

1. 一种Dar2多肽放射性药物,其特征在于:包括Dar多肽二聚体和放射性核素,所述放射性核素通过双功能螯合剂标记所述Dar多肽二聚体;所述Dar多肽二聚体是将GGG与Dar多肽单体连接,再将两个连接有GGG的Dar多肽单体二聚化而合成多肽二聚体,所述GGG指三个连续的甘氨酸分子;所述Dar多肽单体为全反D型氨基酸线性7元多肽,序列为:anedyr;所述放射性核素为^{99m}Tc、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、¹¹¹In、⁹⁰Y和¹⁷⁷Lu中任意一种,所述双功能螯合剂为HYNIC、NOTA、DOTA和DTPA中任意一种。

2. 根据权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物,其特征在于:所述Dar多肽二聚体与所述双功能螯合剂之间连接有药代动力学连接剂,所述药代动力学连接剂为聚乙二醇分子或8-氨基辛酸。

3. 根据权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物,其特征在于:放射性核素为^{99m}Tc,^{99m}Tc通过双功能螯合剂HYNIC标记连有药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体,所述药代动力学连接剂为聚乙二醇分子或8-氨基辛酸。

4. 根据权利要求3所述的Dar2多肽放射性药物,其特征在于:所述聚乙二醇分子的聚合度为4。

5. 根据权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物,其特征在于:所述放射性核素为⁶⁸Ga,⁶⁸Ga通过双功能螯合剂NOTA或DOTA标记不含药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体。

6. 权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物的制备方法,^{99m}Tc通过双功能螯合剂HYNIC标记连有药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar2多肽放射性药物,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

a、HYNIC-PKM-COOH的制备:

以PKM表示所述药代动力学连接剂,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-COOH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 C₁₈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-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 C₁₈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、(GGG-Dar)₂-Glu的制备:

将GGG-Dar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 C₁₈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(GGG-Dar)₂-Glu-Boc;将冻干产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc溶于TFA,室温反应5min,反应液用氮气吹干,获得预期产物(GGG-Dar)₂-Glu;

d、HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂的制备:

将(GGG-Dar)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 C₁₈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-(GGG-Dar)₂;

e、^{99m}Tc-HYNIC-PKM-(GGG-Dar)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-(GGG-Dar)₂的混合液,将混合液冻干;在冻干粉末中加入Na^{99m}TcO₄溶液,100℃水浴加热反应20-25分钟,待反应结束后室温冷却,制成所述Dar2多肽放射性药物。

7. 根据权利要求6所述的Dar2多肽放射性药物的制备方法,其特征在于:所述步骤e中的三苯基膦三磺酸钠、三羟甲基甘氨酸、琥珀酸二钠、琥珀酸和HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂的混合液中,各物质的质量份数为:

三苯基膦三磺酸钠	5.0
三羟甲基甘氨酸	6.5
琥珀酸二钠	38.5
琥珀酸	12.7
HYNIC-PKM-(GGG-Dar) ₂	0.050。

8. 权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物的制备方法,⁶⁸Ga通过双功能螯合剂NOTA标记不含药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar2多肽放射性药物,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

A、(GGG-Dar)₂-Glu的制备:

将GGG-Dar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 C₁₈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(GGG-Dar)₂-Glu-Boc;将冻干产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc溶于TFA,室温反应5min,反应液用氮气吹干,获得预期产物(GGG-Dar)₂-Glu;

B、NOTA-(GGG-Dar)₂的制备:

将(GGG-Dar)₂-Glu和NOTA-CNS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 C₁₈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NOTA-(GGG-Dar)₂;

C、⁶⁸Ga-NOTA-(GGG-Dar)₂的制备:

从锗-镓发生器新鲜淋洗⁶⁸GaCl₃,用NH₄OAc调节pH值至3.5,加入NOTA-(GGG-Dar)₂,99℃水浴加热,待反应结束后室温冷却,制成所述Dar2多肽放射性药物。

9. 如权利要求1所述的Dar2多肽放射性药物的应用,其特征在于:所述Dar2多肽放射性药物可用于制备整合素α₆阳性的肿瘤显像诊断的放射性药物。

10. 根据权利要求9所述的Dar2多肽放射性药物的应用,其特征在于:所述整合素α₆阳性的肿瘤包括肝细胞癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结直肠癌和头颈癌。

一种Dar2多肽放射性药物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及放射性药物技术领域,具体涉及一种新型的基于Dar多肽的放射性药物及其制备方法。

背景技术

[0002] 整合素家族是一类由 α 和 β 两个亚单位以非共价键结合形成的异二聚体跨膜糖蛋白。目前已经在哺乳动物中发现18种 α 亚单位和8种 β 亚单位。这些亚单位可组合形成24种整合素。亚基组合的不同,整合素的分布和生理功能也不同。一种整合素可以有多个配体,而一种配体又可以和多种受体结合。整合素通常参与细胞内外的信号转导从而调控各种重要的细胞功能,如粘附、极性、分化、迁移和细胞分裂等。整合素 α_6 作为整合素家族成员之一,主要和 β_1 或 β_4 亚单位结合,组成 $\alpha_6\beta_1$ 和 $\alpha_6\beta_4$,是层黏连蛋白的特异性受体。整合素 α_6 在乳腺癌、肝癌、鼻咽癌和宫颈癌等多种肿瘤中表达上调,而在相应的正常组织中表达下调。整合素 α_6 在肿瘤的发生、新生血管生成、侵袭和转移中,发挥着重要作用。此外,肿瘤中整合素 α_6 的高表达,与其预后呈现负相关。因此,整合素 α_6 可以作为肿瘤诊断和预后评价的生物标志物,针对整合素 α_6 开发肿瘤分子影像探针显得尤为重要。

[0003] 研究证实cCRWYDENAC序列多肽具有很好的整合素 α_6 靶向性能,放射性核素标记的探针能够有效地对不同肿瘤细胞的整合素 α_6 表达情况进行评价。但是多肽两个末端半胱氨酸的二硫键成环方式,不利于多肽药物的药盒化。前期研究合成优化的cKiE多肽药物(cKRWYDENAIsoE),酰胺键首尾成环,更利于药物的药盒化。同时,cKiE二聚体多肽比单体具有更高的亲和力,增强药物的受体-配体亲和力可以达到更高的肿瘤摄取。但是体内代谢稳定实验显示,放射性核素标记的cKiE二聚体多肽探针 ^{99m}Tc -HYNIC-(GGG-cKiE)₂存在体内被部分分解,不稳定的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服以上技术缺陷,提供一种新型的基于Dar多肽的放射性药物。本发明中的Dar2为多肽二聚体(以下Dar2均表示Dar多肽二聚体),是将三个甘氨酸分子(GGG,G=Glutamic acid)与全反D型多肽anedyr(Dar)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整合素 α_6 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标记到Dar多肽二聚体分子上,在体内标记药物通过Dar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(SPECT)技术或正电子发射计算机断层显像(PET)技术,对整合素 α_6 阳性肿瘤进行显像诊断。

[0005] 本发明的目的具体是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种Dar2多肽放射性药物,包括Dar多肽二聚体和放射性核素,所述放射性核素通过双功能螯合剂标记所述Dar多肽二聚体;所述Dar多肽二聚体是将GGG与Dar多肽单体连

接,再将两个连接有GGG的Dar多肽单体二聚化而合成的多肽二聚体,以(GGG-Dar)₂表示;所述Dar多肽单体为D型氨基酸线性7元多肽,序列为:anedyr (D型-丙氨酸-D型-天冬酰胺-D型-谷氨酸-D型-天冬氨酸-D型-酪氨酸-D型-色氨酸-D型-精氨酸);所述放射性核素为^{99m}Tc、⁶⁸Ga、⁶⁴Cu、¹¹¹In、⁹⁰Y和¹⁷⁷Lu中任意一种,所述双功能螯合剂为HYNIC、NOTA、DOTA和DTPA中任意一种。

[0007] 进一步的,放射性核素为^{99m}Tc时,^{99m}Tc通过双功能螯合剂HYNIC标记连有药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar2多肽放射性药物,所述药代动力学连接剂为聚乙二醇分子(PEG_n,PEG=Polyethylene glycol,n不小于4,优选为4)或8-氨基辛酸(Aoc,8-aminooctanoic acid)。

[0008] 进一步的,放射性核素为⁶⁸Ga时,⁶⁸Ga通过双功能螯合剂NOTA或DOTA标记不含药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar2多肽放射性药物。

[0009] 一种所述的Dar2多肽放射性药物的制备方法,^{99m}Tc通过双功能螯合剂HYNIC标记连有药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar2多肽放射性药物,所述方法包括以下步骤:

[0010] a、HYNIC-PKM-COOH的制备

[0011] 以PKM表示所述药代动力学连接剂,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-COOH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 C₁₈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-COOH;

[0012] b、HYNIC-PKM-OSu的制备

[0013] 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-AC₁₈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;

[0014] c、(GGG-Dar)₂-Glu的制备

[0015] 将GGG-Dar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 C₁₈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(GGG-Dar)₂-Glu-Boc;将冻干产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc溶于1mLTFA,室温反应5min,反应液用氮气吹干,获得预期产物(GGG-Dar)₂-Glu;

[0016] d、HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂的制备

[0017] 将(GGG-Dar)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 C₁₈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-(GGG-Dar)₂;

[0018] e、^{99m}Tc-HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂的制备

[0019] 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-(GGG-Dar)₂的混合液500μL于10mL西林瓶中,将混合液冻干。在冻干粉末中加入1.0-1.5mLNa^{99m}TcO₄溶液,100℃水浴加热反应20-25分钟,待反应结束后室温冷却10分钟,制成Dar2多肽^{99m}Tc放射性药物。经HPLC分析备用。

[0020] 进一步的,所述步骤e中的三苯基膦三磺酸钠、三羟甲基甘氨酸、琥珀酸二钠、琥珀酸和HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂的混合液中,各物质的质量份数为:

三苯基膦三磺酸钠	5.0 mg
三羟甲基甘氨酸	6.5 mg
[0021] 琥珀酸二钠	38.5 mg
琥珀酸	12.7 mg
HYNIC-PKM-(GGG-Dar) ₂	50 μg。

[0022] 一种Dar₂多肽放射性药物的制备方法,⁶⁸Ga通过双功能螯合剂NOTA或DOTA标记不含药代动力学连接剂的Dar多肽二聚体形成所述Dar₂多肽放射性药物,所述方法包括以下步骤:

[0023] A、(GGG-Dar)₂-Glu的制备:

[0024] 将GGG-Dar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 C₁₈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(GGG-Dar)₂-Glu-Boc;将冻干产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc溶于1mLTFA,室温反应5min,反应液用氮气吹干,获得预期产物(GGG-Dar)₂-Glu;

[0025] B、NOTA (DOTA) - (GGG-Dar)₂的制备:

[0026] 将(GGG-Dar)₂-Glu和NOTA-CNS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 C₁₈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NOTA (DOTA) - (GGG-Dar)₂;

[0027] C、⁶⁸Ga-NOTA (DOTA) - (GGG-Dar)₂的制备:

[0028] 从锗-镓发生器新鲜淋洗⁶⁸GaCl₃,用2.5M的NH₄OAc调节pH至3.5。加入50μg NOTA (DOTA) - (GGG-Dar)₂,99℃水浴加热20分钟,待反应结束后室温冷却10分钟,制成Dar多肽⁶⁸Ga放射性药物。经HPLC分析备用。

[0029] 所述HPLC方法为使用Agilent 1260 HPLC系统配备YMC-Pack ODS-A C₁₈半制备柱(250×10mm, I.D.S-5μm, 12nm)或分析柱(250×4.6mm, I.D.S-5μm, 12nm),梯度淋洗30或20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2.5mL/min,淋洗梯度设定为起始时80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%B。步骤b:配备分析柱,流速1mL/min,淋洗梯度为初始时90%A和10%B,17.5分钟时60%A和40%B,20分钟时90%A和10%B。

[0030] 所述Dar₂多肽放射性药物用于整合素α₆阳性肿瘤患者的显像诊断。

[0031] 本实验合成优化的Dar多肽药物(anedywr),全反D型的多肽,简化多肽合成工序,药物的药盒化更易实现。同时,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,Dar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整合素α₆靶点,比单体具有更高的整合素α₆结合力,增强多肽的受体-配体亲和力以达到更高的肿瘤摄取。在用于放射性核素标记的双功能螯合剂HYNIC或DOTA与Dar二聚体多肽之间加入了药代

动力学修饰分子PKM,优化了药代动力学性质,以达到更好的肿瘤诊断效果。

[0032] 本发明的有益效果:

[0033] 1、本发明Dar2多肽放射性药物,全反D型多肽序列不会被体内的蛋白酶识别,能够有效提高体内代谢稳定性,从而提高肿瘤组织的摄取。

[0034] 2、本发明Dar2多肽放射性药物,首先将三个甘氨酸分子(GGG)与Dar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整合素 α_6 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。

[0035] 3、本发明在用于放射性核素标记的双功能螯合剂HYNIC与整合素 α_6 靶向的Dar2多肽之间引入了药代动力学修饰分子PKM,即HYNIC-PKM-(GGG-Dar)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。

[0036] 4、本发明中使用HYNIC作为双功能螯合剂,同时使用TPPTS和tricine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。

[0037] 5、本发明Dar2多肽放射性药物,是一种全新的整合素 α_6 靶向的分子影像探针,可以应用于多种整合素 α_6 高表达肿瘤的核医学分子成像,从而实现肿瘤的早期诊断与筛查。

[0038] 下面结合附图及具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

附图说明

[0039] 图1. (A) Dar多肽单体, (B) Dar2多肽(即Dar多肽二聚体), (C) HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂, (D) HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂, (E) NOTA-(GGG-Dar)₂, (F) DOTA-(GGG-Dar)₂的结构示意图。

[0040] 图2. Cy5.5-Dar2在HepG2细胞和肿瘤组织切片的荧光染色图。

[0041] 图3. (A) Biotin-Dar2与人源性整合素 $\alpha_6\beta_4$ 蛋白的结合亲和力测定图; (B) Dar和Dar2多肽体外竞争结合曲线图。

[0042] 图4. ^{99m}Tc-HYNIC-PKM-(GGG-Dar)₂标记物的结构示意图。

[0043] 图5. (A) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂与(B) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在正常ICR小鼠模型的代谢稳定性图。

[0044] 图6. ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂与^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在正常ICR小鼠模型的血液清除速率对比图。(虚线圈指示为肿瘤部位)

[0045] 图7. 在HepG2肝细胞癌模型中注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ (A) 0.5、1和2h后的SPECT/CT显像图; (B) 0.5h冷肽阻断组的SPECT/CT显像图; (C) 在HepG2肝细胞癌模型中注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂ 0.5h后的SPECT/CT显像图。

[0046] 图8. (A) 注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 0.5、1和2h后,在HepG2肿瘤模型中体内分布结果; (B) 注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 0.5h后,在HepG2肿瘤模型和HepG2肿瘤模型阻断实验中的体内分布结果对比; (C) 注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂和^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂ 0.5h后,在HepG2肿瘤模型中的体内分布结果对比。

[0047] 图9. (A) 在HepG2肝原位癌模型中注射^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 0.5h后的SPECT/CT显像图; (B) 解剖后的离体SPECT/CT显像图。(白色箭头指示为肿瘤部位)

具体实施方式

[0048] 本发明实施例中所采用的材料:

[0049] 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), NOTA-CNS, DOTA-NHS 购自美国 Noca-biochem 公司。GGG-anedywr (GGG-Dar) 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。

[0050] 实施例1:

[0051] 本实施例以 Dar2 多肽 (即 Dar 多肽二聚体) 体外特异性和亲和力测定为例。

[0052] Cy5.5-Dar2 在 HepG2 细胞和肿瘤组织切片的荧光染色: 荧光素 Cy5.5 与 Dar2 多肽偶联, 合成 Cy5.5-Dar2。将 Cy5.5-Dar2 分别与 HepG2 细胞和肿瘤组织切片孵育, HepG2 细胞和肿瘤组织切片的细胞膜上均能看到明显的荧光信号, 在阻断实验中, 此荧光信号明显下降 (图 2), 说明 Dar2 多肽能够特异性的与整合素 α_6 结合。

[0053] Dar2 多肽体外亲和力测定: 生物素 Biotin 与 Dar2 多肽偶联, 合成 Biotin-Dar2。将不同浓度的 Biotin-Dar2 与人源性整合素 $\alpha_6\beta_4$ 蛋白结合, 测得 Biotin-Dar2 与人源性整合素 $\alpha_6\beta_4$ 蛋白的结合亲和力 K_d 值为 $294.8 \pm 42.50 \text{ nM}$ (图 3A)。竞争结合曲线结果显示 Dar2 和 Dar 多肽的 IC_{50} 值分别为 $231.3 \pm 1.43 \text{ nM}$, $1.3 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (图 3B), 说明多肽二聚化使得其与整合素 α_6 的结合亲和力明显高于单体多肽。

[0054] 实施例2:

[0055] 本实施例以 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 多肽放射性药物及其制备方法为例。

[0056] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 中, Dar 多肽单体为 D 型多肽 anedywr, Dar 多肽二聚体是将连接剂 GGG 与 Dar 多肽单体连接, 再将两个连接有 GGG 的 Dar 多肽单体二聚化而成的 Dar 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 Dar 多肽二聚体, Dar 多肽二聚体与双功能螯合剂 HYNIC 之间还连接有药代动力学修饰分子 PEG₄, 所述 Dar2 多肽放射性药物为 ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂, 所述 Dar2 多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0057] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂ 制备方法如下:

[0058] 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 C₁₈ 半制备柱 (250 × 10 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), 梯度淋洗 30 分钟, 流速 2.5 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 80% A 和 20% B, 25 分钟时 60% A 和 40% B, 30 分钟时 80% A 和 20% 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。

[0059] 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 C₁₈半制备柱(250×10mm,I.D.S-5μm,12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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。

[0060] (GGG-Dar)₂-Glu的制备:将GGG-Dar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 C₁₈半制备柱(250×10mm,I.D.S-5μm,12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=2459.49([M+H]⁺),确认为预期产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc;将冻干产物(GGG-Dar)₂-Glu-Boc溶于1mL TFA,室温反应5min,反应液用氮气吹干,获得产物经MALDI-TOF-MS质谱分析m/z=2359.37([M+H]⁺),确认为预期产物(GGG-Dar)₂-Glu(图1B)。

[0061] HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的制备:将(GGG-Dar)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 C₁₈半制备柱(250×10mm,I.D.S-5μm,12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=2909.96([M+H]⁺),确认为预期产物HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂(图1C)。

[0062] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的制备:配制含三苯基膦三磺酸钠(TPPTS)5.0mg,三羟甲基甘氨酸(tricine)6.5mg,琥珀酸二钠38.5mg,琥珀酸12.7mg和50μg的HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的混合液500μL于10mL西林瓶中,将混合液冻干。在冻干粉末中加入1.0-1.5mL的Na^{99m}TcO₄溶液(10-35mCi),100℃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Dar₂多肽放射性药物。

[0063] 对Dar₂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 C₁₈分析柱(250×4.6mm,I.D.S-5μm,12nm),梯度淋洗20分钟,流速1mL/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,17.5分钟时60%A和40%B,20分钟时90%A和10%B。^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的标记率>95%,放射化学纯度>98%(图5A)。

[0064] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂与^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在正常ICR小鼠模型的体内代谢稳定性:取2只ICR小鼠,一只小鼠经尾静脉注射100μL(~37MBq)^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂,另外一只小鼠经尾静脉注射100μL(~37MBq)^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂,于注射后2小时,收集小鼠尿液,对尿液样品进行放射性HPLC分析。HPLC方法为使用

Agilent 1260 HPLC系统配备YMC-Pack ODS-A C₁₈分析柱(250×4.6mm, I.D.S-5μm, 12nm), 梯度淋洗20分钟, 流速1mL/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, 17.5分钟时60%A和40%B, 20分钟时90%A和10%B。实验结果显示^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂在小鼠体内具有良好的稳定性, 药物在体内保留原型形式不被降解, 这更有利于药物肿瘤摄取(图5A)。而^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂会在小鼠体内被部分降解(图5B)。

[0065] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂与^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在正常ICR小鼠模型的血液清除速率: 将ICR小鼠分为2组, 每组5只。一组小鼠经尾静脉注射100μL (~101kBq) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂, 另外一组小鼠经尾静脉注射100μL (~101kBq) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂, 于注射后1、5、15、30、60、90、120、150和180分钟取血, 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)。实验结果显示两种药物都在血液中清除很快, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的血液半衰期较之前报道的^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂稍长一些, 更有利于SPECT显像(图6)。

[0066] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂在荷瘤鼠中的SPECT/CT显像: 在HepG2肝细胞癌肿瘤模型中, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的肿瘤摄取清晰可见, 除了肾有较高摄取外, 其它脏器背景较低, 且多肽在肿瘤部位滞留时间更长, 更有利于肿瘤的诊断(图7A)。在阻断实验组中, 肿瘤摄取明显降低(图7B), 说明多肽与整合素α₆位点的特异性结合。此外, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在荷瘤鼠中的SPECT/CT显像如图7C所示, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂也在肿瘤有摄取, 但由于其肾脏摄取过高, 导致显像对比度降低, 从而使得其不能对肿瘤进行清晰显像。

[0067] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂在荷瘤鼠中生物分布: 将BALB/c Nude鼠荷HepG2肝细胞癌肿瘤分为4组, 每组4只。其中三组小鼠经尾静脉注射100μL (~74kBq) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂, 于注射后0.5、1和2小时处死; 另外一组小鼠经尾静脉共注射100μL (~74kBq) ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂和500μg Dar多肽, 于注射后0.5小时处死; 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)。实验结果验证了显像结果并显示了探针在各个组织器官中的分布(图8A, 8B); 此外, 与^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-cKiE)₂在荷瘤鼠中生物分布相比, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂在肿瘤的摄取与其相似, 但^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂的肾脏摄取明显降低, 这样会使得探针的显像对比度更高, 肿瘤显像效果更好(图8C)。

[0068] ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂在HepG2肝原位肿瘤模型中的SPECT/CT显像: 在HepG2肝原位肿瘤模型中, ^{99m}Tc-HYNIC-PEG₄-(GGG-Dar)₂也有较高的肿瘤摄取(图9A), 能对肝原位癌进行SPECT显像。各个器官离体SPECT/CT显像结果显示, 肝脏上的肿瘤有明显的放射性吸收信号(图9B), 与在体显像相一致。

[0069] 实施例3:

[0070] 本实施例以^{99m}Tc-HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂多肽放射性药物及其制备方法为例。

[0071] ^{99m}Tc-HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂中, Dar多肽单体为D型多肽anedywr, Dar多肽二聚体是将连接剂GGG与Dar多肽单体连接, 再将两个连接有GGG的Dar多肽单体二聚化而成的Dar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Dar多肽二聚体, Dar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Aoc, 所述Dar₂多肽放射性药

物为 ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂,所述Dar₂多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0072] ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂制备方法如下:

[0073] HYNIC-Aoc-COOH的制备:将Fmoc保护的Aoc-COOH溶于DMF,加入哌啶使终浓度为20%,室温反应20分钟后,加入10mL 4℃乙醚使Aoc-COOH沉淀,4000rpm 4℃离心5分钟,弃掉上清,沉淀用4℃乙醚洗涤3次,旋蒸除去残留的乙醚,获得产物为NH₂-Aoc-COOH;将HYNIC-NHS和NH₂-Aoc-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 C₁₈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 C₁₈半制备柱(250×10mm, I.D.S-5μm, 12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=462.52 ([M+H]⁺),确认为预期产物HYNIC-Aoc-COOH。

[0074] HYNIC-Aoc-OSu的制备:将HYNIC-Aoc-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 C₁₈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 C₁₈半制备柱(250×10mm, I.D.S-5μm, 12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=559.59 ([M+H]⁺),确认为预期产物HYNIC-Aoc-OSu。

[0075] (GGG-Dar)₂-Glu的制备:其制备方法同上。

[0076] HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂的制备:将(GGG-Dar)₂-Glu和HYNIC-Aoc-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 C₁₈半制备柱(250×10mm, I.D.S-5μm, 12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=2803.88 ([M+H]⁺),确认为预期产物HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂(图1D)。

[0077] ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂的制备:配制含三苯基膦三磺酸钠(TPPTS)5.0mg,三羟甲基甘氨酸(tricine)6.5mg,琥珀酸二钠38.5mg,琥珀酸12.7mg和50μg的HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂的混合液500μL于10mL西林瓶中,将混合液冻干。在冻干粉末中加入1.0-1.5mL的Na^{99m}TcO₄溶液(10-35mCi),100℃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Dar₂多肽放射性药物。

[0078] 对Dar₂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 C₁₈分析柱(250×4.6mm, I.D.S-5μm, 12nm),梯度淋洗20分钟,流速1mL/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,17.5分钟时60%A和40%B,20分钟时90%A和10%B。 ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂的标记率>95%,放射化学纯度>98%。

[0079] ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂在荷瘤鼠中的SPECT/CT显像:在HepG2肝细胞癌肿瘤模型中, ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-(GGG-Dar)₂的肿瘤摄取清晰可见,但胆囊和肝脏有明显摄取。在阻断实验组中,肿瘤摄取明显降低,说明多肽与整合素 α_6 位点的特异性结合。

[0080] 实施例4:

[0081] 本实施例以 ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂多肽放射性药物及其制备方法为例。

[0082] ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂中,Dar多肽为D型多肽anedyr, Dar多肽二聚体是将连接剂GGG与Dar多肽单体连接,再将两个连接有GGG的Dar多肽单体二聚化而成的Dar多肽二聚体,放射性核素 ^{68}Ga 通过一个螯合剂NOTA标记所述Dar多肽二聚体,所述Dar₂多肽放射性药物为 ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂,所述Dar₂多肽放射性药物为无色透明液体针剂。

[0083] ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂制备方法如下:

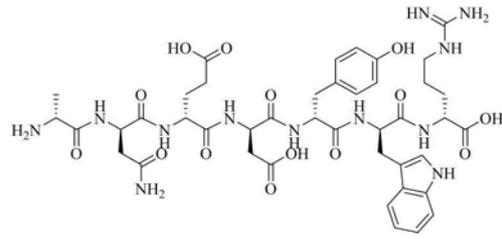
[0084] (GGG-Dar)₂-Glu的制备:其制备方法同上。

[0085] NOTA-(GGG-Dar)₂的制备:将(GGG-Dar)₂-Glu和NOTA-CNS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 C₁₈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 C₁₈半制备柱(250×10mm, I.D.S-5 μ m, 12nm),梯度淋洗30分钟,流速2.5mL/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80%A和20%B,25分钟时60%A和40%B,30分钟时80%A和20%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=2809.88([M+H]⁺),确认为预期产物NOTA-(GGG-Dar)₂(图1E)。

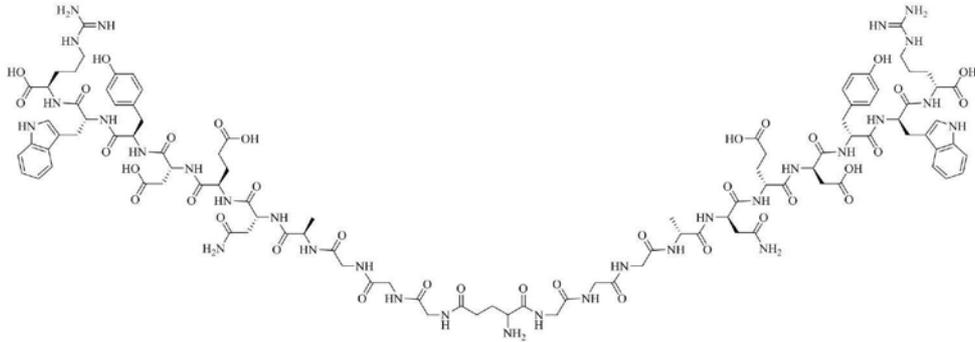
[0086] ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂的制备:使用0.05M的HCl从镅-镓发生器中每1mL一个馏分淋洗 $^{68}\text{GaCl}_3$,共淋洗5mL。选取第1-2mL的 $^{68}\text{GaCl}_3$,用2.5M的NH₄OAc调节pH至3.5。加入50 μ g DOTA-PEG₄-(GGG-Dar)₂,99℃水浴加热20分钟,待反应结束后室温冷却5分钟,制成Dar多肽放射性药物。

[0087] 对Dar₂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 C₁₈分析柱(250×4.6mm, I.D.S-5 μ m, 12nm),梯度淋洗20分钟,流速1mL/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,17.5分钟时60%A和40%B,20分钟时90%A和10%B。 ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂的标记率>95%,放射化学纯度>98%。

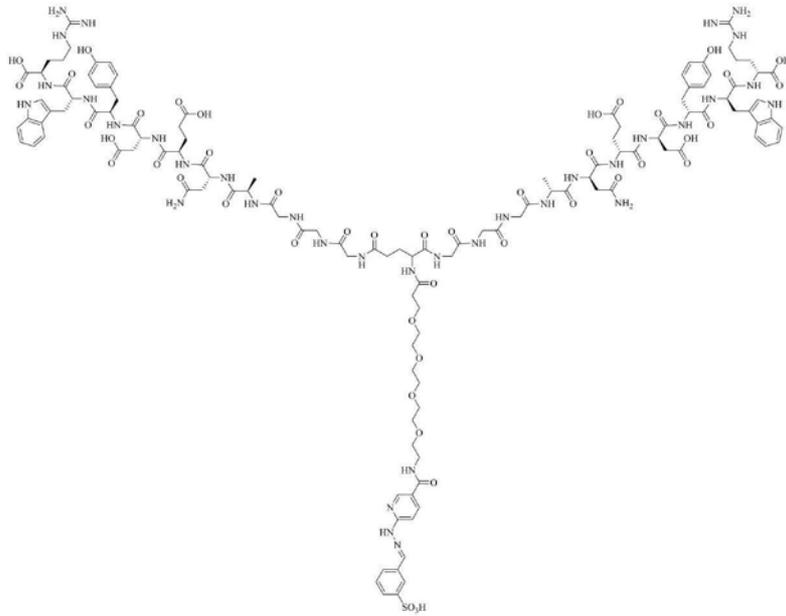
[0088] ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂在荷瘤鼠中的PET/CT显像:在HepG2肝细胞癌肿瘤模型中, ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂的肿瘤摄取清晰可见,除了肾有较高摄取外,其它脏器背景较低,且探针在肿瘤部位滞留时间长,有利于肿瘤的诊断。在阻断实验组中,肿瘤摄取明显降低,说明探针与整合素 α_6 位点的特异性结合。 ^{68}Ga -NOTA-(GGG-Dar)₂在HepG2肝原位肿瘤模型中也有较高的肿瘤摄取,能对肝原位癌进行PET显像。



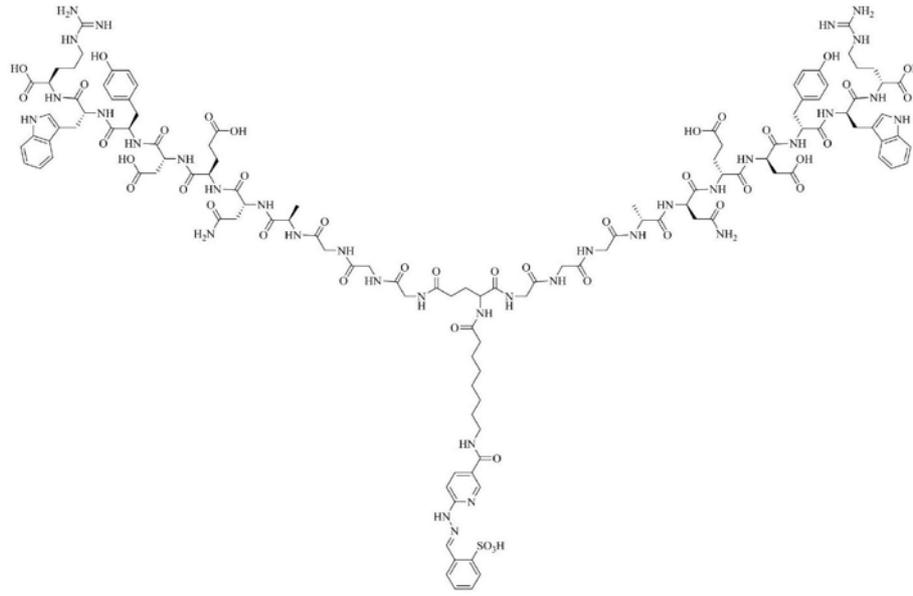
(A)



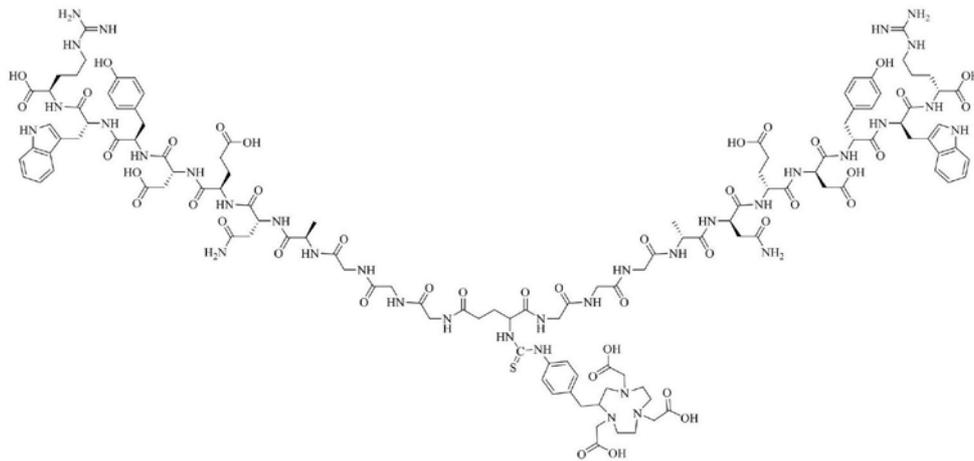
(B)



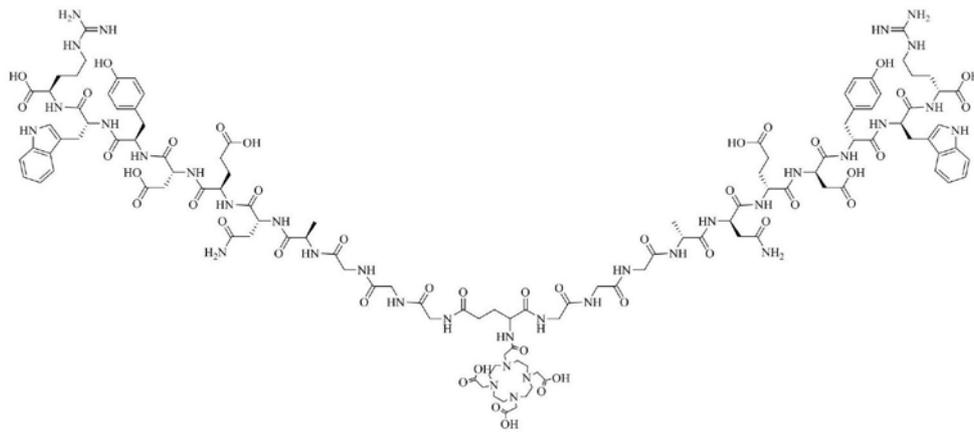
(C)



(D)



(E)



(F)

图1

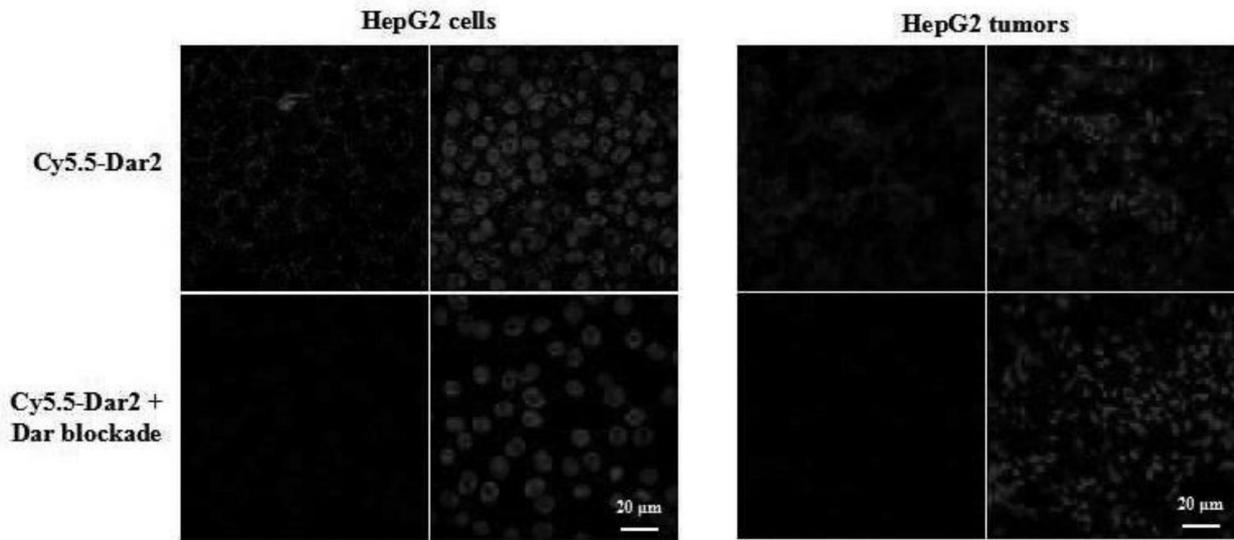


图2

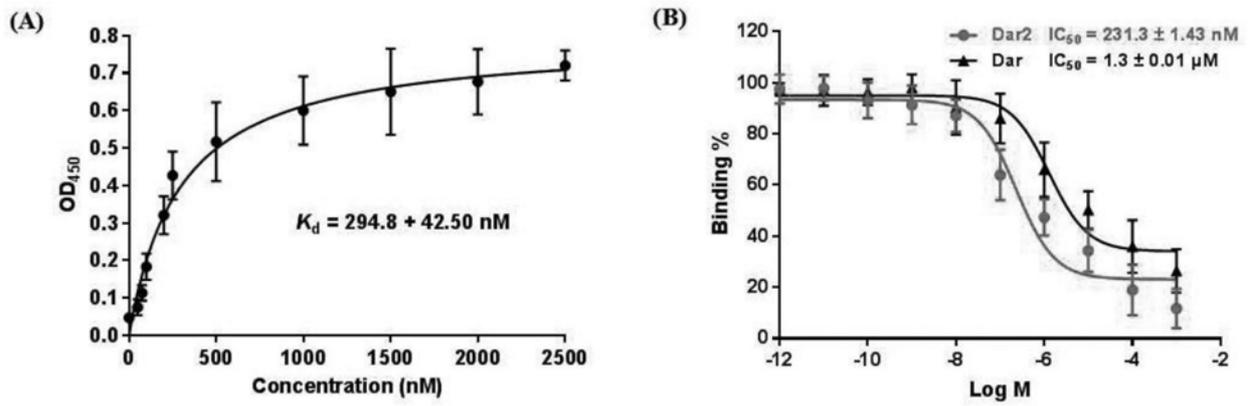


图3

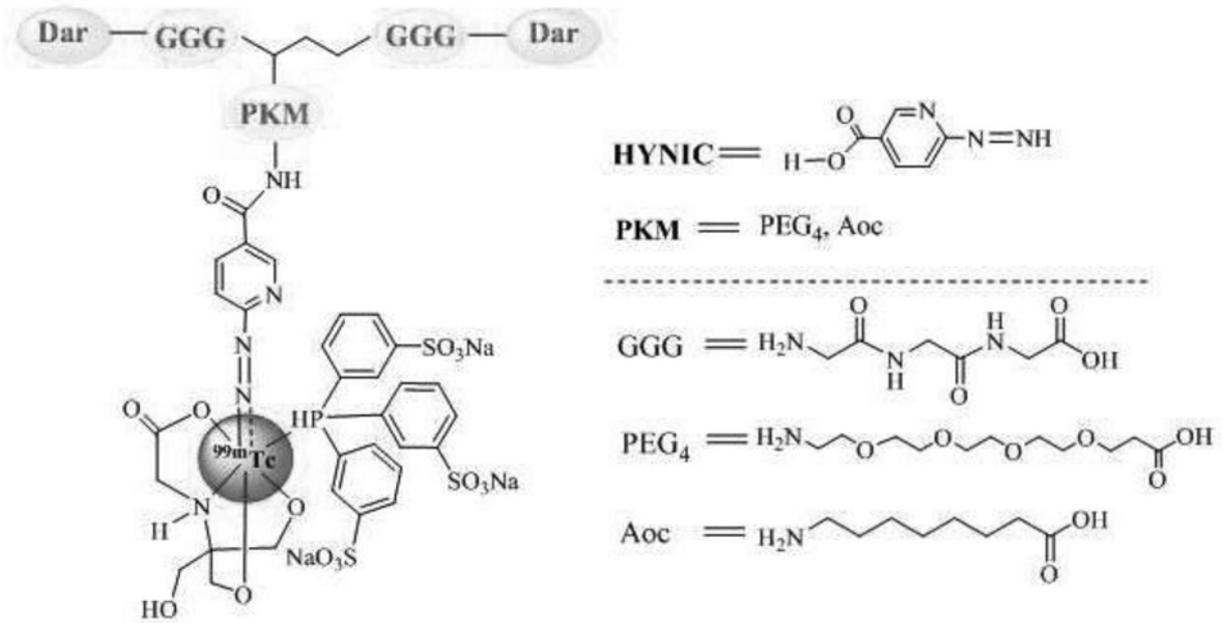


图4

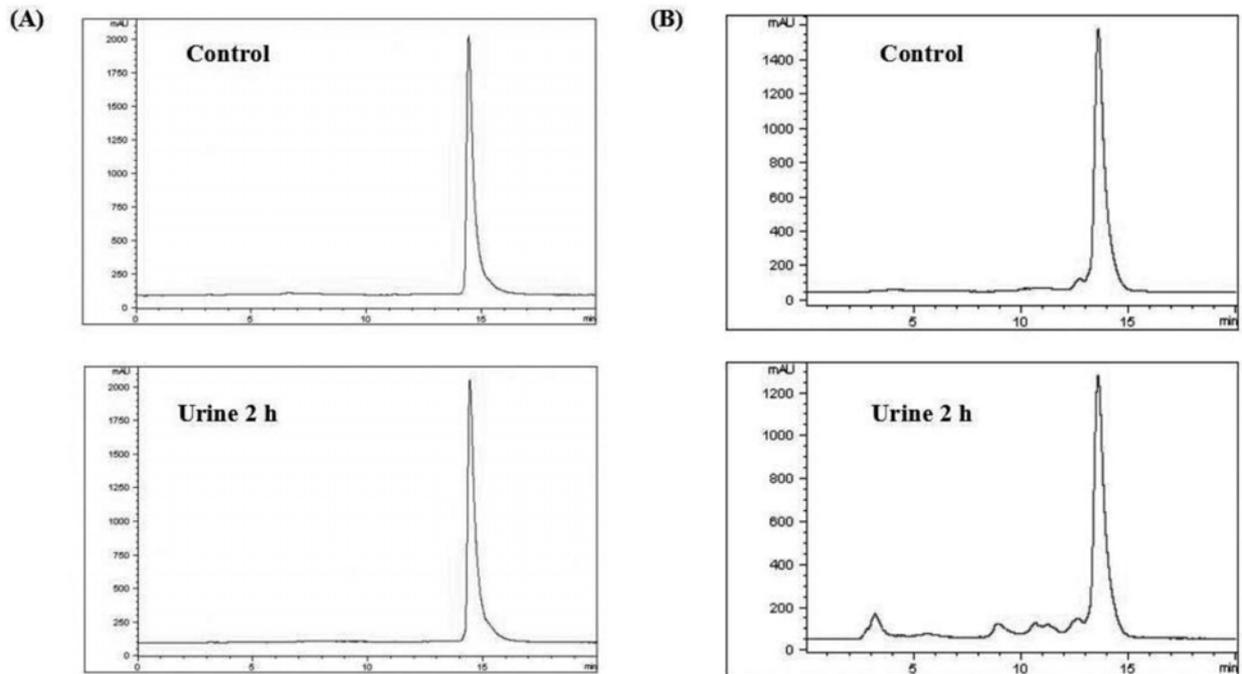


图5

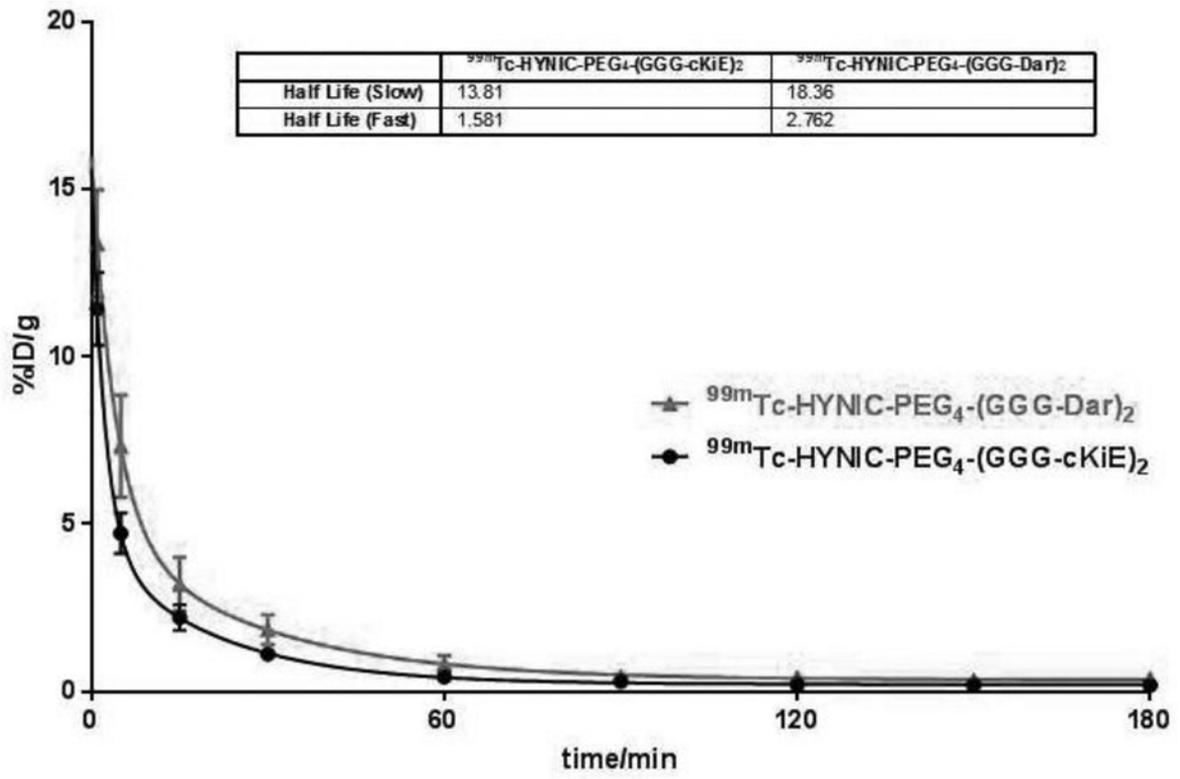


图6

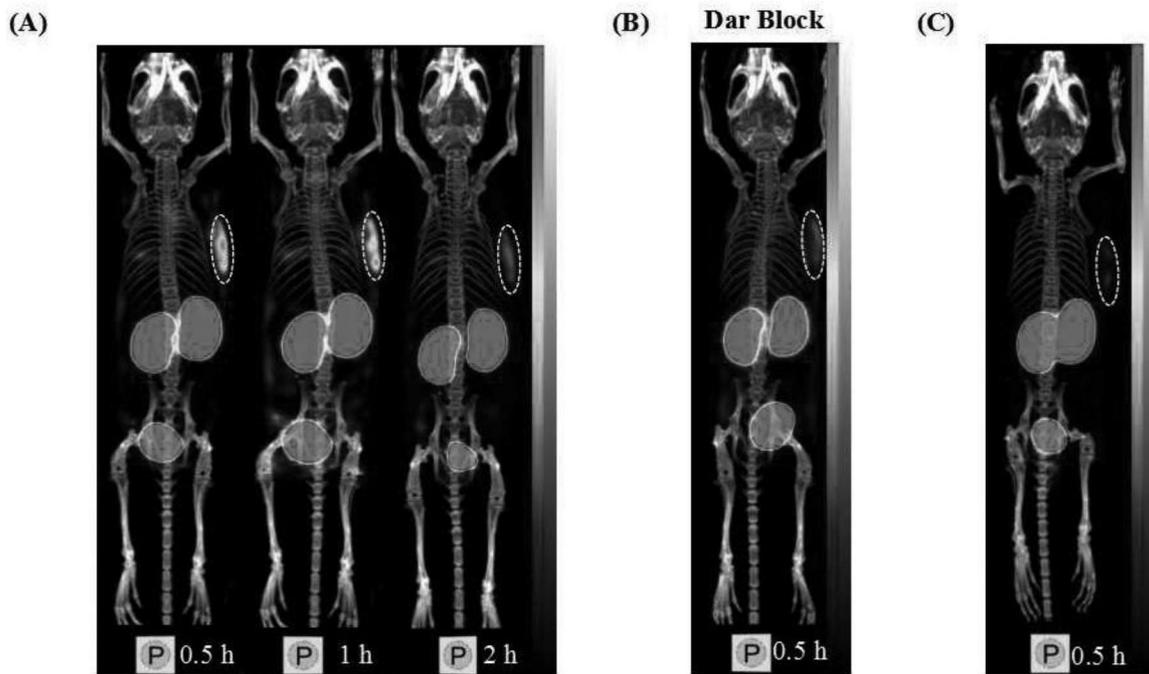
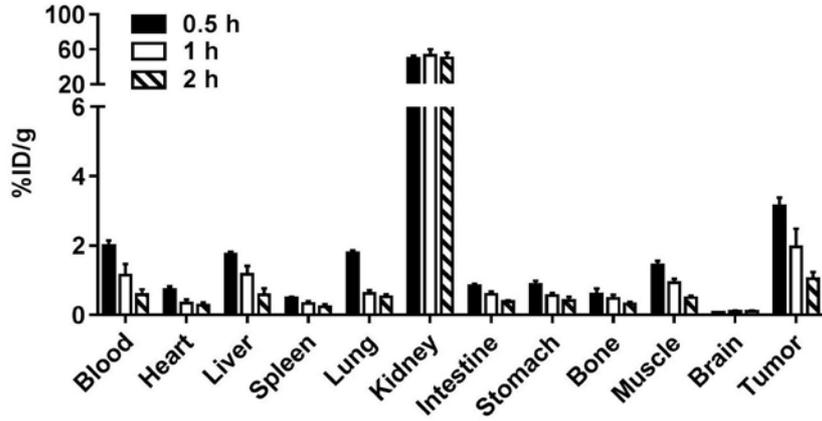
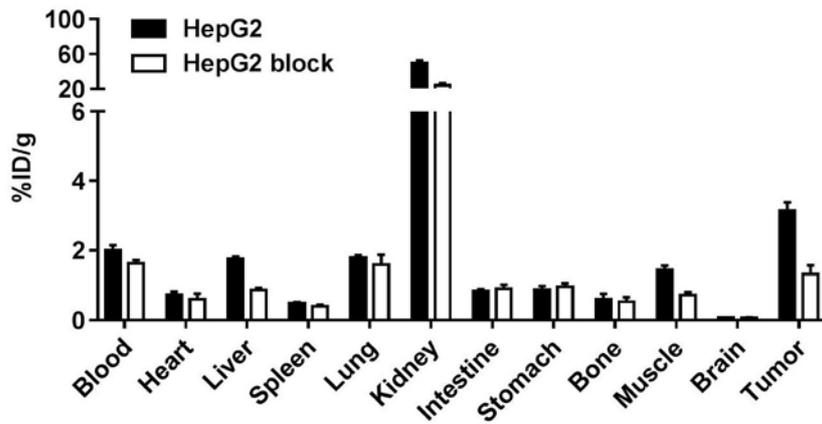


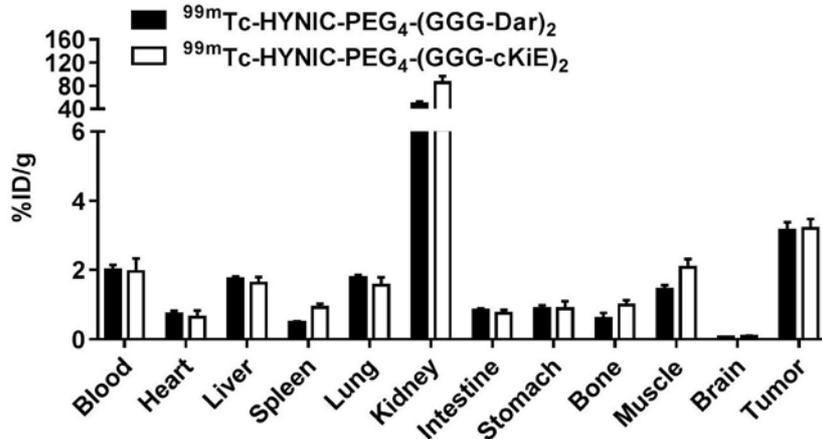
图7



(A)



(B)



(C)

图8

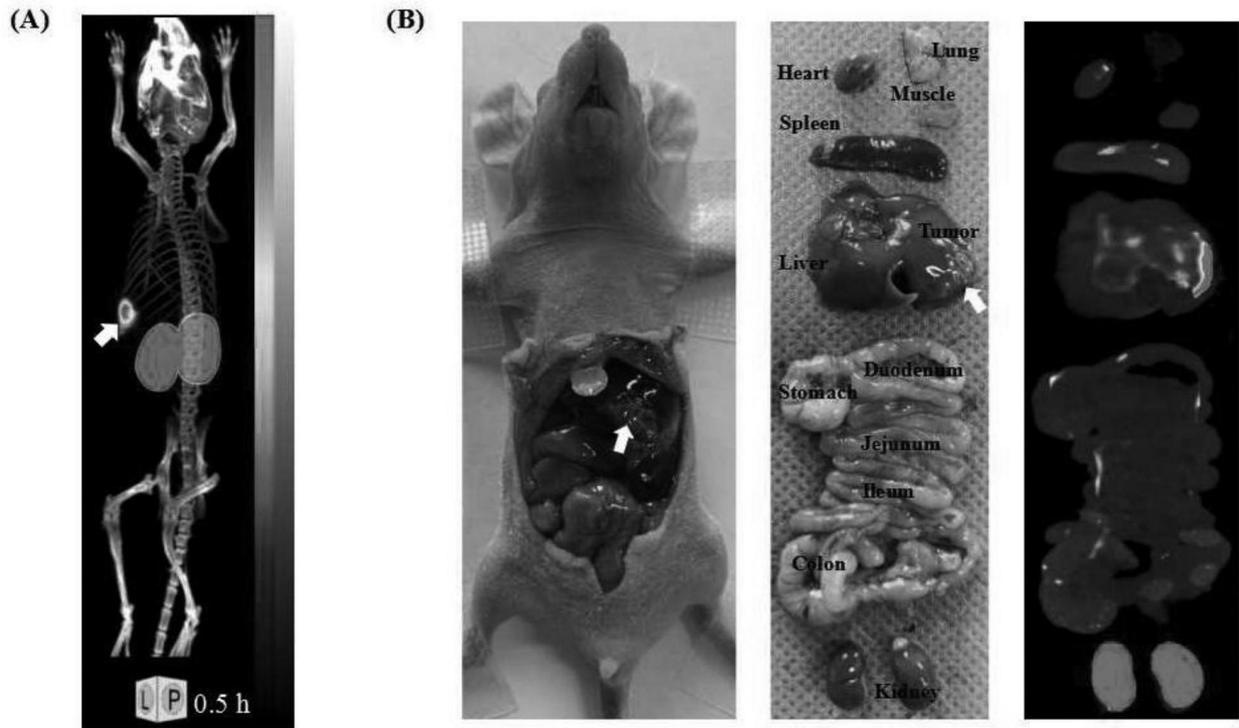


图9