



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107207379 B

(45) 授权公告日 2021.08.10

(21) 申请号 201580073777.3  
 (22) 申请日 2015.11.24  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107207379 A  
 (43) 申请公布日 2017.09.26  
 (30) 优先权数据  
 62/084,366 2014.11.25 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.07.18  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2015/062502 2015.11.24  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02016/086036 EN 2016.06.02  
 (73) 专利权人 百时美施贵宝公司  
 地址 美国新泽西州  
 (72) 发明人 D·唐纳利  
 (74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
 代理人 封新琴  
 (51) Int.Cl.  
 C07B 59/00 (2006.01)  
 C07D 213/65 (2006.01)  
 A61K 51/04 (2006.01)  
 A61K 51/08 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 A61P 35/02 (2006.01)  
 A61P 37/02 (2006.01)  
 A61P 25/28 (2006.01)  
 A61P 9/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(56) 对比文件

B. Kuhnast et al. "PEG-[18F]Fpyzide and PEG-[18F]Fpykyne, two new fluoropyridine-based reagents for the fluorine-18 labeling of macromolecules using click chemistry".《Journal of labeled compounds and radiopharmaceuticals》.2009,第S184页.

B. Kuhnast et al. "PEG-[18F]Fpyzide and PEG-[18F]Fpykyne, two new fluoropyridine-based reagents for the fluorine-18 labeling of macromolecules using click chemistry".《Journal of labeled compounds and radiopharmaceuticals》.2009,第S184页.

Lachlan S et al. "Strain-Promoted Copper-Free "Click" Chemistry for 18F Radiolabeling of Bombesin".《Angewandte Chemie International Edition》.2011,第50卷(第47期),第11117-11120页.

Kalme Sachin et al. ("F-18 Labeling Protocol of Peptides Based on Chemically Orthogonal Strain-Promoted Cycloaddition under Physiologically Friendly Reaction Conditions".《Bioconjugate Chemistry》.2012,第23卷(第8期),第1680-1686页.

审查员 项睿

权利要求书5页 说明书43页  
 序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

用于生物制品的<sup>18</sup>F-放射性标记的方法和组合物

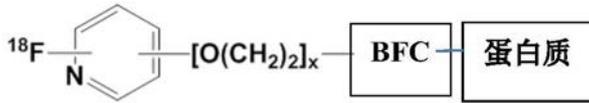
(57) 摘要

本发明涉及水溶性<sup>18</sup>F-辅基,并公开了含有所述<sup>18</sup>F-辅基的<sup>18</sup>F-标记的生物分子的合成以及用于对体内各种过程成像、用于检测与疾病病理

学相关的分子定位和用于监测疾病进展的用途。

CN 107207379 B

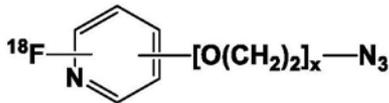
1.  $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其包含具有以下结构的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基、双官能缀合(BFC)部分和蛋白质,或其药用盐:



其中

(a)  $^{18}\text{F}$ 在N原子邻位,且x是1-8的整数,

(b) 所述BFC是与所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基共价结合的双官能缀合部分,其中共价键由具有下述结构的叠氮化物与BFC上的环辛炔基团之间的1,3-偶极环加成形成:

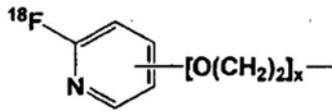


其中 $^{18}\text{F}$ 在N原子邻位,且x是1-8的整数;

(c) 所述BFC包含环辛炔基团和聚乙二醇(PEG)<sub>y</sub>间隔基臂,其中y是1-8的整数,且其中所述(PEG)<sub>y</sub>间隔基臂包含与所述蛋白质上的胺、羧基、羰基或巯基基团共价结合的化学基团;和

(d) 所述蛋白质为抗体、抗体片段或基于纤连蛋白的支架。

2. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基具有以下结构:

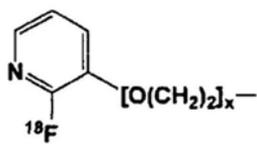


3. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部分存在于吡啶环上的3位。

4. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部分存在于吡啶环上的2位。

5. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中 $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部分存在于吡啶环上的4位。

6. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基具有以下结构:

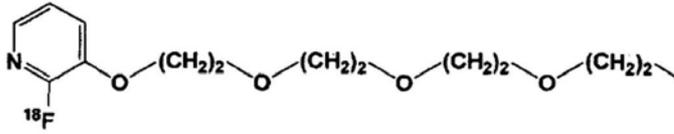


7. 权利要求1-6中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中x是2-6的整数。

8. 权利要求7的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中x是3-5的整数。

9. 权利要求7的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中x是4。

10. 权利要求1的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基具有以下结构:



11. 权利要求1-6和10中任一项所述的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中BFC包含基于二苯并环辛炔的试剂,且<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基与BFC之间的共价键是由所述叠氮化物与所述BFC上的所述环辛炔基团之间的1,3-偶极环加成形成的。

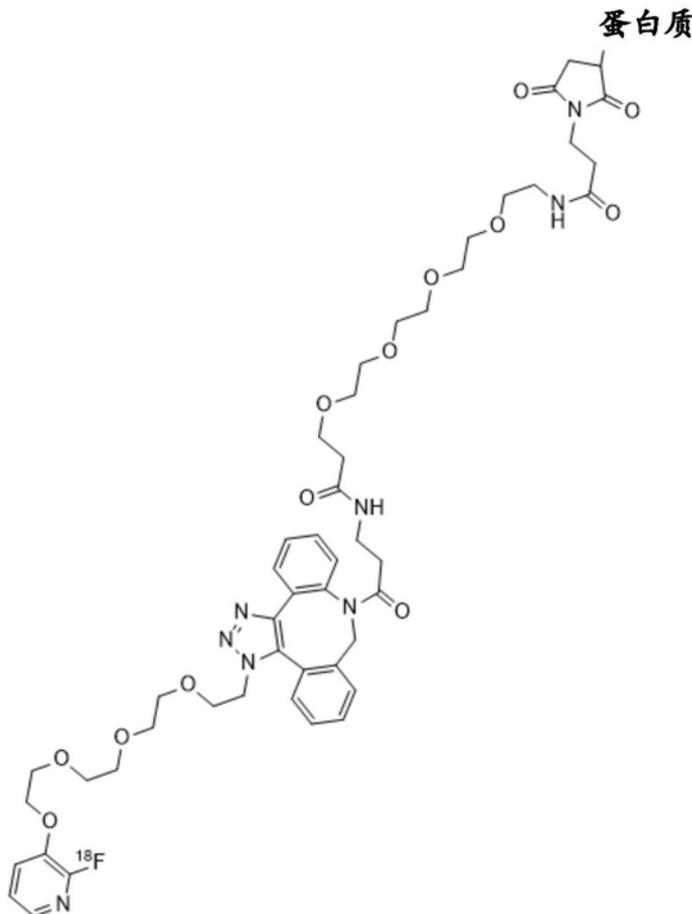
12. 权利要求1-6和10中任一项的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中y是2-6的整数。

13. 权利要求12的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中y是4或5。

14. 权利要求11的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中BFC是DBCO-PEG4-NHS-酯、DBCO-PEG4-酸、DBCO-PEG4-胺或DBCO-PEG4-马来酰亚胺。

15. 权利要求14的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中BFC是DBCO-PEG4-马来酰亚胺。

16. 权利要求1的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其具有以下结构:



其中BFC的马来酰亚胺基团与蛋白质半胱氨酸残基上的巯基基团共价连接。

17. 权利要求16的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述半胱氨酸残基在蛋白质的C-端。

18. 权利要求1-6、10和16-17中任一项的<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述探针的蛋白质部分结合至与疾病相关的生物分子。

19. 权利要求18的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述疾病选自实体癌症、造血癌症、血液癌症、自身免疫性疾病、神经变性疾病、心血管疾病和致病性感染。

20. 权利要求19的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述探针结合至肿瘤相关抗原。

21. 权利要求19的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述探针结合至致病性有机体上存在的蛋白质。

22. 权利要求21的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,其中所述致病性有机体为病毒、细菌或真菌。

23. 权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针在制备用于检测受试者中疾病的存在试剂中的用途,所述检测包括:

基于所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针对与疾病的存在相关的靶标分子的结合,来检测受试者至少一部分的放射性图像中存在或不存在所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针;

其中背景以上的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的存在和位置指示疾病的存在和位置。

24. 权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针在制备用于监测受试者疾病进展的试剂中的用途,所述监测包括

(a) 基于所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针对与疾病的存在相关的靶标分子的结合,在第一时间点从受试者至少一部分的图像中检测患病细胞或组织的量;和

(b) 在一个或多个随后的时间点获得受试者至少一部分的图像;

其中每个时间点患病细胞或组织的尺寸和位置指示疾病进展。

25. 权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针在制备用于定量受试者中患病细胞或组织的试剂中的用途,所述定量包括检测患病细胞或组织中 $^{18}\text{F}$ 的放射性发射,其中患病细胞或组织中放射性发射的水平和分布是患病细胞或组织的定量量度。

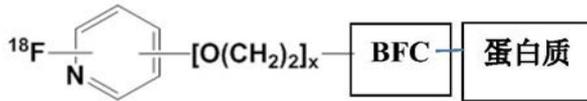
26. 权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针在制备用于获得表达靶标蛋白的组织或细胞的定量图像的试剂中的用途,所述获得包括使所述细胞或组织与结合靶标蛋白的所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针接触,以及使用正电子发射断层扫描术(PET)检测或定量表达靶标蛋白的组织。

27. 药物组合物,其包含权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针。

28. 试剂盒,其包含用于制备权利要求1-6、10和16-17中任一项的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的反应前体,和用于制备所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的说明书。

29. 权利要求28的试剂盒,其中所述反应前体包括非放射性标记的辅基、BFC连接的蛋白质、以及用于进行生物正交无铜点击反应的试剂。

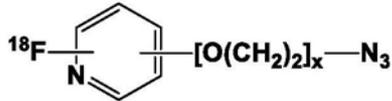
30. 一种制备 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的方法,所述探针包含具有以下结构的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基、双官能缀合(BFC)部分和蛋白质,或其药用盐:



其中

(a)  $^{18}\text{F}$ 在N原子邻位,  $x$ 是1-8的整数,

(b) 所述BFC是与所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基共价结合的双官能缀合部分, 其中共价键由具有下述结构的叠氮化物与BFC上的环辛炔基团之间的1,3-偶极环加成形成:



其中 $^{18}\text{F}$ 在N原子邻位, 且 $x$ 是1-8的整数;

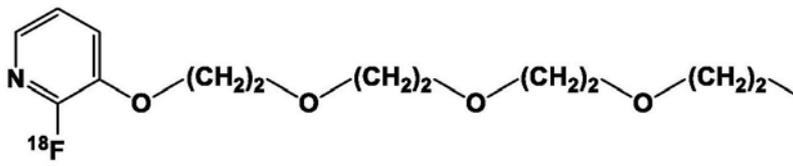
(c) 所述BFC包含聚乙二醇 (PEG)<sub>y</sub>间隔基臂, 其中 $y$ 是1-8的整数, 且其中所述聚乙二醇 (PEG)<sub>y</sub>间隔基臂包含与所述蛋白质上的胺、羧基、巯基或巯基基团共价结合的化学基团; 和

(d) 所述蛋白质为抗体、抗体片段或基于纤连蛋白的支架,

其中该方法包括使用生物正交无铜点击反应将所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基与包含双官能缀合 (BFC) 部分的蛋白质偶联。

31. 权利要求30的方法, 其中所述蛋白质为纤连蛋白III型 (“Fn3”) 结构域。

32. 权利要求30-31中任一项的方法, 其中所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基具有结构:



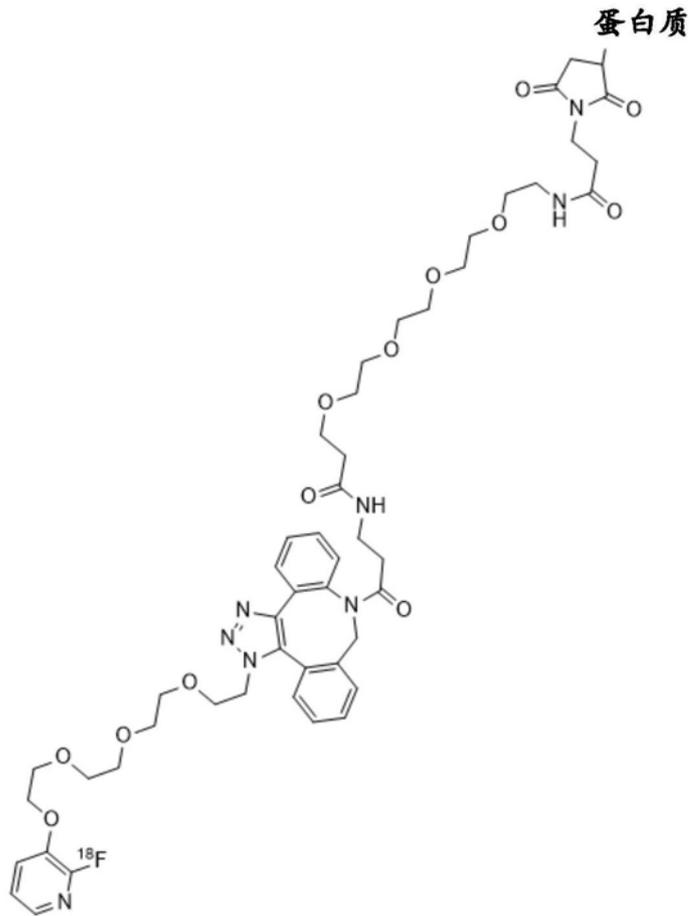
33. 权利要求30-31中任一项的方法, 其中所述BFC包含二苯并环辛炔。

34. 权利要求30-31中任一项的方法, 其中所述BFC包含氮杂二苯并环辛炔。

35. 权利要求30-31中任一项的方法, 其中所述BFC包含DBC0-PEG4-NHS-酯、DBC0-PEG4-酸、DBC0-PEG4-胺或DBC0-PEG4-马来酰亚胺。

36. 权利要求35的方法, 其中所述BFC包含DBC0-PEG4-马来酰亚胺。

37. 权利要求36的方法, 其中所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针具有下述结构



其中所述BFC的马来酰亚胺基团与所述蛋白质的半胱氨酸残基上的巯基基团共价连接。

38. 权利要求37的方法,其中所述半胱氨酸残基在所述蛋白质的C-端。

## 用于生物制品的<sup>18</sup>F-放射性标记的方法和组合物

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2014年11月25日提交的标题为“用于生物制品的<sup>18</sup>F-放射性标记的方法和组合物”的美国临时申请62/084,366的优先权,其内容通过引用由此并入。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及<sup>18</sup>F-辅基 (prosthetic group), 以及<sup>18</sup>F-标记的组合物的合成以及用于对体内各种过程成像、用于检测与疾病病理学相关的分子定位和用于监测疾病进展的用途。

### 背景技术

[0004] 正电子发射断层扫描术 (PET) 是一种非侵入性成像技术, 其已经成为诊断医学和药物开发中使用最广泛的方法之一, 具有高灵敏度 (fmol) 、高分辨率 (4-10mm) 和可以量化的组织增长。通过PET成像提供的存活受试者生物过程的有价值的体内功能信息还提供了独特的翻译医学优势, 这是因为相同的工具可以临床前和临床两者使用。

[0005] PET依赖于用包括<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Cu、<sup>11</sup>C、<sup>15</sup>O、<sup>13</sup>N、<sup>66</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>76</sup>Br、<sup>89</sup>Zr、<sup>94</sup>mTc、<sup>86</sup>Y和<sup>124</sup>I的正电子发射放射性同位素标记的分子的设计和合成。在体内, 这些放射性示踪剂或放射性配体根据所使用的同位素, 从具有不同能量的同位素核发射正电子。喷射的正电子的能量控制其在与电子碰撞之前行进的平均距离, 导致在相反方向上发射两个511keV  $\gamma$  射线。由该正电子湮灭事件产生的  $\gamma$  射线由PET成像扫描仪检测, 以产生平面和断层图像, 其显示放射性示踪剂作为时间的函数的分布。因此, 作为具有低喷射能量同位素的纯正电子发射体的同位素对于PET成像是优选的, 以使得在湮灭之前由正电子行进的距离和由诸如  $\gamma$  射线、 $\alpha$  粒子或 $\beta$ 粒子的其它发射引起的剂量测定问题最小化。

[0006] 此外, PET成像中使用的同位素的半衰期必须足够长以允许放射性示踪剂分子的合成和分析、注射入患者、体内定位、从非靶标组织清除和产生清晰的图像。<sup>18</sup>F ( $\beta^+$ 635keV 97%,  $t_{1/2}$  110min) 是最广泛使用的PET发射同位素之一, 因为其正电子发射能量低, 缺乏侧向发射和合适的半衰期。

[0007] 传统上, 用<sup>18</sup>F标记生物分子, 例如肽和蛋白质, 由于用该放射性核素标记所需的苛刻条件 (高温、有机溶剂和强碱性条件), 已经具有挑战性。用<sup>18</sup>F标记蛋白质的一种方法是使用能够承受苛刻氟化条件的辅基。已经报道了许多辅基 (例如, 在Nucl. Med. Bio. 34:5, 2007中进行了综述), 但是这些<sup>18</sup>F-标记的辅基中的许多需要有机溶剂, 并且不适于在水性介质中标记蛋白质或蛋白质类分子或具有其他不期望的性质。

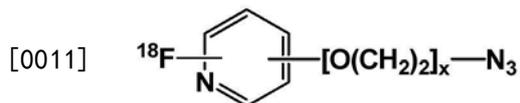
[0008] 因此, 仍然继续需要快速简单的<sup>18</sup>F-标记靶标部分 (例如蛋白质和肽) 的方法来产生放射性示踪剂组合物, 其保留用于体内成像方法的足够的比活度和稳定性。

### 发明内容

[0009] 本发明至少部分基于<sup>18</sup>F-标记的辅基的如下发现: 其含有与聚乙二醇 (PEG) 部分连

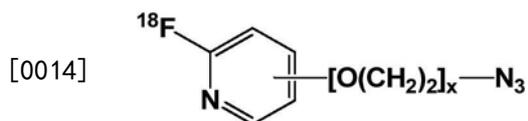
接的硝基-吡啶和末端叠氮基,所述辅基是水溶性的并且比用于 $^{18}\text{F}$ -标记的其它试剂更不易挥发,并且可以通过UV监测将该 $^{18}\text{F}$ -标记的辅基掺入生物分子(例如肽和蛋白质)的反应。这些有利的特征提供了在保留生物分子的生物活性的条件下生产 $^{18}\text{F}$ -标记的生物分子的有效、快速和可重现的方法。在某些实施方案中,含有双官能缀合部分(例如具有环受限的炔基,例如双官能整合剂)的生物分子(例如,肽和蛋白质)通过“点击”双正交反应与 $^{18}\text{F}$ -标记的辅基的末端叠氮基形成共价键,以产生在生理条件下稳定的放射性标记的探针。所得产物的UV吸光度进一步提供了用于确定产物的放射化学纯度的实用、灵敏和快速的分析方法。

[0010] 在一方面,本文提供了具有以下结构的 $^{18}\text{F}$ -标记的辅基,



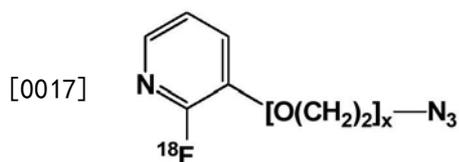
[0012] 或其药用盐,其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。在一些实施方案中, $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-2、1-3或1-4构型存在。在相关的实施方案中, $^{18}\text{F}$ 在N原子的邻位与吡啶连接。在一些实施方案中,所述药用盐选自氟、溴、氯和碘盐。在一个实施方案中,所述盐是三氟甲磺酸盐。在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基或药用盐是水溶性的。在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基或药用盐是非挥发性的。

[0013] 在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的化合物具有以下结构



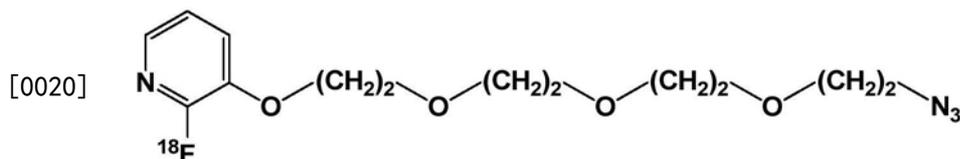
[0015] 或其药用盐,其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。在一些实施方案中, $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-2、1-3或1-4构型存在。在一些实施方案中,所述药用盐选自氟、溴、氯和碘盐。在一个实施方案中,所述盐是三氟甲磺酸盐。在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基或药用盐是非挥发性的。

[0016] 在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的化合物具有以下结构



[0018] 或其药用盐,其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。在一些实施方案中,所述药用盐选自氟、溴、氯和碘盐。在一个实施方案中,所述盐是三氟甲磺酸盐。在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的辅基或药用盐是非挥发性的。

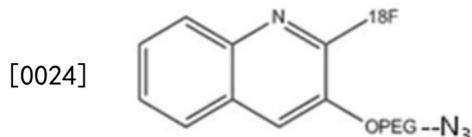
[0019] 在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的化合物具有以下结构



[0021] 或其药用盐。

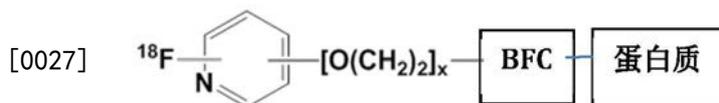
[0022] 在某些实施方案中，<sup>18</sup>F-标记的辅基的吡啶环含有一个或多个另外的取代基，其不干扰分子的氟化。在一些实施方案中，所述另外的取代基是C<sub>1-6</sub>烷基，例如，甲基、乙基或丙基。

[0023] 在相关的方面中，本文提供了具有以下结构的<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基



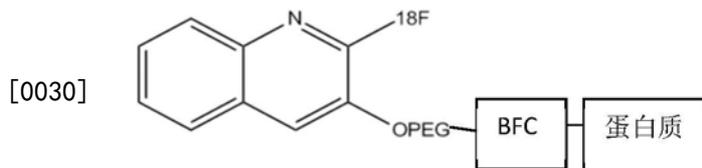
[0025] 其中“OPEG”是 $[O(CH_2)_2]_x$ ，并且x是1-8的整数，或其药用盐。在一些实施方案中，x是2-6的整数。在一些实施方案中，x是3-5的整数。在一个实施方案中，x是4。在一些实施方案中，<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基或药用盐是非挥发性的。

[0026] 在某些方面中，本文提供了<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针，其包含本文所述的<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基、双官能螯合剂或缀合(BFC)部分和蛋白质，其中所述放射性标记的基于蛋白质的探针具有以下结构，



[0028] 或其药用盐。

[0029] 在某些方面中，本文提供了<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针，其包含本文所述的<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基、双官能螯合剂或缀合(BFC)部分和蛋白质，其中所述放射性标记的基于蛋白质的探针具有以下结构，



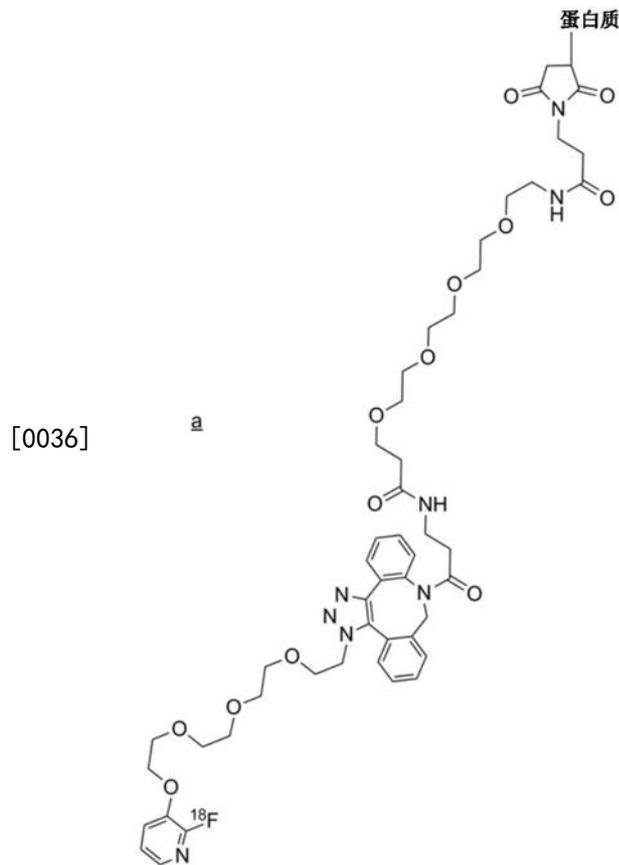
[0031] 或其药用盐。

[0032] 在一些实施方案中，所述BFC是环辛炔，其包含与蛋白质上的胺、羧基、巯基或巯基官能团形成共价键的反应性基团。在一些实施方案中，所述环辛炔选自二苯并环辛炔(DIBO)、联芳基氮杂环辛炔酮(BARAC)、二甲氧基氮杂环辛炔(DIMAC)和二苯并环辛炔(DBCO)。在一些实施方案中，所述环辛炔是DBCO。

[0033] 在一些实施方案中，所述BFC进一步包含聚乙二醇(PEG)<sub>y</sub>间隔基臂(spacer arm)，其中y是1-8的整数。在一些实施方案中，y是2-6的整数。在一些实施方案中，y是4或5。

[0034] 在一些实施方案中，所述BFC是DBCO-PEG4-NHS-酯、DBCO-磺基-NHS-酯、DBCO-PEG4-酸、DBCO-PEG4-胺或DBCO-PEG4-马来酰亚胺。在一些实施方案中，所述BFC是DBCO-PEG4-马来酰亚胺。

[0035] 在某些实施方案中,本文提供了具有以下结构的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,



[0037] 其中BFC的马来酰亚胺与蛋白质的半胱氨酸残基上的巯基共价连接。在一些实施方案中,所述半胱氨酸残基在蛋白质的C-端。

[0038] 在相关的实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的蛋白质部分包含配体。在一些实施方案中,所述探针的蛋白质部分包含抗体或抗体片段。在一些实施方案中,所述探针的蛋白质部分包含基于纤连蛋白的支架(fibronectin based scaffold,FBS)。

[0039] 在相关的实施方案中,所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的蛋白质部分结合至与疾病有关的生物分子。在一些实施方案中,所述疾病选自实体癌症、造血癌症、血液癌症、自身免疫性疾病、神经变性疾病、心血管疾病和致病性感染。在某些实施方案中,探针结合至存在于致病有机体(例如病毒、细菌或真菌)上的蛋白质。

[0040] 在某些实施方案中,本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针可为药物组合物形式。

[0041] 在相关的方面中,本文提供了一种获得本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的图像的方法,所述方法包括以下步骤:(a)给予受试者 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针;和(b)通过正电子发射断层扫描术(PET)扫描在体内对 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的分布成像。在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的成像分布指示存在或不存在疾病。

[0042] 在相关的方面中,本文提供了诊断受试者疾病存在的方法,所述方法包括以下步

骤：(a) 向有需要的受试者给予本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针，其结合至与疾病存在相关的靶标分子；和 (b) 获得所述受试者的至少一部分的放射性图像，以检测存在或不存在所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针；其中，背景上方的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的存在和位置指示该疾病的存在和位置。

[0043] 在相关的方面中，本文提供了监测受试者疾病进展的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 向有需要的受试者给予本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针，其在第一时间点结合至与疾病存在相关的靶标分子，并获得受试者的至少一部分的图像以确定患病细胞或组织的量；和 (b) 在一个或多个随后的时间点向受试者给予 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针，并获得每个时间点受试者的至少一部分的图像；其中每个时间点患病细胞或组织的尺寸和位置指示疾病的进展。

[0044] 在相关的方面中，本文提供了定量受试者中患病细胞或组织的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 向具有患病细胞或组织的受试者给予本文所述的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针，其与位于患病细胞或组织的靶标分子结合；和 (b) 检测患病细胞或组织中 $^{18}\text{F}$ 的放射性发射，其中患病细胞或组织中放射性发射的水平和分布是患病细胞或组织的定量量度。

[0045] 在相关的方面中，本文提供了筛选用于治疗疾病的药物的方法，包括以下步骤：(a) 使表达与疾病相关的靶标蛋白的细胞与本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针接触，所述探针在存在和不存在候选药物的情况下与靶标蛋白结合；和 (b) 使用正电子发射断层扫描术 (PET) 在存在和不存在候选药物的情况下对细胞进行成像，其中在候选药物存在下放射性发射量的减少指示所述药物与靶标蛋白结合。

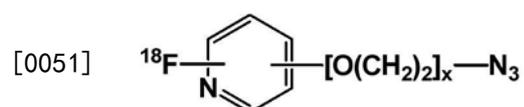
[0046] 在这些方法的一些实施方案中，所述疾病选自实体癌症、造血癌症、血液癌症、自身免疫性疾病、神经变性疾病、心血管疾病和致病性感染 (例如病毒、细菌或真菌感染)。

[0047] 在相关的方面中，本文提供了获得表达靶标蛋白的组织或细胞的定量图像的方法，所述方法包括以下步骤：使细胞或组织与结合靶标蛋白的本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针接触，以及使用正电子发射断层扫描术 (PET) 检测或定量表达靶标蛋白的组织。

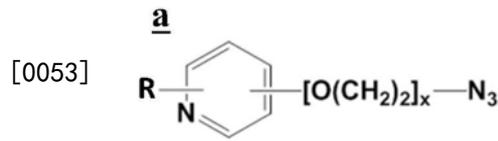
[0048] 在本文提供的方法的一些实施方案中，所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针包含配体。在一些实施方案中，所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针包含抗体或抗体片段。在一些实施方案中，所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针包含基于纤连蛋白的支架 (FBS)。在一些实施方案中，所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针结合肿瘤相关抗原。在其它实施方案中，所述 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针结合存在于致病有机体 (例如病毒、细菌或真菌) 上的蛋白质。

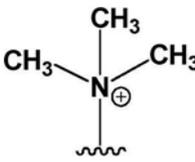
[0049] 本文还提供了试剂盒，其包含用于制备本文提供的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的反应前体 (例如，非放射性标记的辅基、BFC连接的蛋白质探针和用于进行生物正交点击反应的试剂)，以及制备 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的说明书。

[0050] 因此，在一个方面，本文提供了制备具有以下结构的 $^{18}\text{F}$ -标记的辅基的方法：



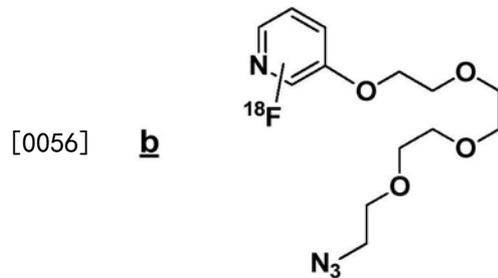
[0052] 其中x是1-8的整数,所述方法包括下列步骤:(a)提供具有以下结构的化合物a的溶液:



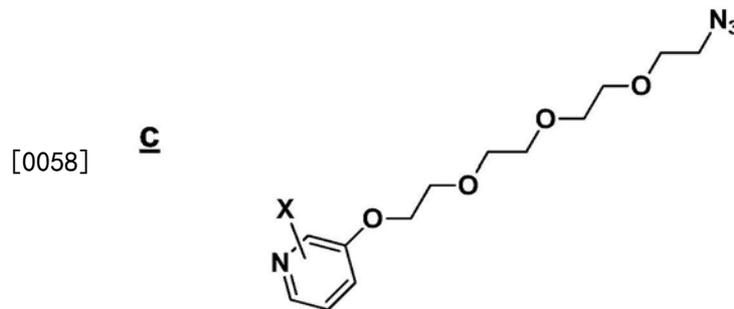
[0054] 其中x是1-8的整数,并且R为NO<sub>2</sub>、Br、F或  并且在吡啶环的N原子邻位;

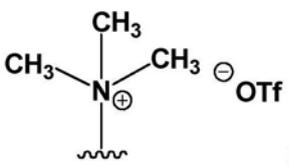
(b)提供<sup>18</sup>F在<sup>18</sup>O水、4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷和弱碱中的混合物;(c)干燥来自步骤(b)的混合物以形成固体;和(d)使来自步骤(a)的溶液与来自步骤(c)的固体反应以形成<sup>18</sup>F-标记的化合物。

[0055] 在某些实施方案中,所述方法产生具有以下结构b的<sup>18</sup>F-吡啶辅基:



[0057] (其中<sup>18</sup>F在N原子邻位),并且包括下列步骤:(a)提供以下结构化合物的溶液



[0059] (其中X在N原子邻位),其中X为NO<sub>2</sub>、Br或  ;

[0060] (b)提供<sup>18</sup>F在<sup>18</sup>O水、4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷和弱碱中的混合物;(c)干燥来自步骤(b)的混合物以形成固体;和(d)使来自步骤(a)的溶液与来自步骤(c)的固体反应以形成<sup>18</sup>F-标记的化合物。

[0061] 在某些实施方案中,在来自上述步骤a)的起始化合物中,X是NO<sub>2</sub>。在某些实施方案中,X连接至与N原子相邻的碳原子和PEG-N<sub>3</sub>侧链。在某些实施方案中,步骤b)中的弱碱是K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、碳酸铯或四丁基氢氧化铵。在一个实施方案中,步骤b)中的弱碱为K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>。

[0062] 在相关的方面中,提供了<sup>18</sup>F标记蛋白质的方法,该方法包括将式b)的<sup>18</sup>F-放射性标记的辅基与要在“点击反应”中被放射性标记的蛋白质偶联以形成<sup>18</sup>F-放射性标记的蛋白质

步骤。在一些实施方案中,生物正交点击反应是不含金属的(例如不含铜的点击反应)。在一些实施方案中,蛋白质包含双官能缀合(BFC)部分(例如双官能螯合剂)。在一些实施方案中,蛋白质包括环辛炔BFC。在一些实施方案中,该蛋白质包含DBCO-PEG4-马来酰亚胺或与其共价连接。

[0063] 本公开的其它特征和优点将从以下详细描述和实施例变得显而易见,其不应被解释为限制。

#### 附图说明

[0064] 图1是用于化学合成 $[^{18}\text{F}]$ -E01-4PEG-DBCO-FPPEGA的示意图。分子的E01部分具有SEQ ID NO:1所示的序列。

[0065] 图2是描绘通过 $\gamma$ 计数器离体测量的携带双侧PD-L1 (+) L2987和PD-L1 (-) HT-29异种移植物的鼠中 $^{18}\text{F}$ -A02放射性示踪剂的组织分布的条形图。

[0066] 图3是食蟹猴中 $^{18}\text{F}$ -E01分布的复合图像。

[0067] 图4A和B描述异种移植物和人肺组织中 $^{18}\text{F}$ -A02的体外放射自显影图像。

[0068] 图5是使用不含金属“点击化学”制备 $[^{18}\text{F}]$ -放射性标记的-A02-PEG-DBCO-FPPEGA的示意图。

[0069] 图6是用于自动合成 $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGA的GE TRACERlab FX2N Synthesis模块的示意图。

[0070] 图7是用于自动合成 $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGA的Synthera Synthesis模块(IBA)的示意图。

#### 具体实施方式

[0071] 本文描述的是 $^{18}\text{F}$ -辅基和用于制备 $^{18}\text{F}$ -辅基的方法。本文还描述了包含 $^{18}\text{F}$ -辅基的放射性标记的组合物以及这些放射性标记的组合物用于诊断、定位、监测和/或评估患病细胞和/或组织以及相关生物学条件的用途。

[0072] 定义

[0073] 为了更容易理解本说明书,首先定义某些术语。在整个详细描述中阐述了其它定义。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义,并且采用常规的质谱、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学方法。

[0074] 如本文所使用的,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。除非另有说明,否则使用“或”或“和”表示“和/或”。此外,使用术语“包括(including)”以及诸如“包括(include、includes、included)”的其他形式并不局限于此。

[0075] 如本文所使用的,“约”表示数字的正负百分之十之内。例如,“约100”表示90到110之间的任一数字。

[0076] 如本文所使用的,“医学成像”是指用于产生受试者身体(或其部分)的图像的技术和过程以用于临床目的(寻求显露、诊断或监测疾病的医学操作)或医学科学(包括正常解剖学和生理学的研究)。

[0077] 如本文所用,“正电子发射断层扫描术”或“PET”是指产生身体中示踪剂位置的三

维图像的非侵入式核医学技术。该方法检测由正电子发射放射性核素(示踪剂)间接发射的 $\gamma$ 射线对,所述放射性核素在生物活性分子上被引入体内。PET成像工具在临床前和临床上都有广泛的用途和帮助药物开发。示例性应用包括靶标的体内饱和度的直接可视化;监测正常组织中的摄取以预期毒性或患者间的变化;量化患病组织;肿瘤转移;并随时间推移监测药物效力,或随时间的抗性。

[0078] 术语“生物正交化学”是指可以在活体系统内发生而不干扰天然生物化学过程的任何化学反应。该术语包括化学反应,化学反应是在生理pH值或水存在下在体外发生的化学反应。被认为是生物正交的反应是选择性的,并避免与起始化合物中发现的其它官能团的副反应。此外,所得到的反应伴侣之间的共价键对于生物反应应该是强烈且化学惰性的,并且不应影响所需分子的生物活性。

[0079] 术语“点击化学”是指用于快速合成新化合物和组合库的一组可靠和选择性的生物正交反应。点击反应的性质包括模块化、范围宽泛、高产率、立体特异性和简单的产品分离(通过非色谱法从惰性副产物分离),以产生在生理条件下稳定的化合物。在放射化学和放射性药物方面,点击化学是一组标签反应的通用术语,其利用选择性和模块化的构建块,并使化学选择性连接在不存在催化剂的情况下放射性标记生物相关化合物。“点击反应”可以用铜,也可以是不含铜点击反应。

[0080] 术语“辅基”或“双官能标记试剂”是指含有能够与肽或蛋白质连接的放射性核素(例如, $^{18}\text{F}$ )的小有机分子。

[0081] 本文中关于放射性药物化学使用的术语“螯合剂配体”是指将双官能螯合剂或双官能缀合(BFC)部分(本文可互换使用),其将放射性标记的辅基与生物活性靶向分子(例如肽或蛋白质)共价连接。BFC利用官能团,例如用于酰胺偶联的羧酸或活化酯,用于硫脲偶联的异硫氰酸酯和用于巯基偶联的马来酰亚胺。

[0082] 如本文所用,作为“生物靶标”的一般指代的“靶标”是指细胞、组织(例如癌症或肿瘤)、病原微生物(例如细菌、病毒、真菌、植物、朊病毒、原生动物或其部分)或与生物学途径相关的其它分子,或生物现象,例如组织炎症、斑块形成等。

[0083] 术语“靶标配体”、“靶标剂”或“靶标分子”可互换使用以指与另一分子结合分子,例如肽、蛋白质、糖蛋白等。在某些实施方案中,靶标剂与 $^{18}\text{F}$ -辅基结合,以“靶标”与特定细胞、组织、病原体或生物学途径相关的分子。

[0084] 本文所用的“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何序列,不管长度、翻译后修饰或功能。“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用。多肽可以包括天然氨基酸和非天然氨基酸,例如美国专利6,559,126描述的那些,通过引用并入本文。多肽也可以以各种标准化学方法中的任何一种进行修饰(例如氨基酸可用保护基修饰;羧基末端氨基酸可以制成末端酰胺基团;氨基末端残基可以用基团修饰以例如增强亲油性;或者多肽可以被化学糖基化或以其它方式修饰以增加稳定性或体内半衰期)。多肽修饰可以包括另一结构如环状化合物或其它分子与多肽的连接,并且还可以包括含有一个或多个改变构型(即R或S;或L或D)的氨基酸的多肽。

[0085] “分离的”多肽是已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的多肽。其天然环境的污染成分是会干扰多肽的诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,多肽将被纯化(1)至大于95重量%的多肽,

如通过Lowry方法测定,最优选大于99重量%, (2) 至足以获得至少N-末端或内部氨基酸序列的残基的程度,或 (3) 至均匀,通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯亮蓝或优选银染色进行。分离的多肽在重组细胞内原位包括多肽,因为多肽天然环境的至少一种成分将不存在。然而,通常通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0086] 本文中可互换使用的术语“特异地结合”、“特异性结合”、“选择性结合”和“选择地结合”是指对生物靶标显示亲和力但不与另一分子显著结合(例如,小于约10%的结合)的肽或多肽,如通过本领域可获得的技术测量的,例如但不限于Scatchard分析和/或竞争性结合测定(例如竞争性ELISA,BIACORE测定)。

[0087] 本文所用的术语“优先结合”是指下列情况:肽或蛋白质与所选生物靶标的结合至少比其结合不同生物靶标多约20%,如通过本领域可获得的技术测量的,例如但不限于Scatchard分析和/或竞争性结合测定(例如竞争性ELISA,BIACORE测定)。

[0088] 本文所用的术语“ $K_D$ ”旨在表示蛋白质-蛋白质相互作用(例如,基于 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针-靶标分子)的解离平衡常数或 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针与靶标蛋白的亲和力,如使用表面等离子体共振测定或细胞结合测定测量的。本文使用的“所需 $K_D$ ”是指 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的 $K_D$ ,其足以达到预期的目的。例如,所需的 $K_D$ 可以指在体内成像测定或体外测定(例如基于细胞的荧光素酶测定)中引发功能效应所需的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的 $K_D$ 。

[0089] 本文所用的术语“ $k_{\text{ass}}$ ”是指将 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针缔合为 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针/靶标蛋白复合物的缔合速率常数。

[0090] 如本文所使用的术语“ $k_{\text{diss}}$ ”意图是指用于从 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针/靶标蛋白复合物解离 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的解离速率常数。

[0091] 本文所用的术语“ $\text{IC}_{50}$ ”是指在体外或体内测定中抑制反应至50%最大抑制反应的水平(即最大抑制反应和未处理反应之间的中间值)的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的浓度。

[0092] 术语“PK”是“药代动力学”的首字母缩写,并且涵盖化合物的性质,包括例如受试者的吸收、分布、代谢和消除。本文所用的“PK调节蛋白”或“PK部分”是指当与生物活性分子融合或一起施用影响生物活性分子的药代动力学性质的任何蛋白质、肽或部分。PK调节蛋白或PK部分的实例包括PEG、人血清白蛋白(HSA)粘合剂(如美国公开2005/0287153和2007/0003549、PCT公开W0 2009/083804和W0 2009/133208中公开的)、人血清白蛋白及其变体、转铁蛋白及其变体、Fc或Fc片段及其变体,以及糖(例如唾液酸)。

[0093] 蛋白质或化合物的“血清半衰期”通常可以定义为在体内将多肽的血清浓度降低50%所需的时间,例如由于序列或化合物的降解和/或通过自然机制清除或螯合序列或化合物。半衰期可以以本身已知的任何方式测定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且可以例如通常包括适当地向受试者给予合适剂量的本文所述的氨基酸序列或化合物的步骤;定期收集个体的血液样品或其他样品;确定所述血液样品中本文所述氨基酸序列或化合物的水平或浓度;并且从如此得到的数据的(图)计算,直到本文所述的氨基酸序列或化合物的水平或浓度与给药时的初始水平相比降低了50%的时间。参考例如标准手册,例如,Kenneth, A. 等人, *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, 和Peters等人, *Pharmacokinete*

Analysis: A Practical Approach (1996)。还参考Gibaldi, M. 等人, Pharmacokinetics, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982)。

[0094] 可以使用诸如 $t_{1/2}^{-\alpha}$ 、 $t_{1/2}^{-\beta}$ 、HL\_Lambda\_z和曲线下面积 (AUC) 的参数来表达半衰期。在本说明书中,“半衰期的增加”是指这些参数中的任何一个,这些参数中的任何两个,这些参数中的任何三个或这些参数中的所有四个的增加。“半衰期的增加”特别是指 $t_{1/2}^{-\beta}$ 和/或HL\_Lambda\_z的增加,其中 $t_{1/2}^{-\alpha}$ 和/或AUC有增加或没有增加,或两者都有或都没有增加。

[0095] 如本文所用,术语“连接的”是指两个或更多个分子的缔合。连接可以是共价或非共价连接。连接也可以是遗传的(即重组融合的)。可以使用各种各样的本领域公认的技术,例如化学共轭和重组蛋白质生产来实现这种连接。

[0096] 术语“诊断”或“检测”可以互换使用。而诊断通常是指定义组织的特定组织学状态,检测识别和定位包含特定可检测靶标的组织,损伤或有机体。

[0097] 术语“可检测的”是指通过背景信号检测信号的能力。在本文成像剂和诊断学的上下文中使用的术语“可检测信号”是衍生自非侵入性成像技术例如但不限于正电子发射断层扫描术(PET)的信号。可检测信号是可检测的并且可以与可能从个体产生的其它背景信号区分开。换句话说,存在可测量和统计学上显著的差异(例如,统计学显著差异足以区分可检测信号和背景的差异,例如可检测信号和背景之间约0.1%、1%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或40%或更多的差异)。标准和/或校准曲线可用于确定可检测信号和/或背景的相对强度。

[0098] 将包含本文所述成像剂的组合物的“可检测有效量”定义为足以使用可用于临床使用的设备产生可接受图像的量。本文提供的可检测有效量的成像剂可以以多于一次的注射给药。可检测有效量可以根据个体易感性的程度、个体的年龄、性别和体重、个体的特异反应等因素而变化。可检测有效量的成像组合物也可以根据所使用的仪器和方法而变化。这些因素的优化完全在本领域的技术水平之内。

[0099] 如本文所用,在成像剂上下文中使用的“给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将包含成像剂的组合物物理引入个体。本文所述的成像剂的优选给药途径包括静脉内、腹膜内、肌内、皮下、脊髓或其它肠胃外给药途径,例如通过注射或输注。本文所用的短语“肠胃外给药”是指通常通过注射而不是肠和局部给药的给药方式,并且包括但不限于静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、角质层下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。或者,本文所述的成像剂可以通过非肠胃外途径施用,例如局部、表皮或粘膜给药途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。还可以例如一次,多次,和/或经一个或多个延长的周期进行施用。

[0100] 本文所用的术语“共同给予”等意图包括将选择的药物给予于单个患者,并且旨在包括其中通过相同或不同的给予途径或在相同或不同的时间给予药物的方案。

[0101] 术语“患者”和“受试者”是指接受包含本文所述成像剂的组合物的任何人或非人动物。对于体外应用,例如体外诊断和研究应用,上述受试者的体液和细胞样品将适合用作,例如血液,尿液或组织样品。

[0102] 术语“样品”可以指组织样品、细胞样品、流体样品等。样本可以取自个体。组织样

本可以包括头发(包括根部)、颊拭子、血液、唾液、精液、肌肉或来自任何内部器官。流体可以是但不限于尿液、血液、腹水、胸膜液、脊髓液等。身体组织可以包括但不限于皮肤、肌肉、子宫内膜、子宫和宫颈组织。

[0103] 术语“同位素纯的”是指元素、化合物或组合物相对于其它同位素含有较大比例的一种同位素。在某些实施方案中,元素、化合物或组合物为大于约40%、50%或60%同位素纯度。

[0104] 如本文所用,当标记的分子与未标记的分子部分或全部分离时,标记的分子被“纯化”,使得与起始混合物相比,标记的分子的部分富集。“纯化”标记的分子可以包括几乎任何比例的标记和非标记的分子的混合物,包括但不限于约5:95;10:90;15:85;20:80;25:75;30:70;40:60;50:50;60:40;70:30;75:25;80:20;85:15;90:10;95:5;97:3;98:2;99:1或100:0。

[0105] 基团“OTf”是指具有式 $CF_3SO_3$ 的三氟甲磺酸酯(triflate)或三氟甲烷磺酸酯。

[0106] 术语“卤代”或者“卤素”或者“卤化物”是指氟、氯、溴或碘。

[0107] 在整个说明书中,本领域技术人员可以选择其基团和取代基以提供稳定的部分化合物,和可用作药用化合物和/或可用于制备药用化合物的中间体化合物。

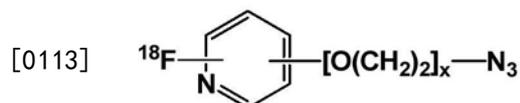
[0108] 本文描述的各个方面在以下小节中进一步详细描述。

[0109] I.  $^{18}F$ 放射性标记的辅基

[0110] 在一个方面中,本文提供了 $^{18}F$ -放射性标记的含有辅基的化合物,用于涉及在耐水条件下选择性进行的叠氮化物和环辛炔之间的1,3-偶极环加成的生物正交反应。本发明的 $^{18}F$ -放射性标记的辅基可溶于100%水溶液,不需要有机相将辅基连接到肽或蛋白质分子上。该特征是特别有利的,因为许多生物制剂(例如肽或蛋白质)不能经受至少量有机溶剂的降解和聚集问题。

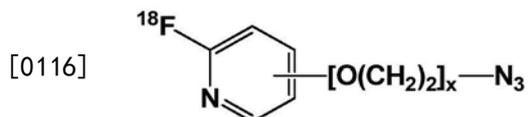
[0111] 另外,与脂肪族辅基不同,在使用本发明的辅基情况下,可用UV监测 $^{18}F$ 氟化反应。本文所述的 $^{18}F$ -放射性标记的辅基不是挥发性的。此外,提供的 $^{18}F$ -放射性标记的辅基可以使用例如实施例中所所述的不含铜点击化学并入生物制剂中,从而避免了当使用铜介导的点击化学时在一些生物制剂中观察到的稳定性问题。

[0112] 在一个方面中,本文提供了具有以下结构的共价结合到叠氮化物的PEG化的 $^{18}F$ -吡啶,



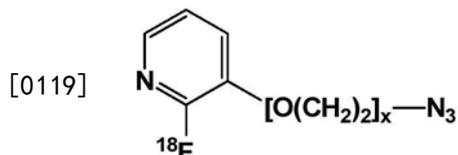
[0114] 或其药用盐,其中 $x$ 是1-8的整数。在一些实施方案中, $x$ 是2-6的整数。在一些实施方案中, $x$ 是3-5的整数。在一些实施方案中, $x$ 是4。在相关的实施方案中, $^{18}F$ 在N原子的邻位与吡啶连接。在一些实施方案中,所述 $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-3构型存在。在一些实施方案中, $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-2构型存在。在其它实施方案中, $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-4构型存在。

[0115] 在一些实施方案中,所述 $^{18}F$ -放射性标记的化合物具有结构



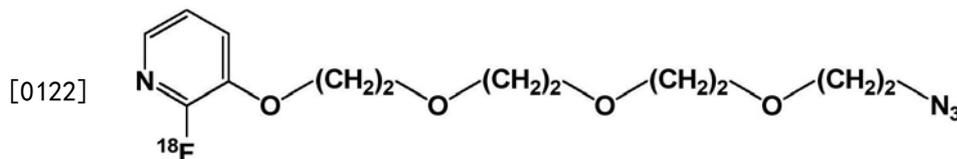
[0117] 或其药用盐,其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。在一些实施方案中,所述 $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-3构型存在。在一些实施方案中, $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-2构型存在。在其它实施方案中, $[O(CH_2)_2]_x$ 部分相对于吡啶环上的氮以1-4构型存在。

[0118] 在一些实施方案中,所述 $^{18}F$ -放射性标记的化合物具有结构



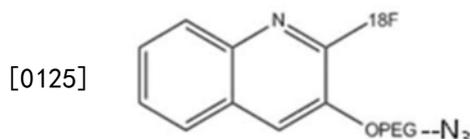
[0120] 其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。

[0121] 在一些实施方案中,所述 $^{18}F$ -放射性标记的化合物为 $[^{18}F]$ -3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶( $^{18}F$ -FPPEGA)并且具有结构



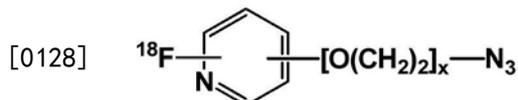
[0123] 在可替换的实施方案中,所述 $^{18}F$ -放射性标记的辅基可以在吡啶环上含有不干扰氟化反应的其它基团。在某些实施方案中,于吡啶环的添加包括 $C_{1-6}$ 烷基,例如甲基、乙基和丙基。

[0124] 在其它实施方案中,所述 $^{18}F$ -放射性标记的辅基是具有以下结构的稠环系统:



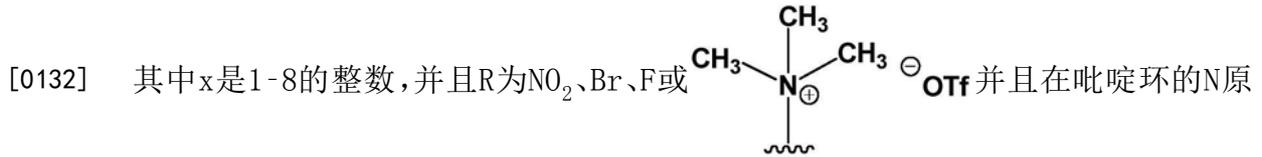
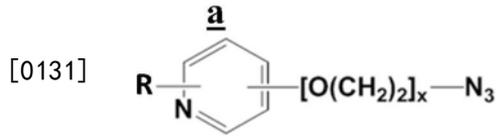
[0126] 其中“OPEG”是 $[O(CH_2)_2]_x$ ,并且x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。

[0127] 在相关的方面中,本文提供了制备具有以下结构的共价结合到叠氮化物的PEG化 $^{18}F$ -吡啶的方法,



[0129] 其中x是1-8的整数,所述方法包括下列步骤:

[0130] (a) 提供具有以下结构的化合物a的溶液:



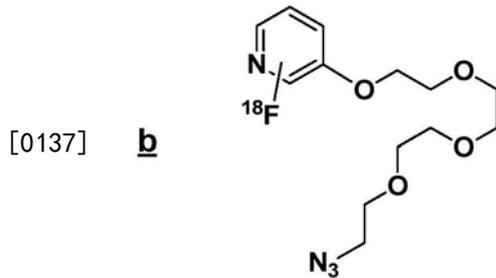
子邻位;

[0133] (b) 提供<sup>18</sup>F在<sup>18</sup>O水、4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷和弱碱中的混合物;

[0134] (c) 干燥来自步骤(b)的混合物以形成固体;和

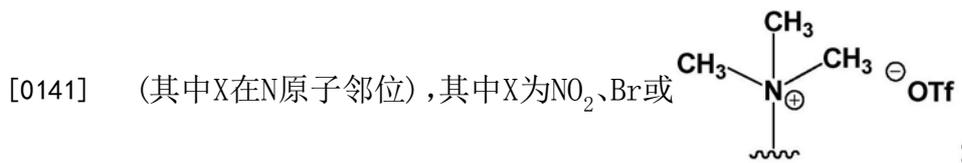
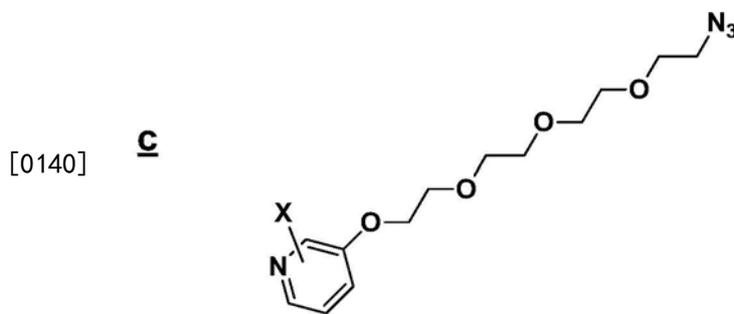
[0135] (d) 使来自步骤(a)的溶液与来自步骤(c)的固体反应以形成<sup>18</sup>F-标记的化合物。

[0136] 在某些实施方案中,所述方法产生具有以下结构b的<sup>18</sup>F-吡啶辅基



[0138] (其中<sup>18</sup>F在N原子邻位),并且包括下列步骤:

[0139] (a) 提供具有以下结构的化合物的溶液

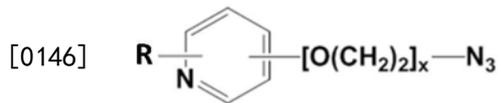


[0142] (b) 提供<sup>18</sup>F在<sup>18</sup>O水、4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷和弱碱例如K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中的混合物;

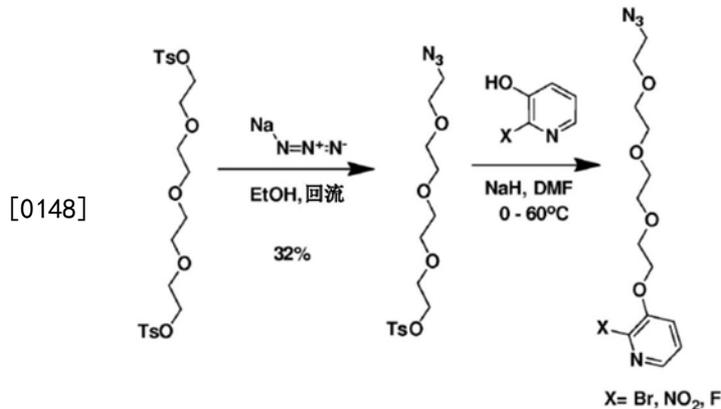
[0143] (c) 干燥来自步骤(b)的混合物以形成固体;和

[0144] (d) 使来自步骤(a)的溶液与来自步骤(c)的固体反应以形成<sup>18</sup>F-标记的化合物。

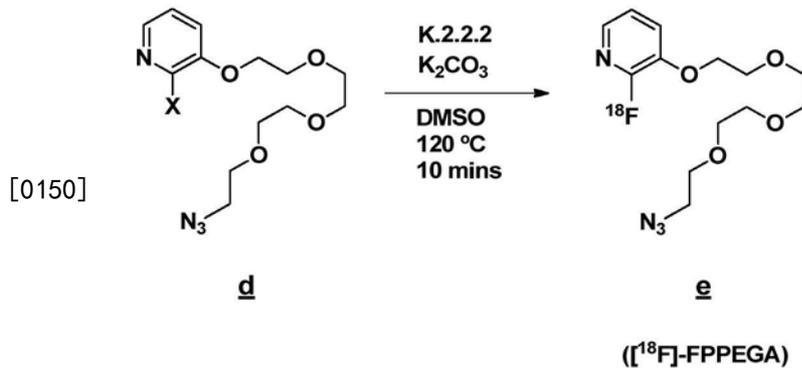
[0145] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括根据下面显示的方案I制备具有以下结构a的化合物的步骤



[0147] 方案I

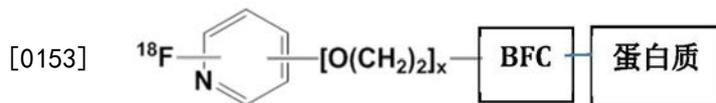


[0149] 在某些实施方案中,所述方法包括根据下列反应条件从d制备<sup>18</sup>F-吡啶辅基 [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶 (<sup>18</sup>F-FPPEGA), e:



[0151] II. <sup>18</sup>F-放射性标记的生物探针

[0152] 在某些方面中,本文提供了具有以下结构的<sup>18</sup>F-放射性标记的探针或试剂



[0154] 其中x是1-8的整数。在一些实施方案中,x是2-6的整数。在一些实施方案中,x是3-5的整数。在一些实施方案中,x是4。

[0155] BFC

[0156] 可以在本文公开的放射性标记的组合物中使用的双官能螯合剂或缀合(BFC)部分是可商购的(例如,Sigma Aldrich;Click Chemistry Tools),或可以根据公知的化学反应合成。

[0157] 在某些实施方案中,BFC选自基于环辛炔的试剂(例如DBCO、DIBO)、DF0、DOTA及其衍生物(CB-D02A、3p-C-DEPA、TCMC、Oxo-D03A)、TE2A、CB-TE2A、CB-TE1A1P、CB-TE2P、MM-TE2A、DM-TE2A、diamsar和衍生物、NODASA、NODAGA、NOTA、NETA、TACN-TM、DTPA、1B4M-DTPA、CHX-A"-DTPA、TRAP (PRP9)、NOPO、AAZTA和衍生物(DATA)、H<sub>2</sub>dedpa、H<sub>4</sub>octapa、H<sub>2</sub>azapa、H<sub>5</sub>decapa、H<sub>6</sub>phospa、HBED、SHBED、BPCA、CP256、PCTA、HEHA、PEPA、EDTA、TETA、和基于TRITA的螯合剂及其密切相关的类似物和衍生物。螯合剂和放射性核素的合适组合被广泛描述于

Price等人, Chem Soc Rev 2014;43:260-90。

[0158] 在某些实施方案中, BFC是包含与靶标蛋白或肽上的胺、羧基、羰基或巯基官能团形成共价键的反应性基团的环辛炔。环辛炔上的反应性基团包括酯、酸、羟基、氨基氧基、马来酰亚胺、 $\alpha$ -卤代酮和 $\alpha$ -卤代乙酰胺。

[0159] 在某些实施方案中, BFC是环辛炔, 例如二苯并环辛炔 (DIBO)、联芳基氮杂环辛炔酮 (BARAC)、二甲氧基氮杂环辛炔 (DIMAC) 和二苯并环辛炔 (DBC0)。在某些实施方案中, 环辛炔是DBC0。

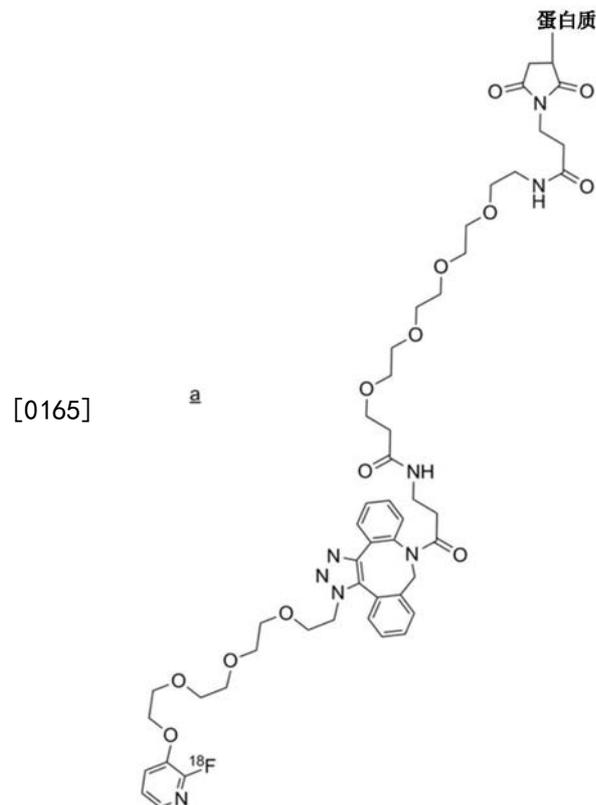
[0160] 在某些实施方案中, 环辛炔包含亲水性聚乙二醇 (PEG)<sub>y</sub> 间隔基臂, 其中y是1-8的整数。在某些实施方案中, y是2-6的整数。在某些实施方案中, y是4或5。

[0161] 在某些实施方案中, BFC是DBC0-PEG4-NHS-酯或DBC0-磺基-NHS-酯, 其与伯胺 (例如, 赖氨酸残基或氨基硅烷涂覆的表面的侧链) 特异且有效地反应。在某些实施方案中, BFC是具有末端羧酸 (-COOH) 的DBC0-PEG4-酸, 其可以在存在形成稳定酰胺键的活化剂 (例如 EDC) 的情况下与伯胺或仲胺基团反应。在某些实施方案中, BFC是在存在形成稳定的酰胺键的活化剂 (例如EDC或DCC) 或活化的酯 (例如NHS酯) 的情况下与羧基反应的DBC0-PEG4-胺。

[0162] 在某些实施方案中, BFC是DBC0-PEG4-马来酰亚胺, 其与半胱氨酸残基上的巯基反应, 例如多肽C末端附近的半胱氨酸残基。

[0163] 在某些实施方案中, 为了标记蛋白质, 蛋白质首先被修饰以掺入用于连接辅基的半胱氨酸。例如, 可以向蛋白质的C末端加入半胱氨酸。在某些实施方案中, P<sub>x</sub>C<sub>y</sub>, 其中P是脯氨酸, C是半胱氨酸, x是至少为0的整数 (例如, 0、1或2), y是至少为1的整数, 被添加到蛋白质的C-末端。对蛋白质进行修饰的方法是本领域公知的。

[0164] 在某些实施方案中, <sup>18</sup>F-放射性标记的探针或试剂具有以下结构a,



[0166] 其中, BFC在半胱氨酸残基处与蛋白质缀合。

[0167] 本文描述的<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标剂可以根据本文所述的操作使用适于直接体内使用的媒介物(例如盐水)中的生物正交不含金属点击化学来生产。

[0168] III. 蛋白质/肽靶标分子

[0169] 本文提供的<sup>18</sup>F-辅基可以连接到实际上任何靶标分子,只要其含有可衍生化的基团,其可以在不影响靶标分子和体内生物靶标(例如,细胞或组织)之间的相互作用的情况下进行修饰。

[0170] 在一些实施方案中,靶标分子是肽或蛋白质,包括但不限于抗体、抗体片段、基于纤连蛋白的分子和配体(例如激素、生长因子、细胞因子、趋化因子、白介素和血管生成因素)。在一些实施方案中,靶标分子将包含针对与疾病或病症相关的靶标的一个或多个结合位点,例如肿瘤相关抗原或自身免疫抗原,或由致病生物如病毒、细菌、真菌或原生动物的蛋白质。

[0171] 在一些实施方案中,可以选择<sup>18</sup>F-标记的肽或蛋白质以直接结合靶标的细胞、组织、致病生物或用于成像和/或检测的其它靶标。在其他实施方案中,可以选择<sup>18</sup>F标记的蛋白质或肽以直接或间接地结合到体内靶标分子。例如,可以向个体给予第一个蛋白质或肽,随后是与第一个结合的第二个<sup>18</sup>F-标记的分子。

[0172] 肽

[0173] 可以使用具有少至两个氨基酸残基,优选2至10个残基的肽,并且还可以与其它部分偶联。可靶标构建体还可以在骨架结构中包含非天然氨基酸,例如D-氨基酸,以增加肽在体内的稳定性。在可替换的实施方案中,可以使用其它骨架结构,例如由非天然氨基酸或拟肽构建的骨架结构。

[0174] 在一些实施方案中,可以使用的肽包括配体,肽疫苗和表位。使用固相支持物和重复正交脱保护和偶联的标准技术在自动肽合成仪上方便地合成用作可靶标构建体的肽。N-末端残基可被乙酰化以增加血清稳定性。这些保护基团将是本领域技术人员已知的。参见Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.)。

[0175] 抗体

[0176] 在某些实施方案中,本文所述的放射性示踪剂组合物中使用的靶标分子是抗体。用于本文的术语“抗体”可以包括全抗体和任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或其单链。举例来说,“抗体”可以指天然存在和非天然存在的抗体;单克隆和多克隆抗体;嵌合和人源化抗体;人和非人抗体;双特异性抗体;全合成抗体;和单链抗体。如本文所用,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,例如蛋白质、肽或半抗原。

[0177] 本文所述的靶标分子可以包含本领域已知的对与疾病状态或病症相关的靶抗原具有结合特异性的任何抗体或片段。可用作靶标分子的抗体可以从多种来源(例如,ATCC, Manassas, VA)商业获得,和/或具有可根据本领域公认的重组技术产生的公开的可变区序列。在一些实施方案中,用于本方法的示例性抗体包括抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL-1抗体、抗OX40(也称为CD134、TNFRSF4、ACT35和/或TXGP1L)抗体或抗LAG-3抗体。

[0178] 本文描述的组合物和方法中使用的抗体可以使用多种已知技术制备。用于分离免疫脾细胞的免疫方案和技术在本领域中是确定的。使用Kohler和Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)描述的标准体细胞杂交技术产生单克隆抗体以及使用人抗体基因文库的噬菌体

展示技术的B淋巴细胞的病毒或致癌转化也是常规的。此外,生产嵌合和人源化抗体的标准方法是容易获得的(参见例如Cabilly等人的美国专利4,816,567;Winter的美国专利5,225,539,和Queen等人的美国专利5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0179] 在某些实施方案中,放射性示踪剂组合物中使用的靶标分子是抗原结合片段。如本文所用的抗体的术语“抗原结合部分”是指保留特异性结合抗原的能力的一个或多个抗体片段。包含在抗体的术语“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 $V_H$ 和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其由 $V_H$ 结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii) 可以任选地由合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段 $V_L$ 和 $V_H$ 的两个结构域通过单独的基因编码,但是它们可以通过合成接头使用重组方法连接,使得它们能够被制成单个的蛋白质链,其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区成对形成称为单链Fv(scFv)的单价分子;参见例如Bird等人(1988) Science 242:423-426;和Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意在被包括在抗体的术语“抗原结合部分”内。这些和其他潜在的构建体描述于Chan&Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并以与完整抗体相同的方式筛选片段的用途。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或完整免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。

[0180] 在某些实施方案中,修饰所使用的抗体以调节,例如降低抗体的半衰期或用于本文所述的医学成像方法的快速清除。在人IgG1的Fc修饰如I253A (Hornick等人(2000) J. Nucl. Med. 41:355) 和H435A/R I253A或H310A (Kim等人(2000) Eur. J. Immunol. 29:2819)可以降低FcRn结合。另见Kenanova等人(2005) Cancer Res. 65:622。增强清除率的其他方法包括将本发明的抗原结合结构域设计为不具有结合FcRn的能力的抗体片段,例如Fab片段。这种修饰可以将抗体的循环半衰期从几周降低到几小时。若需要,抗体片段的特异性PEG化可随后用于微调(增加增量)抗体片段的半衰期。Chapman等人(1999) Nat. Biotechnol. 17:780。

[0181] 可以测定含有抗体或其抗原结合片段的放射性示踪剂组合物的体外和/或体内保留结合特异性。用于分析各种抗体组合物的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域已知的标准测定法,例如ELISA, Western Blotting, 流式细胞术和使用BIACORE<sup>®</sup> 2000SPR仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)的BIACORE<sup>®</sup>表面等离子体共振(SPR)分析。

[0182] 用于本文所述的放射性标记的探针的示例性蛋白质包括特异性结合靶标并且与无关靶标显著交叉反应的任何已知的抗体或可选择的支架蛋白,例如Adnectins。

[0183] 基于纤连蛋白的蛋白质(FBS)

[0184] 在一些实施方案中,本文所述的放射性示踪剂组合物中使用的靶标分子是FBS蛋白。通常,FBS蛋白分子具有固有的快速血液清除率,这可以有利于在成像技术中通过最小化来自非相关组织的背景探针信号所需的时间量使用<sup>18</sup>F。快速清除探针允许在注射探针的同一天收集高对比度图像,并且非常重要是也可以用于减少对个体的总体辐射暴露。

[0185] 如本文所用,“基于纤连蛋白的支架”或“FBS”蛋白质或部分是指基于纤连蛋白III

型(“Fn3”)重复的蛋白质或部分。Fn3是具有免疫球蛋白(Ig)折叠结构的小(约10kDa)结构域(即,由七个 $\beta$ 链和六个环组成的Ig-样 $\beta$ -夹心结构)。纤连蛋白具有18个Fn3重复序列,而重复序列之间的序列同源性较低,它们在三级结构中具有很高的相似性。Fn3结构域也存在于纤连蛋白以外的许多蛋白质中,例如粘附分子,细胞表面分子,例如细胞因子受体和碳水化合物结合结构域。对于评论,参见Bork等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89(19):8990-8994(1992);Bork等人,J.Mol.Biol.,242(4):309-320(1994);Campbell等人,Structure,2(5):333-337(1994);Harpez等人,J.Mol.Biol.,238(4):528-539(1994)。术语“FBS”蛋白质或部分旨在包括基于来自这些其它蛋白质(即非纤连蛋白分子)的Fn3结构域的支架。

[0186] Fn3结构域是小的、单体的、可溶的和稳定的。它缺乏二硫键,因此在还原条件下是稳定的。Fn3结构域从N末端到C末端依次包含 $\beta$ 或 $\beta$ 样链,A;环,AB; $\beta$ 或 $\beta$ 样链,B;环,BC; $\beta$ 或 $\beta$ 样链,C;环,CD; $\beta$ 或 $\beta$ 样链,D;环,DE; $\beta$ 或 $\beta$ 样链,E;环,EF; $\beta$ 或 $\beta$ 样链,F;环,FG;和 $\beta$ 或 $\beta$ 样链,G。七个反向平行的 $\beta$ 链排列成形成稳定核心的两个 $\beta$ 片段,同时产生由连接 $\beta$ 或 $\beta$ 样链的环组成的两个“面”。环AB,CD和EF位于一个面(“南极”),环BC,DE和FG位于相对面(“北极”)。人纤连蛋白中至少有15个不同的Fn3模块,而模块间的序列同源性较低,它们在三级结构中具有很高的相似性。

[0187] Fn3分子中的环在结构上类似于抗体的互补决定区(CDR),并且当改变时,可能参与Fn3分子与靶标例如靶标蛋白的结合。当改变时,Fn3分子的其它区域,例如 $\beta$ 或 $\beta$ 样链和N-末端或C-末端区域也可能参与与靶标的结合。环AB、BC、CD、DE、EF和FG中的任何一个或全部可以参与与靶标的结合。 $\beta$ 或 $\beta$ 样链中的任何一种都可能参与与靶标结合。Fn3结构域还可以通过一个或多个环和一个或多个 $\beta$ 或 $\beta$ 样链结合到靶标上。结合也可能需要N末端或C末端区域。用于蛋白质的FBS结构域可以包含所有环,所有 $\beta$ 或 $\beta$ 样链,或仅其一部分,其中修饰(或改变)某些环和/或 $\beta$ 或 $\beta$ 样链和/或N-或C-末端区域,条件是FBS结构域优选特异性结合靶标。例如,FBS结构域可以包含1、2、3、4、5或6个环,1、2、3、4、5、6、7或8个 $\beta$ 链,以及任选的N-末端和/或C末端区域,其中一个或多个环,一个或多个 $\beta$ 链,N末端区和/或C末端区相对于野生型FBS结构域修饰。

[0188] 基于人<sup>10</sup>Fn3结构域的FBS蛋白的一个实例是adnectins(Adnexus,Bristol-Myers Squibb的全资子公司)。adnectins是<sup>10</sup>Fn3分子,其中已经修饰了<sup>10</sup>Fn3结构域的CDR样环区, $\beta$ 链,N末端和/或C末端区,以产生能够结合目的化合物的蛋白质。例如,美国专利7,115,396描述了<sup>10</sup>Fn3结构域蛋白,其中对BC,DE和FG环的改变导致高亲和性TNF $\alpha$ 结合物。美国专利7,858,739描述了Fn3结构域蛋白,其中对BC,DE和FG环的改变导致高亲和力的VEGFR2结合物。

[0189] 在某些实施方案中,FBS部分基于例如人纤连蛋白的纤连蛋白III型结构域的第10个重复序列以外的Fn3重复。例如,FBS部分可能类似于任何其他纤连蛋白III型重复序列,例如第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17和第18个Fn3重复序列。在其它实施方案中,FBS部分可以来自纤连蛋白以外的分子。示例性FBS部分可以衍生自腱生蛋白,一种由15个Fn3结构域组成的蛋白质,其与在纤连蛋白中发现的彼此的序列相似性相似。这些重复序列例如在Jacobs等人,Protein Engineering, Design&Selection,25:107(2012)中进行了描述。基于纤连蛋白分子和腱生蛋白分子中的重复序列的同源性,已经创建了基于这些同源性的人造分子。包含基于纤连蛋白分子中的结构域的同源性的共有氨基酸序列的蛋白质被称为Fibcon和FibconB(WO 2010/093627和

Jacobs等人(2012)同上)以及包含基于腱生蛋白分子中的结构域的同源性的蛋白质被称为Tencon(WO 2010/051274,WO 2010/051310和WO 2011/137319,其通过引用具体并入本文)。Fibcon、FibconB或Tencon部分或其靶标结合变体,无论是通过自身还是连接到异源部分,可以如本文所述融合。来自其它蛋白质,例如细胞表面激素和细胞因子受体,伴侣蛋白和碳水化合物结合结构域的Fn3结构域可如本文所述缀合。

[0190] 可以使用本领域公认的方法产生和测试对任何所需靶标分子特异性的FBS蛋白。测试FBS蛋白结合特性的方法也是众所周知的。例如,快速制造和测试具有特异性结合特性的Fn3结构域的一种方法是Adnexus(Bristol-Myers Squibb R&D Company)的核酸-蛋白质融合技术。本公开利用体外表达和标记技术,称为‘PRO融合’,其利用核酸-蛋白质融合(RNA-和DNA-蛋白质融合)来鉴定对与蛋白质结合重要的新多肽和氨基酸基序。核酸-蛋白质融合技术是将蛋白质与其编码遗传信息共价偶联的技术。关于RNA-蛋白融合技术和基于纤连蛋白的支架蛋白文库筛选方法的详细描述参见Szostak等人,美国专利6,258,558、6,261,804、6,214,553、6,281,344、6,207,446、6,518,018和6,818,418;Roberts等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,1997;94:12297-12302;和Kurz等人,Molecules,2000;5:1259-64,所有这些都通过引用并入本文。

[0191] 示例性FBS蛋白或部分包括但不限于结合mesothelian、磷脂酰肌醇聚糖、TL1A、CD8、肌生成抑制素、LPA1受体、TNF- $\alpha$ 、VEGFR2、PCSK9、IL-23、EGFR或IGF1R的那些以及描述于例如WO 2010/093627、WO 2011/130324、WO 2009/083804、WO 2009/133208、WO 02/04523、WO 2012/016245、WO 2009/023184、WO 2010/051310、WO 2011/020033、WO 2011/051333、WO 2011/051466、WO 2011/092233、WO 2011/100700、WO 2011/130324、WO 2011/130328、WO 2011/137319、WO 2010/051274、WO 2009/086116、WO 09/058379、WO2013/067029和WO2012/016245中的那些(所有这些都通过引用具体并入本文):可以如本文所述使用这些出版物中描述的任何FBS蛋白或部分。

[0192] 在一些实施方案中,FBS蛋白与PDL-1结合。在一些实施方案中,FBS蛋白包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0193] 在某些实施方案中,例如包含FBS蛋白的成像剂与部分连接,该部分通过小增量调节例如增加其血液PK,以增强成像对比度或增加<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的亲和力。在一些实施方案中,哺乳动物(例如,小鼠、大鼠或人)中的多肽的清除率为或增加了大于2倍、大于3倍、大于4倍或大于5倍,相对于未修饰的FBS蛋白。在本文中称为“PK部分”的缓慢从血液中清除蛋白质的部分包括聚氧化烯部分(例如,聚乙二醇),糖(例如唾液酸)和良好耐受的蛋白质部分(例如,Fc及其片段和变体、转铁蛋白或血清白蛋白)。如美国公开2007/0048282中所述,FBS蛋白还可以与白蛋白或白蛋白的片段(部分)或变体融合,或者可以如本文所述与一种或多种血清白蛋白结合FBS蛋白融合。

[0194] 可用于本发明的其它PK部分包括Kontermann等人(Current Opinion in Biotechnology 2011;22:868-76)中所述的那些,其通过引用并入本文。这样的PK部分包括但不限于人血清白蛋白融合物、人血清白蛋白缀合物、人血清白蛋白结合物(例如,Adnectin PKE,AlbudAb,ABD)、XTEN融合物、PAS融合物(即,重组PEG模拟物,其基于三个氨基酸脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸)、碳水化合物缀合物(例如羟基乙基淀粉(HES))、糖基化、聚唾液酸共轭物和脂肪酸共轭物。

[0195] 在一些实施方案中,本发明提供了与作为聚合糖的PK部分融合的<sup>18</sup>F-标记的FBS蛋白。在一些实施方案中,PK部分是聚乙二醇部分。PEG是众所周知的水溶性聚合物,其是可商购的或者可以根据本领域熟知的方法通过乙二醇的开环聚合制备(Sandler and Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)。

[0196] 术语“PEG”广泛地用于涵盖任何聚乙二醇分子,而不考虑大小或PEG的末端的修饰,并且可以由下式表示: $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$ ,其中n为2或更大,例如20至2300,X为H或末端修饰,例如C<sub>1-4</sub>烷基。PEG可以包含由分子的化学合成产生的结合反应所必需的其它化学基团;或者作为分子部分的最佳距离的间隔物。此外,这样的PEG可以由连接在一起的一个或多个PEG侧链组成。具有多于一个PEG链的PEG被称为多臂或支化PEG。支化PEG描述于例如欧洲公开申请473084A和美国专利5,932,462。

[0197] 一个或多个PEG分子可以连接在蛋白质上的不同位置,并且这种连接可以通过与胺、巯基或其它合适的反应性基团反应来实现。胺部分可以是例如在多肽的N-末端发现的伯胺或存在于氨基酸如赖氨酸或精氨酸中的胺基。在一些实施方案中,PEG部分连接在选自以下的多肽上的位置:a) N末端;b) 在N末端和最N末端β链或β样链之间;c) 位于与靶结合位点相对的多肽面上的环;d) C末端和最C末端β链或β样链之间;和e) 在C末端。

[0198] PEG化可以通过定点PEG化实现,其中将合适的反应性基团引入蛋白质以产生优先发生PEG化的位点。在一些实施方案中,修饰蛋白质以在所需位置引入半胱氨酸残基,从而允许在半胱氨酸上进行定点PEG化。可将突变引入蛋白质编码序列以产生半胱氨酸残基。这可以通过例如将一个或多个氨基酸残基突变成半胱氨酸来实现。用于突变为半胱氨酸残基的优选氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和其它亲水性残基。优选地,要突变为半胱氨酸的残基是表面暴露的残基。算法在本领域中是众所周知的,用于预测基于一级序列或蛋白质的残基的表面可及性。可选择地,可以通过比较结合多肽的氨基酸序列来预测表面残基,鉴于框架的晶体结构基于哪个结合多肽被设计和进化已被解决(参见Himanen等人, *Nature* 2001; 414:933-8),因此识别出表面暴露的残基。半胱氨酸残基的PEG化可以使用例如PEG-马来酰亚胺,PEG-乙烯砜,PEG-碘乙酰胺或PEG-邻吡啶基二硫化物进行。

[0199] PEG通常用适于与多肽上的所需位点偶联的合适的活化基团来活化。PEG化方法是本领域公知的,并且进一步描述于Zalipsky, S.等人,“Use of Functionalized Poly (Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides”, *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992), 和Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182。

[0200] PEG可以在分子量方面广泛变化,并且可以是支链或直链的。通常,PEG的重均分子量为约100道尔顿至约150,000道尔顿。PEG的示例性重均分子量包括约1,000道尔顿、约2,000道尔顿、约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约40,000道尔顿、约60,000道尔顿和约80,000道尔顿。在某些实施方案中,PEG的分子量约为5,000道尔顿。也可以使用具有上述任一项的总分子量的PEG的支化形式。在一些实施方案中,PEG有两个分支。在其它实施方案中,PEG具有四个分支。在一个实施方案中,PEG是双PEG (NOF Corporation, DE-200MA)。

[0201] 类似于抗体,如果需要,可以使用adnectin的选择性PEG化来微调(增加增量)adnectin的半衰期。

[0202] 本领域已知的常规分离和纯化技术可用于纯化PEG化FBS蛋白,例如尺寸排阻(例如凝胶过滤)和离子交换色谱。产品也可以使用SDS-PAGE分离。可分离的产品包括单-、二-、三-、多-和未-PEG化Adnectins,以及无PEG。可以通过在洗脱峰周围合并更宽的馏分控制单PEG共轭物的百分比,以增加组合中单PEG的百分比。约90%的单PEG共轭物代表产率和活性的良好平衡。

[0203] IV. 靶标

[0204] 与本文所述的<sup>18</sup>F-标记的探针结合的示例性体内靶标分子是与各种疾病或病症如恶性疾病、心血管疾病、感染性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病或神经学疾病有关的那些。

[0205] 本文提供的是<sup>18</sup>F标记的成像剂,例如[<sup>18</sup>F]-部分-4PEG-DBCO-FPPEGA,其中所述部分特异性结合靶细胞,例如人细胞表面上的靶标蛋白。在某些实施方案中,部分是肽;抗体或其抗原结合部分或抗体的变体;替代性支架,例如Fn3(例如人Fn3)结构域,例如FBS,例如人<sup>10</sup>Fn3结构域。在某些实施方案中,所述部分结合细胞表面分子,例如肿瘤细胞上的细胞表面分子或肿瘤中的细胞,例如位于肿瘤中的肿瘤浸润淋巴细胞。在某些实施方案中,所述部分结合免疫细胞上的细胞表面分子,例如T细胞(例如,Treg细胞)、Teff细胞、B细胞、巨噬细胞、树突状细胞、NK细胞或朗氏细胞。

[0206] 在某些实施方案中,<sup>18</sup>F标记的成像剂包括与免疫肿瘤学靶标(受体或配体)特异性结合的部分,例如免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)上的共刺激受体或免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)上的抑制剂,其靶标调节免疫应答。在一个实施方案中,所述部分结合以下分子之一或其配体或受体:免疫球蛋白超家族(IgSF)成员;B7家族的成员,其包括B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6;TNF受体超家族成员或其配体,例如CD40、CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、GITR、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LTβR、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素α/TNFB、TNFR2、TNFα、LTβR、淋巴毒素α1β2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR(参加,例如Tansey(2009) Drug Discovery Today 00:1);抑制免疫细胞的蛋白质(例如,免疫检查点抑制剂),例如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2和LAG-3、TIM-3、Galectin9、CEACAM-1、BTLA、CD69、Galectin-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4、CD39;刺激免疫应答的蛋白质,例如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、GITRL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3和CD28H;任一下列细胞表面分子:KIR、细胞因子或白介素受体、IL-6、IL-10、TGF-β、VEGF、CSF-1R、CD25和IDO。

[0207] 在一些实施方案中,靶标分子与病原体的抗原或受体结合,所述病原体包括但不限于真菌、病毒、寄生虫和细菌。可通过本文描述的方法检测的致病病毒的实例包括HIV、肝炎(甲型、乙型或丙型)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、Epstein Barr病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、回波病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软体动物病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和arboviral脑炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、Reo病毒、脊髓灰质炎病毒、人类血清parvo样病毒、猿猴病毒

40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、水痘带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人类T细胞白血病病毒、Epstein-Barr病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、Sindbis病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒。细菌和真菌的实例包括无乳链球菌、嗜热军团杆菌、化脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟球菌、肺炎球菌、B型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、结核分枝杆菌和破伤风杆菌。

[0208] 通过本文所述的方法可检测到的引起感染的致病细菌的一些实例包括衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯杆菌、变形杆菌、丝氨酸杆菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽病、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆病细菌。

[0209] 通过本文所述的方法可检测的引起感染的致病真菌的一些实例包括假丝酵母(白假丝酵母、克柔假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母等)、新型隐球酵母、曲霉(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉属(毛霉属、犁头霉属、根霉属)、申克氏胞丝菌、皮炎芽生菌、西副孢子菌、粗球孢子菌和荚膜组织胞浆菌。

[0210] 通过本文所述的方法可检测的引起感染的致病寄生虫的一些实例包括痢疾变形虫、结肠小袋纤毛虫、福氏纳格里阿米巴原虫、棘阿米巴属、肠兰伯氏鞭毛虫、隐孢子虫属、卡氏肺孢子虫、间日疟原虫、微小巴贝虫、布鲁斯锥虫、克氏锥虫、杜氏利什曼虫、刚地弓形虫、巴西日圆线虫。

[0211] V. 生物物理和生物化学表征

[0212] 本文所述的蛋白质靶标分子与靶标分子的结合可以根据平衡常数(例如,解离, $K_D$ )和根据动力学常数(例如,结合速率常数(on-rate constant, $k_{on}$ )和解离速率常数(off-rate constant, $k_{off}$ ))评估。蛋白质靶标分子通常与 $K_D$ 小于500nM、100nM、10nM、1nM、500pM、200pM或100pM的靶标分子结合,尽管在 $k_{off}$ 足够低或 $k_{on}$ 足够高的情况下,可以容忍更高的 $K_D$ 值。

[0213] 用于测定蛋白质靶标分子的结合亲和力的示例性测定包括但不限于溶液相方法,例如动力学排除测定(KinExA)(Blake等人,JBC 1996;271:27677-85;Drake等人,Anal Biochem 2004;328:35-43),使用Biacore系统(Uppsala,Sweden)的表面等离子共振(SPR)(Welford等人,Opt.Quant.Elect 1991;23:1;Morton和Myszka,Methods in Enzymology 1998;295:268)和均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Newton等人,J Biomol Screen 2008;13:674-82;Patel等人,Assay Drug Dev Technol 2008;6:55-68)。

[0214] 在某些实施方案中,可以使用Biacore系统实时监测生物分子相互作用,Biacore系统使用SPR来检测由于高达300nm厚的表面折射率变化而导致的玻璃载体上的薄金膜表面的光的共振角的变化在表面的折射率高达的地方。Biacore分析产生缔合速率常数、解离速率常数、平衡解离常数和亲和力常数。通过使用Biacore表面等离子共振系统(Biacore, Inc.)评估缔合和解离速率常数获得结合亲和力。生物传感器芯片被激活用于靶标的共价偶联。然后将靶标稀释并注入芯片上,以获得固定化材料的反应单位的信号。由于共振单位(RU)中的信号与固定化材料的质量成正比,所以表示基质上固定的靶标密度范围。在整体分析中同时拟合缔合和解离数据以解决1:1双分子相互作用的净速率表达,产生 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 和 $R_{max}$ (饱和浓度时的最大反应)的最佳拟合值。用于结合的平衡解离常数 $K_D$ 由SPR测量计算为

$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。

[0215] 在一些实施方案中,本文所述的蛋白质靶标分子在SPR亲和力测定中显示的 $K_D$ 为500nM或更少、400nM或更少、300nM或更少、200nM或更少、150nM或更少、100nM或更少、90nM或更少、80nM或更少、70nM或更少、60nM或更少、50nM或更少、40nM或更少、30nM或更少、20nM或更少、15nM或更少、10nM或更少、5nM或更少或1nM或更少。

[0216] 应当理解,上文所述的测定是示例性的,并且本领域已知的用于确定蛋白质之间的结合亲和力的任何方法(例如,荧光基转移(FRET)、酶联免疫吸附测定和竞争性结合测定(例如,放射免疫测定))可以用于评估本文所述的蛋白质靶标分子的结合亲和力。

[0217] VI. 制剂

[0218] 还提供了组合物,例如药物组合物,其含有与药用载体一起配制的本文所述的一种 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂或其组合。这样的组合物可以包括一种本文所述的试剂或本文所述的(例如,两种或更多种不同的)试剂的组合。例如,本文所述的药物组合物可以包含 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂和药物的组合。

[0219] 如本文所用,“药用载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮给药(例如通过注射或输注)。根据给药途径, $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂可以涂覆在材料中以保护化合物免受酸和其它可能使化合物失活的天然条件的作用。

[0220] 本文所述的药物化合物可包括一种或多种药用盐。“药用盐”是指保留母体化合物的所需生物学活性并且不产生任何不期望的毒理作用的盐(参见例如Berge, S.M., 等人(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这种盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷等的那些,以及衍生自无毒有机酸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的烷酸、羟基烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等的那些。碱加成盐包括衍生自碱土金属如钠、钾、镁、钙等的那些,以及衍生自无毒有机胺如N, N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等的那些。

[0221] 本文所述的药物组合物还可以包含药用抗氧化剂。药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0222] 可用于本文所述药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油如橄榄油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。例如通过使用包衣材料,例如卵磷脂,通过在分散体的情况下维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。

[0223] 这些组合物还可以含有辅料,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过灭菌方法,同上,和通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨醇等来确保预防微生物的存在。还可以期望将等渗剂如糖、氯化钠等包括在组合物内。此外,可注射药物形式的延长吸收可以通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶而引起。

[0224] 药用载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的

无菌粉末。使用这种介质和试剂用于药物活性物质是本领域已知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容之外,预期其在本文所述的药物组合物中的用途。补充的活性化合物也可以并入组合物中。

[0225] 药物组合物通常在制造和储存条件下必须是无菌和稳定的。该组合物可以配制成适合于高药物浓度的溶液、微乳液、脂质体或其它有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质及其合适的混合物。例如通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散体的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以维持合适的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0226] 无菌可注射溶液可以通过将 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂以所需量根据需要将上面所列成分的一种或其组合一起,并入合适的溶剂中,然后进行无菌微量过滤来制备。通常,通过将活性化合物并入含有碱性分散介质和来自上面列举的那些的所需的其它成分的无菌媒介物来制备分散体。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其从之前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0227] 可以与载体材料组合以产生单一剂型的 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂的量将根据所治疗的个体以及特定的给药模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂的量通常是产生可检测作用的组合物的量。一般来说,在100%之外,这一数量的范围将为约0.01%至约99%的活性成分,优选约0.1%至约70%,最优选约1%至约30%的活性成分与药用载体组合。

[0228] VII. 给药和成像

[0229] 本文描述的 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂可用于各种体内成像应用(例如,用于组织或全身成像)。在某些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂可用于成像靶阳性细胞或组织,例如靶标表达肿瘤(target expressing tumor)。例如,标记的 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂以足以将 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂吸收到感兴趣组织中的量给予受试者。然后使用诸如PET的成像系统对受试者进行成像达对 $^{18}\text{F}$ 放射性核素适当的时间量。然后由成像系统检测 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂与表达靶标剂的细胞或组织的结合。

[0230] 通常,出于成像目的,希望为接受者提供约1mg至200mg范围内的蛋白质或肽的剂量作为单次静脉内输注,尽管也可以根据情况规定给予较低或较高剂量。通常,对于典型的成年人来说,期望向受试者提供在每平方米体表面积约1mg至10mg范围内的蛋白质或肽的剂量,尽管也可以根据情况规定给予较低或较高剂量。可以给予受试者用于成像目的的蛋白质或肽剂量的实例为约1至200mg,约1至70mg,约1至20mg和约1至10mg,尽管可使用较高或较低剂量。

[0231] 在某些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的蛋白质的给予量为每天约0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,通常为0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重至约3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。与PET示踪剂相关联的物质是天然同位素的形式,即 $^{19}\text{F}$ ,对于 $^{18}\text{F}$  PET示踪剂。本发明组合物的特定分析剂量包括约0.5 $\mu\text{g}$ 至约100 $\mu\text{g}$ 的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的蛋白质。剂量通常为约1 $\mu\text{g}$ 至约50 $\mu\text{g}$ 的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的蛋白质。

[0232] 调整剂量方案以提供用于获得吸收<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的组织或细胞的清晰图像的最佳可检测量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于给予和剂量均匀性是特别有利的。本文使用的剂量单位形式是指适合作为<sup>18</sup>F-标记的靶标剂待给予的受试者的单位剂量的物理上离散的单位。本文描述的剂量单位形式的说明由下列支配并直接依赖于：(a) <sup>18</sup>F-标记的靶标剂的靶标部分的独特特征；(b) 待靶标的组织或细胞；(c) 使用的成像技术固有的局限性。

[0233] 对于<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的给予，所用的剂量将依赖于疾病类型、所使用的靶标化合物、受试者的年龄、身体状况和性别、疾病程度、检查部位等。特别地，对受试者的暴露剂量必须充分注意。优选地，向患者给予饱和剂量的<sup>18</sup>F。例如，<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的放射量范围通常为3.7MBq至3.7GBq，优选18MBq至740MBq。或者，例如，剂量可以通过例如mCi测量。在一些实施方案中，用于成像研究给予的<sup>18</sup>F成像量为5-10mCi。在其它实施方案中，有效量将是足以产生约1-5mCi范围内的发射的化合物的量。

[0234] 本文描述的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化，以便获得一定量的有效成分，其有效地实现<sup>18</sup>F-标记的靶标剂在特定患者的细胞或组织中的所需摄取，组合物和给药方式，而不对患者有毒性。然而，应当理解，本公开的<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的总每日用量将由主治医师或其他专业人员在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者的具体有效剂量水平将取决于多种因素，包括例如所用特定组合物的活性；所用的具体组成；宿主的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给予时间；给予途径；所用具体化合物的排泄速率；治疗的持续时间；与所用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料；所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和先前病史等医学领域中公知的因素。在某些实施方案中，成像所需的给予人受试者的<sup>18</sup>F-放射性标记的探针的量将由处方医师确定，剂量通常根据<sup>18</sup>F-放射性核素的发射量而变化。

[0235] 本文所述的组合物可以通过一种或多种给予途径使用本领域已知的各种方法中的一种或多种给予。本领域技术人员将理解，给予途径和/或模式将根据期望的结果而变化。本文所述的<sup>18</sup>F-标记的靶标剂的优选给予途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其它肠胃外给予途径，例如通过注射或输注。本文所用的短语“肠胃外给予”是指不是肠内和局部给予的给予方式，通常通过注射，且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。在某些实施方案中，静脉内给予<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物。

[0236] 或者，本文所述的<sup>18</sup>F标记的靶标剂可以通过非肠胃外途径给予，例如局部，表皮或粘膜给予途径，例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部。

[0237] 在某些实施方案中，本文描述的<sup>18</sup>F-标记的靶标剂可以被配制以确保在体内的适当分布。例如，血脑屏障 (BBB) 排除许多高亲水性化合物。试剂可以通过例如在脂质体中配制它们穿过BBB。关于制备脂质体的方法，参见例如美国专利4,522,811；5,374,548和5,399,331。脂质体可以包含一个或多个选择性转运到特定细胞或器官中的部分，从而增强靶标药物递送(参见例如V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol. 29:685)。示例性靶标部分包括叶酸或生物素(参见例如Low等人的美国专利5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa等人, (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 153:1038)；抗体(P.G.Bloeman等人 (1995) FEBS

Lett.357:140;M.Owais等人(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性蛋白A受体(surfactant protein A receptor)(Briscoe等人(1995)Am.J.Physiol.1233:134);p120(Schreier等人(1994)J.Biol.Chem.269:9090);还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)。

[0238] 当对临床上的患者进行PET成像研究时,可以使用以下示例性操作。在实验日前一段时间内用未标记的蛋白质对患者进行前驱给药,并禁食至少12小时,允许随意摄取水分。将20G两英寸静脉导管插入对侧尺骨静脉,用于血液中的放射性示踪剂给药浓度。

[0239] 将患者定位在PET相机中,并且通过静脉内导管给予示踪剂剂量的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针例如 $^{18}\text{F}$ 实施例9化合物的PET示踪剂( $<20\text{mCi}$ )。在整个PET扫描中以适当的时间间隔采集动脉或静脉血样,以分析和定量血浆中 $^{18}\text{F}$ 实施例2化合物的未代谢的PET示踪剂部分。图像采集长达120分钟。在注射放射性示踪剂的十分钟之内,并且在成像期结束时,获得1ml血样用于测定可能在PET示踪剂之前给予的任何未标记的蛋白质的血浆浓度。

[0240] 通过图像重建获得断层图像。为了确定放射性示踪剂的分布,在重建图像上绘制感兴趣区域(ROIs),包括但不限于肺、肝脏、心脏、肾脏、皮肤或其他器官和组织。在这些区域中,放射性示踪剂随时间推移的摄入被用于产生时间活动曲线(TAC),其在所检查的各种给药模式中在不存在任何干预的情况下或者在存在未标记的蛋白质的情况下获得。数据表示为每单位体积每单位时间的放射性( $\mu\text{Ci}/\text{cc}/\text{mCi}$ 注射剂量)。TAC数据以本领域众所周知的各种方法进行处理,以产生与未占据的靶阳性组织的密度成比例的定量参数,例如结合电位(BP)或分布体积( $V_T$ )。

[0241] VIII. 试剂盒和制品

[0242] 还提供了用于生产本文所述的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标组合物和使用说明书的试剂盒。试剂盒通常包括预定量的试剂与说明书的包装组合和指示试剂盒内容物的预期用途的标签。术语标签包括任何书写或记录材料,其在试剂盒上提供或与试剂盒一起提供,或者以其他方式补充试剂盒。

[0243] 例如,在一些实施方案中,该试剂盒含有能够使辅基原位被 $^{18}\text{F}$ 氟化、然后在给予前使放射性标记的辅基连接到BFC连接的靶标分子(例如,蛋白质或肽)所必需的试剂。

[0244] 在某些实施方案中,试剂盒包含形成 $^{18}\text{F}$ 标记的抗PD-L1 Adnectin体内成像剂所需的一种或多种试剂,例如PD-L1 Adnectin-PEG4-DBCO- $^{18}\text{F}$ ,如本文进一步描述的。例如,试剂盒可以包含含有抗-PD-L1Adnectin-PEG-4-DBCO的第一小瓶和含有 $^{18}\text{F}$ FPPEGA的第二小瓶。试剂盒可以包含含有抗PD-L1 Adnectin-PEG-4-DBCO的第一小瓶,含有4-PEG-甲苯磺酰基叠氮化物的第二小瓶和含有在 $\text{O}^{18}$ 水中的 $^{18}\text{F}$ 的第三小瓶。试剂盒可进一步包含制造PD-L1 Adnectin-PEG4-DBCO- $^{18}\text{F}$ 所需的小瓶,溶液和任选的附加试剂。

[0245] 在一些实施方案中,试剂盒可进一步含有至少一种另外的试剂(例如药用载体)。在一些实施方案中,该试剂盒包括用于根据本文公开的方法产生标记探针的反应前体。试剂盒的组分可以根据如本文所述进行监测的特定生物学条件进行调整。试剂盒可进一步包括本领域已知的合适的缓冲液和试剂,用于将上面所列的组分的各种组合给予宿主细胞或宿主有机体。成像剂和载体可以溶液或冻干形式提供。当试剂盒的成像剂和载体是冻干形式时,试剂盒可以任选地含有无菌和生理上可接受的重构介质,例如水、盐水、缓冲盐水等。

合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可以由各种材料形成,例如玻璃或塑料。它还可以包括从商业和用户的角度所需的其它材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有使用说明书的包装说明书。

[0246] IX. 用途

[0247] 本文提供使用 $^{18}\text{F}$ -标记的靶标剂成像的方法。正电子发射断层扫描术(PET)示踪剂,例如现有的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的PET探针可以与目前可用的PET技术一起使用,用于体外和体内的探索和诊断成像应用。通过PET扫描的 $^{18}\text{F}$ 成像的成像技术和设备在本领域中是众所周知的(参见例如美国专利6,358,489;6,953,567;Page等人,Nuclear Medicine And Biology,21:911-919,1994;Choi等人,Cancer Research 55:5323-5329,1995;Zalutsky等人,J.Nuclear Med.,33:575-582,1992),并且可以使用任何这样的已知PET成像技术或装置。

[0248] 本文提供的成像方法的体内应用包括疾病诊断、疾病进展的监测、预后、确定个体对治疗的响应的可能性、确定治疗的适应性、对治疗的临床反应的监测、临床评估和治疗化合物的剂量选择、动物模型中潜在候选药物的临床前研究,以及组织和器官中靶标分子的区域分布和浓度的研究。体外应用包括在细胞测定中筛选候选药物(例如,竞争性测定、亲和力和测定等)。

[0249] 在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ 标记的靶标剂可用于确定候选治疗化合物组织占用水平与患者临床疗效之间的关系;在开始长期临床研究之前确定候选药物的临床试验的剂量选择;并比较不同候选药物的效力。

[0250] 在一些实施方案中, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物用于体内成像正常或患病组织和/或器官(例如肺、心脏、肾脏、肝脏和皮肤)的方法。例如, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物以有效导致将 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物摄入到感兴趣的细胞或组织中的量给予受试者。然后将受试者引入适当的成像系统(例如,PET系统)足够的时间量以允许检测 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物。来自 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物的检测信号的位置可以与感兴趣的细胞或组织的位置相关。在一些实施方案中,也可以确定位置的尺寸。本文描述了体内成像。还参见美国专利6,126,916;6,077,499;6,010,680;5,776,095;5,776,094;5,776,093;5,772,981;5,753,206;5,746,996;5,697,902;5,328,679;5,128,119;5,101,827;和4,735,210,其各自通过引用并入本文。

[0251] 因此,在某些方面中,提供了获得 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的-探针的图像的方法,该方法包括向个体给予 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,并通过PET在体内将 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的分布成像。

[0252] 在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人、狗、猫、猿、猴、大鼠或小鼠。

[0253] 在某些方面中,提供了诊断受试者中疾病存在的方法,所述方法包括向有需要的受试者给予结合与疾病存在相关的靶标分子的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针,以及获得受试者的至少一部分的放射性图像,以检测 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针的存在或不存在。

[0254] 在一些实施方案中,该疾病是实体癌症、造血癌症、血液癌症、自身免疫疾病、神经变性疾病、心血管疾病或致病性感染。

[0255] 可以使用 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的靶标化合物进行的PET成像来定性或定量检测靶标

化合物。<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物成像剂可以用作生物标志物,并且可以指示受试者中存在或不存在阳性信号,例如,受试者将对给定的治疗应答,例如癌症治疗,或者受试者对治疗有或没有反应。

[0256] 在一些实施方案中,可以以确定的间隔重复该方法的步骤,使得可以根据时间和/或治疗来监测疾病的位置和/或大小。在某些实施方案中,<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物可以用于经历治疗(例如,化学疗法等)的受试者,以帮助可视化对治疗的反应。例如,<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物通常在治疗之前,并且在治疗期间周期性地(例如,每天、每周、每月、这些之间的间隔等)可视化和依大小排列,以监测患者疾病的进展或消退。

[0257] 因此,在某些方面中,提供了监测有需要的受试者的疾病进展的方法,所述方法包括在第一时间点向受试者给予<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,其与和存在疾病相关的靶标分子结合,并且获得受试者的至少一部分的图像以确定患病细胞或组织的量,并在一个或多个后续时间点向受试者给予<sup>18</sup>F-放射性标记的基于蛋白质的探针,并且在每个后续时间点获得受试者的至少一部分(例如,与第一时间点相同的部分)的图像。

[0258] 在某些实施方案中,可以在经历癌症治疗(例如,化学疗法、放射疗法)的受试者中监测肿瘤的大小,并且可以基于检测<sup>18</sup>F-放射性标记的肿瘤靶标实时监测肿瘤的消退程度。

[0259] 在一些实施方案中,本文中的方法用于评估患者对治疗的反应。在一些实施方案中,该方法用于选择或修改治疗化合物的剂量。在一些实施方案中,该方法用于监测<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物在正常组织中的摄取,以分析毒性或患者间的差异。在一些实施方案中,该方法用于监测药物效力或检测耐药性。

[0260] 在一些实施方案中,放射性标记的化合物根据标准药理学实践单独或与药用载体或稀释剂组合在药物组合物中给予于哺乳动物,优选人。这样的组合物可以口服或肠胃外给予,包括静脉内、肌内、腹膜内、皮下、直肠和局部给予途径。在某些实施方案中,给予是静脉内给予。在某些实施方案中,放射性标记的化合物在合成不到一小时内通过静脉内注射给予。

[0261] 在一些实施方案中,就器官特异性摄取而言,<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标剂在体内的生物活性可以通过在适当动物模型中的生物分布研究和动态小动物PET成像研究来测量。例如,对于生物分布研究,一组动物注射<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标剂,并且以一个或多个时间间隔(例如5min.,10min.,30min.,60min.,2h)处死动物的子集。感兴趣的器官和组织被快速切除并称重,并确定放射性。器官和选定组织中的累积放射性计算为注射剂量的百分比(% ID)。

[0262] 在一些实施方案中,本文提供的<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标剂在体外用作筛选工具,以选择用于治疗组织或细胞的化合物。例如,在一些实施方案中,患病细胞在暴露于一种或多种候选药物期间或之后与<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物一起孵育。使用<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标化合物,药物候选物影响疾病的能力可以随时间成像。

[0263] 例如,在表达靶标分子的细胞系中评估<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标剂在体外就与所选靶标分子的特异性结合和摄取放射性标记的组合物而言的生物活性的完整性。对于结合和细胞缔合测定,将细胞在4°C或37°C与<sup>18</sup>F-放射性标记的靶标组合物一起孵育适当的时间。非特异性结合通过添加过量的未标记靶标剂来确定。通过从总结合中减去非特异性结合来计算特异性结合的程度。摄取量表示为每微克蛋白质向细胞添加的靶标剂的总剂量的百分

比(% ID/ $\mu\text{g}$ 细胞蛋白质)。

[0264] 在相关的方面中,本发明提供了用于体内或体外的诊断或放射性药物组合物,其包括 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的基于蛋白质的探针和药用载体。

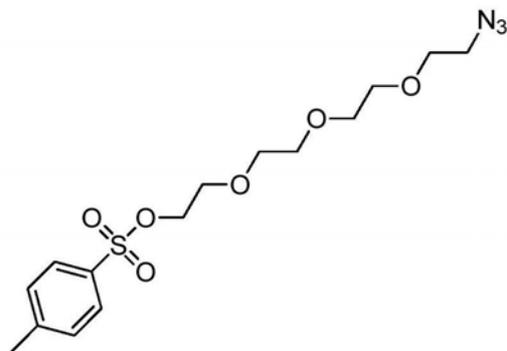
[0265] 通过引用并入

[0266] 本文所述的所有文件和参考文献,包括专利文件和网站,通过引用单独并入本文中,就像全部或部分在本文中写出一样。

[0267] 现在通过参考以下实施例描述本发明,这些实施例仅是示例性的,并不意图限制本发明。尽管已经详细描述了本发明并且参考其具体实施例,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对其进行各种改变和修改。

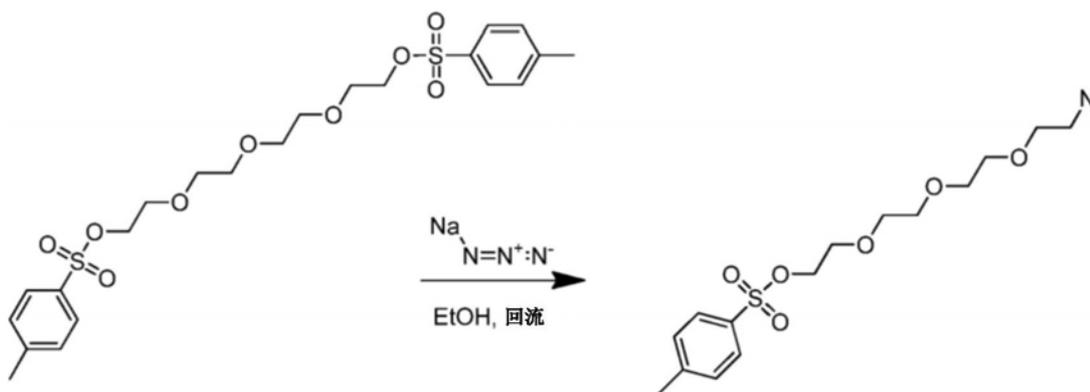
[0268] 实施例1

[0269] 制备4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯



4-甲基苯磺酸 2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯

[0270]



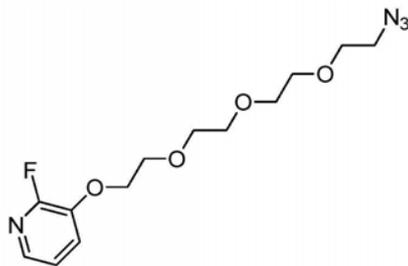
甲基苯磺酸 2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯

[0271] 将((氧基二(乙烷-2,1-二基))二(氧基))二(乙烷-2,1-二基)二(4-甲基苯磺酸酯)(5g,9.95mmol)和叠氮化钠(0.647g,9.95mmol)的混合物溶于乙醇(50mL)并在90℃回流反应混合物达17小时的时段。使用部分真空除去溶剂,然后装载在40克硅胶柱上,并使用快速色谱纯化(IscoCombiFlash-使用线性梯度法洗脱,从10%乙酸乙酯/己烷开始至90%乙酸乙酯/己烷,经45分钟时段)。通过TLC检查合并的馏分并混合以得到无色油状物形式的4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯。由于4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯产品的反应性质,“如原样”使用该物质而不进行任

何进一步表征。

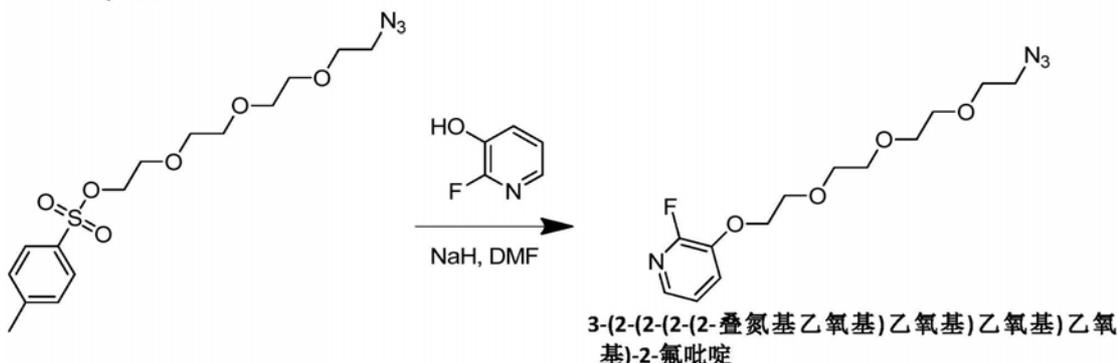
[0272] 实施例2

[0273] 制备3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶



3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶

[0274]

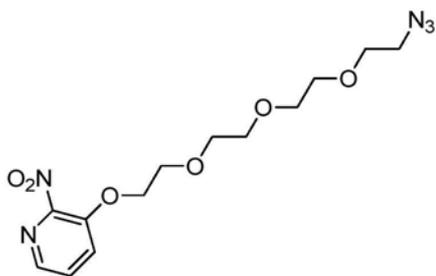


3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶

[0275] 在0℃向氢化钠(0.129g, 3.21mmol)的DMF(10mL)悬浮液中滴加2-氟吡啶-3-醇(0.363g, 3.21mmol)的DMF(5mL)搅拌溶液,然后滴加4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯(1.00g, 2.68mmol)的DMF(5mL)溶液。将悬浮液在0℃保持10min,然后达到环境温度1小时,然后在60℃额外加热4小时。真空除去溶剂。加入100ml乙酸乙酯,然后用浓盐水溶液进行3个单独洗涤萃取(wash extraction)。经硫酸钠干燥有机层,过滤并浓缩。使用快速色谱纯化粗物质(IscoCombiFlash-用10-50%EtOAc/Hex洗脱)以得到无色油状物。分离为澄清油状物的3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶(702mg, 2.233mmol, 83%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ7.75(dt, J=4.9, 1.6Hz, 1H), 7.33(ddd, J=10.0, 8.1, 1.5Hz, 1H), 7.10(ddd, J=7.9, 4.9, 0.7Hz, 1H), 4.30-4.16(m, 2H), 3.95-3.83(m, 2H), 3.80-3.61(m, 10H), 3.38(t, J=5.1Hz, 2H) <sup>13</sup>C NMR(101MHz, 氯仿-d) δ142.3, 137.7, 137.5, 123.4, 123.4, 121.7, 121.6, 77.3, 76.7, 70.9, 70.7, 70.6, 70.0, 69.4, 69.0, 50.6 <sup>19</sup>F NMR(400MHz, 氯仿-d) δ-83.55。HRMS(ESI)理论值:C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>+m/z 315.464;实测值315.1463

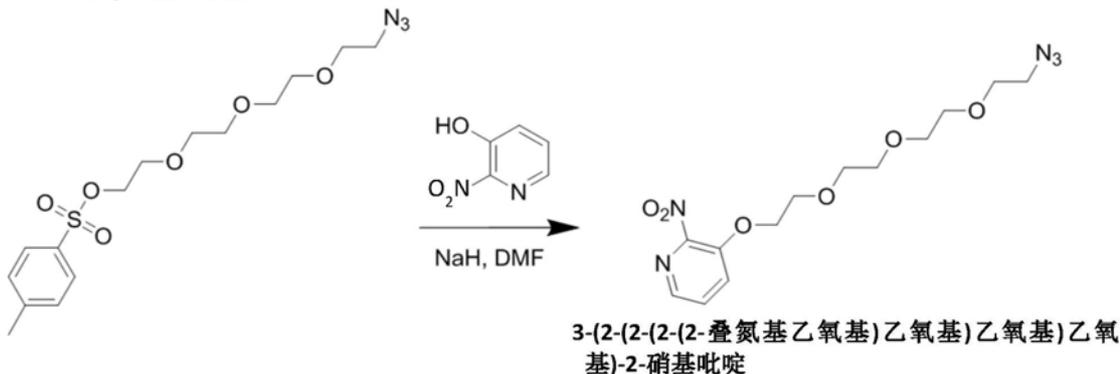
[0276] 实施例3

[0277] 制备3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶



3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶

[0278]



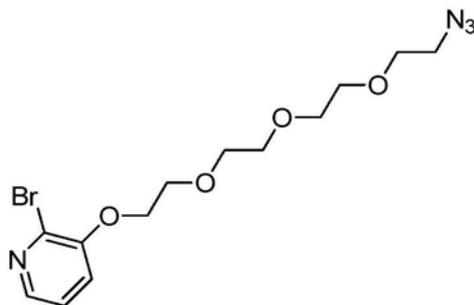
3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶

[0279] 将氢化钠(0.121g, 3.01mmol) (在油中的60%悬浮液)溶于DMF(7.0mL), 并将所得悬浮液冷却至0℃。缓慢加入2-硝基吡啶-3-醇(0.384g, 2.74mmol)的DMF(1.5mL)溶液, 然后滴加4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯(1.023g, 2.74mmol)的DMF(1.5mL)溶液。将悬浮液在0℃保持10分钟, 然后达到环境温度2小时, 然后在60℃加热72小时的时段。用10ml DI水淬灭反应混合物, 然后进行乙酸乙酯萃取(3x10mL)。用浓盐水溶液(10mL)洗涤合并的EtOAc萃取物, 经硫酸钠干燥, 过滤并减压蒸发以得到浅黄色油状物。通过快速色谱纯化粗物质。24g硅胶柱, 25mL/min,

[0280] 从10%乙酸乙酯/己烷开始, 然后线性改变至50%乙酸乙酯/己烷, 经25分钟的时段。此后, 将梯度保持在该溶剂组成10分钟, 然后改变至100%乙酸乙酯, 经10分钟的时段。在色谱的30-40分钟部分之间洗脱3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶, 并减压蒸发合并的馏分, 然后真空蒸发2小时以得到浅黄色油状物形式的3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶(687mg, 1.973mmol, 72.0%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ8.11(dt, J=4.9, 1.6Hz, 1H), 7.60(ddd, J=10.0, 8.1, 1.5Hz, 1H), 7.52(ddd, J=7.9, 4.9, 0.7Hz, 1H), 4.30-4.16(m, 2H), 3.95-3.83(m, 2H), 3.80-3.61(m, 10H), 3.38(t, J=5.1Hz, 2H) <sup>13</sup>C NMR(101MHz, 氯仿-d) δ147.3, 139.5, 128.4, 124.4, 71.1, 70.7, 70.6, 70.0, 69.9, 69.3, 50.7。HRMS(ESI)理论值:C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>+m/z 342.1408; 实测值342.1409

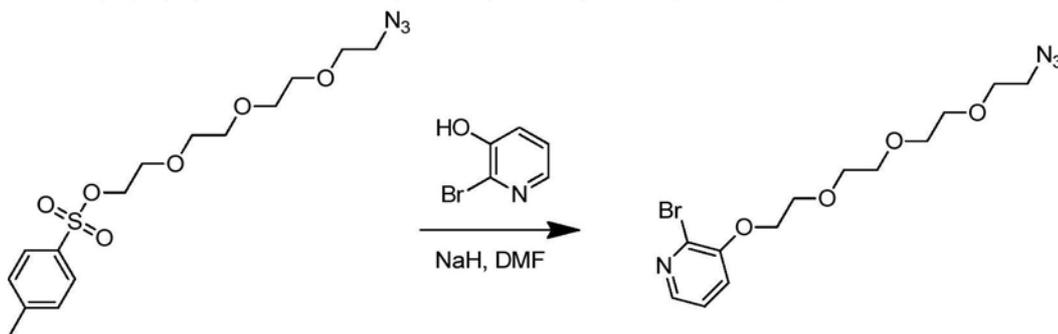
[0281] 实施例4

[0282] 合成3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-溴吡啶



[0283]

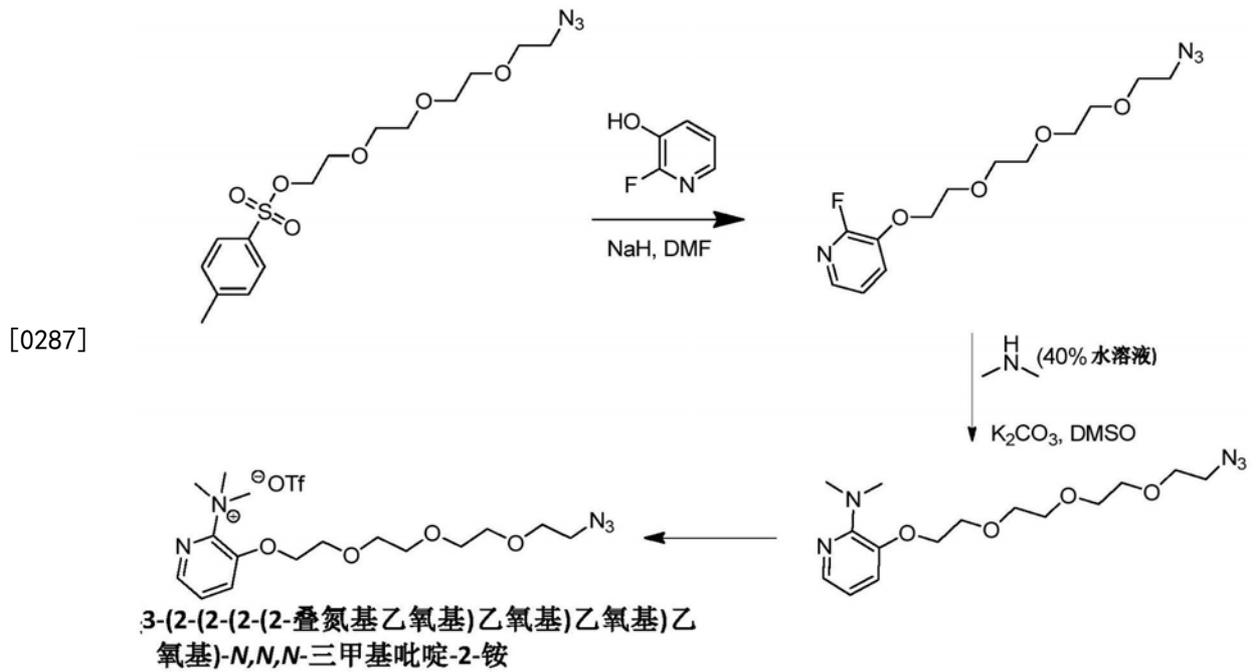
3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-溴吡啶



[0284] 在0℃向氢化钠(NaH, 25.7mg, 0.643mmol)的二甲基甲酰胺(DMF, 5mL)悬浮液中滴加2-溴吡啶-3-醇(112mg, 0.643mmol)的DMF(1mL)溶液,然后滴加4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯(200mg, 0.536mmol)的DMF(1mL)溶液。将悬浮液在0℃保持10分钟,然后达到环境温度并保持1小时,然后加热至60℃且保持4小时。完成加热后,真空除去粗反应混合物的溶剂。在50mL乙酸乙酯中重构粗反应混合物,用2x50mL盐水溶液洗涤,并经硫酸镁干燥有机层,过滤并真空浓缩。使用反相HPLC纯化粗反应混合物以得到浅黄色油状物形式的3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-溴吡啶, TFA(112mg, 0.229mmol, 42.7%产率)。HRMS ESI  $m/z$  (M+H), 理论值C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 375.0664 实测值375.0662; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.97(dd, J=4.6, 1.5Hz, 1H), 7.54(dd, J=8.2, 1.6Hz, 1H), 7.40(dd, J=8.1, 4.6Hz, 1H), 4.24(dd, J=5.3, 3.9Hz, 2H), 3.85-3.78(m, 2H), 3.68-3.62(m, 2H), 3.62-3.52(m, 8H), 3.42-3.34(m, 2H)。

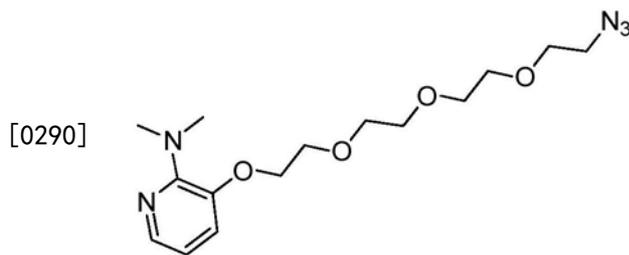
[0285] 实施例5

[0286] 合成三甲基铵化合物的方案

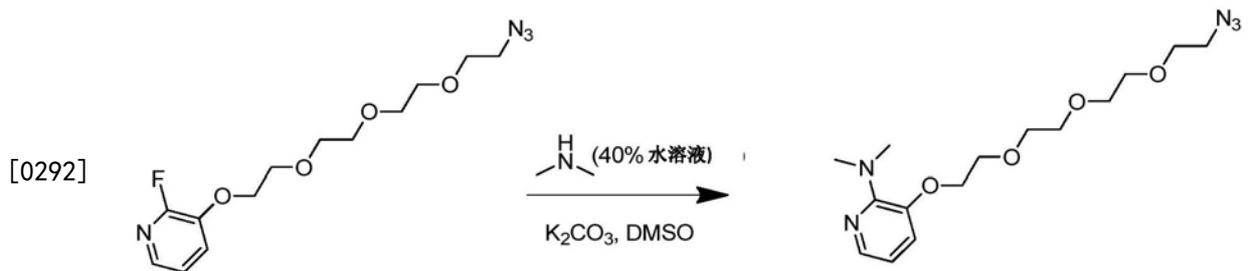


[0288] 实施例6

[0289] 合成3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N-二甲基吡啶-2-胺



[0291] 3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N-二甲基吡啶-2-胺

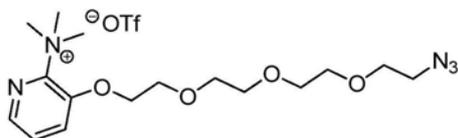


[0293] 在密封的耐压容器中在110℃将3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶(160mg,0.509mmol)、碳酸钾(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,84mg,0.611mmol)和二甲胺(40%的水溶液,0.097mL,0.764mmol)在二甲基亚砷(DMSO,2.5mL)中的混合物加热14小时。加热完成后,真空除去粗反应混合物的溶剂。在50mL乙酸乙酯中重构粗反应混合物,用2x50mL盐水溶液洗涤,并经硫酸镁干燥有机层,过滤并真空浓缩。使用正相色谱纯化粗反应混合物以得到无色油状物形式的3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N-二甲基吡啶-2-胺(140mg,0.413mmol,81%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)δ7.86(dd,J=4.9,

1.5Hz, 1H), 7.02 (dd, J=7.8, 1.5Hz, 1H), 6.73 (dd, J=7.8, 4.9Hz, 1H), 4.20-4.07 (m, 2H), 3.98-3.86 (m, 2H), 3.81-3.61 (m, 9H), 3.38 (t, J=5.1Hz, 2H), 3.13-2.94 (m, 6H), 1.69 (s, 2H)。HRMS (ESI) 理论值: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>+m/z 340.1980; 实测值340.1979。

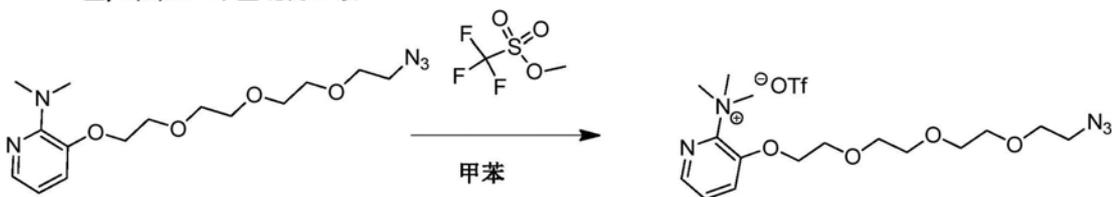
[0294] 实施例7

[0295] 合成3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵



3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵

[0296]

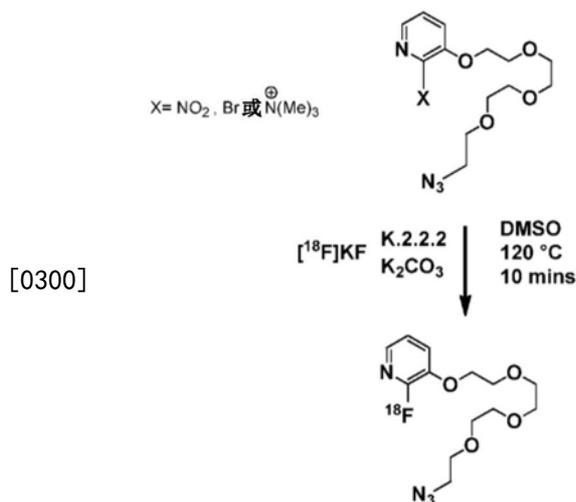


3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵

[0297] 在密封容器中在稳定氮气流下将三氟甲磺酸甲酯(0.065mL, 0.589mmol)加入至3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N-二甲基吡啶-2-胺(40mg, 0.118mmol)的甲苯(1.5mL)溶液中。在14小时的时段内在室温搅拌反应混合物。除去溶剂并用2x10ml乙醚洗涤所得残留物,用2x1ml二氯甲烷共沸干燥并在高压真空下干燥过夜以得到粘稠无色油状物形式的3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵三氟甲磺酸盐,定量产率。LCMS m/z 354.33; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.24-8.17 (m, 1H), 7.98 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.75 (ddd, J=8.2, 4.6, 3.2Hz, 1H), 4.44 (br. s., 2H), 3.88 (d, J=3.9Hz, 2H), 3.69-3.45 (m, 21H)。

[0298] 实施例8

[0299] 使用3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵三氟甲磺酸盐合成<sup>[18F]</sup>-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶



[<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶的合成

[0301] 从P.E.T. Net<sup>®</sup> Pharmaceuticals, West Point PA购买 [<sup>18</sup>F]-氟化物水溶液 (2.0ml, 33.3GBq/900mCi) 并直接转移至Sep-Pak light QMA [使用前, 依次用5ml 0.5M碳酸氢钾、5ml去离子水和5ml MeCN预处理Sep-Pak light QMA柱]。该转移完成后, 通过相继加入碳酸钾 (15mg/ml; 0.1ml), 然后加入碳酸钾 (30mg/ml, 0.1ml)、4, 7, 13, 16, 21, 24-六氧杂-1, 10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷 (15mg, 0.04mmol) 和1.2ml MeCN的混合物从QMA Sep-Pak释放 [<sup>18</sup>F] 氟化物水溶液。在温和氮气流下在90°C和真空下蒸发溶剂。用1ml份乙腈重复共沸干燥两次以产生无水K.2.2.2/K [<sup>18</sup>F]F复合物。将3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)-N,N,N-三甲基吡啶-2-铵三氟甲磺酸盐 (2mg, 5.6μmol) 溶于500微升DMSO并加入至干燥的穴状配体。在120°C加热该溶液10分钟。此后, 用3ml DI水稀释粗反应混合物。然后转移粗反应混合物的全部内容物, 装载并使用反相HPLC和下列条件纯化: HPLC柱: Luna C18 250x10溶剂A: 0.1% TFA/DI水, 溶剂B: 0.1% TFA/乙腈, 流速4.6ml/分钟, 使用等度法, 32%B, 同时在280nm监测UV。在色谱图的24min标记分离得到 [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶并经2分钟的时段收集。将该产物收集至含有10ml DI水的100ml烧瓶中, 并将全部内容物递送至来自Waters的Sep-Pak Vac tC18 6cc 1g sep pack。从该反应混合物分离6.1GBq/164mCi的 [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶。使用3ml乙醇从Sep-Pak将其释放, 并用98°C热源、温和氮气流和真空经15分钟时段浓缩该溶液直至在该小瓶中仅剩余薄膜。在100% 1x PBS缓冲液中重构终产物并在该介质中在37°C稳定1小时。

[0302] 通过利用与含有炔的合适生物产品的“点击”叠氮化物-炔反应, [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶可用于产生<sup>18</sup>F标记的生物产品。

[0303] 实施例9

[0304] 使用“点击化学”制备<sup>18</sup>F-放射性标记的蛋白质

[0305] 在该实施例中, [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶用于放射性标记靶标蛋白, 如图1和5所例示。

[0306] A.4-PEG-甲苯磺酰基-叠氮化物前体的氟化以形成 [<sup>18</sup>F]-FPPEGA

[0307] 将900mCi <sup>18</sup>F/<sup>18</sup>O水 (3ml) 活度 (购自IBA Molecular) 直接转移至含有4, 7, 13, 16, 21, 24-六氧杂-1, 10-二氮杂二环[8.8.8]二十六烷 (2.8mg, 7.44μmol) 和碳酸钾 (1.7mg,

0.012mmol)的微量小瓶(无QMA)中。将另外的2.0ml乙腈转移至该粗反应混合物并共沸干燥全部混合物。这通过使用98°C油浴蒸发溶液并施加温和氮气流和部分真空完成。溶液体积减少至约2ml。加入另外2ml乙腈并经40分钟时段重复该过程3次。当液体体积减少至小于0.3ml时,加入0.7ml等分试样的乙腈,并通过进一步共沸蒸馏浓缩溶液直至体积为~0.1ml。加入另外的0.9ml乙腈并完成该过程直至形成白色固体。该过程耗时~55分钟。最后的操作期间,从油浴移去小瓶,然后将溶液干燥,并将小瓶中的残留物在全真空(无N<sub>2</sub>流)下在室温放置20分钟。转移和干燥<sup>[18F]</sup>-FPPEGA穴状配体混合物的总时间为65min。

[0308] 向干燥的<sup>[18F]</sup>-FPPEGA穴状配体混合物中加入溶于500微升DMSO中的3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶(2mg,5.86μmol),并在120°C加热该混合物10分钟。此后,用3ml DI水稀释粗反应混合物,然后转移全部内容物,并装载于下列HPLC柱和条件:HPLC柱:Luna C18 250x10mm;溶剂A:0.1%TFA/DI水;溶剂B:0.1%TFA/乙腈;流速4.6ml/min;压力1820PSI;等度法32%B;UV-280nm。在色谱图的24分钟标记处分离得到<sup>[18F]</sup>-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶(<sup>[18F]</sup>-FPPEGA)产物并经2分钟的时段收集。将该产物收集至含有15ml DI水的100ml烧瓶中,并将全部内容物递送至Sep PakVac tC18 6cc lg sep pack.PN WAT036795。使用2.5ml乙醇从Sep Pak释放<sup>[18F]</sup>-FPPEGA并用98°C的氮气和真空经15分钟的时段浓缩该溶液直至干燥。将该化合物溶于0.1ml 1X PBS(磷酸盐缓冲盐水)。使用下列条件分析该产物:Varian HPLC HPLC柱Luna C18(2)4.6x150mm溶剂A:0.1%TFA/DI水;溶剂B:0.1%TFA/乙腈;流速1.0ml/min;梯度法0min 90%A 10%B;15mins 30%A 70%B;17mins 30%A 70%B;18mins 90%A 10%B;20mins 90%A 10%B;UV-280nm。分离220mCi<sup>[18F]</sup>-FPPEGA。

#### [0309] B. 制备E01-4PEG-DBCO

[0310] 使用一种FBS蛋白质,即具有以下氨基酸序列的E01 Adnectin:

[0311] GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFTVPNDVMTATISGLKPGVD YTITVYAVTTHGVYFYSPISINYRTPC(E01;SEQ ID NO:1),其含有C末端氨基酸PC。

[0312] 使用马来酰亚胺化学将靶标蛋白质与PEG4-DBCO连接,首先通过使用常规重组技术在其C末端加入脯氨酸、然后加入半胱氨酸来修饰E01Adnectin。将4倍摩尔过量的马来酰亚胺-PEG4-DBCO(Click Chemistry Tools)溶于DMSO中,并在1mM TCEP存在下加入至纯化的修饰的E01 Adnectin中。缀合混合物中DMSO的最终浓度不超过5%。将缀合混合物在室温放置1小时,然后进行质谱分析。在MS确认缀合后,使用在PBS pH 7.2中平衡的HiLoad 26/60Superdex 75柱(GE Healthcare)通过尺寸排阻色谱纯化样品。

#### [0313] C. <sup>[18F]</sup>-FPPEGA与Adnectin的偶联

[0314] 将0.2ml的5.4mg/ml E01-4PEG-DBCO adnectin溶液(如部分B所述制备)与1×PBS缓冲液中的200mCi的0.1ml<sup>[18F]</sup>-FPPEGA(实施例1)一起孵育。通过用移液管将粗反应混合物上下吸取数次来轻微混合溶液,并在45°C或室温一起孵育45分钟。使用SEC柱纯化该粗反应混合物的内容物。在2分钟的时段内在色谱图的37分钟标记处分离Superdex 200 0.5ml/min 1X PBS缓冲液和<sup>[18F]</sup>-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA产物。

[0315] 通过SEC,共同注射非放射性标准品,使用PLRPS柱的RP HPLC和凝胶电泳来分析<sup>[18F]</sup>-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA。

[0316] 用下列参数进行尺寸排阻色谱(SEC):

[0317] Superdex 200柱;溶剂100%1X PBS缓冲液;0.5ml/min 280UV;

[0318] 反相HPLC

[0319] 柱:PLRPS 8微米1000A 4.6x250mm

[0320] 溶剂A:0.1%甲酸/DI水

[0321] 溶剂B:乙腈

[0322] 流速:1ml/min

[0323] 压力:1351PSI

[0324] 梯度:

[0325] 0min 90%A 10%B

[0326] 30min 45%A 55%B

[0327] 32min 25%A 75%B

[0328] 36min 25%A 75%B

[0329] 50min 90%A 10%B

[0330] 分离 $15\text{mCi} [^{18}\text{F}]$ -E01-4PEG-DBCO-FPPEGA,通过SEC和RP HPLC计算,其具有>99%的放射化学纯度(RCP),并且当反应在 $45^\circ\text{C}$ 进行时,比活度为 $0.6\text{mCi/nmol}$ 。当在室温进行反应时,得到 $5.72\text{mCi}$ 。分别在 $45^\circ\text{C}$ 或室温进行反应时, $[^{18}\text{F}]$ -FPPEGA的比活度在其合成结束后3小时为 $0.512\text{mCi/nmol}$ ,且RCP为85.7%。通过Nanodrop(参见<http://www.nanodrop.com>)测量比活度。在SEC和PLRPS上将产物与非放射性标准品共洗脱。凝胶电泳证实了与11kDa分子量标准品一致的 $^{18}\text{F}$ 产物。

[0331]  $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO可用于各种体外和/或体内成像应用,包括诊断成像、基础研究和放射治疗应用。可能的诊断成像和放射治疗应用的具体实例包括确定PD-L1阳性肿瘤的位置、相对活度和/或定量,PD-L1阳性肿瘤的放射性免疫测定和放射自显影以确定PD-L1阳性肿瘤在哺乳动物或其器官或组织样品中的分布。

[0332] 具体地, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO可用于肺、心脏、肾脏、肝脏和皮肤以及人和实验动物的其他器官中PD-L1阳性肿瘤的正电子发射断层扫描术(PET)成像。使用 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO的PET成像可用于获得以下信息:候选PD-L1肿瘤治疗药物的组织占用水平与患者临床疗效之间的关系;在开始长期临床研究之前,PD-L1肿瘤治疗药物临床试验的剂量选择;结构新型PD-L1肿瘤治疗药物的比较效能;研究在用PD-L1肿瘤治疗药物治疗临床靶标期间PD-L1肿瘤治疗药物对体内转运体亲和力和密度的影响;在有效和无效治疗期间,PD-L1阳性肿瘤的密度和分布变化。

[0333] 例如,与未介导状态下的BP或 $V_T$ 相比,在不同给药模式的PD-L1肿瘤治疗药物存在下,通过平衡分析基于BP或 $V_T$ 的变化可以计算出PD-L1的抑制。通过将上述数据对PD-L1肿瘤治疗药物的剂量(浓度)作图产生抑制曲线。然后根据PET放射性配体 $V_T$ 或BP的最大减少来计算PD-L1阳性肿瘤的抑制,这可以通过以下实现:处于 $E_{\text{max}}$ 、 $T_{\text{max}}$ 或 $T_{\text{min}}$ 的阻断药物及其非特异性分布体积( $V_{\text{ND}}$ )和BP在不同给药模式的PD-L1肿瘤治疗药物的存在下与未介导状态下的BP或 $V_T$ 相比的变化。通过曲线拟合剂量率/抑制曲线获得 $\text{ID}_{50}$ 值。

[0334] 实施例10

[0335] 用抗-PD-L1 Adnectin成像剂体外区分PD-L1-阳性细胞与PD-L1-阴性细胞

[0336] 在该试验中,测试 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO体外区分PD-L1-阳性细胞和

PD-L1-阴性细胞的能力。

[0337] 将 $1 \times 10^6$ 个PD-L1-阳性L2987人肺癌细胞或PD-L1阴性HT-29人结直肠腺癌细胞置于5mL培养管中(每个条件,n=3个管)。在PBS+0.5%BSA中以300nCi/200 $\mu$ L的浓度制备 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO溶液。将该溶液的部分用冷的(未标记的)E01 Adnectin或冷的(未标记的)Adnectin(对照)补充至终浓度为450nM。将细胞样品以 $200 \times g$ 离心5分钟,然后重新悬浮于200 $\mu$ L适当的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO溶液中,并在冰上孵育1小时。孵育期后,将细胞样品以 $200 \times g$ 离心,并弃去上清液。将细胞团块重新悬浮于1mL PBS+0.5%BSA中,并重复洗涤操作达总计3次洗涤。最终洗涤后,将细胞再次以 $200 \times g$ 离心,并弃去上清液。然后通过 $\gamma$ 计数器测量剩余的细胞团块的放射性。

[0338] 结果表明细胞标记是特异性的,如由以下证实:与PD-L1阴性HT-29细胞相比, $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO与PD-L1阳性L2987细胞的区别缔合(PD-L1阳性L2987细胞的细胞相关放射性是PD-L1阴性HT-29细胞的44.6倍)。当与过量的450nM冷的(未标记的)E01 Adnectin共孵育时,在细胞相关的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO的显著减少(减少99.6%)的证据进一步证实了特异性。当细胞与450nM冷的(未标记的)非PD-L1结合的adnectin共孵育时,细胞相关的 $^{18}\text{F}$ -E01的减少最低(减少9.9%,不显著)。

[0339] 总之,这些结果证实了 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的E01-4PEG-DBCO在体外区分PD-L1(+)与PD-L1(-)细胞的能力。

[0340] 实施例11

[0341] 用抗-PD-L1 Adnectin成像剂在体内区分PD-L1-阳性肿瘤与PD-L1-阴性肿瘤

[0342] 在该试验中,如实施例9所述,制备具有下列氨基酸序列的 $^{18}\text{F}$ -放射性标记的PD-L1 Adnectin:

[0343] EVVAATPTSLLLISWSYDGPIDRYRITYGETGGNSPVQEFVPPDQKTATISGLKPGVDYITITVYAVR  
LEEAHYNREFPISINYRTPC (A02;SEQ ID NO:2)

[0344] 测试其在小鼠中区分PD-L1-阳性肿瘤和PD-L1-阴性肿瘤的能力。

[0345] 通过在小鼠的相对侧皮下引入 $1 \times 10^6$ 个PD-L1(+)L2987人肺癌细胞和 $1.5 \times 10^6$ 个PD-L1(-)HT-29人结肠癌细胞产生携带双侧异种移植肿瘤的小鼠。一旦肿瘤达到约300mm<sup>3</sup>(细胞植入后约2-3周),选择动物进行成像。为了成像,将动物置于2%异氟烷的麻醉下,并安装尾静脉导管。然后将小鼠放入能容纳4只动物的定制动物笼(holder)中,在研究期间它们仍处于麻醉状态。将动物笼转移到microPET<sup>®</sup>F120<sup>™</sup>扫描仪(Siemens Preclinical Solutions,Knoxville,TN)。该仪器的轴向视野为7.6厘米。由于这种限制,动物被定位以使得扫描区域从眼睛的正前方到大约尾基部。

[0346] 首先采用 $^{57}\text{Co}$ 点源获得10分钟透射图像,以用于最终PET图像的衰减校正的目的。在透射扫描之后,通过先前安装的尾静脉导管给予放射性示踪剂溶液,并获得2小时的发射图像。注射的放射性示踪剂溶液由约200 $\mu$ Ci  $^{18}\text{F}$ -放射性标记的A02或200 $\mu$ Ci  $^{18}\text{F}$ -放射性标记的A02组成,其补充有3mg/kg终浓度的冷的未标记的A02 Adnectin(基于个体动物体重)。在注射前,将所有注射液配制在200 $\mu$ L盐水中。通过直接测量配制剂量并减去注射器和尾静脉导管中残留的放射性来计算精确的注射剂量。

[0347] 使用最大后验(maximum a posteriori,MAP)算法重建图像,其中使用收集的透射图像进行衰减校正,并对放射性同位素衰变进行校正。在最终图像中,使用ASIPro软件

(Siemens Preclinical Solutions) 在肿瘤边界周围绘制感兴趣区域 (ROIs)。计算每个 ROI 的时间-活性曲线,以产生在 2 小时发射图像过程中肿瘤体积内放射性示踪剂的定量视图。为了最终比较,基于每个具体动物的注射放射性示踪剂剂量对各个时间-活性曲线进行标准化。使用每个时间-活性曲线的最终 10 分钟(放射性示踪剂注射后 1 小时 50 分钟-2 小时),在肿瘤之间比较放射性示踪剂摄取。使用这种方法,PD-L1 (+) L2987 异种移植物中的放射性示踪剂摄取为仅接受<sup>64</sup>Cu-A01 放射性示踪剂的动物中 PD-L1 (-) HT-29 异种移植物的 3.05 倍。在共同注射<sup>18</sup>F-放射性标记的 A02 放射性示踪剂和 3mg/kg 未标记的 A02 Adnectin 的动物中,PD-L1 (+) L2987 异种移植物的摄取仅为 PD-L1 (-) HT-29 异种移植物的 1.04 倍。

[0348] 对于一些研究,在成像后立即通过颈椎脱位处死动物。然后对动物进行尸体剖检,并将各组织(血液、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、胃、骨、L2987 肿瘤和 HT-29 肿瘤)收集至预先称重的管中。然后再次称重所有组织以确定每个组织的重量。然后使用 Perkin-Elmer Wizard3  $\gamma$  计数器直接离体测量每个组织中的放射性。对于所有组织,将每分钟计数 (CPM) 的测量值标准化为针对各个动物的注射放射性剂量,并对放射性衰变进行校正。然后绘制这些结果以显示放射性示踪剂的生物分布,如图 2 所示。

[0349] 这些结果证明了与 PD-L1 (-) HT-29 异种移植物相比,PD-L1 (+) L2987 异种移植物中放射性示踪剂的明显区别摄取。此外,唯一具有较高 PD-L1 摄取的组织是肾脏,这是可预期的,这是因为预期<sup>18</sup>F-放射性标记的 A02-4PEG-DBCO Adnectin 的清除是通过基于分子的分子量的肾脏过滤。

[0350] 总之,这些结果提供 PD-L1 (+) 与 PD-L1 (-) 异种移植肿瘤的体内区分的直接可视化。通过共同注射 3mg/kg 未标记的抗 PD-L1 A02 adnectin 进一步证明特异性,这导致 PD-L1 (+) 肿瘤中放射性示踪剂摄取降低至 PD-L1 (-) 异种移植物的水平。使用<sup>18</sup>F-A02 Adnectin 放射性示踪剂所获得的 hPD-L1 (+) L2987 异种移植物与 hPD-L1 (-) HT-29 异种移植物的最大放射性示踪剂摄取比为 3.53:1。这使用 PET 成像进一步验证了抗 PD-L1 adnectin 用于可视化 PD-L1 组织表达的用途。在鼠中进行使用<sup>18</sup>F 作为放射性核素的类似实验,得到类似的结果。

[0351] 实施例 12

[0352] 食蟹猴的体内成像

[0353] 当在食蟹猴中进行时,<sup>18</sup>F-放射性标记的 E01 成像剂也显示相似的结果。在这些研究中,测试了如实施例 9 中所述制备的<sup>18</sup>F-E01 抗 PD-L1 在食蟹猴中产生高对比度图像的能力。本文所述的抗 PD-L1 adnectin 对食蟹猴 PD-L1 保持高亲和力(但对啮齿动物 PD-L1 具有低亲和力)。此外,由于食蟹猴不含有如小鼠模型中的 PD-L1 (+) 肿瘤,所以成像性能主要根据在内源性 PD-L1 表达的背景下在图像中测量的背景水平进行评估(低背景使得用于 PD-L1 (+) 组织的高灵敏度检测成为可能)。在这些研究中,所得 PET 图像的背景水平非常低,其中主要在肾脏、脾脏和膀胱中注意到显著放射性示踪剂积聚。

[0354] 用 0.02mg/kg 阿托品、5mg/kg Telazol 和 0.01mg/kg 丁丙诺啡 I.M (全部吸入单个注射器) 将具有先前安装的血管通路口 (VAP) 的雄性食蟹猴麻醉。然后将 i.v. 导管置于头部血管中,以在成像过程期间进行流体给药以维持水合作用。用通常为 3.0mm 的气管内导管对动物进行插管,并转移至 **microPET<sup>®</sup>F220<sup>™</sup>** PET 仪器 (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN) 的成像床。用异氟烷和氧气维持麻醉,并在成像操作期间以 6ml/kg/hr 的速

率给予I.V.流体(LRS)。由于microPET<sup>®</sup>F220<sup>™</sup>仪器的轴向视野仅为7.6cm,获取了5个不同床位置的图像,以便从心脏正上方通过大约骨盆处产生动物的复合图像。

[0355] 对于每个视野,首先采用<sup>57</sup>Co点源获得10分钟透射图像,以用于最终PET图像的衰减校正的目的。一旦获得所有床位置的透射图像,通过安装的VAP给予约1.5mCi(约0.015mg/kg)的<sup>18</sup>F-E01 adnectin放射性示踪剂。然后对于每个床位置顺序地获取五分钟持续时间的发射扫描,在大约心脏中心处的位置1开始朝向动物的骨盆移动。一旦在每个位置(1至5)获取图像,将成像床移回床位置1,并重复该过程。使用此操作,在成像研究期间,对于每个床位置获得总共5个不同的图像。

[0356] 使用滤过反向投影(FBP)算法重建各个图像,其中使用收集的透射图像进行衰减校正,并对放射性同位素衰变进行校正。然后通过排列来自覆盖成像研究的持续时间的从单次通过获得的所有5个床位置的图像(即,从床位置1至5的每组连续图像产生单个复合图像)来生成最终复合图像(图3)。目视检查最终图像以观察可见的放射性示踪剂摄取(即脾脏、肾脏、膀胱)和背景组织(肌肉)的区域。<sup>18</sup>F-E01 adnectin的背景积累非常低,其中在背景组织如肌肉中几乎没有信号可见。此外,在脾脏中验证了摄取,据信其是基于mRNA表达的PD-L1(+).因此,食蟹猴的研究证明了在内源性PD-L1背景下高灵敏度PD-L1成像的潜力。

[0357] 综上所述,啮齿动物和食蟹猴的PET研究显示,根据本文所述的方法产生的<sup>18</sup>F标记的蛋白质提供用于体内标记靶标阳性组织的强力和特异性探针,其具有用于高灵敏度检测具有低水平靶标表达的组织的潜力。

[0358] 实施例13

[0359] 使用 [<sup>18</sup>F]-A02抗-PD-L1 adnectin的体外放射自显影

[0360] 将人肺肿瘤组织嵌入OCT中,并在2-甲基丁烷中冷却2-5分钟直至冷冻。将样品储存在-80℃的致冷器中直至使用。人异种移植组织也包括在测定中。通过将 $4 \times 10^6$ 个PD-L1(+)-L2987细胞和 $1.5 \times 10^6$ 个PD-L1(-)HT-29t细胞皮下引入nu/nu小鼠的相对侧,产生携带双侧异种植物的小鼠。一旦产生的异种移植肿瘤达到适当的大小(约200-300mm<sup>3</sup>),用2%异氟烷麻醉小鼠,并通过颈椎脱位处死。将新鲜的肿瘤组织切下,浸入OCT中,在2-甲基丁烷中冷却2-5分钟直至冷冻。然后将组织包裹在箔/ZIPLOC<sup>®</sup>袋中并在-80℃储存直至使用。对于所有组织(人肺肿瘤和异种植物),使用低温恒温器切割5μm厚度的切片(收集为2个切片/载玻片),解冻安装在玻璃显微镜载玻片上,并使其风干约30分钟。

[0361] 使用以下条件进行分别为0.025nM、0.25nM、2.5nM和25nM的冷的(未标记的)A02 adnectin和25nM非PD-L1结合的adnectin的阻断研究。将各个载玻片(每个浓度1个载玻片)放置在塑料载玻片盒中,并在Dako无血清蛋白质封闭溶液中预孵育30分钟。然后将载玻片转移到载玻片孵育室中进行进一步孵育。单独地,通过用300ml PBS+0.5%BSA稀释10.6μl原始放射性配体储备液(在实验时为7064nM),制备0.25nM <sup>18</sup>F-A02 adnectin的储备液。从该储备液中,将40ml加入到每个孵育室中。这些室中的一个仅含有放射性配体缓冲液,其被称为总结合切片。其他孵育室接受40ml该储备液连同相关浓度的阻断化合物(0.025nM、0.25nM、2.5nM或25nM未标记的A02 adnectin,或25nM未标记的adnectin)。将载玻片在单独的缓冲液中在室温孵育1小时以达到最大结合。孵育后,将各处理组的载玻片从孵育溶液中取出,并置于冰冷洗涤缓冲液(PBS+0.5%BSA)中3分钟,并淋洗4次。然后将载玻片在冷空气流下干燥大约30分钟。通过在室温将载玻片置于成像板上过夜暴露风干的载玻片。使用生

物成像分析仪 (Fujifilm Fluorescent Image Analyzer, FLA-9000) 扫描成像板。放射自显影图像的像素大小为100 $\mu$ m。使用Multi-Gauge软件进行图像分析。在所有研究组中绘制感兴趣区域 (ROIs) 以围绕整个肿瘤组织。从这些ROI定量来自组织相关放射性的放射自显影信号。

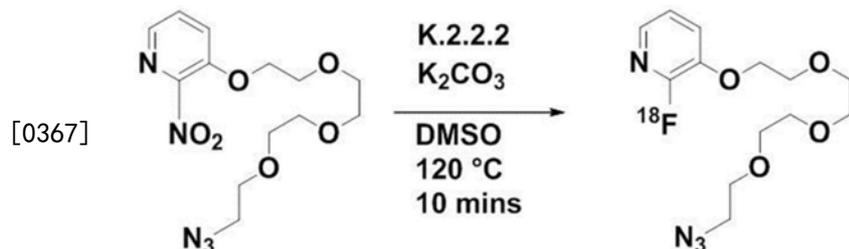
[0362] 在人肺肿瘤切片以及人异种移植切片中测定针对4种不同浓度 (0.025nM、0.25nM、2.5nM和25nM) 的未标记的A02 adnectin与总结合切片相比的 $^{18}\text{F}$ -A02 adnectin放射性配体的表观位移 (apparent displacement)。在添加未标记的A02 adnectin的所有组织切片中观察到 $^{18}\text{F}$ -A02的剂量依赖位移。与总结合相比, 25nM的非PD-L1结合Adnectin在所有组织中显示出最小的阻断 (图4A)。

[0363] 对来自每个组织的系列5 $\mu$ m组织切片进行抗-人-PD-L1免疫组织化学操作以验证样品中PD-L1抗原表达的水平 (图4B)。

[0364] 总之, 这些结果提供在人肺肿瘤样品以及人异种移植组织中PD-L1的直接可视化。单个组织中放射性配体结合水平对应于IHC冷冻切片的PD-L1染色强度。另外, 用未标记的抗PD-L1 A02 adnectin进行的受体的剂量依赖性阻断 (并且没有使用未标记的非PD-L1结合adnectin进行阻断) 进一步证实了使用PET成像,  $^{18}\text{F}$ -A02用于可视化PD-L1组织表达的用途。

[0365] 实施例14

[0366] 根据放射性合成的一般操作使用商业GE TRACERlab FX2N合成单元自动制备 [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶



[0368] 操作:

[0369] 使用非盒式GE TRACERlab FX2N合成模块进行 [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶的自动合成。合成单元的设置总结在表1和图6中。将 [ $^{18}\text{F}$ ]-氟化物水溶液 (2.0ml, 29.6GBq/800mCi) 递送至Sep-Pak light QMA [在使用前依次用5ml 0.5M碳酸氢钾、5ml去离子水和5ml乙腈预处理Sep-Pak light QMA柱]。完成该转移后, 通过将洗脱混合物 (来自“V1”) 加入到反应器中从QMA Sep-Pak中释放 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化物水溶液。在温和的氮气流和真空下蒸发溶剂。将前体溶液 (来自“V3”) 加入到干燥的穴状配体残留物中, 将该反应混合物加热至120 $^{\circ}\text{C}$ 且保持10分钟。然后将4ml蒸馏水 (来自“V4”) 加入到反应器中的粗反应混合物中, 并将混合物通过液体传感器转移到半制备HPLC的5ml样品注射回路中, 该液体传感器控制装载结束。将混合物装载到半制备HPLC柱 (Luna C18 (2) .250x10mm, Phenomenex) 上。35%乙腈在0.1%三氟乙酸水溶液中的混合物以4.6ml/分钟的速率冲洗通过柱。将产物从该HPLC柱收集至含有15ml蒸馏水的稀释烧瓶中, 并将其全部内容物转移到tC18 1克固相提取柱中。用3ml乙醇从该柱 (来自“V14”) 释放352mCi (13GBq) 的 [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶, 并可用于通过利

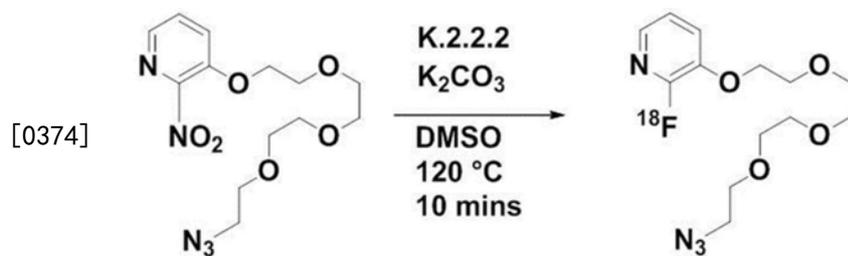
用与含有炔的适当生物制品的“点击”叠氮化物-炔反应来产生<sup>18</sup>F标记的生物产品。

[0370] 表1

小瓶 1 (V1)	16 mg K.2.2.2, 3 mg 碳酸钾, 溶于 0.1 ml 蒸馏水和 1.4 ml 乙腈
小瓶 3 (V3)	2 mg 3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶/0.5 ml DMSO
小瓶 4 (V4)	4 ml 蒸馏水
小瓶 14 (V14)	3 ml 100% 乙醇
稀释烧瓶	15 ml 蒸馏水
柱 1 (C1)	tC18 6 cc 1g sep pack
HPLC 柱	Luna C18(2), 250x10mm, 5 μm, Phenomenex
HPLC 溶剂	35% 乙腈/0.1% 三氟乙酸水溶液
HPLC 流速	4.6 ml/min

[0372] 实施例15

[0373] 根据放射性合成的一般操作使用商业 IBA Synthera 合成单元自动制备 [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶



[0375] 操作:

[0376] 使用盒式 IBA Synthera 合成模块和适当组装的集成流体处理器套件 (integrator fluidic processor kit) 进行 [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶的自动合成。集成流体处理器 (IFP) 套件装载有用于该合成的合适前体, 并且总结在表2中。纯化在 Varian HPLC 单元上进行。HPLC 的注射回路的填充通过 HPLC 单元上的稳定的氮气流控制。两种自动化的设置总结在表2中。将 [<sup>18</sup>F]-氟化物水溶液 (2.0 ml, 29.6 GBq/800 mCi) 递送至 Sep-Pak light QMA [在使用前依次用 5 ml 0.5 M 碳酸氢钾、5 ml 去离子水和 5 ml 乙腈预处理 Sep-Pak light QMA 柱]。完成该转移后, 通过将洗脱混合物 (来自“V1”) 加入到反应器中从 QMA Sep-Pak 中释放 [<sup>18</sup>F] 氟化物水溶液。在温和的氮气流和真空下蒸发溶剂。将前体溶液 (来自“V2”) 加入到干燥的穴状配体残留物中, 将该反应混合物加热至 120 °C 且保持 10 分钟。然后将 3 ml 蒸馏水 (来自“V4”) 加入到反应器中的粗反应混合物中, 并将混合物通过液体传感器转移到半制备 HPLC 的 5 ml 样品注射回路中, 该液体传感器控制装载结束。将混合物装载到半制备 HPLC 柱 (Luna C18 (2) .250x10mm, Phenomenex) 上。在 0.1% 三氟乙酸水溶液中的 35% 乙腈的混合物以 4.6 ml/分钟的速率冲洗通过柱。将产物从该 HPLC 柱收集到含有 15 ml 蒸馏水的稀释烧瓶中, 并将其全部内容物转移到 tC18 1 克固相提取柱中。用 3 ml 乙醇从该柱释放 325 mCi (12 GBq) [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-氟吡啶, 并可用于利用与含有炔的适当生物制品的“点击”叠氮化物-炔反应产生 <sup>18</sup>F 标记的生物产品。

[0377] 表2

小瓶 1 (V1)	22 mg K.2.2.2, 4 mg 碳酸钾, 溶于 0.3 ml 蒸馏水和 0.3 ml 乙腈
小瓶 2 (V2)	2 mg 3-(2-(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-2-硝基吡啶/0.5 ml DMSO
小瓶 4 (V4)	3 ml 蒸馏水
[0378] 稀释烧瓶	15 ml 蒸馏水
柱 1 (C1)	tC18 6 cc 1g sep pack
HPLC 柱	Luna C18(2), 250x10mm, 5 μm, Phenomenex
HPLC 溶剂	35% 乙腈/0.1% 三氟乙酸水溶液
HPLC 流速	4.6 ml/min

[0379] 等价形式

[0380] 本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验来确定本文所述的具体实施例的许多等价形式。这样的等价形式旨在被所附权利要求所涵盖。

## 序列表

<110> 百时美施贵宝公司

<120> 用于生物制品的 18F-放射性标记的方法和组合物

<130> MXI-540PC

<140> PCT/US2015/062502

<141> 2015-11-24

<150> US 62/084,366

<151> 2014-11-25

<160> 2

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: FBS 蛋白, 含有 C 末端氨基酸 PC 的 E01 Adnectin

[0001]

<400> 1

Gly Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Arg Ala Gln Leu Ser Pro Ser Phe Tyr

20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu

35 40 45

Phe Thr Val Pro Asn Asp Val Met Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

50 55 60

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Thr His Gly

65 70 75 80

Val Tyr Phe Tyr Ser Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Cys

85 90 95

<210> 2

<211> 88

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成: 18F-放射性标记的 PD-L1 Adnectin, A02

<400> 2

Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Ser Tyr

1 5 10 15

Asp Gly Pro Ile Asp Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly

20 25 30

[0002] Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Pro Asp Gln Lys Thr

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val

50 55 60

Tyr Ala Val Arg Leu Glu Glu Ala His Tyr Asn Arg Glu Phe Pro Ile

65 70 75 80

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Pro Cys

85

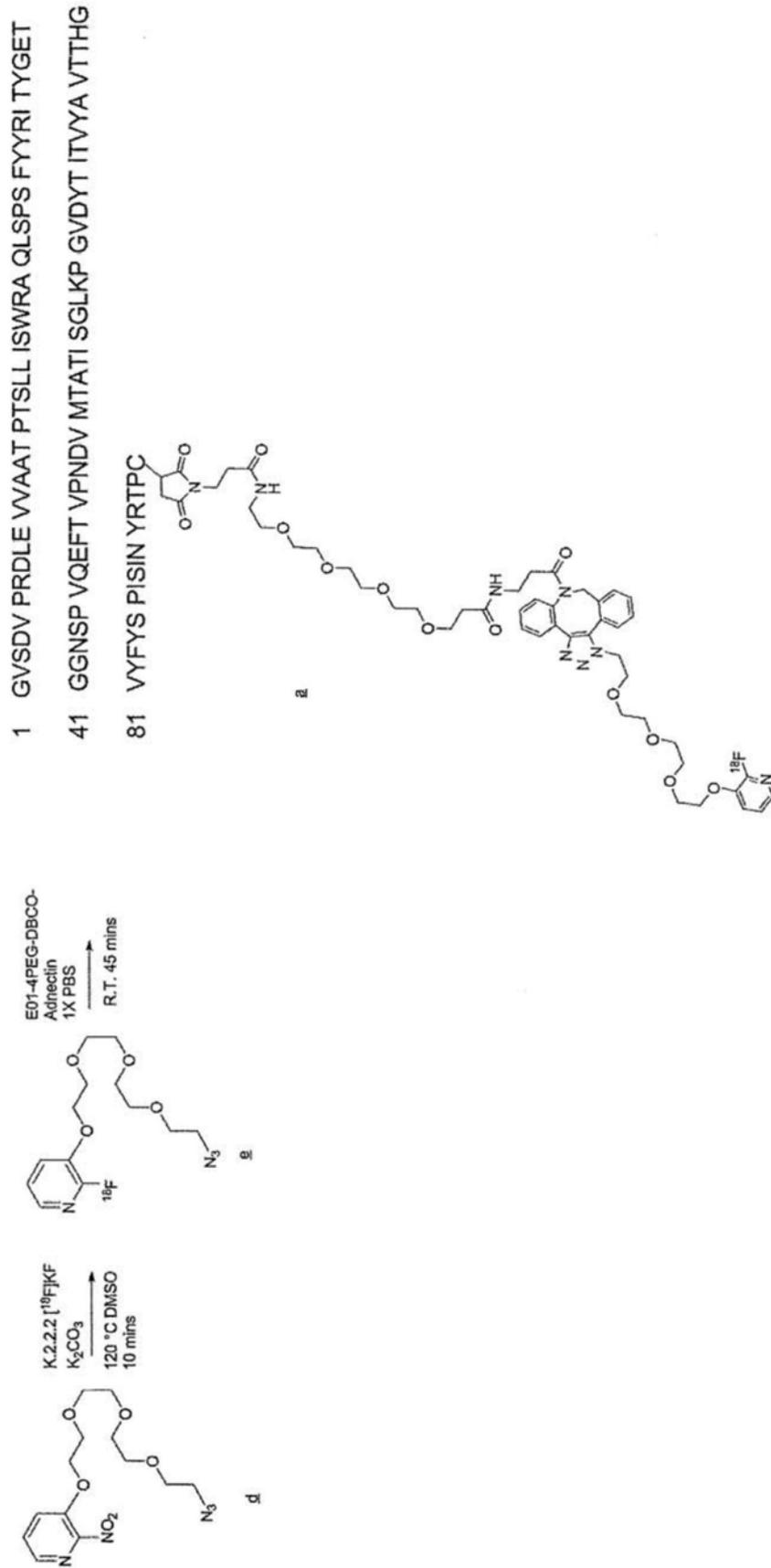


图1

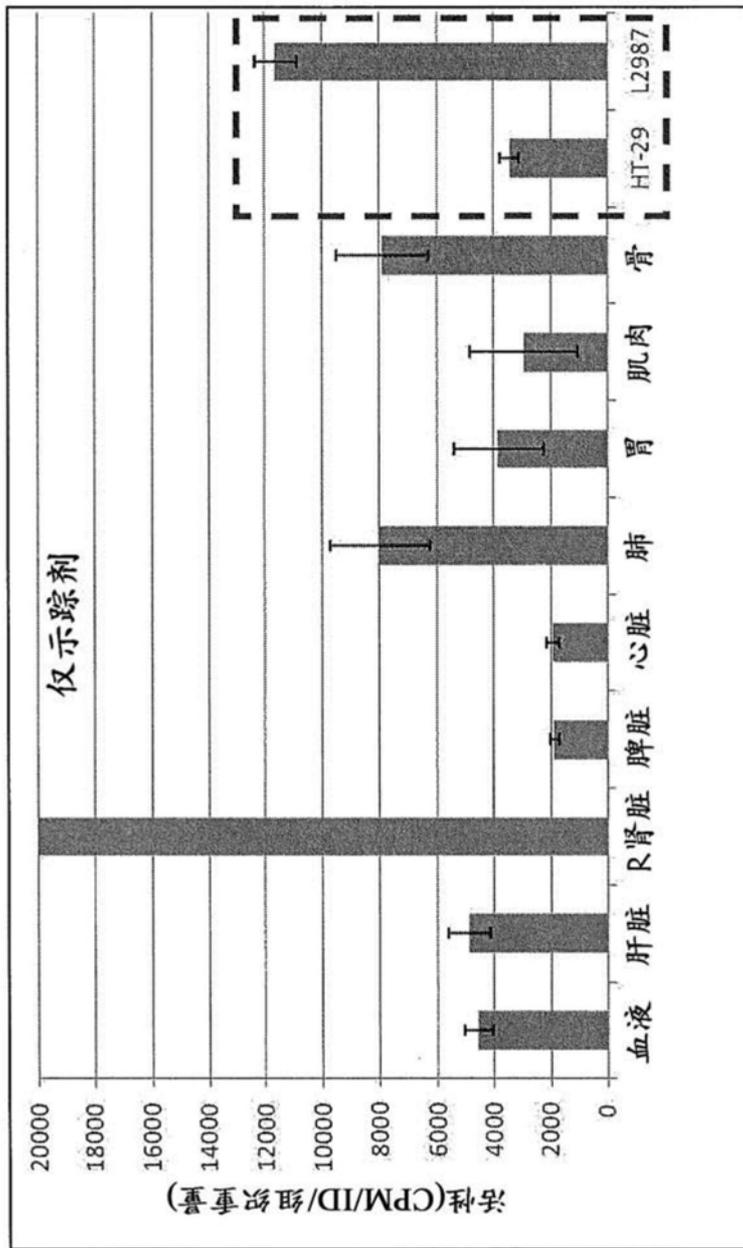


图2

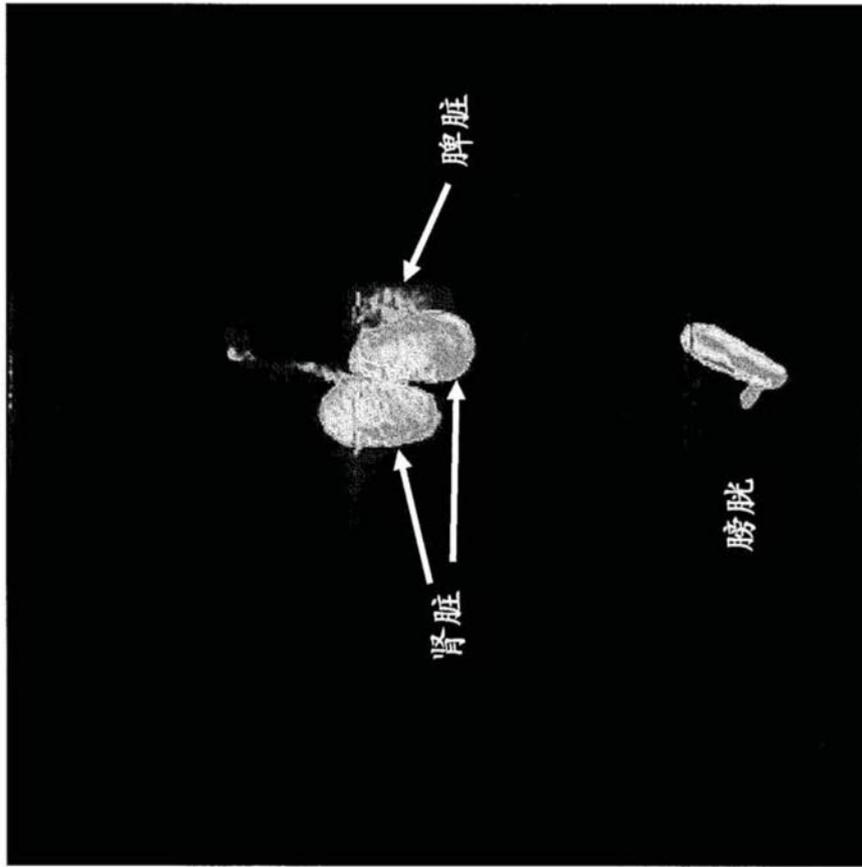


图3



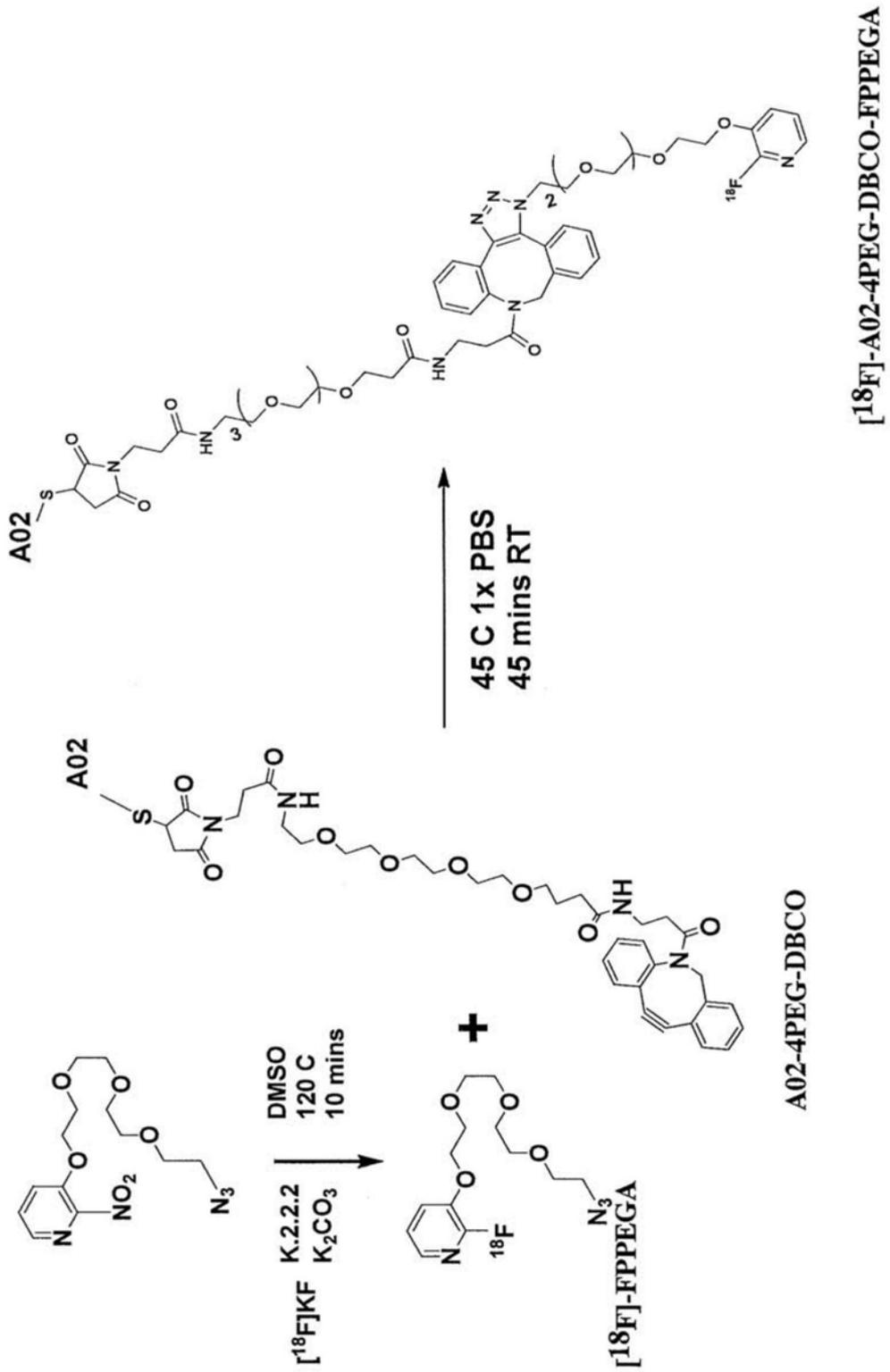


图5

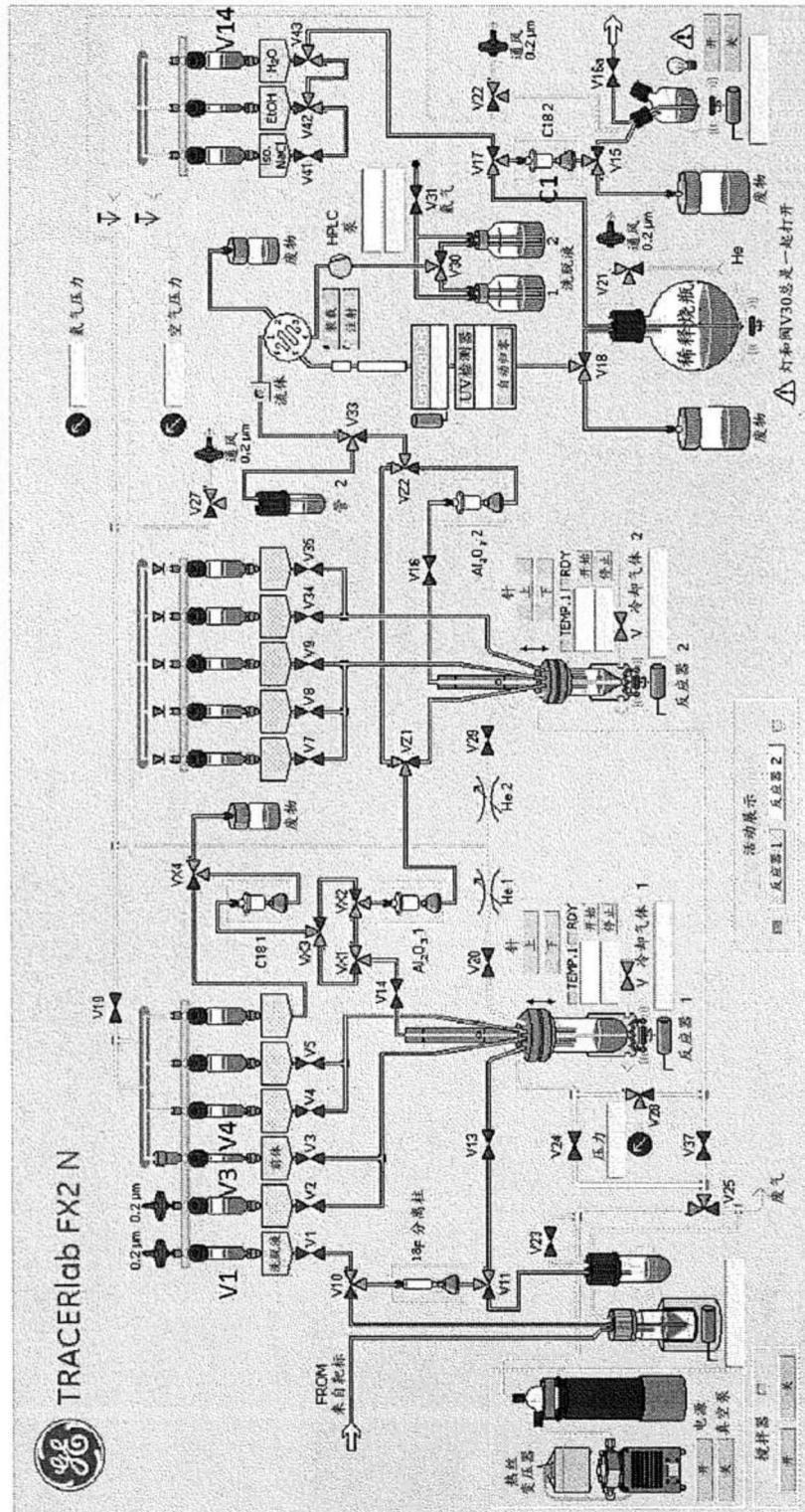


图6

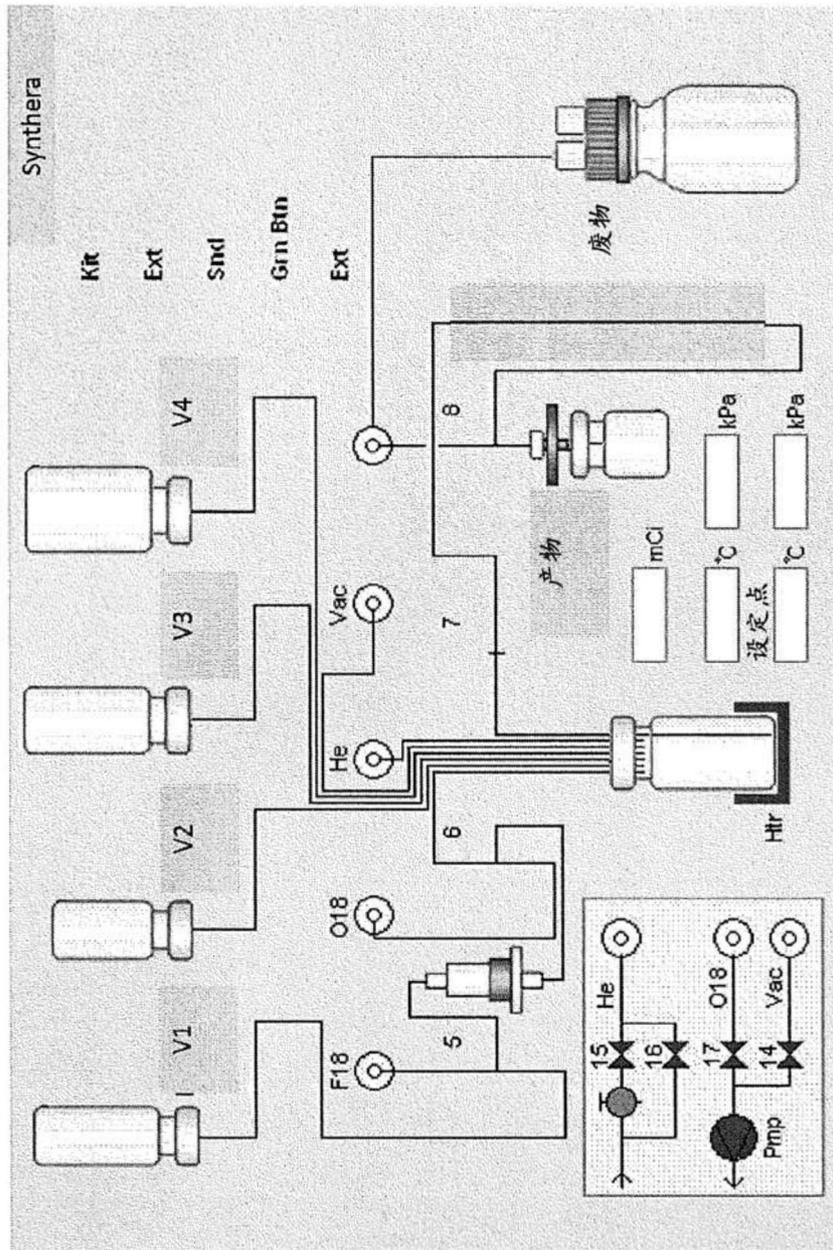


图7