

**Препарат для магнитно-резонансной томографии, содержащий
дейтерированный саркозин, и способ диагностики с использованием
этого препарата**

5 Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно к средствам для магнитно-резонансной томографии.

Уровень техники

Неинвазивная диагностика заболеваний, в том числе ранняя диагностика, является
10 приоритетным направлением в здравоохранении. Одним из информативных методов
диагностики заболеваний является магнитно-резонансная томография (МРТ).

Большинство разновидностей МРТ, применяемых в клинической практике, основано
на регистрации сигнала магнитного резонанса протонов (ядер ^1H), входящих в состав воды
в организме человека. ^1H МРТ обеспечивает высокую степень анатомической детализации.
15 В то же время, из клинической практики известно, что МРТ не всегда дает однозначную
информацию о природе заболевания. В частности, в онкологии достоверное различение
злокачественных новообразований и неопасных доброкачественных образований, очагов
воспаления и т.п. остается нерешенной задачей [см., например: Baltzer, P.A.T. *et al.* Am. J.
Roentology, 2010, 194, 1658-1663; Shahid, H. *et al.* Appl. Radiol. 2016, 45, 7-13.]. В связи с
20 этим также затруднена ранняя диагностика онкологических заболеваний, так как высок
риск ложноположительного результата.

Основной метод повышения информативности ^1H МРТ – использование контрастных
агентов, изменяющих время релаксации протонов воды в своем окружении [Topics in
Current Chemistry, Contrast Agents I, Magnetic Resonance Imaging. Krause, W. (Ed.), Springer,
25 2002]. Известен широкий круг контрастных препаратов, использующихся в МРТ
диагностике, включая коммерчески доступные Omniscan®, Magnevist®, ProHance® и
Clariscan®, представляющие собой комплексы гадолиния, а также Feridex® и Resovist®,
представляющие собой водные суспензии стабилизированных магнитных наночастиц.
Помимо повышения контраста изображений эти вещества позволяют оценивать перфузию.

30 Альтернативой проведения ^1H МРТ с контрастными агентами является регистрация
сигнала других ядер, в частности, на разных стадиях клинических испытаний находятся
методы, использующие изотопы ^{31}P , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na .

Дейтерий (^2H) – это природный, нерадиоактивный изотоп водорода, содержание
которого в биологических объектах составляет 0,0156% от общего количества водорода.

35 В документе US5042488 была показана возможность регистрации сигнала дейтерия
после инъекции D_2O и 1-дейтеро-глюкозы *in vivo* (в печени крысы).

В документе US20030211036 A1 был предложен способ измерения перфузии в выбранных участках тканей с помощью изотопно-меченых соединений (например, D₂O) по аналогии с парамагнитными контрастными агентами.

В документе US20100322865 A1 описывается применение метаболитических прекурсоров воды для оценки скорости метаболизма. В качестве примера метаболитического предшественника HOD приводится 1,2,3,4,5,6-дейтерированная глюкоза. В рамках описанного изобретения осуществляется регистрация только ЯМР сигналов на дейтерии метаболитической воды и алифатической цепи жирных кислот, и отсутствуют ЯМР сигналы дейтерированной глюкозы.

Несмотря на широкое клиническое применение технологии ¹H MPT, сохраняется потребность в разработке новых более эффективных методов MPT-диагностики.

Раскрытие изобретения

Задачей данного изобретения является разработка нового эффективного диагностического препарата для диагностики заболеваний посредством MPT и/или МР-спектроскопии и способа диагностики, включающего использование указанного препарата.

Технический результат данного изобретения заключается в создании нового и эффективного диагностического препарата, который может использоваться для неинвазивной диагностики заболеваний и патологических процессов, сопровождающихся локально измененным (повышенным или пониженным) уровнем поглощения клетками питательных веществ, в частности, онкологических заболеваний, методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия.

Данный технический результат достигается за счет разработки диагностического препарата, совместимого с фундаментальными физическими ограничениями метода ядерного магнитного резонанса (MPT или МР-спектроскопии). Известно, что гиромагнитное отношение ядра дейтерия в 6,5 раз меньше, чем протия. Как следствие, чувствительность регистрации сигнала дейтерия составляет примерно 0,01 (т.е. 1%) от чувствительности регистрации сигнала протия [Biological Magnetic Resonance, Volume 11, In Vivo Spectroscopy. Berliner L.J., Reuben, J. (Eds.), Springer, 1992]. Регистрация слабого сигнала может быть осуществлена путем усреднения сигнала нескольких идентичных сканирований. Однако такое усреднение требует увеличения времени съемки, причем отношение сигнал/шум растёт нелинейно (пропорционально $\sqrt{n}$, где n – число сканирований; например, если съемка занимает 10 минут, и при этом отношение сигнал/шум должно быть увеличено в 10 раз, потребуется увеличение времени съемки в 100 раз, т.е. до 16 часов). При этом продолжительность съемки в живых организмах ограничена как фармакокинетикой диагностического препарата, так и практической применимостью в клинической практике (исследование не должно

занимать более 1-2 часов) и необходимостью для пациента сохранять неподвижность в течение всего времени сканирования. Интенсивность сигнала магнитного резонанса также зависит от напряженности магнитного поля. Поскольку в настоящее время одобрены к клиническому применению МР-томографы с напряженностью магнитного поля не более 7Т, практически применимы только такие диагностические препараты, которые обеспечивают достаточную интенсивность сигнала при 7Т.

Таким образом, дейтерированное соединение в диагностическом препарате по изобретению должно обладать таким набором физико-химических и биологических свойств, который обеспечивает как селективное накопление дейтерия, так и поддержание его концентрации в исследуемых тканях в течение времени, достаточного для регистрации сигнала. Чем ниже достигаемая в ткани концентрация дейтерированного соединения, тем дольше необходимо усреднять сигнал и, следовательно, тем дольше дейтерированное соединение должно присутствовать в тканях, сохраняя селективное распределение. С другой стороны, увеличение дозы диагностического препарата не является универсальным решением, поскольку при этом может ускоряться его выведение (в частности, за счет превышения реабсорбционной способности почек), увеличивается риск токсичности, снижается селективность накопления в различных тканях, кроме того, доза ограничивается растворимостью.

Для большинства химических соединений, включая аминокислоты, отсутствуют данные о максимально достижимых нетоксичных концентрациях в тканях при патологии. Вследствие этого, разработка диагностического препарата, отвечающего вышеизложенным критериям, требует экспериментального подтверждения его применимости в ^2H МРТ и/или МР-спектроскопии *in vivo*.

Техническим результатом настоящего изобретения также является разработка нового эффективного и информативного способа диагностики заболеваний и патологических процессов, сопровождающихся локально измененным (повышенным или пониженным) уровнем поглощения клетками питательных веществ, в частности, онкологических заболеваний, методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия, включающего введение диагностического препарата по изобретению, который способен накапливаться в анализируемых тканях и органах (в частности, в опухолевой ткани) в концентрации, достаточной для регистрации информативной дейтериевой томограммы или ^2H -ЯМР спектра *in vivo*. Дополнительными техническими результатами при осуществлении изобретения являются возможность получения сведений об уровне перфузии в разных точках области сканирования, сведений о структуре опухоли, ее границах, о злокачественности или доброкачественности опухоли. Еще одним дополнительным техническим результатом является возможность оценки локальной скорости

метаболических процессов в области сканирования, которая, в свою очередь, позволяет оценить уровень метаболической активности и/или пролиферации клеток, скорость роста опухоли и является дополнительным параметром, повышающем надежность и достоверность диагностики.

- 5 Способ по изобретению также характеризуется тем, что осуществляется без вредного воздействия ионизирующего излучения (характерного, например, для методов визуализации КТ, ПЭТ, ОФЭКТ), что в свою очередь повышает безопасность исследований, делает возможным проведение более частых повторных исследований, в частности делает метод привлекательным для педиатрии.
- 10 Изобретение направлено на получение диагностической информации, сходной с методом позитронно-эмиссионной томографии или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (отклонение уровня или скорости накопления препарата в патологической ткани от нормы или от значений, достигаемых в окружающих частях той же ткани/того же органа), но при этом позволяет устранить риски, связанные с
- 15 ионизирующим излучением радиофармпрепаратов. Кроме того, в отличие от радиофармпрепаратов для ПЭТ, производство дейтерированных препаратов по изобретению не ограничено синтезом и логистикой малых партий короткоживущих изотопов.

- Указанные технические результаты обеспечиваются за счет разработки
- 20 диагностического препарата, включающего дейтерированное производное саркозина и/или его фармацевтически приемлемую соль или смесь, для диагностики заболеваний методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия.

- Таким образом, первым аспектом изобретения является диагностический
- 25 препарат, включающий по меньшей мере одно соединение, выбранное из дейтерированного производного саркозина и/или фармацевтически приемлемой соли дейтерированного производного саркозина, для диагностики заболеваний или патологических процессов методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия.

- 30 В некоторых вариантах осуществления изобретения диагностический препарат дополнительно включает, по меньшей мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых частных случаях фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой носитель, наполнитель и/или растворитель.

- 35 В некоторых вариантах осуществления изобретения диагностический препарат дополнительно включает ингибитор метаболизма саркозина и/или ингибитор мембранного транспорта саркозина. В некоторых частных случаях ингибитор мембранного транспорта саркозина представляет собой глицин или пролин.

Ингибитор метаболизма саркозина представляет собой фармацевтически приемлемый ингибитор деметилирования саркозина, в частности, уксусную кислоту или ее соль.

В некоторых вариантах осуществления изобретения дейтерированное производное саркозина и/или его фармацевтически приемлемая соль наряду с атомами дейтерия, связанными с атомами углерода, содержит атомы дейтерия, частично или полностью замещающие подвижные атомы водорода, связанные с атомами кислорода и/или азота.

В некоторых вариантах осуществления изобретения диагностический препарат включает

- дейтерированное производное саркозина, содержащее атомы дейтерия как во 2-м, так и в 4-м положении, или его фармацевтически приемлемую соль; или
- смесь дейтерированных производных саркозина и/или их фармацевтически приемлемых солей, в которой присутствует по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия во 2-м положении, и по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия в 4-м положении.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения дейтерированное производное саркозина представляет собой саркозин-4,4,4-d₃, саркозин-2,2-d₂ или саркозин-2,2,4,4,4-d₅.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения диагностический препарат включает смесь, по меньшей мере, двух разных соединений, выбранных из дейтерированного производного саркозина и/или фармацевтически приемлемой соли дейтерированного производного саркозина. В некоторых частных вариантах осуществления изобретения диагностический препарат включает смесь, по меньшей мере, двух соединений, выбранных из саркозина-4,4,4-d₃, саркозина-2,2-d₂ и саркозина-2,2,4,4,4-d₅.

Еще одним аспектом изобретения является способ диагностики заболевания или патологического процесса у субъекта, включающий следующие этапы:

- вводят субъекту диагностический препарат по изобретению;
- проводят магнитно-резонансную томографию и/или магнитно-резонансную спектроскопию на ядрах дейтерия после введения диагностического препарата спустя время, достаточное для его накопления в исследуемой ткани, для получения, соответственно, томограммы (дейтериевой томограммы) и/или ЯМР спектра(ов);
- диагностируют наличие или отсутствие заболевания на основании наблюдаемой интенсивности сигнала ядер дейтерия, отражающей уровень накопления диагностического препарата.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения диагностируемое заболевание или патологический процесс сопровождается локально измененным (повышенным или пониженным) уровнем поглощения клетками питательных веществ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения патологический процесс представляет собой воспалительный процесс, инфекционный процесс, процесс, сопровождающийся активной регенерацией, заболевание, связанное с ишемией органов и тканей, реакцию отторжения трансплантата, аутоиммунное заболевание. В некоторых других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В некоторых частных вариантах осуществления изобретения онкологическое заболевание представляет собой солидную опухоль или метастазы опухоли, в том числе метастазы в лимфоузлах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения наличие или отсутствие заболевания диагностируют на основании сравнения интенсивности сигнала ядер дейтерия у исследуемого субъекта с типичной интенсивностью сигнала, наблюдаемой у здоровых субъектов в соответствующей ткани или соответствующем органе. В некоторых других вариантах осуществления изобретения наличие или отсутствие заболевания диагностируют на основании сравнения интенсивности сигнала ядер дейтерия в областях, соответствующих нормальной и аномальной ткани по данным дополнительного медицинского исследования. В некоторых вариантах наличие или отсутствие заболевания диагностируют на основании комбинирования вышеуказанных сравнений.

В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят, по меньшей мере, одно дополнительное медицинское исследование, выбранное из магнитно-резонансной томографии на ядрах, отличных от ядер дейтерия, ультразвукового исследования, компьютерной томографии, рентгенографии, пальпации, биопсии, анализа биологических жидкостей на онкомаркеры, радионуклидной диагностики и/или визуального наблюдения. В некоторых частных вариантах осуществления изобретения дополнительное медицинское исследование проводят перед проведением диагностики заболевания или патологического процесса методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия, как это описано выше. В некоторых других частных вариантах осуществления изобретения дополнительное медицинское исследование проводят после проведения диагностики заболевания или патологического процесса методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия, как это описано выше.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения наличие или отсутствие заболевания или патологического процесса диагностируют на основании сравнения дейтериевой томограммы исследуемого субъекта с изображением,

полученным в результате магнитно-резонансной томографии субъекта на ядрах протия.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения по пространственному распределению области с повышенным накоплением
5 диагностического препарата на дейтериевой томограмме, делается вывод о пространственной структуре опухоли.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения по интенсивности сигнала дейтерия на дейтериевой томограмме и/или ЯМР спектре(ах) в области
10 повышенного накопления диагностического препарата делается вывод о злокачественности или доброкачественности опухоли.

В некоторых частных вариантах осуществления изобретения по скорости изменения интенсивности сигнала дейтерия на дейтериевой томограмме и/или ЯМР спектре(ах) после его введения делается вывод об уровне перфузии в разных точках области сканирования.

15 Частные варианты осуществления способа диагностики заболевания или патологического процесса у субъекта по изобретению также включают все варианты воплощения изобретения в части диагностического препарата, описанные выше.

В некоторых вариантах осуществления способа диагностики заболевания или патологического процесса у субъекта вводимый диагностический препарат включает

20 - дейтерированное производное саркозина, содержащее атомы дейтерия как во 2-м, так и в 4-м положении, или его фармацевтически приемлемую соль; или

- смесь дейтерированных производных саркозина и/или их фармацевтически приемлемых солей, в которой присутствует по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия во 2-м положении, и по меньшей мере
25 одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия в 4-м положении;

при этом на основании сравнения интенсивности сигналов ядер дейтерия во 2-м и в 4-м положении дейтерированного соединения, на дейтериевой томограмме и/или ЯМР спектре(ах) в исследуемой ткани оценивают локальную скорость метаболизма саркозина, что позволяет проводить более точную диагностику, в частности,
30 оценивать скорость роста или злокачественность опухоли.

В некоторых частных случаях вышеописанных вариантов осуществления изобретения дейтерированное производное саркозина представляет собой саркозин-4,4,4-d₃, саркозин-2,2-d₂ или саркозин-2,2,4,4,4-d₅. В некоторых других частных
35 случаях вышеописанных вариантов осуществления изобретения диагностический препарат включает смесь, по меньшей мере, двух разных соединений, выбранных из дейтерированного производного саркозина и/или фармацевтически приемлемой соли дейтерированного производного саркозина. В некоторых частных вариантах

осуществления изобретения диагностический препарат включает смесь, по меньшей мере, двух соединений, выбранных из саркозина-4,4,4-d₃, саркозина-2,2-d₂ и саркозина-2,2,4,4,4-d₅.

В некоторых вариантах осуществления изобретения диагностический препарат вводят субъекту перорально. В некоторых других вариантах осуществления изобретения диагностический препарат вводят субъекту парентерально.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. а) дейтериевая томограмма (слева) и ²H спектр (справа) образца с саркозином-4,4,4-d₃; б) дейтериевая томограмма (слева) и ²H спектр (справа) образца с саркозином-2,2,4,4,4-d₅; в) дейтериевая томограмма (слева) и ²H спектр (справа) образца со смесью саркозина-2,2-d₂ и саркозина-4,4,4-d₃.

Фигура 2. Томограммы мыши №1 с карциномой молочной железы 4T1 после введения 30 мг саркозина-4,4,4-d₃: а) ²H томограммы, полученные в разные моменты времени после введения; б) ²H томограмма (слева), наложение ²H и ¹H томограмм (по центру), ¹H томограмма (справа).

Фигура 3. Томограммы мыши с карциномой молочной железы 4T1 после введения: а) 30 мг L-аланина-3,3,3-d₃; б) 10 мг L-фенилаланина-β,β,2,3,4,5,6-d₇.

Определения и термины

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены некоторые термины, использованные в настоящем описании изобретения.

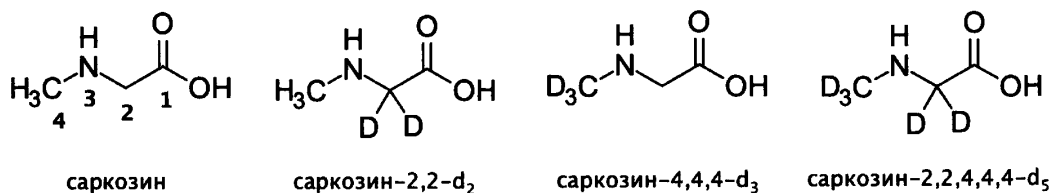
В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Термин «субъект» охватывает все виды млекопитающих, предпочтительно человека.

Под термином «дейтерированное производное» в данном документе понимается соединение, содержащее дейтерий, связанный с углеродом, в количестве, превышающем его природное содержание, по меньшей мере, в одном положении. В частных случаях воплощения изобретения содержание дейтерия, по меньшей мере, в одном положении, превышает 10%, в других частных случаях – 90%. Под «смесью, по меньшей мере, двух разных дейтерированных производных» понимается смесь соединений, содержащих дейтерий в разных положениях, или содержащих разное количество дейтерия в одном и том же положении. Символом «d» («D») в данном документе обозначается атом водорода, представленный изотопом ²H в доле, превышающей его природное содержание.

Дейтерированные производные саркозина включают саркозин-4,4,4-d₃, саркозин-2,2-d₂, саркозин-2,2,4,4,4-d₅, а также другие производные, например, саркозин-2,4,4-d₃, саркозин-2,2,4-d₃, саркозин-2,4,4,4-d₄, саркозин-4,4-d₂, но не ограничиваются ими (принятая

в данном документе нумерация атомов показана ниже).



Под термином «воксел» в данном документе понимается минимальный элемент объема области сканирования, которому соответствует определенное значение интенсивности сигнала дейтерия или определенный локальный спектр.

- Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к таким солям, которые пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.д., и отвечают разумному соотношению пользы и риска. Фармацевтически приемлемые соли амин
- аминов, карбоновых кислот, фосфонатов и другие типы соединений хорошо известны в медицине. Соли могут быть получены *in situ* в процессе выделения или очистки соединений изобретения, а также могут быть получены отдельно, путем взаимодействия свободной кислоты или свободного основания соединения изобретения с подходящим основанием или кислотой, соответственно. Примером фармацевтически приемлемых, нетоксичных солей кислот могут служить соли аминокруппы, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная, фосфорная, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, малеиновая, фумаровая, винная, янтарная, аскорбиновая, лимонная, масляная, молочная, глюконовая кислоты, или полученные другими методами, используемыми в данной области, например, с помощью ионного обмена. Типичные соли щелочных и щелочноземельных металлов содержат натрий, калий, кальций, магний и другие. Кроме того, фармацевтически приемлемые соли могут содержать, если требуется, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, полученные с использованием таких противоионов, как галогениды, гидроксиды, карбоксилаты, сульфаты, фосфаты, и другие.
- Диагностический препарат по изобретению может включать одно или несколько любых фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, подходящих для конкретной формы дозирования, в частности, любых носителей, растворителей и/или наполнителей, таких, которые могут быть введены в организм пациента совместно с соединением, составляющим суть данного изобретения, и которые не разрушают это соединение, и являются нетоксичными при введении. Неограничивающими частными примерами фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ могут служить хлорид натрия, глюкоза, подсластители, пищевые ароматизаторы, и красители и др.

Подробное раскрытие изобретения

Успешная реализация диагностики заболевания с помощью ^2H МРТ или МР-спектроскопии основывается на способности конкретного дейтерированного соединения селективно накапливаться в различных тканях и при этом создавать сигнал с интенсивностью, достаточной с точки зрения фундаментальных физических ограничений методов ядерного магнитного резонанса (гиромангнитное отношение, параметры релаксации ядер дейтерия). Интенсивность сигнала дейтерия при этом:

- а) пропорциональна достигаемой в ткани концентрации дейтерия (зависит от дозы, кинетики мембранного транспорта, концентрирующей способности ткани),
- б) пропорциональна квадратному корню из времени съемки (время ограничено скоростью выведения и/или метаболизма дейтерированного соединения, а также необходимостью для пациента оставаться без движения в течение всего сканирования),
- в) зависит от времени релаксации T_1 (определяет максимальную скорость усреднения и, следовательно, интенсивность суммарного сигнала, получаемого в единицу времени; для разных соединений различается в несколько раз: см. Biological Magnetic Resonance, Volume 11, In Vivo Spectroscopy. Berliner L.J., Reuben, J. (Eds.), Springer, 1992).

Каждое химическое соединение обладает уникальными параметрами фармакокинетики (в частности, концентрация соединения и скорость ее изменения в крови, различных органах и тканях). Фармакокинетика при этом неочевидным образом зависит от используемой дозы (в частности, превышение реабсорбционной способности почек в отношении конкретного соединения может приводить к его ускоренному выведению). При этом доза ограничена токсичностью и растворимостью данного соединения. Эксперименты, проведенные авторами, а также сведения из уровня техники показывают, что свободно диффундирующие дейтерированные соединения, такие как D_2O , не демонстрируют селективного накопления в различных органах и тканях субъекта.

Авторами было обнаружено, что дейтерированные производные саркозина, входящие в состав диагностического препарата по изобретению:

- способны селективно накапливаться в тканях животных в концентрации, достаточной для визуализации различных органов и тканей *in vivo*, в том числе, раковых опухолей, методом ^2H МРТ или МР-спектроскопии;
- обладают фармакокинетическими свойствами, позволяющими использовать нетоксичные дозы, и при этом успешно регистрировать ^2H МРТ и/или ^2H ЯМР спектры;
- в концентрациях, достаточных для успешной регистрации ^2H МРТ и/или ^2H ЯМР, характеризуются достаточно медленным выведением и метаболизмом,

совместимыми с временными ограничениями методов дейтериевой томографии и МР-спектроскопии.

Несмотря на то, что саркозин не является физиологически значимым питательным веществом, авторами было обнаружено, что он селективно
5 накапливается в различных органах и тканях субъекта в концентрации, достаточной для проведения визуализации методом МРТ. В свою очередь, это позволяет осуществлять эффективную диагностику заболеваний и патологических процессов, сопровождающихся локально измененным (повышенным или пониженным) уровнем поглощения клетками питательных веществ, в том числе, определять наличие и
10 локализацию онкологического заболевания, посредством магнитно-резонансной томографии на ядрах дейтерия. При этом наши эксперименты показали, что другие аминокислоты, в частности, глицин-d₂, L-аланин-3,3,3-d₃ и L-фенилаланин-β,β,2,3,4,5,6-d₇ не обладают подходящими физико-химическими и биологическими свойствами и, таким образом, не могут быть использованы для диагностики
15 заболеваний методом ²H МРТ или МР-спектроскопии.

Отличительной особенностью дейтерированных производных саркозина является возможность наблюдения сразу двух сигналов дейтерия в МРТ или МР-спектроскопии при использовании производного, содержащего атомы дейтерия как во
20 2-м, так и в 4-м положении, например, саркозина-2,2,4,4,4-d₅ (Фигура 1б) или смеси саркозинов, в которой отдельные компоненты содержат атомы дейтерия во 2-м и/или в 4-м положении (за исключением вариантов, в которых присутствуют лишь компоненты, содержащие атомы дейтерия только во 2-м (или только в 4-м) положении), например смеси саркозина-2,2-d₂ и саркозина-2,2,4,4,4-d₅ или смеси
25 саркозина-4,4,4-d₃ и саркозина-2,2-d₂. В отличие от методов, основанных на радиоактивных изотопах, это позволяет, помимо уровня накопления дейтерированного производного, получать информацию о метаболизме саркозина на основании разницы в отношении интенсивностей сигналов дейтерия препарата. Отношение интенсивностей сигналов ЯМР атомов дейтерия во 2-м и в 4-м положении
30 саркозина в данном случае отражает различия исследуемых вокселей области сканирования в скорости окислительного деметилирования (первой стадии метаболизма) саркозина. Известно, что саркозин служит донором метильной группы в системе метаболизма одноуглеродных фрагментов (S. de Vogel et al. Int. J. Cancer, 2014, 134,1, 197-206). Одноуглеродные фрагменты (в основном, связанные с тетрагидрофолатом и S-аденозилметионином) используется организмом, в том числе,
35 для синтеза ДНК, необходимого для пролиферации клеток. Таким образом, повышенная локальная скорость метаболизма саркозина может свидетельствовать о локально повышенной скорости пролиферации, в частности, о росте опухоли или отдельных ее частей. Использование такой дополнительной диагностической

информации о метаболизме саркозина делает метод диагностики по изобретению более достоверным. Отношение интенсивностей сигналов ЯМР атомов дейтерия во 2-м и в 4-м положении саркозина может измеряться как один раз за сканирование, так и несколько раз. Пониженное отношение сигнала во 2-м положении к сигналу в 4-м
5 положении по сравнению с интактным дейтерированным производным свидетельствует о деметилировании. Таким образом, чем ниже отношение этих сигналов в данном вокселе, тем быстрее протекает в нем деметилирование саркозина.

Массовое отношение двух различных дейтерированных производных саркозина, входящих в состав одного диагностического препарата, может составлять от 1:1 до
10 1:10, в предпочтительных вариантах воплощения – от 1:1 до 1:3, но не ограничивается ими.

Из уровня техники известно, что метаболизм дейтерированного саркозина отличается от метаболизма недейтерированного саркозина за счет кинетического изотопного эффекта реакции окисления N-метильной группы (R.H. Abeles, W.R. Frisell,
15 C.G. Mackenzie; J. Biol. Chem. 1960, 235, 3, 853-856). Это делает невозможной прямую экстраполяцию результатов, полученных со сверхнизкими дозами радиоактивно-меченых производных саркозина на дейтерированные производные саркозина по изобретению, применяемые в дозах более 10 мг/кг, ввиду фундаментальных ограничений метода дейтериевой МРТ.

Из уровня техники известно, что разные аминокислоты обладают различной кинетикой накопления в клетках животных и человека, а также различаются в десятки раз по достигаемому в равновесном состоянии градиенту концентрации [Johnstone, R.M., Scholefield, P.G., Adv. Cancer Res. 1965, 9, 143-226]. Поведение аминокислот *in vivo* дополнительно осложняется гомеостазом и направленным транспортом на
25 уровне целого организма. В частности, известно, что избыток аланина, высвобождаемого мышцами, активно поглощается печенью; в физиологической концентрации глутамин активно поглощается несколькими видами раковых опухолей. Поскольку дейтериевая томография или спектроскопия предполагает введение доз, в несколько раз превышающих физиологические, а разные органы и ткани
30 характеризуются различной кинетикой накопления и емкостью в отношении различных аминокислот, не представляется возможным предсказать наличие селективного накопления конкретной аминокислоты без проведения прямого эксперимента.

Важным свойством дейтерированного компонента (саркозина) диагностического препарата по изобретению является достаточная устойчивость к метаболическому
35 обмену дейтерия на протий *in vivo*. Такой обмен понижает концентрацию дейтериевой метки, одновременно повышая фоновый сигнал тяжелой воды (DOH), которая равномерно распределяется по организму за счет быстрой диффузии. Этот процесс приводит к снижению контрастности изображения, а также препятствует

количественной оценке концентрации дейтерированного компонента путем сравнения с интенсивностью сигнала природной ДОН. Проведенные нами исследования показали, что некоторые дейтерированные природные аминокислоты, в частности, глицин-2,2-d₂ и L-аланин-3,3,3-d₃ не могут быть использованы для получения

5 диагностически значимых изображений по изобретению, поскольку очень быстро теряют дейтерий *in vivo*.

Благодаря низкому содержанию дейтерия в организме (0,015% атомов водорода), фоновые сигналы в ²H МРТ на несколько порядков ниже, чем в ¹H МРТ. Таким образом, даже в низкой концентрации диагностического препарата его сигнал

10 не накладывается на сигналы естественных фоновых компонентов. Разработка аналогичных методов с использованием недейтерированных диагностических препаратов на основе ¹H МРТ затруднена из-за существования большого количества фоновых сигналов естественных низкомолекулярных соединений с интенсивностью, сравнимой с максимальной достижимой интенсивностью сигнала недейтерированного

15 диагностического препарата.

Способ по изобретению позволяет диагностировать, в частности, наличие или отсутствие онкологического заболевания, сопровождающегося образованием солидных опухолей (как первичных, так и метастатических) и/или метастазов в лимфоузлах. Онкологические заболевания, поддающиеся диагностике с помощью

20 дейтерированных диагностических препаратов, включают: рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, меланому, рак мозга (в том числе, метастазы опухолей другого происхождения), рак почки, рак кишечника, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак матки, неходжкинскую лимфому, рак печени, саркомы, но не ограничиваются ими. Помимо онкологических заболеваний способ по изобретению

25 может быть использован в диагностике других заболеваний, характеризующихся высокой метаболической активностью или пролиферацией клеток: например, при отторжении пересаженных органов и клеток, при аутоиммунных, воспалительных или инфекционных заболеваниях, при поражениях печени, сопровождающихся активной регенерацией. Также возможна диагностика заболеваний, развивающихся вследствие

30 нарушения кровоснабжения (ишемии) различных органов, например, сердца, мозга, почек. Нарушение кровоснабжения приводит к снижению скорости поглощения и достигаемого уровня накопления в этих органах аминокислот, в том числе, саркозина, наблюдаемого с помощью ²H МРТ или МР-спектроскопии. Метод по изобретению основан на использовании дейтерированного диагностического препарата и

35 регистрации томограмм и/или ЯМР спектров на частоте дейтерия.

Известно, что ¹H МРТ сама по себе во многих случаях обладает недостаточной диагностической точностью. То же самое касается методов МРТ, основанных на измерении параметров перфузии (например, dynamic contrast-enhanced MRI). В

отличие от перфузионных методов, способ диагностики по изобретению предоставляет данные о скорости мембранного транспорта и уровне накопления саркозина в клетках, характерные для ПЭТ или ОФЭКТ, и недоступные в традиционных способах воплощения ^1H МРТ. Таким образом, способ по изобретению

5 позволяет получить более точную диагностическую информацию. В частности, при онкологическом заболевании способ по изобретению позволяет производить оценку метаболической активности исследуемой ткани, и, как следствие, делать вывод о злокачественности или доброкачественности опухоли, оценивать ее агрессивность. Сигнал диагностического препарата по изобретению может наблюдаться в течение по

10 меньшей мере 3-х часов (см. фигуру 2). Скорость изменения интенсивности сигнала в раковой опухоли и различных внутренних органах (печень, селезенка, поджелудочная железа, почки) при повторном сканировании на протяжении до 3-х часов отражает уровень перфузии и метаболическую активность данных тканей и органов, что может использоваться при постановке более точного диагноза на основании дейтериевой

15 томографии и/или МР-спектроскопии.

В частных случаях воплощения изобретения по пространственному распределению сигнала дейтерия диагностического препарата делают вывод о пространственной структуре опухоли.

В других частных случаях воплощения изобретения по интенсивности сигнала дейтерия в области с повышенным содержанием диагностического препарата делают вывод о степени злокачественности/агрессивности опухоли. Злокачественные опухоли характеризуются более активным метаболизмом и повышенной активностью мембранного транспорта. Следовательно, в опухолях, имеющих более высокую степень злокачественности, интенсивность сигнала дейтерия будет выше.

25 В других частных случаях воплощения изобретения по скорости изменения интенсивности сигнала дейтерия диагностического препарата оценивают перфузию в исследуемой области. В областях с высокой степенью перфузии скорость изменения сигнала дейтерия во времени (от момента начала накопления в опухолевой ткани до полного выведения) выше.

30 Диагностический препарат по изобретению вводят в количестве, эффективном для проведения диагностики. Под эффективным количеством в данном случае подразумевается такое количество соединения (дейтерированного производного саркозина и/или его фармацевтически приемлемой соли), вводимого или доставляемого пациенту, при котором с наибольшей вероятностью проявится желаемый эффект –

35 возможность осуществления способа диагностики по изобретению методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия. Ввиду фундаментальных ограничений метода дейтериевой МРТ, количество дейтерированного производного саркозина и/или его фармацевтически приемлемой соли

не может быть сверхмалым и применяется в количестве от нескольких мг на кг веса, в дозах более 10 мг/кг, например 0,1-1,5 г/кг. В частности, при расчете дозы препаратов для млекопитающих разных видов обычно используется не вес, а площадь поверхности тела, которая нелинейно зависит от веса. Точное требуемое количество может меняться от
5 субъекта к субъекту в зависимости от вида млекопитающего, возраста, массы тела и общего состояния пациента, тяжести заболевания, методики введения препарата.

Из уровня техники также известно, что период полувыведения одного и того же соединения может различаться у разных видов животных (обычно период полувыведения больше у животных более крупных видов), в связи с чем оптимальное время между
10 введением препарата и сканированием может существенно отличаться для разных млекопитающих. Оптимальное время между введением препарата и сканированием зависит от природы заболевания и исследуемой области тела субъекта. Как видно на Фигуре 2, внутренние органы субъекта (печень, поджелудочная железа, селезенка и т.д.) проявляются на дейтериевой томограмме до того, как накопление саркозина в опухоли
15 достигает максимума.

Диагностический препарат по изобретению может быть введен в организм пациента любым путем введения, эффективным для проведения диагностики, например, он может быть введен перорально, парентерально, местно и т.п.

Мембранный транспорт саркозина осуществляется теми же транспортерами, что и
20 транспорт глицина и пролина (F.H. Glorieux et al. J. Clin. Investigation, 1971, 50, 2313-2322). Глицин и пролин ингибируют транспорт саркозина пропорционально своей концентрации и при этом характеризуются биораспределением, отличным от такового для саркозина. Поэтому введение глицина и/или пролина одновременно с препаратом по изобретению или в составе препарата по изобретению способно изменять уровни накопления саркозина в
25 различных органах и тканях субъекта. Такое изменение может усиливать контрастность дейтериевой томографии, если сканируемые органы и ткани субъекта в разной степени накапливают саркозин, глицин и/или пролин.

Поскольку мембранный транспорт саркозина осуществляется несколькими транспортерами с различной аффинностью к разным аминокислотам, введение
30 аминокислот, использующих те же транспортеры, что и саркозин, в частности, глицина и пролина, вместе с дейтерированным производным саркозина позволяет ингибировать транспорт саркозина отдельными транспортерами и, таким образом, селективно визуализировать накопление, осуществляемое другими транспортерами. Такое использование ингибиторов, например, глицина и/или пролина, позволяет улучшить
35 контрастность диагностического изображения без изменения структуры дейтерированного производного саркозина. Улучшение контрастности диагностических изображений за счет селективного использования отдельных типов транспортеров при переходе от 2-дезоксидеокси-2-[¹⁸F]фторглюкозы к метил 4-дезоксидеокси-4-[¹⁸F]фторглюкозиду ранее было

продемонстрировано (V. Kere et al. J. Neurooncol., 2018, 138, 5, 557-569), но, в отличие от этой работы, способ по изобретению позволяет изменять селективность транспорта без изменения химической структуры действующего вещества.

Окислительное деметилирование саркозина ингибируется некоторыми соединениями, например, ацетатом и метоксиацетатом (W.R. Frisell, C.G. Mackenzie, J. Biol. Chem. 1955, 217, 1, 275-285). Введение субъекту ацетата или другого фармацевтически приемлемого ингибитора деметилирования саркозина одновременно с или в составе диагностического препарата позволяет замедлить окисление дейтерированного производного саркозина и таким образом увеличить интенсивность сигнала дейтерированного производного и/или продолжительность его присутствия в концентрации, достаточной для регистрации дейтериевой МРТ или спектров.

В одном из вариантов воплощения изобретения процесс диагностики включает проведение МРТ и осуществляется следующим образом:

а) в некоторых вариантах воплощения изобретения проводится МРТ на ядрах протия (^1H). Регистрация ^1H МРТ позволяет, во-первых, осуществить анатомическую привязку дейтериевого сигнала, во-вторых, идентифицировать области с подозрением на патологию, в частности, злокачественное новообразование (в других вариантах воплощения изобретения определение области проведения ^2H МРТ может быть осуществлено другими способами, в частности, посредством ультразвукового исследования, компьютерной томографии, рентгенографии, пальпации, биопсии, анализа биологических жидкостей на онкомаркеры, радионуклидной диагностики и/или визуального наблюдения);

б) вводится диагностический препарат;

в) спустя время, достаточное для накопления диагностического препарата в исследуемой ткани субъекта, проводится регистрация томограммы на частоте прецессии ядер дейтерия диагностического препарата;

г) полученные дейтериевые томограммы анализируются с целью нахождения участков с аномально высокой или низкой интенсивностью и, следовательно, отвечающих селективному накоплению диагностического препарата. В частности, возможно сравнение томограмм, полученных на ^1H и на ^2H : если аномальные участки на ^1H и ^2H совпадают, можно говорить о большей вероятности наличия патологии.

В другом варианте воплощения изобретения процесс диагностики включает проведение МР-спектроскопии на ядрах дейтерия и осуществляется следующим образом:

а) проводится ^1H МРТ, в результате чего идентифицируются области с подозрением на патологию, в частности, злокачественное новообразование (в других вариантах воплощения изобретения определение области проведения ^2H МРТ может быть осуществлено другими способами, в частности, посредством ультразвукового исследования, компьютерной томографии, рентгенографии, пальпации, биопсии,

анализа биологических жидкостей на онкомаркеры, радионуклидной диагностики и/или визуального наблюдения);

б) вводится диагностический препарат;

5 в) спустя время, достаточное для накопления диагностического препарата в исследуемой ткани субъекта в вокселях, соответствующих области с подозрением на патологию (например, по результатам ^1H МРТ), проводится регистрация спектра дейтерия (в частности, с использованием методов локальной спектроскопии); опционально проводится регистрация спектра в соседних вокселях для сравнения интенсивности сигнала;

10 г) интенсивность сигнала в вокселях, соответствующих области с подозрением на патологию, сравнивается, в частности, с: (i) типичными значениями для данного органа или ткани (которые должны быть определены предварительно на здоровых субъектах) и/или (ii) интенсивностью в соседних вокселях, соответствующих тому же органу или ткани и свободных от аномалий по данным ^1H МРТ. Повышенная или пониженная интенсивность
15 сигнала позволяет говорить о селективном накоплении диагностического препарата и, как следствие, о наличии патологии, в частности, злокачественного новообразования.

Порядок этапов «а), б), в)» в обоих вышеуказанных вариантах воплощения изобретения может быть изменен на «б), а), в)» или «б), в), а)». Также возможна параллельная регистрация сигналов ^1H и ^2H (т.е. одновременное проведение этапов
20 «а)» и «в)»).

В частных случаях воплощения изобретения после идентификации области с подозрением на злокачественное образование выбираются отдельные воксели, лежащие как в пределах, так и за пределами подозрительной области (в частности, может быть выбрана серия соседних вокселей, лежащих на одной линии,
25 пересекающей границу подозрительной области). Регистрация интегрального сигнала ^2H или локальных ^2H спектров в выбранных вокселях с последующим сравнением их интенсивности позволяет быстро и с большей чувствительностью обнаруживать области накопления диагностического препарата.

МРТ изображения и МР спектры могут быть получены на любом магнитно-резонансном томографе, оснащенном оборудованием для регистрации сигнала
30 дейтерия.

Исследования, проведенные авторами изобретения, свидетельствуют о хорошей переносимости диагностического препарата животными, отсутствии видимых побочных эффектов при использовании в указанных дозах. Из уровня техники
35 известно, что саркозин безопасен при введении в больших дозах ($\text{LD}_{50} > 5$ г/кг). Учитывая эффективный катаболизм природного саркозина с сопутствующим высвобождением дейтерия в виде DOH (нетоксична в очень высоких дозах, вплоть до замещения 10-30% воды в организме, а также присутствует в воде организма в

концентрации около 1×10^{-2} моль/л), мы не ожидаем побочных эффектов, связанных с введением множественных атомов дейтерия.

Способ по изобретению осуществляется без вредного воздействия ионизирующего излучения (характерного, например, для методов КТ, ПЭТ, ОФЭКТ), что в свою очередь повышает безопасность исследований, делает возможным проведение более частых повторных исследований, в частности делает метод привлекательным для педиатрии.

Способ диагностики по изобретению может применяться, в частности, для ранней диагностики злокачественных опухолей различной локализации, метастатических поражений, оценки ответа опухоли на лечение и заключения об эффективности проводимой терапии, для уточнения диагноза, составленного на основании результатов ^1H МРТ и/или других методов диагностики.

Способ по изобретению расширяет существующие возможности неинвазивной диагностики, в том числе, позволяет осуществлять эффективную диагностику онкологических заболеваний.

Фармацевтически приемлемые соли дейтерированных производных саркозина обладают всеми свойствами, необходимыми для их использования в составе диагностического препарата по изобретению.

Осуществление изобретения

Возможность объективного проявления технического результата при использовании изобретения подтверждена достоверными данными, приведенными в примерах, содержащих сведения экспериментального характера, полученные в процессе проведения исследований по методикам, принятым в данной области. Сущность изобретения поясняется фигурами.

Следует понимать, что эти и все приведенные в материалах заявки примеры не являются ограничивающими и приведены только для иллюстрации настоящего изобретения.

Приведенные в данном документе примеры служат иллюстрациями принципа действия разработанного метода, и не ограничивают диапазон используемых доз, а также диапазон времени между введением диагностического препарата и регистрацией сигнала дейтерия, поскольку в зависимости от чувствительности и других параметров используемого оборудования, диагностируемого заболевания и природы субъекта (человек или лабораторное животное) необходимые дозы и время, необходимое для накопления препарата, могут отличаться. В частности, из уровня техники известно, что период полувыведения одного и того же соединения может различаться у разных видов животных, и что при переходе от одного вида животного к другому или к человеку дозы, как правило, масштабируются пропорционально площади поверхности тела, а не массе тела. Кроме того, приведенные параметры регистрации спектров и томограмм, включая время

накопления сигнала, являются частью конкретных вариантов воплощения изобретения и могут меняться в зависимости от используемого оборудования и конкретных диагностических задач.

Синтез N-(CD₃)-глицина (саркозина-4,4,4-D₃).

5 N-тозилглицин был получен по литературной методике (A. Cohen *et al.* J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, **1986**, 24, 5, 587-597).

В 17.2 мл 3М NaOH растворили 3.29 г (0.014 моль) тозилглицина. Полученный раствор поместили в стеклянный автоклав и охладили на ледяной бане. К холодному раствору тозилглицина в водной щелочи при перемешивании добавили 3.25 г (0.022 моль) 10 CD₃I. Реакционную смесь поместили в предварительно нагретую до 85 °С водяную баню, и интенсивно перешивали при заданной температуре 8ч. Затем смесь охладили до комнатной температуры и оставили на ночь в холодильнике. Реакционную смесь охладили в бане со льдом, и при перемешивании добавили 4 мл холодной конц. HCl. Полученную суспензию перемешивали 1ч в бане со льдом, после этого отфильтровали светло-желтый 15 осадок. Выход N-тозилсаркозина-4,4-d₃: 3.15 г (92%).

Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 7.67 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 2,6-Ar), 7.71 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 3,4 Ar), 3.84 (2H, s, CH₂), 2.39 (3H, s, ArCH₃).

T_{пл.} = 149–151 °C.

Раствор тозилсаркозина-d₃ 2.8 г (0.011 моль) в 12 мл концентрированной HCl 20 интенсивно перемешивали при 100 °C в течение 14 ч. После этого смесь охладили до комнатной температуры и разбавили водой. Полученный раствор концентрировали на роторном испарителе (водяная баня 38°C), повторно разбавили водой и снова концентрировали для удаления соляной кислоты. Продукт был выделен из реакционной 25 смеси, состоящей из самого продукта, остаточной соляной кислоты и TsOH с помощью ионообменной хроматографии следующим образом: смесь в виде разбавленного водного раствора (200 мл) была пропущена со скоростью 0,1 объема подушки в минуту через колонну, содержащую 46 мл (88 мэв) смолы Dowex 50. Колонку промывали водой до выхода нейтрального элюата 300 мл. Продукт был элюирован 250 мл 1М раствора NH₄OH и высушен на роторном испарителе. Выход саркозина-4,4,4-d₃: 0.86 г (85%).

30 Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, D₂O, ppm): δ = 3.59 (s, CH₂).

T_{пл.} = 202–204 °C

Синтез саркозина-2,2-D₂.

Тозилглицин 0.47 г (0.002 моль) растворили в растворе натриевой щелочи в D₂O, приготовленном из 3.5 мл D₂O и 0.29г (0.007 моль) NaOH. Полученный раствор поместили 35 в стеклянный автоклав и охладили на ледяной бане. К холодному раствору тозилглицина в водной щелочи при магнитном перемешивании добавили 0.46 г (0.003 моль) CH₃I. Реакционную смесь поместили в предварительно нагретую до 85 °С водяную баню, и интенсивно перешивали при заданной температуре 8ч. Затем смесь охладили до

комнатной температуры и оставили на ночь в холодильнике. Реакционную смесь охладили в бане со льдом, и при перемешивании добавили 0.7 мл холодной концентрированной HCl. Полученную суспензию перемешивали 1ч в бане со льдом, после этого отфильтровали светло-желтый осадок. Для дальнейших реакций продукт не нуждается в очистке. Выход

- 5 N-тозилсаркозина-2,2-d₂: 0.44 г (90%).

Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 7.67 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 2,6-Ar), 7.71 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 3,4 Ar), 2.74 (3H, s, NMe), 2.39 (3H, s, ArCH₃).

T_{пл.} = 149–151 °C

Гидролиз проводили аналогично методике, описанной выше для случая саркозина-

- 10 4,4-d₃. Выход саркозина-2,2-D₂: 84%.

Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, D₂O, ppm): δ = 2.68 (s, CH₃).

T_{пл.} = 200–203 °C

Синтез саркозина-2,2,4,4,4-d₅.

- 15 N-тозилсаркозин-2,2,4,4,4-d₅ был получен аналогично предыдущему примеру, но с использованием CD₃I вместо CH₃I. Выход: 88%.

Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ = 7.67 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 2,6-Ar), 7.71 (2H, d, ³J=8.2 Hz, 3,4 Ar), 2.39 (3H, s, ArCH₃).

T_{пл.} = 150–152 °C.

Гидролиз проводили аналогично методике, описанной выше для случая саркозина-

- 20 4,4-d₃. Выход саркозина-2,2,4,4,4-D₅: 85%

Спектр ЯМР ¹H (600 MHz, D₂O, ppm): В спектре присутствуют только сигналы остаточных протонов растворителя.

T_{пл.} = 200–203 °C

- 25 В приведенных ниже примерах использовался томограф Bruker BioSpec BC70/30 USR с постоянным полем 7,05 Тл, оснащенный объемным резонатором, настроенным на частоты ¹H (передача/прием) и ²H (передача), а также поверхностной приемной катушкой диаметром 5 см.

- 30 Для регистрации дейтериевой томограммы использовалась импульсная последовательность FLASH (Fast low angle shot). Частота возбуждения определялась по ²H ЯМР спектру и составляла на используемом приборе: sfo1 ≈ 46.17452 МГц, прямоугольный возбуждающий импульс шириной 2560 Гц и мощностью 11.2 dB, угол отклонения FA = 30°, время повторения TR = 11.8 мс, время эхо TE = 4.07 мс, область сканирования 10 см x 10 см, матрица сканирования 50 x 50, толщина среза 3 см, 35 ширина пропуска частот 12500 Гц, общее время сканирования 9 минут 34 секунды (1024 накопления).

Пример 1. Регистрация дейтериевой томограммы и ^2H ЯМР спектра образца, содержащего разбавленный раствор дейтерированного саркозина.

Для демонстрации принципиальной возможности регистрации дейтериевой томограммы разбавленного раствора дейтерированного саркозина был проведен следующий эксперимент.

Стекланный флакон, содержащий 5 мл раствора саркозина-4,4,4- d_3 (5 мг) или саркозина-2,2,4,4,4- d_5 (5 мг) или смеси саркозина-4,4,4- d_3 (5 мг) и саркозина-2,2- d_2 (5 мг) в дистиллированной воде, помещался в центре магнита томографа. Поверхностная катушка диаметром 5 см располагалась непосредственно над флаконом.

На фигуре 1а показаны дейтериевая томограмма (слева) и ^2H спектр (справа) образца с саркозином-4,4,4- d_3 . На фигуре 1б показаны дейтериевая томограмма (слева) и ^2H спектр (справа) образца с саркозином-2,2,4,4,4- d_5 . На фигуре 1в показаны дейтериевая томограмма (слева) и ^2H спектр (справа) образца со смесью саркозина-2,2- d_2 и саркозина-4,4,4- d_3 .

Пример 2. Использование дейтериевой томографии для визуализации карциномы молочной железы мыши 4T1 *in vivo* с использованием диагностического препарата, содержащего саркозин-4,4,4- d_3 .

В данном примере проводились эксперименты на мышах Balb/c с привитой карциномой молочной железы 4T1 (инъекция 5×10^5 клеток/60 мкл под левой передней лапой за 12 дней до эксперимента). Животному весом 20 г вводился внутривенно раствор 30 мг саркозин-4,4,4- d_3 в 0.5 мл воды. Через 10 мин после введения животное обезбоживалось с помощью изофлурана, размещалось на подогреваемой кровати в томографе. Поверхностная приемная ^2H катушка располагалась над передней частью тела животного с дорсальной стороны, как отмечено на фигуре 2 пунктиром.

На фигуре 2 видно, что начало процесса накопления дейтерированного производного саркозина в опухолевой ткани наблюдается уже через несколько минут после введения, со временем дейтерированное производное саркозина накапливается в опухолевой ткани, причем максимальная интенсивность сигнала дейтерия наблюдается примерно через 90-140 минут после введения препарата. Как видно из приведенных данных, сигнал дейтерия сохраняется в течение нескольких десятков минут, таким образом, саркозин-4,4,4- d_3 обладает благоприятной фармакокинетикой для практического использования в ^2H МРТ и МР-спектроскопии.

Как следует из приведенных результатов, диагностический препарат на основе дейтерированного производного саркозина способен накапливаться в патологической (опухолевой) ткани в концентрации, достаточной для регистрации информативной дейтериевой томограммы или ^2H -ЯМР спектра *in vivo* и, следовательно, может использоваться для неинвазивной диагностики заболеваний, включая онкологические, методом ^2H МРТ и/или МР-спектроскопии.

Пример 3. Использование дейтериевой томографии для визуализации карциномы молочной железы мыши 4T1 *in vivo* с использованием диагностического препарата, содержащего L-аланин-3,3,3-d₃ и L-фенилаланин-β,β,2,3,4,5,6-d₇.

- 5 В данном примере проводились эксперименты на мышах Balb/c с привитой карциномой молочной железы 4T1 (инъекция 5×10^5 клеток/60 мкл под левой передней лапой за 12 дней до начала эксперимента).

Животному весом 20 г вводился внутривенно раствор:

- а) 30 мг L-аланина-3,3,3-d₃ в 0.5 мл воды; либо
10 б) 10 мг L-фенилаланина-β,β,2,3,4,5,6-d₇ в 1.0 мл воды (меньшая доза фенилаланина в пересчете на дейтерий обусловлена низкой растворимостью фенилаланина и, как следствие, невозможностью введения большего объема диагностического препарата без вреда для здоровья субъекта).

- Через 10 мин после введения животное обездвигивалось с помощью
15 изофлурана, размещалось на подогреваемой кровати в томографе. Поверхностная приемная ²H катушка располагалась над передней частью тела животного с дорсальной стороны, как отмечено на фигуре 3 пунктиром.

- На фигуре 3 видно, что дейтерированные производные аланина и фенилаланина не накапливаются в опухолевой ткани и не проявляют селективности накопления в
20 различных органах. Это свидетельствует о том, что дейтерированные производные аланина и фенилаланина не могут быть использованы для проведения диагностики онкологических заболеваний методом ²H MPT или МР-спектроскопии.

- Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты
25 воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути
30 настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Диагностический препарат, включающий по меньшей мере одно соединение, выбранное из дейтерированного производного саркозина и/или фармацевтически приемлемой соли дейтерированного производного саркозина, для диагностики заболеваний методом магнитно-резонансной томографии и/или магнитно-резонансной спектроскопии на ядрах дейтерия.
2. Диагностический препарат по п.1, который дополнительно включает, по меньшей мере, одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
3. Диагностический препарат по п.2, характеризующийся тем, что фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой носитель, наполнитель и/или растворитель.
4. Диагностический препарат по п.1, дополнительно включающий ингибитор метаболизма саркозина и/или ингибитор мембранного транспорта саркозина.
5. Диагностический препарат по п.4, в котором ингибитор мембранного транспорта саркозина представляет собой глицин или пролин.
6. Диагностический препарат по п.4, в котором ингибитор мембранного транспорта саркозина представляет собой фармацевтически приемлемый ингибитор деметилирования саркозина.
7. Диагностический препарат по п. 1, в котором дейтерированное производное саркозина представляет собой саркозин-4,4,4-d₃, саркозин-2,2-d₂, саркозин-2,2,4,4,4-d₅.
8. Диагностический препарат по п.1, который включает смесь, по меньшей мере, двух разных соединений, выбранных из дейтерированного производного саркозина и/или фармацевтически приемлемой соли дейтерированного производного саркозина.
9. Диагностический препарат по п. 1, в котором дейтерированное производное саркозина и/или его фармацевтически приемлемая соль наряду с атомами дейтерия, связанными с атомами углерода, содержат атомы дейтерия, частично или полностью замещающие подвижные атомы водорода, связанные с атомами кислорода и/или азота.
10. Диагностический препарат по п.1, который включает
- дейтерированное производное саркозина, содержащее атомы дейтерия как во 2-м, так и в 4-м положении, или его фармацевтически приемлемую соль; или
- смесь дейтерированных производных саркозина и/или их фармацевтически приемлемых солей, в которой присутствует по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия во 2-м положении, и по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия в 4-м положении.
11. Способ диагностики заболевания у субъекта, включающий следующие этапы:
- а) вводят субъекту диагностический препарат по любому из п.п.1-10;

б) проводят магнитно-резонансную томографию и/или магнитно-резонансную спектроскопию на ядрах дейтерия после введения диагностического препарата спустя время, достаточное для его накопления в исследуемой ткани, для получения, соответственно, томограммы и/или ЯМР спектра(ов);

- 5 в) диагностируют наличие или отсутствие заболевания на основании наблюдаемой интенсивности сигнала ядер дейтерия, отражающей уровень накопления диагностического препарата.

12. Способ по п.11, в котором заболевание представляет воспалительный процесс, инфекционный процесс, процесс, сопровождающийся активной регенерацией, 10 заболевание, связанное с ишемией органов и тканей, реакцию отторжения трансплантата и/или аутоиммунное заболевание.

13. Способ по п.11, в котором заболевание представляет собой онкологическое заболевание.

14. Способ по п. 11, в котором проводят, по меньшей мере, одно дополнительное 15 медицинское исследование, выбранное из магнитно-резонансной томографии на ядрах, отличных от ядер дейтерия, ультразвукового исследования, компьютерной томографии, рентгенографии, пальпации, биопсии, анализа биологического материала субъекта на онкомаркеры, радионуклидной диагностики и/или визуального наблюдения.

20 15. Способ по п.11, в котором диагностируют наличие или отсутствие заболевания на основании сравнения интенсивности сигнала ядер дейтерия у исследуемого субъекта с типичной интенсивностью сигнала, наблюдаемой у здоровых субъектов в соответствующей ткани или соответствующем органе.

25 16. Способ по п.11, в котором диагностируют наличие или отсутствие заболевания на основании сравнения интенсивности сигнала ядер дейтерия в областях, соответствующих нормальной и аномальной ткани по данным дополнительного медицинского исследования.

17. Способ по п.11, в котором
используют диагностический препарат, включающий
30 - дейтерированное производное саркозина, содержащее атомы дейтерия как во 2-м, так и в 4-м положении, или его фармацевтически приемлемую соль; или
- смесь дейтерированных производных саркозина и/или их фармацевтически приемлемых солей, в которой присутствует по меньшей мере одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия во 2-м положении, и по меньшей мере
35 одно дейтерированное производное, которое содержит атомы дейтерия в 4-м положении,

и в котором дополнительно оценивают уровень метаболической активности и/или пролиферации клеток исследуемой ткани на основании сравнения интенсивности сигналов ядер дейтерия во 2-м и в 4-м положении.

- 5 18. Способ по п.14, в котором диагностируют наличие или отсутствие заболевания на основании сравнения дейтериевой томограммы исследуемого субъекта с изображением, полученным в результате магнитно-резонансной томографии у субъекта на ядрах протия.

- 10 19. Способ по п.13, в котором по пространственному распределению области с повышенным накоплением диагностического препарата делается вывод о структуре опухоли.

20. Способ по п.13, в котором по интенсивности сигнала дейтерия в области повышенного накопления диагностического препарата делается вывод о злокачественности или доброкачественности опухоли.

- 15 21. Способ по п.11, в котором по скорости изменения интенсивности сигнала дейтерия после введения делается вывод об уровне перфузии в разных участках области сканирования.

22. Способ по п.11, в котором диагностический препарат вводят субъекту перорально.

- 20 23. Способ по п.11, в котором диагностический препарат вводят субъекту парентерально.

24. Способ по п.11, в котором магнитно-резонансную томографию и/или магнитно-резонансную спектроскопию на ядрах дейтерия проводят через 10-180 минут после введения диагностического препарата.