[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910127855.X

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 23 日

[11] 公开号 CN 101537190A

[51] Int. Cl. (续)
A61K 103/10 (2006.01)
A61K 103/20 (2006.01)
A61K 103/32 (2006.01)
A61K 103/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.7.8

[21] 申请号 200910127855.X

分案原申请号 02813864.3

[30] 优先权

[32] 2001.7.10 [33] GB [31] 0116815.2

[32] 2001.10.11 [33] NO [31] 20014954

[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·库斯伯特森 B·因德雷沃尔 M·索尔巴肯 C·M·阿歇尔 T·恩格尔 H·J·瓦德斯沃斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 付 磊

权利要求书 6 页 说明书 34 页

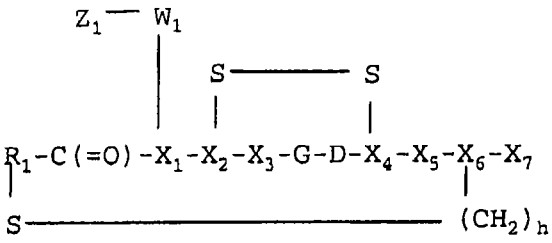
[54] 发明名称

肽基化合物

[57] 摘要

本发明涉及用作诊断成像剂或者治疗药物的新的肽基化合物，其中所述物质包括与整联蛋白受体结合的导向载体。

1. 通式(I)的化合物或者其药学可接受盐



(I)

其中

G 代表甘氨酸，

D 代表天冬氨酸，

R_1 代表$-(CH_2)_n-$或$-(CH_2)_n-C_6H_4-$，其中

n 代表正整数：1-10，

h 代表 1 或 2 的正整数，

X_1 代表氨基酸残基，其中所述氨基酸具有一个功能侧链，

X_2 和 X_4 独立地代表能形成二硫键的氨基酸残基，

X_3 代表精氨酸，N-甲基精氨酸或精氨酸模拟物，

X_5 代表疏水性氨基酸或者其衍生物，和

X_6 代表含有硫羟的氨基酸残基，和

X_7 不存在或者代表生物改性剂部分，

Z_1 代表抗肿瘤剂，螯合剂或者报道基因部分和

W_1 不存在或代表间隔基团部分。

2. 权利要求 1 要求的化合物，其中任何氨基酸残基独立地是 D 或 L 构型。

3. 权利要求 1 要求的化合物，其中 R_1 代表$-(CH_2)-$ 。

4. 权利要求 1－3 任一项要求的化合物，其中 X_1 代表天冬氨酸，谷氨酸，赖氨酸，高赖氨酸，二氨基脂环酸或其衍生物。

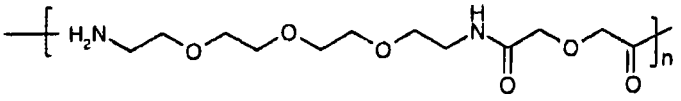
5. 权利要求 1－3 任一项要求的化合物，其中 X_2，X_4 和 X_6 独立地代表半胱氨酸或高半胱氨酸残基。

6. 权利要求 1－3 任一项要求的化合物，其中 X_3 代表精氨酸残基。

7. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 X_5 代表酪氨酸，苯丙氨酸，3-碘-酪氨酸或萘基丙氨酸残基。

8. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 X_7 不存在或者包括 1-10 单元的单分散 PEG 结构单元。

9. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 X_7 不存在或者包括 1-10 单元的式 II



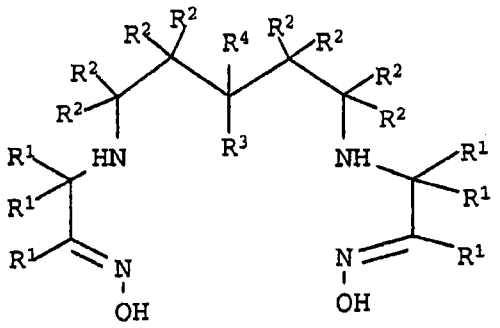
(II)

。

10. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 X_7 代表 1-10 个氨基酸残基。

11. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 X_7 代表甘氨酸，赖氨酸，天冬氨酸或丝氨酸残基。

12. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 Z_1 是式 III 的螯合剂

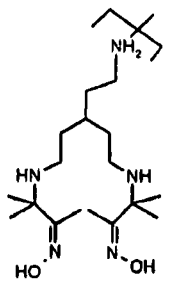


(III)

其中

各个 R^1，R^2，R^3，和 R^4 独立地是 R 基团；各个 R 基团独立地是 H 或 C_{1-10} 烷基，C_{3-10} 烷基芳基，C_{2-10} 烷氧基烷基，C_{1-10} 羟基烷基，C_{1-10} 烷基胺，C_{1-10} 氟代烷基，或者两个或多个 R 基团，与它们连接的原子一起形成碳环，杂环，饱和的或不饱和的环。

13. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 Z_1 是



e

。

14. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 Z_1 包括报道基因部分。

15. 权利要求 14 要求的化合物，其中报道基因部分包括金属放射性核素，顺磁性金属离子，荧光金属离子，重金属离子或簇离子。

16. 权利要求 14 和 15 要求的化合物，其中报道基因部分包括 ^{90}Y，^{99m}Tc，^{111}In，^{47}Sc，^{67}Ga，^{51}Cr，^{177m}Sn，^{67}Cu，^{167}Tm，^{97}Ru，^{188}Re，^{177}Lu，^{199}Au，^{203}Pb，^{141}Ce 或 ^{18}F。

17. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中报道基因部分是 ^{99m}Tc。

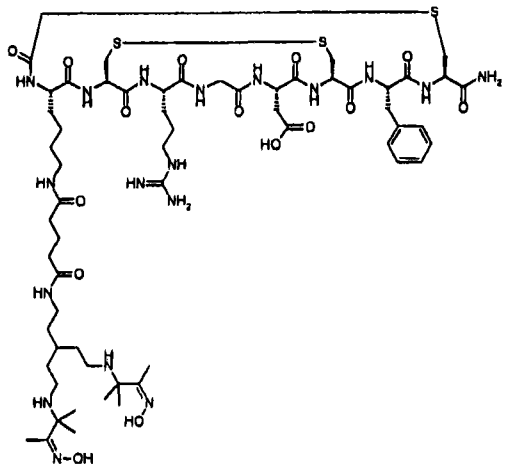
18. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 Z_1 是抗肿瘤剂。

19. 权利要求 18 要求的化合物，其中 Z_1 代表环磷酰胺，苯丁酸氮芥，二甲磺酸丁酯，甲氨喋呤，阿糖孢苷，氟尿嘧啶，长春碱，紫杉醇，阿霉素，柔红霉素，依托泊苷，替尼泊苷，顺铂，安吖啶或多西紫杉。

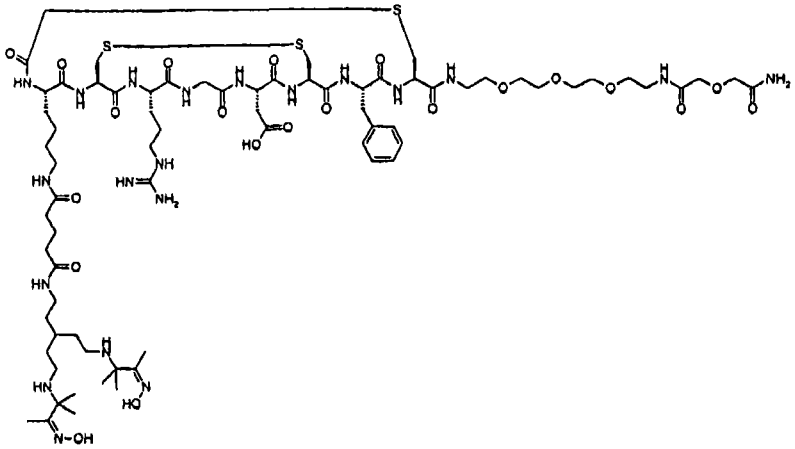
20. 权利要求 1 - 3 任一项要求的化合物，其中 W_1 是戊二酸或琥珀酸。

21. 权利要求 1 要求的化合物，其由下式所定义:

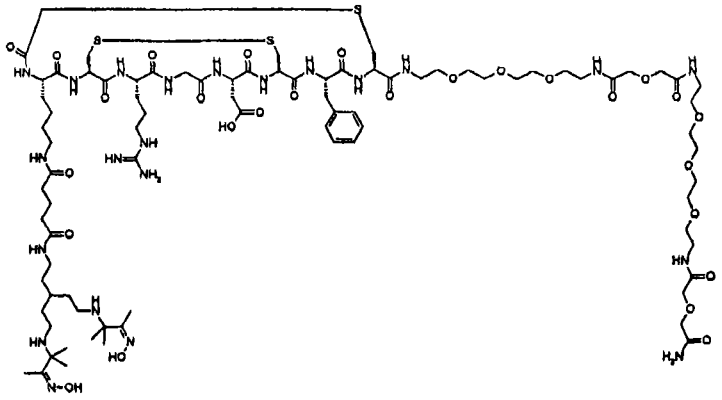
化合物 I



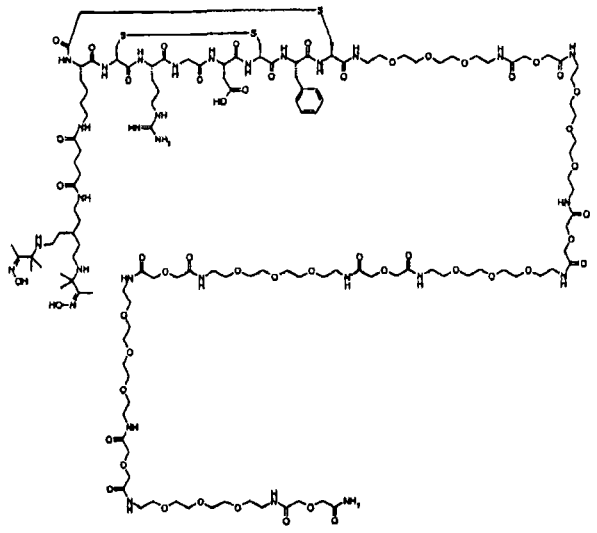
化合物 II



化合物 III



化合物 IV



22. 一种药物组合物，它含有有效量的通式（I）的化合物或者其盐，和一种或多种药学可接受佐剂、赋形剂或稀释剂。

23. 权利要求 1－21 任一项要求的化合物在制备造影介质中的用途。

24. 权利要求 1－21 任一项要求的化合物在制备用于对事先施用造影剂的人体或动物体进行成像的造影剂方面的用途。

25. 权利要求 1 要求的化合物在制备用于对事先施用造影剂组合物的人体或动物体产生增强成像的造影剂组合物方面的用途。

26. 权利要求 1－22 任一项要求的化合物或组合物在制备用于监测一种药物对人体或动物体与癌症相关的症状的治疗效果的药物方面的用途，其中所述人体或动物体事先施用权利要求 1－22 任一项要求的化合物或

组合物，所述用途包括检测细胞受体对所述化合物或组合物的摄取，其中所述施用和检测任选地反复进行，在用所述化合物或组合物治疗之前、期间和之后。

27. 权利要求 1－12 和权利要求 18－19 中任一项要求的化合物用于制备用于对人或动物的癌症或相关疾病的治疗性或预防性治疗的药物的用途。

肽基化合物

本申请是申请号为02813864.3、申请日为2002年7月8日的发明专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及新的肽基化合物和它们在治疗有效疗法中的用途以及用于诊断成像技术的用途。更具体地，本发明涉及这样的肽基化合物作为与和血管发生相关的受体结合的导向载体的用途，特别是整联蛋白受体，例如αvβ3整联蛋白受体。因此这样的造影剂可以用于诊断例如恶性疾病，心脏病，子宫内膜异位，与炎症相关的疾病，类风湿性关节炎和卡波济氏肉瘤。此外，这样的试剂可以在这些疾病的治疗性疗法中使用。

背景技术

新血管能通过两种不同的机理形成：血管发生或血管生成。 血管发生是从存在的血管分支形成新血管。这种过程的主要刺激可能是对组织中的细胞的不充分的营养和氧（氧不足）的供应。细胞可以通过分泌多种的血管发生因子响应；常常提到的一个例子是血管内皮生长因子(VEGF)。这些因子引起蛋白水解酶的分泌，蛋白水解酶裂解基膜蛋白质，还有限制这些可能有害的酶的作用的抑制剂。血管发生因子的其他突出的作用是引起内皮细胞的移行和分裂。与基膜附着的围绕血管在 contralumenal 侧上形成连续片状的内皮细胞没有经历有丝分裂。附着损失和来自血管发生因子的受体的信号的联合作用引起内皮细胞移动，繁殖，并且自身重排，最终在新血管周围合成基膜。

血管发生在组织生长和重组中是突出的，包括伤口愈合和炎症过程。

当肿瘤达到毫米大小时为了保持它们的生长速度，必须开始血管发生。血管发生伴随内皮细胞和它们的环境的特征性变化。除了在影响和控制蛋白质水解中涉及的各种蛋白质之外，在准备移行中这些细胞的表面被重组，基膜被降解的地方隐蔽结构被暴露。在肿瘤的情况下，得到的血管网通常被打乱，形成明显的关联还有动静脉分路。对血管发生的抑制作用被认为是抗肿瘤治疗的有希望的策略。

伴随血管发生的转化作用对于诊断也是非常有希望的，一个明显

的例子是恶性疾病，但是这个概念还指出对炎症和各种与炎症相关的疾病非常有前途，包括动脉粥样硬化，早期动脉粥样硬化损伤的巨噬细胞可能是血管发生因子的潜在根源。在心肌梗塞部分再血管化作用中也涉及这些因子，如果短时间内狭窄得以解决，则发生心肌梗塞部分再血管化作用。

下面给出与新血管形成或血管发生，新血管的发育或增殖有关的不期望病症的其他例子。关于这方面也可参见WO 98/47541。

与血管发生有关的疾病和征兆是例如各种形式的癌症和转移，例如乳腺癌，皮肤癌，结肠癌，胰腺癌，前列腺癌，肺癌或卵巢癌。

其他疾病和征兆是炎症(例如慢性的)，动脉粥样硬化，类风湿性关节炎和牙龈炎。

与血管发生有关的其他疾病和征兆是动静脉alformations，星形细胞瘤，绒毛膜癌，成胶质细胞瘤，神经胶质瘤，血管瘤(儿童期，毛细血管)，肝细胞瘤，子宫内膜增生，心肌缺血，子宫内膜异位，卡波济氏肉瘤，斑变性，黑素瘤，成神经细胞瘤，外周动脉闭塞疾病，骨关节炎，牛皮癣，视网膜病（糖尿病，增生），硬皮病，精原细胞瘤和溃疡性结肠炎。

血管发生涉及对内皮细胞和周围的组织独特的受体。这些标志包括生长因子受体例如VEGF和整联蛋白家族受体。免疫组织化学研究证明各种整联蛋白可能最重要的是 α_v 类的在血管顶端表面上表达[Conforti，G. ，等，(1992) Blood 80: 37- 446]并且是对于通过循环配体的导向的可利用的[Pasqualini，R. ，等，(1997) Nature Biotechnology 15: 542- 546]。α5β1也是促进纤连蛋白基质装配和引发细胞附着纤连蛋白的重要的整联蛋白。它在细胞移行 [Bauer，J. S. ，(1992) J. Cell Biol. 116: 477-487] 以及肿瘤发病和转移中也起着重要的作用[Gehlsen，K. R.，(1988) J. Cell Biol. 106: 925 - 930]。

整联蛋白αvβ3是已知与血管发生有关的受体中的一种。受刺激的内皮细胞表现出在血管发生过程的关键时期的存活取决于这种受体，因为αvβ3整联蛋白受体／配体相互作用的拮抗剂诱导编程性细胞死亡并且抑制血管生长。

整联蛋白是杂二聚体，其中 α－和 β－亚基渗透细胞膜脂双层。α

-亚基在其胞外链上有四个 Ca^{2+} 结合结构域，β-亚基有多个半胱氨酸-富集结构域。

细胞粘着中涉及的很多配体（例如纤连蛋白）包含三肽序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（RGD）。该 RGD 序列表现出作为代表该序列的配体与细胞表面上的受体之间的基本识别位点而起作用。一般认为配体和受体之间的二级相互作用提高相互作用的特异性。这些二级作用可能发生在配体和紧邻 RGD 序列的受体之间的部分或者发生在远离 RGD 序列的位点。

已知 RGD 肽与很多种整联蛋白受体结合并且有调节临床显著应用的很多种细胞作用的潜力（Ruoslahti，J.Clin.Invest.，87:1-5(1991)）。可能对于 RGD 肽及其模拟物的最广泛研究的作用涉及它们作为导向血小板整联蛋白 GpIIbIIIa 的抗凝剂。

例如 WO97／06791 和 WO95／25543 中描述过使用抗体或者包含 RGD 的肽通过施用 αvβ3 或 αvβ5 对组织中相关发生的抑制作用。EP578083 描述了一系列包含单环 RGD 的肽，WO90／14103 要求保护 RGD-抗体。Haubner 等在 J.Nucl.Med.（1999）；40: 1061-1071 中描述了新的一类以包含单环 RGD 的肽为基础的导向肿瘤的示踪剂。使用全身放射自显影的生物分布研究揭示 ^{125}I-标记肽具有非常快的血液清除率和主要肝胆管排泄途径，导致高背景。

WO98/54347 和 WO95/14714 中还描述了包含多个桥键的环 RGD 肽。从体内生物淘选得到的肽（WO97/10507）已经被用于各种各样的导向应用。序列 CDCRGDCFC（RGD-4C）被用来药物导向，例如 doxirubicin(WO98/10795)，核酸和腺病毒（参见 WO99/40214，WO99/39734，WO98/54347，WO98/54346，US5846782）。不管怎样包含多个半胱氨酸残基的肽有着多个二硫键异构体能发生的缺陷。有 4 个半胱氨酸残基的肽例如 RGD-4C 有着形成 3 种不同的二硫键折叠形式的可能性。因为 RGD 药学核心被迫形成三种不同的构象，因此这些异构体对于整联蛋白受体有不同的亲和性。

PCT/NO01/00146 和 PCT/NO01/00390 公开了包含 RGD 的肽为基础的化合物的其他例子，这些专利文献在此引作参考。

因此与体内血管发生相关的整联蛋白受体的有效导向和成像要求化学稳健和稳定的选择性、高亲和性 RGD 为基础的载体。因此，当为

了减少与背景有关的问题而设计显像剂时，排泄途径是重要的因素。本发明描述的二环结构符合这些严格条件。

发明内容

本发明的描述

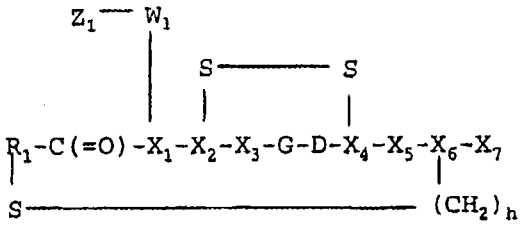
本发明的一方面提供如权利要求书中定义的式 I 的新的肽为基础的化合物。这些化合物对整联蛋白受体有亲和性，例如对整联蛋白 αvβ3 有亲和性。

式 I 的化合物具有至少两个桥键，其中一个桥键形成二硫键，第二个桥键包括硫醚（硫）键，并且所述桥键中将肽部分折叠成“巢”构型。

因此，本发明的化合物每个分子部分最多有一个二硫桥。本发明定义的化合物具有令人惊奇地体内稳定性，并且稳定于符合标记条件下，例如用锝标记中应用的条件。

这些新的化合物可以用于治疗有效疗法以及用于成像目的。

式 I 定义本发明描述的新的肽为基础的化合物或者其生理可接受盐：



(I)

其中

G 代表甘氨酸，和

D 代表天冬氨酸，和

R_1 代表 $-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-$，优选 R_1 代表 $-(CH_2)-$，和

n 代表 1 和 10 之间的正整数，和

h 代表 1 或 2 的正整数，和

X_1 代表氨基酸残基，其中所述氨基酸具有一个功能侧链例如酸或胺，优选天冬氨酸或谷氨酸，赖氨酸，高赖氨酸，二氨基脂环酸（alcylic

acid）或二氨基丙酸，

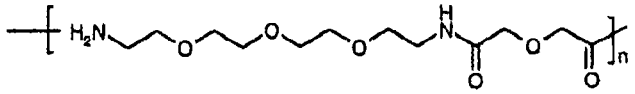
X_2 和 X_4 独立地代表能形成二硫键的氨基酸残基，优选半胱氨酸或高半胱氨酸残基，和

X_3 代表精氨酸，N-甲基精氨酸或精氨酸模拟物，优选精氨酸，和

X_5 代表疏水性氨基酸或者其衍生物，优选酪氨酸，苯丙氨酸，3-碘-酪氨酸或萘基丙氨酸残基，更优选苯丙氨酸或 3-碘-酪氨酸残基，和

X_6 代表含有硫羟的氨基酸残基，优选半胱氨酸或高半胱氨酸残基，和

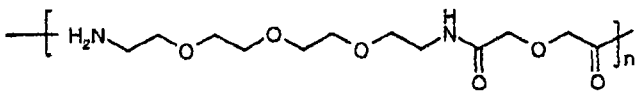
X_7 不存在或者代表优选以单分散性 PEG 结构单元为基础的均相生物改性剂部分，包括 1－10 个所述结构单元链节，所述生物改性剂具有改变所述药物的药物动力学和血液清除率的功能。另外，X_7 还可以代表 1－10 个氨基酸残基，优选甘氨酸，赖氨酸，天冬氨酸或丝氨酸。在本发明优选的实施方案中，X_7 代表由单分散性 PEG 类似结构的聚合作用构成的生物改性剂单元，式 II 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸



(II)

其中 n 等于 1－10 的整数并且其中 C-末端单元是酰胺部分。

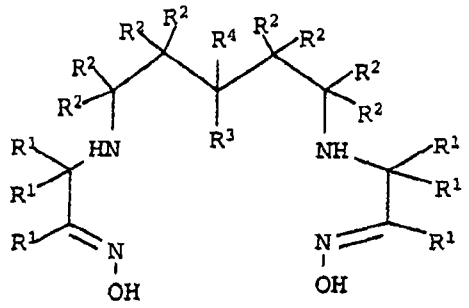
W_1 不存在或代表间隔基团部分并且优选从戊二酸和／或琥珀酸和／或聚乙二醇为基础的单元和／或式 II 的单元衍生出：



(II)

Z_1 是抗肿瘤剂，螯合剂或者报道基因部分，可以用式 III 的螯合

剂代表

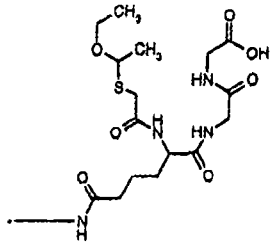


(III)

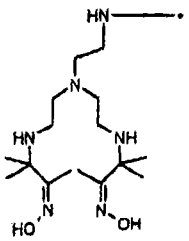
其中

各个 R^1，R^2，R^3，和 R^4 独立地是 R 基团；各个 R 基团独立地是 H 或 C_{1-10} 烷基，C_{3-10} 烷基芳基，C_{2-10} 烷氧基烷基，C_{1-10} 羟基烷基，C_{1-10} 烷基胺，C_{1-10} 氟代烷基，或者两个或多个 R 基团，与它们连接的原子一起形成碳环，杂环，饱和的或不饱和的环，

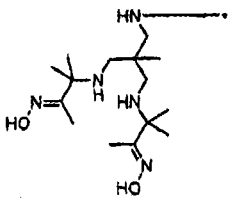
或者能代表式 a，b，c 或 d 给出的螯合剂：



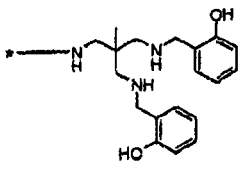
a



b

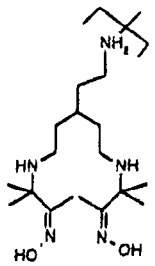


c



d

式 e 代表螯合剂的优选的实施例：



e

。

室温下，接近中性 pH 有水存在的条件下，可以将包括式 III 的螯合剂的轭合物进行放射性标记，给出好的放射化学纯度，RCP。室温下打开肽成分的二硫桥的风险比高温小。室温下放射性标记轭合物的另一个优点是医院配药程序简便。

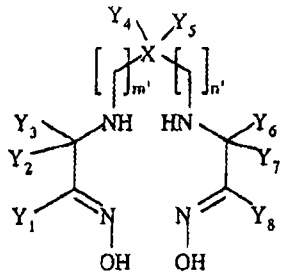
间隔基团部分 W_1 的作用是使相对大的螯合剂与肽成分的活性位点之间有距离。间隔基团部分 W_1 还用于使大的抗肿瘤剂与肽的活性位点之间有距离。

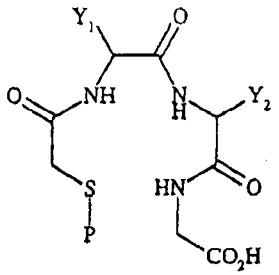
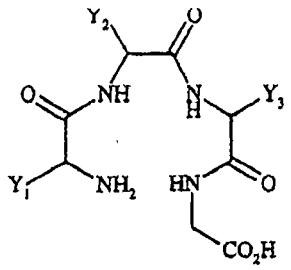
发现生物改性剂，X_7，改变化合物的药物动力学和血液清除率。生物改性剂使组织，例如肌肉，肝脏等较少吸收化合物，因此由于较少背景干扰而给出较好的诊断成像。生物改性剂的另一个优点是排泄主要通过肾。

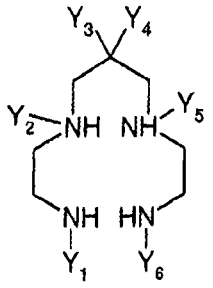
但是，式 I 定义的化合物还可以包括螯合剂，Z1，如表 I 中定义。

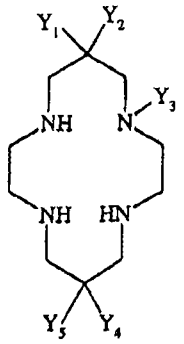
在本发明的一些方面，Z_1 包括报道基因部分，其中所述报道基因部分包括放射性核素。下面的表 I 中列出了螯合剂的其他定义。

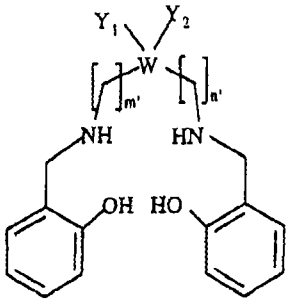
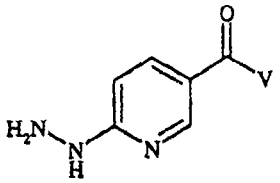
表 I:

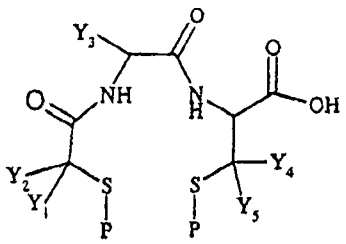
配体类别	结构	定义
胺肟		Y 1-8 是 H，烷基，芳基或它们的组合 并且 Y4 或 Y5 包含合适的官能团，使得它能与肽载体偶联—例如优选地烷基胺，烷基硫化物，烷氧基，羧酸烷基酯，芳基胺，芳基硫化物或α-卤代乙酰基，当 m′=n′=1 时 X=C 或 N 当 m′=n′=2 时 X=N

配体类别	结构	定义
MAG3 型		P=保护基团（优选苯甲酰基，乙酰基，EOE）； Y1，Y2 包含合适的官能团，使得它能与肽载体偶联；优选地，H(MAG3)，或任何氨基酸的侧链，或者 L 型或者 D 型。
G4 型配体		Y1，Y2，Y3-包含合适的官能团，使得它能与肽载体偶联；优选地 H，或者任何氨基酸的侧链，或者 L 型或者 D 型。

配体类别	结构	定义
四胺配体		Y1-Y6 可以是 H，烷基，芳基或它们的组合 并且 Y1-Y6 基团包含一个或多个官能团部分，使得螯合物能与载体偶联—例如优选地烷基胺，烷基硫化物，烷氧基，羧酸烷基酯，芳基胺，芳基硫化物或α-卤代乙酰基

配体类别	结构	定义
Cylam 型配体		Y1-5 可以是 H，烷基，芳基或它们的组合 其中 Y1-5 基团包含一个或多个官能团部分，使得螯合物能与载体偶联—例如优选地烷基胺，烷基硫化物，烷氧基，羧酸烷基酯，烷基胺，芳基硫化物或α-卤代乙酰基

配体类别	结构	定义
二胺二苯酚		Y1，Y2-H，烷基，芳基 并且其中 Y1 或 Y2 基团包含官能团部分，使得螯合物能与载体偶联—例如优选地烷基胺，烷基硫化物，烷氧基，羧酸烷基酯，芳基胺，芳基硫化物或α-卤代乙酰基 W=C，N m′=n′=1 或 2
HYNIC		V=与载体连接的连接基团或者载体本身

配体类别	结构	定义
酰胺硫醇		P=保护基团（优选地苯甲酰基，乙酰基，EOE）； Y1-5=H，烷基，芳基；或者Y3是L或D氨基酸侧链或甘氨酸并且羧酸酯可以用于通过酰胺键与载体偶联。或者R1-5基团可以包含另外的官能团，使得整合物能与载体偶联—例如烷基胺，烷基硫化物，烷氧基，羧酸烷基酯，芳基胺，芳基硫化物或α-卤代乙酰基

在本发明式I的一些方面，Z_1部分包括结合^{18}F同位素或Cu同位素，作为辅基或者通过取代或加成反应而掺合到试剂中。因此得到的化合物可以在正电子发射断层扫描（PET）成像中使用。

在本发明式I的一个方面中，Z_1代表抗肿瘤剂。在这方面，化合物定向与癌相关的血管发生位点并且将抗肿瘤剂带给病灶区。

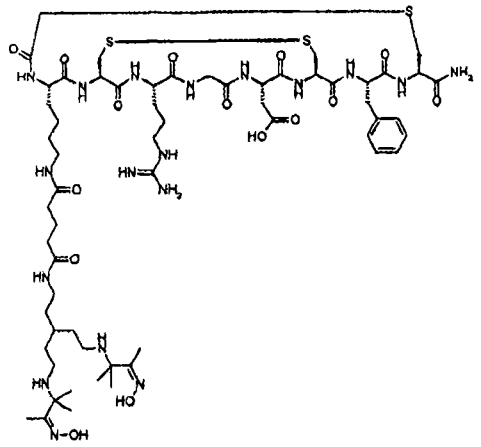
抗肿瘤剂可以是环磷酰胺，苯丁酸氮芥，二甲磺酸丁酯，甲氨喋呤，阿糖孢苷，氟尿嘧啶，长春碱，紫杉醇，阿霉素，柔红霉素，依托泊苷，替尼泊苷，顺铂，安吖啶，多西紫杉，但是也可以使用宽范围的其他抗肿瘤剂。

这里描述的轭合物的肽成分优选没有自由氨基－或羧基－末端。这使得这些化合物抗酶促降解的抗性显著提高，结果它们与很多已知的自由肽相比体内稳定性提高。

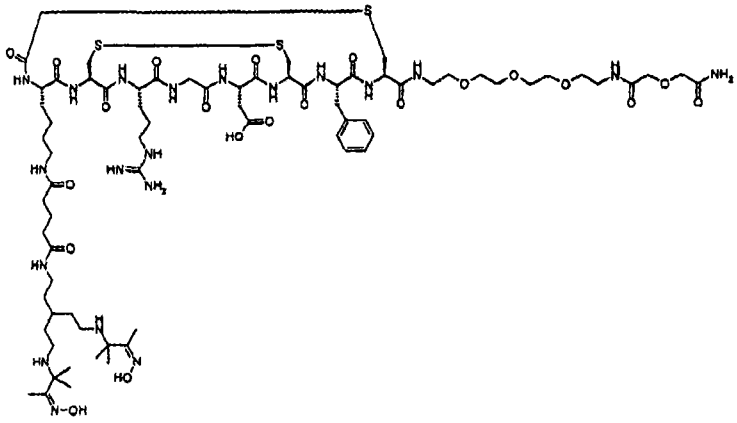
根据这里使用的术语“氨基酸”指它的最广义意义的蛋白质源的L-氨基酸，D-氨基酸，化学改性的氨基酸，N-甲基，Cα-甲基和氨基酸侧链模拟物和非天然氨基酸例如萘基丙氨酸。任何天然存在的氨基酸或者这样的天然存在的氨基酸的模拟物都是优选的。

下面的化合物I-IV详细说明式I的化合物的一些优选实施方案：

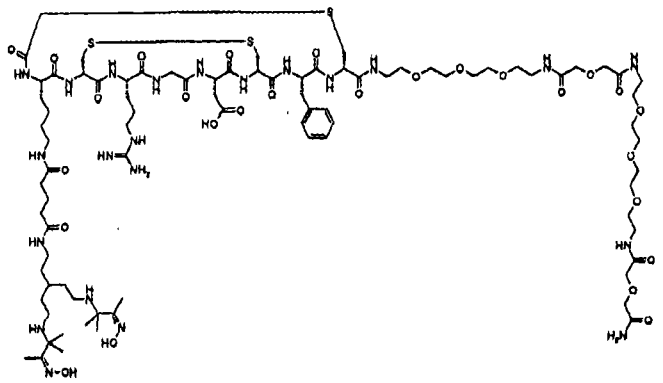
化合物 I



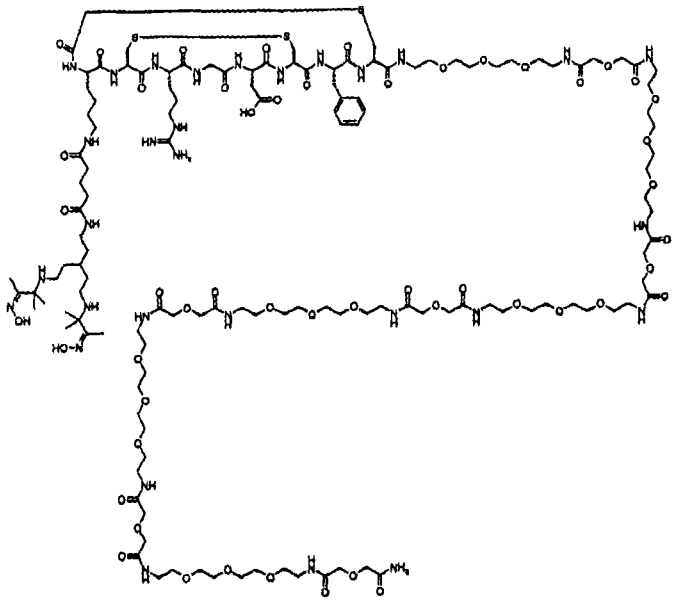
化合物 II



化合物 III



化合物 IV



在大多数情况下，优选的是肽中的氨基酸全部是 L-型。但是，在本发明的一些实施方案中，肽中的氨基酸中的一个，两个，三个或多个优选是 D-型。包含这样的 D-型氨基酸对化合物的血清稳定性有显著作用。

根据本发明，式 I 中定义的任何氨基酸残基可以优选代表天然存在的氨基酸，并且独立地是 D-或 L-构型之任何一种。

本发明的一些化合物是高亲和性 RGD 为基础的载体。根据这里使用的，术语“高亲和性 RGD 为基础的载体”指在对 αvβ3 整联蛋白的竞争结合测试中 Ki < 10 nM 并且优选< 5 nM ，并且 Ki 值通过与已知的高亲和性配体锯鳞血抑肽竞争而测得的化合物。实施这样的竞争测试的方法是本领域公知的。

本发明还提供含有有效量的（例如在体内成像中增强成像对照的有效量）通式 I 的化合物或者其盐，和一种或多种药学可接受佐剂，赋形剂或稀释剂的药物组合物。

本发明还提供含有有效量的通式 I 的化合物或者其酸加成盐，和一种或多种药学可接受佐剂，赋形剂或稀释剂的用于治疗疾病的药物组合物。

其他有代表性的间隔基团(W_1)成分包括结构-型多糖，贮存-型多糖，多氨基酸和它的甲酯和乙酯酯，和多肽，寡糖和寡核苷酸，它们可以包含或不包含酶裂解位点。

本发明造影剂中的报道基因 (Z_1) 可以是在体内诊断成像过程中能直接或间接检测的任何部分。优选地，造影剂包括一个报道基因。优选的是散发或者可被引起散发射线（例如通过放射性衰变）的部分。

对于 MR 成像，报道基因是非零核自旋同位素(例如 ^{19}F)或者具有没有配对的电子自旋因此有顺磁性，超顺磁性，铁氧体磁性或铁磁体性质的材料；对于光成像，报道基因是光散射体(例如有色的或没有色的颗粒)，光吸收体或光发射体；对于磁量成像，报道基因具有可检测磁性；对于电抗成像，报道基因影响电抗；对于闪烁成像法，SPECT，PET，等等，报道基因是放射性核素。

一般来说，报道基因可以是(1)可螯合金属或包含多原子金属的离子(即 TcO，等)，其中所述金属是高原子数金属(例如原子数大于 37)，顺磁物质(例如过渡金属或镧系)，或放射性同位素，(2) 共价键合的非金属物质，它是没有配对的电子点(例如存留自由基中的氧或碳)，高原子数非金属，或放射性同位素，(3) 含有高原子数原子，显示协同的磁性性状（例如超顺磁性，铁氧体磁性或铁磁性）或者包含放射性核素的多原子簇或晶体。

下面更详细描述特别优选的报道基因(Z_1)的实施例。

螯合金属报道基因优选选自如下：^{90}Y，^{99m}Tc，^{111}In，^{47}Sc，^{67}Ga，

^{51}Cr，^{177m}Sn，^{67}Cu，^{167}Tm，^{97}Ru，^{188}Re，^{177}Lu，^{199}Au，^{203}Pb 和 ^{141}Ce。

连接基团部分上的螯合基团理想的是与金属离子螯合。合适的螯合基团的其他例子公开于 US-A-4647447，WO89/00557，US-A-5367080，US-A-5364613。

本发明的金属与任何螯合剂螯合的方法在本领域技术人员的水平内。通过三种一般方法中的任一种，金属能与螯合剂部分结合：直接结合，模板合成和/或金属转移作用。直接结合是优选的。

因此期望金属离子容易与螯合剂络合，例如，只是通过使含有螯合剂部分的水溶液与优选 pH 范围大约 4 至大约 11 的水溶液中的金属接触或混合。所述盐可以是任何盐，但是优选所述盐是金属的水溶性盐，例如卤化物盐，更优选选择这样的盐使得不干扰金属离子与螯合剂的结合。

含有螯合剂的部分优选在 pH 在大约 5 和大约 9 之间，更优选 pH 在大约 6 和大约 8 之间水溶液中。含有螯合剂的部分能与缓冲盐例如柠檬酸盐，碳酸盐，乙酸盐，磷酸盐和硼酸盐混合，达到最佳 pH。优选地，选择缓冲盐使得不干扰接着的金属离子与螯合剂的结合。

下面的同位素或同位素对能被用于成像和治疗而不改变放射标记方法或螯合剂：

$^{47}Sc_{21}$；$^{141}Ce_{58}$；$^{188}Re_{75}$；$^{177}Lu_{71}$；$^{199}Au_{79}$；$^{47}Sc_{21}$；$^{131}I_{53}$；$^{67}Cu_{29}$；$^{131}I_{53}$ 和 $^{123}I_{53}$；$^{188}Re_{75}$ 和 $^{99m}Tc_{43}$；$^{90}Y_{39}$ 和 $^{87}Y_{39}$；$^{47}Sc_{21}$ 和 $^{44}Sc_{21}$；$^{90}Y_{39}$ 和 $^{123}I_{53}$；$^{146}Sm_{62}$ 和 $^{153}Sm_{62}$；和 $^{90}Y_{39}$ 和 $^{111}In_{49}$。

优选的非金属原子报道基因包括放射性同位素例如 ^{123}I，^{131}I 和 ^{18}F 和非零核自旋原子例如 ^{19}F，和重原子例如 I。

在本发明的另一个实施方案中，具体涉及碘或氟放射性同位素的使用。例如，如果肽或连接基团由能在共价键生成反应中被碘或氟化学取代的取代基组成，例如，包含羟基苯基或对硝基苯甲酰基官能团的取代基，这样的取代基可以通过本领域公知的方法分别用碘或氟的放射性同位素标记。这些基团可以用于治疗性或诊断性成像应用中。同时，在治疗性或诊断性成像应用中也可以使用与相同的肽-连接基团上的螯合剂连接的金属。

本发明优选的实施方案涉及特别用于肿瘤成像的通式(I)的放射

性标记试剂。

可以对患者施用足够量的得到与特定成像技术期望的对比度的本发明的诊断剂用于成像。报道基因是金属的情况下，一般情况下，每千克患者体重使用 0.001 至 5.0 毫摩尔螯合成像金属离子的剂量有效实现足够的对比度提高。 对于报道基因是放射性核素，每 70kg 体重使用 0.01 至 100 mCi，优选 0.1 至 50 mCi 的剂量一般是足够的。

用于治疗用途的本发明的化合物的剂量取决于要治疗的病症，但是一般是 1 pmol/kg 至 1 mmol/kg 体重级。

因此，根据本发明的化合物可以使用本领域技术人员公知的生理可接受载体或赋形剂加以配制用于给药。例如，化合物，任选地加有药学可接受赋形剂，可以悬浮或溶解于含水介质，然后将得到的溶液或混悬液灭菌。

式 I 的化合物在对病症的治疗中是治疗有效的，并且在体内成像中是可检测的 。因此，例如信号基因部分上的载体具有治疗功效，例如凭借载体部分的放射性核素报道基因的放射性治疗作用。

因此认为式 I 的化合物在治疗组合物（药物）的制备中的用途，和对人体或动物体的治疗性疗法或预防性治疗，优选对癌症的治疗方法中的用途代表本发明的另一方面。

本申请上下文中可以使用的报道基因的其他例子在 WO98/47541 的第 63-66 和 70-86 页给出，这些页上的公开内容全部在此引作参考。因此主张上面提到的页中公开的每一个和所有报道基因或者其部分认为是本申请中包含的本发明说明书的一部分。

本发明的另一方面提供式 I 的化合物用于制备在涉及对人体或动物体施用造影介质并且对所述人体或动物体的至少一部分成像的诊断方法中使用所述造影介质的用途。

本发明的另一方面提供涉及对所述人体或动物体施用造影剂，例如施用到脉管系统，并且对所述人体或动物体的至少一部分成像的对人体或动物体成像的方法，其中所述造影剂使用闪烁法 ，PET 或 SPECT 形式分布，其中所述造影剂使用式 I 的物质。

本发明的另一方面提供对事先施用含有式 I 定义的化合物的造影剂组合物的人体或动物体产生增强的像的方法，所述方法包括对所述人体或动物体的至少一部分成像。

本发明的另一方面提供检测使用药物例如细胞毒素物质治疗人体或动物体减轻与癌症相关的症状优选血管发生的作用的方法，所述方法包括对所述人体或动物体施用式 I 的物质并且检测细胞受体优选内皮细胞受体特别是 αvβ3 受体对所述物质的吸收，所述施用和检测任选地但是优选反复进行，例如用所述药物治疗之前，期间和之后。

可以应用化学合成公知的所有的方法合成本发明的化合物，但是特别有用的是使用自动肽合成仪的 Merrifield 的固相方法(J. Am. Chem. Soc. , 85: 2149 (1964))。在体外筛选测试之前，肽和肽螯合物可以使用高效液相色谱法(HPLC) 纯化并且通过质谱和分析 HPLC 表征。

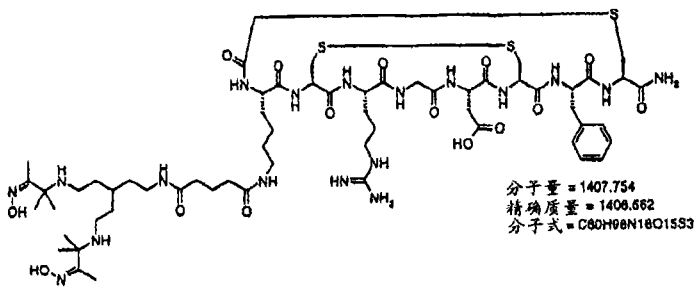
现在通过下面的非限制性实施例进一步详细描述本发明。

具体实施方式

实施例:

实施例 1:

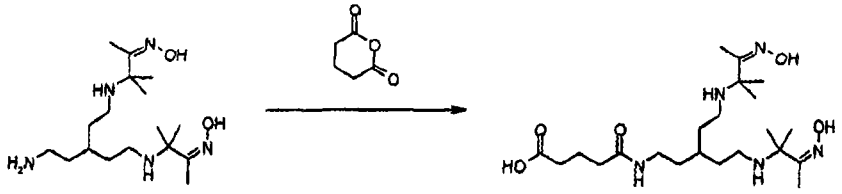
二硫化物[Cys^{2-6}]硫醚环[CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^{2}-Arg-Gly-Asp-Cys^{6}-Phe-Cys]-NH_2 的合成



1 a) cPn216 螯合物的合成

对于锝螯合物 cPn216 合成的描述，读者参见专利申请 GB0116815.2。

1 b) cPn216-戊二酸中间体的合成



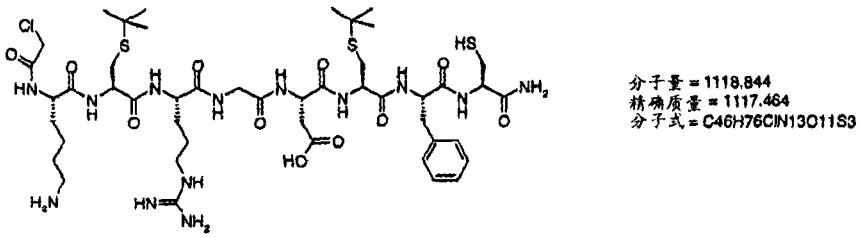
cPn216 (100 mg, 0.29 mmol)溶解于 DMF (10 mL)并且搅拌下分批加入戊二酸酐(33 mg, 0.29 mmol)。将反应搅拌 23 小时，使得完全转化为期望的产物。RP-HPLC 之后以好的产率获得纯的酸。

1 c) cPn216-戊二酸的四氟苯硫酯的合成



向 cPn216-戊二酸(300 mg, 0.66 mmol)的 DMF (2 mL)溶液加入 HATU (249 mg, 0.66 mmol)和 NMM (132μL, 1.32 mmol)。将混合物搅拌 5 分钟之后加入四氟苯硫酚(0.66 mmol, 119 mg)。将溶液搅拌 10 分钟之后用 20%乙腈/水(8 mL)将反应混合物稀释，并且通过 RP-HPLC 将产物纯化，冻干之后得到 110 mg 期望的产物。

1 d) $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)- Phe-Cys-NH_2 的合成



使用 1 mmol 氨基酸筒以 0.25 mmol 规模使用 Rink 酰胺 AM 树脂

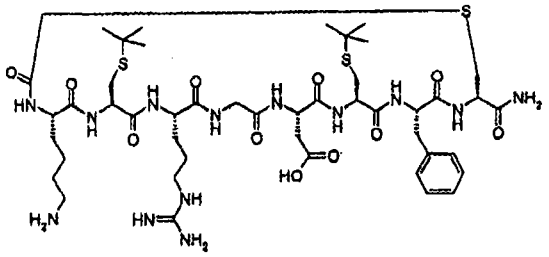
起始在 ABI 433A 自动肽合成仪上合成肽。在偶联之前使用 HBTU 将氨基酸预先活化。使用氯代乙酸酐的 DMF 溶液将 N-末端胺基氯乙酰化 30 分钟。

在含有 TIS (5%), H_2O(5%) 和苯酚(2.5%)的 TFA 中同时从树脂中去除肽和侧链保护基团(除了 tBu 之外), 进行 2 小时。

后处理之后获得 295 mg 的粗产物肽(分析 HPLC: 梯度, 5-50% B, 10 分钟, 其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子, Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速, 2 毫升/分钟; 检测, UV 214 nm; 产物滞留时间, 6.42 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:

预期值, M+H 1118.5, 实测值, 1118.6)。

1 e) 硫醚环[CH_2CO-Lys-Cys (tBu) -Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH_2 的合成



分子量 = 1082.383
精确质量 = 1081.487
分子式 = C46H75N13O11S3

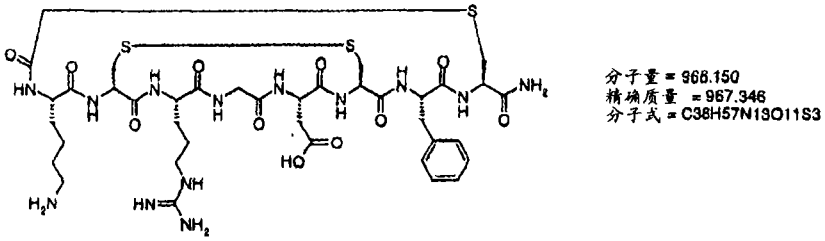
295 mg 的 $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-NH_2 溶解于水/乙腈。用氨水将混合物调节至 pH 8 并且搅拌 16 小时。

后处理之后获得 217 mg 的粗产物肽(分析 HPLC: 梯度, 5-50% B, 10 分钟, 其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子, Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速, 2 mL/min; 检测, UV 214 nm; 产物滞留时间, 6.18 min)。利用质谱进行产物的进一步表征:

预期值, M+H 1882.5, 实测值, 1882.6)。

1 f) 二硫化物[Cys^{2-6}]硫醚环[CH_2CO-Lys-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-

Phe-Cys]-NH_2 的合成

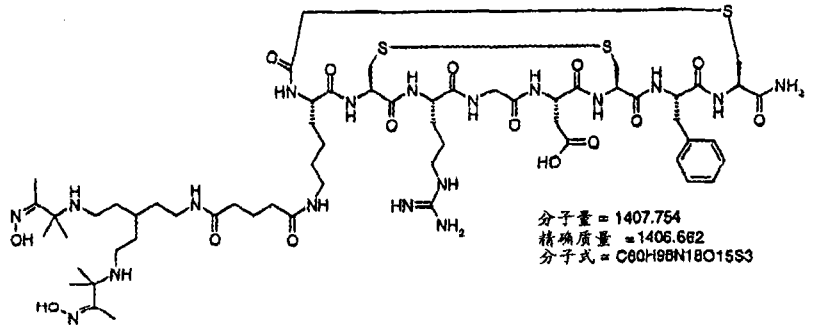


用茴香醚(500μL)，DMSO (2 mL)和 TFA (100 mL)的溶液处理 217 mg 硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys (tBu) -Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-NH_2 60 分钟，接着真空去除 TFA ，并且通过加入二乙基醚将肽沉淀。

对粗产物(202 mg) 实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 10μC18 (2) 250 x 50 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 60 分钟，流速 50 毫升/分钟。

冻干之后得到 112 mg 纯物质 (分析 HPLC:梯度，5-50% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm ; 产物滞留时间，5.50 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 968，实测值，971)。

1 g) 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-NH_2 的合成



9.7 mg 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys-Arg-Gly-

Asp-Cys-Phe-Cys]-NH_2，9.1 mg 的 cPn216 螯合物活泼酯和 6μL 的 N-甲基吗啉溶解于 DMF (0.5 mL)。将混合物搅拌 3 小时。

对反应混合物实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 5μC18 (2) 250 x 21.20 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 40 分钟，流速 10 毫升/分钟。

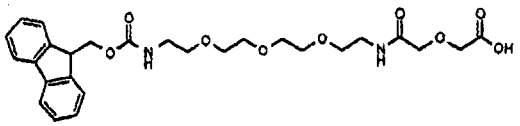
冻干之后得到 5.7mg 纯物质 (分析 HPLC:梯度，0-30% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，7.32 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:

预期值，M+H 1407.7，实测值，1407.6)。

实施例 2:

二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-$(PEG)_n$-NH_2，其中 n= 1 的合成

2 a) 17-(Fmoc-氨基)-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸



利用 Fmoc 化学过程使该结构单元与固相偶联。这种结构单元的偶联形式简言之是指$(PEG)_n$，其中 n 是正整数。

1,11-二叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷

无水 THF (100 ml)中的四乙二醇(19.4 g，0.100 mol)和甲磺酰氯 (25.2 g，0.220 mol)的溶液保持在氩气下并且在冰／水浴上冷却至 0°C。用 45 分钟的时间向烧瓶中滴加三乙胺(22.6 g，0.220 mol)的无水 THF (25 ml)溶液。1 小时之后去除冷却浴并且继续搅拌 4 小时。加入水(60 ml) 。按顺序向混合物加入碳酸氢钠(6 g，至 pH 8)和叠氮化钠(14.3 g，0.220 mmol)。蒸馏去除 THF 并且将水溶液回流 24 小时(形成两层)。将混合物冷却并且加入乙醚(100 ml)。用氯化钠将

水相饱和。分离各相并且用乙醚萃取水相(4 x 50 ml)。合并的有机相用盐水(2 x 50 ml) 洗涤并且干燥($MgSO_4$)。过滤并且浓缩，得到 22.1 g(91%) 黄色油状物。产物不用进一步纯化即可在下一步中使用。

11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷胺

室温下经 3 小时向机械剧烈搅拌着的 5% 盐酸(200 ml)中 1,11-二叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷(20.8 g，0.085 mol)的混悬液加入 三苯基膦(19.9 g，0.073 mol)的乙醚(150 ml)溶液。再将反应混合物搅拌 24 小时。分离各相并且用二氯甲烷萃取水相(3 x 40 ml)。水相在冰／水浴上冷却并且通过加入 KOH 将 pH 调节至大约 12 。将产物萃取到二氯甲烷中(5 x 50 ml)。干燥($MgSO_4$)合并的有机相。过滤并蒸发，得到 14.0 g(88%)黄色油状物。通过 MALDI-TOF 质谱分析(基质：α-氰基-4-羟基肉桂酸)，正如所预期的，在 219 给出 M+H 峰。使用 ^1H (500 MHz)和 ^{13}C (125 MHz) NMR 光谱学进一步表征证实结构。

17-叠氮基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸

向 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷胺(10.9 g，50.0 mmol)的二氯甲烷溶液(100 ml)中加入二甘醇酸酐(6.38 g，55.0 mmol)。将反应混合物搅拌一夜。 HPLC 分析(柱子 Vydac 218TP54；溶剂：A = 水/0.1% TFA 和 B = 乙腈/0.1% TFA；梯度 4-16% B，20 分钟；流速 1.0 毫升/分钟；UV 检测在 214 和 284 nm 进行)，表明滞留时间 18.3 分钟时起始物完全转化为产物。将溶液浓缩得到定量产率的黄色浆液。通过 LC-MS (ES 离子化作用) 分析产物，正如所预期的给出 [MH] + 335 。^1H (500 MHz) 和 ^{13}C (125 MHz) NMR 光谱与结构相吻合。产物不用进一步纯化即可在下一步中使用。

17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸

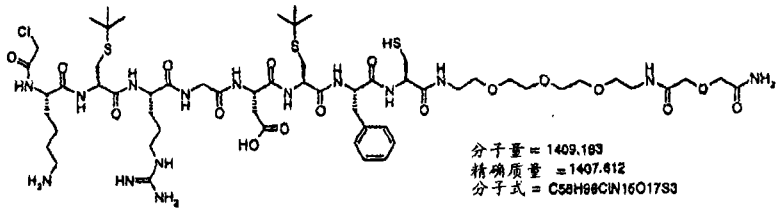
使用 H_2 (g) -Pd/C (10%)还原 17-叠氮基-5-氧-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸(8.36 g，25.0 mmol)的水溶液(100ml)。进行反应直到 LC-MS 分析表明起始物完全转化(柱子 Vydac 218TP54；溶剂：A = 水/0.1% TFA 和 B = 乙腈/0.1% TFA；梯度 4-16% B，20 分钟；流速 1.0 毫升/分钟；UV 检测在 214 和 284 nm 进行，ES 离子

化作用对于起始物是M+H 335，对于产物是309）。将溶液过滤并且在下一步中直接使用。

17-（Fmoc-氨基）-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸

向上一步得到的17-氨基-5-氧-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七酸（相当于25.0 mmol氨基酸）的水溶液加入碳酸氢钠（5.04 g，60.0 mmol）和二噁烷（40 ml）。滴加Fmoc-氯（7.11 g，0.275 mol）的二噁烷（40 ml）溶液。将反应混合物搅拌一夜。将二噁烷蒸出（旋转蒸发）并且用乙酸乙酯萃取水相。通过加入盐酸将水相酸化并且将沉淀出的物质萃取到氯仿中。将有机相干燥（$MgSO_4$），过滤并浓缩，得到11.3 g（85%）黄色浆液。通过LC-MS分析证实结构（柱子Vydac 218TP54；溶剂：A = 水/0.1% TFA 和 B = 乙腈/0.1% TFA；梯度40-60% B，20分钟；流速1.0毫升/分钟；UV检测在214和254 nm进行，ES离子化作用对于5.8分钟峰的产物正如预期的是M+H 531）。分析表明副产物含量非常低，产物不用进一步纯化即可使用。

2 b) $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)n-NH_2，其中 n= 1 的合成



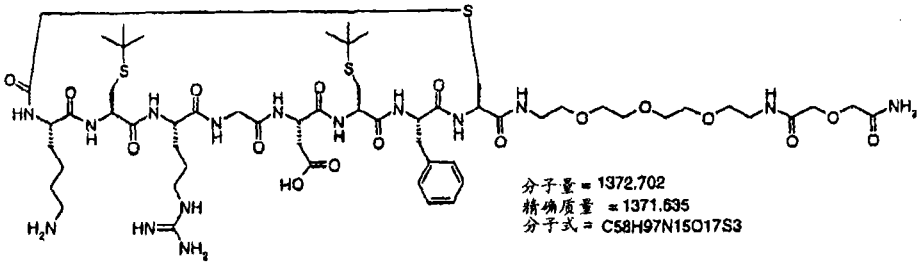
以0.25 mmol规模开始，由HATU活化作用介导，人工使PEG单元与Rink酰胺AM树脂偶联。使用1 mmol氨基酸筒在ABI 433A自动肽合成仪上组装其余的肽。在偶联之前使用HBTU预先将氨基酸活化。使用氯乙酸酸酐的DMF溶液将N-末端胺基氯乙酰化30分钟。

在含有TIS（5%），H_2O（5%）和苯酚（2.5%）的TFA中同时从树脂中去除肽和侧链保护基团（除了tBu之外），进行2小时。

后处理之后获得322mg的粗产物肽（分析HPLC：梯度，5-50% B，10分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA；柱子，

Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.37 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1409，实测值，1415)。

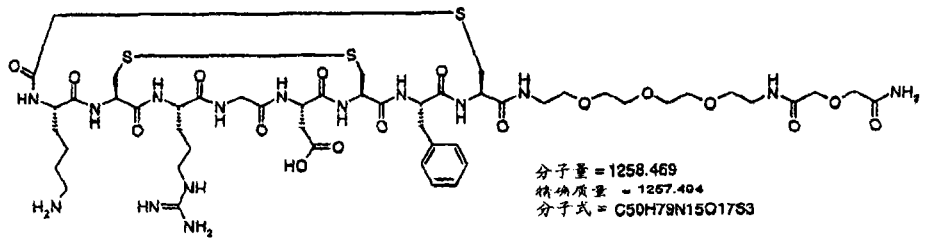
2 c) 硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2，其中 n= 1 的合成



322 mg 的 $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys- (PEG)n-NH_2 溶剂于水/乙腈。用氨水将混合物调节至 pH 8 并且搅拌 16 小时。

后处理之后获得粗产物肽(分析 HPLC: 梯度，5-50% B，10 分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.22 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1373，实测值，1378)。

2 d) 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO- Lys-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 1 的合成

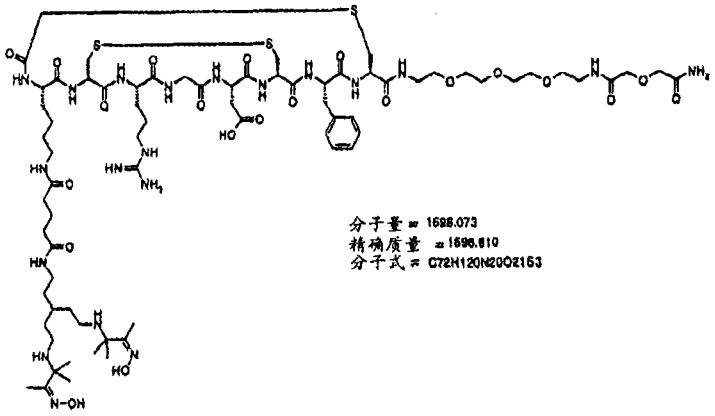


用茴香醚(200μL)，DMSO (2 mL)和 TFA (100 mL)的溶液处理硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 60 分钟，接着真空去除 TFA ，并且通过加入二乙基醚将肽沉淀。

对 70mg 粗产物实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 5μC18 (2) 250 x21.20 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 40 分钟，流速 10 毫升/分钟。

冻干之后得到 46mg 纯物质 (分析 HPLC:梯度，0-30% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm ; 产物滞留时间，6.80 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1258.5，实测值，1258.8)。

2 e) 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO- Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 1 的合成



13mg [Cys^{2-6}] 环 [CH_2CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2，9.6 mg 的 cPn216 螯合物活泼酯和 8μL 的 N-甲基吗啉溶解于 DMF (0.5 mL)。将混合物搅拌 2 小时 30 分钟。

对反应混合物实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 5μC18 (2) 250 x 21.20 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 40 分钟，流速 10 毫升/分钟。

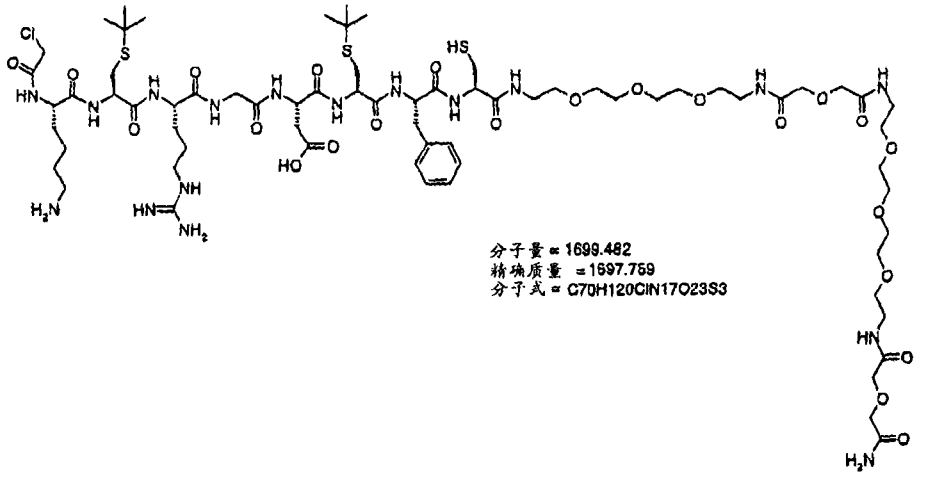
冻干之后得到 14.2mg 纯物质 (分析 HPLC:梯度，0-30% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex

Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm；产物滞留时间，7.87 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1697.8，实测值，1697.9)。

实施例 3:

二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^{2}-Arg-Gly-Asp-Cys^{6}-Phe-Cys]-$(PEG)_n$-NH_2 ，其中 n= 2 的合成

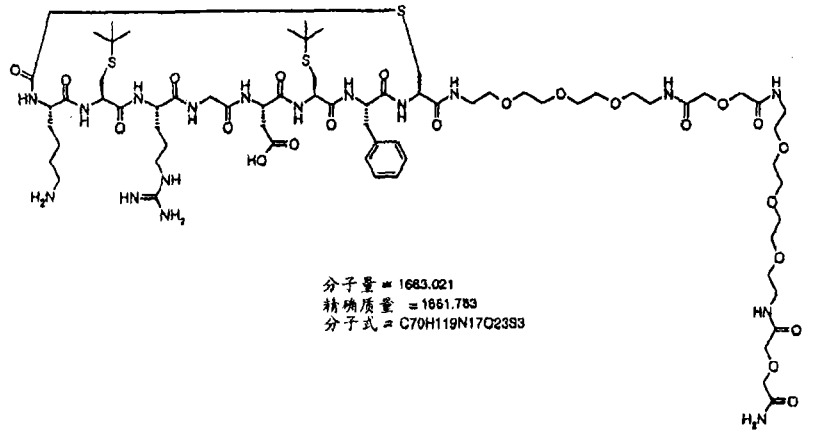
3 a) $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)n-NH_2 ，其中 n= 2 的合成



根据实施例 2 b)组装肽，人工偶联两个 PEG 单元。

后处理之后获得粗产物肽(分析 HPLC: 梯度，5-50% B ，10 分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.40 分钟)。

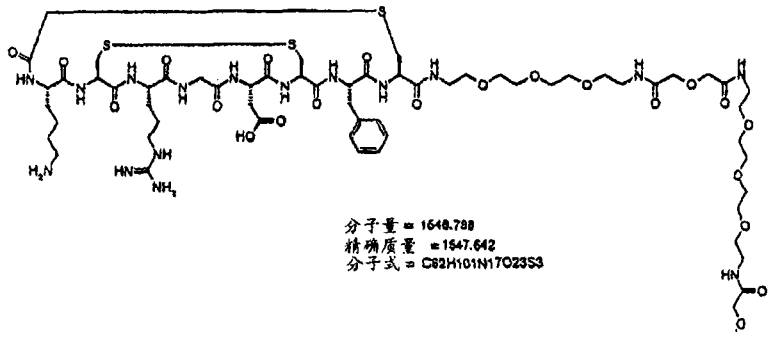
3 b) 硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]- (PEG)n-NH_2，其中 n= 2 的合成



$ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-(PEG)n-NH_2，其中 n= 2 溶剂于水/乙腈。用氨水将混合物调节至 pH 8 并且搅拌 16 小时。

后处理之后获得 380 毫克粗产物肽(分析 HPLC: 梯度，5-50% B，10 分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.28 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1663，实测值，1670)。

3c) 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO- Lys-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 2 的合成



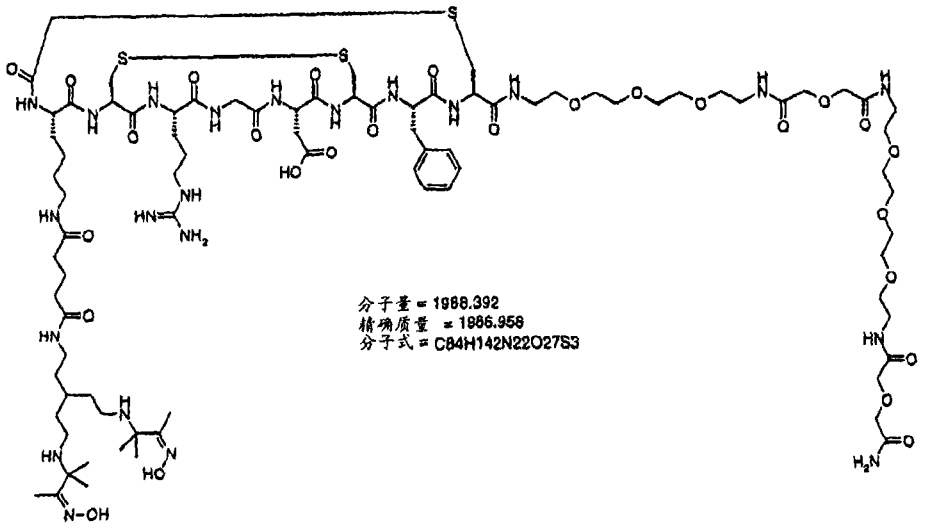
用茴香醚(500μL)，DMSO (2 mL)和 TFA (100 mL)的溶液处理 380mg

硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2，其中 n= 2，60 分钟，接着真空去除 TFA，并且通过加入二乙基醚将肽沉淀。

对粗产物（345mg）实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 10μC18 (2) 250 x50 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 60 分钟，流速 50 毫升/分钟。

冻干之后得到 146mg 纯物质 (分析 HPLC: 梯度，0-30% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，7.42 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征:
预期值，M+H 1548.6，实测值，1548.8)。

3d) 二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO- Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 2 的合成



146mg [Cys^{2-6}] 环 [CH_2CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-$(PEG)_2$-NH_2，110 mg 的 cPn216 螯合物活泼酯和 76μL 的 N-甲基吗啉溶解于 DMF (6 mL)。将混合物搅拌 9 小时。

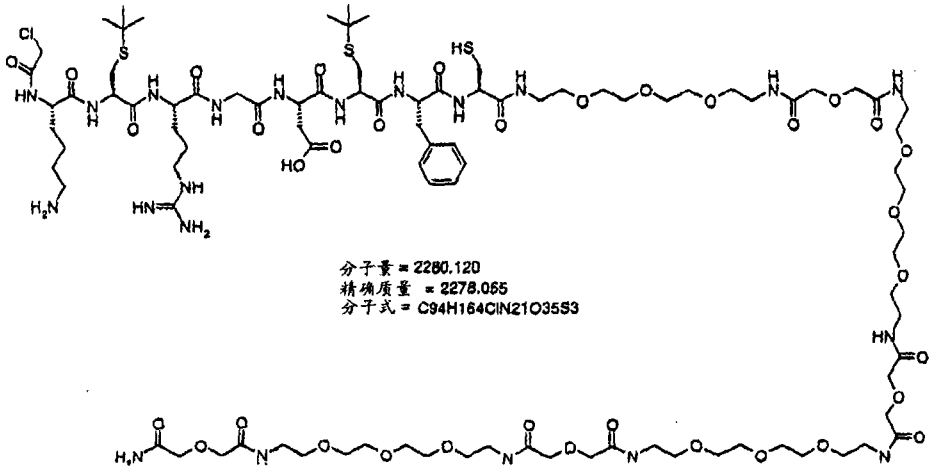
对反应混合物实施制备 HPLC (Phenomenex Luna 10μC18 (2) 250 x 50 mm 柱) 纯化，使用 0-30% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 60 分钟，流速 50 毫升/分钟。

冻干之后得到 164mg 纯物质 (分析 HPLC:梯度，0-30% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm ; 产物滞留时间，8.13 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征: 预期值，M+H 1988.0，实测值，1988.0)。

实施例 4:

二硫化物 [Cys^{2-6}] 硫醚环 [CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-$(PEG)_n$-NH_2 ，其中 n= 4 的合成

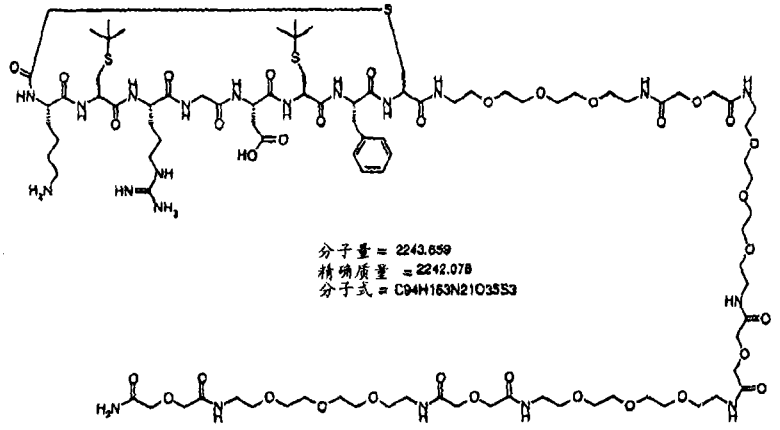
4 a) $ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-$(PEG)_n$-NH_2 ，其中 n= 4 的合成



根据实施例 2 b)组装肽，人工偶联所有四个 PEG 单元。

后处理之后获得粗产物肽(分析 HPLC: 梯度，5-50% B ，10 分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.50 分钟)。

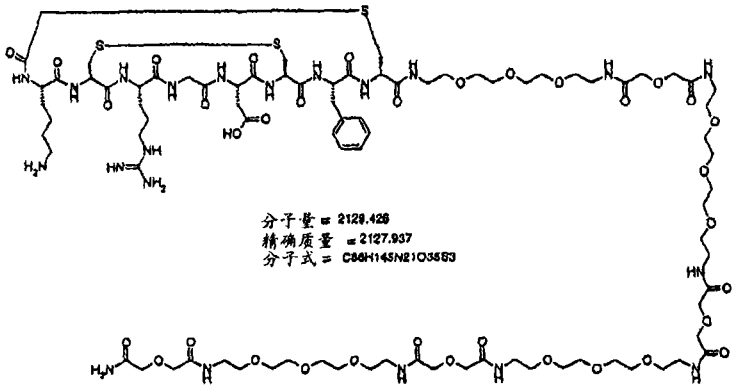
4b) 硫醚环 [CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]- (PEG)n-NH_2，其中 n= 4 的合成



$ClCH_2CO$-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-$(PEG)_4$-NH_2溶剂于水/乙腈。用氨水将混合物调节至 pH 8 并且搅拌 16 小时。

后处理之后获得粗产物肽(分析 HPLC: 梯度，5-50% B，10 分钟，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm; 产物滞留时间，6.37 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征: 预期值，[(M+2H)/2] 1122.0，实测值，1122.5)。

4c) 二硫化物[Cys^{2-6}]硫醚环[CH_2CO- Lys-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 4 的合成



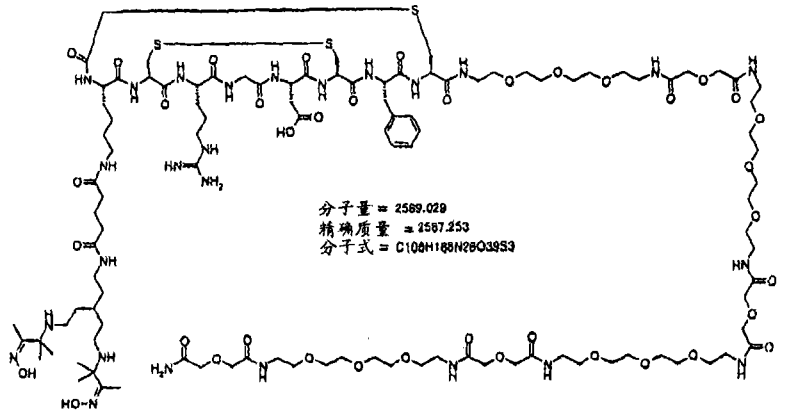
用茴香醚(100μL)，DMSO (1mL)和 TFA (50 mL)的溶液处理硫醚环[CH_2CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-$(PEG)_4$-

NH_2 60 分钟，接着真空去除 TFA，并且通过加入二乙基醚将肽沉淀。

对粗产物（345mg）实施制备 HPLC (Phenomenex Luna5μC18 (2) 250 x21.20 mm 柱) 纯化，使用 5-50% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 40 分钟，流速 10 毫升/分钟。

冻干之后得到 12mg 纯物质（分析 HPLC: 梯度，5-50% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm；产物滞留时间，4.87 分钟)。

4d) 二硫化物[Cys^{2-6}]硫醚环[CH_2CO-Lys(cPn216-戊二酰)-Cys^2-Arg-Gly-Asp-Cys^6-Phe-Cys]-(PEG)n-NH_2 其中 n= 4 的合成



12mg 二硫化物[Cys^{2-6}]硫醚环[CH_2CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys] -$(PEG)_4$-NH_2，5.2mg 的 cPn216 螯合物活泼酯和 2μL 的 N-甲基吗啉溶解于 DMF (0.5mL)。将混合物搅拌 7 小时。

对反应混合物实施制备 HPLC (Phenomenex Luna5μC18 (2) 250 x 21.20 mm 柱) 纯化，使用 5-50% B，其中 A =H_2O/0.1 % TFA 和 B= CH_3CN/0.1 % TFA，用 40 分钟，流速 10 毫升/分钟。

冻干之后得到 8mg 纯物质（分析 HPLC: 梯度，5-50% B，用 10 分钟，其中 A =H_2O/0.1% TFA 和 B = CH_3CN/0.1% TFA; 柱子，Phenomenex Luna 3μC18 (2) 50 x 4.6 mm; 流速，2 毫升/分钟; 检测，UV 214 nm；产物滞留时间，5.17 分钟)。利用质谱进行产物的进一步表征：预期值，[(M+2H)/2] 1284.6，实测值，1284.9)。

序列表

<110> Amersham Health AS

<120> 肽基化合物

<130> NO 20014954

<150> NO20014954

<151> 2001-10-11

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> DISULFID

<222> (2)..(5)

<223> 氨基酸残基2和5之间的二硫桥

<220>

<221> THIOETH

<222> (1)..(8)

<223> 氨基酸残基1和8之间的硫醚桥

<400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5