

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年12月3日 (03.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/238795 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 51/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/091801
- (22) 国际申请日: 2020年5月22日 (22.05.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910438639.0 2019年5月24日 (24.05.2019) CN
201910778630.4 2019年8月22日 (22.08.2019) CN
- (71) 申请人: 北京大学 (PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。
- (72) 发明人: 王凡 (WANG, Fan); 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。 史继云 (SHI, Jiyun); 中国北京市海淀区颐和园路5号,

Beijing 100871 (CN)。 杜帅樊 (DU, Shuaifan); 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。 贾兵 (JIA, Bing); 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。

(74) 代理人: 北京国林贸知识产权代理有限公司 (BEIJING GLM INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市东城区建国门内大街18号恒基中心办公楼1座605, Beijing 100005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: RK POLYPEPTIDE RADIOPHARMACEUTICAL TARGETING HER2, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种靶向HER2的rk多肽放射性药物及其制备方法

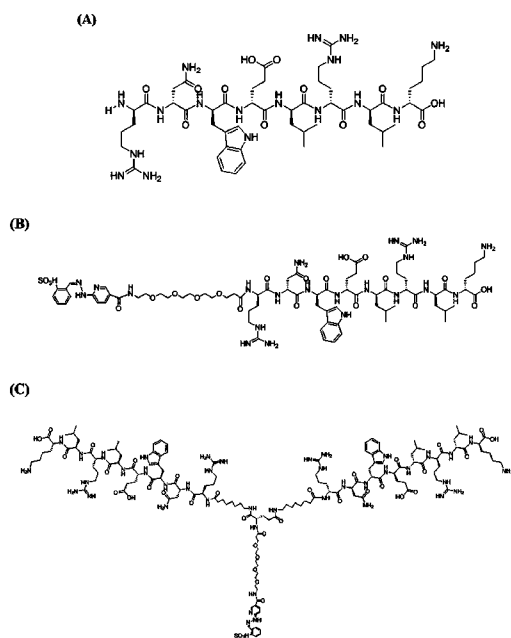


图1

(57) Abstract: Disclosed are an rk polypeptide radiopharmaceutical targeting HER2, and a preparation method therefor. The rk polypeptide radiopharmaceutical comprises an rk polypeptide dimer and a radionuclide, wherein the radionuclide marks the rk polypeptide dimer by means of a chelating agent, the rk polypeptide dimer is a polypeptide dimer formed by connecting PKM and rk polypeptide monomers and then dimerizing two rk polypeptide monomers connected to the PKM; each rk polypeptide monomer is a D-type amino acid linear eight-membered polypeptide, and the sequence of the rk polypeptide monomer is as follows: Arg-Asn-Trp-Glu-Leu-Arg-Leu-Lys; and the PKM represents a pharmacokinetic modifying molecule. The radiopharmaceutical is used for imaging diagnosis of HER2-positive tumor patients, and medication guidance and real-time therapeutic effect monitoring of patients treated by monoclonal antibodies of the anti-cancer drug trastuzumab.

(57) 摘要: 本发明公开了一种靶向HER2的rk多肽放射性药物及其制备方法, 包括rk多肽二聚体和放射性核素, 放射性核素通过整合剂标记rk多肽二聚体, rk多肽二聚体是将PKM与rk多肽单体相连, 再将两个连接有PKM的rk多肽单体二聚化而成的多肽二聚体; rk多肽单体为D型氨基酸线性8元多肽, 其序列为: Arg-Asn-Trp-Glu-Leu-Arg-Leu-Lys; PKM表示药代动力学修饰分子。该药物用于HER2阳性肿瘤患者的显像诊断, 以及对接受抗癌药物曲妥珠单抗治疗患者的用药指导和实时疗效监测。



WO 2020/238795 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型肿瘤诊断放射性药物及其制备方法，特别涉及用于 HER2 阳性肿瘤患者的显像诊断，以及对接受抗癌药物曲妥珠单抗治疗患者的用药指导和实时疗效监测。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，约占女性恶性肿瘤的 25%，且有年轻化趋势，严重威胁了女性的生命健康。人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是一种原癌基因，HER2 的异常扩增及其蛋白的过表达可导致细胞的恶性转化，与乳腺癌的浸润、转移和复发息息相关。在临床病例中，约 30% 的乳腺癌患者为 HER2 阳性。

[0003] 有统计数据显示，乳腺癌早期患者的治愈率极高，但由于很多肿瘤早期症状不明显，确诊时已经错过了最佳治疗时期，而可以观察细胞和分子水平的分子影像学的出现使肿瘤的早期诊断成为了可能。其中，核医学成像 (PET, SPECT) 凭借其灵敏度高，组织穿透能力强，可进行在体定量，多种核素可供选择的优点，在临床上起到越来越重要的作用。

[0004] 曲妥珠单抗是一种针对 HER2 的人源化单克隆抗体，是临床上治疗 HER2 阳性乳腺癌的一线用药，能有效提高总体生存率，在早期和晚期 (转移性) 乳腺癌的治疗中均显示出疗效。但是，仅有一部分患者对曲妥珠单抗治疗敏感，并且治疗一段时间后，单一抗体治疗和联合其他药物治疗的患者均会出现不同程度的耐药。因此，在治疗前和治疗期间评估 HER2 表达水平的变化就显得格外重要。临床上通常采用手术或者穿刺活检获得病理组织，然后通过 IHC 或 FISH 判断 HER2 的表达水平，但是活检有创伤，并且原发肿瘤与转移灶之间 HER2 表达水平有较高的不一致率 (6%-48%)，以及小样本量不一定代表整个肿瘤的 HER2 表达状态。基于这种情况，能够靶向 HER2 位点的分子探针就显示出巨大的优势。

[0005] 研究证实 KLRLEWNR 序列多肽具有很好的 HER2 靶向性能，能够有效地分辨出不同肿瘤细胞的 HER2 表达情况。本实验合成优化的 rk 多肽药物 (rnwelrk)，D 型多肽序列不会被体内的蛋白酶识别，能够有效的提高体内代

谢稳定性，从而提高肿瘤组织的摄取。此外，rk 多肽二聚体在两个多肽之间引入足够长的连接剂，使二聚体分子中的两个多肽有足够长的距离能够同时结合两个 HER2 靶点，比单体具有更高的亲和力。在用于放射性核素标记的双功能螯合剂 HYNIC 与 rk 多肽二聚体之间加入了 PKM，优化了药代动力学性质，以达到更好的诊治效果。值得注意的是，rk 多肽药物与曲妥珠单抗分别结合在 HER2 的不同位点，因此可用于在曲妥珠单抗治疗过程中的疗效监测，而不受用药量的影响，对患者精准用药起到关键作用。

[0006]

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种新型的靶向 HER2 阳性肿瘤的多肽放射性药物。本发明的目的是通过如下技术方案实现：

一种靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，包括 rk 多肽二聚体和放射性核素，所述放射性核素通过螯合剂标记所述 rk 多肽二聚体，所述 rk 多肽二聚体是将 PKM 与 rk 多肽单体相连，再将两个连接有 PKM 的 rk 多肽单体二聚化而成的多肽二聚体；所述 rk 多肽单体为 D 型氨基酸线性 8 元多肽，其序列为：Arg-Asn-Trp-Glu-Leu-Arg-Leu-Lys（精氨酸-天门冬酰胺-色氨酸-谷氨酸-亮氨酸-精氨酸-亮氨酸-赖氨酸，简写 rnwelrk）；所述 PKM 表示药代动力学修饰分子。

[0008] 进一步的，所述 rk 多肽二聚体与所述螯合剂之间还连接有 PKM。

[0009] 进一步的，PKM 为聚乙二醇（PEGn）或者为 8-氨基辛酸（Aoc），PEGn 优选 PEG₄、PEG₆、PEG₈、PEG₁₂。

[0010] 进一步的，所述放射性核素为 ^{99m}Tc，⁶⁸Ga，⁶⁴Cu，¹¹¹In，⁹⁰Y 和 ¹⁷⁷Lu 中任意一种。

[0011] 进一步的，螯合剂为 HYNIC，NOTA，DOTA 和 DTPA 中任意一种。

[0012] 进一步的，所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0013] 该药物的优选方案：放射性核素 ^{99m}Tc，所述 rk 多肽为 D 型氨基酸线性 8 元多肽 rnwelrk，所述 rk 多肽二聚体是将 PEG₄ 或 Aoc 与 rk 多肽单体连接，再将两个连接有 PEG₄ 或 Aoc 的 rk 多肽单体二聚化而合成的 rk 多肽二聚体，所述放射性核素 ^{99m}Tc 通过一个双功能螯合剂 HYNIC 标记所述 rk

多肽二聚体，所述 rk 多肽二聚体与所述双功能螯合剂之间还连接有药代动力学修饰分子 PKM (PKM = Aoc 或 PEG4)，所述 rk 多肽放射性药物为 ^{99m}Tc -HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂，所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0014] 该药物首先将 PKM 与 D 型多肽 r_nwelr₁k 连接，然后再将此二聚化，使二聚体分子中的两个多肽有足够长的距离能够同时结合两个 HER2 靶点，在增强体内稳定性、改善药代动力学性质的同时，提高肿瘤的靶向性。这种双价形式的结合可以进一步增强肿瘤对药物的摄取，达到更好的诊断效果。该药物通过双功能螯合剂将放射性核素 ^{99m}Tc 标记到 rk 多肽二聚体分子上，在体内标记药物通过 rk 多肽的靶向作用浓聚到肿瘤部位，利用核医学的单光子断层显像技术，对 HER2 阳性肿瘤进行显像诊断。

[0015] 一种 rk 多肽放射性药物的制备方法，包括以下步骤：

a、HYNIC-PKM-COOH 的制备

将 Fmoc 保护的 PKM-COOH 溶于终浓度体积分数 20% 吡啶的 DMF 溶液，室温反应 15~30 分钟后，加入乙醚使 PKM 沉淀，离心，弃掉上清，沉淀用乙醚洗涤，除去残留的乙醚，获得预期产物 NH₂-PKM-COOH；将 HYNIC-NHS 和 NH₂-PKM-COOH 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析确认为预期产物 HYNIC-PKM-COOH；

b、HYNIC-PKM-OSu 的制备

将 HYNIC-PKM-COOH 溶于 DMF，加入 NHS 和 EDC·HCl，室温搅拌 5~10 小时，向反应液中加入体积分数 50%ACN 的水溶液并过滤，滤液经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析确认为预期产物 HYNIC-PKM-OSu；

c、(PKM-rk-Dde)₂-Glu 的制备

将 PKM-rk-Dde 和 OSu₂-Glu-Boc 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得预期产物 (PKM-rk-Dde)₂-Glu-Boc；将冻干产物(PKM-rk-Dde)₂-Glu-Boc 溶于 1ml TFA，室

温反应 5 min, 反应液用氮气吹干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析确认为预期产物(PKM-rk-Dde)₂-Glu; 其中以 rk 表示 rk 多肽单体;

d、HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂ 的制备

将(PKM-rk-Dde)₂-Glu 和 HYNIC-PKM-OSu 溶于 DMF, 加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0, 室温搅拌过夜, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化, 收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得预期产物 HYNIC-PKM-(PKM-rk-Dde)₂; 将 HYNIC-PKM-(PKM-rk-Dde)₂ 溶于体积分数 2%水合肼的 DMF 溶液, 室温反应 30 分钟, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化, 收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析确认为预期产物 HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂;

e、^{99m}Tc-HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂ 的制备

配制含三苯基膦三磺酸钠 (TPPTS)、三羟甲基甘氨酸 (tricine)、琥珀酸二钠、琥珀酸和 HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂ 的混合液, 混合液中上述各物质的质量比为: 4~6:6~7:38~39:12~13:0.04, 将混合液冻干。在冻干粉末中加入 1ml Na^{99m}TcO₄ 溶液, 100 °C 水浴加热反应 20~25 分钟, 待反应结束后室温冷却, 制成 rk 多肽放射性药物。经 HPLC 分析备用。

[0016] 所述 HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm) 或分析柱 (250×4.6 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。步骤 a: 配备半制备柱, 流速 4 mL/min, 淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。步骤 b: 配备分析柱, 流速 1 mL/min, 淋洗梯度为初始时 90% A 和 10% B, 20 分钟时 30% A 和 70% B。

[0017] 所述 rk 多肽放射性药物用于 HER2 阳性肿瘤患者的显像诊断, 以及对接受抗癌药物曲妥珠单抗治疗患者的用药指导和实时疗效监测。

[0018] 本发明的有益效果:

1、在本发明 rk 多肽放射性药物, D 型多肽序列不会被体内的蛋白酶识别, 能够有效的提高体内代谢稳定性, 从而提高肿瘤组织的摄取。

[0019] 2、本发明 rk 多肽放射性药物，首先将四个聚乙二醇分子 (PEG₄) 或 8-氨基辛酸 (Aoc) 与 D 型多肽单体连接，然后再将此二聚化，使二聚体分子中的两个多肽有足够长的距离能够同时结合两个 HER2 靶点，这种双价形式的结合可以进一步增强肿瘤对药物的摄取，达到更好的诊断效果。

[0020] 3、本发明不仅在两个 rk 多肽之间引入 PKM (PEG₄ 或 Aoc)，同时在用于放射性核素标记的双功能螯合剂 HYNIC 与 HER2 靶向的 rk 多肽二聚体之间引入了 PKM，即 HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂，改善了探针的生物相容性，优化了药代动力学性质，特别是从非肿瘤组织的清除动力学。

[0021] 4、本发明中使用 HYNIC 作为双功能螯合剂，同时使用 tricine 和 TPPTS 作为协同配体从而使“^{99m}Tc-HYNIC 核”具有更加良好的体内外稳定性。

[0022]

附图说明

[0023] 图 1. (A)rk 多肽，(B) HYNIC-PEG₄-rk，(C)HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 结构示意图。

[0024] 图 2. ^{99m}Tc-HYNIC-PKM-(PKM-rk)₂ 标记物结构示意图。其中的 mw 表示 rk 多肽。

[0025] 图 3. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 细胞结合实验。其中的 mw 表示 rk 多肽。

[0026] 图 4. 注射 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 0.5h, 1h, 2h 后，在 NOD SCID 鼠 SKBR3 乳腺癌模型中 SPECT/CT 显像图。

[0027] 图 5. (A) 注射 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 0.5h 后，在 SKBR3 乳腺癌模型中实验组，冷肽阻断组和抗体阻断组 SPECT/CT 显像图；(B) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-rk 在 SKBR3 中 0.5h SPECT/CT 显像图。其中的 mw 表示 rk 多肽。

[0028] 图 6. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在 NOD SCID 鼠早期 SKBR3 乳腺癌模型中(V = 30mm³)延迟显像图。

[0029] 图 7. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在 (A) SKBR3 肿瘤模型(HER2 高表达)，(B) HT29 肿瘤模型(HER2 中度表达)，(C) BxPC3 肿瘤模型(HER2 低表达) 中 SPECT/CT 显像图。

[0030] 图 8. 注射 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 0.5h, 1h 后, 在 SKBR3 乳腺癌模型中体内分布结果。 其中的 rrw 表示 rk 多肽。

[0031] 图 9. SKBR3 乳腺癌模型中注射 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ (A) 0.5h, 1h, 2h 后 SPECT/CT 显像图; (B)0.5h 冷肽阻断组 SPECT/CT 显像图。 其中的 rrw 表示 rk 多肽。

图 10. HER2 阳性模型 (SKBR3 乳腺癌模型) 的显像对比及定量数据分析结果;

图 11. HER2 阳性模型的生物分布数据和肿瘤与正常组织比值结果;

图 12. 蛋白和细胞层面对放射性药物 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ (简称为 ^{99m}Tc -HPArk2) 对 HER2 结合特异性检测结果;

图 13. ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ (简称为 ^{99m}Tc -HPArk2) 和 ^{99m}Tc -HP₄-ref 对 HER2 阴性 EGFR 阳性模型的显像结果。

图 14. (A) 细胞流式图; (B) SPECT/CT 成像的代表图像; (C) HER2 表达量与肿瘤摄取的相关性;

图 15. 病理诊断为 (A) HER2 (2+); (B) HER2 (-); (C) HER2 (3+) 患者的 ^{18}F -FDG PET/CT 显像图 (左) 和 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ (简称为 ^{99m}Tc -HPArk2) SPECT/CT 显像图 (右); (D) ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ (简称为 ^{99m}Tc -HPArk2) SPECT/CT 的 SUV_{max} 与 HER2 表达水平的相关性 ($R^2 = 0.863$, $P = 0.001$); (E) ^{18}F -FDG PET/CT 的 SUV_{max} 与 HER2 表达水平的相关性 ($R^2 = 0.475$, $P = 0.073$)。

[0032]

具体实施方式

[0033] 本发明实施例中所采用的材料:

1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐), N-hydroxysuccinimide (NHS, N-羟基琥珀酰亚胺), succinic acid (琥珀酸), disodium succinate hexahydrate (琥珀酸二钠), trisodium triphenylphosphine- 3,3',3"-trisulfonate (TPPTS, 三苯基膦三磺酸钠), N,N-Dimethylform amide (DMF, N,N-二甲基甲酰胺), tricine (三羟甲基甘氨酸) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。HYNIC-NHS(联脒尼克酰胺)购自美国 Noca-biochem 公司。PEG₄-rrw₁rk、Aoc-rrw₁rk 多肽单体购自中国吉尔生化公司。Na^{99m}TcO₄ 洗脱液购自北京原子高科股份有限公司。

[0034] 一种靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，包括 rk 多肽二聚体和放射性核素，所述放射性核素通过螯合剂标记所述 rk 多肽二聚体，所述 rk 多肽二聚体是将 PKM 与 rk 多肽单体相连，再将两个连接有 PKM 的 rk 多肽单体二聚化而成的多肽二聚体；所述 rk 多肽单体为 D 型氨基酸线性 8 元多肽，其序列为：Arg-Asn-Trp-Glu-Leu-Arg-Leu-Lys（精氨酸-天门冬酰胺-色氨酸-谷氨酸-亮氨酸-精氨酸-亮氨酸-赖氨酸，简写 rnwelrk）；所述 PKM 表示药代动力学修饰分子，所述多肽化学结构式如图 1 所示。

[0035] 所述 rk 多肽二聚体与所述螯合剂之间还连接有 PKM。PKM 为聚乙二醇（PEG_n）或者为 8-氨基辛酸（Aoc），PEG_n 优选 PEG₄、PEG₆、PEG₈、PEG₁₂。所述放射性核素为 ^{99m}Tc，⁶⁸Ga，⁶⁴Cu，¹¹¹In，⁹⁰Y 和 ¹⁷⁷Lu 中任意一种。螯合剂为 HYNIC，NOTA，DOTA 和 DTPA 中任意一种。所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0036] 以下实施例为优选的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，及其制备方法。

[0037]

实施例 1：

本实施例以 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 多肽放射性药物及其制备方法为例。

[0038] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 中，rk 多肽单体为 D 型氨基酸线性多肽 rnwelrk，rk 多肽二聚体是将连接剂 Aoc 与 rk 多肽单体连接，再将两个连接有 Aoc 的 rk 多肽单体二聚化而成的 rk 多肽二聚体，放射性核素 ^{99m}Tc 通过一个双功能螯合剂 HYNIC 标记所述 rk 多肽二聚体，rk 多肽二聚体与双功能螯合剂之间还连接有药代动力学修饰分子 PEG₄，所述 rk 多肽放射性药物为 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂，标记物结构式如图 2 所示，所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0039] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 制备方法如下：

HYNIC-PEG₄-COOH 的制备：将 Fmoc 保护的 PEG₄-COOH 溶于 DMF，加入哌啶使终浓度为 20%，室温反应 20 分钟后，加入 10 ml 4 °C 乙醚使 PEG₄-COOH 沉淀，4000 rpm 4 °C 离心 5 分钟，弃掉上清，沉淀用 4 °C 乙醚洗涤 3 次，旋蒸除去残留的乙醚，获得产物为 NH₂-PEG₄-COOH；将 HYNIC-NHS

和 $\text{NH}_2\text{-PEG}_4\text{-COOH}$ 溶于 DMF, 加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0, 室温搅拌过夜, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm , 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z=568.60$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 确认为预期产物 HYNIC-PEG4-COOH。

[0040] HYNIC-PEG4-OSu 的制备: 将 HYNIC-PEG4-COOH 溶于 DMF, 加入 NHS 和 EDC·HCl, 室温搅拌 7 小时, 向反应液中加入体积分数 50%ACN 的水溶液并过滤, 滤液经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm , 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 665.67$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 确认为预期产物 HYNIC-PEG4-OSu。

[0041] (AOC-rk-Dde)₂-Glu 的制备: 将 AOC-rk-Dde 和 OSu₂-Glu-Boc 溶于 DMF, 加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0, 室温搅拌过夜, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm , 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3050.70$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 确认为预期产物 (Aoc-rk-Dde)₂-Glu-Boc; 将冻干产物 (Aoc-rk-Dde)₂-Glu-Boc 溶于 1ml TFA, 室温反应 5 min, 反应液用氮气吹干, 获

得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 2950.58$ ($[M+H]^+$), 确认为预期产物 (Aoc-rk-Dde)₂-Glu。

[0042] HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的制备: 将 (Aoc-rk-Dde)₂-Glu 和 HYNIC-PEG₄-OSu 溶于 DMF, 加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0, 室温搅拌过夜, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化, HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3501.16$ ($[M+H]^+$), 确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk-Dde)₂; 将 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk-Dde)₂ 溶于体积分数 2%水合肼的 DMF 溶液, 室温反应 30 分钟, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化, HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3172.75$ ($[M+H]^+$), 确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂; 化学结构式如图 1 所示。

[0043] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的制备: 配制含三苯基膦三磺酸钠 (TPPTS) 5.0 mg, 三羟甲基甘氨酸 (tricine) 6.5 mg, 琥珀酸二钠 38.5 mg, 琥珀酸 12.7 mg 和 50 μg 的 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的混合液 500 μL 于 10 mL 西林瓶中, 将混合液冻干。在冻干粉末中加入 1.0-1.5 mL 的 Na^{99m}TcO₄ 溶液 (10~35 mCi), 100 °C 水浴加热西林瓶反应 20~25 分钟, 待反应结束后室温冷却 10 分钟, 制成 rk 多肽放射性药物, 其化学结构式如图 2 所示。

[0044] 对 rk 多肽放射性药物取样进行放射性 HPLC 分析。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 分析柱 (250×4.6 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 20 分钟, 流速 1 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水

(含 0.05% TFA)，流动 B 相为乙腈（含 0.05% TFA）。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，20 分钟时 30% A 和 70% B。 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的标记率>95%，经 Sep-Pak C18 柱纯化后放射化学纯度>98%。

[0045] HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 与 HER2 结合亲和力测定结果如图 3 所示：高表达 HER2 的人乳腺癌细胞 SKBR3 和不表达 HER2 的人乳腺癌细胞 MCF7 作为实验样本，使用 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 作为 HER2 受体特异性结合的放射性配基，采用细胞结合实验，分别测定 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 与 SKBR3、MCF7 的结合力，并设置过量 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 封闭组，验证 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 与 SKBR3 结合的特异性。实验结果显示 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 与 SKBR3、MCF7 和 SKBR3 封闭组的结合分别为 4.49%，1.14%，1.24%每 10⁵ 个细胞，存在明显的统计学差异，表明 HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 与 HER2 有较高的亲和力，并且是特异性结合。

[0046] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在荷瘤鼠中 SPECT/CT 显像结果如图 4 所示：在 SKBR3 乳腺癌肿瘤模型中， ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的肿瘤摄取清晰可见，明显高于单体，且全身背景干净，可用于早期肿瘤诊断。多肽在肿瘤部位滞留时间较长，注射后四小时肿瘤依然清晰可见，可以延迟显像，更有利于肿瘤的诊断，显像结果如图 6 所示。阻断实验结果如图 5 所示，肿瘤摄取明显降低，说明多肽与 HER2 位点的特异性结合。在 SKBR3 乳腺癌模型 Herceptin 阻断实验组中，肿瘤摄取基本没有变化，说明探针与多肽的结合位点不同，可以用于 Herceptin 治疗病人的实时疗效监测。 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在 HER2 高表达肿瘤模型(SKBR3 人乳腺癌肿瘤)，HER2 中度表达肿瘤模型(HT29 人结肠癌肿瘤)，HER2 低表达肿瘤模型(BxPC3 人胰腺癌肿瘤)中 SPECT/CT 显像图如图 7 所示，结果显示 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的摄取与 HER2 表达水平线性相关，能用于检测肿瘤 HER2 的表达情况。

[0047] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在荷瘤鼠中生物分布：将 NOD SCID 鼠荷 SKBR3 乳腺癌肿瘤，每组 4 只。各组小鼠分别经尾静脉注射不同的 ^{99m}Tc 标记多肽，与注射后 30 分钟、60 分钟处死，取血及主要脏器，称重并测量放射

性计数，经衰变校正后计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。实验结果如图 8 显示，30 分钟肿瘤摄取为 3.7 %ID/g，除肾脏外，血液及其他脏器摄取较低。

[0048] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 肿瘤摄取与 HER2 表达量的相关性：选择拥有不同 HER2 表达量的不同肿瘤类型的细胞，包括人乳腺癌细胞系 SKBR3、MCF7、MDA-MB-468，人结直肠癌细胞系 HT29，人胰腺癌细胞系 BxPC3，分别进行了细胞流式实验，对细胞的 HER2 表达量进行定量分析；之后用相应细胞的肿瘤模型进行 SPECT/CT 成像，并定量分析肿瘤的摄取；最后，对 HER2 表达量与肿瘤摄取的相关性进行研究。

细胞流式：将上述细胞用 0.25% 的 EDTA/胰酶消化下来后封闭 15 min，用 PBS 离心洗净后分为实验组和对照组，实验组加入 PE 直标的抗人 HER2 抗体 (1:100 稀释)，对照组用等体积 PBS 重悬，4 °C 避光孵育 0.5 h，用冷 PBS 洗 3 次，使用流式细胞仪进行分析，通过流式曲线计算出每种细胞上结合抗体的平均荧光强度 (MFI)。

SPECT/CT 显像：选取肿瘤大小相近的不同肿瘤模型，经尾静脉注射 1 mCi ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂，于注射后 0.5 h 进行 SPECT/CT 成像，显像后对 SPECT 图像进行重建，与 CT 图像融合得到小鼠 3D 成像图，用 InVivoScope 软件扣取肿瘤部位进行定量分析。

HER2 表达量与肿瘤摄取的相关性分析：用 prism 7.0 软件作图分析 HER2 表达量 (MFI) 和肿瘤摄取 (%ID/g) 相对应的线性关系，计算 R² 值。

实验结果如图 14 所示，肿瘤摄取与 HER2 表达量呈正相关 (R²=0.977)，说明探针 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在肿瘤的摄取可以准确的反应出 HER2 表达的高低。

[0049] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 在乳腺癌患者中的 SPECT/CT 显像：经北京协和医院伦理审查委员会的批准和知情同意，招募 20 名经乳房钼靶或超声检查怀疑患有乳腺癌的女性患者，于手术前 1 周分别进行 SPECT/CT 和 PET/CT 成像。患者静脉注射 11.1 MBq (0.3 mCi) /千克体重的 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂，30 min 后进行 SPECT/CT 扫描；静脉注射 5.6 MBq (0.15 mCi) /千克体重的 ^{18}F -FDG，60 min 后进行 PET/CT 扫描。其中有 15 名患者被病理诊断为乳腺癌，其中 6 例患者出现同侧淋巴结转移。临床试验结果如图 15 所示，在 15 例患者中，

^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 较准确的显像出 14 例患者的肿瘤 (93%), 在 6 例出现淋巴结转移的患者中, 有 5 例显像出转移灶 (83%), 另一例患者仅有轻微的淋巴结转移。乳腺癌对 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(Aoc-rk)₂ 的摄取强度 (SUVmax) 与 HER2 的免疫组化结果呈显著的相关性 ($R^2 = 0.863$, $P = 0.001$)。临床试验过程中未发现与放射药物相关的不良反应。

[0050]

实施例 2:

本实施例以 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 多肽放射性药物及其制备方法为例。

[0051] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 中, rk 多肽单体为 D 型氨基酸线性多肽 mwelrk , rk 多肽二聚体是将连接剂 PEG₄ 与 rk 多肽单体连接, 再将两个连接有 PEG₄ 的 rk 多肽单体二聚化而成的 rk 多肽二聚体, 放射性核素 ^{99m}Tc 通过一个双功能螯合剂 HYNIC 标记所述 rk 多肽二聚体, rk 多肽二聚体与双功能螯合剂之间还连接有药代动力学修饰分子 PEG₄, 所述 rk 多肽放射性药物为 ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂, 所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0052] ^{99m}Tc -HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 制备方法如下:

HYNIC-PEG₄-COOH 的制备: 将 Fmoc 保护的 PEG₄-COOH 溶于 DMF, 加入哌啶使终浓度为 20%, 室温反应 20 分钟后, 加入 10 ml 4 °C 乙醚使 PEG₄-COOH 沉淀, 4000 rpm 4 °C 离心 5 分钟, 弃掉上清, 沉淀用 4 °C 乙醚洗涤 3 次, 旋蒸除去残留的乙醚, 获得产物为 NH₂-PEG₄-COOH; 将 HYNIC-NHS 和 NH₂-PEG₄-COOH 溶于 DMF, 加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0, 室温搅拌过夜, 粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 4 mL/min, 其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA), 流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分, 合并收集液并冻干, 获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z=568.60$ ($[M+H]^+$), 确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-COOH。

[0053] HYNIC-PEG₄-OSu 的制备：将 HYNIC-PEG₄-COOH 溶于 DMF，加入 NHS 和 EDC·HCl，室温搅拌 7 小时，向反应液中加入体积分数 50%ACN 的水溶液并过滤，滤液经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱（250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm），梯度淋洗 30 分钟，流速 4 mL/min，其中流动 A 相为去离子水（含 0.05% TFA），流动 B 相为乙腈（含 0.05% TFA）。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，25 分钟时 50% A 和 50% B，30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 665.67$ ($[M+H]^+$)，确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-OSu。

[0054] (PEG₄-rk-Dde)₂-Glu 的制备：将 PEG₄-rk-Dde 和 OSu₂-Glu-Boc 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱（250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm），梯度淋洗 30 分钟，流速 4 mL/min，其中流动 A 相为去离子水（含 0.05% TFA），流动 B 相为乙腈（含 0.05% TFA）。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，25 分钟时 50% A 和 50% B，30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3262.85$ ($[M+H]^+$)，确认为预期产物 (PEG₄-rk-Dde)₂-Glu-Boc；将冻干产物 (PEG₄-rk-Dde)₂-Glu-Boc 溶于 1ml TFA，室温反应 5 min，反应液用氮气吹干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3162.73$ ($[M+H]^+$)，确认为预期产物 (PEG₄-rk-Dde)₂-Glu。

[0055] HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 的制备：将(PEG₄-rk-Dde)₂-Glu 和 HYNIC-PEG₄-OSu 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱（250×10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm），梯度淋洗 30 分钟，流速 4 mL/min，其中流动 A 相为去离子水（含 0.05% TFA），流动 B 相为乙腈（含 0.05% TFA）。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，25 分钟时 50% A 和 50% B，30 分钟时 90% A 和

10% B。收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3713.32$ ($[M+H]^+$)，确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk-Dde)₂；将 HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk-Dde)₂ 溶于体积分数 2%水合肼的 DMF 溶液，室温反应 30 分钟，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 (250×10 mm, I.D. S-5 μ m, 12 nm)，梯度淋洗 30 分钟，流速 4 mL/min，其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA)，流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，25 分钟时 50% A 和 50% B，30 分钟时 90% A 和 10% B。收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物经 MALDI-TOF-MS 质谱分析 $m/z = 3384.91$ ($[M+H]^+$)，确认为预期产物 HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂。

[0056] ^{99m}Tc- HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 的制备：配制含三苯基膦三磺酸钠 (TPPTS) 5.0 mg，三羟甲基甘氨酸 (tricine) 6.5 mg，琥珀酸二钠 38.5 mg，琥珀酸 12.7 mg 和 50 μ g 的 HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 的混合液 500 μ L 于 10 mL 西林瓶中，将混合液冻干。在冻干粉末中加入 1.0-1.5 mL 的 Na^{99m}TcO₄ 溶液 (10~35 mCi)，100 °C 水浴加热西林瓶反应 20~25 分钟，待反应结束后室温冷却 10 分钟，制成 rk 多肽放射性药物。

[0057] 对 rk 多肽放射性药物取样进行放射性 HPLC 分析。HPLC 方法为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 分析柱 (250×4.6 mm, I.D. S-5 μ m, 12 nm)，梯度淋洗 20 分钟，流速 1 mL/min，其中流动 A 相为去离子水 (含 0.05% TFA)，流动 B 相为乙腈 (含 0.05% TFA)。淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B，20 分钟时 30% A 和 70% B。

^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 的标记率>95%，经 Sep-Pak C₁₈ 柱纯化后放射化学纯度>98%。

[0058] ^{99m}Tc- HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 在荷瘤鼠中 SPECT/CT 显像如图 9 所示：在 SKBR3 乳腺癌肿瘤模型中，^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(PEG₄-rk)₂ 的肿瘤摄取清晰可见，明显高于单体，且全身背景干净。在阻断实验组中，肿瘤摄取明显降低，说明多肽与 HER2 位点的特异性结合。

对比例 1：

公开号为 CN 109045313 A 的中国专利公开一种基于 refvffly 多肽序列 (D 型氨基酸线性多肽的序列为: Arg-Glu-Phe-Val-Phe-Phe-Leu-Tyr, 简称 ref 多肽) 的化合物 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PKM-ref}$ (PKM = PEG_n, n = 1-24), 也是一种靶向 HER2 阳性肿瘤的多肽放射性药物。本发明在该化合物的基础上进行了改进。

本发明所选用的多肽水溶性优于 refvffly 多肽。改进后的化合物的靶向特异性优于 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PKM-ref}$ 。详见图 10。图 10A 是同一模型显像对比和定量分析结果。图 10B 是从图 10A 定量分析出来的结果。

如图 10 所示, 本发明申请的显像剂 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG}_4\text{-(Aoc-rk)}_2$ (附图中简写成 $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$) 不管是相对于 CN 109045313 A 中的 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG}_4\text{-ref}$ (简称 $^{99m}\text{Tc-HP}_4\text{-ref}$) 或者 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG}_{24}\text{-ref}$ (简称 $^{99m}\text{Tc-HP}_{24}\text{-ref}$) 显像剂, 最终在 HER2 阳性的乳腺癌模型中的显像效果都有明显差异。由于本发明最终是要用于乳腺癌的原位显像, 那么肿瘤摄取和在胸腔的肝脏摄取本底最为关键, $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 的肿瘤摄取比 $^{99m}\text{Tc-HP}_{24}\text{-ref}$ 更高, 与 $^{99m}\text{Tc-HP}_4\text{-ref}$ 无明显差异。而 $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 的肝脏摄取最低, 比 $^{99m}\text{Tc-HP}_4\text{-ref}$ 和 $^{99m}\text{Tc-HP}_{24}\text{-ref}$ 都低。因此, $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 的肿瘤与肝脏的比值最高。这对于在胸腔显像原位的乳腺癌肿瘤尤其关键, 因此本发明的 $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 的显像剂在显像乳腺癌原位肿瘤方面更有优势。

本发明与公开号为 CN 109045313 A 的专利文件的放射性药物具体体内药代动力学分布的具体差异如图 11 所示。图 11 的肿瘤摄取和对比度跟图 10 的显像是对应的数据。图 11 是定量数据, 图 10 是直观影像数据。图 11B 图是图 11A 计算的结果。就把肿瘤和每个脏器的摄取值做了对比分析。由图 11 可见, 本发明的放射性药物 $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 与 $^{99m}\text{Tc-HP}_4\text{-ref}$ 和 $^{99m}\text{Tc-HP}_{24}\text{-ref}$ 相比, 在肿瘤的摄取相对更高, 有助于提高肿瘤显像的灵敏度, 更小的肿瘤都能清晰显像, 这点在图 10 中也可见, $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 显像了更小的肿瘤, 显像效果仍然有保证。 $^{99m}\text{Tc-HPArk2}$ 在血液, 心脏, 肝脏, 脾, 肠, 胃, 骨等组织中的摄取均相对更低, 肿瘤与正常组织血、心脏、肝脏、脾、肠、胃的比值相对更高。这样在显像的对比度上有更好的效果, 尤其是在胸腔里的心脏和肝脏的摄取相对更低, 有利于乳腺癌的原位肿瘤清晰显像。

如图 12 所示, 为了验证本发明药物的效果, 进行了该放射性药物对 HER2

特异性的检测。不管在蛋白层面还是在细胞层面都具有良好的特异性。

由于 EGFR 和 HER2 是同一家族的蛋白，结构相似，一般靶向分子很难对其有较好的区分，这样在检测肿瘤时，难免会造成有假阳性和假阴性。与公开号为 CN 109045313 A 的专利文本的药物进行了在同一模型的对比，公开号为 CN 109045313 A 的专利文本所公布的放射性药物在显像 HER2 阴性 EGFR 阳性的 MDA-MB-468 乳腺癌模型时，呈假阳性结果，区分效果不如本发明的药物。本发明药物显示阴性，区分度更高，不会因为 EGFR 表达得到假阳性结果。可见本发明放射性药物在区分 HER2 和 EGFR 高表达的肿瘤时有明显的优势，减少了假阳性结果的产生，具有明显的优势。

权利要求书

1. 一种靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：包括 rk 多肽二聚体和放射性核素，所述放射性核素通过螯合剂标记所述 rk 多肽二聚体，所述 rk 多肽二聚体是将 PKM 与 rk 多肽单体相连，再将两个连接有 PKM 的 rk 多肽单体二聚化而成的多肽二聚体；所述 rk 多肽单体为 D 型氨基酸线性 8 元多肽，其序列为：Arg-Asn-Trp-Glu-Leu-Arg-Leu-Lys；所述 PKM 表示药代动力学修饰分子。
2. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：所述 rk 多肽二聚体与所述螯合剂之间还连接有 PKM。
3. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：PKM 是聚乙二醇或者 8-氨基辛酸。
4. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：所述放射性核素为 ^{99m}Tc ， ^{68}Ga ， ^{64}Cu ， ^{111}In ， ^{90}Y 和 ^{177}Lu 中任意一种。
5. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：螯合剂为 HYNIC，NOTA，DOTA 和 DTPA 中任意一种。
6. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：所述 rk 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。
7. 根据权利要求 1 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：所述放射性核素为 ^{99m}Tc ，所述 rk 多肽二聚体与所述螯合剂之间连接有 PKM，PKM 是聚乙二醇或者为 8-氨基辛酸，螯合剂为 HYNIC，所述 rk 多肽放射性药物表示为 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PKM}-(\text{PKM-rk})_2$ 。
8. 根据权利要求 7 所述的靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物，其特征在于：rk 多肽二聚体与螯合剂之间连接的 PKM 是聚合度为 4 的聚乙二醇，与 rk 多肽单体相连的 PKM 是聚合度为 4 的聚乙二醇或者 8-氨基辛酸，所述 rk 多肽放射性药物表示为 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG}_4-(\text{Aoc-rk})_2$ 及 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-PEG}_4-(\text{PEG}_4\text{-rk})_2$ 。
9. 一种靶向 HER2 的 rk 多肽放射性药物的制备方法，其特征在于：所述方法包括以下步骤：
 - a、HYNIC-PKM-COOH 的制备将 Fmoc 保护的 PKM-COOH 溶于终浓度体积分数 20% 哌啶的 DMF 溶液，室温反应 15~30 分钟后，加入乙醚使 PKM 沉淀，离心，弃掉上清，沉淀用乙

醚洗涤，除去残留的乙醚，获得预期产物 $\text{NH}_2\text{-PKM-COOH}$ ；将 HYNIC-NHS 和 $\text{NH}_2\text{-PKM-COOH}$ 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得产物 HYNIC-PKM-COOH；

b、HYNIC-PKM-OSu 的制备

将 HYNIC-PKM-COOH 溶于 DMF，加入 NHS 和 EDC·HCl，室温搅拌 5~10 小时，向反应液中加入体积分数 50% ACN 的水溶液并过滤，滤液经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得预期产物 HYNIC-PKM-OSu；

c、 $(\text{PKM-rk-Dde})_2\text{-Glu}$ 的制备

将 PKM-rk-Dde 和 $\text{OSu}_2\text{-Glu-Boc}$ 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得预期产物 $(\text{PKM-rk-Dde})_2\text{-Glu-Boc}$ ；将冻干产物 $(\text{PKM-rk-Dde})_2\text{-Glu-Boc}$ 溶于 1ml TFA，室温反应 5 min，反应液用氮气吹干，获得预期产物 $(\text{PKM-rk-Dde})_2\text{-Glu}$ ；其中以 rk 表示 rk 多肽单体；

d、HYNIC-PKM- $(\text{PKM-rk})_2$ 的制备

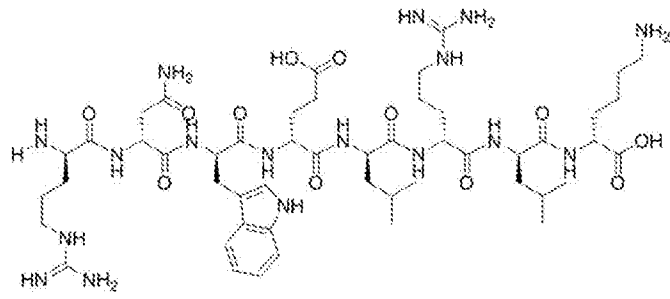
将 $(\text{PKM-rk-Dde})_2\text{-Glu}$ 和 HYNIC-PKM-OSu 溶于 DMF，加入 DIEA 调节 pH 值至 8.5-9.0，室温搅拌过夜，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得预期产物 HYNIC-PKM- $(\text{PKM-rk-Dde})_2$ ；将 HYNIC-PKM- $(\text{PKM-rk-Dde})_2$ 溶于体积分数 2%水合肼的 DMF 溶液，室温反应 30 分钟，粗产品经 YMC-Pack ODS-A 半制备柱 HPLC 分离纯化，收集目标物的馏分，合并收集液并冻干，获得预期产物 HYNIC-PKM- $(\text{PKM-rk})_2$ ；

e、 $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-PKM-}(\text{PKM-rk})_2$ 的制备

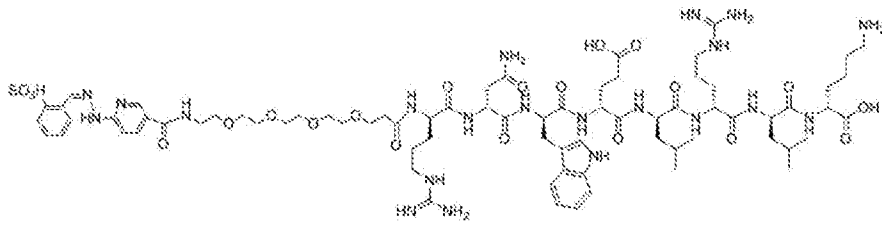
配制含三苯基膦三磺酸钠、三羟甲基甘氨酸、琥珀酸二钠、琥珀酸和 HYNIC-PKM- $(\text{PKM-rk})_2$ 的混合液，混合液中上述各物质的质量比为：4~6:6~7:38~39:12~13:0.04，将混合液冻干。在冻干粉末中加入 1ml $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液，100 °C 水浴加热反应 20~25 分钟，待反应结束后室温冷却，制成 $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-PKM-}(\text{PKM-rk})_2$ ，即为所述 rk 多肽放射性药物。

10. 根据权利要求 9 所述的 rk 多肽放射性药物的制备方法, 其特征在于: 所述 HPLC 为使用 Agilent 1260 HPLC 系统配备 YMC-Pack ODS-A 半制备柱或分析柱, 梯度淋洗 30 分钟, 其中流动 A 相为去离子水, 含 0.05% TFA, 流动 B 相为乙腈, 含 0.05% TFA; 步骤 a: 配备半制备柱, 流速 4 mL/min, 淋洗梯度设定为起始时 90% A 和 10% B, 25 分钟时 50% A 和 50% B, 30 分钟时 90% A 和 10% B; 步骤 b: 配备分析柱, 流速 1 mL/min, 淋洗梯度为初始时 90% A 和 10% B, 20 分钟时 30% A 和 70% B。

(A)



(B)



(C)

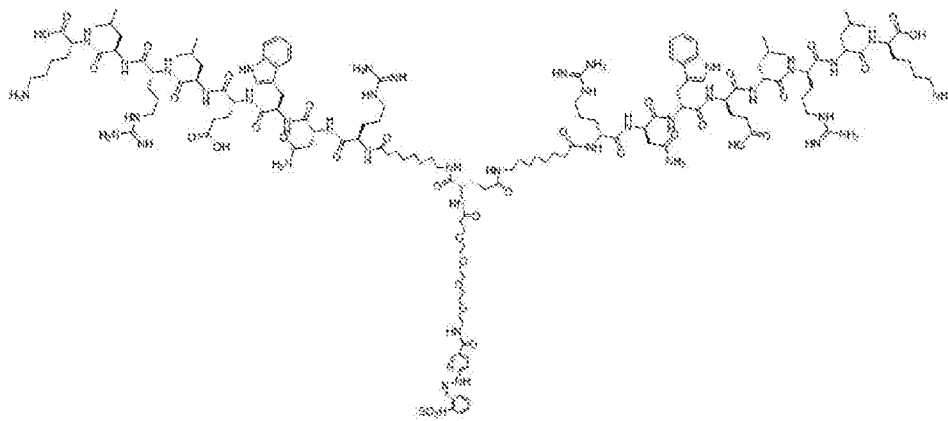


图 1

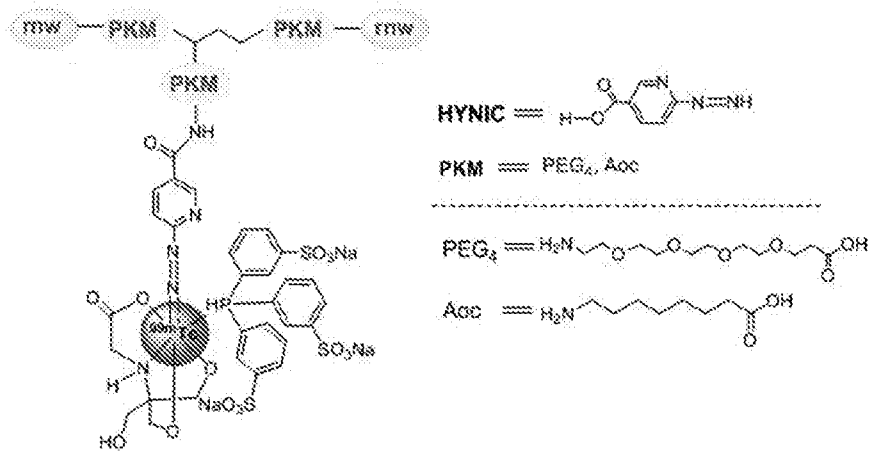


图 2

Binding of ${}^{99m}\text{Tc}$ -PEG₄-(AOC-mw)₂ to SKBR3 and MCF7 cells

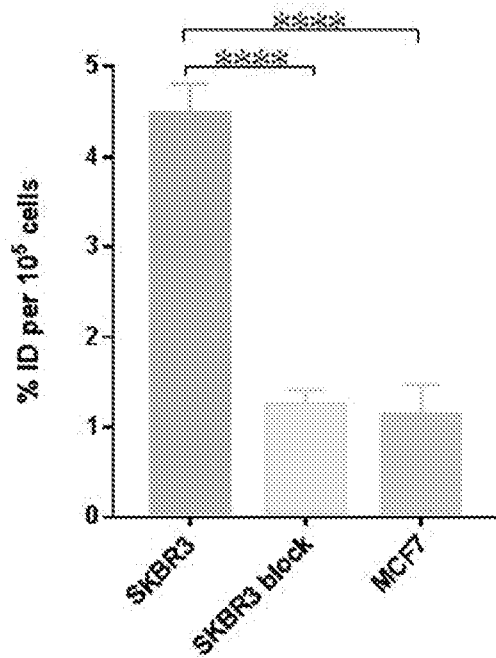


图 3

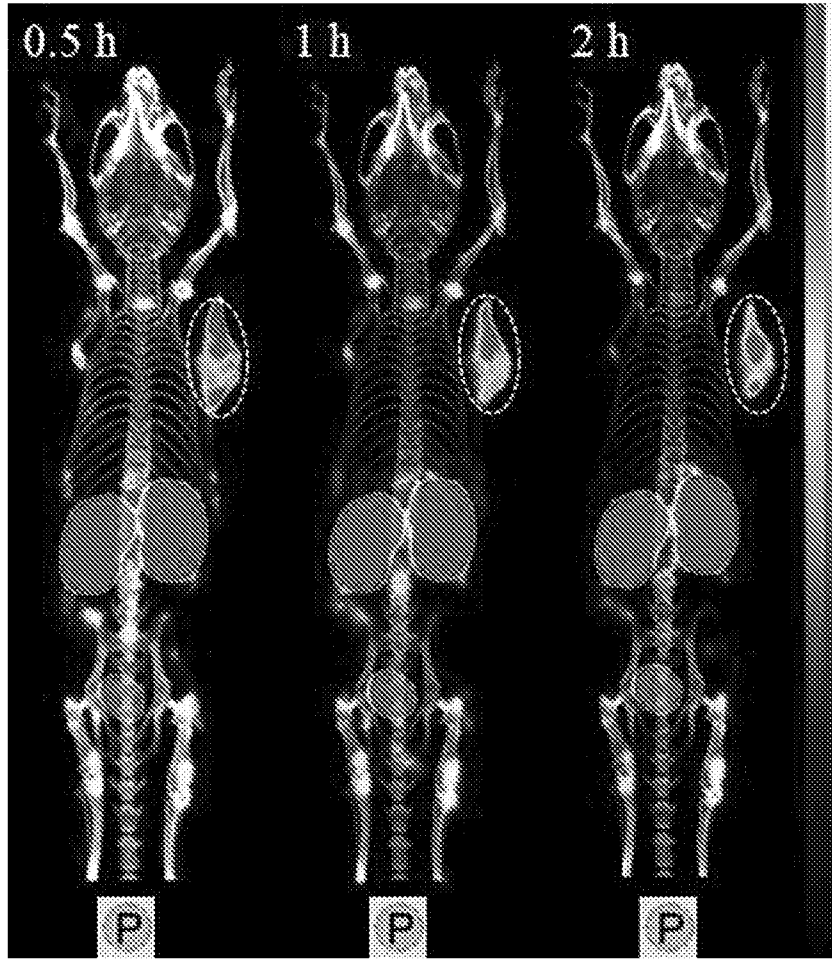


图 4

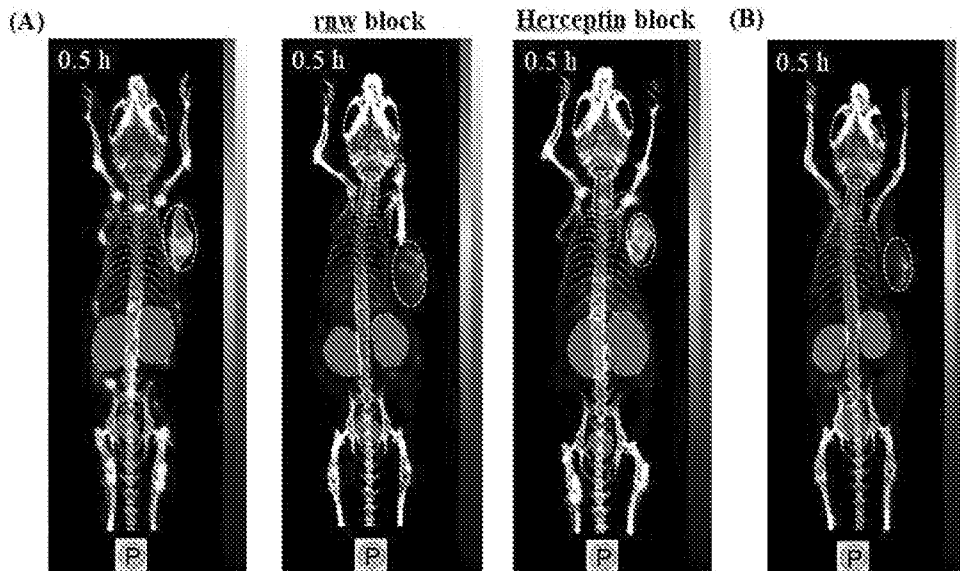


图 5

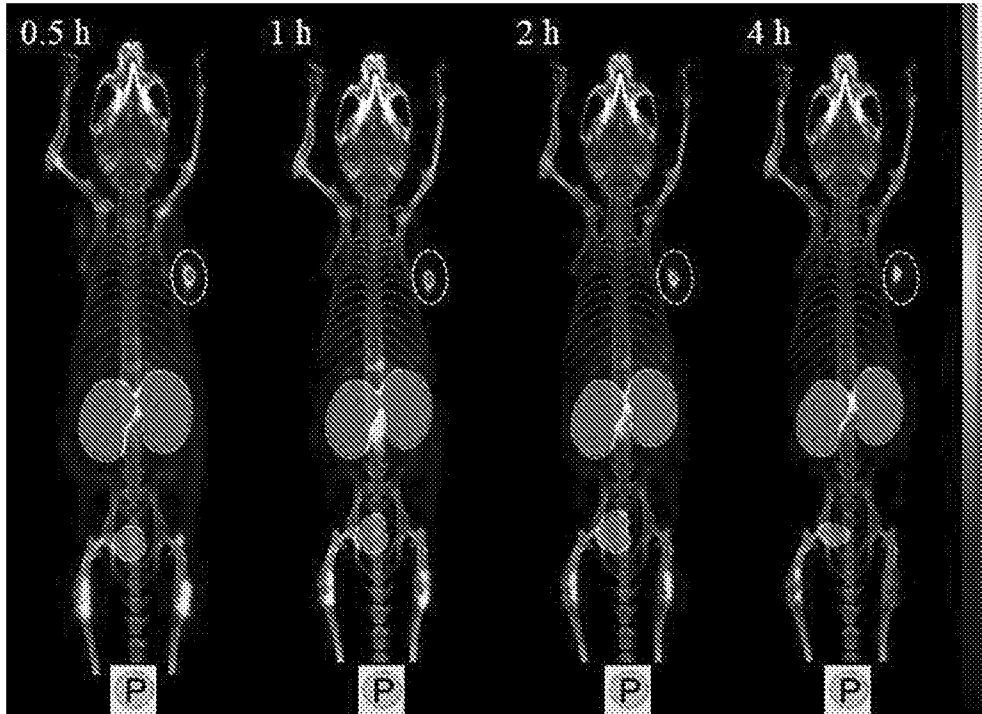


图 6

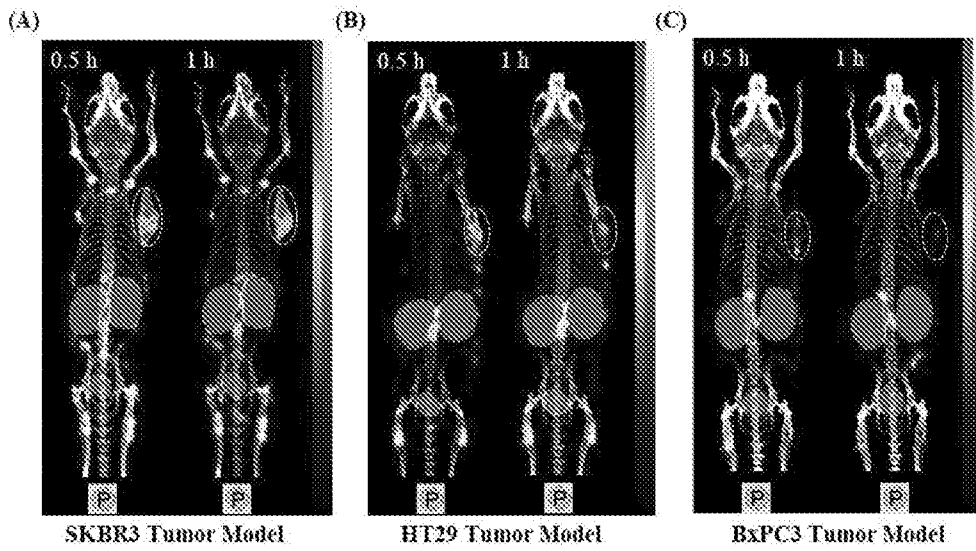


图 7

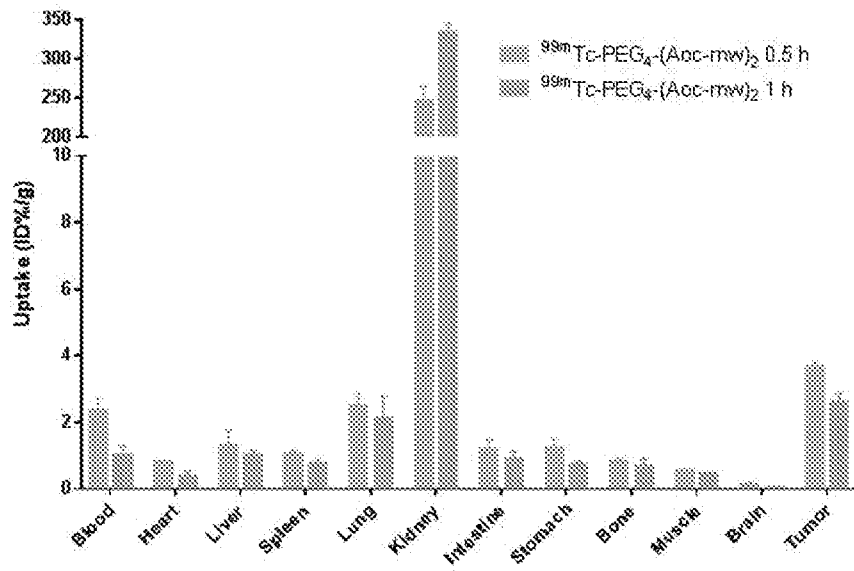


图 8

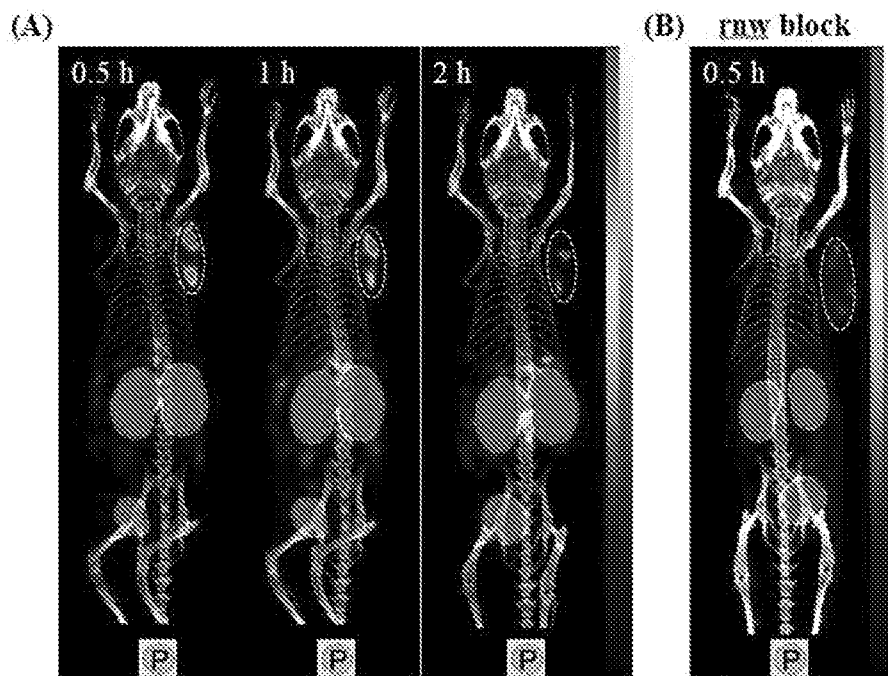
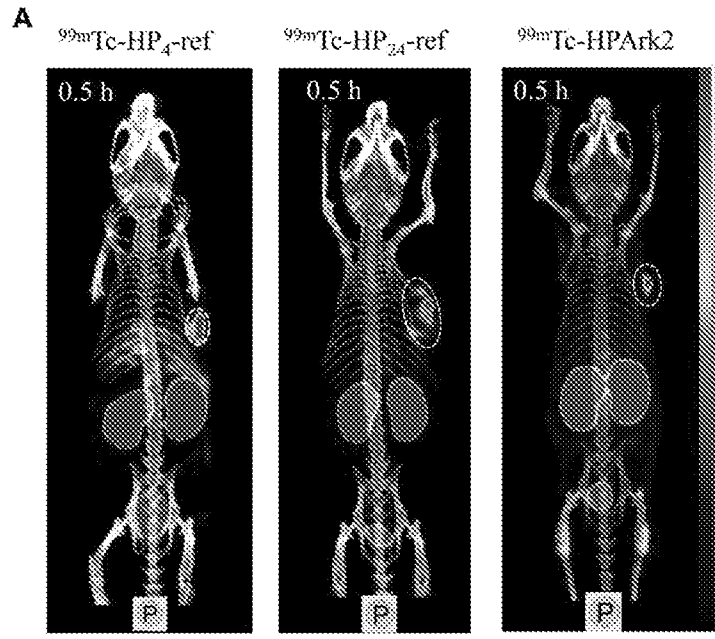


图 9



SKBR3乳腺癌模型

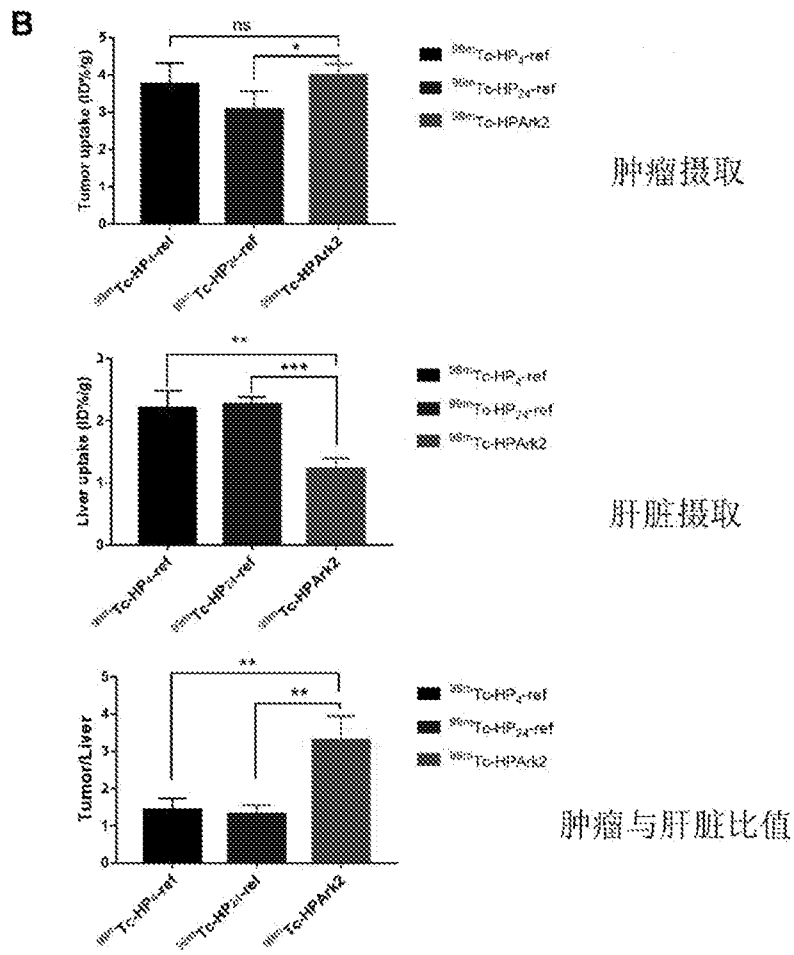


图 10

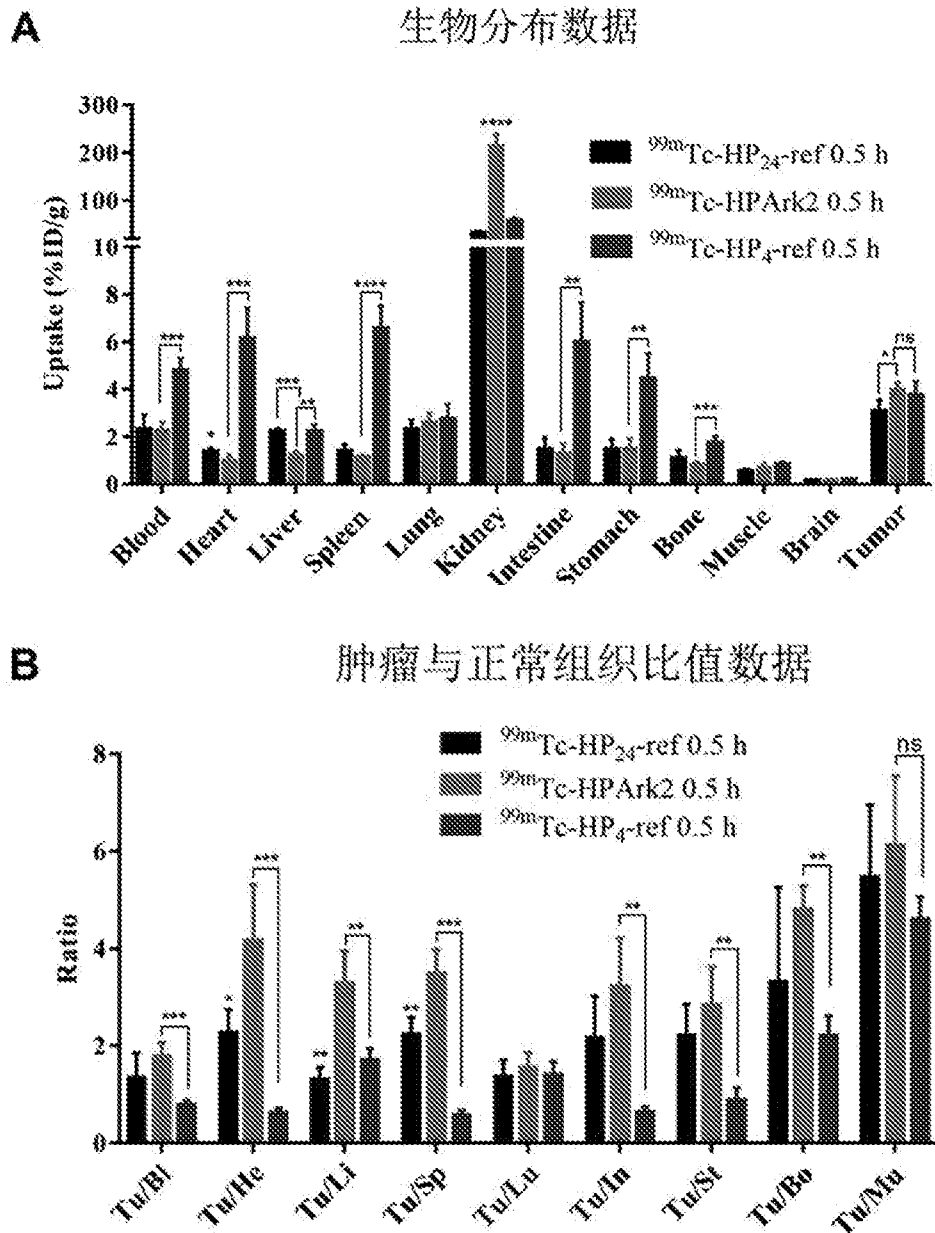


图 11

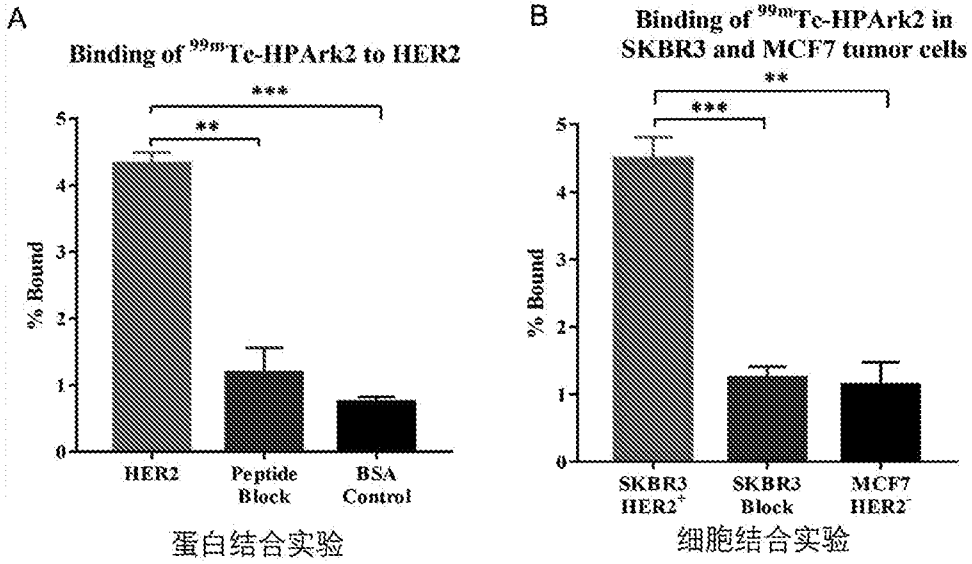
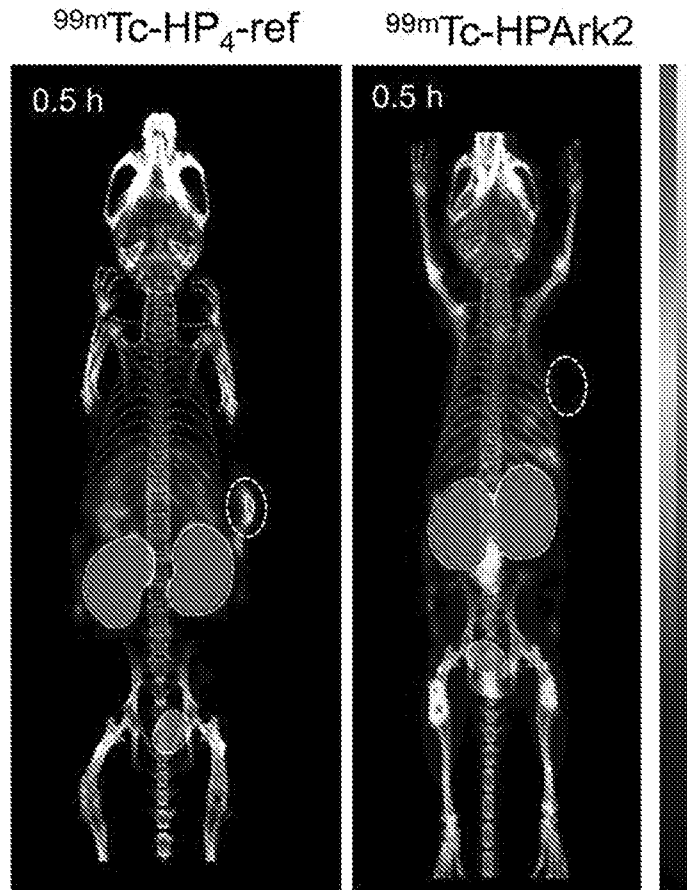


图 12



HER2阴性/EGFR阳性 乳腺癌 MDA-MB-468模型

图 13

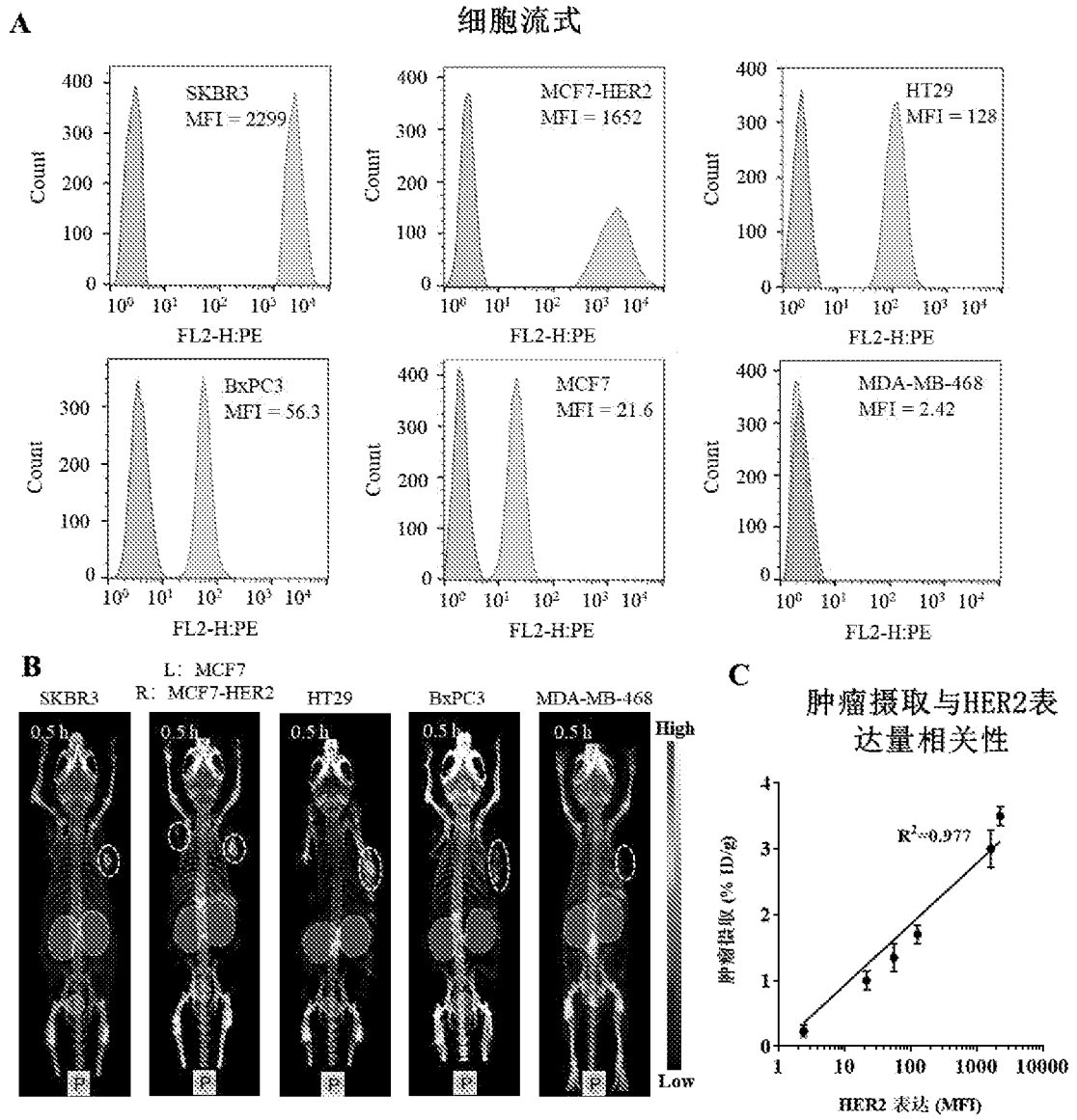


图 14

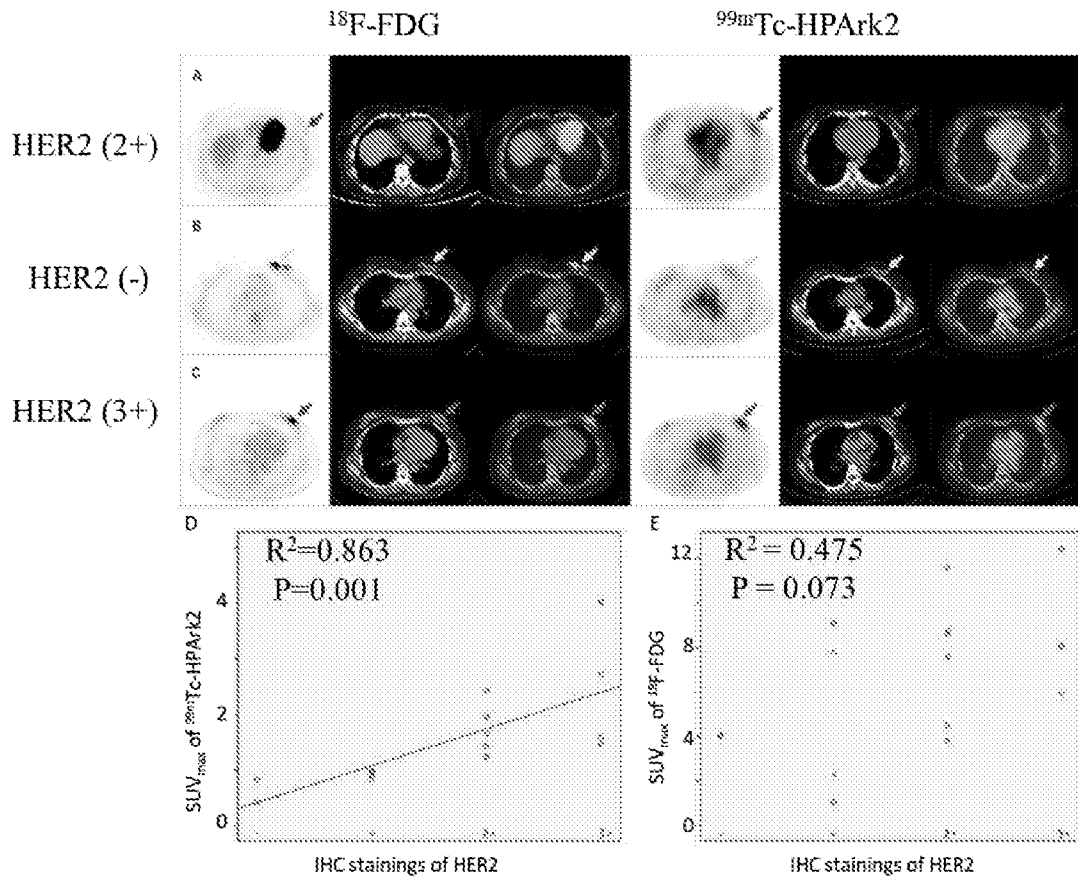


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/091801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 51/06(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; 万方; 读秀学术; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN; ISI Web of Science; Springer: 北京大学, 王凡, 史继云, 杜帅樊, 贾兵, rk多肽, 二聚体, 放射性核素, 单体, 氨基酸, 聚乙二醇, 氨基辛酸, 螯合剂, 肿瘤, 癌, PEKING UNIVERSITY, WANG Fan, SHI Jiyun, DU Shuai fan, JIA Bing, rk polypeptide, dimer, radioactive nuclide, radionuclide, monomer, amino acid, polyethylene glycol, amino octanoic acid, aminocaprylic acid, chelating agent, cancer, tumor, HER2, rnwelrlk, KLRLEWNR, PKM, PEG, AOC, HYNIC, NOTA, DOTA, DTPA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110339375 A (PEKING UNIVERSITY) 18 October 2019 (2019-10-18) claims 1-8	1-10
Y	CN 109045313 A (PEKING UNIVERSITY et al.) 21 December 2018 (2018-12-21) description, paragraphs [0008]-[0022]	1-10
Y	WANG Zihua et al. "Microarray Based Screening of Peptide Nano Probes for HER2 Positive Tumor" <i>Anal.Chem.</i> , Vol. 87, 28 July 2015 (2015-07-28), pp. 8367-8372	1-10
Y	靳存敬等 (JIN, Cunjing et al.). "99Tcm标记的PEG4/2PEG4修饰的环状RGD二聚体体内 外性质的对比 (Comparison of in Vitro and in Vivo Characteristics of 99Tcm-Labeled Cyclic RGD Dimers With PEG4/2PEG4 Linkers)" <i>Journal of Nuclear and Radiochemistry</i> , Vol. 32, No. 5, 31 October 2010 (2010-10-31), pp. 287-292	1-10
A	CN 101428148 A (PEKING UNIVERSITY) 13 May 2009 (2009-05-13) entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
09 July 2020		17 August 2020
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/091801

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 110339375 A	18 October 2019	None	
CN 109045313 A	21 December 2018	CN 109045313 B	18 February 2020
CN 101428148 A	13 May 2009	CN 101428148 B	01 September 2010

A. 主题的分类 A61K 51/06 (2006.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;万方;读秀学术;中国专利生物序列检索系统;Genbank;EMBL;STN;ISI Web of Science;Springer; 北京大学, 王凡, 史继云, 杜帅樊, 贾兵, rk多肽, 二聚体, 放射性核素, 单体, 氨基酸, 聚乙二醇, 氨基辛酸, 螯合剂, 肿瘤, 癌, PEKING UNIVERSITY, WANG Fan, SHI Jiyun, DU Shuaifan, JIA Bing, rk polypeptide, dimer, radioactive nuclide, radionuclide, monomer, amino acid, polyethylene glycol, amino octanoic acid, aminocaprylic acid, chelating agent, cancer, tumor, HER2, rnwelrlk, KLR-LEWNR, PKM, PEG, AOC, HYNIC, NOTA, DOTA, DTPA		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110339375 A (北京大学) 2019年 10月 18日 (2019 - 10 - 18) 权利要求1-8	1-10
Y	CN 109045313 A (北京大学 等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 说明书第[0008]-[0022]段	1-10
Y	WANG Zihua 等. "Microarray Based Screening of Peptide Nano Probes for HER2 Positive Tumor" Anal.Chem., 第87卷, 2015年 7月 28日 (2015 - 07 - 28), 第8367-8372页	1-10
Y	靳存敬 等. "99Tcm标记的PEG4/2PEG4修饰的环状RGD二聚体内外性质的对比" 核化学与放射化学, 第32卷, 第5期, 2010年 10月 31日 (2010 - 10 - 31), 第287-292页	1-10
A	CN 101428148 A (北京大学) 2009年 5月 13日 (2009 - 05 - 13) 全文	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2020年 7月 9日	2020年 8月 17日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	李小晶 电话号码 (86-512)88996463	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/091801

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	110339375	A	2019年 10月 18日	无	
CN	109045313	A	2018年 12月 21日	CN 109045313	B 2020年 2月 18日
CN	101428148	A	2009年 5月 13日	CN 101428148	B 2010年 9月 1日