



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103269725 B

(45) 授权公告日 2015.09.23

(21) 申请号 201180057989.4

(22) 申请日 2011.12.01

(30) 优先权数据

1020314.9 2010.12.01 GB

1106593.5 2011.04.19 GB

61/476805 2011.04.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/071506 2011.12.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/072736 EN 2012.06.07

(73) 专利权人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 B. 因德雷福尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

A61K 51/08(2006.01)

A61K 51/04(2006.01)

C07B 59/00(2006.01)

C07C 251/32(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1758925 A, 2006.04.12,

N Satyamurthy et al..Electronic

Generators for the Production

of Positron-Emitter Labeled

Radiopharmaceuticals Where Would PET

Be Without Them?. 《Clinical Positron

Imaging》.1999, 第2卷(第5期),

Steacute

phanie Foillard et

al..1-Ethoxyethylidene, a New Group for

the Stepwise SPPS of Aminooxyacetic Acid

Containing Peptides. 《J. Org. Chem.》.2008,

第73卷

审查员 张丽芳

权利要求书2页 说明书18页

序列表7页

(54) 发明名称

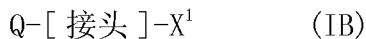
放射性缀合法

(57) 摘要

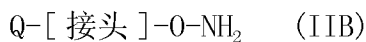
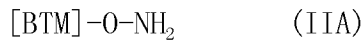
本发明涉及用于体内成像的放射性药物领域,具体而言涉及用放射性同位素标记生物靶向分子的方法。本发明的方法特别适于与自动合成仪一起使用。亦提供了用于所述方法的呈无菌形式的前体,以及包含这类前体的盒。

1. 一种用于放射性标记生物靶向分子的方法,所述方法包括:

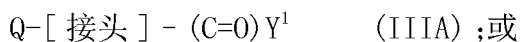
(i) 提供式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物



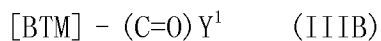
(ii) 将步骤 (i) 的式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物脱保护,分别得到式 (IIA) 或 (IIB) 氨基氧化合物;



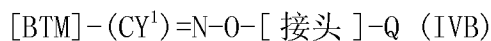
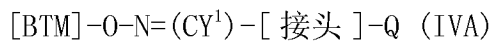
(iii) (a) 使式 (IIA) 氨基氧化合物与式 (IIIA) 羰基化合物缩合



(b) 使式 (IIB) 氨基氧化合物与式 (IIIB) 羰基化合物缩合,



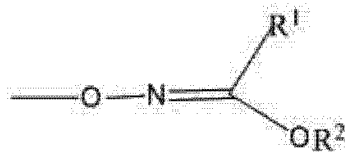
分别得到式 (IVA) 或 (IVB) 放射性标记的缀合物:



其中:

[BTM] 为生物靶向分子;

X^1 为下式受保护的氨基氧基:



其中 R^1 和 R^2 独立选自 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 氟烷基或 C_{4-6} 芳基;

Q 为包含适于体内 PET 或 SPECT 成像的放射性同位素的基团;

Y^1 为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{4-10} 芳基,

[接头] 为接头基团。

2. 权利要求 1 的方法,其中 R^1 和 R^2 独立地为 C_{1-2} 烷基。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的方法,其中将式 (IA) 化合物用于步骤 (i),使得步骤 (ii) 的氨基氧化合物为式 (IIA) 的,以及放射性标记的缀合物为式 (IVA) 的。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中 Y^1 为 H。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中 Q 选自 ^{18}F 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{68}Ga 或 ^{64}Cu 。

6. 权利要求 5 的方法,其中 Q 为 ^{18}F 。

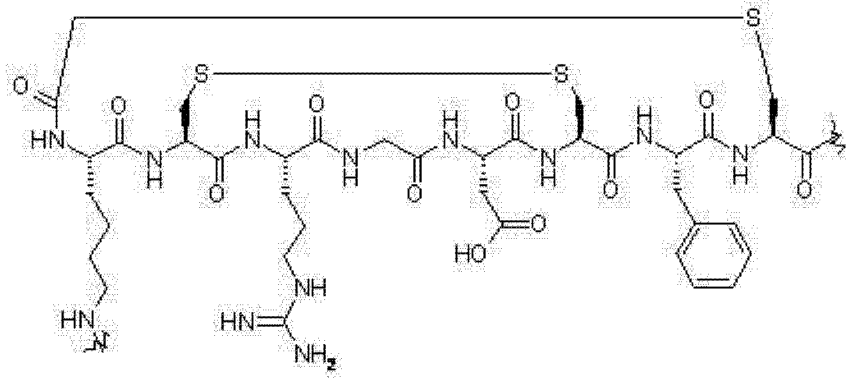
7. 权利要求 1-6 中任一项的方法,其中 BTM 包含单个氨基酸、3-100 聚体肽、酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物。

8. 权利要求 7 的方法,其中 BTM 包含 Affibody™。

9. 权利要求 7 的方法,其中 BTM 包含 3-100 聚体肽,所述 3-100 聚体肽选自如下定义的肽 A、肽 B、肽 C 和肽 D:

(i) 肽 A = Arg-Gly-Asp 肽;

(ii) 肽 B = 包含以下片段的 Arg-Gly-Asp 肽



(iii) 肽 C = c-Met 结合环肽, 其包含氨基酸序列:

-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

其中 X¹为 Asn、His 或 Tyr;

X²为 Gly、Ser、Thr 或 Asn;

X³为 Thr 或 Arg;

X⁴为 Ala、Asp、Glu、Gly 或 Ser;

X⁵为 Ser 或 Thr;

X⁶为 Asp 或 Glu;

以及 Cys^{a-d}各自为半胱氨酸残基, 使得残基 a 和 b 以及 c 和 d 环化形成两个独立的二硫键;

(iv) 肽 D = 下式羊毛硫抗菌肽:

Cys^a-Xaa-Gln-Ser^b-Cys^c-Ser^d-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr^e-Phe-Val-Cys^b-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr^a-Lys^d

其中 Xaa 为 Arg 或 Lys;

Cys^a-Thr^a、Ser^b-Cys^b和 Cys^c-Thr^e经由硫醚键共价连接;

Ser^d-Lys^d经由赖丙氨酸键共价连接;

HO-Asp 为 β-羟基天冬氨酸。

10. 权利要求 1-9 中任一项的方法, 其中同时进行步骤 (ii) 和 (iii)。

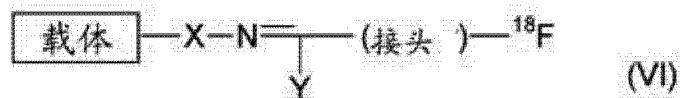
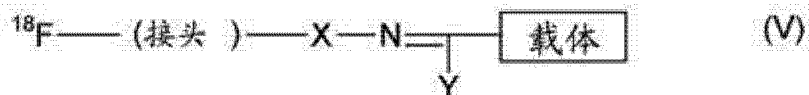
11. 权利要求 1-10 中任一项的方法, 其中在苯胺存在下进行缩合步骤 (iii)。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法, 所述方法利用自动合成仪实施。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述自动合成仪包含单次使用的一次性盒, 所述盒包含包括无菌形式的式 (IA) 的受保护化合物的前体。

14. 一种制备放射性药物组合物的方法, 其中所述放射性药物组合物包含呈适于哺乳动物给予的形式的如在权利要求 1-9 中任一项定义的式 (IVA) 或 (IVB) 放射性标记的缀合物, 连同生物相容性载体, 并且所述制备方法包括权利要求 1-13 中任一项的放射性标记法。

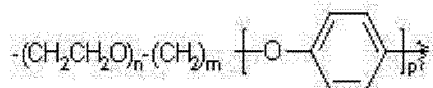
15. 如在权利要求 1-9 中任一项所定义的式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物在如权利要求 1 或 7-9 中任一项所定义的生物靶向分子的放射性标记中的用途。



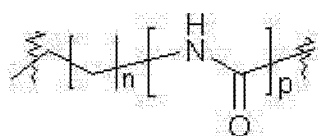
[0015] 其中 X 为 -CO-NH-、-NH-、-O-、-NHCONH- 或 -NHCSNH-，以及优选为、-NH- 或 -O-；Y 为 H、烷基或芳基取代基；以及

[0016] 式 (II)、(IV)、(V) 和 (VI) 化合物中的接头基团选自

[0017]



[0018]



[0019]



[0020]



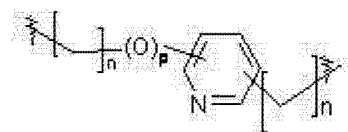
[0021]



[0022]



[0023]



[0024] 其中：

[0025] n 为 0-20 的整数；

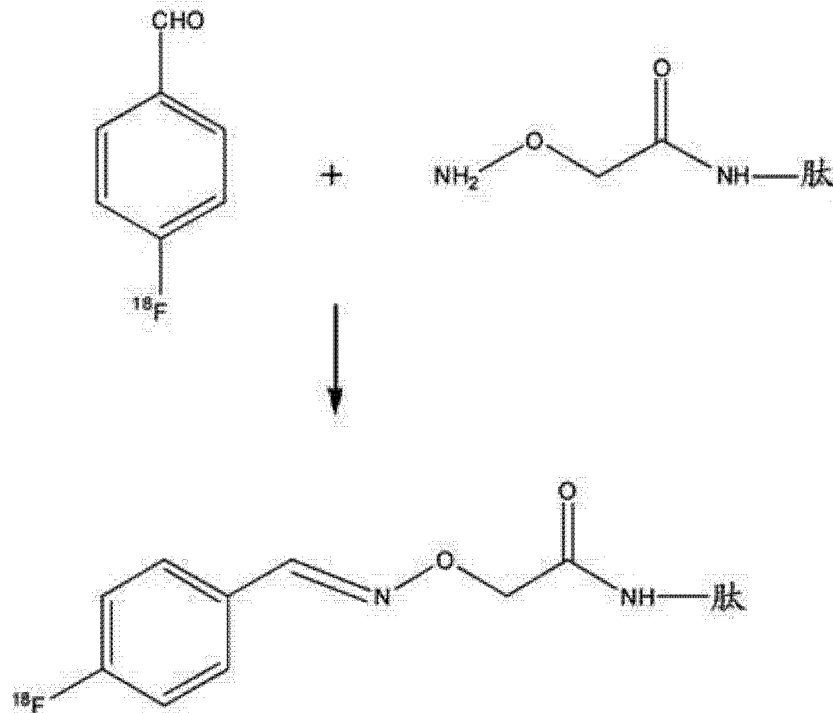
[0026] m 为 1-10 的整数；

[0027] p 为 0 或 1 的整数

[0028] Z 为 O 或 S。

[0029] Poethko 等 [J. Nucl. Med., 45(5), 892-902 (2004)] 公开了使用放射性同位素 ^{18}F 放射性标记肽的方法, 其中将氨基氧官能化的肽与 [^{18}F]- 氟苯甲醛缩合以得到具有如下脞醚键合的标记肽:

[0030]



[0031] Schottelius 等 [Bioconj. Chem., 19(6), 1256-1268 (2008)] 进一步发展了 Poethko 等的方法。Schottelius 等使用氨基氧官能化肽, 其中用 *N*-Boc (Boc = 叔丁氧羰基) 保护基保护氨基氧基的胺。在 [^{18}F]- 氟苯甲醛存在下, 在酸性 pH (pH = 2) 于 75 °C 经由 *N*-Boc 基团的脱保护来原位生成所需的氨基氧官能化肽。Schottelius 等使用 5 倍摩尔过量的 Boc 保护的前体, 因为在所述反应条件下脱保护不是定量的。

[0032] Mezo 等 [J. Pept. Sci., 17, 39-46 (2010)] 描述了与 Boc 保护的氨基氧官能化肽的上述脞连接化学相关的一些问题。因此, 已知的是, 最初形成的自由氨基氧肽可酰化未反应的 Boc 保护的氨基氧肽, 导致不合乎需要的副产物。亦已知的是, 官能化肽的自由氨基氧基对羰基化合物的反应性很高。所以, 可与存在于反应混合物中或任何后续纯化步骤中的任何外来醛或酮发生不必要的缩合。这类醛或酮可以是痕量的存在于所用溶剂中的丙酮, 或者甲醛 (例如来自增塑剂)。对于抗癌药与肽的缀合和 [^{18}F]- 氟苯甲醛与肽的缀合二者, Mezo 等关注于解决此问题。Mezo 等通过在作为 ‘羰基捕获剂’ 的十倍摩尔过量的自由 (氨基氧) 乙酸 (Aoa) 存在下, 进行 Boc-氨基氧肽的脱保护来解决所述问题。然后将脱保护的氨基氧基-肽和过量的 Aoa 冻干并在 4 °C 储存。临近脞连接反应之前, 将冻干混合物复溶, 并通过 HPLC 或 Sep-Pak +C18 柱分离过量的 Aoa。Mezo 等提供了其中利用此技术将非放射性 (即 ^{19}F) 4- 氟苯甲醛与氨基氧官能化的促生长素抑制素肽缀合的实例。Mezo 等未提供关于 ^{18}F - 放射性标记的任何数据。

[0033] 因此对于放射性标记肽及其它生物靶向分子的改进方法仍有需要。

发明内容

[0034] 本发明提供了经由氨基氧官能团放射性标记生物靶向分子 (BTM) 的改进方法。本发明提供了保护基途径,所述途径克服了先有技术中公认的杂质问题,而无需:

[0035] (i) ‘羰基捕获剂’以及在 4 °C 长期储存;

[0036] (ii) 强酸性条件以去除 *N*-Boc 氨基氧保护的保护基;

[0037] (iii) 使用过量 *N*-Boc 氨基氧保护的起始材料。

[0038] 选项 (i) 对于放射性标记目的而言并非合意的,因为必须事先完全去除过量的羰基捕获试剂以防止涉及所述羰基捕获剂的副反应。所述去除步骤需要制备性色谱法或类似方法。另外,对于在 4 °C 储存前体的需要较不理想。

[0039] 先有技术亦教导,可使用 Boc 保护的氨基氧前体——选项 (ii)。所述方法的问题在于 Boc 脱保护需要强酸性条件,例如 95% 含水三氟乙酸 (TFA) 或 25–50% TFA/ 有机溶剂 (例如 DCM),二者均在室温下。一些出版物亦建议在 60–75 °C 加热。所述强酸和 / 或加热可能破坏生物靶向分子。亦需要用附加步骤去除过量的强酸——通常通过蒸发 TFA,其可为费时的。然而,三氟乙酸亦可生成不会经由蒸发去除的盐——以及通常需要研磨来去除。本发明的方法在室温下仅使用含水稀酸 (例如 2.5% 含水 TFA 或 0.01M 含水盐酸) 或者在 60°C 仅使用 0.1% 含水 TFA 便实现完全脱保护。所述条件与 BTM 更相容,并且避免了对于附加纯化步骤的需要。

[0040] 第三,先有技术教导,应使用 5 倍摩尔过量的 Boc 保护的氨基氧 BTM 前体——选项 (iii)。这是因为 Boc 脱保护不完全并且其对于消耗全部 [¹⁸F]- 氟苯甲醛反应物而言很重要。所述方法对于放射性药物目的而言为不合乎需要的,因为存在于产物中的任何过量的未标记 BTM 前体很可能会与放射性标记的 BTM 竞争体内生物目的位点,并因此具有抑制所需成像剂摄取的风险。因此,在使用前有必要从放射性标记的产物中去除过量的非放射性前体。相比之下,本发明的方法允许在温和条件下有效完全的脱保护,由此不需要使用过量的受保护的起始材料。

[0041] 本发明的受保护 BTM 具有阻抑在脱保护和放射性标记期间的过度酰化的优势。

[0042] 鉴于本发明的方法需要更少步骤,以及避免了对先有技术的一些色谱纯化步骤的需要,其亦更有效且更遵从自动化——例如使用自动合成仪。

[0043] 本发明的保护基的又一个优势在于其在中性和碱性 pH 下稳定并且在高达 50% 含水乙酸溶液中稳定,由此可用 0.1 % 含水乙酸作为流动相采用 HPLC 色谱法来纯化受保护的前体。因此,使用本发明的方法保护的 BTM 可在多种条件下纯化,所述条件可针对 BTM 的稳定性定制。

[0044] 发明详述

[0045] 在第一方面,本发明提供用于放射性标记生物靶向分子的方法,所述方法包括:

[0046] (i) 提供式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物

[0047] [BTM]-X¹ (IA)

[0048] Q-[接头]-X¹ (IB)

[0049] (ii) 将步骤 (i) 的式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物脱保护,分别得到式 (IIA) 或

(IIB) 氨基氧化合物；

[0050] [BTM]-O-NH₂ (IIA)

[0051] Q-[接头]-O-NH₂ (IIB)

[0052] (iii) 缩合：

[0053] (a) 式 (IIA) 氨基氧化合物与式 (IIIA) 羰基化合物

[0054] Q-[接头]-(C=O)Y¹ (IIIA) ;或

[0055] (b) 式 (IIB) 氨基氧化合物与式 (IIIB) 羰基化合物，

[0056] [BTM]-(C=O)Y¹ (IIIB)

[0057] 分别得到式 (IVA) 或 (IVB) 的放射性标记缀合物：

[0058] [BTM]-O-N=(CY¹)-[接头]-Q (IVA)

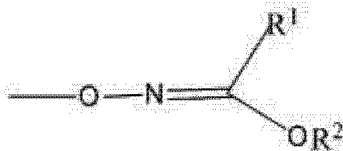
[0059] [BTM]-(CY¹)=N-O-[接头]-Q (IVB)

[0060] 其中：

[0061] [BTM] 为生物靶向分子；

[0062] X¹为下式受保护的氨基氧基：

[0063]



[0064] 其中 R¹和 R²独立选自 C₁₋₃烷基、C₁₋₃氟烷基或 C₄₋₆芳基；

[0065] Q 为包含适于体内 PET 或 SPECT 成像的放射性同位素的基团；

[0066] Y¹为 H、C₁₋₆烷基或 C₄₋₁₀芳基，

[0067] [接头] 为接头基团。

[0068] 术语“放射性标记”具有其常规意义，即其中将放射性同位素与 BTM（在本文情况下）共价连接的过程。

[0069] 术语“生物靶向部分” (BTM) 意指这样的化合物，其在给予之后被选择性吸收或在体内定位于哺乳动物身体的特定部位。这类部位例如可能牵涉于特定的疾病状态或者表明器官或代谢过程如何运作。

[0070] 术语“脱保护”具有其在化学和 / 或放射化学领域中的常规意义，即保护基的去除。术语“保护基”或 P^{GP}意指抑制或阻抑不合乎需要的化学反应的基团，但是将其设计成具有足够的反应性使得其可在不修饰分子的剩余部分的足够温和的条件下从讨论中的官能团上切除。脱保护之后获得所需产物。保护基的使用在 *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基)，第 4 版，Theodor W. Greene 和 Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)] 中阐述。

[0071] 术语“氨基氧基”具有其常规意义，是指式 -O-NH₂、优选式 -CH₂-O-NH₂的取代基。

[0072] 术语“包含放射性同位素的基团”意指官能团包含放射性同位素，或者将放射性同位素作为附加物质连接。当官能团包含放射性同位素时，这意味着化学结构已含有讨论中的化学元素，并且该元素的放射性同位素以显著超过所述同位素的天然丰度水平的水平存在。同位素的这类升高水平或富集水平适当为讨论中的同位素的天然丰度水平的至少 5 倍、优选至少 10 倍、最优选至少 20 倍；以及理想上为讨论中的同位素的天然丰度水平的至

少 50 倍,或者以其中讨论中的同位素的富集水平为 90-100% 的水平存在。这类官能团的实例包括具有升高水平的 ^{18}F 使得 ^{18}F 原子在化学结构之内的氟烷基。当放射性同位素为射电金属,例如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{68}Ga 或 ^{64}Cu 时,“附加物质”通常会螯合剂。当所述放射性同位素为放射性碘时,那么如本领域已知,所述附加物质会是苯基或乙烯基,以使碳-碘键对体内代谢脱碘稳定。

[0073] 术语“PET”和“SPECT”具有其在放射性药物领域中的常规意义,分别是指正电子发射断层扫描和单光子发射断层扫描。

[0074] 术语“接头基团”意指式 $-(\text{A})_m-$ 的二价基团,其中每个 A 独立地为 $-\text{CR}_2-$ 、 $-\text{CR}=\text{CR}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CR}_2\text{CO}_2-$ 、 $-\text{CO}_2\text{CR}_2-$ 、 $-\text{NRCO}-$ 、 $-\text{CONR}-$ 、 $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}-$ 、 $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}-$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}-$ 、 $-\text{NRSO}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{OCR}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{SCR}_2-$ 、 $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2-$ 、 C_{4-8} 环杂亚烷基、 C_{4-8} 环亚烷基、 C_{5-12} 亚芳基或 C_{3-12} 杂亚芳基,其中每个 R 独立选自: H、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{1-4} 烷氧基烷基或 C_{1-4} 羟基烷基;

[0075] 以及 m 为值为 1-20 的整数。

[0076] 在式 IA 中,将 X^1 基团与如上所述的 BTM 的官能团适当连接。

[0077] 优选特征

[0078] 在第一方面,优选 R^1 和 R^2 二者均独立地为 C_{1-2} 烷基。更优选 R^1 和 R^2 选自甲基和乙基,最优选 R^1 为甲基而 R^2 为乙基,即乙氧基次乙基 (“Eei”) 保护基。

[0079] 优选实施第一方面的方法使得将式 (IA) 化合物用于步骤 (i),由此步骤 (ii) 的氨基氧化合物为式 (IIA) 的,以及放射性标记的缀合物为式 (IVA) 的。那是因为向 BTM 中比向式 (III B) 的羰基 (即醛基或酮基) 中选择性引入氨基氧基更容易。

[0080] 在第一方面,优选 Y^1 为 H,即式 (III A) 或 (III B) 羰基化合物为醛。

[0081] 在第一方面,优选 Q 选自 ^{18}F 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{68}Ga 或 ^{64}Cu 。更优选 Q 为 ^{18}F 。如果 Q 为 ^{18}F ,则优选的式 (III A) 羰基化合物为 ^{18}F -4- 氟苯甲醛。

[0082] 在第一方面方法的步骤 (iii) 之后,式 (IVA) 或 (IV B) 产物缀合物可优选采用诸如色谱法等标准技术来分离和 / 或纯化。

[0083] BTM 可以是合成或天然来源的,但优选为合成的。术语“合成的”具有其常规意义,即与分离自天然来源 (例如哺乳动物体) 相对而言的人造的。这类化合物具有以下优势,其制备和杂质概况可以是完全受控的。因此天然来源的单克隆抗体及其片段在本文所用术语“合成的”的范围之外。BTM 的分子量优选为高达 30,000 道尔顿。更优选所述分子量在 200-20,000 道尔顿范围,最优选 300-18,000 道尔顿,特别优选 400-16,000 道尔顿。当 BTM 为非肽时, BTM 的分子量优选为高达 3,000 道尔顿,更优选 200-2,500 道尔顿,最优选 300-2,000 道尔顿,特别优选 400-1,500 道尔顿。

[0084] 优选 BTM 包含: 3-100 聚体肽、肽类似物、类肽或肽模拟物,其可以是线性肽或环肽或其组合; 单个氨基酸; 酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂 (包括部分激动剂) 或酶抑制剂; 受体结合化合物 (包括受体底物、拮抗剂、激动剂或底物); 寡核苷酸或者寡 DNA 或寡 RNA 片段。更优选 BTM 包含 Affibody™ 或单个氨基酸、3-100 聚体肽、酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物。

[0085] 术语“肽”意指包含通过肽键 (即,将一个氨基酸的胺与另一个氨基酸的羧基连接的酰胺键) 连接的如下所定义的两个或更多个氨基酸的化合物。术语“肽模拟物”或

“模拟物”是指模拟肽或蛋白质的生物活性但在化学性质上不再为肽的生物活性化合物，即它们不再含有任何肽键（即氨基酸之间的酰胺键）。此处，以更广泛的意义上使用术语肽模拟物以包括性质上不再完全为肽的分子，例如假肽、半肽和类肽。术语“肽类似物”是指包含如下所述的一个或多个氨基酸类似物的肽。亦参见 *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (肽和肽模拟物的合成)，M. Goodman 等，Houben-Weyl E22c, Thieme。

[0086] 术语“氨基酸”意指 *L*-或 *D*-氨基酸、氨基酸类似物（例如萘基丙氨酸）或氨基酸模拟物，其可以是天然存在的或完全合成来源的，以及可以是光学纯的，即单一对映体并因此手性的，或者对映体的混合物。本文使用用于氨基酸的常规 3 字母或单字母缩写。优选本发明的氨基酸为光学纯的。术语“氨基酸模拟物”意指天然存在氨基酸的合成类似物，其为电子等排体，即被设计成模拟天然化合物的空间结构和电子结构。这类电子等排体为本领域技术人员众所周知并且包括但不限于酯肽、逆-反肽 (retro-inverso peptide)、硫代酰胺、环烷或 1,5-二取代四唑 [参见 M. Goodman, *Biopolymers*, 24, 137, (1985)]。已知诸如酪氨酸、组氨酸或脯氨酸等放射性标记的氨基酸为有用的体内成像剂。

[0087] Affibody™ 分子基于来源于葡萄球菌蛋白 A 的 IgG 结合域之一的 58 个氨基酸残基结构域。Affibody 可以单体或二聚体形式使用，并且已由 Nygren [FEBS J., 275, 2668-2676 (2008)] 和 Nilsson 等 [Curr. Opin. Drug. Disc. Dev., 10, 167-175 (2007)] 综述。与大 10-20 倍（约 150kDa）的抗体相比，相对小尺寸的这些 Affibody 应允许更好的靶组织穿透力和血液清除率。Affibody 亦具有以下优势，它们在多个 pH 条件 (pH 5.5-11) 下稳定。

[0088] 当 BTM 为酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂、酶抑制剂或受体结合化合物时，优选其为非肽，以及更优选为合成的。术语“非肽”意指不包含任何肽键（即两个氨基酸残基之间的酰胺键）的化合物。合适的酶底物、拮抗剂、激动剂或抑制剂包括葡萄糖及葡萄糖类似物；脂肪酸；或者弹性蛋白酶、血管紧张素 II 或金属蛋白酶抑制剂。合适的合成受体结合化合物包括雌二醇、雌激素、黄体酮、孕酮或其它类固醇激素；多巴胺 D-1 或 D-2 受体的配体、或者诸如莨菪烷等多巴胺转运蛋白；以及血清素受体的配体。

[0089] 最优选 BTM 为 3-100 聚体肽或肽类似物。当 BTM 为肽时，优选其为 4-30 聚体肽，以及最优选为 5-28 聚体肽。

[0090] 当 BTM 为酶底物、酶拮抗剂、酶激动剂或酶抑制剂时，本发明优选的这类生物靶向分子为合成的药物样小分子，即药物分子。优选的多巴胺转运蛋白配体例如莨菪烷；脂肪酸；多巴胺 D-2 受体配体；苯甲酰胺；苯丙胺；苄基胍、碘西尼、苯并呋喃 (IBF) 或马尿酸。

[0091] 当 BTM 为肽时，优选的这类肽包括如下定义的肽 A、肽 B、肽 C 和肽 D，以及：

[0092] - 促生长素抑制素、奥曲肽及类似物，

[0093] - 与 ST 受体结合的肽，其中 ST 是指由大肠杆菌 (*E. coli*) 和其它微生物产生的热稳定毒素；

[0094] - 铃蟾肽；

[0095] - 血管活性肠肽；

[0096] - 神经降压素；

[0097] - 层粘连蛋白片段，例如 YIGSR、PDSGR、IKVAV、LRE 和 KCQAGTFALRGDPQG，

[0098] - 用于靶定白细胞蓄积部位的 N 甲酰基趋化肽，

[0099] - 血小板因子 4 (PF4) 及其片段,

[0100] - α_2 -抗纤溶酶、纤连蛋白或 β -酪蛋白、纤维蛋白原或血小板反应蛋白的肽片段。

α_2 -抗纤溶酶、纤连蛋白、 β -酪蛋白、纤维蛋白原和血小板反应蛋白的氨基酸序列可在下列参考文献中找到： α_2 -抗纤溶酶前体 [M. Tone 等, *J. Biochem*, 102, 1033, (1987)]; β -酪蛋白 [L. Hansson 等, *Gene*, 139, 193, (1994)]; 纤连蛋白 [A. Gutman 等, *FEBS Lett.*, 207, 145, (1996)]; 血小板反应蛋白-1 前体 [V. Dixit 等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 5449, (1986)]; R.F. Doolittle, *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 195, (1984);

[0101] - 其为血管紧张素的底物或抑制剂的肽, 例如:

[0102] 血管紧张素 II Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (E. C. Jorgensen 等, *J. Med. Chem.*, 1979, 第 22 卷, 9, 1038-1044)

[0103] [Sar, Ile] 血管紧张素 II :Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile (R. K. Turker 等., *Science*, 1972, 177, 1203)。

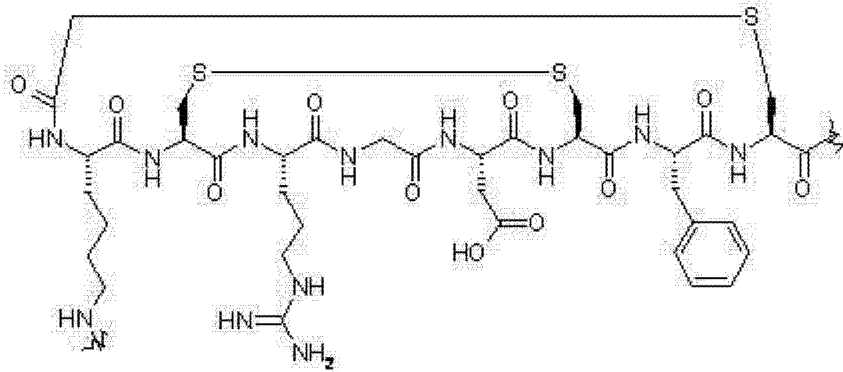
[0104] - 血管紧张素 I :Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu。

[0105] 更优选的 BTM 肽选自如下定义的肽 A、肽 B、肽 C 和肽 D:

[0106] (i) 肽 A = Arg-Gly-Asp 肽;

[0107] (ii) 肽 B = 包含以下片段的 Arg-Gly-Asp 肽

[0108]



[0109] (iii) 肽 C = c-Met 结合环肽, 其包含以下氨基酸序列:

[0110] -Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-

[0111] 其中 X¹为 Asn、His 或 Tyr;

[0112] X²为 Gly、Ser、Thr 或 Asn;

[0113] X³为 Thr 或 Arg;

[0114] X⁴为 Ala、Asp、Glu、Gly 或 Ser;

[0115] X⁵为 Ser 或 Thr;

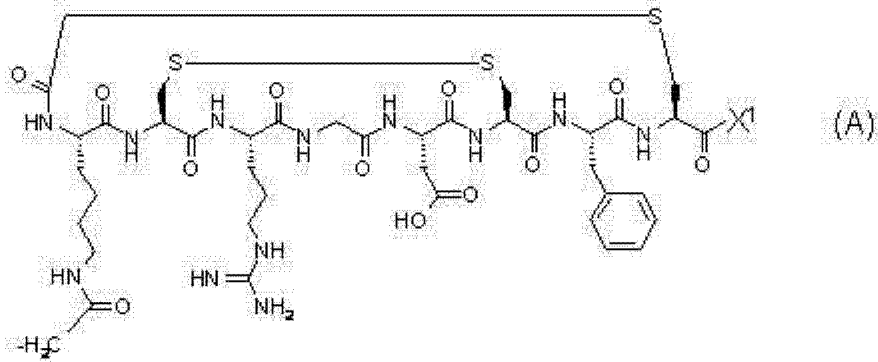
[0116] X⁶为 Asp 或 Glu;

[0117] 以及 Cys^{a-d}各自为半胱氨酸残基, 使得残基 a 和 b 以及 c 和 d 环化形成两个独立的二硫键;

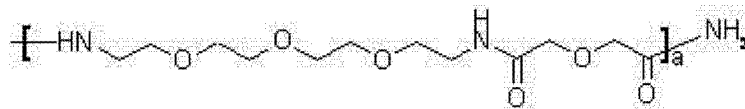
[0118] (iv) 肽 D = 下式羊毛硫抗菌肽:

[0119] Cys^a-Xaa-Gln-Ser^b-Cys^c-Ser^d-Phe-Gly-Pro-Phe-Thr^c-Phe-Val-Cys^b-(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr^a-Lys^d

- [0120] 其中 Xaa 为 Arg 或 Lys ;
 [0121] Cys^a-Thr^a、Ser^b-Cys^b和 Cys^c-Thr^c经由硫醚键共价连接 ;
 [0122] Ser^d-Lys^d经由赖丙氨酸键共价连接 ;
 [0123] HO-Asp 为 β - 羟基天冬氨酸。
 [0124] 特别优选的 BTM 肽为肽 B、肽 C 和肽 D。
 [0125] 最优选的这类肽 B 肽为式 (A) 的 ;
 [0126]



- [0127] 其中 X¹为 -NH₂或
 [0128]



- [0129] 其中 a 为 1-10 的整数。
 [0130] 在式 A 中, a 优选为 1。
 [0131] 优选的 c-Met 结合环肽具有序列 :
 [0132] Ala-Gly-Ser-Cys^a-Tyr-Cys^c-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys。
 [0133] 当 BTM 为肽时,所述肽的一端或两端 (优选两端) 具有与其缀合的代谢抑制基团 (M^{Ig})。将肽的两端以此方式保护对于体内成像应用而言很重要,因为否则预计会迅速代谢,结果导致对 BTM 肽的选择性结合亲和力的损失。术语“代谢抑制基团”(M^{Ig}) 意指抑制或阻抑 BTM 肽在氨基端或羧基端的酶 (尤其是诸如羧肽酶等肽酶) 代谢的生物相容性基团。这类基团对于体内应用而言特别重要,并且为本领域技术人员众所周知以及适当地选自 (对于肽氨基端) :

[0134] N- 酰化基团 -NH(C=O)R^G, 其中酰基 - (C=O)R^G含有选自 C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀芳基的 R^G或包含聚乙二醇 (PEG) 结构单元。优选的这类氨基端 M^{Ig}基团为乙酰基、苄氧羰基或三氟乙酰基,最优选乙酰基。

[0135] 用于肽羧基端的合适的代谢抑制基团包括 : 甲酰胺、叔丁酯、苄酯、环己酯、氨基醇或聚乙二醇 (PEG) 结构单元。用于 BTM 肽的羧基端氨基酸残基的合适的 M^{Ig}基团为其中氨基酸残基的末端胺用 C₁₋₄烷基 (优选甲基) N- 烷基化的基团。优选的这类 M^{Ig}基团为甲酰胺或 PEG, 最优选这类基团为甲酰胺。

[0136] 优选实施第一方面的方法,使得步骤 (ii) 和 (iii) 同时进行。以该方式,式 (IIA) 或 (IIB) 自由氨基氧化合物在原位生成,并因此可随着其产生而与已存在于反应介质中的

式 (IIIA) 或 (IIIB) 羰基化合物反应。预期这改善所需放射性缀合产物的产率, 因为使相对活性的自由氨基氧化化合物的副反应的可能性降至最低。

[0137] 优选在苯胺或其盐 (例如盐酸苯胺) 存在下实施第一方面的缩合步骤 (iii)。已显示在脗连接中使用苯胺有效增加总反应速率并允许这类反应在更小酸性 pH 值下发生 [Dirksen 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45, 7581-7584 (2006)]。

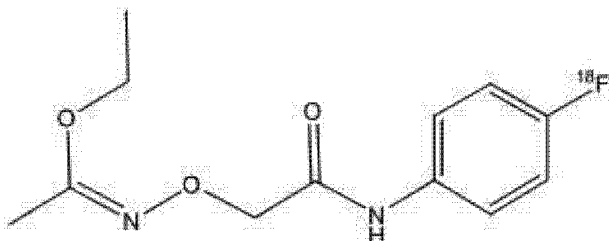
[0138] 优选实施第一方面的方法, 使得以适于哺乳动物给予的形式、更优选以适于作用于如在第二方面 (下文) 中所述体内成像的放射性药物的形式获得式 (IVA) 或 (IVB) 放射性标记缀合物。

[0139] 优选利用如在第二和第四方面 (下文) 中所述自动合成仪实施第一方面的方法。

[0140] *N*-(1-乙氧基亚乙基)-2-氨基氧乙酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯可市购于 Iris Biotech GmbH (Waldershofener Str. 49-51, 95615 Marktredwitz, Germany)。可将所述 Eei 保护的氨基氧活性酯与含胺的 BTM (例如具有 Lys 残基) 直接缀合, 得到式 (IA) 受保护的化合物。Dulery 等 [*Tetrahedron*, 63, 11952-11958 (2007)] 和 Foillard 等 [*J. Org. Chem.*, 73, 983-991 (2008)] 阐述了针对 Eei 保护肽的其它途径。Dulery 和 Foillard 亦描述了用于 Eei 保护基的脱保护的合适条件。

[0141] 可如下获得式 IB 氨基氧化合物。在叔碱 (tertiary base) 存在下使 (4-氨基苯基) 三甲胺和 *N*-(1-乙氧基亚乙基)-2-氨基氧乙酸 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯在有机溶剂中反应, 形成 (Z)-4-(2-(((1-乙氧基亚乙基)氨基)氧)乙酰胺基)-*N,N,N*-三甲苯铵。采用标准 ^{18}F -标记条件用 ^{18}F 标记 (Z)-4-(2-(((1-乙氧基亚乙基)氨基)氧)乙酰胺基)-*N,N,N*-三甲苯铵, 以提供 (Z)-*N*-2-((4-氟苯基)氨基)-2-氧代乙氧基亚氨逐乙酸乙酯:

[0142]



[0143] 可如下获得式 IIIA 羰基化合物。 ^{18}F -氟化的醛可以是 ^{18}F -氟苯甲醛或对-(二叔丁基- ^{18}F -氟甲硅烷基)苯甲醛 (^{18}F -SiFA-A)。式 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_q\text{CH}_2\text{CHO}$ 的 ^{18}F -标记的脂族醛 (其中 q 为 3) 可通过 Glaser 等 [*Bioconj. Chem.*, 19(4), 951-957 (2008)] 的方法获得。 ^{18}F -氟苯甲醛可通过 Glaser 等 [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 52, 327-330 (2009)] 的方法获得。 ^{18}F -氟苯甲醛的前体 (即 $\text{Me}_3\text{N}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHO}$, CF_3SO_3^-) 可通过 Haka 等 [*J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 27, 823-833 (1989)] 的方法获得。

[0144] ^{123}I -苯甲醛可从相应的三甲基锡前体制备, 其由 Thumshirn 等 [*Chem. Eur. J.*, 9, 2717-2725 (2003)] 阐述。

[0145] 当 BTM 为单克隆抗体时, 式 IIIB 的羰基可通过使用例如高碘酸盐将抗体的糖部分氧化来引入 [Kurth 等及其中的参考文献 *J. Med. Chem.*, 36, 1255-1261 (1993)]。可通过 *Tet. Lett.*, 43(12), 第 2303-2306 页 (2002) 所述方法向肽序列中引入具有醛侧链的氨基酸。

[0146] 式 IIIA 或 IIIB 羰基化合物可任选通过合适的受保护衍生物的脱保护来原位生成。羰基保护基的使用在 *Protective Groups in Organic Synthesis* (有机合成中的保护基), 第四版, Theodorora W. Greene 和 Peter G. M. Wuts, [Wiley Blackwell, (2006)] 中阐述。

[0147] 在第二方面, 本发明提供制备放射性药物组合物的方法, 其中所述放射性药物组合物包含呈适于哺乳动物给予的形式的如在第一方面中定义的式 (IVA) 或 (IVB) 放射性标记的缀合物, 连同生物相容性载体, 并且所述制备方法包括第一方面的放射性标记法。

[0148] 第二方面中式 (IVA) 或 (IVB) 放射性标记的缀合物的优选实施方案如在第一方面 (上文) 中所述。第二方面的放射性标记的缀合物优选为式 (IVA) 的。

[0149] 短语“呈适于哺乳动物给予的形式”意指这样的组合物, 其为无菌无热原的, 不含产生毒性作用或不利作用的化合物, 并且在生物相容性 pH (约 pH 4.0-10.5) 下配制。这类组合物不含可导致体内栓塞风险的微粒, 并且配制成与生物流体 (例如血) 接触时不产生沉淀。这类组合物亦仅含有生物相容性赋形剂, 以及优选为等渗的。

[0150] “生物相容性载体”为流体特别是液体, 其中所述放射性缀合物可以是悬浮的或优选溶解的, 使得所述组合物为生理上耐受的, 即可给予哺乳动物体而无毒性或过度不适。生物相容性载体适当为注射用载体液体, 例如无菌无热原的注射用水; 水溶液, 例如盐水 (可让其有利地平衡以便用于注射的最终产物等渗); 包含生物相容性缓冲剂的水性缓冲液 (例如磷酸盐缓冲液); 一种或多种以下物质的水溶液: 调节张力的物质 (例如具生物相容的反荷离子的等离子体阳离子的盐)、糖 (例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇 (例如山梨醇或甘露醇)、二醇 (例如甘油) 或其它非离子多元醇物质 (例如聚乙二醇、丙二醇等)。优选生物相容性载体为无热原注射用水、等渗盐水或磷酸盐缓冲液。

[0151] 放射性标记的缀合物和生物相容性载体在合适的小瓶或容器中提供, 所述小瓶或容器包含密闭容器, 其允许保持无菌完整性和 / 或放射性安全性, 任选加上惰性顶空气体 (例如氮气或氩气), 同时允许通过注射器或插管来加入和吸出溶液。优选的这类容器为隔膜密封的小瓶瓶, 其中气密封盖用顶封物 (overseal) (通常为铝的) 压紧。所述封盖适于用皮下注射针单次或多次穿刺 (例如压紧的隔膜密封封盖) 同时保持无菌完整性。这类容器具有额外的优点: 所述封盖可在需要时 (例如更换顶空气体或给溶液除气) 承受真空, 并承受压力变化, 例如压力减小而不会允许外部大气气体 (例如氧气或水蒸气) 进入。

[0152] 优选的多剂量容器包括单个散装小瓶 (例如 10-50 cm³ 体积的), 其包含多个患者剂量, 由此可在制剂的有效期期间于不同时间间隔将单个患者剂量抽到临床级注射器中, 以适合临床情况。设计预填充的注射器以含有单个人剂量或“单位剂量”, 并因此优选为适于临床使用的一次性注射器或其它注射器。

[0153] 放射性药物组合物可包含另外的任选赋形剂, 例如: 抗微生物防腐剂、pH 调节剂、填充剂、辐射防护剂、增溶剂或同渗重摩调节剂。术语“辐射防护剂”意指通过捕获高活性自由基 (例如因水的辐解而产生的含氧自由基) 来抑制降解反应 (例如氧化还原过程) 的化合物。本发明的辐射防护剂适当地选自: 抗坏血酸、对氨基苯甲酸 (即 4-氨基苯甲酸)、龙胆酸 (即 2,5-二羟基苯甲酸) 及其带有如上所述生物相容性阳离子的盐。术语“增溶剂”意指存在于组合物中增加成像剂在溶剂中的溶解度的添加剂。优选的这类溶剂为水性介质, 因此所述增溶剂优选改善水中的溶解度。合适的这类增溶剂包括:

C₁₋₄醇；甘油；聚乙二醇 (PEG)；丙二醇；聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯；山梨醇酐单油酸酯 (sorbitan monooleate)；聚山梨酯；聚(氧乙烯)聚(氧丙烯)聚(氧乙烷)嵌段共聚物 (PluronicTM)；环糊精(例如 α 、 β 或 γ 环糊精、羟丙基- β -环糊精或羟丙基- γ -环糊精)和卵磷脂。

[0154] 术语“抗微生物防腐剂”意指抑制潜在有害微生物(例如细菌、酵母或霉菌)生长的物质。抗微生物防腐剂亦可表现出某些杀菌特性,这取决于所用剂量。本发明抗微生物防腐剂的主要作用为抑制任何所述微生物在药物组合物中的生长。然而,亦可任选将抗微生物防腐剂用于抑制潜在有害微生物在试剂盒的一种或多种组分中的生长,所述试剂盒用于在给予之前制备所述组合物。合适的抗微生物防腐剂包括:对羟基苯甲酸酯类,即对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯或对羟基苯甲酸丁酯或其混合物;苯甲醇;苯酚;甲酚;溴化十六烷基三甲胺和硫柳汞。优选的抗微生物防腐剂为对羟基苯甲酸酯类。

[0155] 术语“pH 调节剂”意指用于确保组合物的 pH 在用于人或哺乳动物给予的容许界限(约 pH 4.0-10.5)之内的化合物或化合物的混合物。合适的这类 pH 调节剂包括药学上可接受的缓冲剂,例如曲辛、磷酸盐或 TRIS [即三(羟甲基)氨基甲烷],以及药学上可接受的碱,例如碳酸钠、碳酸氢钠或其混合物。当所述组合物以试剂盒形式使用时,所述 pH 调节剂可任选在独立小瓶或独立容器中提供,以便试剂盒的使用者可作为多步操作的部分调节 pH。

[0156] 术语“填充剂”意指可在生产和冻干期间利于原料处理的药学上可接受的膨胀剂。合适的填充剂包括诸如氯化钠等无机盐,以及诸如蔗糖、麦芽糖、甘露醇或海藻糖等水溶性糖或糖醇。

[0157] 第二方面的方法可以多种方式实施:

[0158] a) 其中所述步骤在洁净室环境中进行的无菌制备技术;

[0159] b) 终末灭菌,其中第一方面的步骤(i)-(iii)不采用无菌制备进行,然后作为最后一步灭菌[例如通过 γ 辐照、高压灭菌干热或化学处理(例如用环氧乙烷)];

[0160] c) 试剂盒方法,其中将包含合适的式(IA)或(IIIB)非放射性前体和任选赋形剂的无菌非放射性试剂盒制剂分别与式(IIIA)或(IB)放射性化合物反应;

[0161] d) 其中所述步骤采用自动合成仪进行的无菌制备技术。

[0162] 方法(d)为优选的。其在第四方面(下文)中阐述。

[0163] 在第三方面,本发明提供可用于第二方面方法的前体,其中所述前体包括无菌形式的式(IA)受保护的化合物。

[0164] 第三方面中式(IA)化合物的优选实施方案如在第一方面(上文)中所述。

[0165] 式(IA)“前体”包括 BTM 的非放射性衍生物。这类前体为合成的并且可以良好的化学纯度方便地获得。“前体”可任选进一步包含用于生物靶向分子的某一(某些)官能团的一个或多个保护基(P^{GP})。所述 P^{GP}如在第一方面(上文)中所定义。

[0166] 式(IA)受保护的化合物的优选无菌形式为冻干固体。更优选所述无菌前体作为如在第五方面(下文)中所述盒的部分提供。

[0167] 获得无菌化合物的方法如对第二方面(上文)的放射性药物组合物所述。

[0168] 在第四方面,本发明提供自动合成仪实施第一或第二方面的方法的应用。

[0169] 第三方面中第一方面方法的优选实施方案如在第一方面（上文）中所述。优选将第四方面用于实施第二方面的方法，即用于制备放射性药物组合物。

[0170] 术语“自动合成仪”意指基于如由 Satyamurthy 等 [Clin. Positr. Imag., 2(5), 233-253 (1999)] 描述的单元操作原理的自动化模块。术语“单元操作”意指将复杂过程简化为一系列简单操作或反应，其可应用于多种材料。特别是当需要放射性药物组合物时，所述自动合成仪对于本发明的方法而言为优选的。它们可市购于多个供应商 [Satyamurthy 等, 上文], 包括: GE Healthcare; CTI Inc; Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, Belgium); Raytest (Germany) 和 Bioscan (USA)。

[0171] 商业自动合成仪亦提供用于液体放射性废物的合适容器，所述液体放射性废物因放射性药物制备而产生。自动合成仪通常不提供辐射屏蔽，因为它们设计成在适当配置的放射性工作间使用。所述放射性工作间提供合适的辐射屏蔽以保护操作者避开可能的辐射剂量，以及提供通风以去除化学和 / 或放射性蒸气。优选所述自动合成仪包含盒。

[0172] 术语“盒”意指设计成可移动且可交换地安装至自动合成仪（如上所定义）上的一块器具，这样使得合成仪的活动件的机械运动从盒外，即外部地控制盒的操作。合适的盒包含线性阵列的阀，各阀通过针刺倒置隔膜密封的小瓶或通过气密连接的接头与可连接试剂或小瓶的端口连接。各阀具有凸 - 凹接头，其与自动合成仪的对应移动臂对接。因此当盒与自动合成仪连接时臂的外部旋转控制阀的打开或闭合。将自动合成仪的另外的活动件设计为夹在注射器活塞头上，并由此提起或下压注射器管。

[0173] 盒是多用途的，通常具有若干可连接试剂的位置，和若干适于连接试剂注射器小瓶或色谱柱（例如固相萃取或 SPE）的位置。盒总是包括反应容器。这类反应容器体积优选为 1-10 cm³，最优选 2-5 cm³，并且经配置使得盒的 3 个或更多个端口与之连接，以允许从盒上的不同端口传送试剂或溶剂。优选所述盒具有呈线性阵列的 15-40 个阀，最优选 20-30 个，特别优选 25 个。所述盒的阀优选为各自相同的，以及最优选为 3 通阀。将所述盒设计成适于放射性药物制备并因此制备自医药级的以及理想上亦耐受辐解作用的材料。

[0174] 本发明优选的自动合成仪包含一次性或单次使用的盒，所述盒包含进行给定批次的放射性氟化放射性药物的制备所需的全部试剂、反应容器和器具。所述盒意味着自动合成仪具有能够通过简单变换盒在最小交叉污染风险的情况下制备各种不同放射性药物的灵活性。盒方法还具有以下优势：简化装配因而降低操作人员的误差风险；改进的 GMP（药品生产质量管理规范）遵从性；多 - 示踪物能力；生产运行之间的快速转换；预运行自动诊断核查盒和试剂；自动条形码交叉检查化学试剂与待进行的合成；试剂可示踪性；单次使用并因此无交叉污染、擅自改变和滥用抗性的风险。

[0175] 在第五方面，本发明提供适用于如在第四方面中定义的自动合成仪的单次使用的一次性盒，其中所述盒包含第三方面的前体。

[0176] 第五方面中自动合成仪和盒的优选方面如在第四方面（上文）中所述。第五方面中前体的优选方面如在第三方面（上文）中所述。

[0177] 在第六方面，本发明提供式 (IA) 受保护的化合物，其中 X¹ 及其优选方面如在第一方面中所定义，而 BTM 为 Affibody 或者肽 A、肽 B、肽 C 或肽 D 及其优选方面，如在第一方面（上文）中所定义。

[0178] 在第七方面,本发明提供式 (IB) 的受保护化合物,其中 X^1 和 Q 及其优选方面如在第一方面中所定义。

[0179] 在第八方面,本发明提供如在第一方面中定义的式 (IA) 或 (IB) 的受保护化合物在如在第一方面中定义的生物靶向分子 (BTM) 的放射性标记中的用途。第八方面中式 (IA) 或 (IB) 化合物和 BTM 的优选方面,如在第一方面(上文)中所述。

[0180] 本发明通过下文详细说明了非限制性实施例来阐述。实施例 1 提供本发明的 c-Met 靶向肽 (“肽 1”) 的合成。实施例 1 提供氨基氧官能化的肽 1 (“化合物 1”) 的合成,其中用本发明的保护基 (Eei) 保护所述氨基氧官能团。实施例 3 提供化合物 1 的脱保护以得到自由氨基氧-肽 1 (“化合物 2”)。实施例 4 提供化合物 1 的原位 (即一锅 (one-pot)) 脱保护和醛缀合以得到缀合物 (“化合物 3”)。实施例 5 提供本发明的另外的 Eei- 保护肽的合成,而实施例 6 提供其脱保护。

[0181] 缩写

[0182] 使用常规的单字母或 3 字母氨基酸缩写。

[0183] Ac :乙酰基

[0184] AcM :乙酰胺基甲基

[0185] ACN :乙腈

[0186] AcOH :乙酸

[0187] Boc :叔丁氧羰基

[0188] tBu :叔丁基

[0189] DCM :二氯甲烷

[0190] DIPEA :*N,N*-二异丙基乙胺

[0191] DMF :二甲基甲酰胺

[0192] DMSO :二甲亚砜

[0193] Eei :乙氧基次乙基

[0194] Fmoc :9- 芴甲氧羰基

[0195] HBTU :*O*- 苄并三唑 -1- 基 -*N,N,N',N'*- 四甲基脒鎓六氟磷酸盐

[0196] HPLC :高效液相色谱法

[0197] NHS :*N*- 羟基 - 琥珀酰亚胺

[0198] NMM :*N*- 甲基吗啉

[0199] NMP :1- 甲基 -2- 吡咯烷酮

[0200] Pbf :2, 2, 4, 6, 7- 五甲基二氢苯并呋喃 -5- 磺酰基

[0201] tBu :叔丁基

[0202] TFA :三氟乙酸

[0203] THF :四氢呋喃

[0204] TIS :三异丙基硅烷

[0205] Trt :三苯甲基。

[0206] 本发明的化合物

[0207]

| 名称 | 结构 |
|-------|---|
| 肽 1 | 二硫键在 Cys4-16 和 Cys6-14 处： Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH ₂ 或 Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂ |
| 化合物 1 | [肽 1]-NH(CO)-(CH ₂)-O-N-C(CH ₃)(OCH ₂ CH ₃) |
| 化合物 2 | [肽 1]-NH(CO)-(CH ₂)-O-NH ₂ |
| 化合物 3 | [肽 1]-NH(CO)-(CH ₂)-O-NH-CH(CH ₃) |
| 化合物 4 | [LBPI]-(CO)CH ₂ ONC(CH ₃)OEt. LBPI Cys ^a -Lys ^b -Gln-Ser ^c -Cys ^d -Ser ^e -Phe-Gly-Pro-Phe-Thr ^f -Phe-Val-Cys ^g -(HO-Asp)-Gly-Asn-Thr ^h -Lys ⁱ (在 Cys ^a 或 Xaa Lys 基团处官能化的异构体 LBPI 的混合物)。 |
| 化合物 5 | [LBPI]-(CO)CH ₂ ONH ₂ . (在 Cys ^a 或 Xaa Lys 基团处官能化的异构体 LBPI 的混合物)。 |

[0208] 其中：

[0209] 化合物 1、2 和 3 在肽 1 羧基端 Lys 的 ε 胺基处官能化。

[0210] 实施例 1:肽 1 的合成。

[0211] 步骤 (a):受保护的前体线性肽的合成。

[0212] 前体线性肽具有以下结构：

[0213] Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys(Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys(Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂

[0214] 以 0.1 mmol Rink Amide Novagel 树脂出发, 利用 Fmoc 化学在 Applied Biosystems 433A 肽合成仪上装配肽基树脂 H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Cys(Acm)-Ser(tBu)-Gly-Pro-Pro-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Trp(Boc)-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr(ψ^{Me, Me}pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-聚合物。将过量的 1 mmol 预活化的氨基酸(使用 HBTU)用于偶联步骤。将 Glu-Thr 伪脯氨酸(Novabiochem 05-20-1122)掺入序列中。将树脂转移至氮气鼓泡器并用溶于 DCM(5 mL)的乙酸酐(1 mmol)和 NMM(1 mmol)溶液处理 60 min。通过过滤去除酐溶液以及用 DCM 洗涤树脂,并在氮气流下干燥。

[0215] 在含 2.5% TIS、2.5% 4-硫代甲酚和 2.5% 水的 TFA(10 mL)中进行肽的侧链保护基的同时去除和自树脂的裂解 2 小时和 30 min。通过过滤去除树脂,在真空中去除 TFA 并向残留物中加入二乙醚。将形成的沉淀物用二乙醚洗涤并风干,得到 264 mg 粗肽。

[0216] 通过制备型 HPLC(梯度:在 40 min 内的 20-30% B,其中 A = H₂O/0.1% TFA 而 B = ACN/0.1% TFA,流速:10 mL/min,柱:Phenomenex Luna 5μ C18(2) 250 x 21.20 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:30 min)纯化粗肽得到 100 mg 纯的肽 1 线性前体。通过分析型 HPLC(梯度:在 10 min 内的 10-40% B,其中 A = H₂O/0.1% TFA 而 B = ACN/0.1% TFA,流速:0.3 mL/min,柱:Phenomenex Luna 3μ C18(2) 50 x 2 mm,检测:UV 214 nm,产物保留时间:6.54 min)分析所述纯产物。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行(计

算的 MH_2^{2+} :1464.6, 实测的 MH_2^{2+} :1465.1)。

[0217] 步骤 (b):单环 Cys4-16二硫键的形成。

[0218] Cys4-16 ;Ac-Ala-Gly-Ser-Cys-Tyr-Cys (Acm)-Ser-Gly-Pro-Pro-Arg-Phe-Glu-Cys (Acm)-Trp-Cys-Tyr-Glu-Thr-Glu-Gly-Thr-Gly-Gly-Gly-Lys-NH₂。

[0219] 将来自步骤 (a) 的线性前体 (100 mg) 溶于 5 % DMSO/水 (200 mL) 并用氨水将溶液调至 pH 6。将反应混合物搅拌 5 天。然后用 TFA 将溶液调至 pH 2 并通过真空蒸发去除大部分溶剂。将残留物 (40 mL) 分批注入制备型 HPLC 柱上用于产物纯化。

[0220] 通过制备型 HPLC (梯度:0 % B 达 10 min, 然后在 40 min 内 0-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:10 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:44 min) 纯化所述残留物得到 72 mg 纯的肽 1 单环前体。通过分析型 HPLC (梯度:在 10 min 内 10-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:0.3 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:5.37 min (P1);5.61 min (P2);6.05 min (P3)) 分析所述纯产物 (作为异构体 P1-P3 的混合物)。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行 (计算的 MH_2^{2+} :1463.6, 实测的 MH_2^{2+} :1464.1 (P1);1464.4 (P2);1464.3 (P3))。

[0221] 步骤 (c):第二个 Cys4-16二硫键 (肽 1)的形成。

[0222] 在氮气层下将来自步骤 (b) 的单环前体 (72 mg) 溶于 75 % AcOH/水 (72 mL)。依次加入 1 M HCl (7.2 mL) 和 0.05 M I₂/AcOH (4.8 mL) 并将混合物搅拌 45 min。加入 1 M 抗坏血酸 (1 mL) 得到无色混合物。真空蒸发大部分溶剂以及用水 /0.1 % TFA (4 mL) 稀释残留物 (18 mL) 并使用制备型 HPLC 纯化产物。通过制备型 HPLC (梯度:0 % B 达 10 min, 然后在 40 min 内 20-30 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:10 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 21.20 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:43-53 min) 纯化所述残留物得到 52 mg 纯的肽 1。通过分析型 HPLC (梯度:在 10 min 内 10-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:0.3 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 50 x 2 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:6.54 min) 分析所述纯产物。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行 (计算的 MH_2^{2+} :1391.5, 实测的 MH_2^{2+} :1392.5)。

[0223] 实施例 2:肽 1的 Eei-保护的氨基氧缀合物 (化合物 1)的合成。

[0224] 将肽 1 (0.60 g, 0.22 mmol) 和 Eei-AOAc-Osu (IRIS Biotech;83 mg, 0.32 mmol) 溶于 DMF (5 mL)。加入 DIPEA (75 μ L, 2 mmol) 并将反应混合物振荡 30 min。加入第二份 DIPEA 等分样 (75 μ L, 2 mmol) 并将反应混合物振荡 1 小时。然后用 10% ACN/水 /0.1 % 乙酸铵 (10 mL) 稀释反应混合物, 并使用制备型 HPLC 纯化产物。将含有纯产物的流分合并以及将产物冻干, 得到 550 mg (89% 产率) 化合物 1。

[0225] 通过分析型 HPLC (梯度:在 5 min 内 10-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:0.6 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:3.56 min) 分析所述纯产物。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行 (计算的 MH_2^{2+} :1463.1, 实测的 MH_2^{2+} :1463.2)。

[0226] 实施例 3:脱保护以得到肽 1的氨基氧缀合物 (化合物 2)。

[0227] 将化合物 1 (实施例 2;461 mg, 158 μ mol) 悬浮在 2.5% TFA/水 (46 mL) 溶液中

并将溶液振荡 / 超声处理 60 min。用水 (414 mL) 稀释所述混悬液并将溶液冷冻干燥得到 472 mg (105%) 化合物 2。

[0228] 通过分析型 HPLC (梯度:在 5 min 内的 10-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:0.6 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:3.00 min) 分析所述纯产物。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行 (计算的 MH₂²⁺:1428.1, 实测的 MH₂²⁺:1428.6)。

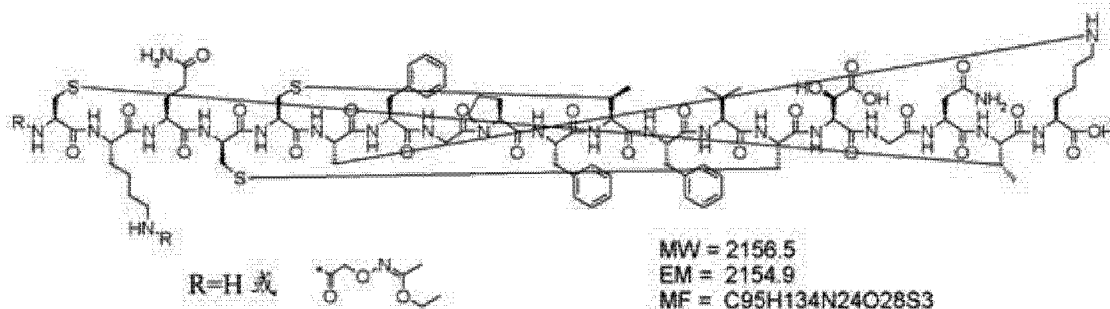
[0229] 实施例 4:化合物 1 与醛的一锅缀合。

[0230] 向化合物 1 (实施例 2; 5 mg, 1.7 μ mol) 在 1M HCl (0.5 mL) 中的混合物中加入含乙醛 (1 μ L, 17 μ mol) 的乙醇 (0.5 mL) 并将反应混合物振荡 / 超声处理 30 min。然后用 10% ACN/水 / 0.1 % TFA (7 mL) 稀释反应混合物并通过半制备型 HPLC 纯化产物, 得到 3.8 mg (78%) 化合物 3。

[0231] 通过分析型 HPLC (梯度:在 5 min 内的 10-40 % B, 其中 A = H₂O/0.1 % TFA 而 B = ACN/0.1 % TFA, 流速:0.6 mL/min, 柱:Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20 x 2 mm, 检测:UV 214 nm, 产物保留时间:3.22 min) 分析所述纯产物。进一步的产物表征采用电喷射质谱法进行 (计算的 MH₂²⁺:1441.1, 实测的 MH₂²⁺:1441.4)。

[0232] 实施例 5:(Eei-氨基氧)乙酰基-耐久霉素 (化合物 4) 的合成。

[0233]



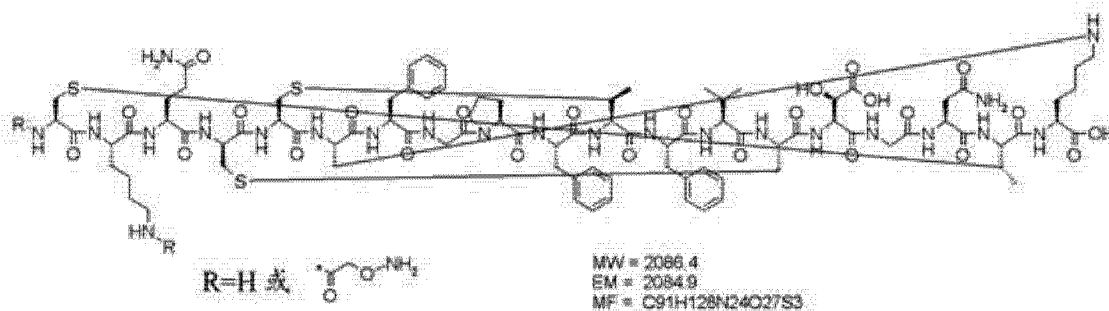
[0234] 将耐久霉素 (Sigma-Aldrich; 50 mg, 25 μ mol)、(Eei-氨基氧)乙酸 NHS 酯 (Iris Biotech., 5.1 mg, 20 μ mol) 和 DIPEA (17 μ L, 100 μ mol) 溶于 NMP (1 mL)。将反应混合物振荡 45 min。然后用水 / 0.1% 乙酸 (8 mL) 稀释混合物并使用制备型 HPLC 纯化产物。

[0235] 通过制备型 HPLC (如实施例 1, 使用梯度在 40min 内的 14-45% B, 其中 A = 水 / 0.1% 乙酸而 B = ACN) 纯化得到 14 mg 纯化合物 4 (产率 26%)。通过 LC-MS (梯度:在 5 min 内的 20-50% B, t_r :2.5 和 2.7 min, 实测的 m/z :1078.8, 预期的 MH₂²⁺:1078.5) 分析了纯化的物质。

[0236] 可使用 0.1% TFA 在分析型 HPLC 上实现 (Eei-氨基氧)乙酰基-耐久霉素区域异构体 (regioisomer) 的色谱分离。然而, Eei 保护基在 0.1% TFA 中不稳定, 所以制备性分离不可行。使用 0.1% 乙酸未拆分所述区域异构体。

[0237] 实施例 6:氨基氧乙酰基-耐久霉素 (化合物 5) 的合成。

[0238]



[0239] 在氩气下用 2.5% TFA/水 (2.8 mL) 将化合物 4 (实施例 5; 14 mg) 处理 40 min。用水 (31 mL) 稀释反应混合物并将产物冻干 (使用异丙醇 / 干冰在氩气下冷冻), 得到 18 mg 化合物 5。通过 LC-MS (梯度: 在 5 min 内的 20-50% B, t_R : 2.5 和 2.1 min, 实测的 m/z : 1043.8, 预期的 MH_2^{2+} : 1043.5) 分析所述冻干产物。

[0240] 可使用 0.1% TFA 在分析型 HPLC 上实现化合物 5 区域异构体的色谱分离。然而, 因自由氨基氧基对溶剂和大气中痕量酮和醛的高反应性所致, 未尝试进行分离该区域异构体。

[0001]

序 列 表

<110> 通用电气健康护理有限公司

<120> 放射性缀合法

<130> PZ1124 WO

<140> PCT/EP2011/071506

<141> 2011-12-01

<160> 14

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Arg

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 2

Pro Asp Ser Gly Arg

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0002]

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成肽

<400> 7

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Sar

<400> 8

Xaa Arg Val Tyr Ile His Pro Ile
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> 硫醚
 <222> (1)..(8)

<220>
 <221> 二硫化物
 <222> (2)..(6)

<400> 9

[0004]

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 二硫化物

<222> (1).. (13)

<220>

<221> 变体

<222> (2).. (2)

<223> N、H 或 Y

<220>

<221> 二硫化物

<222> (3).. (11)

<220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> G、S、T 或 N

<220>

<221> 变体

<222> (8).. (8)

<223> T 或 R

<220>

<221> 变体

<222> (15).. (15)

<223> A、D、E、G 或 S

<220>

<221> 变体

<222> (16).. (16)

<223> S 或 T

<220>

<221> 变体

<222> (17).. (17)

<223> D 或 E

[0005]

<400> 10

Cys Xaa Cys Xaa Gly Pro Pro Xaa Phe Glu Cys Trp Cys Tyr Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 二硫化物

<222> (4).. (16)

<220>

<221> 二硫化物

<222> (6).. (14)

<400> 11

Ala Gly Ser Cys Tyr Cys Ser Gly Pro Pro Arg Phe Glu Cys Trp Cys
1 5 10 15

Tyr Glu Thr Glu Gly Thr Gly Gly Gly Lys
20 25

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> 肉桂链霉菌(*Streptoverticillium cinnamoneum*)

<220>

<221> 硫醚

<222> (1).. (18)

<220>

<221> 硫醚

<222> (4).. (14)

[0006]

- <220>
- <221> 硫醚
- <222> (5)..(11)

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (6)..(19)
- <223> 赖丙氨酸键

- <220>
- <221> 变体
- <222> (15)..(15)
- <223> β -羟基天冬氨酸

- <400> 12

Cys Arg Gln Ser Cys Ser Phe Gly Pro Thr Phe Val Cys Xaa Gly
 1 5 10 15

Asn Thr Lys

- <210> 13
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> 肉桂链霉菌

- <220>
- <221> 硫醚
- <222> (1)..(18)

- <220>
- <221> 硫醚
- <222> (4)..(14)

- <220>
- <221> 硫醚
- <222> (5)..(11)

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (6)..(19)
- <223> 赖丙氨酸键

- <220>
- <221> 变体
- <222> (15)..(15)

[0007]

