



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101951964 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 29

(21) 申请号 200880117542. X

A61K 51/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/988, 840 2007. 11. 19 US

0722650. 9 2007. 11. 19 GB

W0 2007066115 A2, 2007. 06. 14, 全文.

W0 2006054904 A2, 2006. 05. 26, 实施例
1-4.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 刘启明

2010. 05. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/065824 2008. 11. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02009/071444 EN 2009. 06. 11

(73) 专利权人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 S·彻蒂比 B·牛顿 M·索尔贝肯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 李进 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 49/14 (2006. 01)

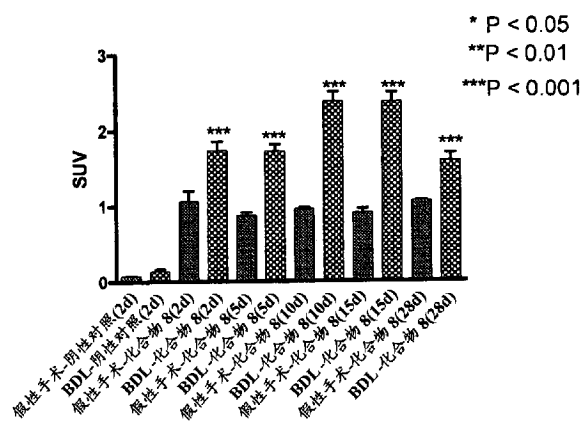
权利要求书2页 说明书36页 附图3页

(54) 发明名称

成像方法

(57) 摘要

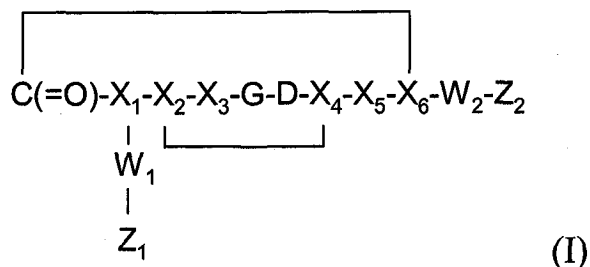
本发明涉及可用于促进患者中纤维发生鉴定的方法, 当作为诊断肝脏纤维发生的方法的一部分应用时, 本发明方法尤其有用。本发明还提供化合物, 该化合物用于在患者中鉴定纤维发生的方法中。本发明的再一方面是用于药物制备的化合物, 此类药物用于在患者中鉴定纤维发生的方法。



1. 式 I 化合物在制备药物中的用途,所述药物用于在患者肝脏中检测纤维发生的存在、位置和 / 或量的方法中,所述方法包括以下步骤:

- (i) 提供患者,该患者已被给予可检测量的式 I 化合物;
- (ii) 让式 I 化合物与所述肝脏中任何纤维发生组织结合;
- (iii) 通过体内成像方法检测所述式 I 化合物发射的信号;和
- (iv) 生成表示所述信号的位置和 / 或量的影像;

其中所述式 I 化合物定义如下:



其中:

G 代表甘氨酸;

D 代表天冬氨酸;

X₁ 代表氨基酸,所述氨基酸选自天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、高赖氨酸或 C₃₋₆ 二氨基链烷酸或其衍生物;

X₂ 和 X₄ 独立代表氨基酸残基,所述氨基酸残基的侧链连接在一起形成环化桥;

X₃ 代表精氨酸、N-甲基精氨酸或精氨酸类似物;

X₅ 代表酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸 C₄₋₆ 环烷基丙氨酸或萘丙氨酸或其衍生物;

X₆ 代表含巯基的氨基酸,所述氨基酸形成将 X₆ 与 C(=O) 基团连接的硫醚键或硫缩醛键;

W₁ 和 W₂ 独立为任选的接头部分,其中当存在时, W₁ 与 X₁ 的氨基酸侧链部分连接,且当存在时, W₂ 与 X₆ 的羧基连接;且

Z₁ 和 Z₂ 独立为成像部分、糖部分和有机染料部分或氢,条件是 Z₁ 和 Z₂ 中的至少一个为成像部分,

其中所述衍生物表示其中侧链为天然氨基酸侧链的衍生物的氨基酸;且

所述类似物表示天然氨基酸的合成类似物,其为等排体,即设计模拟天然化合物的空间和电子结构。

2. 权利要求 1 的用途,其中对于所述式 I 化合物:

X₁ 为赖氨酸;

X₂ 和 X₄ 均为半胱氨酸;

X₃ 为精氨酸;

X₅ 为苯丙氨酸;且

X₆ 为半胱氨酸。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途,其中对于所述式 I 化合物,存在 W¹ 和 W² 中的至少一个,且所述接头部分为式 -(L)_n- 基团,其中:

各 L 独立为 -C(=O)-、-CR'₂-、-CR'=CR'-、-C≡C-、-CR'₂CO₂-、-CO₂CR'₂-、-NR

' -、-NR' CO-、-CONR' -、-NR' (C=O)NR' -、-NR' (C=S)NR' -、-SO₂NR' -、-NR' SO₂-、-CR' ₂OCR' ₂-、-CR' ₂SCR' ₂-、-CR' ₂NR' CR' ₂-、C₄₋₈亚环杂烷基、C₄₋₈亚环烷基、C₅₋₁₂亚芳基、C₃₋₁₂亚杂芳基、氨基酸、聚烷二醇、聚乳酸或聚羟基乙酸部分；

n 为 1-15 的整数；

各 R' 基团独立为 H 或 C₁₋₁₀ 烷基、C₃₋₁₀ 烷基芳基、C₂₋₁₀ 烷氧基烷基、C₁₋₁₀ 羟基烷基、C₁₋₁₀ 氟烷基，或 2 个或更多个 R' 基团和它们连接的原子一起形成碳环、杂环、饱和或不饱和环。

4. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中对于所述式 I 化合物，存在 W¹ 和 W² 中的至少一个，所述接头部分代表包含所述构件 1-10 个单元的单分散 PEG 构件。

5. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中对于所述式 I 化合物，存在 W¹ 和 W² 中的至少一个，所述接头部分代表 1-10 个氨基酸残基。

6. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中对于所述式 I 化合物，Z₁ 和 Z₂ 中的一个为糖部分。

7. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中对于所述式 I 化合物，Z₁ 和 Z₂ 中的一个为有机染料部分。

8. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中对于所述式 I 化合物，所述成像部分选自：

- (i) 放射性金属离子；
- (ii) 发射 γ-射线的放射性卤素；
- (iii) 发射正电子的放射性非金属；和
- (iv) 顺磁性金属离子。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述成像部分选自 (i)-(iii)。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述成像部分选自 ^{99m}Tc、¹²³I、¹¹C 和 ¹⁸F。

11. 权利要求 1 或权利要求 2 的用途，其中所述式 I 化合物以适合哺乳动物给药的形式，与生物相容载体一起以药用组合物提供。

12. 权利要求 11 的用途，其中所述患者为体内完整哺乳动物体。

13. 权利要求 11 的用途，其中所述患者为人。

14. 权利要求 1 的用途，其中 X₂ 和 X₄ 独立代表形成二硫键或硫醚键的半胱氨酸或高半胱氨酸。

15. 权利要求 1 的用途，其中 X₂ 和 X₄ 独立代表天冬氨酸或赖氨酸。

成像方法

[0001] 发明的技术领域

[0002] 本发明涉及体内成像方法,尤其涉及某些已知体内显像剂的新应用。本发明体内成像优选的方法为单光子发射断层扫描(SPECT)和正电子发射断层扫描(PET)。

[0003] 相关技术描述

[0004] 潜在造成肝纤维变性的损害具有广泛的地理分布并高度流行;包括慢性病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、寄生物血症、先天性代谢缺陷和酒精消耗所致毒性损害。所有这些因素说明导致肝硬化和可能的肝癌的纤维变性仍是全球发病率和死亡率的主要原因。单在英国,肝病现为第5大最常见死亡原因,且其发病率还上升(Iredale 2003BMJ 第327卷,第143-147页)。

[0005] 存在两种脂肪肝病;非酒精性脂肪肝病(NAFLD)和NASH。据认为,约24%的美国人口具有NAFLD,它发展为NASH的频率低。NAFLD与代谢综合征有关,代谢综合征与肥胖症、高脂血症、高血压和II型糖尿病有关。据信,在美国,4700万人居住的地区存在代谢综合征。据认为,估计860万美国人口具有NASH,它可变得与纤维变性和肝硬化相关,并且20-28% NASH患者在十年间发展为肝硬化。因此,NAFLD非常普遍,代表可发展为NASH并最终成为肝硬化的NAFLD谱的较小严重性终端。肝纤维变性是由NASH发展为肝硬化的风险指标。

[0006] 目前使用的检测肝纤维变性的方法具有一些显著缺点。据认为,通过肝脏活检组织学分析胶原沉积方式是评价肝病阶段和肝纤维变性的金标准。但是,该方法与以下因素有关:某些发病、偶然死亡、高成本、取样误差和在划分纤维变性程度的肝病学家间具有高的观察者间差异。在活检中,肝脏取样导致仅评价了1/50,000肝脏,因此可导致分期诊断错误。另外,因为胶原是纤维变性组织的标记,而不是活动性疾病的理想靶标,因为其可在活动性纤维变性的后期和疾病消退期被发现。目前没有可有效表征肝纤维变性和通过非侵入性方法监测的方法。这对早期治疗干预具有消极影响,早期干预可延缓或终止肝纤维变性。另外,为及时监测疾病发展,建议每3-5年重复活检。检测肝纤维变性的可利用血液试验价值有限,因为不能用它们评价纤维变性程度或区分纤维变性和肝硬化。因此,目前没有可区别NAFLD和NASH,或在NASH中满意的定量和表征纤维变性的可用方法。

[0007] 广泛认为,肝星形细胞(HSC)是肝脏中主要的纤维感受态(fibrocompetent)细胞。在进行性肝纤维变性期间,HSC激活并增殖,但在纤维变性消退期间,存在广泛HSC凋亡,它与肝脏疤痕退化相符。纤维变性过程中该进行期称为纤维发生。据报道,在激活的HSC上整联蛋白表达上调(Zhou et al J.Biol.Chem. 2004;279(23):23996-24006)。HSC的激活对纤维发生的引发和发展以及随后肝纤维变性至关重要。因此,HSC激活的标记代表使纤维发生成像的目标机会。在这点上,近来凸显的过程标记为整联蛋白(Zhou et al 2004 J.Biol.Chem.;279:23996-24006;Patsenker et al 2007 J.Hepatol.;46(5):878-887;Zhou et al 2006 J.Biol.Chem.;281:39757-39765;Carlioni et al 1996Gastroenterology;110:11 27-36)。

[0008] 先前已经描述了用于体内成像应用的适当标记的整联蛋白结合剂的用途。

[0009] WO 2004/020435 中公开了整联蛋白-结合嘧啶基化合物,此类化合物可用于治

疗与由 α_v 整联蛋白或其亚型表达导致的细胞增殖病理学上调或失调有关的疾病。WO 2004/020435 还公开了发明化合物, 此类化合物可与适合体内成像的部分缀合, 并用作非侵入性肿瘤显像剂。

[0010] WO 2007/088041 公开了一类小分子整联蛋白结合化合物, 此类化合物可用于治疗和 / 或预防疾病, 其中所述疾病优选为由 $\alpha_v\beta_1$ 整联蛋白介导的疾病。肝纤维变性作为其中发现可用 WO 2007/088041 化合物治疗的特定疾病包括在内。除治疗和预防外, WO 2007/0880041 教授了其中公开的化合物可包含体内成像部分, 且可用于体内成像。

[0011] WO 2003/006491、WO 2005/012335 和 WO 2005/123767 涉及 RGD 肽基化合物, 此类化合物与与血管发生有关的受体结合, 所述受体包括整联蛋白。公开的化合物包括抗癌药物或体内成像部分, 并教授可用于与血管发生相关的疾病的治疗和体内成像。

[0012] WO 2006/054904 公开了用体内成像部分标记的 RGD 肽作为造影剂的用途, 此类造影剂的靶标为细胞外基质 (ECM)。据称, 此类造影剂可用于诊断和监视与胶原过度形成有关的疾病, 包括肝纤维变性。但是, 使用用于肝纤维变性体内成像的 RGD 肽存在障碍, 因为已知放射性标记的整联蛋白结合 RGD 肽的排泄主要通过肝胆系统发生 (Haubner 1999 J. Nuc. Med. ;40 :1061-71)。另外如上所述, 胶原不是活动性纤维变性的理想标记, 因为它可在疾病过程消退时和在活动性疾病的后期发现。靶向早期、活动性阶段将更有利, 此时例如在 NASH 中纤维变性的早期、肝硬化发展前, 应用治疗方案可能更合适, 并且也可能在临床上更有效。因此, 需要一种方法来鉴定肝纤维变性早期 (又称为“纤维发生”), 并因此在可最有效治疗的阶段干预疾病过程。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及可用于促进患者肝脏中纤维发生鉴别的方法。本发明还提供化合物, 该化合物用于鉴别患者肝脏中纤维发生的方法。本发明的再一方面是用于制备药物的化合物, 所述药物用于鉴别患者肝脏中纤维发生的方法。本发明证明, RGD 肽基化合物可有效用于检测激活的肝星形细胞 (HSC), 从而提供可用于肝纤维变性早期诊断的方法。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 和图 2 显示化合物 6 与激活的人肝星形细胞和 EA-Hy926 膜特异性结合。在 EA-Hy926 膜测定中, 测得 K_i 为 $\sim 10\text{nM}$; 在 LX-2 细胞测定中, 测得 EC_{50} 为 $\sim 1\text{nM}$ 。在 LX-2 测定中, 结合特异性通过由 未标记 (cold) 化合物 6 的结合导致的化合物 6 的特异性抑制显示。低亲和力颠倒 (scrambled) 阴性对照不与整联蛋白或激活的星形细胞结合。

[0017] 图 3 和图 4 显示化合物 3 与激活的肝星形细胞膜和 EA-Hy926 膜特异性结合。在 EA-Hy926 膜测定中, 观测到的测定 K_i 为 $\sim 1\text{nM}$; 在星形细胞膜测定中, 为 59nM 。化合物 8 的亲和力似乎在化合物 3 之后, 在激活的星形细胞膜测定中, 测定的 K_i 为 56nM ; 在 EA-Hy926 膜测定中, 为 6nM 。阴性对照颠倒 RGD 肽显示与任一细胞类型几乎都不结合。

[0018] 图 5 证明, 与其中未观察到肝脏摄取的阴性对照颠倒 RGD 肽相比, 化合物 8 被胆管结扎 (BDL) 的大鼠的肝脏特异性摄取。BDL 肝脏摄取还与纤维发生的程度成比例, 当纤维发生处于其最高水平时, 手术后第 10 和第 15 天, 观察到最大摄取。

[0019] 图 6 阐述了 RGD 肽被特异性摄取进入 BDL 大鼠肝脏对阴性对照化合物 (RGD 颠倒肽)。该实验的数据显示, 与注射 1 小时后的假手术 (sham) 动物相比; 与其中未观察到在 BDL 和假手术之间存在摄取显著性差异的阴性对照相比; 化合物 3 和化合物 8 显著保留在

BDL 的肝脏中。

[0020] 图 7 显示,在术后第 15 天,在 BDL 中 α_v - 整联蛋白显著上调。结合图 7,图 8 证明 α_v - 整联蛋白表达与 BDL 动物肝脏中化合物摄取之间在术后所有时间点均相关。

[0021] 发明详述

[0022] 在一个方面,本发明涉及式 I 化合物,该化合物用于在患者肝脏中测定纤维发生的存在、位置和 / 或数量的方法中,所述方法包括以下步骤:

[0023] (i) 提供患者,该患者已被给予可检测量的式 I 化合物;

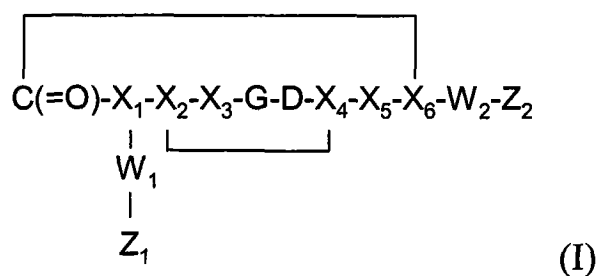
[0024] (ii) 让式 I 化合物与所述肝脏中任何纤维发生组织结合;

[0025] (iii) 通过体内成像方法检测所述式 I 化合物发射的信号;和

[0026] (iv) 生成表示所述信号的位置和 / 或量的影像;

[0027] 其中所述式 I 化合物定义如下:

[0028]



[0029] 其中:

[0030] G 代表甘氨酸;

[0031] D 代表天冬氨酸;

[0032] X_1 代表氨基酸,所述氨基酸选自天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、高赖氨酸或 C_{3-6} 二氨基链烷酸或其衍生物;

[0033] X_2 和 X_4 独立代表氨基酸残基,这些残基的侧链连接在一起形成环化桥,例如形成二硫键或硫醚键的半胱氨酸或高半胱氨酸,或可形成环化桥的其它氨基酸例如天冬氨酸和赖氨酸;

[0034] X_3 代表精氨酸、N-甲基精氨酸或精氨酸类似物;

[0035] X_5 代表酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸 C_{4-6} 环烷基丙氨酸或萘基丙氨酸或其衍生物;

[0036] X_6 代表含巯基的氨基酸,该氨基酸形成将 X_6 与 $C(=O)$ 基团连接的硫醚键或硫缩醛键;

[0037] W_1 和 W_2 独立为任选的接头部分,其中当存在时, W_1 与 X_1 的氨基酸侧链部分连接;当存在时, W_2 与 X_6 的羧基连接;且

[0038] Z_1 和 Z_2 独立为成像部分、糖部分和有机染料部分或氢,条件是 Z_1 和 Z_2 中的至少一个为成像部分。

[0039] 对于所述式 I 化合物:

[0040] X_1 优选为赖氨酸。

[0041] X_2 和 X_4 优选独立为半胱氨酸或高半胱氨酸,且最优选均为半胱氨酸。

[0042] X_3 优选为精氨酸。

[0043] X_5 优选为环己基丙氨酸、苯丙氨酸或 3-碘-酪氨酸,最优选苯丙氨酸。

[0044] X_6 优选为半胱氨酸或高半胱氨酸,最优选半胱氨酸。

[0045] 在优选的式 I 实施方案中:

[0046] X_1 为赖氨酸;

[0047] X_2 和 X_4 独立为半胱氨酸或高半胱氨酸;

[0048] X_3 为精氨酸;

[0049] X_5 为苯丙氨酸或 3-碘-酪氨酸;且

[0050] X_6 为半胱氨酸或高半胱氨酸。

[0051] 在最优选的式 I 实施方案中:

[0052] X_1 为赖氨酸;

[0053] X_2 和 X_4 均为半胱氨酸;

[0054] X_3 为精氨酸;

[0055] X_5 为苯丙氨酸;且

[0056] X_6 为半胱氨酸。

[0057] 在本发明中,术语“纤维发生”具体涉及纤维变性的活动性、进行期,其中此时肝星形细胞(HSC)激活并表达整联蛋白。广泛认为HSC是肝脏中主要的纤维感受态细胞。在纤维发生期间,HSC激活并增殖,但在纤维变性消退期间,存在广泛HSC调亡,该调亡与肝脏疤痕退化相符。另外,在纤维发生期间,细胞外基质(ECM)成分例如胶原的沉积尚未发生。因此,ECM成分的存在是纤维变性晚期和纤维变性消退的特征。因此,在纤维发生期间,靶向疾病过程可提供活动性疾病的更好标识,其中治疗应用最合适。

[0058] 在本发明中,“氨基酸”由氨基、羧基、氢原子和氨基酸侧链部分组成,它们均(在 α -氨基酸的情况下)与单个碳原子结合,该碳原子称为 α -碳。氨基酸包括但不限于天然氨基酸。天然氨基酸是天然蛋白的氨基酸单元衍生自其中的那些氨基酸,为本发明领域技术人员所熟知。当在本文中,术语“其衍生物”与氨基酸联用时,表示其中侧链为天然氨基酸侧链的衍生物的氨基酸(参见“Amino Acid Derivatives”1990 Oxford University Press, Barrett, Ed.)。

[0059] 术语“氨基酸类似物”表示天然氨基酸的合成类似物,其为等排体,即设计模拟天然化合物的空间和电子结构。此类等排体为本领域技术人员所熟知,包括但不限于酯肽、retro-inverso 肽、硫代酰胺、环烷烃或 1,5-二取代的四唑(参见 M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985))。

[0060] 术语“环化桥”是指氨基酸,或氨基酸和 $-(CH_2)_o-$ 或 $-(CH_2)_o-C_6H_4-$ 基团的任何组合,官能团允许引入桥(其中 o 代表 1-10 的正整数)。优选的实例为二硫化物、二硫化物类似物例如 $-(CH_2)_4-$ 碳酰基(carba)桥、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚(cystathione)或羊毛硫氨酸)、含酯和醚的桥和酰胺桥。优选,一个桥形成二硫键,第二个桥含硫醚(硫化物)键。当通过两个氨基酸如用 X_2 和 X_4 形成环化桥时,例如半胱氨酸或高半胱氨酸中一个的侧链与半胱氨酸、高半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸或含醛的氨基酸中的一个的侧链连接形成环化桥。

[0061] “精氨酸类似物”为天然精氨酸的合成类似物,其为按以上氨基酸类似物定义的同方式定义的等排体。

[0062] 式 I 化合物的肽部分可用所有已知的化学合成方法合成,但采用自动化肽合成仪

的 Merrifield 固相方法特别有用 (J. Am. Chem. Soc., 85 :2149(1964))。用于合成策略的标准方法的描述参见 E. Atherton & R. C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis :a Practical Approach", 1989, IRL Press, Oxford。

[0063] 使用含有酸不稳定性接头基团的合成树脂, 该接头基团通过酰胺键形成与需要保护的 C-端氨基酸残基连接。例如, 可采用含(二甲氧基苯基-氨基甲基)-苯氧基-衍生的接头的所谓 Rink 酰胺 AM 树脂 (Rink, H. (1987), Tetrahedron Lett. 30, 第 3787 页)。肽从该树脂酸解裂解会得到肽酰胺。或者, 可使用 O-二(氨基乙基 (aminoethyl)) 乙二醇三苯甲基树脂 (K. Barlos et al (1988), Liebigs Ann. Chem, 第 1079 页), 酸解裂解后, 其得到含伯胺柄 (handle) 的肽。

[0064] 可通过“前体化合物”便利地用成像部分标记, 前体化合物是所述式 I 化合物的衍生物, 其设计成使一个或多个需要的成像部分的便利化学形式位点特异性发生化学反应; 可按最少数目的步骤 (理想的是单一步骤) 进行; 无需重要的纯化 (理想的是无需进一步纯化), 得到需要的式 I 化合物。此类前体化合物为合成的, 可以好的化学纯度便利地得到。前体化合物可任选含一个或多个式 I 的某些官能团的保护基团。

[0065] 术语“保护基团”表示抑制或阻止不需要的化学反应的基团, 但其被设计为具有可在不改变分子的剩余部分的足够温和条件下, 从讨论的官能团解离的足够活性。脱保护后, 得到需要的产物。保护基团为本领域技术人员所熟知, 对于胺基, 适合选自: Boc (其中 Boc 为叔丁氧基羰基)、Fmoc (其中 Fmoc 为芴基甲氧基羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde [即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化亚环己基)乙基] 或 Npys (即 3-硝基-2-吡啶亚氧硫基); 对于羧基, 适合选自: 甲酯、叔丁酯或苄酯。对于羟基, 合适的保护基团为: 甲基、乙基或叔丁基; 烷氧基甲基或烷氧基乙基; 苄基; 乙酰基; 苯甲酰基; 三苯甲基 (Trt) 或三烷基甲硅烷基例如四丁基二甲基甲硅烷基。对于巯基, 合适的保护基团为: 三苯甲基和 4-甲氧基苄基。其它保护基团的用途的描述见 'Protective Groups in Organic Synthesis', Theodorora W. Greene and Peter G. M. Wuts, (第 3 版, John Wiley & Sons, 1999)。

[0066] 本发明的“接头部分”为式 $-(L)_n$ - 基团, 其中:

[0067] 各 L 独立为 $-C(=O)-$ 、 $-CR'_2-$ 、 $-CR'=CR'-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-CR'_2CO_2-$ 、 $-CO_2CR'_2-$ 、 $-NR'-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-CONR'-$ 、 $-NR'(C=O)NR'-$ 、 $-NR'(C=S)NR'-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $-NR'SO_2-$ 、 $-CR'_2OCR'_2-$ 、 $-CR'_2SCR'_2-$ 、 $-CR'_2NR'CR'_2-$ 、 C_{4-8} 亚环杂烷基、 C_{4-8} 亚环烷基、 C_{5-12} 亚芳基、 C_{3-12} 亚杂芳基、氨基酸、聚烷二醇、聚乳酸或聚羟基乙酸部分;

[0068] n 为 1-15 的整数值;

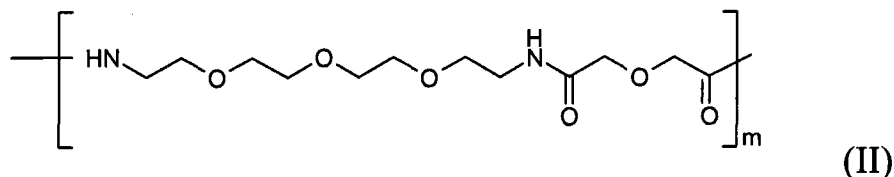
[0069] 各 R' 基团独立为 H 或 C_{1-10} 烷基、 C_{3-10} 烷基芳基、 C_{2-10} 烷氧基烷基、 C_{1-10} 羟基烷基、 C_{1-10} 氟烷基, 或 2 个或多个 R' 基团与它们连接的原子一起形成碳环、杂环、饱和或不饱和环;

[0070] 条件是所述接头部分为不大于 100 个原子, 优选不大于 50 个原子的链。接头部分最优选为 10-50 个原子之间的链, 尤其优选 10-30 个原子之间的链。优选的 L 基团为 $-C(=O)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 和氨基酸。

[0071] 优选, 接头起生物调节剂部分的作用。“生物调节剂部分”具有调节式 I 化合物的药代动力学和血液清除速率的功能。合适的生物调节剂部分的实例是基于单分散 PEG 构件的部分, 包含 1-10 个所述构件的单元。另外, 所述生物调节剂部分也可代表 1-10 个氨基酸

残基。所述生物调节剂部分的优选氨基酸残基为带电荷的氨基酸例如赖氨酸和谷氨酸,或带电荷的非天然氨基酸例如半胱氨酸和磷酸基丙氨酸。另外,可包括氨基酸甘氨酸、天冬氨酸和丝氨酸。在优选的实施方案中,生物调节剂部分含单分散 PEG 样结构,即式 II 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸:

[0072]



[0073] 其中 m 等于 1-10 的整数,其中 C-端单元为酰胺部分。生物调节剂部分起调节化合物的药代动力学和血液清除速率的作用。本发明中生物调节剂部分的功能是减少组织摄取和增加通过肾脏的排泄,从而导致更少背景干扰和给出更佳体内影像。生物调节剂部分可进一步代表优先衍生自戊二酸和 / 或琥珀酸和 / 或聚乙二醇基单元和 / 或上述式 II 单元的部分。接头部分的性质不应干扰式 I 化合物对其靶受体的亲和力。另外,接头部分不应起增加式 I 化合物的背景肝脏摄取作用,例如如果例如使用过度大的聚乙二醇基单元,该背景肝脏摄取增加可能发生。

[0074] 当 Z_1 或 Z_2 为糖部分时,它也可起生物调节剂部分的作用。“糖部分”为碳水化合物基团,该基团通常为多元醇的醛或酮衍生物。它可为单体(单糖),例如果糖或葡萄糖,或连接在一起形成二糖的两种糖。二糖包括糖例如由葡萄糖和果糖制成的蔗糖。术语糖包括取代和未取代的糖,和糖衍生物。优选,糖选自葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、甘露糖、乳糖、果糖及其衍生物例如唾液酸(一种葡糖胺衍生物)。糖优选为 α 或 β 糖。糖尤其可为甘露糖-或半乳糖吡喃糖苷。可将糖上的羟基用例如一个或多个乙酰基保护。优选糖部分被 N-乙酰化。此类糖的优选实例包括 N-乙酰基半乳糖胺、唾液酸、神经氨酸、N-乙酰基半乳糖和 N-乙酰基葡糖胺。

[0075] “有机染料部分”可以为任何有机染料,此类有机染料与具有从紫外光到近红外波长的电磁波谱内的光相互作用。优选的有机染料部分包括具有广延离域电子系统的基团。最优选的有机染料部分为花青染料(CyDye™)。花青染料为通过多烯链定义的化合物,该多烯链含通过交替的单键和多键,优选碳-碳双键连接的奇数碳原子,在任一末端通过氨基终止,其中的一个氨基被季铵化。花青染料和类似物芳基-接头-芳基发色团任选具有侧基或稠环取代基。花青染料及其合成的全面描述参见美国专利 6048982、美国专利 5268486 和 EP 1037947。用于本发明的花青染料优选选自碳酞菁(carbacyanines)、氧杂菁(oxacyanines)、噻菁(thiacyanines)和氮杂菁(azacyanines)。

[0076] 本文所述方法的“检测”步骤涉及通过对所述信号敏感的检测器,检测由式 I 的“成像部分”发射的信号。该检测步骤也可理解为采集信号数据。由适用于本发明的成像部分发射的信号实例为(i)可从人体外部检测的任何信号,例如 γ 射线;或(ii)通过使用设计用于体内的检测器,例如为手术中使用设计的辐射检测器检测的信号。通过计算机实施本文所述方法的“生成”步骤,该计算机将重建算法应用到采集的信号数据,得到数据集。然后将该数据集处理,生成显示患者内目标区域的影像。

[0077] 本发明化合物的成像部分优选选自:

[0078] (i) 放射性金属离子；

[0079] (ii) 发射 γ -射线的放射性卤素；

[0080] (iii) 发射正电子的放射性非金属；和

[0081] (iv) 顺磁性金属离子。

[0082] 当成像部分为放射性金属离子即射电金属时，合适的射电金属可以为正电子发射体例如 ^{64}Cu 、 ^{48}V 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{68}Ga ；或 γ -发射体例如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 或 ^{67}Ga 。优选的射电金属为 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 和 ^{111}In 。最优选的射电金属为 γ 发射体，尤其是 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

[0083] 当成像部分为顺磁性金属离子时，合适的此类金属离子包括： Gd(III) 、 Mn(II) 、 Cu(II) 、 Cr(III) 、 Fe(III) 、 Co(II) 、 Er(II) 、 Ni(II) 、 Eu(III) 或 Dy(III) 。优选的顺磁性金属离子为 Gd(III) 、 Mn(II) 和 Fe(III) ，尤其优选 Gd(III) 。

[0084] 当式 I 化合物的成像部分为金属离子时，优选以金属离子与合成配体的金属络合物存在。术语“金属络合物”表示金属离子与一个或多个配体的配位络合物。强烈优选金属络合物“抗反式螯合”，即不容易与金属配位部位的其它潜在竞争配体进行配体交换。潜在竞争配体包括体外制剂中的其他赋形剂（例如制剂中使用的辐射防护剂或抗微生物防腐剂），或体内内源性化合物（例如谷胱甘肽、转铁蛋白或血浆蛋白）。术语“合成”具有其常规含义，即与从自然来源例如从哺乳动物机体分离的相反为人造的。此类化合物具有它们的制备和杂质特性完全可控的优点。

[0085] 用于本发明的形成抗反式螯合的金属络合物的合适配体包括：螯合剂，其中 2-6，优选 2-4 个金属供体原子排列成可得到 5 元或 6 元螯合环（通过具有碳原子的非配位骨架或连接金属供体原子的非配位杂原子）；或含与金属离子紧密结合的供体原子的单齿配体，例如异腈、膦或二氮烯化物（diazenides）。与作为螯合剂的一部分的金属结合很好的供体原子类型的实例为：胺、硫醇、酰胺、肟和膦。膦形成如此强的金属络合物，以致于甚至单齿或双齿膦形成合适的金属络合物。异腈和二氮烯化物的线性几何构型使它们不能容易的提供自己以结合至螯合剂中，因此通常用作单齿配体。合适的异腈的实例包括简单的烷基异腈例如叔丁基异腈，和醚取代的异腈例如 MIBI（即 1-异氰基-2-甲氧基-2-甲基丙烷）。合适的膦的实例包括 Tetrofosmin，和单齿膦例如三-(3-甲氧基丙基)膦。合适的二氮烯化物的实例包括 HYNIC 系列配体，即肟取代的吡啶或烟酰胺。

[0086] 当金属离子为钆时，形成抗反式螯合的金属络合物的合适螯合剂 包括但不限于：

[0087] (i) 二胺二肟；

[0088] (ii) N_3S 配体和相关配体，该 N_3S 配体具有巯基三酰胺供体组件 (set) 例如 MAG_3 （巯基乙酰基三甘氨酸）；或具有二酰胺吡啶硫醇供体组件例如 Pica；

[0089] (iii) N_2S_2 配体，该 N_2S_2 配体具有二胺二硫醇供体组件例如 BAT 或 ECD（即半胱氨酸乙酯二聚体），或酰胺胺二硫醇供体组件例如 MAMA；

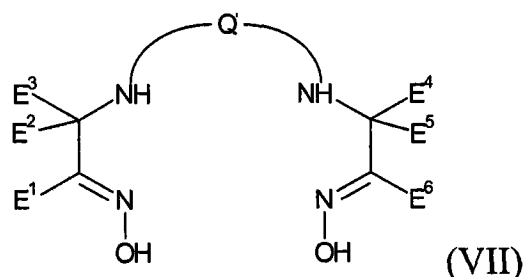
[0090] (iv) 开链 N_4 配体或具有四胺、酰胺三胺或二酰胺二胺供体组件的大环配体，例如 cyclam、单氧代 cyclam、二氧代 cyclam；和

[0091] (v) 具有二胺二苯酚供体组件的 N_2O_2 配体。

[0092] 当成像部分为钆时，优选的本发明螯合剂为二胺二肟和四胺，现在更详细地描述它们的优选形式。

[0093] 优选的二胺二肟具有式 VII :

[0094]



[0095] 其中 E^1-E^6 各自独立为 R^* 基团 ;

[0096] 各 R^* 为 H 或 C_{1-10} 烷基、 C_{3-10} 烷基芳基、 C_{2-10} 烷氧基烷基、 C_{1-10} 羟基烷基、 C_{1-10} 氟烷基、 C_{2-10} 羧基烷基或 C_{1-10} 氨基烷基, 或两个或多个 R^* 基团与它们连接的原子一起形成碳环、杂环、饱和或不饱和环, 其中一个或多个 R^* 基团与 CBP 缀合 ;

[0097] Q' 为式 $-(J')_e-$ 桥接基团 ;

[0098] 其中 e 为 3、4 或 5, 各 J' 独立为 $-O-$ 、 $-NR^*-$ 或 $-C(R^*)_2-$, 条件是 $-(J')_e-$ 含最多 1 个 J' 基团, 该基团为 $-O-$ 或 $-NR^*-$ 。

[0099] 优选的 Q' 基团如下 :

[0100] $Q' = -(CH_2)(CHR^*)(CH_2)-$ 即亚丙基胺肟或 PnAO 衍生物 ;

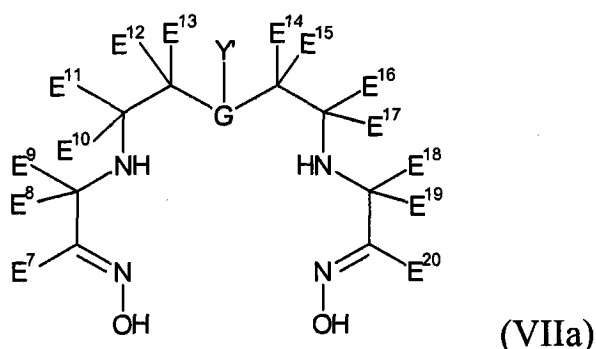
[0101] $Q' = -(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$ 即亚戊基胺肟或 PentaAO 衍生物 ;

[0102] $Q' = -(CH_2)_2NR^*(CH_2)_2-$ 。

[0103] E^1-E^6 优选选自 $:C_{1-3}$ 烷基、烷基芳基烷氧基烷基、羟基烷基、氟烷基、羧基烷基或氨基烷基。最优选, E^1-E^6 基团各自为 CH_3 。

[0104] 二胺二肟优选在 E^1 或 E^6 R^* 基团, 或 Q' 部分的 R^* 基团上缀合。最优选, 在 Q' 部分的 R^* 基团上缀合。当在 Q' 部分的 R^* 基团上缀合时, R^* 基团优选位于桥头位置。在该情况下, Q' 优选为 $-(CH_2)(CHR^*)(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$ 或 $-(CH_2)_2NR^*(CH_2)_2-$, 最优选 $-(CH_2)_2(CHR^*)(CH_2)_2-$ 。尤其优选的二胺二肟具有式 VIIa :

[0105]



[0106] 其中 :

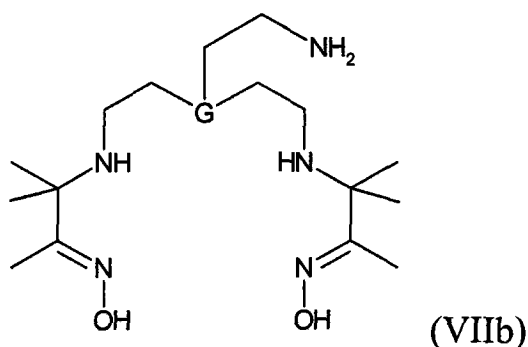
[0107] E^7-E^{20} 各自独立为以上定义的 R^* 基团 ;

[0108] G 为 N 或 CR^* ; 且

[0109] Y' 为与式 I 的肽部分连接的连接点。

[0110] 优选的式 VIIa 螯合剂具有式 VIIb :

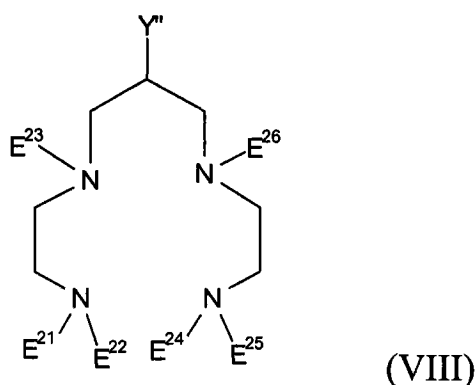
[0111]



[0112] 其中 G 定义同上,且优选为 CH。螯合物 I 的制备方法在 W003/006070 中公开。

[0113] 优选的四胺螯合剂具有式 VIII :

[0114]



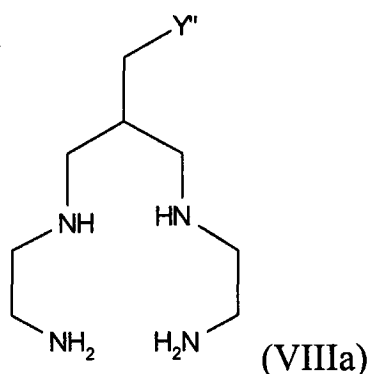
[0115] 其中 :

[0116] Y'' 为与式 I 其余部分连接的连接点 ;且

[0117] E²¹-E²⁶ 为前文定义的 R* 基团。

[0118] 最优选的四胺螯合物具有式 VIIIa :

[0119]



[0120] 其中 Y'' 定义同上。式 VIIIa 螯合物的合成方法在 W0 06/008496 中公开。

[0121] 上述配体尤其适合络合锝例如 ^{94m}Tc 或 ^{99m}Tc,且在 Jurisson et al (Chem. Rev. ,99, 2205-2218(1999)) 更全面地进行了描述。此类配体也可用于其它金属例如铜 (⁶⁴Cu 或 ⁶⁷Cu)、钒 (例如 ⁴⁸V)、铁 (例如 ⁵²Fe) 或钴 (例如 ⁵⁵Co)。

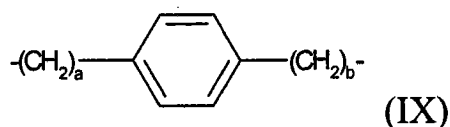
[0122] 在 Sandoz W0 91/01144 中描述了其它合适的配体,包括尤其适合铟、钷和钆的配体,尤其是大环氨基羧酸酯和氨基膦酸配体。形成钆的非离子 (即中性) 金属络合物的配体已知,描述见美国专利 4885363。对于钆来讲,尤其优选螯合物,该螯合物包括 DTPA、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三亚乙基四胺六乙酸 (TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷 -1,4,7,10-四

乙酸 (DOTA)、10-(2-羟基丙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸 (DO3A) 和这些物质的衍生物。

[0123] 当成像部分为作为金属络合物的一部分存在的金属离子时,优选存在有关的接头部分。在该情况下,接头部分的作用是间隔相对庞大的金属络合物,金属配位后,其从肽的活性部位产生,以便例如不削弱底物结合。这可通过挠性组合(例如简单的烷基链)实现,以使大基团具有将自身定位在远离活性部位的自由度和/或刚性例如环烷基或芳基间隔基,该间隔基使金属络合物远离活性部位取向。在这些螯合剂的上下文中,优选的接头部分具有骨架链,该骨架链含有 2-10 个原子,最优选 2-5 个原子,并且尤其优选 2 或 3 个原子。2 个原子的最小接头基团骨架链赋予螯合剂与肽很好分离以使任何相互作用最小化的优点。另外,肽不可能和螯合剂有效竞争与金属离子配位。按该方式,可保持肽的生物靶向特性和螯合剂的金属络合能力。强烈优选金属络合物按在血液中键不经历温和和代谢的方式结合至肽。这是因为在标记肽到达需要的体内靶部位前,这种代谢会导致成像金属络合物解离。因此,优选肽与金属络合物通过接头部分共价结合,该接头部分含不易被代谢的键。合适的此类键为碳-碳键、酰胺键、脲或硫脲键或醚键。

[0124] 非肽接头基团例如亚烷基或亚芳基具有没有大量氢与式 I 的肽部分结合以致于接头不与肽相互作用的优点。优选的亚烷基间隔基为 $-(CH_2)_q-$, 其中 q 为 2-5 的整数值。优选 q 为 2 或 3。优选的亚芳基间隔基具有式 IX:

[0125]



[0126] 其中:a 和 b 各自独立为 0、1 或 2。

[0127] 因此,此处优选的接头部分为 $-CH_2CH_2-(L)_p-$, 其中 L 定义同上,p 为 0-3 的整数值。最优选, $-(L)_p-$ 为 $-CO-$ 或 $-NR-$ 。对于式 VIIb, 当 G 为 N, $-(L)_p-$ 为 $-NH-$ 时,该分组具有另一个优点,即它源自市售对称中间体 $N(CH_2CH_2NH_2)_3$ 。

[0128] 当成像金属为锝时,常用的锝原料为高锝酸盐,即 TcO_4^- , 其为 Tc(VII) 氧化态的锝。高锝酸盐本身不易形成金属络合物,因此锝络合物的制备通常需要加入合适的还原剂例如亚锡离子,通过将锝的氧化态还原为更低的氧化态,通常将 Tc(I) 还原为 Tc(V) 来促使络合。溶剂可为有机溶剂或含水溶剂或其混合物。当溶剂含有机溶剂时,有机溶剂优选为生物相容溶剂,例如乙醇或 DMSO。优选溶剂为含水溶剂,最优选等渗盐水。

[0129] 当成像部分为发射 γ 射线的放射性卤素时,该放射性卤素适合选自 ^{123}I 、 ^{131}I 或 ^{77}Br 。 ^{125}I 特别排除在外,因为它不适合用作外用体内成像的成像部分。优选的用于体内成像的发射 γ 射线的放射性卤素为 ^{123}I 。

[0130] 当成像部分为放射性碘时,可通过经历亲电或亲核性碘化或经历与标记的醛或酮缩合的前体化合物包含衍生物,得到式 I 化合物。第一类的实例为:

[0131] (a) 有机金属衍生物例如三烷基锡烷(例如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基),或三烷基硅烷(例如三甲基甲硅烷基)或有机硼化合物(例如硼酸酯或有机三氟硼酸酯);

[0132] (b) 用于卤素交换的非放射性烷基溴,或用于亲核性碘化的甲苯磺酸、甲磺酸或三氟甲磺酸的烷基酯;

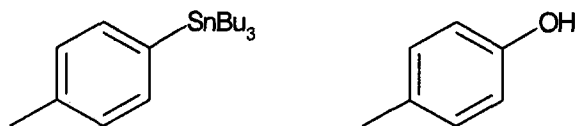
[0133] (c) 向亲核性碘化方向激活的芳环(例如芳基碘鎓盐、芳基重氮盐、芳基三烷基铵盐或硝基芳基衍生物)。

[0134] 优选的此类前体化合物包含:非放射性卤素原子例如芳基碘或芳基溴(允许放射性碘交换);有机金属前体化合物(例如三烷基锡、三烷基甲硅烷基或有机硼化合物);或有机前体例如三氮烯或用于亲核取代的好离去基团例如碘鎓盐。优选用于放射性碘化,前体化合物含有有机金属前体化合物,最优选三烷基锡。

[0135] 前体化合物和将放射性碘引入有机分子的方法的描述见 Bolton (J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002))。合适的硼酸酯有机硼化合物和它们的制备的描述参见 Kabalka et al (Nucl. Med. Biol., 29, 841-843 (2002) 和 30, 369-373 (2003))。合适的有机三氟硼酸酯和它们的制备的描述参见 Kabalka et al (Nucl. Med. Biol., 31, 935-938 (2004))。

[0136] 以下给出可与放射性碘连接的芳基的实例:

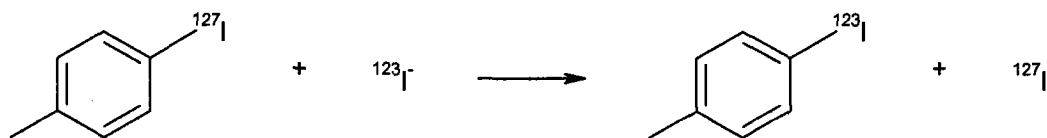
[0137]



[0138] 二者均含允许在芳环上进行温和放射性碘取代的取代基。酪氨酸残基允许用其内在苯酚基团进行放射性碘化。

[0139] 可通过经放射性卤素交换的直接碘化,合成含放射性碘的备选取代基,例如

[0140]



[0141] 优选,通过与芳环例如苯环或乙烯基直接共价结合,连接放射性碘原子,因为已知结合至饱和脂族系统的碘原子易在体内代谢,因此损失放射性碘。

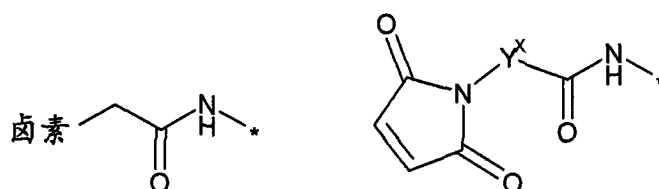
[0142] 当成像部分为发射正电子的放射性非金属时,合适的此类正电子发射体包括: ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{17}F 、 ^{18}F 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 或 ^{124}I 。优选的发射正电子的放射性非金属为 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 和 ^{124}I ,尤其是 ^{11}C 和 ^{18}F ,最尤其是 ^{18}F 。

[0143] 可用 $^{18}\text{F}^-$ 氟化物与具有好离去基团例如烷基溴、甲磺酸烷基酯或甲苯磺酸烷基酯的前体化合物中合适的化学基团反应,通过直接标记,进行放射性氟化。也可通过用 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 反应物将 N- 卤代乙酰基烷基化,得到 $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_3^{18}\text{F}$ 衍生物,引入 ^{18}F 。对于芳基系统,芳基重氮盐、芳基硝基化合物或芳基季铵盐的 $^{18}\text{F}^-$ 氟化物亲核置换反应是得到芳基 ^{18}F 衍生物的合适路线。

[0144] 当 ^{18}F 氟二烷基胺与含例如氯、 $\text{P}(\text{O})\text{Ph}_3$ 或活化酯的前体反应时,可通过形成 ^{18}F 氟二烷基胺,然后形成酰胺,得到本发明 $^{18}\text{F}^-$ 标记的化合物。

[0145] 尤其适合肽放射性氟化的另一种放射性氟化方法的描述参见 WO 03/080544,并使用硫醇偶合。使含以下取代基之一的前体化合物:

[0146]



[0147] 与式 X 化合物反应：

[0148] $^{18}\text{F}-\text{X}^{\text{x}}-\text{SH}$ (X)

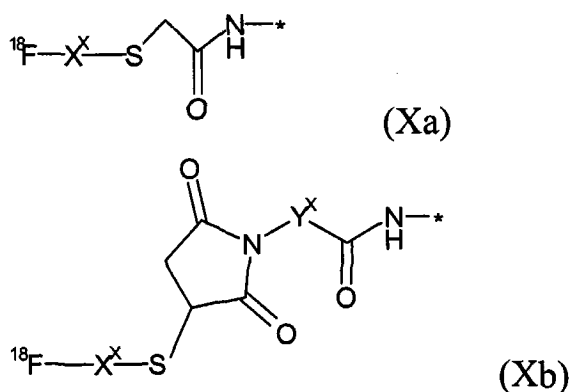
[0149] 其中 Y^{x} 为式 $-(\text{L}^{\text{y}})_y-$ 接头部分, 其中 L^{y} 同前文 L 定义, y 为 1-10 ; 任选含 1-6 个杂原子 ;

[0150] X^{x} 为式 $-(\text{L}^{\text{x}})_x-$ 接头, 其中 L^{x} 同前文 L 定义, x 为 1-30, 任选含 1-10 个杂原子 ; 且

[0151] * 定义与化合物的其余部分连接的连接点 ;

[0152] 分别得到式 (Xa) 或 (Xb) 放射性氟化显像剂 :

[0153]



[0154] 其中 X^{x} 、 Y^{x} 和 * 定义同上。

[0155] 尤其适合将肽放射性氟化的另一种方法的描述参见 W004/080492, 并利用氨基氧基偶合。通过使式 (XI) 前体化合物与式 (XIa) 化合物反应 :

[0156] $\text{R}^1-\text{*}$ (XI)

[0157] $^{18}\text{F}-\text{X}^{\text{XI}}-\text{R}^2$ (XIa)

[0158] 或

[0159] 通过使式 (XII) 前体化合物与式 (XIIa) 化合物反应, 进行放射性氟化 :

[0160] $\text{R}^3-\text{*}$ (XII)

[0161] $^{18}\text{F}-\text{X}^{\text{XII}}-\text{R}^4$ (XIIa)

[0162] 其中 ;

[0163] X^{XI} 和 X^{XII} 为接头基团 $-(\text{L}^{\text{XI}})_z-$, 其中 L^{XI} 同前文 L 定义, z 为 1-10 ; 任选含 1-6 个杂原子 ;

[0164] R^1 为醛部分、酮部分、保护的醛例如缩醛、保护的酮例如缩酮, 或官能团例如二醇或 N- 端丝氨酸残基, 它们可用氧化剂迅速并有效的氧化为醛或酮 ;

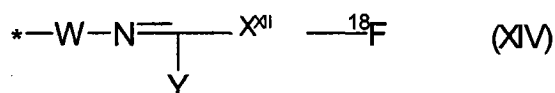
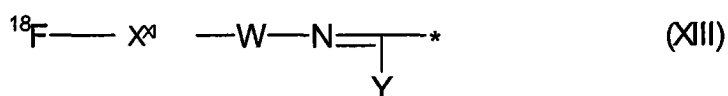
[0165] R^2 为官能团, 在温和条件下例如缓冲水溶液中, 该官能团与 R^1 发生位点特异性反应, 得到稳定的缀合物。 R^2 可为氨衍生物例如伯胺、仲胺、羟胺、肼、酰肼、氨基氧基、苯肼、氨基脲或氨基硫脲, 优选为肼、酰肼或氨基氧基 ;

[0166] R^3 为与 R^4 位点特异性反应的官能团。 R^3 可为氨衍生物例如伯胺、仲胺、羟胺、肼、酰肼、氨基氧基、苯肼、氨基脲或氨基硫脲, 优选肼、酰肼或氨基氧基 ;

[0167] R^4 为醛部分、酮部分、保护的醛例如缩醛、保护的酮例如缩酮,或官能团例如二醇或 N-端丝氨酸残基,它们可用氧化剂迅速并有效的氧化为醛或酮;

[0168] 分别得到式 (XIII) 或 (XIV) 缀合物:

[0169]



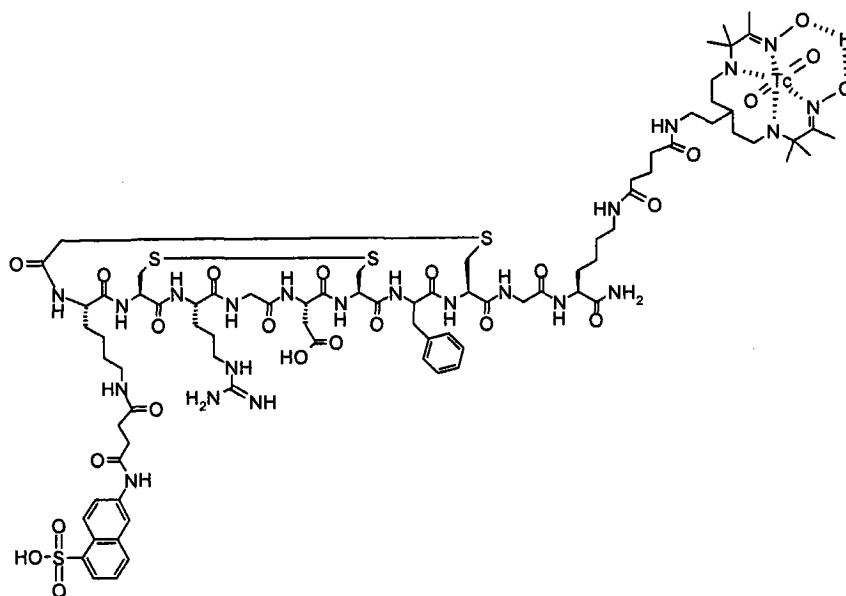
[0170] 其中 W 为 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHCONH}-$ 或 $-\text{NHCSNH}-$, 优选为 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{O}-$; Y 为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{5-6} 芳基取代基, 其中 X^{XI} 、 X^{XII} 和 * 定义同前。

[0171] 得到 ^{18}F -标记衍生物的合成路线的进一步细节的描述参见 Bolton, J. Lab. Comp. Radiopharm., 45, 485-528 (2002)。

[0172] 优选的成像部分是可在体内给药后按非侵入性方式例如通过单光子发射断层扫描 (SPECT)、正电子发射断层扫描 (PET) 和核磁共振成像 (MRI) 进行外部检测的那些。最优选的成像部分为放射性, 尤其是放射性金属离子、发射 γ 射线的放射性卤素和发射正电子的放射性非金属, 尤其是适合用 SPECT 或 PET 成像的那些, 例如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{11}C 和 ^{18}F 。

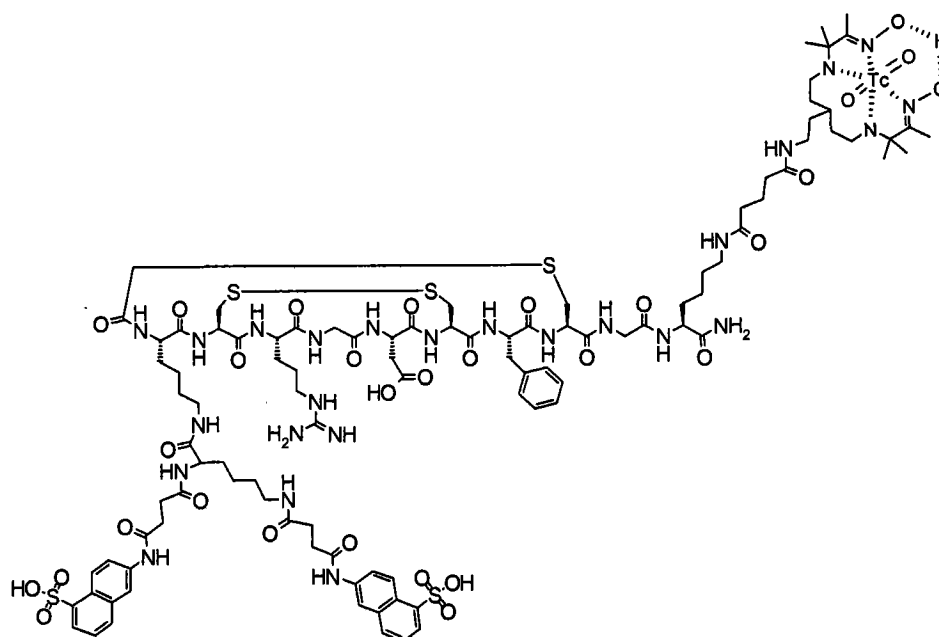
[0173] 在一个优选的实施方案中, W_1 和 W_2 均代表接头部分, Z_1 代表有机染料部分, Z_2 代表成像部分。WO 2006/054904 提供了这些化合物和它们的制备方法。最优选, Z_2 为放射性成像部分。这些优选的化合物的实例包括以下化合物:

[0174]



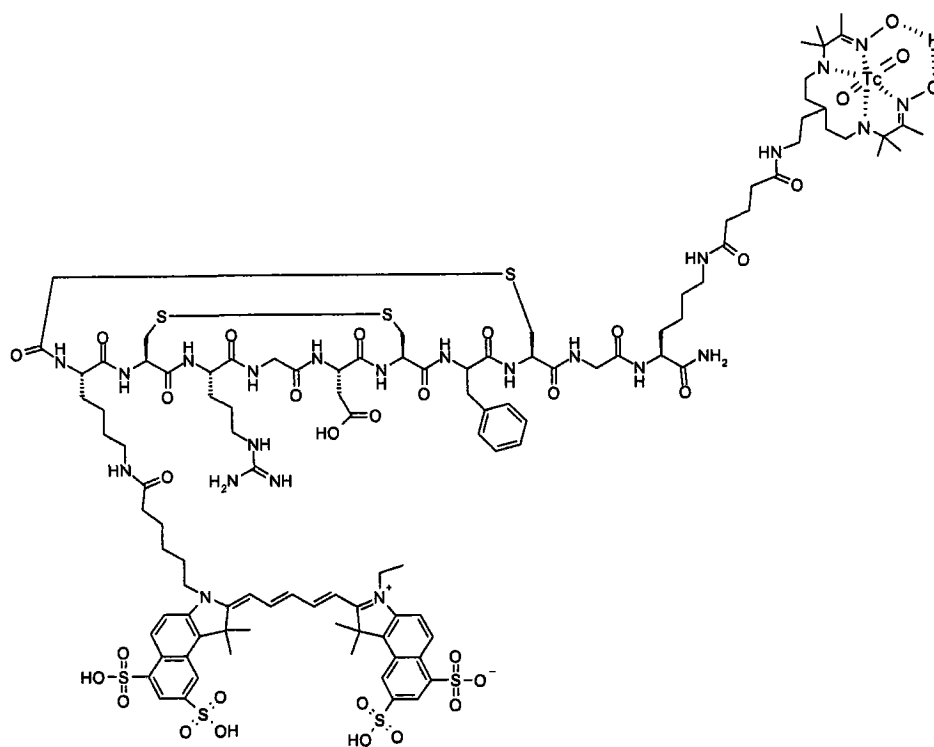
[0175] 化合物 1

[0176]



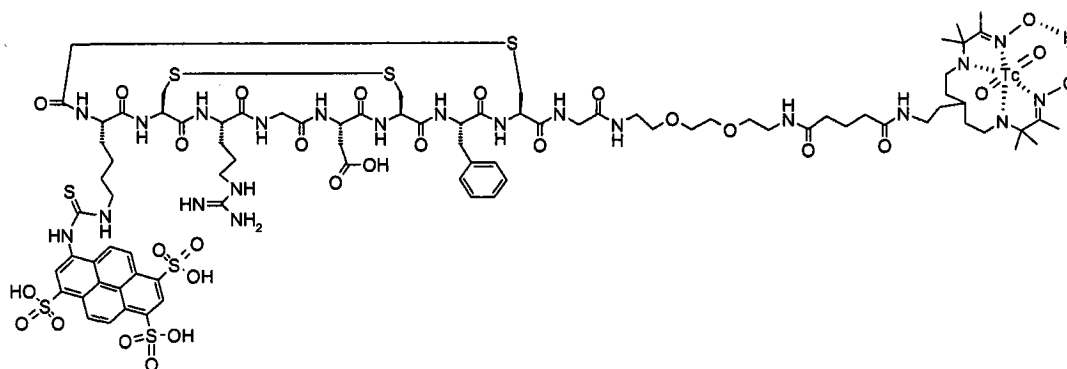
[0177] 化合物 2

[0178]



[0179] 化合物 3

[0180]

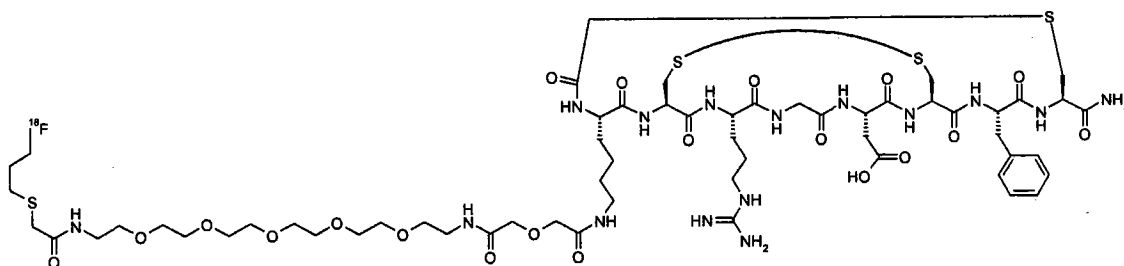


[0181] 化合物 4

[0182] 化合物 1-4 的制备方法的详述参见 WO 2006/054904。

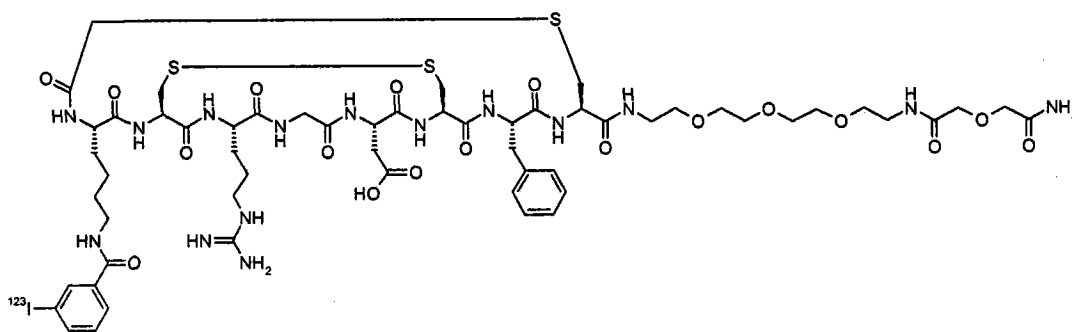
[0183] 在备选的优选实施方案中, W_1 代表接头部分, Z_1 代表成像部分, W_2 代表任选的接头部分, Z_2 为氢。WO 2005/012335 提供这些化合物和它们的制备方法。这些优选的化合物的实例包括以下化合物:

[0184]



[0185] 化合物 5

[0186]

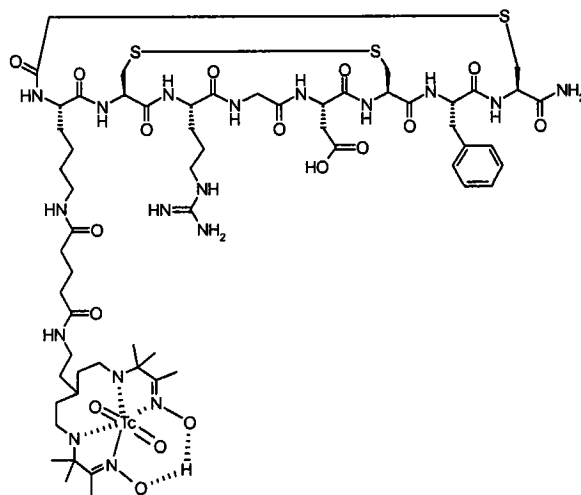


[0187] 化合物 6

[0188] 化合物 5 和 6 的制备方法详述参见 WO 2005/012335。

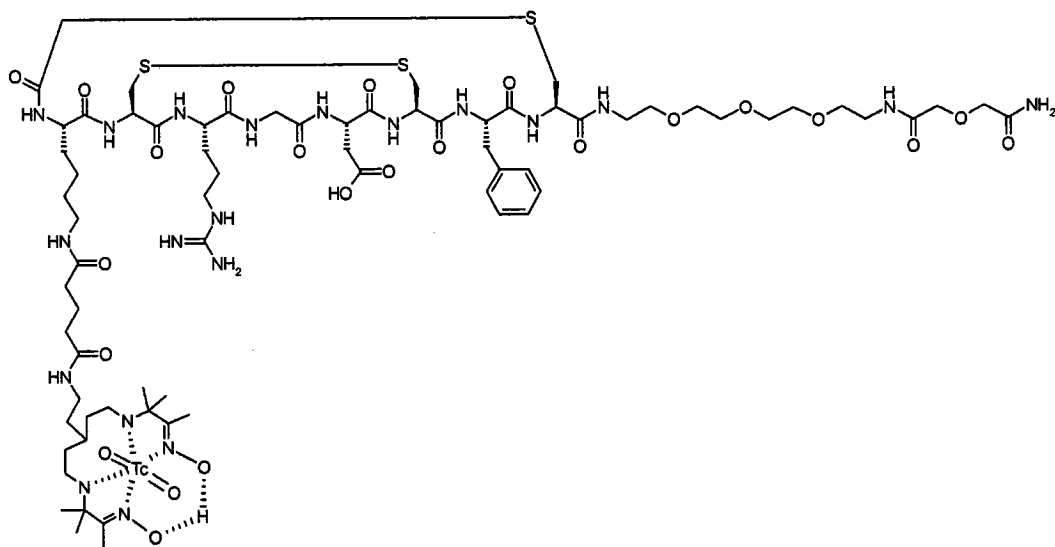
[0189] 在又一个备选的优选实施方案中, W_1 代表任选的接头部分, Z_1 为氢, W_2 代表接头部分, Z_2 代表成像部分。WO 2003/006491 提供了这些化合物和它们的制备方法。这些优选的化合物的实例包括以下化合物:

[0190]



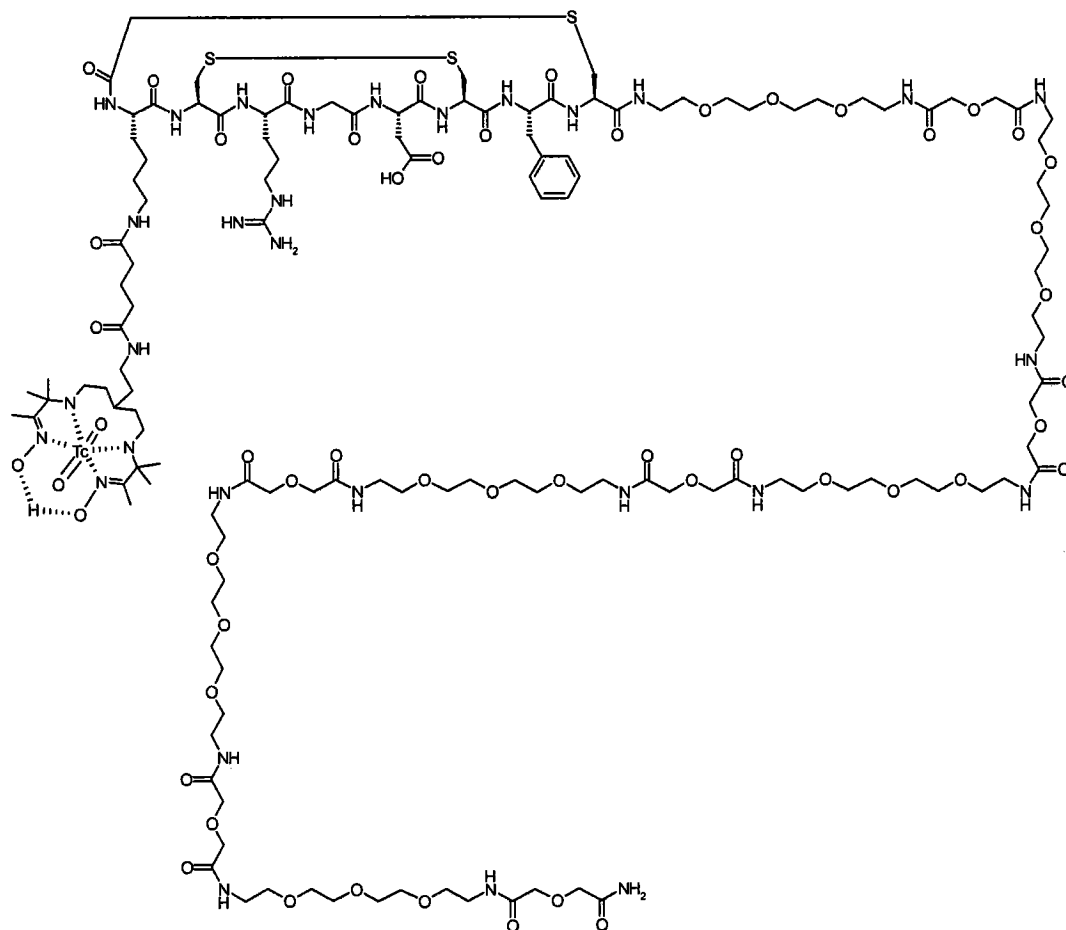
[0191] 化合物 7

[0192]



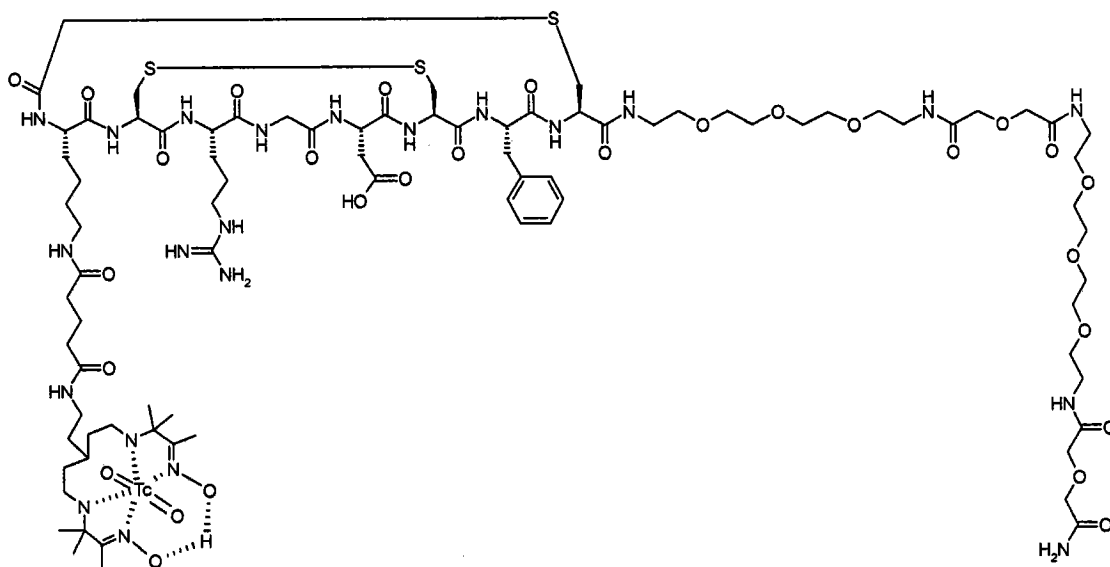
[0193] 化合物 8

[0194]



[0195] 化合物 9

[0196]

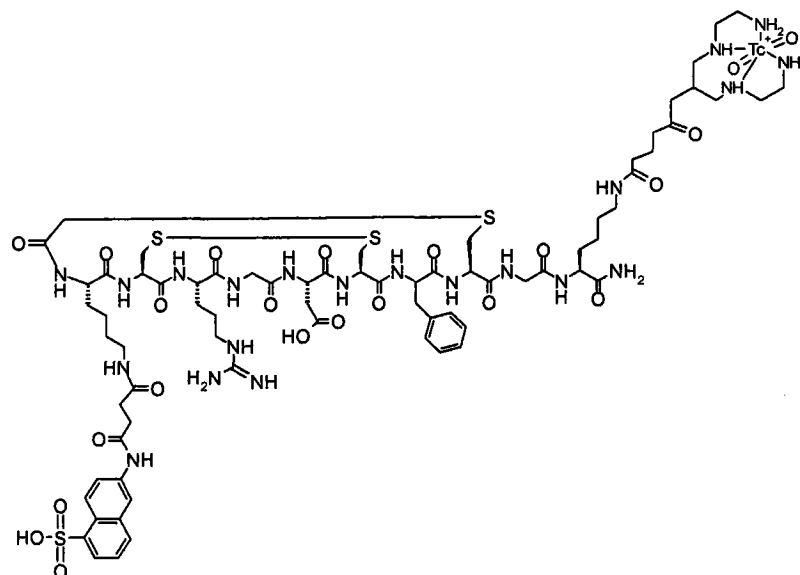


[0197] 化合物 10

[0198] 化合物 7-10 的制备方法详述参见 WO 2003/006491。

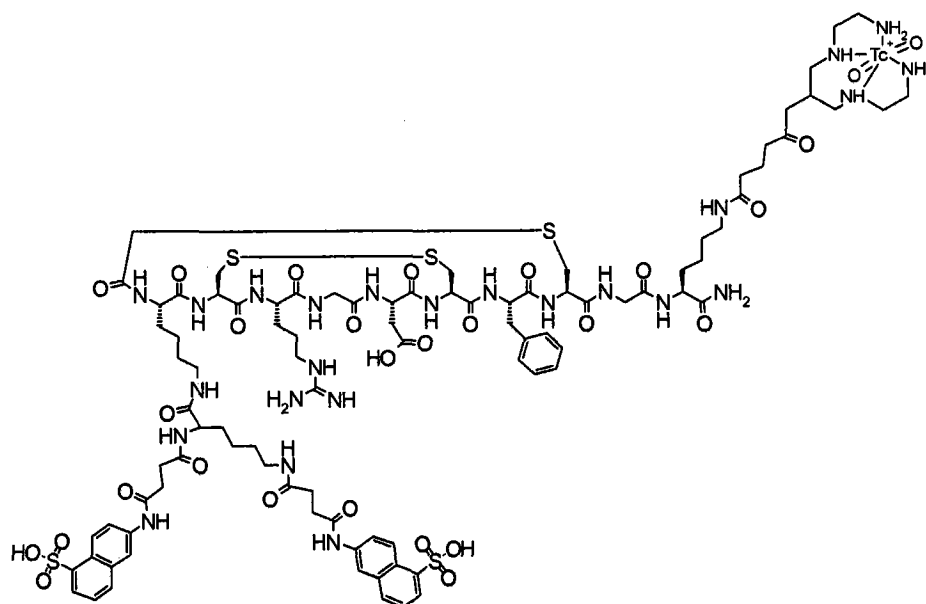
[0199] 对于化合物 1-4 和 7-10, 另外, 进一步优选将二胺二肟螯合物部分用四胺螯合物部分置换, 形成化合物 1a-4a 和 7a-10a:

[0200]



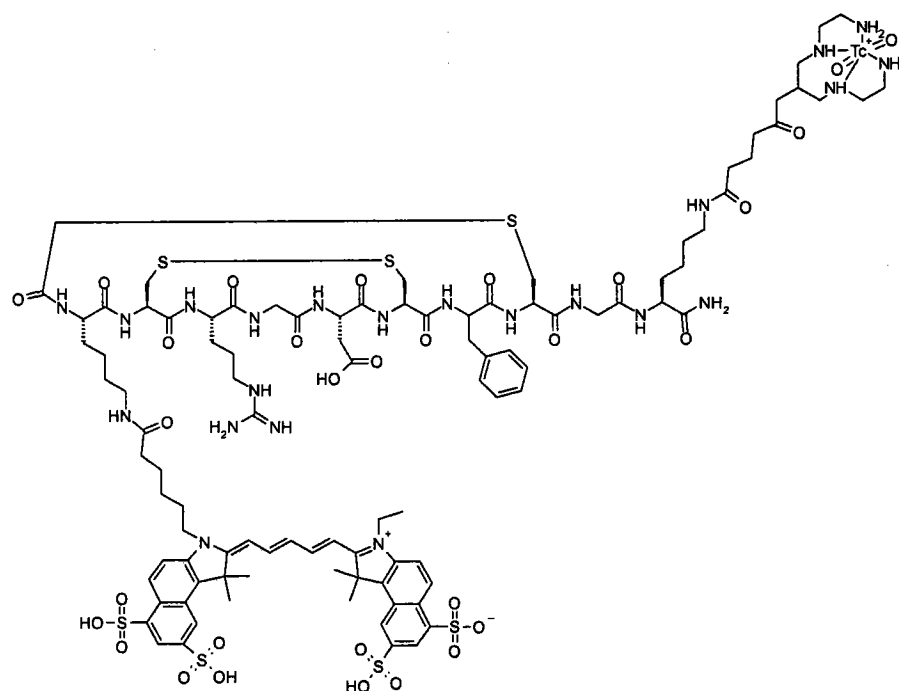
[0201] 化合物 1a

[0202]



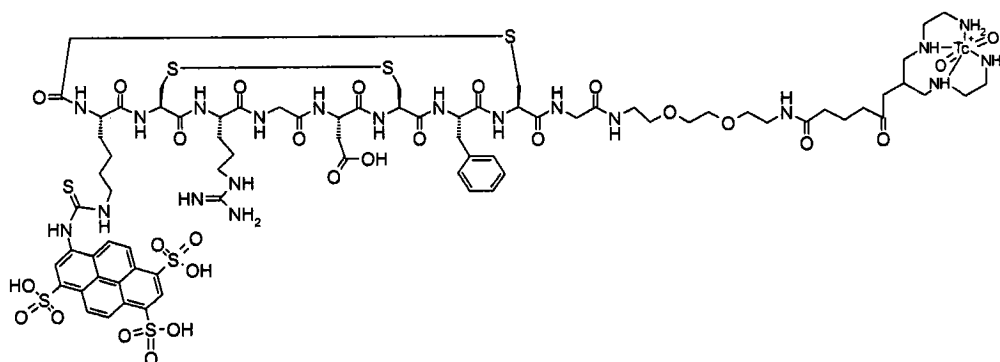
[0203] 化合物 2a

[0204]



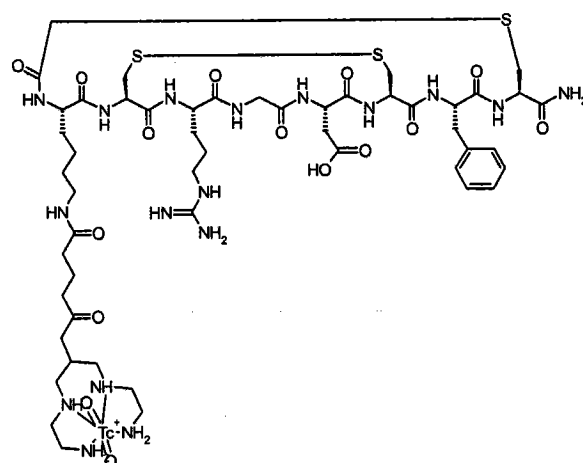
[0205] 化合物 3a

[0206]



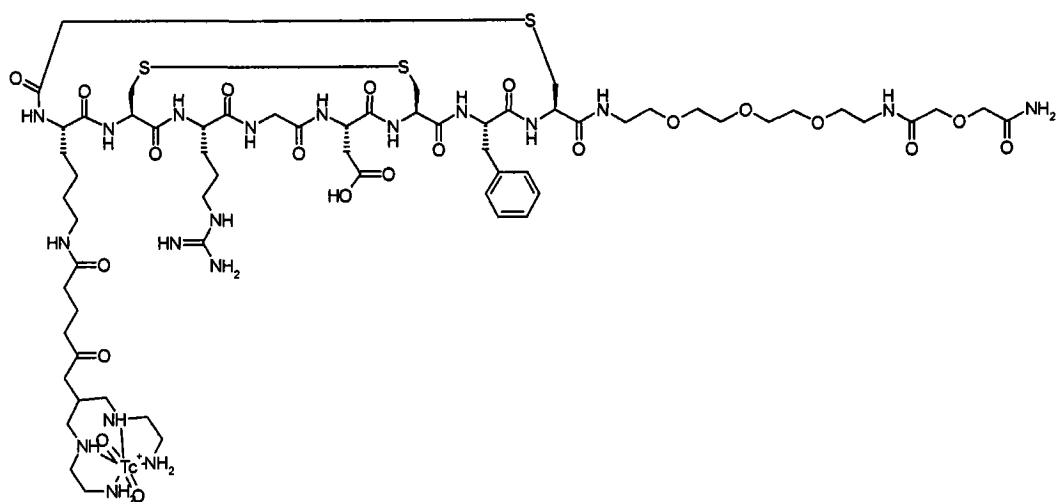
[0207] 化合物 4a

[0208]



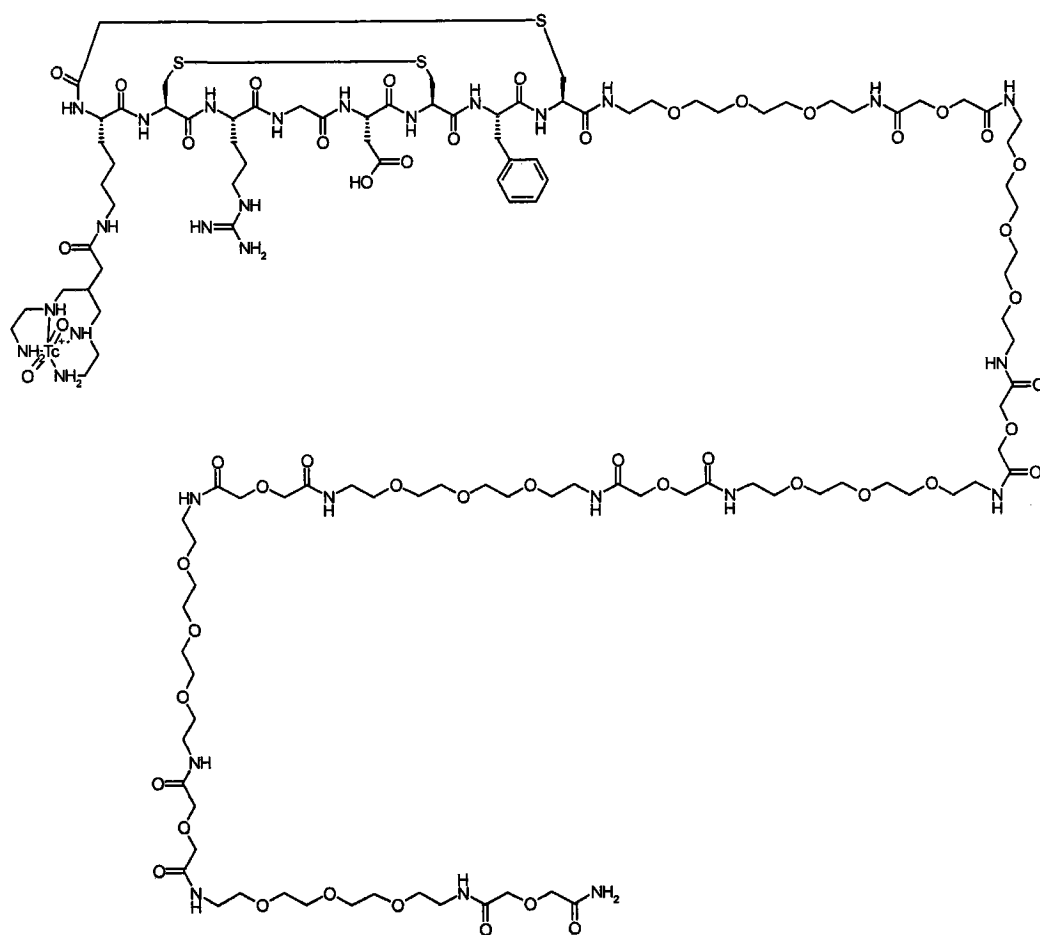
[0209] 化合物 7a

[0210]



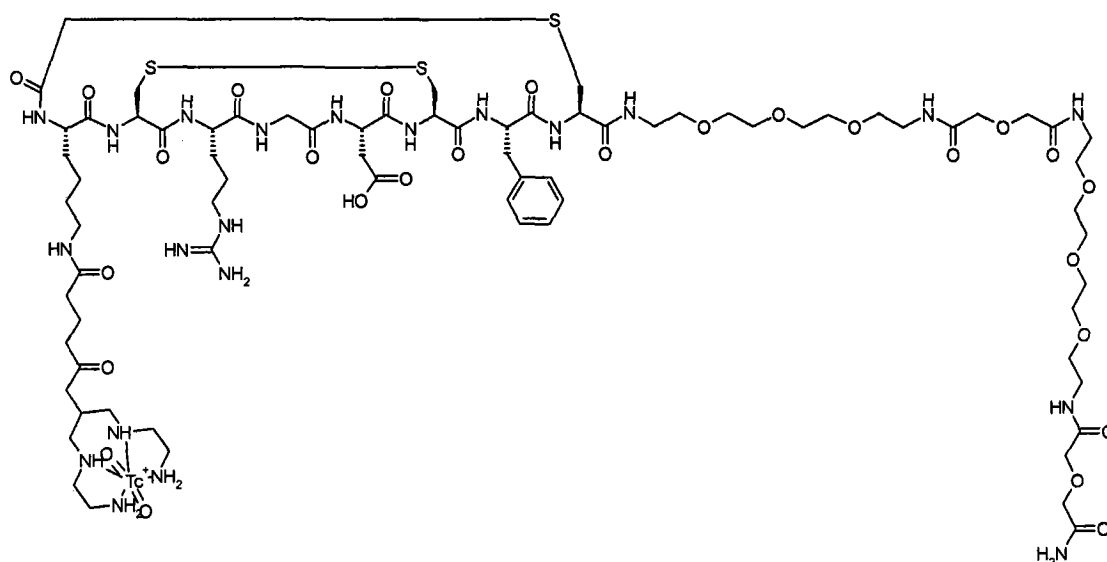
[0211] 化合物 8a

[0212]



[0213] 化合物 9a

[0214]



[0215] 化合物 10a

[0216] 化合物 1a-10a 的制备方法与化合物 1-10 的那些类似,不同之处在于用化合物 1a-10a 四胺螯合物代替化合物 1-10 二胺二脲螯合物。用与 Boc 保护的物质偶合的正常肽实现四胺螯合物的缀合。

[0217] 为改善生物分布即主要为减少背景肝脏摄取的目的,合成了许多进一步修饰的化合物。化合物 11-15 的合成细节在以下实施例 8-12 中提供。设计化合物 11,以评价从二胺二脲螯合物变为四胺螯合物的效果。在化合物 12 中,加入半胱磺酸基团。化合物 13 在肽的 N-端侧链具有另外的 PEG 部分。化合物 14 在肽的 C-端侧链具有另外的 PEG 部分。在化合物 15 中,除许多谷氨酸残基外,还使用四胺螯合物。

[0218] 通过“提供”已给予可检测量的式 I 化合物的患者,开始本文中所述方法。本发明方法的目的是提供诊断上有用的影像。因此,给予患者式 I 化合物可理解为促使所述影像生成所必需的预备步骤。优选所述患者为哺乳动物,最优选人。最优选,所述患者为体内完整的哺乳动物体。因此,在优选的实施方案中,以药用组合物给予式 I 化合物,该组合物以适合哺乳动物给药的形式含所述化合物以及生物相容载体。优选的给药途径为血管内给药。在备选的实施方案中,给予可检测量的式 I 化合物作为所述方法的一部分实施。

[0219] 在提供步骤后和检测步骤前,使式 I 化合物与所述患者的任何纤维发生组织结合。例如,当患者为完整哺乳动物时,式 I 化合物会通过哺乳动物的机体动态迁移,与其中的各种组织接触。一旦化合物与任何纤维发生组织接触,则发生特异性相互作用致使从纤维发生组织中清除化合物的时间比从非纤维发生组织中清除时间长。一定时间点将会到达,此时因为结合至纤维发生组织的化合物与结合在非纤维发生组织的化合物之间的比例,确保了与纤维发生组织特异性结合的化合物的检测。理想的这种比例为至少 2 : 1。

[0220] “生物相容载体”是流体,尤其是液体,其中式 I 化合物悬浮或溶解,致使组合物生理上可耐受,即可给予哺乳动物体,而无毒性或不适当的不适。生物相容载体介质适合为可注射载体液体例如无菌、无热原注射用水;水溶液例如盐水(其最好可被平衡以使最终注射产品等渗或非低渗);一种或多种等渗调节物质的水溶液(例如含生物相容反荷离子的等离子体阳离子的盐)、糖(例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇(例如山梨醇或甘露醇)、二醇(例如甘油),或其它非离子型多元醇物质(例如聚乙二醇、丙二醇等)。生物相容载体介质也可

含生物相容有机溶剂例如乙醇。此类有机溶剂可用于使更具亲脂性的化合物或制剂增溶。优选,生物相容载体介质为无热原注射用水、等渗盐水或乙醇水溶液。用于静脉内注射的生物相容载体介质的 pH 适合为 4.0-10.5。

[0221] 此类药用组合物适合用容器提供,所述容器提供有密封,该密封适合用皮下注射针头单次或多次穿刺(例如弯边的(crimped-on)隔膜密封塞),同时保持无菌完整性。此类容器可含单个或多个患者剂量。优选的多剂量容器含单个大包装瓶(例如 10-30cm³ 体积),该瓶含多个患者剂量,从而单个患者剂量可因此在制剂的有效期内各时间间隔被抽取到临床级注射器,以满足临床需要。设计预填充注射器含单个人剂量或“单位剂量”,因此优选一次性或其它适合临床使用的注射器。当药用组合物为放射性药用组合物时,可任选为预填充注射器提供注射器防护物,以防止操作人员受到放射性剂量伤害。合适的这种放射性药用注射器防护物在本领域中已知,优选含铅或钨。

[0222] 药用组合物可由试剂盒制备。或者,可在无菌制备条件下制备,得到需要的无菌产物。药用组合物也可在非无菌条件下制备,然后用例如 γ 辐射、高压灭菌、干热或化学处理(例如用环氧乙烷)最后灭菌。

[0223] 在本发明的再一方面,可用式 I 化合物制备药物,该药物用于在患者的器官或机体区域检测纤维发生的存在、位置和 / 或数量。优选和最优选的式 I 实施方案、器官或机体区域、患者和给药方法定义同上。

[0224] 本发明可用于评价激活的 HSC 的存在、位置和 / 或数量,提供纤维发生的指示剂。该指示剂尤其有利,因为与纤维变性组织相比,纤维发生组织是早期活动性疾病的较好标记,当疾病过程消退时,后者也存在。因此,可在实施治疗可能最有效的阶段进行疾病过程鉴定。

[0225] 在以下非限制性实施例中证实了这些优点。

[0226] 实施例简述

[0227] 实施例 1 证明,化合物 2 与活化的人 HSC 在体外特异性结合。

[0228] 实施例 2 描述了用于建立大鼠胆管结扎模型和相关假性手术模型的方法,以及组织病理学验证。

[0229] 实施例 3 证明化合物 4 摄取与纤维发生之间相关。在手术后 1-5 天,纤维发生标记在大鼠胆管结扎(BDL)模型(在实施例 2 中所述)中高,在手术后 15 天,在大鼠 BDL 模型的纤维发生肝脏中化合物 4 摄取最高。

[0230] 实施例 4 证明,结合至 BDL 纤维发生肝脏的化合物 4 被未标记化合物 4 特异性抑制。

[0231] 实施例 5 证明,化合物 4 的肝脏摄取与 α_v 整联蛋白的肝脏表达之间相关。

[0232] 实施例 6 显示结合至 BDL 纤维发生肝脏的化合物 8 被未标记化合物 8 特异性抑制。

[0233] 实施例 7 证明, α_v 表达与化合物 8 摄取相关。

[0234] 实施例 8-12 描述化合物 11-15 的合成。

[0235] 用于实施例的缩写

[0236]

BCA	二辛可宁酸测定
BDL	胆管结扎
Boc	叔丁氧基羰基
BSA	牛血清白蛋白
DIEA	二异丙基乙胺
DMF	二甲基甲酰胺
EA-Hy966	人脐静脉内皮细胞
EGTA	乙二醇四乙酸
ESI-MS	电喷雾离子化质谱
FBS	胎牛血清
Fmoc	9H- 芴 -9- 基甲氧基羰基
MBHA	对 - 甲基二苯甲基胺
DCC	1,3- 二环己基碳二亚胺
DMSO	二甲亚砜
HATU	六氟磷酸 (N-[(二甲氨基)-1H-1,2,3- 三唑并 [4,5-b] 吡啶 -1- 基亚甲基]-N- 甲基甲铵 N- 氧化物
HPLC	高效液相色谱
HOAt	1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑
HSC	肝星形细胞
i. d.	注射剂量
i. v.	静脉内
ITLC	瞬时薄层色谱
K _d	解离常数
LC-MS	液相色谱 - 质谱
NMM	N- 甲基吗啉
NMP	1- 甲基 -2- 吡咯烷酮
NPP	磷酸对 - 硝基苯酯
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PEG	聚乙二醇
PEI	聚氮丙啶
PMSF	苯基甲磺酰氟
PyAOP	六氟磷酸 (7- 氮杂苯并三唑 -1- 基氧基) 三吡咯烷 -1- 基磷 鎓
RIPA	放射免疫沉淀测定
s. c.	皮下
SUV	标准摄取值
TFA	三氟乙酸
UV	紫外

实施例

[0237] 实施例 1: 化合物 6 与激活的人 HSC 结合

[0238] 1(i) 与由 EA-Hy926 细胞制备的膜结合

[0239] 用前述膜结合测定 (Indrevoll et al, Bioorg & Med Chem Lett, 2006, 16, 6190-6193) 测量化合物 6 的抑制常数。

[0240] 简而言之, 制备人内皮腺癌细胞系 EA-Hy926 的膜, 计算纯化的膜部分的 K_d 。然后建立竞争性结合测定, 测量未标记化合物 6 的抑制常数。用 ^{125}I - 锯鳞血抑肽 (echistatin) 作为标记配体, 用未标记锯鳞血抑肽作为参照标准。

[0241] 制备总计稀释倍数 16 倍的未标记试验化合物 (未标记锯鳞血抑肽或未标记化合物 6), 与 ^{125}I - 锯鳞血抑肽和膜的组合混合, 然后在 37°C 下温育 1 小时。几次洗涤后, 用 Skatron 微量收获器, 在过滤器上收获结合物。最后将过滤斑点切割, 在 Packard γ -计数器中计数。

[0242] 图 1 举例说明在 EA-Hy926 膜上, ^{125}I - 锯鳞血抑肽结合对未标记化合物 6 和锯鳞血抑肽

[0243] 1(ii) 与激活的人肝星形细胞结合

[0244] 将激活的人肝星形细胞 LX-2 (由 Prof. Scott L. Friedman, Mount Sinai School of Medicine, New York 提供) 在 12 孔板 (Nunc) 中培养, 在含 10% FBS、青霉素、链霉素和谷氨酰胺的 Dulbeccos 改性虎红培养基培养至连生。将细胞在含 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM MnCl_2 , 1mM CaCl_2 和 0.01% BSA 的冷缓冲液中洗涤两次。在 4°C 下, 振摇下, 将细胞在含痕量标记化合物 (0.1nM ^{125}I 化合物 6 或 0.1nM ^{125}I - 锯鳞血抑肽) 的缓冲液中和各种浓度的未标记化合物一起再温育 60 分钟。温育后, 通过用冷缓冲液洗涤细胞 3 次将未结合的物质除去。通过加入 0.1M NaOH 将细胞与孔分离, 然后转移到试管, 放入 γ -计数器 (Packard) 计数。图 2 举例说明观察到的活性值。

[0245] 实施例 2: 化合物 3 和化合物 8 与激活的大鼠 HSC 结合

[0246] 2(i) 与由 EA-Hy926 细胞制备的膜结合

[0247] 用实施例 1 中所述方法测定化合物 3 和化合物 8 的抑制常数。图 3 举例说明在 EA-Hy926 膜上, ^{125}I - 锯鳞血抑肽结合对未标记化合物 3、化合物 8 和锯鳞血抑肽。

[0248] 2(ii) 细胞和培养

[0249] 激活的大鼠肝星形细胞系 (固定) 是奥斯陆大学的 Trond Berg 教授赠送的赠品。使细胞在 150mm 培养瓶中生长直至含 10% FBS、谷氨酰胺和青霉素 / 链霉素的 Dulbeccos 改性虎红培养基中连生。

[0250] 2(iii) 膜制备

[0251] 将细胞在冰冷 PBS, pH 7.4 中洗涤两次, 加入 10ml PBS, 用橡皮警察 (policeman) 刮出, 转移到置于冰上的 50ml 瓶中。将 10ml PBS 再加入烧瓶中, 刮下, 与第一批细胞合并。在 4°C 下, 将细胞在 2000rpm 下离心 10 分钟。倾去上清液, 将沉淀再悬浮于 3ml PBS。将所有沉淀合并到一个试管中, 按上述离心, 将最终沉淀在 -70°C 下立即冷冻。

[0252] 将细胞沉淀再悬浮于冰冷均化缓冲液 (细胞量的 10 倍, 例如将 2g 沉淀加入 20ml 均化缓冲液), 该缓冲液含 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl_2 , 1mM EGTA, pH 7.4 和蛋白酶抑制剂 $10\mu\text{g/ml}$ 抑酶肽、 $10\mu\text{g/ml}$ 胃酶抑制剂、 $200\mu\text{g/ml}$ 杆菌肽、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 抑酶肽和 $100\mu\text{M}$

PMSF。将细胞在冰上均化 3 次,在 Dounce 匀化器中用 B 槌打击 10 次。在 4℃ 下,将匀浆在 2100rpm 下离心 5 分钟,倾去上清液。将沉淀再悬浮于 10ml 均化缓冲液,再均化 2 次,打击 10 次,然后在 2100rpm 下离心 10 分钟。将该上清液与第一批合并,在具有 JA-17 转子 (29000×g) 的 Beckman Coulter 离心机中,在 16500rpm 下离心。将沉淀在 20ml 均化缓冲液中再悬浮,重复该离心步骤。

[0253] 倾去上清液,将沉淀再悬浮于 3ml 结合缓冲液中,该结合缓冲液含 10mM Hepes, 135mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.7mM MgSO₄, 2.5mM CaCl₂, 1.0mM NaH₂PO₄, pH 7.4。取出样品后,测量蛋白质,再加入 3ml 结合缓冲液。将 300 μl 等份试样在 -80℃ 下立即冷冻。

[0254] 2(iv) 蛋白质测量

[0255] 将 100 μl 充分混合的膜制剂按 1 : 10 稀释,制备系列稀释液,按 BCA Protein Assay Reagent 试剂盒 (Pierce 编号 23225) 说明测量蛋白含量。

[0256] 2(v) 测试星形细胞膜上整联蛋白结合的实验设计

[0257] 在 96 孔板中进行实验。向各孔中加入 60 μl 缓冲液 (50mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 5mM MnCl₂, 1mM CaCl₂ 和 0.01% BSA)、20 μl 未标记化合物 3、化合物 8 或未标记锯鳞血抑肽、20 μl ¹²⁵I-锯鳞血抑肽和 50 μl 膜溶液 (在缓冲液中按 1 : 30 稀释至约 1 μg 膜/孔),振摇下,在 37℃ 下温育 60 分钟。温育后,在 Skatron 细胞收获器中,用 PBS 将未结合物质洗去,将结合物质浓缩到过滤器孔 (spot) 中。将该过滤孔切下,加入试管,最后在 γ-计数器中计数。将过滤器在 0.3% PEI 水溶液中预浸泡至少 4 小时。图 4 显示得到的结果。

[0258] 实施例 3:胆管结扎 (BDL) 和假性手术动物

[0259] 3(i) 动物模型建立

[0260] 远系繁殖的雄性 Sprague Dawley 大鼠 (180-200g; Charles River) 用于所有胆管结扎 (BDL) 和假性手术研究。环境适应 6 天后,将大鼠分为 2 组 (BDL 组和假性手术组)。

[0261] 对于 BDL 动物,将腹部刮毛,用聚维酮碘溶液擦洗,然后皮下注射 (s. c.) 5mg/kg 卡洛芬和 s. c. 5mg/kg 丁丙诺啡,在异氟烷麻醉下实施剖腹术,定位正常胆管。将胆管双重结扎,在肝道交叉处制备第一次结扎,在胰腺道的入口上方制备第二次结扎。

[0262] 将第二组 (假性手术动物) 腹部刮毛,用聚维酮碘溶液擦洗,然后皮下注射 (s. c.) 5mg/kg 卡洛芬和皮下给予 5mg/kg 丁丙诺啡。使动物经历假性手术,其中处理胆管,在胆管下通过缝合。

[0263] 在缝合前,给予每个动物的腹膜 2-3ml 盐水。将筋膜和皮肤缝合,皮下给予动物 2mg/kg 甲氧氯普胺 (metaclopramide),皮下给予 5mg/kg Baytril 和皮下给予 ~ 2ml 盐水。在随后两天,按需要给予卡洛芬 (5mg/kg)。在实验期间,密切监视动物。

[0264] 3(ii) 给予试验化合物和生物分布

[0265] 在手术后适当日,将 BDL 和假性手术动物取出,使处于异氟醚麻醉下,然后通过尾静脉给每只动物静脉内 (i. v.) 注射 0.3ml (~ 3MBq)。在注射试验物后的适当时间点,用异氟醚再麻醉各动物,通过颈脱臼将动物处死,称量,通过巴氏扫描系统记录重量。将每只动物解剖,然后将器官和组织除去,用 BASIL 计数器方案 40 或人工计数:

[0266] 骨 * 肌肉 *

[0267] 血液 * 肾脏

[0268] 膀胱和尿 (B/U) 肺

- [0269] 肝脏* 脾脏
 [0270] 胃和内容物 小和大肠 (SI 和 LI)
 [0271] 心脏 甲状腺
 [0272] 皮肤* 尸体
 [0273] 注射部位
 [0274] * 称定重量的样品

[0275] 根据背景放射性和放射性衰减,校正在整个器官(例如肝脏)中记录的活性,通过式 1 计算放射性的生物分布:

[0276]

$$\% i.d. \text{ 器官} = \frac{A}{B} \times 100$$

[0277] 其中:

[0278] A = 在器官中测量的计数 / 秒

[0279] B = 在所有样品(注射部位除外)中测量的总计数 / 秒

[0280] 通过式 2 计算注射的放射性在称定重量的组织样品(例如血液)中的百分比,得到在全部组织中的% i. d.:

[0281]

$$\% i.d. \text{ 组织} = \frac{(Z_s \times W_b \times F) / B}{W_s} \times 100$$

[0282] 其中:

[0283] Z_s = 样品中计数 / 秒

[0284] W_s = 按克计的样品重量

[0285] W_b = 处死后立即称量的按克计的动物重量

[0286] B = 在所有样品(注射部位除外)中测量的总计数 / 秒

[0287] F = 组织特异性因子,该因子按照动物总体重的比例代表组织质量。

[0288]

组织	F
骨	0.05
肌肉	0.43
血液	0.058
皮肤	0.18
脂肪	0.07

[0289] 3(iii) 组织病理学评价

[0290] 在室温下,将各动物的肝脏切片在 10%缓冲中性福尔马林液中固定,包埋在石蜡中,制备 5- μ m 厚切片。将切片用 Mayer 苏木素和曙红 (H&E) 染色,用于评价胆汁性增生、坏死和炎症,用前述标准染色方案 (Gomori 1950 Am. J. Clin. Pathol. 20 :661-663),进行 Gomori 三色染色(胶原染色),用于评价纤维变性。

[0291] 通过评价各损害的程度和严重性,半定量评价肝脏损害的组织学评分,然后按如下 0-5 级给损害评分:无损害 = 0,极少 = 1,温和 = 2,中等 = 3,显著 = 4,严重 = 5。基于关于手术后天数和方法(即假性与胆管结扎)的盲法,对组织进行组织学评价。通过另外的

病理学家对所有数据进行对等再检查。通过光学显微镜进行组织学分析。在亮场照明下，用 40X、100X 或 400X 目镜观察切片。

[0292] 表 4 组织学评价总结：

[0293] 表 4

[0294]

处理	病理学	第 3 天	第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 28 天
假性手术	所有	0	0	0	0	0
BDL	胆汁性增生	1	1	2	3	3
	炎症	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	坏死	1	0/1	0/1	0/1	0/1
	纤维变性	1	2	4	4	2

[0295] 列出的数据支持该模型，尤其在第 15 天，作为肝脏纤维变性的合适模型使用，可在该模型中鉴定显示与纤维发生有关的特异性摄取的分子。

[0296] 实施例 4：与假性手术动物相比，摄入大鼠 BDL 模型中纤维发生肝脏的化合物 8（在第 15 天，此时纤维发生的标记高）

[0297] 按实施例 3 中所述，建立 BDL 和假性手术动物模型。如下计算摄取的化合物 8，作为标准摄取值（SUV）：

[0298]
$$SUV = \frac{(Z_s / W_s)}{(Z_t / W_t)}$$

[0299] Z_s = 样品中计数 / 秒

[0300] W_s = 按克计的样品重量

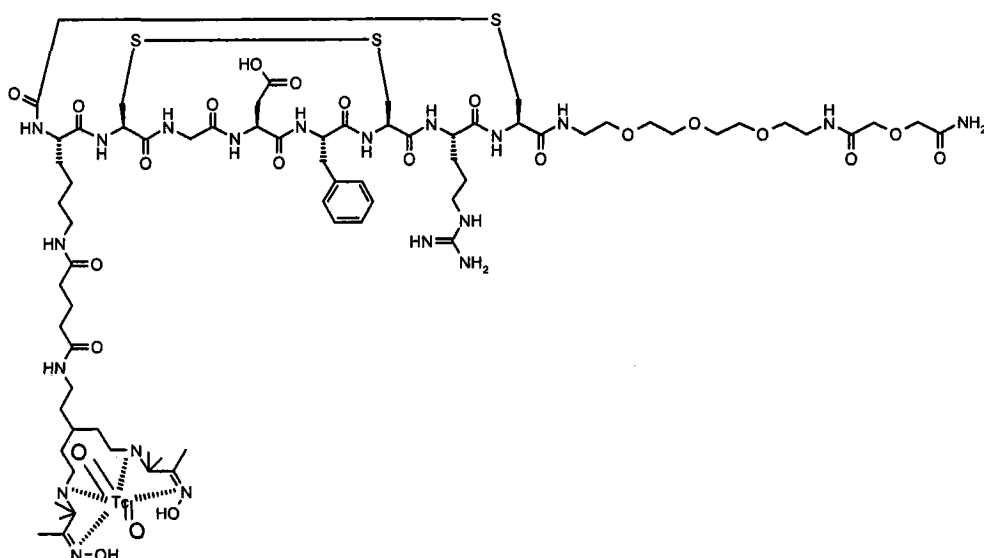
[0301] Z_t = 在所有样品（注射部位除外）中测量的总计数 / 秒

[0302] W_t = 按克计的动物重量

[0303] 通过参考解剖后剩余尸体中的计数 / 秒，并根据残留在尸体中的取样组织校准，计算尸体中放射性百分率。在评估组织值时，机体成分中的生物变异性可导致略微误差，因此可能尸体值的校正过度或不足。当尸体值校正过度时，偶然会导致负值。

[0304] 图 5 总结了在手术后第 2、5、10、15、28 天中之一，在尾静脉注射化合物 81 小时后，BDL- 和假性手术动物的肝脏中以 SUV 表达的放射性保留值，和在手术后第 2 天颠倒的阴性对照（以下结构）

[0305]



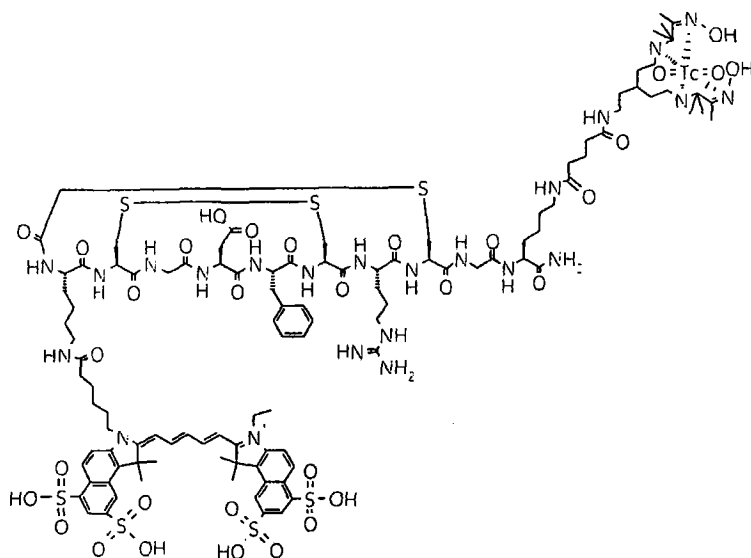
[0306] 结果证明,与假性手术动物相比,在所有试验时间点,在BDL中存在显著放射性保留;在手术后第10和15天,在BDL动物的肝脏中,观察到最大放射性保留。在手术后任何时间点,假性手术动物的肝脏摄取无显著性差异。

[0307] 实施例5:在手术后15天,与假性手术动物和阴性对照相比,在BDL模型中,化合物3和化合物8被纤维发生肝脏摄取

[0308] 按实施例3中所述建立BDL和假性手术动物模型。在手术后第15天,将化合物3、化合物8或阴性对照中的一个给予各动物,按实施例3中所述评价肝脏摄取。

[0309] 阴性对照的结构如下:

[0310]



[0311] 图6举例说明,在BDL模型中化合物3和8的肝脏摄取显著高于假性手术动物。

[0312] 实施例6:结合至BDL纤维发生肝脏的化合物8被未标记化合物8特异性抑制

[0313] 在手术后15天,通过尾静脉静脉注射~3MBq化合物8后1小时,均在加入大于1:100和1:10,000倍未标记化合物8前后,在BDL和假性手术雄性Sprague Dawley大鼠(实施例3中所述方法)中研究放射性的生物分布。在注射试验物后适当的时间点,用异氟醚将各动物再麻醉,通过颈脱臼将动物处死,称量。将各动物解剖,然后将器官和组织(参见下表5和6)除去,用BASIL计数器方案40或人工计数。

[0314] 注射 1 小时后,在 BDL 动物中活性 (按 % i. d. 计) 蓄积的主要部位归纳在下表 5:

[0315] 表 5

[0316]

BDL 60 分钟	化合物 8		大于 100 倍		大于 10K 倍	
	均值	SD±	均值	SD±	均值	SD±
骨	3.02	0.53	2.97	0.16	3.18	0.40
肌肉	10.76	2.37	8.76	0.19	9.61	1.40
血液	1.47	0.15	1.61	0.09	1.60	0.13
肾脏	3.78	0.08	4.20	0.26	3.61	0.29
胆汁和尿	40.98	0.37	38.27	0.70	41.58	6.57
肺	0.43	0.02	0.50	0.01	0.50	0.08
肝脏	12.73	7.10	16.10	3.33	9.81	2.08
脾脏	0.51	0.00	0.57	0.04	0.52	0.10
胃	0.89	0.07	0.96	0.12	1.69	0.72
小和大肠	8.32	1.50	7.41	0.48	8.58	1.73
心脏	0.13	0.00	0.13	0.01	0.14	0.01
甲状腺	0.04	0.02	0.04	0.02	0.06	0.01
皮肤	12.58	2.02	12.02	0.41	12.99	0.63
尸体	4.36	0.88	6.47	1.83	6.14	0.60
注射部位	1.32	0.26	1.75	0.35	1.68	0.07

[0317] 注射 1 小时后,在假性手术动物中活性 (按 % i. d. 计) 蓄积的主要部位归纳在下表 6:

[0318] 表 6

[0319]

BDL 60 分钟	化合物 8		+ 100 倍过量		+ 10K-倍过量	
	均值	SD±	均值	SD±	均值	SD±
骨	3.10	0.19	3.06	0.63	2.42	0.10
肌肉	10.43	0.82	10.92	0.40	8.41	1.02
血液	1.55	0.14	1.37	0.09	1.40	0.16
肾脏	4.07	0.13	4.13	0.11	3.65	0.52
胆汁和尿	44.65	2.79	43.25	2.87	46.52	4.68
肺	0.46	0.07	0.38	0.04	0.39	0.05

[0320]

肝脏	3.71	0.66	3.52	0.39	3.03	0.31
脾脏	0.29	0.02	0.29	0.06	0.27	0.02
胃	0.90	0.11	1.21	0.15	1.92	1.07
小和大肠	7.86	0.12	8.42	0.60	7.54	1.01
心脏	0.12	0.02	0.10	0.01	0.10	0.01
甲状腺	0.05	0.02	0.05	0.00	0.04	0.01
皮肤	14.37	0.71	13.97	0.93	12.69	1.37
尸体	8.45	0.67	9.32	1.01	11.63	1.90
注射部位	1.66	0.12	1.44	0.06	1.71	0.15

[0321] 实施例 7 : 在第 15 天 BDL 中化合物 8 摄取和 α -v 上调

[0322] 按实施例 3 中所述建立 BDL 和假性手术动物模型。在手术后第 2、15 和 28 天中各天, 将 $\sim 3\text{MBq}$ 化合物 8 给予动物, 按实施例 3 中所述评价肝脏摄取。

[0323] 在 BDL- 和假性手术动物的匀化肝脏中, 测量动物肝脏中的 α_v 整联蛋白的表达。在手术后第 2、15 和 28 天中的各天, 将动物处死, 将它们的肝脏摘除, 在 -70°C 下储存。

[0324] 从 -70°C 冰柜中取出预先称重的肝脏, 在低量液氮存在下, 放入预冷的研钵和碾槌。将肝脏碾碎至几乎为均匀粉末 (在碾碎肝脏期间加入少量液氮, 保持将组织一直冷冻)。将碾碎的肝脏放入预冷药物量器中, 置于 -70°C 冰柜备用。将 1g 冷冻碾碎组织直接加入含 1mM EDTA, 0.25M 蔗糖的 10ml 冰冷 RIPA 缓冲液 (Sigma; 150mM NaCl, 1.0% IgepalCA-630 (清洁剂), 0.5% 脱氧胆酸钠 (阴离子型清洁剂), 0.1% SDS, 50mM Tris, pH 8.0), 临用时加入蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma) ($10\mu\text{l}$ 混合物/ ml 溶胞缓冲液)。在 4°C 下, 用锋利刀片匀化器将混合物均化, 在湿冰上保持 30 分钟。

[0325] 将匀浆转移到预冷玻璃组织杜恩斯匀化器, 在 4°C 下, 用碾槌上下捶击 3 次。然后将组织匀浆转移到预冷离心管中, 在 4°C 下, 在 $30,000\text{rpm}$ 下离心 30 分钟。取出上清液 (总细胞溶胞物), 置于湿冰上。

[0326] 用市售含 BSA 标准品的蛋白测定试剂盒, 按厂商说明 (Pierce, USA) (应在改性 RIPA 缓冲液中制备 BSA 等份试样, 缓冲液用于均化) 测定各样品的相对蛋白浓度。将各样品的上清液在 H_2O 中进一步稀释至 $1:50$ – $1:200$, 用 99 多孔板读板器 (iEMS) 测定蛋白浓度。将各样品分成 1ml 等份试样, 在 -70°C 下储存备用。

[0327] 将抗 α -v 整联蛋白捕获抗体 (BD; 分类号: 611013) 在结合溶液 (0.05M tris, 0.138M NaCl 和 0.0027M KCl) 中稀释至适当浓度, 将 50 或 $100\mu\text{l}$ 加入增强的蛋白结合 ELISA 板 (Nunc-Immuno™ 板 96 孔板, MaxiSorp) 的各孔中。使用的抗体量为 $200\text{ng}/\text{孔}$ 。封板, 在 37°C 下温育 1 小时, 或在 4°C 下温育过夜。将板腾空, 通过与阻断缓冲液 (含 0.02% 叠氮化钠的 3% BSA/TBS, 约 $300\mu\text{l}/\text{孔}$) 一起温育, 使结合在微量滴定板上的蛋白的保留位点饱和。封板, 在 37°C 下温育 1 小时, 然后用 TBS/ 0.01% 吐温-20 洗涤 3 次。在阻断缓冲液中制备纯肝脏匀浆上清液和 / 或不同浓度的纯化 α -v 整联蛋白标准品, 按一式三份 ($100\mu\text{l}/\text{孔}$) 加入涂覆的板, 然后封板, 然后在 37°C 下温育 2 小时。将板用 TBS/ 0.05% 吐

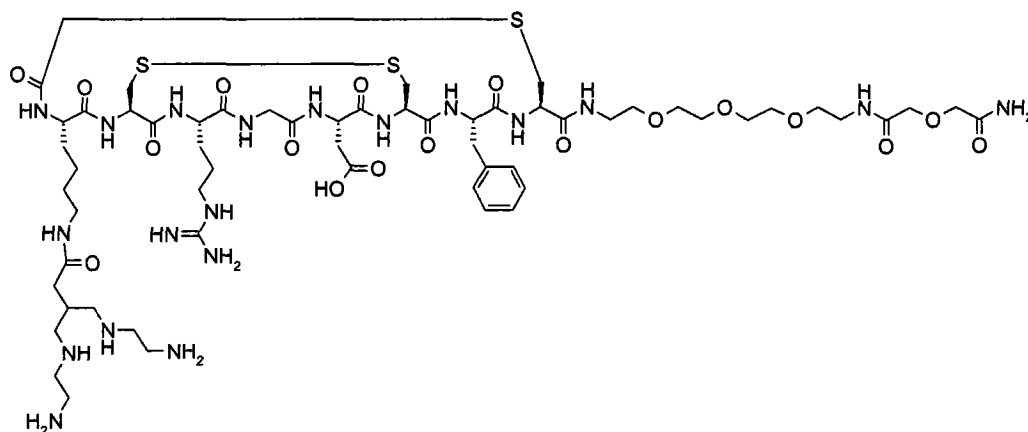
温-20 洗涤 4 次,将在阻断缓冲液中稀释的第二代抗整联蛋白检测抗体 (Chemicon AB1930) 加入各孔,在 37℃ 下温育 1 小时。将板用 TBS/0.05% 吐温 20 洗涤 4 次,将与检测抗体特异性缀合的次生抗体碱性磷酸酯酶 (Sigma ;分类号 :A7539) 加入各孔,在 37℃ 下温育 1 小时。将板用 TBS/0.05% 吐温 -20 洗涤 4 次,将 100 μ l NPP 底物溶液加入各孔,在室温下温育 2 小时,或在 4℃ 下温育过夜。通过目视检查或用微量滴定板读板器定量监测水解。经过建议的温育时间后,NPP 水解出现黄色,在 ELISA 板读板器 (Spectra-Max Plus) 上,在目标波长 (405nm) 处测量光学密度。通过加入 50 μ l 5 M 氢氧化钠 NaOH 终止水解。

[0328] 为定量结果,将未知样品的信号与标准曲线的那些信号作对比。用 GraphPad PRISM,版本 4.0 进行统计分析。通过非参数单向 ANOVA 分析组间差异。在所有的统计分析中,认为小于 0.05 的概率值 ($P < 0.05$) 具有显著性。

[0329] 图 7 和图 8 阐述了在 BDL 对假性手术动物中的 α_v 表达,证明 α_v 表达与化合物 8 的摄取相关。

[0330] 实施例 8 :化合物 11 的合成

[0331]

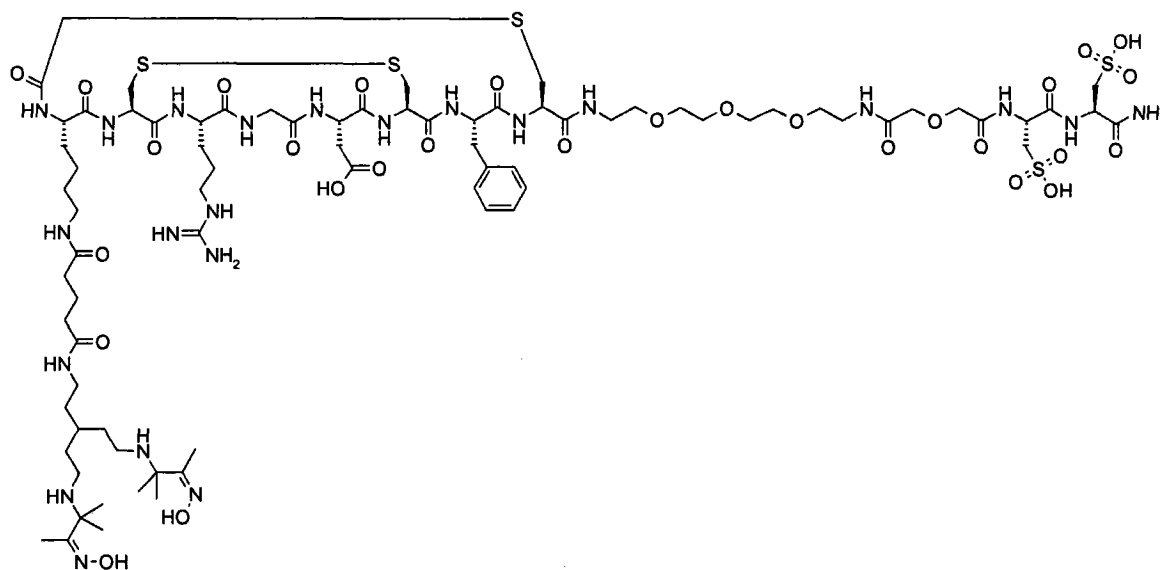


[0332] 将 Boc- 四胺 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (WO 2006/008496) (36mg, 0.050mmol) 用 HOAt (1.4mg, 0.010mmol) 和 NMM (17 μ l, 0.15mmol) 的 DMF (0.5mL) 溶液预活化 10 分钟,然后加入 Cys2-6 ;c[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-PEG(4)- 二乙醇酰 -NH₂ (WO 03/006491) (12.6mg, 0.010mmol) 的 DMF (0.5mL) 溶液。将反应混合物在室温下搅拌 3 天,然后真空浓缩。通过加入 TFA/ 水 / 三异丙基硅烷 (95 : 2.5 : 2.5, 10mL) 溶液,在其中保持 90 分钟,将 Boc 保护基团除去。将混合物浓缩,使粗产物从乙醚中沉淀,通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250×21.2mm, 5 μ m, 溶剂 :A = 水 /0.1% TFA, B = 乙腈 /0.1% TFA ;梯度 10-20% B 洗脱 40 分钟 ;流速 10mL/ 分钟,在 214nm 和 254nm 处 UV 检测) 纯化,冷冻后,得到 10.4mg。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 20×2mm, 3 μ m, 溶剂 :A = 水 /0.1% TFA, B = 乙腈 /0.1% TFA ;梯度 10-20% B 洗脱 5min ;流速 0.6mL/min,在 214 和 254nm 处 UV 检测,ESI-MS) 分析, $t_R = 2.02$ min, m/z 1458.7 (MH)⁺, 确证结构。

[0333] 通过将以下物质加入氮气吹扫的 P46 瓶 :100 μ g IGF 前体 1 或 2/MeOH ;0.5ml Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液 (pH 9.2) ;来自 Drytec™ ^{99m}Tc 发生器的 0.5ml TcO₄⁻ ;0.1ml SnCl₂/MDP 溶液 (含 10.2mg SnCl₂ 和 101mg 亚甲基二膦酸的 100ml N₂ 吹扫的盐水溶液),用 ^{99m}Tc 标记。

[0334] 实施例 9 :化合物 12 的合成

[0335]



[0336] 按 0.3mmol 规模 (0.432g, 载荷 0.71mmol/g), 在 Rink 酰胺 AM 树脂上进行该合成。在人工氮气鼓泡装置中进行前 3 步偶合。通过标准方案 (20% 哌啶的 DMF 溶液) 使树脂上的 Fmoc 基团解离。通过标准偶合剂 HATU 和 DIEA, 使 Fmoc-Cys(三苯甲基)-OH (702mg, 1.20mmol) 在 DMF 中与树脂偶联。通过标准 Kaiser 试验检查偶合完成程度。Fmoc 解离后, 重复偶合, 引入第二个半胱氨酸。将树脂悬浮于二氯甲烷/TFA/三异丙基硅烷 (94:5:1, 10mL) 溶液。3 分钟后, 排出黄色溶液。将该步骤重复 6 次, 确保侧链硫醇官能团完全脱保护。将树脂用二氯甲烷洗涤, 干燥 (在氮气流中保持 30 分钟)。将 20% 甲酸 (18mL) 和 35% 过氧化氢 (2mL) 的混合物在室温下放置 1h, 然后冷却至 0℃。将树脂用过甲酸溶液的等份试样洗涤 (2x4mL), 然后在 5℃ 下, 在过甲酸溶液 (5mL) 中轻轻振动 12h。将树脂的等份试样解离 (TFA/水/三异丙基硅烷, 95:2.5:2.5), 通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 50×2mm, 3μm, 溶剂: A = 水/0.1% TFA, B = 乙腈/0.1% TFA; 梯度 5-50% B 洗脱 5min; 流速 0.3mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 2.48\text{min}$, m/z 564.3 (Mn)⁺, 确证结构。

[0337] 除去以上树脂上的 Fmoc (标准方案) 后, 用标准偶合剂 (HATU 和 DIEA), 使 Fmoc-氨基-PEG(4)-二甘醇酸 (796mg, 1.50mmol) 在 DMF 中与树脂偶联。6h 后, 将等份试样解离 (前文段落中所述), 通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 50×2mm, 3μm, 溶剂: A = 水/0.1% TFA, B = 乙腈/0.1% TFA; 梯度 5-50% B 洗脱 5min; 流速 0.3mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 3.28\text{min}$, m/z 832.3 (MH)⁺, 显示转化完全。

[0338] 用 ABI433A 自动化肽合成仪, 用 SlowMoc 偶合方案, 在以上 ~0.25mmol 树脂上使所有后续氨基酸偶联, 得到 H-Lys(Boc)-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-PEG4-二乙醇酰-CyA-CyA-Rink 酰胺树脂。

[0339] 将氯乙酸 (142mg, 1.50mmol) 和 DCC (155mg, 0.75mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液在室温下搅拌 15 分钟, 然后过滤, 浓缩。将残渣溶于 DMF, 加入以上肽树脂。用 TFA/水/三异丙基硅烷溶液 (95:2.5:2.5, 10mL) 保持 2h, 使肽与树脂解离。将溶液浓缩, 粗肽从乙醚中沉淀, 真空干燥, 得到 340mg。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 50×2mm, 3μm, 溶剂: A = 水/0.1% TFA, B = 乙腈/0.1% TFA; 梯度 0-50% B 洗脱 5min; 流速 0.3mL/min, 在

214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 3.09\text{min}$, $m/z 1710.6 (\text{MH})^+$, 确证氯乙酰化肽。

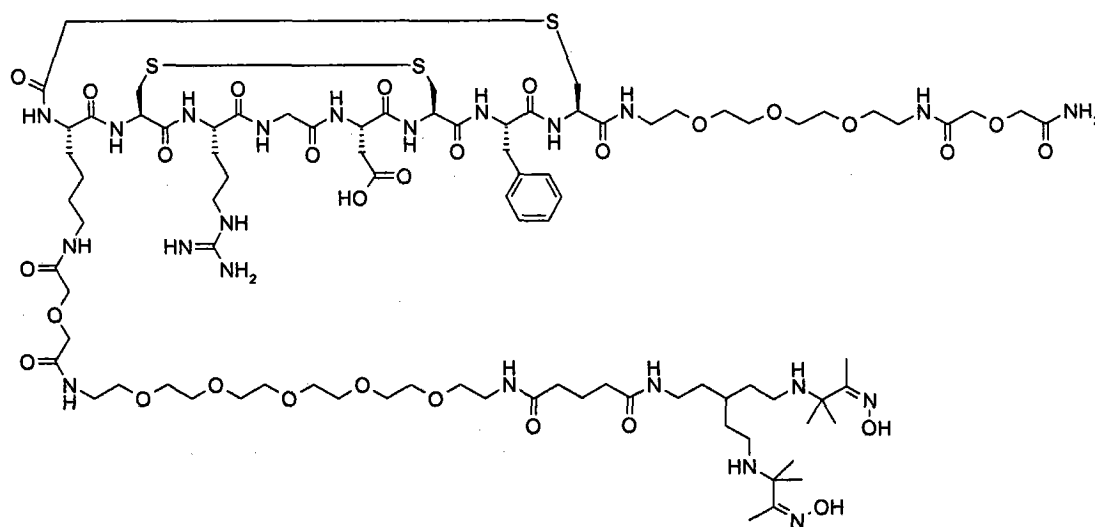
[0340] 向肽 (68mg) 的 50% 乙腈 (64mL) 溶液中加入 2.5% 氨水至 pH 8.5。将混合物在室温下搅拌 16h。LC-MS 分析确证完全硫醚环合。将乙腈减压除去, 将等份试液冻干。将分离物溶于 5% DMSO 的 TFA 溶液 (100mL), 在室温下搅拌 60 分钟。将混合物浓缩, 通过从乙醚中沉淀分离粗产物, 然后通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250×21.2mm, 5 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 5-20% B 洗脱 60min; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化, 得到 48mg 固体物。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 50×2mm, 3 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 0-30% B 洗脱 5min; 流速 0.3mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 3.18\text{min}$, $m/z 1560.5 (\text{MH})^+$, 确证二硫桥形成。

[0341] 使肽 (5mg)、螯合物 I-戊二酰四氟苯硫酚酯 (WO 03/006491) (5mg) 和 DIEA (2.7 μL) 在 NMP (1.5mL) 中的部分溶解混合物在 40℃ 下加热过夜。通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250×21.2mm, 5 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 0-30% B 洗脱 40min; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化混合物, 得到 2.9mg 纯产物。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 20×2mm, 3 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 0-30% B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 3.83\text{min}$, $m/z 1000.7 (\text{MH}_2)^{2+}$, 确证结构。

[0342] 按 WO 2003/006491 中所述, 用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记。

[0343] 实施例 10: 化合物 13 的合成

[0344]



[0345] 用标准偶合剂 (HATU 和 NMM), 使 Boc-PEG (6)-二甘醇酸 (50mg, 0.10mmol) 与 Cys2-6 ; c[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-PEG (4)-二乙醇酰-NH₂ (WO 03/006491) (25.2mg, 0.020mmol) 在 DMF 中偶联。将反应混合物搅拌过夜, 真空浓缩。在室温下, 通过加入 TFA/水/三异丙基硅烷 (95 : 2.5 : 2.5, 10mL) 溶液保持 45 分钟, 将 Boc 保护基团除去。将混合物浓缩, 然后使粗物质从乙醚中沉淀。通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250×21.2mm, 5 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 10-30% B 洗脱 40min; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm UV 检测) 纯化产物, 得到 5.5mg。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 20×2mm, 3 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯

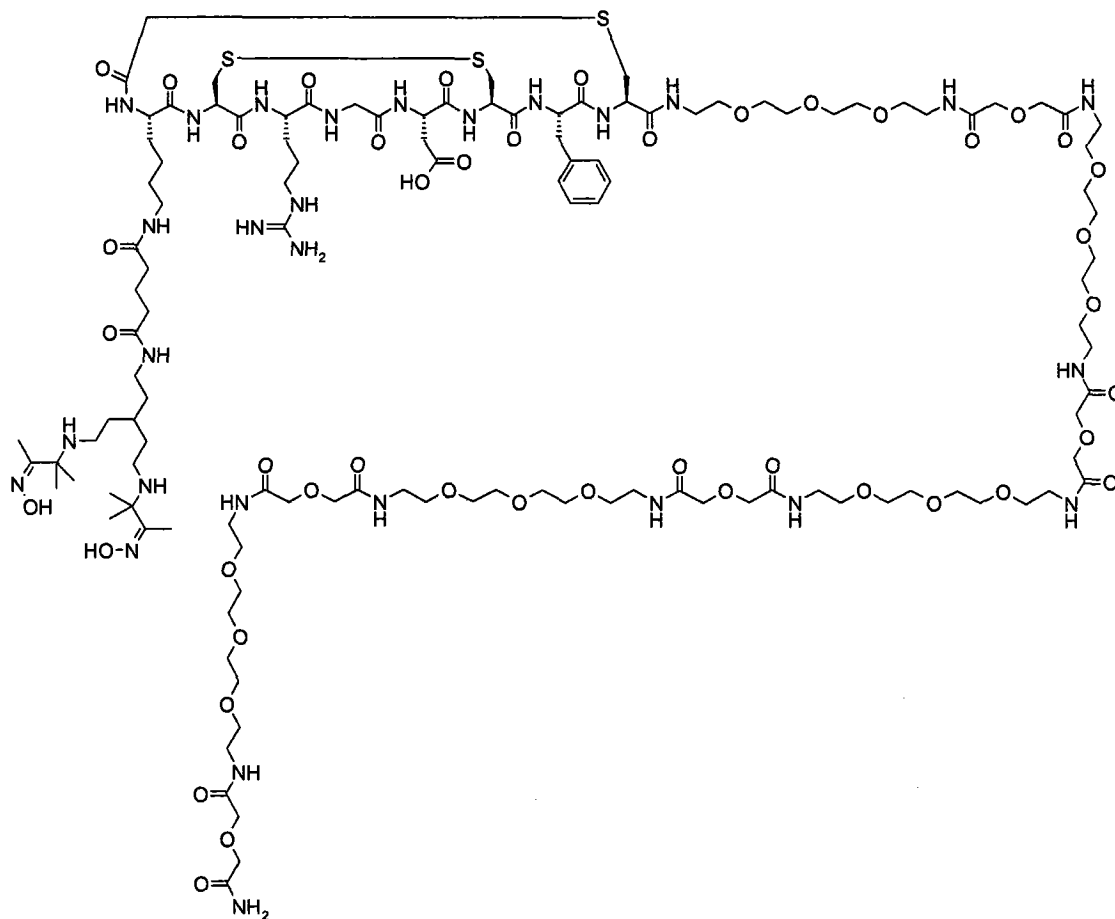
度 10-25% B 洗脱 5min;流速 0.6mL/min,在 214 和 254nm 处 UV 检测,ESI-MS) 分析, $t_R = 3.01\text{min}$, m/z 1636.0 $(\text{MH})^+$,确证产物。

[0346] 用标准偶合剂 (PyAOP (六氟磷酸 7-氮杂苯并三唑-1-基氧基-三(吡咯烷-1-基)磷鎓) 和 NMM),使螯合物 I-戊二酸 (WO 03/006491) (15.6mg,0.034mmol) 与肽 (5.5mg,0.0034mmol) 在 DMF 中偶联。4h 后,通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250×21.2mm,5 μm ,溶剂:A = 水 /0.1% TFA, B = 乙腈 /0.1% TFA;梯度 15-30% B 洗脱 40min;流速 10mL/min,在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化混合物,得到 3.8mg。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 20×2mm,3 μm ,溶剂:A = 水 /0.1% TFA, B = 乙腈 /0.1% TFA;梯度 15-30% B 洗脱 5min;流速 0.6mL/min,在 214 和 254nm 处 UV 检测,ESI-MS) 分析, $t_R = 2.13\text{min}$, m/z 1039.0 $(\text{MH}_2)^{2+}$,确证结构。

[0347] 按 WO 2003/006491 中所述,用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记。

[0348] 实施例 11:化合物 14 的合成

[0349]



[0350] 在人工氮气鼓泡装置中,按 0.80mmol 规模,在 Rink 酰胺 MBHA 树脂 (载荷 0.72mmol/g) 上进行该合成。按标准方案,将树脂上的 Fmoc 基团解离。用标准偶合剂 (PyAOP 和 DIEA) 的 DMF 溶液,使 Fmoc-PEG (4)-二甘醇酸 (850mg,1.6mmol) 与树脂偶联。缀合反应后,重复进行 Fmoc 脱保护至 5 PEG (4)-二乙醇酰基引入树脂。

[0351] 用标准偶合剂 (PyAOP 和 NMM) 的 DMF/二氯甲烷溶液 (1 : 1,6mL),使 Fmoc-Cys(Trt)-OH (1.0mmol) 与以上树脂 (0.2mmol) 偶联。2.5h 后,将树脂的等份试样 (上述) 解离,通过 LC-MS (柱 Phenomenex LunaC18(2) 20×2mm,3 μm ,溶剂:A = 水 /0.1% TFA,

B = 乙腈 / 0.1% TFA ; 梯度 10–80% B 洗脱 5min ; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 2.3\text{min}$, $m/z 1794.1 (\text{MH})^+$, 显示转化完全。

[0352] 用 ABI433A 自动化肽合成仪, 用 SlowMoc 偶合方案, 在以上约 0.1mmol 树脂上使所有后续氨基酸偶联, 得到 H-Lys(Boc)-Cys(tBu)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-(PEG(4)-二乙醇酯)₅-Rink 酰胺树脂。

[0353] 通过将氯乙酸 (378mg, 4.00mmol) 和 DCC(412mg, 2.00mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液搅拌 1h, 然后过滤, 合成氯乙酸酐 (2.00mmol)。将溶液浓缩, 将残渣溶于 DMF (3mL), 加入以上肽树脂。加入 NMM(220 μL , 2.00mmol), 将混合物放置 3h。将树脂等份试样 (上述) 解离, 通过 LC-MS 分析, 确证转化完全。通过加入 TFA/ 水 / 三异丙基硅烷溶液 (95 : 2.5 : 2.5, 10mL) 保持 3h, 使肽与树脂解离, 将溶液浓缩。

[0354] 将以上残渣溶于水 (100mL), 用乙醚萃取。向水溶液中加入乙腈 (100mL), 通过加入稀氨水将 pH 调至 8。让反应静置过夜。将乙腈蒸去, 通过冻干将粗产物分离, 得到 154mg。通过 LC-MS 分析, 确证硫醚环合完全。

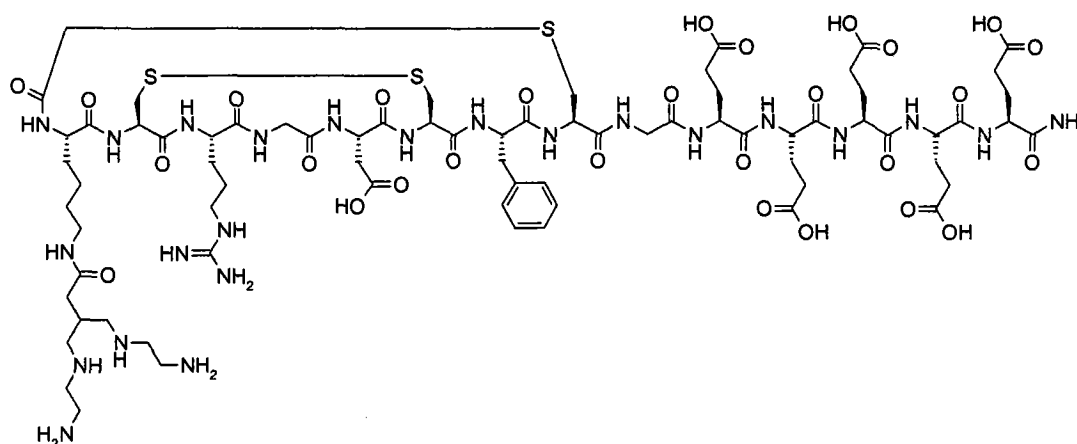
[0355] 将以上分离物溶于 5% DMSO 的 TFA 溶液 (80mL), 在室温下搅拌 60 分钟。将混合物浓缩, 通过从乙醚中沉淀将粗产物分离, 然后通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250 $\times$ 21.2mm, 5 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA ; 梯度 15–25% B 洗脱 60min ; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化, 得到 5mg 纯物质。通过 LC-MS 分析, 确认二硫桥形成。

[0356] 用标准偶合剂 (PyAOP 和 DIEA) 的 DMF 溶液, 使螯合物 I- 戊二酸 (WO 03/006491) (9mg, 0.02mmol) 与以上肽偶联过夜。产物通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18(2) 250 $\times$ 21.2mm, 5 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA ; 梯度 10–30% B 洗脱 60min ; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化, 得到 1.3mg。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18(2) 20 $\times$ 2mm, 3 μm , 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA ; 梯度 10–60% B 洗脱 5min ; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 1.8\text{min}$, $m/z 1430.1 (\text{MH}_2)^{2+}$, 确证结构。

[0357] 按 WO 2003/006491 中所述, 用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记。

[0358] 实施例 12 : 化合物 15 的合成

[0359]



[0360] 在 ABI 433A 自动化肽合成仪上, 用 SlowMoc 偶合方法, 在 Rink 酰胺 MBHA 树脂 (0.1mmol) 上装配肽序列 H-Lys(Boc)-Cys(tBu)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Cys(tBu)-Phe

-Cys(Trt)-Gly-[Glu(OtBu)]₅-NH₂。

[0361] 将氯乙酸 (378mg, 4.00mmol) 和 DCC (412mg, 2.00mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液在室温下搅拌 1h, 然后过滤, 浓缩。将残渣溶于 DMF, 加入上述肽树脂。加入 NMM (220 μ l, 2.00mmol), 将反应放置 2h。将树脂的等份试样 (上述) 解离, 通过 LC-MS (柱 Phenomenex LunaC18 (2) 20 $\times$ 2mm, 3 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 20-30% B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 2.2$ min, m/z 1820.7 (MH)⁺, 确证转化完全。通过加入 TFA / 水 / 三异丙基硅烷溶液 (95 : 2.5 : 2.5, 10mL) 保持 2h, 将树脂上的肽解离。将溶液浓缩, 通过从乙醚中沉淀将粗产物分离, 然后通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18 (2) 250 $\times$ 21.2mm, 5 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 20-40% B 洗脱 60min; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化。通过冻干和溶于 50% 乙腈 / 水 (6mL) 将半纯产物分离。通过加入稀氨水将 pH 调至 8, 将反应物搅拌过夜。将乙腈减压蒸去, 通过冻干将产物分离, 得到 14.8mg。通过 LC-MS [柱 Phenomenex Luna C18 (2) 20 $\times$ 2mm, 3 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 10-60% B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 2.0$ min, m/z 1785.0 (MH)⁺, 确认硫醚环化。

[0362] 将以上分离的肽溶于 5% DMSO 的 TFA 溶液 (8mL), 在室温下搅拌 15 分钟。将混合物浓缩, 粗产物从乙醚中沉淀, 然后通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18 (2) 250 $\times$ 10mm, 10 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 10-20% B 洗脱 60min; 流速 5mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 纯化, 得到 2mg 纯物质。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18 (2) 20 $\times$ 2mm, 3 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 10-60% B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 1.0$ min, m/z 1670.8 (MH)⁺, 确认肽。

[0363] 向以上肽 (2mg, 1 μ mol) 和 Boc- 四胺 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (W02006/008496) (8.6mg, 0.012mmol) 的 DMF 溶液中加入 DIEA (3 μ L, 0.02mmol)。将反应混合物搅拌过夜, 通过制备 HPLC (柱 Phenomenex Luna C18 (2) 250 $\times$ 21.2mm, 5 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 20-80% B 洗脱 60min; 流速 10mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测) 进行纯化。将纯产物冻干, 溶于 TFA 和二氯甲烷 (1 : 1, 2mL) 的混合物。2h 后, 将溶剂蒸发, 将残渣溶于乙腈 / 水, 冻干, 得到 1.0mg 纯产物。通过 LC-MS (柱 Phenomenex Luna C18 (2) 20 $\times$ 2mm, 3 μ m, 溶剂: A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA; 梯度 0-20% B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min, 在 214 和 254nm 处 UV 检测, ESI-MS) 分析, $t_R = 4.2$ min, m/z 935.5 (MH₂)²⁺, 确证结构。

[0364] 按以上实施例 8 中化合物 11 的描述, 用 ^{99m}Tc 标记。

EA-Hy926 膜上, ^{125}I -锯鳞血抑肽结合对
未标记化合物 6 和锯鳞血抑肽化合物

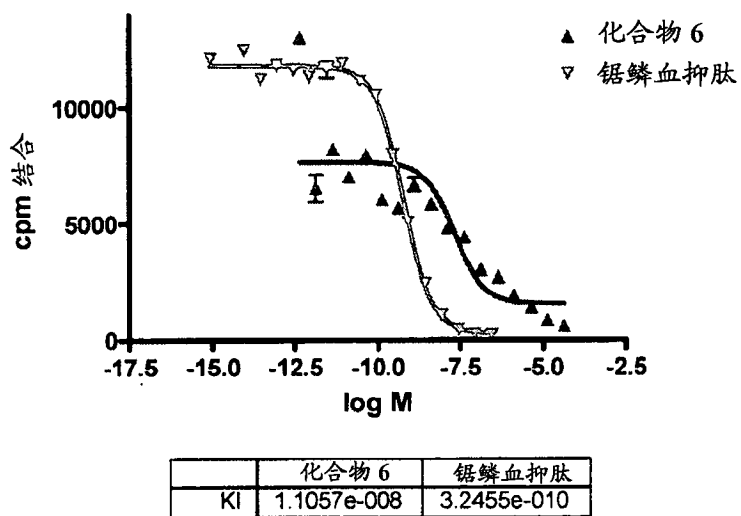


图 1

^{125}I -化合物 6 与 LX-2 细胞结合

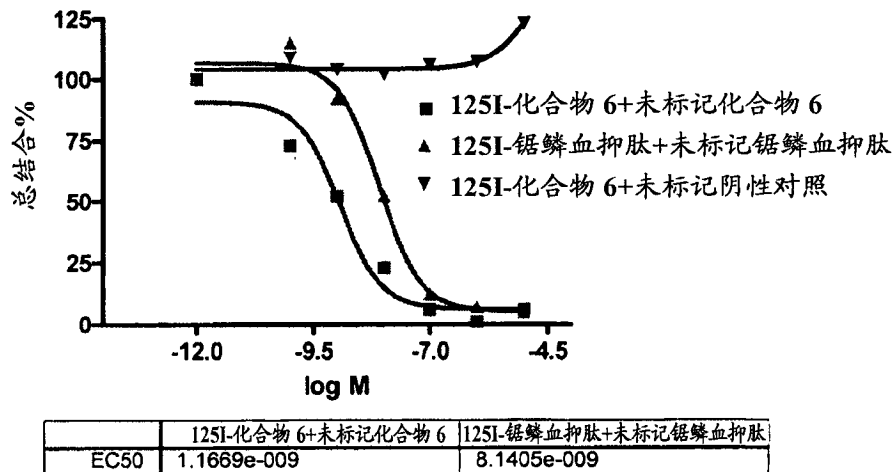


图 2

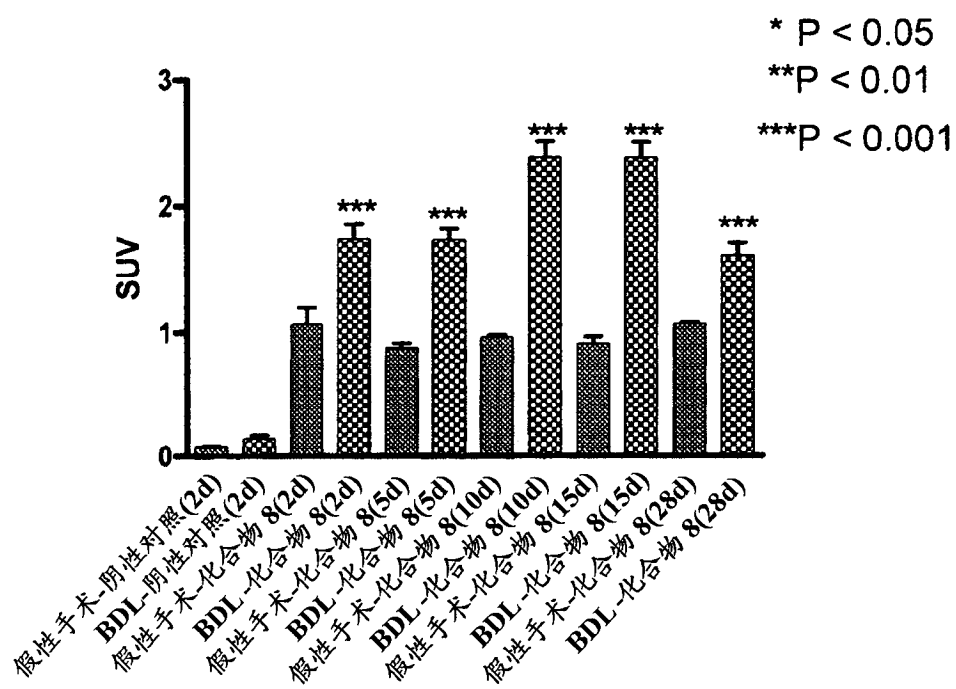


图 5

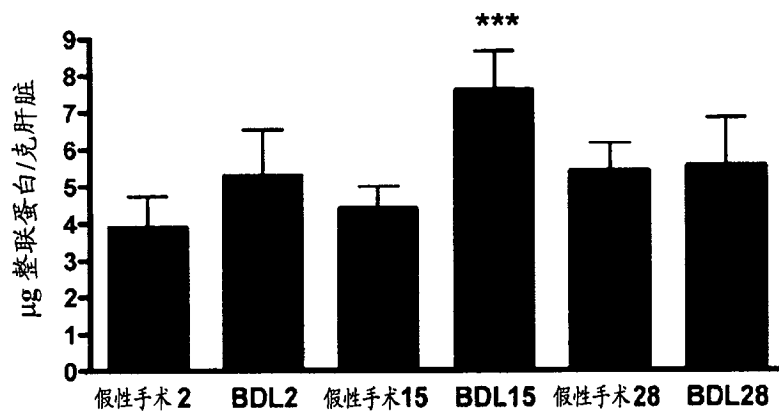


图 7

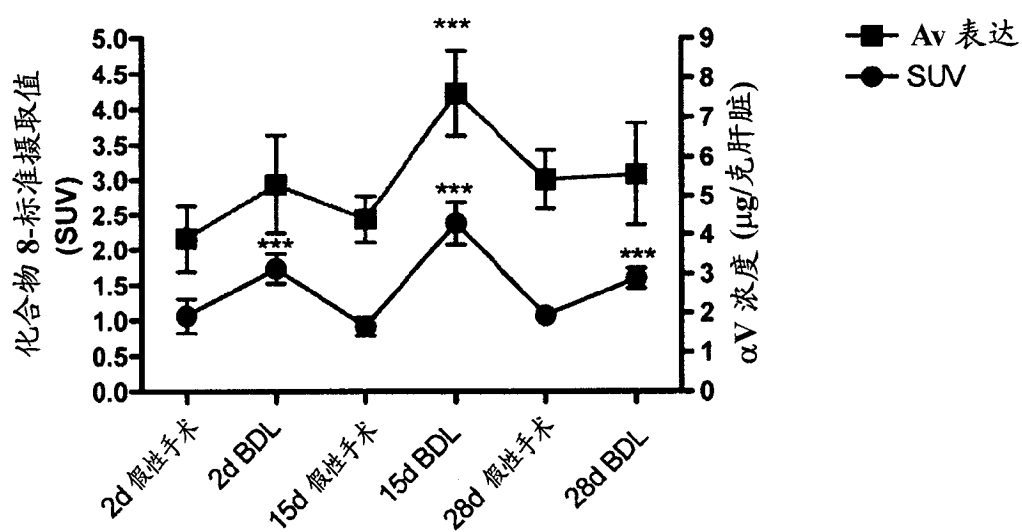


图 8