



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102123739 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 200880120434. 8

(22) 申请日 2008. 04. 30

(30) 优先权数据

11/960, 262 2007. 12. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/062108 2008. 04. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/079024 EN 2009. 06. 25

(73) 专利权人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 W·J·麦克布莱德 D·M·戈德堡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 郭文洁

(51) Int. Cl.

A61K 51/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005/0136001 A1, 2005. 06. 23, 说明书第 1 页第 7 段第 5 行至第 17 行, 第 2 页第 8 段第 1 行至第 8 行, 第 9 页第 89 段第 10 行.

EP 0083129 A1, 1983. 07. 06, 说明书第 8 页第 22 行至第 29 行.

审查员 张朝磊

权利要求书1页 说明书36页

序列表2页 附图22页

(54) 发明名称

用于蛋白质、肽和其他分子的改进的 F-18 标记方法和组合物

(57) 摘要

本申请公开了用于例如 PET 成像技术的 F-18 标记分子的组合物和合成方法以及用途。在特定的实施方式中, 标记的分子可以是肽或蛋白质, 虽然其他类型的分子(包括但不限于核酸适体、寡核苷酸和核酸)可被标记并用于此类成像研究。在优选的实施方式中, F-18 标记可通过形成金属络合物并将 F-18-金属络合物结合至螯合部分(比如 DOTA, NOTA, DTPA, TETA 或 NETA)而与靶向分子缀合。在其他的实施方式中, 金属可首先与螯合基团缀合, 随后 F-18 结合至金属。在其他优选的实施方式中, F-18 标记的部分可包含可靶向的缀合物, 其可与双特异性或多特异性抗体联合使用, 以将 F-18 靶向至与疾病、医疗状况或病原体相关的细胞或组织上表达的抗原。示例性结果显示 F-18 标记的可靶向缀合物肽于 37°C 下可在人血清中稳定数小时, 有足够的时间进行 PET 成像分析。

1. 一种用 F-18 标记分子的方法,其包括:
 - a) 使 F-18 和金属反应形成 F-18 金属络合物;和
 - b) 将 F-18 金属络合物连接至分子,形成一种或多种 F-18 标记的分子,其中所述络合物连接至所述分子上的螯合部分,所述螯合部分选自:DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA,并且所述金属选自:铝、镓、铟和镱。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述分子是肽。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述分子是蛋白质。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的 F-18 标记的分子在血清中稳定。
5. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述肽选自:NOTA-ITC 苄基-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂ 和 In-DTPA 奥曲肽。
6. F-18、金属和包含螯合部分的分子在制备用于通过正电子成像术 (PET) 的 F-18 成像的试剂盒中的用途,
其中 F-18 与所述金属反应形成 F-18 络合物,所述金属选自铝、镓、铟或镱;
F-18 络合物连接至分子的螯合部分,形成一种或多种 F-18 标记的分子,所述螯合部分选自 DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA; 并且
其中所述的 F-18 标记的分子选自:用于血管形成受体成像的缀合 Al-¹⁸F 的 RGD-NOTA 或用于肿瘤成像的 F-18 标记的蛙皮素。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 F-18 标记的分子从所述方法一开始的一小时内制备得到。
8. 一种用 F-18 标记分子的方法,其包括:将 F-18 添加至金属标记的分子中,使 F-18 结合至金属形成 F-18 金属络合物,其中所述络合物连接至所述分子上的螯合部分,所述螯合部分选自:DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA,并且
所述金属选自:铝、镓、铟和镱。
9. 一种 F-18 标记的肽,其包含连接至所述肽的 F-18 金属络合物,其中所述络合物连接至所述肽上的螯合部分,所述螯合部分选自:DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA,并且,其中所述的金属选自:铝、镓、铟和镱。
10. 一种 F-18 标记的蛋白质,其包含连接至所述蛋白质的 F-18 金属络合物,其中所述络合物连接至所述蛋白质上的螯合部分,所述螯合部分选自:DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA,并且,其中所述的金属选自:铝、镓、铟和镱。
11. a) 与 F-18 形成络合物的金属和 b) 与 F-18 络合物结合的包含一个或多个螯合部分的靶向肽在制备用于 F-18 标记的试剂盒中的用途,其中所述的金属选自:铝、镓、铟和镱;和所述螯合部分选自:DOTA、TETA、NOTA 或者 NETA。
12. 如权利要求 11 所述的用途,所述试剂盒进一步包括抗坏血酸作为辐射分解保护剂。

用于蛋白质、肽和其他分子的改进的 F-18 标记方法和组合 物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是于 2007 年 12 月 19 日递交的美国专利申请号为 11/960,262 申请的部分继续申请,该申请根据 U.S.C. § 119(e) 要求 2007 年 1 月 11 日提交的美国临时专利申请第 60/884,521 号的权利,两者的全部内容均通过参考予以援引。

技术领域

[0003] 在某些实施方式中,本发明涉及用 F-18 标记肽的简单方法,其可用于体内成像。施用于受试者时,F-18 标记肽的优选比活性为约 1,000 至 2,000Ci/mol。也可使用 100 至数万 Ci/mmol 范围内的比活性。虽然在某些成像应用中优选更高比活性,但是在其他替代实施方式中,可以使用较低比活性的 NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-N,N',N''-三乙酸)或另一螯合部分与金属-F-18 络合物,例如,肾血流成像剂或用于对血流成像的心脏和脑成像剂。优选地,F-18 标记的完成不需要纯化步骤来从标记的肽分离未标记的肽。更优选地,F-18 标记的肽在体内状况下是稳定的,诸如在人血清中。

背景技术

[0004] 正电子成像术(PET)成像提供了高分辨率和从 PET 图定量。肽或其他小分子可用正电子发射体(仅举几例, ^{18}F , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{76}Br , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{86}Y 和 ^{124}I)标记。从同位素的核发射的正电子根据使用的同位素以不同能量喷射。当正电子与电子反应时,两种 511keV γ 射线以相反的方向发射。喷射的正电子的能量控制正电子在其通过撞击电子而被湮灭之前飞行平均距离。喷射能越高,正电子与电子碰撞前飞行的越远。希望 PET 同位素具有低喷射能,以使正电子在其产生被 PET 照相机成像的两种 511keV γ 射线前从靶位点飞行的距离最小。发射正电子的许多同位素在其衰变链中也具有其他发射,诸如 γ 射线、 α 粒子或 β 粒子。希望具有纯的正电子发射体的 PET 同位素,以便将任何发射量测定问题减至最小。

[0005] 同位素的半衰期也是重要的,因为半衰期必须足够长,以便将同位素连接至靶向分子、分析产物、将其注射于患者、允许产物定位、从非靶组织中清除和然后成像。如果半衰期太长,则比活性可能不够高以获得足够的光子来得到清晰的图,而如果半衰期太短,则生产、商业分配和生物分配需要的时间可能不够。F-18(β +635keV 97%, $t_{1/2}$ 110 分钟)由于它的低正电子发射能、无侧向发射和合适的半衰期,而成为最广泛使用的 PET 发射同位素之一。产生的 F-18 具有高比活性。当同位素连接至分子用于靶向时,通常需要一些未反应的靶向剂来完成,其经常相比于放射性标记的产物是以摩尔过量形式存在的。通常,标记产物和未标记产物在体内对同一靶点存在竞争,因而冷的靶向剂可以降低靶向剂的有效比活性。如果将 F-18 连接至具有非常高吸收的分子(诸如 2-氟-2-脱氧葡萄糖(FDG)),则比活性就不是那么重要了。不过,如果技术人员用标记的肽靶向受体或用有限量的有效结合位点进行免疫 PET 预靶向研究,则当冷的靶向剂过量存在时,其能够潜在地阻断发射标记剂的吸收。

[0006] 肽的常规 F-18 标记包括标记具有低比活性的试剂和 HPLC 纯化剂,然后与目标肽缀合。缀合获得所需比活性的标记肽后,通常缀合物需要再提纯。一个实例是 Poethko 等人的标记方法 (J. Nucl. Med. 2004 ;45 :892-902),其中首先合成和纯化了 4-[¹⁸F] 氟苯甲醛 (Wilson 等人, J. Labeled Compounds and Radiopharm. 1990 ;XXVIII :1189-1199),然后将其与肽缀合。然后通过 HPLC 纯化肽缀合物,以除去用来驱动缀合完成的多余的肽。如果 F-18 具有长的半衰期,所述两个反应和纯化不会成问题。但是, F-18 的半衰期只有 2 小时,因此将 F-18 连接至肽需要的所有操作是很显著的负担。

[0007] 这些方法进行时间长,并且需要使用特殊设计的设备来产生标记的产物和 / 或专业化学家的努力。它们不是可以在临床环境中常规使用的试剂盒制剂。需要一种快速、简单的 18-F- 标记靶向部分如蛋白质或肽的方法,获得具有合适的比活性和在体内检测和 / 或成像的稳定性,同时对特殊设备或专门人才的需求降至最低限度,以及减少操作人员受到的高强度辐射的靶向构建体。进一步需要预先包装好的试剂盒,用于提供实现所述新方法所需的组成成份。

发明内容

[0008] 氟化物与事实上所有其他元素结合,并且其中的一些键相对稳定。已知携带金属结合配体的肽稳定地且以非常高的比活性结合放射性金属。本方法采用的途径是首先使 F-18 与金属结合,然后用肽上的配体螯合 F-18 金属络合物。那么问题就是选择哪种金属 (或其他元素,例如硼)。根据对文献的快速检索, IIIA 族的元素 (硼、铝、镓、铟和铊) 成为首选。也可以使用镓。

[0009] 另外,技术人员可首先将金属或其他原子连接至肽,然后加入 F-18。对于例如氟化硼连接,第二个方法可能更加有效。

[0010] 已报道氟化铝络合物在体外稳定 (Martinez 等人, Inorg. Chem. 1999 ;38 : 4765-4660 ;Antony 等人, J. Biol. Chem. 1992 ;267 :6710-6718)。将氟化铝掺入骨和牙齿的釉质,则所述络合物在体内也是稳定地 (Li, Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2003 ;14 : 100-114)。

[0011] 熟练的技术人员将理解,几乎任何递送分子都可连接 F-18 用于成像目的,只要其含有可被修饰而不影响递送分子与细胞或组织靶受体之间的配体 - 受体结合相互作用的可衍生基团。虽然下面的实施例涉及 F-18 标记的肽部分,但是许多其他类型的递送分子均可被 F-18 标记并用于成像目的,其他类型的递送分子诸如寡核苷酸、激素、生长因子、细胞因子、趋化因子、血管生长因子、抗血管生成因子、免疫调节剂、蛋白质、核酸、抗体、抗体片段、药物、白细胞介素、干扰素、寡糖、多糖、脂质等。相似地,可被成像的疾病或病症的类型仅受合适靶向与疾病或病症相关的细胞或组织的递送分子有效性的限制。许多这样的递送分子是已知的,在下述实例中举例说明。例如,任何与疾病组织或靶点如癌结合的蛋白质或肽可利用已知的方法用 F-18 标记,用于检测和 / 或成像。在某些实施方式中,这样的蛋白质或肽可以包括但不限于:结合肿瘤 - 相关抗原 (TTAs) 的抗体或抗体片段。任何已知的 TTA- 结合抗体或片段通过描述的方法用 F-18 标记,并用于肿瘤的成像和 / 或检测,例如通过 PET 扫描或其他已知技术。

[0012] 在下面的某些实施例中,示例性的 F-18 标记的肽可作为使用双特异性或多特异

性抗体或抗体片段的预靶向方法中的可靶向的构建体用于成像目的。这种情况下,抗体或抗体片段将包含针对与疾病或病症相关的靶的一个或多个结合位点,所述靶诸如肿瘤-相关抗原或自身免疫疾病相关抗原或由病原生物(诸如病毒、细菌、真菌或其他微生物)产生或展示的抗原。第二个结合位点将特异性结合可靶向的构建体。使用双特异性或多特异性抗体的预靶向方法是本领域公知的(参见,例如美国专利第6,962,702号,其完整内容通过引用并入本文)。相似地,与可靶向的构建体结合的抗体或其片段也是本领域公知的(同上),诸如与HSG(组胺琥珀酰甘氨酸)结合的679单克隆抗体。一般而言,在预靶向方法中,首先施用双特异性或多特异性抗体,并让其与细胞或组织靶抗原结合。经过合适的时间让未结合的抗体从循环中清除后,例如F-18标记的可靶向的构建体施用于患者并与定位至靶细胞或组织的抗体结合,然后例如通过PET扫描拍摄图像。

[0013] 在示例性实施方式中,诸如叶酸的非肽受体靶向剂可与DOTA缀合,然后用例如与NOTA结合的F-18金属络合物标记。此类非肽受体靶向剂可包括,例如TA138(整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 受体的一种非肽拮抗剂)(Liu等,2003, Bioconj. Chem. 14:1052-56)。本领域已知的可与DOTA、NOTA或F-18金属络合物的另外的螯合剂缀合的相似的非肽靶向剂可用于要求保护的方法。其他受体靶向剂是本领域已知的,诸如生长抑素受体靶向剂In-DTPA奥曲肽(TYCO®)。如下文所述,F-18金属络合物可潜在地使用DTPA螯合并用于成像目的。NODAGATOC肽可以AIF-18进行标记用于生长抑素受体靶向(Eisenwiener等人, Bioconj. Chem. 2002, 13(3):530-41)。使用金属螯合物的受体靶向成像的其他方法是本领域已知的,并可用于实施要求保护的方法(参见,例如Andre等人,2002, J. Inorg. Biochem. 88:1-6; Pearson et al., 1996, J. Med. Chem. 39:1361-71)。

[0014] 用于通过PET扫描的F-18成像的成像技术和装置也是本领域公知的(参见,例如美国专利第6,358,489;6,953,567号;Page等人, Nuclear Medicine And Biology, 21:911-919, 1994;Choi等人, Cancer Research 55:5323-5329, 1995;Zalutsky等人, J. Nuclear Med., 33:575-582, 1992)且可使用任何此类已知的PET成像技术活装置。

[0015] 虽然下述实施例表明F-18金属络合物可用于PET成像,然而技术人员将意识到稳定的金属-氟络合物诸如非放射性的A1-27和F-19络合物也可以连接至NOTA或其他螯合剂和连接至肽或其他靶向剂用作MRI造影剂。所述A1F-NOTA络合物还可连接至聚合物而用于MRI成像。所述A1FNOTA衍生物也可用作PARACEST MRI成像剂(Woessner et al., Magn. Reson. Med. 2005, 53:790-99)。

附图说明

[0016] 包括下列图以说明本发明的特定实施方式,但其并不意味着限制要求保护的主题的范围。

[0017] 图1. 示例性肽IMP272。

[0018] 图2. 示例性肽IMP288。

[0019] 图3. 示例性肽IMP326。

[0020] 图4. 示例性肽IMP329。

[0021] 图5. 示例性肽IMP331。

[0022] 图6. 示例性肽IMP332。

- [0023] 图 7. 示例性肽 IMP333。
- [0024] 图 8. 示例性肽 IMP334。
- [0025] 图 9. 示例性肽 IMP349。
- [0026] 图 10. 示例性肽 IMP368。
- [0027] 图 11. 示例性肽 IMP375。
- [0028] 图 12. 示例性肽 IMP384。
- [0029] 图 13. 示例性肽 IMP386。
- [0030] 图 14. 示例性肽 IMP389。
- [0031] 图 15. 示例性肽 IMP449。
- [0032] 图 16. 附加的示例性肽 IMP422、IMP426、IMP428。
- [0033] 图 17. 示例性 NOTA 衍生物。
- [0034] 图 18. 示例性 NODA- 肽结构。
- [0035] 图 19. 具有或不具有 TF2 双特异性抗体的 In-111 和 F-18 标记的 IMP449 在小鼠中的比较生物分布。
- [0036] 图 20. 利用具有或不具有预靶向 TF10 双特异性抗 MUC-1 抗体的 ^{111}In - 标记的双 HSG 肽 (IMP 288) 在体内的肿瘤成像。
- [0037] 图 21. 利用 ^{124}I - 标记肽和 TF2 双特异性抗 -CEA 抗体预靶向在裸鼠的肺中微转移人类结肠癌的 PET 成像。
- [0038] 图 22A-22D. 附加的示例性用于 F-18 标记的整合部分。

具体实施方式

[0039] 在下面的描述中,使用了大量术语,提供以下定义以便于理解本文的公开内容。未明确定义的术语根据其明显的和普通含义使用。

[0040] 如本文所用,“一个”或“一种”可指一个 / 一种或多于一个 / 一种。

[0041] 如本文所用,术语“和”和“或”可用于指合取的或析取的。即除非另外声明,两个术语均应理解为等同于“和 / 或”。

[0042] 如本文所用,“约”指数字的加或减 10% 的范围内。例如,“约 100”是指 90 至 110 之间的任何数字。

[0043] 如本文所用,“肽”指长度介于 2 个和 100 个氨基酸残基之间、更优选地长度介于 2 个和 10 个氨基酸残基之间、更优选地长度介于 2 个和 6 个氨基酸残基之间的天然存在或非天然存在的氨基酸的任何序列。“氨基酸”可以是 L- 氨基酸、D- 氨基酸、氨基酸类似物、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物。

[0044] 如本文所用,部分地或全部地从未标记的分子中分离得到的所述标记分子是“纯化的”,因而所述标记分子级分相对于起始混合物而言是富集的。一种“纯化的”标记分子可以是包括几乎任何比率的标记和未标记分子的混合物,包括但不限于约 5 : 95 ; 10 : 90 ; 15 : 85 ; 20 : 80 ; 25 : 75 ; 30 : 70 ; 40 : 60 ; 50 : 50 ; 60 : 40 ; 70 : 30 ; 75 : 25 ; 80 : 20 ; 85 : 15 ; 90 : 10 ; 95 : 5 ; 97 : 3 ; 98 : 2 ; 99 : 1 或 100 : 0。

[0045] 如本文所用,术语“病原体”包括但不限于真菌、病毒、寄生虫和细菌,包括但不限于人免疫缺陷病毒 (HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、仙

台病毒、猫白血病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿猴病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳癌病毒、水痘带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病毒、爱泼斯坦 - 巴尔病毒、鼠白血病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒和蓝舌病毒、无乳链球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、乙型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分支杆菌、流产布鲁杆菌、结核分枝杆菌和破伤风梭菌。

[0046] 如本文所用,“辐射分解保护剂”是指任何分子、化合物或组合物,其可被添加到 F-18 标记络合物或分子中,以减低 F-18 标记的络合物或分子被辐射分解的速度。可以使用任何已知的辐射分解保护剂,包括但不限于抗坏血酸。

[0047] 靶向的构建体肽

[0048] 在某些实施方式中,F-18 标记的部分可以包含肽或其他可靶向的构建体。F-18 标记的肽(或蛋白质)可被选择直接与靶向细胞、组织、病原生物或其他用于成像和/或检测的靶点结合。在其他实施方式中,F-18 标记的肽可被选择间接结合,例如利用双特异性抗体与一个或多个针对可靶向的构建体肽的结合位点,和与一个或多个针对与疾病或病症相关的靶抗原的结合位点。双特异性抗体可以用于例如预靶向技术中,其中抗体可先施用于受试者。需要充足的时间以使双特异性抗体与靶抗原结合以及使未结合抗体从循环中清除。可靶向的构建体如 F-18 标记的肽可施用于受试者,并可与双特异性抗体结合,定位在病态细胞或组织中,然后 F-18 标记的可靶向的构建体的分布可以通过 PET 扫描或其他已知技术进行测定。

[0049] 这些可靶向的构建体可以具有多种结构,其选择不仅根据抗体或片段与可靶向的构建体的高亲和力结合的有效性,而且根据当用于预靶向方法和双特异性抗体(bsAb)或多特异性抗体时能快速从体内消除。疏水剂在引起强免疫应答方面最佳,而亲水剂是快速体内消除所优选的。因此,建立了疏水和亲水特性之间的平衡。这可以部分地通过使用亲水螯合剂以抵消许多有机部分固有的疏水性来实现。另外,可选择具有相反溶解性质的可靶向的构建体的亚单元,例如选择含有氨基酸的肽,氨基酸中的一些是疏水性的、一些是亲水性的。除了肽以外,还可以使用糖类。

[0050] 可使用具有至少两个氨基酸残基的肽,优选地为 2 至 10 个残基,也可将肽与诸如螯合剂的其他部分偶连。接头应是低分子量缀合物,优选具有低于 50,000 道尔顿的分子量,并且有利地低于约 20,000 道尔顿、10,000 道尔顿或 5,000 道尔顿的分子量(包括螯合物中的金属离子)。更常见地,可靶向构建体肽将具有四个或更多残基,诸如肽 DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(SEQ ID NO:1),其中 DOTA 是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸,而 HSG 是组胺琥珀酰甘氨酸基团。另外,DOTA 可被 NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-N,N',N''-三乙酸)或 TETA(对-溴乙酰氨基-苄基-四乙胺四乙酸)部分取代。

[0051] 可靶向的构建体还可在主链结构中包含非天然氨基酸(例如,D-氨基酸)以增加肽在体内的稳定性。在可选的实施方式中,其他主链结构,诸如从非天然氨基酸和拟肽构建的那些。

[0052] 使用固相支持体和重复正交脱保护和偶联的标准技术在自动肽合成仪上方便地合成用作可靶向构建体的肽。肽中以后用于螯合物缀合的游离氨基用标准的保护基团(诸

如 Boc 基团) 有利地封闭, 而 N- 末端残基可被乙酰化以增加血清稳定性。此类保护基团是熟练的技术人员已知的。参见 Greene 和 Wuts, 有机合成中的保护基团, 1999 (John Wiley and Sons, N. Y.)。当肽准备以后用于双特异性抗体系统时, 它们被有利地从树脂中切割下, 产生相应的 C- 末端酰胺, 以便抑制体内羧肽酶的活性。

[0053] 免疫原的半抗原包含免疫原识别部分, 例如化学半抗原。使用化学半抗原, 优选地 HSG 半抗原, 接头显示出对抗体的高特异性。HSG 半抗原产生的抗体是已知的, 并可容易地掺入适当的双特异性抗体 (参见, 例如美国专利号 6, 962, 702 ; 7, 138, 103 和 7, 300, 644, 它们的完整内容均通过引用并入本文)。因此, 接头与连接的半抗原的结合是对抗体或抗体片段高度特异性的。

[0054] 螯合部分

[0055] 在一些实施方式中, F-18 标记的分子可包含一个或多个亲水螯合部分, 其结合金属离子并且还有助于确保快速的体内清除。螯合剂可根据其特定的金属结合性质进行选择, 并且可容易地被交换。

[0056] 特别有用的金属-螯合物组合包括 2- 苄基-DTPA 和其单甲基和环己基类似物。诸如 NOTA (1, 4, 7- 三氮杂- 环壬烷-N, N', N''- 三乙酸)、DOTA 和 TETA (对- 溴乙酰氨基- 苄基- 四乙胺四乙酸) 的大环螯合剂也可与可潜在地用作 F-18 缀合配体的多种金属一起使用。

[0057] 其中配体包括硬碱螯合功能诸如羧酸或胺基的 DTPA 和 DOTA- 型螯合剂对于螯合硬酸阳离子、尤其是 IIa 族和 IIIa 族金属阳离子最为有效。通过调整目标金属的环的大小, 可使此类金属-螯合物络合物非常稳定。诸如大环聚醚的其他环型螯合剂由于稳定结合核素而受到关注。卟啉螯合剂可与许多金属络合物一起使用。可将不止一种类型的螯合剂与载体缀合以结合多种金属离子。诸如美国专利第 5, 753, 206 号中公开的那些螯合剂, 尤其是缩氨基硫脲基乙醛酰半胱氨酸 (Tscg-Cys) 和缩氨基硫脲基乙酰半胱氨酸 (Tsca-Cys) 螯合剂有利地用于结合 Tc, Re, Bi 和其他过渡金属元素、镧系元素和铜系元素的软酸阳离子, 所述软酸阳离子紧密地结合软碱配体。将不止一种类型的螯合剂与肽连接是有用的。由于双-DTPA 半抗原的抗体是已知的 (Barbet 等人, 美国专利第 5, 256, 395 号) 并且容易偶联至靶向抗体形成双特异性抗体, 因此, 在预靶向实验方案中使用带有冷的双 DTPA 螯合剂和用于结合 F-18 络合物的另一螯合剂的肽半抗原是可能的。此类肽的一个实例是 Ac-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ IDNO : 2)。其他硬酸螯合剂 (诸如 DOTA、TETA 等) 可取代 DTPA 和 / 或 Tscg-Cys 基团, 并且可使用用来产生抗-双-DTPA Mab 的技术类似的技术来产生特异于这些硬酸螯合剂的 Mab。

[0058] 另一种有用的螯合剂可含有 NOTA- 型部分, 例如, 如 Chong 等人 (用于抗体靶向的发射癌症疗法的双模态双功能配体的合理设计和产生, J. Med. Chem., 电子出版于 12-7-07, 通过引用并入本文) 中所公开的。Chong 等人公开了基于 NOTA 结构的双功能 C-NETA 配体的产生和用途, 所述配体在与 ¹⁷⁷Lu 或 ^{205/206}Bi 络合时显示在血清中高达 14 天的稳定性。

[0059] 应理解, 可将两种不同的硬酸或软酸螯合剂 (例如具有不同的螯合环大小) 掺入可靶向的构建体, 以优先结合两种不同的硬酸或软酸阳离子 (根据阳离子的不同大小、螯合环的几何学和阳离子的优选络合物离子结构)。这将允许两种不同的金属 (其中一种或两种可与 F-18 连接) 掺入可靶向的构建体, 以被预靶向的双特异性抗体最终捕获。

[0060] 施用方法

[0061] 在不同的实施方案中,双特异性抗体和可靶向的构建体可用于成像正常或病态组织和器官(参见,例如美国专利第 6,126,916 ;6,077,499 ;6,010,680 ;5,776,095 ;5,776,094 ;5,776,093 ;5,772,981 ;5,753,206 ;5,746,996 ;5,697,902 ;5,328,679 ;5,128,119 ;5,101,827 ;和 4,735,210 号,它们的完整内容均通过引用并入本文)。

[0062] 双特异性抗体(bsAb)和 F-18 标记的可靶向构建体的施用可通过在施用可靶向的构建体之前某些时间施用 bsAb 抗体来执行。试剂的剂量和施用时间可由熟练得技术人员容易地设计,并依赖于所用试剂的具体性质。如果首先施予 bsAb-F(ab')₂ 衍生物,则施用可靶向构建体之前 24-72 小时(或者 48-96 小时)的等待时间将是适当的。如果 IgG-Fab'bsAb 缀合物是最初的靶向载体,则施用可靶向的构建体之前将需要 3-10 天范围内的更长的等待时间。经过充分的时间让 bsAb 靶向病态组织之后,施用 F-18 标记的可靶向的构建体。施用可靶向的构建体之后,即可进行成像。

[0063] 某些实施方式涉及具有至少三个不同的靶结合位点的多价靶结合蛋白质的使用,如序号为 60/220,782 的专利申请所述。已通过经由化学接头交联几个 Fab- 样片段制备了多价靶结合蛋白质。参见美国专利第 5,262,524 ;5,091,542 号和 Landsdorp 等人, Euro. J. Immunol., 16 :679-83(1986)。也已通过共价连接几个单链 Fv 分子(scFv)以形成单个多肽来制备多价靶结合蛋白质。参见美国专利第 5,892,020 号。一种基本上是 scFv 分子聚集体的多价靶结合蛋白质已公开于美国专利第 6,025,165 和 5,837,242 号。包含三个 scFv 分子的三价靶结合蛋白质已公开于 Krott 等人 Protein Engineering, 10(4) : 423-433(1997)。

[0064] 可选地,一种称为“对接和锁定”(DNL)的技术已被证实可以简单地和可重现地构建各种多价络合物,包括含有 2 个或多个不同抗体或抗体片段的络合物。(参见,例如,2006 年 3 月 24 日提交的美国专利申请 11/389,358 ;2006 年 3 月 28 日提交的 11/391,584 ;2006 年 6 月 29 日提交的 11/478,021 ;2006 年 12 月 5 日提交的 11/633,729 ;和 2007 年 10 月 26 日提交的 11/925,408,它们的完整内容均通过引用并入本文)。这些构建体也可应用于本文所述要求保护的方法和组合物。

[0065] 可使用可在双特异性抗体(bsAb)和可靶向构建体的给药之间施予的清除剂。可使用具有新机制作用的清除剂,即被靶向 bsAb 的疾病靶向臂的糖基化的抗基因型 Fab' 片段。在一个实例中,施予抗 CEA(MN 14ab) x 抗肽 bsAb,并允许其最大程度地附着于疾病靶点。为了清除残留的 bsAb,施予 MN-14 的抗基因型 Ab(称为 WI2),优选地作为糖基化的 Fab' 片段。清除剂以单价方式与 bsAb 结合,而其附着的糖残基将整个复合物引向肝脏,在肝脏中发生快速的代谢。然后将 F-18 标记的可靶向构建体施予受治疗者。bsAb 的 MN-14 臂的 WI2Ab 具有高亲和力,并且其清除机制不同于其他公开的机制(参见 Goodwin 等人,同上),原因是其不涉及交联,因为 WI2-Fab' 是单价部分。然而,可选的用于清除剂的方法和组合物是已知的,并且可以使用任何已知的清除剂。

[0066] 制剂和施用

[0067] F-18 标记分子可以制备得到包含一种或多种药学上适当的赋形剂,一种或多种额外成分或它们的混合物的组合物。这些组合物可采用已知的方法制成药学上有用的剂量,使活性成份(即 F-18 标记分子)与一种或多种药学上适合的赋形剂组合成混合物。无菌

磷酸缓冲盐水是药学上适合的赋形剂的一例。现有技术中还有其他合适的赋形剂。参见，例如 Ansel 等人，药品剂型与药物输送系统，第 5 版 (Lea & Febiger 1990) 和 Gennaro (编辑)，雷明顿的制药科学，第 18 版 (Mack 出版公司 1990) 及它们的修订版。

[0068] 本文所述的组合物的优选给药途径是 parental 注射。注射可以是静脉注射、动脉注射、淋巴管注射、鞘内注射、腔内注射（即非口服注射）。非口服施用中，组合物与药学上可接受的赋形剂被制成单元计量注射形式（例如溶液、悬浊液或乳剂）。这些赋形剂本身是无毒和无疗效的。这些赋形剂例如盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和汉克氏溶液。也可以使用无水赋形剂诸如固定油和油酸乙酯。优选赋形剂是 5% 葡萄糖盐水。所述赋形剂可以包含少量添加剂，如提高渗透压和化学稳定性的物质，其包括缓冲剂和防腐剂。包括口服给药的其他给药方式也在考虑范围内。

[0069] 包含 F-18 标记分子的制剂组合物可以通过例如团注或连续输注进行静脉给药。注射用组合物可以添加防腐剂，在例如安瓿或多剂量容器中以单元剂量形式存在。组合物也可以在油性或水性媒质中的悬浮液、溶液或乳液形式存在，且含有如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂的成型剂。可选地，所述组合物可以以粉末形式在使用前与合适的媒质例如灭菌无热原水混合。

[0070] 组合物可以以溶液形式给药。溶液的 pH 应当在 pH 5 至 9.5 范围内，优选 pH 6.5 至 7.5。因而制剂应当在含有适当的药学上可接受缓冲剂（例如磷酸、TRIS（羟甲基）氨基甲烷-HCl 或柠檬酸等）的溶液中。缓冲液浓度应当在 1 至 100mM 范围。制剂溶液也可以含有盐，例如浓度 50 至 150mM 的氯化钠或氯化钾。还可以包含有效量的稳定剂，例如甘油、白蛋白、球蛋白、去污剂、明胶、鱼精蛋白或鱼精蛋白的盐。组合物可以给药至哺乳动物皮下、静脉内、肌肉内或其他非口服途径。此外，给药方式可以通过连续输注或通过单次或多次团注。

[0071] 当施用双特异性抗体时，例如在预靶向技术中，人类给药抗体的剂量取决于各种因素，例如患者的年龄、体重、身高、性别、日常身体状况和先前病史。典型地，为达到靶向的目的，需要为受者提供一定剂量的双特异性抗体，其以约 1mg 至 200mg 范围作为单次静脉输注，也可根据情况指示施予更低或更高的剂量。典型地，需要提供受者一定剂量，即在约 10mg 每平方米体表面积或一般成年人 17 至 18mg 抗体的范围内，也可以根据情况施用更低或更高的剂量。可以成像目的施用于人受试者的双特异性抗体剂量的例子为 1 ~ 200mg，优选 1 ~ 70mg，最优选 1 ~ 20mg，尽管可使用更高或更低的剂量。

[0072] 通常，施予 F-18 标记的剂量取决于各种因素，例如患者的年龄、体重、身高、性别、日常身体状况和先前病史。优选地，施予患者 F-18 标记分子的饱和剂量。F-18 标记分子的给药剂量可以以毫居里来衡量。F-18 成像研究的典型范围是 5 至 10mCi。

[0073] 肽的施用

[0074] 要求保护的方法和 / 或组合物的各种实施方式可以涉及待施予受试者的一种或多种 F-18 标记肽。给药方式可以采用任何现有技术的方式，包括但不限于口服、经鼻、含服、吸入、直肠、阴道、局部、正位、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、动脉内、鞘内或静脉注射。例如，当 F-18 标记肽在预靶向协议中施用时，肽优先以静脉注射方式给药。

[0075] 以口服方式施用于受试者的未修饰的肽可在消化道中降解，根据序列和结构可以穿过肠道内膜表现出弱的吸收。然而，以化学的方式修饰肽使得它们受内源性蛋白酶降解

的影响降低或通过消化道时吸收增加的方法是已知的（参见，例如，Blondelle 等人，1995，*Biophys. J.* 69 :604-11 ;Ecker 和 Crooke，1995，*Biotechnology* 13 :351-69 ;Goodman 和 Ro，1995，BURGER' S MEDICINAL CHEMISTRY AND DRUG DISCOVERY, VOL. I, Wollf 编，John Wiley & Sons ;Goodman 和 Shao，1996，*Pure & Appl. Chem.* 68 :1303-08）。用于制备肽类似物库的方法，例如含有 D-氨基酸的肽；由模拟肽结构的有机分子组成的肽模拟物；或类肽诸如插烯加成的类肽，这些方法也已被描述，可以用于构建适合口服施用于受试者的基于 F-18 标记分子的肽。

[0076] 在某些实施方式中，标准的肽键连接可以被一个或多个替代性连接基团所取代，诸如 $\text{CH}_2\text{-NH}$ ， $\text{CH}_2\text{-S}$ ， $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ， $\text{CH}=\text{CH}$ ， CO-CH_2 ， CHOH-CH_2 等。用于制备肽模拟物的方法式已知的（例如，Hruby，1982，*Life Sci* 31 :189-99 ;Holladay 等人，1983，*Tetrahedron Lett.* 24 :4401-04 ;Jennings-White 等人，1982，*Tetrahedron Lett.* 23 :2533 ;Almquist 等人，1980，*J. Med. Chem.* 23 :1392-98 ;Hudson 等人，1979，*Int. J. Pept. Res.* 14 :177-185 ;Spatola 等人，1986，*Life Sci* 38 :1243-49 ;美国专利号 5,169,862 ;5,539,085 ;5,576,423, 5,051,448, 5,559,103，分别通过引用并入本文）。肽模拟物可以表现出相比它们的肽类似物更高的体内稳定性和 / 或吸收。

[0077] 可选地，利用给 N 端和 / 或 C 端加帽来阻止外肽酶活性，从而肽可以通过口服递送给药。例如，C 端可利用酰胺肽加帽，N 端可通过肽的乙酰化作用加帽。肽也可以环化以阻断外肽酶，例如形成环酰胺、二硫化物、醚类、硫化物等。

[0078] 肽的稳定性还可以通过将 D-氨基酸替代天然形成的 L-氨基酸，尤其是在内肽酶会起作用的位置。内肽酶的结合和切割序列是现有技术已知的，制备和利用掺入 D-氨基酸的肽的方法已被描述（参见，McBride 等人，2004 年 6 月 14 提交的美国专利申请号 20050025709，其通过引用并入本文）。在某些实施方式中，通过与蛋白酶和 / 或肽酶抑制剂联合制剂，肽和 / 或蛋白质可以口服给药。

[0079] 其它口服递送治疗肽的方法公开在 Mehta(“Oral delivery andrecombinant production of peptide hormones”，2004 年 6 月，BioPharmInternational)。肽与赋形剂以肠溶包衣固体剂型给药，所述赋形剂可以调节肠蛋白水解活性和提高肽转运穿越肠壁。利用该技术的完整肽的相对生物利用度可达到给药剂量的 1% 至 10% 范围内。胰岛素利用与胆酸钠和蛋白酶抑制剂的肠溶包衣微囊剂已经成功施用于狗 (Ziv 等人，1994，*J. Bone Miner. Res.* 18 (Suppl. 2) :792-94. Oral administration of peptides has been performed using acylcamitine as a permeation enhancer and an enteric coating (Eudragit L30D-55, Rohm Pharma Polymers, 参见 Mehta, 2004)。用于口服给药的肽的赋形剂通常包含一种或多种肠蛋白酶 / 肽酶抑制剂，并伴有去污剂或其他试剂以提高肽的溶解性或吸收，其可被包装成肠溶包衣胶囊或药片 (Mehta, 2004)。有机酸可以包含在胶囊中以酸化肠道，当胶囊溶解于肠道时抑制肠蛋白酶活性 (Mehta, 2004)。其余可选的用于口服递送的肽可以包含与基于聚乙二醇 (PEG) 的两亲性寡聚物缀合，增加吸收和阻止酶促降解 (Soltero and Ekwuribe, 2001, *Pharm. Technol.* 6 :110)。

[0080] 产生抗体的方法

[0081] 肽主链的 Ab 可通过公知的 Ab 生产方法产生。例如，向免疫活性动物中注射于完全弗氏佐剂中的免疫原（诸如（肽）_n-KLH（其中 KLH 是钥孔血蓝蛋白，并且 n = 1-30）），

接下来再两次注射悬于不完全弗氏佐剂中的同一免疫原,在静脉推注抗原后三天收获脾细胞。然后将收获的脾细胞与 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞融合,并使用直接结合 ELISA 分析所得克隆的培养上清液的抗肽反应性。产生的 Ab 的特异性可通过使用原始免疫原的肽片段进行分析。这些片段可使用自动肽合成仪容易地制备。对于 Ab 生产,分离酶缺陷的杂交瘤以便能够选择融合的细胞系。此技术也可用于产生针对包含可靶向构建体的一种或多种螯合物(例如,In(III)-DTPA 螯合物)的抗体。In(III)-双-DTPA 的单克隆小鼠抗体是已知的(Barbet' 395 见上)。

[0082] 使用的靶向抗体,例如作为双特异性抗体的组分,可以对作为标志物质的多种细胞表面或细胞内肿瘤相关抗原具有特异性。这些标志物可以是肿瘤产生的物质,或可以是在肿瘤部位、在肿瘤细胞表面或在肿瘤细胞内(无论是在细胞质、核还是在各种细胞器或亚细胞结构中)积累的物质。此类肿瘤相关标志物包括由 He 内 erman,“Immunodiagnosis of Cacer”(癌症的免疫诊断),Fleisher 编,“The Clinical Biochemistry of Cancer”(癌症的临床生物学),第 347 页(American Association of Clinical Chemists,1979)和在美国专利第 4,150,149 ;4,361,544 ;和 4,444,744 号中公开的那些,分别通过引用并入本文。关于肿瘤相关抗原的最新报道包括 Mizukami 等人(2005, Nature Med.11 :992-97); Hatfield 等人(2005, Curr. Cancer DrugTargets 5 :229-48);Vallbohmer 等人(2005, J. Clin. Oncol. 23 :3536-44);和 Ren 等人(2005, Ann. Surg. 242 :55-63),分别通过引用并入全文。

[0083] Herbeman(见上)已将肿瘤相关标志物分为许多类别,包括瘤胚抗原、胎盘抗原、致癌或肿瘤病毒相关抗原、组织相关抗原、器官相关抗原、异位激素和正常抗原或其变体。有时,肿瘤相关标志物的亚基有利地用于产生具有更高肿瘤特异性的抗体,例如,人绒毛膜促性腺激素(HCG)的 β 亚基或癌胚抗原(CEA)的 γ 区,其刺激对非肿瘤物质具有大大降低的交叉反应性的抗体的产生,如美国专利第 4,361,644 和 4,444,744 号所公开。

[0084] 感兴趣的另一种标志物是跨膜激活剂及 CAML-相互作用分子(TACI)。参见,Yu 等人 Nat. Immunol.,1 :252-256(2000)。简单地说,TACI 是 B 细胞恶性肿瘤(例如,淋巴瘤)的标志物。进一步,已知 TACI 和 B 细胞成熟抗原(BCMA)被肿瘤坏死因子同系物(一种增殖诱导配体(APRIL))结合。APRIL 刺激原 B 细胞和 T 细胞的体外增殖,并由于 B 细胞在体内的积累而增加脾的重量。APRIL 还与 TALL-I(也称为 Blys 或 BAFF)竞争受体的结合。可溶性 BCMA 和 TACI 特异性防止 APRIL 的结合,并阻断 APRIL-刺激的原 B 细胞的增殖。BCMA-Fc 还抑制小鼠中针对钥孔血蓝蛋白和肺炎疫苗(Pneumovax)的抗体的产生,表明经由 BCMA 和 / 或 TACI 的 APRIL 和 / 或 TALL-1 信号转导是产生体液免疫必需的。因此,APRIL-TALL-I 和 BCMA-TACI 形成参与 B 细胞和 T 细胞功能刺激的两配体-两受体途径。

[0085] 用于成像各种疾病或疾患(诸如恶性疾病、心血管疾病、传染病、炎症疾病、自身免疫病或神经疾病)的示例性靶抗原可包括结肠特异性抗原-p(CSAp)、癌胚抗原(CEA)、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD45、CD74、CD79a、CD80、HLA-DR、Ia、Ii、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、NCA(CEACAM6 或 CD66a-d 和 CD67 以及 CD138)、EGFR、HER 2/neu、TAG-72、EGP-1、EGP-2、A3、KS-1、Le(y)、S100、PSMA、PSA、腱糖蛋白、叶酸受体、VEGFR、PIGF、ILGF-1、坏死抗原、IL-2、IL-6、T101、MAGE 或这些抗原的组合。尤其是,抗原可包括癌胚抗原(CEA)、腱糖蛋白、表皮生长因子受体、血小板衍生生长因子受体、成纤

维细胞生长因子受体、血管内皮生长因子受体、神经节苷脂、HER/2neu 受体和这些抗原的组合。

[0086] 当涉及淋巴瘤、白血病或自身免疫失调的成像或检测时,靶向抗原可以选自:CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD154, B7, MUC1, Ia, Ii, HM 1.24, HLA-DR, 腱糖蛋白, VEGF, PlGF, ED-B 纤连蛋白, 癌基因, 癌基因产物, CD66a-d, 坏死抗原, IL-2, T 101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) 和 TRAIL-R2 (DR5)。

[0087] 最初产生针对免疫原的抗体后,可对抗体进行测序,并随后通过重组技术制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合是本领域技术人员公知的。例如,通过以下制备人源化单克隆抗体:将来自小鼠免疫球蛋白重链和轻链可变链的小鼠互补决定区转移到人可变区,然后在框架区内用鼠对应残基置换人残基。使用衍生自人源化单克隆抗体的抗体组分消除了与鼠恒定区的免疫原性相关的潜在问题。克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般技术描述于例如以下出版物:Orlandi 等人,Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 86 :3833(1989),其通过引用整体并入本文。生产人源化 Mab 的技术描述于例如 Jones 等人, Nature, 321 :522(1986), Riechmann 等人, Nature, 332 :323(1988), Verhoeyen 等人, Science, 239 :1534(1988), Carter 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 12 :437(1992) 和 Singer 等人, J. Immun., 150 :2844(1993),其每个通过引用整体并入本文。

[0088] 可选地,完全人抗体可从转基因非人的动物获得。参见,例如,Mendez 等人, Nature Genetics, 15 :146-156(1997);美国专利第 5,633,425 号。例如,可从具有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中回收人抗体。小鼠体液免疫系统通过灭活内源免疫球蛋白基因并引入人免疫球蛋白基因座而被人源化。人免疫球蛋白基因座极其复杂,并包含总共占人类基因组近 0.2% 的大量离散区段。为了确保转基因小鼠能够产生足够的抗体谱,必须将人重链和轻链基因座的大部分引入小鼠基因组。这是以逐步过程实现的,开始于形成含有胚系构型的人重链或轻链免疫球蛋白基因座的酵母人工染色体(YAC)。由于每个插入物的大小是大约 1Mb, YAC 的构建要求免疫球蛋白基因座的重叠片断的同源重组。经由含有 YAC 的酵母球芽与小鼠胚胎干细胞的融合,将两个 YAC(一个含有重链基因座而一个含有轻链基因座)分别引入小鼠。然后将胚胎干细胞克隆微注射于小鼠胚胎。得到的嵌合雄性根据其通过其种系递送 YAC 的能力进行筛选,并将其与具有鼠抗体产生缺陷的小鼠杂交。繁殖两个转基因品系(一个含有人重链基因座而另一个含有人轻链基因座)产生响应于免疫接种而产生人抗体的子代。

[0089] 未重排的人免疫球蛋白基因也可经由微细胞介导的染色体转移(MMCT)被引入小鼠胚胎干细胞。参见,例如, Tomizuka 等人, Nature Genetics, 16 :133(1997)。在此方法中,含有人染色体的微细胞与小鼠胚胎干细胞融合。转移的染色体被稳定地保持,并且成年嵌合体显示适当的组织特异性表达。

[0090] 作为替代方案,抗体或抗体片段可从分离自组合免疫球蛋白库的人抗体片段衍生。参见,例如, Barbas 等人, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2(方法:与酶学方法的比较 2):119(1991),和 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol, 12 :433(1994),其通过引用并入本文。与通过 B 细胞永生产生单克隆抗体相关的许多困难可通过使用噬菌体展示在大肠杆菌中改造和表达抗体片段来克服。

[0091] 可采用相似的策略获得高亲和力 scFv。参见,例如, Vaughn 等人, Nat. Biotechnol, 14:309-314(1996)。通过使用对应于所有已知 V_H 、 V_K 和 V_{80} 基因家族的 PCR 引物从未免疫的人供体分离 V 基因,可构建大库藏的 scFv 库。扩增之后, V_K 和 V_L 库被合并形成一个库。将这些片段连接入噬菌粒载体。然后将 scFv 接头 (Gly4, Ser)₃ 连接于噬菌粒中 V_L 片段的上游。扩增 V_H 和接头- V_L 片段并在 J_H 区上装配。将得到的 V_H -接头- V_L 片段连接于噬菌粒载体。可使用如上所述的过滤器或使用免疫管 (NUNC®;MAXISORP®) 淘选噬菌粒库。相似的结果可通过从免疫的兔的淋巴细胞或脾细胞构建组合免疫球蛋白库和通过在巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 中表达 scFv 构建体来实现。参见,例如, Ridder 等人, Biotechnology, 13:255-260(1995)。另外,分离适当的 scFv 后,具有更高的结合亲和力和更慢的解离速率的抗体片段可通过亲和力成熟过程(诸如 CDR3 诱变和链改组)获得。参见,例如, Jackson 等人, Br. J. Cancer, 78:181-188(1998); Osbourn 等人, Immunotechnology, 2:181-196(1996)。

[0092] 抗体片段的另一形式是编码单个 CDR 的肽。CDR 肽(“最小识别单位”)可通过构建编码目标抗体的 CDR 的基因来获得。此类基因例如通过使用聚合酶链式反应来制备,以从产生抗体的细胞的 RNA 合成可变区。参见,例如, Larrick 等人, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2(方法:与酶学方法的比较)2:106(1991); Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”(单克隆抗体的遗传操作),选自单克隆抗体:产生、改造和临床应用(MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION), Ritter 等人(编),第 166-179 页(Cambridge University Press 1995);和 Ward 等人, “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”(抗体的遗传操作和表达),选自 MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS(单克隆抗体:原理和应用), Brich 等人(编),第 137-185 页(Wiley-Liss, Inc. 1995)。

[0093] 双特异性抗体可通过本领域已知的技术制备,例如,抗 CEA 肿瘤 Ab 和抗肽 Ab 二者分别用胃蛋白酶消化为它们各自的 $F(ab')_2$ 片段。用半胱氨酸还原抗 CEA- $Ab-F(ab')_2$ 以产生 Fab' 单体单元,其进一步与交联剂双(马来酰亚胺基)己烷反应以产生 Fab'-马来酰亚胺部分。用半胱氨酸还原抗肽 $Ab-F(ab')_2$, 并且纯化的、回收的抗肽 Fab'-SH 与抗 CEA-Fab'-马来酰亚胺反应以产生 Fab' x Fab' 双特异性 Ab。可选地,抗肽 Fab'-SH 片段可与抗 CEA $F(ab')_2$ 偶联以产生 $F(ab')_2$ x Fab' 构建体,或与抗 CEA IgG 偶联以产生 IgG x Fab' 双特异性构建体。在一个实施方案中, IgG x Fab' 构建体可如下以位点特异性的方式制备:将抗肽 Fab' 巯基与已用高碘酸盐氧化的抗 CEA IgG 重链碳水化合物连接,然后通过与可商业化获得的酰肼-马来酰亚胺交联剂反应而活化。使用的组分 Ab 可通过已知技术被嵌合或人源化。嵌合抗体是含有来自啮齿类动物抗体的可变区和互补决定区的重组蛋白,而抗体分子的剩余部分衍生自人抗体。人源化抗体是其中单克隆抗体的鼠互补决定区被从鼠免疫球蛋白的重链和轻链可变链转移至人可变区的重组蛋白。

[0094] 嵌合 Ab 是通过连接编码小鼠轻链可变区和重链可变区的 cDNA 片段与编码人抗体 C 结构域的片段而构建的。由于 C 结构域不参与抗原结合,因此嵌合抗体将保留与原始小鼠 Ab 相同的抗原特异性,但在序列上将更接近人抗体。不过,嵌合 Ab 仍还有一些小鼠序列,并且仍可以是免疫原性的。人源化 Ab 仅含有识别抗原必需的那些小鼠氨基酸。此产物是通过将小鼠互补决定区的氨基酸结合于人抗体框架内而构建的。

[0095] 产生双特异性抗体的其他最近方法包括具有额外的半胱氨酸残基以便他们比更常见的免疫球蛋白同种型更强地交联的改造的重组 Ab。参见,例如,FitGerald 等人, *Protein Eng.*, 10:1221-1225, 1997。另一途径是改造重组融合蛋白质,连接具有需要的双特异性的两个或多个不同的单链抗体或抗体片段区段。参见,例如,Coloma 等人, *Nature Biotech.*, 5:159-163, 1997。使用分子工程可产生多种双特异性融合蛋白质。在一种形式中,双特异性融合蛋白质是单价的,由例如具有一个抗原的单个结合位点的 scFv 和具有第二抗原的单个结合位点的 Fab 片段组成。在另一种形式中,双特异性融合蛋白质是二价的,由例如具有一个抗原的两个结合位点的 IgG 和具有第二抗原的两个结合位点的两个 scFv 组成。

[0096] 功能性双特异性单链抗体 (bscAb) (也称为双抗体) 可使用重组方法在哺乳动物细胞中产生。参见,例如, Mack 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:7021-7025, 1995。

[0097] 优选的双特异性抗体是包括 MAb Mu-9 的 Fv 和 MAb 679 的 Fv、或 MAb MN-14 的 Fv 和 MAb 679 的 Fv, 及其人、嵌合化或人源化对应物的那些抗体。MN-14 以及其嵌合化和人源化对应物公开于美国专利第 5,874,540 号。另外优选的是包括 Mu-9 或 679 的一个或多个 CDR 的双特异性抗体。抗体还可以是包括 III 类抗 CEA 抗体和 679III 类抗体的 Fv 的融合蛋白质或双特异性抗体。包括 III 类抗 CEA 的 III 类抗体在美国专利第 4,818,709 号中详细讨论。

[0098] 技术人员将意识到双特异性抗体可以结合任何现有技术中已知的抗体或片段,所述抗体或片段具有已知与疾病情形或状况相关的靶抗原的结合特异性。这些已知抗体包括但不限于 LL1 (抗 -CD74), LL2 和 RFB4 (抗 -CD22), hA20 (抗 -CD20), RS7 (抗上皮糖蛋白 -1 (EGP-1)), PAM-4 和 KC4 (均抗粘蛋白), MN-14 (抗癌胚抗原 (CEA, 也称作 CD66e)), MN-3 或 MN-15 (NCA 或 CEACAM6), Mu-9 (抗结肠特异性抗原 p), Immu 31 (抗甲胎蛋白), TAG-72 (如 CC49), Tn, J591 (抗 -PSMA (前列腺特异性膜抗原)), G250 (抗碳酸酐酶 IX MAb) 和 L243 (抗 -HLA-DR)。所述抗体在现有技术中已知 (如美国专利号 5,686,072 ; 5,874,540 ; 6,107,090 ; 6,183,744 ; 6,306,393 ; 6,653,104 ; 6,730,300 ; 6,899,864 ; 6,926,893 ; 6,962,702 ; 7,074,403 ; 7,230,084 ; 7,238,785 ; 7,238,786 ; 7,256,004 ; 7,282,567 ; 7,300,655 ; 7,312,318 ; 和美国专利申请公开号 20040185053 ; 20040202666 ; 20050271671 ; 20060193865 ; 20060210475 ; 20070087001 ; 全部内容通过引用并入本文)。这些已知抗体用于检测和 / 或成像各种疾病情形或状况 (例如 hMN-14 或 TF2bsMAb (CEA- 表达癌), hA20bsMab (TF-4- 淋巴瘤), hPAM4 (TF-10 胰腺癌), RS7bsMAb (肺、乳腺、卵巢、前列腺癌), hMN-15 或 hMN3bsMAb (炎症), 人类 gp120 和 / 或 gp41bsMAbs (HIV), 抗血小板 bsMab 和抗凝血酶 bsMAb (凝块成像), 抗肌球蛋白 bsMAb (心肌坏死))。

[0099] 候选的抗 HIV 抗体包括 Johansson 等人 (*AIDS*. 2006Oct 3;20(15):1911-5) 所述的抗包膜抗体, 和 Polymun (Vienna, Austria) 描述和销售的抗 HIV 抗体, 以及美国专利 5,831,034, 美国专利 5,911,989, 和 Vcelar 等人, *AIDS* 2007;21(16):2161-2170 和 Joos 等人, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(5):1773-9 中描述的, 全部内容通过引用并入本文。

[0100] 在某些实施方案中, 上面讨论的 bsAb F-18 标记的可靶向的构建体可用于手术中、血管内和 / 或内窥镜肿瘤以及损伤检测、活组织检查和治疗, 如美国专利第 6,096,289 号所

述。

[0101] 用标记的分子成像

[0102] 利用标记分子的成像方法在现有技术中已知,且任何这样已知的方法可以使用本文所述的氟-标记分子。参见,例如美国专利号 6,241,964 ;6,358,489 ;6,953,567 和公开的美国专利申请公开号 20050003403 ;20040018557 ;20060140936,全部内容通过引用并入本文。也可参见,Page 等人, *Nuclear Medicine And Biology*, 21 :911-919,1994 ;Choi 等人, *Cancer Research* 55 :5323-5329,1995 ;Zalutsky 等人, *J. Nuclear Med.*, 33 :575-582, 1992 ;Woessner 等人. *Magn. Reson. Med.* 2005, 53 :790-99。

[0103] 在某些实施方式中, F-18 标记分子可以用于正常或患病组织和器官的成像,例如利用美国专利号 6,126,916 ;6,077,499 ;6,010,680 ;5,776,095 ;5,776,094 ;5,776,093 ;5,772,981 ;5,753,206 ;5,746,996 ;5,697,902 ;5,328,679 ;5,128,119 ;5,101,827 和 4,735,210 中所描述的方法,分别通过引用并入本文。其他的方法在 1999 年 6 月 22 日提交的美国申请号 09/337,756 和 2001 年 4 月 3 日提交的美国申请号 09/823,746 中描述。所述成像可以通过直接 F-18 标记合适的靶向分子或通过预靶向成像方法实现,如 Goldenberg 等人 (2007, *Update Cancer Ther.* 2 :19-31) ;Sharkey 等人 (2008, *Radiology* 246 :497-507) ;Goldenberg 等人 (2008, *J. Nucl. Med.* 49 :158-63) ;Sharkey 等人 (2007, *Clin. Cancer Res.* 13 :5777s-5585s) ;McBride 等人 (2006, *J. Nucl. Med.* 47 :1678-88) ;Goldenberg 等人 (2006, *J. Clin. Oncol.* 24 :823-85) 中所描述,也可参见美国专利申请号 20050002945, 20040018557, 20030148409 和 20050014207,分别通过引用并入本文。

[0104] 用标记肽或 Mabs 诊断成像的方法是已知的。例如,在免疫闪烁成像技术中,配体或抗体以伽马射线放射性同位素标记和施用于患者。伽马射线照相机用于检测伽马射线放射性同位素的位置和分布。参见,例如 Srivastava (编辑), *RADIOLABELED MONOCLONAL ANHBODIES FORIMAGING AND THERAPY* (Plenum Press 1988), Chase, " *Medical Applications of Radioisotopes*, " in REMINGTON ' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, Gennaro 等人 (编辑), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) 和 Brown, " *Clinical Use of Monoclonal Antibodies*, " in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY* 227-49, Pezzuto 等人 (编辑) (Chapman & Hall 1993)。同样优选使用正电子发射放射性同位素 (PET 同位素),诸如用 511keV 的能量,如 ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu , 和 ^{124}I 。这些放射性同位素可以通过众所周知的 PET 扫描技术进行成像。

[0105] 实施例

[0106] 实施例 1. 肽 IMP272 的 F-18 标记

[0107] 使用的第一个肽是 IMP272 :

[0108] DTPA-Gln-Ala-Lys (HSG) -D-Tyr-Lys (HSG) - NH_2MH^+ 1512

[0109] 乙酸盐缓冲溶液: 乙酸 1.509g 于 ~ 160ml 水中稀释,并通过加入 1MNaOH 调节 pH 然后稀释至 250ml 以获得 pH 4.03 的 0.1M 溶液。

[0110] 乙酸钠缓冲溶液: 铝溶液通过将 0.1028g 的 AlCl_3 六水合物溶解于 42.6ml DI 水中来制备。4ml 等份的铝溶液与 16ml 的 0.1M NaOAc 溶液 (pH 4) 混合,以提供 2mM Al 贮存溶液。

[0111] IMP 272 乙酸盐缓冲溶液:将肽 0.0011g、 7.28×10^{-7} mol IMP 272 溶解于 364 μ L 的 0.1M pH 4 的乙酸盐缓冲溶液,以获得肽的 2mM 的贮存溶液。

[0112] F-18 标记 IMP 272 :3 μ L 等份的铝贮存溶液置于 REACTI-VIAL™ 并与 50 μ L F-18(原始样品)和 3 μ L 的 IMP 272 溶液混合。溶液在加热器中于 110℃ 加热 15 分钟,并通过反相 HPLC 分析。HPLC 谱图(未显示)显示 93% 的游离 F-18 和 7% 与肽结合的 F-18。向所述反应中加入另外 10 μ L 的 IMP 272 溶液,并再次加热和通过反相 HPLC 分析(未显示)。HPLC 谱图显示 8% 的 F-18 处于空体积,而 92% 的活性连接至肽。剩余的肽溶液在室温下与 150 μ L PBS 温育~1 小时,然后通过反相 HPLC 分析。HPLC(未显示)显示 58% 的 F-18 未结合,而 42% 的 F-18 仍连接至肽。数据表明 F-18-Al-DTPA 络合物在与磷酸盐混合时可能不稳定。

[0113] 反相 HPLC :反相 HPLC 分析在下列条件下进行:

[0114] 柱:WATERS XTERRA™ MS C₁₈ 5 μ m, 4.6 $\times$ 250mm

[0115] 流速:1mL/ 分钟

[0116] 梯度缓冲液:缓冲液 C,于 DI 水中的 0.1% NH₄OAc,缓冲液 D,90% 乙腈、10% 水和 0.1% NH₄OAc

[0117] 梯度:100%缓冲液 C 至 100%缓冲液 D,使用 30 分钟的线性梯度。

[0118] 运行时间:30 分钟

[0119] 尺寸排阻 HPLC :尺寸排阻 HPLC 在下列条件下进行:

[0120] 柱:BIORAD® BIO-SIL™ SEC 250, 300 $\times$ 7.8mm

[0121] 梯度:等度

[0122] 洗脱缓冲液:0.2M 磷酸盐 pH 6.8

[0123] 流速:1mL/ 分钟

[0124] 运行时间:30 分钟

[0125] 所有放射谱图都是使用 PERKINELMER® 610Tr 监测 F-18 的发射获得的。表 1-3 分别列表呈现数据。

[0126] 表 1F-18+IMP 272+AlCl₃ 在 110℃ 下加热 15 分钟,接着通过反相 HPLC 分析。

[0127] 区:F-18 检测器:FSA

[0128]

名称	开始 (分钟)	结束 (分钟)	保留 (分钟)	高度 (CPM)	面积 (CPM)	% ROI (%)	%总 (%)
Bkg 1	2.20	2.30	2.20	130.0			
区 1	2.30	3.30	2.60	85270.0	200050.0	93.15	96.31
Bkg 2	4.40	4.50	4.40	210.0			
区 2	8.70	9.80	9.00	5590.0	14720.0	6.85	7.09

2 个峰					214770.0	100.00	103.40
------	--	--	--	--	----------	--------	--------

[0129] 表 2F-18+ 过量 IMP 272+AlCl₃ 在 110℃ 下加热 15 分钟,接着通过反相 HPLC 分析。

[0130] 区 :F-18 检测器 :FSA

[0131]

名称	开始 (分钟)	结束 (分钟)	保留 (分钟)	高度 (CPM)	面积 (CPM)	% ROI (%)	%总 (%)
Bkg 1	2.20	2.30	2.20	340.0			
区 1	2.40	3.20	2.70	6450.0	20549.6	7.76	8.23
Bkg 2	7.10	7.20	7.10	630.0			
区 2	7.30	8.70	8.50	3140.0	13113.6	4.95	5.25
区 3	8.70	10.00	9.00	93700.0	231023.9	87.28	92.57
Bkg 3	10.70	10.80	10.70	520.0			
3 个峰					264687.1	100.00	106.06

[0132] 表 3 在 PBS 中于室温下用磷酸处理 90 分钟。F-18+ 过量 IMP 272+AlCl₃ 的等份在 110℃ 下加热 15 分钟,接着通过反相 HPLC 分析。

[0133] 区 :F-18 检测器 :FSA

[0134]

名称	开始 (分钟)	结束 (分钟)	保留 (分钟)	高度 (CPM)	面积 (CPM)	% ROI (%)	%总 (%)
Bkg 1	2.00	2.10	2.00	350.0			
区 1	2.40	3.30	2.70	81930.0	162403.6	58.23	62.44

[0135]

Bkg 2	4.20	4.30	4.20	410.0			
Bkg 3	7.50	7.60	7.50	780.0			
区 2	7.80	8.60	8.40	2110.0	5564.7	2.00	2.14
区 3	8.60	9.80	8.90	44590.0	110942.0	39.78	42.66

Bkg 4	10.50	10.60	10.50	460.0			
3 个峰					278910.3	100.00	107.24

[0136] 标记的肽通过以下方法纯化：将标记的肽溶液应用到 1cc (30mg) **WATERS®** HLB 柱（部件 #186001879）并用 300 μ L 水洗涤以除去未结合的 F-18。通过用 2 $\times$ 100 μ L 1 : 1MeOH/H₂O 洗涤柱来洗脱肽。纯化的肽在水中于 25℃温育并通过反相 HPLC 分析（未显示）。HPLC 分析显示 F-18 标记的 IMP 272 在水中不稳定。在水中温育 40 分钟后，约 17% 的 F-18 从所述肽释放，而 83% 保留下来（未显示）。

[0137] 实施例 2. F-18IMP 272 的免疫反应性

[0138] 肽 (16 μ L 2mM IMP 272, 48 μ g) 用 F-18 标记并通过尺寸排阻 HPLC 分析抗体结合。尺寸排阻 HPLC 显示所述肽结合 hMN-14 $\times$ 679，但不与无关的双特异性抗体 hMN-14 $\times$ 734 结合（未显示）。

[0139] 实施例 3. 用其它金属标记的 IMP 272F-18

[0140] $\sim$ 3 μ L 等份的金属贮存溶液 (6×10^{-9} mol) 置于聚丙烯锥形管，并与 75 μ L F-18（原始样品）混合，在室温下温育 $\sim$ 2 分钟，然后与 20 μ L 的于 0.1M NaOAc pH 4 缓冲液中的 2mM (4×10^{-8} mol) IMP 272 溶液混合。溶液在加热器中于 100℃加热 15 分钟，并通过反相 HPLC 分析。IMP272 用铟 (24%)，镓 (36%)，锆 (15%)，镧 (37%) 和钇 (2%) 标记（未显示）。

[0141] 实施例 4. 用于筛选 Al-¹⁸F 结合的其他肽的标准 F-18 肽标记条件

[0142] 3 μ L 等份的 2mM 铝贮存溶液置于聚丙烯锥形管，并与 50 μ L F-18（原始样品）混合，在室温下温育 $\sim$ 2 分钟，然后与 16 μ L 至 20 μ L 的于 0.1MNaOAc pH 4 缓冲液中的 2mM 肽溶液混合。溶液在加热器中于 100℃加热 15 分钟，并通过反相 HPLC (PHENOMENEXTM, **GEMINIR**, 5 μ , C-18, 110A, 250 $\times$ 4.6mm HPLC 柱) 分析。

[0143] 测试的肽

[0144] IMP 272 :DTPA-Gln-Ala-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1512 (图 1)

[0145] IMP 288DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1453 (图 2)

[0146] IMP 326DTPA-ITC-NH-NH-Phe-CO-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1477 (图 3)

[0147] IMP 329 去铁胺 -NH-CS-NH-NH-Ph-CO-D-Tyr-DLys (HSG)-D-Glu-D-LyS (HSG)-NH₂MH⁺1804 (图 4)

[0148] IMP 331NTA-iAsp-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1240 (图 5)

[0149] IMP 332EDTADpr-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Ala-D-Lsy (HSG)-NH₂MH⁺1327 (图 6)

[0150] IMP 333DTPA-Dpr (DTPA)-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Ala-D-Lys (HSG)-NH₂ MH⁺1845 (图 7)

[0151] IMP 334 (H₂O₃P)₂-C(OH)-(CH₂)₃-NH-Gly-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1192 (图 8)

[0152] IMP 337Ac-D-Ser (PO₃H₂)-D-Ser (PO₃H₂)-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Ala-D-Lys (HSG)-NH₂MH⁺1291

- [0153] IMP 338Ac-D-Ser(PO_3H_2)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1126
- [0154] IMP 345DTPA-D-Ser(PO_3H_2)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1459
- [0155] IMP 349DTPA-D-CyS($(\text{H}_2\text{O}_3\text{P})_2\text{-CH-CH}_2\text{-S}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1583 (图 9)
- [0156] IMP 361DTPA-Dpr($\text{BrCH}_2\text{CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1498
- [0157] IMP 366DTPA-Dpr($\text{Ph-S-CH}_2\text{CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 H^+1528
- [0158] IMP 368Sym-DTPA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1292 (图 10)
- [0159] IMP 369Sym-DTPA-NH-CH(2-Br-Phe-)- $\text{CH}_2\text{-CO-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)-NH}_2$ MH^+1517
- [0160] IMP 370Sym-DTPA-NH-CH(2- $\text{O}_2\text{N-Phe-}$)- $\text{CH}_2\text{-CO-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)-NH}_2$ MH^+1484
- [0161] IMP 371DTPA-NH-CH(2- $\text{O}_2\text{N-Phe-}$)- $\text{CH}_2\text{-CO-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)-NH}_2$ MH^+1484
- [0162] IMP 372DTPA-Dpr(Ser)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1465
- [0163] IMP 373DTPA-Dpr(Sym-DTPA)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1753
- [0164] IMP 374DTPA-Dpr($\text{Cl-CH}_2\text{CO-Cys(Et)-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1585
- [0165] IMP 375DTPA-Dpr(2-Br-Phe- $\text{CHNH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1603 (图 11)
- [0166] IMP 376DTPA-Cys($\text{HO}_3\text{S-S}$)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 H^+1558
- [0167] IMP 379DTPA-Dpr(2- $\text{H}_2\text{N-Phe-CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 H^+1497
- [0168] IMP 382DTPA-Dpr(H)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1378
- [0169] IMP 383DTPA-Dpr(Gla-)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1507
- [0170] IMP 384DTPA-Dpr(2-HO-Phe- $\text{CHNH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1541 (图 12)
- [0171] IMP 385DTPA-Dpr(Dpr)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1464
- [0172] IMP 386DTPA-Dpr(2-吡啶基- $\text{CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-CO-}$)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1526 (图 13)
- [0173] IMP 387DTPA-Dpr(D-9- 蒽基丙氨酸)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1625
- [0174] IMP 389DTPA-Dpr(2-羧基哌嗪基)-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Ala-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1490 (图 14)
- [0175] IMP 460NODA-GA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)- NH_2 MH^+1366
- [0176] 进一步的可利用的肽的实例如表 15 和 16 所示。表 16 所示为 IMP 422, IMP 426 和 IMP 428 的结构。如下所述, IMP449(图 15) 在体内条件下表现出缀合 F-18 的肽特有的稳定性, 可用于标记和成像技术。

[0177] 图 17 显示 NOTA 型配体可选择的构型。NOTA 部分可由 D 或 L 对硝基苯丙氨酸制得,亚氨基二乙酸部分可来自于 D 或 L 的二氨基丙酸。此外,乙烯桥的位置可通过二氨基丙酸转换,得到在配体上不同构型的基团。所有这些修饰可能影响随后形成的络合物的结合动力学和稳定性。图 18 阐明了可被例如 Ga-68 或 F-18 标记的 NODA-Ga 肽的结构。

[0178] 在某些实施方式中,可选择的螯合物部分可用于结合 ^{18}F -金属或 ^{18}F -硼络合物。图 22A-D 阐明了一些例示潜在的基于 NETA 结构的螯合物部分。如上所述,Chong 等人 (2007) 报道了 NETA 配体与各种金属络合时,表现出改进的血清稳定性。优化螯合剂的设计以提高肽对 ^{18}F -金属的结合亲和力。

[0179] 肽标记筛选研究的结果

[0180] 大多数 DTPA 衍生物显示出与 IMP 272 标记相当的标记。例外的是,在半胱氨酸侧链上携带双磷酸盐基团的 IMP 349 标记非常差。DOTA 配体未结合 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 。IMP 326 的 ITC DTPA 配体未结合 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 以及 DTPA。IMP 331 的 NTA 配体未结合 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 。IMP 332 的 EDTA 配体结合 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 但不如 DTPA。对称 DTPA 配体未结合 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 。测试的磷酸盐和磷酸盐基团在测试的条件下与 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 结合得不好。筛选确实显示连接于 DTPA 附近的基团可影响 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ -DTPA 络合物的稳定性。筛选显示 IMP 375 标记得更好并形成比 IMP272 显著更稳定的络合物。IMP 375 标记得良好并且在水中稳定,25℃下 5 小时后表现出 95.4% 的剩余结合 (未显示)。在体内优选施用高血清稳定性的肽。

[0181] 肽标记筛选研究仅考察了 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 的结合。一些用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 标记得不好的肽可用另一种结合 F-18 的金属更好地标记。

[0182] 肽合成

[0183] 通过使用 Fmoc 策略的固相肽合成来合成肽。通过使用 Fmoc/Aloc 保护基团以允许差异的脱保护而将基团加至二氨基氨基酸的侧链。通过 Dangles 等人 (J. Org. Chem. 1987, 52 :4984-4993) 的方法除去 Aloc 基团,不同的是将哌啶以 1 : 1 的比例加入使用的乙酸。不对称四叔丁基 DTPA 的制备如 McBride 等人所述 (美国专利申请公布第 US 2005/0002945A1 号,申请第 10/776,470 号,公布日期 2005 年 1 月 6 日)。三叔丁基 DOTA、对称四叔丁基 DTPA 和 ITC-苄基 DTPA 获自 **MACROCYCLICS®**。Aloc/Fmoc 赖氨酸和 Dap (二氨基丙酸衍生物 (也称为 Dpr)) 获自 **CREOSALUS®** 或 **BACHEM®**。Sieber 酰胺树脂获自 **NOVABIOCHEM®**。其余的 Fmoc 氨基酸获自 **CREOSALUS®**、**BACHEM®**、**PEPTECH®** 或 **NOVABIOCHEM®**。

[0184] IMP 272 根据描述合成 (McBride 等人,美国专利申请公布第 20040241158A1 号,申请第 10/768,707 号,2004 年 12 月 2 日)。IMP 288 根据描述制备 (McBride 等人, J. Nucl Med. , 2006, 47 :1678-1688)。

[0185] IMP 326 肽 (IMP 319) 使用 Fmoc-D-Lys (Aloc)-OH、Fmoc-D-Glu (OBut)-OH、Fmoc-D-Lys (Aloc)-OH、Fmoc-D-Tyr (But)-OH 和 4-(Boc-NH-NH-)C₆H₄-CO₂H 以所述顺序在 Sieber 酰胺树脂上制备。4-(Boc-NH-NH-)C₆H₄-CO₂H 通过将 Boc 二碳酸盐加入于二噁烷氢氧化钠溶液中的 4-肼基苯甲酸来制备。

[0186] 添加 Boc-酰肼后,除去侧链 Aloc 基团,并将三苯甲基-HSG-OH 基团加到赖氨酸的侧链上。然后用 TFA 从树脂解离肽,并通过 HPLC 纯化,以获得需要的肼二-HSG 肽 IMP 319 (MH⁺1201)。然后将酰肼肽 (0.0914g) 与于 3mL 0.1M 磷酸钠 pH 8.2 中的 0.0650g ITC-苄

基 DTPA 混合。用 1M NaOH 调节所述溶液的 pH, 以使 pH 保持在 pH 8.2。肽和 ITC- 苄基 DTPA 之间的反应完成后, 通过 HPLC 纯化肽缀合物。

[0187] IMP 329: 通过将 1.0422g 的甲磺酸去铁胺 ($1.59 \times 10^{-3} \text{mol}$) 和于 10mL 1 : 1 甲醇 / 水中的 0.2835g ($1.59 \times 10^{-3} \text{mol}$) 的硫代羰基二咪唑混合来制备异硫氰酸去铁胺。加入三乙胺 0.23mL, 2.5 小时后通过反相 HPLC 纯化反应, 以获得异硫氰酸去铁胺 MNa^+625 。

[0188] 肽 IMP 319 (0.0533g , $4.4 \times 10^{-5} \text{mol}$, MH^+1201) 与于磷酸钠缓冲液 pH 8.1 中的 0.0291g 异硫氰酸去铁胺混合两小时, 然后通过 HPLC 纯化以获得需要的产物 MH^+1804 。

[0189] IMP 331 下列氨基酸以所示顺序连接至 Sieber 酰胺树脂 (0.58mmol/g) Sieber 酰胺树脂: Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Tyr(But)-OH 和 Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH。除去 Aloc 基团, 并将 Trt-HSG-OH 加至赖氨酸的侧链。除去 Fmoc, 然后以所述顺序添加 Fmoc-D-Ala-OH 和 Fmoc-Asp-OBu (0.5g 树脂)。除去 Fmoc, 并用 3mL 叔丁基溴乙酸酯和 3.6mL 二异丙基乙胺在 3.4mL NMP 中使 Asp 的氮烷基化过夜。用 TFA 从树脂切割下肽, 并通过反相 HPLC 纯化, 以获得需要的肽 MH^+1240 。

[0190] IMP 332: 肽在 3g Sieber 酰胺树脂 (0.58mmol/g) 上制备。下列氨基酸以所示顺序添加至树脂: Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Tyr(But)-OH、Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Ala-OH 和 Fmoc-D-Pr(Fmoc)-OH。树脂分成几部分以用于后续合成。取出一克树脂, 并除去二氨基丙酸上的 Fmoc 基团。用 3mL 叔丁基溴乙酸酯、3.6mL 二异丙基乙胺和 3.4mL NMP 使肽烷基化过夜。然后除去侧链 Aloc 基团并添加 Trt-HSG-OH 基团。然后将肽从树脂切割下, 并通过 HPLC 纯化以获得产物 MH^+1327 。

[0191] IMP 333: 肽使用 1g 与用于制备 IMP 332 相同的树脂制备。将 DTPA 四叔丁基酯 (美国专利公布第 20050002945 号) 添加至 Dpr 基团的两个胺上。然后除去 Aloc 基团, 并添加 Trt-HSG-OH。然后将肽切割下, 并通过 HPLC 纯化以获得需要的产物 MH^+1845 。

[0192] IMP 334: 肽在 1g Rink 酰胺树脂 (0.7mmol/g) 上制备, 并以所示顺序添加下列氨基酸: Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Glu(But)-OH、Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Boc-Ser(But)-OH。除去 Aloc 基团, 并添加三苯甲基-HSG-OH。用 TFA 从树脂切割下肽。通过从醚中沉淀收集粗肽并干燥。高碘酸钠 0.33g 溶于 15mL 水。粗品肽溶于 1mL 0.5M 磷酸钠 pH 7.6、3mL 水和 1mL 高碘酸盐溶液。在 ~ 2 小时内以一毫升的增量另外添加 3mL 高碘酸盐。然后通过反相 HPLC 纯化所述混合物, 并冻干以获得醛 IMP 289 $\text{HCO-CO-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH}_2$ MH^+959 。阿伦膦酸盐 (0.0295g , **CALBIOCHEM®**) 溶于 150 μL 0.1M NaOAc pH 4。肽 IMP 289 (0.0500g) 溶于 100 μL 13% 于水中的异丙醇。添加氰基硼氢化钠, 并通过 HPLC 纯化所述混合物以获得需要的产物 MH^+1192 。

[0193] IMP 337 和 IMP 338: 肽在 Sieber 酰胺树脂上制备, 使用以所示顺序添加的下列氨基酸: Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Ser(PO(Obzl)OH)-OH、Fmoc-D-Ser(PO(Obzl)OH)-OH 和 Ac_2O 。除去 Aloc 基团, 并向赖氨酸的侧链添加 Trt-HSG-OH 基团。将肽从树脂切割下, 并通过 HPLC 纯化以获得需要的产物: IMP 337 MH^+1291 和 IMP 338 MH^+1126 。

[0194] IMP 345: 肽在 Sieber 酰胺树脂上制备, 使用以所示顺序添加的下列氨基酸: Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH、Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Ser(PO(Obzl)OH)-OH 和四叔丁基 DTPA。除去 Aloc 基团, 并向赖氨酸的侧链

添加 Trt-HSG-OH 基团。将肽从树脂切割下,并通过 HPLC 纯化以获得需要的产物:IMP 345MH⁺1459。

[0195] IMP 349: 肽 IMP 347DTPA-D-Cys-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂ 在 Sieber 酰胺树脂上制备,使用以所示顺序添加的下列氨基酸:Aloc-D-Lys(Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH,切割 aloc,添加 Fmoc-D-Ala-OH、Aloc-D-Lys(Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH,切割 aloc,添加 Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-D-Cys(Trt)-OH 和四叔丁基 DTPA。将肽从树脂切割下,并通过 HPLC 纯化以获得需要的产物:IMP 347MH⁺1395。肽 IMP 3470.0446g(3.2×10^{-5} mol) 与于 3mL 水中的 0.4605g(2.4×10^{-3} mol) 亚乙烯基双(膦酸)(Degenhardt 等人, J. Org. Chem. 1986, 51:3488-3490) 混合,并用逐滴添加的 1M NaOH 将所述溶液调节至 pH 6.5。反应搅拌过夜,并通过添加过量的亚乙烯基双(膦酸)将反应溶液调节至 pH 1.49。混合物在室温下搅拌过夜,然后通过 HPLC 纯化以获得需要的肽 IMP 349MH⁺1583。

[0196] IMP361: 肽在 Sieber 酰胺树脂上制备,使用以所示顺序添加的下列氨基酸:Aloc-D-Lys(Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH,切割 aloc,添加 Fmoc-D-Ala-OH、Aloc-D-Lys(Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH,切割 aloc,添加 Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-Dap(Aloc)-OH 和四叔丁基 DTPA。除去 Dap 侧链上的 Aloc,并用溴乙酸酐添加溴乙酰基。粗产物通过 HPLC 纯化以获得需要的肽 IMP 361(MH⁺1498)。

[0197] IMP366: 肽通过与 IMP 361 相同的方法制备,最后添加苯硫乙酸。粗产物通过 HPLC 纯化以获得产物 IMP 366MH⁺1528。

[0198] IMP 368: 肽的制备参见 IMP 349,除了未添加半胱氨酸残基,并且使用对称四叔丁基 DTPA (MACROCYCLICS®) 替代非对称 DTPA,以在纯化后获得需要的产物 IMP 368MH⁺1292。

[0199] IMP 369: 肽的制备参见 IMP 349,但是添加 Fmoc-R-3-氨基-3-(2-溴苯基)丙酸替代 D-Cys 和添加对称四叔丁基 DTPA 替代 DTPA 四叔丁基酯的非对称形式。纯化粗肽以获得需要的产物 MH⁺1517。

[0200] IMP 370: 肽的制备参见 IMP 369,除了使用 Fmoc-R-3-氨基-3-(2-硝基苯基)丙酸替代溴。通过 HPLC 纯化后获得需要的产物 MH⁺1484。

[0201] IMP 371: 肽的制备参见 IMP 370,除了使用非对称四叔丁基 DTPA 替代对称形式。通过 HPLC 纯化后获得需要的产物 MH⁺1484。

[0202] IMP 372: 肽的制备参见 IMP 361,但是使用 Fmoc-Ser(But)-OH 将 Ser 连接至 Dap 侧链。除去 Fmoc,将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1465。

[0203] IMP 373: 肽的制备参见 IMP 361,但是使用对称四叔丁基酯 DTPA 将 Sym-DTPA 连接至 Dap 侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1753。

[0204] IMP 374: 肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-S-乙基半胱氨酸添加至 Dap 侧链,然后经由氯乙酸酐添加氯乙酰基(于半胱氨酸氮上)。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1585。

[0205] IMP 375: 肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-R-3-氨基-3-(2-溴苯基)丙酸添加至 Dap 侧链,然后切割 Fmoc 基团。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1603。

[0206] IMP 376: 肽的制备参见 IMP 361,但是在第二个丙氨酸后添加 Fmoc-D-Tyr(But)-OH,然后是 Fmoc-Cys(SO₃H) 和四叔丁基 DTPA。将肽从树脂切割下,并纯

化以获得需要的产物 MH⁺1558。

[0207] IMP 379 :肽的制备参见 IMP 361,但是将 Boc-2-Abz-OH 添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1497。

[0208] IMP 382 肽的制备参见 IMP 361,但是从 Dap 的侧链除去 Alloc。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1378。

[0209] IMP 383 :肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-Gla(OBut)₂-OH 添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺-CO₂1507。

[0210] IMP 384 :肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-Boc-S-3-氨基-3-(2-羟基苯基)丙酸添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1541。

[0211] IMP 385 :肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-Dpr(Fmoc)-OH 添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1464。

[0212] IMP 386 肽的制备参见 IMP 361,但是将 Boc-D-2-吡啶基丙氨酸-OH 添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1526。

[0213] IMP 387 :肽的制备参见 IMP 361,但是将 Fmoc-D-9-蒽基丙氨酸-OH 添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1625。

[0214] IMP 389 肽的制备参见 IMP 361,但是将双-Boc-哌嗪-2-羧酸酯添加至 Dap 的侧链。将肽从树脂切割下,并纯化以获得需要的产物 MH⁺1664。

[0215] 实施例 5 制备和分离 F-18 标记肽的替代方法

[0216] 在某些实施方式中,通过加热使得 A1-F-18 络合物进入 NOTA 螯合基团。可选地,ITC 苄基 NOTA(大环的)可用 A1-F-18 标记,然后在标记后与其他热敏性分子(如蛋白质)缀合。如果需要高比活性,则 ITC 苄基 NOTA 络合物可从冷配体中分离纯化。

[0217] 肽中加入 A1,其 HPLC 图谱与空 NOTA 肽和 A1-F-18 肽进行对比。A1 肽和 A1-F-18 肽具有实质上相同的 HPLC 保留时间,未标记肽的 RT 长~1 分钟。肽在 PHENOMENEX™ **ONYX®** 整体式 C-18100×4.5mm 柱中以 3ml/min 的流速进行纯化。缓冲液 A 是在水中的 0.1% TFA,缓冲液 B 是 90% CH₃CN、10% 水和 0.1% TFA。线性梯度在 15 分钟期间从 100% 缓冲液 A 至 75 : 25A/B。由于 A1 络合物和 A1-F-18 络合物共洗脱,A1 和 F-18 的加入量将决定比活性。

[0218] IMP449 根据如下实施例 7 制备,接着标记。F-18 接收至 2.0ml 的费希尔微量离心瓶中(02-681-374),其中含有 15mCi F-18 溶在~325 μL 水中。F-18 溶液中加入 3 μL 0.1M pH 4NaOAc 中的 2mM AlCl₃,然后涡旋混合。在约 4 分钟后,加入 10 μL pH4.0.5M NaOAc 中的 0.05M IMP 449。所述样品再次涡旋混合,用加热器在 102°C 下加热 17 分钟。然后反应简单冷却,转移瓶内容物,通过上述 HPLC 进行纯化。

[0219] 在 **WATERS® ALLIANCE™** 分析系统上独立地确定洗脱条件,并将标记的肽洗脱 7.5 ~ 8.5 分钟。分析 HPLC 显示,标记的肽含 A1-F IMP 449(UV220nm),不含未络合肽,导致比活性增加。

[0220] 将肽用水稀释,并使其通过 **WATERS® OASIS PLUS HLB™** 提取柱。标记肽用 3mL 1 : 1 的 EtOH/H₂O 洗脱。洗脱物的 HPLC 分析证实柱有效捕获了标记肽,其允许乙腈和 TFA 从肽中被洗掉。HPLC 还显示 1 : 1 的 EtOH/H₂O 洗脱物含所需产物(适用于稀释后注射的溶剂中无游离的 F-18)。明显的纯化后产量是 11%。

[0221] 实施例 6. 体内研究

[0222] 向携带 GW-39 人结肠异种移植肿瘤 (100–500mg) 的裸鼠注射双特异性抗体 hMN-14x m679 (1.5×10^{-10} mol)。在注射 F-18 标记的带有 HSG 的肽 ($8.8 \mu\text{Ci}$, 1.5×10^{-11} mol) 之前, 允许抗体清除 24 小时。在注射后 3、24 和 48 小时对所述动物成像。异种移植肿瘤通过 PET 扫描检测与双特异性 hMN-14x m679 结合的 F-18 标记的肽而被清晰成像, 双特异性 hMN-14xm679 通过 hMN-14 与肿瘤抗原的结合而定位于肿瘤。

[0223] 实施例 7. 血清稳定的 F-18 标记肽的制备和用途

[0224] IMP 449NOTA-ITC 苄基 -D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH₂MH⁺1459 (图 15)

[0225] 肽 IMP 448D-Ala-D-Lys (HSG) -D-Tyr-D-Lys (HSG) -NH₂MH⁺1009 在 Sieber 酰胺树脂上制备, 通过以所示的顺序向树脂添加下列氨基酸: Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH、切割 Aloc、Fmoc-D-Tyr (But)-OH、Aloc-D-Lys (Fmoc)-OH、Trt-HSG-OH、切割 Aloc、Fmoc-D-Ala-OH, 最后切割 Fmoc 以制备需要的肽。然后将肽从树脂切割下, 并通过 HPLC 纯化以制备 IMP 448, 其然后与 ITC-苄基 NOTA 偶联。肽 IMP 4480.0757g (7.5×10^{-5} mol) 与 0.0509g (9.09×10^{-5} mol) ITC 苄基 NOTA 混合, 并溶于 1mL 水。然后向搅拌的肽 /NOTA 溶液缓慢加入无水碳酸钾 (0.2171g)。在加入所有碳酸盐后反应溶液为 pH 10.6。允许反应在室温搅拌过夜。14 小时后用 1MHC1 小心猝灭反应, 并通过 HPLC 纯化以获得 48mg 需要的产物 IMP 449 (图 15)。

[0226] IMP 449 的 F-18 标记

[0227] 肽 IMP449 (0.002g, 1.37×10^{-6} mol) 溶于 686 μL (2mM 肽溶液) 0.1M NaOAc pH 4.02。三微升于 pH 4 乙酸盐缓冲液中的 2mM Al 溶液与 15 μL 、1.3mCi 的 F-18 混合。所述溶液然后与 20 μL 的 2mM IMP 449 溶液混合, 并在 105°C 加热 15 分钟。反相 HPLC 分析显示 35% (RT ~ 10 分钟) 的活性连接至肽, 而 65% 的活性在柱的空体积洗脱 (3.1 分钟, 未显示), 表明大部分活性与所述肽无关。粗标记的混合物 (5 μL) 与收集的人血清混合, 并在 37°C 温育。15 分钟后取出等份并通过 HPLC 分析。HPLC 显示 9.8% 的活性仍连接至肽 (从 35% 下降)。1 小时后取出另一等份并通过 HPLC 分析。HPLC 显示 7.6% 的活性仍连接至肽 (从 35% 下降), 这基本上与 15 分钟的谱图相同 (数据未显示)。

[0228] 高剂量 F-18 标记

[0229] 使用纯化的 IMP 449 的进一步研究证明, F-18 标记的肽在人血清中于 37°C 下至少一小时内是高度稳定的 (91%, 未显示), 并且在人血清中于 37°C 下至少四小时内是部分稳定的 (76%, 未显示)。这些结果证明, 本文公开的 F-18 标记的肽在接近体内的条件下显示充分的稳定性以用于 F-18 成像研究。

[0230] 于 ~ 400 μL 水中 ~ 21mCi 的 F-18 与于 0.1M pH 4NaOAc 中的 9 μL 2mM AlCl₃ 混合。加入肽 IMP 449 60 μL (0.01M, 6×10^{-7} mol, 于 0.5NaOH 中, pH 4.13), 并将溶液加热至 110°C, 15 分钟。然后如下纯化粗标记的肽: 将反应溶液置于 1cc **WATERS®** HLB 柱的管中, 并用水洗脱以除去未结合的 F-18, 然后用 1 : 1EtOH/H₂O 以洗脱 F-18 标记的肽。粗反应溶液通过所述柱进入废液瓶, 并用三个 1 毫升水的级分 (18.97mCi) 洗涤柱。然后将 HLB 柱置于新瓶上, 并用 2 × 200 μL 1 : 1EtOH/H₂O 洗脱来收集标记的肽 (1.83mCi)。在所有的洗脱完成后柱保留 0.1mCi 的活性。等份的纯化的 F-18 标记肽 (20 μL) 与 200 μL 合并的人血清混合, 并在 37°C 加热。等份通过反相 HPLC 分析 (如上所述)。结果显示在 37°C 下在

人血清中温育零时、1 小时 (91% 标记的肽)、2 小时 (77% 标记的肽) 和 4 小时 (76% 标记的肽) 的 F-18 标记的纯化 IMP 449 的相对稳定性 (未显示)。还观察到 F-18 标记的 IMP 449 在 TFA 溶液中稳定, 其有时用于反相 HPLC 色谱。观察到的本文所述示例性 F-18 标记的分子在 TFA 中的稳定性与在人血清中的稳定性之间显示普遍相关性。这些结果表明根据本文所述的方法制备的 F-18 标记肽在人血清中表现出足够的稳定性, 可成功地用于体内标记和成像研究, 例如利用 PET 扫描检测标记的细胞或组织。

[0231] 实施例 8F-18 标记 IMP449 在 SCID 小鼠中的体内生物分布

[0232] F-18 标记的 IMP449 如上所述制备 (实施例 7)。所得物质在 **OASIS®** HLB 柱 (**WATERS®**, Milford, MA) 进行纯化。未结合的物质用水冲洗, 结合在柱上的标记肽用 1 : 1 的乙醇 : 水的混合液进行洗脱。两级分均用反相 C18HPLC 进行分析。纯化肽在反相 HPLC 柱上洗脱形成几个峰 (未显示)。从 **OASIS®** 柱收集的未结合部分从 C18 柱的低回收率, 仅 7% (未显示)。

[0233] “未结合”级分和纯化的 ^{18}F -IMP 449 注射入预先皮下注射 SU-DHL6 淋巴瘤细胞的 SCID 小鼠体内。仅少数小鼠具有可见的肿瘤。生物分布数据表明在“未结合”F-18 级分和纯化的 ^{18}F -IMP 449 之间存在显著差异。数据如下表 4-6 所示。注意在此研究中, 在标记肽之前没有给动物注射预靶向双特异性抗体。这些结果表明标记肽与游离 F-18 在体内的分布。

[0234] 未缀合 F-18 在体内表现出对骨骼组织的高水平分布。正如所料, 注射 20 分钟后吸收主要在骨骼中 (脊柱), 约为 12-15% 注射剂量每克 (ID/g), 接着是肾脏, 约为 4% ID/g。通过与靶向肽缀合, F-18 标记对骨骼组织的定位实质性降低。当连接至 IMP449, 骨骼中的吸收在注射后 20 分钟降至 ~ 1% ID/g, 1 小时时降至 0.3%, 肾脏吸收在 20 分钟时为 11%, 1 小时为 3.3% ID/g。肾脏对仅肽的吸收与对预靶向 ^{18}F -IMP 449 肽 (见下列实例) 的吸收相似, 提示其吸收是肽的功能, 而非 18 小时前施予动物 bsMAb 的结果。与未结合 F-18 相比, F-18 标记肽在脊柱和股骨的非特异性吸收相对较低。

[0235] 表 4. F-18 “未结合”级分注射后 20 分钟 : % ID/g 平均值和个体动物。

[0236]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3
肿瘤	1	--	--	0.902	--	--
肝	3	2.056	0.244	1.895	2.338	1.937
脾	3	1.869	0.434	1.677	2.366	1.564
肾	3	4.326	0.536	3.931	4.936	4.111
肺	3	2.021	0.149	1.903	2.188	1.972
血液	3	2.421	0.248	2.355	2.696	2.212
胃	3	0.777	0.409	0.421	1.224	0.687

小肠	3	2.185	0.142	2.042	2.325	2.187
大肠	3	1.403	0.069	1.482	1.356	1.372
股骨	3	11.688	1.519	11.502	13.292	10.270
脊柱	3	14.343	2.757	17.506	13.072	12.452
肌肉	3	1.375	0.160	1.191	1.457	1.478

[0237] 表 5. 纯化的 ^{18}F -IMP 449,80 μCi , $1 \times 10^{-8}\text{mol}$ 注射后 20 分钟 : % ID/g 平均值和个体动物。

[0238]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5
肿瘤	1	—	—	0.891	—	—	—	—
肝	5	2.050	0.312	1.672	1.801	2.211	2.129	2.440
脾	5	1.297	0.259	0.948	1.348	1.144	1.621	1.425
肾	5	12.120	4.128	8.354	7.518	12.492	15.535	16.702
肺	5	2.580	0.518	2.034	2.103	2.804	2.678	3.278
血液	5	3.230	0.638	2.608	2.524	3.516	3.512	3.992
胃	5	1.017	0.907	0.805	0.775	0.344	0.557	2.605
小肠	5	1.212	0.636	0.896	0.921	0.927	0.967	2.349
大肠	5	0.709	0.220	0.526	0.568	0.599	0.793	1.057
股骨	5	0.804	0.389	0.314	0.560	1.280	0.776	1.087
脊柱	5	3.915	6.384	0.819	0.923	1.325	1.177	15.330 [#]
肌肉	5	0.668	0.226	0.457	0.439	0.960	0.673	0.814

[0239] [#] 统计确认动物 #5 的高脊柱吸收。

[0240] 表 6. 纯化的 ^{18}F -IMP 449,80 μCi , $1 \times 10^{-8}\text{mol}$ 注射后 1 小时 : % ID/g 平均值和个体动物。

[0241]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4
----	---	-----	----	------	------	------	------

肿瘤	1	0.032	0.064	0.000	0.127	0.000	0.000
肝	4	0.883	0.308	1.103	0.632	0.604	1.191
脾	4	1.061	0.702	1.598	0.631	0.301	1.713
肾	4	3.256	0.591	3.606	2.392	3.362	3.666
肺	4	0.324	0.094	0.411	0.232	0.256	0.399
血液	4	0.285	0.104	0.378	0.153	0.250	0.358
胃	4	0.152	0.082	0.225	0.041	0.199	0.142
小肠	4	1.290	0.228	1.124	1.247	1.166	1.624
大肠	4	0.115	0.035	0.167	0.091	0.094	0.109
股骨	4	1.006	0.876	2.266	0.448	0.939	0.374
脊柱	4	0.314	0.076	0.423	0.257	0.268	0.306
肌肉	4	0.591	0.946	0.205	0.077	2.008	0.075

[0242] 我们认为 F-18 标记肽显示出足够的体内稳定性,能成功进行标记和成像研究。

[0243] 实施例 9. 预靶向抗体的体内研究

[0244] F-18 标记 IMP449 如下制备。~ 0.5mL, 54.7mCi 的 F-18 与 3 μ L 2mMAl 的 0.1M NaOAc pH 4 缓冲液混合。3 分钟后,加入 10 μ L 0.05M IMP449 的 0.5M pH 4NaOAc 缓冲液,反应在加热器上 96℃加热 15 分钟。反应内容物用注射器移出。然后粗标记肽通过 HPLC 在 Phenomenex Onyx 整体式 C18, 100×4.6mm 柱 No. CH0-7643 部分进行纯化。流速为 3mL/分钟。缓冲液 A 是 0.1% TFA 的水溶液,缓冲液 B 是含有 0.1% TFA 的 90% 乙腈水溶液。梯度在 15 分钟期间从 100% A 至 75/25A : B。先洗脱得到的标记肽与未标记肽的 RT 存在 1 分钟差别。收集 HPLC 洗脱液 0.5 分钟的级分。标记肽根据所使用的 HPLC 在 6 至 9 分钟时间流出。HPLC 纯化肽样品通过将感兴趣的级分在水中稀释 2 倍,并将溶液置于 1cc WatersHLB 柱的管中进行进一步加工。滤芯用 3×1mL 水进行洗脱以除去乙腈和 TFA,接着用 400 μ L 1 : 1EtOH/H₂O 洗脱 F-18 标记肽。

[0245] 纯化的 ¹⁸F-IMP 449 在分析 HPLC C18 柱上洗脱成单峰。

[0246] 使用 4 只带有在皮下缓慢生长的 CaPan1 异种移植物的泰康丽裸鼠。其中 3 只小鼠注射 TF10(162 μ g), 18 小时后注射 ¹⁸F-IMP 449。TF10 是用于肿瘤成像研究的人性化双特异性抗体,二价结合 PAM-4 确定的 MUC 1 肿瘤抗原和一价结合 HSG(参见,例如 Gold 等人, 2007, J Clin Oncol. 25(18S):4564)。1 只小鼠仅注射肽。所有的小鼠在注射后 1 小时进行解剖。组织立即进行计数。动物 #2 在股骨中表现出高吸收。股骨转移至新的瓶中,与旧的空瓶重新计数。重计数表明数量集中在组织上。该股骨已经破裂,大块的肌肉与之粘连。

相比于平均分布表明,在肿瘤靶向双特异性抗体的存在下,定位于肿瘤处的 F-18 标记肽水平实质上高于任何正常组织。

[0247] 仅 ^{18}F -IMP 449 给药或以预靶向方式,其在动物体内的组织吸收类似。与仅肽给药相比,预靶向动物在人类胰腺癌异种移植物 CaPan1 的吸收 1 小时增加了 5 倍 ($46 \pm 0.9\%$ ID/g 对比 089% ID/g)。此时得到特殊肿瘤 / 非肿瘤比率 (例如,肿瘤 / 血液和肝脏比率分别是 23.4 ± 2.0 和 23.5 ± 2.8)。

[0248] 表 7. 注射肽 1 小时后的组织吸收,平均值和个体动物:

[0249]

	TF10 (162 μg)- $\rightarrow$ 18 h $\rightarrow$ ^{18}F IMP449(10:1)						仅 ^{18}F IMP 449
组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 1
肿瘤 (质量)	3	4.591	0.854	4.330 (0.675 g)	5.546 (0.306 g)	3.898 (0.353 g)	0.893 (0.721 g)
肝	3	0.197	0.041	0.163	0.242	0.186	0.253
脾	3	0.202	0.022	0.180	0.224	0.200	0.226
肾	3	5.624	0.531	5.513	6.202	5.158	5.744
肺	3	0.421	0.197	0.352	0.643	0.268	0.474
血液	3	0.196	0.028	0.204	0.219	0.165	0.360
胃	3	0.123	0.046	0.080	0.172	0.118	0.329
小肠	3	0.248	0.042	0.218	0.295	0.230	0.392
大肠	3	0.141	0.094	0.065	0.247	0.112	0.113
胰腺	3	0.185	0.078	0.259	0.194	0.103	0.174

[0250]

脊柱	3	0.394	0.427	0.140	0.888	0.155	0.239
股骨	3	3.899	4.098	2.577	8.494*	0.625	0.237
脑	3	0.064	0.041	0.020	0.072	0.100	0.075
肌肉	3	0.696	0.761	0.077	1.545	0.465	0.162

[0251] * 将股骨转移至新瓶后,通过重计数确认动物 #2 股骨的高计数。动物 #2 显示在正常组织吸收高于动物 #1 和 #3。

[0252] 实施例 10. ^{111}In -IMP 449 对比 ^{18}F -IMP 449 和预靶向抗体的生物分布比较

[0253] 研究的目的是为了比较 ^{111}In -IMP 449 和 ^{18}F -IMP 449 在以双特异性抗体 TF2 预靶向后皮下带有 LS174 异种移植物的裸鼠中的生物分布。TF2 抗体用对接和锁定方法制得,包含与 CEA 肿瘤抗原和 HSG 半抗原的结合位点 (参见,例如 Sharkey 等人, Radiology 2008, 246:497-507; Rossi 等人, PNAS USA 2006, 103:6841-46)。由于同一时间没有足够数量的具有肿瘤的小鼠,研究分在 2 个不同周进行。

[0254] ^{111}In -IMP 449: ^{111}In 标记采用与标记 IMP288 相同的过程进行,但是比活性较低。ITLC 和 C-18RP HPLC 表现出 $\sim 30\%$ 未结合 (未显示)。标记肽在 HLB 柱 (1mL, 30mg) 上纯化。所得纯化产物在饱和氯化钠中开发的 ITLC 分析仍显示 33% 未连接 (最高 20% 带状)。

RP HPLC 在纯化前后显示多重峰（未显示）。当混合有 20× 摩尔过量的 TF2 时，纯化后的 SE HPLC 显示 47% 活性转移至 HMW（未显示）。

[0255] ^{18}F -IMP 449：标记如上所述方法进行，但是如其他所述（Kim 等人，Applied Radiation and Isotopes 61,2004,1241-46），F-18 在标记前先在 QMA 滤芯上纯化。简言之，**Sep-Pak®** Light Waters Accell™ Plus QMA 滤芯先用 10mL 0.4M KHCO_3 冲洗，而后用 10mL DI 水洗涤来制备。 ^{18}F (42mCi) 的 2mL 水加载到 QMA 滤芯上。滤芯用 10mL DI 水洗脱以除去杂质。随后用 1mL 0.4M KHCO_3 的 200 μL 级分洗脱柱体。级分 2 含有大部分活性，33mCi。F-18 溶液的 pH 用 10 μL 冰醋酸调节。级分 #2 中的 ^{18}F 与 3 μL 的 2mM Al 的 0.1M pH 4NaOAc 缓冲液中混合。样品与 10 μL 的 0.05MIMP 449 的 pH40.5M NaOAc 缓冲液混合，且反应溶液在 94℃ 加热 15 分钟。 ^{18}F -IMP 449 用 RP HPLC 纯化。包含产品的级分通过 HLB 柱来交换缓冲液。柱加载样品后用水洗涤。产品用 400 μL 体积的 1 : 1 的水 : 乙醇进行洗脱。产品的 RP HPLC 显示一个有肩主峰（未显示）。由于产率低，比活性低，需要往小鼠注射更多的肽，从而导致 bsMAb : 肽的比率为 6.9 : 1 而非 10 : 1。

[0256] 结果

[0257] IMP449 用 ^{111}In 标记可能得到多种产品。其中一些可能为双核络合物。 ^{111}In -IMP 449 表现出高肾脏吸收和高血药浓度。虽然有多种类别，但是当以 TF2 预靶向时， ^{111}In -IMP 449 仍表现对肿瘤的定位。

[0258] 图 19 表明在小鼠体内 In-111 和 F-18 标记的 IMP 449 的比较生物分布。当存在双特异性 TF2 抗体时，两种标记肽表现出对肿瘤组织类似的高定位水平。当存在或不存在 TF2 抗体时，In-111 标记类别比 F-18 标记类别在肾脏显示出更高的浓度。数据汇总在下列表 8-11 中。

[0259] 表 8. 小鼠静脉注射 TF2 (163.2ug, $1.035 \times 10^{-9}\text{mol}$)，接着注射 ^{111}In -IMP449 ($1.035 \times 10^{-10}\text{mol}$) 16 小时后。注射肽后 1 小时的肽组织吸收 (% ID/g) 如下所示。

[0260]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5
肿瘤	5	9.18	1.02	9.22	8.47	8.04	9.45	10.70
肝	5	1.15	0.09	1.03	1.25	1.20	1.21	1.08
脾	5	0.48	0.06	0.43	0.49	0.58	0.50	0.42
肾	5	6.63	1.38	8.81	6.21	7.03	5.85	5.23
肺	5	1.03	0.14	0.92	1.14	1.18	1.04	0.86
血液	5	0.99	0.15	1.04	1.13	1.12	0.83	0.83
胃	5	0.16	0.05	0.25	0.17	0.16	0.13	0.12

小肠	5	2.33	0.65	2.21	2.51	2.01	3.33	1.59
大肠	5	0.20	0.04	0.21	0.25	0.18	0.21	0.14
股骨	5	1.45	0.87	0.59	1.30	0.71	2.02	2.62
脊柱	5	1.18	1.23	0.89	3.35	0.76	0.47	0.43
脑	5	0.14	0.16	0.05	0.06	0.13	0.04	0.43
肌肉	5	0.83	0.66	0.25	1.30	0.23	0.65	1.73

[0261]

体重	5	25.49	1.41	27.89	24.14	25.27	25.10	25.06
----	---	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------

[0262] 表 9. 给一组 2 只小鼠注射不含预靶向抗体的 ^{111}In -IMP449 ($1.035 \times 10^{-10} \text{mol}$)。注射肽后 1 小时的肽组织吸收 (% ID/g) 如下所示。

[0263]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2
肿瘤	2	0.922	0.195	0.784	1.060
肝	2	1.033	0.048	0.999	1.067
脾	2	0.409	0.067	0.362	0.456
肾	2	6.046	0.449	5.729	6.364
肺	2	0.695	0.032	0.672	0.717
血液	2	0.805	0.182	0.934	0.676
胃	2	0.290	0.055	0.251	0.329
小肠	2	2.234	0.594	1.814	2.654
大肠	2	0.237	0.022	0.253	0.222
股骨	2	1.210	1.072	1.968	0.453
脊柱	2	1.463	1.213	2.320	0.605
脑	2	0.133	0.091	0.068	0.197
肌肉	2	1.005	1.148	1.817	0.193

体重 .	2	26.65	3.19	28.90	24.39

[0264] 表 10. 小鼠静脉注射 TF2(163.2 μ g, 1.035×10^{-9} mol), 接着在 16 小时后注射 ^{18}F -IMP 449(1.5×10^{-10} mol)。注射肽后 1 小时的肽组织吸收 (% ID/g) 如下所示。

[0265]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5
肿瘤	5	7.624	3.080	5.298	7.848	12.719	5.118	7.136
肝	5	0.172	0.033	0.208	0.143	0.196	0.131	0.180
脾	5	0.142	0.059	0.239	0.081	0.132	0.118	0.140
肾	5	2.191	0.125	2.313	2.141	2.154	2.319	2.027
肺	5	0.315	0.094	0.474	0.230	0.300	0.305	0.265
血液	5	0.269	0.143	0.431	0.395	0.132	0.126	0.260
胃	5	0.218	0.341	0.827	0.041	0.098	0.054	0.070
小肠	5	0.351	0.313	0.903	0.185	0.297	0.170	0.198
大肠	5	0.069	0.028	0.076	0.043	0.111	0.073	0.042
股骨	5	0.625	0.358	0.869	0.146	0.811	0.957	0.344

[0266]

脊柱	5	0.585	0.569	0.159	0.119	0.493	1.526	0.626
脑	5	0.029	0.005	0.033	0.021	0.035	0.026	0.028
肌肉	5	0.736	0.970	0.190	0.064	0.494	2.438	0.496
体重 .	5	24.69	1.20	23.05	26.36	24.45	24.48	25.11

[0267] 表 11. 小鼠注射不含预靶向抗体的 ^{18}F -IMP 449(1.5×10^{-10} mol)。注射肽后 1 小时的肽组织吸收 (% ID/g) 如下所示。

[0268]

组织	n	平均值	SD	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5
肿瘤	5	0.472	0.201	0.256	0.344	0.533	0.447	0.779

肝	5	0.177	0.035	0.141	0.200	0.141	0.185	0.217
脾	5	0.118	0.027	0.098	0.094	0.101	0.144	0.151
肾	5	2.727	0.367	2.430	2.452	2.500	3.080	3.173
肺	5	0.246	0.082	0.206	0.209	0.156	0.301	0.358
血液	5	0.167	0.072	0.110	0.135	0.104	0.217	0.267
胃	5	0.114	0.083	0.149	0.241	0.037	0.067	0.074
小肠	5	0.277	0.081	0.407	0.286	0.206	0.213	0.271
大肠	5	0.072	0.029	0.061	0.052	0.047	0.083	0.118
股骨	5	0.100	0.032	0.080	0.144	0.110	0.109	0.059
脊柱	5	0.305	0.268	0.104	0.647	0.099	0.132	0.545
脑	5	0.034	0.025	0.018	0.018	0.022	0.034	0.077
肌肉	5	0.088	0.022	0.087	0.069	0.069	0.122	0.092
体重 .	5	25.34	1.72	25.05	26.88	26.40	25.88	22.51

[0269] 总之,本文所述简单的可重现的方法和组合物用于制备 F-18 标记靶向肽,其可用于各种疾病状况的体内成像。技术人员能够意识到上述双特异性抗体不受限制,而是可以包括任何已知的可对抗各种疾病或病原体靶抗原的抗体。所述方法也不限于双特异性抗体预靶向。在其他实施方式中,直接连接至待成像的靶向细胞、组织或器官的分子或络合物可以采用本文所述的方法用 F-18 进行标记,施用于受试者进行 PET 呈像(参见下列实施例)。

[0270] A1-F-18 标记肽,例示 IMP449,在体内状况下足够稳定,可在已知成像方法中利用,诸如 PET 扫描。如上所述方法制备的放射性标记的肽的现有收率在 5 到 20% 之间,即使使用 HPLC 纯化步骤将标记肽从未标记肽中分离出来,最终收率约为 5%。进一步,要求保护的方法可在 1 小时制备时间内制备可注射的 F-18 标记靶向肽,并在 F-18 的衰变时间内使合适的成像过程进行。最后,相比制备用于成像研究的 F-18 标记化合物的已知方法,描述的和要求保护的方法使操作者最小程度的暴露于放射性同位素下。

[0271] 实施例 11. F-18 标记试剂盒

[0272] F-18 标记的试剂盒通过混合 8.0mg 的 IMP 449 和 0.1549g 的抗坏血酸制备得到。两种试剂溶解在 10.5mL 水中,溶液以 1.0mL 等分入 10 小瓶。pH 未调节。溶液在真空下冷冻、冻干、密封。

[0273] 实施例 12. 利用标记肽和双特异性抗体预靶向在体内进行肿瘤成像

[0274] 当前实施例表明利用双特异性抗体预靶向和标记的靶向肽的体内成像技术可以

成功地用于检测相对小尺寸的肿瘤。使用的预靶向抗体可以是如上所述的 TF2 或者 TF10 抗体。

[0275] 制剂缓冲液：

[0276] 制剂缓冲液是将 0.3023g 抗坏血酸, 18.4mL DI 水和 1.6mL 1MNaOH 混合, 调节 pH 至 pH6.61。缓冲液等分为 20 小瓶 1mL, 然后冻干。根据文献记载, F-18 在 **WATERS® ACCELL™ Plus QMA** 轻质滤芯上纯化, 其中滤芯先用 10mL 0.4M KHCO_3 洗涤, 接着用 10mL DI 水洗涤。含有 F-18 的 2mL 水通过滤芯, 然后用 10mL 水洗涤。F-18 从滤芯上洗脱下来成含有 0.4M KHCO_3 的 $5 \times 200 \mu\text{L}$ 等分。大部分活性洗脱至第二级分。第二级分的活性与 $3 \mu\text{L}$ 2mM Al 的 pH4 乙酸缓冲液混合。然后将 Al-F-18 溶液注射入抗坏血酸 IMP449 标记瓶, 加热至 105°C 15 分钟。冷却反应溶液, 与 0.8mL DI 水混合。反应内容物置于 **WATERS® OASIS® IccHLB** 柱, 洗脱至废物瓶中。柱体用 $3 \times 1\text{mL}$ DI 水洗涤。柱体转移至含有抗坏血酸的制剂瓶中。柱体用 $2 \times 200 \mu\text{L}$ 1 : 1EtOH/ H_2O 洗脱, 洗脱得到标记肽。

[0277] 利用 DNL 技术制备 TF10 双特异性抗体

[0278] TF10 中的癌靶向抗体成份是从 hPAM4 中得到的, 这是一种已作为放射性标记的 Mab 进行详细研究的人源化抗 -MUC 1Mab (例如, Gold 等人, Clin. Cancer Res. 13 : 7380-7387, 2007)。半抗原连接成份是一种从 h679 中得到的如上所述的人源化抗组胺琥珀酰甘氨酸 (HSG)。TF10 双特异性 ($[\text{hPAM4}]_2 \times \text{h679}$) 抗体用已知制备 (抗 CEA) $_2 \times$ 抗 HSG bsAb TF2 的方法 (Rossi 等人, 2006) 制备。TF10 构建体具有两个人源化 PAM4Fab 和一个人源化 679Fab。

[0279] 对于 TF10, 人源化 hPAM4 抗体 Fab 使用肽间隔子连接至 α -序列。由于 α -序列是唯一的, 其可自发地与另一 α -序列连接形成二聚体。在 TF10 中, 含有 2hPAM4 抗 -MUC 1Fabs 的结构通过 2 α -序列 (称作 hPAM4-DDD) 相互连接。TF10 的其他组分是通过连接 β -序列至人源化抗 HSG 抗体的 Fab' 来制备。与 α -序列不同, β -序列不能自身连接, 但是可以与 2 α -序列 (h679-AD) 形成的二聚结构连接。因此, 当这些 2 独立制备蛋白相互混合时, 它们可立即形成 ' a_2p ' 结构, 各 Fab' 定向为与其抗原无阻碍连接的方式。此结合相互作用的稳定性已经通过在各 α -和 β -序列 (β -序列中的 2 个, 和 α -序列中的 1 个) 中重要的定位半胱氨酸得到进一步改进。由于 ' b' ' 以高特异性定位连接至 ' a_2' ', a_2b 一旦被组装, 即可在 α -和 β -部分形成二硫桥, 从而共价结合这些 2 蛋白质。 α -和 β -序列均可在人蛋白中找到, 因而不期望被加入络合物的免疫原性。

[0280] 抗 MUC1 融合蛋白 hPAM4- α 是通过 α 序列融合至 Fd 链的 C 端形成的。抗 HSG 融合蛋白 h679- β 是通过 β 序列连接至 Fd 链的 C 端形成的。稳定连接的多价 bsMAb Tf10 是通过 hPAM4- α 与 h679- β 配对形成。

[0281] 两种融合蛋白 (hPAM4-DDD 和 h679-AD2) 在稳定转染骨髓瘤细胞中各自独立表达。合并组织培养上清液, 得到 2 倍摩尔过量的 hPAM4- α 。反应混合物在使用 1mM 还原谷胱甘肽的温和还原条件下, 室温温育 24 小时。还原后, 利用 2mM 氧化谷胱甘肽的温和氧化条件完成 DNL 反应。TF10 通过使用 IMP 291-affigel 树脂的亲和色谱法进行分离, 它与 h679Fab 高特异性结合。

[0282] 全组织学和血细胞结合样本已用于检测 hPAM4IgG 和抗 CEA $\times$ 抗 HSG bsMAb, 现已进入临床实验。hPAM4 结合仅限于在 1/3 样本中对膀胱和胃的微弱结合 (体内未见结合),

对正常组织没有结合归因于抗 CEAx 抗 HSG bsMAb。此外,对带有 H1 和 H2 阻胺受体的细胞系的体外研究表明,IMP-288 二-HSG 肽没有拮抗或激动活性,而在 2 不同类别的动物研究中表明,与阻胺成份相关肽在剂量为用于成像的 20,000 倍时没有药理活性。因此,HSG-组胺衍生物不具有药理学活性。

[0283] 生物分布:TF10 双特异性抗体的靶向和剂量研究

[0284] 测定了用渐增的 TF10 剂量的 TF10 的生物分布和肿瘤靶向。这些研究提供了 TF10 在一定范围剂量内的基础 PK 数据。主要剂量范围模拟人等价剂量 (HED) 是约 1.0 至 50mg 给予 70kg 的患者。基于 FDA 对转化给予动物的剂量至 HED 的指导方针 [即, (mg/kg 小鼠体内 /12.3) = mg/kgHED], 那么将 1mg (6.37nmol) Tf10 剂量给予 70kg 人相当于 3.5 μ g (0.022nmol) 剂量在 20g 的小鼠体内。

[0285] 总之,动物静脉注射 3.5, 17.5, 35 和 70 的 TF10 (加入追踪 125 I-TF10)。给予 17.5, 35 和 70 μ g 剂量 (HED = 1, 5, 10 和 20mg) 的动物在 1, 6, 16, 48 和 72 小时进行解剖 (n = 5 每次观测, 总的 N = 75 动物 / 细胞线)。目前很多 TF10 的研究表明在小鼠体内快速消除, 与上述的 TF2 抗-CEA 构建体类似。

[0286] Pk 研究也用 131 I-TF10 在兔子中进行。之前关于 TF2 抗-CEA bsMAb 的研究表明, 兔子可能能够更好的预测在患者中观察到的 Pk 行为, 因为它们以在患者中发现的相同的方式清除人源化抗-CEA, 而小鼠以更快的速度清除人源化 IgG。这些研究涉及 4 只兔子, 2 只施予 5 ~ mg HED 和 2 只施予 20 ~ mg 加入 131 I-TF10 (~ 700 μ Ci) 的 TF10 的 HED。兔子在 5 分钟, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120 和 168 小时进行抽血。用装有高能量准直仪的 ADACSolut 伽马照相机拍摄完整像。 131 I-标准物 (~ 20 μ Ci 在 10mL 注射器中) 置于每只兔子可见范围内, 在 3, 24, 48, 120 和 168 小时进行成像。然后利用标准物提供关于 131 I-TF10 分布的半定量数据。

[0287] 利用 TF2 和 TF10 双特异性抗体和标记肽的预靶向的成像研究

[0288] 下述研究表明利用双特异性抗体和标记肽的预靶向技术的体内成像的可行性。利用如上所述的 18 F-金属标记肽无法获得成像, 而双特异性抗体的预靶向技术通常适用于任何种类的标记。因此, 本研究是代表利用要求保护的 F-18 标记肽获得的结果。

[0289] 图 20 和图 21 表明利用 bsMAb 预靶向方法, 以 111 In-标记的二-HSG 肽, IMP-288, 是检测动物模型中以何种程度清晰描绘的肿瘤的实施例。在图 20 中, 利用 TF10 和 111 In-IMP-288 肽的预靶向对具有 0.2 至 0.3g 人胰腺癌异种移植物的裸鼠进行成像。在图形上部的 6 只动物接受两种不同剂量的 TF10 (相对所给肽的摩尔数, 摩尔比为 10 : 1 和 20 : 1), 第二天它们施予 111 In-标记的二 HSG 肽 (IMP-288)。另外 3 只动物仅给予 111 In-IMP-288 (未预靶向)。注射标记肽后 3 小时成像, 在预靶向动物中清晰显示出 0.2-0.3g 肿瘤的定位, 而仅给予 111 I-肽的动物没有定位。

[0290] 本研究中, 肿瘤吸收平均为 20-25% ID/g, 肿瘤 / 血比率超过 2000 : 1, 肿瘤 / 肝脏比率为 170 : 1, 肿瘤 / 肾脏比率为 18/1。如上述实施例中所示的肿瘤吸收, A1- 18 F-标记的 IMP 449 在相同的 CaPan1 异种移植模型中平均仅为约 4-5% ID/g, 可见低吸收的 18 F-标记肽仅仅反映 A1- 18 F-标记的 IMP 449 的低比活性。然而, A1- 18 F-标记 IMP 449 数据显示出预靶向的氟化肽的显著潜能, 当所述氟化肽与 TF10bsMAb 的特异性结合将成为胰腺或者其他癌成像的极好的工具。 18 F-标记肽的生物分布数据大大超出直接放射性标记的抗

体和直接用 ^{18}F 标记的小改造抗体构建体的靶向能力 (Cai 等人, J. Nucl. Med. 48 :304-310, 2007)。

[0291] 图 21 所示数据进一步强调了用于检测癌的预靶向方法的灵敏度。这里,从静脉注射了人结肠癌细胞系和肺中有 0.2-0.3mm 微转移肿瘤的裸鼠获得微型 PET 成像图。动物施予抗 CEA bsMAb TF2,然后是预靶向 ^{124}I - 标记肽。成像显示横断面和冠状横切面在 1.5 小时甚至到 21 小时均具有强烈的吸收。冠状横切面是后视图,表明注射后 1.5 小时在胃和肾脏中也可见 ^{124}I - 肽。当解剖直径不大于 0.3mm 时 (上图,穿过胸的横切面),成像显示何为在肺中的个体损伤 (箭头) (Sharkey 等人, Radiology, 246 (2) :497-507, 2008)。以抗 CD22TF6bsMAb 预靶向和给予相同的 ^{124}I - 标记肽的对照动物 (左侧,中图) 显示,此时抗 CEA bsMAb 定位的特异性。抗 CEA 预靶向动物的冠状横切面显示在胸和肾中的吸收,以及胃中的一些活性。显著地,给予 ^{18}F -FDG 的动物中没有显示肺中相同尺寸的损伤。因而,相比于目前用于肿瘤 PET 成像的标准的 F-18- 标记的氟脱氧葡萄糖探针,预靶向抗体的使用提供了更好的检测特异性和灵敏度。

[0292] 这些数据进一步表明利用双特异性抗体预靶向和 ^{18}F - 标记肽进行成像的可行性。

[0293] 实施例 13. 叶酸 NOTA 缀合物的合成

[0294] 叶酸如所述激活 (Wang 等人, Bioconjugate Chem. 1996, 7, 56-62), 并缀合至 $\text{Boc-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ 。缀合物通过色谱法进行纯化。然后 Boc 基团用 TFA 处理而除去。氨基叶酸衍生物在碳酸盐缓冲溶液中与 p-SCN-Bn-NOTA (大环的) 混合。产物用 HPLC 进行纯化。叶酸-NOTA 衍生物如实施例 10 所述用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 标记,接着 HPLC 纯化。 ^{18}F - 标记叶酸静脉注射入受试者,并且成功用于叶酸受体分布的成像,例如癌或炎症疾病 (参见,例如, Ke 等人, Advanced Drug Delivery Reviews, 56 :1143-60, 2004)。

[0295] 实施例 14. 在人体内的预靶向 PET 成像

[0296] 给有疑似再发性肿瘤的患者 (1.7m^2 体表面积) 注射 17mg 双特异性单克隆抗体 (bsMab)。bsMab 允许定位在靶点并从血液中清除。当 99% 的 bsMab 从血液中清除后,注射 F-18 标记肽 ($5 \sim 10\text{mCi}$ 在 $5.7 \times 10^{-9}\text{mol}$)。PET 成像显示微转移肿瘤的存在。

[0297] 实施例 15. 用 F-18 标记的血管形成受体的成像

[0298] 标记的 Arg-Gly-Asp (RGD) 肽已被用于血管形成的成像,例如在涉及 $\alpha_v \beta_3$ 整合蛋白的缺血性组织中。(Jeong 等人, J. Nucl. Med. 2008, Apr. 15 电子公开)。根据 Jeong 等人 (2008) RGD 缀合至 SCN-Bz-NOTA。如上实施例 10 所述的 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 连接至 NOTA- 衍生的 RGD 肽,将铝贮存溶液与 F-18 和衍生的 RGD 肽混合, 110°C 加热 15 分钟,利用过量肽使得标记反应如实施例 10 所述进行完全。F-18 标记 RGD 肽如 Jeong 等人 (2008) 所述的用于体内生物分布和 PET 成像。RGD-NOTA 的 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 缀合物进入缺血性组织,提供血管形成的 PET 成像。

[0299] 实施例 16. 利用 F-18 标记的蛙皮素的肿瘤成像

[0300] 缀合 NOTA 的蛙皮素衍生物 ($\text{NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH}_2$) 根据 Prasanphanich 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104 :12462-467) 制备。NOTA- 蛙皮素衍生物根据上述实施例 10 用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 进行标记。如实施例 10 所述, F-18 标记的蛙皮素衍生物在 OASIS® 柱 (Waters, Milford, MA) 上从未标记蛙皮素中分离出来。根据 Prasanphanich 等人 (2007), $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 标记的 NOTA- 蛙皮素缀合物成功地用于促胃液素释放肽受体表达肿瘤的 PET 成像。

[0301] 实施例 17. 利用 F-18 标记的可靶向缀合物的肿瘤成像

[0302] 肽、多肽、蛋白质、糖类、细胞因子、激素或细胞受体结合剂的 NOTA 衍生物是根据美国专利号 7,011,816(通过引用全文并入本文)进行制备的。NOTA 衍生的可靶向缀合物如实施例 10 所述用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 进行标记。缀合物体内给药,成功用于肿瘤的 F-18PET 成像。

[0303] 实施例 18. 利用双特异性抗体的肿瘤成像

[0304] 具有至少一个特异性结合靶向组织的臂,至少另一个特异性结合可靶向缀合物的臂的双特异性抗体的制备是根据引用并入本文的美国专利号 7,052,872 进行的。可靶向缀合物包含一种或多种 NOTA 螯合部分。可靶向缀合物如实施例 10 所述方法用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 进行标记。患病的受试者注射双特异性抗体。在足够时间后使游离的双特异性抗体从循环中清除,受试者注射 F-18 标记的可靶向缀合物。F-18 标记分布的成像通过 PET 扫描进行。

[0305] 在另一个实施方式中,人源化或嵌合内化的抗 -CD74 抗体如美国专利号 7,312,318 所述进行制备。p-SCN-bn-NOTA 前体如权利要求 7 所述用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 进行标记。 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ NOTA 采用标准技术缀合至抗体。在对有 CD74 表达的肿瘤的受试者进行静脉注射后,抗 CD74 抗体定位于肿瘤处,允许通过 PET 扫描使肿瘤成像。在替代性实施方式中, F-18 标记抗体的制备是利用甲胎蛋白结合抗体 Immu31, hPAM4, cPAM4, RS7, 抗 -CD20, 抗 -CD19, 抗 -CEA 和抗 -CD22, 如美国专利号 7,300,655 ;7,282,567 ;7,238,786 ;7,238,785 ;7,151,164 ;7,109,304 ;6,676,924 ;6,306,393 和 6,183,744 所描述。抗体根据标准技术缀合至 NOTA, 如抗 CD74 抗体所述的用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 进行标记。F-18 标记抗体。F-18 标记抗体注射入受试者,提供通过 PET 扫描的成功的肿瘤成像。

[0306] 实施例 19. ^{18}F 标记的 NOTA 用于肾血流成像

[0307] 铝贮存溶液 (20 μL 0.05M 在 pH 4NaOAc 缓冲液中) 与 200 μL QMA 纯化的 F-18 (如实施例 10) 混合。 Al-F-18 溶液接着与 500 μL pH 4,0.2MNOTA 混合,加热 15 分钟。样品稀释在 5mL PBS 中用于注射。F-18 标记 NOTA 直接地用于成功的肾血流成像。

[0308] 实施例 20. 用 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 的进一步的肽标记研究

[0309] IMP 460NODA-GA-D-Ala-D-LyS(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂ 与如上所述的 IMP 361 类似的方法来制备。NODA-Ga 配体从 Chematech 购买,连接至肽合成器如其他氨基酸。纯化粗品肽获得期望的肽 MH⁺1366。

[0310] IMP460 的放射标记

[0311] IMP460 (0.0020g) 溶于 732 μL , pH 4,0.1M NaOAc 中。F-18 如实施例 10 所述方法进行纯化,用冰醋酸中和,与 Al 溶液混合。然后加入 20 μL 肽溶液,溶液在 99°C 加热 25 分钟。粗产品随后如上所述在 Waters HLB 柱上进行纯化。 Al-F-18 标记肽在 1 : 1EtOH/H₂O 柱洗脱液中。0.1% TFA 缓冲液中的反相 HPLC 跟踪显示在标记肽的预期位置产生清晰的单 HPLC 峰。

[0312] 实施例 21. 糖类标记

[0313] NOTA 氨基硫脲衍生物是通过 p-SCN-bn-NOTA 与肼反应制得的,然后用 HPLC 纯化配体。 Al-F-18 如实施例 10 所述制备, Al-F-18 加入 NOTA 氨基硫脲,加热 15 分钟。可选地 Al-F-18 氨基硫脲络合物用 HPLC 纯化。 Al-F-18 氨基硫脲以已知的方法缀合至氧化糖类。F-18 标记糖成功地用于利用 PET 扫描的成像研究中。

[0314] 实施例 22. 脂类标记

[0315] 含有醛的脂类缀合至实施例 21 的 Al-F-18 NOTA 氨基硫脲, F-18 标记脂类成功地

用于利用 PET 扫描的成像研究中。

[0316] 另一个可供选择的实施方式, 含有氨基的脂类与 p-SCN-bn-NOTA 反应。NOTA- 标记的脂类与上述实施例中的 A1-F-18 反应。F-18 标记脂类成功地用于利用 PET 扫描的成像研究中。

[0317] 实施例 23. 适体标记

[0318] 包含醛的适体与实施例 21 中 A1-F-18NOTA 氨基硫脲缀合。F-18 标记的适体施予受试者, 成功地用于利用 PET 扫描的成像研究中。

11960,262_Chinese(sequence listings)

序列表

<110>IMMUNOMEDICS, INC.

MCBRIDE, William J.

GOLDENBERG, David M.

<120> 用于蛋白质、肽和其他分子的改进的 F-18 标记方法和组合物

<130>78258-361491

<140>11960262

<141>2007-12-19

<150>60/884, 521

<151>2007-01-11

<160>2

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>4

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的肽 :DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂

<400>1

Phe Lys Tyr Lys

1

<210>2

<211>4

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的肽 :Ac-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂

<400>2

Lys Tyr Lys Lys

1

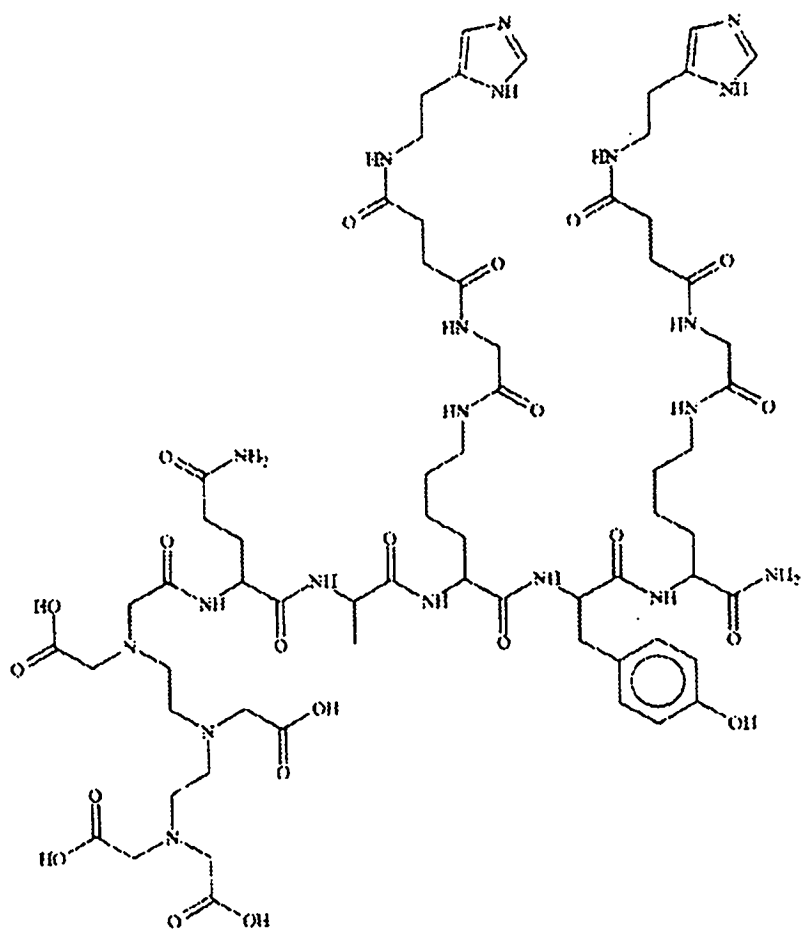
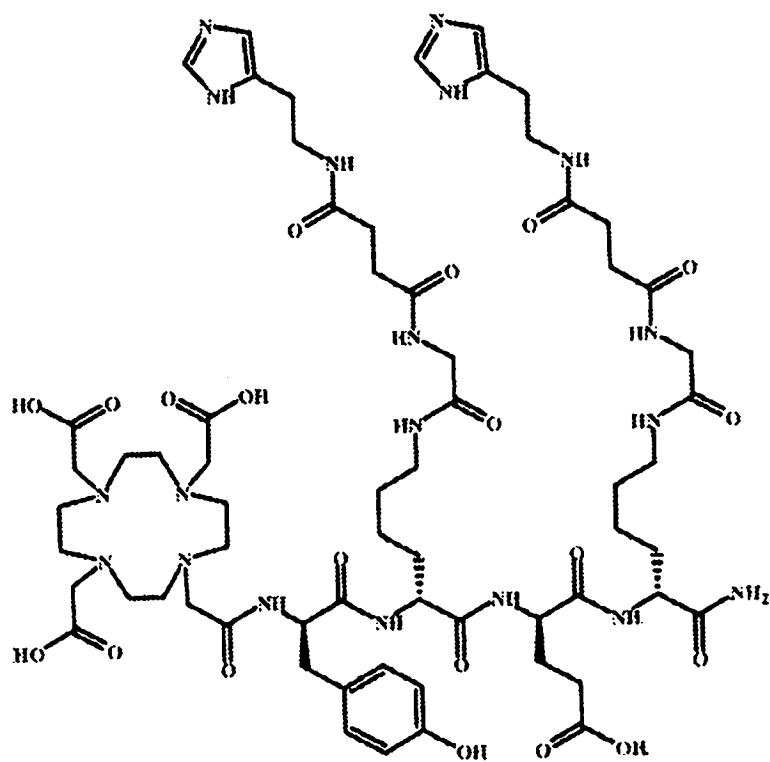
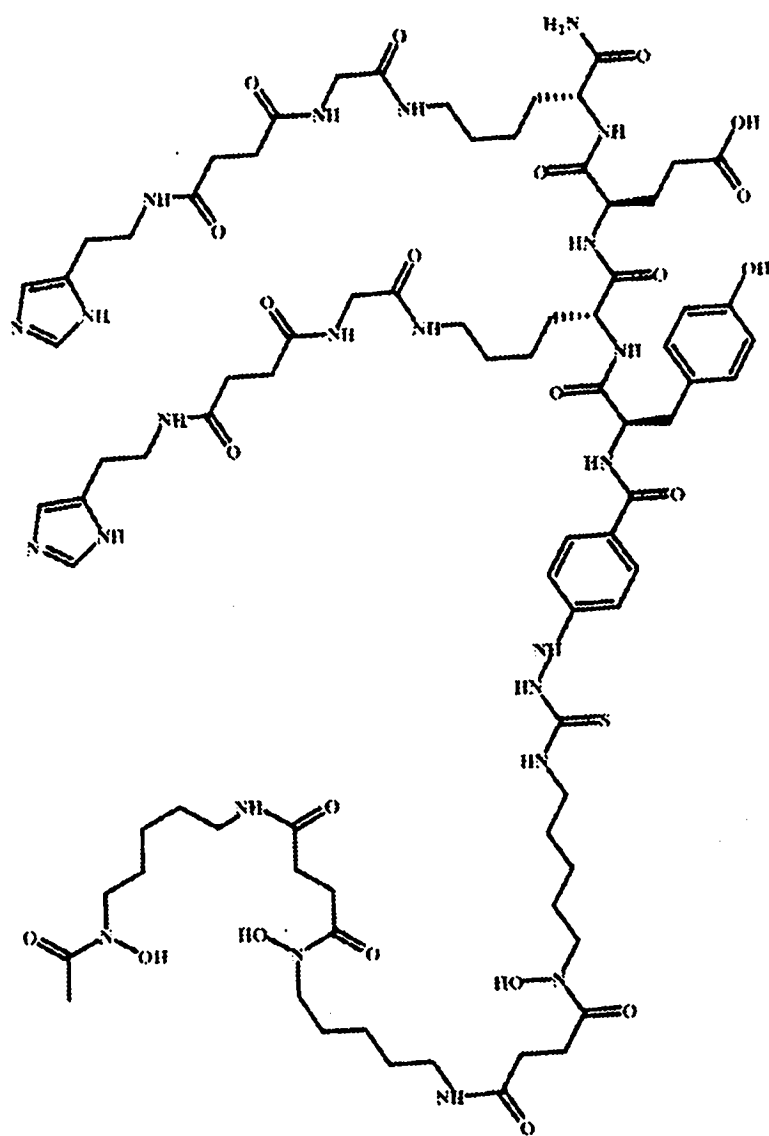
**IMP 272**

图 1



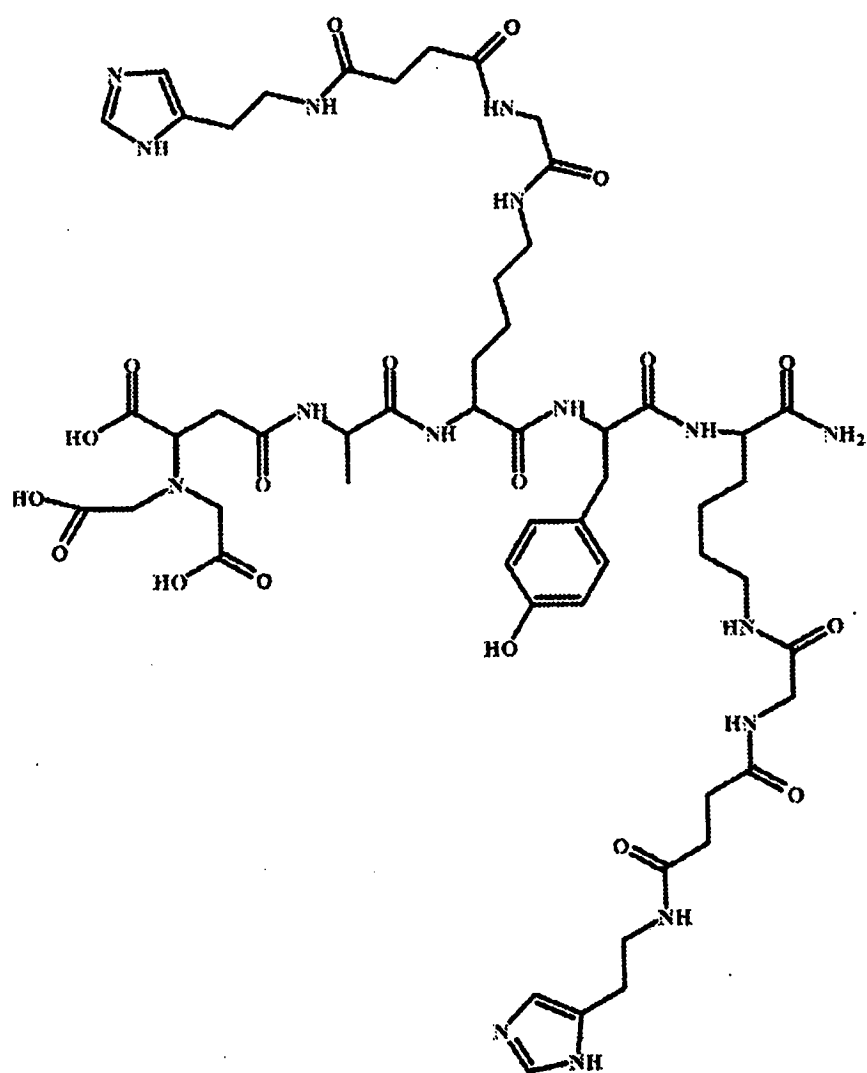
IMP 288

图 2



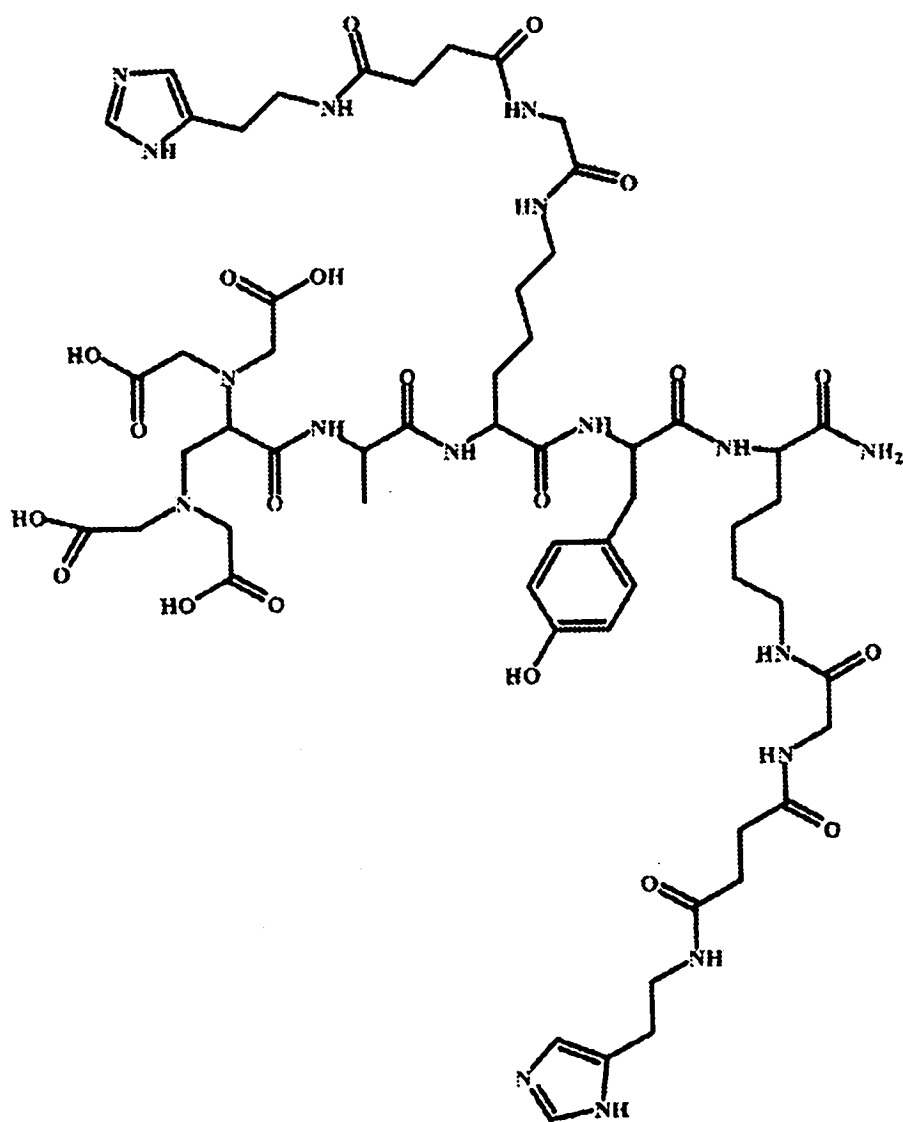
IMP 329

图 4



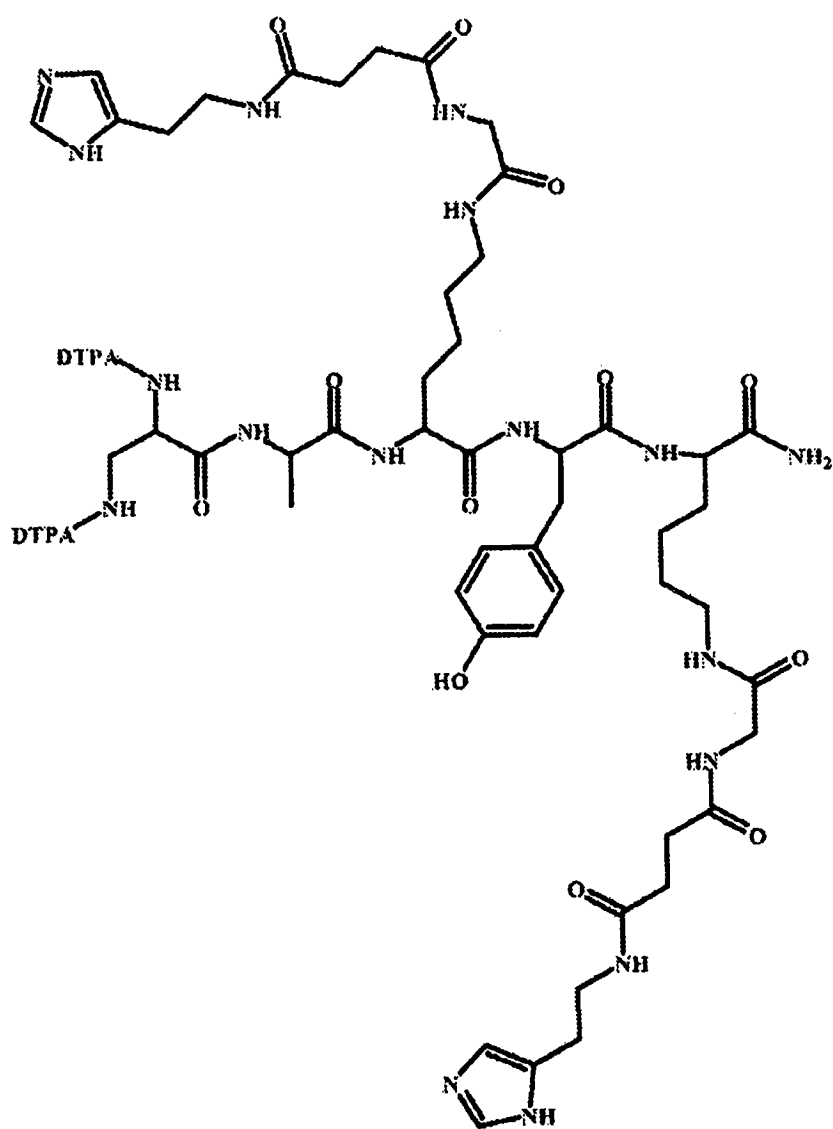
IMP 331

图 5



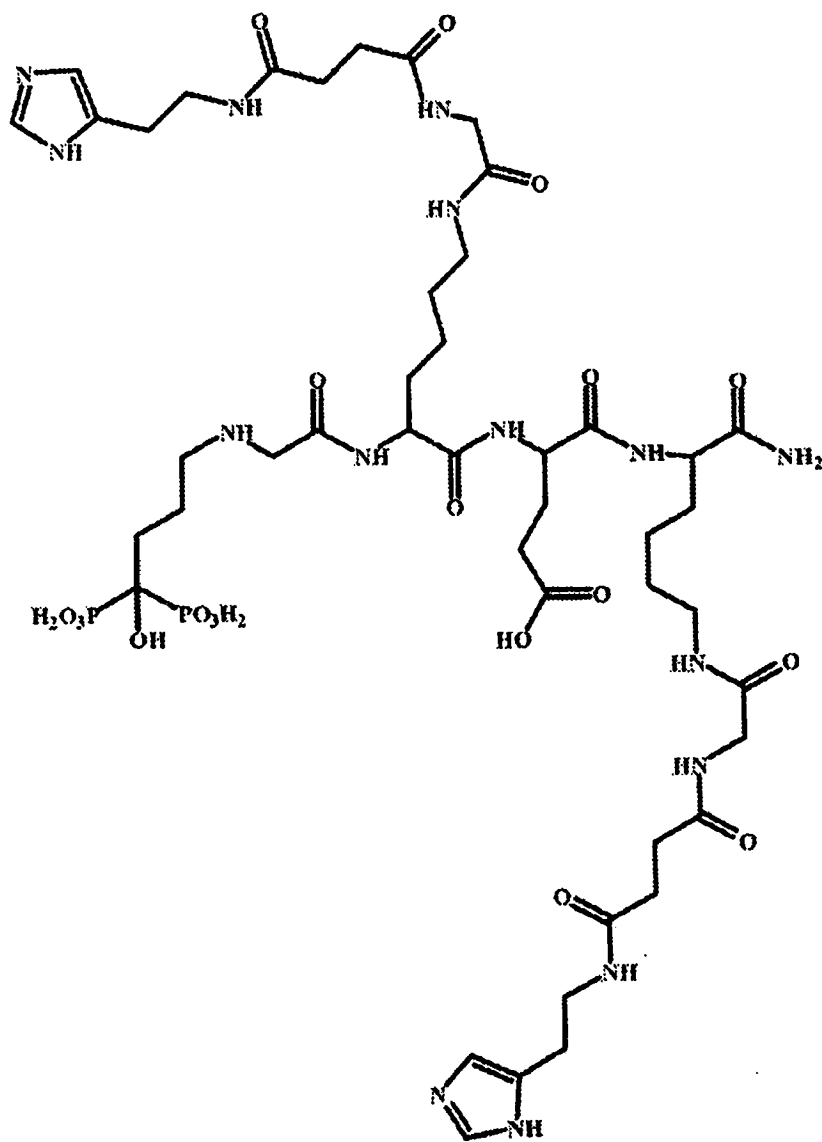
IMP 332

图 6



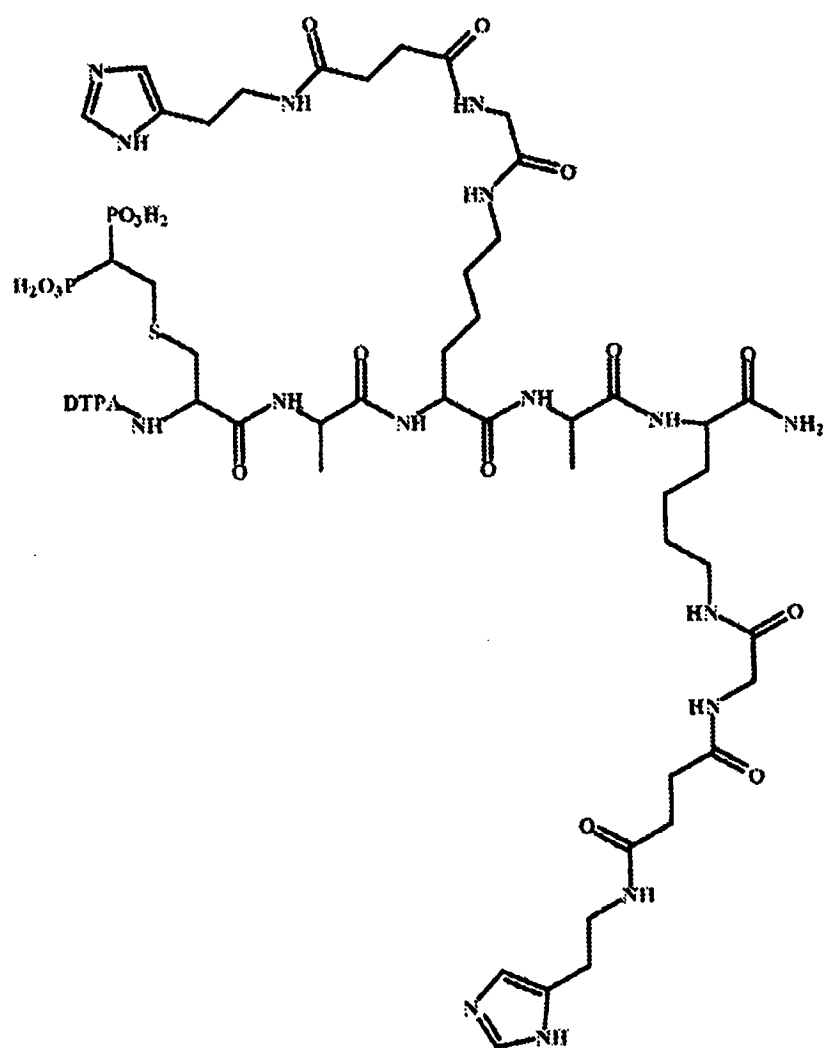
IMP 333

图 7



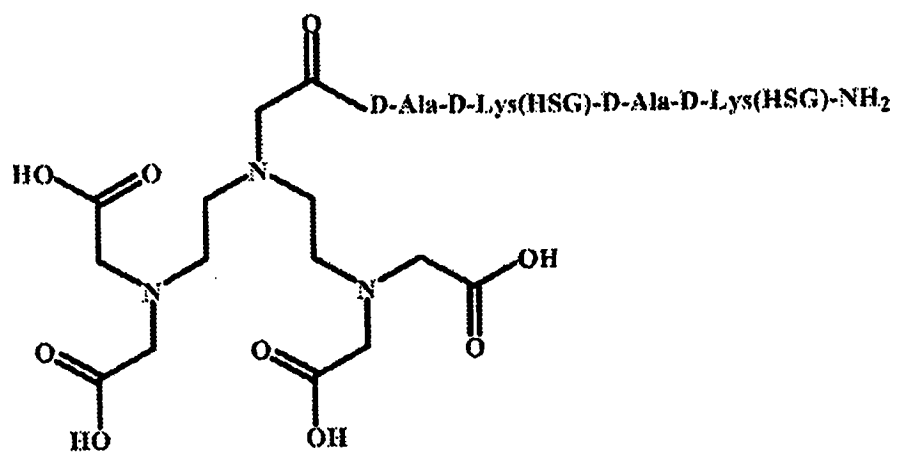
IMP 334

图 8



IMP 349

图 9



IMP 368

图 10

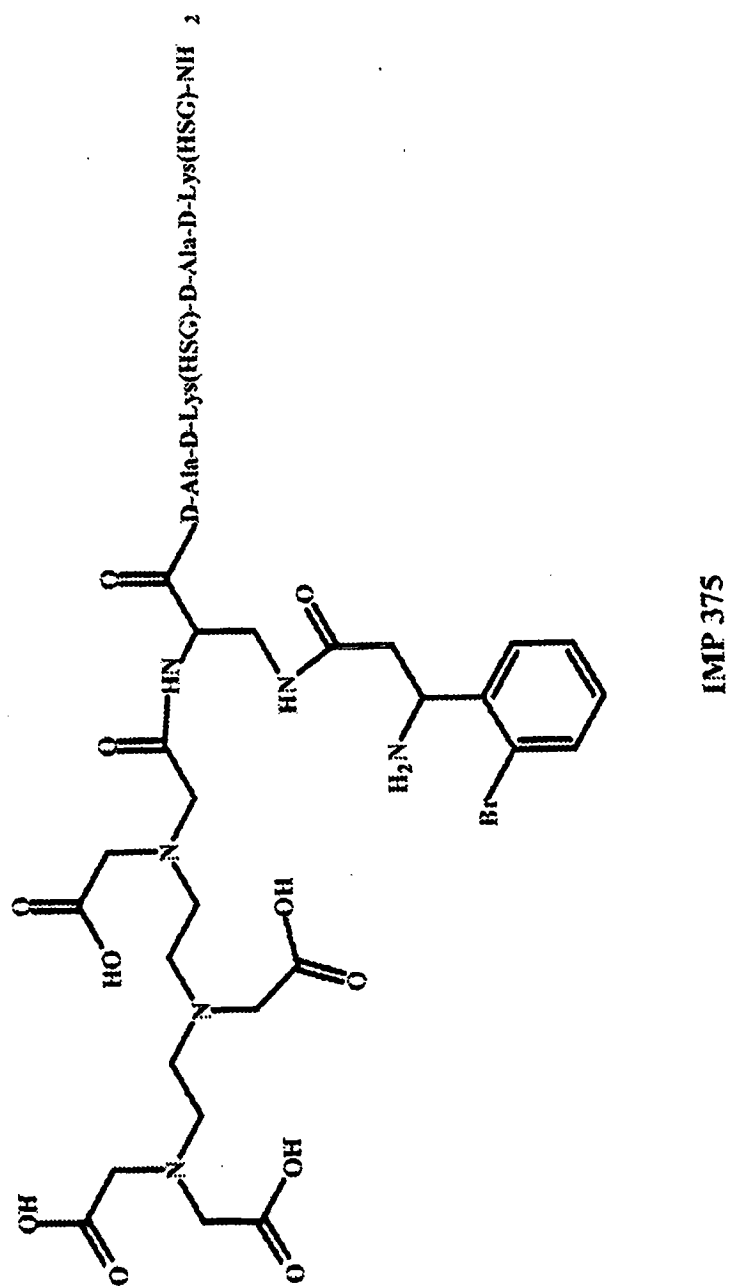
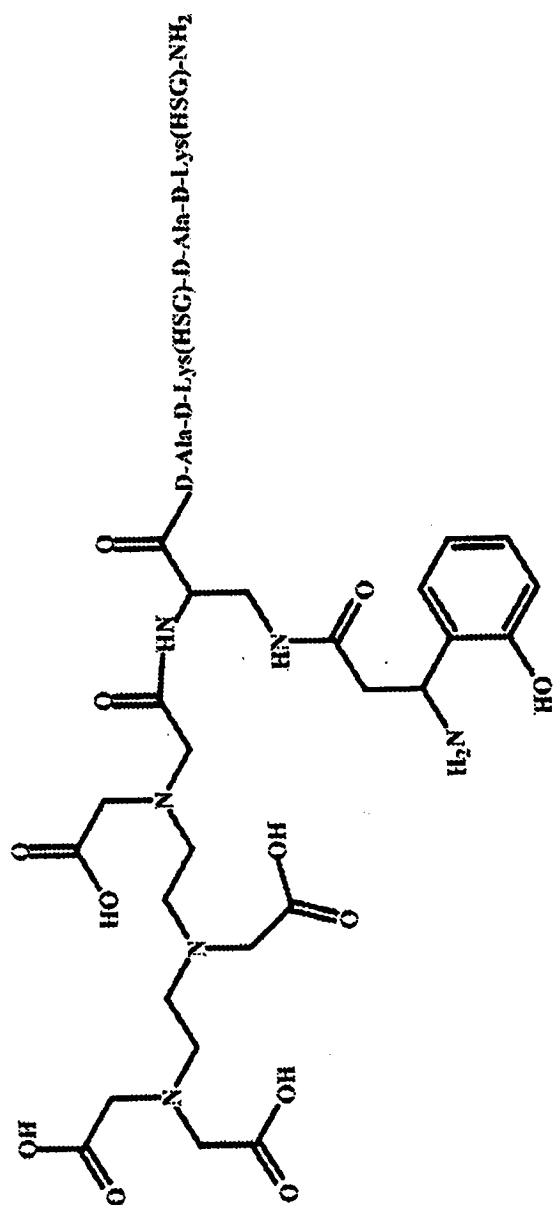
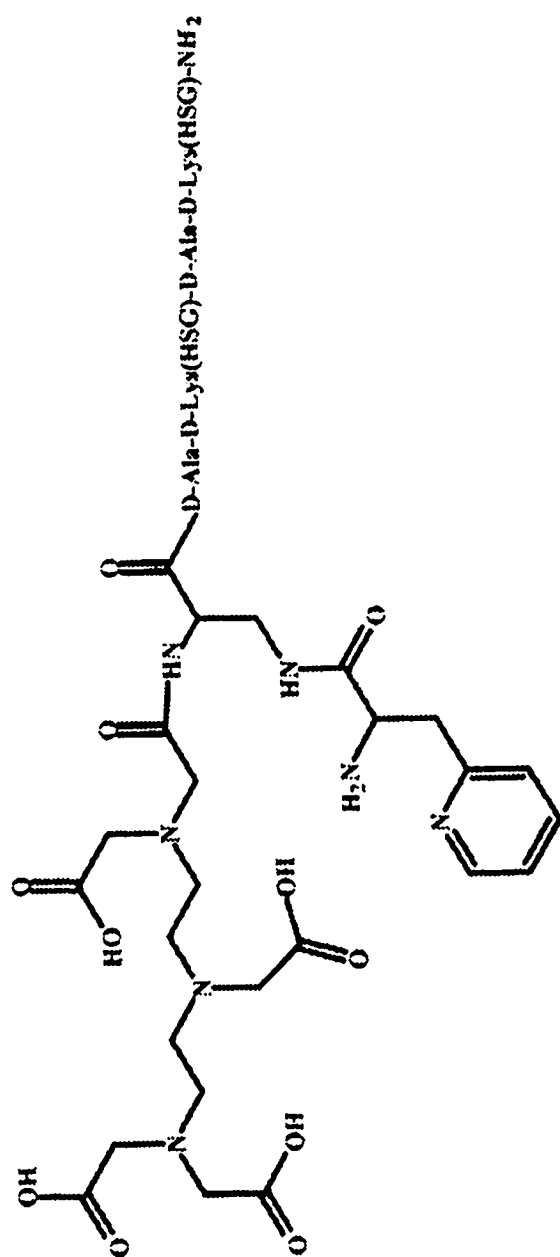


图 11



IMP 384

图 12



IMP 386

图 13

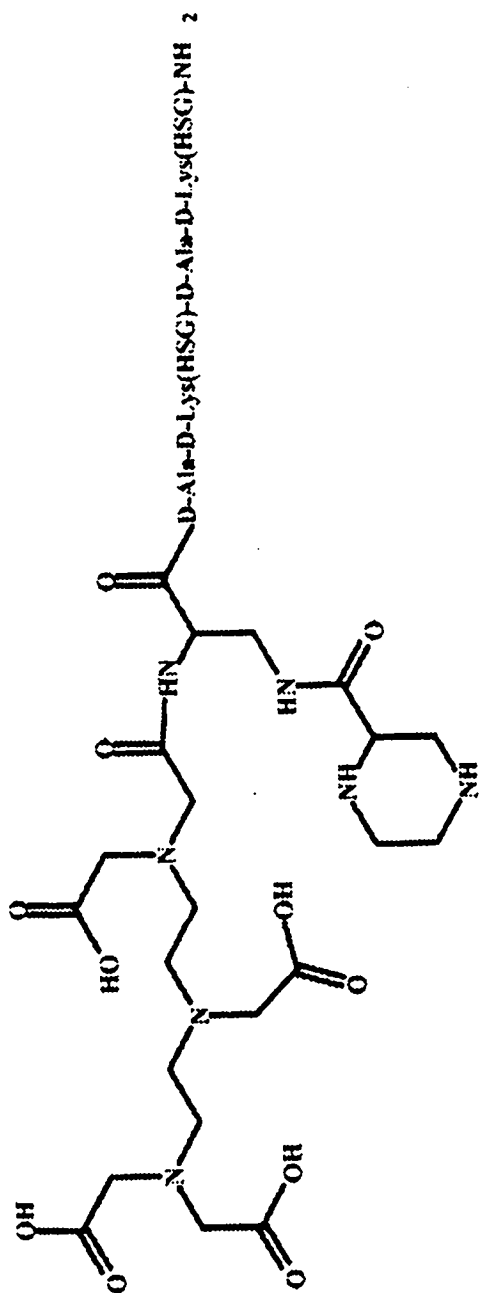
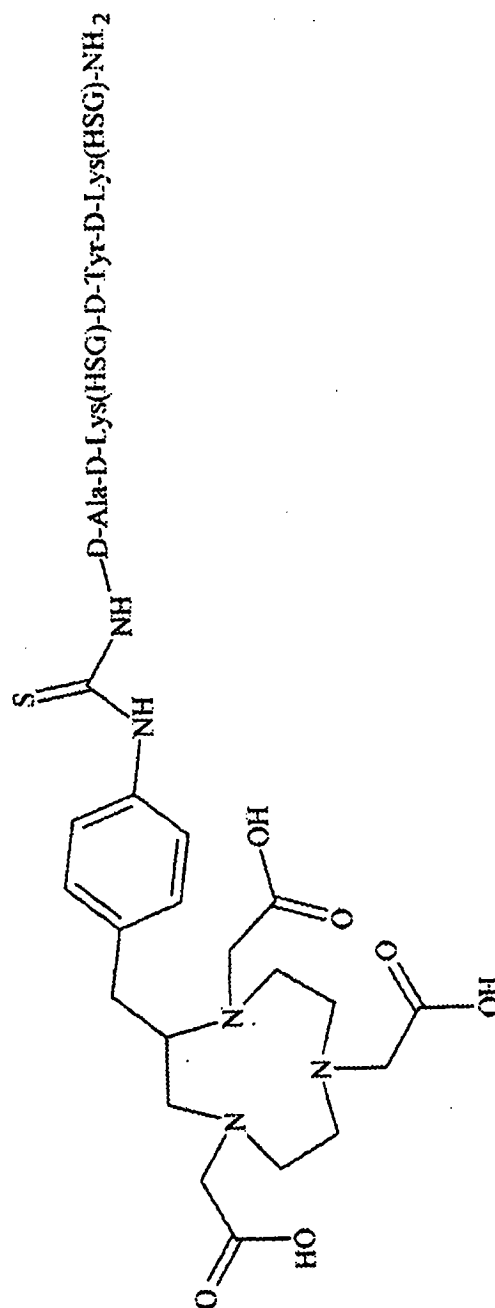


图 14

IMP 389



IMP 449

图 15

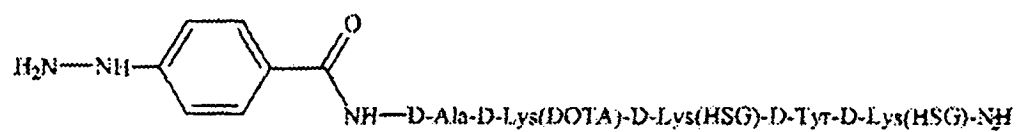
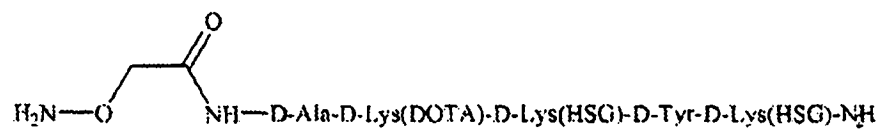
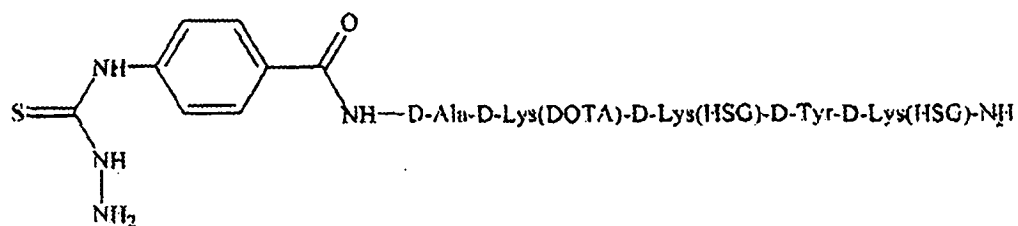
IMP 422 MH⁺ 1657IMP 426 MH⁺ 1596IMP 428 MH⁺ 1716

图 16

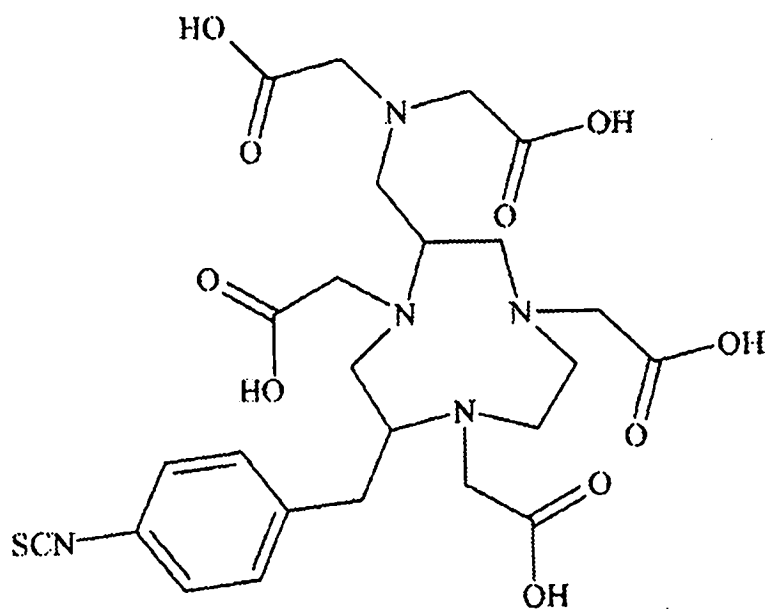


图 17

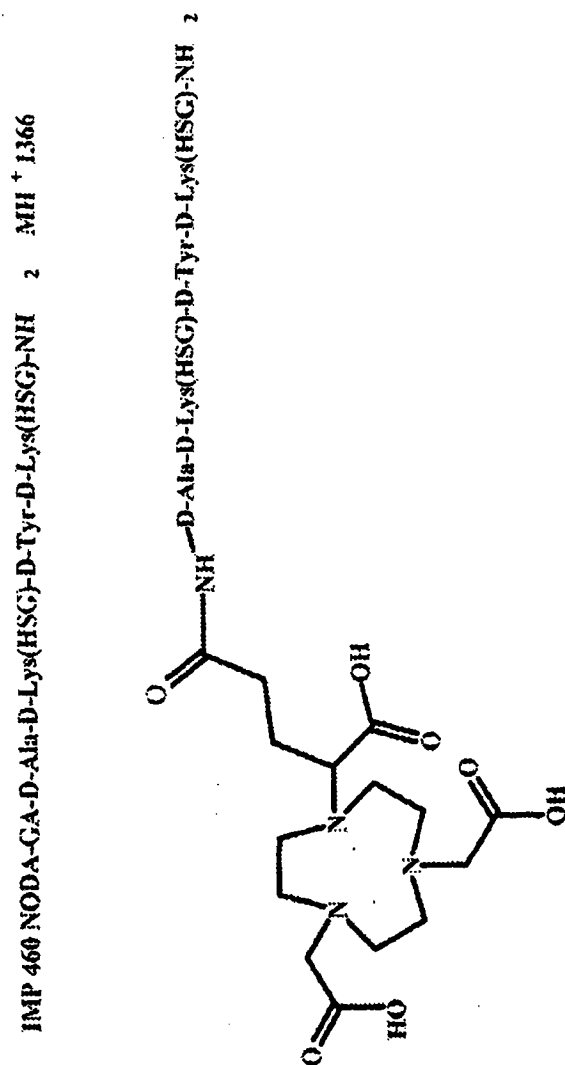


图 18

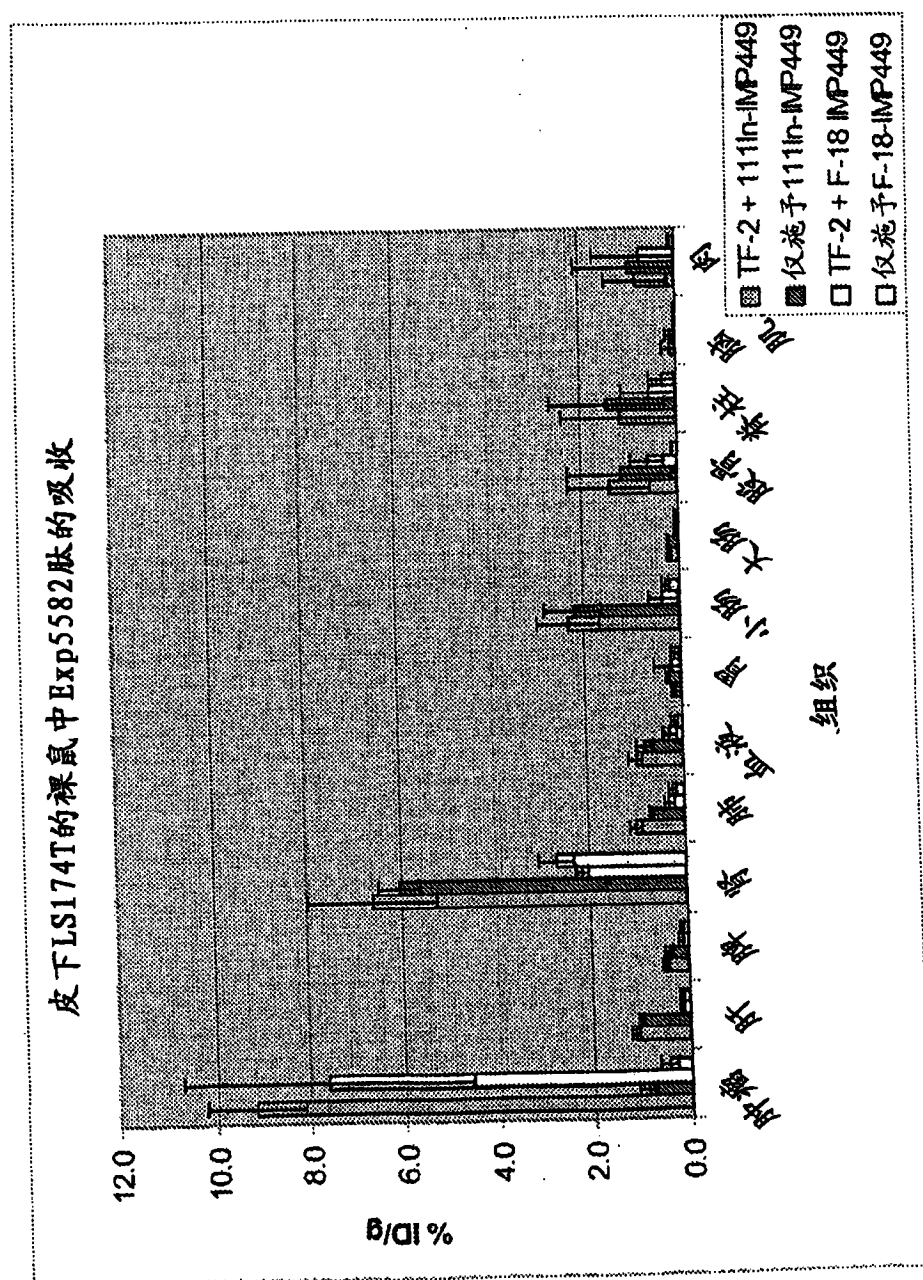


图 19

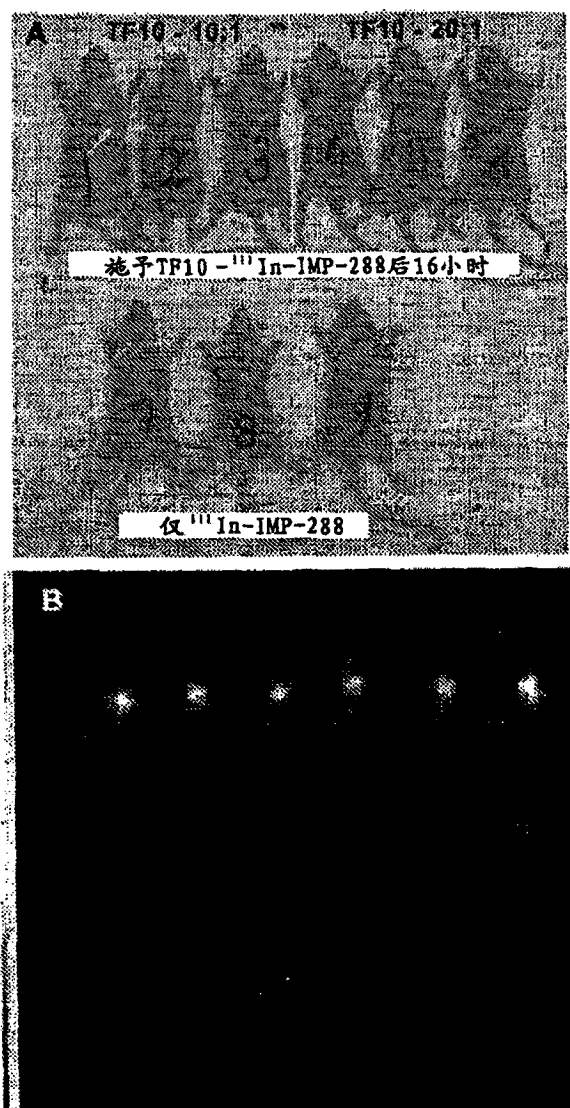


图 20

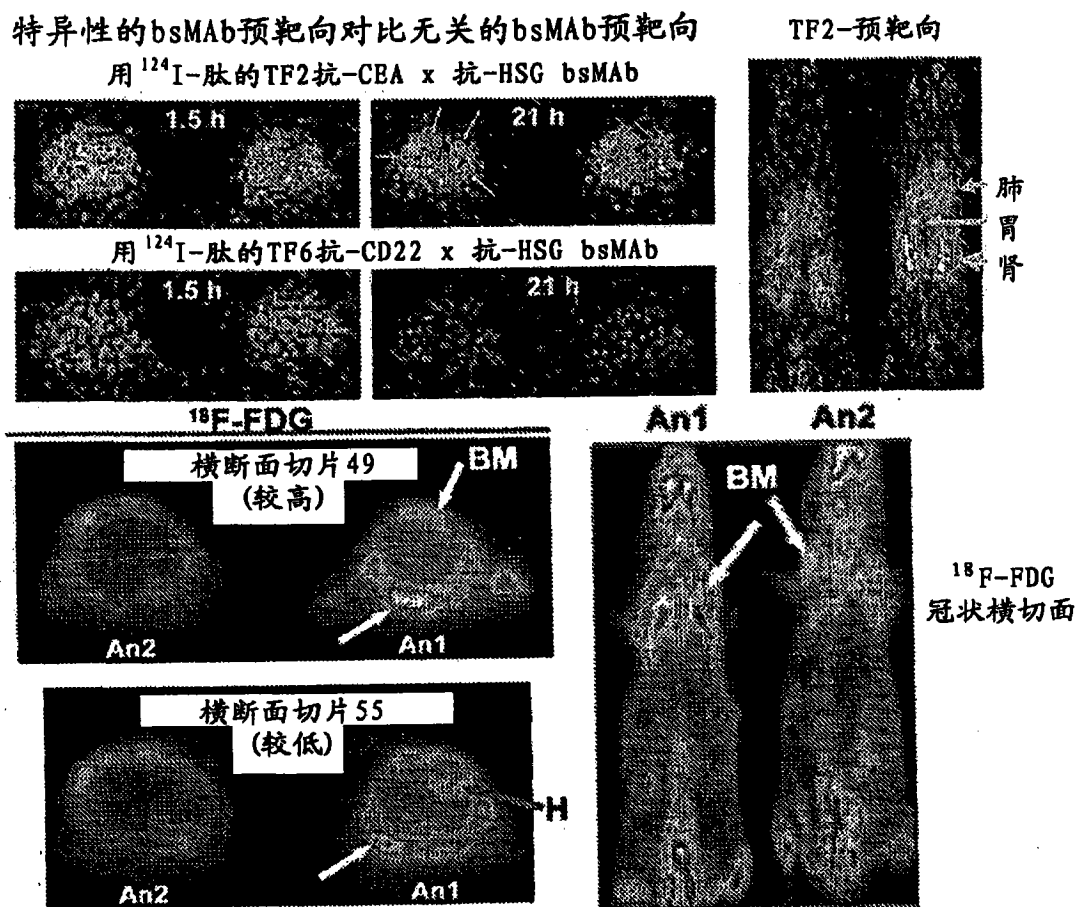
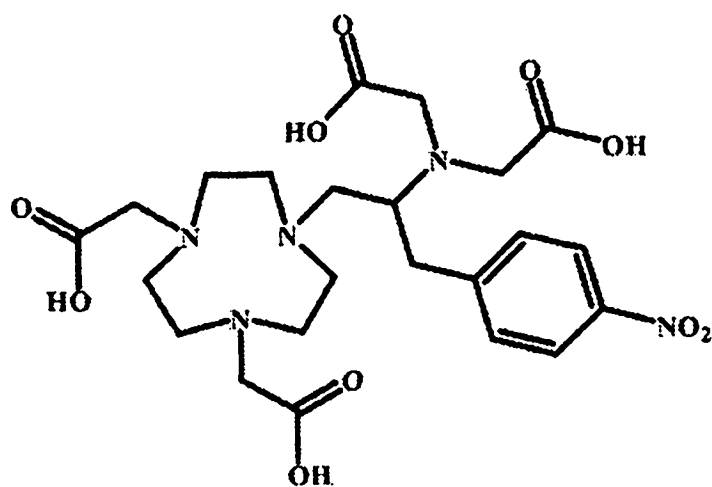


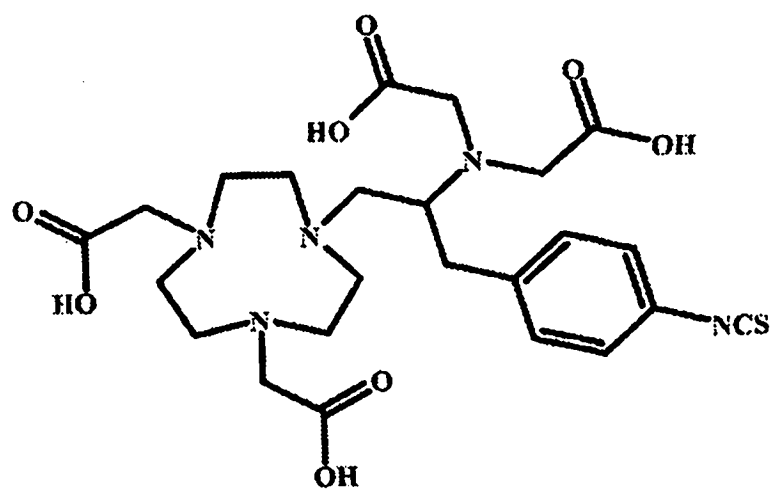
图 21

(A)



C-NETA

(B)



ITC-C-NETA

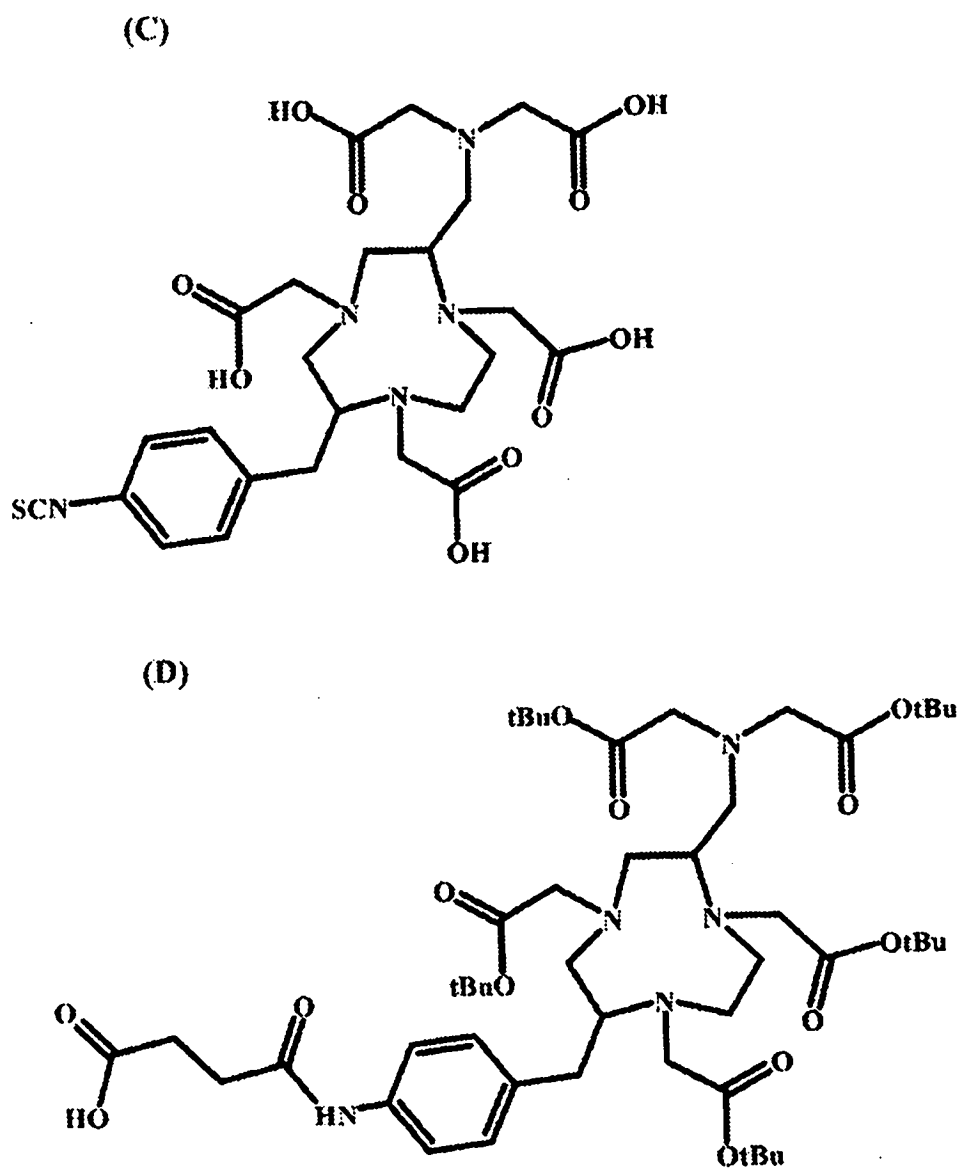


图 22