

一种双重靶向化合物及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及核医学与分子影像学领域，具体地涉及一种放射性核素标记的成纤维细胞活化蛋白 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 双重靶向化合物，以及制备方法和所述化合物在诊断或治疗以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病中的用途。

背景技术

成纤维细胞活化蛋白(Fibroblast activation protein, FAP) 是一种膜丝氨酸蛋白酶，表达于肿瘤间质活化的成纤维细胞表面，在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。既往研究表明，FAP 在正常人组织中一般无表达，但是选择性地高表达于 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、胃癌和胰腺癌等。整合素 $\alpha_v\beta_3$ (integrin $\alpha_v\beta_3$) 是位于细胞表面的异源二聚体受体，在正常血管内皮和上皮细胞很少表达，但在肺癌、骨肉瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、胶质母细胞瘤及浸润性黑色素瘤等多种实体肿瘤细胞表面有高水平的表达，而且在所有肿瘤组织新生血管内皮细胞膜有高表达，提示整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤生长、侵袭和转移过程中起着关键作用。含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的多肽能与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合。鉴于 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤中的广泛表达及重要作用，FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已成为肿瘤显像和治疗的重要靶点。

为了进一步提高肿瘤的诊断和治疗效率，现有技术中对两个靶点同时具备亲和力的双重靶向探针已有所开发。例如，Anna Orlova 等人报道了针对前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 和胃泌素释放肽受体 (GRPR) 同时具有亲和力的双重靶向探针。由于 PSMA 和 GRPR 同时在前列腺中高表达，因此这种双重靶向探针存在的缺点是仅应用于前列腺癌的放射诊断与治疗，无法应用于其他肿瘤。

发明内容

由于 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 主要分布在肿瘤基质细胞和新生血管中，因此在多种肿瘤类型中同时高表达，是开发“泛肿瘤”双重靶向探针的理想靶点。考虑到肿瘤的异质性，为了能够进一步提高肿瘤的诊断和治疗效率，有必要开发一种针对 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 两种靶点均可发挥靶向作用的靶向化合物。这种双重靶向化合物需要对两个靶点同时具备高亲和力，实现

协同靶向肿瘤中的 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点，同时在体内需要具有优异的药物代谢动力学性质，提升肿瘤摄取和肿瘤滞留时间。基于这种双重靶向化合物的放射性核素标记的双重靶向化合物，能够同时利用 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点，提升肿瘤中的有效受体数量和利用效率，从而解决提升阳性肿瘤检出效率和/或治疗效率的问题。

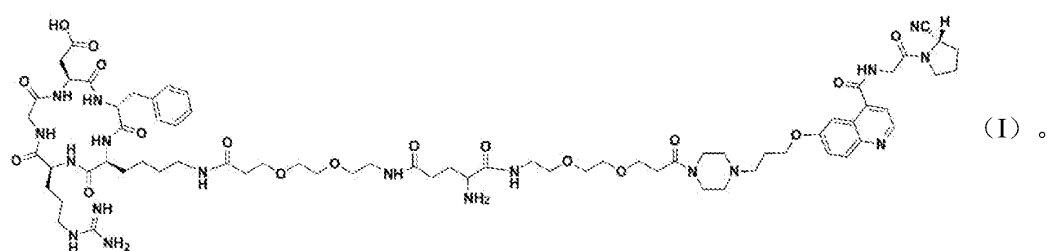
为了解决上述问题，本发明的首要目的在于：开发一种新的化合物结构可协同靶向肿瘤中的 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点，以提升药物在肿瘤中的摄取及滞留时间。

本发明的另一个目的在于：提供制备所述的新化合物的方法，以通过方便易得的合成路线合成可协同靶向肿瘤中的 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点的化合物。

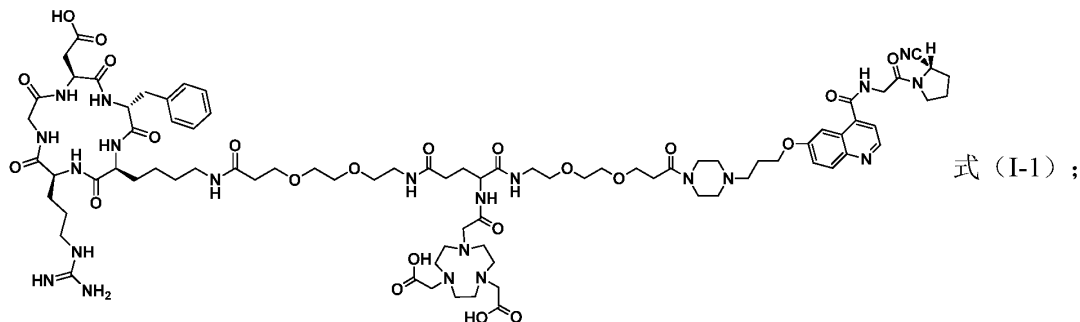
本发明的再一个目的在于：提供所述化合物在诊断或治疗以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病中的应用。

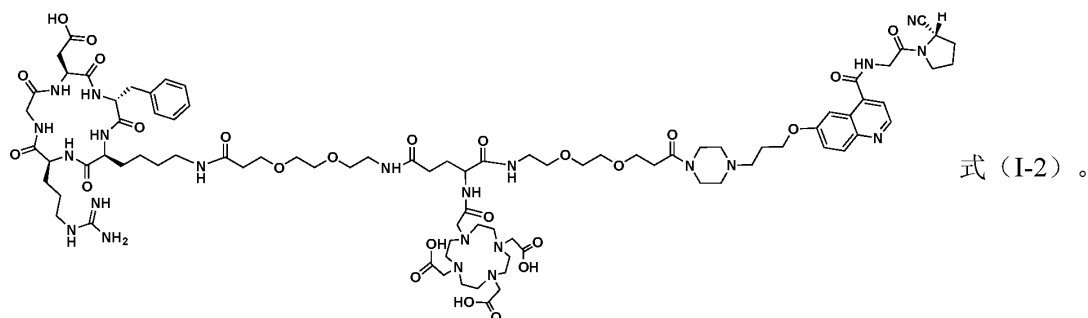
本发明的上述目的通过以下技术方案实现。

第一方面，本发明提供一种可靶向 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物，其结构中同时包含 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合配体结构，所述的化合物结构如下式 (I) 所示：



第二方面，本发明还提供一种可用放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物，其结构中同时包含 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合配体结构以及核素螯合结构，本发明将该结构记作 FAPI-RGD 结构，所述的化合物结构如下式 (I-1) 或式 (I-2) 所示，





第三方面, 本发明提供一种放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物, 它是由本发明第二方面所述的化合物标记了放射性核素得到的。

本发明所述的方案中, 所述的放射性核素可以选自发射 α 射线的同位素、发射 β 射线的同位素、发射 γ 射线的同位素、发射俄歇电子的同位素或发射 X 射线的同位素等, 例如 ^{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 、 ^{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 、 ^{198}Au 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{89}Zr 或 ^{199}Ag 中的任意一种; 更优选的放射性核素为 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{188}Re 或 ^{225}Ac 。

第四方面, 本发明提供一种制备第二方面所述的双重靶向化合物及其放射性核素标记化合物 (即本发明第三方面所述的双重靶向化合物) 的方法, 本发明提供的制备方法包括:

① 6-羟基喹啉-4-羧酸的羧基首先与甘氨酸叔丁酯的氨基发生酰胺缩合反应; 然后在酰胺缩合产物羟基位置通过烷基链连接 Boc 保护的哌嗪基; 酸性条件下脱去 Boc 和叔丁基保护基, 接着在哌嗪环引入 Boc 保护基; 接着与(S)-吡咯烷-2-甲脒盐酸盐发生酰胺缩合反应; 脱除 Boc 保护基后与 N-Boc-3-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]丙酸发生缩合反应; 接着脱去 Boc 保护基, 与 Fmoc-O-叔丁基-L-谷氨酸反应; 脱去叔丁酯后, 制备成活化酯, 接着与带有氨基-二聚乙二醇的 c(RGDfK)反应, 得到双重靶向化合物; 脱去 Fmoc 保护后与核素螯合剂反应, 所述的核素螯合剂为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸或 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; 接着脱除螯合基团上的叔丁酯保护后得到可被放射性核素标记的双重靶向化合物, 即本发明第二方面所述的双重靶向化合物。

② 将①所得可被放射性核素标记的双重靶向化合物与含放射性核素的化合物按照现有的湿法标记方法或冻干法标记法反应, 即可制备得到本发明第三方面所述的放射性核素标记的

FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物。

第五方面，本发明提供一种药物组合物，所述的药物组合物包含本发明第一方面所述可靶向 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物、本发明第二方面所述的可用放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物、第三方面所述的放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物、或它们在药学上可接受的任意互变异构体、外消旋体、水合物、溶剂化物或盐。

第六方面，本发明还提供本发明第一方面所述可靶向 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物、第二方面所述的可用放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物、第三方面所述的放射性核素标记的 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的双重靶向化合物或第五方面所述的药物组合物在制备用于诊断或治疗动物或人类个体的以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病的药物中的应用。

本发明所述的应用中，所述的以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病包括但不限于：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，所述的癌症进一步选自乳腺癌、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、神经胶质瘤、星形细胞瘤、子宫颈癌或前列腺癌。

本发明提供的所述 FAPI-RGD 化合物结构，对于 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点均具有较高的亲和力，能够协同靶向肿瘤中的 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点，表现出较高的肿瘤摄取和肿瘤滞留时间，有望应用于诊断或治疗以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病。

此外，本发明提供的所述 FAPI-RGD 化合物的制备方法反应路线简洁，操作简单，制备原料廉价易得，生产成本低，适宜工业化生产。

附图说明

图 1 为化合物 7 的核磁氢谱图。

图 2 为化合物 7 的核磁碳谱图。

图 3 为化合物 7 的质谱图。

图 4 为化合物 8 的质谱图。

图 5 为化合物 9 的质谱图。

图 6 为化合物 12 的质谱图。

图 7 为化合物 13 的质谱图。

图 8 为化合物 14 的质谱图。

图 9 为化合物 15 的质谱图。

图 10 为本发明中 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD (式 I-1) 配合物在生理盐水中的稳定性实验结果图。

图 11 为本发明中 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD (式 I-1) 配合物的细胞摄取和细胞结合实验结果图。

图 12 为本发明中 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD (式 I-1) 配合物以及单体 ^{68}Ga -FAPI-02 和 ^{68}Ga -C(RGDfK)在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠体内的 MicroPET 显像结果图。

图 13 为本发明中 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD (式 I-1) 配合物与 C(RGDfK)或和 FAPI-02 共注射 30min 后 MicroPET 成像结果及肿瘤及重要器官的摄取结果统计图。

图 14 为本发明中实施例 4 制备的 ^{177}Lu -FAPI-RGD 配合物在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠体内的 SPECT 显像结果图。

图 15 体现了 ^{68}Ga 标记的对照化合物 FAPI-RGD 的配合物的分子结构, 以及该对照化合物在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠体内注射 30min 和 2h 后的 MicroPET 成像结果, 和肿瘤及重要器官的摄取结果统计图。

图 16 为本发明中 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD (式 I-1) 配合物、 ^{18}F -FDG 和 ^{68}Ga -FAPI46 在胰腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌和鼻咽癌患者经静脉注射 3 小时后的 PET/CT 显像结果图。

具体实施方式

以下通过具体实施方式结合附图对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

实施例 1: 化合物 I-1 的制备

化合物 2 的合成:

在 100 mL 烧瓶中分别投入化合物 1 (6-羟基喹啉-4-羧酸, 1.89 g, 10.0mmol)、甘氨酸叔丁酯 (1.89 g, 10.0mmol), HATU (3.8 g, 10.0 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (2.6 g,

20.0mmol) 依次投入至 30 mL N,N-二甲基甲酰胺。反应混合物搅拌过夜, 减压蒸馏除去溶剂, 得到粗产物。经硅胶柱(二氯甲烷/甲醇=30:1) 纯化得白色固体化合物 2, 产率 87%。

化合物 3 的合成:

在 100 mL 烧瓶中分别将化合物 2 (1.51 g, 5.0 mmol)、1-溴-3-氯丙烷 (1.55 g, 10.0 mmol) 和碳酸钾 (1.38 g, 10.0 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(二氯甲烷/甲醇=50:1) 纯化得白色固体化合物 3, 产率 63%。

化合物 4 的合成:

在 100 mL 烧瓶中分别将化合物 3 (0.76 g, 2.0 mmol)、1-叔丁氧羰基哌嗪 (0.55 g, 3.0 mmol), 和碘化钾 (0.49 g, 3.0 mmol) 依次投入至 30 mL 乙腈中。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(二氯甲烷/甲醇=30:1) 纯化得白色固体化合物 4, 产率 58%。

化合物 5 的合成:

在冰浴条件下, 将化合物 4 (0.52 g, 1.0 mmol) 溶解在 10mL 二氯甲烷和三氟乙酸(体积比 9:1) 混合溶液中, 将体系升温到室温反应 2h, 反应结束后减压蒸馏除去溶剂, 用 10mL 的 N,N-二甲基甲酰胺溶解, 得到化合物 5, 备用。

化合物 6 的合成:

向化合物 5 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中分别加入二碳酸二叔丁酯 (0.22 g, 1.0 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.39 g, 3.0 mmol), 室温搅拌过夜, 减压蒸馏除去溶剂, 得到粗产物。经硅胶柱(二氯甲烷/甲醇=10:1) 纯化得白色固体化合物 6, 产率 72%。

化合物 7 的合成:

在 100 mL 烧瓶中分别投入化合物 6 (0.47 g, 1.0 mmol)、(S)-吡咯烷-2-甲腈盐酸盐 (0.13 g, 1.0 mmol), HATU (0.38 g, 1.0 mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.26 g, 2.0 mmol) 依次投入至 10 mL N,N-二甲基甲酰胺。反应混合物室温搅拌至反应结束, 减压蒸馏除去溶剂, 得到粗产物。经硅胶柱(二氯甲烷/甲醇=50:1) 纯化得白色固体化合物 7, 产率 85%。图 1 为化合物 7 的核磁氢谱, 图 2 为化合物 7 的核磁碳谱, 图 3 为化合物 7 的质谱图。

化合物 8 的合成:

将化合物 7 (2.50 g, 4.5 mmol), 对甲苯磺酸一水合物 (2.58 g, 13.6 mmol), 25 mL 的乙腈加入反应瓶中, 65°C反应 1h, TLC 监测化合物 7 反应完全 (甲醇:二氯甲烷=5:1), 40°C减压蒸干。加入 14mL 的 DMF、DIPEA (3.05 g, 23.6 mmol), 25°C搅拌, 反应编号 (1), 即化合物 7 的哌嗪脱保护得到中间体。将 N-叔丁氧羰基-二聚乙二醇-羧酸 (1.62 g, 4.8 mmol), HATU(2.60 g, 6.8 mmol), 10 mL 的 DMF 加入另一反应瓶中, 25°C反应 30 min, 反应编号 (2), 将反应 (2) 的反应溶液体系滴加到反应 (1) 体系中, 反应 1h。40°C减压蒸干, 加入 50 mL 的纯化水, 用 DCM 萃取两次, 每次 50 mL, 合并 DCM, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸干, 得粗品, 柱层析提纯, 得目标物 1.68 g。理论分子量 709.3799, 实测分子量 709.38801, 质谱结果与目标物一致。图 4 为化合物 8 的质谱图。

化合物 9 的合成:

将化合物 8, 对甲苯磺酸一水合物(1.61 g, 8.5 mmol), 20 mL 的乙腈加入反应瓶中, 65°C反应 1h, 40°C减压蒸干。加入 20 mL 的 DMF, DIPEA (1.83 g, 14.2 mmol), 25°C搅拌, 反应编号 (1)。将 Fmoc-O-叔丁基-L-谷氨酸(1.43 g, 3.4 mmol), HATU(1.29 g, 3.4 mmol), 20 mL 的 DMF 加入另一反应瓶中, 25°C反应 30min, 反应编号 (2), 将反应 (2) 的反应溶液体系滴加到反应 (1) 体系中, 反应 1h。40°C减压蒸干, 得粗品, 柱层析提纯, 得目标物 1.19g。理论分子量 1016.5008, 实测分子量 1016.51094, 质谱结果与目标物一致。图 5 为化合物 9 的质谱图。

化合物 12 的合成:

将 c(RGDfK)(1.00 g, 1.7 mmol)、氨基叔丁酯-二聚乙二醇-琥珀酰亚胺酯(0.74 g, 1.9 mmol)、DIPEA(0.44 g, 3.4 mmol)和 20 mL 的 DMF 加入反应瓶中, 30°C反应 20h。40°C减压蒸干, 加入 10 mL 的甲醇, 滴加 60 mL 的 MTBE, 析出固体, 得到中间体 11, 抽滤, 40°C真空干燥 2h。将固体的中间体 11 加入反应瓶中, 加入 30 mL 的 TFA, 1.5 mL 的纯化水, 30°C反应 1h, 降温至 0-5°C, 滴加 200 mL 的 MTBE, 0-5°C搅拌 30min, 抽滤, 用 MTBE 淋洗, 40°C真空干燥, 得产品。理论分子量 762.4024, 实测分子量 762.40768, 质谱结果与目标物一致。图 6 为化合物 12 的质谱图。

化合物 13 的合成:

将化合物 9, 对甲苯磺酸一水合物(0.34 g, 1.8mmol), 20 mL 的乙腈加入反应瓶中, 65°C 反应 4h, 40°C减压蒸干。加入 20 mL 的 DMF, DIPEA(0.36 g, 2.8 mmol), DCC(0.14 g, 0.7 mmol), NHS(0.08 g, 0.7 mmol), 35°C反应 15-20 h 得到中间体 10, 降温至 25°C, 加入化合物 12, 反应 1h, 40°C减压蒸干, 得粗品, 制备液相纯化, 得目标物 66.5 mg。理论分子量 1704.8300, 实测分子量 1704.84518, 质谱结果与目标物一致。图 7 为化合物 13 的质谱图。

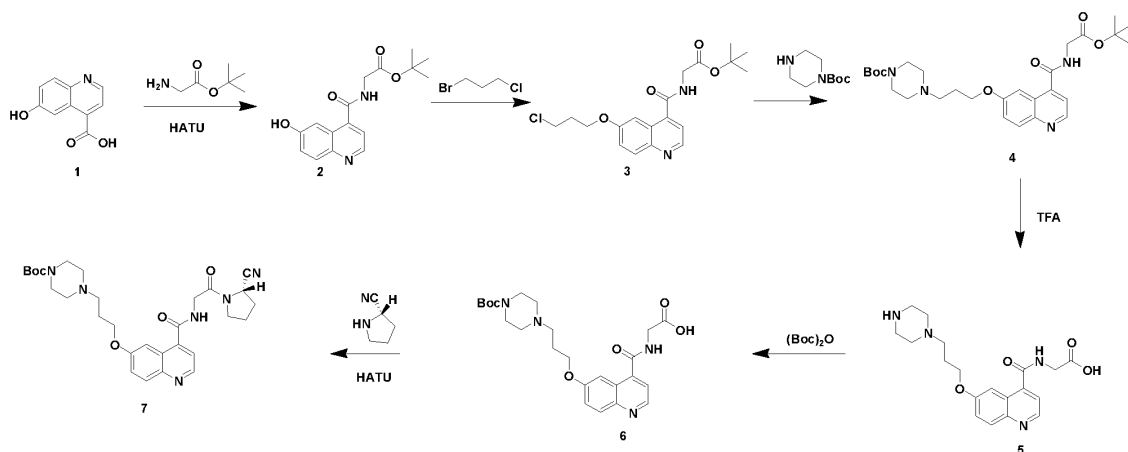
化合物 14 的合成:

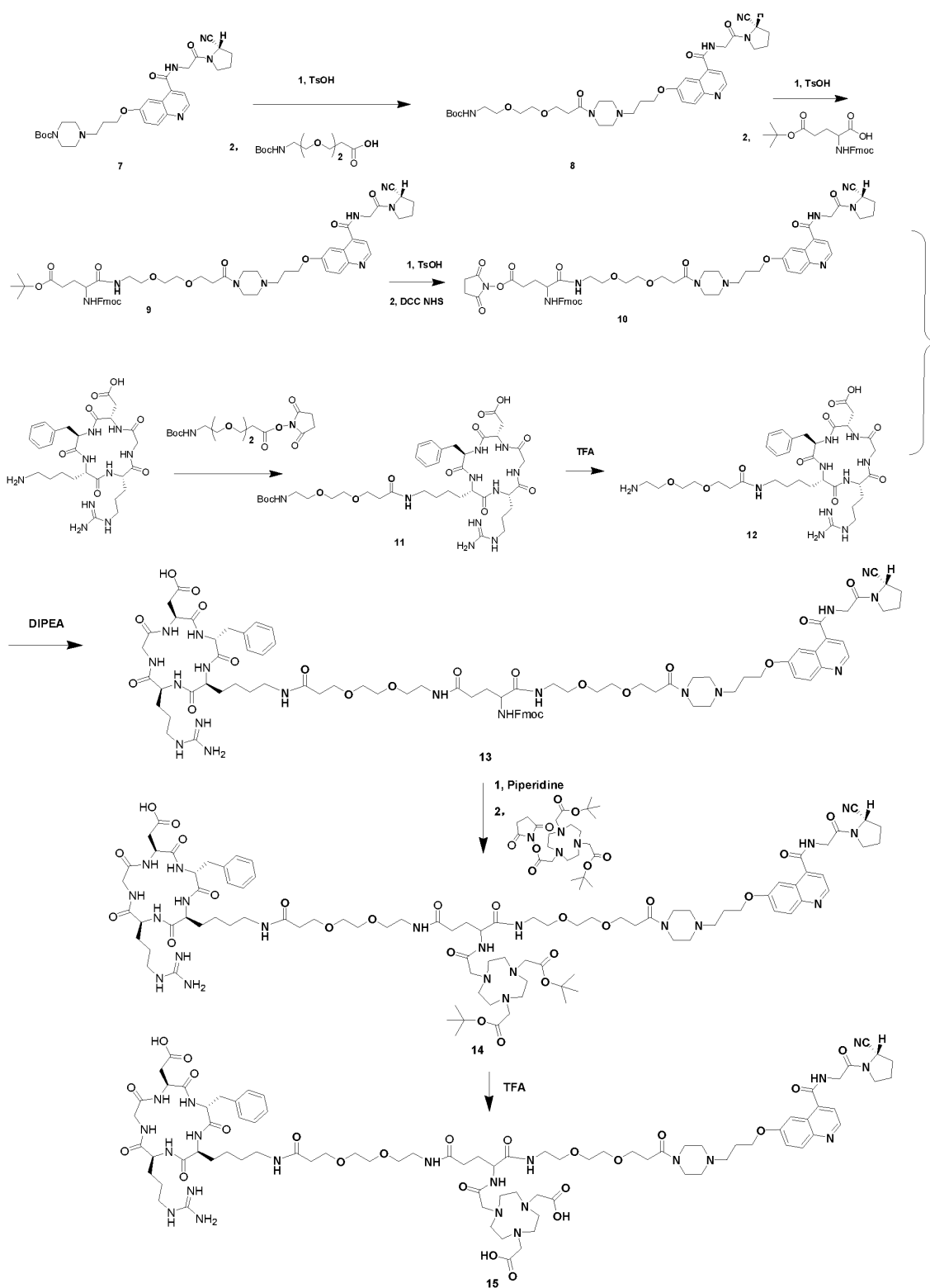
将化合物 13, 0.5 mL 的哌啶, 2 mL 的 DMF 加入反应瓶中, 25°C反应 1h, 滴加 10 mL 的乙酸乙酯析晶, 搅拌 30min, 抽滤, 固体 40°C真空干燥 2h, 得产品 50.8 mg。将脱去 Fmoc 保护的化合物 13 溶解在 2 mL 的 DMF 中, 加入 NOTA-2 叔丁酯-NHS 活化酯, DIPEA(0.010 g, 0.08 mmol), 25°C反应 1h, 40°C减压蒸干, 加入 2 mL 的乙酸乙酯, 2 mL 的 MTBE 析晶, 搅拌 20 min, 抽滤, 固体 40°C真空干燥, 得产品 43.2 mg。理论分子量 1880.0196, 实测分子量 1880.0369, 质谱结果与目标物一致。图 8 为化合物 14 的质谱图。

化合物 15 的合成:

将化合物 14, 2 mL 的三氟乙酸加入反应瓶中, 25°C反应 1h, 40°C减压蒸干, 得粗品, 用制备液相提纯, 冻干, 得产品化合物 15, 产率 42%。理论分子量 1767.8944, 实测分子量 1767.91036, 质谱结果与目标物一致。图 9 为化合物 15 的质谱图。

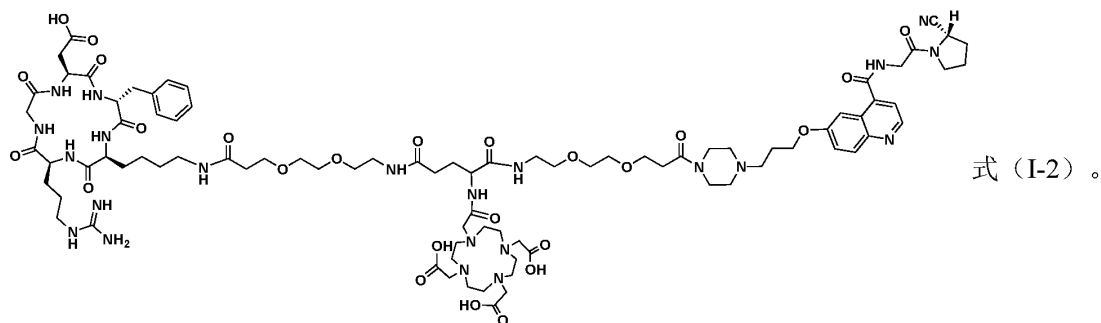
上述步骤合成路线如下:





实施例 2

实施例 2 的制备方法参考实例 1，将上述实施例中 NOTA-2 叔丁酯-NHS 活化酯替换为 DOTA-3 叔丁酯-NHS 活化酯，得到如下的结构：



实施例 3.放射性 Ga-68 标记 FAPI-RGD 式 (I-1) 配合物 (^{68}Ga -FAPI-RGD) 的制备:

湿法: 将约 18.5~1850 兆贝可 (MBq) $^{68}\text{GaCl}_3$ 盐酸溶液 (淋洗自锗镓发生器) 加入到含 0.5mL 实施例 1 制备的结构如式 (I-1) 的化合物的醋酸-醋酸盐溶液 (1.0g/L) 的离心管中, 置于 37°C 下反应 20min。取一 C18 分离小柱, 先用 10mL 无水乙醇缓慢淋洗, 再用 10mL 水淋洗。用 10mL 水将标记液稀释后, 上样到分离柱上, 先用 10mL 水除去未标记的 ^{68}Ga 离子, 再用 0.3mL 10mM 的 HCl 的乙醇溶液淋洗得到 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD 配合物。该淋洗液经生理盐水稀释, 并经无菌过滤后即得 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD 配合物的注射液。

冻干法: 将约 18.5~1850 兆贝可 (MBq) $^{68}\text{GaCl}_3$ 盐酸溶液 (淋洗自锗镓发生器) 加入到含有式 (I-1) 化合物的冻干药盒中, 混匀后 37°C 下反应 20min。取一 C18 分离小柱, 先用 10mL 无水乙醇缓慢淋洗, 再用 10mL 水淋洗。用 10mL 水将标记液稀释后, 上样到分离柱上, 先用 10mL 水除去未标记的 ^{68}Ga 离子, 再用 0.3mL 10mM 的 HCl 的乙醇溶液淋洗得到配合物淋洗液。该淋洗液经生理盐水稀释, 并经无菌过滤后即得 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD 配合物的注射液。

实施例 4.放射性 Lu-177 标记 FAPI-RGD 式 (I-2) 配合物 (^{177}Lu -FAPI-RGD) 的制备:

配置 pH=5.5 的缓冲溶液: 称取 57.6 毫克醋酸、189 毫克龙胆酸和 525 毫克三水合醋酸钠, 用 48 毫升纯水溶解, 用氢氧化钠溶液调节 pH=5.5。用 200 μL 缓冲液 (pH=5.5) 充分溶解 200 μg 实施例 2 制备的结构如式 (I-2) 的化合物, 然后加入 5 毫升缓冲液 (pH=5.5) 以及 150mCi 左右 $^{177}\text{LuCl}_3$ 的盐酸溶液。混合物摇匀后 80°C 加热反应 20min。反应结束后冷却至

室温。该反应液经生理盐水稀释，并经无菌过滤后即得 10 mCi/mL 的 ^{177}Lu 标记的 FAPI-RGD 配合物的注射液。

实验例分析及应用效果

1、 ^{68}Ga 标记的式 (I-1) FAPI-RGD 的配合物的稳定性分析

移取 20 μL 实施例 3 制备的 ^{68}Ga -FAPI-RGD (3.7MBq 活度/20 μL) 的溶液加入到含有 100 μL 生理盐水或 PBS(pH=7.4) 的离心管中，在 37°C 条件下共孵育 0.5h、1h 和 4h，共孵育溶液。取 20 μL 共孵育溶液，过 0.22 μm 针式滤膜，采用 HPLC 分析放射化学纯度。测试结果如图 10 所示， ^{68}Ga -FAPI-RGD 在生理盐水中孵育后，未见明显分解，放射化学纯度均大于 99%，说明本发明制备的 ^{68}Ga -FAPI-RGD 稳定性优异。

2、 ^{68}Ga 标记的式 (I-1) FAPI-RGD 的配合物细胞实验分析

在 HT1080-FAP 肿瘤细胞中进行 ^{68}Ga -FAPI-RGD 的细胞摄取实验，测试结果如图 11 中的 A 部分所示， ^{68}Ga -FAPI-RGD 具有快速的细胞摄取，在孵育 30 分钟时，摄取达到最大并保持在相似摄取水平长达 2 小时。此外，阻断实验证实， ^{68}Ga -FAPI-RGD 的细胞摄取可以被 C(RGDfK) 或 FAPI-02 部分抑制，可以被 FAPI-RGD 完全阻断（参见图 11 中的 A 部分）。在 HT1080-FAP 和 U87MG 肿瘤细胞中进行了细胞结合实验，测试结果分别如图 11 中的 B 和 C 所示，在 HT1080-FAP 细胞实验中，测得 ^{68}Ga -FAPI-RGD 和 ^{68}Ga -FAPI-02 的 IC_{50} 两分别为 11.17 nM 和 4.14nM。HT1080-FAP 细胞实验中，测得 ^{68}Ga -FAPI-RGD 和 ^{68}Ga -C(RGDfK) 的 IC_{50} 两分别为 18.93 nM 和 11.49nM 组。实验结果表明 FAPI-RGD 与相应的单体相比，与其相应受体 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 具有相似的亲和力。

3、 ^{68}Ga 标记的式 (I) FAPI-RGD 的配合物在荷瘤小鼠体内的 MicroPET 显像

按实施例 3 的方法制备 ^{68}Ga -FAPI-RGD，在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠中，针对随机分组的小鼠，分别经尾静脉注射 7.4 MBq 的 ^{68}Ga -FAPI-RGD、 ^{68}Ga -FAPI-02 和 ^{68}Ga -C(RGDfK)，然后在异氟烷麻醉下， ^{68}Ga -FAPI-RGD 组分别于给药后 0~240 min 进行 MicroPET 显像，其余组分别于给药后 0~120 min 进行 MicroPET 显像，结果见图 12。图 12 中 A、C 和 E 分别显示了上述三组小鼠静脉注射后不同时间的 HT1080-FAP 荷瘤小鼠 (n=3) 的 MicroPET 最大密度投影图像，B、D 和 F 分别体现了上述三组小鼠注射后各器官或组织（血、肝、肾、肿瘤和肌肉）在不同时间点的摄取，每组中三个摄取量从左至右分别对应注射后 0.5h、1h 和

2h。图 12 显示了在采集成像的时间点，肿瘤清晰可见，并且 ^{68}Ga -FAPI-RGD 的肿瘤摄取高于单体 ^{68}Ga -FAPI-02 和 ^{68}Ga -C(RGDfK)的肿瘤摄取。 ^{68}Ga -FAPI-RGD 在体内特异性结合整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 FAP 的性能通过阻断实验得到证实。将上述 ^{68}Ga -FAPI-RGD 与 C(RGDfK)或 FAPI-02 共注射到 HT1080-FAP 荷瘤小鼠体内，其 MicroPET 显像结果图及器官摄取结果如图 13 所示。图 13 中，A 的四个影像从左至右分别对应单独注射 ^{68}Ga -FAPI-RGD、 ^{68}Ga -FAPI-RGD 与 C(RGDfK)共注射、 ^{68}Ga -FAPI-RGD 与 FAPI-02 共注射、 ^{68}Ga -FAPI-RGD 与 C(RGDfK)和 FAPI-02 共注射得到的影像；B 和 C 分别体现了上述四组不同注射方式注射后小鼠各器官或组织（血、肝、肾、肿瘤和肌肉）对 ^{68}Ga -FAPI-RGD 的摄取和靶/非靶比值，B 和 C 中的每种器官或组织中四个柱状图形从左至右分别对应 A 中的四种注射方式。从图 13 中可以看到，与 ^{68}Ga -FAPI-RGD 共注射 RGD 或 FAPI-02 均能降低肿瘤对 ^{68}Ga -FAPI-RGD 的摄取，与 ^{68}Ga -FAPI-RGD 共注射 C(RGDfK)+FAPI-02 则进一步降低肿瘤对 ^{68}Ga -FAPI-RGD 的摄取，阻断实验证实 ^{68}Ga -FAPI-RGD 在体内能够通过结合整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 FAP 实现肿瘤特异性靶向。

4、 ^{177}Lu 标记的式 (II) FAPI-RGD 的配合物在荷瘤小鼠体内的 SEPCT 显像

按实施例 4 的方法制备 ^{177}Lu -FAPI-RGD，在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠中，分别经尾静脉注射 37 MBq 的 ^{177}Lu -FAPI-RGD，然后在异氟烷麻醉下，于给药后 4 h 进行 SPECT 显像，结果见图 14，可以看到，在给药 4h 时肿瘤清晰可见。

5、 ^{68}Ga 标记的 FAPI-RGD(对照化合物)的配合物在荷瘤小鼠体内的 MicroPET 显像

作为对照，采用了马来酰亚胺-硫醇形成的硫代琥珀酰亚胺键作为连接结构，制备了图 15B 化合物，按实施例 3 的方法进行 ^{68}Ga 标记，在 HT1080-FAP 荷瘤小鼠中进行 MicroPET 显像研究，结果见图 15。图 15A 显示了在采集成像的时间点，主要放射性信号集中在肝脏和肾脏，肿瘤摄取较少。图 15C 也表明在肝脏和肾脏的高摄取以及肿瘤的低摄取。因此，硫代琥珀酰亚胺键作为连接结构，可能会导致靶向基团与靶向受体的亲和力下降，致使靶器官的摄取下降，同时非靶组织摄取过高，导致靶/非靶比值的下降，更容易造成不良反应。本发明中的特定连接结构既能保证与受体的高亲和力又能提供适宜的药代动力学性质，从而保证了较高的肿瘤绝对摄取以及靶/非靶比值。

4、 ^{68}Ga 标记的式 (I-1) FAPI-RGD 的配合物在肿瘤病人上的 PET/CT 显像

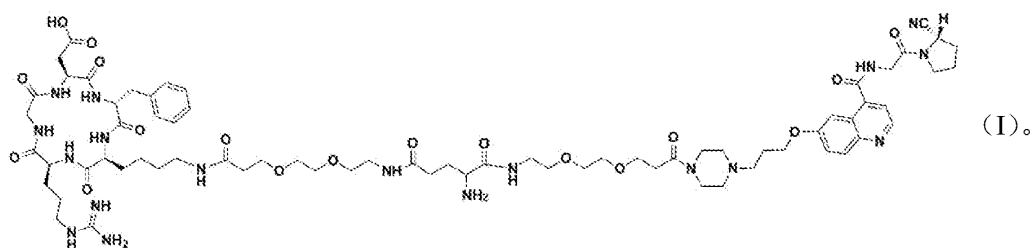
经厦门大学第一附属医院临床研究伦理委员会批准进行 ^{68}Ga -FAP- RGD 的临床试验, 所有受试者均签署书面知情同意书, 包括一名胰腺癌患者, 一名非小细胞肺癌患者, 一名小细胞肺癌患者和一名鼻咽癌患者。根据受试者体重计算静脉注射 ^{68}Ga -FAP- RGD 的剂量 ($1.8\sim 2.2\text{MBq}[0.05\sim 0.06\text{mCi}]/\text{kg}$)。在静脉注射 3 小时后, 使用混合 PET/CT 扫描仪(Discovery MI, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA)获取数据, 显像结果如图 16。使用在经轴图像上绘制的感兴趣区域(ROI)自动计算最大标准摄取值(SUV_{max})。双靶点靶向的 ^{68}Ga -FAP- RGD 在不同类型肿瘤中的 SUV_{max} 均高于 FAP 蛋白单靶向的 ^{68}Ga -FAP-46, SUV_{max} 升高约 30-50%, 证实了双靶点靶向的设计可以提升肿瘤中的有效受体数量和利用效率进而提升肿瘤摄取。

综上所述, 本发明开发了 FAP- RGD 结构, 对于 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点均具有较高的亲和力, 能够协同靶向肿瘤中的 FAP 靶点及整合素 $\alpha_v\beta_3$ 靶点, 表现出优异的代谢动力学、较高的肿瘤摄取和肿瘤滞留时间, 有望应用于诊断或治疗以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病。

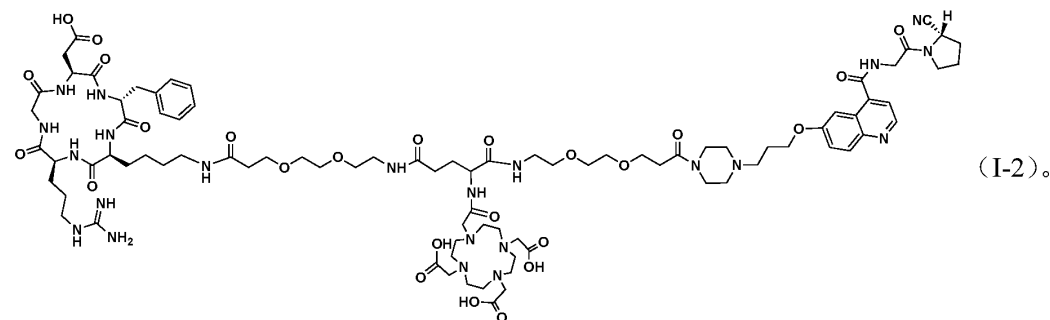
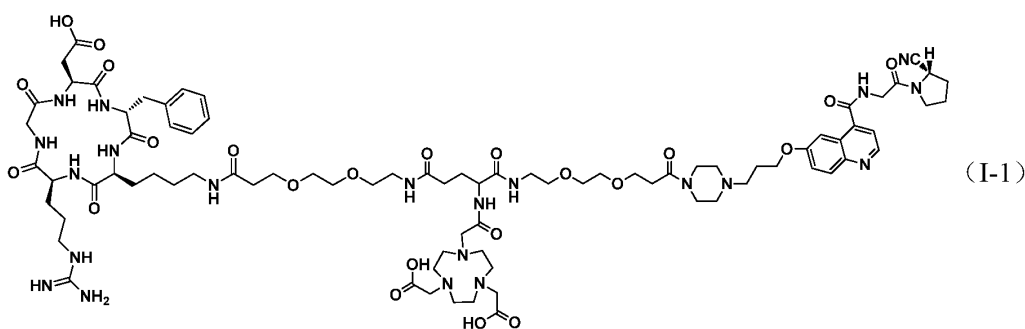
虽然, 上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验, 对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之作一些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进, 均属于本发明要求保护的范围。

权 利 要 求 书

1. 一种双重靶向化合物，其特征在于，结构中同时包含 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合配体结构，所述的化合物结构如下式 (I) 所示：



2. 一种可被放射性核素标记的双重靶向化合物，其特征在于，结构中同时包含 FAP 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的特异性结合配体及核素螯合结构，所述的化合物结构如下式 (I-1) 或式 (I-2) 所示，



3. 制备权利要求 2 所述的可被放射性核素标记的双重靶向化合物的方法，其特征在于，包括以下步骤：6-羟基喹啉-4-羧酸的羧基首先与甘氨酸叔丁酯的氨基发生酰胺缩合反应；然后在酰胺缩合产物羟基位置通过烷基链连接 Boc 保护的哌嗪基；酸性条件下脱去 Boc 和叔丁基保护基，接着在哌嗪环引入 Boc 保护基；接着与(S)-吡咯烷-2-甲脒盐酸盐发生酰胺缩合反应；脱除 Boc 保护基后与 N-Boc-3-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]丙酸发生缩合反应；接着脱去

Boc 保护基, 与 Fmoc-O-叔丁基-L-谷氨酸反应; 脱去叔丁酯后, 制备成活化酯, 接着与带有氨基-二聚乙二醇的 c(RGDfK)反应, 得到双重靶向化合物; 脱去 Fmoc 保护后与核素螯合剂反应, 所述的核素螯合剂为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N,N'-四乙酸或 1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸; 接着脱除螯合基团上的叔丁酯保护后得到一种可被放射性核素标记的双重靶向化合物。

4. 一种放射性核素标记的双重靶向化合物, 其特征在于: 它是权利要求 2 所述的任意一种可被放射性核素标记的双重靶向化合物标记了放射性核素得到的; 所述的放射性核素选自发射 α 射线的同位素、发射 β 射线的同位素、发射 γ 射线的同位素、发射俄歇电子的同位素或发射 X 射线的同位素。

5. 如权利要求 4 所述的放射性核素标记的双重靶向化合物, 其特征在于: 所述的放射性核素选自 ^{18}F 、 ^{51}Cr 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{139}La 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{86}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 、 ^{198}Au 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 或 ^{199}Ag 中的任意一种。

6. 如权利要求 4 所述的放射性核素标记的双重靶向化合物, 其特征在于: 所述的放射性核素选自 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{188}Re 或 ^{225}Ac 。

7. 制备权利要求 4 所述放射性核素标记的双重靶向化合物的方法, 其特征在于, 包括: 将权利要求 2 所述的可被放射性核素标记的双重靶向化合物与含放射性核素的化合物按照湿法标记方法或冻干法标记法反应, 即可制备得到所述的放射性核素标记的双重靶向化合物。

8. 一种药物组合物, 其特征在于: 包含权利要求 1 所述的双重靶向化合物、权利要求 2 所述的可被放射性核素标记的双重靶向化合物、权利要求 4 所述的放射性核素标记的双重靶向化合物、或它们在药学上可接受的水合物、溶剂化物或盐。

9. 权利要求 1 所述的双重靶向化合物、权利要求 2 所述的可被放射性核素标记的双重靶向化合物、权利要求 4 所述的放射性核素标记的双重靶向化合物、或它们在药学上可接受的水合物、溶剂化物或盐、或权利要求 8 所述的药物组合物中的任意一种在制备用于诊断或治疗

动物或人类个体的以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病的药物中的应用。

10. 如权利要求 9 所述的应用，其特征在于：所述的以 FAP 和/或整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达为特征的疾病包括：癌症、慢性炎症、动脉粥样硬化或瘢痕病。

11. 如权利要求 10 所述的应用，其特征在于：所述的癌症选自乳腺癌、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、原发性未知癌、胸腺癌、胶质瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、子宫颈癌或前列腺癌。