

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 51/08

//(A61K103: 10,1

23: 00)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194335.9

[45] 授权公告日 2002 年 9 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1090973C

[22] 申请日 1995. 6. 1

[21] 申请号 95194335.9

[30] 优先权

[32]1994. 6. 3 [33]US [31]08/253,678

[86] 国际申请 PCT/US95/07017 1995. 6. 1

[87] 国际公布 WO95/33498 英 1995. 12. 14

[85] 进入国家阶段日期 1997. 1. 24

[73] 专利权人 迪亚太德公司

地址 美国新罕布什尔州

[72] 发明人 理查德·T·迪安 斯科特·巴特拉姆

威廉·麦克布莱德

约翰·利斯特-詹姆斯

埃德加·R·西维特罗

[56] 参考文献

CN 1155248A 1997. 7. 23 A61K51/08

WO9317719A 1993. 9. 16 A61K49/02

审查员 刘菊芳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 5 页 说明书 25 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 用于成象的铽-99m 标记的肽

[57] 摘要

本发明涉及放射性标记的肽和这类肽的制备方法。更具体地说,本发明 涉及肽、肽的制备方法和用于制备这类肽的试剂盒、以及使用这类肽使哺乳 动物体内的各部位成象的方法,所说的哺乳动物体使用铽-99m(Tc 99m)通过放射性键合基团标记,所说的放射性键合基团通过肽的氨基酸侧 链共价连接在特异性结合的肽上。

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

权 利 要 求 书

1. 一种用于制备哺乳动物体内各部位成象所用的闪烁照相成象剂的试剂，其包括具有含 3-100 个氨基酸的氨基酸序列的特异性结合肽和与所说的肽共价连接的镓-99m 结合部分，其中镓-99m 结合部分共价连接在特异性结合肽的氨基酸残基的侧链上，和其中镓-99m 结合部分具有下面的通式：



其中 Cp 是保护的半胱氨酸，(aa)是不含硫羟基的任何伯 α -或 β -氨基酸。

2. 权利要求 1 的试剂，其中特异性结合肽和镓-99m 结合部分通过赖氨酸残基或高半胱氨酸残基共价连接。

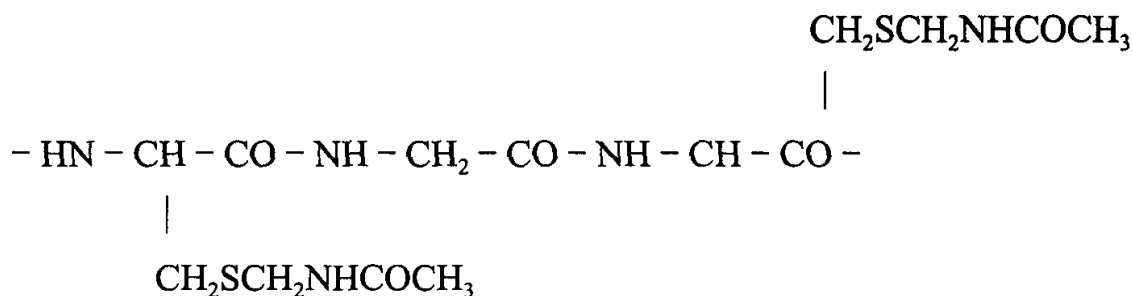
3. 包含权利要求 1 的试剂的闪烁照相成象剂，其中镓-99m 结合部分与镓-99m 相结合。

4. 权利要求 1 的试剂，其中通式 I 的镓-99m 结合部分中保护的半胱氨酸具有下面通式的保护基：

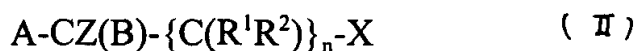


其中 R 是具有 1 至 6 个碳原子的低级烷基，2-、3-、4-吡啶基、或有低级烷基、羟基、低级烷氧基、羧基或低级烷氧基羰基取代的苯基。

5. 权利要求 1 的试剂，其中镓-99m 结合部分具有下面的通式：



6. 一种用于制备哺乳动物体内各部位成象所用的闪烁照相成象剂的试剂，其包括具有含 3-100 个氨基酸的氨基酸序列的特异性结合肽和与所说的肽共价连接的镓-99m 结合部分，其中镓-99m 结合部分共价连接在特异性结合肽的氨基酸残基的侧链上，其中镓-99m 结合部分包含一个具有下述通式的含单一硫羟基的部分：



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

B 是 H、SH、或 -NHR³、-N(R²)-(氨基酸或肽)或 R⁴；

X 是 H、SH、或 -NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴；

5 Z 是 H 或 R⁴；

R¹、R²、R³和 R⁴分别为 H 或直链或支链低级烷基或低级环烷基；

n 是 0、1 或 2；

(肽)是 2 至 10 个氨基酸的肽；

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

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

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

当 A 为 H 或 R⁴，而其中的 B 为 SH 时，X 是 -NHR 或 -N³(R)-(氨基酸或肽)和当 X 是 SH 时，B 是 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽)；

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

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

20 和其中硫羟基部分为还原形式和其中(氨基酸)是任何不含硫羟基的伯 α - 或 β - 氨基酸。

7. 权利要求 6 的试剂，其中得 -99m 结合部分选自具有下面通式的部分：

II a. -(氨基酸)¹-(氨基酸)²-{A-CZ(B)-{C(R¹R²)}}_n-X}

II b. -{A-CZ(B)-{C(R¹R²)}}_n-X}-(氨基酸)¹-(氨基酸)²

25 II c. -(伯 α, ω - 或 β, ω - 二氨基酸)-(氨基酸)¹-{A-CZ(B)-{C(R¹R²)}}_n-X} 或

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

30 其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²分别为任何天然生成的、修饰的、取代的或改变的不含硫醇基的 α - 或 β - 氨基酸；

A 是 H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC

或 R⁴;

B 是 H、SH 或 -NHR³, -N(R²)-(氨基酸或肽)或 R⁴;

X 是 SH 或 -NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或 R⁴;

Z 是 H 或 R⁴;

5 R¹、R²、R³和 R⁴分别为 H 或直链或支链低级烷基或低级环烷基;

(肽)是 2 至 10 个氨基酸的肽;

n 是 0、1 或 2 的整数; 和

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

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

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

当 A 为 H 或 R⁴, 而其中的 B 为 SH 时, X 是 -NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)和当 X 是 SH 时, B 是 -NHR³ 或 -N(R³)-(氨基酸或肽);

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

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

和其中巯基部分为还原形式。

20 8. 包含权利要求的 6 的试剂的闪烁照相成象剂, 其中锝-99m 结合部分与锝-99m 相结合。

9. 权利要求 6 的试剂, 其中特异性结合肽和锝-99m 结合部分通过赖氨酸残基或高半胱氨酸残基共价连接。

10. 权利要求 1、6 或 7 的试剂, 其中特异性结合肽选自具有下面氨基酸序列的肽:

25 甲酰基-MLF

(VGVAPG)₃ 酰胺

(VPGVG)₄ 酰胺

RALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

RALVDTEFKVKQEAGAK 酰胺

30 PLARITLPDFRLPEIAIP 酰胺



GQQHHLGGAKAGDV

PLYKKIIKKLLES

LRALVDTLK 酰胺

GGGLRALVDTLK 酰胺

5 GGGLRALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

GGGRALVDTLKALVDTL 酰胺

GHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYR

PSPSPIHPAHHKRDRRQ 酰胺

GGGF_D.Cpa.YW_DKTFT 酰胺

10 GGCNP.Apc.GDC



{SYNRGDSTC}₃-TSEA

GGGLRALVDTLK 酰胺

15 GCGGGLRALVDTLK 酰胺

GCYRALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

和

GC(VGVAPG)₃ 酰胺。

11. 权利要求 1、6 或 7 的试剂，其中该试剂还进一步包括与许多特异性结合化合物共价连接并且也与许多放射性标记结合部分共价连接的多价连接部分，以制备多体的多价闪烁照相成象剂，其中多体的多价闪烁照相成象剂的分子量小于 20,000 道尔顿。

12. 权利要求 11 的试剂，其中多价连接部分是双琥珀酰亚氨基甲基醚、4-(2, 2-二甲基乙酰基)苯甲酸、N-{2-N', N'-二(2-琥珀酰亚氨基乙基)氨基乙基}-N⁶, N⁹-二(2-甲基-2-巯基丙基)-6, 9-二氮杂壬酰胺、三(琥珀酰亚氨基乙基)胺、三(乙酰氨基乙基)胺、二-(乙酰氨基乙基)醚、二-(乙酰氨基甲基)醚、 α, ϵ -双乙酰基赖氨酸、赖氨酸和 1, 8-双乙酰氨基-3, 6-二氧杂辛烷，或其衍生物。

13. 权利要求 1、6 或 7 中任一项的试剂的得-99m 配合物。

14. 权利要求 13 的配合物，其中所述配合物是在还原剂存在下进行反应而制得的。

15. 权利要求 14 的配合物，其中还原剂选自连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子。

16. 用于制备放射性药物制剂的试剂盒，所说的试剂盒包括含有预定量权利要求 1、6 或 7 的试剂和足够量用于由 Tc-99m 标记肽的还原剂的封闭的小瓶。

17. 权利要求 1、6 或 7 的试剂在制备使哺乳动物体内各部位成象的组合物中的用途，其中试剂用 ^{99m}Tc 进行标记。

18. 制备权利要求 1、6 或 7 的试剂的方法，其中肽是在体外化学合成。

19. 权利要求 18 所述的方法，其中肽是通过固相肽合成法来合成。

10 20. 权利要求 1、6 或 7 的试剂，其中特异性结合肽是环肽。

21. 权利要求 1、6 或 7 的试剂，其中特异性结合肽是选自下列的环肽：

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRK.酰胺)

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCK.酰胺)

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCR.酰胺)

15 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKC.酰胺)

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.酰胺)

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKK.酰胺)

或

环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.酰胺)。

说明书

用于成象的铟-99m 标记的肽

5

发明的背景

1.发明的领域

本发明涉及放射性诊断试剂和肽，以及标记的放射性诊断剂的制备方法。更具体地说，本发明涉及肽、肽的制备方法和用于制备这类肽的试剂盒、以及使用这类肽使哺乳动物体内的各部位成象的方法，所说的哺乳动物体使用铟-99m (Tc - 99m) 通过放射性结合基团标记，所说的放射性键合基团与 Tc - 99m 形成中性配合物。

2.现有技术的描述

在核药物领域中，有时需要通过检测少量体内给药的放射性标记示踪化合物（称之为放射性指示剂或放射性药物）的分布来定位某些疾病症状或评估疾病症状的严重程度。用于检测这些放射性药物的方法通常被称之为成象方法或放射性成象方法。

在放射性成象中，放射性标记是发射 γ 射线的放射性核素，其中使用检测 γ 射线的照相机定位放射性指示剂（这种方法经常被称之为闪烁照相法）。成象部位之所以可检测是因为选择使用了可在病变部位定位的放射性指示剂（称为正反差法）或特定地选择使用了不能在病变部位定位（称为负反差法）的放射性指示剂。

必须考虑各种不同的因素以使人体放射性成象达到最佳化。为了使检测的效率达到最高，优选使用发射 γ 射线的能量为 100 至 200keV 的放射性核素。为了使病人获得最少量的放射性辐射，放射性核素的物理半衰期应短至仅能满足成象过程之所需。为了能够在每天及在每天的任何一个时间进行病理检查，优选在诊所地点始终有一个可获得的放射性核素源。

各种已知的放射性核素包括 ^{67}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m)、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{169}Yb 都可用于放射性成象。其中 Tc-99m 是优选的放射性核素，因为其发出能量为 140keV 的 γ 射线，且具有 6 小时的物理半衰期以及使用铟-99/铟-99m 发生器易于当地获得。

使用放射性标记肽的成象方法，其感光性要高于现有技术中使用其它已知放射性药物进行放射性成象的感光性。因为，放射性肽的特异性结合使放射性信号集中在检查所感兴趣的区域。与靶向物特异性结合的小分子合成肽可以优选地用作放射性指示剂的基质。这是因为：1.可用化学方法合成这类肽（不再要求其在生物系统中如细菌或哺乳动物细胞中制备，或者要求其从生物衍生的物质如蛋白质片段中分离）；2.它们是小分子，因而，可迅速地从体内除去那些与非靶向物结合的放射性指示剂，由此减少了背景（非靶向物）放射性和更好地确定靶向物；3.小分子的肽可以容易地经化学处理使其在特异性结合部位的亲合力达到最大。

10 小分子易于合成的标记肽优选用作日常使用的放射性药物。显然，目前仍需要有能直接注入病人体内并通过在疾病部位的定位使疾病部位成象的小分子合成的标记肽。由于 Tc - 99m 可用作成象用放射性核素的特性和特异性结合的小分子合成肽作为放射性指示剂分子的效用，Tc - 99m 标记的小分子合成肽作为 γ 射线闪烁照相法的放射性指示剂明显具有许多优点。

15 现有技术中已经报道了放射性标记的肽。

Ege 等人在美国专利 4, 832, 940 中教导了用于定位 T - 淋巴细胞成象的放射性标记的肽。

Olexa 等人，于 1982 年，在欧洲专利申请 823017009 中公开了选自从交联的血纤维蛋白分离得到的片段 E₁ 和从交联的血纤维蛋白分离得到的片段 E₂ 的药学上可接受的放射性标记的肽，和具有片段 E₁ 和片段 E₂ 之间的氨基酸序列中间体的肽。

Ranby 等人，于 1988 年，在 PCT/US88/02276 中公开了检测动物体内血纤维蛋白的方法，该方法包括将放射性标记的化合物共价结合到血纤维蛋白上。

25 Hadley 等人，于 1988 年，在 PCT/US88/03318 中公开了包括如下步骤的检测体内血纤维蛋白 - 血小板凝块的方法：(a) 给病人施用标记的稀释溶解血栓蛋白，其中标记选择性地连接在血纤维蛋白结合区域之外的那部分溶解血栓蛋白上；(b) 检测病人体内标记的溶解血栓蛋白的分布状况。

Lees 等人，于 1989 年，在 PCT/US89/01854 中教导了用于动脉成象的标记肽。

30 Sobel, 于 1989 年，在 PCT/US89/02656 中公开了使用标记的酶失活组织

纤维蛋白溶酶原激活剂定位动物体内一个或多个血栓位置的方法。

Stuttle, 于1990年, 在PCT/GB90/00933中公开了含有3至10个包含精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(RGD)序列的氨基酸并能结合到体内RGD结合部位上的放射性标记的肽。

- 5 Maraganore 等人, 于1991年, 在PCT/US90/04642中公开了放射性标记的血栓抑制剂, 其包含(a)抑制剂部分; (b)连接部分; 和(c)阴离子结合位置部分。

Rodwell 等人, 于1991年, 在PCT/US91/03116公开了“分子识别单元”与“效应物域”的共轭物。

- 10 Tubis 等人, 于1968年, 在Int. J. Appl. Rad. Isot. 19:835-840中描述了用镓-99m标记肽的方法。

Sundrehagen, 于1983年, 在Int. J. Appl. Rad. Isot. 34:1003中描述了用镓-99m标记多肽的方法。

- 15 在现有技术中, 螯合剂在放射性标记多肽方法中的应用以及使用Tc-99m标记肽和多肽的方法都是已知的, 并且公开在共同待审的美国专利申请07/653,012和07/807,062中, 这两篇专利申请在此引用作为参考文献。

- 20 尽管Tc-99m最适宜用于放射性成象, 但是, 目前对于Tc-99m化学特性的研究还不象对其它元素化学特性的研究那样全面。为此, 至今尚未大量使用由Tc-99m标记的方法。Tc-99m通常是以Tc-99m的高锝酸盐(TcO_4^- , 锝为+7价氧化态)的形式获得, 一般从钼-99/锝-99m发生器中得到。但是, 高锝酸盐不能良好地与其它化合物结合。因此, 为了放射性标记肽, 必需将Tc-99m的高锝酸盐转化成其它的形式。由于锝在水溶液中不能形成稳定的离子, 所以必需将其以配位化合物的形式置于一种溶液中, 所说的溶液具有足够的稳定性以阻止其分解并最终使Tc-99m转化成不溶的二氧化锝或再转化成高锝酸盐。
- 25

- 上述这类Tc-99m的配位化合物(以+1至+6价氧化态)是已知的。但是, 许多这类配位化合物由于其分子形状的原因而不适合用于放射性标记。为了进行放射性标记, 特别有利的是将配位化合物制成螯合物, 在该螯合物中通过单一的螯合配位体提供所有围绕锝离子的供电子团。由此, 通过
- 30 螯合剂和肽之间的单一连接体使螯合的Tc-99m共价结合到肽上。

这些配位体有时被称为具有螯合部分和连接部分的双功能螯合剂。这类

化合物在现有技术中也是已知的。

Byrne 等人在美国专利 4, 434, 151 中描述了高半胱氨酸硫羟内酯 (thiolactone) 衍生的双功能整合剂, 该整合剂能够使放射性核素偶合到含有氨基末端的化合物上, 所说的含有氨基末端的化合物能够在待成象的器官或组织中定位。

Fritzberg, 在美国专利 4, 434, 151 中描述了一系列以 2, 3 - 二 (巯基乙酰氨基) 丙酸盐为基质的镓整合剂。

Byrne 等人在美国专利 4, 571, 430 中描述了用于整合放射性核素的新的 5 高半胱氨酸硫羟内酯双功能整合剂, 该整合剂能够使放射性核素偶合到含有氨基末端的化合物上, 所说的含有氨基末端的化合物能够在待成象的器官或组织中定位。

Byrne 等人在美国专利 4, 575, 556 中描述了用于整合放射性核素的新的 15 高半胱氨酸 t 硫羟内酯双功能整合剂, 该整合剂能够使放射性核素偶合到含有氨基末端的化合物上, 所说的含有氨基末端的化合物能够在待成象的器官或组织中定位。

Davison 等人在美国专利 4, 673, 562 中描述了主要用作肾功能监视剂的二酰氨基 - 二硫代 - 配位体的镓整合物和其盐。

Nicolotti 等人在美国专利 4, 861, 869 中描述了用于与生物分子如抗体形成共轭物的双功能偶合剂。

Fritzberg 等人在美国专利 4, 965, 392 中描述了用于标记蛋白质的各种 20 S - 保护的以巯基乙酰基甘氨酸为基质的整合剂。

Fritzberg 等人在欧洲专利申请 86100360.6 中描述了用于制备镓标记的成象试剂的二巯基、二氨基、或二酰氨基羧酸或胺配合物。

Dean 等人, 于 1989 年, 在 PCT/US89/02634 中描述了用于放射性标记 25 蛋白质和肽的双功能偶合剂。

Flanagan 等人在欧洲专利申请 90306428.5 中公开了通过一组有机整合分子用 Tc - 99m 对合成肽片段进行标记的方法。

Albert 等人在欧洲专利申请 WO91/01144 中公开了使用放射性标记的肽进行放射性成象的方法, 所说的放射性标记的肽与生长因子、激素、干扰素 30 和细胞分裂素有关并含有共价连接在放射性核素整合基团上的特异性识别肽。

Dean 在共同待审的美国专利申请 07/653,012 中教导了用于制备肽的试剂和方法，所说的肽含有共价连接在用于体内放射性成象的特异性结合肽上的 Tc-99m 螯合基团，该美国专利申请在此作为参考文献使用。

5 Baidoo &Lever 于 1990 年，在 *Bioconjugate Chem*, 1:132-237 中描述了使用提供阳离子镓配合物的双巯基基团标记生命分子的方法。

可以简单地通过加入含巯基部分如半胱氨酸或巯基乙酸来标记肽。这类方法在现有技术中已有描述。

Schochat 等人在美国专利 5, 061, 641 中公开了对含有至少一个“悬挂的”巯基的蛋白质进行直接放射性标记的方法。

10 Dean 等人在共同待审的美国专利申请 07/807, 062 中教导了通过含有游离巯基的连接基团来放射性标记肽的方法，该美国专利申请在此作为参考文献使用。

Goedemans 等人在 PCT 申请 WO89/07456 中描述了使用环硫醇化合物，特别是 2 - 亚氨基硫醇和其衍生物放射性标记蛋白质的方法。

15 Thornback 等人在欧洲专利申请 90402206.8 中描述了使用含有巯基的化合物，特别是 2 - 亚氨基硫醇进行放射性标记的蛋白质的制备方法和应用。

Stuttle 在 PCT 申请 WO90/15818 中描述了 Tc-99m 标记含有 RGD 的低聚肽的方法。

20 Burns 等人，于 1985 年，在欧洲专利申请 85104959.3 中描述了用于制备少量中性 Tc-99m 脑成象剂的双胺双硫醇化合物。

Kung 等人于 1986 年，在欧洲专利申请 86105920.2 中描述了用于制备少量中性 Tc-99m 成象剂的双胺双硫醇化合物。

Bergstein 等人于 1988 年，在欧洲专利申请 88102252.9 中描述了用于制备少量中性 Tc-99m 脑成象剂的双胺双硫醇化合物。

25 Bryson 等人于 1988 年，在 *Inorg. Chem.* 27:2154-2161 中描述了对于过量配位体呈不稳定状态的镓-99 的中性配合物。

Misra 等人于 1989 年，在 *Tet. Let.* 30: 1885-1888 中描述了用于标记的双胺双硫醇化合物。

30 Bryson 等人于 1990 年，在 *Inorg. Chem.* 29:2948-2951 中描述了可以生成中性 Tc-99m 配合物的含有二个酰氨基、一个巯基和一个取代的吡啶基的螯合剂。

Taylor 等人于 1990 年, 在 J. Nucl. Med. 31:885 (摘要) 中描述了用于脑成象的中性 Tc-99m 配合物。

使用螯合剂对肽进行放射性标记, 和用 Tc-99m 标记肽的方法在现有技术中是已属已知技术, 并已公开在下面共同待审的美国专利申请中
5 07/653,012 、 07/807,062 、 07/871,282 、 07/886,752 、 07/893,981 、
07/955,466 、 08/019,864 、 08/073,577 、 08/210,822 、 08/236,402 和
08/241,625 。为使血栓成象而用作闪烁照相成象剂的标记肽在现有技术中也是已知的, 并已公开在下面共同待审的美国专利申请中 07/886,752 、
10 07/893,981 和 08/044,825 ; 以及公开在国际专利申请 PCT/US92/00757 、
PCT/US92/10716 、 PCT/US93/02320 、 PCT/US93/03687 、
PCT/US93/04794 、 PCT/US93/05372 、 PCT/US93/06029 、
PCT/US93/09387 、 PCT/US94/01894 、 PCT/US94/03878 和
PCT/US94/05895 。上述每篇文献以其整体在此被引用作为参考文献。

发明的简要说明

15 本发明提供了放射性标记肽的闪烁照相成象剂。本发明的放射性标记肽含有与体内的靶向物特异性结合的肽并共价连接到放射性标记结合部分, 其中放射性标记结合部分与放射性同位素相结合。本发明一个特有的优点就是放射性标记结合部分共价连接在含有肽的氨基酸残基的侧链上。

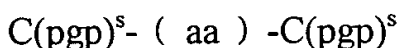
由于下述的多种原因, 上述这种共价连接模式十分有利。第一、与肽的
20 氨基酸组分的侧链形成共价连接避免了共价连接的放射性标记结合部分对于特异性结合肽的特异性结合特性的干扰。第二、这种连接方式可以使环肽(其定义是指端部不含有游离的氨基或羧基)与本申请公开的用作闪烁照相成象剂的放射性标记结合部分一起使用。第三、与氨基酸组分的侧链形成的共价连接可以使照相检查更为灵活地选取使用各种本发明的闪烁照相成象剂以最大
25 限度地提高效率和降低抗原性等。与氨基酸侧链的共轭作用使得放射性标记结合部分可以在肽的合成过程中以氨基酸共轭物的形式加入肽中, 或在肽的合成结束之后加入肽中。最后, 环肽公知是抗外蛋白酶消化的, 由此而将体内的这种提高了稳定性的肽结合至本发明的闪烁照相成象剂中。

本发明的第一个方面是提供可用于哺乳动物体内各部位成象的放射性
30 标记的肽。所说的肽包含具有氨基酸序列和与该肽共价连接的放射性标记结合部分的特异性结合的肽。另外, 放射性标记结合部分共价连接在包含该肽

的氨基酸的侧链上。在优选的实施方案中，放射性标记结合部分共价连接在具有包含胺或硫醇的侧链的氨基酸侧链上，氨基酸最优选的是赖氨酸或高半胱氨酸。在另一个优选的实施方案中，放射性标记是钨-99m。

5 本发明的第二个方面是提供一种用于制备哺乳动物体内各部位成象用的闪烁照相成象剂的试剂，所说的试剂包含特异性结合的肽，该特异性结合的肽中放射性标记结合部分通过肽的氨基酸的氨基酸侧链共价连接在该肽上，所说的放射性结合部分具有下面的通式：

I



10 其中 $(pgp)^s$ 是保护的半胱氨酸， (aa) 是任何不含硫羟基的初级 α -或 β -氨基酸。在优选的实施方案中，氨基酸是甘氨酸。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于制备哺乳动物体内各部位成象用的闪烁照相成象剂的试剂，所说的试剂包含特异性结合的肽，其中放射性标记结合部分通过肽的氨基酸的氨基酸侧链共价连接在该肽上，所说的
15 放射性结合部分具有下面的通式：

II



其中A是H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC或R⁴；B是H、SH或-NHR³，-N(R²)-(氨基酸或肽)或
20 R⁴；Z是H或R⁴；X是SH或-NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或R⁴；R¹、R²、R³和R⁴分别为H或直链或支链低级烷基或低级环烷基；n是0、1或2；其中(肽)是2至约10个氨基酸的肽；和；(1)当B为-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)时，X是SH和n是1或2；(2)其中当X为-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)时，B是SH和n是1
25 或2；(3)当B为H或R⁴时，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC，X是SH和n是0或1；(4)当A为H或R⁴，而其中的B为SH时，X是-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)和当X是SH时，B是-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)；(5)当X为H或R⁴时，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸
30 或肽)-OOC和B是SH；(6)当Z为甲基时，X是甲基，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC和B是SH和n

是0；和（7）当B为SH和X为SH时，n不为0；以及其中巯基部分为还原形式和其中（氨基酸）是任何不含巯基的初级 α -或 β -氨基酸。

在本发明这一方面的具体实施方案中，放射性标记结合的部分具有下面的通式：

- 5 II a. $-(\text{氨基酸})^1 - (\text{氨基酸})^2 - \{A-CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n-X\}$
 II b. $-\{A-CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n-X\} - (\text{氨基酸})^1 - (\text{氨基酸})^2$
 II c. $-(\text{伯}\alpha, \omega\text{-或}\beta, \omega\text{-二氨基酸}) - (\text{氨基酸})^1 - \{A-CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n-X\}$ 或
 II d. $-\{A-CZ(B) - \{C(R^1R^2)\}_n-X\} - (\text{氨基酸})^1 - (\text{初级}\alpha, \beta\text{-或}\beta, \gamma\text{-二氨基酸})$
- 10

其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²分别为任何天然生成的、修饰的、取代的或改变的不含巯基的 α -或 β -氨基酸；A是H、HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC或R⁴；B是H、SH或-NHR³、-N(R²)-(氨基酸或肽)或R⁴；Z是H或R⁴；X是SH或-NHR³、-N(R³)-(氨基酸或肽)或R⁴；R¹、R²、R³和R⁴分别为H或直链或支链低级烷基或低级环烷基；n是0、1或2；(肽)是2至约10个氨基酸的肽；和：（1）当B为-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)时，X是SH和n是1或2；（2）当X为-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)时，B是SH和n是1或2；（3）当B为H或R⁴时，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC，X是SH和n是0或1；（4）当A为H或R⁴，而B为SH时，X是-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)和当X是SH时，B是-NHR³或-N(R³)-(氨基酸或肽)；（5）当X为H或R⁴时，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC和B是SH；（6）当Z为甲基时，X是甲基，A是HOOC、H₂NOC、(氨基酸或肽)-NHOC、(氨基酸或肽)-OOC和B是SH和n是0；和（7）当B为SH和X为SH时，n不为0；以及其中巯基部分为还原形式。

15

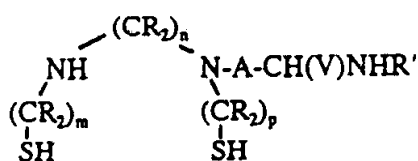
20

25

在另一个实施方案中，本发明提供了用于哺乳动物体内各部位成象的放射性标记的肽，所说的肽包含特异性结合的肽，该特异性结合的肽中放射性标记结合部分通过肽的氨基酸的氨基酸侧链共价连接在肽上，所说的放射性

30

II



5

其中每个 R 分别为 H、CH₃、或 C₂H₅；m、n 和 p 分别为 2 或 3；A 是直链或环状的低级烷基、芳基、杂环基、它们的组合或取代的衍生物；V 为 H 或 CO-肽；R' 为 H 或肽；其前提条件是当 V 为 H 时，R' 是肽，而当 R' 为 H 时，则 V 为肽。{为了本发明的目的，具有这些结构的放射性标记结合部分将被称之为“BAT”部分}。在优选的实施方案中，肽通过氨基酸共价连接到放射性标记结合部分，最优选的是氨基酸为甘氨酸，放射性标记为钆-99m。

在本发明上述这些方面的优选实施方案中，特异性结合化合物是包含 3 至 100 个氨基酸的肽。最优选的放射性标记是钆-99m。

15 本发明提供的特异性结合肽包括（但并不仅限于这些）具有下述序列的肽：

甲酰-MLF

(VGVAPG)₃ 酰胺

(VPGVG)₄ 酰胺

20 RALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

RALVDTEFKVKQEAGAK 酰胺

PLARITLPDFRLPEIAIP 酰胺

GQQHHLGGAKAGDV

PLYKKIIKLLES

25 LRALVDTLK 酰胺

GGGLRALVDTLK 酰胺

GGGLRALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

GGGRALVDTLKALVDTL 酰胺

GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR

30 PSPSPIHPAHHKRDRRQ 酰胺

GGGF_D.Cpa.YW_DKTFT 酰胺

GGCNP.Apc.GDC



{SYNRGDSTC}₃-TSEA

5 GGGLRALVDTLK 酰胺

GCGGGLRALVDTLK 酰胺

GCYRALVDTLKFVTQAEGAK 酰胺

GC(VGVAPG)₃ 酰胺。

10 本发明的试剂可以形成其中特异性结合化合物或放射性标记结合部分均共价连接在多价连接部分上，以便制备多体的多价闪烁照相成象剂，其中多体的多价闪烁照相成象剂的分子量小于 20,000 道尔顿。本发明的多价连接部分包含至少 2 个相同的能够共价结合到特异性结合化合物或放射标记结合部分上的连接体官能基团。优选的连接体官能基团是伯胺或仲胺、羟基、羧酸基团或巯基反应基团。在优选的实施方案中，多价连接部分包含双琥珀酰亚氨基甲基醚(BSME)、4-(2, 2-二甲基乙酰基)苯甲酸(DMAB)、三(琥珀酰亚氨基乙基)胺(TSEA)、N{2-N', N'-二(2-琥珀酰亚氨基乙基)氨基乙基}-N⁶, N⁹-二(2-甲基-2-巯基丙基)-6, 9-二氮杂壬酰胺(BAT-BS)、二-(乙酰氨基乙基)醚、三(乙酰氨基乙基)胺、二-(乙酰氨基乙基)醚、二-(乙酰氨基甲基)醚、 α, ϵ -二乙酰基赖氨酸、赖氨酸和 1,8-二乙酰亚氨基-3, 6-二氧杂辛烷。

15

20

25 本发明还包括本发明的肽和 Tc-99m 形成的配合物以及用 Tc-99m 放射性标记本发明肽的方法。本发明提供的放射性标记配合物是在还原剂存在下，由本发明的肽与 Tc-99m 反应而制得。优选的还原剂包括(但不限于这些)连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子。本发明的配合物还可以通过本发明提供的预还原的 Tc-99m 配合物的配位体交换用 Tc-99m 标记本发明肽而制得。

本发明还提供了用于制备由 Tc-99m 标记的本发明肽的试剂盒。用于由 Tc-99m 标记本发明肽的试剂盒包括一个含有预定量本发明的肽和足够量用于由 Tc-99m 标记肽的还原剂的封闭的小瓶。

30 本发明提供了通过体内的化学合成制备本发明肽的方法。在优选的实施方案中，肽通过固相肽合成方法来合成。

本发明提供了 Tc-99m 标记的肽通过在体内获得 γ 射线闪烁照相法成

象而使哺乳动物体内各部位成象的使用方法。这些方法包括施用诊断有效量的本发明的 Tc - 99m 放射性标记肽和检测在哺乳动物体内的检查部位定位的 Tc - 99m 发射的 γ 射线。

5 本发明特别优选的实施方案会通过下面一些优选实施方案和权利要求的更为详细的说明变得十分明显。

附图的简要说明

图 1 表示患有肿瘤大鼠体内的 $^{99m}\text{Tc} - \text{P587}$ 的成象。

发明的详细说明

10 本发明提供了用于在哺乳动物体内各靶向部位成象的 Tc - 99m 标记的肽，所说的肽包含通过氨基酸侧链共价连接在放射性标记结合部分上的氨基酸序列，其中放射性标记结合部分与放射性同位素相结合。

使用 Tc - 99m 进行标记是本发明的一个优点，因为这种同位素的核特性和放射特性使其成为一种理想的闪烁照相成象剂。这种同位素具有 140keV 的单一光子能和约 6 小时的放射性半衰期，并且易于从 $^{99}\text{Mo}, ^{99m}\text{Tc}$ 发生器中获得。在现有技术中已知的其它放射性核素则具有太长的有效半衰期（例如 ^{111}In 的半衰期为 67.4 小时）或者具有毒性（例如 ^{125}I ）。

在放射性标记结合部分和与该部分共价连接的肽中（所说的放射性标记结合部分含有共价连接在本发明提供的硫羟基保护基 $[(\text{pgp})^5]$ 上的硫羟基），硫羟基保护基可以相同或不同并可以是（但并不仅限于这些）：

- 20
- $\text{CH}_2 - \text{芳基}$ （芳基是苯基或烷基或烷氧基取代的苯基）；
 - $\text{CH} - (\text{芳基})_2$ ，（芳基是苯基或烷基或烷氧基取代的苯基）；
 - $\text{C} - (\text{芳基})_3$ ，（芳基是苯基或烷基或烷氧基取代的苯基）；
 - $\text{CH}_2 - (4 - \text{甲氧基苯基})$ ；
 - $\text{CH} - (4 - \text{吡啶基}) (\text{苯基})_2$ ；

25

 - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ；
 - 9 - 苯基苄基；
 - CH_2NHCOR （R 是未取代的或取代的烷基或芳基）；
 - $\text{CH}_2 - \text{NHCOOR}$ （R 是未取代的或取代的烷基或芳基）；
 - CONHR （R 是未取代的或取代的烷基或芳基）；

30

 - $\text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{苯基}$

优选的保护基具有通式 $-\text{CH}_2 - \text{NHCOR}$ ，其中 R 是具有 1 至 8 个碳原

子的低级烷基、苯基或有低级烷基、羟基、低级烷氧基、羧基或低级烷氧基羰基取代的苯基。最优选的保护基是乙酰氨基甲基。

本发明的每个含有特异性结合肽的实施方案都包含氨基酸序列。本发明中所用的术语氨基酸是指天然生成或非天然生成的所有L-或D-氨基酸。

5 本发明的肽可以在体内化学合成。通常，本发明的肽优选在氨基酸合成器中制备。本发明的肽也可以这样来合成，即其中使用本领域内的普通技术人员熟知的技术，使放射性标记结合部分在体外化学合成过程中共价连接到肽上。由于可以确定共价连接的具体部位，因此，这种在合成中共价连接到放射性标记结合部分上的肽是优选的。

10 本发明中特别优选将放射性标记结合部分通过靶向特异性结合肽的氨基酸侧链共价连接到肽上。上述的共价连接可以通过与特定的氨基酸侧链形成共价键而将放射性标记结合部分偶合到肽上来完成，或者也可以通过结合在肽合成中与放射性标记结合部分共轭的氨基酸来完成。

在前一种情况下，例如，在pH 8 - 10的条件下，将放射性标记结合部分 $\text{ClCH}_2\text{CO.Gly-Gly-Cys-Lys}$ 酰胺（特别是，在合成过程中，通过半胱氨酸残基中巯基的三苯甲基化来保护）偶合到生长激素释放的抑制因子受体结合的肽 $\text{cyclo. (N-CH}_2\text{) .Phc - Tyc - (p-Trp) -Lys-Val-Hcy}$ 上生成肽 $\text{cyclo. (N-CH}_2\text{) .Phc - Tyc - (p-Trp) -Lys-Val-Hcy. (CH}_2\text{CO) . Gly-Gly-Cys-Lys}$ 酰胺（接着脱去保护）。在上述该通式中，应该认识到放射性标记结合部分是共价连接在高半胱氨酸的侧链硫原子上。

20 在另一种情况下，通过使用在肽合成过程中制得的赖氨酸衍生物， $\text{Na (Fmoc) -N } \epsilon \text{ (N}^9\text{ - (叔丁氧基羰基) - N}^6\text{, N}^9\text{ - 二(2 - 甲基 - 2 - 三苯基甲基硫代丙基) - 6, 9 - 二氮壬酰基)}$ 赖氨酸将放射性标记结合部分 $\text{BAT (N}^6\text{, N}^9\text{ - 二(2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 6, 9 - 二氮壬酸)}$ 结合到白细胞结合肽，甲酰基 Met-Leu-Phe-Lys 酰胺上。

25 本发明其它的放射性标记结合部分可以在肽合成中引入靶向特异肽上。可以将含有吡啶甲酸的放射性标记结合部分共价连接到赖氨酸的 ϵ -氨基上得到，例如， $\alpha \text{N (Fmoc) -Lys- } \epsilon \text{N [Pic-Gly-Cys (保护基)]}$ ，其可以结合到肽链的任何位置上。该序列特别优选，因为其提供了易于结合到靶向物结合肽的模式。

30 在放射性铈和本发明肽的配合物的制备方法中，在还原剂存在下，铈配

合物，优选为 Tc-99m 的高锝酸盐，与本发明的肽进行反应。优选的还原剂是二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子。最优的还原剂是二氯化锡。在其它的优选实施方案中，还原剂是固相还原剂。配合物和制备这类配合物的方法通常是以一个试剂盒的形式提供，所说的试剂盒包含一个含有预定量待
5 标记的本发明的肽和足够量用于由 Tc-99m 标记肽的还原剂的封闭小瓶。另外，所说的配合物也可以通过本发明的肽与预选制得的锝和另一种作为转移配位体的已知化合物形成的易变配位化合物的反应而生成。该方法是被称之为配位体交换的已知方法并已为本领域内的普通技术人员所熟知。易变配位化合物可以使用象酒石酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐或甘露糖醇这样的转移配
10 位体来制备。本发明使用的 Tc - 99m 的高锝酸盐包括碱金属盐如钠盐、或铵盐或低级烷基铵盐。

在本发明优选的实施方案中，提供了用于制备锝标记的肽的试剂盒。本发明的肽可以使用本领域内的普通技术人员所熟知的和下述的方法和手段化学合成。由此制得的肽包含 3 - 100 个氨基酸残基，并且这种肽共价连接在
15 放射性标记结合部分上，所说的放射性标记结合部分与放射性同位素相结合。肽是以足以能满足用 Tc - 99m 标记肽的量被引入到含有还原剂如二氯化锡或固相还原剂的小瓶中。该小瓶中还包含了如上所述的转移配位体（如酒石酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐或甘露糖醇）。本发明的锝标记的肽可以通过将适量的 Tc - 99m 或 Tc - 99m 配合物加入到小瓶中并在下述实施例 3 中所
20 述的条件下进行反应来制备。

本发明提供的放射性标记的肽具有适量的放射性。在 Tc - 99m 放射性配合物的制备中，通常，优选制得在含放射性浓度为每毫升约 0.01 毫居里（mCi）至 100mCi 的溶液中的放射性配合物。

本发明提供的放射性标记的肽可以用于使哺乳动物体内各部位显象。根据本发明，将锝标记的肽以一个单位的可注射剂量给药。任何本领域内的普通技术人员所熟知的常用载体，如无菌盐水溶液或血浆都可以在放射性标记之后，用于制备可注射的溶液。所说的可注射溶液根据本发明的方法使各器官、肿瘤等诊断成象。通常，给药的单位剂量具有的放射性为约 0.01 mCi 至
25 100 mCi，优选 1 至 20 mCi。以单位剂量注射的溶液为约 0.01 毫升至约 10
30 毫升。在静脉注射给药之后，可以在几分钟内使体内的器官或肿瘤成象。但是，如果需要，也可在放射性标记肽注射入病人体内数小时或更长的时间之

后成象。在大多数情况下，在 0.1 小时内，给药剂量中有足够量的放射性标记肽在待成象的区域积累以进行闪烁照相。任何诊断用的常用闪烁照相成象方法都可用于本发明。

5 可以将本发明提供的镓标记的肽和配合物置于任何静脉注射常用的介质如盐酸水溶液介质或血浆介质中并通过静脉注射给药。上述这种介质还可含有常用的药物添加剂物质如用于调节渗透压的药学上可接受的盐、缓冲剂、防腐剂及类似物质。优选的介质是常用的盐水和血浆。

下面将用实施例更为全面地说明制备和标记这些化合物的方法。这些实施例说明了上述方法的一些方面和有利的效果。它们只是用于说明本发明，
10 而并不是用来限定本发明。

实施例 1

固相肽合成

使用 Applied Biosystems Model 431A 肽合成反应器和使用二环己基碳化二亚胺/羟基苯并三唑或 2 - (1H - 苯并三唑 - 1 - 基) - 1, 1, 3, 3
15 - 四甲基脲六氟磷酸酯/羟基苯并三唑 (HBTU/HOBT) 与 9 - 芴基甲氧基羰基 (Fmoc) 偶合的氨基末端保护和使用用于羧基末端酸的对羟基甲基苯氧基甲基聚苯乙烯 (HMP) 树脂或用于羧基末端酰胺的 Rink 酰胺树脂, 以 0.25 毫摩尔 (mmole) 的规模, 进行固相肽合成 (SPPS)。在室温下, 使用含有三乙酸、水、苯硫基甲烷、乙二硫醇和三乙基硅烷 (含量比为 100 : 5 : 5 :
20 2.5) 的溶液将树脂结合产物裂解 1.5 - 3 小时。

在适当的情况下, 通过下述步骤以引入 α N - 甲酰基, 即用在 98 % 甲酸中的过量乙酸酐处理裂解和去保护后的肽, 并搅拌约 18 小时, 然后使用 HPLC 提纯。在适当情况下, 通过用 20 % (体积/体积) 在 NMP (N - 甲基吡咯烷酮) 中的乙酸酐对结合在树脂上的游离 N - 氨基末端肽处理 30 分钟
25 以引入 N - 乙酰基末端。通过使用作为 SPPS 中待偶合的最后残基的 2 - 卤代乙酸或者通过用 2 - 卤代乙酸/二异丙基碳化二亚胺/在 2 - 卤代乙酸酐的 NMP 中的 N - 羟基琥珀酰亚胺/在 NMP 中的二异丙基乙胺处理与树脂结合的游离 N - 末端氨基肽以引入 2 - 氯乙酰基和 2 - 溴乙酰基。在适当的情况下, 通过下述方法使 HPLC 提纯的 2 - 卤代乙酰化的肽环化, 所述的方法包
30 括将在含或不含 0.5-1.0 毫摩尔 EDTA 的碳酸氢钠或氨水缓冲液 (pH8) 中的 0.1-1.0 毫克/毫升溶液搅拌 1 - 48 小时, 然后用乙酸酸化, 冷冻干燥和使

用 HPLC 提纯。在适当的情况下，通过用 0.006 摩尔 $K_3Fe(CN)_6$ 的等分试样处理以 0.1 毫克/毫升的浓度处于 pH7 缓冲溶液中的前体半胱氨酸 - 游离巯基肽直至其保持稳定的黄色以使 Cys-Cys 二硫醚键发生环化。用过量的半胱氨酸还原过量的氧化剂，冷冻干燥混合物，然后用 HPLC 提纯。

- 5 在适当的情况下，通过使用二异丙基碳化二亚胺和 N - 羟基琥珀酰亚胺使吡啶甲胺共轭到前体肽上以引入“Pica”基团。通过使用作为 SPPS 中待偶合的最后残基的 BAT 酸或用 BAT 酸/二异丙基碳化二亚胺/在 NMP 中的 N - 羟基琥珀酰亚胺处理结合在树脂上的 N - 末端游离氨基肽以引入 BAT 配位体。通过下述方法使[BAM]共轭到肽上，所述方法包括，首先使用在 DMF、
- 10 NMP 或 CH_2Cl_2 中的二异丙基碳化二亚胺/N - 羟基琥珀酰亚胺或 HBTU/HOBt 的混合物活化肽羧酸酯，然后，在二异丙基乙胺存在下，使其偶合；偶合后，按照上述的方法使所得的共轭物去保护。

在适当情况下，在室温下，通过含单一巯基的肽（浓度为 5 - 50 毫克/毫升，在 50 毫摩尔磷酸钠缓冲液中的溶液，PH8）与预先溶解在乙腈中的

15 0.5 摩尔当量 BMME（二马来酰亚氨基甲基醚）反应约 1 - 18 小时制备 BSME 加成物。将反应所得溶液浓缩并用 HPLC 提纯浓缩得到的产物。

在适当情况下，在室温下，通过含单一巯基的肽（浓度为 10 - 100 毫克/毫升，在 DMF 中的肽溶液或浓度为 5 - 50 毫克/升，在毫克磷酸钠（PH8）/乙腈或 THF 中的肽溶液）与预先溶解在乙腈中或 DMF 中的含或不合 1 摩尔

20 当量三乙醇胺的 0.33 摩尔当量的 TMEA（三（2 - 马来酰亚氨基乙基）胺（其公开在美国专利申请 08/044，825 中，该申请在此引用作为参考文献））反应约 1 - 18 小时制备 TSEA 加成物。将含有加成物的反应混合物浓缩，然后再用 HPLC 提纯该加成物。

在适当情况下，在室温下，通过通过含有单一巯基的肽（浓度为 2 - 50

25 毫克/毫升，在 50 磷酸钠（PH8）/乙腈或 THF 中的肽溶液）与预先溶解在乙腈或 THF 中的 0.5 摩尔当量的 BAT - BM（N - [2 - （N',N' - 二（马来酰氨基甲基硫代丙基）氨基乙基）] - N⁹ - （叔丁氧基羰基） - N⁶，N⁹ - 二（2 - 甲基 - 2 - 三苯基甲基硫代丙基） - 6，9 - 二氮壬酰胺）（其公开在美国专利申请 08/044，825，该申请在此引用引用作为参考文献）反应约

30 1 - 18 小时制备 BAT - BS 加成物。将反应所得溶液蒸发至干并通过用 10 毫升 TFA 和 0.2 毫三乙基硅烷处理 1 小时使[BAT-BS] - 肽共轭物去保护。将

溶液浓缩，用乙醚使产物加成物沉淀，然后再用 HPLC 浓缩。

通过制备性高压液相色谱 (HPLC) 分离提纯粗产物肽，其中使用 Waters Ddlta Pak C18 柱和使用 0.1 % 三氟乙酸在由乙腈改性的水中的溶液进行梯度洗脱。在乙腈从洗脱馏份中蒸除之后，将该洗脱馏份冷冻干燥。由快速原子
5 爆炸质谱 (FABMS) 确认每种产物都相同。

实施例 2

用 Tc - 99m 进行放射性标记的一般方法

将 0.1 毫克实施例 2 中制得的肽溶解在 0.1 毫升水或 50 毫升磷酸钾缓冲液中 (PH = 5.6 或 7.4)。通过下述方法制备 Tc - 99m 的葡庚糖酸盐，该方
10 法包括用含有至多 200mCi 的 1.0 毫升 Tc - 99m 高锝酸钠再配制一个 Glucoscan 小瓶 (E.I. DuPont de Nemours, Inc.) 并将其在室温下放置 15 分钟。然后，将 25 微升 Tc - 99m 的葡庚糖酸盐加入到肽中，并使其在室温下或 100 °C 下反应 15 - 30 分钟，通过 0.2 微米过滤器过滤。

通过使用下述条件的 HPLC 测定 Tc - 99m 标记肽的纯度：用放射性标
15 记肽装载 Waters DeltaPure RP-18,5 μ, 150 毫米 × 3.9 毫米分析柱；以 1 毫升/分钟的溶剂流速洗脱肽。经 20 分钟从 10 % 溶剂 A (0.1%CF₃COOH/H₂O) 至 40% 溶剂 B₉₀ (0.1%CF₃COOH/90%CH₃CN/H₂O) 进行梯度洗脱。

使用与积分记录器相连的联机放射性检测器检测放射性组分。在上述条
20 件下，在 1 至 4 分钟之间洗脱 Tc - 99m 的葡庚糖酸盐和 Tc - 99m 高锝酸钠，而 Tc - 99m 标记肽则在很长一段时间之后才洗脱。

下面的表格说明了用上述方法对实施例 2 制得的肽成功地进行了 Tc - 99m 标记。

表 I

肽	FABMS MH ⁺	放射性化学物质 收率 (%) *	HPLC R _T (分钟)
环 (<u>N - 甲基</u>) FYW _D KV.Hcy. (CH ₃ CO.GGC.酰胺)	1129	98 ¹	15.1,17.2

表 I(续)

环(N - 甲基) FYW _D KV.Hcy. (CH ₂ CO.GGCK. 酰胺)	1258	99 ²	15.0
环(N - 甲基) FYW _D KV.Hcy. (CH ₂ CO.GGCR. 酰胺)	1285	99 ¹	15.1
环(N - 甲基) FYW _D KV.Hcy. (CH ₂ CO.GGCKK. 酰胺)	1386	N.D	N.D
环(N - 甲基) FYW _D KV.Hcy. (CH ₂ CO.GGC.Om. 酰胺)	1244	98 ³	7.0

*上标是指下面的标记条件:

1 = 室温下, 在 10 % HPCD 中,

2 = 在室温下, 在 50/50 乙醇/水中

5 3 = 在 100 °C, 在 0.9 % NaCl 中

HPLC 方法 (用 R_T 后的上标表示):

Waters-1 柱, 在 10 分钟内 100 % 溶液 A→100 % 溶液 B

10

15

5
10
15
20
25
30

表 II

肽	FAB/MS MH ⁺	放射性化学物质 收率(%) ^a	HPLC R _T (分钟)
甲酰基-MLFK.(BAT). 酰胺	884	99	12.6
甲酰基-MLFK.(BAT)	884	96	11.9, 12.8
甲酰基-MLFK.(BAT).KKKKK. 酰胺	1524	96	11.7, 12.2
甲酰基-MLFK.(BAT).GSGSGS. 酰胺	1315	97	11.9, 12.8
甲酰基-MLFK.(BAT).E	1013	99	12.3
甲酰基-MLFK.(BAT).EGE	1200	98	13.7
甲酰基-MLFK.(BAT.)GGC _{AcM} .GC _{AcM} .GGC. 酰胺) ₂ -BSME	3477	99	11.9, 12.4
YRALVDTLKFVTQAEQAK.(BAT). 酰胺	2329	98	11.4
K.(BAT).D.Nal.C _{Mc} .YW _D KVC _{Mc} .T. 酰胺	1573	97	12.0, 12.5
(DTPA).{p-Nal.SYW _D KVTK.(BAT)} ₂ . 酰胺	3210	97	12.1, 12.5
(DTPA).{p-Nal.SYW _D KVTK.(BAT)}. 酰胺	1801	96	11.8, 12.0
(DTPA)K.(BAT).p-Nal.C _{Mc} .YW _D KVC _{Mc} .T. 酰胺	1949	96	11.8, 12.0
pGlu.GVNDNEEGFFSARK.(BAT). 酰胺	1997	N.D.	N.D.

*下述是相应的肽使用的标记条件:

1. 将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液 (PH7.4) 中并在室温下标记.
2. 将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液 (PH7.4) 中并在 100 °C 下标记.
3. 将肽溶解在水中并在室温下标记.
- 5 4. 将肽溶解在水中并在 100 °C 下标记.
5. 将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液 (PH6.0) 中并在 100 °C 下标记.
6. 将肽溶解在 50 毫摩尔磷酸钾缓冲液 (PH5.0) 中并在室温下标记.

**HPLC 方法:

- 10 一般方法: 溶剂 A = 0.1%CF₃COOH/H₂O
溶剂 B₇₀ = 0.1%CF₃COOH/70 % CH₃CN/H₂O
溶剂 B₉₀ = 0.1%CF₃COOH/90 % CH₃CN/H₂O
溶剂流速 = 1 毫升/分钟

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

- 15 Brownlee 柱 = Brownlee Spheri - 5 RP - 18, 5 μ × 220 毫米 × 4.6 毫米分析柱

Waters 柱 = Waters Delta-Pak C18, 5 μ m, 39 毫米 × 150 毫米

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

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

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

- 20 方法 4: Brownlee 柱 10 分钟内从 100 % A 至 100 % B₉₀

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

用单一字母缩写表示氨基酸可以在 G. Zubay, Biochemistry (2d.ed.), 1988 (MacMillen Publishing: New York) 第 33 页上找到; Ac=乙酰基; Pic = 吡啶甲酰基 (吡啶 - 2 - 羧基) = 6 -

- 25 氨基己酸; Hly = 高赖氨酸 (homolysine); AcM=乙酰亚氨基甲基; pGlu=焦谷氨酸; Mob=4-甲
氧基苄基; Pica=吡啶甲基胺 (2 - (氨基甲基) 吡啶); Apc=L-[S- (3 - 氨基丙基) 半胱氨酸; F_D

= D-苯基丙氨酸; W_D = D-色氨酸; Y_D = D-酪氨酸; Cpa=L (4-氯苯基) 丙氨酸; Thp = 4 -

- 氨基 - 四氢噻喃 - 4 - 羧酸; ma=巯基乙酸; D-Nal = D-2-萘基丙氨酸; Dpg=二丙基甘氨酸;
Nle=正亮氨酸; BAT = N⁶, N⁹ - 二 (2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 6, 9 - 二氮壬酸; BAT 酸 (保

- 30 护的) = N⁹ - (叔丁氧基羰基) - N⁶, N⁹ - 二 (2 - 甲基 - 2 - 三苯基甲基硫代丙基) - 6, 9 -
二氮壬酸; BAM = N¹, N⁴ - 二 (2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 1, 4, 10 - 三氮癸烷; BAM (保
护的) = N¹ - (叔丁氧基羰基) - N¹, N⁴ - 二 (2 - 甲基 - 2 - 三苯基甲基硫代丙基) - 1, 4,

10 - 三氯癸烷; [BAT-BM] = N - [2- (N',N'-二 (2 - 马来酰亚氨基乙基) 氨基乙基)-N⁹- (叔丁氧基羰基) - N⁶, N⁹ - 二 (2 - 甲基 - 2 - 三苯基甲基硫代丙基) - 6, 9 - 二氮壬酰胺; [BAT-BS]=N-[2- (N',N'-二 (2 - 琥珀酰亚氨基乙基) 氨基乙基)- N⁶, N⁹ - 二 (2 - 巯基 - 2 - 甲基丙基) - 6, 9 - 二氮壬酰胺; [BMME] = 二马来酰亚氨基甲基醚; [BSME] = 二琥珀酰亚氨基甲基醚; 5 [DTPA] = 二亚乙基三胺五乙酸; Amp=4 - 咪基苯基丙氨酸。

实施例 3

在高胆固醇血症兔子模型中使用 Tc - 99m 标记化合物 P215 使动脉粥样硬化斑定位和体内成象

10 将 22 个两种性别体重为 2 - 3 公斤的新西兰白兔 (NZW) 分成两组。将对对照组的兔笼养并喂食商购的兔食 (Purina)。从 7 周龄开始给 HC 组的兔喂食标准化的高胆固醇食物 (混合了 1 % 重量/重量浓度的胆固醇的兔食) 直至兔长到 28 周龄。给所有的兔随意喝水。

15 按照上述实施例 1 的方法制备 Tc - 99m 标记的 P215 ({BAT}.RAIVDTLKFVTQAEGAK 酰胺)。用 140 - 160mCi 的 Tc - 99m 标记约 250 - 400 微克的肽并将其制成在 0.2 毫升体积剂量中含 7 - 8mCi (12.5 - 20.0 微克/兔; 6 - 7 微克/公斤) 的单位剂量。以慢速浓输液的方式 (约 0.1 毫升/分钟) 从兔耳外侧的静脉给成年兔静脉给药 Tc - 99m 标记的肽。使用装有针孔准直器 (5 毫米孔) 和 Tc - 99m 的能量视窗组并且程序设置为累计计数 500.000 次或扫描所需时间的 γ 射线照相机来获得成象。

20 在成象前的瞬间, 使用克他命和甲苯噻嗪的混合物麻醉动物 (5:1,1 毫升/公斤肌肉内给药)。

25 在心脏正上方的 40° - 50° 处 (左斜前方取景区) 收集 γ 射线照相成象以勾画出主动脉弓并检查下行的主动脉。在注射后的 1 小时和 2 小时得到成象, 在注射后的 3 小时和 5 小时或性地得到成象。在每次收集成象之前根据需要对动物进行补充麻醉。

30 在 2.5 小时 (在 2 小时扫描之后) 时, 给动物施用静脉剂量的戊巴比妥钠以使其致死。根据验尸, 从中腹区的主动瓣膜中移出主动脉和切除分枝血管。使用平行孔准直器, 再从躯体外使主动脉成象。然后, 纵向打开主动脉并用苏丹第四染色, 由此使动脉粥样硬化斑变成深砖红色。脱脂的和未损伤的主动脉内皮仍保持其原样, 并且在这些条件下所说主动脉内皮的外观呈现白桃红色。在体内和体外的 Tc - 99m P215 成象中的正反差和在 HC - 处理

的兔主动脉中苏丹IV 的沉积图案表明, 本发明的闪烁照相成象剂能够使动脉粥样硬化斑成象。

实施例 4

在体内使用 Tc - 99m 标记的化合物 P357 使犬模型的深静脉栓塞成象

5 肌肉注射给药克他命和乙酰丙嗪的结合物使 Mongrel 狗镇静, 然后, 静脉注射给药戊巴比妥钠使其麻醉。将 18 号口径的血管导管 (angiocath) 从右侧股骨静脉的靠远端的一半处插入静脉并将由 8 毫米 Dacron[®] 缠绕的不锈钢绕制线圈 (Cook Co., Bloomington IN) 置于每个动物接近股骨中部的股骨静脉中。取出血管导管, 缝合伤口并通过 X 光记录线圈的移动。然后, 使
10 各动物过夜后苏醒。

在线圈移动一天后, 将每个动物再次麻醉, 在动物的每个前肢上经静脉输液生理盐水并插膀胱导管收集尿样。将动物仰卧置于低耗能状态, 且在装有各种用途准直器的 γ 射线照相机下, 使 Tc - 99m 达到光峰。在 Nuclear Mac 计算机系统中获得成象。

15 将 Tc - 99m 标记的 P357 { ($\text{CH}_2\text{CO}-\text{Y}_D\text{.Apc.GDCGGC}_{\text{Acm}}\text{GC}_{\text{Acm}}\text{GGC.酰胺}$)₂ - [BAT-BS]} {185-370mBq (5-10mCi) Tc - 99m 和 0.2-0.4 毫克 P357} 注射进入插入点处的一条前肢静脉血管中。保持第二条前肢血管用于收集血样。在注射后约 10 - 20 分钟和在注射后约 1, 2, 3, 和 4 小时, 获取 500, 000 次或 20 分钟的 (无论哪种方式, 只选取更短时间的那种) 腿部的腹面成
20 象。 通过心内注射或药团静脉注射给药安乐死剂量的饱和氯化钾溶液, 然后用肝磷脂注射器通过心脏穿刺收集两种血样。将含有血栓的股骨静脉和大腿肌肉试样细心地剖开分离。然后, 从血管中切割下血栓并置于预先称重的试管中。称重血栓试样并用 Tc - 99m 通道中的 γ 井式计数器计数。另外, 还计数已知馏份的注射剂量。

25 测定新鲜的血栓重量、安乐死之前获得的血栓和血液中的百分注射剂量 (% ID) / 克以及血栓/血液比和血栓/肌肉比。通过对在靶向区 (ROI) 中测得的计数/象素的分析来确定血栓/背景比率, 所说的靶向区是根据储存在计算机中的成象, 在血栓和其相邻肌肉区域上画出的。

上述所得结果用来说明可以在体内迅速而有效地定位深静脉血栓。

30

实施例 5

闪烁照相成象和 Tc - 99m 标记的肽的生物分布

为了说明上面给出的 Tc - 99m 标记肽的作用，在新西兰白兔的左腓肠部上肌肉内注射大肠杆菌有效染剂。在肌肉内注射克他命和甲苯噻嗪使动物镇静 24 小时之后，给动物静脉注射 Tc - 99m 标记的肽 (≤ 150 微克, 2 - 10mCi)。将动物以仰卧姿式置于 γ 射线照相机 (LEAP 准直器/Tc - 99m 达到光峰) 的取景区中，并在注射 1 小时后开始成象，然后，在此后的 3 小时内每间隔约 1 小时进行成象。在获取成象和根据需要再次使动物麻醉之间使动物苏醒。

在完成最后一次成象后，通过静脉注射过量的苯巴比妥使每个动物致死，并解剖获取血样和感染组和对照组肌肉组织的试样。称重组织试样，使用 γ 计数器计数组织试样和注射剂量的标准量，并测定留在组织中的百分注射剂量 (每克组织)。对于每种肽计算出每克感染组织的百分注射剂量，感染肌肉组织与非感染肌肉组织的比率，以及感染肌肉组织与血液的比率。下面的表中给出了使用具有下述通式的本发明 Tc - 99m 标记试剂所获得的这些结果：

15 甲酰基 MLFK (BAT) . 酰胺

表 III

肽	A	B	C	D	E
甲酰基 MLFK(BAT). 酰胺	0.0215	0.0028	7.68	0.006	3.58

A=%ID/克感染的肌肉

B=%ID/克对照组的肌肉

C=感染的肌肉与对照组的肌肉之比

20 D=%ID/克血液

E=感染的肌肉与血液之比

实施例 6

用大鼠肿瘤表达的生长激素释放抑制因子受体 (SSTR) 的定位和体内成象

25 用基本上如 Bakker 等人 (1991, Life Sciences 49:1593-1601) 所述的方法进行由大鼠肿瘤细胞表达的生长激素释放抑制因子受体的体内成象。

将采样并冷冻的肿瘤接髓质解冻后获得的 CA20948 鼠的胰肿瘤细胞，以每个动物 0.05-0.1.05-0.1 毫升细胞悬浮液的剂量，通过肌肉注射植入 6 周龄 Lewis 鼠的右后腿。使肿瘤长至约 0.5-2 克，采样，并将肿瘤接髓质植入第

二个鼠，自然组 Lewis 鼠。重复这种转种方式以生产患肿瘤动物的下一代。用于体内研究的患肿瘤动物通常是第三至第五代转种的且长有 0.2-2 克肿瘤的鼠。

5 为了研究放射性试剂对于肿瘤的特异性，在注射放射性试剂之前 30 分钟，给选择的动物施用皮下 SSTR 阻断剂量（4 毫克/公斤）的奥曲肽（Bakker 等人已对此发表了实验报告，其结果是 ^{111}In -[DTPA]奥曲肽肿瘤吸收下降了 40 %）。

10 将第三至第五代转种的 CA20948 患有肿瘤的 Lewis 鼠禁锢并通过背侧的尾静脉注射，对应于 0.2-0.4 毫升中 3 - 8 微克肽，剂量为 0.15-0.20mCi 的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - 标记的肽。

在选定的时间，将动物颈部脱位而致死并对其进行选择性的验尸。称重采样的组织试样并在 γ 井式计数器中逐个计数注射剂量的可分量。

15 表 1 中给出了选择的放射性标记肽的 90 分钟生物分布。其中 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P587、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P617、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P726、和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P736 显著地表明非常高的肿瘤吸收，肿瘤/血液比率表明了它们在靶向（肿瘤）组织中高的特异性吸收。

图 1 表明了患肿瘤鼠中 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P587 的成象。在腿下部（箭头所指部分）肿瘤中的高吸收清晰可见。

20 对于经预先注射 奥曲肽 处理或没有经预先注射 奥曲肽 处理两种情况，比较 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P587 在鼠肿瘤中的吸收，其中已经知晓生长激素释放抑制因子结构类似物结合在体内的生长激素释放抑制因子受体之上。在这些实验中，通过在施用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P587 之前施用 奥曲肽 而阻断受体可使放射性标记肽的特异性肿瘤吸收下降 76 %。这些结果证实体内 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - P587 的结合是 SSTR 特异性。

25

30

表 IV

序号	肽	% ID/克		
		肿瘤	血液	肿瘤/血液
P736	环(N - 甲基) <u>FYW_DKV.Hcy.</u> (CH ₂ CO.GGCRK. 酰胺)	2.1	0.24	9
P587	环(N - 甲基) <u>FYW_DKV.Hcy.</u> (CH ₂ CO.GGCK. 酰胺)	3.4	0.61	6
P617	环(N - 甲基) <u>FYW_DKV.Hcy.</u> (CH ₂ CO.GGCR. 酰胺)	6.7	0.73	9
P726	环(N - 甲基) <u>FYW_DKV.Hcy.</u> (CH ₂ CO.KKC.酰 胺)	2.5	0.30	8

5 应该认识到上述公开的本发明的一些具体实施方案以及所有在此基础上所做的改进或变化的等同物都在本申请权利要求中所述的本发明的精神和保护范围之内。

说明书附图

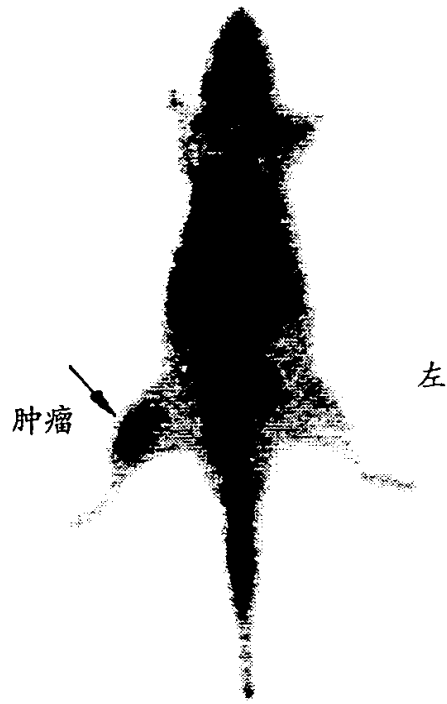


图 1