[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 51/02 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680011074.9

[43] 公开日 2008 年 4 月 2 日

[11] 公开号 CN 101155602A

[22] 申请日 2006.2.3
[21] 申请号 200680011074.9
[30] 优先权
[32] 2005. 2. 4 [33] GB [31] 0502277.7
[86] 国际申请 PCT/GB2006/000398 2006.2.3
[87] 国际公布 WO2006/082434 英 2006.8.10
[85] 进入国家阶段日期 2007.9.30
[71] 申请人 通用电气健康护理有限公司
地址 英国白金汉郡
[72] 发明人 B·吉尔贝 S·钱皮安
A·M·吉布森 S·-A·里克茨
M·阿沃里 B·E·阿博

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 冬 梁 谋

权利要求书 3 页 说明书 37 页 附图 1 页

[54] 发明名称

包含胱天蛋白酶-3 底物的成像剂

[57] 摘要

本发明涉及体内成像用诊断成像剂。 该成像剂包含标记有适合于体内诊断成像的成像部分的合成胱天蛋白酶-3 底物肽。 本发明还提供包含该成像剂的放射药物组合物，以及用以制备放射药物的药盒。 本发明还描述了适合于制备该成像剂的非放射性前体。 该成像剂可用于其中涉及胱天蛋白酶-3 的各种疾病状态的体内诊断成像和/或治疗监测。

1. 一种式 I 的包含标记胱天蛋白酶-3 底物的成像剂：

Z^1-$(X^1)_{m1}$-Asp(R^1)-Xaa1-Xaa2-Asp(R^2)-$(A)_n$–[IM] (I)

其中：

Z^1 连接到 X^1 或 Asp 残基的 N 末端，为 H 或代谢抑制性基团；

X^1 为 4-20 个氨基酸的细胞膜透性前导序列肽，其促进体内从哺乳动物细胞外部到内部的细胞膜转运作用；

Xaa1 为 Glu(R^3)或 Met；

Xaa2 为 Val，或当 Xaa^1 为 Met 时为 Gln；

Asp 为天冬氨酸；

-$(A)_n$-为接头基团，其中 A 各自独立为-CR_2-、-CR=CR-、-C≡C-、-CR_2CO_2-、-CO_2CR_2-、-NRCO-、-CONR-、-NR(C=O)NR-、-NR(C=S)NR-、-SO_2NR-、-$NRSO_2$-、-CR_2OCR_2-、-CR_2SCR_2-、-CR_2NRCR_2-、C_{4-8} 亚环杂烷基、C_{4-8} 亚环烷基、C_{5-12} 亚芳基或 C_{3-12} 亚杂芳基、氨基酸、糖或单分散聚乙二醇(PEG)结构单元；

R 各自独立选自 H、C_{1-4} 烷基、C_{2-4} 烯基、C_{2-4} 炔基、C_{1-4} 烷氧基烷基或 C_{1-4} 羟基烷基；

R^1、R^2 和 R^3 独立为在 Asp 或 Glu 氨基酸残基的羧基侧链连接的 R′基团，其中 R′各自选自 H、C_{1-8} 烷基、C_{2-8} 烷氧基烷基、C_{5-12} 芳基或 C_{5-16} 芳烷基；

m_1 为 0 或 1；

n 为 0-10 的整数；

IM 为包含发射 γ 射线的放射性卤素或发射正电子的放射性非金属的成像部分，其中在将所述标记胱天蛋白酶-3 底物给予哺乳动物身体体内后，该成像部分能以非侵入方式在外部检测。

2. 权利要求 1 的成像剂，其中当 m_1 为 0 时，R^1、R^2 和 R^3 中的至少一个为 C_{1-8} 烷基。

3. 权利要求 1 或 2 的成像剂，其中当 m_1 为 1 时，R^1、R^2 和 R^3 中的至少一个为 H。

4. 权利要求 1-3 中任一项的成像剂，其中 R 各自独立选自甲基和环己基。

5. 权利要求 1-4 中任一项的成像剂，其中 Z^1 为乙酰基或苄氧基羰基。

6. 权利要求 1-5 中任一项的成像剂，其中 $(A)_n$ 为 $(Gly)_n$ 或 $(Lys)_n$。

7. 权利要求 1-6 中任一项的成像剂，其中 X^1 包含选自以下的前导序列：KWSFRVSYRGISYRRSR、AWSFRVSYRGISYRRSR、RKKRRQRRR、RRLSYSRRRF、RGGRLSYSRRRFSVSVGR、RGGRLSYSRRRFSTSTGR、RKKRR-Orn-RRR、RRRRRRRRR 和 β-$(VRR)_4$，其中 Orn 为鸟氨酸。

8. 权利要求 1-7 中任一项的成像剂，其中发射 γ 射线的放射性卤素为 ^{123}I。

9. 权利要求 1-7 中任一项的成像剂，其中发射正电子的非金属选自 ^{18}F、^{11}C、^{124}I 或 ^{13}N。

10. 一种适于制备权利要求 1-9 中任一项的成像剂的前体，所述前体包含式 II 化合物：

$$Z^1\text{-}(X^1)_{m1}\text{-}Asp(R^1)\text{-}Xaa1\text{-}Xaa2\text{-}Asp(R^2)\text{-}(A)_n\text{–}[Y^1] \qquad (II)$$

其中 Z^1、X^1、m_1、R^1、Xaa1、Xaa2、Asp、R^2、A 和 n 如权利要求 1 中定义，Y^1 为非放射性基团，其包含能够与发射正电子的放射性非金属或发射 γ 射线的放射性卤素的来源反应以产生式(I)成像剂的取代基。

11. 权利要求 10 的前体，其中所述 Y^1 基团的取代基选自：

(i) 有机金属衍生物如三烷基锡烷或三烷基甲硅烷；

(ii) 含有用于亲核取代的烷基卤、甲苯磺酸烷基酯或甲磺酸烷基酯的衍生物；

(ii) 含有被活化而倾向于亲核或亲电取代的芳环的衍生物；

(iv) 含有容易进行烷基化的官能团的衍生物;

(v) 将含巯基化合物烷基化以产生含硫醚产物的衍生物;

(vi) 与醛或酮进行缩合的衍生物;

(vii) 通过活性酯基团被酰化的衍生物。

12. 权利要求 10 或 11 的前体，所述前体为无菌无热原形式。

13. 权利要求 10-12 中任一项的前体，其中所述前体结合到固相。

14. 权利要求 10-13 中任一项的前体，其中发射正电子的放射性非金属或发射γ射线的放射性卤素的来源选自:

(i) 卤化物离子或 F^+或 I^+; 或者

(ii) 选自烷基卤或氟烷基卤、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯或甲苯磺酸酯的烷基化剂。

15. 一种放射药物组合物，所述组合物包含权利要求 1-9 中任一项的成像剂以及生物相容性载体，其为适合哺乳动物给药的形式。

16. 权利要求 15 的放射药物组合物，所述组合物的放射性剂量适合于单个患者，所述组合物在合适的注射器或容器中提供。

17. 一种用以制备权利要求 15 或 16 的放射药物组合物的药盒，所述药盒包含权利要求 10-14 中任一项的前体。

18. 权利要求 17 的药盒，其中所述前体为无菌无热原形式。

19. 权利要求 1-9 中任一项的成像剂在涉及胱天蛋白酶-3 的哺乳动物身体疾病状态的诊断方法中的用途，其中所述哺乳动物之前给予过权利要求 15 或 16 的放射药物组合物。

包含胱天蛋白酶-3底物的成像剂

发明领域

本发明涉及体内成像用诊断成像剂。该成像剂包含标记有适合于体内诊断成像的成像部分的合成胱天蛋白酶-3 (caspase-3)底物。

发明背景

凋亡所致的程序性细胞死亡是一个复杂的过程，涉及许多具有多个调控水平的细胞过程。它由两种途径之一引发。第一种是通过细胞表面死亡受体引发的外源途径，第二种是通过内源起始因素(例如紫外辐射所致的 DNA 损伤)的内源途径。这两种途径都以细胞的协同死亡(co-ordinated death)而告终，细胞的协同死亡需要能量，且与坏死性细胞死亡不同的是它不涉及炎症反应。将要凋亡的细胞在其细胞表面上发出"吃掉我"的信号，诱使其它细胞通过吞噬作用将它们消灭。

细胞凋亡是体内许多过程中的一个重要事件。例如，胚胎发育完全依赖于细胞凋亡，快速更新的组织要求进行严格调节，以避免严重的病理后果。细胞凋亡调节失败会引起癌症(细胞死亡不足)和神经病症如阿尔茨海默病(细胞死亡过多)。此外，细胞凋亡也可表明存在受损的组织，如心脏中局部缺血/再灌注伤害后的区域。

膜联蛋白-5 是一种内源性人蛋白(RMM 36 kDa)，它能以 10^{-9} M 左右的亲和力结合凋亡细胞外膜上的磷脂酰丝氨酸(PS)。^{99m}Tc-标记的膜联蛋白-5 已被用于体内细胞凋亡成像[Blankenberg 等, J.Nucl.Med., 40, 184-191 (1999)]。但是，这种方法有几个问题。首先，膜联蛋白-5 也可进入坏死细胞而结合暴露在细胞膜内叶(inner leaflet)上的 PS，这可能会导致出现假阳性结果其次是血池活性高，这一活性在注射

标记的膜联蛋白-5 后维持至少两小时。这意味着最佳成像时间在注射后 10-15 小时之间[Reutelingsperger 等, J.Immunol.Meth., 265 (1-2), 123-32 (2002)]，使得这种方法不适合用于急性冠状动脉综合征患者的临床判定。此外，膜联蛋白-5 的清除由肾和肝进行，故在腹部区域具有极强的本底信号。这使得不可能对腹部的细胞死亡进行成像(例如在肾移植及肿瘤监测中)。

WO 99/67284 公开了细胞膜通透性肽连接到"功能接头部分"所成的螯合缀合物(chelator conjugator)，该功能接头部分给诊断性或药物活性物质赋予靶细胞特异性。诊断性物质选自：放射性核素、relaxivity 金属、荧光染料、染料或酶底物。公开了多种通透性肽，包括 Tat 肽。靶细胞特异性优选由肽或蛋白质结合基序赋予，有许多酶靶标得到了描述。胱天蛋白酶，从胱天蛋白酶-1 到胱天蛋白酶-13，被提及为优选的蛋白酶反应性序列。

WO 01/89584 在实施例 16-18 和 21 中公开，胱天蛋白酶-3 底物四肽 DEVD (即 Asp-Glu-Val-Asp)的螯合缀合物可用于使用 MRI (核磁共振成像)或闪烁照相术的凋亡组织体内成像。

Haberkorn 等[Nucl.Med.Biol., 28, 793-798 (2001)]研究了将标记有放射性同位素 ^{131}I 的胰胱天蛋白酶(pan-caspase)抑制剂 Z-VAD-fmk 即苄氧基羰基-Val-Ala-*DL*-Asp(*O*-甲基)-氟甲基酮作为潜在的细胞凋亡成像剂。他们发现细胞对成像剂的绝对摄取量低，并将这归因于每个激活的胱天蛋白酶仅捕获一个抑制剂分子。他们推断，标记的胱天蛋白酶底物应该不会遭遇这个问题，将是成像剂的更好方法。

Bauer 等在 2005 年 6 月发表的文章[J.Nucl.Med., 46(6), 1066-1074 (2005)]中，报告了含有 DEVDG 肽序列的 ^{131}I 放射标记胱天蛋白酶底物向凋亡细胞中的摄取。DEVDG 肽本身据说显示极少的细胞摄取，而缀合的 Tat 细胞穿透性肽则给出改进的结果。Bauer 等推断，射电金属标记物预期能通过带电金属复合物的释放或通过转络合作用(transcomplexation)进一步改进标记物在凋亡细胞中的胞内保留。

Fischer 等[Cell Death Diff., 10, 76-100 (2003)]对胱天蛋白酶底物作了综述。

Lahorte 等[Eur.J.Nucl.Med., 31, 887-919 (2004)]对用于细胞凋亡成像的放射性药物作了综述。

因此，仍需要可快速成像(例如在注射后 1 小时内)且能很好地从血液和本底器官清除的细胞凋亡成像剂。

发明概述

胱天蛋白酶是具有高度特异性的蛋白酶，显示在肽的天冬氨酸部分之后进行切割的绝对要求[Thornberry 等, Science 281, 1312-16, (1998)]。易切断的酰胺键是将天冬氨酸残基(或"P1 残基")的 α-羧基连接到肽序列中肽 C 末端方向的下一个氨基酸的酰胺键。要进行有效的催化作用，还需要在易切断的酰胺键的 N 末端一侧上存在至少四个氨基酸。不同的胱天蛋白酶其优选的四肽识别基序差异明显[Thornberry 等, J.Biol.Chem., 272(19), 17907-17911, (1997)]。

迄今在人类中已鉴定出至少十四种不同的胱天蛋白酶，分别命名为胱天蛋白酶-1、胱天蛋白酶-2 等。已将胱天蛋白酶分类成三大类:

I 类胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶-1、4 和 5)，它们偏好序列 WEHD;

II 类胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶-2、3 和 7)，它们偏好序列 DExD;

III 类胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶-6、8 和 9)，它们偏好序列 (L/V)ExD。

基于激活机制，胱天蛋白酶被如下分类:

起始物，如胱天蛋白酶-8、9;

效应物，如胱天蛋白酶-3、6 和 7;

促炎酶，如胱天蛋白酶-1、4、5、11、12 和 13。

对于胱天蛋白酶-3，DExD 中的 x 可以是 A、P、L 或 V [Cohen

等, Biochem. J. 326, 1-16 1997)] —这里使用常规的单字母氨基酸缩写。现已发现，标记有成像部分的合成胱天蛋白酶-3 底物是有用的诊断性成像剂，用于对其中涉及到异常细胞凋亡特别是过量细胞凋亡的哺乳动物身体疾病的体内成像。成像部分具有放射性，为发射 γ 射线的放射性卤素或发射正电子的非金属。

本发明涉及胱天蛋白酶-3 的底物，胱天蛋白酶-3 也称 CPP32，为 29kDa 的半胱氨酸蛋白酶。采用底物方法的主要优点在于信号有可能放大。因此，放射标记的胱天蛋白酶-3 底物会被传递到凋亡细胞，然后会被激活的胱天蛋白酶-3 切割，切割下的放射标记部分保留在凋亡细胞中。由于激活的胱天蛋白酶-3 能在细胞的凋亡级联中切割多种底物，这种方法会导致示踪物信号显著放大，从而提供更好的靶标-本底比。

发明详述

在一个方面，本发明提供包含式 I 所示的标记胱天蛋白酶-3 底物的成像剂：

$$Z^1\text{-}(X^1)_{m1}\text{-}Asp(R^1)\text{-}Xaa1\text{-}Xaa2\text{-}Asp(R^2)\text{-}(A)_n\text{–}[IM] \qquad (I)$$

其中：

Z^1 连接到 X^1 或 Asp 残基的 N 末端，为 H 或代谢抑制性基团；

X^1 为 4-20 个氨基酸的细胞膜通透性前导序列肽，它促进体内从哺乳动物细胞外部到内部的细胞膜转运作用；

Xaa1 为 Glu(R^3)或 Met;

Xaa2 为 Val，或当 Xaa1 为 Met 时为 Gln;

Asp 为天冬氨酸;

$-(A)_n-$为接头基团，其中 A 各自独立为$-CR_2-$、-CR=CR-、-C≡C-、$-CR_2CO_2-$、$-CO_2CR_2-$、-NRCO-、-CONR-、-NR(C=O)NR-、-NR(C=S)NR-、$-SO_2NR-$、$-NRSO_2-$、$-CR_2OCR_2-$、$-CR_2SCR_2-$、$-CR_2NRCR_2-$、C_{4-8} 亚环杂烷基、C_{4-8} 亚环烷基、C_{5-12} 亚芳基或 C_{3-12} 亚

杂芳基、氨基酸、糖或单分散聚乙二醇(PEG)结构单元;

R 各自独立选自 H、C_{1-4} 烷基、C_{2-4} 烯基、C_{2-4} 炔基、C_{1-4} 烷氧基烷基或 C_{1-4} 羟基烷基;

R^1、R^2 和 R^3 独立为在 Asp 或 Glu 氨基酸残基的羧基侧链连接的 R′基团，其中 R′各自选自 H、C_{1-8} 烷基、C_{2-8} 烷氧基烷基、C_{5-12} 芳基或 C_{5-16} 芳烷基;

m_1 为 0 或 1;

n 为 0-10 的整数;

IM 为包含发射 γ 射线的放射性卤素或发射正电子的放射性非金属的成像部分，其中在将所述标记的胱天蛋白酶-3 底物体内给予哺乳动物后，该成像部分能以非侵入方式在外部检测到。

Asp(R^1)-Xaa1-Xaa2-Asp(R^2) 为胱天蛋白酶-3 四肽底物基序，因此本发明的成像剂包含标记有成像部分的合成胱天蛋白酶-3 底物。

优选的成像剂在体内不容易遭到代谢，因此最优选在人体内中显示出 60－240 分钟的半衰期。成像剂优选通过肾脏排泄(即显示尿排泄)。成像剂优选在细胞凋亡灶(apoptotic focus)显示至少 1.5、最优选至少 5 的信号-本底比，特别优选的是至少 10。在体内非特异性结合或游离的成像剂发生一半峰水平的清除的时间，优选小于或等于成像部分的放射性同位素的放射性衰变半衰期。

成像剂的分子量宜最多至 5000 道尔顿。优选地，分子量在 150-3000 道尔顿的范围，最优选 200-1500 道尔顿，特别优选的是 300-800 道尔顿。

相对于其它胱天蛋白酶，胱天蛋白酶-3 能在几乎所有组织中高水平表达，且比其它的 II 类胱天蛋白酶显示更高的催化活性。但是，胱天蛋白酶-3 只在凋亡期间以活性形式表达。这构成了本发明的标记底物成为凋亡疾病的可行成像剂(信噪比良好)的基础。

由于胱天蛋白酶是胞内蛋白酶，本发明的成像剂要显示良好的细胞膜通透性。这可通过两种方法或者它们的组合来实现。第一，

具有酸性基团(例如羧酸官能团)的肽作为酯而不是游离酸存在时，其细胞通透性会增高。这些酯对应于式 I 的 R^1、R^2 和 R^3 基团，其中 R′不是 H。此外，细胞通透性的程度与造成不利药物动力学的亲脂性的程度，可通过改变所用的酯的性质来微调。成像剂一旦跨过细胞膜，细胞中存在的不同酯酶就会释放出所需的游离酸形式。因此，在一个优选的实施方案中，R^1、R^2 和 R^3 中的至少一个是 C_{1-8} 烷基。优选 R^1、R^2 和 R^3 基团中的两个或更多个是 C_{1-8} 烷基。当 R^1、R^2 或 R^3 是 C_{1-8} 烷基时，优选的烷基是甲基、环己基和庚基，最优选甲基和环己基。

第二，为促进细胞膜转运，本发明的成像剂优选包含如下定义的“前导序列” (X^1)，即 m_1 优选为 1。前导序列在胱天蛋白酶-3 底物肽的 N 末端连接。本发明的“前导序列”(X^1)基团为能促进细胞膜转运的 4-20 个氨基酸的肽。这很重要，因为胱天蛋白酶-3 是胞内酶，因此成像剂必须能够跨过细胞膜。前导序列因此可用于将成像剂转运到凋亡细胞中，也可用于将未被切割的肽转运出正常细胞(即非凋亡细胞)。当 R^1、R^2 或 R^3 中的一个或更多个是 C_{1-8} 烷基时，前导序列仍然可用于让成像剂离开不含有激活的胱天蛋白酶-3、但其中的非特异性酯酶仍会将酯基团除去的细胞。酯一旦被水解，未被切割的成像剂就可能没有足够的亲脂性以离开不含胱天蛋白酶-3 的细胞，这会导致非特异性摄取。前导序列的后一作用有助于改进成像剂在所需体内成像部位的选择性靶标-本底比，证明了为什么要优选前导序列。

术语“氨基酸”意指 L-或 D-氨基酸、氨基酸类似物(例如萘基丙氨酸)或氨基酸模拟物，它们可以是天然的或纯粹是合成的，且可以是光学纯的，即为单一对映异构体并因此具有手性，或者是对映异构体的混合物。本文使用常规的氨基酸三字母或单字母缩写。优选本发明的氨基酸是光学纯的。合适的前导序列肽为本领域所公知，包括蛋抗菌肽衍生物、protegrin 衍生物、细胞膜通透性基序如聚 Arg 序列、β-肽如 β-(Val-Arg-Arg)$_n$，或者可使用病毒蛋白的渗透基序

(permeation motif)，例如基于 HIV-1 Tat 蛋白碱性肽的基序[Fawell 等, PNAS, 91: 664-68 (1994)]。β-肽由与 α-氨基酸相对的 β-氨基酸残基(即骨架中多一个-CH_2-)组成，对蛋白水解降解作用更稳定，可形成完好的二级结构[参见 T.B. Potocky 等, J Biol Chem., 278(50), 50188-94 (2003)及其中所引用的参考文献]。具体的"前导序列"及其参考文献在下表 1 中给出:

表 1: 前导序列

	前导序列	说明	参考文献
1	CNSRLHLR 和 CENWWGDV	用噬菌体肽文库进行血管靶向	Pasqualini J.Nucl. Med., 43(2):159-62 (1999)
2	KWSFRVSYRGISYRRSR	鲨抗菌肽衍生物	WO 99/07728; WO 00/32236; Nakamura 等, J Biol Chem. 15; 263(32): 16709-13 (1988); Tamura 等, Chem. Pharm. Bull. Tokyo 41, 978-980 (1993)
3	AWSFRVSYRGISYRRSR	鲨抗菌肽衍生物	WO 99/07728
4	RKKRRQRRR	HIV-1 Tat_{49-57}	Mie 等, Biochem Biophys Res Commun. 24; 310(3): 730-4 (2003); Potocky 等, J.Biol Chem. 278(5), 50188-50194 (2003)
5	RRLSYSRRRF	Protegrin 衍生物	WO 99/07728
6	RGGRLSYSRRRFSVSVGR	Protegrin	WO 00/32236; Kokryakov 等, FEBS Lett.; 327(2):231-6 (1993)
7	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	Tropic protegrin (SynB1)	WO 99/07728; WO 00/32236
8	PRPRPLPFPRPGPPGPRPIPR	Ip (Bac7)	
9	RQIKIWFQNRRMKWKK	Penetratin	
10	RGGGLSYSRRRFSTSTGR	Tropic protegrin 类似物	
11	ILPWKWPWWPWRR	Ip (Indolicin)	
12	FKCRRWQWRMKKLGA	Ip (Lferrin B)	
13	RLSRIVVIRVSR	Ip (十二肽)	

“前导序列”不提供体内生物靶向作用，但它可帮助提供从体内本底器官的更快清除作用。因此，例如 ^{99m}Tc 标记的 Tat 肽已证实比其它放射标记的肽显示更快的体内肾清除作用[Polyakov 等，Bioconj.Chem., 11, 762-771 (2000)]。

优选的前导序列肽是 Tat 肽、蛩抗菌肽衍生物和 protegrin 衍生物。Gammon 等[Bioconj.Chem., 14, 368-376 (2003)]描述了特别优选的前导序列，包括 RKKRR-Orn-RRR、RRRRRRRRR 和 β-$(VRR)_4$，其中 Orn 是鸟氨酸。

术语“代谢抑制性基团” (Z^1)意指能抑制或阻碍氨基末端处的肽或氨基酸体内代谢的生物相容性基团。这种基团为本领域技术人员所公知，对于肽氨基末端宜选自：乙酰基、Boc (其中 Boc 为叔丁氧基羰基)、Fmoc (其中 Fmoc 为芴基甲氧基羰基)、苄氧基羰基、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde [即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基]或 Npys (即 3-硝基-2-吡啶亚磺酰基)。亲脂性更强的 Z^1 基团其优势在于，即使酯基团已被体内非凋亡细胞的胞内酯酶切割，成像剂仍具有足够的亲脂性以跨过细胞膜。这用于将非凋亡细胞中不需要的非特异性摄取减至最少。因此，肽 N 末端的优选代谢抑制性基团是乙酰基(当 $m_1 = 1$ 时)和苄氧基羰基(当 $m_1 = 0$ 时)。

术语“标记有”意指官能团包含有成像部分，或者指成像剂部分作为附加物而连接。当官能团包含有成像部分时，这指“成像部分”构成化学结构的一部分，且是以显著高于其天然丰度的水平存在的放射性同位素。这种提高或富集的同位素水平宜为所指同位素的天然丰度水平的至少 5 倍、优选至少 10 倍，最优选至少 20 倍，理想地为至少 50 倍，或者所指同位素以富集水平达 90-100%的水平存在。这种官能团的实例包括 ^{11}C 水平升高的 CH_3 基团和 ^{18}F 水平升高的氟代烷基，这样成像部分是化学结构中同位素标记的 ^{11}C 或 ^{18}F 原子。放射性同位素 ^3H 和 ^{14}C 不是合适的成像部分。

当成像部分是发射 γ 射线的放射性卤素时，放射性卤素宜选自 ^{123}I、^{131}I 或 ^{77}Br。优选的发射 γ 射线的放射性卤素是 ^{123}I。当成像部分是发射正电子的放射性非金属时，成像剂将会适用于正电子发射断层成像(PET)。合适的这种正电子发射物包括 ^{11}C、^{13}N、^{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是 ^{11}C、^{13}N、^{124}I 和 ^{18}F，特别是 ^{11}C 和 ^{18}F，最特别是 ^{18}F。

成像部分优选是发射正电子的放射性非金属。使用 PET 成像部分会有一些技术优势，包括:

(i) PET/CT 照相机的开发允许容易地将功能图像(PET)和解剖图像(CT)整合在一起，获得改进的诊断信息;

(ii) 容易对 PET 图像进行定量，以便准确进行评级和治疗监测;

(iii) 灵敏度提高，可以显示更小的靶组织。

设想式 I 的接头基团-$(A)_n$-的一个作用是将 IM 与胱天蛋白酶-3 底物的活性位点隔开。这在成像部分体积相对较大(例如放射性碘原子)时特别重要，使得与酶进行的相互作用不受削弱。这可通过组合应用柔性因素和/或刚性因素来实现，柔性因素如简单烷基链使得体积大的基团具有让其自己避开活性位点的自由度，刚性因素如环烷基或芳基间隔基可将 IM 隔离活性位点。也可利用接头基团的性质来改进成像剂的生物分布。因此，例如在接头中引入醚基团会有助于将血浆蛋白质结合减至最低。当-$(A)_n$-包含聚乙二醇(PEG)结构单元或 1-10 个氨基酸残基的肽链时，接头基团可起到改进成像剂在体内的药物动力学和血液清除率的作用。这种“生物修饰剂(biomodifier)”接头基团可加速成像剂从本底组织如肌肉或肝脏或者从血液的清除，从而因为本底干扰减少而得出更好的诊断图像。生物修饰剂接头基团也可用来偏向于特定的排泄途径，例如通过肾脏排泄而不是通过肝脏排泄。

术语“糖”意指单糖、二糖或三糖。合适的糖包括葡萄糖、半乳糖、果糖、甘露糖和乳糖。任选地，糖可进行官能化，以便容易偶

联到氨基酸。因此，例如氨基酸的葡糖胺衍生物可通过肽键缀合到其它氨基酸。天冬酰胺的葡糖胺衍生物(可从 Novabiochem 市售获得)的一个实例如下:

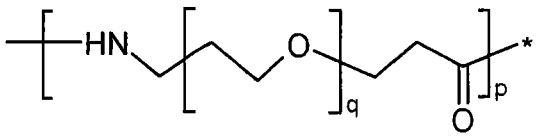
P11-1。

当-$(A)_n$-包含 1-10 个氨基酸残基的肽链时，氨基酸残基优选选自甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或丝氨酸。当-$(A)_n$-包含 PEG 部分时，它优选包含由式 IA 或 IB 的单分散 PEG 样结构寡聚化而衍生的单元:

P11-2

式 IA 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3, 9, 12, 15-四氧杂十七烷酸

其中 p 为 1-10 的整数，且其中 C 末端单元(*)连接到成像部分。或者，可使用基于式 IB 丙酸衍生物的 PEG 样结构:



(IB)

其中 p 如对式 IA 所定义，q 为 3-15 的整数。

在式 IB 中，p 优选为 1 或 2，q 优选为 5-12。

当接头基团不包含 PEG 或肽链时，优选的-$(A)_n$-基团其具有的连接原子的骨架链构成 2-10 个原子的-$(A)_n$-部分，最优选 2-5 个原子，特别优选的是 2 或 3 个原子。接头基团骨架链最少有 2 个原子，其赋予的优点在于成像部分得到很好的分离，使得任何不需要的相互作用被减至最少。

非肽接头基团如亚烷基或亚芳基的优点在于，不会与所缀合的胱天蛋白酶底物发生显著的氢键相互作用，这样接头不会缠绕到底物上。优选的亚烷基间隔基是-$(CH_2)_d$-，其中 d 为 2-5。优选的亚芳基间隔基为下式:

P12-3

其中: a 和 b 独立为 0、1 或 2。

接头基团-$(A)_n$-优选包含二甘醇酸部分、戊二酸、琥珀酸、基于聚乙二醇的单元或者式 IA 或 IB 的 PEG 样单元。

本发明的接头基团优选包含 1-10 个氨基酸残基的肽链，氨基酸残基优选选自甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或丝氨酸。优选的氨基酸是甘氨酸和赖氨酸。

本发明要求成像部分[IM]在特定位置连接。之所以这样选择是因为 P1 位置的 Asp 残基对于全体胱天蛋白酶的底物识别和选择性是重要的，四个氨基酸 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)和 Asp-Met-Gln-Asp (DMQD)已被鉴定为胱天蛋白酶-3 的特异性识别基序。因此，如果要保持底物活性，不优选在天冬酰残基的羧酸侧链进行修饰以连接成像部分。而且，如上所述，成像部分宜位于胱天蛋白酶-3 易切断的酰胺键的 C 末端侧上。成像剂在被胱天蛋白酶-3 切割后，其含 IM 的片断在生理 pH 下总体上会具有正电荷，因此会被挡在凋亡细胞当中，因为它会具有过强的亲脂性而不能跨过细胞膜。由于特异性的酶促作用，这会产生增强的成像信号或信号-本底比。正电荷预期还会促进成像部分与胞内蛋白质的缔合，因为大部分的胞内蛋白质会带负电荷。当选定成像剂(胱天蛋白酶切割后释放)包括有接头基团$(A)_n$(其中$(A)_n$的氨基酸用在生理 pH 下会被质子化的基团取代)时，这个特征预期会被增强。

某些胱天蛋白酶-3 荧光底物和显色底物可市售获得，如 Z-DEVD-[Rhodamine110] (Cambridge Biosciences)和 Ac-DEVD-[*p*-硝基苯胺] (Calbiochem)。本发明的含肽胱天蛋白酶-3 底物和前导序列也可通过如 P.Lloyd-Williams, F. Albericio 和 E. Girald; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, 1997 中所述的常规固相合成获得。如下文第二实施方案所述，本发明的成像剂宜通过用前体进行反应来制备。

在第二个方面，本发明提供适合于制备第一实施方案的成像剂的前体，所述前体包含式 II 化合物:

$$Z^1\text{-}(X^1)_{m1}\text{-}Asp(R^1)\text{-}Xaa1\text{-}Xaa2\text{-}Asp(R^2)\text{-}(A)_n\text{-}[Y^1] \qquad (II)$$

其中 Z^1、X^1、m_1、R^1、Xaa1、Xaa2、Asp、R^2、A 和 n 定义同上，Y^1 为非放射性基团，其包含能够与发射正电子的放射性非金属或发射γ射线的放射性卤素的来源反应以产生式(I)成像剂的官能团或取代基。Z^1、X^1、m_1、R^1、Xaa1、Xaa2、Asp、R^2、A 和 n 的优选实施方案如对上文第一方面所述。

“前体”宜包含胱天蛋白酶-3 底物的非放射性衍生物，该衍生物经设计使得与便利化学形式的所需非金属放射性同位素的化学反应可以最少的步骤数(理想地单个步骤)进行，且不需要进行大量的纯化(理想地不需要进一步的纯化)以得到所需的放射性产物。这种前体是合成的，可便利地以很好的化学纯度获得。“前体”可任选包含针对胱天蛋白酶-3 底物的某些官能团的保护基(P^{GP})。Bolton, J.Lab.Comp.Radiopharm., 45, 485-528 (2002)描述了合适的前体。

术语“保护基”(P^{GP})意指以下基团，它能抑制或阻碍不需要的化学反应，但它经设计具有足够的反应性，使得它可在不会改变分子其余部分的足够温和的条件下从所涉及的官能团切割下来。脱保护后，就获得所需的产物。保护基是本领域技术人员公知的，对于胺基团宜选自：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-2,6-二氧代亚环己基)乙基]或 Npys (即 3-硝基-2-吡啶亚磺酰基)；对于羧基基团宜选自：甲酯、叔丁酯或苄酯。对于羟基基团，合适的保护基是：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)或三烷基甲硅烷基如叔丁基二甲基甲硅烷基。对于巯基基团，合适的保护基是三苯甲基和 4-甲氧基苄基。另外的保护基的使用描述于‘Protective Groups in Organic Synthesis’, Theorodora W. Greene 和 Peter G. M. Wuts, (Third Edition, John Wiley & Sons, 1999)。

优选的前体是其中 Y^1 包含衍生物的前体，这种衍生物直接发生

亲电子或亲核卤化；容易与选自烷基卤或氟烷基卤、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯、马来酰亚胺的标记烷基化剂或标记 N-卤代乙酰基部分发生烷基化反应；烷基化硫醇部分形成硫醚键；或者与标记的活性酯、醛或酮发生缩合反应。第一类的实例为：

(a) 有机金属衍生物如三烷基锡烷(例如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基)或者三烷基硅烷(例如三甲基甲硅烷基)；

(b) 用于进行卤素交换的非放射性烷基碘或烷基溴和用于进行亲核卤化的甲苯磺酸烷基酯、甲磺酸烷基酯或三氟甲磺酸烷基酯；

(c) 被活化而倾向于发生亲电子卤化的芳环(例如苯酚)和被活化而倾向于发生亲核卤化的芳环(例如芳基碘鎓、芳基重氮鎓、芳基三烷基铵盐或硝基芳基衍生物)。

优选的容易进行烷基化反应的衍生物是醇、酚、胺或硫醇基团，特别是硫醇和立体不受阻的伯胺或仲胺。优选的能将含硫醇的放射性同位素反应物烷基化的衍生物是马来酰亚胺衍生物或 N-卤代乙酰基。后者的优选实例是 N-氯乙酰基和 N-溴乙酰基衍生物。

优选的能与标记的活性酯部分发生缩合反应的衍生物是胺，特别是立体不受阻的伯胺或仲胺。

优选的能与标记的醛或酮发生缩合反应的衍生物是氨基氧基和酰肼基团，特别是氨基氧基衍生物。

“前体”可优选以共价连接到固体载体基质的形式提供。这样，所需的成像剂产物在溶液中形成，而原料和杂质则保持结合到固相。WO 03/002489 描述了供与 ^{18}F-氟化物进行固相亲电子氟化的前体。WO 03/002157 描述了供与 ^{18}F-氟化物进行固相亲核氟化的前体。因此药盒包含可塞入经适当改装的自动合成仪中的模块筒(cartridge)。该模块筒除含有固体载体结合的前体外，还装有用以除去不需要的氟离子的柱和适当连接的容器，该容器可让反应混合物得以蒸发和让产物得以按需配制。同时可包括的还有进行合成所需的试剂和溶剂及其它消耗品，以及装有软件的压缩光盘，该软件能让合成仪的

方式操作符合客户对放射性浓度、体积、释放时间等的要求。便利地，药盒中的所有组分都是一次性的，以使各次运行之间的污染可能性减至最低，且它们须是无菌的和有质量保证的。

当成像部分包含放射性卤素如碘时，Y^1 宜包含：非放射性前体卤素原子如芳基碘或芳基溴(以便进行放射性碘交换)；活化的前体芳环(例如苯酚或苯胺基团)；咪唑环；吲哚环；有机金属前体化合物(例如三烷基锡或三烷基甲硅烷基)；或者有机前体如三氮烯或供进行亲核取代的良好离去基团如碘鎓盐。Bolton [J.Lab.Comp.Radiopharm., 45, 485-528 (2002)]描述了引入放射性卤素(包括 ^{123}I 和 ^{18}F)的方法。放射性卤素特别是碘可连接于其上的合适前体芳基的实例如下：

P17-4

两者都含有让放射性碘容易取代到芳环上的取代基。替代性的含有放射性碘的取代基可经放射性卤素交换通过直接碘化来合成，例如：

P17-5

当成像部分包含碘的放射性同位素时，放射性碘原子优选通过直接共价键连接到芳环如苯环或乙烯基，因为已知结合到饱和脂族体系的碘原子倾向于发生体内代谢而导致放射性碘的损失。结合到活化芳环如苯酚的碘原子也被观察到在某些情况下其体内稳定性有限。

当成像部分包含放射性卤素如 ^{123}I 和 ^{18}F 时，Y^1 优选包含会与放射标记的合成子发生选择性反应的官能团，因此缀合后即产生式(I)成像剂。术语“放射标记的合成子”意指小的合成的有机分子，其

(i) 已放射标记，使得放射标记物以稳定方式结合到合成子；

(ii) 包含官能团，这种官能团经设计能选择性和特异性地与作为待进行放射标记的所需化合物一部分的相应官能团发生反应。该方法比直接放射标记方法能有更好的机会可产生放射标记物的体内稳定性改进的成像剂。

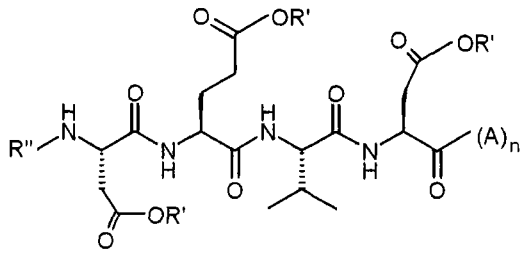
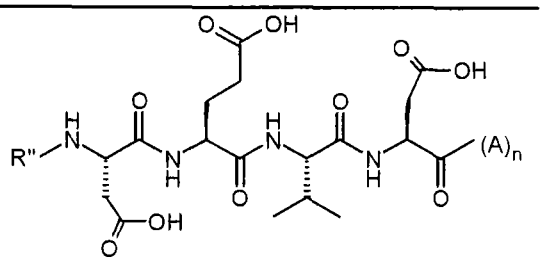
合成子方法还能让用于引入成像部分的条件有更大的灵活性。这在式(I)的 R^1 基团至 R^3 基团中的一个或多个是 C_{1-8} 烷基时是重要的，因为在这些情况中本发明的胱天蛋白酶-3 底物在碱性条件下明显不稳定。另外，它们因此不适合于在碱性条件下通过亲核置换反应进行的常规直接标记方法。

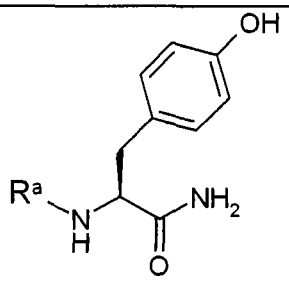
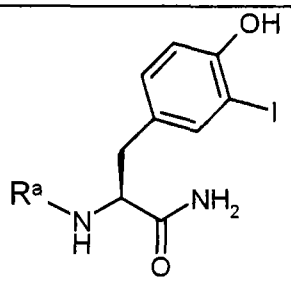
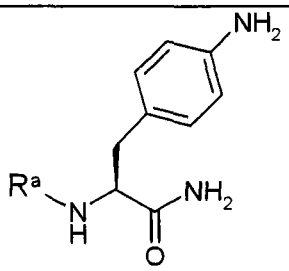
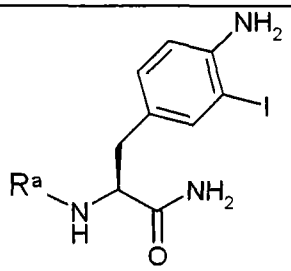
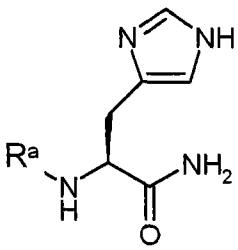
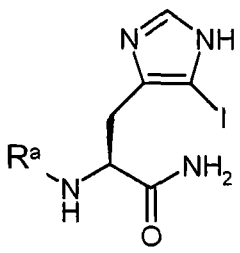
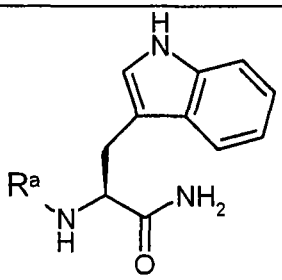
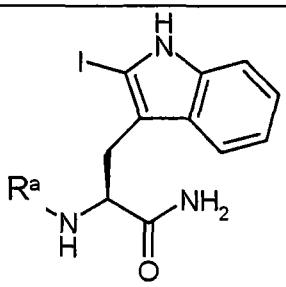
适合于产生本发明成像剂的前体的实例是其中式(II)的 Y^1 包含氨基氧基基团、巯基基团、胺基团、马来酰亚胺基团或 N-卤代乙酰基基团的前体。如 Poethko 等[J.Nuc.Med., 45, 892-902 (2004)]所教导，进行选择性标记的优选方法是采用肽的氨基氧基衍生物作为前体。然后使这种前体与放射卤化的苯甲醛合成子在酸性条件(例如 pH 2-4)下进行缩合，通过稳定的肟醚键产生所需的放射卤化成像剂。Y^1 因此优选包含式-NH(C=O)CH_2-O-NH_2 的氨基氧基基团。另一个优选的标记方法是当 Y^1 包含巯基基团，其与放射卤化的含马来酰雅胺的合成子在中性条件(pH 6.5-7.5)下(例如如 Toyokuni 等[Bioconj. Chem. 14, 1253-1259 (2003)]所教导)进行烷基化以标记含巯基的肽底物。

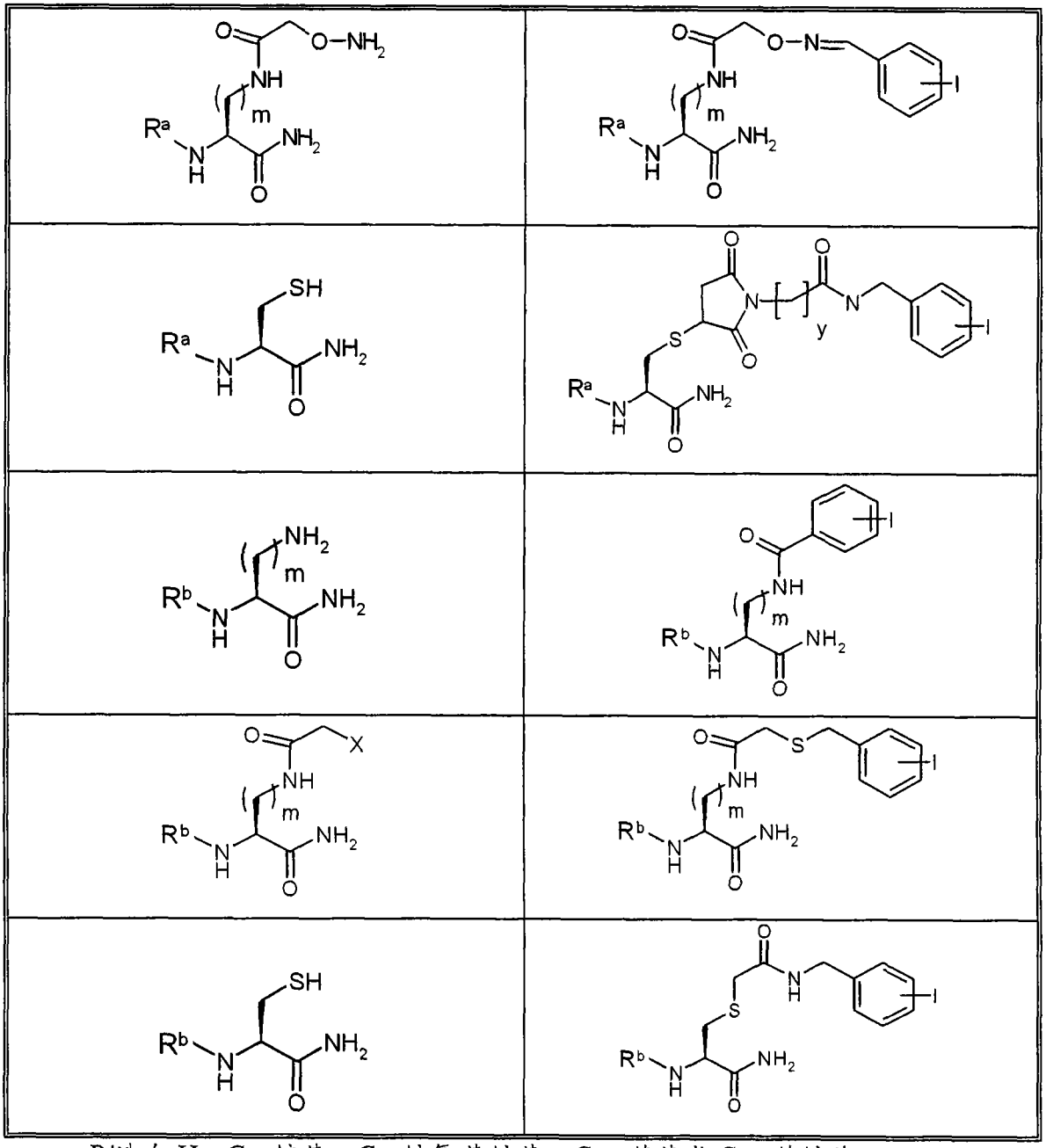
又一种优选的标记方法是当 Y^1 包含胺基团，其与合成子 4-[^{123}I]碘苯甲酸-*N*-琥珀酰亚胺酯在 pH 7.5-8.5 下进行缩合，产生酰胺键连接的产物。Vaidyanathan 等[Nucl.Med.Biol., 19(3), 275-281 (1992)]和 Johnstrom 等[Clin.Sci., 103 (Suppl. 48), 45-85 (2002)]教导了使用 N-羟基琥珀酰亚胺酯来标记肽。

当式(I)的 R^1-R^3 是 C_{1-8} 烷基时，特别优选的用放射性卤素标记成像剂前体的方法是当 Y^1 包含氨基氧基基团时。观察到体内一些化合物发生一碘酪氨酸的脱碘现象(对于二碘酪氨酸程度更高)。D-酪氨酸衍生物的使用预期是克服这个问题的一种方法。认为可克服这一体内脱碘反应问题的替代性放射性碘掺入方法在表 2 中给出：

表 2：用于碘化的前体和相应的碘化产物

R^a	R^b
	

前体	产物
	
	
	
	



R′选自 H、C_{1-8}烷基、C_{2-8}烷氧基烷基、C_{5-12}芳基或 C_{5-16}芳烷基；

$R'' = Z^1\text{-}(X^1)_{m1}$-

n = 1-10，m = 1-4

y = C_{1-10}烷基、烷基芳基

X = Cl 或 Br。

当成像部分包含氟的放射性同位素时，放射性氟原子可构成氟烷基或氟烷氧基的一部分，因为烷基氟对体内代谢有抗性。当成像部分包含氟的放射性同位素(例如 ^{18}F)时，放射卤化可通过直接标记

来进行，直接标记应用了 ^{18}F-氟化合物与具有良好离去基团的合适前体如烷基溴、甲磺酸烷基酯或甲苯磺酸烷基酯的反应。或者，放射性氟原子可通过直接共价键连接到芳环如苯环。对于这种芳基体系，前体宜包含活化硝基芳环、芳基重氮盐或芳基三烷基铵盐。但是，生物分子的直接放射氟化往往对敏感官能团有害，因为这些亲核反应是在强碱性条件下在极性非质子溶剂中用无水[^{18}F]氟离子进行的。当 R^1-R^3 为 C_{1-8} 烷基时的式(II)前体在碱性条件下也明显不稳定性。因此，对本发明成像剂的前体的直接放射氟化不是优选的标记方法。如前文对全体放射性卤素的标记所讨论，优选的放射氟化方法的实例涉及使用选择性缀合到式(II)成像剂前体的放射性标记合成子。

^{18}F 也可如下引入：通过胺前体与烷基化剂如 $^{18}F(CH_2)_3OMs$ (其中 Ms 为甲磺酸)的 N-烷基化反应产生 N-$(CH_2)_3{}^{18}F$，通过羟基与 $^{18}F(CH_2)_3Oms$、$^{18}F(CH_2)_3OTs$ 或 $^{18}F(CH_2)_3Br$ 的 O-烷基化反应，或者通过巯基基团与 $^{18}F(CH_2)_3OMs$ 或 $^{18}F(CH_2)_3Br$ 的 S-烷基化反应。^{18}F 还可如下引入：通过 N-卤代乙酰基与 $^{18}F(CH_2)_3OH$ 反应物的烷基化反应产生 $NH(CO)CH_2O(CH_2)_3{}^{18}F$ 衍生物，或者与 $^{18}F(CH_2)_3SH$ 反应物的烷基化反应产生-$NH(CO)CH_2S(CH_2)_3{}^{18}F$ 衍生物。^{18}F 亦可通过含马来酰亚胺的前体与 $^{18}F(CH_2)_3SH$ 的反应来引入。对于芳基体系，^{18}F-氟化物从芳基重氮盐、芳基硝基化合物或芳基季铵盐的亲核置换，是产生可用于缀合到成像剂前体的芳基-^{18}F 标记合成子的合适途径。

其中 Y^1 包含伯胺基团的式(II)前体，也可如 Kahn 等[J.Lab.Comp.Radiopharm. 45, 1045-1053 (2002)]和 Borch 等[J. Am. Chem. Soc. 93, 2897 (1971)]所教导，用 ^{18}F-C_6H_4-CHO 通过还原性胺化标记上 ^{18}F。这种方法也可有效地应用于芳基伯胺，如包含苯基-NH_2 基团或苯基-CH_2NH_2 基团的化合物。

特别优选的对式(II)前体进行 ^{18}F 标记的方法是当 Y^1 包含式-$NH(C=O)CH_2$-O-NH_2 的氨基氧基时，其与 ^{18}F-C_6H_4-CHO 在酸性条件(例如 pH 2-4)下发生缩合。当式(I)和(II)的 R^1-R^3 为 C_{1-8} 烷基等(其使

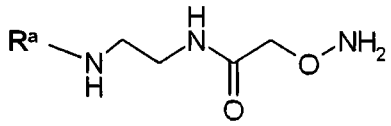
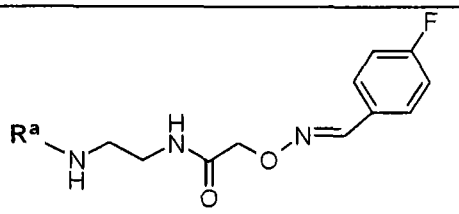
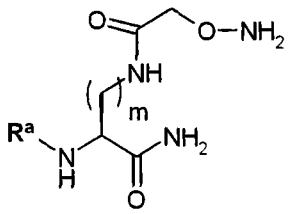
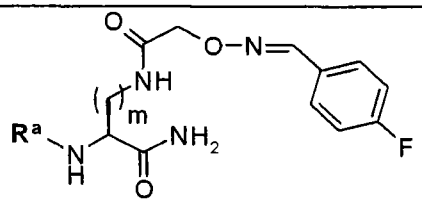
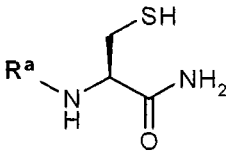
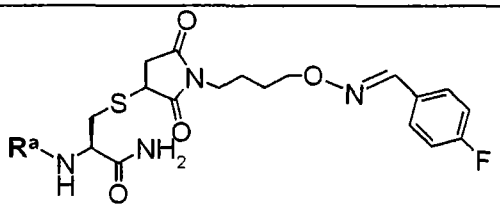
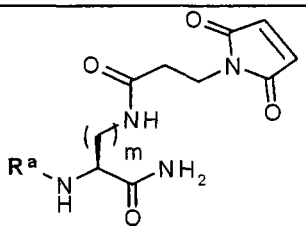
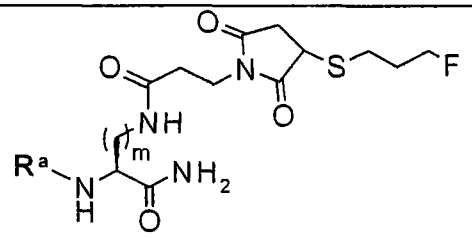
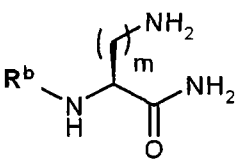
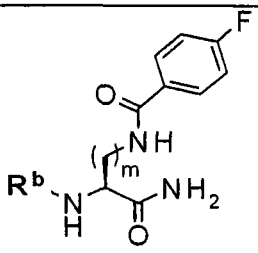
得前体对碱特别敏感)时这种方法特别有用。

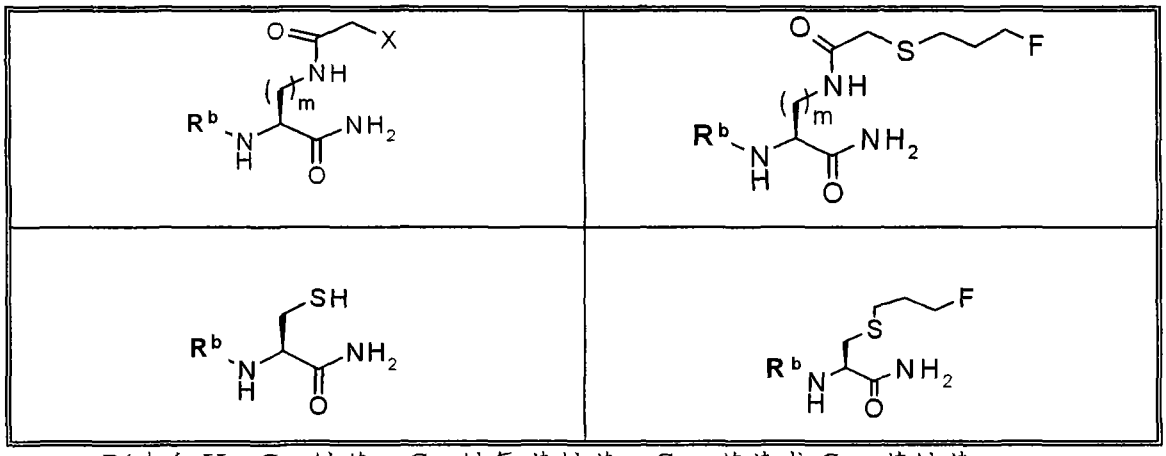
Bolton, J.Lab.Comp.Radiopharm., 45, 485-528 (2002)描述了有关产生 ^{18}F 标记衍生物的合成途径的更多细节。具体前体和相关产物的实例在表 3 中给出:

表 3: 供进行 ^{18}F 标记的前体和相应的产物

R^a	R^b

P22-6

前体	产物
	
	
	
	
	



R′选自 H、C_{1-8}烷基、C_{2-8}烷氧基烷基、C_{5-12}芳基或C_{5-16}芳烷基;

$R'' = Z^1\text{-}(X^1)_{m1}$-

n = 1-10

m = 1-4

y = C_{1-10}烷基、烷基芳基

X = Cl 或 Br。

在第三个方面，本发明提供包含如上所述的成像剂以及生物相容性载体的放射药物组合物，所述组合物为适合于哺乳动物给药的形式。“生物相容性载体”是成像剂可悬浮或溶解在其中的流体特别是液体，使得所述组合物是生理上可耐受的，即能给予哺乳动物身体而不会造成毒性或过度不舒服。生物相容性载体宜是可注射载体液体如无菌注射用无热原水；水溶液如盐水(其可有利地加以平衡，使得注射用终产物是等渗的)；一种或多种渗透压调节物质(例如血浆阳离子与生物相容性反荷离子的盐)的水溶液；糖(例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇(例如山梨糖醇或甘露糖醇)、甘醇(例如甘油)或其它非离子型多元醇材料(例如聚乙二醇、丙二醇等)。

优选地，生物相容性载体是注射用无热原水或等渗盐水。

这种放射药物宜在提供有封口物的容器中供应，该封口物适合于用皮下注射器针头进行单次或多次穿刺，同时保持无菌完整性(例如卷包的隔片闭合物(crimped-on septum seal closure))。这种容器可含有单次或多次患者剂量。优选的多剂量容器包含单个大瓶子(bulk vial)(例如体积为 10-30 cm^3)，其含有多次患者剂量，由此可在制剂的可

行寿命期间在不同时间间隔抽取患者用单剂量到临床级注射器中，以适应临床情况。预充注射器设计成含有单次人剂量或者说“单位剂量”，因此优选是适合于临床使用的一次性注射器或其它注射器。预充注射器可任选提供有注射器护罩，以保护操作者免受放射性剂量辐射。合适的这种放射药物注射器护罩是本领域公知的，其优选包含铅或钨。

本发明的放射药物可如下文的第四实施方案所述从药盒制备。或者，放射药物可在无菌制造条件下制备，以得到所需的无菌产物。放射药物还可在非无菌条件下制备，然后用例如γ辐照、高压灭菌、干热或化学处理(例如用环氧乙烷)进行最终灭菌处理。优选地，本发明的放射药物从药盒制备。

在第四方面，本发明提供用以制备第三实施方案的放射药物组合物的药盒。这种药盒包含第二实施方案的“前体”，优选为无菌无热原形式，使得其与放射性同位素的无菌来源的反应用最少的操作数就产生所需的放射药物。对于其中的放射性同位素半衰期相对较短的放射药物来说，和出于处理上的便利并因此减少对放射性药剂师的辐射剂量，这种考虑特别重要。因此，用于这种药盒的重构的反应介质优选是如上定义的“生物相容性载体”，最优选是含水的。

合适的药盒容器包含密封容器，其可保持无菌完整性和/或放射安全性，任选加有惰性顶空气体(例如氮气或氩气)，同时便于通过注射器加入或抽取溶液。优选的这种容器是隔片封闭的小瓶(septum-sealed vial)，其中气密闭合物(gas-tight closure)用包封物(通常为铝)卷包。这种容器另外的优点在于，闭合物如有需要(例如改变顶空气体或使溶液脱气)可经得住真空。

非放射性药盒可任选还包含另外的组分，如辐射防护剂、抗微生物防腐剂、pH调节剂或填充剂。

术语“辐射防护剂”是指能通过俘获高度反应性自由基如由水的辐射分解产生的含氧自由基，来抑制降解反应如氧化还原过程的化

合物。本发明的辐射防护剂宜选自：抗坏血酸、对氨基苯甲酸(即 4-氨基苯甲酸)、龙胆酸(即 2,5-二羟基苯甲酸)和它们与生物相容性阳离子所成的盐。术语“生物相容性阳离子”是指能与离子化的带负电荷基团形成盐的带正电荷反荷离子，其中所述带正电荷反荷离子也是无毒的，因此适合给予哺乳动物身体特别是人体。合适的生物相容性阳离子的实例包括：碱金属钠或钾、碱土金属钙和镁及铵离子。优选的生物相容性阳离子是钠和钾，最优选钠。

术语“抗微生物防腐剂”是指能抑制潜在有害微生物如细菌、酵母或霉菌的生长的物质。抗微生物防腐剂还可显示一些杀细菌性质，这取决于剂量。本发明的抗微生物防腐剂的主要作用是抑制任何这种微生物在重构后的放射药物组合物中，即在放射性诊断产品本身中的生长。但是，抗微生物防腐剂也可任选用来抑制潜在有害的微生物在重构前的本发明非放射性药盒的一种或多种组分中的生长。合适的抗微生物防腐剂包括：对羟基苯甲酸酯类，即对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯或丁酯或者它们的混合物；苄醇；苯酚；甲酚；溴化十六烷基三甲铵和硫柳汞。优选的抗微生物防腐剂是对羟基苯甲酸酯类。

术语“pH 调节剂”是指可用于确保重构药盒的 pH 在人或哺乳动物给药的可接受限度内(大约 pH 4.0-10.5)的化合物或化合物混合物。合适的这种 pH 调节剂包括药物可接受的缓冲剂，如三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)、磷酸盐或 TRIS (即三(羟甲基)氨基甲烷)和药物可接受的碱，如碳酸钠、碳酸氢钠或它们的混合物。当缀合物以酸式盐形式应用时，pH 调节剂可任选在单独的小瓶或容器中提供，以使药盒的使用者可调节 pH (作为多步骤程序中的一步)。

术语“填充剂”是指可有利于生产和冷冻干燥过程中的物料处理的药物可接受增量剂。合适的填充剂包括无机盐如氯化钠和水溶性糖或糖醇如蔗糖、麦芽糖、甘露糖醇或海藻糖。

“前体”当在药盒中应用时的优选各方面如对上文第二实施方案

所述。供用于药盒的前体可在无菌制造条件下应用，以产生所需的无菌无热原性材料。前体也可在非无菌条件下应用，然后用例如γ辐照、高压灭菌、干热或化学处理(例如用环氧乙烷)进行最终灭菌处理。优选地，前体以无菌无热原性形式形式应用。最优选地，无菌无热原性前体在如上所述的密封容器中应用。药盒的"前体"优选如对第二实施方案所述以共价连接到固体载体基质的形式供应。

在第五个方面，本发明公开了第一实施方案的成像剂用于其中涉及胱天蛋白酶-3 的哺乳动物身体疾病状态的诊断性体内成像的用途，其中所述哺乳动物之前给予过第三实施方案的放射药物组合物。

"之前给予过"是指已经进行过临床医生参与的步骤，在该步骤中成像剂例如通过静脉注射给予患者。这个实施方案包括第一实施方案的成像剂用于制造诊断剂的用途，该诊断剂用于其中涉及胱天蛋白酶-3 的哺乳动物身体疾病状态的诊断性体内成像。

这种非侵入式成像会涉及到异常细胞凋亡中的胱天蛋白酶-3，可用于监测多种疾病中的细胞死亡。据认为细胞凋亡成像会在其中细胞增殖和凋亡程度高的病理，如心肌梗塞、迅速蔓延的肿瘤和移植物排斥中有价值。这种成像也会在这些病症的化疗药物疗法的监测中有价值。

在其中细胞凋亡据认为重要，但细胞凋亡事件的数量相对较少的其它疾病如阿尔茨海默病中，可获得的细胞库会比较小，因此更难以进行显现。因此或许认为，本发明的细胞凋亡成像剂最好应用于其中细胞凋亡相对较为急性的病理，这种细胞凋亡如心肌梗塞、侵略性的肿瘤和移植物排斥中所见的细胞凋亡。对于其中细胞凋亡更为慢性的疾病，如神经病和侵略性较小的肿瘤，可能没有足够的凋亡细胞来超越背景而显示。

基本上所有针对癌症的治疗方法，包括放射疗法、化学疗法或免疫疗法，目的都在于在其肿瘤细胞靶标中诱导细胞凋亡。对细胞凋亡进行成像可有能力为肿瘤治疗的有效性提供快速、直接的评估

或监测，这可在根本上改变对癌症患者的处理方式。可以预见，其肿瘤对治疗有响应的患者由于肿瘤中细胞凋亡反应升高而会显示对成像剂的摄取显著增加。其肿瘤不会对进一步的治疗有响应的患者，可由其肿瘤在治疗后不能增加对成像剂的摄取来鉴别。

过度的细胞凋亡与多种人类疾病有关，胱天蛋白酶在许多这些疾病的进展中的重要性已得到证明。因此，本发明的成像剂可用于多种疾病状态的体内诊断成像和/或治疗监测，这些疾病状态包括:

(a) 急性疾病，如对心脏和大脑局部缺血/再灌注损伤的反应(例如分别为心肌梗塞和中风)、脊髓损伤、创伤性脑损伤、移植过程中的器官排斥、肝变性(例如肝炎)、脓毒病和细菌性脑膜炎;

(b) 慢性疾病，如神经变性性疾病(例如阿尔兹海默病、亨廷顿舞蹈病、唐氏综合征、脊髓性肌肉萎缩症、多发性硬化、帕金森病)、免疫缺陷疾病(例如 HIV)、关节炎、动脉粥样硬化和糖尿病。

对用以在例如以下癌症中诱导细胞凋亡的药物的效价监测: 膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、头颈癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌和直肠癌。

在有可测量疾病的癌症患者中的治疗干预的评估具有以下几个应用:

- 评估新抗癌药物的抗肿瘤活性;
- 确定有效的治疗方案;
- 鉴定新抗癌药物的最佳剂量和剂量方案;
- 鉴定现有抗癌药物和药物组合的最佳剂量和剂量方案;
- 更有效地将临床试验中的癌症患者分成治疗方案的响应者和非响应者;
- 有效和及时地评估个体患者对既定治疗性抗癌方案的响应。

本发明现通过以下详述的非限制性实施例进行说明。实施例 1 描述化合物 1-22 (见图 1)的合成。实施例 2-8 提供从合适的前体合成本发明的 ^{123}I 标记化合物(分别为化合物 2A、6A、8A、10A、14A、18A

和 20A)。实施例 9-11 提供适合于对本发明的胱天蛋白酶-3 底物进行 ^{18}F 放射标记的 ^{18}F 标记化合物的合成。实施例 12 提供化合物 2 和 22 的体外效价数据。实施例 13 提供化合物 2、6 和 8 的体内血浆稳定性数据。虽然观察到体内脱碘现象，但上文本发明描述中所讨论的放射氟化标记方法或替代性的放射碘化标记方法会改进放射标记物的体内稳定性。这些方法涉及用氨基-苯丙氨酸、组氨酸或色氨酸置换酪氨酸部分，用于苯胺衍生物、咪唑衍生物或吲哚衍生物的直接碘化。更多的替代性方法涉及使用合成子方法来通过多种途径将放射碘化的苯基合成子缀合到前体。这些化合物的实例在表 2 中例示。放射碘化的苯基化合物其体内稳定性很可能有改进，因为该标记化合物比放射碘化的酚衍生物如放射碘化的含酪氨酸肽较不易发生脱碘。

实施例 1：化合物 1-22 的合成

a) 肽合成

在 Rink Amide 树脂(获自 NovaBiochem，典型装载量 0.73 mmol/g)上，通过标准的固相肽化学法[Barany 等，*Int. J. Peptide Protein Research* 30, 705-739 (1987)]，装配对应于图 1 中化合物 1-22 的序列的肽基树脂。使用 Applied Biosystems (Perkin Elmer) 433A 型肽合成仪。将残基(从羧基末端)按 0.25 mmol 的规模，采用 4 倍摩尔过量的 Fmoc-氨基酸(1 mmol cartridges)的单偶联(2.5 小时偶联循环)进行装配，所述 Fmoc-氨基酸用六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓(HBTU)/1-羟基苯并三唑(HOBt)/二异丙基乙胺(DIEA)的 N-甲基吡咯烷酮(NMP)溶液预活化。用 20%哌啶的 NMP 溶液，在电导监测下完成 Fmoc 脱保护。洗涤溶剂为 NMP。所用的氨基酸侧链保护基，对于 Asp、Glu 为叔丁基(*t*Bu)或环己基(OcHex)，对于 Tyr 为 *t*Bu，对于 Lys 和 Orn 为 Boc，对于 Arg 为(2,2,5,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基) (Pbf)。

将 Fmoc-^{127}I-Tyr-OH 用六氟磷酸 7-氮杂苯并三唑-1-基氧基三(吡咯烷基)-磷鎓(PyAOP)的二甲基甲酰胺(DMF) (含 4-甲基吗啉(NMM))溶液预活化十分钟，然后加入到装在手动氮气起泡装置[Wellings, D.A., Atherton, E. (1997) in Methods in Enzymology (Fields, G.编辑), 289, 第 53-54 页, Academic Press, New York]中的 Rink Amide 树脂。用上述肽合成仪进行进一步的链延伸。所需序列完全装配后，通过用 20%哌啶的 DMF 溶液处理肽树脂，逆转 ^{127}I-碘酪氨酸侧链上的未保护羟基的任何不合需要的酰化。用乙酸酐或苄基氯的 DCM 溶液，在 NMM 存在下，完成肽树脂的 N 末端的最终加帽。

b) 脱保护和从树脂切割

使用手动氮气起泡装置，用含 2.5%三异丙基甲硅烷(TIS)和 2.5%水的三氟乙酸(TFA)处理肽树脂 2 小时，以将肽从树脂上切割下来，同时将所有侧链保护基(OcHex 除外)从肽上除去。将切割混合物过滤，用少量的纯 TFA 洗涤。将合并的滤液和洗涤液通过旋转蒸发进行浓缩，然后用二乙醚研磨，获得粗肽。将沉淀物离心分离，用醚洗涤，然后从 50% ACN-0.1% aq TFA 冻干，产生粗产物。

c) 甲基化(化合物 3, 4, 13, 14, 17, 18)

待甲基化的粗肽(1 当量, 20 mg)通常用亚硫酰氯(20 当量)的甲醇(MeOH) (10 mL)溶液在室温下进行处理。60 分钟后，将反应混合物减压浓缩，残余物从 50% ACN-0.1% aq TFA 中冻干。

d) 纯化

将粗肽通过制备型 RP-HPLC 进行纯化。柱(Phenomenex Luna C18 5μ, 22 x 250 mm)以 10 mL/min 的流速进行 40 分钟梯度洗脱。洗脱缓冲液为含 0.1% TFA 的水和含 0.1% TFA 的乙腈。集中所需的峰级分，冻干，得到纯产物。

d)表征

通过分析型 RP-HPLC 和电喷雾 MS (表 3)对肽进行表征。所用的 C18 柱是 Phenomenex Luna C18 5μ, 4.6 x 250 mm 柱或 Phenomenex

Luna C18(2) 3μ, 2.0 x 50 mm 柱，它们分别以 1 mL/min 或 0.3 mL/min 的流速进行 20 或 10 分钟的梯度洗脱。洗脱缓冲液为含 0.1% TFA (缓冲液 A)的水和含 0.1% TFA 的乙腈(缓冲液 B)。洗脱液在 λ=214 nm 处和在 λ=254 nm 处进行监测。

表 4: 化合物 1-22 的表征

化合物	梯度	保留时间 (min)	MS ($M+H^+$)	
			m/z 预测值	m/z 实测值
1	0-30% B, 10 min	7.68	738.3	738.7
2	5-50% B; 20 min	15.88	864.2	864.5
3	5-50% B; 10 min	6.49	780.3	780.0
4	5-50% B; 10 min	7.77	906.2	905.9
5	30-80% B; 10 min	7.33	984.5	984.3
6	30-80% B; 10 min	8.12	1110.4	1110.3
7	40-80% B; 20 min	16.98	927.5	927.8
8	30-80% B; 10 min	8.36	1053.4	1053.3
9	20-60% B; 20 min	16.77	1183.7	1183.9
10	20-60% B; 20 min	18.40	1309.6	1309.9
11	5-50% B, 20 min	16.90	1029.5	1029.8
12	10-50% B; 20 min	14.97	1155.4	1155.7
13	30-55% B; 20 min	13.45	815.3	815.6
14	30-50% B; 20 min	18.53	941.2	941.5
15	5-40% B; 10 min	8.00	1071.5	1071.5
16	10-60% B; 20 min	15.90	1197.4	1197.4
17	40-90% B; 10 min	7.29	1076.6	1076.5
18	40-95% B; 20 min	18.97	1202.4	1202.6
19	30-60% B; 20 min	15.18	1183.7	1183.9
20	20-60% B; 20 min	18.40	1309.6	1309.9
21	5-15% B; 20 min	20.30	1179.7 (MH^{2+})	1180.0 (MH^{2+})
22	10-20% B; 20 min	15.45	1242.6 (MH^{2+})	1243.0 (MH^{2+})

实施例 2: ^{123}I 标记的化合物 2 (化合物 2A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 2)

化合物 2 按以下反应方案合成:

P33-7

化合物 1

74μl (74μg, 1×10^{-7} mol)化合物 1 的水溶液

200μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液

100μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-7} mol

10μl 0.01M PAA 溶液, 1×10^{-7} mol

化合物 2

其中 PAA = 过氧乙酸

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析证实了特性(identity)。

步骤(b): 化合物 2A 的制备

向溶于 74μl 水中的化合物 1 (74μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)加入 200μl pH 4, 0.2M 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH (1 x 10^{-8} 摩尔)溶液、约 10-30μl (150-450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)。将[^{123}I]-化合物 2 进行 HPLC 纯化，在 pH 7.4, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，比活分别为 14 和 45MBq/纳摩尔。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了特性。在稀释后 3.5 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 3: ^{123}I 标记的化合物 6 (化合物 6A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 6)

化合物 6 按以下反应方案合成:

P34-8

化合物 5

98μg 化合物 5 的 98μl 甲醇溶液，9.96×10^{-8} mol

100μl pH4, 0.2M 乙酸铵

100μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-8} mol

10μl 0.001M PAA 溶液, 1×10^{-8} mol

其中 PAA = 过氧乙酸

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析证实了特性。

步骤(b): 化合物 6A 的制备

在碘镓形成后，将溶于 98μl 甲醇的化合物 5 (98μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)加入到 100μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH (1 x 10^{-8} 摩尔)溶液、约 10-30μl (150-450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将化合物 6A 进行 HPLC 纯化，在 pH6, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，比活分别为 13 和 43MBq/纳摩尔。加入 10%乙醇帮助溶解。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了特性和化合物 6A。在稀释后 3.5 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 4: 123 I 标记的化合物 8 (化合物 8A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 8)

化合物 8 按以下反应方案合成:

P35-9

化合物 7

93μg (93μg, 1 × 10^{-7} mol)化合物 7 的 MeCN 溶液

100μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液

100μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1 × 10^{-7} mol

10μl 0.01M PAA 溶液, 1 × 10^{-7} mol

化合物 8

其中 PAA = 过氧乙酸

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析证实了特性。

步骤(b): 化合物 8A 的制备

在碘镓形成后，将溶于 93μl 乙腈的化合物 7 (93μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)加入到 100μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH (1 x 10^{-8} 摩尔)溶液、约 10-30μl (150-450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将[^{123}I]-化合物 8 进行 HPLC 纯化，在 pH7.4, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，比活分别为 10 和 40MBq/纳摩尔。加入 10%乙醇帮助

溶解。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了特性。在稀释后 4 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 5: ^{123}I 标记的化合物 10 (化合物 10A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 10)

化合物 10 按以下反应方案合成:

P36-10

化合物 9

1:1 0.1% TFA 水溶液:0.1% TFA 乙腈溶液中的 118μg (118μg, 1×10^{-7} mol)化合物 9

100μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液

100μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-7} mol

10μl 0.01M PAA 溶液, 1×10^{-7} mol

化合物 10

其中 PAA = 过氧乙酸

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析证实了特性。

步骤(b): 化合物 10A 的制备

在碘镓形成后，将溶于 118μl 1:1 0.1% TFA 水溶液:0.1% TFA 乙腈溶液的化合物 9 (118μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)加入到 200μl pH4, 0.2M 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH (1 x 10^{-8} 摩尔)溶液、约 10-30μl (150-450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将[^{123}I]-化合物 10 进行 HPLC 纯化，在 pH 7.4, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，比活分别为 12 和 40MBq/纳摩尔。加入 10%乙醇帮助溶解。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了结构。在稀释后 4 小时里观察到良好的稳定性(>85%)。

实施例 6: ^{123}I 标记的化合物 14 (化合物 14A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 14)

化合物 14 按以下反应方案制备:

P37-11

81μg 化合物 13 的甲醇溶液，9.9×10^{-8} mol

200μl pH4, 0.2M 乙酸铵

10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-8} mol

10μl 0.001M PAA, 1×10^{-8} mol

其中 PAA = 过氧乙酸

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析证实了特性。

步骤(b): 化合物 14A 的制备

在碘镓形成后，将溶于 81μl 甲醇的化合物 13 (81μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)加入到 200μl 0.2M, pH4 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH (1 x 10^{-8} 摩尔)溶液、约 30μl (450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将化合物 14A 进行 HPLC 纯化，在 pH6, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 100MBq/ml，比活为 41MBq/纳摩尔。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了特性和化合物 14A。在稀释后 3.5 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 7: ^{123}I 标记的化合物 18 (化合物 18A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 18)

化合物 18 按以下反应方案制备:

P38-12

100μg 化合物 17 的 100μl 乙腈溶液，9.29×10^{-8} mol

200μl pH4, 0.2M 乙酸铵

100μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-7} mol

10μl 0.01M PAA, 1×10^{-7} mol

^{127}I 制备的和纯化的材料的质谱分析确认了特性。

步骤(b): 化合物 18A 的制备

在碘镓形成后，将化合物 17 (100μg, 9.29×10^{-8} 摩尔)溶于 100μl 乙腈后即加入到 100μl 0.2M, pH4 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ (1 x 10^{-8} 摩尔)、约 10-30μl $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH (150-450MBq)溶液和 10μl

0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将化合物 18A 进行 HPLC 纯化，在 pH7.4, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，典型比活分别为 10 和 40MBq/纳摩尔。加入 10%乙醇帮助溶解。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了结构和化合物 18A。在稀释后 3.5 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 8: ^{123}I 标记的化合物 20 (化合物 20A)的合成

步骤(a): ^{127}I 类似物(化合物 20)

化合物 20 按以下反应方案制备:

P39-13

100μl pH4, 0.2M 乙酸铵

10μl $Na^{127}I$ 的 0.01M NaOH 溶液, 1×10^{-7} mol

10μl 0.01M PAA, 1×10^{-7} mol

118μg 化合物 19 的 118μl 乙腈溶液，1.0×10^{-7} mol

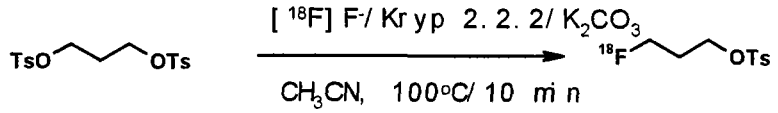
化合物 20 和相应的二碘化物质都进行纯化，并通过质谱分析确认它们的一致性。

步骤(b): 化合物 20A 的制备

在碘鎓形成后，将化合物 19 (118μg, 1 x 10^{-7} 摩尔)溶于 118μl 1:1 0.1% TFA 水溶液:0.1% TFA 乙腈溶液后，即加入到 200μl 0.2M, pH4 乙酸铵缓冲液、10μl $Na^{127}I$ (1 x 10^{-8} 摩尔)、约 10-30μl (150-450MBq) $Na^{123}I$ 的 0.05M NaOH 溶液和 10μl 0.001M PAA 溶液(1 x 10^{-8} 摩尔)中。将化合物 20A 进行 HPLC 纯化，在 pH7.4, 50mM 磷酸钠缓冲液中稀释至 20 和 100MBq/ml，典型比活分别为 13 和 41MBq/纳摩尔。观察到与 ^{127}I 标准品的共洗脱，证实了结构和化合物 20A。在稀释后 3.5 小时里观察到良好的稳定性(>90%)。

实施例 9: 用于 N-烷基化的 ^{18}F 标记衍生物的合成

甲苯磺酸-3-[^{18}F]氟丙酯的合成



使用塑料注射器(1ml)，将 Kryptofix 222 (10mg)的乙腈(300 μL)溶液和碳酸钾(4mg)的水(300 μL)溶液(在玻璃小瓶中制备)经由二路栓转移到设置在黄铜加热器中的碳玻璃反应容器中。然后通过二路栓加入 ^{18}F-氟化物(185-370MBq)于靶水(0.5-2ml)的溶液。将加热器设定在 125°C，启动计时器。15 分钟后，以 1 分钟的时间间隔加入三等分的乙腈(0.5ml)。将 ^{18}F-氟化物干燥达总共 40 分钟。40 分钟后，用压缩空气将加热器冷却下来，打开罐盖，加入二对甲苯磺酸-1,3-丙二醇酯(5-12mg)和乙腈(1ml)。盖回罐盖，用塞子封住管道。将加热器设定在 100°C，在 100°C 进行标记 10 分钟。标记后，通过 Gilson RP HPLC 用以下条件分离甲苯磺酸-3-[^{18}F]氟丙酯:

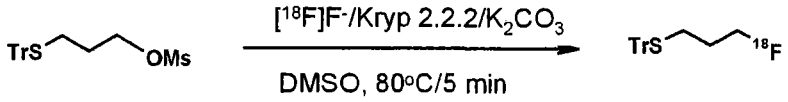
柱	u-bondapak C18 7.8 × 300mm
洗脱液	水(泵 A):乙腈(泵 B)
环大小	1 ml
泵速	4ml/min
波长	254 nm
梯度	5-90%洗脱液 B，20 分钟
产物保留时间	12 min

一旦进行了分离，将切取样品(大约 10ml)用水(10ml)稀释，荷载到经过调节的 C18 sep pak 上。将 sep pak 用氮气干燥 15 分钟，用有机溶剂吡啶(2ml)、乙腈(2ml)或 DMF (2ml)冲洗。大约冲洗掉 99%的活性。

甲苯磺酸-3-[^{18}F]氟丙酯通过在吡啶中回流用于 N-烷基化胺。

实施例 10: 用于 S-烷基化的[^{18}F]-硫醇衍生物

步骤(a): 3-[^{18}F]氟代三苯甲基硫基丙烷的制备



使用塑料注射器(1ml)，将 Kryptofix 222 (10mg)的乙腈(800 μL)溶液和碳酸钾(1mg)的水(50 μL)溶液(在玻璃小瓶中制备)经由二路栓转移到设置在黄铜加热器中的碳玻璃反应容器中。然后通过二路栓加入 ^{18}F-氟化物(85-370 MBq)于靶水(0.5-2ml)的溶液。将加热器设定在 125°C，启动计时器。15 分钟后，以 1 分钟的时间间隔加入三等分的乙腈(0.5ml)。将 ^{18}F-氟化物干燥最多总共 40 分钟。40 分钟后，用压缩空气将加热器冷却下来，打开罐盖，加入三甲基(3-三苯甲基硫基丙氧基)甲硅烷(1-2mg)和 DMSO (0.2ml)。盖回罐盖，用塞子封住管道。将加热器设定在 80°C，在 80°C 进行标记 5 分钟。标记后，通过 RP HPLC 用以下 HPLC 条件分析反应混合物:

柱	u-bondapak C18 78x300mm	
洗脱液	0.1%TFA/水(泵 A):0.1%TFA/乙腈(泵 B)	
环大小	100ul	
泵速	4ml/min	
波长	254nm	
梯度	1 min	40%B
	15 min	40-80%B
	5 min	80%B

将反应混合物用 DMSO/水(1:1 v/v, 0.15ml)稀释，荷载到经过调节的 t-C18 sep-pak 上。将柱用水(10ml)洗涤，用氮气干燥，将 3-[^{18}F]氟代-1-三苯甲基硫基丙烷用 4 等分的乙腈(每等分 0.5ml)洗脱。

步骤(b): 3-[^{18}F]氟代丙-1-硫醇的制备

P42-14 水

将 3-[^{18}F]氟代-1-三苯甲基硫基丙烷的乙腈(1-2 ml)溶液用氮气流 100°C 蒸发 10 分钟至干。加入 TFA (0.05ml)、三异丙基甲硅烷(0.01ml)和水(0.01ml)的混合物，然后在 80°C 加热 10 分钟，产生 3-[^{18}F]氟代丙-1-硫醇。

步骤(c): 与 $-N(CO)CH_2Cl$ 前体反应

标记氯乙酰基前体的一般程序是，用压缩空气冷却装有步骤(b)的 3-[^{18}F]氟代-1-巯基丙烷的反应容器，然后加入氨水(27%水溶液，0.1ml)和前体(1mg)的水(0.05ml)溶液。将混合物在 80^{0}C 加热 10 分钟。

实施例 11: 通过苯甲醛合成 ^{18}F 标记的衍生物

步骤(a): 4-^{18}F-苯甲醛

向平底碳玻璃反应容器(4ml)中加入 Kryptofix 222 (5mg)的乙腈(800μl)溶液和碳酸钾水溶液[13.5mg/ml (H_2O)，约 0.1M] (50μl)。将容器放入黄铜加热器中，将装有 3 根 PTFE 管道的反应容器盖盖紧。管道 1 装有二路栓，管道 2 连接到废液小瓶，管道 3 被封住。将实验装置放在铅墙之后。通过二路栓加入装在回旋加速器靶水中的 ^{18}F-氟化物(370-740MBq; 0.5-2ml)。将氮气管道连接到二路栓，加热器设定在 110°C。启动加热后 10 分钟，取下氮气管道，加入等分的乙腈(0.5ml)。在启动加热后大约 10.5 和 11 分钟，重复这个过程。每次加入乙腈后，将氮气管道重新连接到二路栓。将另一根氮气管道连接到被塞住的管道 3，以冲掉该管道中存在的任何液体。将 ^{18}F-氟化物干燥最多总共 30 分钟。

30 分钟后，用压缩空气将加热器冷却下来，取下反应容器盖子，加入三氟甲磺酸 4-(三甲基铵)苯甲醛[按 Poethko 等, J.Nucl.Med., 45(5)第 892-902 页(2004)的方法制备; 0.5-0.8mg, 0.0016-0.0026mmol]的 DMSO (1000μl)溶液。用塞子塞住 3 根 PTFE 管道。将反应容器在 90 °C 下加热 15 分钟，产生 4-^{18}F-苯甲醛(典型的掺入得率为大约 50%)。粗产物不经进一步纯化即使用。

步骤(b): 缀合程序

将伯胺官能化的前体(0.003mmol)溶于柠檬酸/Na_2HPO_4 缓冲液[500μl; 可通过将 809 μL 的 0.1M 柠檬酸水溶液与 110 μL 的 0.2M 无水 Na_2HPO_4 水溶液混合来制备]，然后直接加入到步骤(a)的 4-^{18}F-苯

甲醛(粗品)。然后将反应容器在 70℃下加热 15 分钟，产生粗产物。

步骤(c): 整理程序和配制

将步骤(b)的整个反应混合物用水稀释至体积大约 20ml，荷载到经过调节的 t-C18 sep pak 上[用 DMSO (5ml)然后是水(10ml)调节]。荷载的 t-C18 sep pak 随后用水(2x5ml)冲洗，接着用 DMSO (3x5ml)冲洗。将含有所需产物的合并 DMSO 冲洗液用 RP HPLC 制备系统纯化:

柱	LunaC18(2) 10x100mm (5u)
洗脱液	水(泵 A):乙腈(泵 B)
环大小	2ml
流速	3ml/min
波长	254nm

将分离的 HPLC 峰用水稀释至体积大约 20ml，荷载到经过调节的 t-C18 sep pak 上[用乙醇(5ml)然后是水(10ml)调节]。荷载的 t-C18 sep pak 随后用水(1x5ml)冲洗，接着用乙醇(3x0.2ml, 1x0.4ml)冲洗。将含有所需产物的合并乙醇冲洗液蒸发至体积大约为 0.1ml，用磷酸缓冲盐水(PBS, 1ml)配制成大约 10%乙醇。配制好的化合物的 pH 大约为 7。

实施例 12: 化合物 2 和 22 的体外效价

用市售的胱天蛋白酶-3 测定试剂盒(BIOMOL *QuantiZyme*™ Assay System, *CASPASE-3 Assay Kit for Drug Discovery*)，评估胱天蛋白酶-3 试验底物的效价(Ki)。表 5 显示了所产生的数据的概要。DEVD 底物序列通过加入用于放射标记的酪氨酸残基和用以帮助细胞增殖的前导序列来进行生物修饰。在这两种生物修饰后，体外效价都得到保持。

表 5：体外效价数据

化合物	平均 Ki (μM)
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Calbiochem，目录号 235425)	7.74
化合物 2	7.83
化合物 22	9.24

实施例 13：化合物 2A、6A 和 8A 的体内血浆稳定性

用 ^{123}I-化合物 2、^{123}I-化合物 6 和 ^{123}I-化合物 8 (分别为化合物 2A、6A 和 8A)进行体内稳定性研究。将放射标记的化合物静脉注射到雄性 Wistar 大鼠(约 200-300g)中。在注射后几个时间点收集血样，离心获得血浆，通过 HPLC 分析。将 HPLC 谱图与对照样品(在体外将样品掺入血浆)进行比较，用以评估体内代谢的程度。

^{123}I-化合物 6 (化合物 6A)的体外稳定性研究显示化合物不稳定，随时间推移发生脱碘，形成一批代谢物。代谢物保留时间与游离酸形式、保护基和碘代酪氨酸有关。进行 ^{123}I-化合物 8 (化合物 8A)的体外稳定性研究，以确定化合物中不存在 asp-甘氨酸是否会导致体内稳定性提高。结果显示化合物快速变性，形成代谢物和发生脱碘。与化合物 6A 相比所产生的代谢物较少。进行 ^{123}I-化合物 2 (化合物 2A)的体外稳定性研究，以查明化合物 6A 和 8A 发生的代谢物形成是否是环己基保护基切割的结果。但是，化合物 2A 也显示随时间推移发生不稳定，形成一批代谢物并发生脱碘。

图 1：本发明的化合物

化合物	序列
1	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Tyr-NH_2
2	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Tyr(^{127}I)-NH_2
3	Ac-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Gly-Tyr-NH_2
4	Ac-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Gly-Tyr(^{127}I)-NH_2
5	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Gly-Tyr-NH_2
6	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Gly-Tyr(^{127}I)-NH_2
7	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val–Asp(OcHex)-Tyr-NH_2
8	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Tyr(^{127}I)-NH_2
9	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val–Asp(OcHex)-Lys-Lys-Tyr-NH_2
10	Ac-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Lys-Lys-Tyr(^{127}I)-NH_2
11	Z-Asp-Glu-Val–Asp-Lys-Lys-Tyr-NH_2
12	Z-Asp-Glu-Val-Asp-Lys-Lys-Tyr(^{127}I)-NH_2
13	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Tyr-NH_2
14	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Tyr(^{127}I)-NH_2
15	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Lys-Lys-Tyr-NH_2
16	Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-Lys-Lys-Tyr(^{127}I)-NH_2
17	Z-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Gly-Tyr-NH_2
18	Z-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Gly-Tyr(^{127}I)-NH_2
19	Z-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Lys-Lys-Tyr-NH_2
20	Z-Asp(OcHex)-Glu(OcHex)-Val-Asp(OcHex)-Lys-Lys-Tyr(^{127}I)-NH_2
21	Ac-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Orn-Arg-Arg-Arg-Gly-Asp-Glu-Val–Asp-Gly-Lys-Lys-Tyr-NH_2
22	Ac-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Orn-Arg-Arg-Arg-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Lys-Lys-Tyr(^{127}I)-NH_2

其中：Z＝ 苄氧基羰基，cHex＝ 环己基