

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391143 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.21(51) Int. Cl. *A61K 51/04* (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.10.14

(54) КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ

(31) 2020903727

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.14

Хогг Филип, Хо Шон Иван (AU)

(33) AU

(74) Представитель:

(86) PCT/AU2021/051203

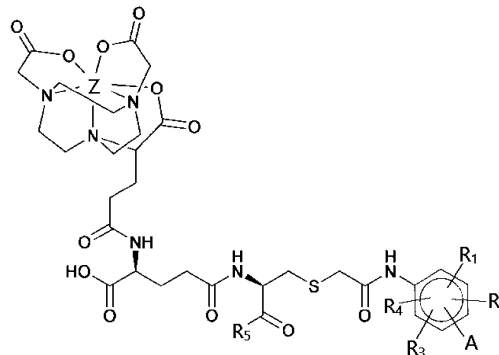
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2022/077068 2022.04.21

(71) Заявитель:

СЭНТИНЕРИ ИНСТИТЮТ ОФ
КЭНСЕР МЕДСИН ЭНД СЭЛЛ
БАЙОЛОДЖИ; ЮНИВЕРСИТИ ОФ
СИДНЕЙ (AU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I)



где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген; R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу; и Z представляет собой терапевтический радиоизотоп, или их фармацевтически приемлемой соли, сложному эфиру, пролекарству или сольвату, применениям указанных соединений и способам получения указанных соединений. Настоящее изобретение также относится к способам лечения с использованием указанных соединений. Настоящее изобретение также относится к способам получения соединений формулы (I), где Z представляет собой радиоизотоп.

A1

202391143

202391143

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577912EA/061

КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ

Область техники

[01] Настоящее изобретение в широком смысле относится к конъюгату, меченному радиоактивным изотопом, в соответствии с формулой (I), определенной в данном документе. Настоящее изобретение также относится к применению таких конъюгатов, меченных радиоактивным изотопом, для лечения неопластических состояний и к способам получения таких конъюгатов, меченных радиоактивным изотопом.

Уровень техники

[02] Рак является причиной примерно 1 из 6 смертей во всем мире, а экономические издержки исчисляются триллионами долларов ежегодно. Опухоли возникают в результате дисбаланса между скоростью клеточной пролиферации и выживаемостью в ткани, в то время как успешное лечение контролирует рост опухоли, подавляя пролиферацию опухолевых клеток и/или способствуя гибели опухолевых клеток.

[03] Химиотерапия, лучевая терапия и иммунотерапия являются основой лечения рака и во многих случаях эффективны. Когда рак локализован, он поддается потенциально излечивающим методам лечения, таким как хирургическое вмешательство или синергетические комбинации, такие как химиолучевая терапия. Однако при диссеминации заболевания требуются системные методы лечения, такие как химиотерапия, таргетная терапия или иммунотерапия. В то время как добавление дистанционной лучевой терапии может быть синергичным у пациентов с диссеминированным поражением, часто невозможно лечить все участки поражения из-за токсичности, и поэтому лучевая терапия предназначена для паллиативного лечения симптоматических участков поражения. Излечивающие методы лечения остаются в меньшинстве для большинства типов рака. Кроме того, эффективность этих стратегий лечения ограничена гетерогенностью опухоли, поскольку определенные популяции раковых клеток становятся устойчивыми к терапии.

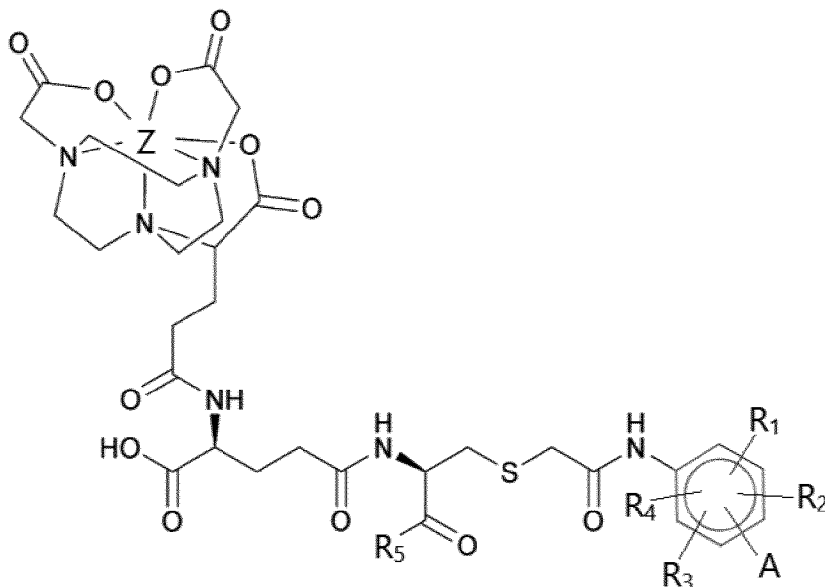
[04] Возобновился интерес к тераностике для повышения показателей излечения солидных опухолей. Тераностика использует онкомаркер для доставки терапевтического изотопа к опухоли. Тераностические подходы оказались успешными в нишевых применениях, таких как нейроэндокринные опухоли (Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, et al. Phase 3 Trial of (177)Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. N Engl J Med. 2017;376(2):125-135) и карцинома предстательной железы (von Eyben FE, Roviello G, Kiljunen T, et al. Third-line treatment and (177)Lu-PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018;45(3):496-508), где онкомаркеры представляют собой рецептор соматостатина и специфический мембранный антиген предстательной железы, соответственно. Однако тераностические подходы традиционно ограничивались нишевыми применениями и

отдельными группами опухолей.

[05] По-прежнему желательно обеспечить эффективное целенаправленное лечение рака.

Сущность изобретения

[06] Согласно первому аспекту настоящего изобретения предусмотрено соединение формулы (I),



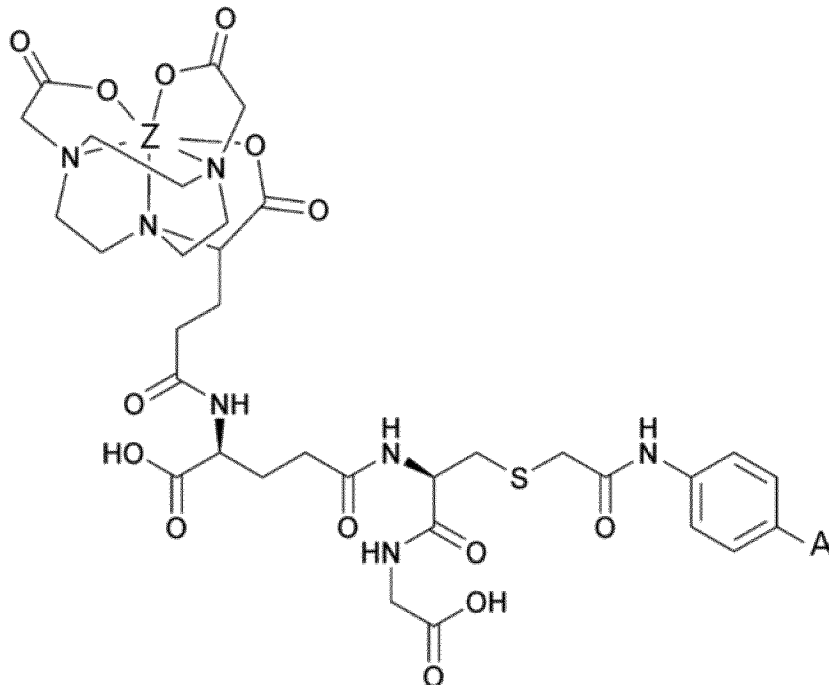
Формула (I)

где A представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R₁, R₂, R₃ и R₄ независимо выбран из H, X, OH, NH₂, CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген; R₅ представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR₆, где R₆ представляет собой C₁₋₅ неразветвленную или разветвленную алкильную группу; и Z представляет собой терапевтический радиоизотоп, или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[07] Соединения в соответствии с настоящим изобретением применимы для обеспечения эффективного направленного лечения рака и опухолей путем селективной доставки терапевтического радиоизотопа в области с высокой гибелью клеток, такие как опухоли, для дальнейшего усиления гибели клеток; излучение радиоизотопа вызывает гибель жизнеспособных соседних опухолевых клеток. Эта индуцированная гибель клеток может затем способствовать дальнейшему связыванию соединения по настоящему изобретению, что приводит к усилению эффекта в отношении эффективности лечения. Соединения по настоящему изобретению необязательно можно вводить несколько раз, чтобы воспользоваться преимуществом такого усиливающего эффекта. Кроме того, сочетание с существующими методами лечения рака, такими как химиотерапия, обеспечивает высокоэффективный механизм положительной обратной связи для лечения рака; лечение, такое как химиотерапия, вызывает гибель клеток в опухолях, что, в свою очередь, притягивает большее количество соединения по настоящему изобретению, что вызывает дальнейшую гибель клеток в соседних клетках, что может привлекать

дополнительное соединение по настоящему изобретению.

[08] В некоторых вариантах осуществления каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (Ia)



формула (Ia)

где A и Z имеют указанные выше значения, или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[09] В некоторых вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{177}Lu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re . В некоторых конкретных вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{90}Y . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{64}Cu . В некоторых конкретных вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu . Известно, что такие изотопы можно использовать при лечении рака и/или опухолей, вызывая гибель клеток, и в данном документе было продемонстрировано, что Lu и Cu легко включаются в соединения по настоящей заявке с высокой эффективностью и полученной в результате стабильностью соединений. Вышеупомянутые изотопы также испускают визуализируемые излучения и, таким образом, также полезны в качестве изотопов для визуализации, чтобы определить, где и сколько терапевтического излучения было доставлено субъекту. Такое изображение можно получить, например, с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Таким образом, использование таких изотопов дает тераностическое соединение, которое можно использовать как для терапии, так и для визуализации, для визуализации доставки терапевтического средства в области гибели клеток.

[010] В некоторых вариантах осуществления Z не представляет собой ^{64}Cu .

[011] Особенно предпочтительным соединением является соединение формулы (I),

где Z представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu , R₁- R₄ представляют собой H, R₅ представляет собой -NHCH₂COOH и A представляет собой As(OH)₂. Такие варианты осуществления легко синтезируются, синтезируются из легкодоступных и недорогих исходных материалов и включают терапевтические изотопы, пригодные для лечения рака и/или опухолей.

[012] Настоящее изобретение обеспечивает соединения согласно первому аспекту для применения в терапии. В частности, соединения оказывают терапевтическое действие, вызывая гибель клеток. В некоторых вариантах осуществления соединения предназначены для лечения неопластического состояния. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой рак. В конкретных вариантах осуществления соединение лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

[013] В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую соединение в соответствии с первым аспектом вместе с фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом, разбавителем, наполнителем и/или адъювантом.

[014] В соответствии с третьим аспектом настоящее изобретение обеспечивает способ лечения неопластического состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения в соответствии с первым аспектом или фармацевтической композиции в соответствии со вторым аспектом. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой рак.

[015] В некоторых вариантах осуществления соединение согласно первому аспекту или фармацевтическую композицию согласно второму аспекту вводят внутривенно.

[016] В некоторых вариантах осуществления способ по первому аспекту включает введение эффективного количества соединения согласно первому аспекту или фармацевтической композиции согласно второму аспекту указанному субъекту за два или более циклов, при этом эффективность введения в отношении неопластического состояния увеличивается в течение двух или более циклов.

[017] В некоторых вариантах осуществления способ согласно третьему аспекту включает:

а) проведение лечения указанного неопластического состояния у субъекта, кроме введения эффективного количества соединения в соответствии с первым аспектом или фармацевтической композиции в соответствии со вторым аспектом указанному субъекту;

и

б) введение эффективного количества соединения согласно первому аспекту или

фармацевтической композиции согласно второму аспекту указанному субъекту.

[018] В некоторых вариантах осуществления лечение, проводимое на стадии а), представляет собой химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию и/или таргетную терапию.

[019] В некоторых вариантах осуществления стадию а) проводят одновременно со стадией б) или стадию б) проводят после стадии а).

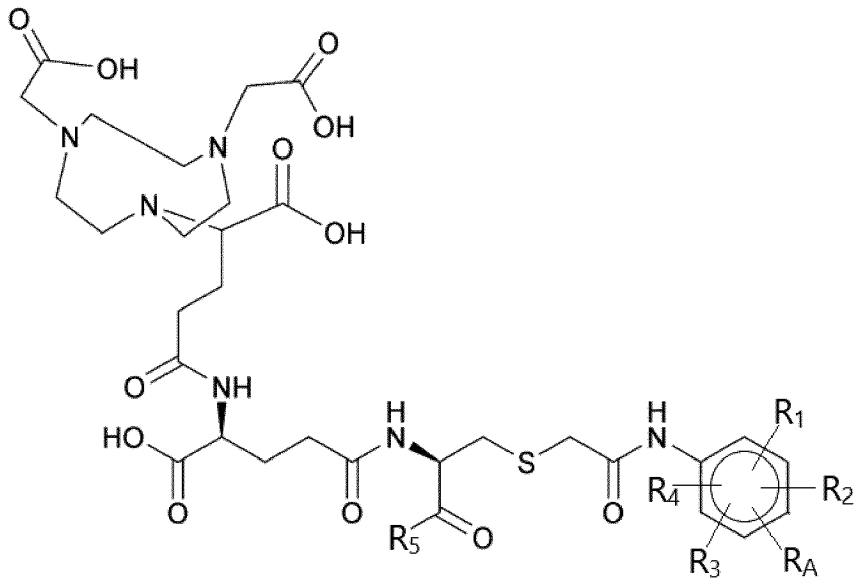
[020] В некоторых вариантах осуществления стадию б) проводят в течение двух или более циклов. В некоторых таких вариантах осуществления эффективность стадии б) в отношении неопластического состояния увеличивается в течение двух или более циклов. В некоторых вариантах осуществления обе стадии а) и б) проводят в течение двух или более циклов.

[021] В конкретных вариантах осуществления соединение согласно первому аспекту лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

[022] В соответствии с четвертым аспектом настоящее изобретение обеспечивает способ индукции гибели клеток у субъекта, включающий введение субъекту соединения в соответствии с первым аспектом или фармацевтической композиции в соответствии со вторым аспектом. В некоторых вариантах осуществления соединение в соответствии с первым аспектом или фармацевтическую композицию в соответствии со вторым аспектом вводят субъекту в течение нескольких циклов, при этом степень индуцированной гибели клеток увеличивается в течение нескольких циклов.

[023] В соответствии с пятым аспектом настоящее изобретение обеспечивает применение соединения в соответствии с первым аспектом в производстве лекарственного средства для лечения неопластического состояния. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления неопластическое состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления лечение включает способ согласно третьему аспекту. В конкретных вариантах осуществления лекарственное средство лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

[024] В соответствии с шестым аспектом настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения в соответствии с первым аспектом, включающий добавление терапевтического радиоизотопа к соединению формулы (II)



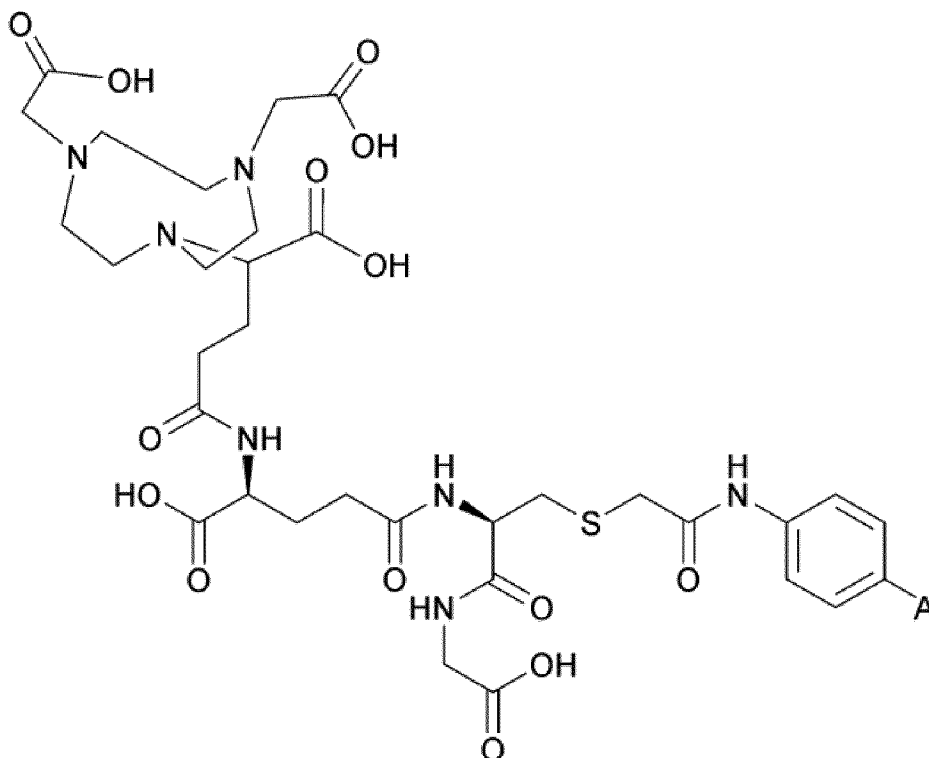
формула (II)

где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[025] В некоторых вариантах осуществления каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa)



формула (IIIa)

где А имеет значение, определенное в формуле (II),

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[026] В некоторых вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re . В некоторых предпочтительных вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu .

[027] В некоторых вариантах осуществления соединение согласно формуле (II) представлено в буфере, где буфер имеет рН около 5,0.

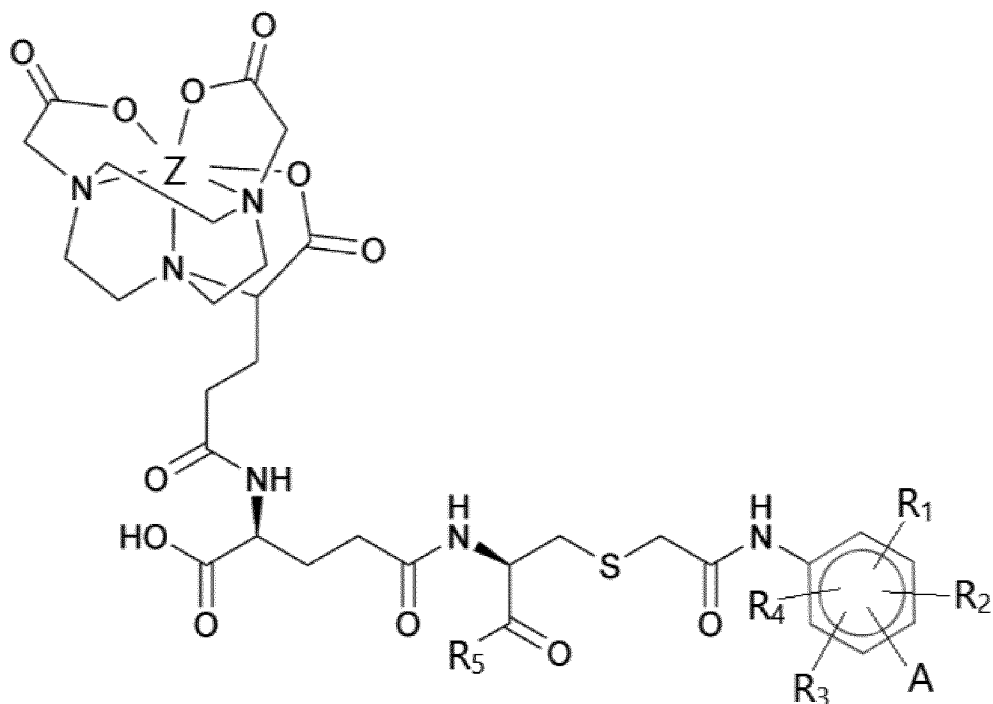
[028] В некоторых вариантах осуществления способ включает элюирование терапевтического радиоизотопа на колонке с сильным катионообменом и элюирование с колонки с сильным катионообменом в соединение формулы (II).

[029] В некоторых вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии одного или нескольких антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько антиоксидантов содержат аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

[030] В некоторых вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии глутатиона. В некоторых вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии как глутатиона, так и аскорбиновой кислоты. В некоторых вариантах

осуществления концентрация глутатиона в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

[031] В соответствии с седьмым аспектом настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения формулы (I)



Формула (I)

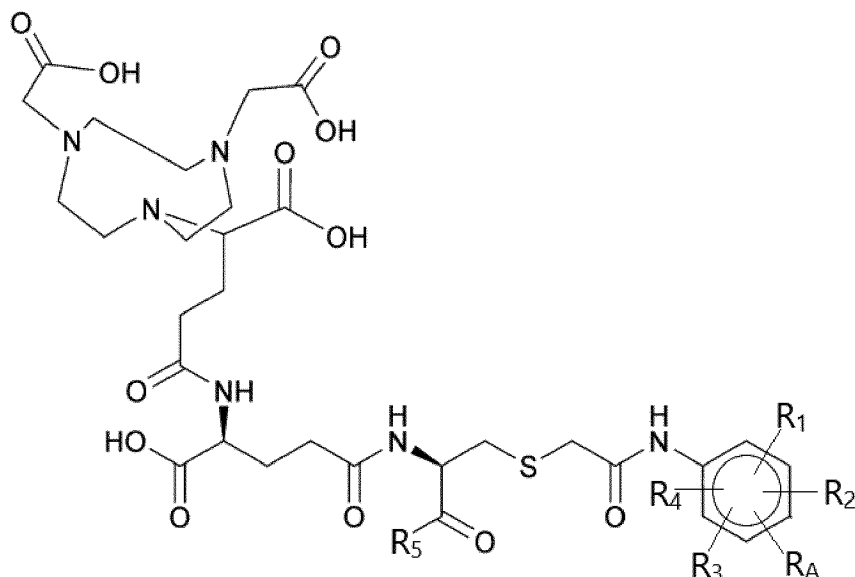
где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

и Z представляет собой радиоизотоп,

или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира, пролекарства или сольвата,

указанный способ включает добавление радиоизотопа к соединению формулы (II)



формула (II)

где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира, пролекарства или сольвата,

где радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии глутатиона. В некоторых вариантах осуществления концентрация глутатиона в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

[032] В некоторых вариантах осуществления радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии одного или нескольких антиоксидантов, например аскорбиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

[033] В конкретных вариантах осуществления радиоизотоп представляет собой терапевтический радиоизотоп, как определено в первом аспекте, и/или радиоизотоп с периодом полувыведения менее 4 дней, например ^{68}Ga .

Краткое описание графических материалов

[034] Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в данном документе только в качестве неограничивающего примера со ссылкой на следующие графические материалы.

[035] На **фиг. 1** показана модель действия описанных в данном документе терапевтических соединений, меченых радиоактивным изотопом.

[036] На **фиг. 2** представлена хроматограмма ВЭЖХ $^{175}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$, меченного в течение 30 минут при pH 5,0 при 80°C , (А) без 2,3-димеркапто-1-пропанола

(DMP) или (B) с предварительной инкубацией с DMP, как описано в примере 2.

[037] **На фиг. 3** представлена хроматограмма ВЭЖХ ^{63}Cu -NODAGA-GSAO, меченного в течение 30 минут при pH 5,0 при комнатной температуре, (A) без DMP или (B) с предварительной инкубацией с DMP, как описано в примере 2.

[038] **На фиг. 4** представлена хроматограмма ВЭЖХ ^{89}Y -NODAGA-GSAO, меченного в течение 30 минут при pH 5,0 при 120°C, как описано в примере 2.

[039] **На фиг. 5** показан процент мечения в различные моменты времени после образования комплекса изотоп-NODAGA-GSAO для А) меченного ^{175}Lu продукта, полученного в результате инкубации в течение 30 минут при pH 5,0 при 80°C, и В) полученного меченного ^{63}Cu продукта после инкубации в течение 30 минут при pH 5,0 при комнатной температуре.

[040] **На фиг. 6** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 4 в конце синтеза.

[041] **На фиг. 7** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 4 через 1,5 часа в конце синтеза.

[042] **На фиг. 8** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5a в конце синтеза.

[043] **На фиг. 9** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5a, смешанного с 1% DMP в ДМСО.

[044] **На фиг. 10** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5b в конце синтеза.

[045] **На фиг. 11** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5b, смешанного с 1% DMP в ДМСО.

[046] **На фиг. 12** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5c в конце синтеза.

[047] **На фиг. 13** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5c в конце синтеза, смешанного с 1% DMP в ДМСО.

[048] **На фиг. 14** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5c через 72 часа после синтеза.

[049] **На фиг. 15** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5c через 72 часа после синтеза, смешанного с 1% DMP в ДМСО.

[050] **На фиг. 16** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5d в конце синтеза.

[051] **На фиг. 17** представлена радиометрическая хроматограмма ВЭЖХ продукта реакции примера 5d в конце синтеза, смешанного с 1% DMP в ДМСО.

[052] **На фиг. 18** представлено схематическое изображение системы мечения радиоактивным изотопом, использованной в примере 6.

[053] **На фиг. 19** представлена радиометрическая ВЭЖХ-хроматограмма конечного продукта, полученного в примере 6.

[054] **На фиг. 20** представлена радиометрическая ВЭЖХ-хроматограмма конечного

продукта, полученного в примере 6 (тот же продукт, что и на фиг. 19) после реакции с DMP.

[055] **На фиг. 21** показано биораспределение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ (%ID/g) у здоровых самцов крыс через 1 и 2 часа после введения $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$.

[056] **На фиг. 22** показана проекция максимальной интенсивности сканирований PET КТ $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$, выполненная а) через 1 час и б) через 2 часа после введения индикатора ($^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$).

[057] **На фиг. 23** показаны передние проекции максимальной интенсивности PET $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в 8 временных точках после инъекции пациенту 1.

[058] **На фиг. 24** показаны передние проекции максимальной интенсивности PET $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в 8 временных точках после инъекции пациенту 2.

[059] **На фиг. 25** показаны передние проекции максимальной интенсивности PET $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в 8 временных точках после инъекции пациенту 3.

[060] **На фиг. 26** показаны передние проекции максимальной интенсивности PET $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в 8 временных точках после инъекции пациенту 4.

[061] **На фиг. 27** показано биораспределение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в здоровых органах пациента 1 с течением времени.

[062] **На фиг. 28** показано биораспределение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ в выбранных здоровых тканях и опухоли для пациента 1.

[063] **На фиг. 29** показано биораспределение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ в выбранных здоровых тканях и опухоли для пациента 2.

[064] **На фиг. 30** показано биораспределение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ в выбранных здоровых тканях и опухоли для пациента 3.

[065] **На фиг. 31** показано биораспределение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ в выбранных здоровых тканях и опухоли для пациента 4.

[066] **На фиг. 32** показано биораспределение в выбранных здоровых тканях (среднее значение $\text{SUV} \pm \text{SD}$) $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ субъектов 1-4.

[067] **На фиг. 33** показана активность пула крови и поглощение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ опухолевыми отложениями у субъектов 1-4.

[068] **На фиг. 34** показаны изображения FDG-PET с максимальной интенсивностью в передней проекции (фиг. 34А), полученные через 60 мин. после введения 256 МБк FDG (фтордезоксиглюкозы), и CDI-PET (фиг. 34В), выполненные через 60 мин. после введения 205 МБк CDI ($^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$) у пациента 3. Опухоли вырезали хирургическим путем, фиксировали и соседние срезы окрашивали на апоптотические клетки (фиг. 34С, коричневая окраска TUNEL, а и б) или на морфологию гематоксилином и эозином (фиг. 34С, с и d).

Подробное описание изобретения

[069] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится изобретение. Хотя любые способы и материалы,

подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, описаны типичные способы и материалы.

[070] Во всем этом описании, если контекст не требует иного, слово «содержать» или варианты, такие как «содержит» или «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанной стадии или элемента, или целого числа, или группы стадий, или элементов, или целые числа, но не исключение любой другой стадии или элемента, или целого числа, или группы элементов или целых чисел. Таким образом, в контексте данного описания термин «содержащий» означает «включающий в основном, но не обязательно исключительно».

[071] В контексте данного описания термины в единственном числе относятся к одному или более чем одному (т.е. по меньшей мере к одному) грамматическому объекту. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[072] В контексте данного описания термин «около» понимается как относящийся к диапазону чисел, которые специалист в данной области техники счел бы эквивалентными указанному значению в контексте достижения той же функции или результата.

[073] В контексте настоящего описания ссылка на диапазон чисел, раскрытых в данном документе (например, от 1 до 10), также включает ссылку на все рациональные числа в этом диапазоне (например, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 и 10), а также любой диапазон рациональных чисел в этом диапазоне (например, от 2 до 8, от 1,5 до 5,5 и от 3,1 до 4,7) и, следовательно, все поддиапазоны всех диапазонов прямо раскрыты в настоящем документе в явной форме. Это только примеры того, что конкретно предназначено, и все возможные комбинации числовых значений между самым низким значением и самым высоким из перечисленных значений должны рассматриваться как явно указанные в этой заявке аналогичным образом.

[074] Используемый в данном документе термин «и/или» означает «и» или «или» или и то, и другое.

[075] Используемый в данном документе термин «субъект» относится к любому млекопитающему, включая, помимо прочего, домашний скот и других сельскохозяйственных животных (таких как крупный рогатый скот, козы, овцы, лошади, свиньи и куры), рабочих животных (таких как скаковые лошади), домашних животных (таких как кошки и собаки), животных для лабораторных испытаний и людей. Обычно субъектом является человек.

[076] Используемые в данном документе термины «лечащий», «лечение», «лечащий», «уменьшать», «уменьшение», «предотвращать», «предотвращающий» и «предотвращение» и т. п. относятся к любому и всем применениям, которые устраняют или иным образом препятствуют, замедляют или обращают вспять прогрессирование инфекции или заболевания или по меньшей мере одного симптома инфекции или заболевания, включая снижение тяжести инфекции или заболевания. Таким образом,

термины «лечить», «лечащий», «лечение» не обязательно подразумевают, что субъект лечится до полной ликвидации инфекции или выздоровления от заболевания. Аналогично, термины «предотвращать», «предотвращающий», «предотвращение» и т.п. относятся к любому и всем применениям, которые предотвращают возникновение инфекции или заболевания или иным образом задерживают начало инфекции или заболевания.

[077] Термин «необязательно» используется в данном документе для обозначения того, что описанная далее функция может присутствовать или не присутствовать, или что описанное впоследствии событие или обстоятельство может иметь место или не иметь места. Следовательно, следует понимать, что описание включает и охватывает варианты осуществления, в которых признак присутствует, и варианты осуществления, в которых признак отсутствует, и варианты осуществления, в которых происходит событие или обстоятельство, а также варианты осуществления, в которых они отсутствуют.

[078] Используемые в данном документе термины «эффективное количество» и «эффективная доза» включают в своем значении нетоксичное, но достаточное количество или дозу соединения для обеспечения желаемого эффекта. Требуемое точное количество или доза будет варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от таких факторов, как вид, подвергаемый лечению, возраст и общее состояние субъекта, тяжесть состояния, подлежащего лечению, конкретное вводимое соединение и способ введения и так далее. Таким образом, невозможно указать точное «эффективное количество» или «эффективную дозу». Однако для любого конкретного случая подходящее «эффективное количество» или «эффективная доза» может быть определено специалистом в данной области с использованием только стандартных экспериментов.

[079] В контексте настоящего описания термин «арсеноксид» относится к группе $As=O$. Группы, обозначенные как $-As=O$ и $-As(OH)_2$, следует считать синонимами.

[080] Используемый в данном документе термин «эквивалент арсеноксида» относится к любым реакционноспособным дитиолам, которые проявляют по существу такую же аффинность к дитиолам, как $-As=O$ или $As(OH)_2$, и этот термин включает, например, группы, содержащие переходный элемент, и любой трехвалентный мышьяк, который гидролизует до $-As=O$ или $-As(OH)_2$ при растворении в водной среде (такой как буферы для клеточных культур и жидкости, содержащиеся в обрабатываемом организме). Как правило, эквивалент арсеноксида включает соединения, реагирующие с дитиолом, такие как соединения As, Ge, Sn и Sb. Ожидается, что эквиваленты арсеноксида будут проявлять идентичную или практически идентичную активность с активностью соответствующего арсеноксида.

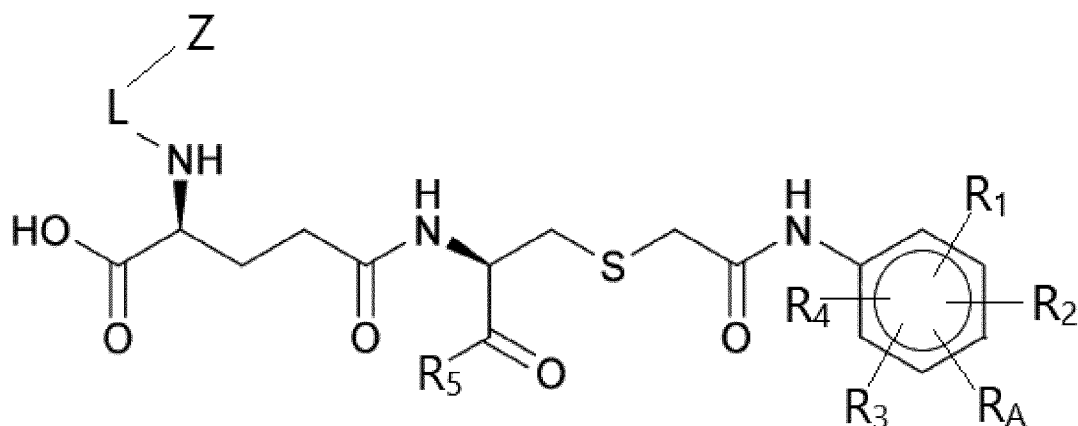
[081] Термин «бифункциональный хелатор» относится к химическому фрагменту, который включает хелатирующий фрагмент, способный связывать металл или другой ион, например радионуклид, а также химически реакционноспособную функциональную группу для присоединения к другому химическому соединению. В контексте настоящей заявки термин «бифункциональный хелатор» относится как к соответствующему химическому соединению перед хелатированием с ионом металла или другим ионом

и/или перед реакцией на реакционноспособную функциональную группу, так и после хелатирования с металлом или другим ионом и/или присоединения к другому химическому соединению посредством реакционноспособной функциональной группы, причем соответствующее определение очевидно из контекста. Если он не хелатирует металл или другой ион, бифункциональный хелатор подходит для хелатирования металла или другого иона.

[082] Термины «С₁-С₅-алкил» и т.п., используемые в данном документе, относятся к насыщенным углеводородным радикалам с прямой или разветвленной цепью, содержащим от одного до трех, от одного до шести или от одного до двенадцати атомов углерода соответственно. Примеры С₁-С₅-алкильных радикалов включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, изопентил и неопентил.

[083] Под «фармацевтически приемлемой солью» подразумеваются те соли, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., и являются соизмеримыми с разумным соотношением польза/риск. Следует понимать, что ссылка на соединение в данном документе включает его фармацевтически приемлемые соли, если не указано иное или иное не следует из контекста.

[084] В настоящем документе представлены соединения согласно формуле (X)

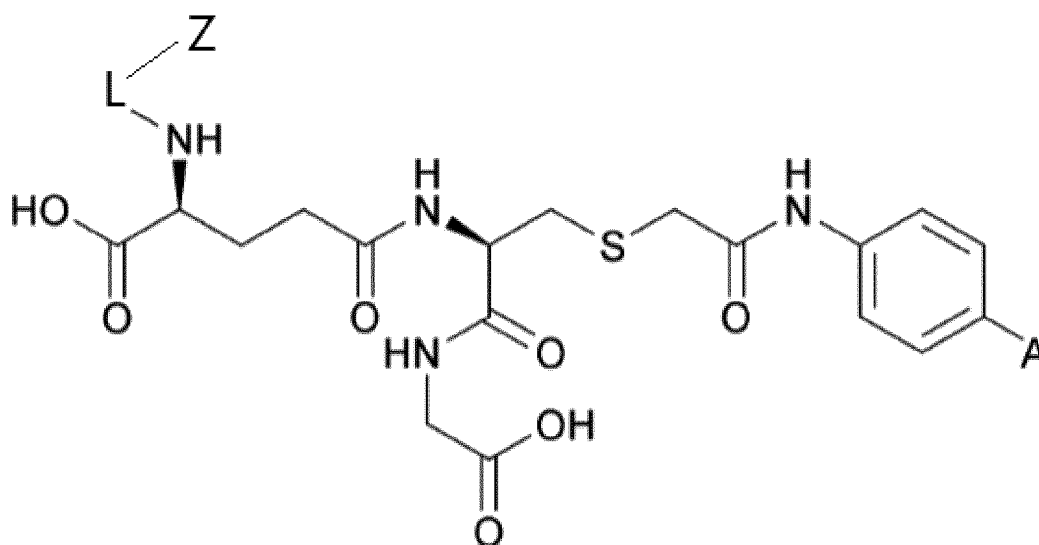


формула (X)

где А представляет собой -As(OH)₂ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R₁, R₂, R₃ и R₄ независимо выбран из H, X, OH, NH₂, CO, SCN, -CH₂NH, -NHCOCH₃, -NHCOCH₂X или NO, и X представляет собой галоген; R₅ представляет собой NHCH₂COOH, OH или OR₆, где R₆ представляет собой С₁₋₅ неразветвленную или разветвленную алкильную группу; Z представляет собой терапевтический радиоизотоп; и L представляет собой бифункциональный хелатор, хелатирующий Z; или их фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[085] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (X)

представляет собой соединение формулы (Ха) или его фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.



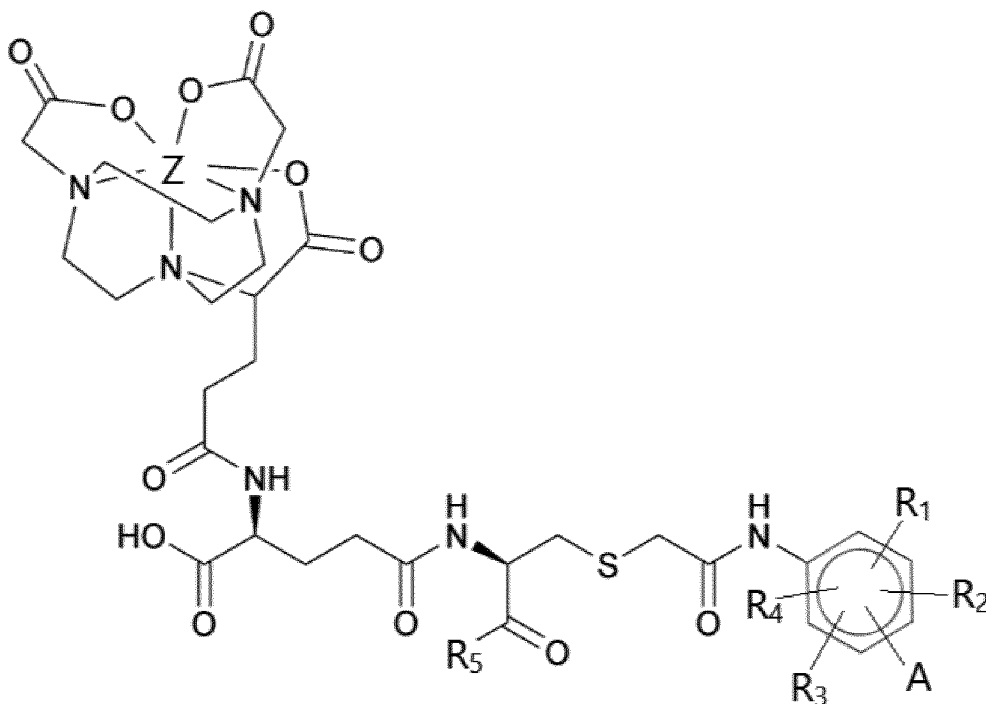
формула (Ха)

[086] Под термином «терапевтический радионуклид» в контексте настоящего изобретения понимается любой радионуклид, обладающий терапевтическим эффектом, в частности терапевтическим эффектом в отношении стимуляции гибели клеток, например, для лечения опухолевого состояния, такого как опухоль или рак. Под «неопластическим состоянием» понимают состояние, характеризующееся аномально высокими уровнями клеточной пролиферации. Такое стимулирование гибели клеток является терапевтически полезным. Как правило, терапевтический радионуклид представляет собой альфа- или бета-излучатель. В некоторых вариантах осуществления терапевтический радионуклид представляет собой альфа-излучатель, например ^{225}Ac , ^{211}At , ^{213}Bi и/или ^{223}Ra . Может быть выбран любой подходящий терапевтический радионуклид, и, в частности, терапевтический радионуклид, имеющий соответствующий радиус доставки энергии (т.е. радиус уничтожения клеток), может быть выбран для конкретной биологии *in vivo* и конкретного желаемого терапевтического применения, например, в зависимости от размера/радиуса опухоли и/или характера распределения мертвых и умирающих клеток внутри опухоли. В некоторых вариантах осуществления радионуклид Z выбран из ^{225}Ac , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re и ^{188}Re , например, выбран из ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re и ^{188}Re . В некоторых вариантах осуществления радионуклид Z выбран из ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re и ^{188}Re . В некоторых предпочтительных вариантах осуществления радионуклид Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu или ^{90}Y , например ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{90}Y . В особенно предпочтительных вариантах осуществления радионуклид Z представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu . В конкретных вариантах осуществления, где радионуклид Z представляет собой радионуклид Re, такой как ^{188}Re или ^{186}Re , или другие терапевтические радионуклиды, если это необходимо, радионуклид Z может относиться к терапевтическому радионуклиду в любой подходящей форме для включения в соединения по настоящему изобретению, например, в виде трикарбонила, например трикарбонила рения. В

предпочтительных вариантах осуществления L представляет собой бифункциональный хелатор, который, как известно, хелатирует терапевтический радиоизотоп, например, ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{90}Y , с высокой аффинностью. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления терапевтический изотоп также действует как диагностический изотоп, т.е. имеет диагностическое излучение, позволяющее визуализировать соединение, в частности, где было доставлено терапевтическое соединение и/или сколько терапевтического соединения было доставлено в желаемое место, и/или расчет дозы облучения опухоли и здоровой ткани для определения вероятности уничтожения опухоли, а также токсичности для здоровой ткани. Например, терапевтический изотоп может излучать позитроны, и его изображение может быть получено с помощью позитронно-эмиссионной томографии. В некоторых вариантах осуществления визуализацию можно проводить с помощью однофотонной визуализации (СПЕКТ). В некоторых вариантах осуществления для получения изображения радиоизотопа можно использовать ядерную медицину («гамма-камеру»). Специалисту в данной области техники будет очевиден конкретный тип визуализации, подходящий для данного изотопа и применения.

[087] В некоторых вариантах осуществления Z не представляет собой ^{64}Cu .

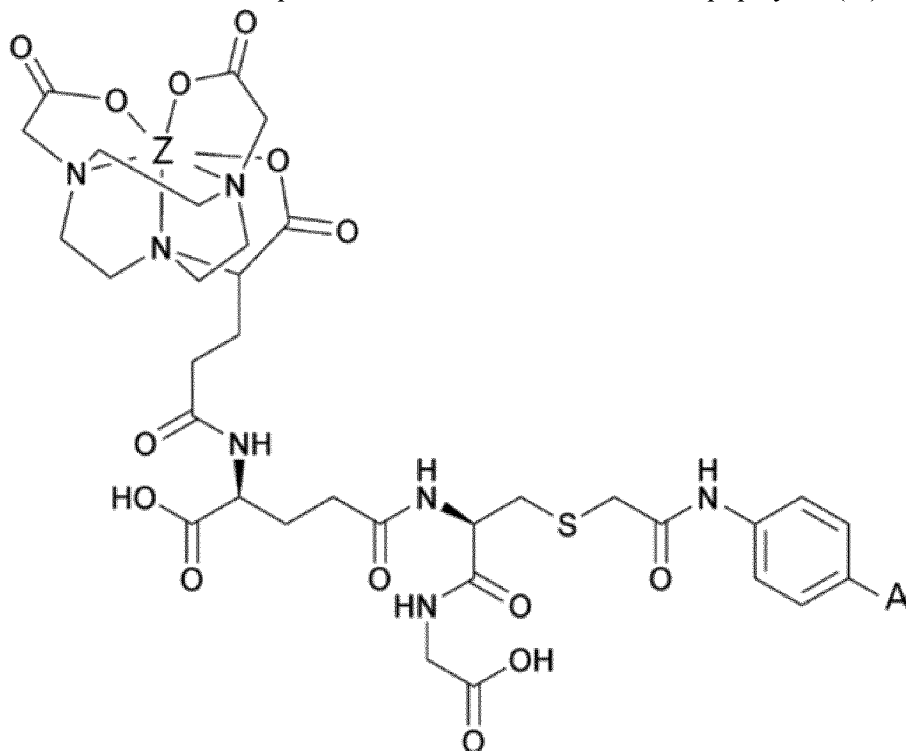
[088] В настоящем изобретении предусмотрено соединение формулы (I),



Формула (I)

где A представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген; R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу; и Z представляет собой терапевтический радиоизотоп, или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват. В

некоторых предпочтительных вариантах осуществления каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (Ia):



формула I(a)

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват. В предпочтительных вариантах осуществления A представляет собой группу арсеноксида $\text{As}(\text{OH})_2$.

[089] В соединениях, пригодных для использования в настоящем изобретении, группа арсеноксида ($-\text{As}(\text{OH})_2$) обычно может быть заменена эквивалентом арсеноксида.

[090] Такие соединения основаны на 4-(N-(S-глутатионацетил)амино)фениларсеновой кислоте (GSAO), которая была мечена радиоизотопом с использованием бифункционального хелатора. В особенно предпочтительных вариантах бифункциональный хелатор представляет собой 2,2'-(7-(1-карбокси-4-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-4-оксобутил)-1,4,7-триазонан-1,4-диил)диуксусную кислоту (NODAGA), как показано в формуле (I) и формуле (Ia).

[091] GSAO подвергается специфическому поглощению мертвыми и умирающими клетками. Не желая быть связанными теорией, считается, что GSAO сохраняется в цитозоле умирающих и мертвых клеток за счет образования ковалентных связей между ионом $\text{As}(\text{III})$ и тиоловыми группами проксимальных остатков цистеина. GSAO представляет собой трехвалентный пептид $\text{As}(\text{III})$, который, как было обнаружено, активирует пору перехода митохондриальной проницаемости. GSAO токсичен для пролиферирующих клеток и ингибирует ангиогенез *in vivo* (Don AS, Kisker O, Dilda P et al. (2003) A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial

function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 3:497-509), но нетоксичен для неактивных эндотелиальных клеток *in vitro*. Конъюгация γ -глутамилового остатка GSAO с терапевтическими радиоизотопами, как в настоящем изобретении, приводит к потере его антиангиогенного действия и способности воздействовать на умирающие клетки. Когда целостность плазматической мембраны нарушена, конъюгат GSAO проникает и связывается с внутриклеточными белками, преимущественно белками теплового шока 90 кДа (Hsp90) (Park D, Don AS, Massamiri T et al (2011) Non-invasive imaging of cell death using an Hsp90 ligand. *J Am Chem Soc* 133:2832-2835); этот белок очень распространен в цитозоле, доступен только тогда, когда целостность клеточной мембраны нарушается во время гибели клеток, и его экспрессия повышается при многих злокачественных новообразованиях (Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep.* 2009;42(10):623-30). Мотив As(III) GSAO сшивает неспаренные тиолы Cys597 и Cys598 Hsp90, образуя стабильный циклический дитиоарсинит, который эффективно необратим в клеточном цитозоле. Соединения, меченные радиоактивным изотопом, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения не нацелены на процесс временной гибели клеток, распознают как апоптотическую, так и некротическую формы гибели клеток, а клеточная мишень является обильной, а связывание необратимым. Эти характеристики особенно выгодны для создания целевого терапевтического агента, воздействующего на участки гибели клеток.

[092] В примерах 4-8 настоящего изобретения также было показано, что биораспределение соединений, аналогичных соединениям в вариантах осуществления настоящего изобретения, хотя и меченных радиоактивным изотопом ^{68}Ga , а не терапевтическим изотопом, легко производится и имеет благоприятные характеристики биораспределения с высоким поглощением в опухолях и низким поглощением в здоровых тканях и без наблюдаемых побочных эффектов. Низкое поглощение в здоровых тканях сводит к минимуму побочные эффекты лечения соединениями в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

[093] Когда *in situ* в области высокой гибели клеток, такой как опухоль, излучение, испускаемое терапевтическим радиоизотопом, находится в диапазоне, который влияет на несколько окружающих клеток. Соединения в соответствии с настоящим изобретением, меченные терапевтическими радиоизотопами, метят умирающие и мертвые клетки, такие как опухолевые клетки, с высокой специфичностью и чувствительностью и, таким образом, пригодны для введения терапевтических радиоизотопов конкретно в области с высокой гибелью клеток, такие как опухоли. В частности, меченные радиоактивным изотопом конъюгаты, как описано в настоящем документе, можно использовать для лечения состояний, связанных с высокими уровнями гибели клеток, например неопластических нарушений, например опухолей или, например, рака. Поскольку соединения по настоящему изобретению нацелены на участки с высокой клеточной гибелью и клеточным оборотом, такие как опухоли, их можно успешно использовать для селективного усиления гибели опухолевых клеток путем доставки терапевтических

изотопов к опухолям, так что терапевтическое излучение, следовательно, доставляется к жизнеспособным опухолевым клеткам, смежные с умирающими/мертвыми клетками; эти смежные клетки могут быть относительно устойчивыми к другому лечению, учитывая, что они еще не подвержены гибели клеток. Индукция гибели смежных клеток радиоизотопом может затем дополнительно способствовать связыванию меченого радиоактивным изотопом соединения по настоящему изобретению, вызывая, следовательно, дальнейшую гибель клеток в смежных клетках. Это может создать механизм положительной обратной связи для лечения таких состояний, как опухоли. Соединения в соответствии с настоящим изобретением также находят применение в «усиливающих» подходах к терапии, при которых осуществляется инициирующее событие, вызывающее гибель клеток, такое как терапия, такая как лучевая терапия, химиотерапия, иммунотерапия или таргетная терапия, которая увеличивает число умирающих клеток в области-мишени, и также вводят меченое радиоактивным изотопом соединение по настоящему изобретению, которое связывается с указанными умирающими клетками (до, после или одновременно с инициирующей терапией). Связывание меченого радиоактивным изотопом соединения по настоящему изобретению с умирающими клетками вызывает дальнейшую гибель клеток в соседних клетках, как обсуждалось выше, таким образом усиливая эффекты инициирующей терапии, такой как лучевая терапия, химиотерапия, иммунотерапия или таргетная терапия.

[094] Например, соединения по настоящему изобретению можно вводить в комбинации (в том числе в разное время) с другой терапией, такой как дополнительный радиофармацевтический препарат, такой как дополнительный радиофармацевтический препарат целевого действия, чтобы снизить дозу, требуемую для другой терапии, в силу дальнейшая гибель клеток также индуцируется соединением по настоящему изобретению. Соединения по настоящему изобретению могут также повышать эффективность терапии за счет увеличения ее эффективности, например, за счет индукции гибели клеток в клетках, на которые не нацелена другая таргетная терапия; например, в обстоятельствах, когда субъект страдает от двух разных видов рака, которые экспрессируют разные маркеры, и таргетная терапия нацелена только на один из таких видов, соединения по настоящему изобретению могут быть использованы для индуцирования гибели клеток в тех клетках, на которые не нацелена альтернативная таргетная терапия. Таким образом, в настоящем изобретении предлагаются способы снижения дозы терапии, необходимой для эффективного лечения состояния и/или повышения эффективности терапии, например, радиофармацевтического препарата, такого как радиофармацевтический препарат таргетного действия, включающие применение терапии в сочетании с соединением по настоящему изобретению. Такое применение в комбинации может включать применение терапии и соединения по настоящему изобретению в разное время или одновременно.

[095] При таком лечении мишенью является область гибели клеток, такая как сама опухоль, а не область, прилегающая к опухоли, что обеспечивает лечение с высокой специфичностью. Этот механизм обеспечивает особенно эффективное и

целенаправленное средство лечения таких состояний, как опухоли. Соединения, меченные радиоактивным изотопом, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут дополнительно эффективно воздействовать на все очаги заболевания, не затрагивая при этом здоровые ткани, что особенно полезно при лечении нелокализованного рака. В некоторых вариантах осуществления меченые радиоактивным изотопом конъюгаты по настоящему изобретению могут преимущественно обеспечивать ценное панопухоловое лечение, поскольку умирающие/мертвые опухолевые клетки присутствуют во всех солидных опухолях.

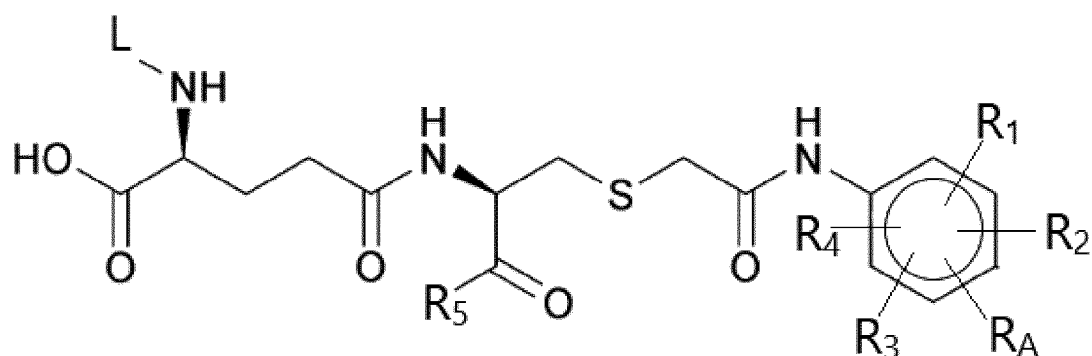
[096] Как отмечено выше, соединения, аналогичные соединениям по настоящему изобретению, но с использованием ^{68}Ga , а не терапевтического изотопа, как показано в примерах 6-8 настоящей заявки, обладают очень низкими уровнями активности во всех органах, кроме мочевыводящих путей, которые являются путями выведения, при этом органом ограничения дозы является мочевой пузырь. Это общее с радионуклидами, используемыми для лечения нейроэндокринных опухолей, и существуют установленные протоколы для их лечения. Важно отметить, что нацеливание соединения на гибель клеток в здоровых тканях, таких как костный мозг, лимфатические узлы и желудочно-кишечный тракт, минимально, если вообще происходит. Умирающие клетки в здоровых тканях быстро очищаются макрофагами, в отличие от умирающих/мертвых клеток в опухолях, которые сохраняются от дней до недель, поэтому нацеливание на гибель клеток в здоровых тканях минимально. Высокое поглощение соединения в опухолях с высокой гибелью базальных клеток также показано в примерах настоящего описания (пример 8). Это значительно минимизирует потенциальные побочные эффекты терапевтических соединений.

[097] В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления Z может быть, например, ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re . В некоторых вариантах осуществления Z может быть, например, ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re . В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu или ^{90}Y . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{90}Y , или в некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu или ^{64}Cu . В особенно предпочтительных вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu . ^{177}Lu представляет собой распадающийся радиоактивный атом, испускающий бета-частицы, представляющие собой отрицательно заряженные электроны, с максимальной энергией 497 кэВ, которые перемещаются в биологической ткани на ~1800 мкм. Опухолевые клетки имеют диаметр 10-20 мкм, поэтому бета-частицы ^{177}Lu могут перемещаться по ширине нескольких опухолевых клеток. Таким образом, мечение умирающих и мертвых опухолевых клеток меченым ^{177}Lu соединением в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения обеспечивает доставку терапевтического излучения к соседним жизнеспособным опухолевым клеткам. ^{177}Lu имеет период полувыведения 6,7 дня, что хорошо подходит для терапевтического изотопа. Было доказано, что ^{67}Cu клинически полезен для лечения рака. ^{90}Y используется в

широком спектре применений в лучевой терапии, в том числе в качестве стратегии лечения некоторых форм рака. В некоторых вариантах осуществления Z не представляет собой ^{64}Cu .

[098] В особенно предпочтительных вариантах осуществления соединение формулы I представляет собой ^{177}Lu -NODAGA-GSAO (то есть соединение формулы I, где Z представляет собой ^{177}Lu , R_1 - R_4 представляют собой H, R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ и A представляет собой $\text{As}(\text{OH})_2$) или ^{67}Cu -NODAGA-GSAO (то есть соединение формулы I, где Z представляет собой ^{67}Cu , R_1 - R_4 представляют собой H, R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ и A представляет собой $\text{As}(\text{OH})_2$). Такие варианты осуществления обеспечивают преимущества легкого синтеза и получения радиоизотопов, пригодных для целенаправленного лечения рака.

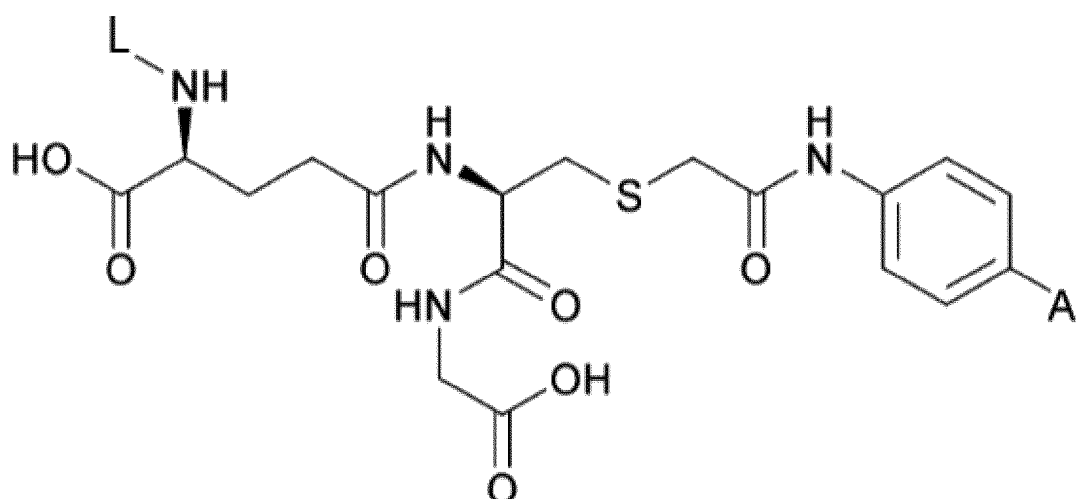
[099] В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение также относится к соединениям формулы (Y)



формула (Y)

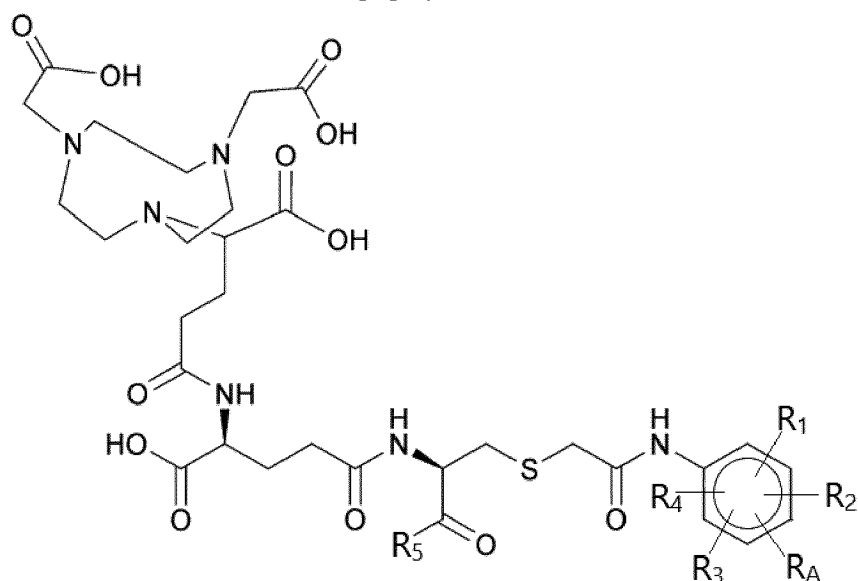
где A представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген; R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу; и L представляет собой бифункциональный хелатор, или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват или его производное.

[0100] В некоторых предпочтительных вариантах осуществления соединение формулы (Y) представляет собой соединение формулы (Ya)



формула (Ya)

[0101] Настоящее изобретение относится к соединению формулы (Y), которое представляет собой соединение формулы II



формула (II)

где A представляет собой $-As(OH)_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду; каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-CH_2NH$, $-NHCOCH_3$, $-NHCOCH_2X$ или NO, и X представляет собой галоген; R_5 представляет собой $-NHCH_2COOH$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу; или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[0102] Соединения формулы (Y) применимы в синтезе формулы (X). В частности,

соединения формулы (II) применимы в синтезе соединений формулы I путем радиоактивного мечения группы NODAGA. Такой синтез схематически представлен ниже на схеме 1, на примере NODAGA-GSAO в качестве исходного материала и ^{177}Lu в качестве радиоизотопа.

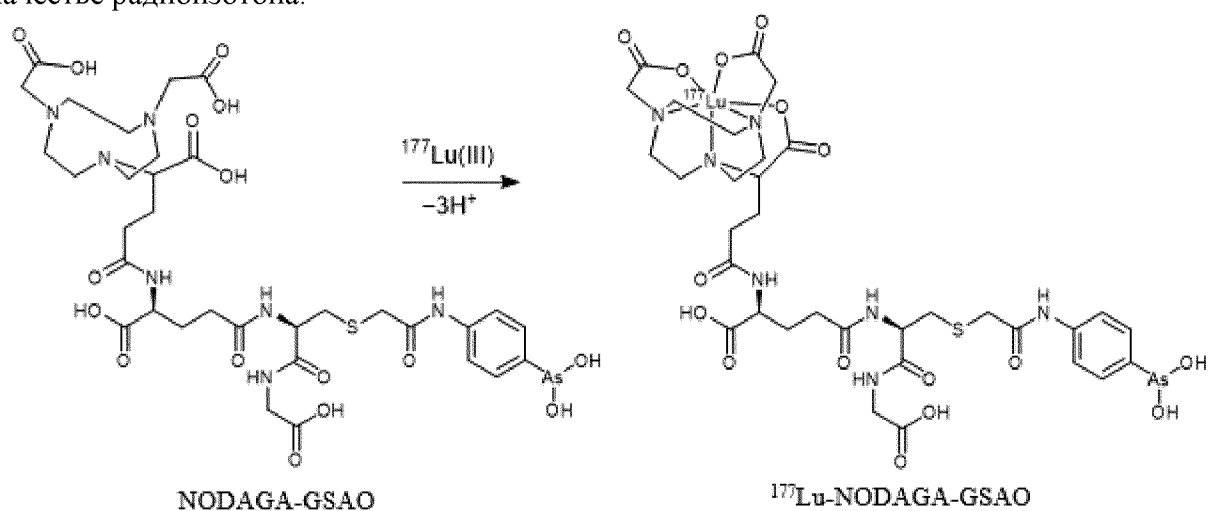
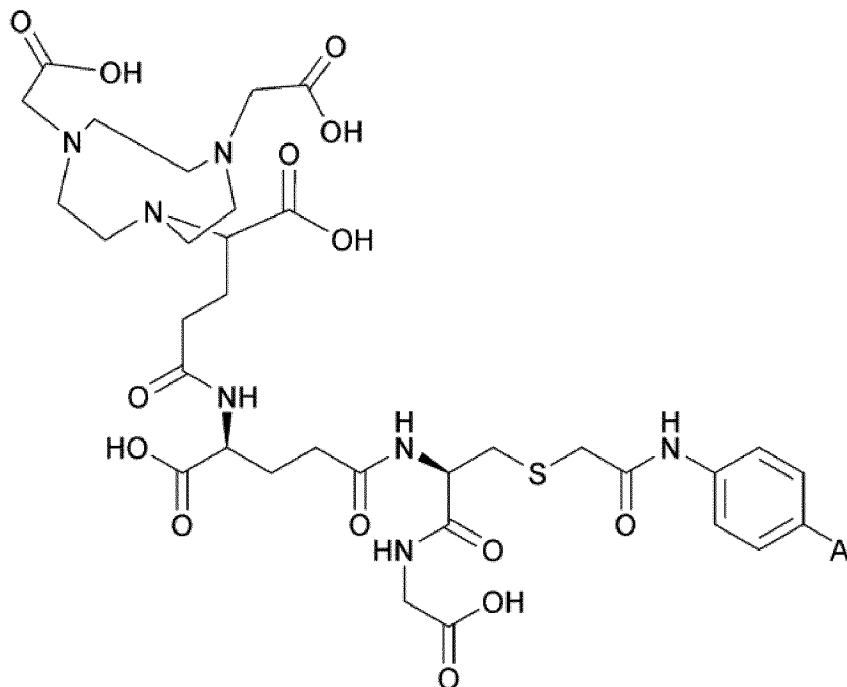


схема 1

[0103] В предпочтительном варианте осуществления каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$. В особенно предпочтительных вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (IIIa)



формула (IIIa)

где A имеет значение, определенное для формулы (II), или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

[0104] В предпочтительных вариантах осуществления A представляет собой

группу арсеноксида $\text{As}(\text{OH})_2$.

[0105] В соединениях, пригодных для использования в настоящем изобретении, группа арсеноксида ($-\text{As}(\text{OH})_2$) обычно может быть заменена эквивалентом арсеноксида.

[0106] Настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения формулы (I), включающий смешивание терапевтического радиоизотопа с соединением формулы (II), где соединение формулы (I) или формулы (II) может быть любым из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления смешивание происходит при комнатной температуре, т.е. без нагревания, например, в некоторых вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{67}Cu . В некоторых вариантах осуществления смешивание происходит при нагревании, например, в некоторых вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{177}Lu . В таких вариантах осуществления нагревание может осуществляться до температуры, например, по меньшей мере около 60°C , например, от около 60°C до около 80°C , например, около 80°C , например, в вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{177}Lu или, в некоторых вариантах осуществления нагревание может быть до температуры, например, по меньшей мере около 80°C , например, от около 80°C до около 150°C , например, около 120°C , например, в вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{90}Y . В некоторых вариантах осуществления смешивание происходит при pH по меньшей мере около 5,0, например, около 5,0, например, в вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{177}Lu . В некоторых конкретных предпочтительных вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{177}Lu , смешивание происходит при температуре от около 60 до около 80°C , при pH по меньшей мере около 5,0, например около 5,0, необязательно в течение периода времени около по меньшей мере 20 минут, например около 30 минут. Желаемые уровни pH могут быть достигнуты путем использования любого подходящего буфера, например буфера с ацетатом натрия.

[0107] Настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения формулы (I), включающий добавление терапевтического радиоизотопа Z к соединению формулы (II). Соединение формулы (II) может, согласно некоторым вариантам осуществления, необязательно быть смешано с буфером, где буфер может иметь pH, например, по меньшей мере около 5,0, например около 5,0. В некоторых вариантах осуществления смешивание проводят при комнатной температуре, т.е. без нагревания, а в некоторых альтернативных вариантах осуществления смешивание проводят с нагреванием, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает элюирование терапевтического радиоизотопа на колонке с сильным катионообменом и элюирование с колонки с сильным катионообменом в соединение формулы (II). В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) и формулы (II) представляют собой соединения формулы (Ia) и формулы (IIa) соответственно. Настоящее изобретение также обеспечивает способ получения соединения формулы (X), включающий смешивание терапевтического радиоизотопа с соединением формулы (Y), где соединение формулы (X) или формулы (Y) может быть любым из описанных выше. В

некоторых вариантах осуществления смешивание проводят при комнатной температуре, т.е. без нагревания, а в некоторых альтернативных вариантах осуществления смешивание проводят с нагреванием, как описано выше. В настоящем изобретении предложен способ получения соединения формулы (X), где Z представляет собой ^{177}Lu , ^{64}Cu или ^{67}Cu , например ^{177}Lu или ^{67}Cu , включающий добавление ^{177}Lu или ^{67}Cu к соединению формулы (Y), необязательно смешанного с буфером, где в некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH по меньшей мере около 5,0, например около 5,0. В некоторых вариантах осуществления смешивание проводят при комнатной температуре, т.е. без нагревания, например, в некоторых вариантах осуществления, где Z представляет собой ^{67}Cu или ^{64}Cu , например, ^{67}Cu . В некоторых альтернативных вариантах осуществления смешивание проводят при нагревании, как описано выше, например, в некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ^{177}Lu .

[0108] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных выше, терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) (или формулы (IIa) или формулы (Y), как описано в настоящем документе) в присутствии одного или нескольких антиоксидантов. В конкретных вариантах осуществления один или несколько антиоксидантов содержат аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных выше, терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) (или формулы (IIa) или формулы (Y), как описано в настоящем документе) в присутствии одного или нескольких средств защиты от радиолитического распада. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных выше, терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) (или формулы (IIa) или формулы (Y), как описано в настоящем документе) в присутствии глутатиона. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что глутатион может действовать как антиоксидант и как защитное средство, уменьшая радиолитический распад NODAGA-GSAO во время синтеза, который дает окисленную NODAGA-GSAO. «Добавлено к» указывает, что терапевтический радиоизотоп взаимодействует с соединением формулы (II) в присутствии одного из перечисленных компонентов, независимо от того, в каком порядке компоненты добавляются к реакционной смеси. Как показано в примерах 4 и 5 ниже, присутствие антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота, и/или присутствие глутатиона, и, в частности, присутствие как аскорбиновой кислоты, так и глутатиона, особенно в высоких концентрациях, снижает радиолитический распад NODAGA-GSAO во время синтеза, что образует окисленную NODAGA-GSAO. Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению, соответствующему формуле (II) (или формуле (IIa), или формуле (Y), как описано в настоящем документе) в присутствии одного или нескольких антиоксидантов и/или одного или нескольких защитных средств против радиолитического распада, например в присутствии глутатиона, например в присутствии аскорбиновой кислоты и глутатиона.

[0109] В конкретных вариантах осуществления каждый из одного или нескольких антиоксидантов и/или одного или нескольких защитных средств, таких как аскорбиновая

кислота и/или глутатион, может присутствовать в реакционной смеси в концентрации примерно 0,0075 или выше, например около 0,01 М или выше, например около 0,0125 или выше, например около 0,015 или выше, например около 0,0175 или выше, например около 0,02 или выше. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или нескольких антиоксидантов и/или одного или нескольких защитных средств, таких как аскорбиновая кислота и/или глутатион, может присутствовать в реакционной смеси в концентрации около до 0,1 М. Если присутствует несколько антиоксидантов и/или защитных средств, такие концентрации могут в соответствии с некоторыми вариантами осуществления относиться к каждому из отдельных антиоксидантов и/или защитных средств, например, к каждому из аскорбиновой кислоты и/или глутатиона независимо. Концентрация «в реакционной смеси» относится к концентрации, в которой присутствует соответствующий компонент, когда терапевтический радиоизотоп взаимодействует с соединением формулы (II) (или формулы (IIa)) или формулы (Y), как описано в данном документе).

[0110] Такие способы могут быть использованы для получения соединений, меченых радиоактивным изотопом, как описано в данном документе, за исключением того, что Z является радиоизотопом, который не ограничивается терапевтическим радиоизотопом. Z может быть терапевтическим радиоизотопом, описанным в данном документе, или Z может быть альтернативным радиоизотопом. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой радиоизотоп с периодом полувыведения менее 4 дней, например менее 1 дня, например менее 4 часов, например менее 2 часов. В некоторых вариантах осуществления Z может представлять собой радиоизотоп, пригодный для использования в качестве визуализирующего агента, например, в позитронно-эмиссионной томографии. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ^{68}Ga . Такие варианты осуществления могут найти применение при получении соединений, пригодных для визуализации гибели клеток. Z может быть таким, как описано в заявке РСТ № РСТ/AU2020/050359 (опубликован как WO2020206503).

[0111] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и/или терапевтическим композициям, то есть соединениям настоящего изобретения, присутствующим вместе с фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом, разбавителем и/или носителем.

[0112] Для медицинского применения могут быть использованы соли соединений по настоящему изобретению и они включают фармацевтически приемлемые соли, хотя при получении соединения или его фармацевтически приемлемой соли могут быть использованы другие соли. Под фармацевтически приемлемой солью подразумеваются такие соли, которые, согласно здравому медицинскому заключению, подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п. и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск.

[0113] Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники.

[0114] Например, подходящие фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению могут быть получены путем смешивания фармацевтически приемлемой кислоты, такой как соляная кислота, серная кислота, метансульфо-кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, бензойная кислота, фосфорная кислота, уксусная кислота, щавелевая кислота, угольная кислота, винная кислота или лимонная кислота с соединениями по изобретению. Таким образом, подходящие фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению включают соли присоединения кислот.

[0115] Например, S. M. Berge et al подробно описали фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977,66 : 1-19. Соли могут быть получены *in situ* во время окончательного выделения и очистки соединений по настоящему изобретению или отдельно путем взаимодействия функциональной группы свободного основания с подходящей органической кислотой. Характерные соли присоединения кислоты включают ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, полусульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканат, валерат и т.п. Иллюстративные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п., а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не ограничиваясь ими, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и т.п.

[0116] Настоящее изобретение также обеспечивает пролекарства. Как правило, пролекарства представляют собой функциональные производные соединений по настоящему изобретению, которые легко превращаются *in vivo* в требуемые (активные) соединения по настоящему изобретению, такие как визуализирующие, терапевтические и/или диагностические агенты.

[0117] Типичные процедуры выбора и получения пролекарств известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в H. Bundgaard (Ed), Design of Prodrugs, Elsevier, 1985.

[0118] Промежуточные и конечные продукты могут быть переработаны и/или очищены в соответствии со стандартными методами, например, с использованием хроматографических методов, методов распределения, (пере)кристаллизации и т.п. Соединения, включая их соли, также могут быть получены в виде сольватов, в частности гидратов. В контексте изобретения сольваты относятся к тем формам соединений по настоящему изобретению, которые в твердом или жидком состоянии образуют комплекс

за счет координации с молекулами растворителя. Гидраты представляют собой особую форму сольватов, в которых координация осуществляется с водой. Кристаллы соединений по изобретению могут, например, включать растворитель, используемый для кристаллизации. Могут присутствовать различные кристаллические формы.

[0119] Настоящее изобретение также относится к тем формам способа получения соединений в соответствии с настоящим изобретением, в которых в качестве исходного материала используется соединение, получаемое в качестве промежуточного соединения на любой стадии процесса, и осуществляются остальные стадии процесса, или в которых исходный материал образуется в условиях реакции или используется в виде производного, например, в защищенной форме или в форме соли, или соединение, получаемое способом по изобретению, производится в условиях процесса и далее обрабатывается на месте.

[0120] Однократное или многократное введение соединений или фармацевтических композиций может быть осуществлено с уровнями доз и схемами, выбранными лечащим врачом. В любом случае соединения или фармацевтические композиции по настоящему изобретению должны обеспечивать количество соединения, достаточное для эффективного лечения пациента.

[0121] Специалист в данной области техники может путем рутинных экспериментов определить эффективное нетоксичное количество соединений или фармацевтических композиций, используемых в изобретении, которое требуется для лечения или предотвращения нарушений и заболеваний, описанных в данном документе.

[0122] Соединение по настоящему изобретению можно вводить в дозе, например, до 800 мкг. В некоторых конкретных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению можно вводить в дозе, например, до 700 мкг, например, до 600 мкг, например, до 500 мкг, например, до 400 мкг, например, до 300 мкг, например, до 250 мкг, например, до 200 мкг, например, до 150 мкг, например, до 100 мкг, например, до 50 мкг. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления соединения настоящего изобретения вводят в дозе до 200 мкг. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению вводят в дозе менее 50 мкг, например, от 10 до 50 мкг.

[0123] Хотя соединения по настоящему изобретению можно вводить отдельно, обычно предпочтительно, чтобы соединение вводилось в виде фармацевтической композиции/состава. Обычно фармацевтические составы соединений по настоящему изобретению могут быть приготовлены способами, известными специалистам в данной области, и, соответственно, могут включать фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество, разбавитель, наполнитель и/или адъювант.

[0124] Носители, вспомогательные вещества, разбавители, наполнители и адъюванты должны быть «приемлемыми» с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава и не оказывать вредного воздействия на реципиента.

[0125] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат соединение по настоящему изобретению, а также один или несколько дополнительных компонентов, выбранных из аскорбиновой кислоты,

натрия, фосфата, ацетата и хлорида. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат все такие компоненты. В предпочтительной форме фармацевтическая композиция соединения по настоящему изобретению содержит эффективное количество соединения по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и/или адъювантами, как показано в примере 5 для аналогичной композиции, содержащей $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ вместо терапевтического изотопного соединения, как раскрыто в настоящем документе.

[0126] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить стандартными путями.

[0127] В особенно предпочтительных вариантах осуществления соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят внутривенно. Для введения в виде раствора или суспензии для инъекций нетоксичные парентерально приемлемые разбавители или носители могут включать раствор Рингера, изотонический солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, этанол и 1,2-пропиленгликоль.

[0128] В настоящем изобретении предложены соединения и композиции согласно настоящему изобретению для применения при лечении неопластических состояний, включая опухоли и рак, например солидные опухоли. Рак может включать виды рака, которые не обязательно включают солидные или дискретные опухоли, например лейкоз или лимфому. Упомянутое лечение заключается в доставке терапевтического радиоизотопа в зону гибели клеток и, в ответ на доставку терапевтического изотопа, в индукции/усилении гибели клеток в окружающих клетках. При внутривенном введении соединения по настоящему изобретению будут нацелены на умирающие клетки, присутствующие в больших количествах, например, в опухолях (которые имеют высокие показатели гибели и оборота клеток); как следствие, излучение терапевтического радиоизотопа будет доставлено к соседним жизнеспособным клеткам, вызывая гибель окружающих опухолевых клеток. Такая гибель клеток, вызванная соединениями по настоящему изобретению, может вызвать дополнительное связывание соединения по настоящему изобретению, таким образом вызывая дальнейшую гибель клеток по механизму положительной обратной связи; соединения по настоящему изобретению можно вводить субъекту несколько раз (т.е. в нескольких циклах), чтобы обеспечить повышенную гибель клеток в течение нескольких циклов, например, при каждом цикле введения.

[0129] Настоящее раскрытие дополнительно обеспечивает способы лечения вышеупомянутых состояний, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение описанных в данном документе соединений в таких способах и применение в производстве лекарственных средств для лечения таких состояний. Упомянутое лечение может осуществляться посредством соединений по настоящему изобретению, содержащих терапевтический изотоп, индуцирующий гибель клеток, в частности, в клетках, окружающих умирающие клетки,

которые соединения селективно метят.

[0130] Применение соединений по настоящему изобретению и способов лечения, представленных в настоящем документе, например состояний, описанных выше, включает введение субъекту эффективного количества соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе.

[0131] В некоторых вариантах осуществления такие способы включают введение эффективного количества соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в течение двух или более циклов, при этом эффективность введения в отношении неопластического состояния увеличивается в течение двух или более циклов. Повышение эффективности введения в отношении неопластического состояния в течение двух или более циклов может включать общее повышение эффективности от первого к более позднему циклу, даже если эффективность в каждом отдельном цикле не выше, чем в непосредственно предшествующем цикле. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления эффективность введения в отношении неопластического состояния увеличивается с каждым из двух или более циклов, то есть эффективность каждого введения выше, чем в непосредственно предшествующем цикле. Под «циклами» следует понимать отдельные повторяющиеся введения, которые могут перемежаться или не перемежаться другими этапами, такими как введение других видов терапии. Повышение эффективности введения в отношении неопластического состояния в течение двух или более циклов возникает благодаря механизму положительной обратной связи, связанному с соединениями по настоящему изобретению, обсуждаемыми выше; соединения могут проявлять эффект самоусиления, когда гибель клеток, вызванная соединениями по настоящему изобретению, в свою очередь, притягивает больше соединения, что, в свою очередь, вызывает большую гибель клеток. Как таковые, последующие циклы введения соединения по настоящему изобретению могут иметь повышенную эффективность против опухолевого состояния благодаря повышенному поглощению соединения умирающими клетками из-за повышенных уровней гибели клеток, вызванных предыдущим введением (введениями). «Повышенную эффективность» можно понимать как более высокие уровни гибели клеток в области-мишени (такой как опухоль), вызванные введением соединения для данного количества соединения, по сравнению с предыдущим введением(-ями).

[0132] Особенно выгодно и в отличие от других терапевтических подходов можно увеличить поглощение соединений, меченных радиоактивным изотопом, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения путем начального, одновременного или последующего (обычно начального или одновременного) введения инициирующей терапии, которая вызывает гибель клеток, такие как химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия и/или таргетная терапия, которые путем уничтожения некоторых клеток, таких как опухолевые клетки, увеличивают поглощение меченых радиоактивным изотопом соединений согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, но также имеют синергетический эффект при доставке внутреннего облучения. Этот способ действия показан на фиг. 1 (где «CDI» относится к меченому радиоактивным изотопом

соединению, содержащему терапевтический радиоизотоп согласно настоящему изобретению). Это приводит к механизму положительной обратной связи с самоусиливающимся каскадом гибели опухолевых клеток; каждый цикл лечения приводит к большей гибели клеток, что будет усиливать поглощение радиоактивно меченого соединения в последующем цикле лечения и т. д., обеспечивая экспоненциальное уничтожение остаточных соседних жизнеспособных опухолевых клеток с обратной связью. Соответственно, соединения по настоящему изобретению могут быть доставлены в несколько циклов, необязательно вместе с несколькими циклами иницирующей терапии, чтобы обеспечить повышенную гибель клеток в течение нескольких циклов. Увеличение гибели клеток в течение нескольких циклов может включать общее увеличение гибели клеток от первого к более позднему циклу, даже если гибель клеток в каждом отдельном цикле не больше, чем непосредственно в предыдущем цикле. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления гибель клеток, связанная с введением, увеличивается с каждым из двух или более циклов, то есть гибель клеток, связанная с каждым введением, выше, чем в непосредственно предшествующем цикле. Это представляет собой новую парадигму мультимодальной терапии с потенциалом трансформации подходов к комбинированной терапии при всех злокачественных новообразованиях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления меченое радиоактивным изотопом соединение вариантов осуществления настоящего изобретения, то есть терапевтическое средство, в сочетании с сенсibiliзирующей химиотерапией, лучевой терапией, иммунотерапией и/или таргетной терапией будет генерировать самоусиливающийся каскад уничтожения опухолевых клеток - новая концепция для терапии.

[0133] Соответственно, в настоящем описании дополнительно предлагаются способы лечения описанного выше состояния, причем способ включает: а) необязательное проведение лечения указанного состояния у субъекта, нуждающегося в этом; и б) введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе. Лечение на стадии а) представляет собой лечение, отличное от введения соединения или композиции по настоящему изобретению. Лечение на стадии а) предпочтительно вызывает некоторую гибель клеток, в частности, в желаемом месте, таком как опухоль или рак, или в другом месте неопластического состояния. Стадию а) можно проводить одновременно с стадией б) или стадию б) можно проводить после стадии а). Стадии а) и/или б) могут быть повторены. В некоторых вариантах осуществления стадия б) повторяется в два или более циклов, т.е. выполняется два или более раз; такие варианты осуществления обеспечивают лечение с самоусилением, как обсуждалось выше. В некоторых таких вариантах осуществления эффективность введения в отношении опухолевого состояния увеличивается в течение двух или более циклов, например, с каждым циклом, как обсуждалось выше, в частности степень гибели клеток, индуцированная каждым лечением, включающим стадию а) и/или б), может увеличиваться в течение двух или более циклов, например, с каждым циклом. В

некоторых вариантах осуществления стадию а) проводят, чтобы инициировать или изначально увеличить гибель клеток в области-мишени, такой как неопластический участок, такой как опухоль, и стадию б) проводят несколько раз, при этом соединение, вводимое на стадии б), поглощается умирающими клетками, полученными в результате стадии а), и дальнейшие циклы стадии б) дополнительно усиливают лечебный эффект, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления обе стадии а) и б) осуществляются в несколько стадий, чередующихся стадий или в любом другом порядке. Терапия на стадии а) в некоторых вариантах осуществления может быть выбрана из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии и таргетной терапии. Настоящее раскрытие дополнительно обеспечивает соединения, как описано в настоящем документе, содержащие терапевтический радиоизотоп, для применения в таких способах, применение указанных соединений в таких способах и применение указанных соединений в производстве лекарственных средств для лечения описанных выше состояний, при которых лечение может содержать такие методы.

[0134] Настоящее изобретение также относится к способу индуцирования гибели клеток у субъекта, будь то при лечении опухолевого состояния или иным образом, включающему введение соединения или фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. Такими способами могут быть описанные в данном документе способы лечения новообразований или других состояний с *соответствующими изменениями*. В некоторых вариантах осуществления соединение или композицию по настоящему изобретению вводят субъекту в течение нескольких циклов, при этом степень индуцированной гибели клеток увеличивается в течение нескольких циклов, например, с каждым циклом, благодаря эффекту самоумножения, описанному выше. Такое увеличение гибели клеток может иметь место для данного количества вводимого соединения или композиции по сравнению с предыдущим введением.

[0135] Терапевтические соединения по настоящему изобретению могут быть использованы для тераностического лечения состояний, обсуждаемых в данном документе, с использованием терапевтического изотопа, который также обеспечивает выбросы, способные к визуализации. Например, терапевтический изотоп может быть позитронно-эмиссионным изотопом, который может быть изображен с использованием позитронно-эмиссионной томографии. В некоторых вариантах осуществления терапевтический изотоп может представлять собой ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{90}Y , ^{188}Re или ^{186}Re , все из которых могут быть визуализированы. Терапевтический изотоп, который также можно использовать для визуализации/диагностики, позволяет использовать соединения по настоящему изобретению в тераностических способах (т.е. в способах, сочетающих терапию и диагностику/идентификацию целевых состояний, таких как рак/опухоли). Например, можно вводить терапевтическое соединение в соответствии с настоящим изобретением, а затем проводить визуализацию для визуализации того, куда было доставлено соединение, и, в некоторых вариантах осуществления, сколько соединения было доставлено, например, сколько соединения было доставлено в указанное место. В

некоторых вариантах осуществления расчет дозы облучения опухоли и здоровой ткани для определения вероятности уничтожения опухоли, а также токсичности для здоровой ткани можно проводить с использованием тераностического соединения. Поскольку соединения по настоящему изобретению избирательно метят умирающие клетки, визуализацию гибели клеток путем визуализации терапевтического агента можно дополнительно использовать для оценки изменений гибели клеток в ответ на доставку терапевтических соединений, то есть для мониторинга эффективности лечения. Таким образом, такие тераностические соединения по настоящему изобретению позволяют проводить как лечение, так и визуализацию или мониторинг лечения с помощью одного соединения.

[0136] Терапевтические соединения по настоящему изобретению также можно использовать в сочетании с введением отдельного диагностического агента, например, визуализирующего агента, например, визуализирующего агента, нацеленного на неопластические клетки, такие как опухолевые клетки, и который можно визуализировать, например, с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Такая диагностика может быть использована перед введением терапевтических соединений, раскрытых в настоящем документе, для визуализации наличия состояния, например, в форме визуализации гибели клеток, например, в форме опухолей, имеющих высокие уровни гибели клеток, и/или после лечения соединениями по настоящему изобретению для визуализации изменений в ответ на указанное лечение, например изменений в гибели клеток. Альтернативно или дополнительно диагностический агент можно вводить вместе с терапевтическим агентом. Подходящим диагностическим агентом для использования в таких тераностических подходах является соединение, меченое ^{68}Ga (^{68}Ga -NODAGA-GSAO), описанное в примерах 4-8 настоящей заявки и раскрытое в заявке PCT/AU2020/050359, раскрытие которой включено в данный документ по ссылке. Соединения PCT/AU2020/050359 и раскрытые в нем способы можно использовать для визуализации гибели клеток вместе с лечением путем введения терапевтических соединений, меченных терапевтическими радиоизотопами, как описано в настоящем документе. Например, меченое ^{68}Ga соединение, описанное в примерах изобретения, можно вводить до и/или после лечения соединениями, меченными терапевтическими радиоизотопами, как описано в настоящем документе, и визуализировать с помощью PET для мониторинга эффективности лечения. Диагностические соединения PCT/AU2020/050359, в частности ^{68}Ga -NODAGA-GSAO, легко синтезируются, синтезируются из легкодоступных и недорогих исходных материалов, демонстрируют хорошее биораспределение, низкое поглощение в здоровых органах, благоприятные характеристики визуализации, благоприятную радиационную дозиметрию, не инвазивны при использовании и/или имеют короткий период полураспада, подходящий для последовательной повторной визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии и визуализации в клинически значимом и практическом временном масштабе. В некоторых вариантах осуществления диагностический агент можно вводить

внутривенно.

[0137] В контексте настоящего описания термин «диагностическое соединение» может относиться к отдельному диагностическому соединению или к терапевтическому соединению по настоящему изобретению, которое также может действовать как диагностическое соединение посредством визуализации соединения, т.е. «тераностическое соединение». Значение таких терминов становится очевидным из контекста использования.

[0138] При внутривенном введении тераностические соединения по настоящему изобретению и визуализирующие соединения PCT/AU2020/050359 будут нацеливаться на умирающие клетки и могут быть визуализированы благодаря их радиоактивному мечению, таким образом предоставляя информацию об уровнях гибели клеток в различных частях тела субъекта, например, в ответ на какую-то другую терапию, вызывающую гибель клеток. Соединения можно использовать для измерения гибели клеток в один момент времени, то есть путем проведения одного сканирования PET или другого подходящего метода визуализации. В некоторых вариантах осуществления может быть проведено более одного введения и/или сканирования, например, до и после введения терапии, для оценки изменений уровней гибели клеток до и после терапии и для определения того, является ли лечение успешным. Успешное лечение неопластических состояний, таких как опухоль или рак, после введения терапевтических соединений по настоящему изобретению и/или другой терапии можно определить путем визуализации повышенных уровней гибели клеток в месте неопластического состояния при использовании изображаемых соединений.

[0139] Диагностические соединения, как тераностические, как описано в настоящем документе, так и отдельные диагностические соединения, такие как соединения, описанные в PCT/AU2020/050359, могут быть использованы для адаптации или изменения применяемого лечения, например, интенсивности или продолжительности лечения. Мера гибели клеток может указывать на то, что терапевтический режим оказался эффективным или не доказал свою эффективность; если он неэффективен, может быть принята альтернативная доза или альтернативное лечение. Там, где это эффективно, лечение может быть продолжено, если необходимо, или сокращено/прекращено, если необходимо. Например, терапевтическая доза терапевтических соединений по настоящему изобретению или какой-либо другой терапии может быть скорректирована соответствующим образом в зависимости от уровня гибели клеток. Например, идентификация пациентов, у которых гибель опухолевых клеток незначительна или отсутствует после лечения, указывает на необходимость либо увеличения дозы или продолжительности лечения (эскалация), либо перехода на более интенсивную или мультимодальную терапию, чтобы максимизировать вероятность излечения или борьбы с заболеванием. И наоборот, точная оценка ответа на раннем этапе лечения позволит сократить либо продолжительность, либо интенсивность лечения у онкологических больных, которые хорошо реагируют, чтобы избежать связанных с лечением

заболеваемости и смертности (деэскалация) без ущерба для вероятности излечения или борьбы с заболеванием. Оценка успеха терапии, например, путем гибели клеток, может привести к принятию новой терапии, когда показатель гибели клеток после первоначального терапевтического подхода предполагает, что первоначальный подход не был успешным.

[0140] Применение тераностического соединения по настоящему изобретению включает введение соединения по настоящему изобретению субъекту. Применение отдельных диагностических соединений, таких как раскрытые в РСТ/AU2020/050359, вместе с терапевтическими соединениями по настоящему изобретению включает введение субъекту эффективного количества диагностического соединения. Такие применения могут дополнительно включать проведение метода визуализации у субъекта после введения диагностического соединения (например, тераностического соединения), например, проведение PET у субъекта после введения диагностического соединения, например, сразу после введения диагностического соединения. В альтернативных вариантах осуществления для визуализации диагностического соединения можно использовать любой подходящий метод визуализации, кроме PET. В некоторых вариантах осуществления, особенно когда соединение представляет собой тераностическое соединение, для получения изображения соединения можно использовать ядерную медицину (гамма-камеру) или PET, в зависимости от используемого изотопа. В некоторых вариантах осуществления для изображения изотопов используется однофотонная визуализация (SPECT). Специалисту в данной области техники будет очевиден конкретный тип визуализации, подходящий для данного изотопа и применения.

[0141] В некоторых вариантах осуществления PET-сканирование проводят через временной интервал по меньшей мере 10 минут, например, по меньшей мере 20 минут, по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 40 минут, по меньшей мере 50 минут или по меньшей мере 1 час после введения диагностического или тераностического соединения, например, примерно через 1 час после введения диагностического соединения. В некоторых вариантах осуществления можно проводить несколько PET-сканирований в разное время после введения. Например, может быть введено диагностическое соединение, и PET-сканирование может быть проведено сразу же после введения, а также примерно через 30 минут, примерно через 1 час, примерно через 2 часа и примерно через 3 часа после введения. В качестве альтернативы, для терапевтического соединения по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления может потребоваться некоторое время, прежде чем его эффекты проявятся; визуализация эффективности, например, путем гибели клеток, с помощью диагностического соединения или использования тераностического соединения, такого как PET-сканирование, может поэтому иметь место в течение более длительного времени после введения терапевтического или тераностического соединения, например, через по меньшей мере или примерно 1 день, 3 дня, 5 дней, 1 неделю, 2 недели или месяц после введения терапевтического или тераностического соединения. В некоторых таких вариантах

осуществления, где используется отдельное диагностическое соединение, диагностическое соединение может быть введено перед сканированием.

[0142] В некоторых вариантах осуществления способ лечения включает введение терапевтического соединения, меченого радиоактивным изотопом, в соответствии с настоящим изобретением, например, для лечения неопластического состояния, и введение отдельного диагностического средства, такого как раскрытое в РСТ/AU2020/050359, для визуализации эффективности терапевтического соединения, такой как эффективность в индуцировании гибели клеток. Терапевтическое соединение может быть введено субъекту вместе с диагностическим соединением, до или после него. PET-сканирование может быть проведено после введения диагностического соединения для визуализации активности терапевтического соединения, индуцирующей гибель клеток.

[0143] В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ оценки реакции субъекта на лечение опухолевого состояния, включающий: введение терапевтического соединения по настоящему изобретению; и визуализацию гибели клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое соединение содержит терапевтический радиоизотоп, способный визуализировать гибель клеток, т.е. соединение представляет собой тераностическое соединение. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение отдельного диагностического соединения для визуализации гибели клеток, например, как описано в РСТ/AU2020/050359, например, $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$. В одном конкретном варианте осуществления гибель клеток визуализируют путем проведения позитронно-эмиссионной томографии на субъекте. В одном конкретном варианте осуществления гибель клеток визуализируют с помощью ядерной медицины («гамма-камера») на субъекте. В некоторых вариантах осуществления визуализацию можно проводить с помощью однофотонной визуализации (SPECT). При успешной терапии оценка покажет успех терапии, когда визуализируется высокий уровень гибели клеток в желаемом месте. В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтического соединения вводят диагностическое соединение и/или также визуализируют гибель клеток, чтобы можно было сравнить уровень гибели клеток до и после введения терапевтического соединения. В таких случаях увеличение уровня гибели клеток между двумя визуализациями может указывать на успешную терапию. И наоборот, низкий уровень клеточной гибели или снижение клеточной гибели может указывать на неудачную или субоптимальную терапию.

[0144] В вышеуказанных способах визуализация гибели клеток (и необязательно введение отдельного диагностического соединения) может происходить, например, примерно через 1 день, примерно через 2 дня, примерно через 3 дня, примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель и/или примерно через 6 недель после введения терапевтического соединения по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления визуализация гибели клеток происходит в течение 7 дней после введения

терапевтического соединения. В некоторых вариантах осуществления визуализация гибели клеток происходит по меньшей мере через 4 недели после введения терапевтического соединения. В некоторых вариантах осуществления визуализация гибели клеток происходит более одного раза после введения терапевтического соединения. Например, в некоторых вариантах осуществления визуализация гибели клеток происходит как в течение 7 дней, так и по меньшей мере через 4 недели после введения терапевтического соединения.

[0145] В вышеуказанных способах, где для визуализации гибели клеток вводят отдельное диагностическое соединение, визуализация гибели клеток, например, с помощью позитронно-эмиссионной томографии, может происходить, например, через по меньшей мере 10 минут, по меньшей мере 20 минут, по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 40 минут, по меньшей мере 50 минут, по меньшей мере 1 час или по меньшей мере 90 минут после введения диагностического соединения. Например, диагностическое соединение можно вводить, а визуализацию можно проводить, например, сразу после введения или примерно через 30 минут, примерно через 1 час, примерно через 90 минут, примерно через 2 часа или примерно через 3 часа после введения диагностического соединения.

[0146] Настоящее изобретение относится к вышеуказанным способам, соединениям согласно настоящему изобретению для применения в таких способах, применению соединений согласно настоящему изобретению в таких способах и применению соединений согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного средства для применения в таких способах.

[0147] Можно также сказать, что настоящее изобретение в широком смысле состоит из частей, элементов и признаков, упомянутых или указанных в описании заявки, по отдельности или вместе, и любой или всех комбинаций любых двух или более указанных частей, элементов или признаков, и где в данном документе упоминаются конкретные целые числа, которые имеют известные эквиваленты в области техники, к которой относится настоящее изобретение, такие известные эквиваленты считаются включенными в настоящее описание, как если бы они были изложены отдельно.

[0148] Ссылка в настоящем описании на любую предыдущую публикацию (или информация, полученная из него), или к любому вопросу, который известен, не и не должен быть взят как, подтверждение или допуск или любая форма предположения что предшествующая публикация (или информация, полученная из него) или известный вопрос является частью общих знаний в области усилий, к которым относится настоящее описание.

[0149] Далее настоящее описание будет описано со ссылкой на следующие конкретные примеры, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

Примеры

ПРИМЕР 1

Синтез NODAGA-GSAO

[0150] а) GSAO был получен с использованием процесса, описанного в Park D, Don AS, Massamiri T et al (2011) Non-invasive imaging of cell death using an Hsp90 ligand. J Am Chem Soc 133:2932-3835; 4-(N-(бромацетил)амино)фениларсоновая кислота (BRAA) синтезирована из п-арсаниловой кислоты и бромацетилбромида и восстановлена до 4-(N-(бромацетил)амино)фениларсоновой кислоты (BRAO). BRAO была соединена с глутатионом (GSH) для получения GSAO. GSAO отделяли от непрореагировавших BRAO и GSH с помощью хроматографии C18.

[0151] б) Бикарбонат натрия и сверхчистую воду продували азотом в течение 30 минут перед использованием. Реакционную подготовку и очистку проводили в инертной атмосфере азота. GSAO, полученный на стадии а) (20,0 мг, 36,5 мкмоль), растворяли в 0,1 н. растворе бикарбоната натрия (7,4 мл) при 4°C и перемешивали в течение 10 минут.

[0152] в) NODAGA-NHS (2,2'-(7-(1-карбоксо-4-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-4-оксобутил)-1,4,7-триазоан-1,4-диил)диуксусной кислоты моно-N-гидроксисукцинимидный эфир), полученный от CheMatech (Дижон, Франция) (34,5 мг, 47,0 мкмоль), растворяли в безводном диметилформамиде (DMF) (1 мл) и добавляли к реакционной смеси, полученной на стадии б), по каплям в течение 1 часа.

[0153] д) Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов, подкисляли добавлением 1 М соляной кислоты (1 мл), подвергали шоковой заморозке в жидком азоте и сушили вымораживанием.

Очистка NODAGA-GSAO

[0154] е) Остаток, полученный на стадии д), повторно растворяли в деаэрированной воде (4 мл), фильтровали (0,45 мкм) и очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ). Градиент 2-20% подвижной фазы В (0,2% трифторуксусной кислоты (TFA) в ацетонитриле) в подвижной фазе А (0,2% TFA в сверхчистой воде) применяли от 0 до 25 минут. NODAGA-GSAO элюировали через 20,6 мин. Образец собирали вручную, и каждую фракцию мгновенно продували азотом.

[0155] ВЭЖХ проводили на системе ЖХ Shimadzu серии LC-20 с двумя насосами LC-20AP, автодозатором SIL-10AP, детектором SPD-20A UV/VIS и колонкой Shimadzu ShimPack GIS-C18 (150×10,0 мм внутр. диам., 5 мкм, 4 мл/мин¹) (система А). Программное обеспечение Shimadzu LabSolutions (версия 5.73) использовалось для сбора и обработки данных.

[0156] ф) Объединенные фракции замораживали при -20°C и лиофилизировали с получением 7,3 мг белого порошка (выход 21,6%).

[0157] г) NODAGA-GSAO распределяли аликвотами по 54 мкг на 100 мкл воды и хранили при -80°C.

[0158] h) Чистоту соединения (>95%) проверяли путем введения раствора NODAGA-GSAO (5 мкл; примерно 17 мМ в воде) на жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС) при 2-2-50% подвижной фазы В (0,1% муравьиной кислоты

(FA) в ацетонитриле) в подвижной фазе А (0,1% FA в воде для масс-спектрометрии) в течение 0-5-45 минут. NODAGA-GSAO элюировали через 19,4 минуты.

[0159] ЖХ-МС проводили с использованием системы Agilent (Санта-Клара, Калифорния, США), состоящей из четвертичного насоса серии 1260 со встроенным дегазатором, автоматического пробоотборника серии 1200, термостатируемого отделения колонки, детектора с диодной матрицей, коллектора фракций, одноквадрупольного масс-спектрометра серии 6120 и колонки Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (внутренний диаметр 150×4,6 мм, 5 мкм) при 30°C (система В). Поток осушающего газа, температура и распылитель были установлены на 12 л/мин., 350°C и 35 фунтов на кв. дюйм соответственно. Система Agilent OpenLAB для хроматографических данных (CDS) ChemStationEdition (C.01.05) использовалась для сбора и обработки данных. Ионизацию электрораспылением (ESI) использовали для анализа аликвот (5 мкл) в режиме положительных ионов с капиллярным напряжением 3500 В. Спектры спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (^1H и ^{13}C) регистрировали в 5-мм трубках из пирекса (Вилмад, США) с использованием ЯМР-спектрометра Varian 400-MR (Лексингтон, Массачусетс, США) на частоте 399,73 МГц (^1H) или 100,51 МГц (^{13}C) при 24°C с программным обеспечением VnmrJ 3.1 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Спектральные данные представлены в ppm (δ) и относятся к остаточному растворителю (дейтерированный диметилсульфоксид [ДМСО- d_6] 2,50/39,52 ppm).

[0160] i) Поглощение измеряли при 210 и 254 нм, и соответствующую площадь под кривой (AUC) использовали для определения чистоты соединения в процентах от общей AUC по сравнению с фоновыми данными.

ПРИМЕР 2

Мечение NODAGA-GSAO с помощью ^{175}Lu лютеция (^{175}Lu), ^{63}Cu меди (^{63}Cu) и ^{89}Y иттрия (^{89}Y)

[0161] Перед мечением радиоизотопами оценивали условия связывания с использованием стабильных изотопов. В частности, ^{175}Lu , ^{63}Cu и ^{89}Y используются вместо ^{177}Lu , ^{67}Cu и ^{90}Y соответственно. Эти эксперименты определили оптимальные условия связывания и служат доказательством концепции радиоизотопов.

[0162] Мечение NODAGA-GSAO (62 мкМ), полученного в примере 1, проводили в 0,4 М буфере ацетата натрия (Sigma Aldrich) при различных уровнях pH и температурах, как указано ниже. Стабильный изотоп ^{175}Lu (в виде хлорида лютеция (III)), ^{63}Cu (в виде пентагидрата сульфата меди (II)) или ^{89}Y (хлорид иттрия (III)) (Sigma Aldrich) добавляли в 1,2-кратном молярном соотношении по отношению к NODAGA-GSAO и смесь выдерживали в течение 30 минут.

[0163] Все эксперименты были выполнены на Agilent (Санта-Клара, Калифорния, США) 1260 Infinity Quaternary LC и проанализированы с использованием программного обеспечения Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition. Аналитическая колонка представляла собой Alltima HP C18 150 × 4,6 мм с размером частиц 5 мкм (Hichrom,

Беркшир, Великобритания). Колонку уравнивали в смеси 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислоты (Sigma Aldrich) в воде MilliQ (подвижная фаза А) и ацетонитриле (подвижная фаза В; 98/2, об./об.) (Unichrom, Thermo Fisher Scientific). Образцы (100 мкл) загружали на колонку с помощью автоматического пробоотборника при комнатной температуре, а продукты элюировали с использованием градиента 2-20-70-2-2% подвижной фазы В в подвижной фазе А в течение 0-18-28-28-33 мин. при скорости потока 0,6 мл/мин. Поглощение измеряли при 210 нм и 280 нм.

[0164] Степень мечения определяли как процент площади под кривой (AUC) меченого пика CDI (время до пика, 13,9-14,1) от общей AUC по сравнению с фоном.

[0165] Зависимое от pH мечение NODAGA-GSAO стабильными изотопами после инкубации при комнатной температуре (^{63}Cu), 80°C (^{89}Y) или 85°C (^{175}Lu) в течение 30 мин. показано в таблице 1 ниже. Данные взяты из одного или двух (среднее \pm стандартное отклонение двух измерений) экспериментов.

Таблица 1

Изотоп	Мечение (%)				
	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0
^{63}Cu	>99,9 \pm 0,0	>99,9 \pm 0,0	>99,9 \pm 0,0	>99,9 \pm 0,0	>99,9 \pm 0,0
^{89}Y	18,59	44,46	62,69	58,33	57,72
^{175}Lu	77,34	90,05	92,08	91,52	92,21

[0166] Зависимое от времени и температуры мечение NODAGA-GSAO ^{175}Lu или ^{89}Y при pH 5 показано в таблице 2 ниже (N.D.=не определено). Данные взяты из одного или двух (среднее \pm стандартное отклонение двух измерений) экспериментов.

Таблица 2

Изотоп	Температура реакции и pH	Мечение (%)		
		10 мин.	20 мин.	30 мин.
^{175}Lu	RT, pH 5,0	N.D.	N.D.	7,76
	60°C, pH 5,0	53,02	70,57	76,00
	70°C, pH 5,0	79,13	90,16	91,27
	80°C, pH 5,0	91,49	92,12 \pm 0,26	94,08 \pm 0,18
	85°C, pH 5,0	N.D.	N.D.	92,08
	90°C, pH 5,0	93,88	91,37	90,24
	100°C, pH 5,0	92,94	94,13	90,81
	110°C, pH 5,0	92,50	90,06	90,29
	120°C, pH 5,0	90,85	90,07	90,46
^{89}Y	RT, pH 4,5	N.D.	N.D.	11,63
	80°C, pH 4,5	N.D.	N.D.	44,46

	80°C, pH 5,0	N.D.	N.D.	62,69
	120°C, pH 5,0	N.D.	N.D.	57,52

¹⁷⁵Lu

[0167] Связывание ¹⁷⁵Lu с NODAGA-GSAO оказалось субоптимальным при pH 4,0 или 4,5, но эффективным при pH ≥ 5,0. Связывание при pH 5,0 оказалось неэффективным (7,76%) при 30-минутной инкубации при комнатной температуре, но повышение температуры до 60-80°C усиливало мечение в зависимости от температуры и времени, а максимальное мечение было обнаружено после инкубации 30 минут при 80°C.

[0168] Чтобы гарантировать, что наблюдаемые пики элюирования представляют собой ¹⁷⁵Lu-NODAGA-GSAO, меченые продукты предварительно инкубировали с DMP в течение 15 мин. при комнатной температуре и оценивали с помощью ВЭЖХ. Дитиол DMP взаимодействует с гидроксильными группами As(III) NODAGA-GSAO с образованием пятичленной кольцевой структуры, которая сдвигает пик элюирования вправо, как показано на схеме 2 ниже.

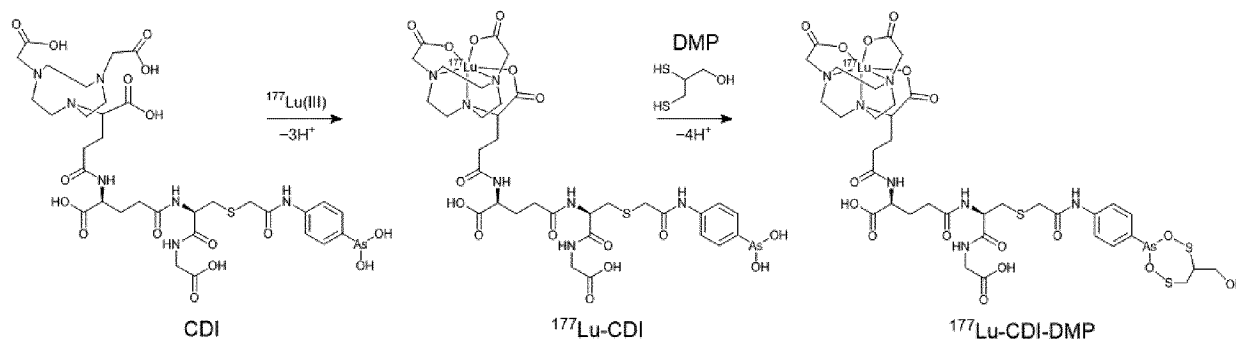


Схема 2

[0169] Хроматограмма ВЭЖХ ¹⁷⁵Lu-NODAGA-GSAO, меченного в течение 30 минут при pH 5,0 при 80°C, показана на фиг. 2, (A) без DMP или (B) с предварительной инкубацией с DMP, как описано выше. Указано время до достижения соответствующих пиков элюирования. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов. Инкубация ¹⁷⁵Lu-NODAGA-GSAO с DMP сдвигала время элюирования соединения с 13,9 до 25,0 мин., подтверждая, что соединение содержит активный целевой фрагмент As(III).

⁶³Cu

[0170] Было обнаружено, что мечение с помощью ⁶³Cu составляет около 100% для всех условий pH, проверенных при инкубации при комнатной температуре.

[0171] Инкубация продукта ⁶³Cu-NODAGA-GSAO с DMP подтвердила наличие в нем активного As(III). Хроматограммы меченного методом ВЭЖХ ⁶³Cu-NODAGA-GSAO в течение 30 минут при pH 5,0 при комнатной температуре показаны на фиг. 3, (A) без DMP или (B) с предварительной инкубацией с DMP, как описано выше.

⁸⁹Y

[0172] Было обнаружено, что мечение ⁸⁹Y неэффективно при pH 4,0 или 4,5 и достигает максимальных значений при pH ≥ 5,0, примерно до 60% мечения NODAGA-

GSAO, при 80°C. При 120°C происходило умеренное увеличение мечения, но при 120°C наблюдалось образование побочных продуктов. Хроматограмма ВЭЖХ меченного ^{89}Y -NODAGA-GSAO в течение 30 минут при pH 5,0 при 120°C представлена на фиг. 4.

ПРИМЕР 3

Стабильность меченых продуктов NODAGA-GSAO

[0173] Стабильность комплексного продукта *in vitro* является важным фактором, определяющим потенциальное клиническое применение терапевтического соединения. Стабильность после мечения оценивали путем инкубации продуктов NODAGA-GSAO, меченных ^{175}Lu и ^{63}Cu , при комнатной температуре.

[0174] Измеряли процент мечения в разные моменты времени после образования комплекса изотоп-NODAGA-GSAO. Результаты показаны на фиг. 5 для А) меченного ^{175}Lu продукта, полученного в результате инкубации в течение 30 минут при pH 5,0 при 80°C, и В) меченного ^{63}Cu продукта, полученного в результате инкубации в течение 30 минут при pH 5,0 при комнатной температуре. В определенные моменты времени брали аликвоты и оценивали мечение (черные кружочки) NODAGA-GSAO с помощью ВЭЖХ. Данные взяты из одного или двух (среднее \pm стандартное отклонение двух измерений) экспериментов.

[0175] Для ^{175}Lu -NODAGA-GSAO мечение немного уменьшилось со временем, но оставалось $\sim 90\%$ после 14 дней хранения. Кроме того, потеря мечения совпала с повышенным уровнем побочных продуктов (4-7,5% от общей AUC).

[0176] NODAGA-GSAO, хелатированный с ^{63}Cu , был очень стабилен в течение четырех дней, и образовывалось лишь незначительное количество одного побочного продукта ($<1\%$ от общей AUC). Побочные продукты, наблюдаемые с ^{175}Lu -NODAGA-GSAO, но не с ^{63}Cu -NODAGA-GSAO, вероятно, связаны с нагреванием во время реакции с ^{175}Lu . Учитывая период полураспада радиоизотопов и время обработки после синтеза продукта, NODAGA-GSAO, меченный ^{175}Lu и ^{63}Cu , демонстрирует достаточную стабильность для проведения терапевтической оценки.

[0177] Приведенные выше результаты демонстрируют, что NODAGA-GSAO можно эффективно метить изотопами Lu и Cu; терапевтические радиоизотопы с установленной клинической ролью в радиационной онкологии. Кроме того, была продемонстрирована высокая стабильность *in vitro* ^{175}Lu - и ^{63}Cu -меченого NODAGA-GSAO. Используя уникальные свойства NODAGA-GSAO, эти конъюгаты обеспечивают многообещающий терапевтический подход к нацеливанию на умирающие и мертвые опухолевые клетки и обеспечивают новые средства доставки терапевтического излучения к смежным жизнеспособным опухолевым клеткам.

ПРИМЕР 4

Мечение NODAGA-GSAO с помощью ^{177}Lu лютеция (^{177}Lu)

[0178] После мечения NODAGA-GSAO стабильными изотопами, как описано в примере 2, NODAGA-GSAO успешно метили радиоизотопом ^{177}Lu при удельной активности 500 МБк/54 мкг NODAGA-GSAO (~ 2 ГБк/216 мкг NODAGA-GSAO).

Синтез

[0179] Сначала $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ разбавляли до получения маточного раствора. 1,0 мл 0,04 М HCl добавляли во флакон с 0,5 мл $^{177}\text{LuCl}$ (без добавления носителя) (ANSTO). Затем весь $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ переносили в вакуумированный флакон объемом 10 мл. Еще 1,5 мл 0,04 М HCl использовали для промывки остаточного $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ в вакуумированном флаконе с получением раствора $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ с 5,0 ГБк в 5,0 мл (радиоактивная концентрация=1 ГБк/мл). Для уравнивания давления вставляли вентиляционную иглу со шприцем.

[0180] Флакон NODAGA-GSAO, приготовленный как в примере 1 (54 мкг в 100 мкл, 0,06 мкмоль), размораживали и пипеткой перенесли содержимое в пробирку Эппендорфа. Затем добавляли 100 мкл 0,25 М аскорбиновой кислоты, а затем 250 мкл буфера для связывания ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,5 М, pH 4,5, молекулярная масса 136,08). 0,25 М аскорбиновой кислоты получали растворением 44 мг аскорбиновой кислоты (Merck 100468) в 1 мл сверхчистой воды. Общая концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составила 0,0056 М.

[0181] Ацетатно-натриевый буфер получали растворением 10,21 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck 106267) в 40 мл сверхчистой воды, доводя pH до 5,0 с помощью ледяной уксусной кислоты и добавляя сверхчистую воду, чтобы получить общий объем 50 мл.

[0182] Затем в шприц набирали сверхчистую воду так, чтобы общий объем воды, NODAGA-GSAO, аскорбиновой кислоты и буфера для связывания (и этанола или глутатиона при использовании в примере 5 ниже) составлял 4 мл. Затем наполненный шприц использовали для забора содержимого пробирки Эппендорфа и переноса в вакуумированный флакон. Затем добавляли 500 мкл раствора $^{177}\text{LuCl}_3$. Для уравнивания давления с помощью шприца вставляли вентиляционную иглу, а флакон обертывали парапленкой для предотвращения загрязнения аэрозолем. Затем флакон инкубировали в течение 30 минут при 85°C.

[0183] Приблизительно 0,4 мл содержимого реакционной пробирки затем отбирали для анализа. 200 мкл помещали во флакон автоматического пробоотборника со вставкой и проводили анализ ВЭЖХ. 200 мкл также помещали во флакон автоматического пробоотборника со вставкой, содержащей 10 мкл DMP:ДМСО, и проводили анализ ВЭЖХ. DMP: ДМСО получали растворением 5 мкл 2,3-димеркапто-1-пропанола (DMP) (Sigma D1129) в 495 мкл ДМСО). Результаты показаны на фиг. 6 и 7. pH также измеряли с помощью бумаги.

Очистка после синтеза

[0184] Содержимое реакционного флакона отбирали в шприц и загружали в картридж Oasis PRiME HLB (335 мг сорбента, заправленного 1 мл этанола и 10 мл воды для инъекций) со скоростью примерно ~ 1 мл.мин⁻¹, продували воздухом и отходы собирали во флакон для отходов. Реакционный флакон дополнительно промывали 10 мл физиологического раствора и загружали в картридж Oasis PRiME HLB со скоростью примерно ~ 1 мл.мин⁻¹, продували воздухом и отходы собирали во флаконе для отходов.

[0185] Продукт элюировали с картриджа Oasis PRiME HLB с помощью 0,5 мл этанола и продували воздухом, собирая продукт во флакон с продуктом. Картридж Oasis PRiME HLB был дополнительно промыт 9,5 мл физиологического раствора со скоростью приблизительно ~ 1 мл/мин⁻¹ и продували воздухом, собранным во флакон с продуктом.

[0186] Активность измеряли во флаконе для отходов, картридже Oasis PRiME HLB и флаконе с продуктом.

[0187] Приблизительно 0,4 мл из флакона с продуктом отбирали для анализа. Приблизительно 200 мкл помещали во флакон автоматического пробоотборника со вставкой и проводили анализ ВЭЖХ. Приблизительно 200 мкл также помещали во флакон автоматического пробоотборника со вставкой, содержащей 10 мкл DMP:DMCO, и проводили анализ ВЭЖХ (раствор 2,3-димеркапто-1-пропанола (DMP) (Sigma D1129) для ВЭЖХ получали путем растворения 5 мкл DMP в 495 мкл DMCO), как указано выше. pH также измеряли с помощью бумаги.

[0188] Параметры ВЭЖХ представлены ниже.

Растворы

A: трифторуксусная кислота (TFA)/H₂O

B: ацетонитрил (ACN)

C: H₂O

D: MeOH

Градиенты

Таблица 3. Градиент для анализа

<u>Время (мин.)</u>	<u>Расход (мл)</u>	<u>%A (H₂O/0,1%TFA)</u>	<u>%B ACN</u>
<u>0</u>	<u>0,6</u>	<u>98</u>	<u>2</u>
<u>18</u>	<u>0,6</u>	<u>80</u>	<u>20</u>
<u>28</u>	<u>0,6</u>	<u>30</u>	<u>70</u>
<u>38</u>	<u>0,6</u>	<u>98</u>	<u>2</u>
<u>42</u>	<u>0,6</u>	<u>98</u>	<u>2</u>

Таблица 4. Чистый градиент

<u>Время (мин.)</u>	<u>Расход (мл)</u>	<u>%C (H₂O/0,1%TFA)</u>	<u>%D MeOH</u>
<u>0</u>	<u>1,0</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>5</u>	<u>1,0</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>25</u>	<u>1,0</u>	<u>5</u>	<u>95</u>
<u>30</u>	<u>1,0</u>	<u>5</u>	<u>95</u>
<u>40</u>	<u>1,0</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
<u>45</u>	<u>1,0</u>	<u>50</u>	<u>50</u>

Результаты

[0189] NODAGA-GSAO был успешно помечен ¹⁷⁷Lu в концентрации 500 МБк/~51 мкг NODAGA-GSAO. Радиохроматограммы продукта реакции до очистки после синтеза

представлены на фиг. 6 и фиг. 7, продукта реакции в конце синтеза (фиг. 6) и через 1,5 часа после окончания синтеза (фиг. 7). Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой ^{177}Lu -NODAGA-GSAO.

[0190] Хроматограммы показывают, что в продукте реакции присутствует очень небольшое количество свободного Lu-177 даже до проведения какой-либо очистки после синтеза. В то время как NODAGA-GSAO был успешно помечен ^{177}Lu , как описано выше, во время синтеза произошел радиолиз с образованием окисленного NODAGA-GSAO, как показано на фиг. 6 и 7. После синтеза дальнейшего радиолиза не происходит, что позволяет предположить, что требуется как выделение тепла, так и образование свободных радикалов для радиолиза. Соответственно, исследовали способы уменьшения радиолиза, как описано ниже.

ПРИМЕР 5

Мечение NODAGA-GSAO с помощью ^{177}Lu лютеция (^{177}Lu) с уменьшением радиолиза

[0191] Как показано в примере 4 выше, присутствие аскорбиновой кислоты во время мечения NODAGA-GSAO ^{177}Lu не полностью предотвращало радиолиз. Было исследовано несколько методов дальнейшего профилактики радиолиза:

а) этанол

[0192] Для получения ^{177}Lu -NODAGA-GSAO использовали способ, описанный в примере 4, за исключением того, что во время синтеза к NODAGA-GSAO добавляли 100 мкл этанола вместо 100 мкл М аскорбиновой кислоты.

[0193] Радиохроматограммы продукта реакции до очистки после синтеза показаны на фиг. 8 и 9. Радиохроматограмма реакции в конце синтеза показана на фиг. 8. Радиохроматограмма продукта, смешанного с 1% DMP в ДМСО, показана на фиг. 9. Область 1 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 2 представляет собой ^{177}Lu -NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III) NODAGA-GSAO.

[0194] Как видно из хроматограмм, мечение радиоактивным изотопом достигается в присутствии этанола. Однако этанол обеспечивал минимальную защиту от радиолиза. Часть реакционной смеси все еще была способна образовывать циклический дитиоарсинитовый комплекс с DMP.

б) Аскорбиновая кислота высокой концентрации

[0195] Для получения ^{177}Lu -NODAGA-GSAO использовали способ, описанный в примере 4, за исключением того, что во время синтеза к NODAGA-GSAO добавляли 500 мкл 0,25 М аскорбиновой кислоты вместо 100 мкл аскорбиновой кислоты. Общая концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составила 0,023 М.

[0196] Радиохроматограммы продукта реакции до очистки после синтеза показаны на фиг. 10 и 11. Радиохроматограмма реакции в конце синтеза показана на фиг. 10. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой ^{177}Lu -NODAGA-GSAO. Радиохроматограмма продукта, смешанного с 1% DMP в

ДМСО, показана на фиг. 11. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III) NODAGA-GSAO.

[0197] Как видно из радиохроматограмм, увеличение количества аскорбиновой кислоты обеспечивало некоторую дополнительную защиту от радиолиза.

с) Высокая концентрация аскорбиновой кислоты и глутатиона

[0198] Для получения $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$ применяли способ, описанный в примере 4, за исключением того, что при синтезе к NODAGA-GSAO добавляли 500 мкл аскорбиновой кислоты вместо 0,25 М 100 мкл аскорбиновой кислоты, а также 500 мкл 0,25 М глутатиона (получено путем растворения 77 мг восстановленного L-глутатиона (Sigma G4251-25G) в 1 мл сверхчистой воды). Общая концентрация каждого из глутатиона и аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составляла 0,023 М.

[0199] Радиохроматограммы продукта реакции до очистки после синтеза показаны на фиг. 12-15. Радиохроматограмма реакции в конце синтеза показана на фиг. 12. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$. Радиохроматограмма продукта в конце синтеза, смешанного с 1% DMP в ДМСО, показана на фиг. 13. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III) NODAGA-GSAO. Радиохроматограмма продукта через 72 часа после синтеза показана на фиг. 14. Область 2 представляет собой $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$. Радиохроматограмма продукта через 72 часа после синтеза, смешанного с 1% DMP в ДМСО, показана на фиг. 15. Область 1 представляет собой циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III) NODAGA-GSAO.

[0200] Как видно на радиохроматограммах, сочетание высокой концентрации аскорбиновой кислоты и глутатиона почти полностью предотвращало радиолиз как во время, так и в течение 72 часов после синтеза. Важно отметить, что аскорбиновая кислота и глутатион являются биосовместимыми соединениями.

д) Снижение концентрации глутатиона

[0201] Для получения $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$ использовали способ, описанный выше в примере 5с), за исключением того, что во время синтеза использовали 100 мкл вместо 500 мкл 0,25 М глутатиона. Общая концентрация глутатиона в реакционной смеси составила 0,0056 М.

[0202] Радиохроматограммы продукта реакции до очистки после синтеза показаны на фиг. 16 и 17. Радиохроматограмма реакции в конце синтеза показана на фиг. 16. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$. Радиохроматограмма продукта, смешанного с 1% DMP в ДМСО, показана на фиг. 17. Область 2 представляет собой окисленный NODAGA-GSAO. Область 3 представляет собой $^{177}\text{Lu-NODAGA-GSAO}$. Область 4 представляет собой циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III) NODAGA-GSAO.

[0203] Снижение концентрации глутатиона приводило к увеличению радиолиза

NODAGA-GSAO. Кроме того, присутствует компонент NODAGA-GSAO, который, по-видимому, не образует циклический дитиоарсинитовый комплекс DMP с атомом As(III).

ПРИМЕР 6

Радиомечение NODAGA-GSAO с помощью ^{68}Ga

[0204] ^{68}Ga использовали для мечения NODAGA-GSAO вместо терапевтического изотопа, как описано в заявке РСТ/AU2020/050359 и показано на схеме 3 ниже. Такие соединения подходят для визуализации клеточной гибели, например, для наблюдения за развитием состояния, связанного с клеточной гибелью, например неопластического состояния, такого как опухоль или рак, или для наблюдения за эффективностью лечения. Такое изображение может быть выполнено, например, посредством позитронно-эмиссионной томографии.

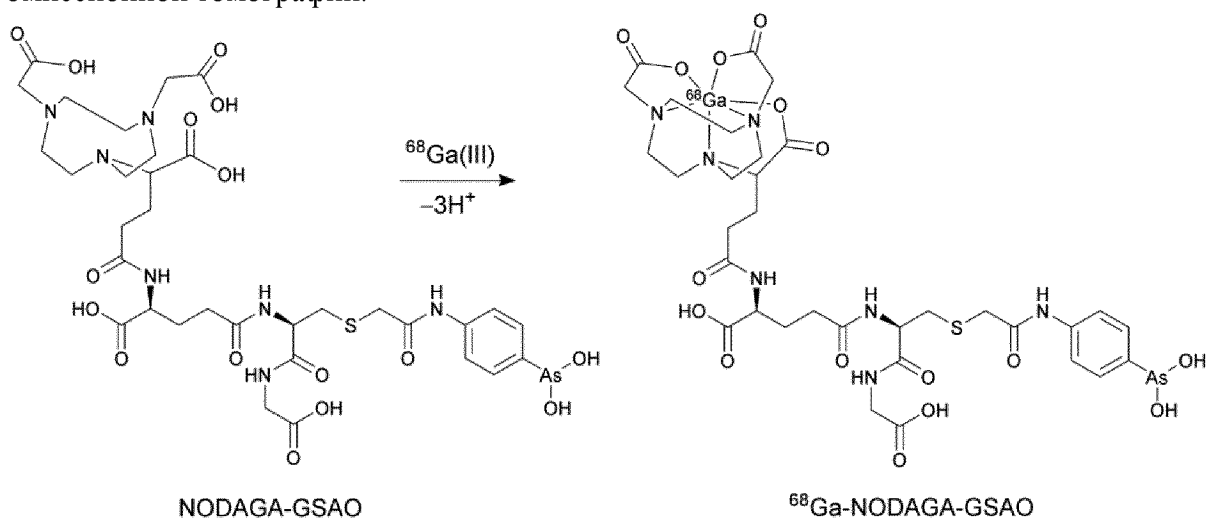


схема 3

[0205] Способы и процедуры следующих примеров, описанные в отношении ^{68}Ga , могут быть применены к соединениям, содержащим терапевтический радиоизотоп, как описано в данном документе, с *соответствующими изменениями*. Однако мечение ^{177}Lu или ^{67}Cu можно проводить без стадий от а) до с), g) и h) и ниже (т. е. без использования колонки SCX; радиоизотоп добавляется в NODAGA-GSAO без начального катионного обмена).

[0206] а) Цилиндр колонки BondElute SCX был обрезан таким образом, чтобы при вставке зазубренная внутренняя резьба Люэра располагалась непосредственно над средой колонки для создания картриджа (далее именуемого картриджем SCX). Зазубренная внутренняя резьба Люэра должна быть прочно и надежно вставлена в обрезанный цилиндр колонки BondElute SCX, чтобы создать герметичный картридж, непроницаемый для воздуха и жидкости.

[0207] б) Картридж SCX был притеран 1 мл 5,5 М HCl, а затем промыт 10 мл воды.

[0208] с) Картридж SCX продували воздухом.

[0209] d) Раствор аскорбиновой кислоты (0,25 М) получали растворением 44 мг аскорбиновой кислоты в 1 мл воды (Water Ultrapur, Merck).

[0210] e) Ацетатно-натриевый буфер (1,5 М $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, pH 4,5) получали путем растворения 10,21 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в воде (Water Ultrapur, Merck). pH доводили до pH 4,5 с помощью ледяной уксусной кислоты и добавляли воду до общего объема 50 мл.

[0211] f) Один флакон с 54 мкг NODAGA-GSAO, полученный в примере 1, размораживали и смешивали со 100 мкл раствора аскорбиновой кислоты (используемого в качестве поглотителя свободных радикалов, поскольку GSAO чувствителен к радиолизу и окислению), 250 мкл натрий-ацетатного буфера и 3,5 мл воды, и смесь переносили в вакуумированный стеклянный реакционный флакон объемом 10 мл.

[0212] g) ^{68}Ga элюировали в соответствии с инструкциями поставщика на заполненный картридж SCX.

[0213] h) Картридж SCX продували воздухом.

[0214] i) Содержимое картриджа SCX элюировали в реакционный флакон 500 мкл элюирующей смеси NaCl/HCl , а затем 0,5 мл воздуха, используя иглы B. Braun Sterican, чтобы свести к минимуму выщелачивание ионов металлов из игл. Содержимое реакционного флакона быстро перемешивали и оставляли для реакции при комнатной температуре в течение 10 минут.

[0215] j) В реакционный флакон добавляли 3 мл фосфатного буфера. Содержимое реакционного флакона отбирали шприцем объемом 10 мл и пропускали через фильтр 0,22 мкм в новый стерильный флакон, получая конечный продукт для инъекции. Последующая очистка продукта не проводилась, поскольку ^{68}Ga -NODAGA-GSAO не задерживался в значительной степени на картриджах C-18, а подходящая биосовместимая система картридж/растворитель для последующей очистки не была идентифицирована. Несмотря на это, описанный способ обеспечивает ^{68}Ga -NODAGA-GSAO высокой радиохимической чистоты и удельной активности, превышающей текущие требования к выпуску радиофармпрепаратов ^{68}Ga .

[0216] k) Для описанной выше процедуры используется стерильная закрытая система мечения радиоактивным изотопом, которая предпочтительнее для подготовки к использованию человеком, а также для сведения к минимуму риска радиоактивного заражения оператора и окружающей среды (фиг. 18). Это также можно автоматизировать с помощью модуля радиохимического синтеза.

Чистота ^{68}Ga -NODAGA-GSAO

[0217] l) Радиохимическую чистоту ^{68}Ga -NODAGA-GSAO (приблизительно 100 мкл образца конечного продукта, полученного на стадии h) выше) оценивали с помощью системы ВЭЖХ С при 9-9-60% подвижной фазы В (ацетонитрила) в подвижной фазе А (0,1% TFA в сверхчистой воде) в течение 0-6-10 минут с использованием радиометрического обнаружения. Для определения радиохимической чистоты использовали AUC пика ^{68}Ga -NODAGA-GSAO по сумме всех радиометрических пиков, более чем в три раза превышающую фон. Поглощение также измеряли при 210 и 280 нм; однако молярные количества были ниже пределов надежного определения поглощения и

поэтому не использовались для оценки чистоты. ^{68}Ga -NODAGA-GSAO элюировали со временем удерживания примерно 3 минуты 55 секунд, как показано на радиометрической хроматограмме ВЭЖХ конечного продукта на фиг. 19: область 1 соответствует ^{68}Ga , область 2 соответствует продуктам окисления, а область 3 соответствует ^{68}Ga -NODAGA-GSAO. Критерий высвобождения, использованный для радиохимической чистоты ^{68}Ga -NODAGA-GSAO в конечном продукте, составлял $\geq 91\%$ (European Pharmacopeia (2016) 01/2013:2482 Gallium (^{68}Ga) Edotreotide injection correct 8.6. European Pharmacopeia, 9th edn, pp 1150-1152).

[0218] м) Дальнейшую оценку радиохимической чистоты ^{68}Ga -NODAGA-GSAO проводили путем реакции 200 мкл конечного продукта с 5 мкл раствора DMP/DMCO при комнатной температуре при периодическом перемешивании в течение 10 минут. Приблизительно 100 мкл этой смеси оценивали с помощью системы ВЭЖХ С при 9-9-60% подвижной фазы В (ацетонитрил) в подвижной фазе А (0,1% TFA в сверхчистой воде) в течение 0-6-10 минут с использованием радиометрического обнаружения. Пик DMP- ^{68}Ga -NODAGA-GSAO (с временем удерживания примерно 9 минут 30 секунд) по сумме всех радиометрических пиков, превышающий фон более чем в три раза, должен составлять $\geq 91\%$; поскольку DMP с очень высокой аффинностью связывается с фениларсоновым фрагментом ^{68}Ga -NODAGA-GSAO, это отменяет обычный пик ^{68}Ga -NODAGA-GSAO со временем удерживания приблизительно 3 минуты 55 секунд и приводит к появлению нового пика со временем удерживания примерно 9 минут 30 секунд. Это предоставляет конкретную информацию о радиохимической чистоте активного GSAO и позволяет отличить ^{68}Ga -NODAGA-GSAO от других продуктов, таких как окисленные продукты разложения GSAO. Однако это не включено в требуемые критерии выпуска, чтобы свести к минимуму потери продукта из-за разложения. Полученная хроматограмма радиометрической ВЭЖХ представлена на фиг. 20: область 1 соответствует нехелатированному ^{68}Ga , область 2 соответствует продуктам окисления, область 3 соответствует DMP- ^{68}Ga -NODAGA-GSAO.

[0219] н) Оценка коллоидных загрязнений проводилась методом мгновенной тонкослойной хроматографии, проявленной в 0,9% NaCl. Коллоидные примеси остались в происхождении, в то время как ^{68}Ga -NODAGA-GSAO имел $R_f > 0,5$. Критерий выброса коллоидных загрязнителей с общей радиоактивностью с $R_f \geq 0,5$ составлял $\geq 90\%$.

[0220] о) Период полувыведения определяли минимум четырьмя измерениями в течение 10 минут, выполненными на калибраторе дозы. В качестве критерия выброса использовался рассчитанный период полувыведения от 64 до 72 минут (определение периода полувыведения необходимо для подтверждения отсутствия значительного прорыва ^{68}Ge)

Испытания на стерильность и пирогенность

[0221] р) Стерильность и пирогенность были первоначально протестированы в аккредитованной лаборатории на трех серийных синтезах, чтобы подтвердить, что для процесса стерильность и пирогенность находятся в пределах руководств фармакопеи

(European Pharmacopeia (2016) 01/2013:2482 Gallium ^{68}Ga Edotreotide injection correct 8.6. European Pharmacopeia, 9th edn, pp 1150-1152). Последующие выборочные испытания препаратов проводят через равные промежутки времени.

ПРИМЕР 7

Фармацевтический состав ^{68}Ga -NODAGA-GSAO

[0222] Была получена композиция, содержащая ингредиенты в количествах, перечисленных в таблице 5 ниже.

Название ингредиента	Количество	Единица
Аскорбиновая кислота	4,4	мг
Натрий	95	мг
Фосфат	109	мг
Ацетат	22	мг
Хлорид	91	мг
^{68}Ga -NODAGA-GSAO	200	МБк

Таблица 5

ПРИМЕР 8

Биораспределение ^{68}Ga -NODAGA-GSAO

[0223] Биораспределение изучали на десяти здоровых самцах крыс (Lewis, Liverpool Hospital Animal Facility) в возрасте 6-8 недель. Пяти крысам вводили ^{68}Ga -NODAGA-GSAO. Крыс помещали по отдельности в клетку с непроницаемым абсорбирующим матом, и через 1 час после введения 5 крыс умерщвляли путем летальной передозировки диоксидом углерода. Сразу после смерти брали кровь путем пункции сердца. Две из 5 крыс были затем визуализированы с помощью PET-КТ (GE Discovery 710). PET-КТ включало КТ-сканирование (80 кВп, 20 мА, спиральный режим, толщина реконструированного среза 0,625 мм) с последующим PET-сканированием (2 положения слоя, 7,5 мин/положение слоя, матрица реконструкции 256×256, толщина среза 3,27 мм).

[0224] Затем всех крыс препарировали, отбирали образцы органов, взвешивали и подсчитывали в гамма-счетчике, а значение имп./мин. преобразовывали в МБк с использованием известного стандарта. Активность в оставшейся туше измеряли калибратором дозы.

[0225] Исследования биораспределения проводились еще на 5 крысах через два часа после введения ^{68}Ga -NODAGA GSAO.

[0226] Инъекционную активность корректировали путем измерения остаточной активности, оставшейся в шприце после инъекции, в калибраторе дозы. Чтобы скорректировать любую дозу, излитую в месте инъекции, собирали хвост и активность в хвосте вычитали из введенной активности. Все расчеты были скорректированы на затухание с использованием времени впрыска в качестве эталона.

[0227] Биораспределение выражали как %ID/г и %ID/орган. % оставшейся активности представлял собой сумму всей активности во всех отдельно взятых органах, а

также активность в оставшейся туше в процентах от введенной дозы. % восстановленной активности представлял собой сумму всей активности во всех отдельно взятых органах, а также активности в оставшейся туше и активности, выделенной в непроницаемом мате, в процентах от введенной дозы.

Результаты

[0228] Крысы весили в среднем 170 г (диапазон 120-229 г, стандартное отклонение 32,2 г). Средняя введенная активность составила 27,3 МБк (диапазон 18,9-38,6 МБк, стандартное отклонение 7,4 МБк).

[0229] Для группы с 1-часовым биораспределением среднее время поглощения составило 62,6 (диапазон 60-65) минут, а для группы с 2-часовым биораспределением среднее время поглощения составило 122,2 (диапазон 120-126) минут.

[0230] На фиг. 21 показано биораспределение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в органах (%ID/г) у здоровых самцов крыс через 1 и 2 часа после введения $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$.

[0231] Как видно на фиг. 21, самая высокая концентрация $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ находится в почках, а органами с наибольшим поглощением $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ являются почки, печень и тонкий кишечник. Высокое почечное и печеночное поглощение согласуется с почечной экскрецией и печеночным метаболизмом, в то время как поглощение в тонкой кишке, вероятно, отражает поглощение мертвыми и умирающими эпителиальными клетками тонкой кишки.

[0232] Через 1 час у животного сохранялось 32,4% (диапазон 24,9-38,2%, стандартное отклонение 5,6%) введенной активности, а через 2 часа 21,4% (диапазон 11,2-32,1%, стандартное отклонение 7,5%) введенной активности. Общая средняя общая восстановленная активность через 1 час составила 84,9% (диапазон 55,3-107,9%, стандартное отклонение 19,0%), а через 2 часа общая восстановленная активность составила 75,3% (диапазон 50,0-120,9%, стандартное отклонение 27,2%) введенной активности.

Визуализация

[0233] Изображения PET-КТ продемонстрировали результаты, согласующиеся с количественными данными биораспределения. На фиг. 22 показаны проекции максимальной интенсивности PET-КТ с $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$, выполненные а) через 1 час и б) через 2 часа после введения индикатора ($^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$). Изображения, полученные через час после введения индикатора, демонстрируют высокую концентрацию индикатора в почках (стрелки i) на фиг. 22 а) и б)), с более низкими уровнями поглощения в печени (стрелки ii)). Остаточная активность пула крови в средостении (стрелка iii) аналогична активности печени. На изображениях, полученных через 2 часа после введения (фиг. 22b), снова наблюдается высокая концентрация индикатора в почках с более низким уровнем поглощения в печени. В средостении больше нет видимой активности пула крови. В обоих наборах изображений наблюдается поглощение в тонкой кишке (стрелка iv)) и в пластинках роста (стрелка v)), вероятно, из-за специфического поглощения в местах высокой физиологической гибели клеток.

ПРИМЕР 9**Радиационная дозиметрия**

[0234] Полученные выше данные о биораспределении использовались для оценки дозиметрии излучения человека с использованием методов, описанных Stabin для стандартного здорового мужчины (Stabin and Siegel 2003). %ID/г для заданного стандартного мужского органа экстраполировали из данных биораспределения крыс с использованием следующего уравнения:

$$\left(\frac{\%ID}{\text{Орган}}\right)_{\text{человек}} = \left[\left(\frac{\%ID}{g_{\text{орган}}}\right) \times (g_{ТВ\text{масса}})_{\text{животное}} \right] \times \left(\frac{g_{\text{орган}}}{g_{ТВ\text{масса}}}\right)_{\text{человек}}$$

[0235] Моноэкспоненциальные кривые клиренса для каждого органа и общего количества оставшихся тканей были подобраны с использованием инструментов в программном обеспечении OLINDA/EXM. Учитывая быстрое выведение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$, предполагалось, что вся экскреция происходит с мочой (т. е. время полувыведения с мочой рассчитывали с использованием моноэкспоненциальной аппроксимации и предполагалось, что оно составляет 1% от общей сохраненной активности в каждый момент времени). Для модели мочевого пузыря предполагалось, что пациенты будут опорожняться через 1 час после введения.

[0236] Эффективная доза на все тело оценивалась в $2,13\text{E-}02$ мЗв/МБк. Если предположить, что введенная активность составляет 150 МБк, это дает эффективную дозу для всего тела 3,2 мЗв, что ниже, чем при диагностической КТ брюшной полости, и ниже, чем при КТ с FDG-PET. Расчетные дозы облучения отдельных органов человека приведены в таблице 6 ниже (ULI=верхние отделы толстой кишки, LLI=нижние отделы толстой кишки).

Целевой орган	Альфа	Бета	Фотон	Всего	ED прод.
Надпочечники	0,00E000	2,13E-03	1,89E-03	4,02E-03	2,01E-05
Головной мозг	0,00E000	8,15E-04	5,73E-04	1,39E-03	6,94E-06
Молочные железы	0,00E000	2,13E-03	8,94E-04	3,02E-03	1,51E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E000	2,13E-03	2,15E-03	4,28E-03	0,00E000
Стенка LLI	0,00E000	2,13E-03	5,09E-03	7,23E-03	8,67E-04
Тонкий кишечник	0,00E000	5,18E-03	3,03E-03	8,21E-03	4,10E-05
Стенка желудка	0,00E000	2,61E-03	1,61E-03	4,22E-03	5,06E-04
Стенка ULI	0,00E000	2,53E-03	2,63E-03	5,16E-03	2,58E-05
Стенка сердца	0,00E000	3,09E-03	1,55E-03	4,65E-03	0,00E000
Почки	0,00E000	2,27E-02	3,56E-03	2,62E-02	1,31E-04
Печень	0,00E000	4,76E-03	2,04E-03	6,80E-03	3,40E-04
Легкие	0,00E000	5,42E-03	1,38E-03	6,80E-03	8,16E-04

Мышца	0,00E000	2,13E-03	2,04E-03	4,18E-03	2,09E-05
Яичники	0,00E000	2,13E-03	4,89E-03	7,02E-03	1,40E-03
Поджелудочная железа	0,00E000	3,87E-03	2,03E-03	5,90E-03	2,95E-05
Красный костный мозг	0,00E000	1,49E-03	1,89E-03	3,38E-03	4,05E-04
Остеогенные клетки	0,00E000	3,31E-03	1,67E-03	4,98E-03	4,98E-05
Кожа	0,00E000	2,13E-03	1,06E-03	3,19E-03	3,19E-05
Селезенка	0,00E000	4,05E-03	1,86E-03	5,91E-03	2,95E-05
Яички	0,00E000	2,21E-03	3,49E-03	5,69E-03	0,00E000
Вилочковая железа	0,00E000	4,48E-03	1,36E-03	5,84E-03	2,92E-05
Щитовидная железа	0,00E000	2,13E-03	1,15E-03	3,28E-03	1,64E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	2,84E-01	3,92E-02	3,24E-01	1,62E-02
Матка	0,00E000	2,13E-03	9,42E-03	1,15E-02	5,77E-05
Весь организм	0,00E000	2,68E-03	1,93E-03	4,61E-03	0,00E000

Таблица 6**Обсуждение**

[0237] Как показано в вышеописанных экспериментах, $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ имеет выгодные характеристики визуализации, с относительно небольшим вмешательством в физиологическую почечную и печеночную активность. Кроме того, быстрый клиренс предполагает, что визуализация через 1-2 часа после инъекции возможна и, таким образом, хорошо подходит для использования ^{68}Ga (клинически для визуализации экспрессии рецептора соматостатина на основе ^{68}Ga визуализацию проводят через 45-90 минут после инъекции). Следует отметить, что на ПЕТ/КТ-изображениях $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ (фиг. 22) визуализируется поглощение в тонком и толстом кишечнике, а также в пластинках роста длинных костей, что может отражать поглощение в областях с высокой скоростью физиологической гибели клеток. Внешние изображения подтверждаются измеренным распределением, и в отличие от некоторых других органов (особенно печени и почек) поглощение выше через 2 часа, чем через один час после инъекции, что позволяет предположить, что поглощение в кишечнике может представлять собой специфическое связывание, а не неспецифическую диффузию индикатора.

[0238] Предполагаемая радиационная дозиметрия человека является благоприятной, с расчетной эффективной дозой для всего тела в 0,021 мЗв/МБк, что, при условии, что стандартная инъекционная доза составляет 150 МБк, обеспечивает эффективную дозу для всего тела в 3,2 мЗв. Органом ограничения дозы является стенка мочевого пузыря с дозой 0,32 мЗв/МБк.

[0239] Эти объединенные результаты предполагают, что $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ может быть многообещающим агентом для визуализации мертвых и умирающих клеток *in vivo*, и это оправдано в исследованиях на людях.

ПРИМЕР 10

Исследования на людях

[0240] Следующие пациенты получали от 200 до 207 МБк $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$:

1. мужчина 66 лет с плоскоклеточным раком пищевода
2. женщина 73 лет с метастатическим раком яичников
3. мужчина 66 лет с метастатическим плоскоклеточным раком кожи
4. женщина 81 года с инвазивной протоковой карциномой молочной железы.

[0241] Все субъекты хорошо переносили исследование, без связанных или несвязанных серьезных нежелательных явлений или нежелательных явлений. Значимых изменений клинических, лабораторных и электрокардиографических показателей не было.

Биораспределение

[0242] Данные биораспределения демонстрируют быстрое внутрисосудистое распределение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ с быстрым начальным клиренсом, за которым следует вторая, более медленная фаза клиренса из пула крови. Происходит быстрое поглощение и выведение почками.

[0243] Для пациента 1) % введенной дозы (%ID), выведенной с мочой, через 2 часа составил в среднем 30% (диапазон 19-38%), а через 3 часа - 48% (диапазон 21-71%). Результаты визуализации этого субъекта показаны на фиг. 23, на котором показаны передние проекции максимальной интенсивности PET с $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в 8 временных точках; передняя максимальная проекция FDG PET показана внизу для сравнения. Местоположение опухоли указано стрелкой в каждый момент времени. В остальных органах наблюдаются низкие уровни захвата индикаторов, которые со временем постепенно снижаются (кроме яичек и толстой кишки). Гепатобилиарная экскреция отсутствует. Активность в головном мозге почти отсутствует, что позволяет предположить, что он ни в какой степени не преодолевает гематоэнцефалический барьер. Результаты визуализации у пациентов 2-4 аналогичным образом показаны на фиг. 24 (пациент 2), фиг. 25 (пациент 3), фиг. 26 (пациент 4).

[0244] На фиг. 27 показано биораспределение $^{68}\text{Ga-NODAGA-GSAO}$ в нормальных органах с течением времени у пациента 1. В крови наблюдается начальное быстрое снижение концентрации, за которым следует вторая, более медленная фаза клиренса. В большинстве органов наблюдается ранний пик, за которым следует постепенное снижение, аналогичное второй фазе клиренса крови, за исключением толстой кишки и яичек, в которых наблюдается начальное увеличение концентрации примерно до 40 минут после введения, а затем медленное снижение. Это может быть связано с более высокой физиологической скоростью гибели клеток в этих двух органах. Обратите внимание, что стенку мочевого пузыря оценивали отдельно.

[0245] Паттерны биораспределения в органах и тканях были одинаковыми у субъектов 1-4 (как показано на фиг. 32). Все они продемонстрировали быстрое распределение $^{68}\text{Ga NODAGA GSAO}$ через пул крови после инъекции с быстрым поглощением и выведением почками. Через 1 час после инъекции в почках была самая

высокая концентрация ^{68}Ga NODAGA GSAO ($4,85 \pm 0,70$; среднее значение $\text{SUV} \pm \text{SD}$, SUV =стандартное значение поглощения) с относительно низкими уровнями ^{68}Ga NODAGA GSAO в других тканях и органах, которые со временем исчезли. Толстая кишка имеет следующую по величине концентрацию ^{68}Ga NODAGA GSAO ($3,00 \pm 0,62$), за ней следуют пул крови ($2,31 \pm 0,37$) и желудок ($2,05 \pm 1,34$).

[0246] На фиг. 28-31 показано биораспределение ^{68}Ga NODAGA GSAO в выбранных нормальных тканях и опухоли для пациентов 1-4 соответственно. Обратите внимание, что опухоль 2 применима только к пациентам 3 и 4, поэтому на фиг. 28 и 29 она пуста. На фиг. 32 показано биораспределение в выбранных нормальных тканях (среднее значение $\text{SUV} \pm \text{SD}$) субъектов 1-4.

Радиационная дозиметрия

[0247] Эффективную дозу для всего тела оценивали путем построения репрезентативных сферических объемов внутри органов, оценки $\%ID/g$ для каждого органа и последующего расчета $\%ID/\text{organ}$ с использованием веса органов стандартной взрослой модели.

[0248] Эффективная доза на все тело от ^{68}Ga NODAGA GSAO для субъектов 1-4 варьировалась от $2,16 \times 10^{-2}$ до $3,38 \times 10^{-2}$ мЗв/МБк, что дает расчетную эффективную дозу на все тело в диапазоне от 13,5 до 15,9 мЗв для используемого протокола в первом исследовании на людях. Подробная органная дозиметрия для ^{68}Ga NODAGA GSAO показана для четырех субъектов (таблицы 7-10). Во всех случаях дозоограничивающим органом был мочевой пузырь. Для последующих исследований на людях потребуется меньшее количество временных точек, что уменьшит потребность в низкодозовых КТ, что снизит общую дозу облучения. Доза находится на уровне, сравнимом со многими обычными процедурами медицинской визуализации с использованием ионизирующего излучения, включая рентгеновскую компьютерную томографию (КТ), СPECT/КТ и PET/КТ.

[0249] Для субъектов 1-4 радиационная дозиметрия была рассчитана с использованием Olinda/EXM на основе биораспределения органов, описанного выше. Экскреция с мочой моделировалась на основе измерения активности в собранных образцах мочи, а объем мочи измерялся по изображениям.

[0250] В таблицах 7-10 показана оценка радиационной дозиметрии для субъектов 1-4 200 МБк ^{68}Ga NODAGA GSAO для отдельных органов и для всего тела в мЗв/МБк (EDE cont.=вклад эффективного эквивалента дозы, ED Cont.=вклад эффективной дозы). Оценочная доза на все тело от одной (1) КТ с низкой дозой и двух (2) КТ со сверхнизкой дозой составила 9,2 мЗв.

[0251] В таблице 7 показана оценка радиационной дозиметрии для субъекта 1. Общая расчетная доза облучения для субъекта 1 составила 14,5 мЗв.

Таблица 7

Целевой орган	Альфа	Бета	Фотон	Всего	EDE прод.	ED прод.

Надпочечники	0,00E+00	9,68E-03	4,52E-03	1,42E-02	2,68E-04	7,09E-05
Головной мозг	0,00E+00	6,82E-04	1,14E-03	1,82E-03	0,00E+00	9,10E-06
Молочные железы	0,00E+00	5,07E-03	2,11E-03	7,16E-03	1,08E-03	3,59E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E+00	3,48E-03	4,59E-03	8,07E-03	0,00E+00	0,00E+00
Стенка LLI	0,00E+00	1,29E-02	7,31E-03	2,02E-02	1,03E-03	2,43E-03
Тонкий кишечник	0,00E+00	9,17E-03	5,21E-03	1,44E-02	0,00E+00	7,19E-05
Стенка желудка	0,00E+00	6,13E-03	3,93E-03	1,01E-02	0,00E+00	1,21E-03
Стенка ULI	0,00E+00	7,04E-03	5,20E-03	1,22E-02	0,00E+00	6,12E-05
Стенка сердца	0,00E+00	6,65E-03	3,57E-03	1,02E-02	0,00E+00	0,00E+00
Почки	0,00E+00	4,32E-02	7,22E-03	5,04E-02	3,03E-03	2,52E-04
Печень	0,00E+00	1,27E-02	4,84E-03	1,76E-02	5,09E-04	8,78E-04
Легкие	0,00E+00	5,19E-03	2,93E-03	8,12E-03	9,74E-04	9,74E-04
Мышцы	0,00E+00	6,19E-03	3,51E-03	9,71E-03	0,00E+00	4,85E-05
Яичники	0,00E+00	3,15E-03	7,00E-03	1,01E-02	1,50E-03	1,20E-03
Поджелудочная железа	0,00E+00	1,20E-02	4,90E-03	1,69E-02	8,14E-04	8,46E-05
Красный костный мозг	0,00E+00	5,39E-03	3,70E-03	9,08E-03	1,09E-03	1,09E-03
Остеогенные клетки кости	0,00E+00	7,79E-03	3,47E-03	1,12E-02	3,38E-04	1,12E-04
Кожа	0,00E+00	3,15E-03	2,03E-03	5,17E-03	0,00E+00	5,17E-05
Селезенка	0,00E+00	1,27E-02	4,57E-03	1,73E-02	5,68E-04	8,65E-05
Яички	0,00E+00	1,37E-02	4,58E-03	1,83E-02	4,56E-03	3,65E-03
Вилочковая железа	0,00E+00	3,15E-03	2,96E-03	6,11E-03	0,00E+00	3,06E-05
Щитовидная железа	0,00E+00	1,12E-02	2,86E-03	1,41E-02	4,23E-04	7,05E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E+00	2,52E-01	4,05E-02	2,93E-01	1,76E-02	1,46E-02

пузыря						
Матка	0,00E+00	8,21E-03	1,06E-02	1,89E-02	5,83E-04	9,43E-05
Весь организм	0,00E+00	6,33E-03	3,44E-03	9,78E-03	0,00E+00	0,00E+00
Эффективная доза						2,63E-02

[0252] В таблице 8 показана оценка радиационной дозиметрии для субъекта 2. Общая предполагаемая доза облучения субъекта 2 составила 13,9 мЗв.

Таблица 8

Целевой орган	Альфа	Бета	Фотон	Всего	EDE прод.	ED прод.
Надпочечники	0,00E+00	9,53E-03	5,24E-03	1,48E-02	0,00E+00	7,38E-05
Головной мозг	0,00E+00	6,40E-04	1,46E-03	2,10E-03	0,00E+00	1,05E-05
Молочные железы	0,00E+00	9,48E-03	2,76E-03	1,22E-02	1,84E-03	6,12E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E+00	4,69E-03	5,27E-03	9,96E-03	0,00E+00	0,00E+00
Стенка LLI	0,00E+00	1,37E-02	7,16E-03	2,08E-02	1,25E-03	2,50E-03
Тонкий кишечник	0,00E+00	1,27E-02	5,57E-03	1,83E-02	0,00E+00	9,14E-05
Стенка желудка	0,00E+00	1,15E-02	4,97E-03	1,65E-02	0,00E+00	1,98E-03
Стенка ULI	0,00E+00	1,19E-02	6,02E-03	1,79E-02	0,00E+00	8,97E-05
Стенка сердца	0,00E+00	8,27E-03	4,29E-03	1,26E-02	0,00E+00	0,00E+00
Почки	0,00E+00	4,21E-02	7,59E-03	4,97E-02	2,98E-03	2,48E-04
Печень	0,00E+00	1,45E-02	5,51E-03	2,00E-02	0,00E+00	1,00E-03
Легкие	0,00E+00	5,73E-03	3,54E-03	9,27E-03	1,11E-03	1,11E-03
Мышцы	0,00E+00	6,08E-03	3,83E-03	9,91E-03	0,00E+00	4,95E-05
Яичники	0,00E+00	4,69E-03	6,95E-03	1,16E-02	2,91E-03	2,33E-03
Поджелудочная железа	0,00E+00	1,62E-02	5,90E-03	2,21E-02	1,32E-03	1,10E-04
Красный костный мозг	0,00E+00	6,61E-03	4,24E-03	1,08E-02	1,30E-03	1,30E-03
Остеогенные клетки кости	0,00E+00	1,14E-02	4,14E-03	1,55E-02	4,65E-04	1,55E-04

Кожа	0,00E+00	4,69E-03	2,32E-03	7,01E-03	0,00E+00	7,01E-05
Селезенка	0,00E+00	1,48E-02	5,34E-03	2,02E-02	1,21E-03	1,01E-04
Вилочковая железа	0,00E+00	4,69E-03	3,66E-03	8,36E-03	0,00E+00	4,18E-05
Щитовидная железа	0,00E+00	1,19E-02	3,24E-03	1,52E-02	4,55E-04	7,59E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E+00	1,84E-01	3,21E-02	2,16E-01	1,30E-02	1,08E-02
Матка	0,00E+00	4,69E-03	8,98E-03	1,37E-02	0,00E+00	6,84E-05
Весь организм	0,00E+00	7,76E-03	3,84E-03	1,16E-02	0,00E+00	0,00E+00
Эффективная доза						2,35E-02

[0253] В таблице 9 показана оценка радиационной дозиметрии для субъекта 3. Общая предполагаемая доза облучения субъекта 3 составила 13,5 мЗв.

Таблица 9

Целевой орган					EDE	ED прод.
					прод.	
Надпочечники	0,00E+00	5,97E-03	3,71E-03	9,68E-03	0,00E+00	4,84E-05
Головной мозг	0,00E+00	6,13E-04	8,65E-04	1,48E-03	0,00E+00	7,39E-06
Молочные железы	0,00E+00	2,02E-03	1,59E-03	3,61E-03	5,41E-04	1,80E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E+00	2,02E-03	4,07E-03	6,09E-03	0,00E+00	0,00E+00
Стенка LLI	0,00E+00	1,44E-02	5,96E-03	2,03E-02	1,22E-03	2,44E-03
Тонкий кишечник	0,00E+00	8,73E-03	4,29E-03	1,30E-02	0,00E+00	6,51E-05
Стенка желудка	0,00E+00	4,31E-03	3,12E-03	7,43E-03	0,00E+00	8,91E-04
Стенка ULI	0,00E+00	2,02E-03	4,00E-03	6,02E-03	0,00E+00	3,01E-05
Стенка сердца	0,00E+00	4,65E-03	2,82E-03	7,48E-03	0,00E+00	0,00E+00
Почки	0,00E+00	4,45E-02	6,83E-03	5,13E-02	3,08E-03	2,57E-04
Печень	0,00E+00	1,20E-02	4,36E-03	1,64E-02	9,84E-04	8,20E-04
Легкие	0,00E+00	5,16E-03	2,37E-03	7,53E-03	9,04E-04	9,04E-04

Мышцы	0,00E+00	5,15E-03	2,83E-03	7,98E-03	0,00E+00	3,99E-05
Яичники	0,00E+00	2,02E-03	5,52E-03	7,54E-03	0,00E+00	0,00E+00
Поджелудочная железа	0,00E+00	1,13E-02	4,18E-03	1,54E-02	9,27E-04	7,72E-05
Красный костный мозг	0,00E+00	4,29E-03	2,96E-03	7,25E-03	8,70E-04	8,70E-04
Остеогенные клетки кости	0,00E+00	4,95E-03	2,74E-03	7,69E-03	2,31E-04	7,69E-05
Кожа	0,00E+00	2,02E-03	1,63E-03	3,66E-03	0,00E+00	3,66E-05
Селезенка	0,00E+00	1,09E-02	3,83E-03	1,47E-02	0,00E+00	7,35E-05
Яички	0,00E+00	1,22E-02	4,18E-03	1,64E-02	4,09E-03	3,27E-03
Вилочковая железа	0,00E+00	2,02E-03	2,30E-03	4,32E-03	0,00E+00	2,16E-05
Щитовидная железа	0,00E+00	8,46E-03	2,38E-03	1,08E-02	3,25E-04	5,42E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E+00	1,91E-01	2,79E-02	2,19E-01	1,31E-02	1,09E-02
Матка	0,00E+00	2,02E-03	8,36E-03	1,04E-02	0,00E+00	5,19E-05
Весь организм	0,00E+00	4,94E-03	2,77E-03	7,71E-03	0,00E+00	0,00E+00
Эффективная доза						2,16E-02

[0254] В таблице 10 показана оценка радиационной дозиметрии для субъекта 4. Общая предполагаемая доза облучения субъекта 4 составила 15,9 мЗв.

Таблица 10

Целевой орган	Альфа	Бета	Фотон	Всего	EDE прод.	ED прод.
Надпочечники	0,00E+00	1,30E-02	4,86E-03	1,79E-02	1,07E-03	8,93E-05
Головной мозг	0,00E+00	7,79E-04	1,23E-03	2,01E-03	0,00E+00	1,00E-05
Молочные железы	0,00E+00	6,43E-03	2,25E-03	8,68E-03	1,30E-03	4,34E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E+00	4,09E-03	4,46E-03	8,56E-03	0,00E+00	0,00E+00
Стенка LLI	0,00E+00	3,53E-03	8,79E-03	1,23E-02	0,00E+00	1,48E-03

Тонкий кишечник	0,00E+00	3,53E-03	5,67E-03	9,20E-03	0,00E+00	4,60E-05
Стенка желудка	0,00E+00	3,53E-03	4,01E-03	7,54E-03	0,00E+00	9,05E-04
Стенка ULI	0,00E+00	3,53E-03	5,50E-03	9,03E-03	0,00E+00	4,52E-05
Стенка сердца	0,00E+00	7,57E-03	3,84E-03	1,14E-02	0,00E+00	0,00E+00
Почки	0,00E+00	4,30E-02	7,33E-03	5,03E-02	3,02E-03	2,52E-04
Печень	0,00E+00	1,16E-02	4,71E-03	1,63E-02	0,00E+00	8,13E-04
Легкие	0,00E+00	4,82E-03	3,15E-03	7,97E-03	9,57E-04	9,57E-04
Мышцы	0,00E+00	7,68E-03	4,07E-03	1,18E-02	0,00E+00	5,88E-05
Яичники	0,00E+00	3,53E-03	8,79E-03	1,23E-02	3,08E-03	2,46E-03
Поджелудочна я железа	0,00E+00	1,18E-02	5,04E-03	1,69E-02	1,01E-03	8,44E-05
Красный костный мозг	0,00E+00	5,25E-03	4,13E-03	9,38E-03	1,13E-03	1,13E-03
Остеогенные клетки кости	0,00E+00	8,81E-03	3,80E-03	1,26E-02	3,78E-04	1,26E-04
Кожа	0,00E+00	3,53E-03	2,26E-03	5,79E-03	0,00E+00	5,79E-05
Селезенка	0,00E+00	1,18E-02	4,70E-03	1,65E-02	0,00E+00	8,27E-05
Вилочковая железа	0,00E+00	3,53E-03	3,23E-03	6,76E-03	0,00E+00	3,38E-05
Щитовидная железа	0,00E+00	1,34E-02	3,00E-03	1,64E-02	4,91E-04	8,18E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E+00	4,06E-01	6,85E-02	4,74E-01	2,85E-02	2,37E-02
Матка	0,00E+00	2,38E-02	1,51E-02	3,89E-02	2,33E-03	1,95E-04
Весь организм	0,00E+00	6,96E-03	3,92E-03	1,09E-02	0,00E+00	0,00E+00
Эффективная доза						3,38E-02

Поглощение опухолью

[0255] На фиг. 33 показана активность пула крови и поглощение ^{68}Ga NODAGA GSAO опухолевыми отложениями у субъектов 1-4 (примечание: у пациентов 3 и 4 имеется два опухолевых отложения, и они были проанализированы отдельно). В то время как пул крови и клиренс воспроизводимы, поглощение опухолью и клиренс зависят от

типа опухоли.

[0256] У субъектов 1-4 поглощение опухолью варьировало в зависимости от гистологии опухоли: высокие уровни поглощения наблюдались при плоскоклеточной карциноме пищевода (SUVсреднее 3,8) и метастатическом кожном плоскоклеточном раке (SUVсреднее 4,1), а более низкое поглощение наблюдалось при метастатической карциноме яичников (SUVсреднее 1,9) и раке молочной железы (SUVсреднее 1,8). Следует отметить, что у субъектов 3 и 4 было два опухолевых отложения, и они были проанализированы отдельно. Неудивительно, что разная гистология опухоли будет иметь разную скорость гибели клеток *de novo*. Чтобы подтвердить это, гистологическая корреляция гибели опухолевых клеток с поглощением опухолью ^{68}Ga NODAGA GSAO была выполнена на двух опухолевых отложениях у пациента 3 (одно с высоким поглощением ^{68}Ga NODAGA GSAO SUVсреднее 4,1 в правой подмышечной впадине, а другое с низким поглощением ^{68}Ga NODAGA GSAO SUVсреднее 2,7 в правом верхнем переднешейном треугольнике) (фиг. 34).

[0257] Рассеченные опухоли фиксировали в формалине, заливали в парафин и делали срезы толщиной 4 мкм. Смежные срезы окрашивали на наличие апоптотических клеток с использованием TUNEL (Abcam, № по каталогу 206386) или морфологически с использованием гематоксилина и эозина. Для окрашивания TUNEL срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в уменьшающихся концентрациях этанола и пермеабилizировали протеиназой К в течение 20 мин. при комнатной температуре. Активность эндогенной пероксидазы гасили 3% H_2O_2 в течение 5 мин. Апоптотические клетки метили биотинилированной терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой при 37°C во влажной камере в течение 2 ч. с последующей 30-минутной инкубацией с конъюгатом стрептавидин-HRP. HRP-положительные клетки были разработаны с использованием диаминобензидина и срезов, контрастно окрашенных метиловым зеленым (Sigma). Целые срезы визуализировали с помощью сканирования PowerMosaic с 10-кратным увеличением на микроскопе Leica DM6000D.

[0258] На фиг. 34 показаны изображения FDG-PET с максимальной интенсивностью в передней проекции (фиг. 34А), полученные через 60 мин. после введения 256 МБк FDG (фтордезоксиглюкоза), и CDI-PET (фиг. 34В), выполненные через 60 мин. после введения 205 МБк CDI (^{68}Ga NODAGA GSAO) у 66-летнего мужчины с метастатическим плоскоклеточным раком кожи (*пациент 3*). FDG-PET демонстрирует два интенсивно метаболически активных узловых метастаза, один в правой подмышечной впадине, а другой в правом верхнем переднем шейном треугольнике. Считается, что они представляют собой синхронные узловых метастазы двух разных кожных плоскоклеточных карцином (ранее иссеченных). CDI-PET (^{68}Ga NODAGA GSAO) демонстрирует интенсивное поглощение метастазами в правый подмышечный лимфатический узел (SUVmean=4,1) и слабое поглощение метастазами в правый передний шейный треугольник (SUVmean=1,7). Опухоли вырезали хирургическим путем,

фиксируют и соседние срезы окрашивали на апоптотические клетки (фиг. 34С, коричневая окраска TUNEL, а и b) или на морфологию гематоксилином и эозином (фиг. 34С, с и d). Стрелки в окрашивании TUNEL указывают на области обширного апоптоза.

[0259] Обратите внимание, что опухоли с высоким поглощением имеют поглощение в 2 раза больше, чем пул крови, и поглощение больше, чем поглощение во всех других органах, за исключением почечного тракта, который является путем экскреции. Этот высокий уровень поглощения в некоторых опухолях в сочетании с низким уровнем активности в здоровых тканях и органах демонстрирует потенциал использования ^{68}Ga NODAGA GSAO в качестве эффективного агента визуализации.

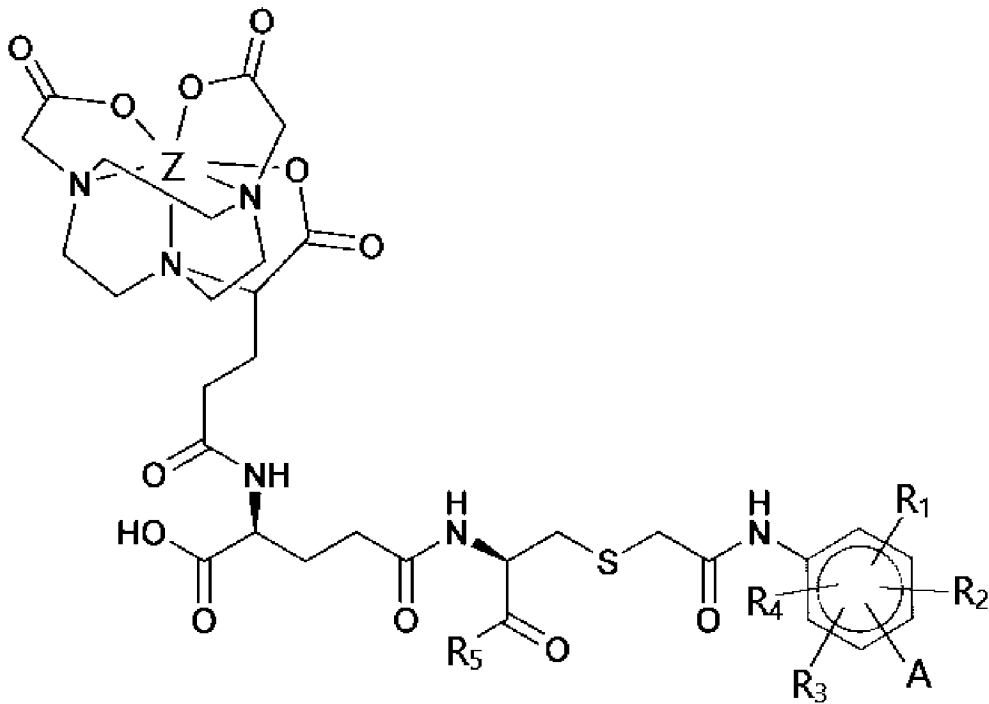
Обсуждение

[0260] Промежуточный анализ первых четырех пациентов в этом первом исследовании ^{68}Ga -NODAGA-GSAO на людях показывает, что он безопасен, хорошо переносится и не имеет побочных эффектов. Характеристики биораспределения и визуализации благоприятны при низком уровне активности в большинстве здоровых органов. Мочевыводящие пути являются единственным путем выведения. Наблюдается поглощение мертвыми и умирающими клетками опухоли, а поглощение ^{68}Ga -NODAGA-GSAO опухолью варьирует в соответствии с различной гистологией опухоли, и гистопатологически было продемонстрировано, что оно коррелирует с долей мертвых и умирающих клеток в опухоли. Эффективная доза для всего тела от ^{68}Ga NODAGA GSAO варьировалась от $2,16 \times 10^{-2}$ до $3,38 \times 10^{-2}$ мЗв/МБк, что дает предполагаемую эффективную дозу для всего тела в диапазоне от 4,3 до 6,8 мЗв для введенной активности 200 МБк. Это сравнимо со многими другими диагностическими радиофармпрепаратами, используемыми для ПЕТ/КТ и СПЕКТ/КТ, а также с эффективной дозой облучения всего тела при других радиологических процедурах, таких как рентгеновская компьютерная томография (КТ).

Раскрытие заявки РСТ №. РСТ/AU2020/050359 (опубликована как WO2020206503) включена в настоящее описание в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I),



Формула (I)

где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

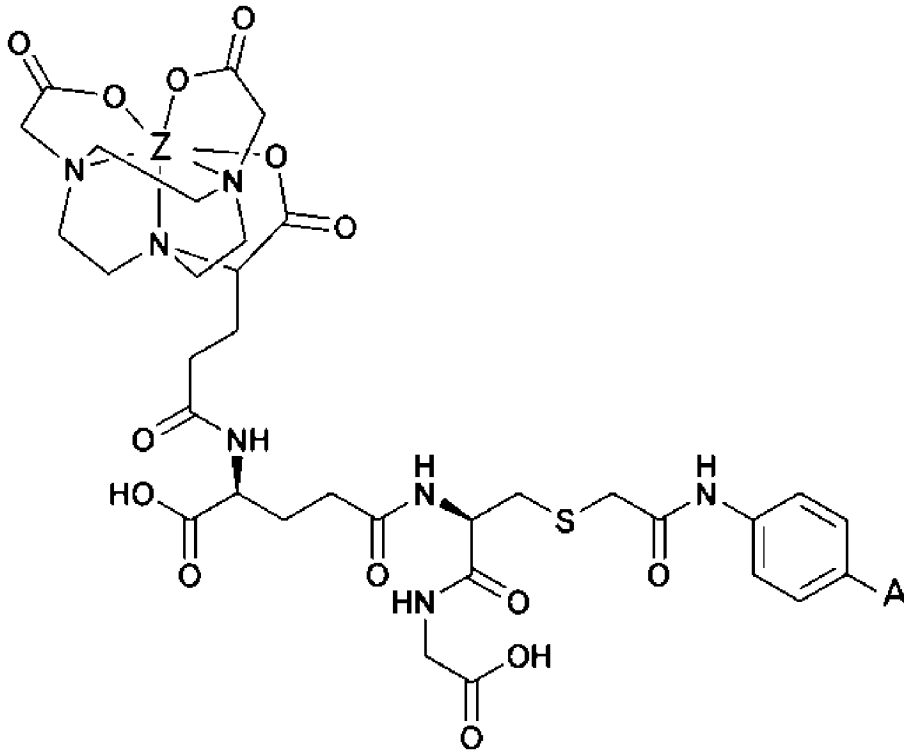
и Z представляет собой терапевтический радиоизотоп,

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

2. Соединение по п. 1, где каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H.

3. Соединение по п. 1 или п. 2, где R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, которое представляет собой соединение формулы (Ia),



Формула (Ia)

где A и Z определены в п. 1,

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, где Z представляет собой ^{177}Lu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re .

6. Соединение по п. 5, где Z представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu .

7. Соединение по любому из пп. 1-6 для применения в терапии.

8. Соединение для применения по п. 7, при этом соединение оказывает терапевтическое действие, индуцируя гибель клеток.

9. Соединение для применения по п. 8 для применения при лечении неопластического состояния.

10. Соединение для применения по п. 9, где неопластическое состояние представляет собой опухоль.

11. Соединение для применения по п. 10, при этом опухоль представляет собой солидную опухоль.

12. Соединение для применения по п. 9, где неопластическое состояние представляет собой рак.

13. Соединение для применения по любому из пп. 9-12, где соединение лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-6 вместе с фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом, разбавителем, средой-носителем и/или адьювантом.

15. Способ лечения неопластического состояния у субъекта, включающий введение

указанному субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6 или фармацевтической композиции по п. 14.

16. Способ по п. 15, при котором неопластическое состояние представляет собой опухоль.

17. Способ по п. 16, при котором опухоль представляет собой солидную опухоль.

18. Способ по п. 15, при котором неопластическое состояние представляет собой рак.

19. Способ по любому из пп. 15-18, при котором соединение по любому из пп. 1-6 или фармацевтическую композицию по п. 14 вводят внутривенно.

20. Способ по любому из пп. 17-21, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6 или фармацевтической композиции по п. 14 указанному субъекту в течение двух или более циклов, при этом эффективность введения в отношении неопластического состояния увеличивается в течение двух или более циклов.

21. Способ по любому из пп. 15-20, включающий:

а) проведение лечения указанного неопластического состояния у субъекта, кроме введения эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6 или фармацевтической композиции по п. 14 указанному субъекту; и

б) введение указанному субъекту эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6 или фармацевтической композиции по п. 14.

22. Способ по п. 21, при котором лечение, проводимое на стадии а), представляет собой химиотерапию, иммунотерапию, лучевую терапию и/или таргетную терапию.

23. Способ по п. 21 или п. 22, при котором стадию а) проводят одновременно со стадией б) или стадию б) проводят после стадии а).

24. Способ по любому из пп. 21-23, при котором стадию б) проводят в течение двух или более циклов.

25. Способ по п. 24, при котором эффективность стадии б) в отношении неопластического состояния увеличивается в течение двух или более циклов.

26. Способ по п. 24 или п. 25, при котором обе стадии а) и б) проводят в течение двух или более циклов.

27. Способ по любому из пп. 15-26, при котором соединение по любому из пп. 1-6 лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

28. Способ индуцирования гибели клеток у субъекта, включающий введение субъекту соединения по любому из пп. 1-6 или фармацевтической композиции по п. 14.

29. Способ по п. 28, при котором соединение по любому из пп. 1-6 или фармацевтическую композицию по п. 14 вводят субъекту в течение нескольких циклов, при этом степень индуцированной гибели клеток увеличивается в течение нескольких циклов.

30. Применение соединения по любому из пп. 1-6 в производстве лекарственного препарата для лечения неопластического состояния.

31. Применение по п. 30, при котором неопластическое состояние представляет

собой опухоль.

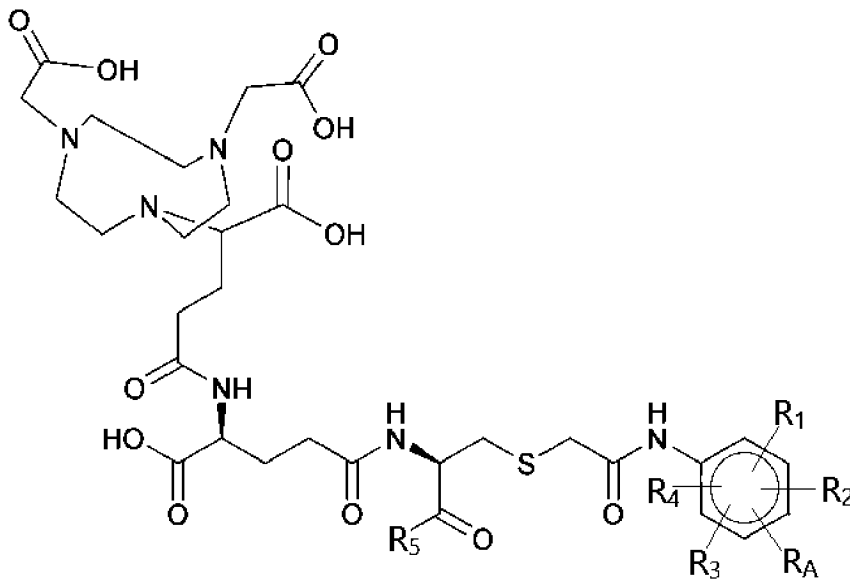
32. Применение по п. 31, при котором опухоль представляет собой солидную опухоль.

33. Применение по п. 30, при котором неопластическое состояние представляет собой рак.

34. Применение по любому из пп. 30-33, при котором лечение включает способ по любому из пп. 15-27.

35. Применение по любому из пп. 30-34, при котором лекарственный препарат лечит неопластическое состояние, индуцируя гибель клеток.

36. Способ получения соединения по любому из пп. 1-6, включающий добавление терапевтического радиоизотопа к соединению формулы (II)



Формула (II)

где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;

каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

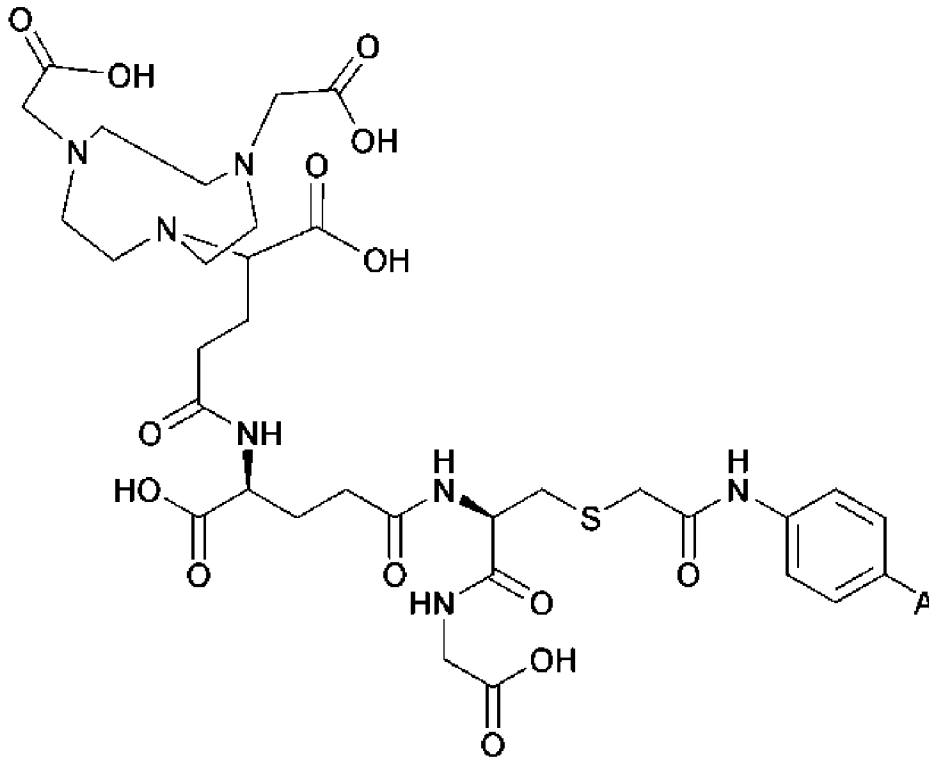
R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

37. Способ по п. 36, при котором каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляет собой H.

38. Способ по п. 36 или п. 37, при котором R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$.

39. Способ по любому из пп. 36-38, при котором соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIIa)



Формула (III)

где А имеет значение, определенное в п. 36,

или его фармацевтически приемлемая соль, сложный эфир, пролекарство или сольват.

40. Способ по любому из пп. 36-39, при котором терапевтический радиоизотоп представляет собой ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{186}Re или ^{188}Re .

41. Способ по п. 40, при котором терапевтический радиоизотоп представляет собой ^{177}Lu или ^{67}Cu .

42. Способ по любому из пп. 36-41, при котором соединение согласно формуле (II) представлено в буфере, где буфер имеет рН около 5,0.

43. Способ по любому из пп. 36-42, при этом способ включает элюирование терапевтического радиоизотопа на колонке с сильным катионообменом и элюирование с колонки с сильным катионообменом в соединение формулы (II).

44. Способ по любому из пп. 36-43, при котором терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии одного или более антиоксидантов.

45. Способ по п. 44, при котором один или более антиоксидантов содержат аскорбиновую кислоту.

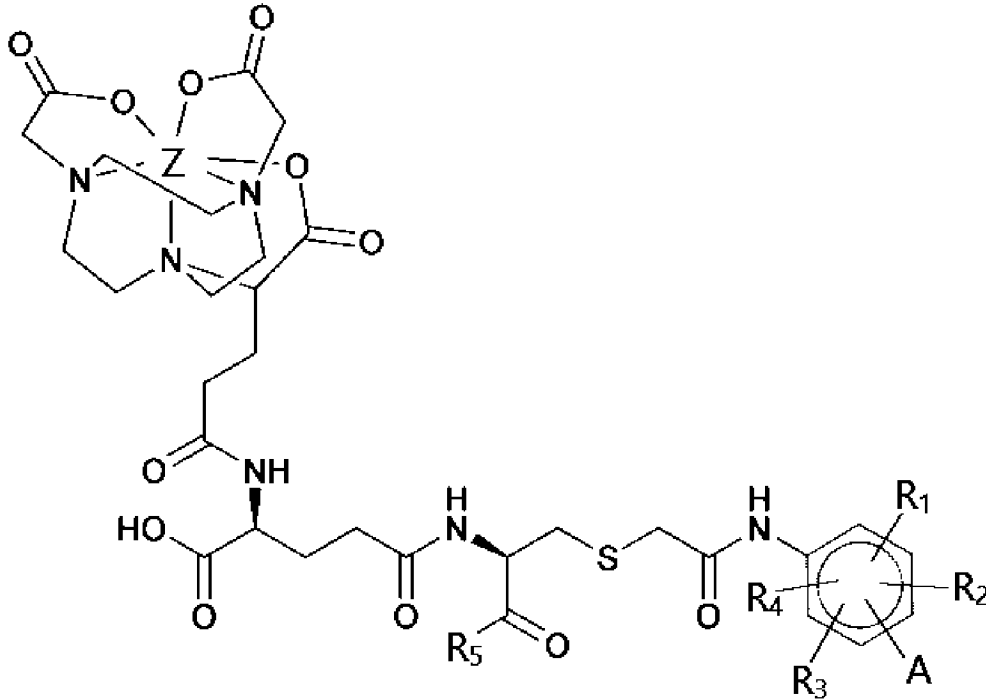
46. Способ по п. 45, при котором концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

47. Способ по любому из пп. 36-46, при котором терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии глутатиона.

48. Способ по п. 47, при котором терапевтический радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии как глутатиона, так и аскорбиновой кислоты.

49. Способ по п. 47 или п. 48, при котором концентрация глутатиона в реакционной смеси составляет около 0,01 М или выше.

50. Способ получения соединения формулы (I),



Формула (I)

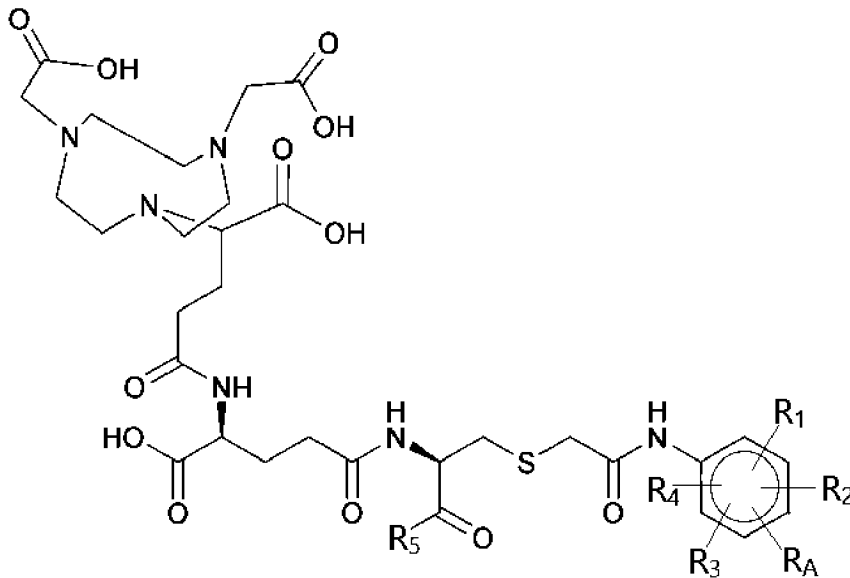
где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

и Z представляет собой радиоизотоп,

или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира, пролекарства или сольвата,

указанный способ включает добавление радиоизотопа к соединению формулы (II)



формула (II)

где А представляет собой $-\text{As}(\text{OH})_2$ или группу, эквивалентную арсеноксиду;
каждый из R_1 , R_2 , R_3 и R_4 независимо выбран из H, X, OH, NH_2 , CO, SCN, $-\text{CH}_2\text{NH}$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{NHCOCH}_2\text{X}$ или NO, и X представляет собой галоген;

R_5 представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, OH или OR_6 , где R_6 представляет собой C_{1-5} неразветвленную или разветвленную алкильную группу;

или его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира, пролекарства или сольвата,

где радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии глутатиона.

51. Способ по п. 50, при котором концентрация глутатиона в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

52. Способ по п. 50 или п. 51, при котором радиоизотоп добавляют к соединению формулы (II) в присутствии одного или более антиоксидантов.

53. Способ по п. 52, при котором один или более антиоксидантов содержат аскорбиновую кислоту.

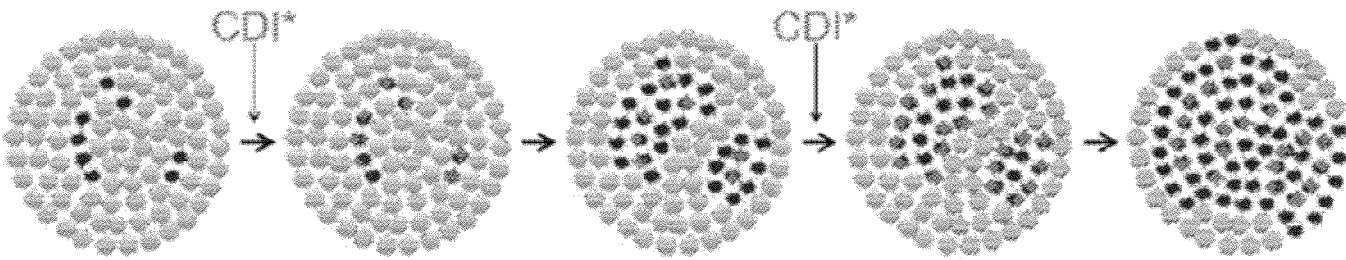
54. Способ по п. 53, при котором концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси составляет около 0,01 М или более.

55. Способ по любому из пп. 50-54, при котором радиоизотоп представляет собой терапевтический радиоизотоп по любому из пп. 1-6 и/или радиоизотоп с периодом полувыведения менее 4 суток.

56. Способ по п. 55, при котором радиоизотопом с периодом полувыведения менее 4 суток является ^{68}Ga .

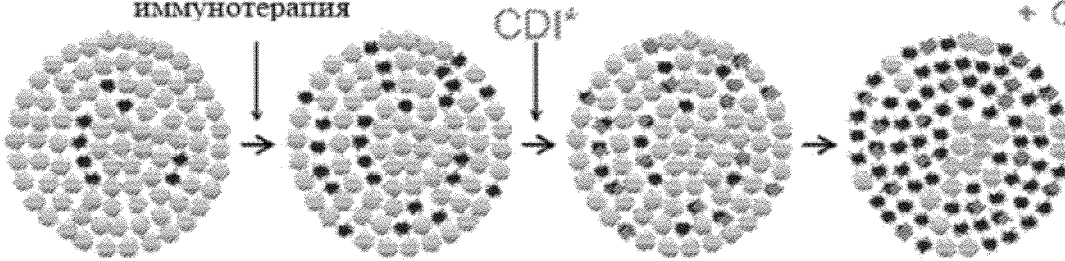
По доверенности

только действие CDI*



CDI* в сочетании с сенсбилизирующей терапией

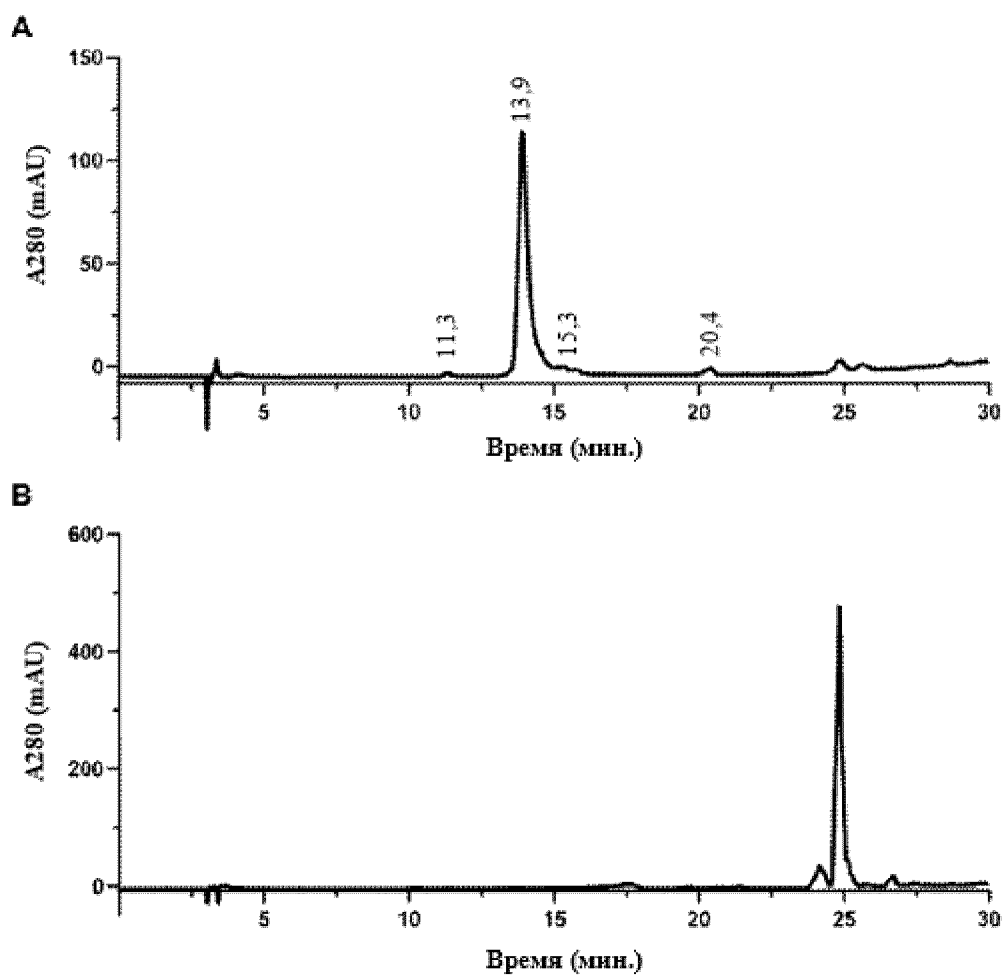
химио-, радио- или
иммунотерапия



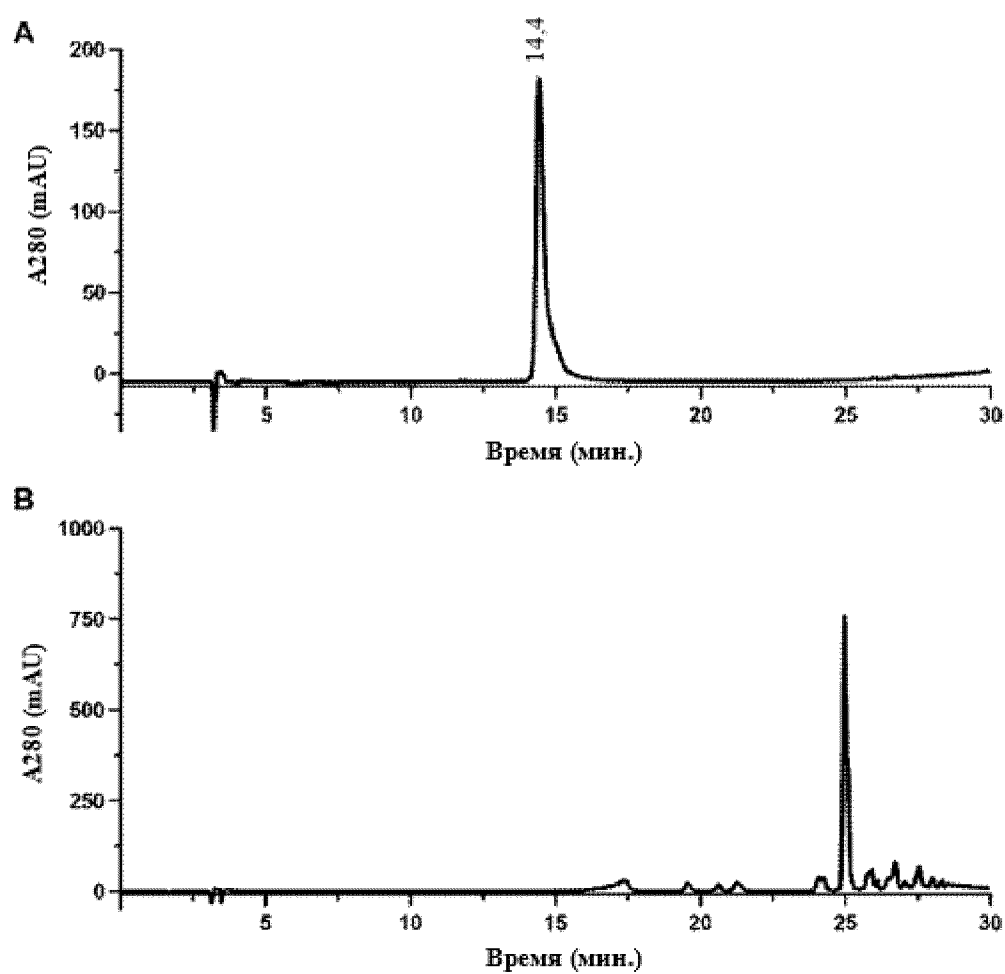
- жизнеспособная опухолевая клетка
- умирающая/мертвая опухолевая клетка
- + CDI*

Фиг. 1

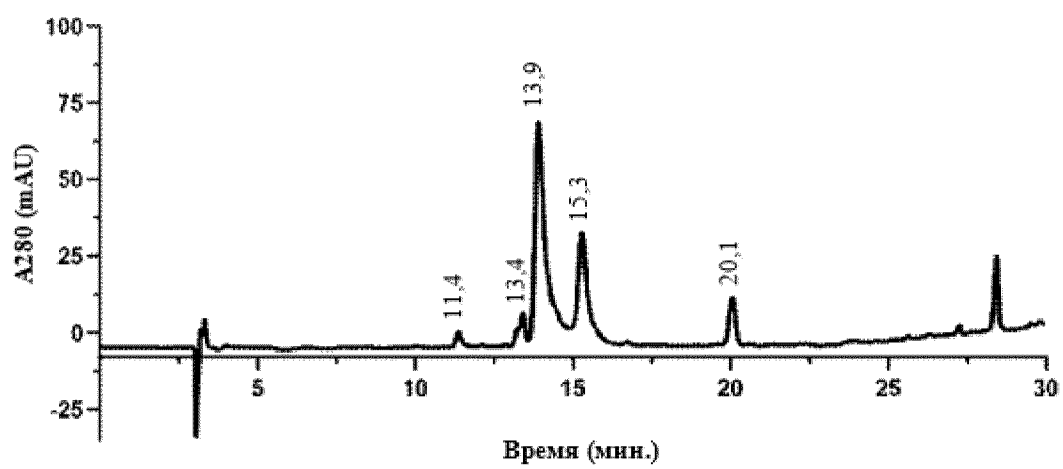
Фиг. 2



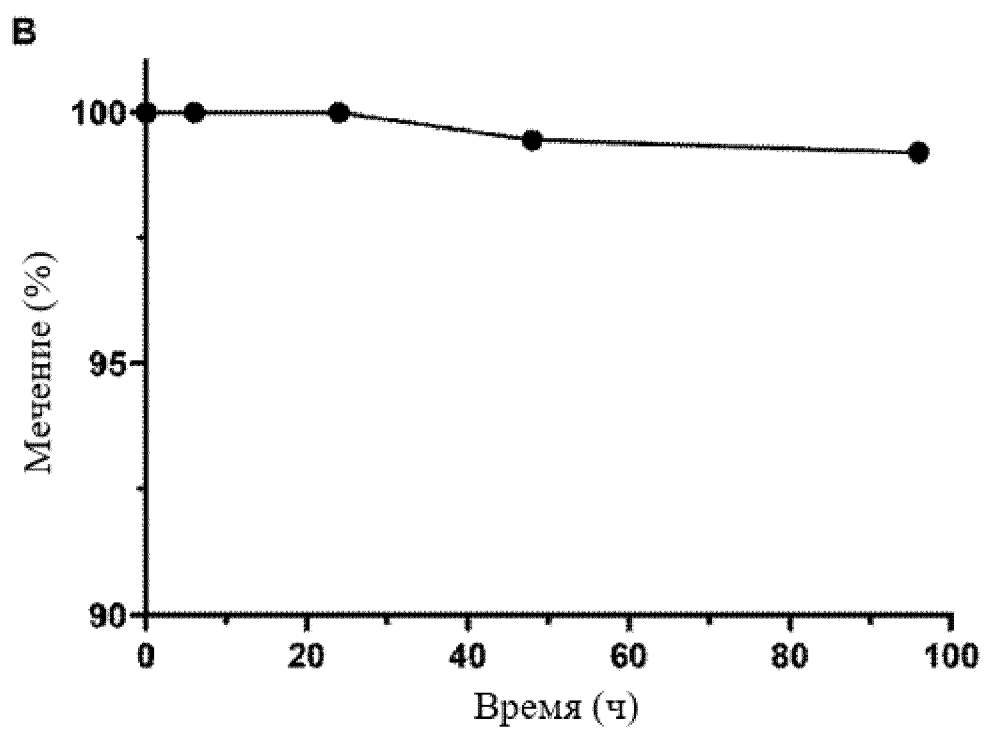
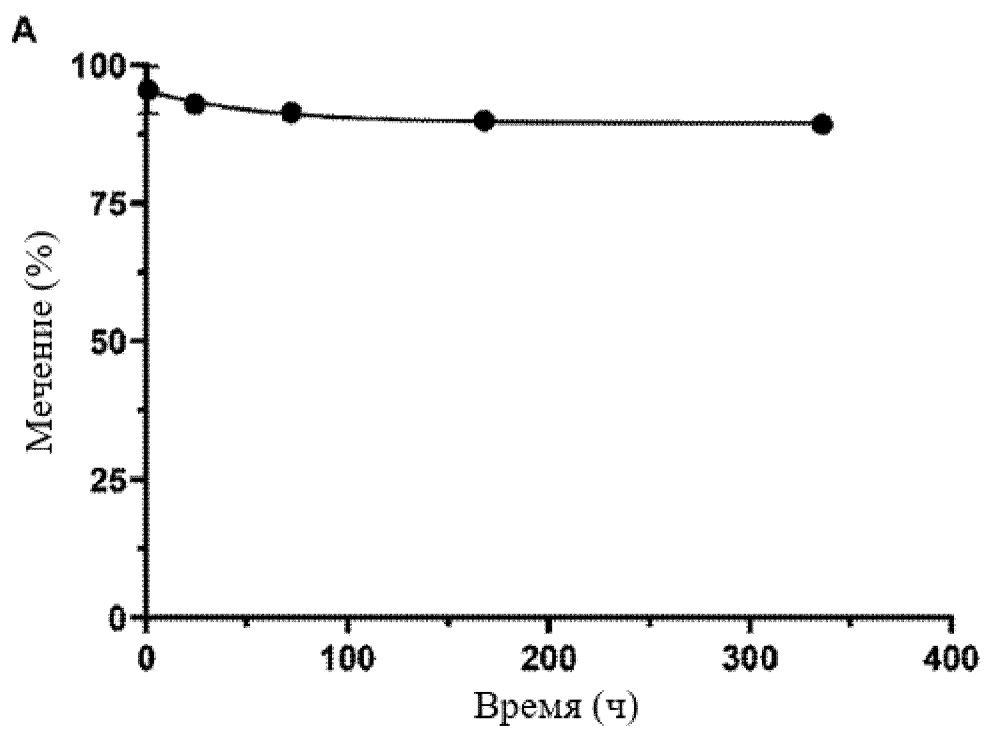
Фиг. 3

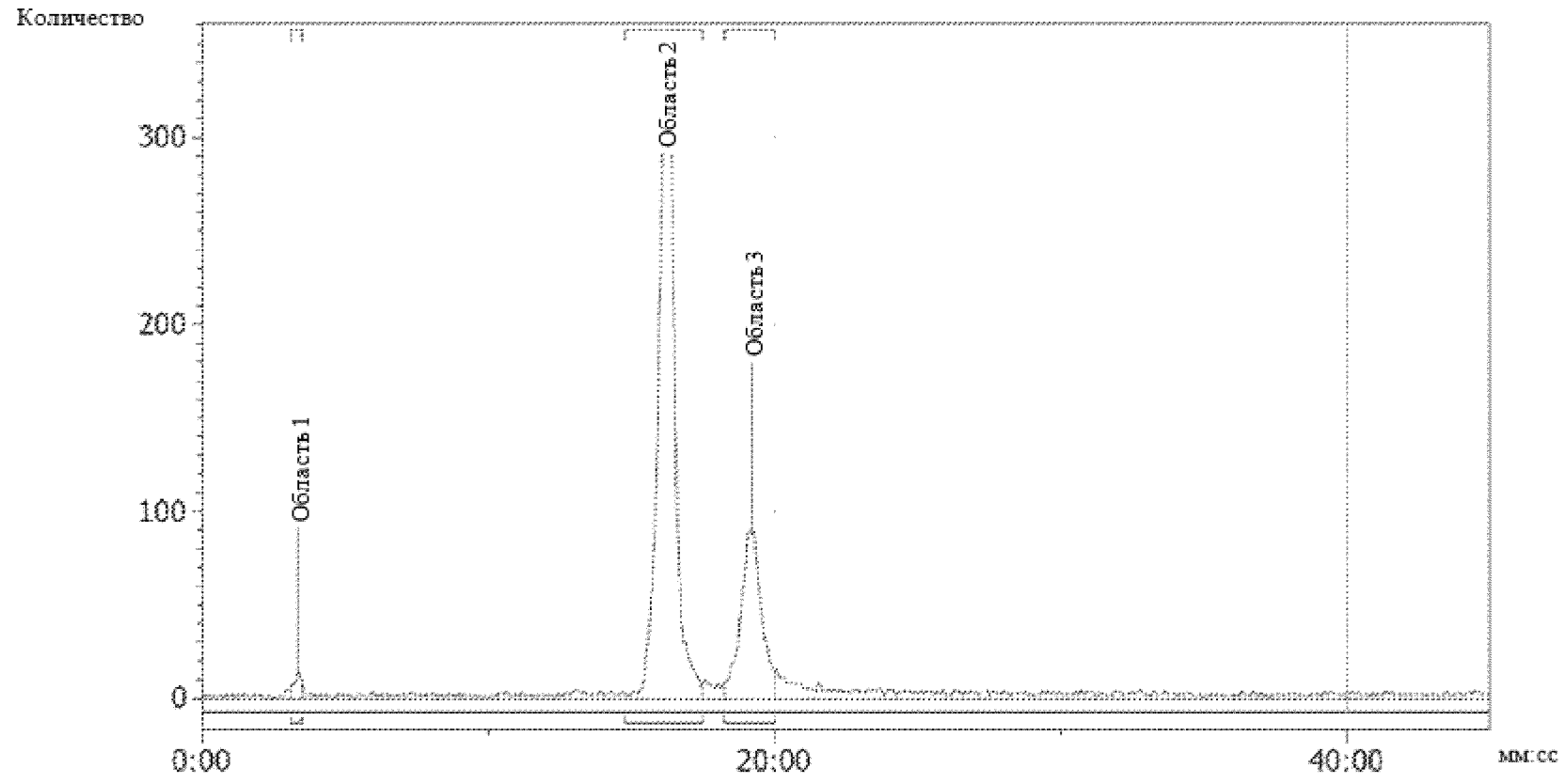


Фиг. 4



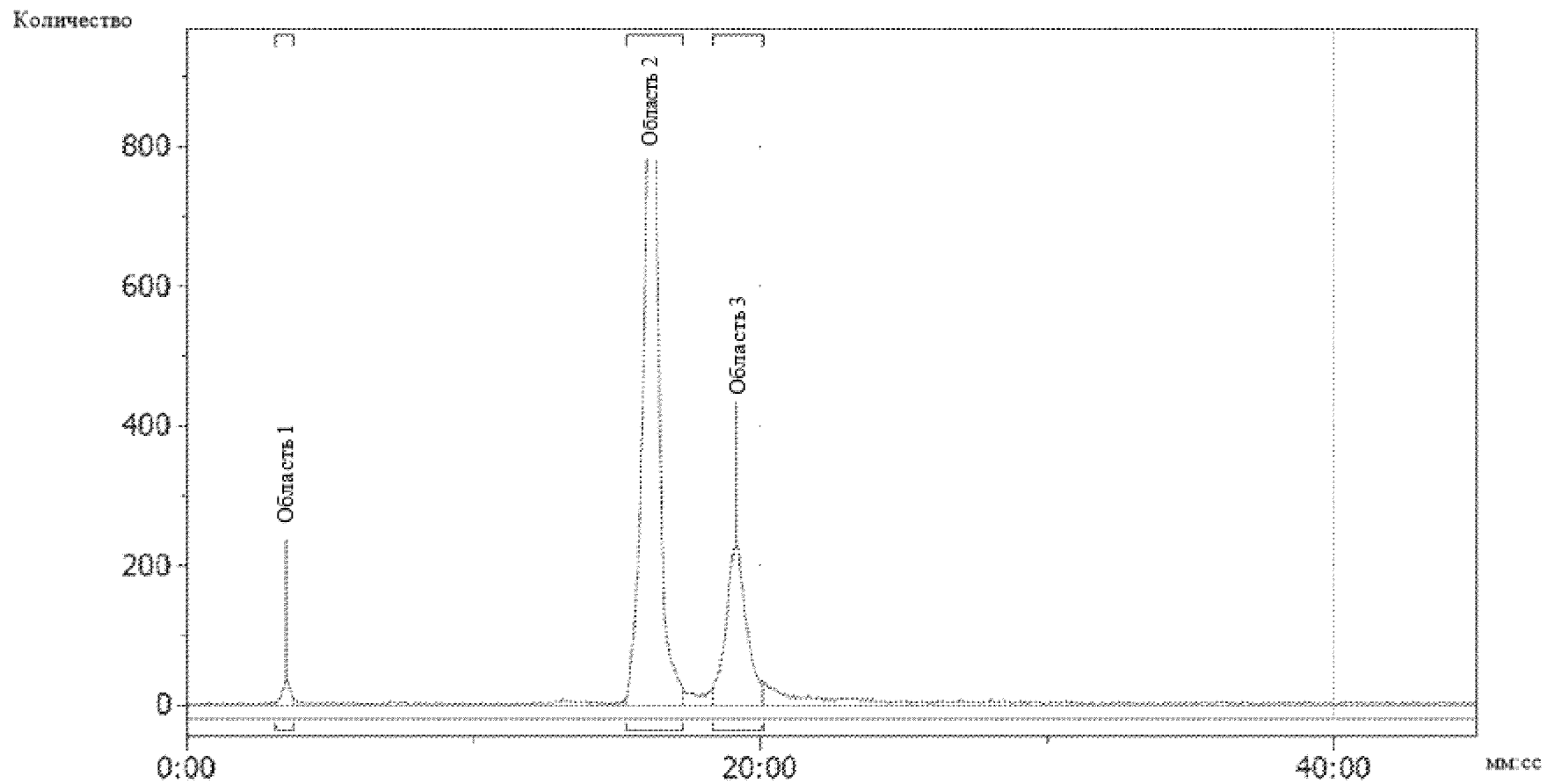
Фиг. 5

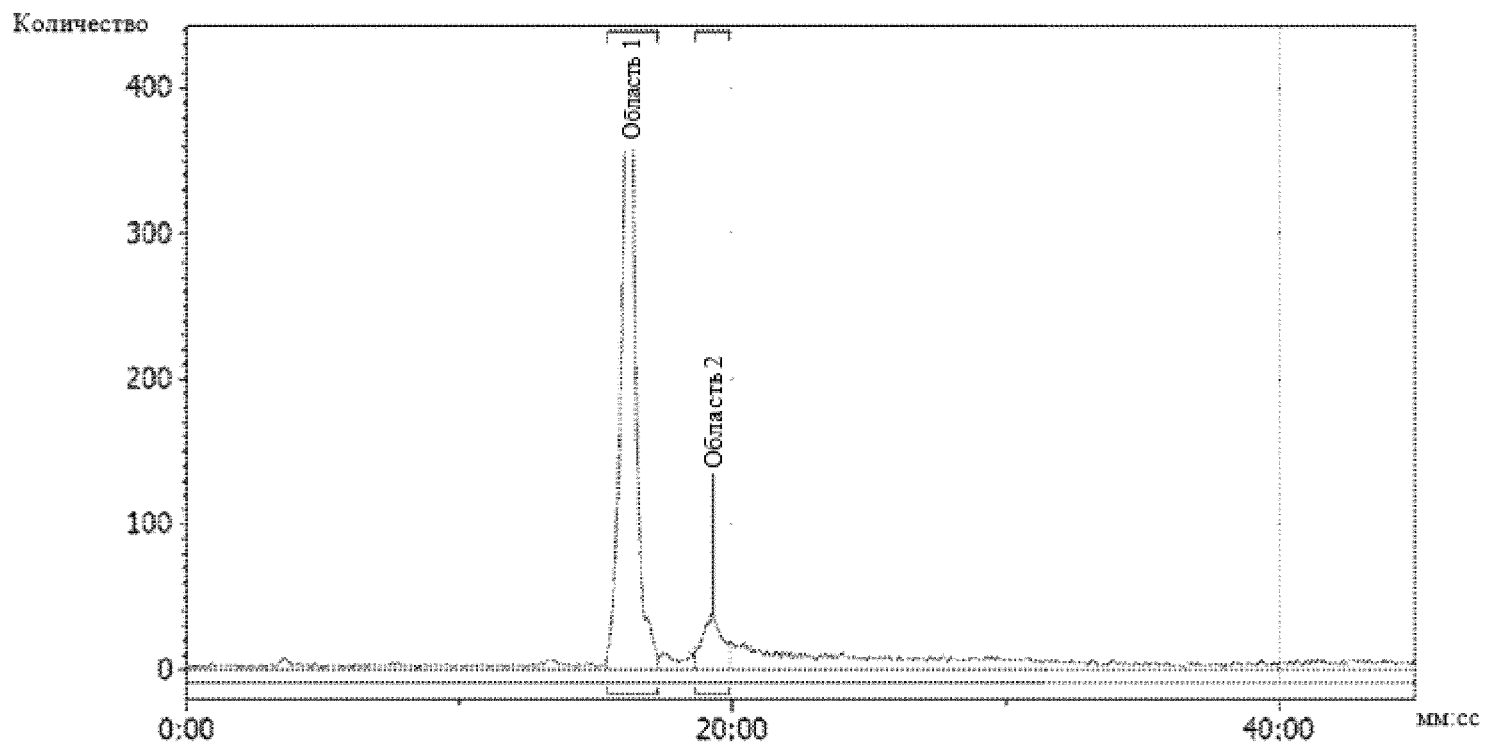




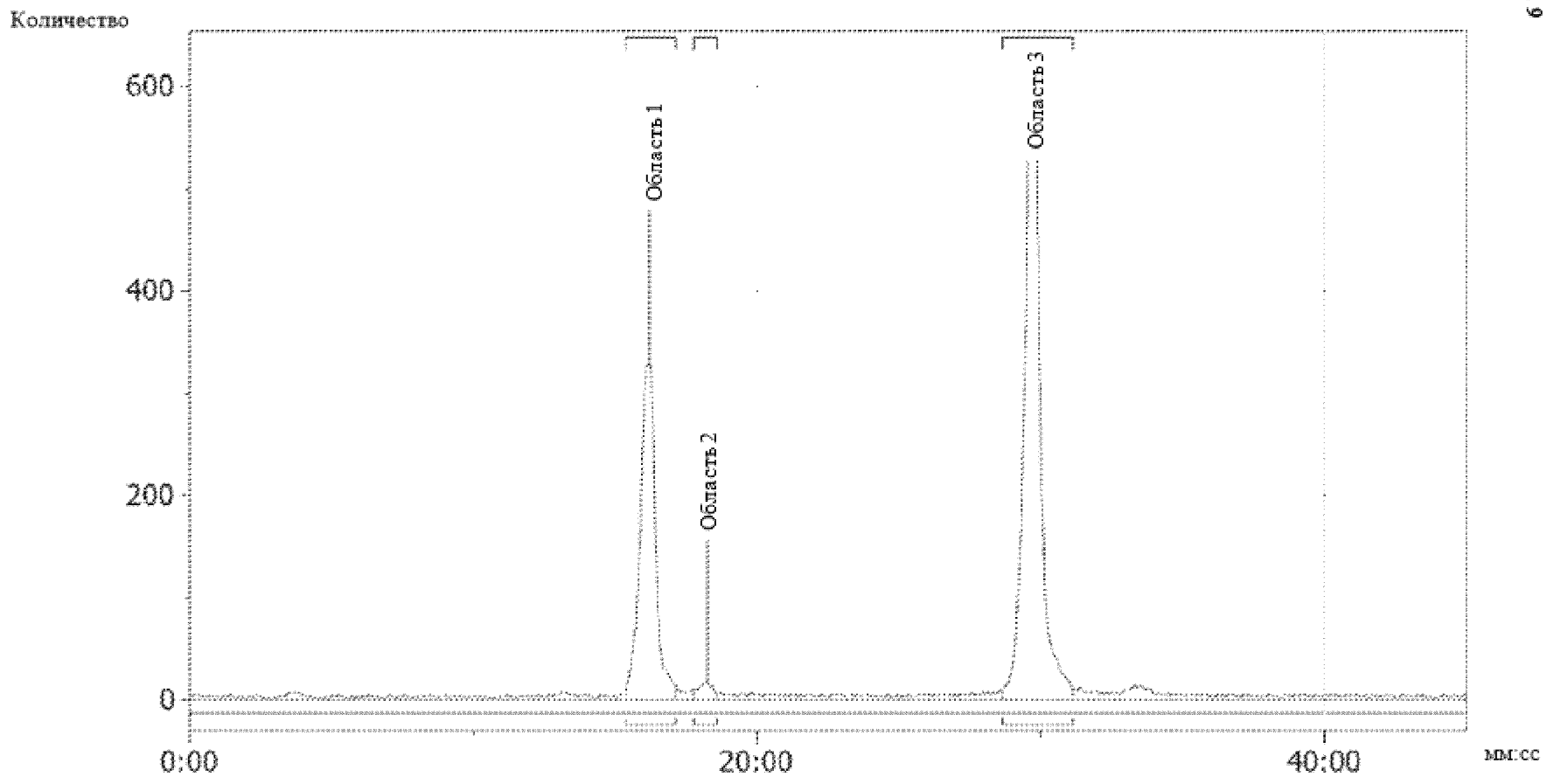
Фиг. 6

Фиг. 7

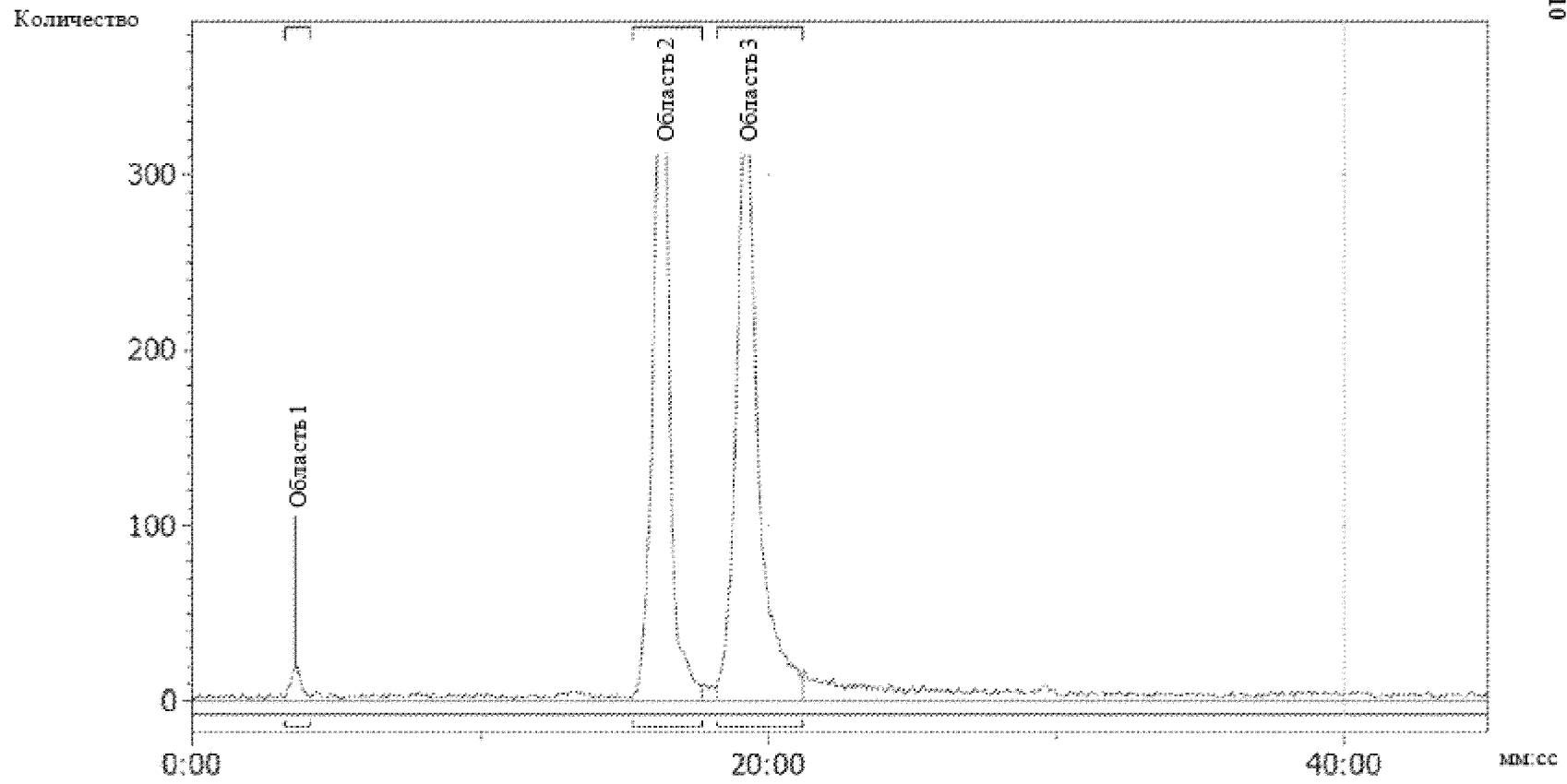




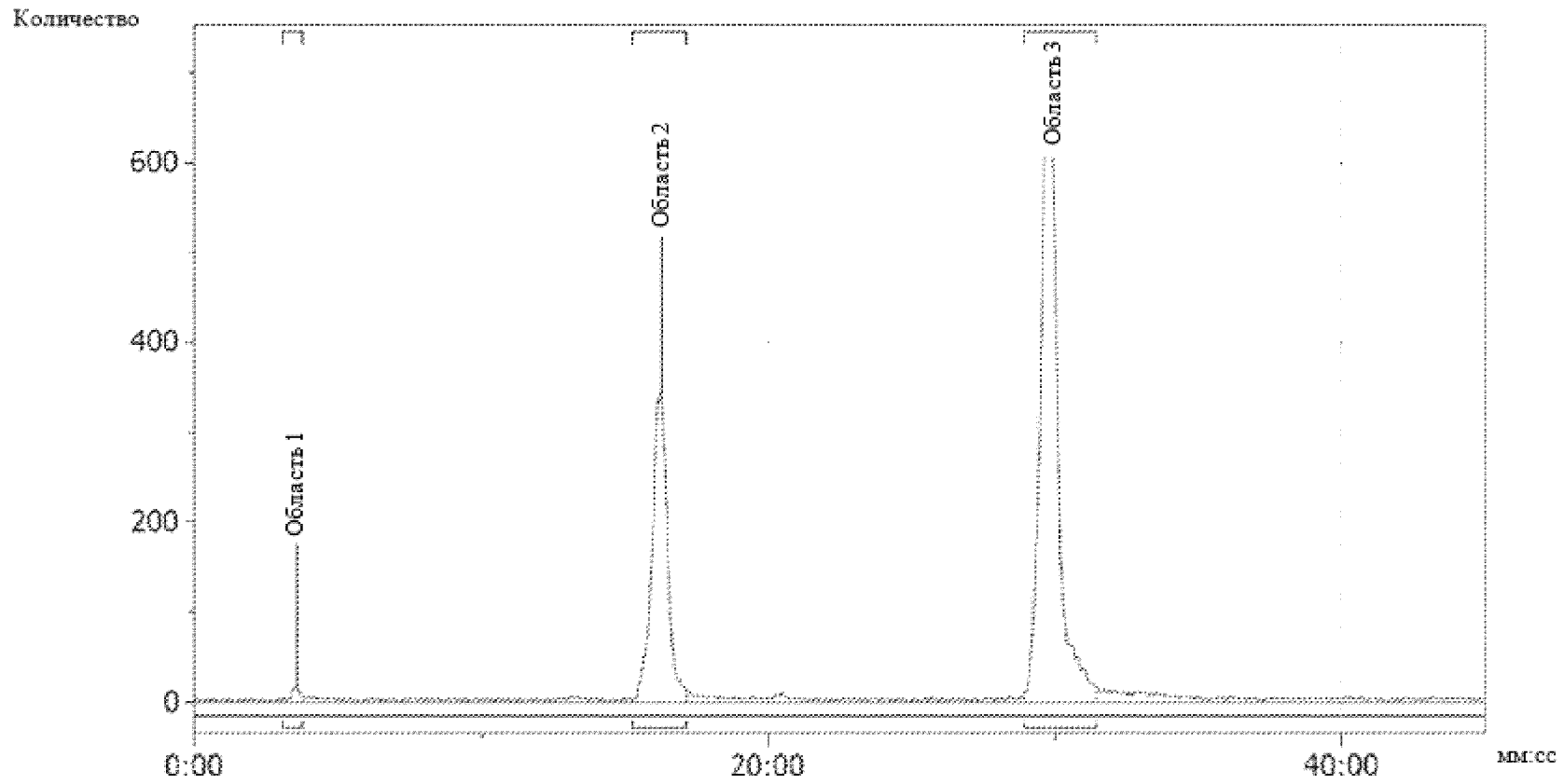
Фиг. 8



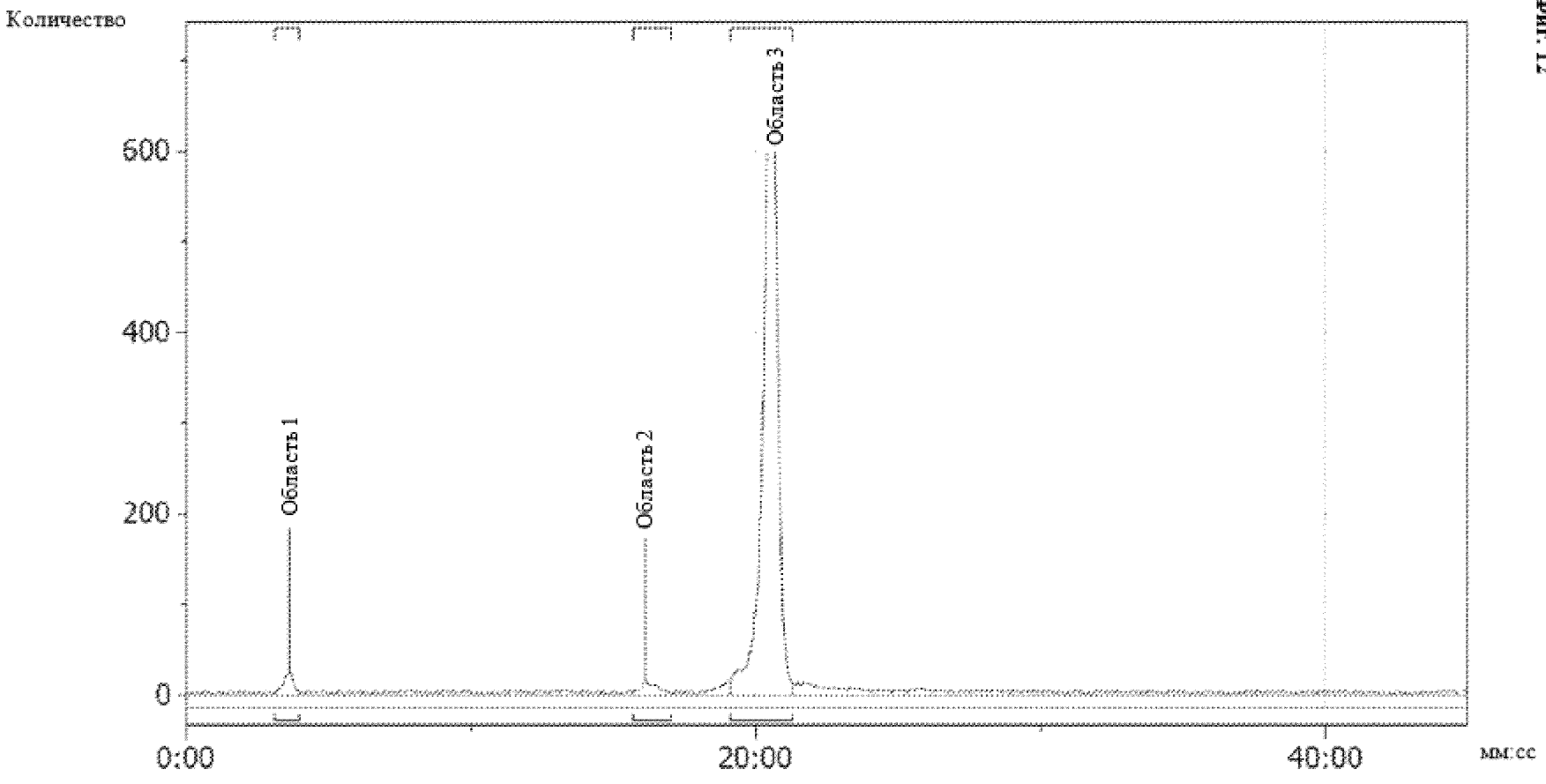
Фиг. 9



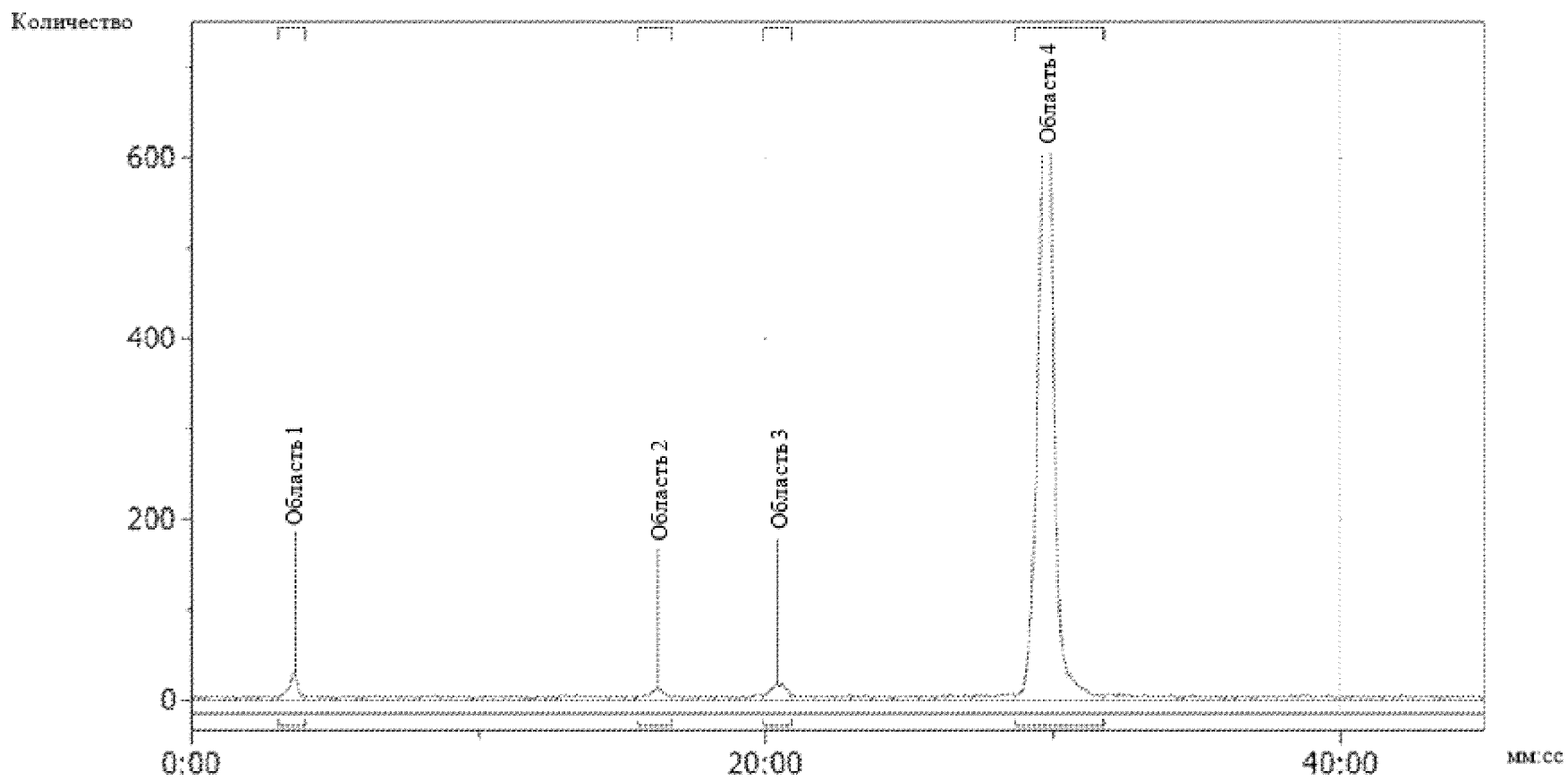
Фиг. 10



Фиг. 11

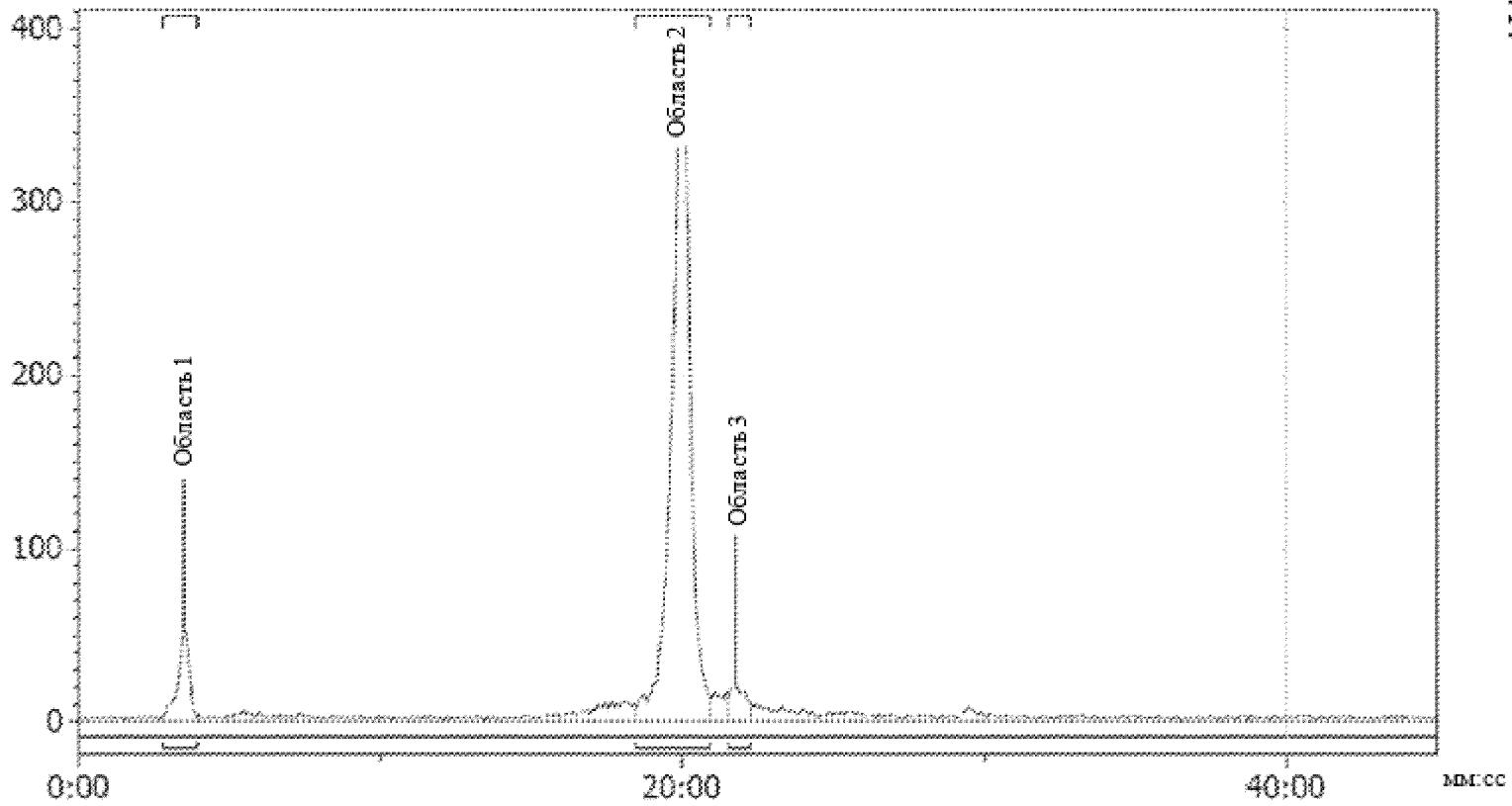


Фиг. 12

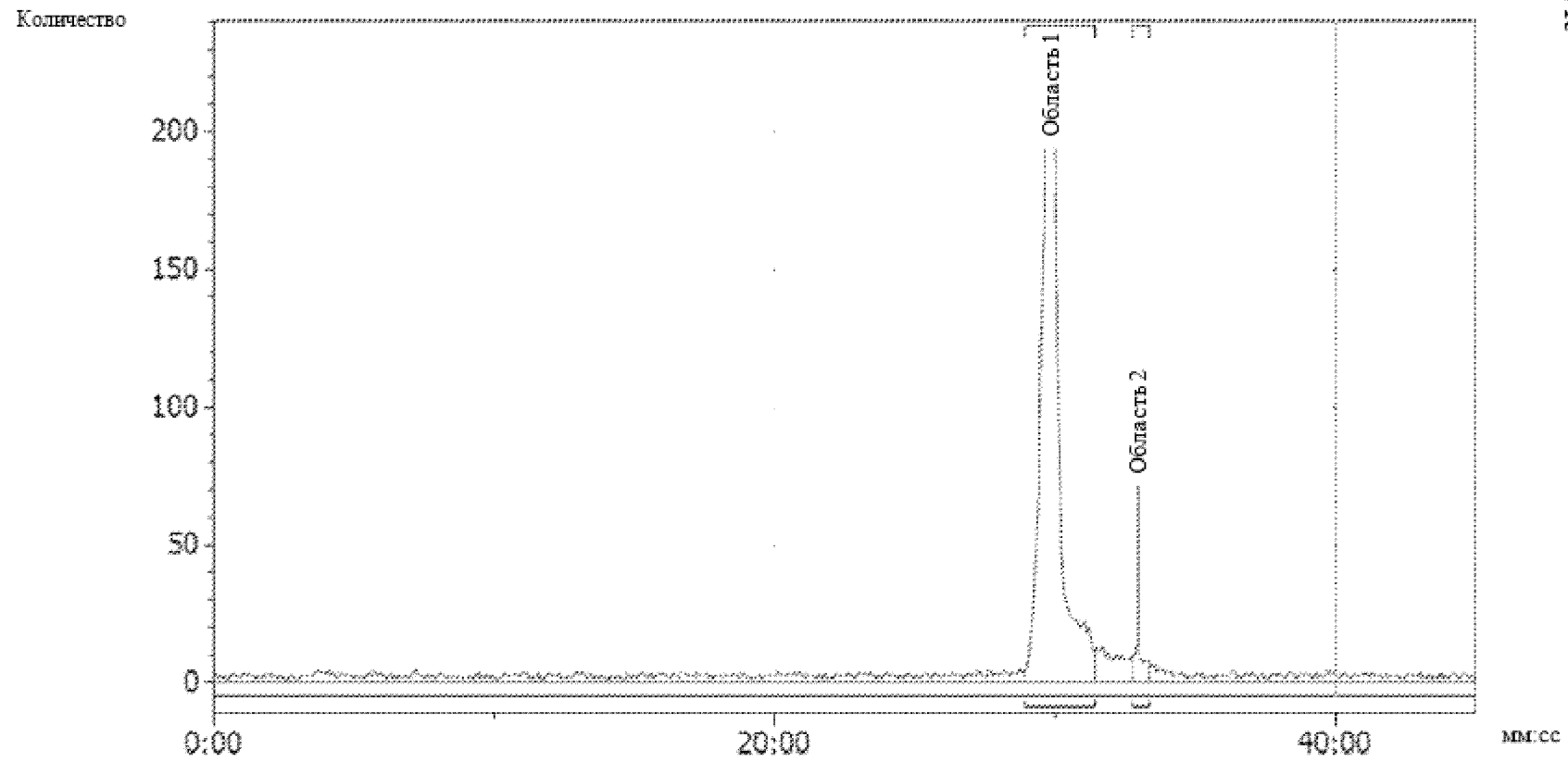


Фиг. 13

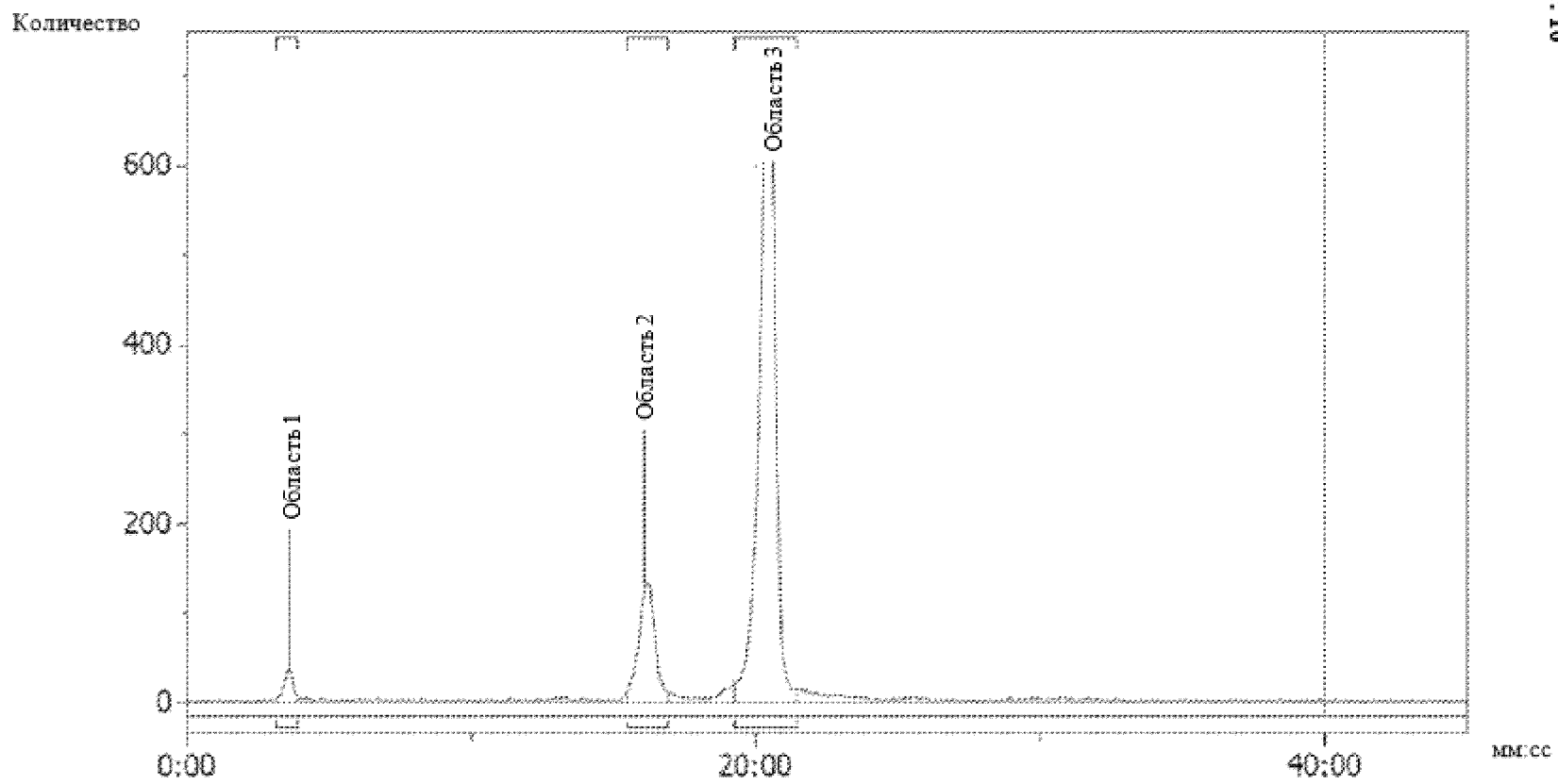
Количество



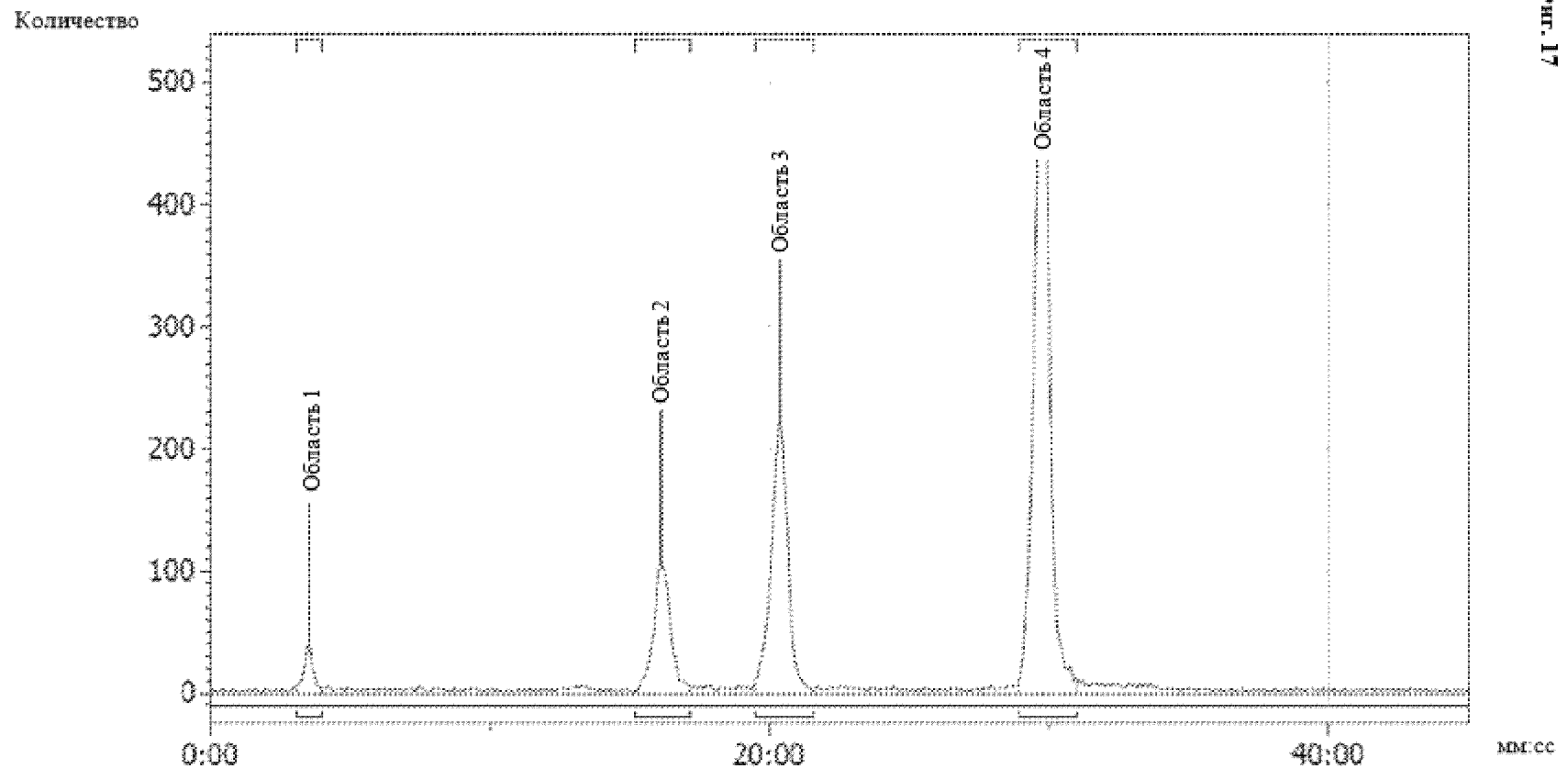
Фиг. 14



Фиг. 15

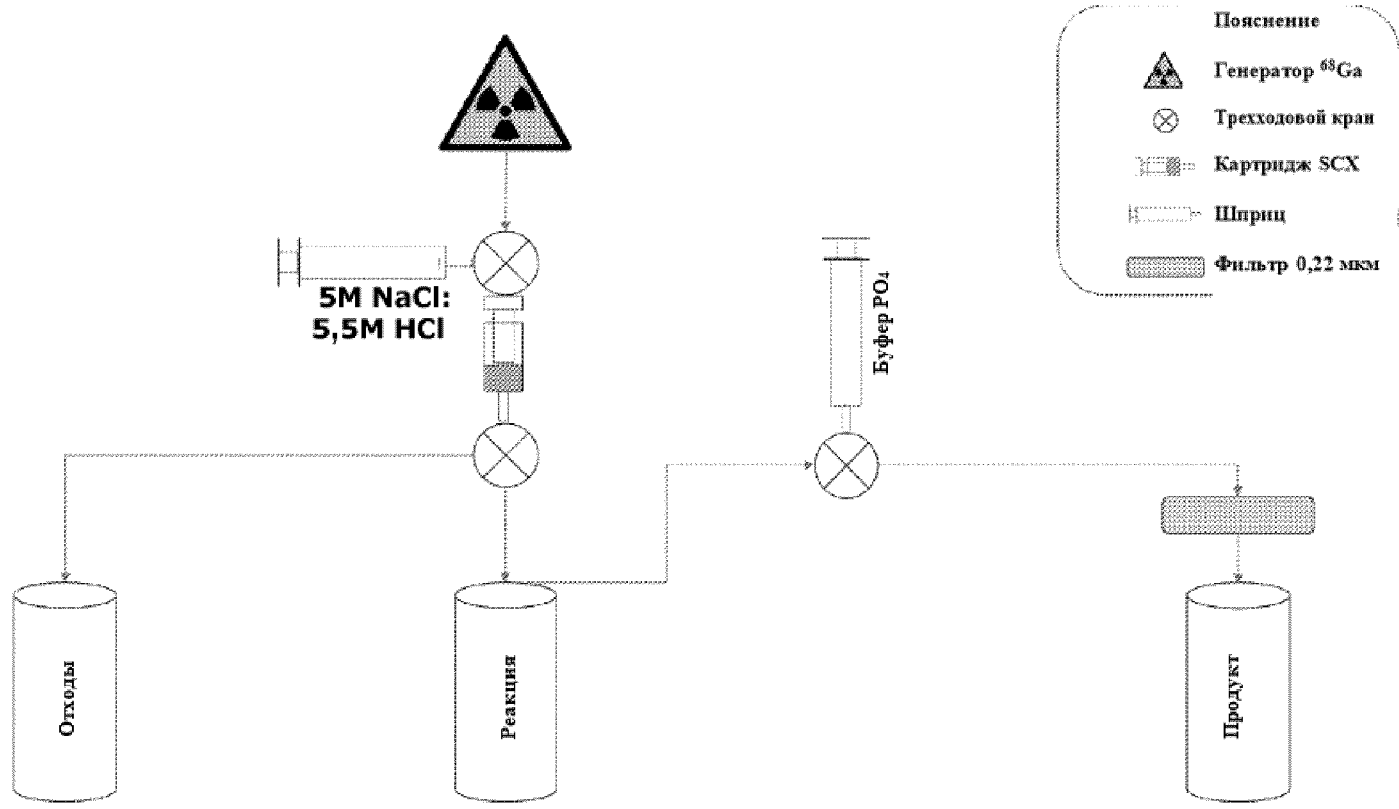


Фиг. 16

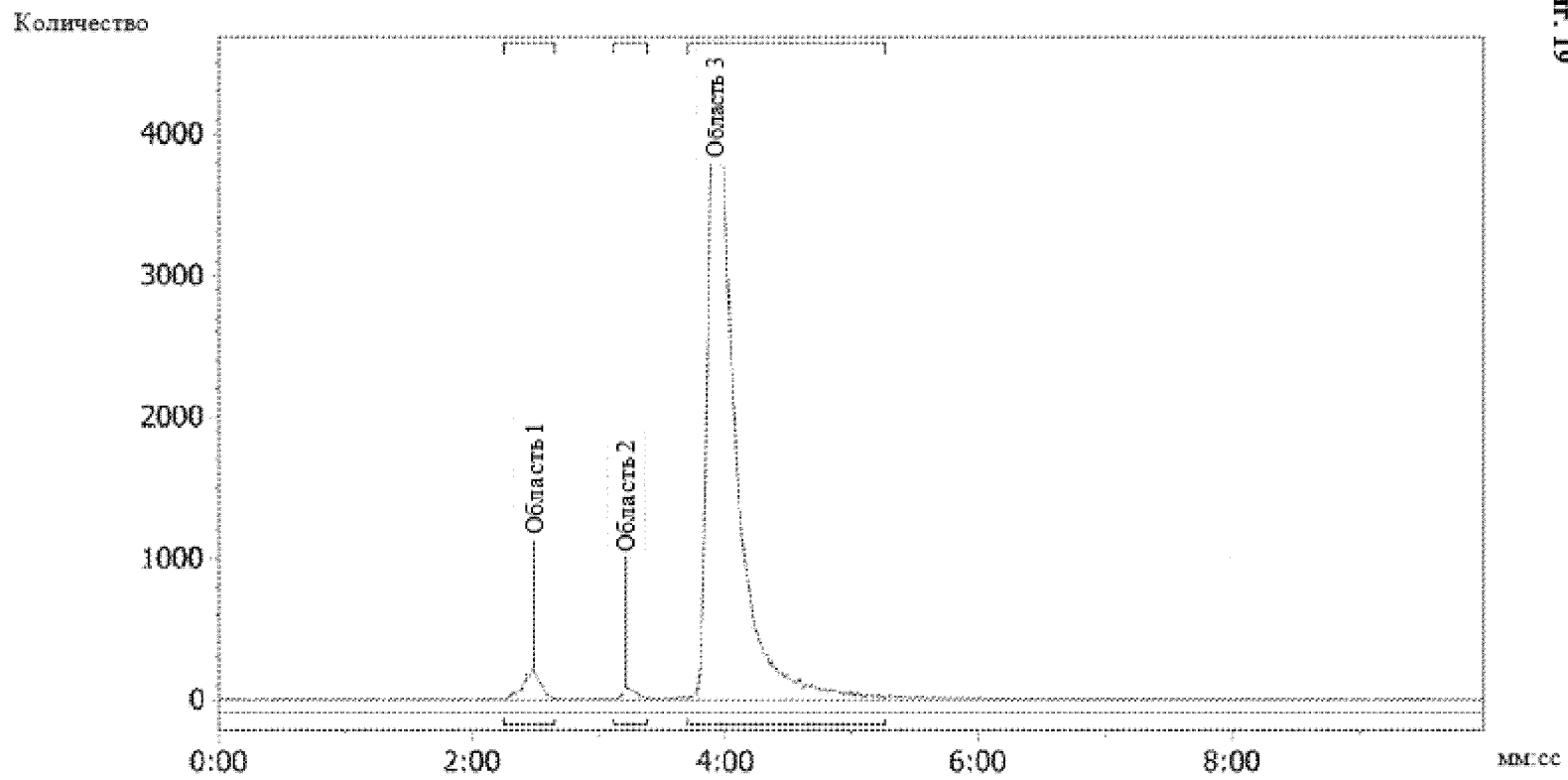


Фиг. 17

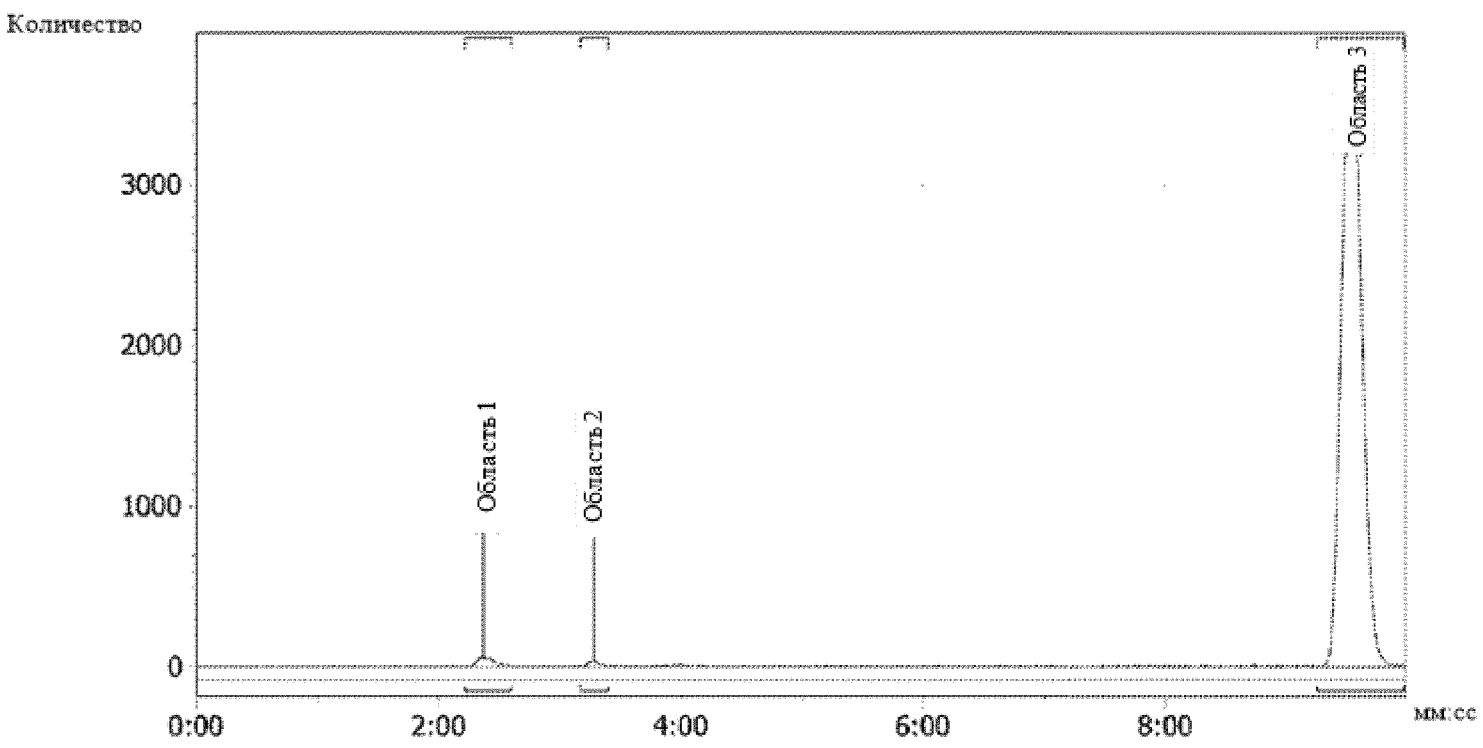
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



Фиг. 18

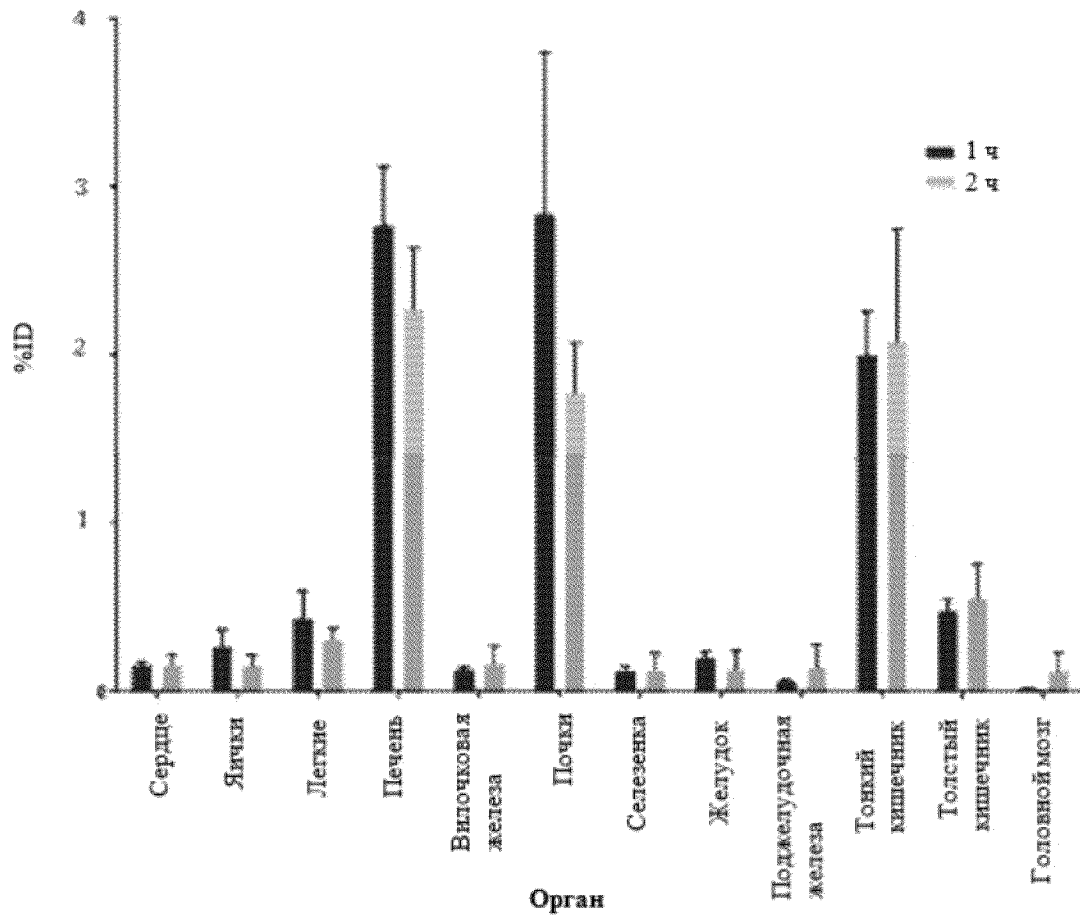


Фиг. 19

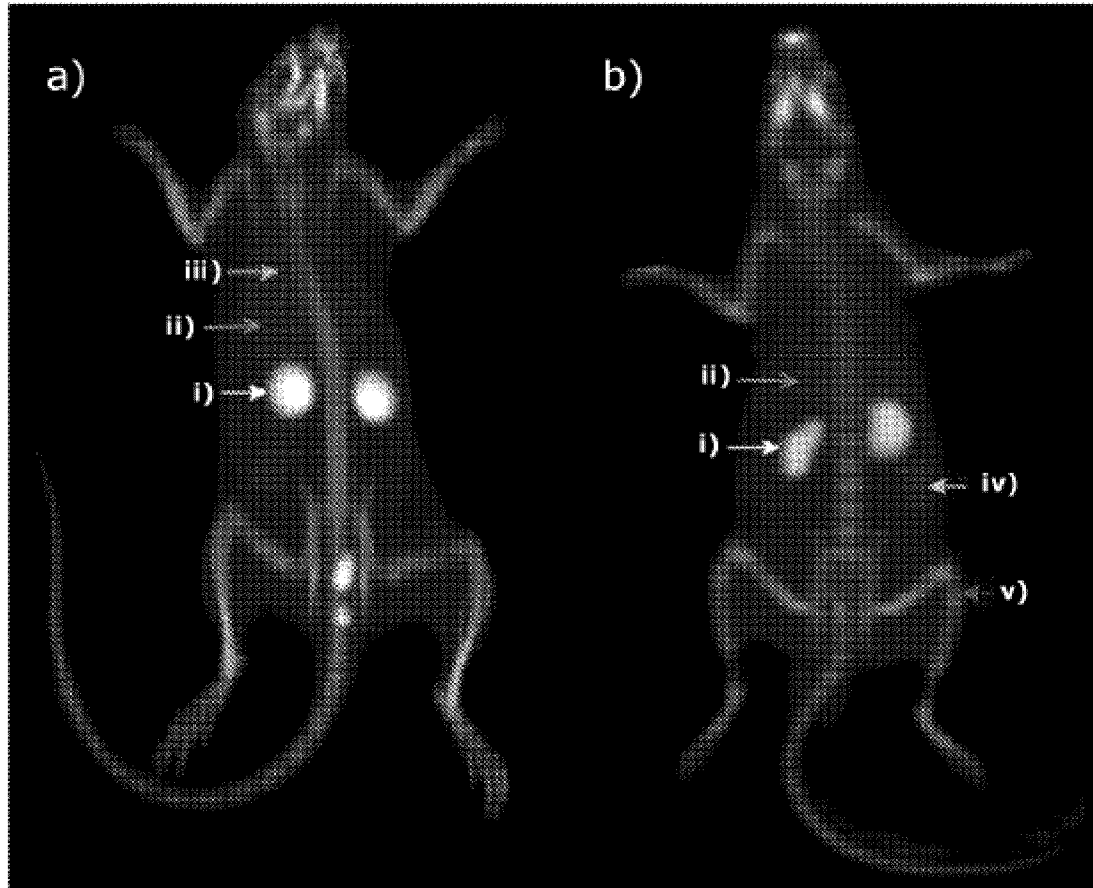


Фиг. 20

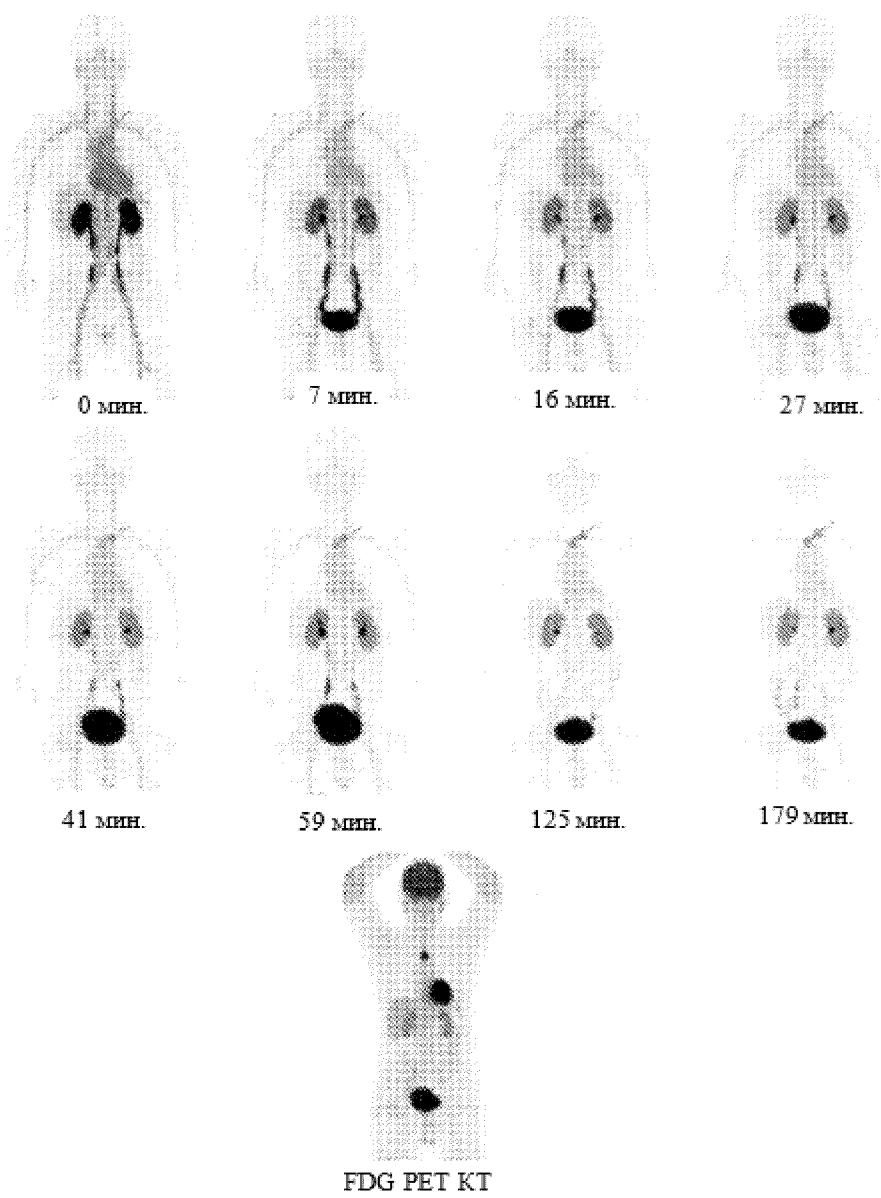
Фиг. 21



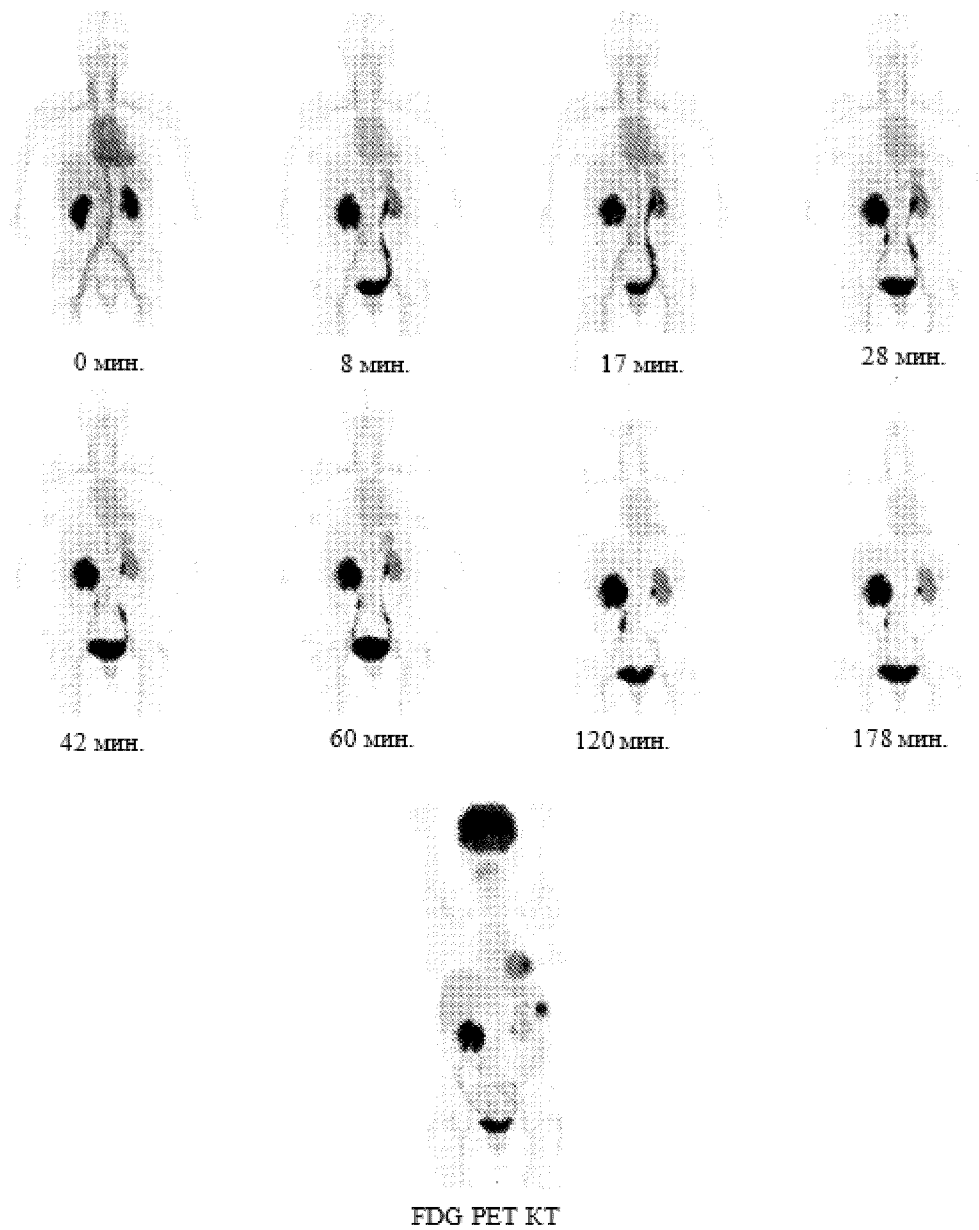
Фиг. 22



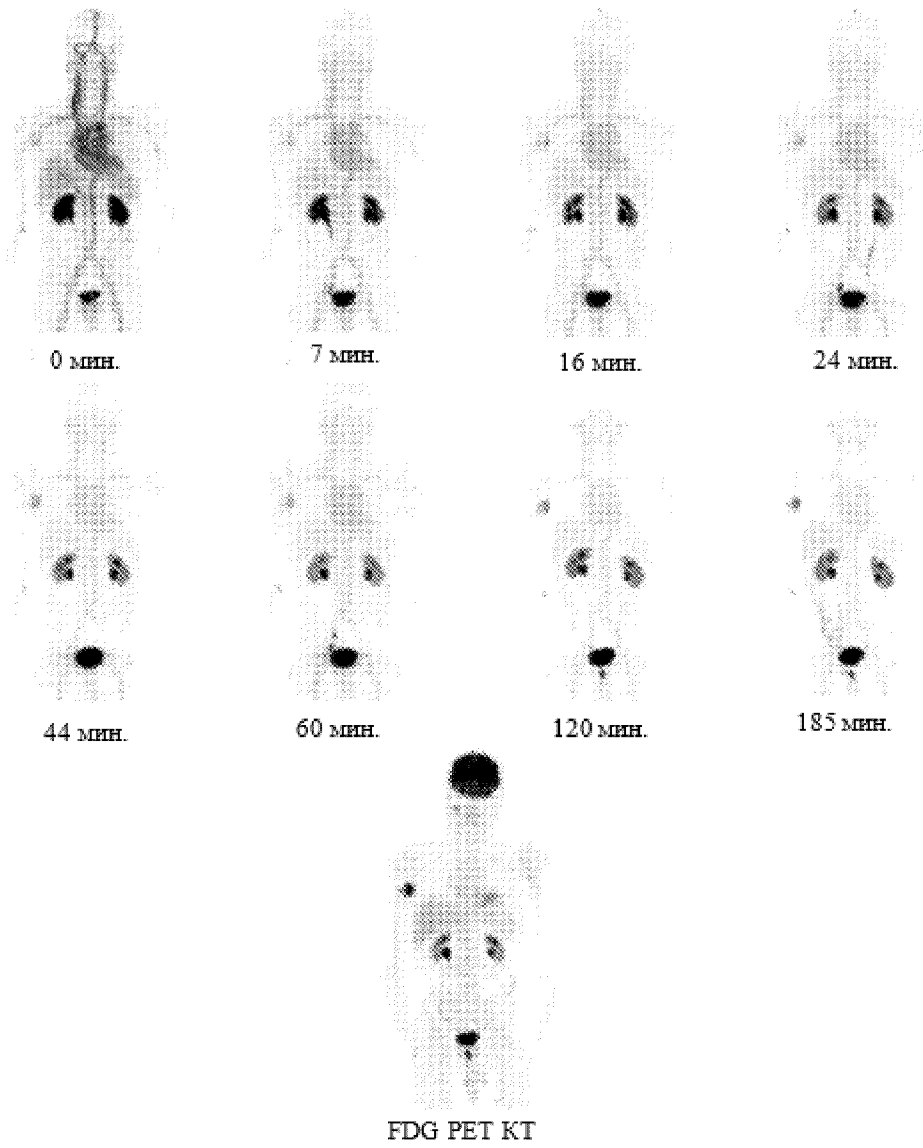
Фиг. 23



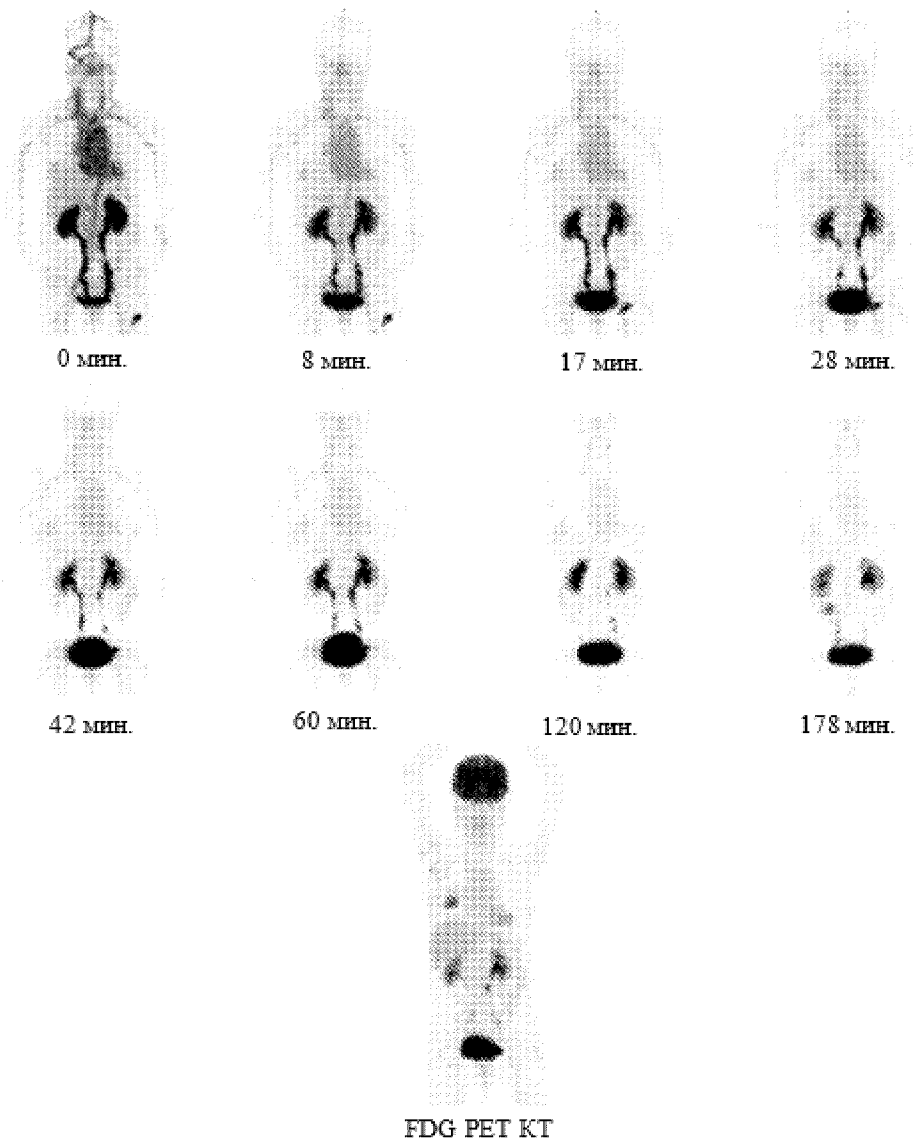
Фиг. 24

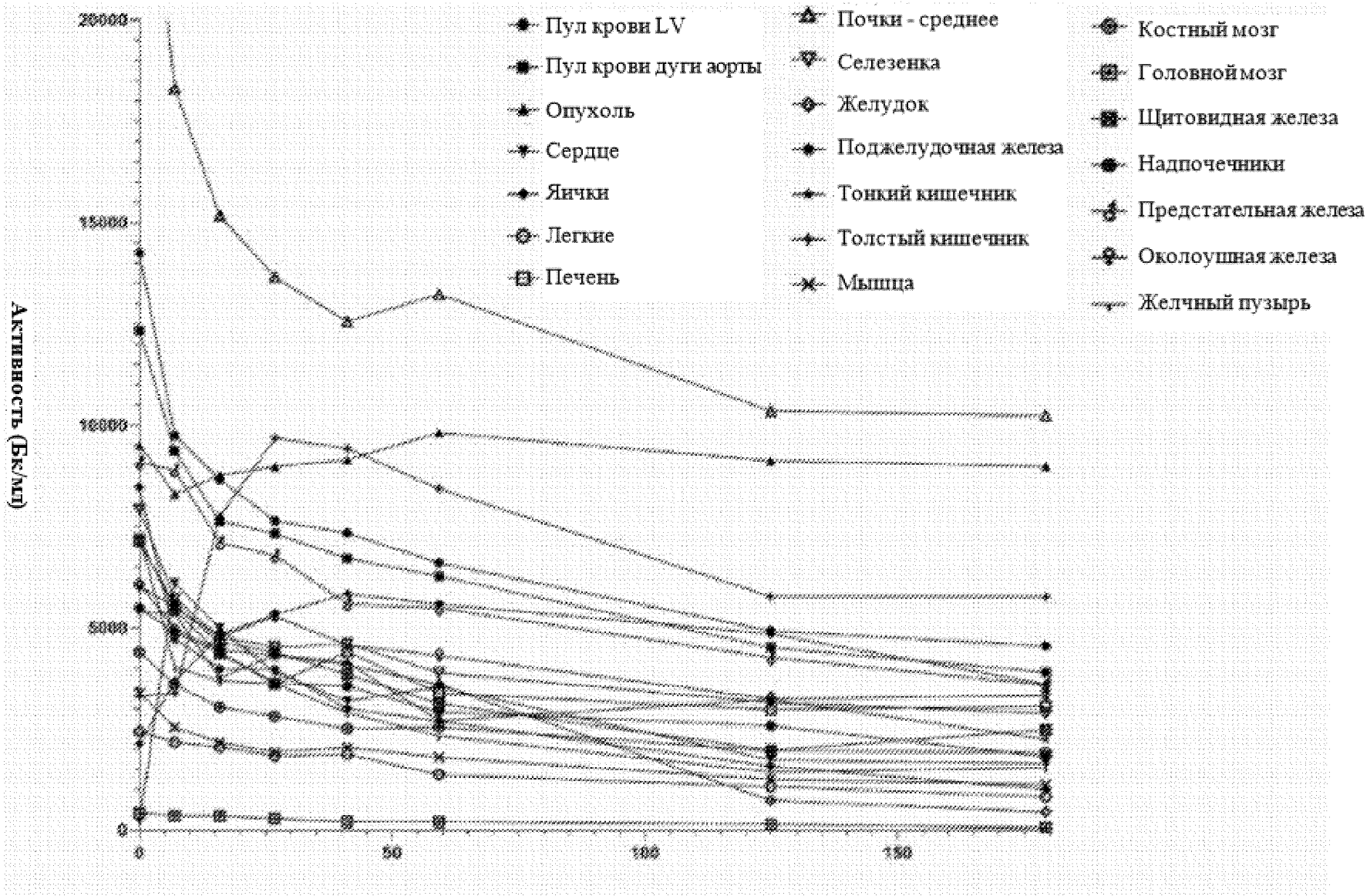


Фиг. 25

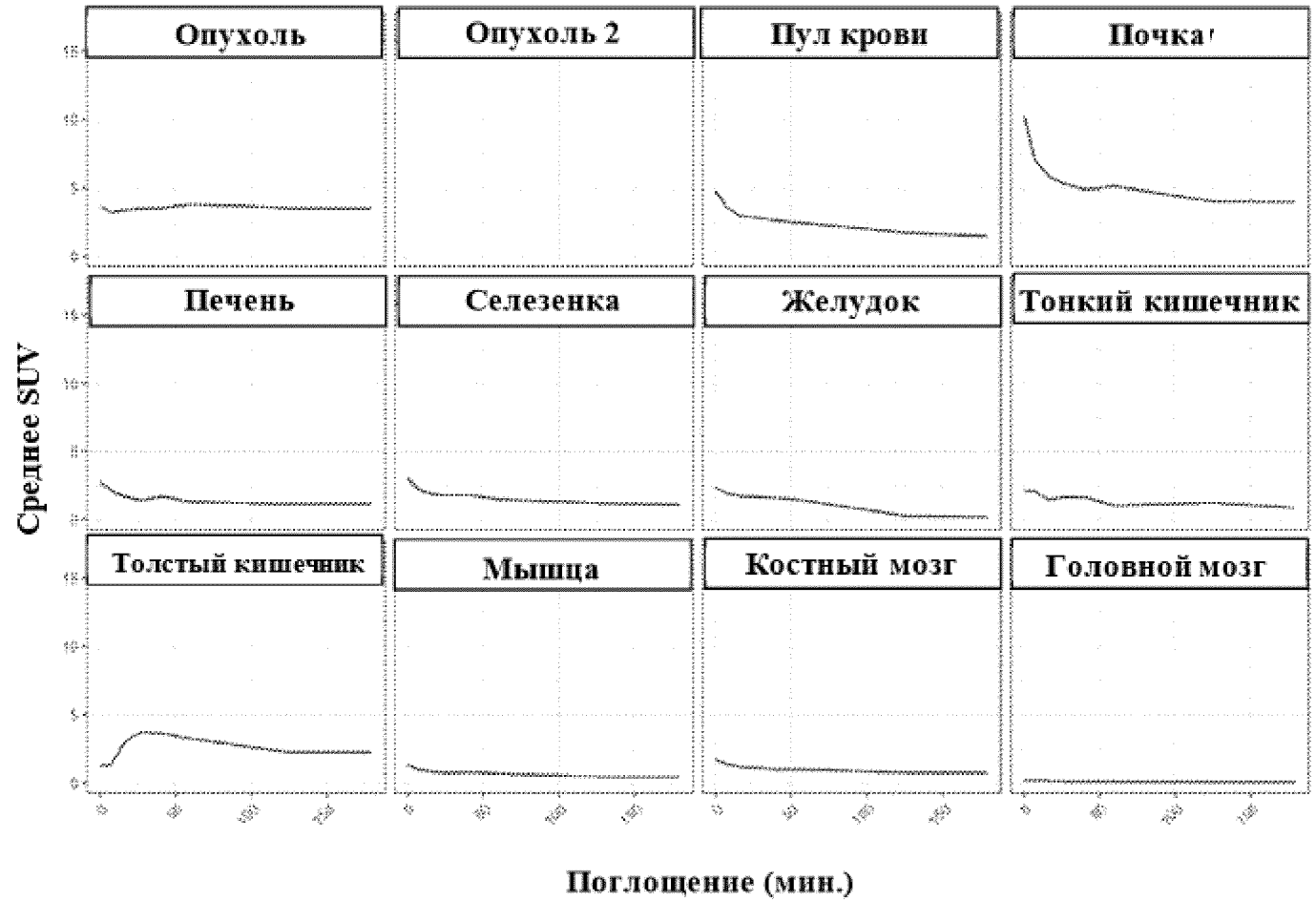


Фиг. 26

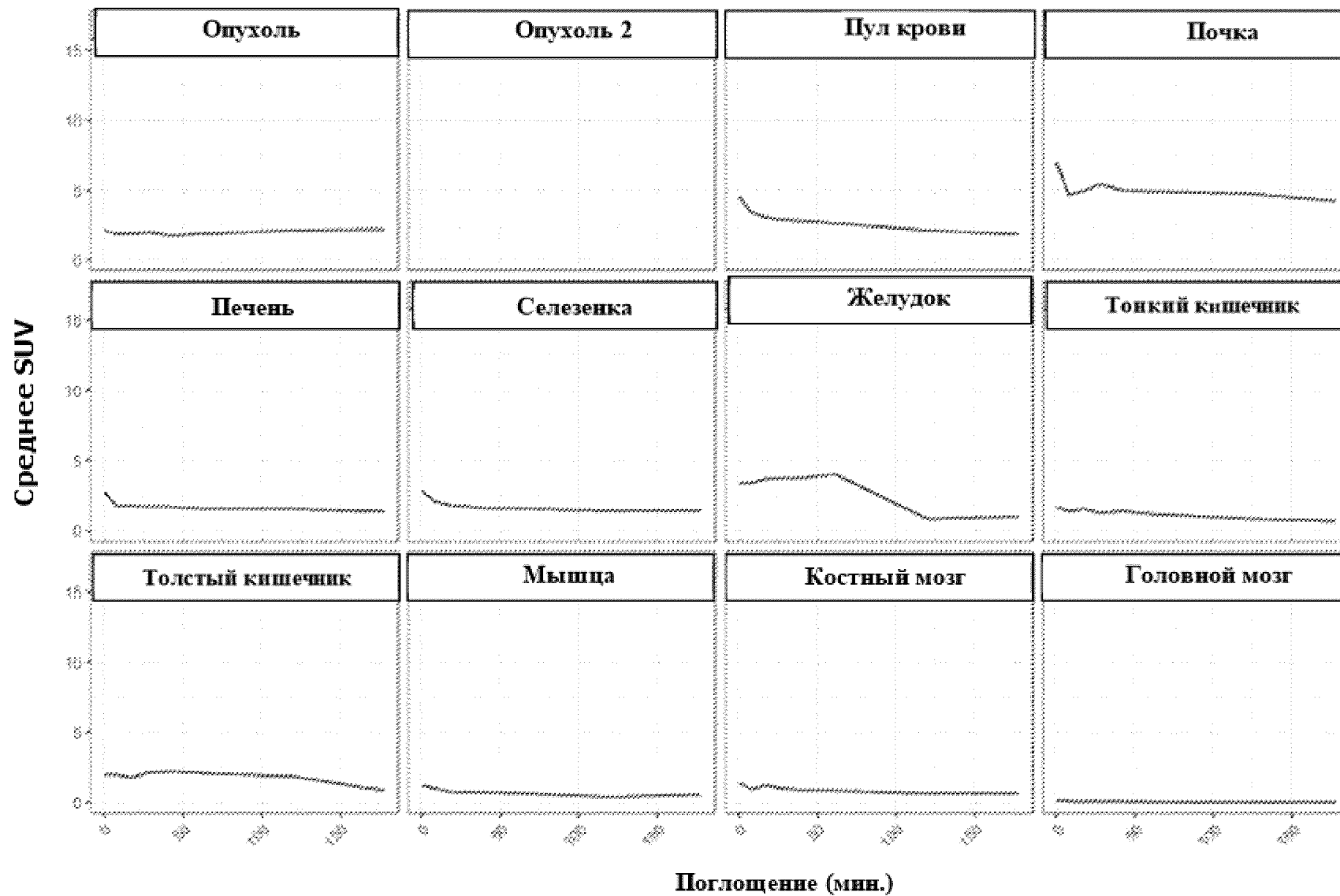




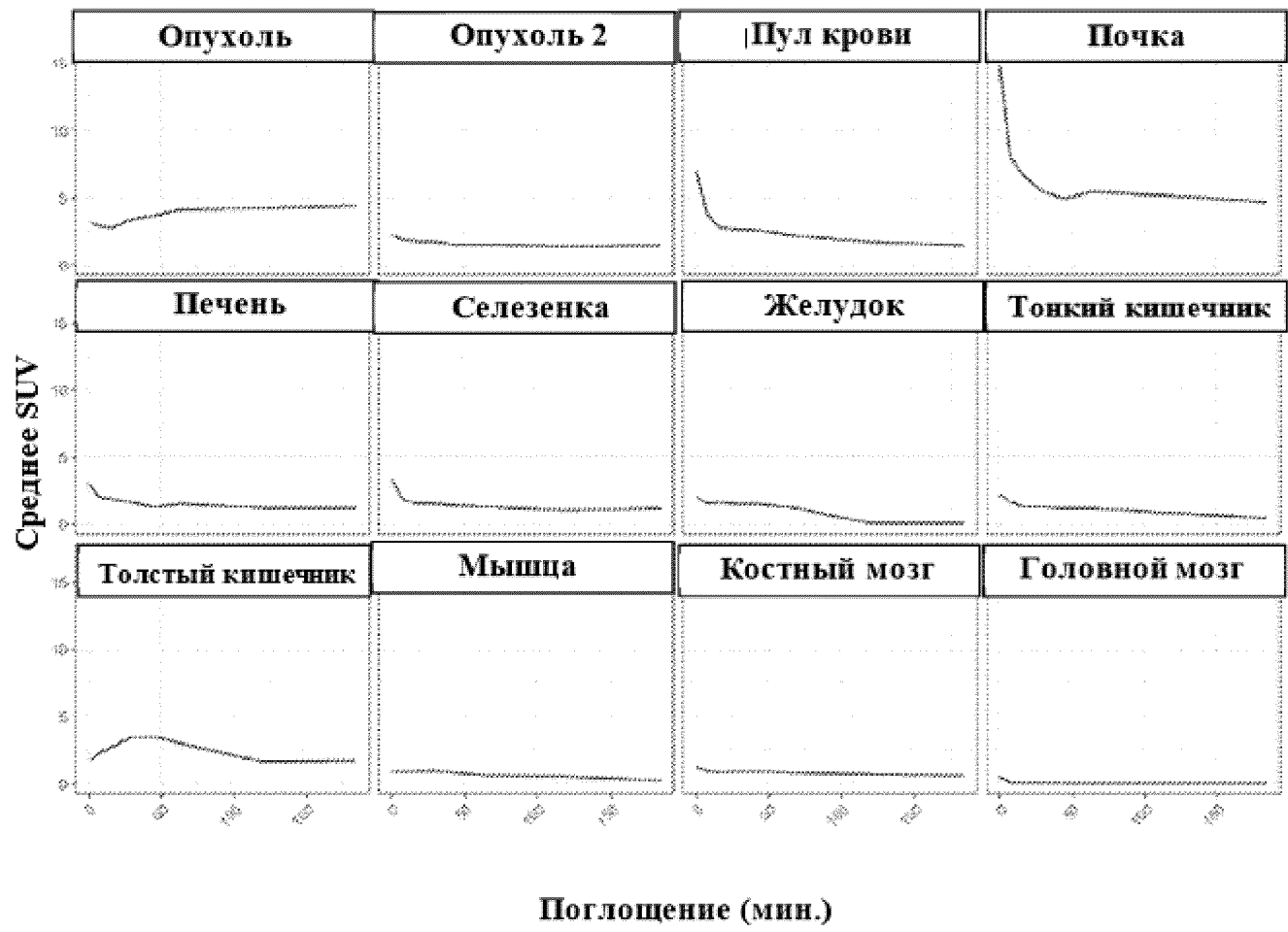
Фиг. 27



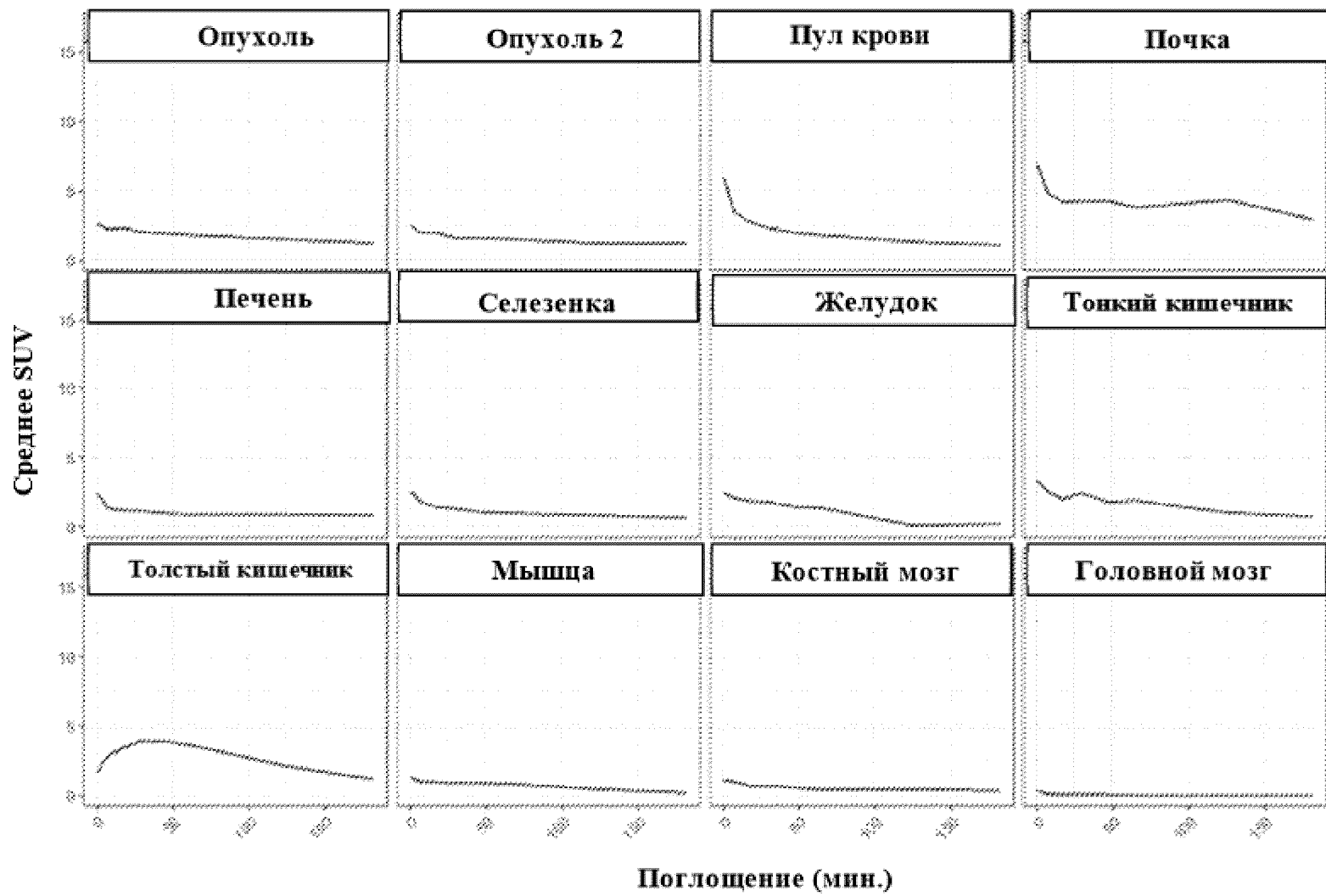
Фиг. 28



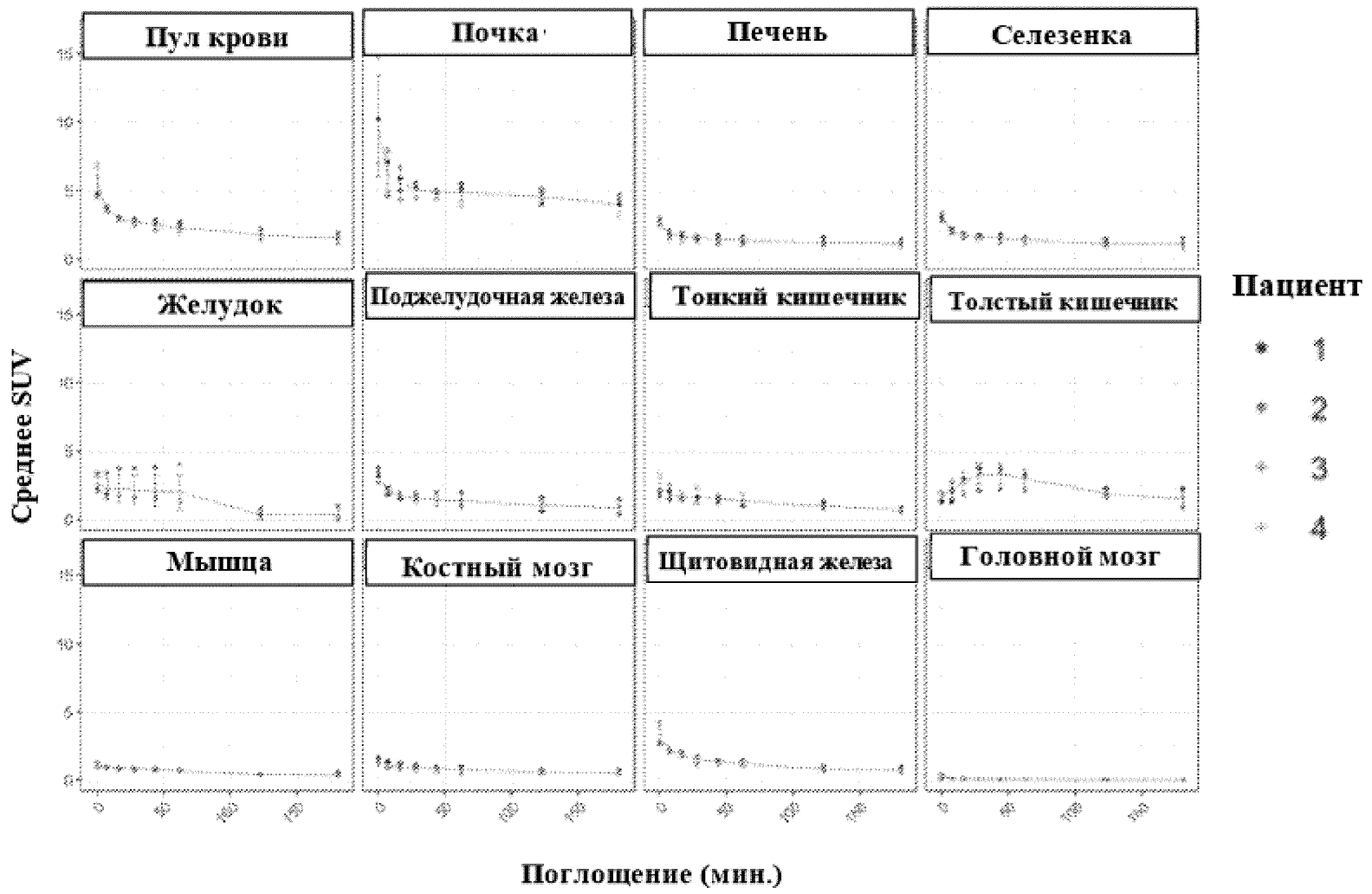
Фиг. 29



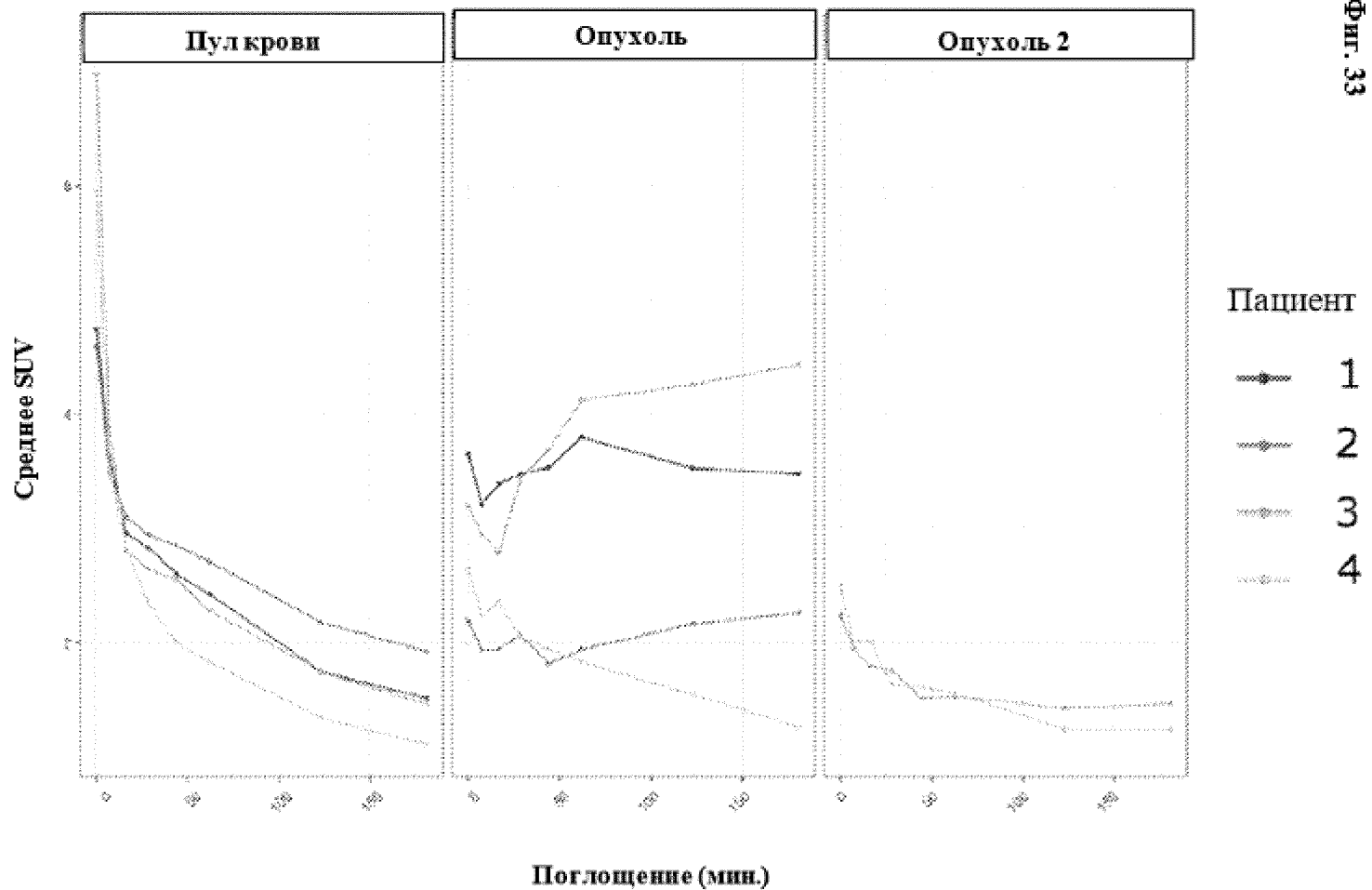
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

Фиг. 34

