



(45)授权公告日 2018.04.17

[illegible]

張紀東

1. 一种纯化放射性示踪剂的方法,所述方法包括下列步骤:

- (a) 提供包含 ^{18}F 标记的氨氧基官能化生物打靶部分的放射性示踪剂;
- (b) 将辐射防护剂加入所述放射性示踪剂中得到放射性示踪剂溶液,其包含5-25% v/v有机溶剂含量的一种或多种含水水混溶性有机溶剂中的所述放射性示踪剂;
- (c) 使步骤(b)的放射性示踪剂溶液通过反相SPE柱体,其中所述放射性示踪剂保留在所述SPE柱体上;
- (d) 将步骤(c)的SPE柱体用洗涤溶液洗涤一次或多次,所述洗涤溶液包含15-25% v/v有机溶剂含量的含水水混溶性有机溶剂溶液的辐射防护剂;
- (e) 将步骤(d)的SPE柱体用水或水性缓冲溶液洗涤一次或多次;
- (f) 将步骤(d)或(e)的洗涤的SPE柱体用洗脱溶剂洗脱,所述洗脱溶剂包含乙醇含量为35-80% v/v的乙醇水溶液中的辐射防护剂,其中所述洗脱液包含所述洗脱溶剂中的纯化的放射性示踪剂;

其中各辐射防护剂独立地包含以下的一种或多种:抗坏血酸、对氨基苯甲酸和龙胆酸及其与生物相容性阳离子的盐。

2. 权利要求1的方法,其中所述放射性示踪剂溶液的水混溶性有机溶剂包含乙醇。

3. 权利要求1或权利要求2的方法,其中步骤(b)的放射性示踪剂溶液包含0.5-5% v/v乙醇。

4. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述SPE柱体是C18 SPE柱体。

5. 权利要求1-2中任一项的方法,其中步骤(f)的洗脱溶剂包含35-70% v/v乙醇水溶液。

6. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述辐射防护剂包含4-氨基苯甲酸或与其与生物相容性阳离子的盐。

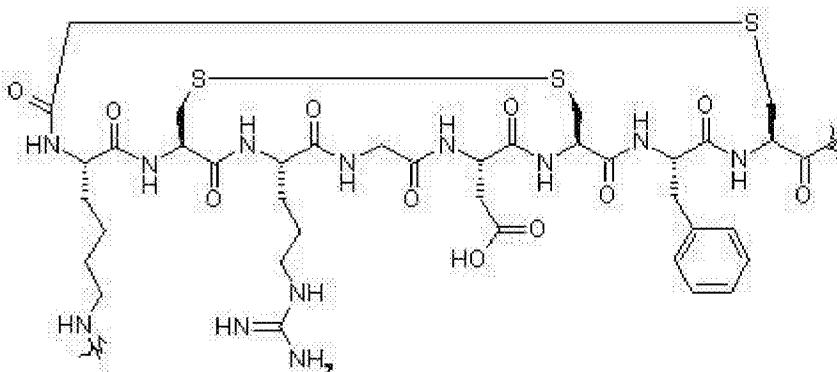
7. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述BTM包含单个氨基酸、3-100聚体肽、酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物。

8. 权利要求7的方法,其中所述BTM包含AffibodyTM。

9. 权利要求7的方法,其中所述BTM包含3-100聚体肽,其选自如下定义肽A、肽B、肽C和肽D:

(i) 肽A = Arg-Gly-Asp肽;

(ii) 肽B = 包含以下片段的Arg-Gly-Asp肽



(iii) 肽C = 包含以下氨基酸序列的c-Met结合环肽:

-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

其中X¹为Asn、His或Tyr；

X²为Gly、Ser、Thr或Asn；

X³为Thr或Arg；

X⁴为Ala、Asp、Glu、Gly或Ser；

X⁵为Ser或Thr；

X⁶为Asp或Glu；

和Cys^{a-d}各自为半胱氨酸残基，使得残基a和b以及c和d环化形成2个单独的二硫键；

(iv) 肽D = 下式的羊毛硫抗菌肽：

Cys^a-Xaa-Gln-Ser^b-Cys^c-Ser^d-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr^c-Phe-Val-Cys^b-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr^a-Lys^d

其中Xaa为Arg或Lys；

Cys^a-Thr^a、Ser^b-Cys^b和Cys^c-Thr^c通过硫醚键共价连接；

Ser^d-Lys^d通过赖丙氨酸键共价连接；

HO-Asp为β-羟基天冬氨酸。

10. 一种呈适于哺乳动物给药的形式的放射性药物组合物的制备方法，所述组合物包含：

(i) 权利要求1或7-9中任一项限定的放射性示踪剂；

(ii) 如权利要求1或6中限定的至少一种辐射防护剂；

(iii) 包含乙醇含量为0.1-10% v/v的乙醇水溶液的生物相容性载体；

其中所述制备方法包括：

●实施权利要求1-9中任一项限定的步骤(a)-(f)的放射性示踪剂的纯化方法；

(g) 任选用生物相容性载体稀释步骤(f)的纯化的[¹⁸F]-放射性示踪剂；

(h) 将步骤(g)的任选稀释的溶液除菌过滤，得到所述[¹⁸F]放射性药物组合物。

11. 权利要求10的方法，其中步骤(b)-(f)或(b)-(h)的至少一步是自动化的，且其中所述自动化采用自动合成仪装置进行。

12. 权利要求11的方法，其中所述自动合成仪装置包含单次使用盒。

13. 权利要求12的方法，其中所述单次使用盒包含：

(i) 含有待纯化的[¹⁸F]-放射性示踪剂溶液的容器；

(ii) 一个或多个反相SPE柱体；

(iii) 供应权利要求1限定的洗涤溶液；

(iv) 供应权利要求1限定的洗脱溶剂。

纯化方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及用于体内成像的放射性药物领域,具体地说涉及纯化包含 ^{18}F 标记的氨基官能化生物打靶部分的放射性示踪剂的方法。本发明提供含有辐射防护剂的示踪剂的放射性药物组合物以及相关自动化方法和盒。

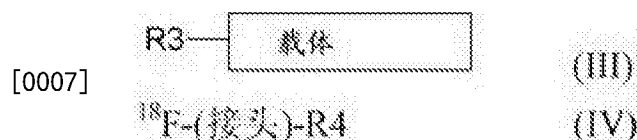
[0002] 发明背景

[0003] WO 2004/080492 A1公开了用于生物打靶载体的放射性氟化的方法,所述方法包括使式(I)的化合物与式(II)的化合物反应:



[0005] 或,

[0006] 使式(III)的化合物与式(IV)的化合物反应



[0008] 其中:

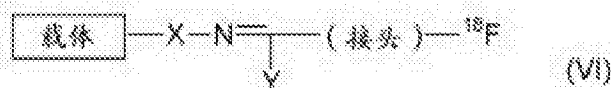
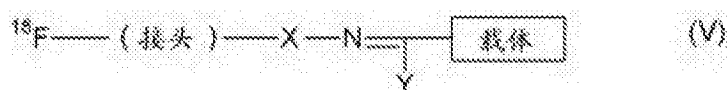
[0009] R1为醛部分、酮部分、被保护的醛例如乙缩醛、被保护的酮例如缩酮或使用氧化剂可被快速且有效氧化成醛或酮的官能团,例如二醇或N-端丝氨酸残基;

[0010] R2是选自伯胺、仲胺、羟胺、肼、酰肼、氨基基、苯肼、氨基脒和氨基硫脒的基团;

[0011] R3是选自伯胺、仲胺、羟胺、肼、酰肼、氨基基、苯肼、氨基脒或氨基硫脒的基团;

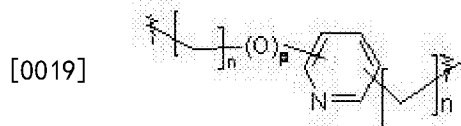
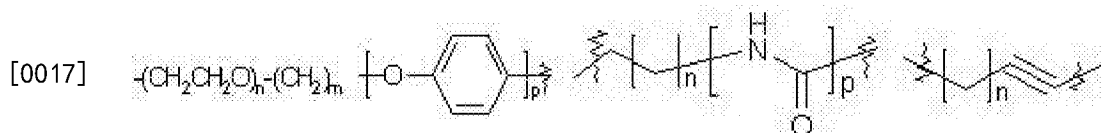
[0012] R4为醛部分、酮部分、被保护的醛例如乙缩醛、被保护的酮例如缩酮或使用氧化剂可被快速且有效氧化成醛或酮的官能团,例如二醇或N-端丝氨酸残基;

[0013] 分别得到式(V)或(VI)的缀合物:



[0015] 其中X为 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHCONH}-$ 或 $-\text{NHCSNH}-$,且优选为 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{O}-$; Y为H、烷基或芳基取代基;和

[0016] 式(II)、(IV)、(V)和(VI)的化合物中的接头基团选自:



[0020] 其中:

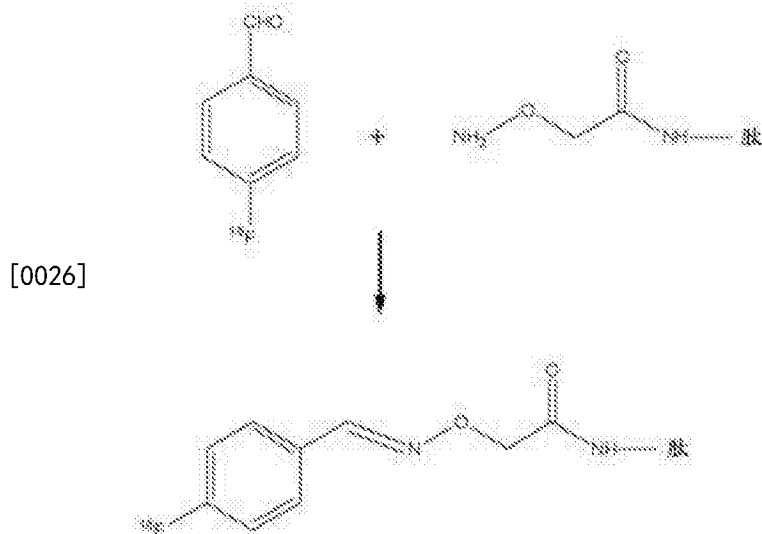
[0021] n为0-20的整数;

[0022] m为1-10的整数;

[0023] p为0或1的整数;

[0024] Z为0或S。

[0025] Poethko等[J. Nucl. Med., 45 (5), 892-902 (2004)]公开了用放射性同位素¹⁸F对肽进行放射性标记的方法,其中氨氧基官能化肽与[¹⁸F]-氟苯甲醛缩合得到具有如下脞醚键的标记的肽:



[0027] Schottelius等[Bioconj. Chem., 19 (6), 1256-1268 (2008)]进一步发展了Poethko等人的方法。Schottelius等人使用氨氧基官能化肽,其中氨氧基的胺被N-Boc (Boc =叔丁氧基羰基) 保护基保护。在[¹⁸F]-氟苯甲醛存在下通过N-Boc基团在酸性pH (pH = 2)、75℃下脱保护,原位产生所需的氨氧基官能化肽。Schottelius等人使用5倍摩尔过量的Boc保护的前体,因为脱保护在此反应条件下不是定量的。

[0028] Mezo等[J. Pept. Sci., 17, 39-46 (2010)]描述了与Boc保护的氨氧基官能化肽的上述脞连接化学有关的一些问题。因此,已知Boc-氨氧基试剂可使所形成的Boc保护的氨氧基-肽酰化,产生不需要的副产品。还已知官能化肽的游离氨氧基对羰基化合物的反应性高。因此,可随存在于反应混合物或任何后续纯化步骤中的任何外来的醛或酮发生不需要的缩合。这类醛或酮可以是存在于所用溶剂中的痕量的丙酮,或甲醛(例如来自可塑剂)。

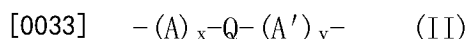
Mezo等人对解决此问题以用于抗癌药物和 $[^{18}\text{F}]$ -氟苯甲醛与肽的缀合两者产生兴趣。Mezo等人通过在10倍摩尔过量的作为“羰基俘获剂”的游离(氨氧基)乙酸(Aoa)存在下进行Boc-氨氧基肽的脱保护,解决了这个问题。然后使脱保护的氨氧基-肽和过量的Aoa冻干并保存在 4°C 下。临在脗连接反应之前,使冻干的混合物复溶,并通过HPLC或Sep-Pak plus C18柱体分离过量的Aoa。Mezo等人提供其中采用该技术使非放射性(即 ^{19}F) 4-氟苯甲醛与氨氧基官能化促生长素抑制素肽缀合的实例。Mezo等人未提供有关 ^{18}F -放射性标记的任何数据。

[0029] WO 2012/022676公开了包含下式I的 ^{18}F -放射性标记的18-30聚体c-Met结合环肽的成像剂:

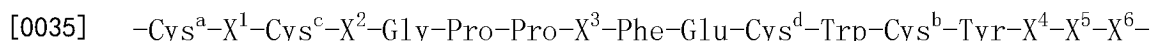


[0031] 其中:

[0032] cMBP为下式II:



[0034] 其中Q为氨基酸序列(SEQ-1):



[0036] 其中 X^1 为Asn、His或Tyr;

[0037] X^2 为Gly、Ser、Thr或Asn;

[0038] X^3 为Thr或Arg;

[0039] X^4 为Ala、Asp、Glu、Gly或Ser;

[0040] X^5 为Ser或Thr;

[0041] X^6 为Asp或Glu;

[0042] 且 Cys^{a-d} 各自为半胱氨酸残基,使得残基a和b以及c和d环化形成2个单独的二硫键;

[0043] A和A'独立地为Cys以外的任何氨基酸,前提条件是A和A'的至少一个存在且为Lys;

[0044] x和y独立地为值0-13的整数,并且经选择使得 $[x + y] = 1-13$;

[0045] Z^1 与cMBP的N端连接,且为H或 $\text{M}^{1\text{G}}$;

[0046] Z^2 与cMBP的C端连接,且为OH、 OB^c 或 $\text{M}^{1\text{G}}$,

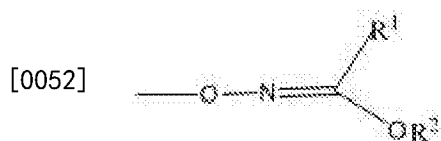
[0047] 其中 B^c 为生物相容性阳离子;

[0048] $\text{M}^{1\text{G}}$ 各自独立地为代谢抑制基团,其是抑制或阻止cMBP肽的体内代谢的生物相容性基团;

[0049] 其中cMBP在A或A'基团的Lys残基上被 ^{18}F 标记。

[0050] WO 2012/022676还公开了可将成像剂用作药物组合物,其中所述组合物优选包含优选选自以下的一种或多种辐射防护剂:乙醇、抗坏血酸、对氨基苯甲酸(即4-氨基苯甲酸或pABA)、龙胆酸(即2,5-二羟基苯甲酸)和所述酸与生物相容性阳离子的盐。

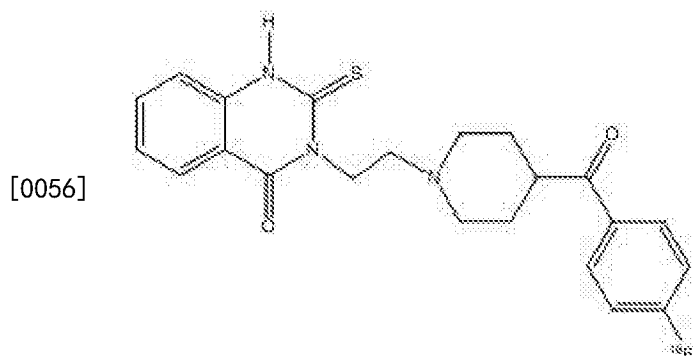
[0051] WO 2012/072736公开了官能化生物分子的氨氧基的备选保护基化学的应用。被保护的氨氧基具有下式:



[0053] 其中：

[0054] R^1 和 R^2 独立选自 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 氟烷基或 C_{4-6} 芳基。

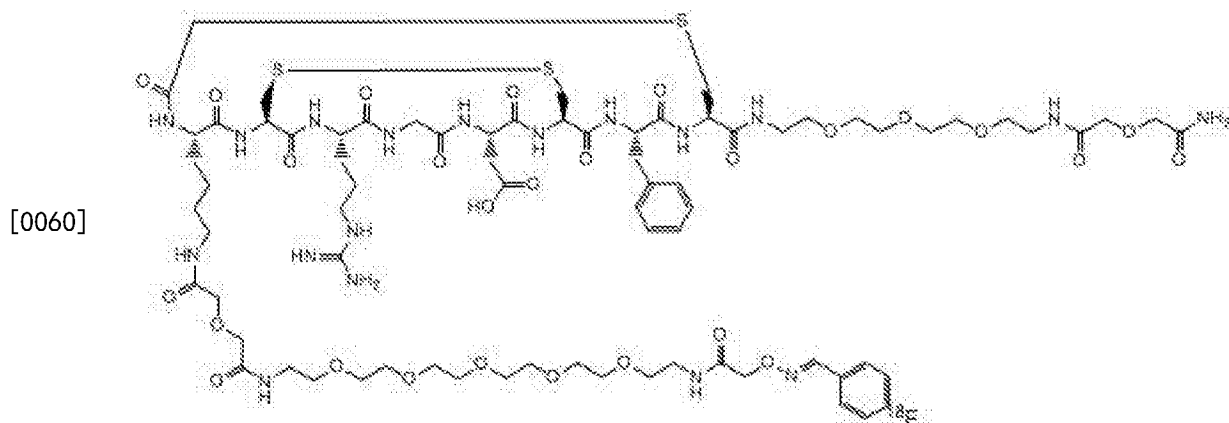
[0055] Lemaire等[J. Lab. Comp. Radiopharm., 42, 63-75 (1999)]描述了 ^{18}F -阿坦色林的固相提取(SPE)纯化：



[0057] ^{18}F -阿坦色林

[0058] 他们注意到 ^{18}F -阿坦色林对辐照分解非常敏感,并且使用含0.1%抗坏血酸的乙醇和盐水的柱调节溶液。柱洗涤用盐水/抗坏血酸混合物进行。将 ^{18}F -阿坦色林在纯乙醇中洗脱,随后用柱调节溶液稀释。

[0059] US 2013/0209358 A1公开了在高放射性浓度下 ^{18}F -fluciclatide可进行辐解作用：



[0061] ^{18}F -fluciclatide

[0062] US 2013/0209358 A1报告了 ^{18}F -fluciclatide不被乙醇稳定,且抗坏血酸对自动化放射合成不理想,但4-氨基苯甲酸(或其盐)是有效的。US 2013/0209358 A1教导了先制备 ^{18}F -fluciclatide,然后加入辐射防护剂。US 2013/0209358 A1还教导了包含 ^{18}F -fluciclatide和辐射防护剂4-氨基苯甲酸(pABA)的放射性药物组合物。

[0063] WO 2013/174909 A1提供使用SPE (固相提取)纯化 ^{18}F -fluciclatide的方法。WO 2013/174909 A1教导了一旦从SPE柱上洗脱,便可将 ^{18}F -fluciclatide用可包括4-氨基苯甲酸的生物相容性载体洗脱。

[0064] 因此仍然需要制备和纯化氨基官能化生物打靶部分以得到适于体内放射性药物应用的高纯度组合物的改进方法。

[0065] 本发明

[0066] 本发明人已鉴定并分析了存在于 ^{18}F 标记的氨基官能化生物打靶部分中的放射

化学杂质和所述杂质的水平如何随时间推移而变化。该研究导致认识到试图纯化期间进程中的辐解作用是RCP（放射化学纯度）问题的根本原因。

[0067] 这还可以如下理解。因此，当纯化并配制用于体内应用时，本发明的放射性示踪剂以约500-700 MBq/mL (0.5-0.7 GBq/mL) 的放射性浓度(RAC) 存在。在所述RAC条件下放射性示踪剂可显示令人满意的稳定性或最低降解。然而，其获自粗制反应混合物，其中RAC的范围为约10-15 GBq/mL。此外，本发明人证实了在纯化期间(即在放射合成结束时)，约45 GBq的放射性以小于1 mL的体积浓缩在色谱柱上的紧密条带中。这导致在纯化期间进程中的RAC >45 GBq/mL。因为纯化可能耗时高达20分钟，所以进程中的辐解作用的风险高。

[0068] 本发明提供用于在进行纯化的同时稳定放射性示踪剂的方法，因此还提供改进的放射性产率和组合物。本发明提供纯化包含¹⁸F-氨基官能化生物打靶部分的放射性示踪剂的方法。实际上既是纯化的方法也是放射稳定(即针对放射性降解稳定)的方法。因此，通过防止纯化期间的进程中的放射性降解，本发明还改进放射化学纯度，因为抑制可另外产生的杂质。所述方法还提供改进的放射化学产率，因为色谱法期间进程中的丢失被减到最小。因此，与通过HPLC而无进程中的放射稳定的纯化相比，本发明提供高达65%的产率增加。

[0069] 发明详述

[0070] 第一方面，本发明提供纯化放射性示踪剂的方法，所述方法包括下列步骤：

[0071] (a) 提供包含¹⁸F标记的氨基官能化生物打靶部分的放射性示踪剂；

[0072] (b) 将辐射防护剂加入所述放射性示踪剂中得到放射性示踪剂溶液，其包含5-25% v/v有机溶剂含量的一种或多种含水水混溶性有机溶剂中的所述放射性示踪剂；

[0073] (c) 使步骤(b)的放射性示踪剂溶液通过反相SPE柱体，其中放射性示踪剂保留在所述SPE柱体上；

[0074] (d) 将步骤(c)的SPE柱体用洗涤溶液洗涤一次或多次，所述洗涤溶液包含15-25% v/v有机溶剂含量的含水水混溶性有机溶剂溶液的辐射防护剂；

[0075] (e) 将步骤(d)的SPE柱体用水或水性缓冲溶液洗涤一次或多次；

[0076] (f) 将步骤(d)或(e)的洗涤的SPE柱体用洗脱溶剂洗脱，所述洗脱溶剂包含乙醇含量为35-80% v/v的乙醇水溶液中的辐射防护剂，其中洗脱液包含所述洗脱溶剂中的纯化的放射性示踪剂；

[0077] 其中各辐射防护剂独立地包含以下的一种或多种：抗坏血酸、对氨基苯甲酸和龙胆酸及其与生物相容性阳离子的盐。

[0078] 术语“放射性示踪剂”具有其常规含义，是指用于跟踪生理学或生物学过程而不影响所述过程的放射性药物。术语“放射性药物”具有其常规含义，是指给予哺乳动物机体体内用于成像或治疗目的的放射性标记的化合物。在色谱纯化期间，例如当加载并因此在SPE柱的顶部浓缩成小体积时，放射性示踪剂可瞬时暴露在极高的放射性浓度(“RAC”)下。因此，在其它情况下显得放射性稳定的放射性示踪剂，在试图纯化期间可显示不稳定性，随后损失放射化学纯度(“RCP”)和/或放射化学产率。

[0079] 术语“氨基官能化”意指被氨基官能化的生物打靶部分。术语“氨基”具有其常规含义，是指式-O-NH₂、优选-CH₂-O-NH₂的取代基。

[0080] 所谓术语“生物打靶部分”(BTM)意指在给予后被选择性吸收或体内定位于哺乳动物机体的特定部位的化合物。所述部位可例如涉及特定的疾病状态或表明器官或代谢过程

如何起作用。

[0081] 术语“反相”是指“反相色谱法纯化”，它具有其常规含义，是指其中固定相是亲脂性且流动相是亲水性(通常包括水性介质)的色谱法。本发明的色谱技术是使用SPE柱(有时称为“SPE柱体”)的固相提取(SPE)。这类SPE柱具有它们是单次使用(即一次性)的优势，因此没有与其它放射性示踪剂交叉污染的风险。

[0082] 术语“5-25% v/v有机溶剂含量的含水水混溶性有机溶剂”是指与至少一种(即可能两种或更多种不同的)水混溶性有机溶剂混合的水性溶液(例如水本身、盐水、水性缓冲液或其混合物)。5-25% v/v有机溶剂含量因此可来自单一有机溶剂，或两种或更多种这类溶剂。水混溶性有机溶剂是本领域已知的，包括：乙腈、C₁₋₄醇、DMF、DMSO、二噁烷、丙酮、2-甲氧基乙醇、THF和乙二醇。

[0083] 所谓术语“辐射防护剂”意指通过截留高反应性自由基(例如产生自水的辐解作用的含氧自由基)，抑制降解反应(例如氧化还原过程)的化合物。本发明的辐射防护剂适宜选自：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)及其与生物相容性阳离子的盐。所谓术语“生物相容性阳离子”意指与离子化带负电荷的基团形成盐的带正电荷的反荷离子，其中所述带正电荷的反荷离子也是无毒的，因此适于给予哺乳动物机体，尤其是人体。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；和铵离子。优选的生物相容性阳离子为钠和钾，最优选钠。

[0084] 本发明的方法除去保持与SPE柱结合的物类—例如极亲脂性物类或任何颗粒。本发明的方法还使亲水性杂质减到最低或除去，所述亲水性杂质对SPE柱固定相显示低亲和力—并因此在加载和洗涤步骤中除去。所述亲水性杂质包括任何盐或离子物类(例如氟离子)；催化剂(例如苯胺或Kryptofix)；以及来自放射性示踪剂溶液的水混溶性有机溶剂。

[0085] 放射性示踪剂通常产生于¹⁸F-氟苯甲醛(或相似物)与氨氧基官能化生物打靶部分前体的缀合，缀合的氟苯甲醛部分赋予缀合物额外的亲脂性。因此，放射性示踪剂会趋于保留在反相SPE柱中，而非放射性前体本身(是更亲水性的)趋于在第一方面的加载步骤(c)和洗涤步骤(d)和(e)中除去。洗涤步骤(d)和(e)对除去步骤(b)的水混溶性有机溶剂也是重要的。以这种方式，将放射性示踪剂溶液纯化以除去不需要的基于生物打靶部分的非放射性杂质，所述生物打靶部分如果存在，则体内会与放射性示踪剂竞争目标生物部位。任何更亲水性的¹⁸F标记的放射性杂质会趋于以类似方式除去。因此，在制备物中化合物2的初始水平为5 mg，其在纯化的放射性示踪剂中减少至约200 μg (0.2 mg)。

[0086] 优选的特征

[0087] 在第一方面的方法中，洗涤溶液和/或放射性示踪剂溶液的水混溶性有机溶剂优选选自：乙腈、C₂₋₄醇、DMF、2-甲氧基乙醇、THF和乙二醇。水混溶性有机溶剂更优选选自乙腈和乙醇。

[0088] 乙腈具有以下优势：它是多种放射性示踪剂的良好溶剂，既非酸性也非碱性，是相对无反应活性的并因此与广泛种类的官能团相容，并且是与水极易混溶的，使得通过在方法步骤(d)和(e)中洗涤SPE柱而容易地将其除去。发现乙腈是用于除去放射性示踪剂中的杂质(包括苯胺)的最高效的溶剂。放射性示踪剂溶液和洗涤溶液的乙腈含量优选不超过25% v/v，因为较高水平有通过从SPE柱上洗脱而丢失放射性示踪剂产物的风险。洗涤溶液的乙腈含量优选为18-22% v/v，更优选20-21% v/v。

[0089] 放射性示踪剂溶液、洗涤溶液和洗脱溶剂的水性组分的pH优选为7.5-8.5。这优选使用缓冲溶液、更优选磷酸盐缓冲液来实现。

[0090] 步骤(b)的放射性示踪剂溶液优选包含乙醇,更优选包含乙腈和乙醇两者。乙醇具有潜在的多种作用,因为它可用作:水混溶性有机溶剂(如上定义);辐射防护剂或放射性稳定剂(radiostabiliser);“生物相容性载体”(如下定义);和作为抗微生物防腐剂(如下定义)。本发明人发现的“辐射防护剂”(如上定义)和乙醇的组合最有效地针对辐解作用稳定本发明的放射性示踪剂。放射性示踪剂溶液的乙醇含量优选为0.5-5% v/v乙醇。

[0091] 加入步骤(b)优选通过加入步骤(d)定义的洗涤溶液来实现。

[0092] 用前,特别是在加载到SPE柱中之前,优选使步骤(a)提供的放射性示踪剂和/或步骤(b)的放射性示踪剂溶液冷却至12-30℃、更优选15-25℃、最优选16-22℃的温度范围。

[0093] 步骤(d)的洗涤溶液优选包含乙醇,更优选包含乙腈和乙醇两者。放射性示踪剂溶液的乙醇含量优选为1.0-3%、更优选1.5-2.5%、最优选2% v/v乙醇。

[0094] 第一方面的反相SPE柱体优选具有2.7-17%的碳负载,且为更优选C8或C18 SPE柱体,最优选tC18 SPE柱体。

[0095] 步骤(f)的洗脱溶剂优选包含35-70%v/v乙醇水溶液,更优选40-60%,最优选48-52%乙醇水溶液,尤其优选50%乙醇水溶液。

[0096] 在第一方面的方法中,用于放射性示踪剂溶液、洗涤溶液和洗脱溶剂的辐射防护剂可相同或不同,或相同但以不同的浓度使用。优选用于放射性示踪剂溶液、洗涤溶液和洗脱溶剂的辐射防护剂相同。这样,避免了在纯化的放射性示踪剂中存在多种不同的不挥发组分,使其更适于体内应用。第一方面的辐射防护剂优选包含4-氨基苯甲酸或与其与生物相容性阳离子的盐,更优选4-氨基苯甲酸钠。

[0097] 当辐射防护剂是4-氨基苯甲酸钠时,放射性示踪剂溶液中的优选浓度为5 mg/mL,而洗涤溶液和洗脱溶剂中的优选浓度为2.5 mg/mL。尤其优选的放射性示踪剂溶液包含在79 g磷酸盐缓冲盐水(pH 6-9,优选7-8.5)和16.5 g乙腈的混合物中的2%乙醇、5 mg/mL 4-氨基苯甲酸钠。尤其优选的洗涤溶液包含磷酸盐缓冲盐水(pH 6-9,优选7-8.5)中的5 mg/mL 4-氨基苯甲酸钠。

[0098] 当辐射防护剂是4-氨基苯甲酸钠时,在纯化步骤之间,优选用空气而不是氮吹扫SPE柱体。因此,本发明人发现辐射防护剂4-氨基苯甲酸在空气存在下更有效地起作用,与其中排除氧的情况相反。

[0099] 步骤(f)的纯化的放射性示踪剂因此优选在35-70%乙醇水溶液中含有4-氨基苯甲酸或与其与生物相容性阳离子的盐作为辐射防护剂。如第二和第三方面(下文)中所述,对于放射性药物应用,其优选用水性生物相容性载体稀释,得到0.1-10% v/v的最终乙醇含量。

[0100] 第一方面的SPE柱体优选用前通过先用水混溶性有机溶剂处理,然后用调节溶液处理而进行调节。所述水混溶性有机溶剂优选为乙醇,所述调节溶液适宜为水性/水混溶性有机溶剂混合物,优选步骤(d)的洗涤溶液。

[0101] 第一方面的方法优选按第三和第五方面(下文)中所述使用自动合成仪装置进行。

[0102] 在第一方面的方法中,BTM优选包含单个氨基酸、3-100聚体肽、酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物。BTM可为合成或天然来源,但优选为合成的。术语“合成的”具有其常规含义,即与从天然来源(例如从哺乳动物机体)分离的相对是人造的。

这类化合物具有以下优势,即可完全控制其生产和杂质概况。单克隆抗体及天然来源的其片段因此超出本文所用术语“合成的”范围。BTM的分子量优选至多30,000道尔顿。更优选分子量为在200-20,000道尔顿的范围内,最优选300-18,000道尔顿,其中尤其优选400-16,000道尔顿。当BTM为非肽时,BTM的分子量优选至多3,000道尔顿,更优选200-2,500道尔顿,最优选300-2,000道尔顿,其中尤其优选400-1,500道尔顿。

[0103] 更优选BTM包含Affibody™或单个氨基酸、3-100聚体肽、酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物。

[0104] 所谓术语“肽”意指包含由肽键(即连接一个氨基酸的胺与另一个氨基酸的羧基的酰胺键)连接的两个或多个如下定义的氨基酸的化合物。术语“肽模拟物”或“模拟物”是指模拟肽或蛋白质的生物活性但在化学性质上不再是肽类,即它们不再含有任何肽键(即氨基酸间的酰胺键)的生物活性化合物。在此,术语肽模拟物以较广含义使用,以包括性质上不再完全是肽类的分子,例如假肽、半肽和类肽。术语“肽类似物”是指包含如下所述一种或多种氨基酸类似物的肽。也参见*Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, M. Goodman等, Houben-Weyl E22c, Thieme。

[0105] 所谓术语“氨基酸”意指可以天然存在的或纯合成来源的,且可以是旋光纯的即单一对映异构体因此是手性的或对映异构体的混合物的L-或D-氨基酸、氨基酸类似物(例如萘丙氨酸)或氨基酸模拟物。本文使用氨基酸的常规3字母或单字母缩略语。优选本发明的氨基酸是旋光纯的。所谓术语“氨基酸模拟物”意指是等排物(即被设计成模拟天然化合物的空间和电子结构)的天然存在的氨基酸的合成类似物。这类等排物为本领域技术人员所熟知,包括但不限于缩肽、逆-倒位肽(retro-inverso peptide)、硫代酰胺、环烷烃或1,5-二取代的四唑[参见M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)]。已知放射性标记的氨基酸例如酪氨酸、组氨酸或脯氨酸是有用的体内成像剂。

[0106] Affibody™分子基于来源于葡萄球菌蛋白A的IgG结合结构域之一的58个氨基酸残基结构域。亲和体(Affibodies)可以单体或二聚体形式使用,有关综述见Nygren [FEBS J., 275, 2668-2676 (2008)]和Nilsson等[Curr. Opin. Drug. Disc. Dev., 10, 167-175 (2007)]。与大10-20倍(~150 kDa)的抗体相比,这些亲和体相对小的大小可允许更好的靶组织穿透性和血液清除。亲和体还具有这样的优势,即在各种pH条件(pH 5.5-11)下是稳定的。本发明的优选亲和体靶向HER2。优选的HER2打靶亲和体包含如下所述的亲和体1。

[0107] 当BTM为酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物时,它优选为非肽,更优选是合成的。所谓术语“非肽”意指不包含任何肽键(即2个氨基酸残基间的酰胺键)的化合物。合适的酶底物、拮抗剂、激动剂或抑制剂包括葡萄糖和葡萄糖类似物;脂肪酸或弹性蛋白酶、血管紧张素II或金属蛋白酶抑制剂。合适的合成受体结合化合物包括雌二醇、雌激素、黄体制剂(progestin)、黄体酮和其它类固醇激素;多巴胺D-1或D-2受体的配体,或多巴胺转运蛋白例如茛菪烷;和5-羟色胺受体的配体。

[0108] BTM最优选为3-100聚体肽或肽类似物。当BTM为肽时,它优选为4-30聚体肽,最优选5-28聚体肽。

[0109] 当BTM为酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂或酶抑制剂时,本发明的优选的这类生物打靶部分是合成的药物类小分子即药物分子。优选的多巴胺转运蛋白配体例如茛菪烷;脂肪酸;多巴胺D-2受体配体;苯甲酰胺;苯异丙胺(amphetamine);苄基胍、碘西尼(iomazenil)、

苯并呋喃 (IBF) 或马尿酸。

[0110] 当BTM为肽时, 优选的这类肽包括如下定义肽A、肽B、肽C和肽D, 以及:

[0111] -促生长素抑制素、奥曲肽和类似物;

[0112] -与ST受体结合的肽, 其中ST是指由大肠杆菌 (*E. coli*) 和其它微生物产生的耐热毒素;

[0113] -铃蟾肽;

[0114] -舒血管肠肽;

[0115] -神经紧张素;

[0116] -层粘连蛋白片段例如YIGSR、PDSGR、IKVAV、LRE和KCQAGTFALRGDPQG;

[0117] -用于白细胞蓄积的打靶部位的N-甲酰基趋化肽;

[0118] -血小板因子4 (PF4) 及其片段;

[0119] - α_2 -抗纤溶酶、纤连蛋白或 β -酪蛋白、血纤蛋白原或血小板反应蛋白的肽片段。 α_2 -抗纤溶酶、纤连蛋白、 β -酪蛋白、血纤蛋白原和

[0120] 血小板反应蛋白的氨基酸序列可见于下列参考文献: α_2 -抗纤溶酶前体[M. Tone等, *J. Biochem*, 102, 1033, (1987)]; β -酪蛋白[L. Hansson等, *Gene*, 139, 193, (1994)];纤连蛋白[A. Gutman等, *FEBS Lett.*, 207, 145, (1996)];血小板反应蛋白-1前体[V. Dixit等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 5449, (1986)];R. F. Doolittle, *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 195, (1984);

[0121] -是血管紧张素的底物或抑制剂的肽, 例如:

[0122] 血管紧张素II Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (E. C. Jorgensen等, *J. Med. Chem.*, 1979, Vol 22, 9, 1038-1044)

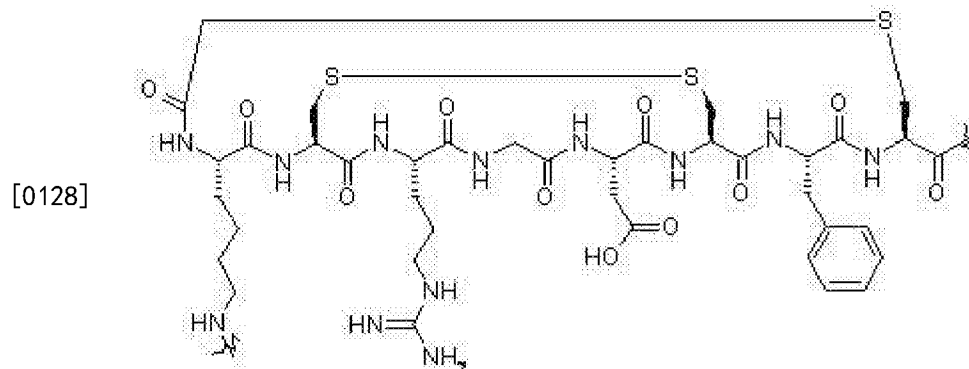
[0123] [Sar,Ile]血管紧张素II: Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile (R. K. Turker等, *Science*, 1972, 177, 1203)。

[0124] -血管紧张素I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu。

[0125] 更优选的BTM肽选自如下定义的肽A、肽B、肽C和肽D:

[0126] (i) 肽A = Arg-Gly-Asp肽;

[0127] (ii) 肽B = 包含以下片段的Arg-Gly-Asp肽



[0129] (iii) 肽C = 包含以下氨基酸序列的c-Met结合环肽:

[0130] -Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

[0131] 其中X¹为Asn、His或Tyr;

[0132] X²为Gly、Ser、Thr或Asn;

[0155] N-酰化基团-NH(C=O)R^G,其中酰基-(C=O)R^G具有选自以下的R^G:C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀芳基或包含聚乙二醇(PEG)结构单元。优选的这类氨基端M^{IG}基团为乙酰基、苄氧基羰基或三氟乙酰基,最优选乙酰基。

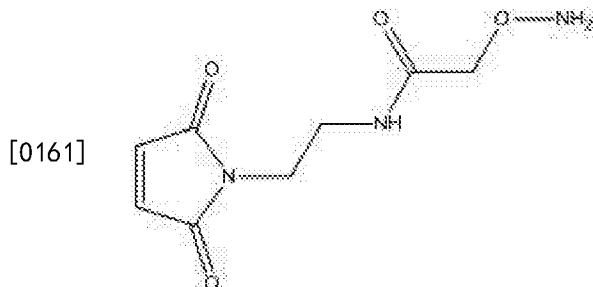
[0156] 对于肽羧基端的合适的代谢抑制基团包括:羧酰胺、叔丁酯、苄酯、环己酯、氨基醇或聚乙二醇(PEG)结构单元。对于BTM肽的羧基端氨基酸残基的合适的M^{IG}基团是其中氨基酸残基的末端胺是被C₁₋₄烷基(优选甲基)N-烷基化的地方。优选的这类M^{IG}基团是羧酰胺或PEG,最优选的这类基团是羧酰胺。

[0157] 适用于本发明的反相SPE柱体可获自Waters Limited (730-740 Centennial Court, Centennial Park, Elstree, Hertfordshire, UK)。

[0158] 氨羟基官能化肽可通过以下方法制备:Poethko等[J. Nucl. Med., 45, 892-902 (2004)];Schirmacher等[Bioconj. Chem., 18, 2085-2089 (2007)];Indrevoll等[Bioorg. Med. Chem. Lett, 16, 6190-6193 (2006)];Glaser等[Bioconj. Chem., 19, 951-957 (2008)]或Dall'Angelo等[Org. Biomol. Chem., 11, 4551-4558 (2013)]。氨羟基可任选分两步骤缀合。第一,使N-保护的氨羟基羧酸或N-保护的氨羟基活性酯与肽缀合(例如通过与Lys残基的胺基缀合或通过常规固相合成)。第二,使中间体N-保护的氨羟基官能化肽脱保护得到所需产物[参见上文引述的Solbakken和Glaser论文]。N-保护的氨羟基羧酸例如Boc-氨羟基乙酸[Boc-NH-O-CH₂(C=O)OH]和Eei-N-O-CH₂(C=O)OH市购可获自例如Sigma-Aldrich、Novabiochem和IRIS。

[0159] 术语“保护的”是指保护基的使用。所谓术语“保护基”意指抑制或阻止不需要的化学反应,但被设计成有足够的反应性使得它在不修饰分子的其余部分的充分温和的条件下可从所讨论的官能团上切割的基团。在脱保护后,获得所需产物。胺保护基为本领域技术人员所熟知,适宜选自:Boc(其中Boc为叔丁氧基羰基);Eei(其中Eei为乙氧基亚乙基);Fmoc(其中Fmoc为苄基甲氧基羰基);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)。另外的保护基的使用描述于*Protective Groups in organic Synthesis*,第4版,Theodor W. Greene and Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)]。优选的胺保护基是Boc和Eei,最优选Eei。

[0160] 另外,Padilla de Jesus等[US 7,902,332和Mol. Imaging Biol., 10, 177-181 (2008)]描述了氨羟基官能化马来酰亚胺Mal-A0:



[0162] Mal-A0

[0163] 通过所述硫醇基与Mal-A0的马来酰亚胺官能团的选择性反应,可使用双官能接头Mal-A0连接氨羟基官能团与含硫醇基的BTM。Padilla de Jesus(上文引述)将这应用于Mal-A0与HER2选择性亲和体的缀合。

[0164] 第二方面,本发明提供制备呈适于哺乳动物给药的形式放射性药物组合物的方法,所述组合物包含:

[0165] (i) 第一方面定义的放射性示踪剂;

[0166] (ii) 第一方面定义的至少一种辐射防护剂;

[0167] (iii) 包含乙醇含量为0.1-10% v/v的乙醇水溶液的生物相容性载体;

[0168] 其中所述制备方法包括:

[0169] ●实施第一方面定义的步骤(a)-(f)的放射性示踪剂纯化方法;

[0170] (g) 任选用生物相容性载体稀释步骤(f)的纯化的 ^{18}F -放射性示踪剂;

[0171] (h) 使步骤(g)的任选稀释的溶液除菌过滤,得到所述 ^{18}F 放射性药物组合物。

[0172] 第二方面中的放射性示踪剂和辐射防护剂的优选实施方案如第一方面(上文)中所述。

[0173] “生物相容性载体”是放射性缀合物可悬浮或优选溶解于其中的流体,尤其是液体,使得组合物是生理上可耐受的,即可给予哺乳动物机体而无毒性或过多不适。生物相容性载体适宜为可注射载体液体,例如无菌的无热原注射用水;水性溶液,例如盐水(其可有利地平衡,使得最终的注射用制品是等渗的);包含生物相容性缓冲剂的水性缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲液);一种或多种张力调节物质的水性溶液(例如血浆阳离子与生物相容性反荷离子的盐)、糖(例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇(例如山梨糖醇或甘露糖醇)、二醇(例如甘油)或其它非离子的多元醇物质(例如聚乙二醇、丙二醇等)。优选生物相容性载体是无热原注射用水、等渗盐水或磷酸盐缓冲液。

[0174] 所谓短语“呈适于哺乳动物给药的形式”意指是无菌无热原的、没有产生毒性作用或不利作用的化合物且在生物相容性pH(约pH 4.0-10.5)下配制的组合物。所述组合物没有可能有引起体内栓子的风险的颗粒,并且经配制使得在与生物流体(例如血液)接触时不发生沉淀。所述组合物还只含有生物相容性赋形剂,并且优选是等渗的。

[0175] 放射性示踪剂和生物相容性载体以合适的小瓶或容器供应,所述小瓶或容器包括允许保持无菌完整性和/或放射性安全、任选加上惰性顶部空间气体(例如氮气或氩气),同时允许通过注射器或套管加入和取出溶液的密封容器。优选的这类容器是隔膜密封的小瓶,其中气密盖用顶封(通常为铝的顶封)卷边。盖适宜用皮下注射器针头单次或多次刺穿(例如卷边隔膜密封盖),同时保持无菌完整性。这类容器具有额外优势,如有需要,盖可承受真空(例如更换顶部空间气体或使溶液脱气),并承受压力变化,例如压力减弱而不允许外部大气气体(例如氧气或水蒸汽)进入。

[0176] 优选的多剂量容器包含单一容积小瓶,其含有多个患者剂量,因此可在制品的可行使用期内的不同时间间隔从中抽取单一患者剂量到临床级注射器以适应临床状况。预装注射器被设计成含有单人用剂量或“单位剂量”,因此优选适于临床使用的一次性或其它注射器。

[0177] 放射性药物组合物可含有其它任选的赋形剂,例如:抗微生物防腐剂、pH调节剂、填充剂、增溶剂或重量摩尔渗透压浓度调节剂。

[0178] 所谓术语“填充剂”意指药学上可接受的增量剂,可在生产和冻干期间促进材料处理。合适的填充剂包括无机盐例如氯化钠和水溶性糖或糖醇例如蔗糖、麦芽糖、甘露糖醇或海藻糖。

[0179] 所谓术语“增溶剂”意指存在于组合物中的提高目标剂在溶剂中的溶解度的添加剂。优选的这类溶剂是水性介质,因此增溶剂优选改进在水中的溶解度。合适的这类增溶剂包括:C₁₋₄醇;甘油;聚乙二醇(PEG);丙二醇;聚氧乙稀失水山梨醇单油酸酯;失水山梨醇单油酸酯;聚山梨酸酯;聚氧乙烯聚氧丙烯聚氧乙烯嵌段共聚物(PluronicTM);环糊精(例如 α 、 β 或 γ 环糊精、羟丙基- β -环糊精或羟丙基- γ -环糊精)和卵磷脂。

[0180] 所谓术语“抗微生物防腐剂”意指抑制潜在有害微生物(例如细菌、酵母或霉菌)的生长的剂。抗微生物防腐剂还可显示一些杀菌性质,这取决于所用剂量。本发明的抗微生物防腐剂的主要作用是抑制药物组合物中的任何这类微生物的生长。然而,抗微生物防腐剂还可任选用于抑制在给药前用于制备所述组合物的试剂盒的一种或多种组分中的潜在有害微生物的生长。合适的抗微生物防腐剂包括:对羟基苯甲酸酯,即对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯或对羟基苯甲酸丁酯或其混合物;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。

[0181] 术语“pH调节剂”意指可用于确保组合物的pH在可接受的界限(约pH 4.0-10.5)内用于人或哺乳动物给药的化合物或化合物的混合物。合适的这类pH调节剂包括药学上可接受的缓冲剂,例如曲辛(tricine),磷酸盐或TRIS[即三(羟甲基)氨基甲烷],和药学上可接受的碱例如碳酸钠,碳酸氢钠或其混合物。当以试剂盒形式使用组合物时,pH调节剂可任选以单独的小瓶或容器提供,使得试剂盒的用户可调节pH作为多步程序的一部分。

[0182] 第二方面的方法可以各种方式实施:

[0183] 1) 无菌生产技术,其中步骤在绝对无尘室环境中进行;

[0184] 2) 终点灭菌,其中第一方面的步骤(a)-(g)在不采用无菌生产的情况下进行,然后在最后一步灭菌[例如通过 γ 辐射、高压灭菌、干热或化学处理(例如用环氧乙烷)];

[0185] 3) 无菌生产技术,其中所述步骤使用自动合成仪装置进行。

[0186] 优选方法(3)。因此,在第三方面的方法中,步骤(b)-(f)或(b)-(h)的至少一步优选是自动化的。更优选自动化采用自动合成仪装置进行。最优选自动合成仪装置包含单次使用盒。

[0187] 所谓术语“自动合成仪”意指基于Satyamurthy等[Clin. Positr. Imag., 2(5), 233-253 (1999)]所述的单元操作的原理的自动化模块。术语“单元操作”意指复杂过程被简化成一系列的简单操作或反应,其可应用于各种材料。这类自动合成仪对于本发明的方法尤其当需要放射性药物组合物时是优选的。它们可市购获自多个供应商[Satyamurthy等,如上],包括:GE Healthcare;CTI Inc;Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Belgium);Raytest (Germany)和Bioscan (USA)。

[0188] 商品化自动合成仪还提供用于因放射性药物制备而产生的液体放射性废物的合适容器。通常不提供带有辐射屏蔽的自动合成仪,因为它们被设计成用于适当配置的放射性工作单元。放射性工作单元提供合适的辐射屏蔽以保护操作者免遭潜在的辐射剂量,以及提供通风以除去化学和/或放射性蒸汽。自动合成仪优选包含盒。

[0189] 所谓术语“盒”意指经设计以合成仪活动件的机械运动从盒的外面(即从外部)控制盒的操作的方式使得整个单位可取出地且可替换地安装在自动合成仪装置(如下定义)上的装置的单位组件。合适的盒包含各自与出入口连接的线性阵列阀,试剂或小瓶可通过

针穿刺倒置隔膜密封的小瓶或通过气密的合成接合处 (marrying joints) 在所述出入口处连接。各阀具有与自动合成仪的相应移动臂对接的凹凸连接处。当将盒与自动合成仪连接时, 臂的外旋转因此控制阀的开启或关闭。自动合成仪的其它活动件被设计成夹在注射器活塞端上, 因此提升或压下注射器针筒。

[0190] 所述盒是多用途的, 通常具有试剂可连接的几个位置和适于连接试剂的注射器小瓶或色谱法柱体 (例如固相提取或SPE) 的几个位置。盒总是包含反应容器。所述反应容器的体积优选为1-10 cm³, 最优选2-5 cm³, 并且经配置使得盒的3个或更多个出入口与之连接, 以允许试剂或溶剂从盒上的不同出入口转移。优选盒具有呈线性阵列的15-40个阀, 最优选20-30个, 尤其优选为25个。盒的阀优选是各自相同的, 最优选为3通阀。盒被设计成适于放射性药物生产, 并因此自是医药级的并且还理想地是耐辐解作用的材料生产。

[0191] 本发明优选的自动合成仪包含一次性或单次使用的盒, 所述盒包含进行规定批次的放射性氟化放射性药物制备所必需的所有试剂、反应容器和装置。所述盒意指通过简单地更换盒, 自动合成仪便具有能够制备具有最小交叉污染风险的各种不同的放射性药物的机动性。盒式方法还具有以下优势: 简化设置因此操作者误差的风险减小; GMP (药品生产惯例 (Good Manufacturing Practice)) 服从性改进; 多示踪剂能力; 生产运行间的快速变化; 盒和试剂的预运行自动化诊断检查; 化学试剂与待进行的合成的自动化条码反覆核对; 试剂可追溯性; 单次使用并因此无交叉污染、篡改和耐滥用性的风险。

[0192] 第三方面的单次使用盒式方法优选包括:

[0193] (i) 含有如第一方面定义的待纯化的 [¹⁸F]-放射性示踪剂溶液的容器;

[0194] (ii) 一个或多个反相SPE柱体;

[0195] (iii) 供应如第一方面定义的洗涤溶液;

[0196] (iv) 供应如第一方面定义的洗脱溶液。

[0197] 盒中的放射性示踪剂、SPE柱体、洗涤溶液和洗脱溶剂的优选实施方案如第一方面 (上文) 中所述。

[0198] 第二方面的方法优选进一步包括:

[0199] (j) 将步骤 (h) 的 [¹⁸F]-放射性示踪剂放射性药物组合物分配到一个或多个注射器中。

[0200] 在步骤 (h) 之后的顺序步骤在此有意选择为“(j)” — 避免与罗马数字1的可能混淆。

[0201] 第三方面, 本发明提供用于进行本文所述自动化方法的第二方面定义的单次使用盒, 所述盒包含:

[0202] (i) 适于如第一方面定义的含有待纯化的 [¹⁸F]-放射性示踪剂溶液的容器;

[0203] (ii) 如第一方面定义的一个或多个反相SPE柱体;

[0204] (iii) 供应如第一方面定义的洗涤溶液;

[0205] (iv) 供应如第一方面定义的洗脱溶液。

[0206] 盒中的放射性示踪剂、SPE柱体、洗涤溶液和洗脱溶剂的优选实施方案如第一方面 (上文) 中所述。

[0207] 第四方面, 本发明提供采用自动合成仪装置以实施第一方面的制备方法或第三方面的放射性标记方法。

[0208] 第四方面的自动合成仪的优选实施方案如第二方面(上文)中所述。

[0209] 附图描述

[0210] 图1显示使用位于整个FastLab盒(包括通过SPE柱的侧面)的放射性检测器在加载、洗涤和洗脱过程中化合物3通过SPE柱的辐射洗脱概况。

[0211] 图2显示化合物3的自动化放射合成和自动化纯化的FastLab盒配置。

[0212] 通过以下详述的非限制性实施例说明本发明。实施例1提供本发明的c-Met打靶肽(“肽1”)的合成。实施例2提供氨氧基官能化肽1 (“化合物1”)的合成,其中氨氧基官能团用保护基(Eei)保护,随后脱保护得到化合物2。实施例3提供 ^{18}F -氟苯甲醛的放射合成。实施例4是比较实施例,其提供不用本发明的方法的情况下 ^{18}F 标记的共轭化合物3的放射合成。在这种情况下,RCP在合成结束时相对低(79%)。

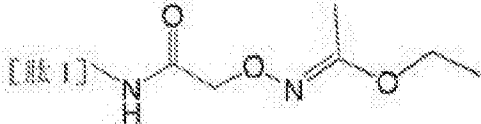
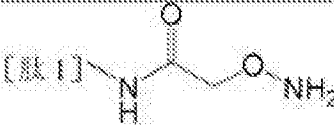
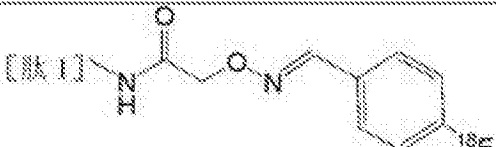
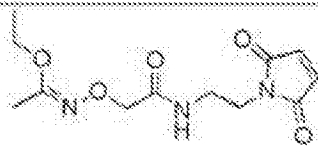
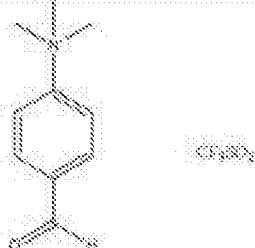
[0213] 实施例5提供按照实施例4纯化的低RCP化合物3中的放射化学杂质的特性和时程的分析。这提供了以下证据,即在试图色谱法纯化期间进程中的辐解作用是造成低RCP的原因。实施例5提供有关在SPE纯化期间放射性通过SPE柱移动的信息,表明在SPE过程中RAC超过45 GBq/mL。这种相当高但受时间限制的RAC也表明了进程中的辐解作用。

[0214] 实施例7提供使用自动合成仪和盒的化合物3的自动化合成和纯化。通过配制含有2.5 mg/Na-pABA的MeCN/PBS纯化溶液,实现EOS产率的显著提高,但EOS RCP仍低,并对高RAC敏感(在25 mL制剂中,当RAC为660 MBq/mL时RCP= 89%,当RAC为844 MBq/mL时RCP = 85%)。在EOS时高RAC表明在纯化过程的较晚阶段柱体上仍较高的RAC。通过提高放射性示踪剂溶液的Na-pABA含量至5 mg/mL,将进一步改进RCP至89-91%。将乙醇(2%)加入放射性示踪剂溶液和洗涤溶液中,导致RCP进一步改进至>92%。实施例7的过程除去85%的肽相关杂质和基本全部的苯胺(在纯化前存在于粗产物中的100,000 μg 苯胺剩余20 μg)。对于除去化学杂质,加入pABA和乙醇不会不利影响SPE纯化的性能。

[0215] 实施例8提供双官能氨氧基马来酰亚胺接头(化合物4)的合成。

[0216] 本发明的化合物

[0217]

名称	结构
肽 1	Cys4-16 和 Cys6-14 处的二硫桥： Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH ₂ 或 Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
化合物 1	
化合物 2	
化合物 3	
化合物 4	
亲和体 1	AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKKRAFIRKLYDDPSQSSELLS EAKKLNDSQAPKVDC
前体 1	

[0218] 其中：

[0219] 化合物1、2和3在肽1的羧基端Lys的ε胺基处被官能化；

[0220] 亲和体1对HER2有选择性。

[0221] 缩略语

[0222] 使用常规单字母或3字母氨基酸缩略语。

[0223] Ac：乙酰基；

[0224] AcM：乙酰氨基甲基；

[0225] ACN或MeCN：乙腈；

[0226] AcOH：乙酸；

[0227] Boc：叔丁氧基羰基；

[0228] BTM：生物打靶部分；

[0229] tBu：叔丁基；

- [0230] DCM: 二氯甲烷;
- [0231] DIPEA: *N,N*-二异丙基乙胺;
- [0232] DMF: 二甲基甲酰胺;
- [0233] DMSO: 二甲亚砜;
- [0234] Eei: 乙氧基亚乙基;
- [0235] Eei-AOAc-OSu:*N*-(1-乙氧基亚乙基)-2-氨基基乙酸*N*-羟基琥珀酰亚胺基酯;
- [0236] EOS: 合成结束;
- [0238] FBA: 4-氟苯甲醛;
- [0239] Fmoc: 9-芴基甲氧基羰基;
- [0240] HBTU: 六氟磷酸0-苯并三唑-1-基-*N,N,N',N'*-四甲基脒;
- [0241] HPLC: 高效液相色谱法;
- [0242] MW: 分子量;
- [0243] NHS: *N*-羟基-琥珀酰亚胺;
- [0244] NMM: *N*-甲基吗啉;
- [0245] NMP: 1-甲基-2-吡咯烷酮;
- [0246] PBS: 磷酸盐缓冲盐水;
- [0247] Pbf: 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基;
- [0248] RAC: 放射性浓度;
- [0249] RCP: 放射化学纯度;
- [0250] RP-HPLC: 反相高效液相色谱法;
- [0251] tBu: 叔丁基;
- [0252] TFA: 三氟乙酸;
- [0253] THF: 四氢呋喃;
- [0254] TIS: 三异丙基甲硅烷;
- [0255] Trt: 三苯甲基。
- [0256] 实施例1:肽1的合成
- [0257] 步骤(a):受保护的前体线性肽的合成
- [0258] 前体线性肽具有以下结构:
- [0259] Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys (Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys (Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂
- [0260] 采用Fmoc化学法以0.1 mmol Rink Amide Novagel树脂开始,在Applied Biosystems 433A肽合成仪上装配肽基树脂H-Ala-Gly-Ser (tBu)-Cys (Trt)-Tyr (tBu)-Cys (Acm)-Ser (tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg (Pbf)-Phe-Glu (OtBu)-Cys (Acm)-Trp (Boc)-Cys (Trt)-Tyr (tBu)-Glu (OtBu)-Thr (ψ^{Me,Me}pro)-Glu (OtBu)-Gly-Thr (tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys (Boc)-聚合物。在偶联步骤中应用过量的1 mmol预先激活的氨基酸(使用HBTU)。将Glu-Thr假脯氨酸(pseudoproline) (Novabiochem 05-20-1122) 掺入序列中。树脂被转移到氮气鼓泡装置中,并用溶于DCM (5 mL)中的乙酸酐(1 mmol)和NMM (1 mmol)溶液处理60分钟。经过滤除去酐溶液,将树脂用DCM洗涤,并在氮气流下干燥。

[0261] 同时脱去侧链保护基和将肽从树脂上切割在含有2.5% TIS、2.5% 4-硫甲酚和2.5%水的TFA (10 mL)中进行2小时30分钟。经过滤除去树脂,真空除去TFA,将乙醚加入残余物中。将形成的沉淀用乙醚洗涤,风干得到264 mg粗制肽。

[0262] 粗制肽通过制备型HPLC纯化(梯度:在40分钟内20-30% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:10 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:30分钟),得到100 mg纯肽1线性前体。纯产物通过分析型HPLC分析(梯度:在10分钟内10-40% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:0.3 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:6.54分钟)。进一步的产物表征采用电喷雾质谱法进行(MH₂²⁺计算值:1464.6,MH₂²⁺实测值:1465.1)。

[0263] 步骤(b):单环Cys4-16二硫桥的形成

[0264] Cys4-16;Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Lys-NH₂。

[0265] 将步骤(a)的线性前体(100 mg)溶于5% DMSO/水(200 mL)中,使用氨调节溶液至pH 6。将反应混合物搅拌5天。然后使用TFA调节溶液至pH 2,并通过真空蒸发除去大部分溶剂。将残余物(40 mL)分批注入制备型HPLC柱中用于产物纯化。

[0266] 残余物通过制备型HPLC纯化(梯度:0% B 10分钟,然后在40分钟内0-40% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:10 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:44分钟),得到72 mg的纯肽1单环前体。纯产物(作为异构体P1-P3的混合物)通过分析型HPLC分析(梯度:在10分钟内10-40% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:0.3 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:5.37分钟(P1);5.61分钟(P2);6.05分钟(P3))。进一步的产物表征采用电喷雾质谱法进行(MH₂²⁺计算值:1463.6,MH₂²⁺实测值:1464.1 (P1);1464.4 (P2);1464.3 (P3))。

[0267] 步骤(c):第二Cys6-14二硫桥(肽1)的形成

[0268] 在氮气层(blanket of nitrogen)下将步骤(b)的单环前体(72 mg)溶于75% AcOH/水(72 mL)中。按顺序加入1 M HCl (7.2 mL)和含0.05 M I₂的AcOH (4.8 mL),并搅拌混合物45分钟。加入1 M抗坏血酸(1 mL),得到无色混合物。大部分溶剂经真空蒸发,将残余物(18 mL)用水/0.1% TFA (4 mL)稀释,并采用制备型HPLC纯化产物。残余物通过制备型HPLC纯化(梯度:0% B 10分钟,然后在40分钟内20-30% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:10 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:43-53分钟),得到52 mg的纯肽1。纯产物通过分析型HPLC分析(梯度:在10分钟内10-40% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN/0.1% TFA,流速:0.3 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:6.54分钟)。进一步的产物表征采用电喷雾质谱法进行(MH₂²⁺计算值:1391.5,MH₂²⁺实测值:1392.5)。

[0269] 实施例2:化合物2的合成、纯化和冻干

[0270] 将肽1 (0.797 g)和Eei-AOAc-OSu (IRIS Biotech;127 mg)溶于DMF (12 mL)中。加入DIPEA (100 μ L),将反应混合物振荡26分钟。加入第二等分部分的DIPEA (80 μ L),并

将反应混合物振荡2小时。然后将反应混合物用10% ACN/水/0.1%乙酸铵(40 mL)稀释,使用A = 0.1% TFA/水,B = ACN,以40分钟内20-40% B的梯度洗脱,通过制备型HPLC纯化产物。在长颈瓶中合并含有纯产物的流分(这些是化合物1和化合物2的混合物),将长颈瓶用氩气吹扫。将溶液搅拌过夜,以使Eei保护基完全除去。将脱保护的产物冻干,得到550 mg (69% 收率)的化合物2。

[0271] 纯产物通过分析型LC-MS进行分析(梯度:在5分钟内10-40% B,其中A = H₂O/0.1% TFA,B = ACN TFA,流速:0.6 mL/分钟,柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:3.00分钟),MH₂²⁺计算值:1428.1,MH₂²⁺实测值:1427.9)。

[0272] 实施例3:[¹⁸F]-氟苯甲醛(¹⁸F-FBA)的放射合成

[0273] 使用具有银靶的GEMS PETtrace回旋加速器通过[¹⁸O] (p,n) [¹⁸F]核反应,产生[¹⁸F]-氟化物。使用3.2 - 4.8 mL的总目标体积。将放射性氟化物截留在Waters QMA柱体(用碳酸盐预调节)上,将氟化物用含Kryptofix2.2.2. (5.14 mg)和碳酸氢钾(1.40 mg)在水(800 μ L)和乙腈(200 μ L)中的溶液洗脱。使用氮气驱动溶液从QMA柱体到反应容器中。将[¹⁸F]-氟化物在稳定的氮气流和真空下在120℃下干燥9分钟。将含三甲铵苯甲醛三氟甲磺酸盐(trimethylammonium benzaldehyde triflate)[前体1;Haka等, J. Lab. Comp. Radiopharm., 27, 823-833 (1989)] (3.7 mg)的DMSO (2.0 mL)加入干燥的[¹⁸F]-氟化物中,将混合物加热至80℃ 2分钟,产生4-[¹⁸F]-氟苯甲醛。

[0274] 实施例4:化合物3(比较实施例)的放射合成

[0275] 使用实施例3的¹⁸F-FBA,用¹⁸F对实施例2的化合物2进行放射性标记,然后在没有本发明的进程中的放射稳定的情况下,使用MCX+ SPE柱纯化,得到RCP为79%的化合物3。

[0276] 实施例5:低RCP化合物3中的放射化学杂质

[0277] 研究随时间变化的按照实施例3制备的化合物3的RCP。RCP不随时间推移进一步下降(直到8小时),表明了:

[0278] (i) 在SPE过程结束时存在的RAC条件下化合物3是相对放射性稳定的;

[0279] (ii) 在SPE过程结束时RCP必总是低的。

[0280] 实施例4的化合物3的分析,即在不使用本发明的放射稳定方法和显示低RCP(79%)的情况下,发现两种辐解产物是低RCP的主要促成因素。这些通过分析型HPLC中的保留时间和与非放射性类似物真实样品的保留时间的比较来鉴定。这两种辐解产物为[¹⁸F]4-氟苯甲醛(FBA)和[¹⁸F]4-氟苯腈(FPhCN),其一起代表存在于来自实施例4的低RCP化合物3制备物的12%的放射性。

[0281] 不随时间显著增加的这些主要的放射化学杂质,表示化合物3的放射性降解产物,进而表示进程中的辐解作用。

[0282] 实施例6:化合物3的纯化中的SPE洗脱概况

[0283] 沿FastLab盒放置了6个放射性检测器,其中将检测器#6朝向按照实施例7配置的SPE柱的底部放置。以这种方式跟踪SPE纯化过程的加载、洗涤和洗脱步骤期间的放射性的移动。

[0284] 结果见图1。显示了粗产物被截留在SPE柱体的顶部。在纯化进行时,放射性沿柱体向下移动并移向检测器6,使信号增强。这表明放射性不扩散到整个柱体中,但集中在致密带中。在纯化期间,所有活性集中在小于1 mL的体积中,得到在纯化期间(多达20分钟)45,

000 MBq/mL的RAC,即45 GBq/mL。

[0285] 实施例7:化合物3的自动合成和纯化

[0286] 使用带盒的FastLab自动合成仪(GE Healthcare)。tC18柱体获自Waters Limited (地址如上)。按照实施例3使前体1与Fastlab上的 $[^{18}\text{F}]$ -氟化物反应,得到 $[^{18}\text{F}]$ -FBA。随后使 $[^{18}\text{F}]$ -FBA在FastLab上与化合物2 (肽1的氨氧基衍生物) 反应,得到粗制化合物3。

[0287] 纯化

[0288] 图2中给出盒配置。在盒中使用3个外部溶剂小瓶用于SPE纯化:

[0289] 位置17 =无水乙醇;

[0290] 位置18 =含5 mg/mL Na-pABA 2% EtOH的79 g PBS/16.5gMeCN的洗涤溶液;

[0291] 位置20 = 34 mL含有80 mg Na-pABA的PBS的制剂缓冲液。

[0292] 其它盒位置:

[0293] 位置21:在位置22上向tC18柱体装上管子;

[0294] 位置22:tC18柱体;

[0295] 位置23:除菌过滤器。

[0296] FASTlab程序

[0297] 在以下中,P17等是指盒的位置17。S2和S3是指注射器2和注射器3:

[0298] (i) 纯化过程的第一部分用来自P17的乙醇填满的满载S2调节,接着来自P18的MeCN/PBS溶液填满的满载S2调节。

[0299] (ii) 将来自缀合步骤的乙醇水溶液中的粗制化合物3用来自P20的制剂缓冲液1:1稀释。这分两部分进行:将来自反应容器的粗产物体积内容物的一半转移到S2,之后与来自P20的相同体积的制剂缓冲液混合。然后使该混合物在tC18柱体中慢慢截留。在第一次截留后,用剩余一半的粗产物重复相同程序。

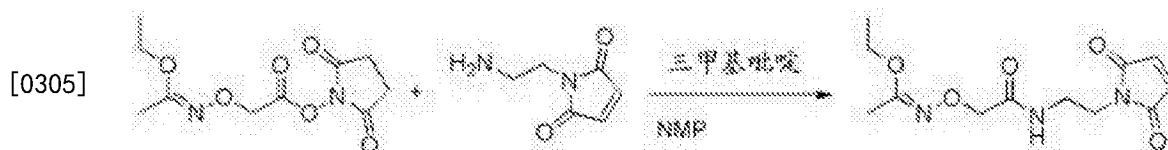
[0300] (iii) 将S2用水冲洗,之后用来自P18的MeCN洗涤溶液完全充满S2冲洗。慢慢推动MeCN洗涤溶液通过tC18柱体,并推到废物区(waste)。将此另重复5次—这种洗涤共6次(但该程序只有共3次洗涤时,得到类似结果)。

[0301] (iv) 通过溶剂交换除去tC18柱体中的MeCN:先用来自P20的制剂缓冲液2次完全充满S2接着用来自水袋的水1次完全充满S2。

[0302] (v) 通过在S2中将来自P17的3 mL乙醇和来自P20的3 mL制剂缓冲液混合制备洗脱液。首先使1 mL洗脱液通过tC18且通向废物区,接着使4 mL洗脱液通过tC18,并在S3中收集纯化的化合物3产物。在洗脱后,使产物通过P19从FASTlab中转移出来并进入产物小瓶中。

[0303] 在此情况下,放射化学纯度(RCP)为92%。

[0304] 实施例8:双官能接头(化合物4)的合成



[0306] 化合物4

[0307] 将N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺TFA-盐(Sigma-Aldrich;151 mg)和Eei-AOAc-OSu

(IRIS Biotech; 77 mg) 在 NMP (2 mL) 中在环境温度下搅拌。加入三甲基吡啶 (80 μ L), 在环境温度下搅拌反应混合物 70 分钟。通过用 0.1% 乙酸 (7 mL) 稀释猝灭反应。产物如下通过制备型 HPLC 纯化:

[0308]

检测	214 nm 和 254 nm 处的 UV
柱类型和大小	Luna C-18 (2), 5 μ m, 100 $\text{\AA}$, 20 x 250 mm, 来自 Phenomenex
洗脱液 A	0.1% v/v 乙酸/水, 1 mL/L
洗脱液 B	乙腈 (Lichrosolv)
梯度	在 40 分钟内 15-30% B
流速	梯度洗脱期间 10 mL/分钟

[0309] 将纯化的化合物 4 冻干。产率 43 mg (75%), 纯度 > 97% 以面积计。

[0310] 纯产物通过分析型 LC-MS 进行分析 (梯度: 在 5 分钟内 10-40% B, 其中 A = H₂O/0.1% TFA, B = ACN/0.1% TFA, 流速: 0.6 mL/分钟, 柱: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, 检测: UV 214 nm, 产物保留时间: 1.93 分钟), MH⁺ 计算值: 284.1, MH⁺ 实测值: 284.1)。

<110> GE Healthcare Limited

<120> 纯化方法和组合物

<130> PZ1392 PCT

<140> PCT/EP2014/078608

<141> 2014-12-18

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> I

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

[0001]

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> X

<222> (2)..(2)

<223> Asn 或 His 或 Tyr

<220>

<221> X

<222> (4)..(4)

<223> Gly 或 Ser 或 Thr 或 Asn

<220>

<221> X

<222> (8)..(8)

<223> Thr 或 Arg

<220>
 <221> X
 <222> (15).. (15)
 <223> Ala 或 Asp 或 Glu 或 Gly 或 Ser

<220>
 <221> X
 <222> (16).. (16)
 <223> Ser 或 Thr

<220>
 <221> X
 <222> (17).. (17)
 <223> Asp 或 Glu

<400> 2

Cys	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Pro	Pro	Xaa	Phe	Glu	Cys	Trp	Cys	Tyr	Xaa	Xaa
1				5					10					15	

Xaa

[0002]

<210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> X
 <222> (2).. (2)
 <223> Arg 或 Lys

<220>
 <221> X
 <222> (15).. (15)
 <223> Beta-羟基天冬氨酸

<400> 3

Cys	Xaa	Gln	Ser	Cys	Ser	Phe	Gly	Pro	Phe	Thr	Phe	Val	Cys	Xaa	Gly
1				5				10						15	

Asn Thr Lys

<210> 4
<211> 26
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys
1 5 10 15

Tyr Glu Thr Glu Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

[0003] <210> 5
<211> 61
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
50 55 60

SPE 期间的放射性洗脱概况

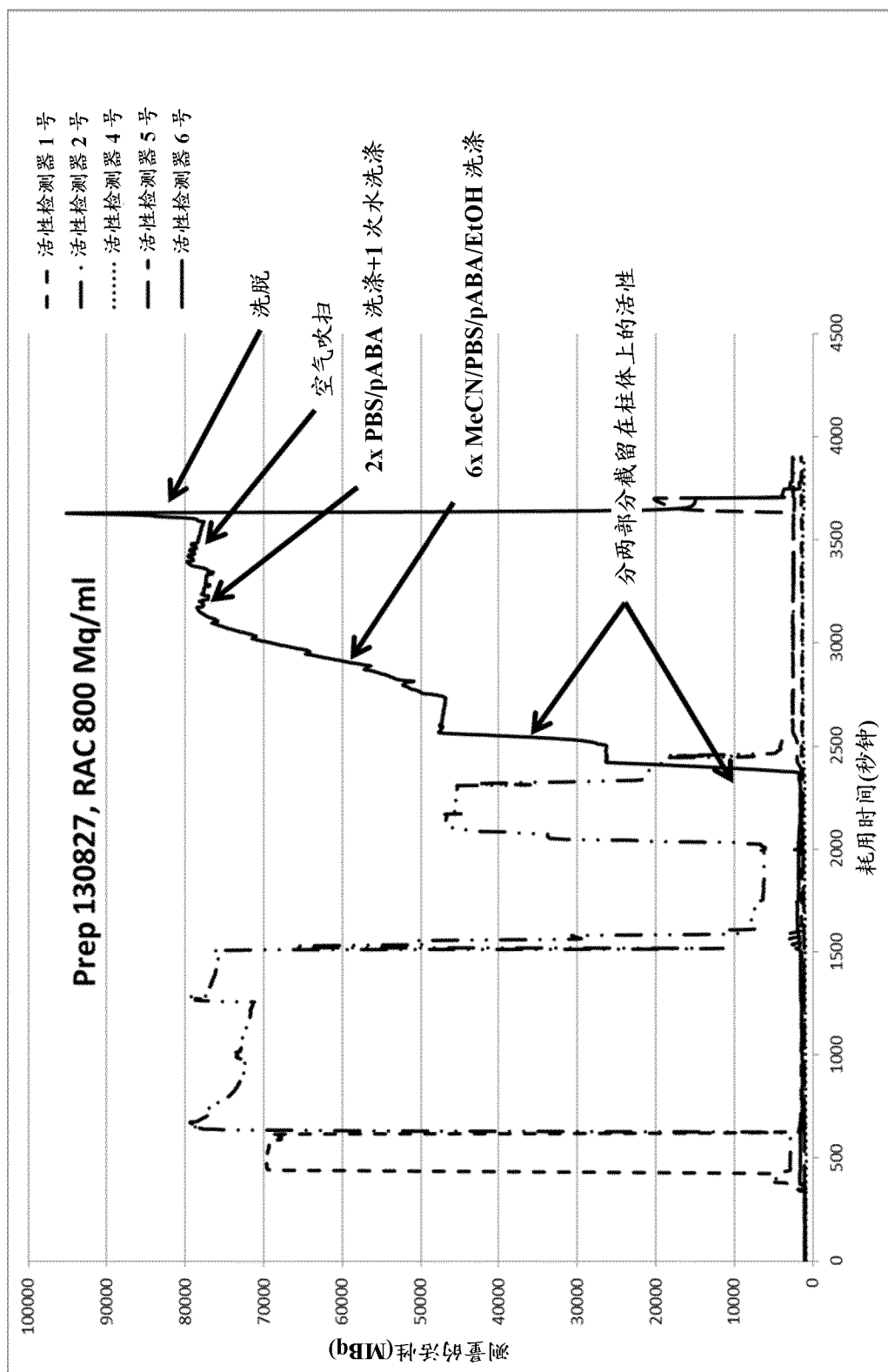


图 1

盒配置

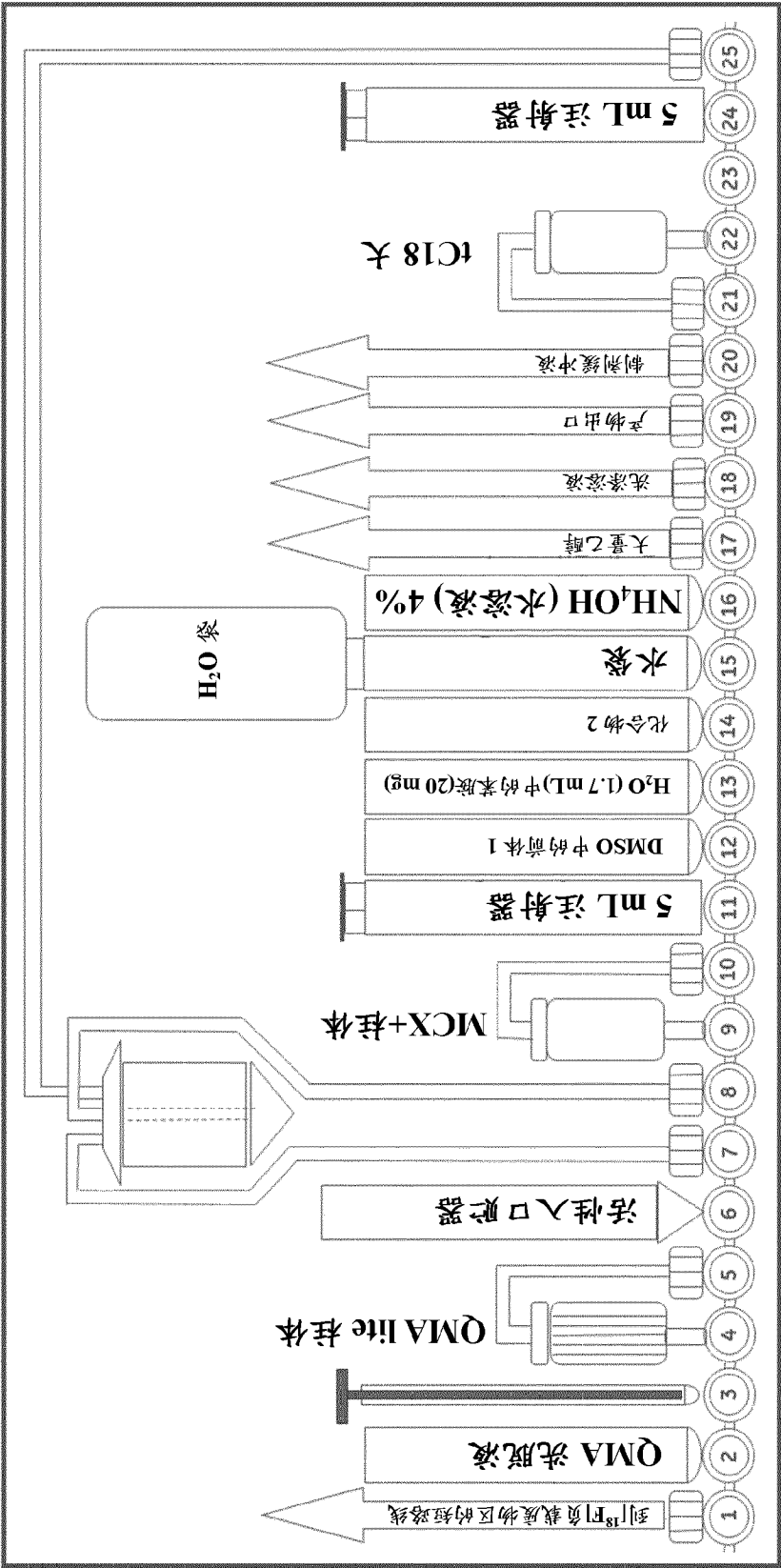


图 2