

[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 200580040883.8

[51] Int. Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 10 月 31 日

[11] 公开号 CN 101065152A

[22] 申请日 2005.9.28

[21] 申请号 200580040883.8

[30] 优先权

[32] 2004.9.29 [33] NO [31] 20044139

[86] 国际申请 PCT/NO2005/000362 2005.9.28

[87] 国际公布 WO2006/036071 英 2006.4.6

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.29

[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·卡思伯森 B·E·阿波

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 黄可峻

权利要求书 2 页 说明书 21 页 序列表 3 页

[54] 发明名称

靶向尿激酶纤溶酶原激活物受体的造影剂

[57] 摘要

本发明涉及用于检测尿激酶纤溶酶原激活物受体(uPAR)的造影剂。更具体地,本发明涉及造影剂,其包含用可成像的部分标记的结合 uPAR 的肽载体。

1. 式 Ia 的 uPAR 靶向造影剂,



其中,

$X_0$  代表 1-5 个氨基酸,

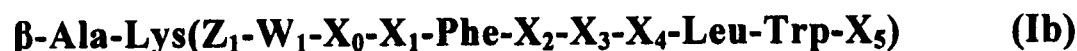
$X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  和  $X_5$  独立地代表 1 个氨基酸,

Phe 代表苯丙氨酸,

Leu 代表亮氨酸,

Trp 代表色氨酸,

$X_6$  代表 0-5 个氨基酸, 或由式 (Ib) 确定,



其中符号如关于式 Ia 所定义的,

且其中

$\beta-Ala$  代表  $\beta$ -丙氨酸,

Lys 代表赖氨酸,

式 Ib 的  $\beta-Ala$  连接式 Ia 的  $X_5$ , 且其中

$W_1$  和  $W_2$  代表相同或不同的部分, 且单独地是间隔臂、生物修饰剂或不存在, 且存在至少一个  $Z_1$  或  $Z_2$  代表能在诊断成像过程中直接或间接检测的可成像的部分。

2. 如权利要求 1 所述的造影剂, 其中  $X_0$  代表 1-5 个选自下述的氨基酸: 丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的造影剂, 其中  $X_1$  代表  $\beta$ -环烷基丙氨酸。

4. 如权利要求 1-3 中的任一项所述的造影剂, 其中  $X_2$  代表丝氨酸或丙氨酸。

5. 如权利要求 1-4 中的任一项所述的造影剂, 其中  $X_3$  代表精氨酸、精氨酸模拟物、酪氨酸或丙氨酸。

6. 如权利要求 1-5 中的任一项所述的造影剂, 其中  $X_4$  代表酪氨酸、丙氨酸、亮氨酸或环己基丙氨酸。

7. 如权利要求 1-6 中的任一项所述的造影剂, 其中  $X_5$  代表丝氨酸、组氨酸、丙氨酸、酪氨酸或亮氨酸。

8. 如权利要求 1-7 中的任一项所述的造影剂, 其中  $X_6$  包含选

自下述的氨基酸：甘氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸或  $\beta$ -丙氨酸，或不存在。

9. 如权利要求 1-8 中的任一项所述的造影剂，其包含肽序列  $Z_1-W_1-X_0-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-X_6-W_2-Z_2$ ，其中 Cha 代表环己基丙氨酸，Ser 代表丝氨酸，Arg 代表精氨酸，Tyr 代表酪氨酸，且所有其它的符号如前面所定义的。

10. 如前面权利要求中的任一项所述的造影剂，其中至少一个  $W_1$  和  $W_2$  包含 1-10 个单分散性的 PEG 构件单元，或 1-10 个氨基酸残基。

11. 前面权利要求中的任一项的造影剂，其中  $Z_1$  和  $Z_2$  中的一个或两个代表用于体内诊断的可成像的部分，其包含在放射、SPECT、PET、X 射线、MR、超声或光学成像中可检测的部分。

12. 如权利要求 11 所述的造影剂，其中  $Z_1$  和  $Z_2$  中的一个或两个包含部分 M，它代表选自下述的用于放射或 SPECT 成像的  $\gamma$  发射部分： $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{201}\text{Tl}$  和  $^{133}\text{Xe}$ 。

13. 如权利要求 11 所述的造影剂，其中  $Z_1$  和  $Z_2$  中的一个或两个包含部分 M，它代表选自下述的用于 PET 成像的具有正电子发射性质的放射性发射体： $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{77}\text{F}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{68}\text{Ga}$  或  $^{82}\text{Rb}$ 。

14. 如权利要求 11 所述的造影剂，其中  $Z_1$  和  $Z_2$  中的一个或两个包含部分 M，它代表用于 MR 成像的选自下述的顺磁金属： $\text{Gd(III)}$ 、 $\text{Mn(II)}$ 、 $\text{Cu(II)}$ 、 $\text{Cr(III)}$ 、 $\text{Fe(III)}$ 、 $\text{Co(II)}$ 、 $\text{Er(II)}$ 、 $\text{Ni(II)}$ 、 $\text{Eu(III)}$  或  $\text{Dy(III)}$ ，或金属氧化物，如超顺磁的、铁磁性的或铁磁性的种类。

15. 如权利要求 11 所述的造影剂，其中  $Z_1$  和  $Z_2$  中的至少一个代表用于光学成像的光散射体、光吸收体或光发射体。

16. 药物组合物，其包含前面权利要求中的任一项的造影剂，以及一种或多种可药用佐剂、赋形剂或稀释剂。

17. 权利要求 1-15 中的任一项的造影剂，其用于诊断成像。

16. 通过诊断成像生成人或动物身体的图像的方法，其包含将权利要求 1-15 中的任一项所述的造影剂施用给所述身体，并生成向其施用所述造影剂的所述身体的至少部分的图像。

## 靶向尿激酶纤溶酶原激活物受体的造影剂

### 发明领域

本发明涉及用于检测尿激酶纤溶酶原激活物受体(uPAR)的造影剂。更具体地,本发明涉及造影剂,其包含用可成像的部分标记的结合 uPAR 的肽载体。该造影剂可以用于鉴别表达 uPAR 的位点,以诊断与该受体有关的疾病。

### 发明背景

尿激酶-型纤溶酶原激活物(uPA)与细胞表面的相互作用排他地由它的糖脂-锚定的受体(uPAR)介导, uPA 以高亲和力结合所述受体。

uPAR 通过糖基磷脂酰肌醇键(GPI 锚)局限在细胞膜外层。它是一种富含半胱氨酸的高度糖基化的蛋白,由 3 个同源结构域组成。uPA 由催化性的 C-末端丝氨酸蛋白酶结构域和模块化的 N-末端部分组成,后者包括生长因子-样结构域(GFD; 氨基酸 1-49)和三环域(氨基酸 50-135)。uPA 和 uPAR 之间的相互作用,主要由 uPA 的 GFD 的残基 19-31 介导。

因为细胞外基质的蛋白水解性降解在肿瘤侵入和转移中具有确定的作用,所以 uPAR 代表着诊断造影剂的潜在靶。迄今为止,在检查的大多数人癌中, uPAR 似乎受到体内上调,具体地,在肿瘤细胞本身中,在经历血管发生的肿瘤-相关的内皮细胞中,和在巨噬细胞中。uPAR 在癌症患者中的超表达,存在于晚期疾病中,且已经与许多人癌的不良预后相关联。uPAR 表达仅仅在病理状态(包含细胞外基质改造和细胞运动性,例如癌症)中受到上调的事实,使它成为有吸引力的诊断标记。

WO 01/25410 描述了诊断上或治疗上标记的 uPAR-靶向蛋白和肽。该肽或蛋白包含至少 38 个氨基酸残基,包括 uPA 的 uPAR 结合位点的残基 13-30。

US 6,277,818 描述了 uPAR-靶向环肽化合物,其可以缀合诊断标记。该肽是基于 uPA 的氨基酸残基 20-30 的。

US 6,514,710 也涉及对 uPAR 具有亲和力的环肽。该肽可以携带检测标记。该肽包含通过连接单元连接的 11 个氨基酸。

Ploug 等在 Biochemistry 2001, 40, 12457-12168 中描述了 uPAR 靶向肽，但不是在成像的上下文中，它包括如本文件所述的氨基酸序列。

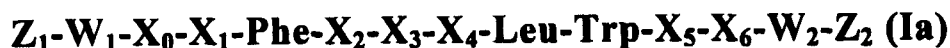
有效的 uPAR 靶向和成像需要选择性的低亲和力载体，它是化学上有力的且稳定的。本发明的造影剂满足了这些严格的条件。

### 发明概述

考虑到本领域的需要，本发明提供了用于检测尿激酶纤溶酶原激活物受体(uPAR)的造影剂。更具体地，本发明涉及造影剂，其包含用可成像的部分标记的以高亲和力结合 uPAR 的肽序列。Ploug 公开了，例如，具有序列 X-Phe-X-X-Tyr-Leu-Trp-Ser 的 uPAR 靶向肽，其中使用氨基酸的标准缩写，且其中 X 代表选自 25 种氨基酸的氨基酸。

### 发明详述

从第一个方面看，本发明提供了式 Ia 的 uPAR 靶向造影剂，



其中，

$X_0$  代表 1-5 个氨基酸，

$X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  和  $X_5$  独立地代表 1 个氨基酸，

Phe 代表苯丙氨酸，

Leu 代表亮氨酸，

Trp 代表色氨酸，

$X_6$  代表 0-5 个氨基酸，或由式(Ib)确定，



其中符号如关于式 Ia 所定义的，

且其中

$\beta-Ala$  代表  $\beta$ -丙氨酸，

Lys 代表赖氨酸，且其中

$W_1$  和  $W_2$  代表相同或不同的部分，且单独地是间隔臂、生物修饰

剂 (biomodifier) 或不存在, 且存在至少一个  $Z_1$  或  $Z_2$  代表能在诊断成像过程中直接或间接检测的可成像的部分。

氨基酸  $X_0$ 、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$  和  $X_6$  都代表天然的或非天然的氨基酸, 且优选地是天然的, 例外是  $X_1$ , 它优选地是非天然的。所有氨基酸都是 D 或 L 形式, 具有下面给出的优先选择。

式 Ia 试剂的组分  $X_0$ - $X_1$ -Phe- $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ -Leu-Trp- $X_5$ - $X_6$  对 uPAR 具有亲和力, 且在下文中称作肽载体。造影剂的肽载体与 uPA 的生长因子结构域具有同源性, 但是与现有技术的 uPAR 靶向载体不同, 因为它不包含与在人 uPA 中发现的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

$X_0$  代表 1-5 个 D 或 L 氨基酸。优选地,  $X_0$  包括选自下述的氨基酸: 丙氨酸 (Ala)、苏氨酸 (Thr)、甘氨酸 (Gly)、天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu)。氨基酸优选地是 L 形式, 例外是苏氨酸, 它优选地是 D 形式。最优选地,  $X_0$  代表 L-Asp、D-Thr 或 Gly-Gly-Asp。

$X_1$  优选地代表  $\beta$ -环烷基丙氨酸, 且更优选地是  $\beta$ -环戊基丙氨酸、 $\beta$ -环己基丙氨酸 (Cha) 或  $\beta$ -环庚基丙氨酸, 且最优选地是  $\beta$ -环己基丙氨酸。

$X_2$  优选地代表丝氨酸 (Ser) 或丙氨酸 (Ala), 更优选丝氨酸且最优选 D-丝氨酸。

$X_3$  优选地代表精氨酸 (Arg), 或精氨酸模拟物如 N-甲基精氨酸 (mArg), 酪氨酸 (Tyr) 或丙氨酸, 且更优选 D-精氨酸。

$X_4$  优选地代表酪氨酸、丙氨酸、亮氨酸或环己基丙氨酸, 更优选酪氨酸, 且最优选 L-酪氨酸。

$X_5$  优选地代表丝氨酸、组氨酸 (His)、丙氨酸、酪氨酸或亮氨酸, 且更优选 L-丝氨酸或 D-组氨酸。

$X_6$  优选地代表 0-5 个 D 或 L 氨基酸。优选地,  $X_6$  包括选自下述的氨基酸: 甘氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸或  $\beta$ -丙氨酸 ( $\beta$ -Ala)。或者,  $X_6$  包含式 (Ib) 的基团

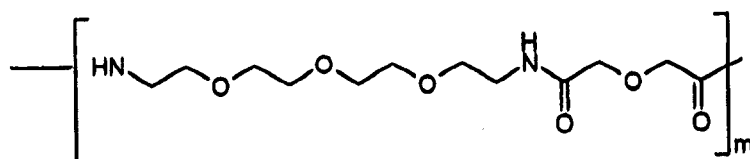


其中所有符号都与前面定义的相同, 且其中式 Ib 的  $\beta$ -Ala 连接式 Ia 的  $X_5$ 。括号中的肽链通过它的  $X_5$  连接到赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基上。在该替代方案中, 造影剂将包含在修饰的赖氨酸支架 (它具有用  $\beta$ -丙氨酸预先衍生的  $\alpha$ -氨基) 上合成的二聚体, 从而生成关于赖氨酸的  $\alpha$ -

碳原子假对称的二聚体。在该替代方案中，二聚体优选地是同型二聚体，其中两种单体中的肽序列是相同的。最优选地， $X_6$  不存在。

令人惊奇地，已经发现肽载体的  $X_4$  和  $X_5$  位置（其中 Ploug 分别使用酪氨酸和丝氨酸）可以用如上所述的其它氨基酸替代。

$W_1$  和  $W_2$  单独地代表作为间隔臂、生物修饰剂或二者的部分，或不存在，且优选地基于单分散性的聚乙二醇(PEG)构件，其包含 1-10 个所述构件的单元。 $W_1$  或  $W_2$  也可以代表 1-10 个氨基酸残基，优选地包含甘氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、丝氨酸或氨基己酸。更优选地， $W_1$  或  $W_2$  包含氨基酸残基和基于 PEG 的结构两者，例如 1-10 个氨基酸残基和基于 PEG 的结构组合。优选地， $W_1$  或  $W_2$  代表生物修饰剂，且在优选的实施方案中，至少一个  $W_1$  或  $W_2$  代表包含单分散性的基于 PEG 的结构的单元，式(II)的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七烷酸，



(II)

其中  $m$  等于 1-10 的整数，且其中 C-末端是酰胺或酸部分。作为生物修饰剂， $W_1$  或  $W_2$  具有修饰化合物的药物代谢动力学和血液清除率的功能。生物修饰剂招致化合物在组织（即肌肉、肝等）中的更少摄入，从而产生更好的诊断图像，这是由于更少的背景干扰。分泌主要是通过肾，这是生物修饰剂的另一个优点。

作为生物修饰剂部分， $W_1$  或  $W_2$  优选地源自戊二酸和/或琥珀酸和/或基于 PEG 的单元，例如包括式 II 的部分。 $W_1$  或  $W_2$  还可以作为具有生物修饰剂性质的间隔臂，将可成像的部分  $Z_1$  或  $Z_2$  连接到肽载体上。其它代表性的间隔臂元件包括结构-型多糖、贮藏-型多糖、聚氨基酸和它的甲基和乙基酯，和多肽、寡糖和寡核苷酸，其可以含有或不含有酶切割位点。作为间隔臂部分， $W_1$  或  $W_2$  的一种作用是使相对较大的可成像的部分远离肽载体的受体结合结构域。或者，在最简单的形式中， $W_1$  或  $W_2$  是功能键，或包含允许可成像的部分容

易地缀合到肽载体上的功能基团，这样的基团包括 $-NR^a$ -、 $CO_2$ -、 $N(C=S)$ -、 $-N(CO)$ -、 $-S$ 、 $-O$ -、 $-O-NH_2$ 和 $-CHO$ ，其中  $R^a$  基团独立地是 H、 $C_{1-10}$  烷基、 $C_{3-10}$  烷基芳基、 $C_{2-10}$  烷氧基烷基、 $C_{1-10}$  羟烷基、 $C_{1-10}$  卤烷基和  $\alpha$ -卤代乙酰基。

当  $Z_1$  不存在且  $W_1$  存在时， $W_1$  优选地具有 N-末端，后者具有游离氨基或包含代谢抑制基团的氨基。术语“代谢抑制基团”是指一种生物相容基团，它抑制或阻抑在氨基末端的肽或氨基酸的体内代谢。这样的基团是本领域的技术人员熟知的，且适当地选自：乙酰基、Boc(叔丁氧基羰基)、Fmoc(苄基甲氧基羰基)、苄氧基羰基(benzyloxycarbonyl)、三氟乙酰基和烯丙氧基羰基。优选的代谢抑制基团是乙酰基和苄氧基羰基。当  $Z_2$  和  $W_2$  不存在时，肽载体的 C-末端优选地是酰胺或羧基，且优选地是酰胺基。同样，当  $Z_2$  不存在、且存在包含氨基酸的  $W_2$  时， $W_2$  优选地以酰胺或羧基结尾，且更优选酰胺基团。

本发明的造影剂优选地包含线性肽，这意味着在任意的氨基酸之间、或在氨基酸和试剂的其它部分之间不存在产生环状结构的桥。因此，优选地不存在硫化物、硫醚桥或形成环肽结构的其它桥。造影剂优选地包含最多 20 个氨基酸。

在一个优选的实施方案中，由式 Ia 的  $X_0-X_1-Phe-X_2-X_3-X_4-Leu-Trp-X_5-X_6$  代表的肽载体包含序列： $X_0-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser$ ，从而使得造影剂具有式  $Z_1-W_1-X_0-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-X_6-W_2-Z_2$ ，其中符号如前面所定义的。

更优选地，肽载体包含序列：

**Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser**，或

**Thr-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser**，

其中斜体字母代表 D 氨基酸，且其中  $X_6$  不存在。

本发明的造影剂的一个实例是：

**$Z_1-W_1-Gly-Gly-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-NH_2$**

其中  $Z_1$  和  $W_1$  如前面所定义的，且其中  $X_6$ 、 $W_2$  和  $Z_2$  不存在，且其中 C-末端是酰胺基。

$Z_1$  和  $Z_2$  至少存在一个，且代表可成像的部分。 $Z$  在下文中用于代表  $Z_1$  或  $Z_2$ 。 $Z$  可以是任意的可成像的部分。 $Z$  的性质将取决于在

诊断中使用的成像方式。从例如 WO 98/47541 可知适用于体内成像检测的许多种部分，它的内容引作参考。

Z 是能在体内诊断成像过程中直接或间接检测的部分，如放射或 SPECT、PET、MR、X 射线、超声或光学成像。Z 包含，例如，发射或可以被造成发射可检测的辐射的部分(例如通过放射性衰变、荧光激发、自旋共振激发等)，影响局部电磁场的部分(例如，顺磁的、超顺磁的、亚铁磁性的或铁磁性的种类)，吸收、发射或散射辐射能的部分(例如生色团、颗粒(包括含有囊泡的气体或液体)、重元素和其化合物等)，和产生可检测的物质的部分(例如气体微泡发生器)。

可成像的部分 Z 可以由实体 M 和部分  $Y_1$  代表，其中 M 代表金属离子、顺磁金属、金属放射性核素、重金属和重金属氧化物。部分  $Y_1$  必须能携带一个或几个部分 M。携带是指部分  $Y_1$  和 M 之间的任何形式的结合，例如化学键，例如共价键或电价键或离子键，或通过吸附或任何其它类型的结合，且优选地 M 由螯合部分  $Y_1$  螯合。

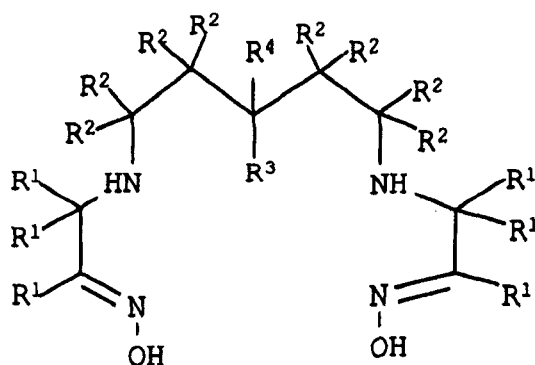
在下文中更详细地描述了成像方式和可成像的部分 Z:

在该方面的第一个实施方案中，Z 包含一个或多个用于放射和 SPECT 成像方式的部分 M，例如放射性金属离子或发射  $\gamma$  的放射性卤素，其任选地由部分  $Y_1$  携带。优选地，M 是具有较低或没有  $\alpha$ -和  $\beta$ -发射且具有超过 1 小时的半衰期的  $\gamma$  发射体。优选的基团 M 是放射性核素  $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{201}\text{Tl}$  和  $^{133}\text{Xe}$ 。最优选地是  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

M 可以进一步由下面的同位素或同位素对代表： $^{47}\text{Sc}_{21}$ ； $^{141}\text{Ce}_{58}$ ； $^{188}\text{Re}_{75}$ ； $^{177}\text{Lu}_{71}$ ； $^{199}\text{Au}_{79}$ ； $^{47}\text{Sc}_{21}$ ； $^{131}\text{I}_{53}$ ； $^{67}\text{Cu}_{29}$ ； $^{131}\text{I}_{53}$  和  $^{123}\text{I}_{53}$ ； $^{188}\text{Re}_{75}$  和  $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$ ； $^{90}\text{Y}_{39}$  和  $^{87}\text{Y}_{39}$ ； $^{47}\text{Sc}_{21}$  和  $^{44}\text{Sc}_{21}$ ； $^{90}\text{Y}_{39}$  和  $^{123}\text{I}_{53}$ ； $^{146}\text{Sm}_{62}$  和  $^{153}\text{Sm}_{62}$ ；和  $^{90}\text{Y}_{39}$  和  $^{111}\text{In}_{49}$ 。

当 M 代表用于放射或 SPECT 成像的金属放射性核素时，那么  $Y_1$  优选地代表适合与 M 形成稳定的螯合物的螯合剂。这样的螯合剂是现有技术领域熟知的，且在 WO 01/77145 的表 1 中描述了这样的螯合剂的一般实例。

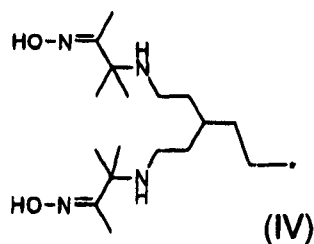
特别优选的是式(III)的螯合剂  $Y_1$ :



(III)

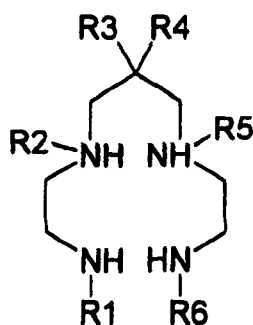
每个  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  独立地是 H 或  $C_{1-10}$  烷基、 $C_{3-10}$  烷基芳基、 $C_{2-10}$  烷氧基烷基、 $C_{1-10}$  羟烷基、 $C_{1-10}$  烷基胺、 $C_{1-10}$  氟烷基，或 2 或更多个 R 基团，连同与它们附着的原子一起形成碳环的、杂环的饱和的或不饱和的环。

更特别优选的是式(III)的螯合剂  $Y_1$ ，其中  $R^1$ 、 $R^2$  和  $R^3$  是氢或甲基，且  $R^4$  是烷基或烷基胺基团。更优选地， $Y_1$  是式(IV)的螯合物，在本文中称作 cPN216，且最优选地，成像部分 M 是  $^{99m}\text{Tc}$ 。星号代表可能的连接位点。



(IV)

其它优选的螯合剂是式(V)



(V)

其中 R1-R6 独立地代表 H、烷基、芳基或它们的组合, 其中 R1-R6 基团含有一个或多个功能部分, 从而使得螯合物可以缀合式(Ia)的 W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub>。合适的功能部分是例如烷基胺、烷基硫、烷氧基烷基羧酸酯、芳基胺、芳基硫化物 (arylsulphide) 或  $\alpha$ -卤代乙酰基。

如果 Z 代表发射  $\gamma$  的放射性卤素如  $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$  和  $^{77}\text{Br}$ , 其中  $^{125}\text{I}$  是优选的, 则它可以通过本领域熟知的取代或加成反应, 共价地连接 W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub>, 或者如果 W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub> 不存在, 则连接 X<sub>0</sub> 或 X<sub>6</sub>, 或者如果 X<sub>6</sub> 不存在, 则直接连接 X<sub>5</sub>。

在第二个实施方案中, 式(Ia)的化合物包含用于 PET 成像方式的部分 Z。这时 Z 包含具有发射正电子性质的放射性发射体, 优选发射正电子的放射性非金属。优选的基团 Z 包含任一种正电子发射体  $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{77}\text{F}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$  和  $^{124}\text{I}$ 。 $^{18}\text{F}$  是特别优选的。合适的金属正电子-发射体是  $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{48}\text{V}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{68}\text{Ga}$  或  $^{82}\text{Rb}$ , 优选  $^{68}\text{Ga}$ , 其可以与螯合剂 Y<sub>1</sub> 相螯合。

非金属的放射性核素 (例如包含  $^{18}\text{F}$  的那些) 可以通过本领域熟知的取代或加成反应, 共价地连接到部分 W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub> (当存在时) 上, 或者可选择地连接到 X<sub>0</sub>、X<sub>5</sub> 或 X<sub>6</sub>。当 Z 是  $^{18}\text{F}$ -标记的醚、硫羧或氨基氧基团时, W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub> 优选地具有包含  $\alpha$ -卤代乙酰基部分、醚或氨基氧基团的官能团。在 WO 03/080544 和 WO 04/080492 中描述了硫羧偶联化学和醚和氨基氧偶联化学、使用该化学制备的  $^{18}\text{F}$ -合成子和标记的肽, 其内容在本文中引作参考。或者, 可以通过其它包含  $^{18}\text{F}$  的部分导入  $^{18}\text{F}$ , 所述部分例如  $^{18}\text{F}$ -氟代苯甲醛。这时连接位点 W<sub>1</sub>、W<sub>2</sub>、X<sub>0</sub>、X<sub>5</sub> 或 X<sub>6</sub> 优选地包含氨基氧基团。

当 M 代表用于 PET 成像的金属正电子-发射体时, 那么 Y<sub>1</sub> 代表适合与 M 形成稳定的螯合物的螯合剂。这样的螯合剂是现有技术领域熟知的, 且在 WO 01/77145 的表 1 中和前面的涉及放射和 SPECT 成像的实施方案中, 描述了这样的螯合剂的一般实例。

在优选的实施方案中, Y<sub>1</sub> 是 DOTA 螯合剂, 且 M 是  $^{68}\text{Ga}$ , 其可以使用微波化学容易地导入螯合物中。

在第三个实施方案中, Z 包含部分 Y<sub>1</sub>, 后者携带一个或多个用于 MR 成像方式的部分 M。M 在这里代表顺磁金属, 合适的这样的金属离子包括: Gd(III)、Mn(II)、Cu(II)、Cr(III)、Fe(III)、Co(II)、

Er(II)、Ni(II)、Eu(III)或 Dy(III)、Gd(III)、Dy(III)、Fe(III)和 Mn(II)是特别优选的。Y<sub>1</sub> 代表螯合剂，尤其是如例如 US 4,647,447 和 WO 86/02841 所述的无环的或环状的聚氨基酸酯的螯合剂(例如 DTPA、DTPA-BMA、DOTA 和 DO3A)。M 也可以代表金属氧化物，如超顺磁的、亚铁磁性的或铁磁性的种类，其被 Y<sub>1</sub> 吸附或结合，例如从而使得 Y<sub>1</sub> 起金属氧化物的涂层的作用。在例如本文引作参考的美国专利 6,230,777 中，描述了用作 MR 造影剂的金属氧化物。

在第四个实施方案中，Z 代表用于 X 射线成像方式的可成像的部分。Z 在这里包含重金属如钨、金和铋，优选地是氧化物形式。Z 也可以由碘化的芳基衍生物代表，尤其是熟知作为 X 射线造影剂的那些，例如 Iopamiron<sup>TM</sup>和 Omnipaque<sup>TM</sup>。这些试剂可以通过它们的酸或胺官能连接到式(Ia)的肽载体上，任选地通过 W<sub>1</sub> 或 W<sub>2</sub>。

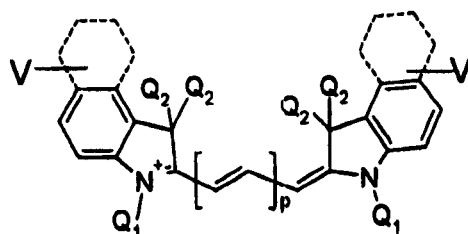
在另一个实施方案中，式(Ia)的化合物包含 Z，它是充气的微泡形式。这样的超声成像剂可以用于受体的成像，例如当它们被官能化以用于结合如现有技术(例如 WO98/18500)所述的肽时。

在本发明的第六个且优选的实施方案中，式(Ia)的部分 Z 可以是能在光学成像过程中直接或间接检测的任何部分。该可检测的部分可以是光散射体(例如有色的或无色的颗粒)、光吸收体或光发射体。更优选地，Z 由染料如生色团或荧光化合物代表。部分 Z 可以是与具有紫外线至近红外波长电磁谱的光相互作用的任何染料。在优选的形式，Z 具有荧光性质。

优选的有机染料部分包括具有广泛的非定域电子系统的基团，例如花菁、部花青、靛青、酞菁、萘酞菁(naphthalocyanine)、三苯基次甲基(triphenylmethine)、卟啉、吡喃鎓(pyrylium)染料、噻喃鎓(thiapyrylium)染料、squarylium 染料、croconium 染料、azulenium 染料、indoanilines、benzophenoxazinium 染料、benzothiaphenothiazinium 染料、蒽醌、萘醌(naphthoquinone)、indathrene、邻苯二甲酰吡啶酮、三苯酚合苯醌(trisphenoquinones)、偶氮染料、分子内的和分子间的电荷转移染料和染料复合物、环庚三烯酮、四嗪、bis(dithiolene)复合物、双(苯-二硫醇盐)复合物、碘苯胺(iodoaniline)染料和 bis(S,O-dithiolene)复合物。在荧光染料中，花菁染料的基团是优选的，甚至更优选的是 carbacyanine、oxacyanine、

thiacyanine 和 azacyanine 的基团。Cy5-和 Cy7-染料的基团是最优选的荧光染料，且它们可以通过 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯(NHS-酯)连接到肽载体上。荧光蛋白，如绿色荧光蛋白(GFP)和 GFP 的具有不同吸收/发射性质的修饰也是有用的。在某些上下文中使用某些稀土金属(例如，镧、钐、铕或镱)的络合物，如荧光纳米晶体 (nanocrystal) (量子点)。

优选的染料选自碳花青，且甚至更优选地是吲哚类型的碳花青染料。式 VI 解释了优选的这类染料：



(VI)

其中  $Q_1$  基团是相同的或不同的，且是取代的或未取代的低级烷基，例如任选地取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基。烷基被例如下述基团取代：羧基、磺酸、胺、铵或酯基团，如杂环状的酯基团(例如 NHS-酯)。  $Q_2$  基团是相同的或不同的，且是低级烷基，如  $C_1$ - $C_6$  烷基，优选甲基，其任选地地被例如羧基或磺酸基团取代。用虚线指示任选的芳族基团，以包括包含稠合的苯并环和稠合的萘并环的结构。每个环都是取代的或未取代的。环可以被选自下述的基团 V 取代：磺酸基团、羧基、羟基、烷基(磺基烷基)氨基、双(磺基烷基)氨基、磺基烷氧基、磺基烷基磺酰基、烷基或取代的烷基或磺基烷基氨基。  $p$  是正整数 1、2、3 或 4。优选地，花青染料是分别具有 5 和 7 个碳原子的碳桥的五甲川 (pentamethine) 或七甲川 (heptamethine) 染料。

$Q_1$ 、 $Q_2$  和 V 是用于将染料连接到肽载体上的潜在连接位点，任选地通过  $W_1$  和/或  $W_2$ ， $Q_1$  和 V 基团是优选的连接位点。在优选的方面，一个  $Q_1$  基团连接肽载体，而另一个  $Q_1$  基团是任选地取代的低级烷基。

从第二个方面看，本发明提供了式(VII)的 uPAR 靶向化合物

**$W_1-X_0-X_1-Phe-X_2-X_3-X_4-Leu-Trp-X_5-X_6-W_2$  (VII)**

其中符号如关于式 Ia 所定义的,且其中  $W_1$  和  $W_2$  至少存在一个,并代表所述的生物修饰剂。式 VII 的化合物可以连接到在第一方面所述的可成像的部分上,或可以具有其它用途,例如在治疗中。

使用已知的化学合成方法,可以合成本发明的化合物,但是特别有用的是 Merrifield 的使用自动化肽合成仪的固相方法(J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964))。一般地,通过固相肽合成装配所需序列。在 E. Atherton & R.C. Sheppard, "Solid phase peptide synthesis: a practical approach", 1989, IRL Press, Oxford 中,描述了本发明的实施例使用的合成策略的标准步骤。

例如,使用具有许多种酸不稳定的连接基团的树脂,它将产生具有 C-末端酸、胺或酰胺的肽。然后移除氨基保护基,并使用合适的缩合试剂,偶联序列中的第二个氨基酸。对于功能侧链,使用具有半永久性的氨基保护基和永久性的保护基的氨基酸。然后以交替的步骤重复氨基-脱保护和偶联循环,直到装配了目标序列。

或者,可以通过本领域已知的溶液肽合成方法,以逐步的方式从羧基末端合成肽,和/或通过使用片段缩合或连接方法,其中使用全面的或最少的保护策略。也可以使用组合的溶液-固相片段缩合方法。

通常,在如上所述的全部合成过程中,将保护存在的反应性侧链基团(例如氨基、羟基、胍基和羧基)。已知氨基酸的保护基团的广泛选择(参见,例如, Greene, T.W. & Wuts, P.G.M. (1991) *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, New York)。可以使用的氨基保护基团包括 9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)和叔丁氧基羰基(Boc)。可以使用的侧链保护基团包括叔丁基(*t*Bu)、三苯甲基(Trt)、Boc 和 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)。应当理解,本领域已知许多其它的这样的基团。

最后,移除永久性的侧链保护基团,并从树脂切割下肽,通常同时通过用合适的酸性试剂处理,例如三氟乙酸(TFA)。

使用已知的化学合成方法,可以将  $W_1$  和/或  $W_2$  缀合到肽载体上。至于制备肽载体,特别有用的是通过酰胺键形成,将  $W_1$  和/或  $W_2$  直接缀合到肽载体上。或者,可以使用亲核体取代反应,其中肽

N-末端上的离去基团被  $W_1$  和/或  $W_2$  上的亲核基团替代。这样的离去基团可以是在  $\alpha$  位置附着到羰基上的溴化物, 且这样的亲核体可以是氮。

使用与将  $W_1$  和/或  $W_2$  缀合到肽载体上相同的方法, 可以将  $Z$  直接缀合到肽上。在  $Z$  通过  $W_1$  或  $W_2$  附着肽的情况下, 可以使用任意的化学合成方法来缀合  $Z$  和  $W_1$  或  $W_2$ 。特别有用的是  $Z$  的自动偶联, 从而产生例如肽和可成像的部分之间的酰胺键。将报道分子部分连接到肽上的方法, 是本领域熟知的, 且将取决于选择的报道分子和使用哪种间隔臂。

使用高效液相色谱(HPLC), 可以纯化肽载体和造影剂, 并通过质谱法和分析型 HPLC 进行表征。

本发明的化合物发挥 uPA/uPAR 系统的有效造影剂功能的要求是, 一方面, 肽载体应当对受体具有高亲和力, 且另一方面, 只要需要, 载体应当“停留”在受体上。因而, 造影剂/uPAR 系统应当优选地表现出较慢的解离动力学(所谓的“解离速率(off-rate)”), 这可以方便地表达为解离速率常数  $K_{diss}$ 。已经发现, 本发明的造影剂具有极大提高的受体结合动力学。基于此, 本发明的特别优选的造影剂具有优选地  $< 50$ 、更优选地  $< 20$ 、甚至更优选地  $< 10$  且最优选地  $< 1$  的相对于 uPA 的生长因子结构域(GFD)的解离速率常数( $K_{diss}$ )。

本发明的造影剂优选地能抑制 uPA 与细胞表面 uPAR 的结合。本发明的造影剂优选地与二异丙基氟磷酸灭活的 uPA 等效。参数  $IC_{50}$  给出当 50 % uPA 被竞争掉时的浓度。本发明的优选的造影剂具有  $< 50$  nM, 优选  $< 25$  nM, 更优选  $< 10$  nM, 且甚至更优选  $< 3$  nM 的  $IC_{50}$ 。

根据本发明的造影剂优选地用于鉴别表达 uPAR 的位点, 以诊断与受体的上调有关的疾病。在患病组织中, 受体优选地比周围组织多超过 50%。更优选地, 患病组织中的受体为周围组织的超过 2 倍。甚至更优选地, 患病组织中的受体为周围组织的超过 5 倍。

从另一个方面看, 本发明提供了用于检测由于病理状态而被怀疑超表达 uPAR 的细胞表面、组织、器官或生物学样品中的 uPAR 存在的方法。该方法包含下述步骤:

- a) 使细胞、组织、器官或生物学样品接触本发明的造影剂, 和
- b) 检测与细胞、组织、器官或样品结合的可成像的部分的存在。

在该方法中，接触和检测都可以体外进行，或者接触是体内的，而检测是体外的，优选地，接触和检测是体内的。

优选的方法包括生成人或动物身体的图像，这通过诊断成像来实现，其包含将所述的造影剂施用给所述身体，例如进入血管系统，并生成所述造影剂已经分布的所述身体的至少部分的图像。

从另一个方面看，本发明提供了通过成像生成增强的人或动物身体的图像的方法，事先给其施用包含定义的造影剂的造影剂组合物，该方法包含产生所述身体的至少部分的图像。

本发明的新造影剂可以用作任何成像方式中的造影剂，这取决于选择的可成像的部分。因此，造影剂在诊断成像中的用途是本发明的一个方面。优选的方面是所述造影剂在不同形式的癌症和转移的成像和诊断中的用途，例如乳腺癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰癌、前列腺癌、肺癌或卵巢癌。或者，造影剂可以用于检测其中存在激活的巨噬细胞的疾病，例如动脉粥样硬化中的易损斑块。

本发明也提供了药物组合物，其包含有效量（例如能有效地增强体内成像的图像对比的量）的本发明的造影剂，或其盐，以及一种或多种可药用佐剂、赋形剂或稀释剂。

从另一个方面看，本发明提供了本发明的造影剂在生产对比增强试剂中的用途，所述对比增强试剂用于诊断方法中，所述诊断方法包含将所述对比增强试剂施用给人或动物身体，并产生所述身体的至少部分的图像。

现在，通过非限制性实施例进一步解释本发明，其中使用下面的缩写：

**BAEEG:** 双-(氨基乙基)乙二醇

**Boc:** 叔丁氧基羰基

**Cy:** 花青

**DEG:** 二甘醇

**DMF:** N,N-二甲基甲酰胺

**Fmoc:** 9-芴基甲氧基羰基

**HATU:** 2-(7-氟杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脲阳离子

**HPLC:** 高效液相色谱

**Krytofix 222: 4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂二环-(8,8,8)二十六烷**

**LC: 液相色谱**

**MS: 质谱分析法**

**NHS: N-羟基琥珀酰亚胺**

**NMM: N-甲基吗啉**

**PEG: 聚乙二醇**

**PBS: 磷酸盐缓冲液**

**Pmc: 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基**

**PyAOP: (7-氮杂苯并三唑-1-基氧)三吡咯烷六氟磷酸磷**

**Rink Amide MBHA 树脂: 连接到聚苯乙烯基质上的 4-甲基二苯甲基胺**

**RP-HPLC: 反相 HPLC**

**RT: 室温**

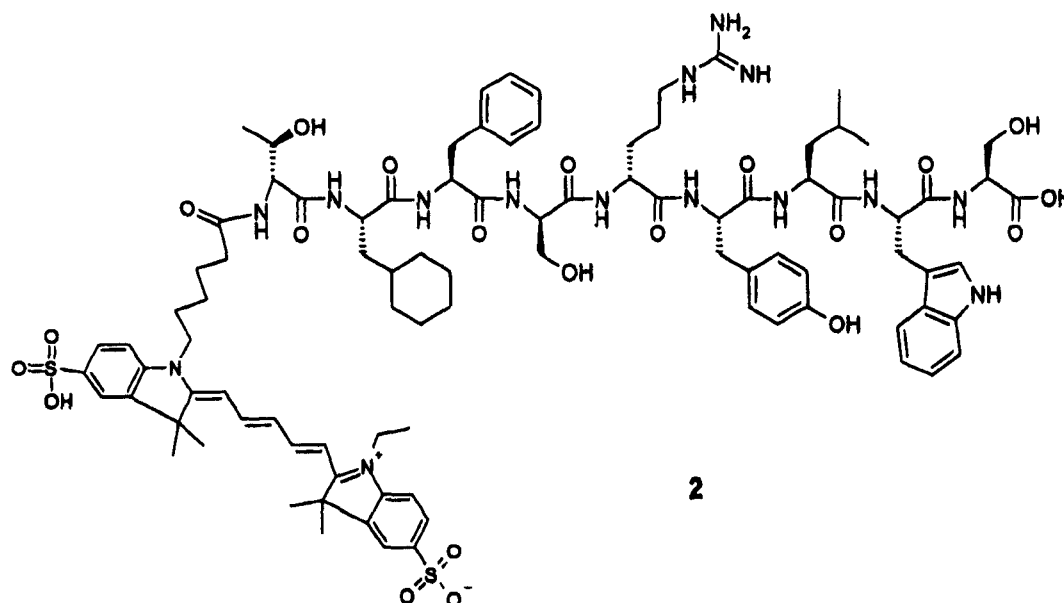
**Sep-Pak: 具有 C18-树脂的分离柱**

**TFA: 三氟乙酸**

**TIS: 三异丙基硅烷**

### 实施例 1:

**Cy5(双-SO<sub>3</sub>)-Thr-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-OH (2)**



### 合成 H-Thr-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-OH (1)

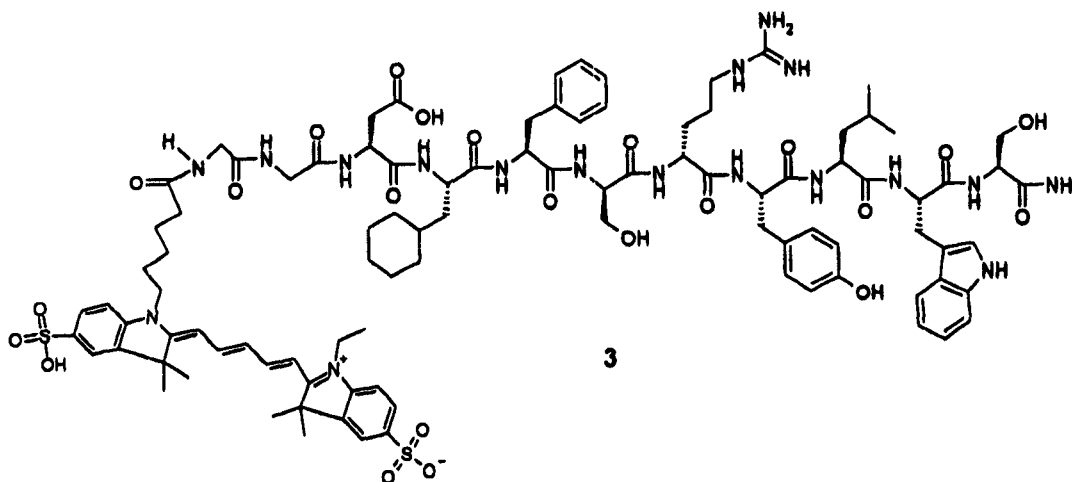
通过标准的固相肽化学，合成与上面的序列相对应的肽。

### Cy5(双 SO<sub>3</sub>)单 NHS 酯与肽(1)的缀合

将 Cy5(双 SO<sub>3</sub>)单 NHS 酯(1,18 mg, 0,0017 mmol)溶于 DMF 中，向溶液中加入作为固体的肽(1) (2 mg, 0,0015 mmol)，随后加入 NMM (0,55  $\mu$ l, 0,005 mmol)。将反应容器包入箔中，并置于摇动器装置上 16 小时。通过电喷射 MS 证实所需产物：预期产物的  $[M+H]^+$  是 1850.85 m/z，实测是 1850.9 m/z。

### 实施例 2:

Cy5(双 -SO<sub>3</sub>)-Gly-Gly-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp- Ser-NH<sub>2</sub> (3)

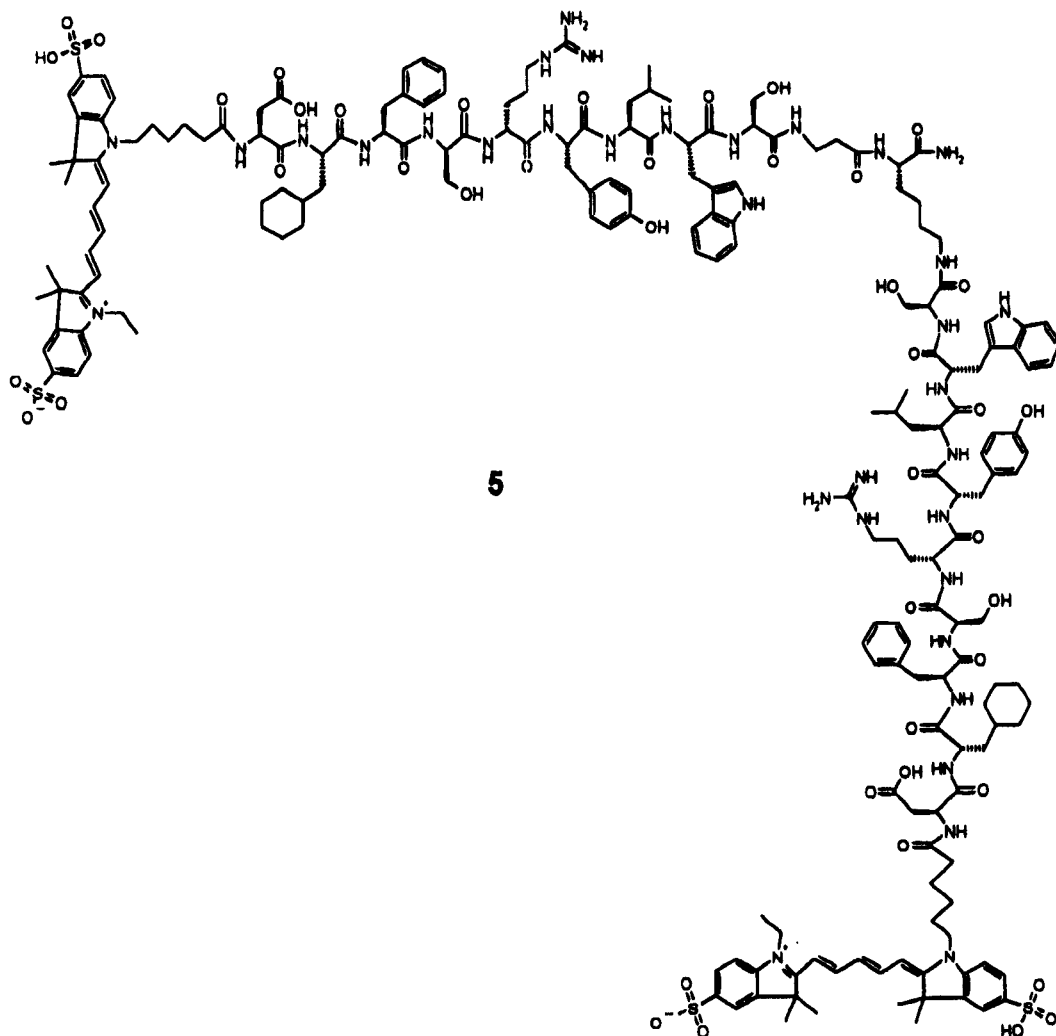


### 合成 Cy5(双-SO<sub>3</sub>)-Gly-Gly-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu- Trp-Ser-NH<sub>2</sub> (3).

通过标准的固相肽化学，装配上面序列的氨基酸。然后将 Cy5(双 SO<sub>3</sub>)单 NHS 酯(0.5 当量)溶于 DMF，并加入到 H-Gly-Gly-Asp(OtBu)-Cha-Phe-Ser(tBu)-Arg(Pmc)-Tyr(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Rink Amide MBHA 树脂 (1 当量)，随后加入 NMM(3 当量)。将反应容器包入箔中，并置于摇动器装置上 16 小时。脱保护 Cy5 染料缀合的肽，并通过用含有 2.5 % 水和 2.5 % TIS 的 TFA 处理 1 小时，从树脂切割下来。通过电喷射 MS 证实所需产物：预期产物的  $[M+H]^+$  是 1977.88 m/z，实测是 1977.8 m/z。

**实施例 3:**

**Cy5(双-SO<sub>3</sub>)-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-βAla-Lys(Cy5(双-SO<sub>3</sub>)-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser)-NH<sub>2</sub> (5).**



**合成 H-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-βAla-Lys(H-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser)-NH<sub>2</sub> (4).**

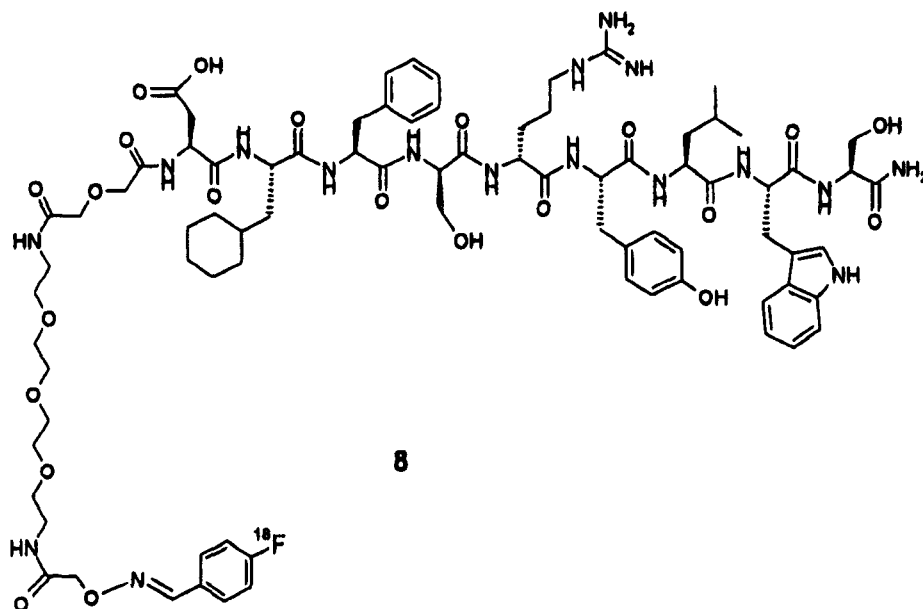
通过标准的固相肽化学，装配与上面的序列相对应的肽。

**Cy5(双 SO<sub>3</sub>)单 NHS 酯与肽(4)的缀合**

将 Cy5(双 SO<sub>3</sub>)单 NHS 酯(2.2 当量)溶于 DMF 中，向溶液中加入作为固体的肽(4)(1 当量)，随后加入 NMM (3 当量)。将反应容器包入箔中，并置于摇动器装置上 24 小时，以得到所需的双缀合的产物。通过 RP-HPLC 和电喷射-MS 分析产物。

**实施例 4**

**N-(4-<sup>18</sup>F-氟苯亚甲基)氨基氧乙酰基-PEG(4)-二乙醇酰-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-NH<sub>2</sub> (8).**



**合成 N-Boc-氨基氧乙酰基-PEG(4)-二乙醇酰-Asp-Cha-Phe- Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-NH<sub>2</sub> (7)**

熟练的技术人员使用 Boc-氨基氧乙酸的活性酯,并使它与对应的氨基-PEG(4)-二乙醇酸 (diglycolic acid) 反应,可以制备 Boc-氨基氧乙酰基-PEG(4)-二乙醇酸。将得到的产物 Boc-氨基氧乙酰基-PEG(4)-二乙醇酸 (1,4 当量)和 PyAOP (1,2 当量)溶于 DMF。加入 NMM (2 当量, 200  $\mu$ L), 并将混合物搅拌 5 分钟。加入肽(6) (1 当量)和 NMM (4 当量)溶于 DMF 中的溶液, 并将反应混合物搅拌 30 分钟。真空蒸发 DMF, 并使用制备型 RP-HPLC 纯化产物。使用 0.3 %氨(NH<sub>3</sub>)/水将含有所需产物的级分调至 pH 5, 然后冷冻干燥, 以预防 Boc 保护基团的去除。通过 PR-HPLC 和电喷射-MS 分析产物。

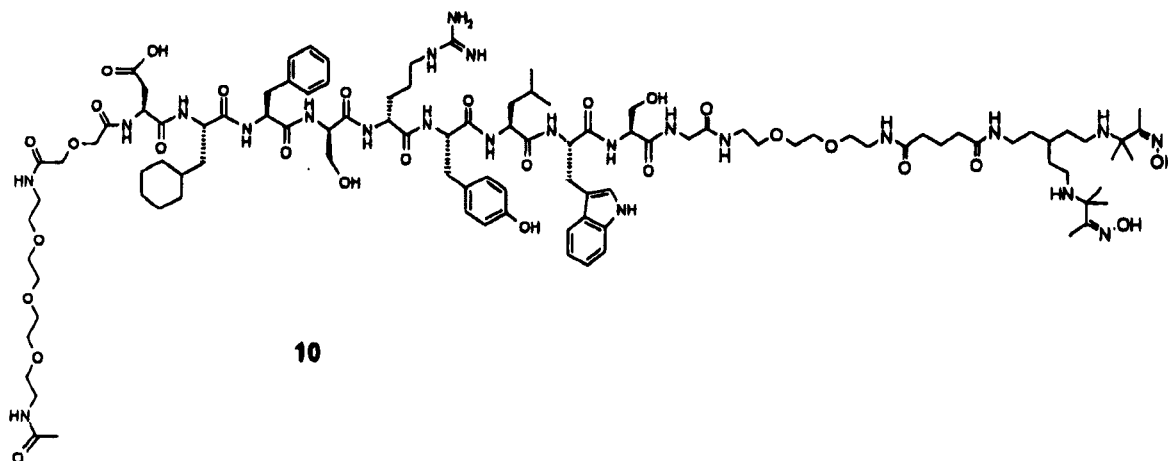
**肽(7)的 <sup>18</sup>F 标记**

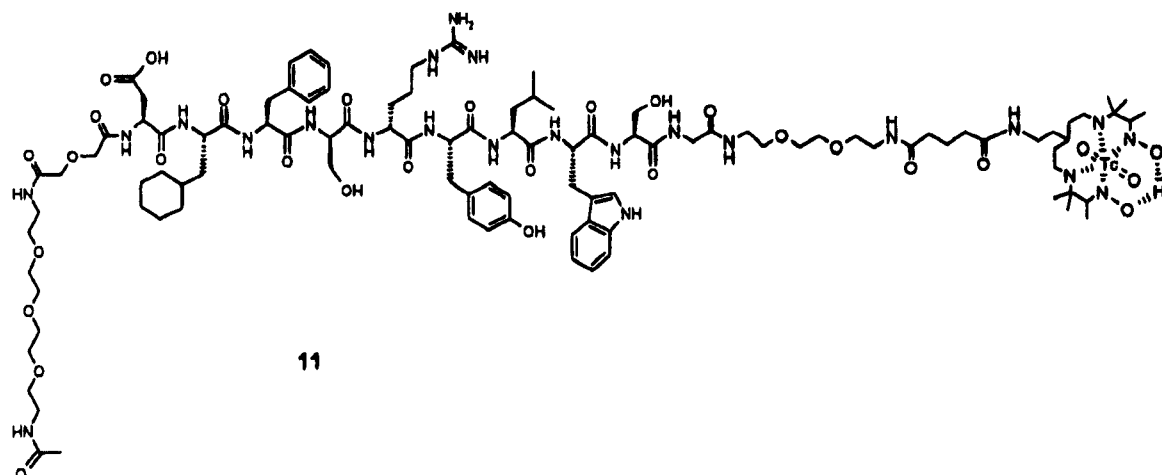
通过在氦气流下加热至 110 $^{\circ}$ C 20 分钟, 在有 Kryptofix 222 (5 mg, 溶于 0.5 ml ACN 中)和碳酸钾 (50  $\mu$ l 0.1 M 溶液)存在下共沸地干燥 <sup>18</sup>F-氟化物。在这过程中, 加入 3 x 0.5 ml ACN, 并移除。将混合物冷却至 <40 $^{\circ}$ C, 并加入根据 Haka 等在 J. Labelled Cpds.&

**Radiopharms 1989 27(7) 823** 中所述的方法合成的三甲基铵苯甲醛三氟甲磺酸 (triflate) (1 mg, 溶于 0.4 ml 二甲亚砜中)。密封反应容器, 并加热至 90℃ 15 min, 以实现标记。然后将粗 4-18F-氟苯甲醛溶液冷却至室温。同时, 在室温用溶于 TFA 中的 5% 水 (200  $\mu$ l) 处理肽 (7) (6 mg) 5 分钟, 以去除 Boc-保护基团。在真空中去除溶剂。将 Boc-脱保护的肽重新溶于 0.1M 乙酸铵溶液 (pH4, 0.4 ml), 并与粗 4-18F-氟苯甲醛溶液在反应容器中组合。密封反应容器, 并加热至 70℃ 15 分钟, 以实现缀合。冷却至室温后, 通过制备型 HPLC 纯化粗缀合物。用 10 ml 水稀释含有所需缀合物的级分, 并将其装载到 C18 Sep-Pak (通过先后用 10 ml 乙醇和 20 ml 水洗涤来预制备) 上。用 10 ml 水冲洗 Sep-Pak, 然后用 2 ml 乙醇洗脱。在真空中去除乙醇, 并在 PBS 中配制产物 (8)。

### 实施例 5

乙酰基-PEG(4)-二乙醇酰-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-BAEEG-Glut-cPN216 (10)。





### 合成乙酰基-PEG(4)-二乙醇酯-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr- Leu-Trp-Ser-Gly-BAEEG-NH<sub>2</sub> (9)

通过标准的固相肽化学，合成与上面的序列相对应的肽基树脂。将乙酰基-PEG(4)-二乙醇酸 (5 当量)和 PyAOP (4.5 当量)溶于 DMF。加入 NMM (10 当量, 200  $\mu$ L)，并将混合物搅拌 5 分钟。然后将混合物加入在 DMF 中预溶胀的肽树脂，并使反应继续过夜。然后，将肽脱保护，并使用含有 2.5 %水和 2.5 % TIS 的 TFA 从树脂切割 1 小时。通过 RP-HPLC 和电喷射-MS 分析产物。

### cPN216 与肽(9)的缓合

将肽(9) (1 当量)溶于 DMF，加入 cPN216-戊二酰基-四氟苯硫基酯(2 当量)，随后加入 NMM (3 当量)。搅拌过夜后，通过在减压下去除溶剂，建立反应混合物，并通过制备型 RP-HPLC 纯化产物(10)。通过 RP-HPLC 和电喷射-MS 分析产物。

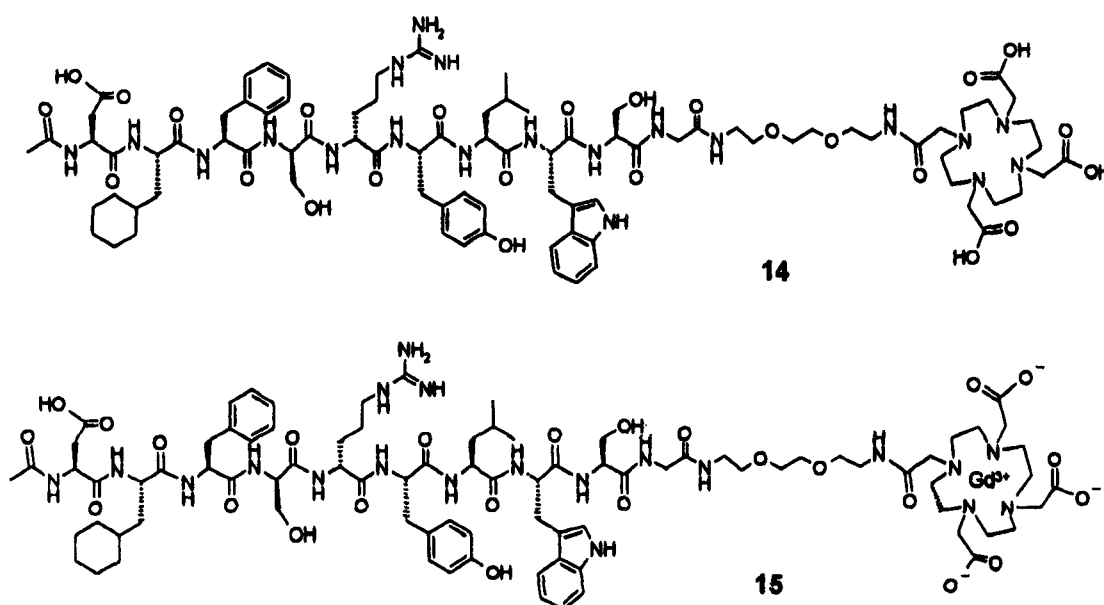
### 肽(10)的 <sup>99m</sup>Tc-标记

在盐水或甲醇 (0.1 ml)中重构肽(10) (0.1 mg)，并转入冷冻干燥的赋形剂 Toolbox 试剂盒中。Toolbox 试剂盒设计用于为基于胺的螯合物提供普通的放射标记条件，它含有氯化亚锡脱水物(16  $\mu$ g)、二磷酸亚甲酯(25  $\mu$ g)、碳酸氢钠 (4500  $\mu$ g)、碳酸钠 (600  $\mu$ g)、对氨基苯甲酸钠(200  $\mu$ g)，试剂盒 pH= 9.2。然后加入溶于盐水(3 ml)中的高锝酸钠(<sup>99m</sup>Tc)注射液(2.1 千兆贝克勒尔)，将试剂盒反转几次，以溶解内容物，然后在室温温育 15-20 分钟。立即通过 HPLC 和 ITLC 分析样品，

并在重构试剂盒后 1-3 小时, 将  $^{99m}\text{Tc}$ -标记的肽(11)施用给试验受试者。

### 实施例 6

乙酰基-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly-BAEG-Glut-DOTA 的钆(III)络合物(15)。



### 合成乙酰基-Asp-Cha-Phe-Ser-Arg-Tyr-Leu-Trp-Ser-Gly- DEG-NH<sub>2</sub> (12)

通过标准的固相肽化学, 合成与上面的序列相对应的肽。

### 合成三-tBu-DOTA (13)

将三-tBu-DO3A (1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N''-三乙酸, 三叔丁基酯, 10 mmol)和溴乙酸(10 mmol)溶于 MeOH (50 ml). 加入溶解在水(50 ml)中的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (30 mmol)(pH 11, 在 MeOH/水混合物中), 将反应物搅拌 24 小时, 然后在 40℃加热另外 24 小时. 通过 RP-HPLC 纯化粗产物(Phenomenex Luna 5 micron, C18, 250 x 21.2 mm, 梯度 5-50% B, 经 40 分钟, 10 ml/分钟). 通过电喷射-MS 证实所需产物: 预期产物的  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  是 595.4 m/z, 通过在 80℃的  $^1\text{H}$ -NMR 发现  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 是 595.3 m/z.

### **合成 DOTA-缀合的肽(14)**

在有 NMM (3 当量)存在下, 用溶于 DMF 中的 HATU (1 当量)激活三-*t*Bu-DOTA (13) (1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸, 三叔丁基酯 1 当量) 5 分钟. 将混合物加入肽(12), 并使反应继续过夜. 在真空中去除溶剂, 并在含有 5%水的 TFA 中, 将产物 *t*Bu-脱保护. 通过 RP-HPLC 纯化产物, 并通过 RP-HPLC 和电喷射-MS 进行分析.

### **与 Gd(III)的络合**

在室温, 使 DOTA-缀合的肽(14) (1 当量)与溶于 pH 6.5 水溶液中的 GdCl<sub>3</sub> (1 当量)反应. 通过离心碱性 pH 的溶液, 去除未络合的 Gd(III). 通过冷冻干燥分离产物(15).

<110> Amersham Health AS

<120> uPAR-靶向造影剂

<130> PN0453 PCT

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 环己基丙氨酸

<400> 1

Asp Xaa Phe Ser Arg Tyr Leu Trp Ser

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 环己基丙氨酸

---

<400> 2

Thr Xaa Phe Ser Arg Tyr Leu Trp Ser  
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> 环己基丙氨酸

<400> 3

Gly Gly Asp Xaa Phe Ser Arg Tyr Leu Trp Ser  
1 5 10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 环己基丙氨酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> 环己基丙氨酸

<400> 4

Asp Xaa Phe Ser Arg Tyr Leu Trp Ser Ala Lys Ser Trp Leu Tyr Arg

1 5 10 15

Ser Phe Xaa Asp

20

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 环己基丙氨酸

<400> 5

Asp Xaa Phe Ser Arg Tyr Leu Trp Ser Gly

1 5 10