[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 49/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820681.9

[43] 公开日 2005 年 1 月 26 日

[11] 公开号 CN 1571680A

[22] 申请日 2002.10.21 [21] 申请号 02820681.9
[30] 优先权
[32] 2001.10.19 [33] US [31] 60/344,511
[86] 国际申请 PCT/US2002/033904 2002.10.21
[87] 国际公布 WO2003/033030 英 2003.4.24
[85] 进入国家阶段日期 2004.4.19
[71] 申请人 托马斯杰斐逊大学
地址 美国宾夕法尼亚州
[72] 发明人 马休卡·马休·L·塔可尔

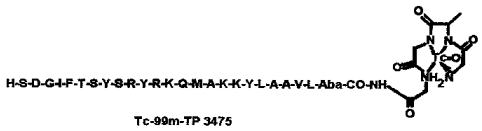
[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有限公司
代理人 南 霆

权利要求书 6 页 说明书 35 页 序列表 3 页
附图 5 页

[54] 发明名称 PACAP 组合物及用于肿瘤成像与治疗的方法

[57] 摘要

表达 VPAC 受体的肿瘤可以用含 PACAP 的化合物或生物活性的 PACAP 类似物片段进行造影或治疗。



ISSN1008-4274

1. 一种检测受试验者中能够表达 VPAC 受体的肿瘤的方法，该受试验者为这种肿瘤的患者或疑似患者，包括：

（1） 给受试验者使用有效量的具有分子式 A 或 B 的造影化合物；和

（2）在受试验者的至少一部分身体产生闪烁影像，

其中分子式 A 和 B 是：

(A) $M(I)-X_1-P-X_2$

(B) $X_1-P-X_2-M(I)$

对于分子式 A 和 B：

M 为螯合剂，在分子式 A 中，当 X_1 为 0 且 P 为 $PACAP_{27}$ (SEQ ID NO: 2)时，M 不是多氨基-多羧基酸类螯合剂；

(I)是联结于 M 的造影核素；

X_1 是从 0 到 20 的天然或合成的氨基酸；

P 是 PACAP，或具有 PACAP 生物活性的其类似物或片段；和

X_2 是从 0 到 20 的天然或合成的氨基酸。

2. 权利要求 1 的方法， 其中 M 含有一个 NxSy 螯合化合物。

3. 权利要求 2 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有一个 N2S2 或 N3S 核心。

4. 权利要求 2 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有一个 N4 核心。

5. 权利要求 2 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有 MAG3 或 Gly-(D) Ala-Gly-Gly。

6. 权利要求 1 的方法，其中分子式 B 的螯合剂 M 含有一个多氨基-多羧基酸。

7. 权利要求 1 的方法，其中 I 选自下列组：^{99m}Tc、^{87}Y、^{67}Ga、^{64}Cu 和 ^{111}In。

8. 权利要求 7 的方法，其中 I 为 ^{99m}Tc。

9. 权利要求 1 的方法，其中分子式 A 的造影化合物还含有一个空间臂 Z_1 连接 X_1 和 M，分子式 B 的造影化合物还含有一个空间臂 Z_2 连接 X_2 和 M。

10. 权利要求 9 的方法，其中空间臂 Z_1 和空间臂 Z_2 分别含 4-氨基丁酸。

11. 权利要求 1 的方法，其中 P 含有 SEQ ID NO: 2。

12. 权利要求 1 的方法，其中造影化合物为 ^{99m}Tc- TP 3475。

13. 权利要求 1 的方法，其中能够表达 VPAC 的肿瘤选自下列组：肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、脑瘤、前列腺癌、甲状腺癌；鳞状细胞癌；腺癌；小细胞癌；黑色素瘤、神经胶质瘤和神经母细胞瘤。

14. 权利要求 1 的方法，其中受试验者为非人哺乳动物。

15. 权利要求 1 的方法，其中受试验者使用的造影剂有效量从每 70 kg 体重约 0.01 mCi 至约 100 mCi。

16. 权利要求 1 的方法，其中受试验者使用的造影剂有效量从每 70 kg 体重约 0.1 mCi 至约 50 mCi。

17. 权利要求 1 的方法，进一步包括了使用赖氨酸的步骤，先于或与造影剂同时使用以减少肾脏对造影剂的摄取。

18. 一种抑制或逆转患有肿瘤的受试验者内表达 VPAC 受体的肿瘤生长的方法，包括对受试验者使用有效量的分子式为 C 或 D 的组合物，分子式 C 和 D 为：

(C) $M(T)-X_1-P-X_2$

(D) $X_1-P-X_2-M(T)$

其中：

M 为螯合剂；

（T）是联结于 M 的治疗核素；

X_1 是从 0 到 20 的天然或合成氨基酸；

P 是 PACAP，或具有 PACAP 生物活性的其类似物或片段；和

X_2 是从 0 到 20 的天然或合成氨基酸。

19. 权利要求 18 的方法，其中 M 含有一个 NxSy 螯合化合物。

20. 权利要求 19 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有一个 N2S2 或 N3S 核心。

21. 权利要求 19 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有一个 N4 核心。

22. 权利要求 21 的方法，其中的 NxSy 螯合化合物含有一个 MAG3 或 Gly-(D)Ala-Gly-Gly。

23. 权利要求 18 的方法，其中 T 选自下列组：^{47}Sc、^{64}Cu、^{67}Cu、^{67}Ga、^{212}Pb、^{68}Ga、^{90}Y、^{111}In、^{153}Sm、^{212}Bi、^{210}At、^{211}At、^{177}Lu、^{186}Re 和 ^{188}Re。

24. 权利要求 23 的方法，其中 T 选自下列组：^{90}Y、^{186}Re 或 ^{188}Re。

25. 权利要求 18 的方法，其中分子式 C 的治疗化合物还含有一个空间臂 Z_1 连接 X_1 和 M，分子式 D 的治疗化合物还含有一个空间臂 Z_2 连接 X_2 和 M。

26. 权利要求 25 的方法，其中空间臂 Z_1 和空间臂 Z_2 分别含 4-氨基丁酸。

27. 权利要求 18 的方法，其中 P 含有 SEQ ID NO: 2。

28. 权利要求 18 的方法，其中表达 VPAC 的肿瘤选自下列组：肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、脑瘤、前列腺癌、甲状腺癌；鳞状细胞癌；腺癌；小细胞癌；黑色素瘤、神经胶质瘤和神经母细胞瘤。

29. 权利要求 18 的方法，其中受试验者为非人哺乳动物。

30. 权利要求 18 的方法，其中受试验者使用的造影化合物有效量从每 70 kg 体重约 1mCi 至约 1000 mCi。

31. 权利要求 18 的方法，其中受试验者使用的造影化合物的有效量从每 70 kg 体重约 10m Ci 至约 500 mCi。

32. 权利要求 18 的方法，其中受试验者使用的造影化合物的有效量从每 70 kg 体重约 20m Ci 至约 100 mCi。

33. 权利要求 18 的方法，进一步包括了使用赖氨酸的步骤，先于或与治疗化合物同时使用，以减少肾脏对治疗化合物的摄取。

PACAP 组合物及用于肿瘤成像与治疗的方法

与相关申请的相互关系

本申请要求 2001 年 10 月 19 日提交的美国临时专利申请第 60/344,511 号之权益，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

发明领域

本发明总体上涉及核医学及分子肿瘤造影剂或治疗剂，更具体地说，涉及表达 VPAC 受体的肿瘤的成像或治疗用的放射标记组合物。

发明背景

癌症是一种严重的细胞增殖性疾病，每年都在夺去无数的生命。仅乳腺癌一项，美国每年都有 5 万多妇女罹患。传统的检查乳腺肿瘤的方法是超声、MRI 或乳房造影术加组织学方法，至于治疗，则是外科手术切除后进行化疗和/或放疗。乳腺（以及其他）癌症的死亡率可以通过肿瘤的早期诊断和治疗而降低（Kelsey JL, Epidemiol. Rev. 1:74-109, 1989）。肿瘤早期检测的一个有效方法是用肿瘤特异性的放射性造影剂进行闪烁造影。

已经有很多种放射性肿瘤造影剂用于乳腺癌的检测，取得了不同程度的成功。例如，受体特异性的生物分子，如神经肽在纳摩尔浓度

水平与受体结合，在治疗及诊断领域都引起了极大的关注和兴趣（Fischman AJ et al.,J Nucl. Med. 34: 2253-2263,1993; Hokfelt T Neuron 7: 867-879,1991)。

然而，唯一的商业化了的神经肽造影剂 ^{111}In-[DTPA-D-Phe^{1}]奥曲肽(Octreotide)在检测乳腺肿瘤方面并不是非常成功(van Eijck CHJ et al. Lancet 343: 640-643,1994; McCready VR et al. Lancet 343: 617,1994)。上述 van Eijck 等人 1994 的文献报道 52 例原发性乳腺癌中，用此造影剂仅有 75%得到了阳性闪烁造影结果。进而，van Eijck 等人报道，在 13 例组织学上已确定的转移病例中，用 ^{111}In-[DTPA-D-Phe^{1}] 奥曲肽进行腋窝造影只在 4 例中检测到了不可触知的含癌淋巴结。[DTPA-D-Phe^{1}] 奥曲肽用于乳腺肿瘤造影的低效能归因于乳腺肿瘤细胞表达的造影剂靶向的癌基因受体密度过低。因而 ^{111}In- [DTPA-D-Phe^{1}] 奥曲肽在乳腺肿瘤造影中的应用大大受限。

^{123}I-Tyr3-奥曲肽也用于放射诊断造影，但没有此剂在乳腺肿瘤造影中的评价（Krenning EP et al., Eur.J Nucl. Med. 20: 716-731,1993)。然而，基于 ^{111}In-[DTPA-D-Phe^{1}] 奥曲肽对乳腺肿瘤的较差能力，预计 ^{123}I-Tyr3-奥曲肽也不会是一种有用的乳腺肿瘤造影剂。

总的来说，任何情况下放射性碘组合物都不适合用作造影或治疗剂，因为已批准的放射性碘标记的放射性药物通常不能在临床条件下制备。放射性碘标记的造影剂还有一些特别的局限，例如，^{125}I 标记的组合物通常不用于造影，因其半衰期过长（约 59 天）且核素的发

射能量过低。^{123}I 标记的组合物也不是首选，因为 ^{123}I 是回旋加速器里产生的核素，制造成本高且核素的半衰期（13.3 小时）太短，无商业用途。^{123}I 标记剂的发射能量也过高，不适于产生高质量的造影图。

锝-99（^{99m}Tc）是一种广泛使用的诊断用造影剂，因为它发出能量为 140 KeV 的γ 辐射，物理半衰期为 6 小时，易于用钼-99/ ^{99m}Tc 发生器现场制造。^{99m}Tc 的短半衰期减少了对正常器官的辐射剂量，而其发射能量足以被γ 照相机有效探测到。 因而在 90%的临床核医学应用中 ^{99m}Tc 都是首选。

造影剂一般是通过一个金属螯合部分标记上 ^{99m}Tc 的。螯合 ^{99m}Tc 的金属螯合部分通常也能络合 ^{186}Re 和 ^{188}Re 等治疗用核素。因此，一个含金属螯合剂的试剂可以根据使用核素的不同而作诊断或治疗用。

M. Thakur 的 U. S. 6,395, 255 披露了一个方法，用 ^{99m}Tc 螯合剂标记基于血管活性肠肽（VIP）的试剂。U. S. 6,395, 255 中揭示的螯合剂和标记化学过程也适用于以 ^{99m}Tc 或放射性铼标记 VIP 试剂。然而，U. S. 6,395, 255 中揭示的 VIP 试剂只与表达 VIP 受体的肿瘤细胞结合。由于某些肿瘤高密度地表达其他类型的受体，能结合这些肿瘤细胞中更宽范围受体的造影剂或治疗剂将有明显的优势。

垂体腺苷环化酶激活肽（PACAP）是一个 38 个氨基酸的肽，最初分离于牛下丘脑（Miyata A et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 164:567-574, 1989）。此肽刺激单层培养的大鼠垂体前叶细胞的细胞间和细胞内 cAMP 的积累(Gottschall PE et al., Endocrinology 127:

272-277, 1990)。前述之 Gottschall et al.,1990 从牛下丘脑中分离到了一个 27 个氨基酸的 PACAP (PACAP$_{27}$)，并得出结论 PACAP$_{38}$ 和 PACAP$_{27}$ 有同等效力，来自同一个 176 个氨基酸的前体。

PACAP$_{27}$ 比 28 个氨基酸的血管活性肠肽 VIP$_{28}$ 刺激垂体细胞腺苷酸环化酶的能力要强 10 倍（前述 Gottschall et al. , 1990)。^{125}I-PACAP$_{27}$ 也能够置换结合于正常肺膜上的 VIP$_{28}$。VIP$_{28}$ 的 IC$_{50}$ 值约为 15nM，而 PACAP$_{27}$的 IC$_{50}$值约为 1.5nM。

PACAP$_{27}$ 高亲和力地与 PACAP、VIP-R1 和 VIP-R2 的受体结合，而 VIP$_{28}$ 仅与 VIP-R1 和 VIP-R2 的受体高亲合力结合（Zia F et al., Cancer.Res. 55:4886-4891,1995)。PACAP、VIP-R1 和 VIP-R2 受体统称为 VPAC 受体（Reubi JC,J. Nucl. Med. 36: 1846-1853, 1995; Reubi JC et al., Cancer Res. 60: 1305-1312, 2000)，它们高水平地表达于乳腺肿瘤（Zia H et al., Cancer Res. 56:3486-3489, 1996)和其他肿瘤细胞中(Harmar T et al., TiPs15 : 97-98, 10 1994; Reubi JC et al., Eur. J. Nucl. Med. 24:1058, 1997; Le Meuth V et al., Amer. J. Physio. 260: G265-74,1991; Basille M et al. Brain Res. 82 : 1-2, 1994; Vertrongen P et al.,Neuropeptides 30:491-496,1996 ; Olianas MC et al., J Neurochem. 67: 1292-1300,1996 ; Lelievre V et al., Neuropeptides 30: 313-322,1996 和 Parkman HP et al., Regulatory Peptides 71: 185-190, 1998)。例如，表达 VPAC 受体的肿瘤（乳腺肿瘤以外）有：卵巢、子宫内膜、前列腺、膀胱、肺、食道、结肠、胰腺的肿瘤以及

神经内分泌系统和脑部肿瘤。

然而，用 PACAP 制造导向的放射药物却很不成功。参见，例如，Reubi JC et al., Eur. J Nucl. Med. 24:1058, 1997 显示以 N 端结合 DTPA 后 $PACAP_{27}$ 的生物活性由 100 下降到了<0.01。

因此，需要的是一种基于受体特异性生物分子如 PACAP 的放射标记的肿瘤造影剂或治疗剂，其能高亲合力地结合于特定肿瘤细胞上的一类或几类受体。该造影剂或治疗剂理想是通过金属螯合剂标记上诊断或治疗用的核素。

发明概述

本发明的目的是放射标记的 PACAP 及生物活性 PACAP 片段与类似物在乳腺及其它表达 PACAP、VIP-R1 和 VIP-R2 受体的肿瘤的成像和治疗中的应用。PACAP、VIP-R1 和 VIP-R2 的受体此后被总称为“VPAC 受体”。

这样，本发明提供了一种检测能表达 VPAC 受体的肿瘤的方法，包括向患有或怀疑患有这类肿瘤的受试验者使用有效量的具有分子式 A 或 B 的造影化合物。使用造影化合物后，对受试验者的至少部分身体做闪烁造影。

分子式 A 和 B 为：

(A) M (I)-X_1-P-X_2

(B) X_1-P-X_2-M (I)

分子式 A 和 B 中：

M 是螯合剂

(I) 是一个联结于 M 的造影核素；

X_1 是 0 到 20 个天然或合成的氨基酸；

P 为 PACAP，或其类似物或片断；和

X_2 是 0 到 20 个天然或合成的氨基酸。

对患有能够表达 VPAC 受体的肿瘤的患者，本发明同时还提供了一种方法抑制或逆转肿瘤的生长。包括向患有或怀疑患有这类肿瘤的受试验者使用有效量的具有分子式 C 或 D 的治疗化合物。分子式 C 和 D 为：

(C) M (T)-X_1-P-X_2

(D) X_1-P-X_2-M(T)

分子式 C 和 D 中：

M 是螯合剂

(T) 是一个联结于 M 的治疗核素；

X_1 是 0 到 20 个天然或合成的氨基酸；

P 为 PACAP，或其类似物或片断；和

X_2 是 0 到 20 个天然或合成的氨基酸。

附图简述

图 1A 和 1B 分别是 MAG3 和 Gly-(D) Ala-Gly-Gly 的结构示意。在 MAG3 中，R1 =R2 = R3 =R4 = H。在四肽中，R1 = R2 = R4 = H；

R3 = CH3。

图 2 是本发明所述之造影剂 ^{99m}Tc-TP 3475 的制备与标记过程的示意图。

图 3 是 ^{99m}Tc-TP 3475 的 HPLC 洗脱图谱。100%的放射活性以单峰形式洗脱，保留时间（Rt）为 12.5 min。TP 3475 的 Rt（U.V.）也是 12.5 min。在此层析图谱中，U.V.峰不能测到，因为上样的 TP 3475< 0.01μg。游离的 ^{99m}Tc 在 Rt 3.2 min 时洗脱。X 轴为洗脱时间，单位为分钟。斜线代表梯度构成。

图 4 是 ^{99m}Tc-TP 3475 的示意图。

图 5 显示增加 $PACAP_{27}$ 和 PACAP 类似物 TP 3475 浓度对负鼠肛门内括约肌(IAS) 平滑肌张力的影响。数据显示 10^{-5}M 浓度下，$PACAP_{27}$ 和 TP 3475 引起的 IAS 张力下降的百分数是相等的。

缩略语

Aba：4-氨基丁酸

ADP：腺苷酸-5'-二磷酸

cAMP：环腺苷酸单磷酸

CPTA：[4-(1,4,8,11-tetraazacyclotetradec-1-yl)甲基]苯甲酸

HT-29：一个人结肠直肠肿瘤细胞株

IC_{50}：50%抑制浓度

%ID/g：每克组织百分注射剂量

Kd：解离常数

LS174T：一个人结肠直肠肿瘤细胞株

mCi：毫居里

MAG3：巯乙酰基三甘氨酸（[N- [N [N-(benzylthio)acetyl] glycyl] glycyl] glycine）

MD MB 231：一株不依赖雌激素的人乳腺肿瘤细胞株

PACAP：垂体腺苷环化酶激活肽

RIA：放射免疫分析

Rt：保留时间

T47D：一株雌激素依赖的人乳腺肿瘤细胞株

TFA：三氟乙酸

VIP：血管活性肠肽

氨基酸简称

用于描述本发明中肽化合物的命名法遵循传统：每个氨基酸残基都是氨基在左、羧基在右。除特别说明外，在分子式中表示本发明的特别实施方案时，氨基端与羧基端的基团尽管没有特别显示，也将被当作其在正常生理 pH 值下的形式。在氨基酸结构式中，每个残基通常用相应氨基酸的单字母或三字母缩写来代表，详列如下：

A 丙氨酸 Ala

C 半胱氨酸 Cys

D 天冬氨酸 Asp

E 谷氨酸 Glu

F 苯丙氨酸 Phe

G 甘氨酸 Gly

H 组氨酸 His

I 异亮氨酸 Ile

K 赖氨酸 Lys

L 亮氨酸 Leu

M 蛋氨酸 Met

N 天冬酰胺 Asn

P 脯氨酸 Pro

Q 谷氨酰胺 Gln

R 精氨酸 Arg

S 丝氨酸 Ser

T 苏氨酸 Thr

V 缬氨酸 Val

W 色氨酸 Trp

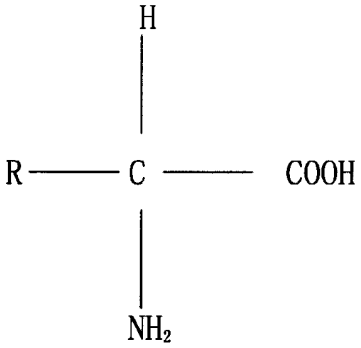
Y 酪氨酸 Tyr

定义

此处所述“**氨基酸**”一词意义包括了天然与合成的氨基酸，D 型和 L 型均包括。“**标准氨基酸**”指自然产生的肽中通常见到的 20 种 L 型氨基酸中的任何一种。“**非标准氨基酸**”指标准氨基酸以外的氨基酸，不论是合成的还是自然来源的。此处“合成氨基酸”一词也包

括了经化学修饰过的氨基酸，包括但不限于：盐、氨基酸衍生物（如酰氨）和取代产物。本发明的肽中所含的氨基酸，特别是氨基端和羧基端的，可以用甲基化、酰胺化、乙酰化或用其他化学基团取代进行修饰，其可以在不影响生物活性的前提下改变肽的循环半衰期。另外，本发明的肽中的一个二硫键联接可有可无。

氨基酸的一般结构如下：



根据侧链 R 的不同，氨基酸被分为 7 类：（1）脂肪族侧链，（2）含羟基（OH）侧链，（3）含硫原子的侧链，（4）含有一个酸性或氨基基团的侧链，（5）含碱性基团的侧链，（6）含芳香环的侧链，（7）脯氨酸，一种亚氨酸，其中侧链与氨基融合。

“有 PACAP 生物活性”的化合物：指在与 VIP_{28} 对不依赖雌激素的人乳腺癌细胞株（MDA MB 231）或雌激素依赖的人乳腺癌细胞株（T47D）作用的相当剂量下，至少能刺激腺苷酸环化酶活性提高十倍或提高核癌基因表达至少十倍的化合物，测定方法见下面的例 3 所述。

“分离的”指通过人的行为从自然状态改变的或移除的。例如，一个活动物中自然存在的一个核酸序列或肽不是“分离的”，但同一

个核酸或肽一旦部分地或完全地与自然共存的其他物质分开来，就成了“分离的”。一个分离的核酸序列或蛋白质可以实质上纯的形式存在，也可以存在于一个非自然的环境中，例如一个宿主细胞中。

此处所述关于肽的末端氨基的**“保护基团”**指肽合成中传统使用的各种氨基末端保护基团的任一种。这些保护基团包括，例如酰基保护基团如甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、琥珀酰基和甲氧琥珀酰基等；芳香氨脂基保护基团如苄氧羰基；以及脂肪族氨脂基保护基团例如叔丁氧羰基或金刚烷氧羰基。合适的保护基团参见 Gross and Mienhofer, eds., The Peptides, vol. 3, pp. 3-88 (Academic Press, New York, 1981)。

此处所述关于肽的末端羧基的**“保护基团”**指肽合成中传统使用的各种羧基末端保护基团的任一种。此类保护基团包括，例如叔丁基、苯甲基或其他可接受的通过酯键或醚键与末端羧基基团相连的基团。

“类似物”包括任何自然产生的或特意制造的 PACAP，其特征是有单个或多个氨基酸取代、缺失、增加或置换，但仍保留了 PACAP 的生物活性。此种类似物包括（a）PACAP 的一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸取代（b）增加了一个或多个氨基酸（c）一个或多个氨基酸含有不在通常的氨基酸中出现的取代基团（d）PACAP 或其一部分与另一个肽融合（e）一个或多个非标准氨基酸残基（即天然产生的蛋白质中出现的 20 种 L-氨基酸以外的氨基酸）引入或取代 PACAP 序列（f）一个或多个非氨基酸连接基团引入或置换 PACAP 的一部分。

“肽”和“蛋白质”可互换使用，指至少两个氨基酸由肽键或修饰的肽键（例如肽键的电子等排体）共价连接形成的化合物。对组成一个蛋白质或肽的氨基酸最大数目没有限定。此处及后附的权利要求中所指的构成肽或蛋白质的氨基酸既可是D型也可是L型，但优选是L型。此处所指的构成肽或蛋白质的氨基酸既可由天然过程如翻译后加工修饰，也可由现有技术公知的化学修饰技术进行修饰。可以理解，修饰可在肽的任何部位进行，包括肽骨架、氨基酸侧链以及氨基或羧基末端。在一个指定的肽中，同种类型的修饰可以在几处以相同或不同的程度出现。同样的，而一个肽中也可以有多种不同类型的修饰。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰氨化、黄素的共价结合、血红素部分的共价结合、核苷酸或核苷酸衍生物的共价结合、脂及脂衍生物的共价结合、磷脂酰肌醇的共价结合、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、γ-羧基化、糖基化、GPI锚定的形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酸化、氧化、蛋白水解过程、磷酸化、异戊二烯基化、外消旋、硒代、硫化、tRNA介导的蛋白质的氨基酸加成，如精氨酸化和泛素化。例如，参见PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed. , T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 和 Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et

al. ,"Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182: 626-646 和 Rattan et al. ,"Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

此处所述一个肽或其一部分与一个参照蛋白**"有基本相似的氨基酸序列"**意思是说，此肽或其部分的氨基酸序列与参考蛋白质序列的一致性或相似性超过 80%。优选的序列的一致性是超过 85%，更优选的是超过 90%，特别优选超过 95%，最优选的情况是超过 98%。此处与参考肽的**"序列一致性"**指 BLASTP 和 TBLASTN 程序用 BLAST(basic local alignment search tool) 2.0.14 算法得出的结果；计算中 BLASTP 和 TBLASTN 的设置见下面表 1。BLASTP 和 TBLASTN 程序中氨基酸序列一致性的报告在"Identities"下。计算氨基酸序列一致性的技术是本领域公知的，BLAST 算法的使用见述于 Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-10 和 Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。BLASTP 和 TBLASTN 程序使用 BLAST 2.0.14 算法。

表 1-BLASTP 和 TBLASTN 程序用 BLAST 2.0.14 算法计算氨基酸序列一致性时的设置

预期值	10

过滤	低复杂度过滤用 SEG 程序*
取代 Matrix	BLOSUM62
Gap existence cost	11
Per residue gap cost	1
Lambda ratio	0. 85
Word size	3

* SEG 程序的描述见 Wootton and Federhen, Comput. Chenu. 17: 149-163, 1993.

发明详述

含 PACAP 或其生物活性类似物或片段的肿瘤特异性诊断造影与治疗化合物应用于表达 VPAC 受体的肿瘤有明显优点。38 氨基酸和 27 氨基酸形式的 PACAP 都已分离到，分别称为 $PACAP_{38}$ 和 $PACAP_{27}$。SEQ ID NO: 1 给出了 $PACAP_{38}$ 的氨基酸一级序列；SEQ ID NO: 2 给出了 $PACAP_{27}$ 的氨基酸一级序列。$PACAP_{38}$ 和 $PACAP_{27}$ 来自同一个 176 氨基酸的 PACAP 前体蛋白，其序列由 SEQ ID NO: 3 给出。此处“PACAP”一词包括 $PACAP_{38}$ (SEQ ID NO: 1)、$PACAP_{27}$ (SEQ ID NO: 2) 以及 176 氨基酸的 PACAP 前体蛋白(SEQ ID NO: 3)。

PACAP 可以用已知技术从牛下丘脑中分离，例见 Miyata A et al, Biochena. Biophys. Res. Commun. 164: 567-574, 1989 和 Gottschall PE etal., Endocrinology 127: 272-277, 1990，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。PACAP 也可以通过已知方法合

成产生，包括用生物系统或化学方法合成。

肽的生物合成是现有技术公知的，包括一个自然发生的或合成的编码 PACAP 的核酸序列的转录和翻译。这些核酸序列可以亚克隆入合适的质粒表达载体以在适当的宿主细胞中增殖和表达。构建核酸序列与质粒表达载体、转染宿主细胞、表达感兴趣的核酸序列等技术都是现有技术广泛使用的，具有一般技术的专业人士均熟悉有关具体条件与操作步骤的标准资料来源。例如，重组分子克隆与表达的通用技术见于 Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982 及 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1987，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

适合直接合成 PACAP 的化学肽合成技术（包括人工和自动化技术）也是本领域技术人员所熟知的。例如，PACAP 可以用传统固相合成法从头合成。在此方法中，肽链由一系列偶联反应生成，取代氨基酸被按照需要的顺序依次加到生长的肽链上。下列也是一般专业人员所熟知的：各种不同的 N 保护基团的使用，如苄氧羰基或叔丁氧羰基；不同偶联剂的使用，如 dicyclohexylcarbodiimide（二环己基碳二亚胺(DCCI)）或 1.1-碳酰二咪唑；各种活性酯的使用，如 N-hydroxyphthalimide 或 N-羟基琥珀酰亚胺的酯；各种裂解剂的使用，如三氟乙酸(TFA)、盐酸加二氧杂环乙烷、boron tris-(trifluoracetate)和溴化氰；中间产物分离与纯化的液相反应也是专业人员熟知的。较好的肽化学合成方法按照专业人员熟知的传

统的 Merrifield 固相法进行。进一步的关于固相合成方法的资料可以参见 Steward and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman & Co. , San Francisco, 1969; Advances in Enzymology 32 :221-296, (Nold FF, ed.), Interscience Publishers, New York, 1969 中 Merrifield 的综述; 以及 Erickson and Merrifield (1990), The Proteins 2: 61-64, 其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

现有的造影剂和治疗剂也有含生物活性 PACAP 片段的。本发明所述之生物活性 PACAP 片段可由化学或酶学手段裂解大的天然的或合成的 PACAP 得到，也可由上述的生物或化学合成方法得到。

现有的造影剂和治疗剂也有含生物活性 PACAP 类似物的。获得这些类似物的技术也是一般专业人员所熟知的，例如标准的重组核酸技术、固相肽合成技术及上述的化学合成技术。还可以用连接基团将 PACAP 的部分与其他肽连接或置换。连接基团包括，例如能够连接 PACAP 氨基端部分与羧基端的成环化合物。制造类似物的技术也可见于 U. S. patent 6,030, 942, 其公开的全部内容在此作为参考文献引入（专利 6,030, 942 中将类似物称为“类肽”（peptoids））。

PACAP 类似物也包括一部分的氨基酸序列基本上类似 PACAP 的融合肽。这种融合肽的制造也可以用专业人员熟知的方法进行，例如将编码 PACAP 的核酸序列与一个异源肽的序列亚克隆进同一个表达载体，使 PACAP 与异源肽的序列表达在同一个蛋白质里。

本发明所述之造影剂与治疗剂是通过将 PACAP 或其生物活性片段或类似物与一个金属螯合剂连接而成的。此处所说的“连接”指共

价键合。螯合剂则与造影或治疗核素联结。在不影响产物中 PACAP 生物活性的前提下，螯合剂可以与 PACAP 或其生物活性片段或类似物在肽结构的任意点相连接。优选的是螯合剂连接在 PACAP 或其生物活性片段或类似物肽的 N 末端或 C 末端，更优选的是 C 末端。

这样，本发明的造影或治疗化合物优选地包含一个由一个或多个天然或合成氨基酸构成的空间臂，连接到 PACAP 或其生物活性片段或类似物的 N 端或 C 端。然后螯合剂可以与这个空间臂相连。空间臂使核素或螯合剂产生的空间位阻最小化，利于保存造影剂与治疗剂中的 PACAP 活性。

上述的本发明之造影剂的分子式 A 和 B 以及治疗剂分子式 C 和 D 中，可选的空间臂用 Z1、Z2 表示，分别将 X1、X2 连接到 M。带有可选空间臂的分子式如下：

(A) $M(I)-Z_1-X_1-P-X_2$

(B) $X_1-P-X_2-Z_2-M(I)$

(C) $M(T)-Z_1-X_1-P-X_2$

(D) $X_1-P-X_2-Z_2-M(T)$

分子式中其他变量见发明概述中的描述。

空间臂 Z_1 或 Z_2 可以含有，例如 1 到 20 个氨基酸，更好的是 1 到 4 个，最好是 1 个氨基酸。一个特别适合的空间臂是 4-氨基丁酸，也叫“Aba”。作空间臂的 Aba 最好用 D 型。

螯合剂可以由大量不同的能络合一个金属离子或多原子离子(如 TcO)的螯合化合物中的一种或多种的残基构成。此处所述之“螯合剂”指一种能与 PACAP 或其生物活性片段或类似物连接的化合物，同时还

含有能结合金属原子的供体原子。螯合剂通过配位键与金属原子结合，形成环状结构称为“螯合复合物”或“螯合物”。

适于本发明使用的螯合剂包括 NxSy 螯合化合物。此处“NxSy 螯合化合物”指能够配位结合金属核素且能与 PACAP 或其生物活性片段或类似物连接的，核心具有下面构造的螯合剂：N2S2 （例见 U. S. 4,897, 225、U. S. 5,164, 176 或 5,120, 526）；N3（例见 U. S. 4,965, 392）；N2S3 （例见 U. S. 4,988, 496）；N2S4（例见 U. S. 4,988, 496）；N3S3（例见 U. S. 5,075, 099）；N4（例见 U. S. 4,963, 688 和 U. S. 5,227, 474）或 NS3。优选的 NxSy 螯合化合物含 N2S2, N3S 或 N4 核心。NxSy 螯合化合物的例子也可见于 Fritzberg et al., P.N.A.S. USA 85: 4024-29,1988 和 Weber etal., Bioconj. Chem. 1: 431-37,1990。此段提到的杂志文章和美国专利均以全文形式作为参考文献引入。

特别合适的 N4 螯合剂是[N-[N [N-(benzylthio)acetyl] glycyl] glycyl] glycine，也叫巯乙酰基三甘氨酸或 MAG3，还有四肽 Gly-(D)Ala-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4)，见 Vanbilloen HP et al.,Nucl. Med. Biol. 22: 325-338,1995，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。Gly-(D)Ala-Gly-Gly 是 MAG3 的一个衍生物，其中巯基被更稳定的更易引入的氨基基团所替代。这两种 N4 螯合剂的结构示意于图 1。

在肽合成过程中，可以把序列 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 引入到 PACAP 或其生物活性片段或类似物的 N 端或 C 端，优选是 C 端。优选这一步

骤是因为这样可以避免很多麻烦，如需要单独连接螯合剂到有可能含有保护基团和解封闭基团的肽上，HPLC 纯化反应混合物、质谱分析鉴定所需的产物等。如上面所讨论的，Aba 可以作 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 与 PACAP 或其生物活性片段或类似物之间的空间臂。在肽合成过程中无需增加任何步骤就可以把 Aba 连接到 PACAP 或其生物活性片段或类似物上。用 MAG3 或 Gly-(D)Ala-Gly-Gly 螯合剂制造肽化合物、连接这些螯合剂到含 Aba 的肽上、以及将造影或治疗核素交联于螯合剂等过程都可在 U. S. 6,395, 255 见到描述，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

连接 NxSy 螯合剂与蛋白质的方法也是熟知的，比如揭示于 U. S. 5,175, 257 和 U. S. 6,171, 577， 其公开的全部内容在此作为参考文献引入。例如，NxSy 螯合剂可以在非变性条件下通过活性的“连接基团”与 PACAP 或其生物活性片段或类似物连接，如不是这样的条件下可能会对蛋白有不良影响。连接基团与螯合剂可以是分开的也可以是整合的。具有整合的连接基团的螯合剂被称为“双功能螯合剂”。连接基团要与蛋白质上的功能基团有充分的反应活性以使反应能在水溶液中进行，且不需要用加热至高温等可能使蛋白质变性的方式强制进行。

合适的连接基团的例子有活性酯、异硫氰酸盐、胺、肼、马来酰亚胺或其他 Michael 型受体、硫醇和活化的卤化物。优选的活性酯有 N-羟基琥珀酰酯、磺基琥珀酰酯、 苯硫基酯、2,3,5,6-四氟苯基酯和 2,3,5,6-四氟苯硫基酯。后三者形成了一组位于苯环的对位(即 4

位)或邻位时能增强水溶性的活性酯。这类基团的例子有 CO_2H、SO_3^-、PO_3^{2-}、OPO_3^{2-}、OS O_3^-，和 N^+R_3，R 代表 H 或烷基团。

其他适用于本发明的螯合剂包括线性、环状和分枝的多氨基多羧基酸及其含磷的含氧酸对等物，例如乙二胺四乙酸 (EDTA)；二乙三胺五乙酸 (DTPA)；1,4,7,10-tetraazocyclododecane-N,N'N",N"'-tetraacetic acid (DOTA)；1,4,7,10-tetraazo-cyclododecane-N,N'N"-triacetic acid (DO3A)；1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane-N,N'N"-triacetic acid (OTTA)；trans(1,2)-cyclohexanodiethylene-triamine-pentaacetic acid (CDTPA)；1-oxa-4,7,10-triazacyclododecantriaacetic acid (DOXA)；1,4,7-triazacyclononanetriacetic acid (NOTA) 和 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecanetetraacetic acid (TETA)。

这些螯合剂可以用已知的任何方法与 PACAP 相连。例如，螯合剂可以通过一个金属配位基团与 PACAP 相连，与 PACAP 上的氨基、巯基或羟基形成酯、氨基硫酯或硫代酰胺。而且，也可以将螯合剂通过一个直接连在螯合剂上的功能基团与 PACAP 相连，例如 DOTA 的碳环上连着一个 CH_2-苯基-NCS 基团，见 Meares et al., JACS 110 : 6266-6267，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。螯合剂也可经过同质或异质的双功能连接子间接与 PACAP 相连，如二胺、二环氧化物、二醇、二酸或双功能的 PEG。上述的具有内部连接基团的螯合

剂被称作“双功能螯合剂”。最优选的是将多氨基多羧基酸类螯合剂连接到 PACAP 或其生物活性片段或类似物的 C 端。

将 PACAP 或其生物活性片段或类似物上相连的金属螯合剂与造影或治疗核素相连的方法也是专业人员熟知的，例如见于 U. S. 5,175,257 和 U. S. 6,171, 577，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。举例说明，造影或治疗核素可以通过直接引入、模板合成和/或金属转移作用引入本发明之化合物。优选使用直接引入。

直接引入时，造影或治疗核素必须很容易被螯合剂络合，例如，在水溶液中将含有螯合剂的化合物与金属盐水溶液简单地暴露、混合。金属盐可以是任意的盐，但最好是金属的水溶性盐如卤素盐。该盐最好选择得使其不干扰金属离子与螯合剂的结合。含有螯合剂的化合物可以与缓冲性盐如柠檬酸盐、乙酸盐、磷酸盐和/或硼酸盐混合以形成适宜直接引入的 pH 值。

对造影用途，造影核素选自 ^{99m}Tc；^{87}Y；^{67}Ga；^{64}Cu 和 ^{111}In。较好的造影核素是 ^{99m}Tc。含有 PACAP 或其生物活性片段或类似物的本发明之化合物，加上一个造影核素即为“造影化合物”。

对治疗用途，“治疗核素”选自 ^{47}Sc、^{64}Cu、^{67}Cu、^{67}Ga、^{212}Pb、^{68}Ga、^{90}Y、^{111}In、^{152}Sm、^{212}Bi、^{210}At、^{211}At、^{177}Lu、^{186} Re 和 ^{188}Re。较好的治疗核素是 ^{90}Y、^{186} Re 和 ^{188}Re。含有 PACAP 或其生物活性片段或类似物的本发明之化合物，加上一个治疗核素即为“治疗化合物”。

本发明之造影化合物可以用于检测作为患者或疑患者的受试验者表达 VPAC 的肿瘤。此处“受试验者”包括人和非人哺乳动物。非

人哺乳动物包括牛、绵羊、猪、马、犬、猫和啮齿动物（如大鼠、小鼠、豚鼠和兔）。表达 VPAC 受体的肿瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、甲状腺癌；鳞状细胞癌；腺癌；小细胞癌；黑色素瘤以及脑肿瘤如神经胶质瘤和神经母细胞瘤。

在本发明的实施中，有效量的含 PACAP 或其生物活性片段或类似物的造影化合物可以通过任何肠道或肠道外方式递送到受试验者。优选使用肠道外递送。

适用的肠道外递送方法包括血管内递送（如静脉推注、静脉输注、动脉推注、动脉输注及对脉管系统的导管滴注）；组织外围和组织内注射（如肿瘤外围和肿瘤内注射）；皮下注射或埋藏包括皮下输注（例如用渗透泵）；以及直接应用于肿瘤或肿瘤外围组织，例如通过导管或其他内置物（含有多孔或非多孔的或凝胶状材料的栓剂或植入物；硅橡胶膜或纤维）。皮下注射或皮下输注优选接近肿瘤或怀疑肿瘤位点，尤其是当肿瘤或怀疑肿瘤就在皮肤上或接近皮肤时。造影化合物优选以单剂量单位做血管内注射，例如在传统的注射媒介如等渗盐水、血清或生物相容性等渗缓冲液（如磷酸盐、Hepes 或 Tyrode's 缓冲液）中。

做血管内注射时，现有的造影化合物很容易渗透到实体瘤中，在瘤体内分布相对均匀，肿瘤细胞间的紧密联结、纤维基质、间隙压力梯度及结合位点的屏障都不构成影响。相似地，本发明的造影化合物

在进行肿瘤外围或肿瘤内递送时也很容易在瘤体内分布。

此处本发明之造影化合物的“有效量”指能够使受试验者的表达 PACAP 或 VPAC 的肿瘤产生闪烁影像的足够剂量。造影化合物的有效量用放射活性表示比较方便，如用 mCi。一般地，造影化合物的有效量在每 70 kg 体重约 0.01 mCi 至约 100 mCi 范围，推荐每 70 kg 体重约 0.1 mCi 至约 50 mCi。

当造影化合物递送到受试验者后，受试验者的至少一部分身体会产生闪烁影像。例如，期望在受试验者的有肿瘤或怀疑有肿瘤的身体部位得到影像。闪烁影像的产生需要足够的时间，以便被递送的造影化合物到达肿瘤并与肿瘤细胞表达的 PACAP 或 VPAC 受体相结合。造影化合物到达肿瘤并结合一般需要几分钟时间。然而，如果需要的话，肿瘤造影可以在注射造影化合物后数小时进行。肿瘤可以通过任何闪烁扫描造影技术进行造影，包括平面闪烁扫描、SPECT 或 PET。得到受试验者闪烁影像的技术和机器都是本领域人员熟知的。

放射标记药物通常会滞留在肾脏。因此有必要设法尽量减小肾脏对此类药物的保留，这样能减轻受试验者器官的放射负担也能增强肿瘤的对比度。已知预先或与放射药物同时递送一种氨基酸（如赖氨酸）能显著降低肾脏对放射药物的摄取。因此，现有的造影方法中都选择性地包括了预先或与放射药物同时使用一种氨基酸以降低肾脏对造影化合物的摄取。氨基酸可以通过前述的任何适当的肠道或肠道外途径递送，可以与造影化合物的递送途径相同或不同。

具有一般技术的专业人员很容易确定对于现有造影化合物预先

或与放射药物同时使用的氨基酸的合适剂量，以抑制肾脏对造影化合物的摄取，例见 Kobayashi H et al., Cancer Res. 56: 3788-3795,1996；Bernard BF et al., J :Nucl. Med. 38: 1929-1933,1997 和 Behr TM et al.,Eur. J. Nucl. Med. 25: 201-212,1998，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

一般地，对于现有造影化合物预先或与放射药物同时使用的氨基酸的合适剂量为 0.1-5g/kg 体重，优选使用 0.4-2g/kg 体重。预先或同时使用的首选氨基酸是 D-赖氨酸。

仅仅是表达 VPAC 肿瘤的疑患者，而实际上并没有患这类肿瘤的受试验者也可能做本发明所述的造影检查。当然结果会是阴性的。

本发明的治疗化合物可以用来治疗受试验者的表达 VPAC 的肿瘤。实施本发明时，有效量的含 PACAP 或其生物活性片段或类似物的治疗化合物可以通过任何肠道或肠道外方式递送到受试验者，同上述的造影化合物的方法。推荐使用血管内或瘤体内递送。现有的治疗化合物也很容易渗透到实体瘤和/或相对均匀地方分布于肿瘤块内，正如上面描述的造影化合物的情况。治疗化合物的有效量用放射活性表示比较方便，例如用 mCi。此处本发明之治疗化合物的“有效量”指足以抑制或逆转受试验者表达 VPAC 的肿瘤生长的足够量。使用给一个特定受试验者的治疗化合物的有效量取决于很多因素，如递送方式、被治疗肿瘤的分期与严重程度、受试验者的体重与一般健康状况以及处方医师的判断等。

通常使用于一个受试验者的有效量是每 70kg 体重 1mCi 到

1000mCi，优选使用每 70kg 体重 10mCi 到 500mCi，更优选每 70kg 体重 20mCi 到 100mCi。需要指出现有的治疗方法包括治疗化合物的多次用药。

现有治疗方法也可选择地包括预先或同时使用一种氨基酸以减少肾脏对治疗化合物的摄取，如上文所述。氨基酸的剂量和递送途径也如上文所述造影剂的方法。优选预先或同时使用的氨基酸是 D-赖氨酸。

具有一般技术的专业人员很容易确定表达 VPAC 的肿瘤的生长是否被抑制或逆转，例如通过在治疗前后用上述造影方法直接检查肿瘤的尺寸大小。肿瘤的生长的抑制或逆转也可由治疗前后用物理方法估计肿瘤的大小来确定，如肿瘤组织的触诊或用卡尺等测量仪器测量组织块的大小。

在递送给受试验者前，本发明的造影化合物与治疗化合物优选依已知技术制成药物组合物。本发明之药物组合物的特征至少是无菌和无致热源的。此处“药物组合物”包括人用和畜用配方。

现有的药物组合物含本发明之造影化合物与治疗化合物及生理学上可接受的载体媒介。优选的生理性的载体媒介有水、缓冲水、普通盐水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。

本发明之药物组合物也可含有传统的药物赋形剂和/或添加剂。适合的制药赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。适合的添加剂包括生理性的生物相容性缓冲剂（如盐酸氨丁三醇 tromethamine hydrochloride），或钙或钠的盐（例如氯化

钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙）作添加剂（摩尔比 1 到 50）。如果需要的话，药物组合物中也可含少量湿润剂、乳化剂或 pH 缓冲剂。口服配方可包括标准的载体如制药等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

本发明之药物组合物也可含有中性或盐形式的本发明之造影化合物与治疗化合物。药学上可接受的造影化合物与治疗化合物可用的盐包括与自由氨基形成的盐，如盐酸盐、磷酸盐、乙酸盐、酢浆草酸盐和酒石酸盐；以及与自由羧基形成的盐，如钠盐、钾盐、铵盐、钙盐、碱式铁盐和与异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸和普鲁卡因形成的盐。

现用以下非限制性的实例阐述本发明。

实施例 1、TP 3475 的制备

一个 $PACAP_{27}$ 的类似物，称为 TP 3475，根据上述之 U. S. 6,395,255 的技术制造。TP 3475 由 $PACAP_{27}$ 在 C 末端连接螯合剂 Gly-(D) Ala-Gly-Gly 而成。螯合剂与 $PACAP_{27}$ 之间有一个 Aba 空间臂。

简要地说，$PACAP_{27}$ 是用标准的固相合成法合成的。C 末端的 Aba 空间臂和螯合剂 Gly-(D) Ala-Gly-Gly 都是通过延续固相合成反应，将适当的氨基酸残基连续地向 $PACAP_{27}$ 的 C 末端加成连上去的。此类似物根据其分子量命名（预测 3475.17，实测 3475.18）。TP 3475 的一级序列见图 2 及 SEQ ID NO: 5。

实施例 2、用 ^{99m}Tc 放射标记 TP 3475

TP 3475 按照前述 U. S. 6,395, 255 中的方法用 ^{99m}Tc 金属化。如下述进行的金属化反应产生了一个基于本发明的造影化合物，称为 ^{99m}Tc-TP 3475。

向一个干净的、充氮的、10 毫升硅化过的小玻璃瓶中加入 10μg 的 TP 3475 在 10μl pH4.6 的乙酸盐缓冲液中（100μg $SnCl_2.2H_2O$ 在 10μl 0.005 M HCl 和 300μl 0.067M Na_3PO_4, pH 12 中）。小瓶内容物在丙酮干冰浴中速冻。然后将小瓶放在 GeneVac 冷冻干燥机中冻干 2 小时，充氮，密封，保存于 -20℃ 备金属化反应用。

准备做金属化反应时，将小瓶放在室温中。将 10-40 mCi ^{99m}Tc 在 200μl 0.9%NaCl 中注入小瓶。混合物在 100℃ 保温 30min，加入 1ml 0.1 M Na_2HPO_4 把 pH 升至 6-6.5。加 125 毫克抗坏血酸钠作稳定剂。在 Rainin HPLC 系统用反相 C-18 microbond 柱做金属化造影化合物 ^{99m}Tc-TP 3475 的 HPLC 分析，0.1% TFA 水溶液为溶剂 A，0.1% TFA 的乙腈溶液为溶剂 B。梯度为溶剂 B 在 0 min 时为 10%，在 28 min 时为 90%。 ^{99m}Tc-TP 3475 在 22℃、24 小时是稳定的。HPLC 测出 22℃ 时的得率是定量的，在保留时间 12.5 分钟处得到一个单峰。^{99m}Tc-TP 3475 的 HPLC 洗脱图谱见图 3，^{99m}Tc-TP 3475 的结构见图 4。

^{99m}Tc-TP 3475 的稳定性在 37℃，100mM 过量半胱氨酸、DTPA 和 HAS 存在下进行 24 小时。相似的研究也在人血清中进行。HPLC 分析显示 ^{99m}Tc- TP 3475 在测试的介质中都有优异的稳定性。

实施例 3 TP 3475 与乳腺肿瘤结合的评测

^{99m}Tc-TP 3475 和 VIP_{28} 与人结肠癌细胞株 LS 174T 和 HT-29、以及人乳腺癌细胞株 MDA MB 231 (不依赖雌激素)和 T47D (依赖雌激素)的结合照下述方法评测。^{125}I-$PACAP_{27}$ 作为对照细胞的培养与分析方法见前述的 U. S. 6,395, 255。TP 3475、VIP_{28} 和 ^{125}I-$PACAP_{27}$ 的 IC_{50} 和 Kd 值用标准方法确定。

cAMP 活性与剂量函数关系的测定

依赖雌激素细胞 T47D 和不依赖雌激素细胞 MDA MB 231 各约 $5x10^6$ 个，分别用 SIT 培养基洗两次，重悬于含 1% BSA、1mg/ml 杆菌肽和 100μM 异丁基甲基黄嘌呤的 SIT 培养基中。将浓度系列增加的 TP 3475、VIP_{28} 和 ^{125}I-$PACAP_{27}$ 加入细胞中，5 分钟后加入等体积乙醇终止反应。样品振荡混匀后冻存于-80℃ 以备用 RIA 法检测 cAMP，方法见 Moody TW, Peptides 17: 545-555, 1995，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。数据以 cAMP 对肽浓度作图。

测定核癌基因 c-fos 与 c-myc mRNA 的诱导

我们测定了 TP 3475 在人乳腺肿瘤细胞中刺激 c-fos 与 c-myc 基因表达的能力。上述的依赖雌激素细胞 T47D 和不依赖雌激素细胞 MDA MB 231 各约 $5x10^6$ 个，分别培养于 15cm 培养皿中，用含 0.5%胎牛血清的 SIT 培养基处理 4 小时。将 TP 3475、$PACAP_{27}$ 和 VIP_{28} 分别加入培养细胞中，孵育 60 分钟。孵育后移去培养基用异硫氰酸胍分离被处理细胞的总 RNA，方法见 Chirgwin et al., Biochemistry 18:

5294-5299,1979，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。

将 10μg 从处理细胞中分离到的总 RNA 变性，于 0.66 M 甲醛-1% 琼脂糖凝胶中分离。凝胶用溴化乙锭染色以评判 RNA 的完整性。然后用标准方法将 RNA 印迹到 Nytran 膜上过夜，此膜用 c-fos 和 c-myc cDNA 探针在标准的 Northern 印迹杂交条件下杂交。c-fos 和 c-myc cDNA 探针用[^{32}P] dCTP 标记，用 Bethesda Research Laboratories 的随机引物试剂盒按照厂商说明进行。杂交后洗膜，对 Kodak XAR-2 胶片曝光，冲洗后得到放射自显影。处理细胞与对照细胞的 c-fos 与 c-myc mRNA 表达水平用密度扫描仪定量。

实施例 4、TP 3475 对负鼠肛门内括约肌（IAS）平滑肌组织的基础张力的影响

已知 $PACAP_{27}$ 能引起 IAS 基础张力的浓度依赖性下降，测定见 Rattan S et al., J Pha-mcol. Exper. Theta. 263: 722-728,1997，其公开的全部内容在此作为参考文献引入。这里的 IAS 测试用依次增加的 TP 3475 浓度，直至达到最大下降，如下述。对照为 $PACAP_{27}$。

平滑肌条的准备

两种性别的成年负鼠（Didelphis virginiana）在腹膜内注射戊巴比妥（40mg/kg）后处死。将大血管及外部组织包括外括约肌去除，把肛管打开钉平于有充氧 Krebs’液（NaCI, 118.07; KC1, 4.69; $CaCl_2$, 2.52; $MgSO_4$, 1.16; NaH_2PO_4, 1.01; $NaHCO_3$, 25 和 glucose, 11.10）的解剖盘上，粘膜面向上。移除粘膜，从肛管最底端制备肛

门内括约肌环状平滑肌小条（约 2 mm x 1 cm）。

等长张力的测定

将 IAS 平滑肌条转入控温的装有 Krebs' 液的 2ml "肌肉池（muscle bath)"中，持续用 95%O_2-5% CO_2混合气体鼓泡。肌肉条的下端用丝缝合线绑在肌肉池底部，另一端固定在等长力传感器上（型号 FTO3 ;Grass Instruments Co, Quincy, MA)。用 Beckman Dynograph 记录仪（Beckman Instruments, Schiller Park, IL）记录等长张力。开始给肌肉条加 1g 张力，让其平衡 1 小时，不时冲洗。只有产生稳定张力且在电场刺激下松弛的肌肉条是可用的。最佳长度与基线的确定见前述之 Rattan S 等人, 1997。

图 5 所示的结果说明 10^{-5} M 的 $PACAP_{27}$ 和 TP 3475 引起 IAS 张力相等的下降。这些数据表明 TP 3475 的生物活性没有因向 $PACAP_{27}$ 的 C 端加空间臂和螯合剂而受损。

实施例 5、^{99m}Tc-TP 3475 在裸鼠种植的人乳腺肿瘤细胞中的组织分布和药代物动力学

研究在荷有依赖雌激素的 T47D 和不依赖雌激素的 MDA MB 231 肿瘤的裸鼠中按下述方法进行。

将两种肿瘤细胞各约 $5x10^6$ 个种植于小鼠右股，待肿瘤块形成。每个实验组有 5 只荷瘤小鼠，均通过尾侧静脉注射了 200-700μCi 剂量的 ^{99m}Tc-TP 3475，含有少于 1μg 的造影化合物（比活性 1400-2500Ci/mmol 或更高)。注射后 15 min、1 hr、2 hr、4 hr 和

24 hr 将动物处死，测定各种组织中的% ID/g 组织。荷瘤小鼠对照组注射 ^{125}I 单碘化的 $PACAP_{27}$。注射对照动物前将 ^{125}I-$PACAP_{27}$ 调整到与 ^{99m}Tc-TP 3475 相同的比活性。所有动物的造影均用配有专用计算机和低能量平行孔准直器的 GE STARCAM γ 照相机进行。

结果作为时间的函数以数字形式和直方图形式展示。同时计算了注射化合物的肿瘤/肌肉比和肌肉/血管比。注射后 15min 处死的动物中，以 15 秒一帧进行了动态造影研究。对不同区域作了动力学曲线图，包括肿瘤、心、肝、肾和膀胱。根据这些数据结合其它数据点可以得出重要器官中放射活性的摄取与清除的概况，包括肿瘤组织的。动物均置于代谢笼中以便确定尿中分泌的放射活性的化学本质和量。尿中的放射活性定期测定，尿样用 HPLC 分析。

实施例 6、^{99m}Tc-TP 3475 在大鼠血液中的清除

^{99m}Tc-TP 3475 在血液中的清除在 Sprague-Dawley 大鼠中按下述方法进行。三只 Sprague-Dawley 大鼠，体重均为约 250 克，从一侧尾静脉注射 1mCi 的 ^{99m}Tc-TP 3475，注射后 1、5、10、15 和 30 分钟和 1、2、4、6、18 和 24 小时从另一侧尾静脉取三份系列血样。血样称重，用标准闪烁计数方法测定放射活性，以注射时制备的 ^{99m}Tc 溶液为标准。% ID/g 对时间作图。

^{99m}Tc-TP 3475 的血液清除是两相的，α-$t_{1/2}$ 和 β-$t_{1/2}$ 分别为约 6 分钟和 90 分钟。这些数据表明 75%的 ^{99m}Tc-TP 3475 放射活性在注射后 12 分钟从循环中清除。

实施例 7、肿瘤大小与 ^{99m}Tc-TP 3475 比活性对肿瘤摄取的影响

肿瘤大小对 ^{99m}Tc-TP 3475 摄取的影响

用实施例 5 中的荷瘤小鼠研究了肿瘤大小对造影化合物摄取的影响，方法如下述。将 ^{99m}Tc-TP 3475 和 ^{125}I- $PACAP_{27}$ （作为对照）注射到荷瘤小鼠。肿瘤直径用游标卡尺度量。在注射后的最佳造影时间进行实验，时间点依据来自实施例 5。数据以% ID/g 对肿瘤绝对重量作图。实验中，化合物比活性与注射量保持恒定，以保证递送的受体特异性的肽分子数量一致。

注射的 ^{99m}Tc-TP 3475 的比活性对肿瘤摄取的影响

受体特异性的造影剂或治疗剂的肿瘤摄取会与注射的受体特异性的化合物的量成函数关系。用实施例 5 中的荷瘤小鼠研究了 ^{99m}Tc-TP 3475 注射量的影响，方法如下述，注射量用比活性代表。制备 5 份比活性在 1000-25,000Ci/mmol 范围的 ^{99m}Tc-TP 3475。5 组每组 5 只荷瘤小鼠每只注射固定的放射活性剂量(~700μCi)，分别含 0.1、0.5、1、1.5 或 2μg 的 ^{99m}Tc-TP 3475。注射后 24 小时测定组织分布。比较肿瘤和其他组织对化合物的摄取以及放射活性从组织中的清除。

实施例 8、减少肾脏对 ^{99m}Tc-TP 3475 的摄取

5 只小鼠组成的治疗组注射少于 1 微克，200-700μCi 剂量 ^{99m}Tc-TP 3475（比活性为 1400-2500Ci/mmol 或更高）的同时注射 50 毫克 D-赖氨酸。对照组 5 只小鼠只接受 ^{99m}Tc-TP 3475。治疗组和对照组动物

在注射后 15 分钟、1、2、4 和 24 小时处死，测定肾组织的% ID/g。

实施例 9、^{99m}Tc-TP 3475 的受体特异性

为确定 ^{99m}Tc-TP 3475 在任乳腺肿瘤中的受体特异性，用 PACAP 进行受体阻断实验。在荷有 T47D 移植片的裸鼠上，^{99m}Tc-TP 3475 的肿瘤摄取在预先注射 PACAP 的情况下下降了约 50%。

另一个受体阻断实验如下进行。静脉内注射 ^{99m}Tc-TP 3475 之前 30 分钟，上述的荷瘤小鼠静脉内注射多至 50μg 的 TP 3475 在 100μl PBS 中。依据实施例 5 得到的最佳造影时间对动物进行造影，然后处死定量测定组织分布。用这些数据可以确定 ^{99m}Tc-TP 3475 的受体特异性，反映为肿瘤组织摄取放射活性的下降，以及可能的其他组织中，如肺、肝、肾。

实施例 10、^{99m}Tc-TP 3475 与人肿瘤的结合

用下述方法测定 ^{99m}Tc-TP 3475 和 ^{99m}Tc-VIP_{28} 与鳞状上皮细胞癌、腺癌、小细胞癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤以及肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、喉癌、食道癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、子宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌、脑瘤、前列腺癌、甲状腺癌的结合。^{99m}Tc-VIP_{28} 的制备见上述的 U. S. 6,395, 255。

将每种肿瘤的样品在恒冷切片机上切片成 10-20 μm 厚度，封装为显微玻片。封好的玻片在-20℃ 储存至少 3 天，以增强组织对玻片

的粘附。玻片复温至室温，于 22℃ 在 50 mM Tris HCl, pH7.4； 2% BSA； 2 mM EGTA； 1 mM 杆菌肽和 5 mm $MgCl_2$ 中与 30 pM ^{99m}Tc-TP 3475 或 ^{99m}Tc-VIP_{28} 在存在或不存在单碘化的 ^{125}I-$PACAP_{27}$ 或 ^{125}I-VIP_{28} 的情况下孵育 90 分钟。

孵育后，玻片用冰冷的 50 mM Tris HCl, pH-7.4, 0.25% BSA 洗四次，水洗一次，用干燥空气流干燥。玻片对 ^{3}H Ultra 胶片（Amersham, England）曝光一周。放射自显影图用计算机辅助的图像分析系统定量。胶片同时对 ^{125}I 放射自显影标准曝光。在每种肿瘤中测定 ^{99m}Tc-TP 3475 或 ^{99m}Tc-VIP_{28} 的 Kd 值和抑制放射碘标记的对应物的 IC_{50} 值。

实施例 11、^{99m}Tc-TP 3475 与 ^{99m}Tc-Sesta-MIBI 和 In-111-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽的功效比较

我们比较了 ^{99m}Tc-TP 3475 、 ^{99m}Tc-Sesta-MIBI 和 In-111-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽用于乳腺肿瘤造影的功效。^{125}I-PACAP 作为对照。^{99m}Tc-Sesta-MIBI 尽管不是受体特异性试剂但还是被 FDA 批准可能会成为最常用的乳腺造影剂。^{111}In-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽是一个商业化的造影剂，针对乳腺肿瘤细胞上一类受体（SSTR 受体）。

^{111}In-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽 和 ^{99m}Tc-Sesta-MIBI 来自放射制药厂商。^{99m}Tc-TP 3475 用上述方法制备，^{125}I-PACAP 用标准技术制备。所有药物的药代动力学和组织分布均在荷瘤小鼠上用实施例 5 方法进行。由于 SSTR 和 VPAC 受体是不同的，^{99m}Tc-TP 3475 和 ^{111}In-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽共同注射给荷瘤小鼠。共注射的 ^{99m}Tc-TP

3475 和 ^{111}In-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽在鼠组织中的计量用各自相应核素的特征能量窗口进行（±15 或 20%）；即 140 KeV 计 ^{99m}Tc、173 KeV 和 247 KeV 计 ^{111}In。待 ^{99m}Tc 完全衰变（10-12 个半衰期）后对 ^{111}In 再进行一次组织计量。

第 24 小时点上，肿瘤对 ^{99m}Tc-TP 3475 的 24 小时摄取约为 0.2 % ID/g。这与肿瘤对 ^{125}I-PACAP 的摄取（0.23±0.03 %I.D./g）相当，高于对 ^{111}In-DTPA-D-Phe^{1}-奥曲肽的摄取（0.09±0.01 %ID/g）和对 ^{99m}Tc-Sesta-MIBI 的摄取（0. 18±0.0 %I.D/g）。

这里所引用的文献均以全文形式作为参考引用。本发明是通过特定的实施方案及各种附图进行描述的，但应当知晓可以用其他类似的实例或对上述的实例进行修饰和添加，在未偏离本发明的情况下而实现与本发明样的功能。因此，本发明不应被局限于任何单独的实施方案，而是应该根据后附的权利要求的广度和范围进行解释。

<110> 马休卡(马休).L.塔可尔

<120> PACAP组合物及用于肿瘤成像与治疗的方法

<130> 8321-121 PC

<150> 60/344,511
<151> 2001-10-19

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 38
<212> PRT
<213> 人类

<400> 1
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30
Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> 人类

<400> 2
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 3
<211> 176
<212> PRT
<213> 人类

<400> 3
Met Thr Met Cys Ser Gly Ala Arg Leu Ala Leu Leu Val Tyr Gly Ile

SEQUEN 1

```
 1               5                  10                  15
Ile Met His Ser Ser Val Tyr Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gly Leu Arg
            20                  25                  30
Phe Pro Gly Ile Arg Pro Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Asp Gly Asn
        35                  40                  45
Pro Leu Pro Asp Phe Gly Gly Ser Glu Pro Pro Gly Ala Gly Ser Pro
    50                  55                  60
Ala Ser Ala Pro Arg Ala Ala Ala Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Gly Arg
65                  70                  75                  80
Arg Asp Val Ala His Gly Ile Leu Asn Glu Ala Tyr Arg Lys Val Leu
                85                  90                  95
Asp Gln Leu Ser Ala Gly Lys His Leu Gln Ser Leu Val Ala Arg Gly
            100                 105                 110
Val Gly Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ala Gly Asp Asp Ala Glu Pro Leu
        115                 120                 125
Ser Lys Arg His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr
    130                 135                 140
Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys
145                 150                 155                 160
Arg Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys Gly Arg Arg Ile Ala Tyr Leu
                165                 170                 175
```

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N4 螯合剂

<221> 变异体
<222> 2
<223> D-型

<400> 4
Gly Ala Gly Gly
 1

<210> 5
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PACAP 类似物 TP 3475

SEQUEN 1

<221> 变异体
<222> 28
<223> Xaa = 4-氨基丁酸

<221> 变异体
<222> 30
<223> D-型

<400> 5

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Xaa	Gly	Ala	Gly	Gly
			20					25					30		

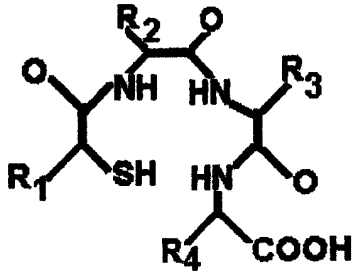


图 1A

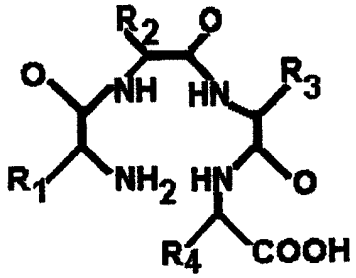
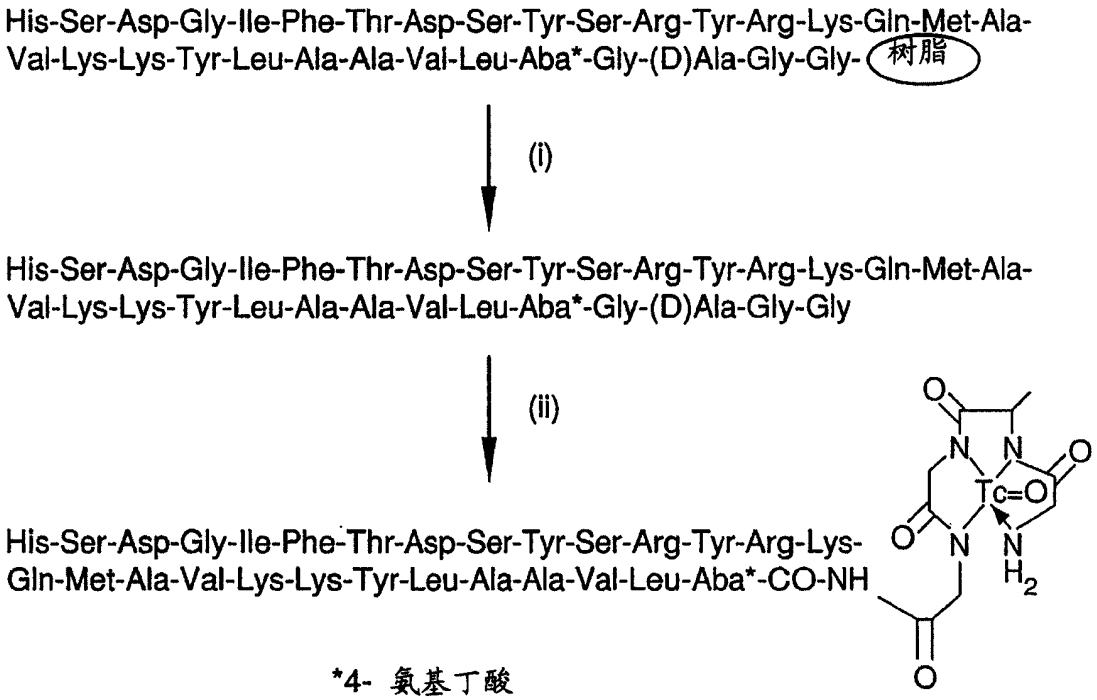


图 1B



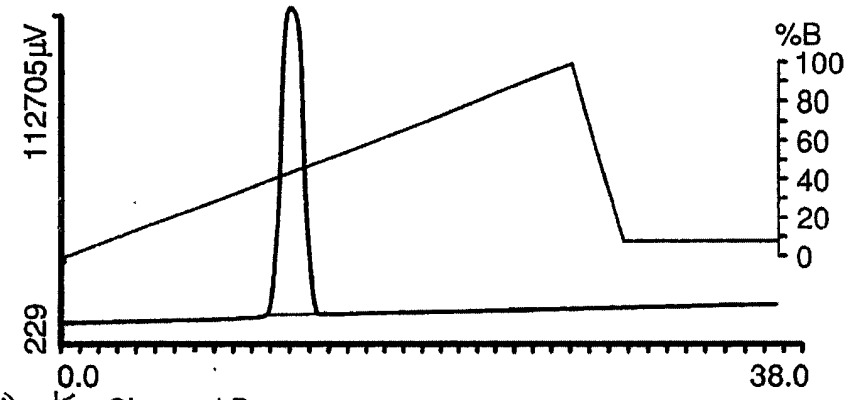
*4- 氨基丁酸

(i) TFA / 苯硫基甲烷 /乙烷二硫醇 / 苯酚 (90 : 5 : 3 : 2)

(ii) $Na^{99m}TcO_4$ /$SnCl_4$ /Na_3PO_4 (pH 12)

图 2

方法: TP-3475
注射体积: 200
上样间隔 (Sampling Int): 0.1 秒
数据:



分 析: Channel B

峰号 No.	时间	类型	高度(μV)	面积(μV-sec)	面积 %
1	12.543	N	106585	3036778	100.000
总面积				3036778	100.000

图 3

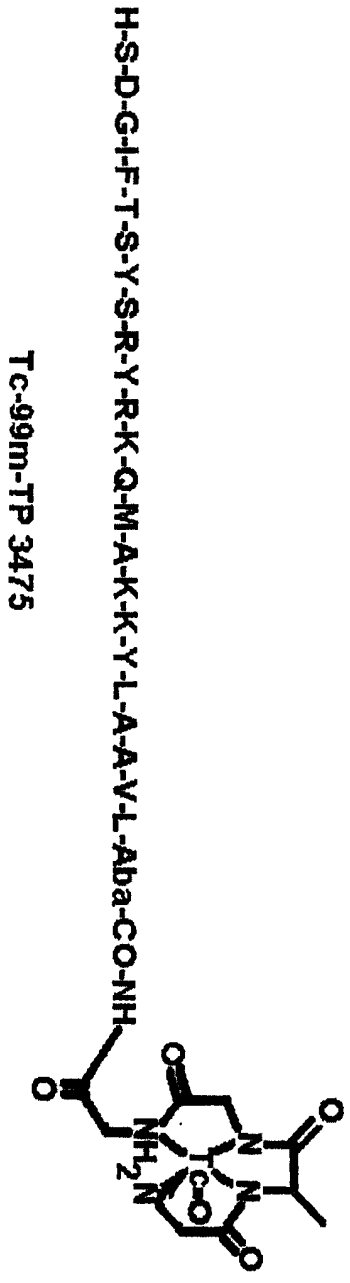


图 4

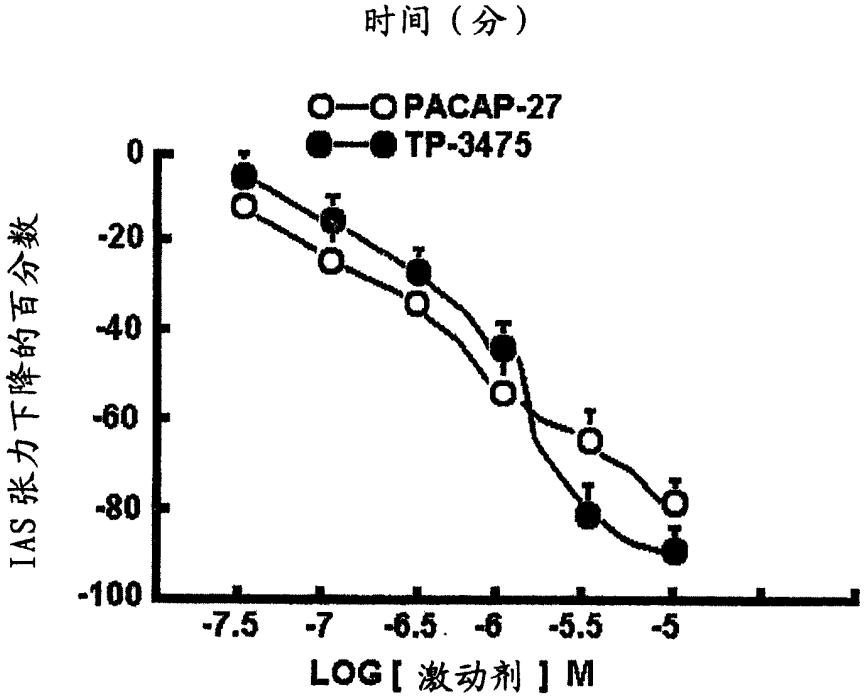

时间（分）
PACAP-27
TP-3475
0
-20
-40
-60
-80
-100
IAS 张力下降的百分数
-7.5
-7
-6.5
-6
-5.5
-5
LOG [激动剂] M

图 5