

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810042679.5

[51] Int. Cl.

C07K 5/117 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 1/13 (2006.01)

A61K 49/22 (2006.01)

A61K 51/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101423546A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 103/10 (2006.01)

[22] 申请日 2008.9.9

[21] 申请号 200810042679.5

[71] 申请人 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 于俊峰 马玉飞 唐林 尹端沚

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 薛琦 朱水平

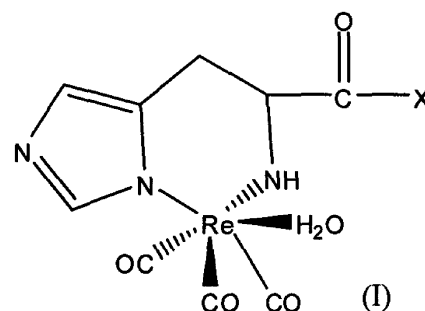
权利要求书 2 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

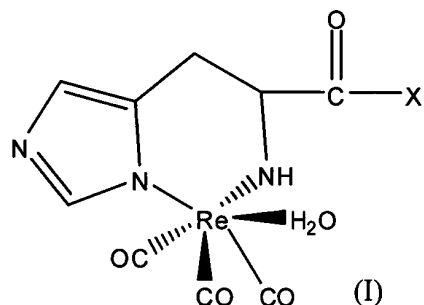
一种放射性铼标记的含 RGD 序列的多肽及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明公开了一种放射性铼标记的含 RGD 氨基酸序列的多肽及其制备方法和用途, 其中, 该多肽的 N 末端为组氨酸残基, 组氨酸残基上螯合着放射性铼, 其结构如通式 (I) 所示, 其中, X 为含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。本发明采用简单易得的原料, 整个实验过程操作简单, 无高温、高压等特殊要求, 采用 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 前体标记多肽, 并没有改变多肽的结构, 不影响多肽的生物活性, 对血管增生和肿瘤转移的早期诊断和治疗有重要的现实意义。



1、一种放射性铼标记的含 RGD 氨基酸序列的多肽，其特征在于，该多肽的 N 末端为组氨酸残基，组氨酸残基上螯合着放射性铼，其结构如通式(I)所示：



其中，X 为含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。

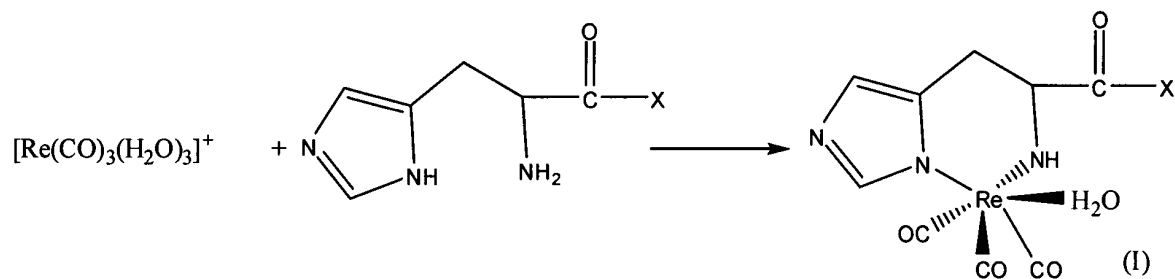
2、根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，Re 为 ^{188}Re 或 ^{186}Re 。

3、根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，X 为含 1 个或多个 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。

4、根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，X 中还含有双硫键。

5、根据权利要求 1 所述的多肽，其特征在于，所述多肽的分子量小于 3500。

6、一种权利要求 1 所述的多肽的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：在水中，三羰基铼水合离子，即 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ，与 N 末端是组氨酸残基的含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽进行反应，形成如通式 (I) 所示的化合物，



其中，X 为含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。

7、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述三羰基铼水合

离子为 $[\text{}^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 。

8、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述反应的反应温度为 $50^\circ\text{C}\sim 100^\circ\text{C}$ ，反应时间为 10~100 分钟。

9、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，所述反应的反应温度为 65°C ，反应时间为 20 分钟。

10、如权利要求 1 所述的多肽在制备哺乳类动物或人的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达阳性肿瘤的显像试剂或者制备放射性治疗或诊断试剂中的用途。

一种放射性铼标记的含 RGD 序列的多肽及其制备方法和用途

技术领域

本发明属于多肽领域，特别涉及一种放射性铼标记的含 RGD 序列的多肽及其制备方法和用途。

背景技术

血管增生，即在已有血管的基础上生成新的血管的过程，是肿瘤生长和转移的基础。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在血管的新生过程中起着重要的作用。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 主要通过和细胞外基质中的含 RGD 序列配体结合发挥作用。RGD（精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸，Arg - Gly - Asp）序列是广泛分布的细胞识别体系的基本单位，是纤粘连蛋白的独特结构。因此，可以将含 RGD 序列的肽及其类似物作为拮抗剂与整合素进行竞争结合，从而阻断血管上皮细胞增殖的信使传递，终止细胞增殖，使血管不能生长，导致癌肿组织供氧系统中断，细胞萎缩、凋亡。

自从 ^{125}I -3-iodo-Tyr⁴-cyclo(Ary-Gly-Asp-Tyr(D)-Val)作为放射性标记的 RGD 类似物被研究以来，筛选和寻找亲和力更好含 RGD 序列的多肽，对其进行适当的化学修饰，采用放射性核素对其进行标记就成为肿瘤分子核医学中研究的热点。 ^{188}Re 由于具有优良的核素特性，在放射性药物研究中得到越来越多的关注和应用。 ^{188}Re 能够发射 79%和 20%最大能量为 2.11 MeV 和 1.97 MeV 的 β 射线，并伴随发射 15%的 155 keV 的 γ 射线，这一射线适合于显像，可以方便地进行标记药物的辐射剂量估计、生物体内分布等药代动力学研究； ^{188}Re 的半衰期为 16.9 小时，一方面可以防止高能量 β 射线可能引起的骨髓损伤；另一方面可以多次给药，提高疗效；另外， ^{188}Re 是发生器核素，可以从 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ 发生器随时淋洗得到高比活度、无载体的 $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$

溶液。

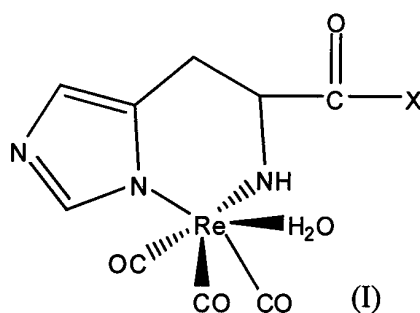
^{188}Re 标记多肽的方法分为直接标记和间接标记两种。由于直接标记的位点多为多肽的二硫键，容易导致肽失去活性，所以通常采用的都是间接标记的方法。间接标记法引入双功能螯合剂连接铼和多肽 (Jeong JM, Chung JK. Therapy with ^{188}Re -labeled radiopharmaceuticals: an overview of promising results from initial clinical trials. *Cancer Biotherapy and Radipharm*, 2003, 18(5):707-717)，但此方法面临的问题是标记率不高，同时对多肽的结构有一定的影响，从而降低多肽的活性。

发明内容

因此，本发明要解决的技术问题就是针对现有的放射性铼标记含 RGD 序列的多肽会影响多肽活性的缺陷，提供一种放射性铼标记的含 RGD 序列的多肽及其制备方法和用途，该方法不改变多肽的结构，不影响多肽的生物活性，标记率高。

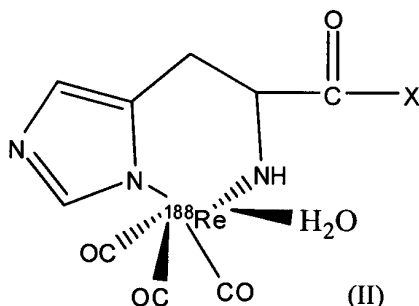
本发明人经过研究后发现：三羰基铼水合离子具有良好的水溶性，在水溶液中以水合三羰基一价铼阳离子 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的形式存在，其中三个配位水分子很容易被其他配体取代，形成螯合物；含 RGD 序列的多肽末端的 His 可做为二齿配体，与 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 中三个配位的水分子进行取代反应，进而形成羰基配合物，从而标记上铼，完成了本发明。

本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是：一种放射性铼标记的含 RGD 氨基酸序列的多肽，其中，该多肽的 N 末端为组氨酸残基，组氨酸残基上螯合着放射性铼，其结构如通式(I)所示：



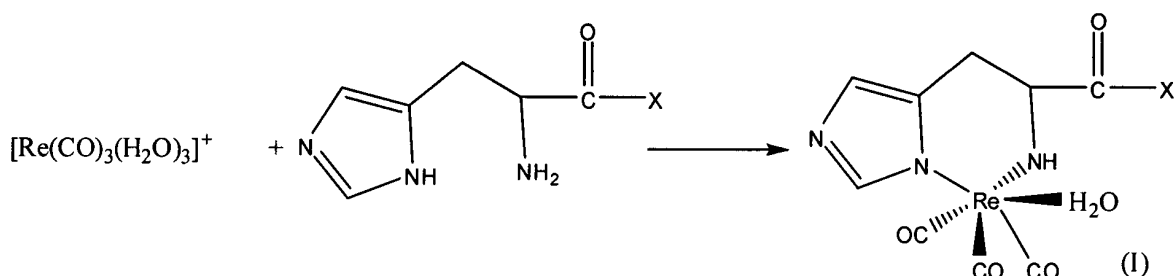
其中，X 为含一个或多个 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。

根据本发明，其中所述的 Re 为放射性铼，可以是铼的同位素，如 $^{186/188}\text{Re}$ ，较佳的为 ^{188}Re 。当所述的 Re 为 ^{188}Re 时，本发明所述的多肽如通式 II 所示。



根据本发明，其中所述的 X 为含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。该多肽同常规，含一个或多个的 RGD 序列（Arg - Gly - Asp 序列）。RGD 序列跟 His 残基不需要直接相连，只要满足 His 在肽链的 N 末端即可。该多肽中可以含有一个或多个双硫键。两个半胱氨酸所含的双硫键要求成环。该多肽含有双硫键后，有更好的组织靶向性。X 也可以是含 RGD 序列的肽段的聚合体。聚合数越高，越有利于该多肽的靶位定向。本发明对该多肽的长度，或氨基酸残基的数量没有要求，一般多肽的分子量少于 3500 较为合适。大于 3500 的多肽因代谢等方面的原因，不适合做为药物使用。

本发明还提供一种所述的多肽的制备方法，其中，包括如下步骤：在水中，三羰基铼水合离子 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 与 N 末端是组氨酸残基的含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽进行反应，形成如通式 (I) 所示的化合物，



其中，X 为含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽链。

根据本发明，其中， $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 较佳的为 $[\text{Re}^{188/186}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ，更佳地为 $[\text{Re}^{188}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ，可通过已知的常规方法得到 (Junfeng Yu, Urs

O. Häfeli, Jiaoyun Xia, Shiqiang Li, Mo Dong, Duanzhi Yin and Yongxian Wang. Radiolabelling of poly(histidine) derivatized biodegradable microspheres with the ^{188}Re tricarbonyl complex $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ [J]. Nuclear Medicine Communications, 2005, 26(5): 453-458)。较佳的为反式-三羰基铼水合离子 ($\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$)，顺式的也能完成本发明。N末端是组氨酸残基的含 Arg - Gly - Asp 序列的多肽可以是现有的任何满足该条件的多肽，或者是通过常规的多肽合成方法合成的。所述多肽的反应浓度通常采用常规剂量，一般要求不小于 10^{-4}M 。铼的反应浓度采用放射性浓度计量，大小范围只要满足放射性检测仪器的量程即可。所述反应的反应温度较佳的为 50°C ~ 100°C ，较佳的为 65°C ，反应时间为 10~100 分钟，较佳的为 20 分钟。

本发明还提供所述的多肽在制备哺乳类动物或人的整合素 $\alpha_v\beta$ 表达阳性肿瘤的显像试剂或者制备放射性治疗或诊断试剂中的用途。

相比于现有技术，本发明的有益效果如下：

(1) 本发明采用 $[\text{}^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记多肽，并没有改变多肽的结构，不影响多肽的生物活性，标记率高。

(2) 本发明修饰的多肽对血管增生和肿瘤转移的早期诊断和治疗有重要的现实意义。

(3) 本发明所用原料简单易得，整个实验过程操作简单，无高温、高压等特殊要求。

具体实施方式

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。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。本发明中，若无特殊说明，所述的百分比均为重量百分比。

实施例 1 化合物 1 的制备

1、按照现有技术， $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的合成及鉴定

称取 4.5 mg $\text{BH}_3\cdot\text{NH}_3$ (化学名硼烷氨络合物) 加入洁净干燥的 10 ml 西林瓶中, 加盖密封。向西林瓶中通 CO 气体约 20 min。8 μl 浓度 >85% 的磷酸与 1ml 放射性量 3 mCi/ml 的 $\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$ 的生理盐水淋洗液混合, 而后注射到已经事前通好 CO 气体的西林瓶中。70 $^\circ\text{C}$ 水浴中反应 15 min。反应后立即用冰水冷却。反应混合物经 QMA Spe-Pak 柱过滤, 分离纯化。所得的 $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 放射性纯度达到 95% 以上。

采用薄板层析法 (TLC) 和高效液相色谱法 (HPLC) 分析鉴定反应产物。

TLC 检测条件为: AR-2000 型放射性薄层扫描仪 (美国 Bioscan 公司), GF_{254} 玻基硅胶板 (台州四青生化材料厂) 为固定相, 甲醇 (中国医药集团上海化学试剂公司): 浓盐酸=99: 1 (V: V) 为流动相。在此条件下, $^{188}\text{ReO}_2$ 的 $R_f=0$; $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的 $R_f=0.4-0.6$; $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的 $R_f=0.8-1.0$ 。

HPLC 检测条件为: P680 泵 (美国戴安公司), 放射性检测器 (美国 Bioscan 公司), 分析柱 C_{18} 反相柱 (Ubondapak, 300mm*3.9mm, Waters 公司), America PDA-100 紫外检测器。梯度条件: 0-3 min 100%B+0%A; 3-6 min 75%B+25%A; 6-9 min 66%B+34%A; 9-20 min 0%B+100%A; 20-22 min 0%B+100%A; 22-25 min 75%B+25%A; 25-30 min 100%B+0%A (A 为甲醇; B 为 TEAP (1000 ml 水溶液中含有三乙基溴化胺磷酸盐 7ml, 浓磷酸调解 pH 至 2.25)。流速为 1 ml/min, 紫外波长 262 nm。在此条件下, $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的保留时间为 4 min; $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的保留时间约为 10min。

2、放射性铼标记的含 RGD 氨基酸序列的多肽的合成及鉴定

分别取 50 μl 浓度为 10^{-4}mol/ml 的多肽 a (其结构见表 1, 由上海吉尔生物有限公司合成) 与 450 μl 上述纯化后放射性量 2 mCi/ml 的 $\text{fac-}[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 充分混合。65 $^\circ\text{C}$ 条件下反应 20 min, 即得相应的配合物 (即化合物 1)。采用 HPLC 和双展开剂 TLC 测定反应的标记率。

TLC 检测条件 1: AR-2000 型放射性薄层扫描仪; GF_{254} 玻基硅胶板为固

定相；乙腈为流动相。此条件下， $^{188}\text{Re-RGD}$ 肽、 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 和 $^{188}\text{ReO}_2$ 胶体均在原点， $R_f=0.0-0.2$ ； $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的 $R_f=0.8-1.0$ 。

TLC 检测条件 2：AR-2000 型放射性薄层扫描仪；GF₂₅₄ 玻基硅胶板为固定相；丙酮：水=1：1 (V：V) 为流动相。在此条件下， $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 和 $^{188}\text{ReO}_2$ 胶体的 $R_f=0.0-0.2$ ； $^{188}\text{Re-RGD}$ 肽和 $^{188}\text{ReO}_4^-$ 的 $R_f=0.8-1.0$ 。

HPLC 检测条件为：P680 泵（美国戴安公司），放射性检测器（美国 Bioscan 公司），分析柱 C₁₈ 反相柱（Ubondapak, 300mm*3.9mm, Waters 公司）。梯度条件：0-30 min 5%B+95%A；30-35 min 60%B+40%A；35-40 min 5%B+95%A（流动相 A 为三氟乙酸/水=1/1000 V/V；流动相 B 为三氟乙酸/乙腈=1/1000 V/V）。流速为 1 ml/min。此条件下，有关 HPLC 纯化肽和 $^{188}\text{Re-RGD}$ 保留时间总结见表 2。标记率均 93%。

实施例 2 化合物 2 的制备

$\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的合成同实施例 1。分别取 50 μl 浓度为 10^{-4}mol 的多肽 b(其结构见表 1, 由上海吉尔生物有限公司合成)与 450 μl 上述纯化后放射性量 2 mCi/ml 的 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 充分混合。65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min, 即得相应的配合物（即化合物 2）。采用与实施例 1 中相同的 HPLC 和双展开剂 TLC 测定反应的标记率。有关 HPLC 纯化肽和 $^{188}\text{Re-RGD}$ 保留时间总结见表 2。标记率均 93%。

实施例 3 化合物 3 的制备

$\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的合成同实施例 1。分别取 50 μl 浓度为 10^{-4}mol/ml 的多肽 c(其结构见表 1, 由上海吉尔生物有限公司合成)与 450 μl 上述纯化后放射性量 2 mCi/ml 的 $\text{fac-}[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 充分混合。65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min, 即得相应的配合物（即化合物 3）。采用与实施例 1 中相同的 HPLC 和双展开剂 TLC 测定反应的标记率。有关 HPLC 纯化肽和 $^{188}\text{Re-RGD}$ 保留时间总结见表 2。标记率均 95%。

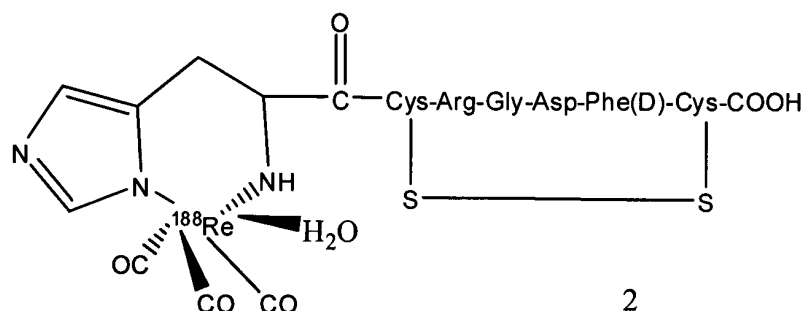
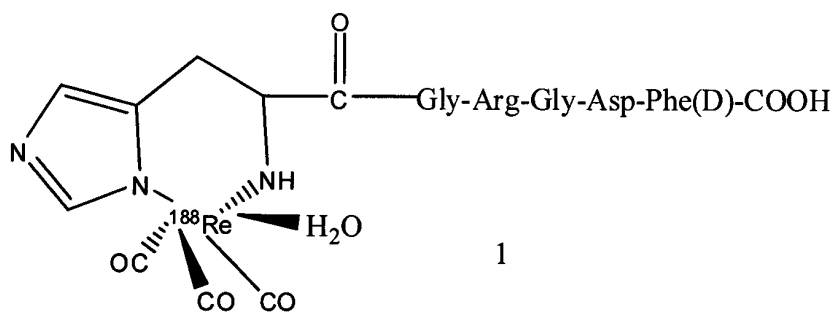
实施例 4 化合物 4 的制备

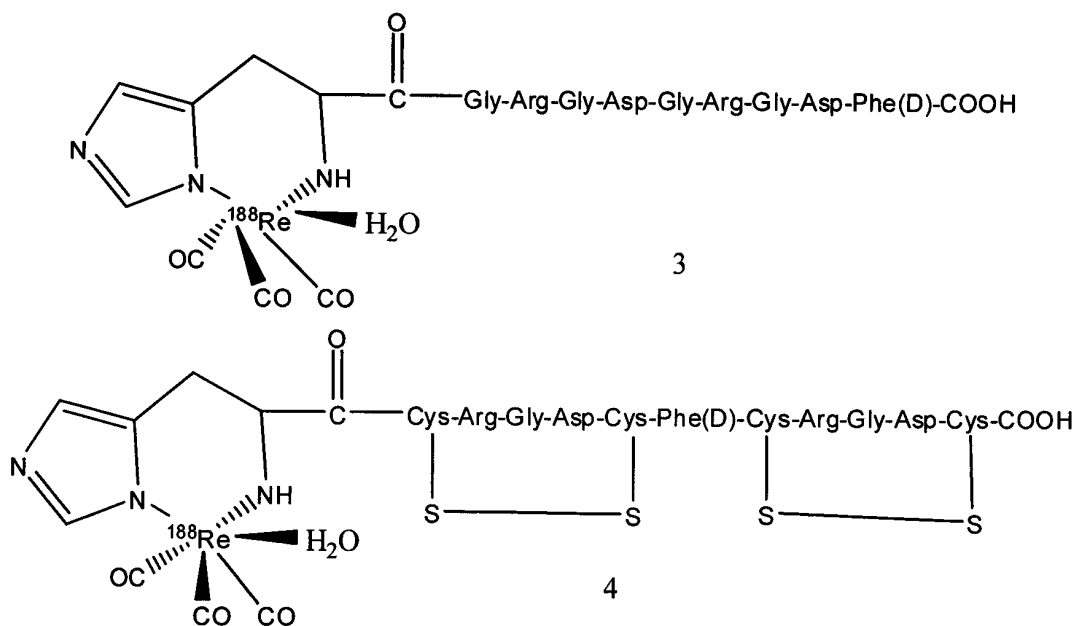
$fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 的合成同实施例 1。分别取 50 μl 浓度为 10^{-4}mol/ml 的多肽 d(其结构见表 1, 由上海吉尔生物有限公司合成)与 450 μl 上述纯化后放射性量 2 mCi/ml 的 $fac-[^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 充分混合。65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min, 即得相应的配合物(即化合物 4)。采用与实施例 1 中相同的 HPLC 和双展开剂 TLC 测定反应的标记率。有关 HPLC 纯化肽和 ^{188}Re -RGD 保留时间总结见表 2。标记率均 92%。

表 1. 实施例中所用的多肽

实施例	反应原料			反应产物
	多肽名称	多肽结构	分子量	标记多肽名称
1	a	HGRGDF(D)	687.72	化合物 1
2	b	$\overline{\text{HCRGDF(D)C}}$	834.94	化合物 2
3	c	HGRGDGRGDF(D)	1073.10	化合物 3
4	d	$\overline{\text{HCRGDCF(D)CRGDC}}$	1367.54	化合物 4

化合物 1、2、3、4 的结构分别为:



表 2. HPLC 纯化肽和 ^{188}Re -RGD 保留时间

化合物	标记肽	保留时间 (min)
1	^{188}Re -HGRGDF(D)	16.5
2	^{188}Re -HCRGDCF(D)	21.5
3	^{188}Re -HGRGDGRGDF(D)	19.5
4	^{188}Re -HCRGDCF(D)CRGDC	22.5

效果实施例 1

体外稳定性：分别取 100ul 实施例 1~4 所得的标记多肽（即化合物 1, 2, 3 和 4）放入 1.5mL 指型管中，加入 500ul 小牛血清或 pH 7.4 的 PBS，在室温或 37 °C 条件下放置 4 H（小时）。分别在 0h、1h、4h 检测标记化合物的放化纯度的变化情况。4 小时后，化合物 1、2 的放化纯度 >80%；3、4 的放化纯度 >87%。

体外竞争结合：标记肽分别与 His (10^{-3}M) 或 Cys (10^{-3}M) 水溶液混合，在室温及 37°C 条件下孵育 24 小时。分别在 0h、1h、4h、24h 检测标记化合物的放化纯度的变化情况。24 小时后，化合物 1 和 2 的放化纯度 >80%；3 和 4 的放化纯度 >85%。

效果实施例 2 化合物 1 和 2 的动物实验

荷 S180 肉瘤小鼠体内的生物分布

雄性昆明小鼠，体重约 18 克。每只小鼠右前肢腋下注射 S180 肉瘤细胞 ($2 \times 10^5 \sim 6$ 细胞/鼠)，当肿瘤长到直径约 1cm 时进行实验。每只小鼠尾静脉注射实施例 1, 2 所得的标记多肽（即化合物 1 和 2）100ul。然后在 1h、4h、24h、48h 四个时间点，从小鼠眼眶取血，断颈处死，取肿瘤、脾、肾、小肠、肝、肺、脑、胃、心、骨样品，称重、测量放射性计数，每个时间点 5 只老鼠，结果见表 3。可见，这两个标记物（即化合物 1 和 2）在肿瘤中都有一定的浓集。T/NT 越高说明在此器官中放射性浓集越少。如肿瘤/肾的 T/NT 比较大，在 0.35 左右，说明在肾中的放射性浓集大，也反应了标记物通过泌尿系统排出体外。此表也反映了化合物 2 从主要脏器组织的清除速度比化合物 1 略快，化合物 1 在肿瘤的保留时间也更长些。

表 3. 标记多肽在 S180 肉瘤小鼠体内各时间点主要脏器的 T/NT (n=5, %ID/g)

T/NT	化合物 1				化合物 2			
	1h	4h	24h	48h	1h	4h	24h	48h
肿瘤/血液	0.35±0.02	0.51±0.05	0.96±0.09	1.01±0.19	0.88±0.41	0.99±0.18	2.10±0.33	2.13±0.83
肿瘤/肌肉	2.77±0.61	3.68±0.29	4.81±0.59	4.12±0.65	4.41±0.11	5.15±0.54	4.47±0.49	4.88±3.16
肿瘤/骨头	1.19±0.15	1.70±0.29	2.30±0.15	1.75±0.35	1.85±0.46	2.07±0.33	2.11±0.28	2.03±0.18
肿瘤/肠	1.48±0.35	2.08±0.17	4.01±0.68	3.99±0.77	1.33±0.63	2.16±0.22	3.45±1.30	9.48±7.29
肿瘤/胃	0.36±0.04	1.07±0.42	2.65±0.4	2.97±1.03	0.29±0.17	0.17±0.04	1.22±0.29	1.29±0.46
肿瘤/脾	1.81±0.36	2.49±0.37	5.72±5.43	2.44±0.54	1.87±0.32	1.53±0.23	1.56±0.15	1.08±0.64
肿瘤/肝	0.44±0.09	0.57±0.08	0.61±0.1	0.53±0.09	0.68±0.09	0.59±0.04	0.37±0.05	0.46±0.28
肿瘤/肾	0.35±0.04	0.50±0.03	0.56±0.06	0.35±0.11	0.35±0.07	0.35±0.06	0.34±0.05	0.38±0.19