



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 49/0017 (2019.08); A61K 47/64 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019120551, 02.07.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.07.2019

Дата регистрации:
04.02.2020

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 02.07.2019

(45) Опубликовано: 04.02.2020 Бюл. № 4

Адрес для переписки:
123298, Москва, ул. Маршала Бирюзова, 8-3-258, Поплевиной Н.В.

(72) Автор(ы):
Мачулкин Алексей Эдуардович (RU),
Успенская Анастасия Алексеевна (RU),
Бер Антон Петрович (RU),
Петров Станислав Александрович (RU),
Ямансаров Эмиль Юлаевич (RU),
Финько Александр Валерьевич (RU),
Красновская Ольга Олеговна (RU),
Нищенко Екатерина Алексеевна (RU),
Зык Николай Юрьевич (RU),
Иваненков Ян Андреевич (RU),
Скворцов Дмитрий Александрович (RU),
Ерофеев Александр Сергеевич (RU),
Горелкин Петр Владимирович (RU),
Белоглазкина Елена Кимовна (RU),
Хазанова Елена Сергеевна (RU),
Мажуга Александр Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Общество с ограниченной ответственностью
"Изварино Фарма" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2009002529 A2, 31.12.2008. RU 2494096 C2, 27.09.2013. WO 2017165473 A1, 28.09.2017. WO 2010045598 A2, 22.04.2010. WO 2009026177 A1, 26.02.2009. WO 2011106639 A1, 01.09.2011. WO 2017044584 A1, 16.03.2017. RU 2670087 C1, 18.10.2018.

(54) **КОНЬЮГАТ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ С ВЕЩЕСТВОМ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ, ВКЛЮЧАЮЩИМ ПСМА-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЛИГАНД НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО МОЧЕВИНЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ПСМА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области органической и медицинской химии, а также молекулярной биологии и касается нового класса соединений для визуализации клеток и тканей, экспрессирующих ПСМА, в том числе таких, как клетки рака предстательной железы. Заявляются новые диагностические конъюгаты для

визуализации патогенных клеток либо тканей, экспрессирующих ПСМА, включающих ПСМА-лиганд с линкером и флуоресцентный краситель, способ его получения и применения. Техническим результатом заявляемой группы изобретений является высокая аффинность и селективность действия заявляемых конъюгатов в отношении

клеток, экспрессирующих ПСМА. Данные соединения позволяют расширить арсенал диагностических средств для визуализации клеток с высокой экспрессией ПСМА. Использование азидпроизводного аминокислоты позволяет получить ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбоксигруппами, что в свою очередь облегчает его модификацию, увеличивает выход и снижает количество используемых в процессе растворителей вследствие значительного увеличения растворимости исходного соединения

(ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбоксигруппами). Ключевой особенностью заявляемого конъюгата является наличие в структуре длинного гидрофобного линкера, а также дополнительных ароматических фрагментов, наличие которых способствует лучшему связыванию заявляемого конъюгата с белковой мишенью, за счет вовлечения дополнительных взаимодействий между соединением и гидрофобными карманами в структуре гидрофобного туннеля белковой мишени. 6 н. и 12 з.п. ф-лы, 29 ил., 8 табл., 3 пр.

R U 2 7 1 3 1 5 1 C 1

R U 2 7 1 3 1 5 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 49/10 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 49/0017 (2019.08); A61K 47/64 (2019.08)(21)(22) Application: **2019120551, 02.07.2019**(24) Effective date for property rights:
02.07.2019Registration date:
04.02.2020

Priority:

(22) Date of filing: **02.07.2019**(45) Date of publication: **04.02.2020** Bull. № 4

Mail address:

**123298, Moskva, ul. Marshala Biryuzova, 8-3-258,
Poplevinoj N.V.**

(72) Inventor(s):

**Machulkin Aleksej Eduardovich (RU),
Uspenskaya Anastasiya Alekseevna (RU),
Ber Anton Petrovich (RU),
Petrov Stanislav Aleksandrovich (RU),
Yamansarov Emil Yulaevich (RU),
Finko Aleksandr Valerevich (RU),
Krasnovskaya Olga Olegovna (RU),
Nimenko Ekaterina Alekseevna (RU),
Zyk Nikolaj Yurevich (RU),
Ivanenkov Yan Andreevich (RU),
Skvortsov Dmitriy Aleksandrovich (RU),
Erofeev Aleksandr Sergeevich (RU),
Gorelkin Petr Vladimirovich (RU),
Beloglazkina Elena Kimovna (RU),
Khazanova Elena Sergeevna (RU),
Mazhuga Aleksandr Georgievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Izvarino Farma" (RU)**

(54) CONJUGATE OF A FLUORESCENT DYE WITH A PEPTIDE SUBSTANCE WHICH CONTAINS A PSMA-BINDING LIGAND BASED ON A UREA DERIVATIVE FOR VISUALIZING CELLS EXPRESSING PSMA, A METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention refers to organic and medical chemistry, as well as molecular biology and concerns a new class of compounds for visualizing cells and tissues expressing PSMA, including such as prostate cancer cells. Novel diagnostic conjugates are used to visualize pathogenic cells or tissues expressing PSMA, including PSMA ligand with a linker and a fluorescent dye, a method for preparing and using it. These compounds enable extending the range of diagnostic agents for imaging cells with high PSMA expression. Using the azido derivative of aminopentanoic acid enables to obtain a PSMA vector with a long hydrophobic linker and protected carboxy groups, which in turn facilitates its modification, increases output and

reduces the amount of solvents used in the process due to considerable increase in solubility of the starting compound (PSMA vector with a long hydrophobic linker and protected carboxy groups). A key feature of the disclosed conjugate is the presence in the structure of a long hydrophobic linker, as well as additional aromatic fragments, presence of which promotes better binding of the disclosed conjugate with a protein target, by involving additional interactions between the compound and hydrophobic pockets in the structure of the hydrophobic tunnel of the protein target.

EFFECT: high affinity and selectivity of action of the disclosed conjugates with respect to cells expressing PSMA.

18 cl, 29 dwg, 8 tbl, 3 ex

Область применения

Изобретение относится к области органической и медицинской химии, онкологии и касается нового класса соединений для визуализации клеток и тканей, экспрессирующих ПСМА, в том числе, таких как клетки рака предстательной железы. Таким образом, изобретение касается маркеров прогностического или клинического значения в диагностике и лечении рака и применения лекарств для лечения рака.

Уровень техники

Рак простаты является наиболее распространенным злокачественным заболеванием у мужчин и занимает второе место среди причин смертности в западном мире. По состоянию на 2018 год общее количество новых случаев выявления раком предстательной железы в мире составило более 1250 тыс. человек, а также зафиксировано более 350 тыс. смертей от данного заболевания. Прирост количества больных по отношению к 2015 году составил 8,0%.

Хирургическое удаление злокачественного новообразования является одним из наиболее обычных и эффективных методов лечения при первичной терапии рака. Резекция всех определяемых злокачественных поражений ведет к отсутствию определяемого рецидива заболевания приблизительно у 50% всех больных раком и может продлить ожидаемую продолжительность жизни или снизить распространенность заболевания у больных с выявленным рецидивом рака. Не удивительно, что хирургические методы достижения удаления клеток более количественно в настоящее время привлекают все большее внимание.

Учитывая важность полного удаления злокачественных поражений, полезно убедиться в том, что злокачественные поражения точно и полностью идентифицированы. Одним из методов идентификация злокачественной ткани в процессе хирургического вмешательства является использование флуоресцентных красителей, которые пассивно проходят из первичной опухоли в дренирующее лимфатические узлы.

Несмотря на понимание важности удаления опухоли и доступность определенных методов идентификации для визуализации опухолевой массы многие злокачественные узлы все еще ускользают от выявления, что ведет к рецидиву заболевания и часто к смерти. Таким образом, существует потребность в улучшенной идентификации опухолей. Существует ряд разработок, направленных на синтез конъюгатов флуоресцентного красителя со специфичным для опухоли направляющим лигандом, который является причиной аккумуляции присоединенного красителя в раковых новообразованиях, которые гиперэкспрессируют рецептор этого лиганда. Примеры направленных на опухоль лигандов, применяемых для этой последней цели, включают фолиевую кислоту, которая специфична для позитивных в отношении рецептора фолиевой кислоты (FR) опухолей яичника, почки, легкого, эндометрия, молочной железы и ободочной кишки, и DUPA, который может доставлять присоединенные флуоресцентные красители селективно к клеткам, экспрессирующим специфичный для простаты мембранный антиген (PSMA), т.е. к раковым клетками простаты и к клеткам, неоваскуляризирующим другие солидные опухоли.

Из уровня техники известны конъюгаты для специфического связывания мембранного антигена простаты (ПСМА, PSMA) с целью доставки терапевтических, диагностических и визуализирующих агентов, включающие лиганд к ПСМА (B), линкер (L) и препарат (D), где линкер ковалентно связан с препаратом и лигандом, и где линкер содержит цепь по меньшей мере из семи атомов (WO 2009026177, 2009-02-26). В качестве лиганда, в частности может выступать DUPA, а препарат представляет собой в одном из вариантов реализации изобретения, визуализирующий агент, выбранный из группы

флуоресцентных красителей (Oregon Greens, AlexaFluor, флуоресцеина, BODIPY флуоресцирующие агенты, родамины, DyLight флуоресцирующие агенты). Раскрыт также синтез данных конъюгатов, заключающийся в получении три-трет-бутилзащищенного производного лиганда DURA. Затем проводят синтез линкера пептидной природы с использованием твердофазного синтеза, где на заключительном этапе в структуру полипептида вводится три-трет-бутилзащищенное производное лиганда DURA, полученное ранее, последующее выделение полипептида в присутствии трифторуксусной кислоты позволяет также удалить трет-бутильные, и/или трет-бутилоксикарбонильной, и/или тритильной защитных групп. В зависимости от структуры используемых пептидов, для получения конъюгатов с флуоресцентными метками были использованы подходы модификации аминокислотной группы с применением изотиоцианатных производных флуоресцентных красителей, либо модификации тиольной-группы с применением реакции Михаэля с использованием малеимидных производных флуоресцентных красителей. В качестве линкера могут выступать длинные гидрофобные полипептидные производные на основе ароматических аминокислот: L-Phe-L-Phe-Glu-1, 2-диаминопропил L-Phe. Недостатком является отсутствие каких-либо заместителей в ближайшем к активному сайту ароматическом фрагменте, наличие которых может существенно сказываться на связывании данных конъюгатов с ПСМА.

Из уровня техники известен конъюгат, содержащий лиганд PSMA (B), линкер (L), и нуклеотид (N), где линкер ковалентно связан с нуклеотидом и лигандом, при этом линкер содержит цепь, по крайней мере, из семи атомов (WO 2010045598, 2010-04-22). Нуклеотид выбран из группы, состоящей из мРНК, микроРНК и метилированную РНК, при этом нуклеотид дополнительно содержит визуализирующий агент, выбранный из группы, состоящей из красителей Oregon Greens, AlexaFluor, флуоресцеины, BODIPY флуоресцирующие агенты, родамины, DyLight флуоресцирующие агенты. Данный конъюгат используется для нацеливания на клетки рака простаты. Синтез проводят аналогично способу, используемому для синтеза конъюгатов по патентному документу WO 2009026177. В зависимости от структуры используемых пептидов, для получения конъюгатов с флуоресцентными метками были использованы способы сочленения лигандов с мРНК, микроРНК и метилированной РНК с флуоресцентной меткой на основе реакций образования 3-тиоксукцинамид-1ил алкильных производных.

Однако недостатком является отсутствие каких-либо заместителей в ближайшем к активному сайту ароматическом фрагменте, наличие которых может существенно сказываться на связывании данных конъюгатов с ПСМА, а также его отсутствие в ряде конъюгатов.

Из уровня техники известен конъюгат, содержащий лиганд PSMA (B), линкер (L), а также препарат (D), в котором лиганд включает одну или более двойных связей углерод-сера, фосфор-сера, одинарную связь фосфор-сера, тиоэфирную связь или их комбинации, и где линкер ковалентно связывается с препаратом, лигандом, и где линкер содержит цепь, по меньшей мере из семи метиленовых звеньев, в частности линкер содержит один или более остатков фенилаланина, каждый из которых независимо может быть замещен (WO 2011106639, 2011-09-01). В качестве препарата может выступать, в частности, визуализирующий агент, выбранный из группы флуоресцентных красителей (Oregon Greens, AlexaFluor, флуоресцеина, BODIPY флуоресцирующие агенты, родамины, DyLight флуоресцирующие агенты). Синтез известных соединений осуществляют аналогичным способом, используемым для синтеза конъюгатов по патентному документу WO 2009026177. В зависимости от структуры используемых пептидов, для получения конъюгатов с флуоресцентными метками были использованы способы сочленения

лигандов на основе реакций образования амидной связи с ϵ -аминогруппой лизина и/или образованием дисульфидного производного, полученное модификацией тиольной группы цистеина, а также образования тиомочевинного фрагмента, по реакции изотиоцианатного производного красителя и аминогруппы линкера, также образование целевых конъюгатов достигалось реакцией Михаэля меркапто-группы линкера с малеимидными производными флуоресцентных красителей. Однако недостатком является отсутствие каких-либо заместителей в ближайшем к активному сайту ароматическом фрагменте для конъюгатов, содержащих три ароматических фрагмента в структуре линкера, наличие которых может существенно сказываться на связывании данных конъюгатов с ПСМА, а также его отсутствие в ряде конъюгатов.

Наиболее близким к заявляемому является соединение общей формулы В-Х-У-З, где соединение (В), способное связываться с простатическим специфическим мембранным антигеном (PSMA), углеводородную цепь или углеводородную цепь с гетероатомами (Х), по меньшей мере одну аминокислоту, или ее производное (У) и инфракрасный краситель (З) (БИК) (WO 2017044584, 2017-03-16). Данные соединения предназначены для диагностики и лечения заболеваний, ассоциированных с клетками и/или сосудистой системой, экспрессирующими ПСМА. Также раскрыты способы и композиции для изготовления и использования соединений, способы введения соединений, а также наборы для введения соединений. Синтез данных соединений проводят аналогично способу, используемому для синтеза конъюгатов по патентному документу WO 2009026177. Для получения конъюгатов с флуоресцентными метками были использованы способы сочленения лигандов с флуоресцентной меткой на основе реакции нуклеофильного замещения в замещенной полиненасыщенной системе флуоресцентного красителя.

Однако, несмотря на разнообразие представленных конъюгатов все они представлены структурами, содержащими два и менее ароматических фрагментов, способствующих гидрофобным взаимодействиям между линкером и структурой гидрофобного туннеля ПСМА. В экспериментах для визуализации опухолей 22Rv1 было использовано 6 нмоль флуоресцентного конъюгата.

Раскрытие изобретения

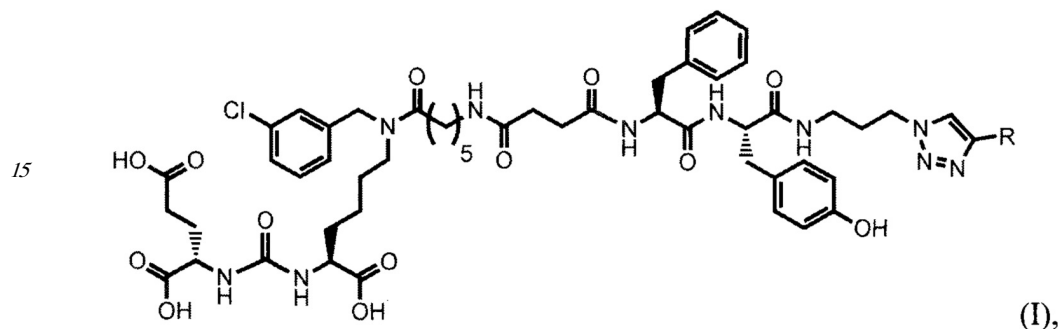
Технической проблемой, на решение которой направлено изобретение является разработка новых диагностических соединений для визуализации патогенных клеток либо тканей, экспрессирующих ПСМА, включающих ПСМА-лиганд с линкером и флуоресцентный краситель, способ его получения и применения.

Техническим результатом заявляемой группы изобретений является высокая аффинность и селективность действия заявляемых конъюгатов в отношении клеток, экспрессирующих ПСМА. Данные конъюгаты позволяют расширить арсенал диагностических средств для визуализации клеток с высокой экспрессией ПСМА, позволяющих добиться селективного связывания с раковыми клетками и достичь высокого соотношения сигнал/шум. Таким образом, для достижения эффективной визуализации опухоли дозировка заявляемых конъюгатов составила 5 нмоль (250 нМ/кг). Использование азидопроизводного аминокислоты при синтезе заявляемых конъюгатов позволяет получить ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбоксигруппами, что в свою очередь облегчает его модификацию и снижает количество используемых в процессе растворителей вследствие значительного увеличения растворимости исходного соединения (ПСМА вектор с длинным гидрофобным линкером и защищенными карбокси-группами).

Ключевой особенностью заявляемого конъюгата является наличие в структуре

длинного гидрофобного линкера, а также дополнительных ароматических фрагментов, наличие которых, способствует лучшему связыванию заявляемого конъюгата с белковой мишенью, за счет вовлечения дополнительных взаимодействий между конъюгатом и гидрофобными карманами в структуре гидрофобного туннеля белковой мишени.

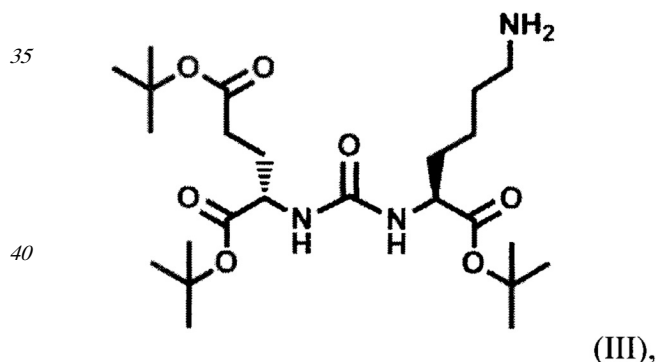
5 Техническая проблема решается соединением для визуализации патогенных клеток либо тканей, экспрессирующих ПСМА, представляющим собой ковалентно-связанные ПСМА-связывающий лиганд на основе производного мочевины структуры DCL и модифицированный гидрофобный пептидный линкер, включающий фрагмент 6-аминогексановой кислоты, связанный с флуоресцентными красителями различной
10 природы (цианиновые красители, производные флуоресцеина и др.) формулы (I):



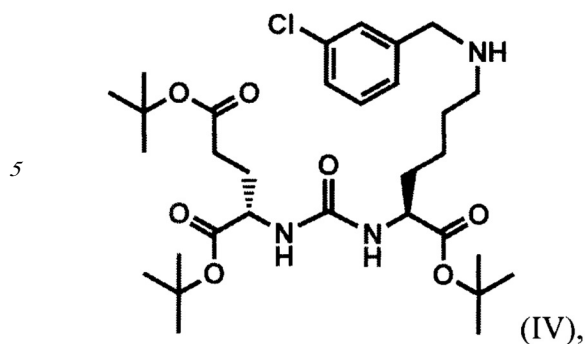
20 где R - флуоресцентный краситель.

Флуоресцентные красители, содержащие алкинильные группы выбирают из флуоресцентных красителей (независимо от их спектральных характеристик), которые могут быть использованы для получения конъюгатов с соединением II, по реакции
25 азид-алкинового циклоприсоединения. Флуоресцентные красители выбирают из структур, содержащих реакционно-способный для их модификации алкиновый структурный фрагмент, например флуоресцеин и родственные аналоги, бор-дипиррометеновые флуоресцентные средства, родаминовые флуоресцентные средства, циановые красители (включающие торговые наименования Oregon Green, AlexaFluor, флуоресцентные средства BODIPY, DyLight).

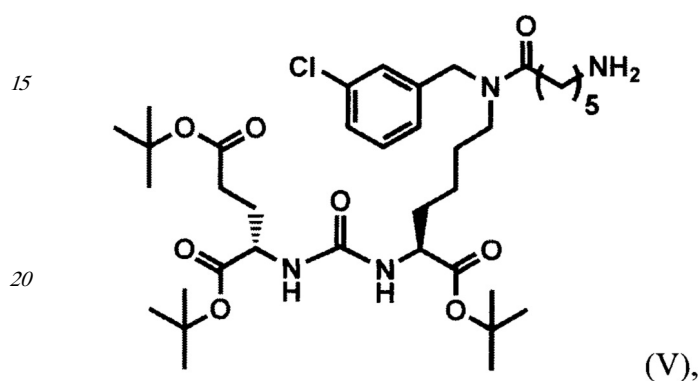
30 Поставленная проблема также решается способом получения соединения для визуализации популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) формулы (I), включающим синтез тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда формулы (III):



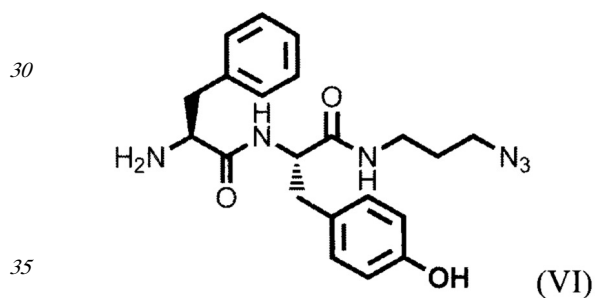
с последующим алкилированием полученного тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда с получением соединения формулы (IV):
45



с последующим получением соединения, содержащего алкилированное тритретбутил производное ПСМА-лиганда и фрагмент линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода формулы (V):

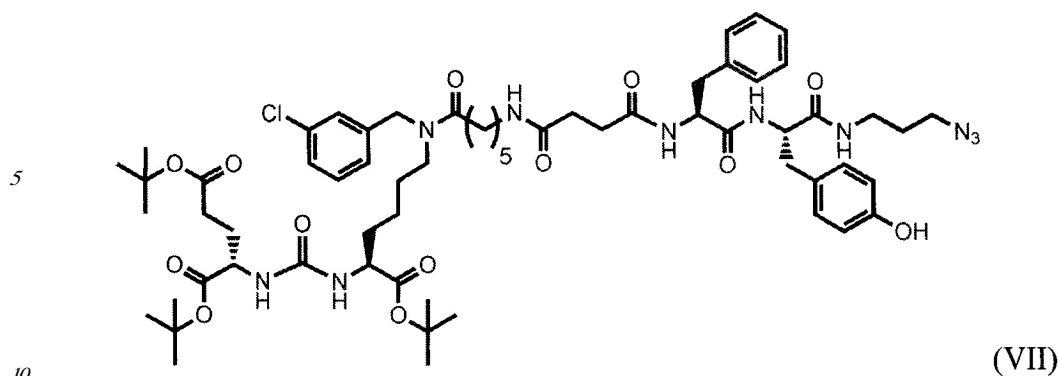


который модифицируют янтарным ангидридом, с получением производного соединения ацилированного янтарным ангидридом, далее осуществляют получение дипептидов производных ароматических аминокислот, представляющих собой L-фенилаланил-L-тирозин формулы (VI), для связывания с модифицированным фрагментом линкера,

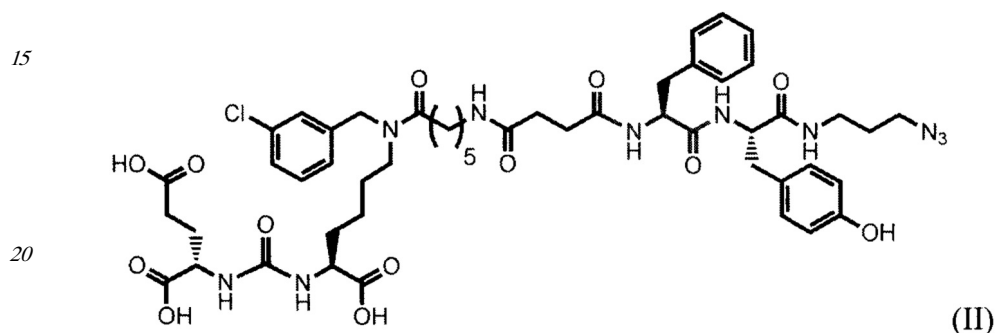


затем получают тритретбутил производное конъюгата радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, включающего фрагменты 6-аминогексановой кислоты, фрагмент L-фенилаланина, фрагмент L-тирозина формулы (VII):

40



с последующим удалением трет-бутильных защитных групп соединения формулы (VII) с получением ковалентно-связанных ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера (II).



Далее проводят реакцию медь (I) катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения соединения (II) с флуоресцентным красителем, содержащим терминальную тройную связь, что приводит к получению целевого соединения (I) (L. Liang, D. Astruc The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview Coordination Chemistry Reviews, 255 (2011) 2933-2945).

При этом получение алкилированного тритретбутил производного ПСМА-лиганда осуществляют путем восстановительного аминирования м-хлорбензальдегидом, получение соединения формулы (IV) проводят путем ацилирования производными 6-азидогексановой кислоты с получением азидного производного алкилированного производного ПСМА-лиганда с последующей реакцией восстановления азидов до аминогруппы. Реакцию восстановления азидов до аминогруппы проводят в присутствии трифенилфосфина и воды в растворе ТГФ, либо в растворе метанола с использованием водорода в присутствии палладия на углеводе в качестве катализатора. Модификацию янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода, осуществляют реакцией ацилирования янтарным ангидридом аминогруппы в присутствии ненуклеофильных оснований, в качестве которых используют диизопропил этил амин или триэтиламин. Получение тритретбутил производного конъюгата формулы (V) осуществляют реакцией ацилирования производным соединения (III), ацилированного янтарным ангидридом, дипептида формулы (IV), а удаление тритретбутильных защитных групп проводят в присутствии 9-11% ТФУ в течение 15-17 часов в дихлорметане. Реакцию медь (I) катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения соединения (II) с флуоресцентным красителем, содержащим терминальную тройную связь проводят, что приводит к получению целевого соединения (I) (L. Liang, D. Astruc The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview Coordination Chemistry Reviews, 255 (2011)2933-2945).

Поставленная проблема также решается композицией для визуализации популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA), включающая конъюгат формулы (I) и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

5 Поставленная проблема также решается способом выявления/определения наличия популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) в биологическом образце ткани, включающим:

- a) обработку образца композицией, включающей конъюгат формулы (I);
- b) инкубирование образца в течение времени необходимого связывания конъюгата по меньшей мере с одной патогенной клеткой;
- 10 c) удаление не связанного конъюгата, и
- d) освещение/облучение биологического образца, где
- e) по наличию флуоресценции делают вывод об обнаружении/ о наличии популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА в биологическом образце.

При этом ткань представляет собой опухоль или лимфатический узел. Образцы, 15 полученные от пациентов, предпочтительно представляют собой образцы биопсии. Биопсия представляет собой диагностический тест, включающий удаление клеток или тканей для исследования. Ткань обычно исследует под оптическим микроскопом патолог. При этом освещение/облучение выполняют с помощью лазера оптического микроскопа при длине волны света в видимой и/или инфракрасной области, 20 составляющей от приблизительно 450 до 900 нм. Используя методики приготовления препарата образца, окрашивания и зондирования, хорошо известные в данной области техники, можно показать структуру клеток и можно обнаружить специфичные белки, связанные с ними, и их локализацию внутри обнаруженного образца.

Поставленная проблема также решается способом интраоперационного выявления/ 25 определения наличия популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) у индивидуума, включающим:

- a) внутривенное введение композиции, включающей конъюгат формулы (I);
- b) освещение/облучение области накопления конъюгата инфракрасным светом;
- c) по наличию флуоресценции при возбуждении инфракрасным светом делают вывод 30 о наличии популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА у индивидуума.

Поставленная проблема также решается способом выполнения у индивидуума хирургической операции, руководствующейся визуализацией, включающим:

- a) введение композиции, включающей соединение формулы (I), в условиях и в течение периода времени, достаточных для взаимодействия соединения с клетками-мишенями;
- 35 b) освещение области накопления соединения для его визуализации с помощью инфракрасного света;
- c) проведение хирургической резекции областей, которые флуоресцируют при возбуждении инфракрасным светом.

При этом освещение (облучение) выполняют с помощью томографической системы, 40 ручной системы оптической визуализации, хирургических очков или интраоперационного микроскопа, при длине волны света в видимой и инфракрасной области, составляющей от приблизительно 450 до 900 нм.

Информацию можно использовать для предсказания того, будет ли солидная опухоль пациента чувствительной к противораковой терапии. Данный аспект изобретения 45 предпочтительно дает возможность стратификации пациентов со злокачественным новообразованием. Это дает возможность идентифицировать оптимальную противораковую терапию или схему лечения для данного индивидуального пациента.

В других аспектах в изобретении предложен способ скрининга противораковых

агентов, включающий стадии:

1. получение тестируемых опухолевых клеток (первая аликвота) и клеток ткани, не затронутых опухолью (вторая аликвота);

2. воздействие агента-кандидата (противораковых агентов) в течение периода
5 времени;

3. измерение степени пролиферации клеток в первой и второй аликвоте, где снижение какой-либо пролиферации клетки(ок) в первой аликвоте относительно клетки(ок) во второй аликвоте идентифицирует сильный или активный противораковый агент и/или повышенная или непрерывная пролиферация клетки(ок) в первой аликвоте относительно
10 клетки(ок) во второй аликвоте идентифицирует слабый или неактивный противораковый агент.

Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется следующими чертежами, где:

На фиг. 1 представлен спектр ЯМР ^1H МА-207257-Sulfo-Cy5 (ось абсцисс - химический
15 сдвиг (м.д.), ось ординат - нормализованная интенсивность).

На фиг. 2 показана ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-Sulfo-Cy5.

На фиг. 3 представлен масс-спектр ESI HRMS соединения МА-207257-Sulfo-Cy5 (ось абсцисс - соотношение масса/заряд (m/z), ось ординат - интенсивность).

На фиг. 4 представлен спектр ЯМР ^1H МА-207257-Sulfo-Cy7 Cy5 (ось абсцисс -
20 химический сдвиг (м.д.), ось ординат - нормализованная интенсивность).



На фиг. 5 показана ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-Sulfo-Cy7.

На фиг. 6 представлен масс-спектр ESI HRMS соединения МА-207257-Sulfo-Cy7 (ось абсцисс - соотношение масса/заряд (m/z), ось ординат - интенсивность).

На фиг. 7 представлен спектр ЯМР ^1H МА-207257-FAM (ось абсцисс - химический
25 сдвиг (м.д.), ось ординат - нормализованная интенсивность).



На фиг. 8 показана ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-FAM.

На фиг. 9 представлен масс-спектр ESI HRMS соединения МА-207257-FAM (ось абсцисс - соотношение масса/заряд (m/z), ось ординат - интенсивность).

На фиг. 10 продемонстрировано накопление конъюгата ПСМА-Cy5 в опухолях
30 22RV1 и РС3, где  - результаты накопления в опухоли РС3,  - в опухоли 22RV1. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo (ось абсцисс - время (ч), ось ординат - суммарная интенсивность, (ф/с)/(мкВ/см²)).



На фиг. 11 показано накопление ПСМА-Cy5 в опухоли 22Rv1 через 24 часа после
35 внутривенного введения. Шкала интенсивности сигнала флуоресценции. Цветовая шкала: Min=5.35×10⁸; Max=1.71×10⁸. Интенсивность сигнала: (фотон/с/см²/ср) / (μВт/см²).



На фиг. 12 продемонстрировано накопление ПСМА-Cy5 в опухоли 22Rv1 через 24
40 часа после внутривенного введения ex vivo. Шкала интенсивности сигнала флуоресценции. Цветовая шкала: Min=8.18×10⁷; Max=1.48×10⁸. Интенсивность сигнала: (фотон/с/см²/ср) / (μВт/см²).



На фиг. 13 продемонстрировано накопление конъюгата ПСМА-Cy7 в опухолях
45 22Rv1 и РС3, где  - результаты накопления в опухоли РС3,  - в опухоли 22RV1. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo



На фиг. 14 продемонстрировано накопление ПСМА-Cy7 в опухоли 22Rv1 через 24 часа после внутривенного введения. Шкала интенсивности сигнала флуоресценции.

Цветовая шкала: $\text{Min}=1.76 \times 10^8$, $\text{Max}=4.55 \times 10^8$. Интенсивность сигнала: (фотон/с/см²/ср) / (μВт/см²)

На фиг. 15 представлено накопление свободного красителя Cy5 в опухолях 22Rv1 и PC3, где  - результаты накопления в опухоли PC3,  - в опухоли 22RV1. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo.



На фиг. 16 показано накопление свободного красителя Cy7 в опухолях 22Rv1 и PC3, где  - результаты накопления в опухоли PC3,  - в опухоли 22RV1. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo.




На фиг. 17 представлено накопление конъюгата ПСМА-Cy5 и свободного красителя Cy5 в опухоли 22RV1, где  - результаты накопления конъюгата ПСМА-Cy5,  - свободного красителя Cy5. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo.

На фиг. 18 показано накопление конъюгата ПСМА-Cy7 и свободного красителя Cy7 в опухоли 22RV1, где  - результаты накопления конъюгата ПСМА-Cy5,  - свободного красителя Cy5. 24 ч_О - уровень накопления, полученный при анализе животных ex vivo.

На фиг. 19-23 приведена общая схема синтеза заявляемого конъюгата.

На фиг. 24 показаны микрофотографии гистологических срезов PC3 (А) и 22Rv1 (В) ксенографтных опухолей, окраска заявляемым соединением с красителем FAM. Увеличение: X100.

На фиг. 25 представлена гистограмма экспрессии сигнала Cy5 клеточными популяциями в линиях 22RV1, LNCaP, PC3 при воздействии конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5, где  обозначены популяция клеток, несущих Cy5 сигнал, и  не несущие Cy5 сигнал.

На фиг. 26 представлено графическое изображение процента клеток, несущих Cy5 флуоресцентный сигнал, где  - результаты в опухоли PC3,  - 22RV1,  - LNCaP (столбец слева). Blocking - результаты эксперимента при предварительной инкубации с избытком лиганда ПСМА-207257 в течении 60 мин, на соответствующих клеточных линиях (столбец справа).

На фиг. 27 приведена схема синтеза конъюгата MA-207257-Sulfo-Cy5

На фиг. 28 приведена схема синтеза конъюгата MA-207257-Sulfo-Cy7

На фиг. 29 приведена схема синтеза конъюгата MA-207257-FAM

Осуществление изобретения

Ниже приведены определения терминов, которые используются в описании настоящего изобретения.

«ПСМА (PSMA)» - трансмембранный гликопротеид II типа с массой ~100 кДа, состоящий из 750 аминокислот. Данный белок состоит из короткого внутриклеточного участка (1-18 аминокислоты), трансмембранного домена (19-43 аминокислоты) и большого внеклеточного домена (44-750 аминокислоты). Данный белок обладает высокой экспрессией в тканях предстательной железы, в связи с этим является перспективной мишенью для адресной доставки.

EDC*HCl - 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид

PFPHOH - пентафторфенол

НОВТ - гидроксibenзотриазол

НВТУ - 3-[Бис(диметиламино)метилиумил]-3Н-бензотриазол-1-оксид гексафторфосфат

EtOAc/MeOH- этилацетат/метанол

DMAP- 4-диметиламинопиридин

DCM - дихлорметан

DIC-диизопропилкарбодиимид

DMF - ДМФА

5 DIPEA - диизопропилэтиламин

TFA - трифторуксусная кислота

ДХМ - дихлорметан

PBS - натрий-фосфатный буфер

FBS - фетальная телячья сыворотка

10 PPh₃ - трифенилфосфин

PuBOP - бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат

THF - тетрагидрофуран

BOC₂O - ди-третбутил дикарбонат

15 Все используемые реагенты являются коммерчески доступными, выпаривание растворителя осуществляли с использованием роторного испарителя, при пониженном давлении при температуре бани примерно 50°C; контроль за ходом реакции осуществляли при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ), и время реакции

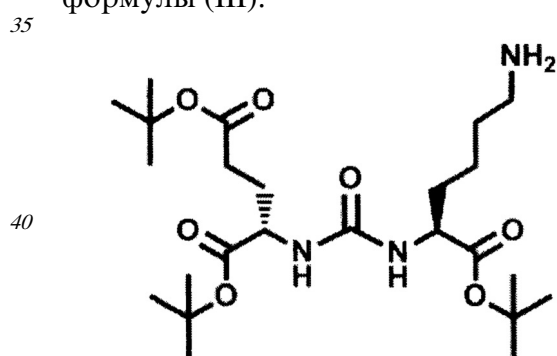
указано только для иллюстрации; структуру и чистоту всех выделенных соединений подтверждали, по меньшей мере, одним из следующих методов: ТСХ (пластины для

20 ТСХ с предварительно нанесенным силикагелем 60 F₂₅₄ Merck), масс-спектрометрии или ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Выход продукта приведен только для иллюстрации. Колоночную флэш-хроматографию осуществляли, используя Merck силикагель 60 (230-400 меш ASTM). Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) положительных ионов зарегистрирован на спектрометре Jeol GCMate II при энергии

25 ионизации 70 eV. Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance-400 (рабочая частота 400.1 и 100.6 МГц для ¹H и ¹³C, соответственно) и Agilent 400-MR (рабочая частота 400.0 и 100.6 МГц для ¹H и ¹³C, соответственно), используя дейтерированный хлороформ (99,8% D) или ДМСО (99,9% D) в качестве растворителя, если не указано

30 иное, относительно тетраметилсилана (TMS) в качестве внутреннего стандарта, миллионных долях (м.д.); обычные используемые сокращения следующие: с - синглет, д - дублет, т - триплет, кв - квартет, м - мультиплет, шир. - широкий и так далее.

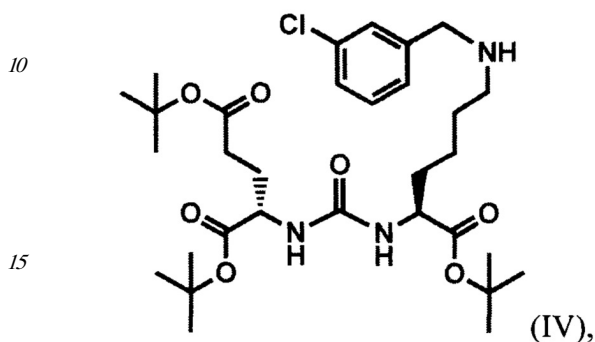
Сначала получают тритретбутиловое производное ПСМА-связывающего лиганда формулы (III):



(III)

45 Соединение формулы (III) может быть получено известным из уровня техники способом (Ryan P. Murelli, Andrew X. Zhang, Julien Michel, William L. Jorgensen, David A. Spiege. Chemical Control Over Immune Recognition: A Class of Antibody-Recruiting Molecules (ARMs) that Target Prostate Cancer. J. AM. CHEM. SOC. 2009, 131, 17090-17092) (Фиг. 19).

Затем полученное тритретбутиловое производное ПСМА-связывающего лиганда алкилируют с получением соединения формулы (IV). Реакцию алкилирования проводят путем восстановительного аминирования с м-хлорбензальдегидом (Jan Tykvart, Jiř í Schimer, Jitka Bařínková, Petr Pachel, Lenka Pořtová-Slavětínská, Pavel Majer, Jan Konvalinka, Pavel řácha. Rational design of urea-based glutamate carboxypeptidase II (GCP II) inhibitors as versatile tools for specific drug targeting and delivery. Bioorg Med Chem. 2014, 22(15):4099-108.)



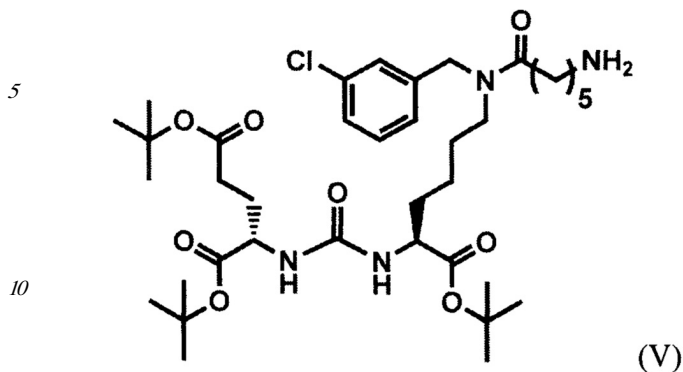
Получение соединения формулы (V) проводят путем ацилирования производными 5-азидогексановой кислоты с получением азидного производного алкилированного производного ПСМА-лиганда (V) с последующей реакцией восстановления азидо до аминогруппы, при этом реакцию восстановления азидо до аминогруппы проводят в присутствии трифенилфосфина и воды в растворе ТГФ или в растворе метанола с использованием водорода в присутствии палладия на углеводе в качестве катализатора.

Реакцию ацилирования проводят в среде полярного апротонного растворителя растворяют исходный амин (IV), азидо-кислоту и ненуклеофильное основание, взятые из расчета, что на 1 мольный эквивалент амина берут по меньшей мере 1 мольный эквивалент азидокислоты и основания, а также не менее 100 мольных эквивалента полярного апротонного растворителя, к полученной смеси при перемешивании добавляют по меньшей мере 1 мольный эквивалент РубОР, полученную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного амина (IV). Далее из полученную реакционной смеси удаляется растворитель при пониженном давлении, и целевой полупродукт выделяется с помощью колоночной хроматографии (Puriflachs SILICA-HP 120G, 50 мкм, градиент от 100% петролейного эфира до 100% EtOAc в течение 30 мин, скорость потока = 50 мл/мин). Верхняя граница используемых реagensов не ограничивается, т.к. избыток какого-либо реагента не уменьшает выходов реакций, однако при большом избытке может понадобиться дополнительная очистка продуктов реакций.

Далее реакцию восстановления азидо-группы до аминогруппы в среде ТГФ/вода с содержанием воды по меньшей мере 10 об. % в которой растворяют полученное азидо-производное и трифенилфосфин, взятые из расчета, что на 1 мольный эквивалент азидо-производного берут по меньшей мере 1,5 мольных эквивалента трифенилфосфина, а также не менее 50 мольных эквивалентов смеси растворителей (ТГФ/вода) из расчета на воду. Реакционную смесь нагревали при температуре не менее 45°C до исчезновения исходного азидо-производного. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Очистку проводили методом колоночной хроматографии (триэтиламин : хлористый метилен : метанол; от 1%:98%:1% до 1%:89%:10%) (Фиг. 20).

Предпочтительно в качестве полярного апротонного растворителя использовать ДМФА или ДМСО.

Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать диизопропилэтиламин или триэтиламин.



Модификация янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода с получением производного соединения (V), ацилированного янтарным ангидридом. При этом модификацию янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 3-5 атомов углерода, осуществляют реакцией ацилирования янтарным ангидридом аминогруппы в присутствии ненуклеофильных оснований. В качестве ненуклеофильных оснований используют диизопропилэтиламин или триэтиламин.

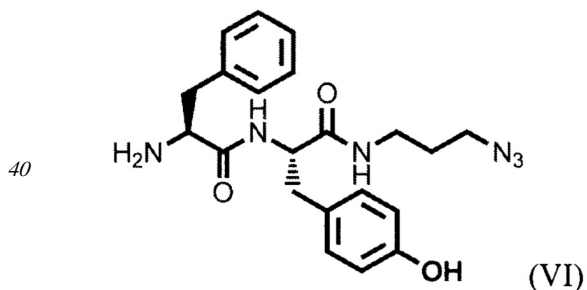
Реакцию ацилирования янтарным ангидридом проводят в среде неполярного апротонного растворителя путем растворения исходного амина (III), янтарного ангидрида и ненуклеофильного основания, взятых из расчета, что на 1 мольный эквивалент амина берут по меньшей мере 1 мольный эквивалент янтарного ангидрида и ненуклеофильного основания, а также не менее 100 мольных эквивалента неполярного апротонного растворителя, полученную смесь перемешивают при комнатной температуре до исчезновения исходного амина (V).

Предпочтительно в качестве неполярного апротонного растворителя использовать дихлорметан или хлороформ.

Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать диизопропилэтиламин или триэтиламин.

Получение дипептидов производных ароматических аминокислот, представляющих собой фенилаланил-тирозин, для связывания с модифицированным фрагментом линкера соединения формулы (V).

Синтез дипептида (VI) проиллюстрирован на схеме, приведенной на фиг. 21.



Синтез ПСМА-векторного фрагмента на основе производного дипептида L-фенилаланил-L-тирозина (L-Phe-L-Tyr, VI) осуществлялся по схеме (с) (Фиг. 21). К суспензии L-фенилаланина в смеси растворителей диоксан - вода с содержанием воды не менее 40 об. %, при температуре не более 5°C добавляли основание в количестве не менее одного мольного эквивалента и ди-трет-бутил дикарбонат BOC_2O в количестве

не менее одного мольного эквивалента. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение не менее 4 суток. Реакционную смесь концентрировали в вакууме роторного испарителя до удаления органического растворителя. Затем в водный остаток добавляли раствор соляной кислоты с концентрацией не менее 1 моль/л, до pH не более 4 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором NaHCO_3 и NaCl , сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Затем повторно переупаривали с дихлорметаном. Продукт реакции получали в виде бесцветного аморфного вещества.

Предпочтительно в качестве основания использовать гидрокарбонат натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия или гидроксид калия.

К раствору соединения Woc-L-Phe в дихлорметане добавляли $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ (не менее 1 экв.), PFPOH (не менее 1 экв.) и перемешивали в течение не менее 12 часов при комнатной температуре. Дальнейшую очистку проводили с помощью колоночной хроматографии на колонке с силикагелем (элюент - дихлорметан). Продукт реакции (желтое маслянистое вещество), растворяли в смеси ТГФ - вода (не менее 30 об. % воды) и добавляли при перемешивании L-тирозин (не менее 1 экв.). К полученному раствору прикапывали раствор ненуклеофильного основания (не менее 1 экв.) и перемешивали в течение не менее 12 часов при комнатной температуре. По окончании реакции реакционную смесь концентрировали в вакууме роторного испарителя до полного удаления органического растворителя. Остаток в колбе подкисляли раствором HCl с концентрацией не менее 1 моль/л до pH не менее 4 и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали насыщенным раствором NaHCO_3 и NaCl , сушили Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Полученный бесцветный аморфный остаток растворяли в минимальном количестве дихлорметана и прикапывали при перемешивании гексан, до прекращения выпадения осадка. Выпавший осадок отфильтровывали и ресуспендировали в гексане в УЗИ-бане, затем заново отфильтровывали.

Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать диизопропилэтиламин или триэтиламин.

На третьем этапе повторно осуществляли процесс активации карбоксильной группы соединения Woc-L-Phe-L-Tyr с последующим взаимодействием с азидопропиламином (не менее 1 экв) в течение не менее 24 часов при комнатной температуре в дихлорметане. По окончании сырую реакционную массу хроматографировали на колонке с силикагелем, в результате получали промежуточный дипептидный амид, который вовлекается в реакцию удаления трет-бутоксикарбонильной защиты действием 10 об. % раствора трифторуксусной кислоты в безводном дихлорметане.

Добавление TFA производили при охлаждении на водяной бане со льдом при температуре не более 10°C с последующим постепенным нагревом реакционной смеси до комнатной температуры. Снятие защиты при комнатной температуре проводить не менее 3 часов.

Таким образом, в результате последовательности реакций по схеме превращения был осуществлен синтез линкера VI, который использован в последующем для получения высокоспецифичных ПСМА-векторов. Разработанные методы синтеза отличаются экологичностью, хорошими выходами целевых продуктов, высокой селективностью процессов и не требуют применения специальной аппаратуры или дорогостоящих реагентов.

Получение тритретбутил производного соединения радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, включающего фрагменты 6-аминогексановой кислоты, фрагмент фенилаланина и фрагмент тирозина

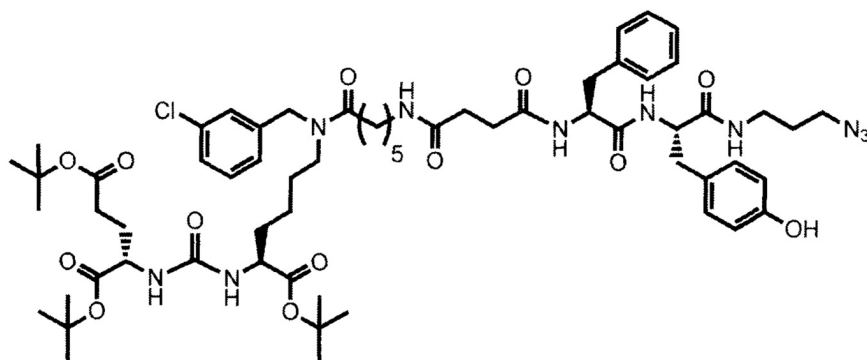
общей формулы (VII), осуществляли реакцией образования амидной связи продукта ацилирования янтарным ангидридом и дипептидом формулы (VI) (Фиг. 22).

К раствору продукта ацилирования янтарным ангидридом в ДМФА добавляли не менее 1 эквивалента дипептида, НОВТ, НВТУ и ненуклеофильного основания. Смесь перемешивали не менее 24 ч. Далее удаляли растворитель при пониженном давлении. Продукт выделяли с помощью метода колоночной хроматографии. Элюент - EtOAc/MeOH=5:1.

Предпочтительно в качестве ненуклеофильного основания использовать диизопропилэтиламин или триэтиламин.

10

15



(VII)

20

Получение соединения радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, общей формулы (II) осуществляли путем удаления тритретбутильных защитных групп соединения формулы (VII). Удаление тритретбутильных защитных групп проводили в присутствии 9-11 об. % ТФУ в течение 15-17 часов в дихлорметане (Фиг. 22).

25

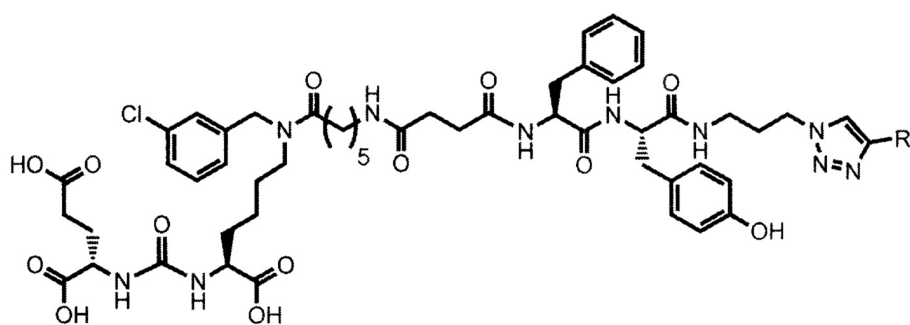
Получение конъюгата формулы (I) осуществляют реакцией азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемой ионами меди (I), получаемой *in situ*. Реакция проводится с использованием 0,1-1 мольных эквивалентов пентагидрата сульфата меди (относительно лиганда II) и 0,3-3 мольных эквивалентов аскорбата натрия в смеси DMF/H₂O (концентрация 4:1) с содержанием воды 10-50 об. %, а также 0,9-1,1 мольных

30

эквивалентов производного флуоресцентного агента, содержащего терминальную алкиновую группу (Фиг. 23).

35

40



(I),

В качестве флуоресцентных красителей, включающих алкиновые фрагменты, для проведения азид-алкинового циклоприсоединения (независимо от их спектральных характеристик) могут быть использованы (без ограничений) красители, выбранные из следующих групп: Oregon Green (например, Oregon Green 488, Oregon Green 514 и т.п.), AlexaFluor (например, AlexaFluor 488, AlexaFluor 647 и т.п.), флуоресцеин и родственные аналоги, флуоресцентные средства BODIPY (например, BODIPY F1, BODIPY 505 и т.п.), родаминовые флуоресцентные средства (тетраметилродамин и т.п.), флуоресцентные средства DyLight (например, DyLight 680, DyLight 800 и т.п.); циановые красители

(например Heptamethine IR-780, Heptamethine IR-808, IRDye® 800CW, DY-675, DY-676, DY-677, DY-678, Cy5, Cy7 и т.п.).

Заявляемые соединения (конъюгаты) можно применять отдельно или в комбинации с другими соединениями, подходящими для диагностики, визуализации и/или лечения заболеваний, вызванных клетками, экспрессирующими ПСМА.

Соединения по настоящему изобретению можно использовать для визуализации практически всех солидных опухолей, экспрессирующих PSMA, включая опухоль легкого, почечно-клеточную, глиобластому, поджелудочной железы, мочевого пузыря, саркому, меланому, молочной железы, толстой кишки, зародышевых клеток, феохромоцитому, пищевода и желудка. Также, в соответствии с настоящим изобретением можно визуализировать некоторые доброкачественные поражения и ткани, включая эндометрии, и хроническую пептическую язву пищевода (синдром Баррета).

ПСМА (PSMA) часто экспрессируется в эндотелиальных клетках капиллярных сосудов в околоопухолевой и внутриопухолевой областях различных злокачественных опухолей, таким образом, соединения по настоящему изобретению и способы визуализации с использованием таких соединений являются подходящими для визуализации таких злокачественных опухолей.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксическому материалу, который не взаимодействует с действием активного компонента фармацевтической композиции. "Фармацевтически приемлемый носитель" относится к биосовместимому раствору, который в достаточной степени имеет такие характеристики, как стерильность, р[Eta], изотоничность, стабильность и подобные, и может включать любые растворители, разбавители, включая стерильный физиологический раствор, раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор декстрозы для инъекций, раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций, содержащий лактат раствор Рингера для инъекций и другие водные буферные растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические вещества и подобные. Фармацевтически приемлемый носитель также может содержать стабилизаторы, консерванты, антиоксиданты или другие добавки, которые хорошо известны специалистам в данной области, или другой наполнитель, известный из уровня техники.

"Фармацевтически приемлемые соли" относятся к производным раскрываемых соединений, где исходное соединение модифицируют так, чтобы получить нетоксичные кислотные или основные соли такого соединения. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются этим, соли минеральных или органических кислот, образованные из основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты; и подобные. Фармацевтически приемлемые соли включают традиционные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Например, традиционные нетоксичные соли кислот включают соли, образованные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и подобные; и соли, полученные из органических кислот, например, уксусной, пропионовой, янтарной, гликолевой, стеариновой, молочной, яблочной, винной, лимонной, аскорбиновой, палмовой, малеиновой, оксималеиновой, фенилуксусной, глутаминовой, бензойной, салициловой, метансульфоновой, сульфаниловой, 2-ацетоксибензойной, fumarовой, толуолсульфоновой, метансульфоновой, этандисульфоновой, щавелевой, изотионовой, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n имеет значение 0-4, и подобных. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему

изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, традиционными химическими способами. Как правило, такие соли можно получить путем взаимодействия формы свободной кислоты этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат Na, Ca, Mg или K или подобные) или путем взаимодействия формы свободного основания этих соединений со стехиометрическим количеством подходящей кислоты. Такие реакции типично осуществляют в воде или в органическом растворителе, или в смеси двух вышеуказанных растворителей. Как правило, используют неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, где это практически возможно. Перечень дополнительных подходящих солей можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985).

Определение наличия популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) (оптическая визуализация биологической ткани), осуществляют путем внутривенного введения индивидууму композиции, включающей соединение формулы (I), предварительно за время необходимое для распределения в ткани заявляемого конъюгата и его взаимодействия с ПСМА, с последующим облучением *in vivo* части тела индивидуума, содержащего пораженную ткань, светом, имеющим по меньшей мере одну длину волны возбуждающего света в интервале от приблизительно 450 до приблизительно 900 нм, для наблюдения флуоресценции, исходящей от специфически связанного и/или захваченного пораженной тканью конъюгата, и область в которой по наличию флуоресценции детектируется связанное соединение указывает на наличие популяции патогенных клеток в исследуемой области. Популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА представляют собой клетки опухоли предстательной железы, метастазированные клетки опухоли предстательной железы или клетки лимфатического узла, в которой присутствуют опухолевые клетки (метастазы).

Время, проходящее с момента введения конъюгата по изобретению испытуемому, до начала оценки с помощью способа флуоресцентной визуализации по настоящему изобретению варьируется в зависимости от типа флуоресцентного контрастного агента для ближней инфракрасной области спектра. Введение индивидууму композиции, включающей конъюгат (соединение) формулы (I) предпочтительно проводить заблаговременно - от 4 до 72 часов до оперативного вмешательства. Временной диапазон устанавливается исходя из того, чтобы обеспечить достаточное накопление флуоресцентного агента в опухоли для возможности ее визуализации в процессе операции.

Заявляемые диагностический способ или способ визуализации позволяют хирургу или практикующему врачу одновременно видеть, наблюдать, визуализировать пораженные или аномальные ткани для облегчения процедуры биопсии или хирургического иссечения.

Определение (выявление) наличия популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА возможно также проводить и в удаленных тканях, органах путем размещения образца ткани в композиции, содержащей соединение формулы (I), инкубирование образца в течение времени необходимого для распределения в ткани заявляемого конъюгата и его взаимодействия с ПСМА, с последующим промыванием образца раствором для удаления не связанного конъюгата и облучением образца светом, возбуждающим используемый флуоресцентный краситель. Область, в которой наблюдается флуоресценция является областью, содержащей патогенные клетки, экспрессирующие ПСМА. Инкубацию образца для определения наличия популяций

патогенных клеток проводят в течение 1-12 часов, в зависимости от размеров образца исследуемой ткани/органа, типа флуоресцентного красителя. Оптимальное время инкубации может быть определено в сравнении со стандартным иммуногистохимическим окрашиванием с применением антител, содержащих флуоресцентную метку

5 соответствующего диапазона флуоресценции. Инкубация с применением флуоресцентных конъюгатов осуществляется до получения сигнала флуоресценции, сопоставимого с аналогичным сигналом при использовании антител.

В качестве источника света для возбуждения можно использовать любое оборудование, обеспечивающее наличие источника излучения с длиной волны,

10 соответствующей длине волны возбуждения флуоресценции для используемого типа красителей.

Ниже представлено более подробное описание заявляемого изобретения. Настоящее изобретение может подвергаться различным изменениям и модификациям, понятным специалисту на основе прочтения данного описания. Такие изменения не ограничивают

15 объем притязаний.

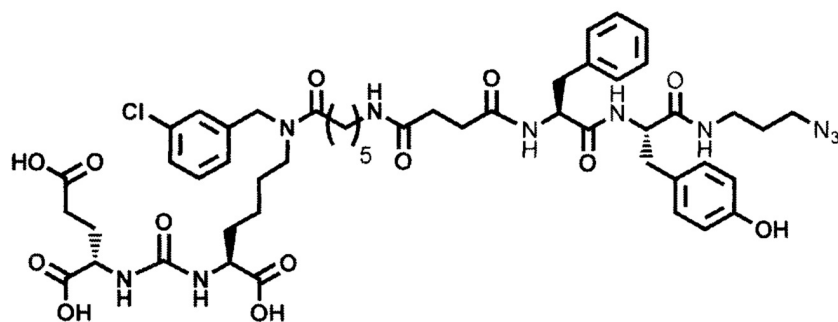
Пример 1.

Синтез 1-(6-(-(((1-(3S,7S,25S,28S)-25-бензил-1,3,7-трикарбокситриаконтан-33-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)-6-оксогексил)-3,3-диметил-2-((1E,3E,5E)-5-

20 (1,3,3-триметил-5-сульфонатиндолин-2-илиден)пента-1,3-диен-1-ил)-3H-индол-1-иум-5-сульфонат (конъюгат ПСМА-диаг МА-207257-Sulfo-Cy5) (Фиг. 27)

Предварительно синтезировали (3S,7S,2S,28S)-три-трет-бутил-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатриаконтанат-1,3,7-трикарбоксилата.

25



(II)

Соединение V (160 мг; 0.28 ммоль) растворили в 10 мл DCM и систему продули аргоном. Добавили янтарный ангидрид (37 мг; 0.376), после этого DIPEA (54 мкл, 0.315 ммоль). Оставили при перемешивании на сутки. После добавили 1 мл метанола и оставили при перемешивании на 1,5 часа. Полученную реакционную смесь упарили. Сухой остаток растворили в 2 мл DCM, добавили DIPEA (36 мкл 0.210 ммоль). Систему продули аргоном. Добавили НОВТ (24 мг, 0.158 ммоль), НВТУ (59 мг 0.158 ммоль) и оставили перемешиваться на 30 минут. Далее добавили растворенное в 500 мкл DMF

40 соединение VI (83 мг, 0.158 ммоль). Реакционную смесь оставили перемешиваться на ночь. Растворитель упарили при пониженном давлении. Очистку проводили методом колоночной хроматографии (этилацетат/гексан от 5% до 100% этилацетата; метанол: этилацетат; от 0% до 100%).

Таким образом, соединение VII было выделено в виде желтоватого маслянистого вещества, выход составил 109 мг. (32%)

45

В круглодонную трехгорлую колбу (29/32, ChemGlass) с магнитным мешальником помещали 8 мг (7.63 мкмоль) полученного соединения для растворения приливали 3

мл ДМФА и 3 мл деионизированной воды. Затем на колбу надевали переходник для ввода аргона (29/32, ChemGlass) и заполняли колбу аргоном. Далее добавили 6 мг Sulfo-Cy5 алкин (7.63 мкмоль), 1.8 мг аскорбата натрия (9.16 мкмоль) и 1.9 мг пентагидрат сульфата меди (7.63 мкмоль). Полученную смесь перемешивали 24 часа с помощью магнитного мешалки (тефлоновый, С). После окончания реакции к реакционной смеси добавляли 4,4 мг этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТУ) (15,26 мкмоль), для комплексообразования ионов меди, после чего упаривали растворитель при пониженном давлении (на роторном испарителе). Далее проводили очистку методом обращенной фазовой хроматографии: Puriflash 15C18HP-F0012, система деионизированная вода/ацетонитрил, от 5% ацетонитрила до 100% ацетонитрила в течение 25 минут, далее 5 минут промывка метанолом, скорость потока - 20 мл/мин. Полученный продукт анализировали методами спектроскопии ЯМР, ВЭЖХ-МС и масс-спектрометрии.

Спектр ЯМР ^1H МА-207257-Sulfo-Cy5 (400 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д.) представлен на фиг. 1.

12.44 (уш с., 2H, COOH), 9.16 (с, 1H, NH), 8.21-8.49 (м, 3H, CH (Ar)), 8.05-8.21 (м, 1H, CH (Ar)), 7.85-8.05 (м, 3H, NH+CH (Ar)), 7.55-7.72 (м, 2H, NH+CH (Ar)), 6.89-7.48 (м, 12H, NH+CH (Ar)), 6.45-6.89 (м, 3H, NH+CH (Ar)), 6.08-6.45 (м, 3H, NH+CH (Ar)), 3.71-4.67 (м, 1H, CH+CH₂), 3.48-3.71 (м, 2H, CH+CH₂), 3.24-3.49 (м, 4H, CH+CH₂), 3.10-3.24 (м, 2H, CH+CH₂), 2.82-3.09 (м, 7H, CH+CH₂), 2.52-2.82 (м, 5H, CH+CH₂), 2.12-2.41 (м, 7H, CH+CH₂), 1.78-1.98 (м, 3H, CH+CH₂), 1.58-1.78 (м, 1H, CH+CH₂), 0.75-1.58 (м, 17H, CH+CH₂+CH₃).

ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-Sulfo-Cy5 (фиг. 2)

ESI -HRMS соединения МА-207257-Sulfo-Cy5 (фиг. 3)

m/z рассчитано для $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ 862.8320; найдено: 862.8331

Пример 2.

Синтез 1-(6-(1-(((1-(3S,7S,25S,28S)-25-бензил-1,3,7-трикарбоксив-12-(4-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-33-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)-6-оксогексил)-3,3-диметил-2-((E)-2-((E)-3-((E)-2-(1,3,3-триметил-5-сульфонатиндолин-2-илиден)этилдиен)циклогекс-1-ен-1-ил)-3H-индол-1-иум-5-сульфоната калия (конъюгат ПСМА-диаг МА-207257-Sulfo-Cy7) (Фиг. 28)

В круглодонную трехгорлую колбу (29/32, ChemGlass) с магнитным мешалкой помещали 8 мг (3S,7S,25S,28S)-три-трет-бутил-33-азидо-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриаконтан-1,3,7-трикарбоксиват (7.63 мкмоль), для растворения приливали 3 мл ДМФА и 3 мл воды. Переходник для ввода аргона (29/32, ChemGlass). Колбу заполнить аргоном. Далее добавили 6 мг Sulfo-Cy5 алкин (7.63 мкмоль; Lumiprobe), 1.8 мг аскорбата натрия (9.16 мкмоль; SigmaAldrich) и 1.9 мг пентагидрат сульфата меди (7.63 мкмоль; SigmaAldrich). Полученную смесь перемешивали 24 часа. Далее упаривали растворитель и проводили очистку методом обращенной фазовой хроматографии: Puriflash 15C18HP-F0012, система деионизированная вода/ацетонитрил (чда, Реахим), от 5% ацетонитрила до 100% ацетонитрила в течение 25 минут, далее 5 минут промывка метанолом, скорость потока - 20 мл/мин. Полученный продукт анализировали методами спектроскопии ЯМР, ВЭЖХ-МС и масс-спектрометрии.

Спектр ЯМР ^1H МА-207257-Sulfo-Cy7 (400 МГц, DMSO-d₆, δ , м.д.) представлен на

фиг. 4.

8.21-8.26 (m, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, NH), 7.74 (s, 2H, NH+CH(Ph)), 7.67-7.70 (m, 2H, CH(Ph)) 7.61-7.63 (m, 2H, CH(Ph)), 7.15-7.29 (m, 7H, CH(Ph)), 6.99 (m, 1H, CH(Ph)), 6.61 (m, 1H, NH), 6.12-6.15 (m, 1H, NH), 4.24-4.34 (m, 4H, CH), 4.01-4.09 (m, 2H, CH₂(Bz)), 3.79 (m, 1H, CH₂), 3.65 (m, 1H, CH₂), 3.60 (m, 3H, CH₂), 2.88-3.06 (m, 6H, CH₂), 2.66 (m, 2H, CH₂), 2.32 (m, 1H, CH₂), 2.17 (m, 2H, CH₂), 1.81-1.91 (m, 4H, CH₂), 1.64 (m, 15H, CH₂), 1.54 (m, 5H, CH₂), 1.33 (m, 5H, CH₂), 1.22 (m, 2H, CH₂), 1.14-1.18 (m, 1H, CH₂), 1.02-1.10 (m, 1H, CH₂).

ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-Sulfo-Cy7 (фиг. 5)
ESI HRMS соединения МА-207257-Sulfo-Cy7 (фиг. 6)

m/z рассчитано для [M-2H]²⁻ 895.8555; найдено: 895.8561

Пример 3.

(3R,7S,25S,28R)-25-бензил-12-(3-хлорбензил)-33-(4-((3',6'-дигидрокси-3-оксо-3H-спиро [изобензофуран-1,9'-ксантен]-4-илкарбоксамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-28-(4-гидроксибензил)-5,13,20,23,26,29-гексаоксо-4,6,12,19,24,27,30-гептаазатритриконтан-1,3,7-трикарбоксовая кислота (конъюгат ПСМА-ДИАГ МА-207257-FAM) (Фиг. 29)

В круглодонную трехгорлую колбу (29/32, ChemGlass) с магнитным мешальником помещали 270 мг (244 мкмоль) полученного соединения для растворения приливали 18 мл ДМФА и 6 мл деионизированной воды. Затем на колбу надевали переходник для ввода аргона (29/32, ChemGlass) и заполняли колбу аргоном. Далее добавили 117 мг FAM-5 алкин (269 мкмоль), 21 мг аскорбата натрия (108 мкмоль) и 27 мг пентагидрат сульфата меди (108 мкмоль). Полученную смесь перемешивали 24 часа с помощью магнитного мешальника (тефлоновый, С). После окончания реакции к реакционной смеси добавляли 63 мг этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ) (216 мкмоль), для комплексообразования ионов меди, после чего упаривали растворитель при пониженном давлении (на ротормном испарителе). Далее проводили очистку методом обращенной фазовой хроматографии: Puriflash 15C18HP-F0012, система деионизированная вода/ацетонитрил, от 5% ацетонитрила до 100% ацетонитрила в течение 25 минут, далее 5 минут промывка метанолом, скорость потока - 20 мл/мин. Полученный продукт анализировали методами спектроскопии ЯМР, ВЭЖХ-МС и масс-спектрометрии.

Спектр ЯМР ¹H МА-207257-FAM (400 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д.) представлен на фиг. 7.

12.44 (уш.с, 3H, COOH), 10.17 (уш. с, 1H, COH), 9.38 (с, 1H, C(O)NH), 8.48 (с, 1H, C(O)NH), 8.30-8.24 (m, 2H, C(O)NH) 8.10-8.02 (m, 3H, C(O)NH), 7.77-7.65 (m, 2H, C(O)NH+ArH), 7.65-7.64 (m, 2H, C(O)NH+ArH), 7.35-7.30 (m, 5H, C(O)NH+ArH), 7.18-7.15 (m, 3H, C(O)NH+ArH), 4.67-4.54 (m, 5H, C(O)NH+ArH), 4.31-4.29 (m, 2H, NH(urea)), 4.55-4.45 (m, 4H, PhCH₂NC(O)), 4.28 (с, 3H, PhCH₂NC(O)), 4.07-4.05 (m, 3H, CH, CH), 3.17-3.16 (m, 3H, CH₂), 3.00-2.98 (m, 6H, CH₂), 2.70-2.65 (m, 3H, CH₂), 2.23-2.19 (m, 8H, CH₂), 1.91-1.88 (m, 3H, CH₂), 1.49-1.10 (m, 11H, CH₂).

ВЭЖХ-хроматограмма соединения МА-207257-FAM (фиг. 8).

ESI -HRMS для C₇₄H₈₀ClN₁₁O₁₉ соединения МА-207257-FAM (фиг. 9).

m/z рассчитано для [M-2H]²⁻ 729.7576; найдено: 729.7586

Полученные конъюгаты были исследованы для оценки эффективности визуализации опухолей простаты с использованием флуоресцентных конъюгатов ПСМА-Диаг-Су5 и ПСМА-Диаг-Су7.

В работе были использованы клеточные линии PC-3 и 22Rv1. PC-3 является наиболее

распространенной моделью андроген независимого рака предстательной железы. Поскольку данная линия отличается высокой злокачественностью и нечувствительностью к андрогенам, РС-3 представляет собой отличную экспериментальную модель для изучения новых методов терапии рака предстательной железы человека.

Новая клеточная линия рака простаты, 22Rv1, была получена из ксенографтной линии CWR22R. 22Rv1 экспрессирует ПСА и чувствительна к дигидротестостерону, соответственно, данная клеточная линия является андроген зависимой в отличие от РС-3.

Исследование эффективности визуализации опухолей РС3 и 22Rv1.

Эксперименты проводили на животных. Предварительно готовили концентрат конъюгата в диметилсульфоксиде, для этого полученные конъюгат ПСМА-диаг МА-207257-Sulfo-Cy5, МА-207257-FAM или ПСМА-диаг МА-207257-Sulfo-Cy7 растворяли до концентрации 10 мкМ/мл в диметилсульфоксиде. Концентрат можно хранить при температуре от -20°C до +4°C не более 14 сут. Перед проведением эксперимента готовили раствор путем разведения концентрата физраствором до содержания конъюгата в 50 нМ/мл раствора. Животным вводили раствор в дозировке 250 нМ/кг (0,448 mg/kg) в объеме 100 мкл в хвостовую вену, после чего проводили исследование на системе для оптической визуализации IVIS Spectrum-CT с фильтрами возбуждения/испускания:

1) Для красителя Cy5: 605/660; 605/680; 605/700; 640/680; 640/700; 640/720; 640/740; 675/720; 675/740; 675/760; 675,780.

2) Для красителя Cy7: 675/720; 675/740; 675/760; 675/780; 675/800; 710/760; 710/780; 710/800; 710/820; 710/840; 745/800; 745/820; 745/840;

Исследование проводили в следующие временные промежутки после введения препарата: 30 минут и 1, 8, 24 часа.

Спустя 24 часа животных выводили из эксперимента путем передозировки наркозом, проводили иссечение брюшины и исследование на системе IVIS Spectrum CT с фильтрами возбуждения/испускания:

1) Для красителя Cy5: 605/660; 605/680; 605/700; 640/680; 640/700; 640/720; 640/740; 675/720; 675/740; 675/760; 675,780;

2) Для красителя Cy7: 675/720; 675/740; 675/760; 675/780; 675/800; 710/760; 710/780; 710/800; 710/820; 710/840; 745/800; 745/820; 745/840.

Полученные изображения были обработаны в программе Living Image 4.5 с целью спектрального разделения каналов специфической и автофлуоресценции.

Полученные на мышях экспериментальные результаты могут быть экстраполированы на дальнейшее использование заявляемых конъюгатов для человека (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть 1. - М., 2012).

Динамика накопления ПСМА.

Поскольку основной мишенью конъюгата являются ткани, активно экспрессирующие рецептор к ПСМА, в качестве такой опухоли была выбрана опухолевая модель 22RV1. Однако известно, что опухолевые ткани способны и к неспецифическому накоплению ксенобиотиков, поэтому исследование на животных, несущих только опухоль 22RV1, не могло бы дать однозначного ответа о специфичности и уровне накопления. Для ответа на данный вопрос было решено проводить эксперименты на животных, которым были имплантированы как ПСМА положительная опухоль 22RV1, так и ПСМА отрицательная опухоль РС3. Результаты количественного анализа накопления конъюгата ПСМА-Cy5 в опухолях 22RV1 и РС3 представлены ниже (На фиг. 10).

Анализ полученных данных показывает, что в первый час нет достоверных отличий в накоплении препарата между ПСМА-положительной и ПСМА-отрицательной опухольями. При этом наиболее интенсивный сигнал наблюдается через 30 минут после введения, и постепенно его уровень снижается. Наиболее достоверные отличия наблюдаются спустя 24 часа. Такая картина объясняется, вероятно, тем, что после введения большая часть конъюгата находится в кровотоке, в том числе в капиллярах кожи и внутренних органов, что обеспечивает высокий общий уровень сигнала. С течением времени, концентрация конъюгата в крови падает в связи с его выведением из организма, предположительно, почками с мочой. Через 24 часа практически весь неспецифически связанный конъюгат удаляется из организма, и накопление наблюдается только в органах, где экспрессируются рецепторы, обеспечивающие его захват, в частности, в опухоли 22RV1. Данные, полученные на живых животных, показывают, что в опухоли 22RV1 наблюдается двукратное увеличение интенсивности сигнала (фиг. 11).

Отдельно стоит отметить, что кожа и ткани активно поглощают свет, что приводит к ослаблению сигнала, поэтому было решено провести снимки каждого животного отдельно, проведя вскрытие и освободив опухоль от окружающей кожи и тканей. Данные условия более приближены к условиям интраоперационной диагностики при полостной или лапароскопической операции, так как между источником/приемником света не находятся дополнительные слои ткани. Анализ накопления конъюгата в опухолях, проведенный таким образом, показал еще более значимые различия между ПСМА-отрицательной и ПСМА-положительной опухольями (фиг. 12).

Анализ накопления в опухолях *ex vivo* показал, что в опухоли типа 22RV1 накапливается в среднем в 14 ± 2 раза больше конъюгата, чем в опухоли типа РС3.

Динамика накопления ПСМА-Су7 в опухолях.

Результаты, полученные для конъюгата ПСМА-Су7, в целом, повторяют результаты, полученные для ПСМА-Су5. Как и в предыдущем случае, в промежутке 0-8 ч после внутривенного введения большая часть конъюгата находится в кровеносном русле, а достоверная разница в накоплении может быть обнаружена только спустя 24 ч (фиг. 13).

Несмотря на то, что *in vivo* значения сигнала между опухолями РС3 и 22RV1 отличались также в 2 раза, в целом, уровень сигнала от опухолей был более различим на фоне других тканей (фиг. 14). Это объясняется более низким уровнем собственной флуоресценции тканей в ближнем ИК диапазоне спектра, где наблюдается флуоресценция красителя Су7.

Исследование накопления *ex vivo* также показало увеличение специфичности накопления, а интенсивность сигнала в опухоли 22RV1 была в 5 раз больше, чем в опухоли РС3. В целом, для обоих конъюгатов уровень сигнала через 24 часа после введения был сравним и составил $1.5 \cdot 10^9$ и $1.9 \cdot 10^9$ (ф/с)/(мкВ/см²) для ПСМА-Су5 и ПСМА-Су7, соответственно.

Динамика накопления свободных красителей Су5 и Су7 в опухолях

Поскольку показанная ранее разница в накоплении конъюгата может быть объяснена всего лишь химической природой самих красителей Су5 и Су7, было также проведено исследование распределения этих красителей без конъюгации с ПСМА. Для обоих красителей было показано существенно более быстрое снижение сигнала в опухолях со временем, что может быть объяснено отличиями в фармакокинетике и более быстрым выведением. Также, спустя 24 ч ни *in vivo* ни *ex vivo* не было обнаружено сколько-нибудь значимой разницы в накоплении между ПСМА-положительной 22RV1 и ПСМА-

отрицательной РСЗ (фиг. 15, фиг. 16).

Сравнительный анализ уровня накопления заявляемых соединений (конъюгатов) и свободных красителей в ПСМА-положительных опухолях также показал, что конъюгаты существенно лучше накапливаются по сравнению со свободными красителями (фиг. 17, фиг. 18). При этом соотношение интенсивностей конъюгат/свободный краситель для ПСМА-Су5 и Су5 составило 8:1, а для ПСМА-Су7 и Су7 - 150:1.

Таким образом, на модели опухолей РСЗ и 22RV1 было показано специфическое накопление флуоресцентных конъюгатов ПСМА-Су5 и ПСМА-Су7, при этом соотношение интенсивности в опухолях 22RV1 и РСЗ спустя 24 ч после внутривенного введения конъюгатов составило $(14 \pm 2):1$ и $(5 \pm 1):1$ для ПСМА-Су5 и ПСМА-Су7, соответственно, а соотношение интенсивности сигнала конъюгат/свободный краситель составило 8:1 и 150:1 для ПСМА-Су5 и ПСМА-Су7, соответственно. Что свидетельствует о селективности накопления синтезированных конъюгатов в тканях и опухолях, имеющих экспрессию ПСМА. А также о специфичности накопления, которая обусловлена именно наличием ПСМА лиганда в структуре флуоресцентного конъюгата.

Проведена оценка способности заявляемых соединений (конъюгатов) визуализировать в гистологических срезах клетки в зависимости от ПСМА представленности на их поверхности. Визуализацию осуществляли с использованием оптического метода (флуоресцентная микроскопия). Были использованы: 1) гистологические срезы подкожных РСЗ и 22Rv1 ксенографтных опухолей (ксенографтная модель рака предстательной железы в мышши). Клеточные линии 22Rv1, РСЗ обладают разным уровнем экспрессии ПСМА на поверхности клеток. В соответствии с литературными данными 22Rv1 является ПСМА-положительной клеточной линией, РСЗ клеточная линия не несет ПСМА, является ПСМА негативной. 2) гистологические срезы ацинарной аденокарциномы предстательной железы человека (глисон 3-5), гистологические срезы были получены на базе Московской городской онкологической больницы №62.

Материально-техническое обеспечение: Высокоскоростной гистологический процессор Leica Peloris II Tissue Tek Prisma, Sakura Инвертированный микроскоп Nikon Ti-U Общелабораторное оборудование (Термостаты водный и воздушный, пипетаторы, аспираторы, вортекс и др.). Были использованы следующие реактивы: забуференный формалин 10%, Ксилол, Dapi (Dako), Этанол 95%.

Для получения гистологических срезов проводили фиксирование биологического материала (РСЗ и 22Rv1 ксенографтные опухоли) в 10% забуференном формалине. Проводку ткани осуществляли с использованием высокоскоростного гистологического процессора Leica Peloris II следующим образом:

- заливали парафином (температура плавления 56-58°C);
- осуществляли микротомию и сушку срезов в вертикальном положении в термостате 30 мин;
- для каждой ксенографтной опухоли один из приготовленных срезов окрашивали гематоксилин-эозином с последующим заключением под пленку.

Гистологические срезы подкожных РСЗ и 22Rv1 ксенографтных опухолей и гистологические срезы ацинарной аденокарциномы предстательной железы человека обрабатывали заявляемым соединением (конъюгатом). Конъюгат наносили по 100 мкл на срез (в концентрации 30 мкМ в буферном растворе для разведения) и инкубировали в течение 1 часа во влажной камере при комнатной температуре. В качестве положительного контроля выявления ПСМА экспрессии использовали коммерческие антитела на ПСМА PSMA Monoclonal Antibody (1H8H5) в соответствии с рекомендациями

производителя. Визуализацию первичных антител на ПСМА проводили коммерческой системой Bond Polymer Refine Detection kit (Leica Biosystems). Кроме иммуногистохимического исследования на ПСМА для каждого образца проводили стандартную окраску гематоксилин-эозином с использованием мультитейнера Tissue-Tek Prisma. Депарафинизацию и окрашивание срезов проводили следующим образом. Первоначально проводили обработку ксилолом 3×10 мин, затем спиртом 95% 3×5 мин, споласкивали в dH₂O, затем проводили обработку отмывочным буфером (Wash Buffer) - 2×3 мин, а затем Pretreatment solution (DAKO) при 98°C 15 мин на водяной бане. Доставали сосуд Коплина, остужали при комнатной температуре - 15 мин, обрабатывали отмывочным буфером (Wash Buffer) - 2×3 мин, удаляли буфер со стекла и тщательно вытирали остатки буфера вокруг среза фильтровальной бумагой. Затем на срез наносили 3-5 капель холодного Пепсина (DAKO) - 15 мин, обрабатывали отмывочным буфером (Wash Buffer) - 2×3 мин, затем наносили заявляемое соединение (в концентрации 30 мкМ в буфере для разведения) 100 мкл. на срез, инкубировали 1 ч во влажной камере при комнатной температуре, проводили обработку отмывочным буфером (Wash Buffer) - 2×3 мин при комнатной температуре в темном месте, а затем спиртом 95% 3×2 мин. Срезы высушивали на воздухе (в темном месте) в течение 20 мин. Наносили DAPI (Dako) 5-7 мкл. на срез и быстро покрывали покровным стеклом 24×24 мм. Выдержали в темном месте не менее 15 мин перед началом визуализации. Визуализацию проводили с использованием микроскопа.

При проведении визуализации гистологических срезов PC3 и 22Rv1 ксенографтных опухолей после обработки заявляемым соединением, несущим FAM флуоресцентную метку показано, что соединение накапливалось в цитоплазме и мембране клеток ксенографтных опухолей, накопление присутствовало как в PC3 ксенографтной опухоли, так и в случае 22Rv1 ксенографтной опухоли (фиг. 24).

При проведении исследовательских испытаний с гистологическими срезами аденокарциномы предстательной железы человека (глисон 3-5) была подтверждена экспрессия ПСМА клетками аденокарциномы человека, при этом при увеличении глисона происходило нарастание представленности ПСМА в клетках аденокарциномы, что согласуется с данными литературы. При иммуногистохимическом анализе аденокарциномы предстательной железы человека глисон 3 наблюдалось окрашивание люминальных/апикальных мембран в тубулярных структурах аденокарциномы предстательной железы. Обращает на себя внимание диапазон интенсивности - от отсутствия окрашивания до умеренной интенсивности.

При иммуногистохимическом анализе наблюдалось окрашивание люминальных/апикальных мембран в тубулярных структурах аденокарциномы предстательной железы. Было показано, что в структурах с Глисон 4 и 5 интенсивность окрашивания значительно выше, чем в структурах с Глисон 3.

Таким образом, в соответствии с проведенными исследовательскими испытаниями заявляемых соединений, показано, что с их использованием возможна визуализация раковых клеток предстательной железы при проведении анализа фиксированных клеток/ткани в гистологическом срезе.

Также была проведена оценка дифференциальной способности анализируемых конъюгатов проникать в клетки в зависимости от представленности ПСМА на поверхности. Интернализацию флуоресцентного лиганда в клетках детектировали с использованием метода проточной цитофлуориметрии.

Для оценки вклада ПСМА опосредованного захвата лиганда клетками в общую, фиксируемую проточным цитофлуориметром, флуоресценцию, проведено частичное

блокирование ПСМА. Частичное блокирование ПСМА было достигнуто путем инкубации анализируемых клеток с избытком лиганда, тождественного по строению, но свободного от флюорисцентной метки.

5 Выбраны три клеточные линии с разным уровнем экспрессии ПСМА на поверхности клеток LNCaP, 22Rv1, PC3. В соответствии с литературными данными наибольший уровень экспрессии ПСМА характерен для LNCaP, низкий уровень экспрессии ПСМА характерен для 22Rv1, а PC3 клеточная линия не несет ПСМА, является ПСМА

10 Лунки 12-луночного планшета для дальнейшего культивирования LNCaP клеток покрывали L-полилизинном (Sigma) в течение 1 часа, после чего промывали лунки PBS дважды.

Клетки (клеточные культуры LNCaP, 22Rv1, PC3) рассаживали в 12-луночный планшет, в лунку помещали 2×10^5 клеток в 800 мкл среды RPMI, инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение ночи. Далее клетки отмывали 15 холодной средой RPMI, содержащей 1% фетальной бычьей сыворотки.

Для каждого конъюгата в анализ включали клетки LNCaP (три повторности), клетки 22Rv1 (три повторности), клетки PC3 (три повторности).

20 Эксперимент проводили в трех повторностях как при частичном блокировании ПСМА (при внесении избытка анализируемого лиганда), так и в эксперименте без дополнительной нагрузки избытком лиганда.

Избыток лиганда достигался внесением к клеткам 720 мкл среды RPMI (1% FBS), содержащей 400 мкМ (100-кратное превышение по концентрации) флуоресцентно немеченого лиганда тождественного по строению анализируемому. Инкубацию 25 проводили в стандартных условиях культивирования в течение 1 часа. В качестве образцов сравнения использовали лунки с клетками, в которые вносили 720 мкл среды RPMI (1% FBS), эти лунки с клетками также инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение 1 часа. По истечению времени инкубации в каждую лунку вносили 80 мкл среды RPMI (1% FBS), содержащую анализируемый конъюгат в 30 концентрации 40 мкМ для достижения конечной концентрации в лунке 4 мкМ. Проводили инкубацию в стандартных условиях культивирования в течение 30 минут. В качестве контрольных образцов включали клетки, которые инкубировали со средой RPMI (1% FBS) с эквивалентным содержанием DMSO в течении 30 мин.

35 Клетки снимали с поверхности пластика трипсинизацией, инактивацию трипсина проводили с использованием PBS, содержащего 10% FBS. Клетки центрифугировали и отмывали дважды в PBS (10% FBS), полученные клетки ресуспендировали в 500 мкл PBS и использовали далее для проточной цитофлуориметрии (Becton Dickinson FACS Aria III).

40 Накопление сигнала флуоресценции, ассоциированного с поступлением меченого конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5, проанализировано в трех клеточных линиях. Результаты проведения анализа с использованием проточной цитофлуориметрии представлены на фиг. 25.

45 Как видно из фиг. 25 и 26 накопление флуоресцентного сигнала Cy5 при введении конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5 было опосредовано представленностью ПСМА на поверхности клеток. Так наибольшее накопление Cy5 флуоресцентного сигнала было характерно для клеточной линии LNCaP (98,4% клеток), 57,5% клеток клеточной линии 22Rv1 и 41,1% для PC3.

В эксперименте при частичном блокировании ПСМА путем предварительной инкубации с лигандом ПСМА-207257 показано, что в клеточной линии LNCaP,

обладающей максимальной представленностью ПСМА на поверхности клеток, наблюдалось снижение накопления конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5 в 4,1 раза. Выраженное снижение проникновения конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5 также было характерно и для клеток 22RV1. Для клеток РС3 наблюдалось незначительное снижение накопления флуоресцентного лиганда при наличии избытка лиганда ПСМА-207257 в инкубационной среде (Фиг. 26). Таким образом, в эксперименте с частичным блокированием ПСМА подтверждено избирательное накопление конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5 клетками в зависимости от экспрессии на ее поверхности ПСМА. Таким образом, проникновение конъюгата ПСМА-207257-Sulfo-Cy5 в клетки зависит от экспрессии ПСМА на поверхности клеток.

Полученные данные свидетельствует о возможности дифференциального определения ПСМА экспрессирующих клеток с заявляемыми соединениями, МА-207257-FAM и МА-207257-Sulfo-Cy5 с последующим гистологическим анализом.

Изучение фармакокинетики препарата ПСМА-Диаг в плазме крови кроликов и крыс после однократного введения.

Исследование проводилось на здоровых бодрствующих кроликах-самцах породы «Советская шиншилла» возрастом 2,5-3 месяца и массой тела в диапазоне 2,0-2,5 кг и на здоровых бодрствующих белых аутбредных взрослых крысах-самцах возрастом около 2 месяцев с массой 190-210 г. и было направлено на определение концентрации конъюгата специфического субстрата для ПСМА диагностическим агентом Cy7 в плазме крови кроликов и крыс после однократного введения исследуемого препарата ПСМА-Диаг.

Исследование проведено на одной группе каждого вида животных, включающей 6 особей для кроликов и 7 особей для крыс.

Для изучения фармакокинетического изучения препарата проводилось исследование динамики изменения его концентрации в крови, поэтому у испытуемых животных отбирались образцы крови (с последующим выделением плазмы крови) через определенные промежутки времени после введения препарата.

Состав исследуемого препарата ПСМА-Диаг (ПСМА-207257-Sulfo-Cy7):

Конъюгат специфического субстрата для простат специфичного мембранного антигена (ПСМА) с диагностическим агентом Cy7.

Солюбилизатор Плюроник F127 - в количестве, пятикратно превышающем количество конъюгата по массе.

Растворитель - инфузионный раствор Гемодез.

Диметилсульфоксид - в количестве 5% от приготавливаемого объема.

Непосредственно перед введением готовили раствор исследуемого препарата для внутривенного использования в инфузионном растворе Гемодез-Н с добавлением солюбилизатора Плюроник F127 и ДМСО. Для приготовления раствора к стерильной навеске препарата и солюбилизатора добавляли стерильный ДМСО в количестве 5% от требуемого общего объема растворителя, перемешивали и оставляли на для обработки ультразвуком при температуре 40°C до растворения. Затем во флакон отмеряли требуемый объема раствора Гемодез-Н и аккуратно перемешивали, набирая раствор в шприц и сливая обратно. Концентрация раствора - 250 нМоль/кг. Раствор использовался только свежеприготовленным.

На основании этого и с учетом межвидового коэффициента пересчета доз исследуемый препарат был введен кроликам в дозе 0,0122 мг/кг, а крысам - 0,0224 мг/кг.

Схема исследования фармакокинетики препарата представлена в таблице 1.

Таблица 1 Схема исследования фармакокинетики при внутривенном способе введения

Группа №	Исследуемый препарат	Дозы, мг/кг	Кол-во животных в группе	Точки отбора проб
Кролики-самцы				
1.	ПСМА-ДИАГ	0,012 2	6	до введения, через 5; 10; 15; 30; 45 мин; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 часа
Крысы-самцы				
2.	ПСМА-ДИАГ	0,022 4	7	до введения, через 5; 10; 15; 30; 45 мин; 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 4 часа

Образцы крови крыс отбирались из хвостовой вены крыс в объеме 0,2 мл в полиэтиленовые микро-пробирки с капилляром объемом до 0,5 мл, путем усечения кончика хвоста. К₂ЭДТА использован в качестве антикоагулянта. Всего в ходе исследования отобран 91 образец крови от 7 животных (по 13 образцов от каждого животного).

Образцы крови кроликов отбирались из краевой ушной вены кроликов в объеме 1.5-1.7 мл в полиэтиленовые пробирки объемом 3,0 мл с помощью иглы-бабочки, индивидуальной для каждого животного. К₂ЭДТА использован в качестве антикоагулянта. Всего в ходе исследования отобрано 78 образцов крови от 6 животных (по 13 образцов от каждого животного).

Сразу же после отбора образца крови пробирку осторожно переворачивали несколько раз для перемешивания содержимого (антикоагулянта). Затем пробирки помещали вертикально в штатив. Плазму отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 10 минут при температуре +4°C. Центрифугирование выполнялось не позднее 15 мин после отбора каждого образца крови. Полученная плазма из каждой пробирки была перенесена в пластиковые пробирки типа Ерrendorf, снабженные этикетками с указанием номера животного и номера временной точки отбора образца.

Все образцы плазмы крови были заморожены в вертикальном положении и хранились при температуре не выше -20°C до проведения анализа.

Определение исследуемых препаратов в образцах плазмы крови крыс и кроликов проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием с предварительным выделением анализата из биоматериала.

Каждый метод был предварительно валидирован по следующим параметрам:

- чувствительность,
- селективность,
- матричный эффект,
- калибровочный диапазон,
- достоверность,
- точность,
- оценка степени извлечения анализируемого вещества,

- тест на разведение,
- стабильность.

При расчете фармакокинетических параметров использовано фактическое время отбора образцов крови.

5 Значения концентрации «ниже предела определения» (BLQ) расчетах фармакокинетических параметров и описательной статистики рассмотрены как пропущенные значения (missing values).

Расчет фармакокинетических параметров и построение фармакокинетических кривых, а также статистический анализ фармакокинетических данных проведен с использованием валидированного программного обеспечения Phoenix Winnonlin (Версия 8.0).

10 Для значений концентрации исследуемого препарата в каждой временной точке и всех фармакокинетических параметров, рассчитаны следующие параметры описательной статистики: среднее арифметическое значение, среднее геометрическое значение, стандартное отклонение среднего результата, коэффициент вариации, медиана, 15 минимальное и максимальное значения, размах (см. табл. 2 и 3).

В ходе исследования получены достаточные данные об изменении концентрации препарата ПСМА-ДИАГ в плазме крови животных, для определения необходимых фармакокинетических параметров. Данные представлены в таблицах 4 и 5 для кроликов и крыс соответственно.

20

Таблица 2. Концентрации ПСМА-Диаг в плазме крови кроликов и данные описательной статистики для них

	Время после введения (час)												
	0.00	0.08	0.17	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00	2.50	3.00	4.00
Животное	Концентрация (мкг/мл)												
1	BLQ	485.47	161.93	25.30	12.74	9.54	9.06	7.09	6.56	6.00	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	179.51	45.75	17.45	8.38	6.21	5.87	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
3	BLQ	179.26	46.99	11.25	6.96	5.90	5.23	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	298.71	80.77	22.00	11.31	8.61	9.73	6.27	5.22	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
5	BLQ	291.90	78.31	20.15	14.10	10.68	8.66	7.74	8.06	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	132.95	68.52	19.93	14.63	10.74	8.81	7.62	8.36	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
N	0	6	6	6	6	6	6	4	4	1	0	0	0
Ср. знач.		261.30	80.38	19.35	11.35	8.61	7.89	7.18	7.05	6.00			
Станд. отклон.		128.44	42.68	4.75	3.11	2.13	1.86	0.67	1.45				
Минимум		132.95	45.75	11.25	6.96	5.90	5.23	6.27	5.22	6.00			
Медиана		235.71	73.42	20.04	12.03	9.08	8.74	7.36	7.31	6.00			
Максимум		485.47	161.93	25.30	14.63	10.74	9.73	7.74	8.36	6.00			
Размах		352.52	116.18	14.05	7.67	4.84	4.50	1.47	3.14	0.00			
КВ%		49	53	25	27	25	24	9	21				
Ср. геометр.		237.86	72.96	18.78	10.96	8.38	7.69	7.16	6.93	6.00			

35

40

45

Таблица 3. Концентрации ПСМА-Диэг в плазме крови крыс и данные описательной статистики для них

	Время после введения (час)												
	0.00	0.08	0.17	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	2.00	2.50	3.00	4.00
Животное	Концентрация (мкг/мл)												
1	BLQ	59.24	26.80	7.98	7.13	5.51	5.63	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	54.41	19.00	12.25	12.23	8.14	7.01	5.49	5.96	5.53	BLQ	BLQ	BLQ
3	BLQ	107.76	29.74	11.55	17.13	12.18	17.07	11.11	7.66	13.79	10.14	8.56	BLQ
4	BLQ	54.27	13.39	10.90	5.76	BLQ	5.39	BLQ	BLQ	5.05	BLQ	5.53	BLQ
5	BLQ	87.33	26.30	22.33	16.48	20.30	22.60	23.62	20.45	31.31	30.46	22.62	BLQ
6	BLQ	50.03	16.18	17.17	10.53	6.35	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
7	BLQ	272.50	53.68	20.65	13.37	28.21	28.54	20.96	14.84	20.78	17.86	18.88	5.67
N	0	7	7	7	7	6	6	4	4	5	3	4	1
Ср. знач.		97.93	26.44	14.69	11.80	13.45	14.37	15.30	12.23	15.29	19.49	13.90	5.67
Станд. отклон.		79.87	13.44	5.40	4.34	9.03	9.87	8.47	6.70	11.06	10.26	8.15	
Минимум		50.03	13.39	7.98	5.76	5.51	5.39	5.49	5.96	5.05	10.14	5.53	5.67
Медиана		59.24	26.30	12.25	12.23	10.16	12.04	16.04	11.25	13.79	17.86	13.72	5.67
Максимум		272.50	53.68	22.33	17.13	28.21	28.54	23.62	20.45	31.31	30.46	22.62	5.67
Размах		222.47	40.29	14.35	11.37	22.70	23.15	18.13	14.49	26.26	20.32	17.09	0.00
КВ%		82	51	37	37	67	69	55	55	72	53	59	
Ср. геометр.		80.78	24.03	13.84	11.04	11.21	11.52	13.18	10.85	12.02	17.67	11.92	5.67

Таблица 4. Полученные фармакокинетические параметры в плазме крови кроликов

животное №	C ₀ (мкг/мл)	AUC ₀₋₁ (час*мкг/мл)	AUC _{0-∞} (час*мкг/мл)	AUC _{t-∞} / AUC _{0-∞} (%)	K _{el} (1/час)	T _{1/2} (час)	V _d (мл/кг)	Cl (мл/час/кг)	MRT ₀₋₁ (час)
1	1436.55	120.14	147.89	18.76	0.216	3.21	1907.25	412.48	0.18
2	692.98	48.62	56.86	14.50	0.712	0.97	1506.71	1072.76	0.12
3	673.04	46.58	55.73	16.42	0.572	1.21	1915.14	1094.57	0.12
4	1087.65	80.60	84.79	4.94	1.245	0.56	577.62	719.38	0.16
5	1071.15	80.69	94.68	14.78	0.576	1.20	1118.21	644.31	0.18
6	255.94	40.93	55.22	25.88	0.585	1.18	1888.31	1104.61	0.32
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Ср. знач.	869.549	69.594	82.529	15.879	0.651	1.389	1485.539	841.351	0.180
Станд. отклон.	413.766	30.301	36.186	6.802	0.335	0.924	544.852	291.414	0.072
Минимум	255.94	40.93	55.22	4.94	0.216	0.56	577.62	412.48	0.12
Медиана	882.06	64.61	70.83	15.60	0.581	1.19	1697.51	896.07	0.17
Максимум	1436.55	120.14	147.89	25.88	1.245	3.21	1915.14	1104.61	0.32
Размах	1180.61	79.21	92.66	20.94	1.029	2.65	1337.52	692.13	0.20
КВ%	47.6	43.5	43.8	42.8	51.5	66.5	36.7	34.6	39.9
Ср. геометр.	764.583	64.563	76.959	14.269	0.577	1.201	1373.449	792.625	0.170

Таблица 5. Полученные фармакокинетические параметры в плазме крови крыс

животное №	C ₀ (мкг/мл)	AUC ₀₋₁ (час*мкг/мл)	AUC _{0-∞} (час*мкг/мл)	AUC _{t-∞} / AUC _{0-∞} (%)	K _{el} (1/час)	T _{1/2} (час)	V _d (мл/кг)	Cl (мл/час/кг)	MRT ₀₋₁ (час)
1	129.72	17.04	27.83	38.78	0.522	1.33	1515.25	790.50	0.23
2	153.87	25.36	33.96	25.31	0.643	1.08	1006.98	647.83	0.55
3	384.52	57.37	75.32	23.83	0.477	1.45	612.57	292.10	0.89
4	216.32	28.49	63.09	54.84	0.160	4.34	2181.62	348.69	0.87
5	285.87	87.79	157.36	44.21	0.325	2.13	430.02	139.80	1.36
6	152.63	17.00	20.19	15.81	1.989	0.35	547.70	1089.60	0.20
7	1356.82	136.01	150.80	9.81	0.383	1.81	380.52	145.89	0.94
N	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Ср. знач.	382.821	52.723	75.508	30.370	0.643	1.784	953.523	493.486	0.719
Станд. отклон.	438.797	44.857	57.130	16.146	0.613	1.259	672.053	359.357	0.419
Минимум	129.72	17.00	20.19	9.81	0.160	0.35	380.52	139.80	0.20
Медиана	216.32	28.49	63.09	25.31	0.477	1.45	612.57	348.69	0.87
Максимум	1356.82	136.01	157.36	54.84	1.989	4.34	2181.62	1089.60	1.36
Размах	1227.10	119.01	137.17	45.03	1.830	3.99	1801.09	949.80	1.16
КВ%	114.6	85.1	75.7	53.2	95.4	70.6	70.5	72.8	58.3
Ср. геометр.	267.610	39.245	57.787	26.339	0.485	1.428	784.423	380.707	0.588

Исследование острой токсичности

Исследование острой токсичности препарата ПСМА-Диаг - конъюгата специфического субстрата для простат специфического мембранного антигена (ПСМА) с диагностическим агентом Су7 проводилось с использованием аутбредным мышей-самцов как минимум двух токсических дозах при однократном введении исследуемых препаратов.

В эксперименте использованы белые аутбредные мыши-самцы (130 особей) возрастом около 2 месяцев с массой 19-21 г. Основная задача эксперимента - определить величину LD50 и описать потенциальные органы и системы органов-мишеней, определить максимальную переносимую дозу.

При изучении острой токсичности были использованы растворы исследуемого препарата в инфузионном растворе Гемодез с добавлением солюбилизатора Плуороник F127 и ДМСО. Для приготовления раствора к стерильной навеске препарата с пятикратным количеством Плуороника добавляли стерильный ДМСО в количестве 5% от требуемого общего объема растворителя, перемешивали и оставляли на для обработки ультразвуком при температуре 40°C до растворения. Затем во флакон отмеривали требуемый объема раствора Гемодез и перемешивали. Перед введением к навеске препарата прибавляли необходимый объем 1% раствора крахмала и перемешивали до получения однородной суспензии.

В эксперименте по определению острой токсичности каждому животному вводили одну дозу исследуемого препарата внутривенно в объеме, не превышающем максимальный допустимый для одновременного введения, при необходимости - дробно. Дизайн исследования острой токсичности представлен в таблице 6.

При оценке острой токсичности следили за поведением животных, внешним видом, двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители, оценивали физиологические функции, определяли динамику массы тела.

В ходе эксперимента наблюдение за животными проводилось непрерывно первые 30 мин после введения, затем - ежечасно, в течение 4 часов, затем - через 24 часа и далее ежедневно в течение 14 дней.

Таблица 6. Дизайн исследования острой токсичности при внутривенном способе введения

Группа №	Исследуемый препарат	Дозы, мг/кг	Кол-во животных в группе
Мыши-самцы			
1	Исследуемый препарат ПСМА-ДИАГ	1,1	10
2	Исследуемый препарат ПСМА-ДИАГ	89,7	10
3	Контроль (Раствор Плуороника в Гемодезе)	---	10

Перед началом эксперимента по определению острой токсичности животные были на 2 часа лишены корма и воды, после чего взвешены. Затем каждому животному вводили внутривенно исследуемый препарат согласно дизайну исследования, в объеме, не превышающем допустимый разовый объем введения: для мышей - 0,5 мл, для крыс - 2 мл, при необходимости - дробно. Для контрольной группы был использован Раствор Плуороника в Гемодезе. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 14 дней. В этот период были оценены видимые признаки интоксикации. Концентрация исследуемого препарата - 250 нМ/кг (0,448 mg/kg).

Описание результатов эксперимента сведено в таблицу 7.

Таблица 7. Результаты наблюдений при однократном внутривенном введении ПСМА-ДИАГ крысам-самцам

Доза	Признаки интоксикации	Некропсия	Гибель
1,1 мг/кг	Специфические признаки интоксикации отсутствуют	отсутствует	0//10
89,7 мг/кг	Сразу после введения кожа животных приобретает светло-зелёный оттенок, окраска полностью проходит через 1-2 часа	отсутствует	0//10

Зависимость летальности от дозы препарата и величина среднесмертельной дозы для мышей-самцов не установлена ввиду отсутствия гибели в экспериментальных группах.

В результате исследования острой токсичности сделаны следующие выводы:

1. Максимально переносимая доза для мышей составила 89,7 мг/кг
2. Токсический эффект препарата отсутствует.
3. Анализ внутренних органов не выявил морфологических изменений.

В результате изучения острой токсичности установлено, что конъюгат ПСМА с Су7 не обладает токсическим действием в дозировке, превышающей эффективную в 2000 раз.

Таким образом проведенные эксперименты показали, что заявляемые конъюгаты обладают высокой аффинностью и селективностью действия в отношении клеток, экспрессирующих ПСМА, при низкой токсичности. Данные соединения позволяют

расширить арсенал диагностических средств для визуализации клеток с высокой экспрессией ПСМА.

Готовая лекарственная форма для практического использования изобретения

5 Готовая лекарственная форма, предназначенная для практического применения изобретения, и представляет собой лиофилизированный фармацевтический препарат, который включает в себя конъюгат ПСМА-диаг в соответствии с изобретением, а также может включать наполнители, буфер и консерванты.

10 Препарат позволяет получать препарат в виде раствора для инъекций конъюгата в соответствии с изобретением, который соответствует по своей концентрации клиническим потребностям.

Используемый в препарате наполнитель может представлять собой моно-, ди- или трисахарид. Примерами моносахаридов, которые могут быть упомянуты, являются глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза и сорбоза, примерами дисахаридов, которые могут быть упомянуты, являются сахароза, лактоза, мальтоза и трегалоза, а примером 15 трисахарида, который может быть упомянут, является раффиноза. Так же указанный наполнитель может представлять собой сорбитол, а также любое другое вещество с подходящей температурой стеклования.

Наполнитель присутствует в препарате в концентрации приблизительно от 50 до 99%.

20 Если препарат включает буферные растворы, то они должны, в принципе, быть физиологически переносимыми веществами, которые приемлемы для установления желательного значения pH. Количество буферных веществ выбирают таким образом, чтобы после восстановления лиофилизированного препарата, например, с помощью 25 воды для инъекций полученный водный раствор имел буферную концентрацию от 5 ммол/л до 20 ммол/л, предпочтительно приблизительно 10 ммол/л. Предпочтительными буферными растворами являются цитратный буферный раствор или фосфатный буферный раствор. Приемлемые фосфатные буферные растворы представляют собой растворы солей фосфорной кислоты моно- и/или динатрия и калия, таких, как гидрофосфат динатрия или дигидрофосфат калия, а также смеси солей натрия и калия, 30 такие как, например, смеси гидрофосфата динатрия и дигидрофосфата калия.

Если восстановленный раствор не является уже изотоническим вследствие осмотических свойств конъюгата, то вспомогательные вещества, которые используются для стабилизации, изотонический агент, предпочтительно физиологически переносимая соль, такая как, например, хлорид натрия или хлорид калия, или физиологически 35 переносимый полиол, такой как, например, глюкоза или глицерин, могут также присутствовать в концентрации, необходимой для установления изотоничности.

Кроме того, препарат может включать также физиологически переносимые вспомогательные вещества, такие как, например, антиоксиданты, такие, как аскорбиновая кислота или глутатион, консерванты, такие, как фенол, крезол, метил- 40 или пропилпарабен, хлорбутанол, тиомерсал или хлорид бензалкония, полиэтиленгликоли (PEG), такие, как PEG 3000, 3350, 4000 или 6000, или циклодекстрины, такие, как гидроксипропил- β -циклодекстрин, сульфобутилэтил- β -циклодекстрин или γ -циклодекстрин, хилаторы, такие как динатрия эдетат.

10 Препарат в соответствии с изобретением может быть приготовлен путем получения водного препарата, включающего конъюгат в качестве активного ингредиента, а также наполнитель и, если это является желательным, фармацевтические вспомогательные вещества такие как буферные соли и консерванты, с последующей лиофилизацией 45 раствора.

Готовая лекарственная форма имеет в составе, но не ограничивается следующими примерами:

Пример 1

Компонент	Мг
ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7	0,25
Калия дигидрофосфат	1,00
Дикалия гидрофосфат	2,00
Натрия хлорид	8,50
Пропил 4-гидроксibenзоат натрия	0,20
Метил 4-гидроксibenзоат натрия	1,80
Маннитол	100,00

В процессе приготовления препарата входят следующие стадии: отвешивают 8,5 г хлорида натрия, 1,00 г калия дигидрофосфата, 2,00 г дикалия гидрофосфата добавляют 1,14 кг воды для инъекций. Добавляют 100 г маннита. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения 10 минут, прибавляют 20 мг пропил 4-гидроксibenзоата натрия, 180 мг метил 4-гидроксibenзоат натрия. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения 10 минут. Добавляют 0,25 г субстанции ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7. Перемешивают на магнитной мешалке при 400 об/мин до полного растворения субстанции 1 час.

Пример 2

Компонент	г
ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7	0,25
Калия дигидрофосфат	1,00
Дикалия гидрофосфат	2,00
Натрия хлорид	8,50
Маннитол	100,00

В процессе приготовления препарата входят следующие стадии: отвешивают 8,5 г хлорида натрия, 1,00 г калия дигидрофосфата, 2,00 г дикалия гидрофосфата добавляют 1,14 кг воды для инъекций. Добавляют 100 г маннита. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения 10 минут. Добавляют 0,25 г субстанции ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7. Перемешивают на магнитной мешалке при 400

об/мин до полного растворения субстанции 1 час.

Пример 3

Компонент	Мг
ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7	0,25
Калия дигидрофосфат	1,00
Дикалия гидрофосфат	2,00
Натрия хлорид	8,50
Пропил 4-гидроксibenзоат натрия	0,20
Метил 4-гидроксibenзоат натрия	1,80
Динатрия эдетат	0,10
Маннит	100,00

В процессе приготовления препарата входят следующие стадии: отвешивают 8,5 г хлорида натрия, 1,00 г калия дигидрофосфата, 2,00 г дикалия гидрофосфата добавляют 1,14 кг воды для инъекций. Добавляют 100 г маннита. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения 10 минут. Прибавляют 20 мг пропил 4-гидроксibenзоата натрия, 180 мг метил 4-гидроксibenзоат натрия, 10 мг динатрия эдетата. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения, 10 минут. Добавляют 0,25 г субстанции ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7. Перемешивают на магнитной мешалке, при 400 об/мин до полного растворения субстанции 1 час.

Далее, полученные по примерам растворы фильтруют через фильтр предварительной фильтрации 0,45 мкм в подходящий, предварительно стерилизованный, стеклянный сосуд. Далее, полученные растворы фильтруют через стерилизующий фильтр с размером пор 0,2 мкм в стерильный приемный сосуд. Далее стерильные флаконы наполняются стерильным раствором препарата, пред укупориваются резиновой пробкой, таким образом, чтобы была возможность воздухообмена с содержимым флакона в процессе сушки. Подготовленные таким образом флаконы устанавливаются в лиофильную сушку. Запускается режим заморозки, до температуры -70°C на 3 часа. По окончании режима заморозки сушилка автоматически переходит в режим основной сушки, при которой в камере создается давление 0,2-0,6 мбар, а температура полки повышается до -30°C , в таком режиме продукт сохнет 24-72 часа. По окончании основной сушки, включается конечная сушка, давление постепенно доходит до 0,012 мбар. Длительность режима конечная сушка составляет 3-4 часа.

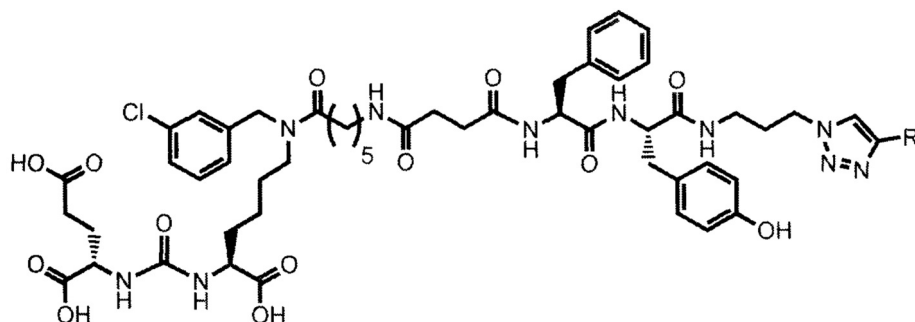
Стабильность готовой лекарственной формы была изучена в режиме естественного хранения при -20°C в течение 1 года. Результаты анализов показали, что готовая лекарственная форма стабильна по всем исследованным показателям качества в течение исследуемого срока хранения. Данные по стабильности приведены в таблице 8.

Таблица 8 Изучение стабильности готовой лекарственной формы содержащей ПСМА-ДИАГ МА-207257-SULFO-CY7

Показатель качества	0	3 месяца	12 месяцев
ОПИСАНИЕ Лиофилизированная масса или порошок от почти белого цвета до белого с зеленоватым оттенком	-	Соответствует	
ПОДЛИННОСТЬ-Время удерживания основного пика (ПСМА-Су7) на хроматограмме испытуемого раствора должно быть в диапазоне от 4 до 6 мин		Соответствует	
ПРОЗРАЧНОСТЬ-100 % раствор препарата не должен превышать эталон мутности 1.		Соответствует	
pH- От 5,5 до 8,0	6,60	6,59	6,71
ВОДА- Не более 5,0 %	2,25 %	2,93 %	3,00%
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ	96,38 %	94,87 %	95,0%
РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	3,62%	5,13%	5,00%

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат для визуализации популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) формулы (I)



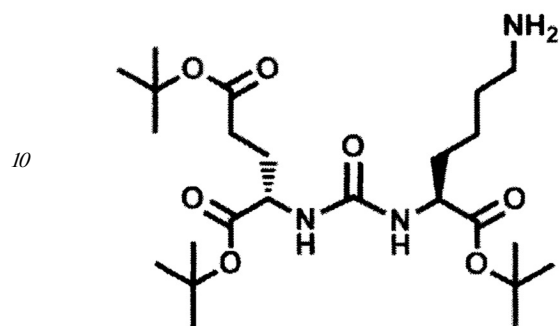
где R - флуоресцентный краситель.

2. Конъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве флуоресцентного красителя используют красители, содержащие по меньшей мере 1 алкильную группу.

3. Конъюгат по п. 2, характеризующийся тем, что флуоресцентный краситель выбирают из группы, включающей Oregon Green, AlexaFluor, флуоресцеин или его

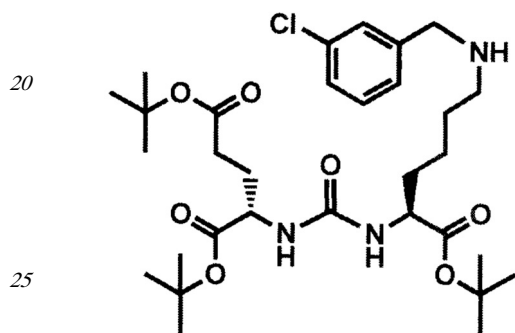
аналоги, флуоресцентные средства BODIPY, родаминовые флуоресцентные средства, флуоресцентные средства DyLight, циановые красители.

4. Способ получения конъюгата для визуализации популяций патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) по п. 1, включающий синтез тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда формулы (III):



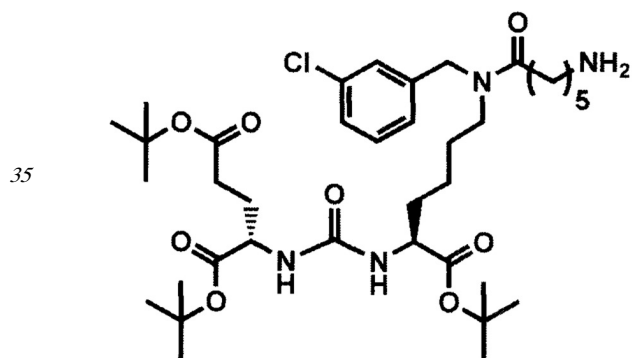
(III),

с последующим алкилированием полученного тритретбутилового производного ПСМА-связывающего лиганда с получением соединения формулы (IV):



(IV),

с последующим получением соединения, содержащего алкилированное тритретбутил производное ПСМА-лиганда и фрагмент линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода формулы (V):

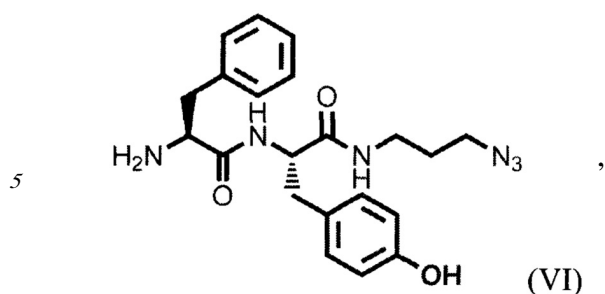


(V),

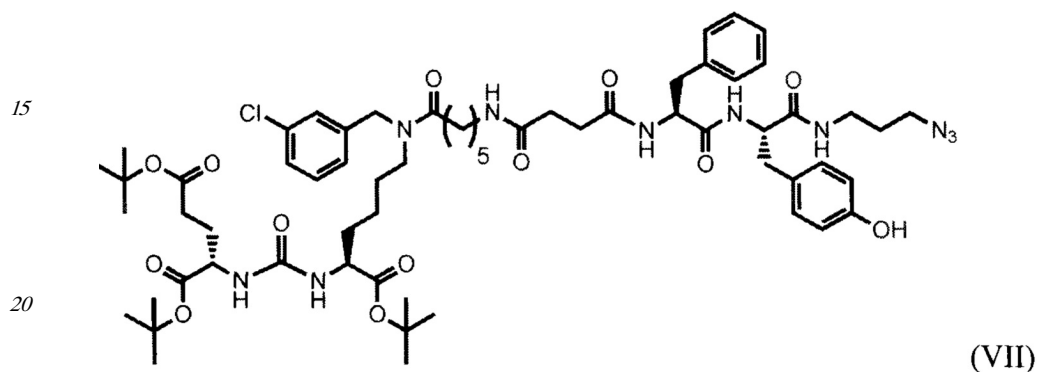
который модифицируют янтарным ангидридом, с получением производного соединения, ацилированного янтарным ангидридом, далее осуществляют получение дипептидов производных ароматических аминокислот, представляющих собой L-фенилаланил-L-тирозин формулы (VI), для связывания с модифицированным

45

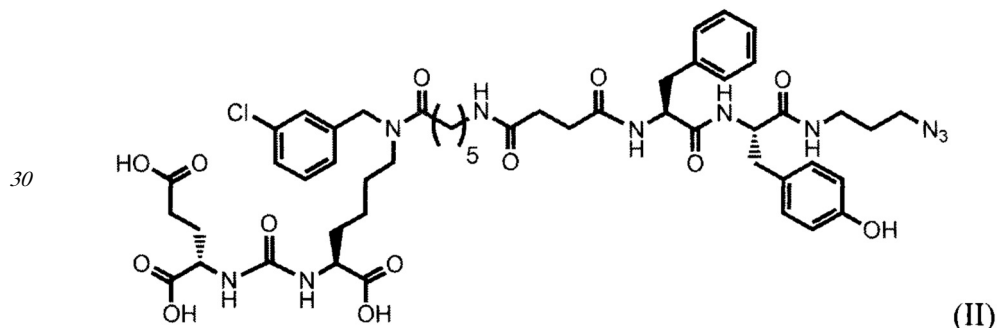
фрагментом линкера:



10 затем получают тритретбутил производное конъюгата радикала ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера, включающего фрагменты 6-аминогексановой кислоты, фрагмент L-фенилаланина, фрагмент L-тирозина формулы (VII):



25 с последующим удалением трет-бутильных защитных групп соединения формулы (VII) с получением ковалентно-связанных ПСМА-связывающего лиганда и модифицированного гидрофобного пептидного линкера (II):



35 затем проводят реакцию медь (I) катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения соединения (II) с флуоресцентным красителем, содержащим терминальную тройную связь, что приводит к получению целевого конъюгата (I).

40 5. Способ по п. 4, характеризующийся тем, что получение алкилированного тритретбутил производного ПСМА-лиганда осуществляют путем восстановительного аминирования м-хлорбензальдегидом.

6. Способ по п. 4, характеризующийся тем, что получение соединения формулы (IV) проводят путем ацилирования производными 6-азидогексановой кислоты с получением азидного производного алкилированного производного ПСМА-лиганда с последующей реакцией восстановления азидов до аминогруппы.

45 7. Способ по п. 6, характеризующийся тем, что реакцию восстановления азидов до аминогруппы проводят в присутствии трифенилфосфина и воды в растворе ТГФ либо в растворе метанола с использованием водорода в присутствии палладия на углеводе в качестве катализатора.

8. Способ по п. 4, характеризующийся тем, что модификацию янтарным ангидридом фрагмента линкера, представляющего собой алкильный фрагмент, включающий 5 атомов углерода, осуществляют реакцией ацилирования янтарным ангидридом

5 9. Способ по п. 8, характеризующийся тем, что в качестве ненуклеофильных оснований используют диизопропилэтиламин или триэтиламин.

10. Способ по п. 4, характеризующийся тем, что получение тритретбутил производного конъюгата формулы (V) осуществляют реакцией ацилирования производным соединения (III), ацилированного янтарным ангидридом, дипептида формулы (IV).

11. Способ по п. 4, характеризующийся тем, что удаление тритретбутильных защитных групп проводят в присутствии 9-11% ТФУ в течение 15-17 часов в дихлорметане.

12. Композиция для визуализации популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA), включающая конъюгат по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

13. Способ визуализации популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) в биологическом образце, включающий

f) обработку образца композицией по п. 12;

g) инкубирование образца в течение времени необходимого связывания конъюгата по п. 1 с патогенными клетками;

h) удаление не связанного конъюгата; и

i) освещение или облучение биологического образца;

j) по наличию флуоресценции визуализируют популяцию патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА в биологическом образце.

14. Способ по п. 13, где биологический образец представляет собой опухоль или лимфатический узел.

15. Способ интраоперационной визуализации популяции патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА (PSMA) у индивидуума, включающий:

d) внутривенное введение композиции по п. 12;

30 e) освещение или облучение области накопления конъюгата видимым или инфракрасным излучением по прошествии от 4 до 120 часов;

f) по наличию флуоресценции визуализируют популяцию патогенных клеток, экспрессирующих ПСМА у индивидуума.

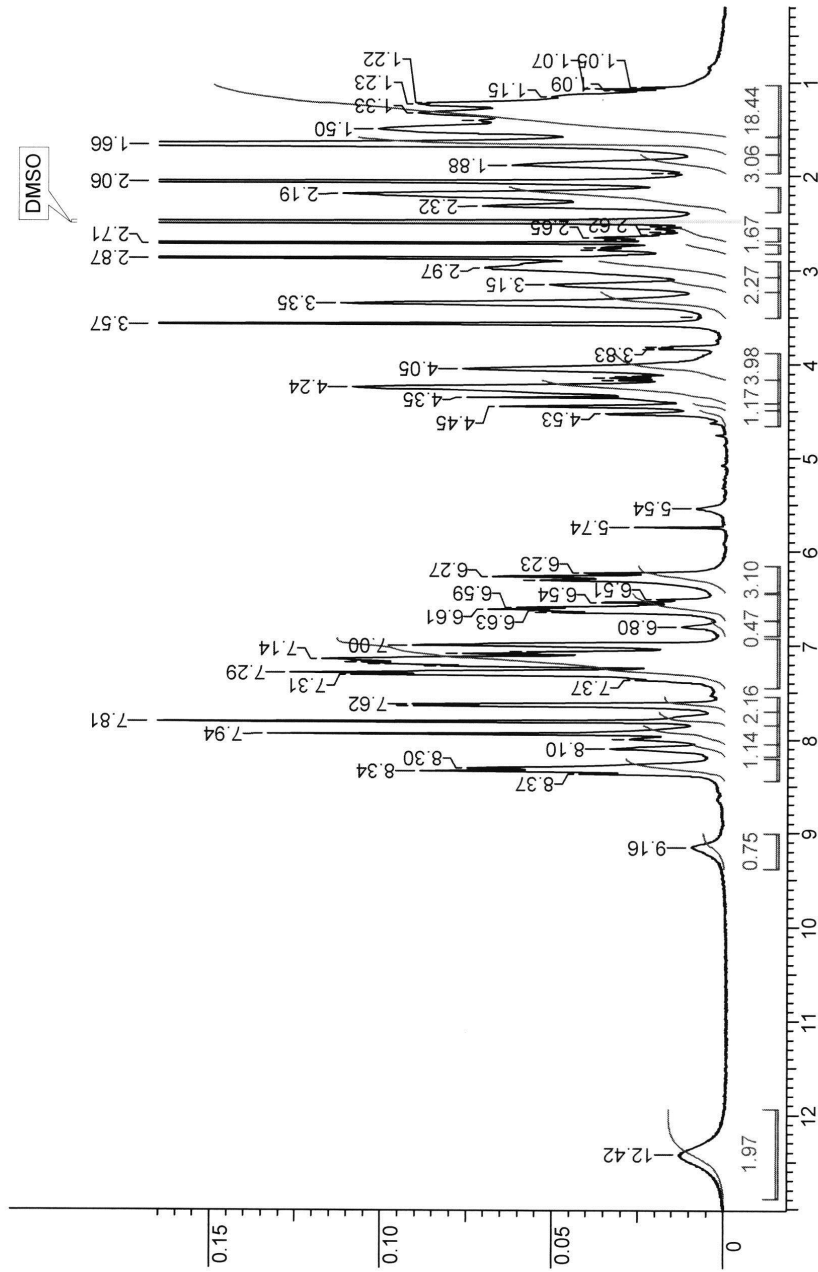
16. Способ по п. 15, где этапы e) и f) выполняют с помощью томографической системы, ручной системы оптической визуализации, хирургических очков или интраоперационного микроскопа.

17. Способ по п. 15, где длина волны света составляет от приблизительно 450 до 900 нм.

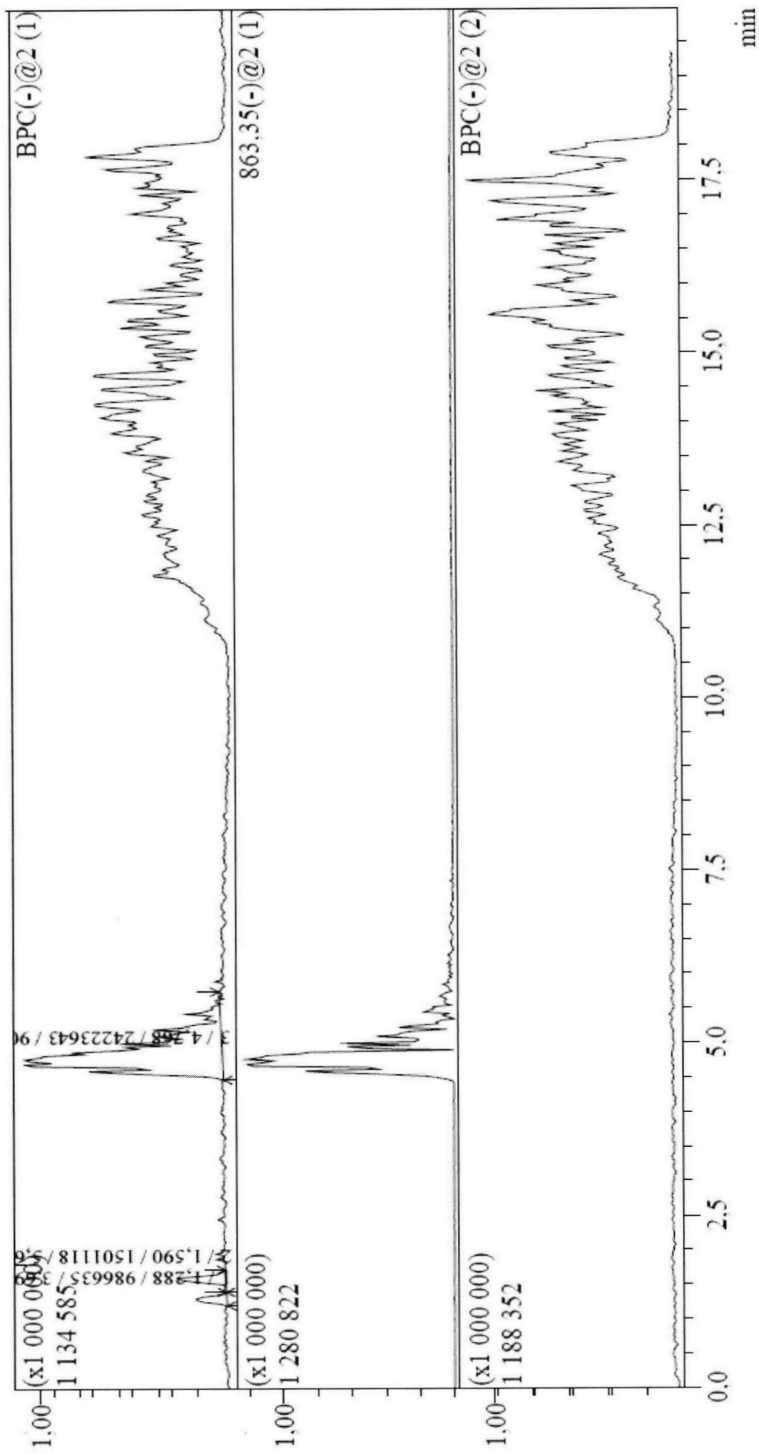
18. Способ выполнения у индивидуума хирургической операции, руководствующейся визуализацией, включающий:

a) осуществление способа по любому из пп. 15-17;

б) проведение хирургической резекции областей, которые флуоресцируют.



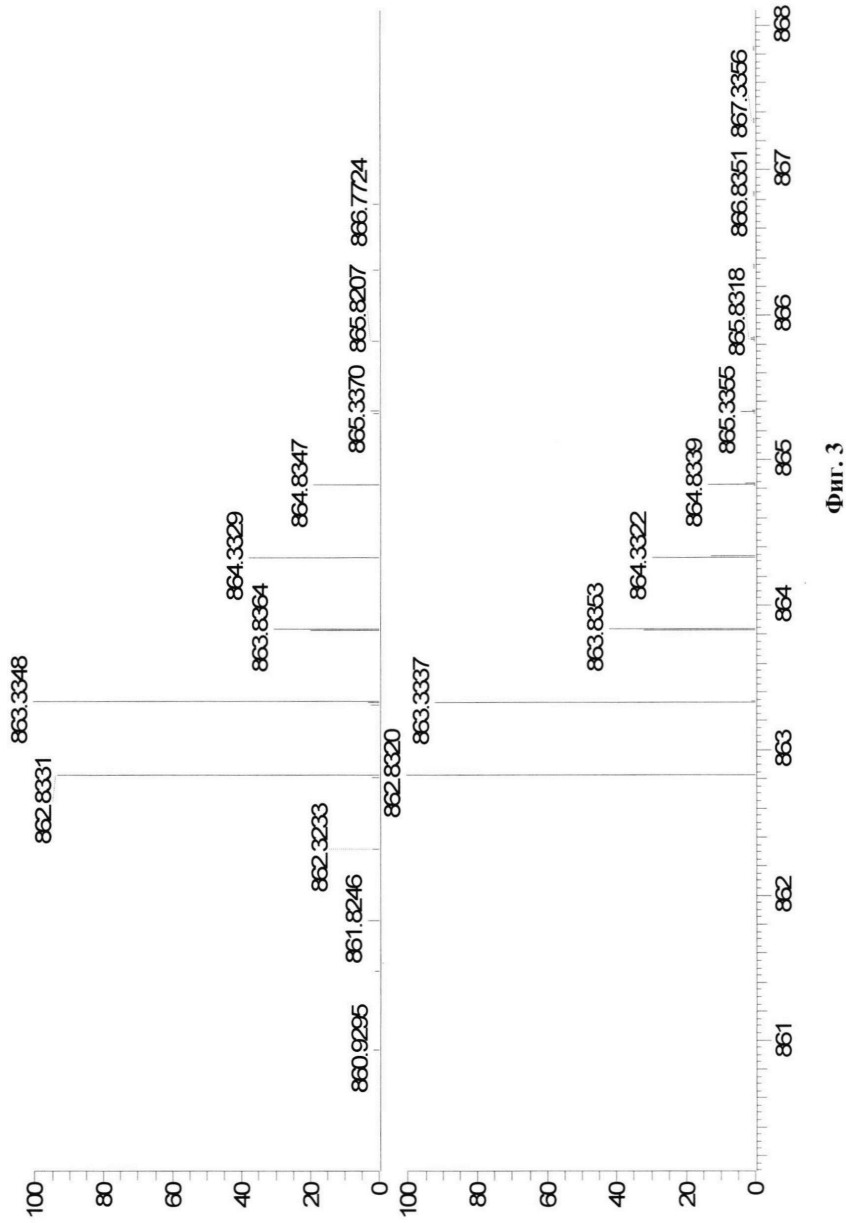
Фиг. 1

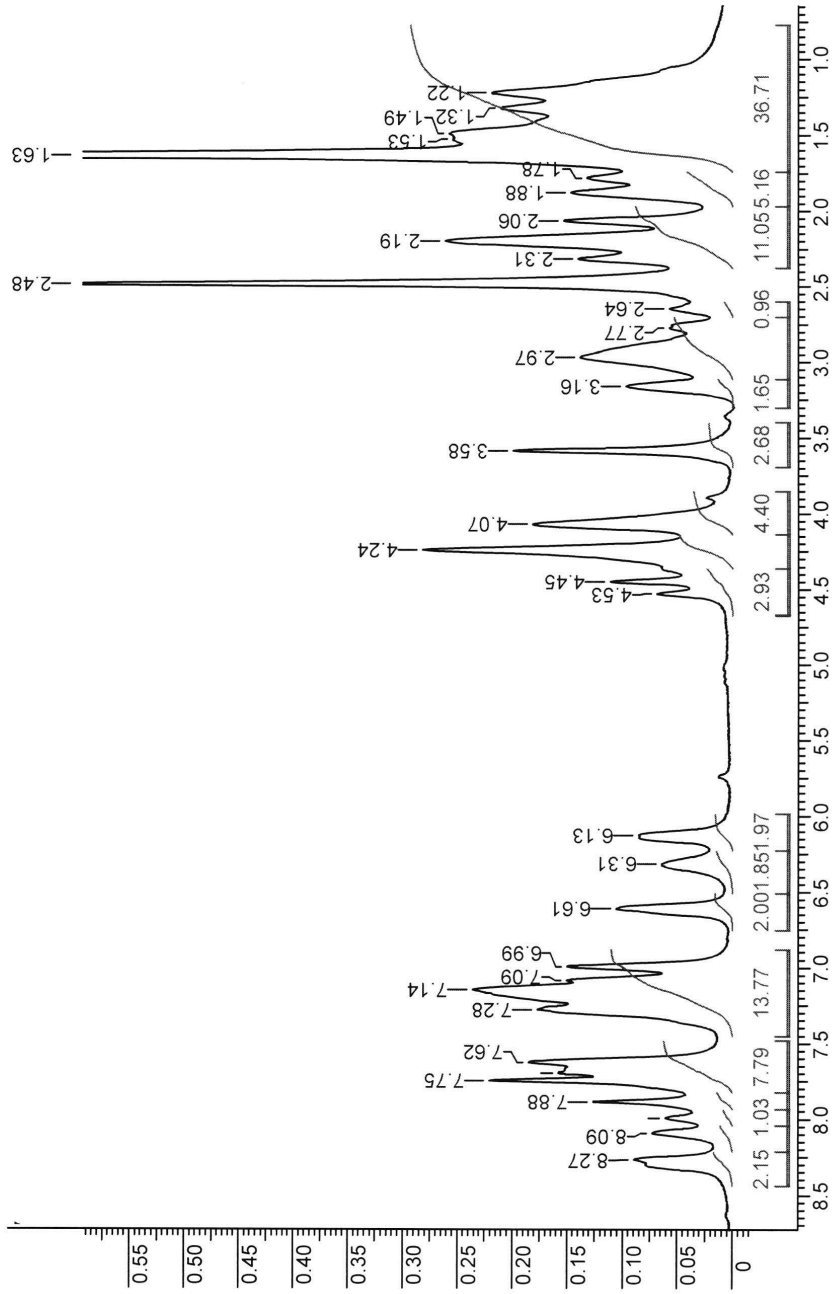


Фиг. 2

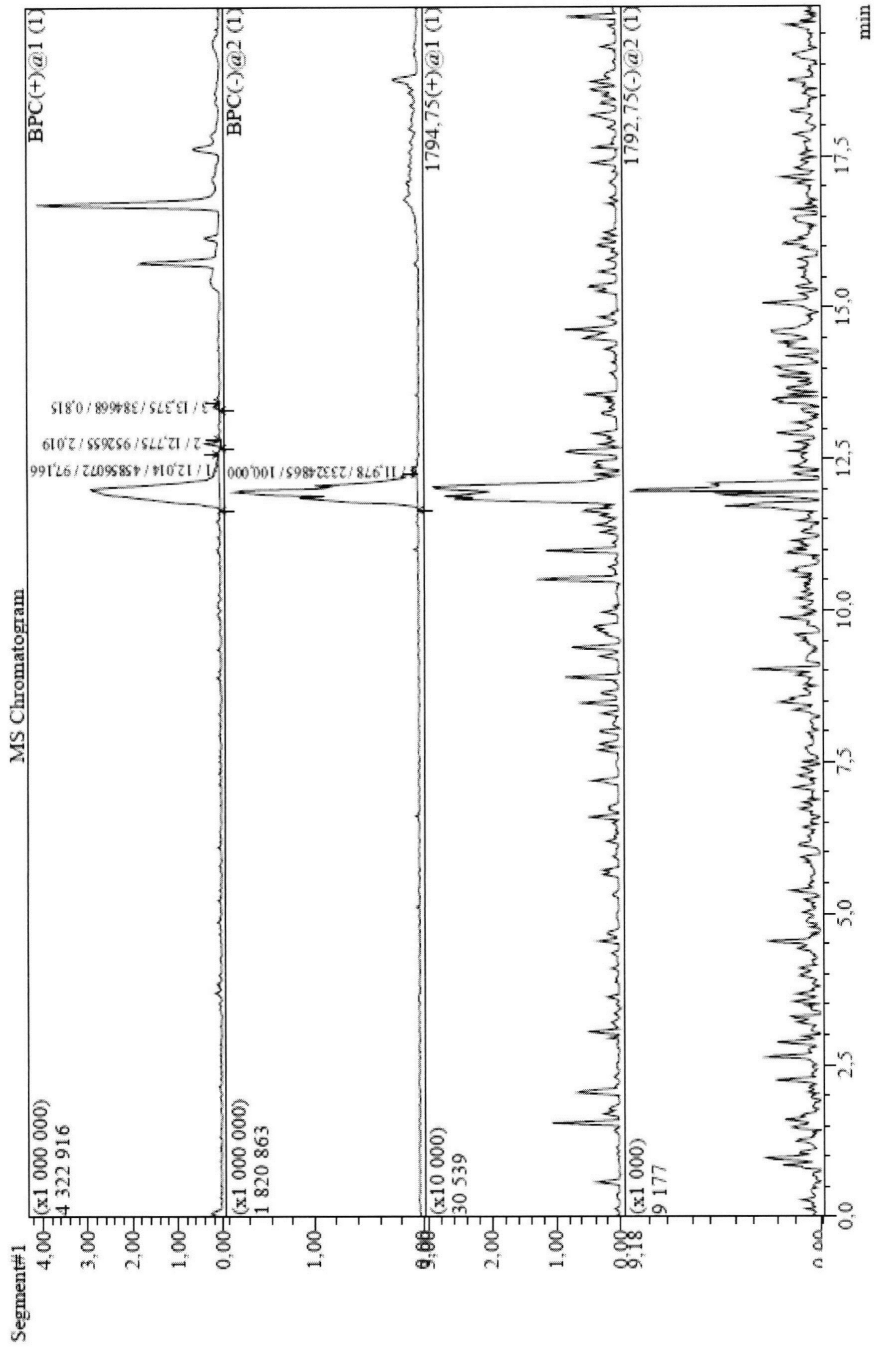
NL:
2.96E4
MA-401_100x_neg#1
RT: 0.02 AV: 1 T: FTMS-
c ESI Full ms
[100.00-2000.00]

NL:
2.46E5
C₈₅H₁₀₄ClN₁₃O₂₀S₂
C₈₅H₁₀₄Cl₁N₁₃O₂₀S₂
pa Crtg 2





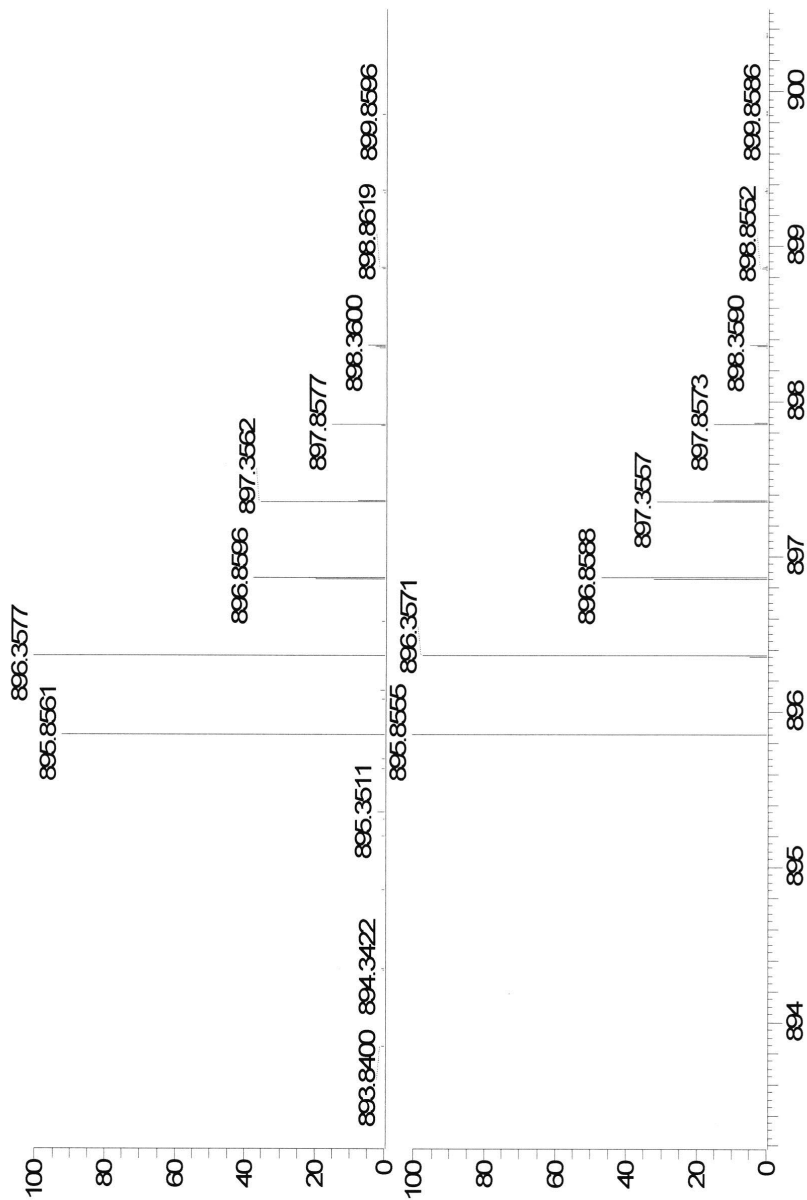
Фиг. 4



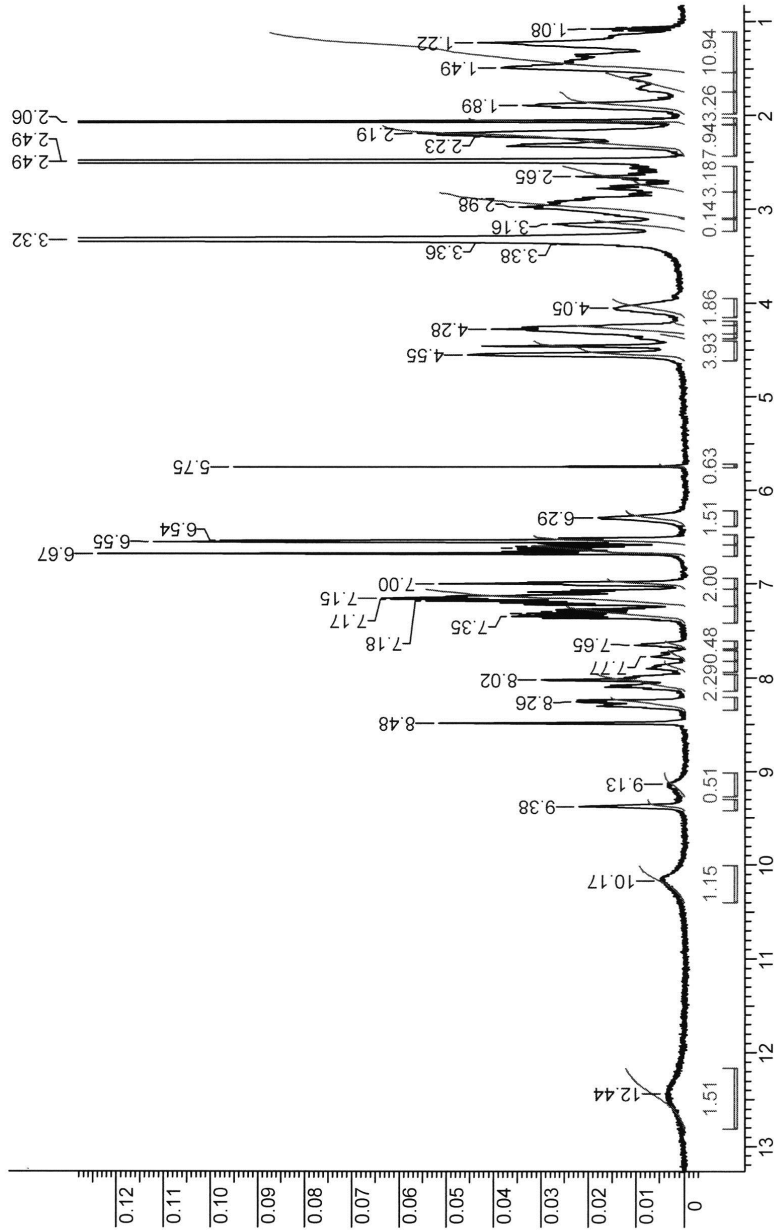
Фиг. 5

NL:
1.81E5
MA-419_100x_neg#1
RT: 0.00 AV: 1 T: FTMS-
c ESI Full ms
[100.00-2000.00]

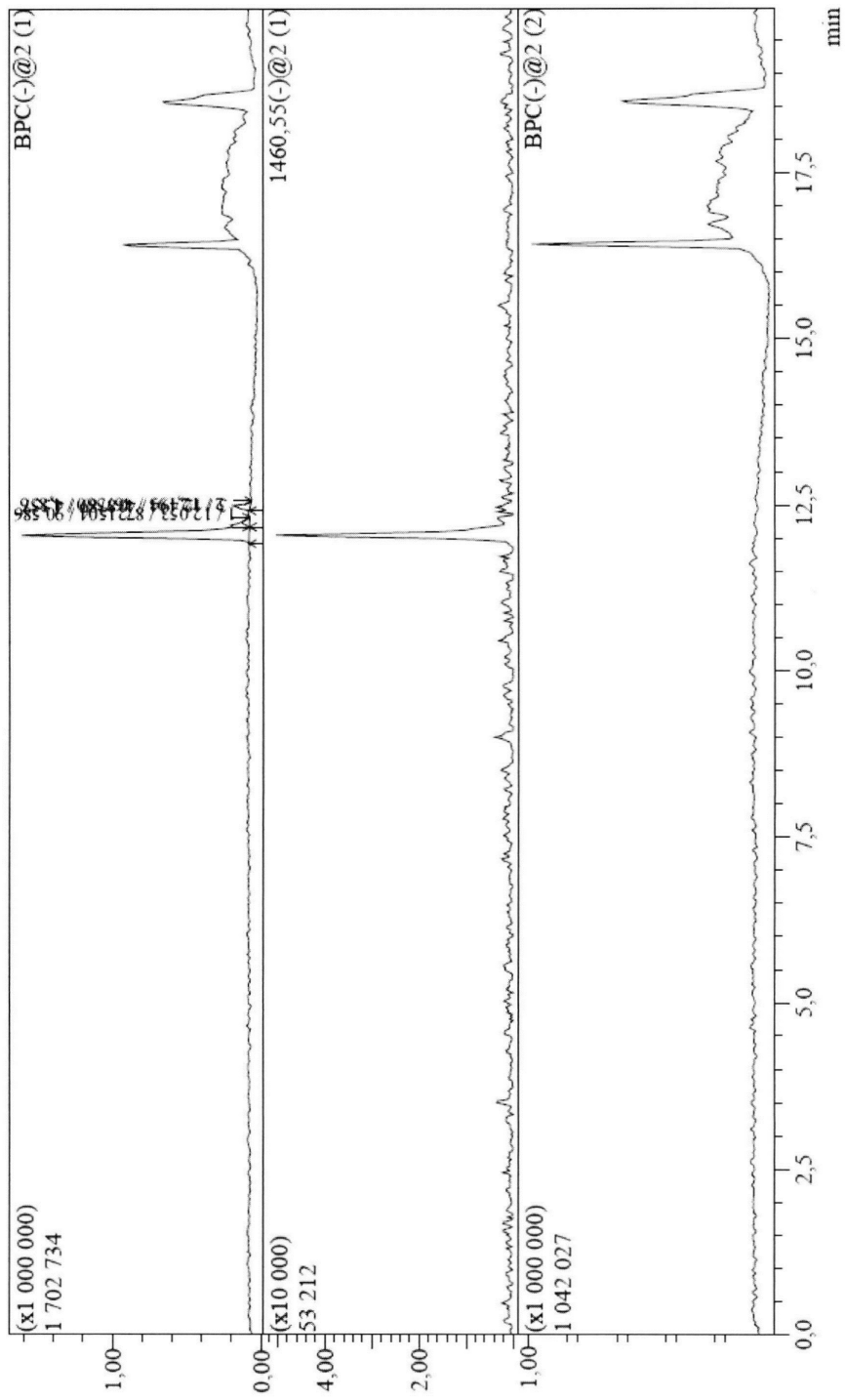
NL:
2.33E5
C₉₀H₁₁₀ClN₁₃O₂₀S₂:
C₉₀H₁₁₀Cl₁N₁₃O₂₀S₂
pa Chrg 2



Фиг. 6



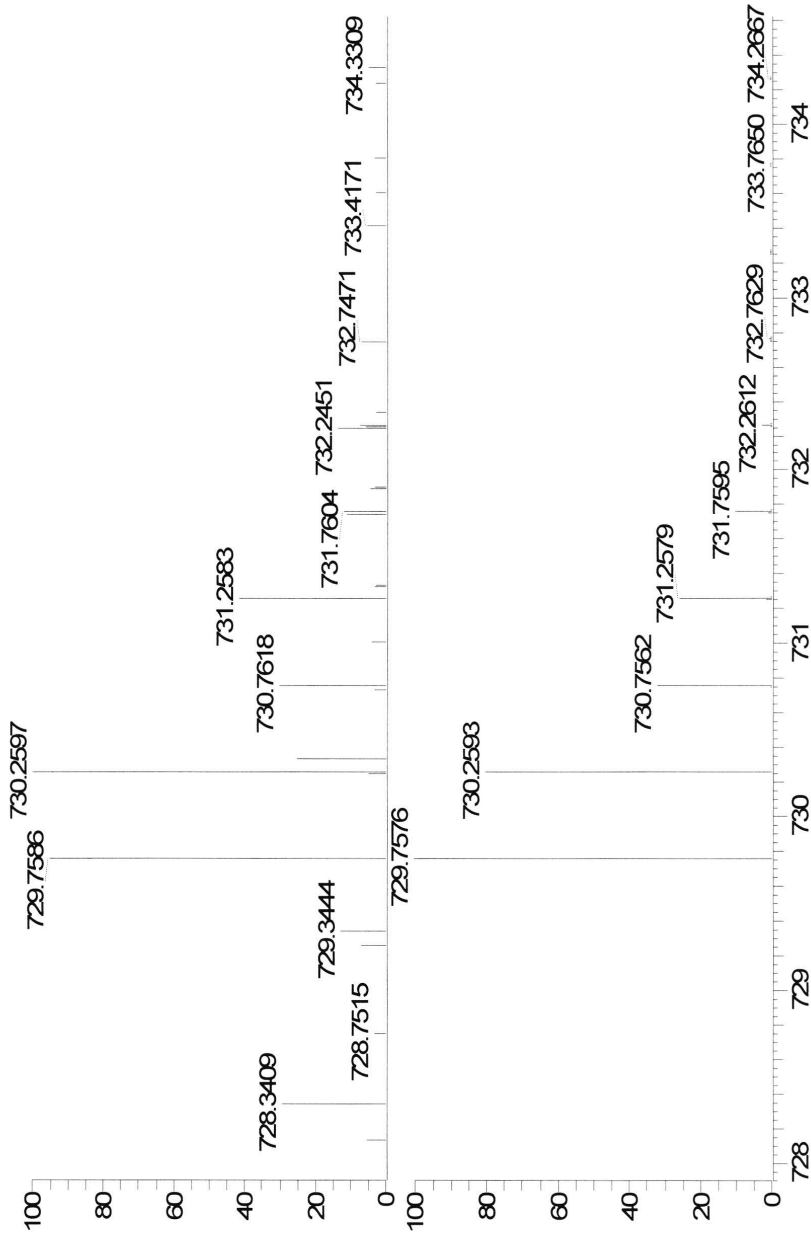
Фиг. 7



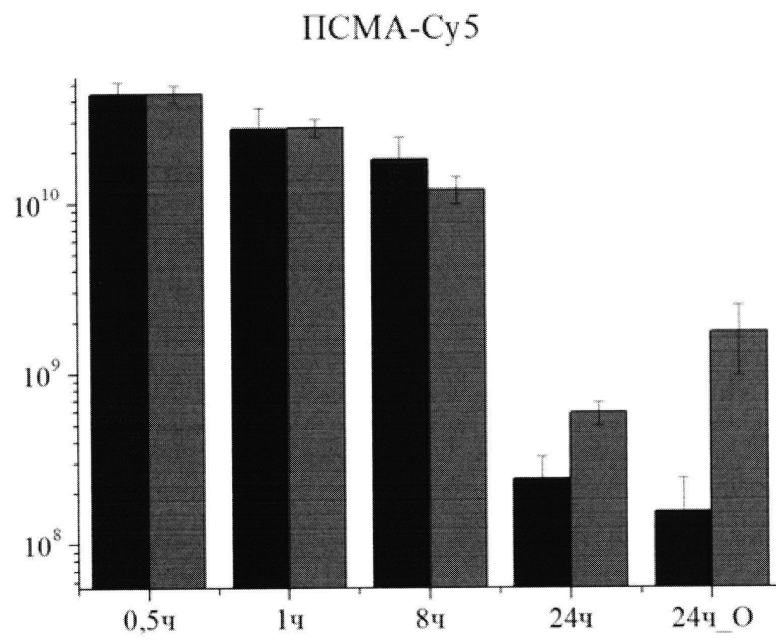
Фиг. 8

NL: 3.57E3
NM-17_100x_neg#1
RT: 0.01 AV: 1 T:
FTMS - c ESI Full ms
[100.00-2000.00]

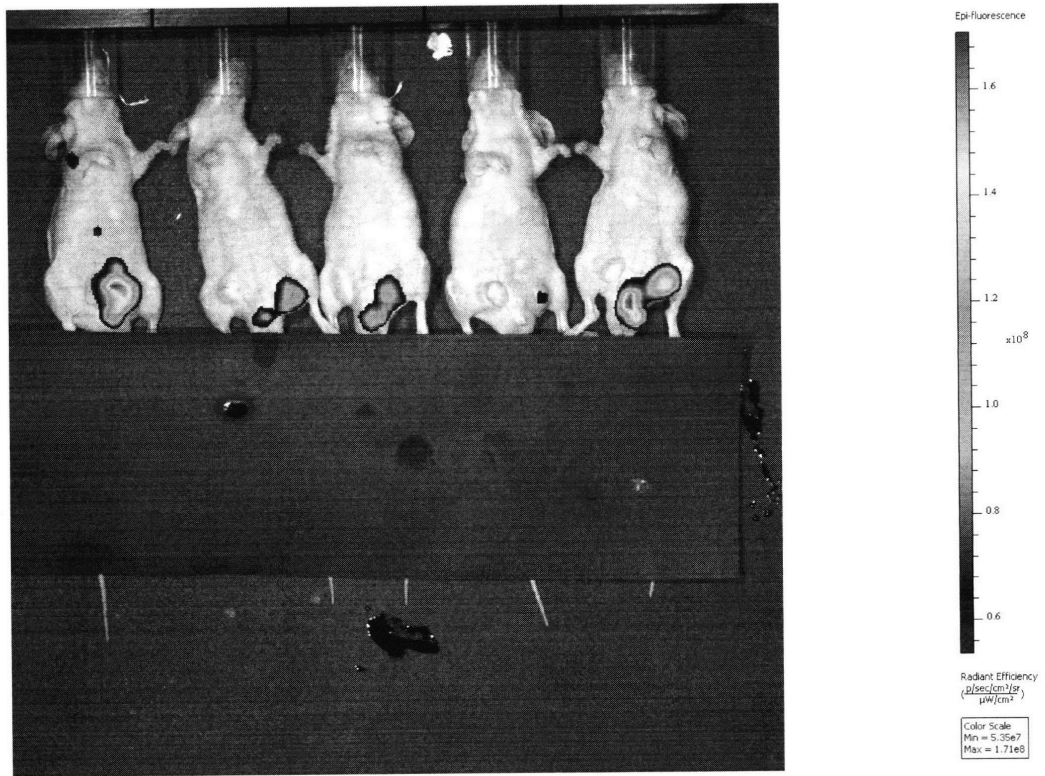
NL: 3.11E5
C74 H78 ClN11 O19
C74 H78 Cl1 N11 O19
pa Chrg 2



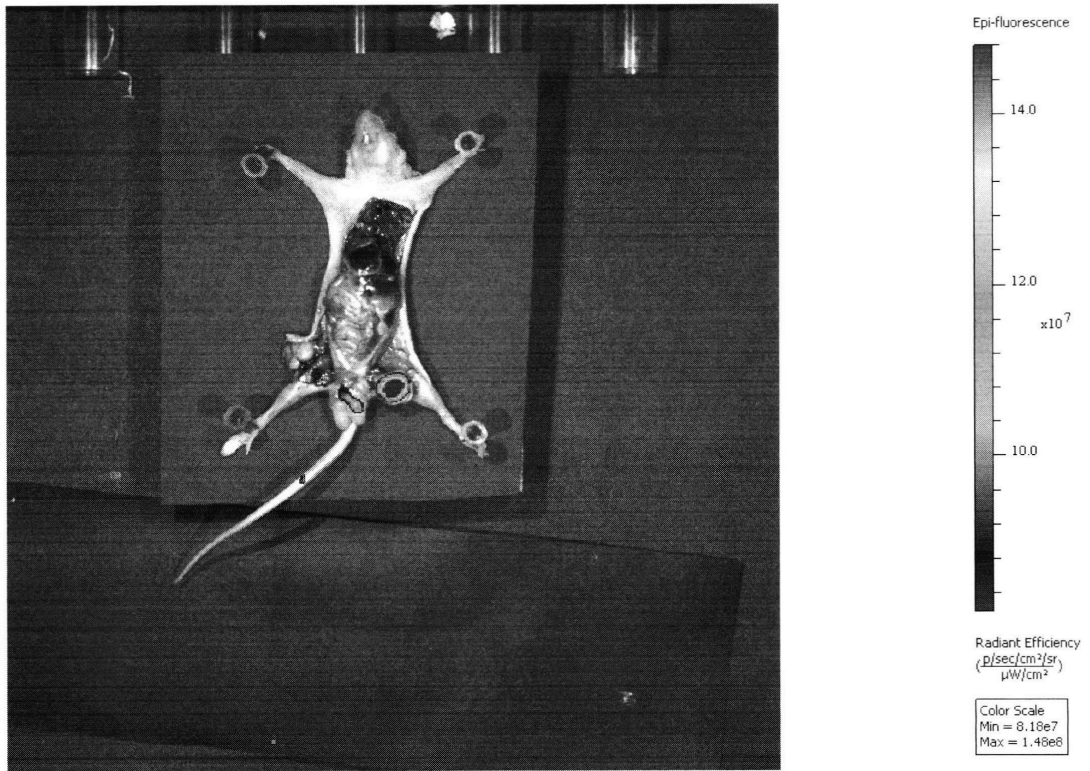
Фиг. 9



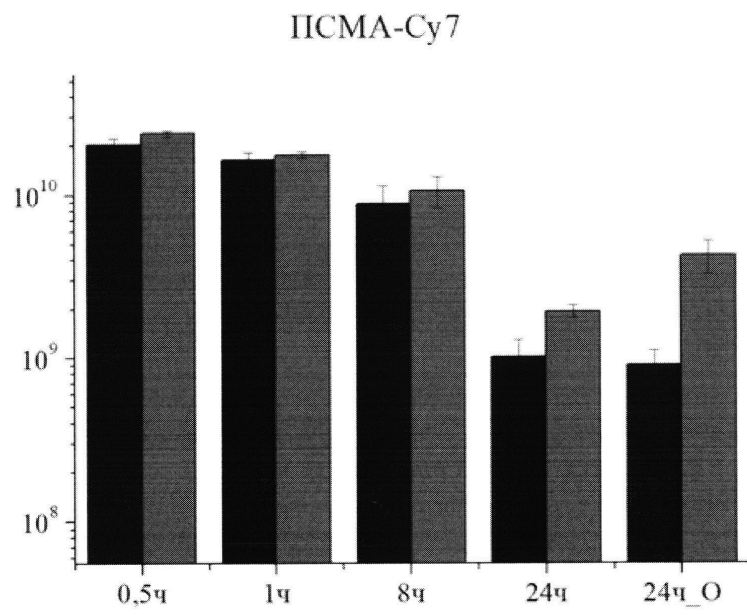
Фиг. 10



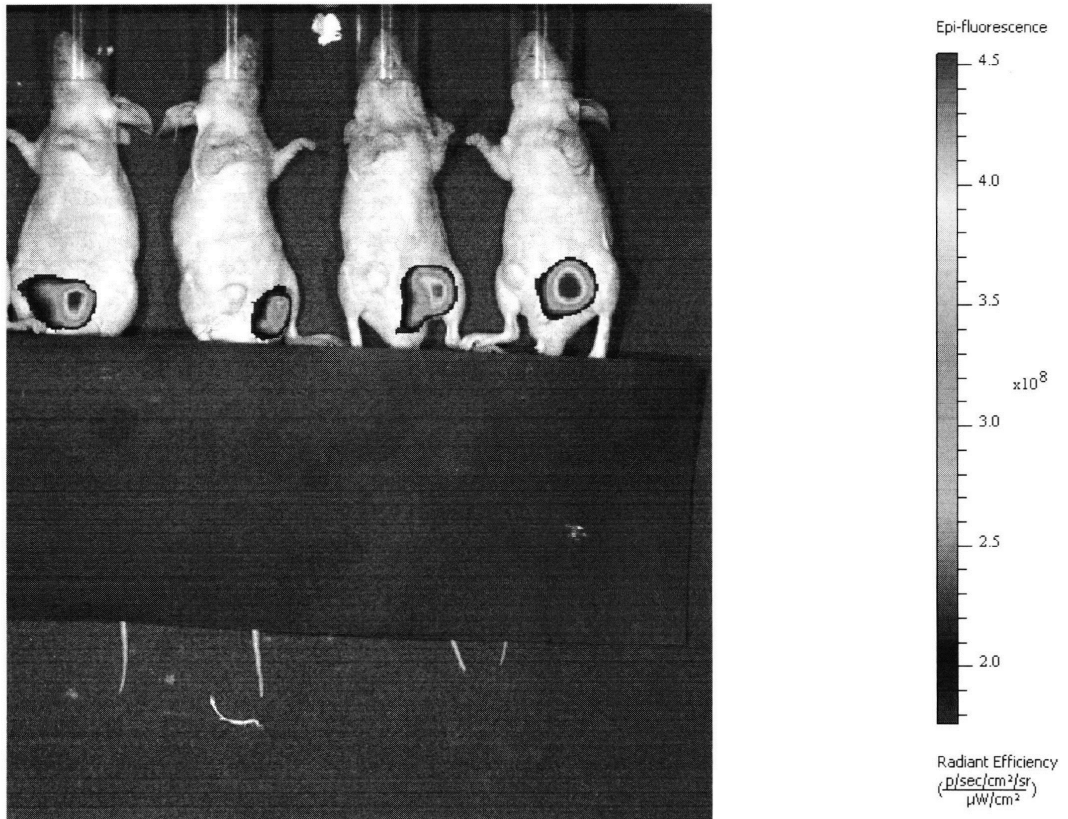
Фиг. 11



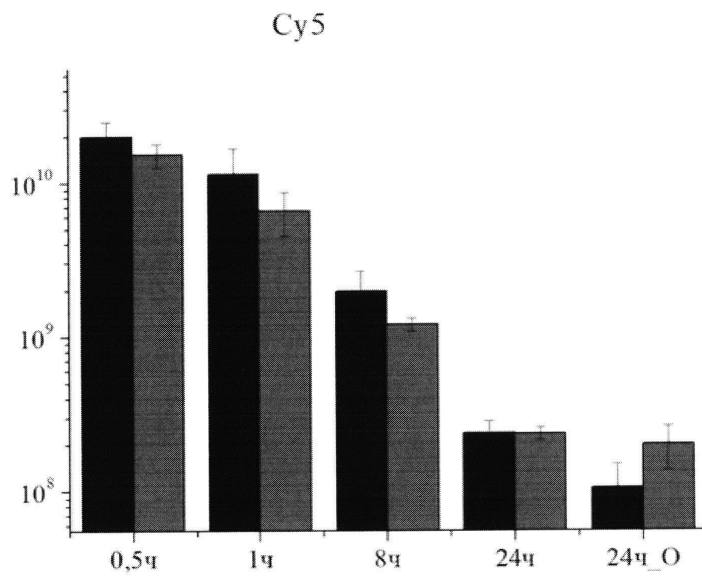
Фиг. 12



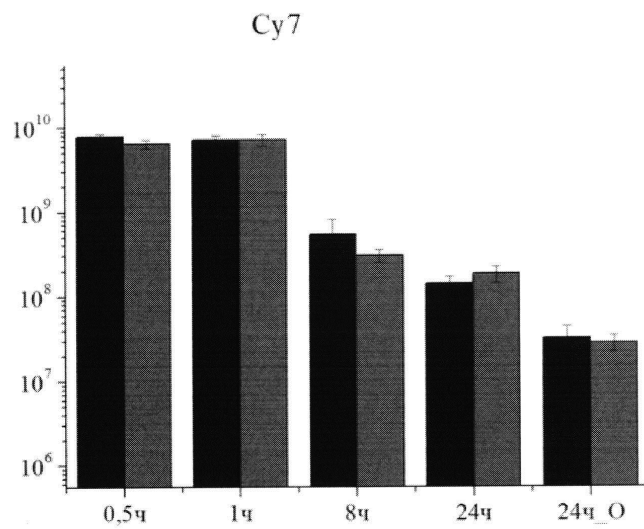
Фиг. 13



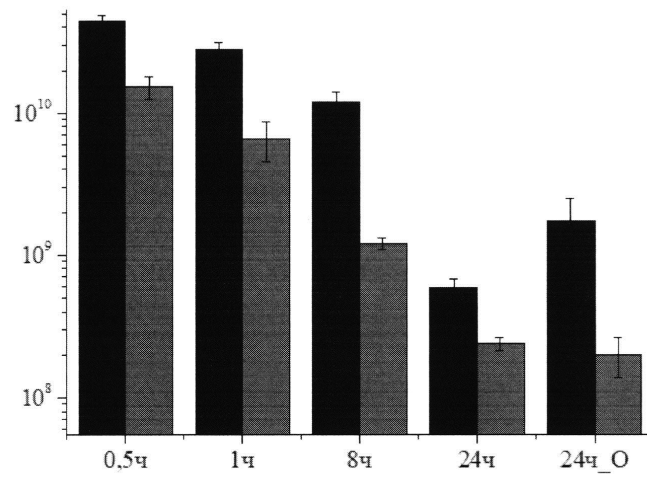
Фиг. 14



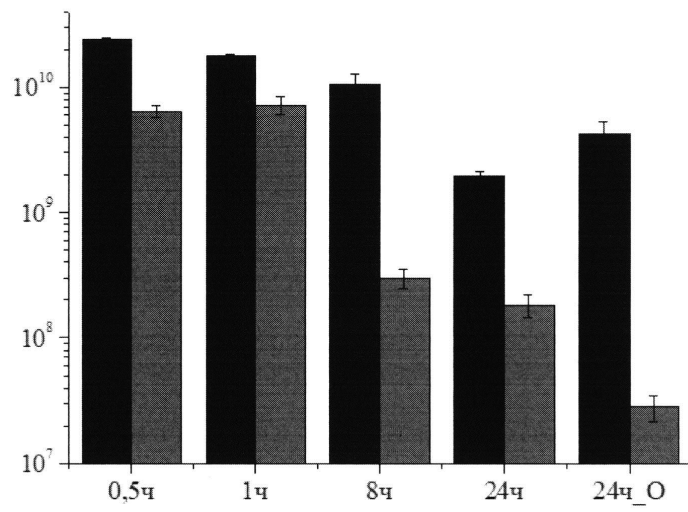
Фиг. 15



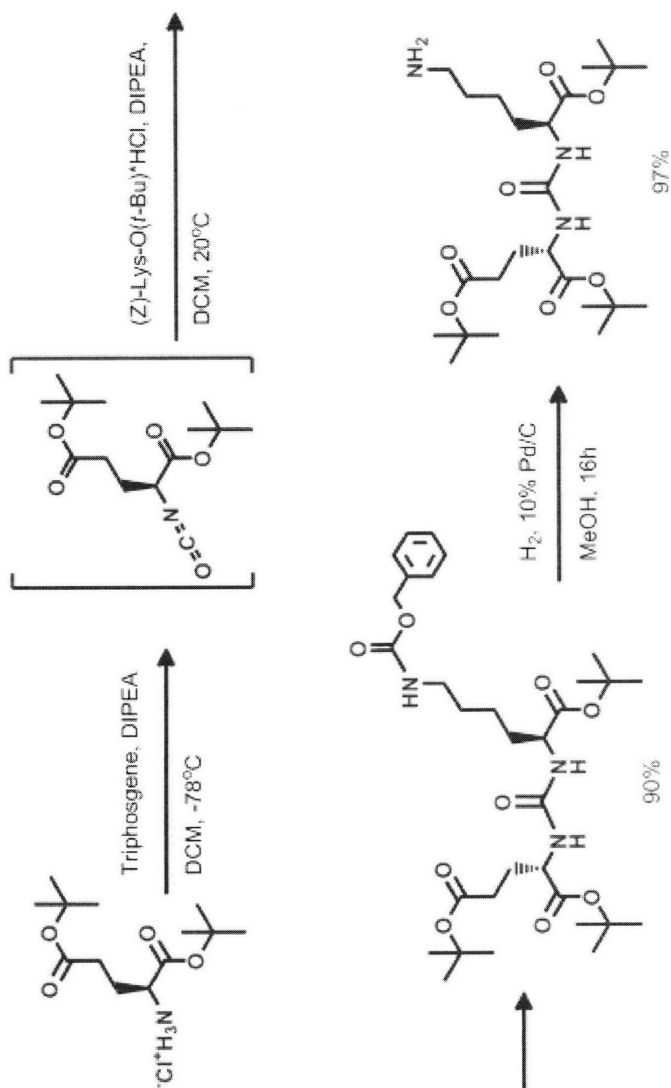
Фиг. 16



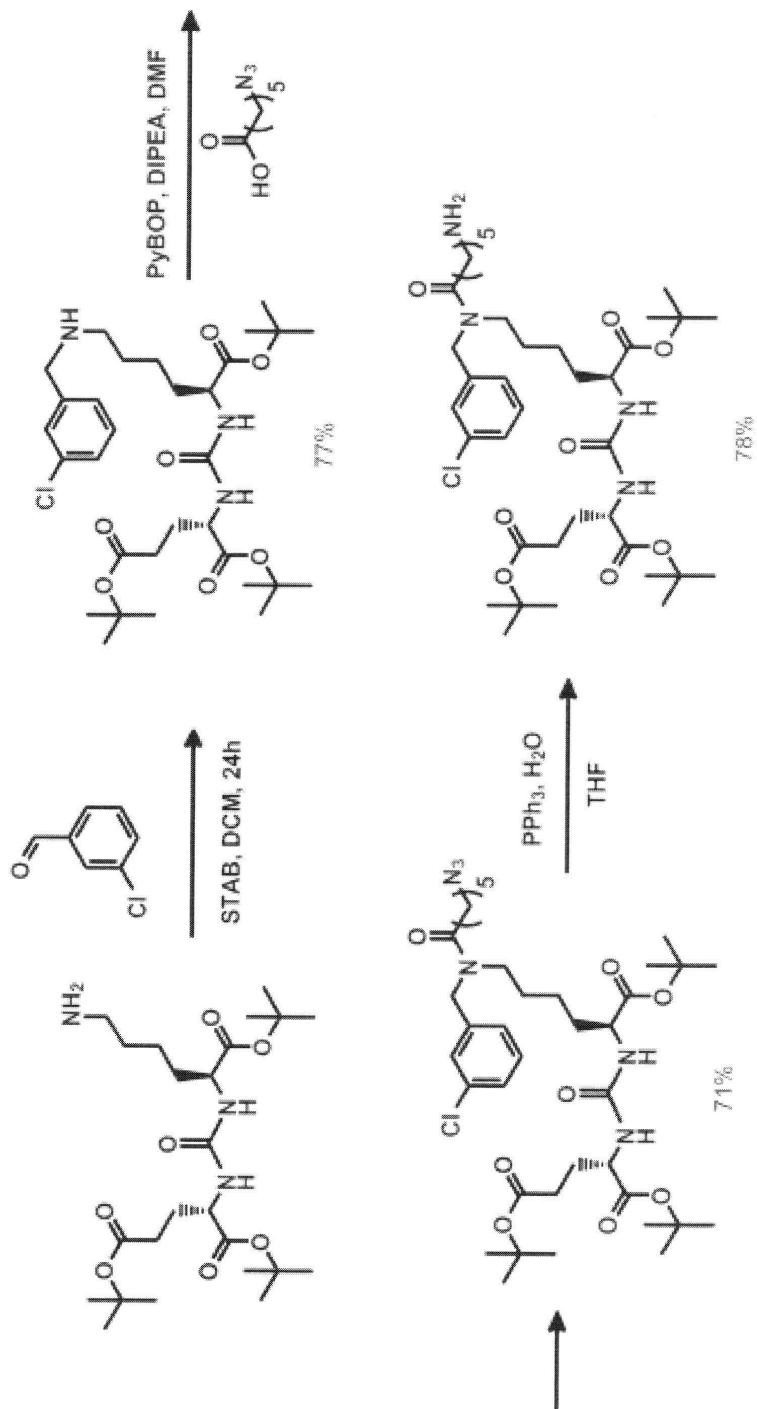
Фиг. 17



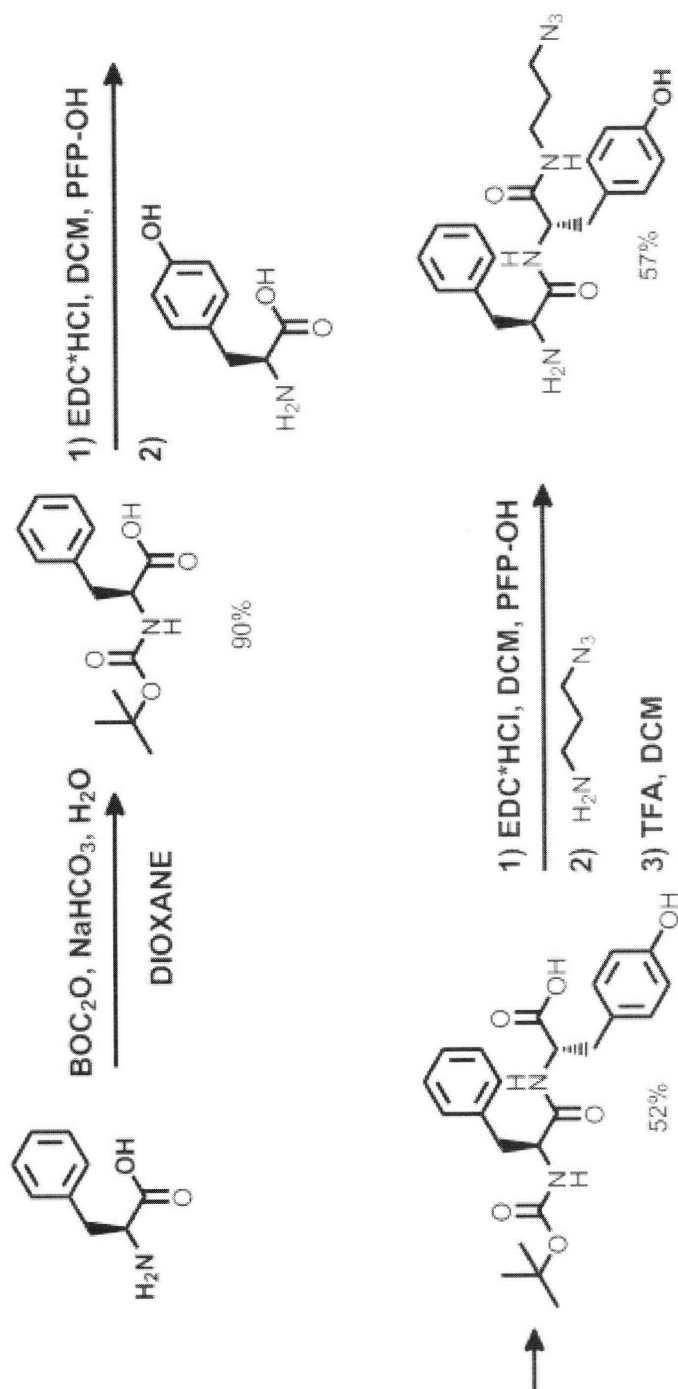
Фиг. 18



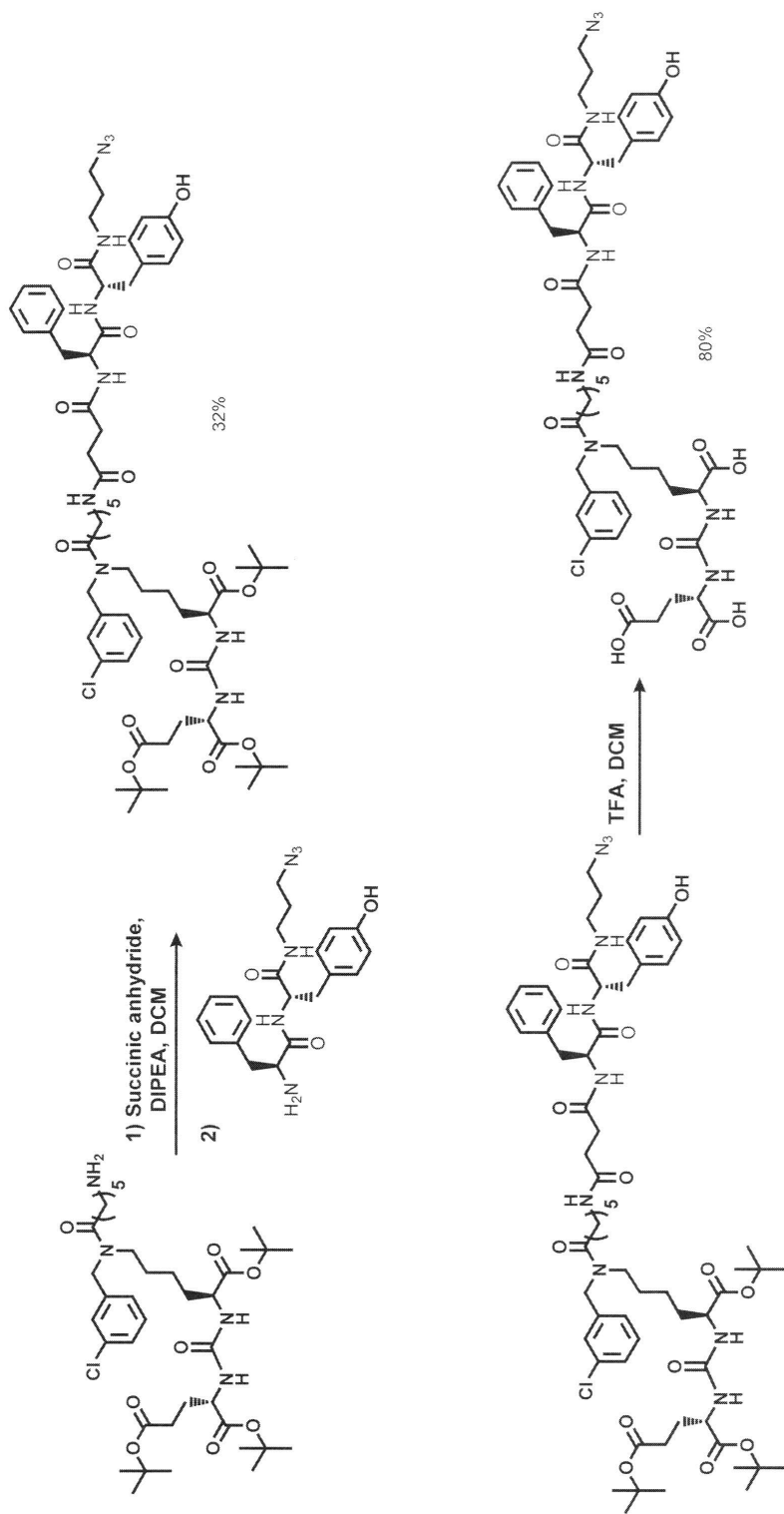
Фиг. 19



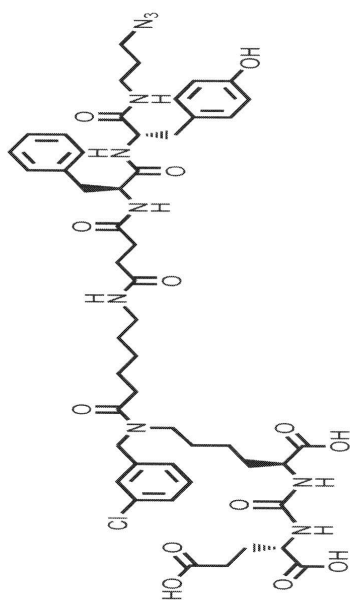
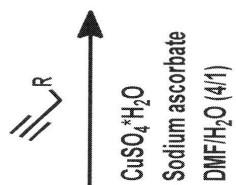
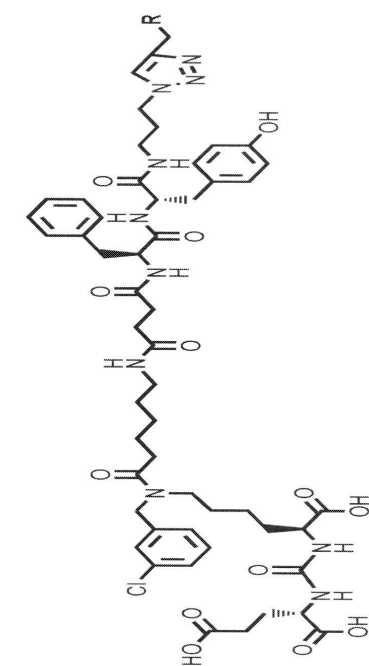
Фиг. 20



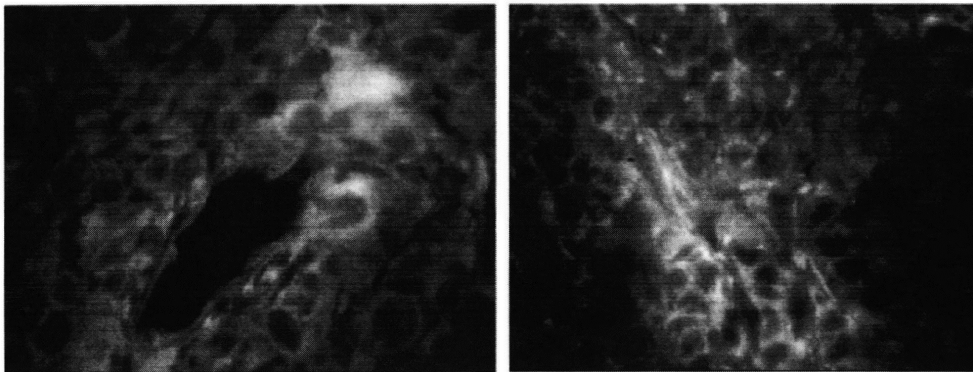
Фиг. 21



Фиг. 22



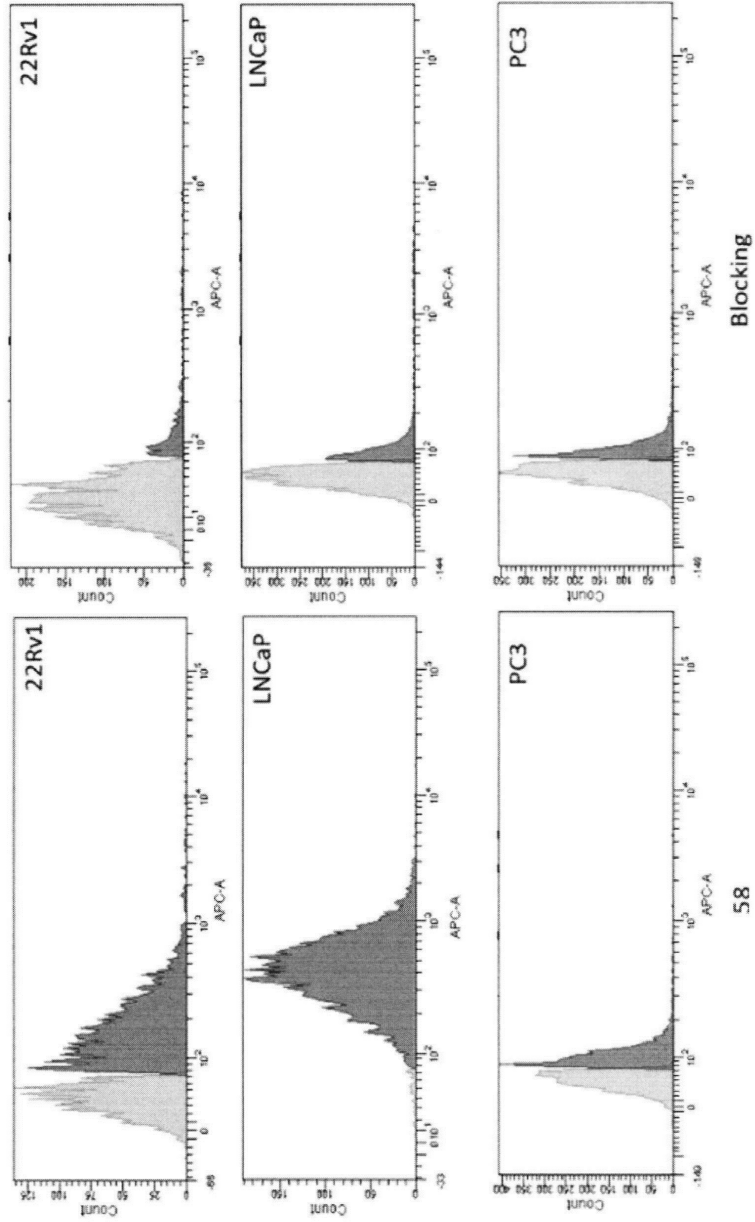
Фиг. 23



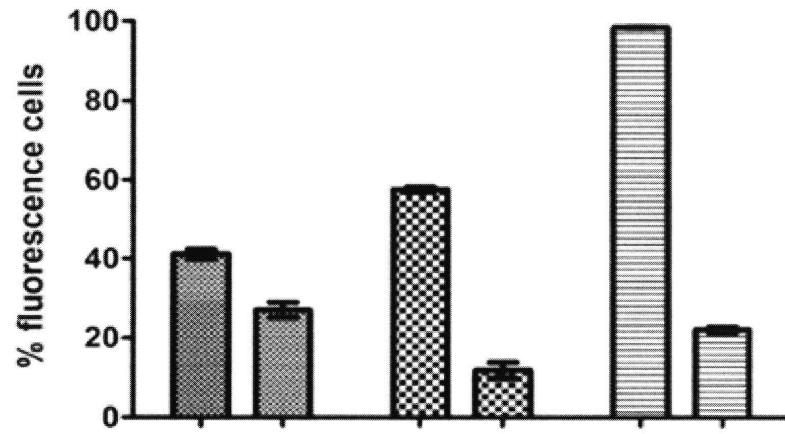
А

Б

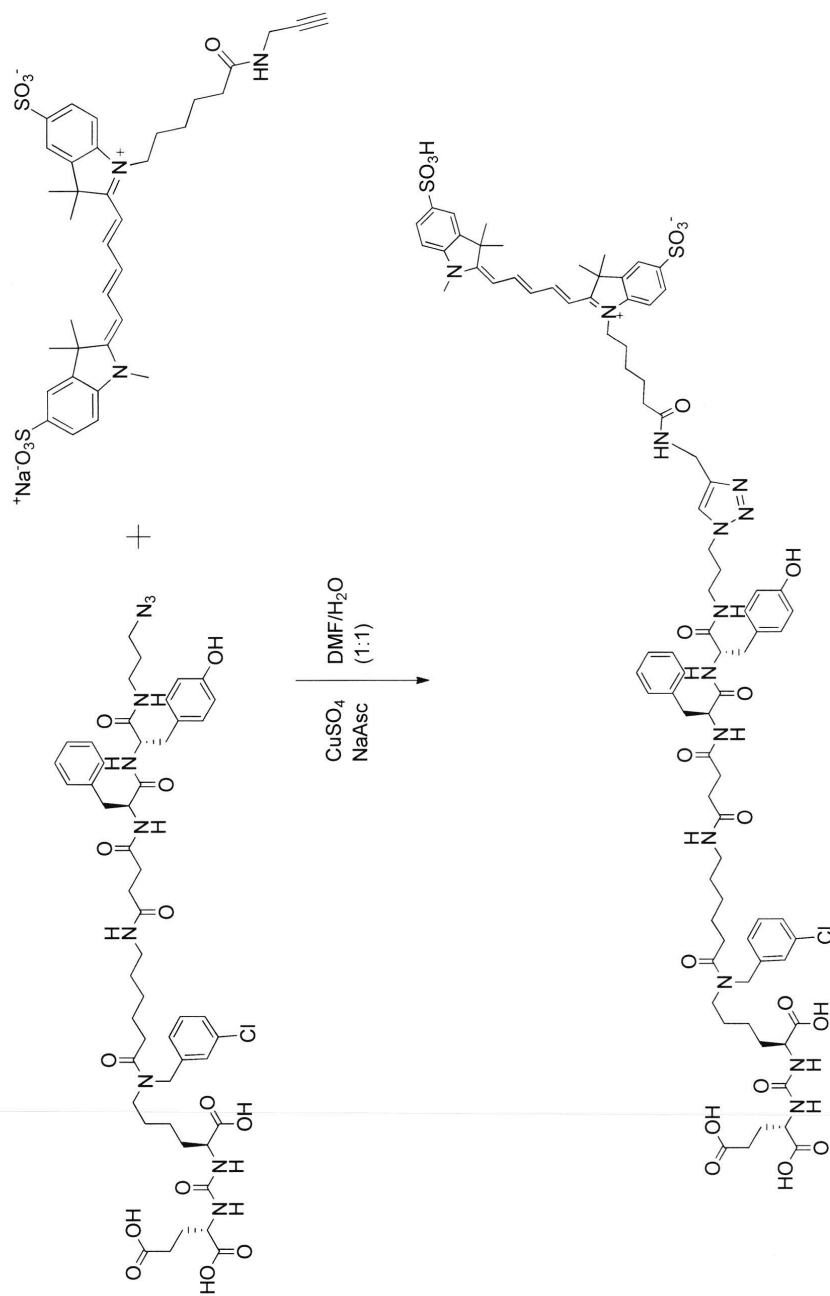
Фиг. 24



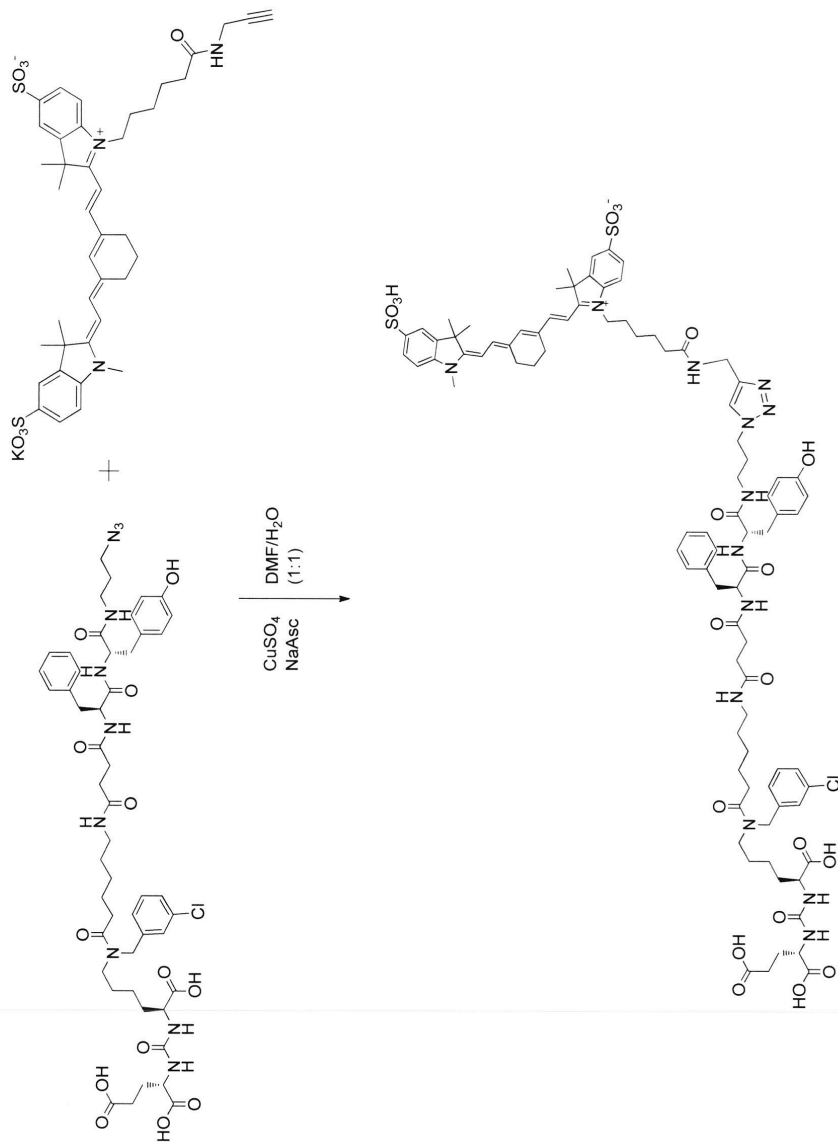
Фиг. 25



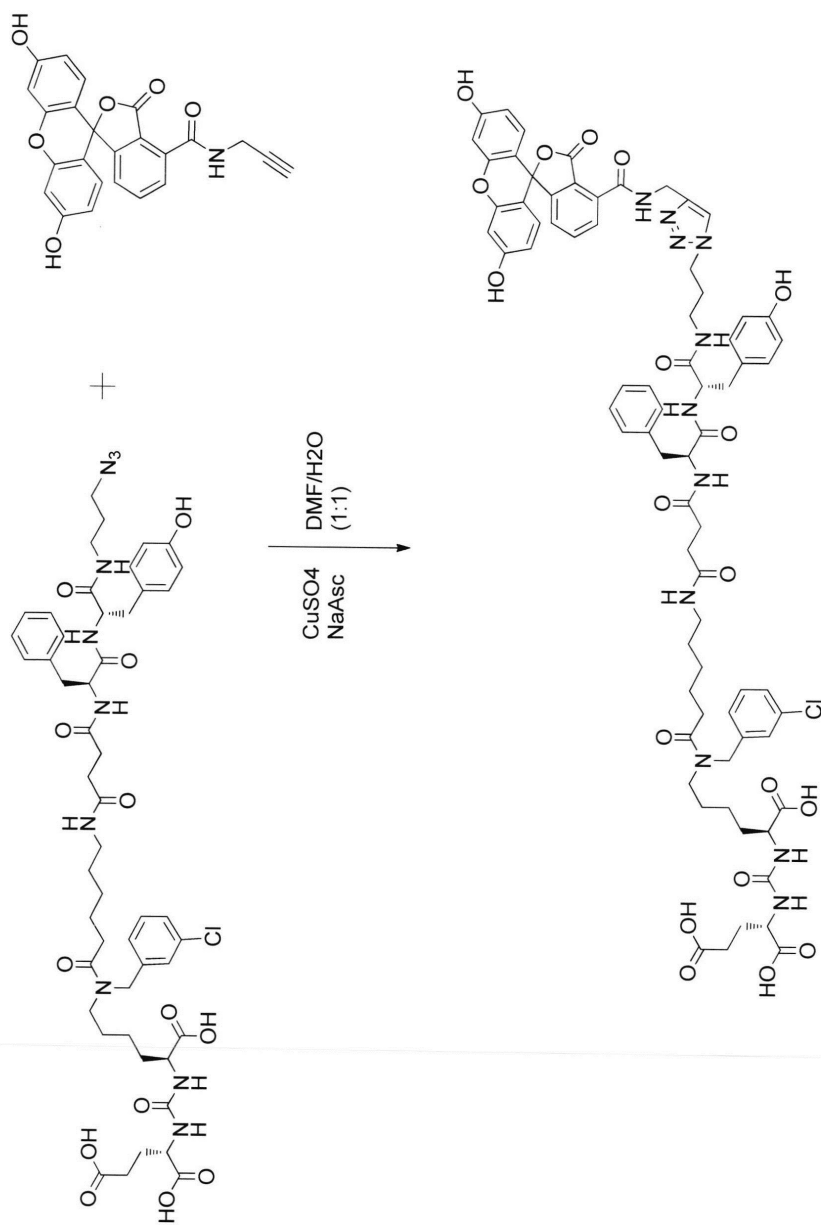
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29