



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105939732 A

(43)申请公布日 2016.09.14

(21)申请号 201480074752.0

(22)申请日 2014.12.03

(30)优先权数据

61/911,413 2013.12.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/068444 2014.12.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/085005 EN 2015.06.11

(71)申请人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 P·卡拉文

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陶启长 陈文青

(51)Int.Cl.

A61K 49/10(2006.01)

A61K 51/00(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

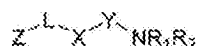
权利要求书5页 说明书40页 附图9页

(54)发明名称

分子成像探针

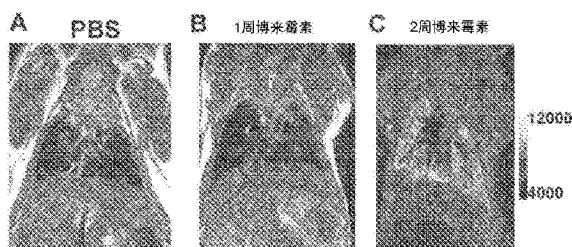
(57)摘要

本发明涉及如下所示的式(I)的化合物:

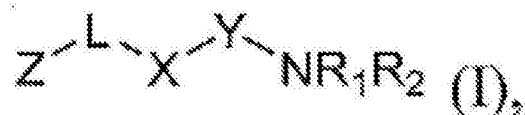


(I)或其药学上可接

受的盐。这些化合物可用作成像探针,例如,用于诊断纤维化或纤维发生。



1. 一种式(I)的化合物:



或其药学上可接受的盐,

其中,

X是 $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、或 $-\text{C}(\text{O})-$,其中 R_a 和 R_b 各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂芳基、或芳基;

Y是 $-\text{N}(\text{R}_c)-$ 或 $-\text{O}-$,其中 R_c 是H、烷基、烯基、炔基、或芳基;

L是 $-(\text{CR}_d\text{R}_e)_n-$ 、 $-\text{NH}(\text{CR}_f\text{R}_g)_n-$ 、或 $-(\text{CR}_h\text{R}_i)_n-$ 芳基-,其中各情况中, R_d 、 R_e 、 R_f 、 R_g 、 R_h 、和 R_i 各自独立地是H、烷基、烯基、或炔基,并且n是1、2、或3;

Z是包含金属离子和第一络合基团的螯合基团,所述第一络合基团与所述金属离子形成金属络合物;并且

R_1 和 R_2 各自独立地是H或 C_1 - C_{10} 烷基。

2. 如权利要求1所述的化合物,其特征在于,所述第一络合基团是DOTA、NOTA、DO3AX、DO3AP、DOTP、DO2A2P、NOTP、NO2AP、NO2PA、TETA、TE2P、TE2A、TE1A1P、CBTE2P、CBTE1A1P、SBTE2A、SBTE1A1P、DTTP、CHX-A"-DTPA、DesferaI、HBED、PyDO3P、PyDO2AP、PyDO3A、DIAMSAR、EDTA、DTPA、CB-TE2A、SarAr、PCTA、pycup、DEDPA、OCTAPA、AAZTA、DOTAIa、CyPic3A、TRAP、NOPO、或CDTA部分。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的化合物,其特征在于,所述金属离子选自 Gd^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Eu^{2+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 、和 Cr^{3+} ,或是选自下组的放射性同位素的离子: ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{52}Mn 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{201}Tl 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的化合物,其特征在于,X是 $-\text{C}(\text{R}_a\text{R}_b)-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 、或 $-\text{C}(\text{O})-$,其中 R_a 和 R_b 各自独立地是H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、或芳基。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的化合物,其特征在于,X是 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{O}-$ 。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的化合物,其特征在于,Y是 $-\text{N}(\text{R}_c)-$ 或 $-\text{O}-$,其中 R_c 是H、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、或芳基。

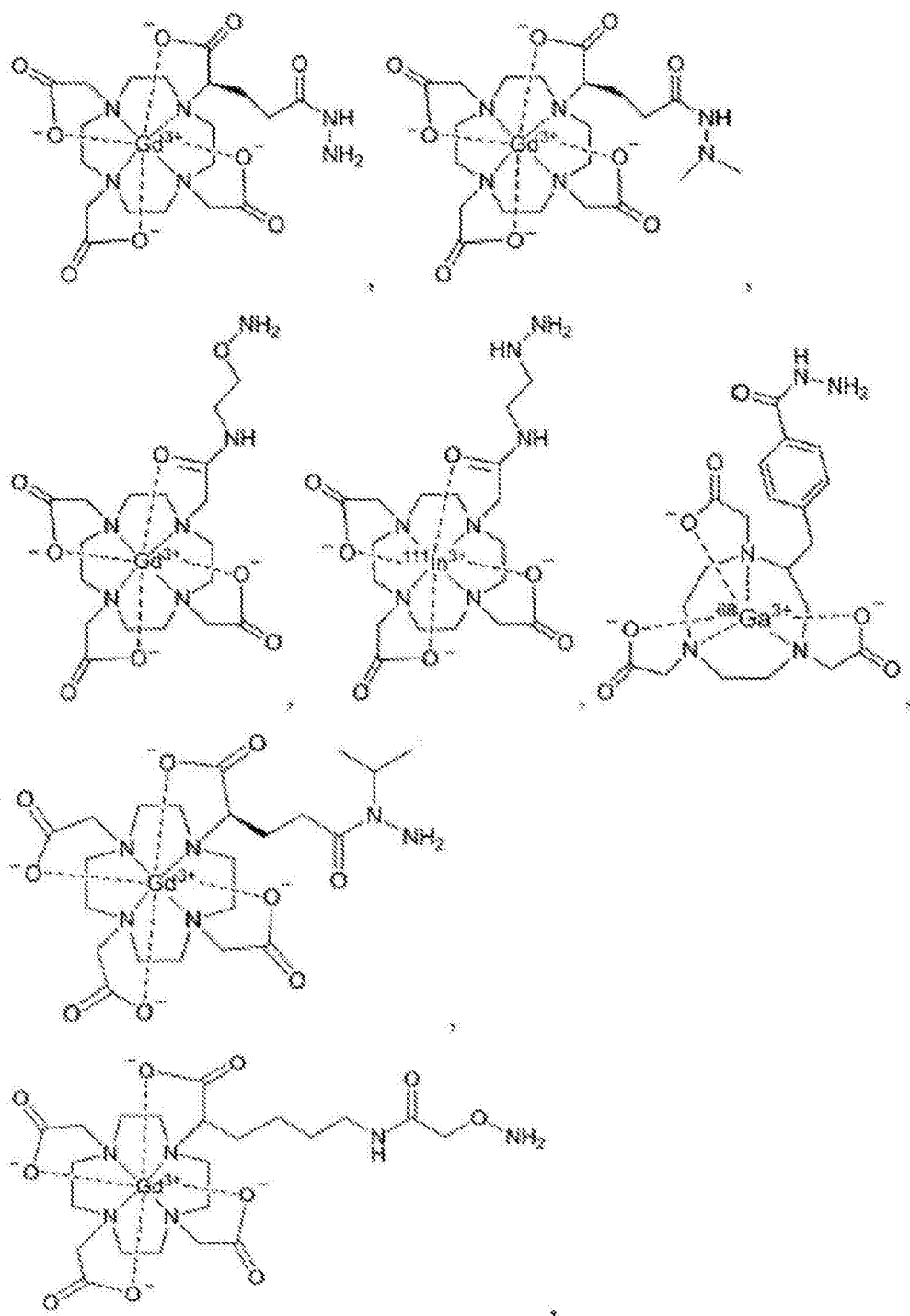
7. 如权利要求1-6中任一项所述的化合物,其特征在于,Y是 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{O}-$ 。

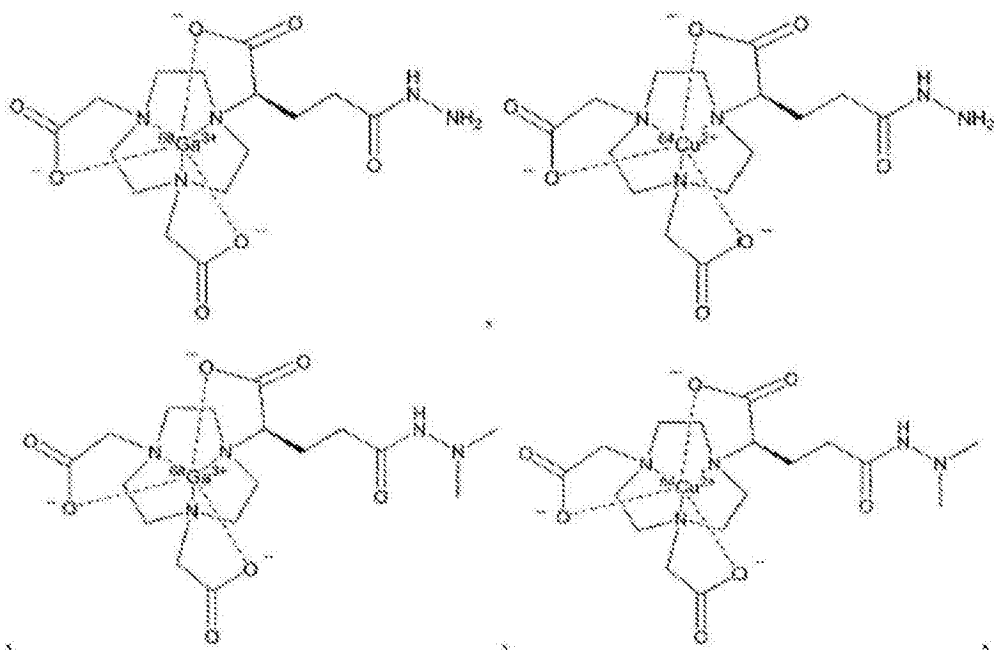
8. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物,其特征在于,L是 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$ 、或 $-(\text{CH}_2)_n$ -芳基-,其中n是1、2、或3。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的化合物,其特征在于,L是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH-Ph-}$ 、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的化合物,其特征在于, R_a 和 R_b 各自独立地是H或 CH_3 。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的化合物,其特征在于,所述化合物是

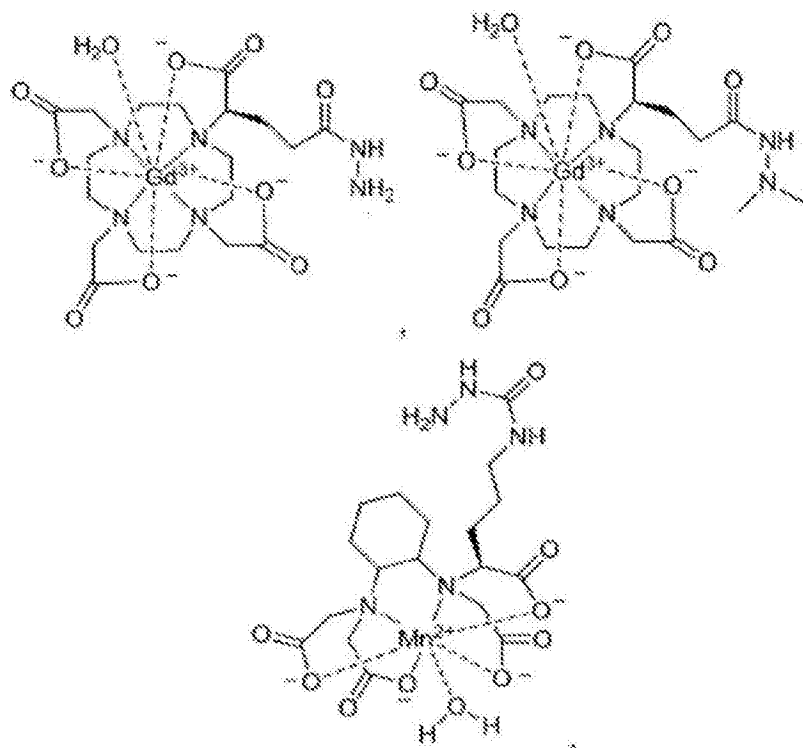




或其药学上可接受的盐。

12. 如权利要求1-10中任一项所述的化合物,其特征在于,Z还包括与所述金属离子络合的水分子。

13. 如权利要求12所述的化合物,其特征在于,所述化合物是



或其药学上可接受的盐。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的化合物,其特征在于,R₁和R₂各自是H。

15. 一种评价生物样品的胞外基质中赖氨酰氧化酶活性的方法,包括

向所述胞外基质给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂,其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基;并且在给予所述成像剂之后获取所述胞外基质的图像。

16. 一种评价哺乳动物组织中赖氨酰氧化酶活性的方法, 包括向所述哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且在给予所述成像剂之后获取所述组织的图像。

17. 一种评价哺乳动物中的肿瘤中赖氨酰氧化酶活性的方法, 包括向所述哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且在给予所述成像剂之后获取所述肿瘤的图像。

18. 一种对生物样品的胞外基质进行成像的方法, 包括:

向所述胞外基质给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且

在给予化合物之后获取所述胞外基质的图像。

19. 一种对哺乳动物中的组织进行成像的方法, 包括:

向哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且

在给予化合物之后获取所述哺乳动物的组织的图像。

20. 一种对哺乳动物中的肿瘤进行成像的方法, 包括:

向哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且

在给予化合物之后获取所述哺乳动物的肿瘤的图像。

21. 一种评价哺乳动物的组织中纤维化水平的方法, 包括向所述哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且在给予所述成像剂之后获取所述哺乳动物的图像。

22. 一种诊断哺乳动物中纤维化疾病的方法, 包括向所述哺乳动物给予包含-NR-NH₂或-O-NH₂基团的成像剂, 其中R是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基; 并且在给予所述成像剂之后获取所述哺乳动物的图像。

23. 如权利要求22所述的方法, 其特征在于, 所述纤维化疾病选自: 肺纤维化、慢性阻塞性肺病、肺高血压、心力衰竭、肥大型心肌病、心肌梗塞、心房纤颤、糖尿病肾病、系统性红斑狼疮、多囊性肾病、肾小球肾炎、末期肾疾病、非酒精性脂肪肝炎、酒精性脂肪肝炎、丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、原发性硬化性胆管炎、炎性肠病、硬皮病、动脉粥样硬化、青光眼、糖尿病视网膜病、放射诱导纤维化、手术粘连、囊性纤维化、和癌症。

24. 如权利要求22或23所述的方法, 其特征在于, 所述纤维化疾病是特发性肺纤维化。

25. 如权利要求22或23所述的方法, 其特征在于, 所述纤维化疾病是选自下组的癌症: 乳腺癌、结肠癌、骨癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、支气管癌、宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、成视网膜细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、神经胶质瘤、头颈癌、心脏癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌、喉癌、唇或口腔癌、间皮瘤、口腔癌、骨髓瘤、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口咽癌、卵巢癌、甲状腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、子宫癌、阴道癌、和外阴癌。

26. 如权利要求15-25中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述成像剂是权利要求14所述的化合物。

27. 如权利要求15-26中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述图像是正电子发射断层

扫描图像。

28. 如权利要求15-26中任一项所述的方法,其特征在于,所述图像是单光子发射计算机断层扫描图像。

29. 如权利要求15-26中任一项所述的方法,其特征在于,所述图像是磁共振图像。

30. 如权利要求15-26中任一项所述的方法,其特征在于,所述图像是计算机断层扫描图像。

31. 如权利要求15-26中任一项所述的方法,其特征在于,所述图像是平面闪烁扫描图像。

32. 如权利要求15-31中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括用对照的信号水平评价给予所述成像剂之后的信号水平。

33. 如权利要求16、19或21所述的方法,其特征在于,所述组织选自:乳腺组织、结肠组织、骨组织、肺组织、膀胱组织、脑组织、支气管组织、宫颈组织、结直肠组织、子宫内膜组织、室管膜组织、眼组织、胆囊组织、胃部组织、胃肠道组织、颈部组织、心脏组织、肝脏组织、胰腺组织、肾脏组织、喉组织、唇或口腔组织、鼻咽组织、口咽组织、卵巢组织、甲状腺组织、阴茎组织、垂体组织、前列腺组织、直肠组织、肾脏组织、唾液腺组织、皮肤组织、胃组织、睾丸组织、咽喉组织、子宫组织、阴道组织、和外阴组织。

34. 如权利要求16、17、19-32中任一项所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物是人。

35. 如权利要求17和20中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括在用对照的信号水平评价给予所述成像剂之后的信号水平后确定肿瘤是否是癌性的。

分子成像探针

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年12月3日提交的美国临时申请号61/911,413的权益,该申请通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及可用作分子成像探针的化合物以及制备和使用这些化合物的方法。

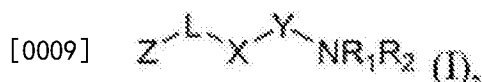
[0004] 背景

[0005] 纤维化是对组织损伤的普遍反应性响应。疤痕组织作为伤口愈合的结果是纤维化的积极示例。然而,在慢性组织损伤中,正在发生的损伤和修复循环导致疤痕组织积累以及正常组织结构和功能破坏,其最终可能导致器官衰竭。无论其发生在肾脏、肝脏、肺或其他地方并且无论其病因是病毒性、化学、物理或炎性,纤维化的细胞和分子生物学是相似的。纤维化由成纤维细胞的过度活性导致并且残余多种胞外基质蛋白,如I型胶原的上调。如果在早期检测到,许多治疗干预可逆转纤维化,然而现有的放射技术仅检测组织破坏不可逆转的晚期疾病。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明基于以下意外发现,含有可与胶原蛋白或弹性蛋白上的醛基反应以(例如,通过共价键)将化合物连接至胶原蛋白的功能性基团和成像基团的某些化合物可用于作用于诊断疾病(例如,纤维化、纤维发生、动脉粥样硬化、心肌梗塞、或癌症)的分子成像探针(例如,磁共振(MR)成像探针)。

[0008] 在一个方面,本发明的特征是式(I)的化合物:



[0010] 或其药学上可接受的盐,

[0011] 其中X是-C(R_aR_b)-、-C(S)-、或-C(O)-,其中R_a和R_b,各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂芳基、或芳基;Y是-N(R_c)-或-O-,其中R_c是H、烷基、烯基、炔基、或芳基;L是-(CR_dR_e)_n-、-NH(CR_fR_g)_n-、或-(CR_hR_i)_n-芳基-,其中在各种情况中,R_d、R_e、R_f、R_g、R_h、和R_i各自独立地是H、烷基、烯基、或炔基,并且n是1、2、或3;Z是包含金属离子和第一络合基团的螯合基团,第一络合基团与金属离子形成金属络合物;并且R₁和R₂各自独立地是H或C₁-C₁₀烷基。

[0012] 在另一个方面中,本发明的特征是一种方法,其包括向哺乳动物给予上述式(I)的化合物;并且在给予该化合物之后获取该哺乳动物的组织图像。

[0013] 在一些实施方式中,该图像是正电子发射断层扫描图像。

[0014] 在一些实施方式中,该图像是单光子发射计算机断层扫描图像。

[0015] 在一些实施方式中,该图像是磁共振图像。

[0016] 在一些实施方式中,该图像是计算机断层扫描图像。

[0017] 在一些实施方式中,该图像是平面闪烁扫描图像。

[0018] 在一些实施方式中,第一络合基团是DOTA、NOTA、D03AX、D03AP、D0TP、D02A2P、

NOTP、NO2AP、NO2PA、TETA、TE2P、TE2A、TE1A1P、CBTE2P、CBTE1A1P、SBTE2A、SBTE1A1P、DTTP、CHX-A”-DTPA、DesferaI、HBED、PyDO3P、PyDO2AP、PyDO3A、DIAMSAR、EDTA、DTPA、CB-TE2A、SarAr、PCTA、pycup、DEDPA、OCTAPA、AAZTA、DOTA1a、CyPic3A、TRAP、NOPO、或CDTA部分。

[0019] 在一些实施方式中,金属离子是 Gd^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Eu^{2+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Cr^{3+} ,或选自下组的放射性同位素的离子: ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $Al-^{18}F$ 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{52}Mn 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{201}Tl 、 ^{94m}Tc 、和 ^{99m}Tc 。

[0020] 在一些实施方式中,Y是 $-N(R_c)-$ 或 $-O-$,其中 R_c 是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基。在一些实施方式中,Y是 $-NH-$ 或 $-O-$ 。

[0021] 在一些实施方式中,X是 $-C(R_aR_b)-$ 、 $-C(S)-$ 、或 $-C(O)-$,其中 R_a 和 R_b 各自独立地是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基。在一些实施方式中,X是 $-CH_2-$ 或 $-O-$ 。

[0022] 在一些实施方式中,L其中L是 $-(CH_2)_n-$ 、 $-NH(CH_2)_n-$ 、或 $-(CH_2)_n$ -芳基-,其中n是1、2、或3。在一些实施方式中,L是 $-CH_2CH_2-$ 、 $-NHCH_2-$ 、 $-CH_2-Ph-$ 、或 $-CH_2CH_2CH_2-$ 。

[0023] 在一些实施方式中, R_a 和 R_b 各自独立地是H或 CH_3 。

[0024] 在一些实施方式中,Z还包括与金属离子络合的水分子。

[0025] 在一些实施方式中,组织选自:乳腺组织、结肠组织、骨组织、肺组织、膀胱组织、脑组织、支气管组织、宫颈组织、结直肠组织、子宫内膜组织、室管膜组织、眼组织、胆囊组织、胃部组织、胃肠道组织、颈部组织、心脏组织、肝脏组织、胰腺组织、肾脏组织、喉组织、唇或口腔组织、鼻咽组织、口咽组织、卵巢组织、甲状腺组织、阴茎组织、垂体组织、前列腺组织、直肠组织、肾脏组织、唾液腺组织、皮肤组织、胃组织、睾丸组织、咽喉组织、子宫组织、阴道组织、和外阴组织。

[0026] 在一些实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0027] 在一些实施方式中, R_1 和 R_2 各自是H。

[0028] 本文提供了评价生物样品的胞外基质中赖氨酰氧化酶活性的方法,包括向胞外基质给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且在给予该成像剂之后获取胞外基质的图像。

[0029] 本文提供了评价哺乳动物中的肿瘤或组织中赖氨酰氧化酶活性的方法,包括向该哺乳动物给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且在给予该成像剂之后获取图像。

[0030] 本文还提供了对生物样品的胞外基质、哺乳动物中的组织、或哺乳动物中的肿瘤进行成像的方法,包括向胞外基质给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且在给予化合物之后获取胞外基质的图像。

[0031] 本文还提供了对哺乳动物中的肿瘤或组织进行成像的方法,包括向该哺乳动物给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且在给予化合物之后获取哺乳动物的图像。

[0032] 本文还提供了评价哺乳动物中的组织中的纤维化水平的方法,包括向该哺乳动物给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且在给予化合物之后获取哺乳动物的图像。

[0033] 本文还提供了诊断哺乳动物中纤维化疾病的方法,包括向该哺乳动物给予包含 $-NR-NH_2$ 或 $-O-NH_2$ 基团的成像剂,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基;并且

在给予化合物之后获取哺乳动物的图像。

[0034] 在一些实施方式中,纤维化疾病选自:肺纤维化、慢性阻塞性肺病、肺高血压、心力衰竭、肥大型心肌病、心肌梗塞、心房纤颤、糖尿病肾病、系统性红斑狼疮、多囊性肾病、肾小球肾炎、末期肾疾病、非酒精性脂肪肝炎、酒精性脂肪肝炎、丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、原发性硬化性胆管炎、炎性肠病、硬皮病、动脉粥样硬化、青光眼、糖尿病视网膜病、放射诱导纤维化、手术粘连、囊性纤维化、和癌症。例如,纤维化疾病可以是特发性肺纤维化。

[0035] 在一些实施方式中,纤维化疾病是选自下组的癌症:乳腺癌、结肠癌、骨癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、支气管癌、宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、成视网膜细胞瘤、胆管癌、胃癌、胃肠癌、胶质瘤、头颈癌、心脏癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌、喉癌、唇或口腔癌、间皮瘤(mesothelioma)、口腔癌、骨髓瘤、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口咽癌、卵巢癌、甲状腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、子宫癌、阴道癌、和外阴癌。

[0036] 在一些实施方式中,本文所述的方法中使用的成像剂是式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐。

[0037] 在一些实施方式中,本发明的方法还包括用对照的信号水平评价给予成像剂之后的信号水平。

[0038] 在一些实施方式中,本发明的方法还包括用对照的信号水平评价给予成像剂之后的信号水平之后确定肿瘤是否是癌性的。

[0039] 通过说明书、附图和权利要求书,不难了解其它的特征、目的和优点。

附图说明

[0040] 图1A是给予探针化合物1(即Gd-Hyd)之前和之后30分钟的纤维化小鼠的轴向肝MR图像(L=肝,S=胃)。该图像显示在给予化合物1之后强的MR信号增强。

[0041] 图1B是给予对照探针化合物2(即Gd-Me₂-Hyd)之前和之后30分钟的纤维化小鼠的轴向肝MR图像。该图像显示纤维化的肝脏几乎没有信号增强。

[0042] 图1C显示在接受探针化合物1的纤维化小鼠中增强的肝/肌肉对比,而有健康肝并接受化合物1的对照小鼠或接受对照探针化合物2的纤维化小鼠没有该增强。

[0043] 图1D显示天狼星红染色确认纤维化小鼠中的晚期纤维化。

[0044] 图2A和2B分别是患有肺纤维化的小鼠和假对照(sham)小鼠的冠状MR图像。伪彩色重叠是给予化合物1(0.1mmol/kg)后30分钟的图像和基线图像之间的差异,其显示纤维化肺的广泛增强,但是在假对照小鼠的肺部有非常少的增强。

[0045] 图2C和2D显示分别在假对照小鼠和纤维化小鼠中给予化合物1之前(左)和之后2分钟(右)获得的图像。该图像显示混合血液中强且类似的初始MR信号增强,证明向两种小鼠中完全注射化合物1。

[0046] 图2E显示在注射化合物1之后(注射后1小时处)肺/肌肉对于与噪音之比(CNR)的变化。CNR的变化(Δ CNR)在纤维化小鼠中大幅升高($p=0.0001$)。

[0047] 图2F显示与假对照小鼠的正常肺(上部组图)相比,在用博来霉素处理的小鼠中肺纤维化(底部组图)的H&E染色(左)和天狼星红染色(右)结果。

[0048] 图3显示化合物1和化合物2与未修饰的牛血清白蛋白(BSA)或修饰的牛血清白蛋白(BSA-ALD)的弛豫度特征。图3a显示各制备物的弛豫度($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)。图3b显示弛豫度($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)变化%。

[0049] 图4显示在体外结合试验中与未修饰的牛血清白蛋白(BSA)或修饰的牛血清白蛋白(BSA-ALD)结合的Gd水平。图4a显示各制备物中与蛋白质结合的nmol Gd。图4b显示各制备物中与蛋白质结合的Gd%。

[0050] 图5A显示分离后结合的未修饰的牛血清白蛋白(BSA)或修饰的牛血清白蛋白(BSA-ALD)与游离溶液部分的弛豫时间变化%。

[0051] 图5B显示分离前后修饰的牛血清白蛋白(BSA-ALD)中化合物1的 T_1 弛豫度测量。

[0052] 图6显示6或12周 CCl_4 -处理后的小鼠中肝纤维化进展的化合物1成像。图6A显示化合物1注射前(前,左图)和后15分钟(后,右图)的载剂对照小鼠的代表性图像。L=肝脏,S=胃,M=肌肉。在载剂中几乎没有看到前后图像之间的增强。图6B显示6-周 CCl_4 -处理的小鼠中看到的增强。图6C显示12-周 CCl_4 -处理的小鼠中看到的增强。

[0053] 图7显示对肝纤维化进展的化合物1成像的定量。 ΔCNR 从载剂对照组(载剂,空心柱)中0.1增加至6周 CCl_4 后(16w,增加2倍,灰色柱)的1.2,并且在12周(12w,黑色柱)进一步增加至2.0(增加20倍)。** $p < 0.01$,**** $p < 0.0001$,ANOVA。

[0054] 图8显示了小鼠中的组织学和赖氨酰氧化酶表达。图8A:天狼星红染色显示6-周 CCl_4 -处理的动物中的肝门纤维化和偶发桥连(6wk)。12-周 CCl_4 -处理的动物有完全桥连纤维化(12wk)。载剂显示背景染色(veh)。图8B:通过天狼星红染色定量的胶原蛋白含量显示载剂中0.6%在6-周动物中明显增加至2.7%,并且在12-周 CCl_4 肝脏中增加至4.0%。赖氨酰氧化酶表达的qRT-PCR显示 CCl_4 处理的LOX(图8C)、LOXL2(图8D)、和LOXL1(图8E)水平。在图8B中,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$,ANOVA。在C-E中,** $p < 0.01$,**** $p < 0.0001$,t-检验。

[0055] 图9显示对肝纤维化抑制的化合物1成像的定量。接受6周 CCl_4 之后6周恢复期的小鼠(6w-r)比在6周(6w)或12周(12w) CCl_4 处理之后成像的小鼠显示出更少的通过Gd-Hyd的肝信号增强。虽然6w和12w组显示出比载剂对照组(veh)明显更高的 ΔCNR ,在6w-r组和veh组之间没有明显差异,并且增加至1.2(6-周 CCl_4)在去除 CCl_4 的6周后降至0.5。*** $p < 0.01$,**** $p < 0.0001$,ns=不显著,ANOVA。

[0056] 图10显示在用博来霉素处理的小鼠中疾病进展的化合物1成像。肺中的信号增向在本文显示在解剖图像上叠加。图10A:PBS注射的假对照动物几乎没有乃至没有化合物1摄取。化合物1的摄取在1周博来霉素处理的动物中增加(图10B),并且在2周博来霉素处理的动物中进一步增加(图10C)。

[0057] 图11显示确认博来霉素处理的小鼠的疾病严重程度的病理测量。图11A显示博来霉素诱导的纤维化小鼠在博来霉素注射后1周时4.1,博来霉素注射后2周时5.3,以及在PBS假对照中0的平均艾氏评分(Ashcroft score)。图11B:与PBS对照中0.09%相比,阳性天狼星红染色的面积在1周博来霉素组中稍有增加(0.17%),并且在2周博来霉素动物中显著增加至0.30%。图11C:H&E染色限定的损伤面积在假对照中为0.3%,在1周博来霉素中增加至4.6%,并且进一步增加至15.0%。*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$ ANOVA。

[0058] 发明详述

[0059] 通常,本发明涉及可用作分子成像探针的化合物以及制备和使用这些化合物的方

法。

[0060] 化合物

[0061] 术语“烷基”是指饱和、直链或支链烃部分,如 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。术语“烯基”和“炔基”指与上述烷基相似的取代或未取代的不饱和脂族基团,但分别含有至少一个双键或三键。术语“芳基”是指具有一个或多个芳环的烃部分。芳基的例子包括苯基(Ph)、亚苯基、萘基、亚萘基、茚基、蒽基和菲基。除非另外说明,本文所述的烷基和芳基都包括取代和未取代的部分。

[0062] 术语“杂芳基”包括取代或未取代的芳族5至7元环结构,更优选5至6元环,其环结构包括1-4个杂原子。术语“杂芳基”也包括具有两个或多个环的多环系统,其中两毗邻环共用两个或多个碳,其中至少一个环是杂芳族,例如其他环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂芳基包括,例如,吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、异噻唑、噁唑、噁二唑、噻唑、噻二唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0063] 本文所用术语“碳环”和“碳环基”是指非芳族取代或未取代的环,其中环的各原子是碳。术语“碳环”和“碳环基”也包括具有两个或多个环的多环系统,其中两毗邻环共用两个或多个碳,其中至少一个环是碳环,例如其他环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。

[0064] 本文所用术语“环烷基”是指饱和取代或未取代的环,其中环的各原子是碳。

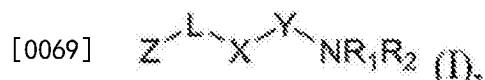
[0065] 本文所用术语“环烯基”和“环炔基”分别指环内含有至少一个双键和三键的环烷基基团。

[0066] 术语“杂环基”或“杂环烷基”指取代或未取代的非芳族3至10元环结构,例如,3至7元环,它们的环结构中包括1-4个杂原子。环可以是完全饱和的或者可具有1个或更多个不饱和键而环仍然是非芳族。杂环含有1-2个原子,其为下组的成员: NH 、 N 、 $\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 O 、和 S 。术语“杂环基”或“杂环烷基”也包括具有两个或多个环的多环系统,其中两毗邻环共用一个或多个碳,其中至少一个环是杂环,例如其他环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂环基包括,例如,哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺等。杂环基可任选地被独立选自下组的1、2或3个取代基取代: 卤素、氰基、硝基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、杂烷基、 C_{6-10} 芳氧基、 C_{1-6} 芳烷氧基、 CF_3 、季铵离子、糖、 C_{1-6} 烷基、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{杂烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{杂烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{苯基})$ 、 $-\text{SO}_2(\text{苯基})$ 、和磷酸酯(或其盐)。多环杂环的示例包括6-氮杂双环[3.1.1]庚烷、3-氧杂-6-氮杂双环[3.1.1]庚烷、5-氮杂螺[2.4]庚烷、2-氧杂螺[3.3]庚烷、八氢苯并呋喃、1,2,3,4-四氢喹啉、和八氢-1H-喹啉。

[0067] 术语“取代的”指的是某部分具有替代主链的一个或多个碳上的氢的取代基。应理解,“取代”或“用……取代”包括的隐含条件是这种取代符合被取代原子和取代基所允许的化合价,并且取代得到稳定的化合物,例如不会通过重排、环化、消除或其它反应而发生自动转化。考虑本文所用术语“取代的”包括有机化合物的所有可允许取代基。就广义方面而言,可允许的取代基包括有机化合物的非环状和环状、分支和未分支、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。可允许的取代基对合适的有机化合物而言可为一个或多个且相同或不同。芳基上的可能取代基包括,但不限于 C_1 - C_{10} 烷基、 C_2 - C_{10} 烯基、 C_2 - C_{10} 炔基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_3 - C_{20} 环烯基、 C_1 - C_{20} 杂环烷基、 C_1 - C_{10} 烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、氨基、 C_1 - C_{10} 烷基

氨基、C₁-C₂₀二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、C₁-C₁₀烷基磺酰氨基、芳基磺酰氨基、C₁-C₁₀烷基亚氨基、芳基亚氨基、C₁-C₁₀烷基磺酰亚氨基、芳基磺酰亚氨基、羟基、卤素、硫代、C₁-C₁₀烷基硫代、芳基硫代、C₁-C₁₀烷基磺酰基、芳基磺酰基、酰基氨基、氨基酰基、氨基硫代酰基、脒基、胍基、脲基、氰基、硝基、亚硝基、叠氮基、酰基、硫代酰基、酰氧基、羧基、和羧酸酯。在另一方面，烷基上的可能取代基包括上述所有取代基，除了C₁-C₁₀烷基。烯基上的可能取代基包括上述针对芳基的所有取代基，除了C₂-C₁₀烯基。炔基上的可能取代基包括上述针对芳基的所有取代基，除了C₂-C₁₀炔基。杂芳基、杂环烷基和碳环基上的可能取代基包括上述针对芳基的所有取代基。

[0068] 在一些实施方式中，本发明涉及式(I)的化合物：



[0070] 或其药学上可接受的盐，

[0071] 其中X是-C(R_aR_b)-、-C(S)-、或-C(O)-，其中R_a和R_b，各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂芳基、或芳基；Y是-N(R_c)-或-O-，其中R_c是H、烷基、烯基、炔基、或芳基；L是-(CR_dR_e)_n-、-NH(CR_fR_g)_n-、或-(CR_hR_i)_n-芳基-，其中在各种情况中，R_d、R_e、R_f、R_g、R_h、和R_i各自独立地是H、烷基、烯基、或炔基，并且n是1、2、或3；Z是包含金属离子和第一络合基团的螯合基团，第一络合基团与金属离子形成金属络合物；并且R₁和R₂各自独立地是H或C₁-C₁₀烷基。

[0072] 在一些实施方式中，R₁和R₂各自是H。

[0073] 在一些实施方式中，式(I)的化合物具有式(Ia)的结构：



[0075] 或其药学上可接受的盐，

[0076] 其中X是-C(R_aR_b)-、-C(S)-、或-C(O)-，其中R_a和R_b，各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂芳基、或芳基；Y是-N(R_c)-或-O-，其中R_c是H、烷基、烯基、炔基、或芳基；L是-(CR_dR_e)_n-、-NH(CR_fR_g)_n-、或-(CR_hR_i)_n-芳基-，其中在各种情况中，R_d、R_e、R_f、R_g、R_h、和R_i各自独立地是H、烷基、烯基、或炔基，并且n是1、2、或3；Z是包含金属离子和第一络合基团的螯合基团，第一络合基团与金属离子形成金属络合物。

[0077] 在一些实施方式中，Y是-N(R_c)-或-O-，其中R_c是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基。在一些实施方式中，Y是-NH-或-O-。

[0078] 在一些实施方式中，X是-C(R_aR_b)-、-C(S)-、或-C(O)-，其中R_a和R_b各自独立地是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基。在一些实施方式中，X是-C(R_aR_b)-或-C(O)-，其中R_a和R_b各自独立地是H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、或芳基。在一些实施方式中，X是-CH₂-或-O-。例如，X可以是-CH₂-。

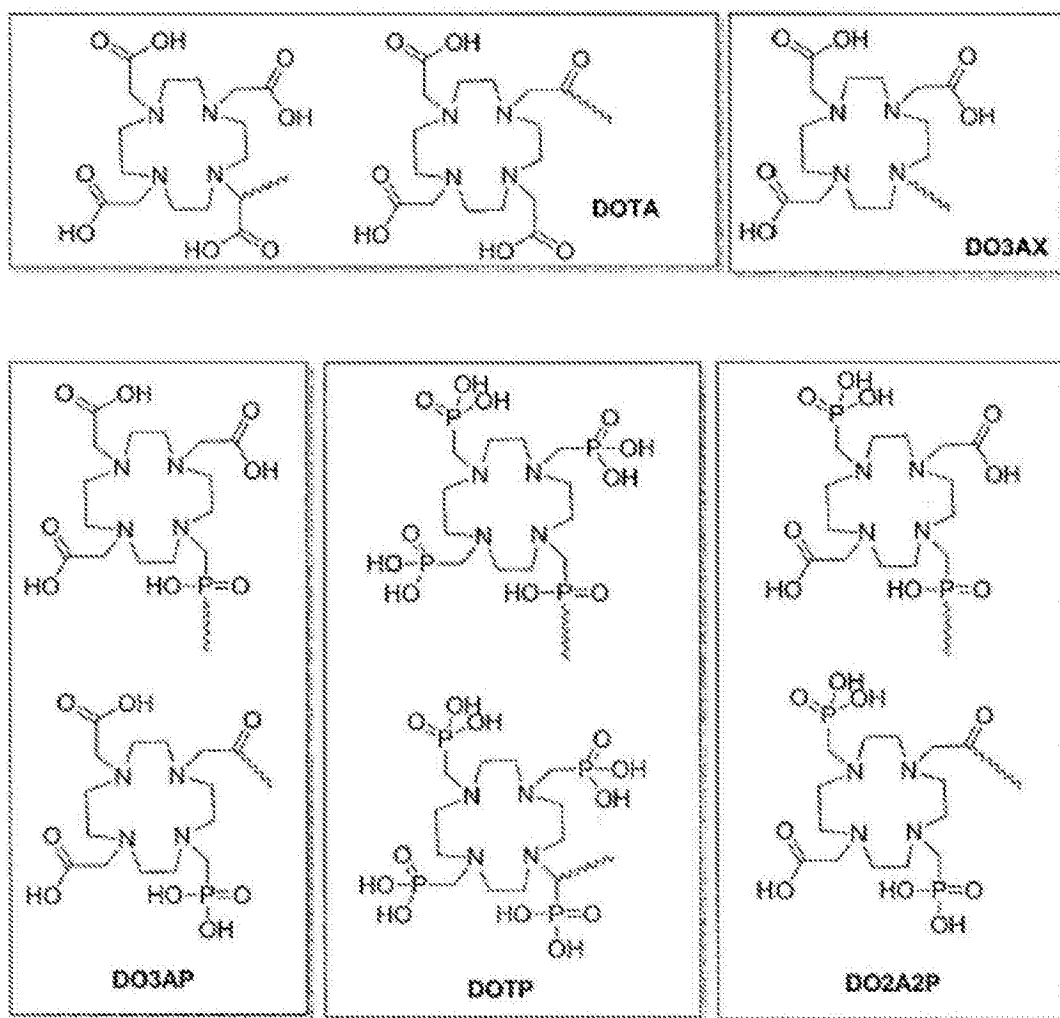
[0079] 在一些实施方式中，L其中L是-(CH₂)_n-、-NH(CH₂)_n-、或-(CH₂)_n-芳基-，其中n是1、2、或3。在一些实施方式中，L是-CH₂CH₂-、-NHCH₂-、-CH₂-Ph-、或-CH₂CH₂CH₂-。

[0080] 在一些实施方式中，R_a和R_b各自独立地是H或CH₃。

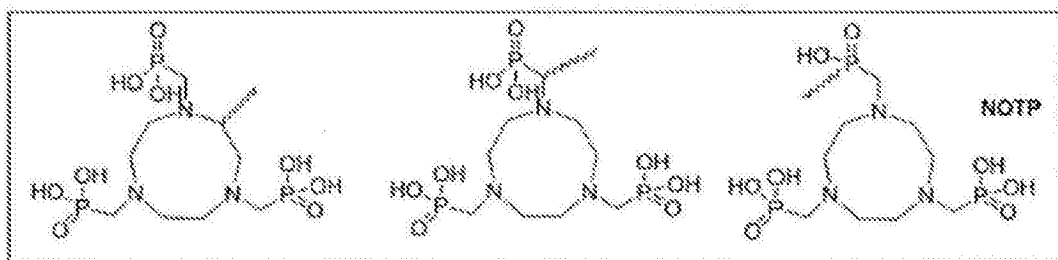
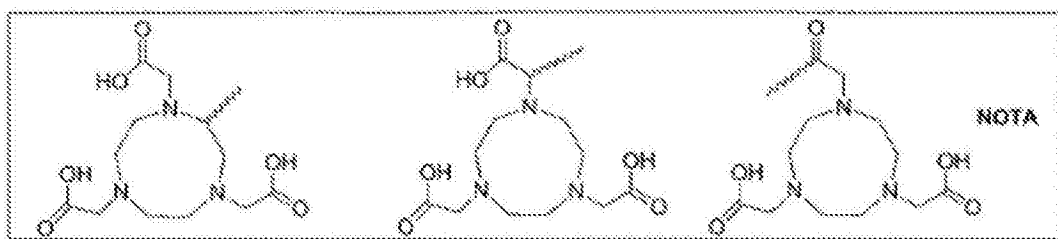
[0081] 在一些实施方式中，Z还包括与金属离子络合的水分子。

[0082] 第一络合基团通常包含可结合至金属离子的氮和/或羧酸酯部分。本领域已知金属络合基团，例如，如Hermann, P.等, Dalton Transactions 2008, 3027-3047中Gd³⁺络合物

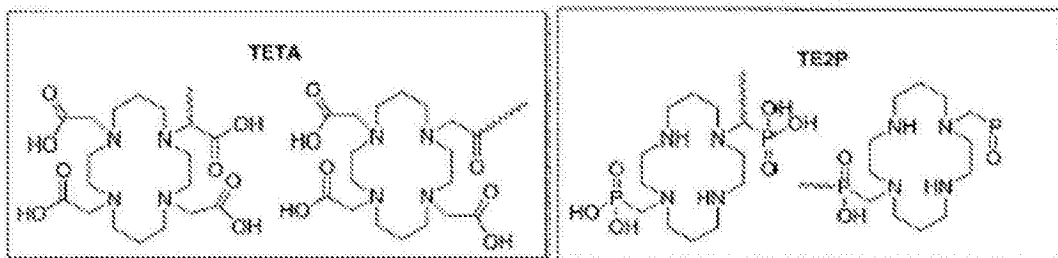
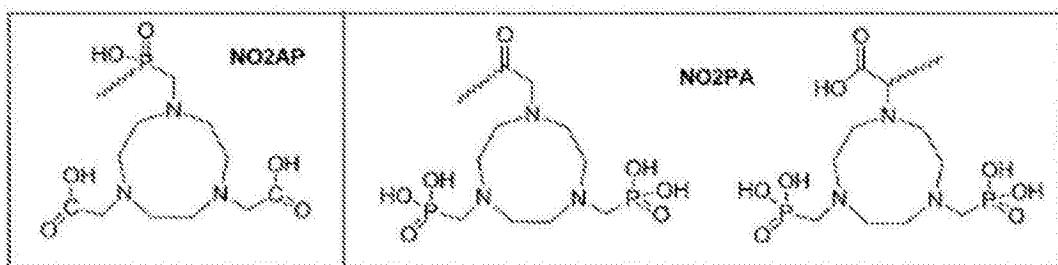
所述,其通过引用全文纳入本文。在一些实施方式中,第一络合基团是DOTA、NOTA、DO3AX、DO3AP、DOTP、DO2A2P、NOTP、NO2AP、NO2PA、TETA、TE2P、TE2A、TE1A1P、CBTE2P、CBTE1A1P、SBTE2A、SBTE1A1P、DTTP、CHX-A"-DTPA、DesferaI、HBED、PyDO3P、PyDO2AP、PyDO3A、DIAMSAR、EDTA、DTPA、CB-TE2A、SarAr、PCTA、pycup、DEDPA、OCTAPA、AAZTA、DOTA1a、CyPic3A、TRAP、NOPO、或CDTA部分。在一些实施方式中,第一络合基团是DOTA、NOTA、EDTA、DTPA、CB-TE2A、SarAr、PCTA、pycup、或CDTA部分。络合基团的示例性代表包括以下,用波浪线表示与分子的其他部分附连的可能点。

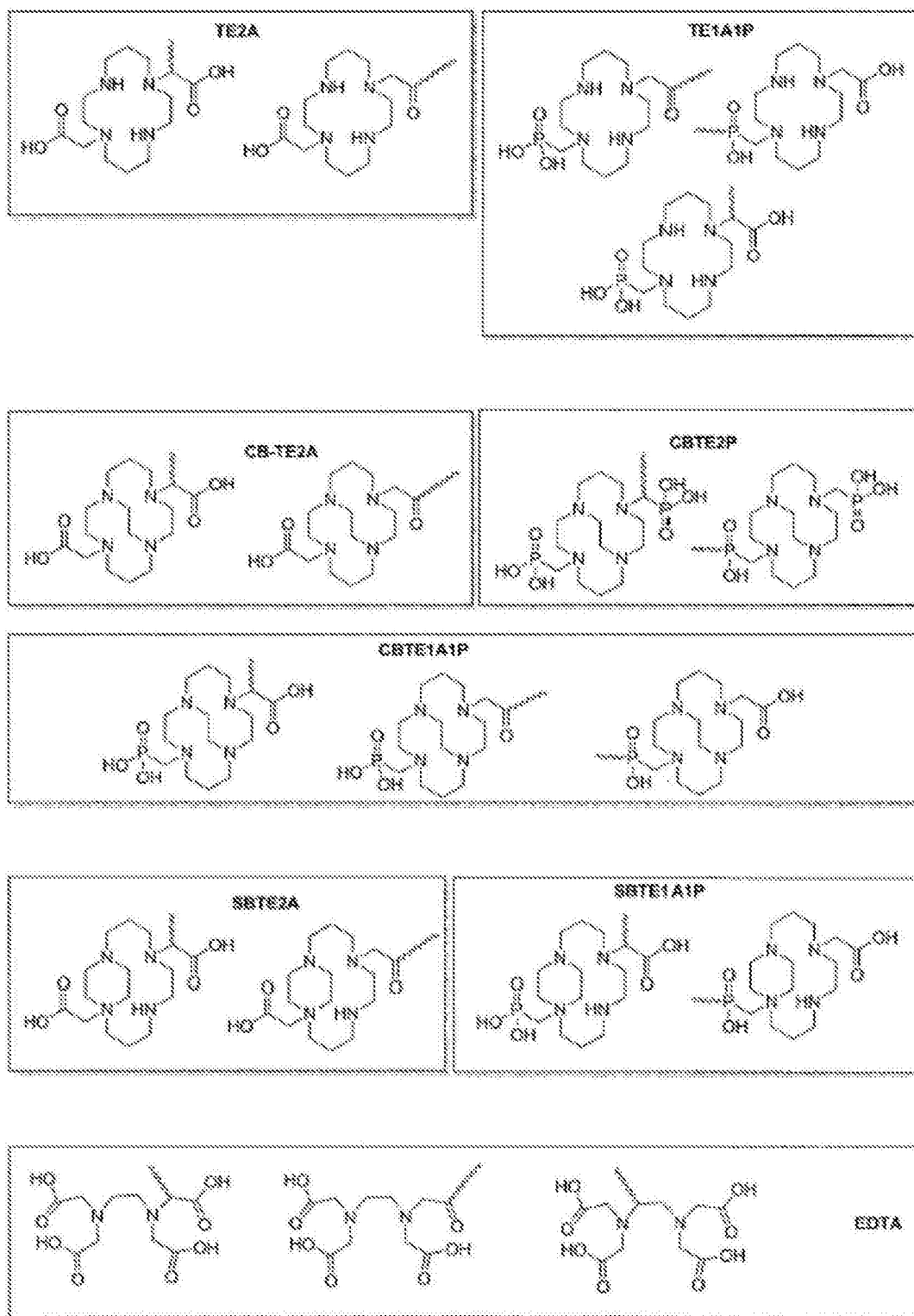


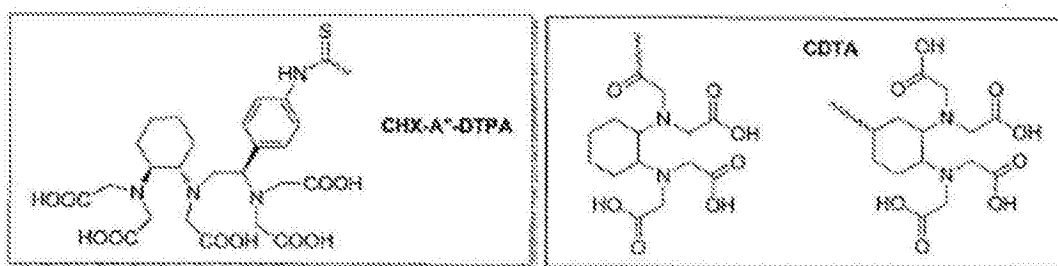
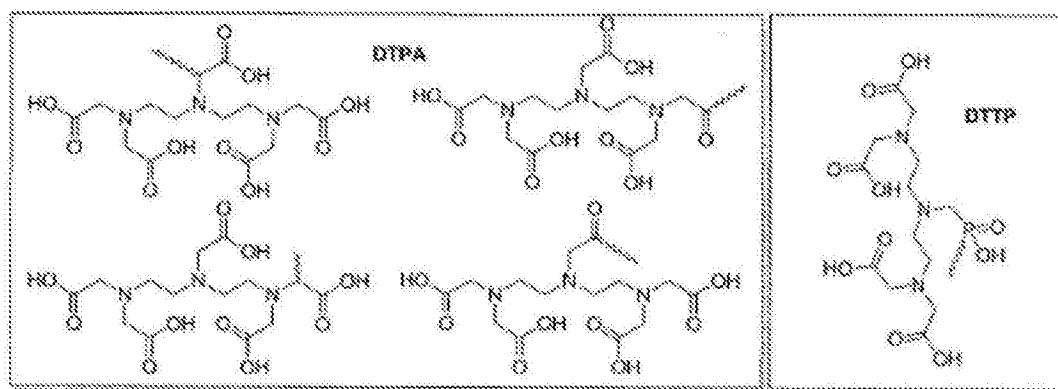
[0083]



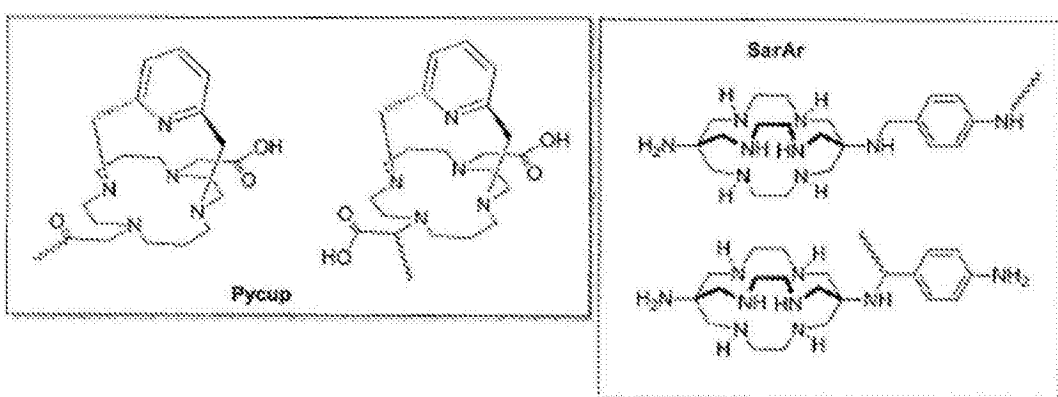
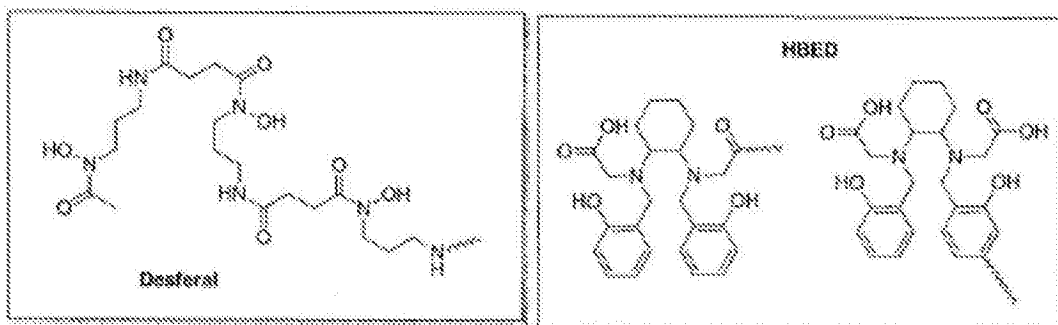
[0084]

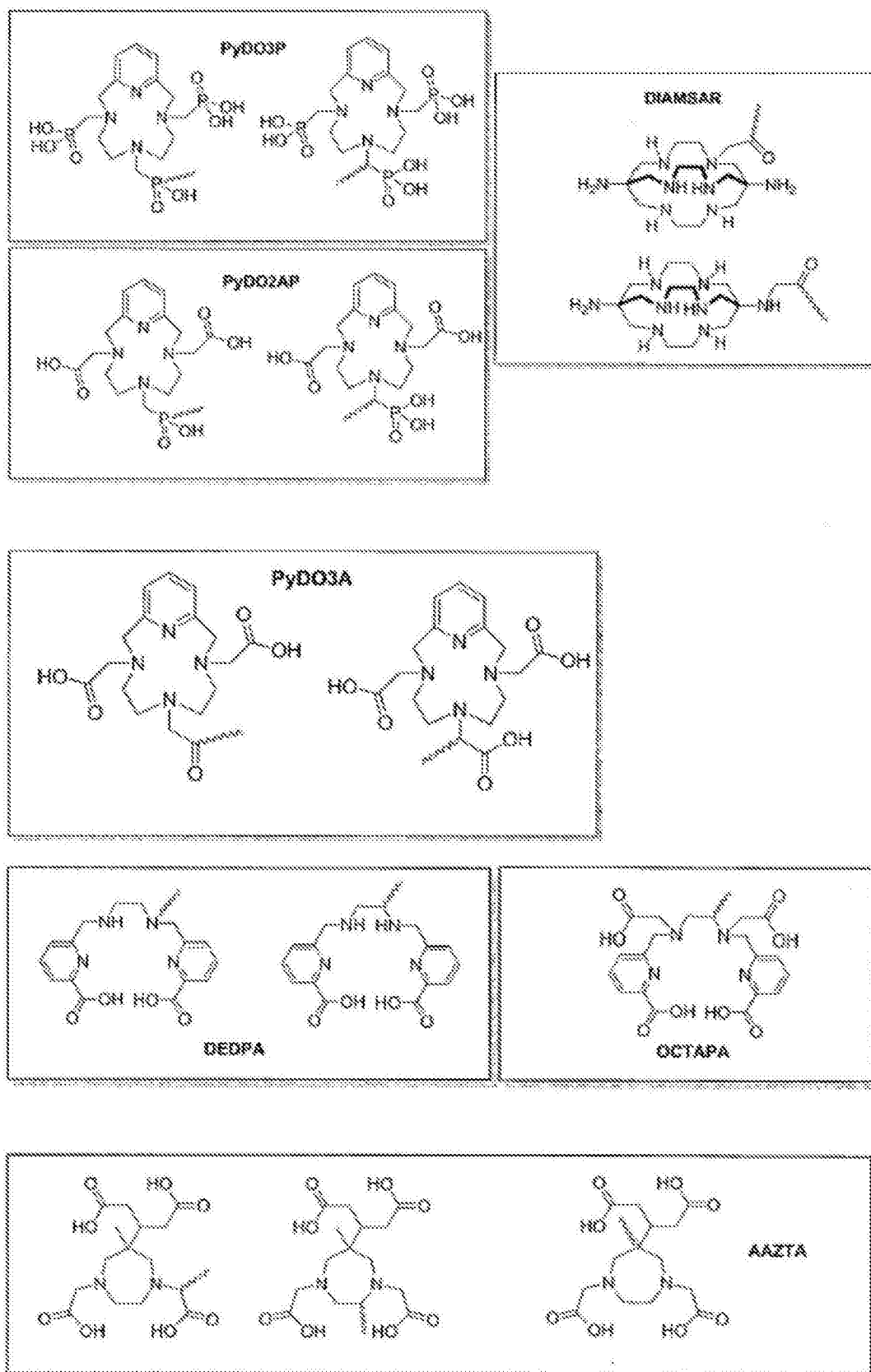




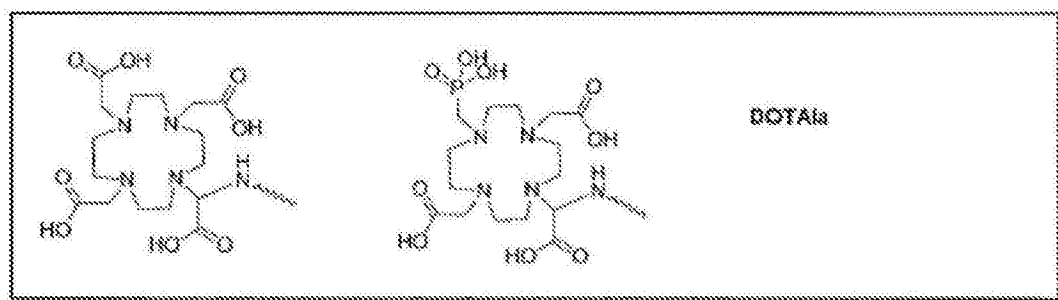


[0086]

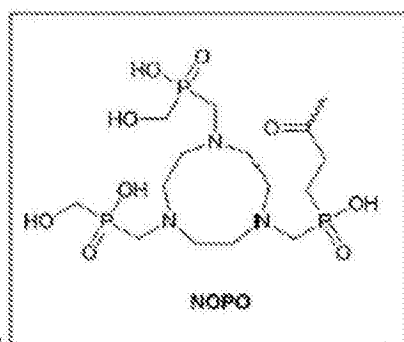
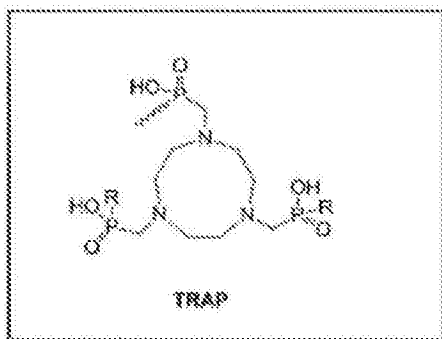
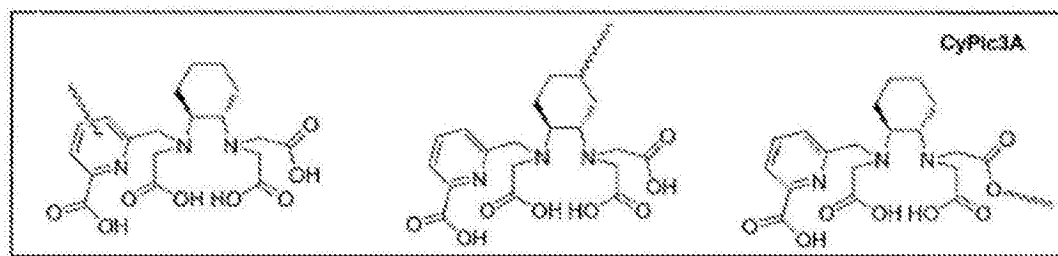




[0087]



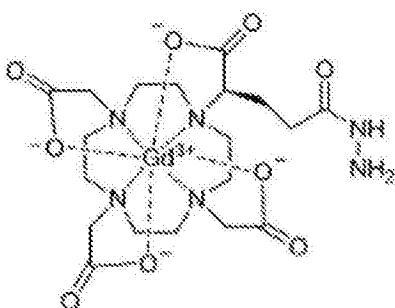
[0088]



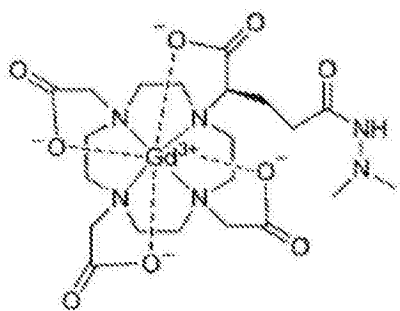
和

[0089] 在这些实施方式中,金属离子可以是 Gd^{3+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Eu^{2+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Er^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Yb^{3+} 、 Cr^{3+} ,或选自下组的放射性同位素的离子: ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{52}Mn 、 ^{89}Zr 、 ^{86}Y 、 ^{201}Tl 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$;Y可以是 NH_2 或O;X可以是 CH_2 或O;L可以是 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{Ph}-$ 、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$;并且 R_a 和 R_b 可各自独立地是H或 CH_3 。这类化合物的示例包括:

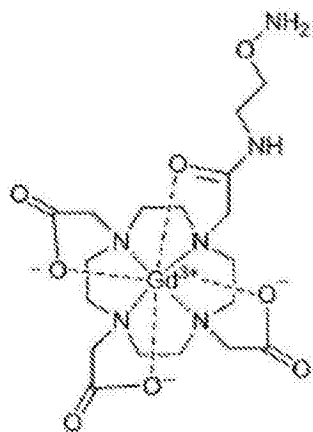
[0090]



(化合物 1),

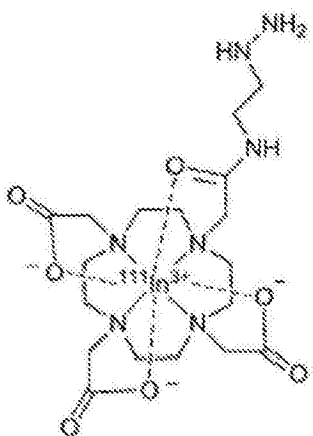


(化合物 2) ,

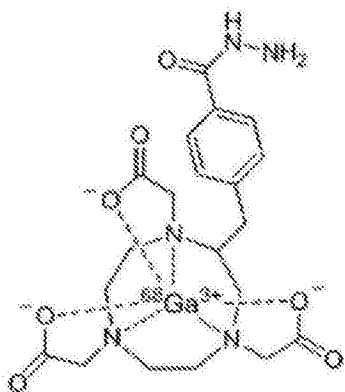


(化合物 3) ,

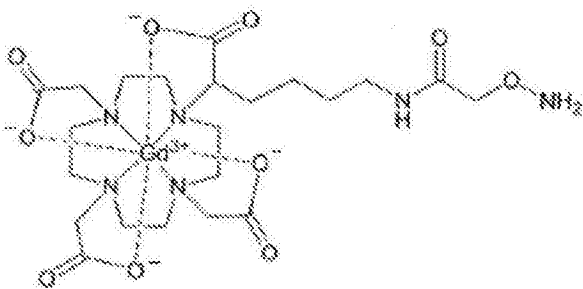
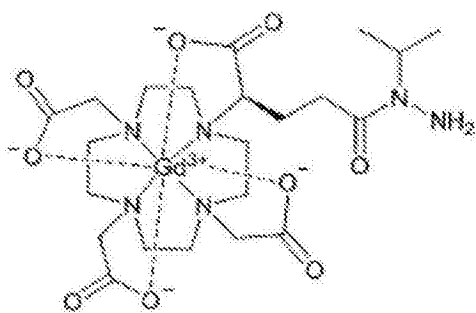
[0091]



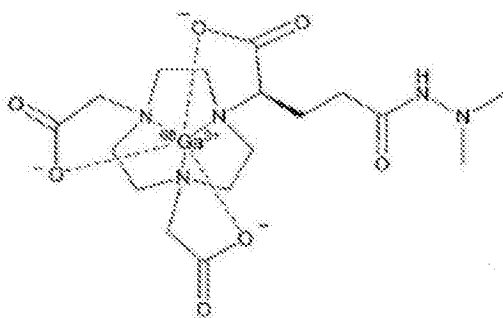
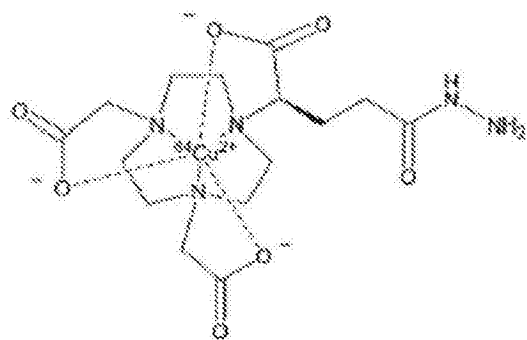
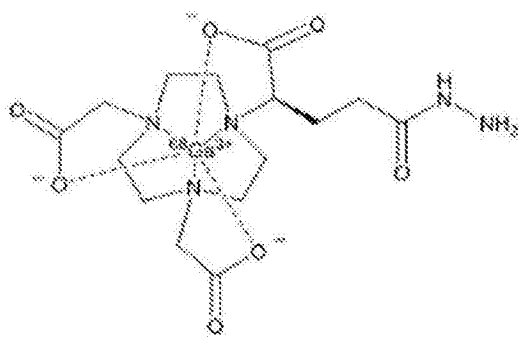
(化合物 4) ,



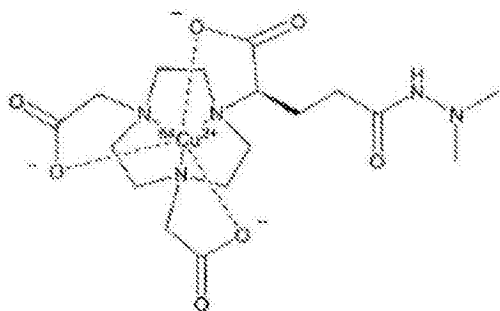
(化合物 5) ,



[0092]



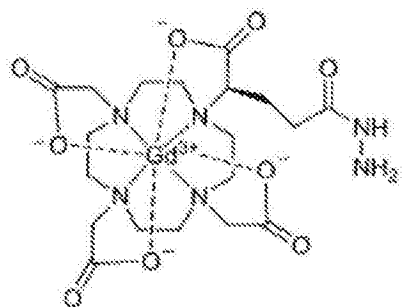
[0093]



或其药学上可接受的盐。

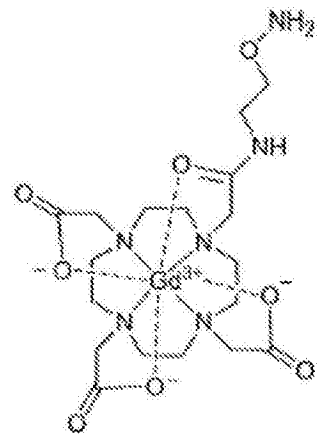
(化合物 14) ,

[0094] 在一些实施方式中,化合物选自

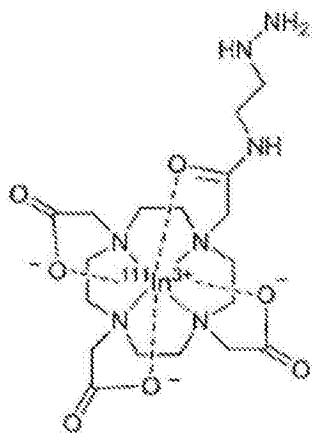


(化合物 1) ,

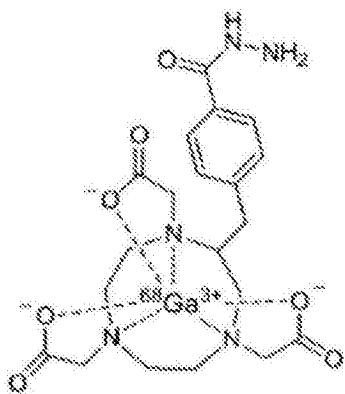
[0095]



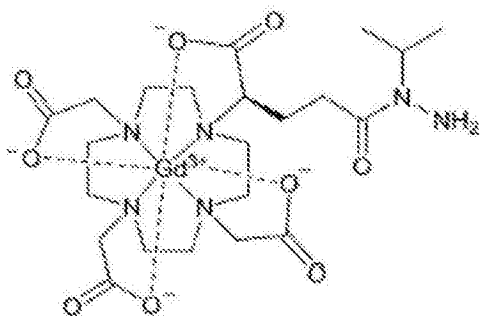
(化合物 3) ,



(化合物 4) ,

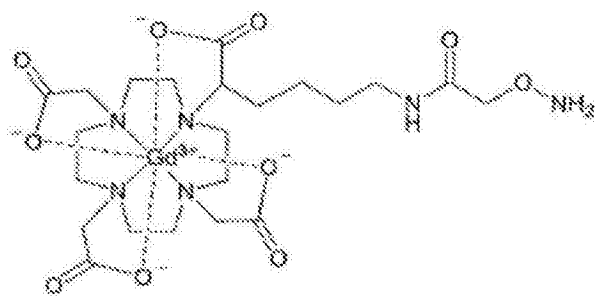


(化合物 5) ,

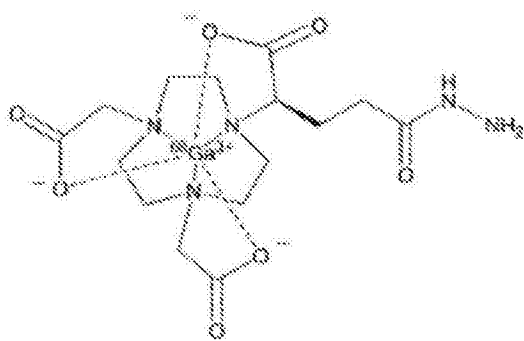


[0096]

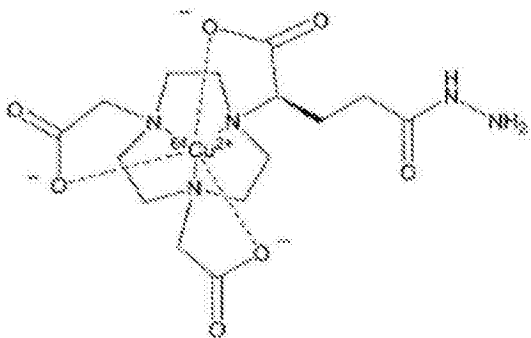
(化合物 9) ,



(化合物 10) ,



(化合物 11) ,

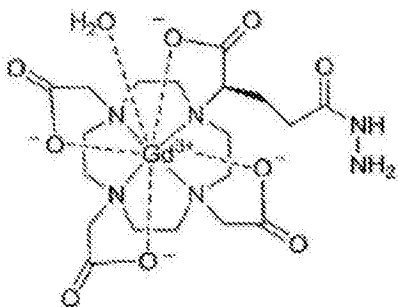


[0097]

(化合物 12) ,

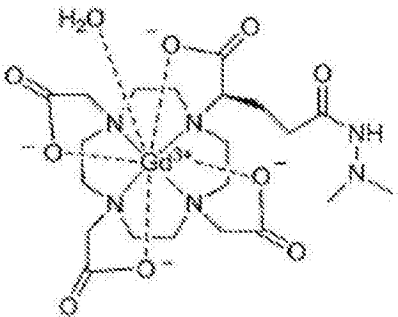
[0098] 或其药学上可接受的盐。

[0099] 在一些实施方式中,Z还包括与金属离子络合的水分子。这类化合物的示例包括:



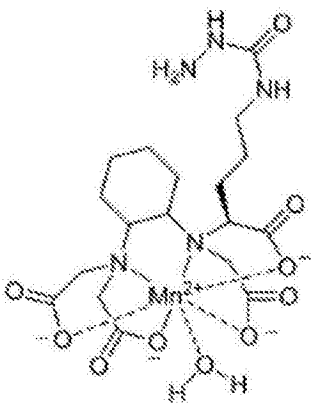
(化合物 6) ,

[0100]



(化合物 7) ,

[0101]

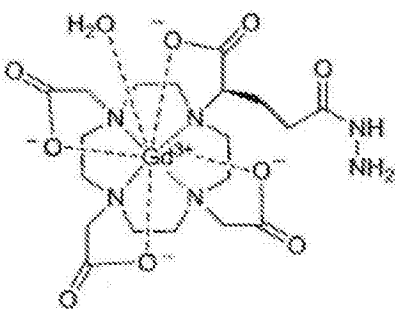


(化合物 8) ,

或其药学上可接受的盐。

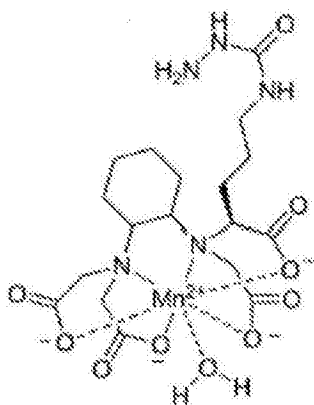
[0102] 在一些实施方式中,其中Z还包括与金属离子络合的水分子的化合物选自:

[0103]



(化合物 6) ,

[0104]



(化合物 8) ,

或其药学上可接受的盐。

[0105] 本文上述的式(1)和/或(1a)的化合物包括化合物本身,及其盐、前药和溶剂合物,如果可用。例如,在式(1)的化合物上,可形成介于阴离子和带正电基团(例如,氨基)之间的盐。合适的阴离子包括氯离子、溴离子、碘离子、硫酸根、硝酸根、磷酸根、柠檬酸根、甲磺酸根、三氟乙酸根、乙酸根、苹果酸根、甲苯磺酸根、酒石酸根、富马酸根、谷氨酸根、糖醛酸根、乳酸根、戊二酸根、和马来酸根。同样地,在式(1)和/或(1a)的化合物上,还可形成介于阳离子和带负电基团(例如,羧酸根)之间的盐。合适的阳离子包括钠离子、钾离子、镁离子、钙离子和铵阳离子例如四甲基铵离子或N-甲基葡萄糖铵离子。式(1)和/或(1a)的化合物也包括含有季氮原子的那些盐。前药的例子包括酯、酰胺、氨基甲酸酯、碳酸酯和其它药学上可接受的衍生物,其通过给予对象而能够提供式(1)和/或(1a)化合物。溶剂合物是指在式(1)和/或(1a)的化合物和药学上可接受的溶剂之间形成的络合物。药学上可接受的溶剂的示例包括水、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0106] 本文所述的式(1)和/或(1a)的化合物可含有非芳族双键和一个或多个手性中心。因此,它们可以外消旋物和外消旋混合物、单个对映异构体、个体非对映异构体、非对映异构体混合物、和顺式或反式异构体形式出现。考虑所有这些异构体形式。

[0107] 可通过本领域熟知的方法制备本文所述的式(1)和/或(1a)的化合物。以下的实施例提供了对如何制备上述化合物的详细描述。

[0108] 可使用其他合适的启示材料通过实施例中所所述的合成途径或本领域已知的其他合成途径制备式(1)和/或(1a)的其他化合物。在本文具体描述的步骤之前或之后,本文所述的方法也可包括其他步骤以添加或去除合适的保护基团以最终允许合成式(1)和/或(1a)的化合物。另外,可以替代次序或顺序进行各种合成步骤以得到所需的化合物。本领域已知可用于合成式(1)和/或(1a)的可用化合物的合成化学转化和保护基团方法并且包括,例如R.Larock, *Comprehensive Organic Transformations*(《综合有机转化》), VCH Publishers(1989); T.W.Greene和P.G.M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*(《有机合成中的保护性基团》), 第2版, 约翰威利父子出版社(John Wiley and Sons)(1991); L.Fieser和M.Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*(《有机合成的费氏试剂》), 约翰威利父子出版社(1994); 和L.Paquette编, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*(《有机合成试剂百科全书》), 约翰威利父子出版社(1995)及其后续版本中所述的那些。

[0109] 本发明范围内还有含有有效量的至少一种式(1)和/或(1a)的化合物和药学上可接受的运载体的药物组合物。

[0110] 方法

[0111] 赖氨酰氧化酶(LOX)和LOX-样酶是残余交联胶原和/或弹性蛋白原纤维的胞外酶。这些酶将赖氨酸氨基催化氧化成醛并且这些醛然后经过与其他氨基酸侧链(或其他氧化的赖氨酸)进行非催化缩合反应以产生稳定的共价交联。本发明的化合物(例如,式(1)和/或(1a)的化合物)通过使用带有基团如酰肼($-\text{NH}-\text{NH}_2$)或氨基-氧基($-\text{O}-\text{NH}_2$)的成像剂(Gd、Mn、核等)靶向由LOX生成的这些醛,这些基团将与醛发生缩合反应以形成中性含亚氨基产物。由于醛在体内稀少,并且因为本发明的化合物并不易于穿透细胞,化合物对于胞外基质中具有高水平LOX活性的组织有选择性。在动脉重塑并且在许多癌症中,LOX活性在活性纤维化(纤维发生)中上调。具有强纤维增生组分并且可包括增加的LOX活性的疾病包括,但不限于,心力衰竭、心脏病、末期肾疾病、肝炎的所有形式、肺纤维化、硬皮病、动脉粥样硬化、和许多侵略性癌症。

[0112] 本发明的一个方面是使用成像剂评价在生物样品的胞外基质中、组织中、肿瘤中、和/或哺乳动物中LOX活性的方法。在一些实施方式中,成像剂包括酰肼($-\text{NR}-\text{NH}_2$)或氨基-氧基($-\text{O}-\text{NH}_2$)基团,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基,其可用于评价在生物样品的胞外基质中、组织中、肿瘤中、和/或哺乳动物中的LOX活性。在一些实施方式中,成像剂是式(1)和/或(1a)的化合物,或其药学上可接受的盐。

[0113] 本发明提供了对生物样品的胞外基质进行成像的方法,包括将胞外基质与本文所述的成像剂接触。在一些实施方式中,胞外基质包括多种细胞。不希望受到理论限制,本发明的化合物(例如,式(1)和/或(1a)的化合物)可与由细胞周围紧密的胞外基质中LOX生成的醛选择性结合并反应。在一些实施方式中,成像剂包括酰肼($-\text{NR}-\text{NH}_2$)或氨基-氧基($-\text{O}-\text{NH}_2$)基团,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基,可用于对细胞成像。在一些实施方式中,成像剂是式(1)和/或(1a)的化合物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中,接触在体外进行。在一些实施方式中,在体内接触。在一些实施方式中,细胞是血细胞、癌细胞、免疫细胞(例如,巨噬细胞)、上皮细胞(例如,皮肤细胞)、细菌细胞或病毒感染的细胞。

[0114] 在一些实施方式中,细胞是癌细胞。在一些实施方式中,癌细胞选自乳腺癌细胞、结肠癌细胞、白血病细胞、骨癌细胞、肺癌细胞、膀胱癌细胞、脑癌细胞、支气管癌细胞、宫颈癌细胞、结直肠癌细胞、子宫内膜癌细胞、室管膜瘤癌细胞、成视网膜细胞瘤癌细胞、胆囊癌细胞、胃癌细胞、胃肠道癌细胞、胶质瘤癌细胞、头颈癌细胞、心脏癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、黑素瘤癌细胞、肾癌细胞、喉癌细胞、唇或口腔癌细胞、淋巴瘤癌细胞、间皮瘤癌细胞、口腔癌细胞、骨髓瘤癌细胞、鼻咽癌细胞、成神经细胞瘤癌细胞、口咽癌细胞、卵巢癌细胞、甲状腺癌细胞、阴茎癌细胞、垂体癌细胞、前列腺癌细胞、直肠癌细胞、肾癌细胞、唾液腺癌细胞、肉瘤癌细胞、皮肤癌细胞、胃癌细胞、睾丸癌细胞、咽喉癌细胞、子宫癌细胞、阴道癌细胞、和外阴癌细胞。

[0115] 本发明还提供了对组织成像的方法,包括给予组织成像剂。在一些实施方式中,成像剂包括酰肼($-\text{NR}-\text{NH}_2$)或氨基-氧基($-\text{O}-\text{NH}_2$)基团,其中R是H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、或芳基,可用于对组织成像。在一些实施方式中,成像剂是式(1)和/或(1a)的化合物,或其药学上可接受的盐。可使用本发明的方法成像的组织可以是以下任意的组织:乳腺组织、结肠组织、骨组织、肺组织、膀胱组织、脑组织、支气管组织、宫颈组织、结直肠组织、子

宫内膜组织、室管膜组织、眼组织、胆囊组织、胃部组织、胃肠道组织、颈部组织、心脏组织、肝脏组织、胰腺组织、肾脏组织、喉组织、唇或口腔组织、鼻咽组织、口咽组织、卵巢组织、甲状腺组织、阴茎组织、垂体组织、前列腺组织、直肠组织、肾脏组织、唾液腺组织、皮肤组织、胃组织、睾丸组织、咽喉组织、子宫组织、阴道组织、和外阴组织。在一些实施方式中,组织是肝、肺、心或肾组织。

[0116] 纤维化疾病显示已经由多个研究人员观察到的增强的LOX表达和/或活性水平。例如,Barker,H.E.等,Nature Reviews Cancer 2012,12,第543页的表1详细描述了在动脉粥样硬化、硬皮病(乳腺、肺、和/或舌)、肝硬化、阿尔茨海默病痴呆、非阿尔茨海默病痴呆、威尔逊病、原发性胆汁性肝硬化、青光眼、剥脱性综合征、子宫内膜异位、肺纤维化、肝纤维化、和心力衰竭中一种或多种LOX家族成员的增强表达。本文所述的成像剂可用于可视化纤维化疾病中受影响的组织。在一些实施方式中,纤维化疾病选自:肺纤维化、慢性阻塞性肺病、肺高血压、心力衰竭、肥大型心肌病、心肌梗塞、心房纤颤、糖尿病肾病、系统性红斑狼疮、多囊性肾病、肾小球肾炎、末期肾疾病、非酒精性脂肪肝炎、酒精性脂肪肝炎、丙型肝炎病毒感染、乙型肝炎病毒感染、原发性硬化性胆管炎、炎性肠病、硬皮病、动脉粥样硬化、青光眼、糖尿病视网膜膜病、放射诱导纤维化、手术粘连、囊性纤维化、和癌症。例如,纤维化疾病可以是特发性肺纤维化。

[0117] 癌症可产生自任意细胞类型。这类癌症包括,但不限于乳腺癌、结肠癌、白血病、骨癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、支气管癌、宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、成视网膜细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胶质瘤、头颈癌、心脏癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌、喉癌、唇或口腔癌、淋巴瘤、间皮瘤、口腔癌、骨髓瘤、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口咽癌、卵巢癌、甲状腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、子宫癌、阴道癌、和外阴癌。在一些实施方式中,本发明的化合物(例如,式(1)和/或(1a)的化合物)可用于对选自下组的癌症成像:乳腺癌、结肠癌、骨癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、支气管癌、宫颈癌、结直肠癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、成视网膜细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胶质瘤、头颈癌、心脏癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤、肾癌、喉癌、唇或口腔癌、间皮瘤、口腔癌、骨髓瘤、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口咽癌、卵巢癌、甲状腺癌、阴茎癌、垂体癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、子宫癌、阴道癌、和外阴癌。

[0118] 多份报告已经与癌症中增加的LOX活性相关联。参见例如Cox,T.R.等,Cancer Research 2013,73(6),1721-1732;Cox,T.R.和Erler,J.T.Carcinogenesis&Mutagenesis 2013,S13;Erler,J.T.等,Nature 2006,440,1222-1226;Mayorca-Guiliani,A.和Erler,J.T.OncoTargets and Therapy 2013,6,1729-1735;Naba,A.等,BMC Cancer 2014,14,518-529;Barker,H.E.等,Nature Reviews Cancer 2012,12,540-552;Moon,H.-J.等,Bioorganic Chemistry 2014,57,231-241,其各自通过引用全文纳入本文。Moon等在第235页上陈述:

[0119] LOXL2与肿瘤进展之间的相关性取决于组织类型。LOXL2表达在卵巢肿瘤中降低。然而,增加的LOXL2表达与结肠和食道肿瘤,以及口腔鳞状细胞癌、喉鳞状细胞癌、和头颈鳞状细胞癌患者中的不良预后相关。另外,已经发现增加的LOXL2表达促进胃癌和乳腺癌转移。一些高度侵入性人乳腺癌细胞系被报告具有升高水平的LOXL2mRNA。(引用去除)

[0120] LOX家族成员与上皮细胞塑性和肿瘤进展相关,包括在小细胞癌(SCC)中。参见,例

如,Cano,A.等,Future Oncology 2012,8(9),1095-1108,其全文通过引用纳入本文。Cano等在第1101页中陈述:

[0121] 已经在口腔SCC、头颈癌、肺腺癌和乳腺癌中观察到增加的LOX的mRNA水平。事实上,LOX可被认为是肺癌中的不良预后因素。近来也已经发现LOX的多态性变体与卵巢癌的风险增加相关。已经在转移性乳腺癌细胞中检测到LOXL1表达并且与增加的恶化可能相关。相反,已经在膀胱癌中观察到LOXL1和LOXL4基因的表观沉默,以致提出它们可能在这种特定肿瘤类型中起到肿瘤抑制物的作用。尽管关于人癌症样品中LOXL3的信息有限,LOXL3似乎在某些特定肿瘤细胞系中过表达。(引用去除)

[0122] 其他报道与实体瘤和结直肠癌(CRC)中增加的LOX表达相关。参见,例如,Cox,T.R.;Erler,J.T.The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2013,305,G659-G666,其通过引用全文纳入本文。Cox和Erler在第G664页陈述:

[0123] LOX在一般实体瘤和CRC中的重要性是毫无疑问的。其在细胞增殖、入侵、和转移、驱动血管形成和恶性转化中的意义使其提升至治疗性介入的活性靶标的地位。事实上,在多种实体瘤模型中表达高水平LOX蛋白质的癌细胞有增加的增殖、侵入和转移倾向,并且来自几个实验室的强力证据表明,在CRC中,靶向LOX不仅抑制癌细胞侵入和转移,还减少了肿瘤血管生成,因为LOX调节多个信号转导网络。

[0124] 因此,增加的LOX活性可用于在多种疾病,如癌症中成像和/或诊断。

[0125] 通常,本文所述的式(1)和/或(1a)的化合物可用于对疾病诊断的成像方法,如纤维化(例如,肝纤维化、肾纤维化、肺纤维化、子宫纤维化、皮肤纤维化、或心脏纤维化)、纤维发生、动脉粥样硬化、心肌梗塞、或癌症(例如,肺癌、乳腺癌、结直肠癌、原发性肝癌、头颈癌、或胰腺癌)。该方法包括向哺乳动物(例如,人)给予式(1)和/或(1a)的化合物(例如,其中R₁和R₂各自是H的那些)并且在给予该化合物之后获取该哺乳动物的组织(例如,肝、肺、心、乳腺、子宫、前列腺、皮肤或肾脏组织)的图像。如本领域技术人员所知,根据待诊断的疾病、给药途径、赋形剂使用、和与其他试剂共用的可能性,用于该方法的式(1)和/或(1a)的化合物的有效量可变化。

[0126] 在一些实施方式中,该方法还可包括在给予化合物之前获取哺乳动物组织的图像。在这些实施方式中,该方法还可包括评估在给予化合物之前和之后获取的图像之间的差异以确定该组织是否纤维化。

[0127] 各种成像技术可与本发明的化合物联用并且为本领域所知。成像技术包括,但不限于,正电子发射断层成像(PET)、单光子发射计算机断层成像(SPECT)、计算机断层扫描(CT)、平面闪烁扫描、和核磁共振成像(MRI)。本领域技术人员将认识到如何将合适的成像剂与合适的成像技术匹配(例如,包括⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、¹⁸F、⁸⁶Y、和^{94m}Tc的那些成像剂可用于PET成像,包括^{99m}Tc、⁶⁷Ga、¹¹¹In、和²⁰¹Tl的那些成像剂可用于SPECT成像,包括Gd³⁺、Mn³⁺、Mn²⁺、Fe³⁺、Ce³⁺、Pr³⁺、Nd³⁺、Eu³⁺、Eu²⁺、Tb³⁺、Dy³⁺、Er³⁺、Ho³⁺、Tm³⁺、Yb³⁺、Cr³⁺的那些成像剂可用于MRI)。

[0128] 在一些实施方式中,PET和SPECT成像剂导致纤维化组织或肿瘤比相邻组织有更高的活性(信号强度)。在一些实施方式中,目标组织或器官获取的图像与参照值比较。对于PET,可获得标准化的摄取值(SUV),并且之前确定的值将指示纤维化。

[0129] 对于MRI,与在注射探针之前获取的图像中的信号相比,本发明的合适化合物(例

如,式(1)和/或(1a)的化合物)可改变MR1信号。纤维化区在信号强度上可能有更大的变化(在T1-加权的图像上更高的信号强度,在T2-加权的图像上更低的信号强度)。纤维化和相邻组织之间的对比可能更高(纤维化组织中的信号和相邻信号中的信号之间的差异)。或者,可在注射探针之后测量弛豫时间T1或T2的变化。比特定值大的弛豫速率($1/T1$ 或 $1/T2$)变化将指示纤维化。在一些实施方式中,该方法可包括(a)在给予式(1)和/或(1a)的化合物后约1至约10分钟时获取哺乳动物的组织的T1-加权图像。在这些实施方式中,该方法还可包括(b)在给予式(1)和/或(1a)的化合物后约10至约2小时时获取哺乳动物的组织的第二T1-加权图像;并且评价步骤(a)和(b)中获取的图像之间的差异,其中与纤维化病变相比,非纤维化病变显示出从步骤(a)中获取的图像至步骤(b)中获取的图像增强的更大损失。

[0130] 不希望受到理论限制,赖氨酰氧化酶(LOX)和赖氨酰氧化酶样酶(LOXL-n)被认为将胶原蛋白和弹性蛋白底物中的肽基赖氨酸氧化成 α -氨基己二酸- δ -半醛的残基。肽基醛然后可与未反应的 ϵ -氨基和相邻的醛官能团发生自发缩合,由此形成共价交联,其将弹性蛋白和胶原蛋白转化成不溶性纤维。不希望受到理论限制,式(1)和/或(1a)的化合物(例如,其中 R_1 和 R_2 各自是H的那些)可与由LOX在胶原蛋白上的作用生成的肽基醛发生反应以将该化合物附连至该胶原蛋白。不希望受到理论限制,式(1)和/或(1a)的化合物中的显像基团(即,形成金属络合物的环状结构)被认为可随后用于生成具有增强的MR信号的MR图像。

[0131] 在一些实施方式中,式(1)和/或(1a)的化合物可以与常规MR1诊断组合物相同的方式使用,并且可用于对器官的胞外基质组分成像。例如,向患者(例如,哺乳动物如人)给予式(1)和/或(1a)的化合物并且获得患者的MR图像。通常,临床医师将获取具有由试剂靶向的胞外基质组分的区域的图像。例如,临床医师可获取心、肺、肝、肾、或其他器官或组织类型的图像,其中式(1)和/或(1a)的化合物靶向疾病状态中异常胶原蛋白或弹性蛋白累积的位置或胶原蛋白。临床医师可在给予式(1)和/或(1a)的化合物之前、期间或之后获取一个或多个图像。已经描述了使用MR1诊断组合物的其他技术,例如,美国申请公开号2008/0044360和2013/0309170。

[0132] 为了实践本文所公开的方法,可胃肠道外、口服、经鼻、直肠、局部、或口颊给予具有一种或多种上述式(1)和/或(1a)的化合物的组合物。本文所用术语“胃肠道外”是指皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、或颅内注射,以及任意合适的输注技术。

[0133] 无菌注射组合物可以是在胃肠道外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的溶液或混悬液,例如,在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的运载体和溶剂是甘露醇、水、林格溶液和等张氯化钠溶液。此外,通常采用非挥发油作为溶剂或悬浮介质(例如,合成甘油单酯或甘油二酯)。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂,天然药学上可接受的油,如橄榄油或蓖麻油,尤其是其聚氧乙烯化形式也可用于制备注射剂。这些油溶液或混悬液也可含有长链醇稀释剂或分散剂、羧甲基纤维素或相似的分散试剂。其他常用的表面活性剂如在药学上可接受的固体、液体或其他剂型中常用的吐温或司盘或其他类似乳化剂或生物利用度增强剂也可用于配制目的。

[0134] 用于口服概要的组合物可以是任意口服可接受的剂型,包括胶囊、片剂、乳液和水性混悬液、分散体、和溶液。在片剂的情况中,常用的运载体包括乳糖和玉米淀粉。一般还加入润滑剂,如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服给药,可用的稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀

粉。当口服给予水性混悬液或乳液时,活性成分可与乳化剂或混悬剂一起在油相中悬浮或溶解。如果需要,可加入某些甜味剂、风味剂或着色剂。

[0135] 可按照药物配制领域熟知的技术制备鼻气溶胶或吸入组合物。例如,这类组合物可采用苯甲醇或其他合适的防腐剂,吸收促进剂以增强生物可及性,碳氟化合物、和/或其他本领域已知的增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。也可以用于直肠给药的栓剂形式给予具有一种或多种上述式(1)和/或(1a)的化合物的组合物。

[0136] 药物组合物中的运载体必须就与该组合物的活性成分相容并且对待治疗的对象无害而言是“可接受的”。一种或多种增溶剂可用作递送本发明的化合物的药物赋形剂。其他运载体的示例包括氧化硅胶体、硬脂酸镁、纤维素、月桂基硫酸钠、和D&C Yellow#10。

[0137] 上述式(1)和/或(1a)的化合物可通过体内试验初步筛选其在疾病诊断中功效(参见下文实施例3)。其它方法对于本领域技术人员也是显而易见的。

[0138] 本文引用的所有公开文件(例如,专利、专利申请公开和文献)的内容通过引用全文纳入本文。

[0139] 实施例

[0140] 以下实施例是说明性的而非旨在限制。

[0141] 实施例1:化合物1:2-(R)-2-(4,7,10-三-羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-酰肼钆络合物的制备

[0142] 一般过程

[0143] 探针合成

[0144] 如之前所述获得2-(R)-2-(4,7,10-三-羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(tBuDOTAGA)(Levy等,Organic Process Research and Development,2009,13(3),535)。所有其他反应物和试剂是商品级并且在没有进一步纯化下使用。

[0145] NMR

[0146] 在装备了5mm宽带探针的Varian 500NMR系统上记录NMR谱(^1H NMR:499.81MHz, ^{13}C :125.68MHz, ^{31}P :207.33MHz)。

[0147] 制备型HPLC

[0148] 使用以下方法进行制备。合并含有纯度>95%的产物的部分:

[0149] 方法1:柱:MetaChem Rechnologies公司,Polaris C18-A 10 μm 250 $\times$ 212mm,流速:25ml/分钟,溶剂A:水中0.1%TFA,B:MeCN中0.1%TFA,5%B持续5分钟,在1分钟内梯度升至30%B,之后在10分钟内梯度升至55%,在1分钟内梯度升至100%B,平稳状态持续2分钟并且再平衡持续6分钟。

[0150] 方法2:柱:Restek,UltraAqueous C18,5 μm 250 $\times$ 10mm,流速:5ml/分钟,溶剂A:水中NH₄OAc(10mM,pH 6.9),B:MeCN/NH₄OAc(10mM,pH 6.9)9:1中0.1%TFA,2%B持续4分钟,在11分钟内梯度升至72%B,之后在1分钟内梯度升至95%B,平稳状态持续2分钟并且再平衡持续2分钟。

[0151] HPLC-MS

[0152] 使用以下方法在安捷伦1100系统上进行HPLC-MS纯度分析:

[0153] 方法A:柱:Phenomenex Luna,C18(2),100 $\times$ 2mm,流速:0.8ml/分钟,220、254和

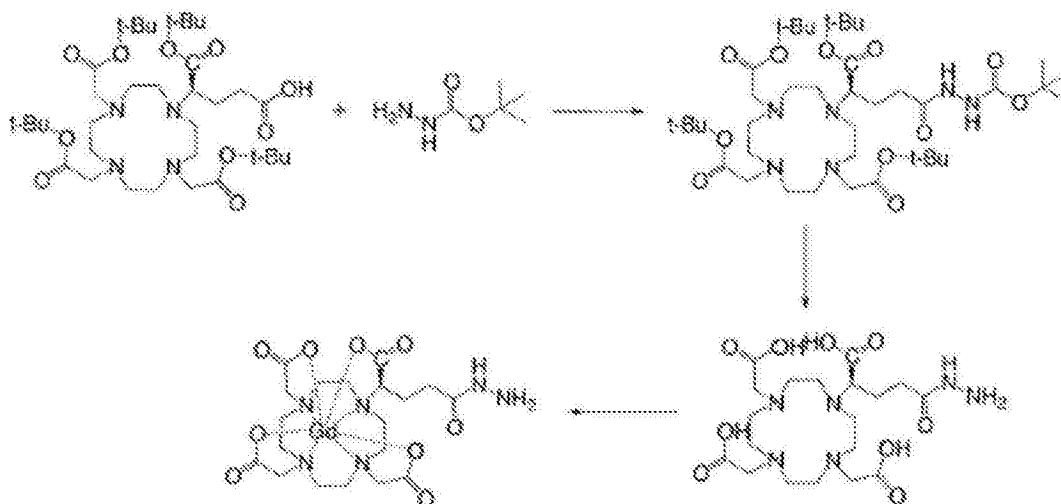
280nm处的紫外检测,在0.1%甲酸中5%的MeCN(0.1%甲酸)持续1分钟,然后在9分钟内梯度升至95%MeCN(0.1%甲酸),平稳状态持续2分钟,再平衡持续2分钟。

[0154] 方法B:柱:Restek,UltraAqueous C18,5 μ m 250 $\times$ 4.6mm,流速:0.8ml/分钟,220、254和280nm处的紫外检测,甲酸铵中5%的MeCN/NH₄OAc(10mM,pH 6.9)9:1持续1分钟,然后在9分钟内梯度升至95%MeCN/NH₄OAc(10mM,pH 6.9)9:1,平稳状态持续2分钟,再平衡持续2分钟。

[0155] 紫外滴定

[0156] 在1.5mL石英比色皿中放置10 μ L配体溶液和1mL偶氮砷III溶液(0.15M NH₄OAc缓冲液中10 μ M偶氮砷III,pH 7)。比色皿放入UV/Vis分光光度计并在656nm处归零。10 μ L的4.85mM Pb(NO₃)₂溶液(或接近终点的0.485mM溶液)的等分在比色皿中滴定直至观察到正吸收。正吸收代表滴定终点。

[0157] 化合物1的制备方法



[0158]

[0159] 2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-N'-叔丁氧基羰基-N-酰肼

[0160] 在干DMF(25ml)中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(500mg,713 μ mol)和0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU,325mg,856 μ mol)。5分钟后,加入固体叔丁基-氨基脲(113mg,856 μ mol)并且持续搅拌24小时。在溶剂蒸发之后,使用方法1纯化残留物得到574mg(704 μ mol,98.7%)的白色固体产物。

[0161] ¹H NMR(DMSO-d₆,90 $^{\circ}$ C):9.27(br s,1H),8.21(br s,1H),3.72-3.81(m,4H),3.47-3.56(m,3H),3.07-3.14(m,8H),2.90-2.93(m,8H),2.21(m,2H),1.87-1.95(m,2H),1.46,1.44,1.40(3s,45H).LC:方法A, t_R=2.55分钟.LC/MS(ESI⁺):C₄₀H₇₄N₆O₁₁:m/z(%):计算值815.54[MH⁺];发现:815.45(MH⁺)。

[0162] 2-(R)-2-(4,7,10-三-羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-酰肼

[0163] 在TFA(1.5ml)、三异丙基硅烷(90 μ l)和1-十二硫醇(90 μ l)的混合物中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-N'-叔丁氧基羰基-N-酰肼(100mg,123 μ mol)。反应混合物在室温下搅拌过夜。真空中去除挥发物并且残留物在半浓缩的HCl中重新溶解。在室温下搅拌溶液3小时后,冻干溶液。残留物重新溶解于水

中并且使用氢氧化铵将pH调节至7。冻干后,固体在水(2.00ml)中重新溶解并且经过使用偶氮砷111的紫外滴定(参见上文)以确定配体的浓度(36mM,72 μ mol,58.5%)。

[0164] ^1H NMR(D_2O ,80 $^\circ\text{C}$,pH9):4.35(d,J=16.7Hz,2H),4.24(d,J=16.7Hz,2H),3.78-4.14(m,17H),3.65(br s,2H),2.95(br s,2H),2.61(br s,1H),2.47(br s,1H)。

[0165] LC:方法B, t_{R} =2.51分钟.LC/MS(ESI+): $\text{C}_{40}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_{11}$:m/z(%):计算值491.51[MH^+];发现:491.35(MH^+)。

[0166] 2-(R)-2-(4,7,10-三-羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-酰肼钆络合物(化合物1)

[0167] 用 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (27.0mg,72.6 μ mol)处理上述获得的2-(R)-2-(4,7,10-三-羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二碳-1-基)-戊二酸-1-酰肼的母液并且将溶液的pH调至6.2。在搅拌溶液1小时后,加入MS-325配体(55mg,73.0 μ mol)并且混合物的pH维持在4-8。1小时后,将pH调至7并冻干溶液。残留物溶解于方法2中使用的水性洗脱剂中并且使用该方法纯化以在冻干后产生30.0mg(46.5 μ mol,64.1%)的标题化合物。偶氮砷111和二甲酚橙测试都是阴性,证明没有非螯合的Gd(III)。

[0168] LC:方法B, t_{R} =3.73分钟.LC/MS(ESI+): $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{GdN}_6\text{O}_9$:m/z(%):计算值646.13[MH^+];发现:646.20(MH^+)。

[0169] 实施例2:化合物2:(R)-2,2',2''-(10-(1-羧基-4-(2,2-二甲基胍基)-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸钆络合物的制备

[0170] 一般过程

[0171] 制备型HPLC

[0172] 使用以下方法进行制备。合并含有纯度>95%的产物的部分:

[0173] 方法1:柱:Phenomenex Luna,C18(2)10 μ m 250 $\times$ 21.2mm,流速:18ml/分钟,溶剂A:水中0.1%TFA,B:MeCN中0.1%TFA,5%B持续5分钟,在1分钟内梯度升至30%B,之后在10分钟内梯度升至75%,在1分钟内梯度升至100%B,平稳状态持续2分钟并且再平衡持续6分钟。

[0174] 方法2:柱:Restek,UltraAqueous C18,5 μ m 250 $\times$ 10mm,流速:4ml/分钟,溶剂A:水中0.1%TFA,B:MeCN中0.1%TFA,2%B持续4分钟,在11分钟内梯度升至72%B,之后在1分钟内梯度升至95%B,平稳状态持续2分钟并且再平衡持续2分钟。

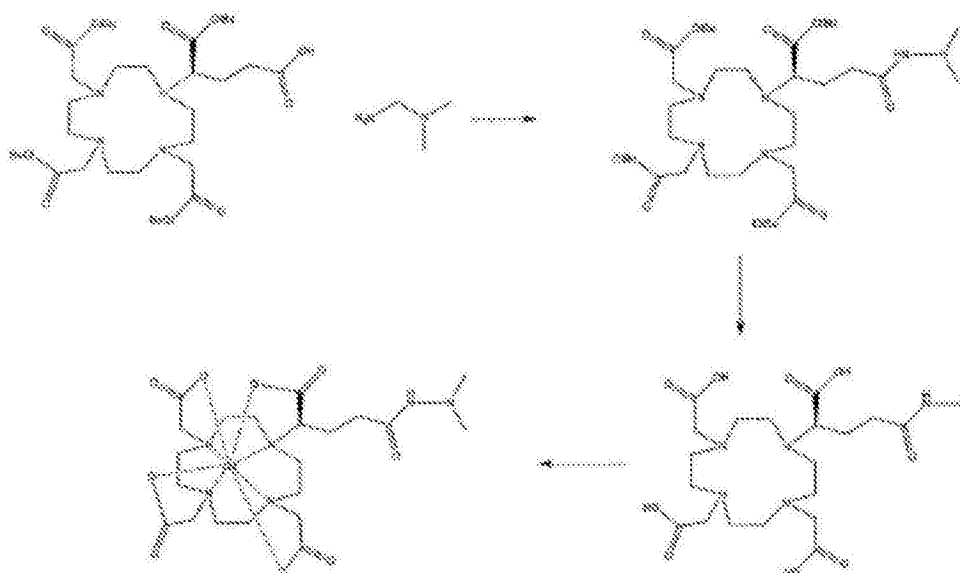
[0175] HPLC-MS

[0176] 使用以下方法在安捷伦1100系统上进行HPLC-MS纯度分析:

[0177] 方法A:柱:Phenomenex Luna,C18(2),100 $\times$ 2mm,流速:0.8ml/分钟,220、254和280nm处的紫外检测,在0.1%甲酸中5%的MeCN(0.1%甲酸)持续1分钟,然后在9分钟内梯度升至95%MeCN(0.1%甲酸),平稳状态持续2分钟并且再平衡持续2分钟。

[0178] 方法B:柱:Restek,UltraAqueous C18,5 μ m 250 $\times$ 4.6mm,流速:0.8ml/分钟,220、254和280nm处的紫外检测,甲酸铵中5%的MeCN/ NH_4OAc (10mM,pH 6.9)9:1持续1分钟,然后在9分钟内梯度升至95%MeCN/ NH_4OAc (10mM,pH 6.9)9:1,平稳状态持续2分钟,再平衡持续2分钟。

[0179] 化合物2的制备方法



[0180]

[0181] (R)-2,2',2''-(10-(1-(叔丁氧基)-5-(2,2-二甲基胍基)-1,5-二氧代戊-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯

[0182] 在二氯甲烷(25mL)中溶解(R)-5-(叔丁氧基)-5-氧代-4-(4,7,10-三(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)戊酸(500mg, 713 μ mol)和N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)(116mg, 927 μ mol)。5分钟后,加入N,N-二甲基甲烷二胺(70.5 μ l, 927 μ mol)并且持续搅拌24小时。在溶剂蒸发之后,使用方法1纯化残留物得到350mg(471 μ mol, 66%)的白色固体产物。

[0183] LC/MS:方法A, t_R =5.05分钟.LC/MS(ESI+):C₃₇H₇₀N₆O₉:m/z(%):计算值743.99[MH⁺];发现:743.5(MH⁺)。

[0184] (R)-2,2',2''-(10-(1-羧基-4-(2,2-二甲基胍基)-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸

[0185] 在TFA(9mL)、三异丙基硅烷(200 μ l)、1-十二硫醇(200 μ l)、水(200 μ l)和甲磺酸(200 μ l)的混合物中溶解(R)-5-(叔丁氧基)-5-氧代-4-(4,7,10-三(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)戊酸(350mg, 471 μ mol)。室温下搅拌该混合物2小时。LC/MS显示完全反应。真空中去除挥发物并且残留物在5mL的1.0M HCl中重新溶解。在室温下搅拌溶液3小时后,冻干溶液,留下177.2mg的白色固体。

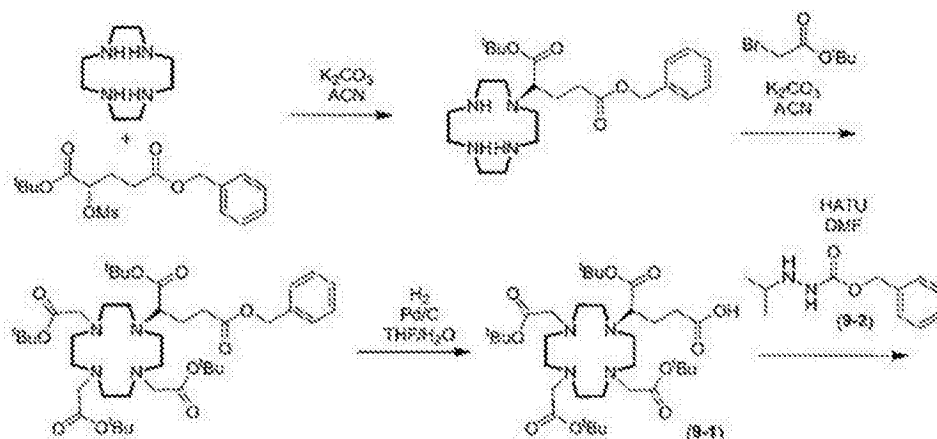
[0186] LC/MS:方法A, t_R =0.6分钟.LC/MS(ESI+):C₂₁H₃₈N₆O₉:m/z(%):计算值519.56[MH⁺];发现:519.2(MH⁺)。

[0187] (R)-2,2',2''-(10-(1-羧基-4-(2,2-二甲基胍基)-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸钆络合物(化合物2)

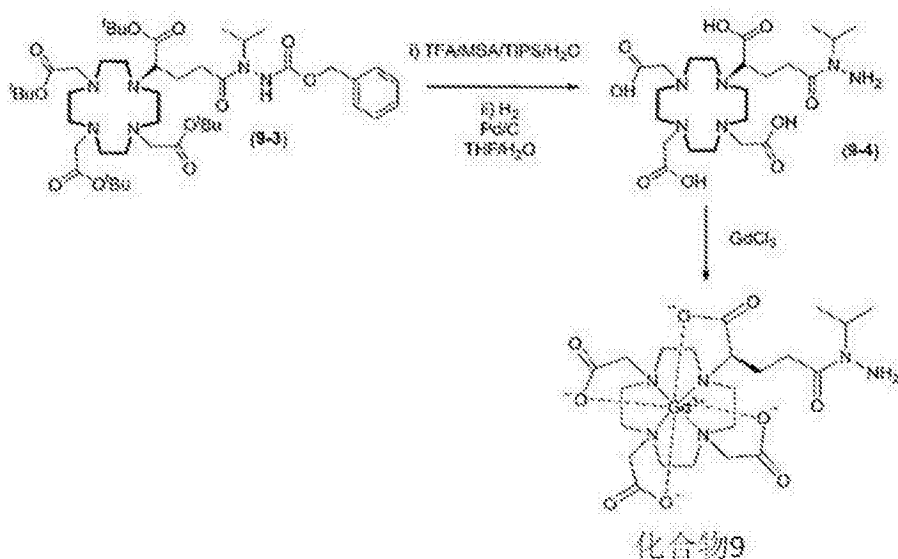
[0188] 在水(10mL)中溶解(R)-2,2',2''-(10-(1-羧基-4-(2,2-二甲基胍基)-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(50mg, 96 μ mol)并且用0.1N NaOH将溶液的pH调至7。用GdCl₃·6H₂O(35.0mg, 92.2 μ mol)处理溶液并且pH调至6。在搅拌溶液1小时后,加入EDTA(2mL, 10mM)并且将pH维持在4-8。1小时后,将pH调至7并且将溶液加载到HPLC上用于使用方法2纯化以在冻干后得到14mg(20.8 μ mol, 21.6%)的标题化合物。

[0189] LC:方法B, t_R =4.5分钟.LC/MS(ESI+):C₂₁H₃₄GdN₆O₉:m/z(%):计算值674.78[MH⁺];发现:675.0(MH⁺)。

[0190] 实施例3:化合物9(2,2',2''-(10-(4-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基胍基)-1-羧基-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸钆)的制备



[0191]



化合物9

[0192] 按照文献方案(Org.Process Res.Dev., 2009, 13, 535-542; ChemMedChem., 2013, 8, 1314-1321)制备2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(9-1)和2-异丙基胍-1-羧酸苄基酯(9-2)。

[0193] 2,2',2''-(10-(5-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基胍基)-1-(叔丁氧基)-1,5-二氧代戊-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(9-3)

[0194] 在干DMF(10mL)中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(9-1)(0.272g, 0.38mmol)和O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HATU, 0.162g, 0.43mmol)。在5分钟后,加入2-异丙基胍-1-羧酸苄基酯(9-2)(0.161g, 0.77mmol)并且持续搅拌24小时。蒸发溶剂并且通过制备型HPLC纯化残留物以产生102mg(0.115mmol, 30%)的白色固体产物。

[0195] ^1H (d_6 -DMSO): δ = 7.37(m, 5H), 5.13(s, 2H), 4.52(br. s, 1H), 3.80(m, 4H), 3.45(m, 3H), 3.12-2.92(m, 16H), 2.28(m, 2H), 1.92(m, 2H), 1.51(m, 36H), 1.04(d, 6H)

[0196] LC/MS(ESI+): $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{11}$: m/z (%) 计算值891.58[MH⁺]; 发现891.5(MH⁺)。

[0197] 2,2',2''-(10-(4-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基胍基)-1-羧基-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(9-4)

[0198] 在TFA(5mL)、三异丙基硅烷(900 μ L)和水(900 μ L)的混合物中溶解2,2',2''-(10-(5-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基肼基)-1-(叔丁氧基)-1,5-二氧代戊-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(9-3)(40mg,44.9 μ mol)并且在室温下该混合物搅拌过夜。真空中去除挥发物并且在水中重新溶解残留物并使用氢氧化铵将pH调至7。在冻干后,向无水甲醇(5mL)中碳载钯浆液(干重,1.9mg,10质量%)加入残留物。混合物经过2次真空和氢气吹扫循环,然后在氢气氛围下搅拌12小时。在排除氢气系统之后,加入硅藻土并且浆液过滤通过MeOH-润湿的硅藻土床。滤液真空浓缩并且固体在水中重新溶解并经过使用偶氮砷111的紫外滴定以确定配体浓度(7.67mg,14.4 μ mol,8.6mM)。

[0199] 步骤i)LC/MS(ESI+):C₃₀H₄₆N₆O₁₁:m/z计算值667.33[MH⁺];发现667.4(MH⁺)

[0200] 步骤ii)LC/MS(ESI+):C₂₂H₄₀N₆O₉:m/z计算值533.29[MH⁺];发现533.3(MH⁺)

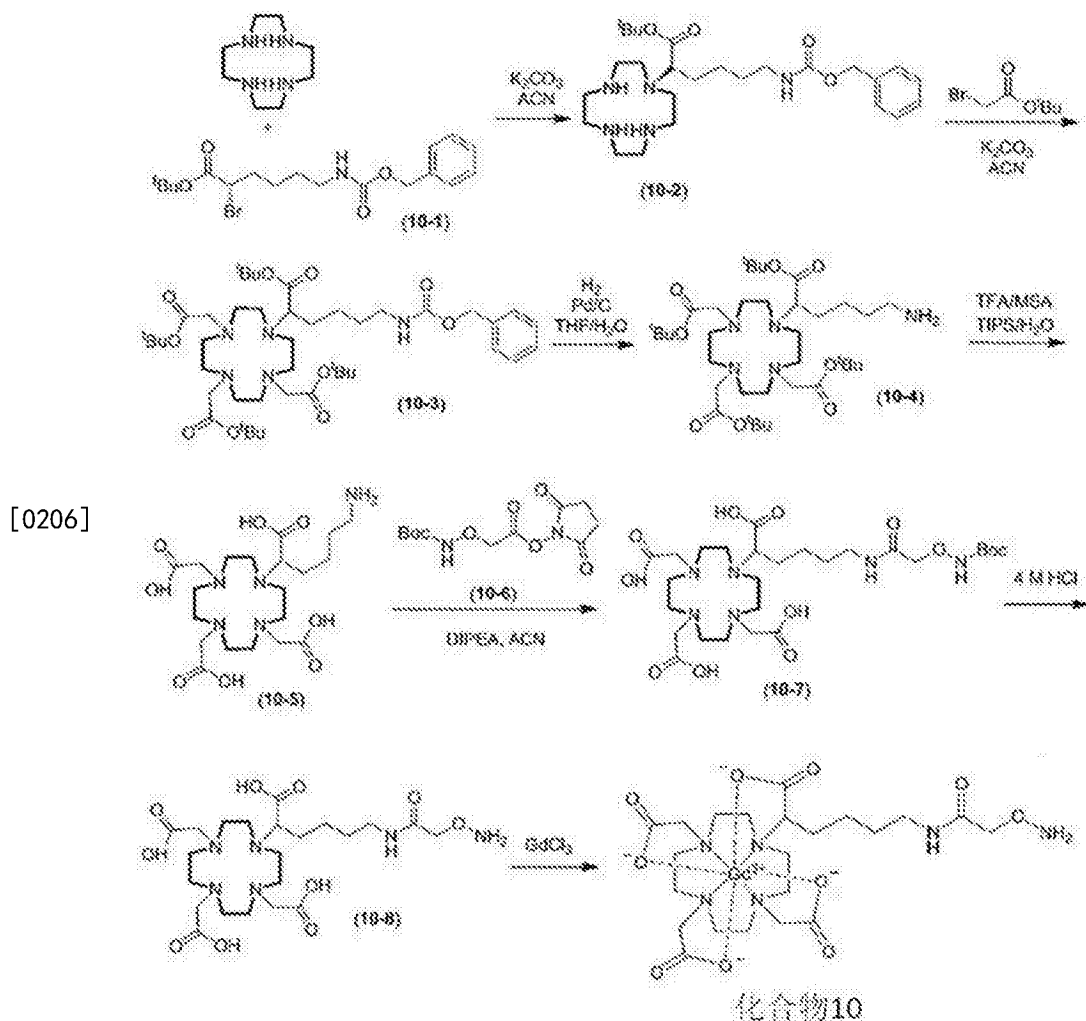
[0201] 2,2',2''-(10-(4-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基肼基)-1-羧基-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸钆络合物(化合物9)

[0202] 用GdCl₃·6H₂O(5.45mg,14.66 μ mol)处理2,2',2''-(10-(4-(2-((苄氧基)羰基)-1-异丙基肼基)-1-羧基-4-氧代丁基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸的母液并且pH调至6.8。在12小时搅拌后,加入Na₂H₂EDTA(0.27mg,0.72 μ mol)并且另外搅拌溶液2小时。pH调至7并且通过制备型HPLC纯化溶液以产生产物(4.7mg,6.85 μ mol,48%)。偶氮砷111和二甲酚橙测试都是阴性,证明没有非螯合的Gd(III)。

[0203] LC/MS(ESI+):C₂₂H₃₆GdN₆O₉:m/z计算值687.19[MH⁺];发现687.1(MH⁺)

[0204] 实施例4:化合物10(2,2',2''-(10-(5-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)-1-羧基戊基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸钆)的制备

[0205] 按照文献方案(PCT国际申请号2006002873,2006;J.Org.Chem.,2008,73,983-991)制备化合物6-(((苄氧基)羰基)氨基)-2-溴己酸叔丁酯(10-1)和2-(((叔丁氧基羰基)氨基)氧基)乙酸2,5-二氧代吡咯啉-1-基酯(10-6)。



[0207] 6-(((苄氧基)羰基)氨基)-2-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)己酸叔丁酯(10-2)

[0208] 在乙腈(25mL)中溶解四氮杂环十二烷(0.842g, 4.89mmol)和三乙胺(1.136mL, 8.13mmol)。向该溶液中加入6-(((苄氧基)羰基)氨基)-2-溴己酸叔丁酯(10-1)(0.650g, 1.63mmol)并且随时通过LC/MS跟踪起始物质消耗。在6小时后,蒸发溶剂并且通过制备型HPLC纯化残留物以产生0.731g(1.49mmol, 91%)的白色固体产物:¹H NMR(CDCl₃): δ7.96(br.s, 4H), 7.28(m, 5H), 5.37(br.s, 1H), 5.06(s, 2H), 3.28-2.88(m, 18H), 1.61(m, 2H), 1.56-1.41(m, 15H); ¹³C NMR(CDCl₃): δ172.1, 156.7, 136.7, 128.5, 128.0, 127.6, 83.0, 66.4, 63.2, 47.0, 44.6, 43.3, 42.4, 40.4, 29.3, 28.4, 27.9, 24.1; LC/MS(ESI⁺): C₂₆H₄₅N₅O₄: m/z 计算值492.35[MH⁺];发现492.4(MH⁺)。

[0209] 2,2',2''-(10-(6-(((苄氧基)羰基)氨基)-1-(叔丁氧基)-1-氧代己-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(10-3)

[0210] 在干乙腈(20mL)中溶解6-(((苄氧基)羰基)氨基)-2-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)己酸叔丁酯(10-2)(0.955g,1.94mmol)和碳酸钾(2.685g,19.4mmol)。逐滴加入溶解在干乙腈(40mL)中的2-溴乙酸叔丁酯(1.100g,5.64mmol)并随时通过LC/MS跟踪起始物质的消耗。在6小时后,蒸发溶剂并且通过制备型HPLC纯化残留物以产生1.491g(0.179mmol,92%)的白色固体产物:LC/MS(ES1+): $C_{44}H_{75}N_5O_{10}$:m/z 计算值834.56[MH⁺];发

现835.5(MH⁺).

[0211] 2,2',2''-(10-(6-氨基-1-(叔丁氧基)-1-氧代己-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(10-4)

[0212] 向无水甲醇(15mL)中的碳载钯(干重,61.3mg,10重量%)浆液中加入2,2',2''-(10-(6-(((苄氧基)羰基)氨基)-1-(叔丁氧基)-1-氧代己-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(10-3)(1.200g,1.44mmol)。混合物经过2次真空和氢气吹扫循环,然后在氢气氛围下搅拌12小时。在排除氢气系统之后,加入硅藻土并且浆液过滤通过MeOH-润湿的硅藻土床。滤液在真空中浓缩成淡黄色油以产生0.896g(1.28mmol,89%)产物,其在下一步骤中使用而不需要进一步纯化:LC/MS(ESI⁺):C₃₆H₆₉N₅O₈:m/z计算值700.52[MH⁺];发现700.7(MH⁺).

[0213] 2,2',2''-(10-(5-氨基-1-羧基戊基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-5)

[0214] 在TFA(5mL)、三异丙基硅烷(900μL)和水(900μL)的混合物中溶解2,2',2''-(10-(6-氨基-1-(叔丁氧基)-1-氧代己-2-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸三叔丁酯(10-4)(0.896g,1.28mmol)并且在室温下该混合物搅拌过夜。真空去除挥发物以产生油0.572g(1.20mmol,94%),其用于下一步骤而不需要进一步纯化:LC/MS(ESI⁺):C₂₀H₃₇N₅O₈:m/z计算值476.27[MH⁺];发现476.5(MH⁺).

[0215] 2,2',2''-(10-(14-羧基-2,2-二甲基-4,8-二氧代-3,6-二氧杂-5,9-二氮杂十四烷-14-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-7)

[0216] 在干燥DMF(10mL)中溶解2,2',2''-(10-(5-氨基-1-羧基戊基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-5)(0.572g,1.20mmol)和二异丙基乙胺(1.05mL,1.26mmol)。在5分钟后,加入2-(((叔丁氧基羰基)氨基)氧基)乙酸2,5-二氧代吡咯啉-1-基酯(10-6)(0.416g,1.44mmol)并且持续搅拌24小时。蒸发溶剂并且通过制备型HPLC纯化残留物以产生0.652g(1.00mmol,84%)的白色固体产物:¹H NMR(d₆-DMSO):δ4.15(s,2H),3.79(m,4H),3.61(m,2H),3.56(dd,1H),3.20-2.93(m,18H),1.76(m,1H),1.60(m,1H),1.56-1.38(m,13H);LC/MS(ESI⁺):C₂₇H₄₈N₆O₁₂:m/z计算值649.34[MH⁺],发现649.6(MH⁺).

[0217] 2,2',2''-(10-(5-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)-1-羧基戊基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-8)

[0218] 在二噁烷(4mL)中的4M HCl中溶解2,2',2''-(10-(14-羧基-2,2-二甲基-4,8-二氧代-3,6-二氧杂-5,9-二氮杂十四烷-14-基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-7)(50.0mg,77.1μmol)并且在室温下搅拌过夜。真空去除挥发性物质。残留物重新溶解于水中并且使用氢氧化铵将pH调节至7。冻干后,固体在水中重新溶解并经过使用偶氮砷III的紫外滴定以确定配体浓度(23.5mg,42.4μmol,43mM)。

[0219] LC/MS:C₂₂H₄₀N₆O₁₀:m/z计算值549.29[MH⁺];发现549.3(MH⁺)

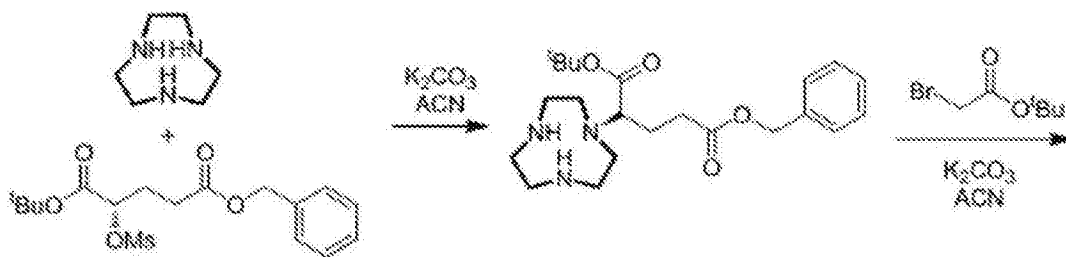
[0220] 化合物10

[0221] 用GdCl₃·6H₂O(16.1mg,43.3μmol)处理2,2',2''-(10-(5-(2-(氨基氧基)乙酰胺基)-1-羧基戊基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(10-8)(23.5mg,42.4μmol)的母液并且pH调至6.8。在12小时搅拌后,加入Na₂H₂EDTA(0.79mg,2.12μmol)并且另外搅拌溶液2小时。pH调至7并且通过制备型HPLC纯化溶液以产生产物(21.4mg,30.4μmol,

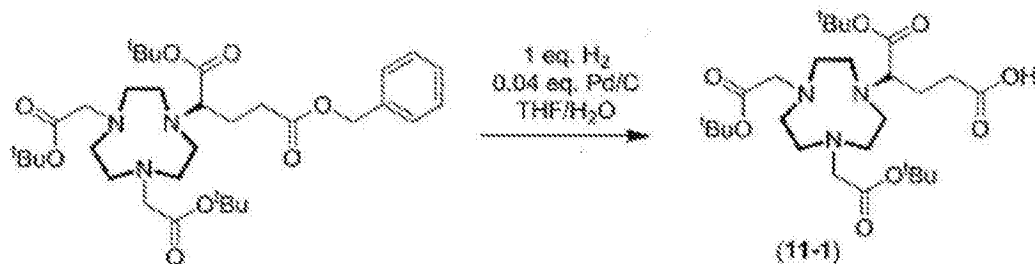
72%)。偶氮砷111和二甲酚橙测试都是阴性,证明没有非螯合的Gd(111)。

[0222] LC/MS(ES1+): $C_{22}H_{36}GdN_6O_{10}$:m/z计算值703.18[MH⁺];发现703.3(MH⁺)

[0223] 实施例5:NOTA化合物11-14的制备

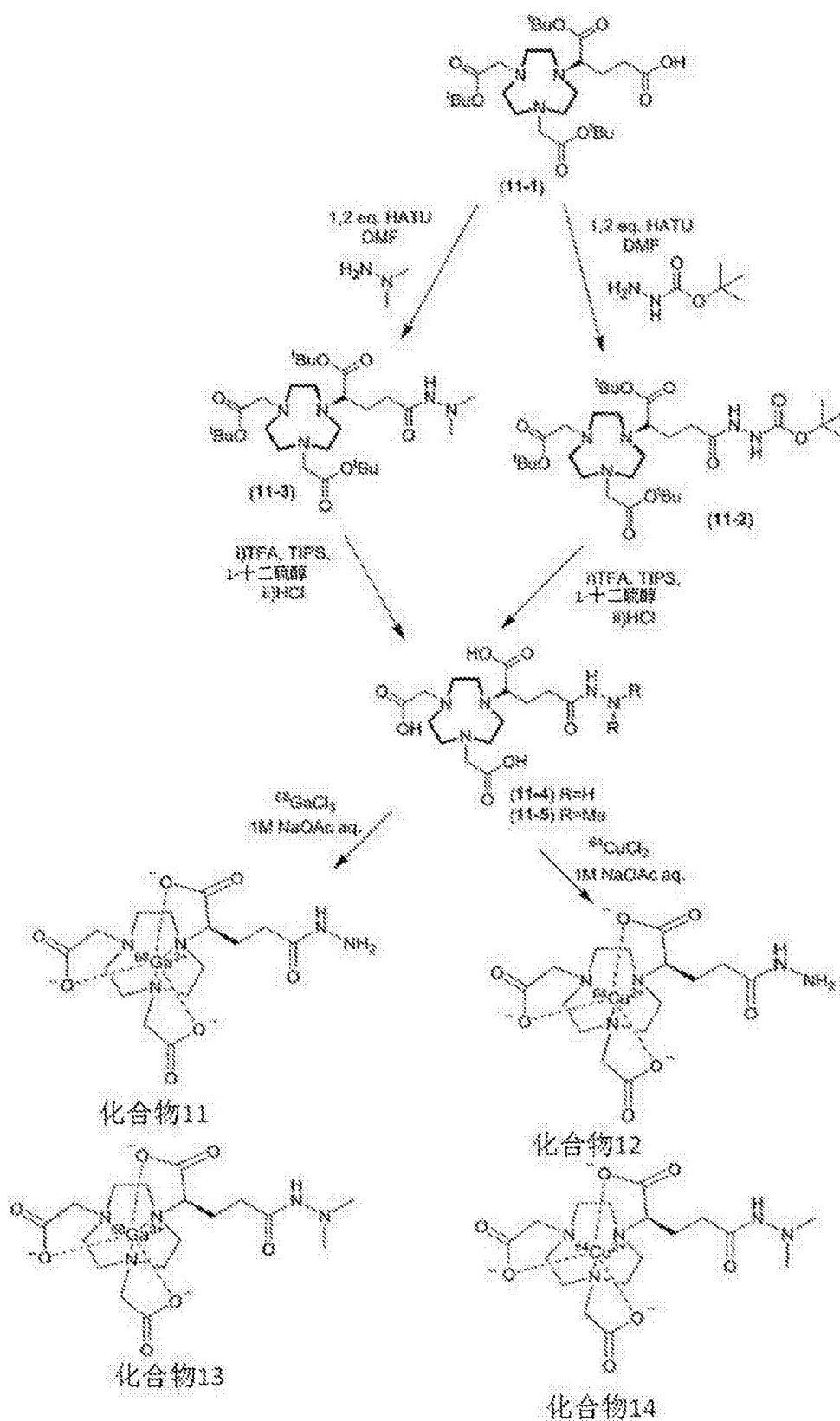


[0224]



[0225] 按照文献过程(Org.Process Res.Dev.,2009,13,535-542)制备2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(11-1)。

[0226]



[0227] 2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7-三氮杂壬烷-1-基)-戊二酸-1-N'-叔丁氧基羰基-N-酰肼(11-2)

[0228] 在干DMF(10ml)中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7-三氮杂壬烷-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(11-1)(152mg,280 μmol) and 0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-

四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HATU, 125.5mg, 330 μ mol)。5分钟后,加入固体叔丁基-氨基脒(43.6mg, 330 μ mol)并且持续搅拌24小时。蒸发溶剂并且通过反相制备型HPLC纯化残留物以产生39mg(59 μ mol, 21%)的白色固体产物。

[0229] LC/MS(ESI+): C₃₂H₆₀N₅O₉: m/z 计算值658.44[MH⁺]; 发现658.4

[0230] 2-(R)-2-(4,7,10-三羧甲基-1,4,7-三氮杂壬烷-1-基)-戊二酸-1-N'-叔丁氧基羰基-N-酰肼(11-4)

[0231] 在TFA(1.5ml)、三异丙基硅烷(90 μ l)和1-十二硫醇(90 μ l)的混合物中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7-三氮杂壬烷-1-基)-戊二酸-1-N'-叔丁氧基羰基-N-酰肼(11-2)(52mg, 79 μ mol)并且该室温下该混合物搅拌过夜。真空去除挥发物并且残留如在6M HCl中重新溶解。在温室下搅拌3小时后,冻干溶液。残留物重新溶解于水中并且使用氢氧化铵将pH调节至7。

[0232] ¹H(d₆-DMSO): δ =4.41(s, 4H), 4.14(dd, 1H), 3.76-3.54(m, 12H), 3.06(t, 2H), 1.05(ddt, 2H)

[0233] ¹³C(d₆-DMSO): δ =175.5, 173.6, 172.4, 64.2, 56.0, 51.8, 50.1, 46.5, 30.5, 24.3.

[0234] LC/MS(ESI+): C₁₅H₂₇N₅O₇: m/z 计算值390.20[MH⁺]; 发现390.1

[0235] 2,2'-(7-(1-(叔丁氧基)-5-(2,2-二甲基胍基)-1,5-二氧代戊-2-基)-1,4,7-三氮杂壬烷-1,4-二基)(S)-二乙酸二叔丁酯(11-3)

[0236] 在干DMF(10ml)中溶解2-(R)-2-(4,7,10-三叔丁基羧甲基-1,4,7-三氮杂壬烷-1-基)-戊二酸-1-叔丁酯(11-1)(152mg, 280 μ mol)和0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐(HATU, 125.5mg, 330 μ mol)。5分钟后,加入N,N-二甲基胍(19.8mg, 330 μ mol)并且持续搅拌24小时。蒸发溶剂并且通过反相制备型HPLC纯化残留物以产生0.123g(0.21mmol, 75%)的白色固体产物。

[0237] LC/MS(ESI+): C₂₉H₅₅N₅O₇: m/z 计算值586.42[MH⁺]; 发现586.6

[0238] (S)-2,2'-(7-(1-羧基-4-(2,2-二甲基胍基)-4-氧代丁基)-1,4,7-三氮杂壬烷-1,4-二基)二乙酸(11-5)

[0239] 在TFA(1.5mL)、三异丙基硅烷(90 μ L)和1-十二硫醇(90 μ l)的混合物中溶解2,2'-(7-(1-(叔丁氧基)-5-(2,2-二甲基胍基)-1,5-二氧代戊-2-基)-1,4,7-三氮杂壬烷-1,4-二基)(S)-二乙酸二叔丁酯(11-3)(80mg, 0.137mmol)并且在室温下该混合物搅拌过夜。真空去除挥发物并且残留如在6MHCl中重新溶解。在温室下搅拌3小时后,冻干溶液。残留物重新溶解于水中并且使用氢氧化铵将pH调节至7。冻干溶剂并且通过反相制备型HPLC纯化残留物以产生22.0mg(0.053mmol, 38%)的白色固体产物:

[0240] ¹H(d₆-DMSO): δ =4.35(s, 4H), 4.12(dd, 1H), 3.75-3.52(m, 18H), 3.04(t, 2H), 2.64(ddt, 2H)

[0241] LC/MS(ESI+): C₁₇H₃₂N₅O₇: m/z 计算值418.23[MH⁺]; 发现418.1

[0242] ⁶⁴Cu-标记的偶联物:

[0243] 乙酸钠缓冲液(1M, pH 4.5)中1mCi的⁶⁴CuCl₂加入含10 μ g化合物1-4的小瓶中并且在室温下标记20分钟。通过在酸性条件下Restek Ultraaqueous C18柱(250mm x 3mm x 5 μ m)上的RP-HPLC评价放射化学纯度(溶剂A: H₂O+0.1% TFA, 溶剂B: MeCN+0.1% TFA; 0-10分钟, 0-20%B; 10-15分钟, 20-95%B; 15-17分钟, 95%B, 17-18分钟, 95-0%B; 18-20分钟, 0%

B)。

[0244] ^{64}Cu -NODAGA-Hyd(化合物12); R_t : 8.23分钟(76%)

[0245] ^{64}Ga -标记的偶联物:

[0246] 用0.5mL的HCl 6N洗脱 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器。洗脱液(15mCi)用0.2mL乙酸钠缓冲液(3M, pH 4.0)中和并且加入含10 μg 化合物11-4或化合物11-5的小瓶中。2种配体在60 $^{\circ}\text{C}$ 下标记15分钟。

[0247] 通过在酸性条件下Restek Ultraaqueous C18柱(250mm x 3mm x 5 μm)上的RP-HPLC评价放射化学纯度(溶剂A: H_2O +0.1% TFA, 溶剂B: MeCN+0.1% TFA; 0-10分钟, 0-20%B; 10-15分钟, 20-95%B; 15-17分钟, 95%B, 17-18分钟, 95-0%B; 18-20分钟, 0%B)。

[0248] ^{68}Ga -NODAGA-Hyd(化合物11); R_t : 5.60分钟(73%)

[0249] ^{68}Ga -NODAGA-diMe(化合物13); R_t : 8.57分钟(100%)

[0250] 实施例6: 化合物与BSA的体外结合

[0251] 为了证明化合物1在生物环境中与醛官能度的选择性结合, 制备具有增强的醛官能度水平的牛血清白蛋白(BSA)并且测量了在与化合物1和化合物2孵育后 T_1 弛豫度变化的比较。

[0252] 向溶于磷酸盐缓冲盐水(2mL, pH 7.4, 0.25mM)的牛血清白蛋白中加入戊二醛溶液(100 μL , 水中25重量%溶液)并且在室温下搅拌5分钟。向该溶液中加入氰基硼氢化钠(25mg)并且溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜搅拌。平行运行不添加戊二醛的BSA蛋白质标准品作为对照。在PD-10Sephadex G25脱盐柱(GE医疗集团(GE healthcare))上纯化2种蛋白质混合物, 用水洗脱, 以去除过量的戊二醛。使用“BCA蛋白试验试剂盒”(热科学公司(Thermo Scientific))评估蛋白质浓度。戊二醛官能化的蛋白质(BSA-ALD)的浓度为20mg/mL, 而对照蛋白质(BSA)的浓度为18.4mg/mL。使用标准DNPH文献方案来估计各蛋白质的醛浓度。BSA-ALD的醛浓度为16nmol醛/mg蛋白质, BSA的醛浓度为1.2nmol醛/mg蛋白质。

[0253] 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下用一定浓度范围(0.1-1.0mM, 等同于1:1、2:1、3:1、4:1和5:1的[Gd]:[醛]比率的浓度)的化合物1或化合物2处理BSA(3mg, 163 μL)或BSA-ALD(3mg, 150 μL)的等分持续24小时, 所有样品维持总体积300 μL 。在24小时后, 在0.47T和37 $^{\circ}\text{C}$ 下使用Bruker mq20Minispec记录纵向(T_1)弛豫测量值。通过0.05x T_1 至10x T_1 范围持续时间的10次反转上的反转恢复实验获取纵向(T_1)弛豫。从5个浓度的Gd(III)的1/ T_1 对[Gd]的曲线的斜率确定弛豫度(r_1)。

[0254] 在测量后, 向各样品加入完全氰基硼氢化钠(10mg)以减少醛官能度并且不可逆地将探针结合至蛋白质。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下另外孵育2小时后, 再次测量所有样品的纵向(T_1)弛豫测量值。

[0255] 化合物1和化合物2的溶液(浓度范围: 0.1mM-1.0mM, 水中)不含蛋白质的平行运行作为对照。

[0256] 通过超滤(5,000Da截止PLCC纤维素膜)实现游离和任意BSA-结合的Gd探针的分离。在分离后, 测量蛋白质和游离溶液部分的纵向(T_1)弛豫测量值, 并且使用安捷伦88001CP-QQQ系统来确定各部分中的Gd含量的定量。

[0257] 图3A和3B中分别给出了化合物1和化合物2与BSA-ALD和BSA的弛豫度测量值及其相对于溶液(水)中化合物1和化合物2标准品的弛豫度的变化。在溶液中的化合物1

($4.07\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)与化合物1与BSA($4.17\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)测量的 T_1 弛豫度之间没有观察到统计学上显著的差异。观察到与BSA-ALD孵育的化合物1的 T_1 弛豫度相比溶液中的化合物1在统计学上显著增加($4.57\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)并且该增加在加入氰基硼氢化钠还原剂之后($5.59\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)显示出更大的统计学显著性。化合物2对BSA($4.20\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)或BSA-ALD($4.22\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)样品相对于标准化合物2溶液测量值($4.09\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 310K, pH 7)在弛豫度上没有看到统计学上显著的差异。

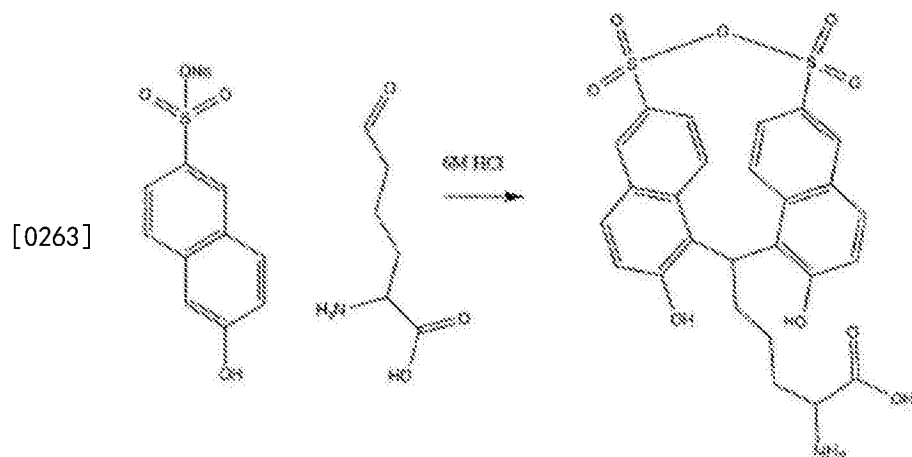
[0258] 在从游离溶液中分离后与各蛋白质部分结合的Gd的量示于图4A并且图4B显示总初始[Gd]浓度的百分比。对于化合物2,没有统计学上显著量的Gd显示与BSA或BSA-ALD结合。与BSA(0.24nmol, 总[Gd]的0.58%)相比,BSA-ALD(2.52nmol, 总[Gd]的5.72%)观察到与蛋白质结合的化合物1的10倍增加。在加入还原剂之后,与BSA-ALD结合的化合物1的量增加至6.78nmol(总[Gd]的16.63%)。

[0259] 蛋白质结合和游离溶液部分的纵向(T_1)弛豫测量值的比较显示,与溶液对照相比,对于蛋白质部分,化合物1显示出在弛豫时间上的显著增加(图5A),以及在游离溶液弛豫时间中的相关降低,支持增加的蛋白质结合。对于BSA-ALD或BSA,化合物2弛豫时间并不与标准品有显著差异。与溶液中化合物1的 $4.09\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (310K, pH 7)的弛豫度相比,分离后与BSA-ALD孵育的化合物1的蛋白质结合弛豫度为 $13.74\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (310K, pH 7)并且游离溶液弛豫度为 $4.02\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (310K, pH 7)(图5B)。

[0260] 醛赖氨酸定量

[0261] 为了使体内成像数据与醛赖氨酸浓度相关联,开发了HPLC分析方法来对肺组织中存在的醛赖氨酸的量进行定量。

[0262] 肺组织在2-萘酚-6-磺酸钠水合物存在下水解以形成2-氨基-5-(1²,3²-二羟基-4,4,6,6-四氧-5-氧杂-4,6-二噻-1,3(1,6)-二萘环己酚(dinaphthalenacyclohexaphane)-2-基)戊酸,一种醛赖氨酸的荧光衍生物,以允许通过HPLC进行检测和定量。



[0264] 在含2-萘酚-6-磺酸钠水合物(2%w/v)、荧光素(20 μL , 1mM)、肌氨酸(100 μL , 4mM)和己醛(50 μL , 8mM)的6M HCl(2mL)的溶液中对博来霉素处理的小鼠或对照小鼠的肺水解24小时。在110 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育24小时后,在通过HPLC分析之前,将溶液冷却至室温并且用6M NaOH(100 μL)中和等分(100 μL)并且用0.6M硼酸盐缓冲液(100 μL , pH9)缓冲。

[0265] HPLC方法

[0266] 溶剂A:含0.2mM EDTA和1mM MgCl_2 的0.5M磷酸盐缓冲液, pH6.5, 溶剂B:60%乙腈,

40%含0.2mM EDTA和1mM MgCl₂的0.5M磷酸盐缓冲液,pH6.5。

[0267] 方法:0-15分钟,100-82.5%A;15-18分钟,82.5-50%A;18-21分钟,50-0%A;21-28分钟,0%A;28-28.5分钟,0-100%A;28.5-35分钟,100%A。

[0268] 波长:0-16分钟, $\lambda_{\text{ex}}=285\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=313\text{nm}$;16-20分钟, $\lambda_{\text{ex}}=460\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=515\text{nm}$;20-35分钟, $\lambda_{\text{ex}}=285\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=313\text{nm}$

[0269] 保留时间:按照荧光素和己醛标准品来校正2-氨基-5-(1²,3²-二羟基-4,4,6,6-四氧-5-氧杂-4,6-二噻-1,3(1,6)-二萘环己酚-2-基)戊酸的峰面积(保留时间:14.1分钟)。包括己醛与2-萘酚-6-磺酸钠水合物形成1²,3²-二羟基-2-戊基-5-氧杂-4,6-二噻-1,3(1,7)-二萘环己酚4,4,6,6-四氧化物的反应作为反应对照(保留时间:26.9分钟)。

[0270] 在相同样品上进行羟脯氨酸HPLC试验以对各组织样品中存在的胶原蛋白的量进行定量以使醛赖氨酸浓度与胶原蛋白浓度相关联。

[0271] 与对照动物相比,在博来霉素处理的动物的肺中观察到多2.7倍的醛赖氨酸。这与胶原蛋白的水平增加相关联(博来霉素处理的动物91.7 μg /肺对比对照动物54.1 μg /肺)。

[0272] 实施例7:化合物1的生物分布

[0273] 为了测试化合物1是否在注射后保留在体内,用100 μmol /kg的化合物1静脉内注射正常A/J小鼠(n=3)。注射后24小时处死小鼠,并且组织被取出、称重、在硝酸中消化并且通过ICP-MS分析Gd含量。注射后24小时在各组织中保留的注射剂量的百分比如下:血液(0.00015 $\pm$ 0.00003)、肺(0.17 $\pm$ 0.08)、心脏(0.0052 $\pm$ 0.0015)、肝脏(0.31 $\pm$ 0.09)、脾(0.029 $\pm$ 0.009)、胃(0.0076 $\pm$ 0.0026)、小肠(0.0024 $\pm$ 0.0003)、肾(0.092 $\pm$ 0.018)、肌肉(0.068 $\pm$ 0.014,估计肌肉占体重的40%)。总之,这些组织中的残留Gd占注射剂量的不到0.7%,表明Gd-Hyd在静脉内注射后几乎完全消除。

[0274] 实施例8:纤维化的小鼠模型中的磁共振(MR)成像

[0275] 动物模型

[0276] 肝纤维化:通过每周三次口服灌胃持续18周向品系A/J雄性小鼠(缅因州巴港的杰克森实验室公司(Jackson Laboratories))给予0.1mL的橄榄油中40%CCl₄溶液(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma))来诱发纤维化。对照仅接受纯橄榄油。在最后一次注射后一周对动物成像以避免CCl₄的急性作用。

[0277] 肺纤维化:在10周龄的雄性C57/BL6小鼠中通过经气管给予PBS中的博来霉素(BM, 2.5U/kg)来引发肺纤维化。假对照动物仅接受PBS。

[0278] MR成像

[0279] 肝成像(CCl₄小鼠)

[0280] 在推注(尾静脉)注射探针(化合物1或化合物2)前后使用4.7T扫描仪通过T1-加权的成像对小鼠进行成像。使用DICOM viewer Osirix来进行图像可视化和定量。感兴趣区域(R01)置于整个肝截面上同时避开主要血管。分析了覆盖整个肝脏的轴向切片(>10切片/小鼠)。也通过单独的R01对各切片内的肌肉信号强度进行定量。为了评价噪音,测量动物外空气的R01并且获取该测量值的标准偏差。在注射前和后30分钟图像上进行相同的分析(3D FLASH顺序)。

[0281] 使用等式(1)计算对比噪音比(CNR)。S1=信号强度,SD=标准偏差,并且 Δ CNR是前和后图像之间的绝对差(2)。

[0282] $CNR = (S1_{\text{肝脏}} - S1_{\text{肌肉}}) / SD_{\text{空气}}$ (1)

[0283] $\Delta CNR = \{CNR_{\text{后}} - CNR_{\text{前}}\}$ (2)

[0284] 结果见图1A-1D。图1A显示向CCL4-处理的小鼠给予化合物1前后的经轴MR图像(1shak 5纤维化)。化合物1给药后的MR图像显示在肝脏中MR信号强度的强烈强化。在另一方面,在具有健康肝脏的年龄匹配的对照小鼠中几乎没有观察到强化。对照探针,化合物2,其为化合物1的甲基化形式,显示出相似的药代动力学,但是不与胶原蛋白中的肽基醛结合。图2B显示这种甲基化的对照,即化合物2几乎没有显示出纤维化肝脏的强化。图2C显示肝脏和骨骼肌之间MR对比的增加。仅在接受化合物1的纤维化小鼠,但不在具有健康肝脏的对照小鼠或接受对照探针化合物2的纤维化小鼠中看到大且显著的影响。图2D显示天狼星红染色确认纤维化小鼠中的晚期纤维化。

[0285] 肺成像(博来霉素处理的小鼠)

[0286] 在推注(尾静脉)注射探针(化合物1或化合物2)前后使用4.7T扫描仪通过T1-加权的成像对小鼠进行成像。针对呼吸运动门选图像。成像方案包括1)多层2D快速获取再聚焦回波(RARE)成像以描述解剖学;2)带呼吸门选的基线3D超短TE(UTE)顺序;3)基线3D快速小角度激发(FLASH)血管造影顺序;4)推注注射100 $\mu\text{mol/kg}$ 化合物1;5)3D FLASH顺序重复 5次;6)3D UTE顺序重复 3次。使用程序Osirix(www.osirix-viewer.com/)来分析图像。使用注射后3D FLASH图像来使肺部脉管系统可视化。将感兴趣区域(ROI)手工置于排除主要血管的肺组织上。一个ROI置于肺的左叶上,而另一个置于肺的右叶上。然后将ROI精确复制到UTE图像上以对探针强度进行定量。分析了覆盖整个肺的皮质切片(>10切片/小鼠)。也通过单独的ROI对各切片内的肌肉信号强度进行定量。这对探针前和探针后UTE图像进行。获得各切片的肺和肌肉中的信号强度(S1)。使用与动物相邻的空气中的信号强度的标准偏差(SD)来估计噪音。如上述等式(1)和(2)计算CNR和 ΔCNR 。

[0287] 结果见图2A-2F。获得2只小鼠的MR图像:一个在成像前10天气管内给予博来霉素以诱发肺纤维化,并且第二小鼠仅给予磷酸盐缓冲盐水(假对照)并且具有正常的肺结构。这些小鼠在基线处成像,然后注射化合物1并另外成像。图2A和2B分别显示患有肺纤维化的小鼠和假对照小鼠的MR图像。图2C和2D是在注射化合物1之前和之后立即拍摄的图像并且证明在2只小鼠中血液池中相似的强化。然而,随着时间推移,化合物1被正常小鼠清除(图2A),但是在纤维化组织中保留明显的MR图像信号强化(图2B)。对肺组织和相邻骨骼肌之间的对比变化(CNR)进行定量。图2E显示2只小鼠注射化合物1后1小时测量的CNR增加。对比在纤维化小鼠中高6倍。图2F显示组织学确认纤维化小鼠中存在纤维化。

[0288] 实施例9:在CCl₄处理6周或12周的小鼠中的磁共振成像

[0289] 动物模型

[0290] 通过每周三次口服灌胃持续6周(n=14)或12周(n=10)向品系A/J雄性小鼠(缅因州巴港的杰克森实验室公司(Jackson Laboratories))给予0.1ml的40%CCl₄溶液(密苏里州圣路易斯的西格玛公司(Sigma))来诱发不同阶段的纤维化。对照仅接受纯橄榄油(n=12)。

[0291] 在注射成像探针之前和之后立即对动物进行成像。成像后,处死动物并且取出肝脏用于组织病理学分析。

[0292] 用异氟烷(1-2%)麻醉动物并且置于专门设计的容器中,体温保持在37℃。尾静脉

插管用于静脉内(iv)递送造影剂同时将动物置于扫描仪中。在4.7T处使用带定制构造容积线圈(custom-built volume coil)的小口径动物扫描仪(Bruker Biospec)来进行成像。在推注静脉内注射化合物1(100 μ mol/kg)前后对小鼠进行成像。图像顺序是三维快速低角度照射(3DFLASH)采集:重复时间(TR=15.3ms),回波时间(TE=1.54ms),翻转角=15°,视场48x24x24mm并且基质尺寸192x96x96针对250 μ m各向同性的分辨率并使用4次平均。

[0293] 图像分析

[0294] 使用0sirix软件进行图像分析。手动追踪感兴趣区域(R01),包括肝实质同时避开主要血管。第二R01置于同一图像切片中可见的背肌上以对肌肉中的信号强度进行定量用于比较。将7个R01置于没有任何组织的视场(空气)中以测量图像中的噪音。以这种方式分析超过20个贯穿整个肝脏的纵向切片/小鼠。在注射前和注射后15分钟图像上进行相同的分析。

[0295] 为了对肝脏中的信号强化进行定量,使用以下等式1计算对比噪音比(CNR)。S1=信号强度,SD=标准偏差。对于注射前图像(CNR_前)和注射后图像(CNR_后)计算所有图像切片的平均。各小鼠的肝脏强化表示成 Δ CNR,注射前CNR与注射后CNR之间的差(等式2)。

$$[0296] \quad \text{CNR} = (S1_{\text{肝脏}} - S1_{\text{肌肉}}) / \text{SD}_{\text{空气}} \quad (1)$$

$$[0297] \quad \Delta \text{CNR} = \text{CNR}_{\text{后}} - \text{CNR}_{\text{前}} \quad (2)$$

[0298] 用重复测量ANOVA,之后是SNK(Student-Newman-Keuls post hoc test)事后检验来检验组间差, $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0299] 组织分析

[0300] 福尔马林固定的样品包埋在石蜡中,切成5 μ m厚的切片并且按照标准过程用天狼星红染色。使用ImageJ(rsweb.nih.gov/ij/)分析天狼星红染色的切片来对染成红色的载玻片的百分比进行定量。通过使用Taqman引物(纽约州格兰德岛的生命技术公司(Life Technologies))的实时PCR来对肝脏组织中LOX、LOXL1、和LOXL2的mRNA表达进行定量。Taqman引物组是针对LOX的Mm00495386_m1,针对LOXL1的Mm01145738_m1和针对LOXL2的Mm00804740_m1。各基因的表达标准化至基因18s的表达。

[0301] 结果示于图6。在载剂处理的动物中,在注射后15分钟时肝脏中几乎没有信号强化,但是对于接受6或12周的CCl₄的小鼠有对于基线图像的明显强化。这示于图6,其中轴向图像在化合物1注射前后显示。注射前图像显示载剂(图6A,左图)、6周CCl₄处理(图6B,左)和12周CCl₄处理(图1C,左)之间类似的对比。在12周CCl₄-处理的动物的化合物1注射后图像中看到的对比强化(图6C,右图)没有在载剂处理的对照中看到(图6A,右)。强化在6周CCl₄-处理的动物中是中等的(图6B,右)。肝脏:肌肉对比噪音比的变化 Δ CNR从载剂处理的假对照动物中的 0.1 ± 0.2 增加至6周CCl₄-处理的动物中的 1.2 ± 0.8 ($p < 0.01$,图7)。 Δ CNR进一步增加至12周组中的 2.0 ± 1.3 (相比载剂 $p < 0.0001$,图7)。在6周CCl₄-处理的动物中化合物1诱导的 Δ CNR增加12倍,并且在12周CCl₄-处理的动物中增加20倍。

[0302] 实施例10:6-周或12-周CCl₄-处理的小鼠的组织学

[0303] 与载剂对照相比,在6周和12周CCl₄组中观察到增加的天狼星红染色。图8A(中图)显示具有广泛肝门纤维化但是偶发桥连纤维化的6-周动物中的弥漫性纤维化(图8A,中)。在12-周组中看到具有完全桥连纤维化的天狼星红染色(图8A,右)。天狼星红染色定量地从载剂中的 $0.6 \pm 0.2\%$ 增加至6-周动物中的 $2.7 \pm 0.8\%$,增加至12-周CCl₄肝脏中的 $4.0 \pm$

1.2% (图8B)。由qRT-PCR确定的赖氨酰氧化酶mRNA表达确认在这些动物中,CCl₄处理增加了LOX(图8C)、LOXL2(图8D)、和LOXL1(图8E)基因表达。

[0304] 实施例11:肝纤维化回归的化合物1成像

[0305] 动物模型

[0306] 通过每周三次口服灌胃持续6周向品系A/J雄性小鼠(缅因州巴港的杰克森实验室公司)给予0.1ml的40%CCl₄溶液(密苏里州圣路易斯的西格玛公司),然后允许恢复另外6周(n=7)。使用与之前的实施例相同的方案在注射成像探针之前和之后立即对动物进行成像。

[0307] 结果

[0308] 与在6周CCl₄处理后成像的小鼠(6w,图9)相比,用6周CCl₄处理接着6周恢复期的小鼠(6w-r,图9)显示降低的 Δ CNR,其从6-周仅CCl₄处理的动物的 1.2 ± 0.8 (与载剂对照相比 $p < 0.01$)降低至 0.5 ± 0.9 (与载剂对照没有统计学显著差异)。化合物1强化降低58%。持续12周接受CCl₄的小鼠显示更高的 Δ CNR。成像研究与组织学相一致。与持续接受CCl₄的小鼠($3.8 \pm 0.7\%$, $P < 0.00001$)相比,天狼星红染色在去除组($1.4 \pm 0.4\%$)中减少,但是高于载剂对照组($0.5 \pm 0.2\%$, $P < 0.00001$)。

[0309] 实施例12:化合物2成像

[0310] 我们就其对纤维化成像的能力比较了化合物2与化合物1。化合物2的结构与化合物1非常相似,但是酰肼官能团已经二甲基化。化合物2中所得的二甲基酰肼不能发生与醛部分的不可逆反应。使用与之前实施例中所述相同的动物模型和成像范例,对持续12周CCl₄处理的小鼠或持续12周接受载剂的小鼠进行成像。

[0311] 对于用化合物2对小鼠成像,在载剂处理(Δ CNR = 0.6 ± 0.9)和12-周CCl₄-处理的动物(Δ CNR = 0.5 ± 0.5)中观察到肝脏的稍许强化,但是在载剂处理和CCl₄-处理的小鼠之间 Δ CNR没有差异。然而,对于化合物1,与载剂组(Δ CNR = 0.1 ± 0.2)相比, Δ CNR在CCl₄-处理的组(Δ CNR = 2.0 ± 1.3)中高20倍。

[0312] 实施例13:小鼠组中博来霉素诱导的肺纤维化的化合物1成像

[0313] 动物模型

[0314] 在10周龄的雄性C57/BL6小鼠中通过经气管给予PBS中的博来霉素(博来霉素; 2.5U/kg)来引发肺纤维化。假对照动物仅接受PBS。在注射成像探针之前和之后立即对动物进行成像。成像后,处死动物并且取出肺用于组织病理学分析。对3组进行成像:1)仅载剂(n=16),2)博来霉素后1周(n=18),3)博来霉素后2周(n=12)。

[0315] 用异氟烷(1-2%)麻醉动物并且置于专门设计的容器中,体温保持在37°C。尾静脉插管用于静脉内(iv)递送造影剂同时将动物置于扫描仪中。在4.7T处使用带定制构造容积线圈的小口径动物扫描仪(Bruker Biospec)来进行成像。在推注静脉内注射Gd-Hyd(100 μ mol/kg)前后对小鼠进行成像。使用2种成像顺序:三维快速低角度照射(3D FLASH)采集:重复时间(TR=15.3ms),回波时间(TE=1.54ms),翻转角(FA=40°),视场48x24x24mm并且基质尺寸192x96x96针对250 μ m各向同性的分辨率,1次平均;和三维超短回波时间(3D UTE)采集:TR/TE/FA=8.0ms/0.02ms/40°,视场48x24x24mm并且基质尺寸192x96x96针对250 μ m各向同性的分辨率,1次平均。

[0316] 图像分析

[0317] 使用Osirix软件进行图像分析。在左和右肩肌肉上,手动追踪左和右肺实质上的ROI,同时避开主要血管,并且将7个ROI置于没有任何组织的视场(空气)中以测量图像中的噪音。分析了覆盖整个肺的皮质切片(>10切片/小鼠)。在注射前和注射后30分钟图像上进行相同的分析。

[0318] 为了对肺中的信号强化进行定量,使用以下等式1计算对比噪音比(CNR)。S1=信号强度,SD=标准偏差。对于注射前图像(CNR_前)和注射后图像(CNR_后)计算所有图像切片的平均。各小鼠的肺强化表示成 Δ CNR,注射前CNR与注射后CNR之间的差(等式2)。

$$[0319] \quad CNR = (S1_{\text{肺脏}} - S1_{\text{肌肉}}) / SD_{\text{空气}} \quad (1)$$

$$[0320] \quad \Delta CNR = CNR_{\text{后}} - CNR_{\text{前}} \quad (2)$$

[0321] 用重复测量ANOVA,之后是SNK事后检验来检验组间差, $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0322] 组织分析

[0323] 福尔马林固定的样品包埋在石蜡中,切成5 μ m厚的切片并且按照标准过程用天狼星红和苏木精和曙红(H&E)染色。使用ImageJ(rsbweb.nih.gov/ij/)来分析天狼星红染色的切片来对染成红色的载玻片的百分比进行定量。同时由病理学家对载玻片进行分析并且使用艾氏标准进行评分,并且也评价肺部损伤程度。

[0324] 在PBS假对照动物中,在注射后30分钟时肺中有最小的信号强化,但是对于用博来霉素处理的小鼠,在博来霉素灌注后7或14天成像时都有相对基线图像的显著强化。这示于图10,其中冠状解剖学图像以灰度表示,化合物1的信号强化以伪彩色覆盖。 Δ CNR从PBS假对照动物中的 0.8 ± 1.1 增加至1周博来霉素动物中的 2.5 ± 1.5 ($p < 0.05$),并且进一步增加至2周博来霉素组中的 4.3 ± 1.3 ($p < 0.001$)(图10)。

[0325] 离体组织分析确认与博来霉素灌注后7天相比,博来霉素14天后小鼠中的疾病进展。平均艾氏评分,作为纤维化严重性的测量,在1周博来霉素动物中为 4.1 ± 0.9 ,在2周博来霉素动物中为 5.3 ± 3.5 ,并且在PBS假对照动物中为0(图11A)。天狼星红染色阳性面积的肺组织染色分数在假对照中为 $0.09 \pm 0.06\%$,在1-周博来霉素中为 $0.17 \pm 0.07\%$,并且在2周博来霉素组中为 $0.30 \pm 0.04\%$ (图11B)。损伤面积从 $0.3 \pm 0.7\%$ (假对照),增加至 $4.6 \pm 1.3\%$ (1-周博来霉素),并且在2周博来霉素动物中进一步增加至 $15.0 \pm 12.3\%$ (图11C)。所有三个病理测量确认从假对照至1周博来霉素灌注后动物的纤维化发展,并且在2周动物中进一步发展。

[0326] 实施例14:博来霉素处理时间

[0327] 博来霉素模型已知产生明显纤维化,其在博来霉素灌注后约2周达到峰值。在之后的时间点上,小鼠开始恢复。经气管灌注博来霉素(2.5u/kg)处理的C57B16小鼠在博来霉素处理后2周和4周时成像。使用与之前的实施例相同的成像方案,发现 Δ CNR在博来霉素后2周时为2.3,但是这在博来霉素后4周时降低至0.9,Gd-Hyd强化降低61%。

[0328] 其他实施方式落在本文权利要求书的范围内。

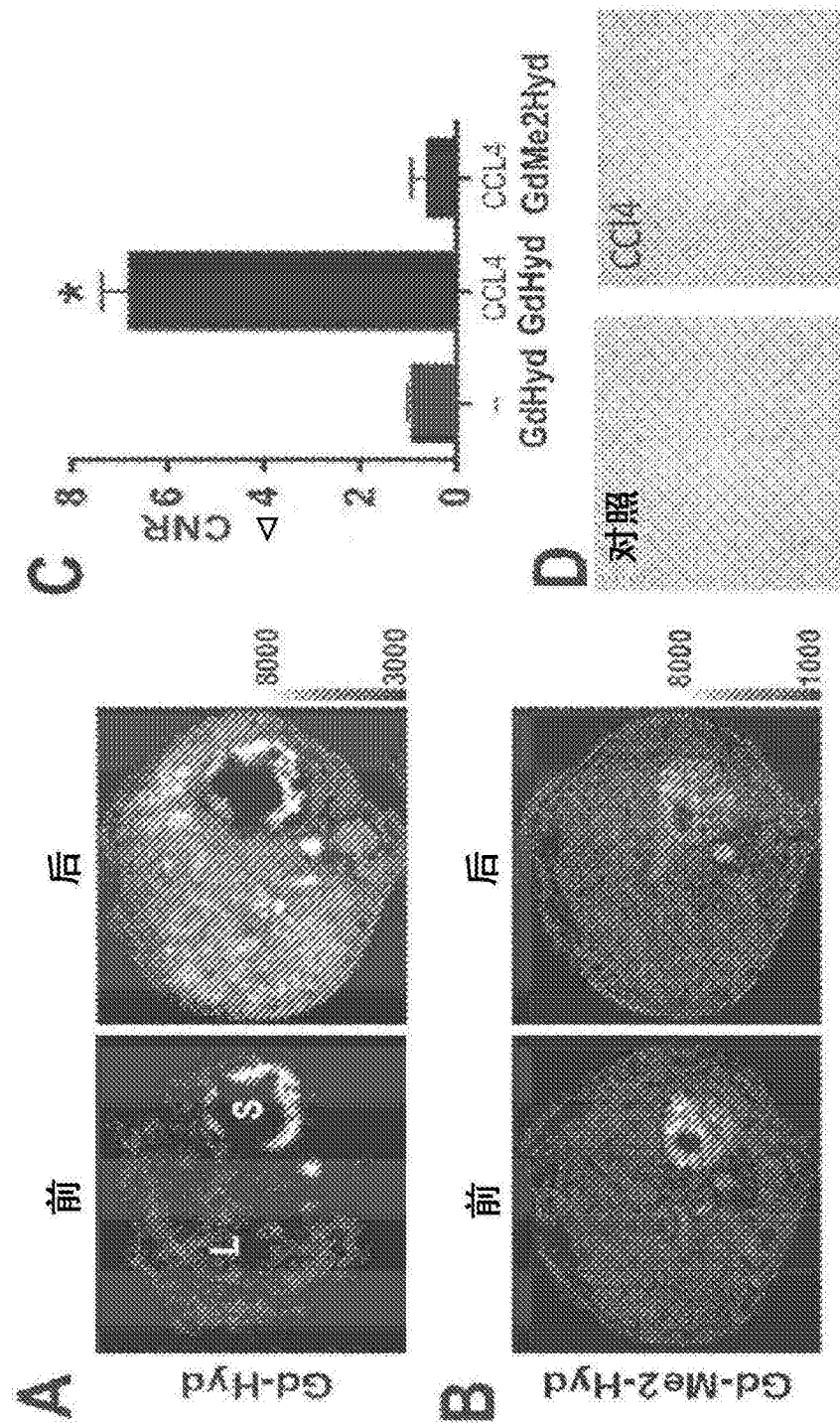


图1

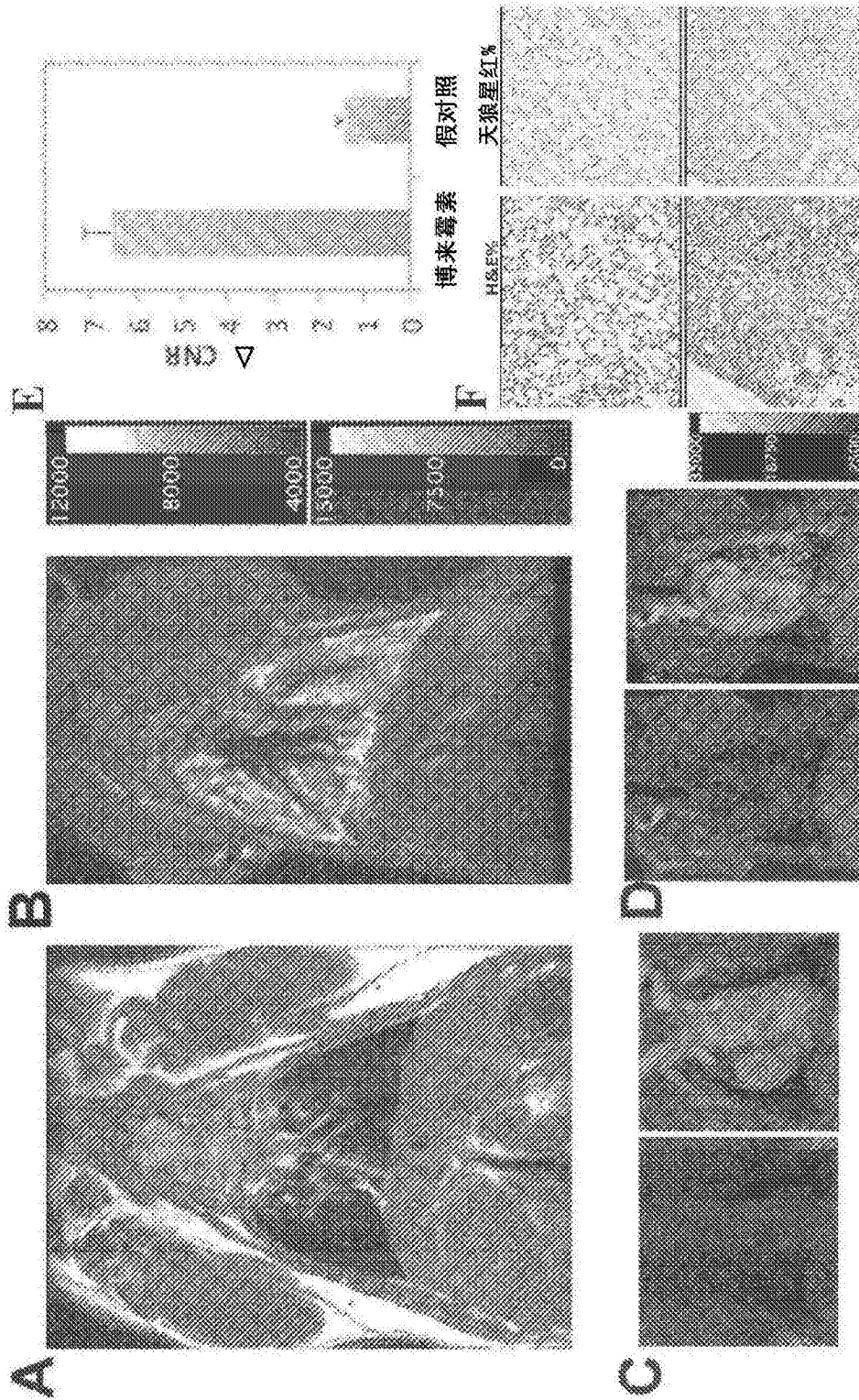


图2

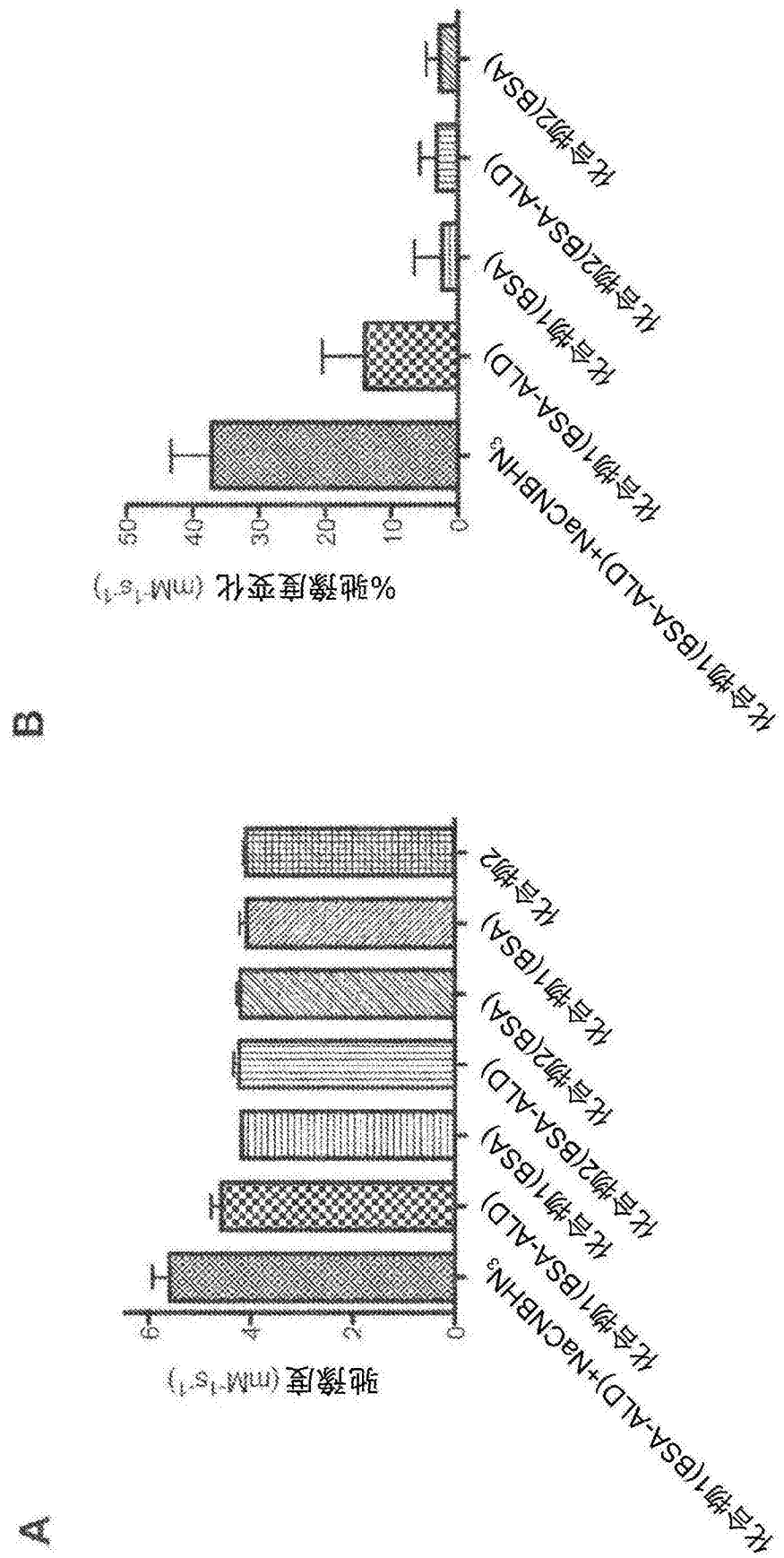


图3

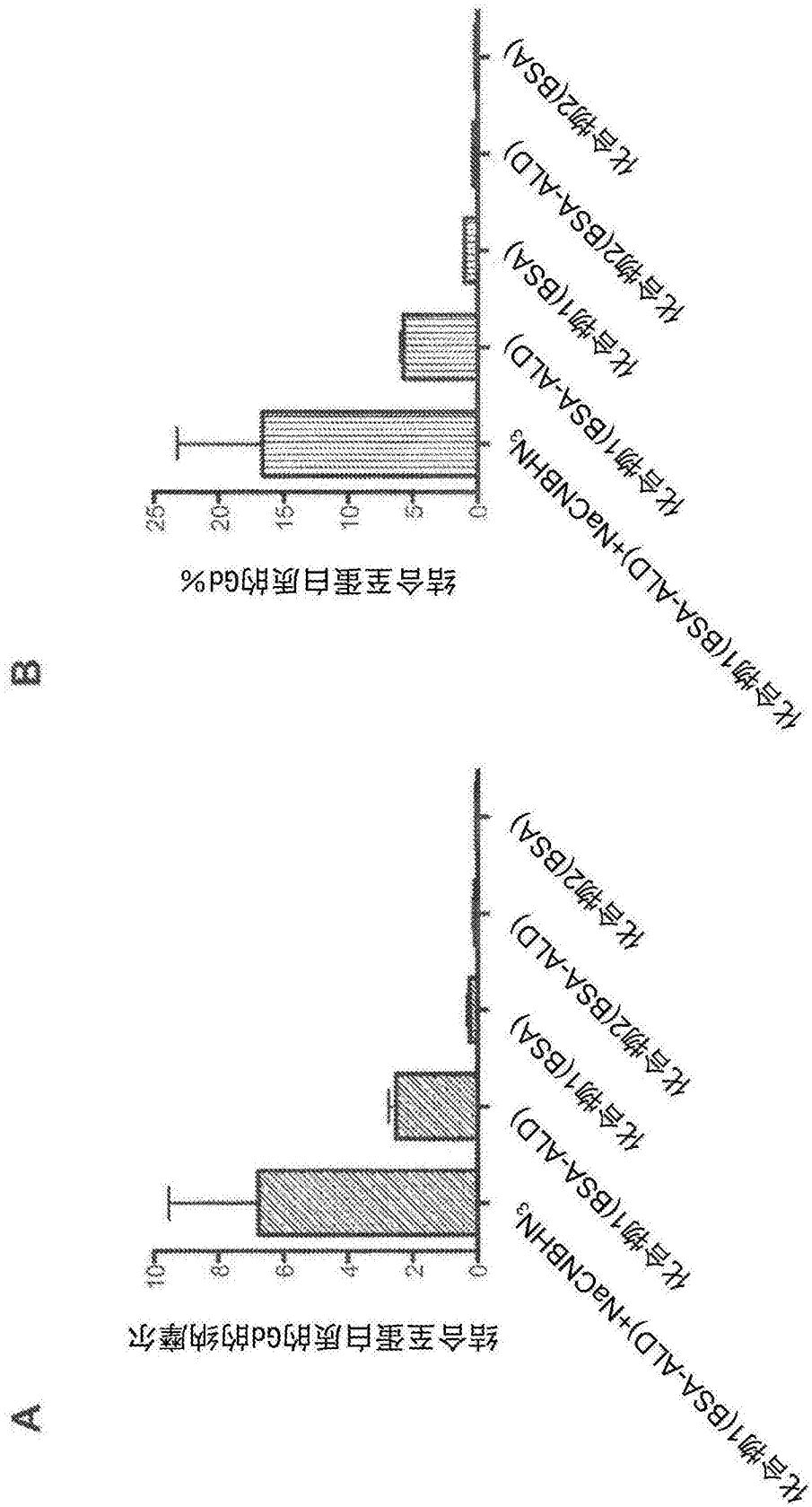


图4

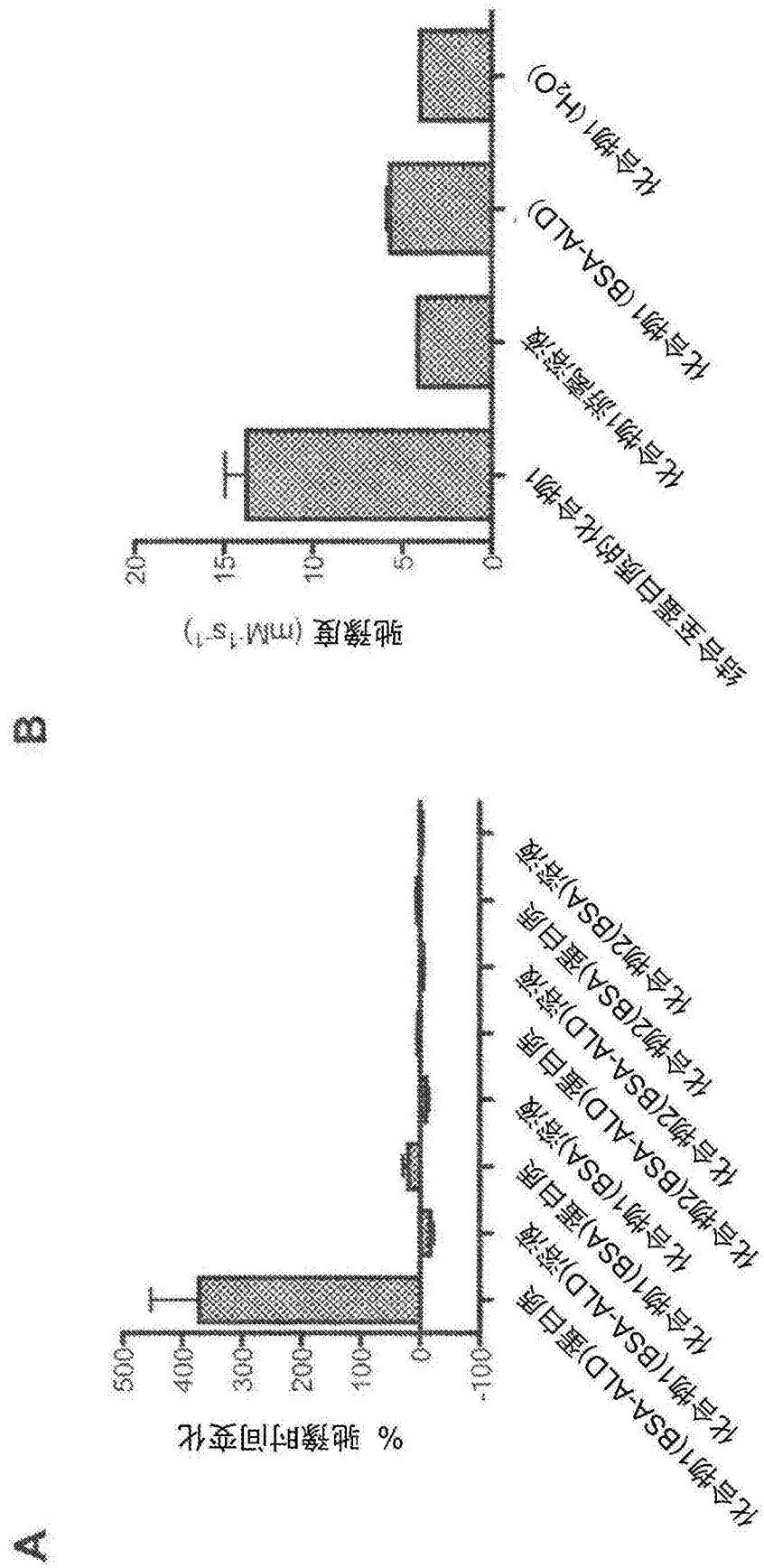


图5

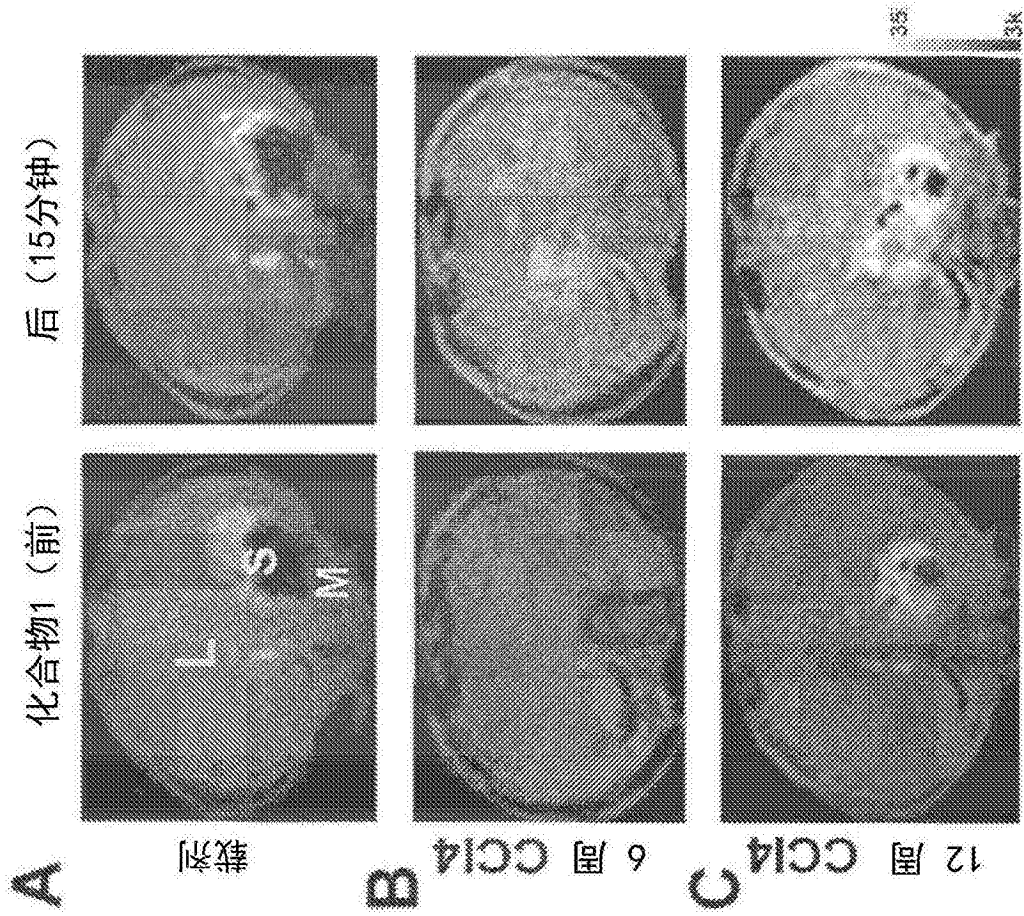


图6

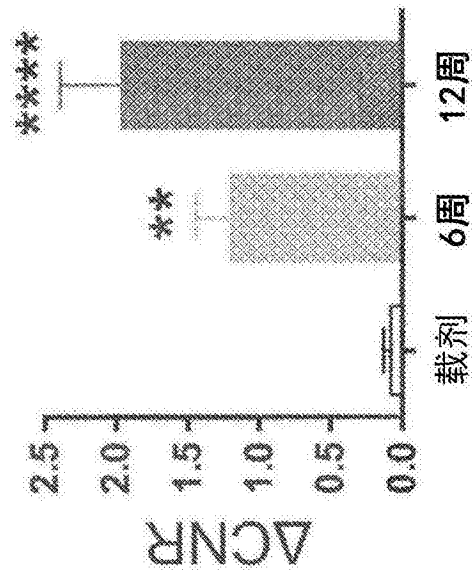


图7

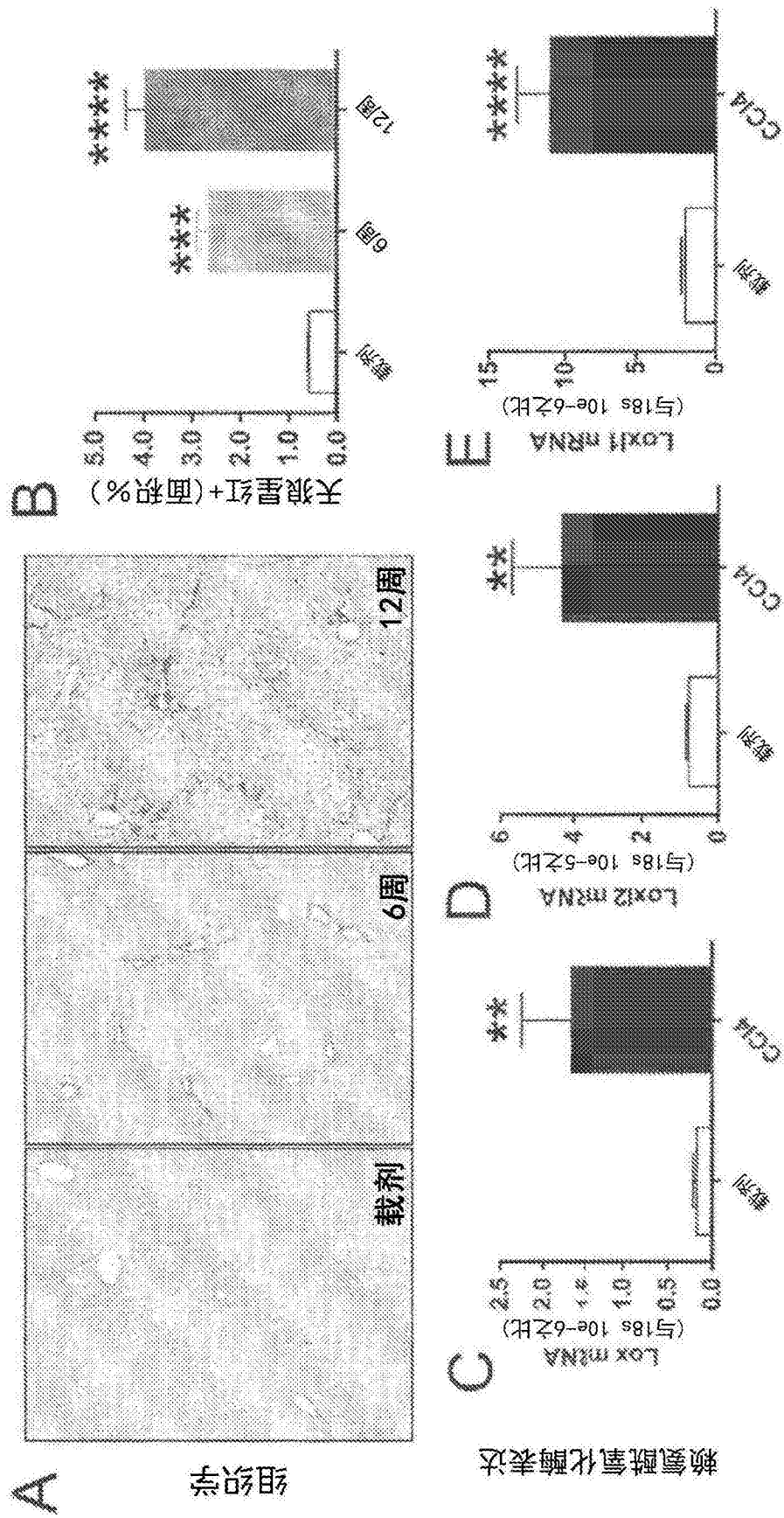


图8

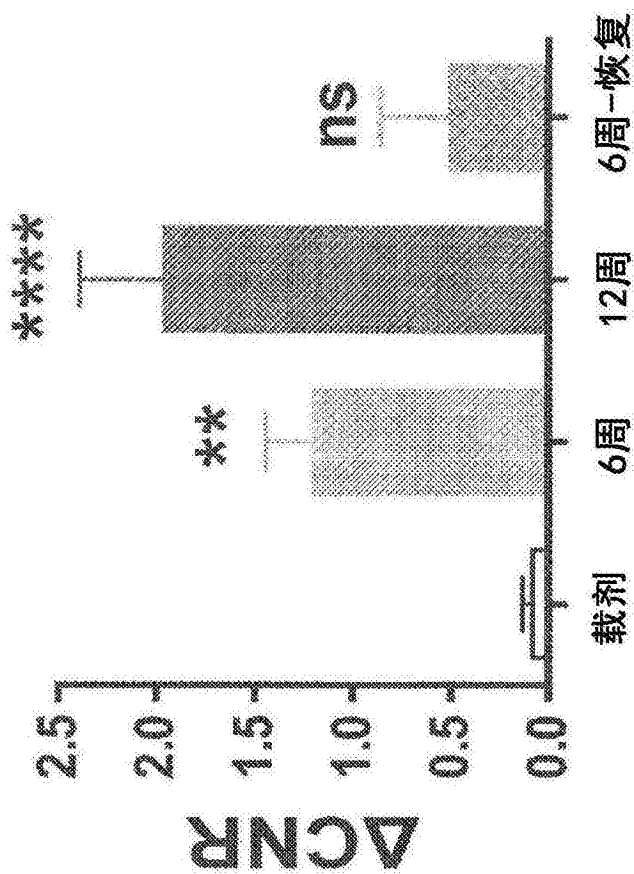


图9

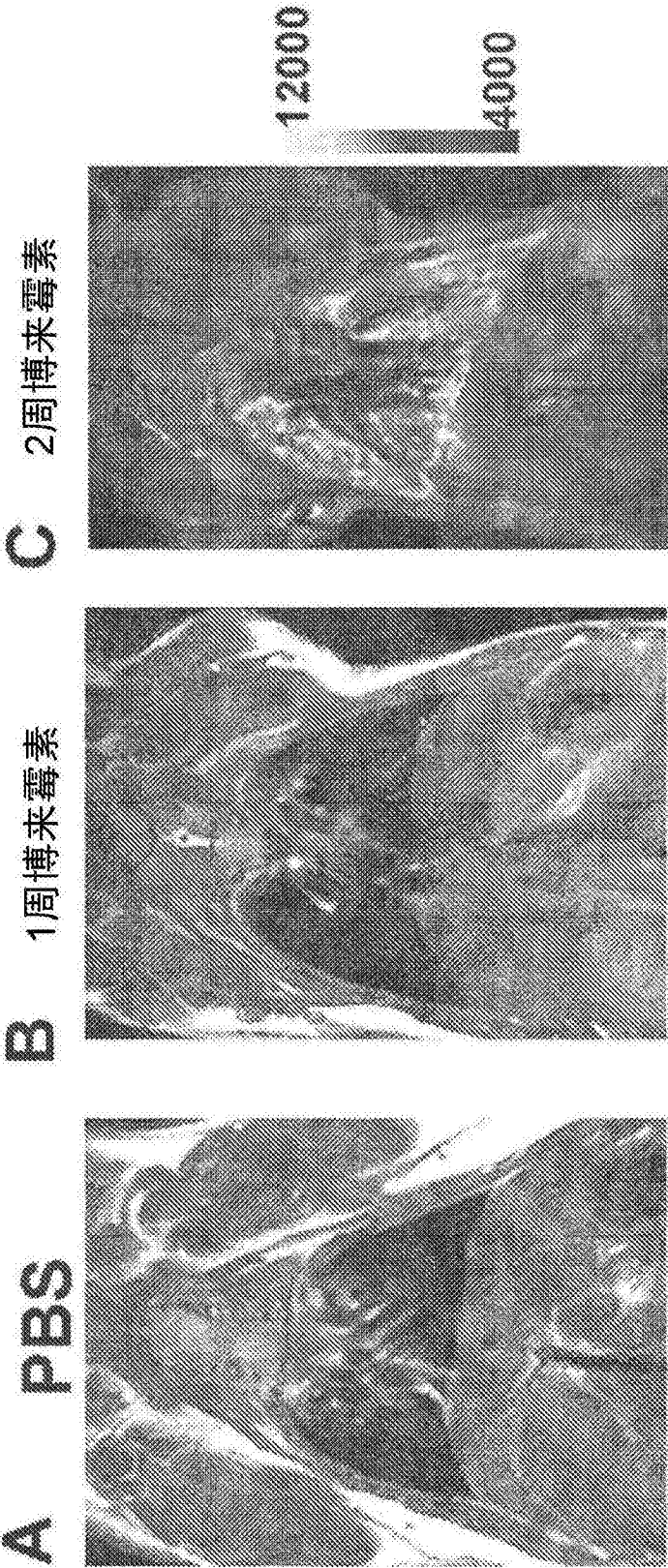


图10

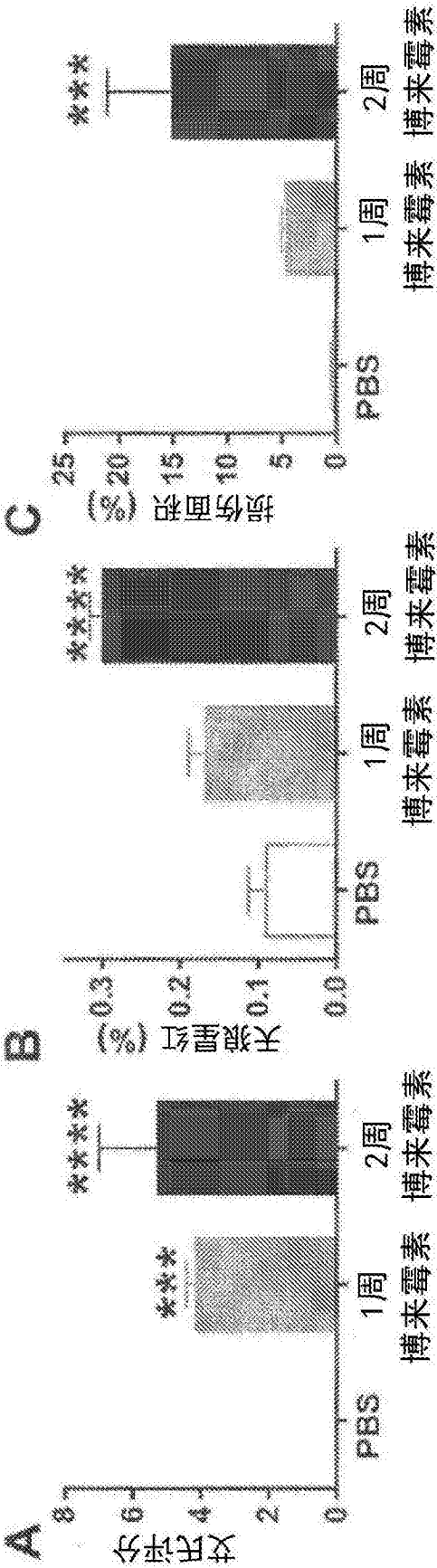


图11

专利名称(译)	分子成像探针		
公开(公告)号	CN105939732A	公开(公告)日	2016-09-14
申请号	CN201480074752.0	申请日	2014-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
[标]发明人	P卡拉文		
发明人	P·卡拉文		
IPC分类号	A61K49/10 A61K51/00 A61K47/48 A61B5/00		
CPC分类号	C07F5/003 A61K49/103 A61K49/106 A61K51/0482 C07F1/08 G01N33/57488 G01N33/6893 G01N2333/765		
代理人(译)	陈文青		
优先权	61/911413 2013-12-03 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及如下所示的式(I)的化合物：或其药学上可接受的盐。这些化合物可用作成像探针，例如，用于诊断纤维化或纤维发生。

