



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101089020 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 200610027652.X

(22) 申请日 2006.06.13

(73) 专利权人 中国科学院上海应用物理研究所  
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路 2019 号

(72) 发明人 尹端沚 程登峰 汪勇先 张岚

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002

代理人 薛琦

(51) Int. Cl.

*C07K 14/47* (2006.01)

*A61K 51/08* (2006.01)

*A61K 101/02* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1186443 A, 1998.07.01, 全文.

BHARGAVA S 等. A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties. JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION 15 3. 2002, 15(3), 145-153.

李俊玲等.  $^{18}\text{F}$  标记多肽药物的研究进展. 核技术 26 8. 2003, 26(8), 638-640.

ONOUE S 等. Structure-activity relationship of synthetic truncated analogues of vasoactive intestinal peptide (VIP): an enhancement in the activity by a substitution with arginine. LIFE SCIENCES 74 12. 2004, 74(12), 1465-1477.

审查员 林峻凯

权利要求书 2 页 说明书 7 页

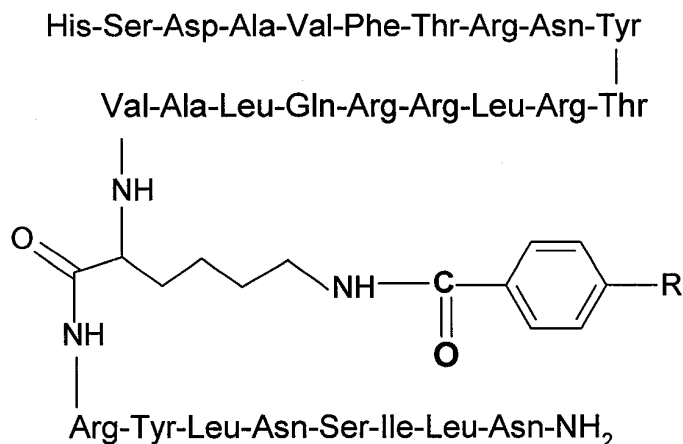
(54) 发明名称

血管活性肠肽类似物及其放射性标记物, 以及它们的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 VIP 类似物, 其具有 SEQ ID No. 1 所示的氨基酸序列, 即将 VIP 氨基酸序列中第 8 位的天冬氨酸残基和第 15、21 位赖氨酸残基替换成精氨酸残基, 第 17 位的甲硫氨酸残基替换成亮氨酸残基。本发明还公开了上述 VIP 类似物的放射性标记物, 特别是两种  $^{18}\text{F}$  标记的 ( $\text{R}^{8,15,21}, \text{L}^{17}$ )VIP 类似物以及它们的制备方法。本发明的 ( $\text{R}^{8,15,21}, \text{L}^{17}$ )VIP 类似物具有更佳的代谢稳定性和受体结合性, 其放射性标记物更适合于制备用于检测体内 VIP 受体的放射性显像试剂。

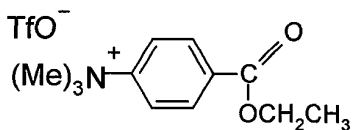
1. 一种血管活性肠肽类似物，其氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示。
2. 如权利要求 1 所述的血管活性肠肽类似物的制备方法，其包括采用固相合成法合成，并经 HPLC 纯化。
3. 如权利要求 1 所述的血管活性肠肽类似物的放射性标记物，其特征在于其为所述血管活性肠肽类似物的  $^{125}\text{I}$  或  $^{18}\text{F}$  标记物。
4. 如权利要求 3 所述的放射性标记物，其特征在于所述血管活性肠肽类似物的  $^{18}\text{F}$  标记物如下列结构式 I 所示：



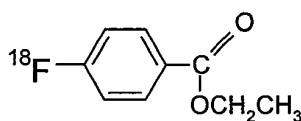
I

其中，R 为  $^{18}\text{F}$  或  $\text{CH}_2^{18}\text{F}$ 。

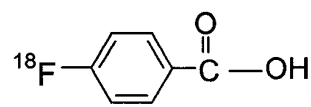
5. 如权利要求 4 所述的放射性标记物的制备方法，其包括下列步骤：
  - 1) 含  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ， $\text{K}_{222}$ 、 $^{18}\text{F}-\text{F}^-$  的混合物与式 II 化合物乙基-4-(三甲胺苯甲酸酯)-三氟磺酸盐的无水乙腈溶液进行  $^{18}\text{F}^-$  亲核取代得到式 III 化合物 4-[ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酸乙酯；
  - 2) 式 III 化合物水解得到式 IV 化合物 4-[ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酸；
  - 3) 式 IV 化合物与 O-(N-琥珀酰亚胺)N,N,N,N-四甲基脲四氟硼酸盐反应得到式 V 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酸酯；



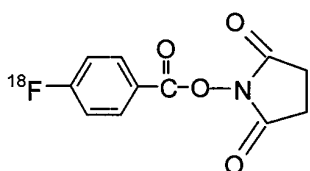
II



III



IV



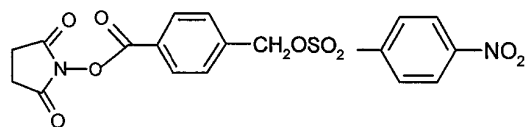
V

- 4) 式 V 化合物与权利要求 1 所述的血管活性肠肽类似物反应得到式 I 化合物，其中 R 为  $^{18}\text{F}$ 。
6. 如权利要求 5 所述的制备方法，其特征在于步骤 4) 制得的式 I 化合物还经过 HPLC

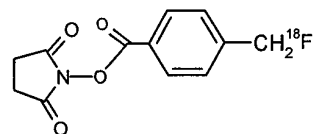
梯度淋洗纯化。

7. 如权利要求 4 所述的放射性标记物的制备方法，其包括下列步骤：

1) 含  $K_2CO_3$ 、 $K_{222}$ 、 $^{18}F-F^-$  的混合物与式 VI 化合物 N-琥珀酰亚胺 4-[4-硝基苯磺酰)氧甲基]苯甲酸酯的无水乙腈溶液进行  $^{18}F^-$  亲核取代得到式 VII 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[ $^{18}F$ ]氟甲基苯甲酸酯；



VI



VII

2) 式 VII 化合物与权利要求 1 所述的血管活性肠肽类似物反应得到式 I 化合物，其中 R 为  $CH_2^{18}F$ 。

8. 如权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于步骤 1) 得到的式 VII 化合物还经过 Sep-Pak 硅胶柱进行分离，先用体积比为 1 : 1 的二氯甲烷 / 正己烷淋洗，然后用二氯甲烷洗脱。

9. 如权利要求 3 ~ 4 任一项所述的血管活性肠肽类似物的放射性标记物在制备用于检测体内血管活性肠肽受体的放射性显像试剂中的应用。

## 血管活性肠肽类似物及其放射性标记物,以及它们的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 VIP 类似物及其放射性标记物,特别是两种  $^{18}\text{F}$  的标记物,以及它们的制备方法,和该 VIP 类似物的放射性标记物在制备用于检测体内 VIP 受体的放射性显像试剂中的应用。

### 背景技术

[0002] 血管活性肠肽 (VIP) 是一种由 28 个氨基酸 (His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn) 组成的多肽,25 年前第一次从猪十二指肠中提取出来,它属于胰高血糖素-胰泌素族多肽,具有广泛的生物功能。VIP 的两种受体 VIPR1 和 VIPR2 被发现大量表达于多种肿瘤细胞上,包括:结肠癌细胞,胰腺癌细胞,前列腺癌细胞等,在这些肿瘤细胞上 VIP 受体密度要高于生长抑素受体,VIP 与它的两种受体有着相当的高亲和力。1994 年以来, $^{123}\text{I}$ -VIP, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TP3654, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -P1666 和  $^{18}\text{F}$ -[Arg<sup>15</sup>, Arg<sup>21</sup>]VIP 这些 VIP 的衍生物已被作为肿瘤显像试剂进行了相关生物学、医学评价。体外细胞结合实验证明  $^{123}\text{I}$ -VIP 跟它的受体有着高的生物活性和亲和性,然而临床实验结果却不理想,肿瘤检测率远低于生长抑素受体显像结果。相关实验结果表明  $^{123}\text{I}$ -VIP 在体内很快被多种蛋白酶降解,这可能是  $^{123}\text{I}$ -VIP 作为体内显像试剂不成功的关键原因。因此 VIP 的结构必须进行修饰,才能满足体内显像的需要。实验证明,两种  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记的 VIP 类似物显像剂已取得了好的体内显像结果。目前,具有更高的分辨率和灵敏度的正电子断层扫描仪 (PET) 在全球已得到广泛应用。而适合于 PET 显像的具有靶向特异性和快速血液清除性优势的多肽类显像药物需要进行研究, $^{18}\text{F}$  作为一种正电子核素,具有合适的物理半衰期 (110min),较低的正电子能量 (0.635MeV),较小的体积以及多种  $^{18}\text{F}$  标记多肽的方法,适合进行多肽标记。 $^{18}\text{F}$ -VIP 作为多肽类正电子药物是一个好的选择,然而  $^{18}\text{F}$ -[Arg<sup>15</sup>, Arg<sup>21</sup>]VIP 体内诊断乳腺癌的结果却不令人满意,它的靶/非靶比相对于 2-氟 ( $^{18}\text{F}$ ) 2-脱氧葡萄糖 ( $^{18}\text{F}$ -FDG) 要低两到三倍;而且,由于其氨基酸序列第 17 位的甲硫氨酸易氧化,影响其体内稳定性。因此,尚需寻找一种体内代谢更稳定、与受体更能结合的适合 PET 显像的  $^{18}\text{F}$ -VIP 类似物。

### 发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题即是上述课题。首先,是提供一种代谢稳定性和受体结合性均佳、且便于放射性标记的 VIP 类似物。

[0004] 本发明的 VIP 类似物,其氨基酸序列与 VIP 不同的是:将上述 VIP 第 8 位的天冬氨酸残基 (-Asp-) 替换成精氨酸残基 (-Arg-),第 15、21 位的赖氨酸残基 (-Lys-) 替换成精氨酸残基 (-Arg-),第 17 位的甲硫氨酸残基 (-Met-) 替换成亮氨酸残基 (-Leu-),即具有 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列。故本发明的 VIP 类似物又可简称为 (R<sup>8, 15, 21</sup>,

L<sup>17</sup>) VIP。

[0005] 本发明所说的“VIP 类似物”是指具有与内源性 VIP 不同的氨基酸序列，但立体结构类似而具有类似生物活性的一类物质。

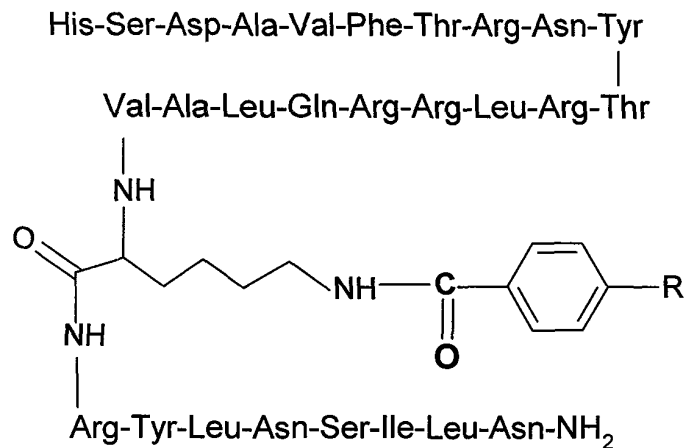
[0006] 本发明的再一目的是提供上述 VIP 类似物的制备方法。

[0007] 该制备方法包括采用常规的固相合成法合成，并经 HPLC 纯化。

[0008] 本发明的又一目的是提供上述 VIP 类似物的放射性标记物，诸如 <sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>99m</sup>Tc 或 <sup>18</sup>F 等。本发明优选简单易合成的 <sup>125</sup>I 标记物，以及适合 PET 显像的 <sup>18</sup>F 标记物。

[0009] 其中，更优选的所述 VIP 类似物的两种 <sup>18</sup>F 标记物如下列结构式 I 所示：

[0010]

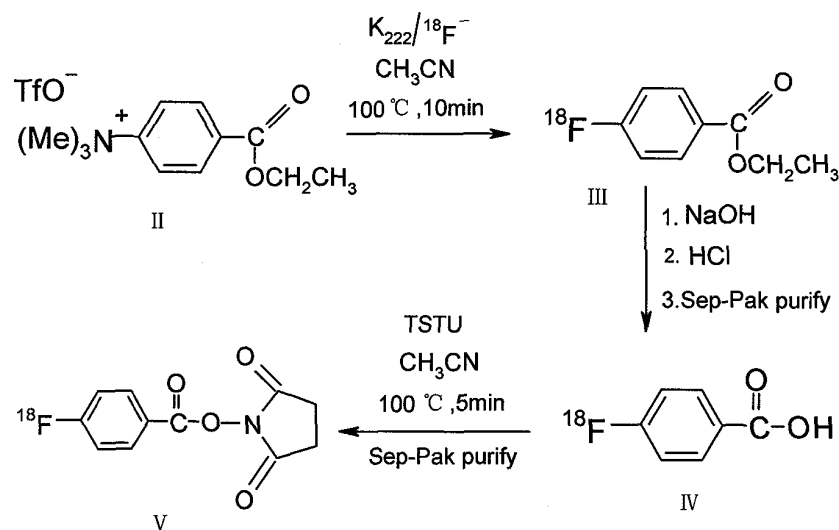


[0011] 其中，R 为 <sup>18</sup>F (化合物 1) 或 CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F (化合物 2)。

[0012] 本发明的再一目的是提供上述两种 <sup>18</sup>F 标记的 (R<sup>8, 15, 21</sup>, L<sup>17</sup>) VIP 类似物的制备方法。

[0013] 其中化合物 1 的制备方法较佳地是采用 N-琥珀酰亚胺-4-[<sup>18</sup>F]氟苯甲酸酯 (合成路线如下所示) 与本发明 VIP 类似物进行连接反应而成。

[0014]



[0015] 其包括下列步骤：

[0016] 1) 含 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>222</sub>, <sup>18</sup>F-F<sup>-</sup> 的混合物与式 II 化合物乙基-4-三甲胺苯甲酸酯-三氟硼酸盐的无水乙腈溶液进行 <sup>18</sup>F 亲核取代得到式 III 化合物 4-[<sup>18</sup>F]氟苯甲酸乙酯；

[0017] 2) 式 III 化合物水解得到式 IV 化合物 4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸；

[0018] 3) 式 IV 化合物与 O-(N-琥珀酰亚胺)N, N, N, N, -四甲基脲四氟硼酸盐 (TSTU) 反应得到式 V 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸酯；

[0019] 4) 式 V 化合物与权利要求 1 所述的 VIP 类似物反应得到化合物 1。

[0020] 其中, 上述各中间产物通过放射性薄层色谱仪进行表征, 对照非放射性标准品, 即 4-氟苯甲酸乙酯、4-氟苯甲酸及 N-琥珀酰亚胺-4-氟苯甲酸酯按文献报导方法合成并进行了 <sup>1</sup>H-NMR 表征 [Fredriksson, A., J Labelled CpdRadiopharm 44, 509-519(2001)]。

[0021] 上述步骤 1) 优选在 100°C ± 10°C 油浴中进行反应 10 分钟左右；

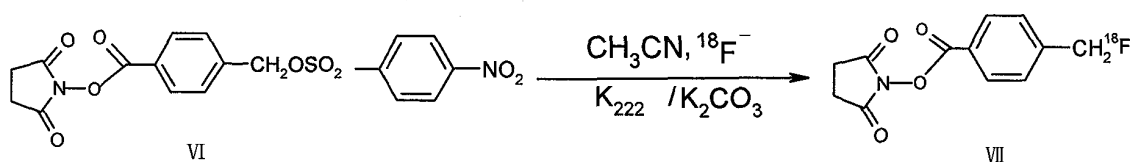
[0022] 步骤 2) 水解反应选用 1mol/L NaOH 溶液在 90°C ± 10°C 反应 8min 左右, 然后用 1mol/L HCl 溶液中和；

[0023] 步骤 2) 和 3) 的产物较佳地是经过 Sep-Pak Plus C18 柱分离；

[0024] 而步骤 4) 包括将式 V 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸酯溶解在己腈中, 与本发明 VIP 类似物的硼砂-硼酸缓冲液进行反应, 再将制得的化合物 1 最好经过分析型 HPLC 梯度淋洗纯化。

[0025] 至于本发明化合物 2 的制备方法, 优选采用 N-琥珀酰亚胺-4-[<sup>18</sup>F] 氟甲基苯甲酸酯 (合成路线如下所示) 与本发明 VIP 类似物进行连接反应而成。

[0026]



[0027] 其包括下列步骤：

[0028] 1) 含 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>222</sub>、<sup>18</sup>F-F<sup>-</sup> 的混合物与式 VI 化合物 N-琥珀酰亚胺 4-[(4-硝基苯磺酰)氧甲基]苯甲酸酯的无水乙腈溶液进行 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 亲核取代得到式 VII 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[<sup>18</sup>F] 氟甲基苯甲酸酯；

[0029] 2) 式 VII 化合物与权利要求 1 所述的 VIP 类似物反应得到化合物 2。

[0030] 其中, 上述中间产物通过放射性薄层色谱仪进行表征, 对照非放射性标准品, 即 N-琥珀酰亚胺-4-氟甲基苯甲酸酯按文献报导方法合成并进行了 <sup>1</sup>H-NMR 表征 [Lang, L., Appl.Radiat.Isot, 45, 1155-1163(1994)]。

[0031] 较佳地, 上述步骤 1) 是在 80°C ± 10°C 油浴中进行反应 10 分钟左右；得到的式 VII 化合物还经过 Sep-Pak 硅胶柱进行分离, 先用体积比为 1 : 1 的二氯甲烷 / 正己烷淋洗, 然后用二氯甲烷洗脱。步骤 2) 制得的化合物 2 最好也经过分析型 HPLC 梯度淋洗纯化。

[0032] 本发明进行 <sup>18</sup>F 标记的 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 的活化采用现有常规技术, 通常为含 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>222</sub>、<sup>18</sup>F-F<sup>-</sup> 的无水混合物。(1.Coenen H.H, Colosimo M., Schüller M.et al.J.Label.Comp. Radiopharm.1986 ; 23 : 587-595 ; 2.Block D., Klätte B., Knöchel A.J.Label.Comp. Radiopharm.1986 ; 23 : 467-477 ; 3.Block D., Coenen H.H., Stocklin G.J.Label.Comp. Radiopharm.1987 ; 24 : 1029-1042)。

[0033] 本发明还可以常规的标记方法对 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 进行  $^{125}\text{I}$  标记 (Pallela V.R, Thakur M.L, Chakder S, and Rattan S J Nucl Med.1999 ; 40 : 352-360)。

[0034] 本发明 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 相较于 VIP, 进行了上述位点氨基酸的替换后, 较 VIP 有更高的受体结合力和体内稳定性; 而且由于 VIP 氨基酸序列中存在 3 个 Lys, 而琥珀酯能与 Lys 上的  $\epsilon$ -氨基成功结合 (1.Jacobson K.A, Furlano D.C, Kirk L, J.Fluorine Chem.1988 ; 39 : 339-347 ; 2.Vadyanathan G and Zalutsky M.R., Bioconjugate Chem.1994 ; 5 : 352-356 ; 3.Wester H.J., Hamacher K and Stöcklin G, Nucl.Med. Biol.1996 ; 23 : 365-372), 但是 3 个 Lys 的存在影响标记和分离, 而现保留第 20 位的 Lys 进行修饰和放射性核素, 如  $^{18}\text{F}$  进行标记, 更易于放射性标记物的标记和分离。

[0035] 为了满足临床进行 PET 显像的要求, 本发明设计了两种新的  $^{18}\text{F}$  标记的 VIP 类似物 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP, 并设计了两种不同的制备方法, 分别选择 N-琥珀酰亚胺-4- $^{18}\text{F}$  氟苯甲酸酯和 N-琥珀酰亚胺-4- $^{18}\text{F}$  氟甲基苯甲酸酯进行  $^{18}\text{F}$  标记。

[0036] 其中, 化合物 1 的制备方法选用合适的路线及最佳条件, 通过 HPLC 梯度淋洗纯化, 得到较高的标记率, 高的放化纯度和比活度, 能满足临床使用的要求。

[0037] 而化合物 2 的制备方法中合成 N-琥珀酰亚胺-4- $^{18}\text{F}$  氟甲基苯甲酸酯的步骤 1) 中, 其选用无水乙腈作为反应溶剂, 得到高的标记率, 分离步骤采用 Sep-Pak 硅胶柱代替传统的 HPLC 分离, 分离步骤简便, 而且得到低沸点的二氯甲烷洗脱液, 容易吹干, 便于下一步反应; 步骤 2) 与化合物 1 制备过程的步骤 4) 类似, 放化纯度大于 98%, 总的放化产率约为 22% (衰变校正)。此制备方法合成路线简便, 合成时间短, 放化纯度高, 比活度高。

[0038] 可见, 本发明 VIP 类似物的放射性标记物, 可作为检测体内 VIP 受体的放射性显像试剂; 其中  $^{18}\text{F}$  标记物更适于作为 PET 显像剂应用于富含 VIP 受体的肿瘤的诊断。

### 具体实施方式

[0039] 下面用实施例来进一步说明本发明, 但本发明并不受其限制。

[0040] 实施例 1 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 的合成

[0041] 采用 Fmoc/tBu 固相多肽合成法手工合成, 所用原料是: Fmoc-LinkerAM Resin, Fmoc-Gly, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-His(trt), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Asn(trt), Fmoc-Tyr(tBu), Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Ile, Fmoc-Asn(trt), 均购自 Bachem 公司, [2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU) 购自 Richelieu Biotechnologies 公司, 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 购自 Sigma 公司, 二异丙基乙胺 (DIPEA) 购自 Aldrich 公司。

[0042] Fmoc-Linker AM Resin 用含 20% 哌啶的 DMF 脱去 Fmoc 保护基, 用 DMF 洗 9 次, 向得到的树脂中加入 HBTU(1.2 当量), HOBT(3.6 当量) 在 0℃ 反应 30 分钟, 然后使用 DIPEA(4.8 当量) 偶联 1 当量的 Fmoc-Asn(trt), 25℃ 反应 3 小时, 接下来根据多肽的序列依次加入上述保护的氨基酸残基, 重复偶联 Fmoc-Asn(trt) 的操作, 最后用 Reagent K 切割树脂, 得到粗制的多肽, 经 HPLC 纯化得到纯度 > 90% 的 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP, 制备性 HPLC 在 Kromaisl-(10  $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$ )-250 $\times$ 50.8mm, C-18 柱上进行; 洗脱剂 (A)

H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) - (B) CH<sub>3</sub>CN (0.1% TFA) ; 线性梯度在 3 小时内 25% -40% (B) ; 流速 80ml/min ; 检测 220nm。

[0043] 实施例 2 化合物 1 的合成

[0044] 第一步, <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 的活化, 100 μL 约 50mCi 的 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 富氧水溶液加入到含有 10mgK<sub>222</sub> 和 1mg 碳酸钾的锥形反应瓶内, 90°C 油浴中加热, 连续通入氮气, 吹干水份。再加入 500 μL 乙腈, 通气吹干; 该过程重复三次, 保证反应体系彻底无水。

[0045] 第二步, 10mg 式 II 化合物乙基 -4- 三甲胺苯甲酸酯 - 三氟磺酸盐的 0.2ml 无水乙腈溶液加入到第一步得到的装有干燥 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 的反应瓶中, 于 100°C 油浴中进行 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 亲核取代反应 10min 得到式 III 化合物 4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸乙酯。产物通过放射性薄层色谱仪进行表征, 该仪器采用 Bioscan system AR-2000 系统 (美国 Bioscan 公司), 软件为 Winscan software, version 3.09, 所用硅胶板为 GF-254 型号, 展开剂使用二氯甲烷 / 乙酸乙酯 (4 : 1, V/V), 测得 R<sub>f</sub> = 0.96。

[0046] 第三步, 第二步得到的 4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸乙酯进行水解, 得到式 IV 化合物 4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸, 水解反应选用 0.5ml 1mol/L NaOH 溶液在 90°C 反应 8min, 然后用 0.7ml 1mol/L HCl 溶液中中和, 反应液经 Sep-Pak® Plus C18 柱 (Waters) 分离, 产物采用第二步所用放射性薄层色谱仪进行表征, 方法同上, R<sub>f</sub> = 0.1。

[0047] 第四步, 第三步得到的 4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸与 12mg O-(N-琥珀酰亚胺)N, N, N, N, - 四甲基脲四氟硼酸盐 (TSTU) 反应得到式 V 化合物 N-琥珀酰亚胺 -4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸酯。反应液经 Sep-Pak® Plus C18 柱 (Waters) 分离, 产物采用第二步所用放射性薄层色谱仪进行表征, 方法同上, R<sub>f</sub> = 0.9。

[0048] 第五步, N-琥珀酰亚胺 -4-[<sup>18</sup>F] 氟苯甲酸酯溶解在 50 μL 乙腈中, 加入 100 μg 实施例 1 制得的 (R<sup>8, 15, 21</sup>, L<sup>17</sup>)VIP (溶于 200 μL pH 值为 8.7 的 0.1M 硼砂 - 硼酸缓冲液), 室温下反应 20min, 通过放射性薄层色谱仪进行检测, 标记率为 66%。反应液过滤后通过 HPLC 分离, HPLC 采用 Dionex P680summit HPLC 分析系统 (美国 Dionex 公司), 配有 Bioscan flow-count 检测器 (美国 Bioscan 公司), 色谱柱使用 LiChrosorb C18 柱 (10 μm, 300×4mm), 使用如下梯度以 1ml/min 淋洗 30min: 1-10min, 25% 乙腈 (含 0.1% 三氟乙酸), 75% 水 (含 0.1% 三氟乙酸), 10-30min, 25% -70% 乙腈 (含 0.1% 三氟乙酸), 75% -30% 水 (含 0.1% 三氟乙酸), 收集 t<sub>r</sub> = 23.56min 的峰, 所得产物溶液, 旋转蒸干, 重新用 0.9% 的 NaCl 注射液溶解, 得目标产物化合物 1。采用第二步所用放射性薄层色谱仪进行表征, 展开剂选用甲醇 / 水 (6 : 1, V/V), R<sub>f</sub> = 0.01; 放化纯度大于 98%; 从第一步反应开始, 反应时间为 100min, 总的放化产率约为 46% (衰变校正)。

[0049] 上述中间产物式 III ~ V 化合物与上述文献中相应的非放射化合物 R<sub>f</sub> 一致。

[0050] 实施例 3 化合物 2 的合成

[0051] 第一步: <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 的活化, 同实施例 2 的第一步。

[0052] 第二步: 含 4mg 式 VI 化合物 N-琥珀酰亚胺 4-[4-硝基苯磺酰)氧甲基] 苯甲酸酯的无水乙腈 (300 μL) 溶液加入到上述反应瓶内, 密闭, 在 80°C 油浴中反应 10min 得式 VII 化合物 N-琥珀酰亚胺 -4-[<sup>18</sup>F] 氟甲基苯甲酸酯。产物采用实施例 2 第二步所用放射性薄层色谱仪进行表征, 测得 R<sub>f</sub> = 0.94, 标记率为 81.6%。

[0053] 采用 Sep-Pak 硅胶柱 (Waters) 分离纯化反应混合物, 先用 2ml 二氯甲烷 / 正己烷



(1 : 1, V/V) 淋洗, 然后用 2ml 二氯甲烷洗脱得产物约 15mCi。放化纯度大于 98%, 放化产率为 30% (未衰变校正)。

[0054] 第三步: 取 50  $\mu$ l 式 VII 化合物 N-琥珀酰亚胺-4-[ $^{18}$ F] 氟甲基苯甲酸酯的乙腈溶液装入指型管, 加入 100  $\mu$ g 实施例 1 制得的 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP (溶于 200  $\mu$ l pH 值为 8.7 的 0.1M 硼砂-硼酸缓冲液), 25 $^{\circ}$ C 下振荡反应 20min, 混合液通过 HPLC 分离, HPLC 采用 Dionex P680summit HPLC 分析系统 (美国 Dionex 公司), 配有 Bioscan flow-count 检测器 (美国 Bioscan 公司), 色谱柱使用 LiChrosorb C18 柱 (10  $\mu$ m, 300 $\times$ 4mm), 使用如下梯度以 1ml/min 淋洗 20min: 0-20min, 25% -70% 乙腈 (含 0.1% 三氟乙酸), 75% -30% 水 (含 0.1% 三氟乙酸), 得目标产物化合物 2。收集  $t_R = 16.58$ min 的峰, 所得产物溶液, 旋转蒸干, 重新用 0.9% 的 NaCl 注射液溶解。产物经上述放射性薄层色谱仪进行表征, 展开剂选用甲醇/水 (6 : 1, V/V),  $R_f = 0.01$ ; 放化纯度大于 98%; 从第一步反应开始, 反应时间为 60min, 总的放化产率约为 22% (衰变校正)。

[0055] 上述中间产物式 VII 化合物与上述文献中相应的非放射化合物 Rf 一致。

[0056] 实施例 4  $^{125}$ I 标记的 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 的合成

[0057] 10  $\mu$ g ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP (溶于 100  $\mu$ l 10.1mol/L 磷酸盐缓冲液, pH = 7.4) 和约 2mCi 的 [ $^{125}$ I]NaI 溶液以 Iodogen 作为氧化剂在室温下反应 20min, 混合溶液经 HPLC 进行分离。HPLC 洗脱液为 A : CH<sub>3</sub>CN (含 0.1% TFA), B : H<sub>2</sub>O (含 0.1% TFA), 以 1ml/min 按以下梯度洗脱: 0-7min, 90% -70% B; 7-9min, 70% -60% B; 9-35min, 60% B。所得  $^{125}$ I-( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 放化纯度 > 95%, 比活度约 500Ci/mmol。

[0058] 上述实施例中的乙基-4-三甲胺苯甲酸酯-三氟磺酸盐按文献所述方法合成, 并经  $^1$ H NMR 表征与文献报导一致 (Haka M.S, Kibourn M.R, Watkins G.L, Toorongian S.A.J Label Compd Radiopharm.1989; 7 : 823-833), N-琥珀酰亚胺-4-[(4-硝基苯磺酰)氧甲基]苯甲酸酯按文献所述方法合成, 并经  $^1$ HNMR 表征与文献报导一致 (Lang L.X, Eckelman W.C.Appl.Radiat.Isot.1997; 48 : 169-173), TSTU 购自 Fluka 公司, Kryptofix2.2.2 (K<sub>222</sub>), 无水乙腈购于 Acros 化学试剂公司, 其它试剂均为分析纯购于国药化学试剂公司, 所有试剂未经纯化直接使用; [ $^{18}$ F]F<sup>-</sup>的生产是采用旋风-30回旋加速器通过小体积 [ $^{18}$ O]H<sub>2</sub>O 完成  $^{18}$ O(p, n) $^{18}$ F 核反应而得。

[0059] 应用实施例 1 本发明 ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 以及 VIP 的受体竞争结合试验

[0060] 约 300g 雄性 SD 大鼠处死后, 取肺组织, 与 30ml 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4), 5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 以及 250mmol/L 的蔗糖混合, 用 Teflon 玻璃匀浆器匀浆, 匀浆混合液在 4 $^{\circ}$ C 以 2000g 的转速离心 10min, 取上清液再以 27000g 的速度在 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 倒掉上清液, 离心管底部的膜蛋白与 10ml 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% 杆菌肽和 0.2% 牛血清蛋白混匀, 即得所需膜蛋白 (约 1mg/ml)。接下来, 100  $\mu$ g 膜蛋白, 0.3nmol [ $^{125}$ I]VIP (按实施例 4 类似方法合成), 以及 0.1-100nmol/L 的 VIP (购自上海吉尔生化有限公司) 分别装在不同的反应管中, 在 24 $^{\circ}$ C 孵育 60min 进行竞争结合实验。孵育结束后, 各管反应液用 Whatman GF/B 滤纸 (英国 Whatman 公司) 进行分离, 混合液经该滤纸过滤后, 用孵育所用缓冲液清洗滤纸 3 次, 每次 5ml, 然后测每张滤纸上的  $\gamma$  计数, 即可得每管溶液中 [ $^{125}$ I]VIP 与膜蛋白的结合率, ( $R^{8, 15, 21}$ ,  $L^{17}$ )VIP 竞争结合实验与上同。结果表明随着每管所加 VIP 浓度的增加, 结合率呈递减趋势, 抑

制 50% [ $^{125}\text{I}$ ]VIP 结合所需的 VIP 以及 ( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 浓度即为  $\text{IC}_{50}$  值。通过  $\text{IC}_{50}$  值的大小, 可以判断不同竞争剂与同一种受体结合力的强弱,  $\text{IC}_{50}$  值越小, 说明该竞争剂与受体的结合能力越强。

[0061] VIP 以及 ( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 抑制  $^{125}\text{I}$ -VIP 与膜蛋白的半抑制常数  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.49nmol/L 和 0.12nmol/L, 结果表明 ( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 相对于 VIP 有更高的受体结合力。

[0062] 应用实施例 2 本发明 ( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 的体内稳定性试验

[0063] 以实施例 4 所得的  $^{125}\text{I}$ -( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 和上述应用实施例中采用的  $^{125}\text{I}$ -VIP 约 20  $\mu\text{Ci}$  分别静脉注射进两只雄性 SD 大鼠体内, 一小时后断颈取血装入离心管, 血样以 2000g 的转速离心 5 分钟后, 取上层液体, 装入另一离心管, 加入等体积的  $\text{CCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (4 : 1, V/V), 再次以 2000g 的转速离心 5 分钟, 取上清液注入 HPLC, 采用实施例 4 中  $^{125}\text{I}$ -( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 合成所用 HPLC 洗脱条件, 用 Bioscan flow-count 检测器 (美国 Bioscan 公司) 采集数据进行分析。通过分析放射性 HPLC 图谱上  $^{125}\text{I}$ -( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 以及  $^{125}\text{I}$ -VIP 的放射性峰占有放射性的比例, 进行体内稳定性试验对比, 结果显示  $^{125}\text{I}$ -( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 保持 84% 的完整性, 而  $^{125}\text{I}$ -VIP 保持 49% 的完整性, 表明 ( $\text{R}^{8, 15, 21}$ ,  $\text{L}^{17}$ )VIP 的体内稳定性显著提高。