



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101107016 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200580047072. 0

(22) 申请日 2005. 11. 21

(30) 优先权数据

20045081 2004. 11. 22 NO

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 07. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NO2005/000435 2005. 11. 21

(87) PCT申请的公布数据

WO2006/054904 EN 2006. 05. 26

(73) 专利权人 通用电气医疗集团股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 D·洛夫豪格 M·埃里克森

H·B·菲耶丁斯塔 A·赫利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘冬 刘玥

(51) Int. Cl.

A61K 49/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03 / 006491 A2, 2003. 01. 23, 权利要求

1, 说明书第 6 页, 20 — 30 行, 第 7 页第 1 行至第 9 页第 10 行, .

WO 01/77145 A2, 2001. 10. 18, 说明书第 7-9 页, 权利要求 1-9, 图 1.

WO 02/055111 A2, 2002. 07. 18, 说明书第 206 页, 化合物 Y-90, 实施例 18, 52-54.

Andreas Becker, et al. Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. 《nature biotechnology》. 2001, 第 19 卷 327-331.

审查员 张溪

权利要求书 2 页 说明书 17 页

(54) 发明名称

靶向细胞外基质的造影剂

(57) 摘要

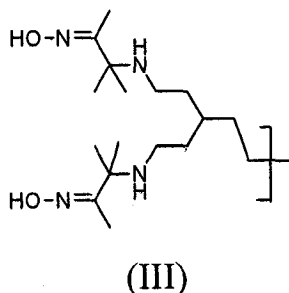
一种通式 (I) 的造影剂: $Z_1-L-V-Z_2(I)$; 其中存在至少 Z_1 和 Z_2 之一, 它们是在人或动物体体内成像中相同或不同的可检测指示部分, V 是与胶原形成区域有结合亲和力的靶向部分, L 是共价键、生物修饰物或连接部分。

1. 一种通式 (I) 的造影剂：



其中

Z_1 为式 Y_1M 的指示部分, 其中 M 为 ^{99m}Tc , Y_1 是式 (III) 的螯合剂,



Z_2 为包含 2 个或多个磺酸部分的菁染料；

L 是共价键或

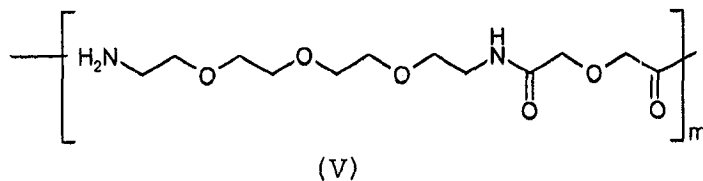
(i) 表示含有 1-10 个氨基酸残基的肽

(ii) 表示甘氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或丝氨酸残基；

(iii) 含有一个或多个二羧酸单元、乙二醇单元或 PEG 样成分或其组合；

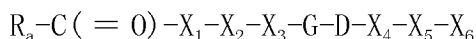
(iv) 含有一个或多个羟乙酰基或琥珀酰基单元或其组合；或

(v) 表示生物修饰物单元, 所述单元含有式 (V) 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七烷酸的单分散 PEG 样结构,



其中 m 等于 1-10 的整数, C 末端单元是酰胺部分；

V 为式 (VI) 的部分



(VI)

包含 2 个环化桥, 其中

X_1 表示共价键或 1、2、3、4 或 5 个氨基酸残基；

X_2 和 X_4 独立表示能形成环化桥的氨基酸残基；

X_3 表示精氨酸或 N-甲基精氨酸；

X_5 表示疏水氨基酸或其衍生物, 所述衍生物选自 3-碘-酪氨酸或萘丙氨酸；

X_6 表示能形成环化桥的氨基酸残基,

R_a 表示能形成桥至 X_2 、 X_4 或 X_6 之一的 $-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-$ 部分；

n 表示 1-10 的正整数。

2. 权利要求 1 的造影剂, 其中

X_1 表示 1、2、3、4 或 5 个选自以下的氨基酸残基：天冬氨酸或谷氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸或二氨基丙酸。

3. 权利要求 1 或 2 的造影剂, 其中

X_2 和 X_4 独立表示形成二硫键或硫醚键的半胱氨酸或高半胱氨酸残基,或能形成环化桥的天冬氨酸或赖氨酸残基。

4. 权利要求 1 的造影剂,其中

X_2 和 X_4 独立表示半胱氨酸或高半胱氨酸残基。

5. 权利要求 1 的造影剂,其中

X_5 表示酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸或萘丙氨酸残基。

6. 权利要求 1 的造影剂,其中

X_6 表示含巯基氨基酸残基。

7. 权利要求 1 的造影剂,其中

X_6 表示半胱氨酸或高半胱氨酸残基。

8. 一种放射性药物组合物,所述组合物包含有效量的权利要求 1-7 中任一项定义的通式 (I) 造影剂或其盐,以及一种或多种药物可接受赋形剂,用于增强在体内成像中的图像对比。

9. 权利要求 1-7 中任一项定义的通式 (I) 造影剂用于制备造影剂的用途,所述造影剂用于胶原形成相关疾病的诊断方法。

10. 权利要求 1-7 中任一项定义的通式 (I) 造影剂在制备造影剂组合物中的用途,所述造影剂组合物用于包括产生至少部分所述机体的图像的方法。

11. 一种用于制备放射性药物组合物的试剂盒,所述组合物包含权利要求 1 中定义的通式 (I) 造影剂,所述试剂盒包含配体-螯合剂缀合物和还原剂。

12. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述还原剂是亚锡盐。

13. 权利要求 11 和 12 中任一项的试剂盒,所述试剂盒另外包含一种或多种用于冻干的稳定剂、抗氧化剂、填充剂,和增溶剂。

靶向细胞外基质的造影剂

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及新的造影剂及其在诊断成像技术中的用途。更具体地说本发明涉及包含靶向载体的造影剂,该载体结合胶原形成区域和细胞外基质ECM。这种造影剂可用于活性纤维化(胶原沉积)的靶向和许多疾病病症的诊断,病症例如心衰、肝和肺纤维化、腹膜后纤维化、动脉粥样硬化、关节炎、癌症和皮肤病症。这种造影剂可进一步用于显示慢性结缔组织炎症性疾病、瘢痕组织和粘连,观察梗死大小,显示早期梗死和诊断充血性心衰。

[0003] 发明背景

[0004] 胶原是动物界最丰富的蛋白质。现已知 25 种不同类型。其基本结构单元是三股螺旋,在胶原 I 中,螺旋由三种多肽组成,各自含有 1050 个氨基酸。胶原纤维由三股螺旋间的侧向相互作用形成。某些胶原,特别是胶原 IV,形成二维片层。

[0005] 胶原分子的氨基酸序列是高度重复的,这种规律反映在胶原纤维结构中。胶原 I 的氨基酸序列含有约 20 个 18-氨基酸基序的拷贝,基序中的每第三氨基酸是甘氨酸。

[0006] 各种胶原由成纤维细胞和某些上皮细胞产生。原始转录物是包含用于从细胞输出的信号序列的前胶原多肽,也是阻止缔合形成三股螺旋的前肽。在前胶原链中约 50%的脯氨酸残基和 15-20%的赖氨酸经历细胞内加工形成羟脯氨酸和羟赖氨酸。这些修饰对胶原的机械性能是必须的。在细胞外,前肽被切割,开始自我组装的过程。

[0007] 一般而言胶原是如骨、腱的结构和细胞外基质的主要成分。例如,胶原 IV 形成基底膜基本网络,上皮细胞和内皮细胞附着在其上。部分胶原多样性由不同类型胶原解释,但也有大量各种胶原相关分子。胶原纤维经常缔合至蛋白聚糖。这些蛋白由核心多肽和一种或多种葡萄糖胺聚糖侧链组成,也是非常多样化的家族。在基底膜中,层粘连蛋白和触觉蛋白(巢蛋白)是重要成分。纤蛋白是一类有几种基底膜蛋白的结合位点的蛋白。粗纤维调节素(undulin)是纤维形成蛋白,发现其在正常肝中少量与胶原缔合,而在纤维化肝中大量缔合。

[0008] 结缔组织中的胶原和其它蛋白包含 Arg-Gly-Asp 氨基酸序列,该序列赋予与细胞粘附分子整联蛋白家族的结合。其它氨基酸序列也可组成核心结合基序,配体其它部分提供了亲和性以及特异性。 β_1 整联蛋白在胶原蛋白结合中很重要。其它胶原-结合蛋白包括盘基菌蛋白区域受体,通过活化酪氨酸激酶应答于胶原。

[0009] 胶原纤维是横向柔韧的,但既无弹性也无可压缩性。结缔组织的弹性特性由弹性蛋白和其相关蛋白耐酸纤维蛋白(oxytalan)和弹性纤维蛋白(elaunin)提供。纤蛋白 1 和 2 是其它蛋白,所述蛋白形成缔合弹性蛋白和其它结构成分微纤维相关糖蛋白的弹性纤维。异常弹性纤维发现于肝纤维化区域。

[0010] 胶原沉积是损伤愈合的常见过程,导致常见的“瘢痕组织”形成。胶原沉积是降低组织功能性的过程。这在组织的弹性重要时是明显的,突出的实例是心肌梗塞愈合中形成的瘢痕组织。在肝中,硬质纤维的作用较不明显。肝纤维化部分过程是肝细胞和肝窦有孔内皮间的细胞外基质物质的沉积,伴有窦状隙向有普通基底膜的毛细血管的转化。这种转化通过阻止血液和肝细胞间溶质的转移降低肝功能。

[0011] 肝纤维化开始于导致肝细胞损伤或死亡的损伤。该损伤启动炎症反应。细胞因子、趋化因子和 ECM 基质蛋白（胶原和纤连蛋白）片段的释放导致肝细胞的活化和炎性细胞如粒细胞的募集。炎症，包括氧化应激，是大多数肝纤维化起因的常见因素。重要事件是星形细胞（aka 贮脂细胞或 Ito 细胞）的活化。正常肝中这些细胞的最已知功能是贮存维生素 A。活化时，它们失去其维生素 A，分化成肌成纤维细胞。这些细胞是产胶原细胞。

[0012] 肝纤维化致病因子有多种：乙醇、肝炎病毒、胆管炎、血色病、Wilson 氏病和 schistosomiasis。在试验动物（通常大鼠）中，纤维化可由四氯化碳或硫代乙酰胺诱导。这些试剂多数产生特殊模式的肝损伤，包括胶原沉积。炎症反应的作用是多样的，在某些病症例如血色病中，氧化应激很重要。

[0013] 如果限制损伤的程度和时间，所致纤维化是可逆的。在肝脏，持续应激可导致肝硬化，其特征在于普遍损伤，再生结节形成和使肝结构变形的纤维化。在大鼠中，I 型胶原的半衰期为 30 天，III 型半衰期为 15 天。当肝硬化由四氯化碳诱导时，两种胶原的半衰期减少 50%。胶原的量达到高于正常值的 5-10 倍（但不超过 30-35mg/g）。

[0014] 肝纤维化的诊断和治疗要点是预防不可逆的肝损伤和其后的功能降低。胶原沉积的量增加和模式转变指示肝纤维化。阳性组织活检认为是确定答案。组织活检是侵入性方法，有 1-5% 频率的严重并发症。单次未导向的组织活检将漏掉 10-30% 病例中的肝硬化。如果检测三份样品，正确的诊断可增加到 100%。由于并发症发生率随着组织活检进行的次数而增加，似乎三次组织活检可增加并发症发生率达到 10% 水平。此外，组织活检的评价远非直截了当的。

[0015] 在肝病任何阶段中，纤维化区域中最多有四倍变异；而且，不同阶段间的纤维化区域有大量重叠。因此，胶原量，如通过计算机辅助成像分析计算的，在确定纤维化阶段中具有极小价值。有经验的观察者使用标准化评分方法确实提供可信的阶段信息。实际上，这些系统工作如此好，以至只有极小动机去进一步寻找胶原以外的组织学标记。然而，ECM 基质蛋白生腱蛋白在早期损伤时沉积，且在经常不存在于成熟的瘢痕组织，而玻连蛋白是成熟纤维组织的标记。

[0016] 使用至今的肝纤维化的血清学标记可分为两种：肝功能改变标记（平板计数，肝转氨酶）和 ECM 反转标记。后者可包括胶原沉积（例如循环的胶原前肽）和 / 或胶原降解（例如胶原 IV 循环片段）的标记。谨慎选择的标记组合可比单标记得到更精确的结果，但关于此问题没有广泛的认可。

[0017] 明确需求可在早期阶段、不可逆损伤发生前诊断纤维化的可信试验。将来试验的非常期待的特征是定量 ECM 变化的能力。

[0018] 如上所述，胶原过度沉积减少组织弹性。这也包括在心肌梗塞愈合中形成瘢痕组织。在心脏损伤或心壁压力持续增加后，心脏试图由重建补偿。这种过程意味着心室腔大小和形状的进行性改变，伴随心肌组成的改变。典型的反应包括存活心肌细胞的扩大和胶原类型、交联和浓度的改变。似乎开始时细胞外基质部分退化，伴随心肌细胞肥大。随后是慢性补偿阶段，胶原浓度回复正常。但是，如果心脏不能补偿，除显著纤维化外重构导致显著的心室扩张。心衰最后阶段的特征在于细胞外基质的进一步重构，伴随肌原纤维瓦解和肌细胞减少。胶原持续累积，但胶原纤维以不规则方式堆积。

[0019] 纤维化是超过 200 种肺病的构成成分。重复损伤或持续应激例如炎症和 / 或吸入

的颗粒,与改变结缔组织沉积方向平衡的遗传因素一起,是常见的病因学成分。一个实例是 α_1 蛋白酶抑制剂的缺乏,该蛋白的活性也可作为吸烟的后果而减低。其主要功能是抑制嗜中性粒细胞弹性蛋白酶。如在其它器官的纤维化中,合成和降解之间的不平衡可启动实际上损伤功能的修复过程。如在心脏或肝的纤维化中,肌成纤维细胞在病理学中显著出现。它们最初作为成纤维细胞募集,随后分化。似乎“修复过程”可在没有可察觉炎症时持续,导致进行性的功能缺失。

[0020] 相关技术描述

[0021] WO 89/10758 描述了结合生物颗粒表面膜的化合物。这些化合物包括生物-影响物质,选择至少一种烃取代基以使化合物有足够非极性,以赋予化合物脂质结合能力,其中生物-影响物质可以是菁染料。

[0022] WO 93/11120 描述了结合含脂质生物相容性颗粒如细胞和病毒的化合物。选择这些化合物,以使化合物有足够的非极性以赋予化合物脂质结合能力。

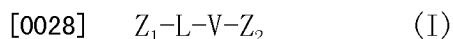
[0023] 发明概述

[0024] 本发明提供新造影剂,用于诊断和监测治疗涉及胶原过度形成的疾病。胶原过度沉积相关疾病和适应症为例如心衰、肺和肝纤维化、动脉粥样硬化、关节炎和皮肤疾病。

[0025] 因此,本发明提供造影剂,用于诊断心衰和涉及胶原过度沉积的其它疾病,例如上述疾病,该造影剂包含结合一个或多个可成像部分的靶向部分。可成像部分可以是给予对象时可产生所述造影剂分布的至少部分所述对象的图像的任何可成像部分,例如通过放射成像、单光子发射计算机断层成像(SPECT)、正电子发射断层成像(PET)、磁共振成像(MRI)、X射线、光学成像(OI)、超声(US)、电阻抗或磁强成像模式。

[0026] 本发明进一步提供所述疾病的成像方法和监测这种疾病治疗进程的方法。本发明也提供新的药物组合物和制备诊断性造影剂的前体。提供造影剂试剂盒,特别是制备放射药物造影剂的试剂盒。

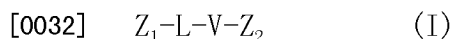
[0027] 本发明造影剂用通式(I)描述:



[0029] 通式(I)将进一步描述于下文中。

[0030] 发明详述

[0031] 从一个方面看,本发明提供如权利要求中定义的式(I)的造影剂。在通式(I)的造影剂中:



[0033] 至少 Z_1 和 Z_2 之一存在,是在人和动物体体内成像中相同或不同的可检测指示部分,V是与胶原形成区域有结合亲和力的靶向部分,L是共价键、生物修饰物或连接部分。

[0034] Z在下文中用于表示 Z_1 和 Z_2 之一或全部。Z可以是任何可成像部分。

[0035] 对用于诊断、具体地说是体内诊断的造影剂,Z部分包含一个或多个可成像部分。当可成像部分自身不能直接结合到V或L(当存在时)时,例如当可成像部分是金属颗粒或下文中标注为M的金属离子时,那么Z包含 Y_1M 部分,其中 Y_1 是可结合到V或L(当存在时)并同时带有M的部分。带有是指 Y_1 和M部分之间任何形式的缔合例如化学键,如共价键或电价键或离子键或通过吸附或任何其它类型的缔合。

[0036] 当M是金属颗粒或金属离子时, Y_1 表示螯合剂。

[0037] Z 和 / 或 Y_1M 的性质将依赖于应用于诊断的成像模式。在体内诊断成像方法中 Z 和 / 或 Y_1M 必须可直接或间接检测,例如发射或可被引起发射可检测辐射(例如通过放射性衰变、荧光激发、自旋共振激发等)的部分、影响局部电磁场(例如顺磁性、超顺磁性、亚铁磁性或铁磁性类)的部分、吸收或散射射线能量(例如生色团、颗粒(包括含有气体或液体的小泡)、重元素和其化合物等)的部分和产生可检测物质(例如微气泡发生器)的部分。

[0038] 特别优选下文中式 (II) 和 (III) 的螯合剂。

[0039] 合适的可成像部分的宽范围从例如 WO 98/18496 中已知,其内容通过引用整体结合到本文中。

[0040] 成像模式和可成像部分 Z 和 M 详述于下文中。

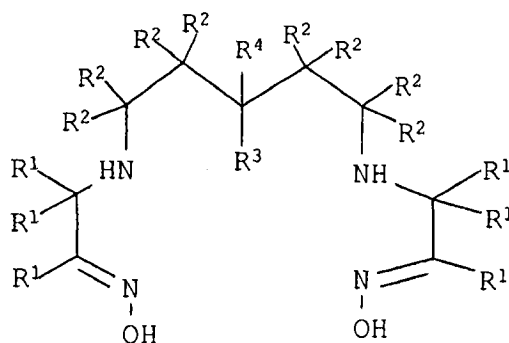
[0041] 在第一个实施方案中,在式 (I) 化合物中 Z 部分包含带有一个或多个可成像 M 部分的 Y_1 部分, M 用于辐射和 SPECT 成像模式。优选 M 是低或无 α - 和 β - 发射的 γ 发射器,半衰期超过 1 小时。优选基团 M 是放射性核素 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Mo}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 和 ^{133}Xe 。最优选为 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

[0042] M 可进一步由下列同位素或同位素对表示,其用于成像和治疗而不需要改变放射标记方法或螯合剂: $^{47}\text{Sc}_{21}$; $^{141}\text{Ce}_{58}$; $^{188}\text{Re}_{75}$; $^{177}\text{Lu}_{71}$; $^{199}\text{Au}_{79}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$; $^{131}\text{I}_{53}$; $^{67}\text{Cu}_{29}$; $^{131}\text{I}_{53}$ 和 $^{123}\text{I}_{53}$; $^{188}\text{Re}_{75}$ 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}_{43}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ 和 $^{87}\text{Y}_{39}$; $^{47}\text{Sc}_{21}$ 和 $^{44}\text{Sc}_{21}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ 和 $^{123}\text{I}_{53}$; $^{146}\text{Sm}_{62}$ 和 $^{153}\text{Sm}_{62}$; $^{90}\text{Y}_{39}$ 和 $^{111}\text{In}_{49}$ 。

[0043] 当 M 表示金属放射性核素时, Y_1 表示适合于与 M 形成稳定螯合物的螯合剂。这种螯合剂是本领域技术人员已知的,这种螯合剂的典型实例描述于 WO 01/77145 的表 I 中。

[0044] 特别优选式 (II) 的螯合剂 Y_1 :

[0045]

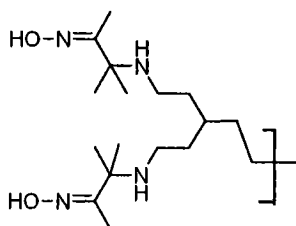


(II)

[0046] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 各自独立表示 H、 C_{1-10} 烷基、 C_{3-10} 烷芳基、 C_{2-10} 烷氧基烷基、 C_{1-10} 羟烷基、 C_{1-10} 烷基氨基、 C_{1-10} 氟烷基,或 2 个或更多个 R 基团与其连接的原子一起形成饱和或不饱和的碳环或杂环。

[0047] 更特别优选式 (II) 的螯合剂 Y_1 , 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 是氢或甲基, R_4 是烷基氨基,最具体为式 (III) 化合物,在下文中标注为 cPN216。

[0048]



[0049] 式 (III)

[0050] 最优选 Z 是 cPN216 与 ^{99m}Tc 的螯合物。

[0051] 式 (II) 和 (III) 的螯合剂的合成描述于 WO 03/006070。

[0052] 非金属放射性核素 Z 基团如 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I 可通过本领域技术人员已知的取代或加成反应共价结合到 V 和 L (当存在时) 部分。

[0053] 在第二个实施方案中, 包含 Z 部分的式 (I) 化合物用于 PET 成像模式。Z 此时表示正电子发射性质的放射发射物。优选基团 Z 是放射性核素 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{82}Rb 。特别优选 ^{18}F 。也优选与螯合剂 Y_1 整合的金属放射性核素 ^{82}Rb 和 ^{68}Ga 。

[0054] 硫醇偶联化学、 ^{18}F -合成子和使用硫醇偶联化学制备的标记肽描述于 WO 03/080544, 其内容通过引用整体结合到本文中。

[0055] 使用硫醇偶联化学标记的肽的描述可见于 WO2005/01235, 其内容通过引用整体结合到本文中。

[0056] 在另一个优选实施方案中 Y_1 表示 DOTA 螯合剂, M 是可使用微波化学容易地导入螯合剂中的 ^{68}Ga 。

[0057] 非金属放射性核素 Z 基团例如 ^{18}F 可通过本领域技术人员已知的取代或加成反应共价结合到 V 和 L (当存在时) 部分, 也描述于如 WO03/080544, 其内容通过引用整体结合到本文中。

[0058] 在第三个实施方案中, 式 (I) 化合物的 Z 部分包含带有一个或多个可成像部分 M 的 Y_1 部分, M 用于 MR (磁共振) 成像模式。此处 M 指顺磁性金属离子, 如美国专利 4 647 447 中提及的。特别优选顺磁性金属离子 Gd^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 。 Y_1 表示螯合剂, 特别是螯合剂如无环或环状聚氨基酸酯 (例如 DTPA、DTPA-BMA、DOTA 和 D03A), 例如美国专利 4 647 447 和 WO 86/02841 中所述。

[0059] 在 MR 成像中, M 也可表示金属氧化物例如超顺磁性、亚铁磁性或铁磁性物类, 其被 Z 吸附, 例如 Z 作为金属氧化物的包衣。用作 MR 造影剂的金属氧化物描述于如美国专利 4 647 447, 其内容通过引用整体结合到本文中。

[0060] 在第四个实施方案中, 式 (I) 化合物的 Z 部分包括带有一个或多个可成像部分 M 的 Y_1 部分, M 用于 X 射线成像模式。此处 M 表示重金属如 W、Au 和 Bi, 其可为吸附到 Z 的氧化物形式或为金属实体 (氧化价为 0) 形式。Z 也可表示碘化芳基衍生物, 具体地说是已知的碘化 X 射线造影剂, 例如商标名为 IopamidolTM 和 OmnipaqueTM 的已知造影剂。这些试剂可通过其酰胺或氨基功能度连接到式 (I) 的 V 和 L (当存在时) 部分。

[0061] 在另一个实施方案中式 (I) 化合物包含充气微囊形式的 Z 部分。这种超声成像剂可应用于受体成像, 例如当将它们功能化以结合肽时, 如本领域现有技术例如 WO98/18500 中的描述。

[0062] 在本发明的第六个实施方案中, 式 (I) 化合物的 Z 部分可以是任何在光学成像方法中可直接或间接检测的部分。可检测部分可以是光散射体 (例如有色或无色粒子)、光吸收体或光发射体。更优选 Z 由染料表示, 例如生色团或荧光化合物。Z 部分可以是任何染料, 该染料与波长从紫外到近红外的电磁谱内的光相互作用。优选形式的 Z 有荧光特征。

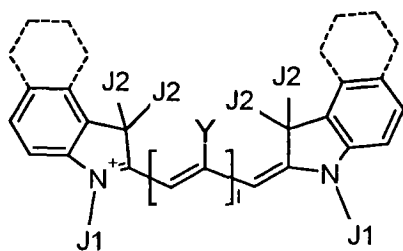
[0063] 优选的有机染料部分包括具有广泛的不定域电子系统的基团, 例如菁、吩菁、吲哚菁、酞菁、蔡菁 (naphthalocyanine)、三苯基甲川、卟啉、吡啶菁 (pyrilium) 染料、硫代吡

啉菁 (thiapyriliun) 染料、方酸菁 (squarylium) 染料、克酮酸菁 (croconium) 染料、蓼菁 (azulenium) 染料、靛苯胺、苯并吩噻嗪染料、苯并硫代吩噻嗪染料、蒽醌、萘醌、靛蒽酮 (indathrene)、邻苯二甲酰吡啶酮、三 (苯酚合苯醌)、偶氮染料、分子内和分子间电荷转移染料和染料复合物、环庚三烯酮、四嗪、二 (二硫杂环戊烯) 复合物、二 (苯二硫酚) 复合物、碘苯胺染料、二 (S, O- 二硫杂环戊烯) 复合物。荧光蛋白, 例如具有不同吸收 / 发射特征的绿色荧光蛋白 (GFP) 和 GFP 修饰物也是有用的。某些稀土金属 (例如铈、钐、铽或镱) 的复合物在某些情况下使用, 例如为荧光纳米晶体 (量子点)。

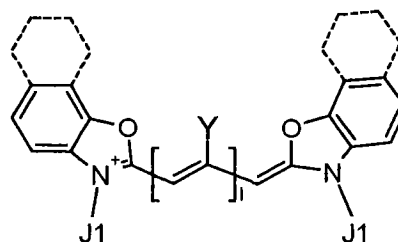
[0064] 优选光学成像部分的实例是菁染料 (CyDye™)。菁染料定义为含有奇数个碳原子的多烯链化合物, 所述碳原子由交替的单个和多个 (优选两个) 碳-碳键连接, 两端均结束于氨基, 其中一个氨基季铵化。菁和类似的芳基-连接基团-芳基生色团任选带有侧链或稠环取代基。菁染料的一般描述和其合成描述于美国专利 6, 048, 982、5, 268, 486 和欧洲专利 1 037 947, 它们均通过引用结合到本文中。菁染料因为宽范围光谱特征和可获得的结构变异而特别有用。一系列菁染料是已知并测试过的, 它们具有低毒性, 可市售获得 (GE Healthcare, 原为 Amersham Biosciences)。菁染料是有良好水溶性的高强度染料的单一家族。它们在 pH 3-10 之间 pH 不敏感, 显示出低的非特异性结合, 比荧光素更耐光。

[0065] 菁染料优选选自碳杂菁、氧杂菁、硫杂菁和氮杂菁, 由下列通式表示。

[0066]

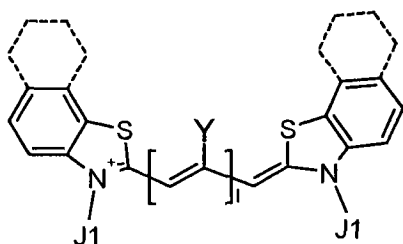


[0067] 式 VI: 碳杂菁式

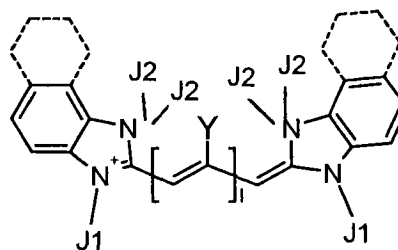


VII: 氧杂菁

[0068]



[0069] 式 VIII. 硫杂菁式



IX. 氮杂菁

[0070] 在这些结构中 J1 基团相同或不同, 是取代或未取代的烷基, 优选 C1-C6 烷基, 可含有醚或 -N-CO-N- 基团。烷基任选由羧基、磺酸基团、氨基、铵基或酯基取代。J1 基团可与任何多烯链的碳原子形成桥, 例如通过 -N-CO-N- 基团或醚基。J2 基团也相同或不同, 是取代或未取代的烷基。烷基任选由羧基或磺酸基团取代, 但优选 J2 基团是低级烷基, 例如 C1-C6 烷基, 最优选甲基。任选的芳基以虚线指示, 以包括含有稠合苯并环或稠合萘并环两者的结构。环是取代或未取代的。环可以由磺酸基团、羧基、羟基、烷基 (磺基烷基) 氨基、二 (磺基烷基) 氨基、磺基烷氧基、磺基烷基磺酰基、烷基或取代烷基或磺基烷基氨基取代。烷基基团优选为低级烷基如具有 1-6 个碳原子。Y 选自氢、卤素、氨基或磺酰基, 优选氢。菁

染料多烯链也可含有一个或多个环状化学基团,在多烯链的两个或更多个碳原子之间形成桥,例如通过包括在链的两个碳原子间的-CO-基团,如在 squaraine 染料中,或通过包括烷基桥。这些桥可用来增加染料的化学稳定性或耐光性。

[0071] 在式 VI-IX 中, I 是正整数 1、2、3 或 4 得到有三碳原子碳桥的三甲川菁、五甲川菁、七甲川菁或九甲川菁染料。优选地,菁染料分别是具有 3、5 或 7 碳原子碳桥的染料。

[0072] J1 和 J2 是连接染料到靶向部分 V 的潜在连接点,任选通过连接物部分 L,优选 J1。在优选方面中一个 J1 连接到靶向部分 V,而其它 R1 基团是任选取代的 C1-C6 烷基。

[0073] 适合光学成像方法的部分的进一步描述见于 WO 2005/003166,其内容通过引用整体结合到本文中。

[0074] 式 (I) 的化合物的 V 部分含有对胶原形成区域有亲和力的氨基酸序列 X_3 -G-D。化合物优选含有其它氨基酸和任选的其它部分,其中序列 X_3 -G-D 是肽载体结合位点,肽载体功能是作为载体结合到胶原形成区域。

[0075] 可约束 (constrain) 本发明的式 (I) 化合物,如通过在肽载体部分中形成一个或多个环化桥。单环肽化合物可通过在氨基酸之间形成二硫键或硫醚键得到。式 (I) 化合物优选包含化合物的不同氨基酸之间的两个环化桥。术语“环化桥”指允许导入桥的氨基酸或氨基酸与带有功能基团的 $-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-$ 基团的任何组合。n 表示从 1 到 10 的正整数。优选实例是二硫化物、二硫化物模拟物例如 $-(CH_2)_4-$ 碳桥、硫代乙缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)和含酯和醚的桥。优选地,一个桥形成二硫键,第二个桥含有硫醚(硫化物)键。

[0076] 在另一个实施方案中,式 (I) 的载体 V 由式 (VI) 表示

[0077] $R_a-C(=O)-X_1-X_2-X_3-G-D-X_4-X_5-X_6$

[0078] (VI)

[0079] 含有两个环化桥,其中,

[0080] X_1 表示共价键或 1、2、3、4 或 5 个氨基酸残基,其中一个氨基酸残基任选用连接部分 L 功能化,优选所述氨基酸残基拥有功能侧链例如酸或胺基团,优选选自天冬氨酸或谷氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸或二氨基丙酸;

[0081] X_2 和 X_4 独立表示能形成环化桥的氨基酸残基,例如形成二硫键或硫醚键的半胱氨酸或高半胱氨酸残基,或其它能形成环化桥的氨基酸残基如天冬氨酸和赖氨酸,优选 X_2 和 X_4 表示半胱氨酸或高半胱氨酸残基;

[0082] X_3 表示精氨酸、N-甲基精氨酸或精氨酸模拟物;

[0083] X_5 表示疏水氨基酸或其衍生物,优选表示酪氨酸、苯丙氨酸、3-碘-酪氨酸或萘丙氨酸残基,更优选苯丙氨酸或 3-碘-酪氨酸残基;

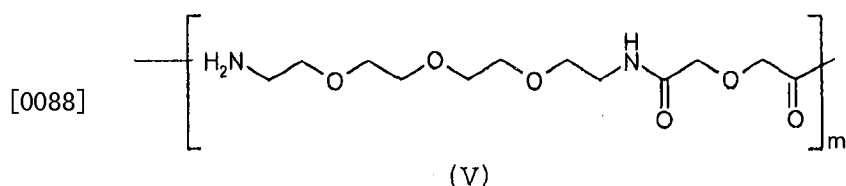
[0084] X_6 表示能形成环化桥的氨基酸残基,优选含巯基氨基酸残基,优选半胱氨酸或高半胱氨酸残基;

[0085] R_a 表示能形成桥至 X_2 、 X_4 或 X_6 之一的 $-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-$ 部分;

[0086] n 表示从 1 到 10 的正整数。

[0087] 在本发明一个方面中,式 (I) 的 L 部分表示优选基于单分散 PEG 构件的同系生物修饰物部分,含有 1-10 个所述构件,所述生物修饰物有改变所述造影剂药代动力学和血液清除率的功能。另外, L 也可表示 1-10 个氨基酸残基,优选甘氨酸、赖氨酸、天冬氨酸或丝

氨酸。在一个优选实施方案中, L 表示含有单分散 PEG 样结构的生物修饰物单元, 式 (V) 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七烷酸。



[0089] 其中 m 等于 1-10 整数, C 末端单元是酰胺部分。

[0090] 如上所注明, 生物修饰物 L 改变化合物的药代动力学和血液清除率。生物修饰物有效降低化合物在组织即肌肉、肝等中的摄取, 由此作为更少背景干扰的结果得到更好的诊断成像。主要通过肾分泌, 这为生物修饰物增加了其它优点。

[0091] L 可进一步表示优选从戊二酸和 / 或丁二酸和 / 或聚乙二醇基础单元和 / 或如上说明的式 (V) 单元衍生的部分。

[0092] 其它代表性 L 成分包括结构型多糖、储存型多糖、聚氨基酸和其甲酯和乙酯、多肽、低聚糖和寡核苷酸, 它们可含有或不含酶切位点。

[0093] 本发明肽可使用所有已知的化学合成方法合成, 但特别有用的是使用自动肽合成仪的 Merrifield 固相方法 (J. Am. Chem. Soc., 85:2149(1964))。合成策略的标准方法描述于 E. Atherton & R. C. Sheppard, "Solid phase peptide synthesis: a practical approach", 1989, IRL 出版社, Oxford。

[0094] 使用合成树脂与酸敏感连接基团, 希望的受保护 C 末端氨基酸残基通过酰胺键形成与其连接。例如, 可应用所谓的 Rink 酰胺 AM 树脂与 (二甲氧基苯基-氨基甲基)-苯氧基-衍生的连接基团 (Rink, H. (1987), Tetrahedron Lett. 30, p. 3787)。肽从这种树脂上酸解断裂将产生肽酰胺。或者, 可使用 O-二-(氨基乙基) 乙二醇三苯甲基树脂 (K. Barlos et al (1988), Liebigs Ann. Chem, p. 1079), 其在酸解断裂时产生有伯胺末端 (handle) 的肽。

[0095] 肽酰树脂从 C 末端到 N 末端方向组装。首先除去 C 末端氨基酸的 N-氨基-保护基, 使用合适的缩合剂偶联序列中的第二个氨基酸。然后在交替步骤中重复 N-氨基-去保护和偶联环, 直至组装完期望的序列。

[0096] 一般地, 肽合成中所有存在的反应基团都被保护。已知宽范围的氨基酸保护基 (见, 如 Greene, T. W. & Wuts, P. G. M. (1991) Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, New York)。可使用正交保护基策略 (Barany, G. et al (1977), J. Am. Chem. Soc, 99, p. 7363)。因此, 例如, 组合不同氨基保护基例如对哌啶敏感的 9-芴基甲氧基-羰基 (Fmoc) 基团和对酸高度敏感的 4-甲基三苯甲基 (Mtt) 基团, 对胍敏感的 2-乙酰基二甲苯环己二酮 (Dde) 基团和对酸敏感的叔-丁氧基羰基 (Boc) 基团, 可在不同氨基位点选择性导入不同部分。更进一步, 通过组合 Cys 侧链的对酸敏感的三苯甲基 (Trt) 保护基和其它 Cys 残基的叔丁基保护 (在酸性氧化性条件如 TFA-2% 二甲基亚砷下敏感), 得到选择性二硫化物形成。

[0097] 完全肽酰树脂可在 N 末端氯乙酰化, 在 N 末端和 Cys 残基之间导入硫醚桥。

[0098] 如本领域技术人员已知, 通过在氮气氛下用 Sn-MDP 和 Na^{99m}TcO₄ 溶液处理溶于蒸馏无氧缓冲溶液 (pH 约 9) 的化合物, 以 ^{99m}Tc 标记肽。

[0099] 本发明通过非限制性实施例 1-4 进一步说明。实施例描述了具有两种不同 Z 和 / 或 Y₁M 部分的化合物的合成。也描述了化合物用 ^{99m}Tc 的标记。

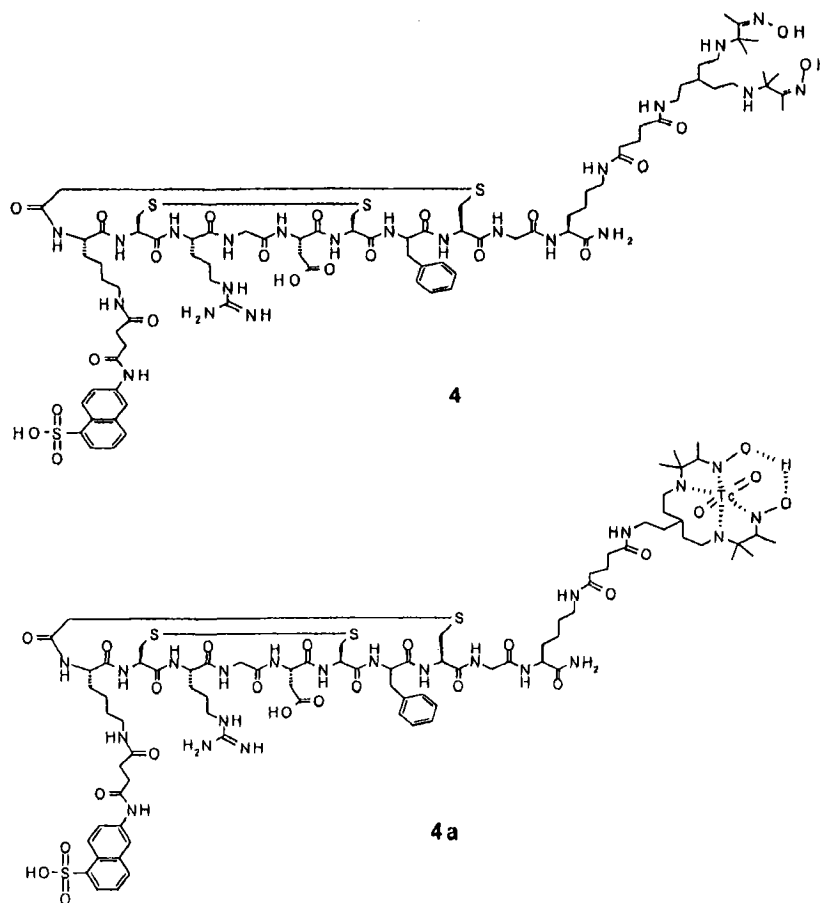
[0100] 肽中各种氨基酸的位置通过上标数字而可见 (如 Cys²)。

[0101] 实施例

[0102] 实施例 1

[0103] Cys²-6 ; c[CH₂CO-Lys(N-(5-磺基-萘-2-基)-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-GlutPn216)-NH₂(4) 和其 ^{99m}Tc 螯合物 (4a)

[0104]



[0105] ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(tBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Rink 酰氨 MBHA 树脂 1 的固相合成

[0106] 对应上述序列的肽酰树脂通过标准固相肽化学 (Barany, G ;Kneib-Cordonier, N ; Mullenm D. G. (1987) Int. J. Peptide Protein Research 30,705-739) 在 Rink 酰氨 MBHA 树脂 (0.73mmol/g ;自 NovaBiochem) 上组装。使用 Applied Biosystems(Perkin Elmer)433A 型肽合成仪。残基 (从羧基末端) 以 0.25mmol 规模在 N-甲基吡咯烷酮 (NMP) 中用 4 倍摩尔过量的 N^α-Fmoc-保护的氨基酸 (1mmol 筒) 和 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓-六氟磷酸盐 (HBTU)/1-羟基-苯并三唑 (HOBt)/二异丙基乙基-胺 (DIEA) 使用单偶联组装,使用 2.5 小时偶联循环。使用 NMP 中的 20%哌啶电导监测完成 Fmoc 去保护。使用的氨基酸侧链保护基对 Lys¹ 是 4-甲基三苯甲基 (Mtt),对 Cys²、Cys⁶ 和 Asp 是叔丁基 (tBu),对 Arg 是 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基 (Pmc),对 Cys⁸ 是三苯甲基 (Trt),对 Lys¹⁰ 是叔丁氧基羰基 (Boc)。

[0107] 组装的肽酰树脂然后转移到手动氮气起泡器装置 (Wellings, D. A., Atherton, E. (1997) in *Methods in Enzymology* (Fields, G. ed), 289, p. 53-54, Academic Press, New York)。N 末端脱 Fmoc 保护, 然后在二甲基甲酰胺 (DMF) 中氯乙酰化, 使用 10 倍摩尔过量的对称酐, 该酐通过在二氯甲烷 (DCM) 中反应氯醋酸 (20eq) 和 N, N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC) (10eq) 形成。通过用含 5% 三异丙基硅烷 (TIS) 和 1% 三氟乙酸 (TFA) 的 DCM 处理肽酰树脂 5×2 分钟, 或直至滤液变成无色, 选择性除去 N^ε-Lys¹ 的 Mtt- 保护基。完整的肽酰树脂 ClCH₂CO-Lys-Cys(tBu)-Arg(Pmc)-Gly-Asp(tBu)-Cys(tBu)-Phe-Cys(Trt)-Gly-Lys(Boc)-Rink 酰胺 MBHA 树脂 1 用 DMF 中的 5% DIEA 中和, 最后以 DMF 和 DCM 洗涤, 在真空下干燥。

[0108] Cys2-6 ; c[CH₂CO-Lys(N-(5-磺基-萘基-2-基)-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys-NH₂ 3 的合成

[0109] 6-氨基-1-萘磺酸 (Dahl 氏酸) (1eq, 0.5mmol) 溶于含有 N-甲基吗啉 (NMM) (2eq) 的 DMF 中, 然后加入丁二酸酐 (10eq)。反应过夜后, 减压下除去溶剂, 产物以制备型 RP-HPLC (反相 HPLC) 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10, 22×250mm) 用在 40 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 5-15% 乙腈 (ACN) 的梯度以 10ml/min 洗脱。混合从 6 次连续运行收集的期望峰级分并冻干, 得到 146mg 纯的 N-(5-磺基-萘-2-基)-琥珀酰胺酸 2。分析型 RP-HPLC : t_R = 16.7 分钟, (Phenomenex Luna 5, 4.6×250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 5-15% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。电喷雾 MS : 产物的期望 [M+H]⁺ 是 324.0m/z, 实测值是 324.0m/z。

[0110] 向肽酰树脂 1 中加入含有 NMM(15eq) 的 N-(5-磺基-萘-2-基)-琥珀酰胺酸 2(5eq) 和 N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲铵六氟磷酸盐 N-氧化物 (HATU) (5eq) 的 DMF 溶液。反应在手动氮气起泡装置中反应过夜。

[0111] 得到的肽酰树脂然后以含有 2.5% TIS 和 2.5% 水的 TFA 处理 2 小时, 以从树脂上切下 Cys^{2,6} 叔丁基保护的肽, 同时从肽除去所有其它侧链保护基。过滤出树脂残留物, 以少量纯 TFA 洗涤。合并的滤液和洗液通过旋转蒸发仪浓缩, 然后以乙醚研磨, 得到粗肽。沉淀通过离心分离, 以醚洗涤, 然后从 50% ACN-0.1% TFA 水溶液冻干, 收得 60mg 粗产物。

[0112] 然后环化线性肽, 首先在室温下将肽以 0.5mg/ml 在 pH 7.5 (以液氨调节) 的 50% 乙腈-水中搅拌 60 分钟, 通过形成硫醚桥进行。环化产物冻干分离。其次, 通过在室温下 60 分钟内以 0.5mg/ml 于 TFA-2% 二甲亚砜中同时脱叔丁基保护和形成二硫化物, 形成内二硫桥。在减压下除去 TFA, 从醚中分离肽, 如上所述干燥, 收得 62mg 环状产物。粗肽通过制备型 RP-HPLC 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ, 50×250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 5-15% ACN 的梯度以 50ml/分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 12mg 纯的产物 3。分析型 RP-HPLC : t_R = 12.9 分钟, (Phenomenex Luna 5 μ, 4.6×250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中的 15-25% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。电喷雾 MS : 产物期望的 [M+H]⁺ 为 1458.5m/z, 测定值为 1458.2m/z。

[0113] cPN216-戊二酰基缀合至肽 3

[0114] cPN216-戊二酰基-四氟苯硫基酯 (2eq) 的 DMF 溶液加入到肽 3(1eq, 0.008mmol) 的 DMF 溶液中, 随后是 NMM(6eq)。在搅拌过夜后, 反应混合物以减压下除去溶剂, 随后用制备型 RP-HPLC 处理。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ, 22×250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA

水溶液中 13-20% ACN 的梯度以 10ml/ 分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 8mg 纯的化合物 4。分析型 RP-HPLC : $t_R = 18.4$ 分钟, (Phenomenex Luna 5μ , $4.6 \times 250\text{mm}$, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 15-25% ACN, 1ml/min, $\lambda = 214\text{nm}$)。电喷雾 MS : 产物的期望 $[M+H]^+$ 为 949.4m/z, 测定值为 949.5m/z。

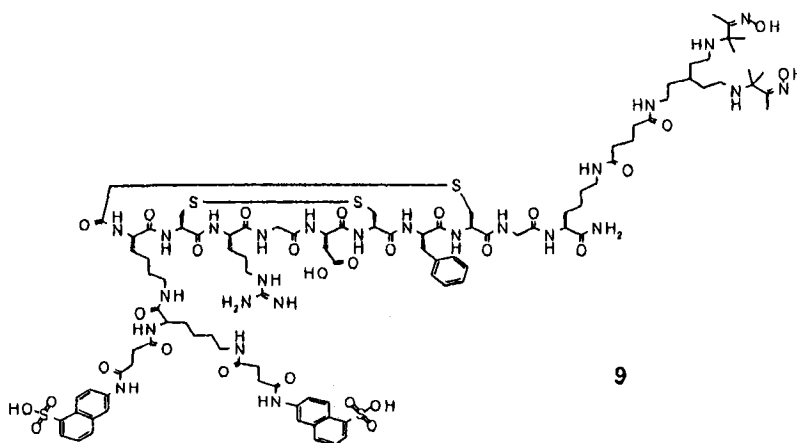
[0115] 肽 4 的 ^{99m}Tc 标记

[0116] 肽 4 (0.1mg) 在盐水或甲醇 (0.1ml) 中重构, 转移至赋形剂的冷冻干燥工具试剂盒。所述工具试剂盒设计为为基于氨基的螯合物提供一般的放射标记条件, 含有无水氯化亚锡 ($16\mu\text{g}$)、亚甲基二磷酸 ($25\mu\text{g}$)、碳酸氢钠 ($4500\mu\text{g}$)、碳酸钠 ($600\mu\text{g}$)、对氨基苯甲酸钠 ($200\mu\text{g}$), 试剂盒 pH = 9.2。然后加入盐水 (3ml) 中的高锝酸钠 (^{99m}Tc) 注射液 (2.1GBq), 反转试剂盒几次以溶解内含物, 然后放置于室温下孵育 15-20 分钟。立即以 HPLC 和 ITLC 分析样品, 在试剂盒重构后 1-3 小时之间给予试验对象 ^{99m}Tc 标记的肽。

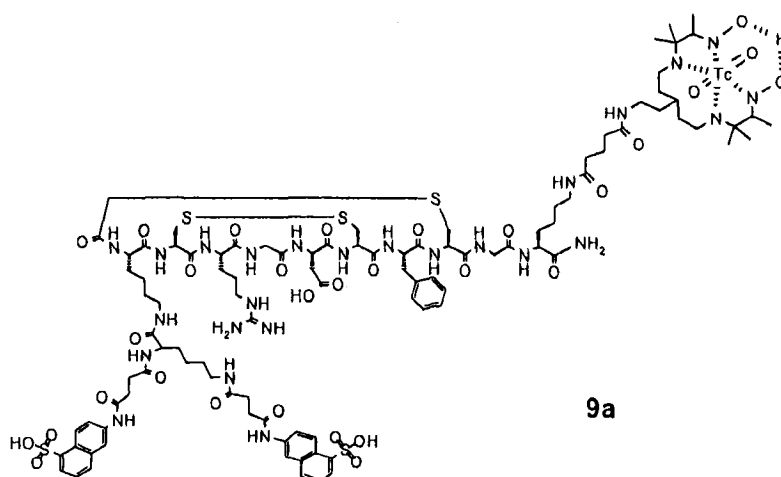
[0117] 实施例 2

[0118] Cys2-6 ; c[CH₂CO-Lys(N-[5-磺基-萘基-2-基]-Succ-Lys(N-[5-磺基-萘基-2-基]-Succ)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys)-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH₂ (9) 和其 ^{99m}Tc 螯合物 (9a)

[0119]



[0120]



[0121] Cys2-6 ; c[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH₂ 7 的合成

[0122] 以上实施例 1 中描述的肽酰树脂 1 是 N^ϵ -Lys¹-保护的,通过使用手动氮气起泡装置用 2-乙酰基二甲基环己二酮 (Dde-OH) 的 DMF 溶液处理 2 小时。部分保护的肽通过与包含 2.5% TIS 和 2.5% 水的 TFA 处理 2 小时从树脂上切下。处理反应混合物,从醚分离肽,如实施例 1 所述冻干,收得 70mg 的 $\text{ClCH}_2\text{CO-Lys(Dde)-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys-Gly-Lys-NH}_2$ 5。

[0123] 线性肽 5 通过如实施例 1 描述形成的硫醚桥环化,粗产物 (78mg) 以制备型 RP-HPLC 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ , 50 $\times$ 250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 20-45% ACN 的梯度以 50ml/分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干,得到 26mg 纯的 $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys-Cys(tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys(tBu)-Phe-Cys]-Gly-Lys-NH}_2$ 6。分析型 RP-HPLC: t_R = 16.35 分钟, (Phenomenex Luna 5 μ , 4.6 $\times$ 250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 20-50% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。电喷雾 MS: 产物的期望 $[M+H]^+$ 为 716.8m/z, 测定值为 716.7m/z。

[0124] 然后将 DMF 中的 cPN216-戊二酰基-四氟苯硫基酯螯合物 (2eq) 加入到肽 6 (1eq, 0.009mmol), 随后是 NMM (3eq), 混合物搅拌过夜。然后 N^ϵ -Lys¹ 的 Dde-基团通过加入足够的肼到反应混合物中产生 2% 溶液而除去。30 分钟后在减压下除去溶剂, 产物通过沉淀分离并如上所述冻干。最后如实施例 1 所述完成肽的脱叔丁基保护和形成二硫化物, 收得 18mg 肽 7。

[0125] 在肽 7 的 N^ϵ -Lys¹ 位导入支链 Dahl 氏酸部分

[0126] $N-(N^{\alpha,\epsilon}$ -二-Boc-赖氨酰氧基)琥珀酰亚胺 (3eq) 的 DMF 溶液加入到肽 7 (1eq, 0.006mmol), 随后是 NMM (5eq)。18 小时后, 反应完成, 在减压下除去溶剂。肽残基以含 2.5% TIS 和 2.5% 水的 TFA 处理 15 分钟, 得到 Cys2-6; $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys(N-Lys)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH}_2$ 8, 通过沉淀分离, 如上所述冻干。

[0127] $N-(5\text{-碘基-萘-2-基})$ -琥珀酰胺酸 3 (10eq) 由 DMF 中含 NMM (30eq) 的 HATU (10eq) 活化。30 分钟后, 混合物加入到肽 8 (1eq) 的 DMF 溶液中, 允许反应进行 24 小时。混合物如上所述处理, 冻干的肽产物以制备型 RP-HPLC 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ , 10 $\times$ 250mm) 用 40 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 10-30% ACN 的梯度以 5ml/分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 2mg 纯的肽 9。分析型 RP-HPLC: t_R = 17.4 分钟, (Phenomenex Luna 5 μ , 4.6 $\times$ 250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 5-30% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。MALDI-TOF MS: 产物的期望 $[M+H]^+$ 为 2330.95m/z, 测定值为 2330.27m/z。

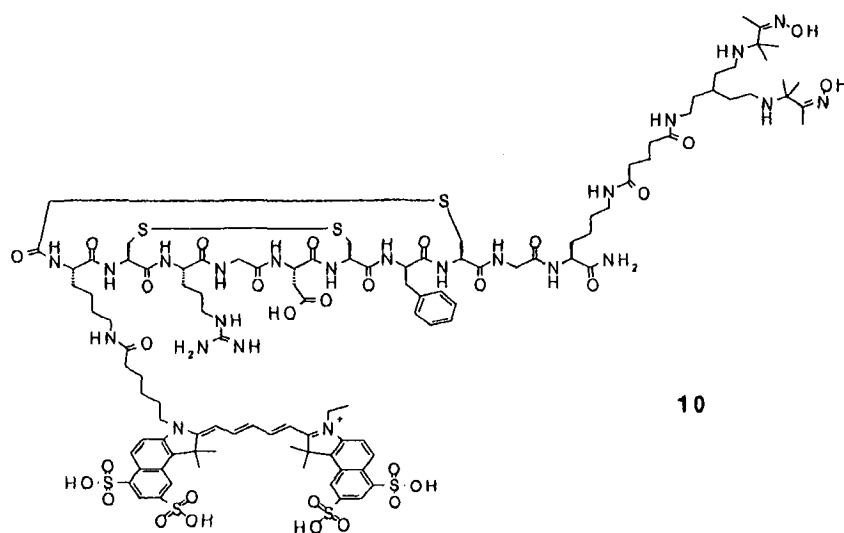
[0128] 肽 9 的 ^{99m}Tc 标记

[0129] 肽 9 在如实施例 1 中标记肽 4 的条件下用 ^{99m}Tc 标记。

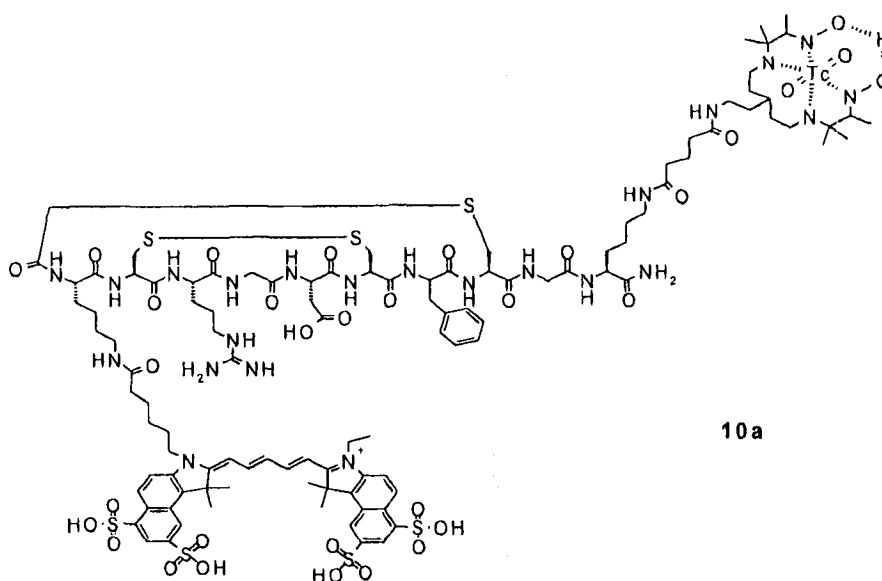
[0130] 实施例 3

[0131] Cys2-6; $\text{c[CH}_2\text{CO-Lys(Cy5.5)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-Lys(Glut-cPn216)-NH}_2$ 10 和其 ^{99m}Tc 螯合物 (10a)

[0132]



10



10a

[0133] 偶联 Cy5.5 至肽 7

[0134] Cy5.5-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (2eq) 溶于 NMP 中, 溶液中加入肽 7 (1eq, 0.005mmol) 中, 随后是 NMM (5eq)。反应允许在暗处进行 2 天。反应混合物然后在 45 度通过旋转蒸发仪浓缩, 然后以 0.1% TFA 水溶液稀释, 以制备型 RP-HPLC 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ , 22 $\times$ 250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 15-30% CAN 的梯度以 10ml/分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 3.2mg 纯的肽 10。分析型 RP-HPLC: t_R = 20.9 分钟, (Phenomenex Luna 5 μ , 4.6 $\times$ 250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 15-30% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。电喷雾 MS: 产物的期望 $[M+H]^+$ 为 1245.97m/z, 测定值为 1246.1m/z。

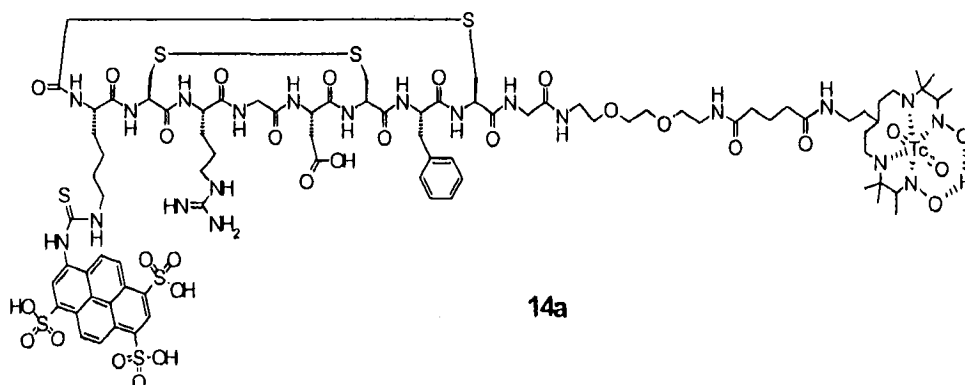
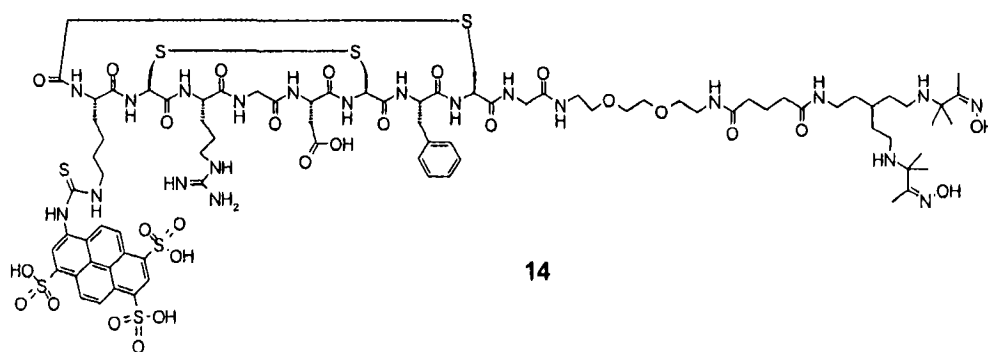
[0135] 肽 10 的 ^{99m}Tc 标记

[0136] 肽 10 在如实施例 1 中标记肽 4 的条件下用 ^{99m}Tc 标记。

[0137] 实施例 4

[0138] Cys2-6; c[CH₂CO-Lys(8-硫脲基-苧-1,3,6-三磺酸)-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys]-Gly-BAEG-Glut-cPn21614 和其 ^{99m}Tc 螯合物 (14a)

[0139]



[0140] Cys2-6, c[CH₂CO-Lys-Cys-Arg-Gly-Asp-CysPhe-Cys]-Gly-BAEG-Glut-cPN216 13 的合成

[0141] 上述序列对应的肽基树脂以类似实施例 1 中肽基树脂的方式在 0-二-(氨基乙基)乙二醇 (BAEG) 三苯甲基树脂 (0.44mmol/g; 自 NovaBiochem) 上组装。使用的 N^ε-Lys¹ 保护基是 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化环己-1-亚基)乙基 (Dde)。组装的肽基树脂然后转移到手动氮气起泡装置, N 末端脱 Fmoc 保护, 然后使用 DMF 中 10 倍摩尔过量的对称酞酰乙酰化, 对称酞通过 DCM 中反应氯乙酸 (20eq) 和 DIC (10eq) 形成。通过用含 2.5% TIS 和 2.5% 水的 TFA 处理肽基树脂 2 小时, 进行从树脂切下部分保护的肽。处理反应混合物, 肽 ClCH₂CO-Lys (Dde)-Cys (tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys (tBu)-Phe-Cys-Gly-DEG-NH₂ 11 从醚分离, 如上实施例 1 所述冻干。

[0142] 如实施例 1 所述通过形成硫醚桥环化线性肽 11 (30mg), 粗产物以制备型 RP-HPLC 纯化。C-18 柱 (Vydac 218TP1022, 10 μ, 22×250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 25-40% ACN 的梯度以 10ml/分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 15mg 纯的肽 c[CH₂CO-Lys (Dde)-Cys (tBu)-Arg-Gly-Asp-Cys (tBu)-Phe-Cys]-Gly-DEG-NH₂ 12。分析型 RP-HPLC: t_R = 19.2 分钟, (Phenomenex Luna 5 μ, 4.6×250mm, 20 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 25-40% ACN, 1ml/min, λ = 214nm)。电喷雾 MS: 产物的期望 [M+H]⁺ 为 1434m/z, 测定值为 1434.6m/z。

[0143] 肽 12 (1eq, 15mg) 溶于 DMF, 加入 cPN216-戊二酰基-四氟苯硫基酯 (2eq), 随后是 NMM (3eq), 混合物搅拌过夜。然后通过加入足够的肼到反应混合物产生 2% 溶液除去 N^ε-Lys¹ 的 Dde-基团。30 分钟后, 在减压下除去溶剂, 以沉淀分离产物, 如上所述冻干。最后如实施例 1 所述进行肽的脱叔丁基保护和形成二硫化物。收得 18mg 完全环化的肽 13。

[0144] 偶联 8-异硫氰酰苊-1,3,6-三磺酸到肽 13

[0145] 肽 13 (1eq, 5mg) 溶于 DMF, 加入少量等份的 NMM 调节 pH 至 8。然后加入 DMF 中的 8- 异硫氰酰苊 -1,3,6- 三磺酸三钠盐 (5eq), 反应混合物搅拌过夜。反应以 RP-HPLC 和 MS 分析监测, 产物以制备型 RP-HPLC 纯化。柱 (Phenomenex Luna C18 10 μ , 22 $\times$ 250mm) 用 60 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 5-60% ACN 的梯度以 10ml/ 分钟洗脱。混合期望的峰级分并冻干, 得到 0.8mg 纯的肽 14。分析型 RP-HPLC : $t_R = 2.04$ 分钟 (宽峰), (Phenomenex Luna 3 μ , 4.6 $\times$ 5mm, 10 分钟内 0.1% TFA 水溶液中 10-80% ACN, 2ml/min, $\lambda = 214$ nm)。电喷雾 MS : 产物的期望 $[M+H]^+$ 为 1047.8m/z, 测定值为 1048.2m/z。

[0146] 肽 14 的 ^{99m}Tc 标记

[0147] 肽 14 在如实施例 1 中标记肽 4 的条件下用 ^{99m}Tc 标记。

[0148] 序列表

[0149]

<110> Amersham Health AS

<120> 造影剂

<130> PN0466

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

 $\langle 210 \rangle$ 1 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> THIOETH

<222> (1).. (8)

〈223〉 残基 1 和 8 之间的硫醚桥

 $\langle 220 \rangle$

<221> DISULFID

 $\langle 222 \rangle$ (2) .. (6)

〈223〉 残基 2 和 6 之间的二硫桥

<400> 1

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> THIOETH

<222> (1).. (9)

〈223〉 残基 1 和 9 之间的硫醚桥

 $\langle 220 \rangle$

<221> DISULFID

<222> (2).. (6)

〈223〉 残基 2 和 6 之间的二硫桥

[0150]

<400> 2

Lys Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Lys

1

5

10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> THIOETH

<222> (1).. (8)

<223> 残基 1 和 8 之间的硫醚桥

<220>

<221> DISULFID

<222> (2).. (6)

<223> 残基 2 和 6 之间的二硫桥

<400> 3

Lys Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly

1

5