



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114790194 B

(45) 授权公告日 2024.03.26

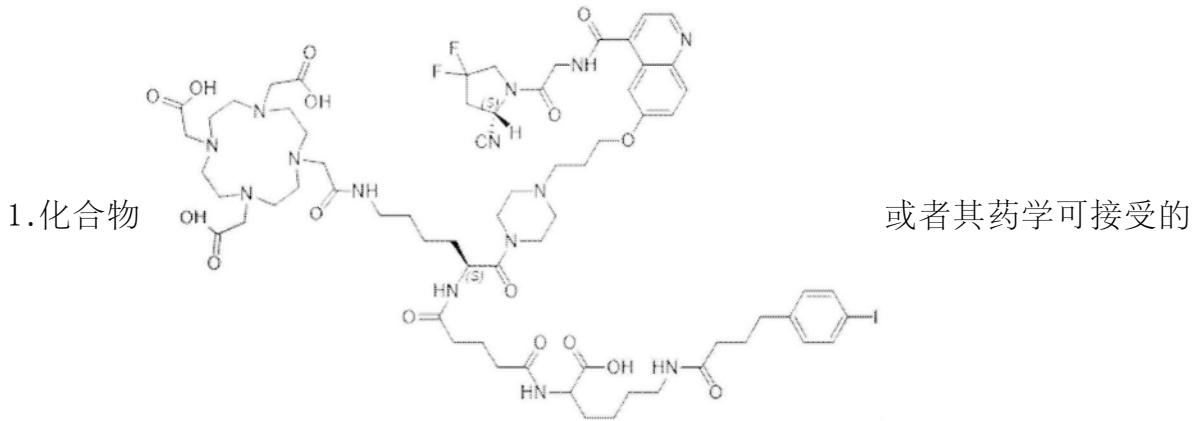
(21) 申请号 202011519183.X	A61K 51/04 (2006.01)
(22) 申请日 2020.12.21	A61P 35/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61P 9/10 (2006.01)
申请公布号 CN 114790194 A	A61P 17/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2022.07.26	A61P 17/02 (2006.01)
(73) 专利权人 苏州药明博锐生物科技有限公司	C07B 59/00 (2006.01)
地址 215500 江苏省苏州市常熟高新技术	A61K 103/00 (2006.01)
产业开发区贤士路88号6幢801	A61K 103/32 (2006.01)
(72) 发明人 刘志博 徐梦欣 陈俊艺	A61K 103/30 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所	(56) 对比文件
11105	CN 111699181 A, 2020.09.22
专利代理师 张文辉 金明钟	CN 112105354 A, 2020.12.18
(51) Int. Cl.	WO 2020205948 A1, 2020.10.08
C07D 401/14 (2006.01)	审查员 薛文君
A61K 31/496 (2006.01)	权利要求书1页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

成纤维细胞活化蛋白抑制剂

(57) 摘要

本公开提供通式(I)的化合物或者其药学可接受的盐、立体异构体或溶剂合物,其中C为螯合剂单元;AB为白蛋白结合单元;FAPI为成纤维活化蛋白抑制剂单元。本公开还提供上述化合物与放射性核素的螯合物、药物组合物以及它们作为成纤维细胞活化蛋白抑制剂用于诊断和治疗疾病的用途。C-AB-FAPI (I)。



盐、异构体。

2. 一种螯合物,其包含:

- (1) 权利要求1的化合物或者其药学可接受的盐、异构体;和
- (2) 放射性核素。

3. 权利要求2的螯合物,其中所述放射性核素选自: ^{18}F 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{139}La 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{149}Pm 、 ^{165}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{177}Lu 、 ^{47}Sc 、 ^{142}Pr 、 ^{159}Gd 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{72}As 、 ^{72}Se 、 ^{97}Ru 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 $^{101\text{m}}\text{Rh}$ 、 ^{119}Sb 、 ^{128}Ba 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{197}Hg 、 ^{211}At 、 ^{151}Eu 、 ^{153}Eu 、 ^{169}Eu 、 ^{201}Tl 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{198}Au 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 和 ^{199}Ag 。

4. 权利要求3的螯合物,其中所述放射性核素为 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 或 ^{177}Lu 。

5. 一种药物组合物,其包含或组成为:

至少一种根据权利要求2-4中任一项所述的螯合物,
任选地,和药学上可接受的辅料。

6. 根据权利要求2-4中任一项所述的螯合物或根据权利要求5所述的药物组合物在制备用于诊断或治疗在受试者中以成纤维细胞激活蛋白(FAP)过度表达为特征的疾病的试剂中的用途。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中以成纤维细胞激活蛋白(FAP)过度表达为特征的疾病选自癌症、慢性炎症、动脉粥样硬化、纤维化、组织重塑和瘢痕病。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中癌症选自乳腺癌、胰腺癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、肝细胞癌、食道癌、下咽癌、鼻咽癌、喉癌、骨髓瘤细胞、膀胱癌、胆管细胞癌、透明细胞肾癌、神经内分泌肿瘤、致癌性骨软化症、肉瘤、CUP(原发性未知癌)、胸腺癌、胶质瘤、星形细胞瘤、子宫颈癌和前列腺癌。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中癌症选自神经胶质瘤。

10. 一种试剂盒,其包含或组成为根据权利要求2-4中任一项所述的螯合物或根据权利要求5所述的药物组合物,以及用于诊断或治疗疾病的说明书。

成纤维细胞活化蛋白抑制剂

技术领域

[0001] 本公开涉及医疗和诊断领域,具体涉及抑制成纤维活化蛋白的化合物、螯合物、组合物及其用途。

背景技术

[0002] 肿瘤是威胁人们健康的第二大杀手。肿瘤不仅可以被认为是恶性细胞的集合,也可以被认为是基质细胞的集合,其中包括血管细胞、炎症细胞和成纤维细胞。在有纤维增生反应的肿瘤如乳腺癌、结肠癌和胰腺癌中,肿瘤中的间质可能会达到90%或以上。肿瘤间质中的一种被称为癌症相关成纤维细胞(CAFs)的成纤维细胞亚群,会参与肿瘤的生长、迁移和进展甚至对化学疗法产生抵抗和免疫抑制。

[0003] 肿瘤周围的肿瘤微环境(TME)在肿瘤的发生发展过程中起到了重要作用,TME以活化的成纤维细胞(CAFs)为核心。成纤维活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)是一种II型跨膜丝氨酸蛋白水解酶,属于二肽基肽酶(DPP)家族。FAP选择性地表达于90%以上的上皮恶性肿瘤的CAFs上,而在正常组织中几乎不表达,具有特殊的生物学特性和基因稳定性。FAP在多种肿瘤的微环境中广泛表达,因此可以靶向不同的肿瘤实体,包括胰腺癌,乳腺癌和肺癌,它们占实体瘤整体的很大一部分。因此FAP既可以作为肿瘤早期诊断的生物学标志物,又具有良好的靶向治疗生物学特性,有望在恶性肿瘤的临床诊断和治疗方面发挥重要作用。

[0004] 目前,对FAP的抑制剂研究尚不深入,第一个进入临床试验的FAP活性抑制剂为Talabostat,但其在各种癌症中表现出不充分的临床活性,因此没有继续进一步的发展。后来有研究者利用¹³¹I标记抗FAP的抗体sibrotuzumab进行肿瘤治疗研究,但存在低清除率和缺乏临床活性等缺陷。

[0005] 近两年来,德国海德堡大学Haberkorn,Uwe团队开发了一系列基于喹啉的小分子放射药物靶向FAP进行诊断和治疗,参见W02019154886A1。所生成的抑制剂能够快速且几乎完全的与人类和小鼠的FAP结合,重要的是,它与DPP家族成员DPP4没有交叉反应,因此为进一步的发展奠定了基础。通过将这种FAP抑制剂(FAPI)与螯合剂DOTA连接便形成了具有良好药代动力学特性的放射性核素示踪剂。整个示踪剂中最受关注的为FAPI-04,它对FAP有较高亲和力,示踪剂迅速从血液中清除,并被肾脏清除。这些特性使⁶⁸Ga-FAPI-04PET/CT的肿瘤显像具有高对比度和高灵敏度。但FAPI-04在体内的快速洗脱限制其在肿瘤核素治疗中的应用。因此在保留其优异靶向性并解决FAP抑制剂小分子的循环时间短的问题是尤为期望的。

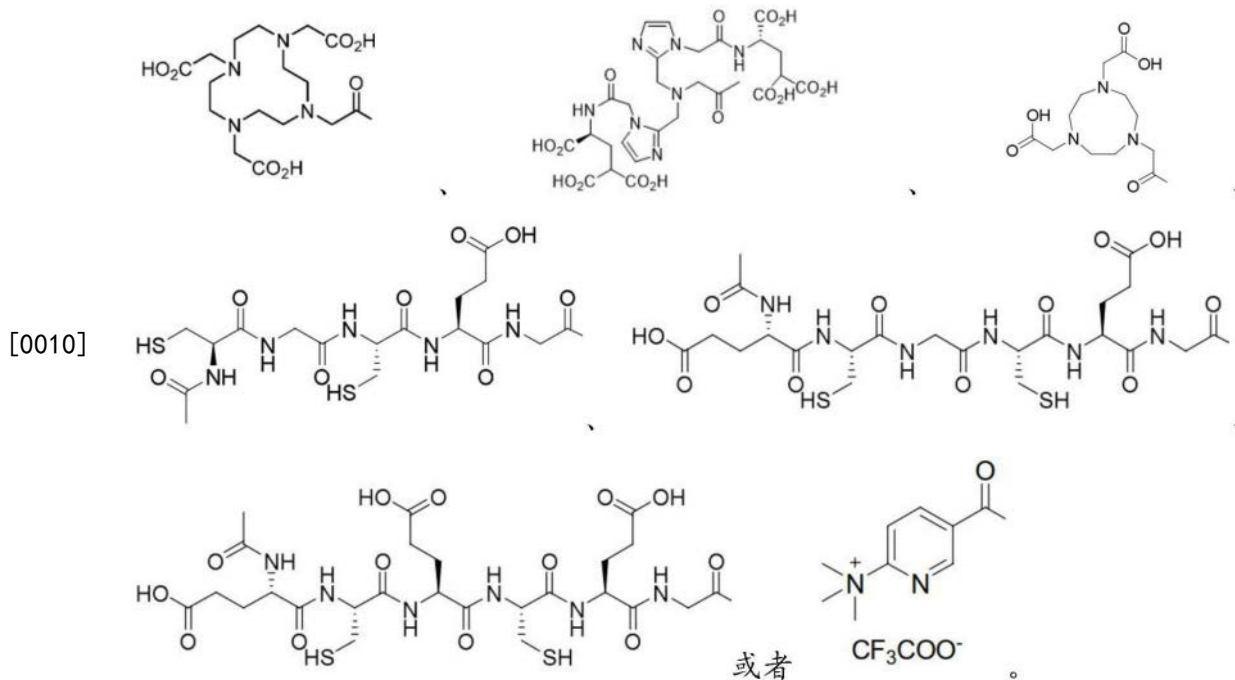
发明内容

[0006] 本公开的一个方面提供一种通式(I)的化合物或者其药学可接受的盐、异构体或溶剂合物,

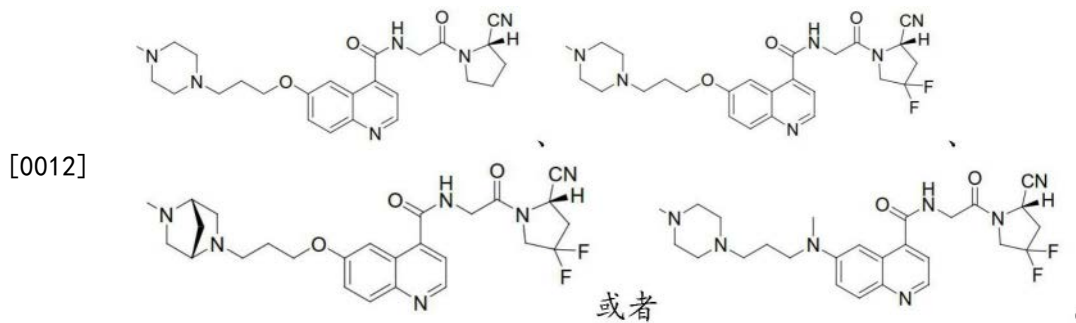
[0007] C-AB-FAPI (I)

[0008] 其中C为螯合剂单元;AB为白蛋白结合单元;FAPI为成纤维活化蛋白抑制剂单元。

[0009] 在一些实施方案中,通式(I)中的C单元选自:



[0011] 在一些实施方案中,通式(I)中的FAPI单元选自:



[0013] 在一些实施方案中,通式(I)中的AB单元包含4-碘-苯基末端基团。

[0014] 本公开的另一个方面提供一种螯合物,其包含上述式(I)化合物和放射性核素。

[0015] 本公开的再一个方面提供一种药物组合物,其包含或组成为:至少一种上述式(I)化合物,任选地和药学上可接受的辅料。

[0016] 本公开的又一个方面还提供上述螯合物或药物组合物的诊断或治疗用途以及试剂盒。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本公开实施例的技术方案,下面将对实施例的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅涉及本公开的一些实施例,而非对本发明的限制。

[0018] 图1示出了利用 ^{68}Ga -TEFAPI-06对健康鼠成像测定体内半衰期结果。

[0019] 图2示出了利用 ^{68}Ga -TEFAPI-06在胰腺癌PDX小鼠模型的PET成像结果。

[0020] 图3示出了利用 ^{86}Y -TEFAPI-06在胰腺癌PDX小鼠模型中的长时间PET成像结果。

[0021] 图4示出了TEFAPI-06在PDX胰腺癌小鼠中的竞争抑制实验结果。

[0022] 图5示出了利用¹⁷⁷Lu-TEFAPI-06对PDX胰腺癌小鼠治疗结果。

具体实施方式

[0023] 为使本公开实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本公开实施例的附图,对本公开实施例的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例是本公开的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于所描述的本公开的实施例,本领域普通技术人员在无需创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的 范围。

[0024] 本发明可在不偏离本发明基本属性的情况下以其它具体形式来实施。应该理解的是,在不冲突的前提下,本发明的任一和所有实施方案都可与任一其它实施方案或多个 其它实施方案中的技术特征进行组合以得到另外的实施方案。本发明包括这样的组合得 到另外的实施方案。

[0025] 本公开中提及的所有出版物和专利在此通过引用以它们的全部内容纳入本公开。如 果通过引用纳入的任何出版物和专利中使用的用途或术语与本公开中使用的用途或术 语 冲突,那么以本公开的用途和术语为准。

[0026] 本文所用的章节标题仅用于组织文章的目的,而不应被解释为对所述主题的限制。

[0027] 除非另有规定,本文使用的所有技术术语和科学术语具有要求保护主题所属领域的 通常含义。倘若对于某术语存在多个定义,则以本文定义为准。

[0028] 除非另有说明,当公开或要求保护任何类型的范围时,意图单独公开或要求保护 该 范围可有理由涵盖的各可能的数值,包括涵盖在其中的任何子范围。例如取代基个数为 1 至5表明该范围内的整数,其中1-5应理解包括1、2、3、4、5,也包括1-4和1-3的子 范围。

[0029] 本公开的说明书应该被解释为与化学键的法则和原理一致。在一些情况下,可能 为 了在给定的位置适应取代基而除去氢原子。

[0030] 本公开中使用的“包括”、“含有”或者“包含”等类似的词语意指出现该词前面的要 素涵 盖出现在该词后面列举的要素及其等同,而不排除未记载的要素。本文所用的术语 “含有”或“包括(包含)”可以是开放式、半封闭式和封闭式的。换言之,所述术语也包括“基 本上 由…组成”、或“由…组成”。

[0031] 术语“药学上可接受的”在本申请中是指:化合物或组合物在化学上和/或在毒理 学上 与构成制剂的其它成分和/或与用其预防或治疗疾病或病症的人类或哺乳动物相容。

[0032] 术语“受试者”或“患者”在本申请中包括人类和哺乳动物。

[0033] 在本申请的上下文中,除非作出相反的具体说明,术语“治疗”也可包括预防。

[0034] 术语“溶剂合物”在本申请中指的是通过组合式(I)化合物或其药学上可接受的盐 和溶 剂而形成的复合物。应理解的是,在诊断或治疗本申请所述的疾病或病症中使用的式 (I) 化合物的任何溶剂合物尽管可能提供不同的性质(包括药代动力学性质),但是一旦吸 收至 受试者中,会得到式(I)化合物,使得式(I)化合物的使用分别涵盖式(I)化合物的任 何溶剂 合物的使用。

[0035] 术语“水合物”指的是上述术语“溶剂合物”中溶剂为水的情形。

[0036] 应进一步理解,式(I)化合物或其药学上可接受的盐可以溶剂合物形式分离,并且

因此任何所述溶剂合物皆包括于本发明的范围内。例如,式(I)化合物或其药学上可接受的盐可以未溶剂化形式以及与药学上可接受的溶剂(诸如,水、乙醇等)形成的溶剂化形式存在。

[0037] 术语“药学上可接受的盐”是指本公开化合物的相对无毒的加成盐。例如,参见 S.M. Berge 等人“Pharmaceutical Salts”, J.Pharm.Sci.1977,66,1-19。

[0038] 本公开化合物的适合的药学上可接受的盐可以是例如在链或环中携带氮原子的具有足够碱性的本公开化合物的酸加成盐,例如与如下无机酸形成的酸加成盐:例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸或硝酸,或者与如下有机酸形成的酸加成盐:例如甲酸、乙酸、乙酰乙酸、丙酮酸、三氟乙酸、丙酸、丁酸、己酸、庚酸、十一烷酸、月桂酸、苯甲酸、水杨酸、2-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、樟脑酸、肉桂酸、环戊烷丙酸、3-羟基-2-萘甲酸、烟酸、扑酸、果胶酯酸、过硫酸、3-苯基丙酸、苦味酸、特戊酸、2-羟基乙磺酸、衣康酸、氨基磺酸、三氟甲磺酸、十二烷基硫酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、2-萘磺酸、萘二磺酸、樟脑磺酸、柠檬酸、酒石酸、硬脂酸、乳酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、己二酸、藻酸、马来酸、富马酸、D-葡萄糖酸、扁桃酸、抗坏血酸、葡庚酸、甘油磷酸、天冬氨酸、磺基水杨酸或硫氰酸。

[0039] 另外,具有足够酸性的本发明化合物的另一种适合的药学上可接受的盐是碱金属盐 例如钠盐或钾盐,碱土金属盐例如钙盐或镁盐,铵盐,或与提供生理学上可接受的阳离子的有机碱形成的盐,例如与如下物质形成的盐:N-甲基葡萄糖胺、二甲基葡萄糖胺、乙基葡萄糖胺、赖氨酸、二环己基胺、1,6-己二胺、乙醇胺、葡萄糖胺、肌氨酸、丝氨酸、三羟基 甲基氨基甲烷、氨基丙二醇、1-氨基-2,3,4-丁三醇。另外,碱性含氮基团可用如下试剂季 铵化:低级烷基卤化物,例如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;硫酸 二烷基酯,例如硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、硫酸二丁酯和硫酸二戊酯;长链卤化物例如 癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物;芳烷基卤化物如苄基和苯 乙基溴化物等。

[0040] 本领域技术人员还会认识到,所要求保护的化合物的酸加成盐可通过多种已知方法 中的任意一种使所述化合物与适当的无机酸或有机酸反应来制备。或者,本公开的酸性化合物的碱金属盐和碱土金属盐通过各种已知的方法使其与适当的碱反应来制备。

[0041] 本发明包括本公开化合物的所有可能的盐,其可为单一盐或所述盐的任意比例的任 意混合物。

[0042] 应理解,本申请所用的术语“本公开化合物”根据语境可包括:式(I)所示的化合物、其药学上可接受的盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、以及它们的混合物。

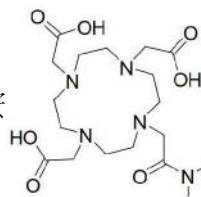
[0043] 本公开的化合物可包含一个或多个不对称中心,视期望的各种取代基的位置和性质 而定。不对称碳原子可以(R)或(S)构型存在,在具有一个不对称中心的情况下得到外消旋混合物,并且在具有多个不对称中心的情况下得到非对映异构体混合物。在某些情况下,由于围绕特定键的旋转受阻还可能存在不对称性,例如该中心键连接特定化合物的两个被取代的芳环。

[0044] 优选的化合物是那些能产生更期望的生物活性的化合物。本公开化合物的分离的、纯化的或部分纯化的异构体和立体异构体、或者外消旋混合物或非对映异构体混合物均 包括在本发明的范围内。此类物质的纯化和分离可通过本领域已知的标准技术实现。

[0045] 本公开针对通式(I)的化合物提及的“螯合剂单元”是指衍生自螯合剂的分子片

段。例如螯合剂单元是衍生自1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N,N'-四乙酸(DOTA)的分

子片段,其可以是通过DOTA的一个羧基形成酰胺而引入到通式(I)的化合物



中。

[0046] 本公开针对通式(I)的化合物提及的“成纤维活化蛋白抑制剂单元”是指衍生自成纤维活化蛋白抑制剂的分子片段。例如,当抑制剂是W02019154886A1的表1和表3中公开的FAPI系列化合物,“成纤维活化蛋白抑制剂单元”是该FAPI系列化合物中去除R⁸得到的分子片段。

[0047] 本公开针对通式(I)的化合物提及的“白蛋白结合单元”是指具有与白蛋白高亲和力的分子片段,并且该分子片段具有与螯合剂单元和成纤维活化蛋白抑制剂单元相连的基团。

[0048] 本公开针对通式(I)的化合物提及的“FAPI单元和C单元一起构成”并不是指在通式(I)的化合物中FAPI单元和C单元直接连接,而是指一种假象情形,即将通式(I)的化合物中的FAPI单元和C单元抽出来连接(去掉中间的白蛋白结合单元)。

[0049] 应该理解,在本公开中使用的单数形式(如“一种”)可包括复数指代,除非另有规定。

[0050] 除非另有指明,本公开采用分析化学、有机合成化学和配位化学的标准命名及标准实验室步骤和技术。除非另有说明,本公开采用质谱、元素分析的传统方法,各步骤和条件可参照本领域常规的操作步骤和条件。

[0051] 本公开所用试剂和原料是市售可得的或者可通过常规化学合成方法制得的。

[0052] 本文使用术语“任选”来描述某一情形是指该情形可发生也可不发生。例如,术语“任选取代的”是指为未取代的或者具有至少一个不破坏由未取代的类似物所拥有的性能的基团。例如,针对药物组合物,本文使用的表述“任选地,和药学上可接受的辅料”表示药学上可接受的辅料可存在于药物组合物中,也可以不存在于药物组合物中。

[0053] 本公开中,如无特殊说明,所述的“取代”的个数可为一个或多个;当为多个时,可为2个、3个或4个。并且,当所述的“取代”的个数为多个时,所述的“取代”可相同或不同。

[0054] 本公开中,“取代”的位置,如未做特别说明,位置可为任意。

[0055] 本文使用的术语“C₁-C₁₀烷基”是指含有1-10个碳原子的直链或支链烷烃链。例如,C₁-C₆烷基的代表性实例包括但不限于甲基(C₁)、乙基(C₂)、正丙基(C₃)、异丙基(C₃)、正丁基(C₄)、叔丁基(C₄)、仲丁基(C₄)、异丁基(C₄)、正戊基(C₅)、3-戊烷基(C₅)、新戊基(C₅)、3-甲基-2-丁烷基(C₅)、叔戊基(C₅)和正己基(C₆)等。术语“低级烷基”是指具有1至4个碳原子的直链或支链烷基。“经取代的烷基”指在任何可用连接点处经一个或多个取代基优选1至4个取代基取代的烷基。术语“卤代烷基”是指具有一个或多个卤素取代基的烷基,其包括但不限于如-CH₂Br、-CH₂I、-CH₂Cl、-CH₂F、-CHF₂及-CF₃那样的基团。

[0056] 本文使用的术语“亚烷基”是指如以上就“烷基”所述但具有两个连接点的二价烃基。例如,亚甲基为-CH₂-基团,亚乙基为-CH₂-CH₂-基团。

[0057] 本文使用的术语“烷氧基”及“烷基硫基”指分别经由氧键(-O-)或硫键(-S-)连接

的如上所述的烷基。术语“经取代的烷氧基”及“经取代的烷基硫基”指分别经由氧键或硫键连接的经取代的烷基。“低级烷氧基”为基团OR,其中R为低级烷基(含有1至4个碳原子的烷基)。

[0058] 本文使用的术语“卤素”是指氟、氯、碘或溴。

[0059] 白蛋白作为药物载体的应用已越来越广泛,常被用来改善药物的血流动力学特性,从而提高血流半衰期。白蛋白是人体血浆中含量最丰富的蛋白质,承担着体内各种贮存和运输工作。与正常组织相比,肿瘤组织的血管丰富、血管内皮间隙较大,白蛋白作为大分子物质,能够渗入肿瘤组织而不能进入正常组织,另外,分子量较小的物质从肿瘤间质中清除较快,而大分子被截留,这种效应又被称为大分子物质在肿瘤组织的透过性增强及滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)。此外,肿瘤微环境有结合白蛋白的受体高表达,例如gp60受体和SPARC134,它们进一步使白蛋白保留在肿瘤附近。因此,使用白蛋白作为抗癌药物的载体不仅改善了这些药物的半衰期,而且还改善了向肿瘤的递送和在肿瘤中的保留。白蛋白载药体系主要包括化学偶联和物理结合的白蛋白载药。

[0060] 本公开将白蛋白结合剂与螯合剂单元和FAP抑制剂单元进行连接,从而形成能与FAP和白蛋白进行双靶向的小分子化合物(TEFAPI),目的在于延长FAPI分子的血液循环半衰期,增加肿瘤摄取。

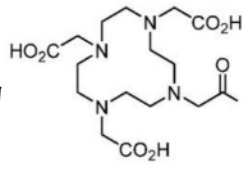
[0061] 本公开提供了一种通式(I)的化合物或者其药学可接受的盐、异构体或溶剂合物,

[0062] C-AB-FAPI (I)

[0063] 其中C为螯合剂单元;AB为白蛋白结合单元;FAPI为成纤维活化蛋白抑制剂单元。

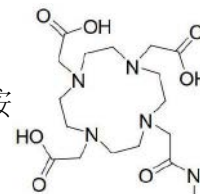
[0064] 在一种实施方式中,C单元衍生自选自以下的螯合剂:1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N,N'-四乙酸(DOTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)、三亚乙基四胺(TETA)、亚氨基二乙酸、二亚乙基三胺-N,N,N',N',N"-五乙酸(DTPA)、双-(羧甲基咪唑)甘氨酸或6-胍基吡啶-3-羧酸(HYNIC)。

[0065] 例如,C单元为



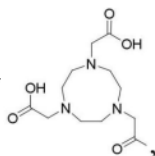
,

N'-四乙酸(DOTA),其可以通过DOTA的一个羧基形成酰胺而引入到通式(I)



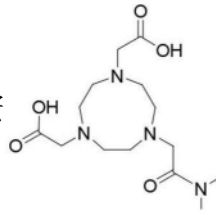
的化合物中。

[0066] 例如,C单元为

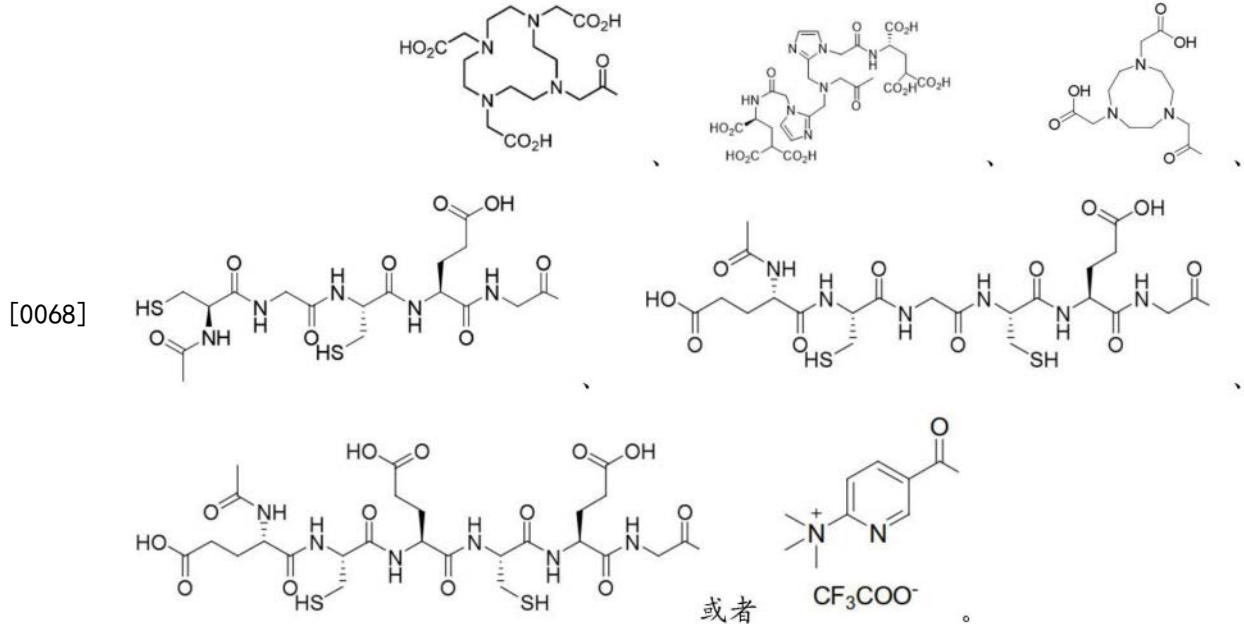


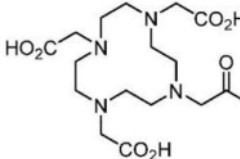
其衍生自1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA),

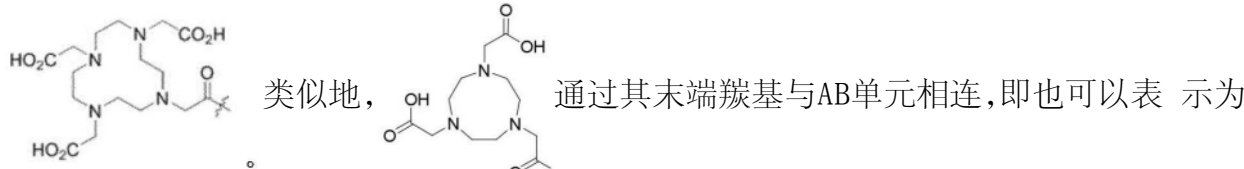
其可以通过NOTA的一个羧基形成酰胺而引入到通式(I)的化合物中。

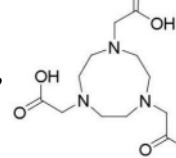


[0067] 在一种实施方式中,通式(I)的化合物中的C单元选自:



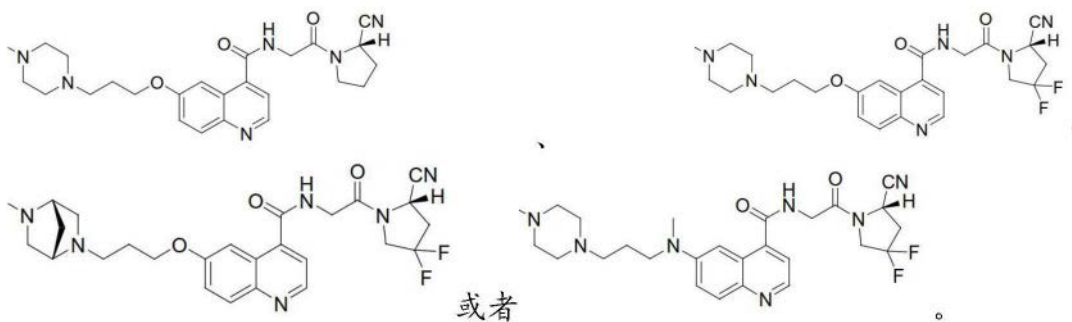
[0069] 请注意,  通过其末端羧基与AB单元相连,即也可以表示为



类似地,  通过其末端羧基与AB单元相连,即也可以表示为

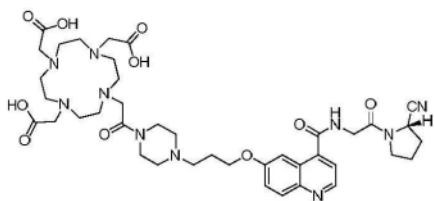


[0070] 在一种实施方式中,通式(I)的化合物中的FAPI单元选自

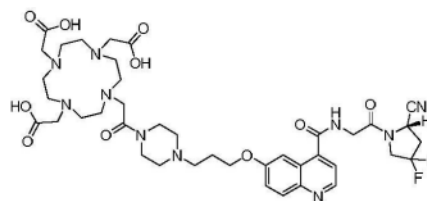


[0071] 在一种实施方式中,通式(I)的化合物中的FAPI单元和C单元满足以下条件:

[0072] 如果将FAPI单元和C单元进行连接(去掉中间的白蛋白结合单元),则连接得到的新的化合物选自:

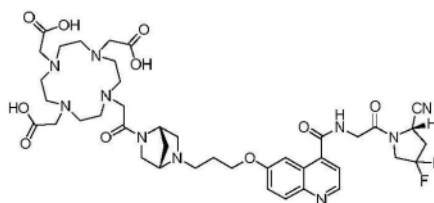


FAPI-02

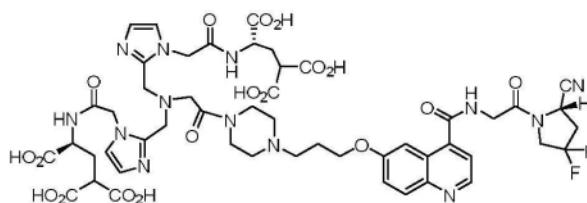


FAPI-04

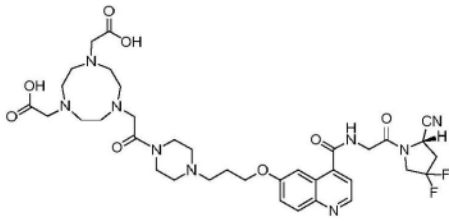
[0073]



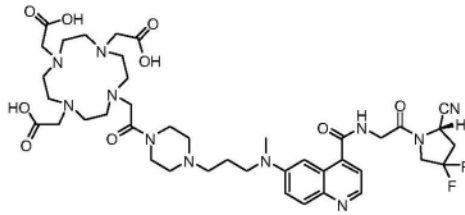
FAPI-21



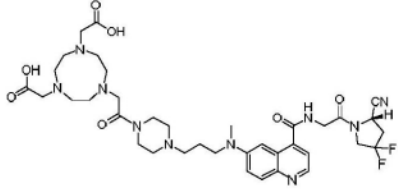
FAPI-34



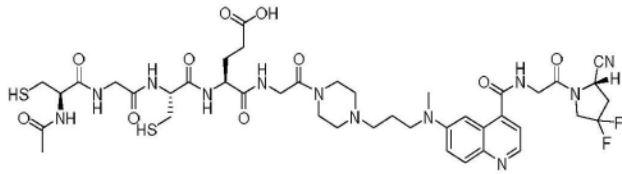
FAPI-42



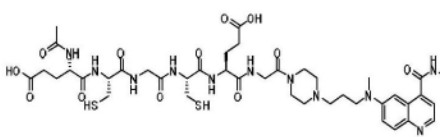
FAPI-46



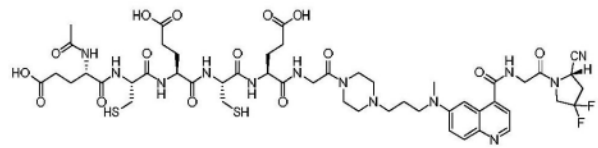
FAPI-52



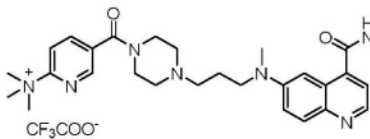
FAPI-69



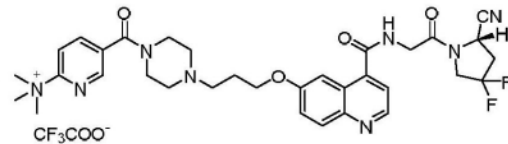
FAPI-70



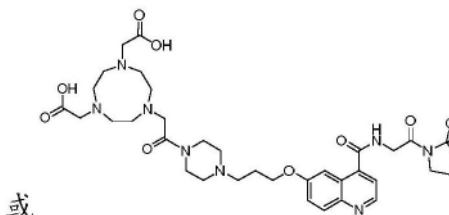
FAPI-71



FAPI-72



FAPI-73



FAPI-74


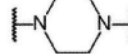
或

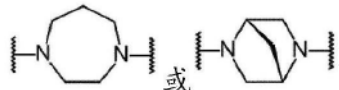
。

以看作是在化合物FAPI-02、FAPI-04、FAPI-21、FAPI-34、FAPI-42、FAPI-46、FAPI-52、FAPI-69、FAPI-70、FAPI-71、FAPI-72、FAPI-73、FAPI-74的分子结构中插入白蛋白结合单元AB。化合物FAPI-02、FAPI-04、FAPI-21、FAPI-34、FAPI-42、FAPI-46、FAPI-52、FAPI-69、FAPI-70、FAPI-71、FAPI-72、FAPI-73、FAPI-74在W02019154886A1中披露为一种FAP抑制剂。

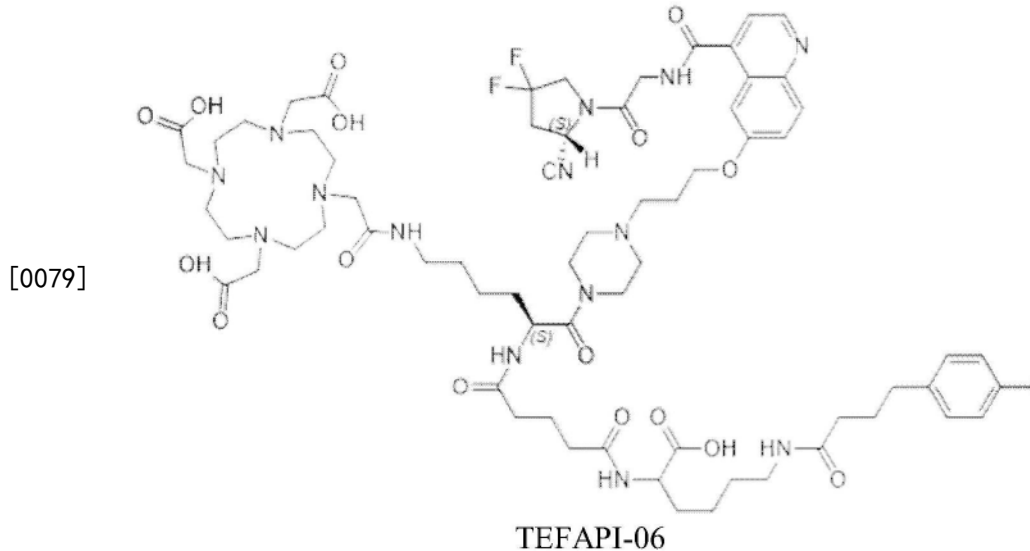
[0075] 在一种优选的实施方式中,通式(I)的化合物中的FAPI单元和C单元满足以下条件: 如果将FAPI单元和C单元进行连接(去掉中间的白蛋白结合单元),则连接得到的新的化合物选自:FAPI-04、FAPI-21或FAPI-46。在一种实施方式中,通式(I)的化合物中的FAPI单元和C单元满足以下条件: 如果将FAPI单元和C单元进行连接(去掉中间的白蛋白结合单元),则连接得到的新的化合物为FAPI-04。

[0076] 在一种实施方式中,AB单元包含4-碘-苯基末端基团。

[0077] 在一种实施方式中,AB单元通过与FAPI单元中的末端 、、


 形成酰胺键将其与FAPI单元相连,AB单元通过与C单元中的末端羰基形成酰胺键将其与C单元相连。

[0078] 在一种实施方式中,通式(I)的化合物为



[0080] 或者其药学可接受的盐、异构体或溶剂合物。

[0081] 基于Jansen等人设计的具有高亲和力的小分子FAP抑制剂(FAPI),Loktev等人首先开发了放射性示踪剂FAPI-01和FAPI-02,可以迅速与人和鼠细胞中的FAP结合内化。在正常组织中的积聚非常少,且清除速度很快,因此可以为PET成像获得高对比度。此外,FAPI-02可通过肾脏清除而迅速从生物体中清除,而不会保留在肾实质中,这有利于治疗应用。为了优化肿瘤中的摄取和示踪剂保留,开发了一系列基于FAPI-02的化合物,其中FAPI-04的PET成像显示出较高的肿瘤摄取,更长的滞留时间,并且在正常器官中的活性没有明显增加。FAPI-04在临床实验中对28种不同癌症的病人进行PET成像,发现只有癌症部位有摄取而正常组织几乎没有摄取,显示出了非常优异的癌症靶向性质,该诊断试剂现在已经在临床中得到了应用。由于FAP靶点还是一个优异的治疗性靶点,对于转移性晚期病人,手术、放化疗等常规方法无法抑制肿瘤发展,延长病人生命,使用FAP抑制剂携带放射性治疗核素将是希望的治疗方法。因此期望在保留其优异靶向性的前提下解决FAP抑制剂小分子的循环时间短的问题。

[0082] TEFAPI-06是在FAPI-04结构中引入4-(对-碘苯基)丁酸衍生物结构。在FAPI-04结构中引入这种与白蛋白有高亲和力的碘苯结构延长了成纤维活化蛋白(FAP)抑制剂的体内血液循环时间,并且可以在肿瘤部位有特异性高摄取,经过PET显像测试其影像学代谢规律后,发现血液半衰期由原来26分钟延长至400分钟。在镓-177放射性治疗实验中,小鼠肿瘤得到明显抑制。TEFAPI-06有望应用于多种癌症的显像和放射性核素携带剂。

[0083] 本公开还提供了一种螯合物,其包含:

[0084] 上述通式(I)的化合物或者其药学可接受的盐、异构体或溶剂合物,和

[0085] 放射性核素。

[0086] 在所述螯合物中,螯合剂单元与放射性核素直接螯合(例如, ^{68}Ga 与衍生自DOTA的螯合剂单元螯合),或者通过与其它金属螯合间接地引入放射性核素(例如, Al^{3+} 与衍生自

DOTA的螯合剂单元螯合,放射性核素¹⁸F以反离子形式引入螯合物中)。

[0087] 在一种实施方式中,放射性核素选自:¹⁸F、⁵¹Cr、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、¹¹¹In、^{99m}Tc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹³⁹La、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、⁸⁶Y、⁸⁸Y、⁹⁰Y、¹⁴⁹Pm、¹⁶⁵Dy、¹⁶⁹Er、¹⁷⁷Lu、⁴⁷Sc、¹⁴²Pr、¹⁵⁹Gd、²¹²Bi、²¹³Bi、⁷²As、⁷²Se、⁹⁷Ru、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁵Rh、^{101m}Rh、¹¹⁹Sb、¹²⁸Ba、¹²³I、¹²⁴I、¹³¹I、¹⁹⁷Hg、²¹¹At、¹⁵¹Eu、¹⁵³Eu、¹⁶⁹Eu、²⁰¹Tl、²⁰³Pb、²¹²Pb、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁸⁸Re、¹⁸⁶Re、¹⁹⁸Au、²²⁵Ac、²²⁷Th和¹⁹⁹Ag。例如,所述放射性核素为⁶⁸Ga、⁸⁶Y或¹⁷⁷Lu。

[0088] 本公开还提供了一种药物组合物,其包含或组成为:

[0089] 至少一种上述螯合物,

[0090] 任选地,和药学上可接受的辅料。

[0091] 在一种实施方式中,药物组合物包含或组成为至少一种上述螯合物。在另一种实施方式中,药物组合物包含或组成为至少一种上述螯合物和药学上可接受的辅料。

[0092] 本公开的组合物必须或视需要还可包含将螯合物配制成用于预期的给药途径的药学上可接受的辅料。辅料包括但不限于稀释剂、崩解剂、沉淀抑制剂、表面活性剂、助流剂、粘合剂、润滑剂、包衣材料等。辅料在E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中被一般性描述。辅料的实例包括但不限于单硬脂酸铝、硬脂酸铝、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、交聚维酮、异硬脂酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、羟基乙基纤维素、羟基甲基纤维素、羟基硬脂酸羟基二十八酯、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、乳糖、乳糖一水合物、硬脂酸镁、甘露醇、微晶纤维素等。

[0093] 适当时可用于将所述组合物配制成用于预期的给药途径的试剂包括:

[0094] 酸化剂(实例包括但不限于乙酸、柠檬酸、富马酸、盐酸、硝酸);

[0095] 碱化剂(实例包括但不限于氨水溶液、碳酸铵、二乙醇胺、单乙醇胺、氢氧化钾、硼酸钠、碳酸钠、氢氧化钠、三乙醇胺(triethanolamine)、三乙醇胺(trolamine));

[0096] 缓冲剂(实例包括但不限于偏磷酸钾、磷酸氢二钾、乙酸钠、无水柠檬酸钠以及柠檬酸钠二水合物);等等。

[0097] W02019154886A1披露了包含FAPI系列化合物和放射性核素的螯合物或组合物可用于诊断或治疗在哺乳动物或人类中以成纤维细胞激活蛋白过度表达为特征的疾病。本公开通过在W02019154886A1公开的FAPI化合物的结构中引入白蛋白结合单元,保留了其优异的FAP靶向性,同时延长了FAP抑制剂的循环时间。

[0098] 本公开的另一方面涉及上述的螯合物或组合物用于诊断或治疗在哺乳动物或人类中以成纤维细胞激活蛋白过度表达为特征的疾病。例如以成纤维细胞激活蛋白(FAP)过度表达为特征的疾病选自癌症、慢性炎症、动脉粥样硬化、纤维化、组织重塑和瘢痕病,优选地,其中癌症选自乳腺癌、胰腺癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、头颈癌、卵巢癌、肝癌、食管癌、下咽癌、鼻咽癌、喉癌、骨髓瘤细胞、膀胱癌、胆管细胞癌、透明细胞肾癌、神经内分泌肿瘤、致癌性骨软化症、肉瘤、CUP(原发性未知癌)、胸腺癌、胶质瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、子宫颈癌和前列腺癌。

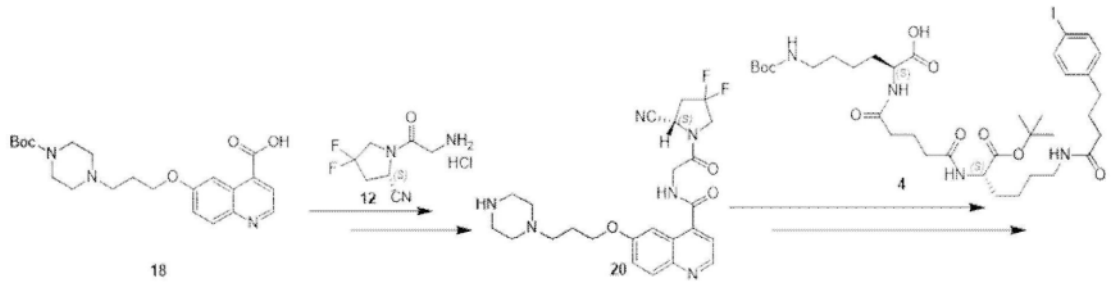
[0099] 本公开的又一方面涉及一种试剂盒,其包含或组成为上述螯合物或上述药物组合物,以及用于诊断或治疗疾病的说明书。在一种优选的实施方式中,所述疾病为成纤维细胞激活蛋白过度表达为特征的上述疾病。

[0100] 实施例

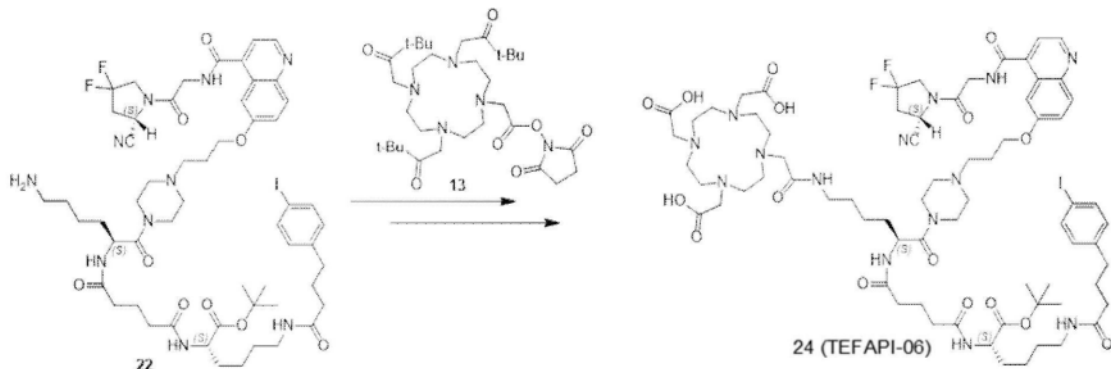
[0101] 实施例的起始材料是市售可得和/或可以以有机合成领域技术人员熟知的多种方法进行制备。有机合成领域的技术人员会在下述合成方法的中适当地选择反应条件(包括溶剂、反应气氛、反应温度、实验的持续时间和后处理)。有机合成领域的技术人员会理解,存在于分子各部分上的官能团应当与所提出的试剂和反应相容。

[0102] 以下缩写分别表示:

[0103] 一、TEFAPI-06化学合成



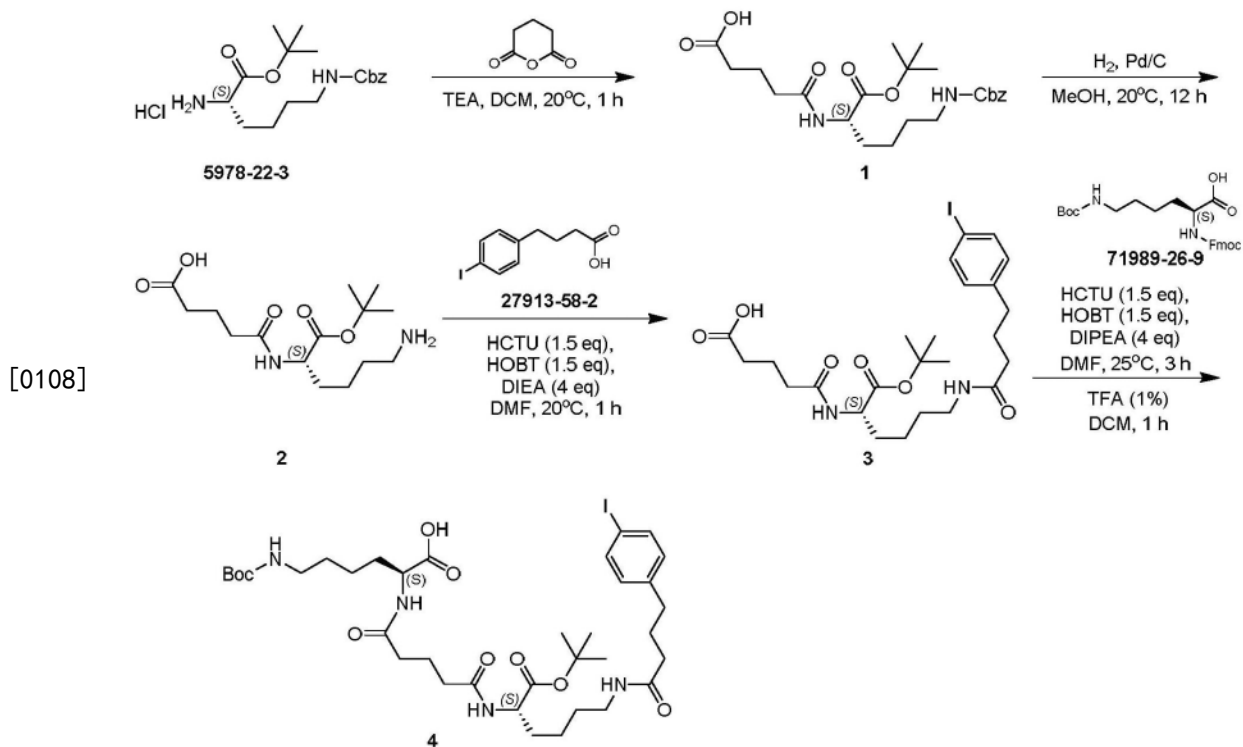
[0104]



[0105] 合成的所有试剂、化合物均可在中国(不含港澳台)通过一般商业渠道购得,供应商包括国药集团化学试剂有限公司、萨恩化学技术(上海)有限公司、九鼎化学(上海)科技有限公司、北京百灵威科技有限公司、北京市通广精细化工公司、上海毕得医药科技有限公司、北京伊诺凯科技有限公司、上海麦克林生化科技有限公司、西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。其中的关键起始物料均在线路图上标示出CAS号。

[0106] TEFAPI-06通过以上化学线路合成。具体可以分解为砌块4合成、砌块12合成、砌块13合成、砌块20合成及砌块连接共5部分,相互之间具有一定的前置性要求。

[0107] 砌块4合成:



[0109] a) 向化合物5978-22-3 (20g, 53.64mmol, 1eq, HCl) 的二氯甲烷 (200mL) 溶液中加入四氢吡喃-2,6-二酮 (9.18g, 80.45mmol, 1.5eq), 然后将溶液冷却至0°C, 随后逐滴加入三乙胺 (16.28g, 160.91mmol, 22.40mL, 3eq), 随后在20°C搅拌反应1小时。反应结束后浓缩得到无色油状液体化合物1 (20g, 粗品)。MS (ESI⁺): m/z 451.2 (M+H)⁺

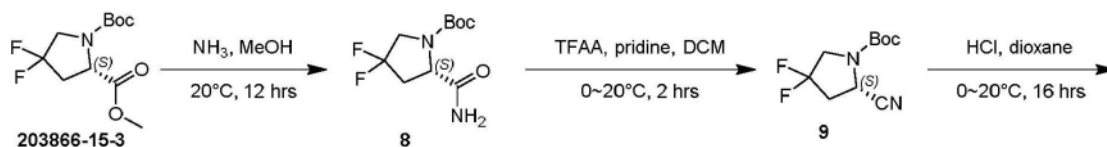
[0110] b) 向化合物1 (20g, 44.39mmol, 1eq) 的甲醇 (200mL) 溶液中加入Pd/C (8g, 10% 纯度), 随后在H₂ (15psi) 气氛中反应12小时。反应结束后, 减压浓缩, 得到无色油状液体化合物2 (14g, 粗品)。MS (ESI⁺): m/z 317.2 (M+H)⁺

[0111] c) 0°C下, 向化合物27913-58-2 (15g, 51.71mmol, 1eq) 的二氯甲烷 (150mL) 溶液中加入1-羟基吡咯烷-2,5-二酮 (6.55g, 56.88mmol, 1.1eq) 和二环己基碳二亚胺 (12.80g, 62.05mmol, 12.55mL, 1.2eq), 随后恢复至室温反应1小时。反应结束后, 过滤活 得滤液, 并减压浓缩得到浅黄色固体, 随后溶于二甲基甲酰胺 (120mL) 中。并加入化 合物2 (12g, 37.93mmol, 1eq) 和N,N-二异丙基乙胺 (14.71g, 113.78mmol, 19.82mL, 3 eq), 随后在室温下反应2小时。反应混合物浓缩后使用prep-HPLC分离纯化, 得到 无色油状液体化合物3 (10g, 16.57mmol, 43.68% 产率, 97.5% 纯度)。MS (ESI⁺): m/z 533.1 (M/2+H)⁺

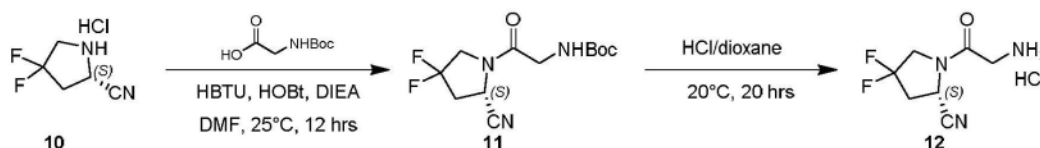
[0112] d) 向Trt-Cl树脂 (3.85g, 76.3mmol, 1eq) / 二氯甲烷 (500mL) 溶液中加入化合物 71989-26-9 (42.90g, 91.56mmol, 1.2eq)、N,N-二异丙基乙胺 (29.58g, 228.90mmol, 39.87mL, 3eq), 室温搅拌, 并氮气鼓泡48小时。随后, 混合物依次用二氯甲烷 (5*500 mL)、CH₃OH (5*500mL) 和二甲基甲酰胺 (5*500mL) 洗涤。随后加入哌啶/二甲基甲酰胺 (v/v=1: 5, 400mL) 溶液, 氮气鼓泡20分钟, 随后用二甲基甲酰胺 (5*300mL) 洗涤。随后加入二甲基甲酰胺 (300mL), 反应降至0°C, 依次加入化合物3 (18.14g, 30.43 mmol, 1.1eq)、6-氯苯并三氮唑-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯HCTU (22.84g, 56.96 mmol, 2eq)、1-羟基苯并三唑HOBT (1.92g, 14.14mmol, 0.5eq) 和N,N-二异丙基乙胺 (10.8g, 86.44mmol, 14.9mL, 3eq), 随后恢 复至室温反应2小时。随后使用二甲基甲 酰胺 (4*400mL) 和二氯甲烷 (4*400mL) 洗涤, 然后

加入二氯甲烷/三氟乙酸 ($v/v=100:1$, 600mL), 并鼓泡反应20分钟, 过滤。滤液使用 NaHCO_3 (aq) 调至中性, 并用二氯甲烷 (200mL*3) 和水 (200mL*3) 分液萃取, 合并的有机相用柠檬酸 (200mL*3) 洗涤, 随后减压蒸干, 获得黄色固体化合物4 (6g, 7.11mmol, 74.99% 产率, 96.77% 纯度)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) $\delta=1.30-1.40$ (m, 2H), 1.43-1.51 (m, 24H), 1.91-1.93 (m, 6H), 2.16-2.21 (m, 7H), 2.56-2.60 (m, 3H), 3.07-3.11 (m, 3H), 3.47-3.49 (m, 1H), 4.48-4.50 (m, 1H), 4.57-4.60 (m, 1H), 4.76-4.79 (m, 1H), 5.86 (br s, 1H), 6.90-6.94 (m, 2H), 7.58-7.61 (m, 2H), 7.88-7.91 (m, 1H), 8.09-8.12 (m, 1H)。MS (ESI^+): m/z 817.4 ($\text{M}+\text{H}^+$)

[0113] 砌块12合成:



[0114]



[0115] a) 0°C 下, 20分钟内缓慢地向化合物203866-15-3 (10g, 37.70mmol, 1eq) 的 MeOH (25mL) 溶液中加入 NH_3 的 (28.89g, 1.70mol, 45eq) 的MeOH (125mL) 溶液。随后温度恢复至室温, 在 N_2 (15psi) 气氛下搅拌反应18小时。反应结束后, 减压蒸发浓缩, 使用PE/MTBE打浆, 得到黄色固体化合物8 (8.9g, 35.57mmol, 94.34% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz DMSO): δ 1.28-1.45 (m, 9H), 2.16-2.38 (m, 1H), 2.59-2.87 (m, 1H), 3.55-3.84 (m, 2H), 4.08-4.36 (m, 1H), 6.97-7.19 (m, 1H), 7.36-7.61 (m, 1H)

[0116] b) 0°C 下, 20分钟内缓慢地向化合物8 (8.9g, 35.57mmol, 1eq) 的二氯甲烷 (100 mL) 溶液中加入吡啶 (3.38g, 42.68mmol, 3.44mL, 1.2eq)。保持 0°C , 加入三氟乙酸酐 (8.96g, 42.68mmol, 5.94mL, 1.2eq), 随后反应恢复至室温并搅拌18小时, 随后减压浓缩。使用PE/MTBE打浆, 得到黄色固体化合物9 (7.5g, 32.30mmol, 90.81% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz 氯仿-d): δ 1.33-1.66 (m, 9H), 2.71 (br t, $J=9.04\text{Hz}$, 2H), 3.80 (br s, 2H), 4.52-4.90 (m, 1H)

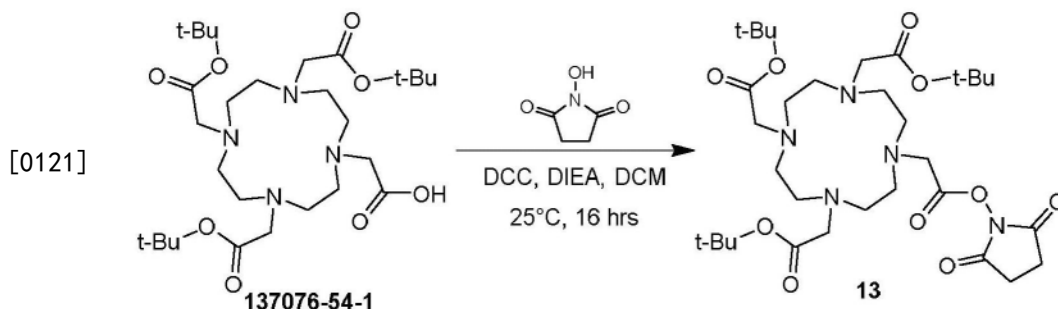
[0117] c) 向化合物9 (7.0g, 30.14mmol, 1eq) 的乙腈 (200mL) 溶液中加入HCl/二氧杂环己烷 (4M, 14.00mL, 1.86eq), 随后反应18小时。固体过滤并用MTBE (100mL) 洗涤, 得到白色固体化合物10 (2.2g, 13.05mmol, 43.30% 产率, HCl)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz DMSO) δ 2.64-3.13 (m, 2H), 3.48-3.89 (m, 2H), 4.99 (br t, $J=6.95\text{Hz}$, 1H), 9.80 (br s, 2H)

[0118] d) 向10mL的二甲基甲酰胺中依次加入2-(叔丁氧基羰基氨基) 乙酸 (779.41mg, 4.45mmol, 1.5eq)、1-羟基苯并三唑HOBt (80.16mg, 593.22 μmol , 0.2eq)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基异脲六氟化磷HBTU (2.25g, 5.93mmol, 2eq) 和化合物10 (500mg, 2.97mmol, 1eq, HCl), 随后反应搅拌30分钟。随后加入N,N-二异丙基乙胺 (1.15g, 8.90mmol, 1.55mL, 3eq) 并搅拌16小时。反应结束后, 加入水 (20mL), 并用乙酸乙酯 (50mL) 萃取, 有机相浓缩后, 使用硅胶柱层析法 (PE: 乙酸乙酯=1:1) 纯化, 得到化合物11 (0.625g, 2.13mmol, 71.68% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz DMSO): δ 1.38 (m, 9H), 2.78 (m, 2H), 3.77 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 5.07 (d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 7.14 (m, 1H)

[0119] e) 向化合物11 (0.4g, 1.38mmol, 1eq) 的乙腈 (13.5mL) 溶液中, 在0摄氏度下, 加入

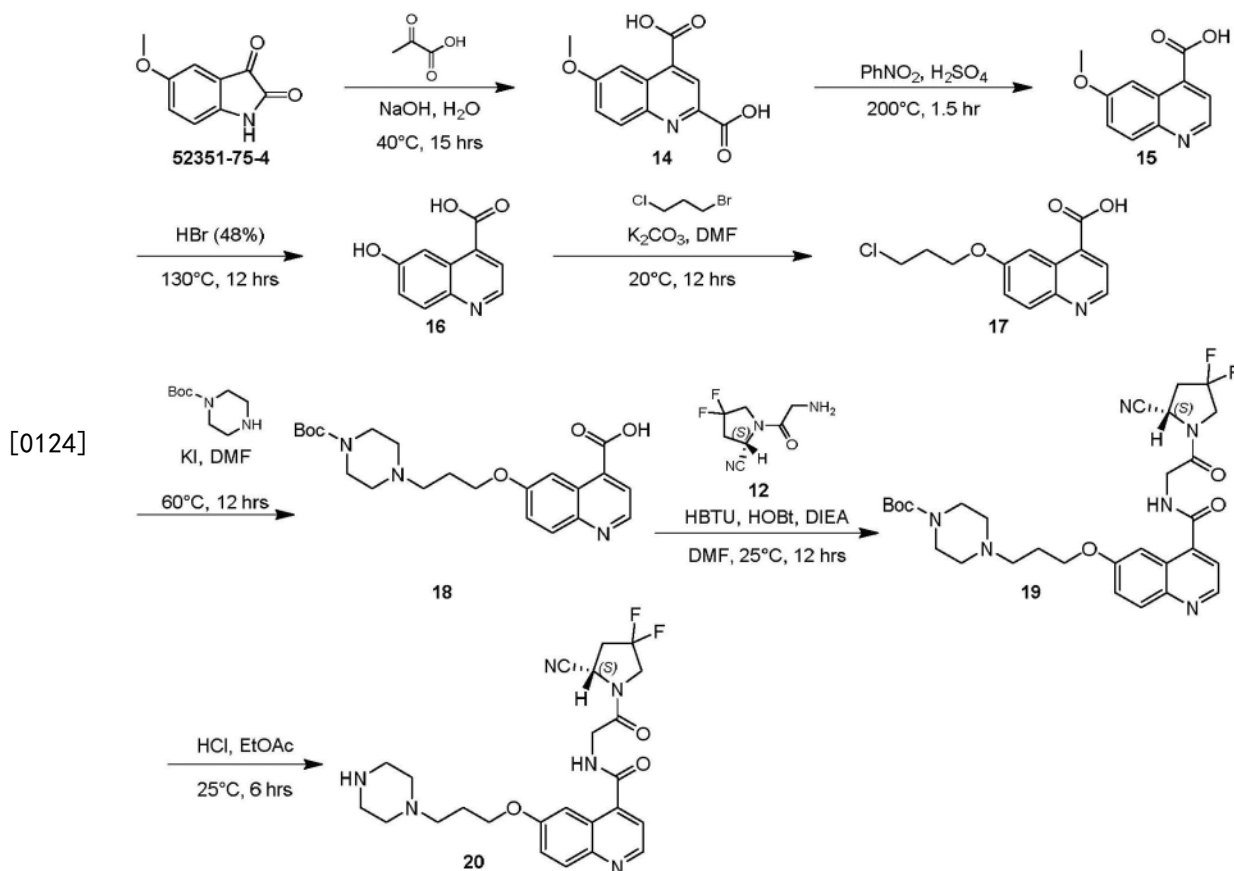
HCl/二氧杂环己烷(4M, 2.67mL, 7.71eq), 随后反应恢复至室温反应16小时。浓缩得到灰白色固体化合物12(322mg, 1.28mmol, 92.89%产率, 90%纯度, HCl)。¹H NMR(400MHz DMSO): δ 2.81-3.01(m, 2H), 3.57(s, 2H), 3.69(br d, J=5.01Hz, 1H), 3.78-3.89(m, 1H), 3.91-4.14(m, 2H), 4.24(ddd, J=15.59, 11.41, 4.11Hz, 1H), 5.19(dd, J=8.70, 3.34Hz, 1H), 8.38(br s, 3H)

[0120] 砌块13合成:



[0122] a) 化合物137076-54-1(150mg, 261.90 μ mol, 1eq) 溶解于乙腈(15mL)中, 并依次加入1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(33.16mg, 288.09 μ mol, 1.1eq)、HBTU(109.26mg, 288.09 μ mol, 1.1eq), 随后搅拌12小时, 混合物减压干燥后, 使用prep-TLC(EA:CAN=7:1) 纯化, 得到浅黄色固体化合物13(115mg, 171.69 μ mol, 65.56%产率) 直接用于下步。

[0123] 砌块20合成:



[0125] a) 化合物52351-75-4(20g, 112.89mmol, 1eq) 和KOH(69.68g, 1.24mol, 11eq) 溶解于H₂O(200mL)中, 随后加入丙酮酸(10.94g, 124.18mmol, 8.75mL, 1.1eq), 反应混合物在40

℃下反应15小时。随后将反应冷却至15℃,并用盐酸酸化至pH 3,将固体过滤并用去离子水洗涤,得到灰白色固体化合物14(24g,92.23mmol,81.70%产率,95%纯度)¹H NMR(400MHz DMSO): δ 3.70-4.24(m,3H),7.58(dd,J=9.24,2.80 Hz,1H),8.15(d,J=9.30Hz,1H),8.26(d,J=2.74Hz,1H),8.53(s,1H),13.75(br s,2H),MS(ESI⁺):m/z 248.1(M+H)⁺

[0126] b)向化合物14(24g,97.09mmol,1eq)中加入硝基苯(150mL)并在220℃下搅拌1.5小时。随后将反应冷却至15℃,并加入PE(150mL),析出的固体用PE(100mL)洗涤,得到灰白色固体化合物15(16.8g,82.68mmol,85.16%产率)¹H NMR(400MHz DMSO) δ 3.72-4.14(m,3H),7.49(dd,J=9.23,2.75Hz,1H),7.93(d,J=4.40Hz,1H),8.02(d,J=9.17Hz,1H),8.18(d,J=2.69Hz,1H),8.87(d,J=4.40Hz,1H),13.76(br s,1H)。MS(ESI⁺):m/z 202.1(M-H)⁻

[0127] c)向化合物15(40g,196.86mmol,1eq)加入溴化氢(1L,48%水溶液),并在130℃下搅拌12小时。随后,反应使用350ml 30%氢氧化钠溶液碱化至pH=6,大量沉淀析出,沉淀过滤后,使用甲醇洗涤沉淀,并抽干得到粗产物,并用甲醇多次洗涤得到产品褐色固体化合物16(30g,128.93mmol,65.50%产率,81.3%纯度)¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 13.66(br s,1H),10.24(s,1H),8.77(d,J=4.5Hz,1H),8.06(d,J=2.6Hz,1H),7.95(d,J=9.1Hz,1H),7.84(d,J=4.4Hz,1H),7.36(dd,J=2.7,9.1Hz,1H)。MS(ESI⁻):m/z 377.0(2M-H)⁻

[0128] d)向化合物16(30g,158.59mmol,1eq)的二甲基甲酰胺(300mL)溶液中加入碳酸钾(87.67g,634.36mmol,4eq)和1-溴-3-氯-丙烷(24.97g,158.59mmol,15.60mL,1eq),随后反应在60℃搅拌12小时。蒸发浓缩后,向体系加入200mL水,大量固体析出,随后反应混合物在25℃搅拌15分钟,抽滤。使用乙酸乙酯研磨,并过滤,获得棕色固体化合物17(37.58g,130.13mmol,86.15%产率,92%纯度)¹H NMR(400 MHz,DMSO-d₆) δ ppm 2.26-2.98(m,2H),3.83-3.88(m,2H),4.22-4.25(m,2H),7.54(dd,J=9.19,2.69Hz,1H),7.96(d,J=4.38Hz,1H),8.03-8.11(m,1H),8.19(d,J=2.63Hz,1H),8.90(d,J=4.38Hz,1H)。MS(ESI⁺):m/z 266.1(M+H)⁺,

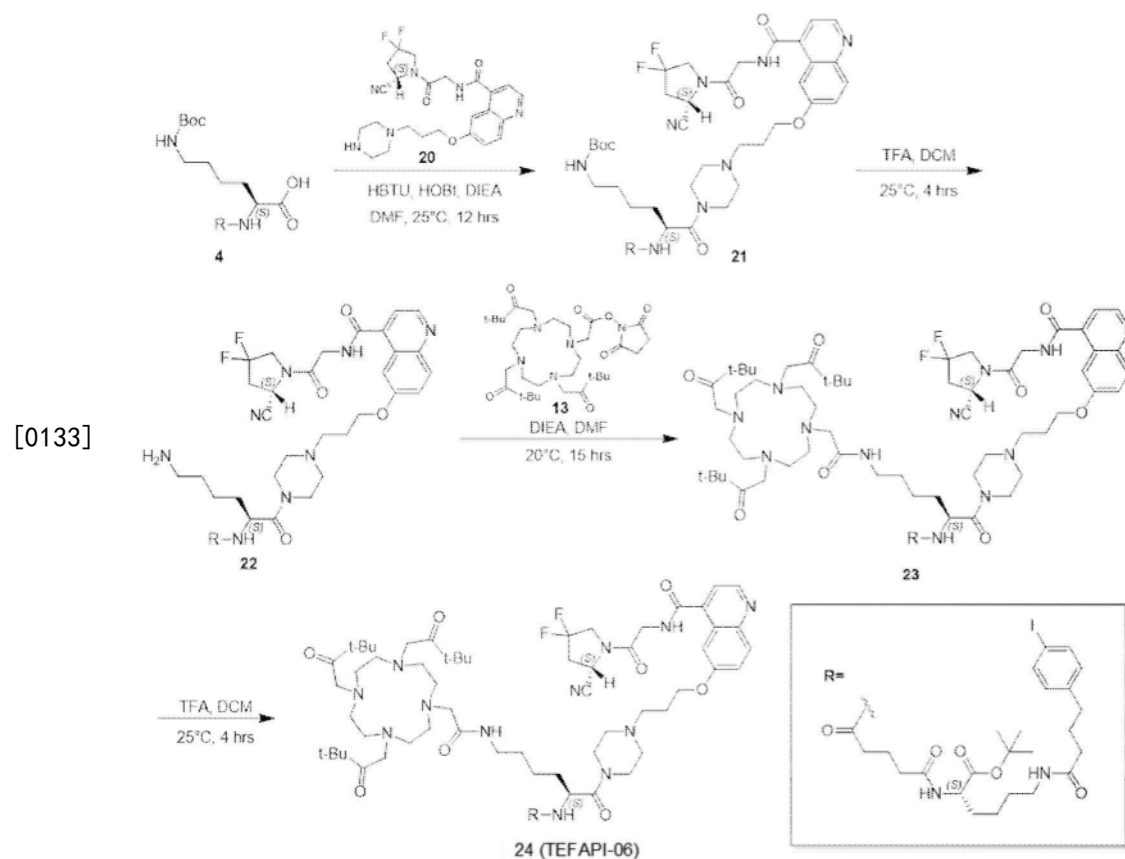
[0129] e)将化合物17(30g,112.91mmol,1eq)加入N-甲基吡咯烷酮(300mL)中,并加入哌嗪-1-甲酸叔丁酯(105.15g,564.56mmol,5eq)和碘化钾(9.37g,56.46mmol,0.5 eq),随后60℃搅拌12小时。反应混合物冷却至室温并过滤,粗产品由Prep-HPLC(0.1% FA)纯化得到黄色固体化合物18(42.96g,96.16mmol,85.16%产率,93%纯度)¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 8.82(d,J=4.4Hz,1H),8.19-8.16(m,1H),7.99(d,J=9.3Hz,1H),7.85(d,J=4.4Hz,1H),7.45(dd,J=2.8,9.1Hz,1H),4.15(br t,J=6.2Hz,2H),2.62-2.50(m,6H),2.42(br t,J=4.6Hz,4H),1.99(br d,J=6.6Hz,2H),1.39(s,9H)。MS(ESI⁺):m/z 416.1(M+H)⁺

[0130] f)向化合物18(12.00g,26.57mmol,92%纯度,1.02eq)的二甲基甲酰胺(120mL)溶液中加入0-苯并三唑-1-基-四甲基脲鎓六氟磷酸酯(19.76g,52.10mmol,2eq)、1-羟基苯并三唑(7.04g,52.10mmol,2eq)、N,N-二异丙基乙胺(10.10g,78.15mmol,13.61mL,3eq),随后加入化合物12(5.88g,26.05mmol,1.00eq,HCl),反应在25℃搅拌12小时。过滤,滤液使用prep-HPLC(HCl)纯化,得到黄色固体化合物19(11.27 g,17.29mmol,66.37%产率,90%纯度)¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 1.41(s,9 H),2.27-2.33(m,2H),3.27-3.29

(m, 5H), 3.43-3.55 (m, 2H), 3.93-4.21 (m, 10H), 5.19 (dd, $J=9.26, 2.75\text{Hz}$, 1H), 7.59 (dd, $J=9.26, 2.63\text{Hz}$, 1H), 7.69 (d, $J=4.63\text{Hz}$, 1H), 7.87-8.00 (m, 1H), 8.14 (d, $J=9.26\text{Hz}$, 1H), 8.95 (d, $J=4.63\text{Hz}$, 1H), 9.24 (br t, $J=5.82\text{Hz}$, 1H), 11.00 (br s, 1H). MS (ESI⁺): m/z 587.2 (M+H)⁺,

[0131] g) 将化合物19 (2g, 3.41mmol, 1eq) 溶解于乙酸乙酯 (40mL) 中, 加入盐酸/乙酸乙酯溶液 (4M, 4mL, 4.69eq), 随后反应在25°C下反应6小时。反应混合物蒸发浓缩, 并直接使用, 获得黄色固体化合物20 (1.5g, 粗品, HCl)。MS (ESI⁻): m/z 485.1 (M+H)⁺

[0132] 砌块连接:



[0134] a) 将化合物4 (858.97mg, 1.05mmol, 1.1eq) 溶解于二甲基甲酰胺 (5mL) 中, 加入 HBTU (453.23mg, 1.20mmol, 1.25eq)、HOBT ((167.94mg, 1.24mmol, 1.3eq)、*N,N*-二异丙基乙胺 (617.83mg, 4.78mmol, 832.65 μL , 5eq) 和化合物20 (229.65mg, 333.04 μmol , 1eq), 混合物搅拌12小时。反应产物浓缩后, 使用prep-HPLC (HCl) 纯化得到白色固体化合物21 (230mg, 170.00 μmol , 17.78%产率, 95%纯度)。MS (ESI⁺): m/z 1285.4 (M+H)⁺

[0135] b) 将化合物21 (150mg, 116.71 μmol , 1eq) 溶解于二氯甲烷 (10mL) 中, 加入三氟乙酸 (3.08g, 27.01mmol, 2mL, 231.45eq), 反应搅拌4小时, 随后蒸发浓缩, 直接得到粗产物黄色油状液体化合物22 (150mg, 粗品, 三氟乙酸)。MS (ESI⁺): m/z 1129.3 (M+H)⁺

[0136] c) 将化合物22 (150mg, 120.67 μmol , 1eq, 三氟乙酸) 溶解于二甲基甲酰胺 (1.6 mL) 中, 依次加入*N,N*-二异丙基乙胺 (124.77mg, 965.36 μmol , 168.15 μL , 8eq) 和化合物13 (88.91mg, 132.74 μmol , 1.1eq), 反应搅拌12h, 随后真空浓缩除去溶剂。得到粗产品黄色油状化合物23 (220mg, 粗品)。MS (ESI⁺): m/z 1684.9 (M/2+H)⁺

[0137] d) 化合物23 (210mg, 124.72 μmol , 1eq) 加入三氟乙酸 (3.23g, 28.36mmol, 2.10 mL,

227.41eq)并搅拌3小时。随后减压浓缩,使用prep-HPLC(三氟乙酸)纯化,得到白色固体化合物24(TEFAPI-06)(30mg,26.40 μ mol,21.16%产率,100%纯度)。

[0138] 白色固体化合物24(TEFAPI-06)的表征如下:

[0139] LCMS(ESI⁺):m/z 758.4 1/2(M+2H)⁺Rt:1.959min.

[0140] LC条件:Kinetex C18 50*2.1mm柱(5 μ m粒径)1.0ml/min

[0141] 梯度:A相0.05%三氟乙酸/水,B相0.05%三氟乙酸/乙腈。0-0.40min 5%B,0.40-3.00 min 5-95%B,3.00-4.00min 95%B。

[0142] HPLC:Rt:2.266min.

[0143] LC条件:Luna-C18 2.0*50mm柱(5 μ m粒径),A相0.05%三氟乙酸/水,B相0.05%三氟乙酸/乙腈。

[0144] LC梯度:0.00-4.90min:10-80%B 0.8mL/min,4.90-5.50min:0%B 1.2mL/min。

[0145] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆)

[0146] δ ppm 9.18-9.07(m,1H),8.84(d,J=4.4Hz,1H),8.49(br s,1H),8.18-7.97(m,3H),7.89(br d,J=2.4Hz,1H),7.78(br t,J=5.8Hz,1H),7.62(br d,J=8.1Hz,2H),7.55(d,J=4.4Hz,1H),7.46(br dd,J=2.7Hz,9.1Hz,1H),7.00(br d,J=8.1Hz,2H),5.15(br dd,J=3.3,9.0Hz,1H),4.69(br s,1H),4.47-4.08(m,6H),4.07-3.69(m,13H),3.64-3.22(m,11H),3.21-2.69(m,14H),2.47(br s,2H),2.33-1.90(m,9H),1.87-1.18(m,18H)。

[0147] ¹⁹F NMR(400MHz,DMSO-d₆)-73.867

[0148] ¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄)

[0149] δ ppm 8.85(d,J=4.6Hz,1H),8.22-7.97(m,2H),7.71-7.53(m,4H),6.99(d,J=8.3Hz,2H),5.15(br d,J=9.3Hz,1H),4.83-4.74(m,4H),4.49-4.30(m,6H),4.30-4.08(m,4H),3.90-3.38(m,17H),3.20-2.74(m,16H),2.58(s,2H),2.40(br s,2H),2.30-2.15(m,6H),2.02-1.82(m,6H),1.77-0.99(m,11H)。

[0150] ¹⁸F NMR(400MHz,甲醇-d₄)-77.161

[0151] 二、利用⁶⁸Ga-TEFAPI-06对健康鼠成像测定体内半衰期

[0152] 用5mL的0.6M高纯盐酸淋洗锗镓发生器,得到Ga-68盐酸溶液。取淋洗的Ga-68溶液1mL,加入100微升3M氢氧化钠、130微升3M醋酸钠调节酸度,最终pH为4.0,加入50微克TEFAPI-06前体,将反应混合物加热至90 $^{\circ}$ C,保持10分钟。将反应溶液通过C18小柱,将游离离子去除,然后用乙醇溶液洗脱C18柱。得到标记好的⁶⁸Ga-TEFAPI-06。

[0153] 取37MBq标记产物,加入200微升生理盐水进行稀释并用胰岛素注射器抽取好药物备用,其中药物的乙醇含量不高于5%。将健康的小鼠事先麻醉放入PET/CT的采集床上,在尾静脉处放置留置针。将注射器连在留置针上,在推针的零时刻便开始进行PET数据的采集。采集时间点分别为0-60分钟,2小时,3小时,4小时,5小时。采集完毕后用专业软件进行数据重建,重建条件为前5分钟每分钟间隔均重建数据,5-60分钟每5分钟重建一次数据,其余时间点重建一次数据。采集的数据经过PET重建软件进行处理,得到连续图像。在PET处理软件中,在小鼠的心脏处描绘固定区域,得到具心脏处的SUV-Mean和SUV-Max值。将得到的SUV在数据处理软件进行模拟。得到对应的血液半衰期,得出TEFAPI-06的半衰期为398分钟,如图1所示。

[0154] 三、 ^{68}Ga -TEFAPI-06在胰腺癌PDX小鼠模型的PET成像

[0155] 用5mL的0.6M高纯盐酸淋洗锗镓发生器,得到Ga-68盐酸溶液。取淋洗的Ga-68 溶液1mL,加入100微升3M氢氧化钠、130微升3M醋酸钠调节酸度,最终pH为4.0, 加入50微克TEFAPI-06前体,将反应混合物加热至90℃,保持10分钟。将反应溶液 通过C18小柱,将游离离子去除,然后用乙醇溶液洗脱C18柱。得到标记好的 ^{68}Ga -TEFAPI-06。将标记好的 ^{68}Ga -TEFAPI-06用生理盐水稀释,每只小鼠注射3.7MBq。在0.5小时,1.5小时,2.5小时进行PET扫描成像,用PET图像处理软件进行重建。得到的显像图如图2所示,可以看到该探针在肿瘤部位有明显的摄取。

[0156] 四、 ^{86}Y -TEFAPI-06在胰腺癌PDX小鼠模型的长时间PET成像

[0157] Y-86是一种半衰期长达14.6小时的正电子核素,并且可以使用DOTA进行放射标记,因此非常适合用来长时间检测TEFAPI分子在活体内的分布情况。取1mL Y-86盐酸 溶液,加入100微升3M氢氧化钠、130微升3M醋酸钠调节酸度,最终pH为4.0,加入50微克TEFAPI-06前体,将反应混合物加热至90℃,保持10分钟。将反应溶液通过 C18小柱,将游离离子去除,然后用乙醇溶液洗脱C18柱。得到标记好的 ^{86}Y -TEFAPI-06。将标记好的 ^{86}Y -TEFAPI-06用生理盐水稀释,每只小鼠注射7.4MBq。在注射后0.5、2、6、12、18、24、36小时分别PET扫描成像,用PET图像处理软件进行重建。得到的PET 图像如图3所示,在小鼠的肿瘤和心脏处勾画SUV值,并将SUV值随时间的变化做成 曲线。肿瘤摄取其SUV摄取曲线表明肿瘤摄取在前24小时不断上升,血液循环时间较 长,且从肾脏中不断清除。

[0158] 五、TEFAPI-06在PDX胰腺癌小鼠中的竞争抑制实验

[0159] 为了验证TEFAPI-06的针对FAP靶点的特异性,在竞争抑制实验中我们对同一批小鼠进行了抑制前后的PET成像。根据Y-86长时间PET成像可以得知,注射药物18小时 到24小时之间,肿瘤的摄取达到峰值。因此先对荷瘤小鼠进行 ^{68}Ga -FAPI-04成像,确定 小鼠具有肿瘤摄取。等待48小时确保 ^{68}Ga -FAPI-04代谢之后,对这两只小鼠注射300 微克TEFAPI-06分子,18小时后对注射TEFAPI-06分子的小鼠进行 ^{68}Ga -FAPI-04的PET 分子成像。注射后 ^{68}Ga -FAPI-04 30分钟的PET成像结果显示,未注射TEFAPI-06时肿 瘤处有明显摄取,注射TEFAPI-06分子之后则显示在小鼠肿瘤处没有额外摄取。

[0160] 如图4所示,进行抑制的小鼠肿瘤处基本没有额外摄取,而没有抑制的同一批小 鼠,肿瘤处的摄取较高。结果表明TEFAPI-06的靶向部位为FAP。

[0161] 六、 ^{177}Lu -TEFAPI-06对PDX胰腺癌小鼠治疗

[0162] 基于TEFAPI-06的肿瘤靶向性和小鼠代谢规律,由于其优异的瘤/正常组织的摄取 比 在18小时后就大于10,且肾脏的代谢基本清除,因此对PDX胰腺癌小鼠进行了Lu-177 的放射性靶向治疗。每组小鼠5只,治疗计划如下图,治疗剂量为3.7MBq,肿瘤生长曲 线可以看到治疗组的肿瘤完全被压制住。为了评估治疗效果,我们在治疗前后分别对小 鼠进行了FAPI-04的成像体检,结果如图5所示。可以看到经过治疗后,小鼠的原肿瘤摄取都已经基本 消失。

[0163] 以上所述仅是本发明的示范性实施方式,而非用于限制本发明的保护范围,本发 明的保护范围由所附的权利要求确定。

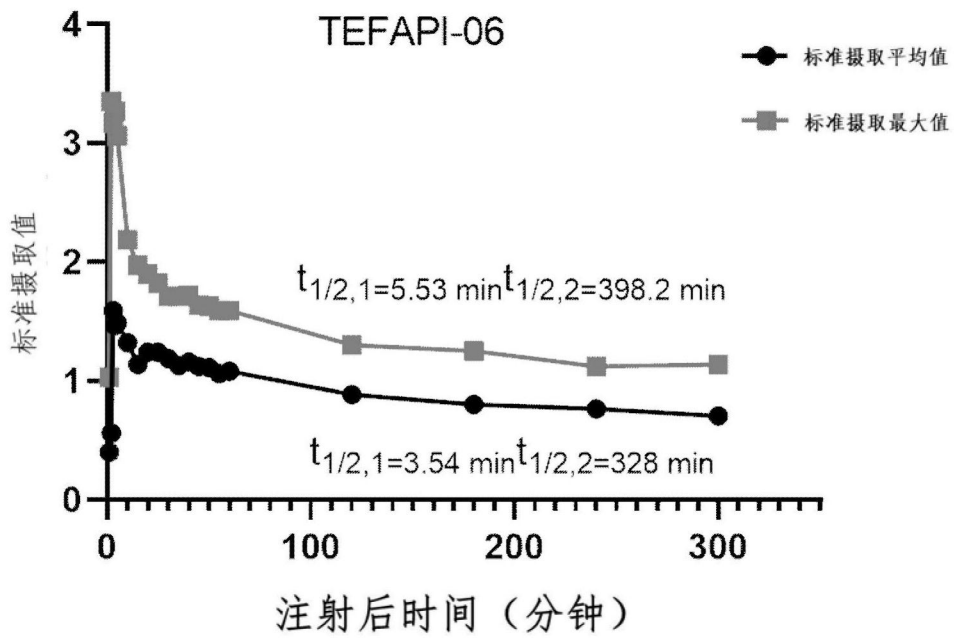
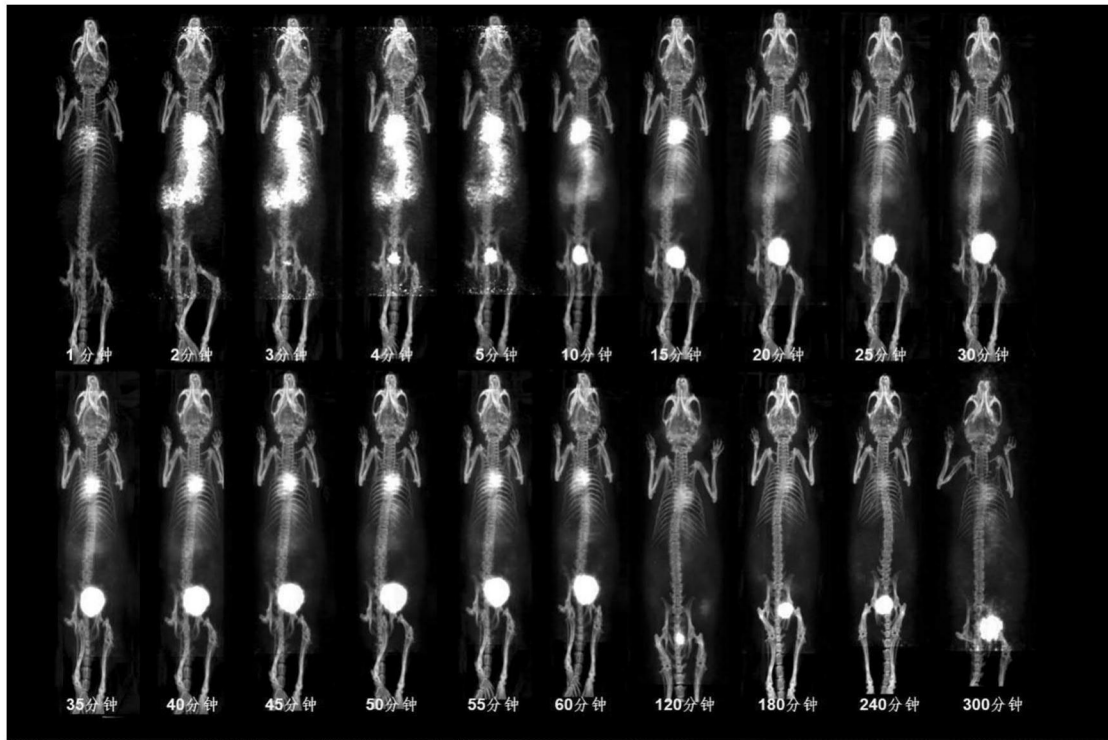


图1

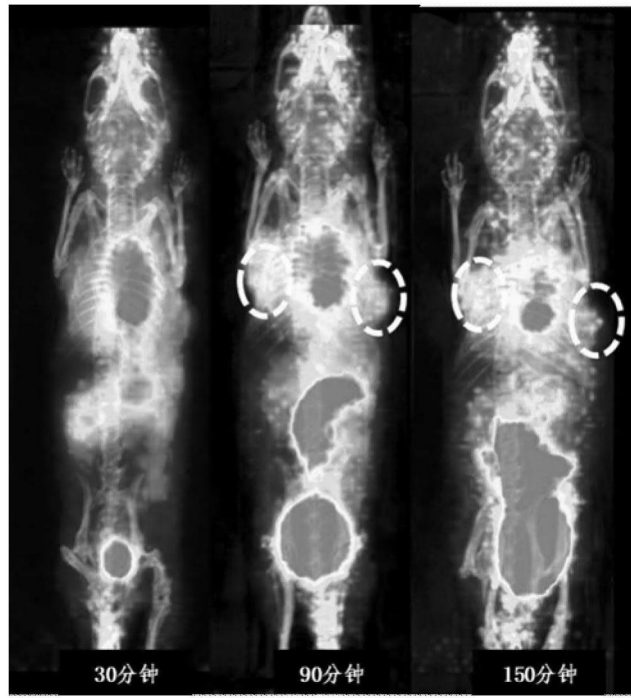
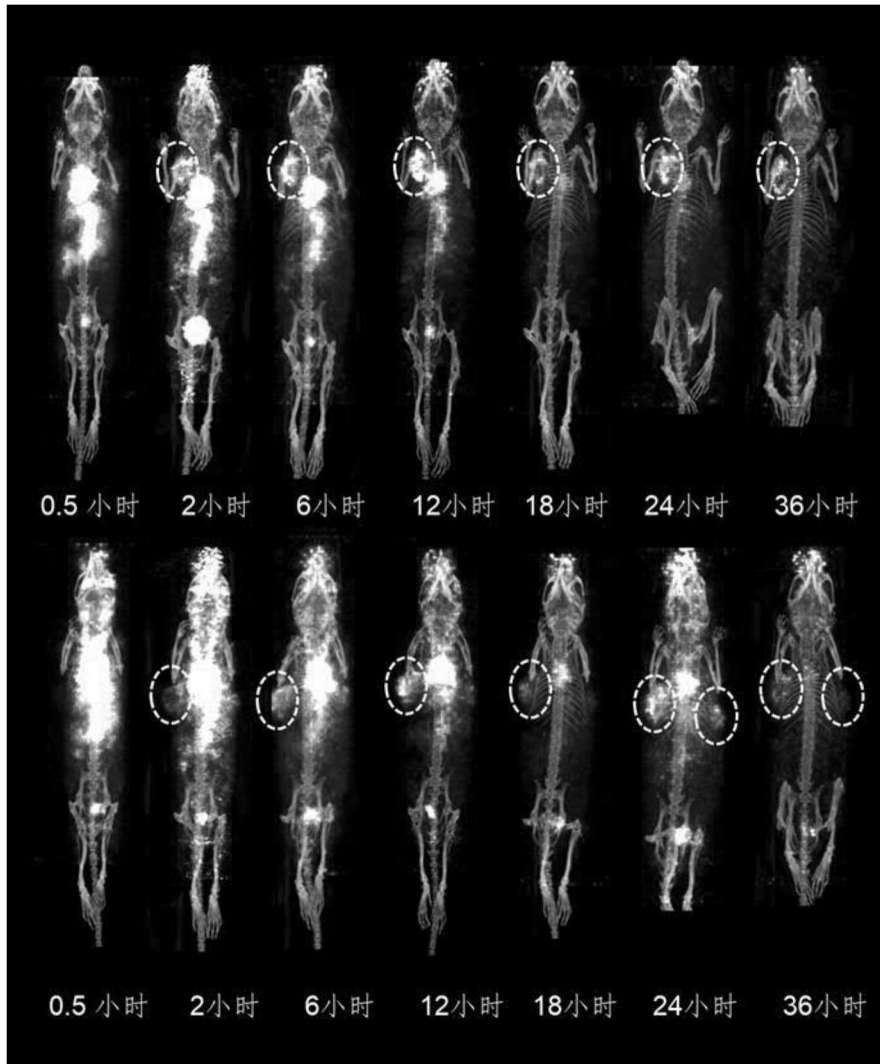


图2



TEFAPI-06

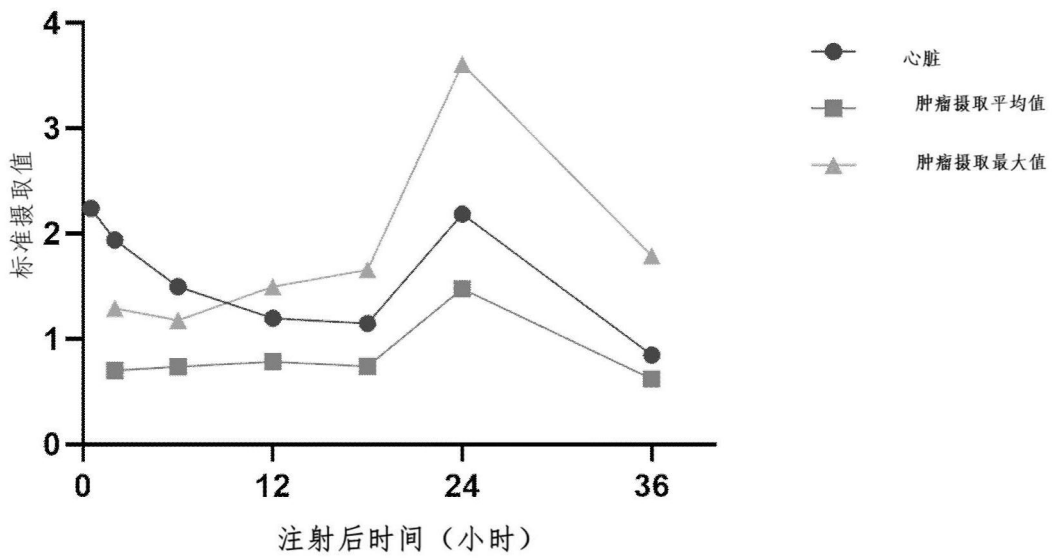


图3

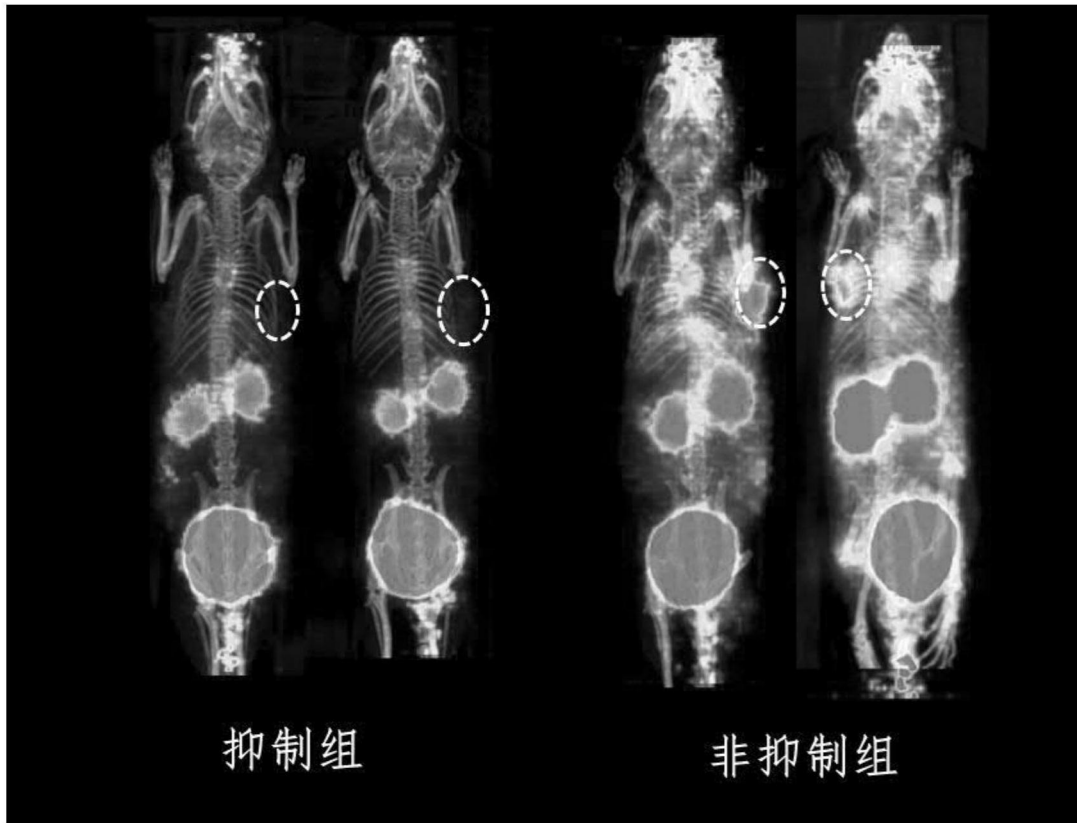


图4

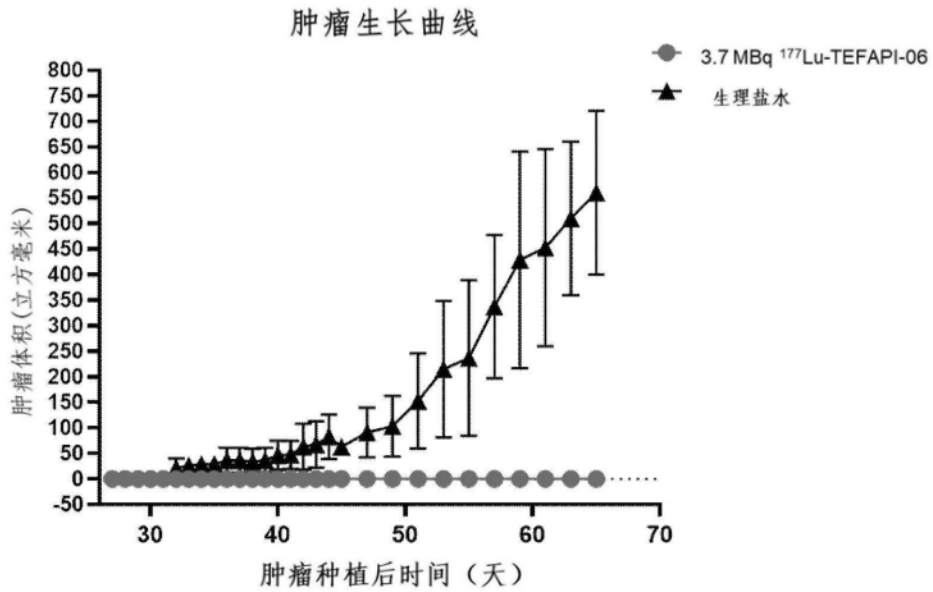
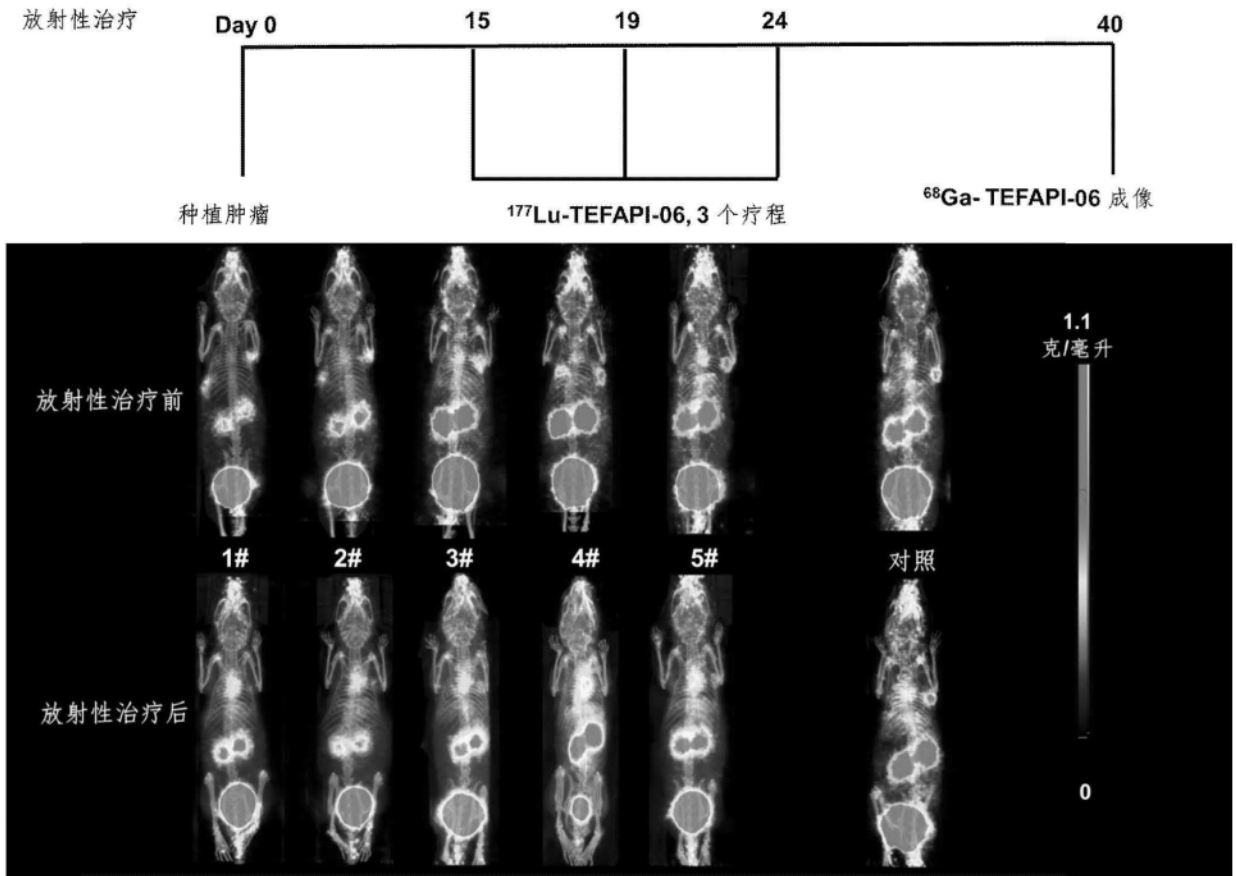


图5