

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 49/00 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03814683.5

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100528241C

[22] 申请日 2003.5.6 [21] 申请号 03814683.5

[30] 优先权

[32] 2002.5.6 [33] US [31] 60/378,571

[86] 国际申请 PCT/US2003/014379 2003.5.6

[87] 国际公布 WO2003/092742 英 2003.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.23

[73] 专利权人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

[72] 发明人 C·P·利蒙 M·A·帕克

[56] 参考文献

US 5688488 A 1997.11.18

审查员 刘启明

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 张元忠 李连涛

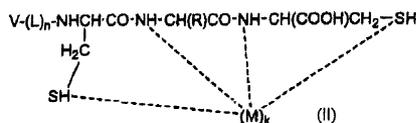
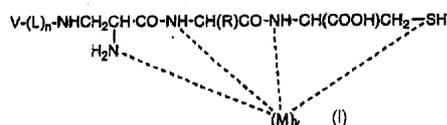
权利要求书 6 页 说明书 34 页 附图 23 页

[54] 发明名称

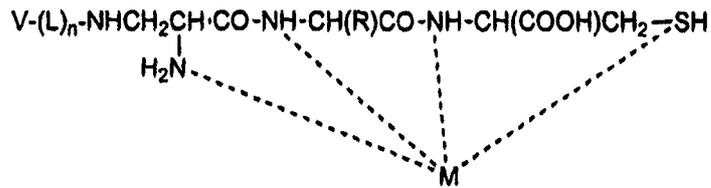
维生素 - 定向的显象剂

[57] 摘要

本发明涉及通过利用维生素作为显象剂的定向配体将放射性核素型显象剂导引到具有维生素受体, 或维生素受体结合衍生物或其类似物的细胞的化合物和方法。本发明提供了用于所述方法的具有结构式(I)或(II)的化合物。在所述化合物中, V 是维生素, 它是受体 - 介导的体内跨膜转运的底物, 或维生素受体结合衍生物或其类似物, L 是二价连键, R 是结构式为  $H_2NCHR\text{COOH}$  的氨基酸的侧链, M 是放射性核素的阳离子, n 是 1 或 0, K 是 1 或 0, 并且, 所述化合物可存在于可以药用的它的载体中。所述维生素型化合物可用于将放射性核素引导到各种细胞上, 如多种肿瘤细胞类型, 用于所述靶细胞的诊断性显象。







其中，V 是维生素，它是受体-介导的体内跨膜转运的底物，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物；

L 是二价连键；

R 是具有结构式  $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$  的氨基酸的侧链；

M 是放射性核素的阳离子；

n 是 1 或 0；和它的可以药用的载体。

7. 权利要求 6 的组合物，其中，所述化合物中的 V 是选自叶酸，核黄素，硫胺素，维生素  $\text{B}_{12}$ ，和生物素的维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物。

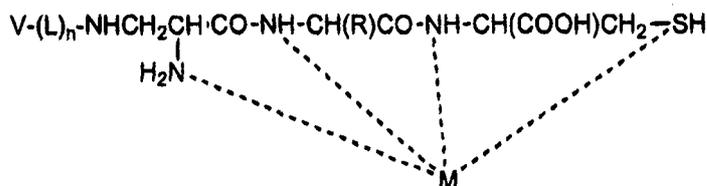
8. 权利要求 6 的组合物，其中，化合物中的所述放射性核素选自镓，铟，铜，镨，和铈的同位素。

9. 权利要求 8 的组合物，其中，所述化合物中的所述放射性核素是镨的同位素。

10. 权利要求 6 的组合物，适合肠胃外服用。

11. 权利要求 6 的化合物，其中，V 是叶酸，或叶酸受体结合衍生物或叶酸受体结合类似物。

12. 具有以下结构式的化合物在制备用于对动物体内的一群细胞进行显象的药物中的应用，所述细胞以这些细胞表面上的维生素受体为特征



其中，V 是所述维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物，对所述细胞表面维生素受体专一；

L 是二价连键；

R 是具有结构式  $H_2NCHRCOOH$  的氨基酸的侧链；

M 是放射性核素的阳离子；

n 是 1 或 0。

13. 权利要求 12 的应用，其中，所述化合物中的 V 是选自叶酸，核黄素，硫胺素，维生素  $B_{12}$ ，和生物素的维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物。

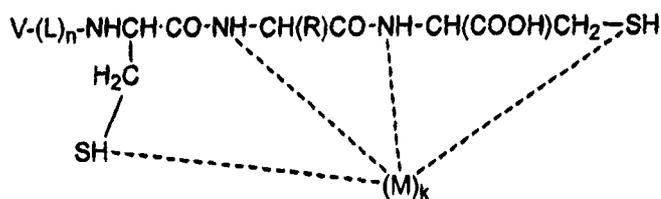
14. 权利要求 12 的应用，其中，化合物中的所述放射性核素选自镓，铟，铜，镉，和铈的同位素。

15. 权利要求 14 的应用，其中，所述化合物中的所述放射性核素是镉的同位素。

16. 权利要求 12 的应用，其中，所述药物是通过肠胃外途径给动物服用的。

17. 权利要求 12 的应用，其中，V 是叶酸，或叶酸受体结合衍生物或叶酸受体结合类似物。

18. 一种具有以下结构式的化合物：



其中，V 是维生素，它是受体-介导的体内跨膜转运的底物，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物；

L 是二价连键；

R 是具有结构式  $H_2NCHRCOOH$  的氨基酸的侧链；

M 是放射性核素的阳离子；



M 是放射性核素的阳离子；

n 是 1 或 0。

21. 权利要求 18 的化合物，其中，V 是选自叶酸，核黄素，硫胺素，维生素 B<sub>12</sub>，和生物素的维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物。

22. 权利要求 18 的化合物，其中，所述放射性核素选自镓，铟，铜，镉，和铼的同位素。

23. 权利要求 22 的化合物，其中，所述放射性核素是镉的同位素。

24. 权利要求 18 的化合物，其中，V 是叶酸，或叶酸受体结合类似物或叶酸受体结合衍生物。

25. 权利要求 19 的组合物，其中，V 是选自叶酸，核黄素，硫胺素，维生素 B<sub>12</sub>，和生物素的维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物。

26. 权利要求 19 的组合物，其中，所述放射性核素选自镓，铟，铜，镉，和铼的同位素。

27. 权利要求 26 的组合物，其中，所述放射性核素是镉的同位素。

28. 权利要求 19 的组合物，其中，V 是叶酸，或叶酸受体结合类似物或叶酸受体结合衍生物。

29. 权利要求 19 的组合物，适合肠胃外服用。

30. 权利要求 20 的应用，其中，V 是选自叶酸，核黄素，硫胺素，维生素 B<sub>12</sub>，和生物素的维生素，或维生素受体结合衍生物或维生素受体结合类似物。

31. 权利要求 20 的应用，其中，所述放射性核素选自镓，铟，铜，镉，和铼的同位素。

32. 权利要求 31 的应用，其中，所述放射性核素是镉的同位素。

33. 权利要求 20 的应用，其中，V 是叶酸，或叶酸受体结合

类似物或叶酸受体结合衍生物。

34. 权利要求 20 的应用，其中，所述药物是通过肠胃外途径给动物服用的。

## 维生素-定向的显象剂

### 发明领域

本发明涉及用于将显象剂引导到动物细胞上的化合物和方法。更具体地讲，通过利用维生素或维生素受体结合衍生物或其类似物作为显象剂的定向配体，将放射性核素型显象剂引导到具有维生素受体的细胞上。

### 发明背景和概述

跨膜转运是一种重要的细胞功能。由于对于包括药物治疗和基因转移在内的很多医学和生物科学领域来说，实践者业已认识到了跨膜转运的重要性，为了理解和应用所述方法，业已进行了大量的研究努力。因此，举例来说，业已通过利用蛋白载体，抗体载体，脂质体输送系统，电穿孔，直接注射，细胞融合，病毒载体，渗透压冲击，和磷酸钙介导的转化尝试了核酸的跨膜输送。不过，很多这样的技术同时局限于进行跨膜转运的细胞的类型，以及使外源分子进行成功的跨膜转运所需要的条件。另外，很多这样的技术局限于外源分子的类型和大小，所述外源分子能够通过细胞膜转运而又不丧失生物活性。

具有广泛用途的外源分子的跨膜转运的一种机制是受体介导的细胞内吞作用。优选的是，受体介导的细胞内吞作用同时在体内和体外进行。受体介导的细胞内吞作用涉及与膜受体结合的配体通过膜的内陷转移到由所述膜所包围的部位的内部。所述过程是通过受体专一性配体与所述受体的结合启动的或激活的。业已表征了多种受体介导的细胞内吞系统，包括能导致以下分子内在化的系统：半乳糖，甘露糖，甘露糖 6 磷酸，转铁蛋白，去唾液酸糖蛋白，叶酸，运钴胺素蛋白（维生素 B<sub>12</sub>）， $\alpha$ -2 巨球蛋白，胰岛素，和其他肽生长因子，如表皮生长因子 (EGF)。

业已将受体介导的细胞内吞作用用于将诸如蛋白和核酸的外源分子输送到细胞中。一般，特定的配体是通过共价键，离子，或氢键结合与感兴趣的外源分子化学缀合的，形成在缀合物中仍然能够被靶受体识别的部分（配体部分）的缀合分子。通过这种技术，业已将光毒

性蛋白补骨脂素缀合在胰岛素上, 并且通过胰岛素受体细胞内吞途径内在化(Gasparro, Biochem. Biophys. Res. Comm. 141 (2), pp. 502-509, Dec. 15, 1986); 业已将半乳糖末端去唾液酸糖蛋白的肝细胞的专一性受体用于与质粒非共价络合的缺乏唾液酸基的血清类黏蛋白-聚-L-赖氨酸的肝细胞专一性跨膜输送(Wu, G. Y., J. Biol. Chem., 262(10), pp. 4429-4432, 1987); 业已将 EGF 的细胞受体用于将与 EGF 共价连接的多核苷酸输送到细胞内部(Myers, 欧洲专利申请 86810614.7, 公开日为 1988 年 6 月 6 日); 业已将位于肠道中的有机金属维生素 B12-内在因子络合物的细胞受体用于介导与维生素 B12 络合的药物, 激素, 生物活性肽和免疫原的输送, 在口服之后输送到循环系统中(Russell-Jones 等, 欧洲专利申请 86307849.9, 公开日为 1987 年 4 月 29 日); 业已将甘露糖-6-磷酸受体用于输送低密度脂蛋白到细胞中(Murray, G. J. 和 Neville, D. M., Jr., J. Biol. Chem, Vol. 255 (24), pp. 1194-11948, 1980); 业已将霍乱毒素结合亚基受体用于将胰岛素输送到缺乏胰岛素受体的细胞中(Roth 和 Maddox, J. Cell. Phys. Vol. 115, p. 151, 1983); 并且业已将人绒毛膜促性腺激素受体用于将与 HCG 结合的蓖麻毒蛋白  $\alpha$ -链输送到具有合适 HCG 受体的细胞中(Oeltmann 和 Heath, J. Biol. Chem, vol. 254, p. 1028 (1979))。

在本发明的一种实施方案中, 涉及到放射性核素-型显象剂通过具有维生素受体, 或维生素受体结合衍生物或其类似物的跨膜转运。让具有维生素受体, 或维生素衍生物或类似物的受体的细胞膜与维生素-显象剂缀合物接触足够的时间, 以便启动并且进行所述缀合物的跨膜转运, 并且监测所述维生素-显象剂缀合物在所述动物体内的生物分布。在另一种实施方案中, 所述维生素/维生素衍生物或类似物定向部分只是与细胞表面维生素受体结合, 以便在所述细胞表面上浓缩整合的放射性核素。

本发明利用了: (1) 维生素受体的定位和 (2) 相关的受体-介导的细胞内吞过程。例如, 本发明利用了能专一性地结合肿瘤细胞上的或能够超量表达所述受体的其他细胞类型上的维生素, 或其衍生物或类似物的维生素受体, 转运蛋白, 或其他表面呈递蛋白的独特的表达, 超量表达, 或优先表达。因此, 本发明可用于检测诸如肿瘤细胞, 或

其他细胞类型的细胞，这些细胞通过利用受体介导的细胞内吞过程能够超量表达维生素受体，或维生素衍生物或类似物的受体，所述过程是在所述细胞与维生素-显象剂接触时发生的。

例如，微生物受体，如高亲和力叶酸受体 (FR) 是在癌细胞上高水平表达的。卵巢，乳腺，结肠，肺，鼻，喉，和大脑的上皮癌都报导了能表达较高水平的 FR。实际，已知超过 90% 的所有人类卵巢肿瘤能表达大量的这种受体。因此，本发明可用于多种肿瘤类型，和与疾病状态相关的其他细胞类型的诊断显象。

业已将与配体络合的放射性核素螯合剂用作诊断显象目的的非损伤性探针。例如，业已将血管活性肠肽，生长激素释放抑制激素类似物，和单克隆抗体用作配体，将放射性核素定位于诸如肿瘤细胞的细胞。单克隆抗体，和它的各种片断最初受到了最多的关注，这是因为人们相信利用单克隆抗体作定向配体可以实现精确的肿瘤专一性定向。不幸的是，这种方法是存在问题的，因为 i) 由于它们的较大的体积，抗体具有很长的循环时间，这对于显象目的来说是不利的，ii) 抗体的生产成本昂贵，iii) 抗体可能是免疫原性的，因此，在使用多个剂量时，必须人源化，和 iv) 抗体结合的放射性核素的肿瘤与非靶定组织的比例 (T/NT) 不是最佳的。因此，最近的焦点集中在利用没有所述限制的较小的肿瘤专一性配体。

业已将诸如叶酸的维生素用于将显象剂引导到肿瘤细胞，并且因为它们较小的体积是有利的。所披露的用于体内肿瘤显象的第一种叶酸型定向络合物是含有  $^{125}\text{I}$  的组胺衍生物。因为长效的  $^{125}\text{I}$  放射性核素成分，这种络合物不被认为是相关的临床候选物。

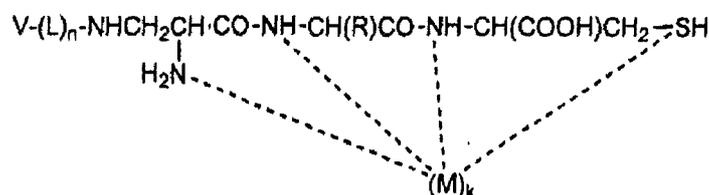
随后，开发了肿瘤显象的去铁胺-叶酸缀合物 (去铁胺螯合物  $^{67}\text{Ga}$ ,  $\gamma$ -发射放射性核素，它具有 78 小时的半衰期)。发现了该缀合物的肝胆管清除，因此，由于在精确的显象腹部定位方面的预期的问题而终止了临床前的开发。不过，通过用一种有效的  $^{111}\text{In}$  螯合剂 (半衰期 68 小时)-二乙三胺五乙酸 (DTPA) 取代所述的去铁胺螯合剂克服了这一障碍。证实了消除  $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸的主要途径是通过肾脏。

最近，业已将  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  用作用于诊断显象的优选放射性核素，因为 i) 这种放射性核素容易从商业销售的  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  发射剂获得，ii) 与生产  $^{111}\text{In}$  的成本相比，生产大量  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  的成本是微不足道的，和 iii)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

具有更短的(6小时)半衰期,这样可以服用更大剂量的放射性核素,能够产生更高分辨率的图像,而又不会使活体器官接收有害的辐射。

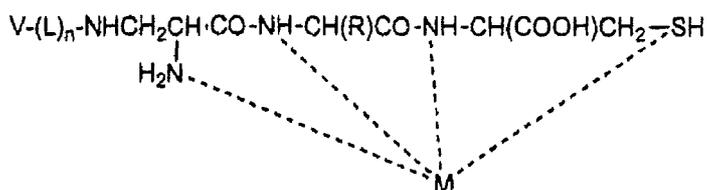
业已开发了若干种叶酸型 $^{99m}\text{Tc}$ 缀合物。例如,业已证实了 $^{99m}\text{Tc}$ -6-胍基烟酰胺-胍基(HYNIC;Guo等,J. Nucl. Med.,40(9):1563-1569(1999)), $^{99m}\text{Tc}$ -12-氨基-3,3,9,9-四甲基-1-5-氧杂-4,8-二氮杂-2,10-dodecanedione二胍(氧杂)(Linder等,Soc. Nucl. Med., Proc. 47th Annual Meeting, 2000, 41(5):119P), $^{99m}\text{Tc}$ -乙烯二半胱氨酸(Ilgan等,Cancer Biother. & Radiopharm., 13(6):427-435(1998)),和 $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-叶酸(Mathias等,Bioconjug. Chem., 11(2):253-257(2000))的叶酸缀合物在体内肿瘤摄取质量方面的应用前景。不过,还需要其他维生素-型 $^{99m}\text{Tc}$ 缀合物,或利用其他放射性核素的维生素-型缀合物,它具有最佳的肿瘤与非目标组织比例(T/NT),并且是通过肾脏消除的。所述维生素型缀合物应当适合作为肿瘤显象剂的临床开发,并且用于其他疾病状态的诊断。

在一种实施方案中,提供了具有以下结构式的化合物



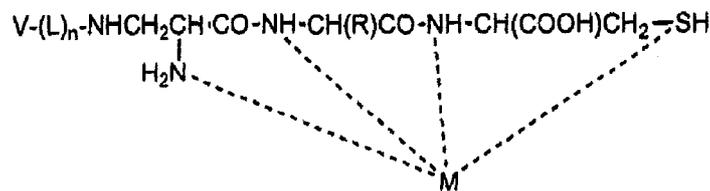
其中,V是维生素,或维生素受体结合衍生物或其类似物,L是二价键,R是具有结构式 $\text{H}_2\text{NCHR}\text{COOH}$ 的氨基酸的侧链,M是放射性核素的阳离子,n是1或0,而k是1或0。所述维生素是受体-介导的体内跨膜转运的底物。

在另一种实施方案中,提供了一种用于诊断显象的组合物,它包括具有以下结构式的化合物



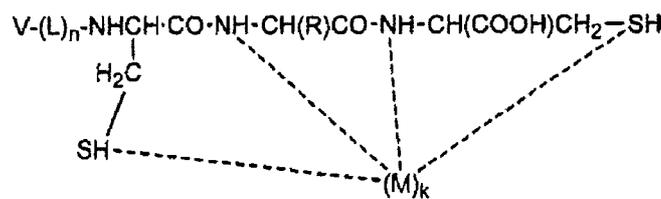
其中，V 是维生素，或维生素受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $H_2NCHR\text{COOH}$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，和它的可以药用的载体。所述维生素是受体-介导的体内跨膜转运的底物。

在另一种实施方案中，提供了一种对动物体内的一群细胞进行显象的方法，其中，所述细胞以这些细胞表面上的维生素受体为特征。所述方法包括给所述动物服用有效量的包括具有以下结构式的化合物的组合物



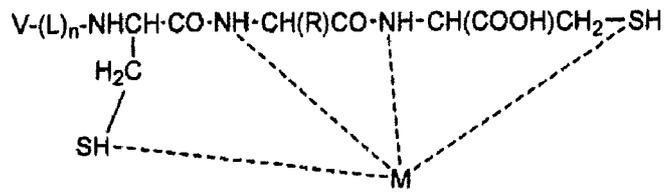
其中，V 是维生素，或对细胞表面维生素受体专一的受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $H_2NCHR\text{COOH}$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，和它的可以药用的载体，并且监测所述化合物在所述动物体内的生物分布。

在另一种实施方案中，提供了具有以下结构式的化合物



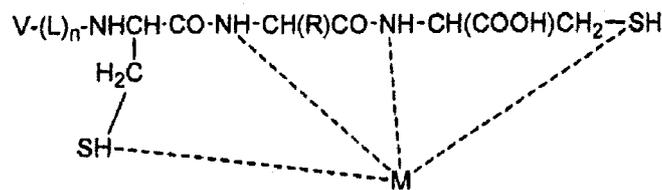
其中，V 是维生素，它是受体-介导的体内跨膜转运的底物，或维生素受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $H_2NCHR\text{COOH}$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，而 k 是 1 或 0。

在另一种实施方案中，提供了用于诊断显象的组合物，它包括具有以下结构式的化合物



其中，V 是维生素，它是受体-介导的体内跨膜转运的底物，或维生素受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $H_2NCHRCOOH$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，和它的可以药用的载体。

在另一种实施方案中，提供了一种对动物体内的一群细胞进行显象的方法，其中，所述细胞以这些细胞表面上的维生素受体为特征。所述方法包括给所述动物服用有效量的包括具有以下结构式的化合物的组合物



其中，V 是维生素，或对细胞表面维生素受体专一的受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $H_2NCHRCOOH$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，和它的可以药用的载体，并且监测所述化合物在所述动物体内的生物分布。

在上述任何实施方案中，所述化合物中的 V 可以是，例如，选自下列一组的维生素：叶酸，核黄素，硫胺素，维生素  $B_{12}$ ，和生物素，或其衍生物或类似物。在上述任何实施方案中，在所述化合物中的放射性核素可以选自，例如，下列一组放射性同位素：镓，铟，铜，锎，和铯。

#### 附图简述

图 1. EC20 的结构，被用作本发明显象剂的典型的化合物。

图 2.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的 HPLC 放射层析图。在 Waters Nova-Pak C 18 (3.9×150 mm) 柱上等度洗脱  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的样品, 使用含有 20% 甲醇和 0.2% 三氟乙酸的水移动相, 流速为 1 毫升/分钟。通过 UV 检测仪 (280 nm) 和 Bioscan FC-3200 检波器监测 HPLC 分析。A 峰, 无  $^{99m}\text{Tc}$ ; B 峰, 具有未知结构的含有叶酸的螯合物; C 和 D 峰, 在 EC20 的 Dap-Asp-Cys 螯合环中具有锝-氧键的顺或反构像的非对映异构体。

图 3. Re-EC20 和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 异构体的结构 (金属-氧键的顺或反位置)。

图 4. 用各种含有叶酸的竞争剂抑制  $^3\text{H}$ -叶酸与 KB 细胞的结合。在有或没有加大竞争剂浓度的条件下, 将 KB 细胞在冰上与 100nM  $^3\text{H}$ -叶酸一起培养 15 分钟。(●) 叶酸; (■) EC20; (▲) EC20: Re 异构体 A; (▼) EC20: Re 异构体 B; (□) DTPA-叶酸。误差线条表示 1 个标准误差 ( $n = 3$ )。

图 5.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的时间决定型结合。在 37℃ 下将 KB 细胞与 10 nM  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 一起长时间培养。在多次洗涤之后, 收获细胞, 并且统计结合的放射性活性。误差线条表示 1 个标准误差 ( $n = 3$ )。

图 6.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的浓度决定型结合。在 37℃ 下, 在提高  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 浓度的情况下培养 KB 细胞 2 小时。在多次洗涤之后, 收获细胞, 并且统计结合的放射活性。误差线条表示 1 个标准误差 ( $n = 3$ )。

图 7.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 “B 峰” 的浓度决定型结合。在 37℃ 下, 在存在较大浓度 “B 峰” 的情况下培养 KB 细胞 2 小时。所述 B 峰是通过层析方法从  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 制剂中分离的。在多次洗涤之后, 收获细胞, 并且统计结合的放射性活性。误差线条表示 1 个标准误差 ( $n = 3$ )。(●), B 峰; (°), B 峰 + 1 mM 叶酸。

图 8. 在 Ba1b/c 小鼠体内抑制  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的血液清除。在进行短时间的乙醚麻醉期间用大约 0.1mL 的体积给每只动物静脉注射 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  EC20 的剂量 (67 nmol/kg)。在指定的注射后时间, 通过二氧化碳窒息对每一只动物实施安乐死, 采集血液, 并且统计相关的放射性活性。误差线条表示 1 个标准误差 ( $n = 3$  只动物)。

图 9. 整体  $\gamma$  图像 (腹部视图)。图像是在给长有皮下叶酸受体阳性 M109 肿瘤的 Ba1b/c 小鼠静脉服用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 之后 4 小时获得的。只有肾脏 (K) 和肿瘤 (T) 表现出这种放射性示踪剂的明显积累。

图 10. EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC20, EC31 和 EC53 的结构。

图 11.  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 在长有 FR-阳性 M109 肿瘤和 FR-阴性 4T1 肿瘤的 Balb/c 小鼠体内的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的组织分布。

图 12. EC11 的 HPLC 分析。

图 13. EC11 的质谱分析。

图 14. EC11 的 NMR 分析。

图 15. EC13 的 HPLC 分析。

图 16. EC14 的 NMR 分析。

图 17. EC15 的质谱分析。

图 18. EC19 的 HPLC 分析。

图 19. EC19 的质谱分析。

图 20. EC31 的 HPLC 分析。

图 21. EC53 的 HPLC 分析。

图 22. EC53 的质谱分析。

图 23. EC53 的质谱分析。

## 发明详述

根据本发明, 提供了用于将放射性核素-型显象剂引导到能独特地表达, 超量表达, 或优先表达维生素受体的细胞群体的化合物和方法。因此, 将维生素, 或其受体结合衍生物或类似物被用作所述显象剂的定向配体。可以将所述维生素-显象剂缀合物用于将放射性核素引导到细胞上, 并且在诸如肿瘤细胞群体的细胞群体中浓缩所述放射性核素, 以便用于诊断显象。

本发明提供了用于诊断显象的组合物, 它包括用于所述方法的具有以下结构式的化合物



明的其他化合物的例子是 EC11, EC13, EC14, EC15, EC19, EC31, 和 EC53 (参见图 10)。所述维生素部分 (例如 EC20 中的叶酸部分) 提供了对细胞 FRs 的高亲和力结合。所述化合物还含有双功能肽型螯合剂, 它提供了用于螯合放射性核素, 例如,  $^{99m}\text{Tc}$  (参见图 1) 的位点, 并且所述化合物可选择性地包括接头, 通过该接头可以将所述维生素部分共价结合在所述螯合部分上。

根据本发明, 所述化合物的维生素部分是维生素, 它是受体-介导的体内跨膜转运的底物, 或维生素受体结合衍生物或其类似物。所述维生素通过接头 (L) 选择性地与所述化合物的螯合剂部分结合。所述螯合剂部分包括通过第三个氨基酸残基与半胱氨酸基团连接的  $\alpha$ ,  $\beta$ -二氨基丙酸部分。所述化合物的螯合剂部分适合结合放射性核素阳离子 (M) (其中  $k = 1$ )。

根据本发明, 所述具有结合的放射性核素的化合物被称为“维生素-显象剂缀合物”。

所述接头 (如果存在的话) 的结构对于本发明来说是不重要的。因此, 例如, 它可以是任何生物兼容性二价键。通常, 所述接头包括大约 1-大约 30 个碳原子, 更常见的是大约 2-大约 20 个碳原子。通常采用较低分子量的接头 (即, 分子量大约为 30-大约 300 的接头)。另外, 所述维生素部分可以是维生素, 或它的衍生物或类似物。例如, 含有一个与蝶酸连接的 L 构型的谷氨酸的叶酸。如图 1 所示, EC20 包括与所述螯合剂部分结合的叶酸类似物, 因为 EC20 具有 D 构型的谷氨酸。EC11 和 EC14 包括两个谷氨酸残基, 因此, 所述化合物还可以, 例如, 被认为是叶酸的衍生物 (图 10)。

被认为能诱导受体介导的细胞内吞作用并且可应用于本发明披露的方法中的维生素包括烟酸, 泛酸, 叶酸, 核黄素, 硫胺素, 生物素, 维生素 B<sub>12</sub>, 和脂溶性维生素 A, D, E 和 K。这些维生素, 以及它们的类似物和衍生物构成了与显象剂结合以便形成用于本发明的维生素-螯合剂缀合物的维生素。优选的维生素部分包括叶酸, 生物素, 核黄素, 硫胺素, 维生素 B<sub>12</sub>, 和这些维生素分子的类似物和衍生物, 以及其他相关的维生素受体-结合分子。

叶酸, 亚叶酸, 蝶酸, 蝶酰聚谷氨酸, 和叶酸受体-结合蝶啶如四氢蝶呤, 二氢叶酸, 四氢叶酸, 和它们的脱氮和二脱氮类似物可用于

本发明。术语“脱氮”和“二脱氮”类似物表示本领域所公认的叶酸类似物，它具有取代天然存在的叶酸结构上的一个或两个氮原子的碳原子。例如，所述脱氮类似物包括1-脱氮，3-脱氮，5-脱氮，8-脱氮，和10-脱氮类似物。所述二脱氮类似物包括，例如1,5二脱氮，5,10-二脱氮，8,10-二脱氮，和5,8-二脱氮类似物。以上是叶酸类似物或衍生物，并且可以与叶酸受体结合。可用于本发明的其他叶酸类似物或衍生物包括叶酸受体-结合类似物氮喋呤，氮甲喋呤(氮甲叶酸)，N<sup>10</sup>-甲基叶酸，2-脱氮-羟基叶酸，脱氮类似物，如1-脱氮甲喋呤或3-脱氮甲喋呤，和3',5'-二氮-4-氨基-4-脱氧-N<sup>10</sup>-甲基蝶酰谷氨酸(二氮氮甲叶酸)。

所述维生素，或它的衍生物或其类似物能够选择性地与要显现的细胞群体结合，因为在所述靶细胞上优先表达了所述维生素，或衍生物或类似物的受体，其中，所述受体是可以结合的。所述维生素的结合位点可以包括能够特异地结合受体的任何维生素分子的受体，所述受体或其他蛋白是由要显现的细胞群体独特的表达，超量表达的，或优先表达的。由要显现的细胞独特表达，超量表达，或优先表达的表面对递蛋白是在其他细胞上不存在或以较低含量存在的受体，提供了选择性地，快速地，和灵敏地观察靶定的细胞的方法，用于利用本发明的维生素-显象剂缀合物进行诊断显象。

根据本发明，所述维生素显象剂缀合物能够与要显现的癌细胞或其他细胞上的受体高亲和力结合。所述高亲和力结合可能是所述维生素部分所固有的或所述高亲和力可以通过使用化学修饰的维生素(即类似物或衍生物)或通过存在于所述缀合物的维生素和螯合剂部分之间的特殊化学键加强。

根据本发明，所述螯合剂可以与多种不同的维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物缀合，以便增加与相应的细胞膜受体结合的机会。另外，维生素-显象剂缀合物的剂量的独立部分可以构成不同的维生素-显象剂缀合物，以便增加与相应的细胞膜受体结合的机会。

一般，在螯合剂和维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物之间形成络合物的任何方法都可用于本发明。所述螯合剂可以通过使用二价键通过所述螯合剂和维生素的直接缀合，所述螯合剂可以与维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物形成络合物。另外，所述维生

素和螯合剂可以是在不使用接头的情况下缀合的。如果使用接头的话，所述接头可以通过氢键，离子键，或共价键直接缀合所述维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物，以及所述螯合剂。另外，根据本发明，所述二价键可以包括结合所述螯合剂和维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物的间接方式，如通过中间接头，间隔臂，或桥连分子连接。直接和间接结合的方法，都必须不会妨碍所述维生素，维生素受体结合衍生物或类似物与所述细胞膜上的维生素受体结合，以便实施本发明的方法。

无论是否使用接头，所述维生素，或维生素受体结合衍生物或类似物，和所述螯合剂的共价结合可以通过酸，醛，羟基，氨基，或胍基之间形成酰胺，酯或亚胺基键实现。例如，可以利用羰基二咪唑或标准碳二亚胺结合试剂，如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)激活维生素部分或螯合剂部分上的羧酸，然后与所述缀合物的其他成分起反应，或与至少一个亲核性基团，即羟基，氨基，胍基或巯基的接头起反应，以便形成有或没有通过酯，酰胺，或硫酯键结合的接头的维生素螯合剂缀合物。

适合诊断显象的放射性核素包括放射性核素镓，铟，铜，镉和铯，包括同位素<sup>111</sup>In，<sup>99m</sup>Tc，<sup>64</sup>Cu，<sup>67</sup>Cu，<sup>67</sup>Ga或<sup>68</sup>Ga。所述放射性核素是阳离子型的，并且通过所述缀合物的螯合基团与所述螯合剂络合，以便形成维生素显象剂缀合物。

本发明的维生素-显象剂缀合物被用于利用闪烁成像技术选择性显现动物体内的一群细胞，其中，所述细胞群体能够独特地表达，超量表达，或优先表达维生素，或维生素受体结合衍生物或其类似物的受体。所述维生素-显象剂缀合物可用于显现致病性细胞的群体，只要所述细胞能独特地或优先表达或超量表达维生素受体或结合维生素衍生物或类似物的受体就行。

本发明可应用于致病性细胞群体，它们能导致多种病状，包括癌症，和通过其他类型的致病性细胞介导的疾病，所述细胞能超量表达维生素受体或能够结合维生素衍生物或类似物的受体。因此，所述致病性细胞群体可以是致瘤的，包括良性肿瘤和恶性肿瘤，或它可以是非治瘤的。如果所述细胞群体是癌细胞群体，所述癌细胞可以自发产生或通过诸如存在于宿主动物种系的突变或体细胞突变自发发生，或

者所述癌症可以是化学，病毒，或辐射诱导的。本发明可用于癌症诸如肿瘤，恶性肿瘤，淋巴瘤，Hodgkin's病，黑素瘤，间皮瘤，Burkitt's淋巴瘤，鼻咽癌，和骨髓瘤的诊断显象。所述癌细胞群体可以包括，但不局限于口腔，鼻咽，甲状腺，内分泌，皮肤，胃，食道，咽，喉，胰腺，结肠，膀胱，骨，卵巢，宫颈，子宫，乳腺，睾丸，前列腺，直肠，肾，肝，肺和大脑癌。对于所述细胞群体是癌细胞群体的实施方案来说，肿瘤细胞，包括原发性肿瘤细胞或具有转移的癌细胞或处在与原发性肿瘤分离的过程中的肿瘤细胞，可以利用维生素显象剂缀合物显现。

本发明的维生素-显象剂缀合物可用于诊断疾病症状或监测疾病的发展。例如，本发明的诊断显象方法可用于监测癌症的发展，与预防性治疗结合，以便预防在通过任何治疗方法切除之后的肿瘤复发，所述方法包括肿瘤的手术切除，放疗，化疗，或生物治疗。

本发明的组合物和方法可用于人类临床药和兽医用途。因此，具有要显现的细胞群体的动物可以是人，或者对于兽医用途来说，可以是实验室，农业，家养，或野生的动物。本发明可应用的动物包括，但不局限于人，实验室动物，如啮齿类动物（例如，小鼠，大鼠，仓鼠等），兔子，猴子，黑猩猩，家养动物，如狗，猫，和兔子，农业动物，如牛，马，猪，绵羊，山羊，和圈养的野生动物，如熊，熊猫，狮子，虎，豹，大象，斑马，长颈鹿，大猩猩，海豚，和鲸鱼。

用于诊断显象的组合物包括在通过一个或通过多个剂量服用时能够在进行诊断显象的动物体内有效显现靶细胞的量的维生素-显象剂缀合物。含有维生素-显象剂缀合物的诊断显象组合物优选通过肠胃外途径给动物服用，例如，真皮内，皮下，肌内，腹膜内，静脉内，或膜内。另外，含有维生素-显象剂缀合物的组合物可以通过其他医学上可以使用的方法给动物服用，并且，可以使用任何有效剂量和合适的剂型，包括口服和吸入剂型。

肠胃外剂型的实例包括所述维生素-显象剂缀合物的水溶液，存在于等渗盐水，5%葡萄糖或其他众所周知的可以药用的液体载体中，如液体醇，乙二醇，酯，和酰胺。本发明的肠胃外剂型可以是可复水的冷冻干燥形式的，包括所述剂量的维生素-显象剂缀合物。

所述诊断显象组合物中的维生素-显象剂缀合物的剂量可以根据

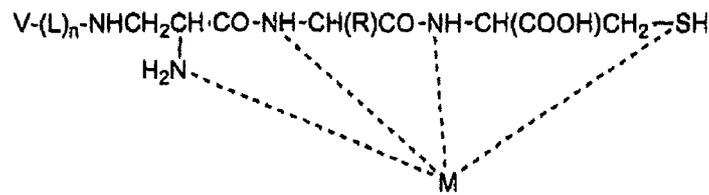
动物的大小，要定向进行诊断显象的细胞群体，所使用的特定维生素显象剂缀合物，以及服用所述缀合物的途径而明显不同。给所述动物服用的有效量是基于所述动物的身体表面积，体重，和医生对动物症状的评估。有效剂量可以是大约 1ng/kg-大约 1 mg/kg 范围内，更优选大约 100 ng/kg-大约 500/ $\mu$ g/kg，最优选大约 100 ng/kg-大约 25  $\mu$ g/kg。

服用含有维生素-显象剂缀合物的诊断显象组合物的任何有效方案都可以使用。例如，所述诊断显象组合物可以作为单剂量服用，或者可以通过多个剂量服用，如果必要的话，以便实现所述靶细胞群体的显现。在首次注射之后，可以数日或数月的间隔给所述动物服用其他注射剂量的含有所述维生素-显象剂缀合物的诊断显象组合物，并且，所述其他注射可用于监测疾病状态的发展。含有维生素-显象剂缀合物的诊断显象组合物还可以与未标记过的维生素一起组合使用。

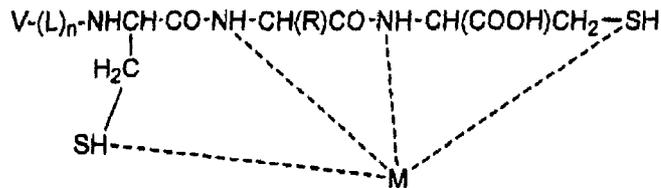
“与...组合”表示所述未标记过的维生素可以与所述显象剂共同服用，或者在服用所述显象剂之前预先注射未标记过的维生素，以便提高图像质量。例如，所述显象剂可以与大约 0.5 ng/kg-大约 100 mg/kg，或大约 1  $\mu$ g/kg-大约 100 mg/kg，或大约 100  $\mu$ g/kg-大约 100 mg/kg 的未标记过的维生素组合服用。

所述诊断显象组合物通常被制备成用于肠胃外服用，并且是以能够使靶细胞群体有效显象的量给所述动物服用的。通常给所述动物服用含有所述维生素定向显象剂的诊断显象组合物，并且在经过一段时间之后，使所述维生素-显象剂缀合物在所述靶细胞群体中输送和浓缩，并且对所述动物进行显象过程，并且显象可以通过所述维生素-显象剂缀合物完成。在用于监测疾病发展过程或诊断时，显象方法通常是在服用含有维生素-显象剂缀合物的诊断显象组合物之后大约 1-大约 6 小时进行的。

本发明还提供了对动物体内的一群细胞进行显象的方法，其中，所述细胞以存在于所述细胞表面上的维生素受体为特征。所述方法包括以下步骤：给所述动物服用有效量的包括具有以下结构式的化合物的组合物



或



其中，V 是所述维生素，或对细胞表面维生素受体专一的受体结合衍生物或其类似物，L 是二价连键，R 是具有结构式  $\text{H}_2\text{NCHRCOOH}$  的氨基酸的侧链，M 是放射性核素的阳离子，n 是 1 或 0，和它的可以药用的载体，并且监测所述化合物在所述动物体内的生物分布。

所述方法可用于在体外，例如，在细胞培养物中或在体内，其中，所述细胞构成了动物组织的一部分或以其他方式存在于动物组织中进行细胞群体的显象。因此，举例来说，所述靶细胞可以包括衬在消化道如口腔和咽喉黏膜里的细胞，所述细胞构成了小肠的绒毛，或衬在大肠里的细胞。根据本发明，所述消化道中的细胞可以通过服用包括维生素显象剂缀合物的诊断显象组合物进行定向。类似地，衬在动物的呼吸系统（鼻道/肺）里的细胞可以通过吸入本发明的络合物定向，并且，内脏器官的细胞，包括卵巢和大脑的细胞特别是可以通过肠胃外服用诊断显象组合物定向。

## 实施例 1

### 材料

$\text{N}^{10}$ -三氟乙酰蝶酸是从瑞士的 Eprova AG, Schaffhausen 购买的。肽合成试剂是从 NovaBiochem 和 Bachem 购买的。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  高锝酸钠是由 Syncor 提供的。 $[\text{ReO}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$  是按照 Rouschias 的方法制备的 (Rouschias, G., Chem. Rev., 74: 531 (1974))。纤维素平板和 DEAE 离子交换平板是从 J. T. Baker 购买的。

## 实施例 2

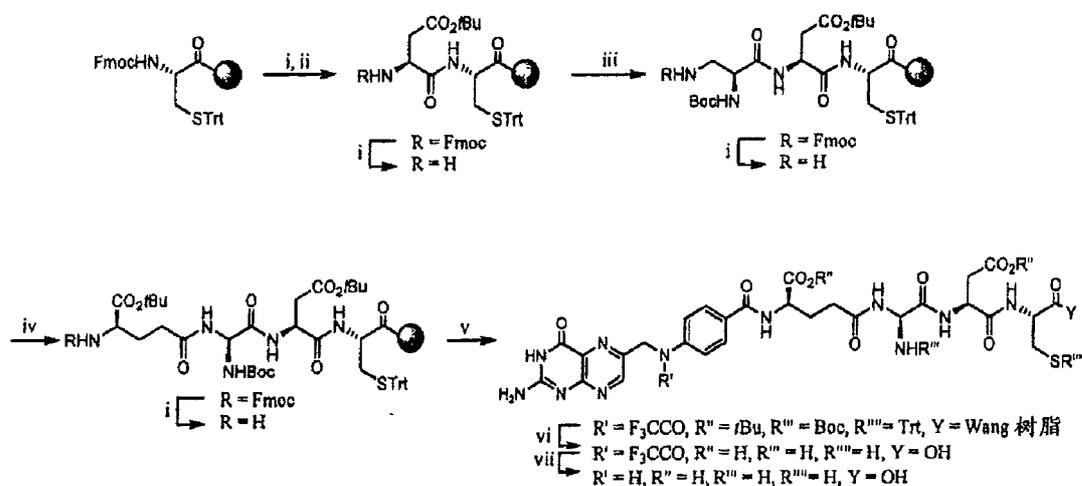
### EC20 的合成, 纯化, 和分析表征

EC20 是使用 Fmoc 方法通过聚合物支持的顺序方法制备的 (参见下面的方案 1; Fmoc = 9-芴基甲氧基羰基; Boc=叔丁氧基羰基; Dap = 二氨基丙酸; DMF = 二甲基甲酰胺; DIPEA = 二异丙基乙胺)。EC20 是在用 Fmoc-L-Cys (Trt)-OH 加载的酸敏感型 Wang 树脂上合成的。苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷-膦六氟代磷酸 (PyBOP) 是作为活化试剂使用的, 以便确保利用低当量的氨基酸进行有效结合。Fmoc 保护基团是在每一个结合步骤之后, 在标准条件下去掉的 (存在于 DMF 中的含有 20% 的吡啶)。在最后的组装步骤之后, 通过用含有 2.5% 乙二硫醇, 2.5% 三异丙基硅烷和 2.5% 去离子水的 92.5% 的三氟乙酸处理将所述肽从聚合物支持物上裂解掉。该反应还导致了 t-Bu, Boc 和三苯甲基保护基团的同时消除。最后, 在氢氧化铵水溶液中除去三氟乙酰部分, 以便得到 EC20。

通过 HPLC 纯化粗制 EC20 产物, 使用 Xterra RP18 30×300 mm, 7 μm 柱 (Waters); 流动相 32 mM HCl (A), MeOH (B); 梯度条件始于 99% A 和 1% B, 以 20 mL/分钟的流速, 用 37 分钟时间达到 89% A 和 11% B。在上述条件下, EC20 单体通常在 14.38 分钟洗脱出, 而 EC20 二硫化物二聚体 (少量污染物) 在 16.83 分钟洗脱出。图 10 所示的所有其他化合物可以用类似的合成方法制备, 所不同的是, EC15 是按照下面所示的方案 2 合成的。

将 2 mg HPLC-纯化的 EC20 溶解在 0.62 mL 的 D<sub>2</sub>O, 并且收集 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR 谱。表 1 (参见下文) 列举了 EC20 分子中的所有非交换质子的化学位移, 信号形状, 和 J 值。

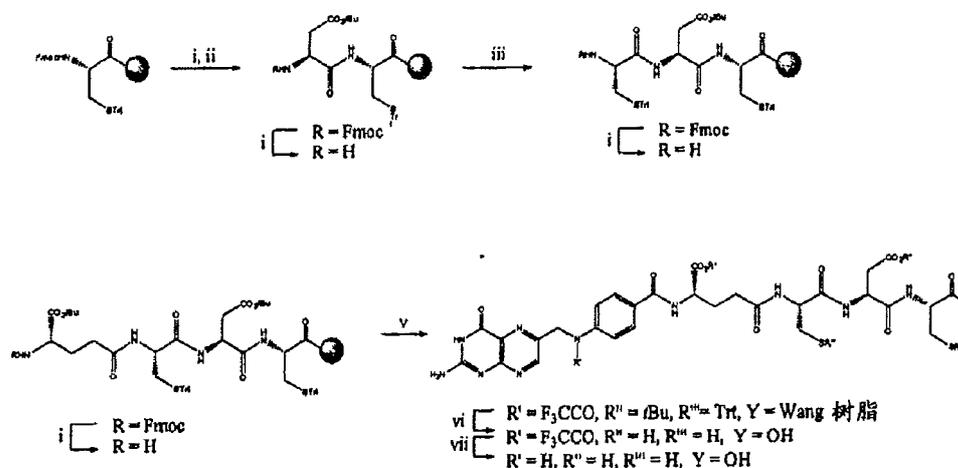
还通过电雾化质谱学分析了 EC20。主要阳性离子峰 (m/z, 相对强度): 746.1, 100; 747.1, 44; 556.8, 32; 570.8, 16。

方案 1<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 试剂和条件: i) 20%吡啶, DMF; ii) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iv) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF; v) N<sup>10</sup>-TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; vi) F<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH, iPr<sub>3</sub>SiH; vii) H<sub>2</sub>NOH, pH = 10.3.

表 1. EC20 的 <sup>1</sup>H-NMR 数据。将 EC20 溶解在 D<sub>2</sub>O 中, 并且采集 500 MHz 光谱。化学位移 ( $\delta$ ) 以 ppm 为单位。将  $\delta = 4.80$  ppm 时的 HOD 信号用作参照。pD = 4.78; s = 单峰; d = 双峰; m = 多峰。

| 残基    | 观察到的质子       | 化学位移 ( $\delta$ ) | 信号          | J 值  |
|-------|--------------|-------------------|-------------|--|
| Pte   | H-7          | 8.76              | s           | <sup>3</sup> J <sub>12,13</sub> = <sup>3</sup> J <sub>15,16</sub> =8.8 Hz  |
|       | 2 x H-9      | 4.64              | s           |  |
|       | H-12 a, H-16 | 7.68              | d           |  |
|       | H-13 a, H-15 | 6.8               | d           |  |
| D-Glu | H-2          | 4.41              | dd          | <sup>3</sup> J <sub>2,3</sub> =9.1 Hz; <sup>3</sup> J <sub>2,3b</sub> =4.5 Hz<br><sup>3</sup> J <sub>3a,3b</sub> = 14.2 Hz<br><sup>3</sup> J <sub>3a,4</sub> = <sup>3</sup> J <sub>4b,4</sub> = 5.6 Hz |
|       | H-3a         | 2.08              | m           |  |
|       | H-3B         | 2.27              | m           |  |
|       | 2 x H-4      | 2.44              | dd          |  |
| Dpr   | H-2          | 4.1               | dd; ABX系统的X | <sup>3</sup> J <sub>2,3A</sub> =6.6 Hz; <sup>3</sup> J <sub>2,3B</sub> =4.7 Hz<br><sup>3</sup> J <sub>A,B</sub> =14.7 Hz   |
|       | H-3A         | 3.52              | dd; ABX系统的A |  |
|       | H-3B         | 3.72              | dd; ABX系统的B |  |
| Asp   | H-2          | 4.71              | dd; ABX系统的X | <sup>3</sup> J <sub>2,3A</sub> =9.5 Hz; <sup>3</sup> J <sub>2,3B</sub> =4.3 Hz<br><sup>3</sup> J <sub>A,B</sub> =16.1 Hz   |
|       | H-3A         | 2.62              | dd; ABX系统的A |  |
|       | H-3B         | 2.81              | dd; ABX系统的B |  |
| Cys   | H-2          | 4.3               | dd; ABX系统的X | <sup>3</sup> J <sub>2,3A</sub> =5.5 Hz; <sup>3</sup> J <sub>2,3B</sub> =4.4 Hz<br><sup>3</sup> J <sub>A,B</sub> =14.1 Hz   |
|       | H-3A         | 2.85              | dd; ABX系统的A |  |
|       | H-3B         | 2.89              | dd; ABX系统的B |  |

方案 2<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 试剂和条件: i) 20%哌啶, DMF; ii) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Fmoc-Cys(Trt)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iv) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF; v) N<sup>10</sup>-TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; vi) TFAA, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH, iPr<sub>3</sub>SiH; vii) H<sub>2</sub>NOH, pH = 10.3

## 实施例 3

非放射性试剂小瓶和 <sup>99m</sup>Tc-EC20 的制备

将 EC20 试剂盒用于制备 <sup>99m</sup>Tc-EC20 放射性药物。每一个试剂盒含有 0.1 mg EC20, 80mg α-D-葡萄糖酸钠, 80 mg 二水合氯化锡(II) 的无菌的, 非致热的冷冻干燥的混合物, 并且含有足够量的氢氧化钠或氢氟酸, 以便在冷冻干燥之前将 pH 调整到 6.8 ± 0.2。在氩气环境中将所述冷冻干燥的粉末密封在 5 mL 小瓶中。然后在 -20℃ 下冷冻保存所述试剂盒, 直到使用或期满 (现有的贮存期限大于 2 年)。重要的是, 需要所述氯化锡(II) 成分, 以便还原所添加的 <sup>99m</sup>Tc-高锝酸盐, 同时需要 α-D-葡萄糖酸钠成分, 以便在它与 EC20 化合物最终整合之前稳定所述新还原的 <sup>99m</sup>Tc。

<sup>99m</sup>Tc-EC20 是按以下方法制备的 (即 <sup>99m</sup>Tc 与 EC20 的整合)。

首先, 制备含有部分淹没的铅瓶罩的煮沸的水。用 70% 的乙醇擦拭 EC20 瓶的顶部, 以便对它的表面进行消毒, 并且将所述小瓶放入合适的密封容器中。使用装有 27 号针头的被密封的注射器将存在于 0.9% 氯化钠中的 1 mL 消毒的高锝酸钠 <sup>99m</sup>Tc 注射液 (15-20 mCi) 注射到所述

密封的小瓶中。在将所述注射器从所述小瓶中取出之前，从所述小瓶中排出与所添加的高锝酸盐体积相等的体积的气体，以便使所述小瓶内的压力正常化。轻轻搅拌所述小瓶 30 秒，以便确保所述冷冻干燥粉末的完全溶解。然后将所述小瓶放入放置在煮沸的水浴的所述铅罩中。将该溶液加热大约 18 分钟，然后用至少 15 分钟时间冷却到室温。该溶液可以在室温（15-25℃）下遮光保存，不过应当在制备之后 6 小时内使用。

在室温下遮光保存长达 24 小时之后，通过 HPLC 测定所述放射性药物的放射化学稳定性。使用 HPLC 系统分析  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 溶液（20  $\mu\text{L}$ ）的样品，该系统包括 Waters 600E 多溶剂输送系统和 490 UV 检测仪，Bioscan EC-3200 检波器，Laura v1.5 放射层析图软件，和 Waters Nova-Pak C18（3.9 $\times$ 150 mm）柱。使用含有 20% 甲醇和 0.1% 三氟乙酸的含水流动相以 1 mL/分钟的流速等度洗脱注射的样品。利用 UV 检测仪（280 nm）和  $\gamma$  检波器监测 HPLC 分析。显然，在所有例子中，在至少 24 小时之后，残留的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的放射化学纯度超过 90%。

#### 实施例 4

##### 通过 TLC 测定 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的放射化学纯度

$^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的制备中的主要放射化学杂质是：1)  $^{99m}\text{Tc}$  高锝酸盐，2)  $^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐（配体交换前体），3) 非专一性结合的  $^{99m}\text{Tc}$ （结合在除了 EC20 分子的预期的 Dap-Asp-Cys 螯合部分以外的位点上的  $^{99m}\text{Tc}$ ），和 4) 水解的  $^{99m}\text{Tc}$ 。由于试验了  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的可能的临床用途，开发了三種-TLC-型方法，以便测定每一种杂质的量，并且估算  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的总的放射化学纯度。

在第一种系统中，用去离子水对纤维素板进行显象。 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20， $^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐，非专一性结合的  $^{99m}\text{Tc}$  和  $^{99m}\text{Tc}$  高锝酸盐移动到溶剂前面 ( $R_f = 1.0$ )，而水解的  $^{99m}\text{Tc}$  保持在起点部分 ( $R_f = 0.0$ )。在  $R_f = 0.3$ （距离起点 1.5 cm）处将所述纤维素板切成两部分，并且用剂量校正仪，对每一部分进行计数。按以下方法计算水解的  $^{99m}\text{Tc}$  的百分比： $A = \text{水解}\%$ ； $^{99m}\text{Tc} = (\text{下面部分中的 } \mu\text{Ci} / \text{在两部分中的 } \mu\text{Ci}) \times 100$ 。

在第二种系统中，用丙酮和 0.9% NaCl（7: 3, v/v）对纤维素平板进行显影。 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐以  $R_f = 0.9$  移动，而  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20， $^{99m}\text{Tc}$ -葡

葡萄糖酸盐,非专一性结合的 $^{99m}\text{Tc}$ 和水解的 $^{99m}\text{Tc}$ 保持在起点( $R_f = 0.0$ )。在 $R_f = 0.6$ 处(距离起点3.0 cm)将纤维素/丙酮-盐水平板切成两部分,用剂量校正仪对每一部分进行计数。 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐的百分比按以下方法计算: $B = \% ^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐 = (上部的 $\mu\text{Ci}$ /两部分中的 $\mu\text{Ci}$ ) $\times 100$ 。

最后,在第三种系统中,用0.3 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 对DEAE离子交换平板进行显影。 $^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐移动到溶剂前面( $R_f = 1.0$ ),非专一性结合的 $^{99m}\text{Tc}$ 以 $R_f = 0.6$ 移动,而 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20,水解的 $^{99m}\text{Tc}$ 和 $^{99m}\text{Tc}$ -高锝酸盐保留在靠近起点的地方( $^{99m}\text{Tc}$ -EC20,  $R_f = 0.1$ ;水解的 $^{99m}\text{Tc}$ :  $R_f = 0.0$ ;  $^{99m}\text{Tc}$ 高锝酸盐:  $R_f = 0.3$ )。在距离起点2.5 cm处将纤维素/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 平板切成两部分,并且利用剂量校正仪对每一部分进行计数。按以下方法计算 $^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐和非专一性结合的 $^{99m}\text{Tc}$ 的百分比如下: $C = \% (^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐+非专一性结合 $^{99m}\text{Tc}) = (\text{上部的}\mu\text{Ci}/\text{两部分的}\mu\text{Ci}) \times 100$ 。然后按以下方法计算 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20的总的放射化学纯度:放射化学纯度 $= 100 - (A+B+C)$ 。

如图2所示, $^{99m}\text{Tc}$ -EC20制剂的HPLC分析出现了四种放射化学成分,被命名为A-D峰。证实A峰是无 $^{99m}\text{Tc}$ 的,并且,该副产物可再现地以 $<2\%$ 的比例存在。B峰,与 $^{99m}\text{Tc}$ -葡萄糖酸盐的峰不同(数据未显示),是以2.8分钟的保留时间洗脱的。该成分占所述混合物的大约3%,并且被认为是由于 $^{99m}\text{Tc}$ 螯合在EC20分子上的除了预计的Dap-Asp-Cys部分以外的位点所得到的。C峰和D峰(保留时间分别为4.8分钟和13.2分钟),占制备的放射化学活性的主要部分。

## 实施例5

### Re-EC20的合成

将52mg (0.010 mmol)的EC20和 $[\text{ReO}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$  (52mg, 0.14 mmol)分别溶解在6 mL和1 mL氩净化的磷酸缓冲液中(0.05 M, pH 5.8)。合并这两种溶液,并且在氩气中,在煮沸的水浴中加热2小时。冷冻反应混合物,并且冷冻干燥过夜。通过HPLC纯化粗产物(Xterra RPI8柱,  $19 \times 150$  mm, 10 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{CH}_3\text{CN}$ , 流速为10 mL/min; 梯度为1%-8%)。收集级分,冷冻干燥,并且在 $-20^\circ\text{C}$ 下保存待用。

由于没有质谱装置可用于分析放射活性材料,对非放射性铼类似

物 Re-EC20 进行分析。铼和铈都是 VIIA 族金属，它们在物理和化学特性方面具有显著的相似性。它们还能与有机配体形成类似的络合物。这种类似的化学特性通常被应用于阐明基于根据非放射性铼类似物的铈放射性药物的新类型。有趣的是，Re-EC20 的 HPLC 分析还表现出分别在 5 分钟和 14.2 分钟洗脱的两个主峰，类似于  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的 C 峰和 D 峰（色谱图未示出）。质谱分析证实，这两种成分是相当于 Re-EC20 络合物的异构体 ( $m/z = 945$ )。实际上，这些种类很可能是具有 Dap-Asp-Cys 螯合环中的铈-氧键的顺或反构型的非对映异构体。因为 i) Re-EC20 色谱图中的两个峰表示异构体络合物，和 ii) 存在铈络合物中的类似异构体的报导， $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 放射层析图中的成分 C 和 D 可能也是异构体。

### 实施例 6

#### 细胞培养物

在 37°C 下，在 5% 二氧化碳/95% 空气-潮湿的环境中，使用无叶酸 RPMI 培养基 (FFRPMI) 让细胞以单层形式连续生长，所述培养基含有 10% 加热失活的胎牛血清 (HIFCS)，不含抗生素。所述 HIFCS 含有它的正常内源叶酸补体，这使得所述细胞能够在这种生理学上更相关的培养基中持续生长。所有细胞实验都是用含有 10% HIFCS 的 FFRPMI (FFRPMI/HIFCS) 作为生长培养基进行的，除非另有说明。

### 实施例 7

#### 相对亲和力测定

通过稍加改进的 Westerhoff 等 (Mol. Pharm., 48: 459-471 (1995)) 所披露的方法测定各种叶酸衍生物的相对亲和力。简单地讲，在室温下，在 0.25% 胰蛋白酶/PBS 中让 FR-阳性 KB 细胞温和地胰蛋白酶化 3 分钟，然后用 FFRPMI/HIFCS 稀释。然后以 800×g 的速度离心 5 分钟，并且用 PBS 洗涤 1 次，将最终的细胞沉淀物悬浮在 FFRPMI 1640 中 (无血清)。在有和没有提高含有叶酸的测试物品的浓度的情况下，在冰上将细胞与 100 nM  $^3\text{H}$ -叶酸一起培养 15 分钟。以 10,000×g 的速度使样品离心 5 分钟，将细胞沉淀悬浮在缓冲液中，转移到装有 5ml 闪烁混合物的每一个小瓶中，然后进行放射性计数。负对照试管仅

装有溶解在 FFRPMI 中的  $^3\text{H}$ -叶酸 (无竞争剂)。阳性对照试管含有最终浓度为 1 mM 的叶酸, 并且从所有样品中扣除在所述样品中测定的 CPMs (表示标记物的非专一性结合)。很明显, 相对亲和力定义为取代与 KB FR 结合的 50% 的  $^3\text{H}$ -叶酸所需要的化合物的反摩尔比, 并且将叶酸对 FR 的相对亲和力设定为 1。

用这种测定方法测定了 EC20 直接与叶酸竞争结合细胞表面 FRs 的能力。重要的是, 1.0 的相对亲和力值表示测试物品配体对 FR 的亲和力与叶酸相等。同样, 低于统一值的值表示较弱的亲和力, 高于统一值的值表示较强的亲和力。

在存在逐渐加大浓度的非放射性叶酸, EC20, 铼-EC20 (异构体 A; C 峰), 铼-EC20 (异构体 B; 0 峰), 或相关的叶酸型放射性药物, DTPA-叶酸的情况下, 将培养的 KB 细胞与  $100\text{nM}^3\text{H}$ -叶酸一起培养。在  $4^\circ\text{C}$  下培养 15 分钟之后, 将未结合的材料从细胞上漂洗掉, 并且对残余的细胞结合的放射性活性进行计数。将结合的放射性活性的量对未标记的配体的浓度进行作图, 并且估算  $\text{IC}_{50}$  值 (抑制 50%  $^3\text{H}$ -叶酸结合所需要的配体浓度)。如图 4 和表 2 所示 (参见下文), 测定 EC20 相对叶酸对人 FRs 的亲和力而言具有 0.92 的亲和力。铼-EC20 的两种异构体的相对亲和力值都非常类似于 (如果不高于) 母体 EC20 分子的亲和力 (Re-EC20 异构体 A 和异构体 B 的亲和力分别为 1.42 和 1.37)。DTPA-叶酸,  $^{111}\text{In}$ -螯合叶酸放射性药物剂对叶酸受体的相对亲和力为 0.87。因此, 用各种金属螯合基序对叶酸进行化学修饰, 不会破坏所述维生素对 FR 的固有的亲和力。

表 2. 相对亲和力评估。相对亲和力 (RA) 定义为取代与 FR-阳性 KB 细胞结合的 50% 的  $^3\text{H}$ -叶酸所需要的化合物的反摩尔比。将叶酸的相对亲和力设定为 1。每一种测试物品重复评估 3 次。

| 测试物品          | IC <sub>50</sub> (nM) | S.D. | RA   | S.D.  |
|---------------|-----------------------|------|------|-------|
| 叶酸            | 118                   | +19  | 1.00 |       |
| EC20          | 128                   | +25  | 0.92 | ±0.23 |
| EC20:Re 异构体 1 | 83                    | ±16  | 1.42 | ±0.36 |
| EC20:Re 异构体 2 | 86                    | ±3   | 1.37 | ±0.23 |
| DTPA-叶酸       | 136                   | +12  | 0.87 | ±0.16 |

### 实施例 8

#### 时间决定型细胞吸收

将 KB 细胞接种到 12 孔 Falcon 平板上, 并且过夜以便形成亚融合的单层。在用 1 mL 新的 FFRPMI/HIFCS 漂洗 1 次之后, 每一个孔接纳 1 mL 含有 10 nM 的  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 的 FFRPMI/HIFCS。在 37°C 下, 将细胞培养预定时间, 然后用 1 mL 冰冷的 PBS 漂洗 4 次。在室温下, 用 15 分钟时间, 将所述细胞单层溶解在 0.5 mL 含有 1% 十二烷基硫酸钠的 PBS, pH 7.4 中, 然后利用 Packard  $\gamma$  计数器进行放射性计数。用 BioRad DC 蛋白测定试剂盒对每一个样品中的样品进行定量, 并且利用每个细胞  $2.23 \times 10^{-7}$  mg 蛋白的换算系数, 将细胞蛋白值换算成细胞数量。最终的制表用的值是以每个细胞的 EC20 分子数形式表示的。

利用这种方法定量测定了被吸收到 FR-阳性 KB 细胞中的  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 的动力学。如图 5 所示, 在 37°C 下, 在 2 小时内达到了稳态吸收, 其中, 大约 3.2 百万个 EC20 分子是细胞结合的, 而 1/2 最大细胞结合出现在将 10 nM 的这种放射性药物与所述细胞混合 9 分钟之后。有趣的是, 当细胞与 10 倍较高浓度的  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 (100 nM; 数据未显示) 一起培养时, 仅用 37 秒就达到了 1/2 最大饱和点。

### 实施例 9

#### 浓度决定型细胞吸收

将 KB 细胞接种到 12 孔 Falcon 平板上, 并且过夜以便形成亚融合

的单层。在用 1 mL 新的 FFRPMI/HIFCS 漂洗 1 次之后，每一个孔接纳 1 mL 含有增加浓度的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的 FFRPMI/HIFCS。在 37°C 下培养细胞 2 小时，然后用 1 mL 冰冷的 PBS，pH 7.4 漂洗 4 次。在室温下，用 15 分钟时间，将所述细胞单层溶解在 0.5 mL 含有 1% 十二烷基硫酸钠的 PBS 中，然后利用 Packard  $\gamma$  计数器进行放射性计数。按上述方法测定蛋白含量，并且最终的制表值是以每个细胞的 EC20 分子数形式表示的。

如图 6 所示，发现  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的细胞吸收取决于细胞外浓度。测定所使用的特定 KB 细胞的每个细胞最多能够结合 400 万个叶酸放射性药物的分子。对所述数据进行 Scatchard 分析，估计结合的  $K_D$  为 3.2 nM，该值与观察到的维生素叶酸与相同细胞的结合值相当。

尽管没有确立 B 峰成分的完全相同，UV 吸收分析表明，它含有叶酸部分（即，所述吸收光谱包括位于 363 nm 处的叶酸的标记性次吸收峰）。收集这种 HPLC 纯化的放射性标记的物质（B 峰物质），然后添加到培养的 KB 细胞中。如图 7 所示，还发现  $^{99m}\text{Tc}$ -标记过的 B 峰成分的细胞吸收取决于细胞外浓度。对所述数据进行的 Scatchard 分析测算出结合的  $K_D$  为 1.1 nM。有趣的是，在存在过量叶酸的情况下，B 峰的细胞结合被完全抑制，这表明这种次要制剂副产品也能够用于放射性诊断用途中定向 FR-阳性细胞。

## 实施例 10

### 血液清除

在剂量服用之前，用无叶酸的饮食（Harlan #TD-90261）将用于本研究的动物维持大约 3 周时间。对这种特殊饮食的适应是重要的，因为正常的啮齿类动物饮食包括大量的叶酸（6 mg/kg 食物），并且促进小鼠体内的高血清叶酸含量。另外，以前的研究业已证实，用无叶酸的饮食饲养小鼠 3 周时间，保持了  $25 \pm 7$  nM 的安全的血清叶酸水平，这一水平明显高于在人类血清中测定的 9-14 nM 的浓度。

$^{99m}\text{Tc}$ -EC20 溶液是在使用当天制备的，并且最初每毫升含有 100  $\mu$ g EC20。用无菌盐水进一步稀释该溶液，以便制备工作母液。通过 TLC 估算该产物的放射性化学纯度为大约 94%。在简单的乙醚麻醉期间，通过尾静脉给每只动物静脉注射大约 0.1 mL 体积的 50  $\mu$ g/kg EC20（67

nmol/kg)的剂量。在注射之后指定的时间(参见图8),通过二氧化碳窒息对每只动物实施安乐死,马上通过心脏穿刺采集血液。

如图8所示, $^{99m}\text{Tc}$ -EC20被很快从Balb/c小鼠的循环系统中清除。估计这种放射性药物的血浆半衰期为大约4分钟,并且在4小时之后在循环系统中残留的注射的 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20不足0.2%(假设血液占总体重的5.5%)。这一数据表明,在静脉服用之后,叶酸缀合物被很快清除,并且,有价值的组织生物分布数据只能在注射数小时之后获得,不考虑由于血液携带的放射活性导致的非专一性组织摄取。

### 实施例 11

#### 组织分布研究

使用FR-阳性M109模型评估了 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20在体内靶定肿瘤的能力。所述肿瘤细胞与Balb/c小鼠是同源的,并且它们能够在接种之后2周之内形成皮下固体肿瘤。在该生物测定中,还评估了在结构上与 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20类似的 $^{99m}\text{Tc}$ -EC14,所不同的是,它包括一个额外的D-Glu残基(即, Pte-D-Glu-D-Glu- $\beta$ Dpr-Asp-Cys),  $^{99m}\text{Tc}$ -EC28(不含蝶酸的对照,包括苯甲酰基-D-Glu-n-Glu- $\beta$ Dpr-Asp-Cys),以及以前报导的 $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸放射性药物。重要的是, $^{99m}\text{Tc}$ -EC28对照制剂不能结合细胞表面FRs,因为它缺乏关键的蝶啶环部分。

4-5周大的小鼠(Balb/c株系)是从Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN)购买的,并且在进行实验之前,用无叶酸的饮食一共维持3周时间。在实验之前2周,将同源的,FR-阳性M109肿瘤细胞( $1 \times 10^6$ 每只动物)接种到右侧腋窝的皮下组织中。所有小鼠都是雌性的,在实验当天,肿瘤的重量为 $54.2 \pm 29.8$  mg。在使用当天制备每毫升含有100  $\mu\text{g}$ 制剂的 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20母液,并且它的放射性化学纯度大于96%。另外两种 $^{99m}\text{Tc}$ -螯合剂, $^{99m}\text{Tc}$ -EC14和 $^{99m}\text{Tc}$ -EC28以及 $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸也被制备成 $> 90\%$ 的放射性化学纯度。所有溶液都用盐水本身或含有100当量叶酸(用于竞争)的盐水溶液稀释,以便最终的放射性药物浓度为10  $\mu\text{mol/mL}$ 。

在简单的乙醚麻醉期间,通过动物尾部侧静脉通过静脉注射100  $\mu\text{l}$ 体积的大约40  $\mu\text{mol/kg}$ 剂量的试验物品。注射之后4小时,通过二氧化碳窒息杀死动物,并且解剖。取出特定的组织,称重,并且

计数,以便测定  $^{99m}\text{Tc}$  分布。对 CPM 值进行衰变校正,并且以每克湿重量组织的%注射剂量形式制表。

如表 3 所示(见下文),含有放射性药物  $^{99m}\text{Tc-EC14}$ ,  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  和  $^{111}\text{In-DTPA-叶酸}$  的这三种“叶酸”主要积累在 FR-阳性肿瘤和肾脏中,不过所述肾脏与肿瘤相比在每克组织中浓缩了更高百分比的注射剂量(% ID/g)。有趣的是,  $^{111}\text{In-DTPA-叶酸}$  和  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  的净肿瘤积累几乎相同(分别为 19 和 17% ID/g),而  $^{99m}\text{Tc-EC14}$  的肿瘤吸收略低于大约 10% ID/g。不过,所有三种制剂都表现出高的肿瘤与血液比例(> 30:1)。

表 3. 叶酸放射性药物在长有皮下 M109 肿瘤的 Balb/c 小鼠体内的生物分布

|       | 每克组织的%注射剂量(静脉注射后4小时)*  |                               |                        |                               |                               |                                      |                        |
|-------|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
|       | $^{99m}\text{Tc-EC14}$ | $^{99m}\text{Tc-EC14}$<br>+叶酸 | $^{99m}\text{Tc-EC20}$ | $^{99m}\text{Tc-EC20}$<br>+叶酸 | $^{111}\text{In-DTPA-}$<br>叶酸 | $^{111}\text{In-DTPA-}$<br>叶酸<br>+叶酸 | $^{99m}\text{Tc-EC28}$ |
| 血液    | 0.31 ± 0.14            | 0.19 ± 0.07                   | 0.34 ± 0.03            | 0.09 ± 0.02                   | 0.21 ± 0.10                   | 0.09 ± 0.04                          | 0.06 ± 0.04            |
| 心脏    | 2.39 ± 0.64            | 0.08 ± 0.01                   | 1.57 ± 0.26            | 0.08 ± 0.01                   | 2.57 ± 0.82                   | 0.06 ± 0.02                          | 0.03 ± 0.01            |
| 肺     | 2.08 ± 0.40            | 0.15 ± 0.04                   | 2.22 ± 0.63            | 0.31 ± 0.26                   | 1.72 ± 0.61                   | 0.09 ± 0.2                           | 0.05 ± 0.01            |
| 肝     | 3.44 ± 2.19            | 1.37 ± 0.98                   | 3.56 ± 0.25            | 1.15 ± 0.22                   | 5.21 ± 2.63                   | 0.81 ± 0.03                          | 0.50 ± 0.26            |
| 脾     | 2.68 ± 2.49            | 2.99 ± 1.43                   | 0.95 ± 0.15            | 0.38 ± 0.33                   | 3.30 ± 2.33                   | 1.46 ± 0.73                          | 0.60 ± 0.38            |
| 小肠    | 1.70 ± 0.55            | 0.32 ± 0.11                   | 2.56 ± 0.61            | 2.93 ± 1.49                   | 1.87 ± 0.69                   | 0.82 ± 0.14                          | 0.47 ± 0.19            |
| 小肾    | 98.0 ± 40.7            | 5.94 ± 0.52                   | 138 ± 12.4             | 5.64 ± 2.13                   | 191 ± 79.2                    | 3.14 ± 1.96                          | 0.62 ± 0.14            |
| 肌肉    | 0.99 ± 0.28            | 0.09 ± 0.11                   | 0.67 ± 0.20            | 0.06 ± 0.02                   | 1.19 ± 0.48                   | 0.05 ± 0.04                          | 0.02 ± 0.01            |
| 胃     | 1.47 ± 0.58            | 0.10 ± 0.03                   | 1.45 ± 0.55            | 3.35 ± 5.19                   | 1.62 ± 0.65                   | 0.25 ± 0.20                          | 0.21 ± 0.19            |
| 肿瘤    | 9.83 ± 2.77            | 0.43 ± 0.52                   | 17.2 ± 1.02            | 0.45 ± 0.18                   | 19.3 ± 5.86                   | 0.46 ± 0.42                          | 0.11 ± 0.06            |
| 肿瘤/血液 | 34.1 ± 7.41            | 2.00 ± 2.00                   | 51.0 ± 8.20            | 4.70 ± 1.30                   | 102 ± 43.4                    | 5.00 ± 4.60                          | 2.00 ± 0.50            |

\*所示出的值表示来自三只动物的数据的平均值 ± 标准误差。

通过两种不同的方法进一步证实了叶酸专一性定向。首先,当这些制剂与 100 倍过量的叶酸同时服用时,  $^{99m}\text{Tc-EC 14}$ ,  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  和  $^{111}\text{In-DTPA-叶酸}$  在 FR-阳性肿瘤和肾脏中的积累被有效的抑制(> 94%)。其次,  $^{99m}\text{Tc-EC28}$  对照制剂不能在肾脏和肿瘤中明显积累。这两种发现都证实了完整的“类叶酸”(或蝶酸)部分是实现所述放射性药物制剂向 FR-阳性组织中吸收和保留所必须的。

## 实施例 12

### γ 闪烁扫描法

实验之前 2 周将 M109 肿瘤细胞 ( $1 \times 10^6$  每只动物) 接种到 Balb/c 小

鼠的右侧腋窝的皮下组织中。在进行简单的乙醚麻醉期间，通过动物尾部侧静脉注射存在 100  $\mu$ l 体积中的大约 50  $\mu$ mol/kg 剂量的试验物品。注射之后 4 小时，通过二氧化碳窒息杀死动物，然后放置在图像获取表面的顶部。使用 Technicare Omega 500 Sigma 410 放射性同位素  $\gamma$  照相以每分钟 50-75000 次计数的计数速度获取整体图像 1 分钟时间。用装有 Medasys Pinnacle 软件的 Medasys MS-DOS-型计算机分析所有数据。

使用这种  $\gamma$  闪烁扫描法证实了 FR-阳性 M109 肿瘤和肾脏对  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的吸收。如图 9 所示，用上述  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射的小鼠的腹部图像将  $\gamma$  辐射定位于两个肾脏(K)和 M 109 肿瘤区(T; 肩部区)。在其他身体组织中没有观察到明显的放射性示踪剂。业已报导了  $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸放射性药物的类似的图像特征。

### 实施例 13

#### 泌尿和代谢

$^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的泌尿 HPLC 物种形成特征，是使用 Ba1b/c 小鼠获得的。通过尾部侧静脉用 1 mCi (6.7 nmol) 的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射小鼠（每只小鼠大约 20 克）。在 1, 4, 或 6 小时时间之后，通过二氧化碳窒息对两只小鼠组成的组实施安乐死，并且采集尿液。在通过 GV13 Millex 滤膜过滤之后，用装有 Nova-Pak C18 3.9 $\times$ 150mm 柱和放射性化学检测仪的 HPLC 系统评估放射性化学物种形成。用含有 0.1 % TFA 的 20% 的甲醇，用 1 mL/分钟的流速对该系统进行等度洗脱。

前面确定了  $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸的主要消除途径是通过尿液。与图 2 所示的 HPLC 曲线类似， $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 标准物和尿液样品都具有四个放射性高峰。如表 4 所示（参见下文），在该实验进行的 6 小时时间内，标准物的放射性化学纯度（C 和 D 峰的总和，推测相当于顺和反  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20）保持稳定在大约 93%。在该标准物（A 峰）中  $^{99m}\text{Tc}$  的量为大约 2%。重要的是，在该放射性化学曲线中的 B 峰被认为是在非常低的，不太稳定的状态下与  $^{99m}\text{Tc}$  螯合的 EC20。不过，在该级分中测定的放射活性没有包含在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的总体放射性化学纯度弧线中。该数据总体上表示在这 6 小时的研究时间中，该制剂保持稳定。

在注射到 Ba1b/C 小鼠体内 1 和 4 小时之后，小鼠尿液中的  $^{99m}\text{Tc}$ -

EC20 的放射性化学物种形成曲线没有改变。不过，在注射 6 小时之后，存在于尿液中的放射性太低，以至于不能通过 HPLC 精确地测定。在进行定量的 4 个小时期间，在尿液中回收的放射性物质的母体药物的比例保持相对稳定在大约 90%。这一值与标准物质的 93% 的纯度非常类似，表明了  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 被以修饰过的形式主要被分泌到尿液中。

表 4. 来自 Balb/c 小鼠的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的分泌物和代谢。通过尾部侧静脉给小鼠注射 1 mCi (6.7 nmol) 的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。在标明的时间，对每组 2 只小鼠实施安乐死，并且采集尿液。通过 HPLC 测定放射性化学物种形成。利用 C 和 D 峰的面积百分比总和 (顺和反异构体) 计算完整  $^{99m}\text{Tc}$  EC20 的总体纯度。

| 峰        | RT (min) | 面积百分比                      |      |      |               |      |      |      |
|----------|----------|----------------------------|------|------|---------------|------|------|------|
|          |          | $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 标准 |      |      | 尿样 (两只小鼠/时间点) |      |      |      |
|          |          | 0 hr                       | 1 hr | 6 hr | 1 hr          |      | 4 hr |      |
| A (高铈酸盐) | 1.4      | 2                          | 2.1  | 1.8  | 8.3           | 6.3  | 9.4  | 10.2 |
| B (未知)   | 3.4      | 4.5                        | 4.5  | 4.8  | 2.5           | 2.6  | 5.4  | 0    |
| C (异构体1) | 5.5      | 15.5                       | 15.7 | 15.9 | 20.4          | 18.1 | 7.3  | 11.1 |
| D (异构体2) | 18.5     | 78                         | 77.7 | 77.5 | 68.8          | 73   | 77.9 | 78.7 |
| C和D的总和   |          | 93.5                       | 93.4 | 93.4 | 89.2          | 91.1 | 85.2 | 89.8 |

#### 实施例 14

##### 血清蛋白结合

将新鲜的大鼠血清，和商业化男人血清 (AB 型供体, Sigma Chemical Co.) 用于评估  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 与血清蛋白的体外结合。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 与 1 mL 的血清在室温下混合 1 分钟之后，将 0.3 mL 的血清溶液转移到干净的 Centrifree® 超滤装置 (30, 000 NMWL) 中，重复进行三次。在用所述血清溶液对离心机加样 1 分钟之内，在 20°C 下使该装置以 1000×g 的速度离心 20 分钟。将 50 μL 所述原始溶液的样品和来自每一个装置的滤液转移到干净的试管中，并且在自动 γ 计数器中计数。用相同的方法对与 1 mL 普通盐水混合的  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的对照溶液进行超滤。计算三种样品中每一个的游离  $^{99m}\text{Tc}$  的百分比。

尽管  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 仅表现出与超滤装置的低水平的非专一性结合 (低于 5%)，发现它的 70% 主要与大鼠或人类血清溶液中的 >30kDa 的血清蛋白级分相关 (分别为 69% 和 72%)。重要的是，由于  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 不能

有效地和优先积累在FR阳性组织中(参见表2和图8),它对血清蛋白的表观亲和力似乎不影响这种放射性示踪剂在体内靶定FRs的能力。

### 实施例 15

#### 组织分布研究

在本实施例中使用的方法类似于例11所述方法。用FR-阳性M109和FR-阴性4T1肿瘤模型进一步评估了 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20在体内靶定肿瘤的能力。六周大的雌性Balb/c小鼠( $n=3/\text{剂量组}$ )是从Harlan Sprague Dawley, Inc.购买的(Indianapolis, IN),并且在接种肿瘤细胞之前用无叶酸饮食(Harlan TEKLAD)一共维持7天时间。

用 $100\ \mu\text{l}$ 含有1%同源小鼠血清的无叶酸RPMI-1640皮下接种同源的FR-阳性M109肿瘤细胞( $2\times 10^6\ \text{P}_0$ 每只动物)或FR-阴性4T1细胞( $5\times 10^5\ \text{P}_0$ 每只动物)。按上述方法在使用当天制备每毫升含有 $100\ \mu\text{g}$ 制剂的 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20母液。

在接种肿瘤细胞16天之后,用500或1800 nmol/kg的EC20对长有M109肿瘤的动物进行静脉内注射,而对于长有4T1肿瘤的动物来说用500 nmol/kg的EC20进行注射(每个剂量组3只小鼠)。所有注射体积均为 $100\ \mu\text{l}$ 。在注射4小时之后,通过二氧化碳窒息杀死动物,并且通过心脏穿孔采集血液,并且对所述动物进行解剖。取出选择的组织(心脏,肺,肝脏,脾,肾,小肠,胃,肌肉和肿瘤),称重,并且用自动 $\gamma$ 计数器计数,并且确定 $^{99m}\text{Tc}$ 分布。通过参考用该注射制剂的稀释液制备的标准物计算所述放射性药物的吸收,以湿重量组织的百分注射剂量表示(% ID/g)。

如图11所示,证实了叶酸受体-专一性定向,因为 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20主要积累在FR-阳性M109肿瘤和肾脏中,而不主要积累在FR-阴性4T1肿瘤中。FR-阴性4T1肿瘤中的吸收比FR-阳性M109肿瘤中的吸收低7.6倍。正如所预料的,除了肾脏之外, $^{99m}\text{Tc}$ -EC20在正常组织中的吸收较低。以上结果表明, $^{99m}\text{Tc}$ -EC20定向是FR-专一性的。

### 实施例 16

#### 组织分布研究

在本实施例中使用的方法类似于例11所披露的方法。利用FR-阳

性 KB 肿瘤模型评估了  $^{99m}\text{Tc}$ -EC11 (肽-A<sub>1</sub>),  $^{99m}\text{Tc}$ -EC13 (肽-A<sub>3</sub>), 和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC14 (肽-A<sub>2</sub>) 在体内靶定肿瘤的能力。在接种肿瘤细胞之前, 用无叶酸饮食将 4 周大的雄性裸鼠 (n=4/组) 维持 10 天时间。

将 FR-阳性 KB 肿瘤细胞 ( $0.25 \times 10^6$  每只动物) 皮下接种到膜内部位。在接种肿瘤细胞 14 天之后, 在下面的表 5 所示的缀合物的剂量 (大约  $12 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) 下用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC11,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC13, 或  $^{99m}\text{Tc}$ -EC14 对所述动物 (n = 4/组) 进行静脉内注射。按上述方法在使用当天制备  $^{99m}\text{Tc}$ -EC11,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC13, 和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC14 溶液的母液。给对照动物共同服用大约 20 倍过量的游离叶酸 (大约  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ )。在注射 4 小时之后, 通过二氧化碳窒息杀死动物, 并且通过心脏穿刺采集血液, 并且解剖所述动物。取出选择的组织, 称重, 并且用自动  $\gamma$  计数器计数, 确定  $^{99m}\text{Tc}$  分布。通过参照用所述注射制剂的稀释液制备的标准物计算湿重量组织的百分注射剂量形式的放射性药物的吸收 (% ID/g)。

如表 5 所示, 证实了叶酸受体-专一性定向, 因为  $^{99m}\text{Tc}$ -EC11,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC13, 和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC14 主要积累在 FR-阳性 KB 肿瘤和肾脏中。通过同时服用游离叶酸抑制所述积累。以上结果表明  $^{99m}\text{Tc}$ -EC11,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC13, 和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC14 在体内能够以 FR-专一性方式靶定肿瘤。

用类似方法, 使用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC53 (EC20 的所有 D-对映体) 获得了类似结果 (参见下面的表 6), 所不同的是,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC53 的剂量大约为  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 并且可以使用 100 倍过量的游离叶酸或冷的 EC53。如表 6 所示, 证实了叶酸受体受体-专一性定向, 这是因为  $^{99m}\text{Tc}$ -EC53 主要积累在 FR-阳性 KB 肿瘤和肾脏中。通过共同服用游离叶酸抑制了所述积累。以上结果表明,  $^{99m}\text{Tc}$ -EC53 能够以 FR-专一性方式体内靶定肿瘤。



表 6

|                   | <sup>99m</sup> Tc-EC53 |      | <sup>99m</sup> Tc-EC53 加叶酸 |       | <sup>99m</sup> Tc-EC53 加 EC53 |      |
|-------------------|------------------------|------|----------------------------|-------|-------------------------------|------|
|                   | 平均                     | STD  | 平均                         | STD   | 平均                            | STD  |
| 测试物品剂量 (ug/kg)    | 50.0                   |      | 50.0                       |       | 50.0                          |      |
| (nmol/kg)         | 67.0                   |      | 67.0                       |       | 67.0                          |      |
| 共同服用的竞争剂(nmol/kg) |                        |      | 6700.0                     |       | 6700.0                        |      |
| 肿瘤质量(g)           | 0.2                    | 0.17 | 0.20                       | 0.14  | 0.19                          | 0.15 |
| 动物                | 3F                     |      | 3F                         |       | 3F                            |      |
| 血液                | 0.38                   | 0.03 | 0.244                      | 0.028 | 0.24                          | 0.06 |
| 心脏                | 1.09                   | 0.28 | 0.15                       | 0.03  | 0.19                          | 0.03 |
| 肺                 | 0.89                   | 0.30 | 0.23                       | 0.04  | 0.26                          | 0.07 |
| 肝                 | 3.86                   | 0.96 | 4.49                       | 1.15  | 3.77                          | 0.48 |
| 小肠                | 3.53                   | 0.86 | 4.33                       | 3.67  | 3.96                          | 1.86 |
| 肾                 | 77.99                  | 6.19 | 10.12                      | 6.91  | 7.97                          | 1.52 |
| 肌肉                | 0.76                   | 0.31 | 0.11                       | 0.04  | 0.12                          | 0.06 |
| 脾                 | 0.67                   | 0.22 | 0.27                       | 0.06  | 0.41                          | 0.11 |
| 胃                 | 1.04                   | 0.36 | 0.30                       | 0.15  | 0.18                          | 0.01 |
| 肿瘤                | 11.77                  | 4.26 | 0.53                       | 0.11  | 1.88                          | 1.56 |
| 肿瘤/血液             | 31.4                   | 13.7 | 2.2                        | 0.6   | 4.5                           | 4.8  |
| 肿瘤/肝              | 3.4                    | 2.2  | 0.1                        | 0.0   | 0.3                           | 0.4  |
| 肿瘤/肌肉             | 17.1                   | 7.0  | 5.2                        | 1.4   | 8.5                           | 8.0  |
| 肿瘤/肾              | 0.2                    | 0.07 | 0.07                       | 0.05  | 0.14                          | 0.16 |

## 讨论

本发明提供了作为显象剂用于临床显象的维生素和放射性核素螯合剂的缀合物。所述显象剂的典型例子是新设计的，合成的，和放射性化学表征的叶酸-型放射性核素螯合剂， $^{99m}\text{Tc-EC20}$ 。

$^{99m}\text{Tc-EC20}$  是叶酸的小分子量肽衍生物，它包括 D- $\gamma$ -Glu 肽键(参见图 1)，它是用有效的固相合成方法合成的。在它的天然形式下，叶酸(或蝶酰-谷氨酸)具有存在于 L 构型中的单一的谷氨酰残基。不过，D-Glu 对映体残基被整合到 EC20 分子中。重要的是，与 EC20 类似，用 D-Glu 残基取代叶酸中的 L-Glu 残基，不会改变叶酸与所述高亲和力 FR 结合的能力。

在存在  $\alpha$ -D-葡萄糖酸盐和氯化锡(II)的情况下，发现 EC20 能有效螯合  $^{99m}\text{Tc}$ 。在通过放射性化学 HPLC 分析时，所得到的  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  制剂超过 95% 是由顺和反立体异构体的混合物组成，各自同样能够以高亲和力与 FR 结合(参见图 3)。所述制剂中大约 3% 的  $^{99m}\text{Tc}$  在 EC20 分子上的某些其他位点上与 EC20 螯合，而不是在预期的 Dap-Asp-Cys 部分上螯合。尽管该成分不是以最佳表征足够的量分离的，但它证实了能够以高亲和力与 FR 结合(参见图 6)。最后， $^{99m}\text{Tc-EC20}$  制剂中的残余的 2% 的放射性活性是由于游离的  $^{99m}\text{Tc}$  产生的。

$^{99m}\text{Tc-EC20}$  表示出与 FR-阳性细胞相关的时间和浓度依赖性。 $^{99m}\text{Tc-EC20}$  被很快从血液中清除( $t_{1/2}$  - 4 分钟)，对于诊断显象剂来说它是重要的。并且  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  优选在 FR-阳性肿瘤中大量积累。

使用两种不同的方法将  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  的性能直接与类似的 FR 定向制剂， $^{111}\text{In-DTPA-叶酸}$  进行比较。首先，发现两种叶酸型放射性药物能以相同的水平与叶酸竞争结合 KB FRs(参见图 3 和表 1)。其次，每一种制剂在长有肿瘤的小鼠体内的分布几乎是相同的(参见表 2)。测定了  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  的高的肿瘤吸收和肿瘤与血液比例。综合以上结果表明，与  $^{111}\text{In-DTPA-叶酸}$  类似， $^{99m}\text{Tc-EC20}$  在给患者临床服用时，能有效定位于 FR-阳性肿瘤。

以前业已表征了若干种叶酸型  $^{99m}\text{Tc}$  缀合物。有关  $^{99m}\text{Tc-12-氨基-3, 3, 9, 9-四甲基-5-氧杂-4, 8 二氮-2, 10-dodecanedinoe 二脞(氧杂)叶酸缀合物$ 的生物分布数据是有限的，不过报导了示踪剂在 KB 肿瘤中的中等水平的(大约 7% ID/g)吸收。还报导了有关  $^{99m}\text{Tc-乙烯二半$

脱氨酸-叶酸缀合物在长有乳腺癌的大鼠体内的生物分布的研究。给该研究中的大鼠喂食富含叶酸的食物。因此，获得了低的肿瘤吸收和低的肿瘤与血液比例。最后，证实了<sup>99m</sup>Tc-6-胍基烟酰胺-胍基(HYNIC)叶酸衍生物(HYNIC-叶酸)在24JK-FBP肿瘤中大量积累。有趣的是，<sup>99m</sup>Tc-EC20在M109肿瘤中的积累水平几乎与HYNIC-叶酸在241K-FBP肿瘤中的积累水平相同(大约17% ID/g)(表2)。在静脉注射之后4小时，这两种制剂还表现出大约50:1的肿瘤与血液的比例。

总之，制备了一种能够有效螯合<sup>99m</sup>Tc的新的叶酸的肽衍生物。这种新的化合物<sup>99m</sup>Tc-EC20能在体外和体内高亲和力的与FR-阳性肿瘤细胞结合。发现EC20能够以非常高的亲和力( $K_D$ 大约为3 nM)以时间和浓度决定型方式与培养的叶酸受体(FR)-阳性肿瘤细胞结合。通过体外相对亲和力测定，发现在单独存在或作为合成的金属螯合剂存在时，EC20能够与<sup>3</sup>H-叶酸有效竞争细胞结合。在静脉注射到Balb/c小鼠体内之后，<sup>99m</sup>Tc-EC20被迅速地从循环系统中清除(血浆 $t_{1/2}$ 大约4分钟)，并且以未代谢过的形式分泌到尿液中。用长有M109肿瘤的Balb/c小鼠进行的 $\gamma$ 闪烁扫描和定量生物分布研究的数据证实了<sup>99m</sup>Tc-EC20主要积累在FR-阳性肿瘤和肾组织中。以上结果表明，<sup>99m</sup>Tc-EC20是有效的，非破坏性的放射性诊断显象剂，可用于检测FR-阳性肿瘤。还证实其他EC20-相关的显象剂是有效的，包括EC11，EC13，EC14，和EC53。

在美国，每年大约有26,000个女性被诊断患有卵巢癌，并且在这些女性中存活超过5年时间的人不超过50%。导致低存活率的一个原因是，这种癌症的诊断的难度。由于担心未确定的腹部团块的破裂和潜在的癌症在腹腔中的扩散，通常不进行细针生物活组织检查。相反，受怀疑的卵巢团块的诊断和定期通常是通过剖腹手术进行的，这是一种破坏性的和昂贵的手术。由于<sup>99m</sup>Tc-EC20与大量存在于卵巢癌上的FR紧密结合(包括其他癌)，这种放射性药物提供了一种廉价的，非破坏性的，但是可靠的用于恶性卵巢癌的早期诊断的方法。重要的是，通过可能的更明确的和更早的诊断疾病的复发或残余的疾病<sup>99m</sup>Tc-EC20还能帮助指导临床确诊过程。

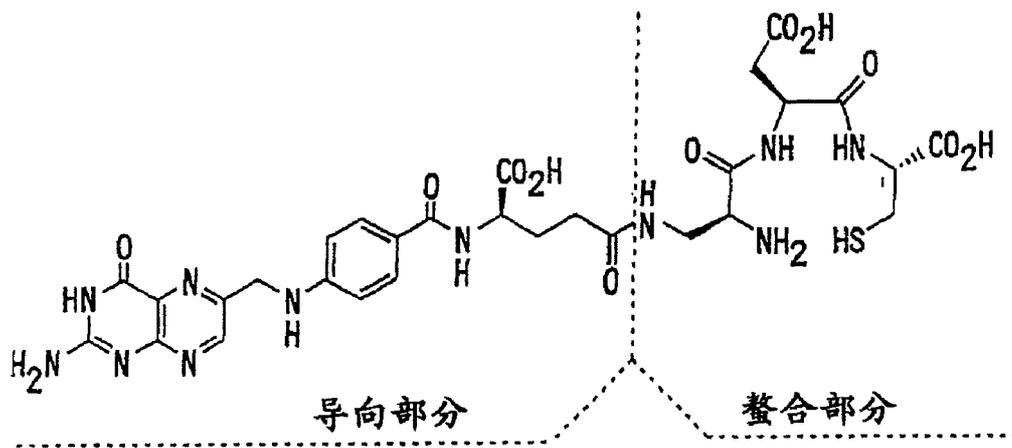


图 1

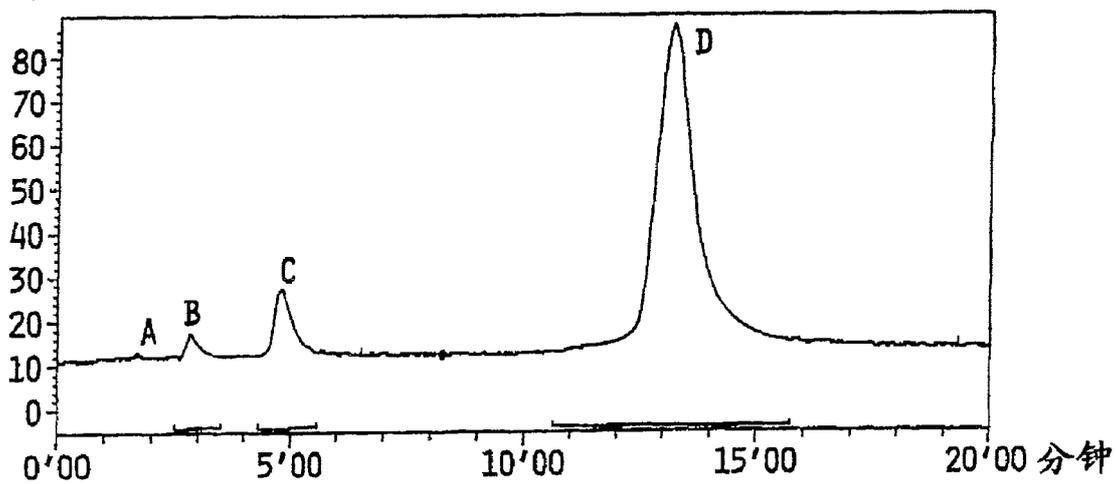


图 2

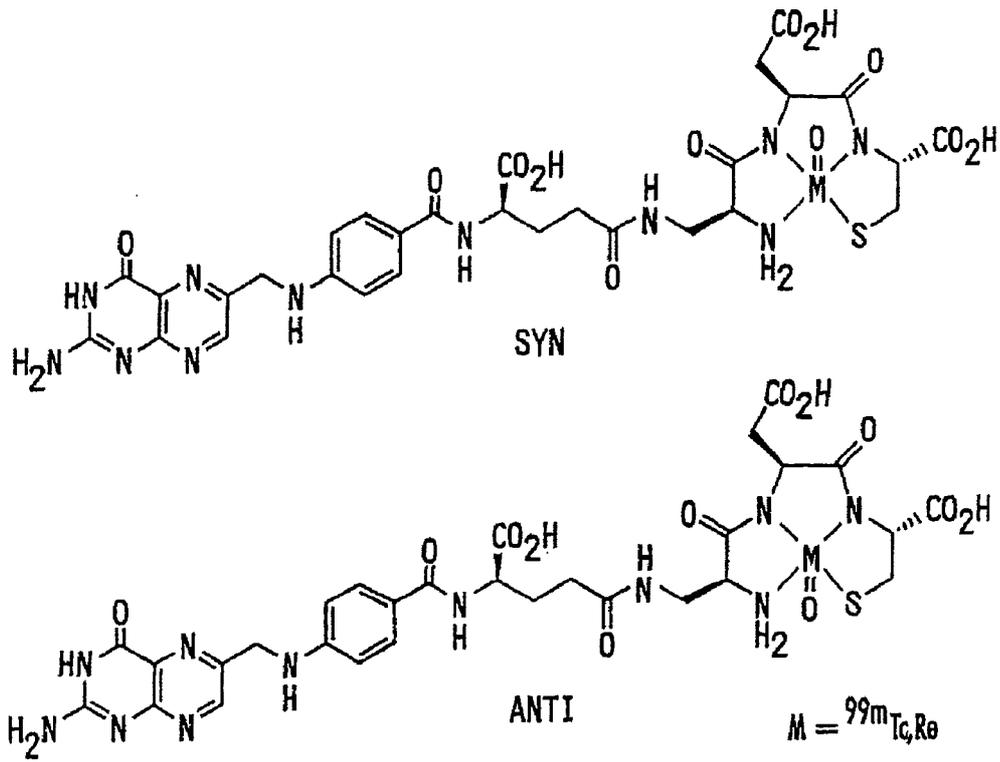
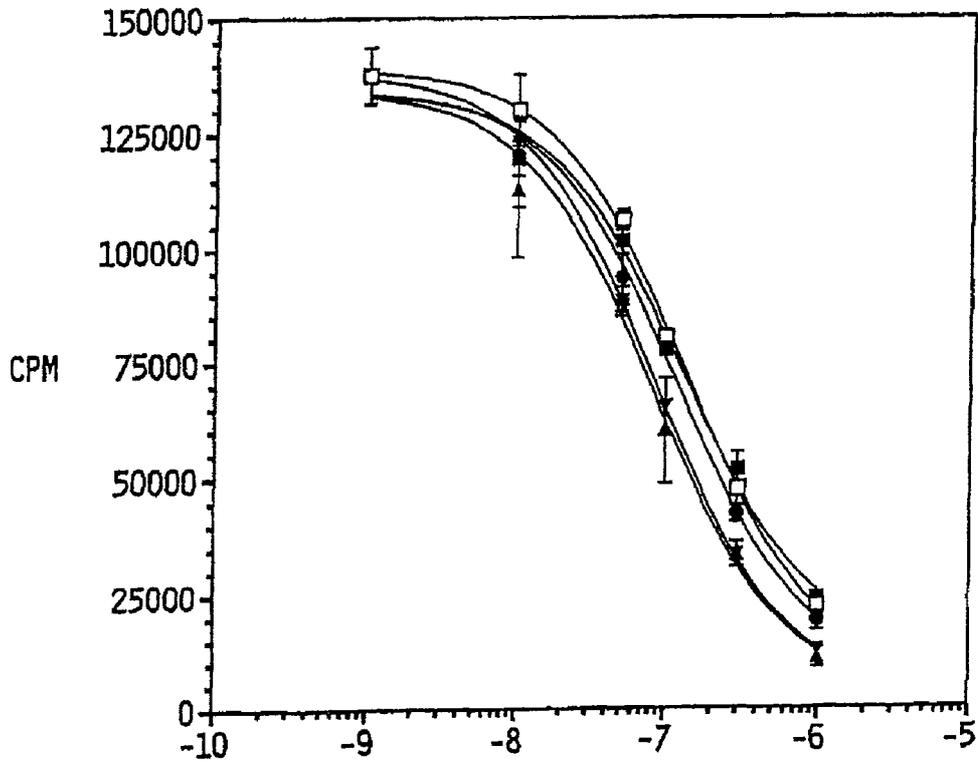


图 3



- (●) FOLIC ACID
- (■) EC20
- (▲) EC20:RE 异构体A
- (▼) EC20:RE 异构体B
- (□) DTPA-叶酸

竞争剂浓度 (LOG M)

图 4

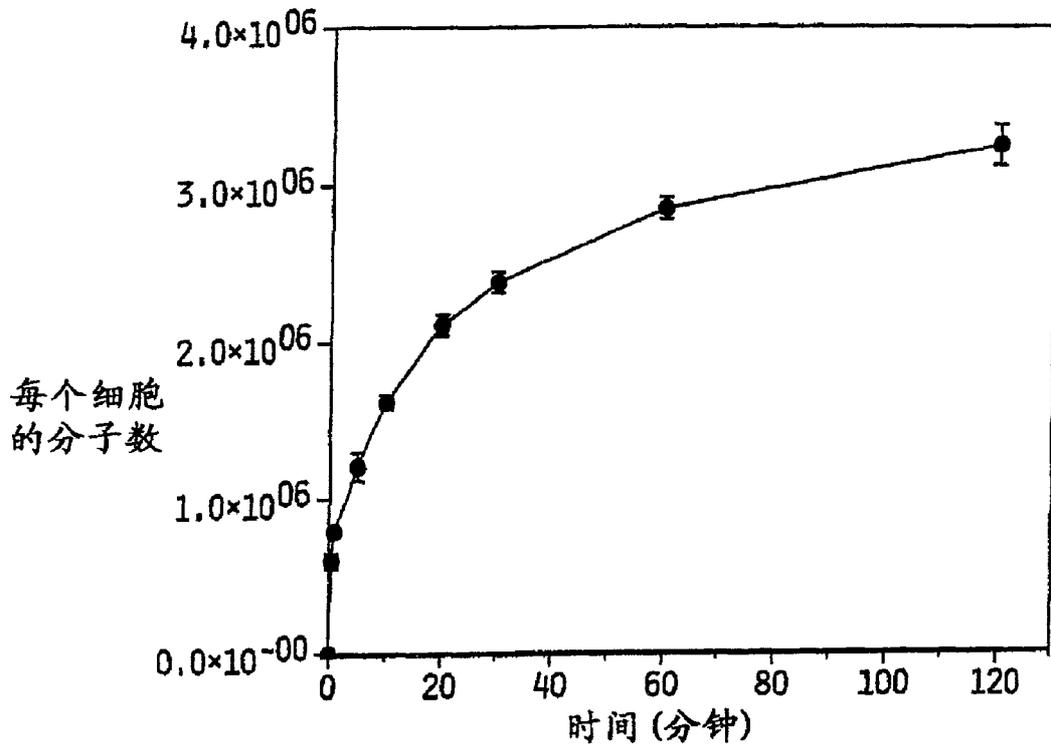


图 5

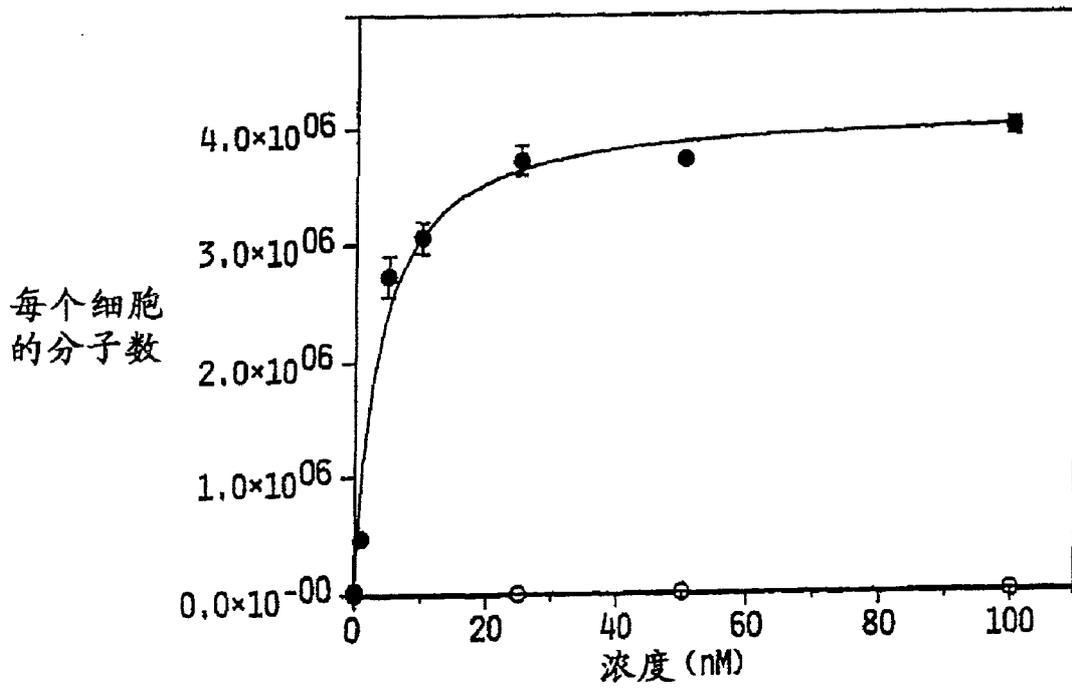


图 6

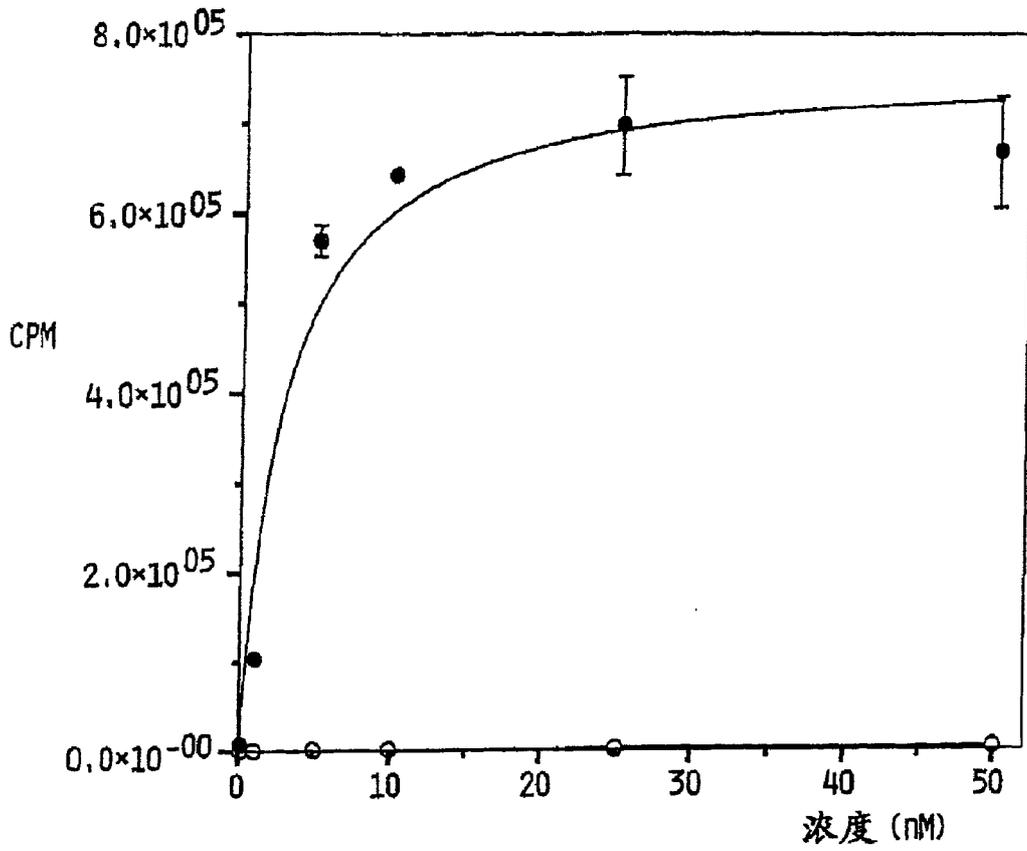


图 7

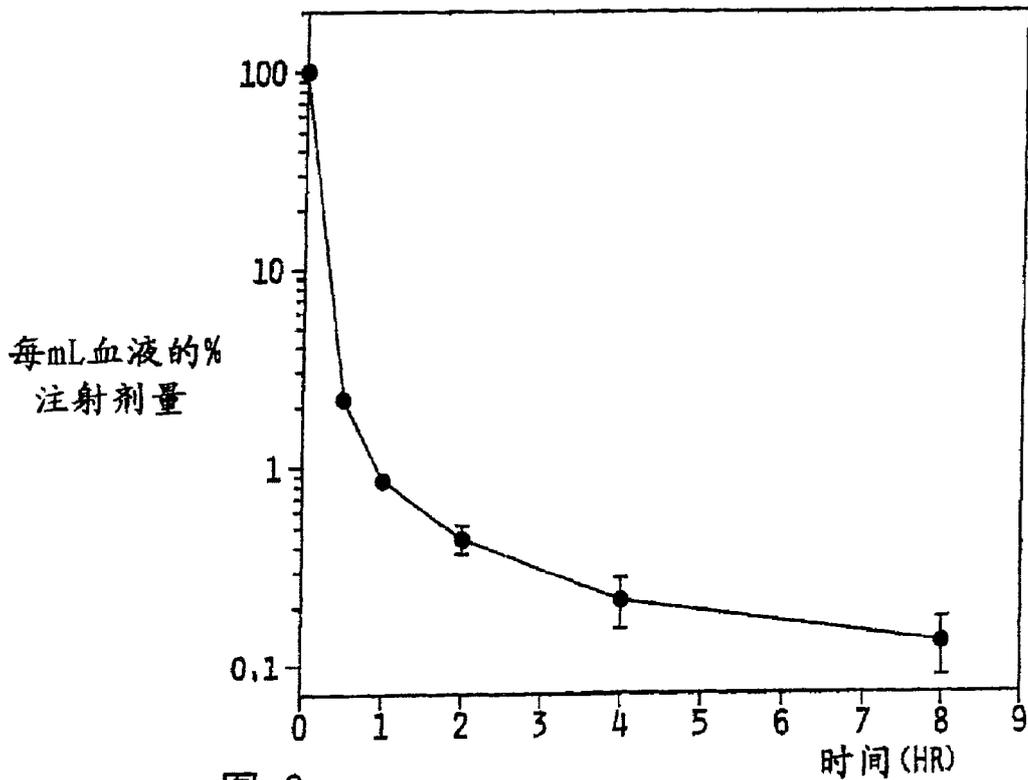


图 8

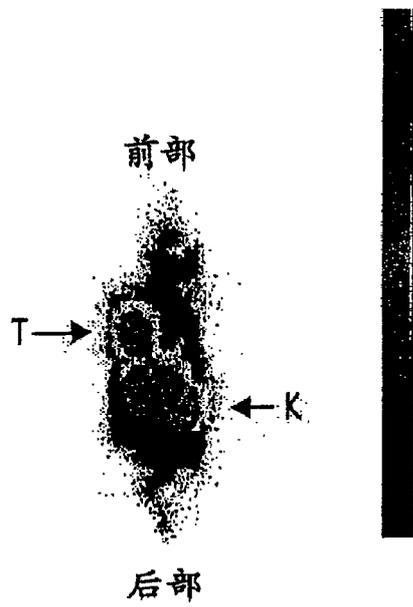


图 9

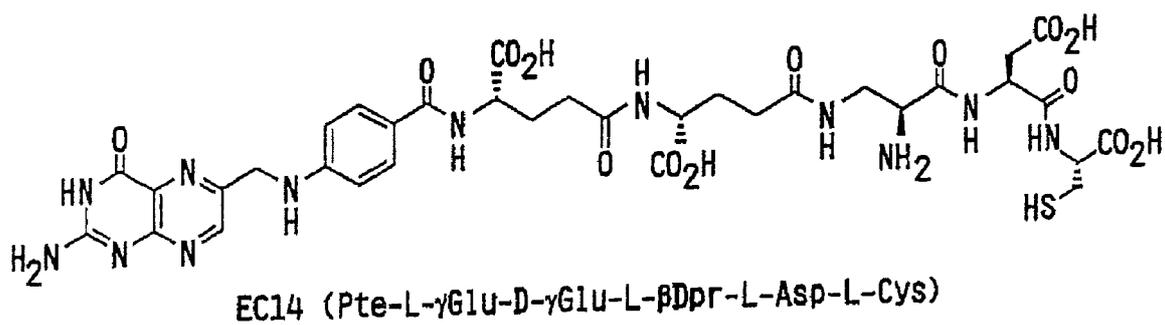
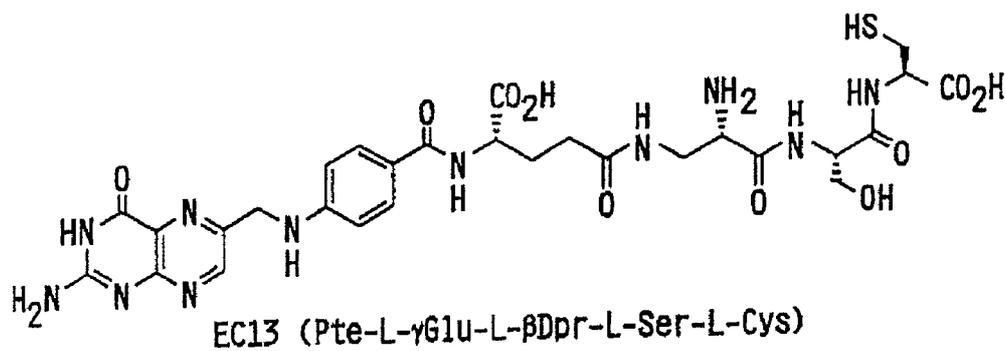
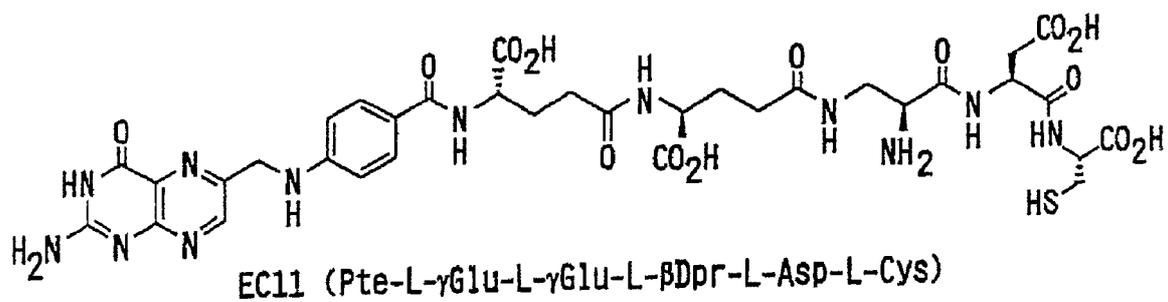


图 10A

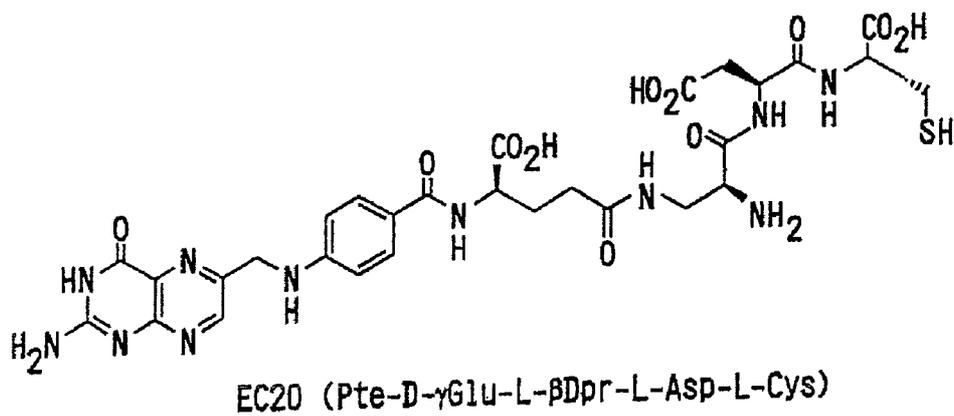
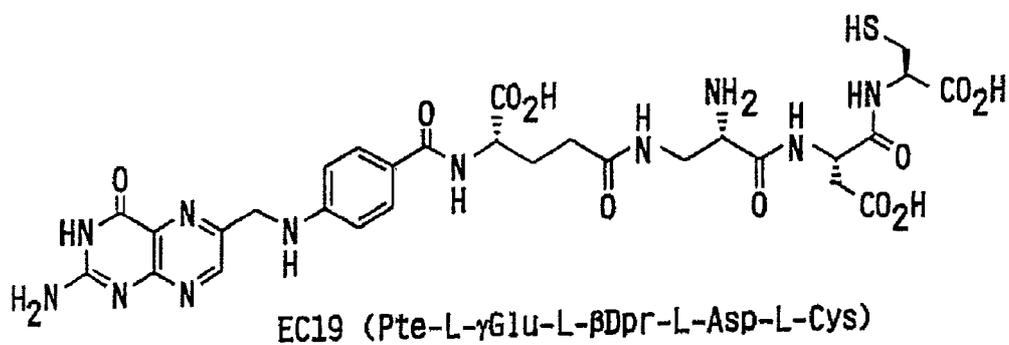
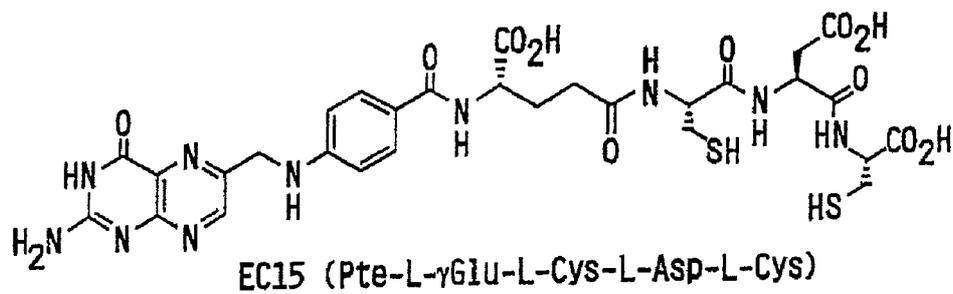
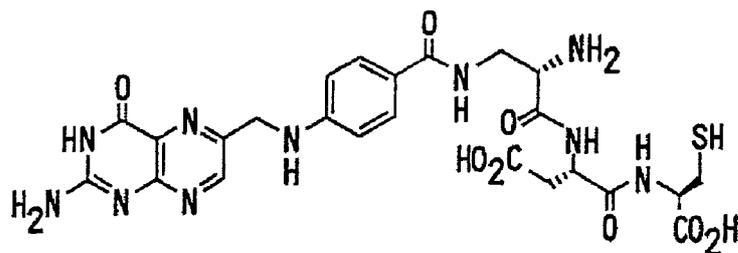
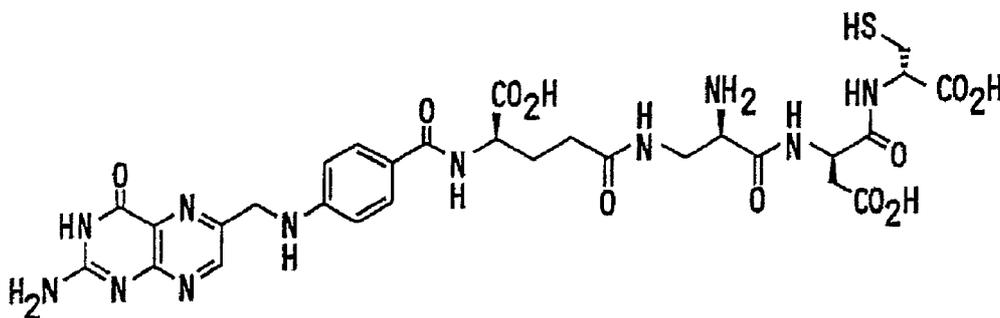


图 10B



EC31 (Pte-L-βDpr-L-Asp-L-Cys)



EC53 (Pte-D-γGlu-D-βDpr-D-Asp-D-Cys)

图 10C

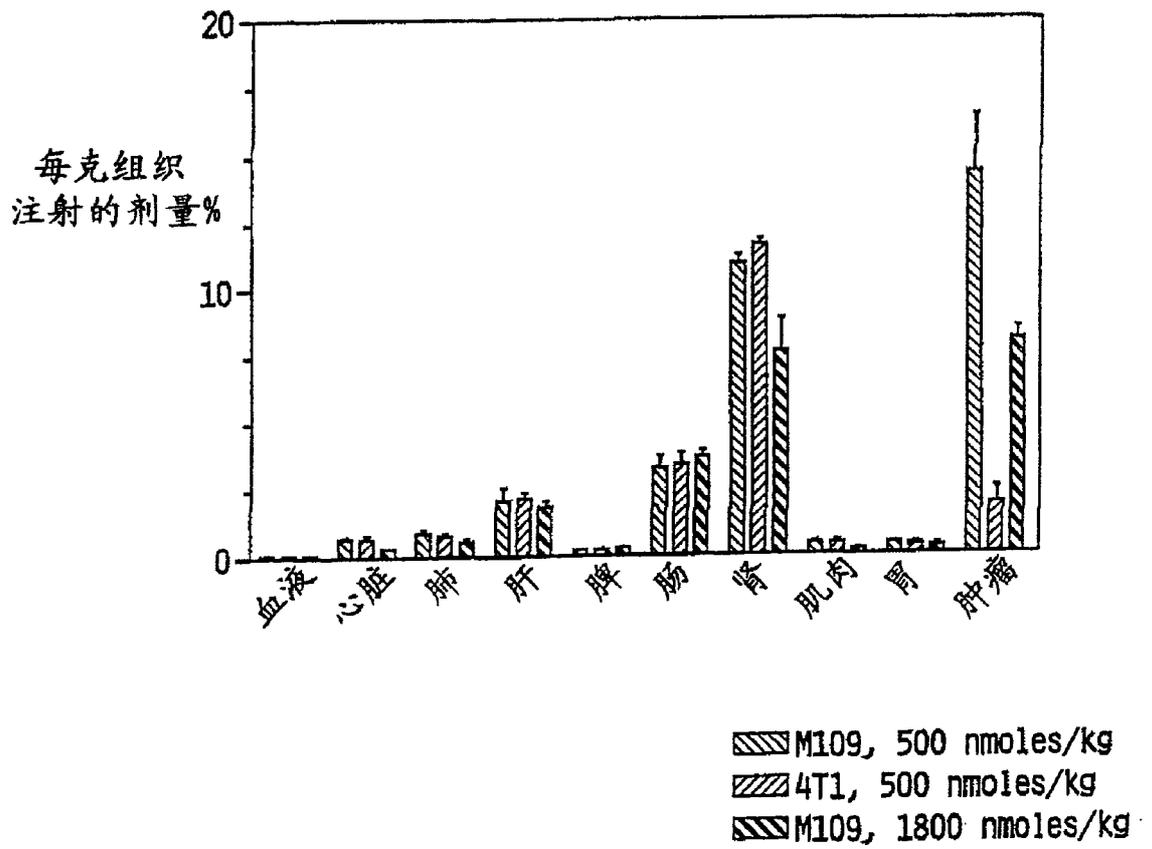


图 11

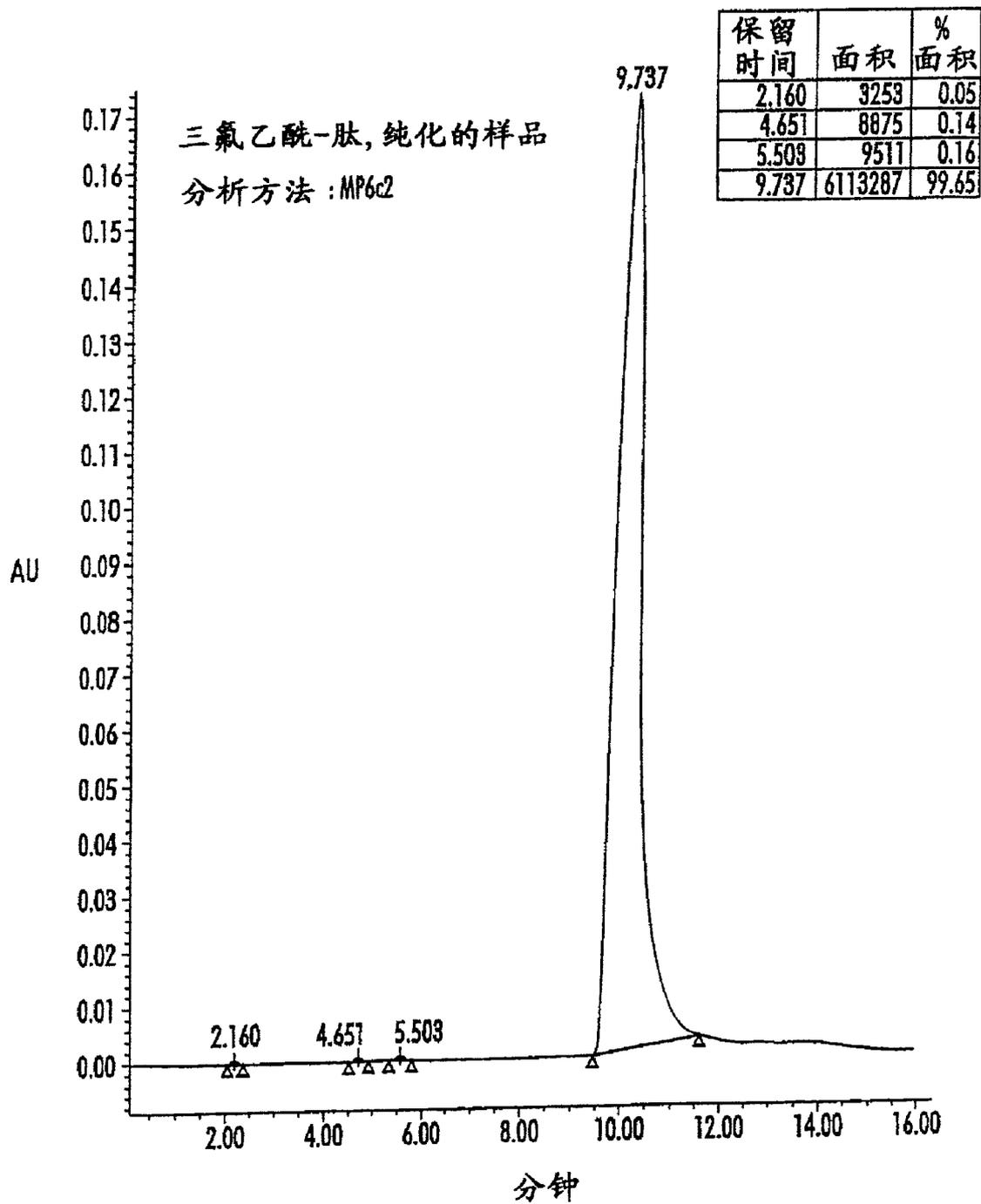


图 12

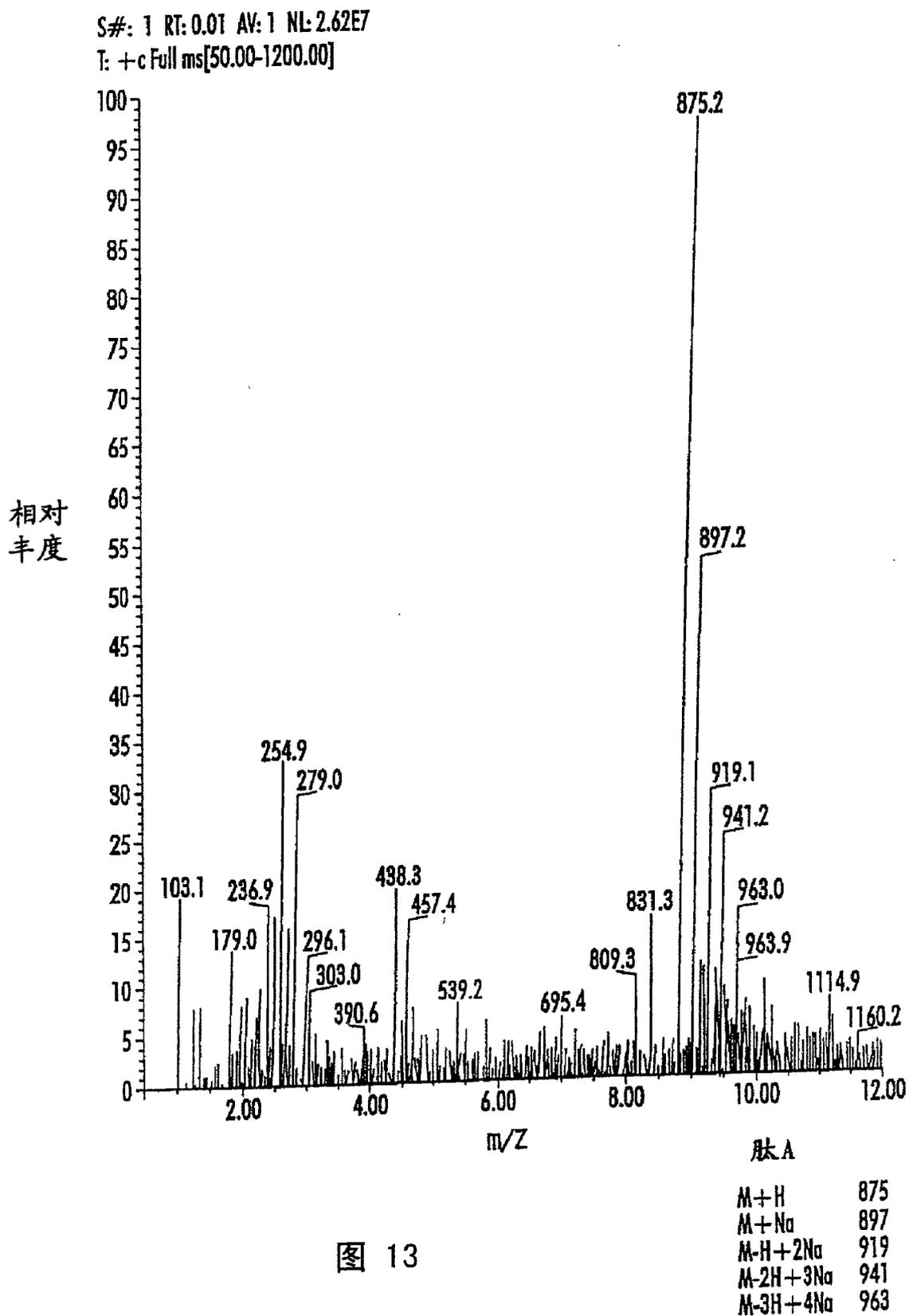
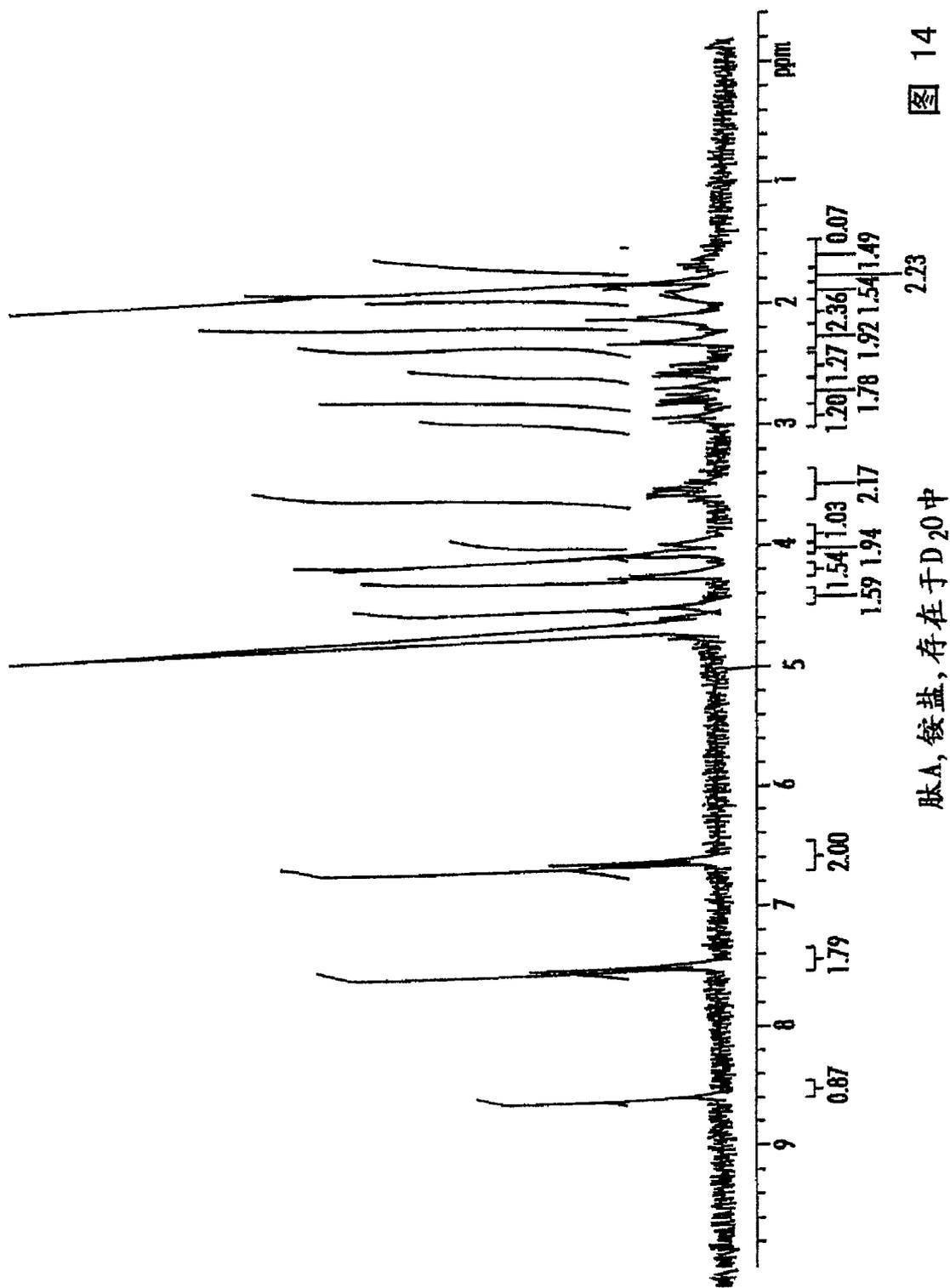


图 13



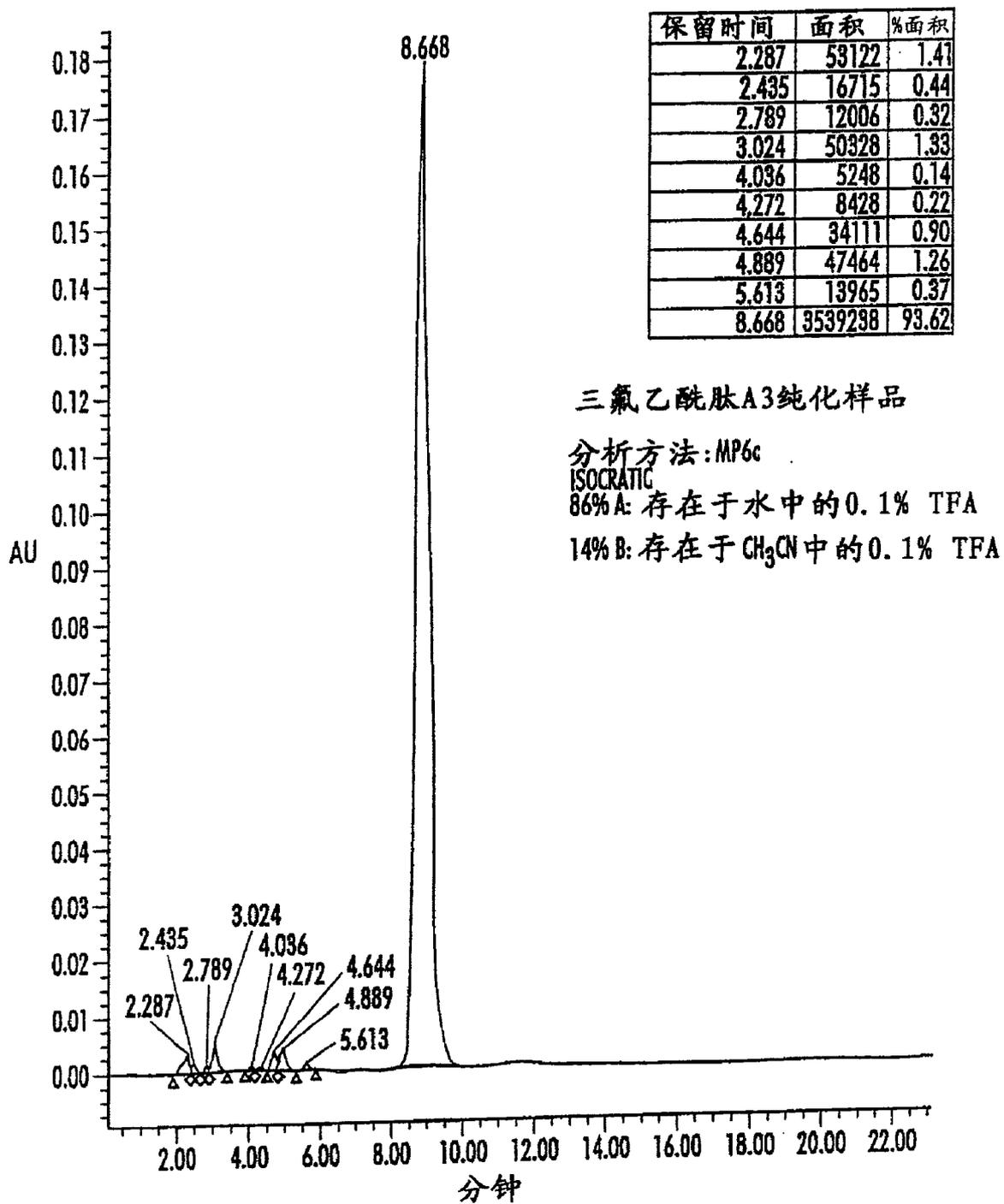


图 15

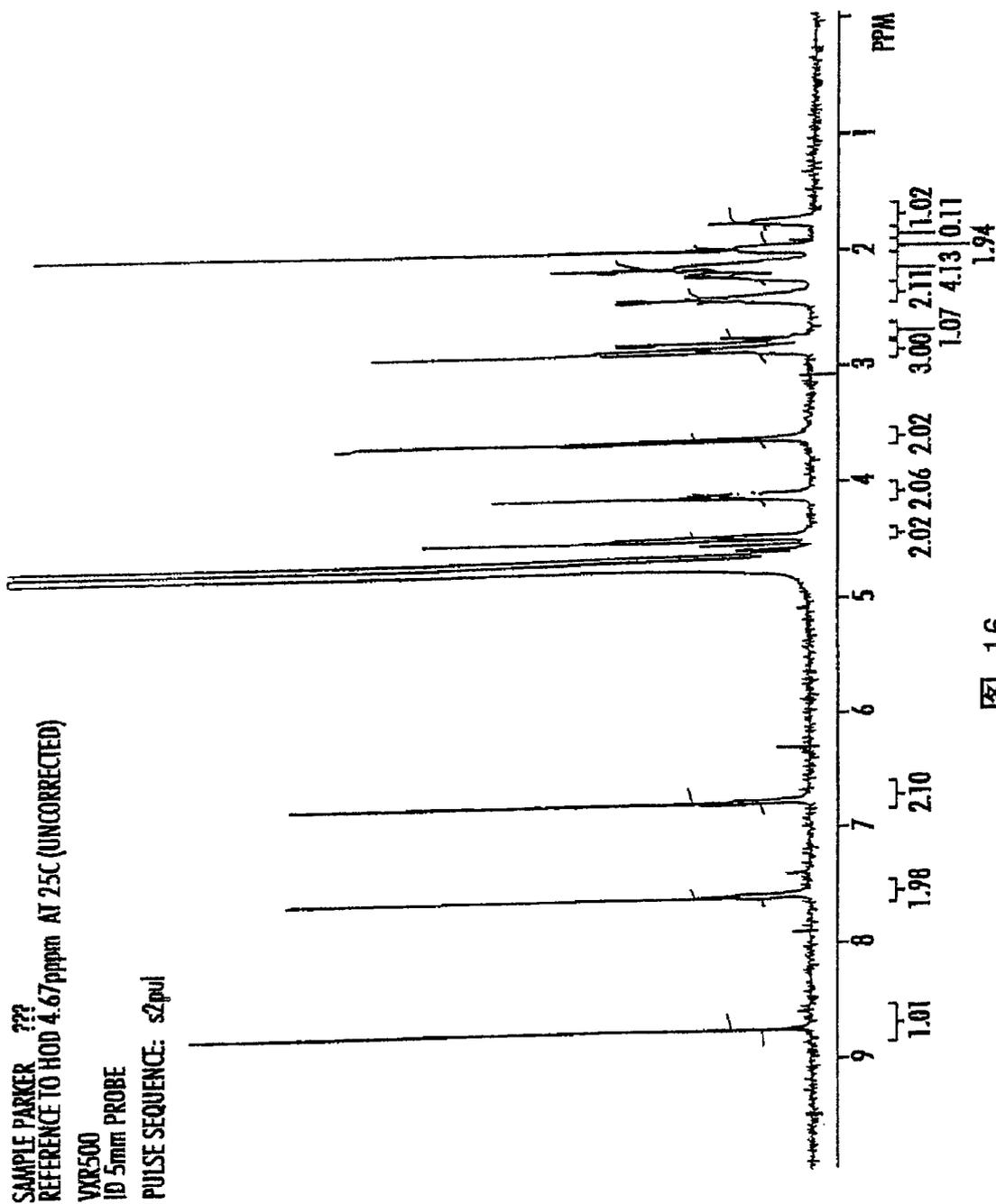


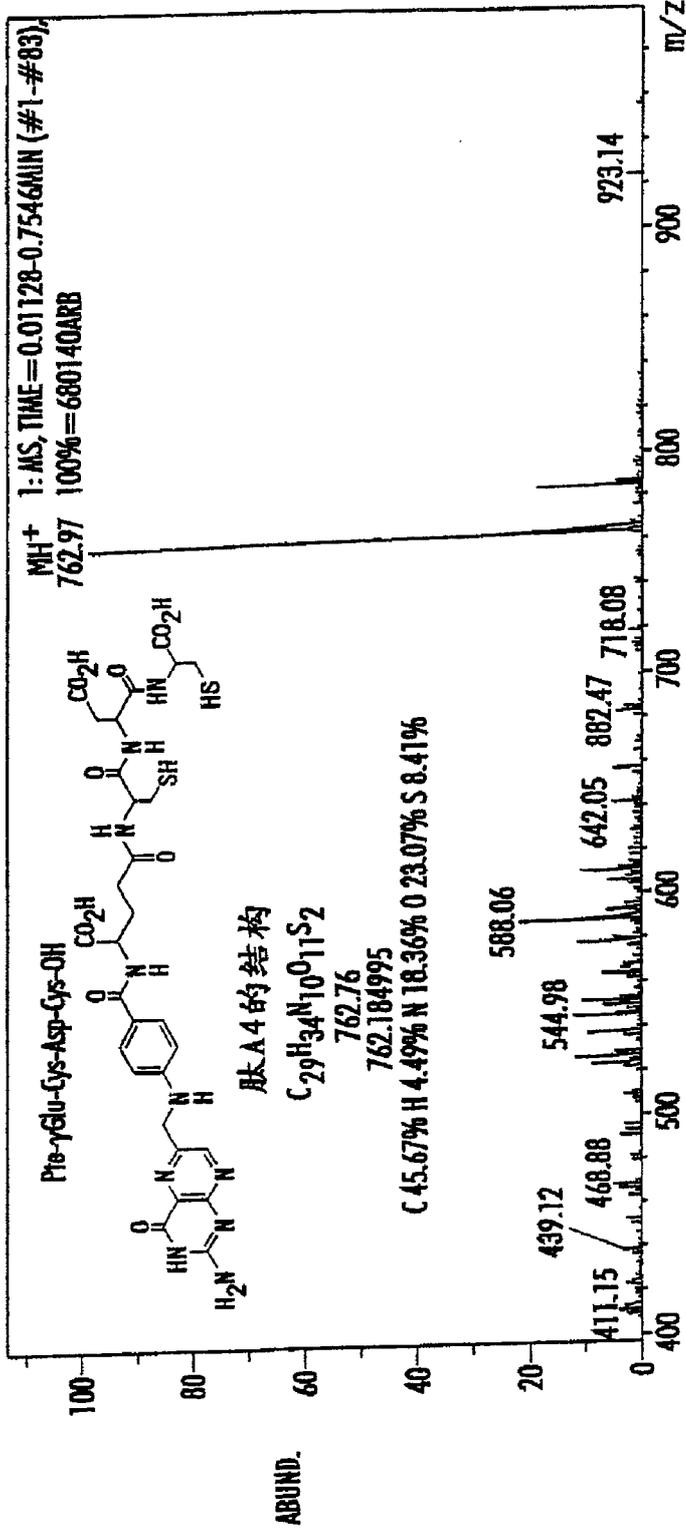
图 16

样品信息:  
样品名称:  
说明:

操作者: ADAM  
样品

仪器 : ESQUIRE-LC  
任务 : ADAM  
方法 : OPTUN.JMS  
说明 : 04

参数 : ESI  
来源 : STD/NORMAL  
模式 : STD/NORMAL  
CAP输出 : 60.0 VOLT  
扫描范围 : 400.00 - 1000.00 m/z  
累计时间 : 1152µs  
极性 : 阳性  
SKIMMER 1 : 29.0 VOLT  
CUT-OFF : 75 m/z  
SUMMATION: 5 SPECTRA



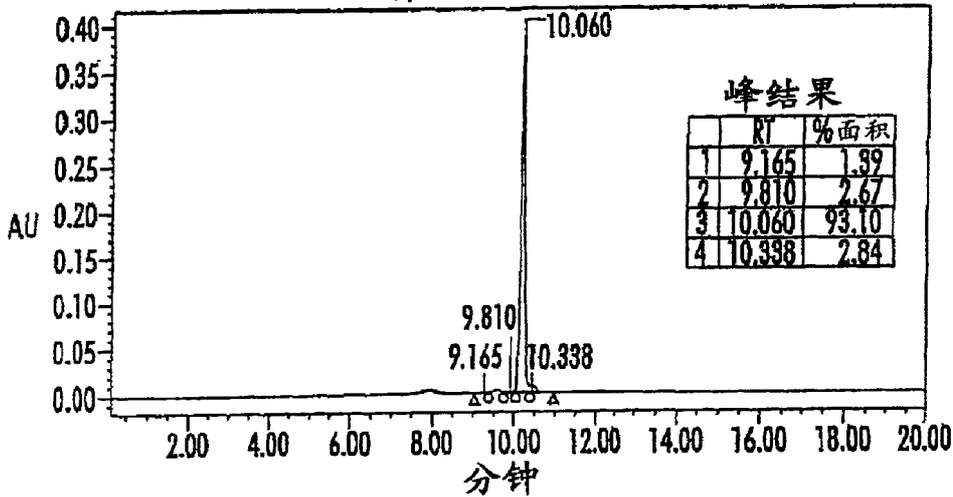
BRUKER DATAANALYSIS ESQUIRE-LC 1.49, BRUKER-FRANZEN ANALYTIK GmbH

图 17

流动相: A=0.1%TFA IN H2O  
 B=0.1%TFA IN CH3CN  
 柱: SYMMETRY C18 (4.6X150 mm). 注入: 20ul.  
 梯度 0%B - 100%B 30MIN. 流速: 1 ml/min.  
 280nm波长下的层析谱  
 BY LE-CUN XU, Ph.D. ENDOCYTE, INC.

|      |          |         |                       |
|------|----------|---------|-----------------------|
| 样品名称 | A5 (旧样品) | 样品类型    | 未知                    |
| 小瓶   | 1        | 数据获取    |                       |
| 注入   | 1        | ACQ方法设定 | 60%B 100%B30MIN1MLMIN |
| 注入体积 | 20.00μL  | 处理方法    | LC预设处理                |
| 通道   | 996      | 处理过的数据  |                       |
| 处理时间 | 20.0 分钟  |         |                       |

自动记录的层析谱



|      |              |         |                       |
|------|--------------|---------|-----------------------|
| 样品名称 | A5 (再次纯化的样品) | 样品类型    | 未知                    |
| 小瓶   | 1            | 数据获取    |                       |
| 注入   | 1            | ACQ方法设定 | 60%B 100%B30MIN1MLMIN |
| 注入体积 | 20.00μL      | 处理方法    | LC预设处理                |
| 通道   | 996          | 处理过的数据  |                       |
| 处理时间 | 30.0 分钟      |         |                       |

自动记录的层析谱

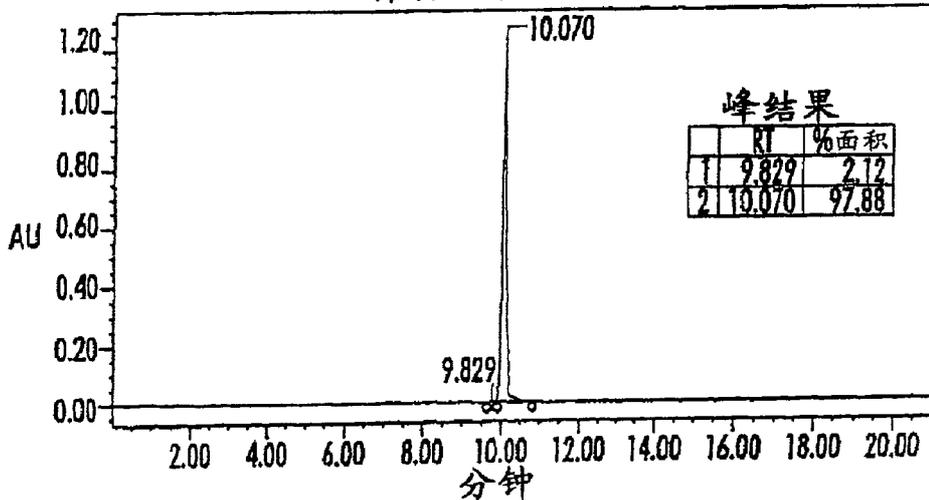
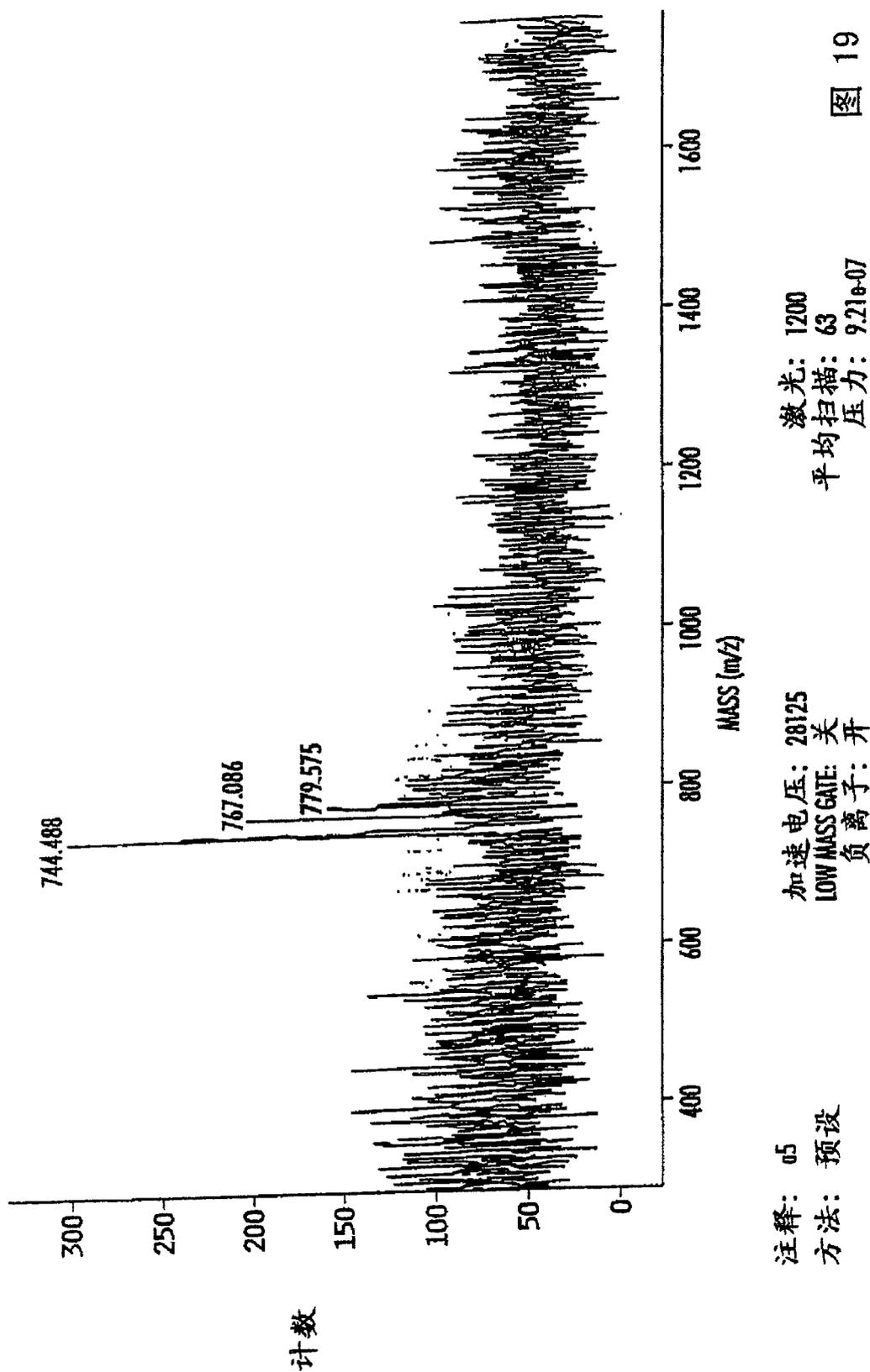
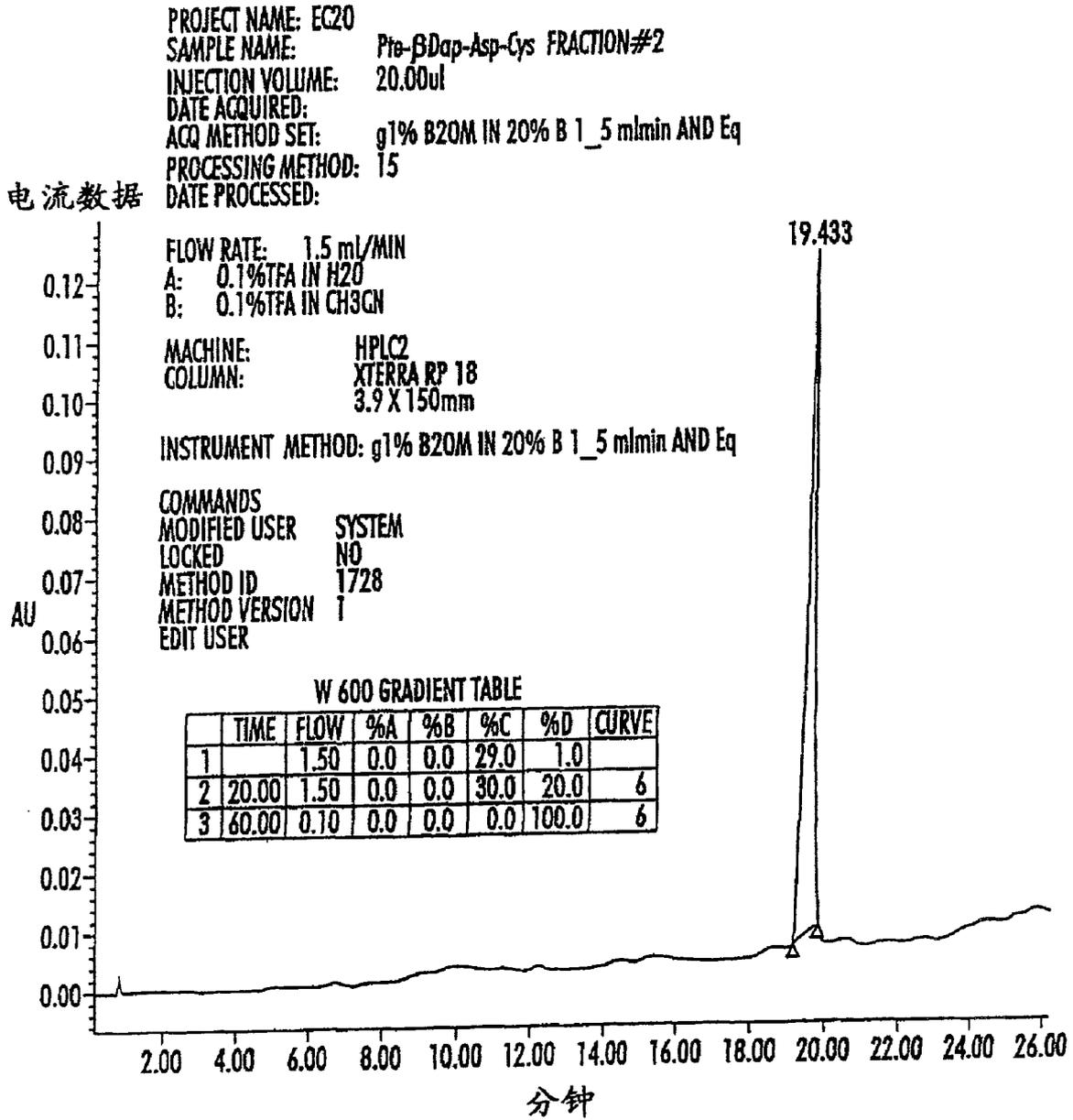


图 18

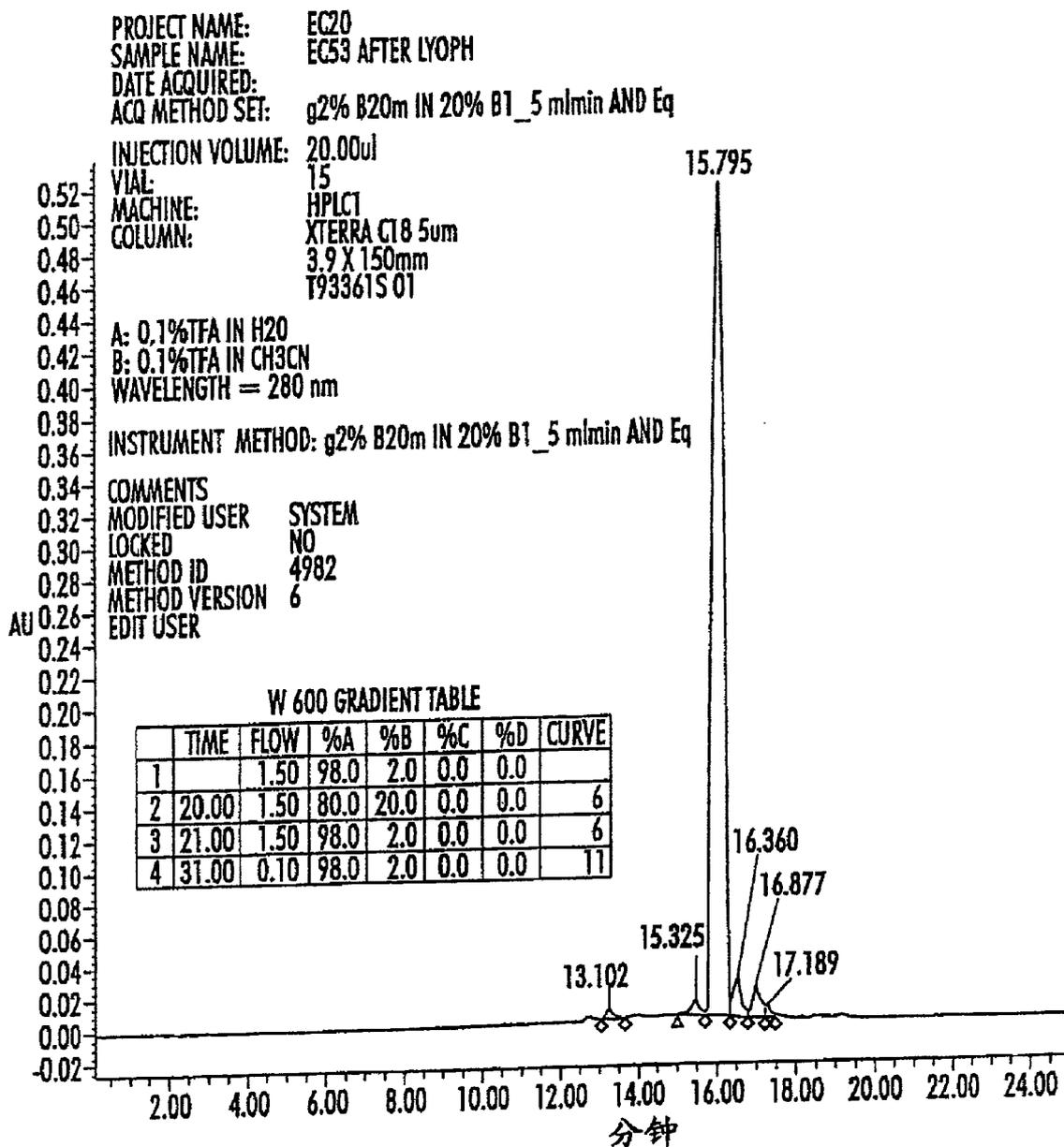




峰结果

| 名称 | RT     | 面积    | 高度   | %面积  |
|----|--------|-------|------|------|
| 1  | 19.433 | 96094 | 7436 | 1.37 |

图 20



峰结果

| 名称 | RT     | 面积      | 高度     | %面积   |
|----|--------|---------|--------|-------|
| 1  | 13.102 | 96094   | 7436   | 1.37  |
| 2  | 15.325 | 131550  | 9546   | 1.88  |
| 3  | 15.795 | 5974085 | 505938 | 85.48 |
| 4  | 16.360 | 390992  | 26982  | 5.59  |
| 5  | 16.877 | 322515  | 21694  | 4.61  |
| 6  | 17.189 | 73995   | 7670   | 1.06  |

图 21

#1 STATUS LOG TIME: 0.01

API SOURCE  
 SOURCE VOLTAGE (kV) : 3.52  
 SOURCE CURRENT (uA) : 0.24  
 VAPORIZER THERMOCOUPLE OK : NO  
 VAPORIZER TEMP (C) : -0.00  
 SHEATH GAS FLOW RATE ( ) : 58.98  
 AUX GAS FLOW RATE ( ) : 3.17  
 CAPILLARY RTD OK : YES  
 CAPILLARY VOLTAGE (V) : 20.64  
 CAPILLARY TEMP (C) : 224.60  
 8 KV SUPPLY AT LIMIT : NO

VACUUM  
 VACUUM OK : YES  
 ION GAUGE PRESSURE OK : YES  
 ION GAUGE STATUS : ON  
 ION GAUGE (x10<sup>-5</sup> TORR) : 1.52  
 CONVECTION PRESSURE OK : YES  
 CONVECTION GAUGE (TOR) : 0.84

TURBO PUMP  
 STATUS : RUNNING  
 LIFE (HOURS) : 16359.00  
 SPEED (RPM) : 60000.00  
 POWER (WATTS) : 39.20  
 TEMPERATURE (C) : 40.00

ION OPTICS

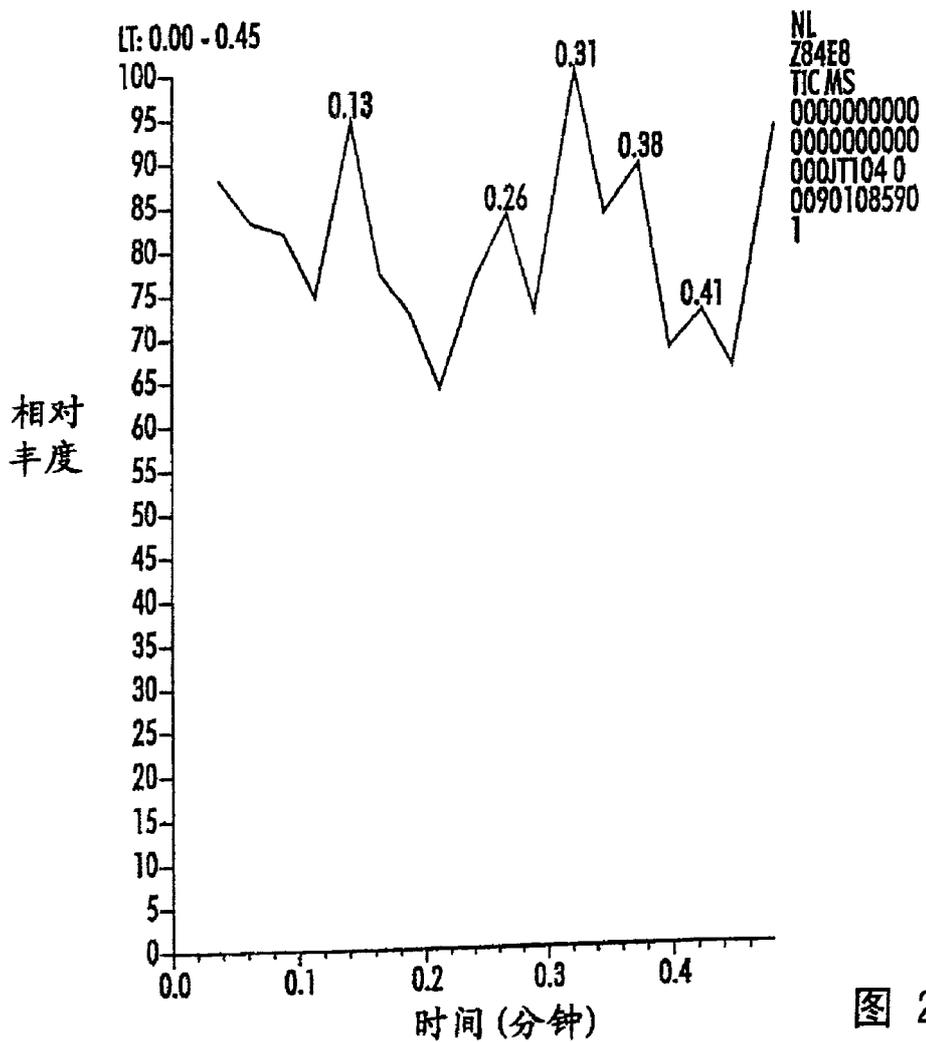


图 22A



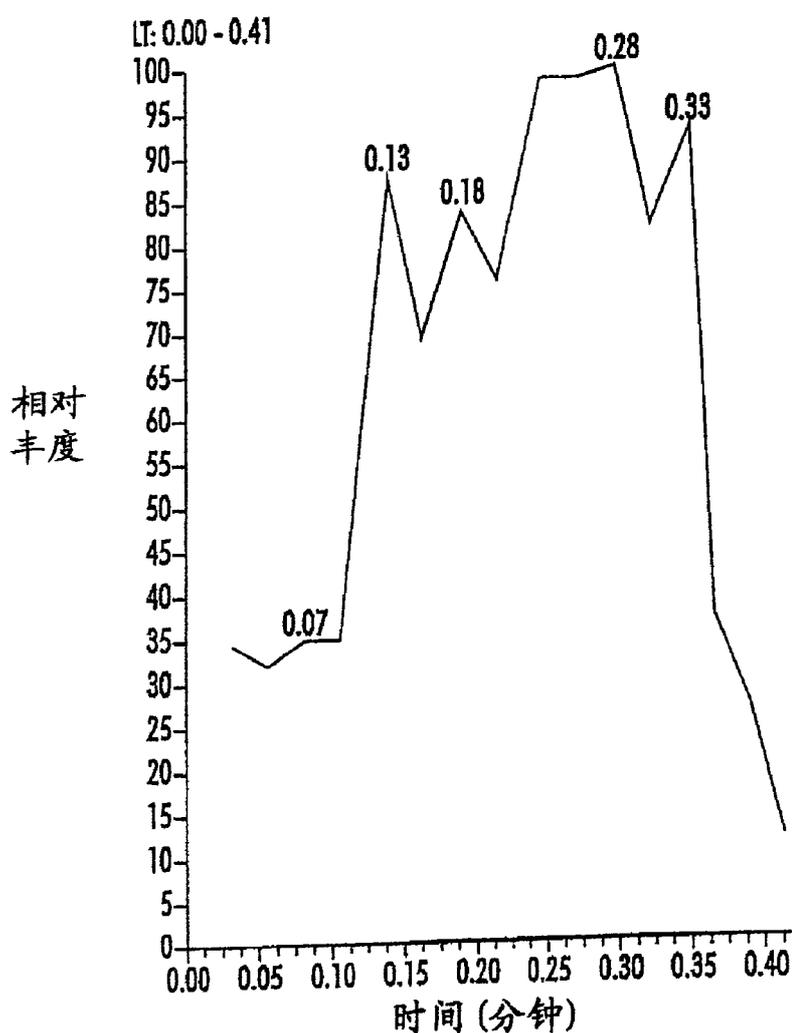
#1 STATUS LOG TIME: 0.03

API SOURCE  
 SOURCE VOLTAGE (KV) : 4.52  
 SOURCE CURRENT (uA) : 19.48  
 VAPORIZER THERMOCOUPLE OK : NO  
 VAPORIZER TEMP (C) : -0.00  
 SHEATH GAS FLOW RATE ( ) : 58.93  
 AUX GAS FLOW RATE ( ) : 3.06  
 CAPILLARY RTD OK : YES  
 CAPILLARY VOLTAGE (V) : -10.10  
 CAPILLARY TEMP (C) : 225.60  
 8 KV SUPPLY AT LIMIT : NO

VACUUM  
 VACUUM OK : YES  
 ION GAUGE PRESSURE OK : YES  
 ION GAUGE STATUS : ON  
 ION GAUGE (x10<sup>-5</sup> TORR) : 1.52  
 CONVECTION PRESSURE OK : YES  
 CONVECTION GAUGE (TOR) : 0.84

TURBO PUMP  
 STATUS : RUNNING  
 LIFE (HOURS) : 16359.00  
 SPEED (RPM) : 60000.00  
 POWER (WATTS) : 39.20  
 TEMPERATURE (C) : 40.00

ION OPTICS



NL  
 Z9968  
 TIC MS  
 0000000000  
 0000000000  
 000JT104 0  
 0090109633  
 8

图 23A

