



(19) **RU**⁽¹¹⁾ **2 205 186**⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 7/00, 14/00, 14/78, A**
61 K 51/08, C 07 B 59/00, A 61 P
7/02

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000131699/04, 14.05.1999
(24) Дата начала действия патента: 14.05.1999
(30) Приоритет: 15.05.1998 EP 98303872.0
(46) Дата публикации: 27.05.2003
(56) Ссылки: WO 89/00051 A, 12.01.1989. RU 94046010 A1, 20.10.1996. WO 91/16931 A, 14.11.1991. US 4041023 A, 09.08.1977.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 15.12.2000
(86) Заявка РСТ: GB 99/01550 (14.05.1999)
(87) Публикация РСТ: WO 99/60018 (25.11.1999)
(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул.Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", Пат.пов. А.П.Агурееву, рег.№ 0590

(71) Заявитель: АМЕРШАМ ПЛК (GB)
(72) Изобретатель: СТОРЕЙ Энтони Имон (GB), МЕНДИСАБАЛ Мариви (GB), ЧЭМПИОН Сьюзан (GB), ГИБСОН Алекс (GB), ГИЛБЕРТ Бенедикт (GB), УИЛСОН Иан Эндрю (GB), КНОКС Питер (GB)
(73) Патентообладатель: АМЕРШАМ ПЛК (GB)
(74) Патентный поверенный: Агуреев Александр Павлович

(54) МЕЧЕННЫЕ АНАЛОГИ ГЛУТАМИНА И ЛИЗИНА

(57) Изобретение относится к соединениям формулы $Y-(CR_2)_n-X-NHJ$, где X представляет собой C=O или CR_2 ; n является целым числом, имеющим значение от 1 до 6; Y представляет собой $L(A)_m-$ или R^1R^2CR- , где L - металлокомплексобразующий агент, A представляет собой $-CR_2-$, $-NR_2CO-$, $-CONR-$ или полиалкиленгликоль; m является целым числом, имеющим значение от 0 до 10; где один из R^1 и R^2 является $-NH(B)_pZ^1$ и другой является $-CO(B)_qZ^2$, где p и q являются целыми числами, имеющими значение от 0 до 20, и каждый B независимо выбирают из Q или остатка аминокислоты, где Q является циклическим пептидом; Z^1 и Z^2 - защитные группы, которые являются биосовместимыми группами, которые ингибируют или подавляют метаболизм пептида in vivo; J и каждую R-группу независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила или C_{1-4} алкоксиалкила; при

условии, что (i) общее число остатков аминокислот в R^1 и R^2 группах не превышает 20; (ii) если X является CR_2 , то Y является $-CRR^1R^2$, и Z^2 является металлокомплексобразующим агентом; (iii) если Y является $-CRR^1R^2$, то по крайней мере один из R^1 и R^2 несет, по крайней мере, одну детектируемую частицу. Соединения действуют как субстраты для фермента фактора XIIIa. Использование защитных групп обеспечивает получение соединений, слабо подверженных метаболизму in vivo. Соединения являются полезными для диагностики тромбозов, эмболии, атеросклероза, инфекций или раковых опухолей. Описаны также металлокомплекс, включающий соединения по изобретению, набор для его получения, препарат для введения человеку и пептидный фрагмент, включающий металлокомплексобразующий агент. 5 с. и 13 з.п. ф-лы, 6 табл., 2 ил.

RU 2 205 186 C2

RU 2 205 186 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 205 186** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 7/00, 14/00, 14/78, A 61 K 51/08, C 07 B 59/00, A 61 P 7/02**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000131699/04 , 14.05.1999

(24) Effective date for property rights: 14.05.1999

(30) Priority: 15.05.1998 EP 98303872.0

(46) Date of publication: 27.05.2003

(85) Commencement of national phase: 15.12.2000

(86) PCT application:
GB 99/01550 (14.05.1999)

(87) PCT publication:
WO 99/60018 (25.11.1999)

(98) Mail address:
103735, Moskva, ul.II'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", Pat.pov. A.P.Agureevu, reg.№ 0590

(71) Applicant:
AMERShAM PLK (GB)

(72) Inventor: STOREJ Ehntoni Imon (GB),
MENDISABAL Marivi (GB), ChEhMPION S'juzan
(GB), GIBSON Aleks (GB), GILBERT Benedikt
(GB), UILSON Ian Ehndrju (GB), KNOKS Piter
(GB)

(73) Proprietor:
AMERShAM PLK (GB)

(74) Representative:
Agureev Aleksandr Pavlovich

(54) **LABELED ANALOGUES OF GLUTAMINE AND LYSINE**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, biochemistry, peptides, medicine. SUBSTANCE: invention relates to compounds of the formula: $Y-(CR_2)_n-X-NHJ$ where X represents C=O or CR_2 ; n is a whole number from 1 to 6; Y represents $L(A)_m-$ or R^1r^2CR- where L is metal-chelating agent; A represents $-CR_2-$, $-NR_2-$, $-CONR-$ or polyalkylene glycol; m is a whole number with value from 0 to 10 where one of R^1 and R^2 is $-NH(B)_pZ^1$ and another is $-CO(B)_qZ^2$ where p and q are whole numbers with values from 0 to 20 each; and each B is taken independently among Q or amino acid residue where Q is cyclic peptide; Z^1 and Z^2 are protective groups that are biocompatible groups that inhibit or suppress metabolism of peptide in vivo; J and each R-group is taken independently among hydrogen atom, C_{1-4} -alkyl or

C_{1-4} -alkoxy-alkyl under condition that: (1) the general number of amino acids residues in groups R^1 and R^2 doesn't exceed 20; (ii) if X means CR_2 then Y is $-CRR^1R^2$ and Z^2 is metal-chelating agent; (iii) if Y means $-CRR^1R^2$ then at least one of R^1 and R^2 carries at least one detectable particle. Compounds act as substrates for enzyme factor XIIIa. The use of protective groups provides synthesis of compounds that are slowly metabolized in vivo. Compounds are useful for diagnosis of thrombosis, embolism, atherosclerosis, infections and cancer tumors. Invention describes also metal-chelate comprising compounds by this invention, set for its preparing, preparation for administration in human and peptide fragment comprising metal-chelating agent. EFFECT: valuable medicinal properties of compounds. 18 cl, 6 tbl, 2 dwg

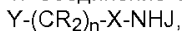
RU 2 205 186 C2

RU 2 205 186 C2

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть). ТС

Формула изобретения:

1. Соединение формулы



где X представляет собой C=O или CR₂;

n является целым числом, имеющим значение от 1 до 6;

Y представляет собой L(A)_m или R¹R²CR-, где L

- металлокомплексообразующий агент, A представляет собой -CR₂-, -NRCO-, -CONR- или полиалкиленгликоль, m является целым числом, имеющим значение от 0 до 10, один из R¹ и R² является -NH(B)_pZ¹ и другой является -CO(B)_qZ², где p и q являются целыми числами, имеющими значение от 0 до 20, каждый B независимо выбирают из Q или остатка аминокислоты, где Q является циклическим пептидом, Z¹ и Z² - защитные группы, которые являются биосовместимыми группами, которые ингибируют или подавляют метаболизм пептида in vivo, J и каждую R-группу независимо выбирают из H, C₁₋₄ алкила, C₁₋₄ алкоксиалкила;

при условии, что (i) общее число остатков аминокислот в R¹ и R² группах не превышает 20, (ii) если X является CR₂, то Y является -CRR¹R², и Z² является металлокомплексообразующим агентом, (iii) если Y является -CRR¹R², то, по крайней мере, один из R¹ и R² несет, по крайней мере, одну детектируемую частицу.

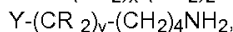
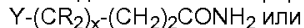
2. Соединения по п. 1, где R¹ или R² включают один или более пептидных фрагментов α₂-антиплазмина, фибронектина, β-казеина, столбнячных белков, амилоида, траппина и остатков полиглутамина, причем указанные пептидные фрагменты содержат, по крайней мере, три аминокислотных остатка.

3. Соединение по п. 2, где пептидный фрагмент является фрагментом α₂-антиплазмина.

4. Соединение по п. 3, где аминокислота в положении 2 N-конца пептида является глутамином.

5. Соединение по пп. 1-4, где J является H.

6. Соединение по п. 5 формулы



5 где x является целым числом, имеющим значение от 0 до 4,

y является целым числом, имеющим значение от 0 до 3.

7. Соединение по любому из пп. 1-6, где Y является -CRR¹R².

10 8. Соединение по любому из пп. 1-7, где, по крайней мере, один из Z¹ и Z² является металлокомплексообразующим агентом.

15 9. Соединение по п. 8, где Z¹ является металлокомплексообразующим агентом, и Z² не является металлокомплексообразующим агентом.

10. Соединение по любому из пп. 1-9 для использования в диагностике мест тромбоза или эмболии.

20 11. Металлокомплекс соединений по п. 8 или 9.

12. Металлокомплекс по п. 11, где металлом является радиоактивный металл.

13. Радиометаллокомплекс по п. 12, где радиоактивным металлом является ^{99m}Tc.

25 14. Металлокомплекс по любому из пп. 11-13 для использования в диагностике мест тромбоза или эмболии.

30 15. Препарат для введения человеку и действующий как субстрат для фермента фактора XIIIa, содержащий соединение по любому из пп. 1-9 или металлокомплекс по пп. 11-13.

16. Набор, содержащий соединение по любому из пп. 1-9, полезный для получения металлокомплекса по любому из пп. 11-13.

35 17. Пептидный фрагмент α₂-антиплазмина, фибронектина, β-казеина, столбнячных белков, амилоида, траппина и полиглутамина, причем указанный пептидный фрагмент содержит, по крайней мере, 3-20 аминокислотных остатка и переносит концевой металлокомплексообразующий агент.

40 18. Пептидный фрагмент по п. 17, в котором указанный металлокомплексообразующий агент находится при C-конце.

45

50

55

60

Настоящее изобретение относится к классу соединений, полезных в диагностике мест венозных и артериальных тромбозов, эмболии или инфекций, содержащим их фармацевтическим композициям, их использованию в диагностике заболеваний и способам их получения.

Предшествующие подходы к радиоактивным фармацевтическим препаратам для визуализации тромбов включают использование радиоактивно меченых фибриногена или плазминогена; радиоактивно меченого фрагмента E1 фибрина человека; радиоактивно меченых активаторов плазминогена, таких как тканевый активатор плазминогена (t-PA) и меченых антител к анти-фибрину. Были также описаны методы, основанные на детекции мест аккумуляции тромбоцитов, такие как введение радиоактивно меченых тромбоцитов (например, с использованием оксина ^{111}In) или радиоактивно меченых анти-тромбоцитарных антител. Более поздние усилия были сфокусированы на радиоактивно меченых пептидах или полипептидах, таких как мотив клеточной адгезии RGD (где R, G и D – стандартные аббревиатуры для аминокислот аргинина, глицина и аспарагина, соответственно), фактор тромбоцитов 4 или его фрагменты, или антикоагулянтные пептиды, такие как дезинтегрины.

Фактор XIII – это гликопротеин плазмы, который присутствует в крови и некоторых других тканях в каталитически неактивной форме (в форме зимогена). Фактор XIII трансформируется в свою активную форму Фактор XIIIa под действием тромбина в присутствии ионов кальция. Фактор XIIIa также известен как трансглутаминаза плазмы, фибринолигаза или фибрин-стабилизирующий фактор. Заключительным шагом в образовании кровяного тромба является ковалентное поперечное сшивание фибрина, образованного протеолитическим расщеплением фибриногена под действием тромбина. Молекулы фибрина выстраиваются в ряд, и фермент Фактор XIIIa катализирует ковалентное поперечное сшивание NH_2 и CONH_2 групп остатков лизина и глутамина, соответственно, придавая кровяному тромбу структурную жесткость. Поперечное сшивание стабилизирует структуру фибринового тромба и придает ему устойчивость к фибринолизу. Образование поперечной сшивки является важным аспектом нормального свертывания крови и заживления ран, а также патологических состояний, таких как тромбоз. Так как

атеротромботические инфаркты головного мозга являются обычным подтипом инсульта, субстраты Фактора XIIIa могут сделать возможной диагностику инсультов. Они могут быть также вовлечены в атеросклероз, воспалительные процессы, рост опухолей и образование метастазов. В WO 91/16931 раскрыто, что радиоактивно меченые аналоги Фактора XIII (в которых активный участок был дезактивирован заменой аминокислот) полезны в качестве радиоактивных фармацевтических препаратов для визуализации тромбов.

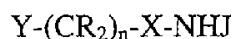
Известно также, что Фактор XIIIa катализирует внедрение низкомолекулярных аминов в γ -глутаминовые участки белков. Подобным образом Фактор XIIIa также катализирует внедрение низкомолекулярных аналогов глутамина в остатки лизина. Таким образом, такие низкомолекулярные амины (или аналоги глутамина) действуют как конкурентные ингибиторы лизин/глутаминового поперечного сшивания белков, индуцируемого Фактором XIIIa. Был описан ряд синтетических аминов, являющихся конкурентными ингибиторами проникновения меченого путресцина (1,4-диаминобутана) в N,N'-диметилказеин, катализируемого трансглутаминазой печени свиньи [L. Lorand *et al.*, *Biochem.*, 18, 1756 (1979)].

В WO 89/00051 (Cytrx Biopool Ltd.) заявлен способ позиционирования отложений фибрина, использующий меченое соединение, ковалентно присоединенное к фибрину под действием Фактора XIIIa. Установлено, что связывающееся с фибрином соединение – это "любой пептид, являющийся субстратом для фермента крови, общеизвестного как Фактор XIIIa." Сообщалось, что предпочтительными являются пептиды, включающие тетрапептидную последовательность -Asn-Gln-Glu-Gln- (или NQEQ в стандартных аббревиатурах для условного обозначения аминокислот). Также была раскрыта последовательность 12-звенного пептида начиная с NH₂ конца фермента α 2 антиплазмина: NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-OH, а также его синтетического аналога: NH₂-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Tyr-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-OH (обозначения NQEQVSPLTLTK и NQEQVSPYTLTK, соответственно). Последний был радиоактивно мечен изотопом иода ¹²⁵I, и было показано, что он внедряется в тромбы *in vitro*.

В настоящем изобретении было обнаружено, что синтетические аналоги лизина и глутамина, меченные подходящей детектируемой частицей, также могут действовать как субстраты для фермента Фактор XIIIa. Применение подходящих

защитных групп обеспечивает соединения, которые в меньшей степени подвержены метаболизму *in vivo*, в особенности под действием пептидаз, и, следовательно, являются более полезными агентами для позиционирования.

Настоящее изобретение обеспечивает следующие соединения:



где:

X представляет собой C=O или CR₂;

n является целым числом, имеющим значение от 1 до 6;

Y представляет собой L(A)_m- или R¹R²CR-, где L – металлокомплексобразующий агент, A представляет собой -CR₂-, -CR=CR-, -C=C-, -NRCO-, -CONR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, C₄₋₈ циклогетероалкиленовую группу, C₄₋₈ циклоалкиленовую группу, C₅₋₁₂ ариленовую группу, C₃₋₁₂ гетероариленовую группу или полиалкиленгликоль, полимолочную кислоту или остаток полигликолевой кислоты;

m является целым числом, имеющим значение от 0 до 10;

где один из R¹ и R² является -NH(B)_pZ¹ и другой является -CO(B)_qZ²,

где p и q являются целыми числами, имеющими значение от 0 до 45 и

каждый B независимо выбирают из Q или аминокислоты,

где Q является циклическим пептидом;

Z¹ и Z² - защитные группы;

J и каждую R-группу независимо выбирают из H, C₁₋₄ алкила, C₁₋₄ алкенила, C₁₋₄ алкинила, C₁₋₄ алкоксиалкила или C₁₋₄ гидроксиалкила;

при условии, что:

(i) общее число остатков аминокислот в R¹ и R² группах не превышает 45;

(ii) если X является CR₂, то Y является -CRR¹R², и Z² является металлокомплексобразующим агентом;

(iii) если Y является -CRR¹R², то по крайней мере один из R¹ и R² несет по крайней мере одну детектируемую частицу.

Настоящее изобретение включает также наборы для получения вышеуказанных соединений, меченных детектируемой частицей, и применение этих

и родственных соединений для диагностики и терапии тромбозов, эмболии, атеросклерозов, воспалений и рака.

Под термином "циклический пептид" подразумевается последовательность от 5 до 15 аминокислот, в которой две концевые аминокислоты связаны друг с другом ковалентной связью, которая может быть пептидной, дисульфидной, или синтетической непептидной связью, такой как тиоэфирная, фосфодизэфирная, дисилоксановая или уретановая.

Под термином "аминокислота" подразумевается L- или D-аминокислота, аналог аминокислоты или миметик аминокислоты, который может иметь природное происхождение или чисто синтетическое происхождение, и может быть оптически чистым, то есть единственным энантиомером и, следовательно, хиральным, или смесью энантиомеров: Аминокислоты настоящего изобретения предпочтительно являются оптически чистыми. Под термином "миметик аминокислоты" подразумеваются синтетические аналоги аминокислот природного происхождения, которые являются изостерами, то есть их строение имитирует пространственную или электронную структуру природных соединений. Такие изостеры хорошо известны специалистам в данной области, и включают, не ограничиваясь ими, депсипептиды, ретроинверсные пептиды, тиамиды, циклоалканы или 1,5-дизамещенные тетразолы [смотри M.Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)].

Под термином "защитная группа" подразумевается биологически совместимая группа, которая ингибирует или подавляет *in vivo* метаболизм пептида или аминокислоты на N- или C-конце. Подобные группы хорошо известны специалистам в данной области, и для N-конца подходящие защитные группы (Z^1) выбирают из следующих: ацетил, Boc (где Boc – *tert*-бутилоксикарбонил), Fmoc (где Fmoc - флуоренилметилоксикарбонил), бензилоксикарбонил, трифторацетил, аллилоксикарбонил, Dde [т.е. 1-(4,4-диметил-2,6-диоксициклогексиден)этил], Nrus (т.е. 3-нитро-2-пиридинсульфенил) или металлокомплексообразующая группа; для C-конца подходящие защитные группы (Z^2) выбирают из следующих: карбоксамид, *tert*-бутиловый эфир, бензиловый эфир, циклогексильный эфир, аминокислотный спирт или металлокомплексообразующая группа. Предпочтительной защитной группой является металлокомплексообразующая группа, наиболее предпочтительной является металлокомплексообразующая группа, связанная с металлом, т. е. металлокомплекс. C-концы пептидов особенно подвержены

расщеплению *in vivo* под действием карбоксипептидаз. Поэтому металлокомплексообразующую группу или металлокомплекс предпочтительно присоединяют к С-концу. Когда R^1 является $-NH(B)_{p-1}QZ^1$, или R^2 является $-CO(B)_{q-1}QZ^2$, тогда защитной группой может являться ковалентная связь, которая замыкает кольцо циклического пептида (Q).

"Детектируемая частица" – это частица, которая испускает сигнал или подходит для диагностической визуализации человеческого тела и может быть радиоактивным изотопом для радиофармацевтической визуализации или терапии, парамагнитным металлом или частицей для MRI контрастной визуализации, радионепроницаемой группой или металлом для рентгенолучевой контрастной визуализации, контрастирующим агентом для ультразвуковой газомикропузырьковой визуализации или подходящим красителем для детекции изображения, полученного при облучении внешним источником света. Предпочтительно, частицей для визуализации является ион металла, наиболее предпочтительно ион радиоактивного металла.

Когда Y является $-CRR^1R^2$, тогда предпочтительно один или оба R^1 и R^2 содержат один или более пептидных фрагментов α_2 -антиплазмина, фибронектина или бета-казеина, фибриногена или тромбоспондина. Такие пептидные фрагменты содержат по меньшей мере 3, и предпочтительно 4-20 аминокислотных остатков. Когда Y является $-CRR^1R^2$ и $-(CR_2)-X-NHJ$ является $-(CH_2)_4NH_2$ (т.е. аминокислотной боковой цепью лизина), тогда предпочтительно один или оба R^1 и R^2 содержат один или более таких пептидных фрагментов α_2 -антиплазмина, фибронектина или бета-казеина. Аминокислотные последовательности α_2 -антиплазмина, фибронектина, бета-казеина, фибриногена и тромбоспондина могут быть найдены в следующих источниках: предшественник α_2 -антиплазмина [M.Tone *et al.*, J.Biochem, 102, 1033, (1987)]; бета-казеин [L.Hansson *et al* , Gene, 139, 193, (1994)]; фибронектин [A.Gutman *et al*, FEBS Lett., 207, 145, (1996)]; предшественник тромбоспондина-1 [V.Dixit *et al* , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 5449, (1986)]; R.F.Doolittle, Ann. Rev. Biochem., 53, 195, (1984).

Предпочтительно берется аминокислотная последовательность N-конца:

- (i) α_2 -антиплазмина,

т. е. $\text{NH}_2\text{-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-OH}$ или ее варианты, в которых одна или более аминокислота были заменены, добавлены или удалены, например:

$\text{NH}_2\text{-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-OH}$,
 $\text{NH}_2\text{-Asn-Gln-Glu-Ala-Val-Ser-Pro-Leu-Thr-Leu-Thr-Leu-Leu-Lys-Gly-OH}$,
 $\text{NH}_2\text{-Asn-Gln-Glu-Gln-Val-Gly-OH}$; или

(ii) казеина,

т. е. $\text{Ac-Leu-Gly-Pro-Gly-Gln-Ser-Lys-Val-Ile-Gly}$.

Если соединение настоящего соединения является пептидом, т. е. Y является $\text{R}^1\text{R}^2\text{CR}-$, число аминокислотных остатков предпочтительно составляет от 2 до 30, наиболее предпочтительно от 3 до 20, и в особенности от 3 до 15.

Для предпочтительных соединений J равно H, т. е. они оканчиваются группой NH_2 . X предпочтительно представляет собой C=O , т. е. предпочтительными являются соединения, имеющие формулу $\text{Y-(CR}_2)_n\text{-CONH}_2$. Наиболее предпочтительными являются соединения, имеющие формулу $\text{Y-(CR}_2)_x\text{-(CH}_2)_2\text{CONH}_2$ или $\text{Y-(CR}_2)_y\text{-(CH}_2)_4\text{NH}_2$, где x является целым числом, имеющим значение от 0 до 4, а y является целым числом, имеющим значение от 0 до 3. Особенно предпочтительными являются соединения, имеющие такую же боковую цепь, как у глутамина, т. е. аналоги глутамина, имеющие формулу $\text{Y-(CR}_2)_x\text{-(CH}_2)_2\text{CONH}_2$.

Неметаллические радиоактивные изотопы, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, не ограничиваясь ими, следующие изотопы: радиоактивные изотопы иода, такие как ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , предпочтительно ^{123}I ; излучатели позитронов, такие как ^{18}F , ^{11}C или ^{57}Br и изотопы для терапии, например ^{211}At .

К соединениям настоящего изобретения, которые содержат металлокомплексобразующие агенты, предпочтительно присоединен только один тип молекулы для позиционирования, то есть $\text{-(CR}_2)_n\text{-X-NHJ}$ заместитель. В комплексообразующем агенте могут быть и другие заместители, но $\text{-(CR}_2)_n\text{-X-NHJ}$ заместитель в первую очередь считается ответственным за биолокализационные свойства. Металлокомплексы настоящего изобретения могут содержать один или более ионов металла, которые могут быть одинаковыми или различными. Таким образом, при определенных обстоятельствах полинуклеарные комплексы могут

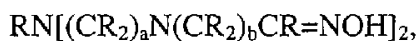
иметь преимущества, например, такое как присутствие некоторых кластеров металлов, имеющих суперпарамагнитные свойства, что делает полинуклеарные комплексы особенно полезными в качестве MRI контрастирующих агентов. Предпочтительные металлокомплексы настоящего изобретения включают только единичный ион металла. Если металл в металлокомплексе является радиоактивным металлом, он может быть или ислучателем позитронов (таким как ^{68}Ga или ^{64}Cu), или γ -излучателем (таким как $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$ или ^{67}Ga). Подходящие ионы металлов для использования в MRI – это ионы парамагнитных металлов, такие как гадолиний (III) или марганец (II). Наиболее предпочтительными радиоактивными металлами для диагностической визуализации являются γ -излучателями, особенно $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Металлокомплексы некоторых радионуклидов могут быть полезными в качестве радиоактивных фармацевтических препаратов для радиотерапии различных заболеваний, таких как рак, или для лечения тромбозов или рестенозов. Полезные радиоактивные изотопы для такого терапевтического применения включают в себя: ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{169}Er , ^{153}Sm и ^{198}Au . Какой бы металлокомплекс ни был выбран, весьма предпочтительно, чтобы он был связан с субстратом Фактора XIIa таким образом, чтобы тот не подвергался быстрому метаболизму в крови, который приводит к тому, что металлокомплекс отщепляется от субстрата Фактора XIIa до того, как меченый Фактор XIIa достигает того места *in vivo*, которое должно быть визуализовано. Субстрат Фактора XIIa, следовательно, является предпочтительно связанным с металлокомплексами настоящего изобретения.

Эти ионы металлов комплексно связаны при помощи металлокомплексообразующего агента, или, более предпочтительно, хелатирующего агента. Хелатирующие агенты содержат 2-10 донорных атомов металла, ковалентно связанных друг с другом при помощи некоординационного остова. Предпочтительные хелатирующие агенты содержат 4-8 донорных атомов металла и содержат донорные атомы металла или в открытой цепи, или в макроциклической упорядоченной структуре, или в их комбинации. Наиболее предпочтительные хелатирующие агенты содержат 4-6 донорных атомов металла и образуют 5- или 6-членные хелатные кольца, когда они скоординированы с центральным атомом металла. Такие полидентатные и/или макроциклические хелатирующие агенты образуют стабильные металлокомплексы, которые способны существовать в присутствии эндогенных конкурирующих лигандов металла *in vivo*, таких как

трансферрин или белки плазмы. В качестве альтернативы возможно использование монодентатных комплексообразующих агентов, которые образуют стабильные комплексы с нужным ионом металла даже в том случае, если они не образуют хелатные кольца при координации металла. Примерами известных комплексообразующих агентов такого рода, особенно подходящих для использования с ^{99m}Tc , являются гидразины, фосфины, арсины или изонитрилы.

Примерами подходящих хелатирующих агентов могут служить бидентатные соединения, такие как диамины или дифосфины, тридентатные соединения, такие как моноаминодитиолы, или тетрадентатные соединения, такие как диаминодиоксисы (US 4615876), или такие лиганды, которые включают амидные доноры (WO 94/08949); тетрадентатные лиганды из WO 94/22816; N_2S_2 диаминодитиолы, диамидодитиолы или амидоаминодитиолы; N_3S тиолтриамиды; N_4 лиганды, такие как тетраамины, макроциклические амины или амидные лиганды, такие как циклам, оксоциклам (который образует нейтральный комплекс с технецием) или диоксоциклам; или дитиосемикарбазоны. Описанные выше лиганды особенно подходят для технеция, но также полезны и для других металлов. Другие подходящие лиганды, которые включают лиганды, особенно подходящие для индия, иттрия и гадолиния, в особенности макроциклические аминокарбоксилаты и лиганды аминорфосфоновой кислоты, описаны в Sandoz WO 91/01144. Известны лиганды, которые образуют неионные (то есть нейтральные) металлокомплексы гадолиния; они описаны в US 4885363. Лиганд может также содержать короткую аминокислотную последовательность, такую как Cys/аминокислота/Cустрипептид из WO 92/13572, или пептидные лиганды, описанные в EP 0719790 A2.

Предпочтительные хелатирующие агенты имеют формулу



где каждое a принимает значение 2 или 3,

каждое b принимает значение 1 или 2,

один R является аминоалкиленом, через который хелатирующий агент присоединяется к остальной молекуле,

каждый другой R является независимо H, C_1 - C_{10} углеводородным остатком, алкокси, алкоксиалкилом, амином, амидом, гидроксиллом или карбоксилатом, или

две R-группы, взятые вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют карбоксильное, гетероциклическое насыщенное или ненасыщенное кольцо.

Металлохелатирующие агенты на непептидной основе обеспечивают улучшенный контроль над присоединением и отщеплением ионов металла и являются предпочтительными.

Настоящее изобретение также включает пептидные фрагменты α 2-антиплазмина, фибронектина, бета-казеина, столбнячных белков, амилоида, траппина или полиглутамина; причем указанные пептидные фрагменты содержат от 3 до 45 аминокислотных остатков и несут концевой металлокомплексообразующий агент.

Получение хелатирующих агентов, к которым присоединены функциональные группы ("бифункциональных хелатов"), является широко известным. Функциональные группы, которые могут быть присоединены к хелатирующим агентам, включают: амин, карбоновую кислоту, цианат, тиоцианат, малеимид и активированный эфир, такой как N-гидроксисукцинимидный. Примеры конъюгатов хелат-амин для диаминодиоксимных лигандов приведены в WO 95/19187. Если желаемый субстрат Фактора ХШа содержит функциональную аминогруппу, лиганды настоящего изобретения могут быть получены путем взаимодействия с бифункциональным соединением, которое содержит как аминогруппу (предпочтительно защищенную с использованием подходящих защитных групп, известных специалистам в данной области), и реакционно-способную группу, такую как сульфонилхлорид, хлорангидрид кислоты, активированный эфир или алкил/бензилгалогенид. Реакционно-способная группа может затем связываться с одной из двух свободных аминогрупп бифункционального хелата или используется для дериватизации одного или более аминокислотных положений N-содержащего лиганда. В качестве альтернативы монозащищенный диамин может взаимодействовать с бифункциональным хелатом со свободным активированным эфиром или карбоксильной группой, при этом образуется защищенная аминогруппа, связанная с системой лиганда при помощи амидной связи. В обоих путях синтеза, описанных выше, полученный в результате конъюгат, содержащий аминогруппу, защищенную лигандом, затем деблокируется при подходящих условиях, что приводит к целевому аминокислотному функционализированному лиганду. Если целевой субстрат Фактора ХШа несет

функциональную карбоксамидную группу, то целевые лиганды могут быть получены, например, при взаимодействии омега-галогеналкил карбоксиамида с подходящей длиной цепи с бифункциональным хелатом со свободной аминогруппой, что приводит к целевому лиганду, связанному карбоксамидной группой.

Металлокомплексы настоящего изобретения могут быть получены при взаимодействии раствора металла в соответствующем окисленном состоянии с лигандом при соответствующем pH. Предпочтительно, раствор может содержать лиганд, который образует слабый комплекс с металлом (такой как хлорид, глюконат или цитрат), т. е. металлокомплекс получают путем обмена лигандов или трансхелатирования. Такие условия полезны для подавления нежелательных побочных реакций, таких как гидролиз ионов металла. Если ионом металла является ^{99m}Tc , исходным материалом обычно является пертехнетат натрия из генератора ^{99}Mo . Технеций присутствует в ^{99m}Tc -пертехнетате в Tc (VII) окисленном состоянии, и является относительно нереакционноспособным. Следовательно, получение комплексов технеция более низких окисленных состояний от Tc(I) до Tc(V) для облегчения комплексообразования обычно требует добавления подходящего восстанавливающего агента, такого как ион двухвалентного олова. Другие подходящие восстановители описаны ниже.

Металлокомплекс предпочтительно должен также обеспечивать низкий неспецифический уровень фона в крови.

Таким образом, настоящее изобретение относится главным образом к диагностическим агентам для визуализации таких мест в теле млекопитающего, где фермент Фактор XIII активирован и где имеются отложения таких белков крови, как фибрин или коллаген. Эти агенты особенно полезны для диагностической визуализации тела человека. Эти агенты содержат субстраты для фермента Фактор XIIIa, меченные комплексом металла, подходящего для внешней визуализации, такого как радиоактивный металл (для сцинтиграфии) или ион парамагнитного металла (для MRI). Металлокомплекс настоящего изобретения имеет свободную амино- или карбоксамидную функциональную группу, подходящую для ковалентного присоединения соответственно к белковой карбоксамидной группе глутамина или аминогруппе лизина ферментом Фактор XIIIa. Тесная взаимосвязь фибрина и Фактора XIIIa обозначает потенциальное использование агентов

настоящего изобретения для диагностики патологических состояний, когда имеется как отложение фибрина, так и аккумуляция и активация Фактора XIII. Увеличенные отложения фибрина являются известным признаком таких заболеваний, как тромбоз, атеросклероз, фиброз печени и мелковкрапленная внутрисосудистая коагуляция. Фибрин также откладывается в местах воспаления тканей, связанного многими патологическими процессами, такими как инфекции, аутоиммунные заболевания или рак. Фактор XIII и тканевая трансглутаминаза активируются при известных физиологических условиях. В процессе апоптоза и образования новых структур белков матрикса наблюдается повышенный уровень этих ферментов. Агенты настоящего изобретения могут быть также использованы для детекции апоптоза и таких патологических состояний, как артриты, при которых происходит увеличение отложения белков матрикса. Так как Фактор XIII активируется именно в месте, представляющем интерес для диагностики *in vivo* (т. е. тромб, эмболия и пр.), это обеспечивает механизм локализации металлокомплексов настоящего изобретения. Ковалентно связанный металлокомплекс может быть затем внешне визуализован посредством радионуклидной сцинтиграфии или магнитнорезонансной визуализации (MRI), обеспечивая таким образом непроникающее средство диагностики места заболевания.

Поскольку затронуты терапевтические аспекты изобретения, авторы изобретения имеют предварительные данные испытаний *in vivo* (детально здесь не представленные), которые демонстрируют, что тромбы, образующиеся в присутствии меченных пептидов настоящего изобретения (как в Примере 17, рассмотренном ниже), меньше, чем те, что образуются в отсутствие меченных пептидов. На основании этих данных предполагается, что определенные в изобретении пептиды, обычно содержащие 4-30, например, 10 аминокислотных остатков, эффективны как лекарственные средства для увеличения степени тромболиза, действующие, например, как мощные ингибиторы поперечной сшивки фибрина в тромбах. Таким образом, возможно фармацевтическое использование описанных соединений в качестве тромболитических и антикоагулянтных терапевтических средств.

Настоящее изобретение также относится к наборам для получения металлокомплексов, связанных с субстратами Фактора XIIIa. Эти наборы разработаны таким образом, чтобы обеспечить стерильные продукты, подходящие

для введения человеку, например, путем инъекций в кровь. Возможные варианты осуществления изобретения обсуждаются ниже. Если детектируемой частицей является ^{99m}Tc , то набор будет включать флакон, содержащий свободный лиганд или хелатирующий агент вместе с фармацевтически приемлемым восстанавливающим агентом, таким как дитионит натрия, бисульфит натрия, аскорбиновая кислота, формамидинсульфиновая кислота, ион двухвалентного олова, Fe (II) или Cu (I), предпочтительно соль двухвалентного олова, такую как хлорид олова или тартрат олова. В качестве альтернативы набор может содержать металлокомплекс, который при добавлении радиоактивного металла или парамагнитного металла, подвергается трансметаллизации (т. е. обмену лигандов), давая желаемый продукт. Для ^{99m}Tc набор предпочтительно лиофилизуют, и его разрабатывают таким образом, чтобы восстанавливать стерильным ^{99m}Tc -пертехнетатом (TcO_4^-) из генератора радиоактивных изотопов ^{99m}Tc , что приводит к раствору, подходящему для введения человеку, без дальнейших манипуляций.

Агенты настоящего изобретения могут быть также обеспечены в форме разовой дозы, готовой для инъекций человеку, и могут, например, поставляться в предварительно заполненном стерильном шприце. Если детектируемая частица представляет собой радиоактивный изотоп, такой как ^{99m}Tc , то шприц, содержащий разовую дозу, может поставляться с экранирующей оболочкой (для защиты оператора от потенциальной радиоактивной дозы).

Вышеуказанные наборы или предварительно заполненные шприцы могут необязательно содержать дополнительные ингредиенты, такие как буферы; фармацевтически приемлемые солюбилизаторы (например, циклодекстрины или поверхностно-активные вещества, такие как плуроник, твин или фосфолипиды); фармацевтически приемлемые стабилизаторы или антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, гентизиновая кислота или *para*-аминобензойная кислота), или наполнители для лиофилизации (такие как хлорид натрия или маннит).

Следующие примеры иллюстрируют получение соединений настоящего изобретения и их применение для визуализации. Методики синтеза отдельных соединений настоящего изобретения приведены в Примерах 1-9, методики мечения этих соединений радиоактивными изотопами ^{123}I или ^{99m}Tc приведены в Примерах 10-12. Соединение 1 (из уровня техники) включено в качестве примера для сравнения. Доказательства увеличенной стабильности в плазме *in vitro* приведены в

Примере 13. Доказательства проникновения в тромбы *in vitro* и *in vivo* приведены соответственно в Примерах 15 и 17; биораспределение радиоактивно меченных соединений в нормальных крысах описано в Примере 16.

In vitro стабильность в плазме ^{123}I -меченного соединения 1 невысока (см. Пример 13), предположительно из-за активности протеаз. Введение защитных групп в С- и N-концы, как в случае радиоактивно меченных соединений 2-5 и 7-49, существенно увеличивает их стабильность в плазме.

Большинство тестируемых соединений *in vitro* проявляют высокую степень проникновения в тромб, и, следовательно, сродство к тромбу. Другие соединения обладают пониженной активностью, причем такие соединения как 14, 16, 18, 31, 34, 36, 46 и 48 проявляют заметно пониженную степень проникновения в тромб. Удаление остатка Gln из положения 2 последовательностей, производных от последовательности α_2 -антиплазмина, как в соединении 14, приводит к значительному уменьшению степени проникновения в тромбы этого меченого элемента, наводя таким образом на мысль, что Gln-2 является существенной аминокислотой в последовательностях этого типа.

Детали биораспределения в нормальных крысах, а также в моделях свежих и застарелых тромбов, приведены в Примерах 16 и 17. Скорость выведения этих соединений из крови относительно велика, биологическое время полужизни составляет 1-2 часа. Биораспределение $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -соединения 3 приведено в качестве типичного примера; в этом случае величина $t_{1/2}$ оценена в 2 ч. Быстрое выведение вещества из окружающих тканей, таких как кровь, легкие, сердце и мышцы, показывает, что агенты настоящего изобретения обладают подходящими фармакокинетическими свойствами для визуализации, и демонстрирует их потенциал в качестве радиодиагностических агентов. Хотя для этих соединений отмечалось, что они могут выводиться через желчные протоки печени, все же главным путем их выделения является мочеполовой тракт.

Степень проникновения в свежие и застарелые тромбы на моделях крыс для многих радиоактивно меченных соединений является очень высокой (относительная концентрация (RC) составляет 5-15); отношение концентраций меченых соединений в тромбе и окружающей ткани очень удобно для визуализации (>5). Пример 18 показывает, что $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -соединение 5 подходит для визуализации тромбов на модели крысы.

^{99m}Tc-соединения 2-49 имеют улучшенную стабильность в плазме по сравнению с ¹²³I-соединением 1 (RC=1,5), что может быть ответственным за улучшенное проникновение в тромбы *in vivo*, наблюдающееся для этих соединений.

Сопоставление результатов измерений степени проникновения в тромбы в Примере 17 для свежих и застарелых тромбов показывает, что эта величина для агентов настоящего изобретения является постоянной и не зависит от возраста тромба. Таким образом, эти агенты обладают улучшенной способностью визуализации ранее существовавших тромбов, таких как обнаруживают при легочной эмболии.

RU 2205186 C2

RU 2205186 C2

Экспериментальная часть

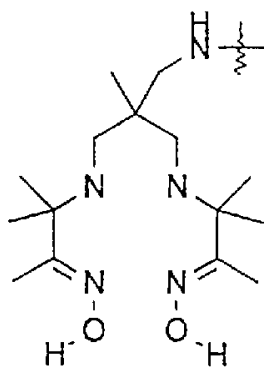
В следующей таблице:

Z – бензилоксикарбонил,

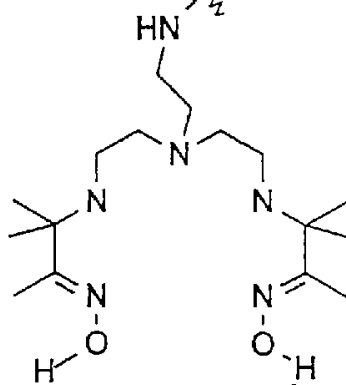
Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил,

Ac – ацетил.

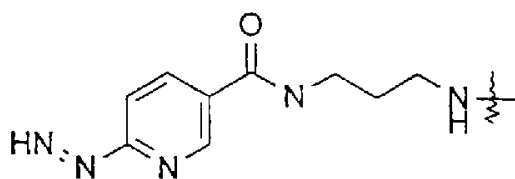
Pn44



Pn216



Hynic



RU 2205186 C2

RU 2205186 C2

Пептид	Соединение	MS Теор.	MS Эксп.
NQEQVSPYLLK	1	1419.6	1419.7 ^a
Ac-NQEQVSPYLLKG-NH ₂	2	1517.7	1517.7
Ac-NQEQVSPYLLKG-Pn44	3	1816.1	1816.2
Ac-NQEQVSPYLLKG-Hynic	4	1709.7	1710.0
Ac-NQEQVSPYLLKG-Pn216	5	1845.2	1845.2
NQEQVSPYLLKG-Pn216	6	1803.1	1803.3
Z-NQEQVSPYLLKG-Pn44	7	1908.2	1908.1
Z-NQEQVSPYLLKG-Pn216	8	1937.2	1937.2
Fmoc-NQEQVSPYLLKG-Pn216	9	2025.4	2025.4
(CF ₃) ₂ (C ₆ H ₅)-NQEQVSPYLLKG-Pn216	10	2044.2	2045.2
Алмаптоил-NQEQVSPYLLKG-Pn216	11	1966.0	1966.5
Ac-NQEA VSPYLLKG-Pn44	12	1759.1	1759.0
Ac-NQEA VSPYLLKG-Pn216	13	1788.1	1788.0
Ac-NAEA VSPYLLKG-Pn216	14	1766.1	1765.8
Ac-NQQQVSPYLLKG-Pn216	15	1844.2	1844.1
Ac-NQG-Pn44	16	656.8	656.6
Ac-NQEQVG-Pn44	17	1908.2	1908.1
Z-NQEQVSPYG-Pn216	18	1481.7	1481.7
Ac-NQEQVSPLTLLKG-Pn216	19	1795.2	1795.1
Ac-NQEQVSP-NaI(2)-TLLKG-Pn216	20	1879.3	1879.3
Ac-NQEQVSP(<i>p</i> -Br-F)TLLKG-Pn216	21	1908.1	1908.9
Ac-NQEQVSP(I-Y)TLLKG-Pn216	22	1971.2	1972.4
Ac-NQEQVSP(I ₂ -Y)TLLKG-Pn216	23	2098.2	2099.5
Z-NQEQVSP(I-Y)TLLKG-Pn216	24	2063.2	2064.4
Z-NQEQVSP(I ₂ -Y)TLLKG-Pn216	25	2189.2	2190.5
Fmoc-NQEQVSP(I-Y)TLLKG-Pn216	26	2152.4	2153.4
Fmoc-NQEQVSP(I ₂ -Y)TLLKG-Pn216	27	2278.4	2279.3
Ac-NQEQVSPYLL(D-K)G-Pn216	28	1845.2	1845.2
Ac-NQEQVSP(D-Y)TLL(D-K)G-Pn216	29	1845.2	1845.1
Ac-NQEQV(D-S)P(Z)-Y)TLL(J)-K)G-Pn216	30	1845.2	1845.2

Пептид	Соединени	MS Теор.	MS Эксп.
Ac-NQEQ(D-V)(D-S)P(D-Y)TLL(D-K)G-Pn216	31	1845.2	1845.1
Ac-(D-N)QEQVSP(D-Y)TLL(D-K)G-Pn216	32	1845.2	1845.0
Ac-NQEQVSP(D-Y)TLL(D-K)βAla-Pn216	33	1859.2	1859.0
Ac-N-CH ₂ NH ₂ -QEQVSP(Z)-Y)TLL(D-K)G-Pn216	34	1831.2	1831.1
Ac-NQEQ(D-V)(D-S)(D-P)(D-Y)(D-T)(D-L)(D-L)(D-K)G-Pn44	35	1816.1	1815.8
Pn216-CO(CH ₂) ₃ CO-G(D-K)(D-L)(D-L)(D-T)(D-Y)(D-P)(D-S)(D-	36	1916.2	1916.0
Fmoc-NQQQ(D-V)S(OMe)PLG-Pn216	37	1532.8	1532.7
Pn44-CO(CH ₂) ₃ CO-NQEQVSPYLLKG-NH ₂	38	1887.7	1887.3
Pn216-CO(CH ₂) ₃ CO-NQEQVSPYLLKG-NH ₂	39	1916.2	1916.3
Ac-NQEQVSPYLLKG-(PEG) ₃ 4k-Pn44	40	5200-5600	5401 ^b
Ac-NQEQVSPYLLKG-(PEG) ₃ 4k-Pn216	41	12400-	12630 ^b
Z-NQEQVSPYAAAAG-Pn216	42	1766.0	1765.9
Z-NQEQVSPYG(CH ₂) ₁₁ (CO)-Pn216	43	1677.7	1679.8
Цикло-[NQEQVSPYLLKG]	44	1458.6	1458.3
Ac-LGPGQSKVIG-Pn44	45	1294.6	1294.4
<i>D</i> -EAQIVG-Pn44	46	1023.2	1023.0
Ac-LEFDTQSKNILG-Pn216	47	1733.0	1732.9
Ac-GQDPVKG-Pn216	48	1068.3	1068.0
Ac-YEVNHQKLVFFG-Pn216	49	1872.2	1872.3

Все соединения, кроме особо отмеченных, были проанализированы с использованием ES⁺ спектрометрии. Те соединения, которые отмечены знаком ^a, были проанализированы с помощью FAB, а те которые отмечены знаком ^b - с помощью MALDI-TOF спектрометрии.

Пример 1: Синтезы соединений 1 и 2

Защищенный пептид Ac-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Val-Ser(tBu)-Pro-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-OH был синтезирован на 2-хлортритильной смоле присоединением Fmoc-Lys(Boc) к смоле и затем путем последовательно проводимых циклов деблокирования/конденсации с соответствующими защищенными аминокислотами (как описано в P.Lloyd-Williams, F.Albericio и E.Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997). Целевое соединение было получено отщеплением пептида от подложки, с использованием 0,1% TFA в дихлорметане, снятием защит и очисткой при помощи офВЭЖХ (Система А).

Пример 2: Синтезы соединений 3-9, 12-21, 28-33, 35, 37, 42 и 45-49

Соответствующие защищенные пептиды были синтезированы так же, как и в Примере 1, при использовании соответствующих защищенных аминокислот. Защищенные фрагменты были отщеплены от смолы и затем присоединены к 6-аминометил-3,3,6,9,9-пентаметил-4,8-диазаундекан-2,10-диондиоксиму (полученному как описано в WO 95/19187), 3,3,11,11-тетраметил-7-аминоэтил-4,7,10-триазатридекан-2,12-диондиоксиму (полученному как описано в WO 98/31399) или N-гидроксисукцинимидному эфиру 6-Вос-гидразинопиридин-3-карбоновой кислоты (полученному как описано в патенте US 5, 206, 370) в растворе, используя ВОР в качестве конденсирующего агента. Целевое соединение было получено снятием защиты в растворе TFA/вода/триэтилсилан (90/5/5) и очищено при помощи офВЭЖХ (Система А).

Пример 3: Синтезы соединений 22-27

Добавляют в пробирку Эппендорфа соединения 5, 8 или 9 (1 мг), аммонийацетатный буфер (400 мкл, 0,2 М, рН 4), иодид натрия (0,5 экв., 15 мг/10 мл в 0,1 М NaOH) и надуксусную кислоту (1,5 экв., 0,1 М раствор). Реакционную смесь тщательно перемешивают в течение 1 минуты, моно- и дииодсодержащие продукты разделяют и собирают при помощи препаративной ВЭЖХ. Эту процедуру повторяют до получения достаточных количеств чистых продуктов.

Пример 4: Синтезы соединений 10 и 11

Fmoc-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(tBu)-Gln(Trt)-Val-Ser(tBu)-Pro-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly (200 мг, 0,73 ммоль), Pn216 (30 мг, 0,87 ммоль) и HBTU (33 мг, 0,87 ммоль) растворяют в безводном DMF (2,5 мл). К раствору добавляют диизопропилэтиламин (20 мл, 1,15 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,75 часа. Затем реакционную смесь обрабатывают пиперидином (0,5 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученный продукт очищают полупрепаративной ВЭЖХ, получая твердое вещество белого цвета (171 мг, 82%); ES⁺-MS: m/z 952.40 (M+3H⁺).

1-Адамантанкарбоновую кислоту или 3,5-бис(трифторметил)-бензойную кислоту (1,5 мол. экв.), защищенный пептид Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(tBu)-Gln(Trt)-Val-Ser(tBu)-Pro-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Pn216 (1 мол. экв.) и HBTU (1,2-1,5 мол. экв.) растворяют в безводном DMF (1 мл). К реакционной смеси добавляют диизопропилэтиламин (11 мол. экв.) и перемешивают ее при комнатной температуре до завершения реакции, о котором судят при помощи ВЭЖХ. Затем защищенный пептидный фрагмент обрабатывают 95% раствором трифторуксусной кислоты в CH₂Cl₂. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 - 4 часов. Полученный продукт выделяют из реакционной смеси при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Пример 5: Синтез соединения 34

Защищенный пептид синтезируют как в предыдущем примере, за исключением того, что пептид Fmoc-Asn(Trt)-ψ(CH₂NH)-Gln(Trt)-OH получают классическим методом синтеза восстановленных пептидных связей, при помощи восстановительного аминирования Gln(Trt) альдегидом, полученным из Fmoc-Asn(Trt) (смотри G. Guichard *et al*, *Peptide Res.*, **6** (3), 121, (1993) и цитируемые там источники).

Конечное соединение получают и очищают как в Примере 2.

Пример 6: Синтезы соединений 36, 38 и 39

Защищенный пептид синтезируют также, как в Примере 1, но на "смоле Ринка". После снятия N-защиты глицина пептид вступает в реакцию с глутаровым ангидридом, все еще оставаясь на смоле. Активация карбоксильной группы глутаровой кислоты под действием BOP/NOBt и конденсация с 6-аминометил-

3,3,6,9,9-пентаметил-4,8-диазаундекан-2,10-диондиоксимом или 3,3,11,11-тетраметил-7-аминоэтил-4,7,10-триазатридекан-2,12-диондиоксимом на смоле приводит к защищенному продукту. Отщепление в системе TFA/вода (95/5) приводит к получению неочищенного материала, который очищают, используя офВЭЖХ (Система А).

Пример 7: Синтезы соединений 40 и 41

Раствор, содержащий требуемое количество α -N-(*трет*-бутоксикарбонил)-поли(этиленгликоль)амино- ω -сукцинимидилкарбоната и один молярный эквивалент 6-аминометил-3,3,6,9,9-пентаметил-4,8-диазаундекан-2,10-диондиоксима или 3,3,11,11-тетраметил-7-аминоэтил-4,7,10-триазатридекан-2,12-диондиоксима в безводном тетрагидрофуране (5 мл) нагревают с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 5 часов. Реакционную смесь упаривают в вакууме до белого твердого вещества, которое очищают флэш-хроматографией в системе изопропанол/аммиак/вода = 10:1:1, получая целевое соединение в виде белого твердого вещества. Вос-защитную группу удаляют, добавляя по каплям 37% HCl в метаноле при охлаждении льдом. Затем раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь подщелачивают до $\text{pH} \approx 10$, добавляя 4М раствор NaOH (4,18 мл). Целевой продукт выделяют полу препаративной ВЭЖХ (система D).

Твердое вещество, описанное выше, растворяют в DMF и к этой смеси добавляют защищенный пептидный фрагмент. Затем добавляют диизопропилэтиламин и HBTU и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре до завершения реакции. Продукт очищают при помощи ВЭЖХ (система E), получая бесцветную смолу.

Смолу растворяют в дихлорметане (2 мл) и полученный раствор обрабатывают TFA (0,2 мл) в течение 5 часов. Реакционную смесь подщелачивают 1М раствором NaOH (2 мл) и летучие вещества удаляют в вакууме. К остатку добавляют MeOH (2,5 мл) и смесь фильтруют, используя фильтр Acrodisc (LC13 PVDF 0,45 м). Продукт выделяют из метанольного раствора при помощи ВЭЖХ (система E).

Пример 8: Синтез соединения 43

12-N-Fmoc-аминододекановую кислоту конденсируют с 3,3,11,11-тетраметил-7-аминоэтил-4,7,10-триазатридекан-2,12-диондиоксимом так же, как описано выше. Fmoc-защитную группу удаляют 20% раствором пиперидина в DMF и полученный продукт очищают при помощи ВЭЖХ (система F).

Вышеуказанный продукт конденсируют с защищенным пептидным фрагментом, после чего защита снимается так же, как описано выше. Полученный продукт очищают при помощи ВЭЖХ (система G).

Пример 9: Синтез соединения 44

Частично деблокированный пептид H-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Val-Ser-(tBu)-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-OH синтезируют на 2-хлортритилхлоридной смоле, используя Fmoc-защитную стратегию, путем постадийного удлинения при помощи BOP/HOBt. Защиту с N-конца удаляют обработкой пиперидином, частично защищенный пептид отщепляют от твердой подложки действием 0,5% раствора TFA в дихлорметане. Циклизацию осуществляют в 10 mM растворе пептида в DMF в присутствии твердого бикарбоната натрия, используя BOP в качестве конденсирующего реагента, согласно известной методике (см., например, M. Rodriguez *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 441, 1990).

Окончательное деблокирование в смеси TFA/вода/этандитиол (90/5/5) приводит к получению неочищенного целевого соединения, которое очищают при помощи офВЭЖХ (Система А).

Пример 10: ¹²³I-мечение соединений 1-2 и соединения 44

Аммонийацетатный буфер (200 мкл, 0,2 М, pH 4,0) добавляют к раствору лиганда (20 мкл, 20 мкг) и Na¹²⁷I (10 мкл, 1,5 мкг) в пробирке Эппендорфа. Раствор тщательно перемешивают и затем добавляют Na¹²³I (5-50 мкл, 111 МБк). Полученный раствор тщательно перемешивают перед тем, как добавить раствор РАА (10 мкл, 0,01 М), продолжая затем перемешивать. Измеряют активность препарата. Во всех случаях целевой продукт отделяют от побочных продуктов и немеченных субстратов при помощи ВЭЖХ.

Пример 11: ^{99m}Tc -мечение соединений 3, 5-43, 45-49

0,1 мл Аликвоту соединения, растворенного в H_2O (1 мг/мл), переносят в наполненную азотом стеклянную колбу объемом 10 мл вместе с деоксигенированным солевым раствором (0,9%, 1 мл) и 0,035 мл водного раствора NaOH (0,1 М). К этому раствору добавляют элюат из генератора технеция (1 мл, примерно 0,4 ГБк) и затем водный раствор дихлорида олова (0,1 мл, примерно 10 мкг). Мечение осуществляют при pH 9.0-10.0. Колбы выдерживают при обычной лабораторной температуре (15-25°C) в течение 30 минут до достижения мечения. Перед тестированием конечный препарат или разбавляют до нужной концентрации радиоактивности или выполняют очистку при помощи ВЭЖХ (Система В) для удаления немеченных исходных материалов и радиоактивных примесей. После очистки органический растворитель удаляют под вакуумом и образец вновь растворяют приблизительно в 5 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), получая рабочую концентрацию 6-9 Бк/мл. Перед использованием радиохимическая чистота оценивается при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системах, описанных ниже:

- i) ИТЛС силикагель 2 см x 20 см, элюент: 0,9% м./об. солевой раствор
- ii) Ватман No 1 2 см x 20 см, элюент: смесь ацетонитрил : H_2O (50 : 50, об./об.)

Меченные субстраты остаются в исходной точке или близко к ней в системе (i), и они двигаются близко к фронту растворителя в системе (ii). При анализе при помощи подходящего оборудования для детекции радиохимическая чистота обычно превышает 85% меченого соединения.

Пример 12: ^{99m}Tc -мечение соединения 4

0,1 мл Аликвоту соединения, растворенного в воде (1 мг/мл), переносят в наполненную азотом стеклянную колбу объемом 10 мл вместе с трицином, растворенным в воде (0,5 мл, 37,5 мг), и *трис*-натриевой солью фосфинедин-*трис*-бензолсульфоната, растворенной в воде (0,1 мл, 10 мг). К этому раствору добавляют элюат из генератора технеция (1 мл, примерно 0,4 ГБк) и затем раствор дихлорида олова в 0,1М HCl (0,02 мл, примерно 2 мкг). Мечение проводят при pH 4,5-5,5. Колбу выдерживают при 60°C в течение 30 минут до достижения мечения. Очистка и оценка радиохимической чистоты были проведены так же, как в Примере 10.

Пример 13: Стабильность в плазме *in vitro*

К части раствора соединения (50 мкл, 10 МБк/мл) добавляют равный объем плазмы (крысы или человека) или солевого раствора. Смеси выдерживают при 37°C и стабильность измеряют при помощи ВЭЖХ (Система С) спустя 0, 30, 120 минут. Солевой раствор используют как контроль.

Соединение	Биологический вид	% неразрушенных соединений спустя 120
¹²³ I-Соединение 1 (уровень техники)	Человек	0
¹²³ I-Соединение 2	Человек	98
	Крыса	99
^{99m} Tc- Соединения 3, 4, 5, 7, 12, 16,17; ¹²³ I-Соединение 44	Человек	>90
	Крыса	>90
^{99m} Tc- Соединения 8-11, 13-15,19-21, 28-36, 38, 39, 45-49	Крыса	>90
^{99m} Tc- Соединения 22-27	Крыса	>60

Пример 14: Системы ВЭЖХ

Скорость потока: 1 мл/мин во всех системах.

Система А

Колонка Waters C18 250 x 4,5 мм. Размер частиц 4 мкм

Градиент: Профиль элюирования 10-60% В за 25 минут

Элюент А: 0,1% водного раствора TFA

Элюент В: 0,1% TFA в ацетонитриле

Система В

Колонка Waters C18 150 x 3,9 мм. Размер частиц 4 мкм

Градиент: Профиль элюирования 0-100% В за 22 минуты

Элюент А: 0,1% водного раствора TFA

Элюент В: 0,1% TFA в ацетонитриле

Система С

Колонка Waters C18 150 x 3,9 мм. Размер частиц 4 мкм

Градиент: Профиль элюирования 0-100% В за 20 минут

Элюент А: 50 mM NH₄OAc буфер (pH 5,6)

Элюент В: ацетонитрил

Система D

Колонка Hamilton PRP-1, 305мм x 7,0 мм;

Градиент: Профиль элюирования 0-65% В за 10 минут

Элюент А: 5% водный раствор аммиака

Элюент В: ацетонитрил

Система E

Колонка Hamilton PRP-1, 150мм x 4,1 мм;

Градиент: Профиль элюирования 0-100% В за 15 минут

Элюент А: 5% водный раствор аммиака

Элюент В: ацетонитрил

Система F

Колонка Polymer Laboratories PLRP-S, 150мм x 2,5 мм;

Градиент: Профиль элюирования 0-100% В за 15 минут

Элюент А: 5% водный раствор аммиака

Элюент В: ацетонитрил

Система G

Колонка Hamilton PRP-1, 150мм x 4,1 мм;

Градиент: Профиль элюирования 0-100% В за 15 минут

Элюент А: 0,1% водного раствора TFA

Элюент В: 0,1% TFA в ацетонитриле

Пример 15: Внедрение в тромбы плазмы человека

Внедрение радиоактивно меченых субстратов в фибрин исследуют путем индукции тромбов в плазме человека *in vitro* следующим образом. В силицированную стеклянную колбу объемом 5 мл добавляют: (а) 800 мкл буферного *трис*(гидроксиметил)аминометанового солевого раствора (рН 7,5), содержащего хлорид кальция (50 мМ *Трис*, 150 мМ хлорида натрия, 4 мМ хлорида кальция), (b) примерно 40 мкл физиологического солевого раствора, содержащего тромбин (100 единиц/мл), (с) примерно 400 мкл плазмы человека, содержащей радиоактивно меченый субстрат в типичной концентрации 10 кБк/мл. Чтобы индуцировать тромбообразование в реакционную колбу помещают стеклянную палочку с шероховатой поверхностью. Реакционные смеси в контрольных колбах получают подобным же образом, но при отсутствии тромбина и хлорида кальция.

После выдерживания тестируемого раствора при обычной лабораторной температуре (примерно 20°C) в течение 60 минут реакцию останавливают добавлением примерно 400 мкл холодного 33,5 мМ раствора динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты. Тромбы отделяют от сыворотки вакуумной фильтрацией на 0,45 мкм нитроцеллюлозных фильтрах (предварительно замоченных в 1,5% буферном BSA/*трис*(гидроксиметил)аминометановом солевом растворе, рН 7,5, содержащем 0,1% твин-20) и промывают примерно 2 x 10 мл буферным *трис*(гидроксиметил)аминометановым соевым раствором (рН 7,5)), содержащем твин-20 в конечной концентрации 0,1% об/об. Долю общей радиоактивности подсчитывают, используя подходящий детектирующий прибор.

Доля радиоактивности, удерживаемая на фильтре, после вычитания неспецифического связывания, определяемого при помощи контроля, является мерой внедрения в фильтрованные тромбы.

Соединение	% удержания (с тромбином)	% удержания (без тромбина)	% специфического проникновения*
¹²³ I-Соединение 1	14.6	2.0	12.6
¹²³ I-Соединение 2	38.6	0.2	38.4
^{99m} Tc-Соединение 3	39.3	0.3	39.0
^{99m} Tc-Соединение 4	22.0	0.1	21.0
^{99m} Tc-Соединение 5	35.5	0.2	35.3
^{99m} Tc-Соединение 6	68.6	4.3	64.3
^{99m} Tc-Соединение 7	41.3	0.7	40.6
^{99m} Tc-Соединение 8	25.9	1.4	24.5
^{99m} Tc-Соединение 9	44.5	2.7	42.8
^{99m} Tc-Соединение 10	65.9	0.2	65.7
^{99m} Tc-Соединение 11	68.1	1.2	66.9
^{99m} Tc-Соединение 12	34.8	0.3	34.5
^{99m} Tc-Соединение 13	57.0	0.2	56.8
^{99m} Tc-Соединение 14	3.3	0.5	2.8
^{99m} Tc-Соединение 15	55.6	0.4	55.2
^{99m} Tc-Соединение 16	12.5	0.1	12.4
^{99m} Tc-Соединение 17	41.3	0.7	40.6
^{99m} Tc-Соединение 18	9.8	0.1	9.7
^{99m} Tc-Соединение 19	48.2	0.2	48.0
^{99m} Tc-Соединение 20	65.0	2.6	62.4
^{99m} Tc-Соединение 21	60.6	0.5	60.1
^{99m} Tc-Соединение 22	59.0	0.3	58.7
^{99m} Tc-Соединение 23	63.8	0.1	63.7
^{99m} Tc-Соединение 24	56.8	0.4	56.4
^{99m} Tc-Соединение 25	68.0	4.3	63.7
^{99m} Tc-Соединение 26	63.3	8.2	55.1
^{99m} Tc-Соединение 27	не определяли	не определяли	не определяли
^{99m} Tc-Соединение 28	42.1	0	41.9
^{99m} Tc-Соединение 29	21.1	0.1	21.0
^{99m} Tc-Соединение 30	14.9	0.2	14.7
^{99m} Tc-Соединение 31	7.7	0.1	7.6

Соединение	% удержания (с тромбином)	% удержания (без тромбина)	% специфического проникновения*
^{99m} Tc-Соединение 32	20.2	0.4	19.8
^{99m} Tc-Соединение 33	63.9	0.1	63.8
^{99m} Tc-Соединение 34	5.5	0.1	5.4
^{99m} Tc-Соединение 35	15.9	0.6	15.3
^{99m} Tc-Соединение 36	8.7	0.1	8.6
^{99m} Tc-Соединение 37	13.0	0.2	12.8
^{99m} Tc-Соединение 38	21.0	0.7	20.3
^{99m} Tc-Соединение 39	23.1	0.1	23.0
^{99m} Tc-Соединение 40	13.3	0.1	13.2
^{99m} Tc-Соединение 41	44.5	7.1	37.4
^{99m} Tc-Соединение 42	14.2	0.2	14.0
^{99m} Tc-Соединение 43			
¹²³ I-Соединение 44	14.1	0.3	13.8
^{99m} Tc-Соединение 45	28.7	0.1	28.6
^{99m} Tc-Соединение 46	6.3	0.2	6.1
^{99m} Tc-Соединение 47	49.9	0.1	49.8
^{99m} Tc-Соединение 48	10.6	0.1	10.5
^{99m} Tc-Соединение 49	33.1	1.6	31.5

* % удержания в анализе тромбов плазмы (с тромбином) – % удержания в анализе тромбов плазмы (без тромбина)

Пример 16: Биораспределение в нормальных крысах

Разрешение графического изображения тромба зависит от комбинации скорости внедрения радиоактивного фармацевтического препарата и скорости его выведения из крови/ткани. По этой причине проводили определение биораспределения нескольких соединений в крысах. Самцам крыс Wistar (100 -150 г) внутривенно вводили инъекции 0,1-0,2 мл раствора радиоактивно меченного элемента (8 МБк/мл), после чего крыс препарировали спустя различные промежутки времени от момента введения инъекции. Измеряли % ID в каждом отобранном кусочке ткани. Некоторых животных выдерживали в метаболических клетках с целью определения % ID в выделяемых моче и фекалиях. Промежутки времени от

момента введения инъекции до начала препарирования для указанного агента составляли 15, 30, 60 и 240 минут. Приведены средние значения величины % ID (n=3).

^{99m}Tc-Соединение 3

	15мин.	30 мин.	60 мин.	240 мин.
Мышцы	14.7	10.4	5.1	2.9
Кровь	5.3	1.8	1.6	0.6
Почка	7.6	4.9	4.6	3.4
Моча	14.9	34.3	37.0	42.0
Легкое	0.7	0.4	0.3	0.3
Печень	6.2	4.1	4.0	3.0
Желудочно-кишечный тракт	13.5	15.1	18.0	20.7
Сердце	0.2	0.1	0.1	0.04

Пример 17: Внедрение в тромбы, индуцированные на моделях крыс.

Модель, использующая нижнюю полую вену (IVC) крысы

Крыс (самцов Wistar, 250-350 г) анестезировали 15%-м раствором уретана. После лапаротомии полая вена была отделена и освобождена от окружающих жировых тканей. В нижнюю полую вену вставляли платиновую проволоку (1,5 см x 0,5 мм) и спустя 5 минут после хирургических действий вводили внутривенно 0,4 мл эллагиновой кислоты ($1,2 \times 10^{-4}$ М) через предварительно вскрытую бедренную вену, позволяя образоваться тромбу. Средний вес тромбов, образовавшихся в этой модели, был приблизительно равен 27 мг, n=32, (в диапазоне 5-50 мг). Соединения были введены через 5 минут (свежий тромб) и через 60 минут (застарелый тромб) после индуцирования тромба. Спустя 60 минут животные были умерщвлены, тромбы были отделены, взвешены и учтены. Другие ткани, например, кровь, легкое, сердце, были также рассечены и взвешены. Мерой проникновения меченого соединения в тромб являлась относительная концентрация (отношение масс соединения и тромба, деленное на отношение дозы и веса животного), а также как отношение величин сигнала тромба и фона окружающей ткани.

Результаты:

Свежие тромбы

Соединение	% id/г	Относит. конц.	Тромб/кровь	Тромб/легкое	Тромб/сердце	Тромб/печень
¹²³ I-Соединение 1	0.5±0.1	1.6±0.4	1	не опред.	не опред.	не опред.
¹²³ I-Соединение 2	4.9±0.8	14.5±2.2	7	10	19	21
^{99m} Tc-Соединение 3	1.4±0.4	5.1±1.2	10	8	17	6
^{99m} Tc-Соединение 4	2.0±0.6	6.5±2.0	6	8	15	20
^{99m} Tc-Соединение 5	6.0±2.1	16±5.8	21	23	51	43
^{99m} Tc-Соединение 7	4.8±1.3	14.5±4.4	15	11	21	6
^{99m} Tc-Соединение 8	6.7±1.7	21.0±6.8	14	18	41	21
^{99m} Tc-Соединение 9	8.8±3.6	24.8±9.6	13	12	32	13
^{99m} Tc-Соединение 10	2.9±0.5	6.5±1.2	4	5	10	5
^{99m} Tc-Соединение 11	1.1±0.4	3.3±1.1	10	11	24	11
^{99m} Tc-Соединение 12	7.3±4.1	19.8±11.0	20	17	31	8
^{99m} Tc-Соединение 13	3.4±0.7	7.9±1.6	7	8	18	18
^{99m} Tc-Соединение 14	0.5±0.1	1.2±0.2	2	1.5	3	0.7
^{99m} Tc-Соединение 15	3.6±1.0	8.3±2.2	4	6	12	11
^{99m} Tc-Соединение 16	0.3±0.1	1.0±0.2	3	3	8	0.8
^{99m} Tc-Соединение 17	1.2±0.7	3.7±2.3	7	12	18	5
^{99m} Tc-Соединение 19	2.5±0.3	7.1±1.2	3	7	29	17
^{99m} Tc-Соединение 20	2.3±0.6	6.5±1.3	12	11	30	18
^{99m} Tc-Соединение 21	2.3±1.3	7.4±4.0	11	16	28	13
^{99m} Tc-Соединение 22	3.8±1.6	13.0±5.5	11	13	28	25
^{99m} Tc-Соединение 23	7.6±1.8	18.2±4.1	6	6	17	21
^{99m} Tc-Соединение 24	4.0±2.2	11.1±6.7	10	10	21	11
^{99m} Tc-Соединение 26	14.1±10	41.4±28	16	11	38	16
^{99m} Tc-Соединение 28	3.5±2.0	9.7±5.0	13	19	31	35
^{99m} Tc-Соединение 29	4.7±1.9	13.0±4.9	14	20	44	44
^{99m} Tc-Соединение 31	0.3±0.2	0.9±0.6	0.6	1	2	3

RU 2205186 C2

RU 2205186 C2

Соединение	% id/г	Относит. конц.	Тромб/кровь	Тромб/легкое	Тромб/сердце	Тромб/печень
^{99m} Tc-Соединение 32	1.7±0.7	4.6±1.9	10	11	26	27
^{99m} Tc-Соединение 33	2.7±0.2	7.8±0.6	11	16	32	28
^{99m} Tc-Соединение 34	0.5±0.2	1.8±0.5	2	3	6	8
^{99m} Tc-Соединение 35	1.2±0.2	3.7±0.8	2	2	4	2
^{99m} Tc-Соединение 36	0.2±0.1	0.7±0.3	1	1	3	4
^{99m} Tc-Соединение 37	0.4±0.2	0.9±0.4	0.6	0.7	1	1
^{99m} Tc-Соединение 38	1.9±0.5	5.4±1.5	5	6	15	3
^{99m} Tc-Соединение 39	2.5±0.3	9.0±1.1	9	14	29	31
^{99m} Tc-Соединение 41	0.7±0.1	2.2±0.3	3	4	6	8
^{99m} Tc-Соединение 42	0.3±0.1	0.3±0.2	2	0.3	1	63
¹²³ I-Соединение 44	0.4±0.1	1.1±0.2	0.9	1.5	1	2
^{99m} Tc-Соединение 45	2.0±0.5	5.5±1.3	6	5	10	3
^{99m} Tc-Соединение 46	0.8±0.4	2.0±0.7	5	3	6	1
^{99m} Tc-Соединение 47	0.8±0.7	2.2±2.0	0.8	1	3	1
^{99m} Tc-Соединение 48	0.3±0.2	1.0±0.5	0.6	0.9	2	3
^{99m} Tc-Соединение 49	2.6±1.1	8.5±3.7	4	6	16	4

Относит. концентрация (RC) = (% id/г в тромбе) / (% id/г в остальном теле)

Застарелые тромбы

Соединение	% id/г	Относит. конц.	Тромб/кровь	Тромб/легкое	Тромб/сердце	Тромб/печень
¹²³ I-Соединение 2	5.5±1.7	14.5±3.9	24	12	23	20
^{99m} Tc-Соединение 3	2.1±0.8	6.2±2.2	8	11	23	5
^{99m} Tc-Соединение 4	1.2±1.1	4.1 ±4.0	8	10	19	19
^{99m} Tc-Соединение 5	3.6±1.7	11±5.1	13	31	33	24
^{99m} Tc-Соединение 7	2.1±0.3	6.5±1.3	9	7	15	3
^{99m} Tc-Соединение 8	5.3±1.3	16.4±4.3	10	9	24	16
^{99m} Tc-Соединение 9	3.7±0.4	11.4±1.5	8	7	21	6
^{99m} Tc-Соединение 10	2.9±1.4	6.3±2.7	6	6	16	5
^{99m} Tc-Соединение 11	0.4±0.3	1.2±0.8	5	6	13	4
^{99m} Tc-Соединение 12	4.1 ±1.2	11.2±3.4	19	15	75	7

Соединение	% id/r	Относит. конц.	Тромб/кровь	Тромб/легкое	Тромб/сердце	Тромб/печень
^{99m} Tc-Соединение 13	4.5±1.5	10.4±3.0	6	9	29	19
^{99m} Tc-Соединение 14	0.6±0.4	1.4±0.8	1.4	1.3	2	0.7
^{99m} Tc-Соединение 15	3.4±0.6	7.6±1.6	3	0.6	1	не опред.
^{99m} Tc-Соединение 17	0.8±0.1	2.7±0.6	3	5	7	3
^{99m} Tc-Соединение 19	3.2±2.3	9.1±7.1	14	5	13	6
^{99m} Tc-Соединение 20	1.7±0.5	4.9±1.4	10	14	36	23
^{99m} Tc-Соединение 21	2.7±2.3	8.5±6.8	31	13	32	31
^{99m} Tc-Соединение 22	6.9±2.5	22.7±7.4	11	1	3	4
^{99m} Tc-Соединение 23	7.5±2.5	17.6±4.6	13	1	1	1
^{99m} Tc-Соединение 24	4.1±2.5	11.9±8.0	15	20	40	37
^{99m} Tc-Соединение 26	4.0±0.9	12.9±3.5	7	12	31	54
^{99m} Tc-Соединение 28	4.5±1.1	13.1 ±3.4	17	2	3	1
^{99m} Tc-Соединение 29	3.8±0.4	10.0±1.7	11	30	67	29
^{99m} Tc-Соединение 31	0.2±0.1	0.6±0.2	0.6	4	9	2
^{99m} Tc-Соединение 32	0.7±0.1	2.0±0.4	3	15	43	21
^{99m} Tc-Соединение 33	2.2±0.6	6.7±1.6	16	9	24	16
^{99m} Tc-Соединение 34	0.4±0.1	1.4±0.4	3	-	-	6
^{99m} Tc-Соединение 35	0.6±0.1	1.5±0.4	1	0.5	1	2
^{99m} Tc-Соединение 36	0.1±0.02	0.2±0.1	0.6	10	18	4
^{99m} Tc-Соединение 37	0.2±0.03	0.5±0.1	0.4	1	2	9
^{99m} Tc-Соединение 38	0.8±0.3	2.4±0.7	3	0.5	1	2
^{99m} Tc-Соединение 39	2.4±0.3	8.2±1.1	15	12	43	11
^{99m} Tc-Соединение 41	0.4±0.1	1.1±0.3	1	6	13	4
^{99m} Tc-Соединение 42	0.4±0.1	1.3±0.3	5	7	21	6
¹²³ I-Соединение 44	0.5±0.03	1.2±0.1	0.9	2	1	1
^{99m} Tc-Соединение 45	2.0±0.8	5.7±2.3	8	5	11	3
^{99m} Tc-Соединение 46	0.5±0.2	1.3±0.6	4	3	5	1
^{99m} Tc-Соединение 47	0.5±0.3	1.5±0.8	1	24	46	44
^{99m} Tc-Соединение 48	0.2±0.04	0.8±0.2	1	109	32	26
^{99m} Tc-Соединение 49	1.2±0.5	3.9±1.6	4	9	29	19

Пример 18: Визуализация тромбов, индуцированных в крысиной модели

Тромбы индуцировали у самцов крыс Wistar (250-350 г) как описано в Примере 17, за исключением того, что для этих экспериментов платиновая проволока была локализована в шейной вене. Соединения были введены спустя 60 минут после введения инъекции и плоские графические изображения получались между 15 и 180 минутами после введения инъекции. Для данных экспериментов использовали камеру Park medical Isocam I gamma, 300К или 150К импульсы от грудной клетки собирали при помощи LEUHR или LEPH коллиматора. Визуализацию тромбов начинали спустя 15 минут после введения инъекции. Наивысшее отношение величин сигнала тромба и фона достигалось при 180 мин после введения инъекции, благодаря быстрому выведению соединения.

Аббревиатуры

Ac	ацетил
Boc	<i>трет</i> -бутилоксикарбонил
DMF	диметилформамид
ES	электронный удар
FAB	бомбардировка быстрыми атомами
Fmoc	флуоренилметилоксикарбонил
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
MALDI-TO	матрично-ассистируемая время-пролетная лазерная десорбционная ионизация
Nal	нафтилаланин
RCP	радиохимическая чистота
офВЭЖХ	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
TFA	трифторуксусная кислота
ТСХ	тонкослойная хроматография

Подписи к рисункам.

Рис.1: Визуализация при помощи ^{99m}Tc -соединения 5.

Модель тромба на шейной вене крысы

Застарелый тромб

Графические образы, полученные при помощи LEUHR коллиматора

Тромб

Голова

Грудная клетка

15 (30, 60 и 180) мин. после введения инъекции

Рис.2: Визуализация при помощи ^{99m}Tc -соединения 5.

Модель тромба на шейной вене крысы

Застарелый тромб

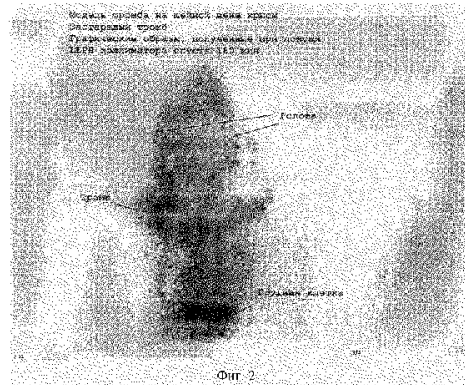
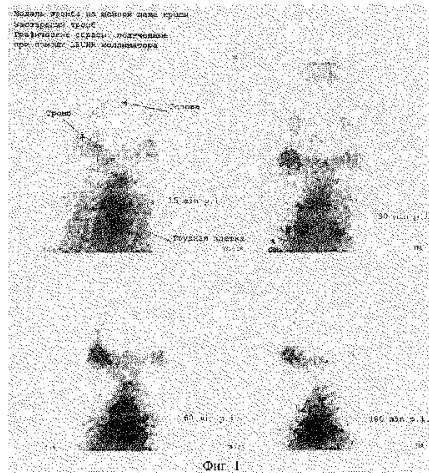
Графические образы, полученные при помощи LEPRH коллиматора спустя 180

мин.

Тромб

Голова

Грудная клетка



RU 2205186 C2

RU 2205186 C2