## Информация о родственных заявках

Данная заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США с регистрационным № 60/308721, поданной 30 июля 2001.

## Область техники

Данное изобретение относится к контрастным веществам для диагностической визуализации изображения и, более конкретно, к основанным на пептидах, направленным к мишеням мультимерным контрастным веществам, в которых пептид функционирует в качестве направляющей к мишени группы, и точкой присоединения для одного или нескольких хелатов как на аминоконце, так и карбоксильном конце пептида.

## Предпосылки изобретения

В течение ряда лет в медицинской диагностике использовали способы диагностической визуализации изображения, такие как магнитно-резонансная визуализация (МРВ), рентгеновская визуализация, ядерная визуализация с использованием радиофармацевтических средств, визуализация в ультрафиолетовом-видимом-инфракрасном свете и ультразвуковые способы. Кроме того, использовали контрастные среды, чтобы улучшить или увеличить разрешение изображения или получить конкретную диагностическую информацию.

Чтобы среды были эффективными, они должны интерферировать с длиной волны электромагнитного излучения, используемого в способе визуализации изображения, изменять физические свойства ткани, давая измененный сигнал, или, как в случае радиофармацевтических средств, должны обеспечивать источник излучения сами по себе. МРВ и оптические способы уникальны среди способов визуализации, так как они дают сложные сигналы, которые чувствительны к химической окружающей среде. В то время как сигнал от рентгеновского излучения или радионуклидных агентов остается одним и тем же, независимо от того, находятся ли агенты свободно в плазме, связаны ли с белками или другими мишенями или захвачены внутри костей, некоторые контрастные вещества для МРВ и оптической визуализации будут иметь различные характеристики сигнала в разных физиологических условиях. Важно, чтобы контрастное вещество было достаточно чувствительным и присутствовало в достаточно высокой концентрации, чтобы можно было наблюдать изменения сигнала.

Для усиления и улучшения МРВ-контраста широко используют комплексы гадолиния или других парамагнитных ионов и органических лигандов. Комплексы гадолиния увеличивают контраст за счет увеличения скоростей ядерной магнитной релаксации на протонах, обнаруживаемых в молекулах воды, которые доступны контрастным веществам во время МРВ (Caravan, P., et al., R.B. Chem. Rev. 99, 2293 (1999)). Скорость релаксации на протонах в указанных молекулах воды увеличивается по отношению к протонам в других молекулах воды, которые не доступны контрастному веществу. Указанное изменение в скорости релаксации приводит к улучшенному контрасту изображений. Кроме того, результатом указанного увеличения способности к релаксации в специфичной популяции протонов молекул воды может быть возможность собрать больше видеоинформации за данный период времени. Это, в свою очередь, приводит к улучшению соотношения сигнала к шуму.

Визуализацию также можно осуществлять с использованием света, и в этом случае выбирают оптический краситель, чтобы получить сигнал. В частности, свет в диапазоне 600-1300 нм (от видимого до ближнего инфракрасного) относительно легко проходит через биологические ткани и может быть использован в целях визуализации. Свет, который пропускается или рассеивается, отражается или переизлучается (флюоресценция), регистрируется и создается изображение. При связывании с биологической мишенью могут происходить изменения характеристик поглощения, отражательной способности или флуоресценции красителя, включая увеличение или уменьшение количества пиков поглощения или изменение максимума их длин волн, таким образом, обеспечивая дополнительный контраст в ткани. В некоторых ситуациях, например, при диагностике заболевания вблизи поверхности тела, также можно использовать УФ или видимый свет.

Существует потребность в контрастных веществах, которые могут доставлять достаточные концентрации визуализирующего фрагмента к мишени, чтобы улучшить чувствительность способа визуализации, а также в контрастных веществах, которые имеют достаточное время полужизни in vivo.

## Сущность изобретения

Изобретение основано на пептидах и основанных на пептидах направленных к мишеням мультимерных контрастных веществах для МР-визуализации, оптической и основанной на радионуклидах визуализации, при этом один пептид может функционировать и как направляющая к мишени группа, и как точка присоединения одного или нескольких хелатов как на N-, так и С-конце, либо непосредственно, либо через необязательный промежуточный линкер. Неожиданно, контрастные вещества согласно изобретению сохраняют аффинность связывания с биологическими мишенями, такими как фибрин, и высокую способность к релаксации. Вещества согласно изобретению имеют достаточное время полужизни после введения in vivo, так что можно осуществлять исследования на основе эффективной визуализации.

В одном аспекте настоящее изобретение характеризует очищенные пептиды, которые содержат аминокислотную последовательность P*-Y*-$X_1$*-L* (SEQ ID NO: 1), где P* означает пролин или его неприродное производное; Y* означает тирозин или его неприродное производное; $X_1$* означает G или D

или неприродное производное G или D; L* означает лейцин или его неприродное производное; и где по меньшей мере один из P*, Y*, $X_1$* и L* является неприродным производным соответствующей аминокислоты. $X_1$* может представлять собой G или D, а L* может представлять собой лейцин. В некоторых вариантах P* является пролином или 4-гидроксипролином и Y* является тирозином или неприродным производным тирозина, замещенным в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$. Соединения согласно изобретению могут содержать такие пептиды, связанные с тромболитическим агентом.

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует очищенные пептиды, которые содержат аминокислотную последовательность $X_1$-$X_2$-C-P*-Y*-$X_3$-L-C-$X_4$-$X_5$-$X_6$ (SEQ ID NO: 2), где P* означает пролин или его неприродное производное; Y* означает тирозин или его неприродное производное; $X_1$ выбран из группы, состоящей из W, Y, F, S, Bip, Hx, Dpr, Cy, Gu, Ad, Hfe, 3-Pal, 4-Pal, DopaMe2, nTyr, dW, dF, F(3/4*) и Y(3*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CH_3$, $CF_3$, $NH_2$, $CH_2NH_2$, CN, F, Cl, Br, I, Et и OMe, и где Y(3*) представляет собой тирозин, замещенный в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$; $X_2$ выбран из группы, состоящей из E, H, dE, S, H(Bzl), 2-Pal, Dpr и Th; $X_3$ выбран из группы, состоящей из G и D; $X_4$ выбран из группы, состоящей из H, F, Y и W; $X_5$ выбран из группы, состоящей из I, L, V, N, Bpa, Bal, Hfe, Nle, Tle, Nval, Phg, Cha, Taz, Fua, Th, 4-Pal и F(3/4*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CF_3$, Et, iPr и OMe; $X_6$ выбран из группы, состоящей из N, Q, I, L и V, или $X_6$ отсутствует; и где по меньшей мере один из $X_1$, $X_2$, $X_5$, P* и Y* является неприродным производным аминокислоты. Например, P* может представлять собой пролин или 4-гидроксипролин, а Y* может быть тирозином или неприродным производным тирозина, замещенным в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$. Очищенные пептиды могут обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях и могут обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином. В некоторых вариантах пептиды содержат дисульфидную связь. Соединения согласно изобретению могут включать такие пептиды, связанные с тромболитическим агентом.

Настоящее изобретение также характеризует очищенные пептиды, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

**W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:4), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:5), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:6), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:7), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:8), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:9), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:10), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:11), F(4-OMe)-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L (SEQ ID NO:12), Y-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:13), W-dE-C-P-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:14) , W-dE-C-P(4-OH)-Y-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:15), и F-H-C-P-(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L**

(SEQ ID NO: 16)

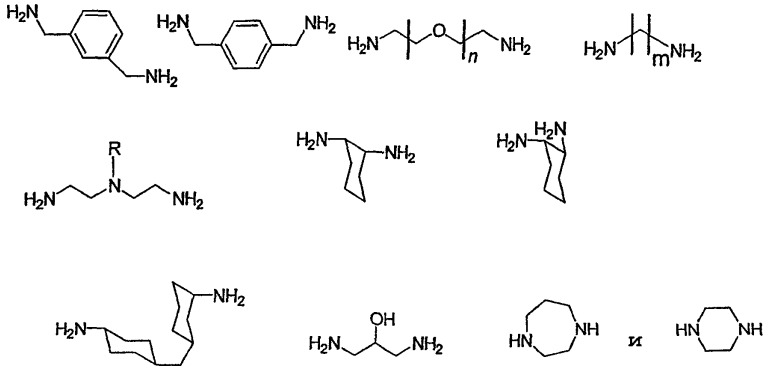
Пептиды могут обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях, и в некоторых вариантах пептиды содержат дисульфидную связь. Пептиды могут обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином. Соединения согласно изобретению могут включать такие пептиды, связанные с тромболитическим агентом.

В некоторых вариантах P* является пролином; Y* является тирозином; $X_1$ выбран из группы, состоящей из W, Y, F, S, Bip, Hx, Dpr, Cy, Gu, Ad, Hfe, 3-Pal, 4-Pal, DopaMe2, nTyr, dW, dF, F(3/4*) и Y(3*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CH_3$, $CF_3$, $NH_2$, $CH_2NH_2$, CN, F, Cl, Br, I, Et и OMe, и где Y(3*) представляет собой тирозин, замещенный в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$; $X_2$ выбран из группы, состоящей из dE, H(Bzl), 2-Pal, Dpr и Th; $X_3$ выбран из группы, состоящей из G и D; $X_4$ выбран из группы, состоящей из H, F, Y и W; $X_5$ выбран из группы, состоящей из I, L, V, N, Bpa, Bal, Hfe, Nle, Tle, Nval, Phg, Cha, Taz, Fua, Th, 4-Pal и F(3/4*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CF_3$, Et, iPr и OMe; где по меньшей мере один из $X_1$, $X_2$ или $X_5$ является неприродным производным аминокислоты; и $X_6$ выбран из группы, состоящей из N, Q, I, L и V, или $X_6$ отсутствует. Такие пептиды могут обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях, и в некоторых вариантах пептиды содержат дисульфидную связь. Пептиды могут обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином.

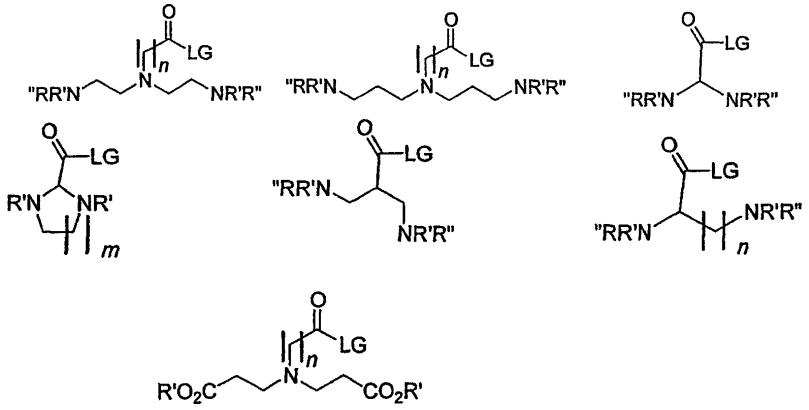
В других вариантах настоящее изобретение характеризует очищенные пептиды, которые содержат аминокислотную последовательность C-P*-Y*-$X_1$-L-C (SEQ ID NO: 3), где $X_1$ означает G или D, P* означает пролин или его неприродное производное 4-гидроксипролин и Y* означает тирозин или неприродное производное тирозина, замещенное в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$; при условии что по меньшей мере один из P* или Y* является неприродным производным соответствующей аминокислоты. Очищенные пептиды могут обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях и могут обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином. В некоторых вариантах пептиды содержат дисульфидную связь. Соединения согласно изобретению могут включать такие пептиды, связанные с тромболитическим агентом.

Настоящее изобретение также характеризует очищенные пептиды, которые содержат аминокислотную последовательность C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$ (SEQ ID NO: 17), где $X_{10}$ выбран из группы, состоящей из n(децил)G, n(4-PhBu)G, MeL, Bpa, Bip, Me-Bip, F(4*), F(3-Me), F(3,4-дифтор), Amh, Hfe, Y(3,5-дийод), Pff, 1Nal, d1Nal и MeL, где F(4*) представляет собой фенилаланин, замещенный в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из Et, $CF_3$, I и iPr. Очищенные пептиды могут содержать аминокислотную последовательность C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$-$X_{11}$ (SEQ ID NO: 18), где $X_{11}$ выбран из группы, состоящей из D, dD, βD, Inp, Nip, Me-D, dC, Cop и Cmp. Например, пептид может иметь следующие аминокислотные последовательности: L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(децил)G-dD (SEQ ID NO: 19), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(децил)G-D (SEQ ID NO: 20), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-D (SEQ ID NO: 21), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-dD (SEQ ID NO: 22), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Inp (SEQ ID NO: 23), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Cmp (SEQ ID NO: 24) или L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeBip-D (SEQ ID NO: 25). Очищенные пептиды могут обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях и могут обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином. В некоторых вариантах пептиды содержат дисульфидную связь. Соединения согласно изобретению могут включать такие пептиды, связанные с тромболитическим агентом.

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует способ получения вещества для МР-визуализации. Способ включает взаимодействие пептида, имеющего N-концевую функциональную аминогруппу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего как С-концевую функциональную аминогруппу, так и N-концевую функциональную аминогруппу; ковалентное связывание остатка линкера с С-концевой функциональной аминогруппой и с М-концевой функциональной аминогруппой с образованием предшественника вещества для МР-визуализации; и превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации. Остаток линкерной субъединицы может быть выбран из группы, состоящей из

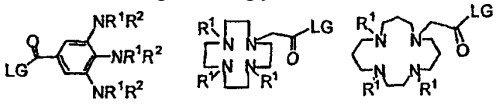


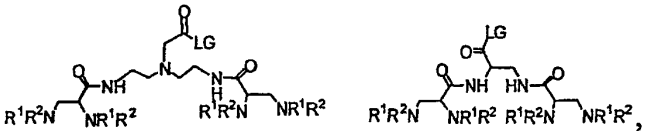
где n является целым числом от 1 до 4; m является целым числом, выбранным из 1-12; и R представляет собой алифатическую или ароматическую группу. Остаток линкера может быть выбран из группы, состоящей из



где m является целым числом от 1 до 4; n является целым числом от 0 до 4; LG означает удаляемую группу и R' и R" независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы.

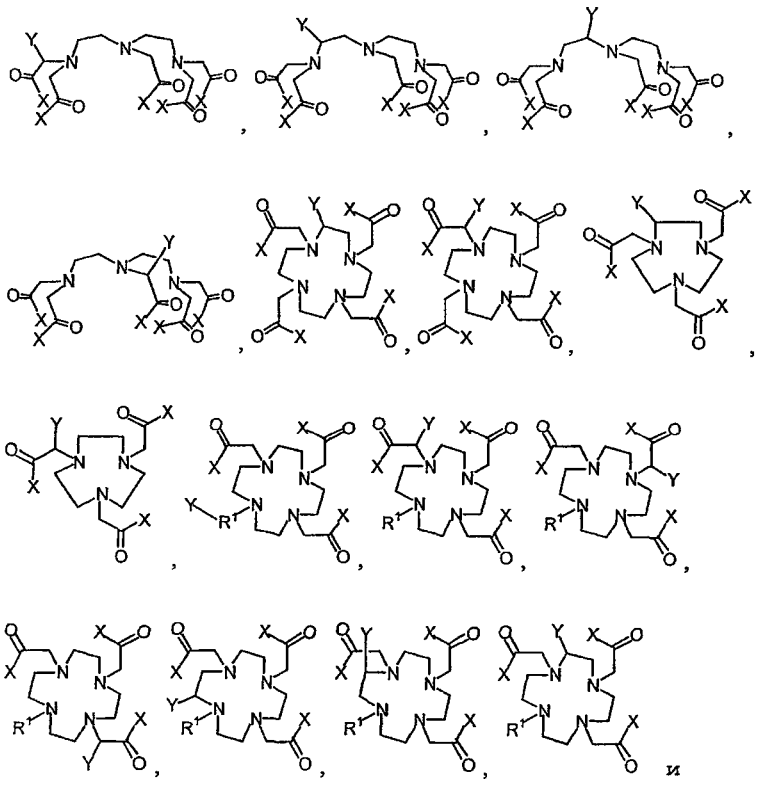
Остаток линкера также может быть выбран из группы, состоящей из

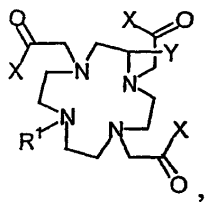




где LG означает удаляемую группу и $R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы. LG может быть выбрана из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида. Активированный сложный эфир может быть выбран из группы, состоящей из пентафторфенола (Pfp), N-гидроксисукцинимида (NHS), натриевой соли N-гидроксисульфосукцинимида (NHSS), 2-тиоксотиазолидин-1-ила и гидроксибензотриазола (OBT). Галогенид может быть выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I. Химическая защитная группа может быть выбрана из группы, состоящей из Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутила, бензила и аллила.

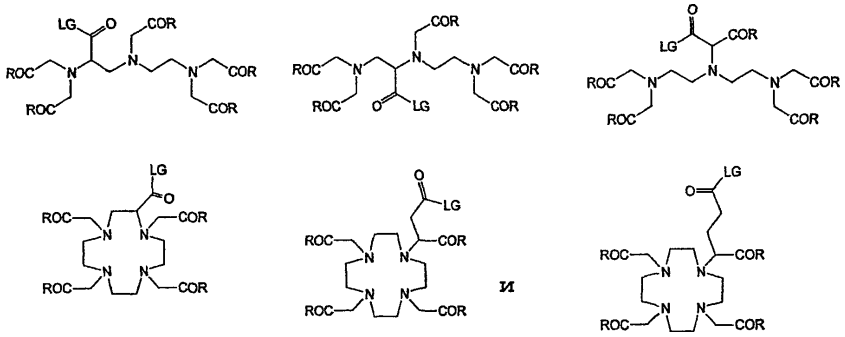
Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации может заключаться во взаимодействии предшественника визуализирующего вещества с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки; в превращении множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплексы с парамагнитными ионами металлов; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением вещества для МР-визуализации. Остаток предшественника хелата может быть выбран из группы, состоящей из





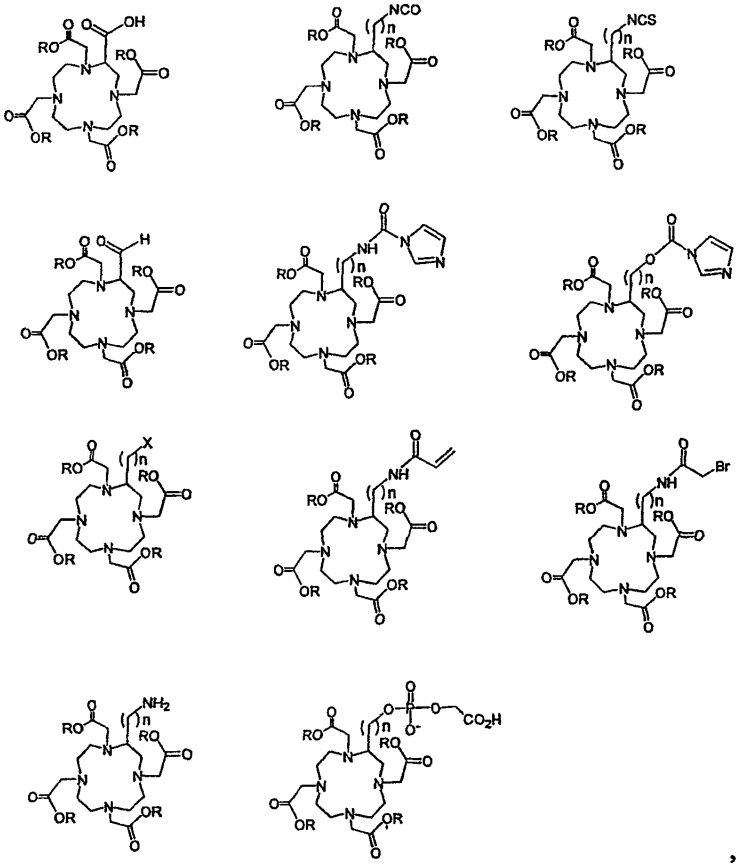
где Y означает синтетический остаток, способный образовывать ковалентную связь с присоединяемым остатком линкера, и где каждый X независимо представляет собой $O^-$ или предшественник $O^-$, так что X в случае превращения в $O^-$ способен образовывать карбоксилатный остаток с близлежащим к нему карбонилом и $R^1$ является незаряженным химическим остатком, алифатической, алкильной группой или циклоалкильной группой, или их незаряженными замещенными вариантами.

Синтетический остаток может быть выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, активированного сложного эфира, галогенангидриды кислоты, ангидрида, алкилгалогенида, изоцианата и изотиоцианата, и где предшественник $O^-$ выбран из группы, состоящей из -OH, -OMe, OEt, OtBu, O-бензила и O-аллила. Остаток предшественник хелата также может быть выбран из группы, состоящей из



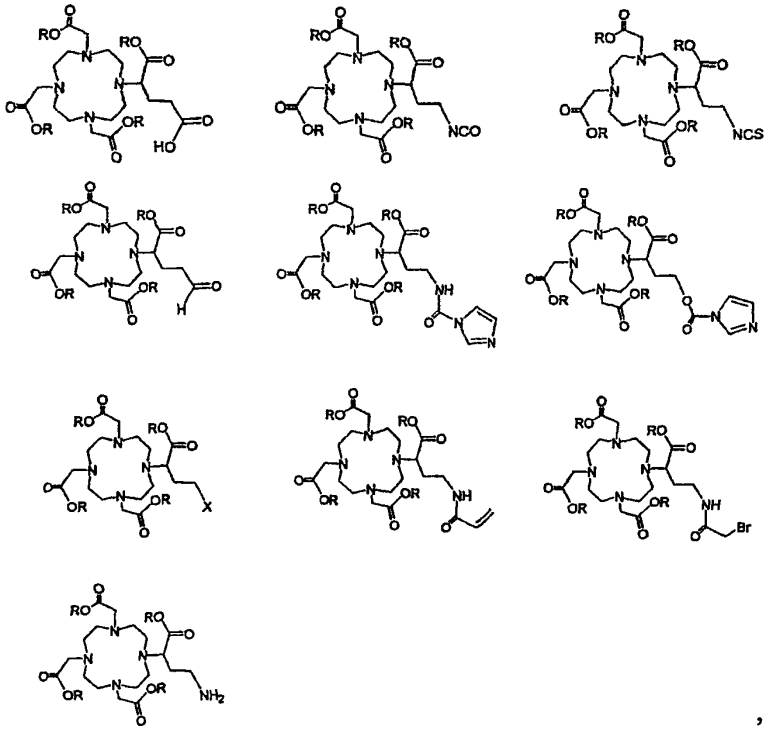
где LG является удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенангидрида и ангидрида, и где каждый R независимо представляет собой $O^-$ или предшественник $O^-$, выбранный из группы, состоящей из OH, -OMe, -O-Et, O-tBu, O-бензила и O-аллила, так что R в случае превращения в $O^-$ способен образовывать карбоксилатный остаток с близлежащим к нему карбонилом.

Остаток предшественника хелата может быть выбран из группы, состоящей из



где n является целым числом от 1 до 4; R выбран из группы, состоящей из отрицательного заряда и предшественника отрицательного заряда, способного превращаться в отрицательный заряд; и X является химической удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -Cl, -Br, -I, -MsO, -TsO и -TfO.

Остаток предшественника хелата может быть выбран из группы, состоящей из

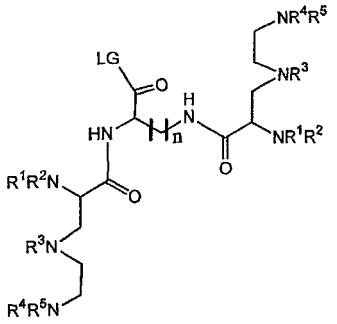


,

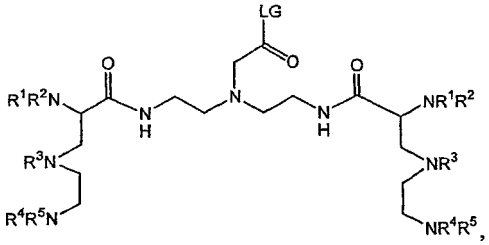
где R выбран из группы, состоящей из отрицательно заряда и предшественника отрицательного заряда, способного превращаться в отрицательный заряд; и X является химической удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -Cl, -Br, -I, -MsO, -TsO и -TfO. Предшественник отрицательного заряда выбран из группы, состоящей из -H, -Me, -Et, -t-Bu, -бензила и -аллила.

В некоторых вариантах остаток линкера может быть ковалентно конъюгирован с остатком предшественника хелата, при этом ковалентный конъюгат содержит множество предшественников карбоксилатных групп, а предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки. Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации может заключаться в трансформации множества предшественников карбоксилатных групп ковалентного конъюгата в карбоксилатные остатки, причем карбоксилатные остатки способны образовывать комплексы с парамагнитными ионами металлов; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением в результате вещества для МР-визуализации. Парамагнитный ион металла может быть выбран из группы, состоящей из Gd(III), Fe(III), Mn(II и III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III и IV), Ho(III), Er(III), Pr(III), Eu(II) и Eu(III). Особенно применимым парамагнитным ионом является Gd(III).

Ковалентный конъюгат может быть выбран из группы, состоящей из

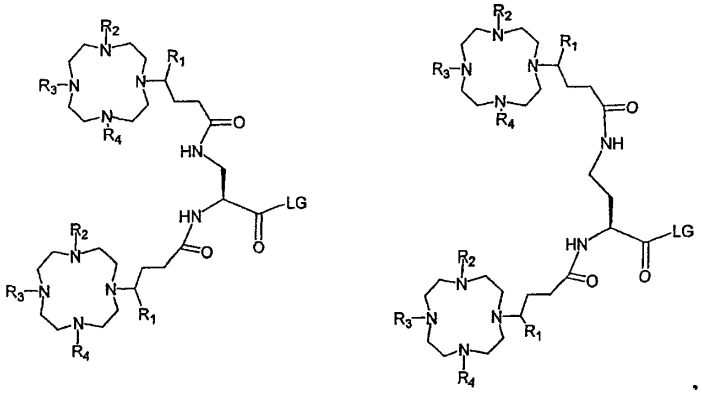


и



где n является целым числом от 1 до 4; LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетоксиостатка.

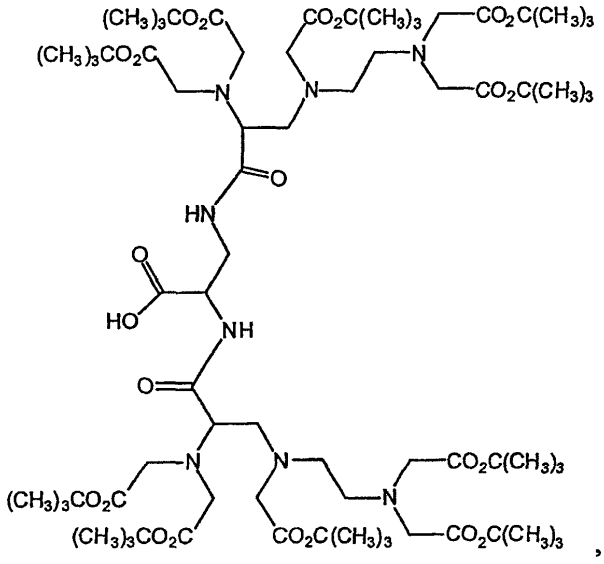
Ковалентный конъюгат также может быть выбран из группы, состоящей из



где LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и $R^1$, $R^2$, $R^3$ и $R^4$ выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетоксиостатка.

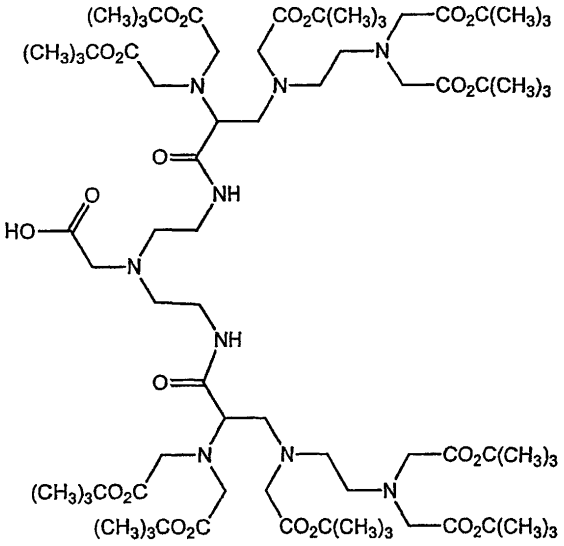
Ковалентный конъюгат может быть выбран из группы, состоящей из

синтона 1

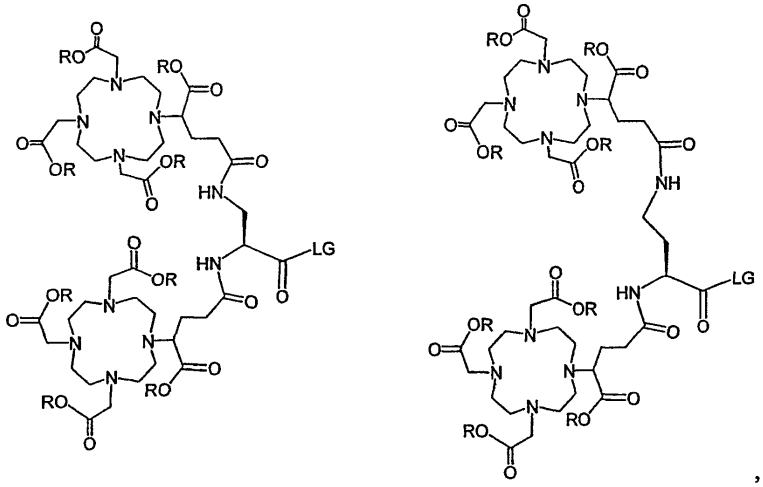


, и

синтона 2

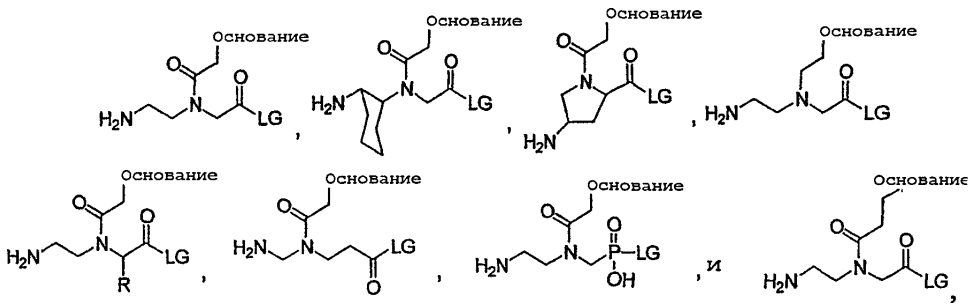


Ковалентный конъюгат также может быть выбран из группы, состоящей из

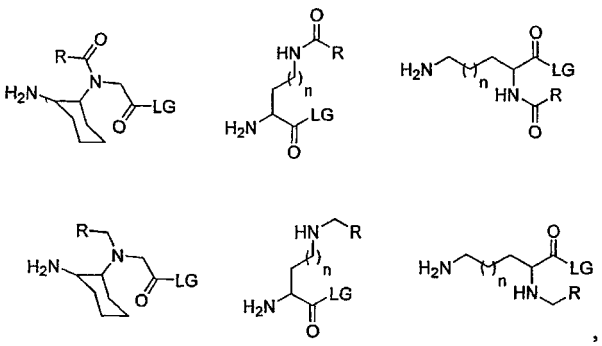


где R означает tBu-группу, LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида.

Способы согласно изобретению, кроме того, могут включать перед ковалентным связыванием остатка линкера с C- и N-концевыми функциональными аминогруппами взаимодействие линкерной субъединицы с N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием дериватизированной N-концевой функциональной аминогруппы пептида. Линкерная субъединица может быть выбрана из группы, состоящей из

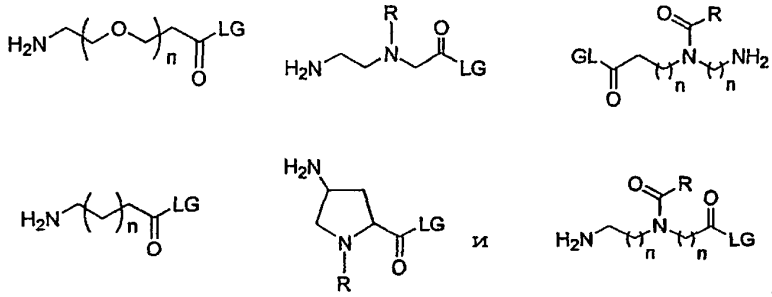


где основание выбрано из группы, состоящей из аденозина, гуанозина, тимина и цитозина; LG означает удаляемую группу, выбранную из группы состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и R является алифатическим или ароматическим остатком. Линкерная субъединица также может быть выбрана из группы, состоящей из



где n независимо является целым числом от 0 до 3, R является алифатической или ароматической группой и LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида.

Линкерная субъединица также может быть выбрана из группы, состоящей из



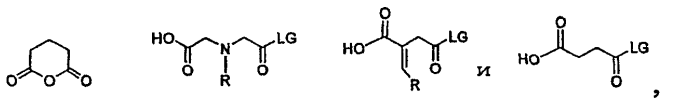
где n независимо равно 1 или 2, R является алифатической или ароматической группой и LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида.

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует способ получения вещества для МР-визуализации. Способ включает ковалентное связывание аминокислотного остатка с остатком линкерной субъединицы с образованием С-конца пептида, при этом остаток линкерной субъединицы ковалентно связан со смолой; синтез пептида на смоле от ковалентно связанного С-конца к N-концевому остатку пептида, при этом N-концевой остаток содержит N-концевую функциональную аминогруппу; отщепление пептида от смолы с получением пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу; ковалентное связывание остатка линкера с С-концевой функциональной аминогруппой и N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием предшественника вещества для МР-визуализации, и превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации. Способ, кроме того, может включать до отщепления пептида от смолы ковалентное связывание остатка линкерной субъединицы с N-концевой функциональной аминогруппой, чтобы получить дериватизированную N-концевую функциональную аминогруппу. Остаток линкера можно ковалентно конъюгировать с остатком предшественника хелата, при этом ковалентный конъюгат содержит множество предшественников карбоксилатных групп, а предшественники карбоксилатных групп поддаются превращению в карбоксилатные остатки.

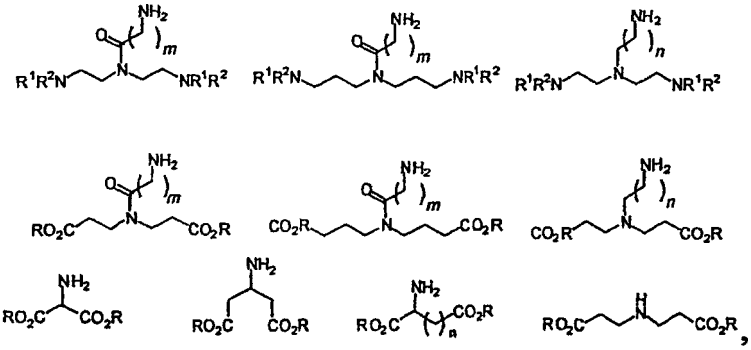
Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации может заключаться во взаимодействии предшественника вещества для МР-визуализации с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп поддаются превращению в карбоксилатные остатки; в превращении множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением вещества для МР-визуализации.

Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации также может заключаться в превращении множества предшественников карбоксилатных групп ковалентного конъюгата в карбоксилатные остатки, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков, приводящем в результате к получению вещества для МР-визуализации. Парамагнитный ион металла может быть выбран из группы, состоящей из Gd(III), Fe(III), Mn(II и III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III и IV), Ho(III), Er(III), Pr(III), Eu(II) и Eu(III). Особенно применимым парамагнитным ионом металла является Gd(III).

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует способ получения вещества для МР-визуализации, который включает взаимодействие пептида, имеющего С-концевую функциональную карбоксилатную группу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего как С-концевую функциональную карбоксилатную группу, так и N-концевую функциональную карбоксилатную группу; ковалентное связывание остатка линкера как с N-концевой, так и С-концевой карбоксилатными функциональными группами модифицированного пептида с образованием предшественника вещества для МР-визуализации; и превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации. Остаток линкерной субъединицы может быть выбран из группы, состоящей из

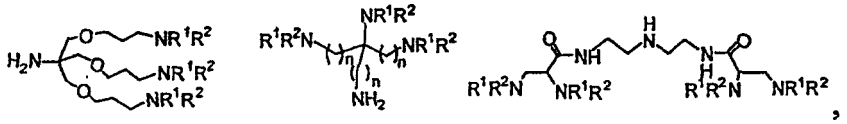


где LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и R является ароматической или алифатической группой. Остаток линкера также может быть выбран из группы, состоящей из



где m является целым числом от 1 до 4; n является целым числом от 0 до 4; R независимо выбран из группы, состоящей из -H, -Me, -Et, -Bz и -tBu; и $R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из водорода и химической защитной группы.

Остаток линкера может быть выбран из группы, состоящей из

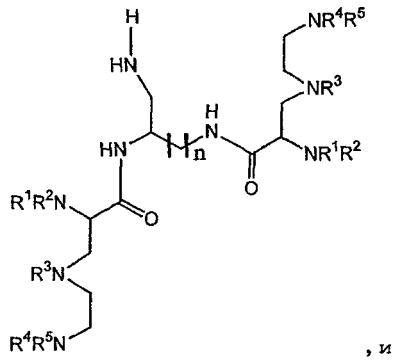


где $R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы, при этом химическая защитная группа выбрана из группы, состоящей из Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутила, бензила и аллила.

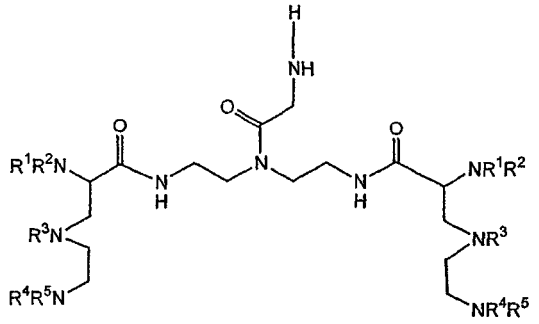
Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации также может заключаться во взаимодействии предшественника визуализирующего вещества с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации и остатком предшественника хелата, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп поддаются превращению в карбоксилатные остатки; в превращении множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением вещества для МР-визуализации. Остаток линкера может быть ковалентно конъюгирован с остатком предшественника хелата, при этом ковалентный конъюгат содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп поддаются превращению в карбоксилатные остатки.

Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации также может заключаться в превращении множества предшественников карбоксилатных групп ковалентного конъюгата в карбоксилатные остатки, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и в образовании комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков, чтобы получить вещество для МР-визуализации.

Ковалентный конъюгат может быть выбран из группы, состоящей из



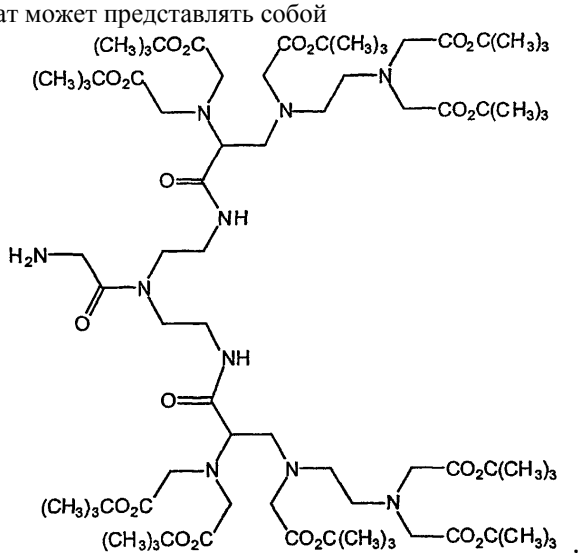
, и



,

где n является целым числом от 1 до 4; и $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетокси-остатка.

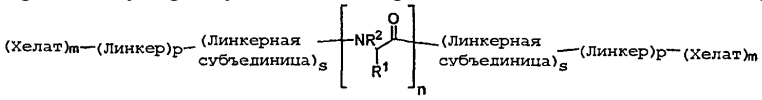
Ковалентный конъюгат может представлять собой



.

Превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации также может заключаться во взаимодействии предшественника визуализирующего вещества с остатком хелата, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла, с образованием ковалентной связи между остатком хелата и остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации, чтобы получить вещество для МР-визуализации. Подходящие парамагнитные ионы металлов описаны выше.

В еще одном аспекте настоящее изобретение характеризует контрастное вещество, которое содержит металло-хелатный комплекс на $-CO_2R$-конце и NHR-конце биополимера (например, пептида), где R независимо выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, алифатической и удаляемой группы. Контрастное вещество может содержать два металло-хелатных комплекса на $CO_2R$- и NHR-концах биополимера. Биополимер может обладать специфичной аффинностью связывания с фибрином. Пептид может обладать способностью образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях и в некоторых вариантах содержит дисульфидную связь. Контрастное вещество может иметь формулу



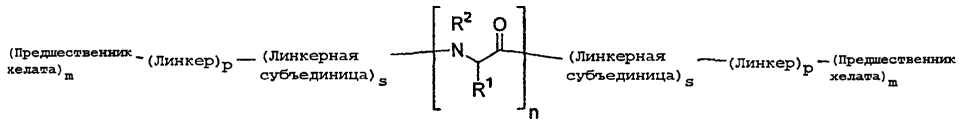
,

где «хелат» означает металло-хелатный комплекс; «линкер» означает остаток линкера; «линкерная субъединица» означает остаток линкерной субъединицы; m независимо является целым числом от 1 до 10; p

независимо является целым числом от 0 до 5; s независимо равно 0 или 1; $R^1$ является боковой цепью аминокислоты или ее производным; и $R^2$ независимо является водородом или алифатической группой. Контрастное вещество также может иметь любую структуру из структур 4-55.

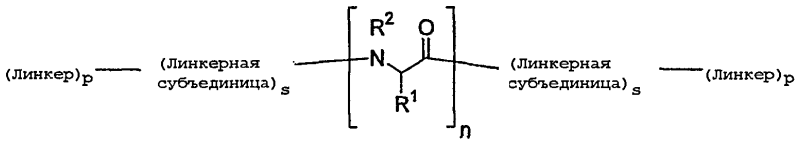
В другом аспекте настоящее изобретение характеризует способ изменения стабильности пептида, причем пептида, имеющего N-концевую функциональную аминогруппу. Способ заключается во взаимодействии пептида с остатком линкерной субъединицы с образованием пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу; и в ковалентном связывании остатка линкера с С-концевой функциональной аминогруппой и N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием модифицированного пептида. Способ, кроме того, может заключаться во взаимодействии модифицированного пептида с кэпирующим остатком с образованием ковалентной связи между кэпирующим остатком и остатком линкера модифицированного пептида. Способ также заключается во взаимодействии модифицированного пептида с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера модифицированного пептида, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, а предшественники карбоксилатных групп поддаются превращению в карбоксилатные остатки. После превращения множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; при этом парамагнитный ион металла может быть в комплексе со множеством карбоксилатных остатков. Способ, кроме того, может включать в себя анализ стабильности модифицированного пептида или анализ стабильности немодифицированного пептида и сравнение стабильности указанного модифицированного пептида со стабильностью немодифицированного пептида. Стабильность модифицированного пептида может быть повышена по сравнению со стабильностью немодифицированного пептида (например, повышена в 10, 20 или 30 раз по сравнению со стабильностью немодифицированного пептида). Стабильность можно анализировать с использованием анализа на основе гомогената печени крыс.

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует модифицированный пептид, имеющий структуру




где «предшественник хелата» означает остаток предшественника хелата; «линкер» означает остаток линкера; «линкерная субъединица» означает остаток линкерной субъединицы; m независимо является целым числом от 1 до 10; p независимо является целым числом от 0 до 5; s независимо равно 0 или 1; $R^1$ является боковой цепью аминокислоты или ее производным; и $R^2$ выбран из группы, состоящей из H и алифатической группы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение характеризует модифицированный пептид, имеющий структуру




где «линкер» означает остаток линкера; «линкерная субъединица» означает остаток линкерной субъединицы; p независимо является целым числом от 0 до 5; s независимо равно 0 или 1; $R^1$ является боковой цепью аминокислоты или ее производным; и $R^2$ выбран из группы, состоящей из H и алифатической группы.

Способ получения вещества для МР-визуализации также характеризуется тем, что включает взаимодействие пептида, имеющего N-концевую функциональную аминогруппу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего функциональную аминогруппу как на N-конце, так и С-конце, или взаимодействие пептида, имеющего С-концевую функциональную карбоксилатную группу с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего функциональную карбоксилатную группу на обоих его концах С-конце и N-конце; и превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации. Превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации может заключаться в ковалентном связывании остатка хелата с модифицированным пептидом, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла, с получением вещества для МР-визуализации. Превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации также может включать ковалентное связывание остатка линкера с остатком хелата с образованием ковалентного конъюгата, где остаток хелата содержит парамагнитный ион металла; и взаимодействие ковалентного конъюгата с модифицированным пептидом с образованием вещества для МР-визуализации. Подходящие парамагнитные ионы описаны выше.

В другом аспекте настоящее изобретение характеризует способ получения вещества для МР-визуализации, который заключается в ковалентном связывании аминокислотного остатка с остатком линкерной субъединицы с образованием С-конца пептида, при этом остаток линкерной субъединицы ковалентно связан со смолой; в синтезе пептида на смоле от ковалентно связанного С-конца к N-концевому остатку пептида, при этом N-концевой остаток содержит N-концевую функциональную аминогруппу; в отщеплении пептида от смолы с получением С-концевой функциональной аминогруппы модифицированного пептида; в превращении модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации. Превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации может включать ковалентное связывание остатка хелата с модифицированным пептидом, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла, с получением вещества для МР-визуализации. Превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации также может включать ковалентное связывание остатка линкера с остатком хелата с образованием ковалентного конъюгата, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла; и взаимодействие ковалентного конъюгата с модифицированным пептидом с образованием вещества для МР-визуализации. Подходящие парамагнитные ионы описаны выше.

Если не оговорено особо, все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области, к которому относится данное изобретение. Хотя в практике или при проверке данного изобретения можно использовать способы и вещества, сходные или эквивалентные способам и веществам, приведенным в данном описании, ниже описаны подходящие способы и вещества. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие источники информации, упоминаемые в данном описании, включены посредством ссылки в полном объеме. В конфликтной ситуации данное описание, включая определения, будет проверено. Кроме того, вещества, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие признаки и преимущества изобретения будут понятны на основе следующего подробного описания и формулы изобретения.

**Описание фигур**

На фиг. 1 представлены химические структуры неприродных аминокислот.

На фиг. 2 показана способность к релаксации на Gd при 20 МГц, 35°С в забуференном трисом физиологическом растворе (TBS) или растворе 10 мг/мл фибрина в TBS.

На фиг. 3 изображено накопление контрастного вещества в тромбе.

Фиг. 4А является изображением тромба; фиг. 4В является изображением тромба с темной кровью.

**Подробное описание**

Определения

Обычно используемые химические сокращения, которые однозначно определены в данном описании, можно найти в The American Chemical Society Style Guide, Second Edition; American Chemical Society, Washington, DC (1997), «2001 Guidelines for Authors» J. Org. Chem. 66(1), 24A (2001), «A Short Guide to Abbreviations and Their Use in Peptide Science», J. Peptide. Sci. 5, 465-471 (1999).

В целях данной заявки термин «химическая защитная группа» или «защитная группа» означает любой химический остаток временно ковалентно связанный с молекулой на протяжении одной или нескольких стадий химического синтеза в последовательности реакций, чтобы предотвратить нежелательные реакции. Обычные методики использования защитных групп описаны в «Protecting Groups in Organic Synthesis, Third Ed.», P. Wuts and T. Greene, © 1999 John Wiley and Sons, Inc.

В целях данной заявки термин «удаляемая группа» означает химический остаток, который замещается нуклеофилом при нуклеофильном замещении или в последовательности реакций присоединения-элиминирования. Молекула, содержащая удаляемую группу, может быть выделенной или она может образовываться in situ в виде временного промежуточного продукта в химической реакции.

В целях данной заявки термин «алифатический» описывает любое ациклическое или циклическое, насыщенное или ненасыщенное, разветвленное или неразветвленное углеродное соединение, за исключением ароматических соединений.

Термин «алкил» включает насыщенные алифатические группы, включая алкильные группы с неразветвленной цепью (например, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и т.д.), алкильные группы с разветвленной цепью (изопропил, трет-бутил, изобутил и т.д.), циклоалкильные (алициклические) группы (циклопропил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил), алкилзамещенные циклоалкильные группы и цикл о алкилзамещенные алкильные группы. Термин «алкил», кроме того, включает алкильные группы, которые могут, кроме того, содержать атомы кислорода, азота, серы или фосфора, заменяющие один или несколько атомов углерода основной углеводородной цепи. В некоторых вариантах алкил с неразветвленной цепью или разветвленной цепью содержит 6 или меньше атомов углерода в своей основной цепи (например, $C_1$-$C_6$ в случае неразветвленной цепи, $C_3$-$C_6$ в случае разветвленной цепи) и более предпочтительно 4 или меньше. Подобным образом предпочтительные циклоалкилы содержат от 3 до 8 атомов углерода в своей циклической структуре и более предпочти-

тельно содержат 5 или 6 атомов углерода в своей циклической структуре. Термин $C_1$-$C_6$ включает алкильные группы, содержащие от 1 до 6 атомов углерода.

Кроме того, термин «алкил» включает как «незамещенные алкилы», так и «замещенные алкилы», последние из которых относятся к остаткам алкила, имеющим заместители, заменяющие водород у одного или нескольких атомов углерода основной углеводородной цепи. Такие заместители могут включать, например, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилоксигруппу, арилкарбонилоксигруппу, алкоксикарбонилоксигруппу, арилоксикарбонилоксигруппу, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонатогруппу, фосфинатогруппу, цианогруппу, аминогруппу (включая алкиламино-, диалкиламино-, ариламино-, диариламино- и алкилариламиногруппу), ациламиногруппу (включая алкилкарбониламино-, арилкарбониламиногруппу, карбамоил и уреидогруппу), амидиногруппу, иминогруппу, сульфгидрил, алкилтиогруппу, арилтиогруппу, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонатогруппу, сульфамоил, сульфонамидогруппу, нитрогруппу, трифторметил, цианогруппу, азидогруппу, гетероциклил, алкиларил или ароматический или гетероароматический остаток. Циклоалкилы, кроме того, могут быть замещены, например, заместителями, описанными выше. Остатком «арилалкила» является алкил, замещенный арилом (например, фенилметил(бензил)). Термин «алкил» также включает боковые цепи природных и неприродных аминокислот. Термин «н-алкил» означает незамещенную алкильную группу с прямой цепью (т.е. неразветвленной).

Термин «алкенил» включает алифатические группы, которые могут быть замещены или незамещены, как описано выше в случае алкилов, содержащие по меньшей мере одну двойную связь и по меньшей мере два атома углерода. Например, термин «алкенил» включает алкенильные группы с прямой цепью (например, этиленил, пропенил, бутенил, пентенил, гексенил, гептенил, октенил, ноненил, деценил и т.д.), алкенильные группы с разветвленной цепью, циклоалкенильные (алициклические) группы (циклопропенил, циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил, циклооктенил), циклоалкильные группы, замещенные алкилом или алкенилом, и алкенильные группы, замещенные циклоалкилом или циклоалкенилом. Термин «алкенил», кроме того, включает алкенильные группы, которые содержат атомы кислорода, азота, серы и фосфора, замещающие один или несколько атомов углерода основной углеводородной цепи. В некоторых вариантах алкенильная группа с прямой цепью и разветвленной цепью содержит 6 или меньше атомов углерода в своей основной цепи (например, $C_2$-$C_6$ в случае прямой цепи, $C_3$-$C_6$ в случае разветвленной цепи). Подобным образом циклоалкильные группы могут содержать 3-8 атомов углерода в своей циклической структуре и более предпочтительно содержат 5 или 6 атомов углерода в своей циклической структуре. Термин «$C_2$-$C_6$» включает алкенильные группы, содержащие от 2 до 6 атомов углерода.

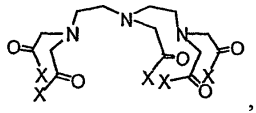
Кроме того, термин «алкенил» включает как «незамещенные алкенилы», так и замещенные «алкенилы», последний термин относится к алкенильным остаткам, имеющим заместители, заменяющие водород у одного или нескольких атомов углерода основной углеводородной цепи. Такие заместители могут включать, например, алкильные группы, алкинильные группы, галогены, гидроксил, алкилкарбонилоксигруппу, арилкарбонилоксигруппу, алкоксикарбонилоксигруппу, арилоксикарбонилоксигруппу, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонатогруппу, фосфинатогруппу, цианогруппу, аминогруппу (включая алкиламино-, диалкиламино-, ариламино-, диариламино- и алкилариламиногруппу), ациламиногруппу (включая алкилкарбониламино-, арилкарбониламиногруппу, карбамоил и уреидогруппу), амидиногруппу, иминогруппу, сульфгидрил, алкилтиогруппу, арилтиогруппу, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонатогруппу, сульфамоил, сульфонамидогруппу, нитрогруппу, трифторметил, цианогруппу, азидогруппу, гетероциклил, алкиларил или ароматический или гетероароматический остаток.

Термин «алкинил» включает ненасыщенные алифатические группы, аналогичные по длине и возможному замещению алкилам, описанным выше, но которые содержат по меньшей мере одну тройную связь и два атома углерода. Например, термин «алкинил» включает алкинильные группы с неразветвленной цепью (например, этинил, пропинил, бутинил, пентинил, гексинил, гептинил, октинил, нонинил, децинил и т.д.), алкинильные группы с разветвленной цепью и алкинильные группы, замещенные циклоалкилом или циклоалкенилом. Термин «алкинил», кроме того, включает алкинильные группы, которые содержат атомы кислорода, азота, серы и фосфора, замещающие один или несколько атомов углерода основной углеводородной цепи. В некоторых вариантах алкинильная группа с неразветвленной цепью и разветвленной цепью содержит 6 или меньше атомов углерода в своей основной цепи (например, $C_2$-$C_6$ в случае неразветвленной цепи, $C_3$-$C_6$ в случае разветвленной цепи). Термин «$C_2$-$C_6$» включает алкинильные группы, содержащие от 2 до 6 атомов углерода.

В общем, термин «арил» включает группы, содержащие 5- и 6-членные моноциклические ароматические группы, которые могут содержать от нуля до четырех гетероатомов, например бензол, фенил, пиррол, фуран, тиофен, тиазол, изотиазол, имидазол, триазол, тетразол, пиразол, оксазол, изооксазол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин, и тому подобное. Кроме того, термин «арил» включает полициклические арильные группы, например трициклические, бициклические, такие как нафталин, бен-

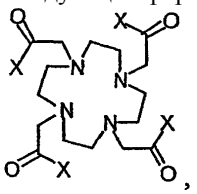
зоксазол, бензодиоксазол, бензотиазол, бензоимидазол, бензотиофен, метилендиоксифенил, хинолин, изохинолин, нафтиридин, индол, бензофуран, пурин, бензофуран, деазапурин или индолизин. Указанные арильные группы, имеющие гетероатомы в структуре цикла, также могут называться «арильными гетероциклами», «гетероциклами», «гетероарилами» или «гетероароматическими соединениями». Арильная группа может быть замещена заместителями в одном или нескольких положениях цикла.

В целях данной заявки «DTPA» относится к химическому соединению, содержащему подструктуру, образованную диэтилентриамином, где каждый их двух первичных аминов ковалентно связан с двумя ацетильными группами, а вторичный амин имеет одну ацетильную группу, ковалентно связанную в соответствии со следующей формулой:



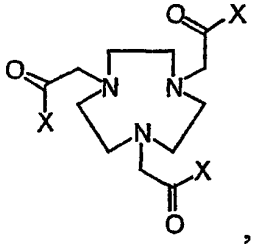
где X означает содержащую гетероатом группу, являющуюся донором электрона, способную координационно связывать катион металла, предпочтительно $O^-$, OH, $NH_2$, $OPO_3^{2-}$ или NHR, или OR, где R означает любую алифатическую группу. В том случае, когда каждая X-группа представляет собой третбутоксигруппу (tBu), структура может быть названа «DTPE» («E» для случая сложного эфира).

В целях данной заявки «DOTA» относится к химическому соединению, содержащему подструктуру, образованную 1,4,7,11-тетраазациклододеканом, где каждый из аминов имеет одну ацетильную группу, ковалентно связанную в соответствии со следующей формулой:



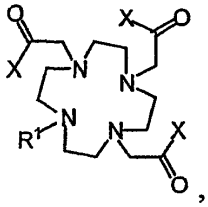
где X имеет значение, определенное выше.

В целях данного изобретения «NOTA» относится к химическому соединению, содержащему подструктуру, образованную 1,4,7-триазациклононаном, где каждый из аминов имеет одну ацетильную группу, ковалентно связанную в соответствии со следующей формулой:



где X имеет значение, определенное выше.

В целях данной заявки «DO3A» относится к химическому соединению, содержащему подструктуру, образованную 1,4,7,11-тетраазациклододеканом, где три из четырех аминов имеют одну ацетильную группу, связанную ковалентно, а другой амин содержит заместитель, имеющий нейтральный заряд, в соответствии со следующей формулой:



где X имеет значение, определенное выше, а $R^1$ означает незаряженный химический остаток, предпочтительно водород, любую алифатическую, алкильную группу или циклоалкильную группу и их незаряженные производные. Предпочтительный хелат «HP»-DO3A имеет $R^1$=-$CH_2$(CHOH)$CH_3$.

В каждой из четырех указанных выше структур атомы углерода указанных этиленов можно назвать атомами углерода «основной цепи». Обозначение «bbDTPA» можно использовать, чтобы указать положение химической связи с молекулой DTPA («bb» означает «основную цепь»). Следует отметить, что в используемом в данном описании смысле bb(CO)DTPA-Gd означает остаток C=O, связанный с атомом углерода основной цепи этилена в DTPA.

Термины «хелатирующий лиганд», «хелатирующий остаток» и «остаток хелата» могут быть использованы по отношению к любому полидентатному лиганду, который способен координационно связывать ион металла, включая молекулу DTPA (и DTPE), DOTA, DO3A или NOTA, или к любому другому подходящему полидентатному хелатирующему лиганду, который дополнительно приведен в данном

описании, который либо координационно связывает ион металла, либо способен к такому координационному связыванию, либо непосредственно, либо после удаления защитных групп, либо является реагентом, имеющим или не имеющим подходящих защитных групп, который используют для синтеза контрастного вещества и который по существу содержит все атомы, которые в итоге будут координационно связывать ион металла в конечном комплексе с металлом. Термин «хелат» относится к фактически существующему комплексу металл-лиганд, и понятно, что полидентатный лиганд в итоге будет координационно связан с ионом металла, применимым в медицинских целях.

Термин «специфичная аффинность связывания» в используемом в данном описании смысле относится к способности контрастного вещества поглощаться, накапливаться или связываться с конкретным биологическим компонентом в большей степени, чем с другими компонентами. Говорят, что контрастные вещества, которые обладают таким свойством, являются «целенаправленными» к компоненту-«мишени». Говорят, что контрастные вещества, которые не обладают таким свойством, являются «неспецифичными» или «не направленными к мишени» веществами. Специфичную аффинность связывания связывающей группы по отношению к мишени выражают в единицах равновесной константы диссоциации «Kd».

Термин «способность к релаксации» в используемом в данном описании смысле относится к увеличению количественного значения MPB либо 1/T1, либо 1/T2 на миллимоль (мМ) концентрации парамагнитного иона или контрастного вещества, и указанные значения могут быть разными, если контрастное вещество содержит множество парамагнитных ионов, где T1 является временем продольной или спин-решеточной релаксации, а T2 является временем поперечной или спин-спиновой релаксации протонов воды или других ядер, используемых для визуализации или спектроскопии, включая протоны, выявляемые в других молекулах, отличных от воды. Способность к релаксации выражают в единицах $мМ^{-1}с^{-1}$.

Термин «открытое координационное положение» в используемом в данном описании смысле относится к положению на ионе металла, которое обычно занято молекулой воды или растворителя.

В используемом в данном описании смысле термин «очищенный» относится к пептиду, который был отделен либо от окружающих природных органических молекул, с которыми он обычно ассоциирован, либо в случае химически синтезированного пептида, отделен от любых других органических молекул, присутствующих при химическом синтезе. Обычно полипептид считается «очищенным», когда он по меньше мере на 70% (например, на 70, 80, 90, 95 или 99%) в расчете на сухую массу не содержит любых других белков или органических молекул.

В используемом в данном описании смысле термин «пептид» относится к цепи аминокислот длиной примерно от 2 до 75 аминокислот (например, от 3 до 50 аминокислот).

В используемом в данном описании смысле термин «биополимер» относится к полимерному веществу, которое естественным путем образуется в биологической системе. Некоторые биополимеры могут быть сконструированы на основе определенного набора структурных субъединиц и с помощью обычных функциональных групп, связывающих субъединицы, например пептид обычно конструируют на основе набора аминокислот (как природных, так и неприродных) с помощью амидных связей, связывающих субъединицы.

Термин «мультимер» в целях данного описания определяют как контрастное вещество или его субъединицу, содержащее по меньшей мере два ковалентно связанных хелата или предшественника их синтеза.

В используемом в данном описании смысле термин «природная» аминокислота или аминокислота «природного происхождения» относится к одной из двадцати наиболее часто встречающихся аминокислот. Природные аминокислоты, модифицированные для того, чтобы ввести метку в целях детектирования (например, радиоактивные метки, оптические метки или красители) считаются природными аминокислотами. Природные аминокислоты указаны с помощью их стандартных одно- или трехбуквенных сокращений.

Термин «неприродная аминокислота» или «неприродный» относится к любому производному природной аминокислоты, включая D-формы и β- и γ-производные аминокислот. Следует отметить, что некоторые аминокислоты, например гидроксипролин, который в данном описании классифицируют как неприродную аминокислоту, можно встретить в природе в некоторых организмах или в конкретном белке.

Термин «стабильный» в используемом в данном описании смысле относится к соединениям, которые обладают стабильностью, достаточной для того, чтобы обеспечить производство, и которая сохраняет целостность соединения в течение достаточного периода времени, чтобы оно было применимо и безопасно в целях, подробно описанных в данной заявке. Обычно такие соединения стабильны при температуре 40°C или меньше, в отсутствии влаги или других химически активных условий, по меньшей мере, в течение недели. Комбинации заместителей и переменных, предполагаемых в данном изобретении, являются только такими комбинации, которые приводят к образованию стабильных соединений.

Термины «связывание с мишенью» или «связывание» в целях данного описания относятся к нековалентным взаимодействиям контрастного вещества с мишенью. Указанные нековалентные взаимодействия независимы друг от друга и наряду с другими, могут представлять собой гидрофобные, гидро-

фильные, диполь-дипольные взаимодействия, перекрывание пи-орбиталей, образование водородных связей, электростатические связи или взаимодействия типа кислота Льюиса-основание.

Термин «кэпирующий остаток» относится к хелату, органическому красителю, контрастному веществу, тромболитическому или стабилизирующему остатку. Подходящие стабилизирующие остатки являются биологически инертными, т.е. не обладают биологической активностью.

Контрастные вещества

В общем, данное изобретение относится к МРВ-, оптическим и радионуклидным контрастным веществам, которые содержат направленный к мишени полимер (например, пептид), в котором как N-концевые, так и С-концевые аминокислоты конъюгированы либо непосредственно, либо через необязательную промежуточную линкерную субъединицу и линкер по меньшей мере с одним хелатом парамагнитного (в случае магнитно-резонансной визуализации) или радиоактивного (в случае визуализации на основе радионуклидов) иона металла или оптического красителя (в случае оптической визуализации). Как далее описано в данной заявке в виде примеров, линкер или линкерная субъединица могут быть разветвленными и поэтому позволяют связывать множество хелатов или красителей с каждым концом пептида, т.е. мультимера. Соединения согласно данному изобретению могут содержать один или несколько асимметричных атомов углерода и, таким образом, могут встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, смесей диастереомеров и отдельных диастереомеров. Все указанные изомерные формы данных соединений специально включены в данное изобретение. Каждый стереогенный атом углерода может быть R- или S-конфигурации, если не оговорено особо. Хотя конкретные соединения, приведенные в качестве примеров в данной заявке, могут быть указаны в конкретной стереохимической конфигурации, также предполагаются соединения, либо имеющие противоположную стереохимию в любом заданном хиральном центре, либо их смеси. Следует понимать, что соединения согласно данному изобретению могут принимать множество конформационных и ионных форм в растворе, в фармацевтических композициях и in vivo. Хотя приведенные в данном описании указания конкретных предпочтительных соединений согласно данному изобретению имеют конкретную конформацию и ионные формы, содержание изобретения не ограничено таким образом.

Новые основанные на пептидах мультимеры согласно данному изобретению открывают новые преимущества в качестве направленных к мишени контрастных веществ.

1. Соединения могут доставлять два или более копирующих остатков (например, хелатов, органических красителей или тромболитиков) к мишени, используя единственный направленный к мишени пептид, вследствие чего будет наблюдаться достаточное усиление тканевого контраста, отчасти вследствие значительной концентрации визуализирующего остатка вблизи мишени.

2. Контрастные вещества для МРВ согласно данному изобретению также проявляют высокую способность к релаксации при связывании с мишенью вследствие индуцированного рецептором эффекта магнитного усиления (RIME) вместе со способностью пептида ограничивать локальное движение отдельных хелатов при связывании с мишенью.

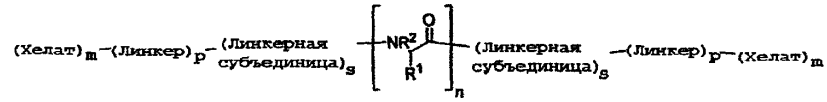
3. Соединения обладают высокой аффинностью по отношению к одной или нескольким мишеням.

4. Так как соединения относительно легко синтезировать согласно способам, приведенным в данном описании, и требуется только один пептид на молекулу, большое количество ионов металлов или органических красителей можно доставить к мишени более экономично.

5. Соединения согласно изобретению обладают более высокой стабильностью in vivo (т.е. более длительным временем полужизни) за счет пониженного ферментного метаболизма (например, пониженного расщепления пептидазами).

Указанные подходящие свойства основанных на пептидах мультимеров согласно данному изобретению делают их полезными направленными к мишени контрастными веществами.

Химическую структуру МРВ- или радионуклидных контрастных веществ, рассматриваемых в изобретении, можно проиллюстрировать формулой



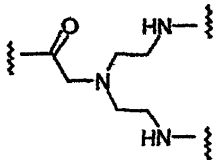

где для каждого m независимо 1≤m≤10, хелат представляет собой комплекс металл-хелат, p независимо является целым числом от нуля до пяти; s независимо равен единице или нулю; $R^1$ является боковой цепью любой аминокислоты, включая боковые цепи неприродных аминокислот; $R^2$ является любой алифатической группой или водородом; и n является целым числом от 3 до 50 включительно. Альтернативно, $R^1$ и $R^2$, вместе взятые, могут образовывать циклическую структуру (включая пролин и его замещенные варианты). Линкеры, в том случае, если они присутствуют, могут быть разными. Ионы металлов, предпочтительные для МРВ, включают ионы с атомными числами 21-29, 39-47 или 57-83 и более предпочтительно парамагнитную форму иона металла с атомными числами 21-29, 42, 44 или 57-83. Особенно предпочтительные парамагнитные ионы металлов выбраны из группы, состоящей из Gd(III), Fe(III), Mn(II и III), Cr(III), Cu(II), Dy (III), Tb(III и IV), Ho(III), Er(III), Pr (III) и Eu(II и III). Особенно применим Gd(III). Следует отметить, что в используемом в данном описании смысле подразумевается, что термин

«Gd» обозначает ионную форму металла гадолиния; такая ионная форма может быть записана в виде Gd(III), Gd3+, гадо- и т.д., без указания отличия рассматриваемой ионной формы.

Для визуализирующих веществ на основе радионуклидов особенно применимы $^{99}Y$, $^{99m}Te$, $^{111}In$, $^{47}Sc$, $^{67}Ga$, $^{51}Cr$, $^{177m}Sn$, $^{67}Cu$, $^{167}Tm$, $^{97}Ru$, $^{188}Re$, $^{177}Lu$, $^{199}Au$, $^{203}Pb$ и $^{141}Ce$. Также описаны комплексы металлов с полезными оптическими свойствами. См., Murru et al., J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1993, 1116-1118. Для оптической визуализации с использованием хелатов особенно применимы хелаты лантаноидов, таких как La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Pn(III), Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Dy(III), Ho(III), Er(III), Tm(III), Yb(III) и Ln(III). Особенно применимы Eu(III) и Tb(III).

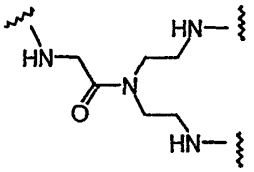
Хелаты металлов не должны диссоциировать в какой-либо значительной степени во время прохождения визуализирующего вещества через организм, включая и то время, когда он связан с тканью-мишенью. Значительное высвобождение свободных ионов металлов может привести к токсичности, которая в большинстве случаев не приемлема.

В одном варианте в отношении указанной выше структуры контрастного вещества m равно 2, n, s, $R^1$ и $R^2$ имеют значение, указанное выше, и остаток линкера содержит



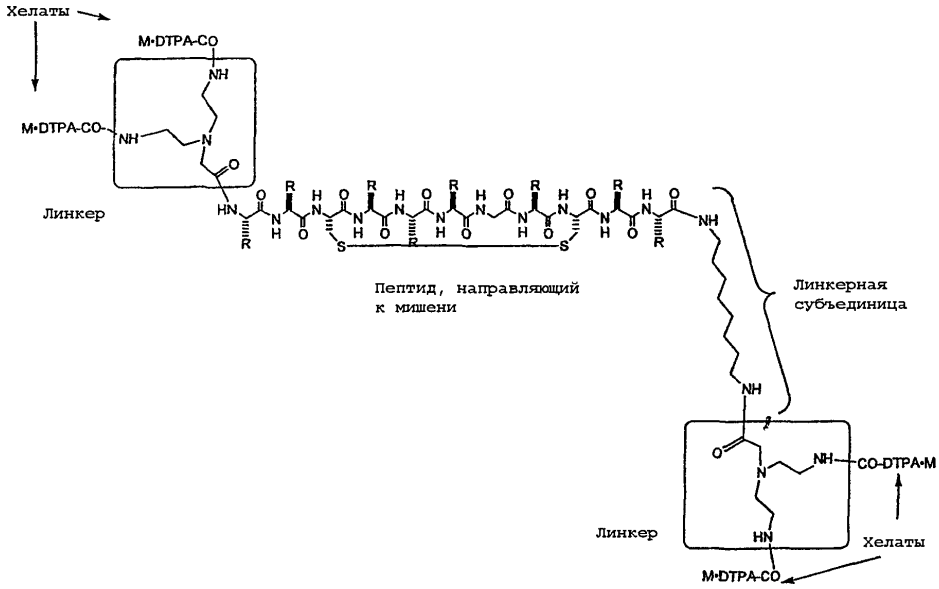
«Хелат» предпочтительно представляет собой bb(CO)DTPA·Gd.

В другом варианте в отношении указанной выше структуры контрастного вещества m равно 2, n, s, $R^1$ и $R^2$ имеют значение, указанное выше, и остаток линкера содержит



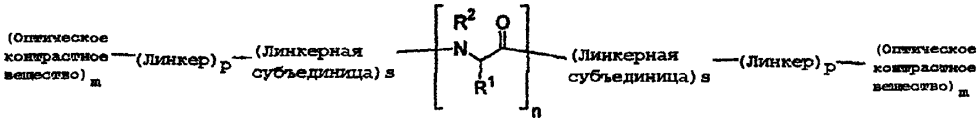
Остатком «хелата» может быть bb(CO)DTPA·Gd.

В целях иллюстрации ниже представлено одно контрастное вещество, предложенное в данном изобретении, с указанием различных субъединиц




где R=боковым цепям аминокислот, при условии, что пептид обладает аффинностью по отношению к биологической мишени и m=ион металла (парамагнитный в случае МРВ, радиоактивный в случае радионуклидной визуализации и флуоресцентный, люминесцентный или поглощающий в случае оптической визуализации).

Химическая структура оптических контрастных веществ, предложенных в данном изобретении, может быть изображена в виде формулы



где $1 \leq m \leq 10$, p независимо является целым числом от нуля до пяти, n равно 3-50 включительно, $R^1$ является боковой цепью любой аминокислоты, включая боковые цепи неприродных аминокислот; $R^2$ является любой алифатической группой или водородом. Альтернативно, $R^1$ и $R^2$, вместе взятые, могут образовывать циклическую структуру (включая Pro и его замещенные варианты). N- и C-концевые аминокислоты пептида могут быть конъюгированы с оптическим красителем непосредственно или через необязательный линкер (например, p=0 или 1). Остатки линкеров могут быть разными.

Оптический краситель может представлять собой органический краситель или подходящий хелат металла. Органические красители, подходящие для оптической визуализации, описаны и включают, например, флуоресцентный порфирин и флуоресцентные фталоцианины [см., например, патент США № 5641878], вещества в виде микрочастиц [см., например, WO 96/23524] и полиметиновые красители [см., например, WO 97/13490]. Обычно используемыми оптическими органическими красителями являются флуоресцеин, родамин [см., например, Kojima H, et al., Anal. Chem. 73, 1967-1973 (2001)], тетраметилродамин [например, Anal. Biochem. 223, 39 (1994)] и техасский красный [например, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3546 (1988)]. Особенно применимы флуоресцеин и люминесцентные хелаты лантанидов.

Мишени и пептиды, связывающие мишени

Остаток пептида контрастных веществ согласно данному изобретению может проявлять специфичное связывание с биологической мишенью и функционировать в качестве точки присоединения одного или нескольких хелатов на каждом конце. В общем, биологические мишени присутствуют в низкой (например, микромолярной или меньше) концентрации и их визуализация с использованием существующих контрастных веществ для МРВ на основе мономерных комплексов гадолиния неэффективна. Однако основанные на пептидах мультимерные контрастные вещества для МРВ согласно данному изобретению обеспечивают намного большую концентрацию вещества у мишени, а также высокую способность к релаксации, делая возможной визуализацию указанных мишеней. Подобным образом основанные на пептидах мультимерные радионуклидные контрастные вещества согласно изобретению могут доставлять больше радионуклидов к мишеням, так что дополнительно может быть улучшена визуализация. Не связывая с конкретным механизмом, предполагается, что направление к мишени создает повышенную концентрацию визуализирующего вещества в месте, которое необходимо визуализировать, и повышает способность к релаксации контрастных веществ для МРВ в связанном состоянии за счет RIME-эффекта, а также ограничивает локальное движение хелата благодаря приданию жесткости связанному пептиду.

Мишени для контрастных веществ могут существовать в любой части организма, клетке, органе или ткани, или в их компоненте. Предпочтительными мишенями являются мишени, которые имеют диагностическое и терапевтическое значение, т.е. мишени, которые связаны с патологическими состояниями. Особенно предпочтительными мишенями являются мишени, связанные с жидкостями организма, и особенно мишени, связанные с кровью, плазмой, лимфой и жидкостями центральной нервной системы. Другими предпочтительными мишенями являются белки и рецепторы, которые либо существуют в высокой концентрации, либо имеют большое количество сайтов связывания для определенных лигандов. Наряду с другими такими белками-мишенями являются ферменты и гликопротеиды.

Сывороточный альбумин человека (ЧСА) и фибрин являются пригодными мишенями для контрастных веществ в случае МРВ. Для визуализации пула крови сосудов предпочтительной мишенью является сывороточный альбумин. Так как ЧСА присутствует в сыворотке в высокой концентрации (примерно 0,6 мМ) и связывает широкий круг молекул с довольно высокой аффинностью, он является предпочтительной белковой мишенью в плазме для контрастных веществ пула крови. ЧСА является особенно предпочтительной мишенью для визуализации сердечно-сосудистой системы (см. заявку на выдачу патента США № 08/875365, поданную 24 июля 1997, и WO 96/23526).

Для визуализации тромбов предпочтительной мишенью является фибрин, так как он присутствует во всех сгустках, и он может быть использован в качестве мишени, не создавая при этом помех для нормального тромболитического процесса. Дополнительные подробности, касающиеся связывающих мишени остатков, которые включают связывающие фибрин пептиды (см. в патентной заявке PCT WO 01/09188).

Другие белковые мишени включают, но не ограничены указанным, кислый гликопротеид альфа, фибриноген, коллаген, рецептор GPIIb/IIIa тромбоцитов, рецептор хемотаксического пептида, рецепторы соматостатина, рецептор вазоактивных пептидов кишечника (VIP), рецептор пептида высвобождения бомбезина/гастрина и рецепторы интегрина.

Подходящие пептиды для применения в изобретении включают пептиды, способные специфично связываться с мишенями, указанными выше. К таким пептидам относятся RGD-содержащие пептиды, мишенью которых является рецептор GPIIb/IIIa тромбоцитов, для визуализации тромбов, хемотаксические пептиды, мишенью которых являются лейкоциты, для визуализации инфекции/воспаления, октреотид и пептид P-829, мишенью которых являются рецепторы соматостатина, для визуализации опухолей, вазоактивные пептиды кишечника (VIP), мишенью которых является рецептор VIP, для визуализации опухоли, аналоги бомбезина, мишенью которых является рецептор пептида, высвобождающего бомбе-

зин/гастрин, для визуализации опухоли, и RGD-содержащие пептиды, мишенью которых является интегрин αvβ3 (рецептор витронектина) для визуализации опухоли.

В принципе, любой пептид, обладающий аффинностью по отношению к биологической мишени, можно использовать в контрастном веществе согласно изобретению. Пептид может быть линейным или циклическим. Обычно нерастворимые липофильные пептиды считаются неподходящими для фармакологического применения, но такие пептиды могут быть подходящими согласно изобретению, поскольку добавление гидрофильных хелатов металла к двум концам пептида может повышать растворимость. Для облегчения синтеза и из соображений стоимости предпочтительно, чтобы пептиды содержали от 3 до 50 аминокислот (например, 3-30, 3-20, 3-15, 5-30, 5-20, 5-15, 10-12 аминокислот в длину).

В направляющих к мишени пептидах согласно изобретению можно использовать большое разнообразие аминокислот. Подходящие аминокислоты включают природные и неприродные аминокислоты. Аминокислоты со многими различными защитными группами, подходящие для непосредственного применения в твердофазном синтезе пептидов, коммерчески доступны. Кроме двадцати наиболее часто встречающихся аминокислот природного происхождения компонентами пептидной направляющей к мишени группы согласно изобретению могут быть следующие неприродные аминокислоты или производные аминокислот (общепринятые сокращения в круглых скобках, см. фиг. 1): β-аланин (β-Ala), γ-атлиномасляная кислота (GABA), 2-аминомасляная кислота (2-Abu), α,β-дегидро-2-аминомасляная кислота (Δ-Abu), 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (ACPC), аминоизомасляная кислота (Aib), 2-аминотиазолин-4-карбоновая кислота, 5-аминовалериановая кислота (5-Ava), 6-аминогексановая кислота (6-Ahx), 8-аминооктановая кислота (8-Aoc), 11-аминоундекановая кислота (11-Aun), 12-аминододекановая кислота (12-Ado), 2-аминобензойная кислота (2-Abz), 3-аминобензойная кислота (3-Abz), 4-аминобензойная кислота (4-Abz), 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановая кислота (статин, Sta), аминооксиуксусная кислота (Aoa), 2-аминотетралин-2-карбоновая кислота (Atc), 4-амино-5-циклогексил-3-гидроксипентановая кислота (ACHPA), парааминофенилаланин (4-NH2-Phe), бифенилаланин (Bip), парабромфенилаланин (4-Br-Phe), ортохлорфенилаланин (2-Cl-Phe), метахлорфенилаланин (3-Cl-Phe), парахлорфенилаланин (4-Cl-Phe), метахлортирозин (3-Cl-Tyr), парабензоилфенилаланин (Bpa), трет-бутилглицин (Tle), циклогексилаланин (Cha), циклогексилглицин (Chg), 2,3-диаминопропионовая кислота (Dpr), 2,4-диаминомасляная кислота (Dbu), 3,4-дихлорфенилаланин (3,4-Cl2-Phe), 3,4-дифторфенилаланин (3,4-F2-Phe), 3,5-дийодтирозин (3,5-12-Tyr), ортофторфенилаланин (2-F-Phe), метафторфенилаланин (3-F-Phe), парафторфенилаланин (4-F-Phe), метафтортирозин (3-F-Tyr), гомосерин (Hse), гомофенилаланин (Hfe), гомотирозин (Htyr), 5-гидрокситриптофан (5-OH-Trp), гидроксипролин (Hyp), парайодфенилаланин (4-I-Phe), 3-йодтирозин (3-I-Tyr), индолин-2-карбоновая кислота (Idc), изонипекотиновая кислота (Inp), метаметилтирозин (3-Me-Tyr), 1-нафтилаланин (1-Nal), 2-нафтилаланин (2-Nal), пара-нитрофенилаланин (4-NO2-Phe), 3-нитротирозин (3-NO2-Tyr), норлейцин (Nle), норвалин (Nva), орнитин (Orn), ортофосфотирозин (H2PO3-Tyr), октагидроиндол-2-карбоновая кислота (Oic), пенициллами н (Pen), пентафторфенилаланин (F5-Phe), фенилглицин (Phg), пипеколиновая кислота (Pip), пропаргилглицин (Pra), пироглутаминовая кислота (pGlu), саркозин (Sar), тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота (Tic) и тиазолидин-4-карбоновая кислота (тиопролин, Th). Стереохимия аминокислот может быть описана с помощью указания перед названием или сокращением соответствующего случаю обозначения «D» или «d» или «L» или «l». Кроме того, можно использовать αN-алкилированные аминокислоты, а также аминокислоты, имеющие аминосодержащие боковые цепи (такие как Lys и Orn), в которых амин был ацилирован или алкилирован.

Пептиды согласно изобретению могут включать пептиды общей формулы P*-Y*-$X_1$*-L* (SEQ ID NO: 1), где P* означает пролин или неприродное производное пролина, Y* означает тирозин или его неприродное производное, $X_1$* означает глицин или аспарагиновую кислоту или неприродное производное глицина или аспарагиновой кислоты и L* означает лейцин или его неприродное производное. Обычно по меньшей мере один из P*, Y*, $X_1$* или L* является неприродным производным соответствующей аминокислоты. Например, $X_1$* может представлять собой глицин или аспарагиновую кислоту, L* может представлять собой лейцин и по меньшей мере один из P* или Y* может быть неприродным производным, таким как гидроксипролин или тирозин, замещенный в положении 3 F, Cl, Br, I или $NO_2$.

Пептид согласно изобретению также может включать пептид общей формулы $X_1$-$X_2$-C-P*-Y*-$X_3$-L-C-$X_4$-$X_5$-$X_6$ (SEQ ID NO: 2), где P* означает пролин или его неприродное производное; Y* означает тирозин или его неприродное производное; $X_1$ является W, Y, F, S, Bip, Hx, Dpr, Cy, Gu, Ad, Hfe, 3-Pal, 4-Pal, DopaMe2, nTyr, dW, dF, F(3/4*) или Y(3*). F(3/4*) может представлять собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 таким остатком, как $CH_3$, $CF_3$, $NH_2$, $CH_2NH_2$, CN, F, Cl, Br, I, Et или OMe. Y(3*) может представлять собой тирозин, замещенный в положении 3 таким остатком, как F, Cl, Br, I и $NO_2$. $X_2$ может представлять собой E, H, dE, S, H(Bzl), 2-Pal, Dpr или Th; $X_3$ может являться G или D; $X_4$ может представлять собой H, F, Y или W; $X_5$ может представлять собой I, L, V, N, Bpa, Bal, Hfe, Nle, Tle, Nval, Phg, Cha, Taz, Fua, Th, 4-Pal или F(3/4*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 таким остатком, как $CF_3$, Et, iPr и OMe; $X_6$ может быть N, Q, I, L или V или отсутствует. Обычно по меньшей мере один из $X_1$, $X_2$, $X_3$, P* и Y* является

непродным производным аминокислоты. Например, P* может представлять собой пролин, а Y* может быть непродным производным тирозина, замещенным в положении 3 таким остатком, как F, Cl, Br, I и $NO_2$. Альтернативно, P* может быть непродным производным пролина, таким как 4-гидроксипролин, а Y* может быть тирозином. Такие пептиды могут образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях.

Другой пример пептида, который может связывать фибрин, включает пептиды общей формулы P*-Y*-$X_1$-L-C (SEQ ID NO: 3), где $X_1$ означает G или D, P*является пролином или его непродным производным 4-гидроксипролином; Y* означает тирозин или непродное производное тирозина, замещенное в положении 3 таким остатком, как F, Cl, Br, I или $NO_2$. Обычно по меньшей мере один из P* или Y* является непродным производным соответствующей аминокислоты. Например, пептид может иметь следующие последовательности:

**W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:4), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:5), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:6), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:7), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:8), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:9), Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:10), W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:11), F(4-OMe)-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L (SEQ ID NO:12), Y-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:13), W-dE-C-P-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:14), W-dE-C-P(4-OH)-Y-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:15)** и F-H-C-P-(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L (SEQ ID NO:16).

Такие пептиды могут образовывать дисульфидные связи в невосстанавливающих условиях.

Согласно стандартным способам синтеза, таким как способы, описанные в WO 01/09188 или в WO 01/08712, пептиды, имеющие последовательность, указанную в табл. 1, синтезировали (структура подтверждена масс-спектрометрией), подвергали циклизации и анализировали в отношении аффинности к фрагменту DD(E) фибрина. Найдено, что каждый пептид имеет Kd≤10 мкМ («-» показывает укорочение).

Таблица 1

| Kd (мкМ) по отношению к DD(E) | $X_1$ | $X_2$ | C | P(4-OH) | Y* | $X_3$ | L | C | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Bpa | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Hfe | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Bpa | |
| ≤0,1 | Y(3-Cl) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | Y | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H(Bzl) | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | Bpa | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | 3Pal | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | 4Pal | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-F) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | Y(3-I) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | Bpa | L |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Bpa | L |
| ≤0,1 | F | H(Bzl) | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | 1Nal | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | MTyr | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H(Bzl) | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Bpa | |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H(Bzl) | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | 3Pal | I | |
| ≤0,1 | F(4-I) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-Br) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-Me) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-CF3) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-CN) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | Y(3-NO2) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | Y(2-F) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-CH2NH2) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(4-NH2) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(3,4-F2) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | DopaMe2 | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(2-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(3-Me) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(3-CF3) | |
| ≤0,1 | F(3-CF3) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F(3-OMe) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | Hfe | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | NTyr | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | W | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | F(4-OMe) | H(Bzl) | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Nle | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Tle | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(4-CF3) | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Bip | |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(4-Et) | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(4-OMe) | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(4-OMe) | |
| ≤0,1 | F(F5) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,1 | F | H | C | Hyp | Y(3-F) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,1 | W | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,2 | T | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,2 | F | H | C | P | Y(3-Cl) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,2 | Y(26-Me) | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,2 | W | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | H | I | Q |
| ≤0,2 | D-F | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,2 | Y | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | Y | I | Q |
| ≤0,2 | W | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | F | I | Q |
| ≤0,2 | H | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,2 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,2 | W | E | C | P | Y | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,2 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | nVal | |
| ≤0,2 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | Phg | |
| ≤0,2 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | F(3-Me) | |
| ≤0,2 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | 4Pal | I | |
| ≤0,2 | S | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,3 | W | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | Y | I | Q |
| ≤0,3 | Y | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,3 | F | D-E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,3 | F | H | C | P | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,3 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,3 | F | H | C | Hyp | Y | D | L | C | H | Bpa | |
| ≤0,4 | F | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | H | I | L |
| ≤0,4 | S(Bzl) | H | C | P | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,4 | H | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | H | I | Q |
| ≤0,4 | F(4-OMe) | H | C | Hyp | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,4 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | Bpa | I | |
| ≤0,4 | Ad | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | F | L | C | H | I | L |
| ≤0,5 | F | E | C | Hyp | Y(3-Cl) | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y(3-Cl) | 2-Nal | L | C | H | I | L |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,5 | Hfe | H | C | Hyp | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,5 | Bip | H | C | Hyp | Y | D | L | C | H | I | L |
| ≤0,5 | W | E | C | P | Y | G | L | C | W | I | Q |
| ≤0,5 | F(4-OMe) | W | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | 2Pal | I | |
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | Taz | I | |
| ≤0,5 | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | Dht | I | |
| ≤0,5 | Gu | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |

Пептид также может иметь общую формулу C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$ (SEQ ID NO: 17), где $X_{10}$ означает n(децил)C, n(4-PhBu)G, MeL, Bpa, Bip, Me-Bip, F(4*), F(3-Me), F(3,4-дифтор), Amh, Hfe, Y(3,5-дийод), Pff, 1Nal, d1Nal или MeL, где F(4*) является фенилаланином, замещенным в положении 4 таким остатком, как Et, $CF_3$, I или iPr. В некоторых вариантах пептид может содержать дополнительные остатки $X_1$, P* и/или $X_{11}$, чтобы получить общую формулу C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$-$X_{11}$ (SEQ ID NO: 18) или $X_1$-P*-C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$-$X_{11}$ (SEQ ID NO: 26), где $X_1$ является любой природной или неприродной аминокислотой, P* означает пролин или его неприродное производное и $X_{11}$ означает D, dD, βD, Inp, Nip, Me-D, Cop или Cmp. Например, пептид может иметь последовательность L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(децил)G-dD (SEQ ID NO: 19), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(децил)G-D (SEQ ID NO: 20), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-D (SEQ ID NO: 21), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-dD (SEQ ID NO: 22), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Inp (SEQ ID NO: 23), L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Cmp (SEQ ID NO: 24) или L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeBip-D (SEQ ID NO: 25).

Синтезировали пептиды, имеющие формулу SEQ ID NO: 26 (структура подтверждена масс-спектрометрией) согласно стандартным способам синтеза, таким как способы, описанные в WO 01/09188 или в WOO 1/08712, и анализировали в отношении аффинности к фрагменту DD(E) фибрина. Найдено, что каждый пептид имеет Kd≤10 мкМ (табл. 2).

Таблица 2

| $X_{01}$ | $X_{10}$ | $X_{11}$ |
|---|---|---|
| L | n(Decyl)G | dD |
| L | n(Decyl)G | D |
| L | MeL | Inp |
| L | Bip | D |
| L | Bip | dD |
| L | Me-Bip | D |
| L | MeL | Cmp |
| L | Bip | D |
| L | L | D |
| Cha | Bip | D |

Способность пептидов связываться с мишенью, такой как ЧСА или фибрин, можно анализировать известными методами. Например, аффинность пептида по отношению к фибрину можно анализировать с использованием DD(E)-фрагмента фибрина, который содержит субъединицы 55 кД (фрагмент E) и 190 кД (фрагмент DD). DD(E)-фрагмент можно биотинилировать и иммобилизовать с помощью авидина на твердом субстрате (например, многолуночном планшете). Пептиды можно инкубировать с иммобилизованным DD(E)-фрагментом в подходящем буфере и регистрировать связывание с использованием известного метода. См., например, WO 01/09188.

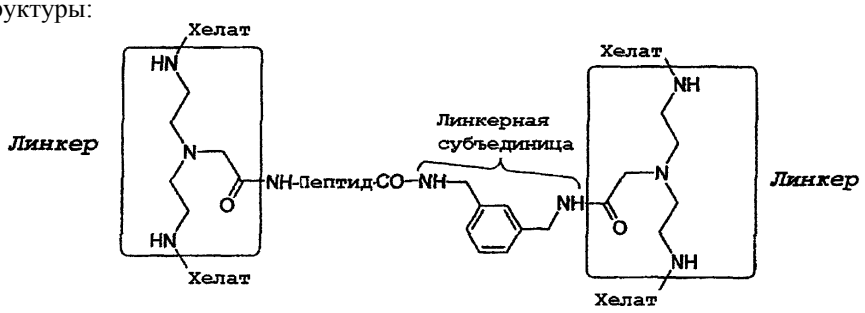
N- и C-концевые линкерные субъединицы и линкер

При их наличии, линкерные субъединицы и линкеры используют для ковалентного связывания кэпирующих остатков, таких как хелаты, тромболитики и другие группы, с двумя концами пептида. Остаток линкерной субъединицы может (i) преобразовывать функциональность либо C-концевого карбоксилата в функциональную аминогруппу, либо N-концевого амина в функциональную карбоксилатную группу; или (ii) обеспечивать спейсерный остаток или группу между концом пептида и линкера, в том случае если он присутствует, или кэпирующей группой. В одном варианте пептид может взаимодейство-

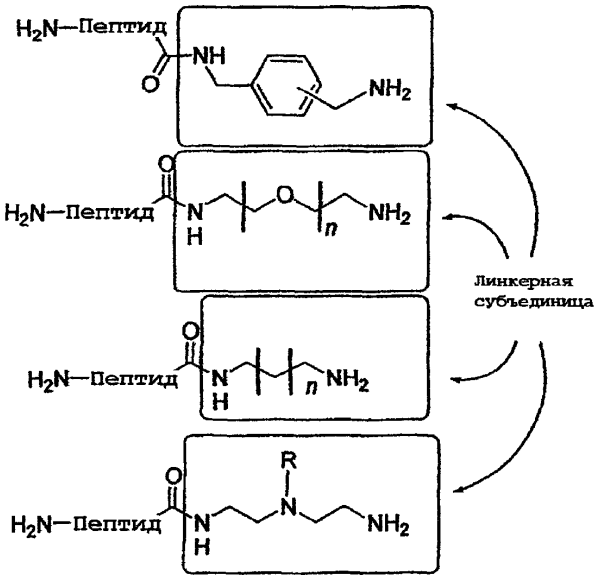
вать с линкерной субъединицей с образованием модифицированного пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу и N-концевую функциональную аминогруппу. В другом варианте пептид может взаимодействовать с линкерной субъединицей с образованием модифицированного пептида, имеющего N-концевую функциональную карбоксилатную группу и С-концевую функциональную карбоксилатную группу. В другом варианте пептид можно синтезировать, начиная с С-концевой линкерной субъединицы, которая связана со смолой, при этом при отщеплении пептида от смолы получают пептид, имеющий С-концевую функциональную аминогруппу. В еще одном варианте линкерную субъединицу можно использовать в качестве спейсерной группы, а не для того, чтобы изменить концевую функциональную группу. Линкерная субъединица может иметь различные функциональные группы для связывания остатков линкера или кэпирующих остатков. Можно использовать многие типы реакций, включая ацилирование, восстановительное аминирование, реакции нуклеофильного замещения, образование мочевины, образование тиомочевины и хемоселективное лигирование при химическом конъюгировании линкерной субъединицы с пептидом, линкером и/или кэпирующими остатками. Одно из преимуществ использования линкерной субъединицы состоит в создании сходных функциональных групп на пептиде, таким образом облегчающего последующий синтез.

Остаток линкера можно использовать для ковалентного связывания одного или нескольких кэпирующих остатков с концом пептида. Линкер может быть разветвленным или неразветвленным и может содержать различные функциональные группы для связывания предшественника хелата и хелата. Химическая структура линкера может влиять на физические и фармакологические свойства контрастного вещества, такие как аффинность, стабильность, время полужизни в крови, способность к релаксации и связывание белков в плазме. Линкеры могут быть замещены алкилом, арилом, алкенильной или алкинильной группами. Линкеры на каждом конце, в том случае, когда они присутствуют, обычно являются относительно небольшими и жесткими в случае контрастных веществ для МРВ. Например, линкер может иметь молекулярную массу менее 350 (например, примерно менее 200).

Пример С-концевого остатка линкерной субъединицы и С- и N-концевого линкера показан в виде следующей структуры:

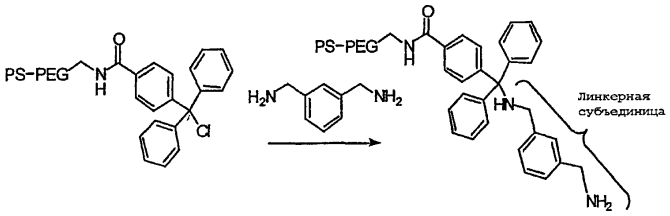



С-концевой карбоксилат пептида можно превратить в функциональную аминогруппу с помощью линкерной субъединицы (например, синтон диамина) с образованием пептида, имеющего функциональную аминогруппу на каждом конце пептида, с которой может быть связан остальной остаток линкера. Примерами таких пептидов, модифицированных так, чтобы они имели С-концевую функциональную аминогруппу, являются

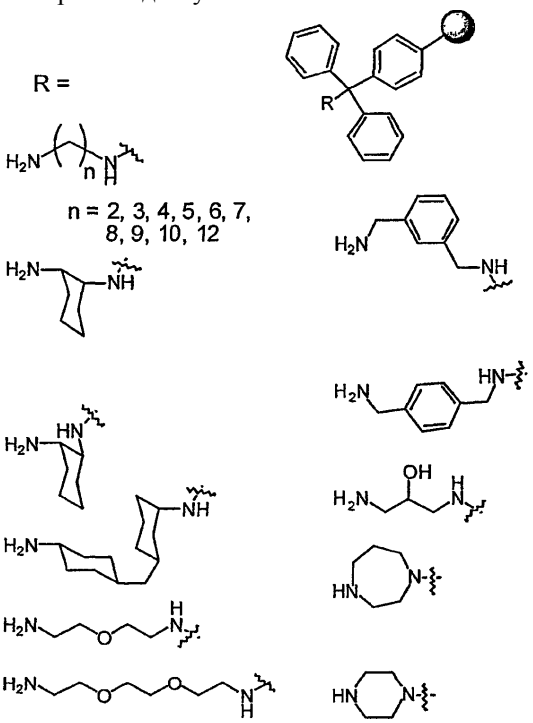



где n=1-4.

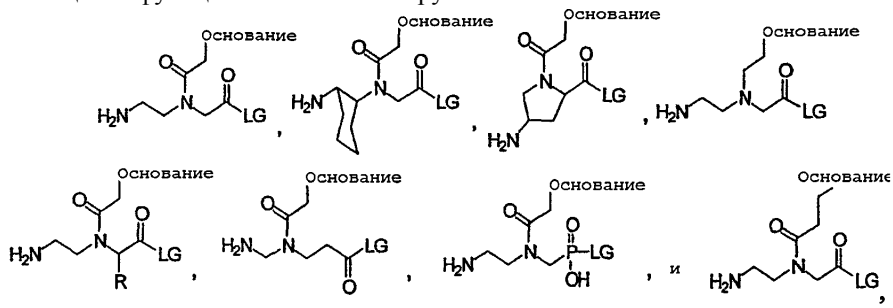
Множество С-концевых линкерных субъединиц диамина легко можно получить, используя твердофазную смолу




Следующие смолы (R) коммерчески доступны из Nova Biochem

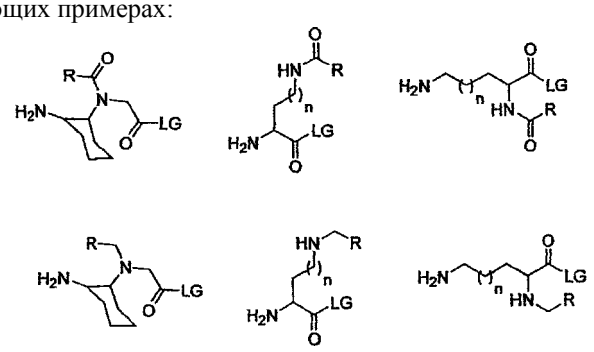



В некоторых случаях следующие линкерные субъединицы можно использовать в качестве спейсерных групп у N-концевой функциональной аминогруппы



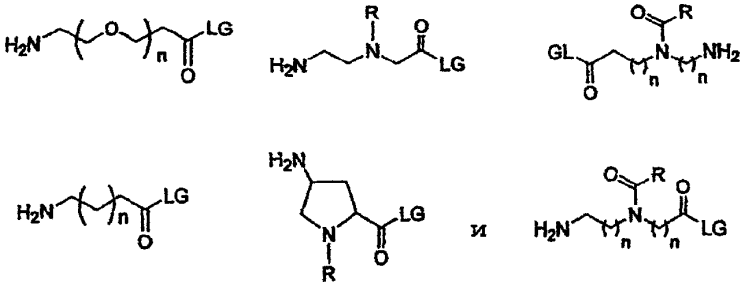

где «основание» является пуриновым или пиримидиновым основанием («Ad»=аденозин, «Gu»=гуанозин, «Th»=тимин, «Cy»=цитозин) , а «LG» означает удаляемую группу, такую как OH, активированный сложный эфир, галогенид или ангидрид.

Кроме того, можно использовать «N-алкилированные аминокислоты, а также аминокислоты, имеющие аминосодержащие боковые цепи (такие как Lys и Orn), в которых амин был ацилирован или алкилирован, как в следующих примерах:



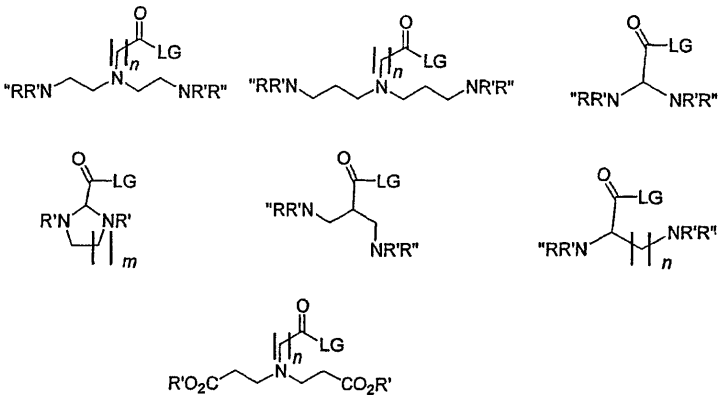
где n является целым числом от 0 до 3, R является любой алифатической или ароматической группой и LG означает удаляемую группу, такую как OH, активированный сложный эфир, галогенид и ангидрид.

Дополнительные линкерные субъединицы включают следующие примеры:



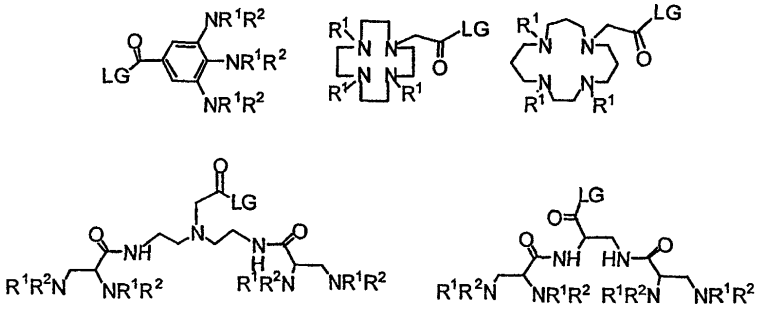
где n независимо равно 1 или 2, R является любой алифатической или ароматической группой и LG означает удаляемую группу, такую как OH, активированный сложный эфир, галогенид и ангидрид.

Примеры остатков линкера, которые могут быть применимы в случае следования методике конструирования амидной связи, когда молекула пептида имеет две концевых аминогруппы, включают следующие соединения:



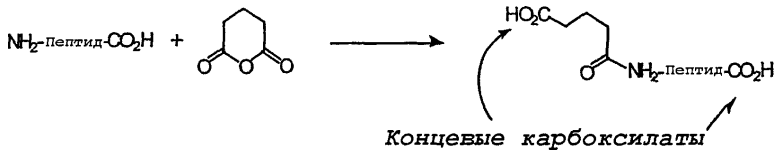
где каждый m независимо является целым числом от 1 до 4, n независимо является целым числом от 0 до 4 включительно, LG означает удаляемую группу и R' или R" независимо являются водородом или химической защитной группой.

Фрагмент линкера также может иметь точки разветвления для связывания более чем двух хелатов. Например, в случае следования методике конструирования амидной связи, линкер, который содержит карбонил с удаляемой группой LG (например, карбоновая кислота или активированный сложный эфир), и тремя или более защищенными аминами, может взаимодействовать с амином пептида с образованием молекулы с тремя или более концевыми аминами. Следующие основанные на карбониле линкерные реагенты могут быть подходящими для введения трех или более функциональных аминогрупп

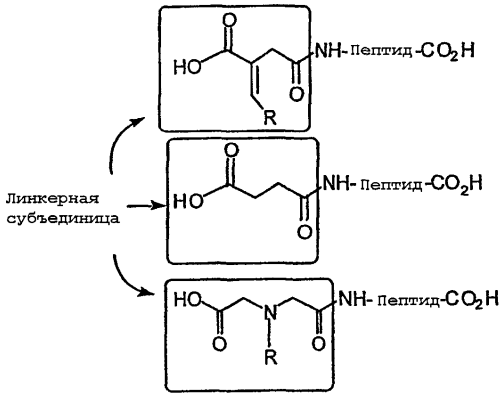


где LG означает удаляемую группу (например, -OH, активированный сложный эфир, такой как пентафторфенол (Pfp), N-гидроксисукцинимид (NHS), натриевая соль N-гидроксисульфосукцинимида (NHSS), 2-тиоксотиазолидин-1-ил или гидроксибензотриазол (HBT)) и $R^1$ и $R^2$ предпочтительно независимо являются водородом или химической защитной группой (например, Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутил, бензил или аллил).

В другом варианте функциональную аминогруппу на N-конце пептида можно превратить в N-концевую функциональную карбоксилатную группу в результате реакции с циклическим ангидридом кислоты (остаток линкерной субъединицы), получая таким образом модифицированный пептид с N-концевой функциональной карбоксилатной группой

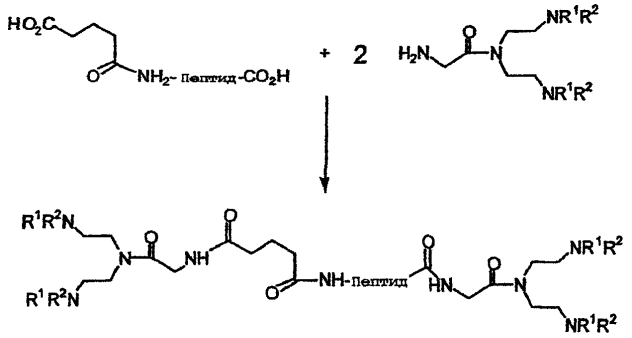



Примеры других линкерных субъединиц, которые можно использовать для того, чтобы превратить N-концевой амин в функциональную карбоксилатную группу, включают

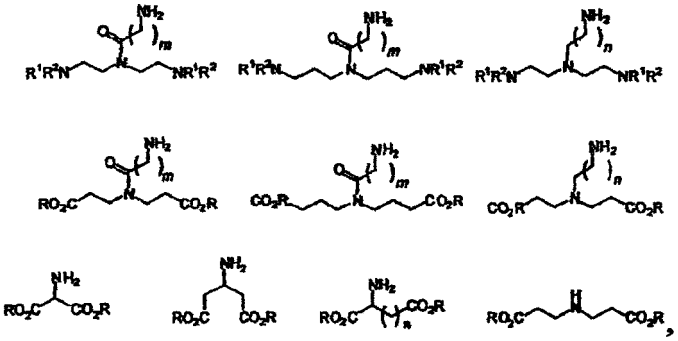



где R является любой алифатической или ароматической группой.

Затем оба концевых карбоксилата в указанных выше примерах можно подвергать одновременному взаимодействию с аминогруппой на остатке линкера, как показано ниже, с образованием предшественника вещества для МР-визуализации. В данном примере предшественник вещества для МР-визуализации является молекулой пептида, дериватизированной линкерами с обоих концов с помощью амидных связей

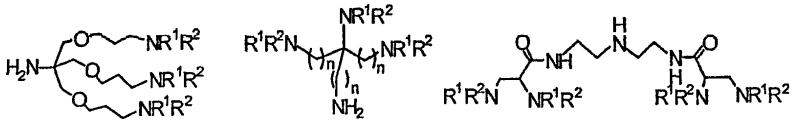



Конкретными примерами дополнительных остатков линкера, применимых для получения предшественников веществ для МР-визуализации, имеющих на концах два карбоксилата, являются



где каждый m независимо равен 1-4 включительно, n независимо равен 0-4 включительно (например, n=1 или 2) и R является водородом или соответствующей химической защитной группой, такой как метил, этил, бензил или трет-бутил. В указанных примерах после связывания линкерных субъединиц защитные группы можно удалить и хелатирующие остатки или предшественники хелатирующих остатков можно связать стандартными способами, например, благодаря образованию амидной связи.

В случае следования методике образования амидной связи, когда молекула пептида оканчивается двумя карбоксилатами, следующие линкерные реагенты могут быть подходящими для введения трех или более функциональных аминогрупп

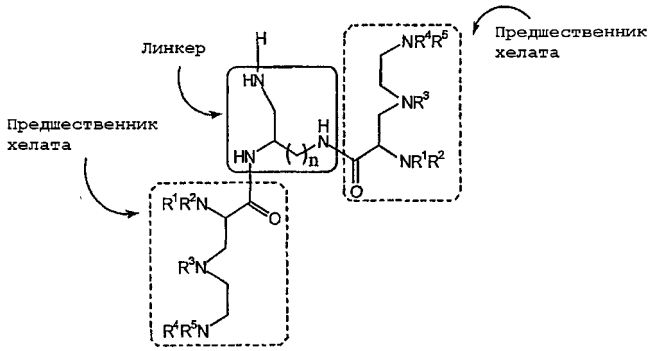


где $R^1$ и $R^2$ независимо являются водородом или химической защитной группой, такой как OS, Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутил, бензил или аллил.

Методики использования линкеров, которые заключаются в образовании амидных связей, применимы в связи с тем, что обычно они совместимы с защитными группами на пептиде. Как указано выше, пептид, линкер и линкерные субъединицы могут быть ковалентно связаны друг с другом в результате образования других типов связей (например, в результате нуклеофильного замещения, восстановительного аминирования и образования тиомочевины).

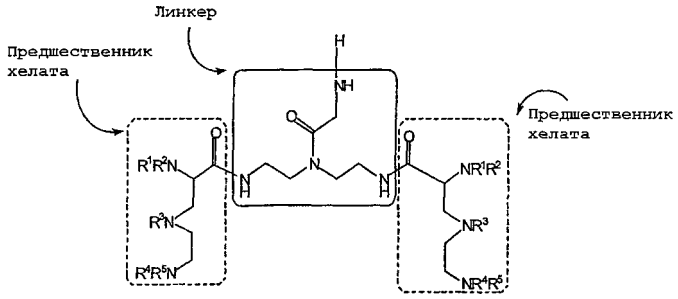
Линкеры также могут влиять на свойства контрастных веществ, такие как аффинность, фармакокинетические свойства, стабильность in vivo и способность к релаксации.

Альтернативно, ковалентный конъюгат, который содержит как остаток линкера, так и хелатирующий остаток или предшественник хелатирующего остатка, можно непосредственно подвергать реакции с пептидом, имеющим соответствующую концевую функциональную группу. Одним примером такого ковалентного конъюгата, способного взаимодействовать с концевыми корбоксилатными группами, показан ниже



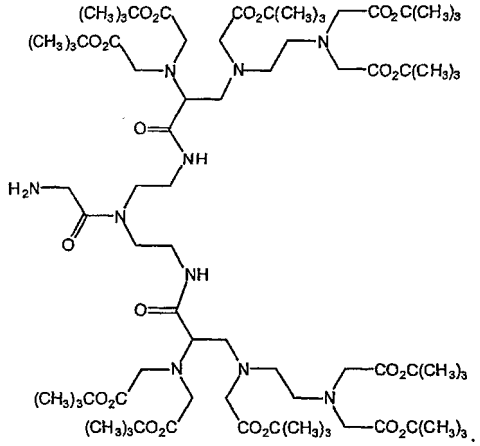

где n=1-4 и $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо представляют собой ацетатную группу, ацетамидную группу или ацетоксигруппу.

Другой пример такого ковалентного конъюгата имеет следующую структуру:

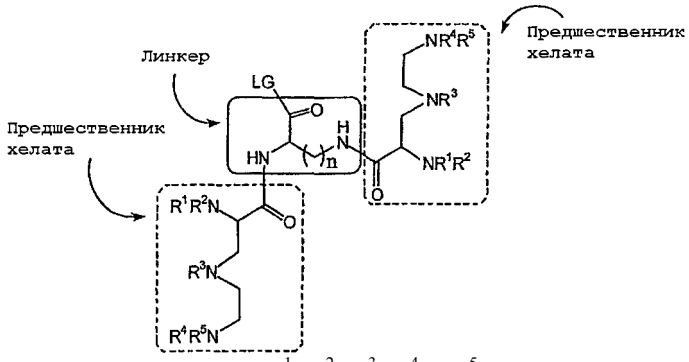



где $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо представляют собой ацетатную группу, ацетамидную группу или ацетоксигруппу.

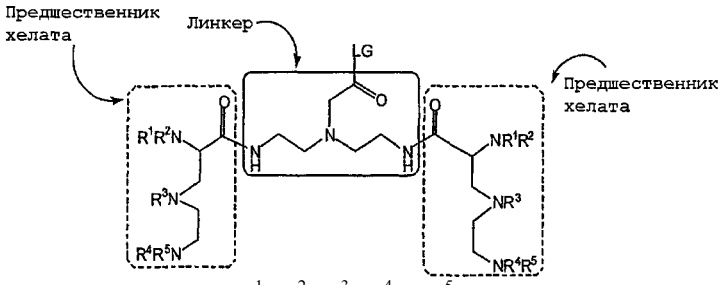
Пример ковалентного конъюгата, применимого для превращения модифицированного пептида с функциональными карбоксилатными группами на двух концах в предшественник визуализирующего вещества, имеет следующую структуру:



Примерами ковалентных конъюгатов, способных взаимодействовать с функциональными аминогруппами на модифицированном пептиде, являются

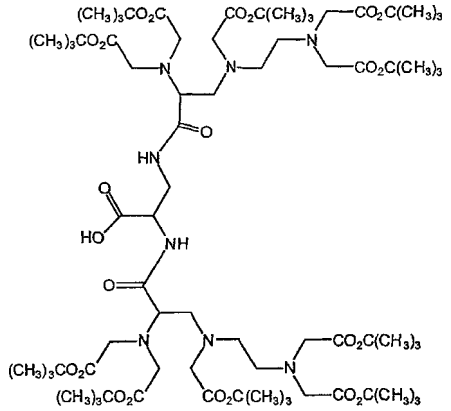



где LG означает удаляемую группу, n=1-4 и $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо представляют собой ацетатную группу, ацетамидную группу или ацетоксигруппу и

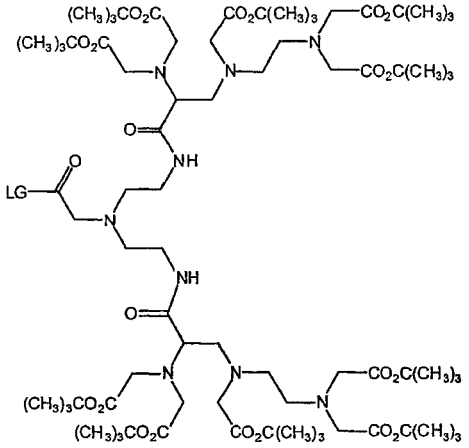



где LG означает удаляемую группу, где $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо представляют собой ацетатную группу, ацетамидную группу или ацетоксигруппу.

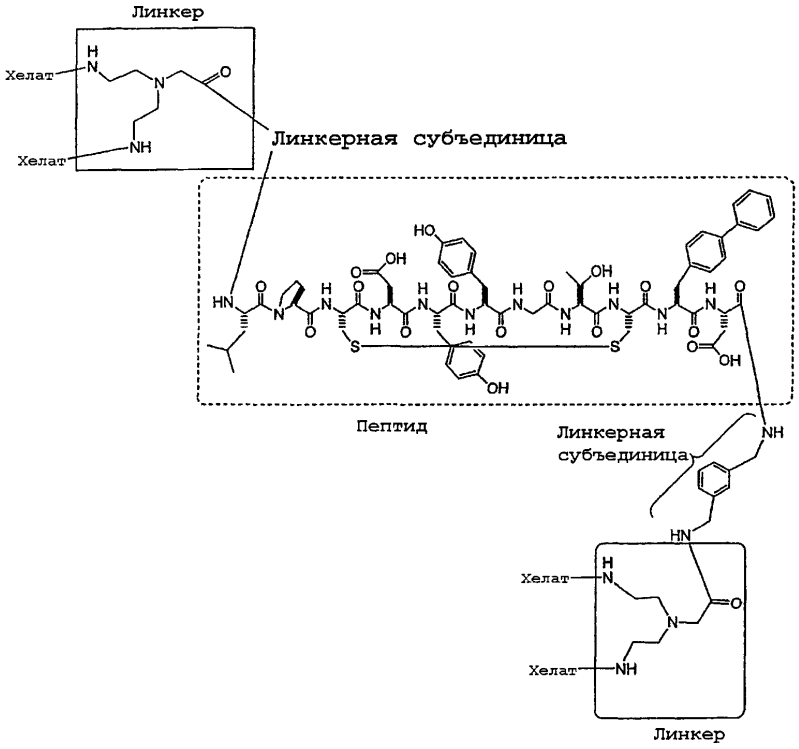
Ковалентный конъюгат, особенно применимый для синтеза мультимерного контрастного вещества, имеет следующую структуру, в дальнейшем называемую «синтон №1»



Другой вариант ковалентного конъюгата, применимого для синтеза мультимера, имеет следующую структуру, в дальнейшем называемую «синтон №2»

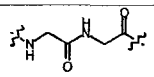
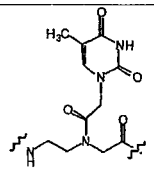


В следующем примере контрастного вещества для МРВ согласно изобретению, который содержит пептид, указанный выше, показано влияние N-концевого линкера на способность к релаксации контрастного вещества для МРВ




В данном примере «хелат» относится к bb-DTPA-Gd (III).

«Линкерную субъединицу», указанную выше, изменяли со следующими результатами (способности к релаксации на ион Gd (III) определяли при 20 МГц и 35°C, единицы представляют собой $мМ^{-1}$ $с^{-1}$)

| Аффинность к фибрину | N-концевая линкерная субъединица | Способность к релаксации, PBS | Способность к релаксации. Фибрин DD(E) (10 мг/мл) |
|---|---|---|---|
| Структура 15 Ki=4,0 мкМ |  | 11,7 | 18,7 |
| Структура 16 Ki=3,4 мкМ |  | 12,6 | 29,5 |
| Структура 32 Ki=4,7 мкМ | (прямая связь) | 12,5 | 21,6 |

Как показано выше, структуры 15 и 16 сходны с 32, за исключением разных N-концевых линкерных субъединиц. Экспериментально полученные результаты показывают, что линкер может влиять на способность к релаксации, а также на другие характеристики контрастного вещества согласно изобретению.

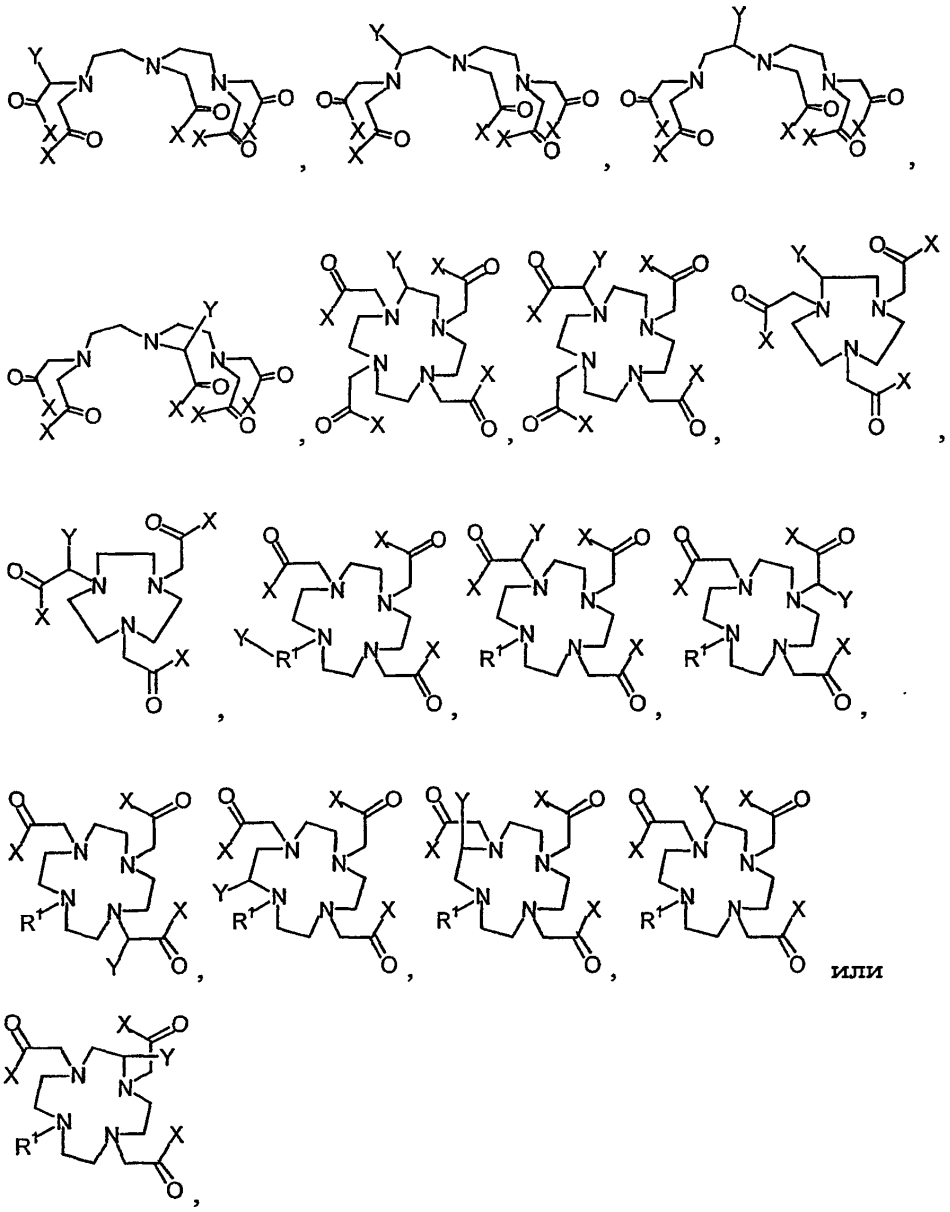
Хелатирующие остатки и реагенты.

Хелатирующие остатки представляют собой хелатирующие лиганды в комплексе с ионами металлов. Указанные хелатирующие остатки содержат синтетический остаток, способный образовывать место связывания с линкером, линкерной субъединицей и/или модифицированным пептидом. Один или несколько хелатирующих остатков могут быть ковалентно конъюгированы с функциональной группой на каждом конце модифицированного пептида. В одном варианте хелат связан с линкерной субъединицей. В другом варианте хелат связан с остатком линкера. В других вариантах хелат может быть конъюгирован с остатком линкера с образованием ковалентного конъюгата до связывания ковалентного конъюгата с модифицированным пептидом.

Предшественники хелатирующих остатков представляют собой хелатирующие лиганды, которые не подвергались комплексообразованию с ионами металлов. Хелатирующие лиганды могут иметь защитные группы или могут быть предшественниками хелатирующих лигандов. Предшественники хелатирующих остатков имеют синтетический остаток, способный образовывать место связывания линкера, линкерной субъединицы и/или модифицированного пептида. Предшественники хелатирующих остатков можно превратить в хелатирующие остатки в результате образования комплекса с ионом металла. Один

или несколько предшественников остатков хелата могут быть ковалентно конъюгированы с функциональной группой на каждом конце модифицированного пептида. В одном варианте предшественник хелата может быть связан с линкерной субъединицей. В другом варианте предшественник хелата связан с остатком линкера. В других вариантах предшественник хелата может быть конъюгирован с остатком линкера с образованием ковалентного конъюгата до связывания ковалентного конъюгата с модифицированным пептидом.

Предшественники остатков хелата и остатки хелата согласно данному изобретению могут иметь любую из следующих структур:

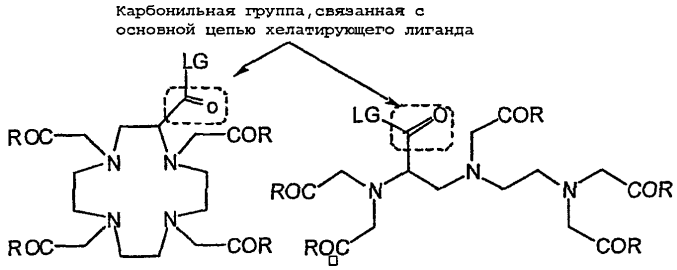


где X представляет собой содержащую гетероатом группу, являющуюся донором электрона, способную координационно связывать катион металла, такую как $O^-$, OH, $NH_2$, $OPO_3^{2-}$, NHR или OR, где R означает любую алифатическую группу; $R^1$ представляет собой незаряженный химический остаток, выбранный из водорода, любой алифатической группы, алкильной группы или циклоалкильной группы или ее незаряженного замещенного варианта (например, спирты); и Y представляет собой синтетический остаток (например, способный образовывать место связывания или являющийся местом связывания с функциональной группой модифицированного пептида, линкера и/или линкерной субъединицы либо непосредственно, либо с помощью промежуточного карбонила, метилена, метилена-кислорода, тиокарбонила). Можно использовать остатки, содержащие (остаток хелата) или не содержащие (остаток предшественника хелата) координационно связанный ион металла.

В контрастных веществах согласно изобретению можно использовать множество хелатирующих лигандов. Такие хелатирующие лиганды включают, но не ограничены указанным, производные DTPA, DOTA, NOTA и DO3A. В случае МРВ особенно применимы такие хелаты металлов, как диэтилентриаминпентаацетат гадолиния (DTPA·Gd), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N', N'', N''-тетраацетат тетраа-

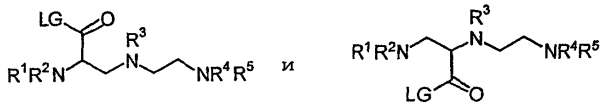
мина гадолиния (DOTA·Gd) и 1,4,7,10-тетрациклододекан-1,4,7-триацетат гадолиния (DOSA·Gd). Особенно применимые хелаты включают bb(CO)DTPA·Gd. В случае применения в МРВ Gd(III) может быть заменен другими металлами.

Примеры функционализированных хелатов, которые были синтезированы в целях получения мультимерных хелатов, включают pNCS-Bz-DTPA [Martin, V., et al. Bioconjugate Chem. 6, 616-23, 1995] и Gd (4-NCS-фенил) аминокарбонилметил-DO3A [Ramachandran, R. et al., Invest. Rad. 1998, 33 (11), 779-797]. Для достижения оптимальных параметров способности к релаксации при связывании с мишенью часто желательно минимизировать движение хелата, и поэтому желательно минимальное количество ковалентных связей, связывающих мишень с хелатирующим лигандом. Ниже приведен пример реагента, который включает хелатирующий лиганд с карбонильной группой в основной цепи для связывания с функциональной аминогруппой или линкерной субъединицей или линкером, где «LG» означает удаляемую группу (например, активированный сложный эфир) и R представляет собой группу, которую можно легко отщепить, чтобы образовать $O^-$ (-OtBu, например, сложный эфир карбоновой кислоты), тем самым, образуя карбоксилат с соседней карбонильной группой

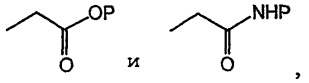



Обнаружено, что благодаря химическому мотиву карбонила, непосредственно близлежащего к хелатирующему лиганду, образуется класс контрастных веществ для МРВ с высокой способностью к релаксации.

Данное изобретение также относится к промежуточным продуктам, применимым для синтеза контрастных веществ для МРВ, соответствующим следующим формулам:

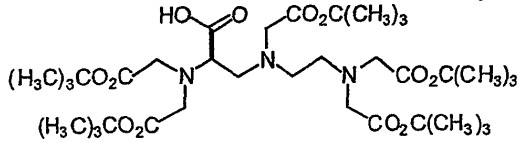



где $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ могут быть любым защищенным или незащищенным ацетильным лигандом, подходящим для образования хелата парамагнитного металла с подходящей константой образования, включая следующие примеры:

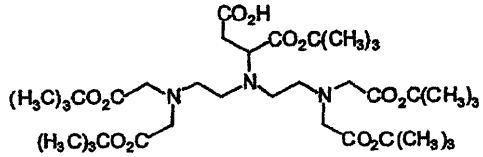



где P означает любую защитную группу, включая бензильную и трет-бутильную группы. LG означает «удаляемую группу» и представляет собой -OH и формы его сложного эфира, включая сложные NHS-эфиры, пентафторфенол и другие активированные сложные эфиры.

В особенно применимом варианте LG означает -OH и $R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ представляют собой $CH_2CO_2O^tBu$, в дальнейшем называемом «синтон №3» и имеющем следующую структуру:




Альтернативно, в синтезе контрастных веществ согласно изобретению можно использовать следующий реагент:




(см. Syn. Comm. 30, 3755 (2000)).

Данное изобретение также относится к способам получения соединений. В частности новая реакция окисления позволяет легко получать синтон №3, предпочтительный вариант хелатирующего лиганда. Синтез синтона №3 можно успешно осуществить двумя различными путями синтеза, оба из которых начинаются с гидроксиметилдиэтилентриамина. Один путь включает последовательность двух стадий синтеза (алкилирование с последующим окислением), а другой включает способ, состоящий из шести ста-

дий (введение защиты, окисление, этерификация, снятие защиты, алкилирование и гидрогенолиз). Оба пути дают синтон №3 высокой химической и оптической чистоты (см. примеры ниже).

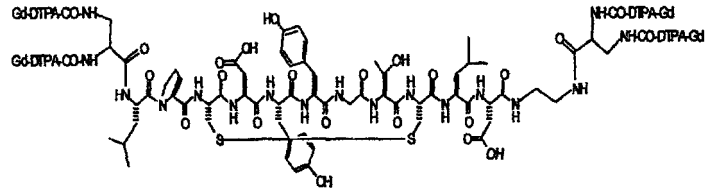
В патенте США № 5637759 раскрыт синтез синтона №1 из 2,3-диаминопропионовой кислоты и азализина с использованием протокола селективного гидролиза с помощью тиофеноксида натрия. В способе, описанном в данной заявке, исключено применение указанного токсичного реагента.

Синтез контрастных веществ

Синтез основанных на пептидах контрастных веществ можно осуществить в ходе следующих стадий. Сначала можно синтезировать направляющий к мишени пептид с С-концевой линкерной субъединицей или без нее, обычно с использованием твердофазного синтеза пептидов. В случае циклических пептидов, приведенных в данном описании, защищенный линейный пептид можно подвергнуть циклизации в растворе или на смоле. Незащищенный пептид также можно подвергнуть циклизации в растворе или на смоле. С-концевая линкерная субъединица может быть легко получена на основе смолы для твердофазного синтеза и N-концевой линкер или N-концевая линкерная субъединица могут быть связаны с пептидом во время твердофазного синтеза. Обычно после циклизации остатки линкерная субъединица-предшественник хелата связывали с пептидом. Защитные группы удаляли, чтобы получить предшественники лигандов и затем получали хелаты. Радионуклидные соединения согласно данному изобретению получали из предшественников лигандов с использованием коммерчески доступных радионуклидов (например, $^{99m}$Tc от Nycomed Amersham Boston, катал. № RX-290195, $^{111}$In от NEN Life Science Products, катал. № NEZ304 или $^{153}$Gd от NEN Life Science Products, катал. № NEZ142) с помощью реакции в водной среде, обычно при pH 4-6 в течение 1 ч. В случае оптических контрастных веществ предшественник хелата мог быть замещен органическим красителем.

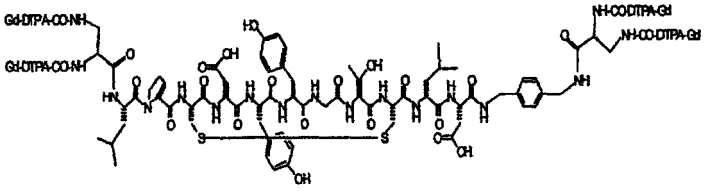
Структура контрастных веществ

4

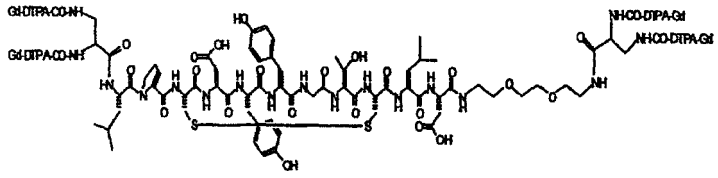



[синтез аналогичен синтезу 32].

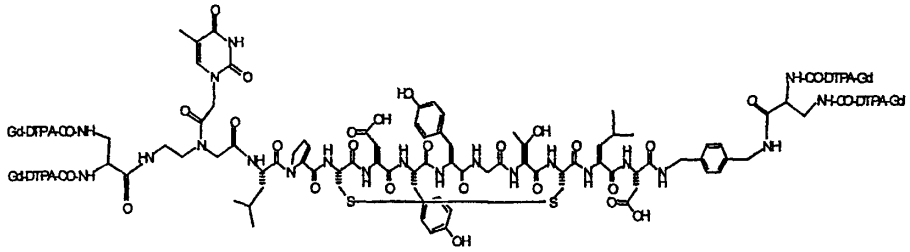
5



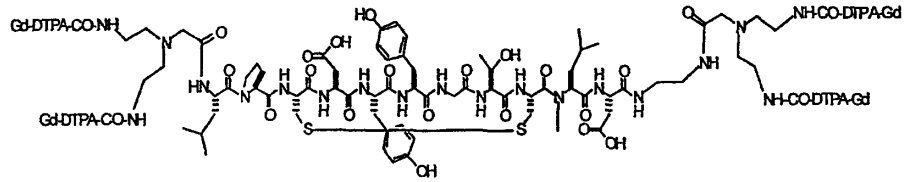

6



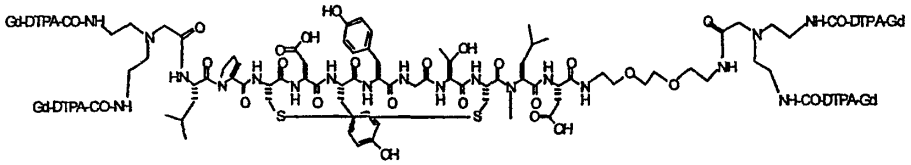
7


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

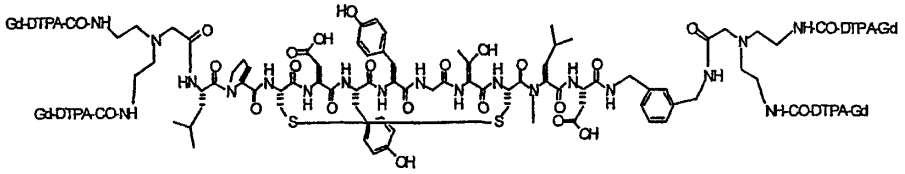
8


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

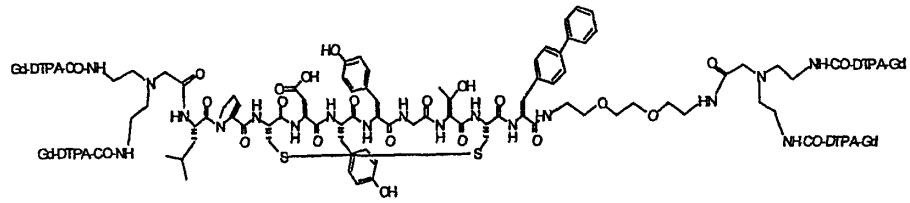
9


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

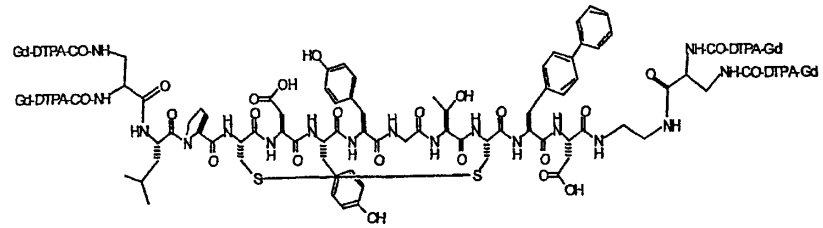
10


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

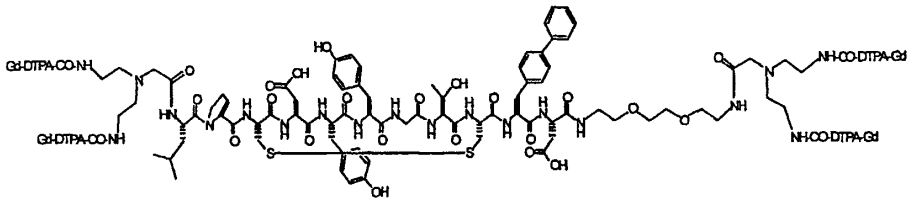
11


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

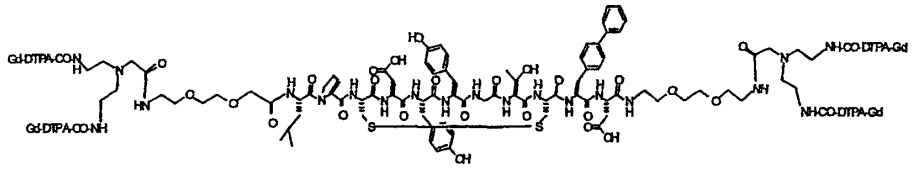
12


Gd-DTPA-CO-NH
Gd-DTPA-CO-NH
NH-CO-DTPA-Gd
NH-CO-DTPA-Gd

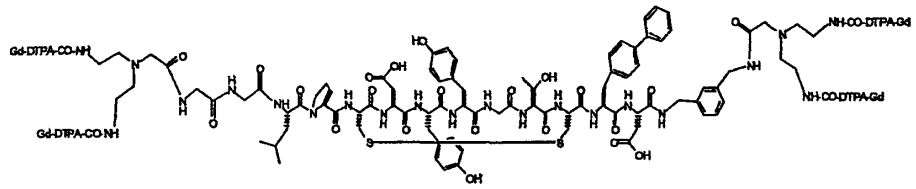
13



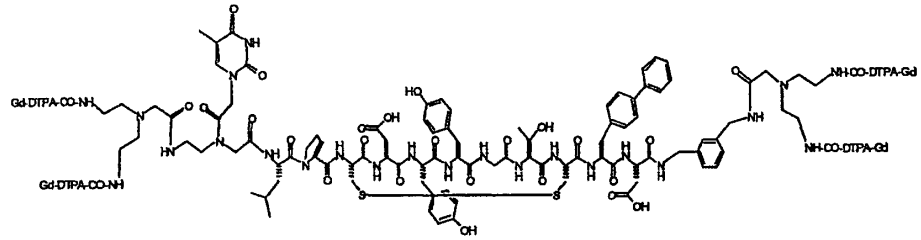

14



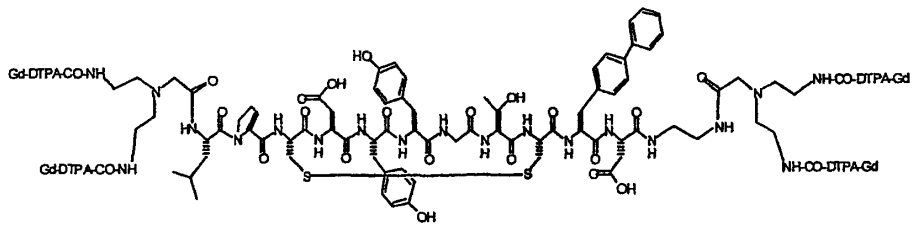

15



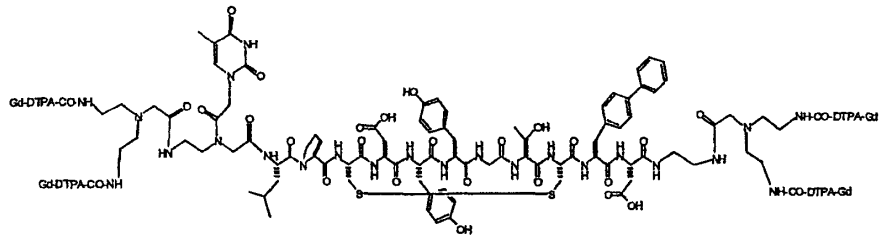

16



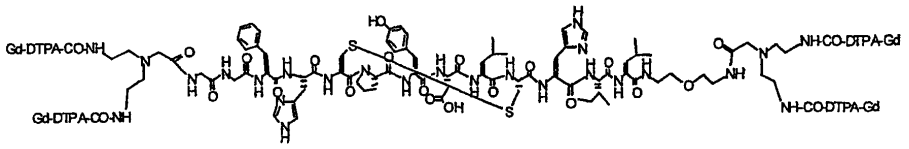

17



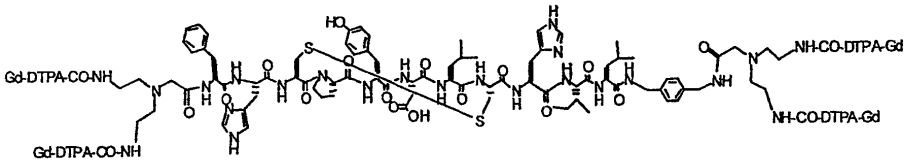

18



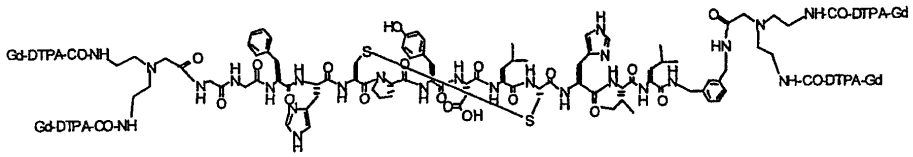
19



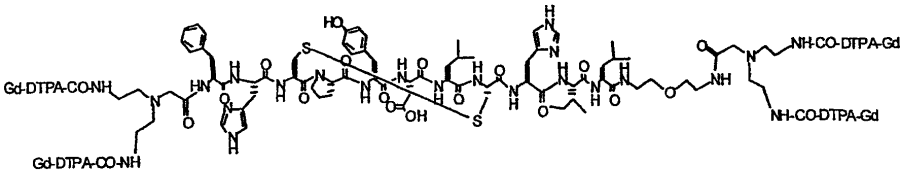

20



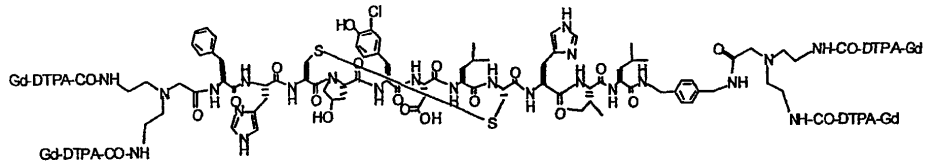

21



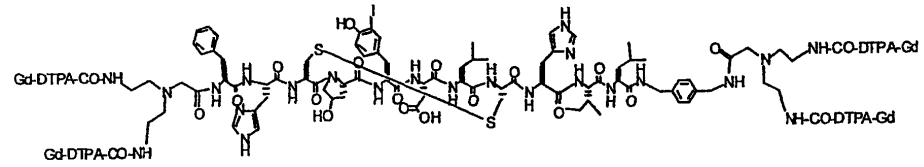

22



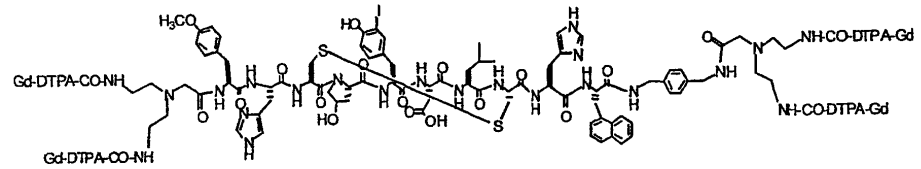

23



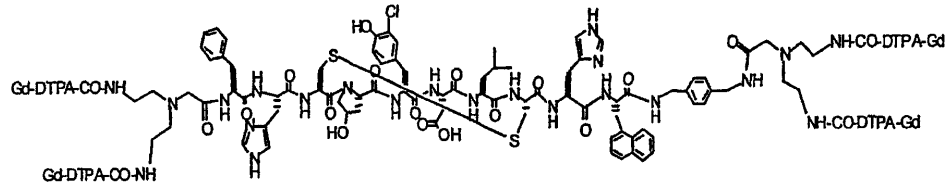

24



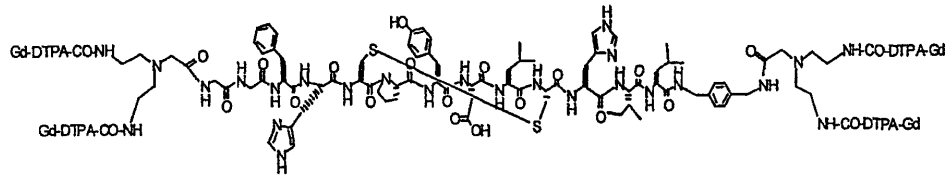

25



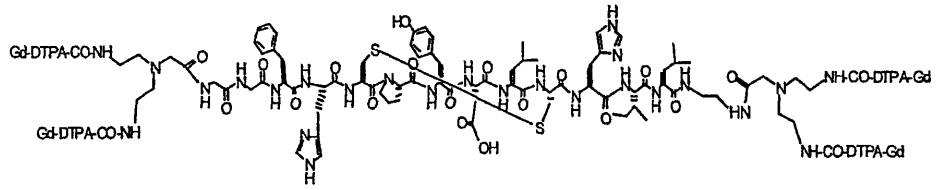
26



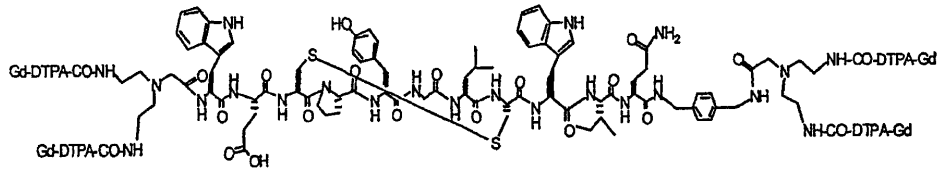

27



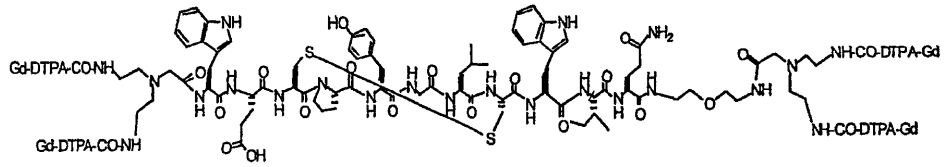

28



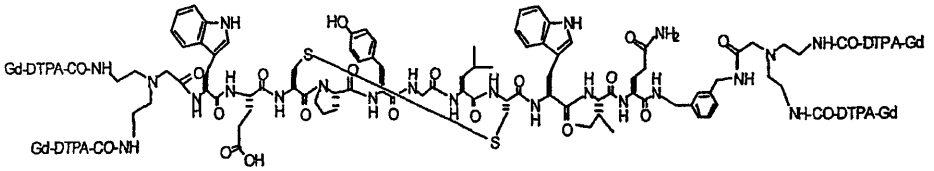

29



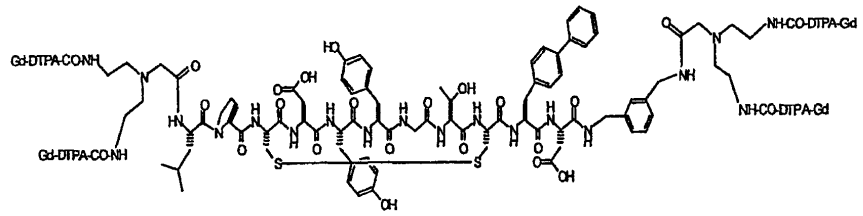

30



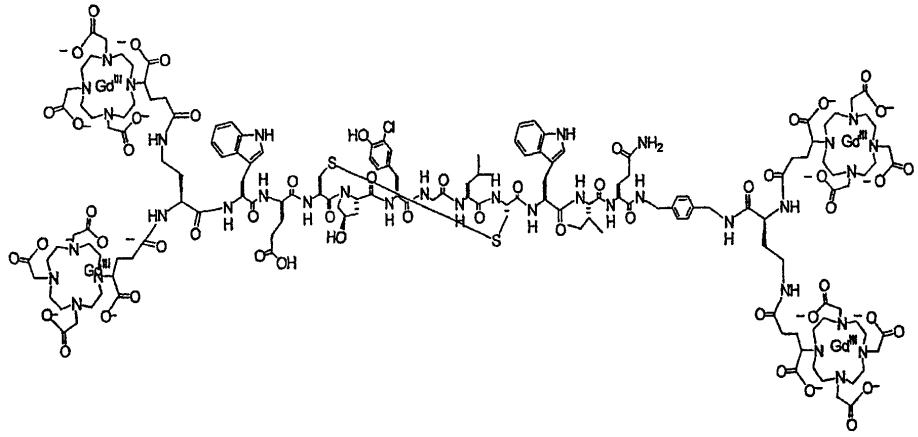

31



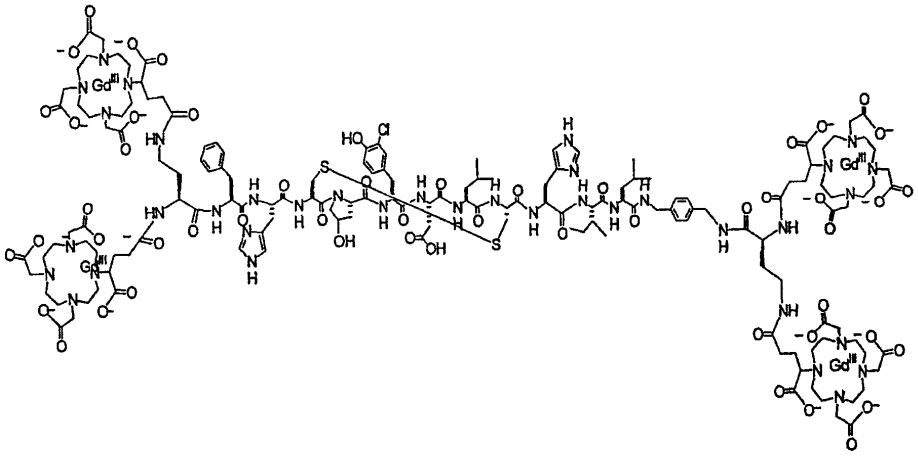
32



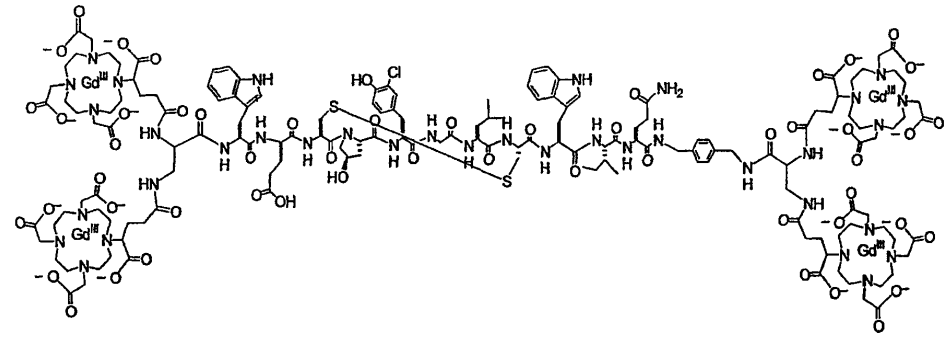

33



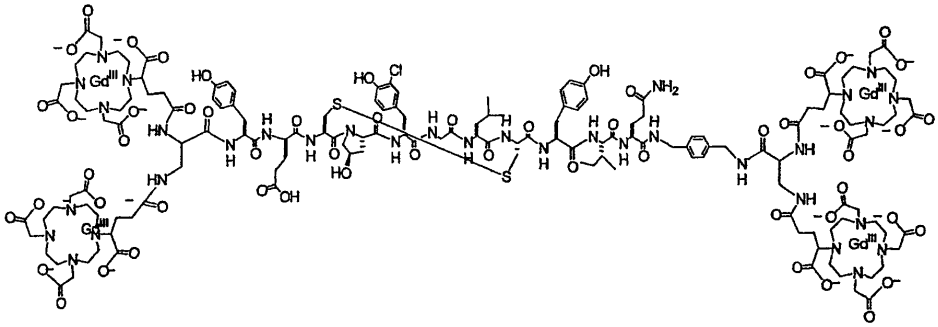
34



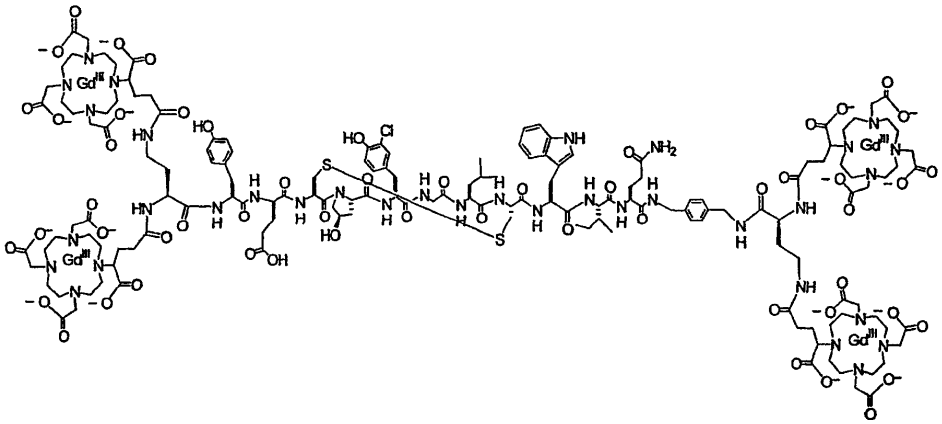
35



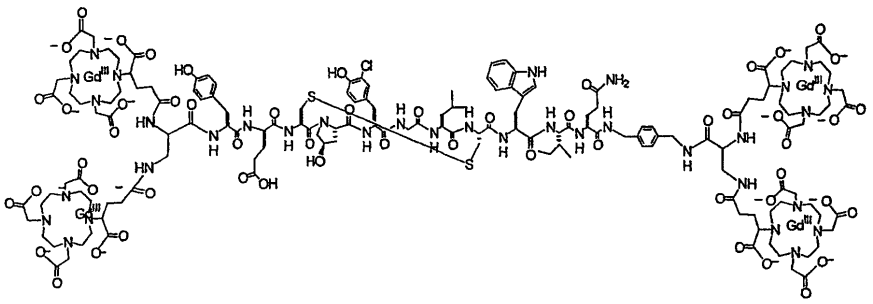
36



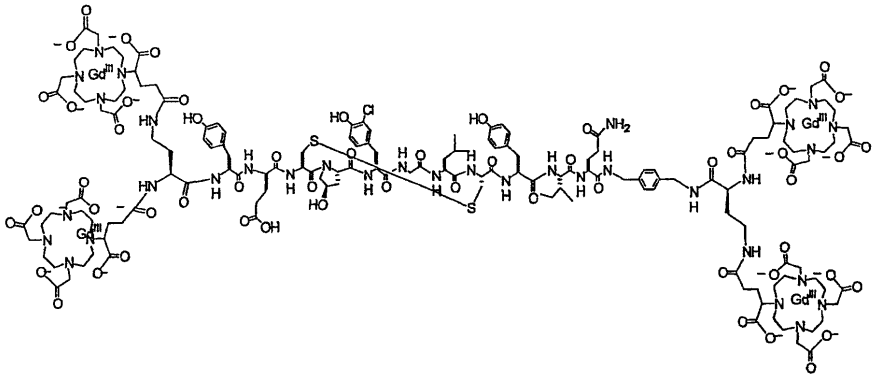
37



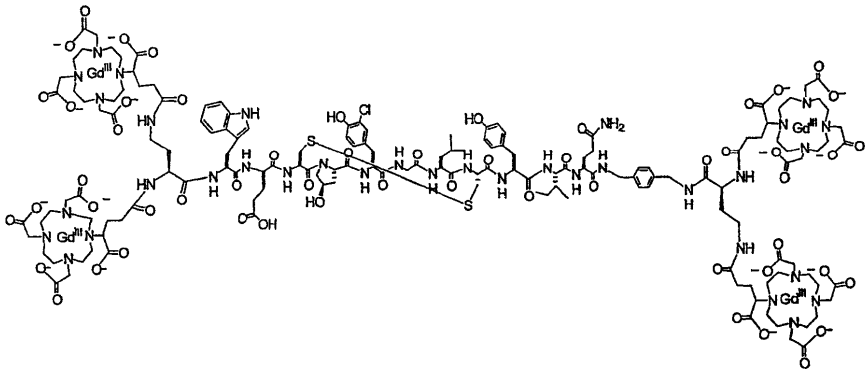
38



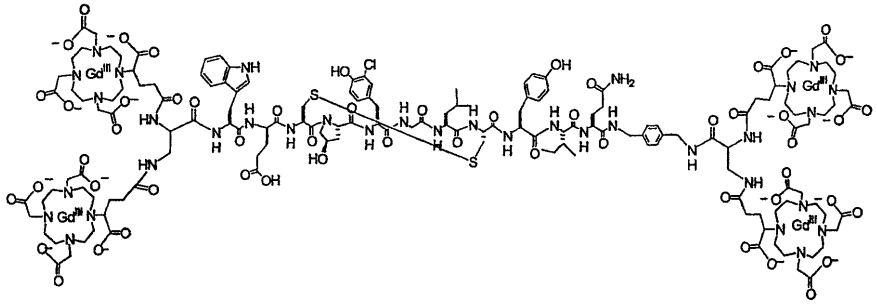
39



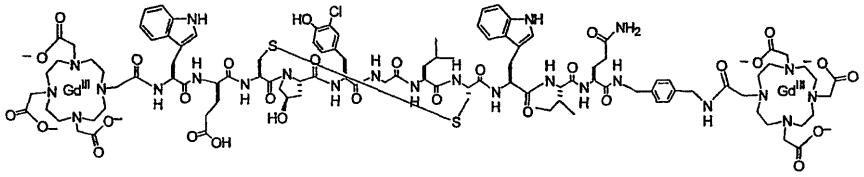
40



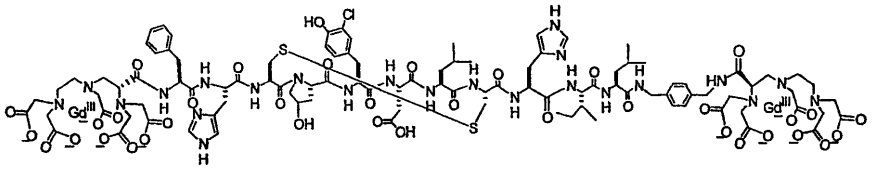
41



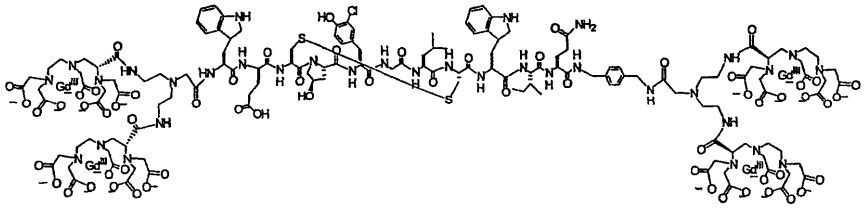
42



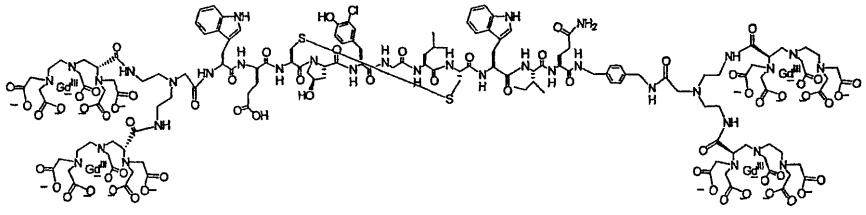
43



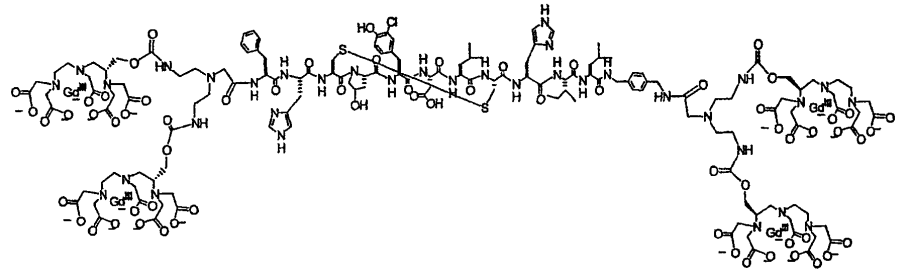
44



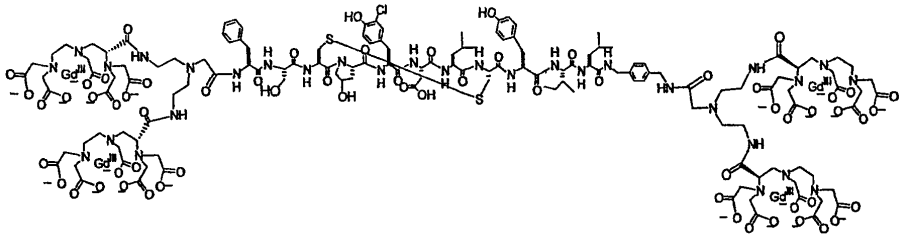
45



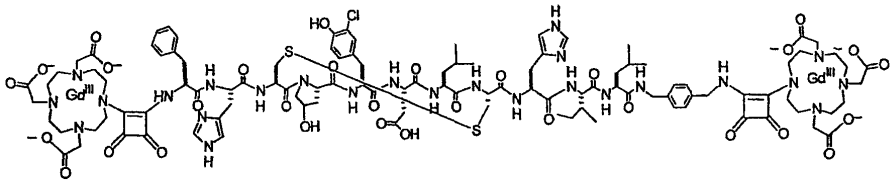
46



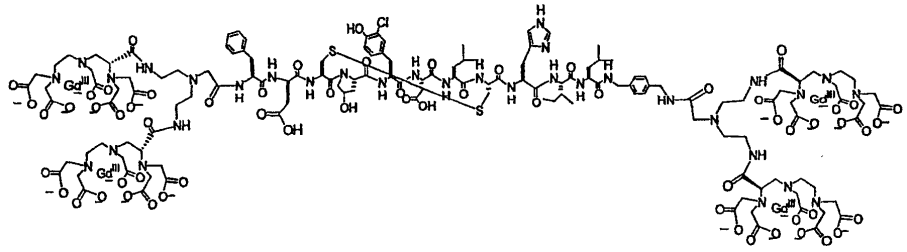
47



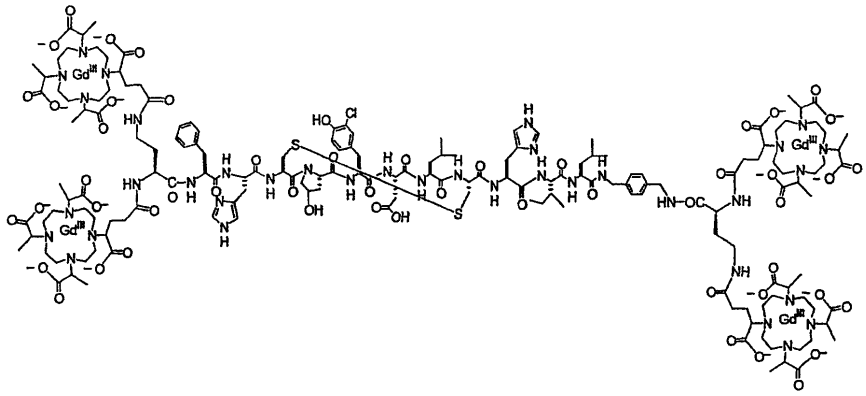
48



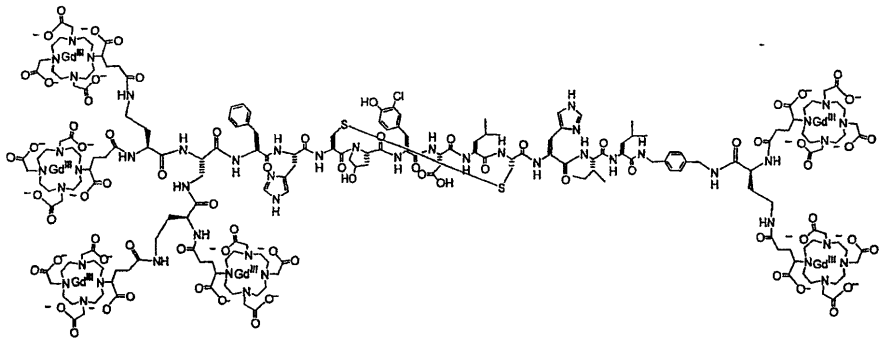
49



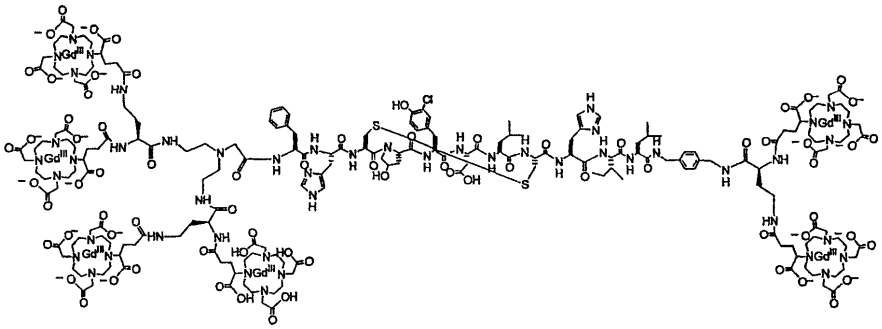
50



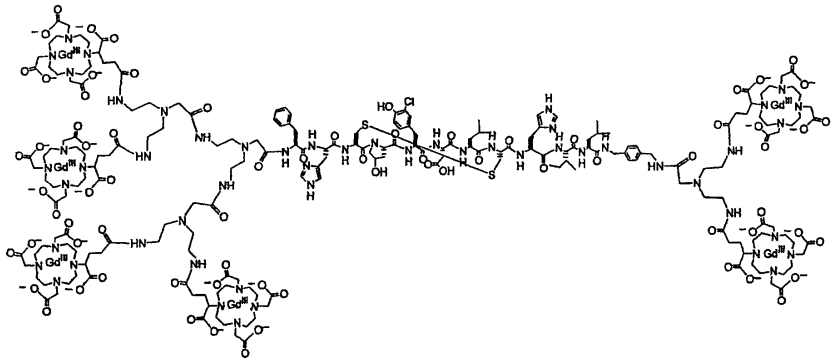
51



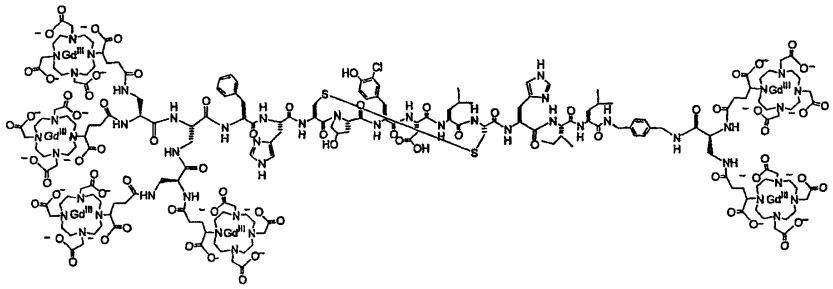
52



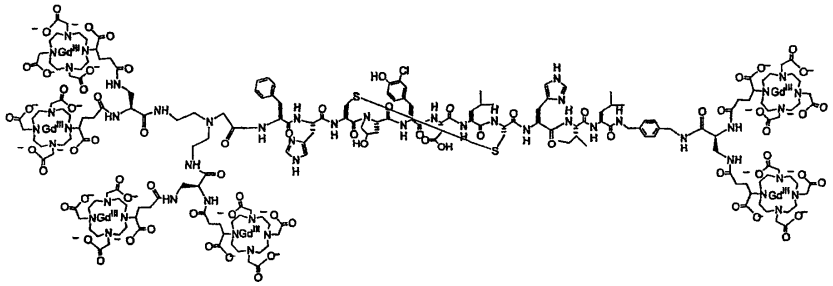
53



54



55



Свойства контрастных веществ

Соединения согласно данному изобретению могут быть более стабильными к расщеплению эндогенными ферментами, чем исходный пептид (т.е. пептид без каких-либо связанных хелатов), пептид с одним или несколькими хелатами, связанными с N-концом, или пептид с одним или несколькими хелатами, связанными с С-концом. Чтобы оценить стабильность in vivo тестируемые соединения можно инкубировать с гомогенатами печени крыс. Через выбранные интервалы реакции можно гасить и реакционные смеси центрифугировать и надосадки можно анализировать с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, чтобы определить количество оставшегося соединения.

Соединения согласно изобретению также могут связывать мишень, такую как сывороточный альбумин человека (ЧСА) или фибрин. Например, по меньшей мере 10% (например, по меньшей мере 50, 80, 90, 92, 94 или 96%) контрастного вещества может быть связано с требуемой мишенью при физиологически подходящих концентрациях лекарственного средства и мишени. Степень связывания контрастного вещества с мишенью, такой как ЧСА или фибрин, можно оценить множеством способов равновесного связывания. Например, связывание с ЧСА можно измерить с помощью ультрафильтрации. Для измерения связывания с фибрином, сгусток фибрина можно образовать в лунке планшета для микротитрования и подвергнуть контакту с направляющей к мишени группой. После инкубации в течение времени, достаточного для установления равновесия, супернатант удаляют аспирацией (нерастворимый фибрин остается связанным в виде желеобразного сгустка на дне лунки). Затем измеряют концентрацию несвязанной направляющей к мишени группы в супернатанте. В обоих способах концентрацию связанного контрастного вещества определяют в виде разности между суммарной концентрацией направляющей к мишени группы и концентрацией несвязанной направляющей к мишени группы после анализа связывания. Связанная часть равна концентрации связанной направляющей к мишени группы, деленной на общую концентрацию направляющей к мишени группы.

Соединения согласно изобретению могут проявлять высокую способность к релаксации в результате связывания мишени (например, фибрина), что может приводить к лучшему разрешению изображения. Увеличение способности к релаксации при связывании обычно является 1,5-кратным или большим (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10-кратное увеличение способности к релаксации). Осо-

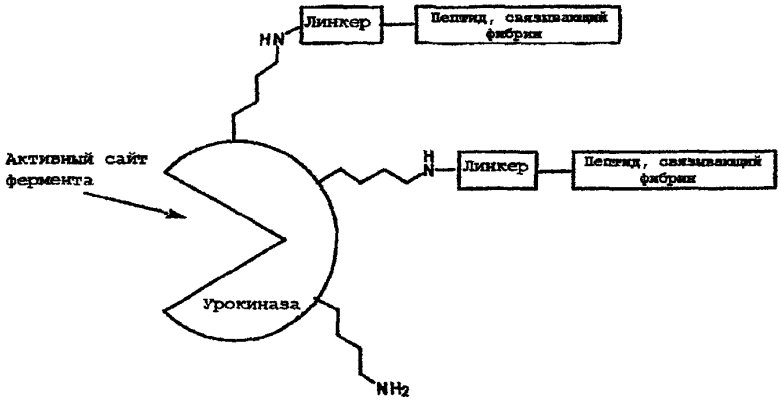
бенно применимы направленные к мишени контрастные вещества, имеющие 7-8-кратное, 9-10-кратное или даже большее, чем 10-кратное увеличение способности к релаксации. Обычно способность к релаксации измеряют с использованием ЯМР-спектрометра. Предпочтительная способность к релаксации контрастного вещества для МРВ при 20 МГц и 37°С составляет по меньшей мере 10 $мМ^{-1}с^{-1}$ на парамагнитный ион металла (например, по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 60 $мМ^{-1}с^{-1}$ на парамагнитный ион металла). Особенно применимы контрастные вещества, имеющие способность к релаксации больше чем 60 $мМ^{-1}с^{-1}$ при 20 МГц и 37°С.

Как указано в данном описании, можно наблюдать увеличение поглощения направленных к мишени контрастных веществ сгустками. Специфичность поглощения направленных к фибрину веществ можно определить в результате сравнения поглощения вещества сгустками крови с поглощением кровью. Для более подробного описания смотри пример 11. Специфичность направленных к фибрину контрастных веществ также можно показать с использованием МРВ и наблюдения усиления сигнала от сгустков.

Применение пептидов и контрастных веществ согласно изобретению

Пептиды согласно изобретению можно использовать для улучшения терапии в случае лечения тромбоэмболического заболевания. Современная тромболитическая терапия имеет ограничения, включая значительный риск кровотечения, невозможность восстановления тока крови, тромботическую реокклюзию после отмены лечения и лаг-период между началом терапии и лизисом сгустка. Улучшенный терапевтический индекс можно получить в результате конъюгации направляющего к фибрину пептида согласно изобретению с тромболитическим агентом (например, белковым тромболитиком, таким как активаторы плазминогена человека или бактериального происхождения). Такие конъюгаты могут локально активировать плазминоген или увеличивать эндогенные уровни tPA. Например, направляющий к фибрину пептид можно конъюгировать с активаторами плазминогена человека, включая рекомбинантный активатор плазминогена тканевого типа (tPA), проурокиназу и урокиназу (как одноцепочечные, так и двухцепочечные формы), полученный из бактерий активатор плазминогена, включая стрептокиназу, стафилокиназу, и полученные из животных активаторы плазминогена, включая активатор плазминогена летучей мыши-вампир. Кроме того, направляющие к фибрину пептиды можно конъюгировать с фибринолитиками, такими как фибролаза медноголовой змеи, которая проявляет прямую фибринолитическую активность. Такие ферменты и белки можно получить коммерчески, экстрагировать из природных источников или тканей или получить рекомбинантно.

Композиции согласно изобретению могут быть связаны или конденсированы известными способами с использованием такого типа линкеров, которые обсуждались выше по отношению к конструированию контрастных веществ для МРВ. Конъюгирование с белком можно успешно осуществить стандартными химическими способами, включая образование амидных, сложноэфирных, дисульфидных и тиоэфирных связей. Например, связывающий фибрин пептид можно ковалентно связать либо непосредственно, либо через линкер с белком за счет образования амидной связи между связывающим фибрин пептидом или линкером и остатками лизина на поверхности белка. Такие поверхностные остатки лизина обычно удалены от каталитического сайта фермента. Таким образом, связанные остатки не мешают каталитической активности фермента. Множественное лигирование можно осуществить в одну стадию. Соотношение направляющего к фибрину пептида с тромболитическим или фибринолитическим агентом можно регулировать посредством корректировки стехиометрии при химических реакциях лигирования. Множественное лигирование особенно применимо в случае лиганда, связывающего фибрин в умеренной степени, так как более высокую аффинность связывания можно реализовать посредством так называемого эффекта «авидности». В частности, можно использовать связывающий агент или активированный сложный эфир, чтобы добиться образования амидной связи между лизином и связывающим фибрин остатком или линкером. На приведенной ниже схеме показан пример гибридной молекулы, образованной химическим лигированием урокиназы с множественными связывающими фибрин пептидами через остатки линкера. Показан ряд поверхностных остатков лизина и ряд связывающих фибрин молекул. Альтернативно, направляющий к фибрину пептид можно включить в гибридную молекулу с использованием технологии рекомбинантной ДНК.



В некоторых вариантах пептиды согласно изобретению можно связать с тромболитическим агентом с помощью линкера, содержащего сайт расщепления ферментом, например сайт ферментативного расщепления, обычно расщепляемый ферментами в каскаде коагуляции, такой как сайты расщепления фактором Ха, тромбином или плазмином, и т.д.. Тромболитический агент не активируется до тех пор, пока он не отщепится от связывающих сгусток композиций согласно изобретению в месте сгустка, при этом может быть минимизирован риск нежелательных явлений кровотечения в местах, удаленных от сгустка. Кроме того, тромболитические остатки можно связать с основанным на пептиде направленным к мишени мультимерным контрастным веществом так, чтобы сгусток можно было идентифицировать, визуализировать и растворять.

Контрастные вещества, полученные согласно данному описанию, можно использовать таким же образом, как и обычные контрастные вещества для МРВ, и они применимы для диагностики тромбоза глубоких вен, легочных эмболов, коронарного тромбоза, тромбоза сонной и внутричерепных артерий, тромбов предсердий и желудочков, тромбов дуги аорты и высокого риска образования бляшек. При визуализации тромба могут быть предпочтительны некоторые МР-способы и последовательности импульсов, чтобы усилить контраст тромба по сравнению с окружающей кровью и тканями. Указанные способы включают, но не ограничены указанным, последовательности при темнокровной ангиографии, при которой прибегают к тому, чтобы сделать кровь темной, такие как последовательности быстрого спин-эхо и последовательности градиентного эхо с прерыванием потока. Указанные способы также включают независимые от потока способы, которые усиливают различие по контрасту благодаря различию T1 между контрастно усиленным тромбом и кровью и тканью, такие как последовательности, полученные при инверсии-восстановлении или насыщении-восстановлении, которые будут увеличивать контраст между тромбом и окружающей тканью. Способы подготовки в случае T2-методики также могут оказаться полезными. Наконец подготовка в случае методики переноса намагниченности также может улучшать контраст при использовании веществ согласно изобретению.

Композиции согласно изобретению, включающие пептиды, пептиды, конъюгированные с тромболитическими агентами, и направленные к мишени основанные на пептидах мультимерные контрастные вещества, могут быть приготовлены в виде фармацевтической композиции согласно обычным способам. В используемом в данном описании смысле соединения согласно изобретению могут включать их фармацевтически приемлемые производные. «Фармацевтически приемлемый» означает, что соединение или композицию можно вводить животному без недопустимых неблагоприятных эффектов. «Фармацевтически приемлемое производное» означает любую фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное соединения согласно данному изобретению, которое при введении реципиенту способно давать (прямо или опосредованно) соединение согласно данному изобретению или его активный метаболит или остаток. Другие производные представляют собой производные, которые увеличивают биодоступность соединений согласно данному изобретению, когда такие соединения вводят млекопитающему (например, позволяя перорально введенному соединению быстрее абсорбироваться в крови), или которые усиливают доставку исходного соединения в биологический отдел (например, в головной мозг или в лимфатическую систему), тем самым, увеличивая экспозицию по сравнению с исходным типом. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно данному изобретению включают в себя противоионы, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований, известных в данной области.

Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить любым путем, включая как пероральное, так и парентеральное введение. Парентеральное введение включает, но не ограничено указанным, подкожное, внутривенное, внутриартериальное, внутритканевое, интратекальное и внутрикавернозное введение. В том случае, когда введение является внутривенным, фармацевтические композиции можно назначать в виде болюса, в виде двух или более доз, разделенных во времени, или в виде инфузии с постоянным или нелинейным потоком. Таким образом, композиции согласно изобретению можно приготовить для любого пути введения.

Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоничном водном буфере. В случае необходимости композиция также может содержать солюбилизирующий агент, стабилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, чтобы уменьшить боль в месте инъекции. Как правило, ингредиенты будут поставляться по отдельности, например, в наборе, или смешанными вместе в единичной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или не содержащего воды концентрата. Композицию можно хранить в герметично запаянном сосуде, таком как ампула, или в саше с указанием количества активного вещества в единицах активности. В том случае, когда композицию вводят с помощью инфузии, она может готовиться и отпускаться во флаконе для инфузии, содержащем стерильную фармацевтически чистую «воду для инъекции», физиологический раствор или другие подходящие для внутривенного введения жидкости. Если композицию необходимо вводить путем инъекции, может прилагаться ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, для того, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению содержат соединения согласно данному

изобретению и их фармацевтически приемлемые соли с каким-либо фармацевтически приемлемым ингредиентом, эксципиентом, носителем, адъювантом или наполнителем.

Контрастное вещество предпочтительно вводят пациенту в форме инъекционной композиции. Способ введения контрастного вещества предпочтительно представляет собой парентеральное введение, что значит внутривенное, внутриартериальное, интратекальное, внутритканевое или внутрикавернозное введение. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению можно вводить млекопитающим, включая человека, подобно другим диагностическим и терапевтическим средствам. Доза, которую необходимо вводить, и способ введения будут зависеть от множества факторов, включая возраст, массу, пол, состояние пациента и генетические факторы, и, в конце концов, решение будет принимать медицинский персонал после экспериментальных определений различных доз и последующей визуализации, как описано в данной заявке. В общем, доза, необходимая для диагностической чувствительности или терапевтической эффективности, будет в пределах примерно от 0,001 до 50000 мкг/кг, предпочтительно от 0,01 до 25,0 мкг/кг массы тела хозяина. Оптимальную дозу можно определить эмпирически, следуя данному описанию.

Что касается лечения тромболитических состояний, количество вводимого вещества будет зависеть от серьезности тромбоэмболического состояния и положения и места сгустка. Решить, какую дозу необходимо ввести и каким способом введения, в зависимости от обстоятельств может врач, контролирующий лечение. В общем, дозы объединенной композиции/конъюгата с тромболитическим агентом будут проистекать из доз, которые являются обычными для тромболитического агента, применяемого отдельно, хотя повышенная аффинность в отношении связывания фибрина/сгустка, добавляемая за счет композиций, заявленных в данном описании, может позволить уменьшить стандартную дозу тромболитика. Конкретными тромболитическими средствами, предусмотренными для применения в случае указанной терапии (с примерами доз и способа введения) являются следующие средства:

стрептокиназа: 1-3 мегаединицы в течение от 30 мин до 3 ч;

анистеплаза: 30 единиц; 2-5-минутная инъекция;

tPA (дикого типа) 50-150 мг; инфузия продолжительностью до 6 ч;

двухцепочечная урокиназа: (40-100 мг); инфузия продолжительностью до 6 ч;

одноцепочечная урокиназа (scuPA): 3-12 мегаединиц (30-100 мг; инфузия продолжительностью до 5 ч;

гибридные активаторы плазминогена и производные: 20-100 мг; инъекция или инфузия;

мутеины активаторов плазминогена: 10-100 мг; инъекция или инфузия.

Далее изобретение будет описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры.

Синтез, характеристика и применение нескольких композиций контрастных веществ с высокой способностью к релаксации согласно изобретению далее будут проиллюстрированы в следующих примерах. Конкретные параметры, включенные в следующие примеры, предназначены для иллюстрации практического применения изобретения и они никоим образом не ограничивают объем изобретения. Специалистам в данной области будут понятны, или специалисты могут выяснить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов и способов, описанных в данной заявке. Подразумевается, что такие эксперименты входят в объем формулы изобретения.

Пример 1. Синтез основанных на пептидах веществ для МР-визуализации.

Пептид с остатком линкерной субъединицы, связанным с С-концом (Р-[остаток линкерной субъединицы]). Незащищенный пептид получали, используя стандартную Fmoc-методику и смолу на основе диаминотритила. Пептид подвергали циклизации, используя трифторацетат таллия, на смоле или в растворе. После отщепления от смолы незащищенный пептид очищали ОФ-ВЭЖХ (колонка С-18, $H_2O/CH_3CN$/ТФУ).

Остаток линкера: к раствору Boc-Dpr(Boc)-OH.DCHA (1 экв.) и пентафторфенола (1,2 экв.) в дихлорметане добавляли PS-карбодиимид (1,2-1,5 экв.). Смесь встряхивали в течение 3-5 ч при комнатной температуре. После того, как результаты ЖХ-масс-спектроскопии показали, что реакция завершилась, смолу удаляли фильтрованием и растворитель выпаривали при пониженном давлении, получая неочищенный остаток линкера (Boc-Dpr(Boc)-Opft (пентафторфениловый эфир (N-α-Boc-N-β-Boc-L-диаминопропионовой кислоты, 356-128)) в виде белой пены.

Предшественник вещества для МР-визуализации: К раствору Р-[остаток линкерной субъединицы] (1 экв.) и остатка линкера {Boc-Dpr(Boc)-Opft} (2,2 экв.) в ДМФА добавляли DIPEA (4-6 экв.). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После того, как результаты ЖХ-масс-спектрометрии показали, что реакция была завершена, растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем неочищенный продукт перемешивали в смеси ТФУ, воды и анизола (90%/5%/5%) при комнатной температуре в течение 3 ч. Добавляли диэтиловый эфир и образовывался белый осадок, который очищали ОФ-ВЭЖХ (колонка С-18, $H_2O/CH_3CN$/ТФУ), получая предшественник вещества для МР-визуализации (тетракисаминопептид) в виде белого твердого вещества.

Остаток предшественника хелата: DOTAGA-Opft. К раствору DOTAGA-OH (1 экв.) и пентафторфенола (1,2 экв.) в дихлорметане добавляли PS-карбодиимид (1,2-1,5 экв.). Смесь встряхивали в течение

3-5 ч при комнатной температуре. После того, как результаты ЖХ-масс-спектрометрии показали, что реакция была завершена, смолу удаляли фильтрованием и растворитель выпаривали при пониженном давлении, получая неочищенный остаток предшественника хелата в виде белой пены.

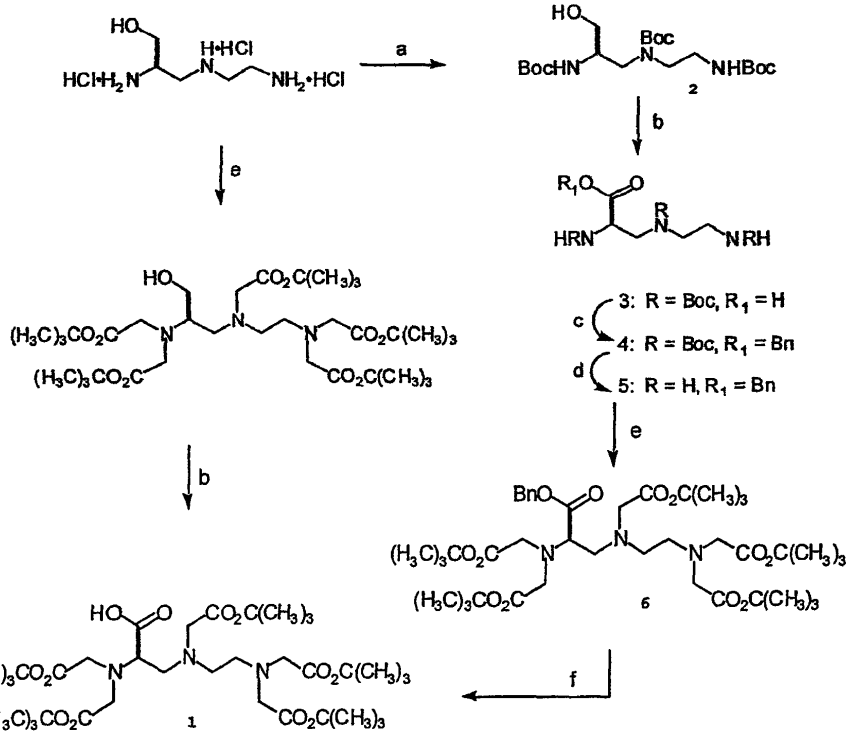
Вещество для МР-визуализации: к раствору предшественника вещества для МР-визуализации (1 экв.) и остатка предшественника хелата (4,0 экв.) в ДМФА добавляли DIPEA (4,0 экв.). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После того, как результаты ЖХ-масс-спектрометрии показывали, что реакция была завершена, растворитель удаляли при пониженном давлении.

Затем неочищенный продукт перемешивали в смеси ТФУ, фенола, метилсульфоновой кислоты, анизола и дихлорметана (90%/2,5%/2,5%/2,5%/2,5%) в течение 15 мин при комнатной температуре. Добавляли диэтиловый эфир и образовавшийся белый осадок собирали в качестве неочищенного продукта.

Неочищенный продукт подвергали взаимодействию с $GdCl_3 \cdot H_2O$ в деионизованной воде с образованием неочищенного вещества для МР-визуализации, который очищали с использованием ОФ-ВЭЖХ (колонка С-18, этанол/50 моль $AcONH_4$). Соответствующие фракции объединяли, этанол удаляли при пониженном давлении и затем объединенные фракции обрабатывали ацетатом натрия для замены соли. После лиофилизации избыток солей удаляли, используя хроматографию с обращенной фазой на картридже WatersSep-Pak® С-18, используя в качестве элюентов воду и смесь этанол:вода (50:50). Соответствующие фракции объединяли, этанол удаляли при пониженном давлении и раствор лиофилизовали, получая требуемое пептидное вещество для МР-визуализации в виде белого твердого вещества.

Аналогичные способы использовали, чтобы синтезировать другие вещества для МР-визуализации.

Пример 2. Способы синтеза остатка предшественника хелата (синтон №3).




a) $Boc_2O$, NaOH-диоксан;

b) NaOCl, $NaOCl_2$, TEMPO, фосфатный буфер, ACN;

c) BnBr, $Cs_2CO_3$, ДМФА;

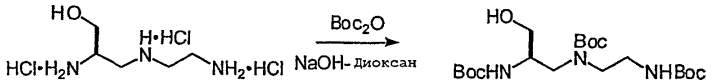
d) ТФУ, $CH_2Cl_2$; затем 2М HCl, $Et_2O$;

e) трет-бутилбромацетат, DIPEA, ДМФА;

f) $H_2$, Pd/C, EtOAc.

Способ А для синтеза №3

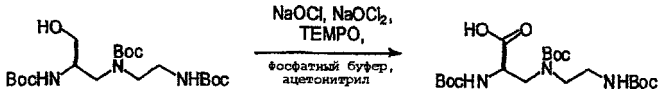
Стадия а - защита аминов




Тригидрохлорид гидроксиметилдиэтилентриамина указанной стереохимии (25,15 г) (оптически чистый исходный продукт: Syn. Comm. 29 (14), 2377-2391 (1999), рацемический исходный продукт: Coll. Czech. Chem. Comm. 34, 630-634 (1969)) растворяли в смеси деионизованная вода/1,4-диоксан и pH раствора доводили до значения от 8 до 9 с помощью водного раствора гидроксида натрия. Дитретбутилдикарбонат (3,5 экв.) растворяли в диоксане и добавляли при температуре от 10 до 20°С. Реакционную смесь перемешивали от 12 до 20 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический экстракт последовательно экстрагировали во-

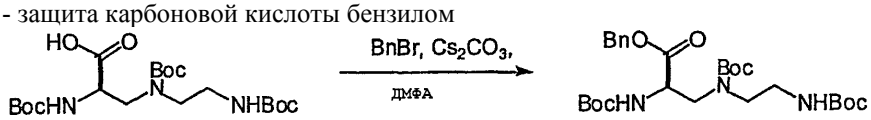
дой, насыщенным раствором бикарбонатом натрия и насыщенным раствором хлорида натрия. Органический экстракт сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая масло, которое очищали хроматографией на силикагеле, используя смесь этилацетат:гексан. Общий выход очищенного продукта составлял 30,11 г. $^1$H ЯМР (300 МГц): 5,18 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,76 (уш.с, 1H), 3,8-3,0 (м, 10H), 1,47-1,42 (2с, 27H). МС (m/z): 456,4 $[M+Na]^+$.

Стадия b - окисление гидроксильной группы [основана на способе окисления, описанном Zhao et al. в J. Org. Chem. 64, 2564-2566(1999)].



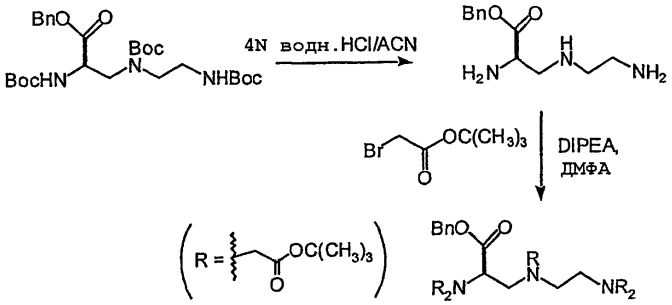

BOC-защищенный триамин (29,94 г) растворяли в ацетонитриле. Добавляли фосфатный буфер (300 мл), состоящий из 21,6 г $NaH_2PO_4$, 21,6 г $Na_2HPO_4$ и достаточного количества деионизованной воды, чтобы получить объем, равный 500 мл, затем 2,2, 6,6-тетраметилпиперидинил-1-окси (TEMPO) (0,07 экв.). Смесь энергично перемешивали и нагревали до 35°C. Хлорид натрия (2,0 экв.) растворяли в деионизованной воде (100 мг/мл). Добавляли раствор хлорита натрия и хлорную известь (0,02 экв., примерно 0,25% водный гипохлорит натрия), поддерживая постоянную температуру. После добавления окислителя реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Дополнительно добавляли TEMPO (0,07 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Добавляли воду и pH доводили до значения 8, используя 2,ON водный раствор NaOH. Добавляли холодный водный раствор сульфита натрия (300 мл), поддерживая постоянное значение pH. Раствор экстрагировали небольшим объемом метилтрет-бутилового эфира и отставляли в сторону. Водный слой подкисляли до pH 3-4 с помощью 2,ON водного раствора HCl и экстрагировали двумя небольшими объемами метилтрет-бутилового эфира. Органический экстракт объединяли с ранее отставленным экстрактом и концентрировали в вакууме. Продукт использовали без очистки на стадии 3, описанной ниже. $^1$H ЯМР (300 МГц): 5,8 (уш.с, 1H), 5,3 (м, 1H), 4,4 (м, 1H), 3,6-3,2 (м, 6H), 1,47-1,43 (2с, 27H). МС (m/z): 470,2 $[M+Na]^+$.

Стадия c - защита карбоновой кислоты бензилом



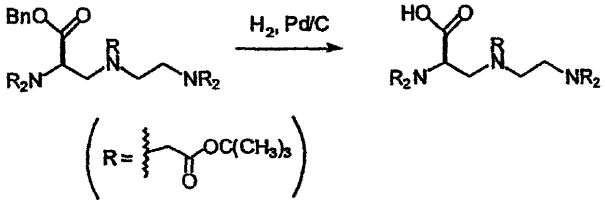

Исходный продукт, карбоновую кислоту, (178 г) растворяли в безводном ДМФА. Добавляли карбонат цезия (2,0 экв.) и раствор перемешивали в течение 30 мин. По каплям при комнатной температуре добавляли бензилбромид (1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере инертного газа в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и дважды экстрагировали этилацетатом. Органические слои объединяли и последовательно промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия и раствором хлорида натрия. Органический слой концентрировали до получения масла (270 г), которое очищали хроматографией на силикагеле, используя смесь этилацетат:гексан. $^1$H ЯМР (300 МГц): 7,3 (с, 5H), 5,6 и 5,15 (2уш.с, 1H), 5,1 (с, 2H), 4,5 (уш.с, 1H), 4,0-4,1 (м, 1H), 3,5-3,2 (м, 6H), 1,45 и 1,4 (2с, 27H). МС (m/z): 560,3 $[M+Na]^+$.

Стадии d u e - снятие защиты аминов и алкилирование



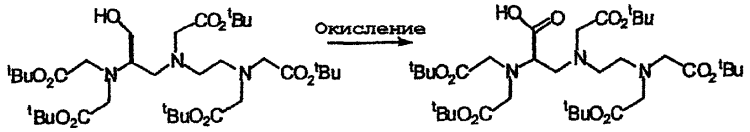

BOC-защищенный триамин (250 г) перемешивали в растворе 1:1 ацетонитрил:4N водный HCl и оставляли перемешиваться примерно на 2,0 ч. Ацетонитрил удаляли в вакууме и оставшийся раствор лиофилизовали, получая остаток, который сразу же растворяли в ДМФА и диизопропиламине (достаточное количество, чтобы повысить pH до 8). Добавляли трет-бутилбромацетат (12,0 экв.). После завершения добавления реакционную смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение 18 ч. После завершения реакции объем реакционной смеси удваивали добавлением воды, после этого смесь дважды экстрагировали этилацетатом. Органические экстракты объединяли и последовательно промывали водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным раствором хлорита натрия. Органический раствор концентрировали в вакууме до получения масла, которое очищали хроматографией на силикагеле, используя смесь этилацетат:гексан. Общий выход очищенного продукта составлял 190 г. МС (m/Z): 809,5 $[M+Na]^+$.

Стадия f - снятие защиты карбоксилата



В реактор из нержавеющей стали загружали сложный бензиловый эфир (157 г), 10% палладий на угле (19,8 г) и этилацетат и гидрировали при 45 фунт/кв. дюйм (310 кПа) в течение 12 ч. Фильтрование через целит и концентрирование в вакууме давало масло. Масло растворяли в смеси этилацетат/гексаны и очищали хроматографией на силикагеле, получая пентатрет-бутиловый эфир DTPA-карбоновой кислоты (выход: 82%). МС (m/Z): 719,5 $[MH]^+$. При использовании указанного реагента в синтезе контрастных веществ с использованием других хиральных элементов не наблюдалось никаких диастереомеров и поэтому пришли к выводу, что данный продукт является в достаточно высокой степени оптически чистым, чтобы ограничивать определение обычным протонным ЯМР.

Способ B для синтеза синтона №3



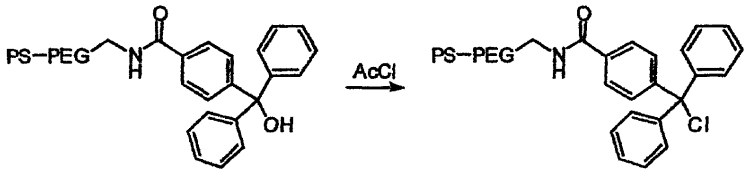
Исходный продукт - спирт (см. Syn. Comm. 29 (14), 2377-2391 (1999) для синтеза из гидроксиметилдиэтилентриамина) (105,0 г), ацетонитрил (1,0 л), фосфатный буфер (1,0 л, приготовленный растворением 100 мг $NaH_2PO_4$ и 10 мг $Na_2HPO_4$ в 1,0 мл воды и затем доведением pH до значения 4,5 с помощью $H_3PO_4$) и TEMPO (7,0 г) объединяли и нагревали до 45-50°C. Раствор, состоящий из хлорита натрия (29,8 г, растворенного в 298 мл воды) и гипохлорита натрия (744 мкл), добавляли к раствору, поддерживая температуру на уровне 45-50°C. Реакционную смесь энергично перемешивали в течение 4-10 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разделяли два слоя. Органический слой отделяли и объединяли с насыщенным водным раствором хлорида натрия и перемешивали в течение 15 мин. Органический слой отделяли и концентрировали в вакууме, получая масло (171 г), которое очищали хроматографией на колонке, используя смесь гексан:изопропанол с 0,1% триэтиламина на всем протяжении, получая 81 г обогащенного продукта в виде масла. МС (m/Z): 719,5 $[MH]^+$. Оптическая чистота продукта, полученного данным способом, не отличалась от чистоты, описанной выше.

Пример 3. Смолы для твердофазного синтеза модифицированных пептидов с С-концевыми функциональными аминогруппами.

Пептиды получали твердофазным синтезом. При твердофазном синтезе линкеры и смолы выбирают в зависимости от типа пептидов, которые необходимо синтезировать (например, от функциональной группы, необходимой на С-конце, защищенного или незащищенного пептида), и используемого способа синтеза (например, химия на основе Fmoc или BOC, ручной или автоматизированный синтез, реактор с непрерывным потоком или периодический). Например, при синтезе пептида с карбоксильной группой на С-конце защищенную аминокислоту связывают с различными смолами, такими как HMPB-смолы, 2-хлортритилхлоридная смола и смола SUSRIN. С другой стороны, при синтезе пептида с аминогруппой на С-конце можно связать диамин с тритиловой смолой. Полистирольные смолы (PS) можно использовать для периодического синтеза, тогда как смолы, модифицированные полиэтиленгликолем (ПЭГ), подходят для синтеза в непрерывном потоке и периодического синтеза. Многие тритил-PS-смолы, включая 1,3-бис(аминометил)бензолсодержащую тритил-PS-смолу, являются коммерчески доступными. В том случае, если требуемая тритил-PS-смола не доступна, можно использовать способ, подобный способу, который описан для ПЭГ-смол, чтобы связать диамин с тритил-PS-смолой.

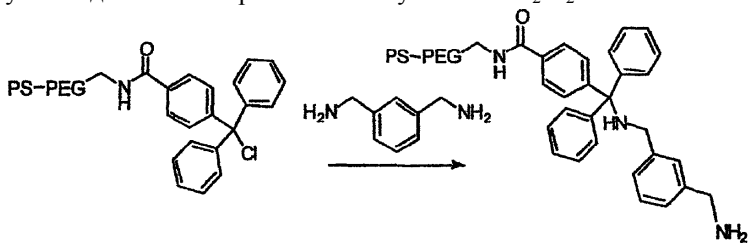
Синтез 1,3-бис(аминометил)бензолсодержащей тритиловой смолы обсуждается в качестве примера. Другие диамины можно связать с тритиловой смолой аналогичным образом.

Получение 1,3-бис(аминометил)бензолсодержащей тритил-ПЭГ-смолы



Во-первых, смолу на основе тритилового спирта (25 г, смола NovaSyn TGT, NovaBiochem) помещали в воронку и последовательно промывали ДМФА, $CH_2Cl_2$ и толуолом. После удаления всех растворителей продукт переносили в колбу, оборудованную обратным холодильником. Добавляли толуол (250 мл) и ацетилхлорид (25 мл), взвесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 1,0 ч. Добавляли допол-

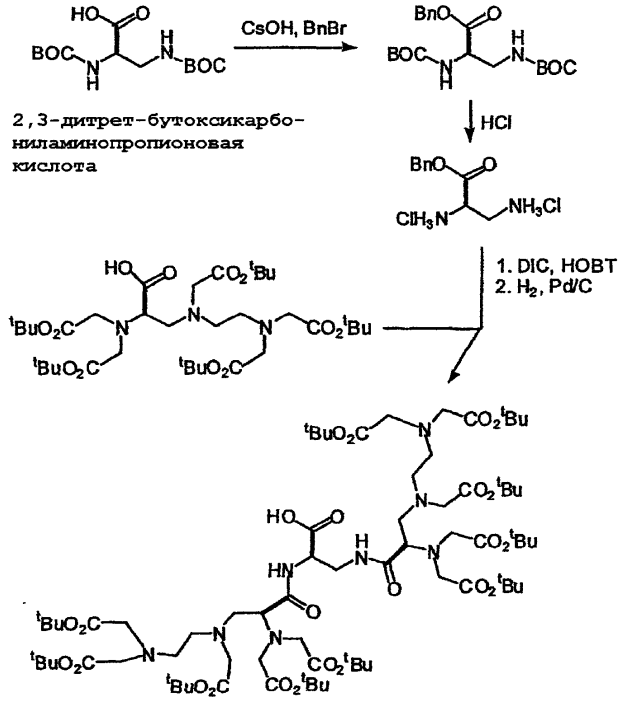
нительную порцию ацетилхлорида (25 мл) и взвесь перемешивали в течение 2,0 ч при 70°C. Взвесь фильтровали и смолу последовательно промывали толуолом и $CH_2Cl_2$.




Во-вторых, свежеприготовленную тритилхлоридную смолу и ТГФ (250 мл) помещали в колбу. К взвеси добавляли 1,3-бис(аминометил)бензол (10 экв., на основании замещения смолы 0,23 ммоль/г) и смесь перемешивали в течение 18,0 ч при комнатной температуре. Взвесь фильтровали и смолу последовательно промывали водой, ДМФА, $CH_2Cl_2$, метанолом и $CH_2Cl_2$. Смолу сушили в вакууме (комнатная температура, 1-5 мм Hg) до постоянной массы (25,4 г). Стехиометрию замещения контролировали, используя количественный нингидриновый способ.

Пример 4. Синтез ковалентных конъюгатов (синтон №1, №2, №4 и №5)

Способ синтеза синтона №1




Бензиловый эфир 2,3-бис-трет-бутоксикарбониламинопропионовой кислоты

Раствор карбоната цезия (6,5 г) и воды добавляли к 2,3-бис-трет-бутоксикарбониламинопропионовой кислоте (3,04 г) в ацетонитриле (25 мл). Смесь перемешивали в течение 40 мин при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме. К остатку твердого вещества добавляли ДМФА (50 мл). Добавляли раствор бензилбромида (1,43 мл) и ДМФА (5,0 мл) в течение 15 мин при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 18 ч, затем смесь разбавляли этилацетатом (100 мл) и водой (50 мл) и перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли и органический слой сушили над сульфатом натрия. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме, получая масло (3,6 г). Масло очищали хроматографией на колонке, используя смесь этилацетат/гексан, получая масло (1,8 г). МС (m/z): $[M+Na]^+$=417. $^1$H ЯМР (300 МГц): 1,4 (с, 9H), 2,4 (м, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,8 (м, 1H), 6,5 (м, 1H), 7,3 (м, 5H).

Тригидрохлорид 2,3-диаминопропионовой кислоты

Раствор бензилового эфира 2,3-бис-трет-бутоксикарбониламинопропионовой кислоты (1,8 г), 4N водного HCl (40 мл) и ацетонитрила (50 мл) перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме и смесь разбавляли этилацетатом (100 мл) и водой (50 мл) и перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли и водный слой упаривали досуха (1,23 г пены/сиропа). $^1$H ЯМР (300 МГц): 3,2-3,5 (м, 2H), 4,2-4,35 (м, 1H), 5,13-5,25 (кв, 2H, J=11,8, 3,1 Гц).

Бензиловый эфир 2,3-бис-карбокси-DTPA-пропионовой кислоты

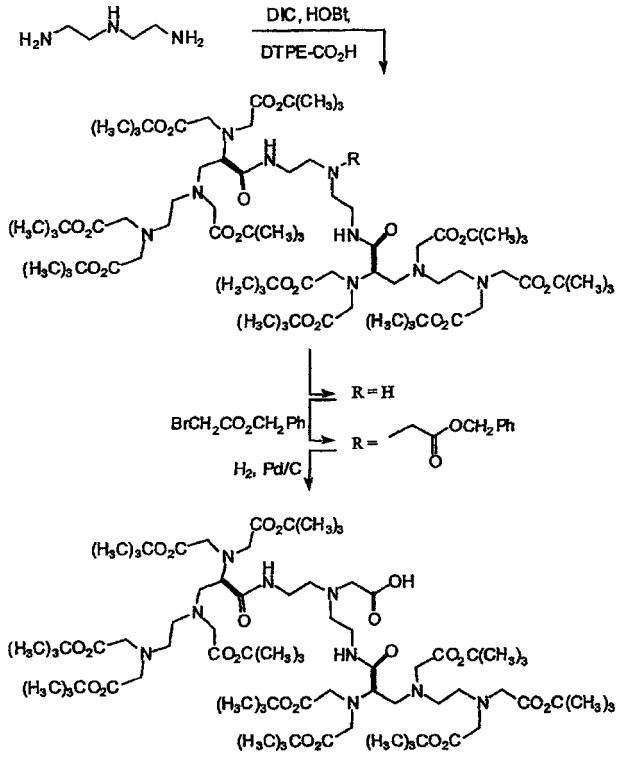
Раствор тригидрохлорида 2,3-диаминопропионовой кислоты (6,65 г), bb(CO)DTPE (40,0 г, «синтон 3»), HOBt (8,5 г), DIC (9,0 мл), диизопропилэтиламина (15,0 мл), $CH_2Cl_2$ (400 мл) и ДМФА (200 мл) перемешивали в течение 48 ч. Смесь разбавляли метиленхлоридом (500 мл) и водой (250 мл) и затем перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным раствором

карбоната натрия (250 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (250 мл) и сушили над сульфатом натрия. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме, получая масло. Масло очищали хроматографией на силикагеле, используя этилацетат и гексаны, получая 28,0 г продукта. МС (m/Z): $[M+2]^+$=798; $[M+1]^+$=1595.

2,3-Бис-карбокси-DTPA-пропионовая кислота

Гидрирование бензилового эфира 2,3-бис-карбокси-DTPA-пропионовой кислоты (17,0 г) осуществляли в смеси этилацетат/триэтиламин (10:3), используя 10% палладиевый катализатор на угле (6,0 г), в течение 24 ч при давлении 50 фунтов/кв. дюйм (344,7 кПа). Сосуд продували азотом и смесь фильтровали через целит и концентрировали при пониженном давлении, получая 16,0 г масла. МС (m/Z) : $[M+2]^+$=753; $[M+1]^+$=1504.

Способ синтеза синтона №2




$N^1$,$N^3$-бис[2-бис-трет-бутоксикарбонилметиламино)-3-{[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино) этил](трет-бутоксикарбонилметил)амино}пропионамид]диэтилентриамин

К раствору диэтилентриамина (3,16 мл), ацетонитрила (700 мл) и диизопропилэтиламина (10,4 мл) добавляли предварительно прореагировавшие (30 мин) bb(CO)DTPE (42,0 г, «синтон 3»), HOBt (7,9 г), EDC (11,2 г) и диизопропилэтиламин (10 мл) в ацетонитриле при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 16,0 ч и затем концентрировали при пониженном давлении. Масло объединяли с этилацетатом, экстрагировали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия и затем концентрировали. Масло очищали хроматографией на колонке с силикагелем, используя смесь гексаны/изопропанол/триэтиламин, получая 22,5 г продукта. МС(m/Z): $[M+H]^+$=1503.

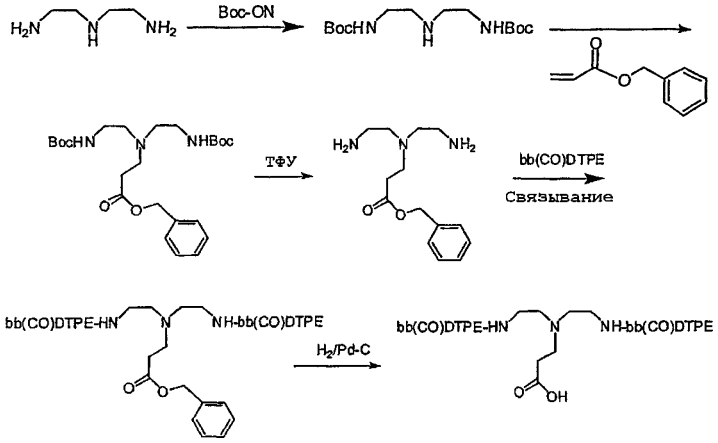
$N^1$,$N^3$-бис[2-бис-трет-бутоксикабонилметиламино)-3-{[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино) этил](трет-бутоксикарбонилметил)амино}пропионамид]-$N^2$-(бензилоксикарбонилметил)диэтилентриа-мин

Бензил-2-бромацетат (2,54 г) добавляли к раствору предыдущего соединения амина (13,5 г), ацетонитрила (200 мл) и карбоната натрия (1,18 г). Смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 15 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Добавляли этилацетат и воду, слои разделяли. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, затем концентрировали при пониженном давлении, получая масло (14,5 г). МС (m/Z): $[M]^+$=1651.

$N^1$,$N^3$-бис[2-бис-трет-бутоксикабонилметиламино)-3-{[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино) этил](трет-бутоксикарбонилметил)амино}пропионамид]-$N^2$-(уксусная кислота)диэтилентриамин

Указанный выше сложный бензиловый эфир (14 г) гидрировали в смеси этилацетат/триэтиламин (49:1) при давлении 50 фунтов/кв. дюйм (344,7 кПа) в течение 16,0 ч в присутствии 10% палладия на угле (3,5 г). Полученную в результате смесь фильтровали через целит и концентрировали в вакууме, получая 12,08 г масла. МС (m/Z): $[M+H]^+$=1561.

Синтез синтона №4




$N^1$,$N^3$-бис-бутоксикарбонилдиэтилентриамин

К раствору диэтилентриамина (2,12 г; 20,6 ммоль) и триэтиламина (30,0 г; 41,3 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли Boc-ON (10,65 г; 43,3 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение ночи. К смеси добавляли 700 мл эфира и затем экстрагировали фосфатным буфером (pH 3, 100 ммоль). Водный раствор делали основным до pH 11 и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. Соли фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении, получая указанное соединение в виде бесцветного масла (5,55 г). МС (m/Z): $[M+H]^+$=304, 1.

$N^1$,$N^3$-бис-бутоксикарбонил-$N^2$-(бензилоксикарбонилэтил)диэтилентриамин

К раствору указанного выше соединения (1,0 г; 3,30 ммоль) в метаноле (40 мл) добавляли бензилакрилат (1,07 г; 6,59 ммоль) при комнатной температуре. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 дней. Растворитель удаляли при пониженном давлении, получая желтую жидкость, которая содержит указанное соединение и бензилакрилат. МС (m/Z): $[M+H]^+$=466,1.

$N^2$-(бензилоксикарбонилэтил)диэтилентриамин

К смеси указанного выше соединения и бензилакрилата (1,0 г) в дихлорметане (25 мл) добавляли ТФУ (13,8 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре и затем к смеси добавляли 1N HCl и воду. Водный слой отделяли и лиофилизовали, получая указанное соединение (420 мг) в виде вязкого твердого вещества. МС [m/Z]: $[M+H]^+$=266,2.

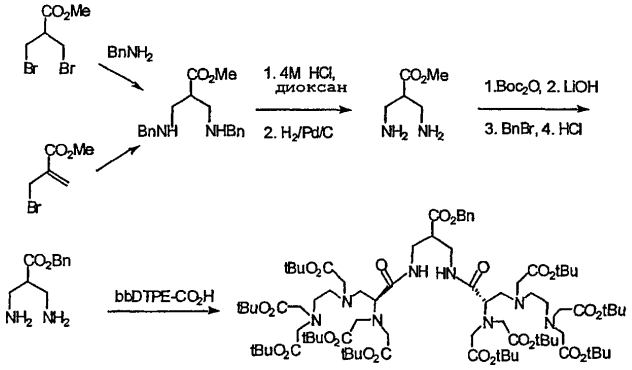
$N^1$,$N^3$-бис[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино)-3-{[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино)этил](трет-бутоксикарбонилметил)амино}пропионамид]-$N^2$-(бензилоксикарбонилэтил)диэтилентриамин

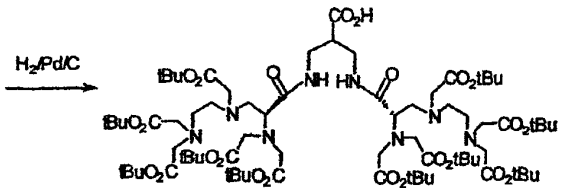
К раствору указанного выше соединения, «синтона 3», HOBt и диизопропилэтиламина в $CH_2Cl_2$ и ДМФА добавляли DIC. Смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Смесь разбавляли дихлорметаном и водой и затем перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли и органический слой промывали насыщенным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлорида натрия и сушили над сульфатом натрия. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме, получая масло. Масло очищали хроматографией на силикагеле, используя этилацетат и гексаны, получая указанное соединение.

$N^1$,$N^3$-бис[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино)-3-{[2-(бис-трет-бутоксикарбонилметиламино)этил](трет-бутоксикарбонилметил)амино}пропионамид]-$N^2$-(пропионовая кислота)диэтилентриамин

В сосуд для гидрирования загружали указанное выше соединение, 10% палладий на угле, этилацетат и триэтиламин. Через сосуд продували азот, затем водород. Смесь встряхивали в течение 24 ч в атмосфере водорода (50 фунтов/кв. дюйм (344,7 кПа)). Через сосуд продували азот и смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая продукт в виде масла.

Синтез синтона №5





Метил-3-(бензиламино)-2-((бензиламино)метил)пропионат

Метил-2-(бромметил)акрилат (1,00 г; 5,6 ммоль, 1,0 экв.), растворенный в ацетонитриле (20 мл) по каплям с перемешиванием при комнатной температуре добавляли к раствору бензиламина (1,83 мл; 16,8 ммоль; 1,5 экв.) в безводном ацетонитриле (10 мл). Через 16 ч добавляли эфир (100 мл) и отфильтровывали белое твердое вещество (гидробромид бензиламина). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая 1,90 г неочищенного масла. Масло растворяли в этилацетате (150 мл) и промывали $H_2O$ и насыщенным раствором NaCl. Органический слой сушили ($MgSO_4$) и упаривали при пониженном давлении. Полученное в результате прозрачное масло очищали флэш-хроматографией (гексаны:этилацетат), получая 1,38 г (79%) продукта. $^1$H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 1,68 (с, 2H), 2,79-2,90 (м, 5H), 3,68 (с, 3H), 7,21-7,32 (м, 10H).

Метил-3-(амино)-2-(аминометил)пропионат

Метил-3-(бензиламино)-2-((бензиламино)метил)пропионат (2,27 г; 7,3 ммоль; 1,0 экв.) растворяли в метиленхлориде (20 мл) и добавляли 4,0 мл 4М раствора HCl в диоксане. Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин и затем растворители выпаривали при пониженном давлении, получая белый порошок, который растворяли в 50 мл MeOH. Добавляли катализатор (10% палладиевый катализатор на угле, 750 мг) при 0°C в атмосфере аргона и смесь встряхивали при давлении $H_2$ 45 фунтов/кв. дюйм (310 кПа) в течение 18 ч, затем фильтровали через целит. Продукт (1,47 г) выделяли после выпаривания MeOH при пониженном давлении. $^1$H ЯМР (300 МГц, $D_2O$): δ 3,25-3,43 (м, 5H), 3,82 (с, 3H).

Метил-3-(BOC-амино)-2-(BOC-аминометил)пропионат

Диамин (1,44 г) подвергали взаимодействию с ди-трет-бутилдикарбонатом (3,22 г; 14,8 ммоль; 1,05 экв.) в смеси диоксан/водный раствор $Na_2CO_3$ при 0°C в течение 1 ч и затем при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем смесь подкисляли (pH 4) 0,5N $KHSO_4$ и диоксан выпаривали при пониженном давлении. Водную часть экстрагировали этилацетатом, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали при пониженном давлении, получая неочищенное масло, которое очищали флэш-хроматографией (гексаны:этилацетат), получая 1,86 г (80%) требуемого продукта. $^1$H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 1,41 (с, 18H), 2,66-2,78 (м, 1H), 3,10-3,27 (м, 2H), 3,50-3,62 (м, 2H), 3,68 (с, 3H), 5,17-5,27 (уш.т, 2H).

3-(BOC-амино)-2-(BOC-аминометил)пропановая кислота

Сложный метиловый эфир (1,50 г) растворяли в 15 мл смеси 2:1 ТГФ/$H_2O$. Добавляли $LiOH·H_2O$ (0,95 г) при 0°C. Смесь перемешивали при температуре от 0°C до комнатной температуры в течение 44 ч. ТГФ выпаривали при пониженном давлении и водный раствор экстрагировали EtOAc. Водный слой подкисляли (pH 3) 0,5М водным раствором $KHSO_4$ и экстрагировали EtOAc. Объединенные органический фракции промывали 30 мл $H_2O$ и сушили ($MgSO_4$). Растворители выпаривали при пониженном давлении, получая 1,32 г (92%) продукта. $^1$H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 1,40 (с, 18H), 2,66 (с, 1H), 3,27-3,47 (м, 4H), 5,42 (с, 1H).

Бензил-3-(BOC-амино)-2-(BOC-аминометил)пропионат

Кислоту (1,01 г) при комнатной температуре подвергали взаимодействию с бензилбромидом (0,45 мл) в безводном ДМФА, содержащем $Cs_2CO_3$ (2,07 г). ДМФА выпаривали при пониженном давлении и остаток распределяли между $H_2O$ и EtOAc. Органический слой промывали насыщенным раствором соли и сушили ($MgSO_4$). Растворитель выпаривали при пониженном давлении и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (гексаны/EtOAc от 95:5 до 9:1 до 85:15). Выход 1,16 г (90%). $^1$H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$): δ 1,42 (с, 18H), 2,79 (квинт, 1H, 5,6 Гц), 3,1-3,3 (м, 2H), 3,5-3,65 (м, 2H), 5,13 (с, 2H), 5,15-5,28 (м, J 1H), 7,30-7,40 (м, 5H). MS: 431,15 (M+1).

Дигидрохлоридная соль бензил-3-амино-2-аминометилпропионата

Бензил-3-(BOC-амино)-2-(BOC-аминометил)пропионат (1,15 г) растворяли в 5 мл 4М раствора HCl в диоксане. Смесь перемешивали при 0°C в течение 6 ч и диоксан выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали в эфире и фильтровали, получая неочищенную дигидрохлоридную соль диамина (0,81 г). $^1$H ЯМР (300 МГц, MeOD): δ 3,1-3,3 (м, 5H + $CHD_2OD$), 3,55 (с, диоксан), 5,19 (с, 2H), 5,15-5,28 (м, 1H), 7,20-7,40 (м, 5H). MS: 209,00 (M+1).

Бензил-3-(N-bb(CO)DTPE-карбоксамид)-2-(N-bb(CO)DTPE-карбоксамид)метилпропионат

Кислоту (2,00 г; 2,8 ммоль, 1,5 экв.) растворяли в 5 мл безводного дихлорметана. Диамин (0,26 г), HOAt (0,32 г) и диизопропилэтиламин (0,65 мл) при 0°C подвергали взаимодействию с HATU (0,88 г) в течение 2 ч. Добавляли трисаминсодержащую смолу (0,5 г), изоцианатсодержащую смолу (0,5 г) и HATU (0,42 г) и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Смолы отфильтровывали и фильтрат упаривали. Остаток распределяли между $H_2O$ и EtOAc. Органический слой промывали $H_2O$, насыщенным раствором $NaHCO_3$, насыщенным раствором соли (20 мл) и сушили ($MgSO_4$).

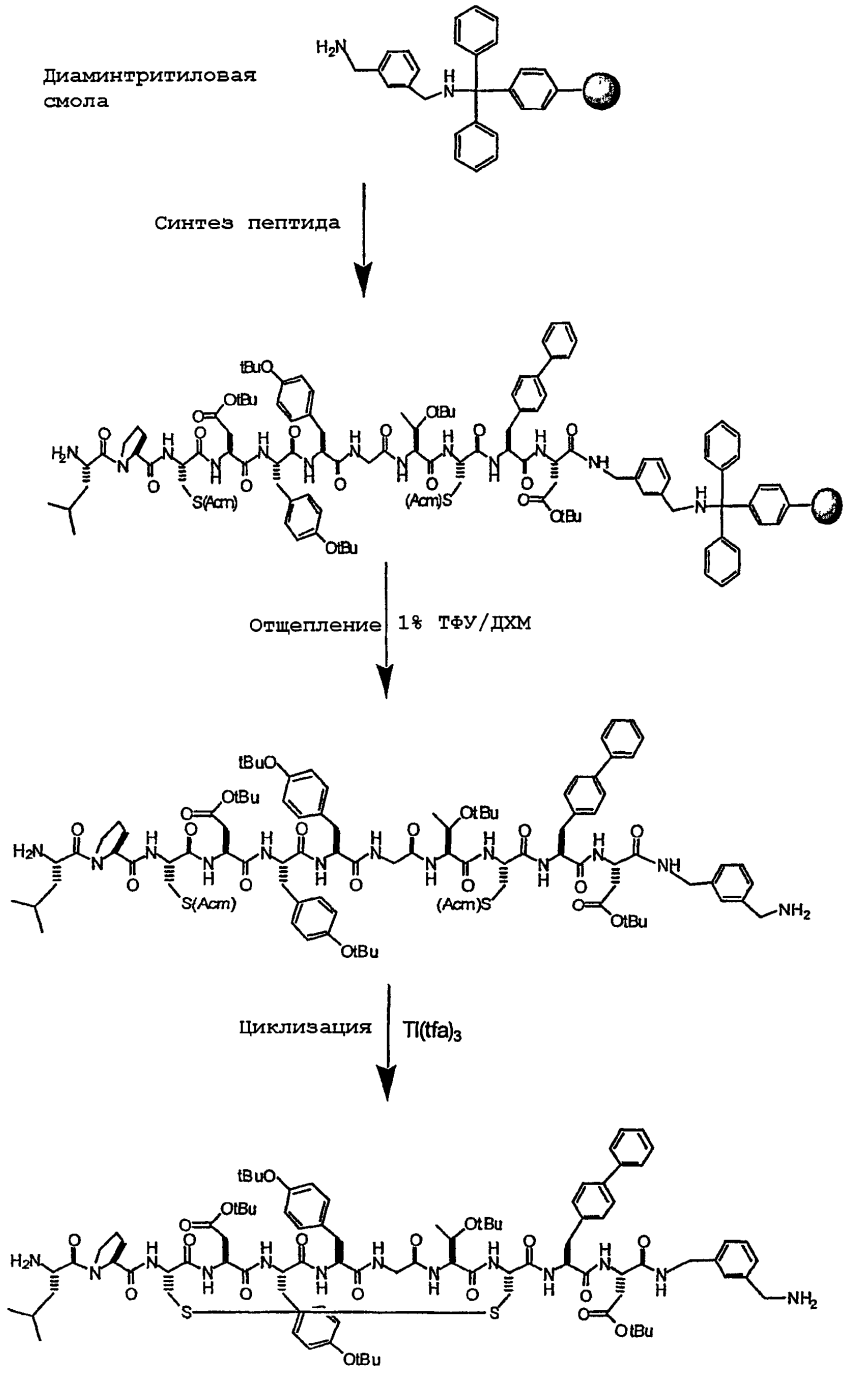
Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Масло очищали флэш-хроматографией на силикагеле (гексаны/ацетон/$Et_3N$) и получали продукт (1,13 г). МС: 1607,95 (M+1) и 1629,95 (M+Na).

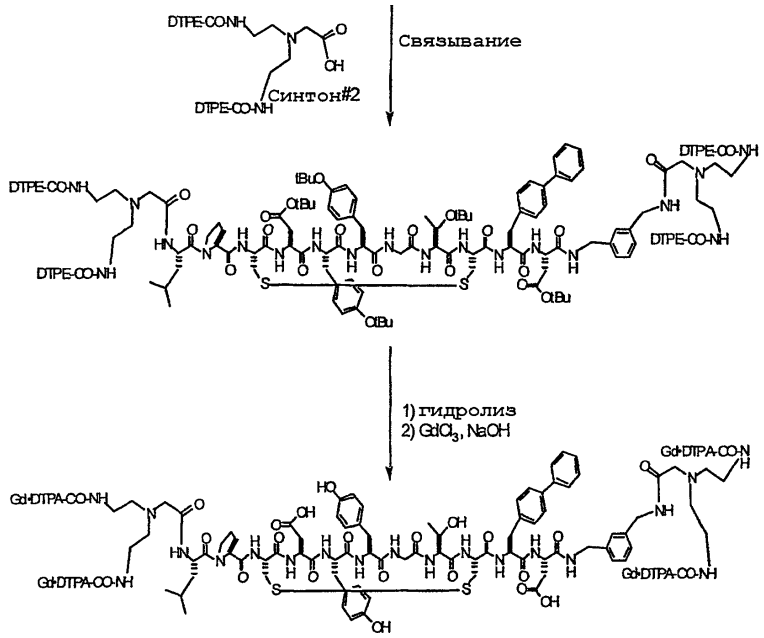
3-(N-bb(CO)DTPE-карбоксамид)-2-(N-bb(CO)DTPE-карбоксамид)метилпропионовая кислота

Сложный бензиловый эфир (0,90 г; 0,56 ммоль) растворяли в 30 мл EtOAc и добавляли $Et_3N$ (1 мл). Добавляли 10% палладиевый катализатор на угле (0,50 г) и смесь перемешивали в течение 15 ч при давлении водорода 45 фунтов/кв. дюйм (310 кПа). Катализатор отфильтровывали и растворители выпаривали, получая продукт (0,82 г). МС: 759,55 (M+2H/2).

Пример 5. Синтез связывающих фибрин веществ для МР-визуализации.

32





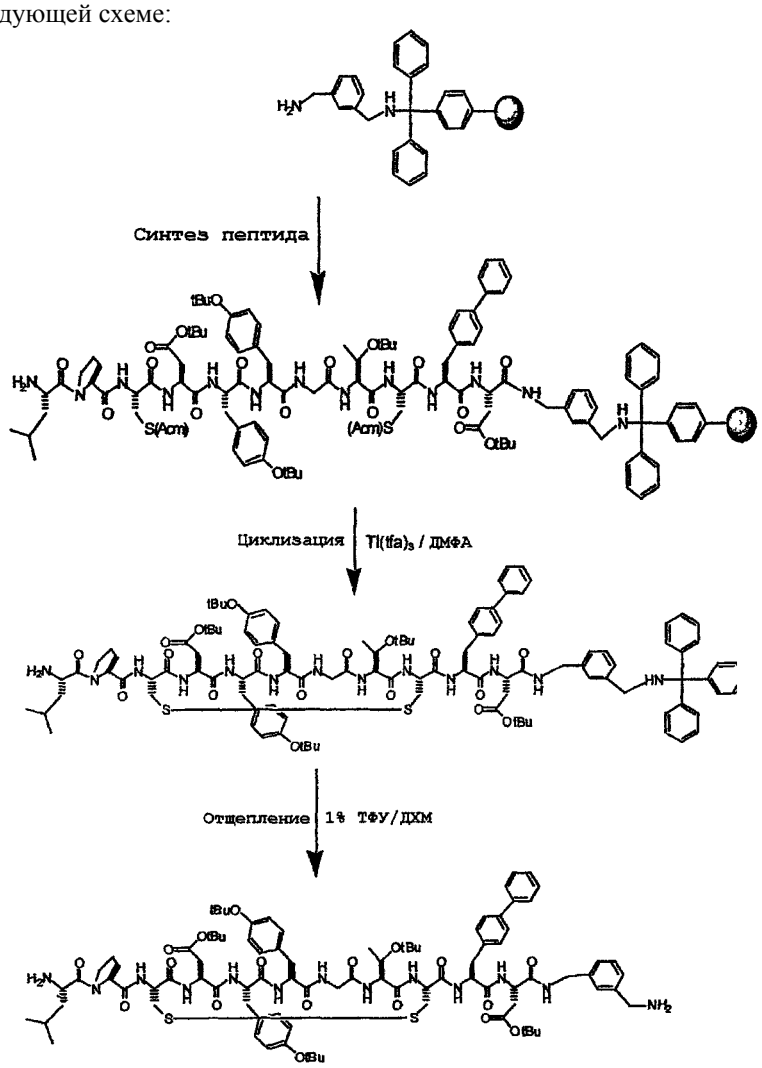

Конструирование пептида: 3,39 г 1,3-бис(аминометил)бензолтритиловую смолу NovaSyn TGT (измеренное замещение=0,59 ммоль) помещали в стандартную колонку для синтеза пептидов и помещали в синтезатор пептидов. Синтез осуществляли с использованием стандартной Fmoc-методики. Кэпирование проводили после связывания первой аминокислоты с использованием уксусного ангидрида, 6% диизопропилэтиламина в ДМФА. После завершения синтеза смолу удаляли из колонки и помещали в реакционный сосуд. Смолу один раз промывали $CH_2Cl_2$ и фильтровали. Затем смолу обрабатывали 1% трифторуксусной кислотой в $CH_2Cl_2$ и помещали на механическую мешалку на 10 мин. Смесь фильтровали, промывая реакционный сосуд и фильтрат собирали. Значение pH объединенного фильтрата доводили примерно до 8, используя триэтиламин, и раствор концентрировали в вакууме, получая масло. После осаждения водой белое твердое вещество отфильтровывали и промывали водой и диэтиловым эфиром. Твердое вещество сушили фильтрованием с использованием всасывающего фильтра, собирали в ДМФА и разбавляли ацетонитрилом. Раствор охлаждали на бане со льдом и обрабатывали 1,5 г трифторацетата таллия в течение 2,0 ч. Значение pH раствора доводили с использованием триэтиламина до pH 8 и затем концентрировали в вакууме. К маслу добавляли воду и полученный в результате осадок собирали фильтрованием с использованием всасывающего фильтра. Твердое вещество промывали водой и диэтиловым эфиром, получая 2,7 г неочищенного модифицированного пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу. Пример синтеза $H_2N$-Leu-Pro-Cys-Asp-Tyr-Tyr-Gly-Thr-Cys-Bip-Asp-CO-$NHCH_2C_6H_4CH_2NH_2$ (SEQ ID NO: 21) подтвердили, регистрируя m/Z 1792,8 $[M+Na]^+$. Модифицированный пептид очищали препаративной ВЭЖХ. Фракции сходной чистоты (98-100%) объединяли и лиофилизовали без нейтрализации.

Модифицированный пептид (3,2 г) и ковалентный конъюгат (указанный выше синтон №2) (3,95 г) растворяли в дихлорметане. По каплям добавляли диизопропилэтиламин вплоть до измерения pH 9 и к смеси одновременно добавляли диизопропилкарбодиимид (2 экв.) и HOBt (2 экв.). После перемешивания в течение 2 мин по каплям добавляли диизопропилэтиламин вплоть до измерения pH 9. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов. Одной порцией добавляли дополнительно синтон №2 (с диизопропилкарбодиимидом, диизопропилэтиламином и HOBt). Растворители удаляли в вакууме и остаток растворяли в этилацетате, который последовательно промывали О, IN хлористоводородной кислотой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая светло-желтую пену (7,8 г). Пену растворяли в дихлорметане и очищали флэш-хроматографией (элюент дихлорметан:метанол), получая белое твердое вещество (5,6 г). Белое твердое вещество перемешивали в смеси ТФУ, воды и триэтилсилана (90%/5%/5%, 30 мл) при комнатной температуре. Смесь нагревали до 40°С и перемешивали в течение 2 ч. Раствор концентрировали до объема 3-5 мл, затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли диэтиловый эфир, и образовывался белый осадок. Смеси давали возможность перемешиваться в течение 10 мин и твердые вещества собирали фильтрованием и промывали диэтиловым эфиром. Твердые вещества сушили в вакууме, получая белое твердое вещество (4,0 г). Твердое вещество растворяли в смеси вода:ацетонитрил (20 мл, отношение 4:1) и очищали препаративной ВЭЖХ, получая белое твердое вещество, предшественник вещества для МР-визуализации (1,6 г).

Предшественник вещества для МР-визуализации (1 г) подвергали взаимодействию с одним эквивалентом $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ в дистиллированной деионизованной воде со значением pH, доведенным примерно

до 6 добавлением 1M NaOH. Комплекс гадолиния очищали хроматографией с обращенной фазой (Waters Sep-Pak®, C-18), используя в качестве элюента дистиллированную деионизованную воду и смесь 50:50 (об.:об.) метанол:вода. Соответствующие фракции объединяли и метанол удаляли при пониженном давлении при 50°C и лиофилизовали, получая 811 мг вещества для МР-визуализации.

Альтернативно синтезу 32, указанному выше, можно осуществлять циклизацию пептида на смоле, как показано на следующей схеме:




Пример 6. Вещества для МР-визуализации, полученные аналогичным способом.

Каждое из следующих веществ для МР-визуализации синтезировали аналогично способам, описанным выше. Пептид, полученный с использованием стандартной Fmoc-методики и подвергнутый циклизации с использованием трифторацетата таллия, очищали ВЭЖХ и подвергали взаимодействию с синтоном №2, диизопропилэтиламином, диизопропилкарбодиимидом (2 экв.) и HOBt (2 экв.) в дихлорметане. Растворители удаляли в вакууме и остаток растворяли в этилацетате, который последовательно промывали 0,1N хлористоводородной кислотой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая пену, которую при необходимости очищали флэш-хроматографией или ВЭЖХ. Полученное в результате белое твердое вещество перемешивали в смеси ТФУ, воды и триэтилсилана (90%/5%/5%, 30 мл) при комнатной температуре в течение 2-6 ч. Добавляли диэтиловый эфир, и образовывался белый осадок, который очищали препаративной ВЭЖХ ($CH_3CN/H_2O/AcONH_4$), получая белое твердое вещество, предшественник вещества для МР-визуализации.

Предшественник вещества для МР-визуализации подвергали взаимодействию с одним эквивалентом $CaCl_3 \cdot 6H_2O$ в деионизованной воде (pH 6, NaOH). Хелат гадолиния очищали, используя хроматографию с обращенной фазой на картридже Waters Sep-Pak®, C-18 с использованием в качестве элюента воды и смеси метанол:вода 50:50. Соответствующие фракции объединяли и метанол удаляли при пониженном давлении при 50°C и лиофилизовали, получая требуемое вещество для МР-визуализации. В табл. 3 представлены данные масс-спектрометрии, подтверждающие каждое из соединений. Смотри подробное описание структуры каждого из соединений.

Таблица 3. МС-данные соединений, связывающих фибрин

| Соединение | Молекулярная масса | МС $(M+3H)^{3+}/3$ | |
|---|---|---|---|
| | | Вычислено | Найдено |
| 4 | 4016,884 | 1256,49467 | 1255,66 |
| 5 | 4025,96 | 1259,52 | 1259,9 |
| 6 | 4108,014 | 1286,87133 | 1284,53 |
| 7 | 4307,336 | 1353,312 | 1369,34 |
| 8 | 4076,064 | 1276,22133 | 1298,48 |
| 9 | 4233,208 | 1328,60267 | 1327,94 |
| 10 | 4221,199 | 1324,59967 | 1324,57 |
| 11 | 4142,146 | 1298,24867 | 1321,13 |
| 12 | 4123,378 | 1291,99267 | 1289,80 |
| 13 | 4325,675 | 1359,425 | 1333,3 |
| 14 | 4470,833 | 1407,811 | 1407,44 |
| 15 | 4363,362 | 1371,98733 | 1393,99 |
| 16 | 4511,483 | 1421,361 | 1444,57 |
| 17 | 4169,128 | 1307,24267 | 1329,85 |
| 18 | 4503,826 | 1418,80867 | 1419,25 |
| 19 | 4387,428 | 1380,00933 | 1379,12 |
| 20 | 4305,369 | 1352,65633 | 1351,6 |
| 21 | 4419,473 | 1390,691 | 1390,53 |
| 22 | 4277,356 | 1343,31867 | 1341,04 |
| 23 | 4357,829 | 1370,143 | 1370,63 |
| 24 | 4443,644 | 1398,748 | 1398,9 |
| 25 | 4448,209 | 1400,26967 | 1400,11 |
| 26 | 4326,731 | 1359,777 | 1359,9 |
| 27 | 4423,505 | 1392,035 | 1392,79 |
| 28 | 4343,375 | 1365,325 | 1364,7 |
| 29 | 4342,387 | 1364,99567 | 1364,7 |
| 30 | 4313,366 | 1355,322 | 1354,9 |
| 31 | 4342,387 | 1364,99567 | 1364,8 |
| 32 | 4319,303 | 1357,301 | 1357,6 |

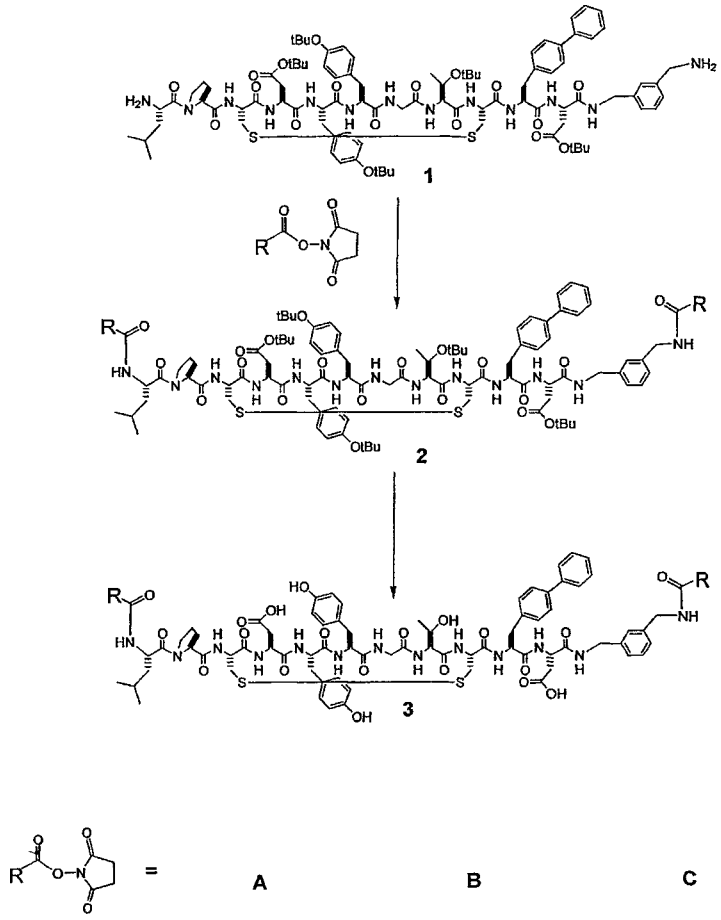
Пример 7. Синтез оптических контрастных веществ, связывающих фибрин.

Каждый из следующих оптических контрастных веществ синтезировали аналогично способам, описанным выше. На схеме X показан общий пример, где два идентичных оптических красителя добавляют к одному и тому же пептиду.

5-Карбокситетраметилродамин-содержащие соединения (3A)

Пептид 1 (177 мг; 0,10 ммоль) и сложный сукцинимидиловый эфир 5-карбокситетраметилродамина A (111 мг; 0,21 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл) и ДМФА (20 мл). По каплям добавляли диизопропилэтиламин до значения pH 9. Смесь перемешивали в течение ночи и затем растворители удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на колонке с силикагелем (элюенты: дихлорметан/метанол), получая соединение 2A.

К соединению 2A добавляли раствор ТФУ, $H_2O$ и триэтилсилана (отношение: 90/5/5, 5 мл). Смесь встряхивали в течение 3 ч при комнатной температуре и затем раствор реакционной смеси вливали в 50 мл эфира, чтобы осадить неочищенный продукт. После отделения растворителей центрифугированием неочищенный продукт собирали и затем очищали, используя ВЭЖХ с обращенной фазой, получая соединение 3A.



5-Карбоксифлуоресцеинсодержащее соединение (3B)

Способом, подобным способу, описанному для синтеза соединения 3A, синтезировали соединение 3B, используя пептид 1 (177 мг; 0,10 ммоль) и сложный сукцинимидиловый эфир 5-карбоксифлуоресцеина B (99,4 мг; 0,21 ммоль).

Соединение, содержащее техасский красный X (3C)

Способом, подобным способу, описанному для синтеза соединения 3A, синтезировали соединение 3C, используя пептид 1 (177 мг; 0,10 ммоль) и сложный сукцинимидиловый эфир техасского красного X C (172 мг; 0,21 ммоль).

Пример 8. Измерение связывания контрастных веществ с мишенями.

Степень связывания контрастного вещества согласно данному изобретению с мишенью, такой как ЧСА или фибрин, можно оценить множеством способов равновесного связывания. Например, связывание с ЧСА можно измерить ультрафильтрацией. В обычном измерении связывания с использованием ультрафильтрации контрастное вещество смешивают с 4,5% мас./об. ЧСА в буфере с pH 7,4. Образец наносят на коммерчески доступное устройство для центрифугирования, оборудованное фильтром с отсечением по молекулярной массе 30 кД (восстановленная целлюлоза с низким связыванием Millipore Ultrafree MC с пределом отсечения по молекулярной массе 30 кД, катал. № UFC3LTK00), проницаемым для направляющей к мишени группы, но не для ЧСА. Небольшую часть (5-10%) объема образца фильтруют центрифугированием при 2000 x g в течение 20 мин через отсекающий фильтр и в фильтрате измеряют концентрацию несвязанной направляющей к мишени группы в образце.

Для измерения связывания с фибрином сгусток фибрина может быть образован в лунке планшета для микротитрования, и его можно подвергнуть контакту с направляющей к мишени группой. После инкубации в течение времени, достаточного для установления равновесия, супернатант удаляют аспирацией (нерастворимый фибрин остается связанным в виде желеобразного сгустка на дне лунки). Затем измеряют концентрацию несвязанной направляющей к мишени группы в супернатанте.

В обоих способах концентрацию связанного контрастного вещества определяют в виде разности между суммарной концентрацией направляющей к мишени группы, присутствующей исходно, и концентрацией несвязанной направляющей к мишени группы после анализа связывания. Связанная часть равна концентрации связанной направляющей к мишени группы, деленной на общую концентрацию направляющей к мишени группы.

Аффинность контрастных веществ к растворимому фрагменту фибрина DD(E) оценивали, как указано выше, и представили в табл. 4. Номера соединений, приведенных в табл. 4, относятся к структурам, указанным в подробном описании. Данные, полученные в указанном биологическом анализе, при многократных определениях имеют процент ошибки не более 20%.

Таблица 4. Аффинность соединений по отношению к фибрину

| Соединение | Kd, DD(E), мкМ |
|---|---|
| 4 | 33 |
| 5 | 12 |
| 6 | 13 |
| 7 | 12 |
| 12 | 5,0 |
| 13 | 5,1 |
| 14 | 4,9 |
| 32 | 4,7 |
| 15 | 4,0 |
| 16 | 3,5 |
| 17 | 6,2 |
| 18 | 5,9 |
| 8 | 8,6 |
| 9 | 6,1 |
| 10 | 9,6 |
| 11 | 13 |
| 27 | 0,7 |
| 28 | 5,3 |
| 29 | 0,8 |
| 30 | 3,7 |
| 19 | 10 |
| 20 | 1,2 |
| 21 | 9,1 |
| 22 | 3,5 |
| 31 | 0,8 |
| 23 | 0,25 |
| 24 | 0,7 |
| 25 | 5,6 |
| 42 | 0,07 |
| 43 | 0,08 |
| 44 | 0,09 |
| 45 | 0,1 |
| 33 | 0,1 |
| 35 | 0,11 |
| 46 | 0,15 |
| 47 | 0,18 |
| 48 | 0,199 |
| 49 | 0,22 |
| 50 | 0,3 |
| 34 | 0,39 |

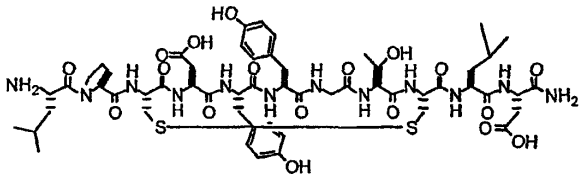
Пример 9. Стабильность контрастных веществ.

Стабильность анализировали с использованием гомогената печени крыс, который содержит как внутри-, так и внеклеточные ферменты и представляет собой особенно жесткую химическую среду для

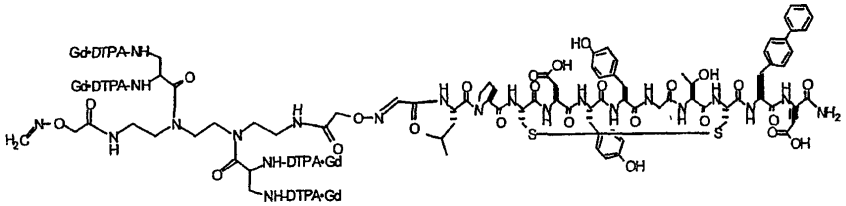
пептидных связей. Свежеприготовленный гомогенат печени крыс (630 мкл) помещали в стеклянную пробирку и инкубировали при 37°C на водяной бане в течение 4 мин. К гомогенату печени крыс при 37°C добавляли 70 мкл 1 мМ раствора тестируемого соединения. Во временных точках 0, 5, 15, 30 и 60 мин извлекали аликвоту реакционной смеси объемом 100 мкл и смешивали со 100 мкл метанола в микроцентрифужной пробирке, чтобы погасить реакцию. Погашенную реакционную смесь центрифугировали в течение 3 мин при 10000 об/мин, чтобы осадить преципитированный белок. Супернатант анализировали ЖХ-МС, чтобы определить количество оставшегося тестируемого соединения, путем сравнения площади МС-пика отдельного иона с площадью пиков серии стандартов. Время полужизни (T1/2) определяли, нанося на графике сигнал в виде процента оставшегося сигнала в логарифмическом масштабе против времени.

Осуществляли подгонку данных, используя подгонку экспоненциальной кривой, где T1/2=ln2/наклон.

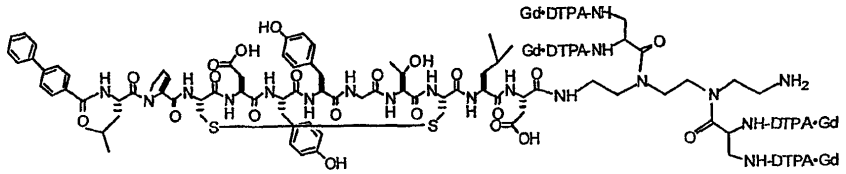
Оценивали данные о стабильности приведенных ниже соединений. Соединение 5, которое имеет хелаты как на C-конце, так и на N-конце пептида, имеет существенное увеличение времени полужизни в результате устойчивости к гидролизу экзопептидазами. Сопоставимое увеличение времени полужизни не достигалось при модификации хелатами одного конца, даже когда другой конец был копирован необычным органическим остатком, как, например, в соединении 3 (содержащем бифенильную группу на N-конце).



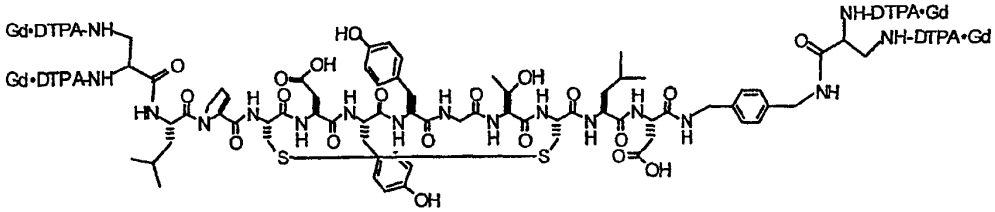
Структура 1: время полужизни ≤2 мин, свободный N-конец и амидированный C-конец.




Структура 2: время полужизни = 10 мин, N-конец, конъюгированный с хелатами, и амидированный C-конец.




Структура 3: время полужизни = 9 мин, C-конец конъюгирован с хелатами и N-конец ацилирован пара(фенил)бензойной кислотой.




Структура 5: время полужизни = 65 мин, оба конца и N- и C-конец конъюгированы с хелатами.

Неожиданно указанные выше данные показывают, что время полужизни пептида наиболее значительно увеличивается в результате присоединения хелатов гадолиния с обоих концов, C-конца и N-конца.

Пример 10. Способность к релаксации контрастных веществ.

Контрастные вещества для МРВ согласно данному изобретению оценивали в отношении способности к релаксации, используя ЯМР-спектрометр Bruker NMS-120 Minispec и проводя измерения при напряженности 0,47 тесла (частота Лармора H-1 20 МГц) и 37°C, или релаксометр Konig-Brown (частота Лармора H-1 20 МГц), проводя измерения при 35°C. T1 протонов воды определяли по последовательности импульсов инверсия-восстановление, используя компьютерную программу прибора. Способность к релаксации определяли, измеряя T1 ряда растворов мишени (например, однородно дисперсные гели свежеполимеризованного фибриногена, 10 мг/мл), содержащих ноль, 20, 30 и 40 мкМ Gd(III), соответственно. Образцы инкубировали при 37°C по меньшей мере в течение 15 мин, чтобы обеспечить температур-

ное равновесие перед тем как выполняли измерение T1. Содержание Gd (III) в образцах определяли с помощью масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (ИСП-МС). Способность к релаксации (на ион Gd(III)) определяли, нанося на графике скорость релаксации (1/T1) в $c^{-1}$ против концентрации Gd(III) в мМ. Наклон линейной подгонки к данным давал способность к релаксации. Также аналогичным образом определяли способность к релаксации соединений в отсутствии мишени, за исключением того, что мишень отсутствовала.

Соединения согласно изобретению проявляют повышенную способность к релаксации при связывании с фибрином (фиг.2) по сравнению со способностью к релаксации в отсутствии биологической мишени.

Пример 11. Поглощение контрастных веществ сгустком.

Поглощение контрастного вещества тромбом (сгусток крови) определяли следующим способом. Морскую свинку массой 600 г (самец Hartley) анестезировали. Делали надрез брюшной полости и изолировали нижнюю полую вену (IVC) и сосуду давали возможность восстановиться в течение 10 мин. Часть IVC длиной 1 см зажимали и в сосуд инъецировали тромбин человека (50 мкл, 4 единицы), чтобы стимулировать образование тромба. Нижний зажим открывали и закрывали, позволяя части крови протекать в участок. Через 2-3 мин зажимы снимали. Тромбу давали возможность «созреть» в животном в течение 30 мин. В этой временной точке через яремную вену инъецировали контрастное вещество, соединение 32, в дозе 2 мкмоль/кг и радиоактивно меченый 70 мккюри $^{111}$In. Сразу после инъекции вещества, соединения 32, через яремную вену инъецировали неспецифичный контроль, содержащий Gd(DTPA) в дозе 2 мкмоль/кг, смешанный с 70 мккюри $^{99m}$TcDTPA. Через 30 мин отбирали кровь, животное забивали и извлекали тромб. Образец крови взвешивали и подсчитывали, используя гамма-счетчик Packard Cobra II. Тромб также взвешивали и подсчитывали. Импульсы, возникающие в результате распада $^{99m}$Tc, определяли в диапазоне энергии 128-165 кэВ, тогда как импульсы, возникающие в результате распада $^{111}$In, определяли в диапазоне 390-500 кэВ. Контрольные эксперименты с использованием только $^{99m}$Tc или только $^{111}$In показали, что радиоактивность, возникающая при распаде $^{99m}$Tc, была пренебрежимо малой при энергии регистрации, используемой для $^{111}$In, и наоборот. Данные радиоактивного распада преобразовывали в % исходной дозы на грамм ткани, %ID/г, и графически представили среднее из трех экспериментов. Радиоактивное мечение $^{111}$In осуществляли заранее: соответствующее радиохимическое количество $^{111}InCl_3$ (New England Nuclear) добавляли к направленному к фибрину контрастному веществу. Значение pH доводили до 4 добавлением 1M HCl. Образец нагревали при 45°C в течение 1 ч. Значение pH доводили до нейтрального добавлением 1M NaOH. Чистота меченого вещества, соединения 32, составляла >95% согласно ВЭЖХ с γ-регистрацией.

Специфичные по отношению к фибрину вещества показали заметное увеличение поглощения сгустком. На фиг. 3 показано, что вещество, соединение 32, накапливается в тромбе. Существует специфичное поглощение сгустком по сравнению с $^{99m}$TcDTPA и имела место более высокая концентрация вещества в тромбе, чем в окружающей крови.

Специфичность поглощения сгустком также можно показать с использованием МРВ. Способ визуализации тромба in vivo с помощью вещества заключается в следующем. Морскую свинку массой 600 г (самец Hartley) анестезировали. Делали надрез горла и изолировали одну из яремных вен. Участок яремной вены длиной 1 см изолировали с помощью зажимов для сосудов. Свежеотобранную кровь животного (50 мкл) смешивали с тромбином человека (50 мкл, 4 единицы) и инъецировали в участок вены, ограниченный зажимами. Через 4 мин после инъекции зажимы снимали и тромбу давали возможность «созреть» в течение 30 мин. Вещество, соединение 32, инъецировали в дозе 6 мкмоль/кг и область горла морской свинки визуализировали при 1,5 Т, используя способ градиентного эха с прерыванием потока, TR=36, TE=5, угол поворота = 30°. Тромб выглядит светлым относительно крови.

Пример 12. Получение МР-изображения тромба с помощью направленного к мишени контрастного вещества в присутствии или в отсутствии темной крови.

Самок белых новозеландских кроликов массой 2,5 кг анестезировали смесью кетамина (50 мг/кг), ацепромазина (2,5 мг/кг) и ромпона (5 мг/кг) и анестезию поддерживали пентобарбиталом натрия (примерно 35 мг/кг по необходимости). В/в-катетер (24 g) помещали в ушную вену и ушную артерию. Изолировали яремную вену и сонную артерию. Стеноз создавали в сонной артерии, помещая иглу калибра 18 g сверху сосуда и затем вводя ее в пространство с лигатурой 3-0. Затем иглу удаляли. Участок артерии длиной 5 мм отделяли дистально от места стеноза с помощью зажимов для микрососудов. Затем артерию два раза сдавливали вдоль участка длиной 5 мм. Проксимальный сосудистый зажим освобождали, давая возможность крови протекать в участок в течение примерно 3 с. Снова устанавливали зажим и артерию снова дважды сжимали вдоль участка длиной 5 мм. Через 4 мин зажимы удаляли. Участок яремной вены длиной 5 мм изолировали с помощью зажимов для микрососудов. Тромб образовывали путем инъекции 100 мкл смеси из 3,7 единиц тромбина, 0,06M $CaCl_2$, цельной крови кролика. Через 4 мин зажимы удаляли.

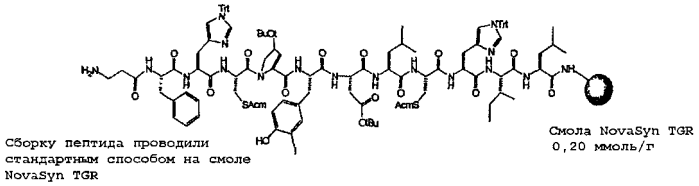
Тромбам давали возможность «созреть» в течение 50 мин. Через ушную вену вводили 1,0 мл раствора направленного к тромбу вещества (структура III, 5 мМ, 2 мкмоль/кг). Через 10 мин животное помещали внутрь сканнера General Electric Signa LxCVi 1,5 тесла и получали первичный набор данных

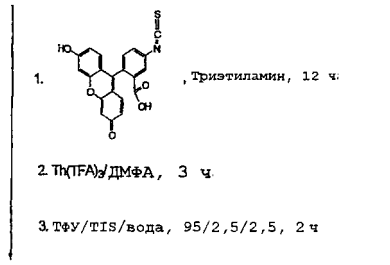
MPB, используя последовательность градиентного эха с РЧ-прерыванием 3D (SPGR:TR=39 мс, TE=3,1 мс, угол поворота = 40 градусов, поле обзора = 8 см, получаемая полоса пропускания 31,25 kH). Применяли насыщение химического сдвига жира, а также нижние и верхние полосы пространственного насыщения 40 мм. Сразу после данного сканирования (через 8 мин) получали второй набор MPB-данных, используя такие же параметры с добавлением верхних и нижних полос пространственного насыщения 40 мм, чтобы создать «темнокровное» изображение.

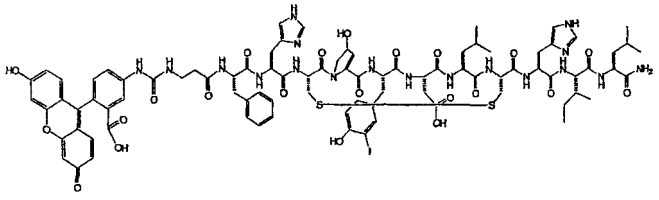
На фиг. 4А показана проекция максимальной интенсивности (MIP) первого набора данных. Кровеносные сосуды частично усилены благодаря времяпролетным эффектам. На фиг. 4В показана MIP второго набора данных, где сигнал от втекающей крови подавлен (темная кровь) благодаря использованию верхней и нижней полос насыщения. На фиг. 4А и 4В несомненно облегчена идентификация стационарной мишени (тромба) с использованием направленного к мишени контрастного вещества.

Пример 13. Синтез оптического контрастного вещества.

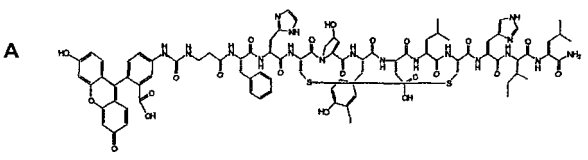
Смолу NovaSyn TGR (0,20 ммоль/г, 100 мг, 20 мкмоль) промывали NMP/эфиром/NMP. Сборку пептида проводили стандартным твердофазным способом, используя активацию PyBOP/HOBt/DIEA. После связывания последнего аминокислотного остатка связанный со смолой пептид обрабатывали раствором пиперидина в ДМФА (20 об.%, 2,0 мл) в течение 10 мин, чтобы удалить защитную группу Fmoc. Смолу тщательно промывали NMP/эфиром/NMP и обрабатывали раствором флуоресцеин-5-изотиоцианата (23,4 мг; 60 мкмоль) и диизопропилэтиламина (11,6 мг; 15,7 мкл; 90 мкмоль) в ДМФА (1,5 мл) в течение 12 ч. Смолу тщательно промывали (NMP/эфир/NMP) и обрабатывали раствором $Tl(ТФУ)_3$ (18,7 мг; 34,5 мкмоль) в ДМФА (1,5 мл) при 4°С в течение 3 ч. После указанной обработки смолу промывали и обрабатывали смесью ТФУ/TIS/вода (95/2,5/2,5; 2,0 мл) в течение 2 ч. Неочищенный пептид осаждали добавлением эфира к смеси для отщепления и очищали препаративной ВЭЖХ, используя колонку Vydac C-18. Структуры A-N образовывали таким же образом и определяли их аффинности к фрагменту DD(E) фибрина (табл. 5).

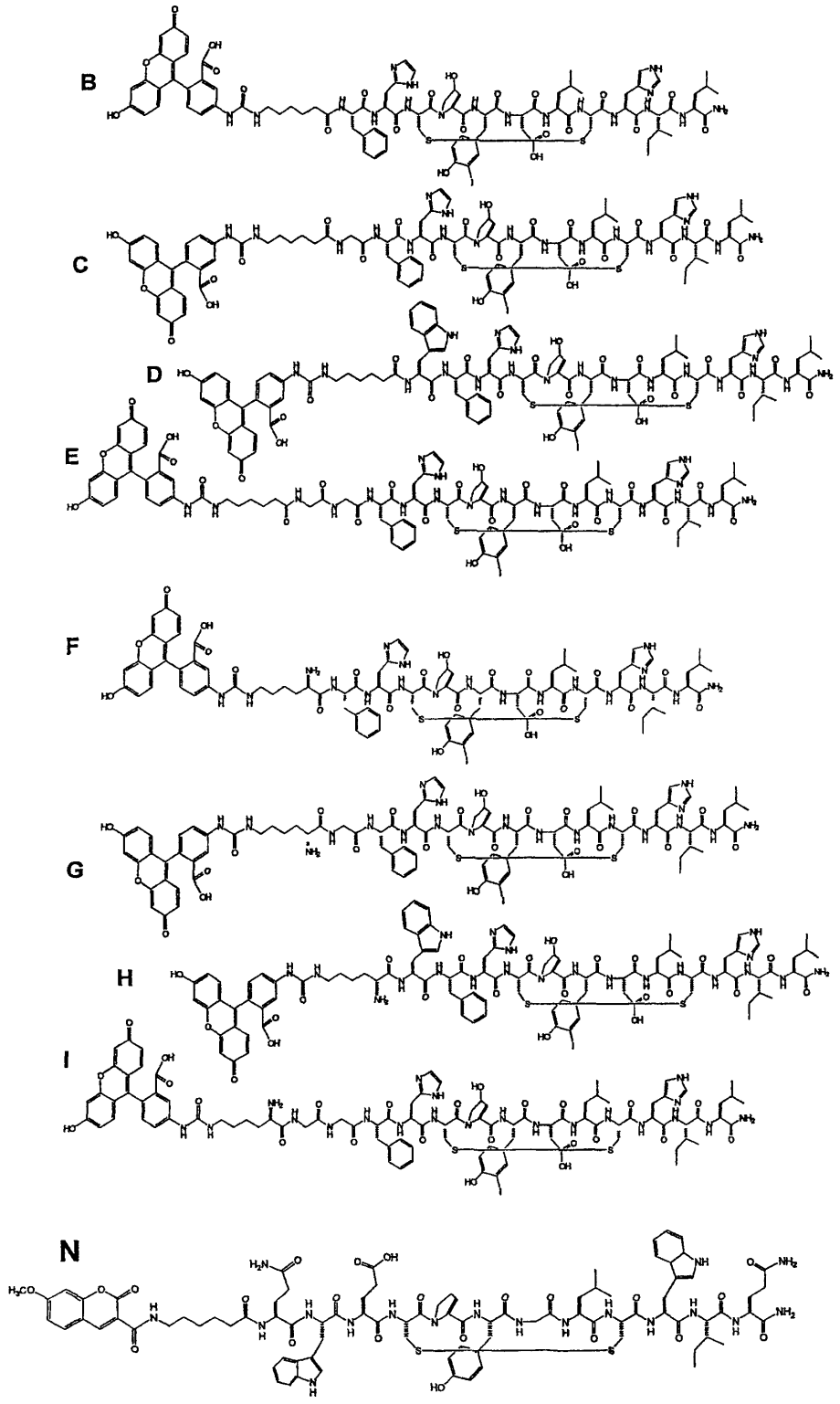


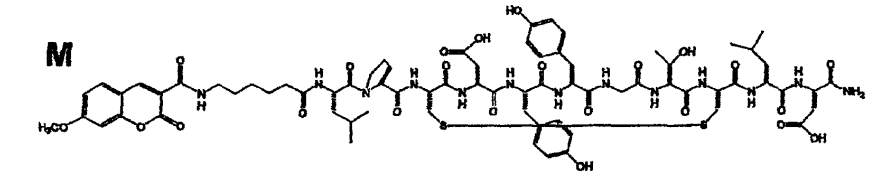



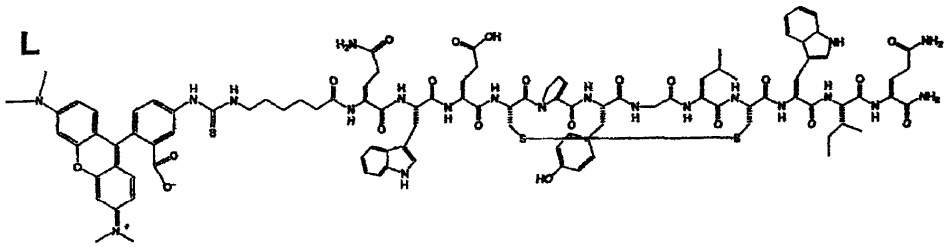



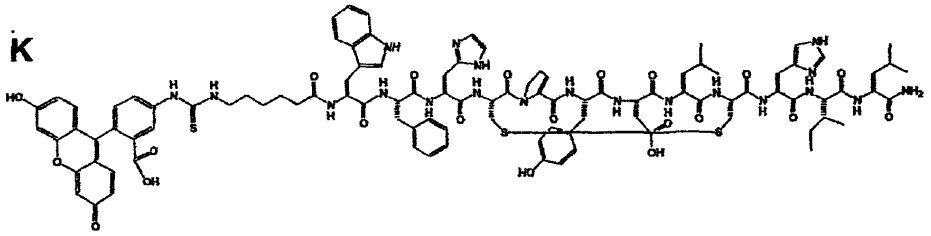
Структуры




B
C
D
E
F
G
H
I
N







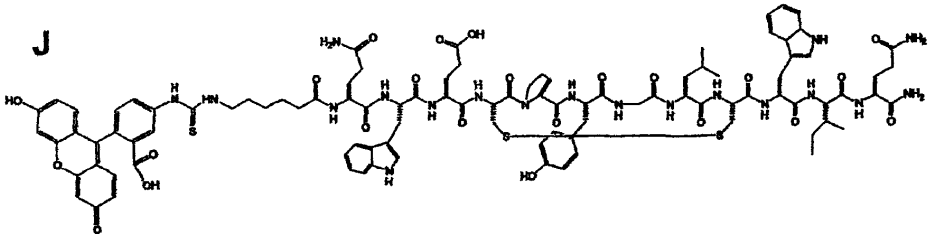


Таблица 5. Аффинность оптических направленных к мишени контрастных веществ по отношению к фибрину

| ID Kd (мкМ) | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | По отношению к DD(E) | Флуорофор | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ | $X_7$ | $X_8$ | $X_9$ | $X_{10}$ | $X_{11}$ | $X_{12}$ | $X_{13}$ |
| D | 0,061 | Флуорофор | Ahx | W | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| J | 0,055 | Флуорофор | Q | W | E | C | P | Y | G | L | C | W | I | Q | |
| K | 0,06 | Флуорофор | W | F | H | C | P | Y | D | L | C | H | I | L | |
| E | 0,09 | Флуорофор | Ahx | G | G | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I |
| C | 0,097 | Флуорофор | Ahx | G | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| B | 0,099 | Флуорофор | Ahx | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | | |
| H | 0,119 | Флуорофор | K | W | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| G | 0,124 | Флуорофор | K | G | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | |
| I | 0,127 | Флуорофор | K | G | G | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I |
| A | 0,136 | Флуорофор | бета-A | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | | |
| F | 0,212 | Флуорофор | K | F | H | C | Hyp | Y(3-I) | D | L | C | H | I | | |

N-концевое мечение пептидов оптическими зондами может модулировать аффинность связывания оптических контрастных веществ. Например, при сравнении флуоресцеиновых, 4-метоксикумариновых и

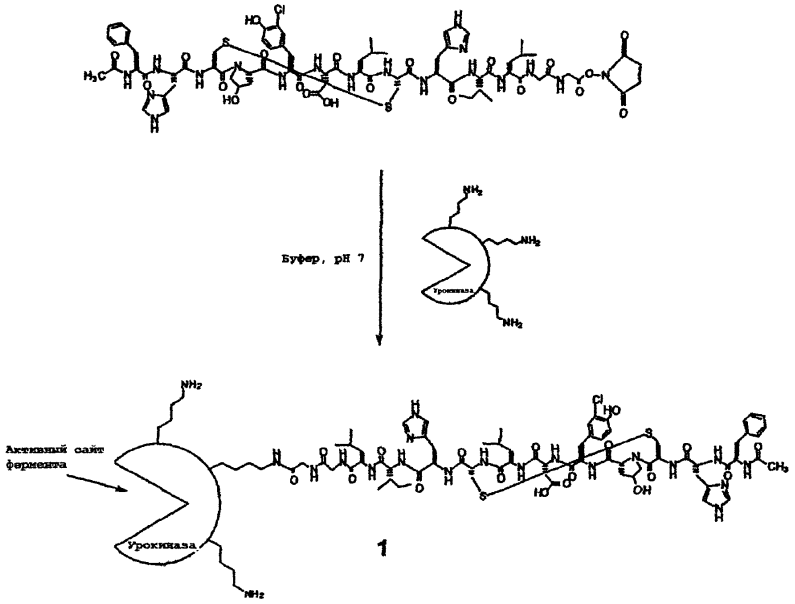
тетраметилродаминовых производных пептида (QWECPYGLCWIQ (SEQ ID NO:27); Kd=3 мкМ) наблюдали следующие Kd (табл. 6).

Таблица 6

| Соединение | Флуорофор | Kd |
|---|---|---|
| J | Флюоресцен | 0,06 |
| L | Татраметилродамин | 2,0 |
| N | 4-Метоксикумарин | 0,2 |

Пример 14. Направленная к фибрину урокиназа.

Направленную к фибрину урокиназу получали согласно следующему способу. Фибрин-связывающий пептид с дипептидным линкером Gly-Gly получали согласно твердофазным способам. N-конец пептида блокировали ацетильной группой, а С-концевую карбоксильную кислоту превращали в активный сложный сукцинамидный эфир. Прямое химическое связывание осуществляли смешиванием урокиназы и активированного пептида в соответствующих пропорциях в водном буфере и осторожным встряхиванием раствора в течение 30 мин.




Направленную к фибрину урокиназу можно очистить ВЭЖХ. Можно исследовать связывание с фибрином. Соединение 1 избирательно связывает фибрин в сравнении с фибриногеном.

Для анализа тромболизиса использовали модель на яремной вене кролика Collen et al. (J. Clin. Invest. 1983, 71, 368-376). Соединение (2 мг/кг) вводили инфузией болюса (составляющего 20% суммарной дозы) в течение 1 мин вместе с болюсом гепарина (300 единиц/кг) в течение 1 мин. Остальную дозу непрерывно инфузировали в течение следующих 60 мин, а гепарин (60 единиц/кг/ч) непрерывно инфузировали в течение следующих 180 мин. Во временной точке 3 ч животных забивали и анализировали сгустки. Соединение 1 является более эффективным при лизисе сгустков, чем один scuPA. В точке 3 ч, в случае 2 мг/кг соединения 1, имеет место меньшее расходование фибриногена и $\alpha$2-антиплазмина по сравнению с эквивалентными дозами одного scuPA, что свидетельствует о том, что соединение 1 более специфично по отношению к фибрину, чем один scuPA.

**Другие варианты**

Должно быть понятно, что хотя изобретение описано в логической связи с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, который определен в прилагаемой формуле изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем нижеследующей формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

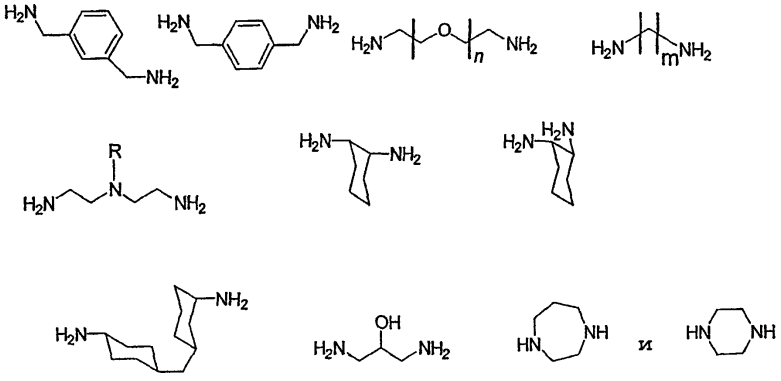
1. Способ получения вещества для МР-визуализации, включающий

a) взаимодействие пептида, имеющего N-концевую функциональную аминогруппу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу и указанную N-концевую функциональную аминогруппу;

b) ковалентное связывание остатка линкера с С-концевой функциональной аминогруппой и с N-концевой функциональной аминогруппой с образованием предшественника вещества для МР-визуализации; и

c) превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации.

2. Способ по п.1, где остаток линкерной субъединицы выбран из группы, состоящей из

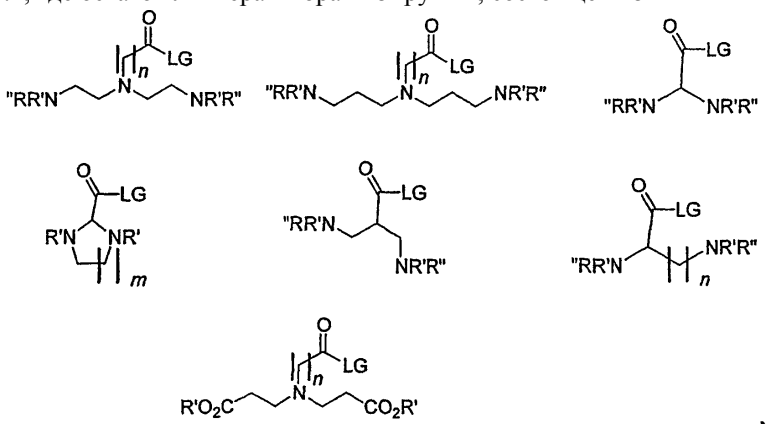


где n является целым числом от 1 до 4;

m является целым числом, выбранным из группы от 1 до 12 и

R представляет собой алифатическую или ароматическую группу.

3. Способ по п.1, где остаток линкера выбран из группы, состоящей из



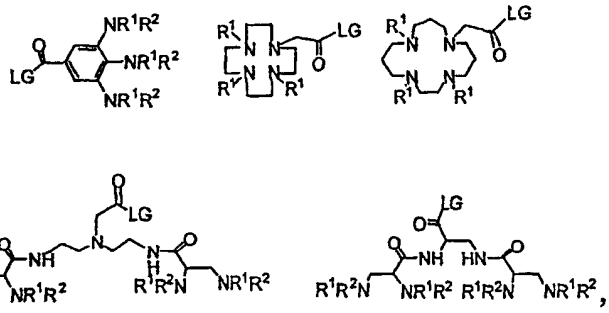
где m является целым числом от 1 до 4;

n является целым числом от 0 до 4;

LG означает удаляемую группу и

R' и R" независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы, или

где остаток линкера выбран из группы, состоящей из



где LG означает удаляемую группу и

$R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы.

4. Способ по п.3, где LG выбрана из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида и где химическая защитная группа выбрана из группы, состоящей из Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутила, бензила и аллила.

5. Способ по п.4, где активированный сложный эфир выбран из группы, состоящей из пентафторфенола (Pfp), N-гидроксисукцинимида (NHS), натриевой соли N-гидроксисульфосукцинимида (NHSS), 2-тиоксотиазолидин-1-ила и гидроксибензотриазола (OBT), и где галогенид выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br и I.

6. Способ по п.1, где превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации включает

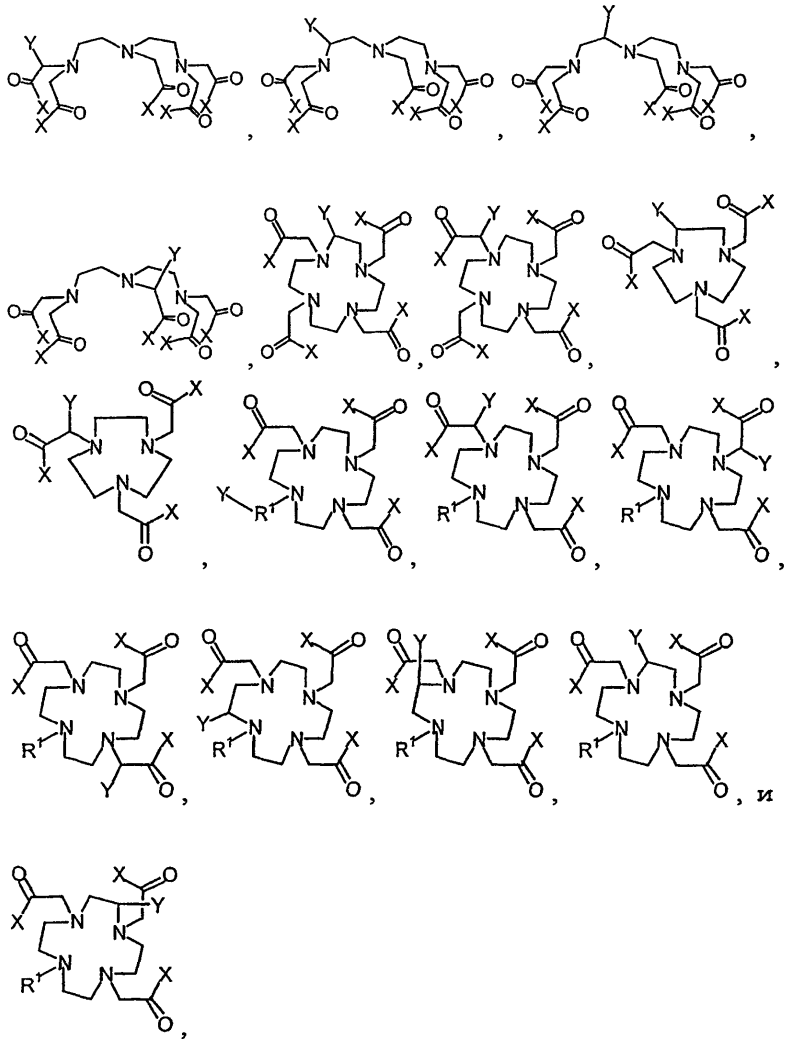
(a) взаимодействие предшественника визуализирующего вещества с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации, при этом остаток предшественника хелата содержит

множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки;

(b) превращение множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплексы с парамагнитным ионом металла; и

(c) образование комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с образованием вещества для МР-визуализации.

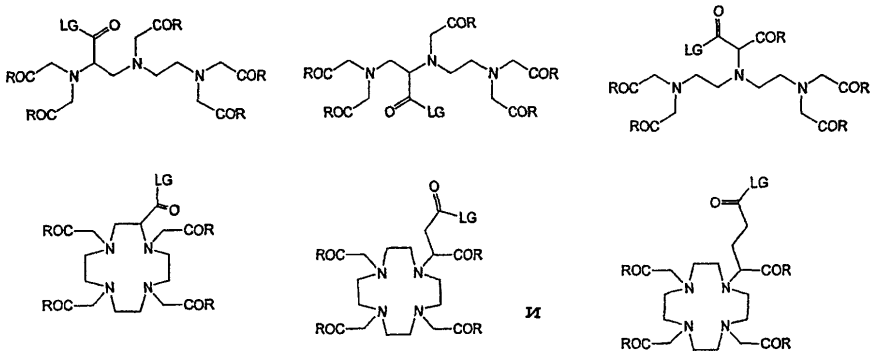
7. Способ по п.6, где остаток предшественника хелата выбран из группы, состоящей из



где Y означает синтетический остаток, способный образовывать ковалентную связь со связанным остатком линкера, и где каждый X независимо представляет собой $O^-$ или предшественник $O^-$, так что X в случае превращения в $O^-$ способен образовывать карбоксилатный остаток с близлежащим к нему карбонилом, и $R^1$ является незаряженным химическим остатком, алифатической, алкильной группой или циклоалкильной группой, или их незаряженными замещенными вариантами.

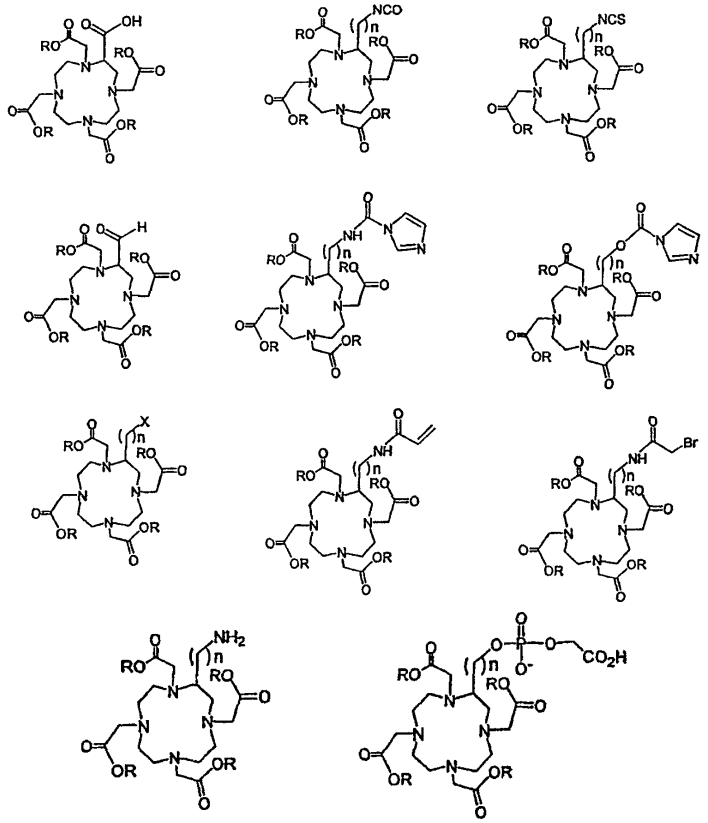
8. Способ по п.7, где синтетический остаток выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, активированного сложного эфира, галогенангидрида кислоты, ангидрида, алкилгалогенида, изоцианата и изотиоцианата, и где предшественник $O^-$ выбран из группы, состоящей из -OH, -OMe, OEt, OtBu, O-бензила и O-аллила.

9. Способ по п.6, где остаток предшественника хелата выбран из группы, состоящей из



где LG является удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида, и где каждый R независимо представляет собой $O^-$ или предшественник $O^-$, выбранный из группы, состоящей из OH, -O-Me, -O-Et, O-tBu, O-бензила и O-аллила, так что R в случае превращения в $O^-$ способен образовывать карбоксилатный остаток с близлежащим к нему карбонилом.

10. Способ по п.6, где остаток предшественника хелата выбран из группы, состоящей из

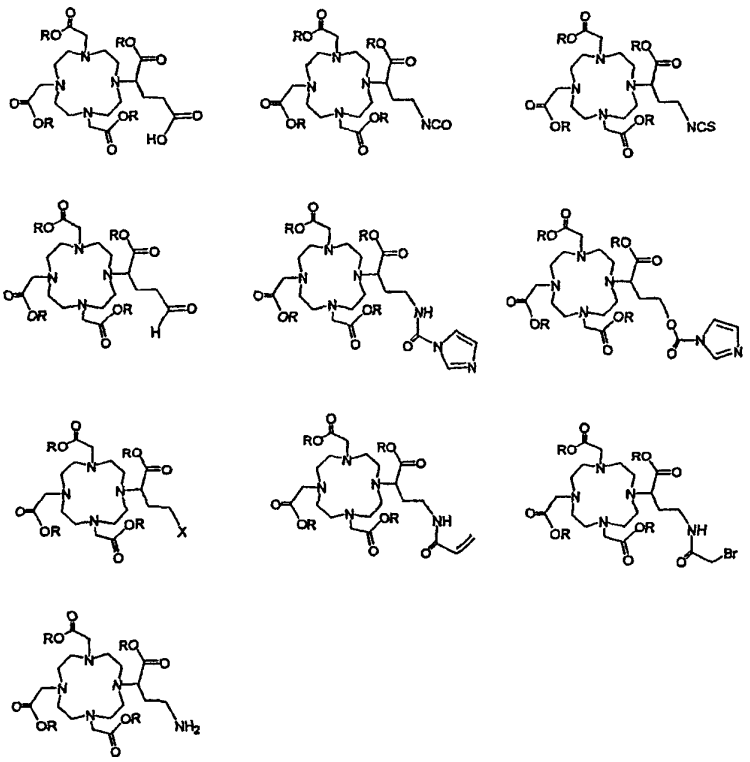


где n является целым числом от 1 до 4;

R выбран из группы, состоящей из отрицательного заряда и предшественника отрицательного заряда, способного превращаться в отрицательный заряд; и

X является химической удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -Cl, -Br, -I, -MsO, -TsO и TfO; или

остаток предшественника хелата выбран из группы, состоящей из



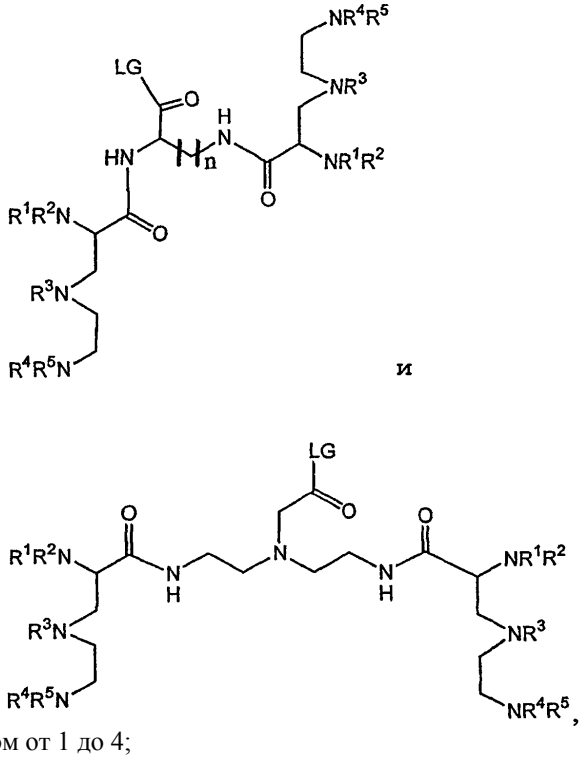
где R выбран из группы, состоящей из отрицательного заряда и предшественника отрицательного заряда, способного превращаться в отрицательный заряд; и

X является химической удаляемой группой, выбранной из группы, состоящей из -Cl, -Br, -I, -MsO, -TsO и TfO.

11. Способ по п.10, где предшественник отрицательного заряда выбран из группы, состоящей из -H, -Me, -Et, -t-Bu, -бензила и -аллила.

12. Способ по п.1, где остаток линкера ковалентно конъюгируют с остатком предшественника хелата, при этом ковалентный конъюгат содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки.

13. Способ по п.12, где ковалентный конъюгат выбран из группы, состоящей из

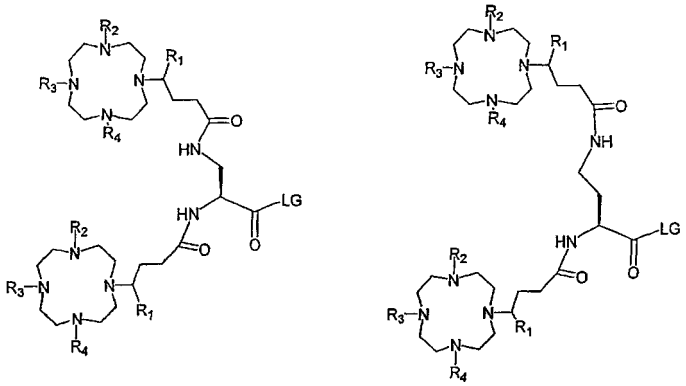


где n является целым числом от 1 до 4;

LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и

$R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетоксиостатка, или

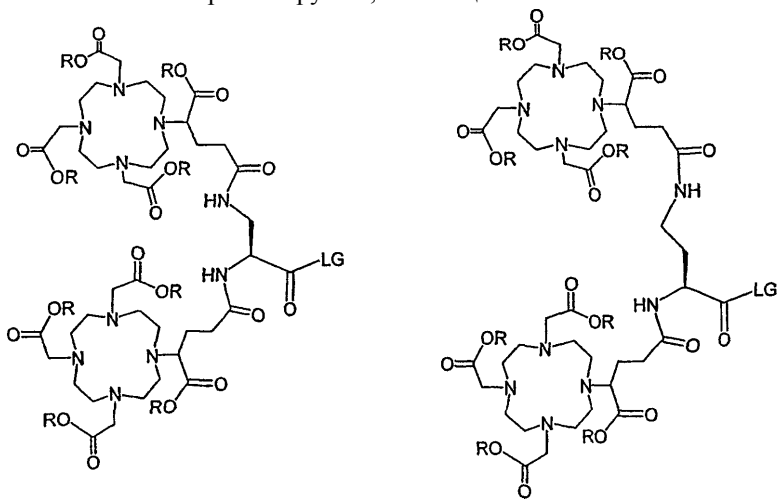
где ковалентный конъюгат выбран из группы, состоящей из



где LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и

$R^1$, $R^2$, $R^3$ и $R^4$ выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетоксиостатка, или

где ковалентный конъюгат выбран из группы, состоящей из

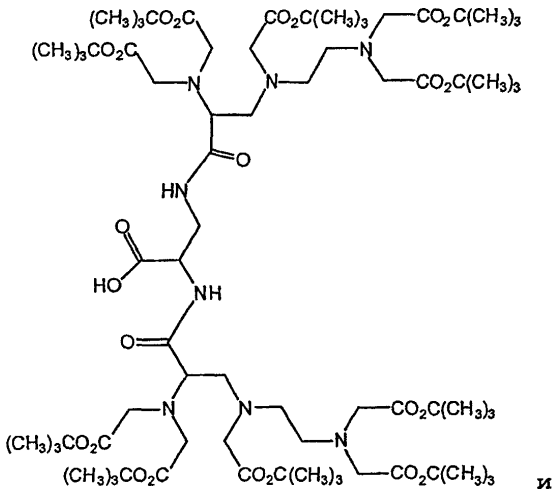


где R означает tBu-группу,

LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из -OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида.

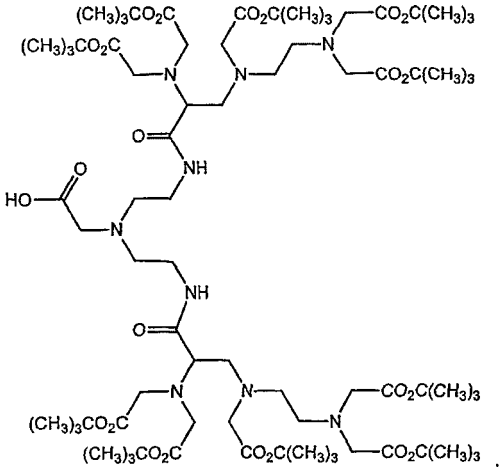
14. Способ по п.12, где ковалентный конъюгат выбран из группы, состоящей из

синтона 1



и

синтона 2



15. Способ по п.12, где превращение предшественника вещества для МРВ-визуализации в вещество для МР-визуализации включает

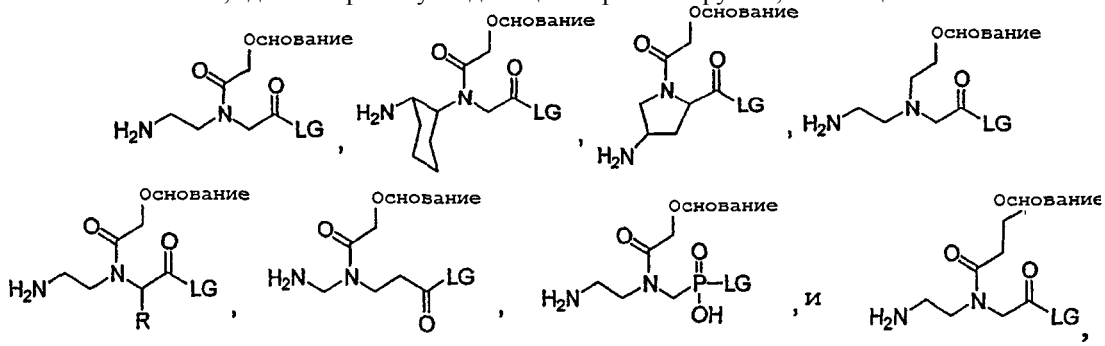
(a) превращение множества предшественников карбоксилатных групп ковалентного конъюгата в карбоксилатные остатки, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и

(b) образование комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением в результате вещества для МР-визуализации.

16. Способ по п.6 или 15, где парамагнитный ион металла выбран из группы, состоящей из Gd(III), Fe(III), Mn(II и III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III и IV), Ho(III), Er(III), Pr(III), Eu(II) и Eu(III).

17. Способ по п.1, кроме того, включающий перед стадией b) взаимодействие линкерной субъединицы с N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием дериватизированной N-концевой функциональной аминогруппы пептида.

18. Способ по п.17, где линкерная субъединица выбрана из группы, состоящей из



где основание выбрано из группы, состоящей из аденозина, гуанозина, тимина и цитозина; LG означает удаляемую группу, выбранную из группы состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и R является алифатическим или ароматическим остатком, или

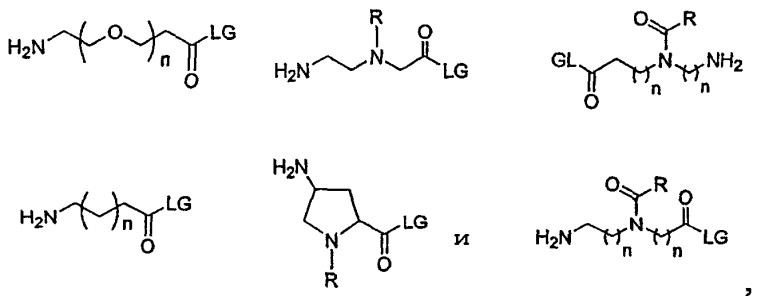
где линкерная субъединица выбрана из группы, состоящей из

где n независимо является целым числом от 0 до 3;

R является алифатической или ароматической группой и

LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида, или

где линкерная субъединица выбрана из группы, состоящей из



где n независимо равно 1 или 2;

R является алифатической или ароматической группой и

LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида.

19. Способ получения вещества для MP-визуализации, включающий

a) ковалентное связывание аминокислотного остатка с остатком линкерной субъединицы с образованием C-конца пептида, при этом остаток линкерной субъединицы ковалентно связан со смолой;

b) синтез пептида на смоле от ковалентно связанного C-конца к N-концевому остатку пептида, при этом N-концевой остаток содержит N-концевую функциональную аминогруппу;

c) отщепление пептида от смолы с получением пептида, имеющего C-концевую функциональную аминогруппу;

d) ковалентное связывание остатка линкера с C-концевой функциональной аминогруппой и N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием предшественника вещества для MP-визуализации и

e) превращение предшественника вещества для MP-визуализации в вещество для MP-визуализации.

20. Способ по п.19, где способ, кроме того, включает перед стадией c) ковалентное связывание остатка линкерной субъединицы с N-концевой функциональной аминогруппой, чтобы получить дериватизированную N-концевую функциональную аминогруппу.

21. Способ по п.19, где превращение предшественника вещества для MP-визуализации в вещество для MP-визуализации включает

(a) взаимодействие предшественника вещества для MP-визуализации с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера предшественника вещества для MP-визуализации, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки;

(b) превращение множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла и

(c) образование комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков с получением вещества для MP-визуализации.

22. Способ по п.19, где остаток линкера является таким, как указано в п.12.

23. Способ по п.22, где превращение предшественника вещества для MP-визуализации в вещество для MP-визуализации включает стадии, как указано в п.15.

24. Способ по п.23, где парамагнитный ион металла является таким, как указано в п.16.

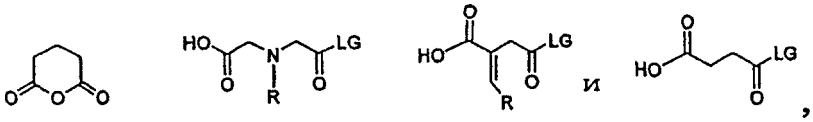
25. Способ получения вещества для MP-визуализации, включающий

a) взаимодействие пептида, имеющего C-концевую функциональную карбоксилатную группу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего как C-концевую функциональную карбоксилатную группу, так и N-концевую функциональную карбоксилатную группу;

b) ковалентное связывание остатка линкера как с N-концевой, так и с C-концевой карбоксилатными функциональными группами модифицированного пептида с образованием предшественника вещества для MP-визуализации; и

c) превращение предшественника вещества для MP-визуализации в вещество для MP-визуализации.

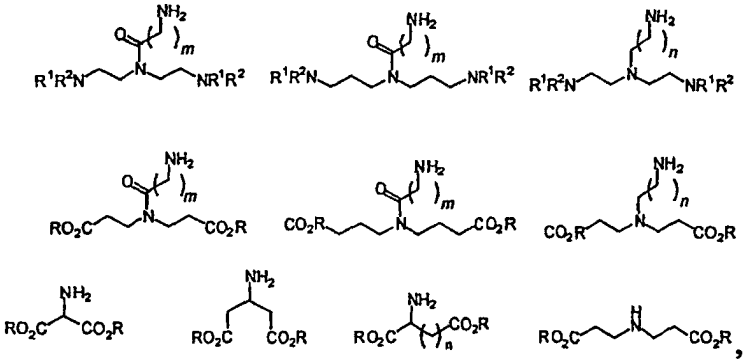
26. Способ по п.25, где остаток линкерной субъединицы выбран из группы, состоящей из



где LG означает удаляемую группу, выбранную из группы, состоящей из OH, активированного сложного эфира, галогенида и ангидрида; и

R является ароматической или алифатической группой,

где остаток линкера выбран из группы, состоящей из



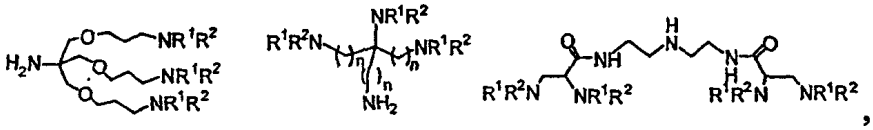
где m является целым числом от 1 до 4;

n является целым числом от 0 до 4;

R независимо выбран из группы, состоящей из -H, -Me, -Et, -Bz и -tBu; и

$R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из водорода и химической защитной группы или

где остаток линкера выбран из группы, состоящей из



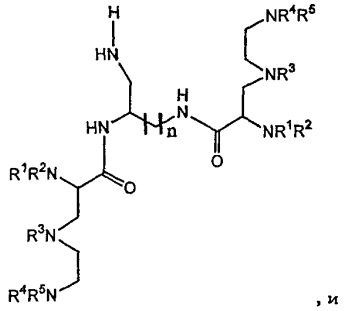
где $R^1$ и $R^2$ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и химической защитной группы, при этом химическая защитная группа выбрана из группы, состоящей из Boc, Fmoc, CBZ, трет-бутила, бензила и аллила.

27. Способ по п.25, где превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации включает стадии, как указано в п.21.

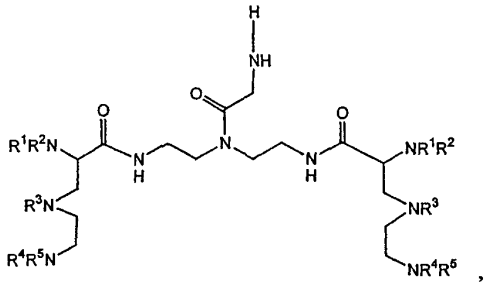
28. Способ по п.25, где остаток линкера является таким, как указано в п.12.

29. Способ по п.28, где превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации включает стадии, как указано в п.15.

30. Способ по п.28, где ковалентный конъюгат выбран из группы, состоящей из



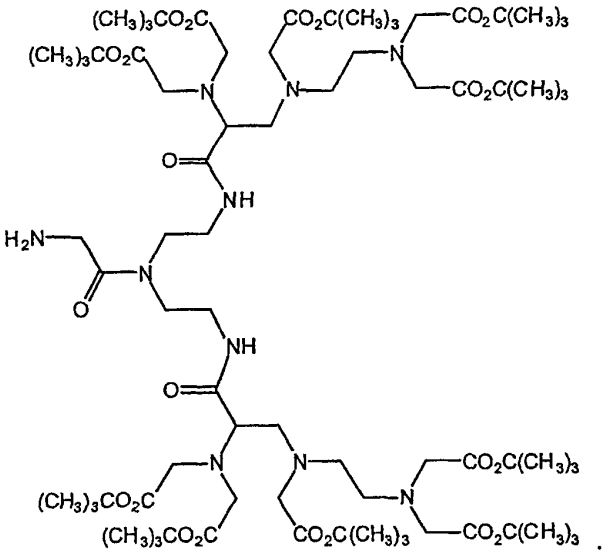
, и



где n является целым числом от 1 до 4 и

$R^1$, $R^2$, $R^3$, $R^4$ и $R^5$ независимо выбраны из группы, состоящей из остатка ацетата, защищенного -Me, -Et или -t-Bu остатка ацетата, остатка ацетамида и ацетоксиостатка.

31. Способ по п.28, где ковалентный конъюгат представляет собой



32. Способ по пп.1, 19 или 25, где превращение предшественника вещества для МР-визуализации в вещество для МР-визуализации включает

а) взаимодействие предшественника вещества для визуализации с остатком хелата, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла, с образованием ковалентной связи между остатком хелата и остатком линкера предшественника вещества для МР-визуализации с получением в результате вещества для МР-визуализации.

33. Способ по п.32, где парамагнитный ион металла является таким, как указано в п.16.

34. Контрастное вещество, содержащее металло-хелатный комплекс на $-CO_2R$-конце и NHR-конце биополимера, где R независимо выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, алифатической и удаляемой группы.

35. Контрастное вещество по п.34, содержащее два металло-хелатных комплекса на $CO_2R$- и NHR-концах биополимера.

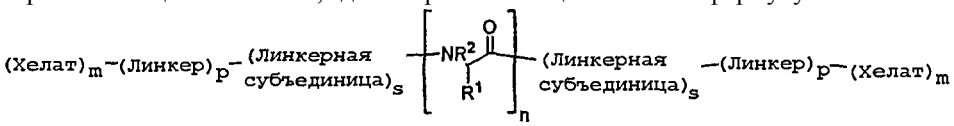
36. Контрастное вещество по п.34, где биополимер имеет специфичную аффинность связывания с фибрином.

37. Контрастное вещество по п.34, где биополимером является пептид.

38. Контрастное вещество по п.37, где пептид способен образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях.

39. Контрастное вещество по п.38, где пептид содержит дисульфидную связь.

40. Контрастное вещество по п.34, где контрастное вещество имеет формулу



где хелат означает металло-хелатный комплекс;

линкер означает остаток линкера;

линкерная субъединица означает остаток линкерной субъединицы;

m независимо является целым числом от 1 до 10;

p независимо является целым числом от 0 до 5;

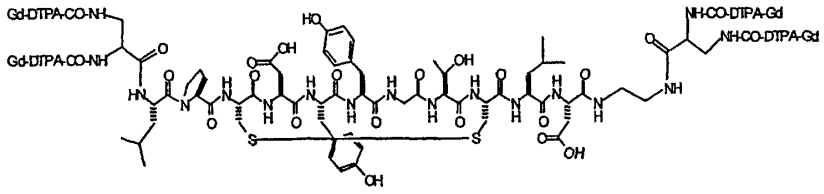
s независимо равно 0 или 1;

$R^1$ является боковой цепью аминокислоты или ее производным и

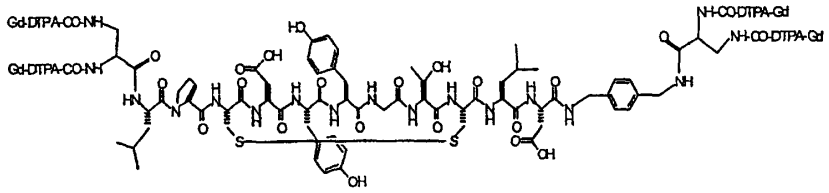
$R^2$ независимо является водородом или алифатической группой.

41. Контрастное вещество по п.40, имеющее структуру, выбранную из группы, состоящей из

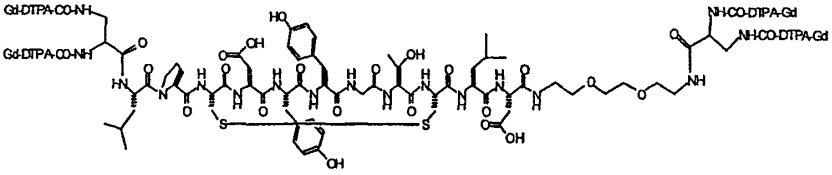
Структура 4



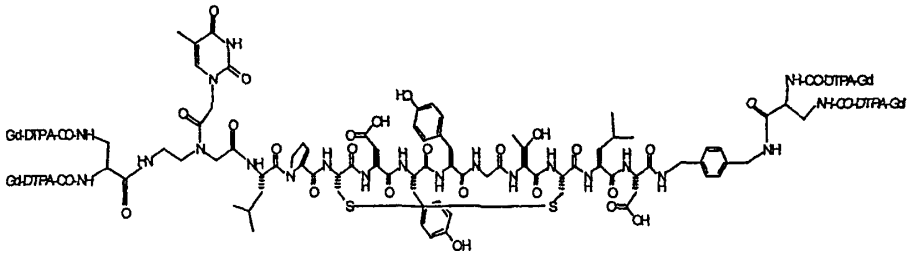

Структура 5



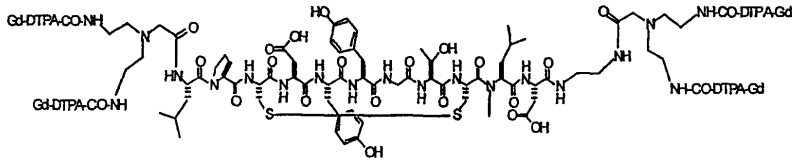

Структура 6



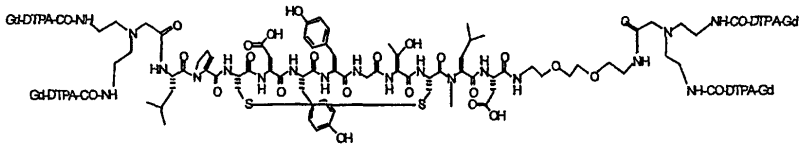

Структура 7



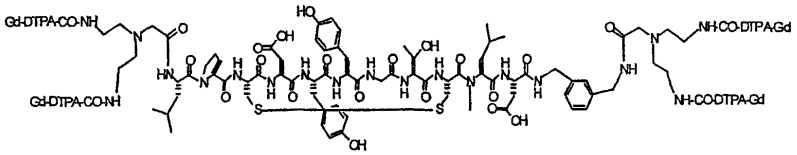
Структура 8



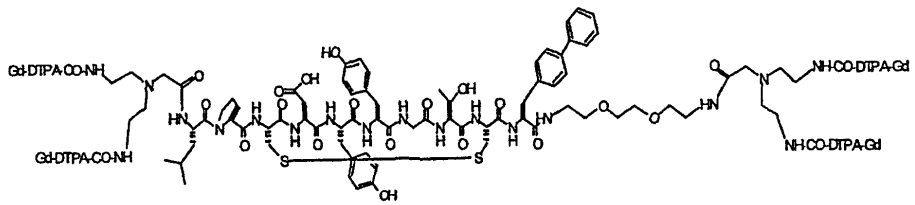

Структура 9



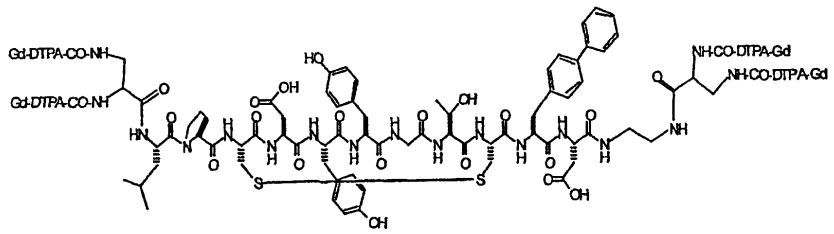

Структура 10



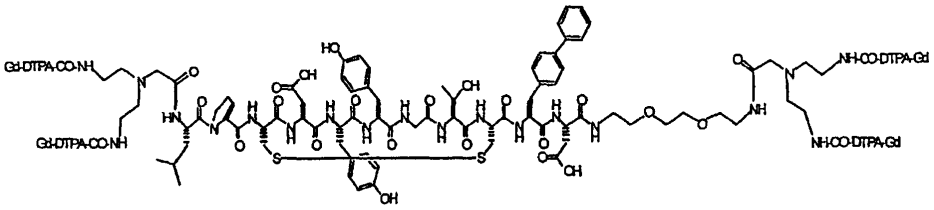

Структура 11



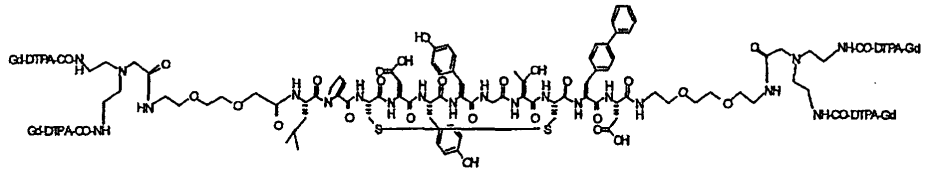

Структура 12



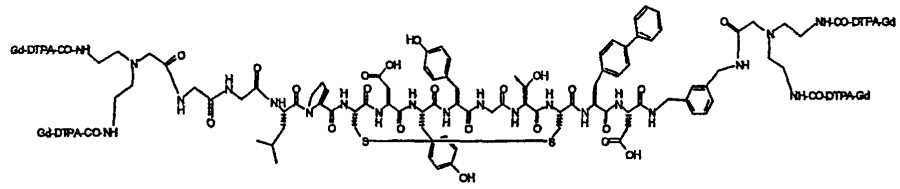
Структура 13



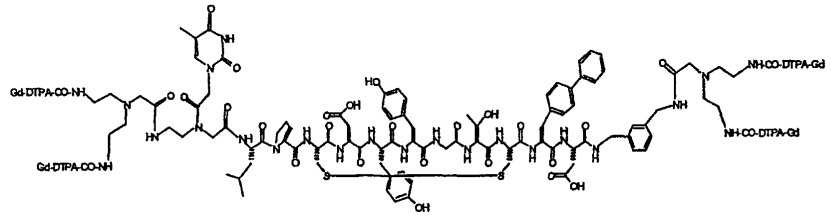

Структура 14



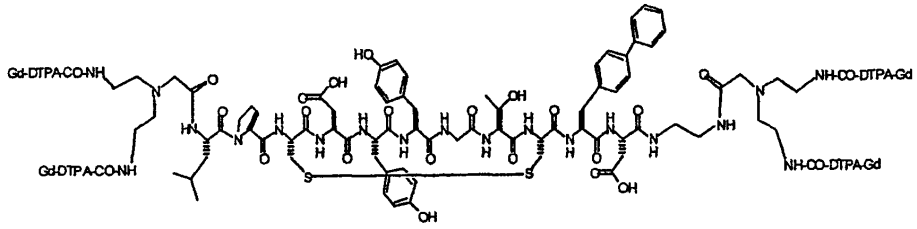

Структура 15



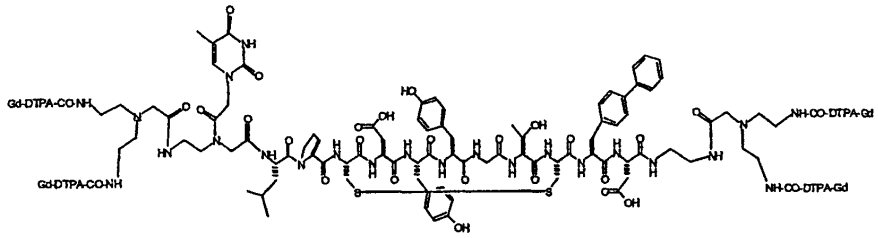

Структура 16



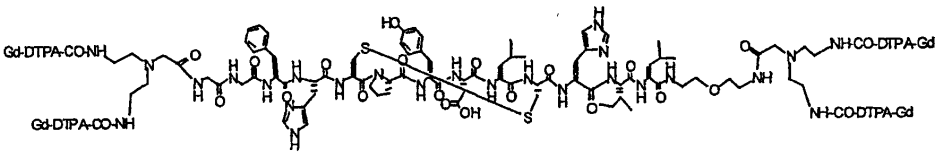
Структура 17



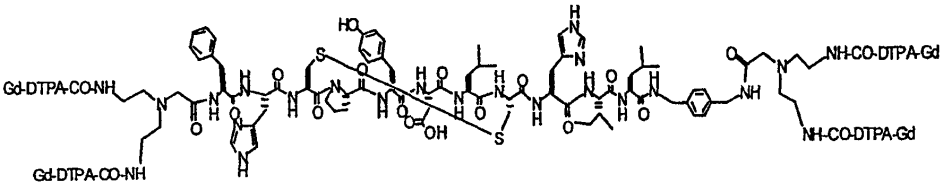

Структура 18



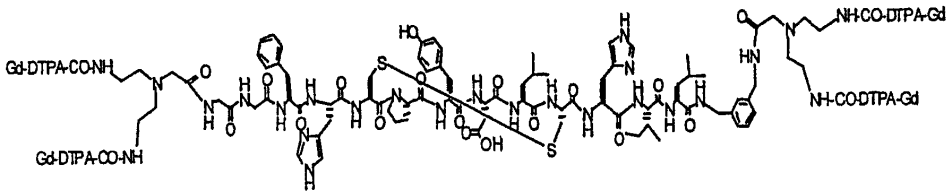

Структура 19



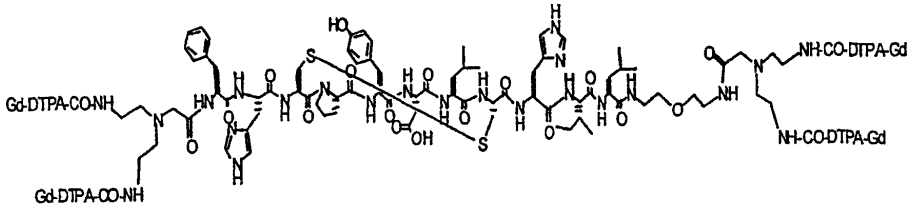

Структура 20



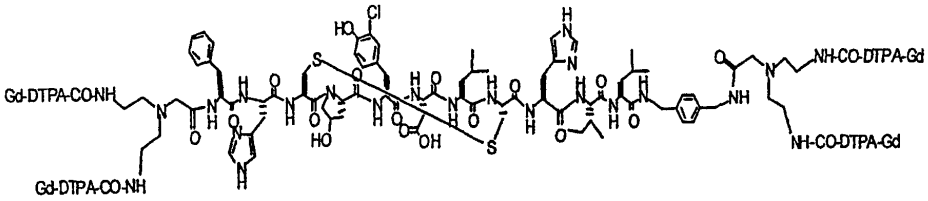

Структура 21



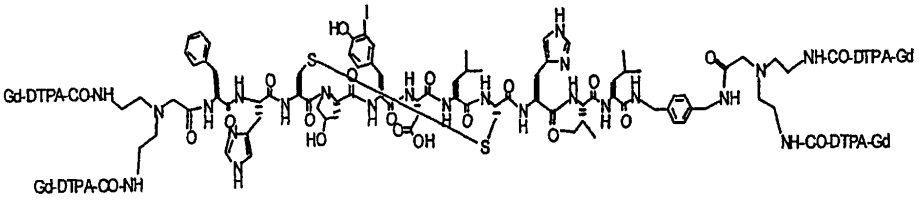
Структура 22



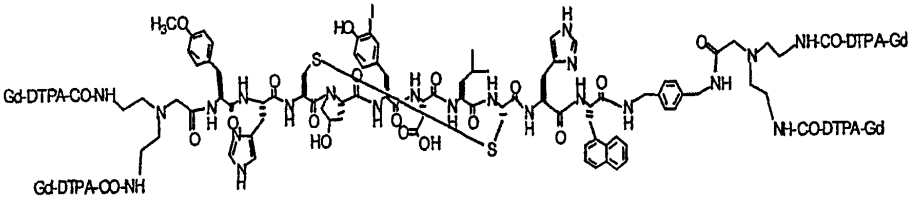

Структура 23



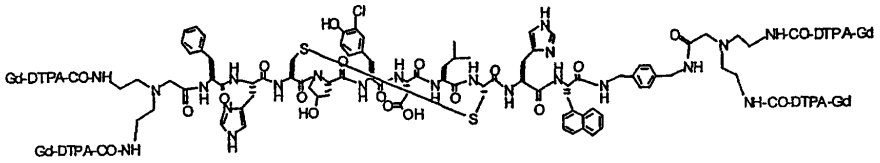

Структура 24



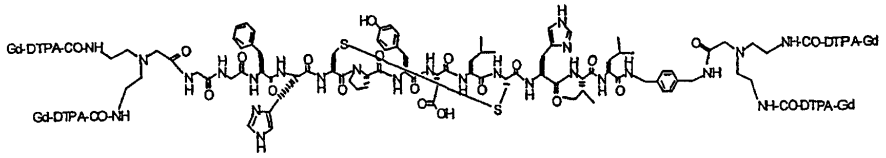

Структура 25



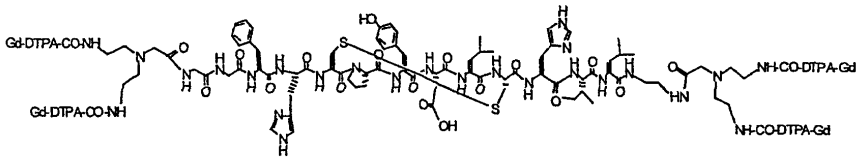

Структура 26



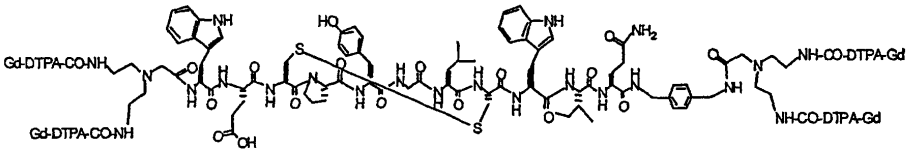

Структура 27



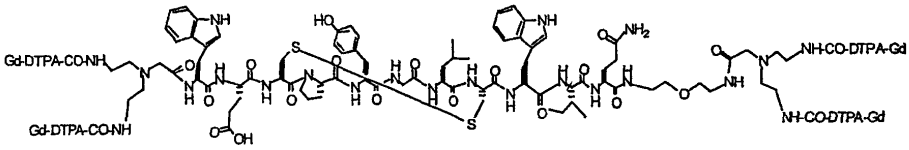
Структура 28



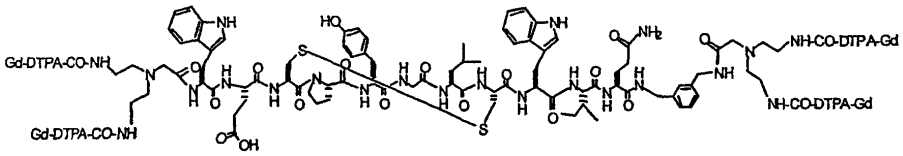

Структура 29




Структура 30

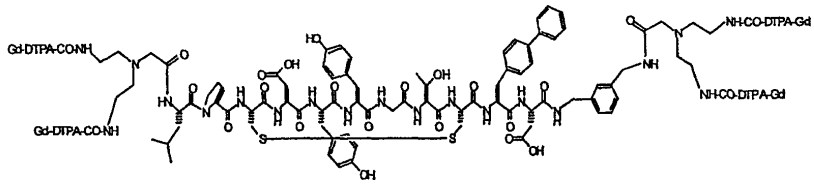



Структура 31



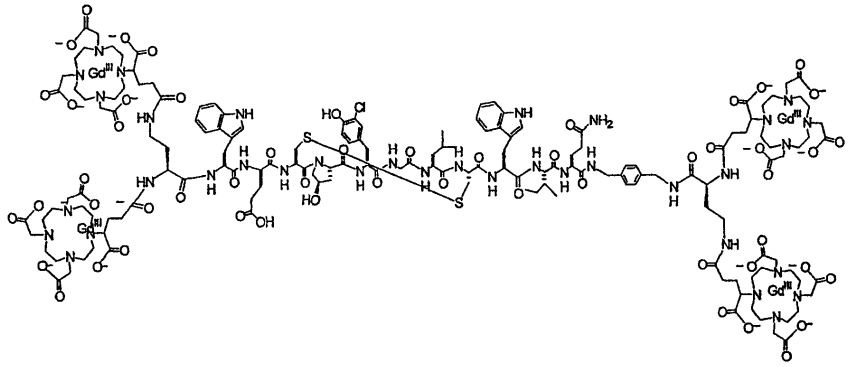

и

Структура 32

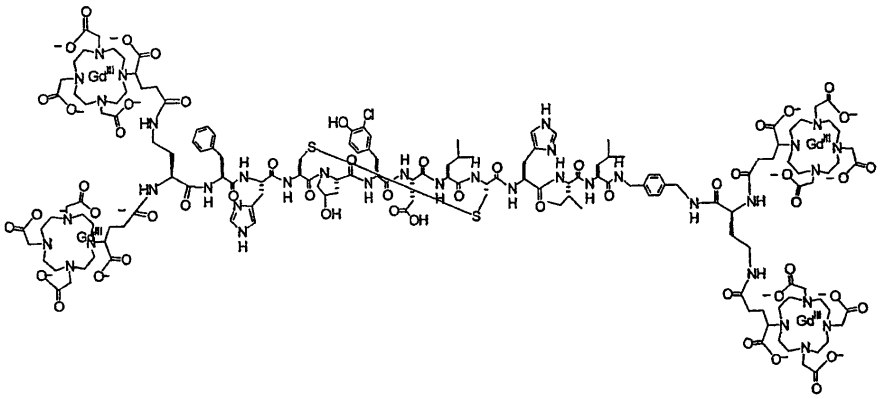



где Gd является парамагнитным ионом металла Gd(III) и где Gd(III) координационно связан с остатком DTPA; и где остаток DTPA ковалентно связан с остатком, содержащим группу C(=O), по углероду этилена или ацетата на остатке DTPA

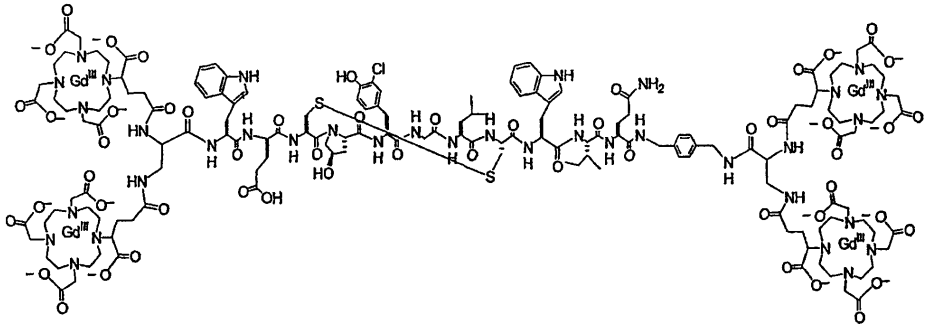
Структура 33



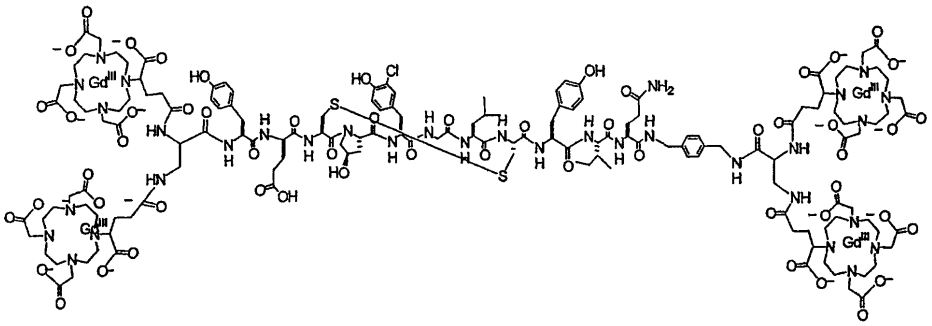
Структура 34



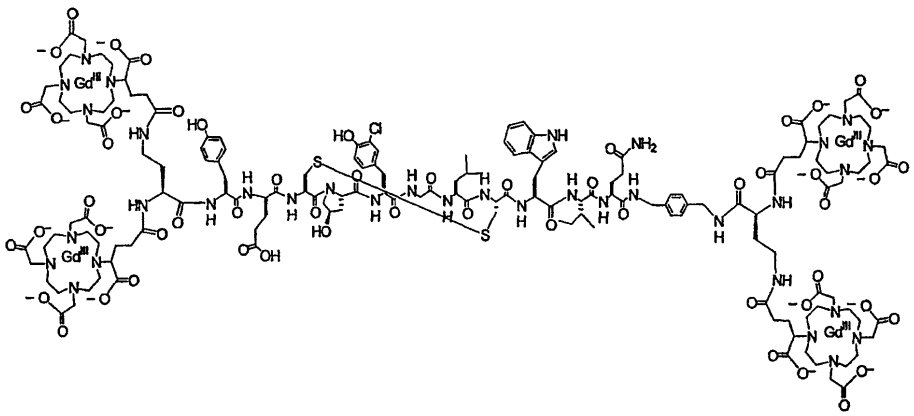
Структура 35



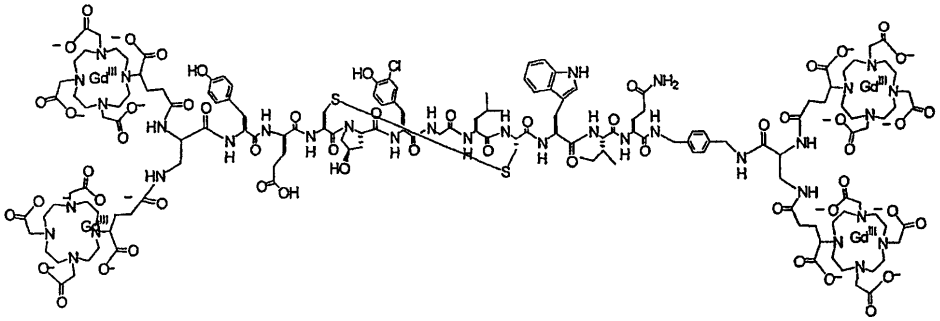
Структура 36



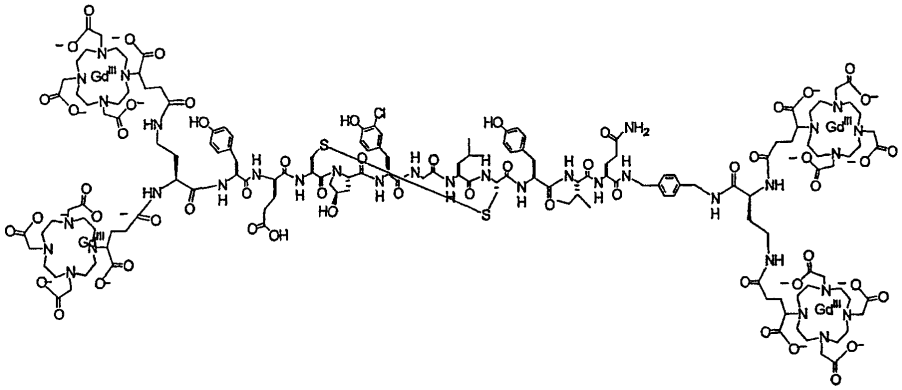
Структура 37



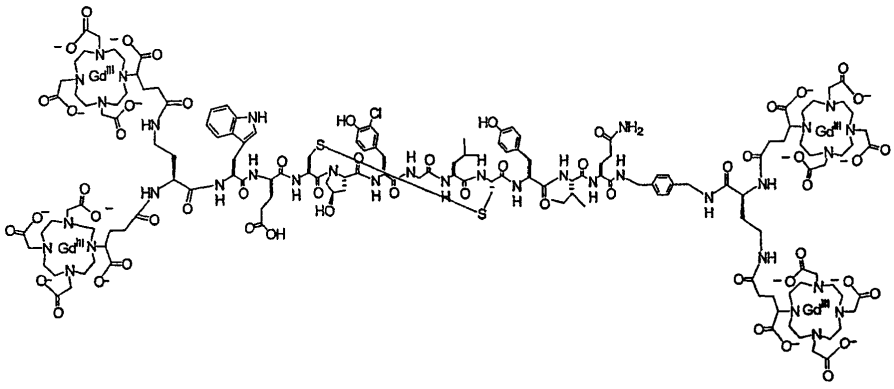
Структура 38



Структура 39

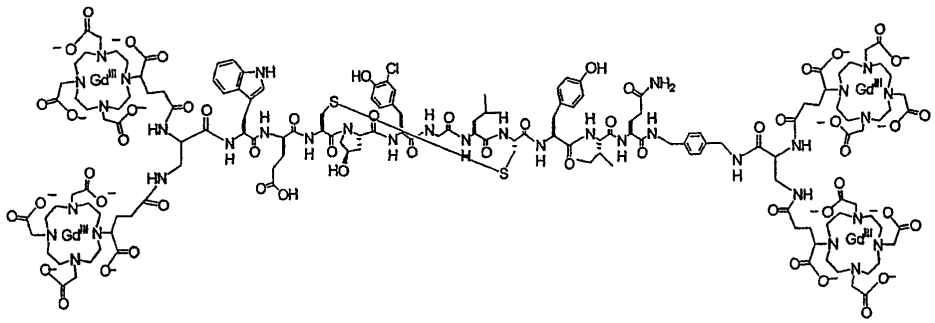


Структура 40



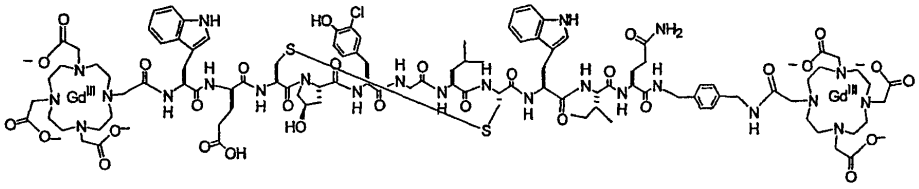
и

Структура 41

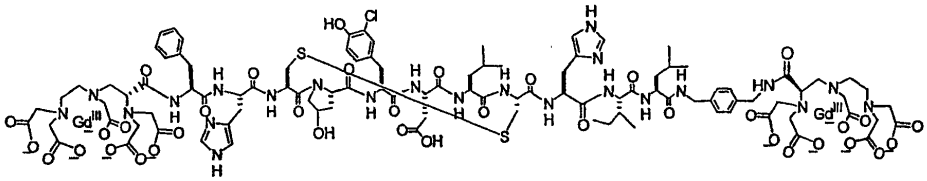


или

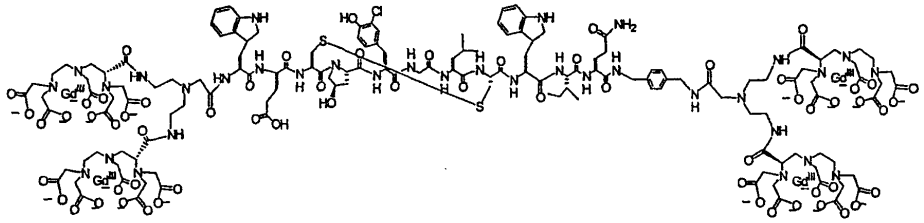
Структура 42



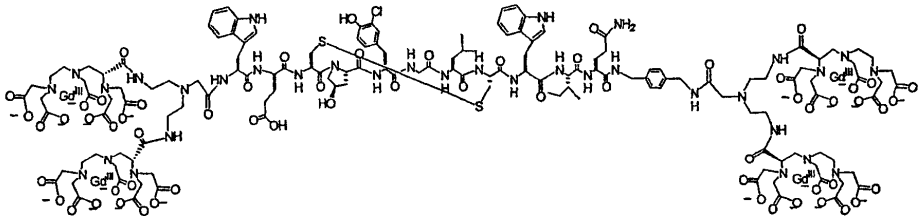
Структура 43



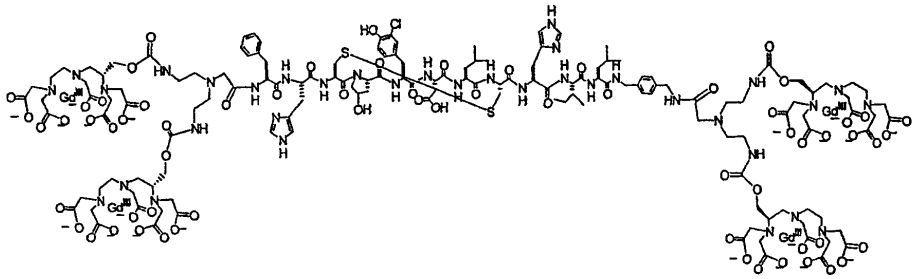
Структура 44



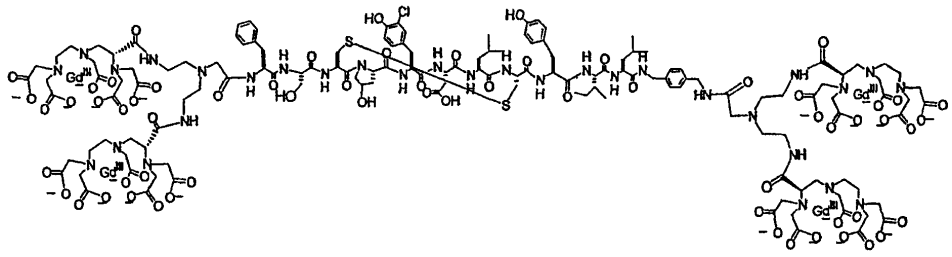
Структура 45



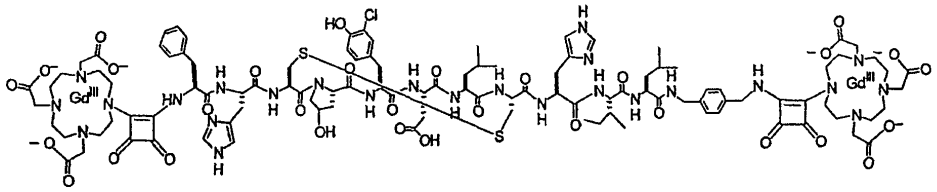
Структура 46



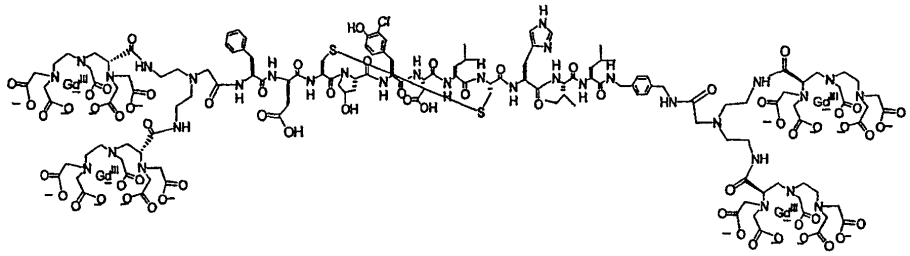
Структура 47



Структура 48

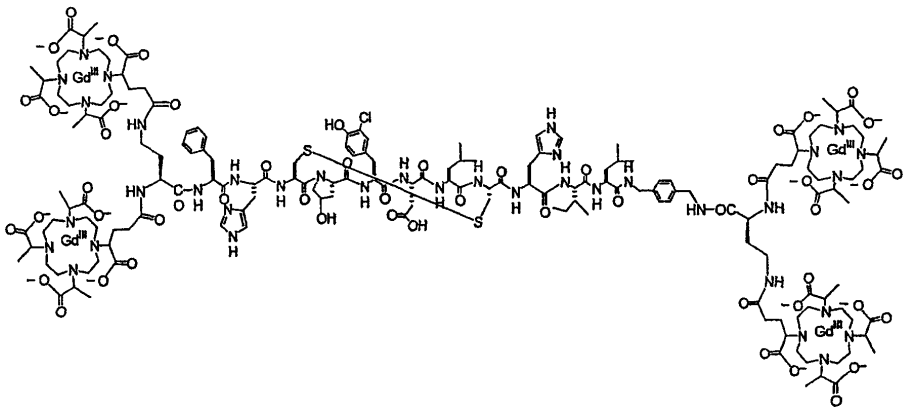


Структура 49



и

Структура 50



42. Способ изменения стабильности пептида, где пептид имеет N-концевую функциональную аминогруппу, при этом способ включает

a) взаимодействие пептида с остатком линкерной субъединицы с образованием пептида, имеющего С-концевую функциональную аминогруппу; и

b) ковалентное связывание остатка линкера с С-концевой функциональной аминогруппой и N-концевой функциональной аминогруппой пептида с образованием модифицированного пептида.

43. Способ по п.42, кроме того, включающий взаимодействие модифицированного пептида с остатком предшественника хелата с образованием ковалентной связи между остатком предшественника хелата и остатком линкера модифицированного пептида, при этом остаток предшественника хелата содержит множество предшественников карбоксилатных групп, и предшественники карбоксилатных групп способны превращаться в карбоксилатные остатки.

44. Способ по п.43, кроме того, включающий

a) превращение множества предшественников карбоксилатных групп связанного остатка предшественника хелата во множество карбоксилатных остатков, при этом карбоксилатные остатки способны образовывать комплекс с парамагнитным ионом металла; и

b) образование комплекса парамагнитного иона металла со множеством карбоксилатных остатков.

45. Способ по п.43, кроме того, включающий анализ стабильности модифицированного пептида.

46. Способ по п.43, кроме того, включающий

a) анализ стабильности немодифицированного пептида и

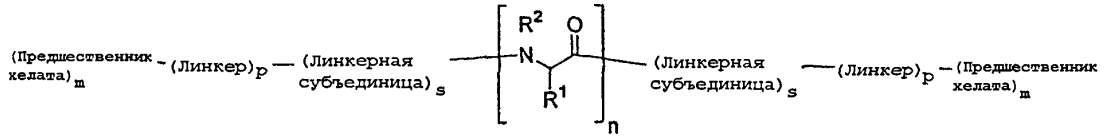
b) сравнение стабильности указанного модифицированного пептида со стабильностью указанного немодифицированного пептида.

47. Способ по п.46, где стабильность модифицированного пептида улучшена по сравнению со стабильностью немодифицированного пептида.

48. Способ по п.47, где стабильность модифицированного пептида улучшена в 10, 20 или 30 раз по сравнению со стабильностью немодифицированного пептида.

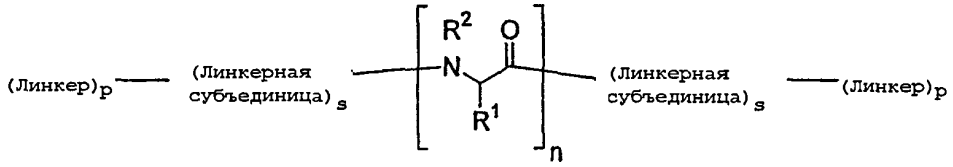
49. Способ по п.45 или 46, где стабильность анализируют с использованием анализа на основе гомогената печени крыс.

50. Модифицированный пептид, имеющий структуру




где предшественник хелата означает остаток предшественника хелата;
а линкер, линкерная субъединица, m, p, s, $R^1$ и $R^2$ имеют значения, определенные в п.40.

51. Модифицированный пептид, имеющий структуру




где линкер означает остаток линкера;

линкерная субъединица означает остаток линкерной субъединицы;

p независимо является целым числом от 0 до 5;

s независимо равно 0 или 1;

$R^1$ является боковой цепью аминокислоты или ее производным и

$R^2$ выбран из группы, состоящей из H и алифатической группы.

52. Способ получения вещества для МР-визуализации, включающий

a) взаимодействие пептида, имеющего N-концевую функциональную аминогруппу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего функциональную аминогруппу как на его N-конце, так и на С-конце; и

b) превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации.

53. Способ получения вещества для МР-визуализации, включающий

a) взаимодействие пептида, имеющего С-концевую функциональную карбоксилатную группу, с остатком линкерной субъединицы с образованием модифицированного пептида, имеющего функциональную карбоксилатную группу как на его С-конце, так и на N-конце; и

b) превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации.

54. Способ получения вещества для МР-визуализации, включающий

a) ковалентное связывание аминокислотного остатка с остатком линкерной субъединицы с образованием С-конца пептида, при этом остаток линкерной субъединицы ковалентно связан со смолой;

b) синтез пептида на смоле от ковалентно связанного С-конца к N-концевому остатку пептида, при этом N-концевой остаток содержит N-концевую функциональную аминогруппу;

c) отщепление пептида от смолы с получением С-концевой функциональной аминогруппы модифицированного пептида;

d) превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации.

55. Способ по пп.52, 53 или 54, где превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации включает ковалентное связывание остатка хелата с модифицированным пептидом, причем остаток хелата содержит парамагнитный ион металла, с получением вещества для МР-визуализации.

56. Способ по пп.52, 53 или 54, где превращение модифицированного пептида в вещество для МР-визуализации включает

a) ковалентное связывание остатка линкера с остатком хелата с образованием ковалентного конъюгата, при этом остаток хелата содержит парамагнитный ион металла; и

b) взаимодействие ковалентного конъюгата с модифицированным пептидом с образованием вещества для МР-визуализации.

57. Способ по п.55 или 56, где парамагнитный ион металла является таким, как указано в п.16.

58. Способ по п.42, кроме того, включающий взаимодействие модифицированного пептида с кэпирующим остатком с образованием ковалентной связи между кэпирующим остатком и остатком линкера модифицированного пептида.

59. Очищенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность

P*-Y*-$X_1$*-L* (SEQ ID NO: 1),

где P* означает пролин или его неприродное производное;

Y* означает тирозин или его неприродное производное;

$X_1$* означает G или D или неприродное производное G или D;

L* означает лейцин или его неприродное производное; и

где по меньшей мере один из P*, Y*, $X_1$* и L* является неприродным производным соответствующей аминокислоты.

60. Очищенный пептид по п.59, где $X_1$* является G или D и где L* является лейцином.

61. Очищенный пептид по п.60, где P* является пролином или 4-гидроксипролином и где Y* является тирозином или неприродным производным тирозина, замещенным в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$.

62. Очищенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность $X_1$-$X_2$-C-P*-Y*-$X_3$-L-C-$X_4$-$X_5$-$X_6$ (SEQ ID NO: 2), где

P* означает пролин или его неприродное производное;

Y* означает тирозин или его неприродное производное;

$X_1$ выбран из группы, состоящей из W, Y, F, S, Bip, Hx, Dpr, Cy, Gu, Ad, Hfe, 3-Pal, 4-Pal, DopaMe2, nTyr, dW, dF, F(3/4*) и Y(3*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CH_3$, $CF_3$, $NH_2$, $CH_2NH_2$, CN, F, Cl, Br, I, Et и OMe, и где Y(3*) представляет собой тирозин, замещенный в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$;

$X_2$ выбран из группы, состоящей из E, H, dE, S, H(Bzl), 2-Pal, Dpr и Th;

$X_3$ выбран из группы, состоящей из G и D;

$X_4$ выбран из группы, состоящей из H, F, Y и W;

$X_5$ выбран из группы, состоящей из I, L, V, N, Bpa, Bal, Hfe, Nle, Tle, Nval, Phg, Cha, Taz, Fua, Th, 4-Pal и F(3/4*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CF_3$, Et, iPr и OMe;

$X_6$ выбран из группы, состоящей из N, Q, I, L и V, или $X_6$ отсутствует; и

где по меньшей мере один из $X_1$, $X_2$, $X_5$, P* и Y* является неприродным производным аминокислоты.

63. Очищенный пептид по п.62, где P* является пролином или 4-гидроксипролином, а Y* является тирозином или неприродным производным тирозина, замещенным в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$.

64. Очищенный пептид по п.63, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:4)

Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:5)

Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:6)

W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:7)

W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:8)

Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:9)

Y-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:10)

W-dE-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-Y-I-Q (SEQ ID NO:11)

F(4-OMe)-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L (SEQ ID NO:12)

Y-H-C-P(4-OH)-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:13)

W-dE-C-P-Y(3-Cl)-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:14)

W-dE-C-P(4-OH)-Y-G-L-C-W-I-Q (SEQ ID NO:15) и

F-H-C-P-(4-OH)-Y(3-Cl)-D-L-C-H-I-L (SEQ ID NO:16).

65. Очищенный пептид по п.62, где

P* является пролином;

Y* является тирозином;

$X_1$ выбран из группы, состоящей из W, Y, F, S, Bip, Hx, Dpr, Cy, Gu, Ad, Hfe, 3-Pal, 4-Pal, DopaMe2, nTyr, dW, dF, F(3/4*) и Y(3*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CH_3$, $CF_3$, $NH_2$, $CH_2NH_2$, CN, F, Cl, Br, I, Et и OMe, и где Y(3*) представляет собой тирозин, замещенный в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$;

$X_2$ выбран из группы, состоящей из dE, H(Bzl), 2-Pal, Dpr и Th;

$X_3$ выбран из группы, состоящей из G и D;

$X_4$ выбран из группы, состоящей из H, F, Y и W;

$X_5$ выбран из группы, состоящей из I, L, V, N, Bpa, Ba1, Hfe, Nle, Tle, Nval, Phg, Cha, Taz, Fua, Th, 4-Pal и F(3/4*), где F(3/4*) представляет собой фенилаланин, замещенный либо в положении 3, либо в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из $CF_3$, Et, iPr и OMe; где по меньшей мере один из $X_1$, $X_2$ или $X_5$ является неприродным производным аминокислоты; и

$X_6$ выбран из группы, состоящей из N, Q, I, L и V, или $X_6$ отсутствует.

66. Очищенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность

C-P*-Y*-$X_1$-L-C (SEQ ID NO: 3),

где $X_1$ означает G или D,

P* означает пролин или его неприродное производное 4-гидроксипролин;

Y* означает тирозин или неприродное производное тирозина, замещенное в положении 3 остатком, выбранным из группы, состоящей из F, Cl, Br, I и $NO_2$; и при условии, что по меньшей мере один из P* или Y* является неприродным производным соответствующей аминокислоты.

67. Очищенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$ (SEQ ID NO: 17), где

$X_{10}$ выбран из группы, состоящей из n(децил)G, n(4-PhBu)G, MeL, Bpa, Bip, Me-Bip, F(4*), F(3-Me), F(3,4-дифтор), Amh, Hfe, Y(3,5-дийод), Pff, 1Nal, d1Nal и MeL, где F(4*) представляет собой фенилаланин, замещенный в положении 4 остатком, выбранным из группы, состоящей из Et, $CF_3$, I и iPr.

68. Очищенный пептид по п.67, содержащий аминокислотную последовательность C-D-Y-Y-G-T-C-$X_{10}$-$X_{11}$ (SEQ ID NO: 18), где

$X_{11}$ выбран из группы, состоящей из D, dD, βD, Inp, Nip, Me-D, dC, Cop и Cmp.

69. Очищенный пептид по п.68, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(Decyl)G-dD (SEQ ID NO:19)

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-n(Decyl)G-D (SEQ ID NO:20)

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-D (SEQ ID NO:21)

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-Bip-dD (SEQ ID NO:22)

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Inp (SEQ ID NO:23)

L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeL-Cmp (SEQ ID NO:24) *и*

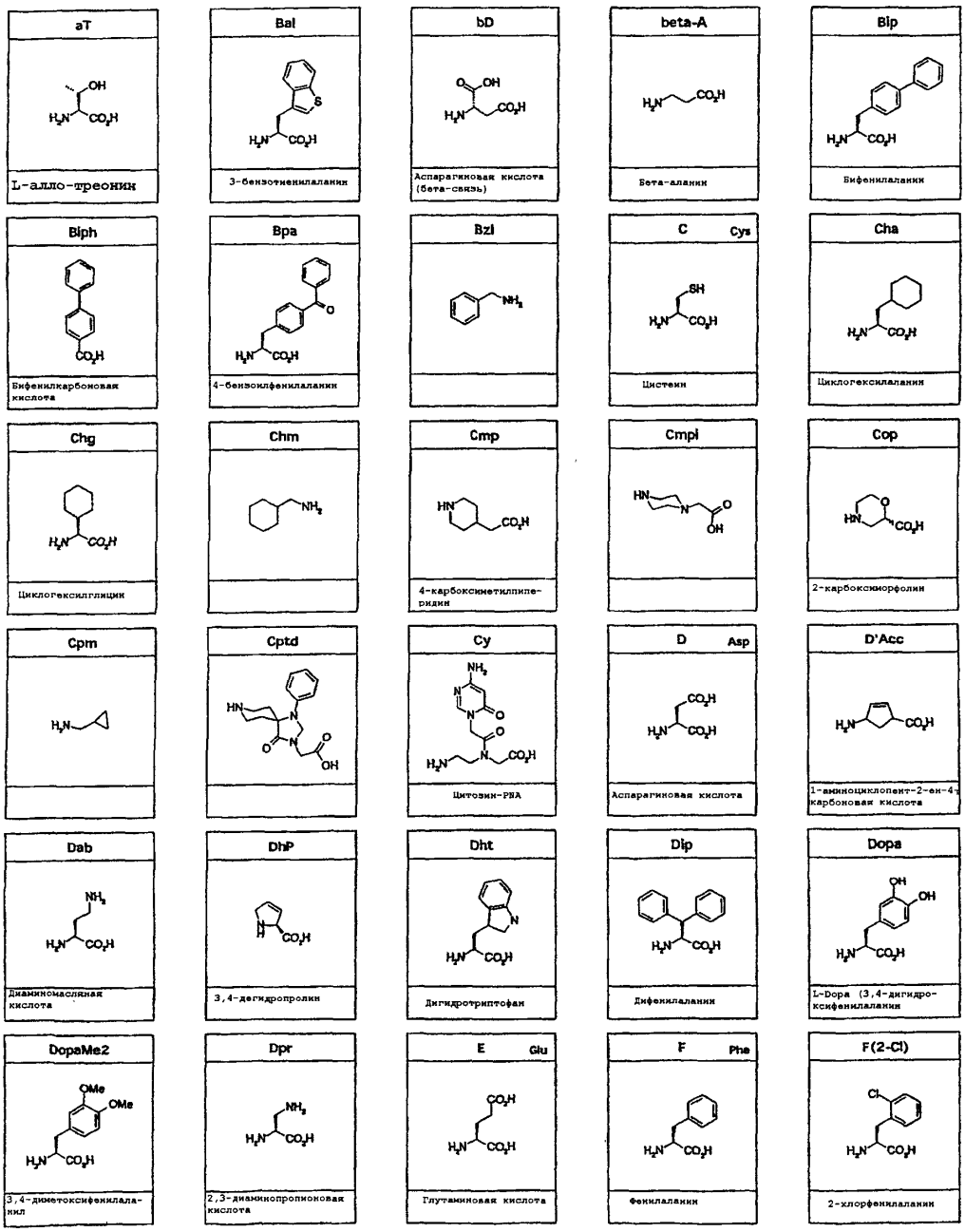
L-P-C-D-Y-Y-G-T-C-MeBip-D (SEQ ID NO:25).

70. Очищенный пептид по пп.61, 62, 64, 65, 66, 68 или 69, где пептид, кроме того, способен образовывать дисульфидную связь в невосстанавливающих условиях.

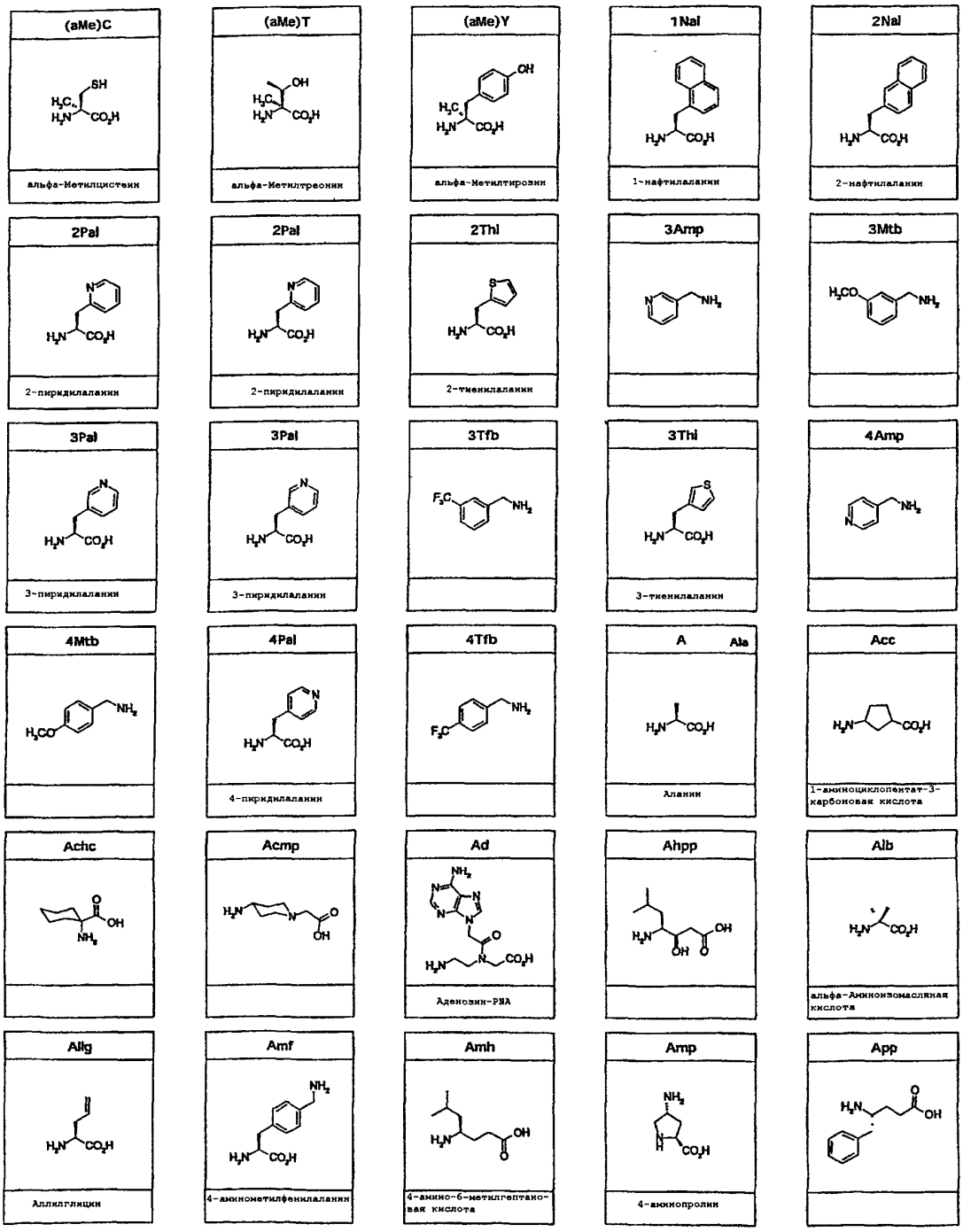
71. Очищенный пептид по п.70, где пептид содержит дисульфидную связь.

72. Очищенный пептид по п.68, где пептид обладает специфичной аффинностью связывания с фибрином.

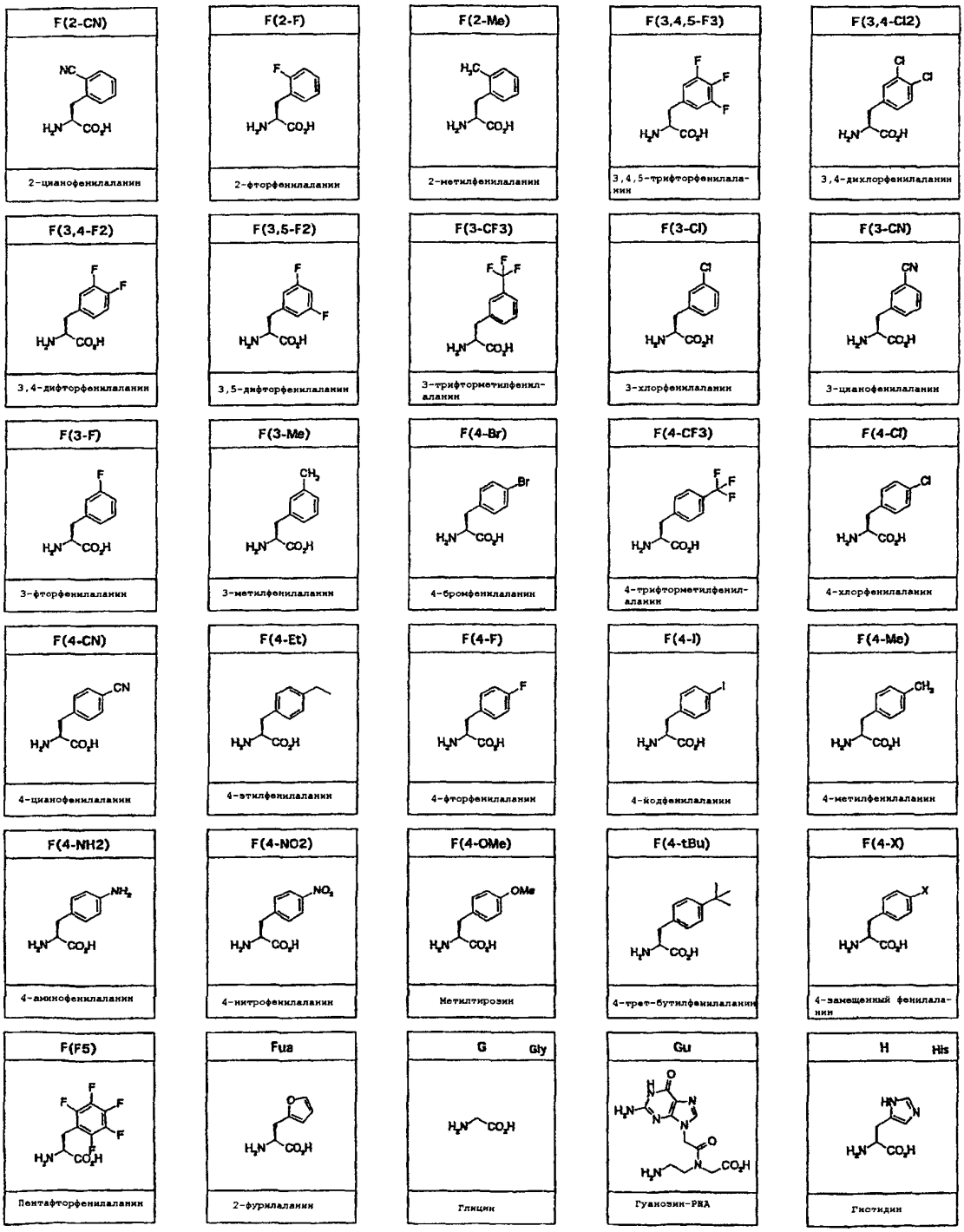
73. Соединение, содержащее пептид по пп.59, 66 и 68, связанный с тромболитическим агентом.


aT
L-алло-треонин
Bal
3-бензотиенилаланин
bD
Аспарагиновая кислота (бета-связь)
beta-A
Бета-аланин
Bip
Бифенилаланин
Biph
Бифенилкарбоновая кислота
Bpa
4-бензоилфенилаланин
Bzl
C Cys
Цистеин
Cha
Циклогексилаланин
Chg
Циклогексилглицин
Chm
Cmp
4-карбоксиметилпиперидин
Cmpl
Cop
2-карбоксиморфолин
Cpm
Cptd
Cy
Цитозин-PNA
D Asp
Аспарагиновая кислота
D'Acc
1-аминоциклопент-2-ен-4-карбоновая кислота
Dab
Диаминомасляная кислота
DhP
3,4-дегидропролин
Dht
Дигидротриптофан
Dip
Дифенилаланин
Dopa
L-Dopa (3,4-дигидроксифенилаланин
DopaMe2
3,4-диметоксифенилаланил
Dpr
2,3-диаминопропионовая кислота
E Glu
Глутаминовая кислота
F Phe
Фенилаланин
F(2-Cl)
2-хлорфенилаланин

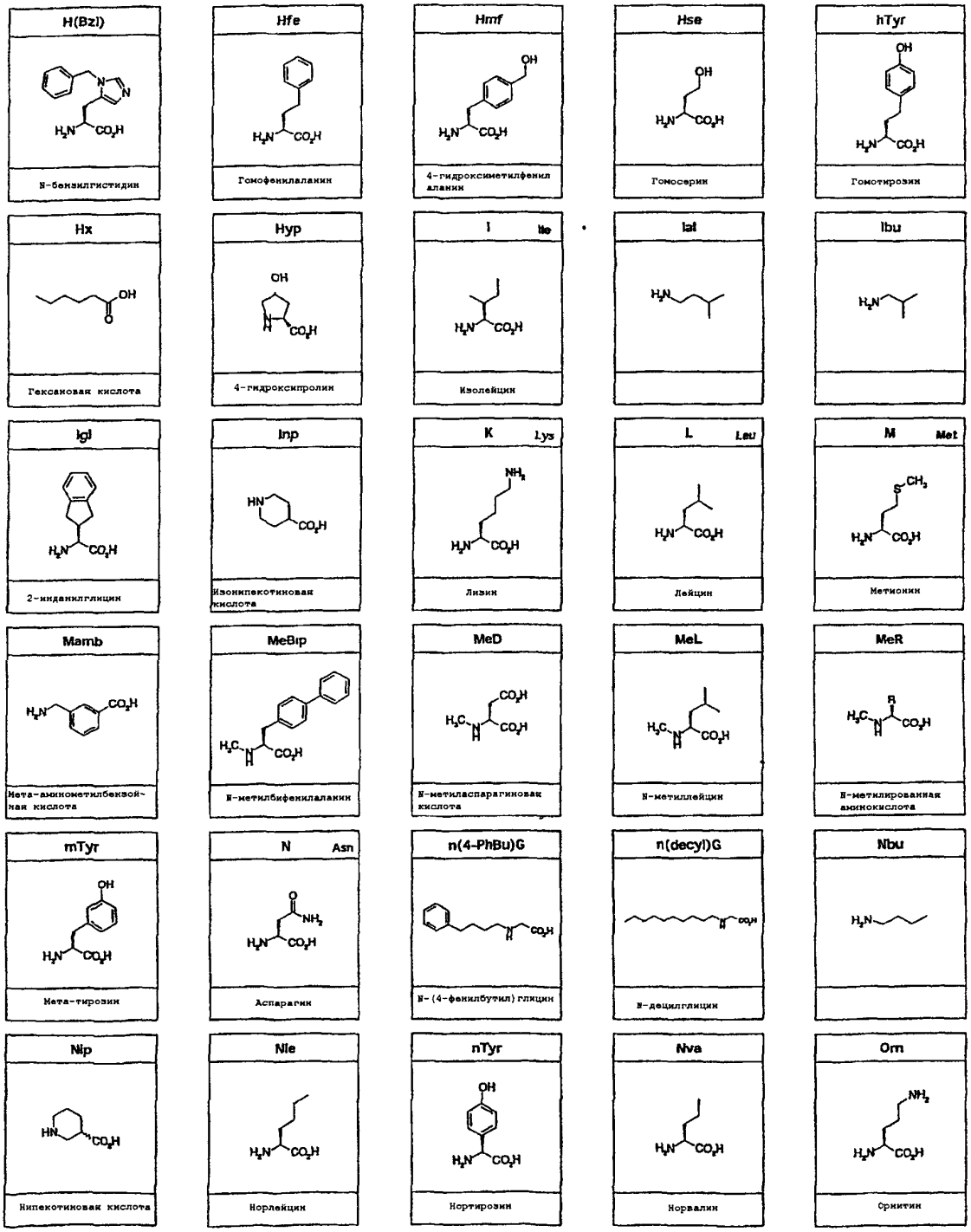
Фиг. 1 - Стр.1/6


(aMe)C
альфа-Метилцистеин
(aMe)T
альфа-Метилтреонин
(aMe)Y
альфа-Метилтирозин
1Nal
1-нафтилаланин
2Nal
2-нафтилаланин
2Pal
2-пиридилаланин
2Pal
2-пиридилаланин
2Thi
2-тиенилаланин
3Amp
3Mtb
3Pal
3-пиридилаланин
3Pal
3-пиридилаланин
3Tfb
3Thi
3-тиенилаланин
4Amp
4Mtb
4Pal
4-пиридилаланин
4Tfb
A Ala
Аланин
Acc
1-аминоциклопентат-3-карбоновая кислота
Achc
Acmp
Ad
Аденозин-РНК
Ahpp
Alb
альфа-Аминоизомасляная кислота
Allg
Аллилглицин
Amf
4-аминометилфенилаланин
Amh
4-амино-6-метилгептановая кислота
Amp
4-аминопролин
App

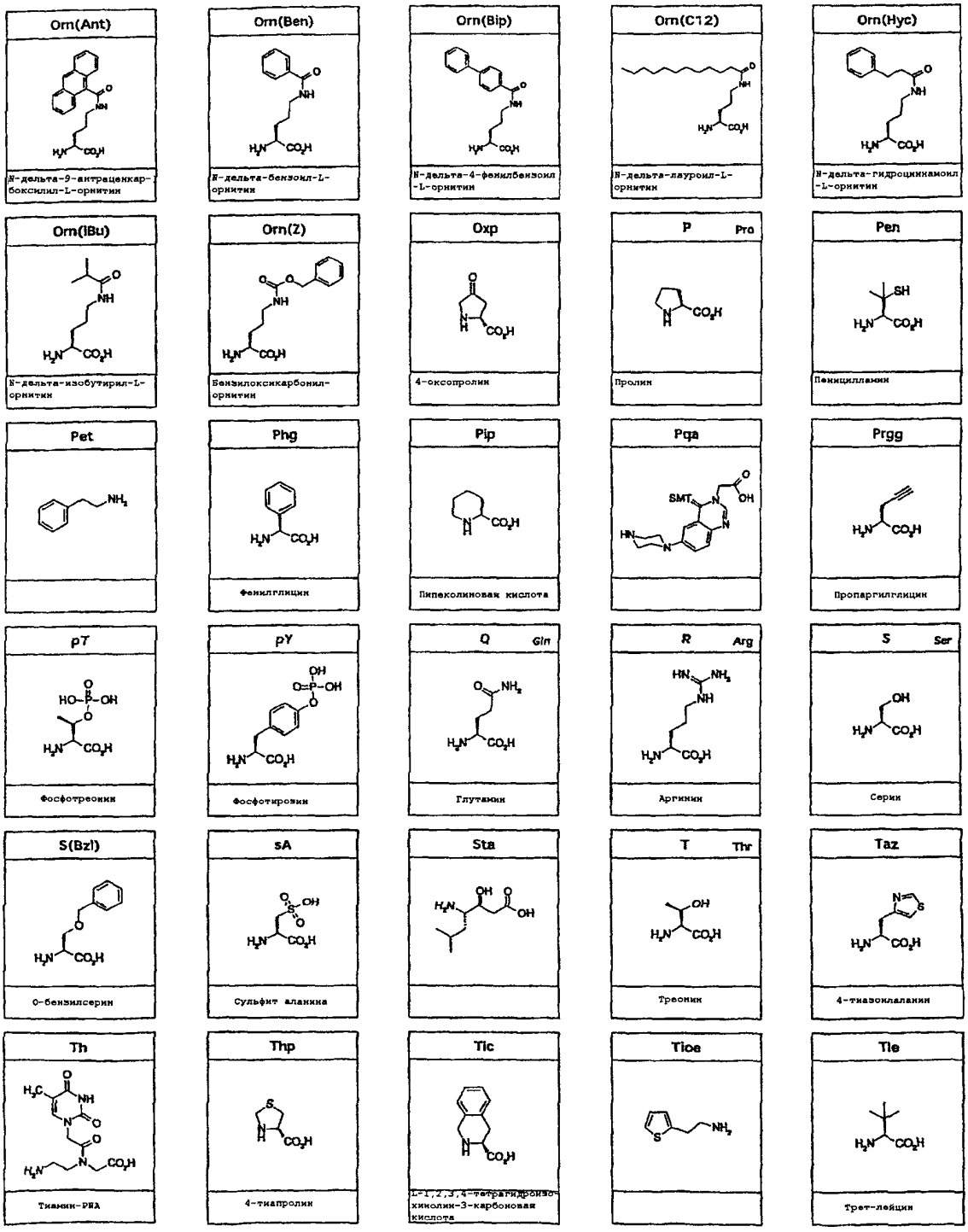
Фиг. 1 - Стр. 2/6


F(2-CN)
2-цианофенилаланин
F(2-F)
2-фторфенилаланин
F(2-Me)
2-метилфенилаланин
F(3,4,5-F3)
3,4,5-трифторфенилала-нин
F(3,4-Cl2)
3,4-дихлорфенилаланин
F(3,4-F2)
3,4-дифторфенилаланин
F(3,5-F2)
3,5-дифторфенилаланин
F(3-CF3)
3-трифторметилфенилл-аланин
F(3-Cl)
3-хлорфенилаланин
F(3-CN)
3-цианофенилаланин
F(3-F)
3-фторфенилаланин
F(3-Me)
3-метилфенилаланин
F(4-Br)
4-бромфенилаланин
F(4-CF3)
4-трифторметилфенил-аланин
F(4-Cl)
4-хлорфенилаланин
F(4-CN)
4-цианофенилаланин
F(4-Et)
4-этилфенилаланин
F(4-F)
4-фторфенилаланин
F(4-I)
4-йодфенилаланин
F(4-Me)
4-метилфенилаланин
F(4-NH2)
4-аминофенилаланин
F(4-NO2)
4-нитрофенилаланин
F(4-OMe)
Метилтирозин
F(4-tBu)
4-трет-бутилфенилаланин
F(4-X)
4-замещенный фенилала-нин
F(F5)
Пентафторфенилаланин
Fua
2-фурилаланин
G Gly
Глицин
Gu
Гуанозин-РНК
H His
Гистидин

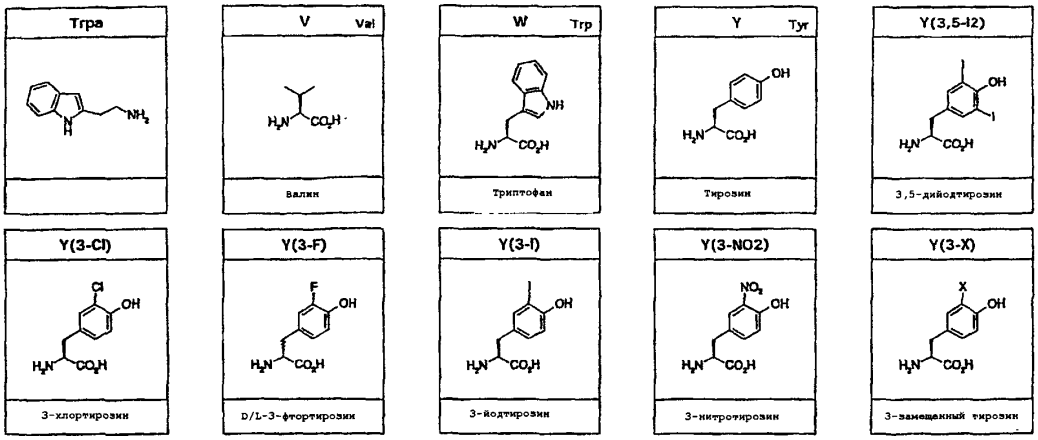
Фиг. 1 - Стр.3/6


H(Bzl)
N-бензилгистидин
Hfe
Гомофенилаланин
Hmf
4-гидроксиметилфенилаланин
Hse
Гомосерин
hTyr
Гомотирозин
Hx
Гексановая кислота
Hyp
4-гидроксипролин
I Ile
Изолейцин
Ial
Ibu
Igl
2-инданилглицин
Inp
Изоникотиновая кислота
K Lys
Лизин
L Leu
Лейцин
M Met
Метионин
Mamb
Мета-аминометилбензойная кислота
MeBip
N-метилбифенилаланин
MeD
N-метиласпарагиновая кислота
MeL
N-метиллейцин
MeR
N-метилированная аминокислота
mTyr
Мета-тирозин
N Asn
Аспарагин
n(4-PhBu)G
N-(4-фенилбутил) глицин
n(decyl)G
N-децилглицин
Nbu
Nip
Нипекотиновая кислота
Nle
Норлейцин
nTyr
Нортирозин
Nva
Норвалин
Orn
Орнитин

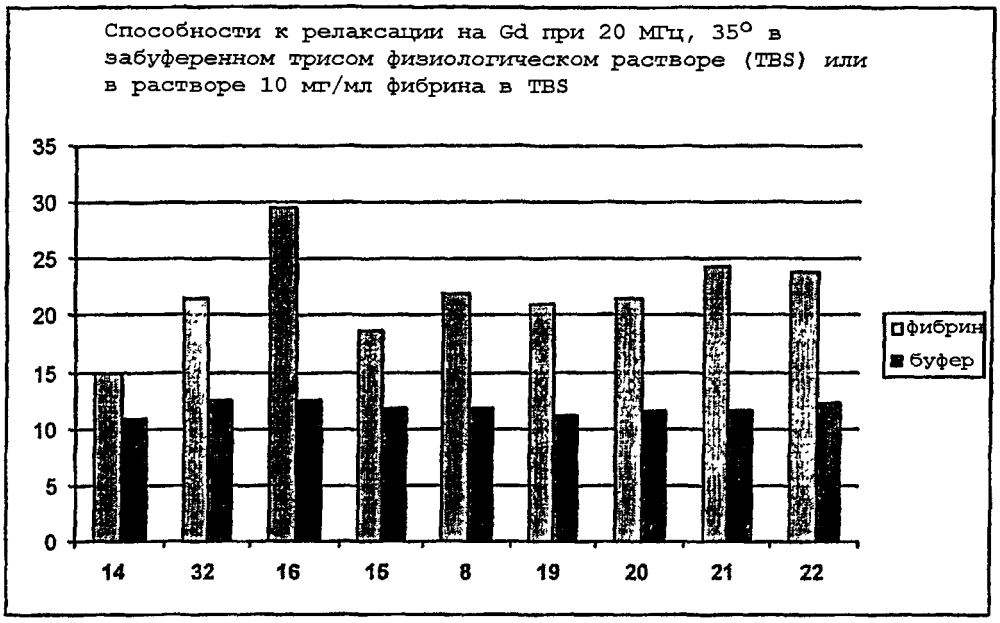
Фиг. 1 - Стр. 4/6


Orn(Ant)
N-дельта-9-антраценкарбоксилил-L-орнитин
Orn(Ben)
N-дельта-бензоил-L-орнитин
Orn(Bip)
N-дельта-4-фенилбензоил-L-орнитин
Orn(C12)
N-дельта-лауроил-L-орнитин
Orn(Hyc)
N-дельта-гидроциннамоил-L-орнитин
Orn(IBu)
N-дельта-изобутирил-L-орнитин
Orn(Z)
Бензилоксикарбонил-орнитин
Oxp
4-оксопролин
P Pro
Пролин
Pen
Пеницилламин
Pet
Phg
Фенилглицин
Pip
Пипеколиновая кислота
Pga
Prgg
Пропаргилглицин
pT
Фосфотреонин
pY
Фосфотирозин
Q Gln
Глутамин
R Arg
Аргинин
S Ser
Серин
S(Bzl)
O-бензилсерин
sA
Сульфит аланина
Sta
T Thr
Треонин
Taz
4-тиазолилаланин
Th
Тиамин-PHA
Thp
4-тиапролин
Tic
L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота
Tioe
Tle
Трет-лейцин

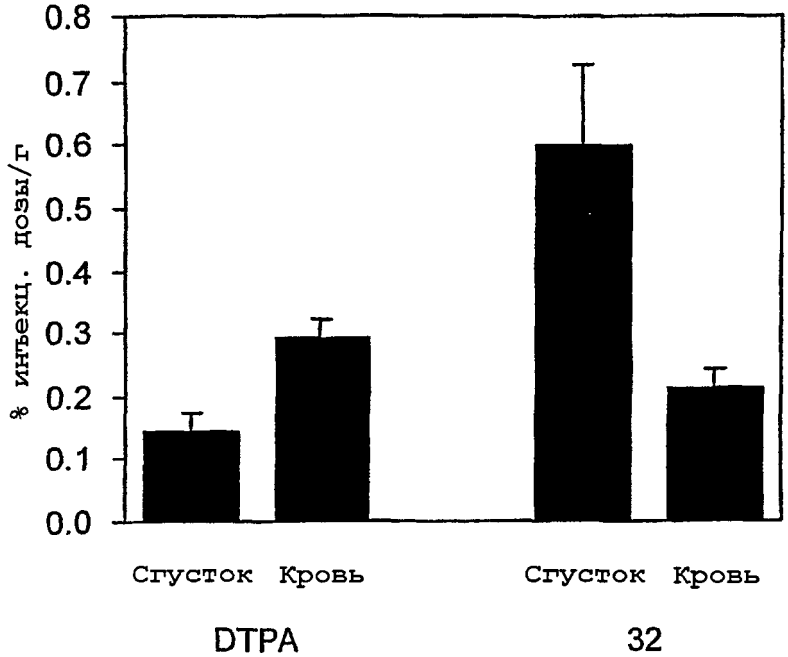
Фиг. 1 - Стр.5/6




Фиг. 1 - Стр. 6/6

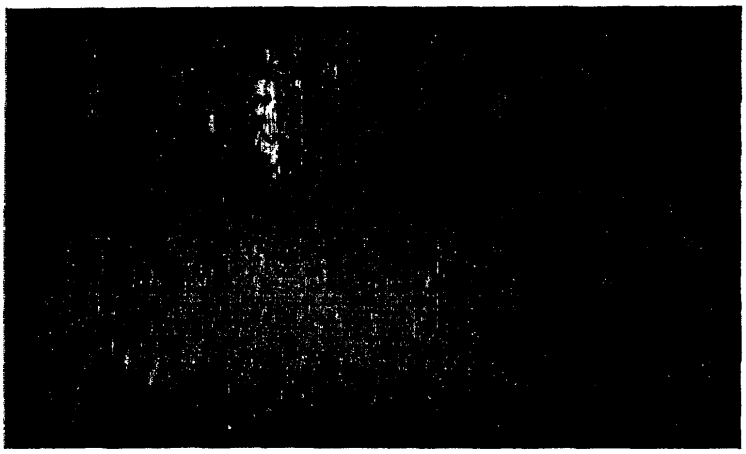



Фиг. 2




Фиг. 3

*A*



*B*

Фиг. 4

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Epix Medical, Inc.

<120> НАПРАЛЕННЫЕ К МИШЕНИ МУЛЬТИМЕРНЫЕ
КОНТРАСТНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ОСНОВАННЫЕ НА ПЕПТИДАХ

<130> 13498-010WO1

<140> PCT/US02/24261
<141> 2002-07-30

<150> US 60/308,721
<151> 2001-07-30

<160> 27

<170> FastSEQ для Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Xaa = Pro или его неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa = Tyr или его неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Xaa = Gly или Asp, или неприродное производное
Gly или Asp

<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa = Leu или его неприродное производное

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Xaa = Trp, Tyr, Phe, Ser, nTyr, dW, dF, F(3/4*), Y(3*)
или их неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa = Glu, His, dGlu, Ser или их неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa = Pro или его неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 5
<223> Xaa = Tyr или его неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 6
<223> Xaa = Gly или Asp

<221> ВАРИАНТ
<222> 9
<223> Xaa = His, Phe, Tyr или Trp

<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa = Ile, Leu, Val, Asn, F(3/4*) или их неприродное
производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa = Asn, Gln, Ile, Leu, Val или отсутствует

<400> 2
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Leu Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa = Pro или 4-гидроксипролин

<221> ВАРИАНТ
<222> 3
<223> Xaa = Tyr или неприродное производное тирозина

<221> ВАРИАНТ
<222> 4
<223> Xaa = Gly или Asp

<400> 3
Cys Xaa Xaa Xaa Leu Cys
 1               5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 4
Trp Glu Cys Xaa Xaa Gly Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 5
Tyr Glu Cys Xaa Xaa Gly Leu Cys Tyr Ile Gln
 1               5                  10

<210> 6

<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 6
Tyr Glu Cys Xaa Xaa Gly Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 7
Trp Glu Cys Xaa Xaa Gly Leu Cys Tyr Ile Gln
 1               5                  10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5

<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 8
Trp Glu Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 9
Tyr Glu Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys Tyr Ile Gln
 1               5                  10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 10
Tyr Glu Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин
<400> 11
Trp Glu Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys Tyr Ile Gln
 1               5                  10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa = 4-метоксифенилаланин

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 12
Xaa His Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys His Ile Leu
 1               5                  10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES

<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 13
Tyr His Cys Xaa Xaa Gly Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 5
<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 14
Trp Glu Cys Pro Xaa Gly Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<400> 15
Trp Glu Cys Xaa Tyr Gly Leu Cys Trp Ile Gln
 1               5                  10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 4
<223> Xaa = 4-гидроксипролин

<221> MOD_RES
<222> 5

<223> Xaa = мета-хлортирозин

<400> 16
Phe His Cys Xaa Xaa Asp Leu Cys His Ile Leu
 1               5                  10

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Xaa = н(децил)Gly, н(4-PhBu)Gly, MeLeu, Phe(4*)
      Phe(3-Me), Phe(3,4-дифтор), Tyr(3,5-дииод) или MeLeu

<400> 17
Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa
 1               5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 8
<223> Xaa = н(децил)Gly, н(4-PhBu)Gly, MeLeu, Phe(4*),
      Phe(3-Me), Phe(3,4-дифторо), Tyr(3,5-дииод) или MeLeu

<221> ВАРИАНТ
<222> 9
<223> Xaa = Asp, dAsp, beta-Asp, Me-Asp или dCys

<400> 18
Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Xaa
 1               5

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = н(Децил)Gly

<400> 19
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Asp
 1               5                  10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = н(Децил)Gly

<400> 20
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Asp
 1               5                  10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = бифенилаланин

<400> 21
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Asp
 1               5                  10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = бифенилаланин

<400> 22
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Asp
 1               5                  10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = метил-лейцин

<400> 23
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa
 1               5                  10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = метил-лейцин

<400> 24
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa
 1               5                  10

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Xaa = метил-бифенилаланин

<400> 25
Leu Pro Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Asp
 1               5                  10

<210> 26

<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> синтетически полученный пептид

<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Xaa = любая природная или неприродная аминокислота

<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa = Pro или его неприродное производное

<221> ВАРИАНТ
<222> 10
<223> Xaa = н(децил)Gly, н(4-PhBu)Gly, MeLeu, Phe(4*),
Phe(3-Me), Phe(3,4-дифтор), Tyr(3,5-дииод) или MeLeu

<221> ВАРИАНТ
<222> 11
<223> Xaa = Asp, dAsp, beta-Asp или Me-Asp

<400> 26
Xaa Xaa Cys Asp Tyr Tyr Gly Thr Cys Xaa Xaa
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетически полученный пептид

<400> 27
Gln Trp Glu Cys Pro Tyr Gly Leu Cys Trp Ile Gln
1 5 10