



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103153350 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 29

(21) 申请号 201180050137. 2

(22) 申请日 2011. 08. 11

(30) 优先权数据

1013808. 9 2010. 08. 18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 04. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/063890 2011. 08. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/022676 EN 2012. 02. 23

(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 P · B · 伊韦逊 R · 布哈拉

B · 英德雷沃尔 G · 格特沃尔德森

(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)

(56) 对比文件

WO 2008/139207 A2, 2008. 11. 20,

CN 101151054 A, 2008. 03. 26,

WO 2008/139207 A2, 2008. 11. 20,

CN 101151054 A, 2008. 03. 26,

审查员 张丽芳

权利要求书2页 说明书21页

序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

肽放射性示踪剂组合物

(57) 摘要

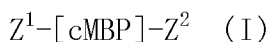
本发明涉及适于体内正电子发射断层扫描(PET) 成像的包含放射性标记的 c-Met 结合肽的成像剂组合物。所述 c-Met 结合肽用放射性同位素 ^{18}F 标记。还公开了药物组合物、所述试剂和组合物的制备方法, 以及使用该组合物体内成像的方法, 特别是用于癌症控制。

1. 成像剂组合物, 其包含:

(i) ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽;

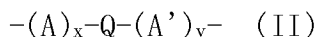
(ii) 未标记的c-Met 结合环肽;

其中所述组合物中存在的未标记cMBP肽不超过所述 ^{18}F -标记的cMBP肽摩尔量的50倍; 并且其中(i)和(ii)中所述c-Met结合环肽具有相同的氨基酸序列, 且为式I的18-30聚体环肽:



其中:

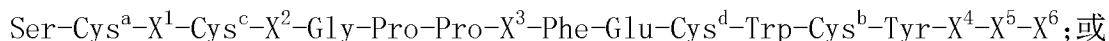
cMBP具有式II:



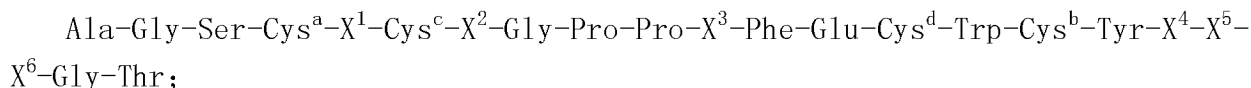
其中Q为氨基酸序列(SEQ-1):



氨基酸序列(SEQ-2):



氨基酸序列(SEQ-3):



其中 X^1 为Asn、His或Tyr;

X^2 为Gly、Ser、Thr或Asn;

X^3 为Thr或Arg;

X^4 为Ala、Asp、Glu、Gly或Ser;

X^5 为Ser或Thr;

X^6 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;

A和A'独立地为除Cys外的任何氨基酸, 条件是A和A'中的至少一个存在并且为Lys;

x和y独立地为数值0-13的整数, 且经选择使得 $[x + y] = 1-13$;

Z^1 连接在cMBP的N-末端, 并且为H或 M^{IG} ;

Z^2 连接在cMBP的C-末端, 并且为OH、 OB^c 或 M^{IG} ,

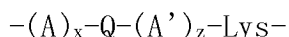
其中 B^c 为生物相容性阳离子;

各 M^{IG} 独立地为代谢抑制基团, 代谢抑制基团为抑制或遏抑cMBP肽体内代谢的生物相容性基团;

其中cMBP在A或A'基团的Lys残基用 ^{18}F 标记,

其中所述组合物维持在pH 7.5或pH 7.5以上。

2. 权利要求1的组合物, 其中cMBP具有式IIA:



(IIA)

其中:

z为数值0-12的整数, 且 $[x + z] = 0-12$,

并且cMBP只包含一个Lys残基。

3. 权利要求1-2中任一项的组合物,其中X³为Arg。
4. 权利要求1的组合物,其中-(A)_x-或-(A')_y-基团包含选自以下的连接肽:
-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),
-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5)或
-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6)。
5. 权利要求2的组合物,其中-(A)_x-基团包含选自以下的连接肽:
-Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),
-Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5)或
-Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6)。
6. 权利要求4的组合物,其中cMBP具有氨基酸序列(SEQ-7):
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-Lys。
7. 权利要求1-6中任一项的组合物,其中Z¹和Z²二者独立地为M^{IG}。
8. 权利要求7的组合物,其中Z¹为乙酰基且Z²为伯酰胺。
9. 权利要求1的组合物,其进一步包含增溶剂。
10. 权利要求1或权利要求9的组合物,其进一步包含一种或多种辐射防护剂。
11. 药物组合物,其包含权利要求1-10中任一项的成像剂组合物以及生物相容性载体,呈适于哺乳动物给药的无菌形式。
12. 制备权利要求1-10中任一项的成像剂组合物或权利要求11的药物组合物的方法,包括:
 - (i) 提供前体,其包括:
 - (a) 权利要求1-8中任一项所定义的式I的c-Met结合环肽,其中Z¹ = Z² = M^{IG};或
 - (b) 氨基氧基官能化的c-Met结合环肽;
 - (ii) 当所述前体包含未标记的其中Z¹ = Z² = M^{IG}的式I c-Met结合环肽时,在活化剂的存在下与¹⁸F-标记的活化酯或¹⁸F-标记的羧酸反应,以产生在所述环肽cMBP的Lys残基处通过酰胺键缀合的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽;
 - (iii) 当所述前体包含氨基氧基官能化的c-Met结合环肽时,与:
 - (a) ¹⁸F-标记的活化酯或¹⁸F-标记的羧酸在活化剂的存在下反应,以产生在所述官能化肽的氨基氧基位置通过酰胺键缀合的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽;或
 - (b) ¹⁸F-标记的醛反应,以产生在所述官能化肽的氨基氧基位置通过肟醚键缀合的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽;
 - (iv) 色谱分离未标记的c-Met结合环肽与¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽。
13. 权利要求12的方法,其中使用氨基氧基官能化的c-Met结合环肽。
14. 权利要求12的方法,其中获得权利要求11的药物组合物,且所述方法使用自动合成仪装置实施。
15. 权利要求1-10中任一项的成像剂组合物或权利要求11的药物组合物在制备用于对哺乳动物身体体内成像以获得c-Met过度表达或定位位点图像的药物中的用途。
16. 权利要求15的用途,其中c-Met过度表达或定位的位点为癌性肿瘤或转移。

肽放射性示踪剂组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及适于体内正电子发射断层扫描(PET)成像的包含放射性标记的c-Met结合肽的成像剂组合物。所述c-Met结合肽用放射性同位素¹⁸F标记。还公开了药物组合物、所述试剂和组合物的制备方法,以及使用该组合物体内成像的方法(特别是用于癌症诊断)。

[0002] 发明背景

[0003] 肝细胞生长因子(HGF),亦称为离散因子(scatter factor, SF),是与多种生理过程(例如伤口愈合和血管发生)有关的生长因子。HGF与其受体(c-Met)相互作用的高亲和力相互作用牵涉肿瘤生长、侵袭和转移。

[0004] Knudsen等已经综述了HGF和c-Met在前列腺癌中的作用,以及对成像和治疗可能的暗示[Adv.Cancer Res., 91, 31-67 (2004)]。WO 03/057155中描述了用于诊断和治疗的标记的抗-met抗体。

[0005] 已表明c-Met在许多人上皮来源的癌症中涉及肿瘤生长、侵袭和转移。大多数癌表达c-Met,且已在下列癌症中检测到c-Met的表达相对于正常组织升高:肺癌、乳腺癌、直肠结肠癌、胰腺癌、头颈癌、胃癌、肝细胞癌、卵巢癌、肾癌、神经胶质瘤、黑素瘤和众多肉瘤。在直肠结肠癌(CRC)中,已在发育异常的隐窝病灶(疾病的最早期瘤前病变)中检测到c-Met的过度表达。在头颈部鳞状细胞癌中,据报道大约80%的原发肿瘤表达或过度表达c-Met。在前列腺癌的骨转移中,据报道c-Met在80%以上的骨转移中过度表达。

[0006] 正常情况下,c-Met在上皮细胞中表达,以旁分泌的方式被间充质衍生的HGF激活。正常细胞中c-Met的激活为瞬时事件,并且被紧密调控。然而,在肿瘤细胞中,c-Met可具有组成型活性。在癌症中,异常的c-Met刺激可通过如下实现:c-Met扩增/过度表达、激活的c-Met突变(例如结构变更)、通过产生自分泌信号传导环路获得自主生长控制。此外,c-Met受体的缺陷性下调也将促成细胞膜中异常的c-Met表达。尽管c-Met的过度表达为HGF依赖性的(自分泌/旁分泌),但突变导致的结构变更为HGF非依赖性的(例如胞外结构域丢失)。

[0007] WO 2004/078778公开了结合c-Met或包含c-Met和HGF的复合物的多肽或多聚体肽构建体。描述了约10种不同结构类型的肽。WO 2004/078778公开了可用于体外和体内应用的可检测标记或用于治疗应用的药物标记的肽。可检测标记可为:酶、荧光化合物、光学染料、顺磁性金属离子、超声造影剂或放射性核素。WO 2004/078778的优选标记陈述为放射性或顺磁性的,并最优选包含通过金属螯合剂螯合的金属。WO 2004/078778陈述了其中的放射性核素可选自:¹⁸F、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、⁷⁷Br、⁷⁶Br、^{99m}Tc、⁵¹Cr、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁴⁷Sc、¹⁶⁷Tm、¹⁴¹Ce、¹¹¹In、¹⁶⁸Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁴⁰La、⁹⁰Y、⁸⁸Y、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁵Dy、¹⁶⁶Dy、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁹⁷Ru、¹⁰³Ru、¹⁸⁶Re、²⁰³Pb、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹⁴Bi、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁶¹Tb、¹⁷⁷Lu、¹⁹⁸Au和¹⁹⁹Au。WO 2004/078778陈述了(62页)用于诊断目的的优选放射性核素为:⁶⁴Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、^{99m}Tc和¹¹¹In,特别优选^{99m}Tc。

[0008] WO 2008/139207公开了17-30个氨基酸的c-Met结合环肽,其用适于利用波长600-1200 nm的绿至近红外光对哺乳动物身体体内成像的光学报道分子(reporter)成像部分标

记。所述c-Met结合肽包含氨基酸序列：

[0009] $\text{Cys}^a\text{-X}^1\text{-Cys}^c\text{-X}^2\text{-Gly-Pro-Pro-X}^3\text{-Phe-Glu-Cys}^d\text{-Trp-Cys}^b\text{-Tyr-X}^4\text{-X}^5\text{-X}^6$ ；

[0010] 其中 X^1 为Asn、His或Tyr；

[0011] X^2 为Gly、Ser、Thr或Asn；

[0012] X^3 为Thr或Arg；

[0013] X^4 为Ala、Asp、Glu、Gly或Ser；

[0014] X^5 为Ser或Thr；

[0015] X^6 为Asp或Glu；

[0016] 并且 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。WO 2008/139207的光学报道分子优选花菁染料。

[0017] WO 2009/016180公开了与WO 2008/139207中c-Met结合环肽相似的c-Met结合环肽，其中光学报道分子为苯并吡喃𬝓(benzopyrylium)染料。WO 2008/139207和WO 2009/016180的试剂陈述为可用于体外和体内光学应用，特别是人体的体内光学成像。直肠结肠癌的光学成像为优选应用。

发明内容

[0018] 本发明涉及适于正电子发射断层扫描(PET)体内成像的包含 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合肽的成像剂组合物。c-Met结合肽通过赖氨酸(Lys)残基标记。

[0019] 所述成像剂组合物优选遏抑存在的未标记c-Met结合环肽的水平。其为有利的，这是因为 ^{18}F -标记的cMBP为放射性示踪剂，以极低的化学浓度存在和给予，因此，如果不除去，否则存在的未标记cMBP将大量化学过剩。已经确定其对PET的体内成像应用是重要的，这是因为否则未标记的cMBP在体内与 ^{18}F -标记的cMBP有效竞争c-Met结合位点。因此其对摄取和因此的体内信号-背景比具有有害作用。该问题在现有技术中未见报道，这是由于例如当c-Met结合肽用光学报道分子染料标记时，有关标记肽的化学量显著超过用于PET的化学量，因此未出现竞争问题。

[0020] 本发明成像剂组合物还克服了先前未认识到的问题，其中放射性标记的cMBP肽遭受与多种材料包括滤器的粘附问题。提供可溶性组合物，这意味着可制备 ^{18}F -标记的cMBP放射性示踪剂并对其进行无菌过滤而无滤器吸附造成的放射性示踪剂的显著损失。

[0021] 发明详述

[0022] 在第一方面，本发明提供包含 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽的成像剂，其中所述c-Met结合环肽为式I的18-30聚体环肽：

[0023] $\text{Z}^1\text{-[cMBP]-Z}^2$ (I)

[0024] 其中：

[0025] cMBP具有式II：

[0026] $\text{-(A)}_x\text{-Q-(A')}_y\text{-}$ (II)

[0027] 其中Q为氨基酸序列(SEQ-1)：

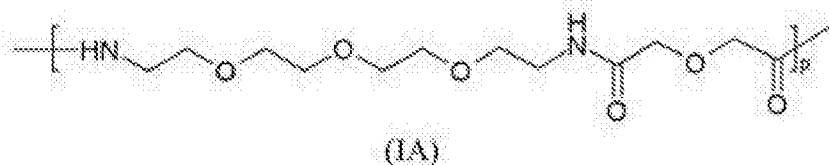
[0028] $\text{-Cys}^a\text{-X}^1\text{-Cys}^c\text{-X}^2\text{-Gly-Pro-Pro-X}^3\text{-Phe-Glu-Cys}^d\text{-Trp-Cys}^b\text{-Tyr-X}^4\text{-X}^5\text{-X}^6\text{-}$

[0029] 其中 X^1 为Asn、His或Tyr；

[0030] X^2 为Gly、Ser、Thr或Asn；

- [0031] X^3 为Thr或Arg;
- [0032] X^4 为Ala、Asp、Glu、Gly或Ser;
- [0033] X^5 为Ser或Thr;
- [0034] X^6 为Asp或Glu;
- [0035] 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;
- [0036] A和A'独立地为除Cys外的任何氨基酸,条件是存在A和A'中的至少一个并且为Lys;
- [0037] x和y独立地为数值0-13的整数,且经选择使得 $[x + y] = 1-13$;
- [0038] Z^1 连接在cMBP的N-末端,并且为H或M^{IG};
- [0039] Z^2 连接在cMBP的C-末端,并且为OH、OB^c或M^{IG},
- [0040] 其中B^c为生物相容性阳离子;
- [0041] 各M^{IG}独立地为代谢抑制基团,代谢抑制基团为抑制或遏抑cMBP肽体内代谢的生物相容性基团;
- [0042] 其中cMBP在A或A'基团的Lys残基处用¹⁸F标记。
- [0043] 术语“成像剂”意指适于对哺乳动物身体成像的化合物。哺乳动物优选为完整的哺乳动物身体体内,更优选人受试者。成像剂优选可以以最小侵入性方式(即在专业的医学专门技能下实施时对哺乳动物受试者无显著健康风险)给予哺乳动物身体。此最小侵入性给予优选静脉给予所述受试者的外周静脉,无需局部或全身麻醉。
- [0044] 本文使用的术语“体内成像”是指非侵入性地产生哺乳动物内部状况(aspect)的全部或部分图像的那些技术。
- [0045] 术语“c-Met结合环肽”意指与肝细胞生长因子受体,也称为c-Met (或简单地MET)结合的肽。合适的本发明此类肽为式I的18-30个氨基酸的环肽。该肽对于c-Met的表观K_D小于约20 nM。所述肽的cMBP序列包含脯氨酸残基,已知这类残基可呈现主链酰胺键的顺/反式异构化。本发明cMBP肽包括任何这样的异构体。
- [0046] Z^1 基团取代cMBP末尾氨基酸残基的氨基(即氨基末端)。因此,当 Z^1 为H时,cMBP的氨基末端以末尾氨基酸残基的游离NH₂基团终止。 Z^2 基团取代cMBP末尾氨基酸残基的羧基(即羧基末端)。因此,当 Z^2 为OH时,cMBP的羧基末端以末尾氨基酸残基的游离CO₂H基团终止,当 Z^2 为OB^c时,末端羧基作为CO₂B^c基团离子化。
- [0047] 术语“生物相容性阳离子”(B^c)意指与离子化的带负电基团形成盐的带正电的反荷离子,其中所述带正电的反荷离子亦为无毒的,因此适于给予哺乳动物身体,特别是人身体。合适的生物相容性阳离子的实例包括:碱金属钠或钾、碱土金属钙和镁,以及铵离子。优选的生物相容性阳离子为钠和钾,最优选钠。
- [0048] 术语“代谢抑制基团”(M^{IG})意指在氨基末端(Z^1)或羧基末端(Z^2)抑制或遏抑cMBP肽体内代谢的生物相容性基团。此类基团是本领域技术人员所熟知的,并且对于肽的氨基末端,合适地选自:
- [0049] N-酰化基团-NH(C=O)R^G,其中酰基-(C=O)R^G具有选自C₁₋₆烷基或C₃₋₁₀芳基或包含聚乙二醇(PEG)结构单元的R^G。对于肽的羧基末端:甲酰胺、叔丁酯、苄酯、环己酯、氨基醇或聚乙二醇(PEG)结构单元。优选的此类PEG基团为式IA或IB的生物改性剂:

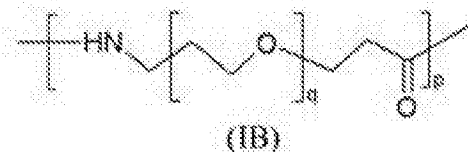
[0050]



[0051] 式IA的17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3, 9, 12, 15-四氧杂十七烷酸

[0052] 其中p为1-10的整数。备选地,可使用基于式IB的丙酸衍生物的PEG-样结构:

[0053]



[0054] 其中p如对于式IA所定义,q为3-15的整数。

[0055] 在式IB中,p优选1或2,q优选5-12。

[0056] 优选的此类氨基末端M¹⁶基团为乙酰基、苄氧羰基或三氟乙酰基,最优选乙酰基。

[0057] 术语“¹⁸F-放射性标记的”意指c-Met结合环肽已经与放射性同位素¹⁸F共价缀合。¹⁸F通过C-F氟烷基或氟芳基键合适地连接,这是因为这些键在体内相对稳定,因此赋予其对¹⁸F放射性标记自cMBP肽的代谢性切割具有抗性。¹⁸F优选通过C-F氟芳基键连接。¹⁸F可直接连接到cMBP的一个氨基酸,但优选作为cMBP上放射性氟化取代基部分而缀合。所述取代基优选具有下式:

[0058] $-(L)_n-^{18}F$

[0059] 其中:

[0060] L为合成的式-(A)_m-接头基团,其中各个A独立地为-CH₂-、-CH=CH-、-C≡C-、-CH₂CO₂-、-CO₂CH₂-、-NR(C=O)-、-(C=O)NR-、-NR(C=O)NR-、-NR(C=S)NR-、-SO₂NR-、-NRSO₂-、-CH₂OCR₂-、-CH₂SCR₂-、-CH₂NRCR₂-、-CH₂-O-N=、-CH₂-O-NR-、-CH₂-O-NH(CO)-、C₄₋₈环杂亚烷基、C₄₋₈环亚烷基、C₅₋₁₂亚芳基、C₃₋₁₂杂亚芳基、氨基酸、糖或单分散聚乙二醇(PEG)结构单元;

[0061] 各个R独立地选自H、C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、C₂₋₄炔基、C₁₋₄烷氧基烷基或C₁₋₄羟烷基;

[0062] m为数值1-20的整数;

[0063] n为数值0或1整数。

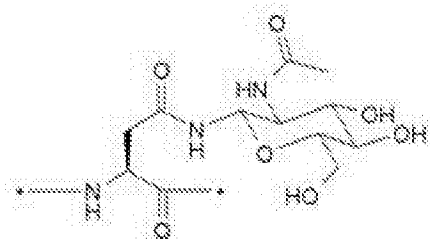
[0064] 术语“氨基酸”意指L-或D-氨基酸、氨基酸类似物(例如萘基丙氨酸)或氨基酸模拟物(其可为天然存在或完全合成来源的),并且可为光学纯的,即单一的对映体(因此为手性的),或对映体的混合物。本文使用氨基酸的常规3字母或单字母缩写。本发明氨基酸优选为光学纯的。术语“氨基酸模拟物”意指合成的天然氨基酸类似物,其为电子等排体,即设计为模拟天然化合物的立体和电子结构。这些电子等排体是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于缩肽、反向-倒转(retro-inverso)肽、硫代酰胺、环烷或1,5-二取代四唑[见M. Goodman, Bio多聚体s, 24, 137, (1985)]。

[0065] 术语“肽”意指包含两个或多个如上所定义的通过肽键(即连接一个氨基酸的胺与另一个氨基酸的羧基的酰胺键)连接的氨基酸的化合物。

[0066] 术语“糖”意指单糖、二糖或三糖。合适的糖包括:葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖和乳糖。糖可任选被官能化以允许容易地偶联到氨基酸。因此,可将例如氨基酸的葡萄糖衍生物通过肽键缀合到其它氨基酸。天冬酰氨的葡萄糖衍生物(自NovaBiochem市售获得)为

此类的一个实例：

[0067]



[0068] 当A和A'为“除Cys外的任何氨基酸”时,意指A和A'基团的额外氨基酸缺少游离硫醇基,特别地Cys残基。这是因为额外的Cys残基将遭受扰乱Q序列的Cys^a-Cys^b和Cys^c-Cys^d二硫键的二硫键的风险,后果是c-Met结合亲和力丧失或降低。

[0069] 优选特征

[0070] 优选的本发明cMBP肽具有小于约10 nM,最优选在1-5 nM的范围内,理想的为小于3 nM的c-Met与c-Met/HGF复合物结合K_D(基于荧光偏振测定法测量)。

[0071] 式I和II的cMBP肽优选具有式IIA:

[0072] $-(A)_x-Q-(A')_z-Lys-$ (IIA)

[0073] 其中A如对于式II所定义,

[0074] z为数值0-12的整数,并且 $[x + z] = 0-12$,

[0075] 并且cMBP只包含一个Lys残基。

[0076] 因此,在式IIA中,该单独的Lys残基特别地位于cMBP的C末端。其进而意指¹⁸F放射性标记优选位于C末端位置。

[0077] Q优选包含SEQ-2或SEQ-3的氨基酸序列:

[0078] Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶ (SEQ-2);

[0079] Ala-Gly-Ser-Cys^a-X¹-Cys^c-X²-Gly-Pro-Pro-X³-Phe-Glu-Cys^d-Trp-Cys^b-Tyr-X⁴-X⁵-X⁶-Gly-Thr (SEQ-3)。

[0080] 在SEQ-1、SEQ-2和SEQ-3中,X³优选为Arg。在式I和式II中, $-(A)_x$ -或 $-(A')_y$ -基团优选包含选自以下的连接肽:

[0081] -Gly-Gly-Gly-Lys- (SEQ-4),

[0082] -Gly-Ser-Gly-Lys- (SEQ-5)或

[0083] -Gly-Ser-Gly-Ser-Lys- (SEQ-6)。

[0084] 第一方面的cMBP肽优选具有氨基酸序列(SEQ-7):

[0085] 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。

[0086] 优选的本发明成像剂具有受M^{IG}基团保护的两个cMBP肽末端,即优选Z¹和Z²二者均为M^{IG},其通常为不同的。两个肽末端均用这种方式保护对体内成像应用而言是重要的,这是因为否则预期将会快速肽代谢,后果是丧失对c-Met的选择性结合亲和力。当Z¹和Z²二者均为M^{IG}时,优选Z¹为乙酰基并且Z²为伯酰胺。最优选Z¹为乙酰基并且Z²为伯酰胺并且¹⁸F部分连接到cMBP赖氨酸残基的ε胺侧链。

[0087] 放射性氟化的取代基 $-(L)_n-^{18}F$ 可连接到c-Met结合肽N末端的α氨基,或备选地连

接到任何氨基取代的氨基酸(例如Lys残基)的胺侧链。其优选连接到cMBP的Lys残基的epsilon (ϵ)氨基。

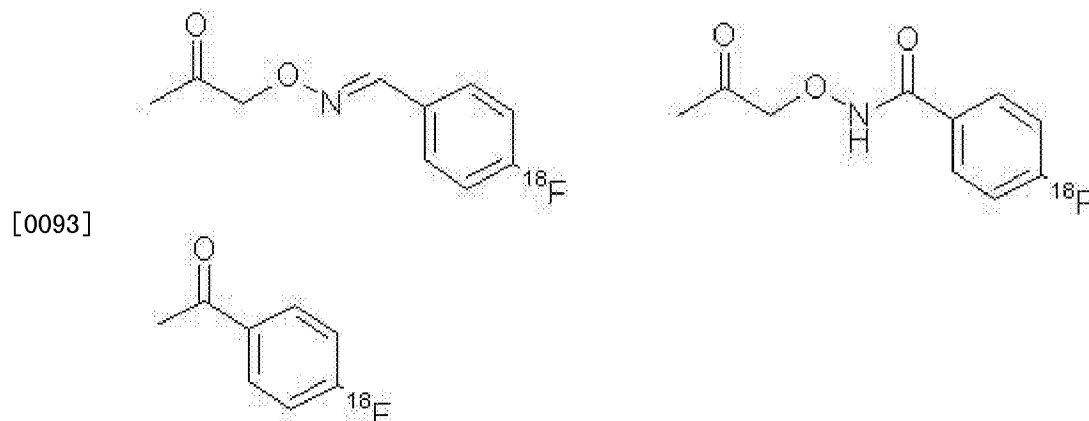
[0088] 优选的放射性氟化的取代基 $-(L)_n-^{18}\text{F}$ 具有 $n = 1$,即,存在1个如上定义的合成的接头基团。更优选的此类取代基包含结合到苯基的 ^{18}F 放射性标记,即,取代基具有下式:

[0089] $-(A)_x\text{C}_6\text{H}_4-^{18}\text{F}$

[0090] 其中:A如上定义,

[0091] X为数值0-5的整数。

[0092] 最优选的此类取代基产生自Lys胺残基与氟化活性酯的N-酰化或Lys胺残基的氨基氧基衍生物与氟化苯甲醛缩合,并且具有下式:



[0094] 第一方面的成像剂可按照第五方面(下文)所述制备。

[0095] 在第二方面,本发明提供成像剂组合物,其包含:

[0096] (i) 第一方面的 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽;

[0097] (ii) 未标记的c-Met 结合环肽;

[0098] 其中:(i)和(ii)中所述c-Met结合环肽具有相同的氨基酸序列,并且所述组合物中存在的未标记cMBP肽不超过所述 ^{18}F -标记的cMBP肽摩尔量的50倍。

[0099] 第二方面中 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽的优选实施方案如第一方面所描述(上文)。

[0100] 术语“组合物”具有其常规含义,即特定组分的混合物。组合物可为固体或液体/溶液形式。

[0101] 术语“未标记的”意指cMet结合环肽为非放射性的,即没有用 ^{18}F 或任何其它放射性同位素放射性标记。组合物中可存在一种或多种此类肽,这些未标记的肽主要包括第四方面(下文)的非放射性前体。术语“未标记的”不包括 ^{19}F 标记的c-Met结合环肽,其中所述 ^{19}F 存在于用于放射性标记所述c-Met结合环肽的 ^{18}F 氟化物中,因此为相同的放射性标记反应的产物。如本领域所已知的,若两个氟取代的化合物仅仅是氟原子的同位素不同,其在化学上将会以几乎相同的方式表现,因此其分离将极其困难。未标记的c-Met结合环肽或前体优选具有已经连接的基团 Z^1 和/或 Z^2 。本发明人已经发现,当 ^{18}F -标记的醛用于缀合到氨基氧基-官能化cMBP肽前体时,非放射性的醛杂质是副产物的主要来源。 ^{18}F -苯甲醛中重要的此类醛杂质为DMAP(即4-二甲氨基)苯甲醛。因此,非放射性醛(例如DMAP)与氨基氧基官能化cMBP肽的缀合产物也在术语“未标记的c-Met结合环肽”的范围内。

[0102] 未标记的c-Met结合环肽优选以相应 ^{18}F -标记肽的摩尔量的多达30倍,更优选多达

20倍,最优选少于10倍存在于所述组合物中。

[0103] 第二方面的组合物优选呈溶液形式,其中组分(i)和(ii)二者均存在于溶液中。更优选所述溶液为生物相容性溶剂,或两种或更多种此类溶剂的混合物。优选的此类生物相容性溶剂在第三方面(下文)描述,并优选包含水性溶剂。

[0104] 本发明人已经发现,在放射性示踪剂浓度—1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的近似浓度范围,本发明 ^{18}F -标记的cMBP肽显示对多种材料不想要的结合。由于放射性示踪剂以如此非常低的浓度存在,甚至小化学量的吸附也可代表存在显著百分比的放射性同位素。该放射性示踪剂浓度要与例如相应的花菁染料标记的c-Met结合肽(其浓度可为约2-10 mg/ml —几乎高1000倍)比较。在这种情况下, μg 量的材料吸附损失将是仍存在于溶液中的染料标记肽的微不足道的百分比。其中已经观察到放射性示踪剂粘附的材料包括塑料、玻璃和二氧化硅。在滤器的情况下,这可意味着当实施无菌过滤时放射性的高百分比损失。

[0105] 本发明人已经发现上述粘附现象源于cMBP肽在酸性条件下(特别是在较低温时)沉淀这一事实。因此优选将组合物维持在pH 7.5或以上,更优选pH 8.0或以上,以将所需的 ^{18}F -标记的c-Met结合肽保留在溶液中,并因此避免材料损失。作为利用受控pH的备选或补充,可包含增溶剂。

[0106] 术语“增溶剂”意指组合物中存在的增加成像剂在溶剂中溶解度的添加剂。优选的此类溶剂为水性介质,因此增溶剂优选改善在水中的溶解度。合适的此类增溶剂包括: C_{1-4} 醇、甘油、聚乙二醇(PEG)、丙二醇、聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯、脱水山梨醇单油酸酯、聚山梨酯、聚(氧乙烯)聚(氧丙烯)聚(氧乙烯)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。

[0107] 优选的增溶剂为环糊精、 C_{1-4} 醇和PluronicTM,更优选环糊精和 C_{2-4} 醇。当增溶剂为醇时,其优选乙醇或丙醇,更优选乙醇。乙醇具有潜在的双重作用,这是因为其还可起辐射防护剂功能。当增溶剂为环糊精时,其优选环糊精,更优选羟丙基- β -环糊精(HPCD)。环糊精浓度可为约0.1-约40 mg/mL ,优选约5-约35 mg/mL ,更优选20-30 mg/ml ,最优选约25 mg/ml 。当使用单个增溶剂时,优选乙醇或羟丙基- β -环糊精,更优选乙醇。当使用增溶剂的组合时,优选乙醇和羟丙基- β -环糊精。

[0108] 第二方面的组合物优选维持在pH 7.5或以上,任选包含5-10% v/v的乙醇作为增溶剂。

[0109] 第二方面的成像剂组合物优选进一步包含一种或多种辐射防护剂。术语“辐射防护剂”意指通过捕获高反应性游离基,例如水辐射分解产生的含氧自由基抑制降解反应例如氧化还原过程的化合物。可使用两种或多种不同辐射防护剂的组合。本发明辐射防护剂合适地选自:乙醇、抗坏血酸、对氨基苯甲酸(即4-氨基苯甲酸或pABA)、龙胆酸(即2,5-二羟基苯甲酸)和(若适用)所述酸与上文定义的生物相容性阳离子的盐。本发明辐射防护剂优选包含对氨基苯甲酸或对氨基苯甲酸钠。

[0110] 最优选的本发明成像剂组合物包含连接 $Z^1 = Z^2 = \text{M}^{16}$ 的SEQ-7的cMBP肽,以及水性缓冲液中对氨基苯甲酸辐射防护剂和乙醇辐射防护剂/增溶剂的组合。该优选组合物中优选的SEQ-7肽为肽1,并且优选的 ^{18}F -标记的cMBP肽为化合物3。放射性浓度优选小于350 MBq/ml ,pABA浓度为2 mg/ml ,并且乙醇为约5-10%体积/体积,优选6.5-7.5%体积/体积。

[0111] 在第三方面,本发明提供适于给予哺乳动物的无菌形式的药物组合物,其包含第

一方面的成像剂,或第二方面的成像剂组合物,以及生物相容性载体。

[0112] 第三方面的成像剂和组合物的优选方面分别如第一和第二方面中所定义。

[0113] “生物相容性载体”为流体,尤其是液体,其中成像剂可悬浮或优选溶解,使得组合物在生理学上可耐受,即,可给予哺乳动物身体,而没有毒性或过度不适。生物相容性载体适宜地为注射用载体液体,例如用于注射的无菌无热原的水;水溶液,例如盐水(其可有利地平衡,使得用于注射的最终产品为等渗的);包含生物相容缓冲液(例如,磷酸盐缓冲液)的水性缓冲溶液;一种或多种张度-调节物质(例如等离子体阳离子与生物相容的反荷离子的盐)的水溶液、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用于注射的无热原的水、等渗盐水或磷酸盐缓冲液。为了控制pH优选使用缓冲液。

[0114] 成像剂和生物相容性载体各自提供在包括密封容器加上任选惰性顶空气体(例如氮气或氩气)的合适的小瓶或容器中,所述密封容器使得可保持无菌完整性和/或放射性安全,所述惰性顶空气体同时使得可通过注射器或插管加入及取出溶液。优选这样的容器为隔膜密封小瓶,其中用顶封(通常为铝)压紧气密封盖。所述封盖适于用皮下注射器针头一次或多次穿刺同时保持无菌完整性(例如压紧的隔膜密封封盖)。这样的容器具有以下另外的优点:需要时封盖可承受真空(例如以改换顶空气体或除去溶液中的气体)以及承受压力变化,例如降低压力而不使外部大气气体例如氧气或水蒸气进入。

[0115] 优选的多剂量容器包含单一的大包装(bulk)瓶(例如,10-30 cm³体积),其含有多个患者剂量,由此在制剂的可用期限期间,在不同的时间间隔,可将单一的患者剂量取出至临床级别注射器中,以适于临床状况。设计预先填充的注射器以含有单人剂量或“单位剂量”,因此优选为一次性注射器或其它适用于临床使用的注射器。本发明的药物组合物优选具有适用于单个患者的剂量,并且在合适的注射器或容器中提供,如以上描述的。

[0116] 药物组合物可含有另外的任选的赋形剂,例如:抗微生物防腐剂、pH-调节剂、填充剂、辐射防护剂、增溶剂或重量克分子渗透压浓度调节剂。术语“辐射防护剂”和“增溶剂”及其优选的实施方案如第二方面中(上文)所描述。术语“抗微生物防腐剂”是指抑制可能有害的微生物(例如细菌、酵母或霉菌)的生长的试剂。抗微生物防腐剂还可呈现一些杀菌性质,取决于采用的剂量。本发明的抗微生物防腐剂的主要作用是抑制任何这样的微生物在药物组合物中的生长。然而,在给药之前,抗微生物防腐剂还可任选用于抑制用于制备所述组合物的试剂盒的一种或多种组分中的可能有害的微生物的生长。合适的抗微生物防腐剂包括:对羟基苯甲酸酯,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它们的混合物;苯醇;苯酚;甲酚;溴化十六烷基三甲铵和硫柳汞。优选的抗微生物防腐剂为对羟基苯甲酸酯。

[0117] 术语“pH-调节剂”是指可用于确保组合物的pH在用于人或哺乳动物给药的可接受的限度(约pH 4.0-10.5)内的化合物或多种化合物的混合物。合适的这样的pH-调节剂包括药学上可接受的缓冲剂,例如曲辛(tricine)、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、碳酸氢钠或它们的混合物。当组合物以试剂盒形式使用时,pH调节剂可任选在单独的小瓶或容器中提供,因此试剂盒的使用者可调节pH作为多步程序的一部分。

[0118] 术语“填充剂”是指在生产和冻干期间可促进材料处理的药学上可接受的膨胀剂。

合适的填充剂包括无机盐例如氯化钠,和水溶性糖或糖醇例如蔗糖、麦芽糖、甘露醇或海藻糖。

[0119] 第三方面的药物组合物可在无菌制造(即,净化室)条件下制备,以得到期望的无菌、无热原产物。优选关键组分,尤其是相关试剂加上与成像剂接触的设备的那些部件(例如,小瓶)无菌。组分和试剂可通过本领域已知的方法灭菌,包括:无菌过滤、使用例如 γ -照射的最终灭菌、高压灭菌、干热或化学处理(例如使用环氧乙烷)。优选事先灭菌一些组分,使得需要进行最少数量的操作。然而,作为预防,优选包括至少无菌过滤步骤作为制备药物组合物的最终步骤。

[0120] 如上所述,本发明的药物组合物优选保持在pH 7.5或以上,和/或包含增溶剂,使得可使用无菌过滤步骤而不会过度损失过滤材料上吸附的放射性。类似的考虑适用于在临床级别注射器中处理药物组合物,或者使用塑料管,其中在不使用增溶剂时,吸附可引起放射性损失。

[0121] 药物组合物优选按照第六方面(下文)所述制备。

[0122] 第三方面的药物组合物可任选从试剂盒制备。这样的试剂盒包含无菌无热原形式的第一方面所述式I的c-Met结合肽或第四方面的前体,使得在合适溶剂中与放射性同位素 ^{18}F 的无菌供应反应时,发生放射性标记以产生所需 ^{18}F -标记的c-Met结合肽。

[0123] 对于试剂盒,c-Met结合肽或前体,以及如上所述的其它任选赋形剂,优选作为冻干粉末在合适的小瓶或容器中提供。试剂然后设计为直接用生物相容性载体中的 ^{18}F 重构(即作为重构物),或首先用生物相容性载体重构试剂盒,随后与 ^{18}F 的供应反应。

[0124] 优选的c-Met结合肽或前体的无菌形式为冻干固体。无菌固体形式优选在药物级容器中提供,如针对药物组合物(上文)所述。当将试剂盒冻干时,制剂可任选包含选自糖类优选甘露醇、麦芽糖或曲辛的冷冻保护剂。

[0125] 在第四方面,本发明提供可用于制备第三方面 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽或第一或第二方面的组合物的前体,其包含:

[0126] (i) 如第一方面所定义的式I的c-Met结合环肽,其中 $Z^1 = Z^2 = \text{M}^{\text{IG}}$;或

[0127] (ii) 氨基氧基官能化的c-Met结合环肽。

[0128] 术语“氨基氧基官能化的c-Met结合环肽”意指式I的c-Met结合环肽与氨基氧基官能团共价缀合。这些氨基氧基基团为式 $-\text{O}-\text{NH}_2$,优选 $-\text{CH}_2\text{O}-\text{NH}_2$,并具有这样的优势,在与醛形成肟醚的缩合反应中氨基氧基基团的氨基比Lys胺基团更有反应性。这样的氨基氧基基团可合适地连接在cMBP的Lys残基,如下文所述。

[0129] 前体为非放射性的,并设计为可以以高度化学纯度获得。其亦经设计使得在与合适的 ^{18}F 源反应时,反应有效发生并具有令人满意的放射化学纯度(RCP)。

[0130] “合适的 ^{18}F 源”取决于前体的性质。当前体包含未标记的式I c-Met结合肽时,未标记肽的赖氨酸(Lys)残基的胺基团设计为放射性标记位点。cMBP肽的末端被保护,这是因为 $Z^1 = Z^2 = \text{M}^{\text{IG}}$ 。优选这样的c-Met结合肽和优选的 Z^1/Z^2 基团如第一方面所述。因此,合适的 ^{18}F 源设计为尽可能有效地与赖氨酸胺基团优选Lys ϵ 氨基反应。

[0131] 对于第三方面的药物组合物的制备,前体优选为无菌形式,更优选冻干固体。

[0132] 第四方面的前体优选为氨基氧基官能化的c-Met结合肽。

[0133] 本发明式I的c-Met结合肽,即 $Z^1\text{-[cMBP]-}Z^2$ 可使用下述制备方法获得,其包括:

[0134] (i) 线性肽的固相肽合成,该肽具有与所需cMBP肽相同的肽序列,并且其中Cys^a和Cys^b为未保护的,Cys^c和Cys^d残基具有硫醇基保护基;

[0135] (ii) 在溶液中用水性碱处理来自步骤(i)的肽,以产生具有连接Cys^a和Cys^b的第一个二硫键的单环肽;

[0136] (iii) 除去Cys^c和Cys^d的硫醇基保护基并环化,以产生连接Cys^c和Cys^d的第二个二硫键,其为所需的二环肽产物Z¹-[cMBP]-Z²。

[0137] 术语“保护基”意指抑制或遏抑不需要的化学反应的基团,但是经设计具有足够的反应性,使其可在不改变分子的其余部分的足够温和的条件下从目标官能团裂解。在脱保护后,得到期望的产物。胺保护基为本领域技术人员众所周知的,并且适宜地选自:Boc(其中Boc为叔丁氧羰基)、Fmoc(其中Fmoc为芴甲氧羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde[即1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化代环亚己基)乙基]或Npys(即3-硝基-2-吡啶氧硫基(3-nitro-2-pyridine sulfenyl))。合适的硫醇基保护基为Trt(三苯甲基)、Acm(乙酰氨基甲基)、t-Bu(叔丁基)、叔丁基硫代(tert-Butylthio)、甲氧苄基、甲基苄基或Npys(3-硝基-2-吡啶氧硫基)。进一步的保护基的应用在‘Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基)’,第四版,Theodor W. Greene和Peter G. M. Wuts,[Wiley Blackwell, (2006)]中描述。优选的氨基保护基为Boc和Fmoc,最优选Boc。优选的胺保护基为Trt和Acm。

[0138] 实施例1和2提供进一步的具体细节。固相肽合成的进一步细节在P. Lloyd-Williams, F. Albericio和E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of peptides and Proteins(肽和蛋白合成的化学方法), CRC Press, 1997中描述。cMBP肽最好在惰性气氛下储存,并在冷藏箱保存。当在溶液中使用,最好避免pH在7以上,因为这样遭受扰乱二硫键的风险。

[0139] 氨基氧基官能化的c-Met结合肽可使用Poethko等[J.Nucl.Med., 45, 892-902 (2004)],Schirmacher等[Bioconj.Chem., 18, 2085-2089 (2007)],Solbakken等[Bioorg.Med.Chem.Lett, 16, 6190-6193 (2006)]或Glaser等[Bioconj. Chem., 19, 951-957 (2008)]的方法制备。氨基氧基基团可任选用两步缀合。首先,将N-保护的氨基氧基羧酸或N-保护的氨基氧基活化酯缀合到c-Met结合肽。其次,将中间体N-保护的氨基氧基官能化的c-Met结合肽脱保护,以产生所需产物[见上文引用的Solbakken和Glaser论文]。N-保护的氨基氧基羧酸例如Boc-NH-O-CH₂(C=O)OH可从例如Novabiochem市售获得。

[0140] 在第五方面,本发明提供制备第一方面的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽的方法,其包括:

[0141] (i) 提供第四方面的前体;

[0142] (ii) 当所述前体包含未标记的式I(其中Z¹ = Z² = M¹⁶) c-Met结合环肽时,在活化剂的存在下与¹⁸F-标记的活化酯或¹⁸F-标记的羧酸反应,以产生在所述环肽cMBP的Lys残基处通过酰胺键缀合的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽;

[0143] (iii) 当所述前体包含氨基氧基官能化的c-Met结合环肽时,与:

[0144] (a) ¹⁸F-标记的活化酯或¹⁸F-标记的羧酸在活化剂的存在下反应,以产生在所述官能化肽的氨基氧基位置通过酰胺键缀合的¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽;或

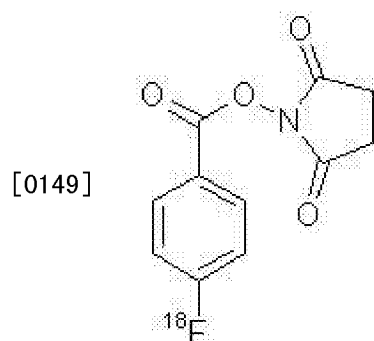
[0145] (b) ¹⁸F-标记的醛反应,以产生在所述官能化肽的氨基氧基位置通过肟醚键缀合

的 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽。

[0146] 术语“活化酯”或“活性酯”意指相关羧酸的酯衍生物,其设计为更好的离去基团,并因此允许与亲核试剂例如胺更容易的反应。合适的活性酯的实例为:N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N-羟基琥珀酰亚胺酯、五氟苯酚、五氟苯硫酚、对硝基苯酚、羟基苯并三唑和PyBOP (即苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷子基磷 六氟磷酸盐)。优选的活性酯为N-羟基琥珀酰亚胺酯或五氟苯酚酯,特别是N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0147] 术语“活化剂”意指用于促进胺与羧酸之间的偶联以产生酰胺的试剂。合适的此类活化剂在本领域中是已知的,且包括碳二亚胺例如EDC [N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺]和N,N'-二烷基碳二亚胺例如二环己基碳二亚胺或二异丙基碳二亚胺,以及三唑例如HBTU [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲 六氟磷酸盐]、HATU [O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲 六氟磷酸盐]和PyBOP [苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷子基磷 六氟磷酸盐],进一步的细节在“March's Advanced Organic Chemistry (March高等有机化学)”,第五版,508-510页,Wiley Interscience (2001)中给出。优选的此类活化剂为EDC。

[0148] ^{18}F -标记的活化酯,例如 $[\text{}^{18}\text{F}]\text{SFB}$ 可通过Glaser等及其中参考文献[J.Lab.Comp.Radiopharm., 52, 327-330 (2009)]的方法或Marik等的自动方法[Appl.Rad.Isot., 65(2), 199-203 (2007)]制备。



[0150] ^{18}F -SFB

[0151] ^{18}F -标记的羧酸可通过上文引用的Marik等的方法获得。

[0152] 式 $^{18}\text{F}(\text{CH}_2)_2\text{O}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_q\text{CH}_2\text{CHO}$ (其中q为3)的 ^{18}F -标记的脂肪族醛可通过Glaser等的方法[Bioconj.Chem., 19(4), 951-957 (2008)]获得。 ^{18}F -氟苯甲醛可通过Glaser等的方法[J.Lab.Comp.Radiopharm., 52, 327-330 (2009)]获得。前体 $\text{Me}_3\text{N}^+-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CHO}$. CF_3SO_3^- 通过Haka等的方法[J.Lab.Comp.Radiopharm., 27, 823-833 (1989)]获得。

[0153] ^{18}F -标记的醛与氨基氧基官能化c-Met肽的缀合优选在苯胺催化剂存在的情况下进行,如Flavell等[J.Am.Chem.Soc., 130(28), 9106-9112 (2008)]所述。同时,可能使用保护的氨基氧基c-Met肽(例如化合物1)作为前体,优选游离氨基氧基衍生物(例如化合物2)。这是因为整个合成更易于自动化,而用保护的前体通常需要手动脱保护步骤。

[0154] 在第六方面,本发明提供制备第二方面的成像剂组合物或第三方面其药物组合物的方法,包括:

[0155] (i) 如第五方面制备方法中所述制备 ^{18}F -放射性标记的c-Met结合环肽;

[0156] (ii) 色谱分离未标记的c-Met结合环肽与¹⁸F-放射性标记的c-Met结合环肽。

[0157] 第六方面的成像剂组合物和药物组合物的优选方面分别如第二和第三方面中所述。

[0158] 步骤(ii)的色谱分离可通过HPLC或使用一种或多种SPE柱的SPE(固相萃取)实施。当使用自动合成仪时优选SPE,其它情况下优选HPLC。实施例5提供用于本发明化合物3的合适HPLC方法。

[0159] 优选使用第六方面的方法获得第三方面的药物组合物。当该方法用于提供第三方面的药物组合物时,制备方法优选使用自动合成仪装置实施。

[0160] 术语“自动合成仪”意指基于Satyamurthy等[Clin.Positr.Imag., 2(5), 233-253 (1999)]所述单元操作原理的自动模块。术语“单元操作”意指复杂的过程被简化为一系列简单操作或反应,其可应用于一系列材料。这样的自动合成仪对于本发明方法是优选的,特别是当期需放射性药物组合物时。其可从多个供应商[Satyamurthy等, 上文],包括GE Healthcare、CTI Inc、Ion Beam Applications S.A. (Chemin du Cyclotron 3, B-1348 Louvain-La-Neuve, 比利时)、Raytest (德国)和Bioscan (USA)市售获得。

[0161] 市售的自动合成仪还提供用于由于放射性药物制备而产生的放射性废液的合适容器。自动合成仪通常不提供辐射屏蔽,这是因为其设计为在适当配置的放射性工作单元中使用。放射性工作单元提供适当的辐射屏蔽以保护操作者免受潜在的辐射剂量,并提供通风以除去化学和/或放射性蒸气。自动合成仪优选包含盒(cassette)。术语“盒”意指可移去以及可互换地安装在自动合成仪装置上的一件装置(如下文定义),其以这样的方式使得合成仪活动部件的机械运动从盒外面即外部控制盒的操作。合适的盒包含线性阵列的阀,每个阀连接到端口,在此可通过针刺倒置的隔膜密封小瓶或通过气密性连接接头而连接试剂或小瓶。各阀具有与自动合成仪相应移动臂对接的凸-凹接头(male-female joint)。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关闭。额外的自动合成仪活动部件设计为夹在注射器柱塞顶端,因此升高或压低注射器桶状体(syringe barrels)。

[0162] 盒为通用的,通常具有一些可连接试剂的位点,以及一些适于连接试剂的注射器小瓶或色谱柱(例如SPE)的位点。盒常常包含反应管。这样的反应管体积优选1-10 cm³,最优选2-5 cm³,并经配置使得其上连接3个或更多盒端口,以允许试剂或溶剂从盒的不同端口转移。盒优选具有线性阵列的15-40个,最优选20-30个,特别优选25个阀。盒的阀优选各自相同的,且最优选为三通阀。盒设计为适于制造放射性药物,因此用药物级并且理想地还抗辐射分解的材料制造。

[0163] 优选的本发明自动合成仪为包含一次性或单次使用的盒的自动合成仪,所述盒包含进行给定批次放射性氟化放射性药物制备所需的所有试剂、反应器皿和装置。盒意指自动合成仪具有能够通过简单地改变盒而制造多种不同的放射性药物并且交叉污染风险最低的灵活性。盒方法还具有下列优点:简化的设置因此减少操作错误风险、改善的GMP(药品生产质量管理规范)顺应性、多示踪能力、生产运行之间的快速更换、盒和试剂的预运行自动诊断检查、化学试剂与待进行合成的自动条码交叉检查、试剂示踪能力、单次使用因此无交叉污染风险、抗干扰和滥用(tamper and abuse resistance)。

[0164] 本发明该方面包括使用自动合成仪装置制备第二方面的药物组合物。

[0165] 在第七方面,本发明提供对哺乳动物身体体内成像以获得c-Met过度表达或定位

(localisation)位点的图像的方法,该方法包括对已经预先给予第一方面的成像剂、第二方面的成像剂组合物或第三方面的药物组合物的所述身体进行成像。

[0166] 第七方面的成像剂、成像剂组合物和药物组合物的优选方面分别如第一、第二和第三方面所述。

[0167] 哺乳动物优选完整的哺乳动物身体体内,更优选人受试者。成像剂优选可以以最小侵入性方式(即在专业的医学专门技能下实施时对哺乳动物受试者无显著健康风险)给予哺乳动物身体。此最小侵入性给予优选静脉给予所述受试者的外周静脉,无需局部或全身麻醉。

[0168] 优选使用第三方面的药物组合物。在第七方面的成像方法中,c-Met过度表达或定位位点优选癌性肿瘤或转移。设想试剂可用于对癌前期和癌性肿瘤或转移二者中c-Met表达进行成像,潜在地使选择治疗成为可能。另外,用该成像剂重复成像也具有快速并有效监测个体受试者对已建立或新治疗方案的反应的潜能,从而允许停止无效治疗。此外,由于c-Met过度表达是侵略性肿瘤的潜在属性,预期c-Met成像剂具有在其发展的早期阶段区分侵略性和较低侵略性癌症的潜能。

[0169] 本方面包括诊断哺乳动物身体体内c-Met过度表达或定位位点的方法,其包括第七方面的成像方法。

[0170] 本发明通过下文详述的非限制性实施例说明。实施例1提供在两个末端含有代谢抑制基团($Z^1 = Z^2 = M^{IG}$)的本发明cMBP肽(肽1)的合成。实施例2提供受保护的本发明前体(化合物1)的合成。实施例3提供氟标记c-Met肽的非放射性氟化(即 ^{19}F)对应物(化合物3A)的合成。实施例4提供本发明 ^{18}F -放射性氟化c-Met肽(化合物3B)的合成。实施例5提供用于分离标记和未标记的c-Met结合肽的HPLC条件。

[0171] 实施例6提供本发明 ^{18}F -标记肽(化合物3B)在动物肿瘤模型中的生物分布。结果显示与HT-29肿瘤中表达的人c-Met受体结合,因此可用于肿瘤成像。实施例7证明实施例6的肿瘤摄取是特异性的,这是因为摄取可被非放射性 ^{19}F -标记的c-Met结合肽(化合物3B)的共给予抑制。实施例8还证明当 ^{19}F -标记的c-Met结合肽共给予时灵长类中肝脏摄取减少约40%。肽的 ^{19}F -标记的杂乱形式(scrambled version)(无c-Met受体亲和力)的共给予没有显著减少肝脏摄取。肝脏具有高水平的c-Met表达,因此认为与 ^{19}F -标记的cMBP竞争后摄取的减少代表c-Met体内特异性结合的证据。

[0172] 实施例9显示增溶剂环糊精对化合物3B在体内的生物分布无显著作用。实施例10比较了化合物3B的全自动合成(从化合物2开始),其半自动合成从化合物1开始。优选使用化合物2,因为其产生较高的得率,且化合物1的脱保护具有下列缺点:

[0173] (i) 难于确立放射性标记前的脱保护程度;

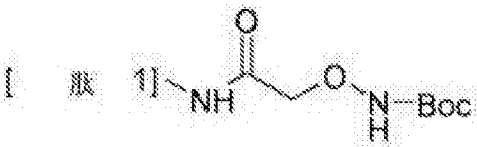
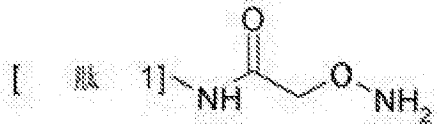
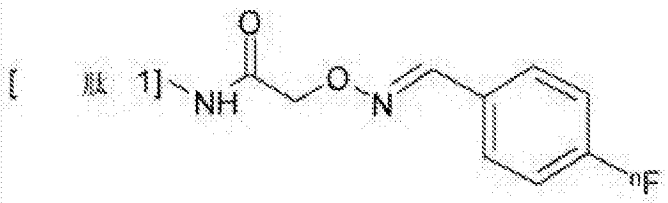
[0174] (ii) 用于脱保护肽的TFA与自动合成仪装置的塑性(plastic)不相容。

[0175] 实施例11提供化合物3B的自动合成,进一步包括SPE柱纯化的自动使用。结果显示使用该方法可以获得高纯度和令人满意的放射化学得率的化合物3B。实施例12提供本发明前体的冷冻干燥。实施例13证明pH对本发明成像剂的作用。实施例14描述使用本发明成像剂的人成像。

[0176] 缩写

[0177] 使用常规的单字母或3字母氨基酸缩写。

- [0178] %id:百分比注射剂量
- [0179] Ac:乙酰基
- [0180] Acn:乙酰氨基
- [0181] ACN:乙腈
- [0182] Boc:叔丁氧羰基
- [0183] DCM:二氯甲烷
- [0184] DIPEA:N,N-二异丙基乙胺
- [0185] DMF:二甲基甲酰胺
- [0186] DMSO:二甲基亚砷
- [0187] EDC:N-3-(二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺.
- [0188] Fmoc:9-芴甲氧羰基
- [0189] HBTU:0-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲 六氟磷酸盐
- [0190] HPLC:高效液相色谱
- [0191] HSPyU:0-(N-琥珀酰亚胺基)-N,N,N',N'-四亚甲基脲 六氟磷酸盐
- [0192] NHS:N-羟基-琥珀酰亚胺
- [0193] NMM:N-甲基吗啉
- [0194] NMP:1-甲基-2-吡咯烷酮
- [0195] pABA:对氨基苯甲酸
- [0196] Pbf:2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
- [0197] PBS:磷酸盐缓冲盐水
- [0198] p.i.:注射后
- [0199] PyBOP:苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷子基磷 六氟磷酸
- [0200] tBu:叔丁基
- [0201] TFA:三氟乙酸
- [0202] TIS:三异丙基硅烷
- [0203] Trt:三苯甲基
- [0204] 本发明化合物

名称	结构
肽 1	二硫键在Cys4-16和Cys6-14; 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 Ac-AGSCYCSGPPRFECWCYETEGTGGGK-NH ₂
化合物 1	
化合物 2	
化合物 3	 n = 19 化合物 3A; n = 18 化合物 3B.

[0206] 其中:

[0207] 化合物1、2和3在肽1羧基末端Lys的ε氨基官能化;

[0208] Boc = 叔丁氧羰基。

[0209] 实施例1:肽1的合成

[0210] 受保护的前体线性肽的合成

[0211] 前体线性肽具有下列结构:

[0212] 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

[0213] 将肽基树脂 H-Ala-Gly-Ser(tBu)-Cys(Ttt)-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($\psi^{Me,Me}$ pro)-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Gly-Gly-Gly-Lys(Boc)-聚合物

在Applied Biosystems 433A肽合成仪上使用Fmoc化学从0.1 mmol Rink Amide Novagel树脂开始装配。偶联步骤中施用过量的1 mmol预活化氨基酸(使用HBTU)。Glu-Thr伪脯氨酸(Novabiochem 05-20-1122)并入序列中。将树脂转移至氮气鼓泡器装置,用溶解于DCM中的NMM(1 mmol)与乙酸酐(1 mmol)的溶液(5 mL)处理约60 min。过滤除去酸酐溶液,用DCM洗涤树脂,并在氮气流中干燥。

[0214] 同时进行的侧链保护基移除和肽从树脂的切割在包含2.5 % TIS、2.5 % 4-硫代甲酚和2.5 %水的TFA (10 mL)中实施2小时和30分钟。过滤除去树脂,真空除去TFA,并向残留物中加入乙醚。形成的沉淀用乙醚洗涤并风干得到264 mg粗肽。

[0215] 用制备型HPLC (梯度:40分钟内20-30 % B其中A = H₂O/0.1 % TFA且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:30 min)纯化粗肽得到100 mg纯的肽1线性前体。纯产物用分析型HPLC (梯度:10分钟内10-40 % B其中A = H₂O/0.1 % TFA且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)进行分析。进一步的产物表征用电喷雾质谱(MH₂²⁺计算值:1464.6, MH₂²⁺实测值:1465.1)实施。

[0216] 步骤(b):单环Cys4-16二硫键的形成

[0217] 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

[0218] 将步骤(a)的线性前体(100 mg)溶解在5 % DMSO/水 (200 mL)中,使用氨将该溶液调节至pH 6。反应混合物搅拌5天。然后使用TFA将溶液调节至pH 2,通过真空蒸发除去大部分溶剂。残留物(40 mL)分批注入制备型HPLC柱以纯化产物。

[0219] 用制备型HPLC (梯度:0 % B 10分钟,然后在40分钟内0-40 % B其中A = H₂O/0.1 % TFA且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)纯化残留物得到72 mg纯的化合物1单环前体。

[0220] 纯产物(作为异构体P1-P3的混合物)用分析型HPLC (梯度:10 分钟内10-40 % B 其中A = H₂O/0.1 % TFA且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))进行分析。进一步的产物表征使用电喷雾质谱实施(MH₂²⁺计算值:1463.6, MH₂²⁺实测值:1464.1 (P1);1464.4 (P2);1464.3 (P3))。

[0221] 步骤(c):第二个Cys6-14二硫键(肽 1)的形成

[0222] 将步骤(b)的单环前体(72 mg)在氮气层下溶解在75 % AcOH/水(72 mL)中。按顺序加入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。真空蒸发掉大部分溶剂,残留物(18 mL)用水/0.1 % TFA (4 mL)稀释,产物使用制备型HPLC纯化。

[0223] 用制备型HPLC (梯度:0 % B 10分钟,然后在40分钟内20-30 % B其中A = H₂O/

0.1 % TFA且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)纯化残留物得到52 mg纯的肽1。

[0224] 纯产物用分析型HPLC(梯度:10分钟内10-40 % B其中A = H₂O/0.1 % TFA且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)进行分析。进一步的产物表征使用电喷雾质谱实施(MH₂²⁺计算值:1391.5, MH₂²⁺实测值:1392.5)。

[0225] 实施例2:化合物1的合成

[0226] 将(Boc-氨基氧基)乙酸(Sigma-Aldrich;138 mg,0.72 mmol)、EDC (138 mg,0.72 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(83 mg,0.72 mmol)溶解在DMF (1 ml)中。将溶液振摇25 min,然后加入到肽1 (1.0 g,0.36 mmol)/DMF(5 ml)溶液中。反应混合物搅拌2 min。然后加入Sym.-可力丁(239 μ L,1.80 mmol),并将反应混合物搅拌3小时。用水(5 ml)稀释反应混合物,产物用制备型RP-HPLC纯化。

[0227] HPLC条件:Waters Prep 4000系统,溶剂A = H₂O/0.1% TFA且溶剂B= ACN/0.1% TFA;梯度60分钟内20-40% B;流速 = 50 ml/min;柱:Phenomenex Luna 10 μ m C18 (2) 250 x 50mm;检测:uv 214 nm。

[0228] 纯化的化合物1得率为690 mg (65%)。实测m/z:1478.4,预期MH₂²⁺:1478.1。

[0229] 实施例3:化合物3A的合成

[0230] 步骤(a):N-(4-氟苯亚甲基)氨基氧基乙酸.

[0231] 将(Boc-氨基氧基)乙酸(96 mg,0.50 mmol)和4-氟苯甲醛 (53 μ L,0.50 mmol)溶解在甲酸(0.5 ml)中,反应混合物搅拌135 min。然后用20% ACN/水/0.1% TFA (7 ml)稀释反应混合物,产物用半制备型RP-HPLC纯化。

[0232] HPLC条件:Beckman System Gold;溶剂A = H₂O/0.1% TFA且溶剂B= ACN/0.1% TFA;梯度40分钟内25-35% B;流速 = 10ml/min;柱:Phenomenex Luna 5 μ m C18 (2) 250 x 21.2 mm;检测:uv 214 nm。

[0233] 得率92 mg (93%)。

[0234] 步骤(b):化合物3A的制备

[0235] N-(4-氟苯亚甲基)氨基氧基乙酸[来自步骤(a),43 mg,0.22 mmol]和PyBOP (112 mg,0.22 mmol)溶解在DMF (2 ml)中。加入DIPEA (157 μ L,0.90 mmol)/DMF (10 ml)溶液,并将混合物振摇1 min。然后将溶液加入到肽1 (500 mg,0.18 mmol)/DMF (10 ml)溶液中,并将反应混合物振摇30 min。接着用水(20 ml)稀释反应混合物,产物用制备型HPLC纯化。

[0236] HPLC条件按照实施例2,除了:溶剂A = H₂O/0.1%乙酸铵且溶剂B = ACN。纯物质得率291 mg (55%)。实测m/z:988.6,预期MH₃³⁺:987.7。

[0237] 实施例4:化合物3B由化合物1的合成

[0238] 步骤(a):脱保护化合物1以产生化合物2

[0239] 用水(10 μ L)和三氟乙酸(190 μ L)处理5 ml反应小瓶中的化合物1 (7 mg,2.37 μ M),然后浸入密封小瓶中声波浴10分钟。接着真空除去含水的TFA (约30分钟),残留物用柠檬酸盐缓冲液(pH 2.6,1.7 mL)重构,并装载到14位的自动合成仪盒(FastLabTM,GE Healthcare Ltd)。

[0240] 步骤(b): ^{18}F -苯甲醛的合成与纯化

[0241] ^{18}F 氟化物使用带有银靶的GEMS PETtrace回旋加速器通过 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})$ ^{18}F 核反应产生。使用1.5–3.5 ml的总靶体积。放射性氟化物捕获在Waters QMA柱(用碳酸盐预处理)上,并用Kryptofix 2.2.2. (4mg, 10.7 μM)和碳酸钾(0.56mg, 4.1 μM)/水(80 μL)和乙腈(320 μL)溶液洗脱氟化物。使用氮气驱使溶液离开QMA柱进入反应器皿。 ^{18}F 氟化物在稳定的氮气流和真空下120°C干燥9分钟。将三甲基铵苯甲醛三氟甲磺酸盐(Trimethylammonium benzaldehyde triflate) [Haka等, J.Lab.Comp.Radiopharm., 27, 823–833 (1989)] (3.3mg, 10.5 μM)/二甲基亚砜(1.1mL)加入到干燥的 ^{18}F 氟化物中,并将混合物105°C加热7分钟以产生4- ^{18}F 氟苯甲醛。标记效率经衰变校正后为69 $\pm$ 3%。

[0242] 粗标记混合物接着用氢氧化铵溶液稀释,并装载到MCX+ SPE柱(用水预调节作为FASTlab序列的一部分)。用水洗涤该柱并用氮气干燥,然后将4- ^{18}F 氟苯甲醛洗脱回乙醇(1 ml)中的反应器皿。约13% (衰变校正)的 ^{18}F 氟苯甲醛仍捕获在柱上。

[0243] 步骤(c): 与氨基氧基衍生物(化合物2)的醛缩合

[0244] 将化合物2 (5mg, 1.8 μmol)转移至FASTlab反应器皿中,然后洗脱的4- ^{18}F 氟苯甲醛从MCX+柱返回。混合物接着在70°C加热17分钟。分析型HPLC证实化合物3B产物的RCP为63 $\pm$ 9%。

[0245] 粗反应混合物用水(10 ml)稀释,并装载到制备型HPLC。10mM乙酸铵与乙腈系统获得粗反应混合物中3种可能放射性组分的完全分离,即 ^{18}F 氟化物(T_R =0.5分钟)、 ^{18}F 化合物3B (T_R =6分钟)和4- ^{18}F 氟苯甲醛(T_R =9分钟)。自HPLC系统的放射性恢复良好,恢复率为97%。纯化产物通过在约6分钟保留时间时收集获得。

[0246] 实施例5: HPLC分离 ^{18}F -标记的c-Met环肽与未标记肽

[0247] 根据实施例3制备化合物3A。

[0248] (i) 分析型HPLC条件

[0249] 柱: XBridge Shield RP 18 (4,6x50) mm, 2.5 μm ,

[0250] 水性流动相A: 10 mM NH_4Ac (缓冲液) pH约6.8;

[0251] 有机流动相B: 乙腈。

[0252] 柱温: 25°C。

[0253] 流速: 1.2 ml/min。

[0254] 梯度:

分钟	0	1	16	19	22	22.1	26
% B	20	20	40	100	100	20	20

[0255] (ii) 制备型HPLC条件

[0256] 柱: XBridge Shield RP 18 (10x100) mm, 5 μm 。

[0257] 水性流动相A: 10 mM NH_4Ac (缓冲液) pH约6.8;

[0258] 有机流动相B: 乙醇 (90%)流动相A (10%)。

[0259] 柱温: 25°C。

[0260] 流速: 4 ml/min。

[0261] 梯度:

分钟	0	1	16	20	25	26
----	---	---	----	----	----	----

% B	15	15	40	100	100	15
-----	----	----	----	-----	-----	----

[0262] (iii) 分析型和制备型HPLC结果

化合物	分析型 HPLC	制备型 HPLC
	保留时间(分钟)	保留时间(分钟)
盐酸苯胺	1.8	3
[0263] 氯苯甲醛	4.3	13
化合物 2	4.8	未定义
肽 1	5.1	未定义
化合物 3A	8.8	19

[0264] 实施例6：¹⁸F-标记的c-Met 肽(化合物3B)在带有肿瘤的裸鼠中的生物分布

[0265] CD-1雄性裸鼠(约20g)在单独的通风笼中饲养,自由获取食物和水。HT-29细胞(ATCC, 目录号HTB-38)在添加10%胎牛血清和青霉素/链霉素的McCoy's 5a培养基(Sigma # M8403)中生长。在70-80%铺满时使用0.25%胰蛋白酶每周两次将细胞1:3分离并在5% CO₂中37℃孵育。在轻气体(异氟烷)麻醉下使用细孔针(25 G)在一个位点(颈背部),将标称剂量10⁶个细胞(每次注射)/100 μl体积的HT-29细胞悬液皮下注射给小鼠。然后让肿瘤发展20天,或直至体积至少200mm³(用于包括在研究中)。

[0266] 20天的生长时间后,通过尾静脉作为静脉推注将化合物3B(0.1 ml, 1-5 MBq/动物)注射给动物。注射后的不同时间对动物实施安乐死,解剖,随后移出器官和组织。

[0267] 肿瘤摄取2分钟时为2.3 %id/g, 30分钟达到峰值(3.8 %id/g),然后随时间推移减少至注射后120分钟时的1.9 %id/g。肿瘤内的整体保留为83%。存在相当快速的随时间推移的血液清除(初始2分钟血液为9.2 %id/g,减少至注射后120分钟的0.81 %id/g)。随时间推移关键背景组织(例如肺和肝)遵循血液清除概况,注射后120分钟时摄取为1.1 %id/g(肝)和1.56 %id/g(肺)。

[0268] 实施例7:化合物3B在带有肿瘤的裸鼠中的受体阻断研究

[0269] 重复实施例6的研究,共注射100和1000倍过量的非放射性类似物,化合物3A(每只动物~1.5 μg和15 μg 过量),注射后120分钟解剖动物。本研究的所有动物具有相似的体重(25-30 g范围)。数据证实对于1000倍过量的未标记肽,获得化合物3B肿瘤摄取的统计学显著减少(p<0.01)(HT-29肿瘤摄取从1.9降至1.1 %id/g;40%的减少)。

[0270] 实施例8:灵长类化合物3B的PET成像

[0271] 通过PET测量了三只雌性食蟹猴中化合物3B的生物分布。各情况进行两次示踪剂注射:

[0272] (a) 单独的示踪剂(化合物3B) 3 MBq/kg(基线研究);

[0273] (b) 基线注射后4小时,9 MBq/kg示踪剂,与0.15 mg/kg化合物3A(阻断研究)共注射。

[0274] 以1-3 ml的推注剂量注射示踪剂,随后注射1 ml盐水。

[0275] 用于放射性测定的血液样品(0.2 ml)在给予后210分钟内每隔一定时间抽取。动力学研究中,目的区域从骨、心脏、肾、肺、肝和肌肉取出。全身研究中,目的区域选定从骨、

脑、结肠、心脏、肾、肺、肝、肌肉、胰、小肠、脾和膀胱取出。生成时间-活性数据,表示为标准摄取值(SUV)。

[0276] 使用冰冻切片放射自显影在猕猴肝中体外观察到特异性结合(~40%)。猕猴肌肉未观察到具有任何特异性结合。食蟹猴中的体内研究显示肝中的快速摄取,且在共注射0.15 mg/kg化合物3A后减少>40%。体内观察到肌肉无特异性结合。

[0277] 实施例9:环糊精对化合物3B生物分布的作用

[0278] 比较了化合物3B与用增溶剂羟丙基-β-环糊精(HPCD)配制的化合物3B的生物分布。未发现显著区别。

[0279] 实施例10:化合物3B的全自动合成

[0280] 使用溶解在缓冲液或苯胺溶液中的化合物2实施与实施例4类似的合成,并装载到FastLab盒供立即使用。

[0281] 下表概述了各主要放射性标记组分的量,其通过分析型HPLC的放射化学纯度计算:

	产物	化合物 1 前体	化合物 2 前体
T=0 分钟	化合物 3B	63±9%	75±3%
	[¹⁸ F]氟苯甲醛	28±15%	20±3%
T=60 分钟	化合物 3B	76±20%	92±2%
	[¹⁸ F]氟苯甲醛	20±15%	2±1%

[0283] 实施例11:化合物3B的自动合成(使用SPE纯化)

[0284] 使用FastLab™ (GE Healthcare Ltd)自动合成仪装置实施实施例4的合成。盒用试剂、注射器和SPE柱配制,如图1所示。

[0285] QMA (甲基季铵水(quaternary methyl ammonium water)处理)、MCX+ (混合阳离子交换)和C2 (低疏水性) SPE 柱均获自Waters。

[0286] 在FASTlab序列期间,柱(串联)用乙醇调节。即将使用前,柱用稀(0.2%)磷酸装填(prime)。粗反应混合物用1%磷酸稀释,并装载到SPE。用水洗涤SPE,然后用6ml 水(80% 乙醇)洗脱产物,用分析型HPLC分析放射性纯度(RCP)。

[0287] 基于使用的¹⁸F-氟化物起始量的结果如下:

起始活性(MBq)	合成终得率(%)	RCP
493	21	>99 %
750	25	>99 %
1,000	26	>99 %
49,000	19	94 %
61,000	18	98 %
67,400	21	96 %

[0288] 实施例12:前体的配制和冷冻干燥

[0289] 肽前体化合物2 (2.5或5 mg)与配方缓冲液(二水合磷酸氢二钠与一水合柠檬酸,pH 2.8)混合并搅拌,直至获得均匀悬浮液。来自带有冷冻干燥塞子的FASTlab™ 自动合成仪装置(GE Healthcare Ltd)的13 mm小瓶各自装入1 ml混悬液。然后将小瓶在冷冻干燥单

元冰冻并对其进行4天的冷冻干燥循环。

[0290] 所有包含肽的小瓶产生令人满意的冻干饼(cake)。发现冻干前体的溶解远远快于干燥分配的(dry-dispensed)化合物2。

[0291] 实施例13:pH对溶解度的作用

[0292] 化合物3B在FASTlab™合成仪上制备,产物洗脱液(~6 mL)收集在包含2 mL配方缓冲液(pABA,柠檬酸盐缓冲液,pH 7)的小瓶中。观察到混浊的溶液。该溶液(8 mL)容易地过滤通过预滤器(具有0.2 µm Supor膜与疏水性排斥条纹(hydrophobic repel stripe)的 Pall 25 mm滤器,part no. 6124211),得到澄清溶液。

[0293] 将过滤的溶液分成4 x 2 mL样品,并用磷酸盐(固体,以便不改变体积)如下调节4个样品的pH:

[0294] 瓶1:pH 7.5 (原始溶液,无调整)

[0295] 瓶2:pH 6.1

[0296] 瓶3:pH 8.6

[0297] 瓶4:pH 9.1

[0298] 所有的样品在黑暗中环境温度下保存。为评估潜在聚集/沉淀,该4个样品随后静态光散射28天。观察到下列情况:

[0299] - pH 6.1在第10天显示出可见的沉淀;

[0300] - pH ≥ 7.5时28天后未观察到聚集迹象。

[0301] 实施例14:人研究

[0302] 在预先确诊为头颈部鳞状细胞癌的6位人患者中对化合物3B成像进行研究。试剂耐受良好(无不良作用)。6位患者中的5位具有中度/高示踪剂摄取,1位具有低示踪剂摄取(与对侧相似)。这与文献报道中80%的此类患者过度表达c-Met一致。

CPCH1360235P

序 列 表

<110> GE Healthcare Limited

<120> 肽放射性示踪剂组合物

<130> PZ1058 W0

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 二硫化物

<222> (1).. (13)

[0001]

<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

<400> 1

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

Xaa

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

[0002] <220>
<223> 合成肽

<220>
<221> 二硫化物
<222> (2).. (14)

<220>
<221> 变体
<222> (3).. (3)
<223> N, H或Y

<220>
<221> 二硫化物
<222> (4).. (12)

<220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> G, S, T或N

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> T或R

<220>
 <221> 变体
 <222> (16).. (16)
 <223> A, D, E, G或S

<220>
 <221> 变体
 <222> (17).. (17)
 <223> S或T

<220>
 <221> 变体
 <222> (18).. (18)
 <223> D或E

<400> 2

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

Xaa Xaa

[0003] <210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成肽

<220>
 <221> 二硫化物
 <222> (4).. (16)

<220>
 <221> 变体
 <222> (5).. (5)
 <223> N, H或Y

<220>
 <221> 二硫化物
 <222> (6).. (14)

<220>
 <221> 变体
 <222> (7).. (7)
 <223> G, S, T或N

<220>
<221> 变体
<222> (11).. (11)
<223> T或R

<220>
<221> 变体
<222> (18).. (18)
<223> A, D, E, G或S

<220>
<221> 变体
<222> (19).. (19)
<223> S或T

<220>
<221> 变体
<222> (20).. (20)
<223> D或E

<400> 3

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

[0004]

Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Thr
				20	

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

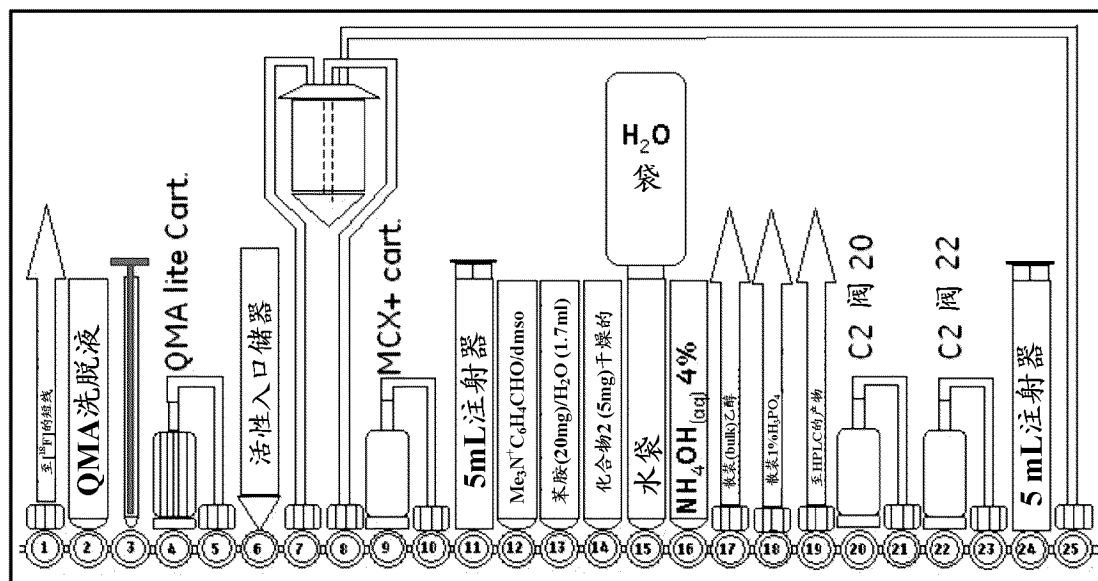
Gly	Gly	Gly	Lys
1			

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

	<223>	合成肽
	<400>	5
	Gly Ser Gly Lys	
	1	
	<210>	6
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工的
	<220>	
	<223>	合成肽
	<400>	6
	Gly Ser Gly Ser Lys	
	1	5
[0005]	<210>	7
	<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>	7
	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

实施例 11 的 FastLab™ 盒构型



其中：

QMA = 甲基季铵水处理 **SPE** 柱

MCX+ = 混合阳离子交换 **SPE** 柱

C2 = 低疏水性基于二氧化硅的 **SPE** 柱

图 1