



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102123738 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 13

(21) 申请号 200980132466. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 08. 14

A61K 49/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

0814960. 1 2008. 08. 15 GB

61/089073 2008. 08. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/060571 2009. 08. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02010/018230 EN 2010. 02. 18

(71) 申请人 通用电气医疗集团股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 A · 丹尼卡斯 B · 吉尔贝尔

(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 林森

权利要求书 3 页 说明书 32 页

(54) 发明名称

用于检测发育异常的方法

(57) 摘要

本发明提供可用于在患 Barrett 食管的患者中测定发育异常部位的成像方法。该方法包括使用含载体的光学成像剂, 所述载体靶向 EGFR 的胞外区, 该载体对 EGFR 的选择性也超过 Her2。将载体用适合用绿色至近红外波长 500-1200nm 的光体内成像的光学报道分子标记。还提供适合用于该方法的新的光学成像剂。

1. 一种体内成像的方法,用于在患 Barrett 食管的患者中测定潜在发育异常的部位,所述方法包括:

(i) 提供含有靶向 EGFR 胞外区的载体的成像剂,所述载体用光学报道分子成像部分标记,该光学报道分子成像部分适合用波长 500-1200nm 的光使哺乳动物体内成像;

(ii) 用步骤 (i) 的成像剂在所述患者至少一段食管中实施光学成像;

(iii) 从步骤 (ii) 的成像中测定在患者食管的一个或多个位置上与背景相比成像剂的吸收是否增加;

(iv) 当步骤 (iii) 的测定显示至少一个此类位置吸收增加,则将该位置鉴定为潜在发育异常的部位。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述载体具有最高达 20kDa 的分子量。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的方法,其中所述载体包含 EGFR 胞外区的内源性配体,选自:

(i) 人 EGF (hEGF) 或其片段;

(ii) TGF- α 或其片段;

(iii) 双调蛋白。

4. 权利要求 1 或权利要求 2 的方法,其中所述载体包含 EGFR 胞外区的外源性配体,选自:

(i) 包含肽序列 CKSPEPQHC 的 9-20-mer 肽 (GE9);

(ii) 包含肽序列 LHLWPEPWTQT 的 2-20-mer 肽 (GE10);

(iii) 包含肽序列 YHWYGYTPQNVI 的 12-20-mer 肽 (GE11);

(iv) 包含肽序列 MLYNPPTYQMDVNPEGK 的 17-20-mer 肽 (Inherbin 1);

(v) 包含肽序列 LVYNKLTQLEPNPHTK 的 17-20-mer 肽 (Inherbin 3);

(vi) AffibodyTM;

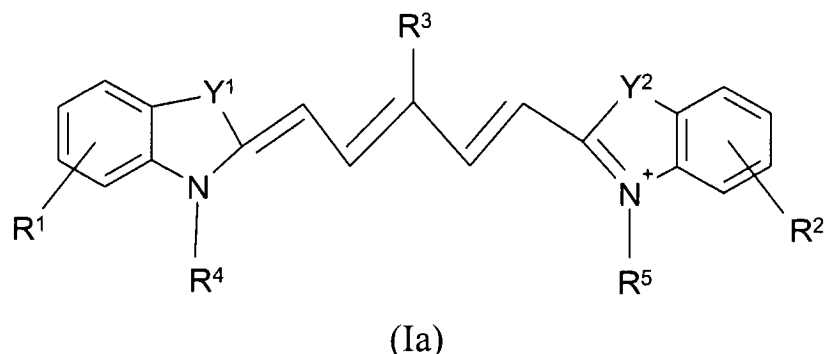
(vii) NanobodyTM;

(viii) 包含肽序列 LARLLT 的 6-15-mer 肽 (D4)。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述光学报道分子是荧光染料。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述染料是菁染料。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述菁染料具有式 Ia:



其中:

Y^1 和 Y^2 独立为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^6-$ 或 $-CR^7R^8-$, 且其选择使得 Y^1 和 Y^2 中至少一个是 $-CR^7R^8-$;

R^1 和 R^2 独立为 H 、 $-SO_3M^1$ 或 R^a , 其中 M^1 为 H 或 B^c , B^c 是生物相容性阳离子;

R^3 为 H、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 R^a 基团；

R^4 - R^6 独立为 C_{1-5} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 R^a ；

R^7 为 H 或 C_{1-3} 烷基；

R^8 为 R^a 或 C_{1-6} 羧基烷基；

R^a 为 C_{1-4} 磺基烷基；

条件是式 Ia 的菁染料包含至少一个 R^a 基团和总计 1-6 个来自 R^1 、 R^2 和 R^a 基团的磺酸取代基。

8. 权利要求 5 的方法，其中所述染料是苯并吡喃染料。

9. 权利要求 1-8 中任一项的方法，其中权利要求 1 步骤 (i) 的成像剂作为药用组合物提供。

10. 权利要求 1-9 中任一项的方法，其中所述成像用于区分：

(a) 无发育异常的 Barrett 食管；

(b) 发育异常；

(c) 癌。

11. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中权利要求 1 的方法还包括步骤：

(v) 在步骤 (iv) 的一个或多个潜在发育异常部位上进行活检。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法，其中所述成像用于指导递送局部治疗的部位。

13. 权利要求 1-12 中任一项的方法，其中所述成像用于监测治疗的功效。

14. 可用于权利要求 1-13 中任一项方法的成像剂，其中所述成像剂选自：

(i) 用权利要求 7 或权利要求 8 定义的光学报道分子标记的 hEGF 或其片段；

(ii) 用权利要求 7 或权利要求 8 定义的光学报道分子标记的 TGF- α 或其片段；

(iii) 用权利要求 1 或 5-8 中任一项定义的光学报道分子标记的双调蛋白；

(iv) 包含氨基酸序列 CKSPEPQHC 的 9-20-mer 肽 (GE9)，所述肽用权利要求 6-8 中任一项定义的光学报道分子标记；

(v) 包含氨基酸序列 LHLWVPEPWTQT (GE10) 或 YHWYGYTPQNV (GE11) 的 12-20-mer 肽，所述肽用权利要求 6-8 中任一项定义的光学报道分子标记；

(vi) 包含氨基酸序列 MLYNPTTYQMDVNPEGK 的 12-20-mer 肽 (Inherbin 1)，所述肽用权利要求 1 或 5-8 中任一项定义的光学报道分子标记；

(vii) 包含氨基酸序列 LVYNKLTFLQLEPNPHTK 的 12-20-mer 肽 (Inherbin 3)，所述肽用权利要求 1 或 5-8 中任一项定义的光学报道分子标记；

(viii) 用权利要求 7 或权利要求 8 定义的光学报道分子标记的权利要求 4 定义的 AffibodyTM；

(ix) 用权利要求 6-8 中任一项定义的光学报道分子标记的权利要求 4 定义的 NanobodyTM。

15. 权利要求 14 的成像剂，其中所述光学报道分子如权利要求 7 或权利要求 8 定义。

16. 一种药用组合物，所述药用组合物包含权利要求 14 或权利要求 15 的成像剂。

17. 一种药剂盒，所述药剂盒用于制备权利要求 16 的药用组合物。

18. 权利要求 1-8、14 或 15 中任一项定义的成像剂在权利要求 1-13 任一项方法中的用途。

19. 药剂盒在权利要求 1-13 任一项方法中,用于制备权利要求 1-8、14 或 15 中任一项定义的成像剂中的用途。

20. 权利要求 1-4 中任一项步骤 (i) 定义的载体在制备成像剂中的用途,所述成像剂用于权利要求 1-13 中任一项的方法。

用于检测发育异常的方法

发明领域

[0001] 本发明提供可用于在患 Barrett 食管的患者中测定发育异常部位的成像方法。该方法包括使用含载体的光学成像剂,所述载体靶向 EGFR 的胞外区,该载体对 EGFR 的选择性也超过 Her2。将载体用适合用绿色至近红外波长 500-1200nm 的光体内成像的光学报道分子标记。还提供适合用于该方法的新的光学成像剂。

[0002] 发明背景

[0003] 食管癌在所有报道的癌症病例中少于 5%,但在美国每年诊断约 30,000 新的此类病例,生存率低(见下文)。可将食管癌分为两种主要类型,鳞状细胞癌和腺癌,取决于恶性细胞的类型。Barrett 食管是恶变前状态,伴随食管癌特别是腺癌发病的危险增加 [Kiesslich et al, Clin. Gastroenterol. Hepatol., 4, 979-987 (2006)]。慢性反流增加 Barrett 食管的危险,因此已提出胃食管反流 (GERD) 是食管癌的危险因素。

[0004] 在美国和西欧食管的腺癌比鳞状细胞癌更普遍。食管癌可以是可治疗的疾病,但很少能治愈。总的 5 年生存率在 5%-30% 之间。早期诊断食管癌改善患者的生存率。主要治疗包括单独手术或化疗结合放疗。用于治疗食管癌的化疗包括 5- 氟尿嘧啶和顺铂。缺乏精确的手术前分期是主要的临床问题。

[0005] 在 Barrett 食管中低度发育异常(即异常组织生长)的存在是食管癌发病的危险因素,但目前监测依赖组织病理学 [Lim et al, Endoscopy, 39, 581-7 (2007)]。目前在 Barrett 食管诊断发育异常是通过每 1-2cm 进行随机四象限活检 (Seattle 方案),这耗费时间且价格昂贵 [DaCosta et al, Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 20(1), 41-57 (2006)]。在常规内窥镜检查过程中通常看不到 Barrett 食管的发育异常 [Endlicher et al, Gut, 48, 314-319 (2001)]。

[0006] US 6,035,229 (Washington 研究基金) 描述在导管末端利用照明和成像探针检测 Barrett 食管的系统。该文件未公开光学造影剂。

[0007] 已经在检测高度发育异常或恶性组织时用染料亚甲蓝,比较在体内 Barrett 食管组织的染色与在体外活检样品的染色 [Canto et al, Endoscopy, 33, 391-400 (2001)]。

[0008] Kiesslich et al [Clin. Gastroenterol. Hepatol., 4, 979-987 (2006)] 报道用共聚焦激光显微内窥镜,用荧光素帮助检测 Barrett 上皮和相关肿瘤。

[0009] WO 2005/058371 公开使食管癌和 Barrett 食管体内成像的光学成像造影剂。造影剂对异常表达于 Barrett 食管的生物靶标具有亲和力。WO 2005/058371 的造影剂优选具有式:

[0010] V-L-R

[0011] 其中:

[0012] V 是一种或多种对食管癌或 Barrett 食管中异常表达的靶标具有亲和力的载体部分;

[0013] L 是连接部分或键;和

[0014] R 是一种或多种在光学成像时可检测的报道分子部分。

[0015] 描述在 Barrett 食管、鳞状细胞癌或腺癌中过度表达或下调的多种靶标。靶标优选选自：-E- 钙粘蛋白、CD44、P62/c-myc (HGF 受体)、p53 和 EGFR/erbB-2 (权利要求 5)。载体 (V) 声称优选选自肽、拟肽部分、寡核苷酸、低聚糖、脂肪相关化合物和传统的有机药物样小分子。报道分子 (R) 优选与电磁波谱的紫外线至近红外部分波长区的光相互作用的染料。

[0016] 表皮生长因子 (EGF) 和 EGR 受体 (EGFR) 是配体 - 受体对。人表皮生长因子受体 (HER) 家族包括 4 种密切相关的 ErbB 受体酪氨酸激酶：

[0017] EGFR (也称为 ErbB-1 或 HER-1)；

[0018] ErbB-2 (也称为 HER-2 或 Neu)；

[0019] ErbB-3 (也称为 HER-3)；和

[0020] ErbB-4 (也称为 HER-4)。

[0021] EGFR 是位于细胞表面的 170kDa 蛋白质，由氨基端胞外配体结合区、单个疏水跨膜螺旋和胞内区组成，胞内区包含酪氨酸激酶区和含有关键性酪氨酸残基和受体调节基序的羧基端区。配体如 EGF 与胞外区的结合导致几种 C-端酪氨酸残基的受体二聚体化、激活和受体自磷酸化。这些磷酸化酪氨酸充当多种胞质信号转导分子的结合位点。在 EGFR 下游这些途径的激活引起细胞增殖、分化、移行 / 活动、粘附、防止凋亡、提高存活和基因转录。已知 EGFR 在许多上皮性肿瘤中异常激活 [Mendolsohn et al, Semin. Oncol., 33(4), 369-385 (2006)]。

[0022] Cai et al [Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 35, 186-208 (2008)] 已回顾根据 PET、SPECT、光学和 MRI 使人 EGF 受体 (EGFR, HER2, HER3 和 HER4) 多模式成像的方法。

[0023] Barrett 食管是以鳞状食管上皮代替柱状上皮 (化生) 为特征性疾病。一部分 Barrett 食管患者将发展为食管腺癌，在此过程中的关键步骤是发育异常的形成。因此诊断发育异常的患者接受可包括抗反流药物、内窥镜粘膜消融和手术切除的疗法，取决于疾病的严重程度 (图 1；摘自“Guidelines for the Diagnosis and Management of Barrett’s Columnar-lined Oesophagus (诊断和管理 Barrett 柱状线食管的指南)”，UK Society of Gastroenterology, 2005 年 8 月；www.bsg.org.uk)：

[0024] 图 1：提出管理 Barrett 患者的指南

[0025]

Barrett- 无发育异常	→ •症状控制/PPI •抗反流手术	→ 每2年内窥镜检查
不确定的 发育异常	→ 再评估 (内窥镜检查) → PPI	→ 6个月后内窥镜检查再分类
低度发育异常	→ 加强 PPI → 每6个月 内窥镜检查	复原: 按照 BO 管理 持续: •重复 PPI/内窥镜检查 •考虑内窥镜粘膜消融
高度发育异常	→ •手术切除 •内窥镜粘膜消融	→ 终生内窥镜检查(每6个月)
癌	→ 手术切除 +/-化疗	→ 姑息关怀

[0026] 其中 PPI = 质子泵抑制剂。

[0027] 对受治疗患者间隔 6 个月随访以评估对治疗的反应。将反应者（即其中证据表明治疗有效的患者）作为低危患者治疗，而持续 / 附加治疗用于无反应者。

[0028] Curvers et al [Gastroenterol., 134, 670-679 (2008)] 在 Barrett 食管中比较各种诊断性成像技术：放大白光内窥镜检查 (WLE)；窄带成像 (NBI)；靛胭脂色素内窥镜检查 (ICC) 和乙酸色素内窥镜检查 (AAC)。他们推断尽管一些技术可改善图像质量，但它们没有改善观察者区分发育异常区域与无发育异常区域的能力。因此，对于 Barrett 食管患者群是否存在食管腺癌发病的危险，特别是从正常组织中识别发育异常的位置，需要更可靠的早期诊断。

[0029] 本发明

[0030] 本发明提供可用于在患 Barrett 食管的患者中确定发育异常部位的成像方法。该方法包括使用含有靶向 EGFR 胞外区的载体的光学成像剂。所述载体用光学报道分子标记，该光学报道分子适合用绿色至近红外波长 500-1200nm 的光体内成像。

[0031] 本发明显示 EGFR 表达在 Barrett 食管患者的发育异常部位明显上调。发现表达的程度与发育异常的程度相关。因此，本发明的成像方法可用于指导活检（即从发育异常部位获得组织样品以体外建立，无论异常是良性或癌性）。还可用于帮助患者诊断和分层，指导和 / 或监测治疗（如组织消融）。本发明促进在疾病的早期阶段诊断“处于危险的”患者，因此允许早期临床干预以便在适当时开始治疗。

[0032] 还提供适合用于该方法的新的光学成像剂。与胞内的 EGFR 相反，靶向胞外具有成像剂不需要跨过细胞膜的优点，以致到达所需靶标不受跨过细胞膜的转运过程和成像剂渗透性的支配。优选光学成像，有两个原因：

[0033] (i) 符合现有的诊断程序；

[0034] (ii) 使患者最小程度地暴露于放射线。

[0035] 发明详述

[0036] 第一方面，本发明提供体内成像的方法，用于在患 Barrett 食管的患者中测定潜在发育异常的部位，所述方法包括：

[0037] (i) 提供含有靶向 EGFR 胞外区的载体的成像剂,所述载体用光学报道分子成像部分标记,该光学报道分子成像部分适合用波长 500-1200nm 光使哺乳动物体内成像;

[0038] (ii) 用步骤 (i) 的成像剂在所述患者至少一段食管中实施光学成像;

[0039] (iii) 从步骤 (ii) 的图像中测定在患者食管的一个或多个位置上与背景相比成像剂的吸收是否增加;

[0040] (iv) 当步骤 (iii) 的测定显示至少一个此类位置吸收增加,将该位置确定为潜在发育异常的部位。

[0041] 用术语“测定”指鉴定与成像剂的食管组织背景相比吸收增加部位的位置和程度。

[0042] 用术语“患者”指活的哺乳动物,优选人受试者。

[0043] 用术语“患 Barrett 食管”指已被诊断或怀疑患 Barrett 食管的患者。将用一线内窥镜检查根据临床症状加典型的认证进行诊断。此类一线内窥镜检查目前用白光进行,为了随机收集,四个象限活检。对这些活检进行组织学评估确认疾病的程度。

[0044] 用术语“成像剂”指适合在人体体内成像的化合物。成像可以是侵入性(如术中或内窥镜检查)或非侵入性。优选的成像方法是内窥镜检查,因为那允许用光照射食管表面,在不干预组织而减弱由组织发出的光的情况下检测任何荧光,因此也不需要手术干预以促进成像。因此,成像优选在最小干预的情况下在体内在患者的完整机体上进行。

[0045] 术语“发育异常”具有其常规含义,即异常组织生长。此类生长可能是良性、癌前或癌性。本发明的方法优选用于癌前期,即用于以前尚未诊断食管腺癌的患者。短语“潜在发育异常”指单独用成像检测的可疑异常-实际发育异常将通常用组织取样(如通过活检)和体外详细测试组织样品证实。因此本发明的成像剂和方法帮助诊断。

[0046] 术语“载体”具有其在体内诊断成像领域的常规含义,即靶向具体生物学位点如受体或酶的化合物。

[0047] 用术语“靶向 EGFR 胞外区”指与背景组织及其它潜在靶标或结合伴侣相比,载体对 EGFR 具有显著更高的亲和力。载体能够与靶标高亲和力(K_i 值在 0-50nM 范围,优选 1-20nM,最优选小于 10nM)结合。载体对 EGFR 的胞外区还具有特异性,所以对 EGFR 的跨膜或胞内区亲和力小或无亲和力。EGFR 优选人 EGFR。

[0048] 用术语“用 --- 标记”指载体的官能团与光学报道分子轭合。优选通过共价化学键轭合。

[0049] 用术语“光学报道分子成像部分”指能够用绿色至近红外波长(500-1200nm,优选 600-1000nm)的光在光学成像程序中直接或间接检测的荧光染料或发色团。优选报道分子具有荧光性质,更优选荧光染料。因为光学报道分子必须适合在哺乳动物体内成像,所以它还必须可生物相容。用术语“可生物相容”指非毒性,从而适合给予哺乳动物体,特别是人体,并且给药后无不良反应或疼痛或不适。

[0050] 光学报道分子是能够在光学成像程序中直接或间接检测的任何部分。报道分子可能是光散射体(如有色或无色颗粒)、光吸收体或光发射体。更优选报道分子是染料如发色团或荧光化合物。染料可以是与紫外光至近红外波长电磁波谱中的光相互作用的任何染料。最优选报道分子具有荧光性质。

[0051] 光学报道分子可任选通过连接基团(L)与载体轭合,其中 L 是式 $-(A)_m-$ 的合成连接基团:

[0052] 其中各 A 独立为 $-\text{CR}_2-$ 、 $-\text{CR}=\text{CR}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CR}_2\text{CO}_2-$ 、 $-\text{CO}_2\text{CR}_2-$ 、 $-\text{NRCO}-$ 、 $-\text{CONR}-$ 、 $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$ 、 $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}-$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}-$ 、 $-\text{NRSO}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{OCR}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{SCR}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2-$ 、 C_{4-8} 环杂亚烷基、 C_{4-8} 亚环烷基、 C_{5-12} 亚芳基或 C_{3-12} 杂亚芳基、氨基酸、糖或单分散性聚乙二醇 (PEG) 构建单元；

[0053] 各 R 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；

[0054] m 是整数值 1-20；

[0055] 光学成像模式和测量技术包括但不限于：冷光成像；内窥镜检查；荧光内窥镜检查；光学相干断层摄影；透射成像；时间分辨的透射成像；共焦成像；非线性显微镜检查；光声成像；声光成像；光谱学；反射光谱学；干涉测量；相干干涉测量；扩散光学断层摄影和荧光介导的扩散光学断层摄影（连续波，时域和频域系统），和测量光散射、吸收、偏振、冷光、荧光寿命、量子收率和淬灭。

[0056] 步骤 (i) 的成像剂可通过患者给药的常规途径递送，如静脉内或口服，如本领域已知。本领域已知配制药物以更有效地递送至食管的方法 [Batchelor, Pharmaceut. Res., 22(2), 175-181 (2005) 和 Collaud et al, J. Control. Rel., 123, 203-210 (2007)]，因此本发明步骤 (i) 的成像剂可任选通过此类制剂递送。

[0057] 载体可包含 EGFR 胞外区的内源性或外源性配体，优选合成的。

[0058] 优选方面

[0059] 成像剂的分子量优选最高达 20,000 道尔顿 (20kDa)，更优选最高达 15kDa，最优选最高达 12kDa，理想的是最高达 6kDa。较大的分子如抗体具有明显较高的分子量（完整抗体为约 150kDa；FAb 片段为约 60kDa；scFv 片段为约 30kDa）。此类物质的药代动力学据信较不适合成像，因为清除慢和组织渗透差。

[0060] 载体优选对 EGFR 的选择性超过 Her2。术语“对 EGFR 的选择性超过 Her2”指载体与 EGFR 的结合亲和力比 Her2 大一定系数，允许在内镜检查过程中使 EGFR 选择性成像。

[0061] 包含 EGFR 胞外区的内源性配体的载体优选选自：

[0062] (i) 人 EGF (hEGF) 或其片段；

[0063] (ii) TGF- α 或其片段；

[0064] (iii) 双调蛋白。

[0065] EGF 是以 $K_D \sim 1\text{nM}$ 与 EGFR 胞外区结合的 6kDa 蛋白质。重组人 EGF 市售购自 Sigma Chemical Company。EGF 具有几个适合与光学报道分子耦合的胺位点。因此，当标记 EGF 时，标记位点并非靶向特异性，可出现在不同位置。hEGF 包含 2 个赖氨酸、5 个谷氨酸和 7 个天冬氨酸残基。因此光学报道分子可与 2 个赖氨酸残基的氨基或在 N-端耦合。可用光学报道分子标记 EGF，如由 Ke et al 对菁染料 Cy5.5 的描述 [Cancer Res., 63, 7870-7875 (2003)]，或者 Adams et al 对菁染料 Cy5.5 和 IRDye® 800CW-NHS 的描述 [J. Biomed. Opt., 12(2) 024017 (2007)]。EGF 已被描述具有强烈的促有丝分裂和促血管生成活性，因此是本发明的次优选载体。与 EGFR 胞外区结合的 10-15-mer EGF 片段如 EGF₂₁₋₃₁ [Lutsenko, New Res. Biotechnol. Med., 211-220 (2006)] 也在本发明范围内。

[0066] TGF- α 是与 EGFR 高亲和力 ($K_D \sim 1\text{nM}$) 结合的 50 氨基酸肽（分子量 5.5kDa）。与 EGFR 胞外区结合的 10-15-mer TGF- α 片段如 TGF₂₂₋₃₁ 也在本发明范围内。重组人 TGF- α 市售购自 Sigma Chemical Company。优选光学报道分子在 N-端，或在 4-Lys 残基的氨基

标记 TGF- α 。

[0067] 双调蛋白 (AR; 也称为角化细胞自分泌因子) 是 EGFR 选择性内源性配体 (HER1)。天然 AR 蛋白包含 78 或 84 个氨基酸残基, N- 和 O- 联低聚糖都有。AR 的 C- 端延伸形式, 具有亮氨酸-86 残基代替蛋氨酸, 称为 AR₁₋₉₀(leu86) (分子量约 9.4kDa) 与天然 AR₁₋₈₄ 相比对 EGFR 具有提高的结合亲和力。[Adam et al., Biochim. Biophys. Acta, 1266, 83-90 (1995)]。

[0068] AR 的 98 个氨基酸残基 (长形) 市售购自 R&D Systems。本发明的优选 AR 是 AR₁₋₉₀(leu86)。

[0069] 包含 EGFR 胞外区外源性配体的载体优选选自:

[0070] (i) 包含肽序列 CKSPEPQHC 的 9-20-mer 肽 (GE9);

[0071] (ii) 包含肽序列 LHLWVPEPWTQT 的 12-20-mer 肽 (GE 10);

[0072] (iii) 包含肽序列 YHWYGYTPQNVI 的 12-20-mer 肽 (GE 11);

[0073] (iv) 包含肽序列 MLYNPTTYQMDVNPEGK 的 17-20-mer 肽 (Inherbin 1);

[0074] (v) 包含肽序列 LVYNKLTFQLEPNPHTK 的 17-20-mer 肽 (Inherbin 3);

[0075] (vi) AffibodyTM;

[0076] (vii) NanobodyTM;

[0077] (viii) 包含肽序列 LARLLT 的 6-15-mer 肽 (D4)。

[0078] 本发明的肽可通过常规固相肽合成获得, 如描述于 P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (合成肽和蛋白质的化学方法), CRC Press, 1997。GE9 优选环化 (通过 2 个半胱氨酸残基), 因为预期环状形式表现的稳定性比开链形式增加。对于 GE9, 光学报道分子可通过连接基团连接至 C- 端或 N- 端。肽 GE11 由 Li et al 描述 [FASEB J., 19, 1978-1985 (2005)]。对于 GE11, 适合光学报道分子耦合的位点是肽的 N- 端的胺基 (如由 Li et al 关于异硫氰酸荧光素的描述)。光学报道分子还可能与 GE11 的 C- 端或者连接于 GE11 的 C- 端或 N- 端的连接体耦合。但是, 还可能包括 12-20mer 肽另外的赖氨酸或半胱氨酸残基, 或者连接基团, 和光学报道分子与赖氨酸残基的氨基丁基侧链, 或者半胱氨酸残基的巯基侧链耦合。标记肽 GE9 或 GE10 的优选位点是 N- 端或赖氨酸残基, 如关于 GE11 的描述。

[0079] 肽 Inherbin 1 和 Inherbin 3 描述于 WO 2007/115571 (Enkam Pharmaceuticals A/S)。用光学报道分子标记 Inherbin 1 和 Inherbin 3 的优选位点是 N- 端、赖氨酸残基或半胱氨酸残基, 如关于 GE11 的描述。

[0080] 外源性配体的肽 (i)-(v) 的其余氨基酸残基可由任何氨基酸组成。用术语“氨基酸”指 L- 或 D- 氨基酸、氨基酸类似物 (如萘基丙氨酸) 或氨基酸拟似物, 其可以天然存在或者纯合来源, 可以为旋光纯, 即单一对映体从而具有手性, 或者对映体混合物。在本文对于氨基酸使用常规 3- 字母或单字母缩写。优选本发明的氨基酸旋光纯。用术语“氨基酸拟似物”指天然存在的氨基酸的合成类似物, 为等排体, 即已被设计模拟天然化合物的立体和电子结构。本领域技术人员熟知此类等排体, 包括但不限于缩肽类、retro-inverso 肽、硫代酰胺、环烷烃或 1,5- 二取代的四唑 [见 M. Goodman, Biopolymers, 24, 137, (1985)]。

[0081] 用术语“肽”指包含两个或多个氨基酸的化合物, 如上文定义, 通过肽键 (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。术语“肽拟似物”或“拟似物”指

模拟肽或蛋白质的生物活性但不再具备肽的化学性质、即它们不再包含任何肽键（即氨基酸之间的酰胺键）的生物活性化合物。这里，术语肽拟似物使用更广泛的意义，包括完全不再具备肽性质的分子，如假肽、半肽和类肽。

[0082] Affibody™ 分子以 58 个氨基酸残基区为基础，该残基区来自葡萄球菌蛋白 A 其中一个 IgG- 结合区。可使用单体或二聚体形式的 Affibodies，如由 Nygren [FEBS J., 275, 2668-2676 (2008)] 和 Nilsson et al [Curr. Opin. Drug. Disc. Dev., 10, 167-175 (2007)] 综述。Friedman et al 已报道与 EGFR 胞外区特异性结合的 Affibody 二聚体分子 ($Z_{\text{EGFR:955}}$)₂ [Protein Eng. Des. Select., 20 (4), 189-199 (2007)]。Friedman et al 还描述与 EGFR 胞外区选择性结合的 3 种选择的单体 affibodies, $Z_{\text{EGFR:942}}$ 、 $Z_{\text{EGFR:948}}$ 和 $Z_{\text{EGFR:955}}$ 。关于染料标记和放射性碘化的 ($Z_{\text{EGFR:955}}$)₂ 的更多研究由 Nordberg et al 报道 [Nucl. Med. Biol., 34, 609-618 (2007)]。Nordberg et al 推断 affibody 分子 ($Z_{\text{EGFR:955}}$)₂ 应考虑用于 EGFR- 基放射性核素成像。具备改善的 EGFR 结合亲和力（提高约 20 倍；Biacore 分析 K_D 5.3nM）的第二代 affibody 单体 $Z_{\text{EGFR:1907}}$ 已由 Orlova et al 报道 [Cancer Biother. Biopharm., 22 (5), 573-584 (2007) ; J. Lab. Comp. Radiopharm., 50 (Suppl. 1) :S70 (2007)]。

[0083] 与大 10-20 倍（~ 150kDa）的抗体相比，这些 Affibodies 相对小的尺寸应允许更好的靶组织渗透和血液清除。Affibodies 还具有它们在一定范围（pH 5.5-11）的 pH 条件下稳定的优点。优选马来酰亚胺官能化报道分子在 C- 端半胱氨酸残基通过轭合 [如上文 Friedman et al 关于 ($Z_{\text{EGFR:955}}$)₂ 的描述]，或者通过与报道分子的共价酰胺键，用光学报道分子标记 affibodies。本发明的优选 affibodies 是单体或二聚体形式的 $Z_{\text{EGFR:942}}$ 、 $Z_{\text{EGFR:948}}$ 、 $Z_{\text{EGFR:955}}$ 和 $Z_{\text{EGFR:1907}}$ ，特别是 $Z_{\text{EGFR:1907}}$ 。

[0084] Camelids 生产没有轻链的功能性抗体，其中单个 N- 端区完全能够抗原结合。这些单区抗体片段 (VHHs 或 nanobodies) 对生物技术应用有以下几方面优点。Nanobodies 已由 Muyldermans 综述 [J. Biotechnol., 74, 277-302 (2001)]。最近它们的生产和应用已由 Harmsen et al 综述 [App. Microbiol. Biotechnol., 77, 13-22 (2007)]。对胞外 EGFR 具有特异性的 Nanobodies 已由 Gainkam et al [J. Nucl. Med., 49, 788-795 (2008)]、Huang et al [Mol. Imaging Biol., 10, 167-175 (2008)] 和 Roovers et al [Cancer Immunol. Immunother., 56, 303-317 (2007)] 描述。Gainkam et al 推断 ^{99m}Tc- 标记的 7C12 是有希望的肿瘤成像剂。用于本发明的优选 nanobodies 是称为 7C12、7D12 和 8B6 的那些。

[0085] D4 肽由 Song 描述 [FASEB J., 23 (5), 1396-1404 (2009) 和 W02009/059450]。

[0086] 本发明的更优选载体选自：TGF- α ，对 EGFR 具有特异性的 Affibodies，和肽 GE9，GE10，GE11，D4，Inherbin 1 和 Inherbin 3。本发明的最优选载体选自：Affibodies，肽 GE9，GE10 或 GE11 和 Inherbin 1 或 Inherbin 3。

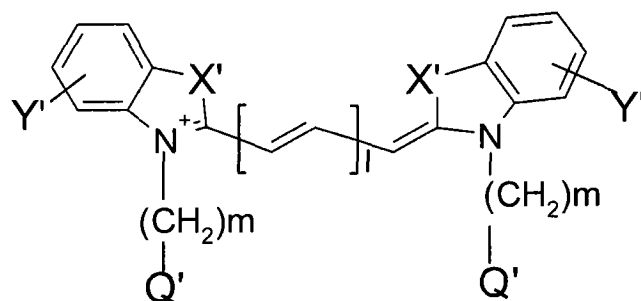
[0087] 优选的有机发色和荧光报道分子包括具有广泛离域电子系统的报道分子，如菁、吩菁、吲哚菁、酞菁、萘酞菁、三苯基次甲基、卟啉、吡喃鎓 (pyrilium) 染料、噻喃鎓 (thiapyriliup) 染料、方酸盐 (squarylium) 染料、克酮酸盐 (croconium) 染料、甘菊环鎓 (azulenium) 染料、吲哚苯胺、苯并吩噻嗪鎓染料、苯并噻吩并噻嗪鎓染料、蒽醌、萘醌、阴丹士林染料、邻苯二甲酰吡啶酮、三苯酚合苯醌 (trisphenoquinones)、偶氮染料、分子内和分子间电荷转移染料和染料络合物、2,4,6- 环庚三烯 -1- 酮、四嗪、双（二硫杂环戊烯 (dithiolene)）络合物、双（苯 - 二硫醇根合）(bis (benzene-dithiolate)) 络合物、吲哚苯

胺染料、双(S, O-二硫杂环戊烯)络合物。也可用荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP)和具有不同吸收/发射性质的GFP变体。某些稀土金属(如铈、钐、铽或镱)的络合物用于某些上下文中,作为荧光纳米晶体(量子点)。优选本发明的光学报道分子不包含金属络合物,优选合成的有机染料。

[0088] 可使用的发色团的具体实例包括:荧光素、磺酰罗丹明 101(Texas 红)、罗丹明 B、罗丹明 6G、罗丹明 19、吡啶菁绿、菁染料 Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Marina 蓝、Pacific 蓝、Oregon 绿 88、Oregon 绿 514、四甲基罗丹明和 Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700 和 Alexa Fluor 750。

[0089] 成像部分优选光学报道分子,更优选荧光绿色至近红外染料。此类 NIR 染料适合在绿色至近红外波长 500-1200nm 具有其吸收最大值。NIR 染料优选菁染料或苯并吡喃鎓染料。优选的荧光团菁染料具有式 I:

[0090]



(I)

[0091] 其中:

[0092] 各 X' 独立选自: $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-$ 或 $-\text{C}[(\text{CH}_2)_a\text{CH}_3][(\text{CH}_2)_b\text{M}^1]-$, 其中 a 是整数 0-5, b 是整数 1-5, M 是基团 G 或选自 SO_3M^1 或 H;

[0093] 各 Y' 独立代表 1-4 个选自下列基团的基团: H、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_3\text{M}^1$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOM}^1$ 、 $-\text{NCS}$ 、F 和基团 G, 其中 Y' 基团位于芳环的任何位置上;

[0094] Q' 独立选自: H、 SO_3M^1 、 NH_2 、 COOM^1 、铵、酯基、苄基和基团 G;

[0095] M¹ 为 H 或 B^c; 其中 B^c 是生物相容性阳离子;

[0096] l 是整数 1-3;

[0097] m 是整数 1-5;

[0098] 其中 X'、Y' 和 Q' 中至少一个包含基团 G;

[0099] G 是适合与载体连接的反应性基团或官能团。

[0100] 用术语“生物相容性阳离子”(B^c) 指与离子化、带负电荷的基团形成盐的带正电荷的反离子, 其中所述带正电荷的反离子也无毒性, 因此适合给予哺乳动物体, 特别是人体。合适的生物相容性阳离子实例包括: 碱金属钠或钾; 碱土金属钙和镁; 和铵离子。优选生物相容性阳离子是钠和钾, 最优选钠。

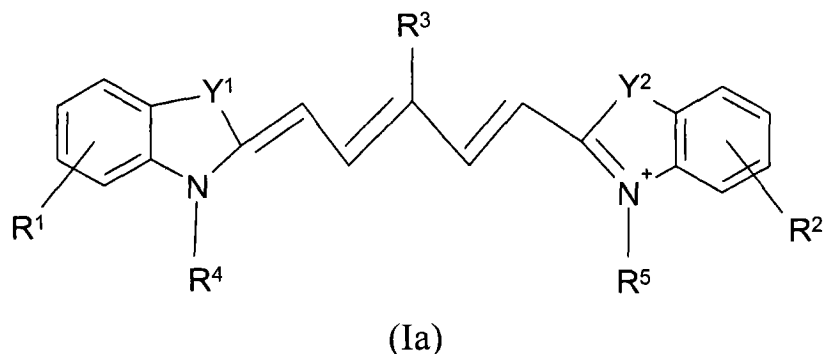
[0101] G 基团与载体的补充基团反应, 在菁染料荧光团与载体之间形成共价连接。G 可以是可与肽的补充官能团反应的反应基团, 或者可包括可与载体的反应基团反应的官能团。反应性基团和官能团的实例包括: 活性酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、卤代乙酰胺、酰卤、酰

肼、乙烯砜、二氯三嗪、氨基亚磷酸酯 (phosphoramidite)、羟基、氨基、巯基、羰基、羧酸和硫代磷酸酯。优选 G 是活性酯。

[0102] 用术语“活化的酯”或“活性酯”指相关羧酸的酯衍生物,设计为更好的离去基团,因此允许与亲核基团如胺更容易反应。合适的活性酯实例是:N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、磺基-琥珀酰亚胺酯、五氟苯酚、五氟苯硫酚、对硝基酚、羟基苯并三唑和 PyBOP (即苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷-1-基磷鎓六氟磷酸盐)。优选活性酯是 N- 羟基琥珀酰亚胺或五氟苯酚酯,特别是 N- 羟基琥珀酰亚胺酯。

[0103] 更优选式 Ia 的菁染料:

[0104]



[0105] 其中:

[0106] Y^1 和 Y^2 独立为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^6-$ 或 $-CR^7R^8-$, 且其选择使得 Y^1 和 Y^2 中至少一个是 $-CR^7R^8-$;

[0107] R^1 和 R^2 独立为 H 、 $-SO_3M^1$ 或 R^a ;

[0108] R^3 为 H 、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 R^a 基团;

[0109] R^4-R^6 独立为 C_{1-5} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 R^a ;

[0110] R^7 为 H 或 C_{1-3} 烷基;

[0111] R^8 为 R^a 或 C_{1-6} 羧基烷基;

[0112] R^a 为 C_{1-4} 磺基烷基;

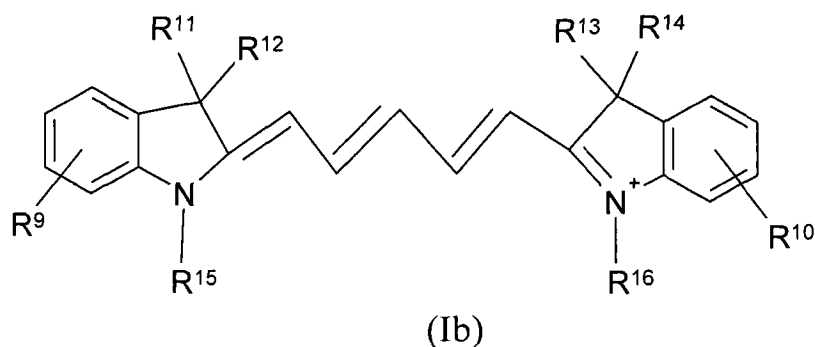
[0113] 其中 M^1 如在式 I 中定义;

[0114] 条件是式 Ia 的菁染料包含至少一个 R^a 基团,总计 1-6 个来自 R^1 、 R^2 和 R^a 基团的磺酸取代基。

[0115] 用术语“磺酸取代基”指式 $-SO_3M^1$ 的取代基,其中 M^1 如上文定义。优选的式 Ia 染料具有 3-6 个磺酸取代基。 $-SO_3M^1$ 取代基与碳原子共价结合,碳原子可以是芳基 (如 R^1 或 R^2 基团),或烷基 (即 R^a 基团)。在式 Ia 中, R^a 基团优选式 $-(CH_2)_kSO_3M^1$,其中 M^1 如上文定义, k 是整数值 1-4。 k 优选 3 或 4。

[0116] 特别优选式 Ib 的菁染料:

[0117]



[0118] 其中：

[0119] R^9 和 R^{10} 独立为 H 或 SO_3M^1 , R^9 和 R^{10} 中至少一个是 SO_3M^1 ；

[0120] R^{11} 和 R^{12} 独立为 C_{1-4} 烷基或 C_{1-6} 羧基烷基；

[0121] R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 和 R^{16} 独立为 R^b 基团；

[0122] 其中 R^b 为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 $-(CH_2)_qSO_3M^1$, 其中 q 是整数 3 或 4；

[0123] 其中 M^1 如式 I 和 Ia 的定义；

[0124] 条件是菁染料在 R^9 、 R^{10} 和 R^b 基团中具有总计 1-4 个 SO_3M^1 取代基。

[0125] 选择优选的式 Ib 菁染料使得存在至少一个 C_{1-6} 羧基烷基, 以促进与载体轭合。

[0126] 优选的各式 Ib 菁染料概括于表 1：

[0127] 表 1：各菁染料的化学结构。

[0128]

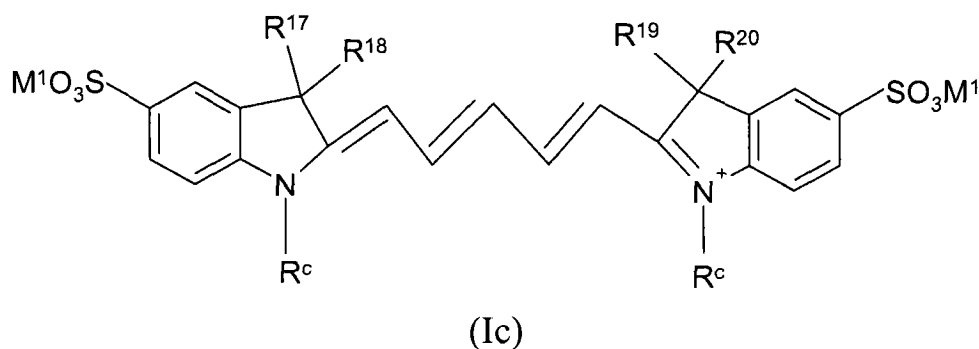
表 1	染料名称			
	Cy5(1)	Cy5(2)	Cy5**	Alexa647
R^9	H	SO_3H	SO_3H	SO_3H
R^{10}	SO_3H	SO_3H	SO_3H	SO_3H
R^{11}	CH_3	CH_3	CH_3	R^f
R^{12}	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
R^{13}	CH_3	CH_3	CH_3	CH_3
R^{14}	CH_3	CH_3	$-(CH_2)_4SO_3H$	CH_3
R^{15}	R^f	R^f	R^f	$-(CH_2)_3SO_3H$
R^{16}	CH_3	Et	$-(CH_2)_4SO_3H$	$-(CH_2)_3SO_3H$

[0129]

[0130] 其中 $R^f = -(CH_2)_5COOH$ 。

[0131] 特别优选式 Ic 的菁染料：

[0132]



[0133] 其中：

[0134] R^c 独立为 R^a 基团或 C_{1-6} 羧基烷基；

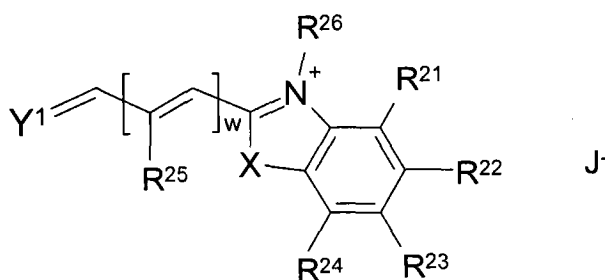
[0135] R^{17} – R^{20} 独立为 C_{1-5} 烷基或 R^c 基团，且其选择使得 $R^{17} = R^{18} = R^c$ 或 $R^{19} = R^{20} = R^d$ ，其中 R^d 为 C_{1-2} 烷基；

[0136] R^a 和 M^1 如上文式 I 的定义。

[0137] 特别优选的式 Ib 和 Ic 菁染料为 Cy5^{**} 和 Alexa647，理想的为 Cy5^{**}。

[0138] 术语“苯并吡喃^鎓染料”具有其常规含义。本发明合适的苯并吡喃^鎓染料用 Bzp^M 表示，具有式 II：

[0139]

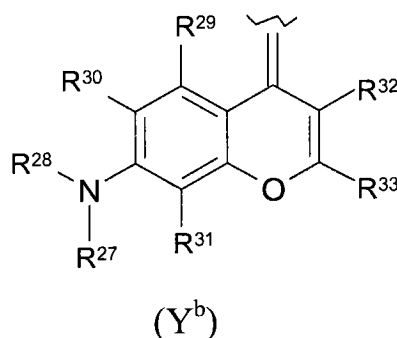
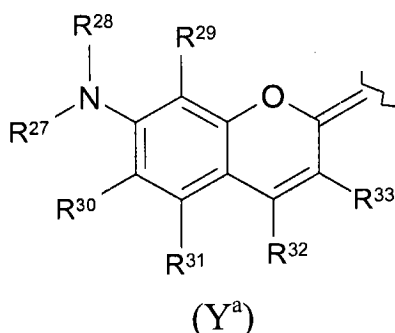


[0140] (II)

[0141] 其中：

[0142] Y^1 是式 Y^a 或 Y^b 基团

[0143]



[0144] R^{21} – R^{24} 和 R^{29} – R^{33} 独立选自 H、 $-SO_3M^1$ 、Hal、 R^g 或 C_{3-12} 芳基；

[0145] R^{25} 为 H、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基、 C_{3-12} 芳基磺酰基、Cl，或者 R^{25} 与 R^{26} 、 R^{34} 、 R^{35} 或 R^{36} 中之一一起可任选形成 5- 或 6- 元不饱和脂族、不饱和杂脂族或芳族环；

[0146] R^{26} 和 R^{36} 独立为 R^g 基团；

[0147] R^{27} 和 R^{28} 独立为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 磺基烷基或 C_{1-6} 羟基烷基或者任选与 R^{29} 和 / 或 R^{30} 中之一或两者一起可形成 5- 或 6- 元含 N 杂环或杂芳环；

[0148] X 是 $-\text{CR}^{34}\text{R}^{35}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Se}-$ 、 $-\text{NR}^{36}-$ 或 $-\text{CH}=\text{CH}-$ ，其中 $\text{R}^{34}-\text{R}^{36}$ 独立为 R^g 基团；

[0149] R^g 为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 磺基烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 C_{1-6} 羟基烷基；

[0150] w 是 1 或 2；

[0151] J 是生物相容性阴离子；

[0152] 其中 M^1 如式 I 的定义；

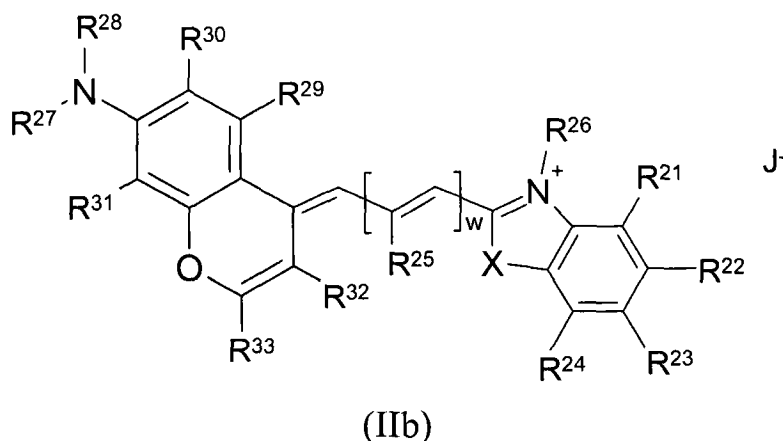
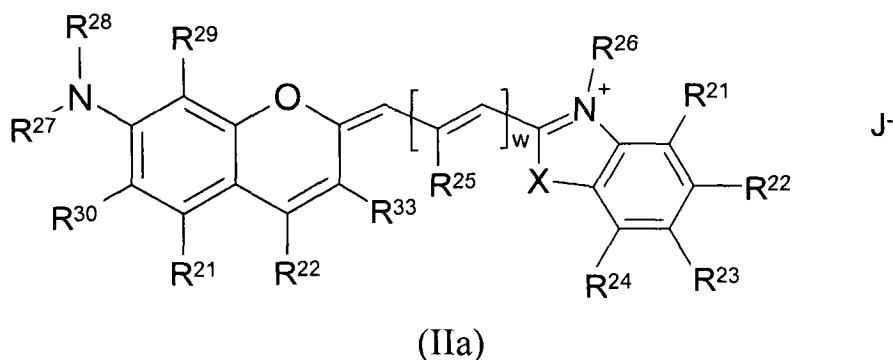
[0153] 条件是 Bzp^{M} 包含至少一个选自 $\text{R}^{21}-\text{R}^{36}$ 基团的磺酸取代基。

[0154] 用术语“生物相容性阴离子”(J) 指与离子化、带正电荷基团（在这种情况下为二氢吡喃鎓基团）形成盐的带负电荷反离子，其中所述带负电荷反离子也无毒性，因此适合给予哺乳动物体，特别是人体。反离子 (J^-) 代表以摩尔当量存在的阴离子，由此平衡 Bzp^{M} 染料上的正电荷。阴离子 (J) 可适合带单-或多-电荷，只要存在电荷平衡量。阴离子适合来自无机或有机酸。合适阴离子的实例包括：卤离子如氯离子或溴离子；硫酸根；硝酸根；柠檬酸根；乙酸根；磷酸根和硼酸根。优选阴离子是氯离子。

[0155] 式 II 的苯并吡喃鎓染料 (Bzp^{M}) 是能够用绿色至近红外波长 (500-1200nm, 优选 550-1000nm, 更优选 600-800nm) 的光在光学成像程序中直接或间接检测的荧光染料或发色团。优选 Bzp^{M} 具有荧光性质。

[0156] 本发明的合适成像剂是其中 Bzp^{M} 具有式 IIa 或 IIb 的那些成像剂：

[0157]



[0158] 其中 X、w、J 和 $\text{R}^{21}-\text{R}^{33}$ 如式 II 的定义。

[0159] 当 R^{25} 与 $\text{R}^{26}/\text{R}^{34}-\text{R}^{36}$ 中之一一起形成 5- 或 6- 元不饱和脂族、不饱和杂脂族或芳族环时，合适的此类芳环包括：苯基、呋喃、噻唑、吡啶基、吡咯或吡唑环。合适的饱和环包含至少与 R^{25} 连接的 $\text{C}=\text{C}$ 。

[0160] 当 R^{27} 和 / 或 R^{28} 与 R^{29} 和 / 或 R^{30} 中之一或两者一起形成 5- 或 6- 元含 N 杂环或

杂芳环时,合适的此类环包括:噻唑、吡啶基、吡咯或吡唑环或其部分氢化形式。优选吡啶基或二氢吡啶基。

[0161]

苯并吡喃𬝓染料的优选特征

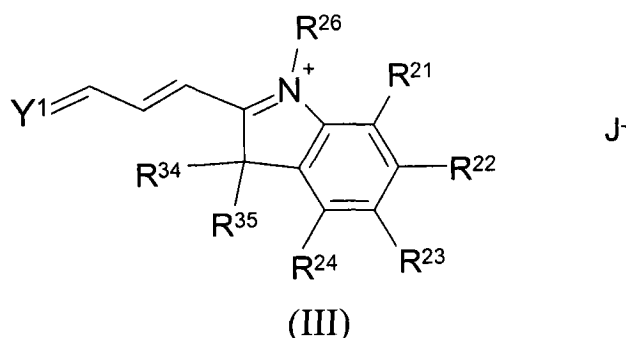
[0162] 优选在式 II Bzp^M 的 R²⁵、R²⁶、R³⁴、R³⁵ 或 R³⁶ 位,更优选在 R²⁶、R³⁴、R³⁵ 或 R³⁶ 位,最优选在 R²⁶、R³⁴ 或 R³⁵ 位连接载体。为了促进连接,相关的 R²⁵、R²⁶、R³⁴、R³⁵ 或 R³⁶ 取代基优选 C₁₋₆ 羧基烷基,更优选 C₃₋₆ 羧基烷基。

[0163] 苯并吡喃𬝓染料 (Bzp^M) 优选具有至少 2 个磺酸取代基,更优选 2-6 个磺酸取代基,最优选 2-4 个磺酸取代基。优选至少一个磺酸取代基为 C₁₋₄ 磺基烷基。此类磺基烷基优选位于 R²⁶、R²⁷、R²⁸、R³⁴、R³⁵ 或 R³⁶ 位;更优选位于 R²⁶、R²⁷、R²⁸、R³⁴ 或 R³⁵ 位;最优选与式 II 的 R²⁷ 和 R²⁸ 中之一或两者一起位于 R²⁶ 位。式 II 的磺基烷基优选式 -(CH₂)_kSO₃M¹, 其中 M¹ 为 H 或 B^c, k 是整数值 1-4, B^c 是生物相容性阳离子 (如上文定义)。k 优选 3 或 4。

[0164] 在式 II 中, w 优选 1。R²⁵ 优选 H 或 C₁₋₄ 羧基烷基,最优选 H。X 优选 -CR³⁴R³⁵- 或 -NR³⁶-, 最优选 -CR³⁴R³⁵-。

[0165] 优选的 Bzp^M 染料具有式 III:

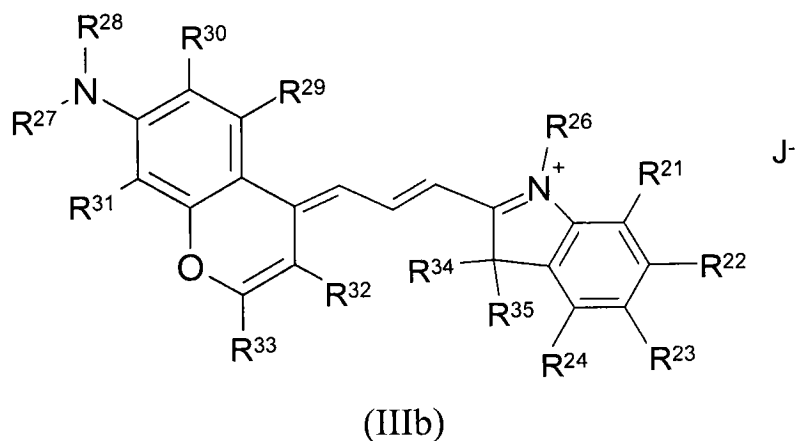
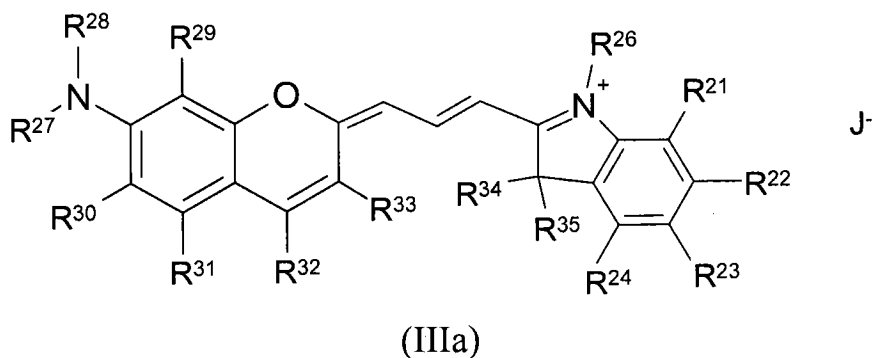
[0166]



[0167] 其中 Y¹、R²¹-R²⁴、R²⁶、R³⁴、R³⁵ 和 J 如式 II 的定义。

[0168] 合适的式 III 染料具有式 IIIa 或 IIIb:

[0169]

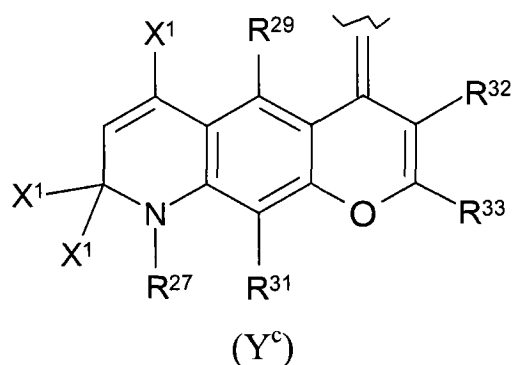


[0170] 式 III、IIIa 和 IIIb 的优选 R^{21} - R^{24} 和 R^{26} - R^{33} 基团如上文关于式 IIa 和 IIb 的描述。在式 III、IIIa 和 IIIb 中, R^{34} 和 R^{35} 优选选择使得一个为 R^j 基团且另一个为 R^k 基团。 R^j 为 C_{1-2} 烷基, 最优选甲基。 R^k 为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-6} 羧基烷基或 C_{1-4} 磺基烷基, 优选 C_{3-6} 羧基烷基或 $-(CH_2)_kSO_3M^1$, 其中选择 k 是 3 或 4。

[0171] 优选式 III 的染料具有 C_{1-6} 羧基烷基取代基以允许促进与载体共价连接。

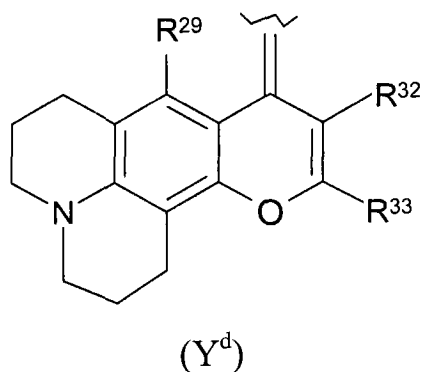
[0172] 在式 II 或 III 中, 当 R^{27} 和 / 或 R^{28} 与 R^{29} 和 / 或 R^{30} 中之一或两者一起形成 5- 或 6- 元含 N 杂环或杂芳环时, 优选此类环是吡啶基或二氢吡啶基。优选的此类 Y^1 基团具有式 Y^c , 其中 R^{28} 基团已与 R^{30} 一起环化:

[0173]



[0174] 优选的此类 Y^1 基团具有式 Y^d , 其中 R^{27} 和 R^{28} 基团已经环化:

[0175]



[0176] 其中：

[0177] R^{27} 、 R^{29} 和 R^{31} - R^{33} 如上文定义；

[0178] 各 X^1 独立为 H 或 C_{1-4} 烷基。

[0179] 在式 Y^c 中, 优选：

[0180] 各 X^1 为 CH_3 ；

[0181] $R^{29} = R^{31} = H$ ；

[0182] R^{32} 为 H；

[0183] R^{33} 为 CH_3 或 $-C(CH_3)_3$, 更优选 $-C(CH_3)_3$ 。

[0184] 在式 Y^d 中, 优选：

[0185] $R^{29} = H$ ；

[0186] R^{32} 为 H；

[0187] R^{33} 优选 CH_3 或 $-C(CH_3)_3$, 更优选 $-C(CH_3)_3$ 。

[0188] 优选式 II 的 $-NR^{27}R^{28}$ 基团：

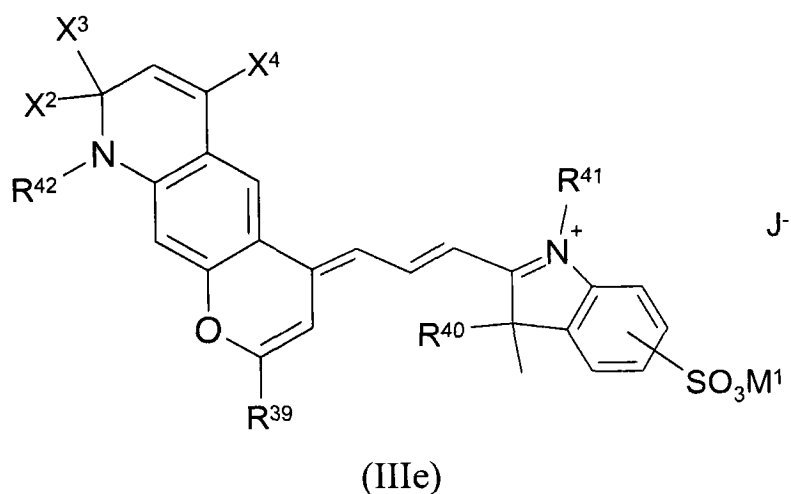
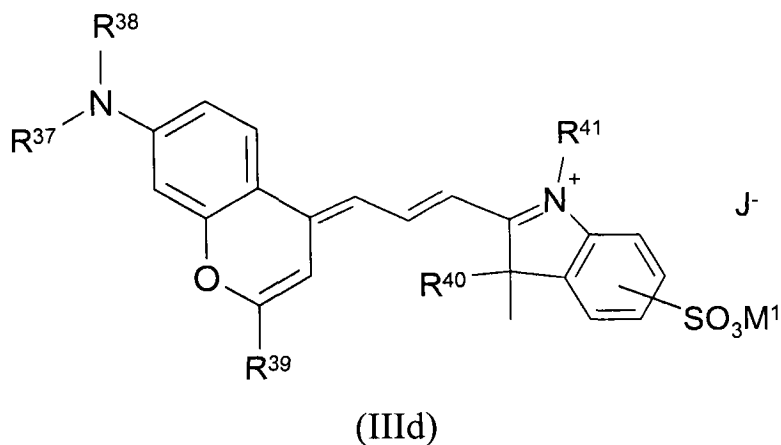
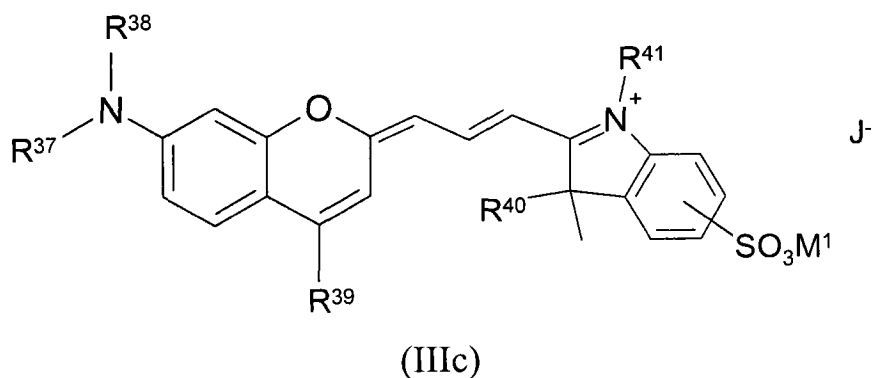
[0189] (i) 为开链形式, 即 R^{27}/R^{28} 基团不与 R^{29}/R^{30} 中之一或两者一起成环。优选此类 R^{27} 和 R^{28} 基团独立选自 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 磺基烷基, 最优选乙基或 C_{3-4} 磺基烷基；

[0190] (ii) 成环以得到式 Y^c 或 Y^d 、更优选式 Y^c 的环状 Y^1 取代基。

[0191] 最优选开链形式 (i)。

[0192] 特别优选的式 III 染料具有式 IIIc、IIIId 或 IIIe：

[0193]



[0194] 其中：

[0195] M^1 和 J 如上文定义；

[0196] R^{37} 和 R^{38} 独立选自 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 磺基烷基；

[0197] R^{39} 为 H 或 C_{1-4} 烷基；

[0198] R^{40} 为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 磺基烷基或 C_{1-6} 羧基烷基；

[0199] R^{41} 为 C_{1-4} 磺基烷基或 C_{1-6} 羧基烷基；

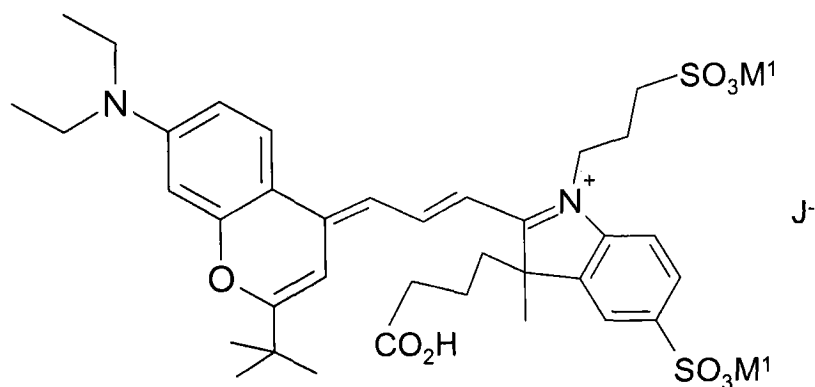
[0200] R^{42} 为 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 磺基烷基或 C_{1-6} 羧基烷基；

[0201] X^2 、 X^3 和 X^4 独立为 H 或 C_{1-4} 烷基。

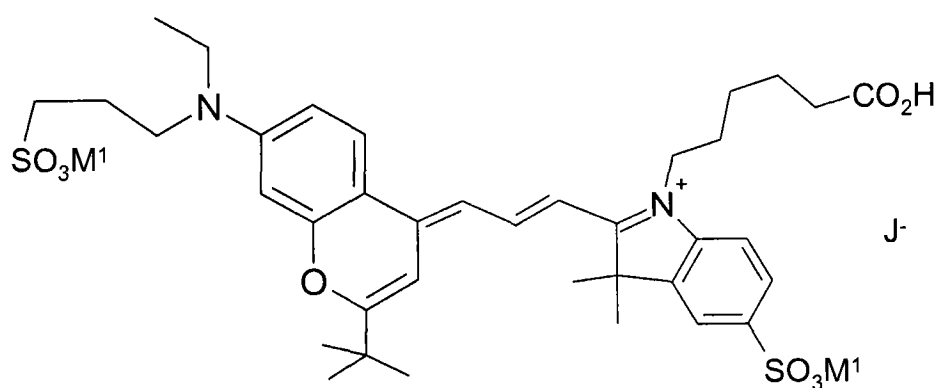
[0202] 式 IIIId、IIIe 和 IIIIf 染料优选选择使得 R^{40} – R^{42} 中一个或多个为 C_{1-4} 磺基烷基。

[0203] 优选的具体式 IIIId 染料是 DY-631 和 DY-633：

[0204]



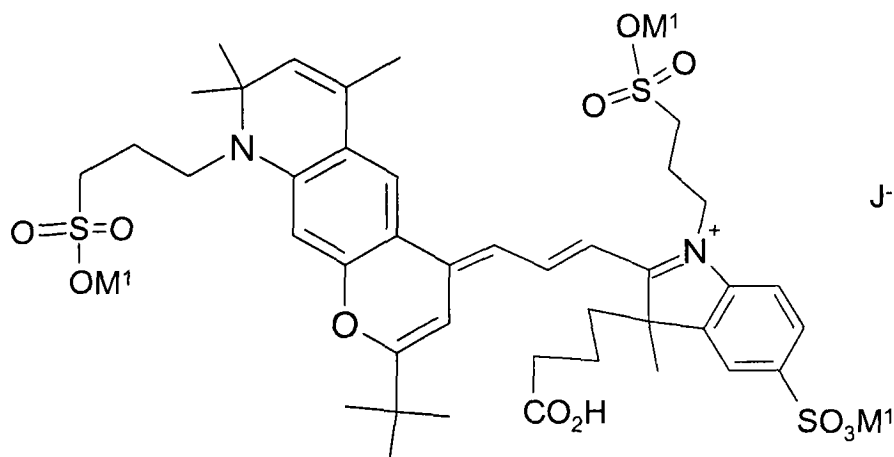
DY-631



DY-633

[0205] 优选的具体式 IIIe 染料是 DY-652 :

[0206]



DY-652

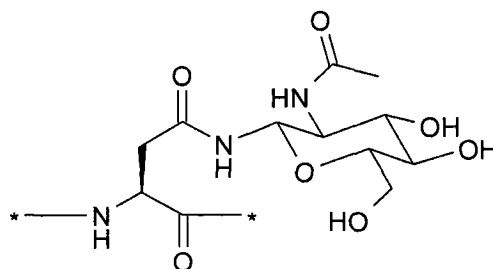
[0207] 优选具体染料是 DY-631 和 DY-652, 最优选 DY-652。

[0208] 当存在时, 设想连接基团 $-(A)_m-$ 的作用之一是使光学报道分子远离载体的活性位点。当报道分子相当大, 因此可能发生不良的空间相互作用时, 这尤其重要。这可通过柔韧性 (如简单烷基链) 和 / 或刚性如使报道分子朝远离活性位点方向的环烷基或芳基间隔基团的组合实现, 以便报道分子具有使其自身位置远离活性位点的自由。连接基团的性质还

可用于调节成像剂的生物分布。因此,例如在连接体中引入醚基将有助于血浆蛋白结合最小化。当 $-(A)_m-$ 包含聚乙二醇 (PEG) 构建单元或 1-10 个氨基酸残基的肽链时,连接基团可发挥改变成像剂体内药代动力学和血液清除率的功能。此类“生物调节剂”连接基团可加速成像剂从背景组织如肌肉或肝脏和 / 或从血中清除,从而因背景干扰较小而得到更好的诊断图像。生物调节剂连接基团还可用于支持具体如通过肾脏而不是肝脏的排泄途径。

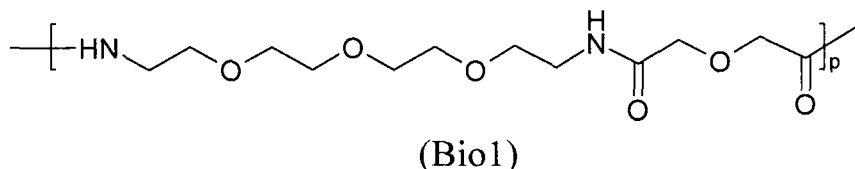
[0209] 用术语“糖”指单-、二-或三-糖。合适的糖包括:葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖和乳糖。可任选将糖官能化以允许容易与氨基酸偶合。因此,例如氨基酸的葡糖胺衍生物可通过肽键与其它氨基酸耦合。天冬酰胺的葡糖胺衍生物(市售购自 NovaBiochem)是这样一种实例:

[0210]



[0211] 当存在合成连接基团 (L) 时,优选包含促使载体与光学报道分子耦合的末端官能团。当 L 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 L 包含 PEG 部分时,优选包含衍生自式 Bio1 或 Bio2 的单分散性 PEG- 样结构低聚化的单元:

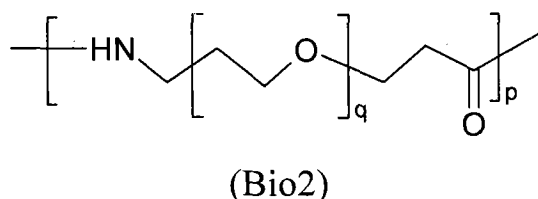
[0212]



[0213] 式 Bio1 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸

[0214] 其中 p 是整数 1-10。或者,可使用基于式 Bio2 丙酸衍生物的 PEG- 样结构:

[0215]



[0216] 其中 p 如式 Bio1 的定义, q 是整数 3-15。

[0217] 在式 Bio2 中, p 优选 1 或 2, q 优选 5-12。

[0218] 当连接基团不包含 PEG 或肽链时,优选 L 基团具有连接原子的主链,所述连接原子组成 2-10 个原子,最优选 2-5 个原子,特别优选 2 或 3 个原子的 $-(A)_m-$ 部分。2 个原子的最小连接基团主链提供的优点是光学报道分子很好地分离以便使任何不需要的相互作用最小化。

[0219] 第一方面的成像剂优选作为药用组合物提供。此类组合物包含成像剂,与生物相

容性载体,采用适合哺乳动物给药的形式。“生物相容性载体”是流体,特别是液体,在其中成像剂可悬浮或溶解,以便组合物在生理学上可耐受,即可以在无毒性或过度不适的情况下给予哺乳动物体。生物相容性载体适合是可注射的载体液体如用于注射的无菌、无热原水;水溶液如盐水(最好可使其平衡以便注射用终产物等渗);一种或多种调节等张性的物质(如血浆阳离子与生物相容性反离子的盐)、糖(如葡萄糖或蔗糖)、糖醇(如山梨醇或甘露醇)、二醇(如甘油),或其它非离子多元醇材料(如聚乙二醇,丙二醇等)的水溶液。优选生物相容性载体是注射用无热原水或等渗盐水。

[0220] 将成像剂和生物相容性载体各自提供在合适的瓶或包含密封容器的器皿中,允许保持无菌完整性和/或放射活性安全性,加上任选惰性顶空气体(如氮气或氩气),同时允许用注射器或导管添加和抽出溶液。优选此类容器是隔垫密封瓶,其中用顶封(通常为铝)将气密垫圈卷曲。垫圈适合用皮下注射针头(如卷曲隔垫密封垫圈)单次或多次穿刺,同时保持无菌完整性。此类容器具有其它优点即如果需要(如更换顶空气体或使溶液除气)时垫圈可耐受真空,耐受压力改变如减压,不允许外部大气的气体如氧气或水蒸气进入。优选多剂量容器包含单个散装瓶(如10-30cm³容积),其装有多患者剂量,从而可在适合临床情况的制剂的有效寿命期间以不同时间间隔将单患者剂量抽吸入临床级注射器内。预充式注射器设计为包含单人剂量,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。本发明的药用组合物优选具有适合单个患者的剂量并提供在合适的注射器或容器中,如上文描述。

[0221] 药用组合物可任选包含另外的赋形剂如抗微生物防腐剂、pH-调节剂、填充剂、稳定剂或重量渗透摩尔浓度调节剂。用术语“抗微生物防腐剂”指抑制可能有害的微生物如细菌、酵母或霉菌生长的药剂。抗微生物防腐剂还可表现一些杀菌性质,取决于所用剂量。本发明抗微生物防腐剂的主要作用是抑制任何此类微生物在药用组合物中生长。但是,抗微生物防腐剂还可任选用于抑制可能有害的微生物在药剂盒的一种或多种组分中生长,所述药剂盒用于在给药前制备所述组合物。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、丙酯或丁酯或其混合物;苯醇;苯酚;甲酚;西曲溴铵和硫柳汞。优选抗微生物防腐剂是对羟基苯甲酸酯类。

[0222] 术语“pH-调节剂”指可用于保证组合物的pH在人或哺乳动物给药可接受限制范围(约pH 4.0-10.5)内的化合物或化合物混合物。合适的此类pH-调节剂包括药学上可接受的缓冲剂,如曲辛、磷酸盐或TRIS[即三(羟基甲基)氨基甲烷],和药学上可接受的碱如碳酸钠、碳酸氢钠或其混合物。当使用药剂盒形式的组合物时,可将pH调节剂任选提供在分开的瓶或容器中,以便药剂盒的使用者可调节pH作为多步骤程序的一部分。

[0223] 用术语“填充剂”指可在生产和冻干过程中促进材料处理的药学上可接受的增量剂。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、甘露醇或海藻糖。

[0224] 可在无菌制造(即洁净室)条件下制备药用组合物以得到所需无菌、无热原产物。优选关键组分,特别是相关试剂加上与成像剂接触的那些仪器部分(如瓶)无菌。可用本领域已知的方法消毒组分和试剂,包括:无菌过滤、用例如 γ -照射终末消毒、高压灭菌、干热或化学处理(如用环氧乙烷)。优选事先消毒一些组分,以便需要进行最少数量的操作。但是,作为预防措施,优选包括至少无菌过滤步骤作为制备药用组合物过程中的终步骤。

[0225] 还可用药剂盒制备药用组合物,如第四方面(下文)描述。

[0226] 第一方面的方法优选用于区分:

[0227] (a) 无发育异常的 Barrett 食管;

[0228] (b) 发育异常;

[0229] (c) 癌;

[0230] 如下文描述。将通过荧光强度确定。该方法主要用于区分无发育异常的 Barrett 食管和发育异常或癌;优选区分(a)、(b)和(c)中的每一种,最优选在(b)内进一步区分“低度”或“高度”发育异常-其中那些术语与图1(上文)有关。

[0231] 第一方面的方法优选还包括步骤:

[0232] (v) 在步骤(iv)的一个或多个发育异常的可能部位上进行活检。

[0233] 通过这种方式,可取出组织样品详细进行离体测试以确认任何疾病的性质和程度。活检将用标准技术进行[参阅如 Barr et al, MedGenMed, 8, 66-88 (2006)]。

[0234] 包括或不包括活检步骤在内,第一方面的方法优选用于指导递送局部治疗的部位。对任何疾病的性质和程度更准确的认识允许对具体患者确定最合适的治疗。此类治疗可包括(见图1):用质子泵抑制剂化疗、内窥镜粘膜消融或手术切除。如果发现疾病并开始治疗,第一方面的方法可最好使用治疗功效的监测,例如在合适的时间间隔通过随访反复成像。

[0235] 光学报道分子可通过常规方法与载体偶合-见 Achilefu [Technol. Cancer. Res. Treat., 3, 393-409 (2004)], Li et al [Org. Lett., 8 (17), 3623-26 (2006) 和 Bullock et al, [J. Med. Chem., 48, 5404-5407 (2005)]。菁染料与生物分子偶合的通用方法由 Licha et al 描述 [Topics Curr. Chem., 222, 1-29 (2002); Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 1087-1108 (2005)]。可在末端位置,或者在一个或多个内部位置上标记用于本发明的肽、蛋白质和寡核苷酸载体。关于用荧光染料标记试剂标记蛋白质的综述和实例,参阅“Non-Radioactive Labelling, a Practical Introduction(非放射性标记,实用介绍)”, Garman, A. J. Academic Press, 1997; “Bioconjugation-Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences(用于生物医学科学的生物偶合-蛋白质偶联技术)”, Aslam, M. and Dent, A., Macmillan Reference Ltd, (1998)。可在合成肽中获得位点特异性标记的方案,例如参阅 Hermanson, G. T., “Bioconjugate Techniques(生物偶合技术)”, Academic Press (1996)。

[0236] 在具体染料中,使合适的光学报道分子与氨基酸和肽偶合的方法描述于 Licha(同上)和 Flanagan et al [Bioconj. Chem., 8, 751-756 (1997)]; Lin et al, [ibid, 13, 605-610 (2002)] 和 Zaheer [Mol. Imaging, 1 (4), 354-364 (2002)]。使连接基团(L)与载体偶合的方法使用与单独染料类似的化学作用,在本领域已知。

[0237] 适合与肽偶合的官能化光学报道分子染料市售购自 GE Healthcare Limited, Atto-Tec, Dyomics, Molecular Probes 等。获得的大部分此类染料作为 NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化酯。适合与载体偶合的官能化苯并吡喃染料(Bzp^M)市售购自 Dyomics(Dyomics GmbH, Winzerlaer Str. 2A, D-07745 Jena, Germany; www.dyomics.com), 其中反应性官能团是 NHS 酯、马来酰亚胺、氨基酸或羧酸。

[0238] 第二方面,本发明提供可用于第一方面方法的具体成像剂,其中所述成像剂选

自：

[0239] (i) 用式 Ia 菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记的 hEGF 或其片段；

[0240] (ii) 用式 Ia 菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记的 TGF- α 或其片段；

[0241] (iii) 用第一方面定义的光学报道分子标记的双调蛋白；

[0242] (iv) 包含氨基酸序列 CKSPEPQHC 的 9-20-mer 肽 (GE9)，所述肽用菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记；

[0243] (v) 包含氨基酸序列 LHLWVPEPWTQT (GE10) 或 YHWYGYTPQNVI (GE11) 的 12-20-mer 肽，所述肽用菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记；

[0244] (vi) 包含氨基酸序列 MLYNPPTYQMDVNPEGK 的 12-20-mer 肽 (Inherbin 1)，所述肽用第一方面定义的光学报道分子标记；

[0245] (vii) 包含氨基酸序列 LVYNKLTQLEPNPHTK 的 12-20-mer 肽 (Inherbin 3)，所述肽用第一方面定义的光学报道分子标记；

[0246] (viii) 第一方面定义的 AffibodyTM，用式 Ia 菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记；

[0247] (ix) 第一方面定义的 NanobodyTM，用菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记。

[0248] 第二方面成像剂的光学报道分子的优选方面如第一方面（上文）定义。具体来讲，(i)-(vii) 的载体优选式 Ia 菁染料或苯并吡喃鎓染料光学报道分子标记。菁染料和苯并吡喃鎓染料的优选方面如第一方面定义。

[0249] 第三方面，本发明提供包含第二方面成像剂的药用组合物。药用组合物及其优选实施方案如第一方面（上文）描述。第三方面药用组合物的优选方面如第二方面描述。

[0250] 第四方面，本发明提供第三方面药用组合物制剂的药剂盒。合适的药剂盒包含第一方面的成像剂，该成像剂为无菌、固体形式，以便用无菌供应的生物相容性载体重新配制后，发生溶解以得到所需药用组合物。

[0251] 在那种情况下，可将成像剂加上其它上文描述的任选赋形剂作为冻干粉剂提供在合适的瓶或容器中。然后将药物设计为用所需生物相容性载体重新配制以得到无菌、无热原形式的药用组合物，准备用于哺乳动物给药。术语“生物相容性载体”及其优选实施方案如第一方面（上文）描述。

[0252] 优选成像剂的无菌、固体形式是冻干固体。优选将无菌、固体形式提供在药物级容器中，如关于药用组合物（上文）的描述。当药剂盒被冻干时，制剂可任选包含选自糖的冷冻保护剂，优选甘露醇、麦芽糖或曲辛。

[0253] 第五方面，本发明提供第一或第二方面定义的成像剂在第一方面体内成像方法中的用途。该用途的成像剂的优选方面如第一和第二方面描述。

[0254] 第六方面，本发明提供用于制备第一方面成像剂的药剂盒在第一方面方法中的用途。

[0255] 第七方面，本发明提供第一方面步骤 (i) 定义的载体在制备用于第一方面方法的成像剂中的用途。

[0256] 通过以下实施例举例说明本发明。本发明的化合物显示于表 2（下文）。化合物

1-3 是 GE11 类似物。化合物 4-7 是 TGF α_{22-31} 片段类似物, 化合物 8-11 是 EGF₂₁₋₃₁ 片段类似物。

[0257] 实施例 1 提供本发明的优选菁染料 Cy5** 的合成。实施例 2 提供 Cy5** 的活化酯的合成。实施例 3 提供具有菁染料 (Cy5**) 耦合其上的本发明肽的合成。实施例 4 提供具有菁染料 (Cy5**) 耦合其上的本发明蛋白质的合成, 包括抗 -EGFR Affibody。实施例 5 提供化合物 1-14 的 HPLC 纯化条件, 实施例 6 提供化合物 1-14 的表征。实施例 7 提供本发明化合物的结合测定数据, 显示用合适光学报道分子标记的本发明载体仍然保持与 EGFR 结合。

[0258] 实施例 8 提供通过组织微阵列法从 Barrett 食管患者获得的患者组织样品中 EGFR 的表达数据。实施例 8 证明在 Barrett 组织中 EGFR 表达低, 从低度发育异常至高度发育异常至腺癌逐渐增加。在靠近发育异常 / 腺癌部位的 Barrett 组织中 EGFR 表达也增加。EGFR 在鳞状组织中的表达不影响该靶标的适合性。那是因为鳞状组织是食管的正常内层, Barrett 是真正的背景, 因为占据广泛的表面积; 在白光下很容易与鳞状组织区分 (因为 Barrett 组织是粉红色, 所以容易区分)。结果显示在“危险”患者 (已进展超过 Barrett 的患者) 中 EGFR 表达明显上调, 支持 EGFR 靶向用于活检指导。发现在发育异常中 EGFR 的表达增加。

[0259] 实施例 9 显示在食管癌中高 EGFR 表达患者的生存率较低的趋势。这证明在该疾病状态下 EGF 作为标记物的重要性。

[0260] 缩写

[0261] 使用常规单字母或 3- 字母氨基酸缩写。

[0262] Acn : 乙酰氨基甲基,

[0263] ACN : 乙腈,

[0264] Boc : 叔丁氧基羰基,

[0265] Cy5** : 见实施例 1 ;

[0266] DBU : 1,8- 二氮杂双环 [5.4.0] - 十一 -7- 烯,

[0267] DCM : 二氯甲烷,

[0268] DIEA ; 二异丙基乙胺,

[0269] DCC : N, N' - 二环己基 - 碳二亚胺,

[0270] DMSO : 二甲基亚砷,

[0271] Fmoc : 9- 芴基甲氧羰基,

[0272] HBTU : 0- 苯并三唑 -1- 基 -N, N, N' , N' - 四甲基脲鎓六氟磷酸盐,

[0273] HOBT : 1- 羟基 - 苯并三唑,

[0274] HSPyU : 0- (N- 琥珀酰亚胺基) -N, N, N' , N' - 四亚甲基脲鎓六氟磷酸盐,

[0275] HPLC : 高效液相色谱,

[0276] ivDde : 1- (4,4- 二甲基 -2,6- 二氧代环己叉基) -3- 甲基丁基,

[0277] LC-MS : 液相色谱质谱,

[0278] NHS : N- 羟基 - 琥珀酰亚胺,

[0279] NMM : N- 甲基吗啉,

[0280] NMP : 1- 甲基 -2- 吡咯烷酮,

[0281] Pbf : 2,2,4,6,7- 五甲基二氢苯并呋喃 -5- 磺酰基,

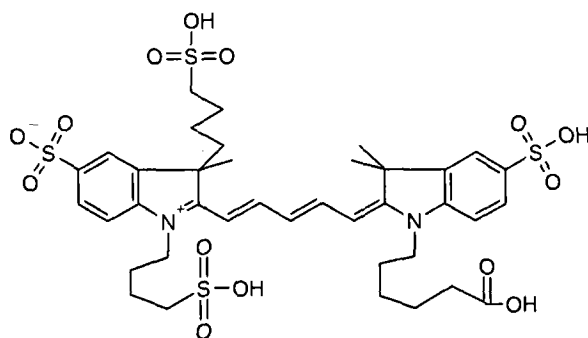
- [0282] PyAOP : 7- 氮杂苯并三唑 -1- 基氧基 - 三 -(吡咯烷 -1- 基) 磷鎓六氟磷酸盐,
- [0283] rhEGF : 重组人 EGF ;
- [0284] rhTGF α : 重组人 TGF α ;
- [0285] RP-HPLC : 反相 HPLC,
- [0286] tBu : 叔丁基,
- [0287] TFA : 三氟乙酸,
- [0288] TIS : 三异丙基硅烷,
- [0289] Trt : 三苯甲基。
- [0290] 表 2 : 本发明的化合物。

[0291]

Comp	序列
1	a H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-NH ₂
	b Cy5**-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-NH ₂
2	a Fmoc-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-Lys-NH ₂
	b H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-Lys(Cy5**-NH ₂
3	a Fmoc-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-PEG-Lys-NH ₂
	b H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-PEG-Lys(Cy5**-NH ₂
4	a H-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Ser-Pro-Ala-OH
	b Cy5**-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Ser-Pro-Ala-OH
5	a ClCH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Ser-Pro-Ala-Cys-Lys-NH ₂
	b <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Ser-Pro-Ala-Cys)-Lys-NH ₂
	c <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Ser-Pro-Ala-Cys)-Lys(Cy5**-NH ₂
6	a H-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Lys-Pro-Ala-Cys-NH ₂
	b H-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Lys-Pro-Ala-Cys(Cy5**-NH ₂
7	a ClCH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Lys-Pro-Ala-Cys-Lys-NH ₂
	b <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Lys-Pro-Ala-Cys)-Lys-NH ₂
	c <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Arg-Phe-Leu-Val-Gln-Glu-Asp-Lys-Pro-Ala-Cys)-Lys(Cy5**-NH ₂
8	a H-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Asp-Cys-OH
9	a ClCH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Asp-Cys-Lys-NH ₂
	b <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Asp-Cys)-Lys-NH ₂
	c <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Ser-Tyr-Asp-Cys)-Lys(Cy5**-NH ₂
10	a H-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys-NH ₂
	b H-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys(Cy5**-NH ₂
11	a ClCH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys-Lys-NH ₂
	b <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys)-Lys-NH ₂
	c <i>cyclo</i> -(CH ₂ CO-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys)-Lys(Cy5**-NH ₂
12	Cy5**-rhEGF
13	Cy5**-rhTGF α
14	抗-EGFR Affibody His ₆ -Z _{EGFR:1907} -Cys(Cy5**)

[0292] 实施例 1: 菁染料 2-((1E,3E,5E)-5-[1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-5-磺基-1,3-二氢-2H-吡啶-2-叉基]戊-1,3-二烯基)-3-甲基-1,3-双(4-磺基丁基)-3H-吡啶鎓-5-磺酸盐(Cy5**)的合成

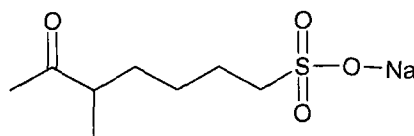
[0293]



Cy5**

[0294] (1a) 5-甲基-6-氧代庚-1-磺酸

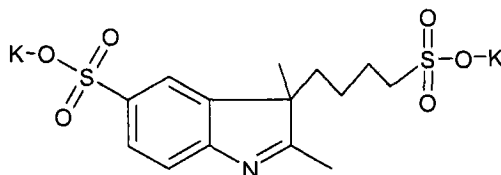
[0295]



[0296] 将 DMF (25ml) 中的 2-甲基乙酰乙酸乙酯 (50g) 加入氢化钠 (12.0g 60% NaH/矿物油) 在 DMF (100ml) 中的悬浮液内, 用 1 小时在冰浴冷却下滴加, (内部温度 0-4℃)。在再冷却之前通过搅拌让该混合物升温至环境温度, 保持 45 分钟。然后用 15 分钟滴加 1,4-丁烷磺酸内酯 (45g) 在 DMF (25ml) 中的溶液。将终混合物在 60℃ 加热 18 小时。旋转蒸发除去溶剂, 使残留物分配在水和乙醚之间。将水层收集, 用新鲜乙醚洗涤, 旋转蒸发以得到粘性泡沫状物。使该中间体溶于水 (100ml) 中, 用 15 分钟搅拌下加入氢氧化钠 (17.8g)。将混合物在 90℃ 加热 18 小时。通过加入浓盐酸 (~40ml) 将冷却的反应混合物调节至 ~pH2。将溶液旋转蒸发, 真空干燥。用含 2% 盐酸的乙醇 (3×150ml) 洗涤黄色固体。将乙醇溶液过滤, 旋转蒸发和真空干燥以得到黄色固体。产量 70g。

[0297] (1b) 2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3H-吡啶-5-磺酸, 二钾盐

[0298]

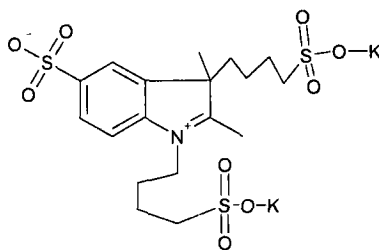


[0299] 将 4-胍基苯磺酸 (40g)、5-甲基-6-氧代庚-1-磺酸 (来自 1a; 60g) 和乙酸 (500ml) 混合, 回流加热 6 小时。将溶剂过滤, 旋转蒸发和真空干燥。使固体溶于甲醇 (1L) 中。向其内加入 2M 甲醇氢氧化钾溶液 (300ml)。将混合物搅拌 3 小时, 然后用旋转蒸发使溶剂体积减小 50%。将所得沉淀物过滤, 用甲醇洗涤, 真空干燥。产量 60g。MS (LCMS): $MH^+ 362$. Acc. 质量: 实测, 362.0729. $MH^+ = C_{14}H_{20}NO_6S_2$ 需要 m/z 362.0732 (-0.8ppm)。

[0300]

(1c) 2,3-二甲基-1,3-双(4-磺基丁基)-3H-吡啶-5-磺酸盐, 二钾盐

[0301]



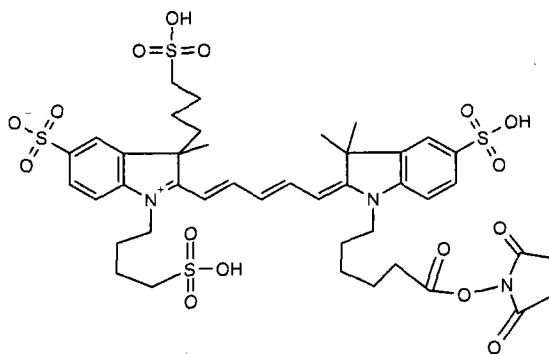
[0302] 将 2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3H-吲哚-5-磺酸(来自 1b;60g)与 1,4-丁烷磺酸内酯(180g)和环丁酮(146ml)在 140℃加热 16 小时。将所得红色固体用乙醚洗涤,研磨成粉末状物,真空干燥。产量 60g。

[0303] (1d)Cy5^{**},作为 TFA 盐

[0304] 将 1-(5'-羧基戊基)-2,3,3-三甲基-溴化吲哚鎓(indolenium)-5-磺酸,K⁺盐(2.7g)、丙二醛双(苯基亚胺)单盐酸盐(960mg)、乙酸酐(36ml)和乙酸(18ml)在 120℃加热 1 小时以得到深色的褐-红色溶液。使反应混合物冷却至环境温度。将 2,3-二甲基-1,3-双(4-磺基丁基)-3H-吲哚鎓-5-磺酸盐(来自 1c;8.1g)和乙酸钾(4.5g)加入混合物内,将其在环境温度下搅拌 18 小时。将所得蓝色溶液用乙酸乙酯沉淀,真空干燥。用液相色谱(RPC₁₈,水+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA梯度)纯化粗染料。将含主要染料峰的流分收集,合并并真空蒸发以得到标题染料,2g。UV/Vis(水+0.1%TFA):650nm。MS(MALDI-TOF):MH⁺=C₃₈H₅₀N₂O₁₄S₄需要 m/z 887.1。

[0305] 实施例 2:2-[(1E,3E,5E)-5-(1-{6-[(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基]-6-氧代己基}-3,3-二甲基-5-磺基-1,3-二氢-2H-吲哚-2-叉基)戊-1,3-二烯基]-3-甲基-1,3-双(4-磺基丁基)-3H-吲哚鎓-5-磺酸盐,二异丙基乙胺盐(Cy5^{**}的 NHS 酯)的合成

[0306]



[0307] 使 Cy5^{**}(实施例 1;10mg)溶于无水 DMSO(3ml)中;向其内加入 HSPyU(20mg)和 N,N'-二异丙基乙胺(80 μl)。将所得溶液混合 3 小时,通过 TLC(RPC₁₈,水/MeCN)显示完全反应。将染料在乙酸乙酯/乙醚中沉淀分离,过滤,用乙酸乙酯洗涤,真空干燥。UV/Vis(水)650nm。MS(MALDI-TOF)MH⁺=C₄₂H₅₃N₃O₁₆S₄需要 m/z 984.16。

[0308] 实施例 3:化合物 1-11 的合成

[0309] a) 肽合成

[0310] 在 Rink Amide MBHA 树脂(购自 NovaBiochem,通常装填 0.72mmol/g,合成 1,2,3,5,6,7,9,10 和 11)、Fmoc-Ala-Wang 树脂(购自 NovaBiochem,装填 0.52mmol/g,合成 4)或 Fmoc-Cys(Trt)-Sasrin 树脂(购自 Bachem,装填 0.45mmol/g,合成 8)上通过标准

固相肽化学 [Barany, Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739 (1987)] 组装与表 2 中化合物 1-11 序列相对应的肽基树脂。在 50% DCM:DMF (合成 6 和 10) 中用 PyAOP/ 可力丁活化将 Fmoc-Cys(Trt)-OH 手工装填在 Rink Amide MBHA 树脂上。用微波辅助肽合成仪 (CEM Liberty) 在固相手工组装所有其它氨基酸。使残基 (来自羧基端) 以 0.1mmol 规模偶合, 通常使用 0.5mmol Fmoc-氨基酸 (0.2M 在 NMP 中的溶液, 通过加入 0.45mmol HBTU 和 HOBt (两种试剂都是 0.45M 在 DMF 中的溶液), 接着加入 1mmol DIEA (2M 在 NMP 中的溶液) 的单偶合循环 (在 75°C 5min)。用双偶合程序加入 His 和 Arg 残基。用 20% 哌啶 /NMP 完成 Fmoc-脱保护。洗涤溶剂是 NMP。使用的聚乙二醇 (PEG) 残基, Fmoc-氨基 PEG 二甘醇酸购自 Polypure (合成 3)。所有其它氨基酸购自 CEM。所用氨基酸侧链保护基团是 tBu 用于 Asp、Glu、Ser、Thr 和 Tyr; Boc 用于 Lys、Trp 和 His; 三苯甲基用于 Asn、Cys 和 Gln; Pbf 用于 Arg; 和在 7 中 ivDde 用于 Lys²⁹, 在 11 中用于 Lys²⁸。

[0311] b) 化合物 5a、7a、9a 和 11a 的肽树脂前体的氯乙酰化

[0312] 以 0.1mmol 规模使 5a、7a、9a 和 11a 的肽树脂前体氯乙酰化。使氯乙酸 (5eq) 和 DCU (2.5eq) 溶于 DCM (5mL) 中, 将混合物搅拌 30 分钟。过滤除去形成的固体尿素, 将滤液减压蒸发至干。使残留物 (对称的酐) 溶于 NMP (5mL) 中, 加入装在氮鼓泡装置的肽树脂内。在 2 小时后通过阴性 Kaiser 检验证实完全反应。

[0313] c) 从树脂脱保护和裂解

[0314] 将肽树脂用含 2.5% TIS 和 2.5% 水的 TFA 处理 2 小时, 使用手工氮鼓泡装置 [Wellings, D. A., Atherton, E. (1997), 在 Methods in Enzymology (Fields, G. Ed), 289, p. 53-54, Academic Press, New York]。在 8、9、10 和 11 的情况下乙二硫醇是 TFA 裂解混合物的另外组分。在这些条件下, 肽从树脂上裂解, 同时从肽上脱除所有侧链保护基团, 除了 ivDde 和 Fmoc 基团之外。将裂解混合物过滤, 用小量净 TFA 洗涤。将合并的滤液和洗涤物旋转蒸发浓缩, 然后用乙醚研磨以得到粗肽。将沉淀物离心分离, 用醚洗涤, 然后用 50% ACN-0.1% aq. TFA 冷冻干燥得到粗产物。在冷冻干燥之前在 50% ACN- 水中将含 Trp 残基的化合物 1a、2a 和 3a 搅拌过夜以完成 Trp-脱保护步骤。

[0315] d) 化合物 5a、7a、9a 和 11a 的环化

[0316] 使肽溶于脱气的 60% ACN- 水中, 用 25% 氨-水将 pH 调节至 7.5-8。在氩气层下让环化进行 2.5 小时, 将混合物酸化和冷冻干燥得到 5b、7b、9b 和 11b。

[0317] e) Cy5^{**} 耦合

[0318] 使化合物 1a、2a、3a、4a、5b、7b、8a、9b 和 11b 与 Cy5^{**} 在 C-端 Lys 侧链残基的 N^α 氨基 (1a、4a、8a) 或在 N^ε-氨基 (2a、3a、5b、7b、9b 和 11b) 耦合。使 Cy5^{**} (实施例 1, 3eq) 溶于 DMF (1mL) 中, 先后加入固体 HBTU (2.7eq) 和 NMM 或 DIEA (20eq), 让其反应约 10-25 分钟。将预活化的染料加入固体肽 (0.01mmol) 内。在 1.5-2 小时后 LC-MS 监测提示完全耦合, 通过制备 RP-HPLC (条件如下) 纯化产物, 得到纯的 1b、4b、5c 和 9c。在接着用 DBU (5eq) 和 N-(2-巯基乙基)-氨基甲基聚苯乙烯树脂 (10eq) 在 DMF (1.5mL) 中 Fmoc-脱保护 1 小时和最终的 RP-HPLC 纯化 (条件如下) 后获得纯的 2b 和 3b。在接着用 2% 胍在 DMF (1mL) 中 ivDde-脱保护 15 分钟, 然后酸化和最终的 RP-HPLC 纯化 (条件如下) 后, 获得纯的 7c 和 11c。

[0319] 使化合物 6a 和 10a 与 Cy5^{**} 在 C-端 Cys 侧链残基的巯基耦合。使用四磺酸化菁

染料 Cy5^{**}-N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺,通过用 HBTU(1eq) 和对称性可力丁(5eq) 在 DMF 中活化相应的游离酸(1.1eq),使预活化染料与 N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺反应,接着通过制备 RP-HPLC 纯化制备。将 6a 和 10a(0.004mmol,1eq) 和三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)(5eq) 在 DMF-0.05M PBF 缓冲液(1:2,3mL) 中的溶液加入固体 Cy5^{**}-N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(3eq) 内。在 1.5 小时后 LC-MS 监测提示完全耦合,通过制备 RP-HPLC 纯化反应混合物。

[0320] f) 纯化

[0321] 通过制备 RP-HPLC(Beckman System Gold 层析系统) 纯化粗肽。用梯度以 10mL/min 洗脱柱(Phenomenex Luna C18 5 μ , 22x250mm) 40、60 或 80 分钟(表 2)。所用洗脱液是含 0.1% TFA、0.05% TFA 或 0.1% 甲酸(FA) 的水(溶剂 A) 和含 0.1% TFA、0.05% TFA 或 0.1% FA 的 ACN(溶剂 B)。在 $\lambda = 214\text{nm}$ 监测洗脱液。将所需峰流分合并和冷冻干燥得到纯产物。用于具体化合物的条件见表 3。

[0322] g) 表征

[0323] 用 LC-MS 表征化合物(表 4)。在 3 种不同的仪器中一种上记录 LC-MS 数据:1) LCQ DECA XP MAX 仪(Thermo Finnigan),使用电喷射离子化(ESI),以 4.5kV 正模式工作,扫描速率 5500Da/s,与 ThermoFinnigan Surveyor PDA 层析系统联合,在以下条件下运行:溶剂 A = 水/0.1% TFA,0.05% TFA 或 0.1% FA 和溶剂 B = ACN/0.1% TFA,0.05% TFA 或 0.1% FA,使用 5min 梯度;流速:0.6mL/min;柱:Phenomenex Luna 3 μ m C18(2) 20x2mm;检测:PDA。2) Quattro Premier 仪(Micromass Technologies/Waters UK),使用 ESI 以 3.0kV 正模式工作,扫描速率 2000Da/s,与配备 1525 二元 HPLC 泵、2777c Sample Manager 和 2996PDA 检测器的 Waters 层析系统联合,在如上所述的相同条件下运行。3) LCT Premier ESI 飞行时间仪(Micromass Technologies/Waters UK),与 Acquity Ultra Performance 层析系统(Waters) 联合,在以下条件下运行:溶剂 A 和 B 同上,使用 10min 梯度;流速 0.5ml/min;柱:Zorbax SB-AQ 3.5mm, 3x100mm;PDA 检测。用 Xcaliber(仪器 1) 或 Masslynx 4.0(仪器 2 和 3) 数据系统进行数据采集和处理。具体条件和结果见表 4。

[0324] 实施例 4:化合物 12-14 的合成

[0325] a) rhEGF(化合物 12) 的 Cy5^{**}-标记

[0326] 使重组人 EGF(rhEGF; ~4mg, 含~0.5mg EGF 的 PBS-盐, 购自 R&D Systems) 溶于水(0.4mL) 中,加入 0.1M NaHCO₃(0.05mL) 内。加入以 4mg/mL 在水中的 Cy5^{**}-NHS 酯(实施例 2)(5eq, 0.325mL),用 0.1M NaHCO₃ 将 pH 调节至 8.3。约 2 小时后 LC-MS 监测显示约 70-80% EGF 耗尽。此时加入 20% ACN-01% aq. TFA 猝灭反应混合物,用 RP-HPLC 纯化,条件描述于实施例 3f) 和在表 2 中。将通过 LC-MS 分析鉴定为单-标记 rhEGF 12 的主要峰流分冷冻干燥,条件描述于实施例 3g) 和在表 3 中。

[0327] b) rhTGF α (化合物 13) 的 Cy5^{**}-标记

[0328] 使重组人 TGF α (rhTGF α ; ~0.5mg, 购自 R&D Systems) 溶于水(1.25mg/mL, 0.4mL, 1eq) 中,加入 0.05mL 0.1M NaHCO₃ 得到 pH 为~8.5。将水中的 Cy5^{**}-NHS 酯(实施例 2; 4mg/mL, 0.1mL, 5eq) 加入 TGF α 溶液内,用 0.1M NaHCO₃ 将 pH 调节至~8.2。在 90 分钟后 LC-MS 分析显示反应进行良好;约 60% 转化为单染料标记产物。3 小时后需要另外的 Cy5^{**}-NHS 酯(2.5eq) 以驱使反应接近完成。然后加入 20% ACN-01% aq. TFA 猝灭反应物,

通过制备 RP-HPLC 纯化产物,条件描述于实施例 3f) 和在表 3 中。将通过 LC-MS 分析鉴定为需要的单 - 标记 rhTGF α 13 的主要峰流分冷冻干燥,条件描述于实施例 3g) 和在表 4 中。

[0329] c) 抗 -EGFR affibody His₆-ZEGFR :₁₉₀₇-Cys 的 Cy5^{**}- 标记

[0330] 使 His₆-ZEGFR :₁₉₀₇-Cys affibody 溶于 0.1M PBS 缓冲液, pH 7.4 (0.2ml) 中,加入 TCEP 在 PBS- 缓冲液 (1mg/mL, 0.2mL) 中的溶液,将混合物置于冰箱中 2 小时以确保完全还原 Cys 残基。加入四磺酸化 Cy5^{**}-N-(2- 氨基乙基) 马来酰亚胺 (1.3mg) 在 PBS- 缓冲液 (0.2mL) 中的溶液,用 LC-MS 监测反应进程。6 小时后看到全部转化为所需产物,用 0.05% TFA 基洗脱液通过制备 RP-HPLC 纯化分离 Cy5^{**}- 耦合的 affibody,条件描述于实施例 3f) 和表 3 中。将 1M 乙酸铵缓冲液加入接收瓶内以中和洗脱液,因为 affibody 在低于 4.5 的 pH 容易凝聚。将通过 LC-MS 分析鉴定为所需的单 - 标记抗 -EGFR affibody 14 的主要峰流分冷冻干燥,条件描述于实施例 3g) 和在表 4 中。

[0331] 实施例 5 :化合物 1-14 的 RP-HPLC 纯化

[0332] 详细概述见表 3 :

[0333] 表 3. RP-HPLC 纯化

[0334]

化合物		梯度	溶剂中的酸%	保留时间 (min)	产量(mg)
1	a	20-30% B; 80 min	0.1 TFA	38,4	5.3
	b	20-30% B; 80 min	0.1 TFA	49,5	7.6
2b		20-30% B; 80 min	0.1 TFA	46,4	4.6
3b		20-30% B; 80 min	0.1 TFA	48,6	5.5
4b		15-50% B; 40 min	0.1 TFA	20.9	5.4
5c		18-25% B; 40 min	0.1 TFA	41.5	4.6
6b		15-30% B; 40 min	0.1 TFA	29.8	6.0
7c		20-40% B; 40 min	0.1 FA	31.3	1.2
9c		20-50% B; 40 min	0.1 TFA	20.4	3.3
10b		20-50% B; 40 min	0.1 FA	27.6	5.3
11c		25-50% B; 40 min	0.1 TFA	21.4	1.6
12		20-40% B; 60 min	0.1 TFA	30.2	0.2-0.3
13		25-40% B; 60 min	0.1 TFA	30.8	0.2-0.3
14		30-70% B; 40 min	0.05 TFA	17.3	0.1-0.2

[0335] 实施例 6 :化合物 1-14 的表征

[0336] 详细概述见表 4 :

[0337] 表 4 :化合物 1-14 的表征

[0338]

化合物		梯度	溶剂中的酸%	仪器	保留时间 (min)	MS	
						预期的 m/z	实测的 m/z
1	a	15-30% B	0.1 TFA	2	2,9	MH ⁺ 1539.7	1540,2
	b	15-30% B	0.1 TFA	1	3,6	MH ₂ ²⁺	1204,6
2	b	15-30% B	0.1 TFA	2	3,2	MH ₂ ²⁺	1268,8
3	b	15-30% B	0.1 TFA	2	3,3	MH ₂ ²⁺	1413,8
4	b	15-30% B	0.1 TFA	1	3.1	MH ₂ ²⁺	1015.9
5	c	15-40% B	0.1 TFA	1	1.9	MH ₂ ²⁺	1150.9
6	b	10-30% B	0.1 TFA	1	3.3	MH ₂ ²⁺	1157.5
7	c	15-40% B	0.1 FA	1	1.7	MH ₂ ²⁺	1171.5
8	a	15-25% B	0.1 FA	1	3.1	MH ⁺ 1278.3	1278.5
9	c	10-40% B	0.1 TFA	1	3.4	MH ₂ ²⁺	1157.9
10	b	20-50% B	0.1 FA	1	2.0	MH ₂ ²⁺	1164.5
11	c	20-40% B	0.1 TFA	1	1.4	MH ₂ ²⁺	1178.5
12		20-40% B	0.1 TFA	1	2.7	MH ₄ ⁴⁺	1804.6
13		15-35% B	0.05 TFA	3	7.7	MH ₄ ⁴⁺	1604.3
14		2-95% B	0.05 TFA	3	5.2	MH ₅ ⁵⁺ 1834.2	1833.8

[0339] 实施例 7 : 荧光偏振结合测定

[0340] 在对人 EGFR 的荧光偏振结合测定中测试化合物 12、13 和 14。

[0341] 用 Tecan Safire 荧光偏振读板器在 ex646/em678nm 在 40 μL 体积结合缓冲液 (PBS, 0.01% 吐温-20, pH 7.5) 中, 在 384 孔微量板中一式三份地进行荧光偏振结合测量。染料标记的配体浓度保持不变 (5nM), 靶标 (购自 R&D systems 的人重组 EGFR/Fc 嵌合体, cat. no 344-ER) 的浓度在 0-258nM 变化。在 30°C 使结合混合物在微量板中平衡 10 分钟。将观察到的各向异性 (anisotropy) 变化拟合至方程

$$[0342] \quad \gamma_{obs} = \gamma_{free} + \left(\gamma_{bound} - \gamma_{free} \right) \frac{(K_d + cT + P) - \sqrt{(K_d + cT + P)^2 - 4 \cdot cT \cdot P}}{2 \cdot P}$$

[0343] 其中 γ_{obs} 是实测各向异性, γ_{free} 是游离肽的各向异性, γ_{bound} 是结合肽的各向异性, K_d 是解离常数, cT 是总靶标浓度, P 是总染料标记肽浓度。该方程假定配体与报道分子以 1 : 1 化学计量在溶液中形成可逆性复合物。用 SigmaPlot 软件 (版本 10) 通过非线性回归进行数据拟合以得到 K_d 值。

[0344] 结果显示化合物 12 和 13 的 K_d 值分别为 11.9+/-1.4nM 和 22.1+/-3.7nM, 而化合物 14 对人 EGFR 的 K_d 值为 4.1+/-0.4nM。

[0345] 实施例 8 : 组织微阵列

[0346] 新鲜活检组织样品取自 Barrett 食管患者,具有一定组织学范围。总计有 107 份样品,包括 :20 份胃对照 ;7 份鳞状对照 ;20 份 Barrett 化生 ;20 份低度发育异常 ;20 份高度发育异常 ;和 20 份腺癌。在上述组织样品上进行组织微阵列,其中每个核心具有~0.6mm 直径和不同深度。组织微阵列的方案由 Camp et al 描述 [“Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma(在乳腺癌中组织微阵列技术的验证)”。Lab. Invest. 80,1943-1949(2000)]。完整切片来自从中获得核心的相同石蜡块。所有组织均来自患者活检,无患者接受特别针对食管发育异常 / 腺癌的化疗。

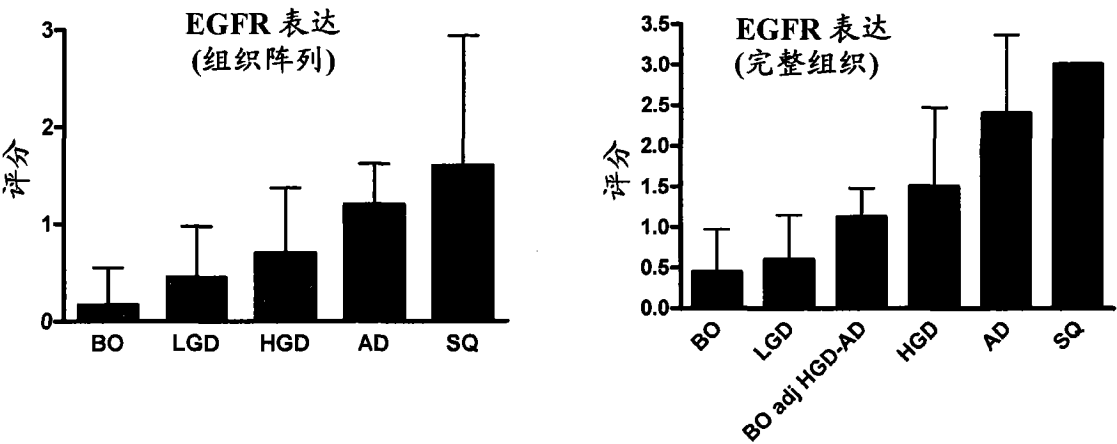
[0347] 通过用 EGFR 靶向抗体进行免疫组织化学染色,然后以 0-3 为基础评分,检测生物学标记 EGFR 的表达。另外,用阴性 /+ /++ /+++ /++++ /+++++ 评分法,在完整切片中进行相同分析。结果在下文描述。化生指组织性质的异常改变 (在食管化生中,正常鳞状上皮被柱状上皮代替),而发育异常指异常组织生长 (在食管发育异常中,化生的柱状上皮开始失去控制地增殖)。

[0348] EGFR 表达

[0349] 用组织阵列或完整组织切片,通过免疫组织化学评估食管癌发生不同阶段中的 EGFR 表达。结果显示于图 2 :

[0350] 图 2 :EGFR 表达

[0351]



[0352] BO :Barrett 食管 ;LGD :低度发育异常 ;HGD :高度发育异常 ;AD :腺癌 ;SQ :鳞状组织 ;adj :接近。

[0353] 完整切片中的 EGFR 表达 (备选评分法 ;以具体评分的组织样品的 %显示结果) :

[0354]

	阴性	+	++	+++	++++	+++++
BO	60%	33%	7%			
HGD		47%	47%	6%		
AD			33%	20%	27%	20%

[0355] 实施例 9 :EGFR 表达和诊断后患者生存率的 Kaplan-Meier 曲线分析

[0356] 用开始的患者生存数据 (在有效的情况下) 进行 Kaplan-Meier 曲线分析。Kaplan-Meier 分析是将参数与患者生存相关联的众所周知的临床工具。随时间推移研究食管癌患者以确定生存是否与 EGFR 的具体表达 - 低 (绿组) 或高 (蓝组) EGFR 水平相关。

在第 0 天即观察第一天,两组的所有患者均存活。在第~ 300 天,两组中 40%患者存活,即 EGFR 表达仍无影响。但是,至第~ 700 天,EGFR 表达水平强的所有患者已死亡,而低 EGFR 表达的患者生存更久(最久的一位~ 2 年后死亡)。