



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114315975 A

(43) 申请公布日 2022.04.12

(21) 申请号 202210006846.0

(22) 申请日 2022.01.05

(71) 申请人 中南大学湘雅医院

地址 410008 湖南省长沙市开福区湘雅路
87号

(72) 发明人 周明 侯佳乐 胡硕 饶婉倩
向仕君 尹小琴

(74) 专利代理机构 长沙新裕知识产权代理有限公司 43210

代理人 刘熙

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

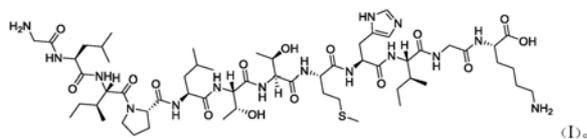
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

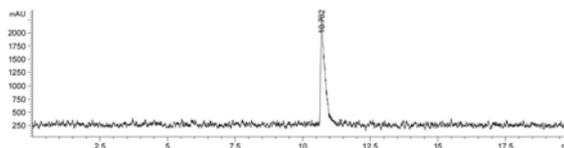
一种以TIM-3为靶点的PET分子探针及其应用

(57) 摘要

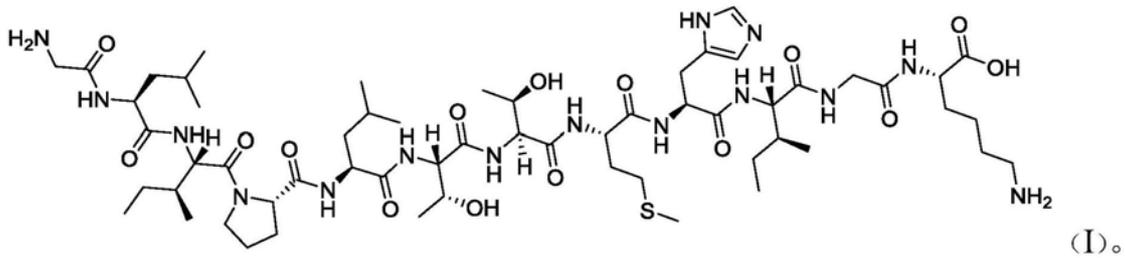
本发明涉及一种以TIM-3为靶点的PET分子探针,所述PET分子探针由放射性同位素、螯合基团、靶向分子以及连接体构成,所述靶向分子结构如式I所示:



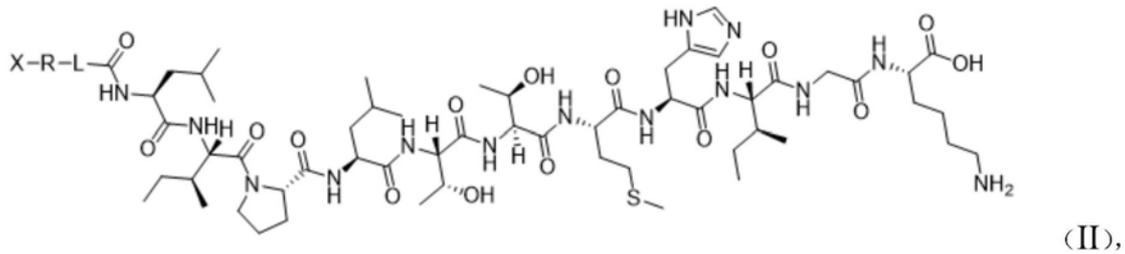
本发明能够对多种肿瘤微环境中的TIM-3表达水平进行活体显像,具有高特异性、高灵敏度的特点。



1. 一种以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,由放射性同位素、螯合基团、靶向分子以及连接体构成,所述靶向分子结构如式I所示:

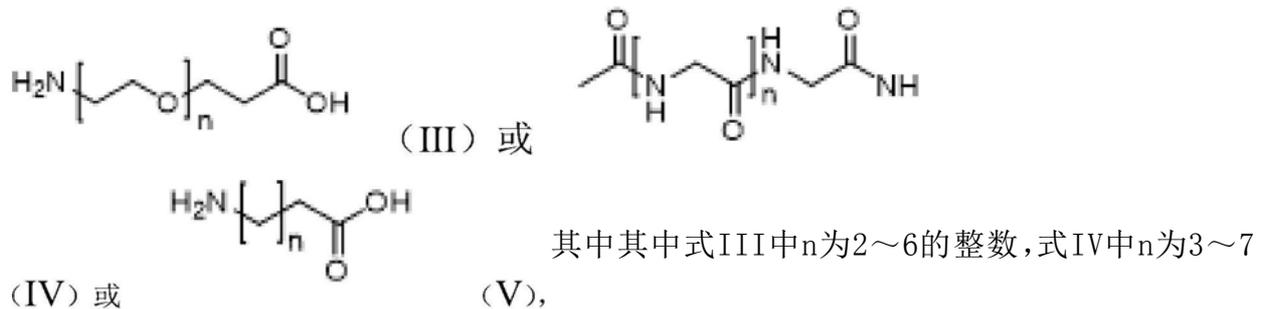


2. 根据权利要求1所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,所述PET分子探针的结构式如式II所述:



其中,L为所述连接体,R为所述螯合基团,X为所述放射性同位素。

3. 根据权利要求1所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,所述连接体包括



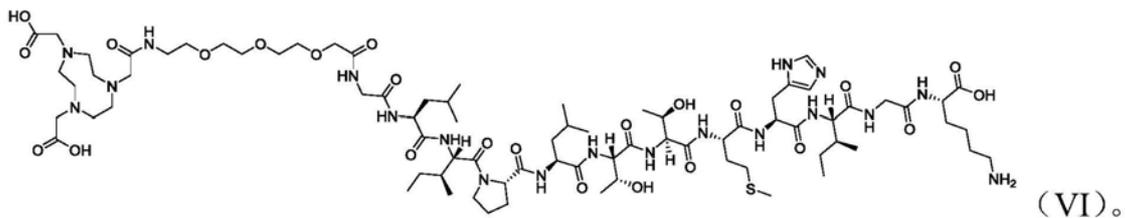
其中其中式III中n为2~6的整数,式IV中n为3~7

的整数,式V中n为4~8的整数。

4. 根据权利要求1所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,所述螯合基团包括包括NOTA或DOTA或DTPA。

5. 根据权利要求1所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,所述放射性同位素选自以下任意一种⁶⁸Ga、¹⁸F、¹⁷⁷Lu、⁸⁹Zr、⁶⁴Cu、^{99m}Tc中的一种。

6. 根据权利要求1所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,其特征在于,所述PET分子探针的标记前体化合物结构式如式VI所述:



7. 一种如权利要求1~6任一所述的PET分子探针的制备方法,其特征在于,将所述靶向分子、连接体与螯合基团构建成的前体化合物后与所述放射性同位素混合,在pH为4.0-

4.5、90~110℃下反应10min,即可获得PET分子探针。

8. 根据权利要求1~6任一所述的PET分子探针在制备PET成像剂中的应用。

9. 如权利要求1~6任一项所述的PET分子探针在制备检测TIM-3表达水平、诊断TIM-3相关疾病的试剂中的应用。

10. 如权利要求1~6任一项所述的PET分子探针在评价免疫药物治疗TIM-3相关疾病的效果中的应用,所述TIM-3相关疾病黑黑色素瘤、肝癌、结肠癌、胰腺癌、淋巴瘤以及其他能影响TIM-3表达变化的肿瘤。

一种以TIM-3为靶点的PET分子探针及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及影像分子探针技术领域,具体涉及一种以TIM-3为靶点的PET分子探针及其应用。

背景技术

[0002] T淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3,TIM-3)是一类T细胞表面抑制性分子。TIM-3主要在产生IFN- γ 的T细胞、FoxP3⁺Treg细胞和先天免疫细胞如巨噬细胞和树突细胞等细胞上表达。TIM-3主要通过调节T细胞衰竭作为关键的免疫检查点。同时,Tim-3可以作为共刺激受体来增强细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T-Lymphocyte,CTL)和其他免疫细胞反应。研究表明包含抗Tim-3和抗程序性死亡受体-1(programmed cell death-1,PD-1)或抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4,CTLA-4)抗体的联合免疫治疗可显著降低临床前环境中的肿瘤负担。目前,针对TIM-3或双重靶向TIM-3和其他免疫检查点(如PD-1或PD-L1)的抗体治疗正在进行临床研究。

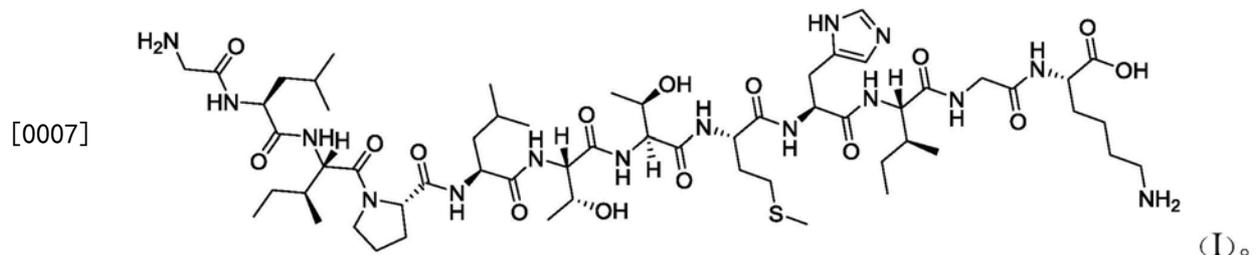
[0003] 活体显示肿瘤微环境中的TIM-3的表达水平可为以TIM-3为靶点的抑制药物的患者选择提供重要参考,同时可以实时检测体内TIM-3的表达情况,以便于临床可及时调整治疗方案。故提供一种能够对多种肿瘤微环境中的TIM-3表达水平进行高效、准确活体显像的分子探针具有重要临床应用价值。

发明内容

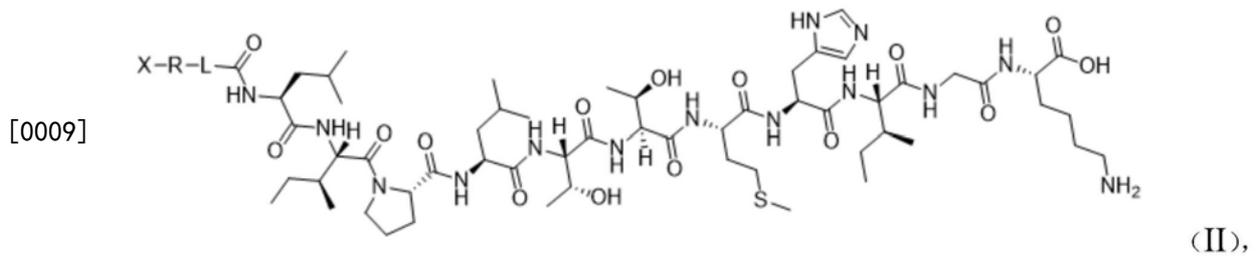
[0004] 本发明所解决的技术问题在于提供一种以TIM-3为靶点的能够对多种肿瘤微环境中的TIM-3表达水平进行高效、准确活体显像的PET分子探针及其应用。

[0005] 本发明所解决的技术问题采用以下技术方案来实现:

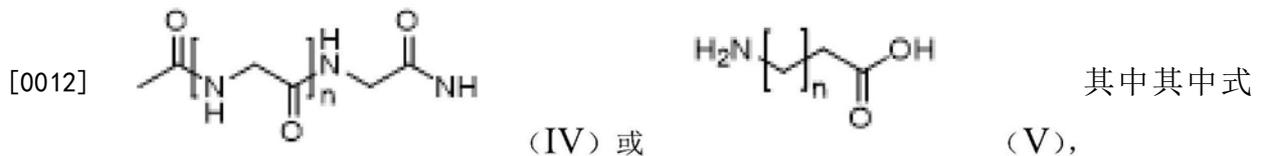
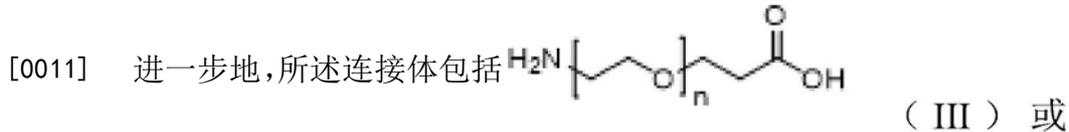
[0006] 一种以TIM-3为靶点的PET分子探针,由放射性同位素、螯合基团、靶向分子以及连接体构成,所述靶向分子结构如式I所示:



[0008] 进一步地,所述PET分子探针的结构式如式II所述:



[0010] 其中,L为所述连接体,R为所述螯合基团,X为所述放射性同位素。

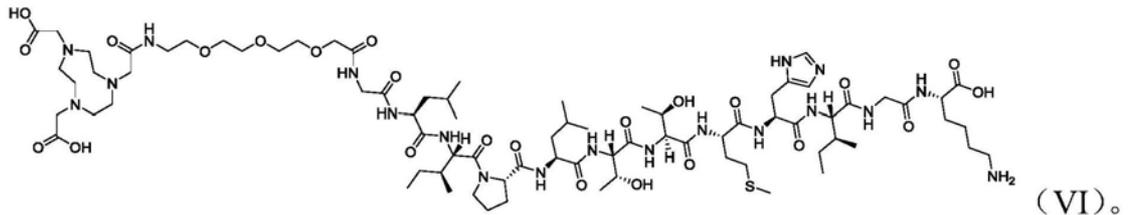


III中n为2~6的整数,式IV中n为3~7的整数,式V中n为4~8的整数。

[0013] 进一步地,所述螯合基团包括包括NOTA或DOTA或DTPA。

[0014] 进一步地,所述放射性同位素选至以下任意一种⁶⁸Ga、Al¹⁸F、¹⁷⁷Lu、⁸⁹Zr、⁶⁴Cu、^{99m}Tc中的一种。

[0015] 进一步地,所述PET分子探针的标记前体化合物结构式如式VI所述:



[0016] 进一步地,将所述靶向分子、连接体与螯合基团构建成的前体化合物后与所述放射性同位素混合,在pH为4.0-4.5、90~110℃下反应10min,即可获得PET分子探针。

[0017] 所述PET分子探针在制备PET成像剂中的应用。

[0018] 所述PET分子探针在制备检测TIM-3表达水平、诊断TIM-3相关疾病的试剂中的应用。

[0019] 所述PET分子探针在评价免疫药物治疗TIM-3相关疾病的效果中的应用,所述TIM-3相关疾病黑黑色素瘤、肝癌、结肠癌、胰腺癌、淋巴瘤以及其他能影响TIM-3表达变化的肿瘤。

[0020] 有益效果:本发明所述的该PET分子探针能够很好的对多种肿瘤微环境中的TIM-3表达水平进行活体显像,不仅可以用于多种肿瘤微环境中的TIM-3表达检测,还能协助免疫抑制剂进行免疫治疗时的疗效评价,并为治疗选择提供实时参考。本发明应用于PET成像剂后可用于非入侵的无创检测,并且能活体全身实时显像,具有高特异性、高灵敏度的特点。

附图说明

[0021] 图1为实施例1中⁶⁸Ga-NOTA-GK12放射化学纯度HPLC图。

[0022] 图2为实施例1中⁶⁸Ga-NOTA-GK12分子探针的小鼠PET成像图。

[0023] 图3为实施例2中A1¹⁸F-NOTA-GK12放射化学纯度HPLC图。

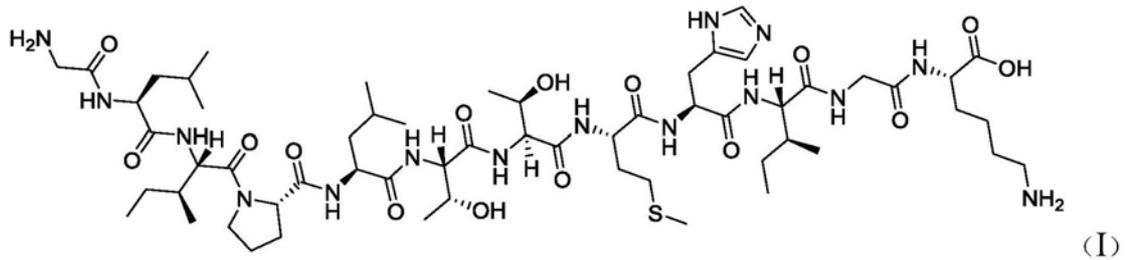
[0024] 图4为实施例2中A1¹⁸F-NOTA-GK12分子探针的小鼠PET成像图。

具体实施方式

[0025] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体实施例进一步阐述本发明。

[0026] 实施例1

[0027] (一) 本实施例所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,由放射性同位素、螯合基团、靶向分子以及连接体组成,所述靶向分子结构如式I所示:

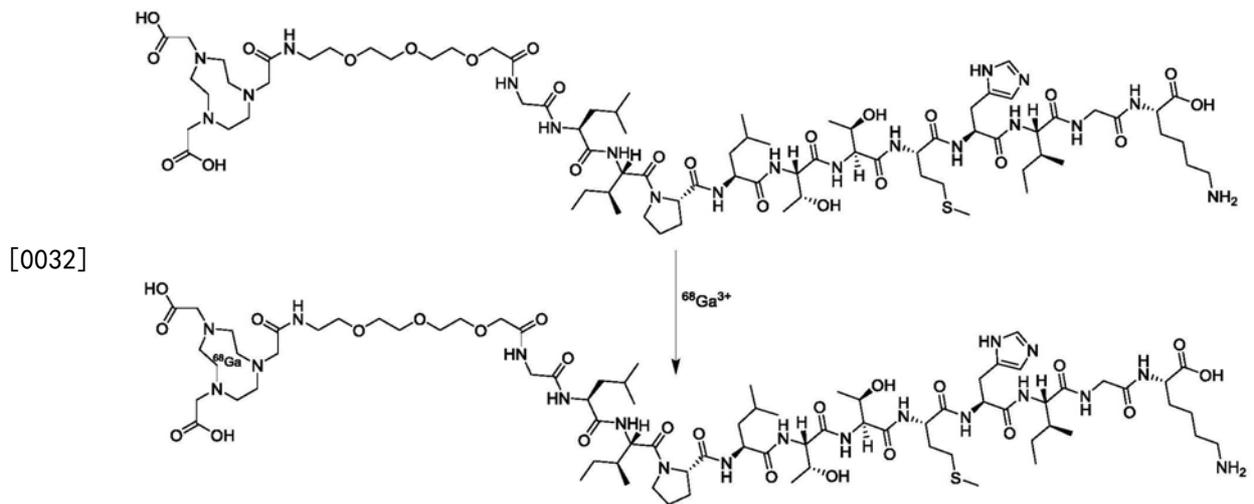


[0028] 所述连接体为PEG₃,结构式为:

[0029] 所述螯合基团为NOTA:

[0030] 所述放射性同位素为⁶⁸Ga;

[0031] 合成路线为:



[0033] 反应时将所述靶向分子、连接体、螯合基团构建成的前体化合物与所述放射性同位素混合,在pH为4.0-4.5、90~110℃下反应10min,即可获得PET分子探针。

[0034] 具体标记步骤为:

[0035] 1) 向含有30μg前体化合物 (NOTA-GK12) 的EP管中加入1mL 0.25M NaOAc水溶液,混匀;

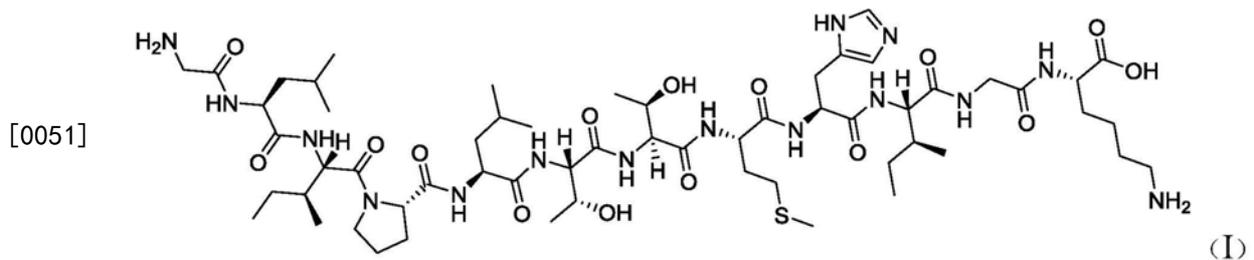
[0036] 2) NOTA-GK12溶液转移至20mL反应管中;

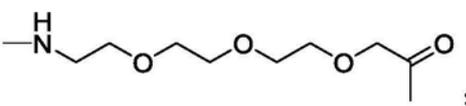
[0037] 3) 用4mL 0.05M HCl将⁶⁸Ga淋洗至反应管中,放射性活度约为30-35mCi;

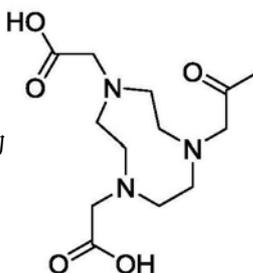
- [0038] 4) 在反应管中,90℃的条件下反应10min;
- [0039] 5) 加入10mL去离子水淬灭反应;
- [0040] 6) 反应体系过C18 Plus柱进行富集,并用10mL去离子水清洗C18 Plus柱;
- [0041] 7) 依次用1mL乙醇和10mL生理盐水将产物淋洗至装有滤膜产品瓶中,形成⁶⁸Ga-NOTA-GK12产品注射液,放射性活度为24.8mCi;
- [0042] 8) ⁶⁸Ga-NOTA-GK12产品注射液进行HPLC纯度分析:流动相A为含0.1%TFA的蒸馏水,流动相B为含0.1%TFA的乙腈,色谱柱为ZORBAX SB-C18。洗脱方式为梯度洗脱(0-2min:5%乙腈;3-20min:90%乙腈),产品出峰时间为10min左右,纯度99%。
- [0043] 得到的PET分子探针的放化纯度HPLC结果如图1所示。
- [0044] (二) 将得到的PET分子探针进行活体成像试验。
- [0045] 1、购买40只C57小鼠,随机分为四组,每组10只小鼠,其中一组作为对照组,正常养殖,另外三组作为实验组,实验组分别构建皮下黑色素瘤B16模型,胰腺癌PANC02模型和结直肠癌CT模型,肿瘤大小为0.5cm左右时作为模型鼠备用。
- [0046] 2、模型鼠尾静脉注射⁶⁸Ga-NOTA-GK12(0.1-0.2mCi);
- [0047] 3、30min后进行小动物PET/CT显像,结果如图1所示,可以发现在30min时即可清洗观察到小鼠的肿瘤位置,说明本发明所述的分子探针能够快速在肿瘤部分聚集,且对比度高,且在持续较长的时间内可观察到肿瘤细胞的聚集情况,说明探针对肿瘤的靶向性较好。
- [0048] 4、数据分析获取肿瘤部位的SUV值,其中⁶⁸Ga-NOTA-GK12探针在黑色素瘤B16模型、胰腺癌PANC02模型和结直肠癌CT26模型中肿瘤摄取SUV值分别为4.6±1.3、6.1±0.9和4.9±1.1,表明⁶⁸Ga-NOTA-GK12能较好的对多种肿瘤模型中的TIM-3表达量进行定量分析检测,且有较高的对比度。

[0049] 实施例2

- [0050] (一) 本实施例所述的以TIM-3为靶点的PET分子探针,由放射性同位素、靶向分子以及连接所述放射性同位素和所述靶向分子的连接体组成,所述靶向分子结构如式I所示:

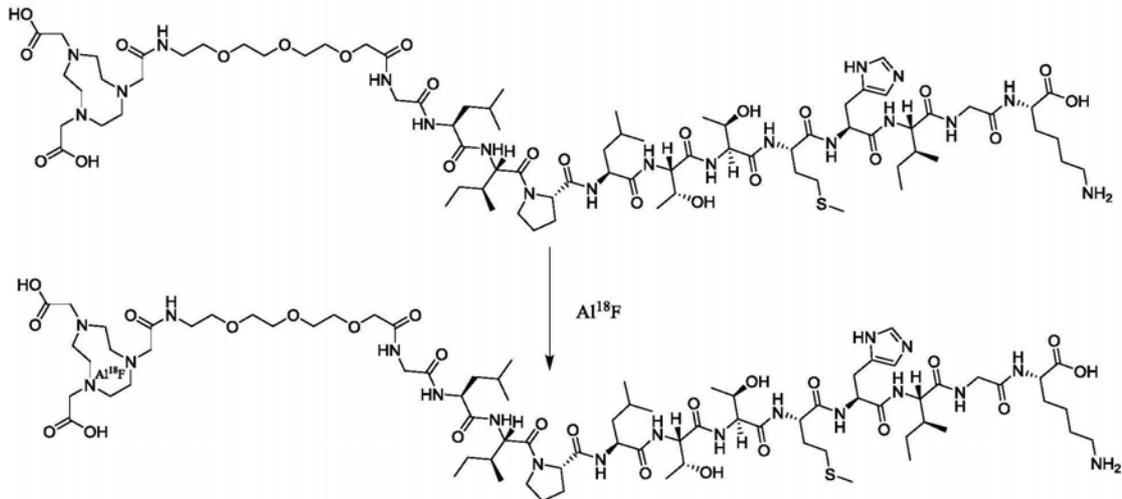


- [0052] 所述连接体为PEG₃,结构式为  ;

- [0053] 所述螯合基团为NOTA,结构式为 

[0054] 所述放射性同位素为 $Al^{18}F$;

[0055] 合成路线为:



[0056]

[0057] 反应时将所述靶向分子、连接体、螯合基团构建成的前体化合物与所述放射性同位素混合,在pH为4.0-4.5、90~110℃下反应10min,即可获得PET分子探针。

[0058] 具体标记步骤为:

[0059] 1) GE公司Qilin回旋加速器生产 ^{18}F (300mCi) 并经过管道传输至阴离子交换柱QMA (QMA[®]READI-CLING[™]型柱进行捕获,用N₂将QMA吹干;

[0060] 2) 反应管中提前加入300ug前体化合物,1.0ml乙腈和0.03ml 0.4M $AlCl_3$ 溶液和0.5mL pH=4.0的醋酸buffer;

[0061] 3) 0.3mL 0.9%NaCl将 ^{18}F 淋洗至反应管淋洗至反应管中,得200-250mCi;

[0062] 4) 在反应管中,110℃的条件下反应10min;

[0063] 5) 加入5mL去离子水,HPLC纯化收集产物峰(80-120mci);

[0064] 6) 产品溶液过C18Plus柱进行富集,然后依次用2mL乙醇和10mL生理盐水进行淋洗,并将淋洗液过无菌过滤膜,得到最终显像剂注射液(^{18}F -A1F-NOTA-GK12),其放射性活度为50-60mCi;

[0065] 7) $Al^{18}F$ -NOTA-GK12产品注射液进行HPLC纯度分析:流动相A为含0.1%TFA的蒸馏水,流动相B为含0.1%TFA的乙腈,色谱柱为ZORBAX SB-C18。洗脱方式为梯度洗脱(0-2min:5%乙腈;3-20min:90%乙腈),产品出峰时间为10.645min左右,纯度为99%。

[0066] 得到的PET分子探针的放化纯度HPLC结果如图3所示。

[0067] (二) 将得到的PET分子探针进行活体成像试验。

[0068] 1、购买40只C57小鼠,随机分四组,每组10只小鼠,其中一组作为对照组,正常养殖,另外三组作为实验组,实验组分别构建皮下黑色素瘤B16模型,胰腺癌PANC02模型和结肠癌CT模型,肿瘤大小为0.5cm左右时作为模型鼠备用。

[0069] 2、模型鼠尾静脉注射 $Al^{18}F$ -NOTA-GK12 (0.1-0.2mCi);

[0070] 3、30min后进行小动物PET/CT显像,结果如图4所示,可以发现实验组在30min时即可清晰观察到小鼠的肿瘤位置,说明本发明所述的分子探针能够快速在肿瘤部分聚集,且对比度高,且在持续较长的时间内可观察到肿瘤细胞的聚集情况,说明探针对肿瘤的靶向性较好。

[0071] 4、数据分析获取肿瘤部位的SUV值,其中 ^{68}Ga -NOTA-GK12探针在黑色素瘤B16模型、胰腺癌PANC02模型和结直肠癌CT26模型中肿瘤摄取SUV值分别为 5.6 ± 1.3 、 6.5 ± 0.9 和 4.5 ± 1.1 ,表明 Al^{18}F -NOTA-GK12能较好的对多种肿瘤模型中的TIM-3表达量进行定量分析检测,且有较高的对比度。

[0072] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

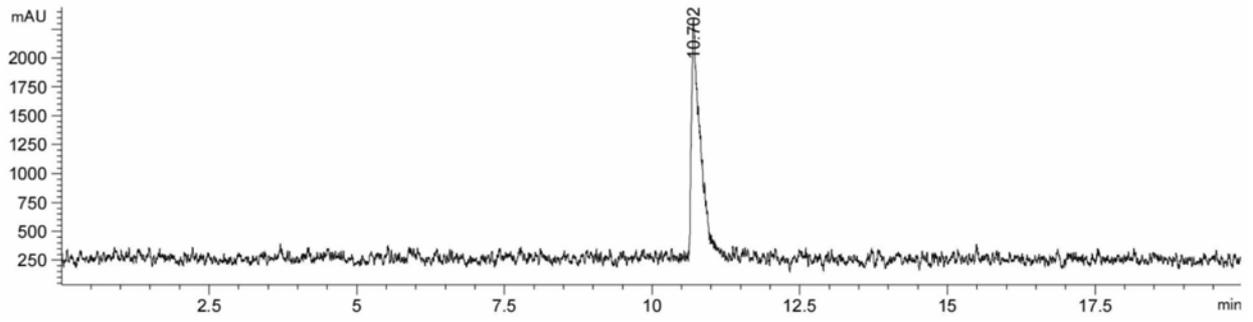


图1

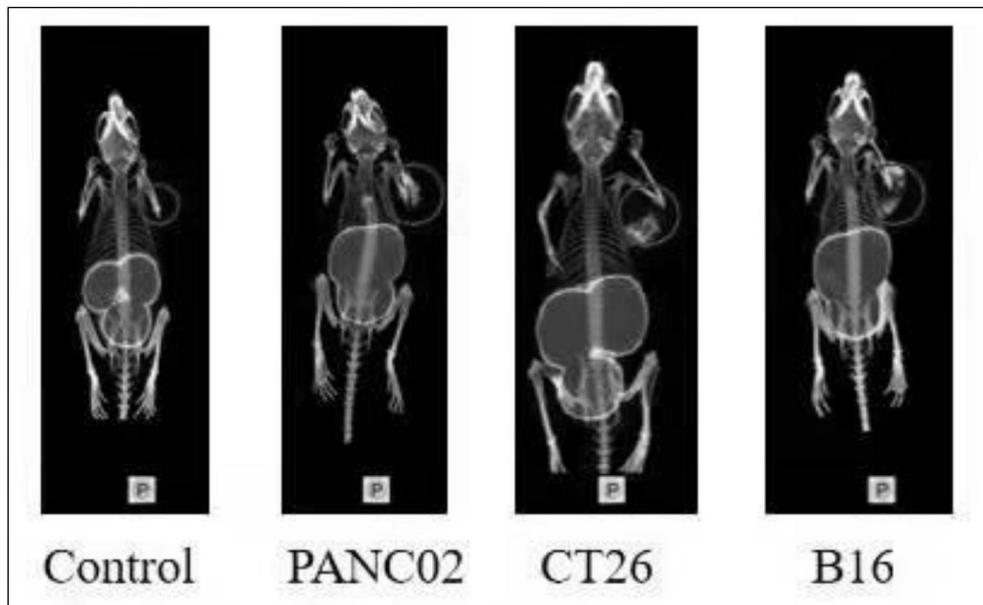


图2

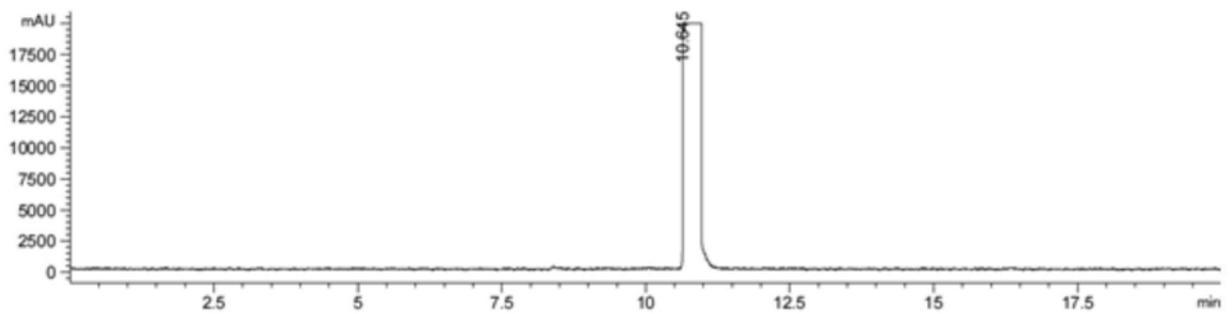


图3

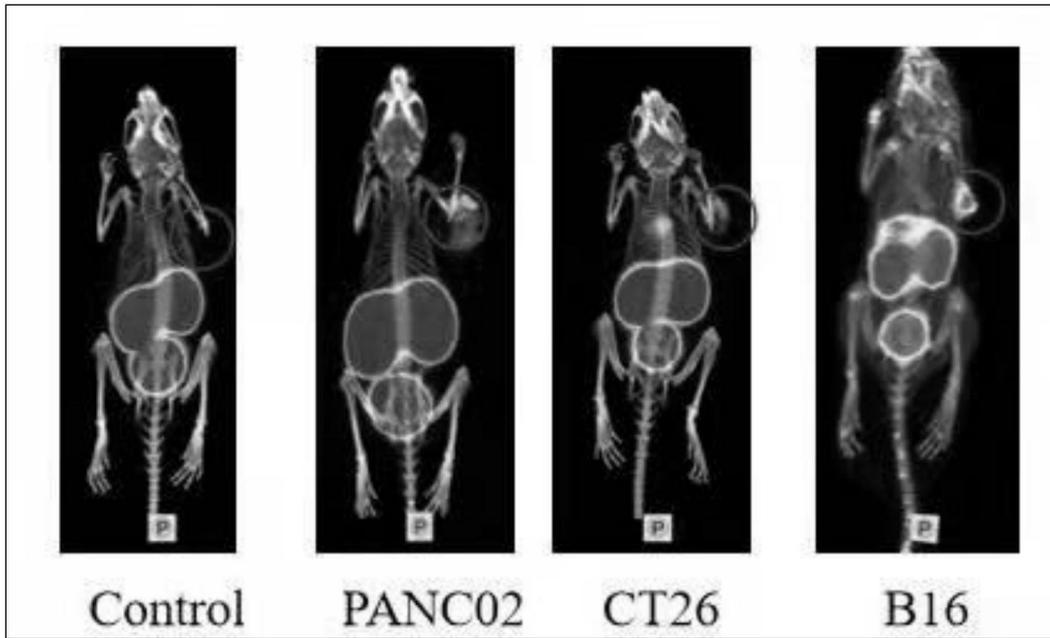


图4