

靶向 FAP 的化合物、基于其的放射性核素标记配合物以及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体地，涉及一种式 (I) 所示的靶向成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 的化合物、基于其的放射性核素标记配合物，以及它们的制备方法，和它们在制备用于诊断、预防和/或治疗以 FAP 高表达为特征的疾病的药物中的应用。

背景技术

恶性肿瘤患者中 90% 的死亡是由肿瘤细胞转移导致的，但现在针对肿瘤转移的预防性或治疗性策略仍处于匮乏阶段。肿瘤是由肿瘤细胞及其周围基质细胞和非细胞组分构成的复合体，肿瘤的发生发展是肿瘤细胞与其微环境相互促进、共同演化的一个动态过程。肿瘤微环境 (TME) 包括细胞及细胞外基质 (ECM)，有形成分主要是细胞组分，包括免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞等，其中肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAFs) 是肿瘤微环境中最主要的基质细胞，占到肿瘤组织细胞总数的 50% 左右。CAFs 在肿瘤的生长、转移、耐药及治疗抵抗等方面均发挥重要作用，是肿瘤诊治研究的热点之一。

在癌症中，成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 已成为肿瘤相关成纤维细胞 (CAF) 的独特标志物，也是肿瘤微环境 (TME) 的关键调节因子和驱动因素。CAF 是 TME 的最大成分之一，通过分泌促炎因子和生长因子以及重塑 ECM 来促进肿瘤生长和细胞侵袭。除了 TME 内的细胞外，FAP 表达还可以存在于恶性上皮细胞中。FAP 通过 ECM 重塑促进肿瘤生长，导致活性癌症基质的形成，这是癌细胞侵袭和转移所必需的。临床上已经观察到，结直肠癌肿瘤样本侵袭性前部 FAP 表达增加，进一步支持其在侵袭和转移中的作用。FAP 还通过启用肿瘤促进炎症来促进免疫抑制 TME 的形成。FAP 选择性地表达于 90% 以上的上皮恶性肿瘤的基质成纤维细胞表面，包括乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、皮肤黑色素瘤等。良性及癌前病变的上皮肿瘤，如结直肠腺瘤、乳腺叶状肿瘤和纤维腺瘤中 FAP 通常不表达。而 FAP 在正常人组织中一般无表达，仅存在于宫颈和子宫内膜，在胚胎发育过程中短暂表达。由于 FAP 在 TME 中起着重要作用，人们越来越有兴趣将其用作成像和治疗的靶点。

近年来许多 FAP 抑制剂进入临床研究，如 ^{68}Ga -FAPI-04、 ^{68}Ga -FAPI-46、 ^{68}Ga -oncoFAP-DOTAGA、 ^{177}Lu -FAPI-04 等，为多种癌症病灶的精准定位和靶向杀伤提供了有力的工具。但是它们在肿瘤的滞留时间相对较短，肿瘤摄取绝对值较低，体内清除过快，导致其在 FAP 表达不高肿瘤内的摄取以及显像效果不理想，同时也限制了长半衰期治疗核素对靶细胞或组织的杀伤作用。因此，开发肿瘤摄取更高、滞留时间更长、非靶组织摄取低且清除快的 FAP 靶向探针，对于推动 FAP 靶向诊疗一体化药物具有重要意义。

发明内容

FAP 选择性地高表达于 90% 以上的上皮恶性肿瘤中，因此是开发肿瘤靶向性探针的理想靶点。考虑到现有 FAP 靶向性小分子化合物在肿瘤的摄取不高及滞留时间不长的特点，本发明提供一种式 (I) 所示的化合物，该化合物可以同时识别 FAP 的不同氨基酸位点，以提高亲和力，增加肿瘤摄取，因此具有 FAP 高亲和力，可以用于靶向 FAP。进一步地，本发明发现，基于此化合物的放射性核素标记配合物，能够特异性识别 FAP 靶点，且增加肿瘤摄取率，从而提高肿瘤检出率和/或治疗效果。

基于此，本发明的一个目的在于提供一种式 (I) 所示的化合物，或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物。

本发明的另一个目的在于：提供式 (I) 所示的化合物的制备方法。

本发明的另一个目的在于：提供一种放射性核素标记配合物，其以式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物为配体，标记放射性核素得到。

本发明的另一个目的在于：提供所述放射性核素标记配合物的制备方法。

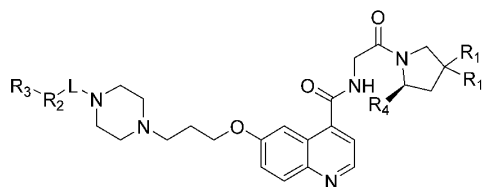
本发明的另一个目的在于：提供一种药物组合物，其包含选自式 (I) 所示的化合物、其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、和经同位素标记的化合物、以及所述放射性核素标记配合物中的一种或多种，以及可选地药学上可接受的辅料。

本发明的另一个目的在于：提供 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于抑制 FAP 活性的试剂中的应用。

本发明的再一个目的在于：提供式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于诊断、预防和/或治疗以 FAP 高表达为特征的疾病的药物或试剂中的应用。

为了达到上述目的，本发明采用了以下技术方案：

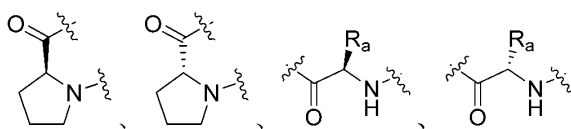
第一方面，提供式 (I) 所示的化合物，或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，

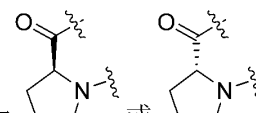


I

其中，各个 R_1 独立地为卤素或 H，卤素优选为 F；

R_2 为 $-(W_1)_{n1}-(W_1)_{n2}-(W_1)_{n3}-(W_1)_{n4}-(W_1)_{n5}-(W_1)_{n6}-$ ， n_1 至 n_6 各自独立地为 0 或 1；

W_1 各自独立地选自以下结构：，其中 R_a 选自 H、C1-C3 烷基（例如甲基、乙基、正丙基、异丙基），各 W_1 之间以羰基和 N 相

连接形成酰胺键，且相邻的 3 或更多个 W_1 不同时为 ；

R_3 为双功能螯合剂、荧光报告基团或治疗药物；

L 为 $-(CH_2)_n-$ ，其中 n 是 0 至 40 的整数；其中每个 CH_2 独立地任选用 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-(CO)-$ 、 $-NH(CO)-$ 或 $-(CO)-NH-$ 替换，条件是没有两个相邻的 CH_2 基团被同时替换；

R_4 为氰基 $(-CN)$ 或硼酸基 $(-B(OH)_2)$ 。

双功能螯合剂是指具有同时螯合放射性核素和连接靶向分子探针功能的螯合剂，例如 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)、三亚乙基四胺 (TETA)、2-(4,7-双羧甲基[1,4,7]三氮杂环壬基-1-基-乙基)羰基-甲基氨基]乙酸 (NETA)、二亚乙基三胺 $-N,N,N',N'',N'''$ -五乙酸 (DTPA)、 N,N -二(2-羟基苯基)亚乙基二胺- N,N' -二乙酸 (HBED)、2,2',2'',2'''-(5²,13²-二羟基-5⁵,13⁵-二甲基-3,7,11,15-四氮杂-1,9(2,6)-二吡啶-5,13(1,3)-二苯并环己二酮-3,7,11,15-四基)四乙酸 (DAR) 等；优选为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)。

荧光报告基团是指吸收和发射一定波长范围的光，释放出光能的基团，包括但不限于可见光基团、近红外一区基团、近红外二区基团。

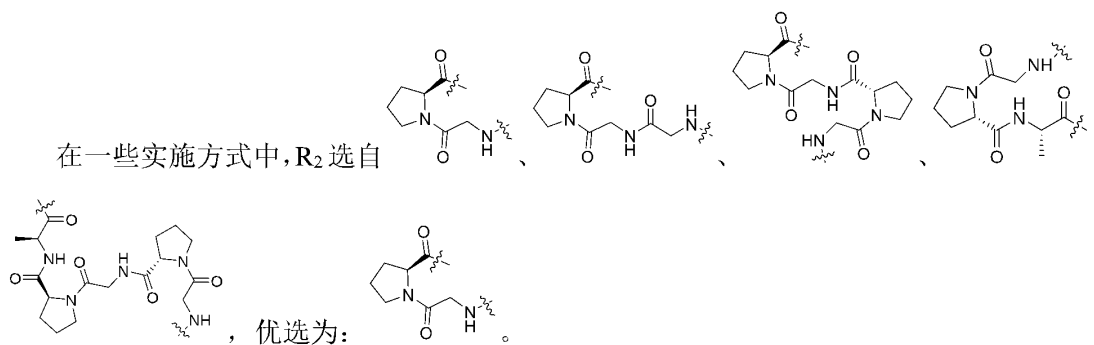
可见光基团可以选自：荧光素、罗丹明、异硫氰酸荧光素、花菁荧光染料（例如 Cy2 等）、绿色荧光蛋白、量子点、纳米粒子、F16 等中任意一种；

近红外一区基团可以选自：花菁染料类（例如 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Cy7.5 等）、BODIPY 类（例如氟硼二吡咯、氮杂氟硼二吡咯等）、罗丹明类（例如罗丹明绿、罗丹明 6G、四甲基罗丹明，罗丹明 B，丽丝胺罗丹明，X-罗丹明，德州红，硅基罗丹明等）、量子点、纳米粒、酞菁中任意一种。

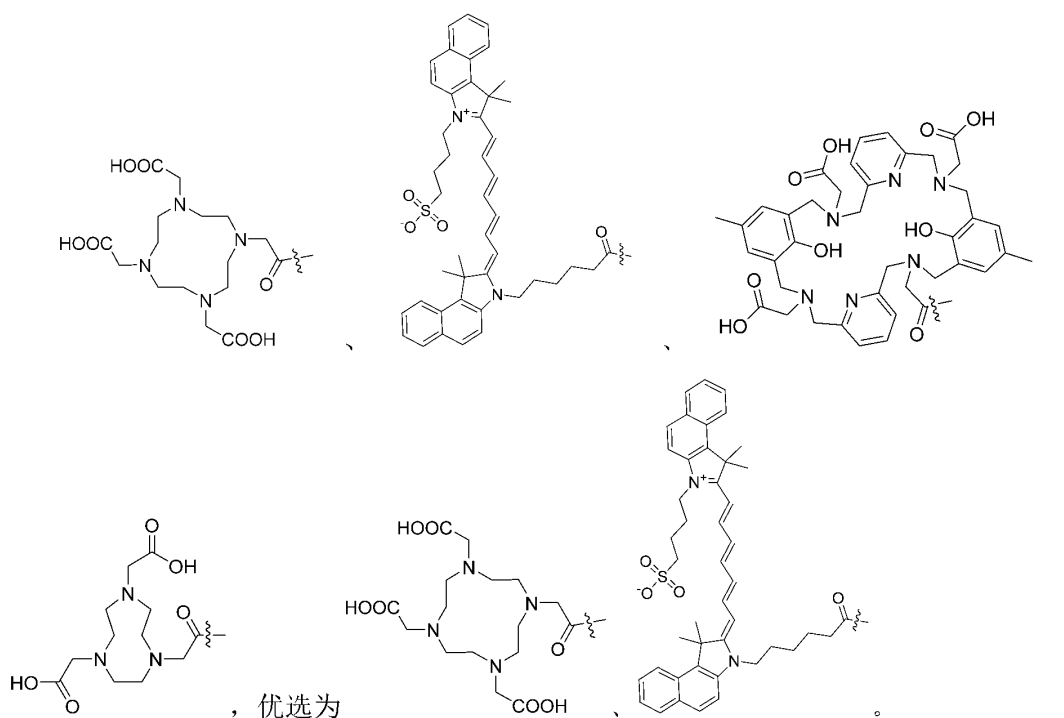
近红外二区基团可以选自：花菁染料类（例如 Cy7、Cy7.5 等）、D-A-D 类（例如 CH-1055、CH-4T、FT-TQT 等）、BODIPY 类（例如 NJ960、NJ1030、NJ1060、PCP-BDP2 等）、量子点、纳米粒子中任意一种。

治疗药物包括小分子抑制剂、单抗类药物、生物烷化剂、细胞毒类药物、激素类药物、生物反应调节剂等。

在一些实施方式中，各个 R_1 同为 H 或者 F 原子。



在一些实施方式中, R_3 选自以下结构:

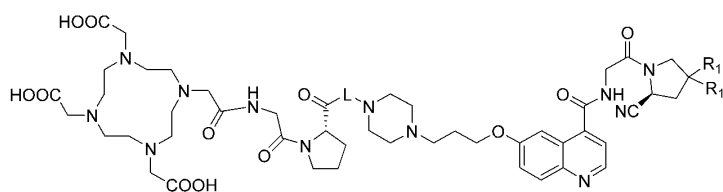


在一些实施方式中, L 是 $-(CH_2)_{n7}-$; $n7$ 是 0-30 的整数, 更优选是 0-12 的整数, 进一步优选 0、3 或 10; 其中每个 $-CH_2-$ 独立地任选用 $-O-$ 、 $-NH-$ 或 $-(CO)-$ 替换, 条件是没有两个相邻的 $-CH_2-$ 基团被替换。

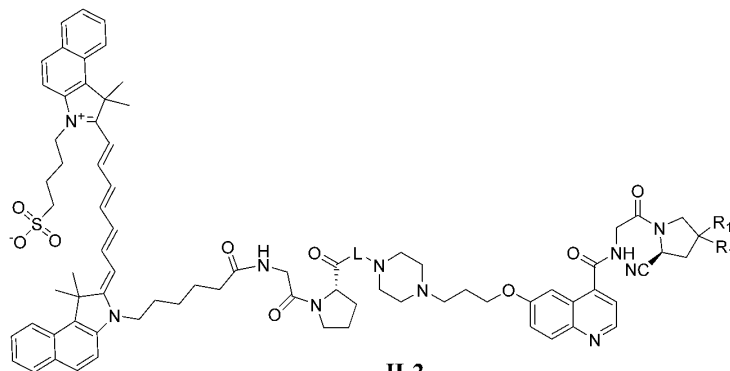
在一些实施方式中, L 为不存在, 或选自 $-NH-(CH_2)_{n8}-(CO)-$ 、 $-NH-(CH_2CH_2O)_{n9}-(CH_2)_{n8}-(CO)-$, 各 $n8$ 和 $n9$ 独立为 1-10 (例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10), 优选 1-8、1-6、1-4 的整数。

在一些实施方式中, R_4 为氰基 ($-CN$)。

在一些实施方式中, 所述式 (I) 化合物选自式 (II-1)、(II-2):



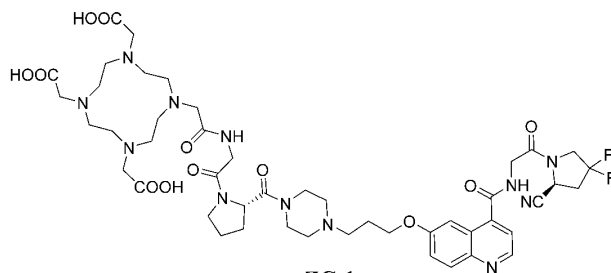
II-1



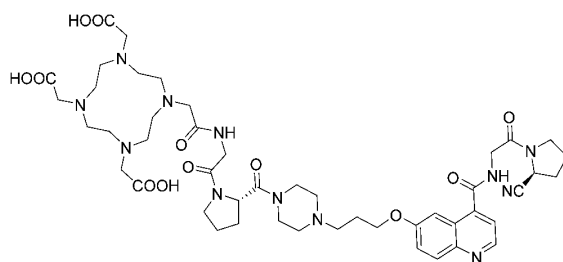
II-2

其中，R₁、L 定义如前所述。

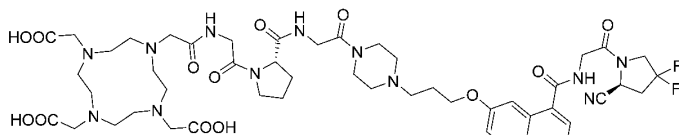
在一些实施方式中，式 (I) 化合物选自如下结构：



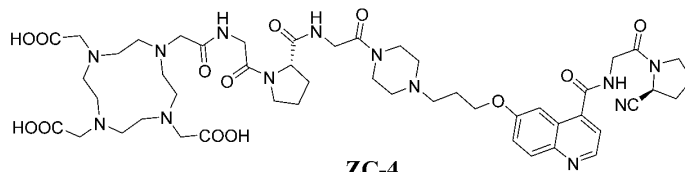
ZC-1



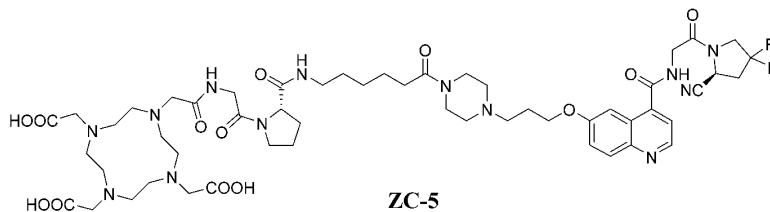
ZC-2



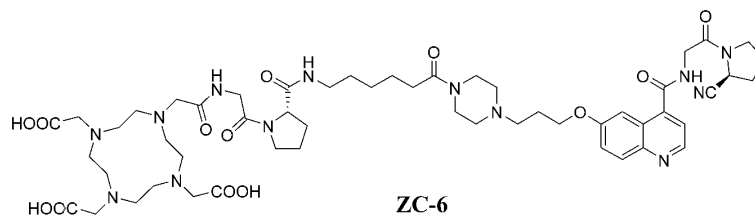
ZC-3



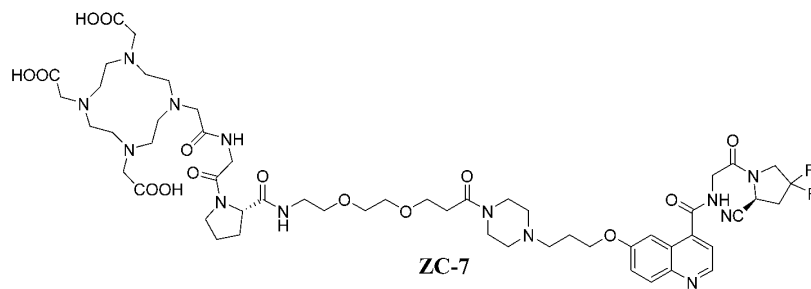
ZC-4



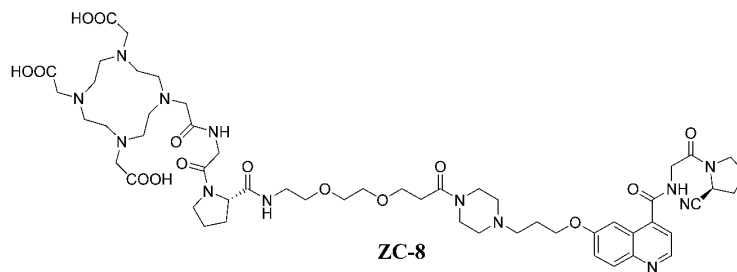
ZC-5



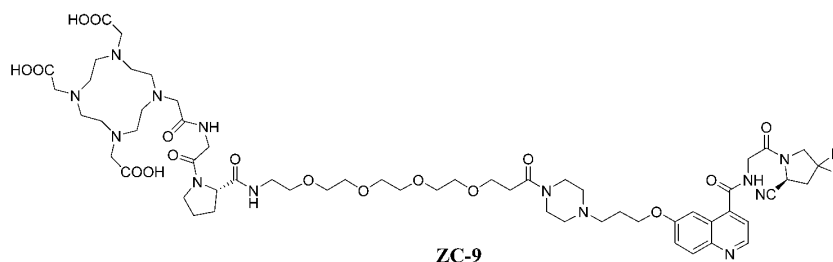
ZC-6



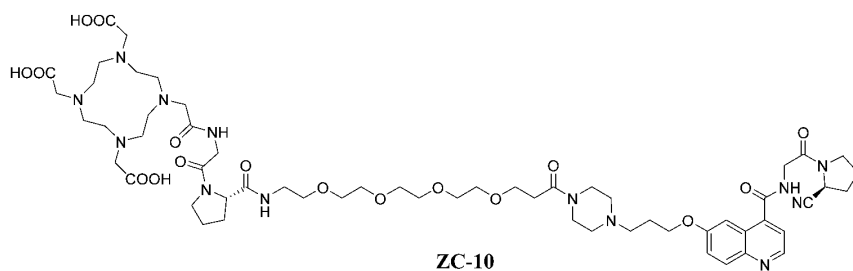
ZC-7



ZC-8



ZC-9



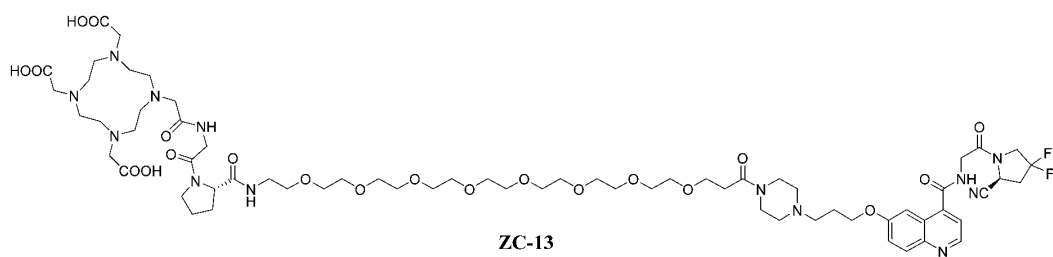
ZC-10



ZC-11



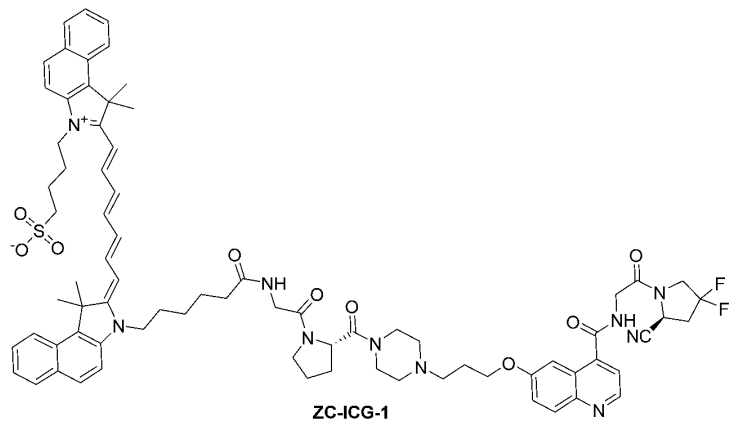
ZC-12



ZC-13

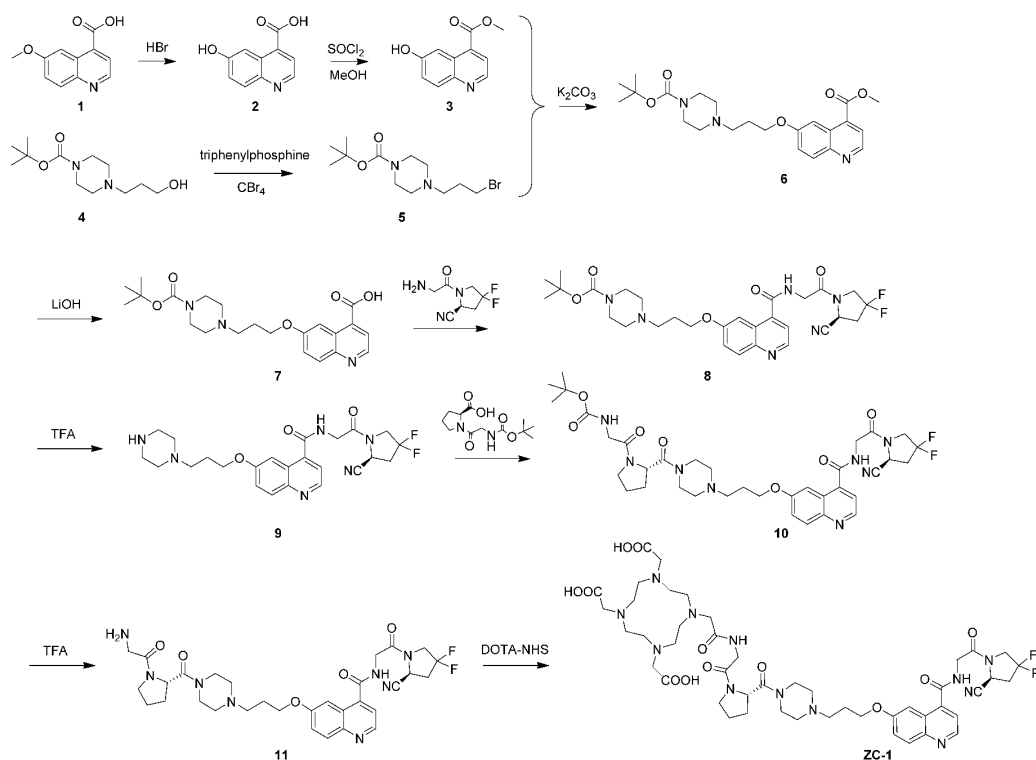


ZC-14



本发明进一步提供制备化合物 ZC-1 的方法，包括以下步骤：

- (1) 化合物 1 发生脱甲基反应得到化合物 2；该反应可以在溴化氢水溶液中进行；
 - (2) 化合物 2 与甲醇进行酯化反应得到化合物 3；该反应可以在氯化亚砷存在下进行；
 - (3) 化合物 4 发生溴代反应生成化合物 5；该反应可以在三苯基磷存在下与四溴化碳进行；
 - (4) 化合物 5 与化合物 3 进行取代反应生成化合物 6；该反应可以在碳酸钾存在下进行；
 - (4) 化合物 6 进行酯水解反应生成化合物 7；该反应可以在 LiOH 条件下进行；
 - (5) 化合物 7 与(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈发生酰胺缩合反应生成化合物 8；
 - (6) 化合物 8 脱除 Boc 保护基形成化合物 9（该反应可以在三氟乙酸条件下进行），然后化合物 9 与 Boc-gly-pro-OH 发生缩合反应形成化合物 10；
 - (7) 化合物 10 脱去 Boc 保护基（该反应可以在三氟乙酸条件下进行），然后与 DOTA-NHS 反应后得到化合物 ZC-1；
- 上述具体步骤的合成路线如下：



本发明方案中的其它化合物（例如化合物 ZC-2~ZC-14）的制备方法与化合物 ZC-1 的制备方法类似，例如将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈，或者将化合物 9 与含有 L 基团和 L 保护基团（例如 BOC）的羧酸类化合物（例如 BOC 甘氨酸、6-[(叔丁氧羰基)氨基]己酸、N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸、5,8,11,14-四氧杂-2-氮杂十七碳二酸-1-叔丁酯、21-(BOC-氨基)-4,7,10,13,16,19-六氧杂二十一碳酸等）偶联，脱去 L 保护基团后，与 Boc-gly-pro-OH 发生缩合，脱去 Boc 保护基，最后偶联 DOTA-NHS；或者两者同时替换。

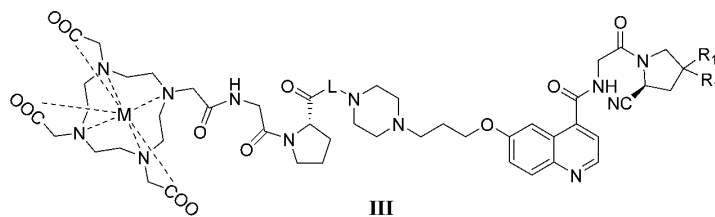
第二方面，本发明进一步提供一种放射性核素标记配合物，其以本发明所述的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物为配体，标记放射性核素 M 得到。所述的放射性核素标记配合物可以作为肿瘤放射性诊疗探针，即可以作为放射性核素诊断探针或放射性核素治疗探针。

所述放射性核素 M 包括放射性诊断核素和放射性治疗核素。

所述放射性诊断核素例如可以为选自： ^{86}Y 、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{g}}\text{Mn}$ 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 等中的任意一种，优选 ^{86}Y 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{124}I 等中的任意一种；

所述放射性治疗核素例如可以为选自： ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 等中的任意一种；优选 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{211}At 等中的任意一种；更优选 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 或 ^{90}Y 。

在一些实施方式中，所述放射性核素标记配合物的结构如下式(III)所示：



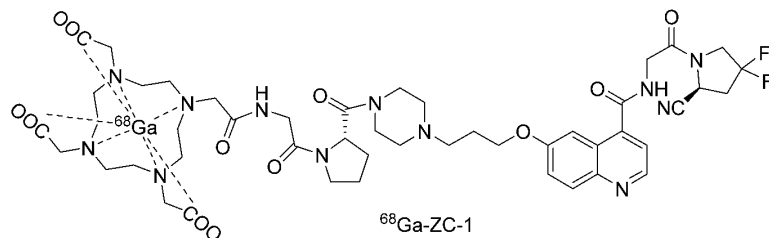
其中，

L、R₁的定义如前所述：

M选自前述放射性核素。

在一些实施方式中，M为选自⁶⁸Ga、¹⁷⁷Lu或⁹⁰Y中的任意一种。

在一些实施方式中，所述放射性核素标记配合物具有以下结构：



本发明所述的放射性核素标记的配合物可以通过含放射性核素的化合物与本发明所述的式(I)化合物按照现有的多种标记方法制备得到。本发明优选的标记方法可以为下述的湿法或冻干法，但不限于此。

湿法标记方法，包括以下步骤：将适量本发明所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物溶于缓冲溶液或去离子水中得到溶液；在所得溶液中加入放射性核素溶液，密闭反应 5-40 min，即生成放射性核素标记配合物；

冻干法标记方法，包括以下步骤：将适量本发明所述的式(I)化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物溶于缓冲溶液或去离子水中得到溶液；将所得溶液经无菌过滤后，分装于容器中，经冷冻干燥后加塞密封，得到冻干药盒；向所述冻干药盒中加入适量乙酸溶液或缓冲液溶解，再加入相应的放射性核素溶液，密闭反应 5-40 min，即生成放射性核素标记配合物。其中，所述的分装用容器优选为冻存管或管制抗生素瓶。还可以根据药盒冻干粉成型情况选择在药盒中增加赋形剂，比如甘露醇、抗坏血酸等，并通过调节本发明所述的式(I)化合物及赋形剂的用量，使药盒成型达到最佳。

所述的湿法标记方案和冻干标记方案得到的产物均可经常规处理(如经色谱分离纯化、旋蒸除去溶剂、以 PBS 或水或生理盐水溶解剩余物、无菌过滤等)进一步制成注射液。

在一些实施方式中，以式(II)所示化合物为配体，制备放射性核素标记配合物的方

法是湿法标记法，包括以下步骤：将式（II）所示化合物溶于缓冲溶液或去离子水中；在其中加入新鲜的放射性核素溶液，密闭 37-90°C 反应 5-40 min，冷却；加水稀释反应液后经 Sep-Pak C18 色谱柱分离纯化，以缓冲液或水冲洗色谱柱以除去未反应的放射性离子，以盐酸乙醇溶液或乙醇溶液淋洗，再经生理盐水或 PBS 稀释后无菌过滤，即得到结构如式（III）所述的放射性标记的配合物的注射液；其中放射性核素 M 为 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 或 ^{90}Y 等。

在一些实施方式中，以式（II）所示化合物为配体，制备放射性核素标记配合物的方法是冻干法标记法，包括：将式（II）所示化合物和其他必要试剂溶于缓冲液中，所得溶液经无菌过滤后分装于冻存管中，经冷冻干燥后密封得到冻干药盒；向冻干药盒中加入适量缓冲溶液溶解，再加入新鲜制的放射性核素溶液，密闭 37-120°C 反应 5-40 min，冷却；加水稀释反应液后经 Sep-Pak C18 色谱柱分离纯化，以缓冲液或水冲洗色谱柱以除去未反应的放射性离子，以盐酸乙醇溶液或乙醇溶液淋洗，再经生理盐水或 PBS 稀释后无菌过滤得到即得到结构如式（III）所示的放射性标记的配合物的注射液；其中放射性核素 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 或 ^{90}Y 等。

上述合成步骤中的所使用的其它化学物质为市售商品。

所述缓冲溶液为稳定反应液 pH 值的物质，可以为醋酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、碳酸盐和磷酸盐，以及它们的混合物等。

再一个方面，本发明提供一种药物组合物，其包含选自式（I）所示的化合物，其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、和经同位素标记的化合物，上述放射性核素标记配合物中的一种或多种，以及任选地药学上可接受的辅料。

再一方面，本发明还提供式（I）所示的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于抑制 FAP 活性的试剂中的应用。

再一方面，本发明还提供式（I）所示的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于诊断、预防和/或治疗以 FAP 高表达为特征的疾病的药物或试剂中的应用。

在一些实施方式中，本发明提供式（I）所示化合物或其药学上可接受的盐、或者上述放射性核素标记配合物在制备用于 FAP 高表达肿瘤的核素治疗或显像的药物或试剂中的应用。

本发明所述应用中，所述的配合物可以被制备成注射剂，通过静脉注射给药，但不限于此。

本发明所述的应用中，所述的 FAP 高表达肿瘤包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌、胃癌和胰腺癌。

有益效果:

本发明提供的式(I)所述化合物及其放射核素配合物,能够特异地靶向FAP并抑制FAP活性,生物试验结果表明其具有显著延长的血液循环半衰期、增强的肿瘤摄取富集和保留时间效果,是目前其它FAPI显像剂(如FAPI-04)所不具备的,其适合用作FAP高表达肿瘤的核素治疗和显像。

附图说明:

图1为实施例1制备的化合物ZC-1的HPLC图。

图2为测试实施例1中化合物ZC-1、FAPI-04与FAP的模拟对接结合图。

图3为测试实施例3不同时间的⁶⁸Ga-ZC-1在37°C下的体外稳定性图。

图4为测试实施例4中⁶⁸Ga-ZC-1和⁶⁸Ga-FAPI-04在U87MG肿瘤小鼠0.5、1、2h的PET/CT图像。

图5为测试实施例4中⁶⁸Ga-ZC-1在U87MG肿瘤小鼠体内分布统计图。

图6为测试实施例4中⁶⁸Ga-ZC-1和⁶⁸Ga-FAPI-04的时间-肿瘤摄取的曲线下面积。

具体实施方式

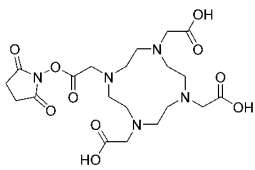
下文将结合具体实施例对本发明的化合物及其制备方法和应用做更进一步的详细说明。应当理解,下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明,而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。除非另有说明,以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品,或者可以通过已知的方法制备。

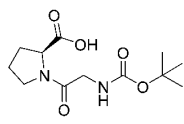
实验仪器耗材

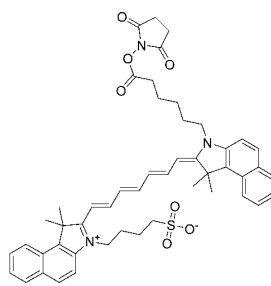
动物模型: 从中国科学院上海实验动物中心购买5至7周龄的BALB/c雌性小鼠(15-20g)。将小鼠饲养在无特定病原体的条件下。饲养环境为25°C,湿度35-45%,12小时明暗交替。所有动物都可以自由喝水进食。

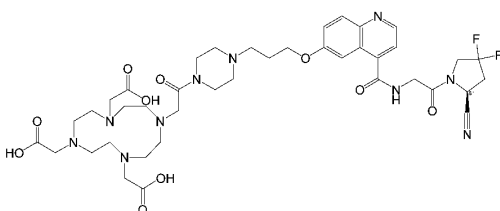
细胞模型: U-87MG(人脑星形胶质母细胞瘤细胞),来自于中国科学院上海药物研究所。

化学试剂: 乙腈、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、N,N-二异丙基乙胺(N,N-Diisopropylethylamine, DIPEA)、二氯甲烷(Dichloromethane, DCM)、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, DMF)购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(N,N,N',N'-TETRAMETHYL-O-(7-AZABENZOTRIAZOL-1-YL)URONIUM HEXAFLUOROPHOSPHATE, HATU)购买于萨恩化学技术(上海)有限公司。(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐购买于韶远科技(上海)有限公司。

DOTA-NHS, , 购买于上海百灵威化学技术有限公司。

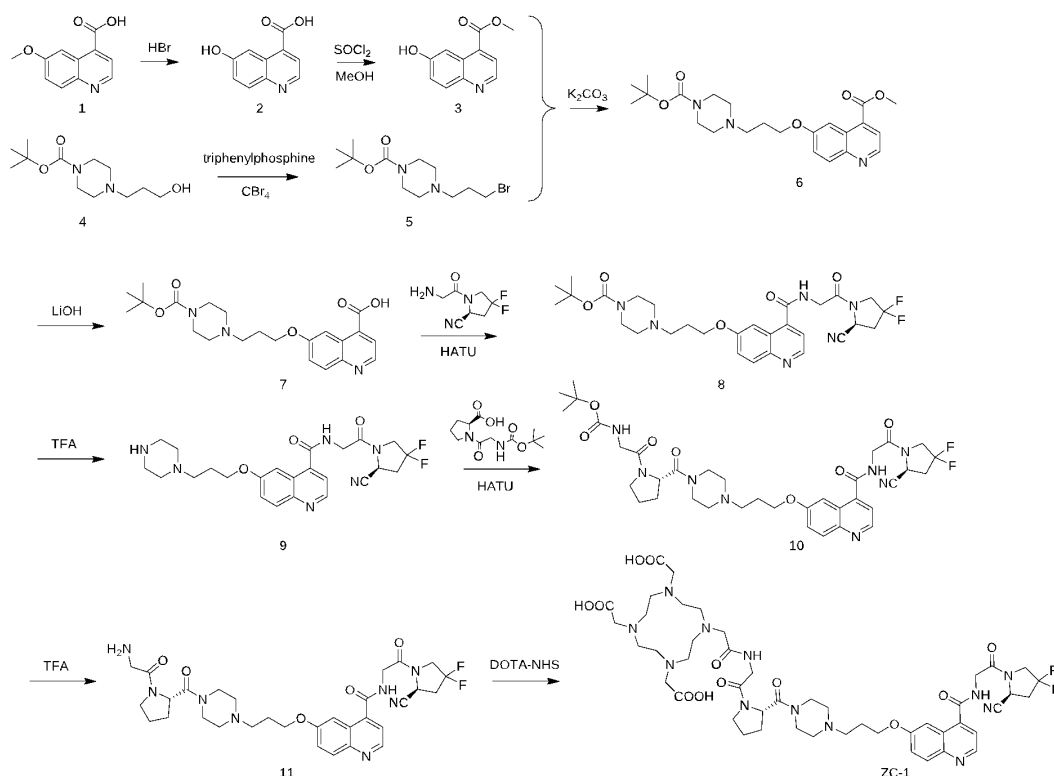
Boc-gly-pro-OH, , 购买于上海毕得医药科技股份有限公司。

ICG-NHS, , 购买于上海百灵威化学技术有限公司。

FAPI-04 (CAS 号: 2374782-02-0), , 购买于无锡捷化医药科技有限公司。

生物试剂: DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)、脱脂奶粉、4%多聚甲醛、CCK8 试剂盒均购买于大连美伦生物技术有限公司。

实施例 1: 化合物 ZC-1 的制备:



步骤 1: 化合物 2 的合成

将化合物 1 (2.00 g, 24.61 mmol) 溶解于 100 mL 溴化氢水溶液中, 并在 120°C 条件下搅拌 24 小时。随后用 50% 氢氧化钠水溶液将反应液碱化至 pH 为 6, 大量固体析出, 收集固体并烘干, 得到化合物 2。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.64 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.81 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 9.1, 2.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.26, 157.36, 147.00, 144.61, 133.83, 131.71, 126.68, 122.80, 122.73, 106.95. LR-ESI-MS (ESI)⁺: *m/z* calcd for C₁₀H₈NO₃⁺ [M+H]⁺: 190.1, found 190.2.

步骤 2: 化合物 3 的合成

将步骤 1 得到的化合物 2 (4.1 g, 21.67 mmol) 溶解于在 150 mL MeOH 中, 在冰浴条件下缓慢滴加 5 mL 氯化亚砷, 滴加完毕后在 60°C 条件下搅拌过夜, 随后蒸发溶剂。残留物用乙醚沉淀。残余物在 0°C 下搅拌 30min, 过滤收集固体, 得到化合物 3。¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.85 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 4.07 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 165.09, 158.07, 143.12, 139.90, 135.66, 127.07, 126.76, 123.86, 122.18, 106.22, 51.59. LR-ESI-MS (ESI)⁻: *m/z* calcd for C₁₁H₈NO₃⁻ [M-H]⁻: 202.1, found. 202.5

步骤 3: 化合物 5 的合成

向化合物 4 (5 g, 20.46 mmol) 的四氢呋喃 (120 mL) 溶液中加入三苯基磷 (5.9 g, 22.51 mmol, 1.1eq), 四溴化碳 (7.46 g, 22.51 mmol, 1.1eq), 然后反应在 25°C 搅拌 12 小时。反应结束后浓缩反应液, 用乙酸乙酯萃取, 水洗后合并有机相浓缩, 经硅胶柱 (PE/EA=3:1)

纯化得到化合物 **5**。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.46 (dt, *J* = 15.6, 5.8 Hz, 6H), 2.57 – 2.31 (m, 6H), 2.10 – 2.00 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).

步骤 4: 化合物 **6** 的合成

在 100 mL 烧瓶中分别将化合物 **3** (4 g, 19.69 mmol)、化合物 **5** (6.05 g, 19.69 mmol)、碳酸钾 (5.44 g, 39.37 mmol) 依次投入至 50 mL N,N-二甲基甲酰胺中。将体系升温到 60°C, 保持体系 60°C 搅拌过夜, 减压蒸馏除去溶剂, 得到粗产物。经硅胶柱 (PE/EA=1:1) 纯化得化合物 **6**。¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.84 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.46 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.64 – 2.41 (m, 6H), 2.07 (m, 2H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 166.80, 158.60, 154.78, 146.89, 145.57, 132.35, 131.38, 126.78, 122.98, 122.78, 103.87, 79.67, 66.40, 55.18, 52.61, 28.44, 26.49. LR-ESI-MS (ESI)⁺: *m/z* calcd for C₂₃H₃₂N₃O₅⁺ [M+H]⁺: 430.2, found. 430.2.

步骤 5: 化合物 **7** 的合成

向化合物 **6** (1.00g, 2.33mmol, 1eq.) 的 100 mL 甲醇和 50 mL 四氢呋喃的溶液中加入 100 mL 氢氧化锂 (167.26mg, 6.98mmol, 3eq.) 水溶液。该混合物在 25°C 下搅拌 1 小时, 然后在真空中浓缩。残余物用水稀释, 加入盐酸调节至 pH 为 5, 再搅拌 15 分钟后, 通过过滤分离出形成的固体, 并在真空中干燥。最后定量得到化合物 **7**。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.87 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.46 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.98 – 2.76 (m, 6H), 2.11 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.74, 157.39, 153.51, 147.61, 144.79, 134.23, 131.18, 125.90, 122.60, 122.06, 104.56, 79.30, 65.60, 53.74, 51.64, 27.98, 24.59. LR-ESI-MS (ESI)⁻: *m/z* calcd for C₂₂H₂₈N₃O₅⁻ [M-H]⁻: 414.2, found. 414.4.

步骤 6: 化合物 **8** 的合成

向化合物 **7** (100 mg, 528.64 μmol, 1.00 eq) 和 (S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲脒盐酸盐 (220 mg, 528.64 μmol, 1.0eq.) 溶解于 DMF 中, 随后加入 HATU (241 mg, 634.36 μmol, 1.2eq.), N,N-二异丙基乙胺 (205 mg, 1.59 mmol, 3eq.), 反应在 25°C 搅拌 12 小时。过滤并使用制备型 HPLC 纯化滤液, 得到化合物 **8**。¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 5.16 (dd, *J* = 9.4, 3.4 Hz, 1H), 4.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.44 – 4.08 (m, 6H), 3.74 – 3.43 (m, 4H), 3.31 – 2.73 (m, 6H), 2.48 – 2.34 (m, 2H), 1.50 (s, 9H). LR-ESI-MS (ESI)⁺: *m/z* calcd for C₂₄H₂₉F₂N₆O₃⁺ [M+H]⁺: 487.3, found 487.5.

步骤 7: 化合物 **9** 的合成

将粗品化合物 **8** (100.00 mg, 170.46 μmol) 溶解于 TFA (10 mL) 的 DCM (10 mL) 溶液中的, 在室温下搅拌 1 小时, 蒸发浓缩后加入乙醚, 析出固体, 收集固体进行真空干燥定量得到化合物 **9**。该产物可直接用于下一步骤, 无需进一步纯化。¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.96 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 8.9, 4.1 Hz, 1H), 4.40 – 4.29 (m, 4H),

4.29 – 4.02 (m, 2H), 3.82 – 3.47 (m, 10H), 2.99 – 2.82 (m, 2H), 2.38 – 2.28 (m, 2H). LR-ESI-MS (ESI)⁺: m/z calcd for C₂₉H₃₇F₂N₆O₅⁺ [M+H]⁺: 587.3, found 587.5. LR-ESI-MS (ESI)⁺: m/z calcd for C₂₄H₂₉F₂N₆O₃⁺ [M+H]⁺: 487.3, found 487.5.

步骤 8: 化合物 10 的合成

将 Boc-gly-pro-OH (100 mg, 367.24 μmol, 1eq) 和化合物 9 (178.67 mg, 367.24 μmol, 1eq) 溶解于 DMF 中, 随后加入 HATU (167.57 mg, 440.69 μmol, 1eq.), N,N-二异丙基乙胺 (237.32 mg, 1.84 mmol, 5eq.), 反应在 25 °C 搅拌 12 小时。反应结束后浓缩反应液, 使用制备型 HPLC 纯化, 得到的化合物 10 为白色固体 ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.17 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.66 – 7.65 (m, 1H), 7.24 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.50 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.55 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 4.09 – 3.82 (m, 8H), 3.53 (m, 6H), 2.73 – 2.48 (m, 8H), 2.03 (m, 2H), 1.94 – 1.80 (m, 4H), 1.40 (s, 9H). LR-ESI-MS (ESI)⁺: m/z calcd for C₃₆H₄₇F₂N₈O₇⁺ [M+H]⁺: 741.35, found 741.5.

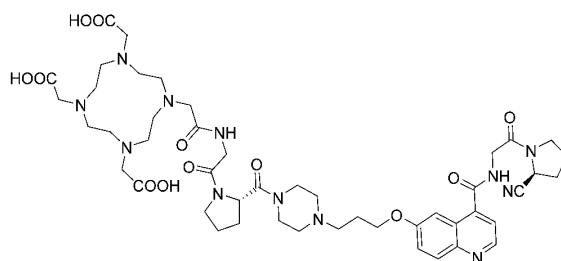
步骤 9: 化合物 11 的合成

将粗品化合物 10 (103.78 mg, 161.98 μmol) 溶解于 TFA (10 mL) 的 DCM (10 mL) 溶液中的, 在室温下搅拌 1 小时, 蒸发浓缩后加入乙醚, 析出固体, 收集固体进行真空干燥定量得到化合物 11。该产物可直接用于下一步骤, 无需进一步纯化。

步骤 10: 化合物 ZC-1 的合成

将粗品化合物 11 (100.00 mg, 156.08 μmol, 1eq) 溶解于 10 mL DMF 中, 加入 DOTA-NHS (391.37 mg, 780.41 μmol, 5eq) 和 DIPEA (201.73 mg, 1.56 mmol, 10eq), 在室温下搅拌 12 小时, 蒸发浓缩后使用制备型 HPLC 纯化, 得到的化合物 ZC-1 为白色固体。 ¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 8.94 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 5.10 (dd, J = 8.9, 4.1 Hz, 1H), 4.34 – 3.94 (m, 9H), 3.85 – 2.79 (m, 38H), 2.32 (s, 2H), 1.98 (s, 2H), 1.81 (s, 2H). HRMS calcd. for C₄₇H₆₅F₂N₁₂O₁₂⁺ [M+H]⁺: 1027.4807, found 1027.4805.

实施例 2 化合物 ZC-2 的制备



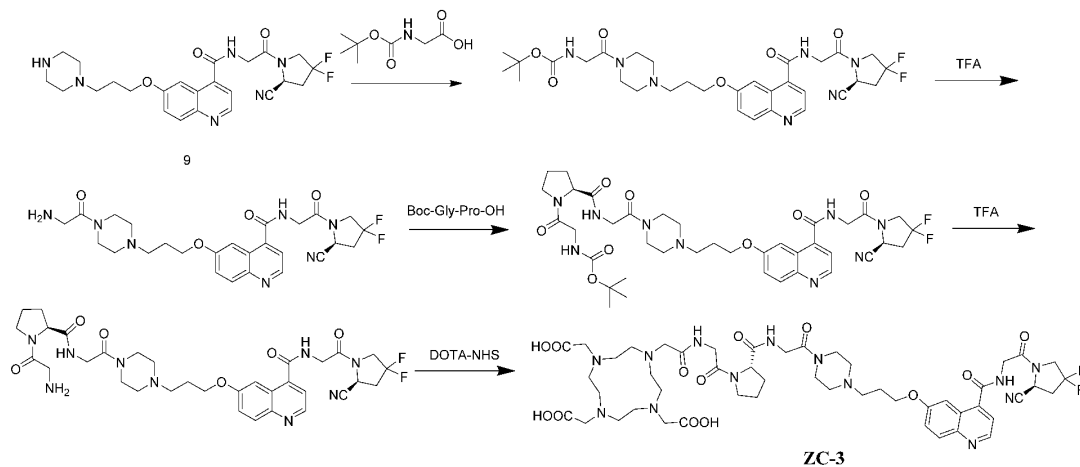
ZC-2

制备方法参考实施例 1, 区别在于, 将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据: ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.11 – 3.88 (m, 6H), 3.76 – 3.18

(m, 16H), 2.82 – 1.68 (m, 32H).

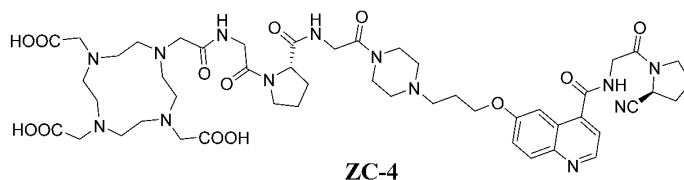
实施例 3 化合物 ZC-3 的制备



制备方法参考实施例 1，区别在于，在进行步骤 8 之前，将化合物 9 与 BOC 甘氨酸反应，具体反应步骤为：将化合物 9 (1.0 eq)、BOC 甘氨酸 (1.5eq) 溶于 DMF，加入 1.2 eq HATU, 3 eq DIPEA，室温搅拌 8 小时；得到的化合物经 TFA 脱保护后再与 Boc-gly-pro-OH 反应，得到的化合物经 TFA 脱保护后与 DOTA-NHS 反应（反应条件均与实施例 1 相同或类似）得到 **ZC-3**。

表征数据：¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.75 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.11 – 3.79 (m, 11H), 3.60 – 2.43 (m, 38H), 2.08 – 1.71 (m, 6H).

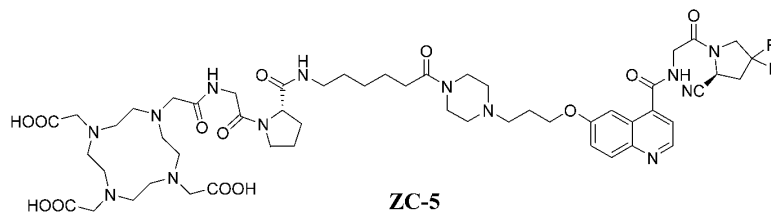
实施例 4 化合物 ZC-4 的制备



制备方法参考实施例 3，区别在于将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据：¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.73 – 7.70 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.10 – 3.89 (m, 8H), 3.74 – 2.43 (m, 38H), 2.23 – 1.72 (m, 10H).

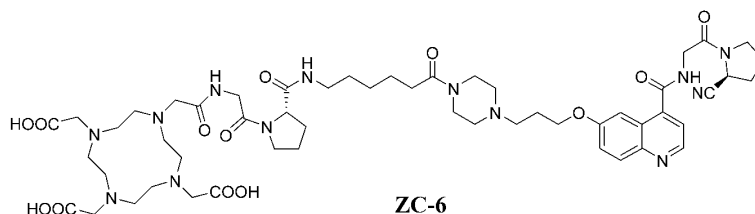
实施例 5 化合物 ZC-5 的制备



制备方法参考实施例 3，区别在于，将与化合物 **9** 反应的 BOC 甘氨酸替换为 6-[(叔丁氧羰基)氨基]己酸。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.74 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.10 – 3.79 (m, 8H), 3.61 – 2.27 (m, 42H), 2.08 – 1.32 (m, 12H).

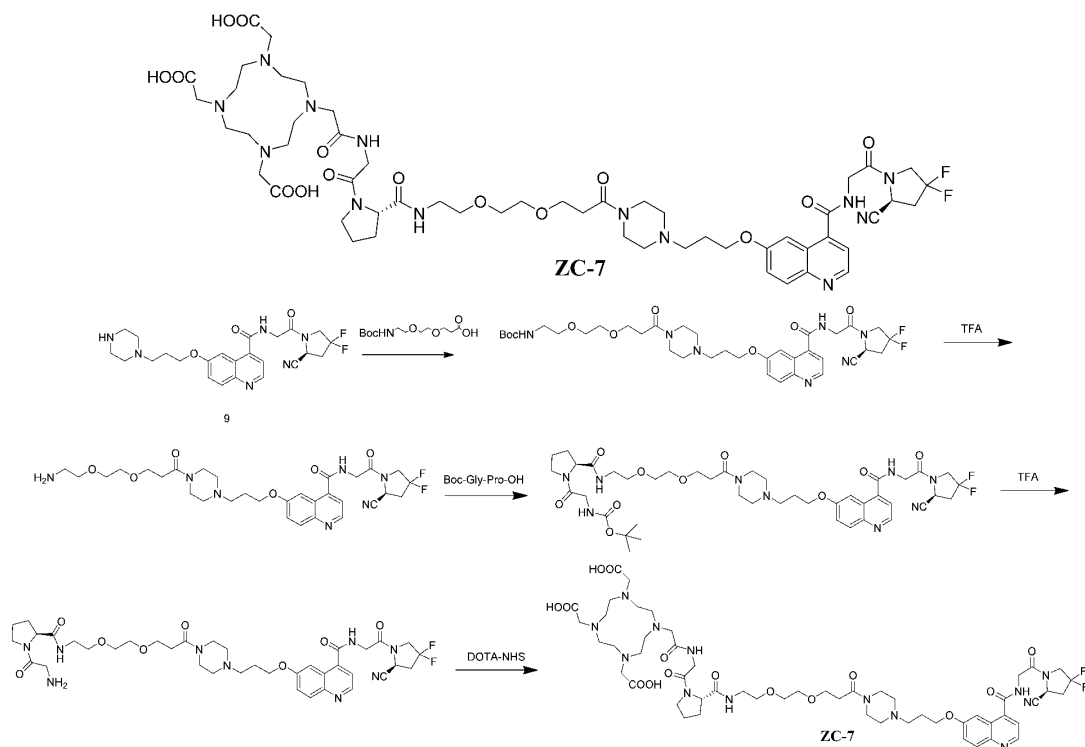
实施例 6 化合物 ZC-6 的制备



制备方法参考实施例 5，区别在于将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.28 m, 1H), 4.11 – 3.88 (m, 6H), 3.74 – 2.28 (m, 42H), 2.22 – 1.31 (m, 16H).

实施例 7 化合物 ZC-7 的制备

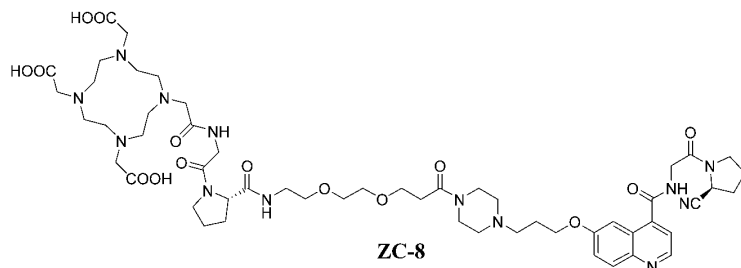


制备方法参考实施例 3，区别在于，在进行步骤 8 之前，将化合物 **9** 与 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸反应，具体反应步骤为：将化合物 **9** (1 eq) 与 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸 (1.1 eq) 溶于 DMF，加入 1.2 eq HATU, 3 eq DIPEA，室温搅拌 8 小时；得到

的化合物经 TFA 脱保护后再与 Boc-gly-pro-OH 反应；得到化合物经 TFA 脱保护后与 DOTA-NHS 反应（反应条件均与实施例 1 相同或类似）得到 **ZC-7**。

表征数据：¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.74 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1.5 Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.12 – 3.77 (m, 10H), 3.73 – 2.39 (m, 48H), 2.10 – 1.65 (m, 6H).

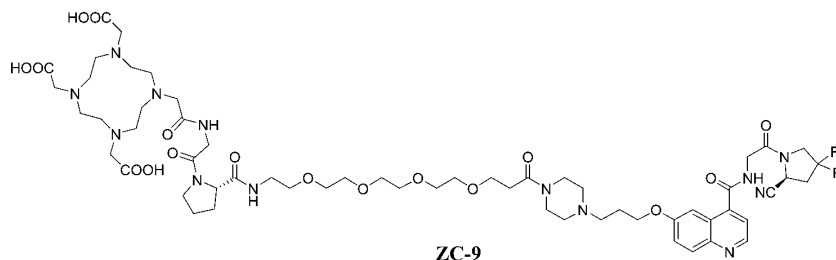
实施例 8 化合物 **ZC-8** 的制备



制备方法参考实施例 7，区别在于，将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据：¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.75 – 7.67 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1.5 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.12 – 2.40 (m, 56H), 2.23 – 1.71 (m, 10H).

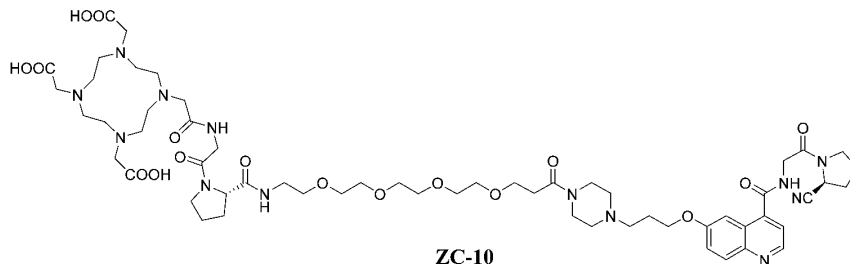
实施例 9 化合物 **ZC-9** 的制备



制备方法参考实施例 7，区别在于，将与化合物 9 反应的 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸替换为 5,8,11,14-四氧杂-2-氮杂十七碳二酸-1-叔丁酯。

表征数据：¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.79 – 7.68 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1.5 Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.12 – 2.36 (m, 66H), 2.08 – 1.70 (m, 6H).

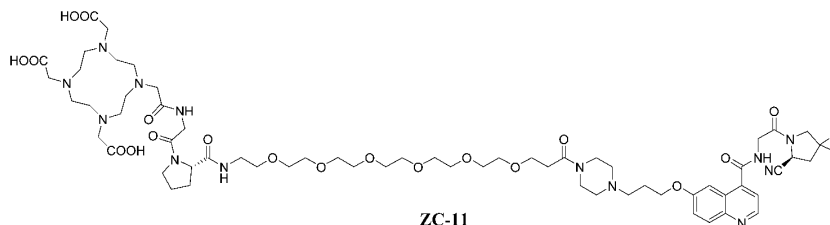
实施例 10 化合物 **ZC-10** 的制备



制备方法参考实施例 9，区别在于将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, Hz, 1H), 7.78 – 7.66 (m, 1H), 7.61 (d, 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.14 – 2.40 (m, 64H), 2.25 – 1.69 (m, 10H).

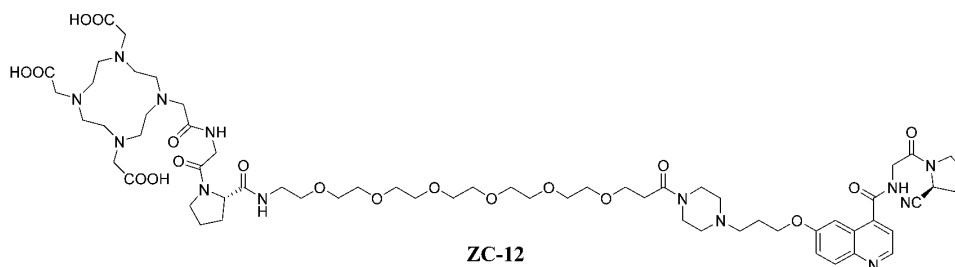
实施例 11 化合物 ZC-11 的制备



制备方法参考实施例 7，区别在于，将与化合物 **9** 反应的 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸替换为 21-(BOC-氨基)-4,7,10,13,16,19-六氧杂二十一碳酸。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.80 – 7.68 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1.5 Hz, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.11 – 2.36 (m, 74H), 2.14 – 1.72 (m, 6H).

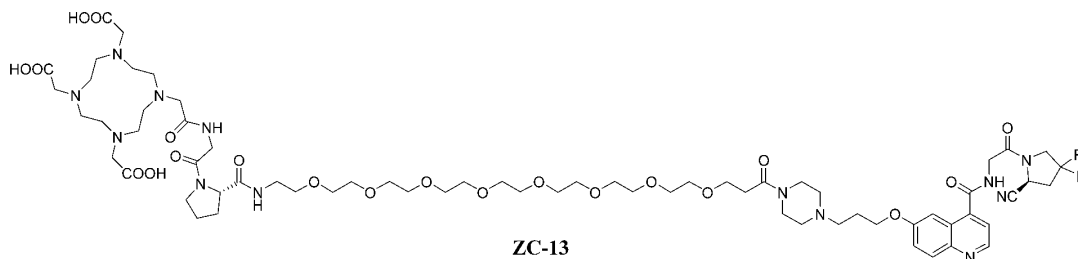
实施例 12 化合物 ZC-12 的制备



制备方法参考实施例 11，区别在于，将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲腈盐酸盐。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.81 – 7.66 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.14 – 2.40 (m, 72H), 2.23 – 1.70 (m, 10H).

实施例 13 化合物 ZC-13 的制备

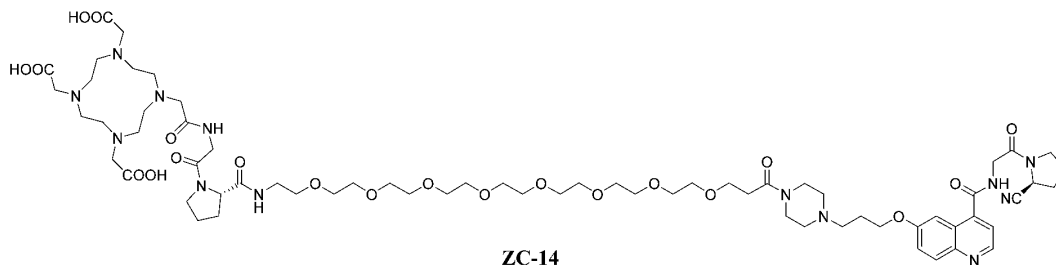


制备方法参考实施例 7, 区别在于, 将与化合物 9 反应的 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-

羧酸替换为 N-叔丁氧羰基-七聚乙二醇-羧酸。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.78 – 7.69 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.16 – 2.41 (m, 82H), 2.08 – 1.68 (m, 6H).

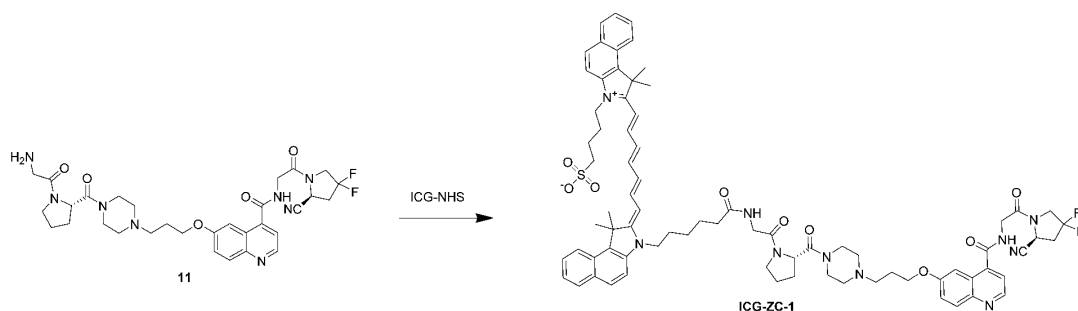
实施例 14 化合物 ZC-14 的制备



制备方法参考实施例 13, 区别在于将与化合物 7 反应的(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲脒盐酸盐替换成(S)-1-(2-氨基乙酰基)吡咯烷-2-甲脒盐酸盐。

表征数据: ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.59 (d, 1H), 8.19 (d, 1H), 7.78 – 7.67 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.28 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.17 – 2.38 (m, 80H), 2.23 – 1.68 (m, 10H).

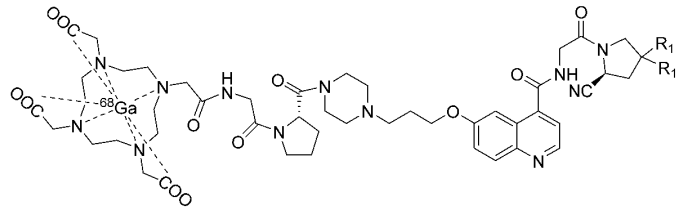
实施例 15: 化合物 ZC-ICG-1 的制备:



步骤 1: 化合物 ZC-ICG-1 的合成

将粗品化合物 11 (100.00 mg, 156.08 μmol , 1eq) 溶解于 10 mL DMF 中, 加入 ICG-NHS (387 mg, 468.2 μmol , 3eq) 和 DIPEA (201.73 mg, 1.56 mmol, 10eq), 在室温下搅拌 12 小时, 蒸发浓缩后使用制备型 HPLC 纯化, 得到的化合物 **ZC-ICG-1** 为绿色固体 ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.72 – 8.65 (m, 1H), 8.59 (d, 1H), 8.27 – 8.16 (m, 2H), 8.06 (d, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 1H), 7.82 – 7.71 (m, 3H), 7.61 (d, 1H), 7.57 – 7.18 (m, 8H), 6.71 – 6.47 (m, 4H), 6.42 – 6.33 (m, 1H), 6.01 (d, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.52 (dt, 3H), 4.18 – 1.26 (m, 48H).

实施例 16: ^{68}Ga -ZC-1 的制备



取用 0.1M 盐酸从 ^{68}Ge - ^{68}Ga 发生器中洗脱 $^{68}\text{GaCl}_3$ 44 μL , 与 0.5 μL 浓度为 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的化合物 **ZC-1** 水溶液混合, 再加入 400 μL 乙酸钠溶液将 pH 值调整到 4-5 后, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 的金属浴中进行反应 10 分钟。反应结束后, 用 1 mL 生理盐水稀释反应物, 用注射器将其注入 C18 脱盐柱中。然后用 10 mL 生理盐水对 C18 脱盐柱进行多次洗涤, 以去除未与化合物 **ZC-1** 结合的 $^{68}\text{Ga}^{3+}$, 直到相邻两次洗涤之间的活度差异小于 10 μCi 。最后, 用 100-200 μL 乙醇洗脱 C18 脱盐柱, 得到 ^{68}Ga -**ZC-1**。

测试实施例 1: **ZC-1**、**FAPi-04** 与 **FAP** 的对接模拟分析

FAP 蛋白的三维结构从 RCSB 蛋白质数据库下载, PDB ID 为 1Z68。使用同源模型方法对化合物 **ZC-1** 和 **FAPi-04** 进行建模。对接模拟分析结果见图 2, 其中的红色部分表示 **FAP** 蛋白残基与小分子相互作用, 潜在的氢键用黄色的虚线表示。由图 2 对接分析可知, **ZC-1** 与 **FAP** 的参考对接得分是 7.6177, 而 **FAPi-04** 是 6.3464。与 **FAPi-04** 相比, **ZC-1** 能够与 Tyr⁷⁴⁵、Trp⁶²³、Arg¹²³、Ser⁵⁴⁸、Arg⁵⁵⁰、Gln⁵⁴⁷ 和 Asn³⁹⁹ 相互作用, 而 **FAPi-04** 仅能够与 Trp⁶²³ 和 Ser⁶²⁴ 相互作用。相比于 **FAPi-04**, **ZC-1** 的 Gly-Pro 序列增强了化合物与 **FAP** 的相互作用, 使其能够与 **FAP** 蛋白中更多的氨基酸残基进行结合, 从而使得 **ZC-1** 与 **FAP** 蛋白相互作用更强。

测试实施例 2: ^{68}Ga -**ZC-1** 体外 **FAP** 酶饱和结合实验

将 1×10^5 个 U87MG 细胞平铺在 96 孔细胞板的每个孔中, 培养 24 小时。将实施例 16 制备的 ^{68}Ga -**ZC-1** 和 ^{68}Ga 标记的 **FAPi-04** 溶液用培养基稀释到 1000 nM、500 nM、250 nM、100 nM、50 nM、25 nM、0.78 nM 的不同浓度。同时, **FAPi-04** 用完全培养基稀释到 100 μM 以制备抑制剂溶液。将孔中上层培养基从孔板中吸出, 用 0.2mL PBS 清洗两次。实验分为 ^{68}Ga -**ZC-1** 或 ^{68}Ga -**FAPi-04** 组, 每组均设置空白组与实验组, 实验组加入 0.1mL 空白培养基, 空白组加入 0.1mL 的 **FAPi-04** 溶液 (100 μM), 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 分钟后, 实验组和空白组分别加入 0.1mL 不同浓度的 ^{68}Ga -**ZC-1** 或 ^{68}Ga -**FAPi-04** 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 小时。吸出溶液, 用 PBS 清洗两次。用 0.2mL NaOH 溶液 (1M) 裂解细胞并通过 γ 计数器测量计数。所有测量均一式两份进行。结果见表 1。

表 1. ^{68}Ga -**ZC-1** 和 ^{68}Ga -**FAPi-04** 与 **FAP** 蛋白结合的 K_d 值

	K_d (nM)
^{68}Ga - ZC-1	10.55 ± 0.57
^{68}Ga - FAPi-04	21.34 ± 0.81

由表 1 可知, 化合物 ^{68}Ga -**ZC-1** 具有良好的 **FAP** 蛋白结合能力。

测试实施例 3: $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 在 37°C 下的体外稳定性

将 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 溶解在 FBS 或 BSA 缓冲液中, 浓度 $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。然后加入 $45\mu\text{L}$ 1.5M 醋酸钠溶液和 $430\text{ }\mu\text{L}$ 氯化镓淋洗液, 混合均匀, 标记完成后置于 37°C 下分别放置 0min , 30min , 60min , 120min 取样进行薄层色谱层析, 经 γ 探测器检测后分别计算稳定性, 结果见图 3。

图 3 表明 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 在 PBS 与 BSA 缓冲液中, 两小时内没有明显的脱金属现象, 稳定性较高, 可用于下一步实验。

测试实施例 4: $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 和 $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 在 U87MG 人脑神经胶质瘤荷鼠体内 PET/CT 成像

试验动物及给药方式: U87MG 人脑神经胶质瘤荷鼠, 尾静脉注射。

给药分组及给药剂量:

$^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 组: 尾静脉注射 $150\text{ }\mu\text{Ci}/200\text{ }\mu\text{L}$ $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 。

阻断组: 在尾静脉注射 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 前 30 分钟, 通过尾静脉注射化合物 FAPI-04 (探针物质的量 500 倍过量)。

对照组: 尾静脉注射 $150\text{ }\mu\text{Ci}/200\text{ }\mu\text{L}$ $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 。

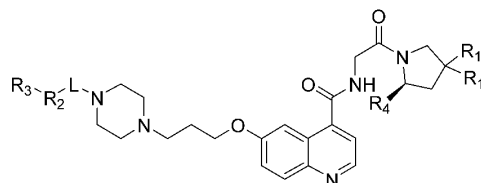
于注射 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 后的 0.5 , 1 , 2h 进行 PET/CT 成像, 观察探针在小鼠体内的分布以及在肿瘤区域的富集, 结果见图 4-6。

结果如图 4 所示, U87MG 异种移植模型的 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ PET 成像显示了高的肿瘤摄取量和肿瘤与背景之间的强烈对比。即使在注射后 0.5 小时, 肿瘤的积累迅速达到 $4.467\pm 0.379\%\text{ID/g}$, 注射后 1 小时后信号逐渐减少。另外, $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 作为对比和临床使用的药剂, 在肿瘤中的信号要低得多。此外, 在注射 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 0.5 小时后, 小鼠左前腋下的 U87MG 肿瘤清晰可见, 阻断实验显示, 预先注射非放射性的 FAPI-04 后, 肿瘤的摄取明显减少。这一结果表明 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 在体内的特异性积累。对照组中, $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 在注射 0.5 h 后肿瘤可见但与肝摄取相差无几, 此后肿瘤区域摄取明显降低, 2h 时已没有信号。可见, 与广被接受的 $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 相比, $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 在肿瘤区域的摄取有显著提升, 肿瘤滞留时间更长。实验结果说明探针 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 具有活体肿瘤成像的效果。

图 5 为生物体内分布统计图, 图中数据表明, 在提前注射 FAPI-04 作为阻断剂后, 通过尾静脉注射 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$, 肿瘤部分对 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 的摄取明显降低, 表明 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 能够特异性靶向 FAP 高表达的肿瘤, 且肿瘤/大脑分布比值高达 13。图 6 为 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 和 $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 基于肿瘤摄取与时间的曲线下面积 (AUC), 用于比较 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 和 $^{68}\text{Ga-FAPI-04}$ 随着时间推移肿瘤摄取量的大小, 分别显示为 422.5 和 98.14, 说明 $^{68}\text{Ga-ZC-1}$ 的肿瘤滞留时间更长。

权利要求

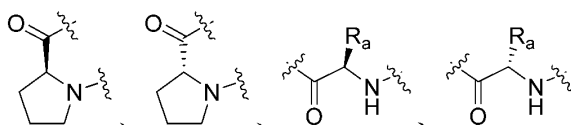
1. 式 (I) 所示的化合物, 或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物,

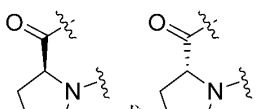
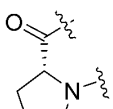


I

其中, 各个 R_1 独立地为卤素或 H, 卤素优选为 F;

R_2 为 $-(W_1)_{n1}-(W_1)_{n2}-(W_1)_{n3}-(W_1)_{n4}-(W_1)_{n5}-(W_1)_{n6}-$, $n1$ 至 $n6$ 各自独立地为 0 或 1;

W_1 各自独立地选自以下结构: , 其中 R_a 选自 H、C1-C3 烷基, 各 W_1 之间以羰基和 N 相连接形成酰胺键, 且相邻的 3 或更多个

W_1 不同时为  或 ;

R_3 为双功能螯合剂、荧光报告基团或治疗药物;

L 为 $-(CH_2)_{n7}-$, 其中 $n7$ 是 0 至 40 的整数; 其中每个 CH_2 独立地任选用 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-(CO)-$ 、 $-NH(CO)-$ 或 $-(CO)-NH-$ 替换, 条件是没有两个相邻的 CH_2 基团被同时替换;

R_4 为 $-CN$ 或 $-B(OH)_2$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物, 其特征在于,

所述双功能螯合剂选自 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸、三亚乙基四胺、2-(4,7-双羧甲基[1,4,7]三氮杂环壬基-1-基-乙基)羧基-甲基氨基]乙酸、二亚乙基三胺-N,N,N',N',N''-五乙酸、N,N-二(2-羟基苯基)亚乙基二胺-N,N'-二乙酸、2,2',2'',2'''-(5²,13²-二羟基-5⁵,13⁵-二甲基-3,7,11,15-四氮杂-1,9(2,6)-二吡啶-5,13(1,3)-二苯并环己二酮-3,7,11,15-四基)四乙酸; 优选为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸; 或

所述荧光报告基团包括可见光基团、近红外一区基团、近红外二区基团;

可见光基团可以选自: 荧光素、罗丹明、异硫氰酸荧光素、花菁荧光染料(例如 Cy2)、绿色荧光蛋白、量子点、纳米粒子、F16 等中任意一种;

近红外一区基团可以选自: 花菁染料类(例如 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、Cy7.5)、

BODIPY 类 (例如氟硼二吡咯、氮杂氟硼二吡咯)、罗丹明类 (例如罗丹明绿、罗丹明 6G、四甲基罗丹明、罗丹明 B、丽丝胺罗丹明、X-罗丹明、德州红、硅基罗丹明)、量子点、纳米粒、酞菁中任意一种;

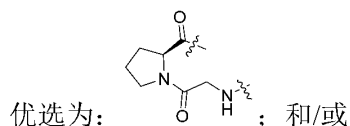
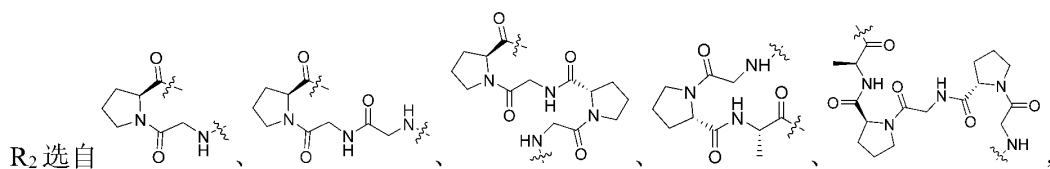
近红外二区基团可以选自: 花菁染料类 (例如 Cy7、Cy7.5)、D-A-D 类 (例如 CH-1055、CH-4T、FT-TQT)、BODIPY 类 (例如 NJ960、NJ1030、NJ1060、PCP-BDP2)、量子点、纳米粒子中任意一种;

所述治疗药物包括小分子抑制剂、单抗类药物、生物烷化剂、细胞毒药物、激素药物、生物反应调节剂;

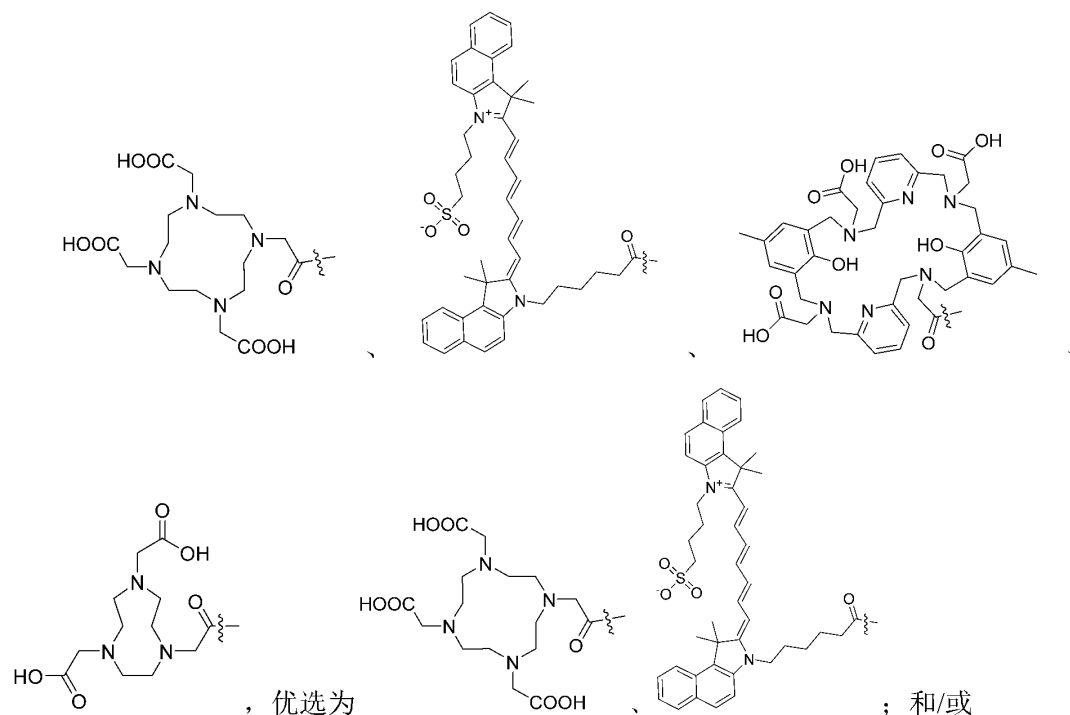
或

式 (I) 中,

各个 R_1 同为 H 或者 F 原子; 和/或



R_3 选自以下结构:



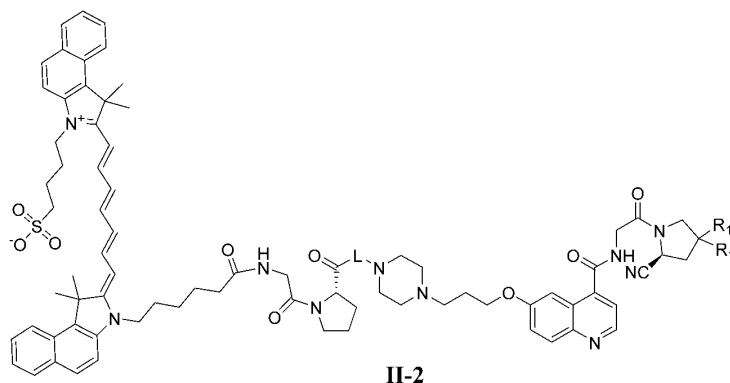
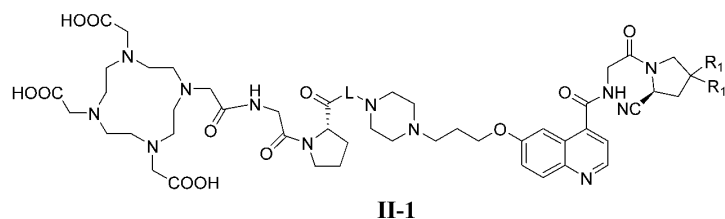
L 是 $-(CH_2)_{n-}$; n 是 0-30 的整数, 更优选是 0-12 的整数, 进一步优选 0、3 或 10; 其

中每个-CH₂-独立地任选用-O-、-NH-或-(CO)-替换, 条件是没有两个相邻的-CH₂-基团被替换; 或

L 为不存在, 或选自-NH-(CH₂)_{n8}-(CO)-、-NH-(CH₂CH₂O)_{n9}-(CH₂)_{n8}-(CO)-, 各 n8 和 n9 独立为 1-10, 优选 1-8、1-6、1-4 的整数; 和/或

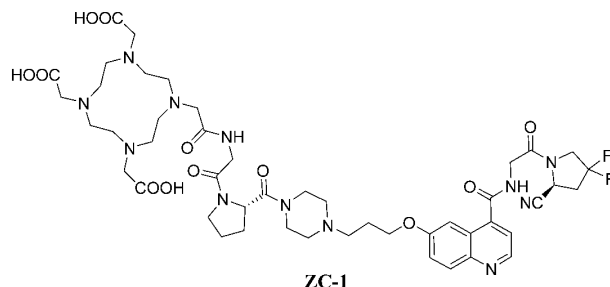
R₄ 为-CN。

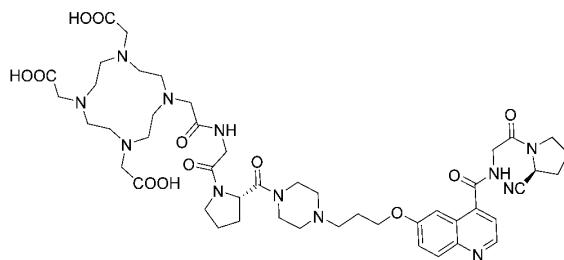
3. 根据权利要求 1 或 2 所述化合物, 或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物, 其特征在于, 所述式 (I) 化合物选自式 (II-1)、(II-2):



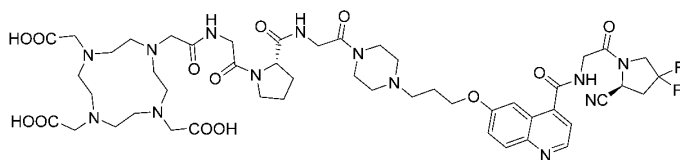
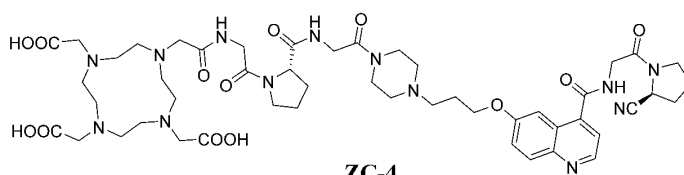
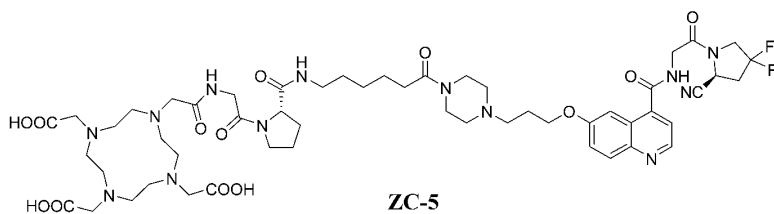
其中, R₁、L 定义如相应权利要求所定义。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的化合物, 或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物, 其特征在于, 式 (I) 化合物选自如下结构:

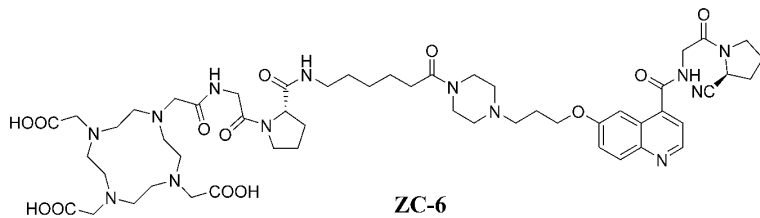
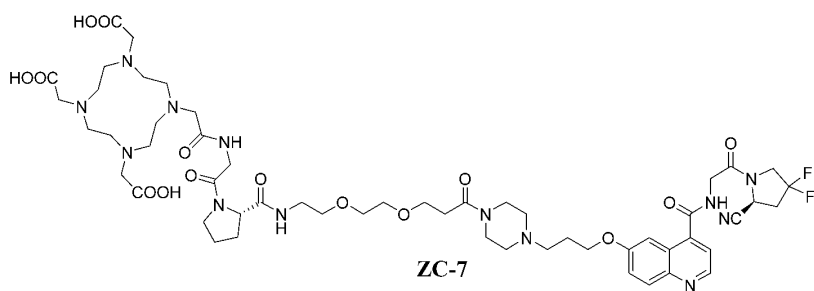




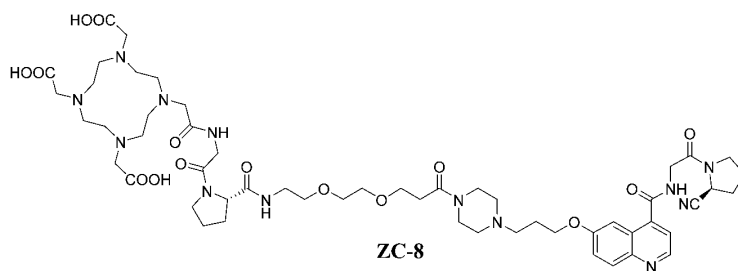
ZC-2

**ZC-3****ZC-4**

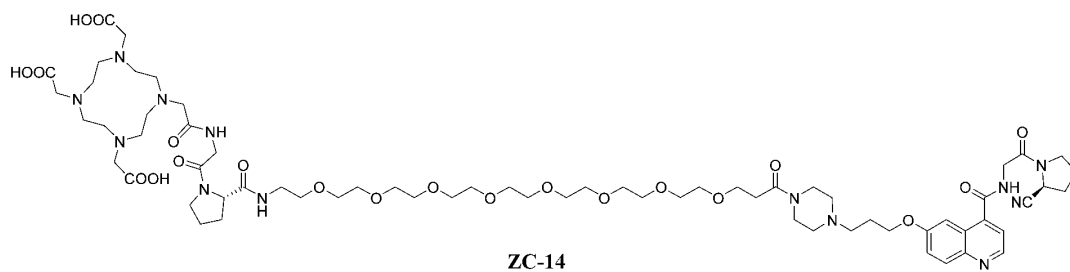
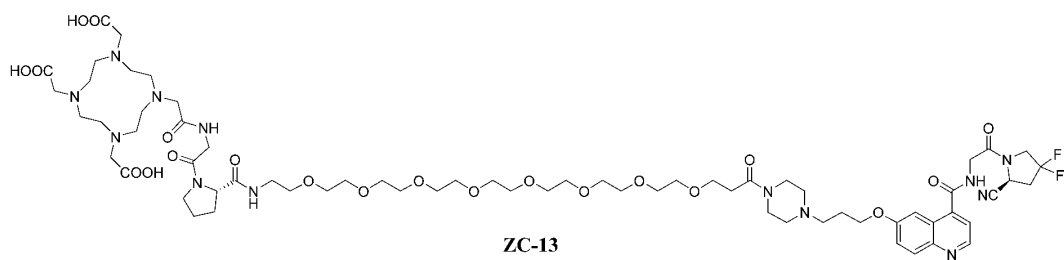
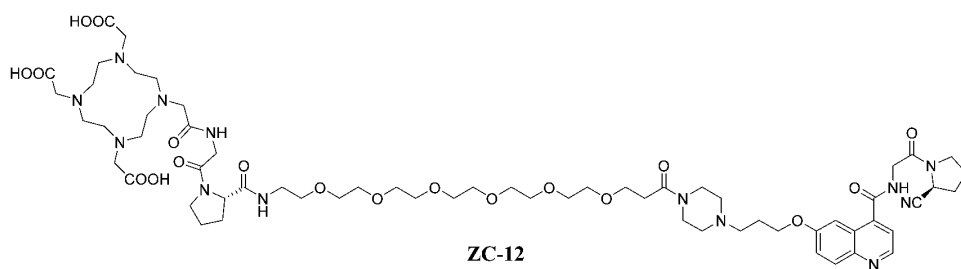
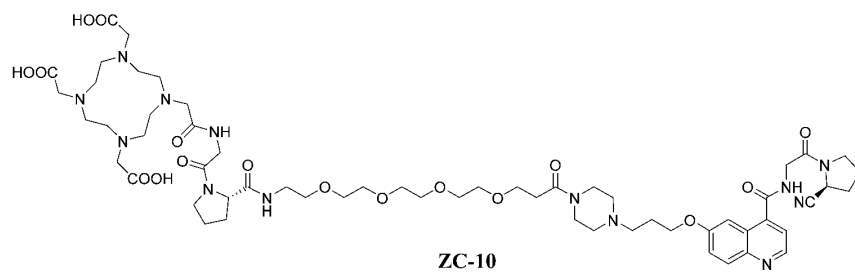
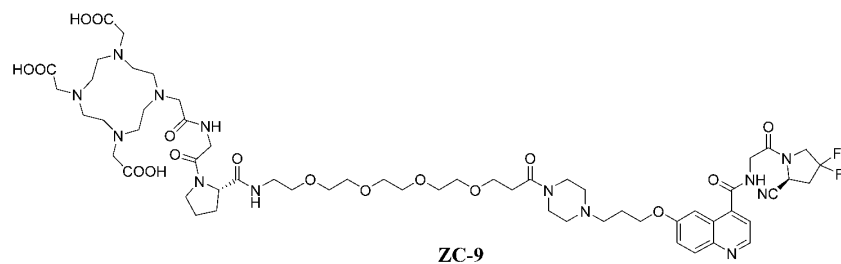
ZC-5

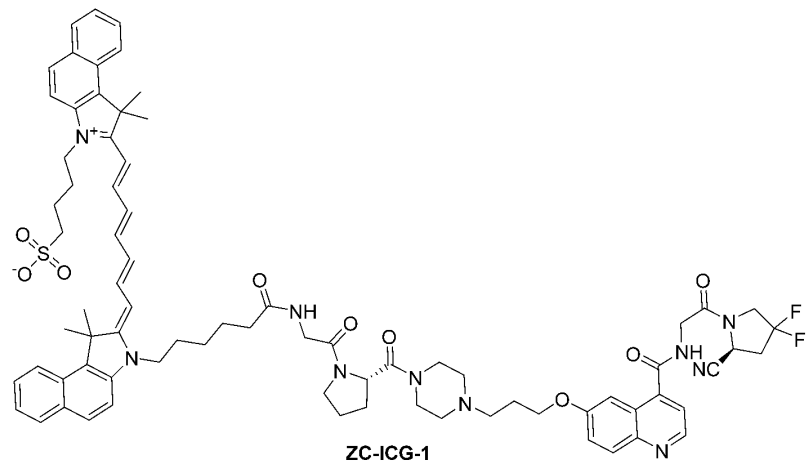
**ZC-6**

ZC-7

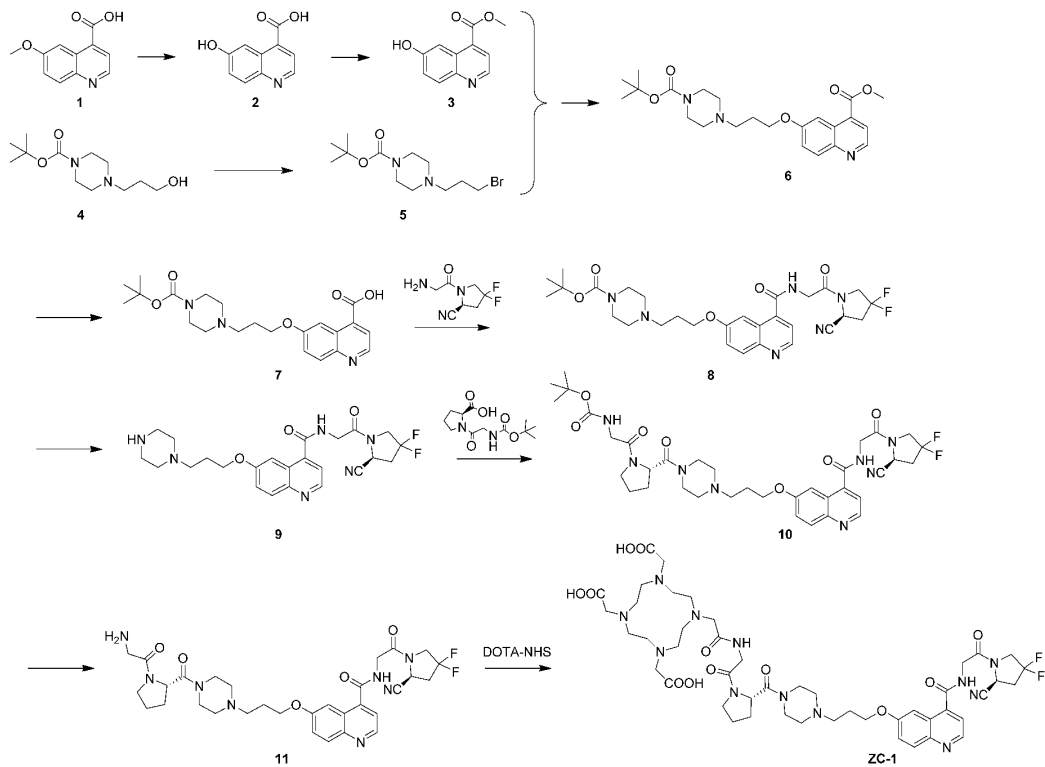


ZC-8





5. 一种制备化合物 ZC-1 的方法，包括以下步骤：



- (1) 化合物 1 发生脱甲基反应得到化合物 2；
- (2) 化合物 2 与甲醇进行酯化反应得到化合物 3；
- (3) 化合物 4 发生溴代反应生成化合物 5；
- (4) 化合物 5 与化合物 3 进行取代反应生成化合物 6；
- (4) 化合物 6 进行酯水解反应生成化合物 7；
- (5) 化合物 7 与(S)-1-(2-氨基乙酰基)-4,4-二氟吡咯烷-2-甲腈发生酰胺缩合反应生成化合物 8；

(6) 化合物 8 脱除 Boc 保护基形成化合物 9; 然后化合物 9 与 Boc-gly-pro-OH 发生缩合反应形成化合物 10;

(7) 化合物 10 脱去 Boc 保护基; 然后与 DOTA-NHS 反应后得到化合物 ZC-1。

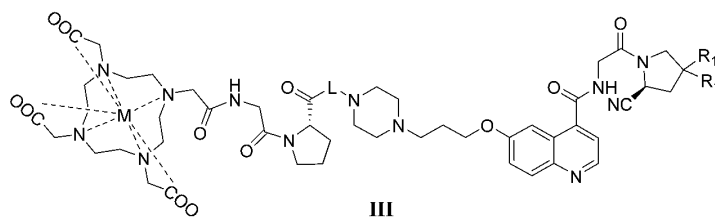
6. 一种放射性核素标记配合物, 其以权利要求 1-4 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物为配体, 标记放射性核素 M 得到;

特别地, 所述放射性核素 M 包括放射性诊断核素和放射性治疗核素;

特别地, 所述放射性诊断核素选自: ^{86}Y 、 ^{18}F 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{52\text{g}}\text{Mn}$ 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{44}Sc 、 ^{47}Sc 中的任意一种, 优选 ^{86}Y 、 $\text{Al}[^{18}\text{F}]$ 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{124}I 中的任意一种;

特别地, 所述放射性治疗核素选自: ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 中的任意一种; 优选 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{211}At 中的任意一种; 更优选 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 或 ^{90}Y ;

优选地, 所述放射性核素标记配合物的结构如下式(III)所示:

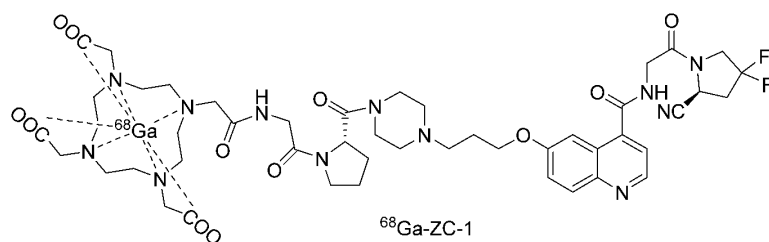


其中,

L、R₁ 如权利要求 1-4 中任一项所定义;

M 定义如前所述; 优选地, M 为选自 ^{68}Ga 、 ^{177}Lu 和 ^{90}Y 中的任意一种;

更优选地, 所述放射性核素标记配合物具有以下结构:



7. 权利要求 6 所述的放射性核素标记配合物的制备方法, 其以权利要求 1-4 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物为配体, 标记放射性核素 M;

特别地, 标记方法为湿法标记方法或冻干法标记方法;

特别地，所述湿法标记方法包括以下步骤：将适量权利要求 1-4 任一项所述的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物溶于缓冲溶液或去离子水中得到溶液；在所得溶液中加入放射性核素 M 溶液，密闭反应 5-40 min，即生成放射性核素标记配合物；

特别地，所述冻干法标记方法，包括以下步骤：将适量权利要求 1-4 任一项所述的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物溶于缓冲溶液或去离子水中得到溶液；将所得溶液经无菌过滤后，分装于容器中，经冷冻干燥后加塞密封，得到冻干药盒；向所述冻干药盒中加入适量乙酸溶液或缓冲液溶解，再加入相应的放射性核素 M 溶液，密闭反应 5-40 min，即生成放射性核素标记配合物；

所述放射性核素 M 定义如权利要求 6 所述。

8. 一种药物组合物，其包含选自权利要求 1-4 任一项所述的化合物、其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、经同位素标记的化合物，和上述放射性核素标记配合物中的一种或多种，以及任选地药学上可接受的辅料。

9. 权利要求 1-4 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于抑制 FAP 活性的试剂中的应用。

10. 权利要求 1-4 任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、对映异构体、非对映异构体、外消旋体、阻转异构体、多晶型物、溶剂合物、或经同位素标记的化合物，或者上述放射性核素标记配合物在制备用于诊断、预防和/或治疗以 FAP 高表达为特征的疾病的药物或试剂中的应用；

优选在制备用于 FAP 高表达肿瘤的核素治疗或显像的药物或试剂中的应用；

优选地，所述的 FAP 高表达肿瘤包括乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结直肠癌、胃癌和胰腺癌。