



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013105491/04, 11.08.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.08.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.08.2010 GB 1013808.9

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2014 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 10.08.2016 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2009016180 A2, 02.05.2009. WO 2004078778 A2, 16.09.2004. WO 2004080492 A1, 23.09.2004. WO 2008139207 A2, 20.11.2008. WO 2008083191 A2, 10.07.2008. RU 2396272 C2, 10.08.2010. РОЕТНКО Т ЕТ AL: "Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: 18F-labeled RGD and Octreotide Analogs", JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, SOCIETY OF (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 18.03.2013

(86) Заявка РСТ:
EP 2011/063890 (11.08.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/022676 (23.02.2012)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

**АЙВИСОН Питер Брайан (GB),
БХАЛЛА Раджив (AU),
АЙНДРЕВОЛЛ Бард (NO),
ГЕТВОЛЬДСЕН Гарет (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

ДжиИ Хелткер Лимитед (GB)**(54) КОМПОЗИЦИИ ПЕПТИДНЫХ РАДИОАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к композициям визуализирующего агента, содержащим меченные радиоактивным изотопом ¹⁸F cMet-связывающие пептиды, подходящие для визуализации in vivo с использованием позитронно-эмиссионной

томографии (PET). Также описаны фармацевтические композиции, способы получения композиций, а также способы визуализации in vivo с использованием данных композиций для применения в терапии рака. 4 н. и 8 з.п. ф-лы, 1 ил., 14 пр.

(56) (продолжение):

NUCLEAR MEDICINE, RESTON, VA, US, vol. 45, no. 5, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 892-902.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 594 167**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2013105491/04, 11.08.2011

(24) Effective date for property rights:
11.08.2011

Priority:

(30) Convention priority:
18.08.2010 GB 1013808.9

(43) Application published: 27.09.2014 Bull. № 27

(45) Date of publication: 10.08.2016 Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: 18.03.2013

(86) PCT application:
EP 2011/063890 (11.08.2011)

(87) PCT publication:
WO 2012/022676 (23.02.2012)

Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**AJVISON Piter Brajan (GB),
BKHALLA Radzhiv (AU),
AJNDREVOLL Bard (NO),
GETVOLDSEN Gareth (GB)**

(73) Proprietor(s):

Dzhil KHeltker Limited (GB)

(54) PEPTIDE COMPOSITION OF RADIOACTIVE INDICATORS

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to compositions of imaging agent containing radioactive isotope ¹⁸F labelled cMet-binding peptides, suitable for imaging in vivo using positron emission tomography (PET).

EFFECT: there are also described pharmaceutical compositions, methods of producing compositions, as well as methods of imaging in vivo using said compositions for use in cancer therapy.

12 cl, 1 dwg, 14 ex

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям визуализирующего агента, содержащим меченные радиоактивной меткой сMet-связывающие пептиды (сМВР), подходящие для визуализации *in vivo* с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET). Эти сMet-связывающие пептиды мечены радиоактивным изотопом ^{18}F . Также описаны фармацевтические композиции, способы получения агентов и приготовления композиций, а также способы визуализации *in vivo* с использованием данных композиций, особенно для применения в диагностике рака.

Предшествующий уровень техники

Фактор роста гепатоцитов (HGF), также известный как рассеивающий фактор (SF), представляет собой фактор роста, который вовлечен в различные физиологические процессы, такие как заживление ран и ангиогенез. Взаимодействие HGF с его высокоаффинным рецептором (с-Met) вовлечено в рост, инвазию и метастазирование опухолей.

В работе Knudsen и др. рассмотрена роль HGF и с-Met в раке предстательной железы с возможными применениями для визуализации и терапии (Adv. Cancer Res., 91, 31-67 (2004)). Меченые антитела против met для диагностики и терапии описаны в WO 03/057155.

Показано, что с-Met вовлечен в рост, инвазию и метастазирование опухолей при многих видах рака эпителиального происхождения у человека. с-Met экспрессируется большинством карцином, и его повышенная относительно нормальной ткани экспрессия зарегистрирована при раке легкого, молочной железы, колоректальном раке, раке поджелудочной железы, головы и шеи, желудка, гепатоцеллюлярном раке, раке яичника, почки, глиоме, меланоме и многих саркомах. В случае колоректальной карциномы (CRC) сверхэкспрессия с-Met зарегистрирована в диспластических очагах аберрантных крипт, участках самых ранних предопухолевых поражений данного заболевания. При плоскоклеточном раке головы и шеи с-Met, по имеющимся данным, экспрессируется или сверхэкспрессируется приблизительно в 80% случаев первичных опухолей. При метастазах рака предстательной железы в кости сообщалось, что с-Met сверхэкспрессируется более чем в 80% случаев костного метастаза.

В нормальных условиях с-Met экспрессируется на эпителиальных клетках и активируется по паракринному механизму под действием HGF мезенхимального происхождения. Активация с-Met в нормальных клетках является кратковременным и строго регулируемым событием. Однако, в опухолевых клетках с-Met может быть конститутивно активным. При раке аберрантная стимуляция с-Met может достигаться посредством амплификации/сверхэкспрессии с-Met, активации мутаций с-Met (например, структурных изменений) и приобретения автономного контроля роста в результате образования аутокринных сигнальных петель. Помимо этого, дефектная понижающая регуляция с-Met-рецептора также будет вносить вклад в аберрантную экспрессию с-Met в клеточной мембране. В то время как сверхэкспрессия с-Met является зависимой от HGF (по аутокринному/паракринному механизму), структурные изменения, вызываемые мутациями, не зависят от HGF (например, потеря внеклеточного домена).

В WO 2004/078778 описаны полипептиды или мультимерные пептидные конструкции, которые связываются с с-Met или комплексом, содержащим с-Met и HGF. Описано приблизительно 10 различных структурных классов пептидов. В WO 2004/078778 описано, что эти пептиды могут быть мечены детектируемой меткой для применений *in vitro* и *in vivo* или лекарственным средством для терапевтических применений. Детектируемая метка может представлять собой: фермент, флуоресцентное соединение,

оптический краситель, ион парамагнитного металла, контрастный агент для ультразвукового исследования или радионуклид. В WO 2004/078778 установлено, что предпочтительные метки являются радиоактивными или парамагнитными и наиболее предпочтительно включают металл, который хелатирован металлохелатирующим агентом. В WO 2004/078778 установлено, что радионуклиды могут быть выбраны из: ^{18}F , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{77}Br , ^{76}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{167}Tm , ^{141}Ce , ^{111}In , ^{168}Yb , ^{175}Yb , ^{140}La , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{186}Re , ^{203}Pb , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{214}Bi , ^{105}Rh , ^{109}Pd , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{198}Au и ^{199}Au . В WO 2004/078778 (страница 62) установлено, что предпочтительными радионуклидами для диагностических целей являются: ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ и ^{111}In , при этом особенно предпочтительным является $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

В WO 2008/139207 описаны cMet-связывающие циклические пептиды из 17-30 аминокислот, меченные оптической репортерной визуализируемой группировкой, подходящей для визуализации организма млекопитающего *in vivo* с использованием света в диапазоне длин волн от зеленой до ближней инфракрасной области спектра 600-1200 нм. Такие cMet-связывающие пептиды содержат аминокислотную последовательность:

$\text{Cys}^{\text{a}}\text{-X}^1\text{-Cys}^{\text{c}}\text{-X}^2\text{-Gly-Pro-Pro-X}^3\text{-Phe-Glu-Cysd-Trp-Cysb-Tyr-X}^4\text{-X}^5\text{-X}^6$;

где X^1 представляет собой Asn, His или Tyr;

X^2 представляет собой Gly, Ser, Thr или Asn;

X^3 представляет собой Thr или Arg;

X^4 представляет собой Ala, Asp, Glu, Gly или Ser;

X^5 представляет собой Ser или Thr;

X^6 представляет собой Asp или Glu;

и все $\text{Cys}^{\text{a-d}}$ представляют собой остатки цистеина, так что остатки a и b, а также c и d циклизованы с образованием двух отдельных дисульфидных связей. Оптическим репортером согласно WO 2008/139207 предпочтительно является цианиновый краситель.

В WO 2009/016180 описаны cMet-связывающие циклические пептиды, аналогичные таковым из WO 2008/139207, где оптическим репортером является бензопирилийевый краситель. В WO 2008/139207 и WO 2009/016180 установлено, что такие агенты полезны для оптического применения *in vitro* и *in vivo*, в особенности для оптической визуализации *in vivo* организма человека. Оптическая визуализация колоректального рака является предпочтительным применением.

Настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям визуализирующего агента, содержащим меченные радиоактивным ^{18}F cMet-связывающие пептиды, подходящие для визуализации *in vivo* с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET). Такие cMet-связывающие пептиды мечены через остаток лизина (Lys).

Предпочтительно, такие композиции визуализирующего агента подавляют уровень присутствующего немеченого cMet-связывающего циклического пептида. В этом и заключается преимущество, поскольку ^{18}F -меченный cMBP представляет собой радиоактивный индикатор, присутствующий и вводимый в экстремально низкой концентрации из расчета на химическое вещество, таким образом, немеченый cMBP, если его не удалить, в противном случае будет присутствовать в большом химическом

избытке. Установлено, что это важно при применениях PET-визуализации *in vivo*, поскольку иначе немеченый сМВР эффективно конкурирует с ^{18}F -меченым сМВР за сайты связывания с с-Met *in vivo*. Ввиду этого наблюдается отрицательное воздействие на "захват" и таким образом на соотношение сигнал/фон *in vivo*. Этот вопрос не был описан в предшествующем уровне техники, поскольку, например, если сMet-связывающие пептиды мечены оптическими репортерными красителями, то количества рассматриваемого химического вещества - меченого пептида, существенно превышают таковые для PET, и ввиду этого вопрос о конкуренции не поднимается.

Путем использования композиций визуализирующего агента по настоящему изобретению также решают ранее непризнанную проблему адгезии меченных радиоактивной меткой сМВР-пептидов к различным материалам, включая фильтры. Предложены солиubilизированные композиции, что подразумевает возможность получения радиоактивных индикаторов на основе ^{18}F -меченых сМВР и проведения стерилизующей фильтрации без значительной потери радиоактивного индикатора, обусловленной адсорбцией на фильтре.

Краткое описание графических материалов

На Фиг.1 представлена конфигурация кассеты FastLabTM, где:

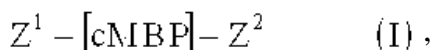
QMA обозначает SPE-картридж (четвертичный метиламмоний; обработка воды);

МСХ+ обозначает SPE-картридж (катионообменник смешанного действия);

С2 обозначает SPE-картридж (низкая гидрофобность; на основе диоксида кремния).

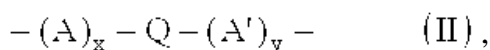
Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предложен визуализирующий агент, содержащий меченный радиоактивным ^{18}F сMet-связывающий циклический пептид, где указанный сMet-связывающий циклический пептид представляет собой 18-30-мерный циклический пептид формулы I:



где:

сМВР (сMet-связывающий циклический пептид) имеет формулу II:



где Q представляет собой аминокислотную последовательность (SEQ-1):



где X^1 представляет собой Asn, His или Tyr;

X^2 представляет собой Gly, Ser, Thr или Asn;

X^3 представляет собой Thr или Arg;

X^4 представляет собой Ala, Asp, Glu, Gly или Ser;

X^5 представляет собой Ser или Thr;

X^6 представляет собой Asp или Glu;

и все Cys^{a-d} представляют собой остатки цистеина, так что остатки a и b, а также c и d циклизованы с образованием двух отдельных дисульфидных связей;

A и A' независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от Cys, при условии, что по меньшей мере один из A и A' присутствует и представляет собой Lys;

x и y независимо представляют собой целые числа величиной от 0 до 13 и выбраны так, что сумма x и y равна от 1 до 13;

Z^1 присоединен к N-концу сМВР и представляет собой Н или M^{IG} ;

Z^2 присоединен к С-концу сМВР и представляет собой ОН, OV^c или M^{IG} ,

где V^c представляет собой биосовместимый катион;

каждый M^{IG} независимо представляет собой группу, ингибирующую метаболизм, которая представляет собой биосовместимую группу, ингибирующую или подавляющую метаболизм сМВР-пептида *in vivo*;

где сМВР мечен посредством ^{18}F по остатку Lys групп А или А'.

Под термином "визуализирующий агент" понимают соединение, подходящее для визуализации организма млекопитающего. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой интактный организм млекопитающего *in vivo* и более предпочтительно представляет собой человека. Предпочтительно, чтобы при введении профессиональным медицинским специалистом визуализирующий агент можно было ввести в организм млекопитающего минимально инвазивным образом, т.е. без существенного риска для здоровья млекопитающего. Таким минимально инвазивным введением предпочтительно является внутривенное введение в периферическую вену указанного субъекта, без необходимости местной или общей анестезии.

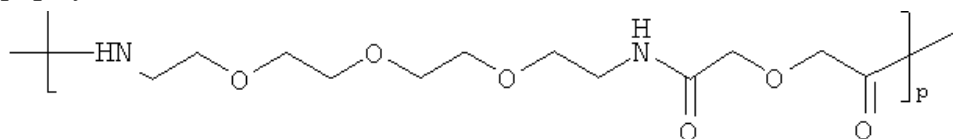
Термин "визуализация *in vivo*", как он использован в данном описании, относится к тем методам, с помощью которых можно неинвазивно получать изображения всего или части внутреннего содержимого млекопитающего.

Под термином "сMet-связывающий циклический пептид" понимают пептид, который связывается с рецептором фактора роста гепатоцитов, также известным как с-Met (или просто МЕТ). Такими подходящими пептидами по настоящему изобретению являются циклические пептиды формулы I из 18-30 аминокислот. Такие пептиды имеют кажущуюся K_D (константу диссоциации) для с-Met менее чем примерно 20 нМ. Последовательность указанных сМВР-пептидов содержит остатки пролина, и известно, что такие остатки могут проявлять цис/транс-изомеризацию амидной связи остова. сМВР-Пептиды по настоящему изобретению включают все такие изомеры.

Группа Z^1 замещает аминогруппу последнего аминокислотного остатка в сМВР, т.е. на amino-конце. Таким образом, когда Z^1 представляет собой Н, amino-конец сМВР оканчивается свободной группой NH_2 последнего аминокислотного остатка. Группа Z^2 замещает карбонильную группу последнего аминокислотного остатка сМВР, т.е. на карбокси-конце. Таким образом, когда Z^2 представляет собой ОН, карбокси-конец сМВР оканчивается свободной группой CO_2H последнего аминокислотного остатка, и когда Z^2 представляет собой OV^c , эта концевая карбоксильная группа ионизирована в виде группы CO_2V^c .

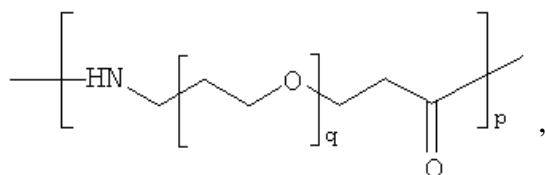
Под термином "биосовместимый катион" (V^c) понимают положительно заряженный противоион, который образует соль с ионизированной отрицательно заряженной группой, где указанный положительно заряженный противоион является также нетоксичным и поэтому подходящим для введения в организм млекопитающего, особенно организм человека. Примеры подходящих биосовместимых катионов включают ионы щелочных металлов натрия или калия; щелочноземельных металлов кальция и магния, и ион аммония. Предпочтительными биосовместимыми катионами являются катионы натрия и калия, наиболее предпочтительно натрия.

Под термином "ингибирующая метаболизм группа" (M^{IG}) понимают биосовместимую группу, которая ингибирует или подавляет метаболизм пептида сMBP *in vivo* либо по аминоконцу (Z^1), либо по карбокси-концу (Z^2). Такие группы хорошо известны специалистам в данной области техники, и их подходящим образом выбирают для аминоконца пептида из: N-ацилированных групп $-NH(C=O)R^G$, где ацильная группа $-(C=O)R^G$ имеет R^G , выбранный из C_{1-6} алкильных или C_{3-10} арильных групп, или содержит полиэтиленгликолевую (ПЭГ) структурную единицу; для карбокси-конца пептида из: карбоксамида, сложного трет-бутилового эфира, сложного бензилового эфира, сложного циклогексилового эфира, аминспирта или полиэтиленгликолевой (ПЭГ) структурной единицы. Такие предпочтительные ПЭГ-группы представляют собой биомодификаторы формулы IA или IB:



(IA)

17-Амино-5-оксо-6-аза-3,9,12,15-тетраоксагептадекановая кислота формулы IA, где p равно целому числу от 1 до 10. Альтернативно, можно использовать ПЭГ-подобную структуру на основе производного пропионовой кислоты формулы IB:



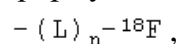
(IB)

где p является таким, как определено для формулы IA, а q равно целому числу от 3 до 15.

В формуле IB p предпочтительно равен 1 или 2, а q предпочтительно равно 5-12.

Таковыми предпочтительными аминоконцевыми группами M^{IG} являются ацетил, бензилоксикарбонил или трифторацетил, наиболее предпочтительно ацетил.

Под термином "меченный радиоактивным ^{18}F " понимают, что сMet-связывающий циклический пептид ковалентно конъюгирован с радиоактивным изотопом ^{18}F . ^{18}F подходящим образом присоединен посредством связи C-F по типу фторалкила или фторарила, поскольку такие связи относительно стабильны *in vivo* и таким образом придают устойчивость к метаболическому отщеплению радиоактивной метки ^{18}F от сMBP-пептида. Предпочтительно ^{18}F присоединен посредством связи C-F по типу фторарила. ^{18}F может быть присоединен непосредственно к одной из аминокислот сMBP, но предпочтительно конъюгирован с сMBP как часть радиоактивного фторированного заместителя. Указанные заместители предпочтительно представлены формулой:



где:

L представляет собой синтетическую линкерную группу формулы $-(A)_m-$, где каждый A независимо представляет собой $-CR_2-$, $-CR=CR-$, $-C\equiv C-$, $-CR_2CO_2-$, $-CO_2CR_2-$, $-NR(C=O)-$, $-(C=O)NR-$, $-NR(C=O)NR-$, $-NR(C=S)NR-$, $-SO_2NR-$, $-NRSO_2-$, $-CR_2OCR_2-$, $-CR_2SCR_2-$, $-CR_2NRCR_2-$, $-CR_2-O-N=$, $-CR_2-O-NR-$, $-CR_2-O-NH(CO)-$, C_{4-8} циклогетероалкиленовую группу, C_{4-8} циклоалкиленовую группу, C_{5-12} ариленовую группу или C_{3-12} гетероариленовую группу, аминокислоту, сахар или монодисперсную полиэтиленгликолевую (ПЭГ) структурную единицу;

каждый R независимо выбран из H, C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{1-4} алкоксиалкила или C_{1-4} гидроксиалкила;

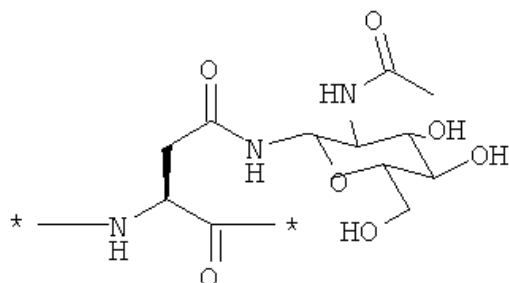
m равно целому числу величиной от 1 до 20;

n равно целому числу величиной 0 или 1.

Под термином "аминокислота" понимают L- или D-аминокислоту, аминокислотный аналог (например, нафтилаланин) или аминокислотный миметик, которые могут иметь природное происхождение или исключительно синтетическое происхождение и могут быть оптически чистыми, т.е. представлять собой единичный энантиомер и, следовательно, быть хиральными, или смесь энантиомеров. В данном описании используют традиционные 3-буквенные или однобуквенные сокращения для аминокислот. Предпочтительно, аминокислоты по настоящему изобретению являются оптически чистыми. Под термином "аминокислотный миметик" понимают синтетические аналоги существующих в природе аминокислот, которые представляют собой изостеры, т.е. разработаны с целью имитации пространственной и электронной структуры природного соединения. Такие изостеры общеизвестны среди специалистов в данной области техники и включают, но этим не ограничиваются, депсипептиды, ретроинверсопептиды, тиамиды, циклоалканы или 1,5-дизамещенные тетразолы (см. M. Goodman, Biopolymers, 24, 137 (1985)).

Под термином "пептид" понимают соединение, содержащее две или более чем две аминокислоты, определенные ниже, соединенные посредством пептидной связи (то есть амидной связью, соединяющей амин одной аминокислоты с карбоксилем другой).

Под термином "сахар" понимают моно-, ди- или трисахарид. Подходящие сахара включают: глюкозу, галактозу, мальтозу, маннозу и лактозу. В сахар возможно могут быть введены функциональные группы для обеспечения легкого сочетания с аминокислотами. Так, например, глюкозаминное производное аминокислоты можно конъюгировать с другими аминокислотами посредством пептидных связей. Одним из примеров этого является глюкозаминное производное аспарагина (имеющееся в продаже от NovaBiochem):



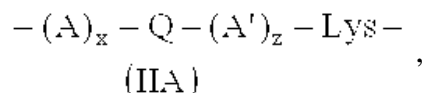
В том случае, когда A и A' представляют собой "любую аминокислоту, отличную от Cys", это означает, что дополнительная аминокислота из групп A и A' не содержит свободных тиоловых групп, в частности остатков Cys. Это так потому, что наличие дополнительного остатка Cys повышало бы риск скремблирования дисульфидных

мостиков, а именно дисульфидных мостиков Cys^a-Cys^b и Cys^c-Cys^d, в последовательности Q с последующей потерей или уменьшением сMet-связывающей аффинности.

Предпочтительные признаки

Предпочтительные сMBP-пептиды по настоящему изобретению имеют КД для связывания с-Met с комплексом с-Met/HGF менее чем примерно 10 нМ (на основании измерений поляризации флуоресценции в анализе), наиболее предпочтительно в диапазоне 1-5 нМ, в идеальном случае менее 3 нМ.

сMBP-Пептид формул I и II предпочтительно имеет формулу IIА:



где А является таким, как определено для формулы II,

z равно целому числу величиной от 0 до 12, и сумма x и z равна от 0 до 12,

и сMBP содержит только один остаток Lys.

Так, в формуле IIА единственный остаток Lys локализован конкретно на С-конце сMBP. Это в свою очередь означает, что радиоактивная метка ¹⁸F предпочтительно локализована на С-конце.

Q предпочтительно содержит аминокислотную последовательность SEQ-2 или SEQ-3:

Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

В SEQ-1, SEQ-2 и SEQ-3 X³ предпочтительно представляет собой Arg. В формуле I и формуле II группа -(A)_x- или -(A')_y- предпочтительно содержит линкерный пептид, который выбран из:

-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5) или

-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6).

сMBP-Пептид согласно первому аспекту предпочтительно имеет аминокислотную последовательность (SEQ-7):

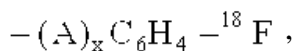
Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Gly-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys.

Предпочтительные визуализирующие агенты по настоящему изобретению содержат пептид сMBP, защищенный по обоим концам группами M^{IG}, т.е. предпочтительно оба Z¹ и Z² представляют собой M^{IG}, которые обычно будут разными. Наличие обоих концов пептида, защищенных таким способом, важно для применений при визуализации in vivo, поскольку иначе можно ожидать быстрого метаболизма пептида с последующей потерей аффинности селективного связывания для с-Met. В том случае, когда оба Z¹ и Z² представляют собой M^{IG}, предпочтительно, чтобы Z¹ представлял собой ацетил, а Z² представлял собой первичный амид. Наиболее предпочтительно, чтобы Z¹ представлял собой ацетил, а Z² представлял собой первичный амид, и группировка ¹⁸F была присоединена к эpsilon-аминогруппе боковой цепи остатка лизина в сMBP.

Радиоактивный фторированный заместитель -(L)_n-¹⁸F может быть присоединен к

альфа-аминогруппе N-конца сMet-связывающего пептида или альтернативно к аминогруппе боковой цепи каких-либо amino-замещенных аминокислот (например, остатков Lys). Предпочтительно, он присоединен к эпсилон (s) аминогруппе остатка Lys в сМВР.

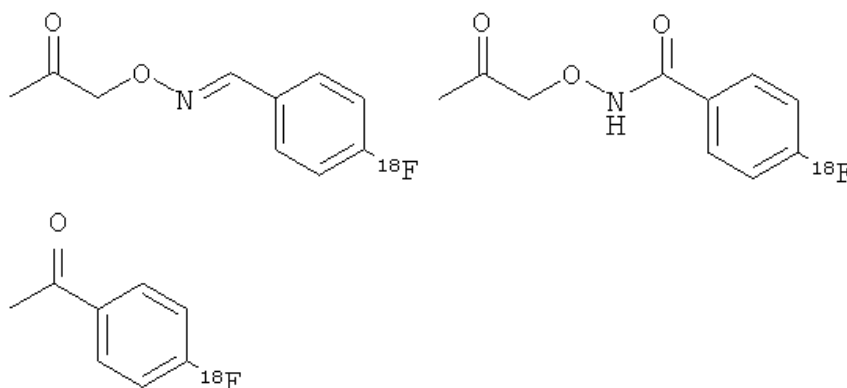
В предпочтительных радиоактивных фторированных заместителях $-(L)_n-^{18}F$ n равно 1, т.е. присутствует синтетическая линкерная группа, которая определена выше. Такие более предпочтительные заместители содержат радиоактивную метку ^{18}F , связанную с фенильной группой, т.е. данный заместитель имеет формулу:



где: А такой, как определено выше,

x равно целому числу величиной от 0 до 5.

Такие наиболее предпочтительные заместители являются результатом либо N-ацилирования аминогруппы остатка Lys активированным фторированным сложным эфиром, либо конденсации аминооксипроизводного по аминогруппе остатка Lys с фторированным бензальдегидом, и имеют формулу:



Визуализирующие агенты по первому аспекту могут быть получены, как описано в пятом аспекте (ниже).

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена композиция визуализирующего агента, содержащая:

(1) меченный радиоактивным ^{18}F сMet-связывающий циклический пептид по первому аспекту;

(2) немеченый сMet-связывающий циклический пептид;

где указанный сMet-связывающий циклический пептид имеет одну и ту же аминокислотную последовательность в (1) и (2),

и где немеченый сМВР-пептид присутствует в указанной композиции не более чем в 50-кратном молярном количестве по отношению к ^{18}F -меченому сМВР-пептиду.

Предпочтительными воплощениями меченного радиоактивным ^{18}F сMet-связывающего циклического пептида во втором аспекте являются такие, которые описаны в первом аспекте (выше).

Термин "композиция" имеет свое общепринятое значение, то есть это смесь определенных компонентов. Композиция может быть в твердой форме или в форме жидкости/раствора.

Под термином "немеченый" понимают, что сMet-связывающий циклический пептид не является радиоактивным, т.е. не мечен радиоактивным ^{18}F или любым другим радиоактивным изотопом. В композиции могут присутствовать один или более таких

пептидов, и такие немеченые пептиды главным образом включают нерадиоактивные предшественники по четвертому аспекту (ниже). Термин "немеченый" включает в себя сMet-связывающий циклический пептид, меченный ^{19}F , где указанный ^{19}F присутствует в составе ^{18}F -фторида, использованного для введения радиоактивной метки в указанный сMet-связывающий циклический пептид, и ввиду этого является продуктом этой же реакции радиоактивного мечения. Как известно в данной области техники, если два фтор-замещенных соединения отличаются только изотопами атома фтора, их поведение с точки зрения химии практически одинаково, и поэтому разделить их будет крайне трудно. Немеченый сMet-связывающий циклический пептид или предшественник предпочтительно имеет уже присоединенные группы Z^1 и/или Z^2 . Авторы настоящего изобретения обнаружили, что когда для конъюгирования с предшественником сМВР-пептида, функционализированным группой аминокси, используют ^{18}F -меченый альдегид, то главным источником побочных продуктов являются нерадиоактивные альдегидные примеси. Такой важной альдегидной примесью в ^{18}F -бензальдегиде является DMAP (т.е. 4-диметиламино)-бензальдегид. Следовательно, продукты конъюгирования нерадиоактивных альдегидов (таких как DMAP) с сМВР-пептидом, функционализированным группой аминокси, также находятся в пределах объема термина "немеченый сMet-связывающий циклический пептид".

Предпочтительно, немеченый сMet-связывающий циклический пептид присутствует в указанной композиции не более чем в 30-кратном, более предпочтительно не более чем в 20-кратном, наиболее предпочтительно менее чем в 10-кратном молярном количестве по отношению к соответствующему ^{18}F -меченому пептиду.

Композиция по второму аспекту предпочтительно существует в форме раствора, причем в растворе находятся оба компонента (1) и (2). Более предпочтительно, данный раствор представляет собой биосовместимый растворитель или смесь двух либо более таких растворителей. Такие предпочтительные биосовместимые растворители описаны в третьем аспекте (ниже), и предпочтительно содержат водный растворитель.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при концентрациях радиоактивного индикатора приблизительно в диапазоне концентраций 1-50 мкг/мл ^{18}F -меченые сМВР-пептиды по изобретению демонстрируют нежелательное связывание с рядом материалов. Поскольку радиоактивный индикатор присутствует в такой очень низкой концентрации, то даже небольшое количество химически адсорбированного вещества может составлять значительный процент от количества имеющегося радиоактивного изотопа. Такую концентрацию радиоактивного индикатора следует сравнить, например, с концентрацией соответствующих меченных цианиновым красителем сMet-связывающих пептидов, для которых концентрация будет составлять приблизительно 2-10 мг/мл, т.е. выше почти в тысячу раз. В таких случаях потеря микрограммовых количеств вещества вследствие адсорбции будет составлять незначительный процент от количества меченных красителем пептидов, по-прежнему остающихся в растворе. Материалы, к которым наблюдается адгезия радиоактивного индикатора, включают пластики, стекло и диоксид кремния. В случае фильтров это может означать высокий процент потерь радиоактивности при использовании стерилизующей фильтрации.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что вышеупомянутое явление адгезии связано с тем, что сМВР-пептид выпадает в осадок в кислотных условиях (особенно при пониженных температурах). Поэтому предпочтительно поддерживать pH композиции при 7,5 или выше, более предпочтительно при pH 8,0 или выше, чтобы

удерживать желаемый ^{18}F -меченый сMet-связывающий пептид в растворе и таким образом избегать потери вещества. В качестве альтернативы или в дополнение к использованию контролируемого значения pH, может быть введен солибилизатор.

Под термином "солибилизатор" понимают присутствующую в композиции добавку, которая повышает растворимость визуализирующего агента в растворителе. Таким предпочтительным растворителем является водная среда, и поэтому солибилизатор предпочтительно улучшает растворимость в воде. Такие подходящие солибилизаторы включают: C1-4 спирты; глицерин; полиэтиленгликоль (ПЭГ); пропиленгликоль; полиоксиэтиленсорбитана моноолеат; сорбитана моноолеат; полисорбаты; блок-сополимеры поли(оксиэтилен)-поли(оксипропилен)-поли(оксиэтилен)а (PluronicTM); циклодекстрины (например, альфа-, бета- или гамма-циклодекстрин, гидроксипропил-β-циклодекстрин или гидроксипропил-γ-циклодекстрин) и лецитин.

Предпочтительными солибилизаторами являются циклодекстрины, C₁₋₄спирты и PluronicTM, более предпочтительно циклодекстрины и C₂₋₄спирты. Когда солибилизатором является спирт, он предпочтительно представляет собой этанол или пропанол, более предпочтительно этанол. Этанол может играть двойную роль, поскольку он также может действовать как радиопротектор. Когда солибилизатором является циклодекстрин, он предпочтительно представляет собой β-циклодекстрин, более предпочтительно гидроксипропил-β-циклодекстрин (HPCD). Концентрация циклодекстрина может составлять от примерно 0,1 до примерно 40 мг/мл, предпочтительно от примерно 5 до примерно 35 мг/мл, более предпочтительно 20-30 мг/мл, наиболее предпочтительно около 25 мг/мл. Когда используют единственный солибилизатор, предпочтительно он представляет собой этанол или гидроксипропил-β-циклодекстрин, более предпочтительно этанол. Когда используют комбинацию солибилизаторов, она предпочтительно состоит из этанола и гидроксипропил-β-циклодекстрина.

Предпочтительно, композицию по второму аспекту поддерживают при pH 7,5 или выше, возможно в присутствии 5-10% (об./об.) этанола в качестве солибилизатора.

Композиция визуализирующего агента по второму аспекту предпочтительно дополнительно содержит один или более радиопротекторов. Под термином "радиопротектор" понимают соединение, которое ингибирует реакции разложения, например, окислительно-восстановительные процессы, путем захвата очень реакционноспособных свободных радикалов, таких как кислородсодержащие свободные радикалы, возникающие в результате радиолиза воды. Возможно использование комбинации двух или более разных радиопротекторов. Удобно, когда радиопротекторы по настоящему изобретению выбраны из: этанола; аскорбиновой кислоты; пара-аминобензойной кислоты (т.е. 4-амино-бензойной кислоты или pABA); гентизиновой кислоты (т.е. 2,5-дигидроксibenзойной кислоты) и, где это применимо, из солей таких кислот с биосовместимым катионом, как определено выше. Радиопротектор по настоящему изобретению предпочтительно содержит пара-аминобензойную кислоту или пара-аминобензоат натрия.

Наиболее предпочтительная композиция визуализирующего агента по настоящему изобретению содержит сMBP-пептид с SEQ-7, где оба присоединенные Z¹ и Z² представляют собой M^{IG}, и комбинацию радиопротектора пара-аминобензойной кислоты и радиопротектора/солибилизатора этанола в водном буфере. Предпочтительным пептидом с SEQ-7 в таких предпочтительных композициях является

пептид 1, а предпочтительным ^{18}F -меченым cMBP-пептидом является соединение 3. Концентрация радиоактивного соединения предпочтительно составляет менее 350 МБк/мл, причем концентрация pABA составляет 2 мг/мл, а этанола примерно 5-10% об./об., предпочтительно 6,5-7,5% об./об.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая визуализирующий агент по первому аспекту или композицию визуализирующего агента по второму аспекту вместе с биосовместимым носителем, в стерильной форме, подходящей для введения млекопитающему.

Предпочтительными аспектами визуализирующего агента и композиции в третьем аспекте являются такие, которые определены в первом и втором аспектах соответственно.

"Биосовместимый носитель" представляет собой текучую среду, в частности жидкость, в которой можно суспендировать или предпочтительно растворить визуализирующий агент, с тем, чтобы композиция стала физиологически переносимой, т.е. могла быть введена в организм млекопитающего без проявления токсичности или без вызывания чрезмерного дискомфорта. Биосовместимым носителем является соответственно инъектируемый жидкий носитель, такой как стерильная, апиrogenная вода для инъекций; водный раствор, такой как физиологический раствор (который предпочтительно может быть сбалансирован таким образом, чтобы конечный продукт для инъекции был изотоническим); водный буферный раствор, содержащий биосовместимый буферный агент (например, фосфатный буфер); водный раствор одного или более регулирующих тоничность веществ (например, солей катионов плазмы с биосовместимыми противоионами), Сахаров (например, глюкозы или сахарозы), спиртов сахаров (например, сорбита или маннита), гликолей (например, глицерина) или других неионных полиолов (например, полиэтиленгликолей, пропиленгликолей и тому подобного). Предпочтительно, биосовместимым носителем является апиrogenная вода для инъекций, изотонический физиологический раствор или фосфатный буфер. Использование буфера предпочтительно для регулирования pH.

Все визуализирующие агенты и биосовместимый носитель поставляются в подходящих флаконах или сосудах, которые содержат герметично закрытый контейнер, позволяющий поддерживать стерильную чистоту и/или радиоактивную безопасность, а также возможно инертный заполняющий свободное пространство газ (например, азот или аргон), в то же время допускающий добавление и отбор растворов посредством шприца или канюли. Таким предпочтительным контейнером является флакон с герметизирующей прокладкой, где газонепроницаемая пробка обжата дополнительным упаковочным средством (обычно из алюминия). Пробка подходит для однократного или многократного прокалывания иглой для подкожных инъекций (например, обжатая пробка с герметизирующей прокладкой) с поддержанием при этом стерильной чистоты. Такие контейнеры имеют дополнительное преимущество в том, что при желании пробка может выдерживать вакуум (например, чтобы заменить заполняющий свободное пространство газ или дегазировать растворы) и выдерживать изменения давления, например, уменьшение давления без допускания проникновения газов из внешней атмосферы, таких как кислород или водяной пар.

Предпочтительные контейнеры для лекарственных средств для многократного приема представляют собой один большой флакон (например, объемом от 10 до 30 см³), который содержит многократные дозы лекарственного средства для приема пациентом, в силу чего однократные дозы для приема пациентом могут быть отобраны таким образом в шприцы марки "для клинического использования" с различными

интервалами времени в течение приемлемого срока годности препарата в зависимости от данной клинической ситуации. Предварительно заполненные шприцы сконструированы для включения разовой дозы для человека или "стандартной дозы" и поэтому предпочтительно представляют собой шприц одноразового применения или другой шприц, подходящий для клинического применения. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно имеют дозировку, подходящую для одного пациента, и предложены в подходящем шприце или контейнере, как описано выше.

Возможно, что фармацевтическая композиция может содержать дополнительные эксципиенты, такие как антимикробный консервант, pH-регулирующий агент, наполнитель, радиопротектор, солюбилизатор или регулирующий осмоляльность агент. Термины "радиопротектор" и "солюбилизатор" и их предпочтительные воплощения имеют те же значения, которые описаны во втором аспекте (выше). Под термином "антимикробный консервант" понимают агент, который ингибирует рост потенциально вредных микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

Антимикробный консервант также может демонстрировать некоторые бактерицидные свойства в зависимости от применяемой дозировки. Главная роль антимикробного консерванта(ов) по настоящему изобретению состоит в ингибировании роста любого такого микроорганизма в фармацевтической композиции. Однако антимикробный консервант также возможно может быть использован для ингибирования роста потенциально вредных микроорганизмов в одном или более компонентах наборов, применяемых для приготовления указанной композиции перед введением. Подходящие антимикробные консерванты включают: парабены, то есть метил-, этил-, пропил- или бутилпарабен или их смеси; бензиловый спирт; фенол; крезол; цетримид и тиомерсал.

Предпочтительными антимикробными консервантами являются парабены.

Термин "pH-регулирующий агент" обозначает соединение или смесь соединений, полезных для обеспечения нахождения pH композиции в пределах, приемлемых (приблизительно pH от 4,0 до 10,5) для введения человеку или млекопитающему. Такие подходящие pH-регулирующие агенты включают фармацевтически приемлемые буферы, такие как трициновый, фосфатный или на основе триса (то есть трис(гидроксиметил)аминометана), и фармацевтически приемлемые основания, такие как карбонат натрия, бикарбонат натрия или их смеси. Когда композицию применяют в форме набора, pH-регулирующий агент возможно может быть представлен в отдельном флаконе или контейнере, чтобы пользователь набора мог осуществить подведение pH как часть многостадийной процедуры.

Под термином "наполнитель" понимают фармацевтически приемлемый увеличивающий объем агент, который может облегчить работу с материалом в процессе получения и лиофилизации. Подходящие наполнители включают неорганические соли, такие как хлорид натрия, и водорастворимые сахара или спирты сахаров, такие как сахароза, мальтоза, маннит или трегалоза.

Фармацевтические композиции по третьему аспекту могут быть приготовлены в асептических условиях производства (то есть в чистой комнате) с получением желаемого стерильного апиrogenного продукта. Предпочтительно, чтобы ключевые компоненты, особенно сопутствующие реагенты, а также те части оборудования, которые приводят в контакт с визуализирующим агентом (например, флаконы), были стерильны. Компоненты и реагенты можно стерилизовать способами, известными в данной области техники, включая: стерилизующую фильтрацию, окончательную стерилизацию с использованием, например, гамма-облучения, автоклавирование, обработку сухим

жаром или химическую обработку (например, этиленоксидом). Некоторые компоненты предпочтительно стерилизовать заранее, с тем чтобы проводить минимальное количество необходимых манипуляций. Тем не менее, для предосторожности предпочтительно включить по меньшей мере стадию стерилизующей фильтрации в качестве конечной стадии приготовления фармацевтической композиции.

Как отмечено выше, фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно поддерживаются при pH 7,5 или выше и/или содержат солубилизатор, так что стадия стерилизующей фильтрации может быть использована без чрезмерных потерь радиоактивного соединения, адсорбированного на материале фильтра.

Аналогичные соображения применимы к манипуляциям с фармацевтическими композициями с использованием шприцов марки "для клинического использования" или с использованием пластиковых трубок, где без применения солубилизатора адсорбция может привести к потере радиоактивного соединения.

Фармацевтическую композицию предпочтительно готовят так, как описано в шестом аспекте (ниже).

Фармацевтическая композиция по третьему аспекту возможно может быть приготовлена из набора. Такие наборы содержат сMet-связывающий пептид формулы I, который описан в первом аспекте, или предшественник по четвертому аспекту в стерильной апиrogenной форме, такой, что после взаимодействия со стерильным источником радиоактивного изотопа ^{18}F в подходящем растворителе осуществляют введение радиоактивной метки с получением желаемого ^{18}F -меченого сMet-связывающего пептида.

Что касается набора, то сMet-связывающий пептид или предшественник вместе с другими возможными эксипиентами, которые описаны выше, предпочтительно представлены в виде лиофилизированного порошка в подходящем флаконе или контейнере. В таком случае агент предназначен для дальнейшего разведения либо путем непосредственного использования ^{18}F в биосовместимом носителе (т.е. как растворение), либо сначала выполняют разведение компонентов набора биосовместимым носителем, после чего осуществляют взаимодействие с источником ^{18}F .

Предпочтительной стерильной формой сMet-связывающего пептида или предшественника является лиофилизированное твердое вещество. Стерильная твердая форма предпочтительно поставляется в контейнере фармацевтической марки, как описано для фармацевтической композиции (выше). Когда набор является лиофилизированным, композиция возможно может содержать криопротектор, выбранный из сахара, предпочтительно маннита, мальтозы, или трицина.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен предшественник, полезный в получении меченого радиоактивным ^{18}F сMet-связывающего циклического пептида по третьему аспекту или в приготовлении композиции по первому или второму аспектам, содержащий:

(1) сMet-связывающий циклический пептид формулы I, как он определен в первом аспекте, где оба Z^1 и Z^2 представляют собой M^{IG} ; или

(2) сMet-связывающий циклический пептид, функционализированный группой аминокси.

Под термином "сMet-связывающий циклический пептид, функционализированный группой аминокси" понимают сMet-связывающий циклический пептид формулы I,

содержащий ковалентно конъюгированную с ним функциональную группу аминоксид. Такие группы аминоксид имеют формулу $-O-NH_2$, предпочтительно $-CH_2O-NH_2$, и обладают преимуществом в том, что аминоксидная группа является более реакционноспособной, чем аминоксидная группа Lys, в реакциях конденсации с альдегидами, приводящих к образованию простых эфиров оксимов. Такие аминоксидные группы подходящим образом присоединены к остатку Lys в cMBP, как описано ниже.

Предшественник не является радиоактивным и сконструирован с возможностью его получения с высокой степенью химической чистоты. Также предусмотрено, чтобы при взаимодействии с подходящим источником ^{18}F реакция протекала эффективно с достаточной радиохимической чистотой (RCP). "Подходящий источник ^{18}F " зависит от природы предшественника. В том случае, когда предшественник содержит немеченый cMet-связывающий пептид формулы I, предусмотрено, чтобы аминоксидная группа остатка лизина (Lys) немеченого пептида была сайтом радиоактивного мечения. Концы cMBP-пептида защищены, поскольку оба Z^1 и Z^2 представляют собой MIG. Такие предпочтительные cMet-связывающие пептиды и предпочтительные группы Z^1/Z^2 описаны в первом аспекте. Таким образом, подходящий источник ^{18}F разработан с целью осуществления настолько эффективного взаимодействия с аминоксидной группой лизина, предпочтительно эпсилон-аминоксидной группой Lys, насколько это возможно.

Для приготовления фармацевтической композиции по третьему аспекту данный предшественник предпочтительно находится в стерильной форме, более предпочтительно представляет собой лиофилизированное твердое вещество.

Предшественник по четвертому аспекту предпочтительно представляет собой cMet-связывающий пептид, функционализированный группой аминоксид.

cMet-Связывающие пептиды формулы I, то есть Z^1 -[cMBP]- Z^2 , по настоящему изобретению могут быть получены способом, включающим:

- (1) твердофазный пептидный синтез линейного пептида, который имеет такую же пептидную последовательность, как и желаемый cMBP-пептид, и в котором Cys^a и Cys^b не защищены, а остатки Cys^c и Cys^d имеют тиол-защитные группы;
- (2) обработку пептида со стадии (1) водным основанием в растворе с получением моноциклического пептида с первой дисульфидной связью, соединяющей Cys^a и Cys^b;
- (3) удаление с Cys^c и Cys^d тиол-защитных групп и циклизацию с получением второй дисульфидной связи, соединяющей Cys^c и Cys^d, с получением желаемого бициклического пептидного продукта Z^1 -[cMBP]- Z^2 .

Под термином "защитная группа" понимают группу, которая ингибирует или подавляет нежелательные химические реакции, но которая предназначена быть достаточно реакционноспособной, чтобы она могла отщепляться от рассматриваемой функциональной группы в достаточно мягких условиях, которые не изменяют остальную часть молекулы. После удаления защиты получают желаемый продукт. Защитные группы для аминов хорошо известны специалистам в данной области техники, и их соответственно выбирают из: Boc (где Boc представляет собой трет-бутилоксикарбонил), Fmoc (где Fmoc представляет собой флуоренилметоксикарбонил), трифторацетила, аллилоксикарбонила, Dde (т.е. 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогексиден)-этила) или Npus (т.е. 3-нитро-2-пиридинсульфенила). Подходящими тиол-защитными группами являются Trt (третил), Acem (ацетамидометил), трет-Bu (трет-бутил), трет-бутилтио,

метоксибензил, метилбензил или Nrys (3-нитро-2-пиридин-сульфенил). Применение дополнительных защитных групп описано в "Protective Groups in Organic Synthesis", 4th Edition, Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts (Wiley Blackwell (2006)).

Предпочтительными защитными группами для аминов являются Boc и Fmoc, наиболее предпочтительно - Boc. Предпочтительными тиол-защитными группами являются Trt и AcM.

В Примерах 1 и 2 приведены дополнительные конкретные подробности. Дополнительные подробности твердофазного пептидного синтеза описаны в P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, 1997. Пептиды cMBP лучше всего хранить в атмосфере инертного газа и держать в морозильной камере. При использовании в растворе лучше избегать значений pH выше 7, так как это повышает риск скремблирования дисульфидных мостиков.

cMet-Связывающие пептиды, функционализированные группами аминокислот, могут быть получены способами Poethko и др. (J. Nucl. Med., 45, 892-902 (2004)), Schirmacher и др. (Bioconj. Chem., 18, 2085-2089 (2007)), Solbakken и др. (Bioorg. Med. Chem. Lett, 16, 6190-6193 (2006)) или Glaser и др. (Bioconj. Chem., 19, 951-957 (2008)). Конъюгирование группы аминокислот возможно может быть осуществлено за две стадии. Сначала N-защищенную аминоксикарбоновую кислоту или N-защищенный по аминоксигруппе активированный сложный эфир конъюгируют с cMet-связывающим пептидом. Затем с промежуточного N-защищенного функционализированного аминоксигруппой cMet-связывающего пептида удаляют защиту с получением желаемого продукта (см. приведенные выше статьи Solbakken и Glaser). N-Защищенные аминоксикарбоновые кислоты, такие как Boc-NH-O-CH₂(C=O)OH, имеются в продаже, например от Novabiochem.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения меченного радиоактивным ¹⁸F cMet-связывающего циклического пептида по первому аспекту, включающий:

- (1) предоставление предшественника согласно четвертому аспекту;
- (2) когда указанный предшественник содержит немеченый cMet-связывающий циклический пептид формулы I, где оба Z¹ и Z² представляют собой M^{IG}, взаимодействие либо с ¹⁸F-меченым активированным сложным эфиром, либо с ¹⁸F-меченой карбоновой кислотой в присутствии активирующего агента с получением меченного радиоактивным ¹⁸F cMet-связывающего циклического пептида, конъюгированного через амидную связь с остатком Lys в cMBP указанного циклического пептида;
- (3) когда указанный предшественник содержит cMet-связывающий циклический пептид, функционализированный группой аминокислот, взаимодействие либо:
 - (а) с ¹⁸F-меченым активированным сложным эфиром или с ¹⁸F-меченой карбоновой кислотой в присутствии активирующего агента с получением меченного радиоактивным ¹⁸F cMet-связывающего циклического пептида, конъюгированного через амидную связь по положению аминоксигруппы указанного функционализированного пептида; либо
 - (б) с ¹⁸F-меченым альдегидом с получением меченного радиоактивным ¹⁸F cMet-связывающего циклического пептида, конъюгированного через оксимную простую эфирную связь по положению аминоксигруппы указанного функционализированного пептида.

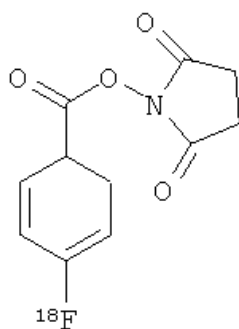
Под термином "активированный сложный эфир" или "активный сложный эфир" понимают сложноэфирное производное соответствующей карбоновой кислоты, которое сконструировано таким образом, чтобы являться более легко уходящей группой и, следовательно, обеспечивать более легкое взаимодействия с нуклеофилом, таким как

амины. Примерами подходящих активных сложных эфиров являются: N-гидроксисукцинимидный (NHS); сульфосукцинимидиловый эфир; пентафторфенольный; пентафтортиофенольный; пара-нитрофенольный; гидроксibenзотриазольный; и PyBOP (то есть гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония). Предпочтительными активными сложными эфирами являются N-

гидроксисукцинимидные или пентафторфенольные эфиры, особенно N-гидроксисукцинимидные эфиры.

Под термином "активирующий агент" понимают реагент, используемый для облегчения реакции сочетания между амином и карбоновой кислотой с образованием амида. Такие подходящие активирующие агенты известны в данной области и включают карбодиимиды, такие как EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид), и N,N'-диалкилкарбодиимиды, такие как дициклогексилкарбодиимид или диизопропилкарбодиимид, и триазолы, такие как HBTU (гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония), HATU (гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония) и PyBOP (гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония). Дополнительные подробности приведены в "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Edition, pages 508-510, Wiley Interscience (2001). Таким предпочтительным активирующим агентом является EDC.

^{18}F -Меченые активированные сложные эфиры, такие как $[\text{}^{18}\text{F}]\text{SFB}$ (N-сукцинимидил-4- $[\text{}^{18}\text{F}]$ -фторбензоат), могут быть получены способом, описанным в работе Glaser и др. (J. Lab. Contr. Radiopharm., 52, 327-330 (2009)) и приводимых там ссылок, или автоматизированным способом Marik и др. (Appl. Rad. Isot., 65(2), 199-203 (2007)):



^{18}F -SFB

^{18}F -Меченые карбоновые кислоты могут быть получены указанным выше способом Marik и др. ^{18}F -Меченые алифатические альдегиды формулы $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_q\text{CH}_2\text{CHO}$, где q равно 3, могут быть получены способом Glaser и др. (Bioconj. Chem., 19(4), 951-957 (2008)). ^{18}F -Фторбензальдегид можно получить способом Glaser и др. (J. Lab. Contr. Radiopharm., 52, 327-330 (2009)). Предшественник $\text{Me}_3\text{N}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHOFCF}_3\text{SO}_3^-$ получают способом Нака и др. (J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)).

Конъюгирование ^{18}F -меченых альдегидов с с-Met-связывающими пептидами, функционализированными аминоксигруппами, предпочтительно осуществляют в

присутствии катализатора для получения анилина, как описано Flavell и др. (J. Am. Chem. Soc., 130(28), 9106-9112 (2008)). Несмотря на то, что в качестве предшественников можно использовать защищенные по аминоксигруппе с-Met-связывающие пептиды (такие как соединение 1), свободное аминоксипроизводное (такое как соединение 2) является предпочтительным. Это обусловлено тем, что в данном случае синтез в целом в большей степени поддается автоматизации, в то время как при использовании защищенного предшественника обычно необходима стадия удаления защиты вручную.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложен способ приготовления композиции визуализирующего агента по второму аспекту или его фармацевтической композиции по третьему аспекту, включающий:

(1) получение меченного радиоактивным ^{18}F с-Met-связывающего циклического пептида, как определено в способе получения по пятому аспекту;

(2) хроматографическое разделение немеченого с-Met-связывающего циклического пептида и меченного радиоактивным ^{18}F с-Met-связывающего циклического пептида.

Предпочтительными аспектами композиции визуализирующего агента и фармацевтической композиции в шестом аспекте являются такие, которые описаны во втором и третьем аспекте, соответственно.

Хроматографическое разделение на стадии (2) может быть осуществлено с использованием HPLC или SPE (твердофазная экстракция) с применением одного или более SPE-картриджей. В случае использования автоматического синтезатора предпочтительна SPE, а HPLC предпочтительна в других случаях. В Примере 5 приведен подходящий способ с использованием HPLC для соединения 3 по настоящему изобретению.

Способ по шестому аспекту предпочтительно используют для приготовления фармацевтической композиции по третьему аспекту. Когда способ используют для приготовления фармацевтической композиции по третьему аспекту, данный способ приготовления предпочтительно осуществляют с использованием прибора "автоматический синтезатор".

Под термином "автоматический синтезатор" понимают автоматический модуль, основанный на принципе блочных операций, как описано в Satyamurthy и др. (Clin. Positr. Imag., 2(5), 233-253 (1999)). Термин "блочные операции" означает, что сложные процессы сводят к серии простых операций или реакций, которые могут быть использованы для ряда материалов. Такие автоматические синтезаторы предпочтительны для способа по настоящему изобретению, особенно когда желательно получение радиофармацевтической композиции. Они имеются в продаже от ряда поставщиков (Satyamurthy и др., выше), включая GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Бельгия); Raytest (Германия) и Bioscan (США).

Коммерческие автоматические синтезаторы также обеспечиваются подходящими контейнерами для жидких радиоактивных отходов, образующихся в результате радиофармацевтического получения. Как правило, в автоматических синтезаторах не предусматривается радиационная защита, поскольку они предназначены для использования в гибком автоматизированном участке, надлежащим образом спроектированном для работы с радиоактивными веществами. Такой гибкий автоматизированный участок для работы с радиоактивными веществами предусматривает подходящую радиационную защиту для предохранения оператора от возможного получения радиационной дозы, а также вентиляцию для удаления химических и/или радиоактивных испарений. Автоматический синтезатор

предпочтительно содержит кассету. Под термином "кассета" понимают часть прибора, сконструированную для съемной и взаимозаменяемой установки в прибор "автоматический синтезатор" (как он определен ниже) таким образом, чтобы с использованием механического движения движущихся частей синтезатора управлять работой кассеты с ее внешней стороны, т.е. извне. Подходящие кассеты содержат линейный ряд клапанов, каждый из которых связан с портом, к которому могут быть подведены реагенты или присоединены флаконы либо путем прокалывания иглой прокладки перевернутого герметичного флакона, либо с помощью газонепроницаемых соединяющих узлов. Каждый клапан снабжен выпукло-вогнутым (male-female) соединением, которое связано с соответствующей движущейся ручкой автоматического синтезатора. Таким образом, наружное вращение ручки контролирует открывание или закрывание клапана, когда кассета присоединена к автоматическому синтезатору. Дополнительные движущиеся части автоматического синтезатора предназначены для нажима на верхние части поршней шприцев и таким образом для заполнения или опустошения цилиндров шприцев.

Кассета является многофункциональной, обычно имея несколько положений, к которым можно подводить реагенты, и несколько положений, подходящих для присоединения с помощью шприца флаконов с реагентами или хроматографических картриджей (например, для SPE). Кассета всегда содержит реакционный сосуд. Такие реакционные сосуды имеют объемы предпочтительно от 1 до 10 см³, наиболее предпочтительно от 2 до 5 см³, и устроены таким образом, что соединены с 3 или более портами кассеты, что позволяет переносить реагенты или растворители от различных портов на кассете. Предпочтительно кассета имеет от 15 до 40 клапанов, расположенных в линейном порядке, наиболее предпочтительно от 20 до 30, особенно предпочтительно 25. Предпочтительно клапаны на кассете являются одинаковыми и наиболее предпочтительно трехходовыми клапанами. Кассеты предназначены для радиофармацевтического производства и поэтому изготовлены из материалов фармацевтического класса и также идеально устойчивых к радиолизу.

Предпочтительными автоматическими синтезаторами по настоящему изобретению являются синтезаторы, содержащие одноразовую кассету или кассету для однократного использования, которая включает все реагенты, реакционные сосуды и аппарат, необходимые для получения заданной партии радиоактивного фторированного радиофармацевтического препарата. Кассета придает автоматическому синтезатору гибкость в отношении способности производить множество различных радиофармацевтических препаратов с минимальным риском перекрестного загрязнения посредством простой замены кассеты. Подход с использованием кассеты также имеет следующие преимущества: упрощенная настройка, вследствие чего снижается риск ошибки оператора; улучшенное соответствие правилам GMP (надлежащей производственной практики); возможность использования многокомпонентных радиоактивных индикаторов; быстрое переключение производственных циклов; автоматическая диагностическая проверка кассеты и реагентов перед производственным циклом; автоматическая перекрестная проверка штрихкодов химических реагентов в зависимости от синтеза, который следует осуществить; возможность оперативного контроля реагентов; однократное использование и, следовательно, отсутствие риска перекрестного загрязнения; защищенность от несанкционированного вмешательства и неправильной эксплуатации. В этот аспект изобретения включено использование прибора "автоматический синтезатор" для изготовления фармацевтической композиции по второму аспекту.

В седьмом аспекте настоящего изобретения предложен способ визуализации организма млекопитающего *in vivo* для получения изображений сайтов сверхэкспрессии или локализации сMet, включающий визуализацию указанного организма, в который предварительно введен визуализирующий агент по первому аспекту, композиция визуализирующего агента по второму аспекту или фармацевтическая композиция по третьему аспекту.

Предпочтительными аспектами визуализирующего агента, композиции визуализирующего агента и фармацевтической композиции по седьмому аспекту являются такие, которые описаны в первом, втором и третьем аспектах, соответственно.

Предпочтительно, млекопитающее представляет собой интактный организм млекопитающего *in vivo* и более предпочтительно представляет собой человека. Предпочтительно, чтобы при введении профессиональным медицинским специалистом визуализирующий агент можно было ввести в организм млекопитающего минимально инвазивным образом, т.е. без существенного риска для здоровья млекопитающего.

Таким минимально инвазивным введением предпочтительно является внутривенное введение в периферическую вену указанного субъекта, без необходимости местной или общей анестезии.

Предпочтительно используют фармацевтическую композицию по третьему аспекту. В способе визуализации по седьмому аспекту сайтом сверхэкспрессии или локализации с-Met является предпочтительно раковая опухоль или метастазы. Предусматривается, что агент будет полезен для визуализации экспрессии с-Met как в предраковых, так и в раковых опухолях или метастазах, что дает возможность выбора терапии. Помимо этого повторная визуализация с использованием такого визуализирующего агента также дает возможность для быстрого и эффективного мониторинга индивидуального ответа субъекта на известные и новые схемы лечения, позволяя тем самым прервать неэффективное лечение. Кроме того, поскольку сверхэкспрессия с-Met является предполагаемым атрибутом быстрорастущих опухолей, ожидается, что с помощью сMet-визуализирующего агента можно будет различать агрессивные и менее агрессивные формы рака на ранней стадии их развития.

В этот аспект включен способ диагностики путем обнаружения сайтов сверхэкспрессии или локализации с-Met в организме млекопитающего *in vivo*, включающий способ визуализации по седьмому аспекту.

Данное изобретение проиллюстрировано неограничивающими Примерами, подробно описанными ниже. В Примере 1 приведен синтез сMBP-пептида по изобретению, имеющего ингибирующие метаболизм группы ($Z^1=Z^2=M^{IG}$) на обоих концах, (пептид 1). В Примере 2 приведен синтез защищенного предшественника по изобретению (соединение 1). В Примере 3 приведен синтез нерадиоактивного фторированного (т.е. ^{19}F) эквивалента меченного фтором сMet-связывающего пептида (соединение 3A). В

Примере 4 приведен синтез радиоактивного ^{18}F -фторированного с-Met-связывающего пептида по изобретению (соединение 3B). В Примере 5 приведены условия HPLC для разделения меченых и немеченых сMet-связывающих пептидов.

В Примере 6 приведено биораспределение ^{18}F -меченого пептида по изобретению (соединения 3B) в модели опухоли на животных. Результаты указывают на связывание с рецептором с-Met человека, экспрессированным в опухолях HT-29, и таким образом на полезность для визуализации опухолей. В Примере 7 продемонстрировано, что захват опухолью из Примера 6 является специфическим, поскольку этот захват можно ингибировать, вводя одновременно нерадиоактивный ^{19}F -меченый сMet-связывающий

пептид (соединение 3A). В Примере 8 также продемонстрировано уменьшение захвата печенью у приматов примерно на 40% при совместном введении с ^{19}F -меченым сMet-связывающим пептидом. Совместное введение с ^{19}F -меченой скремблированной версией данного пептида, не обладающей аффинностью к рецептору с-Met, не показало

5 значительного уменьшения захвата печенью. Печень характеризуется высоким уровнем экспрессии с-Met, и поэтому полагают, что уменьшение захвата вследствие конкуренции с ^{19}F -меченым сMBP является доказательством специфического связывания с сMet in vivo.

10 В Примере 9 показано, что солубилизатор циклодекстрин не оказывает значительного влияния на биораспределение соединения 3B in vivo. В Примере 10 проводится сравнение полностью автоматизированного синтеза соединения 3B (исходя из соединения 2) с частично автоматизированным синтезом, исходя из соединения 1. Использование соединения 2 является более предпочтительным, поскольку в этом

15 случае получаются более высокие выходы, а удаление защиты с соединения 1 связано со следующими недостатками:

(1) трудностью в установлении степени удаления защиты перед проведением радиоактивного мечения;

(2) TFA, используемая для удаления защиты с пептида, несовместима с пластиком

20 прибора - автоматического синтезатора.

В Примере 11 приведен автоматизированный синтез соединения 3B, дополнительно включающий использование автоматизированной очистки на SPE-картридже.

Результаты показывают, что с использованием этого подхода можно получить соединение 3B высокой чистоты и с удовлетворительным радиохимическим выходом.

25 В Примере 12 приведена процедура лиофилизации предшественника по изобретению.

В Примере 13 продемонстрировано влияние pH на визуализирующий агент по изобретению. В Примере 14 описывается визуализация в случае человека с применением визуализирующего агента по изобретению.

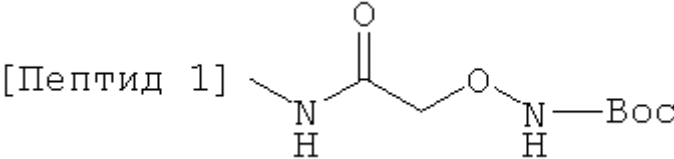
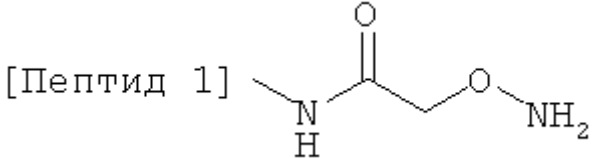
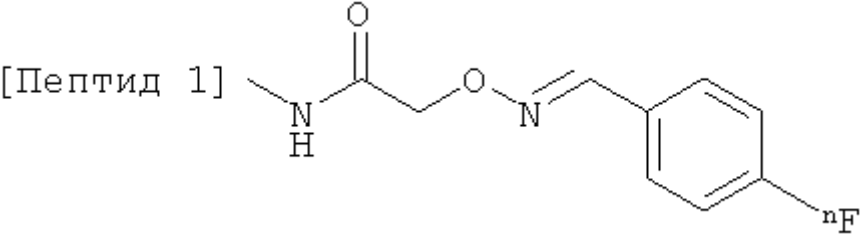
Сокращения

30 Используют традиционные однобуквенные или трехбуквенные сокращения аминокислот.

% ВД:	процент введенной дозы,
Ac:	ацетил,
AcM:	ацетамидометил,
35 ACN:	ацетонитрил,
Boc:	трет-бутилоксикарбонил,
DCM:	дихлорметан,
DIPEA:	N,N-диизопропилэтиламин,
DMF:	диметилформамид,
DMSO:	диметилсульфоксид,
40 EDC:	N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид,
Fmoc:	9-флуоренилметоксикарбонил,
HBTU:	гексафторфосфат О-бензотриазол-1-ил-N,N,N',N'-тетраметилурония,
HPLC:	высокоэффективная жидкостная хроматография,
HSPyU:	гексафторфосфат О-(N-сукцинимидил)-N,N,N',N'-тетраметилен-урония,
45 NHS:	N-гидрокси-сукцинимид,
NMM:	N-метилморфолин,
NM:	1-метил-2-пирролидинон,
pABA:	пара-аминобензойная кислота,
Pbf:	2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил,

PBS: забуференный фосфатом физиологический раствор,
 p.i.: после инъекции,
 PyBOP: гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония,
 tBu: трет-бутил,
 5 TFA: трифторуксусная кислота,
 TIS: триизопропилсилан,
 Trt: тритил.

Соединения по изобретению

10	Наименование	Структура
	Пептид 1	Дисульфидные связи при Cys4-16 и Cys6-14; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH ₂ или Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
15	Соединение 1	
20	Соединение 2	
25	Соединение 3	
30		n=19 Соединение 3А; n=18 Соединение 3В.

где:

соединения 1, 2 и 3 функционализированы по эpsilon-аминогруппе карбоксиконцевого остатка Lys в пептиде 1;

Boc = трет-бутилоксикарбонил.

Пример 1. Синтез пептида 1

Стадия (а): синтез защищенного линейного пептида-предшественника. Линейный пептид-предшественник имеет следующую структуру: Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂.

Проводили сборку пептидильной смолы H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr(Me,Me pro)-Clu(OtBu)-Cly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-полимер на пептидном синтезаторе 433А от Applied Biosystems с использованием Fmoc-химии, начиная с 0,1 ммоль смолы Rink Amide Novagel. На стадиях сочетания использовали избыток (1 ммоль) предварительно активированных аминокислот (используя HBTU). В эту последовательность встраивали Glu-Thr-псевдопролин (Novabiochem 05-20-1122). Смолу переносили в аппарат с азотным барботированием и обрабатывали раствором уксусного ангидрида (1 ммоль) и NMM (1 ммоль) в DCM (5 мл) в течение 60 мин. Раствор

ангидрида удаляли фильтрованием, смолу промывали DCM и сушили в токе азота.

Одновременное удаление защитных групп боковых цепей и отщепление пептида от смолы осуществляли в TFA (10 мл), содержащей 2,5% TIS, 2,5% 4-тиокрезола и 2,5% воды в течение 2 часов и 30 мин. Смолу удаляли фильтрованием, TFA удаляли в вакууме и к остатку добавляли диэтиловый эфир. Образовавшийся осадок промывали диэтиловым эфиром и сушили на воздухе, что позволило получить 264 мг неочищенного пептида.

Очистка препаративной HPLC (градиент: 20-30% В в течение 40 мин, где А=H₂O/0,1% TFA и В=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 10 мл/мин, колонка: C18 (2) (5 мкм; 250×21,20 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 30 мин) неочищенного пептида позволила получить 100 мг чистого линейного предшественника пептида 1. Чистый продукт анализировали посредством аналитической HPLC (градиент: 10-40% В в течение 10 мин, где А=H₂O/0,1% TFA и В=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 0,3 мл/мин, колонка: C18 (2) (3 мкм; 50×2 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 6,54 мин). Снятие дополнительной характеристики продукта осуществляли с использованием масс-спектрометрии с электрораспылением (MН₂²⁺, рассчитано: 1464,6; MН₂²⁺, обнаружено: 1465,1).

Стадия (б): образование моноциклического дисульфидного мостика Cys4-16
Cys4-16; Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂.

Линейный предшественник со стадии (а) (100 мг) растворяли в смеси 5% DMSO/вода (200 мл) и pH раствора доводили до 6, используя аммиак. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 суток. Затем pH раствора доводили до 2, используя TFA, и большую часть растворителя удаляли выпариванием в вакууме. Для очистки продукта остаток (40 мл) порциями вводили в колонку для препаративной HPLC.

Очистка препаративной HPLC (градиент: 0% В в течение 10 мин, затем 0-40% В в течение 40 мин, где А=H₂O/0,1% TFA и В=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 10 мл/мин, колонка: C18 (2) (5 мкм; 250×21,20 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 44 мин) остатка позволила получить 72 мг чистого моноциклического предшественника соединения 1.

Чистый продукт (в виде смеси изомеров P1-P33) анализировали посредством аналитической HPLC (градиент: 10-40% В в течение 10 мин, где А=H₂O/0,1% TFA и В=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 0,3 мл/мин, колонка: C18 (2) (3 мкм; 50×2 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 5,37 мин (P1); 5,61 мин (P2); 6,05 мин (P3)). Снятие дополнительной характеристики продукта осуществляли с использованием масс-спектрометрии с электрораспылением (MН₂²⁺, рассчитано: 1463,6; MН₂²⁺, обнаружено: 1464,1 (P1); 1464,4 (P2); 1464,3 (P3)).

Стадия (в): образование второго дисульфидного мостика Cys6-14 (пептид 1)

Моноциклический предшественник со стадии (б) (72 мг) растворяли в смеси 75% АсОН/вода (72 мл) в защитной среде азота. Добавляли 1 М HCl (7,2 мл) и 0,05 М I₂ в АсОН (4,8 мл) в указанном порядке и смесь перемешивали в течение 45 мин. Добавляли 1 М аскорбиновую кислоту (1 мл), что делало смесь бесцветной. Большую часть растворителей выпаривали в вакууме, остаток (18 мл) разбавляли смесью вода/0,1% TFA (4 мл) и продукт очищали, используя препаративную HPLC.

Очистка препаративной HPLC (градиент: 0% В в течение 10 мин, затем 20-30% В в

течение 40 мин, где A=H₂O/0,1% TFA и B=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 10 мл/мин, колонка: C18 (2) (5 мкм; 250×21,20 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 43-53 мин) остатка позволила получить 52 мг чистого пептида 1.

Чистый продукт анализировали посредством аналитической HPLC (градиент: 10-40% B в течение 10 мин, где A=H₂O/0,1% TFA и B=ACN/0,1% TFA, скорость потока: 0,3 мл/мин, колонка: C18 (2) (3 мкм; 50×2 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм, время удерживания продукта: 6,54 мин). Снятие дополнительной характеристики продукта осуществляли с использованием масс-спектрометрии с электрораспылением (MН₂²⁺, рассчитано: 1391,5; MН₂²⁺, обнаружено: 1392,5).

Пример 2. Синтез соединения 1

(Вос-Аминоокси)уксусную кислоту (Sigma-Aldrich; 138 мг; 0,72 ммоль), EDC (138 мг; 0,72 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (83 мг; 0,72 ммоль) растворяли в DMF (1 мл).

Раствор встряхивали в течение 25 мин и затем добавляли к раствору пептида 1 (1,0 г; 0,36 ммоль) в DMF (5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 мин. Затем добавляли симметричный коллидин (239 мкл; 1,80 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (5 мл) и продукт очищали препаративной RP-HPLC (обращенно-фазовой HPLC).

Условия HPLC: система Prep 4000 от Waters, растворитель A=H₂O/0,1% TFA, а растворитель B=ACN/0,1% TFA; градиент: 20-40% B в течение 60 мин; скорость потока: 50 мл/мин, колонка: C18 (2) (10 мкм; 250×50 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм. Выход очищенного соединения 1: 690 мг (65%). m/z обнаружено: 1478,4; MН₂²⁺ рассчитано: 1478,1.

Пример 3. Синтез соединения 3A

Стадия (а): получение N-(4-фторбензилиден)аминооксиуксусной кислоты

(Вос-Аминоокси)уксусную кислоту (96 мг; 0,50 ммоль) и 4-фторбензальдегид (53 мкл; 0,50 ммоль) растворяли в муравьиной кислоте (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 135 мин. Затем реакционную смесь разбавляли смесью 20% АОМ вода/0,1% TFA (7 мл) и продукт очищали полупрепаративной RP-HPLC.

Условия HPLC: система Beckman Gold; растворитель A=H₂O/0,1% TFA, а растворитель B=ACN/0,1% TFA; градиент: 25-35% B в течение 40 мин; скорость потока: 10 мл/мин, колонка: C18 (2) (5 мкм; 250×21,2 мм) от Phenomenex Luna, детекция: УФ 214 нм. Выход 92 мг (93%).

Стадия (б): получение соединения 3A

N-(4-Фторбензилиден)аминооксиуксусную кислоту (со стадии (а); 43 мг; 0,22 ммоль) и РуВОР (112 мг; 0,22 ммоль) растворяли в DMF (2 мл). Добавляли раствор DIPEA (157 мкл; 0,90 ммоль) в DMF (10 мл) и смесь встряхивали в течение 1 мин. Затем этот раствор добавляли к раствору пептида 1 (500 мг; 0,18 ммоль) в DMF (10 мл) и реакционную смесь встряхивали в течение 30 мин. Затем реакционную смесь разбавляли водой (20 мл) и продукт очищали препаративной HPLC.

Условия HPLC такие же, как в Примере 2, за исключением следующего: растворитель A=H₂O/0,1% ацетата аммония, а растворитель B=ACN. Выход 291 мг (55%) чистого вещества, m/z обнаружено: 988,6; MН₃³⁺ рассчитано: 987,7.

Пример 4. Синтез соединения 3B из соединения 1

Стадия (а): удаление защиты с соединения 1 с получением соединения 2

Соединение 1 (7 мг; 2,37 мкМ) в реакционном флаконе емкостью 5 мл обрабатывали водой (10 мкл) и трифторуксусной кислотой (190 мкл) и затем погружали в герметично закрытом флаконе в ультразвуковую баню на 10 минут. Водную TFA далее удаляли в вакууме (приблизительно 30 мин), остаток повторно разводили в цитратном буфере (pH 2,6; 1,7 мл) и вносили в кассету автоматического синтезатора (FastLab™, GE Healthcare Ltd) в положение 14.

Стадия (б): синтез и очистка ^{18}F -бензальдегида

^{18}F -Фторид получали на циклотроне PETtrace от GEMS (General Electric Medical

Systems) с использованием мишени из серебра в ядерной реакции $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$.

Использовали мишени общим объемом 1,5-3,5 мл. Радиоактивный фторид захватывали на картридже QMA от Waters (предварительно обработанном карбонатом) и элюировали раствором криптофикса_{2.2.2} (Kryptofix_{2.2.2}) (4 мг; 10,7 мкМ) и карбоната калия (0,56 мг; 4,1 мкМ) в воде (80 мкл) и ацетонитриле (320 мкл). Для подачи раствора из картриджа

QMA в реакционный сосуд использовали азот. ^{18}F -Фторид сушили в течение 9 минут при 120°C в стационарном токе азота и вакууме. К высушенному ^{18}F -фториду добавляли трифлат триметиламмоний-бензальдегида (Нака et al., J. Lab. Сотр. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)) (3,3 мг; 10,5 мкМ) в диметилсульфоксиде (1,1 мл) и смесь нагревали при 105°C в течение 7 минут с получением 4- ^{18}F -фторбензальдегида. Эффективность введения метки составляла $69 \pm 3\%$ с коррекцией распада.

Затем неочищенную содержащую метку смесь разбавляли раствором гидроксида аммония и вносили в SPE-картридж MCX+(предварительно обработанный водой, как часть последовательности работ на FASTlab. Картридж промывали водой, сушили газообразным азотом, после чего 4- ^{18}F -фторбензальдегид элюировали обратно в реакционный сосуд в этаноле (1 мл). Приблизительно 13% (с коррекцией распада) ^{18}F -фторбензальдегида осталось захвачено в картридже.

Стадия (в): конденсация альдегида с аминокси-производным (соединением 2)

Соединение 2 (5 мг; 1,8 мкмоль) переносили в реакционный сосуд FASTlab перед элюированием в него 4- ^{18}F -фторбензальдегида из картриджа MCX+. Затем смесь нагревали при 70°C в течение 17 минут. Данные аналитической HPLC подтвердили, что RCP продукта - соединения 3В составила $63 \pm 9\%$.

Неочищенную реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и наносили на колонку для препаративной HPLC. Использование системы растворителей 10 мМ ацетат аммония/ацетонитрил позволило полностью разделить 3 вероятных радиоактивных компонента неочищенной реакционной смеси, а именно, ^{18}F -фторид ($T_R=0,5$ мин), ^{18}F -соединение 3В ($T_R=6$ мин) и 4- ^{18}F -фторбензальдегид ($T_R=9$ мин). Выход радиоактивного материала из системы HPLC был удовлетворительным с эффективностью извлечения 97%. Очищенный продукт получали, собирая фракции с временем удерживания около 6 мин.

Пример 5. Отделение ^{18}F -меченого с-Met-связывающего циклического пептида от немеченого пептида с использованием HPLC

Соединение 3А получали в соответствии с Примером 3.

(1) Условия аналитической HPLC

Колонка:

Водная подвижная фаза А:

Органическая подвижная фаза В:

XBridge Shield RP 18 (4,6×50) мм; 2,5 мкм.

10 мМ NH₄Ac (буфер) pH прил. 6,8.

ацетонитрил.

Температура колонки:

25°C.

Скорость потока:

1,2 мл/мин.

Градиент:

5	Минуты	0	1	16	19	22	22,1	26
	% В	20	20	40	100	100	20	20

(2) Условия препаративной HPLC

10	Колонка:	XBridge Shield RP 18 (10*100) мм, 5 мкм.						
	Водная подвижная фаза А:	10 mM NH ₄ Ac (буфер) pH прил. 6,8.						
	Органическая подвижная фаза В:	этанол (90%), подвижная фаза А (10%).						
	Температура колонки:	25°C.						
	Скорость потока:	4 мл/мин.						
	Градиент:							
	Минуты	0	1	16	20	25	26	
15	% В	15	15	40	100	100	15	

(3) Результаты аналитической и препаративной HPLC

Соединение	Аналитическая HPLC	Препаративная HPLC
	Время удерживания (минуты)	Время удерживания (минуты)
Гидрохлорид анилина	1,8	3
20 Фторбензальдегид	4,3	13
Соединение 2	4,8	не определено
Пептид 1	5,1	не определено
Соединение 3А	8,8	19

Пример 6. Биораспределение ¹⁸F-меченого с-Met-связывающего пептида (соединения 3В) в опухоленесущих бестимусных мышах

Самцов бестимусных мышей CD-1 (прибл. 20 г) размещали в отдельных вентилируемых клетках со свободным доступом к еде и воде. Клетки HT-29 (АТСС, №по каталогу НТВ-38) выращивали в среде Маккоя 5а (Sigma, №M8403), дополненной 10%-ной фетальной сывороткой теленка и пенициллином/стрептомицином. Клетки разделяли 1:3 два раза в неделю при конфлюентности 70-80%, используя 0,25%-ный трипсин, и инкубировали в 5% CO₂ при 37°C. Мышам под газовой анестезией (изофлураном) легкой степени посредством подкожной (п/к) инъекции в одно место (область загривка) вводили суспензию клеток HT-29 с номинальной дозой 10⁶ клеток на одну инъекцию объемом 100 мкл, используя иглу с тонким каналом (калибра 25 G). После этого опухольям давали возможность расти в течение 20 суток или до достижения объема по меньшей мере 200 мм³ (для включения в данное исследование).

Спустя 20 суток роста животным вводили соединение 3В (0,1 мл; 1-5 МБк/животное) в виде внутривенной болюс-инъекции через хвостовую вену. Через различные интервалы времени после инъекции животных подвергали эвтаназии, вскрывали и извлекали органы и ткани, упомянутые ниже.

Захват опухолью составил 2,3% ВД/г через 2 минуты, достигал максимума через 30 минут (3,8% ВД/г), затем уменьшался с течением времени до 1,9% ВД/г через 120 мин после инъекции. Общее удержание внутри опухоли составило 83%. Наблюдали умеренно быстрое выведение из крови с течением времени (в первые 2 минуты в крови содержалось 9,2% ВД/г с уменьшением до 0,81% ВД/г через 120 мин после инъекции). В важной расположенной в глубине ткани (например, легких и печени) наблюдали такой же профиль выведения во времени, как и из крови, с захватом, составляющим

через 120 мин после инъекции 1,1% ВД/г (печень) и 1,56% ВД/г (легкие).

Пример 7. Исследование блокирования рецептора соединением 3В в опухоленесущих бестимусных мышцах

Исследование из Примера 6 повторяли с совместным введением 100- и 1000-кратного избытка нерадиоактивного аналога - соединения 3А (на одно животное избыток составлял ~1,5 мкг и 15 мкг), при этом животных вскрывали через 120 минут после инъекции. Все животные в этом исследовании имели одинаковую массу тела (в диапазоне 25-30 г). Данные показали, что статистически достоверное уменьшение ($p < 0,01$) захвата опухолью соединения 3В достигалось при 1000-кратном избытке немеченого пептида (захват опухолью НТ-29 уменьшался с 1,9 до 1,1% ВД/г; уменьшение на 40%).

Пример 8. РЕТ - визуализация соединения 3В на приматах

Биораспределение соединения 3В для трех самок яванских макак измеряли с использованием РЕТ. В каждом случае выполняли две инъекции радиоактивного индикатора:

(а) только радиоактивного индикатора (соединения 3В, 3 МБк/кг) (определение базовой линии);

(б) радиоактивного индикатора (9 МБк/кг) с совместным введением соединения 3А (0,15 мг/кг) (исследование блокирования) через четыре часа после инъекции для определения базовой линии.

Радиоактивный индикатор вводили инъекцией в виде болюс-дозы в объеме 1-3 мл, затем 1 мл физиологического раствора.

Образцы крови (0,2 мл) для определения радиоактивности отбирали через интервалы времени, начиная от 210 минут после введения. В динамических исследованиях были выбраны представляющие интерес участки в кости, сердце, почке, легком, печени и мышце. В исследованиях всего организма были выбраны представляющие интерес участки в кости, головном мозге, толстой кишке, сердце, почке, легком, печени, мышце, поджелудочной железе, тонкой кишке, селезенке и мочевом пузыре. Получали данные зависимости активности от времени, выраженные в виде стандартизированного уровня захвата (SUV).

Специфическое связывание (~40%) наблюдали в печени макак-резус *in vitro*, используя автордиографию замороженных срезов. В мышце макак-резус не наблюдали никакого специфического связывания. Исследования *in vivo* на яванском макаке показали наличие быстрого захвата печенью, который уменьшался на >40% после совместного введения с соединением 3А (0,15 мг/кг). Никакого специфического связывания в мышце *in vivo* не наблюдали.

Пример 9. Влияние циклодекстрина на биораспределение соединения 3В

Проводили сравнение биораспределения соединения 3В и соединения 3В, приготовленного вместе с солюбилизатором гидроксипропил-β-циклодекстрином (HPCD). Никаких существенных различий обнаружено не было.

Пример 10. Полностью автоматизированный синтез соединения 3В

Синтез, аналогичный Примеру 4, проводили, используя соединение 2, растворенное в буфере или в растворе анилина, и внося его в кассету FastLab для незамедлительного применения.

В приведенной ниже Таблице обобщено количество каждого из основных меченных радиоактивной меткой компонентов, рассчитанное на основании радиохимической чистоты по данным аналитической HPLC.

	Продукт	Соединение 1 как предшественник	Соединение 2 как предшественник
--	---------	---------------------------------	---------------------------------

T=0 мин	Соединение 3В	63±9%	75±3%
	[¹⁸ F]-Фторбензальдегид	28±15%	20±3%
T=60 мин	Соединение 3В	76±20%	92±2%
	[¹⁸ F]-Фторбензальдегид	20±15%	2±1%

Пример 11. Автоматизированный синтез соединения 3В с использованием SPE-очистки

Синтез соединения из Примера 4 осуществляли, используя автоматический синтезатор - прибор FastLab™ (GE Healthcare Ltd). Кассета была оснащена реагентами, шприцами и SPE-картриджами, как показано на Фиг.1.

Все SPE-картриджи: QMA (четвертичный метиламмоний; обработка воды), MCX+ (катионообменник смешанного действия) и C2 (низкая гидрофобность) были получены от Waters.

При выполнении последовательности работ на FASTlab картриджи (один за другим) подвергали обработке этанолом. Непосредственно перед использованием картриджи заполняли разбавленной (0,2%-ной) фосфорной кислотой. Неочищенную реакционную смесь разбавляли 1%-ной фосфорной кислотой и вносили на SPE. SPE-картриджи промывали водой, после чего продукт элюировали в 6 мл воды (80% этанола), и радиохимическую чистоту (RCP) анализировали, используя аналитическую HPLC.

Ниже приведены результаты из расчета на исходное количество использованного ¹⁸F-фторида:

Исходная активность (МБк)	Выход (%) по завершении синтеза	RCP
493	21	>99%
750	25	>99%
1000	26	>99%
49000	19	94%
61000	18	98%
67400	21	96%

Пример 12. Получение и лиофилизация предшественника

Пептид-предшественник - соединение 2 (2,5 или 5 мг) смешивали с буфером для приготовления композиций (дигидратом гидрофосфата динатрия и моногидратом лимонной кислоты, pH 2,8) и перемешивали до получения гомогенной суспензии. В каждый из флаконов (13 мм) автоматического синтезатора - прибора FastLab™ (GE Healthcare Ltd) с затворами для лиофилизации вносили по 1 мл суспензии. Затем флаконы замораживали в установке для лиофилизации и подвергали циклу лиофилизации продолжительностью 4 суток.

Во всех флаконах, содержащих пептид, получали лиофилизированные таблетки, удовлетворяющие требованиям. Было установлено, что данный лиофилизированный предшественник растворяется намного быстрее, чем диспергированное в сухом состоянии соединение 2.

Пример 13. Влияние pH на растворимость

Соединение 3В получали на синтезаторе FASTlab™ и содержащий продукт элюат (~6 мл) собирали во флакон, содержащий 2 мл буфера для приготовления композиций (рАВА, цитратный буфер, pH 7). Получали мутный раствор. Этот раствор (8 мл) легко фильтровался через фильтр предварительной очистки (фильтр Pall (25 мм) с мембраной Supor (0,2 мкм) с гидрофобным отталкивающим слоем, № по каталогу 6124211) с получением прозрачного раствора.

Профильтрованный раствор разделяли на 4 образца по 2 мл и pH в этих 4 образцах

подводили фосфатом (твердым, чтобы не изменить объема) следующим образом:

флакон 1	pH 7,5 (исходный раствор, без подведения).
флакон 2	pH 6,1.
флакон 3	3
флакон 4	4

Все образцы хранили в темноте при температуре окружающей среды. Для оценки возможной агрегации/выпадения в осадок за этими 4 образцами следили, используя статическое светорассеяние, в течение 28 суток. Было обнаружено следующее:

- при pH 6,1 визуально наблюдали выпадение в осадок на 10-е сутки;
- не обнаружено никаких признаков агрегации при pH $\geq 7,5$ через 28 суток.

Пример 14. Исследования на людях

Визуализацию с использованием соединения 3В изучали на 6 пациентах-людях, у которых ранее была диагностирована сквамозно-клеточная карцинома головы и шеи. Данное соединение было хорошо переносимым (без побочных эффектов). У 5 из 6 пациентов отмечали умеренную/высокую степень захвата радиоактивного индикатора, а у 1 пациента - низкую (аналогично противоположной стороне). Эти данные согласуются с сообщениями в литературе о том, что у 80% таких пациентов имеется сверхэкспрессия c-Met.

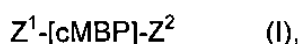
Формула изобретения

1. Композиция визуализирующего агента для визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии, содержащая:

(1) меченый радиоактивным ^{18}F cMet-связывающий циклический пептид;

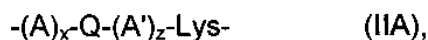
(2) немеченый cMet-связывающий циклический пептид;

где немеченый cMBP-пептид присутствует в указанной композиции не более чем в 50-кратном молярном количестве по отношению к указанному ^{18}F -меченому cMBP-пептиду; и где указанный cMet-связывающий циклический пептид имеет одинаковую аминокислотную последовательность в (1) и (2) и представляет собой 18-30-мерный циклический пептид формулы I:



где

cMBP имеет формулу IIА:



где z равно целому числу величиной от 0 до 12, x равно целому числу, и сумма x и z равна от 0 до 12, и cMBP содержит только один остаток Lys;

и где Q представляет собой аминокислотную последовательность SEQ-1:



где X^1 представляет собой Asn, His или Tyr;

X^2 представляет собой Gly, Ser, Thr или Asn;

X^3 представляет собой Thr или Arg;

X^4 представляет собой Ala, Asp, Glu, Gly или Ser;

X^5 представляет собой Ser или Thr;

X^6 представляет собой Asp или Glu;

и все Cys^{a-d} представляют собой остатки цистеина, так что остатки a и b, а также c и d циклизованы с образованием двух отдельных дисульфидных связей;

A и A' независимо представляют собой любую аминокислоту, отличную от Cys;

⁵ Z¹ присоединен к N-концу сМВР и представляет собой ацильную группу формулы -(C=O)R^G, где R^G выбран из C₁₋₆алкила;

Z² присоединен к эпсилон-аминогруппе карбоксиконцевого Lys сМВР с образованием первичного амида;

¹⁰ где сMet-связывающий циклический пептид мечен посредством ¹⁸F по Z², который функционализирован группой аминокси.

2. Композиция визуализирующего агента по п. 1, где Q содержит аминокислотную последовательность SEQ-2 или SEQ-3:

Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

¹⁵ Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3).

3. Композиция визуализирующего агента по п. 1, где X³ представляет собой Arg.

4. Композиция визуализирующего агента по п. 1, где сМВР имеет аминокислотную последовательность (SEQ-7):

Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys.

²⁵ 5. Композиция визуализирующего агента по п. 1, где Z¹ представляет собой ацетил, а Z² представляет собой первичный амид.

6. Композиция визуализирующего агента по п. 1, которую поддерживают при pH 7,5 или выше и/или которая дополнительно содержит солилизатор.

7. Композиция визуализирующего агента по любому из пп. 1-6, дополнительно содержащая один или более радиопротекторов.

³⁰ 8. Фармацевтическая композиция для визуализации с использованием позитронно-эмиссионной томографии, содержащая композицию визуализирующего агента по любому из пп. 1-7 вместе с биосовместимым носителем, в стерильной форме, подходящей для введения млекопитающему.

³⁵ 9. Способ приготовления композиции меченого радиоактивным ¹⁸F сMet-связывающего циклического пептида по любому из пп. 1-7 или фармацевтической композиции по п. 8, включающий:

(1) предоставление предшественника, содержащего немеченый сMet-связывающий циклический пептид формулы I, как определено в п. 1, где остаток Lys сMet-связывающего циклического пептида функционализирован группой аминокси;

⁴⁰ (2) взаимодействие указанного предшественника либо:

(а) с ¹⁸F-меченым активированным сложным эфиром или с ¹⁸F-меченой карбоновой кислотой в присутствии активирующего агента с получением меченого радиоактивным ¹⁸F сMet-связывающего циклического пептида, конъюгированного через амидную связь по положению аминоксигруппы указанного функционализированного пептида; либо

⁴⁵ (б) с ¹⁸F-меченым альдегидом с получением меченого радиоактивным ¹⁸F сMet-связывающего циклического пептида, конъюгированного через оксимную простую эфирную связь по положению аминоксигруппы указанного функционализированного

пептида;

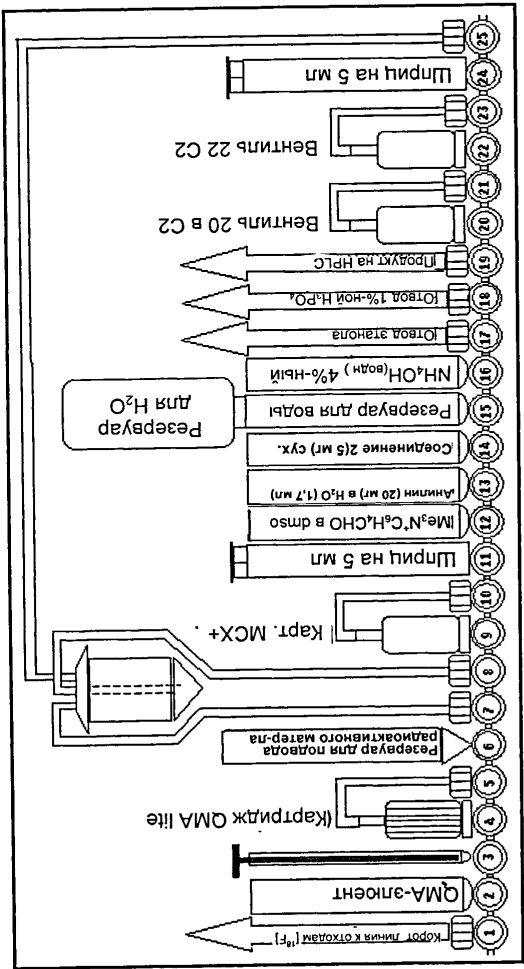
(3) хроматографическое разделение немеченого сMet-связывающего циклического пептида и меченого радиоактивным ^{18}F сMet-связывающего циклического пептида.

10. Способ по п. 9, при котором получают фармацевтическую композицию по п. 8 и указанный способ осуществляют с использованием прибора автоматический синтезатор.

11. Способ визуализации организма млекопитающего *in vivo* для получения изображений сайтов сверхэкспрессии или локализации сMet, включающий визуализацию указанного организма, в который предварительно введена композиция визуализирующего агента по любому из пп. 1-7 или фармацевтическая композиция по п. 8.

12. Способ визуализации по п. 11, где сайтом сверхэкспрессии или локализации с-Met является раковая опухоль или метастазы.

Фиг. 1. Конфигурация кассеты FastLab™ для Примера 11.



ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Джии Хелткер Лимитед
 <120> Композиции пептидных радиоактивных индикаторов
 <130> PZ1058 WO
 <160> 7
 <170> PatentIn версия 3.3

<210> 1
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (1)..(13)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (2)..(2)
 <223> N, H или Y

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (3)..(11)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (4)..(4)
 <223> G, S, T или N

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (8)..(8)
 <223> T или R

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (15)..(15)
 <223> A, D, E, G или S

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (16)..(16)
 <223> S или T

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (17)..(17)
 <223> D или E

<400> 1
 Cys Хаа Cys Хаа Gly Pro Pro Хаа Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Хаа Хаа
 1 5 10 15
 Хаа

<210> 2
 <211> 18
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

страница 1

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (2)..(14)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (3)..(3)
 <223> N, H или Y

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (4)..(12)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> G, S, T или N

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (9)..(9)
 <223> T или R

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (16)..(16)
 <223> A, D, E, G или S

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (17)..(17)
 <223> S или T

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (18)..(18)
 <223> D или E

<400> 2
 Ser Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 3
 <211> 22
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (4)..(16)

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (5)..(5)
 <223> N, H или Y

<220>
 <221> ДИСУЛЬФИД
 <222> (6)..(14)

<220>
 <221> ВАРИАНТ

страница 2

<222> (7)..(7)
 <223> G, S, T или N

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (11)..(11)
 <223> T или R

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (18)..(18)
 <223> A, D, E, G или S

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (19)..(19)
 <223> S или T

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (20)..(20)
 <223> D или E

<400> 3
 Ala Gly Ser Cys Хаа Cys Хаа Gly Pro Pro Хаа Phe Glu Cys Trp Cys
 1 5 10 15
 Tyr Хаа Хаа Хаа Gly Thr
 20

<210> 4
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<400> 4
 Gly Gly Gly Lys
 1

<210> 5
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<400> 5
 Gly Ser Gly Lys
 1

<210> 6
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<400> 6
 Gly Ser Gly Ser Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 26
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная

<220>
 <223> синтетический пептид

<220>
 <221> дисульфид
 <222> (4)..(16)

<220>
 <221> дисульфид
 <222> (6)..(14)

<400> 7
 Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys
 1 5 10 15
 Tyr Glu Thr Glu Gly Thr Gly Gly Gly Lys
 20 25