

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 51/08

//(A61K103: 10,1

03: 20,123: 00)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194303.0

[45] 授权公告日 2002 年 7 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1087630C

[22] 申请日 1995.6.1

[21] 申请号 95194303.0

[30] 优先权

[32] 1994.6.3 [33] US [31] 08/253,317

[86] 国际申请 PCT/US95/06909 1995.6.1

[87] 国际公布 WO95/33496 英 1995.12.14

[85] 进入国家阶段日期 1997.1.23

[73] 专利权人 迪亚太德公司

地址 美国新罕布什尔州

[72] 发明人 理查德·T·迪安

约翰·利斯特-詹姆斯

埃德加·R·西维特罗

威廉·麦克布莱德

[56] 参考文献

WO 93/23085 A 1993.11.25 A61K49/02

WO 94/07918 1994.4.14 C07K15/00

审查员 刘菊芳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 6 页 说明书 21 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 血栓成像用的放射性标记化合物

[57] 摘要

本发明涉及放射性标记的闪烁照相成像剂,以及生产这种成像剂的方法和试剂。具体而言,本发明涉及的是一种包含肽的,与血小板受体即血小板 GP IIb/IIIa 受体相结合的特异性结合的化合物,和形成这种化合物的方法和所用的试剂盒,以及用这种化合物由锝-99m 通过与放射性标记部分共价结合而标记,对哺乳动物体内的血栓进行成像的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

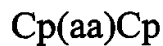
权 利 要 求 书

1. 一种用来制备使哺乳动物体内血栓成像的血栓成像剂的试剂, 该试剂组合有一个能与铟-99m、铟-111或镓-68结合的并与特异性结合肽共价连接的放射性标记复合部分, 所述特异性结合肽的分子量为10,000道尔顿, 与血小板糖蛋白IIb/IIIa受体相结合, 其中当所述试剂的浓度为大于0.3μM至1μM时, 所述试剂能抑制富含血小板的血浆中血小板的聚集作用, 抑制率为50%, 即 $0.3\mu\text{M} < \text{IC}_{50} \leq 1\mu\text{M}$ 。

2. 一种如权利要求1的试剂, 其中所述特异性结合肽是一种包含4~100氨基酸的特异性结合肽。

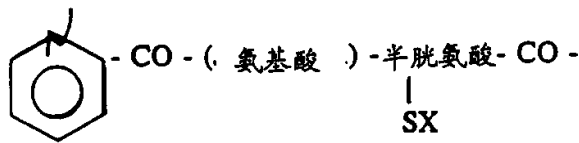
3. 权利要求1的试剂, 其中放射性标记的复合部分选自以下这组通式:

I.

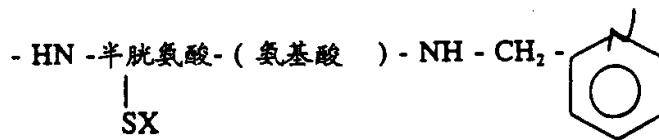


其中 Cp 是保护的半胱氨酸, (aa) 是任何不含巯基的初级 α-或 β-氨基酸; 和

III.



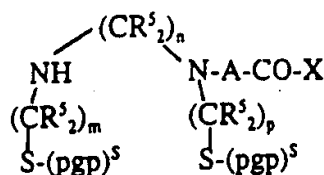
IV.



其中 X = H 或保护基团;

(氨基酸) = 任何不含巯基的初级 α-或 β-氨基酸;

V.



其中 每个 R^s 分别为 H、CH₃ 或 C₂H₅;

每个 (pgp)^s 分别为巯基保护基或 H;

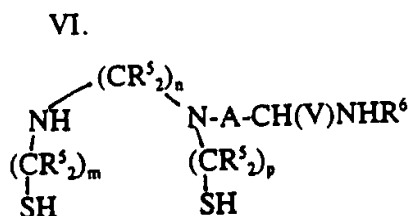
m、n 和 p 分别为 2 或 3;

A = 直链或环状的低级烷基、芳基、杂环基、其组合或其取代的衍生物；

X = 一种特异性结合肽；

和

5



10 其中 每个 R^5 分别为 H、1-6 个碳原子的低级烷基、苯基或被低级烷基、低级烷氧基取代的苯基；

m 、 n 和 p 分别为 1 或 2；

A = 直链或环状的低级烷基、芳基、杂环基、其组合或其取代的衍生物；

15 V = H 或 -CO- 特异性结合肽；

R^6 = H 或特异性结合肽；

和当 V = H 时， R^6 = 特异性结合肽，及当 R^6 = H 时，V = -CO- 特异性结合肽。

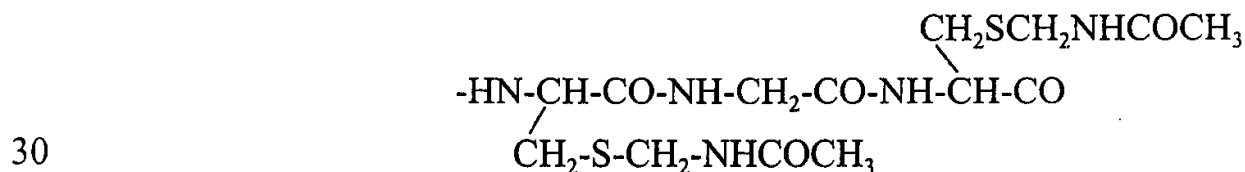
4. 权利要求 1 的试剂，其中特异性结合肽通过一个或多个氨基酸与放射性标记的复合部分共价连接。

5. 权利要求 4 的试剂，其中通式 I 的放射性标记的复合部分中被保护的半胱氨酸具有通式为



25 的保护基，其中 R 为 1-6 个碳原子的低级烷基、2-，3-，4-吡啶基、苯基或被低级烷基、羟基、低级烷氧基、羧基或低级烷氧基羰基取代的苯基。

6. 权利要求 4 的试剂，其中放射性标记的复合部分 Cp(aa)Cp 的通式为：



7. 权利要求 1 的试剂，其中特异性结合肽选自下列式子表示的肽：

CH₂CO-Y_DAmp.GDC

CH₂CO-Y_DAmp.GDCK, 和

O-(4-哌啶基)丁基酪氨酸。

5 8. 权利要求 1 的试剂, 其中该试剂进一步包括一种多价连接部分, 其共价连接到多个特异性结合肽以及多个放射性标记的复合部分从而组成一个制备多体的多价闪烁照相成像剂的试剂, 其分子量小于约 20,000 道尔顿。

9. 权利要求 8 的试剂, 其中多价连接部分是二-琥珀酰亚胺基甲基醚、4-(2,2-二甲基乙酰基)苯甲酸、N-{2-(N',N'-二(2-琥珀酰亚胺基-乙基)氨基乙基)}-N⁶,N⁹-二(2-甲基-2-巯基丙基)-6,9-二氮杂壬酰胺, 三(琥珀酰亚胺基乙基)胺、三(乙酰氨基乙基)胺、二(乙酰氨基乙基)醚、二(乙酰氨基甲基)醚、 α 、 ϵ -二乙酰基赖氨酸、赖氨酸和 1,8-二-乙酰氨基-3,6-二氧杂辛烷; 1,2-二(2-氯乙酰氨基乙氧基)乙烷、或它们的一个衍生物。

10

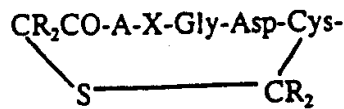
10. 权利要求 2 的试剂, 其中放射性标记结合部分在体外化学合成过程中与特异性结合肽共价连接。

15

11. 权利要求 10 的试剂, 其中放射性标记的结合部分在固相肽合成过程中与特异性结合肽共价连接。

12. 权利要求 1 的试剂, 其中所述特异性结合肽是一个环肽, 该环肽包含序列 - Amp - Gly - Asp - 。

20 13. 权利要求 12 的试剂, 其中特异性结合肽包括下式的环肽结构域:



其中 A 是亲脂的 D- α -氨基酸, 或 N-烷基-L- α -氨基酸或 L-脯氨酸;

25

X 是含有能够带正电荷的侧链的 L- α -氨基酸;

和 R 各自分别为 H、低级烷基或低级烷氧基烷基。

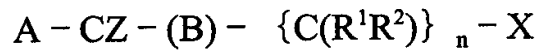
14. 权利要求 13 的试剂, 其中 A 是 D-酪氨酸或 D-苯丙氨酸, 和 X 为 L-(S-(3-氨基丙基)半胱氨酸或 L-4-脒基苯丙氨酸。

30 15. 权利要求 1 的试剂, 其中所述特异性结合肽的结构式为:

CH₂CO-Y_DAmpGDCKGCG 酰胺。

16. 权利要求 1 的试剂，其中放射性标记的复合部分包括一个下式的含单一巯基的部分：

II.



5 其中 A 为 H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 或 R⁴；

B 为 H、SH、-NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴；

X 为 H、SH、-NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴；

Z 为 H 或 R⁴；

10 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 分别为 H 或低级直链、支链或环状烷基；

n 为 0、1 或 2；

(肽)为含 2~10 个氨基酸的肽；

和当 B 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)时，X 为 SH，和 n 为 1 或 2；

当 X 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)时，B 为 SH，和 n 为 1 或 2；

15 当 B 为 H 或 R⁴ 时，A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC，X 为 SH，和 n 为 0 或 1；

当 A 为 H 或 R⁴ 时，B 为 SH，则 X 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)和

当 X 为 SH 时，B 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)；

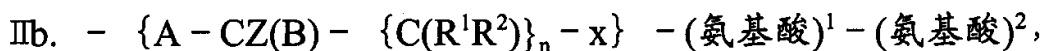
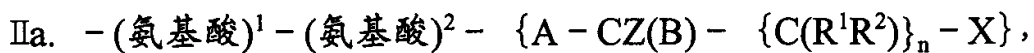
20 当 X 为 H 或 R⁴ 时，A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 和 B 为 SH；

当 Z 为甲基时，X 为甲基，A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC，B 为 SH 和 n 为 0；

当 B、X 都为 SH 时，n 不为 0；

25 而且其中巯基为还原态形式及(氨基酸)为任何不含巯基的初级 α- 或 β-氨基酸。

17. 权利要求 16 的试剂，其中放射性标记的复合部分在下列这组通式的放射性标记部分中选择：



30 IIc. $-(\text{初级 } \alpha, \omega \text{ 或 } \beta, \omega - \text{二氨基酸}) - (\text{氨基酸})^1 - \{A - CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n - X\}$ ，或

IIId. - {A - CZ(B) - {C(R¹R²)}_n - X} - (氨基酸)¹ - (初级 α, β - 或 β, γ - 二氨基酸)

其中 (氨基酸)¹和(氨基酸)²分别为任何不含巯基的天然的、被修饰的、被取代的或被改变的 α - 或 β - 氨基酸;

5 A 为 H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽) - NHOC、(氨基酸或肽) - OOC 或 R⁴;

B 为 H、SH 或 -NHR³、-N(R³) - (氨基酸或肽)或 R⁴;

X 为 SH 或 -NHR³、-N(R³) - (氨基酸或肽)或 R⁴;

Z 为 H 或 R⁴;

10 R¹、R²、R³和 R⁴分别为 H 或直链、支链或环状低级烷基;

(肽)为含 2~10 个氨基酸的肽;

n 为 0、1 或 2; 以及

当 B 为 -NHR³ 或 -N(R³) - (氨基酸或肽)时, X 为 SH 和 n 为 1 或 2;

当 X 为 -NHR³ 或 -N(R³) - (氨基酸或肽)时, B 为 SH 和 n 为 1 或 2;

15 当 B 为 H 或 R⁴时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽) - NHOC、(氨基酸或肽) - OOC, X 为 SH 和 n 为 0 或 1;

当 A 为 H 或 R⁴时, B 为 SH, 则 X 为 -NHR³ 或 -N(R³) - (氨基酸或肽)以及当 X 为 SH 时, 则 B 为 -NHR³ 或 -N(R³) - (氨基酸或肽);

20 当 X 为 H 或 R⁴时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽) - NHOC、(氨基酸或肽) - OOC 和 B 为 SH;

当 Z 为甲基时, X 为甲基, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽) - NHOC、(氨基酸或肽) - OOC, B 为 SH 和 n 为 0;

当 B 和 X 都为 SH 时, n 不为 0; 以及

其中巯基为还原态形式。

25 18. 一种闪烁照相成像剂, 包括权利要求 1 的试剂, 其中放射性标记的复合部分与一种放射性标记物相结合。

19. 权利要求 18 的闪烁照相成像剂, 其中放射性标记物为镓 - 99m、In - 111 或 Ga - 68。

30 20. 一种复合物, 通过权利要求 2 的试剂和镓 - 99m 在还原剂存在下进行反应而形成。

21. 权利要求 20 的复合物, 其中还原剂选自连二亚硫酸盐离子、亚锡

离子或亚铁离子。

22. 一种制备放射性药物制剂的试剂盒，所说的试剂盒包括一个密闭的管形瓶，瓶内装有预定量的权利要求2的试剂和足够量的还原剂以使用得-99m对该试剂进行标记。

5 23. 权利要求2的试剂在制备哺乳动物体内血栓成像用的药物中的应用，其中该试剂是用得-99m标记的。

24. 权利要求2的试剂的制备方法，其中该试剂是体外化学合成的。

25. 权利要求24的制备方法，其中特异性结合肽是通过固相肽合成法合成出来的。

10 26. 一种权利要求2的试剂的标记方法，包括用所述肽与Tc-99m在还原剂存在下进行反应。

27. 权利要求26的标记方法，其中还原剂选自连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子。

说明书

血栓成像用的放射性标记化合物

5

发明的背景

发明的领域

本发明涉及闪烁照相成像剂与生成该成像剂的方法。具体而言，本发明涉及的是一种可用放射性锝-99m($Tc-99m$)标记的试剂以及制备这种试剂的方法和试剂盒，以及用这种放射性标记的试剂对哺乳动物体内的血栓形成部位进行成像的方法。

现有技术的描述

血栓形成和血栓栓塞尤其是深部静脉血栓形成(DVT)与肺栓塞(PE)是常见的临床病症，这些病症具有很高的发病率和死亡率。据统计，在美国，每年大约有5百万居民要经历一次或多次DVT病症，而且每年有50多万肺栓塞病例发生，其结果导致每年10万人的死亡率(J.Seabold, Society of Nuclear Medicine Annual Meeting 1990)。同样据统计，90%以上的肺栓塞起因于下肢的DVT。如果尽早使用抗凝剂，则该抗凝剂疗法便能有效地治疗这些疾病。然而这种治疗法有危险性(如内出血)，以致阻碍了非必要预防工作的应用。比较先进的干扰血栓形成的技术，如应用重组的组织纤维蛋白溶酶原激活剂或链激酶，这可以在紧急情况下运用，不过这些技术运用时有着更大的危险性。而且，这些技术在临床上的有效运用要求进攻血栓的部位是可以鉴定的，以便对治疗作用进行监测。

由于上述这些原因，体内血栓快速定位法非常受欢迎且优选使用无损伤性的方法。现时鉴定DVT部位的方法是静脉造影术和与之相对照的加强性B超。选择哪种方法应取决于血栓的预测部位。不过，这两种方法均使病人感觉不舒服，而且前一种方法是损伤性的。此外，这两种方法对许多病例是不适用的或产生不正确的鉴定结果。

现时诊断PE的方法包括X-光胸透、心电图(EKG)、动脉氧压、肺活量(最大吸气量和最大呼气量)以及肺血管造影术。除了最后一种无损害方法之外，其它的方法均不能提供确切的诊断结果。

在核医学领域里，可以确定某些病灶的部位或大致确定其范围。其方法是内服少量的放射性标记的示踪化合物(称作放射性示踪物或放射性药物)，然后检测其分布情况。检测这些放射性药物的方法一般称为成像术或放射性成像术。

5 放射性成像术中所使用的多种放射性核素包括 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc - 99m)、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{169}Yb 。其中，优选的 Tc - 99m 和 ^{111}In 为单光子发射的放射性核素，优选的 ^{68}Ga 为正电子发射的放射性核素。优选 Tc - 99m 是因为它不发射 α 或 β 粒子射线而发射大约 140KeV 的 γ 射线，而且半衰期为 6 小时以及用钼 - 99/锝 99m 发生器能就地即刻很方便地得到它。

10 γ 射线示踪物内服后，优先与血栓的某个组分而不是其它组织进行特异性结合，这样便能进行外闪烁照相成像，确定与血栓相结合的示踪物的位置从而确定血栓的位置。血栓是由血细胞(高活化的血小板)陷于交联的血纤维蛋白中形成的。活化的血小板是非常好的血栓成像的目标物，因为活化的血小板在循环血中(包含未活化的血小板)通常是不存在的。

15 活化的血小板在其细胞表面表达 GP II b/III a 受体。这种受体的正常配体为血纤维蛋白(Plow 等, 1987, Perspectives in Inflammation, Neoplasia and Vascular Cell Biology, PP.267 - 275)。不过，已经研制了一些合成性的小分子类似物(可能但并不一定是肽)可以和这种受体结合(实例包括 Klein 等, 1992, 美国专利 5,0136,069 和 Egbertson 等, 1992, 欧洲专利申请 EPA0478328A1)。在
20 这些合成性分子中尽管许多只以低的亲和力结合，但其它分子却具有较高亲和力(参阅 Egbertson 等, *ibid*)。

现有技术中，人们开始尝试用放射性示踪物来成像血栓。这些包括用 ^{111}In 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的自体固有的血小板和用 ^{123}I 与 ^{125}I 标记的纤维蛋白原(后者用 γ 闪烁探针检测，优于 γ 照相)。用于标记血栓的其它一些放射性标记物
25 包括血纤维蛋白溶酶、纤维蛋白溶酶原激活剂、肝素、纤维结合蛋白、纤维蛋白片段 E1 以及抗纤维蛋白和抗血小板的单克隆抗体(参阅 Knight, 1990, Sem. Nucl. Med. 20: 52 - 67)。

现有技术中，一些化合物具有与血小板 GP II b/III a 受体相结合的能力。

30 Ruoslahti 和 Pierschbacher, 美国专利 4,578,079, 描述了序列为 X - Arg - Gly - Asp - R - Y 的肽，其中 X 和 Y 为 H 或一种氨基酸，R 为 Thr 或 Cys，这种肽能够与血小板相结合。

Ruoslahti 和 Pierschbacher, 美国专利 4,792,525, 描述了序列为 Arg - Gly - Asp - X 的肽, 其中 X 是 Ser、Thr 或 Cys, 这种肽能够与血小板相结合。

5 Klein 等, 1992, 美国专利 5,086,069 公开了与 GP II b/III a 受体相结合的鸟嘌呤衍生物。

Pierschbacher 等, 1989, PUT/US88/04403 公开了构象上被限制的包含 RGD 的肽, 用来抑制细胞在培养基上的附着。

Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90202015.5 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环状 RGD 多肽。

10 Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90202030.4 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环状 RGD 多肽。

Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90202031.2 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环状 RGD 多肽。

15 Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90202032.0 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环状 RGD 多肽。

Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90311148.2 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环肽。

Nutt 等, 1990, 欧洲专利申请 90311151.6 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环肽。

20 Ali 等, 1990, 欧洲专利申请 90311537.6 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环肽。

Barker 等, 1991, PCT/US90/03788 公开了用来抑制血小板聚集的环肽。

25 Pierschbacher 等, 1991, PCT/US41/02356 公开了作为血纤维蛋白原受体拮抗剂的环肽。

Duggan 等, 1992, 欧洲专利申请 92304111.5 公开了血纤维蛋白原受体拮抗剂。

Garland 等, 1992, 欧洲专利申请 92103861.8 和 92108214.5 公开了作为血小板聚集抑制剂的苯甲酰胺衍生物。

30 Bondinell 等, 1993, 国际专利申请 PCT/US92/0546 公开了二环的血纤维蛋白原拮抗剂。



Blackburn 等, 国际专利申请 PCT/US92/0878, 公开了非肽性整合抑制剂, 与 GP II b/III a 受体特异性结合。

Egbertson 等, 1992, 欧洲专利申请 0478328A1 公开了酪氨酸衍生物, 与 GP II b/III a 受体结合具有高亲合力。

5 Ojima 等, 1992, 204th Meeting, Amer.Chem.Soc.Abst.44 公开了抑制血小板聚集的合成性的多支链的 RDGF 肽。

Hartman 等, 1992, J.Med.Chem.35: 4640 - 4642 描述了酪氨酸衍生物, 与 GP II b/III a 受体结合具有高亲合力。

用来成像血栓的放射性标记的肽在现有技术中已见报导。

10 Stuttle, 1990, PCT/GB90/00933 公开了包含 3 ~ 10 个氨基酸的放射性标记的肽, 肽序列为精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸(RGD), 能够与体内 RGD 结合部位相结合。

Rodwell 等, 1991, PCT/US91/03116 公开了“分子识别单元”与“效应物区域结构”相结合的轭合物。

15 现有技术中, 放射性标记肽的螯合剂的使用以及用 Tc - 99m 来标记肽的方法在共同待批的美国专利申请 07/653,012、07/807,062、07/871,282、07/886,752、07/893,981、07/955,466、08/019,864、08/073,577、08/210,822、08/236,402 和 08/241,625 中公开了。另外, 现有技术中用闪烁照相成像肽来成像血栓的放射性标记肽在共同待批的美国专利申请
20 07/886,752、07/893,981 和 08/044,825 以及国际专利申请 PCT/US92/00757、PCT/US92/10716、PCT/US93/02320、PCT/US93/03687、PCT/US93/04794、PCT/US93/05372、PCT/US93/06029、PCT/US93/09387、PCT/US94/01894、PCT/US94/03878 和 PCT/US94/05895 中公开了。这些文献在此均引用作为参考。

25 被放射性标记物标记的分子要求体积小(以便增强血液和背景组织的清晰度)、是合成的(以便实施常规化生产, 并容易验收)、高亲合力、和特异性结合。这些分子用方便易得的放射性标记核素(优选 Tc - 99m)来进行标记从而对体内的血栓进行成像。为了满足技术上的需要, 本发明提供了一些合成性小分子化合物, 这些化合物可与活化的血小板 GP II b/III a 受体结合并且
30 被一些方便易得的放射性同位素标记, 该放射性同位素优选 Tc - 99m、¹¹¹In 和 ⁶⁸Ga。

发明概述

5 本发明提供了一些放射性标记的(优选 Tc - 99m、¹¹¹In 和 ⁶⁸Ga)合成性小分子化合物，与 GP IIb/IIIa 受体结合具有高亲合力，可作为闪烁照相成像剂对体内血栓进行无损伤成像。因此本发明提供了闪烁照相血栓成像剂，即放射性标记的试剂。具体而言，本发明提供了制备血栓成像剂的试剂，这种试剂用锝 - 99m(Tc - 99m)、¹¹¹In 和 ⁶⁸Ga 进行标记，其中优选用 Tc - 99m。本发明中每一试剂都包括一特异性结合物，包括肽但并不只限于肽，它与血小板糖蛋白 IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)受体结合具有高亲合力，而且与放射性标记的复合物共价结合。

10 我们已经发现，为达到最佳成像效果，该试剂必须能够与 GPIIb/IIIa 受体结合且具有足够高的亲合力以致能够抑制腺苷二磷酸(ADP)诱导的人体内血小板的聚集作用。用血小板聚集作用的标准测定法来测定(参见，下文实施例 3)，当试剂以不超过 1 μM 的浓度存在时，其抑制率可达 50%。

15 运用小分子化合物具有显著的商业效益。该化合物的分子量优选少于 1000 道尔顿。这种小分子化合物很容易生产。而且它们很可能不具有“致免疫性”，并且能够很快地从脉管系统中清除掉，这就使得血栓成像更快更好。相反，大的分子如抗体片段或其它生物合成的肽，其分子重量超过 10,000 道尔顿，生产成本高，而且很可能具有“致免疫性”以及从血液中清除掉的速度较慢，这样就不利于体内血栓的快速诊断。

20 本发明也提供了一些试剂，其中特异性结合物为线性或环状的肽，具有 4~100 个氨基酸的氨基酸序列，分子量不超过约 10,000 道尔顿。

25 另一方面，本发明提供了制备血栓成像剂用的试剂，它能够被放射性标记从而能够对哺乳动物体内的血栓进行成像。这种试剂含有一种特异性结合的化合物，它能够与血小板 GP IIb/IIIa 受体特异性结合，而且与 Tc - 99m 的复合部分共价结合，该部分的化学式为：

I

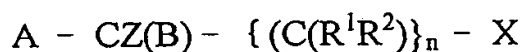


其中 C(pgp)^s 是被保护的半胱氨酸，(氨基酸)是任何不含巯羟基的初级 α - 或 β - 氨基酸。在优选的实施方案中，该氨基酸为甘氨酸。

30 另一个实施方案中，本发明提供了一种制备血栓成像剂的可被放射性标记的试剂，用来对哺乳动物体内的血栓进行成像。它包括一种特异性结合化

合物,它与血小板 GP(IIb/IIIa)受体特异性结合而且与 Tc - 99m 的复合部分(含一个单一的巯羟基)共价结合。其结构式:

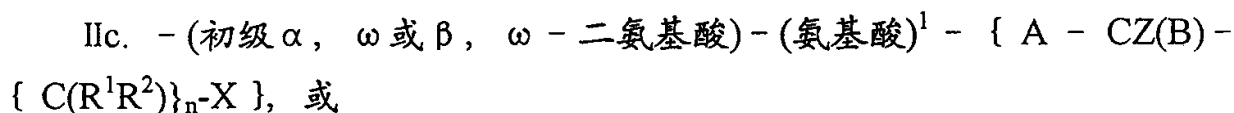
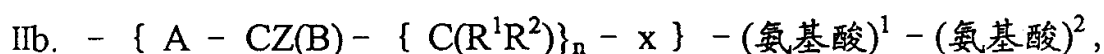
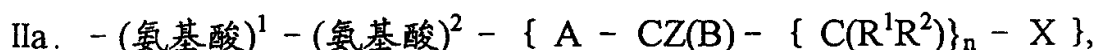
II



- 5 其中 A 为 H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 或 R⁴; B 为 H、SH 或 NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴; R¹、R²、R³ 和 R⁴ 各自为 H 或者直链、支链或环状的低级烷基; n 为 0、1 或 2; 其中(肽)为含有 2 ~ 10 个氨基酸的肽; 而且: (1)B 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)时, X 为 SH 和 n 为 1 或 2; (2)X 为 NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)时, B 为 SH 和 n 为 1 或 2; (3)B 为 H 或 R⁴ 时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC, X 为 SH 和 n 为 0 或 1; (4)A 为 H 或 R⁴ 时, 当 B 为 SH, 则 X 为 -NHR³、或 -N(R³)-(氨基酸或肽), 和当 X 为 SH 时则 B 为 NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽); (5)X 为 H 或 R⁴ 时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 和 B 为 SH; (6)Z 为甲基时, X 为甲基, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 和 B 为 SH 以及 n 为 0; (7)B 为 SH 和 X 为 SH 时, n 不为 0; 以及其中巯羟基部分为还原形式并其中氨基酸为任何不含巯羟基的初级 α - 或 β - 氨基酸。
- 10
- 15

在本发明这方面的一些具体实施方案中,放射性标记的复合物的通式

20 为:



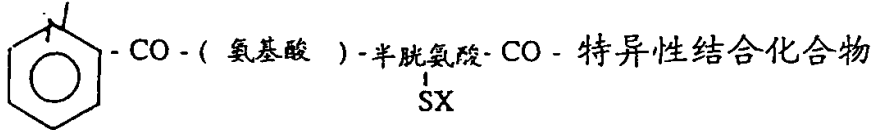
- 25 IIId. - \{A - CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n - X\} - (\text{氨基酸})^1 - (\text{初级 } \alpha, \beta - \text{或 } \beta, \gamma - \text{二氨基酸})

其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²各自为任何天然的、被修饰的、被取代的或被改变的不含巯羟基的 α - 或 β - 氨基酸; A 为 H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 或 R⁴; B 为 H、SH 或 NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴; Z 是 H 或 R⁴; X 为 SH 或 NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴; R¹、R²、R³ 和 R⁴ 各自为 H 或者直链、支链或环状的低级

30

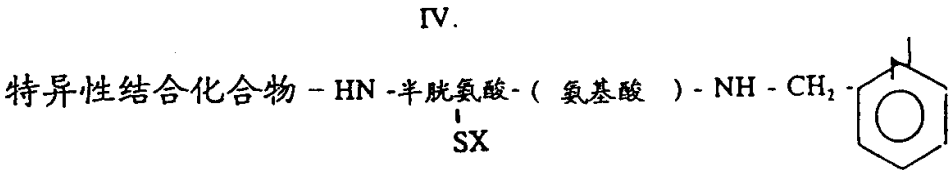
烷烃; n 为整数, 可为 0、1 或 2; (肽) 为含有 2 ~ 10 个氨基酸的肽; 而且:
 (1) B 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽) 时, X 为 SH 和 n 为 1 或 2; (2) X
 为 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽) 时, B 为 SH 和 n 为 1 或 2; (3) B 为 H
 或 R⁴ 时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-
 5 OOC 和 X 为 SH 以及 n 为 0 或 1; (4) A 为 H 或 R⁴ 时, 当 B 为 SH 则 X 为 -
 NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽) 以及当 X 为 SH 时则 B 为 -NHR³ 或 -N(R³)
 -(氨基酸或肽); (5) X 为 H 或 R⁴ 时, A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)
 -NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 和 B 为 SH; (6) Z 为 -CH₃ 时, X 为 -CH₃,
 10 A 为 HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC 和 B
 为 SH 以及 n 为 0; 以及(7) B 为 SH 时, X 为 SH 和 n 不为 0; 其中巯羟基都
 为还原态形式。

在另一个实施方案中, 本发明提供了一种制备血栓成像剂的可被放射性
 标记的试剂, 用来对哺乳动物体内的血栓进行成像。它包括一个特异性结合
 化合物, 与血小板 GP II b/III a 受体特异性结合而且与放射性标记的复合部
 15 分共价结合。其通式:



(出于本发明的目的, 放射性标记的结合部分的结构是指以吡啶甲酸(Pic)为基
 础的部分);

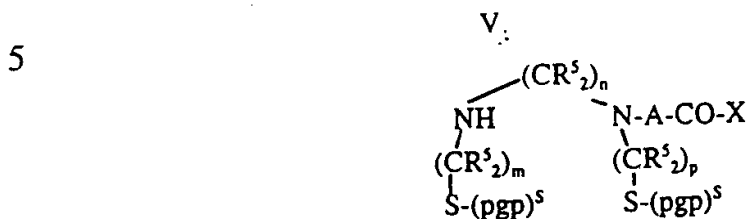
20



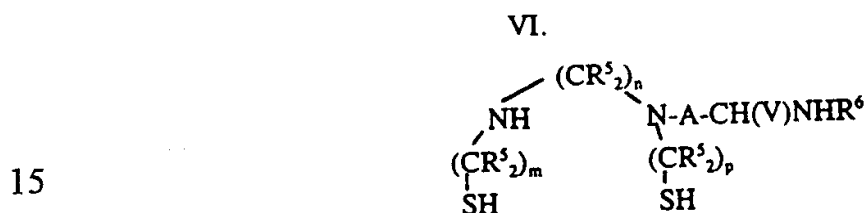
(出于本发明的目的, 放射性标记的结合部分的结构是指以吡啶甲胺(Pica)为
 基础的一些部分); 其中 X 为 H 或保护基; (氨基酸) 为不含巯羟基的初级 α -
 25 或 β - 氨基酸; 放射性标记的复合部分与特异性结合化合物共价结合, 而且
 这种放射性标记的复合部分与放射性标记物都是电中性的。在一个优选的实
 施方案中, 该氨基酸为甘氨酸, X 为乙酰氨基甲基保护基团。另一个优选的
 实施方案中, 特异性结合化合物通过一种氨基酸(最优选甘氨酸)与放射性标
 记的复合部分共价结合。

30 另一种实施方案中, 本发明提供了一种制备血栓成像剂的可被放射性标
 记的试剂, 用来对哺乳动物体内的血栓进行成像。它包括一个特异性结合化

合物，该化合物与血小板受体 GP IIb/IIIa 特异性结合，而且与一个双氨基双硫羟基的放射性标记的复合部分共价结合。本发明这一实施方案中的这种双氨基双硫羟基部分是选自以下这组通式的结构：



其中每个 R^5 分别为 H、 CH_3 或 C_2H_5 ；每个 $(\text{pgp})^s$ 分别为硫羟基保护基或 H；
 10 m 、 n 和 p 分别为 2 或 3；A 为直链或环状的低级烷基、芳基、杂环基、或者它们的组合或取代的衍生物；X 为特异性结合化合物。



其中每个 R^5 分别为 H、低级烷基(含 1 ~ 6 个碳)、苯基或者被低级烷基或烷
 氧基取代的苯基； m 、 n 和 p 分别为 1 或 2；A 为直链或环状的低级烷基、
 芳基、杂环基或者它们的组合或取代的衍生物；V 为 H 或 CO - (氨基酸或
 20 肽)； R^6 为 H、(氨基酸或肽)或特异性结合的化合物；条件为如果 V 为 H，
 则 R^6 为氨基酸或肽或特异性结合的化合物；如果 R^6 为 H，则 V 为氨基酸或
 肽或特异性结合的化合物，其中(氨基酸)是任何一个不含硫羟基的初级 α -
 或 β - 氨基酸。(出于本发明的目的，具有这些结构的放射性标记结合部分称
 25 为“BAT”部分)。在一个优选的实施方案中，特异性结合化合物可通过一
 个氨基酸(优选甘氨酸)与放射性标记的复合部分共价结合。

在上述提及的一些优选的实施方案中，特异性结合化合物为一个含有
 4 ~ 100 个氨基酸的肽。该放射性标记物最优选的实例为镓 - 99m。

本发明提供的一些试剂可以制备成其中特异性结合化合物或放射性标
 记的复合部分是与一个多价连接部分共价连接的形式。本发明中这种多价连
 30 接部分至少包括 2 个相同的连接官能团，能够与特异性结合化合物或标记的
 复合部分共价结合。优选的连接官能基团为一级或二级胺、羟基、羧酸基或

活泼的硫羟基。在优选的实施方案中，这些多价连接部分包括二琥珀酰亚胺基甲基醚(BSME)、4-(2,2-二甲基乙酰基)苯甲酸(DMAB)、三(琥珀酰亚胺基乙基)胺(TSEA)、三(乙酰氨基乙基)胺、二-(乙酰氨基乙基)醚、二-(乙酰氨基甲基)醚、N-{2-(N',N'-二(2-琥珀酰亚胺基乙基)氨基乙基)}-N⁶,N⁹-二(2-甲基-2-巯丙基)-6,9-二氮杂壬酰胺(BAT-BS)、α,ε-二乙酰基赖氨酸、赖氨酸和1,8-二-乙酰氨基-3,6-二氧杂辛烷。

在本发明的优选实施方案中，所述特异性结合肽是一个环肽，该环肽包含序列 - Amp - Gly - Asp - ；更优选的是，特异性结合肽包括下式的环肽结构域：



其中 A 是亲脂的 D-α-氨基酸，或 N-烷基-L-α-氨基酸或 L-脯氨酸；X 是含有能够带正电荷的侧链的 L-α-氨基酸；和 R 各自分别为 H、低级烷基或低级烷氧基烷基；进一步优选的是其中 A 是 D-酪氨酸或 D-苯丙氨酸，和 X 为 L-(S-(3-氨基丙基)半胱氨酸或 L-4-脒基苯丙氨酸。

15

本发明也包括闪烁照相成像剂，该成像剂是本发明的试剂与 Tc-99m、¹¹¹In 和 ⁶⁸Ga(优选 Tc-99m)的复合物。本发明也包括对本发明的该试剂进行放射性标记而得到这种闪烁照射成像剂的方法。本发明提供的用 Tc-99m 放射性标记的复合物可通过本发明提供的一些试剂和 Tc-99m 在还原剂存在下进行反应而形成。优选的还原剂包括(但不限于)连二亚硫酸根离子、二价锡离子和二价铁离子。本发明的复合物也可以通过本发明提供的一些试剂与一个预还原的 Tc-99m 复合物进行配体交换而形成。

20

本发明也提供了用于制备 Tc-99m 放射标记的闪烁照相成像剂的试剂盒。这些试剂盒包括一个密闭的管形瓶，瓶内放入预定量的本发明试剂和用 Tc-99m 对该试剂进行放射性标记的足够量的还原剂。

25

本发明提供了肽的体外化学合成法来制备本发明的肽试剂。在一个优选的实施方案中，肽是用固相肽合成法来合成的。

本发明提供了 Tc-99m 放射性标记的闪烁照相成像剂的使用方法，通过体内 γ-射线闪烁照相来对哺乳动物体内的血栓进行显影。这种方法包括服用有效剂量的 Tc-99m 标记的本发明试剂和监测 Tc-99m 标记物发射的 γ 射线从而确定哺乳动物体内的血栓部位。

30

下面将对某些优选的实施方案和权利要求进行较为详尽的描述，从中可使本发明中特别优选的实施方案得以充分体现。

附图的简要说明

5 图 1 说明了用本发明的 Tc-99m 放射标记的肽对病人大腿的深部静脉血栓进行闪烁照相成像的情况。

图 2 说明了用本发明的 Tc-99m 放射标记的肽对病人腓肠的深部静脉血栓进行闪烁照相成像的情况。

发明的详细描述

10 本发明提供了一些试剂，包括肽试剂，用来制备对哺乳动物体内血栓进行成像的放射性标记的血栓成像剂。这种试剂包括一个放射性标记的结合部分，其与特异性结合化合物共价结合。该特异性结合化合物能与血小板受体 GP IIb/IIIa 相结合，从而能够抑制血浆(含丰富的血小板)中的血小板的聚集。当试剂浓度不超过 $1 \mu\text{M}$ 时，抑制率达 50% 即 $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ 。出于本发明的目的，这种所谓血栓成像剂是指本发明的实施方案中包含的一种
 15 特异性结合化合物，该化合物是与放射性标记的复合部分共价结合并用放射性核素(优选 Tc-99m、 ^{111}In 和 ^{68}Ca ，最优选 Tc-99m)经过放射标记的。

20 我们以前已发现，为了获得最佳成像效果，本发明所公开的成像试剂必须能够与血小板受体 GP IIb/IIIa 受体相结合而且具有高亲和力，从而在标准测定法中(见实施例 3)当浓度达 $0.3 \mu\text{M}$ 时($\text{IC}_{50} < 0.3 \mu\text{M}$)抑制了腺苷二磷酸(ADP)诱导的血小板的聚集作用。本发明在美国专利申请 08/044,825 和国际专利申请 PCT/US94/03878 中公开了。这两者的公开文本在此均全面引用作参考。

我们现已发现，使用象本发明中所公开的 $\text{IC}_{50} \leq 1 \mu\text{M}$ 的放射性标记的闪烁照相成像剂能够得到高质量的体内闪烁照相成像图。

25 用 Tc-99m 标记是本发明的一个优点，因为这个同位素的核和放射活性，能使它制得理想的闪烁照相成像剂。这个同位素具有 140Kev 的单光子能和 6 γ 时的半衰期，而且很容易通过 $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ 发生器来制得。本发明的另一个优点是，优选的放射性核素(Tc-99m、Ga-67、In-111)与现有技术中已知的其它核素(^{125}I)相比都是无毒的。

30 本发明提出的 Tc-99m 复合部分和与这些部分共价结合的化合物包含一个与硫羟保护基 $\{(\text{pgp})^s\}$ 共价结合的硫羟基。这些硫羟保护基可以是相

同的或不相同，并且可以(但不限于)下列这些：

- CH₂-芳基(芳基是苯基或者烷基或烷氧基取代的苯基)；
- CH-(芳基)₂，(芳基是苯基或者烷基或烷氧基取代的苯基)；
- C-(芳基)₃，(芳基是苯基或者烷基或烷氧基取代的苯基)；

- 5
- CH₂-(4-甲氧基苯基)；
 - CH-(4-吡啶基)(苯基)₂；
 - C(CH₃)₃；

-9-苯基苄基

-CH₂NHCOR(R是不取代的或取代的烷基或芳基)；

- 10
- CH₂-NHCOOR(R是非取代的或取代的烷基或芳基)；

-CONHR(R是非取代的或取代的烷基或芳基)；

-CH₂-S-CH₂-苯基

优选的保护基为-CH₂-NHCOR，其中R是含1~8个碳原子的低级烷基、苯基或者低级烷基、羟基、低级烷氧基、羧基或低级烷氧基羰基取代的苯基。最优的保护基为乙酰胺基甲基。

15

本发明每个特异性结合肽的实施方案含有一个氨基酸序列。本发明中所称的氨基酸倾向于包括所有的L-和D-、初级α-或β-氨基酸，天然的和非天然的。本发明提供的特异性结合肽其氨基酸序列如下所示但并不只限于此(下面肽中除了另外注明之外氨基酸均为L-氨基酸)

20 CH₂CO.Y_DApc.GDC GGG

CH₂CO.Y_DApc.GDC KG

CH₂CO.Y_DApc.GDC GG

CH₂CO.Y_DApc.GDC

CH₂CO.Y_DApc.GDC K

25 CH₂CO.Y_DAmp.GDC

CH₂CO.Y_DAmp.GDC K

和O-(4-哌啶基)丁基酪氨酸。

本发明中特异性结合肽可以体外化学合成。而且在肽合成器上一般可以很方便地制得。在体外化学合成过程中，利用本领域技术人员已知的技术能合成本发明的肽，其中放射性标记的结合部分与肽共价结合。特异共价结合位点能确定，这是在合成过程中与特异性结合部分共价结合的这种

30

肽的优点。

在肽的合成期间，本发明的放射性标记的结合部分可引入到特异性靶肽上。包含吡啶甲酸的 $\{(Pic-), \text{如 } Pic-Gly-Cys(\text{保护基})-\}$ 的放射性标记复合部分可以通过作为在该合成中的最后一个残基(即氨基端)而合成出来。另外，包含吡啶甲酸的放射性标记的结合部分可以与赖氨酸的 ϵ -氨基共价结合而得到。例如， $\alpha N(\text{Fmoc})-Lys-\epsilon N \{Pic-Gly-Cys(\text{保护基})\}$ ，它可位于肽链的任何部位。这一序列的优点是提供了一个容易结合到靶肽中的模式。

同样，包含吡啶甲胺(Pica)的放射性标记的结合部分 $\{-Cys(\text{保护基})-Gly-Pica\}$ ，在肽合成期间，可以通过包含 $\{-Cys(\text{保护基})-Gly-\}$ 序列的肽链羧基端而合成出来。当肽从该树脂上解离后，该羧基端被活化了可与吡啶甲胺偶联。这种合成路线要求活性的侧链功能基必须被保护从而在连接吡啶甲胺时不参于反应。

下面实例中提供了包含 $Pic-Gly-Cys$ 和 $-Cys-Gly-Pica$ 螯合剂的小分子合成肽的例子。本发明指出，事实上这些螯合物可以和任何能够与体内血栓特异性结合的肽相结合，结果产生了 $Tc-99m$ 放射性标记的肽，为中性复合物。

本发明也提供了一些与 $Tc-99m$ 标记的双胺双硫羟螯合剂(BAT)相结合的特异性结合的小分子合成肽。本发明指出，这些螯合剂可以与任何能够与体内血栓特异性结合的肽相结合，结果产生了一种 $Tc-99m$ 放射性标记的肽，为中性复合物。在下面实施例中提到了包含 BAT 螯合剂作为放射性标记部分的合成性小分子肽的例子。

在形成本发明试剂的钨复合物过程中，该钨复合物(优选高钨酸盐)是在还原剂存在下与该试剂进行反应。优选的还原剂为连二亚硫酸根离子、亚锡离子和亚铁离子；最优选还原剂为氯化亚锡。合成这种复合物的方法是用一个试剂盒，它含一个密闭的管形瓶，瓶内装有预定量的要被标记的本发明试剂和足够量的还原剂，用 $Tc-99m$ 对该试剂进行标记。另外，这种复合物也可以通过本发明的试剂与预先形成的钨复合物以及已知作为转移配体的另一化合物一起进行反应而制得。这种过程就是配体交换过程，在现有技术中是已知的。这种标记的复合物可以通过使用转移配体(如酒石酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐或甘露糖醇)来形成。本发明中有用的 $Tc-99m$

高得酸盐包括一些碱性金属盐如钠盐、胺盐或低级烷基胺盐。

在优选的实施方案中，提供了制备得标记的试剂的试剂盒。将适量试剂置入管形瓶里，瓶中含足够量的还原剂(如氯化亚锡)以使用 Tc-99m 对该试剂进行标记；还包括适量的上述转移配体(如酒石酸盐、柠檬酸盐、葡
5 糖酸盐或甘露糖醇)；以及一些传统的药用佐剂；如调节渗透压的药用盐、缓冲剂和防腐剂等类似物。该试剂盒中的组分可以为液体状态、冷冻状态或干燥状态。在优选的实施方案中，试剂盒的这些组分为冷冻干燥的形式。

本发明的放射性标记的血栓成像试剂在下边实例 4 所描述的那样，可以这样合成出来：在一个管形瓶里加入适量 Tc-99m 和 Tc-99m 复合物，
10 然后在合适的反应条件下进行反应。

本发明提供的放射性标记的闪烁照相成像剂具有合适量的放射性。在形成 Tc-99m 放射性复合物时，溶液的放射活性浓度一般优选在
0.01mCi/mL~100mCi/mL 之间。

本发明提供的血栓成像剂在被 Tc-99m 标记之后可用来对哺乳动物体内的血栓进行成像。根据本发明，Tc-99m 标记的试剂的给药量为注射一个单位剂量。本发明中提供的 Tc-99m 标记的试剂可以通过任何一种传统的静脉注射介质(如盐水或血浆)来进行静脉注射。一般来说，给药的单位剂量的放射活性约 0.01mCi~约 100mCi，优选的放射活性范围为 1mCi~
15 20mCi。每单位剂量注射的溶液约 0.01mL~10mL。静脉注射给药后几分钟便能进行体内血栓成像。不过，如果需要的话，在放射性标记的肽试剂被注入病人体内之后可在 1 小时或更长时间之后进行血栓成像。在大多数情况下，将所注射的足够剂量的药在特定区域累积起来，然后在约 0.1 小时内成像并拍摄一些闪烁照相图片。根据本发明，为了诊断的目的，任何传统的闪烁照相成像的方法都可以使用。

25 相关领域的技术人员也认识到，血栓通常在动脉硬化斑块中出现；整合受体(可与本发明中的闪烁照相试剂相结合)可在某些肿瘤中出现；另外，这种整合受体在感染部位，与伴随或刺激白细胞定位的细胞粘连过程有关。由此认识到，闪烁照相成像剂作为一种成像剂还具备另一个用途，即用来成像 GP IIb/IIIa 受体的表达部位，包括动脉硬化斑块、肿瘤和感染部位。

30 在下述的实例中将更全面地说明制备和标记这些复合物的方法。这些实例对上述方法及其有用结果的某些方面进行了说明。这些实施例是举例

而不是对本发明进行限制。

实施例 1

固相肽合成法

固相肽合成(SPPS)的合成量为 0.25 毫摩尔(mmol)，合成仪为“应用性
5 生物系统模型 431A 肽合成仪”，用 9-芴基甲氧基羰酰基(Fmoc)进行氨基
-端保护，与双环己基碳化二酰亚胺/羟基苯并三唑或 2-(1H-苯并三唑-
1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脲六氟磷酸酯/羟基苯并三唑(HBTU/HOBT)进
行偶联，然后加入邻-羟基甲基苯氧基甲基聚苯乙烯(HMP)树脂与 C-端羧
10 酸结合，或用 Rink 酰胺树脂与 C-端酰胺结合。连接树脂的产物用一种溶
液将其脱开，该溶液组成为三氟乙酸或 50/50 三氟乙酸/二氯甲烷，含或不
含水、苯硫基甲烷、乙二硫醇、和三乙基硅烷，它们的比例为 100/5/5/2.5/2，
室温下进行，时间为 1.5~3 小时。

条件合适的话，在 N-端引入乙酰基。其方法是用 20% v/v 乙酸酐在
NMP(N-甲基吡咯烷酮)中对结合在树脂上的肽的 N-端游离的氨
15 基进行处理，时间为 30 分钟。在 SPPS 过程中制备支链肽涉及到从赖氨酸
的 α -和 ϵ -氨基(N_{α} (Fmoc) N_{ϵ} (Fmoc)-赖氨酸)开始的肽链合成。条件合适
的话，可引入 2-氯乙酰基和 2-溴乙酰基，在 SPPS 合成过程中，使用合
适的 2-卤代乙酸作为最后一个残基被偶联上；或对结合在树脂上的 N 端
游离氨基用 2-卤代乙酸/二异丙基碳化二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺或 2-卤
20 代乙酸酐/二异丙基乙基胺在 NMP 中进行处理。条件合适的话，对 HPLC
纯化的 2-卤代乙酰化的肽进行环化反应。溶液浓度为 0.1~1.0mg/mL，pH
= 8，含或不含磷酸盐、碳酸氢盐或 0.5~1.0mM 的 EDTA，搅拌 0.5~48 小
时，然后用乙酸酸化，冷冻干燥和 HPLC 纯化。条件合适的话，Cys-Cys
二硫键进行环合。用等分的 0.006M $K_3Fe(CN)_6$ 溶液对前体半胱氨酸游离的
25 巯基肽进行处理，直至有稳定的黄色沉淀析出来。溶液浓度为 0.1mg/mL，
缓冲体系 pH = 7。过量的氧化剂用过量的半胱氨酸进行还原处理，所得混
合物进行冷冻干燥和 HPLC 纯化。

条件合适的话，将肽上的巯基乙酰化衍生成硫醚。其方法是：用含
单一巯基的肽，在浓度为 2~50mg/mL、溶剂为水/乙腈或 THF 或 DMF，pH
30 = 10 条件下，与适量(例如 0.5mol 当量制备二聚物，0.33mol 当量制备三聚
物)的氯乙酰基多价连接物进行反应，时间为 0.5~24 小时。然后用乙酸进

行中和，蒸干，而且如果需要的话，用 10mL TFA 和 0.2mL 三乙基硅烷净化剂进行脱保护，时间为 30~90 分钟。溶液浓缩后用乙醚重结晶，所得产品用制备型 HPLC 纯化。

条件合适的话，制备 BSME 加成物。方法是：用含单一巯基的肽(在 50mM 5 磷酸钠缓冲液中的 5~50mg/mL 浓度，pH7~8)与在乙腈中预溶解的 0.5mol 当量的 BMME(双-马来酰亚胺甲基醚)在室温下进行 1~18 小时反应。然后将溶液浓缩并用 HPLC 纯化产品。

条件合适的话，制备 TSEA 加成物。用含单一巯基的肽(在 DMF 中的浓度为 10~100mg/mL 或在 50mM 的磷酸钠(pH8/乙腈或 THF 中的浓度为 5~ 10 50mg/mL)，与在乙腈或 DMF 中预溶解的 0.33mol 等当量的 THFA(三(2-马来酰亚胺基)胺；如美国专利 08/044,825 所公开的那样，参考文献中引用)进行反应，加或不加 1mol 等当量的三乙醇胺，室温搅拌约 1~18 小时，所得的包含加成物的反应混合物进行浓缩然后用 HPLC 进行纯化。

条件合适的话，制备 BAT-BS 加合物。用含单一巯基的肽(在 50mM 15 磷酸钠(pH8)/乙腈或 THF 中的浓度为 2~50mg/mL)和在乙腈或 THF 中预溶解的 0.5mol 等当量的 BAT-BM(N- {2-(N',N'-二(2-马来酰亚胺基-乙基)氨基乙基)} -N⁹-(叔-丁氧基羰基)-N⁶,N⁹-二(2-甲基-2-三苯基甲基巯基丙基)-6,9-二氮壬烷酰胺；如美国专利 08/044,825 所公开的那样，参考文献中引用)进行反应，室温搅拌约 1~18 小时，溶液蒸干，用 10mL 20 TFA 和 0.2mL 三乙基硅烷对(BAT-BS)-肽衍合物进行 1 小时脱保护处理，溶液浓缩，产品用乙醚重结晶，然后用 HPLC 纯化。

肽的粗产品用制备型高效液相色谱(HPLC)进行纯化。使用的柱子为一个 Waters Delta Pak C18 的柱子，用 0.1% 三氟乙酸水溶液(用乙腈进行极性改变)进行梯度洗脱。洗脱液蒸去乙腈，然后冷冻干燥。每一个产品用快原 25 子轰击质谱(FABMS)和电子散射质谱(ESMS)进行鉴定。

实施例 2

用 Tc-99m 标记的一般方法

在实施例 2 中，0.1mg 肽试剂样品溶于 0.1mL 水中或 50mM 的磷酸钾缓冲液或 0.1M 的碳酸氢钠缓冲液或 10% 羟基丙基环糊精(HPLD)中。每一种缓冲液 pH 值为 5~10。组建一个 Glucoscan 管形瓶(E.I. Dupont de 30 Nemours, Inc., Wilmington, DE)来制备 Tc-99m 葡糖酸盐。其方法是：

管形瓶内加入 1.0mL Tc-99m 高锝酸钠(放射活性达 200mCi)，然后室温静置 15 分钟。25 μ L 的 Tc-99m 葡糖酸盐加入到肽试剂中，反应温度为室温或 100 $^{\circ}$ C，时间为 5~30 分钟，然后用 0.2 μ m 滤器进行过滤。

Tc-99m 标记的肽的纯度由 HPLC 的使用条件决定。其使用条件：一个 Waters Deltapure RP-18, 5 μ m, 150mm \times 1.9mm 的分析柱，装载每一个放射性标记的肽；洗脱时溶剂流动速度为 1mL/min；进行梯度洗脱，溶剂从 10% 溶剂 A(0.1% CF₃COOH/H₂O)到 40% 溶剂 B₉₀(0.1% CF₃COOH/90% CH₃CN/H₂O)整个洗脱时间为 20 分钟。

Tc-99m 标记的肽的纯度由 HPLC 的使用条件(见表 1 附注)决定。放射性组分通过连有积分记录仪的联机放射性检测器进行检测。在这些条件下，Tc-99m 葡糖酸盐和 Tc-99m 高锝酸盐在 1~4 分钟之间被洗脱下来，而放射性标记的肽被洗脱下来的时间长得多。

下表介绍了根据实施例 1 所描述的方法来制备 Tc-99m 标记肽的一些成功的例子。

表 1

肽	FABMS		放射化学试剂 产率 (%)	HPLC R _T (min)
	MH ⁺			
<u>CH₂CO.Y_D.RGDCC_{AcM}.GC_{AcM}</u> 酰肽	1057		97 ²	10.0, 10.4, 10.6 ²
<u>CH₂CO.Y_D.RGDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}</u> 酰肽	1171		99 ²	13.5 ²
<u>CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGGC_{AcM}.GC_{AcM}</u> 酰肽	1233		100 ⁴	17.1, 18.1 ²
GRGDVRGDFKC _{AcM} .GC _{AcM} 酰肽	1510		97 ²	16.2, 16.8 ²
GRGDVRGDFC _{AcM} .GC _{AcM} 酰肽	1382		94 ²	16.4 ²
<u>CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGF_D.PRPG.NH₂</u>	1845		90 ⁴	16.6, 16.9 ²
<u>(CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₂</u> -BSME	3020 ⁴		98 ⁴	9.3 ²
<u>(CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₃</u> -TSEA	4596		99 ⁴	9.2, 11.6 ⁵
<u>(CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₂</u> -(BAT-BS)	3409 ⁴		98 ²	10.3 ⁵
C _{AcM} .GC _{AcM} .RRRRRRRRGDV	2100		100 ²	2.4 ^{3***}
<u>(CH₂CO.Y_D.APC.GDCCKGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₂</u> -BSME	3163 ⁴		98 ⁴	9.6 ⁵
<u>(CH₂CO.Y_D.Amp.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₂</u> -(CH ₂ CO) ₂ K(Nε-K)GC 酰肽	3357 ⁴		99 ⁴	4.6 ⁶
<u>(CH₂CO.Y_D.Amp.GDCCKGGC_{AcM}.GC_{AcM}.K(Nε-K)GC.酰肽)</u>	2573 ⁴		99 ⁴	4.8 ⁶
<u>(CH₂CO.Y_D.APC.GDCGGC_{AcM}.GC_{AcM}.GGC.酰肽)₂</u> -(CH ₂ CO) ₂ -K(Nε-K)GC 酰肽	3298 ⁴		96 ³	12.0 ⁴

* 角标是指如下一些标记条件:

- 1、将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液(pH7.4)中并在室温下标记。
- 2、将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液(pH7.4)中并在 100 °C 下标记。
- 3、将肽溶解在水中并在室温下标记。
- 4、将肽溶解在水中并在 100 °C 下标记。
- 5、将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液(pH6.0)中并在 100 °C 下标记。
- 6、将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液(pH5.0)中并在室温下标记。
- 7、将肽溶解在 50:50 的乙醇/水的混合液中并在 100 °C 下标记。
- 8、将肽溶解在 0.9 % 的氯化钠溶液中并在室温下标记。

10

** HPLC 方法:

一般方法: 溶剂 A = 0.1 % CF₃COOH/H₂O
溶剂 B₇₀ = 0.1 % CF₃COOH/70 % CH₃CN/H₂O
溶剂 B₉₀ = 0.1 % CF₃COOH/90 % CH₃CN/H₂O

溶剂流速 = 1 毫升/分钟

15

Vydak 柱 = 带有防护柱的 Vydak218TP54RP - 18,5 微米, 220 毫米 × 4.6 毫米分析柱

Brownlee 柱 = Brownlee Seri - 5 RP - 18, 5 微米, 220 毫米 × 4.6 毫米分析柱

Waters 柱 = Waters Delta - Pak C18,5 微米, 150 毫米 × 39 毫米分析柱

Waters 2 柱 = Waters Nova - Pak C18,5 微米, 100 毫米 × 8 毫米径向压缩柱

方法 1: Brownlee 柱 100 % A 至 100 % B₇₀, 10 分钟

20

方法 2: Vydak 柱 100 % A 至 100 % B₉₀, 10 分钟

方法 3: Vydak 柱 100 % A 至 100 % B₇₀, 10 分钟

方法 4: Waters 柱 100 % A 至 100 % B₉₀, 10 分钟

方法 5: Waters 柱 100 % A 至 100 % B₉₀, 10 分钟

方法 6: Waters 2 柱 100 % A 至 100 % B₉₀, 10 分钟

25

*** 用十二烷基磺酸钠聚乙酰胺凝胶电泳分析法进行鉴定

氨基酸单字母缩写见 G.Zubay, Biochemistry(2d.ed.), 1988(MacMillen Publishing; New York)P.33; 划线表明在被连结的取代氨基酸之间的硫羟键的形成, 肽通过每一个肽中的未保护的半胱氨酸残基的游离巯基与 BSH、ETAC、BSME、TSEA、(BAT - BS)或包含(CH₂CO)- 的连接物相结合; AC = 乙酰基; BZ = 苯甲酰基; Pic = 甲代吡啶基(吡啶 - 2 - 羧基); AcM = 乙酰氨基甲基; Mob = 4 - 甲氧基苄基; Apc = L - (S - (3 - 氨基丙基)半胱氨酸); Hly = 高赖氨酸; F_D = D - 苯基丙氨酸; Y_D = D - 酪氨酸; ma = 2 - 巯基乙酸; mmp = 2 - 巯基 - 2 - 甲基丙酸; BAT



= N⁶,N⁹ - 二(2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 6,9 - 二氮壬酸; ETAC = 4 - (O - CH₂CO - Gly - Gly - Cys。酰胺基)乙酰苯基丙酮; BAT - BS = N - { 2 - N', N' - 二(2 - 琥珀酰亚胺基乙基)氨基乙基} - N⁵,N⁹ - 二(2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 6,9 - 二氮壬杂酰胺; BSME = 二 - 琥珀酰亚胺基甲基醚; TSEA = 三 - (2 - 琥珀酰亚胺基乙基)胺; NES = N - 乙基琥珀酰亚胺; BSH = 1,6 - 二 - 琥珀酰亚胺基己烷; Amp = 4 - 脒基苯基丙氨酸。

a = 由电子散射质谱(ESMS)进行鉴定。

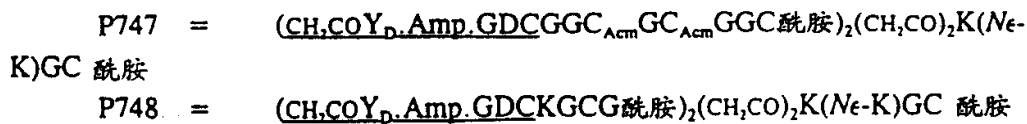
实施例 3

血小板聚集抑制试验

血小板聚集作用的研究基本上是按照 Zucker(1989, Methods in Enzymol. 169: 117 - 133)所描述的方法开展的。大体上, 血小板凝集抑制试验是用人的新鲜血小板富集的血浆(含 300,000 血小板/毫升)加入或不加入一般公认的抑制血小板凝集的化合物进行的。加入二磷酸腺苷溶液(直至最终浓度为 10 ~ 15mmol)可诱导血小板凝集作用, 可由 Bio/Data 凝集仪(Bio/Data Corp., Horsham, PA)检测控制。血小板聚集作用抑制剂的浓度范围从 0.1 ~ 500µg/mL。血小板凝集作用降低 50 % 时所需的抑制剂浓度(定义为 IC₅₀)可在“抑制剂的浓度 - 血小板凝集程度”曲线图上测出。RGDS 多肽的抑制曲线可通过每一批血小板试验绘出。

这些实验结果列于表 II。在表 II 中, 试验的化合物如下(RGDS 为阳性对照):

20	P47 = AcSYGRGDVRGDFKC _{Acm} GC _{Acm}
	P97 = GRGDVRGDFKC _{Acm} GC _{Acm} 酰胺
	P32 = C _{Acm} GC _{Acm} RRRRRRRRRGDV
	P143 = CH ₂ CO-Y _D RGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} 酰胺
	P245 = CH ₂ CO-Y _D ApcGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGF _D PRPG 酰胺
	P63 = AcSYGRGDVRGDFKCTCCA
25	P98 = GRDGVRGDFC _{Acm} GC _{Acm} 酰胺
	P81 = CH ₂ CO-Y _D RGDCC _{Acm} GC _{Acm} 酰胺
	P154 = CH ₂ CO-Y _D ApcGDCGGGC _{Acm} GC _{Acm} 酰胺
	P381 = (CH ₂ CO-Y _D ApcGDCCKGC _{Acm} GC _{Acm} GGC-酰胺) ₂ -BSME
	P317 = (CH ₂ CO-Y _D ApcGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGC-酰胺) ₂ -TSEA
	P246 = CH ₂ CO-Y _D ApcGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGC-酰胺
	P357 = (CH ₂ CO-Y _D ApcGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGC-酰胺) ₂ -(BAT-BS)
30	P667 = (CH ₂ COY _D ApcGDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGC酰胺) ₂ (CH ₂ CO) ₂ K(Nε-K)GC 酰胺



(氨基酸的单字母缩写见 G.Zubay, Biochemistry (2d,ed.), 1988(MacMillen Publishing; New York)P.33;

- 5 AC = 乙酰基; Acm = 乙酰氨基甲基; Apc = L - (S - (3 - 氨基丙基)半胱氨酸; Y_D = D - 酪氨酸;
BSME = 双 - 琥珀酰亚胺基甲基醚; TSEA = 三 - (琥珀酰亚胺基乙基)胺; (BAT - BS) = N - { 2
- (N',N' - 二(2 - 琥珀酰亚胺基乙基)氨基乙基) - N⁶,N⁹ - 二(2 - 甲基 - 2 - 巯基丙基) - 6,9 - 二氮
杂壬酰胺; 多肽通过每一个肽中的未保护半胱氨酸残基的游离巯基与 BSME、TSEA、(BAT - BS)
10 或者包含(CH₂CO) - 的连接物相结合。(…)₂K 代表括弧部分与赖氨酸的每个氨基(即 α - 氨基和侧链氨
基)之间的共价结合。(N_ε - K)代表赖氨酸残基的 ε - 氨基上而不是通常所指的 α - 氨基上的共价结
合。

表 II

肽	IC ₅₀ (μM)**	血块/血 *
P357	0.079	6.3 ± 3.4 ⁵
P667	0.081	5.9,5.0 ²
P682	0.130	4.0 ¹
P317	0.036	3.8 ± 2.2 ³
P381	0.035	2.5
P154	0.30	2.0 ± 0.5 ³
P246	0.85	4.4 ± 1.8
P143	1.3	1.4
P97	8	1.0
P98	15	1.7
P63	19	1.7
P47	23	1.0
P81	25	1.8 ± 0.6 ³
P32	26	1.2 ± 0.2 ⁴

¹n = 1; ²n = 2; ³n = 3; ⁴n = 4; ⁵n = 9

* 对 DVT 犬模型注射每一种 Tc - 99m 标记的试剂, 约 4 小时后的(股静脉血栓中的注射剂量的百分数%)/(血液中注射剂剂量的百分数%)的比例。

** 在腺苷二磷酸(ADP)诱导下, 人的血浆(富含血小板)中血小板的聚集作用降低 50 % 时的试剂浓度。

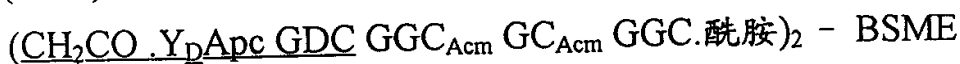
这些结果表明: 作为闪烁照相成像剂, IC₅₀ ≤ 约 1 μ M 的化合物比 IC₅₀

约大于 $1 \mu M$ 的化合物更有效。

实施例 4

体内深部静脉血栓闪烁照相成像

已开展的一系列实验包括了对本发明中的闪烁照相成像剂中一个具体实例(P280)进行试验性的临床研究。P280 化学结构:



这些实验进行时选用了 9 个病人(男 6 人, 女 3 人), 年龄 30 ~ 60 岁, 体重 63 ~ 100Kg。每一个病人都呈现深度静脉血栓的临床病症, 而且经过体检, 超声波检查和/或与之相对照的静脉造影术的诊断确证。

10 供研究的每一个病人, 均给以静脉注射时约含 0.25mg 多肽的 $10 - 20\text{mCi}$ Tc - 99m 标记的 P280。4 小时后, 用一个装有高分辨的准直管的广角 γ 照相机进行闪烁照相显影。 γ 照相显影在注射的同时便开始进行。注射后 1 小时, 2 小时和 4 小时, 先后获得一些显影图片。

15 这些研究的结果在图 1 和图 2 中给以显示了。图 1 显示了大腿下部血管中的血栓部位, 图 2 显示了小腿血管中的血栓的部位。在每一个图中, 血栓定位部位用一个箭头标示出来了。除了迅速有效地显示深部静脉血栓的部位外。这些闪烁照相成像剂还可以迅速地从血液中清除掉, 从而使得血循环中的残留剂量约低于 10 % 的注射剂量。与动物研究相一致的是, 至少有 60 - 70 % 的注射剂量被肾脏清除掉了。血栓成像在注射后 15 ~ 30 分钟就已很明显, 并在注射后 4 ~ 24 小时仍保持一定的可见度。与深部静脉血栓临床诊断密切相关的血栓造影术在上述提及的传统临床诊断方法基础上做出, 供研究的 9 个病人中 8 个病人的血栓显影效果很好。那个未能被显影的病人其血栓临床表现期较长(42 天), 这种血栓很可能已静止, 从而使得血小板在其表面不能再周转。最后, 在这些病人中均未发现 Tc - 99m 标记的 P280 有毒性或
25 其它不良反应。

这些结果表明, 本发明中的这种闪烁照相成像剂代表了一种用于人体内深部静脉血栓显影的安全而有效的诊断试剂。

应该指出的是, 前面所陈述的重点在于本发明中某些特定的具体实施方案; 另外, 所有被改进的或改换的类似物均属本发明范围之内, 如下边所附
30 的权利要求中所陈述的那样。

说明书附图

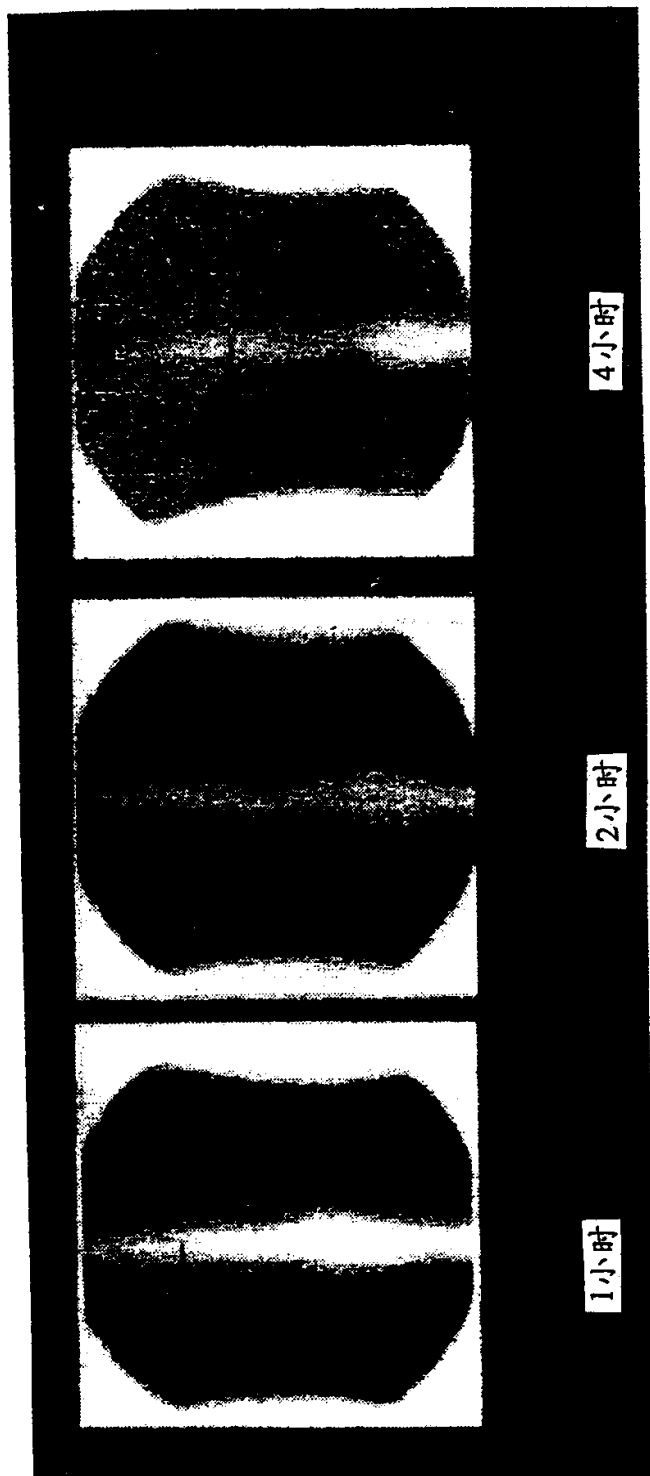


图1

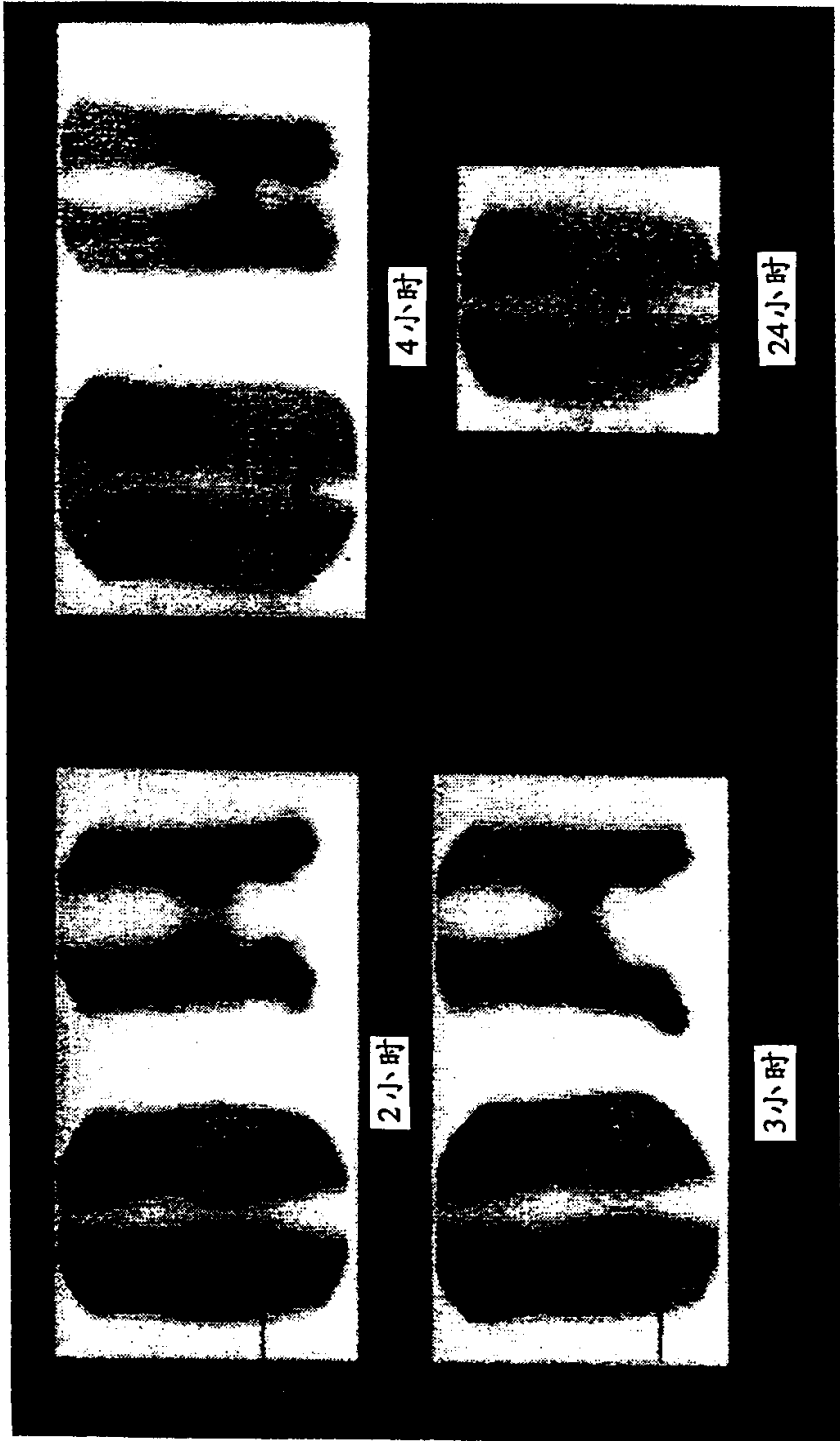


图 2