

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 49/08 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480009565.0

[45] 授权公告日 2010年1月13日

[11] 授权公告号 CN 100579583C

[22] 申请日 2004.4.6

[21] 申请号 200480009565.0

[30] 优先权

[32] 2003.4.11 [33] EP [31] 03008456.0

[86] 国际申请 PCT/EP2004/003684 2004.4.6

[87] 国际公布 WO2004/089424 英 2004.10.21

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.10

[73] 专利权人 布雷克成像有限公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 S·艾梅 E·泰雷诺

D·德利卡斯泰利

G·B·焦文扎纳

[56] 参考文献

WO03013617A2 2003.2.20

WO9638184A2 1996.12.5

审查员 曹 维

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 安佩东

权利要求书1页 说明书10页 附图14页

[54] 发明名称

用于 " CEST " 应用的磁共振位移试剂和包含可交换质子的底物的加合物

[57] 摘要

本发明公开了一种 CEST 顺磁性试剂, 其含有一个底物 (SH), 该底物含有可与顺磁性螯合物 (SR) 结合的自由质子, 该顺磁性螯合物含有选自铁 (II) (高自旋结构)、铁 (III)、钴 (II)、铈 (II)、铜 (II)、镍 (II)、铈 (III)、镨 (III)、钆 (III)、镱 (III)、铪 (III)、铪 (III)、铪 (III)、铪 (III) 和铪 (III) 的金属。

1、含有具有自由质子并且与金属离子的顺磁性螯合配合物 SR 通过缔合热力学常数大于 10 的静电相互作用结合的底物分子 SH 的顺磁性加合物在制备用于基于饱和转移的 MRI 方法的诊断组合物中的用途，其中所述金属离子选自铁(II)、铁(III)、钴(II)、铈(II)、铜(II)、镍(II)、铈(III)、镓(III)、钆(III)、镉(III)、铟(III)、铊(III)、铋(III)、铷(III)、铯(III)和钫(III)。

2、如权利要求 1 所述的用途，其中的底物分子 SH 为反磁性的，并且选自聚精氨酸、白蛋白和 1,4,7,10-四氮杂环十二烷。

3、按照权利要求 1 或 2 所述的用途，其中顺磁性螯合物为 $[\text{LnDOTP}]^{4-}$ ，其中的 Ln 是镧系金属离子。

4、按照权利要求 1 所述的用途，其中 SR 和 SH 在选自脂质体、纳米微粒、微乳剂和蛋白质腔的生物相容性系统中被区室化。

5、含有具有自由质子并且与 $[\text{LnDOTP}]^{4-}$ 螯合配合物通过静电相互作用结合的底物分子 SH 的顺磁性 CEST 试剂，其中 Ln 是镧系金属离子。

6、按照权利要求 5 所述的顺磁性 CEST 试剂，其中的底物分子 SH 选自 1,4,7,10-四氮杂环十二烷、聚精氨酸和人血清白蛋白。

7、含有选自铁(II)、铁(III)、钴(II)、铈(II)、铜(II)、镍(II)、铈(III)、镓(III)、钆(III)、镉(III)、铟(III)、铊(III)、铋(III)、铷(III)、铯(III)和钫(III)的金属离子的顺磁性螯合配合物 SR 和其化学位移受 SR 单元影响并且处于适于与自由水交换的条件下的水分子的顺磁性 CEST 试剂，其中所述 SR 和水分子在选自脂质体、纳米微粒、微乳剂和蛋白质腔的生物相容性系统中被区室化。

8、按照权利要求 7 所述的顺磁性 CEST 试剂，其中可交换的质子属于水分子。

9、一种诊断组合物，含有如权利要求 5 至 8 任意一项所述的 CEST 试剂以及适当的载体。

用于“CEST”应用的磁共振位移试剂和包含可交换质子的底物的加合物

本发明涉及一种用于磁共振成像(MRI)技术的顺磁性加合物,其利用饱和转移以形成影像对比。

背景技术

通过对组织中自由质子的照射在 MRI 图像中产生对比已公开于 US 5,050,609。含有至少一个可与水交换的自由质子的外源性造影剂(最初称为 CEDST 试剂,现在称为 CEST 试剂)的应用已公开于 WO 00/66180。上述文献没有明确提及将顺磁性复合物作为 CEST 试剂的可能性。优选的化合物为反磁性分子例如糖、氨基酸、杂环化合物、核苷、咪唑及其衍生物、胍等。

同一文献还要求保护通过使用含有两组磁不等价自由质子的造影剂进行体内和体外测定 pH、温度、代谢物浓度的方法。对两池(pool)的选择性照射以及应用比例计量法(ratiometric)使得可以不依赖于造影剂的浓度而对转移效应进行测定。饱和转移是指 CEST 试剂的自由质子不与自由水(bulk water)结合,这意味着两组自由质子的共振频率之间的分离一定大于其交换率。而且,转移的程度直接与试剂质子的交换率成比例,这意味着增加两个交换信号共振频率的分离可增加饱和转移的效率。因此 WO 02/43775 公开了 CEST 顺磁性造影剂的用途,其要求保护具有自由质子的顺磁性复合物的用途,其饱和转移(优于 US 5050609 中例举的反磁性化合物)对于对诊断有益的参数例如 pH、温度、代谢物浓度等敏感。

然而,上述文件或文献均未涉及由含有可与自由水交换的质子的底物(包括与 US 5050609 所示例的相似类型)和能够增加加合物与自由水的共振频率之间的分离的顺磁性复合物形成的非共价加合物作为 CEST 试剂系统的应用可能性。在该方法中,将根据其位移试剂(SR)特性与含有可交换质子的化合物特性之间的关系来选择顺磁试剂。

发明内容

本发明涉及顺磁性 CEST 试剂的制备和用途, 其中, 在所述试剂中, 必须被照射以观察饱和转移的自由质子的化学位移已作为底物与含有选自铁(II)(高自旋结构)、铁(III)、钴(II)、铈(II)、铜(II)、镍(II)、铈(III)、镨(III)、钆(III)、铟(III)、铊(III)、铋(III)、铟(III)、铪(III)、铌(III)、钽(III)的金属的顺磁性螯合物的相互作用的结果被适当的“移动”。自由质子可属于反磁性或顺磁性底物, 条件是, 在后一种情况中, 其化学位移受顺磁性物质的非共价相互作用的影响。

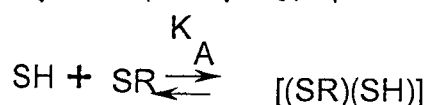
因此, 本发明第一方面涉及由反磁性底物组成的顺磁性 CEST 试剂, 所述底物包含通过静电作用或共价键合与顺磁性螯合物(SR 单元)相结合的自由质子(SH 单元), 所述顺磁性螯合物与底物的相互作用是可逆的。

本发明还涉及包含混有适当赋形剂的上述 CEST 试剂的诊断组合物。

US 5050609 和 WO 00/66180 中所描述的所有分子均可用作含有自由质子的分子, 优选线型和大环聚胺例如 Cyclen (1,4,7,10-四氮杂环十二烷)、聚氨基酸如聚精氨酸、蛋白质例如人血清白蛋白、多糖、聚环糊精、合成聚合物(聚酰氨基胺 (polyamidoamine)、过酰胺化聚氨基酸(peramidated polyaminoacid)和含有酰胺基团的枝状聚合物)。特别优选 Cyclen、聚精氨酸和白蛋白。

可交换质子也可以属于水分子, 其在与 SH 底物相互作用后并且基于加合物 [(SR)(SH)] 的性质, 会从自由水信号中“转移”并且处于适合交换的条件下。该类 SH 底物包括多糖体系, 特别是可形成能够捕获水和 SR 单元的大分子聚集物的体系。这一概念的进一步延伸包括其中 SR 和水分子被捕获到同一区室内并且同时水分子(其化学位移受 SR 单元影响)处于适于与自由水交换的条件下的任意体系。可被用于获得该区室化作用的体系的非详尽性列表包括脂质体、纳米和微米囊体系、蛋白质腔和细胞。

本发明的加合物可通过简单的混合适宜摩尔比的含有自由质子的分子和顺磁性螯合物而制备, 所述摩尔比取决于底物和 SR 单元的亲和力:



亲和力可以通过缔合的热力学常数(K_A)值表示,该值必须大于10。加合物可通过层析法和/或冷冻干燥、沉淀、蒸发等类似方法分离和纯化。

依照本发明的第一种实施方式,SR单元具有能够识别含有自由质子的底物分子部分的化学特性,以显著影响其化学位移。例如, $[LnDOTP]^{4+}$ (Ln为镧系元素)和优选底物 Cyclen、聚精氨酸和 HSA 形成的加合物,通过静电结合产生相互作用。

关于底物与SR单元间的静电相互作用的其他实例是 $[LnDOTP]^{4+}$ 在其中可影响反磁性分子的自由质子的化学位移值的那些,例如 Co(III)-sarcophagine、Co(III)-(乙二胺)₃ 和胍基丁胺。

底物-SR单元的识别也可通过疏水性相互作用(如在聚环糊精的情况下)或混合的相互作用(如在蛋白质的情况下)发生。

或者,SR单元可被捕获到高生物相容性的聚合物体系中,例如水凝胶或交联蛋白质,其在这些系统中能够表现出对于存在于该体系中的慢交换水分子的作用。

其他有益的系统为那些由于区室化效应而在其中发生可交换质子池之间的分化的系统。

根据本发明的具体实施方案,SR单元和SH底物能够在适合的生物相容性系统中被区室化,例如脂质体、纳米微粒、微乳和蛋白质腔(例如脱铁铁蛋白),其中水(不同于SR单元和底物)能够在区室内外自由交换。这样,SR单元的作用可通过能够影响区室中底物的自由质子共振频率的磁化率的简单改变来实现而不需要它们之间的相互作用,其优点在于使底物自由质子的照射频率几乎不变。

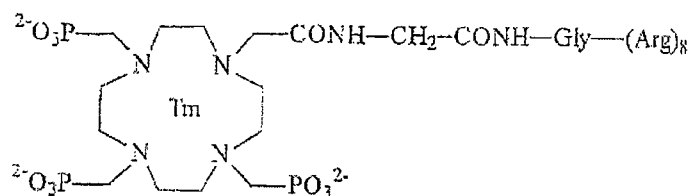
如果SH-SR试剂在其中区室内外的水交换速率非常慢并且含单元区室中的水量足以用于MR显像观察的体系中区室化,那么由于局部SR浓度的增加以及含自由质子的底物的增加,可使饱和转移效应显著增加。

或者,可以对位移试剂进行选择从而仅影响自由水信号的共振。该效应必然增大水和底物共振频率的分离,从而允许底物自由质子的照射。Otting等人报道了一个与CEST无关的该类型的例子(J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 4363),他们

使用 **Co (II)** 来“移动”自由水信号，从而使得可以对捕获于蛋白质 **BPTI** 位点(位移试剂不能进入该位点)内的水分子进行观察。

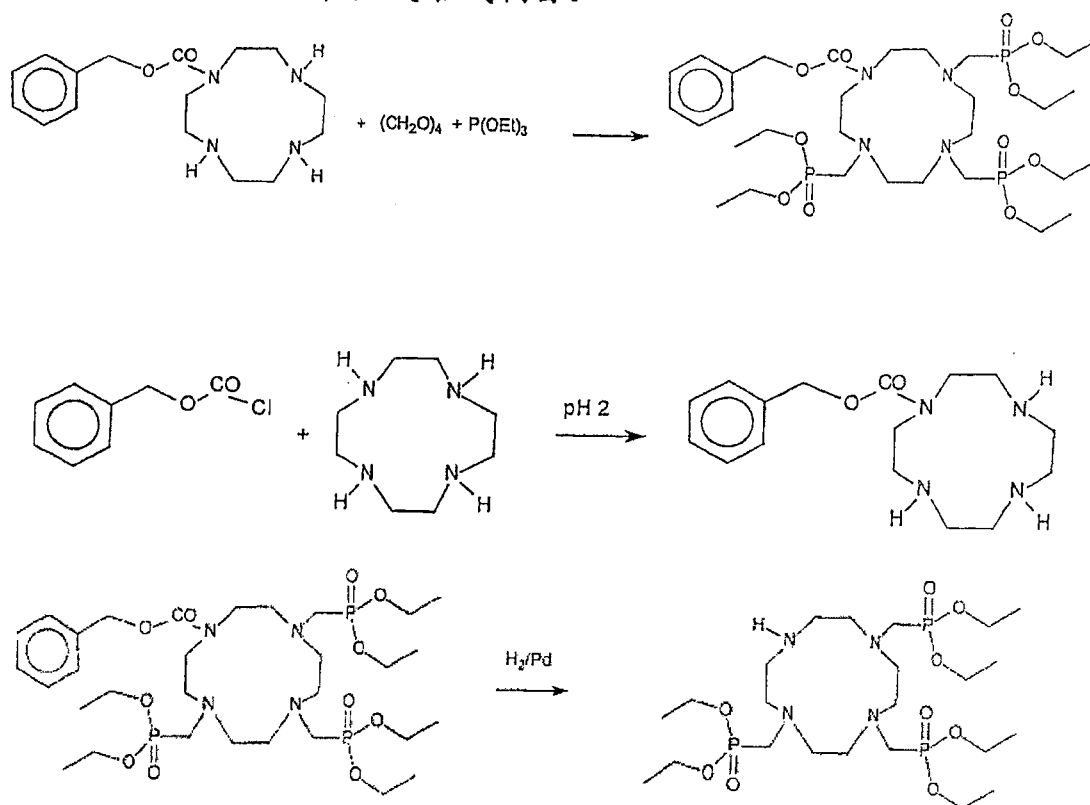
SR 单元和 **SH** 单元还可以通过共价键结合，以保证两个单元在体内具有同样的生物分布。在该情况下，通过自我识别/自我聚集机制，**SR** 单元对于 **SH** 单元质子的作用并不表现为分子内的，而是分子间的。

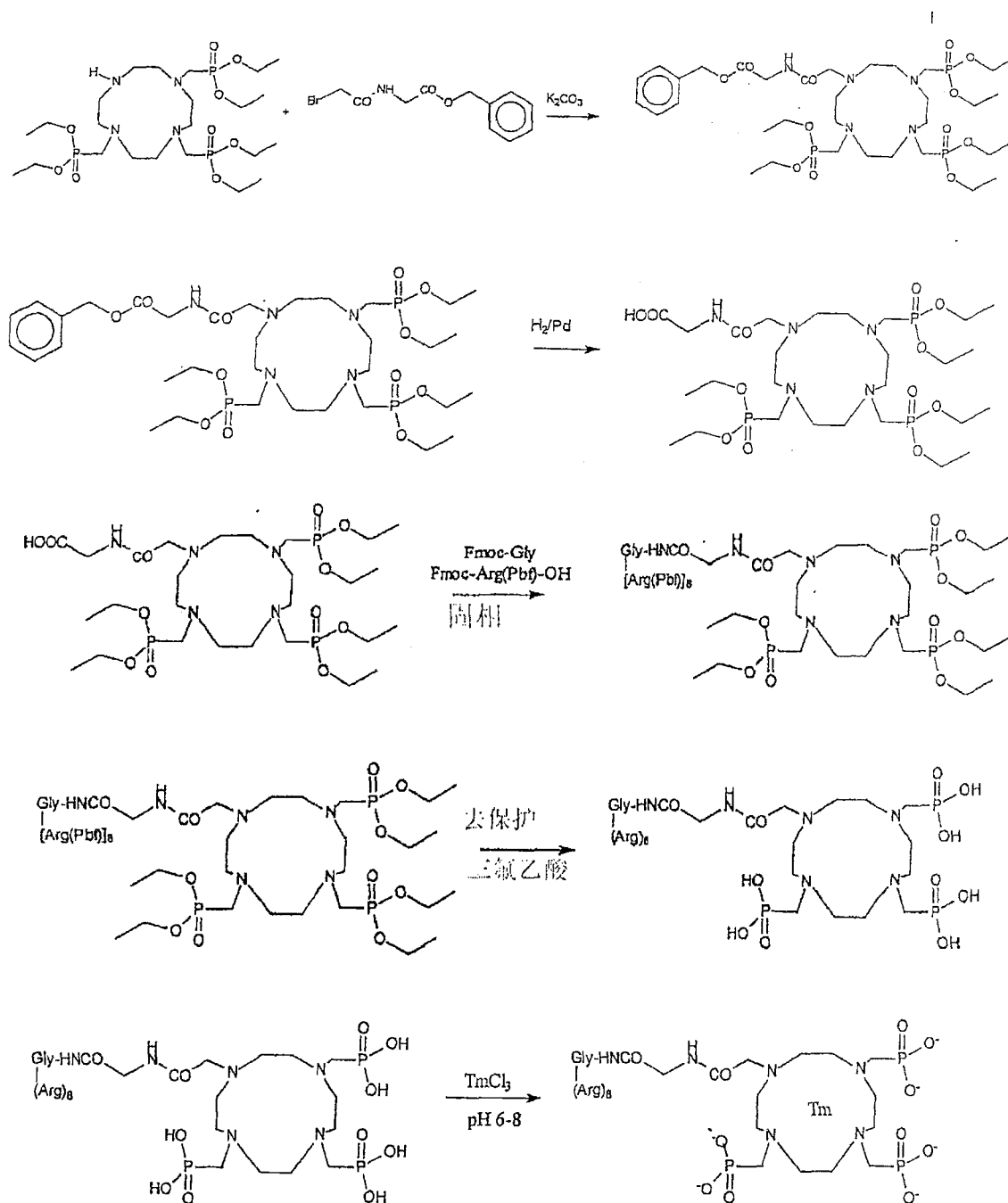
一个优选的该类化合物如下：



其中，分子间的自我识别发生在一个分子的负电性 **SR** 单元和另一个分子的正电性聚精氨酸链之间。该化合物中，侧链上精氨酸残基数量的选择部分是基于已知结构模块 **(Arg)₈** (使人联想起 **HIV-1** 病毒的 48-60 肽片段) 可被细胞识别和内在化这一事实 (Suzuki 等, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 2437)。

该化合物可通过以下合成路线制备：





对于诊断应用，可将本发明的试剂制成适于胃肠道外给药的组合物。

本发明的诊断组合物可用于通过 CEST 方法测定诊断有益的化学-物理参数，如在人或动物组织或体内的温度、pH、代谢物浓度、 O_2 和 CO_2 分压以及酶活性。对此目的，优选的诊断组合物应当含有两个磁性不同的自由质子组，它们的转移效应对于所关心的化学-物理参数优选是不同的。这样，通过使用比例计量法(已描述于 WO 00/66180)，可独立于诊断组合物的局部浓度来测定诊断参数。

另一个优选的实施方式涉及使用该系统以获得内皮通透性的信息。对此目的,常规的诊断试剂(即作用于水质子 T_1 或 T_2 的试剂) (Min-Ying S.等, Magn. Res. Med. 1998, 39, 259-269)通常结合 DCE-MRI (DCE = 动态对比增强)技术一起使用。该方法包括给予不同大小的诊断剂(直接给予,或在与大分子如 HAS 相互作用之后)以评估毛细血管的通透性。毛细血管通透性的定量评估通过需要连续使用不同诊断剂的动力学研究来实现。然而,使用 CEST 方法,可以评估每一 SR 单元(或每一 SH 单元)的外渗,因为可以通过对诊断系统信号的选择性照射来“刺激”造影剂。在此基础上,可以使用能够区别性地移动底物 SH 的自由质子信号的不同大小的 SR 单元(例如,通过改变顺磁性金属)。对透过内皮的物质的鉴定使得可以在单次给予诊断剂后进行动态研究。

可选择地,通过使用同样的 SR 单元并调整反应底物的大小和类型以改变其自由质子的共振频率可达到同样的目的。通过使用具有不同大小的区室化系统可得到相似的结果,其中,透过内皮的诊断剂可以很容易地通过适当地配制所选系统(脂质体、纳米球等)中所包含的溶液来鉴定。

组合物优选含有摩尔浓度为约 0.001 至 1.0M 的与适当辅料相混合的本发明的加合物。

本发明的组合物可通过血管内(例如静脉内、动脉内或心室内途径)或通过胸膜内、腹膜内、淋巴内、腔内、口服或肠道途径给药。

优选的形式为即可使用的无菌水溶液或悬浮液,或用于在临使用前用无菌溶液重构的冻干物的形式。根据具体诊断要求,剂量可以在 0.01 至 0.5mmol/kg 体重之间。

以下实施例详细地描述了本发明。

实施例 1

pH 6.5, 312K, 7.05T, 照射时间 10s 条件下, 0.1mM 聚精氨酸(DP 227)溶液的 CEST 光谱。

该光谱(图 1)显示了自由水 NMR 信号的强度随照射频率的变化,以关于水的 ppm 表达。

可在偏离水 2ppm 和 4ppm 附近观察到两个 CEST 峰值, 显示分别由胍质子和聚合物的酰胺主链的照射所引起的饱和转移。

实施例 2

pH 7.2, 312K, 7.05T, 照射时间 10s 条件下, 0.1mM 聚精氨酸(DP 227)溶液的 CEST 光谱。

该光谱(图 2)显示了由 pH 增加引起的聚合物质子交换速率的增加导致了聚合物质子与自由水信号的结合。

实施例 3

pH 6.5, 312K, 7.05T, 照射时间 4s, 0.5mM 聚精氨酸(DP 227)溶液在 2.5mM [YbDOTP]⁴⁺存在下的 CEST 光谱。

该光谱(图 3)显示了 SR 单元对底物共振频率的影响。

实施例 4

pH 7.2, 312K, 7.05T, 照射时间 4s, 0.5mM 聚精氨酸(DP 227)溶液在 2.5mM [YbDOTP]⁴⁺存在下的 CEST 光谱。

该光谱(图 4)表明, 通过增加溶液的 pH 值, SR 单元效应允许通过偏离自由水 5-10ppm 区间的照射测量胍质子的饱和转移。

实施例 5

pH 6.5, 312K, 7.05T, 照射时间 4s, 0.25mM 聚精氨酸(DP 227)溶液在 3.5mM [DyDOTP]⁴⁺存在下的 CEST 光谱。

该光谱(图 5)显示, Dy (III)离子对胍自由质子共振的影响与使用 Yb(III)离子相比具有相反的数学信号。

实施例 6

pH 7.2, 312K, 7.05T, 照射时间 4s, 0.1mM 聚精氨酸(DP 227)溶液在 1.2mM

和 2.4mM [TmDOTP]⁴存在下的 CEST 光谱。

该光谱(图 6)显示该复合物对胍自由质子共振频率的显著影响, 照射可在 30-40ppm 区间进行(SR 为 2.4mM)。

实施例 7

pH 7.2, 312K, 7.05T, 偏离水照射频率 8400Hz, 照射时间 4s, 6.25 μM 聚精氨酸(DP 227)溶液的饱和转移(ST%)随[TmDOTP]⁴浓度的变化。

该图表明该体系具有很强的灵敏度, 可用于在 SR 单元浓度约为 40μM 时测量 5% 的 ST 效应。

实施例 8

312K, 7.05T, 偏离水照射频率 6000Hz, 照射时间 4s, 0.11mM 聚精氨酸(DP 270)和 2mM [TmDOTP]⁴的溶液的饱和转移(ST%)随 pH 的变化。

该效应在酸性 pH 下显著下降, 主要是由于胍质子交换速率下降。

实施例 9

人血清白蛋白(HSA)和[TmDOTP]⁴之间的相互作用(312K, pH 7.4)。

图 9 显示通过 1.3ppm 至 10ppm 区间照射 NMR 光谱频率进行测量的, 单独的 1mM HSA 溶液(□)和加入总量 3mM 的[TmDOTP]⁴之后(■)的饱和转移。观察到最大转移的频率, 可归于 Arg 蛋白残基胍质子的照射, 位移大约为 2ppm。

实施例 10

[TmDOTP]⁴和 Co(en)₃³⁺间的相互作用。

图 10 说明了 298K, pH 5.7, 7.05T, 偏离水照射频率 21,000 Hz, 照射时间 4s, CEST 效应(ST%)随 1: 1 [TmDOTP]⁴和 Co(en)₃³⁺溶液浓度的变化。该实验条件下, SR 单元浓度为 0.1mM 时可获得 5% CEST 效应。在生理温度和 pH 下, 由于伯胺质子的高交换速率导致最大效应只有 9%。

实施例 11

[TmDOTP]⁴⁺和 Cyclen 间的相互作用。

图 11 显示了 312K, pH 6, 7.05T, 偏离水照射频率 21,000 Hz, 照射时间 4s, CEST 效应(ST%)随 Cyclen 和[TmDOTP]⁴⁺的浓度比的变化, 其中[TmDOTP]⁴⁺的浓度为 4mM。在底物/SR 单元浓度比约为 3-4: 1 时可观察到最大效应。底物浓度较低时, 由于只有少量的质子被照射而使效应大幅下降, 而浓度较高时, 由于 Cyclen 游离部分的增加导致了自由质子信号向反磁性区域发生位移, 使效应大幅下降。

实施例 12

[TmDOTP]⁴⁺和 Cyclen 间的相互作用。

图 12 说明了 312K, pH 6, 7.05T, 偏离水照射频率 21,000 Hz, 照射时间 4s, 保持[Cyclen]/[TmDOTP]⁴⁺浓度比为 3: 1, CEST 效应(ST%)随[TmDOTP]⁴⁺浓度的变化。

该图显示了本系统具有很强的灵敏度, 可用于在 SR 单元浓度约为 60 μ M 时测量 5% ST 效应。

实施例 13

[TmDOTP]⁴⁺和 Cyclen 间的相互作用。

图 13 说明了 312K, 7.05T, 偏离水照射频率 21,000 Hz, 照射时间 4s, 3: 1 的 Cyclen (12mM)和[TmDOTP]⁴⁺ (4mM)溶液的 CEST 效应(ST%)随 pH 的变化。

转移效应反映胺质子交换速率与 pH 的相关性; 换言之, 当交换速率太慢 (pH<5)或当其太快、接近结合条件时(pH>7), 相关性下降。

实施例 14

图 14 中的直方图比较了 312K, pH 7.4, 7.05T, 照射时间 4s 条件下, 一系列的底物与 SR 单元[TmDOTP]⁴⁺相互作用的 ST%值。所有例子中的[TmDOTP]⁴⁺浓度为 4mM, 而底物浓度依据先前评估的最佳浓度比变化。Triaza = 1,4,7-三氮

杂环壬烷 10: 1; Hexaaza = 1,4,7,10,13,16-六氮杂环十八烷 2: 1; Cyclen 3:1; Cyclam 2: 1 和聚精氨酸 0.055 : 1.

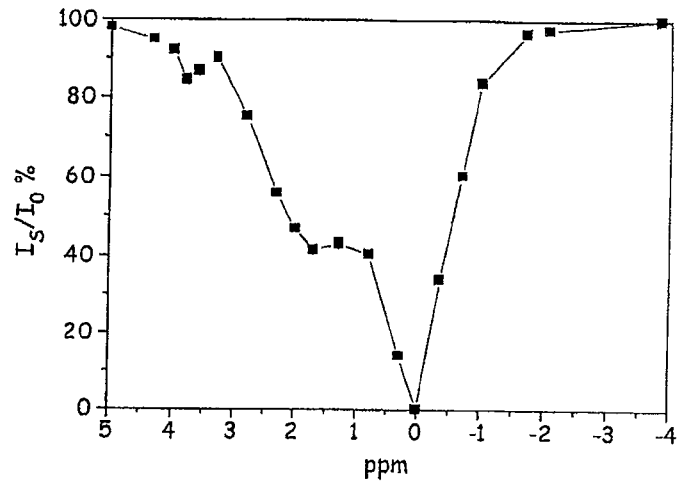


图 1

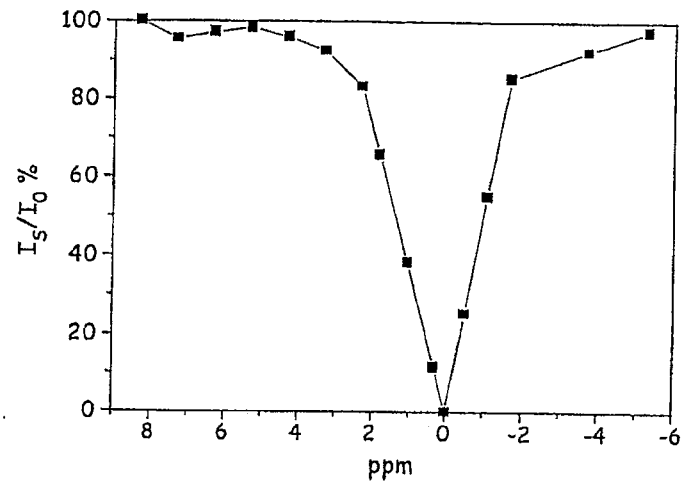


图 2

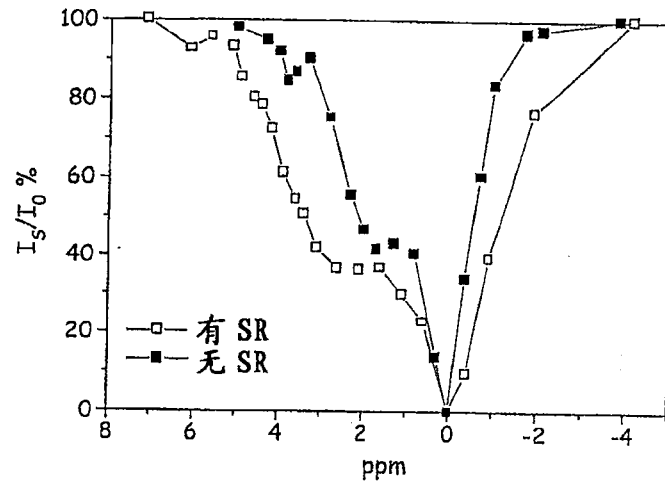


图 3

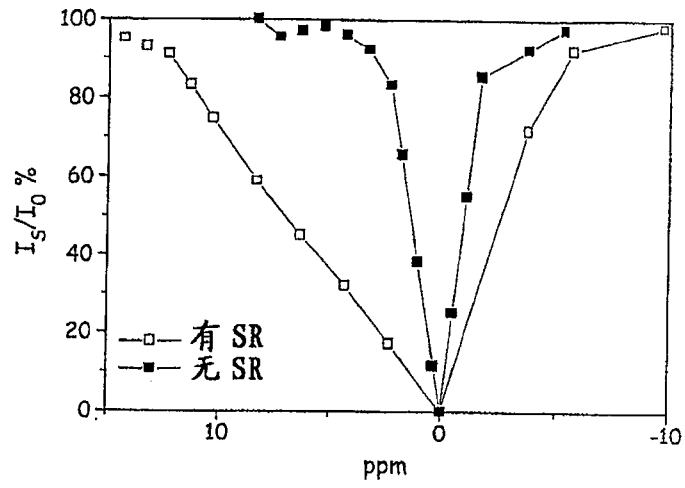


图 4

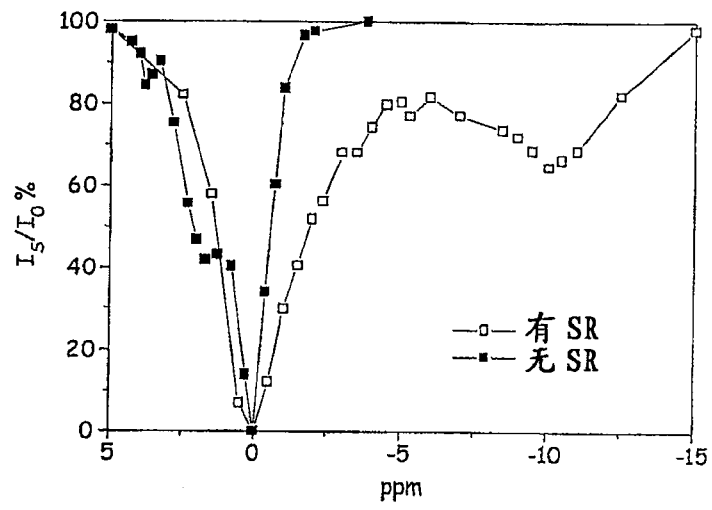


图 5

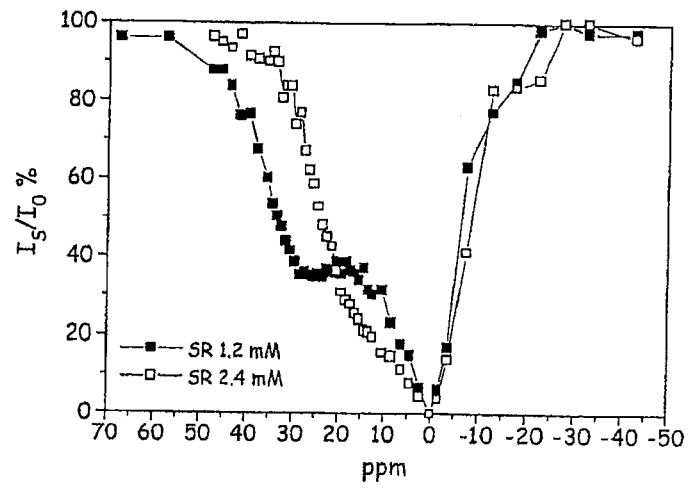


图 6

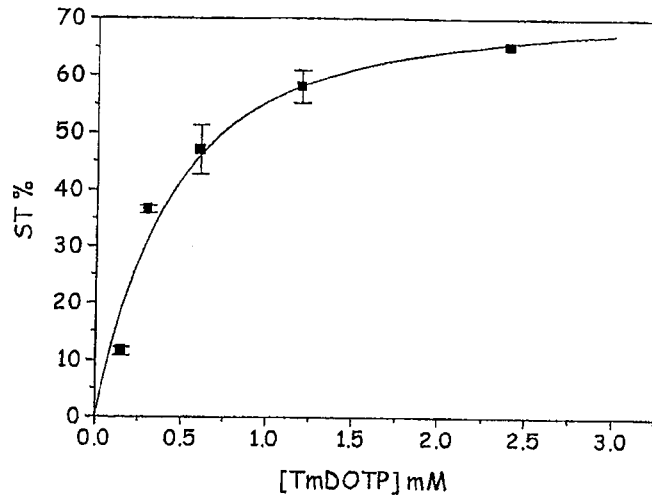


图 7

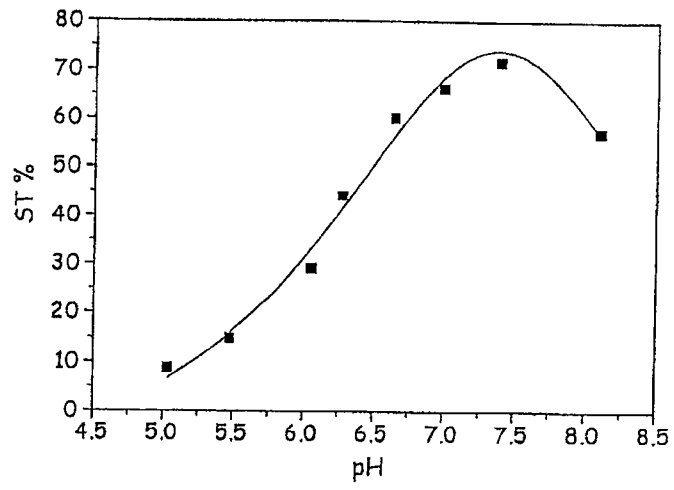


图 8

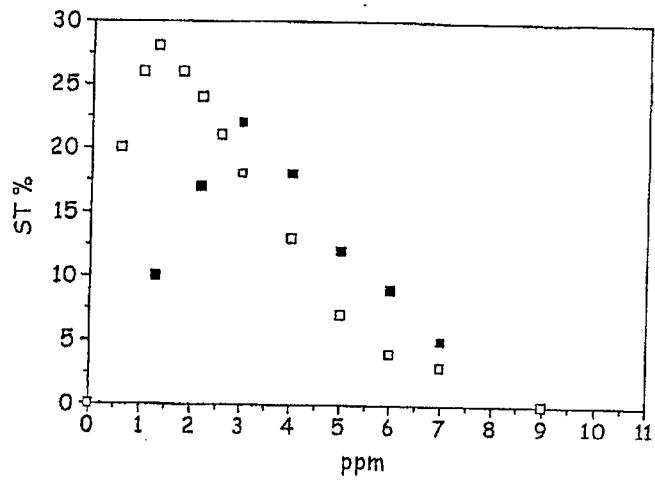


图 9

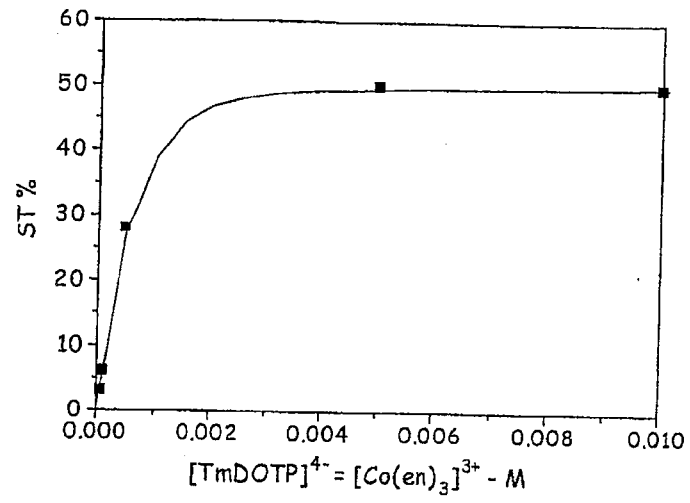


图 10

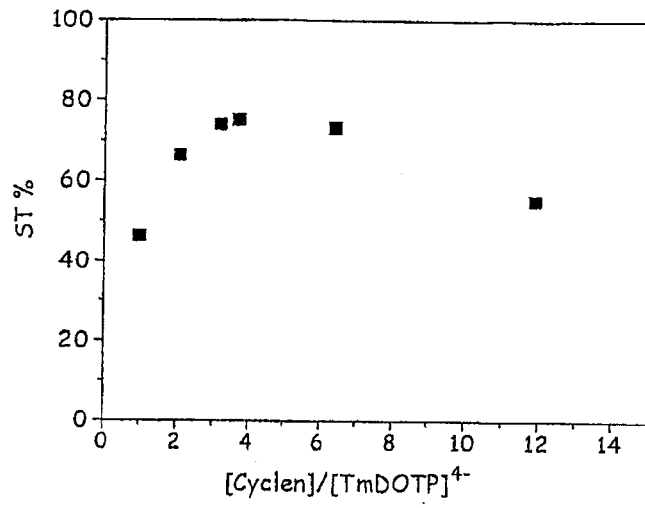


图 11

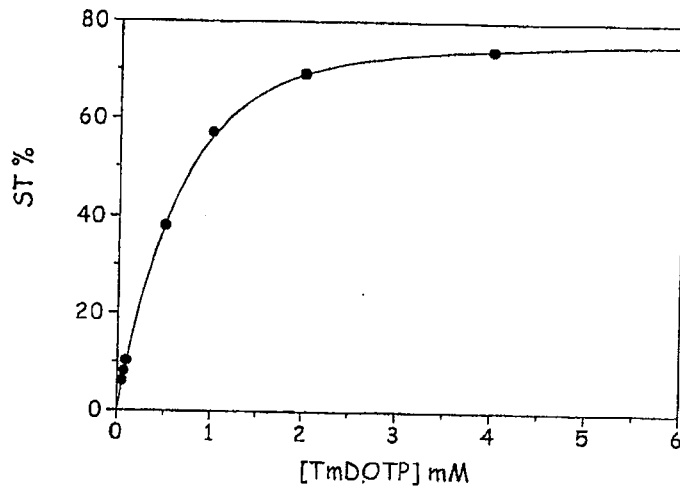


图 12

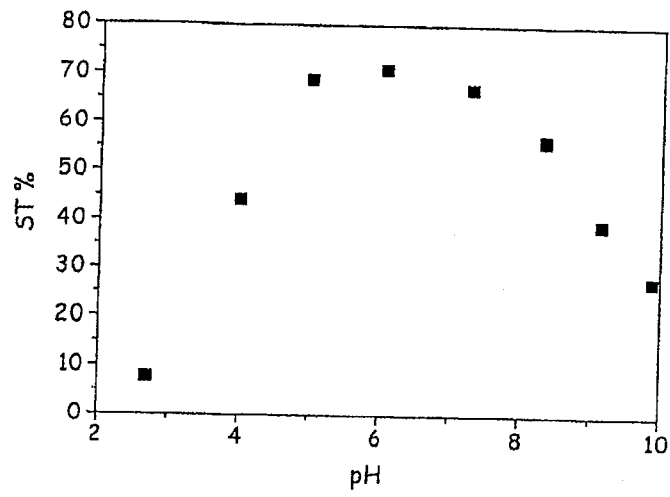


图 13

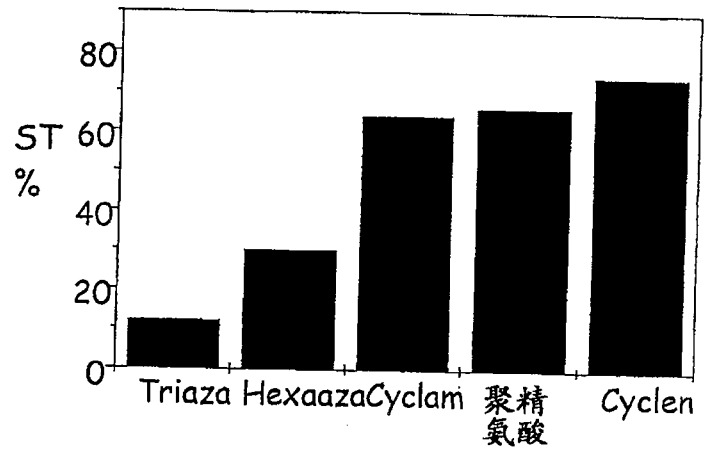


图 14