

[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 200780040205.0

[51] Int. Cl.

A61K 51/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 7/56 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 9 日

[11] 公开号 CN 101528270A

[22] 申请日 2007.8.28

[21] 申请号 200780040205.0

[30] 优先权

[32] 2006.8.28 [33] US [31] 60/823,682

[86] 国际申请 PCT/IB2007/002479 2007.8.28

[87] 国际公布 WO2008/026040 英 2008.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.28

[71] 申请人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

[72] 发明人 B·朗斯特伦 I·维利克彦

M·贝里斯特伦 O·林赫

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 林毅斌 黄可峻

权利要求书 5 页 说明书 27 页

[54] 发明名称

基于⁶⁸Ga 标记的肽的放射性药物

[57] 摘要

本发明涉及用作诊断显像剂或治疗剂的新型基于肽的化合物,其中所述药剂包含与整联蛋白受体结合的靶载体。

酸、高赖氨酸或二氨基烷基酸或其衍生物。

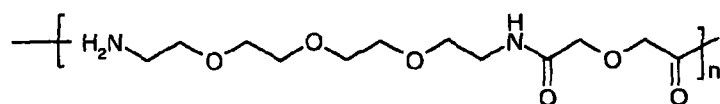
5. 权利要求 1 的化合物, 其中 X_2 、 X_4 和 X_6 独立代表半胱氨酸或高半胱氨酸残基。

6. 权利要求 1 的化合物, 其中 X_3 代表精氨酸残基。

7. 权利要求 1 的化合物, 其中 X_5 代表酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸或苯丙氨酸残基。

8. 权利要求 1 的化合物, 其中 X_7 不存在或包含 1-10 个单元的单分散 PEG 结构单元。

9. 权利要求 1 的化合物, 其中 X_7 不存在或包含 1-10 个单元的式 II



(II)

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

11. 权利要求 1 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, 优选甘氨酸。

12. 权利要求 1 的化合物, 其中 Z_1 是 NOTA、DOTA 或 TETA。

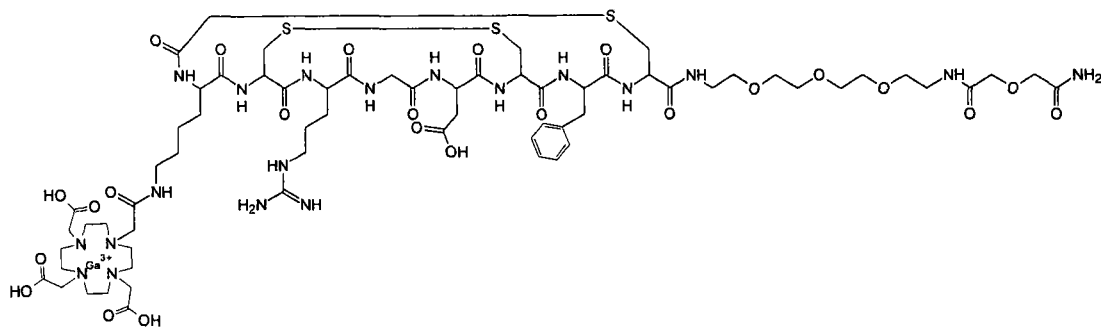
13. 权利要求 1 的化合物, 其中 Z_1 是抗肿瘤剂。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中 Z_1 代表环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、长春碱、紫杉醇、多柔比星、柔红霉素、依托泊苷、替尼泊苷、顺铂、安吡啶或多西他赛。

15. 权利要求 1 的化合物, 其中 W_1 是戊二酸或琥珀酸。

16. 权利要求 1 的化合物, 为下式所限定

化合物 I



17. 药物组合物，其包含有效量的通式(I)化合物或其盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂用以提高体内成像的影像效果。

18. 权利要求 1 的化合物在制备诊断显像剂中的用途，所述诊断显像剂用于包括以下步骤的诊断方法中：将所述诊断显像剂给予人体或动物体和产生至少部分所述身体的影像。

19. 产生人体或动物体的影像的方法，所述方法包括：给予诊断显像剂到所述身体；和产生所述诊断显像剂所分布的至少部分所述身体的影像，所述方法的特征在于所述诊断显像剂包含权利要求 1 的化合物。

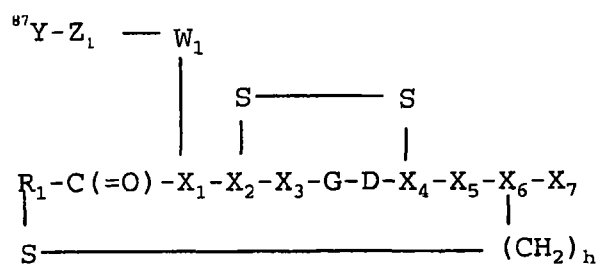
20. 治疗前剂量测定方法，所述方法包括：给予人体或动物体式 I 的化合物，或其酸加成盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂；并通过细胞受体检测所述化合物的吸收情况，所述细胞受体优选为内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测在治疗前进行以计划治疗。

21. 监测方法，用于监测用药物治疗人体和动物体以对抗与癌症相关病症、优选血管生成的效果，所述方法包括：给予所述身体式 I 化合物，或其酸加成盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂；和通过细胞受体检测所述化合物的吸收情况，所述细胞受体优选是内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测在用所述药物治疗之前、期间和之后重复进行。

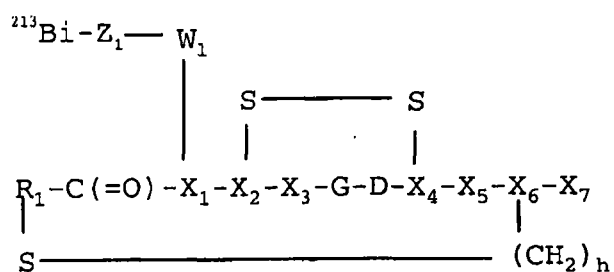
22. 计划治疗的方法，以确定对人体或动物体合适治疗类型，所述方法包括：给予所述身体式 I 化合物，或其酸加成盐，以及一种或

多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂；通过测量受体吸收过表达组织来定量体内受体密度；和确定合适的治疗类型。

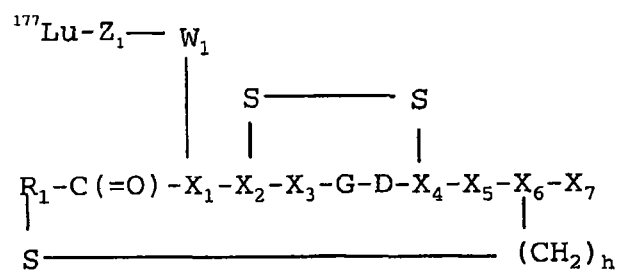
23. 通式(III)、(IV)或(V)的化合物或其药学上可接受的盐



III



IV



V

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 1-10 的正整数

h 代表正整数 1 或 2

X_1 代表氨基酸残基, 其中所述氨基酸具有功能性侧链例如酸或胺,

X_2 和 X_4 独立代表能够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其衍生物, 而

X_6 代表含巯基的氨基酸残基, 而

X_7 不存在或代表生物修饰物部分

Z_1 代表螯合剂。

24. 人体或动物体中的癌症、优选血管生成的放射性治疗方法, 所述方法包括给予有效量的化合物 III、IV 或 V。

25. 权利要求 23 的化合物在制备药物中的用途, 所述药物用于对人或动物中的癌症、优选血管生成的放射性治疗。

基于⁶⁸Ga标记的肽的放射性药物

发明领域

本发明涉及新型放射性标记的基于肽的化合物及其在诊断成像、治疗前剂量测定、治疗计划、治疗监测或放射疗法中的应用。更具体而言本发明涉及这样的基于肽的化合物作为靶载体的用途，该靶载体结合到与血管生成相关的受体，特别是整联蛋白受体例如 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白受体。因此这样的显像剂可用于诊断例如恶性病、心脏病、子宫内膜异位、炎症相关疾病、类风湿关节炎和卡波济氏肉瘤。此外这样的试剂可用于这些疾病的治疗前剂量测定、治疗计划和治疗监测。

发明背景

新血管可通过两种不同机制形成：血管发生(vasculogenesis)或血管生成(angiogenesis)。血管生成是通过从存在的血管分支形成新血管。这一过程的初次刺激可能对于提供营养物和氧(低氧)给组织中的细胞而言是不足够的。细胞可通过分泌许多血管生成因子发生应答；一个经常涉及的实例是血管内皮生长因子(VEGF)。这些因子启动分解基膜蛋白的蛋白水解酶的分泌，也启动限制这些潜在有害酶作用的抑制剂的分泌。血管生成因子的另一个突出作用是引起内皮细胞迁移和分裂。附着于基膜的内皮细胞不经历有丝分裂，所述基膜在逆腔侧(contraluminal side)环绕血管形成连续的层。受体失去血管生成因子的附着及其信号的联合后果是引起内皮细胞移动、繁殖和其自身重排，并最终合成环绕新血管的基膜。

在组织生长和重建包括伤口愈合和炎症过程中，血管生成显著。当肿瘤达到毫米大小时必须启动血管生成以维持其生长速度。血管生成伴随在内皮细胞及其环境的特征变化。除了参与影响和控制蛋白质水解的蛋白发生变化以外，还有这些细胞表面经过重建来为迁移的准

备,并且在基膜降解处隐藏结构被暴露出来。在肿瘤的情况下,产生的血管网络常常是紊乱的,伴随有急剧扭结(sharp kink)形成并且动静脉分流。血管发生的抑制被认为是用于抗肿瘤治疗的有前景的策略。伴随血管发生的变形(transformation)对诊断而言也十分有前景,一个显而易见的实例是诊断恶性病,而且这一概念在炎症和许多炎症相关的疾病包括动脉粥样硬化中也表现出极大的前景,早期动脉粥样硬化病变的巨噬细胞是血管生成因子的潜在来源。这些因子也参与到心肌的梗塞部分的血管再形成中,当短时间内狭窄释放时该血管再形成发生。

与新血管形成或血管生成、新血管的发育或增殖相关的不期望病症的进一步实例在下文中出示。在这一点上也作出了对 WO 98/47541 的引用。

与血管生成相关的疾病和适应症是例如不同形式的癌症和转移,例如乳腺癌、皮肤癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌或卵巢癌。

其他疾病和适应症是炎症(例如慢性炎症)、动脉粥样硬化、类风湿性关节炎和龋炎。

此外的与血管生成相关的疾病和适应症是动静脉畸形、星形细胞瘤、绒毛膜癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、血管瘤(儿童期血管瘤,毛细血管血管瘤)、肝癌、子宫内膜增生、心肌局部缺血、子宫内膜异位、卡波济氏瘤、黄斑变性、黑素瘤、成神经细胞瘤、闭塞性外周动脉病、骨关节炎、牛皮癣、视网膜病(糖尿病视网膜病,增生性视网膜病)、硬皮病、精原细胞瘤和溃疡性结肠炎。

血管生成涉及内皮细胞和外围组织独特的受体。这些标记包括生长因子受体例如 VEGF 和整联蛋白家族受体。免疫组织化学研究表明多种整联蛋白(可能最重要的是 α_v 类)在血管的顶面表达[Conforti, G 等(1992) Blood 80: 37-446]并且适合被循环配体靶向[Pasqualini, R 等(1997) Nature Biotechnology 15: 542-546]。 $\alpha_5\beta_1$ 也是一种促进纤连蛋白基质装配并启动细胞附着于纤连蛋白的重要整联蛋白。它在细胞迁

移[Bauer, J. S., (1992) J. Cell Biol. 116: 477-487]以及肿瘤侵入和转移中[Gehlsen, K. R., (1988) J. Cell Biol. 106: 925-930]也起着关键的作用。

整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 是已知与血管生成相关的受体之一。在血管生成过程临界期,受刺激的内皮细胞似乎依赖于该受体而存活,因为 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白受体/配体相互作用的拮抗剂诱导细胞程序性死亡并抑制血管生长。

整联蛋白是异源二聚体分子,其中 α 和 β 亚基穿过细胞膜脂双分子层膜。 α 亚基在其胞外链上具有四个 Ca^{2+} 结合结构域,而 β 亚基具有许多胞外半胱氨酸富集结构域。

参与细胞粘着作用的许多配体(例如纤连蛋白)含有三肽序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)。RGD序列似乎充当该序列所在的配体与细胞表面受体之间的初级识别位点。普遍认为配体和受体的次级相互作用(secondary interaction)增强相互作用的特异性。这些次级相互作用可能发生在与RGD序列直接相邻的配体部分和受体部分之间,或者发生在远离RGD序列的位点处。

已知RGD肽与很多整联蛋白受体结合,并具有调节临床环境中许多重要应用的细胞事件的潜力(Ruoslahti, J. Clin. Invest., 87: 1-5 (1991)。可能研究最广泛的RGD肽及其模拟物的作用涉及其作为抗凝血剂的用途,这种情况下其靶向血小板整联蛋白GpIIbIIIa。

通过给予 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_5$ 拮抗剂抑制组织中的血管生成已在例如利用抗体或含RGD的肽的WO 97/06791和WO 95/25543中描述。EP 578083描述了一系列单环的含RGD肽,而WO 90/14103要求保护RGD抗体。Haubner等人在J. Nucl. Med. (1999); 40: 1061-1071中描述了一类新的基于单环含RGD肽的肿瘤靶向示踪物。然而,利用全身放射自显影成像的生物分布研究显示用 ^{125}I 标记的肽血液清除率非常快并且主要是肝胆排泄途径导致高背景。

在WO 98/54347和WO 95/14714中也描述了包含多个桥的环状RGD肽。来源于体内生物淘选的肽(WO 97/10507)用于多种靶向作用

的应用。序列 CDCRGDCFC (RGD-4C)用于使药物例如多柔比星(WO 98/10795)、核酸和腺病毒(参见 WO 99/40214, WO 99/39734, WO 98/54347, WO 98/54346, US 5846782) 靶向细胞。然而含多个半胱氨酸残基的肽背负着可能存在多个二硫化物异构体的缺点。有 4 个半胱氨酸残基的肽例如 RGD-4C 可能形成 3 种不同二硫化物折叠构型。因为 RGD 药效团被迫形成为 3 种不同构象, 所以异构体将对整联蛋白受体具有不同的亲和力。

在 PCT/NO01/00146 和 PCT/NO01/00390 中找到包含基于含 RGD 肽的化合物的进一步实例, 其内容通过引用结合到了本文中。

因此, 与体内血管生成有关的整联蛋白受体的有效靶向作用和成像需要具选择性的、亲和力高的基于 RGD 的载体, 且需化学能力强并稳定。此外, 当设计显像剂时排泄途径是一个重要的因素以减少关于本底的问题。这些严格条件可通过本发明中所描述的双环结构得以满足。

基于 ^{68}Ga 的肽示踪物为肿瘤成像/诊断、化学和放射性治疗的计划和监测以及放射性治疗的治疗前剂量测定提供了优越的工具。此外, 诊断和剂量测定后在同样的载体中可用治疗性放射性核素($^{87}\text{Y}_{39}$, $^{213}\text{Bi}_{83}$, $^{177}\text{Lu}_{71}$)取代 ^{68}Ga 用于后续放射性治疗。使用产生 ^{68}Ga 的发生器利用放射性金属化反应(radiometallation)直接制备示踪物可产生试剂盒类型的 PET 放射性药物并且使在缺乏加速器的中心进行 PET 检查成为可能。

发明概述

一方面, 本发明提供了如权利要求中所定义的式 I 的新型基于 ^{68}Ga 肽的化合物。这些化合物对整联蛋白受体具有亲和力, 例如对整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的亲和力。

本发明还提供了药物组合物, 其包含有效诊断成像量(例如有效增强影像致使在体内成像的量)的通式 I 化合物或其盐, 以及一种或更多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂。

本发明进一步提供了用于疾病的治疗前剂量测定、治疗计划和治疗监测的药物组合物，其包含有效量的通式 I 化合物，或其酸加成盐，以及一种或更多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂。

与肽配体例如式 I 化合物上的螯合剂连接的正电子发射射电金属可用于治疗前剂量测定。这将提供信息关于有多少有毒放射活度到达肿瘤以及正常器官是否受影响。这是对肿瘤和正常组织相应剂量的简单快捷的估算。

式 I 的 PET-放射性药物还可以用于化学和放射性治疗计划。被过表达某种受体的组织吸收的 PET-示踪物可以被定量以提供体内受体密度的量。基于受体密度值可以认同或建议合适的治疗类型。

从进一步的方面来看本发明提供了通式 I 的化合物在制备诊断显像剂优选 PET 示踪物中的用途，所述诊断显像剂用于诊断方法，所述诊断方法包括将所述诊断显像剂给予人体或动物体以及产生至少部分所述身体的影像。

从更进一步的方面来看本发明提供了产生人体或动物体的影像的方法，其包括将诊断显像剂给予所述身体例如进入到血管系统；和利用闪烁照相、PET 或者 SPECT 方式(modality)产生所述诊断性显像剂所分布的至少部分所述身体的影像，其中使用式 I 的试剂作为所述诊断显像剂。

从进一步的方面来看，本发明提供了监测用药物治疗(例如细胞毒素剂或放射治疗)人体或动物体以对抗与癌症相关病症(优选血管生成)的效果的方法，所述方法包括：给予所述身体式 I 的化合物，或其酸加成盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂；通过细胞受体检测所述药剂的吸收情况，所述细胞受体优选是内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测任选但优选重复实施，例如在用所述药物治疗之前、治疗中和治疗后实施。

进一步地，本发明提供了治疗前剂量测定方法以测量被肿瘤和正常器官吸收的放射性量。这将会提供信息关于有多少有毒放射性到达

肿瘤以及正常器官是否受影响。这是对到达肿瘤和正常组织剂量的简单快速的估测。所述方法包括：给予所述身体式 I 的药剂；和通过细胞受体检测所述药剂的吸收情况，所述细胞受体优选是内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测在治疗前进行以计划治疗。

更进一步地，本发明提供了治疗计划方法以确定合适的治疗类型。这将提供体内受体密度的信息。所述方法包括：给予人体或动物体式 I 的药剂，或其酸加成盐，以及一种或更多药用可接受的辅药、赋形剂或稀释剂；通过测量受体吸收过表达组织(receptor uptake over expressing tissue)来定量体内受体密度并确定合适的治疗类型。

最后，本发明提供了式 III、IV 和 V 的化合物以及利用化合物 III、IV 和 V 用于癌症优选血管生成的放射性治疗的方法。本发明还提供了癌症优选血管生成的放射性治疗的方法，其包括给予人体或者动物体有效量的式 III、IV 或 V 化合物药剂。本发明进一步提供这样的化合物在制备人或动物中的放射性治疗的药物中的用途。

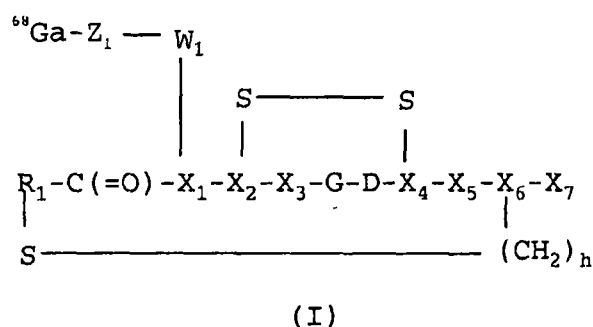
发明详述

从一方面看，本发明提供了如权利要求中所定义的新型的式 I 基于肽的化合物。这些化合物对整联蛋白受体具有亲和力，例如对整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 具有亲和力。

式 I 的化合物包含至少两个桥，其中一个桥形成二硫键而第二个桥包含一个硫醚(硫醚(sulphide))键，并且其中所述桥将肽部分折叠成为“嵌套”(“nested”)构型。

因此本发明的化合物每个分子部分最多具有一个二硫桥。本发明所定义的化合物在体内出乎意料地稳定。

这些新型化合物可用于诊断成像以及治疗前剂量测定、治疗计划和治疗监测。本发明中所描述的新型基于肽的化合物由式 I 或其生理学上可接受的盐所限定：



其中

G 代表甘氨酸，而

D 代表天冬氨酸, 而

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

并且

n 代表 1-10 之间的正整数, 而

h 代表正整数 1 或 2,

并且

X₁ 代表氨基酸残基, 其中所述氨基酸具有功能性侧链例如酸或胺
优选天冬氨酸或谷氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、二氨基丙烯酸
(diaminoalcylic acid)或二氨基丙酸,

X_2 和 X_4 独立代表能够形成二硫键的氨基酸残基, 优选半胱氨酸或者高半胱氨酸, 而

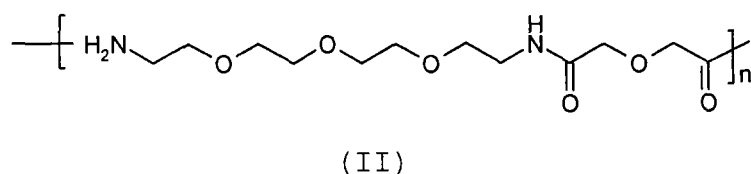
X₃代表精氨酸、N-甲基精氨酸或精氨酸模拟物,优选精氨酸,而

X₅ 代表疏水性氨基酸或其衍生物, 优选酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸或苯丙氨酸残基, 更优选苯丙氨酸或 3-碘-酪氨酸, 而

X₆ 代表含巯基(thiol)的氨基酸残基, 优选半胱氨酸或高半胱氨酸残基, 而

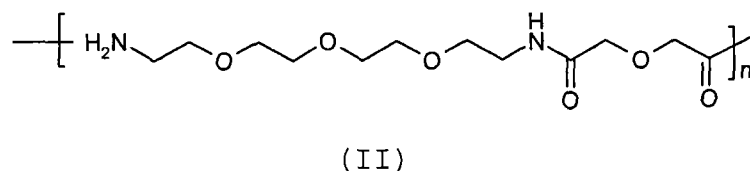
X₇ 不存在或代表均质的生物修饰物部分，优选基于单分散 PEG 结构单元的生物修饰物部分，其包含 1-10 个单元的所述结构单元，所述生物修饰部分具有修改所述药剂的药物动力学和血液清除率的功能。此外 X₇ 也可代表 1-10 个氨基酸残基优选甘氨酸、赖氨酸、天冬

氨酸或丝氨酸。在本发明的优选实施方案中, X₇ 代表由单分散 PEG 类似结构: 式 II 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七烷酸的聚合组成的生物修饰物单元。



其中 n 等于 1-10 的整数并且其中 C 末端单元是酰胺部分。

W₁ 不存在或者代表间隔部分, 优选来自基于戊二酸和/或琥珀酸和/或聚乙二醇的单元和/或式 II 的单元。



Z₁ 是表 1 中所给出结构式的螯合剂。

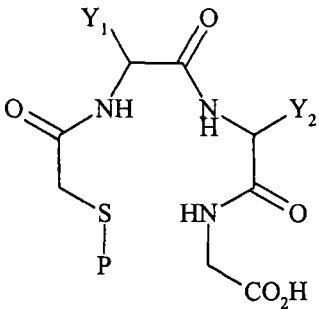
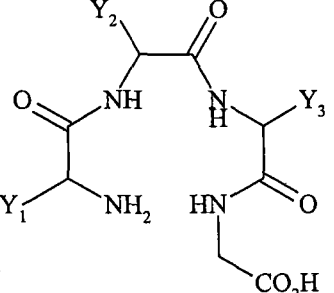
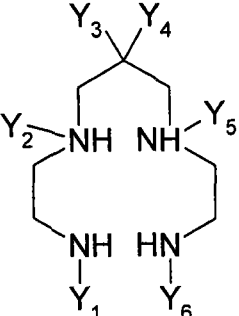
在室温接近中性 pH 的水相条件下, 可以对包含螯合剂的缀合物进行放射性标记, 以得到良好的放射化学纯度(radiochemical purity) RCP。在室温下断开肽组分的二硫桥的风险小于在提高的温度下。室温下对缀合物进行放射性标记的进一步优点是医院药房中的简化过程。

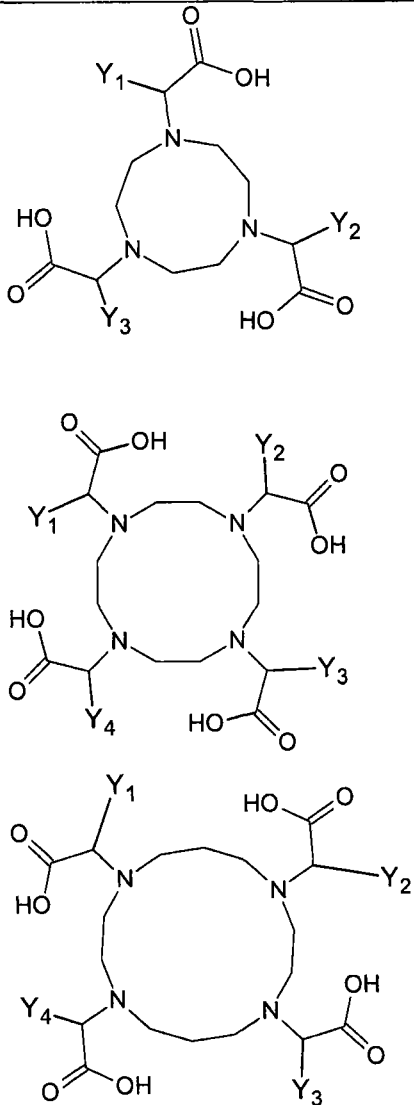
间隔部分 W₁ 的作用是将体积相对大的螯合剂与肽组分的活性位点间隔开。间隔部分 W₁ 也用于将体积大的抗肿瘤剂与肽活性位点间隔开。

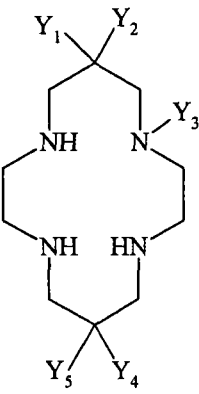
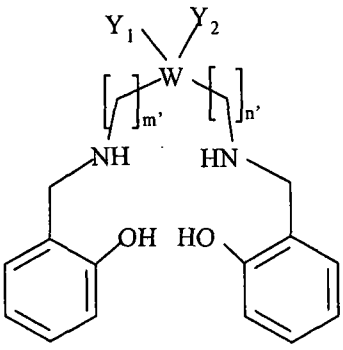
发现生物修饰物 X₇ 改变化合物的药物动力学和血液清除率。生物修饰物起到使所述化合物在组织即肌肉、肝等中吸收减少的作用, 从而因本底干扰较小而产生了更好的诊断影像。因生物修饰物进一步的优点分泌作用主要通过肾。

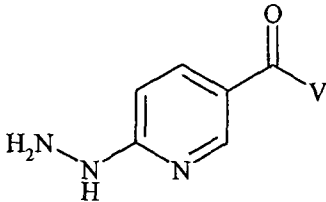
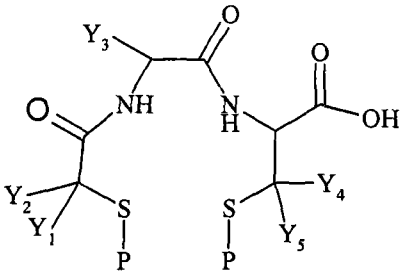
式 I 中定义的化合物也包含如表 I 中所限定的螯合剂 Z₁。

表 I:

配位体种类	结构	定义
MAG3 型		P = 保护基(优选苯甲酰基、乙酰基、EOE); Y1, Y2 包含合适的官能性致使其可以与肽载体缀合; 优选为 H (MAG3), 或者 L 或 D 构型的任何氨基酸的侧链。
G4 型配位体		Y1, Y2, Y3 - 含有合适的官能性致使其可与肽载体缀合; 优选为 H, 或 L 或 D 构型的任何氨基酸的侧链。
四胺配位体		Y1-Y6 可为 H、烷基、芳基或其组合 其中 Y1-6 基团含有一个或多个官能部分致使该螯合物可以与载体缀合-例如优选烷基胺、烷基硫、烷氧基、羧酸烷基酯(alkyl carboxylate)、芳胺、芳基硫(aryl sulphide)或 α-卤代乙酰基。

配位体种类	结构	定义
大环配位体例如 1,4,7-三氮杂环壬烷三乙酸 (NOTA), 1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸 (DOTA), 1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8,11-四乙酸 (TETA) 及它们的衍生物		Y1 可以为 H 或者含有一种或多种官能部分致使该螯合剂可以与载体缀合-例如优选烷基胺、烷基硫、烷氧基、羧酸烷基酯、芳胺、芳基硫或 α-卤代乙酰基。 Y2-4 可为 H 或者含有一种或多种官能部分例如烷基胺、烷氧基、羧酸烷基酯、苯酚、异羟肟酸、芳基硫、烷基, 该官能部分可一方面根据具体的金属阳离子促进络合作用, 另一方面改变络合物的总电荷和亲水性以修改药物动力学和血液清除率。

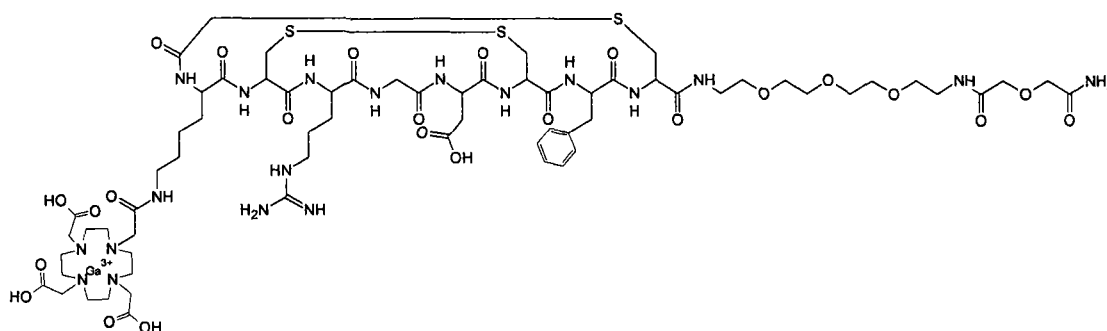
配位体种类	结构	定义
Cylam 型配体		Y1-5 可为 H、烷基、芳香基或其组合， 其中 Y1-5 基团含有一种或多种官能部分致使螯合物可与载体缀合-例如优选烷基胺、烷基硫、烷氧基、羧酸烷基酯、芳胺、芳基硫或 α-卤代乙酰基。
二胺二苯酚		Y1, Y2 - H、烷基、芳基 其中 Y1 或 Y2 基团含有官能部分致使螯合物可以与载体缀合-例如优选烷基胺、烷基硫、烷氧基、羧酸烷基酯、芳胺、芳基硫或 α-卤代乙酰基。 W= C, N $m'=n' = 1$ 或 2

配位体种类	结构	定义
HYNIC		V=到载体的接头或载体本身。
酰胺硫醇 (amide thiol)		P = 保护基(优选苯甲酰基、乙酰基、EOE); Y 1-5 = H、烷基、芳基; 或者 Y3 为 L 或 D 氨基酸侧链或甘氨酸。而羧基(carboxylate)可用于通过酰胺键与载体缀合。可供选择地, R₁₋₅ 基团可含有附加的官能性致使螯合物可与载体缀合-例如烷基胺、烷基硫、烷氧基、羧酸烷基酯、芳胺、芳基硫或 α-卤代乙酰基。

本文中所描述的缀合物的肽组分优选不具有游离氨基或羧基末端。这致使这些化合物对酶降解的抗性显著增加, 结果与许多已知游离肽相比其体内稳定性增加。

本文所用术语“氨基酸”以其最广泛的含义指构成蛋白质的(proteogenic) L-氨基酸、D-氨基酸、化学修饰的氨基酸、N-甲基、Cα-甲基和氨基酸侧链模拟物以及非天然氨基酸例如萘丙氨酸。优选任何天然存在的氨基酸及这种天然存在氨基酸的模拟物。

通过下面化合物 I 阐明式 I 化合物的一些优选实施方案：

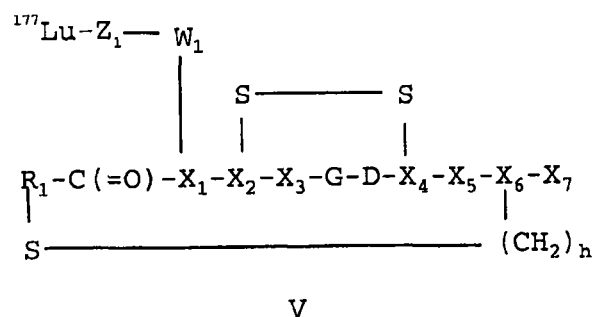
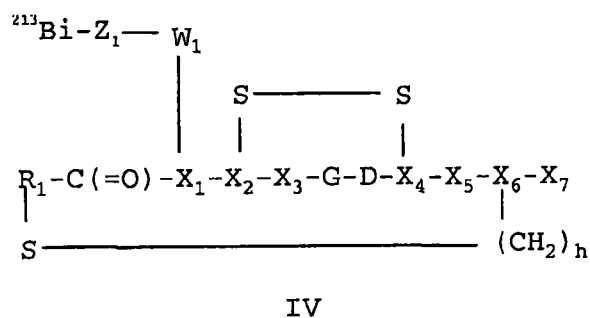
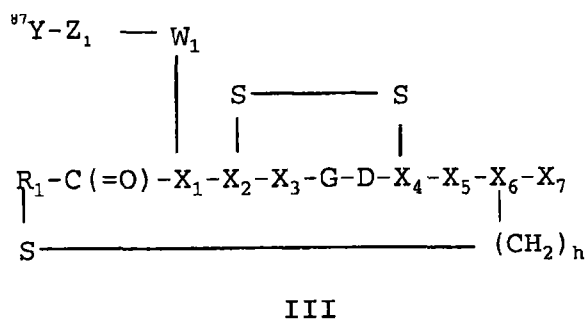


在大多数情况下，优选肽中氨基酸皆为 L-构型。然而，本发明的一些实施方案中，肽中的一个、两个、三个或更多个氨基酸优选为 D-构型。包含这种 D-构型氨基酸可以对该化合物的血清稳定性具有显著效果。根据本发明，如式 I 所定义的任何氨基酸残基可优选代表天然存在的氨基酸并独立地为 D 或 L 构象的任何一种。

本发明中的一些化合物为高亲和力的基于 RGD 的载体。本文所用术语“高亲和力的基于 RGD 的载体”指在对 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的竞争性结合测定中具有 $K_i < 10 \text{ nM}$ 并优选 $< 5 \text{ nM}$ 的化合物，其中所述 K_i 值通过与已知高亲和力配体锯鳞血抑肽竞争来测定。进行这种竞争性测定的方法为本领域公知。

本发明还提供了药物组合物，其包含有效诊断成像量(例如在体内成像中有效提高影像对比度的剂量)的通式 I 化合物或其盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂。

本发明进一步提供了用于疾病治疗的药物组合物，其包含有效量的通式 III、IV 和 V 化合物，或其酸加成盐，以及一种或多种药学上可接受的辅药、赋形剂或稀释剂。



其他代表性的间隔物(W₁)元件包括：结构型多糖、贮存型多糖、聚氨基酸及其甲酯和乙酯、以及多肽、寡糖和寡核苷酸，其可含或不含酶切位点。

本发明显像剂中的螯合剂(Z_1)可为能与 ^{68}Ga 和/或治疗性放射性核素 $^{87}\text{Y}_{39}$ 、 $^{213}\text{Bi}_{83}$ 、 $^{177}\text{Lu}_{71}$ 形成稳定络合物的任何螯合剂。

本发明金属离子可容易地络合到螯合剂，例如通过仅使含螯合剂

部分的水溶液与优选 pH 值范围为约 4-约 11 的金属盐水溶液接触或混合来进行络合。该盐可为任何盐，但优选该盐为金属的水溶性盐例如卤盐，更优选这些盐经过选择以使其不干扰金属离子与螯合剂的结合。含螯合剂部分优选在 pH 值介于约 5-约 9 之间、更优选介于约 6-约 8 之间的水溶液中。含螯合剂部分可与缓冲盐例如 HEPES、柠檬酸盐、碳酸盐、醋酸盐、磷酸盐和硼酸盐混合以产生最佳 pH 值。优选所述缓冲盐经过选择以使其不干扰随后的金属离子与螯合剂结合。

优选放射性核素易于从发生器系统中获得。例如， ^{68}Ga 易于从 $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ 发生器中获得。优选进行放射标记的过程是快速的，放射性掺入是定量进行的(95%)并且制备用缓冲液适于使用以便省略示踪物纯化步骤。如果在标记之前对发生器洗脱液进行预浓缩并且通过微波加热来加速络合作用，则可以满足所述要求。

预浓缩和纯化 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器洗脱液的方法已被开发出来(WO 2004/089517; Velikyan I, Beyer GJ, Langstrom B. 具有高比放射性的 ^{68}Ga -生物缀合物的微波支持性制备(Microwave-supported preparation of ^{68}Ga -bioconjugates with high specific radioactivity.) *Bioconjugate Chem.* 2004;15:554-60)。洗脱液体积减少，因而 ^{68}Ga 和待标记的大分子的浓度增加。此外，所述洗脱液得以从在络合作用反应中可与 ^{68}Ga 竞争的金属阳离子纯化，也从寿期长的母体 ^{68}Ge 中纯化。该方法基于阴离子交换层析。在 HCl 溶液中镓与 Cl^- 形成强阳离子络合物。从 HCl 浓度 $> 3 \text{ M}$ 时相应的 $[\text{GaCl}_6]^{3-}$ 和 $[\text{GaCl}_4]^-$ 络合物被强烈吸附在阴离子交换树脂上，接着用小体积的水洗脱 ^{68}Ga 。

备选的加热技术，微波加热被应用于标记过程以缩短反应时间并增加标记效率(WO 2004/089425; Velikyan I, Beyer GJ, Langstrom B. 具有高比放射性的 ^{68}Ga -生物缀合物的微波支持性制备(Microwave-supported preparation of ^{68}Ga -bioconjugates with high specific radioactivity.) *Bioconjugate Chem.* 2004;15:554-60); Velikyan I, Lendvai G, Valila M, 等. 微波加速的寡核苷酸的 ^{68}Ga 标记(Microwave accelerated ^{68}Ga -labelling of oligonucleotides.) *J Labelled Compd Rad.*

2004;47:79-89)。

用于以高比放射性对大分子进行 ^{68}Ga 标记的快速方法被开发出来。该方法允许定量掺入 ^{68}Ga ，省略了示踪物纯化步骤和适用于人使用的制剂。该方法采用了预浓缩和纯化的 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器洗脱液、微波加热和适用于人体使用的缓冲液。

以下同位素和同位素对(isotope pair)可用于成像和治疗而无需变换放射标记方法和螯合剂： ^{68}Ga 和 $^{87}\text{Y}_{39}$ ； ^{68}Ga 和 $^{177}\text{Lu}_{71}$ ； ^{68}Ga 和 $^{213}\text{Bi}_{83}$ 。

基于 ^{68}Ga 的肽示踪物可用于肿瘤成像/诊断、化学和放射治疗计划和监测、以及放射治疗的治疗前剂量测定。此外，在诊断和剂量测定之后可在相同载体中将 ^{68}Ga 替换成用于随后的放射性治疗的治疗性放射性核素($^{87}\text{Y}_{39}$, $^{213}\text{Bi}_{83}$, $^{177}\text{Lu}_{71}$)。使用产生 ^{68}Ga 的发生器利用放射性金属化反应直接制备示踪物可产生试剂盒类型的 PET 放射性药物，并且使在缺乏加速器的中心进行 PET 检查成为可能。治疗前剂量测定可能需要准确的定量，对于一些应用而言所述定量取决于示踪物的比放射性(SRA)。这对于表征高亲和力结合位点例如许多肽受体而言特别重要。另一个需要高 SRA 的因素是标记可以诱导副作用的高效受体激动剂。因此开发出用于以高 SRA 对各种大分子进行 ^{68}Ga 标记的快速可靠方法是必要的。

优选放射性核素易于从发生器体统中获得。例如， ^{68}Ga 易于从 $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ 发生器中获得。优选放射标记过程是快速的，放射性掺入是定量进行的(95%)并且制备用缓冲液适于人使用以便省略示踪物纯化步骤。如果在标记之前对发生器洗脱液进行预浓缩并且通过微波加热加速络合作用，则可以满足所述要求。

提供反应加速的微波加热是用于寿期短放射性核素的放射性标记化学的受关注的工具。此外，在使用油浴或烘箱的传统加热过程中，容器壁首先变热，在溶液中引起温度梯度。在微波辐照下样品从内部更均匀地于每个点受热，致使加热十分迅速。微波加热特别适用于微量有机化学，例如其中样品大小可比得上微波场穿透深度的放射性标

记。

基于 DOTA 的双功能螯合剂的慢放射性标记动力学需要提高的温度和时间。广泛的传统加热是不合乎要求的，因为其对大分子的潜在破坏和 ^{68}Ga 的半衰期相对短。微波加热是可以提供加速进行标记的受关注的工具。

微波加热时适合使用的，并且没有观察到各自分子量至少高达 7.1 和 9.8kDa 的肽和寡核苷酸的降解。通过醋酸钠或 N-2-羧乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸缓冲液(HEPES)以及氢氧化钠调节反应介质的 PH 值。将大分子、其缀合物和含 $^{69,71}\text{Ga}$ 的对应物暴露于微波，接着通过放射-UV-HPLC 和/或 LC-ESI-MS 进行分析以确定其稳定性。与常规加热合成比较，微波加热的应用大大缩短了合成时间。应当提及的是，增加 10min 的加热则使包含 ^{68}Ga 放射金属的示踪物的放射化学产量由于 ^{68}Ga 的衰变而减少约 10%。

但是微波加热不仅仅减少化学反应时间，它还消除副作用，增加放射性掺入(RAI)，并提高重复性。用分子量在 1.4-3.3 kDa 之间变化的小肽以及分子量为 6.2 和 7.1 kDa 的较大的肽进行微波加热下的 ^{68}Ga 标记。经常进行细胞和冰冻切片受体结合测定，以估计示踪物受体结合能力的维持情况。

^{68}Ga 的理论 SRA 是 100 GBq/nmol。就发生器洗脱的 ^{68}Ga 放射性为 1.25 GBq 而言，已开发的标记技术允许高达 3.3 GBq/nmol 的高 SRA 值。这允许广泛范围的 SRA 值，并允许以下可能性：根据所需的质量迁移、受体饱和度和显像对比度使所应用的示踪物量最优化。

通过 ^{68}Ga -DOTATOC 对恒河猴大脑靶皮质(brain targeting cortex)的结合饱和度来研究示踪物 SRA 对受体结合特性研究的重要性。如果放射性的量保持恒定，那么与受体特异性结合的 ^{68}Ga -DOTATOC 和游离 ^{68}Ga -DOTATOC 的局部浓度的比率反映了关键取决于 SRA 的影像对比度。当 SRA 接近零时，结合到游离配体的比率接近零，因此导致了影像对比度降低。当 SRA 到无限大时，表达接近 $B_{\max}/K_D$ 。当 SRA

处于某个水平时, B/F 到达平稳状态且不随 SRA 升高而改变。信号本底比对 SRA 的依赖在拐点附近是临界的。SRA 值的稍微下降可对影像对比度造成相当大的破坏, 并因此引起不可重复的结果。当需要一定量的放射性以在体外获得足够信号时, 或当在体内放射性剂量是限制因素时, 会出现这种情况。在这种情况下 SRA 值应足够高从而使 B/F 处于平稳状态, 在该平稳状态下信号本底比变得依赖于 SRA 的变化。因为从一个实验到另一个实验的 SRA 变化不会影响定量, 所以这将为体内和体外研究提供高重复性和坚稳性。

因此, 业已表明足够高的 SRA 可对受体定量、评价和充足的影像对比度而言是必需的。此外, 通过 ^{68}Ga 的预浓缩/纯化和微波加热联合所实现的高 SRA, 使作为 SRA 函数的放射性吸收的研究能够用于优化。此外, 当计划化学疗法和放射疗法的剂量时, 可进行 SRA 最优化和结合位点定量用以患者研究。还可为测定体内肿瘤中可接受的 $B_{\max}$ 来对 SRA 作进一步改进。

在放射标记化合物进一步应用之前需要作化学鉴定和分析, 以确保其特性、纯度和数量。分析应在短时间内进行以使放射性的损失最小化。对大分子生物缀合物, 合适的鉴定方法通常包括 HPLC 和质谱法(MS)。最常用的方法是添加真实参照物到示踪物中并在与放射性和 UV 检测仪串联的 HPLC 柱上共洗脱。这种方法便捷并可易于为每一次合成进行。在本研究中开发的 HPLC 分析在 10min 中内完成, 允许在临床应用之前对基于肽的放射性药品进行快速质量控制(QC)。真实参考物(authentic reference substance)是在与其放射性对应物相同的条件下合成的, 但是使用的是 ^{68}Ga 和 $^{69,71}\text{Ga}$ 阳离子的混合物。使用具有放射性镓同位素和稳定的镓同位素混合物的目的有两方面: 1. 创造与标记过程相同的反应条件; 2. 使仿效(follow)所述反应成为可能。通过 LC-ESI-MS 确定化合物的特性。通过用缀合的大分子和未缀合的大分子进行标记反应估计 ^{68}Ga 标记的位置。

通常在 3-4 小时内通过放射-HPLC 并分析取自标记反应混合物的

等分部分，来监测在制备用缓冲液和施用缓冲液中放射性标记生物缀合物的稳定性，以控制可能出现的附加放射-HPLC 信号。通过 UV-HPLC 或 LC-ESI-MS 分析温育 12-24 小时的样品。在应用研究中所使用的 ^{68}Ga -生物缀合物对于至少四小时的放射化学纯度为 >95%。该时间与 3-4 个 ^{68}Ga 的物理半衰期相对应，为应用于实验所要求的时间。此外，通过 UV-HPLC 或 LC-ESI-MS 分析具有稳定镓同位素的大分子、生物缀合物和生物缀合络合物的稳定性。

为了估计所设计的 HPLC 体系的可靠性，通过用晶体闪烁计数器测量注入柱上的样品和收集自出口的流分的放射性，来确定保留在柱上的 ^{68}Ga -标记生物缀合物和放射杂质的量。然后估计体系上的总损失，该损失取决于分离方法为 10-15%。

在本研究中，因为开发方法用于定量 RAI，所以纯化步骤的省略是可能的。此外，标记产物是在 HEPES 缓冲液中获得，后者与生物系统相容并适宜人类使用。

用于本发明方法的优选螯合剂是那些以生理耐受形式呈递 ^{68}Ga 的螯合剂。进一步优选螯合剂是那些与 ^{68}Ga 形成络合物的螯合剂，在利用此放射标记络合物进行诊断研究所需的时间内所述络合物是稳定的。

合适的螯合剂是，例如，多氨基多酸(polyaminopolyacid)螯合剂如 DTPA、EDTA、DTPA-BMA、DOA3、DOTA、HP-DOA3、TMT 或 DPDP。那些螯合剂在放射性药物和放射诊断学方面为公知的。在例如 US-A-4647447、US-A-5362 475、US-A-5534241、US-A-5358704、US-A-5198208、US-A-4963344、EP-A-230893、EP-A-130934、EP-A-606683、EP-A-438206、EP-A-434345、WO-A- 97/00087、WO-A-96/40274、WO-A-96/30377、WO-A-96/28420、WO-A- 96/16678、WO-A-96/11023、WO-A-95/32741、WO-A-95/27705、WO-A-95/26754、WO-A-95/28967、WO-A-95/28392、WO-A-95/24225、WO-A-95/17920、WO-A-95/15319、WO-A-95/09848、WO-A-94/27644、WO-A-94/22368、

WO-A-94/08624、WO-A-93/16375、WO-A-93/06868、WO-A-92/11232、WO-A-92/09884、WO-A-92/08707、WO-A-91/15467、WO-A-91/10669、WO-A-91/10645、WO-A-91/07191、WO-A-91/05762、WO-A-90/12050、WO-A-90/03804、WO-A-89/00052、WO-A-89/00557、WO-A-88/01178、WO-A-86/02841 和 WO-A-86/02005 中描述了它们的应用和合成。

合适的螯合剂包括大环螯合剂(例如如 Zhang 等, Inorg. Chem. 37(5), 1998, 956-963 所描述的类卟啉分子和五氮杂-大环(pentaaza-macrocycle))、酞菁素、冠醚(例如氮冠醚如 sepulchrate、穴醚等)、氯高铁血红素(氯高铁原卟啉 IX)、血红素和具有正方平面对称性的螯合剂。

在本发明的方法中优选使用大环螯合剂。在优选实施方案中, 这些大环螯合剂包含至少一个硬配位原子, 例如如在多氮杂大环和多氧杂大环中的氧和/或氮。多氮杂大环螯合剂的优选实例包括 NOTA、DOTA、TRITA、TETA 和 HETA, 而特别优选 DOTA。

特别优选大环螯合剂包含官能团例如羧基或胺基, 这些官能团对于与 Ga^{3+} 的配位是非必需的, 因此可用于使其他分子例如靶载体与螯合剂偶联。这样的包含官能团的大环螯合剂的实例是 NOTA、DOTA、TRITA 或 HETA。

在进一步优选实施方案中, 双功能螯合剂被用于本发明的方法中。本发明上下文中的“双功能螯合剂”意指连接到包含 RGD 肽的靶载体的螯合剂。

靶载体可通过连接基团或者间隔分子(spacer molecule)连接到螯合剂。连接基团的实例是二硫基(disulfide)、酯或酰胺, 间隔分子的实例是链状分子, 例如溶素或己胺或基于短肽的间隔物。在一个优选实施方案中, 靶载体和放射标记镓络合物的螯合剂部分之间的连接是如此, 以致靶载体可以与其体内靶标相互反应而不会被存在的放射标记镓络合物封闭或阻碍。

本发明的一个优选方面是通过如下步骤产生 ^{68}Ga 放射性标记络

合物的方法:

a) 通过将得自 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器的洗脱液与包含 HCO_3^- 作为平衡离子的阴离子交换器接触, 并从所述阴离子交换器中洗脱 ^{68}Ga 来获得 ^{68}Ga , 和

b) 使 ^{68}Ga 与缀合到靶载体的螯合剂反应, 其中所述反应使用微波加热进行。

当本发明的方法中使用温度敏感螯合剂如例如双功能螯合剂与作为靶载体的肽或蛋白缀合时, 微波加热反应下进行温度控制是适当的。微波加热的持续时间应这样调节, 致使反应混合物的温度不引起螯合剂和/或靶载体的分解。如果本发明的方法中所使用的螯合剂包含肽或蛋白, 那么高温短时间施用通常更优于低温长时间施用。

在反应过程中微波加热可持续进行或进行几个微波加热循环。

本发明的诊断用药可以足够的量给予病人用以成像, 以通过特定的显影技术来获得所需结果。

因此, 以完全在现有技术之内的方法用生理上可接受的载体或赋形剂, 可配制本发明的化合物用以给药。例如, 所述化合物(任意地加入药学上可接受的赋形剂) 可经悬浮或溶解在水介质中, 然后将所得到的溶液或者混悬液灭菌。

因此, 式 I 化合物在制备治疗组合物(药物)中以及在人体或动物体的治疗性和预防性疗治(优选癌症治疗)的方法中的用途, 被考虑为代表本发明的进一步方面。

因此, 本发明涉及制备放射性标记金属络合物的方法。该络合物可以用作诊断用药和治疗剂, 例如用于正电子发射断层显像(PET)、单电子发射计算断层显像(SPECT)、治疗前剂量测定、治疗计划、治疗监控和放射疗法。

从一方面看本发明提供了产生人体或动物体的影像的方法, 其包括: 给予诊断显像剂到所述身体例如到血管系统; 并利用闪烁照相、PET 或者 SPECT 方式产生所述诊断显像剂所分布的至少部分所述身

体的影像，其中所述诊断显像剂是式 I 的药剂。

从另一方面来看本发明提供了监测用药物治疗(例如细胞毒素剂或放射治疗)人体或动物体以对抗与癌症相关病症(优选血管生成)的效果的方法，所述方法包括：给予所述身体式 I 的药剂；和通过细胞受体检测所述药剂的吸收情况，所述细胞受体优选是内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测任选但优选重复实施，例如在用所述药物治疗之前、治疗中和疗治后实施。

进一步地，本发明提供了治疗前剂量测定方法以测量被肿瘤和正常器官吸收的放射性量。这将会提供信息关于有多少有毒放射性到达肿瘤以及正常器官是否受影响。这是对到达肿瘤和正常组织剂量的简单快速的估测。所述方法包括：给予所述人体或动物体式 I 的药剂；和通过细胞受体检测所述药剂的吸收情况，所述细胞受体优选是内皮细胞受体特别是 $\alpha_v\beta_3$ 受体，所述给予和检测在治疗前进行以计划治疗。

更进一步地，本发明提供了治疗计划方法以确定合适的治疗类型。这将提供体内受体密度的信息。所述方法包括：给予所述身体式 I 的药剂；通过测定受体吸收过表达组织来定量体内受体密度并确定合适的治疗类型。

在本发明的又一个实施方案中，提供了式 III、IV 和 V 的化合物以及利用式 III、IV 和 V 的化合物用于放射性治疗的方法。本发明还提供了放射性治疗的方法，其包括给予人体或者动物体式 III、IV 或 V 化合物的药剂。

考虑到 ^{68}Ga 的半衰期相对短，需要用于合成 ^{68}Ga 标记络合物的快速方法，该化合物可作为示踪分子用于 PET 成像。

因此本发明提供了通过 Ga^{3+} 放射性同位素与螯合剂反应制备放射性标记络合物的方法，该方法的特征在于使用微波加热进行该反应。

因此，本发明方法的另一个优选实施方案是利用微波加热通过将 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 与螯合剂反应制备 ^{68}Ga 放射标记络合物的方法，其中通过使来

自 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器洗脱液与阴离子交换器、优选包含 HCO_3^- 作为平衡离子的阴离子交换器接触，并从所述阴离子交换器中洗脱 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 来获得 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 。

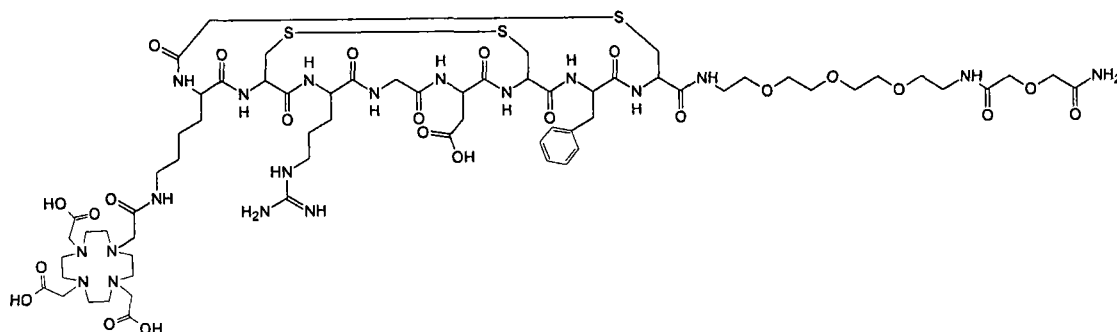
本发明化合物的肽部分可以利用所有已知的化学合成方法来合成，但是特别有用的是用自动肽合成器的 Merrifield 固相方法(J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964))。在进行体外筛选测试之前，所述肽和肽螯合物可使用高效液相色谱(HPLC)来纯化并通过质谱法和分析型 HPLC 鉴定。

现通过下述非限制性的实施例将进一步例证本发明。

实施例

Cys2-6 的 Ga^{68} 标记;

$\text{c}[\text{CH}_2\text{CO-Lys(DOTA)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys}]-\text{CCX}_6-\text{NH}_2$
(DOTA-AH-110847-02)



材料

DOTA-AH-110847-02 ($\text{C}_{66}\text{H}_{105}\text{N}_{19}\text{O}_{24}\text{S}_3$, 分子量= 1644.88)接收自 Amersham Health (Dept. of Synthetic Chemistry, Amersham Health, Olso, Norway)。HEPES(4-(2 羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸)和双蒸盐酸(Riedel de Haën)获自 Sigma-Aldrich Sweden (Stockholm, Sweden)。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和三氟乙酸(TFA)获自 Merck (Darmstadt, Germany)。使用购买的化学药品无需进一步纯化。用 Purelab Maxima Elga 系统(Bucks, UK)制备的去离子水(18.2 MΩ)用于所有反应中。

^{68}Ga 的制备

^{68}Ga ($T_{1/2} = 68 \text{ min}$, $\beta^+ = 89\%$ 且 $\text{EC} = 11\%$)可得自 $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ 发生器系统(Cyclotron Co., Ltd, Obninsk, Russia), 其中 ^{68}Ge ($T_{1/2} = 270.8 \text{ d}$)附着于基于二氧化钛的无机基质柱上。负载在发生器柱上的标称 ^{68}Ge 活性是 1850 MBq (50 mCi)。发生器的特定使用期限(shelf life)是 2-3 年。用 6 mL 的 0.1 M 盐酸洗脱 ^{68}Ga 。

^{68}Ga 洗脱液的阴离子交换柱体纯化和预浓缩

根据制造厂家方案用 6 mL 0.1 M 的溶液洗脱 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器。将 5 mL 30% HCl 加入到 6 mL 发生器的洗脱液中最终得到 4.0 M 的 HCl 浓度。室温下将获得的总共 11 mL 溶液以 4 mL/min 的流速(线流速为 25 cm/min)通过阴离子交换柱。然后用少量去离子水(50-200 μL)以 0.5 mL/min 的流速洗脱 ^{68}Ga 。

成功进行了两个发生器洗脱液(12 mL)的预浓缩。这意味着发生器的有效使用期限甚至可以更长。

DOTA-AH-110847-02 的 ^{68}Ga 标记

通过加入氢氧化钠和 HEPES (4-(2 羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸, Sigma)将预浓缩/纯化的 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器洗脱液的 pH 值调节到 pH 4.6-4.8, 以最终得到关于 HEPES 的 1.5 M 溶液。接着加入 3-8 纳摩尔的肽缀合物。将反应混合物转移到 Pyrex 玻璃小瓶中用插入物调节小体积 ($200 \pm 20 \mu\text{L}$)用于微波加热。在微波炉中的加热时间是 $95 \pm 5^\circ\text{C}$ 1 min。利用反相分离机制通过 UV-放射-HPLC 分析获得的产物。

微波加热

在产生连续辐照的 SmithCreatorTM 单模微波腔(monomodal microwave cavity) (前 Personal Chemistry AB, 今 Biotage, Uppsala, Sweden)中以 2450 MHz 进行微波加热。在反应过程中监控温度、压力和辐照功率。辐照完成后用加压空气冷却反应小瓶。

HPLC 分析

用由 126 泵、166 UV 检测器和辐射探测器串联组成的 Beckman

(Fullerton, CA, USA) HPLC 系统进行液相色谱(LC)分析。用 Beckman System Gold Nouveau Chromatography Software Package 获得数据并进行处理。所用的柱是规格为 150 mm × 4.6 mm、5 μm 粒度的 Vydac RP 300 Å HPLC 柱 (Vydac, USA)。使用下述参数进行梯度洗脱: A = 10 mM TFA; B = 70% 乙腈(MeCN), 30% H₂O, 10mM TFA 于 220 nm UV 检测; 流速为 1.2 mL/min; 20% B 等度洗脱 0-2 min, 20-90% B 线性梯度洗脱 8 min, 90-20% B 线性梯度洗脱 2 min。

LC-ESI-MS 分析

用 Fisons Platform (Micromass, Manchester, UK)以正离子模式扫描和检测[M+2H]²⁺和[M+3H]³⁺种类来进行液相色谱电喷雾电离质谱分析(LC-ESI-MS)。DOTA-AH-110847-02 对于[M+2H]²⁺ m/z = 549.1 和对于[M+3H]³⁺为 823.44, 而 ^{69,71}Ga-DOTA-AH-110847-02 对于[M+2H]²⁺ m/z = 857 和对于[M+3H]³⁺为 571。在与进行标记相同的条件下所合成的 ^{69,71}Ga-缀合物用以鉴定放射-HPLC 色谱图信号。.

放射化学

已用正电子发射放射性核素 ⁶⁸Ga 标记二环辛肽 (DOTA-AH-110847-02), 后者在赖氨酸残基处与大环双功能螯合剂 (DOTA)缀合。洗脱至两个发生器的全部 ⁶⁸Ga 放射性被定量(>95 %)掺入到 3-8 纳摩尔的肽缀合物中。因为核素掺入是定量的并且缓冲液与生物体系是相容的, 所以不需要对 ⁶⁸Ga 标记的肽缀合物作进一步纯化。整个 ⁶⁸Ga 标记过程自最初的发生器洗脱结束开始在 15-20 min 内完成。在应用前进行 HPLC 质量控制(另外 10 分钟)。用 UV-RP-HPLC (t_R = 6.19±0.03)分析原始的 DOTA-AH-110847-02 肽缀合物。

用 ⁶⁸Ga 对 DOTA-AH-110847-02 的标记(示意图 1)在微波炉里进行。

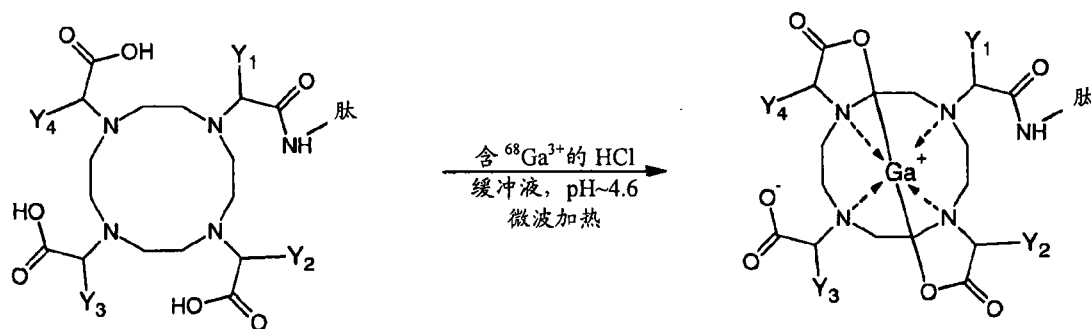


示意图 1 微波激活的 Ga^{3+} 与 DOTA-AH-110847-02 络合反应示意图

放射活性的掺入为>95%。为了本研究开发的 UV-放射-HPLC 分析法在 10min 中内完成,允许放射性药品施用前的快速质量控制(QC)。真实参考物是在与其放射性对应物相同的条件下合成的,但是使用的是稳定的 $^{69,71}\text{Ga}$ 同位素。对于真实 DOTA-AH-110847-02 和 $^{69,71}\text{Ga}$ -DOTA-AH-110847-02 的保留时间(UV-HPLC)分别为 6.19 和 6.35。放射信号具有 $t_{\text{R}} = 6.45$ 。为了确定 HPLC UV-色谱图信号,进行了 DOTA-AH-110847-02 和 $^{69,71}\text{Ga}$ -DOTA-AH-110847-02 浓度依赖性研究。相应信号的面积随着分析物浓度增加而增加。这些化合物的特性通过 LC-ESI-MS 进一步确定。对于 $^{69,71}\text{Ga}$ -AH-110847-02 检测到二价和三价离子的 m/z 为: 857 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 和 571 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 。在镓的稳定同位素络合的情况下,产物由纯 $^{69,71}\text{Ga}$ -DOTA-AH-110847-02 组成。在 ^{68}Ga 络合的情况下,产物由 ^{68}Ga -DOTA-AH-110847-02 和 DOTA-AH-110847-02 组成。将 DOTA-AH-110847-02 掺入示踪物制剂的 HPLC 样品中以避免 t_{R} 偏差。

为了检验微波加热条件下 DOTA-RDG 的稳定性,进行空白试验并通过 UV-HPLC 和 LC-ESI-MS 监测肽缀合物的稳定性。在 MW 辐照下 DOTA-RDG 在水中和在反应溶液中都是稳定的。在稳定性研究中没有检测到另外的信号。

具体实施方案,参考文献引用

本发明不为本文描述的具体实施方案的范围所限制。实际上,根据上述说明和附图,除了本文中所描述的之外,还有本发明的各种修

改对本领域的技术人员将是显而易见的。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围中。

本文中引用了不同出版物和专利申请，其公开内容通过引用全文结合到本文中。