

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 044558

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.09.06

(21) Номер заявки  
202190755

(22) Дата подачи заявки  
2019.09.11

(51) Int. Cl. C07K 7/52 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

## (54) АГЕНТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ РАКА

(31) 18194121.2

(32) 2018.09.12

(33) EP

(43) 2021.06.11

(86) PCT/EP2019/074195

(87) WO 2020/053255 2020.03.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ТЕХНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ  
МЮНХЕН (DE)

(72) Изобретатель:  
Осль Тереза, Вестер Ханс-Юрген,  
Шоттелиус Маргрет (DE)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

(56) Theresa Osl: "Development of cyclic pentapeptide ligands for chemokine receptor targeting", 15 March 2018 (2018-03-15), XP55626839, Retrieved from the

Internet:URL: <http://mediatum.ub.tum.de/doc/1342124/1342124.pdf> [retrieved on 2019-09-27], page 41 - page 54, page 135 - page 150, abstract; compounds 30-32, 34  
-& Osl ET AL.: "Elektronische Prüfungsarbeiten", 15 March 2018 (2018-03-15), XP55626918, Retrieved from the Internet:URL: <http://mediatum.ub.tum.de/print/1342124.pdf> [retrieved on 2019-09-27], abstract

WO-A1-2015185162

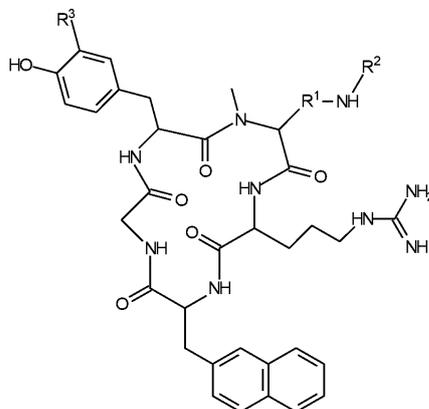
MARGRET SCHOTTELIUS ET AL.: "[<sup>177</sup>Lu]pentixather: Comprehensive Preclinical Characterization of a First CXCR4-directed Endoradiotherapeutic Agent", THERANOSTICS, vol. 7, no. 9, 6 November 2017 (2017-11-06), pages 2350-2362, XP055544221, AU ISSN: 1838-7640, DOI: 10.7150/thno.19119, abstract; figure 1

WO-A2-2008083312

MIRA A. M. BEHNAM ET AL.: "C-Terminal Residue Optimization and Fragment Merging: Discovery of a Potent Peptide-Hybrid Inhibitor of Dengue Protease", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 5, no. 9, 11 September 2014 (2014-09-11), pages 1037-1042, XP055451443, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ml500245v, abstract; figure 1

WO-A1-2008150689

(57) Изобретение относится к визуализации и эндолучевой терапии заболеваний, связанных с хемокиновым рецептором 4 (CXCR4). Предложены соединения формулы (I), которые связывают или ингибируют CXCR4 и, кроме того, несут по меньшей мере один фрагмент, который может быть помечен. Также предложено медицинское применение таких соединений.



(I)

B1

044558

044558 B1

Настоящее изобретение относится к визуализации и эндоррадиотерапии заболеваний, связанных с хемокиновым рецептором 4 (CXCR4). Предложены соединения, которые связывают или ингибируют CXCR4 и, кроме того, несут по меньшей мере один фрагмент, который может быть помечен. Предложено также медицинское применение таких соединений.

В настоящей заявке цитируется ряд документов, включая заявки на патенты и руководства, издаваемые производителями. Раскрытие этих документов, хотя и не считается релевантным по отношению к патентоспособности данного изобретения, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. Более конкретно, все документы, на которые сделаны отсылки, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный такой документ был специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

Связывание единственного эндогенного лиганда CXCL12 (ранее называвшегося SDF-1 $\alpha$ ) с его родственным рецептором, хемокиновым рецептором 4 (CXCR4) [1], активирует нижестоящий (downstream) сигнальный путь протеинкиназы В (АКТ)/митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), что приводит к изменению экспрессии генов, полимеризации актина, перестройке клеточного скелета и миграции клеток. Физиологические функции оси CXCL12/CXCR4 включают эмбриогенез (регуляцию миграции и размещения эмбриональных стволовых клеток), иммунный ответ (направленную миграцию лейкоцитов в места воспаления), имплантацию эмбриона (расположение бластоцист в матринском эндометрии), гемопоэз (хоминг и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток/предшественников в костном мозге), развитие головного мозга и неоангиогенез [2-6]. Как следствие, генетические дефекты, обнаруженные у мышей с делецией гена *Cxcl12* и *Cxcr4*, вызывают идентичные, летальные фенотипы с тяжелыми нарушениями гемопоэза и развития ЦНС [7].

Было обнаружено, что рецептор CXCR4 участвует в различных заболеваниях. Например, он опосредует проникновение ВИЧ-1 в Т-клетки в качестве корецептора, где он был впервые идентифицирован [3]. Кроме того, при ревматоидном артрите (РА) CXCR4-экспрессирующие CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти накапливаются в воспаленной синовиальной оболочке из-за высокой локальной концентрации CXCL12 [8]. В патогенезе атеросклероза центральную роль играет хроническое воспаление артериальной стенки, характеризующееся хемокин-опосредованным притоком лейкоцитов [9]. Цитокин фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) является уникальным провоспалительным регулятором многих острых и хронических воспалительных заболеваний, которые способствуют прогрессированию поражения и воспалению бляшек. Эти хемокиноподобные функции опосредуются взаимодействием MIF с хемокиновыми рецепторами CXCR2 и CXCR4, что позволяет предположить центральную роль CXCR4 в развитии атеросклеротических бляшек, ремоделировании сосудов после повреждения, дестабилизации атеросклеротических бляшек и формировании аневризмы [10].

Кроме того, CXCR4 участвует в направленной миграции и локализации В-клеток в тканях пациентов с хроническим лейкозом [11], а также в регуляции органоспецифических метастазов в различных моделях рака молочной железы [12]. Кроме того, выраженная сверхэкспрессия CXCR4 была обнаружена более чем в 20 типах опухолей человека, включая гемопоэтические злокачественные новообразования, новообразования головного мозга, рак желудочно-кишечного тракта и другие типы рака [2, 13-14]. Таким образом, метод ранней оценки метастатического потенциала и метастатического распространения опухолей представляет собой ценный инструмент для планирования, мониторинга и контроля терапии, поскольку метастазирование рака является одним из критических факторов, влияющих на продолжительность жизни пациентов.

Учитывая неоспоримую актуальность CXCR4 в качестве диагностической и терапевтической молекулярной мишени, за последнее десятилетие было разработано множество пептидных и непептидных антагонистов, нацеленных на CXCR4. Среди них бициклам AMD3100 (плериксафор/Mozobil) - единственное соединение, одобренное FDA (в 2008) для мобилизации стволовых клеток и лечения гематологических и других видов злокачественных онкологических заболеваний [7, 15-17]. В доклинических исследованиях с использованием мышинных моделей различных гематологических и солидных злокачественных опухолей человека противоопухолевая терапия с использованием альтернативных низкомолекулярных антагонистов CXCR4, таких как AMD3465 [18-19] или MSX-122 [20], пептидных производных CXCL12 (СТСЕ-9908) [21], ВКТ-140 [22-24], POL-5551 [25-27]) или анти-CXCR4-антител [28-29], как было показано, воспроизводимо приводит к увеличению общей выживаемости, в первую очередь за счет эффективного предотвращения метастазов в отдаленные органы [30]. Другой мощный антагонист CXCR4, LY2510924 (цикло[*Phe-Tyr-Lys(iPr)-D-Arg-2-Nal-Gly-D-Glu-Lys(iPr)-NH<sub>2</sub>*)] [31-32], проявлял высокую противоопухолевую активность на моделях солидных опухолей и метастазов рака молочной железы, и в настоящее время оценивается в клинических исследованиях фазы II (NCT01391130 и NCT1439568). Сообщалось, что лактам-циклизованные гептапептиды являются мощными антагонистами CXCR4 с высокой эффективностью при лечении рака, ревматоидного артрита, фиброза легких и ВИЧ-инфекции (WO 2008150689 A1). Недавно было показано, что антагонисты циклического гептапептида с дисульфидным мостиком (WO/2011/092575A1) проявляют высокую стабильность *in vivo* [33-34], эффективно ингибируют метастазирование в легкие на модели меланомы [35] и снижают метастатический потенциал печеночно-клеточного рака и остеосаркомы на мышинной модели [36]. Модифицированный ана-

лог (R29, Ac-Arg-Ala-[D-Cys-Arg-Phe-His-Pen]-COOH) эффективно восстанавливает супрессивную активность Т-регуляторных клеток при раке почки [37].

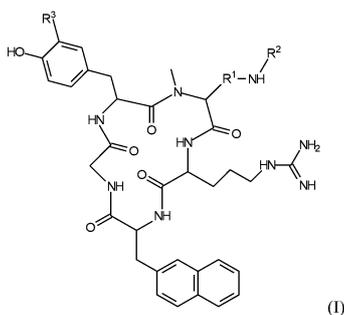
Среди этих нацеленных на CXCR4 антагонистов пептиды на основе Т-140 были первыми соединениями, которые использовались для молекулярной визуализации экспрессии CXCR4 *in vivo*; для неинвазивного обнаружения и визуализации тканей, экспрессирующих CXCR4, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), оптической или ОФЭКТ-визуализации использовались различные аналоги, меченные радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  или  $^{68}\text{Ga}$  или конъюгированные с флуоресцентными красителями, а также соответствующие бимодальные зонды [38-45].

Кроме того, были всесторонне оценены циклические пентапептиды на основе N-концевой последовательности CXCL12 [46] или, что более важно, уменьшенной последовательности связывания Т-140 цикло(Gly-Nal-Arg-Arg-D-Tyr) (FC-131) [47]. Подробные исследования взаимосвязи структуры и активности (SAR) подчеркнули важность отдельных аминокислотных остатков и их стереохимии, а также метилирования амидной связи [48-53] для оптимальной аффинности и антагонистической активности CXCR4. Основываясь на этих выводах и собственных исследованиях SAR, наша группа разработала первый агент молекулярной визуализации на основе пентапептида, направленного на CXCR4, [ $^{68}\text{Ga}$ ]пентиксафора. Замена Arg2 (в FC131) на D-орнитин и N-метилирование D-орнитина привело к CPCR4-каркасу (цикло-Тур<sup>1</sup>-D-[NMe]Orn<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Nal<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>), который показал отличную аффинность связывания с CXCR4 [54]. Дальнейшая функционализация боковой цепи Orn<sup>2</sup> подходящим линкером (4-аминометилбензойной кислотой, AMBS) и хелатором DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой) привела к пентиксафору (цикло(D-Тур<sup>1</sup>-D-[NMe]Orn<sup>2</sup>(AMBS-DOTA)-Arg<sup>3</sup>-Nal<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>), также называемому CPCR4.2 [54-56]; (WO 2007/096662, WO 2009/027706, WO 2011/131735). Его  $^{68}\text{Ga}$ -меченный аналог [ $^{68}\text{Ga}$ ]пентиксафор [57] демонстрирует высокую аффинность и селективность по отношению к CXCR4 человека, быстрое выведение почками и очень низкое неспецифическое фоновое накопление, и таким образом, позволяет получать чувствительные и высококонтрастные изображения тканей, экспрессирующих CXCR4, *in vivo* с использованием ПЭТ. Помимо успешного применения у пациентов с лимфомой [58], множественной миеломой [59-61], ОМЛ [62], мелкоклеточным раком легкого [63], глиобластомой [64] или другими солидными опухолями [65], недавно было показано, что [ $^{68}\text{Ga}$ ]пентиксафор-ПЭТ является ценным инструментом для обнаружения воспалительных процессов *in vivo*, например, после инфаркта миокарда [66-68] или инсульта [69], при атеросклерозе [70-72] или других воспалительных заболеваниях [73-74].

Альтернативный пептидный каркас (цикло(D-3-йодо-Тер<sup>1</sup>-D-[NMe]Orn<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Nal<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>)) был использован для синтеза первого эндорадиотерапевтического агента, нацеленного на CXCR4, а именно пентиксатера (цикло(D-3-йодо-Тур<sup>1</sup>-D-[NMe]Orn<sup>2</sup>(AMBS-DOTA)-Arg<sup>3</sup>-Nal<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>) [75-76] (WO 2015/185162). Первые многообещающие результаты были получены с использованием [ $^{177}\text{Lu}$ ]- и [ $^{90}\text{Y}$ ]-пентиксатера для PRRT (радионуклидной терапии, нацеленной на пептидные рецепторы) у пациентов с множественной миеломой [77-78], и поэтому недавно было начато клиническое испытание для дальнейшей оценки таргетной лечебно-диагностической концепции CXCR4 на основе [ $^{68}\text{Ga}$ ]пентиксафора/[ $^{177}\text{Lu}$ ]/[ $^{90}\text{Y}$ ]пентиксатера.

Кроме того, продолжаются доклинические исследования, направленные на установление потенциала альфа-терапии при диссеминированной микрометастатической гематологической злокачественной онкопатологии с использованием [ $^{213}\text{Bi}$ ]/[ $^{225}\text{Ac}$ ] пентиксатера. К сожалению, однако, применимость конструкции пептида пентиксафора/пентиксатера ограничена этими конкретными (до)клиническими сценариями; конструкция пептид-линкер-хелат как таковая высоко оптимизирована и допускает только незначительные структурные модификации в области хелатора [79-82], в то время как реализация альтернативных стратегий мечения (например, с использованием  $^{99\text{Tc}}$  или  $^{18}\text{F}$  или флуоресцентных красителей) недопустима.

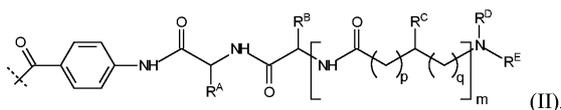
Соответственно, настоящее изобретение в первом аспекте относится к соединению следующей формулы (I)



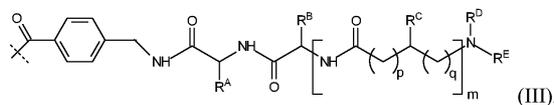
или его фармацевтически приемлемой соли, где

R<sup>1</sup> представляет собой алкандиильную цепь, предпочтительно C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкандиильную цепь, более предпочтительно C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> алкандиильную цепь, и наиболее предпочтительно линейный C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-фрагмент;

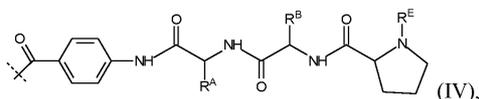
R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы (II)



формулы (III)



или формулы (IV)



которая связана с остальной частью соединения связью, отмеченной пунктирной линией, и где R<sup>A</sup> представляет собой H или алкил, предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, более предпочтительно H или C<sub>1-3</sub> алкил, наиболее предпочтительно H или метил;

R<sup>B</sup> представляет собой замещенный алкил, предпочтительно замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, который замещен по меньшей мере одной группой, выбранной из -NH<sub>2</sub> и гуанидино группы -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>;

R<sup>C</sup> представляет собой H или необязательно замещенный алкил, где алкил предпочтительно представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, более предпочтительно C<sub>1-3</sub> алкил, наиболее предпочтительно C<sub>1</sub> или C<sub>3</sub> алкил, с одним или несколькими необязательными заместителями, выбранными из -NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -S-CH<sub>3</sub> и 5-10-членный карбоцикл или 5-10-членный гетероцикл, содержащий кислород, азот и/или серу в качестве гетероатома (гетероатомов), где указанный карбоцикл или гетероцикл предпочтительно является арилом или гетероарилом, где R<sup>C</sup> может быть дополнительно замещен или может содержать цитотоксический агент, такой как аналог ауристатина;

p равно 0, 1 или 2;

q равно 0, 1 или 2;

p+q равно 0, 1 или 2;

m равно 0 или 1, предпочтительно 0;

R<sup>D</sup> представляет собой H или вместе с прилегающим к нему атомом азота образует 5- или 6-членный гетероцикл, причем гетероцикл также включает часть R<sup>E</sup>;

R<sup>E</sup> является группой, которая включает по меньшей мере одно из следующего:

(i) хелатирующий фрагмент,

(ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или нерadioактивным катионом или анионом,

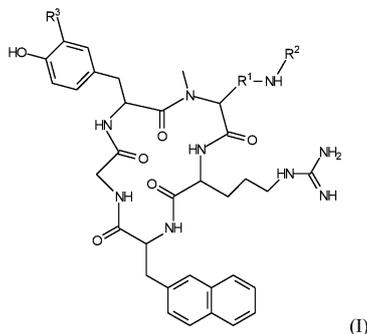
(iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно <sup>18</sup>F-фторид, или предшественник, подходящий для мечения таким радиоизотопом;

(iv) цитотоксический фрагмент, такой как аналог ауристатина,

(v) флуоресцентный фрагмент (краситель), такой как, например, Cy5 или Cy7; и

R<sup>3</sup> представляет собой H или I.

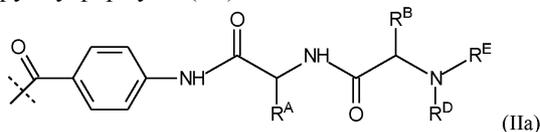
В предпочтительном варианте изобретение относится к соединению общей формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, где

R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкандиильную цепь;

R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы (IIa)



которая связана с остальной частью соединения связью, отмеченной пунктирной линией, и где

$R^A$  представляет собой H или  $CH_3$ ;

$R^B$  представляет собой -(линейный  $C_1$ - $C_6$  алкил)- $NH_2$  или -(линейный  $C_1$ - $C_6$  алкил)- $NH-C(=NH)-NH_2$ ;

$R^D$  представляет собой H;

$R^E$  представляет собой хелатирующий фрагмент, представленный остатком 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты; и

$R^3$  представляет собой H или I.

В областях направленной эндоррадиотерапии, а также молекулярной визуализации, обычно принятый подход к разработке подходящих агентов представляет собой дериватизацию первого фрагмента, который связывается с представляющей интерес молекулярной мишенью, со вторым фрагментом, содержащим метку, терапевтический радионуклид или диагностический радионуклид. С целью соединения двух фрагментов, то есть связывающего фрагмента и фрагмента, несущего радионуклид, используют линкеры.

Вообще говоря, конструкции линкеров не уделяется особого внимания, поскольку в данной области техники существует общее понимание, что линкер, в первую очередь, служит для установления определенного расстояния между связывающим фрагментом и фрагментом, несущим радионуклид. Основная цель состоит в том, чтобы избежать вмешательства компонента, несущего радионуклид, в связывающие свойства связывающего фрагмента. Общее понимание состоит в том, что сам линкер не вносит значительного вклада в связывание с мишенью.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что вставка пептидного линкера между фрагментом, связывающим циклический пентапептид, и меткой известных агентов, связывающих CXCR4, обеспечивает явные и неожиданные преимущества.

Преимущества включают повышенное связывание CXCR4 и лучшую интернализацию. Как объяснялось выше, это является неожиданным.

Еще одним преимуществом является обеспечение тераностического агента, то есть агента, который объединяет в одной молекуле диагностические и терапевтические свойства. Как объяснено в разделе о предшествующем уровне техники выше, получение такой молекулы не является тривиальным занятием. Хотя в идеальном сценарии терапевтические и диагностические агенты различаются только в отношении радионуклида (например, радиометалла), опыт с ранее существовавшими агентами, связывающими CXCR4, показал, что даже изменение одного только радионуклида изменяет связывающие свойства.

В частности, соединения по настоящему изобретению обеспечивают гибкость той части соединения, которая поддается обнаружению, тем самым позволяя создавать новые зонды, нацеленные на CXCR4, меченные широким спектром радионуклидов и/или флуоресцентных красителей для молекулярной визуализации и терапевтических применений.

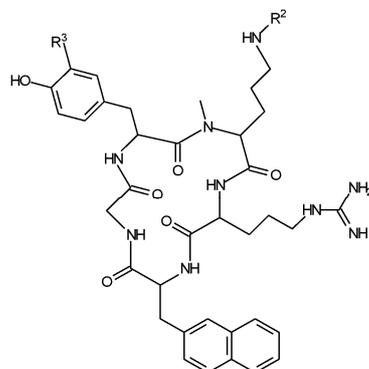
Еще одним преимуществом является значительная аффинность не только к CXCR4 человека, но также и к CXCR4 мыши. Последние два свойства иллюстративно показаны в табл. 1; см. примеры.

Другие дополнительные преимущества очевидны из прилагаемых примеров.

Понятно, что на всем протяжении настоящего описания термин "соединение" охватывает фармацевтически приемлемые соли, сольваты, полиморфы, пролекарства, совместно используемые лекарственные средства, сокристаллы, таутомеры, рацематы, энантиомеры или диастереомеры или их смеси, если не указано иное.

В соединениях формулы (I)  $R^1$  представляет собой алкандиильную цепь, предпочтительно  $C_1$ - $C_6$  алкандиильную цепь, более предпочтительно  $C_2$ - $C_3$  алкандиильную цепь и наиболее предпочтительно линейный  $C_3H_6$ -фрагмент.

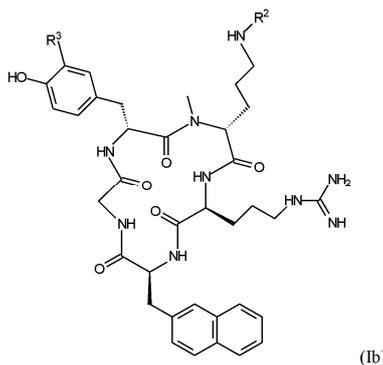
В соответствии с вышеизложенным, предпочтительно, чтобы соединение формулы (I) было представлено формулой (Ia)



(Ia),

где  $R^2$  и  $R^3$  имеют значения, указанные в настоящей заявке, включая их предпочтительные варианты осуществления.

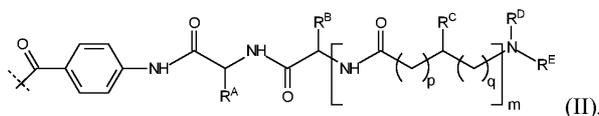
Кроме того, предпочтительно, чтобы соединение формулы (I) было представлено формулой (Ib)



(Ib)

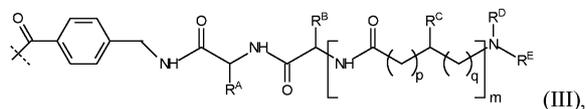
где  $R^2$  и  $R^3$  имеют значения, указанные в настоящей заявке, включая их предпочтительные варианты осуществления.

$R^2$  в формуле (I) или ее предпочтительных вариантах осуществления (Ia) и (Ib) представляет собой группу формулы (II)



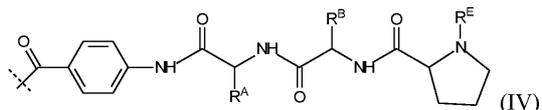
(II),

группу формулы (III)



(III),

или группу формулы (IV)



(IV).

Среди групп (II), (III) и (IV) предпочтение отдается (II) в контексте изобретения.

Группа формулы (II), (III) или (IV) связана с остальной частью соединения связью, отмеченной пунктирной линией.

$R^A$  в формулах (II), (III) и (IV) представляет собой H или алкил, предпочтительно H или  $C_1$ - $C_6$  алкил, более предпочтительно H или  $C_{1-3}$  алкил, наиболее предпочтительно H или метил.

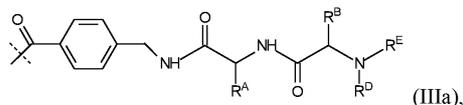
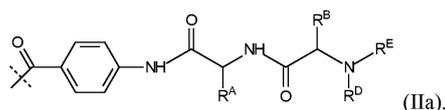
$R^B$  в формулах (II), (III) и (IV) представляет собой замещенный алкил, предпочтительно замещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил и более предпочтительно  $C_1$ - $C_4$  алкил. Алкильная группа предпочтительно представляет собой линейную алкильную группу. Алкил замещен по меньшей мере одной группой, такой как одна, две или три группы, выбранных из  $-NH_2$  и гуанидино группы  $-NH-C(=NH)-NH_2$ . Предпочтительно, чтобы алкильная группа  $R^B$  несла один заместитель, выбранный из  $-NH_2$  и гуанидино группы  $-NH-C(=NH)-NH_2$ . Более предпочтительно, чтобы алкильная группа была линейной алкильной группой, имеющей один заместитель, присоединенный к концевому атому углерода, т.е. атому углерода, наиболее удаленному от места присоединения  $R^B$  к остальной части групп (II), (III) или (IV). Таким образом, особенно предпочтительно, чтобы  $R^B$  был выбран из группы  $-(\text{линейный } C_1\text{-}C_6 \text{ алкил})-NH_2$  и  $-(\text{линейный } C_1\text{-}C_6 \text{ алкил})-NH-C(=NH)-NH_2$ .

$R^C$  представляет собой H или необязательно замещенный алкил. Алкильная группа предпочтительно представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкил, более предпочтительно  $C_{1-3}$  алкил, наиболее предпочтительно  $C_1$  или  $C_3$  алкил. Алкильная группа при необходимости замещена одним или несколькими заместителями, например одним, двумя или тремя заместителями. Предпочтительно алкильная группа не замещена или имеет один заместитель. Необязательный заместитель (заместители) выбирают из  $-NH_2$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-S-CH_3$  и 5-10-членного карбоцикла или 5-10-членного гетероцикла. Гетероцикл содержит кислород, азот и/или серу в качестве гетероатома (гетероатомов). Предпочтительно указанный карбоцикл представляет собой арильную группу, а указанный гетероцикл представляет собой гетероарильную группу.  $R^C$  может быть дополнительно замещен или может содержать цитотоксический агент, такой как аналог ауристатина.

$p$  равно 0, 1 или 2;  $q$  равно 0, 1 или 2, а  $p+q$  равно 0, 1 или 2.

$m$  равно 0 или 1, предпочтительно 0.

Таким образом, предпочтительно, чтобы  $R^2$  представлял следующую формулу (IIa) или (IIIa):



где  $R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^D$  и  $R^E$  имеют значения, указанные в настоящей заявке, включая их предпочтительные варианты осуществления.

$R^D$  представляет собой H или вместе с прилегающим к нему атомом азота образует 5- или 6-членный гетероцикл, причем этот гетероцикл также включает часть  $R^E$ . Гетероцикл, образованный  $R^D$  и частью  $R^E$ , обычно включает 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из кислорода, азота или серы, и предпочтительно включает 2 или 3 гетероатома, которые являются атомами азота. Предпочтительно  $R^D$  представляет собой H.

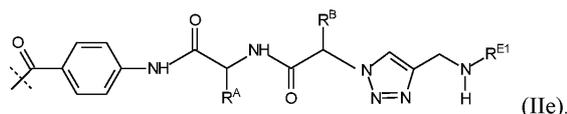
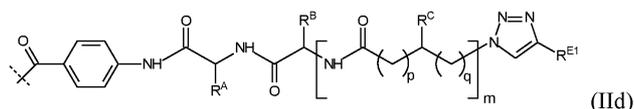
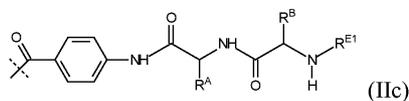
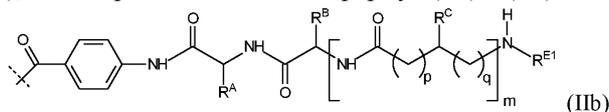
$R^E$  представляет собой группу, которая включает по меньшей мере одно из следующего:

- (i) хелатирующий фрагмент,
- (ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или нерadioактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерadioактивным катионом,
- (iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, или предшественник, пригодный для мечения таким радиоизотопом,
- (iv) цитотоксический фрагмент,
- (v) флуоресцентный фрагмент.

Обычно  $R^E$  включает один из фрагментов от (i) до (v), то есть необязательно, чтобы два или более из (i)-(v) присутствовали в одном соединении в соответствии с изобретением. Среди фрагментов (i)-(v) предпочтение отдается (i), (ii) и (iii). Таким образом, особенно предпочтительно, чтобы  $R^E$  содержал один из (i), (ii) и (iii). Еще более предпочтительно, чтобы  $R^E$  содержал один из (i) и (ii).

Как будет понятно специалисту в данной области техники, приведенное выше определение, согласно которому  $R^E$  содержит по меньшей мере один из вышеуказанных фрагментов, охватывает случай, когда  $R^E$  включает дополнительный фрагмент или другие фрагменты вместе по меньшей мере с одним фрагментом из (i)-(v). В соответствии с предпочтительным примером  $R^E$  может содержать, помимо по меньшей мере одного фрагмента из (i)-(v), соединительную группу, которая присоединяет по меньшей мере один фрагмент из (i)-(v) к остальной части соединения. Соединительная группа может быть двухвалентной соединительной группой, которая присоединяет один из (i)-(v) к остальной части соединения, или разветвленной соединительной группой, которая позволяет двум или более из (i)-(v) присоединяться к остальной части соединения. Предпочтительно, если такая связывающая группа присутствует, она является двухвалентной связывающей группой.

Таким образом, в другом предпочтительном варианте осуществления  $R^2$  имеет формулу, выбранную из формул (IIb) и (IId), более предпочтительно из формул (IIc) и (IIe).



Особо предпочтительно, чтобы  $R^2$  представлял группу формулы (IIc).

В этих формулах  $R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^C$ ,  $p$ ,  $q$  и  $m$  имеют значения, указанные в настоящей заявке, включая их предпочтительные варианты осуществления, а  $R^{E1}$  представляет собой группу, которая включает одно из следующих или является одним из следующих:

- (i) хелатирующий фрагмент,
- (ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или не-

радиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом,

(iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно  $^{18}\text{F}$ -фторид, или предшественник, подходящий для мечения таким радиоизотопом,

(iv) цитотоксический фрагмент,

(v) флуоресцентный фрагмент.

Также для  $\text{R}^{\text{E1}}$  предпочтение отдается (i), (ii) и (iii) среди (i) - (v). Таким образом, особо предпочтительно, чтобы  $\text{R}^{\text{E1}}$  содержал одно из (i), (ii) и (iii) или был одним из (i), (ii) и (iii). Еще более предпочтительно, чтобы  $\text{R}^{\text{E1}}$  содержал одно из (i) и (ii). Также для  $\text{R}^{\text{E1}}$  приведенное выше определение, согласно которому  $\text{R}^{\text{E1}}$  включает один из вышеуказанных фрагментов, охватывает случай, когда  $\text{R}^{\text{E1}}$  содержит дополнительный фрагмент или другие фрагменты вместе с одним фрагментом от (i) до (v), например, дополнительную связывающую группу, которая связывает один фрагмент от (i) до (v) с остальной частью соединения.

Хелатирующий фрагмент (i) и (ii), как в контексте определения  $\text{R}^{\text{E}}$ , так и  $\text{R}^{\text{E1}}$ , подходит для образования хелата с радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно радиоактивным или нерадиоактивным катионом. Подходящие хелатирующие фрагменты для различных катионов и анионов хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы в контексте настоящего изобретения.

Предпочтительно хелатирующий фрагмент включает по меньшей мере одно из макроциклической кольцевой структуры с 8-20 кольцевыми атомами, из которых 2 или более, предпочтительно 3 или более атомов выбраны из атомов кислорода, атомов серы и атомов азота; и ациклической хелатирующей структуры с открытой цепью с 8-20 атомами основной цепи, из которых 2 или более, предпочтительно 3 или более атомов являются гетероатомами, выбранными из атомов кислорода, атомов серы и атомов азота.

Предпочтительным примером хелатирующего фрагмента является остаток хелатирующего агента, такого как бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан (CBTE2a), циклогексил-1,2-диаминтетрауксусная кислота (CDTA), 4-(1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-1-ил)-метилбензойная кислота (CPTA),  $\text{N}'$ -[5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил]- $\text{N}$ -[5-[[4-[5-аминопентил-(гидрокси)амино]-4-оксобутаноил]амино]пентил]- $\text{N}$ -гидроксибутандиамида (DFO), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан (DO2A), 1,4,7,10-тетраазабициклододекан- $\text{N}$ , $\text{N}'$ , $\text{N}''$ , $\text{N}'''$ -тетрауксусная кислота (DOTA),  $\alpha$ -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота или 2-[1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триуксусная кислота]пентандионовая кислота (DOTAGA),  $\text{N}$ , $\text{N}'$ -дипиридоксилэтилендиамин- $\text{N}$ , $\text{N}'$ -диацетат-5,5'-бис(фосфат) (DPDP), диэтилен триаминпентауксусная кислота (DTPA), этилендиамин- $\text{N}$ , $\text{N}'$ -тетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликоль- $\text{O}$ , $\text{O}$ -бис(2-аминоэтил)- $\text{N}$ , $\text{N}$ , $\text{N}'$ , $\text{N}'$ -тетрауксусная кислота (EGTA),  $\text{N}$ , $\text{N}$ -бис(гидроксibenзил)этилендиамин- $\text{N}$ , $\text{N}'$ -диуксусная кислота (HBED), гидроксиэтилендиаминтриуксусная кислота (HEDTA), 1-(*p*-нитробензил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триацетат (HP-DOA3), 6-гидразинил- $\text{N}$ -метилпиридин-3-карбоксамид (HYNIC), 1,4,7-триазабициклононан-1-янтарная кислота-4,7-диуксусная кислота (NODASA), 1-(1-карбоксихлорпропил)-4,7-(карбокси)-1,4,7-триазабициклононан (NODAGA), 1,4,7-триазабициклононан-триуксусная кислота (NOTA), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан (TE2A), 1,4,8,11-тетраазабициклододекан-1,4,8,11-тетрауксусная кислота (TETA), терпиридин-бис(метиленаминтетрауксусная кислота) (TMT), 1,4,7,10-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан- $\text{N}$ , $\text{N}'$ , $\text{N}''$ , $\text{N}'''$ -тетрауксусная кислота (TRITA), триэтилентетраамингексауксусная кислота (TTNA),  $\text{N}$ , $\text{N}'$ -бис[(6-карбокси-2-пиридил)метил]-4,13-диаза-18-краун-6 ( $\text{H}_2\text{macropa}$ ) и 4-амино-4-{2-[(3-гидрокси-1,6-диметил-4-оксо-1,4-дигидропиридин-2-илметил)карбамоил]этил} гептандионовая кислота бис-[(3-гидрокси-1,6-диметил-4-оксо-1,4-дигидропиридин-2-илметил)амид] (THP), где остаток можно получить путем ковалентного связывания карбоксильной группы, содержащейся в хелатирующем агенте, с остальной частью соединения через сложноэфирную или амидную связь, предпочтительно амидную связь. Например, в формулах (II), (III), (IV), (IIa), (IIIa), (IIb), (IIc) и (IIe) амидная связь может быть удобно образована непосредственно из карбоксильной группы, содержащейся в приведенных выше примерах хелатирующих агентов, и атома азота, к которому  $\text{R}^{\text{E}}$  или  $\text{R}^{\text{E1}}$ , соответственно, присоединен в этих формулах.

В более предпочтительном примере хелатирующий фрагмент представляет собой остаток хелатирующего агента, выбранного из DOTA и DOTAGA, еще более предпочтительно остаток, получаемый путем образования амидной связи из карбоксильной группы, содержащейся в DOTA и DOTAGA, и атома азота, к которому  $\text{R}^{\text{E}}$  или  $\text{R}^{\text{E1}}$ , соответственно, присоединены в формулах (II), (III), (IV), (IIa), (IIIa), (IIb), (IIc) или (IIe).

Примеры радиоактивных катионов, которые при необходимости хелатируют хелатирующим фрагментом в соответствии с (ii), выбраны из катионов  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52\text{m}}\text{Mn}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Ni}$ ,  $^{57}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{114\text{m}}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{127}\text{Te}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{151}\text{Pm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{172}\text{Tm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{191}\text{Pt}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , и  $^{227}\text{Th}$ , или молекулы, содержащей  $^{18}\text{F}$ , такой как  $^{18}\text{F}$ -[AlF] $^{2+}$ .

Предпочтительные хелатированные катионы выбраны из катионов  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,

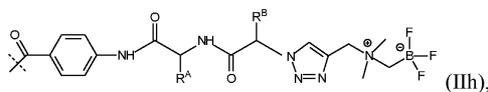
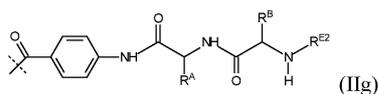
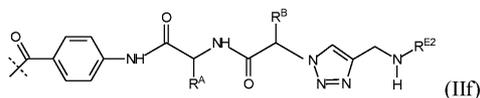
$^{111}\text{In}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , и  $^{227}\text{Th}$ , или катионной молекулы, содержащей  $^{18}\text{F}$ . Еще более предпочтительными являются катионы  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ , и  $^{213}\text{Bi}$ .

Фрагменты (iii), несущие ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно  $^{18}\text{F}$ -фторид, или предшественники, пригодные для мечения таким радиоизотопом, как указано в определении  $\text{R}^{\text{E}}$  и  $\text{R}^{\text{E}1}$ , также известны в данной области техники. В качестве примеров такого предшественника можно указать группу формулы  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{BF}_3^-$  и группу формулы  $-\text{Ar}-\text{SiF}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$ , где Ar представляет собой двухвалентную ароматическую группу, предпочтительно фениленовую группу. Как будет понятно специалисту в данной области техники, такая группа формулы  $-\text{Ar}-\text{SiF}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$  может быть легко связана с остальной частью соединений в соответствии с изобретением посредством функциональной группы, которая может быть присоединена к Ar с открытой валентностью, как указано в формуле, и которая подходит для ковалентного связывания группы  $-\text{Ar}-\text{SiF}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$ . Например, можно указать амидную связь или сложноэфирную связь, которая может быть образована, например, если группа  $-\text{Ar}-\text{SiF}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$  представлена как часть производного бензойной кислоты формулы  $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SiF}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)_2$ .

Цитотоксический фрагмент в виде фрагмента (iv) может быть обеспечен, например, посредством ауристатинового аналога, такого как монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), PF-06380101 с метаболически отделяемым линкером или без него.

Флуоресцентные фрагменты (v) также известны в данной области техники как флуоресцентные красители, которые могут быть ковалентно связаны в качестве маркерных фрагментов с соединением. Примерами таких красителей, которые могут быть ковалентно связаны в виде или в пределах  $\text{R}^{\text{E}}$  или  $\text{R}^{\text{E}1}$  с остальной частью соединения, являются цианиновые красители на основе  $\text{Cu}5$  и  $\text{Cu}7$ .

В соответствии с вышеизложенным, особенно предпочтительно, чтобы  $\text{R}^2$  имел формулу, выбранную из формул (IIf) - (IIh)



где

$\text{R}^{\text{A}}$ ,  $\text{R}^{\text{B}}$  имеют значения, определенные в настоящей заявке, включая их предпочтительные варианты осуществления, и

$\text{R}^{\text{E}2}$  представляет собой хелатирующий фрагмент (i), представленный остатком хелатирующего агента, содержащего карбоксильную группу, указанный остаток образуется за счет образования амидной связи карбоксильной группы хелатирующего агента и атома азота, к которому присоединен  $\text{R}^{\text{E}2}$ . Предпочтительные хелатирующие агенты, содержащие карбоксильную группу, перечислены выше, и особо предпочтительными являются DOTA и DOTAGA.

В другом предпочтительном варианте осуществления  $\text{R}^{\text{E}2}$  представляет собой (ii) хелат, образованный остатком хелатирующего агента, содержащего карбоксильную группу с хелатированным радиоактивным катионом, где указанный остаток может быть получен путем образования амидной связи из карбоксильной группы хелатирующего агента и атома азота, к которому присоединен  $\text{R}^{\text{E}2}$ . Предпочтительные хелатирующие агенты, содержащие карбоксильную группу, перечислены выше, и особо предпочтительными являются DOTA и DOTAGA. Предпочтительный катион выбран из катиона  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52\text{m}}\text{Mn}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Ni}$ ,  $^{57}\text{Ni}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{110\text{m}}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{114\text{m}}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{127}\text{Te}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{151}\text{Pm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{172}\text{Tm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{191}\text{Pt}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{203}\text{Pb}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , и  $^{227}\text{Th}$ , или катионной молекулы, содержащей  $^{18}\text{F}$ , такой как  $^{18}\text{F}-[\text{AlF}]^{2+}$ .

Еще более предпочтительно, чтобы радиоактивный катион был выбран из катиона  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , и  $^{227}\text{Th}$  или катионной молекулы, содержащей  $^{18}\text{F}$ . Еще более предпочтительными являются катионы  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ , и  $^{213}\text{Bi}$ .

В другом предпочтительном варианте осуществления указанное соединение или соль связывает CXCR4 человека с  $\text{IC}_{50}$  100 нМ или менее, предпочтительно 20 нМ или менее, наиболее предпочтительно 5 нМ или менее.

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей или состоящей из соединения или соли в соответствии с первым аспектом.

В третьем аспекте изобретение обеспечивает диагностическую или терапевтическую композицию, содержащую или состоящую из соединения или соли в соответствии с первым аспектом.

Фармацевтическая композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемые но-

сители, вспомогательные вещества и/или разбавители. Примеры подходящих фармацевтических носителей, вспомогательных веществ и/или разбавителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть приготовлены хорошо известными традиционными способами. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может быть осуществлено различными способами, например, путем внутривенного, интраперитонеального, подкожного, внутримышечного, местного, интрадермального, интраназального или интрабронхиального введения. Особо предпочтительно, чтобы указанное введение осуществляли путем инъекции и/или доставки, например, в участок поджелудочной железы, или в артерию головного мозга, или непосредственно в ткань головного мозга. Композиции также можно вводить непосредственно в целевой участок, например путем биологической доставки к внешнему или внутреннему целевому участку, например поджелудочной железе или головному мозгу. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая массу тела пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие препараты, вводимые одновременно. Фармацевтически активное вещество может присутствовать в количествах от 0,1 нг до 10 мг/кг массы тела на дозу; однако предусмотрены дозы ниже или выше этого примерного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов.

Вышесказанное с соответствующими модификациями применимо также к диагностическим композициям.

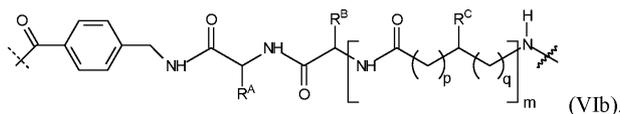
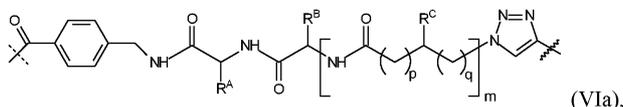
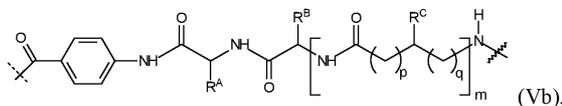
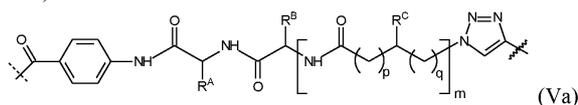
В той степени, в которой описанная выше фармацевтическая композиция, диагностическая композиция и терапевтическая композиция содержат одно или несколько соединений по настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы никакие другие фармацевтически активные соединения, диагностически активные соединения или терапевтически активные соединения не присутствовали. В альтернативном варианте могут присутствовать дополнительные терапевтически активные, диагностически активные или фармацевтически активные соединения, например противораковые агенты.

В четвертом аспекте изобретение обеспечивает соединение или соль в соответствии с первым аспектом для использования в медицине, предпочтительно в ядерной медицине, для ядерно-молекулярной визуализации или оптической визуализации, или направленной эндордиотерапии.

В пятом аспекте изобретение обеспечивает соединение или соль в соответствии с первым аспектом для применения в способе лечения или профилактики заболеваний, которые связаны с повышенной экспрессией хемокиновых рецепторов подтипа 4 (CXCR4), таких как рак и лимфопролиферативные заболевания, а также сердечно-сосудистые заболевания, СПИД и воспалительные заболевания.

В шестом аспекте изобретение обеспечивает соединение или соль в соответствии с первым аспектом для использования в способе диагностики и/или определения стадии рака.

В седьмом аспекте изобретение обеспечивает применение соединения линкера, имеющего структуру формулы (Va) или (Vb), (VIa) или (VIb)



для соединения агента, связывающего CXCR4, с группой, включающей по меньшей мере одно из следующего:

- (i) хелатирующий фрагмент,
- (ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом,
- (iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно  $^{18}\text{F}$ -фторид, или предшественник, подходящий для мечения таким радиоизотопом,

(iv) цитотоксический фрагмент, такой как аналог ауристатина,  
 (v) флуоресцентный фрагмент (краситель), такой как, например, Cy5 или Cy7,  
 где  $R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^C$ , p, q и m имеют значения, указанные выше, включая их предпочтительные варианты осуществления.

Будет понятно, что также определения и предпочтительные определения для фрагментов (i)-(v), приведенные выше для соединений в соответствии с изобретением, применимы в этом контексте.

Термин "агент, связывающий CXCR4" относится к любому агенту, который способен связываться с хемокиновым рецептором 4 (CXCR4), предпочтительно с аффинностью  $IC_{50}$  1 мкМ или более, 500 нМ или более, 100 нМ или более, 50 нМ или более, или 20 нМ или более. Средства и способы определения аффинности рецептора - связывающего агента известны в данной области техники и включают, например, поверхностный плазмонный резонанс. В структурном отношении агент, связывающий CXCR4, особо не ограничивается. Предпочтительные варианты осуществления включают (i) природный лиганд (CXCL12) и (ii) соединения, которые отличаются от соединений формулы (I) по настоящему изобретению тем, что  $R^2$  заменен на H.

Применения в соответствии с седьмым аспектом включают (a) взаимодействие связывающего CXCR4 агента или его химически активированной формы с линкером, имеющим структуру формулы (Va), (Vb), (VIa) или (VIb), так что первая ковалентная связь образуется между указанным агентом, связывающим CXCR4, и указанным линкером, где пунктирная линия в формулах (Va), (Vb), (VIa) и (VIb) указывает свободную валентность, которая преобразуется в указанную первую ковалентную связь; и (b) взаимодействие группы, содержащей по меньшей мере один из пунктов (i)-(v) в соответствии с седьмым аспектом, или её химически активированной формы с указанным линкером таким образом, что между указанной группой и указанным линкером образуется вторая ковалентная связь, где волнистая линия в формулах (Va), (Vb), (VIa) и (VIb) указывает свободную валентность, которая преобразуется в указанную вторую ковалентную связь.

Что касается вариантов осуществления, охарактеризованных в этом описании, в частности в формуле изобретения, предполагается, что каждый вариант осуществления, упомянутый в зависимом пункте формулы, объединен с каждым вариантом осуществления каждого пункта формулы (независимого или зависимого), от которого зависит указанный зависимый пункт формулы изобретения. Например, в случае независимого п.1 формулы изобретения, в котором перечисляются 3 альтернативы A, B и C, зависимого пункта 2 формулы изобретения, в котором перечисляются 3 альтернативы D, E и F, и пункта 3 формулы изобретения, зависимого от пунктов формулы 1 и 2, в котором перечисляются 3 альтернативы G, H и I, следует понимать, что описание однозначно раскрывает варианты осуществления, соответствующие комбинациям

A, D, G;

A, D, H; A, D, I; A, E, G; A, E, H; A, E, I; A, F, G; A, F, H; A, F, I; B, D, G; B, D, H; B, D, I;

B, E, G; B, E, H; B, E, I; B, F, G; B, F, H; B, F, I; C, D, G; C, D, H; C, D, I; C, E, G; C, E, H; C;

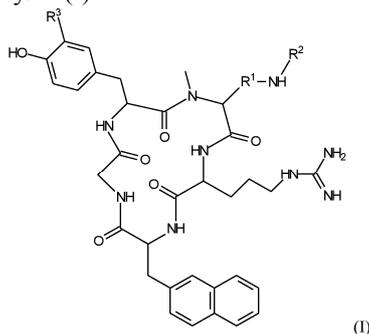
E, I; C, F, G; C, F, H; C, F, I,

если специально не указано иное.

Аналогичным образом, а также в тех случаях, когда независимые и/или зависимые пункты формулы не содержат альтернатив, следует понимать, что если зависимые пункты формулы относятся к множеству предшествующих пунктов формулы изобретения, любая комбинация охваченного ими заявленного решения считается раскрытой в явной форме. Например, в случае независимого п.1, зависимого п.2, ссылающегося на п.1, и зависимого п.3, ссылающегося на оба пункта формулы изобретения 2 и 1, следует, что комбинация технических решений по пунктам формулы 3 и 1 ясно и недвусмысленно раскрыта, как и комбинация решений по пунктам формулы изобретения 3, 2 и 1. В случае, если присутствует дополнительный зависимый пункт формулы изобретения, который зависит от любого из пунктов формулы изобретения 1-3, следует, что комбинация технических решений по пп.4 и 1, пп.4, 2 и 1, пп.4, 3 и 1, а также пп.4, 3, 2 и 1 раскрыта ясно и однозначно. Это также относится к следующим пунктам.

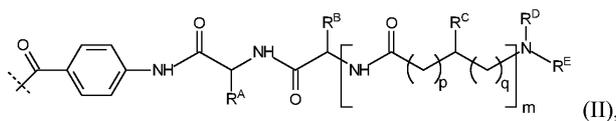
В частности, изобретение включает следующие элементы:

1. Соединение следующей формулы (I)

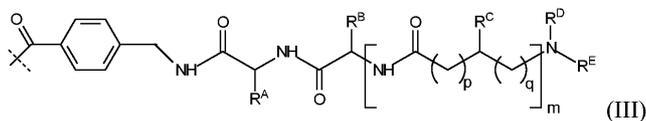


или его фармацевтически приемлемая соль, где

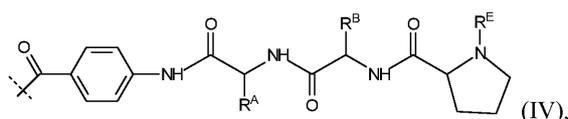
$R^1$  представляет собой алкандиильную цепь, предпочтительно  $C_1$ - $C_6$  алкандиильную цепь, более предпочтительно  $C_2$ - $C_3$  алкандиильную цепь и наиболее предпочтительно линейную  $C_3H_6$ -группу;  
 $R^2$  представляет собой группу формулы (II)



формулы (III)



или формулы (IV)



которая связана с остальной частью соединения связью, отмеченной пунктирной линией, и где

$R^A$  представляет собой H или алкил, предпочтительно H или  $C_1$ - $C_6$  алкил, более предпочтительно H или  $C_{1-3}$  алкил, наиболее предпочтительно H или метил;

$R^B$  представляет собой замещенный алкил, предпочтительно замещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил, где замещенный алкил замещен по меньшей мере одной группой, выбранной из  $-NH_2$  и гуанидино группы  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ;

$R^C$  представляет собой H или необязательно замещенный алкил, где алкил предпочтительно представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкил, более предпочтительно  $C_{1-3}$  алкил, наиболее предпочтительно  $C_1$  или  $C_3$  алкил, с одним или несколькими необязательными заместителями, выбранными из  $-NH_2$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-S-CH_3$ , и 5-10-членный карбоцикл или 5-10-членный гетероцикл, содержащий кислород, азот и/или серу в качестве гетероатома (гетероатомов), где указанный карбоцикл или гетероцикл предпочтительно является арилом или гетероарилом, где  $R^C$  может быть дополнительно замещен цитотоксическим агентом, таким как аналог ауристатиона, или может содержать его;

$p$  равно 0, 1 или 2;

$q$  равно 0, 1 или 2;

$p+q$  равно 0, 1 или 2;

$m$  равно 0 или 1, предпочтительно 0;

$R^D$  представляет собой H или вместе с прилегающим к нему атомом азота образует 5- или 6-членный гетероцикл, причем гетероцикл также включает часть  $R^E$ ;

$R^E$  представляет собой группу, которая включает по меньшей мере одно из следующего:

(i) хелатирующий фрагмент,

(ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом,

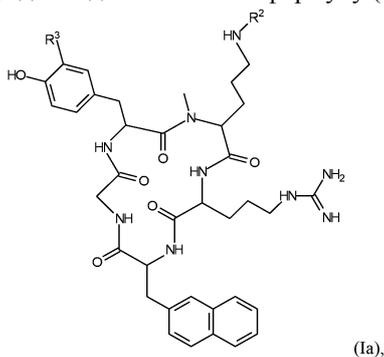
(iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно  $^{18}F$ -фторид, или предшественник, пригодный для мечения такими радиоизотопами;

(iv) цитотоксический фрагмент, такой как аналог ауристатиона,

(v) флуоресцентная группа (краситель), такая как, например, Cy5 или Cy7; и

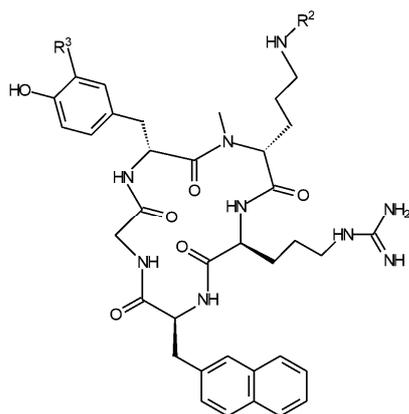
$R^3$  представляет собой H или I.

2. Соединение или соль по п. 1, где соединение имеет формулу (Ia)



и где  $R^2$  и  $R^3$  определены в п. 1.

3. Соединение или соль из п. 2, где соединение имеет формулу (Ib)

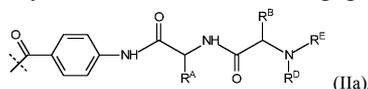


(Ib)

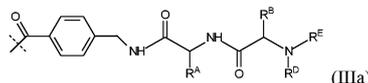
и где  $R^2$  и  $R^3$  определены в п.1.

4. Соединение или соль по любому из пп.1-4, где  $R^B$  представляет собой замещенный линейный  $C_1$ - $C_6$  алкил, более предпочтительно замещенный линейный  $C_1$ - $C_4$  алкил, который замещен на своем конце атоме углерода одной группой, выбранной из  $-NH_2$  и  $-NH-C(=NH)-NH_2$ .

5. Соединение или соль по любому из пп.1-4, где  $R^2$  имеет формулу (IIa) или (IIIa)



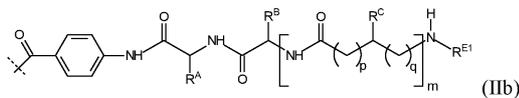
(IIa),



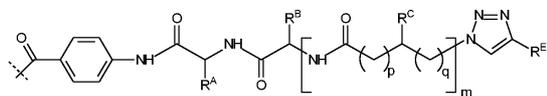
(IIIa),

где  $R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^D$  и  $R^E$  определены в п.1 или 4.

6. Соединение или соль по любому из пп.1-4, где  $R^2$  имеет формулу, выбранную из формул (IIb) и (IIc)



(IIb)



(IIc),

где

$R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^C$ , p, q и m определены в п.1 или 4 и

$R^{E1}$  представляет собой группу, которая включает по меньшей мере одно из следующего:

(i) хелатирующий фрагмент,

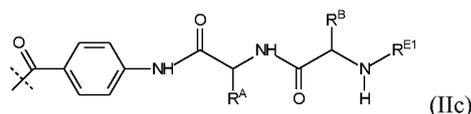
(ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом,

(iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно  $^{18}F$ -фторид, или предшественник, подходящий для мечения таким радиоизотопом,

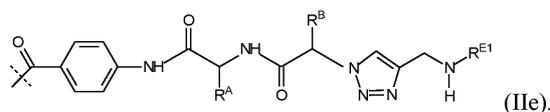
(iv) цитотоксический фрагмент, такой как, например, аналоги ауристатиона,

(v) флуоресцентная группа (краситель), такая как  $Cu5$  или  $Cu7$ .

7. Соединение или соль по п.6, где  $R^2$  имеет формулу, выбранную из формул (IIc) и (IIe)



(IIc)



(IIe),

где

$R^A$ ,  $R^B$  и  $R^{E1}$  определены в п.6.

8. Соединение или соль по любому из пп.1-7, где  $R^E$  или  $R^{E1}$ , соответственно, выбраны из (i) группы, которая включает хелатирующий фрагмент, и (ii) хелата, образованного хелатирующим фрагментом (i) с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом, и где хелатирующий фрагмент включает по меньшей мере одно из макроциклической кольцевой структуры с 8-20 кольцевыми атомами,

из которых 2 или более, предпочтительно 3 или более, выбраны из атомов кислорода, атомов серы и атомов азота; и ациклической хелатирующей структуры с открытой цепью с 8-20 атомами основной цепи, из которых 2 или более, предпочтительно 3 или более, являются гетероатомами, выбранными из атомов кислорода, атомов серы и атомов азота.

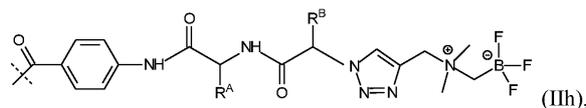
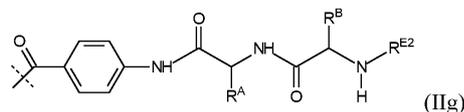
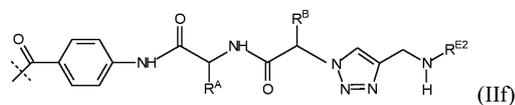
9. Соединение или соль по любому из пп.1-7, где хелатирующий фрагмент представляет собой остаток, полученный из хелатирующего агента, выбранного из бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (CBTE2a), циклогексил-1,2-диаминтетрауксусной кислоты (CDTA), 4-(1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-1-ил)метилбензойной кислоты (CPTA), N'-[5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил]-N-[5-[[4-[5-аминопентил-(гидрокси)амино]-4-оксобутаноил]амино]пентил]-N-гидроксипентандиамида (DFO), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (DO2A), 1,4,7,10-тетраазабициклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (DOTA),  $\alpha$ -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты или 2-[1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триуксусной кислоты]пентандиовой кислоты (DOTAGA), N,N'-дипиридоксилэтилендиамин-N,N'-диацетат-5,5'-бис(фосфата) (DPDP), диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), этилендиамин-N,N'-тетрауксусной кислоты (EDTA), этиленгликоль-О,О-бис(2-аминоэтил)-N,N',N''-тетрауксусной кислоты (EGTA), N,N-бис(гидроксибензил)этилендиамин-N,N'-диуксусной кислоты (HBED), гидроксиэтилендиаминтриуксусной кислоты (HEDTA), 1-(п-нитробензил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триацетата (HP-DOA3), 6-гидразинил-N-метилпиридин-3-карбоксамида (HYNIC), 1,4,7-триазабициклононан-1-янтарной кислоты-4,7-диуксусной кислоты (NODASA), 1-(1-карбокси-3-карбоксипропил)-4,7-(карбокси)-1,4,7-триазабициклононана (NODAGA), 1,4,7-триазабициклононантриуксусной кислоты (NOTA), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (TE2A), 1,4,8,11-тетраазабициклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), терпирин-бис(метиленаминтетрауксусной кислоты) (TMT), 1,4,7,10-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (TRITA), триэтилентетраамингексауксусной кислоты (TTNA), N,N'-бис[(6-карбокси-2-пиридил)метил]-4,13-диазо-18-краун-6 (H<sub>2</sub>масгора) и 4-амино-4-{2-[(3-гидрокси-1,6-диметил-4-оксо-1,4-дигидро-пиридин-2-илметил)карбамоил]этил}гептандиовой кислоты бис-[(3-гидрокси-1,6-диметил-4-оксо-1,4-дигидропиридин-2-илметил)амида] (THP), где остаток может быть получен путем ковалентного связывания карбоксильной группы, содержащейся в хелатирующем агенте, с остатком соединения через сложноэфирную или амидную связь, предпочтительно амидную связь.

10. Соединение или соль по п.9, где хелатирующий агент выбран из DOTA и DOTAGA.

11. Соединение или соль по любому из пп.1-10, где R<sup>E</sup> или R<sup>E1</sup>, соответственно, представляет собой группу, которая включает хелат, образованный хелатирующим фрагментом с хелатируемым радиоактивным катионом, выбранным из катиона <sup>44</sup>Sc, <sup>47</sup>Sc, <sup>51</sup>Cr, <sup>52m</sup>Mn, <sup>58</sup>Co, <sup>52</sup>Fe, <sup>56</sup>Ni, <sup>57</sup>Ni, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>66</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>89</sup>Zr, <sup>90</sup>Y, <sup>89</sup>Y, <sup>94m</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc, <sup>97</sup>Ru, <sup>105</sup>Rh, <sup>109</sup>Pd, <sup>111</sup>Ag, <sup>110m</sup>In, <sup>111</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>114m</sup>In, <sup>117m</sup>Sn, <sup>121</sup>Sn, <sup>127</sup>Te, <sup>142</sup>Pr, <sup>143</sup>Pr, <sup>149</sup>Pm, <sup>151</sup>Pm, <sup>149</sup>Tb, <sup>153</sup>Sm, <sup>157</sup>Gd, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Ho, <sup>165</sup>Dy, <sup>169</sup>Er, <sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>172</sup>Tm, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>191</sup>Pt, <sup>197</sup>Hg, <sup>198</sup>Au, <sup>199</sup>Au, <sup>212</sup>Pb, <sup>203</sup>Pb, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>223</sup>Ra, <sup>225</sup>Ac, или катионную молекулу, содержащую <sup>18</sup>F, такую как <sup>18</sup>F-[AlF]<sup>2+</sup>.

12. Соединение или соль по п.11, где радиоактивный катион выбран из катиона <sup>99m</sup>Tc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>44</sup>Sc, <sup>47</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>161</sup>Tb, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>188</sup>Re, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac и <sup>227</sup>Th, или катионной молекулы, содержащей <sup>18</sup>F.

13. Соединение или соль по любому из пп.1-4, где R<sup>2</sup> имеет формулу, выбранную из формул (IIf)-(IIh)

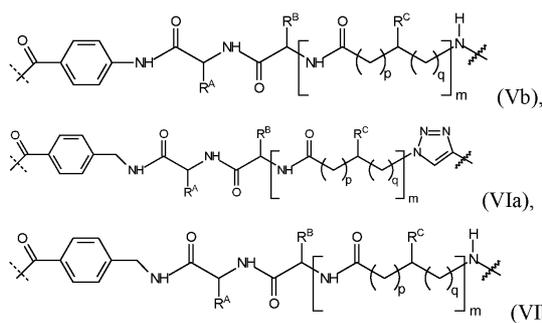


где

R<sup>A</sup>, R<sup>B</sup> определены в п.1 или 4 и

R<sup>E2</sup> выбран из (i) остатка хелатирующего агента, содержащего карбоксильную группу, и (ii) хелата, образованного остатком хелатирующего агента, содержащего карбоксильную группу, с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом, причем указанный остаток может быть получен путем образования амидной связи из карбоксильной группы хелатирующего агента и атома азота, к которому при-





для соединения агента, связывающего CXCR4, с группой, включающей по меньшей мере одно из следующего:

- (i) хелатирующий фрагмент,
  - (ii) хелат, образованный хелатирующим фрагментом с хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом или анионом, предпочтительно хелатированным радиоактивным или нерадиоактивным катионом,
  - (iii) фрагмент, несущий ковалентно связанный радиоизотоп, предпочтительно <sup>18</sup>F-фторид, или предшественник, подходящий для мечения таким радиоизотопом,
  - (iv) цитотоксический агент, такой как аналог ауристатиона,
  - (v) флуоресцентный фрагмент (краситель), такой как, например, Cy5 или Cy7,
- где R<sup>A</sup>, R<sup>B</sup>, R<sup>C</sup>, p, q и m определены в п. 1 или 4.

#### Описание фигур

Фиг. 1: Структуры выбранных лигандов CXCR4. Синтетическая основа и циклический связывающий каркас CPCR4 (1). FC131 (2) использовали в качестве радиолиганда в анализах *in vitro*. 3 и 4 являются ранее описанными лигандами CXCR4 для мечения <sup>68</sup>Ga (пентиксафор (3) и <sup>177</sup>Lu/<sup>90</sup>Y ERT (пентиксатер (4)) и были включены в настоящее исследование посредством ссылок (Wester et al., *imaging. Theranostics*.2015; 5: 618; Schottelius et al. [177] Lu-pentixather: preclinical and first patient results with a highly promising CXCR4-directed endoradiotherapeutic agent. *Journal of Nuclear Medicine*. 2015; 56:339-339; Herrmann et al. First-in-man experience of CXCR4-directed endoradiotherapy with <sup>177</sup>Lu-and <sup>90</sup>Y-labelled pentixather in advanced stage multiple myeloma with extensive intra-and extramedullary disease. *Journal of Nuclear Medicine*. 2015; jnumed. 115.167361). Структурные модификации каркаса для 5-16 перечислены в табл. 1.

Фиг. 2: Кинетика интернализации <sup>177</sup>Lu-15 и <sup>177</sup>Lu-16 в клетках CXCR4<sup>+</sup> Chem1 по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4 (вверху), и кинетика экстернализации <sup>177</sup>Lu-15 и <sup>177</sup>Lu-16 в клетках CXCR4<sup>+</sup> Chem1 по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4 (внизу). Все данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3).

Фиг. 3: Данные биораспределения (в % ID/g) через 6 ч после инъекции. Биораспределение <sup>177</sup>Lu-15 и <sup>177</sup>Lu-16 у мышей SCID с ксенотрансплантатом опухоли Дауди (n=4), по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4 (n=4).

Фиг. 4: Данные биораспределения (в % ID/g) через 48 ч после инъекции. Биораспределение <sup>177</sup>Lu-15 и <sup>177</sup>Lu-16 у мышей SCID с ксенотрансплантатом опухоли Дауди (n=4) по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4 (n=4).

Фиг. 5: Проекция максимальной интенсивности (MIP, от 0 до 12% ID/мл) статических ПЭТ-сканирований мышей SCID с лимфомой Дауди, через 1 ч после инъекции с использованием <sup>68</sup>Ga-3, <sup>68</sup>Ga-15, <sup>68</sup>Ga-16 и <sup>68</sup>Ga-15, при совместном введении с AMD3100 (2 мг/кг).

Фиг. 6: Кривые зависимости активности от времени (линейный график) в % ID/мл для пула крови (сердце), мышц, печени и опухоли. Графики для (a) <sup>68</sup>Ga-3, (b) <sup>68</sup>Ga-15 и (c) <sup>68</sup>Ga-16 получены из динамических данных ПЭТ мелких животных.

#### Примеры, иллюстрирующие изобретение

##### Пример 1.

##### Материалы и методы

##### 1. Химические вещества и приборы

Растворители приобретали у Aldrich, Fluka, Merck и Prolabo, реактивы у Aldrich, Fluka, Sigma, Merck, Acros и Lancaster с качеством "для синтеза", "для анализа" или "степени чистоты для ВЭЖХ" и использовали без очистки. Аминокислоты, производные для защитных групп, а также реагенты для сочетания приобретали у Iris Biotech (Марктревиц, Германия), Bachem (Бубендорф, Швейцария) или Carbo-lytion (Саарбрюккен, Германия). Все реакции, чувствительные к кислороду или воде, проводили в атмосфере аргона.

Твердофазный синтез пептидов проводили в пластиковых шприцах (VWR), снабженных фильтром. Реакционный и промывочный растворы втягивали в шприц, для перемешивания шприцы встряхивали вручную или с помощью встряхивающего устройства для шприцев Intelli-Mixer (Neolab, Гейдельберг, Германия). Для загрузки первой аминокислоты необходимые эквиваленты (экв.) рассчитывали на основе теоретической загрузочной способности, предоставленной поставщиком.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) для контроля реакции и определения значений R<sub>f</sub> проводили на алюминиевой фольге, покрытой кремнеземом 60, F254 (Merck). Детекцию пиков проводили в УФ-

свете (254 нм) или после окрашивания раствором Mostain соответственно.

Препаративную флэш-хроматографию выполняли с 50-100-кратным массовым избытком кремнезема 60 (размер частиц 0,040-0,063 мм, Merck) при избыточном давлении 1-1,5 бар.

Аналитическую и полупрепаративную обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) выполняли с использованием следующих устройств:

а) Sykam: система градиентной ВЭЖХ (Sykam GmbH, Эрезинг, Германия), детектор 206 PHD UV-Vis (Linear™ Instruments Corporation, Рино, США), программное обеспечение Winnie 32. Колонки: (а) Nucleosil 100 C18 (5 мкм, 125×4,0 мм) (CS Chromatographie Services GmbH, Лангервехе, Германия), аналитическая, и (b) Multospher 100 RP 18-5 (250×20 мм) (CS), полупрепаративная. Для обнаружения радиоактивности выход УФ-фотометра был подключен к сцинтилляционному счетчику NaI (TI) чашечного типа от EG&G Ortec (Мюнхен, Германия).

б) Shimadzu: система градиентной ВЭЖХ Prominence (Shimadzu, Дуйсбург, Германия).

В качестве элюентов использовали смеси H<sub>2</sub>O (растворитель А) и ацетонитрила (растворитель В), содержащие 0,1 об.% ТФУ. Применяли различные профили линейного градиента через 15-30 мин (аналитический) и 15-30 мин (полупрепаративный). Скорость потока составляла 1 мл/мин (аналитическая) и 8-9 мл/мин (полупрепаративная), соответственно. УФ-детекцию проводили при 220 и 254 нм.

Масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, ЭРИ-МС проводили с использованием следующего:

а) устройство от Finnigan (тип LCQ в сочетании с ВЭЖХ-системой Hewlett Packard HP 1100). Колонки: (а) YMC Hydrosphere C18 (120 Å, 3 мкм, 125 мм×2,1 мм), скорость потока: 0,55 мл/мин; (b) YMC-UltraHT-Hydrosphere C18 (120 Å, 2 мкм, 50 мм×2,0 мм), скорость потока: 0,75 мл/мин; (c) YMC Octyl C8 (120 Å, 5 мкм, 250 мм×2,1 мм), скорость потока: 0,35 мл/мин. В качестве элюентов использовали смеси H<sub>2</sub>O и ацетонитрила, содержащие 0,1 об.% муравьиной кислоты для различных линейных градиентов (7 мин, 15 мин, 40 мин); или

(b) масс-спектрометр Varian 500-MS IT (Agilent Technologies, Санта-Клара, США).

Эксперименты по флуоресцентной микроскопии проводили с использованием флуоресцентного микроскопа BioRevo BZ9000 (Keyence, Осака, Япония).

## 2. Синтез

### 2.1. Общие процедуры

GP1. Загрузка тритилхлоридполистирольной смолы (TSP).

Синтез пептидов проводили с использованием TSP-смолы (0,9 ммоль/г) в соответствии со стандартной Fmoc-стратегией. Fmoc-Хаа-ОН (1,2 экв.) присоединяли к смоле TSP с DIEA (2,5 экв.) в безводном дихлорметане (0,8 мл/г смолы) при комнатной температуре в течение 1 ч. Оставшиеся тритилхлоридные группы блокировали добавлением 1 мл/г (смолы) раствора MeOH, DIEA (5:1; v/v) в течение 15 мин. Смолу фильтровали и промывали 5 раз ДХМ и 3 раза MeOH. Емкость загрузки определяли по массе после сушки смолы в вакууме, и она составила 0,4-0,9 ммоль/г.

GP2. Fmoc Снятие защиты

Связанный со смолой пептид Fmoc обрабатывали 20% пиперидином в NMP (об./об.) в течение 10 мин и второй раз в течение 5 мин. Смолу промывали 5 раз NMP.

GP3. N-метилование в условиях Мицунобу

Раствор трифенилфосфина (5 экв.), DIAD (5 экв.) и MeOH (10 экв.) в сухом ТГФ (1 мл/г смолы) добавляли к связанному со смолой защищенным Ns пептидам и встряхивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Смолу отделяли фильтрацией и промывали 3 раза сухим ТГФ и 3 раза NMP.

GP4. Соединение HATU/HOAt

Раствор Fmoc-Хаа-ОН, HATU (2 экв), HOAt (2 экв), DIPEA (4 экв.) в NMP (1 мл/г смолы) добавляли к связанному со смолой пептидам и встряхивали в течение 3 ч при комнатной температуре и 5 раз промывали NMP.

GP5. Снятие защиты Ns на смоле

Для снятия защиты Ns связанные со смолой Ns-пептиды перемешивали в растворе меркаптоэтанола (10 экв.) и DBU (5 экв.) в NMP (1 мл/г смолы) в течение 5 мин. Процедуру снятия защиты повторяли еще раз, и смолу 5 раз промывали NMP.

GP6. Отделение пептидов от смолы

Для полного отделения от смолы пептиды трижды обрабатывали смесью уксусной кислоты/2,2,2-трифторэтанола/ДХМ (3/1/6, об./об./об.) при комнатной температуре в течение получаса, и растворители выпаривали при пониженном давлении.

GP7. Циклизация пептидного каркаса

К раствору пептида в ДМФ (1 mM концентрация пептида) и NaHCO<sub>3</sub> (5 экв.) добавляли DPPA (3 экв.) при комнатной температуре, и перемешивали в течение ночи или до тех пор, пока линейный пептид не переставал выявляться с помощью ЭРИ-МС. Растворитель выпаривали до небольшого объема при пониженном давлении, и пептиды осаждали в насыщенном растворе NaCl и дважды промывали водой для ВЭЖХ.

## GP8. Удаление Dde защитной группы

Dde-защитную группу удаляли с использованием 2% гидразина в ДМФ при комнатной температуре. Через 30 мин пептиды со снятой защитой осаждали с использованием воды (Pbf/tBu/Вос-защищенные пептиды) или диэтилового эфира (пептиды со снятой защитой) и сушили в эксикаторе перед дальнейшей функционализацией.

## GP9. Удаление кислотолабильных защитных групп боковой цепи

Циклизованные пептиды перемешивали в растворе ТФУ, воды и TIPS (95/2,5/2,5; об./об./об.) при комнатной температуре в течение одного часа или до тех пор, пока с помощью ЭРИ-МС больше не выявлялся защищенный пептид, а затем осаждали диэтиловым эфиром, дважды промывали диэтиловым эфиром и сушили.

## GP10. N-Метилирование в условиях Мицунобу

Раствор трифенилфосфина (5 экв.), DIAD (5 экв.) и MeOH (10 экв.) в сухом ТГФ (1 мл/г смолы) добавляли к связанному со смолой o-Ns защищенным пептидам и встряхивали в течение 10 мин при комнатной температуре. Смолу отделяли фильтрацией и промывали 3 раза сухим ТГФ и 3 раза NMP.

## GP11. Конъюгация свободной аминофункциональности с незащищенной DOTA

DOTA (4 экв.), NHS (5 экв.) и EDCI (5 экв.) растворяли в воде и добавляли DIPEA (8 экв.). Через 15 мин соответствующий пептид (1 экв.) добавляли в равном объеме воды. За ходом реакции сочетания следили с помощью ОФ-ВЭЖХ. По завершении реакции растворители упаривали в вакууме. Остаток ресуспендировали в метаноле, суспензию центрифугировали, и продукт, растворенный в метанольной надосадочной жидкости, осаждали диэтиловым эфиром, сушили и очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

GP12. Получение эталонных соединений <sup>nat</sup>Ga-, <sup>nat</sup>Lu-, <sup>nat</sup>Bi- и <sup>nat</sup>Y-DOTA

Для приготовления комплексов <sup>nat</sup>Ga- и <sup>nat</sup>Bi- смешивали равные объемы 2 мМ раствора Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> или Bi(OAc)<sub>3</sub> в 1М буфере NaOAc и 2 мМ водного раствора соответствующего пептида, и нагревали до 95°C в течение 30 мин для комплексообразования <sup>nat</sup>Ga- и 15 мин при комнатной температуре для <sup>nat</sup>Bi. Соответствующие комплексы <sup>nat</sup>Lu и <sup>nat</sup>Y получали путем добавления к пептиду 2,5-молярного избытка соответствующего хлорида металла, растворенного в воде. При нагревании до 95°C в течение 30 мин образование соответствующих комплексов металлов подтверждали с помощью ОФ-ВЭЖХ и ЭРИ-МС.

## GP13. Конъюгация в фазе раствора пептидного линкера и циклипентапептидного каркаса

Раствор Fmoc-линкера (1,5 экв.), TBVTU (1,5 экв.), HOBT (1,5 экв.) и DIPEA (3 экв.) в ДМФ добавляли к раствору пептида со снятой D-Orn-Dde-защитой в ДМФ (1 экв.) и перемешивали в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем продукт осаждали в насыщенном растворе NaCl, и промывали два раза водой ВЭЖХ качества.

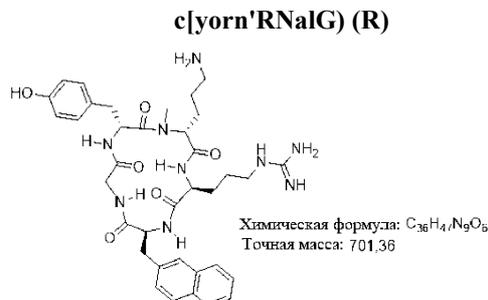
## GP14. Удаление кислотолабильных защитных групп боковой цепи

Пептид с защищенной боковой цепью перемешивали в растворе ТФУ, воды и TIPS (95/2,4/2,5; об./об./об.) при комнатной температуре в течение 1 ч или до тех пор, пока в растворе не переставал выявляться защищенный пептид при ЭРИ-МС, и осаждали в диэтиловом эфире, и промывали еще два раза.

## 2.2. Синтез аналогов циклических пентапептидов R и R1

## CPCR4 (R)

CPCR4 (c[yorn'RNaIG] (R) получали, как описано ранее (1). Вкратце, TCP-смола загружают Fmoc-Gly-OH в соответствии с GP1, а линейный пептид Hd-Orn-R(Pbf)-Nal-G синтезируют в соответствии со стандартной Fmoc-процедурой (GP2 и GP4, соответственно). Затем пептид метилируют в соответствии с GP10, и Fmoc-d-Tyr(OtBu)-OH (GP4) связывают с пептидом, лишенным защиты Ns. После снятия защиты (GP2) проводят отделение от смолы (GP6) и циклизацию основной цепи (GP7). За удалением Dde-защитной группы (GP8) следует осаждение неочищенного пептида в насыщенном водном растворе NaCl и лиофилизация из раствора tBuOH/H<sub>2</sub>O. R (450 мг, 0,64 ммоль, 64%) получают в виде желтоватого порошка (чистота > 90%).



ВЭЖХ (10-50% 15 мин): t<sub>r</sub>=9,7 мин. МС (ЭРИ): m/z=702,4 [M+H]<sup>+</sup>.

## Йодо-CPCR4 (R1)

Синтез немеченого эталонного соединения йодо-CPCR4.3 проводили с использованием N-иодосукцинимидом (NIS) в ацетонитриле/воде (2). Вкратце, CPCR4 растворяли в смеси ацетонитрила и воды 1:1 (об./об.) с получением 9 мМ раствора, и добавляли 0,45 экв. NIS. По завершении реакции (5-10

мин при комнатной температуре) йодо-СРСR4 (R1) выделяли с использованием полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ.

**c [iyorn'RNalG] (R1)**

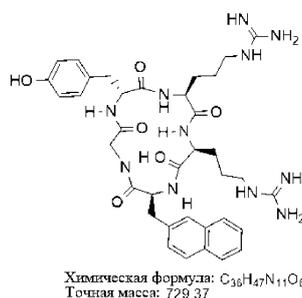


ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин):  $t_R=8$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=829,4$   $[M+H]^+$ .

**FC131 (R2)**

Синтез FC131 (R2) проводили в соответствии с протоколом, описанным для пептида R.

**c [yRRNalG] (R2)**



ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин):  $t_R=8$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=829,4$   $[M+H]^+$ .

2.3. Синтез связывающих единиц (L1-L5) для конъюгации с боковой цепью D-Orn R или R1.

В ТСР-смолу загружают Fmoc-ABS-OH или (Fmoc-AMBS-OH) в соответствии с GP1, и линейные пептидные цепи конструируют в соответствии со стандартной процедурой Fmoc (GP2 и GP4, соответственно). После отделения от смолы (GP6) в качестве Fmoc-защищенного производного пептидные связывающие единицы используют без дополнительной очистки.

**Fmoc-dDap(Boc)-Gly-ABS (L1)**

Связанной со смолой 4-(Fmoc-амино)бензойной кислоте (0,224 ммоль, 1,0 экв.) давали возможность предварительно набухнуть в течение 30 мин в ДМФ. 3,0 экв. Fmoc-Gly-OH и 1,5 экв. Fmoc-D-Dap(Boc)-OH были связаны согласно GP2 и GP4, соответственно. Линейный пептид отделяли от смолы (GP6), осаждали диэтиловым эфиром и лиофилизировали в течение ночи с получением связывающей единицы L1.

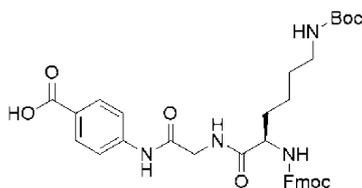
Fmoc-dDap(Boc)-Gly-ABS (R)-4-(2-(2,3-диаминопропанамидо)ацетамидо)бензойная кислота (L1)



ВЭЖХ (10-90% В за 15 мин):  $t_R=12,0$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=502,5$   $[M+H-(Boc)]^+$ .

**Fmoc-dLys (Boc)-Gly-ABS (L2)**

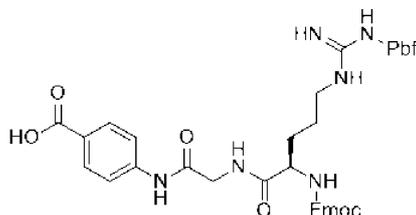
Связанной со смолой 4-(Fmoc-амино)бензойной кислоте (0,224 ммоль, 1,0 экв.) давали возможность предварительно набухнуть в течение 30 мин в ДМФ. 3,0 экв. Fmoc-Gly-OH и 1,5 экв. Fmoc-D-Lys (Boc)-OH были связаны согласно GP2 и GP4, соответственно. Линейный пептид отщепляли от смолы (GP6), осаждали диэтиловым эфиром и лиофилизировали в течение ночи с получением связывающей единицы L2.

**Fmoc-dLys(Boc)-Gly-ABS (L2)**Химическая формула:  $C_{25}H_{40}N_4O_8$ 

Точная масса: 644,28

ВЭЖХ (10-90% В за 15 мин):  $t_R=13,0$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=545,4$   $[M+H-(Boc)]^+$ .**Fmoc-dArg(Pbf)-Glv-ABS (L3)**

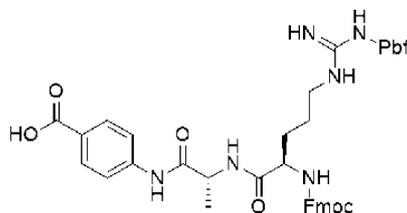
Связанной со смолой 4-(Fmoc-амино)бензойной кислоте (0,224 ммоль, 1,0 экв.) давали возможность предварительно набухнуть в течение 30 мин в ДМФ и 1,5 экв. Fmoc-Gly-OH и 1,5 экв. Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH были связаны согласно GP2 и GP4 соответственно. Линейный пептид отделяли от смолы (GP6), осаждали диэтиловым эфиром и лиофилизировали в течение ночи с получением связывающей единицы.

**Fmoc-dArg(Pbf)-Gly-ABS (L3)**Химическая формула:  $C_{43}H_{48}N_5O_9S$ 

Точная масса: 824,32

ВЭЖХ (10-90% В за 15 мин):  $t_R=12,6$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=573,5$   $[M+H-(Pbf)]^+$ .**Fmoc-dArg(Pbf)-dAla-ABS (L4)**

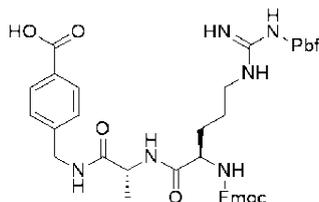
Связанной со смолой 4-(Fmoc-амино)бензойной кислоте (0,224 ммоль, 1,0 экв.) давали предварительно набухнуть в течение 30 мин в ДМФ. 3,0 экв. Fmoc-Gly-OH и 1,5 экв. Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH были связаны согласно GP2 и GP4, соответственно. Линейный пептид отделяли от смолы (GP6), осаждали диэтиловым эфиром и лиофилизировали в течение ночи с получением связующего звена.

**Fmoc-dArg(Pbf)-dAla-ABS (L4)**Химическая формула:  $C_{44}H_{50}N_6O_9S$ 

Точная масса: 838,34

ВЭЖХ (10-90% В за 15 мин):  $t_R=11,6$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=587,5$   $[M+H-(Pbf)]^+$ .**Fmoc-dArg(Pbf)-dAla-AMBS (L5)**

Связанной со смолой 4-(Fmoc-амино)метилбензойной кислоте (0,224 ммоль, 1,0 экв.) давали предварительно набухнуть в течение 30 мин в ДМФ 3,0 экв. Fmoc-D-Ala-OH и 1,5 экв. Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH были связаны согласно GP2 и GP4 соответственно. Линейный пептид отделяли от смолы (GP6), осаждали диэтиловым эфиром и лиофилизировали в течение ночи с получением связующего звена.

**Fmoc-dArg(Pbf)-dAla-AMBS (L5)**Химическая формула:  $C_{45}H_{52}N_6O_9S$ 

Точная масса: 852,35

ВЭЖХ (10-90% В за 15 мин):  $t_R=11,6$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z=587,5$   $[M+H-(Pbf)]^+$ .**2.4. Описание синтеза отдельных соединений (P1-P6)**

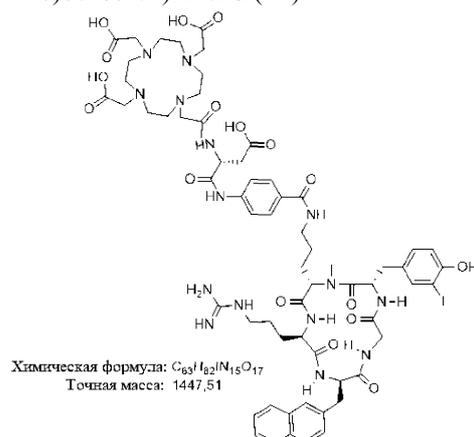
В TCP-смола загружают Fmoc-Gly-OH в соответствии с GP1, и линейный пептид H-d-Ala-R(Pbf)-Nal-G синтезируют в соответствии со стандартной Fmoc-процедурой (GP2 и GP4, соответственно). Затем

пептид алкилируют Dde-аминогексанолом в соответствии с GP10, и Fmoc-d-Тур(OtBu)-ОН (GP4) связывают с пептидом со снятой защитой Ns. После снятия защиты (GP2) проводят отделение от смолы (GP6) и циклизацию основной цепи (GP7). За удалением Dde-защитной группы (GP8) следует осаждение неочищенного пептида в насыщенном водном растворе NaCl, и лиофилизация из раствора ACN/H<sub>2</sub>O. R0 (132 мг, 126 мкМ, 31%) получают в виде желтоватого порошка (чистота >90%). Соответствующий каркас R или R1 конъюгируют со связывающими единицами (L1-L5) согласно GP13. Последующую конденсацию хелатора выполняют согласно GP11.

#### Цикло[i-yorn'(DOTA-d-(4-амино)бензоил-)RNalG (P1)

Синтез соответствующего циклического пептида R1 с удаленной Dde-защитой проводили в соответствии с общими процедурами, описанными выше. Fmoc-ABS и Fmoc-DAsp (tBu) были связаны согласно GP4 и GP2. После снятия защиты Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[i-yorn'(DOTA-d-(4-амино)бензоил-)RNalG (P1)

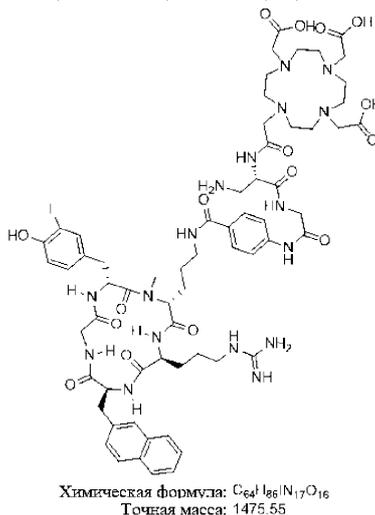


ВЭЖХ (25-55% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=10,1 мин; МС (ЭРИ): m/z=1448,8 [M+H]<sup>+</sup>, 725,3 [M+H+H]<sup>2+</sup>.

цикло[i-yorn'(DOTA-dapG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P2):

R1 был связан с L1 в соответствии с общими процедурами GP13. После снятия защиты Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь, пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

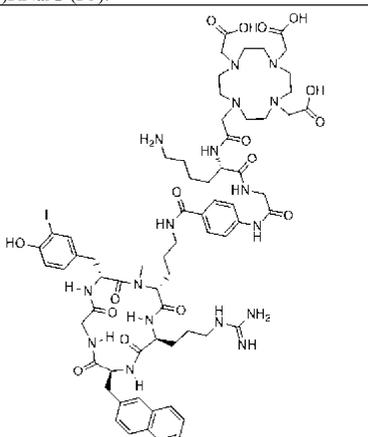
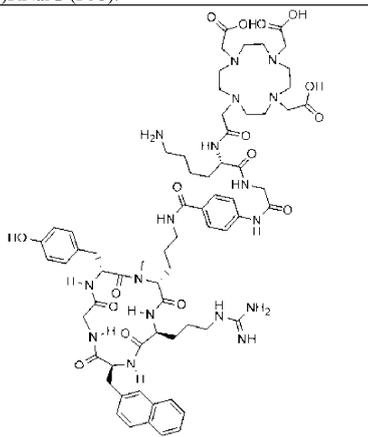
цикло[i-yorn'(DOTA-dapG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P2)



ВЭЖХ (25-65% В за 15 мин): t<sub>R</sub>= 11,9 мин; МС (ЭРИ): m/z=1476,8 [M+H]<sup>+</sup>, 739,3 [M+H+H]<sup>2+</sup>.

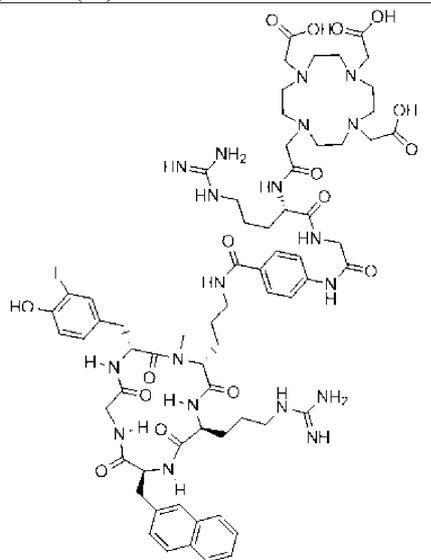
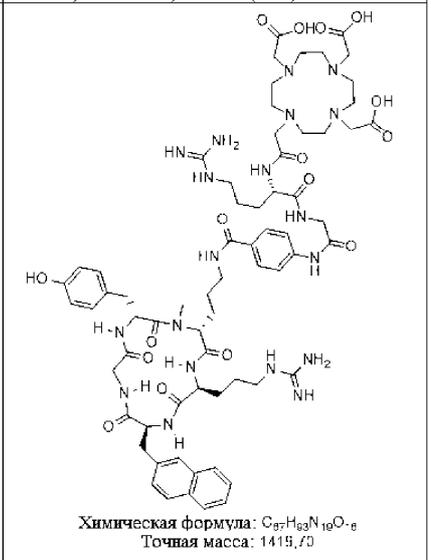
цикло [i-yorn'(DOTA-kG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P3):

R1 или R были связаны с L2 в соответствии с общими процедурами GP13. После снятия защиты Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[i-уорг'(DOTA-kG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P3):	цикло[-уорг'(DOTA-kG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P3b):
 <p>Химическая формула: C<sub>67</sub>H<sub>92</sub>N<sub>17</sub>O<sub>16</sub> Точная масса: 1517,60</p>	 <p>Химическая формула: C<sub>67</sub>H<sub>92</sub>N<sub>17</sub>O<sub>16</sub> Точная масса: 1391,70</p>
ВЭЖХ (25-55% В за 15 мин): tr = 12,8 мин; МС (ЭРИ): m/z = 1519,1 [M+H] <sup>+</sup> , 760,4 [M+H+H] <sup>2+</sup> .	ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин): tr = 7,9 мин; МС (ЭРИ): m/z = 1393,2 [M+H] <sup>+</sup> .

цикло[i-уорг'(DOTA-rG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P4):

R1/R был связан с L3 в соответствии с общими процедурами GP13. После снятия защиты Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь, пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[i-уорг'(DOTA-rG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P4)	цикло[-уорг'(DOTA-rG-(4-амино)бензоил-)RNalG (P4b)
 <p>Химическая формула: C<sub>67</sub>H<sub>92</sub>N<sub>19</sub>O<sub>16</sub> Точная масса: 1545,60</p>	 <p>Химическая формула: C<sub>67</sub>H<sub>92</sub>N<sub>19</sub>O<sub>16</sub> Точная масса: 1415,70</p>
ВЭЖХ (25-55% В в 15 мин): tr = 13,3 мин; МС (ЭРИ): m/z = 1547,2 [M+H] <sup>+</sup> , 774,5 [M+H+H] <sup>2+</sup> .	ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин): tr = 8,2 мин; МС (ЭРИ): m/z = 1421,5 [M+H] <sup>+</sup> .

цикло[i-уорг'(DOTA-га-(4-амино)бензоил-)RNalG (P5):

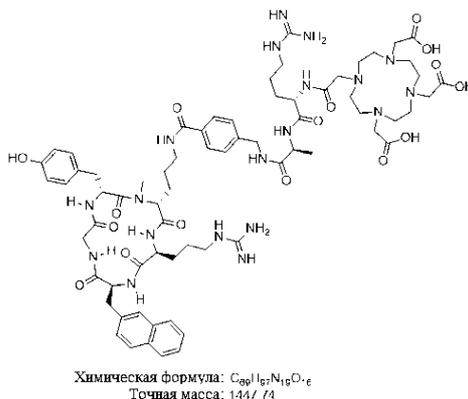
R1/R связывали с L4 в соответствии с общими процедурами GP13. После снятия защиты Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[ <i>i</i> -yoм'(DOTA-га-(4-амино)бензоил-)RNaIG (P5):	цикло[-yoм'(DOTA-га-(4-амино)бензоил-)RNaIG (P5b):
<p>Химическая формула: <math>C_{268}H_{64}N_{17}O_{16}</math> Точная масса: 1559,62</p>	<p>Химическая формула: <math>C_{268}H_{68}N_{17}O_{16}</math> Точная масса: 1433,72</p>
ВЭЖХ (25-55% В за 15 мин): $t_R = 12,1$ мин; МС (ЭРИ): $m/z = 1560,2 [M+H]^+$ , $781,5 [M+H+H]^{2+}$ .	ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин): $t_R = 8,0$ мин; МС (ЭРИ): $m/z = 1435,1 [M+H]^+$ , $717,3 [M+H+H]^{2+}$ .

цикло[*i*-yoм'(DOTA-га-(4-амино)метилбензоил-)RNaIG (P6):

R1/R связывали с L5 в соответствии с общими процедурами GP13. После снятия защиты с Fmoc с использованием 20% пиперидина в ДМФ (GP2) пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ, и DOTA конъюгировали согласно GP11. Вновь пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[-yoм'(DOTA-га-(4-амино)метилбензоил)RNaIG (P6b):



ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин):  $t_R = 8,0$  мин; МС (ЭРИ):  $m/z = 1435,1 [M+H]^+$ ,  $717,3 [M+H+H]^{2+}$ .

$^{nat}Ga$ -соединения: образование  $^{nat}Ga^{III}$ -хелата обеспечивали с использованием протокола GP12. Полученные 1 мМ водные растворы соответствующих комплексов  $^{nat}Ga$  разбавляли (серийное разведение от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М в растворе соли Хенкса (HBSS) с 1% БСА) и использовали в исследованиях  $IC_{50}$  in vitro без дальнейшей обработки.

цикло[*i*-yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-dapG-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P2): ВЭЖХ (от 25% до 65% В за 15 мин):  $t_R = 11,4$  мин;  $K' = 5,3$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{64}H_{84}GaIn_{17}O_{16}$ ): 1542,46, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z = 1544,8 [M+H]^+$ ,  $772,4 [M+2H]^{2+}$ .

цикло[yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-kG-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P3b): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R = 7,6$  мин;  $K' = 3,0$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{91}GaIn_{17}O_{16}$ ): 1458,61, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z = 1459,8 [M+H]^+$ ,  $730,2 [M+2H]^{2+}$ .

цикло[*i*-yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-kG-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P3): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R = 12,9$  мин;  $K' = 6,1$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}GaIn_{17}O_{16}$ ): 1584,51, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z = 1585,0 [M+H]^+$ ,  $1608,9 [M+Na]^+$ ,  $793,7 [M+2H]^{2+}$ .

цикло[yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-rG-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P4b): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R = 7,7$  мин;  $K' = 3,2$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{91}GaIn_{19}O_{16}$ ): 1468,61, найденная ЭРИ-МС:  $m/z = 745,3 [M+2H]^{2+}$ .

цикло[*i*-yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-rG-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P4): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R = 12,6$  мин;  $K' = 6,8$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}GaIn_{17}O_{16}$ ): 1612,51, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z = 1614,9 [M+H]^+$ ,  $808,0 [M+2H]^{2+}$ .

цикло[yoм'( $^{nat}Ga$ ]DOTA-га-(4-амино)бензоил-)RNaIG ( $^{nat}Ga$ ]P5b): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15

мин):  $t_R=6,8$  мин;  $K'=3,5$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{93}GaN_{19}O_{16}$ ): 1500,63, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=751,5$   $[M+2H]^{2+}$ , 787,2  $[M+2K]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Ga]DOTA$ -га-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Ga]P5$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,9$  мин;  $K'=3,9$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{92}GaIN_{19}O_{16}$ ): 1626,53, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1626,8$   $[M+H]^+$ , 815,0  $[M+2H]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Ga]DOTA$ -га-(4-амино)метилбензоил-)RNalG ( $[^{nat}Ga]P6b$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,9$  мин;  $K'=3,9$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{92}GaIN_{19}O_{16}$ ): 1626,53, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1626,8$   $[M+H]^+$ , 815,0  $[M+2H]^{2+}$ .

$^{nat}Lu$ -соединения: образование  $^{nat}Lu^{III}$ -хелата обеспечивали с использованием протокола GP12. Полученные 1 мМ водные растворы соответствующих комплексов  $^{nat}Lu$  разбавляли (серийное разведение от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М в HBSS с 1% БСА) и использовали в исследованиях IC<sub>50</sub> in vitro без дальнейшей обработки.

цикло[i-yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -d-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P1$ ): ВЭЖХ (от 35% до 65% В за 15 мин):  $t_R=8,0$  мин;  $K'=3,4$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{63}H_{79}ILuN_{15}O_{17}$ ): 1619,42, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1620,9$   $[M+H]^+$ , 1,642,8  $[M+Na]^+$ , 811,2  $[M+2H]^{2+}$ , 822,0  $[M+H+Na]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -dapG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P2$ ): ВЭЖХ (от 25% до 65% В за 15 мин):  $t_R=10,8$  мин;  $K'=9,8$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{64}H_{83}ILuN_{17}O_{16}$ ): 1647,47, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1648,9$   $[M+H]^+$ , 825,2  $[M+2H]^{2+}$ , 860,5  $[M+2K]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -kG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P3b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,5$  мин;  $K'=4,0$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}LuN_{17}O_{16}$ ): 1563,62, обнаружено с ЭРИ-МС:  $m/z=1565,4$   $[M+H]^+$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -kG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P3$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=13,1$  мин;  $K'=7,7$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{89}ILuN_{17}O_{16}$ ): 1689,51, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1691,8$   $[M+H]^+$ , 1712,7  $[M+Na]^+$ , 846,4  $[M+2H]^{2+}$ , 857,1  $[M+H+Na]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -rG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P4b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,2$  мин;  $K'=4,1$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}LuN_{19}O_{16}$ ): 1591,62, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1592,5$   $[M+H]^+$ , 1631,0  $[M+K]^+$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -rG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P4$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=13,4$  мин;  $K'=7,9$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{89}IN_{19}O_{16}$ ): 1717,52, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1719,9$   $[M+H]^+$ , 860,5  $[M+2H]^{2+}$ , 871,1  $[M+H+Na]^{2+}$ , 895,7  $[M+2K]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -га-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P5b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,5$  мин;  $K'=4,0$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{92}LuN_{19}O_{16}$ ): 1605,64, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1732,8$   $[M+H]^+$ , 867,3  $[M+2H]^{2+}$ , 902,6  $[M+2K]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Lu]DOTA$ -га-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Lu]P5$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=6,5$  мин;  $K'=2,3$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{91}ILuN_{19}O_{16}$ ): 1731,53, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1732,8$   $[M+H]^+$ , 867,3  $[M+2H]^{2+}$ , 902,6  $[M+2K]^{2+}$ .

Комплексы  $^{nat}Y$  получали, как описано в GP12. После охлаждения образования  $^{nat}Y^{III}$ -хелата подтверждали с помощью ВЭЖХ и МС. Полученные 1 мМ водные растворы соответствующих  $^{nat}Y$ -комплексов разбавляли (серийное разведение от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М в HBSS с 1% БСА) и использовали в исследованиях IC<sub>50</sub> in vitro без дальнейшей обработки.

цикло[i-yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -dapG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P2$ ): ВЭЖХ (от 25% до 65% В за 15 мин):  $t_R=11,5$  мин;  $K'=6,1$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{64}H_{83}IN_{17}O_{16}Y$ ): 1561,43, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1562,7$   $[M+H]^+$ , 782,3  $[M+2H]^{2+}$ , 793,0  $[M+H+Na]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -kG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P3b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,8$  мин;  $K'=2,7$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}N_{17}O_{16}Y$ ): 1477,58, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1478,9$   $[M+H]^+$ , 740,4  $[M+2H]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -kG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P3$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=12,9$  мин;  $K'=7,6$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{89}IN_{17}O_{16}Y$ ): 1603,48, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1605,7$   $[M+H]^+$ , 1626,6  $[M+Na]^+$ , 803,4  $[M+2H]^{2+}$ , 814,1  $[M+H+Na]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -rG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P4b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=8,0$  мин;  $K'=2,8$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{90}N_{19}O_{16}Y$ ): 1505,59, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1506,2$   $[M+H]^+$ , 754,3  $[M+2H]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -rG-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P4$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=13,3$  мин;  $K'=7,9$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{67}H_{89}IN_{19}O_{16}Y$ ): 1631,48, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1632,9$   $[M+H]^+$ , 817,4  $[M+2H]^{2+}$ , 828,1  $[M+H+Na]^{2+}$ , 852,7  $[M+2K]^{2+}$ .

цикло[yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -га-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P5b$ ): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=7,0$  мин;  $K'=3,6$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{92}N_{19}O_{16}Y$ ): 1519,60, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=761,0$   $[M+2H]^{2+}$ .

цикло[i-yom']( $[^{nat}Y]DOTA$ -га-(4-амино)бензоил-)RNalG ( $[^{nat}Y]P5$ ): ВЭЖХ (от 25% до 55% В за 15 мин):  $t_R=9,6$  мин;  $K'=2,8$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $C_{68}H_{91}IN_{19}O_{16}Y$ ): 1645,50, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1646,9$   $[M+H]^+$ , 824,1  $[M+2H]^{2+}$ , 859,5  $[M+2K]^{2+}$ .

Комплексообразование с висмутом проводили с использованием протокола, описанного в GP12.

Образование хелата  $^{nat}\text{Bi}^{\text{III}}$  подтверждали с помощью ВЭЖХ и ЭРИ-МС. Полученные 1 мМ водные растворы соответствующих комплексов  $^{nat}\text{Bi}$  разбавляли (серийное разведение от  $10^{-4}$  до  $10^{-10}$  М в HBSS с 1% БСА) и использовали в исследованиях IC<sub>50</sub> in vitro без дальнейшей обработки.

цикло[i-yorn'( $^{nat}\text{Bi}$ )DOTA-dapG-(4-амино)бензоил-R)NalG ( $^{nat}\text{Bi}$ ]P2): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=8,9$  мин;  $K'=3,9$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $\text{C}_{64}\text{H}_{83}\text{BiN}_{17}\text{O}_{16}$ ): 1681,51, обнаружено с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1682,2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $839,8$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

цикло[i-yorn'( $^{nat}\text{Bi}$ )DOTA-kG-(4-амино)бензоил-R)NalG ( $^{nat}\text{Bi}$ ]P3): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=8,9$  мин;  $K'=3,3$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $\text{C}_{67}\text{H}_{89}\text{BiN}_{17}\text{O}_{16}$ ): 1724,56, обнаруженная ЭРИ-МС:  $m/z=1726,2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $863,2$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

цикло[i-yorn'( $^{nat}\text{Bi}$ )DOTA-rG-(4-амино)бензоил-R)NalG ( $^{nat}\text{Bi}$ ]P4): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=9,0$  мин;  $K'=3,7$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $\text{C}_{67}\text{H}_{89}\text{BiN}_{19}\text{O}_{16}$ ): 1751,56, обнаруженная посредством ЭРИ-МС:  $m/z=1752,3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

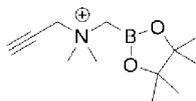
цикло [i-yorn'( $^{nat}\text{Bi}$ )DOTA-ra-(4-амино)бензоил-R)NalG ( $^{nat}\text{Bi}$ ]P5): ВЭЖХ (от 15% до 55% В за 15 мин):  $t_R=9,1$  мин;  $K'=4,0$ ; Расчетная моноизотопная масса ( $\text{C}_{68}\text{H}_{91}\text{BiN}_{19}\text{O}_{16}$ ): 1765,57, обнаруженная с помощью ЭРИ-МС:  $m/z=1767,5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $885,1$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

## 2.5. Использование нового связывающего звена и описание его синтеза (F1-F4)

### 2.5.1 Синтез $^{18}\text{F}$ -меченных предшественников для конъюгации с D-Orn боковой цепью R или R1.

В TSP-смолу загружают Fmoc-ABS-OH в соответствии с GP1, и линейные пептидные цепи конструируют в соответствии со стандартной процедурой Fmoc (GP2 и GP4, соответственно). N-конец со снятой Fmoc был превращен в соответствующий азид согласно ранее опубликованной процедуре (Goddard-Borger and Stick, An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. Organic letters 2007, 9 (19), 3797-3800). Вкратце, имидазол-1-сульфонилазид гидрохлорид (1,5 экв.),  $\text{CuSO}_4$  и DIPEA добавляли к пептиду, связанному со смолой, при 4°C. Охлаждение продолжали в течение 2 ч, и связанный со смолой пептид встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. Пептид отделяли от смолы согласно GP6 и лиофилизировали в течение ночи. N-пропаргил-N,N-диметиламмонийметилборонилпинаколат (1,5 экв.) объединяли с  $\text{KHF}_2$  (3 М раствор в воде, 2,6 экв.) и 3,6 экв.  $\text{HCl}$  (4 М раствор в воде) и нагревали до 45°C в течение 2 ч. После добавления 1,2 мл  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1М в воде) для регуляции pH раствор добавляли к азид-пептиду. Смесь нагревали до 55°C в течение 15 ч и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ. Очищенный фрагмент связывали с R или R1, соответственно, с использованием HOBt, TBTU и DIPEA в стандартных условиях (GP4).

N-пропаргил-N,N-диметиламмонийметилборонилпинаколат:



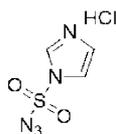
Химическая формула:  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{BNO}_2^+$

Точная масса: 224,18

Синтез проводили в соответствии с опубликованной процедурой с небольшими модификациями (Liu et al., Kit-like 18 F-labeling of RGD-19 F-Arytrifluoroborate in high yield and at extraordinarily high specific activity with preliminary in vivo tumor imaging. Nuclear medicine and biology 2013, 40 (6), 841-849). Вкратце, в сухую круглодонную колбу в атмосфере азота загружали 53,8 мкл (0,5 ммоль, 1,0 экв.) N,N-диметилпропаргиламина и 3 мл сухого ДХМ. При комнатной температуре по каплям добавляли 80,1 мкл (0,5 ммоль, 1,0 экв.) йодометил-боронилпинаколата. При перемешивании раствор становился мутным, и белый осадок отделяли фильтрацией через 2 ч интенсивного перемешивания при 0°C. Осадок дважды промывали ледяным диэтиловым эфиром и использовали без дополнительной очистки. 104 мг (0,45 ммоль, 93%) собирали в виде белого твердого вещества. Расчетная моноизотопная масса ( $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{BNO}_2^+$ ): 224,18; обнаруженная при ЭРИ-МС:  $m/z=224,2$   $[\text{M}]^+$ .

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц [Bruker],  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  [ppm]=1,31 (s, 12H); 3,17 (s, 6H); 3,21 (t, 2H); 3,23 (s, 1H); 4,22 (d, 2H).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (101 МГц [Bruker],  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  [ppm]=24,89.

Имидазол-1-сульфонилазид гидрохлорид:



Химическая формула:  $\text{C}_3\text{H}_4\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}$

Точная масса: 208,98

Синтез выполняли в соответствии с опубликованным протоколом (Hansen et al., Simple and efficient solid-phase preparation of azido-peptides. Organic letters 2012, 14 (9), 2330-2333). Вкратце, сульфонилхлорид (1,62 мл; 20,0 ммоль; 1,0 экв.) добавляли по каплям к охлажденной льдом суспензии  $\text{NaN}_3$  (1,3 г; 20,0 ммоль; 1,0 экв.) в  $\text{MeCN}$  (20 мл) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. При

интенсивном перемешивании к охлажденному льдом раствору осторожно добавляли имидазол (2,5 г; 38,0 ммоль; 2,0 экв.) и перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Раствор разбавляли EtOAc (40 мл) и промывали водой (2×40 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×20 мл), сушили над MgSO<sub>4</sub> и фильтровали. Свежий раствор HCl в EtOH (полученный путем добавления по каплям AcCl (10,0 мл) к охлажденному льдом сухому этанолу (25 мл)) медленно добавляли к фильтрату при перемешивании при 0°C. Кристаллизованный продукт отделяли фильтрацией на льду и белые кристаллы промывали ледяным EtOAc, получая бесцветные иглы (2,0 г; 9,5 ммоль; 48%). Соединение использовали без дополнительной очистки и хранили при -20°C.

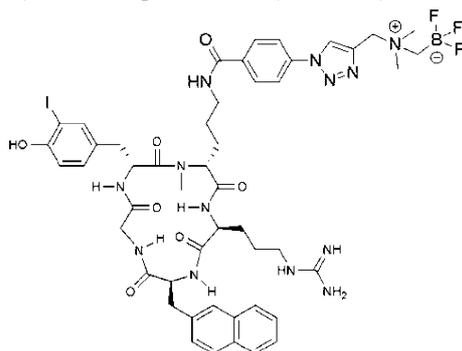
2.5.2 Описание синтеза отдельных соединений (F1-F4).

Цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)4-амино)бензоил-)RNalG]

(F1) (Эталонное соединение)

R1 связывали с AMBF<sub>3</sub>-ABS-OH в соответствии с общими процедурами GP4. Пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)4-амино)бензоил-)RNalG] (F1):



Химическая формула: C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>BF<sub>3</sub>IN<sub>13</sub>O<sub>7</sub>  
Точная масса: 1137,38

ВЭЖХ (25-65% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=10,3 мин; МС (ЭРИ): m/z=1138,6 [M+H]<sup>+</sup>.

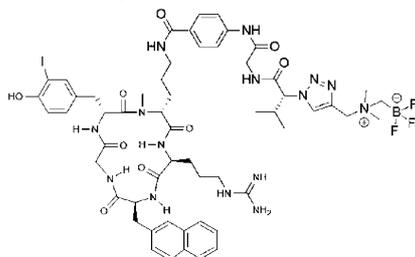
Цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-vG-4-амино)бензоил-)RNalG]

(F2) (Эталонное соединение)

R1 связывали с AMBF<sub>3</sub>-vG-ABS-OH в соответствии с общими процедурами GP4.

Пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

Цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-vG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F2):



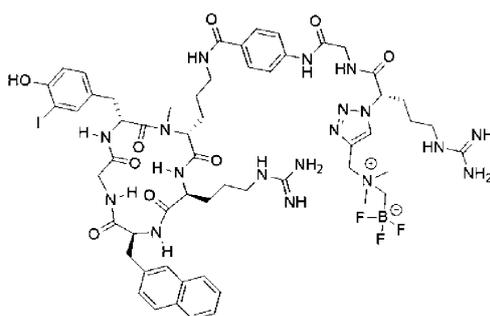
Химическая формула: C<sub>36</sub>H<sub>72</sub>BF<sub>3</sub>IN<sub>15</sub>O<sub>9</sub>  
Точная масса: 1293,47

ВЭЖХ (25-65% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=11,1 мин; МС (ЭРИ): m/z=1294,8 [M+H]<sup>+</sup>.

Цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-vG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F3)

R1 связывали с AMBF<sub>3</sub>-rG-ABS-OH в соответствии с общими процедурами GP4. Пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

Цикло[i-уогн'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-rG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F3):



Химическая формула: C<sub>37</sub>H<sub>73</sub>BF<sub>3</sub>IN<sub>18</sub>O<sub>9</sub>  
Точная масса: 1350,51

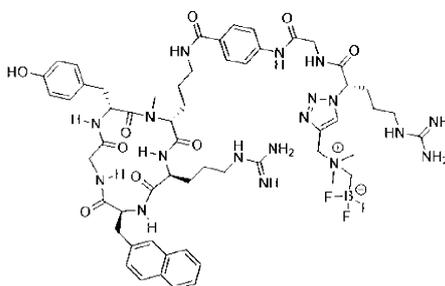
ВЭЖХ (15-65% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=11,3 мин; МС (ЭРИ): m/z=1352,0 [M+H]<sup>+</sup>, 1374,0 [M+Na]<sup>+</sup>; 676,8

$[M+2H]^{2+}$ .

Цикло[-uorn'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-rG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F3b)

R связывали с AMBF<sub>3</sub>-rG-ABS-OH в соответствии с общими процедурами GP4. Пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

Цикло[-uorn'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-rG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F3b):



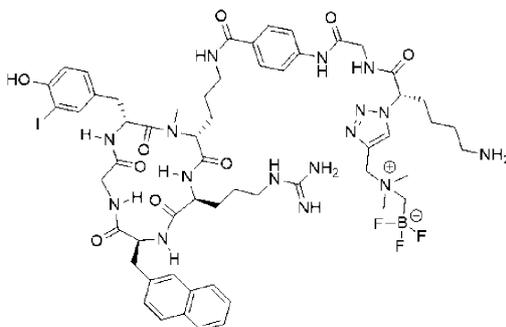
Химическая формула: C<sub>57</sub>H<sub>76</sub>BF<sub>3</sub>N<sub>18</sub>O<sub>9</sub>  
Точная масса: 1224,61

ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=8,7 мин; МС (ЭРИ): m/z=1226,2 [M+H]<sup>+</sup>.

Цикло[i-uorn'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-kG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F4)

R1 связывали с AMBF<sub>3</sub>-rG-ABS-OH в соответствии с общими процедурами GP4. Пептид очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ.

Цикло[i-uorn'(AMBF<sub>3</sub>(метил(1H-1,2,3-триазол-4-ил)-kG-4-амино)бензоил-)RNalG] (F4):



Химическая формула: C<sub>57</sub>H<sub>75</sub>BF<sub>3</sub>I<sub>1</sub>N<sub>18</sub>O<sub>9</sub>  
Точная масса: 1322,50

ВЭЖХ (15-55% В за 15 мин): t<sub>R</sub>=12,1 мин; МС (ЭРИ): m/z=1323,8 [M+H]<sup>+</sup>.

### 3. Введение радиоактивной метки

#### 3.1. Радиойодирование

Все пептиды подвергали радиоактивному йодированию с использованием метода IodoGen®. Вкратце, 100-200 мкг пептида растворяли в 5-10 мкл ДМСО. Этот раствор разбавляли 0,5 мл йодирующего буфера TRIS (25 мМ Трис-НСl; 0,4 М NaCl, рН 7,5) и переносили в реакционную пробирку типа Эппендорф, покрытую 150 мкг IodoGen®. После добавления [<sup>125</sup>I]NaI (18-20 МБк, Hartmann Analytic, Брауншвейг, Германия) или [<sup>123</sup>I]NaI (220 МБк, GE Healthcare, Брауншвейг, Германия) реакционный сосуд на короткое время встряхивали и продолжали реакцию мечения в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем раствор пептида удаляли из нерастворимого окислителя. Отделение меченых продуктов от немеченого предшественника обеспечивали с помощью градиентной ОФ-ВЭЖХ. Для исследований связывания *in vitro* фракцию продукта ВЭЖХ использовали как таковую и разбавляли до необходимой концентрации с использованием соответствующей среды для анализа. Для экспериментов по биораспределению соответствующую фракцию продукта разбавляли водой и переносили в картридж SepPak Plus C-18 (Waters, Эшборн, Германия). Картридж промывали водой, и затем иммобилизованный радиопептид элюировали 1 мл ацетонитрила. Растворитель удаляли барботированием потока аргона через раствор радиолиганда при 90°C в течение 20 мин. Затем радиоактивные йодированные пептиды восстанавливали до концентрации активности примерно 1 МБк/100 мкл с использованием ФБР и использовали как таковой для исследования на животных *in vivo*.

#### 3.2. Введение метки <sup>68</sup>Ga

<sup>68</sup>Ga получали элюированием генератора <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga с матриксом SnO<sub>2</sub> (iTHEMBA LABS, Южная Африка) 1 М HCl (5,5 мл) и иммобилизовали на картридже с сильным катионообменником (SCX - Chromafix, размер M, Macherey-Nagel, Дюрен, Германия).

Для исследований на животных <sup>68</sup>Ga-пептиксафор готовили в системе Gallelut+ по аналогии с ранее опубликованной процедурой мечения <sup>68</sup>Ga (Notni, et al., TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals. Chemistry 2011, 17 (52), 14718-22.) (SCINTOMICS GmbH, Германия). Вкратце, проводили реакцию фракций элюата генератора <sup>68</sup>Ga (1,25 мл; 600-800 МБк, значение рН доведено до

pH 3,3 с помощью буфера, 900 мкл раствора 14,4 г HEPES в 12 мл воды) с 3,5 нмоль соответствующего DOTA-пептида (от P1 до P5) в течение 5 мин. Радиохимическая чистота всегда была >99%, что подтверждается тонкослойной хроматографией (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Добавление 1 мл ФБР и концентрирование в вакууме до общего объема 1 мл давало не содержащие растворителей составы с удельной активностью в диапазоне от 100 до 150 МБк/нмоль.

### 3.3. Введение метки $^{177}\text{Lu}$

Для меченя  $^{177}\text{Lu}$  соответствующие DOTA-пептиды (от P1 до P5) растворяли в воде с получением 100 мкМ раствора. Из этого раствора требуемый объем был добавлен к  $^{177}\text{LuCl}_3$  в 0,04 М HCl (itg Isotope Technologies Garching, Гархинг, Германия; концентрация активности: 370 МБк/500 мкл) для достижения отношения активности пептида к  $^{177}\text{Lu}$ , равной 0,75 нмоль пептида на 25 МБк  $^{177}\text{LuCl}_3$ . К этой смеси добавляли 10 мкл 1 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  вместе с водой, чтобы получить общий реакционный объем 100 мкл. Раствор нагревали до 95°C в течение 30 мин. После охлаждения радиохимическую чистоту определяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) (обычно >98%). Для исследований *in vitro* и *in vivo* реакционную смесь разбавляли ФБР до необходимой концентрации активности и использовали как таковую для экспериментов.

### 4. Определение липофильности

К раствору приблизительно 0,5 МБк радиоактивно меченного пептида в 500 мкл ФБР (pH 7,4) добавляли 500 мкл октанола (n=6). Флаконы интенсивно встряхивали в течение 3 мин. Для достижения количественного разделения фаз флаконы центрифугировали при 14600xg в течение 6 мин в Biofuge 15 (Heraeus Sepatech, Остероде, Германия). Концентрации активности в 100 мкл образцах как водной, так и органической фазы измеряли с помощью  $\gamma$ -счетчика. Рассчитывали как коэффициент распределения  $P_{ow}$ , который определяется как отношение молярных концентраций одного вида А между октанолом и водной фазой в равновесии, так и  $\log P_{ow}$ , который является важным параметром, используемым для характеристики липофильности соединения.

### 5. Оценка *in vitro*

Для экспериментов *in vitro* использовали следующие клеточные линии: клетки Т-клеточного лейкоза человека Jurkat, клетки В-клеточной лимфомы мыши Е $\mu$ -Мус1080 и Chem-1. Клетки Jurkat культивировали в среде RPMI 1640 (Biochrom, Германия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Biochrom, Германия). Клеточную линию Chemicon's Wild-Type (Chem-1), экспрессирующую CXCR4 человека, культивировали в среде DMEM (Biochrom, Германия) с добавлением 10% ЭТС, 1% заменимых аминокислот (Biochrom, Германия) и 1% HEPES (1M). Клеточную линию Е $\mu$ -Мус1080, экспрессирующую CXCR4 мыши (Donnou et al., Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. *Adv Hematol.* 2012;701704), выращивали в среде RPMI 1640 с добавлением 20% ЭТС, 1% заменимых аминокислот (Biochrom, Германия) и 0,1% 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, Германия). Все клеточные линии культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  и пассировали два-три раза в неделю, в зависимости от плотности клеток.

### Анализы аффинности рецепторов

Конкурентные исследования, направленные на CXCR4 человека, были выполнены с использованием CXCR4-положительных клеток Т-клеточного лейкоза Jurkat и  $^{125}\text{I}$ -FC131 ( $^{125}\text{I}$ -2), направленных на мышинные CXCR4, Е $\mu$ -Мус1080 клеток В-клеточной лимфомы, и  $^{125}\text{I}$ -CPCR4.3 (Demmer et al., A Conformationally Frozen Peptoid Boosts CXCR4 Affinity and Anti-HIV Activity. *Angewandte Chemie International Edition.* 2012; 51:8110-8113)) использовали в качестве радиолиганда, как описано ранее (Poschenrieder et al., The influence of different metal-chelate conjugates of pentixafor on the CXCR4 affinity. *EJNMMI research.* 2016; 6:1-8).

### Исследования интернализации и экстернализации и $\log P$ (октанол/ФБР)

Исследования интернализации и оттока из клеток соответствующих лигандов выполняли с использованием ранее опубликованного протокола (Poschenrieder et al., First  $^{18}\text{F}$ -Labeled Pentixafor-Based Imaging Agent for PET Imaging of CXCR4 Expression In Vivo. 2016). Коэффициенты распределения соответствующих  $^{68}\text{Ga}$ - и  $^{177}\text{Lu}$ -меченных пептидов в октанол и буфере ФБР определяли методом встряхивания, как описано ранее (Weinisen et al., Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *EJNMMI Research.* 2014; 1: 1-15).

### 6. Эксперименты *in vivo*

#### Модель на животных

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с общими правилами защиты животных в Германии (Deutsches Tierschutzgesetz, разрешение № 55.2-1-54-2532 71-13). Клеточную линию В-лимфобластов человека Daudi суспендировали (об./об.) 1:1 в бессывороточной среде и Matrigel (BD Biosciences, Германия), и приблизительно  $10^7$  клеток в 200 мкл инокулировали подкожно на правое плечо мышам CB-17 SCID (Charles River, Германия) в возрасте 6-8 недель. Опухоли выращивали от 2 до 4 недель до диаметра от 8 до 10 мм.

#### Биораспределение

Меченные  $^{177}\text{Lu}$  лиганды CXCR4 (приблизительно 5-10 МБк, 0,06-0,1 нмоль) вводили в хвостовую

вену анестезированных животных. Через 6 и 48 ч после внутривенной инъекции примерно 0,15 мл радиоактивно меченного пептида животных ( $n=4$  для каждой временной точки) умерщвляли. Ткани и органы взвешивали сразу после приготовления, и радиоактивность подсчитывали на гамма-счетчике. Рассчитывали % ГО/г каждой ткани и корректировали с учетом активности, обнаруженной в хвосте.

#### μПЭТ-изображения

Визуализационные исследования были выполнены с помощью ПЭТ Siemens Inveon для мелких животных с последующим анализом данных с помощью программного обеспечения Inveon Research Workplace. Животных анестезировали изофлураном и через хвостовую вену вводили от 10 до 15 МБк (0,1 нмоль) индикатора. Динамическую визуализацию проводили после инъекции анестезированным животным в течение 1,5 ч. Статические изображения записывали с интервалом 1 ч/с при времени сбора 15 мин. Для сопоставительных экспериментов животным совместно вводили 50 мкг AMD3100. Изображения были реконструированы с использованием алгоритма максимума ожидания упорядоченных подмножеств 3D (OSEM3D) без коррекции сканера и затухания.

Пример 2.

#### Химия

Полностью лишенный защиты циклический каркас, связывающий CPCR4 (цикло[D-Тур-NMe-D-Орг-Arg-Nal-Gly] (1), см. фиг. 1), синтезировали с выходом 63% на твердом носителе, как описано ранее, с небольшими модификациями. (Demmer et al., Introduction of functional groups into peptides via N-alkylation. *Organic letters*. 2008;10:2015-2018). Все пептидные линкеры были синтезированы посредством твердофазного пептидного синтеза с использованием стандартного протокола Fmoc. Впоследствии пептиды отделяли от смолы (ДХМ/ТФЭ/АсОН; об./об./об; 6/3/1) без снятия защиты с боковых цепей. После конденсации с циклическим связывающим мотивом 1 хелатор DOTA или DOTAGA-ангидрид связывали с N-концевыми свободными пептидами с почти количественными выходами. С помощью нового способа мягкого йодирования боковые цепи D-Тур соответствующих пептидов были селективно йодированы (фиг. 1) (Schottelius et al., An optimized strategy for the mild and efficient solution phase iodination of tyrosine residues in bioactive peptides. *Tetrahedron Letters*. 2015; 56:6602-6605). Комплексы  $^{nat}Ga^{III}$  и  $^{nat}Lu^{III}$  всех тестируемых соединений были получены путем инкубации соответствующих DOTA- или DOTAGA-пептидов с эквивалентным количеством водного  $Ga(NO_3)_3$  или 10-молярным избытком  $LuCl_3$  при 90°C в течение 30 мин.

#### Радиохимия

Получение  $^{68}Ga$ -меченых пептидов (5 нмоль) проводили с помощью полностью автоматизированного модуля (Scintomics, Германия) с высокими выходами и удельной активностью от 100 до 120 ГБк/мкмоль. Пептиды, меченные  $^{177}Lu$ , были получены после инкубации соответствующего DOTA-пептида (0,75 нмоль) с 20 МБк  $^{177}LuCl_3$  в 1,0 М буфере  $NH_4OAc$  (рассчитано как 10% от общего реакционного объема) и нагревания до 95°C в течение 30 мин, что обеспечивало удельную активность 26 ГБк/мкмоль.

Пример 3. Аффинность связывания CXCR4

Аффинность связывания ( $IC_{50}$ ) соответствующих производных  $^{nat}Lu$  и  $^{nat}Ga$  по отношению к CXCR4 человека и мыши (табл. 1a) определяли в анализе конкурентного связывания с использованием клеток Т-клеточного лейкоза человека Jurkat или клеток В-клеточной лимфомы мыши Еμ-Мус1080 ( $4,0$  и  $2,0 \times 10^5$  клеток/лунку, 2 ч, комнатная температура) и  $^{125}I$ -2 или  $^{125}I$ -CPCR4,3 (0,1 нМ) в качестве радиолиганда. Чтобы иметь возможность оценить влияние структурных модификаций в исследовании SAR на аффинность связывания CXCR4, данные для  $^{nat}Ga$ -пентикасафора ( $^{nat}Ga$ -3) и  $^{nat}Lu$ -пентикасатера ( $^{nat}Lu$ -4) также включены в табл. 1a.

Таблица 1а. Структурные модификации синтезированных соединений и аффинность связывания с человеческим и мышинным CXCR4 (IC<sub>50</sub>) комплексов <sup>nat</sup>Lu и <sup>nat</sup>Ga (сМ. фиг. 1)

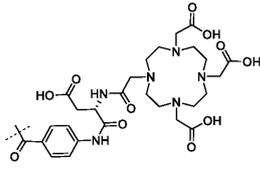
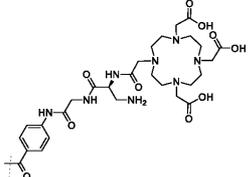
	R <sub>1</sub>	Xaa <sub>1</sub>	Xaa <sub>2</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> [нМ] для <sup>nat</sup> Lu-комплексов и CXCR4 человека	IC <sub>50</sub> [нМ] для <sup>nat</sup> Ga-комплексов и CXCR4 человека	mIC <sub>50</sub> [нМ] <sup>nat</sup> Lu комплексов и CXCR4 мыши
<b>2</b>	-	-	-	-	13,1±5,1		119±69
<b>3</b>	H	- <sup>[a]</sup>	-	DOTA	41±12	24,8±2,5 <sup>a</sup>	> 1000
<b>4</b>	I	- <sup>[a]</sup>	-	DOTA	14,6±1,0	6,1± 1,5	567±62
<b>5</b>	I	-	-	DOTA	12,5±3,2	282±90	-
<b>6</b>	I	-	-	DOTAGA	28,3±9	14,4±0,3	-
<b>7</b>	I	Gly	-	DOTA	5,9±0,3	7,9±1,1	-
<b>8</b>	I	Gly	-	DOTAGA	38,8±1,3	47,4±8,1	-
<b>P1</b>	I	D-Asp	-	DOTA	106±10	-	-
<b>P2</b>	I	Gly	D-Dap <sup>[b]</sup>	DOTA	3,5±0,3	3,6±0,7	-
<b>P3b</b>	H	Gly	D-Lys	DOTA	8,0±3,1	8,9±3,8	-
<b>P3</b>	I	Gly	D-Lys	DOTA	3,6±1,1	2,4±0,1	61,4±17
<b>P4b</b>	H	Gly	D-Arg	DOTA	5,4±1,6	9,7±2,8	-
<b>P4</b>	I	Gly	D-Arg	DOTA	2,1±0,3	1,4±0,2	37,1±2,9
<b>P5b</b>	H	D-Ala	D-Arg	DOTA	1,5±0,1	0,4±0,1	-
<b>P5</b>	I	D-Ala	D-Arg	DOTA	1,7± 0,6	2,6±1,0	48,5±0,5

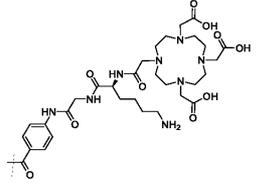
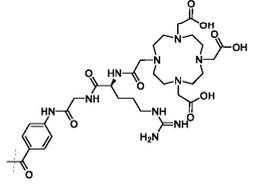
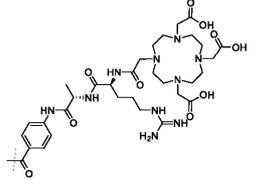
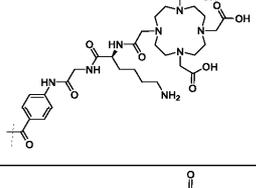
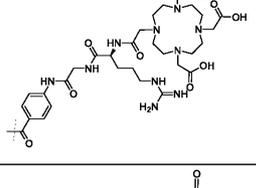
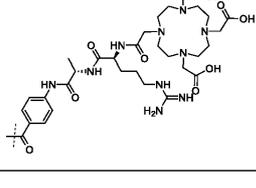
Анализы связывания проводили с использованием клеток Jurkat (400000 на лунку) и ([<sup>125</sup>I]FC131) (с=0,1 нМ) в качестве радиолганда для hCXCR4, и Eμ-Myc1080 клеток В-клеточной лимфомы мыши и [<sup>125</sup>I]CPCR4.3 в качестве радиолганда. Клетки инкубировали в HBSS (1% БСА) при комнатной температуре в течение 2 часов. Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=3). [a] Спейсер из 4-аминобензойной кислоты заменен на 4-аминометилбензойную кислоту (см. фиг. 1 (5-16), [b] (R)-2,3-диаминопропановая кислота.

Как продемонстрировано шестикратным повышением аффинности связывания с hCXCR4 (7 против 8), хелатор DOTA предпочтительнее DOTAGA, а дополнительный глицин в линкере благоприятно влияет на аффинность связывания (12,5±3,2 нМ для <sup>nat</sup>Lu-5 против 5,9±0,3 нМ для <sup>nat</sup>Lu-7, соответственно). Дополнительная вставка катионных аминокислот в линкер дополнительно улучшает аффинность связывания почти в два раза с 3,5±0,3 нМ для <sup>nat</sup>Lu-P2. Мутация катионной аминокислоты в этом положении в сочетании с заключительной стадией оптимизации, на которой глицин был заменен на D-аланин (P5), привела к дополнительному почти двукратному увеличению аффинности по сравнению с P2 (1,7±0,6 нМ для <sup>nat</sup>Lu- P5). Наконец, оптимизированная "связывающая единица" также позволила использовать нейодированный каркас (1), что неожиданно также привело к повышенной аффинности связывания (1,5±0,1 нМ и 0,4±0,1 нМ для <sup>nat</sup>Lu-P5b и <sup>nat</sup>Ga-P5b, соответственно). Кроме того, <sup>nat</sup>Lu-P4 и <sup>nat</sup>Lu-P6 продемонстрировали резко улучшенную аффинность связывания с мышинным рецептором с 37,1±2,9 нМ для <sup>nat</sup>Lu-P4 и 48,5±0,5 нМ для <sup>nat</sup>Lu-P5 по сравнению с 567±62 нМ для <sup>nat</sup>Lu-4.

Дополнительные данные по аффинности для P1, P2, P3, P3b, P4, P4b, P5 и P5b и других соединений приведены в табл. с 1b по 1d ниже.

Таблица 1b. Аффинности связывания ( $IC_{50}$  в нМ) новых лигандов CXCR4 с человеческим CXCR4 (hCXCR4). Аффинность определяли с использованием клеток Т-клеточного лейкоза человека Jurkat (400000 клеток/образец) и [ $^{125}$ I]FC-131 в качестве радиолиганда. Каждый эксперимент проводили в трех экземплярах, и результаты представляют собой средние значения  $\pm$  стандартное отклонение от трех отдельных экспериментов.

цикло(йодо-уом'(R <sup>1</sup> )RNalG) R <sup>1</sup> =	Соединение	$IC_{50}$ [нМ] к hCXCR4	$IC_{50}$ [нМ] к hCXCR4	$IC_{50}$ [нМ] к hCXCR4	$IC_{50}$ [нМ] к hCXCR4
Комплексы металлов		[ <sup>nat</sup> Ga]	[ <sup>nat</sup> Lu]	[ <sup>nat</sup> Y]	[ <sup>nat</sup> Bi]
	<b>P1</b>	-	106±10	-	-
	<b>P2</b>	3,6±0,7	3,5±0,3	4,1±1,3	3,5±0,4

	<b>P3</b>	2,4±0,1	3,6±1,1	2,4±0,2	38±25
	<b>P4</b>	1,4±0,2	2,1±0,3	2,1±0,3	2,9±0,1
	<b>P5</b>	2,6±1,0	1,7± 0,6	1,6±0,5	1,8±0,8
$c(\text{Yonit}(\text{R}^1)\text{RNa})$ $[\text{G}]$ $\text{R}^1 =$	Соединение	$\text{IC}_{50} [\text{нМ}] \text{ к}$ $h\text{CXCR4}$			
<i>Комплексы металлов</i>		$[\text{natGa}]$	$[\text{natLu}]$	$[\text{natY}]$	$[\text{natBi}]$
	<b>P3b</b>	8,9±3,8	8,0±3,1	6,3±2,5	-
	<b>P4b</b>	9,7±2,8	5,4±1,6	8,7±2,9	-
	<b>P5b</b>	0,4±0,1	1,5±0,1	0,3±0,1	-

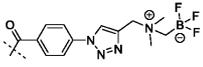
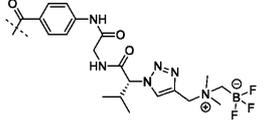
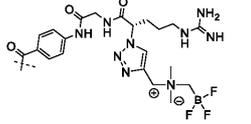
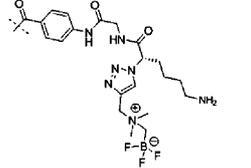
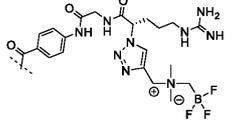
<i>c</i> (iodo- <i>o</i> m <sup>+</sup> (R <sup>1</sup> )RNalG) R <sup>1</sup> =	Соедине- ние	IC <sub>50</sub> [нМ] к <i>h</i> CXCR4
<i>Предшественники для введения метки <sup>18</sup>F</i>		
	<b>F1</b>	134,3± 47
	<b>F2</b>	65,2±10
	<b>F3</b>	2,9±0,9
	<b>F4</b>	3,8±0,9
<i>c</i> ( <i>o</i> m <sup>+</sup> (R <sup>1</sup> )RNalG) R <sup>1</sup> =	Соедине- ние	IC <sub>50</sub> [нМ] к <i>h</i> CXCR4
<i>Предшественники введения метки <sup>18</sup>F</i>		
	<b>F3b</b>	2,4±0,8

Таблица 1с: Аффинности связывания ( $IC_{50}$  в нМ) новых лигандов CXCR4 с мышинным CXCR4 (mCXCR4). Аффинность определяли с использованием В-клеточной лимфомы Еμ-Мус1080 (200000 клеток/образец) и [ $^{125}I$ ]CPCR4.3<sup>8</sup> в качестве радиолиганда. Каждый эксперимент проводили в трех экземплярах, и результаты представляют собой средние значения  $\pm$  стандартное отклонение от трех отдельных экспериментов.

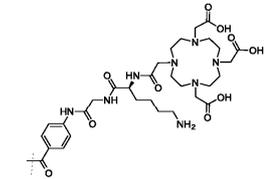
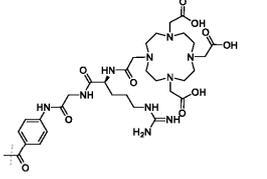
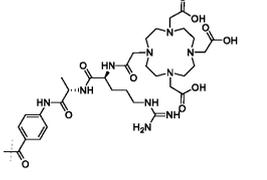
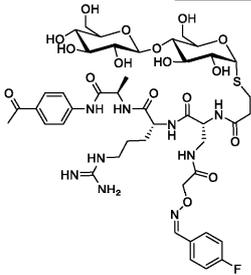
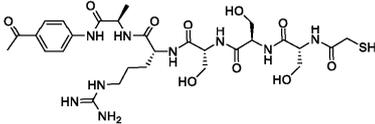
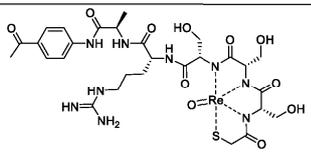
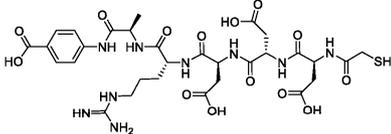
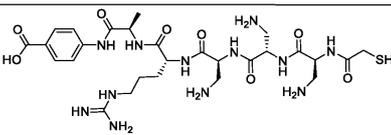
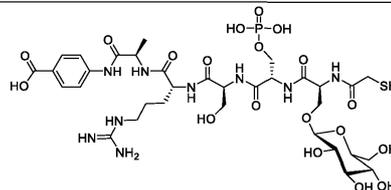
цикло(йодо-орн <sup>1</sup> (R <sup>1</sup> )RNalG) R <sup>1</sup> =	Соединение	$IC_{50}$ [нМ] к mCXCR4
	12=P3	37,1 $\pm$ 2,9
	14=P4	48,5 $\pm$ 0,5
	16=P5	61,4 $\pm$ 17

Таблица 1d

Цикло[tyr-N(Me)orn(S)-Arg-Nal-Gly] S = орн-модификация боковой цепи	Соединение	$IC_{50}$ [нМ] к hCXCR4	logP
<sup>19</sup> F-меченный предшественник (FBOA-аналог)			

	<b>F5</b>	4,6±0,7	
<i>Предшественники введения метки <sup>99m</sup>Tc и ReO-эталонное соединение</i>			
	<b>T1</b>	22,9±3,9	-
	<b>T1b</b>	17,0±3,7	- 1,37
	<b>T2</b>	85,7±5,1	- 2,2
	<b>T3</b>	18,8±8,5	- 1,5
	<b>T4</b>	213±22	- 2,2

### Исследования интернализации и экстернализации

Кинетику интернализации и оттока из клеток большинства аффинных пептидов <sup>177</sup>Lu-P5 и <sup>177</sup>Lu-P5 определяли с использованием клеток hCXCR4<sup>+</sup> Chem\_1 (1,25×10<sup>5</sup> клеток/лунку) при 37°C (фиг. 2). Итоговую концентрацию пептида в анализе доводили до 1,0 нМ, чтобы получить приемлемые скорости счета для оценки анализа. Чтобы отличить специфическое связывание с CXCR4 от неспецифического связывания, эксперименты всегда проводили в отсутствие и в присутствии AMD3100 (с=100 мкМ моль/л) (40). Пептиды, меченные <sup>177</sup>Lu, измеряли в том же анализе вместе с <sup>177</sup>Lu-пентиксатером (<sup>177</sup>Lu-4) для прямого сравнения. Для кинетики экстернализации соответствующим <sup>177</sup>Lu-меченым пептидам позволяли интернализироваться в клетки в течение 120 мин перед началом эксперимента. В верхней части фиг. 2 показана кинетика интернализации <sup>177</sup>Lu-P5b и <sup>177</sup>Lu-P5 за 60 мин по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4. В соответствии с повышенной аффинностью связывания удельная интернализованная активность <sup>177</sup>Lu-P5b и <sup>177</sup>Lu-P5 составляла 21,2±1,9% и 36,7±1,0% по сравнению с 3,8±1,3% для <sup>177</sup>Lu-4. Следовательно, введение пептидного спейсера увеличивало интернализацию новых лигандов CXCR4 почти в 10 раз. На нижней панели фиг. 2 показана кинетика экстернализации <sup>177</sup>Lu-P5b, <sup>177</sup>Lu-P5 и <sup>177</sup>Lu-4. После 60 мин инкубации в среде, свободной от индикаторов (позволяющей повторно интернализировать извлеченный индикатор), более 85% первоначально интернализованной активности <sup>177</sup>Lu-P5b и <sup>177</sup>Lu-P5 оставалось в клетках.

<sup>177</sup>Lu-4, напротив, следовал типичной кинетике оттока, что приводило в результате только к тому, что через 60 мин с клетками ассоциировалось лишь 37% от начальной активности.

### Определение липофильности

Липофильность измеряли методом встряхивания колбы. Логарифмы коэффициента распределения P, где P представляет собой соотношение распределения активности соответствующего <sup>68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu-меченного пептида в n-октаноле и ФБР, перечислены в табл. 2. Все новые пептиды показали повышенную гидрофильность. Среди всех испытанных соединений <sup>68</sup>Ga-15 оказался наиболее гидрофильным.

Таблица 2. Липофильность радиоактивно меченных лигандов (logP (масло/вода); коэффициент распределения в н-октанол/ФБР)

СХСR4 лиганд	logP <sub>(м/в)</sub>
<sup>68</sup> Ga-3	-2,90 ± 0,08
<sup>68</sup> Ga-P5b	-3,58 ± 0,06
<sup>68</sup> Ga-P5	-3,29 ± 0,02
<sup>177</sup> Lu-4	-1,80 ± 0,20
<sup>117</sup> Lu-P5b	-2,96 ± 0,13
<sup>177</sup> Lu-P5	-2,75 ± 0,04

Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=6).

#### Исследования биораспределения

Сравнительные данные по биораспределению <sup>177</sup>Lu-P5b, <sup>177</sup>Lu-P5 и <sup>177</sup>Lu-4 (каждый 0,1-0,2 нмоль) через 6 ч и 48 ч после инъекции мышам SCID с лимфомой Дауди (n=4) суммированы на фиг. 3 (6 ч после инъекции) и фиг. 4 (48 ч после инъекции). Как показано на фиг. 3, все пептиды, меченные <sup>177</sup>Lu, демонстрировали низкое накопление в нецелевых тканях и быстрый почечный клиренс. Однако <sup>177</sup>Lu-P5 продемонстрировал повышенное поглощение печенью, а также повышенное поглощение тканями, ассоциированными с СХСR4 мышью, такими как селезенка, легкие и кости. Кроме того, повышенное накопление в почках наблюдалось для <sup>177</sup>Lu-P5b (7,1±2,0% ID/г). Наиболее важно то, что повышенная СХСR4-опосредованная интернализация и аффинность связывания <sup>177</sup>Lu-P5b и <sup>177</sup>Lu-P5 по сравнению с <sup>177</sup>Lu-4 хорошо отражались в повышенном поглощении в СХСR4-положительной опухоли с 12,5±2,6% ID/г для <sup>177</sup>Lu-P5b и 13,6±3,3% ID/г для <sup>177</sup>Lu-P5 по сравнению с 6,8±0,7% ID/г для <sup>177</sup>Lu-4, соответственно. Через 48 ч после инъекции поглощение опухолью, соотношение опухоль/мышца и соотношение опухоль/кровь <sup>177</sup>Lu-P5b достигали значений 8,8% ID/г, 412 и 948 и 3,2% ID/г, 85 и 201 для <sup>177</sup>Lu-4, соответственно (фиг. 4).

#### ПЭТ-визуализация мелких животных

Как показано на ПЭТ-изображениях на фиг. 5 мышей SCID, несущих лимфому Дауди, через 60 мин после инъекции, <sup>68</sup>Ga-P5b и <sup>68</sup>Ga-P5 в основном накапливаются в опухоли и показывают быстрое выведение почками. В соответствии с данными биораспределения, новые лиганды демонстрируют слегка повышенное поглощение печенью, а для <sup>68</sup>Ga-P5b - повышенное удержание в почках. Поглощение метки опухолью является специфическим и опосредованным СХСR4, как показано в конкурентном эксперименте с использованием 50 мкг AMD3100 (фиг. 5). Кривые время-активность (фиг. 6), полученные из данных динамической ПЭТ, показывают быструю и постоянно увеличивающуюся кинетику поглощения обоих индикаторов опухолью в течение 1,5-часового периода наблюдения. В отличие от <sup>68</sup>Ga-P5b, <sup>68</sup>Ga-P5 показал более быстрое вымывание из крови (интересующая область над сердцем), но почти идентичный клиренс из печени.

**Дополнительные ссылки**

1. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-127.
2. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *European journal of cancer* 2013;49:219-230.
3. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-877.
4. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S-i, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-638.
5. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Advances in immunology* 2000;74:127-180.
6. Aiuti A, Webb I, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos J. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:111-120.
7. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9448-9453.
8. Nagafuchi Y, Shoda H, Sumitomo S, Nakachi S, Kato R, Tsuchida Y, et al. Immunophenotyping of rheumatoid arthritis reveals a linkage between HLA-DRB1 genotype, CXCR4 expression on memory CD4(+) T cells, and disease activity. *Sci Rep* 2016;6:29338.
9. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-197.
10. Schober A, Bernhagen J, Weber C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:761-770.
11. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999;94:3658-3667.
12. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *nature* 2001;410:50-56.

13. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761-1767.
14. Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Advances in cancer research* 2014;124:31.
15. Brave M, Farrell A, Ching Lin S, Ocheltree T, Pope Miksinski S, Lee SL, et al. FDA review summary: Mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation. *Oncology* 2010;78:282-288.
16. Liu T, Li X, You S, Bhuyan SS, Dong L. Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors: from original discovery to use in current clinical practice. *Exp Hematol Oncol* 2015;5:19.
17. Taromi S, Kayser G, Catusse J, von Elverfeldt D, Reichardt W, Braun F, et al. CXCR4 antagonists suppress small cell lung cancer progression. *Oncotarget* 2016;7:85185-85195.
18. Bodart V, Anastassov V, Darkes MC, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, et al. Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4. *Biochem Pharmacol* 2009;78:993-1000.
19. Ling X, Spaeth E, Chen Y, Shi Y, Zhang W, Schober W, et al. The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness in vitro and prevents breast cancer growth and metastasis in vivo. *PLoS One* 2013;8:e58426.
20. Liang Z, Zhan W, Zhu A, Yoon Y, Lin S, Sasaki M, et al. Development of a unique small molecule modulator of CXCR4. *PLoS One* 2012;7:e34038.
21. Wong D, Kandagatla P, Korz W, Chinni SR. Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis. *BMC Urol* 2014;14:12.
22. Beider K, Darash-Yahana M, Blaier O, Koren-Michowitz M, Abraham M, Wald H, et al. Combination of imatinib with CXCR4 antagonist BKT140 overcomes the protective effect of stroma and targets CML in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2014;13:1155-1169.
23. Fahham D, Weiss ID, Abraham M, Beider K, Hanna W, Shlomain Z, et al. In vitro and in vivo therapeutic efficacy of CXCR4 antagonist BKT140 against human non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:1167-1175 e1161.
24. Peled A, Abraham M, Avivi I, Rowe JM, Beider K, Wald H, et al. The high-affinity CXCR4 antagonist BKT140 is safe and induces a robust mobilization of human CD34+ cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2014;20:469-479.
25. Karpova D, Dauber K, Spohn G, Chudziak D, Wiercinska E, Schulz M, et al. The novel CXCR4 antagonist POL5551 mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells with greater efficiency than Plerixafor. *Leukemia* 2013;27:2322-2331.

26. Sison EA, Magoon D, Li L, Annesley CE, Romagnoli B, Douglas GJ, et al. POL5551, a novel and potent CXCR4 antagonist, enhances sensitivity to chemotherapy in pediatric ALL. *Oncotarget* 2015;6:30902-30918.
27. Xiang J, Hurchla MA, Fontana F, Su X, Amend SR, Esser AK, et al. CXCR4 Protein Epitope Mimetic Antagonist POL5551 Disrupts Metastasis and Enhances Chemotherapy Effect in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2015;14:2473-2485.
28. Azad BB, Chatterjee S, Lesniak WG, Lisok A, Pullambhatla M, Bhujwalla ZM, et al. A fully human CXCR4 antibody demonstrates diagnostic utility and therapeutic efficacy in solid tumor xenografts. *Oncotarget* 2016;7:12344-12358.
29. Peng S-B, Zhang X, Paul D, Kays LM, Ye M, Vaillancourt P, et al. Inhibition of CXCR4 by LY2624587, a Fully Humanized Anti-CXCR4 Antibody Induces Apoptosis of Hematologic Malignancies. *PLoS one* 2016;11:e0150585.
30. Ramsey DM, McAlpine SR. Halting metastasis through CXCR4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2013;23:20-25.
31. Cho BS, Zeng Z, Mu H, Wang Z, Konoplev S, McQueen T, et al. Antileukemia activity of the novel peptidic CXCR4 antagonist LY2510924 as monotherapy and in combination with chemotherapy. *Blood* 2015;126:222-232.
32. Peng SB, Zhang X, Paul D, Kays LM, Gough W, Stewart J, et al. Identification of LY2510924, a novel cyclic peptide CXCR4 antagonist that exhibits antitumor activities in solid tumor and breast cancer metastatic models. *Mol Cancer Ther* 2015;14:480-490.
33. Di Maro S, Di Leva FS, Trotta AM, Brancaccio D, Portella L, Aurilio M, et al. Structure-Activity Relationships and Biological Characterization of a Novel, Potent, and Serum Stable C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) Antagonist. *J Med Chem* 2017;60:9641-9652.
34. Di Maro S, Trotta AM, Brancaccio D, Di Leva FS, La Pietra V, Ierano C, et al. Exploring the N-Terminal Region of C-X-C Motif Chemokine 12 (CXCL12): Identification of Plasma-Stable Cyclic Peptides As Novel, Potent C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) Antagonists. *J Med Chem* 2016;59:8369-8380.
35. Ierano C, Portella L, Lusa S, Salzano G, D'Alterio C, Napolitano M, et al. CXCR4-antagonist Peptide R-liposomes for combined therapy against lung metastasis. *Nanoscale* 2016;8:7562-7571.
36. Fontanella R, Pelagalli A, Nardelli A, D'Alterio C, Ierano C, Cerchia L, et al. A novel antagonist of CXCR4 prevents bone marrow-derived mesenchymal stem cell-mediated osteosarcoma and hepatocellular carcinoma cell migration and invasion. *Cancer Lett* 2016;370:100-107.

37. Santagata S, Napolitano M, D'Alterio C, Desicato S, Maro SD, Marinelli L, et al. Targeting CXCR4 reverts the suppressive activity of T-regulatory cells in renal cancer. *Oncotarget* 2017;8:77110-77120.
38. George GP, Stevens E, Åberg O, Nguyen Q-D, Pisaneschi F, Spivey AC, et al. Preclinical evaluation of a CXCR4-specific <sup>68</sup>Ga-labelled TN14003 derivative for cancer PET imaging. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2014;22:796-803.
39. Yan X, Niu G, Wang Z, Yang X, Kiesewetter DO, Jacobson O, et al. Al [<sup>18</sup>F]NOTA-T140 Peptide for Noninvasive Visualization of CXCR4 Expression. *Molecular Imaging and Biology* 2015:1-8.
40. Jacobson O, Weiss ID, Kiesewetter DO, Farber JM, Chen X. PET of tumor CXCR4 expression with 4-<sup>18</sup>F-T140. *Journal of Nuclear Medicine* 2010;51:1796-1804.
41. Wang Z, Zhang M, Wang L, Wang S, Kang F, Li G, et al. Prospective Study of (68)Ga-NOTA-NFB: Radiation Dosimetry in Healthy Volunteers and First Application in Glioma Patients. *Theranostics* 2015;5:882-889.
42. Buckle T, van Berg NS, Kuil J, Bunschoten A, Oldenburg J, Borowsky AD, et al. Non-invasive longitudinal imaging of tumor progression using an (111)indium labeled CXCR4 peptide antagonist. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2012;2:99-109.
43. Kuil J, Buckle T, Oldenburg J, Yuan H, Borowsky AD, Josephson L, et al. Hybrid peptide dendrimers for imaging of chemokine receptor 4 (CXCR4) expression. *Mol Pharm* 2011;8:2444-2453.
44. Kuil J, Buckle T, Yuan H, van den Berg NS, Oishi S, Fujii N, et al. Synthesis and evaluation of a bimodal CXCR4 antagonistic peptide. *Bioconjug Chem* 2011;22:859-864.
45. Nishizawa K, Nishiyama H, Oishi S, Tanahara N, Kotani H, Mikami Y, et al. Fluorescent imaging of high-grade bladder cancer using a specific antagonist for chemokine receptor CXCR4. *Int J Cancer* 2010;127:1180-1187.
46. Portella L, Vitale R, De Luca S, D'Alterio C, Ierano C, Napolitano M, et al. Preclinical development of a novel class of CXCR4 antagonist impairing solid tumors growth and metastases. *PloS one* 2013;8:e74548.
47. Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Tamamura H, et al. Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003;42:3251-3253.
48. Tamamura H, Araki T, Ueda S, Wang Z, Oishi S, Esaka A, et al. Identification of novel low molecular weight CXCR4 antagonists by structural tuning of cyclic tetrapeptide scaffolds. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48:3280-3289.
49. Tamamura H, Esaka A, Ogawa T, Araki T, Ueda S, Wang Z, et al. Structure-activity relationship studies on CXCR4 antagonists having cyclic pentapeptide scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* 2005;3:4392-4394.

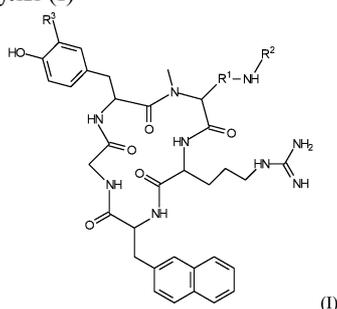
50. Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Esaka A, Oishi S, Ohashi N, et al. Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Organic & biomolecular chemistry* 2009;7:3805-3809.
51. Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, et al. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type Peptide bond isosteres. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:477-480.
52. Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, et al. Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 antagonist, FC131, using a series of alkene dipeptide isosteres. *J Med Chem* 2012;55:2746-2757.
53. Narumi T, Hayashi R, Tomita K, Kobayashi K, Tanahara N, Ohno H, et al. Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres. *Organic & biomolecular chemistry* 2010;8:616-621.
54. Demmer O, Dijkgraaf I, Schottelius M, Wester H-J, Kessler H. Introduction of functional groups into peptides via N-alkylation. *Organic letters* 2008;10:2015-2018.
55. Demmer O, Dijkgraaf I, Schumacher U, Marinelli L, Cosconati S, Gourni E, et al. Design, synthesis, and functionalization of dimeric peptides targeting chemokine receptor CXCR4. *Journal of medicinal chemistry* 2011;54:7648-7662.
56. Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester HJ. PET imaging of CXCR4 receptors in cancer by a new optimized ligand. *ChemMedChem* 2011;6:1789-1791.
57. Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, et al. PET of CXCR4 expression by a <sup>68</sup>Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *Journal of Nuclear Medicine* 2011;52:1803-1810.
58. Wester HJ, Keller U, Schottelius M, Beer A, Philipp-Abbrederis K, Hoffmann F, et al. Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging. *Theranostics* 2015;5:618.
59. Philipp-Abbrederis K, Herrmann K, Knop S, Schottelius M, Eiber M, Luckerath K, et al. In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma. *EMBO Mol Med* 2015;7:477-487.
60. Lapa C, Schreder M, Schirbel A, Samnick S, Kortum KM, Herrmann K, et al. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [<sup>18</sup>F]FDG and laboratory values. *Theranostics* 2017;7:205-212.
61. Avanesov M, Karul M, Derlin T. [<sup>68</sup>Ga]pentixafor PET: clinical molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma. *Radiologe* 2015;55:829-831.

62. Herhaus P, Habringer S, Philipp-Abbrederis K, Vag T, Gerngross C, Schottelius M, et al. Targeted positron emission tomography imaging of CXCR4 expression in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2016;101:932-940.
63. Lapa C, Luckerath K, Rudelius M, Schmid JS, Schoene A, Schirbel A, et al. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer--initial experience. *Oncotarget* 2016;7:9288-9295.
64. Lapa C, Luckerath K, Kleinlein I, Monoranu CM, Linsenmann T, Kessler AF, et al. <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression in Glioblastoma. *Theranostics* 2016;6:428-434.
65. Vag T, Gerngross C, Herhaus P, Eiber M, Philipp-Abbrederis K, Graner FP, et al. First Experience with Chemokine Receptor CXCR4-Targeted PET Imaging of Patients with Solid Cancers. *J Nucl Med* 2016;57:741-746.
66. Lapa C, Reiter T, Werner RA, Ertl G, Wester HJ, Buck AK, et al. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression After Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015;8:1466-1468.
67. Rischpler C, Nekolla SG, Kossmann H, Dirschinger RJ, Schottelius M, Hyafil F, et al. Upregulated myocardial CXCR4-expression after myocardial infarction assessed by simultaneous GA-68 pentixafor PET/MRI. *J Nucl Cardiol* 2016;23:131-133.
68. Thackeray JT, Derlin T, Haghikia A, Napp LC, Wang Y, Ross TL, et al. Molecular Imaging of the Chemokine Receptor CXCR4 After Acute Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015;8:1417-1426.
69. Schmid JS, Schirbel A, Buck AK, Kropf S, Wester HJ, Lapa C. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-Positron Emission Tomography/Computed Tomography Detects Chemokine Receptor CXCR4 Expression After Ischemic Stroke. *Circ Cardiovasc Imaging* 2016;9:e005217.
70. Hyafil F, Pelisek J, Laitinen I, Schottelius M, Mohring M, Doring Y, et al. Imaging the Cytokine Receptor CXCR4 in Atherosclerotic Plaques with the Radiotracer <sup>68</sup>Ga-Pentixafor for PET. *J Nucl Med* 2017;58:499-506.
71. Li X, Heber D, Leike T, Beitzke D, Lu X, Zhang X, et al. [<sup>68</sup>Ga]Pentixafor-PET/MRI for the detection of Chemokine receptor 4 expression in atherosclerotic plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017.
72. Weiberg D, Thackeray JT, Daum G, Sohns JM, Kropf S, Wester HJ, et al. Clinical Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Atherosclerotic Plaque using <sup>68</sup>Ga-Pentixafor PET: Correlation with Cardiovascular Risk Factors and Calcified Plaque Burden. *J Nucl Med* 2017.
73. Bouter C, Meller B, Sahlmann CO, Staab W, Wester HJ, Kropf S, et al. Imaging chemokine receptor CXCR4 in chronic infection of the bone with <sup>68</sup>Ga-Pentixafor-PET/CT - first insights. *J Nucl Med* 2017.

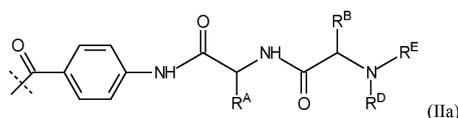
74. Derlin T, Gueler F, Brasen JH, Schmitz J, Hartung D, Herrmann TR, et al. Integrating MRI and Chemokine Receptor CXCR4-Targeted PET for Detection of Leukocyte Infiltration in Complicated Urinary Tract Infections After Kidney Transplantation. *J Nucl Med* 2017;58:1831-1837.
75. Schottelius M, Osl T, Poschenrieder A, Herrmann K, Lapa C, Hoffmann F, et al. [<sup>177</sup>Lu]pentixather: preclinical and first patient results with a highly promising CXCR4-directed endoradiotherapeutic agent. *Journal of Nuclear Medicine* 2015;56:339-339.
76. Habringer S, Lapa C, Herhaus P, Schottelius M, Istvanffy R, Steiger K, et al. Dual Targeting of Acute Leukemia and Supporting Niche by CXCR4-Directed Theranostics. *Theranostics* 2018;8:369-383.
77. Herrmann K, Schottelius M, Lapa C, Osl T, Poschenrieder A, Haenscheid H, et al. First-in-man experience of CXCR4-directed endoradiotherapy with <sup>177</sup>Lu-and <sup>90</sup>Y-labelled pentixather in advanced stage multiple myeloma with extensive intra-and extramedullary disease. *Journal of Nuclear Medicine* 2015;jnumed. 115.167361.
78. Lapa C, Herrmann K, Schirbel A, Haenscheid H, Luckerath K, Schottelius M, et al. CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma. *Theranostics* 2017;7:1589-1597.
79. Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M, Kessler H, Wester H-J. The influence of different metal-chelate conjugates of pentixafor on the CXCR4 affinity. *EJNMMI research* 2016;6:1-8.
80. Poschenrieder A, Schottelius M, Osl T, Schwaiger M, Wester HJ. [<sup>64</sup>Cu]NOTA-pentixather enables high resolution PET imaging of CXCR4 expression in a preclinical lymphoma model. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2017;2:2.
81. Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M, Wester HJ. Preclinical evaluation of [<sup>68</sup>Ga]NOTA-pentixafor for PET imaging of CXCR4 expression in vivo - a comparison to [<sup>68</sup>Ga]pentixafor. *EJNMMI Res* 2016;6:70.
82. Poschenrieder A, Osl T, Schottelius M, Hoffmann F, Wirtz M, Schwaiger M, et al. First <sup>18</sup>F-labeled Pentixafor-based Imaging Agent for PET Imaging of CXCR4-expression in Vivo Tomography 2016;2:85-93.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Соединение следующей формулы (I)



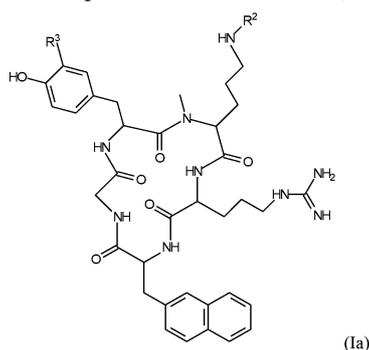
или его фармацевтически приемлемая соль, где  
 $R^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкандиильную цепь;  
 $R^2$  представляет собой группу формулы (IIa)



которая связана с остальной частью соединения связью, отмеченной пунктирной линией, и где  
 $R^A$  представляет собой H или  $CH_3$ ;  
 $R^B$  представляет собой -(линейный  $C_1$ - $C_6$  алкил)- $NH_2$  или -(линейный  $C_1$ - $C_6$  алкил)- $NH-C(=NH)-NH_2$ ;  
 $R^D$  представляет собой H;  
 $R^E$  представляет собой хелатирующий фрагмент, представленный остатком 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты; и

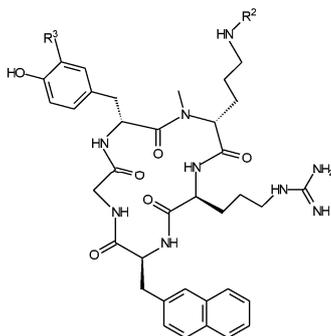
$R^3$  представляет собой H или I.

2. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п.1, где соединение имеет формулу (Ia)



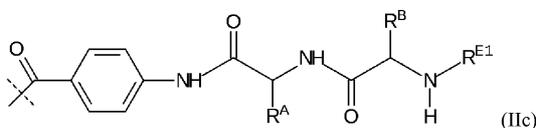
и где  $R^2$  и  $R^3$  определены в п.1.

3. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по п.2, где соединение имеет формулу (Ib)



и где  $R^2$  и  $R^3$  определены в п.1.

4. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-3, где  $R^2$  имеет формулу (IIc)

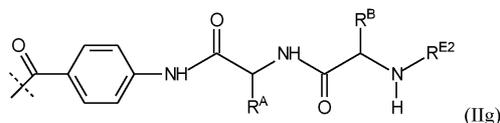


где

$R^A$  и  $R^B$  определены в п.1 и

$R^{E1}$  представляет собой хелатирующий фрагмент, представленный остатком 1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты.

5. Соединение или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-4, где  $R^2$  имеет формулу (IIg)



где

$R^A$ ,  $R^B$  определены в п.1 и

$R^{E2}$  представляет собой хелатирующий фрагмент, представленный остатком 1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель.

7. Диагностическая композиция для диагностики заболевания, связанного с хемокиновым рецептором подтипа 4 (CXCR4), содержащая соединение или фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель.

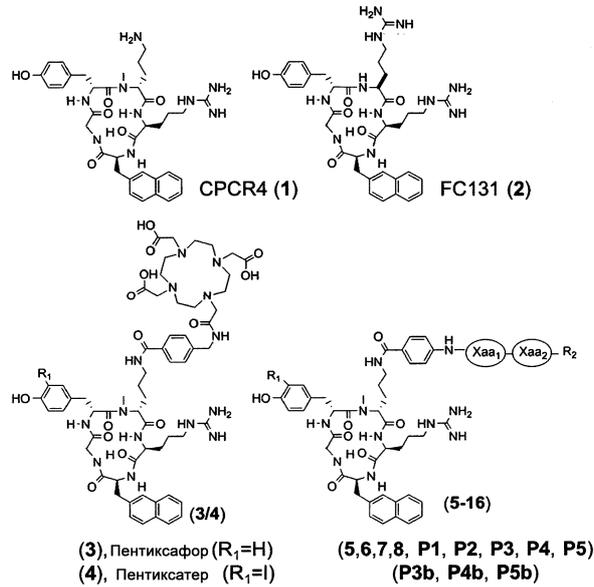
8. Терапевтическая композиция для лечения заболевания, связанного с хемокиновыми рецепторами подтипа 4 (CXCR4), содержащая соединение или фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель.

9. Применение соединения или фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-5 в ядерной медицине, для ядерной молекулярной визуализации, или оптической визуализации, или направленной эндоррадиотерапии.

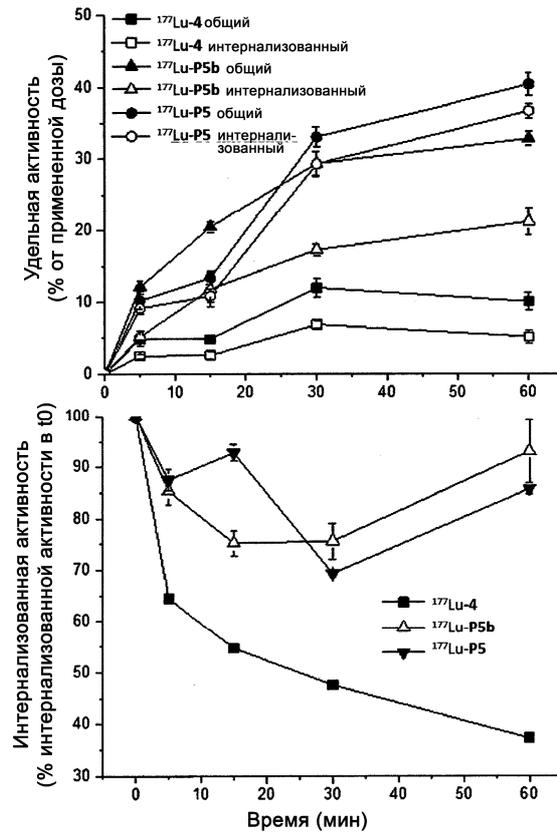
10. Применение соединения или соли по любому из пп.1-5 для лечения или профилактики заболе-

ваний, связанных с повышенной экспрессией хемокиновых рецепторов подтипа 4 (CXCR4), таких как раковые и лимфопролиферативные заболевания, а также сердечно-сосудистые заболевания, СПИД и воспалительные заболевания.

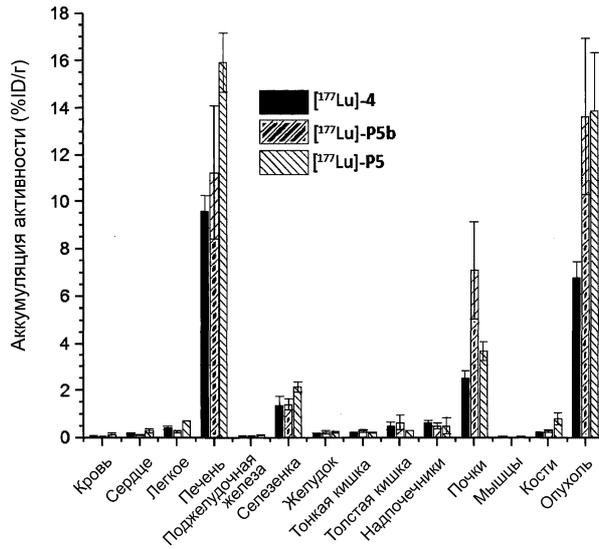
11. Применение соединения или соли по любому из пп.1-5 для диагностики и/или определения стадии рака или сердечно-сосудистых заболеваний.



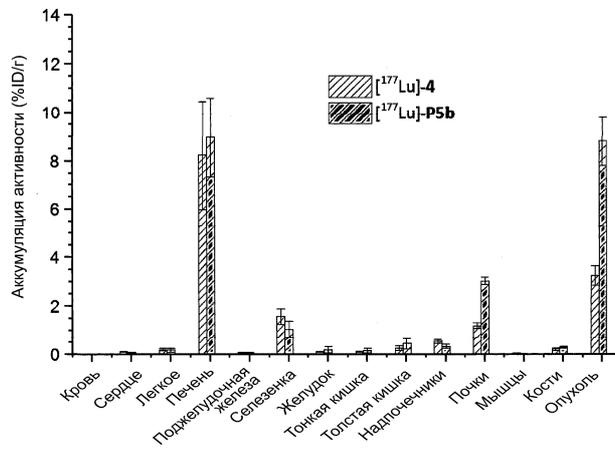
Фиг. 1



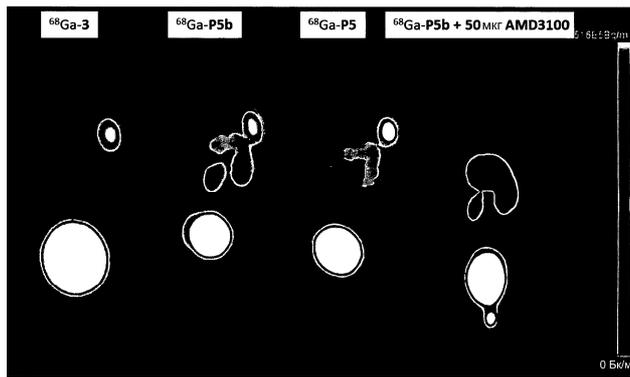
Фиг. 2



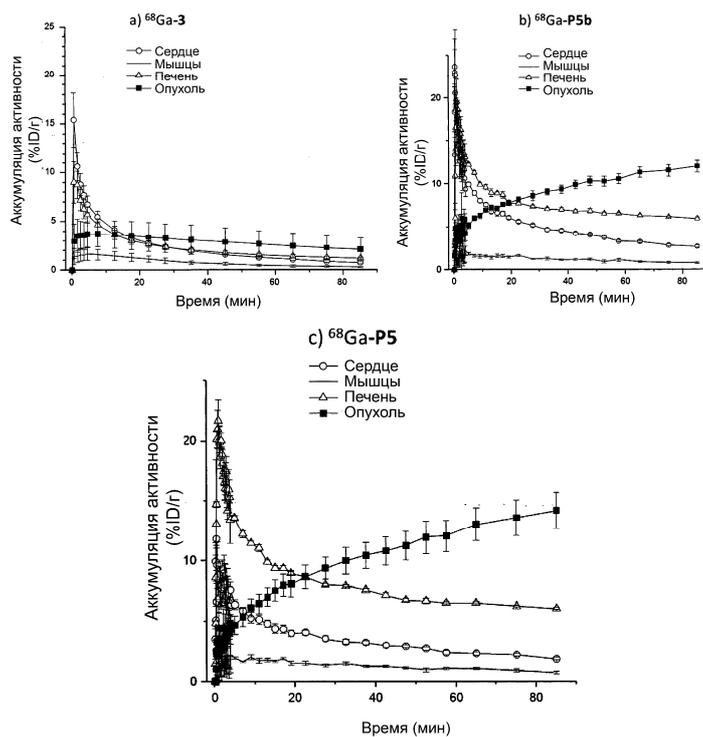
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

