



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118725026 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202410739299.6

A61K 103/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.06.07

(71) 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之路555号

(72) 发明人 程震 瞿春容 宋苗苗 曹蕊

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

专利代理师 张皓

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

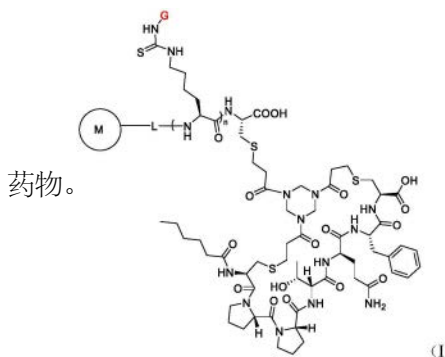
权利要求书9页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

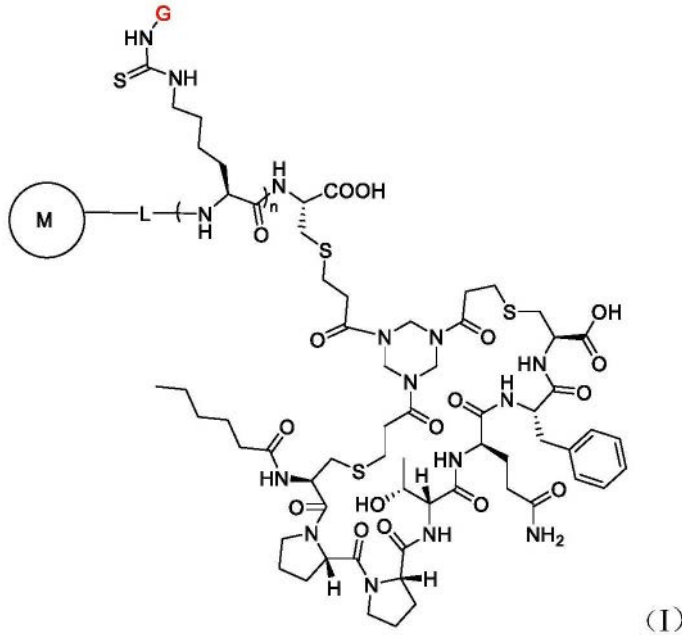
一类靶向肿瘤相关成纤维细胞激活蛋白的糖肽、放射性核素标记物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及式I所示的一类FAP糖肽及其放射性核素标记物和应用。所述FAP糖肽在多肽FAP-2286结构基础上,将形成环肽的连接子部分进行改造,并进一步引入单糖或二糖分子而得到。将所述糖肽采用放射性核素标记后相对于FAP-2286显示出更优的肿瘤摄取和更低的肝脏摄取,具有更好的成像结果,有利于获得具有进一步研发价值的候选放射性核素诊疗药物,并最终获得具有自主知识产权的FAP靶向环肽放射性



1. 下式I所示的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物:



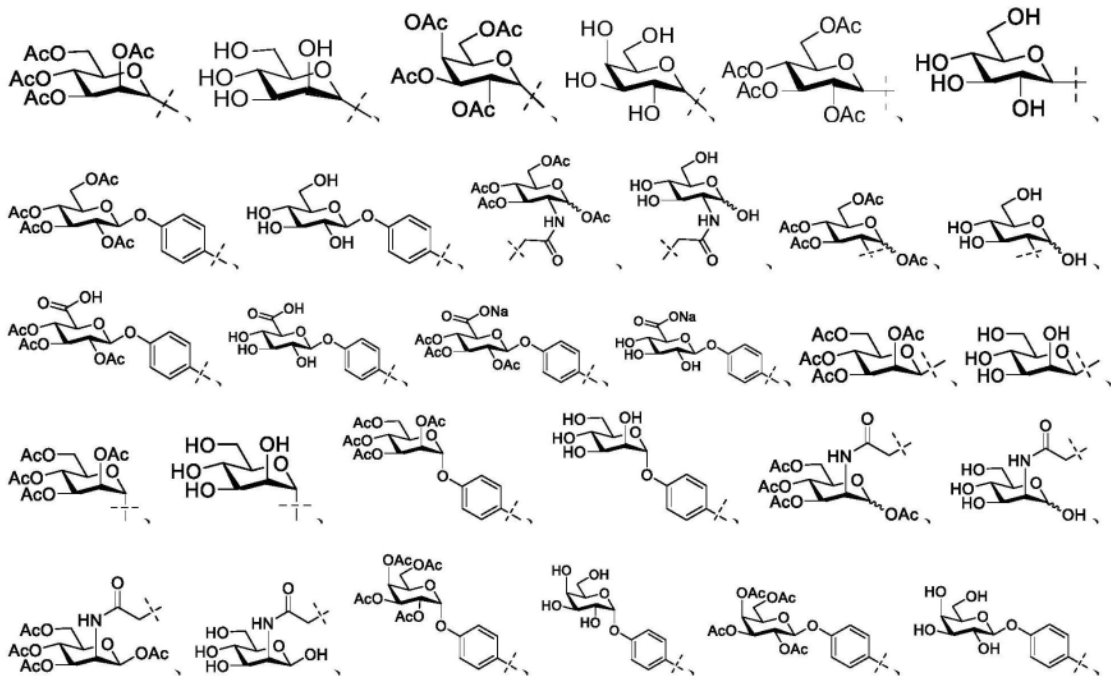
(I)

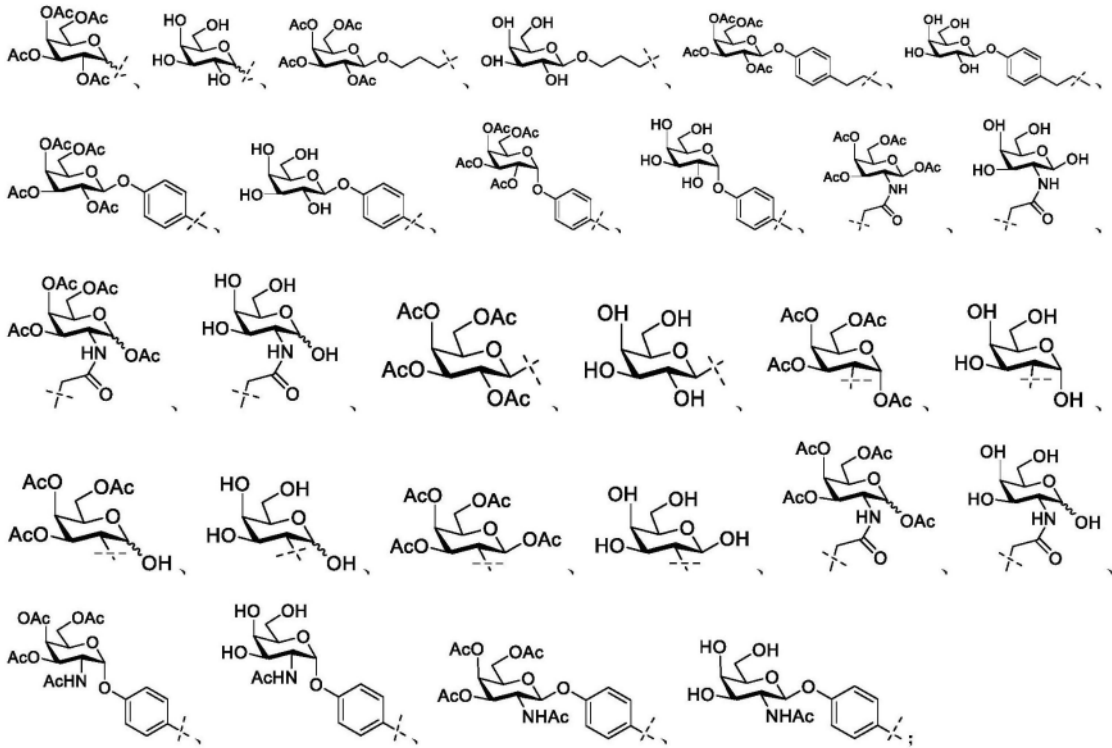
G各自独立地表示单糖、二糖、三糖基团或被单糖、二糖或三糖基团取代的苯基;L表示二肽或三肽连接子;

M表示可与放射性核素结合的金属螯合基团;

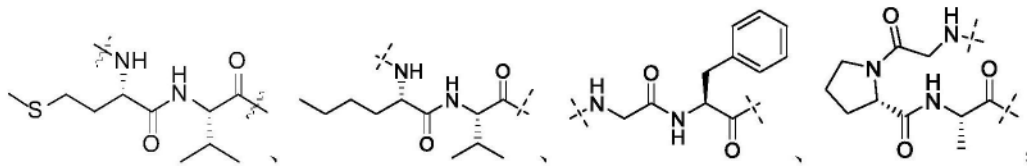
n为1至3的整数。

2. 权利要求1所述的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物,其中,G各自独立地选自以下基团:

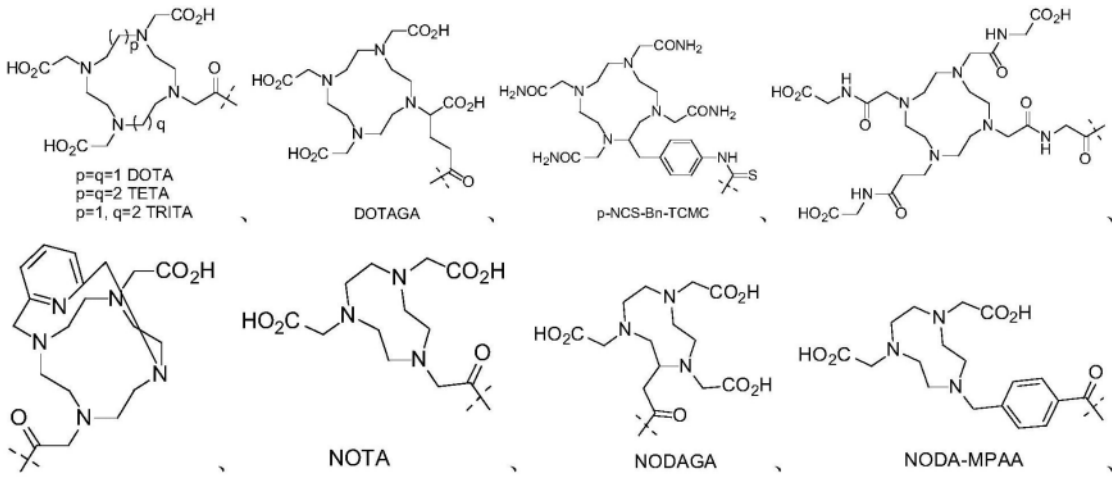


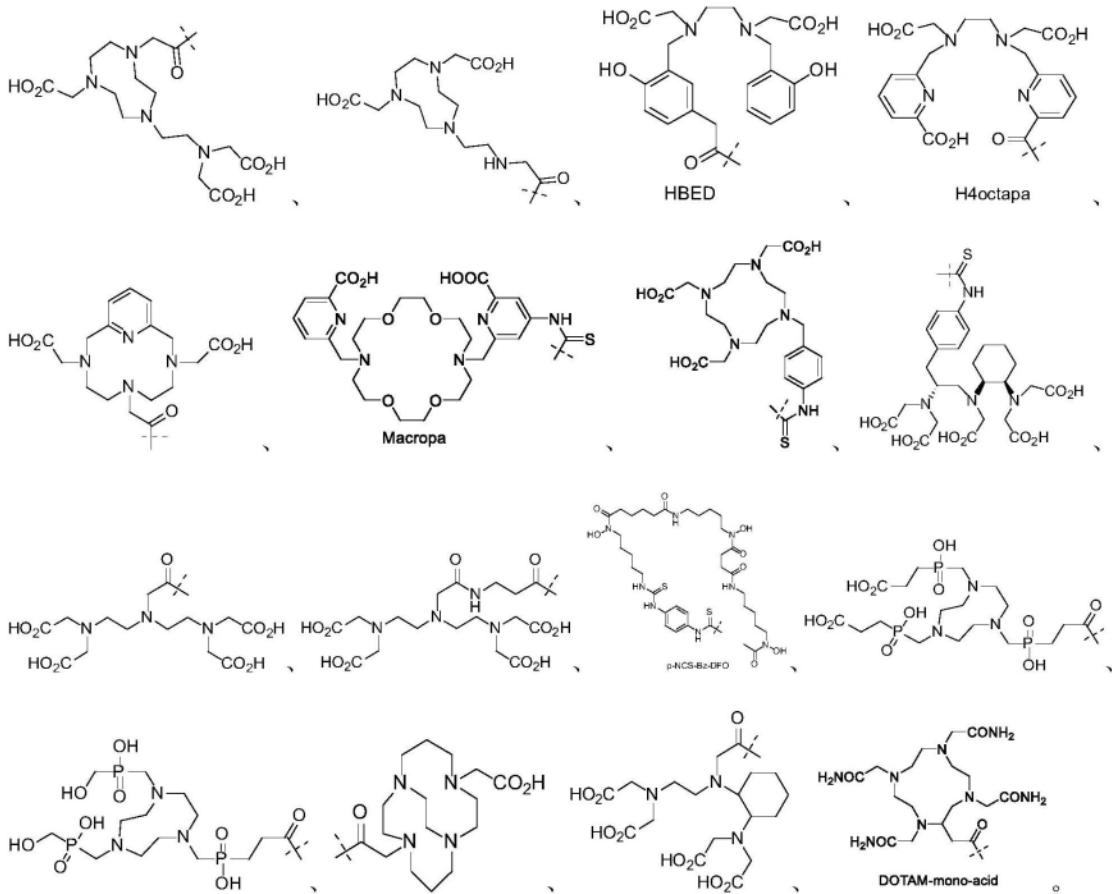


L选自以下基团:

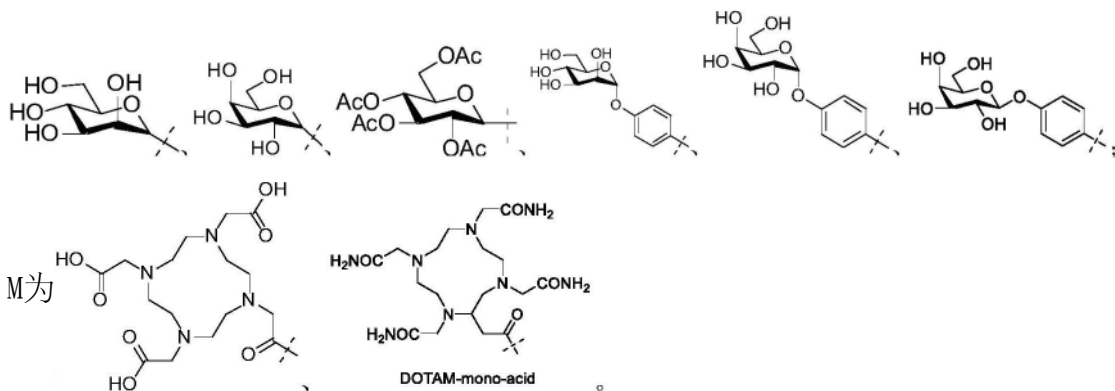


M与L通过酰胺键连接,为选自以下结构的基团:





3. 权利要求1所述的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物,其中, G各自独立地选自以下基团:



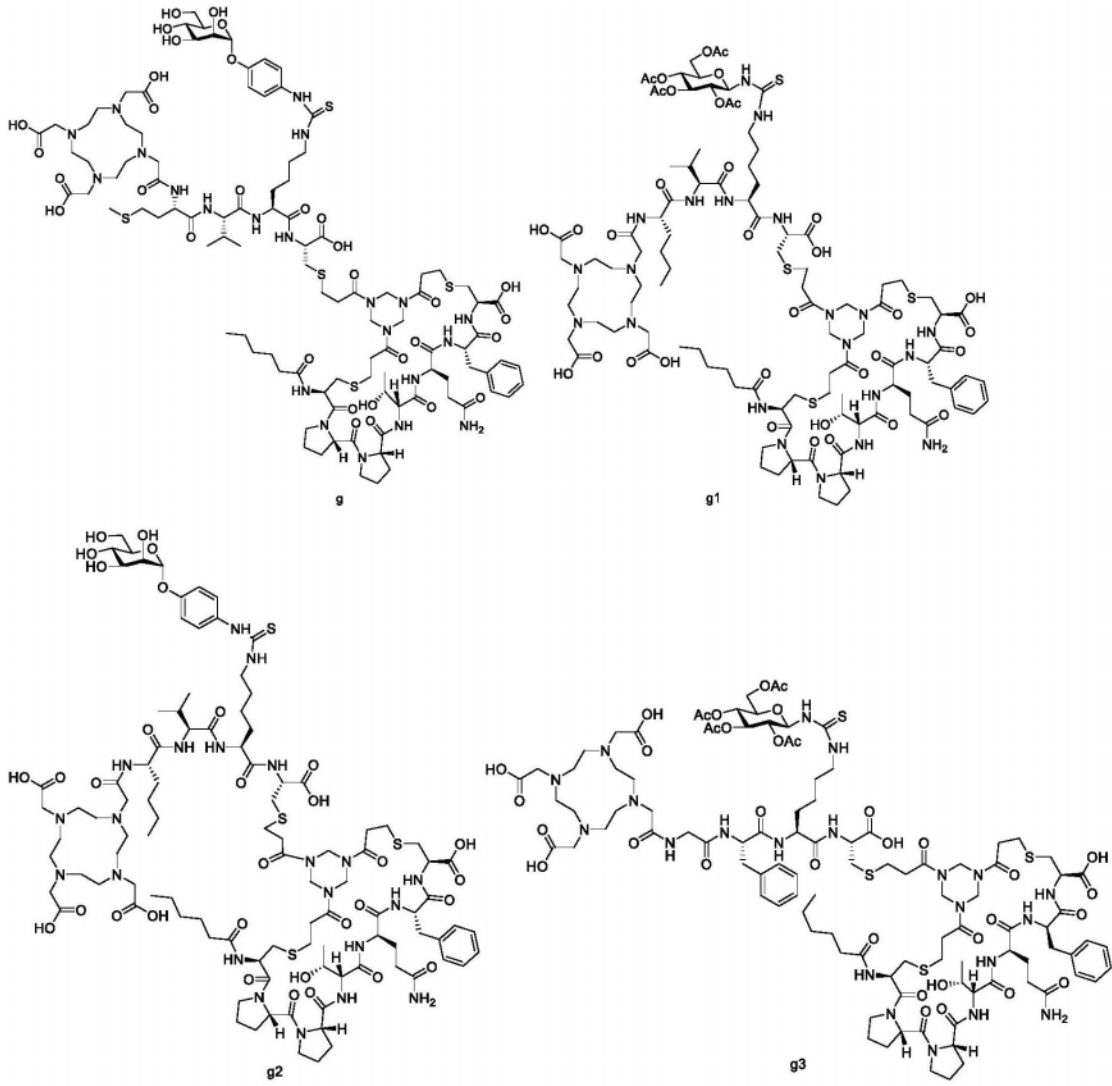
4. 权利要求1所述的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物,其中,所述放射性核素选自放射性诊断核素和放射性治疗核素;

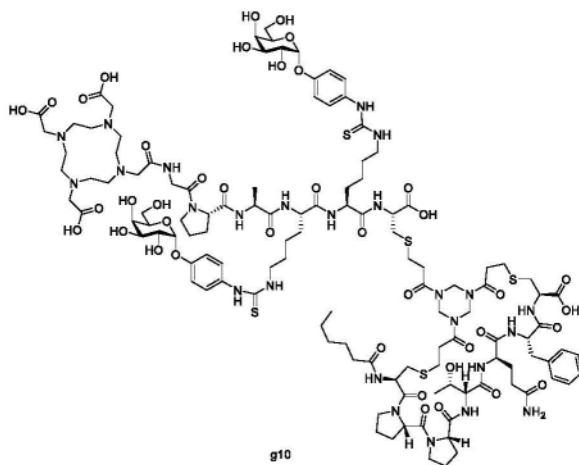
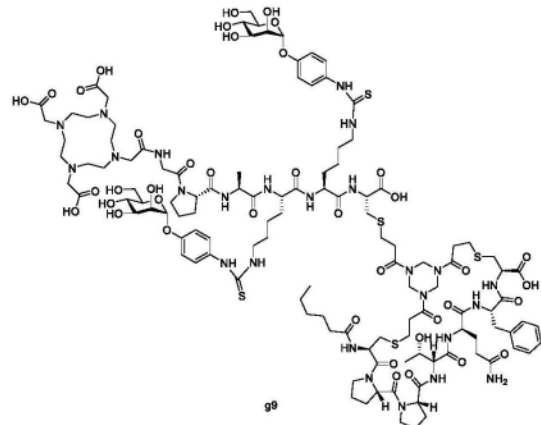
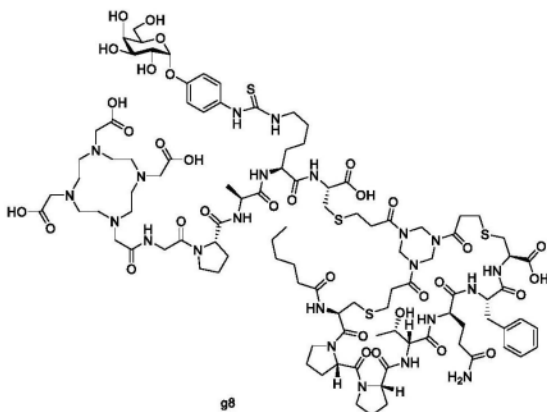
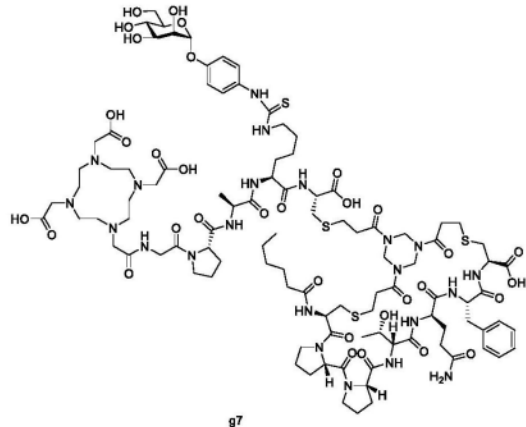
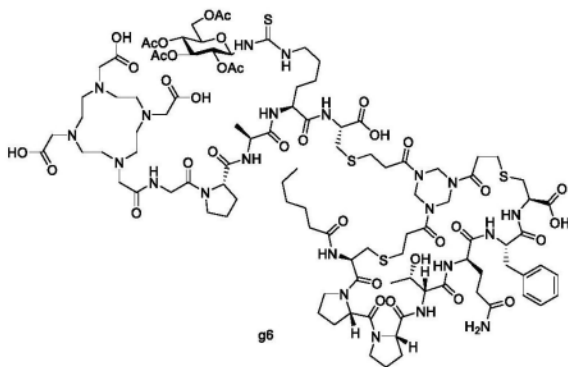
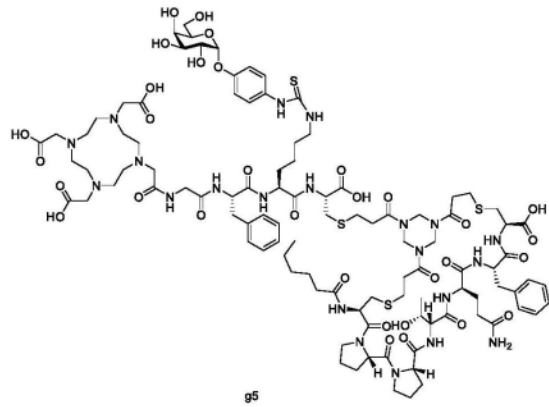
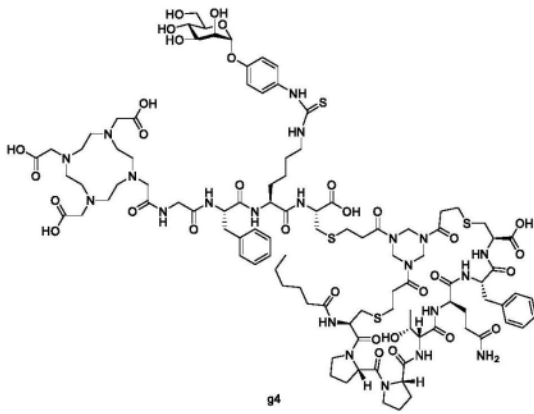
特别地,

所述放射性诊断核素为选自⁸⁶Y、¹⁸F、⁵¹Mn、^{52m}Mn、^{52g}Mn、Al [¹⁸F]、⁶⁴Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁹Zr、^{99m}Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、⁴⁴Sc、⁴⁷Sc中的任意一种或多种;优选⁸⁶Y、Al [¹⁸F]、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁹Zr、^{99m}Tc、¹²⁴I中的任意一种或多种;更优选⁶⁸Ga或⁶⁴Cu;

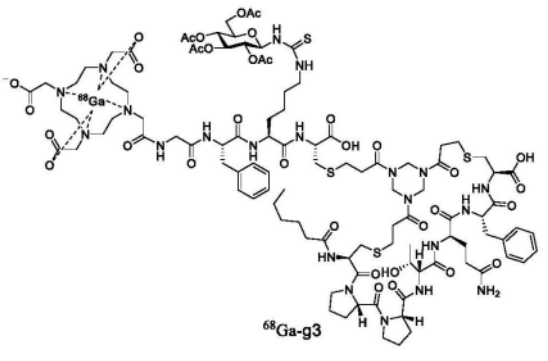
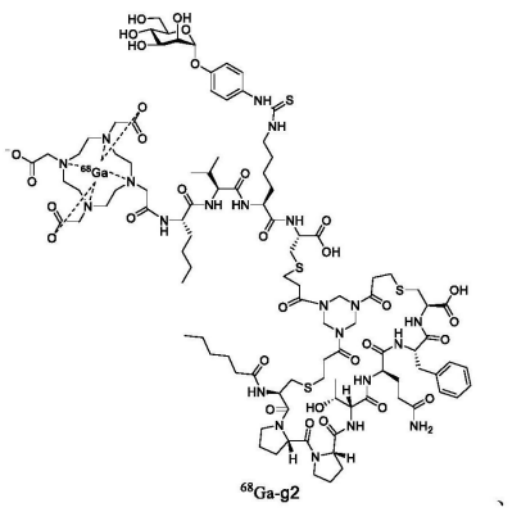
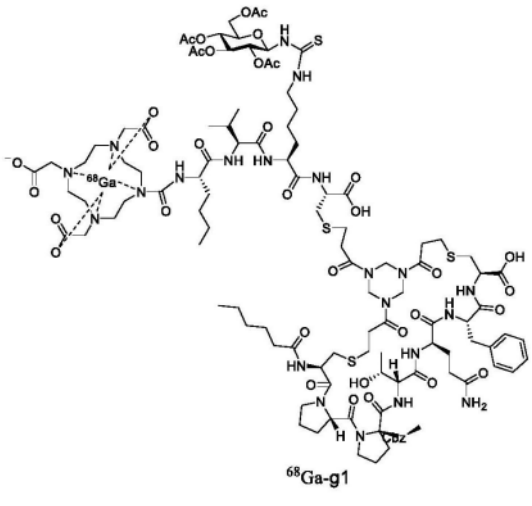
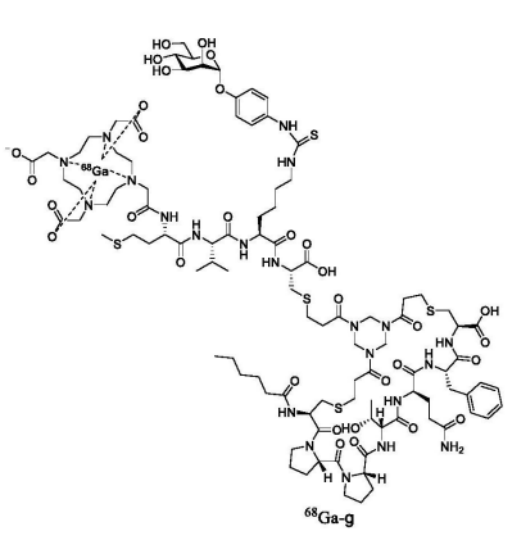
所述放射性治疗核素为选自⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、²²⁷Th、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Pb、²⁰³Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、²²⁷Th中的任意一种或多种;优选⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、²²⁷Th、²²³Ra、²²⁵Ac、²¹¹At中的任意一种或多种;更优选²²⁷Th、¹⁷⁷Lu、²²⁵Ac或²¹²Pb。

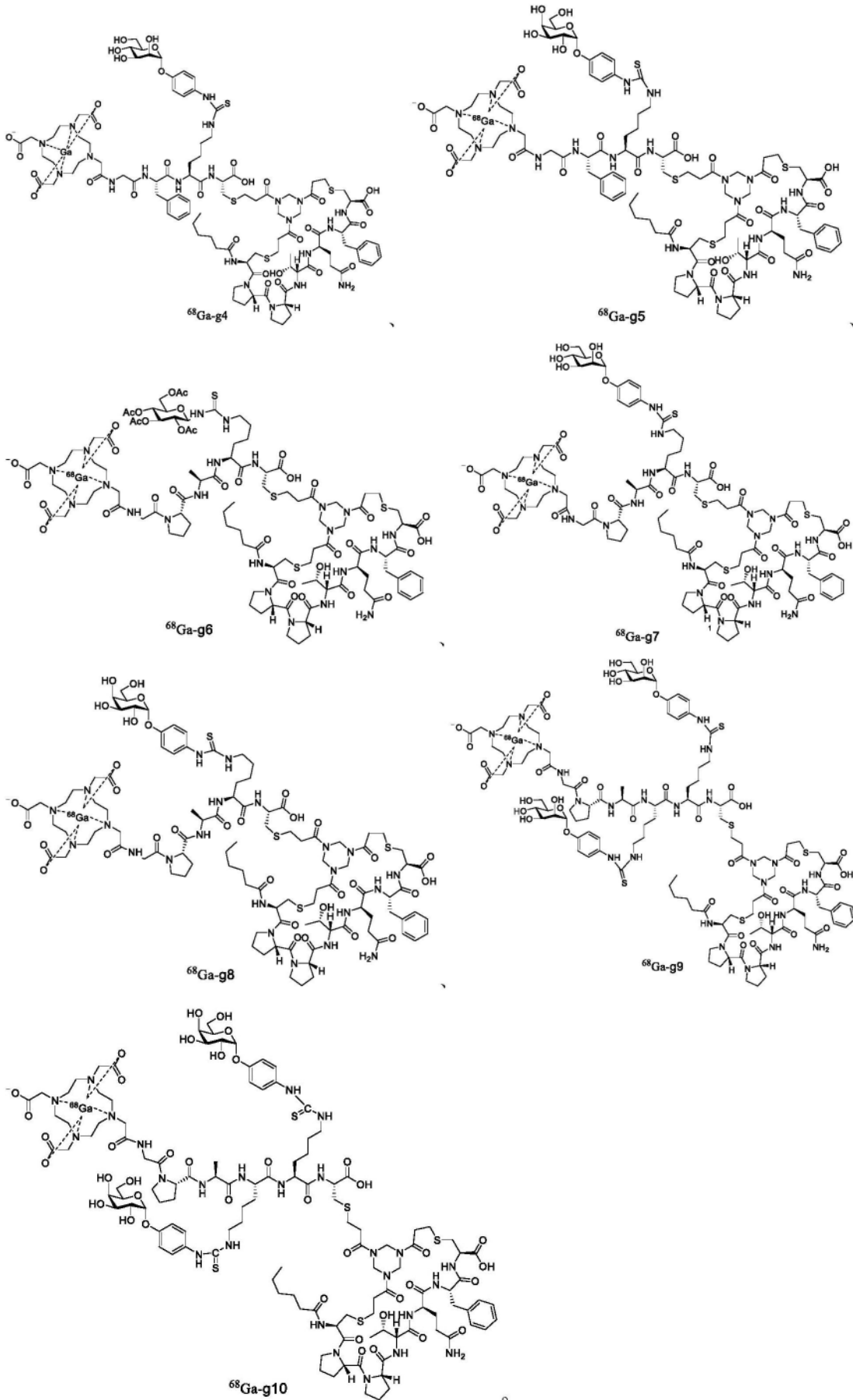
5. 权利要求1所述的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物,其中,
所述化合物优选自:





所述放射性核素标记物选自：



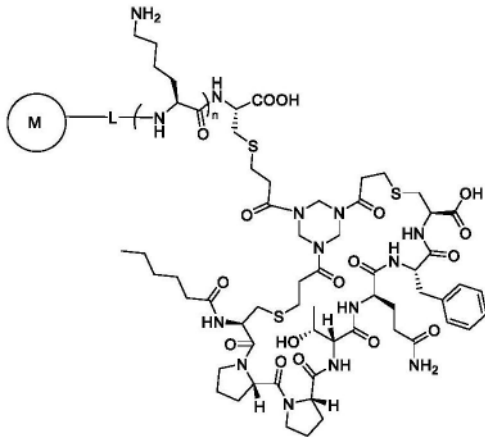


6. 权利要求1-5任一项所述的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物在制备肿瘤显像剂或者抗肿瘤药物中的用途。

7. 权利要求6所述的用途,其中,所述肿瘤为实体瘤,特别是上皮性肿瘤,更特别包括肉瘤、间皮瘤、食管瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌。

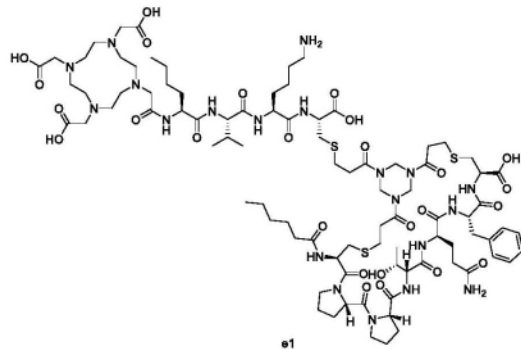
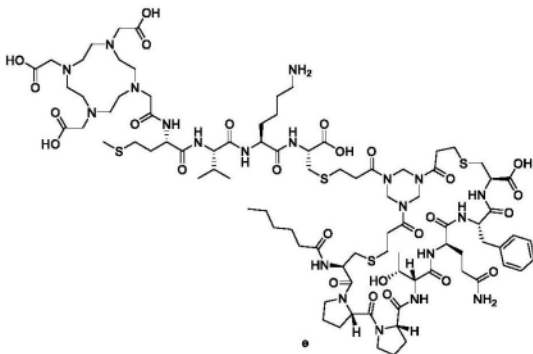
8. 权利要求7所述的用途,其中,所述实体瘤为胶质母细胞瘤。

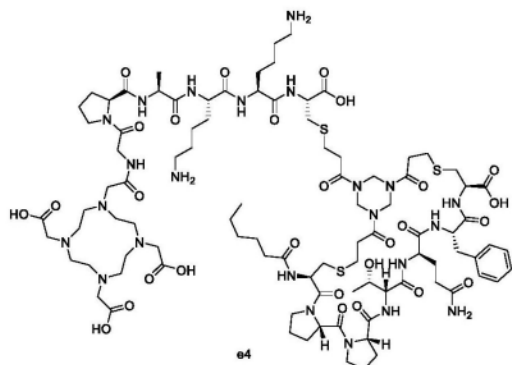
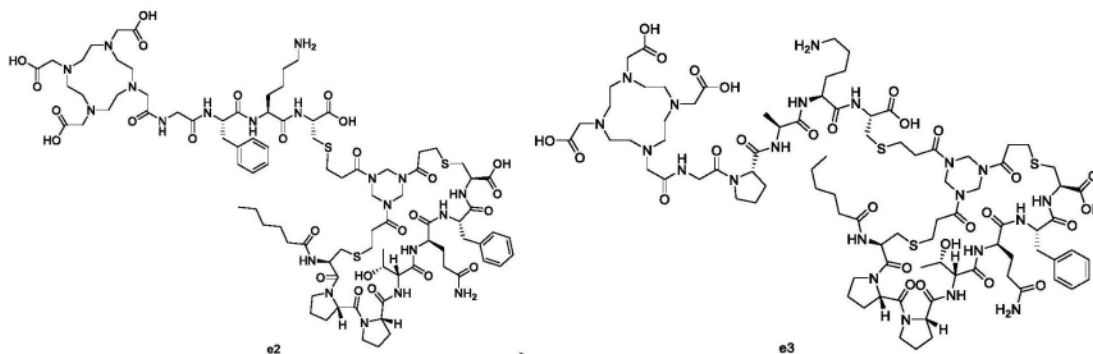
9. 式II所示化合物或其盐:



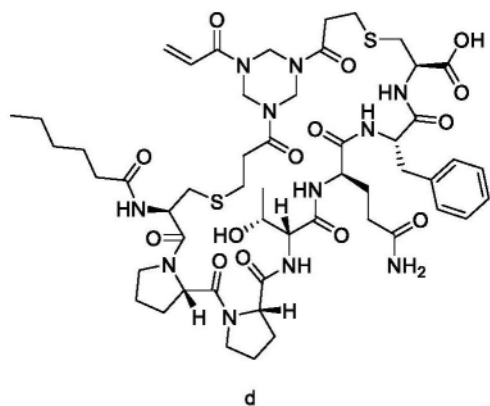
(II)

其中,M、L、n的定义分别如权利要求1中所定义,具体地,所述式II化合物选自:





10. 式d所示化合物或其盐:



一类靶向肿瘤相关成纤维细胞激活蛋白的糖肽、放射性核素标记物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及靶向肿瘤相关成纤维细胞活性蛋白 (Fibroblast activation protein, FAP) 的多肽技术领域, 具体涉及一类FAP糖肽及其放射性核素标记物和应用。

背景技术

[0002] 放射性药物的研发已成为国际国内新药研发的重要发展方向, 吸引了众多研究机构、企业与市场的关注。尤其是诊疗一体化的肿瘤靶向放射性药物, 可以有效的对肿瘤进行诊断和放射性核素治疗, 更是目前药物研究的前沿方向。靶向生长抑素受体的放射性标记的多肽Lutathera (镥氧奥曲肽) 和靶向前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的放射性小分子Pluvicto (原名¹⁷⁷Lu-PSMA-617) 也分别在2018年和2022年, 被美国FDA批准上市。

[0003] 恶性肿瘤包括肿瘤细胞和肿瘤细胞所处的微环境。肿瘤微环境也被称为肿瘤间质包括各种非恶性细胞, 他们共同塑造适宜肿瘤生长的环境。其中非癌基质细胞通过产生各种生长因子、趋化因子和细胞因子, 促进细胞外基质重塑、诱导血管生成、细胞迁移、耐药和逃避免疫监视, 从而促进肿瘤的侵袭与转移。研究证实肿瘤相关成纤维细胞 (Cancer associated fibroblasts, CAFs) 是肿瘤微环境非癌基质细胞的主要成分, 而成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 普遍表达于CAFs的表面, 是非常有潜力的一种肿瘤生物标志物。

[0004] FAP是一种膜结合糖蛋白, 属于二肽基肽酶4 (Dipeptidyl peptidase 4, DPP4) 家族, 具有二肽基肽酶和内肽酶活性, 与DPP4在蛋白质水平上有52%的同源性。该蛋白由760个氨基酸组成, 包括一个短胞内区 (6个氨基酸)、一个跨膜区 (20个氨基酸) 和一个大的胞外区 (734个氨基酸)。在正常组织中FAP一般不表达或表达量很少, 但在CAFs中过度表达, 在超过90%以上的上皮性肿瘤中也高表达。其可直接促进间质成纤维细胞和其他细胞类型的增殖、迁移和侵袭, 导致肿瘤血管生成、细胞外基质降解和逃避免疫监视等。

[0005] 近年来研究表明, FAP是肿瘤放射性诊疗一体化药物的非常有前途的靶点。德国海德堡大学成功研发了一系列靶向FAP的小分子探针, 比如FAPI-02和FAPI-04, 并使用⁶⁸Ga与¹⁷⁷Lu标记成为诊疗一体化放射性药物。Clemens Kratochwil等一共评估了80名患者的⁶⁸Ga-FAPIPET/CT扫描, 这些患者使用¹⁸F-FDG成像或其他传统成像均无法准确诊断, 但在给药⁶⁸Ga-FAPI-04后, 纳入分析的28个癌种中, 检出54个原发肿瘤与229个转移灶 [Kratochwil C., et al. (68) Ga-FAPIPET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer. J Nucl Med, 2019, 60 (6), 801-805.]。与¹⁸F-FDG相比较, ⁶⁸Ga-FAPI-04能检出更多的肿瘤原发灶与转移灶。该探针可准确地对多种肿瘤的转移灶进行准确的诊断、分期, 有非常高的应用前景, 可能成为肿瘤临床中广泛应用的一种筛查及放射性核素治疗工具。此外, 该探针的显像操作流程简化, 无需禁食和控糖, 更易被患者所接受。

[0006] FAP-2286作为靶向FAP的环肽探针, 结构包括7个氨基酸组成的环肽和金属配体部分, 亲和力在0.4-1.4nM范围。与FAP小分子抑制剂探针¹⁷⁷Lu-FAPI系列相比, ¹⁷⁷Lu-FAP-2286在给药72小时后, 仍有高的肿瘤摄取信号, 而FAPI-46在肿瘤中却只有微弱信号, 因此基于

环肽FAP-2286的放射性治疗药物,在肿瘤治疗方面具有更高的研发潜力。

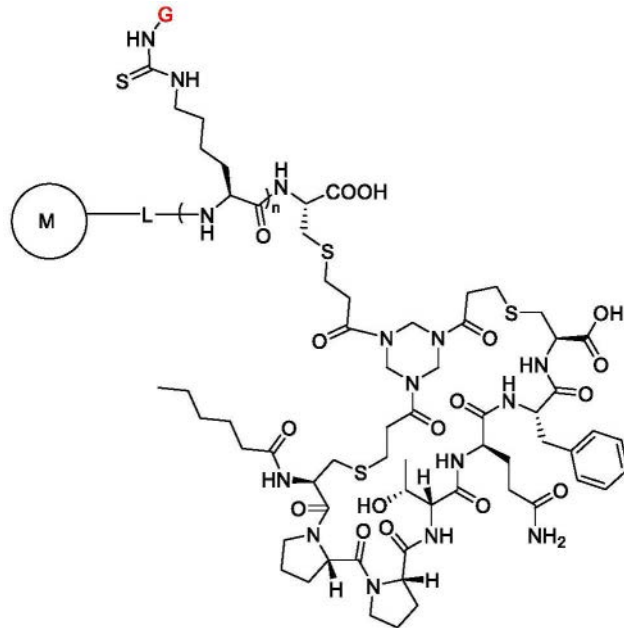
[0007] 目前,⁶⁸Ga-FAP-2286与¹⁷⁷Lu-FAPI-2286的研究已处于临床I/II期(NCT04939610)。虽然⁶⁸Ga-FAP-2286与¹⁷⁷Lu-FAPI-2286对FAP高表达的肿瘤有高的摄取,但其在肾中的滞留时间较长,在给药3h、24h与72h时分别为2.2% ID/g、1.1% ID/g和0.6% ID/g,均高于小分子探针FAPI-46,易引起放射性肾毒性或加重肾负担[Zboralski D., et al. Preclinical evaluation of FAP-2286 for fibroblast activation protein targeted radionuclide imaging and therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2022, 49(11), 3651-3667.].虽然放射性药物本身因为使用量小,正常使用时并不会对正常组织造成损害。但当大量富集并长期滞留时,会由于长时间放射性量的积累,对正常组织造成放射性损伤。另外,使用放射性治疗的病人,大多为癌症晚期,且多数都经过放化疗,本身肝肾功能可能有一定损伤或基础疾病。

[0008] 因此,放射性药物研究对肾滞留时间需特别关注,且是药物设计之初应关注的重要方向。故对该分子进行结构改造修饰,在保持其高肿瘤摄取的同时,减少肝肾代谢器官中富集,研发具有自主知识产权的“best-in-class”FAP靶向环肽放射性药物,具有非常高的临床转化价值和可行性。

发明内容

[0009] 本发明在多肽FAP-2286结构基础上,将形成环肽的连接子部分进行改造,并进一步引入单糖或二糖分子,得到一系列新型糖肽。将所述糖肽采用放射性核素标记后相对于FAP-2286显示出更优的肿瘤摄取和更低的肝脏摄取,具有更好的成像结果,有利于获得具有进一步研发价值的候选放射性核素诊疗药物,并最终获得具有自主知识产权的“best-in-class”FAP靶向环肽放射性药物。

[0010] 本发明一方面提供一种下式I所示的化合物,或其盐或它们的放射性核素标记物:



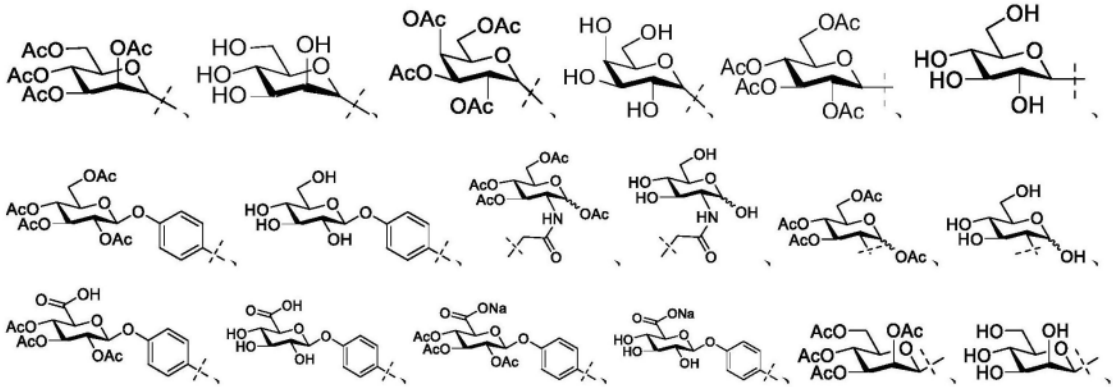
[0011]

[0012] G各自独立地表示单糖、二糖或三糖基团,或被单糖、二糖或三糖基团取代的苯基; L表示二肽或三肽连接子;

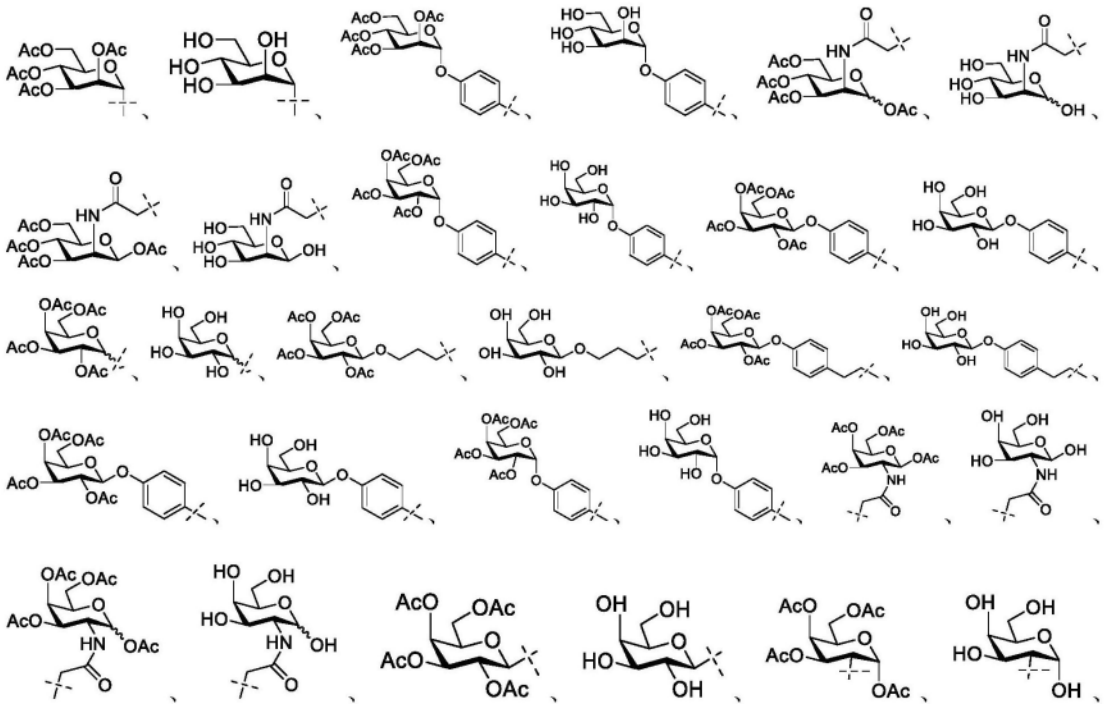
[0013] M表示可与放射性核素结合的金属螯合基团；

[0014] n为1至3的整数,特别是1或2。

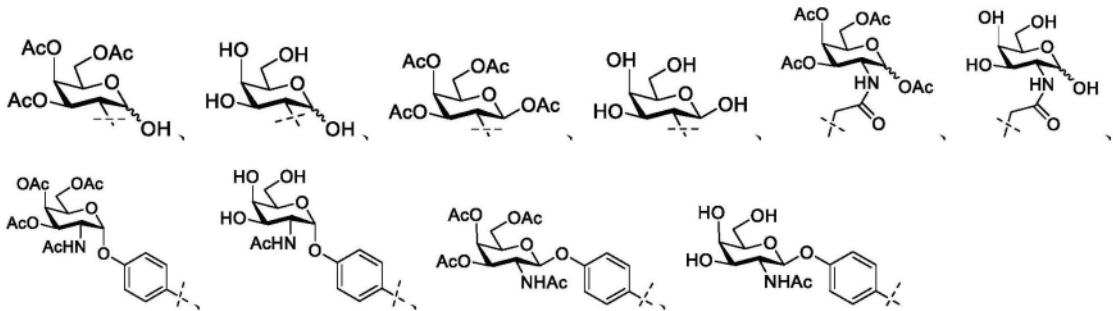
[0015] 在一些实施方式中,G各自独立地选自以下基团：



[0016]

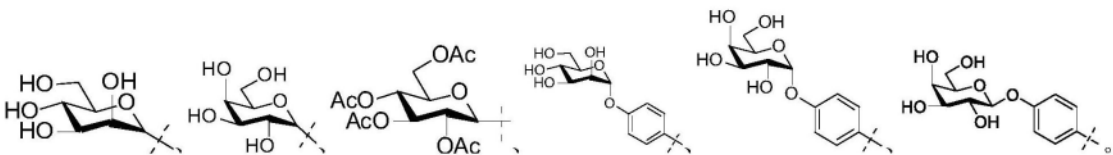


[0017]



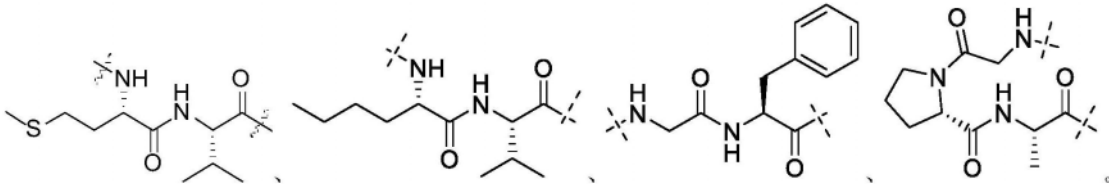
[0018] 在一些实施方式中,G各自独立地选自以下基团：

[0019]



[0020] 在一些实施方式中,L选自以下基团：

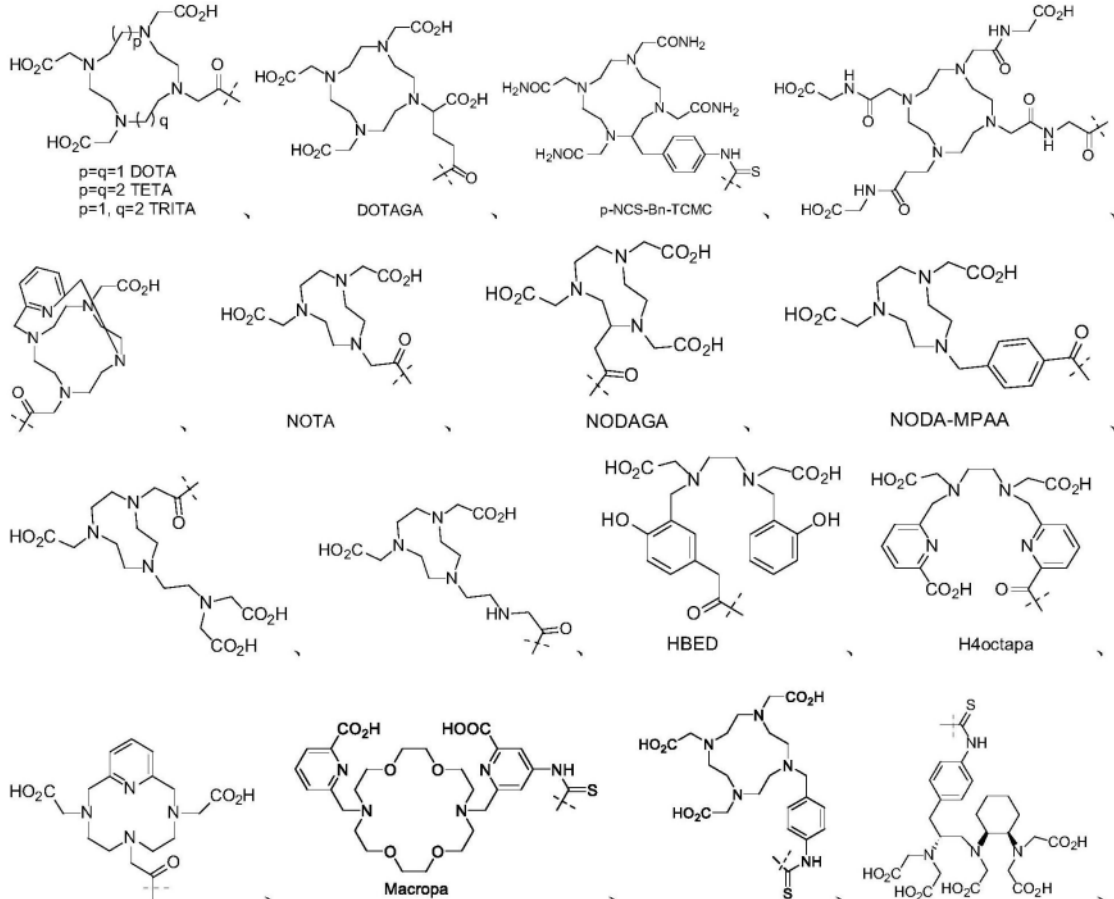
[0021]



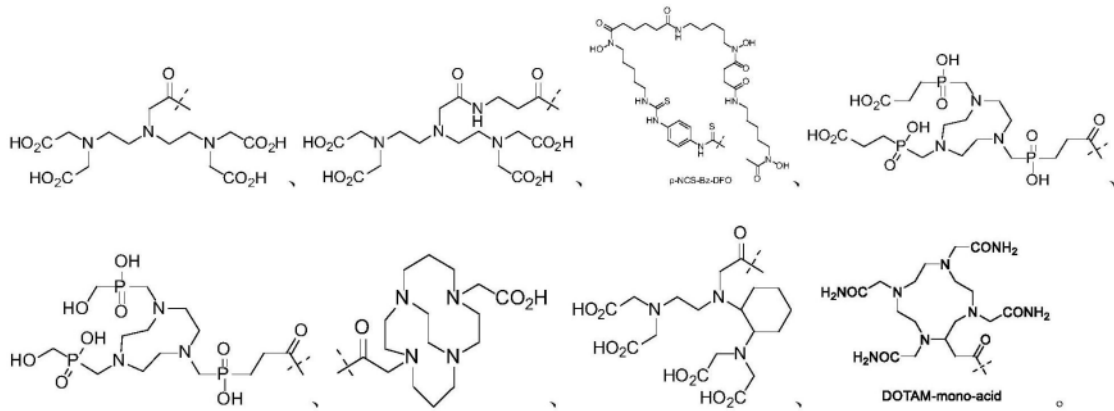
[0022]

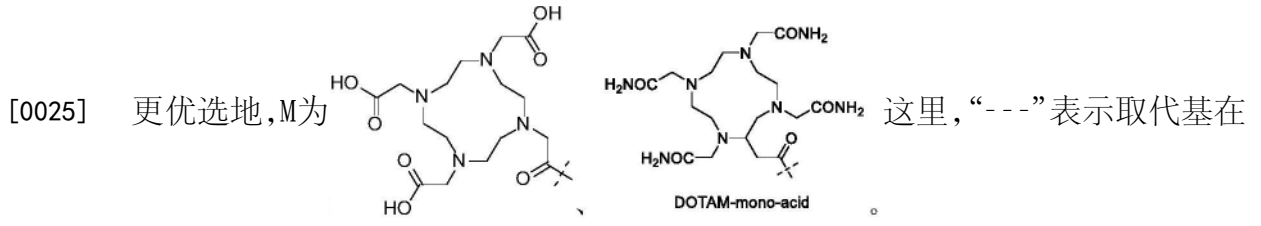
在一些实施方式中, M与L通过酰胺键连接(即M连接至L的NH连接端), M选自以下结构的基团:

[0023]



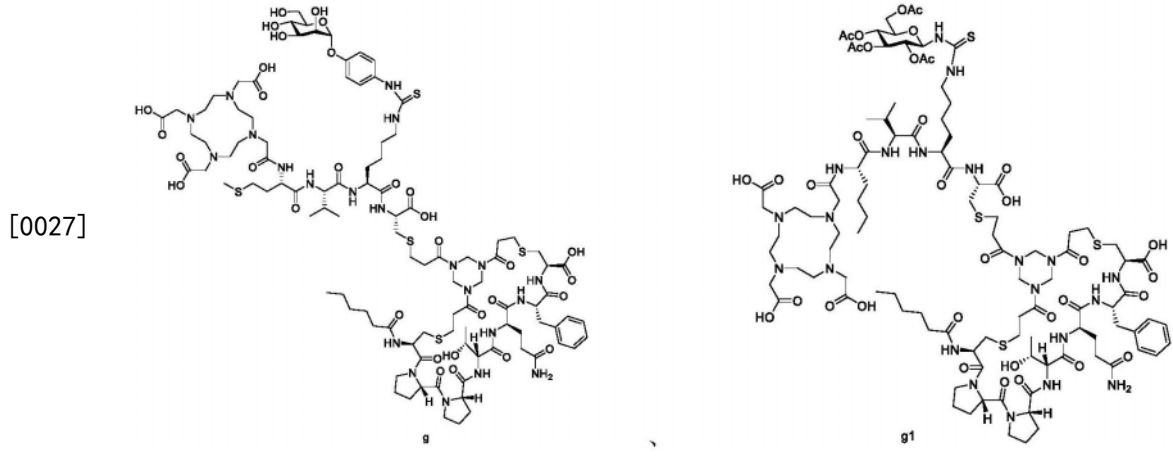
[0024]

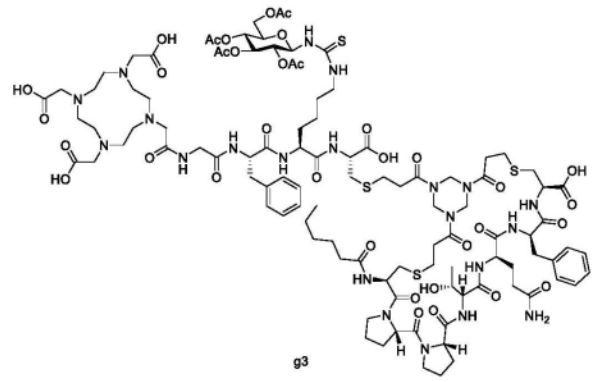
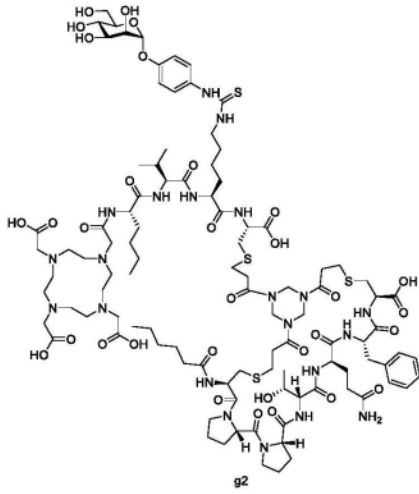




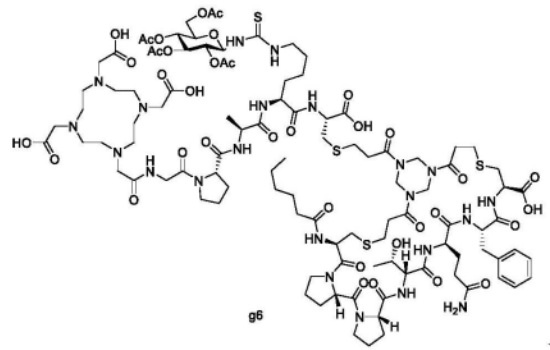
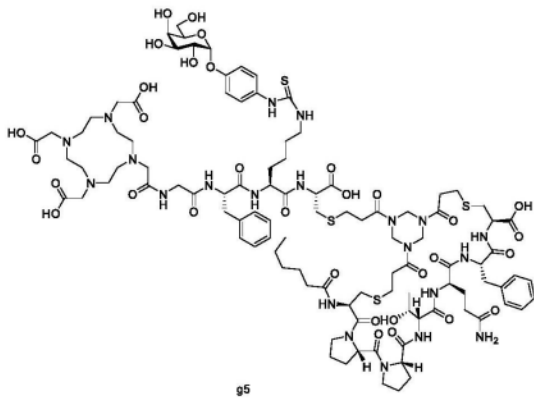
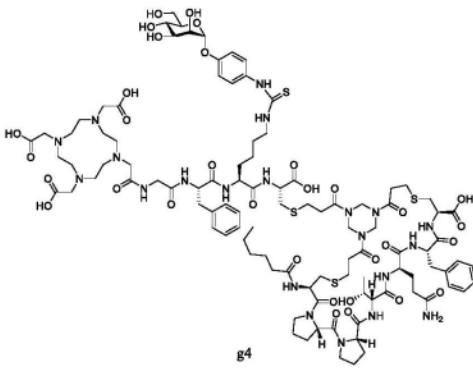
该处连接。

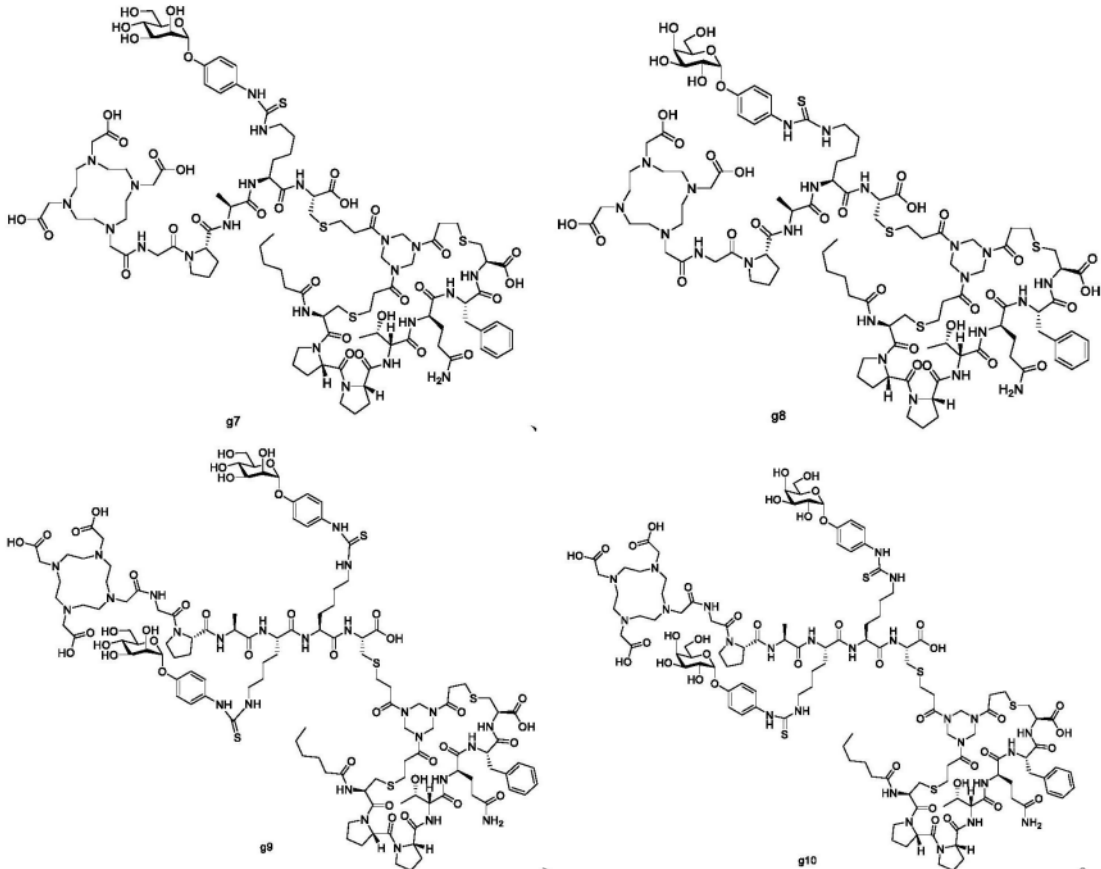
[0026] 在一些实施方式中, 式I化合物选自:





[0028]





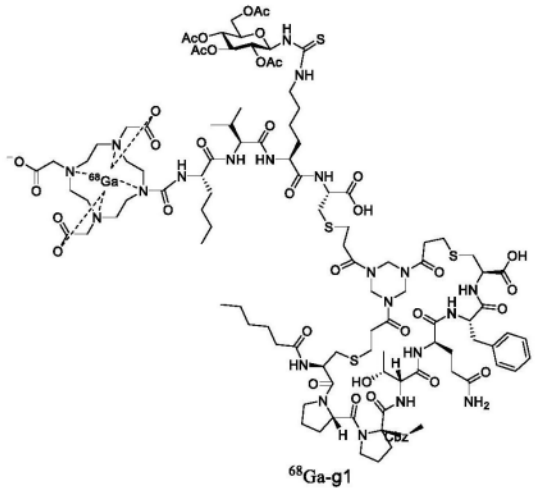
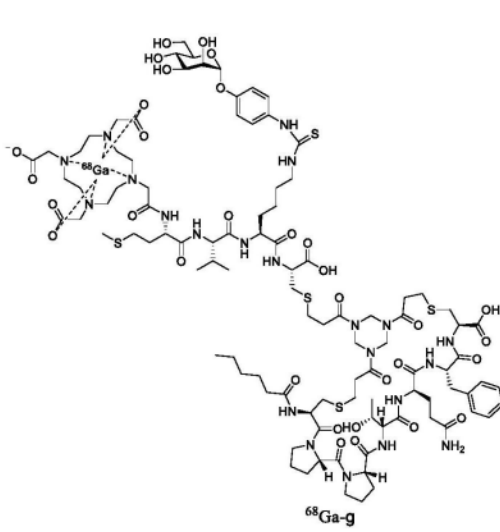
[0029]

[0030] 在一些实施方式中,放射性核素选自放射性诊断核素和所述放射性治疗核素,但不限于此。放射性诊断核素标记物可以用于肿瘤成像,有利于肿瘤的诊断,而放射性治疗核素标记物可以用于肿瘤的诊断治疗。

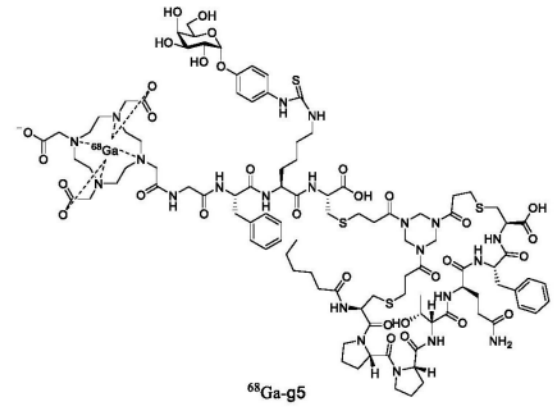
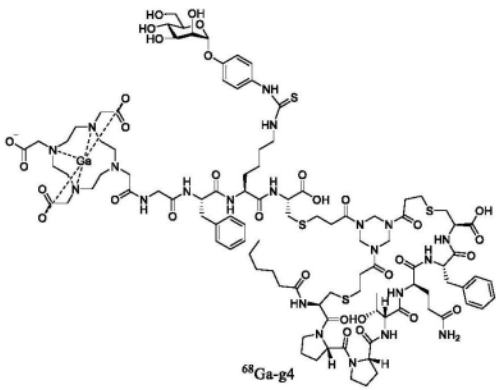
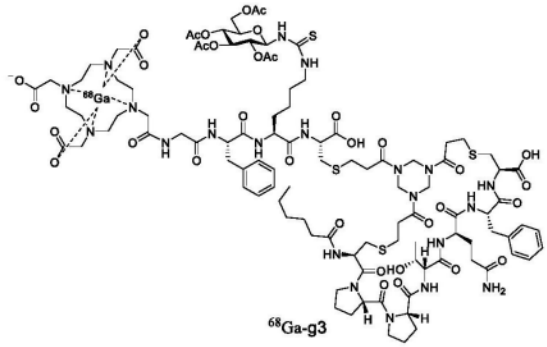
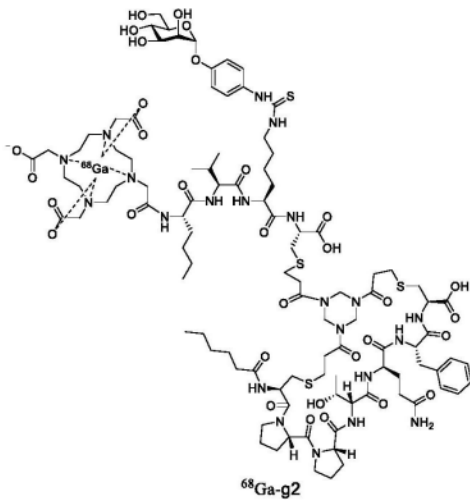
[0031] 所述放射性诊断核素可以为选自 ^{86}Y 、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{g}}\text{Mn}$ 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{44}Sc 、 ^{47}Sc 中的任意一种或多种,优选 ^{86}Y 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{124}I 中的任意一种或多种;更优选 ^{68}Ga 或 ^{64}Cu 。

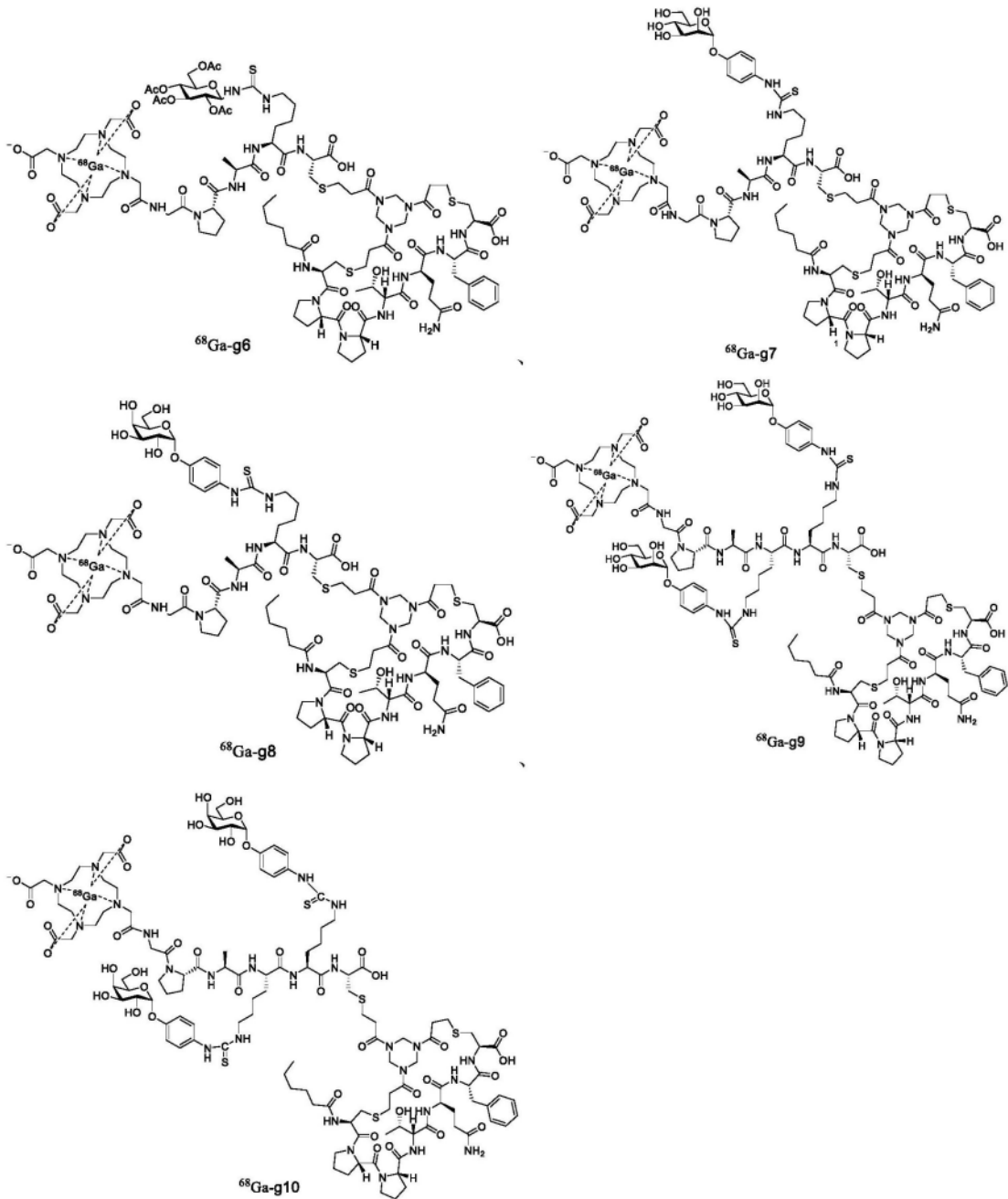
[0032] 所述放射性治疗核素可以为选自 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{227}Th 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 中的任意一种或多种;优选 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{227}Th 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{211}At 中的任意一种或多种;更优选 ^{227}Th 、 ^{177}Lu 、 ^{225}Ac 或 ^{212}Pb ;

[0033] 在一些实施方式中,所述放射性核素标记物为:



[0034]





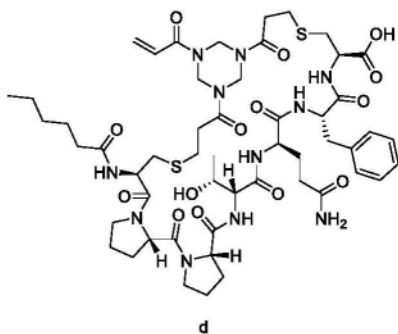
[0035]

[0036] 本发明另一方面提供上述化合物或其盐或它们的放射性核素标记物用于制备肿瘤显像剂或者抗肿瘤药物的应用。

[0037] 在一些实施方式中,所述肿瘤为实体瘤。特别地,所述实体瘤为上皮性肿瘤,特别地,所述肿瘤包括肉瘤、间皮瘤、食管癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、黑色素瘤等,但不限于此。

[0038] 本发明另一方面涉及一种式II所示化合物或其盐,

[0043]



[0044] 根据本发明的化合物可以由本领域技术人员参考实施例中的合成方法结合现有技术而制备得到。

附图说明

[0045] 图1为⁶⁸Ga标记的FAP2286在U87肿瘤鼠模型中30min, 1h, 2h的PET/CT成像图。

[0046] 图2为⁶⁸Ga标记的化合物g4在U87肿瘤鼠模型中30min, 1h, 2h的PET/CT成像图。

具体实施方式

[0047] 为使本发明实施方式的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施方式中的附图,对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施方式是本发明一部分实施方式,而不是全部的实施方式。

[0048] 除特殊说明外,在实施例中所采用的原料、试剂、方法等均为本领域常规的原料、试剂、方法。

[0049] 实验材料和分析仪器:

[0050] H-Cys(Trt) -2-Chlorotriptyl Resin购自吉尔生化(上海)有限公司;

[0051] C18反相色谱制备系统:制备液相色谱仪器(LC-20AR), C18柱为XBridge BEH C18色谱柱(4.6毫米X 150毫米);

[0052] MALDI-TOF质谱仪为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪;

[0053] Sep-Pak C18柱为WAT023501SEP-PAK LIGHT C18;

[0054] 生物分子相互作用仪器型号为Biacore T200;

[0055] 蛋白为Sino Biological的Recombinant Human FAP Protein;

[0056] 有关芯片偶联和再生的试剂均从cytivo公司采购;

[0057] 测定组织生物分布的放射性活度的counter的仪器型号为WIZARD2 2-Detector伽玛计数仪,货号为2470-0020;

[0058] 其余试剂均购置国药。

[0059] 英文缩写释义:

[0060] DCM:二氯甲烷;

[0061] DMF:N,N-二甲基甲酰胺;

[0062] HBTU:苯并三氮唑-N,N,N,N-四甲基脌六氟磷酸酯;

[0063] DIEA:N,N-二异丙基乙胺

[0064] TFA:三氟乙酸

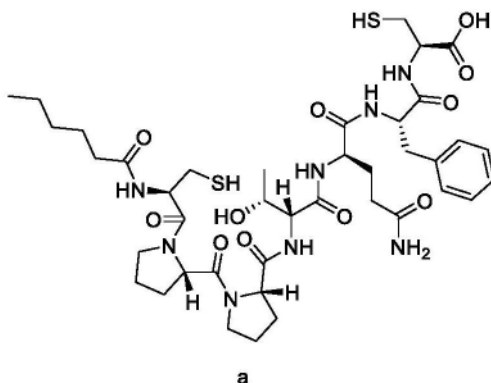
[0065] EDT:1,2-乙二硫醇

[0066] TIS:三异丙基硅烷

[0067] tBu-DOTA:三叔丁基1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸

[0068] 实施例1化合物a的合成

[0069]



a

[0070] S1:将0.6g取代度为0.336mmol/g的树脂H-Cys(Trt)-2-Chlorotrityl Resin放入多肽合成仪(CS Bio,CS336X)中,设定程序;

[0071] S2:树脂溶胀:反应瓶内加入DMF约10mL,震荡30min;

[0072] S3:脱保护2次,每次加入含20%体积哌啶的DMF溶液(10mL)并反应15min,然后DMF冲洗树脂3次,DCM冲洗树脂3次;

[0073] S4:接第一个氨基酸Fmoc-L-Phe-OH:加入Fmoc-L-Phe-OH,基于氨基酸4倍摩尔量的HBTU,以及8倍摩尔量的DIEA,缩合反应3h,DMF冲洗树脂3次,DCM冲洗树脂3次;

[0074] S5:重复S3~S4,依次连接Fmoc-L-Gln(Trt)-OH,Fmoc-L-Thr(tBu)-OH,Fmoc-L-Pro-OH,Fmoc-L-Pro-OH,Fmoc-L-Cys(Trt)-OH;

[0075] S6:脱保护2次,每次加入含20%体积哌啶的DMF溶液(10mL)并反应15min,然后DMF冲洗树脂3次,DCM冲洗树脂3次;

[0076] S7:去除溶剂,在程序最后一个XX1中,放入提前配制的4倍摩尔量己酸的5mLDMF溶液进行缩合;

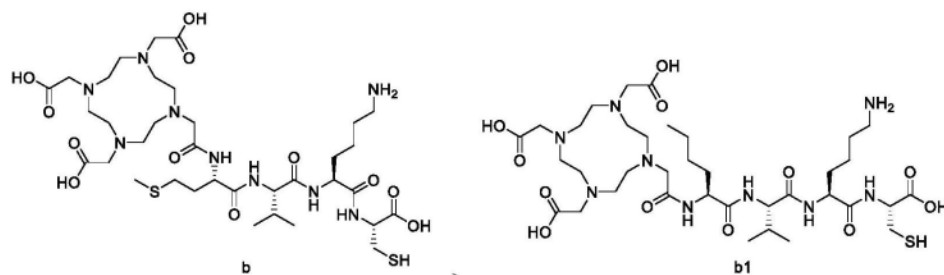
[0077] S8:切树脂:除去溶剂,加入体积比为TFA:TIS:EDT:ddH₂O=95%:2.5%:1.25%:1.25%的裂解液20mL,反应2.5h;

[0078] S9:切割完成,旋转蒸发器旋去溶剂得到溶解在TFA中的粗肽;

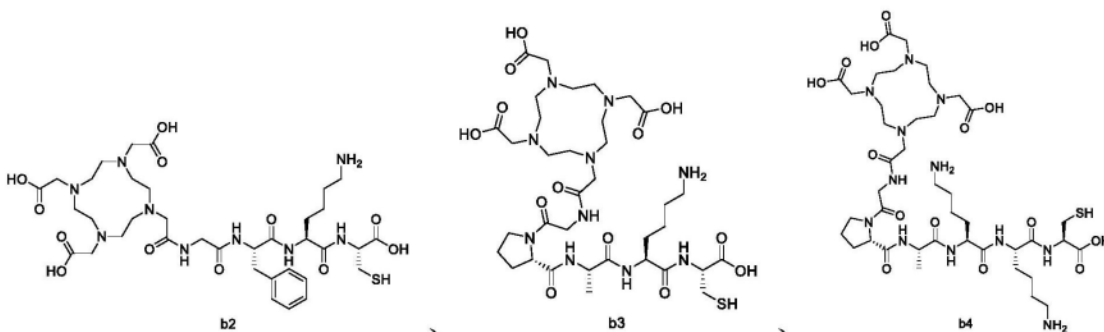
[0079] S10:多肽的沉淀:将溶解在TFA中的粗肽转移到离心管中,向其中加入10倍体积的冰乙醚,然后离心机4℃8000g离心去除溶剂,得到沉淀出的粗肽;

[0080] S11:取10mg粗品多肽,加入体积比1:3=乙腈:dd水的混合溶液溶解,取0.5mg样品在C18反相色谱制备系统收集目标峰溶液,设置HPLC参数:Wavelength:210nm和254nm;Flow Rate:3mL/min;Inj.Vol:1mL;Column Temp:25℃;A相:0.1%TFA水溶液;B相:乙腈。将目标峰溶液进行冻干,得到化合物a,其为FAP-2286前体,-20℃保存。

[0081] 实施例2化合物b和b1-b4的合成



[0082]



[0083] S1: 将0.5g取代度为0.336mmol/g的树脂H-Cys(Trt)-2-Chlorotriptyl Resin放入多肽合成仪(CS Bio,CS336X)中,设定程序;

[0084] S2: 树脂溶胀: 反应瓶内加入DMF约10mL, 震荡30min;

[0085] S3: 脱保护2次, 每次加入20%哌啶的DMF溶液(10mL)并反应15min, 然后DMF冲洗树脂3次, DCM冲洗树脂3次;

[0086] S4: 接第一个氨基酸Fmoc-L-Lys(Boc)-OH: 加入Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, 基于氨基酸4倍摩尔量的HBTU以及8倍摩尔量的DIEA, 缩合3h, DMF冲洗树脂3次, DCM冲洗树脂3次;

[0087] S5: 重复S3~S4, 依次连接Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Met-OH;

[0088] S6: 脱保护2次, 每次加入含20%体积哌啶的DMF溶液(10mL)并反应15min, DMF冲洗树脂3次, DCM冲洗树脂3次;

[0089] S7: 去除溶剂, 在程序最后一个XX1中, 放入提前配制的4倍摩尔量tBu-DOTA的DMF溶液进行缩合;

[0090] S7: 切树脂: 除去溶剂, 加入体积比为TFA:TIS:EDT:ddH₂O=95%:2.5%:1.25%:1.25%裂解液, 反应3h;

[0091] S8: 切割完成, 旋转蒸发仪旋去溶剂得到溶解在TFA中的粗肽;

[0092] S7: 多肽的沉淀: 将溶解在TFA中的粗肽转移到离心管中, 向其中加入10倍的冰乙醚, 然后离心机4℃8000g去除溶剂, 得到沉淀出的粗肽;

[0093] S8: 取10mg粗品多肽, 加入体积比1:3=乙腈:dd水的混合溶液溶解, 取0.5mg样品在C18反相色谱制备系统收集目标峰溶液, 设置HPLC参数: Wavelength: 210nm和254nm; Flow Rate: 3mL/min; Inj. Vol: 1mL; Column Temp: 25℃; A相: 0.1% TFA水溶液, B相: 乙腈。将目标峰溶液进行冻干, 得到化合物b, -20℃保存。

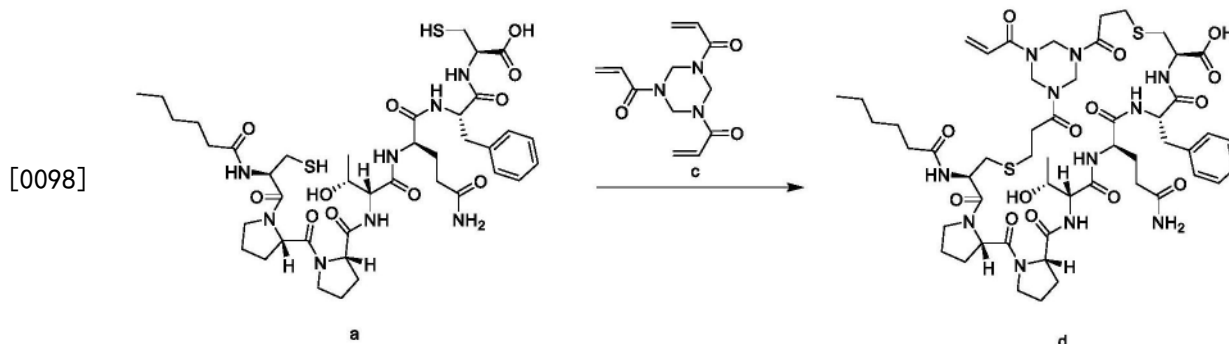
[0094] 除了在步骤S5中将要连接的氨基酸替换为下表1中的氨基酸以外, 以相同的方法得到化合物b1至b4。

[0095] 表1

化合物	氨基酸
-----	-----

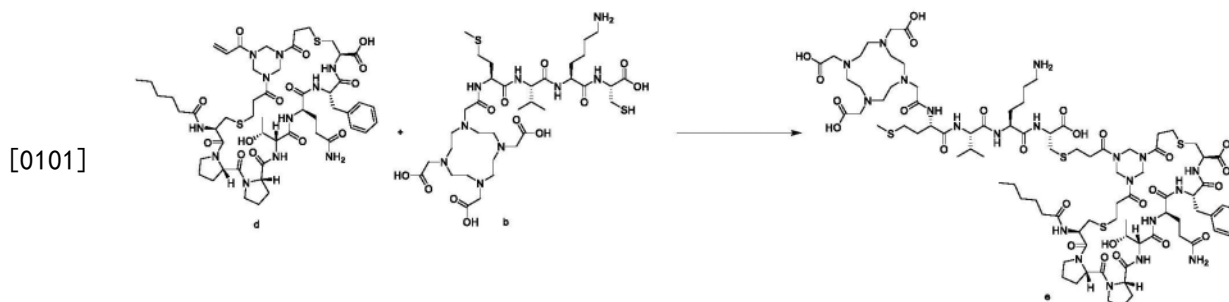
b1	Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Nle-OH
b2	Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Gly-OH
b3	Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Gly-OH
b4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Gly-OH

[0097] 实施例3化合物d的合成



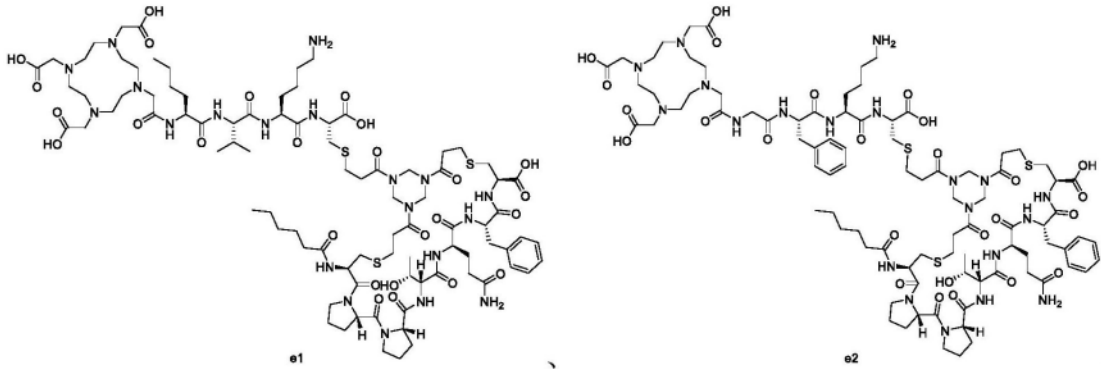
[0099] 将化合物a (3mg, 3.363 μ mol) 与化合物c (1mg, 4.036 μ mol) 溶解于乙腈和dd水的混合溶液中, 加入饱和碳酸氢钠调节pH至8左右, 室温反应3小时, 甲酸淬灭, 氮吹浓缩除去多余溶剂, 在C18反相色谱制备系统收集目标峰溶液, 设置HPLC参数: Wavelength: 210nm和254nm; Flow Rate: 3mL/min; Inj. Vol: 1mL; Column Temp: 25 $^{\circ}$ C; 流动相A: 0.1% TFA水溶液; 流动相B: 乙腈, 得化合物d。

[0100] 实施例4化合物e和e1至e4的合成

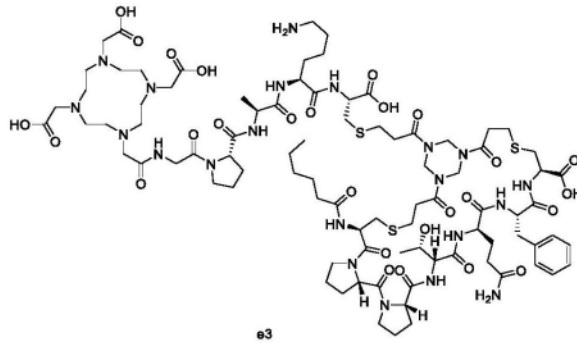


[0102] 将化合物d (1mg, 0.876 μ mol) 与化合物b (0.8mg, 0.876 μ mol) 溶解于500 μ L乙腈和500 μ L dd水中, 加入饱和碳酸氢钠调节pH至8左右, 室温反应过夜, 甲酸淬灭, 浓缩除去溶剂, 在C18反相色谱制备系统收集目标峰溶液, 设置HPLC参数: Wavelength: 210nm和254nm; Flow Rate: 3mL/min; Inj. Vol: 1mL; Column Temp: 25 $^{\circ}$ C; 流动相A: 0.1% TFA水溶液, 流动相B: 乙腈, 得化合物e。

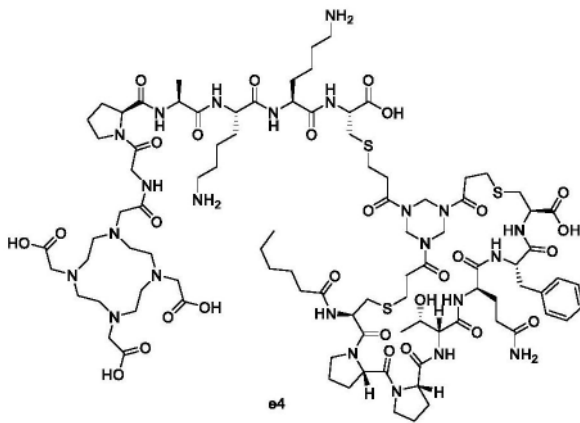
[0103] 除了使用化合物b1至b4分别代替化合物b以外, 以相同的方法合成化合物e1至e4。



[0104]

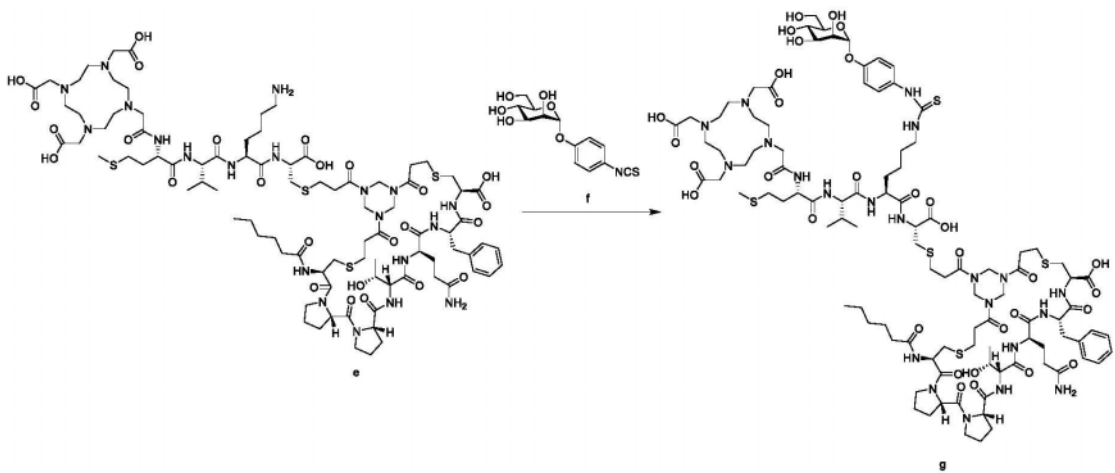


[0105]



[0106] 实施例5化合物g和g1-10的合成

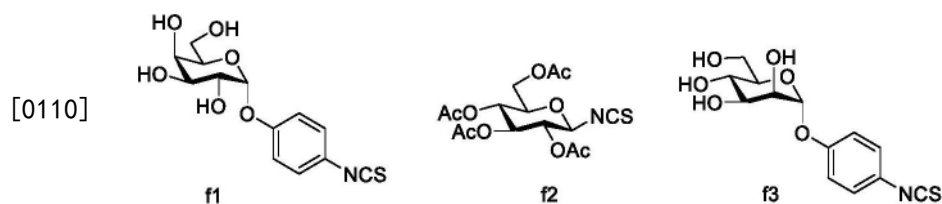
[0107]



[0108] 将化合物e (0.5mg, 0.249 μ mol) 与化合物f (0.234mg, 0.747 μ mol) 溶解于DMF中, 加入DIEA (0.161mg, 1.245mmol), 室温反应过夜, 加水稀释, 在C18反相色谱制备系统收集目

标峰溶液,设置HPLC参数:Wavelength:210nm和254nm;Flow Rate:3mL/min;Inj.Vol:1mL; Column Temp:25°C;流动相A:0.1%TFA水溶液,流动相B:乙腈,得化合物g。

[0109] 按照下表2将化合物e换成化合物e1-e4,将化合物f换成以下f1,f2或f3,以相同的方法得到相应的化合物g1-g10。



[0111] 表2

化合物	原料
g1	e1+f2
g2	e1+f1
g3	e2+f2

g4	e2+f1
g5	e2+f3
g6	e3+f2
g7	e3+f1
g8	e3+f3
g9	e4+2 个 f1
g10	e4+2 个 f3

[0114] 表3显示上述合成的化合物的MALDI-TOF数据。

[0115] 表3

化合物	理论计算值	MALDI-TOF 值
a	892.4	893.7
b	865.4	866.4
b1	847.5	848.8
b2	839.4	840.8
b3	860.4	861.9
b4	988.8	990.4
d	1141.5	1143.7
e	2007.0	2009.6
e1	1990.0	1991.5
e2	1982.0	1983.1
e3	2003.0	2003.9
e4	2131.0	2132.2
g	2321.0	2322.0
g1	2379.0	2380.1
g2	2303.0	2304.3
g3	2371.0	2372.5
g4	2295.0	2297.0
g5	2295.0	2296.5
g6	2392.0	2393.9
g7	2316.0	2317.2
g8	2316.0	2317.0
g9	2757.1	2758.3
g10	2757.1	2758.3

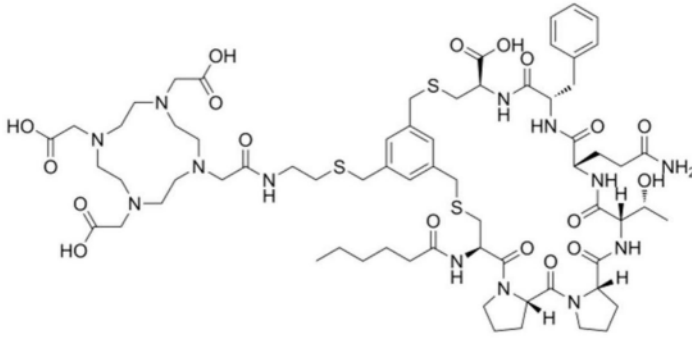
[0116]

[0117]

[0118] 对比例1FAP-2286

[0119] 以已知的FAP-2286 (购自MedChemExpress) 作为对比例。

[0120]



FAP-2286

[0121] 实施例6 ^{68}Ga 标记的化合物的制备

[0122] 通过如下方法分别以化合物g、g4和FAP-2286作为前体化合物制备放射性标记化合物 ^{68}Ga -g、 ^{68}Ga -g4和 ^{68}Ga -FAP-2286。

[0123] S1:取溶解于dd水中的前体化合物1uL(浓度为10ug/uL)于ep管中,加入180 μL 的3M的醋酸钠以调节pH;

[0124] S2:加入400uL的3M放射性 ^{68}Ga 于ep管中95 $^{\circ}\text{C}$ 反应10min;

[0125] S3:反应结束后进行纸层析检测纯度,展开剂为甲醇:1M甲酸铵=1:1,若纯度未达到90%以上,则用Sep-Pak C18小柱进行纯化,具体操作为:先用20mL的无水乙醇活化,再用20mL dd水润洗一次,将放射性样品上样,然后用75%的乙醇进行洗脱,弃掉前500uL的产物,每100uL为一管,测定放射性剂量,取放射性剂量最高的一管为 ^{68}Ga 标记的产物。

[0126] 实施例7 ^{68}Ga 标记的化合物在胶质母细胞瘤模型U87中的PET成像方法

[0127] 使用实施例6制备的 ^{68}Ga -g4和 ^{68}Ga -FAP-2286作为放射性标记化合物进行成像实验。

[0128] 将约150 μCi 放射性标记化合物经尾静脉注射到胶质母细胞瘤模型(U87细胞)的小鼠中,等10min后,将小鼠用异氟烷进行麻醉,将麻醉状态的小鼠放入西门子小鼠Pet/CT仪进行10min的CT扫描和15min的PET扫描。

[0129] 结果分别见图1和2。图1显示注射 ^{68}Ga -FAP-2286后30min、1h和2h的成像图,图2显示注射 ^{68}Ga -g4后30min、1h和2h的成像图。对比图1-2的结果可以看出,与 ^{68}Ga -FAP-2286相比, ^{68}Ga -g4在30min时的PET/CT成像显示肿瘤摄取更高,肝脏摄取更低;其次,由于 ^{68}Ga -g4代谢比 ^{68}Ga -FAP-2286更快,能更好地减少在放射性在体内的损伤。

[0130] 通过使用软件对成像结果图进行直接定量得到放射性标记化合物的摄取率,结果见表4。

[0131] 表4肿瘤、肝脏和肾脏的摄取率

化合物	在肿瘤中的摄取率			在肝脏中的摄取率			在肾脏中的摄取率		
	注射	注射	注射	注射	注射	注射	注射	注射	注射
	30min	1h	2h	30min	1h	2h	30min	1h	2h
⁶⁸ Ga-FAP-2286	5.5%	4.9%	3.2%	13.9%	13.3%	14%	4.8%	4.1%	2%
⁶⁸ Ga-g4	6.8%	5.4%	2.3%	8.2%	6.8%	4.4%	4.8%	3.2%	1.4%

[0133] 由表4可知,本发明的⁶⁸Ga-g4在注射后在肿瘤中的摄取情况优于⁶⁸Ga-FAP-2286,且肝脏和肾脏摄取也更低,具有更好的成像结果,且能更好地减少在放射性在体内的损伤。

[0134] 实施例8SPR表面等离子共振测定亲和力Kd

[0135] 通过SPR表面等离子共振测定FAP蛋白与FAP-2286、化合物g、g1的亲和力Kd。

[0136] 实验在Biacore T200设备(通用电气)中,按照操作手册进行。芯片使用具有羧基表面的CM5系列芯片,经试验选定偶联条件为pH=5.5,再生条件为Glycine-HCl pH2.0,得到的亲和力数据见表5。

[0137] 表5

化合物	Kd (M)
FAP-2286	4.87E-08
g	1.61E-08
g1	2.27E-08

[0139] 表5结果表明化合物g,g1和FAP-2286的亲和力在同一个数量级上面,甚至优于FAP-2286,证明化合物g系列对人源的FAP蛋白有较好的亲和力。

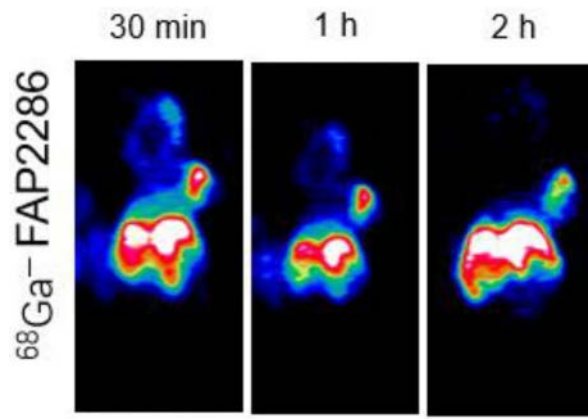


图1

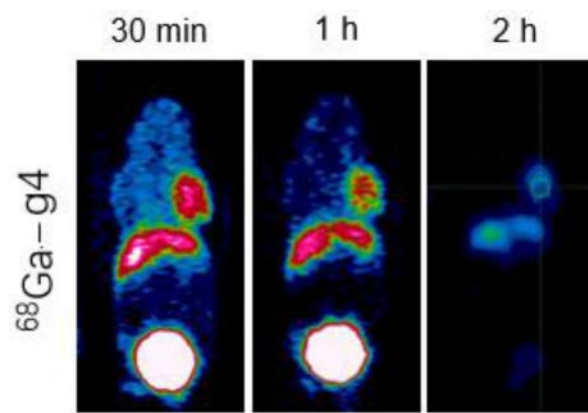


图2