



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103648533 B

(45)授权公告日 2017.09.08

(21)申请号 201280034134.4

(22)申请日 2012.05.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103648533 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据
11165267.3 2011.05.09 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2012/052260 2012.05.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/153254 EN 2012.11.15

(73)专利权人 皇家飞利浦有限公司
地址 荷兰艾恩德霍芬

(72)发明人 M.S.罗比拉德 J.卢布 R.罗斯辛
S.M.范登博世 R.M.维斯蒂根

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 徐厚才 汪扬

(51)Int.Cl.
A61K 51/04(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)

(56)对比文件
WO 2010/119389 A2,2010.10.21,
WO 2010/119389 A2,2010.10.21,
Francesco Fringuelli et al..DIELS
ALDER REACTIONS OF CYCLOALKENONES IN
ORGANIC SYNTHESIS.《ORGANIC PREPARATIONS
AND PROCEDURES INT.》.1990,第22卷(第2期),

审查员 张丽芳

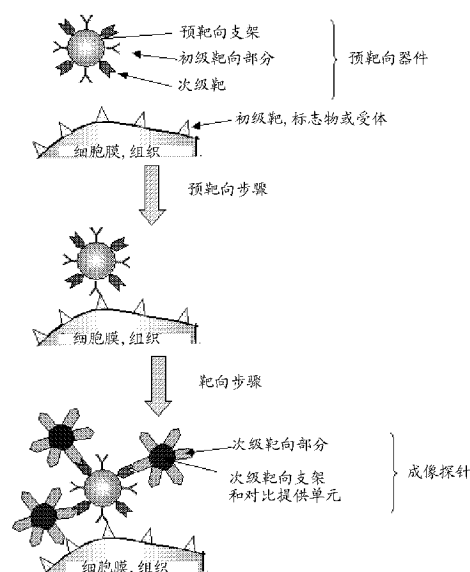
权利要求书3页 说明书45页 附图13页

(54)发明名称

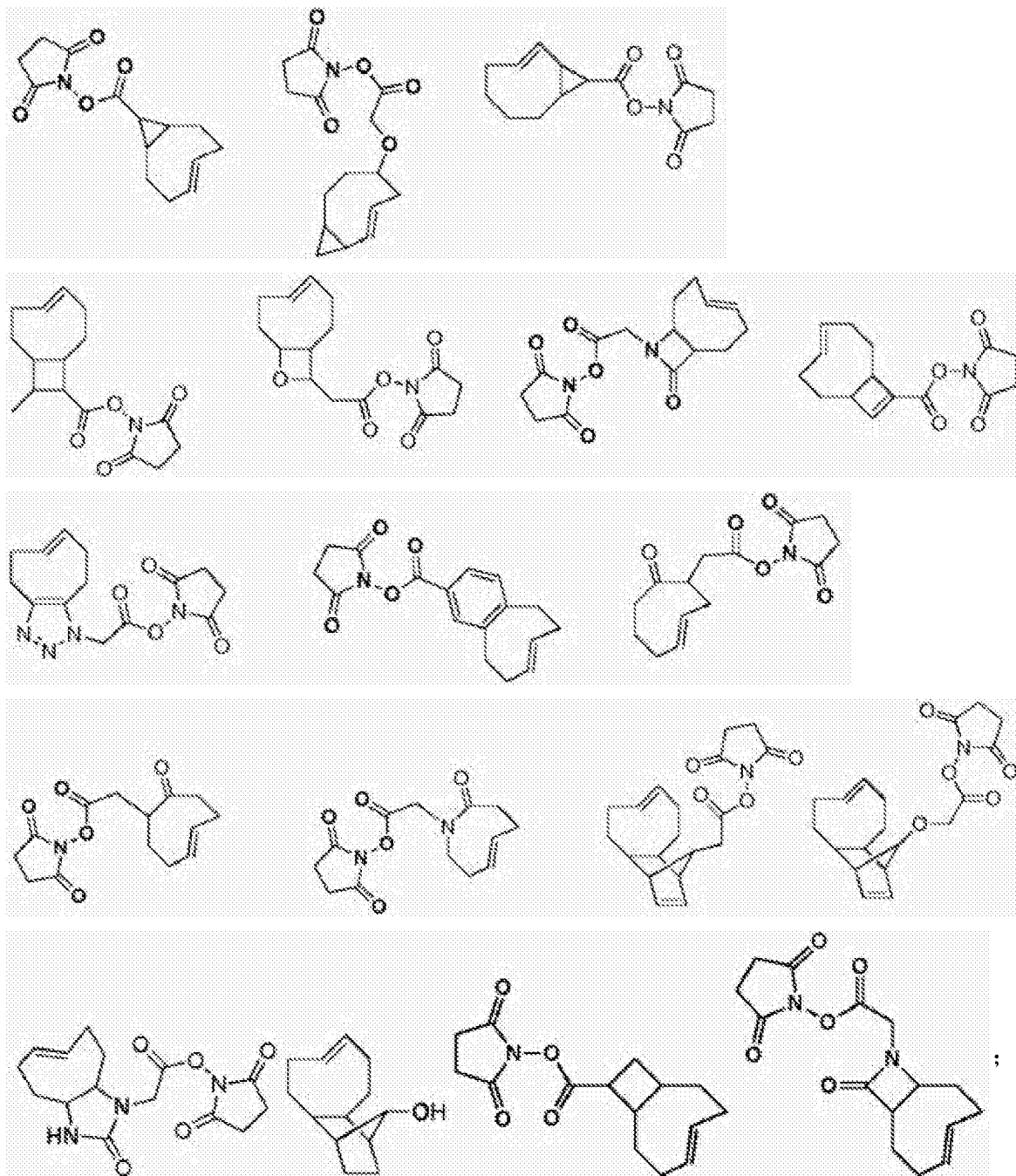
用于成像或治疗的包含反式环辛烯亲双烯体和二烯的预靶向试剂盒

(57)摘要

描述了用于靶向的医学成像和/或治疗的预靶向方法和相关的试剂盒,其中使用显示出彼此生物正交反应性的非生物反应性化学基团。本发明涉及[4+2]逆电子需求(逆)狄尔斯-阿尔德化学反应在提供预靶向探针和效应物探针之间的偶联中的用途。为此,这些探针中的一个包含缺电子的四嗪或其它合适的二烯,且另一个是由于至少两个环外键的位置而具有展平结构的E-环辛烯。



1. 用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒,其包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物探针,其中所述预靶向探针包含初级靶向部分和第一生物正交反应性基团,且其中所述效应物探针包含为标记物或药理学活性化合物的效应物部分,和第二生物正交反应性基团,其中所述第一和第二生物正交反应性基团中的任一个是亲双烯体,并且所述第一和第二生物正交反应性基团中的另一个是二烯,其中所述亲双烯体是反式-环辛烯部分,该部分具有由至少两个被固定在相同平面中的环外键引起的展平结构,且包含至少一个任选经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针的连接,其中所述亲双烯体是选自下述结构的化合物:



其中所述二烯是式(5)的化合物:



其中 R^1 和 R^2 各自独立地表示选自下述的取代基：2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基或苯基，任选被一个或多个吸电子基团取代，所述吸电子基团选自 NO_2 、 F 、 Cl 、 CF_3 、 CN 、 COOH 、 COOR 、 CONH_2 、 CONHR 、 CONR_2 、 CHO 、 COR 、 SO_2R 、 SO_2OR 、 NO 、 Ar ，其中 R 是 C_1 - C_6 烷基，且 Ar 代表苯基、吡啶基或萘基；且其中所述二烯包含至少一个任选经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针的连接。

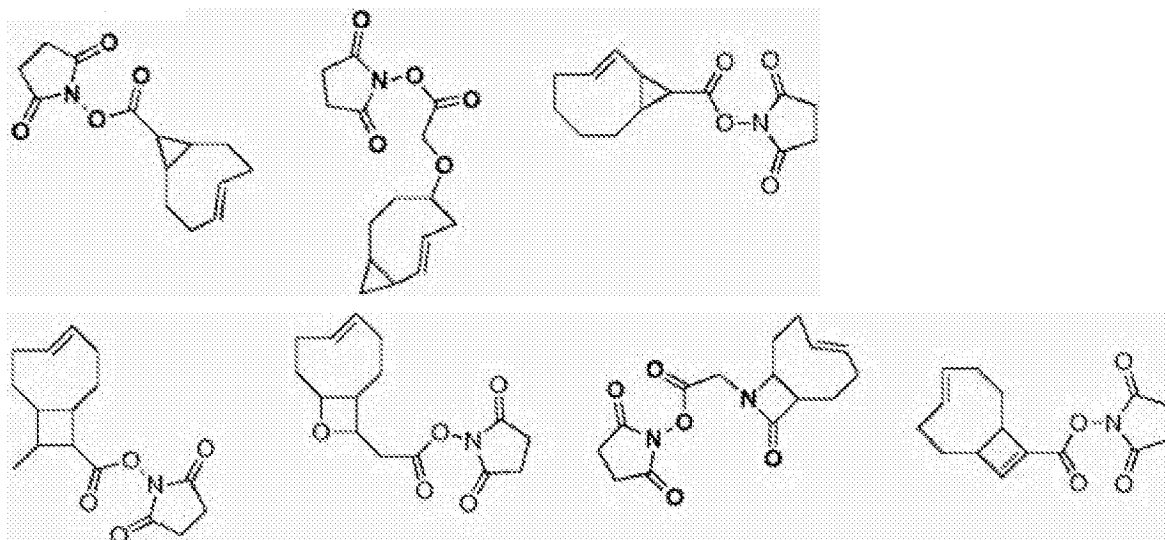
2. 根据权利要求1所述的试剂盒，其中所述预靶向探针包含作为初级靶向部分的抗体。

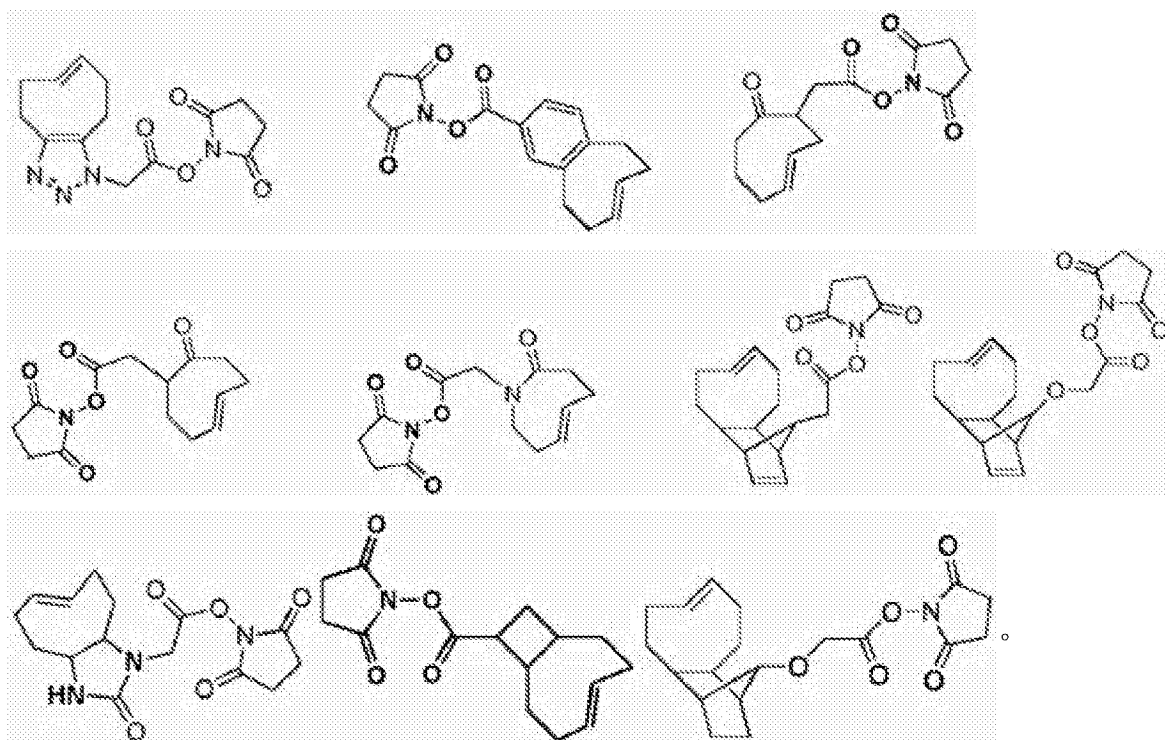
3. 根据权利要求1所述的试剂盒，其中所述效应物探针包含作为效应物部分的可检测标记物，所述可检测标记物选自：可MRI成像的试剂、自旋标记物、光学标记物、超声响应试剂、X-射线响应试剂、放射性核素、FRET型染料、生物发光或荧光分子或标记、生物素、顺磁成像试剂和超顺磁成像试剂。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒，其中所述效应物探针包含作为效应物部分的药学活性化合物。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒，其中所述药学活性化合物是选自下述的同位素： ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。

6. 化合物，选自下述结构：





7. 预靶向试剂,其包含初级靶向部分和生物正交反应性基团,其中所述生物正交反应性基团是权利要求1中限定的亲双烯体。

8. 成像探针,其包含可检测标记物和生物正交反应性基团,所述可检测标记物是选自下述的同位素: ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 和 ^{203}Pb ,其中所述生物正交反应性基团是权利要求1中限定的亲双烯体。

9. 治疗探针,其包含药学活性化合物和生物正交反应性基团,所述药学活性化合物是选自下述的同位素: ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac ,其中所述生物正交反应性基团是权利要求1中限定的亲双烯体。

10. 根据权利要求7所述的预靶向试剂在制备用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒中的用途。

11. 根据权利要求8所述的成像探针在制备用于靶向的医学成像的试剂盒中的用途。

12. 根据权利要求9所述的治疗探针在制备用于靶向的医学治疗的试剂盒中的用途。

13. 如权利要求6中限定的化合物作为亲双烯体反应物在制备用于基于逆狄尔斯-阿尔德反应的靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒中的用途。

用于成像或治疗的包含反式环辛烯亲双烯体和二烯的预靶向试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于靶向的医学成像和/或治疗的预靶向方法,其中使用彼此显示出生物正交(bio-orthogonal)反应性的非生物(abiotic)反应性化学基团。本发明还涉及包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物(effector)探针的预靶向试剂盒(kit),其中所述预靶向探针包含初级靶向部分(primary targeting moiety)和第一生物正交反应性基团,且其中所述效应物探针包含效应物部分,例如标记物或药学活性化合物,和第二生物正交反应性基团。本发明还涉及在上述方法和试剂盒中使用的预靶向试剂。本发明特别地涉及核成像和放射疗法。

背景技术

[0002] 在医学诊断和治疗的许多领域中,希望选择性地使用试剂,例如治疗剂(药物)或诊断(例如成像)剂递送到受试者(例如患者)体内的特定位置或有限区域。

[0003] 器官或组织的活性靶向通过所希望的活性部分(例如对比增强剂或细胞毒性化合物)与靶向结构的直接或间接结合实现,所述靶向结构与细胞表面结合或促进在感兴趣的靶位点处或附近的细胞摄取。用于靶向此类试剂的靶向部分通常是对细胞表面靶(例如膜受体)、结构蛋白(例如淀粉样斑)或细胞内靶(例如RNA、DNA、酶、细胞信号传导通路)具有亲和力的结构。这些部分可以是抗体(片段)、蛋白质、适体(aptamers)、寡肽、寡核苷酸、寡糖以及肽、拟肽(peptoids)和已知在特定疾病或障碍处积累的有机药物化合物。此外,对比/治疗剂可以靶向代谢途径,其在疾病(例如感染或癌症)期间表达升高,例如DNA、蛋白质和膜合成和碳水化合物摄取。在患病组织中,上述标志物可以将患病细胞从健康组织区分并提供早期检测、特异性诊断和(靶向的)治疗的独特可能性。

[0004] 通常对于成功的分子成像/治疗剂和特别对于核成像/治疗剂的一个重要标准是它们呈现高靶摄取,同时显示出从非靶组织和从血液的快速清除(通过肾脏和/或肝胆系统)。但是,这经常存在问题:例如,人体中的成像研究已经显示,在肿瘤位置处经放射标记的抗体在24小时内可达到最大浓度,但需要另外几天在循环中的所述经标记的抗体的浓度才下降到低至足以进行成功成像的水平。

[0005] 在靶组织中的缓慢或不充分的积累以及从非靶区域缓慢清除所带来的这些问题(特别是对于核成像和治疗)已经导致预靶向方法的应用。

[0006] 预靶向是指在靶向方法中的步骤,其中向初级靶(例如细胞表面)提供预靶向探针。后者包括次级靶,其最后将通过装备有次级靶向部分的其它探针(所述效应物探针)进行靶向。

[0007] 因此,在预靶向中,将预靶向探针结合到初级靶。所述预靶向探针还携带次级靶,其促进对诊断(成像)和/或治疗剂(所述效应物探针)的特异性结合。在形成所述预靶向探针的结构已经定位在靶位点处之后(花费时间例如24小时),如果自然清除不充分,则可以使用清除剂从血液除去过量的部分。在第二温育步骤(优选采取较短的时间,例如1-6小时)

中,所述效应物探针通过它的次级靶向部分结合到所述(预)结合的预靶向探针。所述次级靶(存在于所述预靶向探针上)和所述次级靶向部分(存在于所述效应物探针上)应该以高特异性和高亲和力快速结合,并且在体内应该是稳定的。

[0008] 对于成像,预靶向的一般概念在图1中绘出。在这里,所述效应物探针是包含用于成像模式的可检测标记物的成像探针。所述效应物探针通过其次级靶向基团结合到所述(预)结合的预靶向探针。

[0009] 次级靶/次级靶向部分对的一般例子是生物素/链霉亲和素或抗体/抗原系统。为了有效,所述效应物探针必须快速从体内排出(例如通过肾脏)以提供所希望的具有相对低的非靶积累的高肿瘤积累。因此,这些探针通常很小。

[0010] 在核成像和放射疗法中,预靶向的概念具有进一步的益处,因为耗费时间的预靶向步骤可以不必使用放射性核素实施,而使用放射性核素的次级靶向步骤能够更快地实施。后者使得能够使用较短寿命的放射性核素,优点是对患者的放射剂量最小化,并且例如使用PET试剂代替SPECT试剂。结合多齿配体系统(链霉亲和素、树枝状聚合物)在MRI中使用预靶向方法能够在靶位点处提供信号放大。此外,一般而言,该方法有利于通用对比剂的使用。

[0011] 通常在生物学中(如抗体-抗原)和特别在预靶向中(生物素-链霉亲和素、抗体/半抗原、反义寡核苷酸)实施高度选择性相互作用的实体非常大。因此,使用肽和小有机部分作为初级靶向基团的预靶向,以及代谢成像和细胞内靶成像,由于次级靶的尺寸使得小初级基团的使用毫无意义而仍然无法实现。

[0012] 而且,现有的预靶向系统被与它们的生物特性相关的因素所限制。生物素是内源分子,并且它的缀合物能够通过血清酶生物素酶断开。当使用反义预靶向时,所述寡核苷酸会受到RNA酶和DNA酶的攻击。蛋白质和肽也经历自然分解途径。这些相互作用可被它们的非共价和动态特性以及有限的靶上驻留时间进一步削弱。而且,内源性生物素与生物素缀合物竞争链霉亲和素结合。最后,链霉亲和素是高度免疫原性的。

[0013] 近来的一个发展是避免与仅基于天然/生物靶向结构(即生物素/链霉亲和素、抗体/半抗原、反义寡核苷酸)的预靶向相关的缺点。

[0014] 这方面的一篇参考文献是WO 2010/051530,其中基于某些二烯(例如四嗪类)和亲双烯体(例如反式-环辛烯醇(TCO))之间的反应性对预靶向进行了讨论。

[0015] 尽管在这些系统的基础上能够获得相对快速的反应,但这还远不如上述生物素-链霉亲和素系统的反应性。因此,避免后者的缺点,却牺牲了所述反应的主要要求,即速度。因此,希望提供一种系统,其不以如上讨论的生物分子为基础,并且还具有理想的快速反应速率。

发明内容

[0016] 为了更好地满足上述愿望,在一个方面,本发明提供了用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒,其包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物探针,其中所述预靶向探针包含初级靶向部分和第一生物正交反应性基团,且其中所述效应物探针包含效应物部分(例如标记物或药学活性化合物)和第二生物正交反应性基团,其中所述第一和第二生物正交反应性基团中的任一个是亲双烯体(dienophile),且所述第一和第二生物正交反应性基

团中的另一个是二烯,其中所述亲双烯体是反式-环辛烯部分,该部分包含至少两个被固定在相同平面中的环外键,且包含至少一个任选经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针的连接(linkage)。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了一种预靶向方法,以及其中使用的预靶向试剂,和其中使用该试剂盒的靶向的医学成像或疗法。

[0018] 在另一个方面,本发明是用于动物或人类的预靶向方法中的包含8元非芳族环状单亚烯基部分(优选环辛烯部分,和更优选反式-环辛烯部分)的化合物,所述部分包含至少两个被固定在相同平面中的环外键。

[0019] 在又一个方面,本发明涉及包含反式-环辛烯部分的化合物作为亲双烯体反应物在基于逆狄尔斯-阿尔德反应(retro Diels-Alder reaction)的预靶向方法中的用途,所述部分包含至少两个被固定在基本上相同平面中的环外键。

附图说明

[0020] 图1描绘了如上所述的预靶向概念的一般方案;

[0021] 图2提供了(3,6)-二-(2-吡啶基)-s-四嗪和反式-环辛烯亲双烯体之间的[4+2]狄尔斯-阿尔德反应、接着是其中形成产物和分子氮的逆狄尔斯-阿尔德反应的反应方案。因为所述反式-环辛烯衍生物不像在经典狄尔斯-阿尔德反应中那样包含吸电子基团,所以这类狄尔斯-阿尔德反应与经典的狄尔斯-阿尔德反应不同,并且通常被称作“逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应(inverse electron demand Diels Alder reaction)”。在下文中,两个反应步骤序列,即最初的狄尔斯-阿尔德环加成(通常是逆电子需求狄尔斯-阿尔德环加成)和后续的逆狄尔斯-阿尔德反应,将被简称为“逆狄尔斯-阿尔德反应”或“逆-DA”。

[0022] 图3(a和b)描绘了利用逆狄尔斯-阿尔德化学反应的预靶向的一般方案。

[0023] 图4和图5描绘了在实施例中提及的化合物的反应方案和化学结构。

[0024] 图6描绘了(A)天然CC49、每个分子被(B) 0.4或(C) 5.2当量的内-TCO部分(6)修饰的CC49、以及每个分子被(D) 0.7或(E) 8.9当量的外-TCO部分(7)修饰的CC49的SEC-HPLC色谱图(在260 nm的UV曲线)。

[0025] 图7描绘了CC49-TCO构建体的SDS-PAGE分析。泳道1-5分别含有天然CC49、被0.4和5.2的内-TCO部分6修饰的CC49、以及被0.7和8.9的外-TCO部分7官能化的CC49(全长凝胶,分子量标准品在左侧)。

[0026] 图8描绘了用于TCO定量的反应混合物的SDS-PAGE分析,所述TCO定量使用在实施例2中描述的 ^{177}Lu -DOTA-四嗪滴定(A:凝胶放射摄影术;B:蛋白染色)。泳道1-3含有CC49-TCO-6和 ^{177}Lu -DOTA四嗪(相对于mAb而言10、12和14当量)的混合物;泳道4-6含有CC49-TCO-7和 ^{177}Lu -DOTA-四嗪(相对于mAb而言10、12和14当量)的混合物。

[0027] 图9描绘了在实施例3中描述的动力学测定的结果。在 ^{177}Lu -DOTA-四嗪8(0.67 nM)和(A) CC49-TCO-6或(C) CC49-TCO-7(4种不同的mAb浓度)之间的时间依赖性的反应收率,以及 K_{obs} 相对于(B) TCO-6或(D) TCO-7浓度的图。

[0028] 图10描绘了如在实施例4中描述的、与CC49缀合的TCO 6和7的体内稳定性。条代表平均值,且误差棒代表1个标准偏差($n = 3$)。

[0029] 图11描绘了在实施例5中描述的(E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸

2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯12的合成。

[0030] 图12描绘了在实施例6中描述的41,45-二氧代-45-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-十二氧杂-40-氮杂四十五烷-1-酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯16的合成。

[0031] 图13描绘了在实施例7中描述的半乳糖-白蛋白-四嗪22的合成。

[0032] 图14描绘了在实施例8中描述的(E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-9-基)乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(26)的合成。

[0033] 图15描绘了在实施例9中描述的(E)-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯-11-醇(32)的合成。

[0034] 图16描绘了在实施例10中描述的(E)-3,3a,4,5,9,9a-六氢-1H-环辛[d]咪唑-2(8H)-酮(40)的合成。

[0035] 图17描绘了在实施例11中描述的2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(47)和2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(11-氧代-11-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)十一烷基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(48)的合成。

[0036] 图18描绘了在实施例15中描述的 ^{177}Lu -DOTA-四嗪8 (26.6 nM)和CC49-TCO(12)(3种不同的mAb浓度)之间的时间依赖性的反应收率,以及 K_{obs} 相对于TCO 12浓度的图。

[0037] 图19描绘了在实施例15中描述的 ^{177}Lu -DOTA-四嗪8 (1.73 nM)和CC49-TCO(26)(3种不同的mAb浓度)之间的时间依赖性的反应收率,以及 K_{obs} 相对于TCO 26浓度的图。

[0038] 图20描绘了在实施例16中描述的与CC49缀合的TCO 12的体内稳定性。条代表平均值,且误差棒代表1个标准偏差($n = 3$)。

[0039] 图21描绘了在实施例17中描述的在mAb注射后29 h, ^{125}I -CC49-TCO(7)和 ^{125}I -CC49-TCO(12)在荷瘤小鼠中的生物分布。将数据表示为%ID/g,误差棒=1个标准偏差($n = 4$)。

[0040] 图22描绘了在实施例17中描述的用CC49-TCO(7)和CC49-TCO(12)预处理过的小鼠中的 ^{177}Lu -四嗪8(注射后3 h)的生物分布。将数据表示为%ID/g,误差棒=1个标准偏差($n = 4$)。

[0041] 图23描绘了在实施例18中描述的通过建模软件实现的三维结构表示(字母x、y和z分别代表x-轴、y-轴和z-轴)。

[0042] 发明详述

[0043] 一般而言,本发明是基于下述认识:在使用反式-环辛烯部分作为亲双烯体的系统中,如果迫使8元环部分成为展平结构(flattened structure),可以得到反应速率的大幅增加。

[0044] 根据本发明,通过向反式-环辛烯部分提供至少两个被固定在基本上相同平面中的环外键,审慎地达到该展平结构。

[0045] 在下文中,为了清晰起见,将该8元环部分定义为反式-环辛烯部分,或缩写为“TCO”部分。应该理解,重点在于该8元环充当亲双烯体的可能性。技术人员熟知下述事实:亲双烯体活性不一定依赖于所有碳原子在环中的存在,因为也已知杂环单亚烯基8元环具

有亲双烯体活性。

[0046] 因而,一般而言,本发明不严格限于反式-环辛烯。有机化学技术人员会意识到,存在其它基于8元环的亲双烯体,其包含与反式-环辛烯相同的环内双键,但是其可以具有在环内别处的一个或多个杂原子。即,本发明一般地涉及包含至少两个被固定在相同平面中的环外键的8元非芳族环状亚烯基部分,优选环辛烯部分和更优选反式-环辛烯部分。

[0047] 与例如药物活性物质(其中微小结构变化经常会改变体内作用)的情况不同,本发明首先且最重要的是,要求正确的化学反应性。因而,可能的结构扩展至技术人员熟知它们作为亲双烯体的反应性的那些结构。

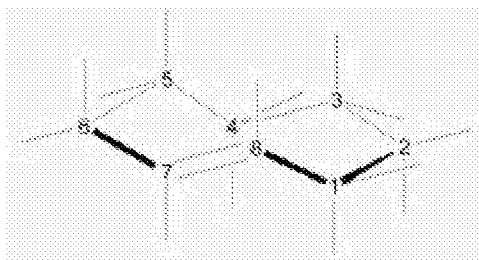
[0048] 有机化学技术人员会理解,术语“被固定在基本上相同平面中”表示这样的键合理论:根据该理论,通常认为键是被固定在相同平面中。在相同平面中的这种固定的典型例子包括双键和具有张力的(strained)稠合环。例如,所述至少两个环外键可以是与氧形成的双键的两个键(即C=O)。所述至少两个环外键还可以是在两个邻近碳原子上的单键,前提条件是,这些键一起形成呈现基本上展平结构的稠合环的一部分(即与TCO环稠合),由此将所述两个单键固定在基本上一个和相同的平面中。后者的例子包括张力环例如环丙基和环丁基。

[0049] 在另一个实施例中,组合前述可能性,所述稠合环是芳族环。在该情况下,所述至少两个键所连接的TCO碳原子是sp²碳原子,且所述键是稠合环的一部分。应该理解,所述键参与芳族稠合环的杂交。

[0050] 不希望受理论的约束,本发明的发明人基于该发现认为,至少两个环外键在相同平面中的存在将导致TCO环的至少部分展平,并且该展平又会提供满足在基于逆狄尔斯-阿尔德反应的预靶向中对较高反应性的要求的关键。TCO环的部分展平是两个被固定在相同平面中的环外键存在的固有结果,并且至少代表与环内双键(即碳原子5和6)相对的部分。不论这两个环外键是位于与(4,5)邻近的碳原子5和6处,还是位于碳原子3和4处,都是如此。

[0051] 应当指出,根据命名法的选择,TCO亲双烯体也可以被称作E-环辛烯。就常规命名法而言,应该理解,由于环辛烯环上的取代,取决于取代基的位置和分子量,相同的环辛烯异构体形式上可以变成表示为Z-异构体。在本发明中,本发明的任何取代变体,无论是否形式上是“E”或“Z”,或“顺式”或“反式”异构体,都将被认为是未被取代的反式-环辛烯或未被取代的E-环辛烯的衍生物。术语“反式-环辛烯”(TCO)以及E-环辛烯可以互换使用,并且对于根据本发明的所有亲双烯体,以及对于取代基形式上将需要相反命名的情况,都适用。即,本发明涉及其中如下编号的碳原子1和6位于E(entgegen)或反式位置的环辛烯。

[0052]



[0053] 因此,在广义上,本发明扩展至满足前述要求的任何被取代的TCO部分,前提条件是,它不含有会干扰TCO环作为亲双烯体的反应性的取代基。

[0054] 将就特定实施方案并参考某些附图进一步描述本发明,但本发明并不受这些所限制,而是仅由权利要求限制。权利要求中的任何参考标记都不应解释为限制其范围。所描述的附图仅仅是示意性的而非限制性的。在所述附图中,为了例证目的,一些要素的尺寸可能被夸大并且不按比例画出。当在本说明书和权利要求中使用术语“包含”时,其不排除其它要素或步骤。当涉及单数名词使用不定冠词或定冠词例如“一个”或“一种”、“所述”时,除非另外特别说明,否则其包括所述名词的复数形式。

[0055] 此外,还要注意,说明书和权利要求中使用的术语“包含”不应被解释为限于随后列举的对象(means);其不排除其它要素或步骤。因此,表述“包含设备A和B的装置”的范围不应被限定为仅由组件A和B组成的装置。其表示,就本发明而言,所述装置的仅有相关组件是A和B。

[0056] 在几个化学式中涉及“烷基”和“芳基”。在这方面,“烷基”各自独立地表示至多10个碳原子的脂族直链、支链或环状烷基,其可包括1-3个杂原子例如O、N或S,优选具有1-6个碳原子,且“芳基”各自独立地表示至多10个碳原子的芳族或杂芳族基团,其可包括1-3个杂原子例如N或S。在几个式中,参考字母例如“A”、“B”、“X”、“Y”和各种编号的“R”基团来表示基团或取代基。这些字母的定义将参考各式进行解读,即在不同的式中,除非另外说明,否则这些字母可各自独立地具有不同的含义。

[0057] 逆狄尔斯-阿尔德反应

[0058] 逆狄尔斯-阿尔德偶联化学通常包括偶联以形成不稳定中间体的反应物对,所述中间体通过逆狄尔斯-阿尔德反应消除作为唯一副产物的小分子(取决于起始化合物,其可以是例如 N_2 、 CO_2 、 RCN)以形成稳定产物。所述成对反应物包括作为一种反应物(即一种生物正交反应性基团)的适合的二烯,例如四嗪衍生物如缺电子四嗪,和作为另一种反应物(即另一种生物正交反应性基团)的根据式(1)的张力环辛烯。

[0059] 例如缺电子(取代的)四嗪与本发明的展平的TCO部分的异常快速的反应导致了连接中间体,其在[4+2]逆狄尔斯-阿尔德环加成中通过消除作为唯一副产物的 N_2 重排为稳定的二氢哒嗪。这在图2中示出。

[0060] 这两种反应性物类是非生物的,且不经历快速的体内代谢。它们是生物正交的,例如它们在生理介质中彼此选择性地反应。关于这点的一个优点在于所述二烯和所述环辛烯都基本上对细胞内或细胞表面上的生物分子和所有其它区域如血清等是非反应性的。因此,本发明的化合物和方法能够在活细胞、组织或生物体中使用。而且,所述反应性基团相对较小,并且能够被引入生物样品或活生物体中而不显著改变其中的生物分子的尺寸。利用所述[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应,可以利用小的反应配偶体例如四嗪或环辛烯将大尺寸的初级靶向部分例如抗体与标记物或其它分子结合。甚至更有利地,利用(匹配的)相对小的反应配偶体例如四嗪和环辛烯,可以使相对小的初级靶向部分例如肽与标记物或其它分子结合。所述预靶向探针和效应物探针的尺寸和性质不受所述次级靶和次级靶向部分的很大影响,使得(预)靶向方案能够用于小的靶向部分。因为这样,能够靶向其它组织,即所述探针的目标不限于脉管系统和胞间隙(目前使用抗体-链霉亲和素的预靶向通常是限于脉管系统和胞间隙)。

[0061] 关于逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应和反应性物类对的行为的文献包括: Thalhammer, F; Wallfahrer, U; Sauer, J, Tetrahedron Letters, 1990, 31 (47),

6851-6854; Wijnen, JW; Zavarise, S; Engberts, JBFN, Journal Of Organic Chemistry, 1996, 61, 2001-2005; Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130 (41), 13518-19), R. Rossin, P. Renart Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375, N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Angew Chem Int Ed 2009, 48, 7013, 和Devaraj等人, Angew.Chem.Int.Ed., 2009, 48, 1-5。

[0062] 应该理解, 广义上, 根据本发明上述偶联化学基本上可以应用于预靶向中能够使用的任何分子、基团或部分对。即一个这样的对将包含初级靶向部分 (其能够与初级靶结合), 且进一步包含至少一个次级靶。另一个将是适合用于与所述次级靶结合的次级靶向部分, 且进一步包含适合发挥治疗作用 (通常是药学活性化合物), 或适合通过成像技术定位 (即标记物) 或两者的部分。

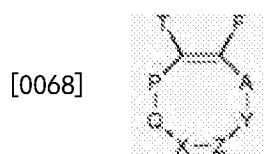
[0063] 因此, 根据本发明, 所述预靶向探针和所述效应物探针中的任一个被上面限定的展平的环辛烯官能化, 而另一个被四嗪或其它适合的二烯官能化。这在图3中示出。上部的方案 (图3 a) 示出了包含通过连接体 (linker) 部分 (任选包含柔性间隔体) 与作为初级靶向部分的抗体连接的二吡啶基四嗪的预靶向探针, 和包含通过连接体 (柔性间隔体) 与可检测标记物连接的环辛烯 (作为次级靶向部分) 的效应物探针。下面的方案 (图3 b) 示出了正好相反的方案, 即包含环辛烯的预靶向探针和包含四嗪的效应物探针。

[0064] 亲双烯体

[0065] 本发明的一个基本成就在于选择亲双烯体, 即如上定义的展平的TCO部分, 其使得对于所述生物正交偶联反应能够获得高达一百 (100) 倍或更多的增加的反应速率。或者换一种说法, 反应时间仅是原来所需时间的1%。或者再换一种说法, 一种反应物的浓度可以是原来的1/100。

[0066] 亲双烯体在广义上是包含至少两个被固定在相同平面中的环外键的8元非芳族环状亚烯基部分 (优选环辛烯部分, 和更优选反式-环辛烯部分)。这在下文中通常被称作“展平的TCO”。

[0067] 优选地, 所述扁平的TCO满足下式:



[0069] 其中A和P是 CR^a_2 ; 每个 R^a 独立地是H或取代基, 优选H或选自烷基和芳基的取代基, 更优选 C_{1-6} 烷基或苯基)。

[0070] 在一个有趣的实施方案中, Y、Z、X、Q各自独立地选自: CR^a_2 、 $C=CR^a_2$ 、 $C=O$ 、 $C=S$ 、 $C=NR^b$ 、S、SO、SO₂、O、NR^b和SiR^c₂, 其中Y、Z、X和Q中至少一个且至多4个选自: $C=CR^a_2$ 、 $C=O$ 、 $C=S$ 和 $C=NR^b$, 且前提条件是, 不存在选自下述的邻近原子对: O-O、O-NR^b、S-NR^b、O-S、O-S(O)、O-S(O)₂和S-S, 并使得Si仅邻近 CR^a_2 或O。

[0071] 在另一个有趣的实施方案中, 键PQ、QX、XZ、ZY、YA中的一个为稠合环的一部分或由 $CR^a=CR^a$ 组成, 前提条件是, PQ和YA不是芳族5-或6-元环、共轭7-元环或 $CR^a=CR^a$ 的一部分; 剩余的基团 (A、Y、Z、X、Q、P) 彼此独立地是 CR^a_2 、 $C=CR^a_2$ 、 $C=O$ 、 $C=S$ 、 $C=NR^b$ 、S、SO、SO₂、O、NR^b、

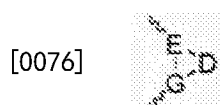
SiR^c_2 ,使得P、A是 CR^a_2 ,其中至多2个基团是 $\text{C}=\text{CR}^a_2$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{NR}^b$,且不存在选自下述的邻近原子对: $\text{O}-\text{O}$ 、 $\text{O}-\text{NR}^b$ 、 $\text{S}-\text{NR}^b$ 、 $\text{O}-\text{S}$ 、 $\text{O}-\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{O}-\text{S}(\text{O})_2$ 和 $\text{S}-\text{S}$,并使得Si (如果存在的话) 邻近 CR^a_2 或 O ,且 $\text{CR}^a=\text{CR}^a$ 键(如果存在的话) 邻近 CR^a_2 或 $\text{C}=\text{CR}^a_2$ 基团;

[0072] 在另一个有趣的实施方案中,键PQ、QX、XZ、ZY、YA中的两个是稠合环的一部分或由 $\text{CR}^a=\text{CR}^a$ 组成,前提条件是,PQ和YA不是芳族5-或6-元环、共轭7-元环或 $\text{CR}^a=\text{CR}^a$ 的一部分;剩余的基团(A、Y、Z、X、Q、P) 彼此独立地是 CR^a_2 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O 、 NR^b 、 SiR^c_2 ,使得P、A是 CR^a_2 ,前提条件是,不存在选自下述的邻近原子对: $\text{O}-\text{O}$ 、 $\text{O}-\text{NR}^b$ 、 $\text{S}-\text{NR}^b$ 、 $\text{O}-\text{S}$ 、 $\text{O}-\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{O}-\text{S}(\text{O})_2$ 和 $\text{S}-\text{S}$,并使得Si (如果存在的话) 邻近 CR^a_2 或 O ,且 $\text{CR}^a=\text{CR}^a$ 键(如果存在的话) 邻近 CR^a_2 或 $\text{C}=\text{CR}^a_2$ 基团。

[0073] T、F各自独立地表示H或选自烷基、F、Cl、Br或I的取代基。

[0074] 在某些实施方案中,存在稠合环,其选自如下定义的稠合的3-元环、稠合的4-元环、稠合的双环7-元环、稠合的芳族5-元环、稠合的芳族6-元环和稠合的平面共轭7-元环:

[0075] 稠合的3-元环是:

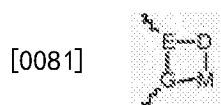


[0077] 其中E、G是上述8-元环的一部分,且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY,使得P、A是C或 CR^a

[0078] E-G是 CR^a-CR^a ,且D是 CR^a_2 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{NR}^b$ 、 NR^b 、 O 、 S

[0079] E-G是 CR^a-N ,且D是 CR^a_2 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{NR}^b$ 、 NR^b 、 O 、 S 。

[0080] 稠合的4-元环是:



[0082] E-G是上述8-元环的一部分,且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY,使得P、A是C或 CR^a

[0083] E、G是 CR^a 或N,且D、M彼此独立地是 CR^a_2 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{NR}^b$ 、 $\text{C}=\text{CR}^a_2$ 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O 、 NR^b ,但是没有邻近的 $\text{O}-\text{O}$ 或 $\text{S}-\text{S}$ 基团

[0084] E-D是 $\text{C}=\text{CR}^a$,且G是N、 CR^a ,且M是 CR^a_2 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O 、 NR^b

[0085] E-D是 $\text{C}=\text{N}$,且G是N、 CR^a ,且M是 CR^a_2 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O

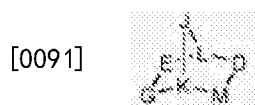
[0086] D-M是 $\text{CR}^a=\text{CR}^a$,且E、G彼此独立地是 CR^a 、N

[0087] D-M是 $\text{CR}^a=\text{N}$,且E是 CR^a 、N,且G是 CR^a

[0088] E是C, G是 CR^a 或N,且D、M是 CR^a_2 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O 、 NR^b 或 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{NR}^b$ 、 $\text{C}=\text{CR}^a_2$ 中的最多1个,但是没有邻近的 $\text{O}-\text{O}$ 或 $\text{S}-\text{S}$ 基团

[0089] E、G是C,且D、M彼此独立地是 CR^a_2 、 S 、 SO 、 SO_2 、 O 、 NR^b ,但是没有邻近的 $\text{O}-\text{O}$ 或 $\text{S}-\text{S}$ 基团。

[0090] 稠合的双环7-元环是:



[0092] E-G是上述8-元环的一部分,且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY,使得P、A是C或 CR^a

[0093] E、G是C、CR^a或N；K、L是CR^a；D、M形成CR^a=CR^a或CR^a=N，或D、M彼此独立地是CR^a₂、C=O、C=S、C=NR^b、C=CR^a₂、S、SO、SO₂、O、NR^b，但是没有邻近的O-O、S-S、N-S基团；J是CR^a₂、C=O、C=S、C=NR^b、C=CR^a₂、S、SO、SO₂、O、NR^b；最多2个N基团

[0094] E、G是C、CR^a；K是N和L是CR^a；D、M形成CR^a=CR^a键或D、M彼此独立地是CR^a₂、C=O、C=S、C=NR^b、C=CR^a₂、NR^b，但是没有邻近的O-O、S-S、N-S基团；J是CR^a₂、C=O、C=S、C=NR^b、C=CR^a₂、S、SO、SO₂、O、NR^b；最多2个N基团

[0095] E、G是C、CR^a；K和L是N；D、M、J彼此独立地是CR^a₂、C=O、C=S、C=NR^b、C=CR^a₂基团。

[0096] 稠合的芳族5-元环是

[0097]



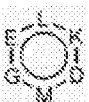
[0098] E、G是上述8-元环的一部分，且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY

[0099] E、G是C。基团L、K或M中的一个O、NR^b、S，且剩余的两个基团彼此独立地是CR^a或N

[0100] E是C且G是N。L、K、M彼此独立地是CR^a或N。

[0101] 稠合的芳族6-元环是：

[0102]

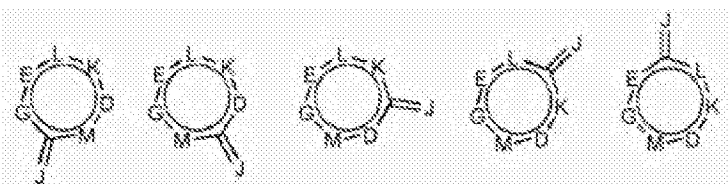


[0103] E、G是上述8-元环的一部分，且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY

[0104] E、G是C。L、K、D、M彼此独立地是CR^a或N。

[0105] 稠合的平面共轭7-元环是

[0106]



[0107] E、G是上述8-元环的一部分，且可以稠合至PQ、QP、QX、XQ、XZ、ZX、ZY、YZ、YA、AY

[0108] E、G是C；L、K、D、M是CR^a；J是S、O、CR^a₂、NR^b。

[0109] 在所有上述的实施方案中，A、P、Q、Y、X和Z中的一个或它们在其中作为一部分的取代基或稠合环任选地经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针结合。

[0110] 上面指出的每个R^a可以独立地是H、烷基、O-烷基、O-芳基、S-芳基、S-烷基、S(O)-芳基、S(O)-烷基、S(O)₂-芳基、S(O)₂-烷基、Si-芳基、Si-烷基、Si-O-烷基、OCO-烷基、OCO-芳基、SCO-烷基、SCO-芳基、OCS-烷基、OCS-芳基、SCS-烷基、SCS-芳基、F、Cl、Br、I、N₃、SO₂H、SO₃H、SO₄H、PO₄H、OH、SH、NO₂、NO、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、CF₃、NR'R''（其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基）、C(=O)O-烷基、C(=O)O-芳基、C(=S)O-烷基、C(=S)O-芳基、C(=O)S-烷基、C(=O)S-芳基、C(=S)S-烷基、C(=S)S-芳基、C(=O)NR'R''（其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基）、NR'CO-烷基（其中R'是H、烷基或芳基）、NR'CO-芳基（其中R'是H、烷基或芳基）、NR'C(=O)O-烷基（其中R'是H、烷基或芳基）、NR'C(=O)O-芳基（其中R'是H、烷基或芳基）、OCONR'-烷基（其中R'是H、烷基或芳基）、OCONR'-芳基（其中R'是H、烷基或芳基）、NR'CONR''-烷基（其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基）、NR'CONR''-芳基（其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基）、NR'CSNR''-烷基（其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基）和

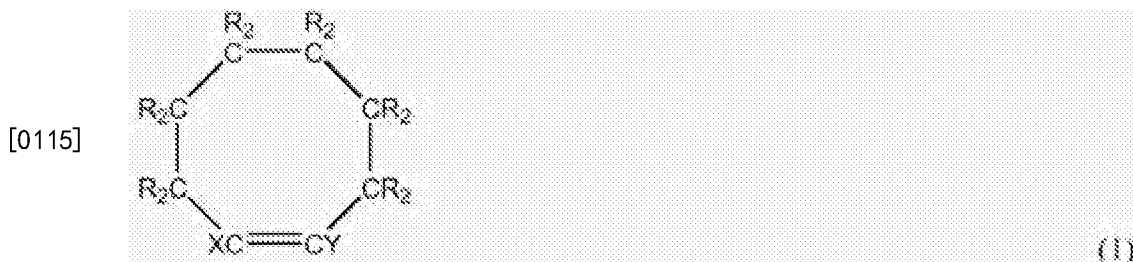
NR'CSNR''-芳基(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基)、CR'NR''(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基)。

[0111] 上面指出的每个R^b选自:H、烷基、芳基、O-烷基、O-芳基、OH、C(=O)NR'R''(其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基)、R'CO-烷基(其中R'是H、烷基和芳基);

[0112] 上面指出的每个R^c选自:H、烷基、芳基、O-烷基、O-芳基、OH;

[0113] 其中两个或更多个R^{a,b,c}部分可以一起形成环;

[0114] 在一个优选实施方案中,所述反式-环辛烯部分满足式(1):

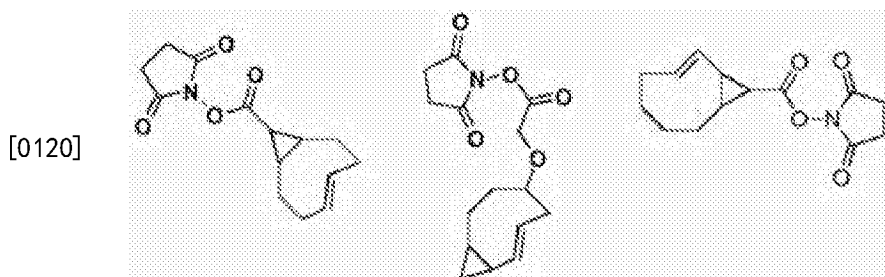


[0116] 其中,除了至少两个被固定在相同平面中的环外键的存在以外,每个R独立地表示H,或者,在至多6个实例中,表示选自下述的取代基:烷基、O-烷基、S-芳基、烷基、O-芳基、O-烷基、S-芳基、S-烷基、S(O)-芳基、S(O)-烷基、S(O)₂-芳基、S(O)₂-烷基、Si-芳基、Si-烷基、Si-O-烷基、OCO-烷基、OCO-芳基、SCO-烷基、SCO-芳基、OCS-烷基、OCS-芳基、SCS-烷基、SCS-芳基、F、Cl、Br、I、SO₂、SO₃、SO₄、OH、SH、NO₂、CN、NR'R''(其中R'和R''各自独立地是H或烷基)、芳基、C(=O)O-烷基、C(=O)O-芳基、C(=S)O-烷基、C(=S)O-芳基、C(=O)S-烷基、C(=O)S-芳基、C(=S)S-烷基、C(=S)S-芳基、C(=O)NR'R''(其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基)、R'CO-烷基(其中R'是H、烷基或芳基)、NR'CO-芳基(其中R'是H、烷基或芳基)、NR'C(=O)O-烷基(其中R'是H、烷基或芳基)、NR'C(=O)O-芳基(其中R'是H、烷基或芳基)、OCONR'-烷基(其中R'是H、烷基或芳基)、OCONR'-芳基(其中R'是H、烷基或芳基)、NR'CONR''-烷基(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基)、NR'CONR''-芳基(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基)、NR'CSNR''-烷基(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基)和NR'CSNR''-芳基(其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基);其中两个R部分可以一起形成环;

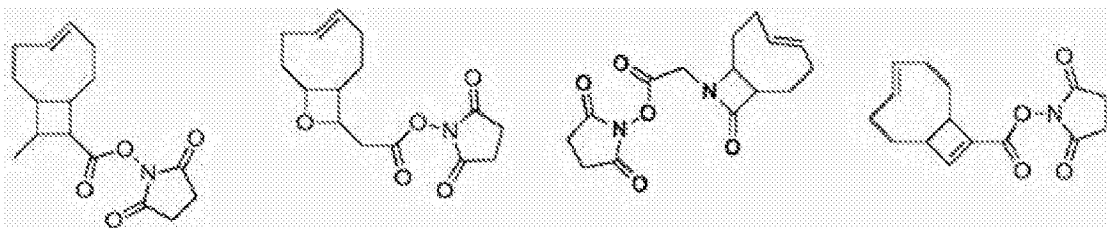
[0117] 其中至少一个R被包含在任选经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针的连接体部分中,且其中X和Y各自独立地表示H或选自烷基、F、Cl、Br和I的取代基。

[0118] 在前述亲双烯体中,优选的是,所述至少两个被固定在相同平面中的环外键选自:(a) 稠合的环丙基环的单键,(b) 稠合的环丁基环的单键,(c) 稠合的芳族环的杂合键,(d) 与氧形成的环外双键,和(e) 与碳形成的环外双键。

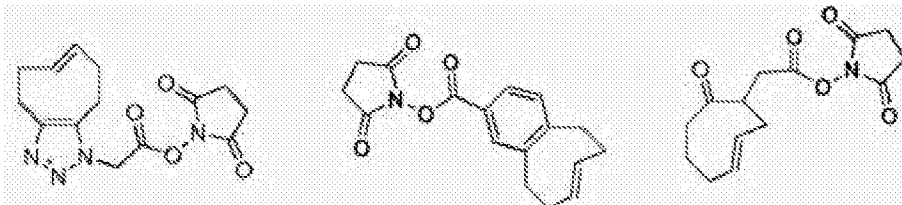
[0119] 在另一个优选实施方案中,所述亲双烯体是选自下述结构的化合物:



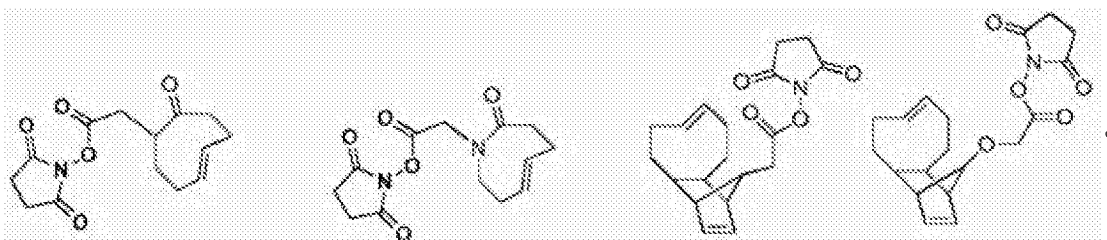
[0121]



[0122]



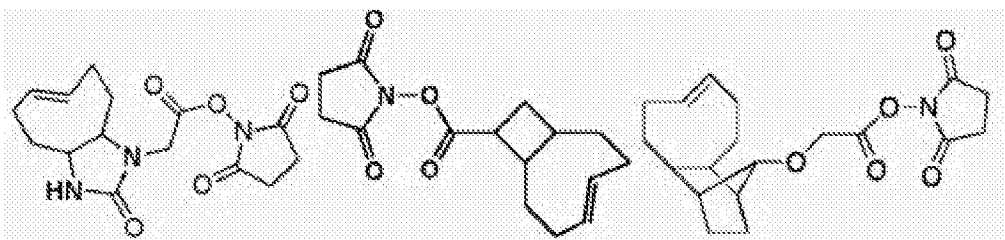
[0123]



[0124] 应当指出,除了它们的适宜的展平的亲双烯体结构以外,通常基于熟练的有机化学家在合成上可得到的结构部分(在环中和在取代基中)来选择前述结构。

[0125] 在另一个有趣的实施方案中,所述亲双烯体是选自下述结构的化合物:

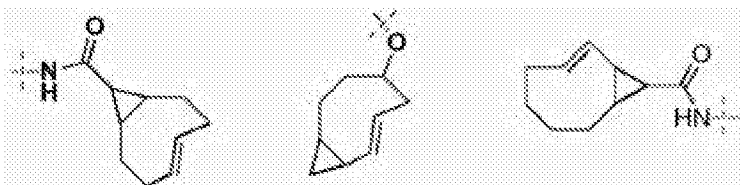
[0126]



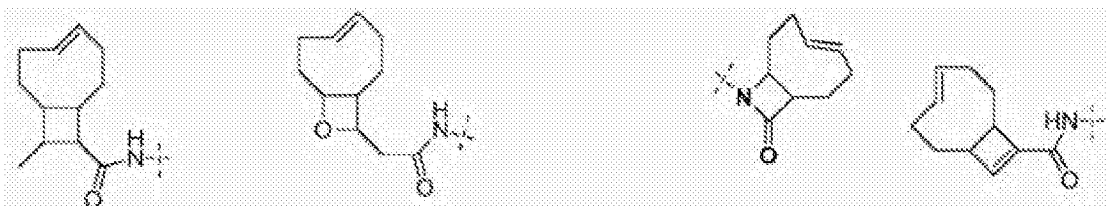
[0127] 在这里以N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS-酯)的形式描绘了上述亲双烯体。NHS-酯通常被用于蛋白修饰,且在这里充当将TCO与靶向部分或效应物部分偶联的工具。

[0128] 为了解释目的,还可以在不具体参考NHS的情况下描绘TCO结构。考虑到本发明的描述(其中所述TCO部分被包含在预靶向探针或效应物探针中),关于前述化合物,这可以如下举例说明:

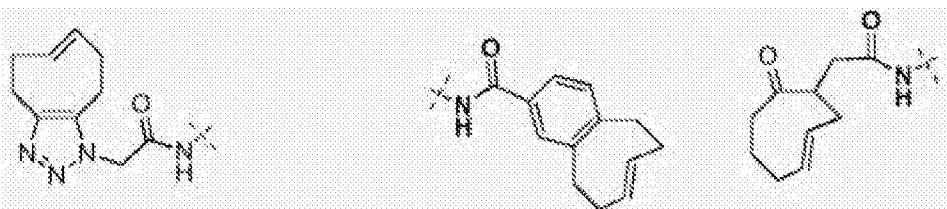
[0129]



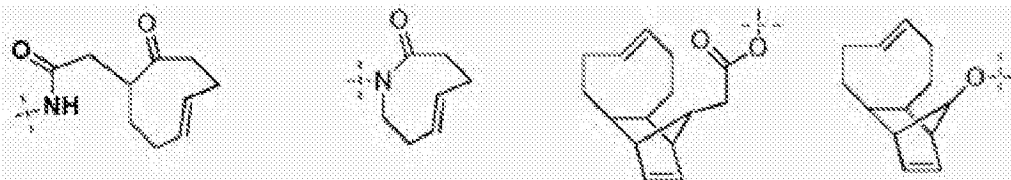
[0130]



[0131]



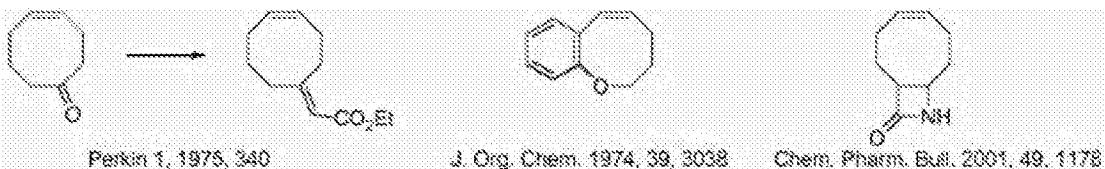
[0132]



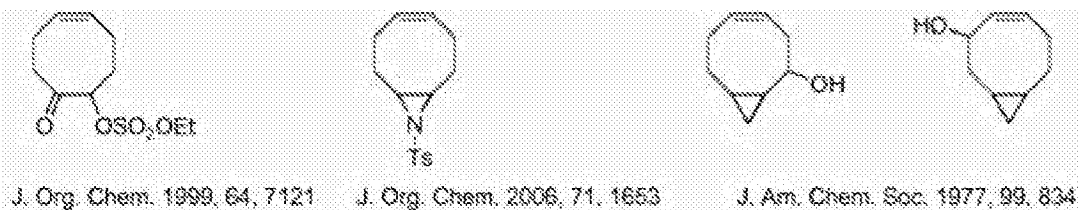
[0133] --- = 连接的初级靶向部分或效应物部分 (的剩余部分), 任选经由连接体连接。

[0134] 技术人员基于已知的得到环-辛烯类和对应的含杂原子的环的合成途径, 可以合成用于本发明中的亲双烯体。通过熟练的有机化学家已知的技术, 可以进行得到两个被固定在相同平面中的环外键所需的取代。合适的起始化合物包括下述前体, 在下面用参考文献指出:

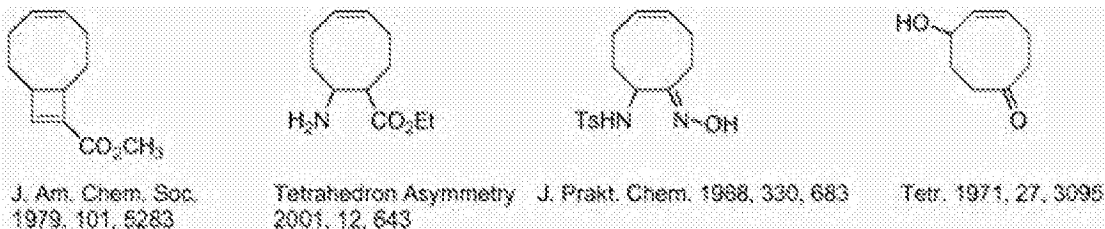
[0135]



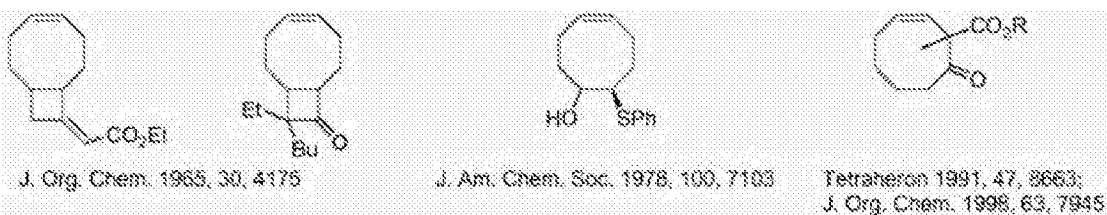
[0136]



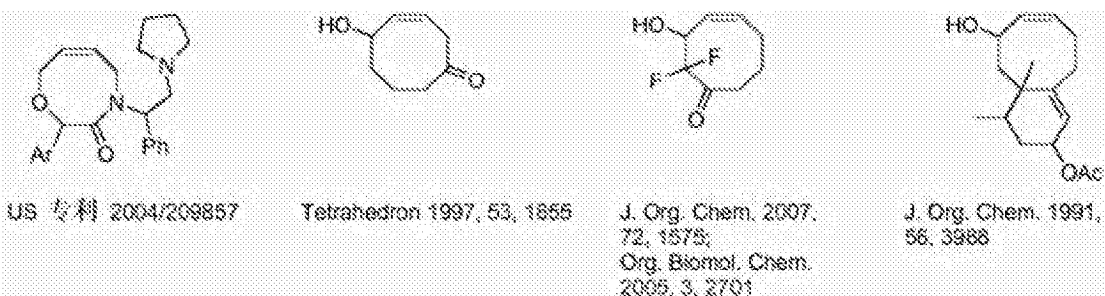
[0137]



[0138]



[0139]



[0140]



[0141] 技术人员进一步知晓大量环辛烯衍生物,其可通过使用Grubbs催化剂的闭环置换反应(ring closing metathesis reaction)来合成。

[0142] 如上所述,所述TCO可能在环中包括一个或多个杂原子。这同样是技术人员可充分获得的。参考例如硫醚在TCO中的存在:Cere等人,Journal of Organic Chemistry 1980, 45, 261。以及,例如,在TCO中的-O-SiR₂-O部分:Prevost等人,Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 14182。

[0143] 二烯

[0144] 本领域技术人员知晓大量在所述逆狄尔斯-阿尔德反应中具有反应性的二烯。优选的二烯参

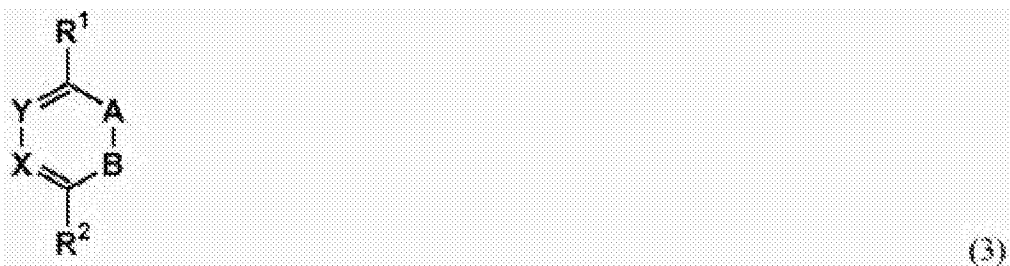
[0145]



[0146] 其中R¹选自:烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、C(=O)R'、C(=S)R'、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、NR'C(=O)NR'R''、NR'C(=S)NR'R''、其中R'、R''和R'''各自独立地是H、芳基或烷基;A和B各自独立地选自:烷基取代的碳、芳基取代的碳、氮、N⁺O⁻、N⁺R(其中R是烷基),前提条件是,A和B不都是碳;X选自:O、N-烷基和C=O,且Y是CR,其中R选自:H、烷基、芳基、C(=O)OR'、C(=O)SR'、C(=S)OR'、C(=S)SR'、C(=O)NR'R''、其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基。

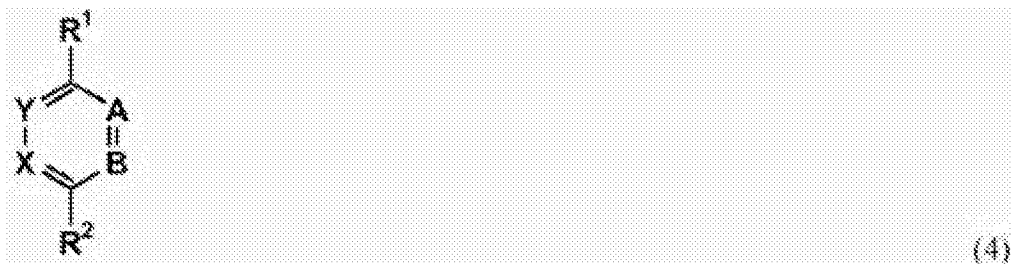
[0147] 特别适合作为环辛烯的反应配偶体的二烯是:

[0148]



[0149] 其中R¹和R²各自独立地选自:H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、NO₂、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R''、SC(=O)R''、OC(=S)R''、SC(=S)R''、S(=O)R'、S(=O)₂R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、OC(=O)NR'R''、SC(=O)NR'R''、OC(=S)NR'R''、SC(=S)NR'R''、NR'C(=O)NR'R''、NR'C(=S)NR'R''、其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基,且R'''独立地是芳基或烷基;A选自:N-烷基、N-芳基、C=O和CN-烷基;B是O;X选自:N、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR'R''、CC(=S)NR'R''、R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基,且R'''独立地是芳基或烷基;Y选自:CH、C-烷基、C-芳基、N和N⁺O⁻。

[0150]



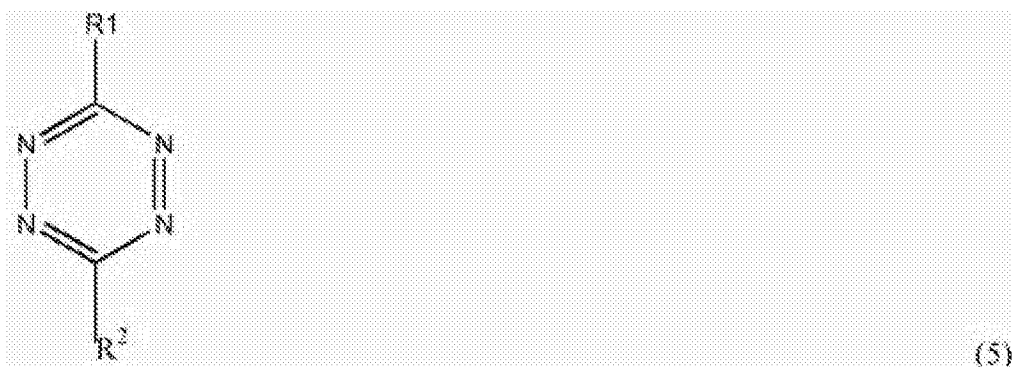
[0151] 特别适合作为环辛烯的反应配偶体的另一种二烯是：

[0152] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自：H、烷基、芳基、 CF_3 、 CF_2-R' 、 NO_2 、 OR' 、 SR' 、 $C(=O)R'$ 、 $C(=S)R'$ 、 $OC(=O)R''$ 、 $SC(=O)R''$ 、 $OC(=S)R''$ 、 $SC(=S)R''$ 、 $S(=O)R'$ 、 $S(=O)_2R''$ 、 $C(=O)O-R'$ 、 $C(=O)S-R'$ 、 $C(=S)O-R'$ 、 $C(=S)S-R'$ 、 $C(=O)NR'R''$ 、 $C(=S)NR'R''$ 、 $NR'R''$ 、 $NR'C(=O)R''$ 、 $NR'C(=S)R''$ 、 $NR'C(=O)OR''$ 、 $NR'C(=S)OR''$ 、 $NR'C(=O)SR''$ 、 $NR'C(=S)SR''$ 、 $OC(=O)NR'R''$ 、 $SC(=O)NR'R''$ 、 $OC(=S)NR'R''$ 、 $SC(=S)NR'R''$ 、 $NR'C(=O)NR'R''$ 、 $NR'C(=S)N'R'R''$ ，其中 R' 和 R'' 各自独立地是H、芳基或烷基，且 R'' 独立地是芳基或烷基；A选自：N、C-烷基、C-芳基和 N^+O^- ；B是N；X选自：N、CH、C-烷基、C-芳基、 $CC(=O)R'$ 、 $CC(=S)R'$ 、 $CS(=O)R'$ 、 $CS(=O)_2R''$ 、 $CC(=O)O-R'$ 、 $CC(=O)S-R'$ 、 $CC(=S)O-R'$ 、 $CC(=S)S-R'$ 、 $CC(=O)NR'R''$ 、 $CC(=S)NR'R''$ ， R' 和 R'' 各自独立地是H、芳基或烷基，且 R'' 独立地是芳基或烷基；Y选自：CH、C-烷基、C-芳基、N和 N^+O^- 。

[0153] 特别有用的四嗪衍生物是缺电子四嗪类，即被通常不被认为供电子的基团或部分取代的四嗪类，优选带有吸电子取代基。

[0154] 这些缺电子四嗪类通常满足以下结构式：

[0155]



[0156] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地表示选自下述的取代基：2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基或苯基，任选被一个或多个吸电子基团取代，所述吸电子基团是例如 NO_2 、F、Cl、 CF_3 、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、Ar，其中R是C₁-C₆烷基，且Ar代表芳族基团，特别是苯基、吡啶基或萘基。

[0157] 在根据式(2)-(5)每一个的化合物中，所述 R^1 和 R^2 基团(包括在X或Y上的那些)可以进一步具有如下所述的适合的连接体或间隔体部分。类似地，并且与其独立地，如上定义的式(1)的亲双烯体也可以进一步具有如下所述的适合的连接体或间隔体部分。

[0158] 应该理解，在所有实施方案中，所述二烯将包含至少一个任选经由间隔体与所述预靶向探针或所述效应物探针的连接。

[0159] 根据一个实施方案，本发明用于靶向的成像。

[0160] 根据该实施方案，特定的初级靶的成像通过所述预靶向探针的初级靶向部分的特

异性结合以及利用所述效应物探针中包含的可检测标记物检测这种结合来实现。

[0161] 基于熟练的有机化学家已知的合成途径,技术人员可以合成用于本发明中的二烯。

[0162] 初级靶

[0163] 本发明中使用的“初级靶”涉及要在诊断和/或成像方法中检测的靶标,和/或要通过药理学活性化合物或其它治疗方式调控、结合或以其它方式寻址的靶标。

[0164] 所述初级靶可以选自人类或动物体内或病原体或寄生物上的任何适合的靶,例如包含以下的组:细胞例如细胞膜和细胞壁、受体例如细胞膜受体、细胞内结构例如高尔基体或线粒体、酶、受体、DNA、RNA、病毒或病毒颗粒、抗体、蛋白质、碳水化合物、单糖、多糖、细胞因子、激素、类固醇、生长抑素受体、单胺氧化酶、毒蕈碱受体、心肌交感神经系统(myocardial sympatic nerve system)、白三烯受体(例如在白细胞上)、尿激酶纤溶酶原激活剂受体(uPAR)、叶酸受体、细胞凋亡标志物、(抗)血管生成标志物、胃泌素受体、多巴胺能系统、血清素能系统、GABA能系统、肾上腺素能系统、胆碱能系统、阿片受体、GPIIb/IIIa受体和其它血栓相关受体、纤维蛋白、降钙素受体、促吞噬素(tuftsins)受体、整合素受体、VEGF/EGF受体、EGF、基质金属蛋白酶(MMP)、P/E/L-选择素受体、LDL受体、P-糖蛋白、神经降压素受体、神经肽受体、P物质受体、NK受体、CCK受体、 σ 受体、白细胞介素受体、单纯疱疹病毒酪氨酸激酶、人酪氨酸激酶。

[0165] 根据本发明的一个特定实施方案,所述初级靶是蛋白质例如受体。或者,所述初级靶可以是代谢途径,其在疾病例如感染或癌症期间表达上调,例如DNA合成、蛋白质合成、膜合成和碳水化合物摄取。在患病组织中,上述标志物可不同于健康组织并提供早期检测、特异性诊断和治疗特别是靶向的治疗的独特可能性。

[0166] 预靶向探针

[0167] 预靶向探针包含能够与感兴趣的初级靶结合的部分。

[0168] 靶向部分通常是对细胞表面靶(例如膜受体)、结构蛋白(例如淀粉样斑)或细胞内靶(例如RNA、DNA、酶、细胞信号传导通路)具有亲和力的结构。这些部分可以是抗体(片段)、蛋白质、适体、寡肽、寡核苷酸、寡糖以及肽、拟肽和已知在特定的疾病或障碍处积累的有机药物化合物。

[0169] 本文描述了用于本发明试剂盒的适合的初级靶向部分的特定实施方案,并包括受体结合性肽和抗体。本发明的一个特定实施方案涉及小靶向部分例如肽的使用,从而获得可透过细胞的靶向探针。

[0170] 本发明中使用的“初级靶向部分”涉及与初级靶结合的靶向探针部分。初级靶向部分的特定例子是与受体结合的肽或蛋白质。初级靶向部分的其它例子是与细胞化合物结合的抗体或其片段。抗体可以针对非蛋白质化合物和蛋白质或肽生成。其它初级靶向部分可以由适体、寡肽、寡核苷酸、寡糖、以及拟肽和有机药物化合物构成。初级靶向部分优选以高特异性、高亲和力、任意地甚至共价结合,并且与所述初级靶的结合优选在体内是稳定的。

[0171] 为了使得特异性靶向以上列举的初级靶,所述靶向探针的初级靶向部分可以包含化合物,其包括、但不限于:抗体、抗体片段例如Fab2, Fab, scFV、双体(diabodies)、聚合物(借助于EPR效应的肿瘤靶向)、蛋白质、肽例如奥曲肽和衍生物、VIP、MSH、LHRH、趋化肽、铃蟾肽、弹性蛋白、肽类似物、碳水化合物、单糖、多糖、病毒、全细胞(whole cells)、噬菌体、

药物、化疗剂、受体激动剂和拮抗剂、细胞因子、激素、类固醇。在本发明的内容中设想的有机化合物的例子是或衍生自：雌激素类例如雌二醇、雄激素类、孕激素类、皮质类固醇类、紫杉醇、依托泊苷、多柔比星 (doxorubicin)、甲氨蝶呤、叶酸和胆固醇。

[0172] 根据本发明的一个特定实施方案,所述初级靶是受体,并且适合的初级靶向部分包括、但不限于此类受体的配体或仍与该受体结合的配体部分,例如在受体结合性蛋白质配体的情况下的受体结合性肽。

[0173] 蛋白质性质的初级靶向部分的其它例子包括干扰素,例如 α 、 β 和 γ 干扰素,白细胞介素和蛋白质生长因子,例如肿瘤生长因子,例如 α 、 β 肿瘤生长因子,血小板衍生生长因子(PDGF),uPAR靶向蛋白,载脂蛋白,LDL,膜联蛋白V,内皮抑素,和血管抑素。

[0174] 初级靶向部分的可选择的例子包括DNA、RNA、PNA和LNA,其例如与所述初级靶互补。

[0175] 根据本发明的一个特定实施方案,使用了小的亲脂性初级靶向部分,其能够与细胞内初级靶结合。

[0176] 根据本发明的另一个特定实施方案,选择所述初级靶和初级靶向部分从而导致组织或疾病,例如癌症、炎症、感染、心血管疾病例如血栓、动脉粥样硬化病变、缺氧位置例如中风、肿瘤、心血管障碍、脑障碍、细胞凋亡、血管生成,器官和报告基因/酶的特异性的或增加的靶向。这可以通过选择具有组织、细胞或疾病特异性表达的初级靶实现。例如,膜叶酸受体介导叶酸及其类似物例如甲氨蝶呤的细胞内积累。正常组织内的表达是有限的,但受体在各种肿瘤细胞类型中被过度表达。

[0177] 根据一个实施方案,所述预靶向探针和所述效应物探针可以是多聚体化合物(multimeric compounds),其包含多个初级和/或次级靶和/或靶向部分。这些多聚体化合物可以是聚合物、树枝状聚合物、脂质体、聚合物颗粒或其它聚合物结构。对于放大检测信号特别感兴趣的是具有多于一个次级靶的靶向探针,其使得能够结合数个效应物探针。

[0178] 所述预靶向探针进一步包含上述第一生物正交反应性基团。该基团充当“次级靶”,即作为提供用于所述逆狄尔斯-阿尔德偶联化学的第一反应配偶体的靶向探针部分。

[0179] 如上所述,所述次级靶可以是所述偶联反应的任一配偶体。即,在一个实施方案中,其是缺电子四嗪。在另一个实施方案中,其是根据本发明如上所述的展平的TCO。

[0180] 在所述预靶向探针中,所述初级靶向部分和所述第一生物正交反应性基团可以彼此直接相连。它们还可以通过连接体彼此结合,此外它们可以都与初级靶向支架(scaffold)例如生物聚合物如多肽连接。即在最简单的情况下,所述连接体部分是键。适合的连接体部分进一步包括,但不限于,具有从2到200,特别是3到113和优选5-50个重复单元的聚乙二醇(PEG)链。通过调节PEG链长,能够影响所述探针在生理系统中的循环时间。这对于预靶向探针是特别相关的(因为将所述初级靶向部分连接到所述初级靶的初始靶向步骤可能涉及相对慢的过程,需要相对长的循环时间)。连接体部分任选包括生物聚合物片段,例如寡肽或多肽或聚丙交酯。

[0181] 应该理解,本发明包括其中所述二烯和所述亲双烯体与所述预靶向或效应物探针的任一个连接的任何可想到的方式。实施与这些探针的结合的方法,例如通过反应性氨基酸例如赖氨酸或半胱氨酸,已为本领域技术人员所知晓。

[0182] 效应物探针

[0183] 效应物探针包含能够提供想要的诊断、成像和/或治疗效果的效应物部分。所述效应物探针进一步包含次级靶向部分。

[0184] 所述次级靶向部分涉及形成用于可用的次级靶(即所述预靶向探针中包含的一个或多个生物正交反应性基团)的反应配偶体的效应物探针部分。应该理解,在所述次级靶是如上定义的式(1)的展平的TCO的情况下,所述次级靶向部分可以是二烯例如四嗪,反之亦然。

[0185] 所述效应物部分可以是例如可检测标记物。这里使用的“可检测标记物”涉及使得例如当存在于细胞、组织或生物体中时所述探针能够被检测的效应物探针部分。在本发明的内容中,所设想的可检测标记物的一种类型是对比提供剂。在本发明的内容中设想了不同类型的可检测标记物并在下文加以描述。

[0186] 因此,根据本发明的一个特定实施方案,本发明的预靶向试剂盒和方法被用于成像,特别是医学成像。为了识别所述初级靶,使用包含一种或多种可检测标记物的成像探针作为所述效应物探针。所述成像探针的可检测标记物的特定例子是用于常规成像系统的对比提供部分例如可MRI成像的结构、自旋标记物、光学标记物、超声响应结构、X射线响应部分、放射性核素、(生物)发光和FRET型染料。在本发明的内容中所设想的示例性的可检测标记物包括但不限于局限于荧光分子(例如自发荧光分子、与试剂接触时发荧光的分子等)、放射标记物;生物素(例如经由用抗生物素蛋白结合生物素进行检测的生物素);荧光标记(tag),用于MRI的成像结构,包括顺磁金属,成像试剂,例如在美国专利号4,741,900和5,326,856中描述的那些)等。用于成像的放射性核素可以是例如选自下述的同位素: ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 和 ^{203}Pb 。

[0187] 在某些应用中也可以将其它元素和同位素例如被用于治疗的元素或同位素用于成像。

[0188] 所述可MRI成像的部分可以是例如顺磁离子或超顺磁颗粒。所述顺磁离子可以是选自下述的元素:Gd、Fe、Mn、Cr、Co、Ni、Cu、Pr、Nd、Yb、Tb、Dy、Ho、Er、Sm、Eu、Ti、Pa、La、Sc、V、Mo、Ru、Ce、Dy、Tl。所述超声响应部分可以包含微泡,其壳由磷脂和/或(可生物降解的)聚合物、和/或人血清白蛋白构成。所述微泡可以用氟化气体或液体填充。

[0189] 所述X射线响应部分包括、但不限于碘、钡、硫酸钡、泛影葡胺(gastrografin),或可以包含用碘化合物和/或硫酸钡填充的囊泡、脂质体或聚合物胶囊。

[0190] 此外,本发明的内容中所设想的可检测标记物还包括能够通过抗体结合,例如通过结合可检测的经标记的抗体或通过经由夹心式检验检测结合的抗体来进行检测的肽或多肽。在一个实施方案中,所述可检测标记物是小尺寸有机PET和SPECT标记物,例如 ^{18}F 、 ^{11}C 或 ^{123}I 。由于它们的小尺寸,有机PET或SPECT标记物完美地适合用于监控细胞内的事件,因为它们一般不会很大地影响靶向器件的性能,特别是其膜输送。包含PET标记物和作为次级靶向部分的任一逆狄尔斯-阿尔德活性部分的成像探针是亲脂性的并且能够被动地扩散进和扩散出细胞直到它找到它的结合配偶体。而且,两种组分都不妨碍越过血脑屏障并从而使得能够在脑内区域成像。

[0191] 当所述效应物探针打算包含基于金属例如用于MRI对比增强的镧系金属(例如Gd)

的可检测标记物时,其优选以螯合物的形式提供。在这种情况下,所述效应物探针优选包含能够与此类金属形成配位络合物的结构部分。其一个良好例子是衍生自1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(H4dota)和1,4,7,10-四氮杂环十二烷- $\alpha,\alpha',\alpha'',\alpha'''$ -四甲基-1,4,7,10-四乙酸(H4dotma)的大环镧系元素(III)螯合物。

[0192] 所述效应物部分还可以是治疗部分例如药理学活性化合物。本文提供了药理学活性化合物的例子。治疗探针还可以任选包含可检测标记物。

[0193] 因此,根据另一个实施方案,本发明的预靶向试剂盒和方法被用于靶向的治疗。这通过利用包含次级靶向部分和一种或多种药理学活性试剂(即药物、毒素或用于放射疗法的放射性同位素)的效应物探针来实现。用于靶向的药物递送情况的适合药物已为本领域所知。任选地,所述治疗探针还可以包含可检测标记物,例如一种或多种成像剂。用于治疗放射性核素可以是例如选自下述的同位素: ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。

[0194] 或者,所述治疗探针中的药物选自用于光动力疗法的感光剂(sensitizers)。

[0195] 或者,所述治疗探针包含与体内治疗实体(例如T细胞、天然杀伤细胞或其它内源性结构例如蛋白质)结合的识别部分。

[0196] 在所述效应物探针中,所述次级靶向部分即所述第二生物正交反应性基团和所述效应物部分可以彼此直接连接。它们还可以通过连接体彼此结合,此外它们可以都与次级靶向支架连接。所述连接体可以独立地选自如上所述的相同部分,例如聚乙二醇。所述次级靶向支架可以是例如生物聚合物如多肽。

[0197] 本发明还涉及利用逆狄尔斯-阿尔德反应的预靶向方法。在这里,将包含初级靶向部分(例如抗体和抗体片段或受体结合性肽)的预靶向探针注入到受试者中,其中所述预靶向探针分别用适合的二烯,优选根据上述式(2)-(5)中任意一个的化合物,或用根据上述式(1)的环辛烯官能化。在与靶(例如原发或转移性肿瘤病变、动脉粥样硬化斑块、梗死区域、炎症或感染位置等)结合并从循环系统和从非靶组织(例如血液、肝脏、脾脏、肾脏等)清除之后,注入效应物探针,所述效应物探针包含次级靶向部分例如分别携带E-环辛烯或四嗪衍生物(即存在于所述预靶向探针中的生物正交反应性基团的反应性对应物)和药物或可成像标记物。所述效应物探针与所述初级靶向部分结合并提供高对比或选择性治疗所述疾病位点。

[0198] 本发明还涉及一般的代谢途径的靶向,所述一般的代谢途径在疾病(例如感染或癌症)期间表达上调,如DNA、蛋白质和膜合成以及碳水化合物摄取。适合的探针包含被二烯或亲双烯体标记的氨基酸、糖、核酸和胆碱,本领域中目前使用的代谢示踪剂的类似物, $^{[11]\text{C}}$ -蛋氨酸、 $^{[18]\text{F}}$ -氟脱氧葡萄糖(FDG)、脱氧- $^{[18]\text{F}}$ -氟胸苷(FLT)和 $^{[11]\text{C}}$ -胆碱。具有高代谢或增殖的细胞具有对这些构建单元(building block)的较高摄取。在该方法中,例如四嗪-或E-环辛烯衍生物进入这些或其它通路并在细胞内和/或细胞上积累。在充分积聚并清除游离探针后,将经可检测地标记的或携带药物(细胞可透过)的四嗪探针或E-环辛烯探针(或携带根据本发明的其它二烯/亲双烯体的探针)送入以分别结合积累的E-环辛烯或四嗪代谢物。作为优于普通FDG(氟18氟脱氧葡萄糖)型成像的一个益处,可以获得足够的时间使

得能够在送入放射性之前高度积聚所述靶向部分,从而增大靶对非靶的比例。或者,可以靶向疾病特异性的代谢途径和/或代谢物。

[0199] 本发明还涉及细胞内靶的预靶向。由于它们的小尺寸,有机PET标记物(^{18}F 、 ^{11}C)非常适合用于监控细胞内事件,因为它们通常不会很大大地影响所述靶向器件的性能,特别是其膜输送(与大的和极性的放射金属螯合物结构缀合物相反)。尽管在本发明中使用的被取代的四嗪部分和所述E-环辛烯不一定是小的,但是它们是相对非极性的,并且能够用于蛋白质、mRNA、信号传导通路等的分子内成像。所述次级(例如PET标记的)取代的四嗪部分或E-环辛烯探针(即所述效应物探针)能够被动地扩散进和扩散出细胞直到它找到它的结合配偶体或经历活性摄取机理。这些性能还允许将逆狄尔斯-阿尔德反应用于脑内预靶向,因为两种组分都不妨碍越过血脑屏障。

[0200] 本发明还涉及预靶向的信号放大和/或多价装配。至少一个初级靶向器件与含有多个四嗪部分的树枝状聚合物、聚合物、脂质体或纳米颗粒缀合。在受体结合后,注入与用于核成像(例如放射金属螯合物、放射性卤素等)或MRI(例如Gd螯合物)的一个或多个对比部分缀合的(一种或多种)环辛烯。随后的逆狄尔斯-阿尔德反应导致在靶组织处MRI对比剂的高浓度。此外,靶位点处的多价将增大与所述展平的TCO效应物缀合物的反应动力学,提供例如MRI对比剂的有效靶积累。当然,所述展平的TCO也可以用于所述靶向器件缀合物中而所述四嗪(或本发明的其它二烯)与效应物缀合。

[0201] 缀合途径和试剂盒

[0202] 本发明进一步涉及逆狄尔斯-阿尔德反应作为用于将成像剂和药物缀合到靶向结构例如肽的途径的用途。所述效应物可以包含有机PET或SPECT核素标记的辅基、用于PET/SPECT/MRI的金属络合物和用于超声成像的微泡、用于光学成像的荧光团以及用于放射疗法的 α 和 β 发射体,且通常包含细胞毒性抗癌剂。所述成像/治疗剂可以用侧基四嗪或其它适合的二烯部分官能化和用展平的TCO衍生物将靶向基团官能化,反之亦然。

[0203] 本发明的途径对用于核成像和放射疗法的试剂特别有利:考虑到放射性核素的衰变,实施最耗时的步骤(受试者体内的实际靶向)作为预靶向步骤是有益的。根据本发明,选择展平的TCO,以获得上述非常快速的逆狄尔斯-阿尔德化学反应用于次级靶向,使得能够使用广泛的放射性核素,包括与现有方法相比寿命更短的那些。展平的TCO官能化的效应物探针和适合的二烯例如携带四嗪的预靶向探针能够在极低浓度下在体内偶联而不需要效应物部分(例如所述放射性核素)的持续血液循环。应该理解,这对于与二烯(特别是四嗪)官能化的效应物探针结合的带有展平的TCO的预靶向探针同样适用。而且,所述反应性基团有利地是稳定的,并因此展现了较长寿命的反应性而不过于容易地发生副反应。

[0204] 应该理解,以上提供了益处例如最小化对患者的放射剂量。而且,其导致能够利用PET即正电子发射断层成像剂代替SPECT即单光子发射计算机化断层成像剂。而且,增加的反应性使得能够在体内以较低的浓度应用。

[0205] 本发明特别适合用于多模式成像,任选地使用不同的成像剂以使相同的靶可视化。或者,所述成像探针包含至少两种不同的标记物以使得能够实现多模式成像。

[0206] 本发明的改善的[4+2]逆狄尔斯-阿尔德化学反应在分子成像中的应用向所有类型和尺寸的靶向结构打开了预靶向之门。这允许细胞内和代谢成像以从可通过预靶向积聚获得的高靶积累和低背景受益。同样,对于较小的和更多种多样的靶向器件,预靶向的信号

放大方案,例如聚四嗪和/或聚烯烃树枝状聚合物或脂质体,变得可行。

[0207] 由于所述反应配偶体是非生物的和生物正交的,因此如上所述的使用利用展平的TCO作为所述亲双烯体的[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的预靶向不受内源性竞争和代谢/分解妨碍,并提供稳定的共价键。选择靶代谢途径,以及相应的四嗪-代谢物衍生物,凭借其其与正常细胞相比在例如肿瘤细胞中的高通量,提供了在细胞中或在靶细胞表面上高密度人工四嗪受体或其它化学柄的装配,避免使用有时可能处于低水平的内源性细胞表面受体。

[0208] 本发明的进一步的特定实施方案涉及包含代谢前体和成像探针,更特别是包含可检测标记物的成像探针的试剂盒,所述可检测标记物是用于常规成像系统的对比剂。此类可检测标记物可以是但不限于选自下述的标记物:可MRI成像的结构、自旋标记物、光学标记物、超声响应试剂、X-射线响应试剂、放射性核素和FRET类染料。在本发明的一个特定实施方案中,使用了报告物(reporter)探针。这种报告物探针可以是酶的底物,所述酶更特别地是对于所述细胞不是内源性的,但已经通过基因疗法或使用外来试剂感染而引入的酶。在本文中涉及细胞或组织内的基因的非内源性用于表示所述基因在所述细胞或组织内并不天然存在和/或表达。或者,此类报告物探针是通过受体或泵的方式引入到细胞中的分子,其可以是内源性的或通过基因疗法或使用外来试剂感染引入到细胞内。或者,所述报告物探针是对细胞或组织环境内的某些(变化)条件起反应的分子。

[0209] 本发明还包括用于上述试剂盒中的试剂。一种此类试剂是包含初级靶向部分和生物正交反应性基团的预靶向试剂,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。特定反应配偶体在上文描述,即通常是上述缺电子四嗪或其它适合的二烯,或是根据本发明的展平的环辛烯。本发明还涉及这些试剂在靶向的医学成像或靶向的治疗中的用途,和涉及用于这种方法中的所述试剂。特别地,本发明涉及这些试剂在预靶向方法中的这些用途,和涉及在这种方法中使用的这些试剂。另一种此类试剂是包含可检测标记物和生物正交反应性基团的成像探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。

[0210] 本发明还涉及包含可检测标记物和生物正交反应性基团的成像探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。本发明进一步涉及包含药理学活性化合物和生物正交反应性基团的治疗探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。

[0211] 本发明的一部分还涉及预靶向方法,包括将如上所述的预靶向试剂给予受试者并使所述试剂在受试者的系统中循环有效实现所述初级靶向部分与初级靶的结合的一段时间,接着任选借助于清除剂从身体清除未结合的试剂。用于该目的的典型时间段为12到96小时,特别地为约48小时。

[0212] 此外,本发明提供了成像方法,包括如上所述实施预靶向方法,接着施用同样根据本发明的成像探针,其中所述预靶向试剂中和所述成像探针中的生物正交反应性基团一起形成[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。类似地,本发明提供了受试者中靶向的医学治疗方法,其包括如上所述实施预靶向方法,接着施用同样根据本发明的治疗探针,其中所述预靶向试剂中和所述成像探针中的生物正交反应性基团一起形成[4+2]逆狄尔斯-阿尔德反应的反应配偶体。

[0213] 本发明还涉及用于如上所述的成像或治疗方法的上述预靶向试剂。

[0214] 总之,在逆狄尔斯-阿尔德化学反应的基础上,生物正交预靶向的分子成像和治疗有助于给患者带来极大益处。一方面,其有助于提供获得靶组织例如癌症和心血管病变的优良图像。另一方面,能够大大减少源自放射性化合物和通常潜在毒性药物施用的固有副作用,同时增加到达患病组织的有效剂量。此外,其将大大扩展引起疾病的可追踪分子事件的收集。特别地,这种技术可允许到达远离血管的靶组织并可促进信息丰富的细胞内环境的成像。

[0215] 将参考以下非限制性实施例和随附的非限制性附图来说明本发明。

实施例

[0216] 材料:所有试剂和溶剂都从商业来源获得(从Sigma-Aldrich, Acros, Biosolve, ABCR, Invitrogen, 和Merck获得试剂,从Biosolve、Merck和Cambridge Isotope Laboratories获得普通和氘代溶剂),并且除非另外说明都不经进一步纯化即使用。氯化 $[^{177}\text{Lu}]$ 镧溶液购自PerkinElmer。通过milli-Q水过滤系统(Millipore)将水蒸馏和去离子化(18 M Ω cm)。用Chelex-100树脂(BioRad)处理标记缓冲液过夜,然后经过0.22 μm 过滤并在4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。Gelcode蓝色蛋白染色溶液购自Pierce Protein Research (Thermo Fisher Scientific)。Amicon Ultra-4离心过滤器单元(50 kDa MW截留) 购自Millipore。用于制备pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS) 的片剂得自Calbiochem (Merck)。

[0217] 方法:使用Bruker DPX300波谱仪,记录在 CDCl_3 中的NMR谱。使用DEPT脉冲序列,区分 ^{13}C NMR多重性(q=季、t=叔、s=仲和p=伯)。借助于2D-CH关联谱,确定 ^1H 化学位移。

[0218] 在Combiflash Companion仪器(Teledyne Isco)上使用SiliCycle硅胶柱进行制备型柱色谱法。使用装配有Zorbax C18柱(21.2 $\times$ 150mm, 5 μm 颗粒)的Agilent 1200仪器,应用含有0.1% TFA的水和MeCN的梯度,进行制备型HPLC。在装配有Gabi放射性检测器(Raytest)的Agilent 1100系统上进行分析放射-HPLC。将样品加载在Zorbax Eclipse XDB-C18柱(4.6 $\times$ 150mm, 5 μm 颗粒)上,其用MeCN/含有0.1% TFA的水的线性梯度以1 mL/min洗脱(10% MeCN 2 min,接着在11 min内增大到45% MeCN)。将UV波长预设254 nm。在装配有Gabi放射性检测器的Agilent 1200系统上实施尺寸排阻(SEC) HPLC。将样品加载在Superdex-200 10/300 GL柱(GE Healthcare Life Sciences)上并用10 mM磷酸盐缓冲液(pH 7.4)以0.5 mL/min洗脱。UV波长预设260和280 nm。

[0219] 如在Rossin等人,Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375-8中所述,进行DOTA-四嗪8(图5)的合成和放射性标记。如下通过放射-TLC测定 ^{177}Lu -标记收率:使用在0.9% NaCl水溶液中的200 mM EDTA洗脱ITLC-SG条带(Varian),并在磷光体成像仪(FLA-7000, Fujifilm)上成像。在这些条件下,游离 ^{177}Lu 以 $R_f=0.9$ 迁移,而 ^{177}Lu -DOTA-四嗪保留在原位。

[0220] 使用7.5% PAGE均匀凝胶(GE Healthcare Life Sciences),在Phastgel系统上进行SDS-PAGE。在磷光体成像仪上获取凝胶放射摄影图像,并用AIDA软件(Advanced Image Data Analyzer)进行分析。蛋白质分子量标准溶液(Precision Plus双色标准品) 购自BioRad。在电泳后,用gelcode blue将凝胶染色2小时,在水中脱色过夜,然后用常规平板扫描仪数字化。

[0221] 用NanoDrop 1000分光光度计(Thermo Fisher Scientific),由分别在322 nm和280 nm的吸光度确定CC49溶液的浓度。

[0222] 实施例1

[0223] (E-内)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(6)和(E-外)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(7)的合成

[0224] 按照Dommerholt等人,Angew.Chem.Int.Ed.2010,49,9422-9425,合成化合物1。

[0225] (Z)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸乙酯(1):在冰浴中冷却的同时,历时3.5 h的时段,向1,5-环辛二烯(18.5 mL, 150 mmol)和乙酸铈(II)二聚体(催化量)在CH₂Cl₂ (10 mL)中的溶液中,缓慢地加入15%重氮乙酸乙酯(2.0 mL, 18.8 mmol)在CH₂Cl₂ (20 mL)中的溶液。加入以后,将反应混合物温热至室温。1.5 h后,根据NMR分析,反应完全,并将混合物经硅胶塞过滤,并用CH₂Cl₂洗涤。浓缩滤液,直到除去所有CH₂Cl₂,然后用庚烷稀释。在具有硅胶的过滤器上,用庚烷(500 mL)和用MTBE (400 mL)洗脱溶液。MTBE级分含有产物,将其通过柱色谱法(SiO₂, 庚烷/EtOAc梯度0%至4%)进一步纯化。得到为无色油的化合物1 (2.50 g, 12.9 mmol, 68%收率),为内/外异构体的混合物。

[0226] (E-内)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸乙酯(2):向装有庚烷/Et₂O混合物(1:1, 大约650 mL)的反应器中,加入1 (2.50 g, 12.9 mmol)和苯甲酸甲酯(1.6 mL, 12.7 mmol)在庚烷/Et₂O中的溶液。用钨灯照射反应混合物,并同时泵送穿过含有10%w/w AgNO₃浸渍的硅胶(22 g)的柱。在照射16h以后,得到几乎完全转化,并用MTBE (500 mL)洗涤柱。用10% MeOH/MTBE混合物洗涤柱,将其浓缩,用氨处理,并用CH₂Cl₂萃取,得到一定量的E异构体(651 mg)。用氨进一步处理柱材料,并用CH₂Cl₂萃取,得到更多的E异构体(498 mg)。

[0227] 通过柱色谱法(SiO₂, 庚烷/EtOAc 3%)纯化合并的E异构体的混合物,得到为无色油的产物2 (319 mg, 1.6 mmol, 13%收率)和它的异构体3。

[0228] (E-外)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸乙酯(3):在前述实验中色谱分离以后,以23%收率(568 mg, 2.9 mmol)得到为无色油的该化合物。

[0229] (E-内)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸(4):向2 (319 mg, 1.64 mmol)在甲醇(3.0 mL)中的溶液中,加入氢氧化锂一水合物(275 mg, 6.6 mmol)在水(1.5 mL)中的溶液。将混合物加热至45℃ 2h,然后在30℃搅拌过夜。将反应进一步加热至45℃ 6h,直到通过TLC分析观察到完全转化。将混合物浓缩,用水和MTBE稀释,然后用柠檬酸水溶液中和。在用MTBE (3x)萃取以后,用Na₂SO₄干燥,并蒸发溶剂,得到为白色固体的化合物4 (269 mg, 1.62 mmol, 99%收率)。

[0230] (E-外)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸(5):向3 (568 mg, 2.92 mmol)在甲醇(6.0 mL)中的溶液中,加入氢氧化锂一水合物(487 mg, 11.61 mmol)在水(2.0 mL)中的溶液。将混合物加热至45℃ 2h,然后在30℃搅拌16h,直到通过TLC分析观察到完全转化。将混合物浓缩,用水和MTBE稀释,然后用柠檬酸水溶液中和。在用MTBE (3x)萃取以后,用Na₂SO₄干燥,并蒸发溶剂,得到为微黄色结晶固体的化合物5 (440 mg, 2.65 mmol, 91%收率)。

[0231] (E-内)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(6):在冰浴中冷却4 (269 mg, 1.62 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(224 mg, 1.95 mmol)在THF (10 mL)中的溶液,并加入DCC (335 mg, 1.62 mmol)在THF (2 mL)中的溶液。除去冰浴,并将混合物在室温搅拌16h。用MTBE稀释白色悬浮液,经玻璃过滤器过滤,并用MTBE洗涤。在真空中浓缩滤液。通过柱色谱法(SiO₂, 庚烷/EtOAc梯度10%-40%)进行纯化,得到为白色结晶固体的6 (290 mg, 1.10 mmol, 68%收率)。

[0232] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.77 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.41 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 2.09 (t, 1H, J =8.4Hz), 2.04 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.6-1.2 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =169.6 (q), 166.9 (q), 137.5 (t), 132.5 (t), 33.2 (s), 32.9 (s), 25.6 (t), 26.7 (s), 26.8 (s), 25.8 (t), 25.7 (s), 18.0 (t).

[0233] (E-外)-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(7):在冰浴中冷却5 (440 mg, 2.65 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(366 mg, 3.18 mmol)在THF (17 mL)中的溶液,并加入DCC (546 mg, 2.65 mmol)在THF (2 mL)中的溶液。除去冰浴,并将混合物在室温搅拌16h。用MTBE稀释白色悬浮液,经玻璃过滤器过滤,并用MTBE洗涤。在真空中浓缩滤液。通过柱色谱法(SiO_2 , 庚烷/EtOAc梯度10%-60%)进行纯化,得到为白色结晶固体的7 (553 mg, 2.10 mmol, 79%收率)。

[0234] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.88 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 2.82 (s, 4H), 2.5-2.3 (m, 4H), 2.00 (m, 2H), 1.49 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.23 (t, 1H, J =5.7Hz), 0.92 (m, 1H), 0.70 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =169.8 (q), 169.4 (q), 137.9 (t), 132.0 (t), 38.0 (s), 33.1 (s), 31.9 (s), 29.2 (t), 28.2 (t), 26.9 (s), 25.5 (s), 23.9 (t).

[0235] 实施例2

[0236] 使用内-和外-E-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(6和7)的抗体修饰

[0237] 用在总体积500 μL PBS中的1或10摩尔当量的TCO-NHS (6或7, 10 mg/mL的在DMSO中的溶液),修饰CC49 (5 mg/mL, 250 μL) 在PBS中的溶液。用1 M碳酸钠缓冲液,将pH调节至9。在搅拌下在室温在暗处进行反应30 min。随后,使用Amicon Ultra-15离心装置,用PBS充分洗涤TCO-修饰的mAb。在缀合步骤结束时,通过SEC-HPLC和SDS-PAGE分析(图6和7)评估CC49-TCO缀合物的纯度和完整性。用四嗪滴定确定缀合收率。使TCO-修饰的mAb (25 μL)与已知过量的添加载体的 ^{177}Lu -DOTA-四嗪在PBS (50 μL)中反应。在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min以后,向反应混合物加入非还原性样品缓冲液,煮沸10 min,并通过SDS-PAGE进行分析。凝胶电泳后,用磷光体成像仪评估每个泳道中的放射性分布。从放射性mAb带相对于泳道中的总放射性的强度,估测 ^{177}Lu -DOTA-四嗪和CC49-TCO构建体之间的反应收率(图8)。当使用1当量TCO-NHS 6和7时,缀合步骤分别得到0.4和0.7 TCO/mAb分子。当使用10当量TCO-NHS 6和7时,缀合步骤分别得到5.2和8.4 TCO/mAb分子。

[0238] 实施例3

[0239] 四嗪和mAb-缀合的内-和外-E-双环[6.1.0]壬-4-烯甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(6和7)之间的反应动力学的测定

[0240] 以8 MBq/ μg 的比活性,用添加载体的 ^{177}Lu 放射性地标四嗪-DOTA 8 (图5)。使 ^{177}Lu -DOTA-四嗪(0.67 nM)与递增浓度的CC49(被0.4或0.7当量的内和外TCO (6和7)修饰)在1 mL PBS (pH 7.4)中在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应。在选定的时间(15、30、45、60、90和120秒),取出20 μL 样品,并用四嗪衍生物9 (3 μL , 1 mg/mL在DMF中)淬灭反应。然后向样品中加入非还原性样品缓冲液,煮沸10 min,并通过SDS-PAGE进行分析。凝胶电泳后,用磷光体成像仪评估每个泳道中的放射性分布。由放射性mAb带相对于泳道中的总放射性的强度,估测 ^{177}Lu -DOTA-四嗪和CC49-TCO构建体之间的反应收率。将时间依赖性的反应收率拟合至准一阶关联曲

线,并从该拟合确定速率常数 (K_{obs}) (图9, A和C)。然后,相对于TCO的摩尔浓度绘制 K_{obs} 值,并使用线性回归进行拟合(图9, B和D)。基于 $K_{obs} = [CC49-TCO] (k_2)$, 二阶速率常数是该直线的斜率,并且发现内和外TCO异构体的二阶速率常数分别为 $3.72 \pm 0.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $2.80 \pm 0.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。

[0241] 用GraphPad Prism 5.01版进行所有计算。

[0242] 实施例4

[0243] 用内-和外-E-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯(6和7)缀合的mAb的体内稳定性

[0244] 根据生产商的说明书,利用Bolton-Hunter程序,用 ^{125}I 放射性地标记分别用5.2和8.4 mol当量的6和7官能化的mAb CC49。简而言之,用50 μL PBS稀释约5 MBq [^{125}I]碘化钠,并加入1 μL Bolton-Hunter试剂(SHPP, Pierce)在DMSO中的溶液(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和25 μL 氯胺-T(Sigma-Aldrich)在PBS中的溶液(4 mg/mL)。将溶液混合10-20秒,然后加入5 μL DMF和100 μL 甲苯。涡旋以后,将含有 ^{125}I -SHPP的有机相转移进玻璃瓶,并在轻柔的 N_2 流下在室温干燥。然后将300 μg CC49-TCO(在PBS中)加入 ^{125}I -SHPP包被的玻璃瓶中,并用1M碳酸钠缓冲液pH 9.6将pH调节至9。将瓶在轻轻搅拌下在室温温育约60 min,然后用放射-ITLC评价 ^{125}I -mAb标记收率(78-85%)。经由用盐水溶液预平衡的Zeba脱盐旋转柱(40 kDa MW截留, Pierce),纯化粗制的 ^{125}I -mAb。通过放射-ITLC、放射-HPLC和SDS-PAGE分析测定, ^{125}I -标记的CC49-TCO的放射化学纯度大于98%。通过加入未标记的CC49-TCO,将mAb的比活性调节至8-9 kBq/ μg 。

[0245] 给裸雌性Balb/C小鼠(20-25 g体重, Charles River Laboratories, n = 3)注射300 μg ^{125}I -CC49-TCO构建体。在选定的时间点(注射后1、6、24和48 h),从隐静脉抽取血液样品,并收集在含有肝素的管形瓶中。在实验结束时,将小鼠麻醉,并通过颈椎脱位处死。取出胃和甲状腺,进行干法印迹,并与标准品一起在 γ -计数器(Wizard 3, Perkin-Elmer)中计数,以确定每个器官的注射剂量百分比(%ID)。在这些器官中的低 ^{125}I 摄取(参见表)证实,放射性地标记的mAb在体内保有标记物。

[0246] 取样后不久,然后向血液样品中加入过量的精确地以0.1 MBq/ μg 比活性放射性标记的添加载体的 ^{177}Lu -DOTA-四嗪8(图5)。将混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育10 min,然后在400 $\times g$ 离心5 min,以分离血细胞。将该步骤重复2次,然后取20 μL 上清液,并用30 μL PBS稀释。用Zeba脱盐旋转柱(40 kDa MW截留, 加载30 μL 样品),将逆狄尔斯-阿尔德反应产物与未反应的 ^{177}Lu -四嗪分离。用双同位素方案(对于 ^{125}I ,为10-80 keV窗;对于 ^{177}Lu ,为155-380 keV窗),在 γ -计数器中测定在洗脱液中含有的放射性。使用仅含有 ^{177}Lu -四嗪的血清样品校正来自Zeba柱的 ^{177}Lu “渗漏”。针对放射性衰变,校正 ^{125}I 计数,然后计算 $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比率。先体外后体内(ex vivo) $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比率的下降由TCO基团在体内的灭活造成。图10将 $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比率随时间的变化显示为完整TCO 6和7的百分比(在 $t = 0$, 标准化至100%)。两种TCO在注射后6小时仍然具有约75-80%的完整性,且在注射后24小时具有17-25%的完整性。注射后2天,TCO6和7完全灭活。

[0247] 注射了放射性标记的CC49(被TCO 6和7官能化)的小鼠的胃和甲状腺中的 ^{125}I 的摄取。将数据表示为%ID $\pm$ SD。

	TCO 6	TCO 7
[0248] 甲状腺	0.67 ± 0.26	0.40 ± 0.13
胃	0.26 ± 0.07	0.28 ± 0.05

[0249] 实施例5

[0250] (E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)的合成

[0251] 在图11中描绘了(E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)的合成。根据文献程序(M. Royzen, G. P. A. Yap, J. M. Fox, J Am Chem Soc 2008, 130, 3760),合成(E)-环辛-4-烯醇(10,主要异构体,含有约13%的Z-异构体)。将60%氢化钠分散体(1.8 g, 45 mmol)添加到冰浴冷却的10 (1.70 g, 13.5 mmol)在60 mL DMF中的溶液中。在室温搅拌4小时后,分份加入4-溴甲基苯甲酸(3.85 g, 17.9 mmol)并在室温将悬浮液搅拌过夜。将混合物倒入水(100 mL)中,加入叔丁基甲基醚(100 mL),接着加入37%盐酸(5 mL)。分离后,用叔丁基甲基醚(2×100 mL)萃取水层。用水(25 mL)洗涤合并的有机层,用MgSO₄干燥并蒸发。用4:1己烷/乙酸乙酯使残余物通过薄硅胶层。将蒸发后获得的残余物在70℃溶解在庚烷(50 mL)中,然后冷却,提供11。将所述产物溶解在二氯甲烷(40 mL)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.57 g, 4.9 mmol),将混合物在冰浴中冷却,接着加入N,N'-二环己基碳二亚胺(1.03 g, 4.99 mmol)。30分钟后除去冰浴并在室温搅拌所述反应混合物18小时。过滤并蒸发后,通过柱色谱在硅胶上使用乙酸乙酯/庚烷(0-15%)的梯度纯化残余物。接着,将所述残余物溶解在叔丁基甲基醚(20 mL)中并倒入庚烷(50 mL)中,得到白色固体形式的12(1.42 g, 29%)。

[0252] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.10 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.45 (d, J=8.5 Hz, 2H), 5.60 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 4.54 (d, J=13.4 Hz, 1H), 4.47 (d, J=13.4 Hz, 1H), 3.09 (m, 1H), 2.91 (s, 4H), 2.43-1.40 (m, 10H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=169.0 (q), 161.5 (q), 146.7 (q), 135.1 (t), 132.1 (t), 130.4 (t), 127.0 (t), 123.7 (q), 85.3 (t), 68.0 (s), 40.5 (s), 37.7 (s), 34.2 (s), 32.7 (s), 31.4 (s), 25.4 (s); HRMS (ESI, m/z): C₂₀H₂₃NO₅Na⁺ ([M+Na]⁺) 的计算值: 380.1474, 实测值: 380.1472。

[0253] 实施例6

[0254] 41,45-二氧代-45-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-十二氧杂-40-氮杂四十五烷-1-酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(16)的合成

[0255] 在图12中描绘了16的合成,其开始于5-氧代-5-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)戊酸(9),后者根据Rossin等人. Angewandte Chemie International Edition 2010, 49(19), 3375-8来制备。

[0256] 41,45-二氧代-45-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-十二氧杂-40-氮杂四十五烷-1-酸叔丁酯(14):将1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧杂三十九烷-39-酸叔丁酯13 (123 mg, 0.182 mmol; IRIS Biotech GmbH) 添加到经干燥的反应瓶中,并与甲苯一起共蒸发2

次。然后将该瓶置于氮下,并加入额外的无水DMF (2 mL),得到无色溶液。在氮气气氛下,将9 (100 mg, 0.274 mmol)和溶解在额外的无水DMF (1 mL)中的(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP; 267 mg, 0.603 mmol)依次加入反应混合物中,得到红色悬浮液。最后,将DIPEA (0.5 mL, 2.74 mmol)逐滴加入反应混合物中,并将得到的溶液搅拌过夜。将反应混合物蒸发至干燥,溶解在DCM (2 mL)中,并通过在硅胶上的快速柱色谱法使用1-10% MeOH/DCM的梯度进行纯化。合并相关的级分,并在真空中蒸发,得到14 (167 mg, 0.164 mmol, 90%),为深粉红色固体。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=10.58 (s, 1H), 9.05 (d, J=2.4 Hz, 1H), 8.93 (ddd, J₁=0.9 Hz, J₂=1.7 Hz, J₃=4.7 Hz, 1H), 8.62 (d, J=8.8 Hz, 1H), 8.59 (d, J=8.6 Hz, 1H), 8.43 (dd, J₁=2.4 Hz, J₂=8.8 Hz, 1H), 8.15 (td, J₁=1.8 Hz, J₂=7.8 Hz, 1H), 7.93 (t, J=5.5 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J₁=1.1 Hz, J₂=4.7 Hz, J₃=7.8 Hz, 1H), 3.57 (t, J=6.2 Hz, 2H), 3.53-3.47 (宽 s, 46H), 3.25-3.16 (m, 2H), 3.41 (t, J=6.2 Hz, 2H), 2.44 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.17 (t, J=7.3 Hz, 2H), 1.85 (q, J=7.3 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=172.1 (q), 171.7 (q), 170.4 (q), 163.0 (q), 162.8 (q), 150.6 (t), 150.2 (q), 143.8 (q), 141.3 (t), 138.5 (q), 137.8 (t), 126.5 (t), 126.1 (t), 124.8 (t), 124.2 (t), 79.7 (q), 69.8 (s), 69.7 (s), 69.6 (s), 69.5 (s), 69.1 (s), 66.2 (s), 38.5 (s), 35.8 (s), 35.7 (s), 34.4 (s), 27.7 (p), 20.9 (s).

[0258] 41,45-二氧代-45-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-十二氧杂-40-氮杂四十五烷-1-酸(15):在氮气气氛下,向搅拌的14 (160 mg, 0.157 mmol)在无水DCM (2 mL)中的溶液中,加入TFA (2 mL)。将反应混合物在室温搅拌2小时,并蒸发至干。将残余物再溶解在无水DCM (2 mL)中,并再次用TFA (2 mL)处理2小时。将该过程再重复1次。最后,将反应混合物蒸发至干,并与DCM一起共蒸发2次,以定量收率得到去保护的产物15。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=10.57 (s, 1H), 9.05 (宽 s, 1H), 8.94 (宽 s, 1H), 8.63 (d, J=8.4 Hz, 1H), 8.60 (d, J=7.2 Hz, 1H), 8.43 (dd, J₁=2.4 Hz, J₂=8.8 Hz, 1H), 8.16 (td, J₁=1.7 Hz, J₂=7.8 Hz, 1H), 7.93 (t, J=5.5 Hz, 1H), 7.74 (dd, J₁=4.7 Hz, J₂=6.8 Hz, 1H), 3.58 (t, J=6.4 Hz, 2H), 3.53-3.46 (宽 s, 46H), 3.41 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.25-3.17 (m, 2H), 2.44 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.17 (t, J=7.3 Hz, 2H), 1.85 (q, J=7.3 Hz, 2H).

[0260] 41,45-二氧代-45-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-十二氧杂-40-氮杂四十五烷-1-酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(16):在N₂-气氛下在0℃,向搅拌的15 (150 mg, 0.155 mmol)在无水DCM (3 mL)中的溶液中,依次加入二-(N-琥珀酰亚胺基)碳酸酯(47.8 mg, 0.187 mmol)、吡啶(15 μL)和三乙胺(0.25 mL)。在温热至室温的同时,将混合物搅拌2小时,然后蒸发至干,再溶解在DCM (20 mL)中,并用H₂O (3 x 10 mL)洗涤。将有机层经MgSO₄干燥、过滤并在真空中蒸发,得到16 (94 mg, 0.089 mmol, 57%),为深粉红色固体。

[0261] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =9.67 (s, 1H), 9.01-8.97 (m, 2H), 8.77-8.71 (m, 2H), 8.64 (dd, J_1 =2.4 Hz, J_2 =8.8 Hz, 1H), 8.02 (td, J_1 =1.7 Hz, J_2 =7.7 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J_1 =1.1 Hz, J_2 =4.7 Hz, J_3 =7.5 Hz, 1H), 6.60 (t, J =5.4 Hz, 1H), 3.84 (t, J =6.4 Hz, 2H), 3.70-3.55 (宽 s, 46H), 3.52-3.43 (m, 2H), 2.90 (t, J =6.5 Hz, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.58 (t, J =6.8 Hz, 2H), 2.37 (t, J =6.8 Hz, 2H), 2.09 (q, J =6.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =172.9 (q), 172.5 (q), 168.9 (q), 166.7 (q), 163.6 (q), 163.4 (q), 151.0 (t), 150.3 (q), 144.0 (q), 142.0 (t), 138.6 (q), 137.4 (t), 126.5 (t), 126.4 (t), 125.1 (t), 124.3 (t), 70.7 (s), 70.5 (s), 70.2 (s), 69.6 (s), 65.7 (s), 39.3 (s), 35.9 (s), 35.0 (s), 32.1 (s), 25.6 (s), 21.3 (s).

[0262] 实施例7

[0263] 用于TCO-官能化的mAb的清除剂(半乳糖-白蛋白-四嗪)的合成

[0264] 如图13所示,合成了包含被半乳糖和四嗪部分官能化的蛋白支架(小鼠血清白蛋白,MSA)的清除剂。在静脉内注射以后,在清除剂上的四嗪基团经由逆狄尔斯-阿尔德反应与循环中的mAb-TCO反应,而半乳糖部分与肝细胞上的Ashwell受体相互作用(参见L. J. Theodore, D.B. Axworthy, 和J.M. Reno, 美国专利2003/0129191),从而将mAb-清除剂构建体推动至肝脏。

[0265] 通过MSA的2-步连续共价修饰(首先用半乳糖,然后用四嗪)来制备清除剂。使用胺反应性的2-亚氨基-2-甲氧基乙基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷(20)(其缀合至白蛋白上的赖氨酸),实现半乳糖修饰。

[0266] 半乳糖-白蛋白(21)的合成:

[0267] 如图13所示,经由中间体2-S-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-2-硫代脲鎓溴化物(18)和氰基甲基2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷(19),从2,3,4,6-四-O-乙酰基- α -D-吡喃半乳糖基溴(17)开始,在3步中制备半乳糖偶联剂2-亚氨基-2-甲氧基乙基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷(20)。

[0268] 2-S-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-2-硫代脲鎓溴化物(18):将2,3,4,6-四-O-乙酰基- α -D-吡喃半乳糖基溴(17; 15.00 g, 36.48 mmol)和硫脲(3.05 g, 40.07 mmol)溶解在丙酮(75 mL)中。将溶液加热至回流2小时,随后过滤,并冷却至20℃。戊烷(75 mL)的加入导致为白色结晶固体的产物(16.11 g, 91%)的沉淀。

[0269] ^1H -NMR (400MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.95 (s, 3H, CH_3), 2.01 (s, 3H, CH_3), 2.08 (s, 3H, CH_3), 2.14 (s, 3H, CH_3), 4.09 (m, 2H, H_6 , H_6'), 4.45 (t, J =6.4 Hz, 1H, H_5), 5.11 (t, $J_{2,3}$ =10 Hz, 1H, H_2), 5.22 (dd, $J_{2,3}$ =9.9 Hz, $J_{3,4}$ =3.2 Hz, 1H, H_3), 5.39 (d, J 3.2 Hz, 1H, H_4), 5.71 (d, $J_{1,2}$ =10 Hz, 1H, H_1), 9.11 (br, 2H, NH_2), 9.35 (br, 2H, NH_2).

[0270] 氰基甲基2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷(19):将2-S-(2,3,4,6-四-O-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖基)-2-硫代脲鎓溴化物(18; 16.11 g, 31.07 mmol)、偏亚硫酸氢钠(11.81 g, 62.14 mmol)、碳酸钾(4.72 g, 34.18 mmol)和氯乙腈(8.21 g, 108.7 mmol)溶解在丙酮/水(50:50 v/v, 200 mL)中,并在室温搅拌1小时。将反应混合物倒入冰水(300 mL)中,并搅拌另外2小时。通过过滤来收集白色沉淀物,并从热甲醇(30 mL)重结晶。将产物滤出,为白色结晶固体(9.61 g, 77%)。熔点= 97℃ (Lit:95-97℃)。

[0271] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.07 (s, 3H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3), 3.35 (d, J =17 Hz, 1H, S-CH), 3.64 (d, J =17 Hz, 1H, S-CH'), 4.01 (t, J 6.9 Hz, 1H, H_2), 4.16 (m, 2H, H_6 , H_6'), 4.7 (d, $J_{1,2}$ =10 Hz, 1H, H_1), 5.11 (dd, $J_{1,4}$ =3.2 Hz, $J_{1,2}$ =10 Hz, 1H, H_1), 5.24 (t, J =10 Hz, 1H, H_2), 5.47 (d, J =2.4 Hz, 1H, H_4). FT-IR (ATR): ν = 2249 (CN, w), 1739 (C=O, s).

[0272] 2-亚氨基-2-甲氧基乙基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷 (20): 将氰基甲基 2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷 (19; 2.02 g, 5.00 mmol) 溶解在无水 MeOH (50 mL) 中, 并加入甲醇钠的甲醇溶液 (25 w%, 115 μL , 0.50 mmol)。将反应混合物在室温搅拌 24 小时, 随后浓缩至 15 mL 的体积。使产物在室温结晶, 然后在 -18°C 结晶。过滤并干燥, 得到白色晶体 (1.11 g; 83%)。熔点 = 129°C 。

[0273] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 3.44 (dd, $J_{2,3}$ =10 Hz, $J_{1,2}$ =4.2 Hz, 1H, H_2), 3.52 (dd, $J_{2,3}$ =10 Hz, $J_{1,2}$ =9.0 Hz, 1H, H_2), 3.54 (m, 1H, H_2), 3.73 (-OCH₃), 3.78 (m, 2H, H_6 , H_6'), 3.87 (dd, $J_{1,4}$ =4.0 Hz, $J_{4,5}$ =1.5 Hz, 1H, H_4), 4.27 (d, $J_{1,2}$ =9.6 Hz, 1H, H_1). FT-IR (ATR): ν = 3287 (N-H, s), 1650 (C=NH, s).

[0274] 白蛋白-偶联: 向溶解在 PBS pH 7.4/0.5M 硼酸盐缓冲液 pH 8.5 的 10:1 混合物 (900 μL) 中的 MSA (20 mg, 0.303 μmol) 的溶液中, 加入新鲜制备的 18.2 mg/mL 的 2-亚氨基-2-甲氧基乙基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷 (20) 在相同缓冲液混合物中的储备溶液 (200 μL), 得到相对于 MSA 45 倍摩尔过量的半乳糖偶联剂 (20)。将反应混合物在室温摇动 (1000 rpm) 2 小时, 然后使用预先用水平衡过的 Zeba 脱盐旋转筒 (7 kDa MWC0, Pierce) 脱盐。在冻干以后, 得到半乳糖-白蛋白 (化合物 21), 为白色蓬松的固体 (15.3 mg, 72%)。随后通过 MALDI-TOF 分析, 确定半乳糖修饰等级。MSA: MH^+ = 65941。半乳糖-MSA: MH^+ = 69823, 其对应于 16.4 个半乳糖/MSA 的平均值 (添加的半乳糖片段的质量为 236 Da)。不同批次之间的变异是约 16-18 个半乳糖/MSA。每 2 周通过重复的 MALDI-TOF 分析, 评估 10 mg/mL 的半乳糖-白蛋白在水中的溶液在 4°C 的稳定性, 持续共计 5 个月。证实缀合物为稳定的。

[0275] 半乳糖-白蛋白-四嗪 (22) 的合成: 将半乳糖-官能化的小鼠血清白蛋白 (21, 1 mg) 在 PBS 中的溶液与 10 mg/mL 的四嗪-NHS (16) 在 DMF 中的溶液 (30 μL , 相对于半乳糖-白蛋白为 20 当量) 混合, 并加入 1M 碳酸盐缓冲液 pH 9.6 (7.5 μL)。将溶液 (共 250 μL) 在 37°C 温育 30 min, 然后转移进 Ultra-15 离心过滤器单元 (30 kDa MW 截留)。用水充分洗涤产物 22, 然后冷冻干燥过夜, 得到粉红色蓬松的粉末。通过 MALDI-TOF 分析, 确定四嗪修饰等级。半乳糖-白蛋白-四嗪: MH^+ = 79010, 其对应于 9.7 个四嗪/半乳糖 (16.4)-MSA 的平均值 (添加的四嗪片段的质量为 948 Da; MH^+ (半乳糖 (16.4)-MSA) = 69823)。在 nanodrop 上的紫外-可见光测定证实了每个分子中 9-10 个四嗪的存在 (测定值: 8.9 个四嗪/半乳糖 (16.4)-MSA)。

[0276] 实施例 8

[0277] (E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环 [6.2.0] 癸-4-烯-9-基) 乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯 (26) 的合成

[0278] 在图 14 中描绘了 26 的合成。

[0279] (Z)-9-氮杂双环 [6.2.0] 癸-4-烯-10-酮 (23)。通过文献方法 (Tanaka, M.; Oba,

M.; Ichiki, T.; Suemune, H. Chem. Pharm. Bull. 2001, 49, 1178-1181), 制备该化合物。向环辛二烯(108 mL, 879 mmol)在甲苯(200 mL)中的溶液中,加入异氰酸氯磺酰酯(18 g, 127 mmol, 14%)。将该溶液在室温搅拌过夜。NMR分析表明没有转化。继续将反应在30℃过夜和在60℃过夜。用乙醚(150 mL)稀释混合物。在剧烈搅拌下,缓慢地加入硫酸钠(50 g)在水(300 mL)中的溶液。用5% KOH水溶液将混合物调至pH 8,并搅拌过夜。分离各层,并用TBME (2 x 150 mL)和二氯甲烷(2 x 150 mL)萃取水层。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中蒸发,得到7.79 g黄色油。通过柱色谱法(硅胶, 二氯甲烷/乙酸乙酯50%至甲醇5%)纯化粗产物,得到内酰胺23 (2.68 g, 17.7 mmol, 2%)为白色固体。

[0280] (E)-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-10-酮(24)。在反应器中,将内酰胺23 (2.68 g, 17.7 mmol)和苯甲酸甲酯(2.41 g, 17.7 mmol, 1.0当量)在乙醚(200 mL)中的溶液照射6 d,同时使该混物流过硝酸银/硅胶柱(30.0 g, 0.59 mmol/g)。用TBME (400 mL)和TBME/甲醇9/1 (500 mL)洗涤柱。用氨处理柱,并用二氯甲烷(3 x 150 mL)萃取。合并的二氯甲烷层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中在45℃蒸发,得到反式-环辛烯24 (两种异构体, 1.72 g, 11.4 mmol, 64.3%),为灰色固体。

[0281] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.4–2.4 (m, 8H), 3.0–3.1 (m) 和 3.1–3.2 (m) (1H), 3.55–3.6 (m) 和 3.75–3.8 (m) (1H), 5.4–5.7 (m, 2H), 6.1–6.4 (bd, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 27.2, 27.3, 28.5, 31.3, 32.9, 33.2, 34.9, 40.4, 54.1, 54.5, 56.2, 57.0, 134.2, 134.4, 134.8, 135.1, 171.1, 171.2.

[0282] (E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-9-基)乙酸(25)。在冰中冷却氢化钠(60%的在油中的分散体, 330 mg, 8.27 mmol, 2.5当量)在17 mL无水THF中的悬浮液。将内酰胺24 (500 mg, 3.31 mmol, 1.0当量)和溴乙酸(551 mg, 3.97 mmol, 1.2当量)在无水THF (11 mL)中的溶液加入该悬浮液中。将反应混合物搅拌20 min。逐滴加入DMF (1.2 mL, 无水)。将混合物在室温搅拌度过周末。将混合物在真空中在40℃浓缩。加入TBME (25 mL)、冰和冰水(约25 mL)。分离各层,并用TBME (15 mL)洗涤水层。用水(15 mL)萃取合并的TBME层。在冰中冷却合并的水层,用柠檬酸(1.41 g)酸化至pH 1-2,并用TBME (3 x 25 mL)萃取。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中在40℃蒸发,得到为白色固体的酸25 (2种异构体, 360 mg, 1.72 mmol, 52.0%)。

[0283] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.25–1.7 (m, 2H), 1.8–2.3 (m, 4H), 2.3–2.5 (m, 2H), 3.15–3.25 (m) 和 3.25–3.35 (m) (1H), 3.65–3.95 (t + m, 2H), 4.1 (t, 1H), 5.6 (m, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 27.0, 27.6, 28.5, 31.0, 31.5, 33.0, 33.2, 36.9, 41.4, 41.6 (所有 CH_2 信号), 54.4, 56.8, 58.4, 60.5 (所有 CH 信号), 134.0, 134.5, 135.0, 135.2 (所有 CH 信号), 171.4, 171.6, 171.7 (所有 C=O 信号).

[0284] (E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-9-基)乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(26)。在盖有铝箔的烧瓶中,将酸25 (0.21 g, 1.0 mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(0.14 g, 1.2 mmol, 2.25当量)和EDCI (215 mg, 1.1 mmol, 1.1当量)在二氯甲烷(10 mL)中的溶液在室温搅拌过夜。倾析溶液,并用二氯甲烷(10 mL)稀释。用水(2 x 5 mL)和盐水(2 x 5 mL)洗涤溶液,经硫酸钠干燥、过滤并蒸发,得到褐色油(0.24 g)。将油溶解在二氯甲烷(1 mL)中,并在戊烷(20 mL)中沉淀。用戊烷洗涤残余物,并在真空中干燥,得到为灰白色固

体的26 (2种异构体, 0.16 g, 0.52 mmol, 52%)。

[0285] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.25 – 1.7 (m, 2H), 1.8 – 2.3 (m, 4H), 2.35 – 2.5 (m, 2H), 2.85 (m, 4H), 3.15 – 3.25 (m) 和 3.25 – 3.35 (m) (1H), 3.75 – 3.85 (m) 和 3.85 – 3.95 (m) (1H), 4.0 – 4.1 (dd, 1H), 4.4 – 4.6 (dd, 1H), 5.45 – 5.65 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 26.0, 27.0, 27.5, 28.5, 31.0, 31.5, 33.0, 33.5, 37.0, 39.5, 39.5, 55.0, 57.5, 58.5, 60.5, 134.0, 134.5, 135.0, 135.5, 164, 169.5, 170, 170.5.

[0286] 实施例9

[0287] (E)-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯-11-醇(32)的合成

[0288] 在图15中描绘了32的合成。

[0289] (4a,10a,Z)-1,2,3,4-四氯-11,11-二甲氧基-1,4,4a,5,6,9,10,10a-八氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯(28)。(参见Tetrahedron 1981,37,4479-4494)。将5,5-二甲氧基-1,2,3,4-四氯环戊二烯27 (6.7 mL, 10 g, 37.9 mmol)和1,5环辛二烯(37.3 mL, 32.8 g, 303 mmol, 8.0当量)的混合物加热至回流温度10 h。冷却至50℃以后,形成白色沉淀物。将混合物在真空中浓缩。滤出固体,并用戊烷洗涤。将合并的滤液在真空中浓缩,并与甲苯(2 x)共蒸馏,得到加合物28 (11.4 g, 30.6 mmol, 80.7%),为黄色粘稠的油。

[0290] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.35 – 1.5 (m, 2H), 1.95 – 2.1 (m, 4H), 2.3 – 2.45 (m, 2H), 2.65 – 2.75 (m, 2H), 3.55(s, 3H), 3.6 (s, 3H), 5.7 – 5.8 (m, 2H).

[0291] (4a,10a,Z)-11,11-二甲氧基-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯(29)。在氮气气氛下,在回流温度搅拌锂(4.16 g, 0.60 mmol, 28.7当量)在无水四氢呋喃(130 mL)中的混合物。逐滴加入加合物28 (7.78 g, 20.9 mmol, 1.0当量)和叔-丁醇(22 mL, 17 g, 0.23 mol, 11当量)在四氢呋喃(13 mL)中的溶液。在加入过程中形成气体,且反应混合物变成黑色。将混合物在回流温度搅拌度过周末。在硅藻土(Celite)上滤出固体,并用四氢呋喃洗涤。浓缩合并的滤液,得到褐色固体。将固体与冰(25 mL)混合,并用TBME (4 x 100 mL)萃取。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中蒸发,得到为褐色油的粗制物29 (4.23 g)。通过ISCO进行纯化,得到化合物29 (1.21 g, 5.12 mmol, 24.5%),为浅黄色油。

[0292] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.5 (s) 和 1.5 – 1.65 (m) (6H), 1.7 – 1.9 (m, 4H), 1.95 – 2.1 (m, 2H), 2.25 – 2.4 (m, 4H), 3.25 (s, 3H), 3.3 (s, 3H), 5.8 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 16 (CH_2), 25 (CH_2), 28 (CH_2), 37 (CH), 46 (CH), 130 (CH).

[0293] (4a,10a,Z)-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯-11-酮(30)。将化合物29 (1.21 g, 5.12 mmol)在乙醚(3 mL)中的溶液与硫酸水溶液(2 M, 12 mL)混合。将混合物剧烈搅拌5天,并用乙醚(2 x 20 mL)萃取。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中蒸发,得到酮30 (731 mg, 3.84 mmol, 75.0%),为微黄色油。

[0294] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.6 – 1.75 (m, 4H), 1.75 – 1.9 (m, 4H), 1.95 – 2.1 (m, 4H), 2.25 – 2.45 (m, 4H), 5.75 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 16 (CH_2), 25 (CH_2), 28 (CH_2), 37 (CH), 46 (CH), 130 (CH).

[0295] (4a,10a,Z)-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯-11-醇

(31)。向酮30 (598 mg, 3.14 mmol) 在无水乙醚 (18 mL) 中的溶液中, 加入氢化铝锂。将混合物在氮气气氛下搅拌3天, 随后通过逐滴加入水 (5 mL) 进行淬灭。分离各层, 并用乙醚 (20 mL) 萃取水层。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中蒸发, 得到为无色油的醇31 (499 mg, 2.59 mmol, 82.6%, 异构体的15:85混合物)。

[0296] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.3–2.2 (m, 16H), 4.05 (bs, 1H), 5.75 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 20 (CH_2), 26 (CH_2), 28 (CH_2), 39 (CH), 48 (CH), 80 (CH), 132 (CH).

[0297] (4a,10a,E)-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-十氢-1,4-桥亚甲基苯并[8]轮烯-11-醇(32)。将Z-烯烃31 (530 mg, 2.76 mmol) 和苯甲酸甲酯 (0.347 mL, 375 mg, 2.76 mmol, 1.0当量) 在乙醚/庚烷1/2 (600 mL) 中的溶液照射36 h, 同时使溶液连续流过装有硅胶/硝酸银9/1 (5 g, 约1当量)、硅胶 (0.5 cm) 和砂 (0.5 cm) 的柱。在照射过程中, 将柱放在暗处。用二氯甲烷 (40 mL) 洗涤硅胶, 并用二氯甲烷/水/25% 氨2/1/1 (3 x 40 mL) 从柱萃取粗产物。用二氯甲烷 (30 mL) 萃取合并的水层。合并的有机层经硫酸钠干燥、过滤并在真空中蒸发, 得到0.32 g黄色油。通过柱色谱法 (50 mL硅胶, 乙酸乙酯/庚烷1/9) 部分地纯化粗产物, 得到产物和脂族杂质的混合物 (38 mg, 最大0.198 mmol, 7.2%), 为灰白色固体。所述产物可能是2种E-异构体的混合物。

[0298] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0.8–2.4 (m, 16H), 4.0–4.15 (m, 2H), 5.4–5.85 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 20–60 (众多CH和 CH_2 信号), 80 (CH), 134 (CH)。80和134信号各自具有一个靠近它的次要峰, 主要峰相对于次要峰的比率为约3/1。

[0299] 实施例10

[0300] (E)-3,3a,4,5,9,9a-六氢-1H-环辛[d]咪唑-2(8H)-酮(40)的合成

[0301] 在图16中描绘了40的合成。

[0302] 反式(Z)-8-叠氮基环辛-4-烯醇(33)。通过1,5-环辛二烯与过硼酸钠在乙酸和二氯甲烷中的反应, 制备环氧环辛烯, 参见Günes, Y.; Senocak, E.; Tosun, C.; Taskesenligil, Y., Org. Commun. 2009, 2:3, 79–83。将粗产物原样使用。历时45 min时段, 将环氧环辛烯 (80.0 g, 0.645 mol) 在140 mL丙酮中的溶液添加到叠氮化钠 (80 g, 1.23 mol) 在200 mL水中的溶液中。用20 mL丙酮冲洗加料漏斗, 并将混合物在回流下加热76 h。通过旋转蒸发除去大部分丙酮, 将100 mL水加入残余物中, 并用3 x 250 mL TBME萃取混合物。用100 mL水洗涤有机层, 然后干燥和旋转蒸发, 得到粗制的叠氮醇33 (其与环氧化物混合), 将其原样用于下一步。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 产物信号): δ 1.6–2.6 (m, 8H), 3.65–3.8 (m, 2H), 5.5–5.65 (m, 2H)。

[0303] 顺式(Z)-5,6-二叠氮基环辛-1-烯(34)。将200 mL甲苯加入残余物中, 并通过旋转蒸发除去约150 mL溶剂。将300 mL甲苯加入残余物(叠氮醇33和起始环氧化物的约1/1混合物)中, 并在冰中冷却溶液。加入三乙胺 (86.1 g, 0.852 mol), 随后历时1 h时段和在机械搅拌下加入在100 mL甲苯中的甲磺酰氯 (93.8 g, 0.819 mol)。将悬浮液搅拌2天, 然后加入200 mL水。分离各层, 并将有机层用2 x 50 mL水洗涤。用250 mL甲苯萃取连续的水层。干燥和旋转蒸发, 得到残余物, 其为叠氮甲磺酸酯和起始环氧化物的混合物。

[0304] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 产物信号): δ 1.95–2.6 (m, 8H), 3.95 (dt, 1H), 4.8 (dt, 1H), 5.5–5.65 (m, 2H).

[0305] 将一半残余物与100 mL DMF和叠氮化钠(20 g, 0.307 mol)一起在75℃温热44 h,然后在85℃温热3 h。将混合物倒入200 mL水中,然后用3 x 200 mL TBME萃取。用3 x 50 mL水洗涤有机层,然后干燥和旋转蒸发,得到残余物,其为二叠氮化物34、环氧环辛烯和杂质的混合物。

[0306] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 产物信号): δ 1.8 (m, 2H), 1.95 – 2.1 (m, 4H), 2.5 – 2.65 (m, 2H), 3.8 (dt, 2H), 5.6 – 5.7 (m, 2H)。

[0307] 顺式(Z)-N,N'-(环辛-5-烯-1,2-二基)双(2,2,2-三氟乙酰胺)(36)。将上面得到的粗制的二叠氮化物34溶解在150 mL THF中,并历时90 min时段添加到200 mL THF中的氯化铝锂(12.0 g, 0.315 mol)中,用冷水进行冷却。将反应混合物在回流下加热8 h,然后将其冷却,并用6 mL水和12 mL 30% 氢氧化钠溶液缓慢地淬灭。过滤、用THF洗涤和旋转蒸发,得到残余物,将其溶解在150 mL二氯甲烷中,然后在冰中冷却。历时30 min时段加入三氟乙酸酐(69.0 g, 0.328 mol)。将溶液搅拌4 h,然后旋转蒸发。在250 g硅胶柱上色谱分离残余物,用含有递增量的乙酸乙酯的庚烷进行洗脱。第一级分是环辛-2-烯-1-醇的三氟乙酸酯。合并含有期望的(Z)-N,N'-(环辛-5-烯-1,2-二基)双(2,2,2-三氟乙酰胺)的级分,并从TBME和庚烷的混合物重结晶,得到18.85 g产物36 (56.74 mmol, 基于环氧环辛烯为18%)。

二胺 35 的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 产物信号): δ 1.65 (m, 2H), 1.8 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.4 (m, 2H), 3.0 (dt, 2H), 5.6 (m, 2H)。

[0308] 双酰胺 36 的 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.65 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 2.2 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 4.15 (dt, 2H), 5.9 (m, 2H), 7.5 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$: δ 23 (CH_2), 32 (CH_2), 54 (CH), 110–122 (q, CF_3), 132 (CH), 157–159 (q, C=O)。 $^{19}\text{F-NMR}$: δ -76。

[0309] 顺式(E)-N,N'-(环辛-5-烯-1,2-二基)双(2,2,2-三氟乙酰胺)(37)。将蒸发3.50 g (25.0 mmol) (Z)-环辛-5-烯-1,2-二胺和三氟乙酸酐(12.3 g, 58.6 mmol)的反应产物以后得到的粗制的三氟乙酰胺36与4.0 g苯甲酸甲酯和约500 mL庚烷-乙醚(约2/1)混合。将混合物照射42 h,同时使溶液连续流过41 g硝酸银浸渍的硅胶柱(含有约4.1 g硝酸银)。用150 mL TBME冲洗柱,然后用150 mL含有一些甲醇的TBME冲洗柱。用100 mL 15% 氨洗涤该级分,干燥并旋转蒸发。第一级分产生Z和E烯烃的1/2混合物,第二级分产生少量E烯烃。将该柱与TBME和氨一起搅拌,然后过滤,并分离各层。用水层和TBME再次处理固体,然后过滤,并分离各层。将有机层干燥和旋转蒸发,得到3.07 g E烯烃37 (9.25 mmol, 基于胺为37%)。

[0310] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.6–1.9 (m, 4H), 2.1–2.5 (m, 4H), 3.8 (m, 1H), 4.1 (t, 1H), 5.4–5.55 (m, 1H), 5.65–5.8 (m, 1H), 6.4 (bs, 1H), 7.9 (bs, 1H)。

[0311] 顺式(E)-环辛-5-烯-1,2-二胺(38)。将上面得到的酰胺37与40 mL甲醇、5.0 g氢氧化钠和10 mL水混合。将混合物在接近回流时温热90 min,然后将其旋转蒸发,并用30 mL水稀释残余物。用3 x 50 mL二氯甲烷萃取、干燥和旋转蒸发,得到期望的二胺38,其含有少量溶剂(1.38 g, 约100%)。

[0312] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.4–2.5 (m, 8H), 2.8 (bs, 1H), 2.9 (d, 1H), 5.4–5.6 (m, 2H)。

[0313] 顺式-(E)-(8-氨基环辛-4-烯-1-基)氨基甲酸苯酯(39)。将碳酸二苯酯(500 mg,

2.33 mmol) 添加到二胺38 (300 mg, 2.14 mmol) 在10 mL二氯甲烷中的溶液中, 并将溶液在室温搅拌4天。在25 g硅胶上色谱分离溶液, 用含有递增量的甲醇的二氯甲烷洗脱。合并产物级分, 并与15 mL TBME一起搅拌2 h。加入15 mL庚烷, 并将混合物过滤。将固体与15 mL TBME一起搅拌, 然后过滤。将合并的滤液旋转蒸发, 并将残余物与庚烷一起搅拌过夜, 得到固体。过滤, 得到期望的产物39。

[0314] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.5 (bs, 4H), 1.8 – 2.35 (m, 6H), 3.1 (bs, 1H), 3.6 (t, 1H), 5.5 (bd, 1H), 5.6 (m, 2H), 7.05 – 7.4 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 28.4 (CH_2), 33.0 (CH_2), 36.7 (CH_2), 40.7 (CH_2), 57.7 (CH), 58.4 (CH), 121.8 (CH), 125.4 (CH), 129.5 (CH), 133.2 (CH), 133.3 (CH), 151.3 (C), 154.0 (C).

[0315] 顺式(E)-3,3a,4,5,9,9a-六氢-1H-环辛[d]咪唑-2(8H)-酮(40)。将氨基甲酸酯39溶解在DMSO中, 且在40℃在暗处搅拌24 h, 此后完成向尿素40的分子内环化。该产物原样使用。

[0316] $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): δ 1.4 – 2.3 (m, 8H), 3.38 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 5.51 (m, 2H), 6.07 (s, 1H), 6.12 (s, 1H). LCMS: $m/z = 167.1$ ($\text{M}+\text{H}^+$).

[0317] 实施例11

[0318] 2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(47)和2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(11-氧代-11-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)十一烷基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(48)的合成

[0319] 在图17中描绘了47和48的合成。

[0320] 6-(6-氰基吡啶-3-基氨基)-6-氧代己基氨基甲酸叔丁酯(43)。将5-氨基-2-氰基吡啶41 (1.02 g; 8.60 mmol)、N-Boc-6-氨基-己酸42 (0.99 g; 4.30 mmol)、DCC (1.77 g; 8.60 mmol)、DMAP (1.05 g; 8.60 mmol)、和PPTS (0.37 g; 1.47 mmol) 悬浮于氯仿(15 mL)中。将混合物在室温搅拌18小时, 然后蒸发至干, 并在乙腈(20 mL)中搅拌。通过过滤除去沉淀物, 并将滤液蒸发至干, 溶解在氯仿(20 mL)中, 并分别用柠檬酸水溶液(15 mL, 0.5 M)、碳酸氢钾水溶液(15 mL, 1 M)和水(15 mL)洗涤。有机相经硫酸钠干燥, 并蒸发至干。通过柱色谱法(硅胶, 己烷/乙酸乙酯=1:1)纯化粗产物, 得到为白色固体的产物43 (0.95 g; 61%)。MS (ESI, m/z): $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 的计算值: 333.19, 实测值: 333.17。

[0321] 6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2-二氢-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基甲酸叔丁酯(44)。将6-(6-氰基吡啶-3-基氨基)-6-氧代己基氨基甲酸叔丁酯43 (0.70 g; 2.1 mmol)、2-氰基吡啶(0.87 g; 8.4 mmol)、水合肼(1.25 g; 20 mmol)溶解在乙醇(2 mL)中, 并加入硫(0.22 g; 7 mmol)。将混合物在70℃在氩惰性气氛下搅拌2小时, 然后在50℃搅拌16小时。用氯仿(10 mL)稀释橙色悬浮液, 并用水(2 x 15 mL)洗涤得到的溶液。有机相经硫酸钠干燥, 并蒸发至干。通过柱色谱法(硅胶, 氯仿/丙酮=4:1)纯化粗产物, 得到为橙色固体的产物44 (0.65 g; 66%)。MS (ESI, m/z): $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}_3^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 的计算值: 467.25, 实测值: 467.33。

[0322] 6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基甲酸叔丁酯(45)。将6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2-二氢-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基甲酸叔丁酯44 (0.30 g; 0.64 mmol) 溶解在THF (1.5 mL)中,并加入乙酸(2 mL)。将亚硝酸钠(0.25 g; 3.62 mmol) 溶解在水(1 mL)中,并逐滴加入。将该红色溶液倒入碳酸氢钾水溶液(50 mL; 1 M)中,并用氯仿(50 mL)萃取产物。将有机层用水(50 mL)洗涤,并经硫酸钠干燥和蒸发至干,得到为紫色固体的产物45 (0.25 g; 83%)。MS (ESI, m/z): $C_{23}H_{29}N_8O_3^+$ ($[M+H]^+$)的计算值:465.23, 实测值:465.42。

[0323] 6-氨基-N-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)己酰胺(46)。将6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基甲酸叔丁酯45 (66 mg; 0.14 mmol) 溶解在氯仿(6 mL)中,并加入TFA (6 mL)。将溶液在室温搅拌2小时,随后蒸发至干,得到产物46,为其TFA盐(52 mg; 100%)。MS (ESI, m/z): $C_{18}H_{21}N_8O^+$ ($[M+H]^+$)的计算值:365.19, 实测值:365.33。

[0324] 2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(47)。

[0325] 将6-氨基-N-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)己酰胺46 (52 mg; 0.14 mmol) 溶解在DMF (2.5 mL)中,并加入DIPEA (320 mg; 2.0 mmol)。加入N-羟基琥珀酰亚胺活化的DOTA (161 mg; 0.2 mmol),并将混合物在室温搅拌5小时。将溶液蒸发至干,并将粗产物溶解在乙腈和水的混合物中,并通过制备型RP-HPLC进行纯化。冷冻干燥后,得到纯的产物47,为粉红色蓬松的固体(80 mg, 76%收率)。

1H -NMR (30% 乙腈- d_3 / D_2O): δ = 8.90 (m, 2H, ArH), 8.68 (d, 1H, ArH), 8.60 (dd, 1H, ArH), 8.31 (m, 1H, ArH), 8.24 (t, 1H, ArH), 7.82 (t, 1H, ArH), 3.80 (br s, 6H, NCH_2COOH), 3.72 (br s, 2H, NCH_2CONH), 3.34-3.23 (br m, 18H, NCH_2CH_2N , CH_2NHCO), 2.49 (t, 2H, $NHCOCH_2$), 1.70 (m, 2H, $NHCOCH_2CH_2$), 1.59 (m, 2H, CH_2CH_2NHCO), 1.41 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2NHCO$) ppm. ^{13}C -NMR (30% 乙腈- d_3 / D_2O): δ = 175.5, 171.5 (br), 162.6, 162.5, 150.1, 148.1, 142.9, 141.6, 139.6, 138.4, 128.0, 127.9, 125.4, 124.8, 55.4, 54.3 (br), 49.4 (br), 39.4, 36.5, 28.2, 25.9, 24.6 ppm. ESI-MS: $C_{34}H_{47}N_{12}O_8^+$ ($[M+H]^+$)的 m/z : 751.37; 实测值 $[M+H]^+$ 751.58, $[M+Na]^+$ 773.50, $[M+2H]^{2+}$ 376.42, $[M+3H]^{3+}$ 251.33. FT-IR (ATR): ν = 3263, 3094, 2941, 2862, 1667, 1637, 1582, 1540, 1460, 1431, 1395, 1324, 1296, 1272, 1251, 1226, 1198, 1128, 1087, 1060, 1020, 992, 977, 920, 860, 831, 798, 782, 742, 718, 679, 663 cm^{-1} 。

[0327] 2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(11-氧代-11-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)十一烷基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(48),

[0328] 使用与所述的2,2',2''-(10-(2-氧代-2-(6-氧代-6-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)己基氨基)乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(47)的合成相当的程序。

[0329] 冷冻干燥后,得到纯的产物48,为粉红色蓬松的固体(90 mg, 78%收率)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 10.65$ (s, 1H, NH), 9.06 (d, 1H, ArH), 8.93 (d, 1H, ArH), 8.61 (t, 2H, ArH), 8.44 (dd, 1H, ArH), 8.16 (t, 2H, ArH, NH), 7.73 (dd, 1H, ArH), 3.51 (br s, 6H, NCH_2COOH), 3.28 (br s, 2H, NCH_2CONH), 3.06 (q, 2H, CH_2NHCO), 3.34-3.23 (br m, 16H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.43 (t, 2H, NHCOCH_2), 1.64 (m, 2H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$), 1.42 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 1.38-1.22 (m, 12H, CH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 173.0$, 171.0 (br), 169.1 (br), 163.5, 163.2, 151.0, 150.6, 144.2, 141.7, 139.1, 138.2, 127.0, 126.5, 125.3, 124.6, 57.3 (br), 55.2 (br), 50.7, 39.0, 36.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.19, 29.17, 29.1, 26.9, 25.3 ppm. ESI-MS: $\text{C}_{39}\text{H}_{37}\text{N}_{12}\text{O}_8$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 的 m/z 计算值: 821.44; 实测值 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 843.58, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 821.58, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 411.42, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 274.67. FT-IR (ATR): $\nu = 3261, 3067, 2925, 2851, 1633, 1583, 1541, 1458, 1433, 1394, 1324, 1298, 1270, 1249, 1228, 1200, 1165, 1128, 1088, 1059, 1016, 991, 920, 885, 860, 832, 798, 782, 764, 742, 719, 687, 661 \text{ cm}^{-1}$.

[0331] 实施例12

[0332] 四嗪模型化合物的稳定性和反应性

[0333] 四嗪类的水解稳定性试验

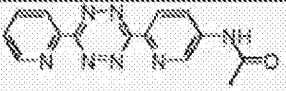
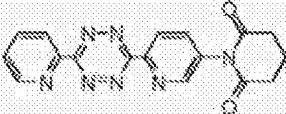
[0334] 用PBS缓冲液 (3 mL) (或者,在水溶解度过低的情况下,用PBS和乙腈的混合物) 稀释10 μL 特定四嗪在DMSO中的溶液 (25 mM)。过滤该溶液,使用UV光谱法监测在525 nm处的吸收带的降低,并从该数据确定水解速率和半衰期。

[0335] 四嗪类对反式-环辛-4-烯-1-醇 (次要异构体) 的反应性

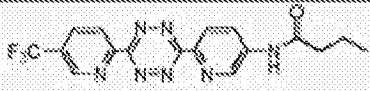
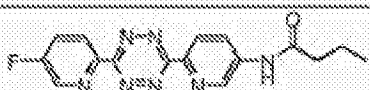
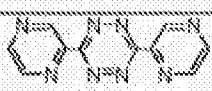
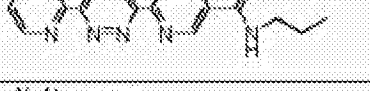
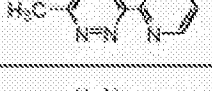
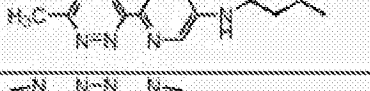
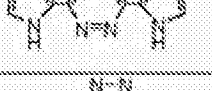
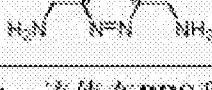
[0336] 进行竞争实验,以确定特定四嗪和3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪 (将其选择为参比四嗪) 在与反式-环辛-4-烯-1-醇 (次要异构体) 的逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应中的反应性比。

[0337] 向乙腈 (0.100 mL) 中加入5 μL 的特定四嗪在DMSO中的溶液 (25 mM) 和5 μL 的参比四嗪在DMSO中的溶液 (25 mM)。用水 (0.9 mL) 稀释该混合物,通过HPLC-MS/PDA分析确定两种四嗪的绝对量。随后,缓慢地加入反式-环辛-4-烯-1-醇 (次要异构体) 在DMSO中的溶液 (25 μL , 2.5 mM), 并将混合物搅拌5 min。再次通过HPLC-MS/PDA分析确定两种四嗪的绝对量,并计算两种四嗪的转化。由这些转化,使用得自Ingold和Shaw (J.Chem.Soc., 1927, 2918-2926) 的数学方法,计算两种四嗪的反应性比 ($R=k_2, \text{TCO}/k_2, \text{Ref}$)。下表表明了如何通过使用不同的取代基使四嗪类的反应性和稳定性谱适应于某些具体要求。

[0338]

四嗪	在PBS中在 20°C 的稳定性 $t_{1/2}$ (小时)	反应性比 ($R=k_{2,ITZ}/k_{2,Ref}$)
	44	1.17
	340	0.4
	80	1
	24	1.6
	4.5	0.12
	115	1.07
	3.6*	5.3*

[0339]

	35*	1.84*
	3.2	2.7
	117	0.95
	0.68	1.5
	>150	0.19
	2.4	0.83
	183	0.77
	4	1.76
	2.7	3.06
	10.3	2.8
	230	0.25
	300	0.18
	未测定	1.2
	16	未测定

*：该值在PBS和乙腈的50/50混合物中测定。

[0340] 实施例13

[0341] TCO模型化合物的稳定性和反应性

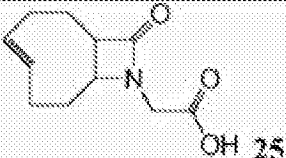
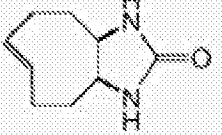
[0342] 反式-环辛烯衍生物的稳定性

[0343] 用PBS缓冲液(3 mL)稀释10 μ L特定反式-环辛烯衍生物在二噁烷中的溶液(25 mM),并将该溶液在20 $^{\circ}$ C在暗处储存。通过HPLC-MS分析,监测TCO化合物的一致性(faith),并估测半衰期。

[0344] 反式-环辛烯衍生物对双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反应性

[0345] 进行竞争实验,以确定特定反式-环辛烯衍生物和反式-环辛-4-烯-1-醇(次要异构体)(将其选择为参比反式-环辛烯)在与双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应中的反应性比。

[0346] 向乙腈(0.05 mL)中加入特定反式-环辛烯衍生物在二噁烷中的溶液(5 μ L, 25 mM; 1.25×10^{-7} mol)和参比反式-环辛烯在二噁烷中的溶液(5 μ L, 25 mM; 1.25×10^{-7} mol)。用水(0.45 mL)稀释该混合物。随后,在剧烈搅拌下缓慢地加入双(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(6.25×10^{-8} mol)在乙腈(0.05 mL)和水(0.45 mL)的混合物中的溶液。加入以后,将混合物搅拌另外5 min。通过HPLC-MS/PDA分析,确定两种反式-环辛烯衍生物的转化,并由这些转化,使用得自Ingold和Shaw (J.Chem.Soc., 1927, 2918-2926)的数学方法,计算特定反式-环辛烯衍生物的反应性比($R=k_{2,TCO}/k_{2,Ref}$)。下表表明,与反式-环辛-4-烯-1-醇的高反应性的次要异构体相比,展平的TCO结构4、5、25和40表现出显著增加的对四嗪类的反应性。

反式-环辛烯衍生物	在PBS中在20℃的 稳定性 $t_{1/2}$ (天)	反应性比 ($R=k_{2,TCO}/k_{2,Ref}$)
 内型异构体 4	> 3 天	13.1
 外型异构体 5	> 3 天	20.0
 25	约1天	5.4
 40	> 3 天	7.3

[0348] 反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物与不同的1,2,4,5-四嗪类的反应

[0349] 为了证实技术的广泛适用性,使反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25与多种1,2,4,5-四嗪衍生物反应。

[0350] 与3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪的反应:

[0351] 向3-(5-乙酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(6.25×10^{-8} mol)在水(1 mL)中的溶液中,加入反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25(6.25×10^{-8} mol)。四嗪溶液的立即变色(从粉红色至无色)指示与TCO的定量反应。这通过HPLC-MS分析来证实:四嗪信号的完全消失和 $m/z=475.33$ ($M+H^+$)的rDA加合物的形成。

[0352] 与3-(5-丁酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-噻啶基)-1,2,4,5-四嗪的反应:

[0353] 向3-(5-丁酰氨基-2-吡啶基)-6-(2-噻啶基)-1,2,4,5-四嗪(6.25×10^{-8} mol)在水

(1 mL) 中的溶液中, 加入反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25 (6.25×10^{-8} mol)。四嗪溶液的立即变色(从粉红色至无色)指示与TCO的定量反应。这通过HPLC-MS分析来证实: 四嗪信号的完全消失和 $m/z=504.42$ ($M+H^+$) 的rDA加合物的形成。

[0354] 与(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)甲胺的反应:

[0355] 向(4-(1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)甲胺(6.25×10^{-8} mol)在水(1 mL)中的溶液中, 加入反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25 (6.25×10^{-8} mol)。四嗪溶液的立即变色(从粉红色至无色)指示与TCO的定量反应。这通过HPLC-MS分析来证实: 四嗪信号的完全消失和 $m/z=369.17$ ($M+H^+$) 的rDA加合物的形成。

[0356] 与(3-甲基-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪)的反应:

[0357] 向(3-甲基-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(6.25×10^{-8} mol)在水(1 mL)中的溶液中, 加入反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25 (6.25×10^{-8} mol)。四嗪溶液的立即变色(从粉红色至无色)指示与TCO的定量反应。这通过HPLC-MS分析来证实: 四嗪信号的完全消失和 $m/z=355.33$ ($M+H^+$) 的rDA加合物的形成。

[0358] 与3,6-二苯基-1,2,4,5-四嗪的反应:

[0359] 向3,6-二苯基-1,2,4,5-四嗪(6.25×10^{-8} mol)在水(1 mL)中的悬浮液中, 加入反式-环辛烯 β -内酰胺衍生物25 (6.25×10^{-8} mol)。在15 min内, 粉红色的浑浊混合物变得澄清和无色, 从而指示与TCO的定量反应。这通过HPLC-MS分析来证实: 四嗪信号的完全消失和 $m/z=416.42$ ($M+H^+$) 的rDA加合物的形成。

[0360] 实施例14

[0361] 使用(E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)和(E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-9-基)乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(26)的抗体修饰

[0362] 如在实施例2中所述。当使用1当量TCO-NHS 12时, 缀合步骤得到0.5 TCO/mAb分子。当使用10当量TCO-NHS 12时, 缀合步骤得到6.6 TCO/mAb分子。与3或20摩尔当量的26的缀合得到每个CC49分子0.6和3.5个TCO的平均值。

[0363] 实施例15

[0364] 四嗪和mAb-缀合的(E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)和(E)-2-(10-氧代-9-氮杂双环[6.2.0]癸-4-烯-9-基)乙酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(26)之间的反应动力学的测定

[0365] 如实施例3所述。发现TCO 12具有 $32000 \pm 2300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的 k_2 (图18), 并发现TCO 26具有 $374800 \pm 3370 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的 k_2 (图19)。

[0366] 实施例16

[0367] 与(E-主要)-4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)缀合的mAb的体内稳定性

[0368] 根据生产商的说明书, 利用Bolton-Hunter程序, 用 ^{125}I 放射性地标记用6.6 mol当量的12官能化的mAb CC49。简而言之, 用50 μL PBS稀释约5 MBq [^{125}I] 碘化钠, 并加入1 μL Bolton-Hunter试剂(SHPP, Pierce)在DMSO中的溶液(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和25 μL 氯胺-T (Sigma-Aldrich)在PBS中的溶液(4 mg/mL)。将溶液混合10-20秒, 然后加入5 μL DMF和100 μL 甲苯。涡旋以后, 将含有 ^{125}I -SHPP的有机相转移进玻璃瓶, 并在轻柔的 N_2 流下在室温干燥。然后将

200 μ g CC49-TCO (在PBS中) 添加到 125 I-SHPP包被的玻璃瓶中,并用1M碳酸钠缓冲液pH 9.6将pH调节至9。将瓶在轻轻搅拌下在室温温育约60 min,然后用放射-ITLC评价 125 I-mAb标记收率(79%)。经由用盐水溶液预平衡的Zeba脱盐旋转柱(40 kDa MW截留, Pierce),纯化粗制的 125 I-mAb。通过放射-ITLC、放射-HPLC和SDS-PAGE分析确定, 125 I-标记的CC49-TCO的放射化学纯度大于98%。通过加入未标记的CC49-TCO,将mAb的比活性调节至1.4 kBq/ μ g。

[0369] 给裸雌性Balb/C小鼠(20-25 g体重, Charles River Laboratories, n = 3) 注射300 μ g 125 I-CC49-TCO。在选定的时间点(直至注射后96 h),从隐静脉抽取血液样品,并收集在含有肝素的管形瓶中。在实验结束时,将小鼠麻醉,并通过颈椎脱位处死。取出胃和甲状腺,进行干法印迹,并与标准品一起在 γ -计数器(Wizard 3, Perkin-Elmer)中计数,以确定每个器官的注射剂量百分比(%ID)。在胃($0.19 \pm 0.04\%$ ID)和甲状腺($0.57 \pm 0.10\%$ ID)中的低 125 I摄取证实放射性标记的mAb在体内保有标记物。

[0370] 取样后不久,用PBS将血液样品稀释至100 μ L,然后加入过量的精确地以0.1 MBq/ μ g比活性放射性标记的添加有载体的 177 Lu-DOTA-四嗪8 (图5)。将混合物在37 $^{\circ}$ C温育20 min,然后在400 $\times$ g离心5 min,以分离血细胞。通过Zeba脱盐旋转柱(40 kDa MW截留)纯化30 μ L,以将逆狄尔斯-阿尔德反应产物与未反应的 177 Lu-四嗪分离。用双同位素方案(对于 125 I,为10-80 keV窗;对于 177 Lu,为155-380 keV窗),在 γ -计数器中测定在洗脱液中含有的放射性。使用仅含有 177 Lu-四嗪的血清样品校正来自Zeba柱的 177 Lu“渗漏”。针对放射性衰变,校正 125 I计数,然后计算 177 Lu/ 125 I比率。先体外后体内(ex vivo) 177 Lu/ 125 I比率的下降由TCO基团在体内的灭活造成。图20将 177 Lu/ 125 I比率随时间的变化显示为完整TCO 12的百分比(在t = 0,标准化至100%)。数据的线性回归表明TCO 12在体内的半衰期为6.2天。

[0371] 实施例17

[0372] 使用与外-E-双环[6.1.0]壬-4-烯-9-甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(7)和(E-主要)-4-(环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸 2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(12)缀合的CC49的肿瘤预靶向

[0373] 由于与内型异构体6相比稍微更高的体内稳定性,选择携带外-TCO 7的CC49构建体($k_2 = 2.8 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 用于体内评价。因此,与更稳定的、但是更低反应性的CC49-TCO 12的那些并行地评价了该化合物的肿瘤靶向能力和体内反应性。

[0374] 从ATCC得到人结肠癌细胞系LS174T,并维持在补充有10%热灭活的胎牛血清(Gibco)、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μ g/mL)和2 mm Glutamax的Eagle最低必需培养基(Sigma)中。给裸雌性Balb/C小鼠(20-25 g体重, Charles River Laboratories) 皮下接种在100 μ L无菌PBS中的 5×10^6 个细胞。当肿瘤达到约100 mm³大小时,给小鼠注射被TCO 7 (8.4/mAb)或TCO 12 (6.6/mAb)官能化的 125 I-CC49。mAb注射后24小时,小鼠接受1剂清除剂(22, 160 μ g/100 μ L/小鼠),在2 h以后,继之以 177 Lu-DOTA-四嗪8 (相对于mAb为1当量,约0.5 MBq)。在四嗪注射后3小时,将小鼠麻醉,并通过颈椎脱位处死,通过心脏穿刺抽取血液,采收感兴趣的器官和组织,并干法印迹。称重所有收集的样品,并加入1 mL PBS。在 γ -计数器中(用双同位素方案)与标准品一起测定样品放射性,以确定每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。图21显示了两种 125 I-标记的CC49-TCO构建体的生物分布,图22显示了 177 Lu-四嗪在用两种CC49-TCO构建体预处理的荷瘤小鼠中的生物分布。

[0375] 与携带TCO 12的对应构建体相比,被TCO 7官能化的CC49在血液中的保留时间明

显更长,所以,肿瘤摄取也显著更高(34.85 ± 5.86 相对于 $18.71 \pm$; $P < 0.05$)。尽管与TCO 7缀合的 ^{125}I -CC49的肿瘤摄取高于 ^{125}I -CC49-TCO (12),但是在两组小鼠中的 ^{177}Lu -四嗪肿瘤摄取是类似的。这是由于TCO 7相对于TCO 12而言更低的稳定性。实际上,考虑到在四嗪注射时18.7%的残余完整TCO 7和90.2%的残余TCO 12,TCO 7在肿瘤上的局部浓度低于TCO 12的局部浓度(参见表)。尽管如此,但是,在用CC49-TCO (7) 预处理的小鼠的肿瘤上的反应收率(基于完整TCO的量)高于在用CC49-TCO (12) 预处理的小鼠中的值。因此,这些发现提示,TCO 7相对于TCO 12而言在体外的较高反应性会转化成在体内的较高反应性,并且高反应性的TCO部分(例如7)可以成功地用于预靶向应用中,在抗体和探针给予之间存在较短至中等间隔。对于长预靶向间隔而言,例如TCO 40的衍生物可能是合适的。

[0376] 在用CC49-TCO (7) 和CC49-TCO (12) 预处理的小鼠的血液和肿瘤中的TCO浓度和逆狄尔斯-阿尔德反应收率

	[TCO] ($\times 10^{-10}$ 摩尔/g)		体内反应收率(%)	
	肿瘤	血液	肿瘤	血液
[0377] TCO 7	3.6 ± 0.6	0.39 ± 0.04	12.3 ± 1.6	2.7 ± 1.0
TCO 12	7.4 ± 2.7	0.41 ± 0.28	5.6 ± 1.3	5.8 ± 1.0

[0378] 实施例18

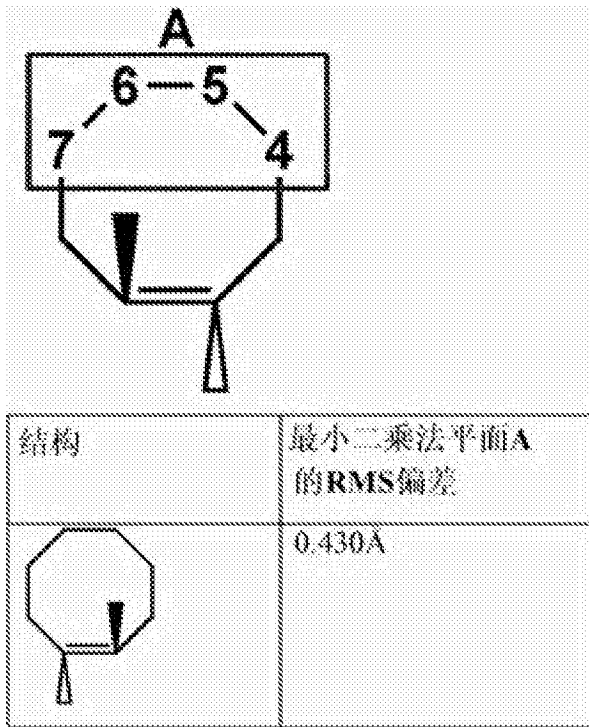
[0379] 由两个被固定在相同平面中的环外键的存在引起的TCO环的部分展平的分子模拟

[0380] 下述实施例证实,TCO环的部分展平是两个被固定在相同平面中的环外键的存在的固有结果,并且至少代表与环内双键(即碳原子5和6)相对的部分。不论两个环外键位于何处都是如此。

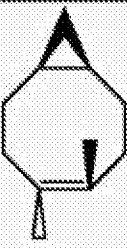
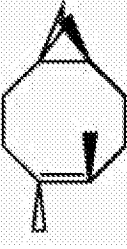
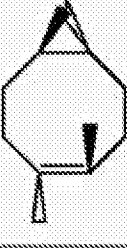
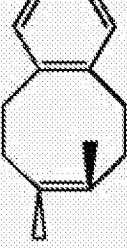
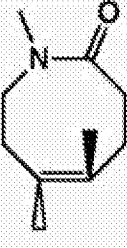
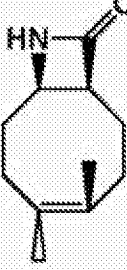
[0381] 用ChemBioOffice 12.02版绘制分子,随后使用MM2进行能量最小化。使用CS MOPAC PRO 8.03版进一步优化结构。在ChemBioOffice 12.02版中计算与选择的原子拟合的最小二乘法平面的均方根(RMS) 偏差(以埃计)。将该平面定位,使得4个原子4、5、6和7到该平面的平均距离最小化。

[0382] 参考图23。该图显示了基本化合物,其中E烯族部分的平面与Z-X平面对齐。8元环与X-Y平面近似对齐。为了增加烯族键的反应性,可以在X-Y平面中进行系统的展平。强贡献/接受/共轭基团在靠近烯族基团的碳原子上的引入不是优选的,因为在那些情况下,电子效应起主要作用,但是,可以在那些位置上使用其它展平要素(例如稠合的环丁基)。两个被固定在相同平面中的环外键的位置可以是C3至C8,且会将展平引入从四亚甲基链(C^4 、 C^5 、 C^6 和 C^7)形成的分子部分上,从而导致TCO的反应性增加。这样的展平可以测定为与4个四亚甲基碳原子(C^4 、 C^5 、 C^6 和 C^7)拟合的最小二乘法平面A的RMS偏差的减小。从表显而易见,在所有情况下,不同的环和酰胺键在环辛烯环上的取代会减小未被取代的基本化合物(表中的第一项)的0.430Å的值。

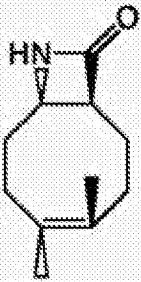
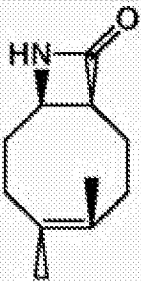
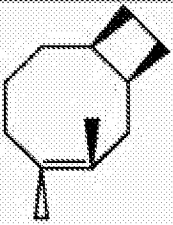
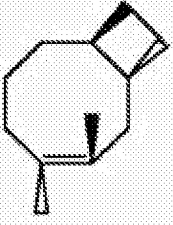
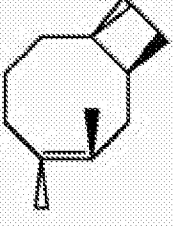
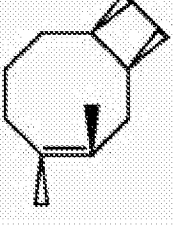
[0383]

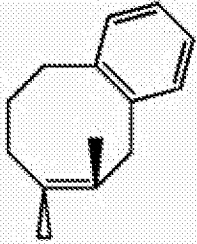
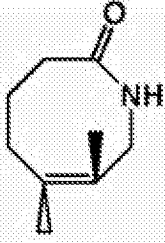
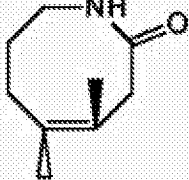
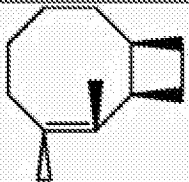
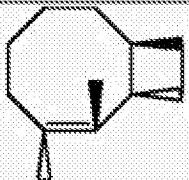
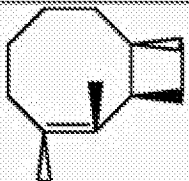
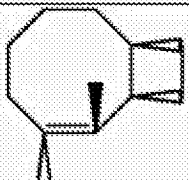


[0384]

结构	最小二乘法平面A 的RMS偏差
	0.000 Å
	0.319 Å
	0.356 Å
	0.000 Å
	0.013 Å
	0.002 Å

[0385]

结构	最小二乘法平面A 的RMS偏差
	0.402Å
	0.417 Å
	0.184Å
	0.147Å
	0.381Å
	0.244Å

结构	最小二乘法平面A 的RMS偏差
	0.266Å
	0.295Å
	0.208Å
	0.395Å
	0.178Å
	0.365Å
	0.405Å

[0386]

。

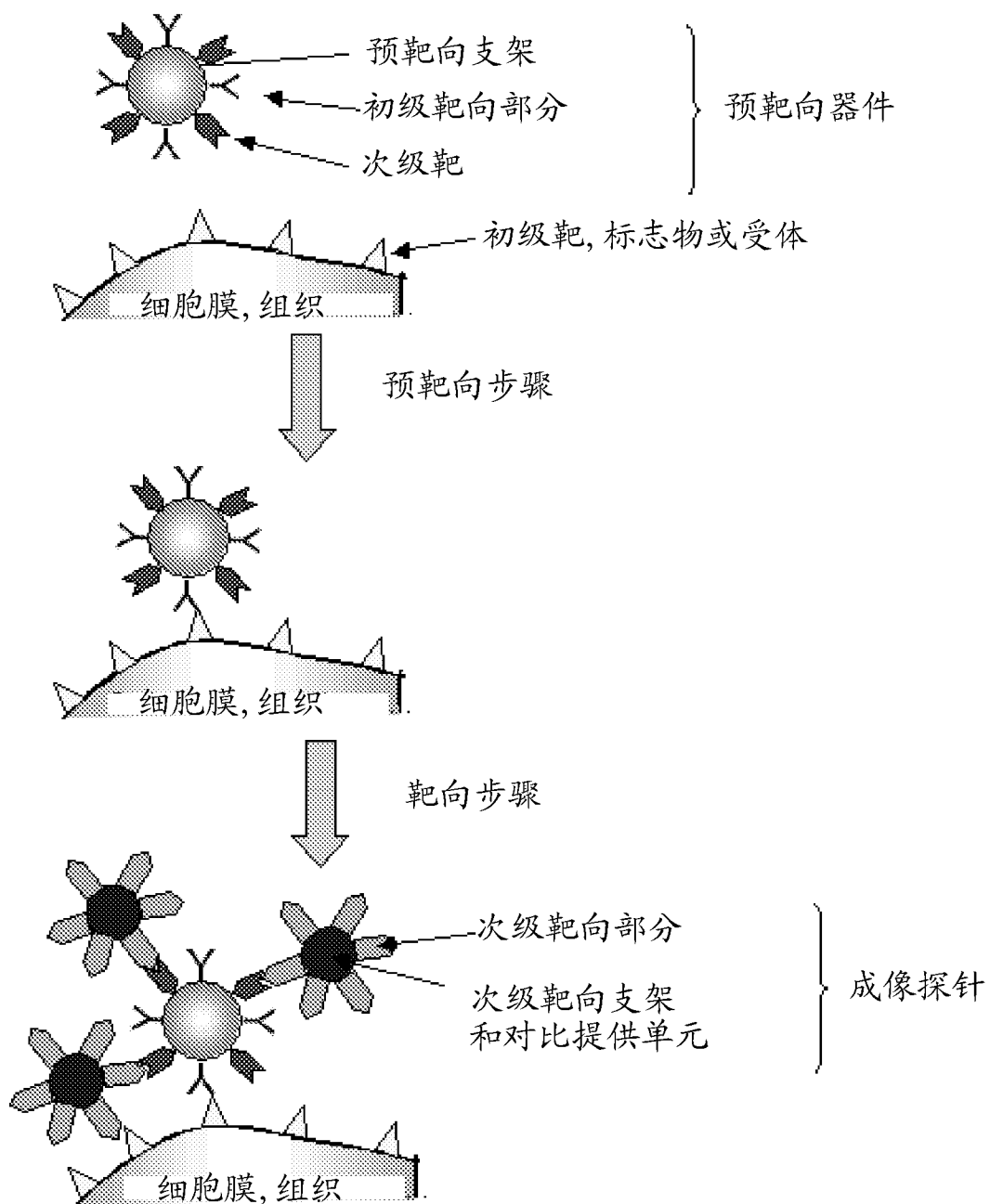


图 1

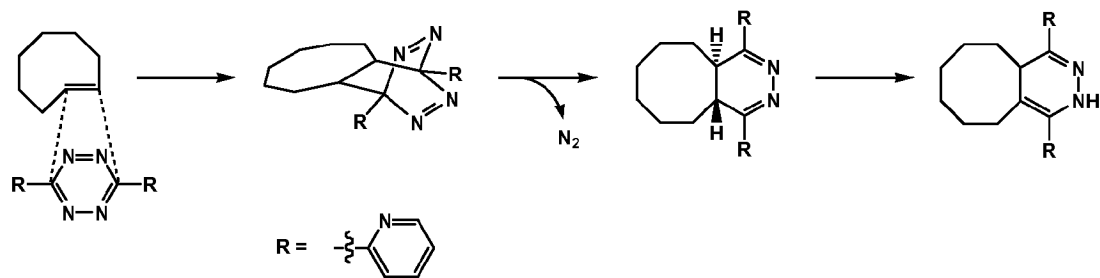


图 2

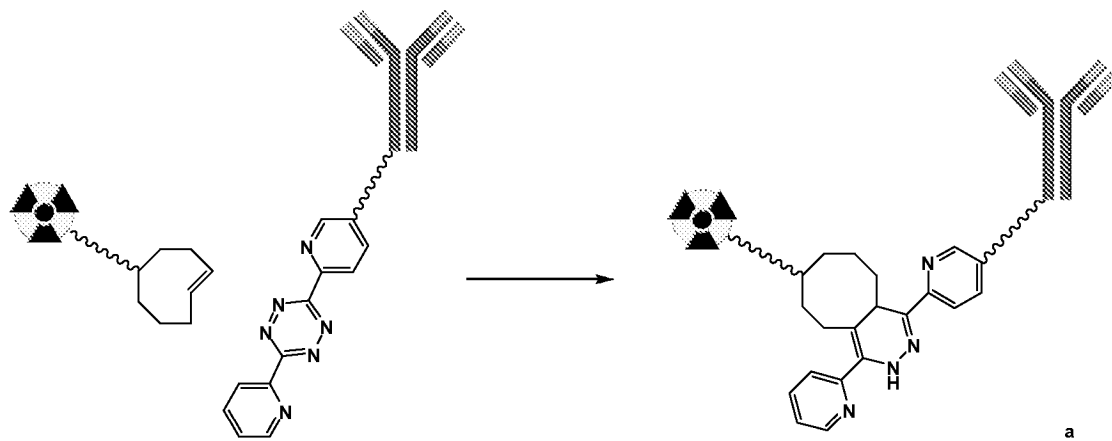


图 3a

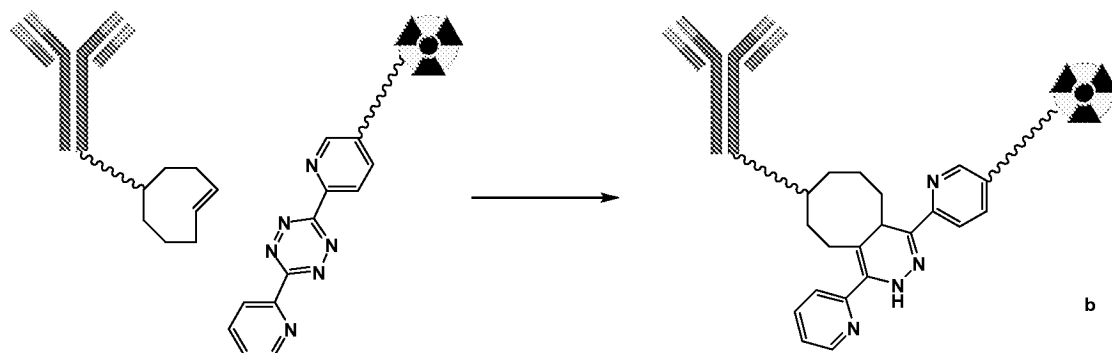


图 3b

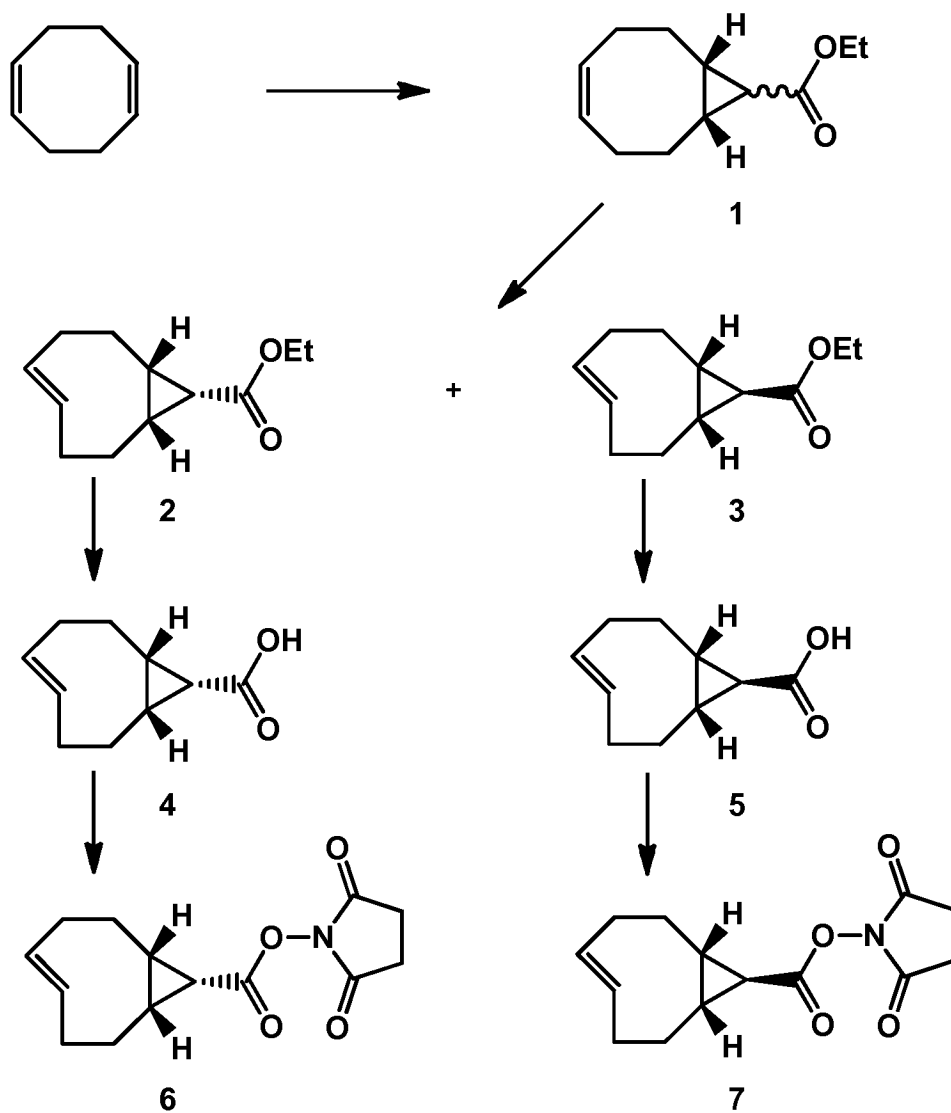


图 4

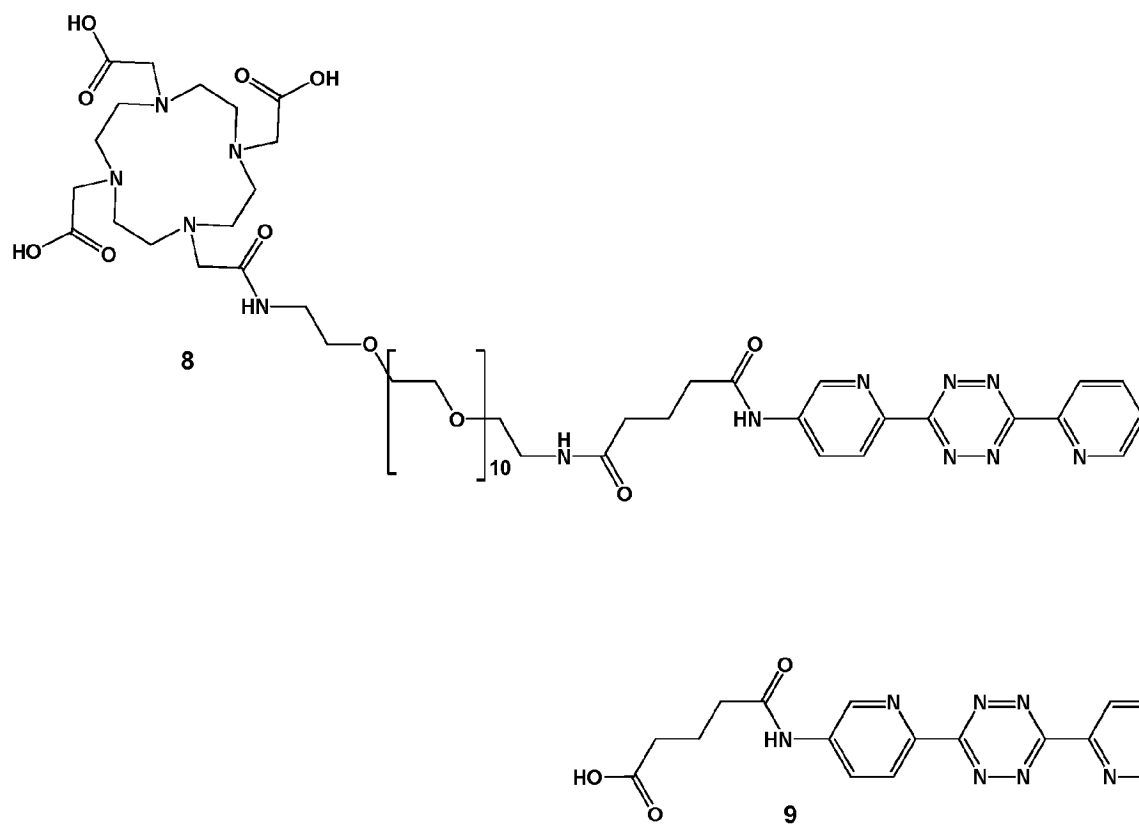


图 5

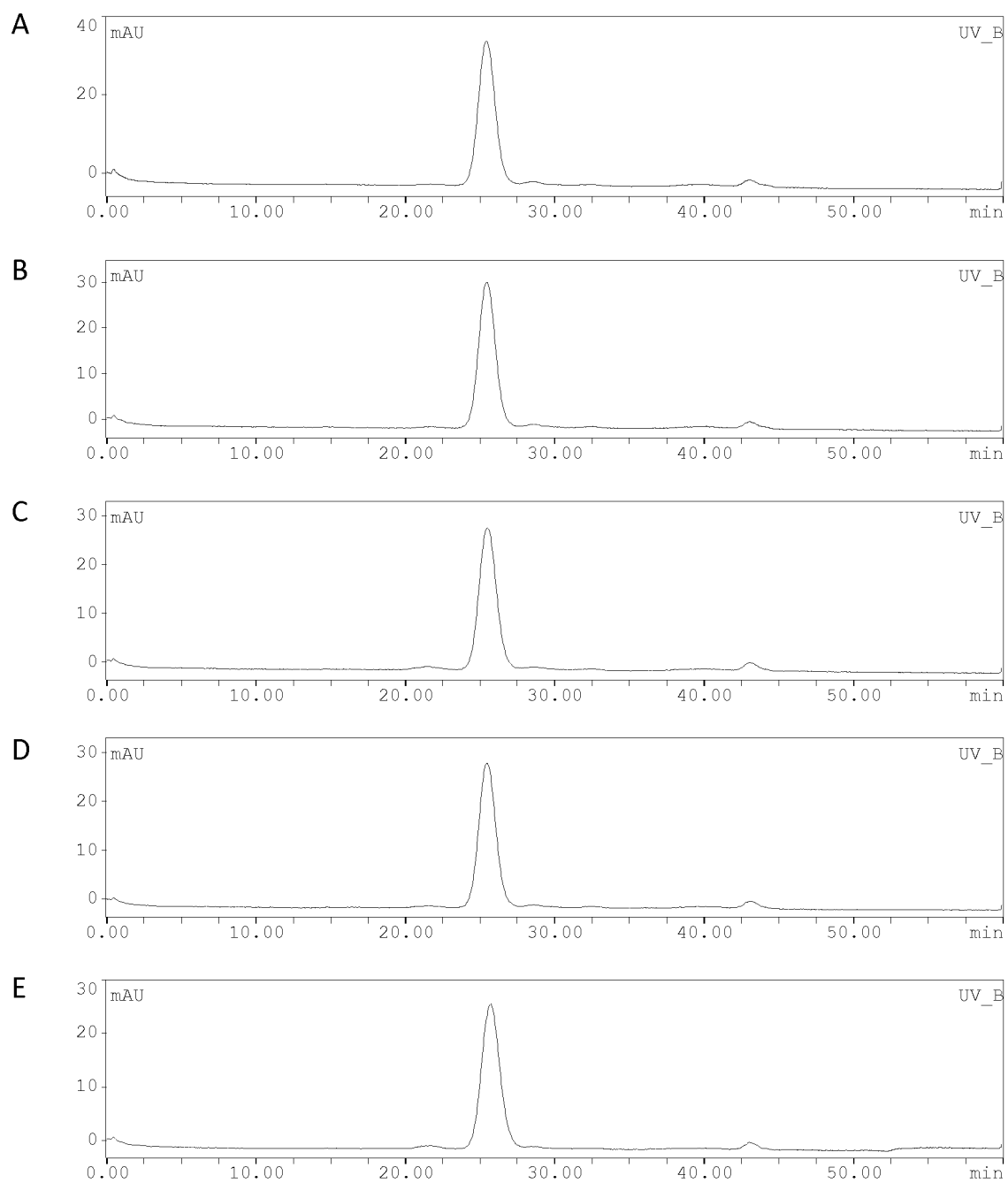


图 6

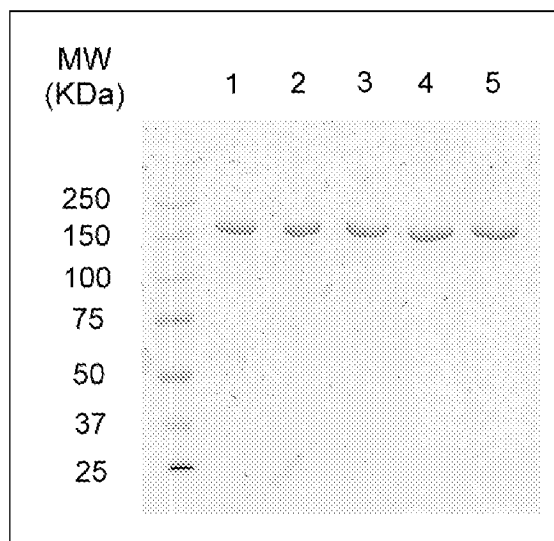


图 7

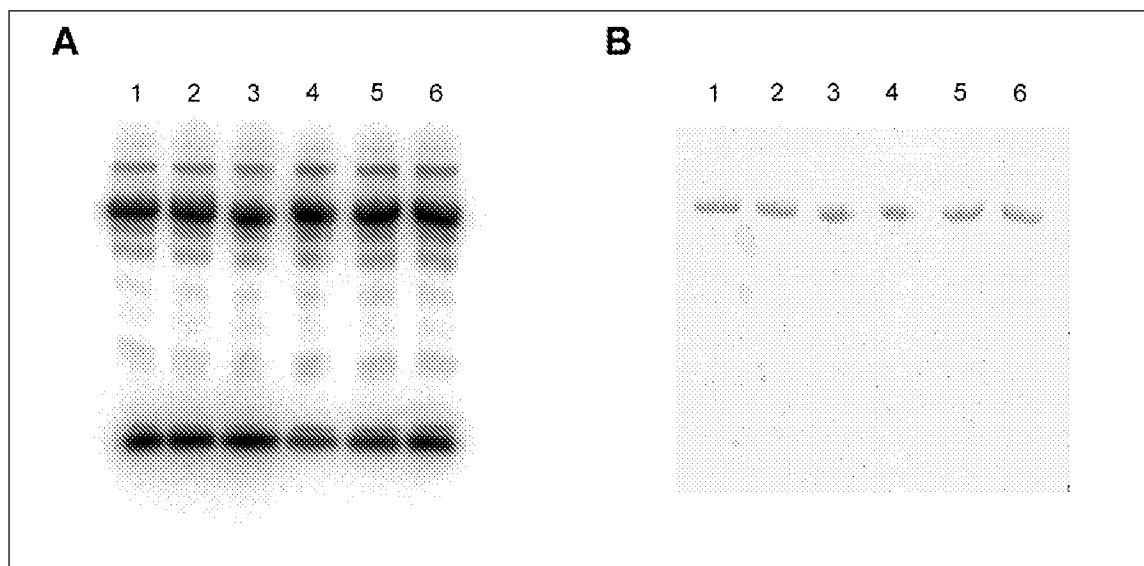


图 8

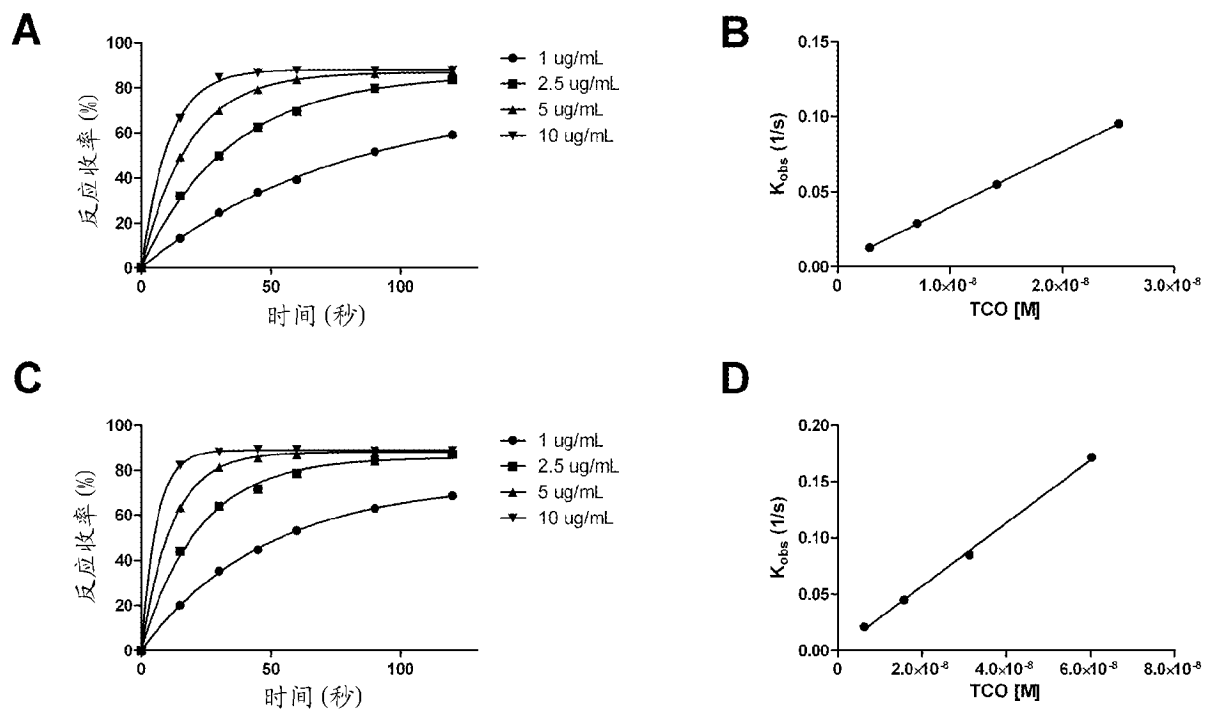


图 9

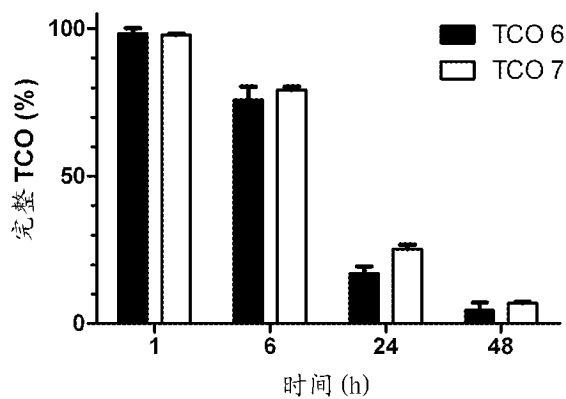


图 10

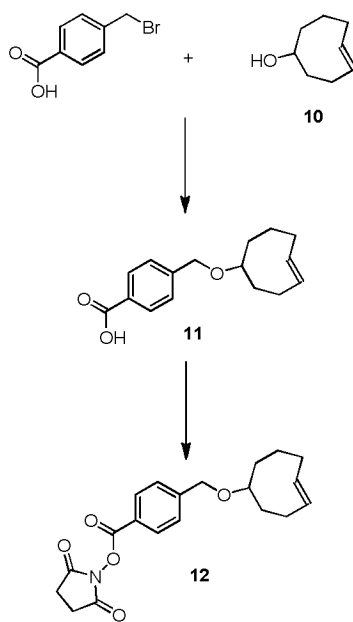


图 11

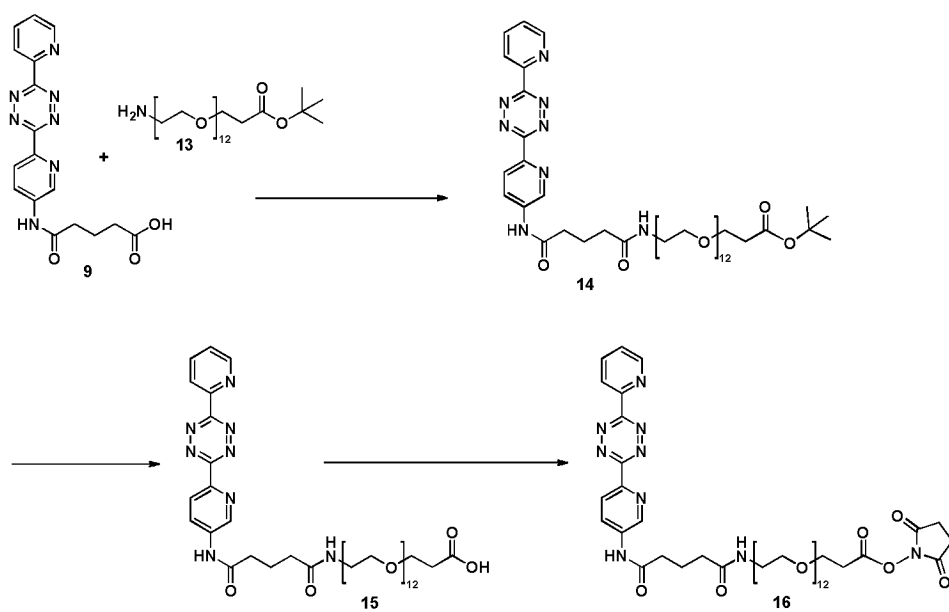


图 12

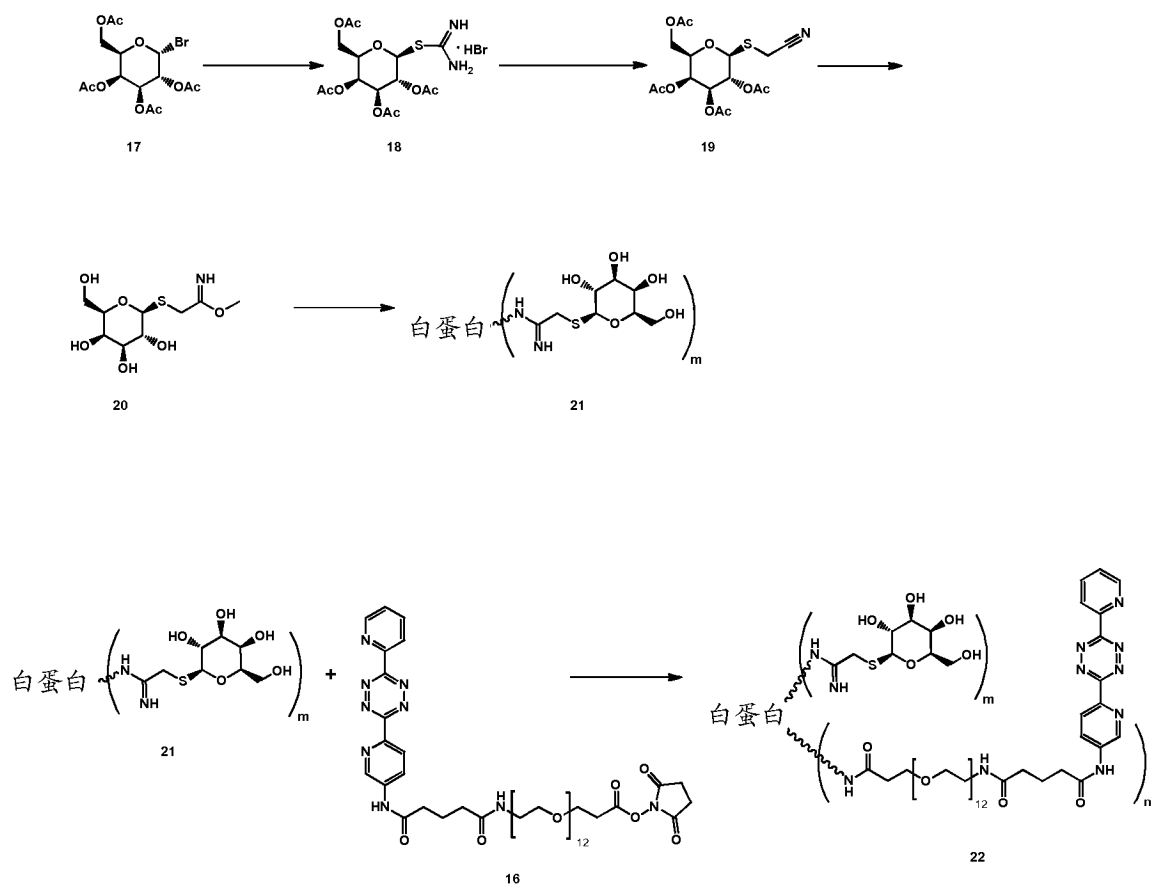


图 13

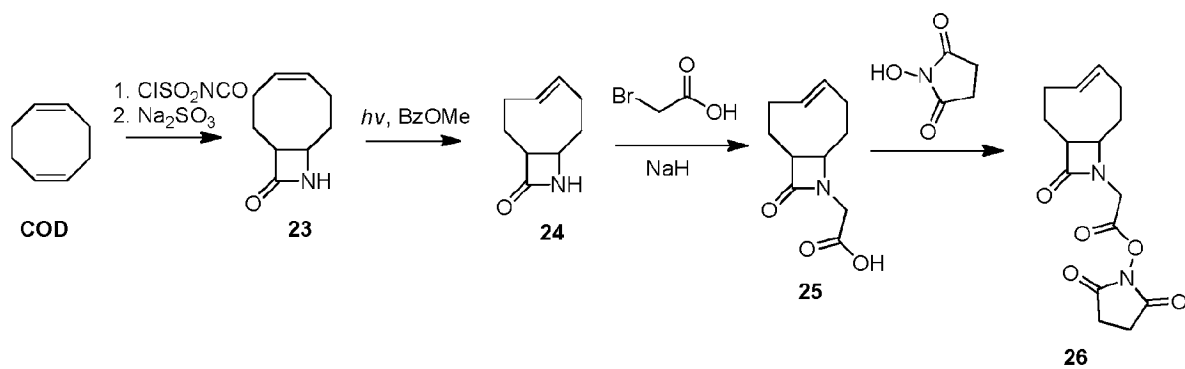


图 14

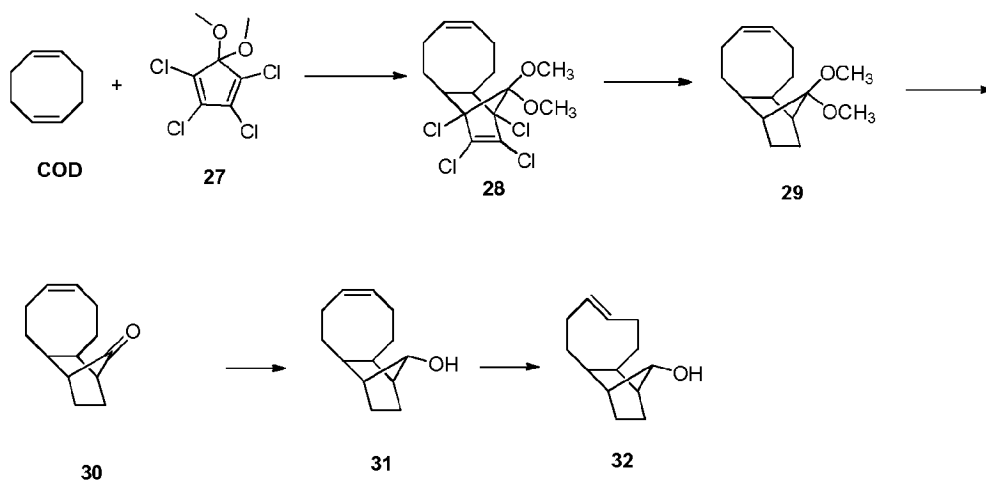


图 15

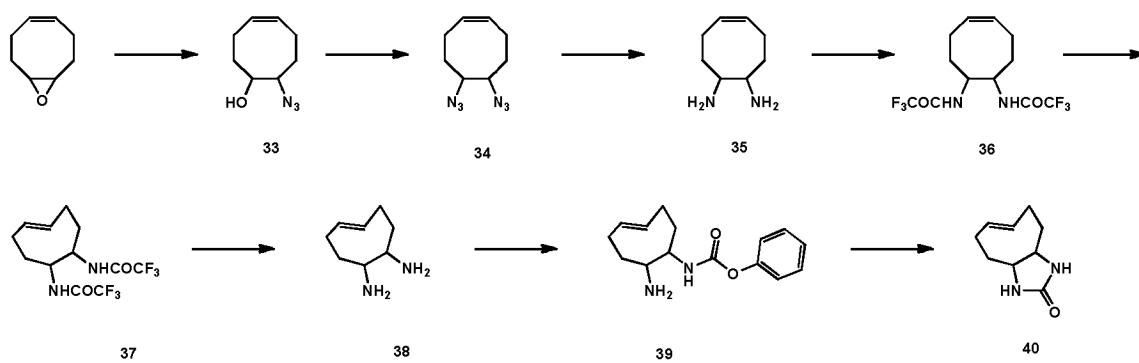


图 16

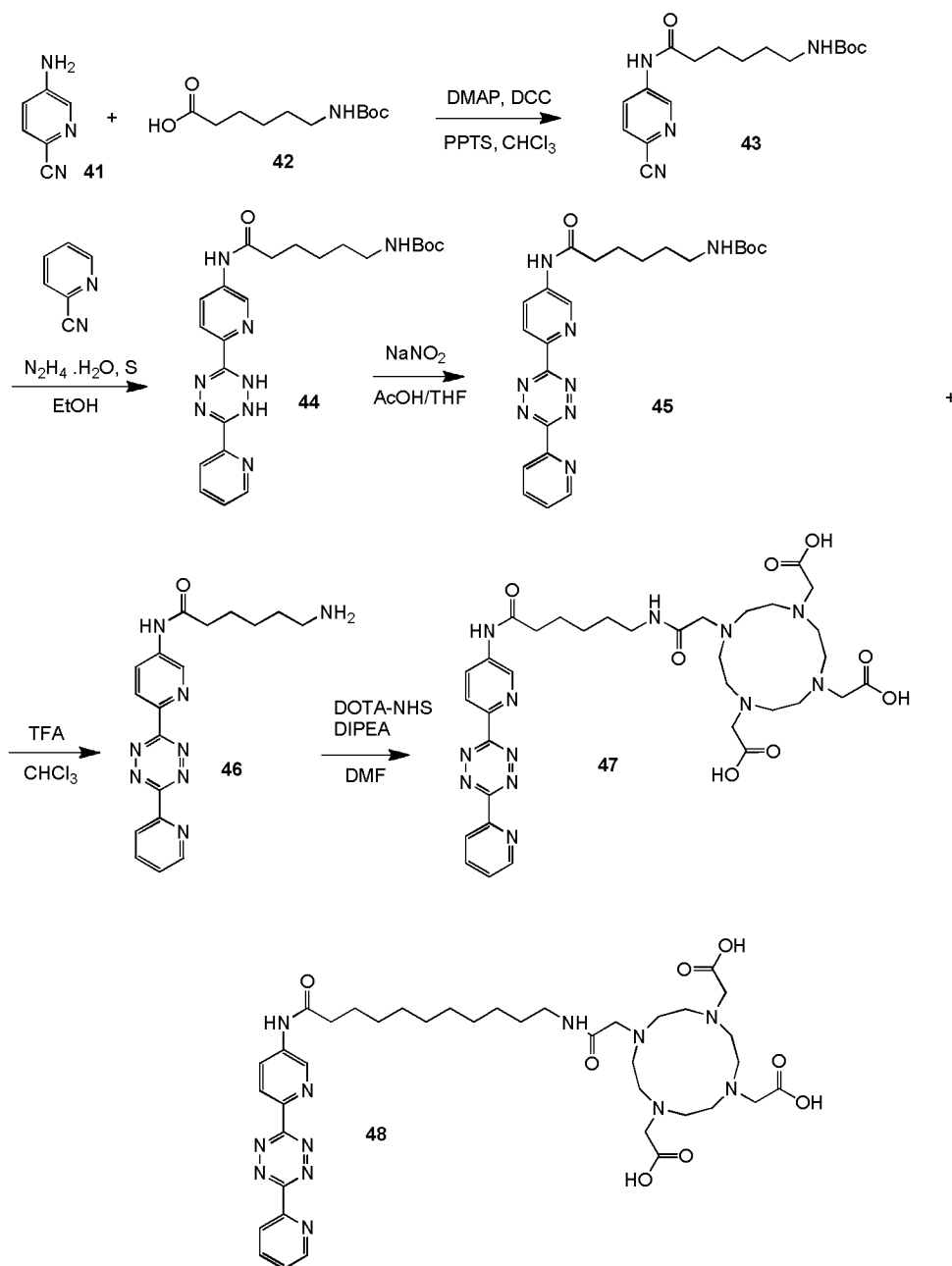


图 17

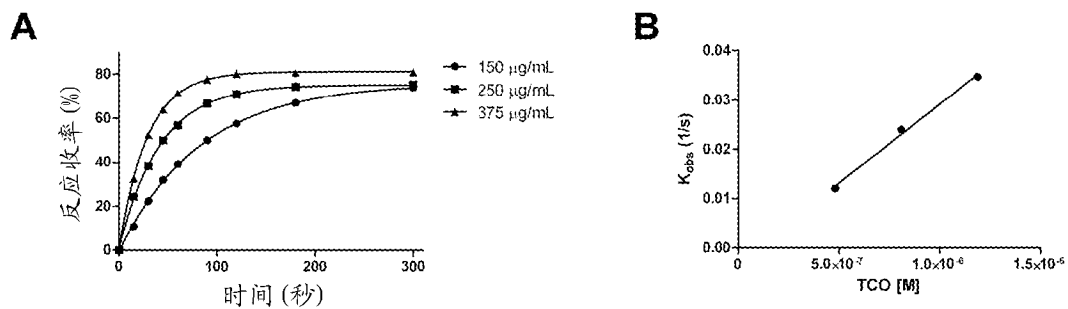


图 18

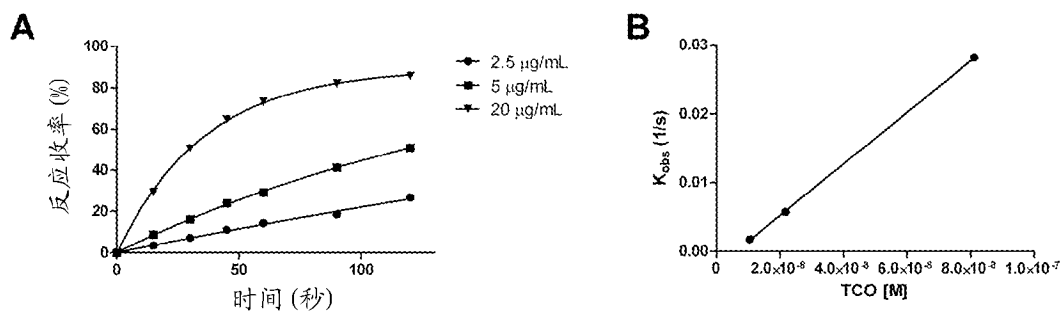


图 19

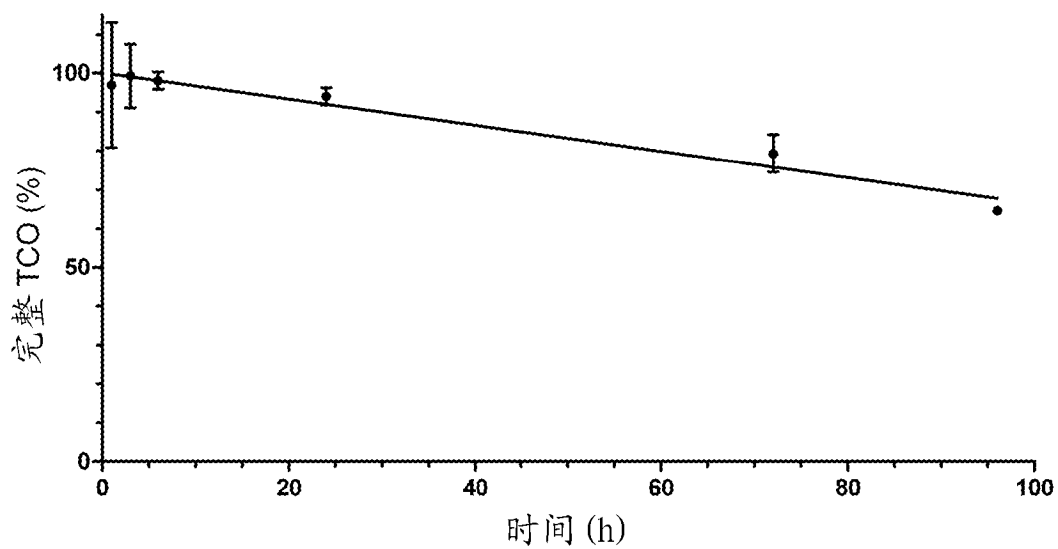


图 20

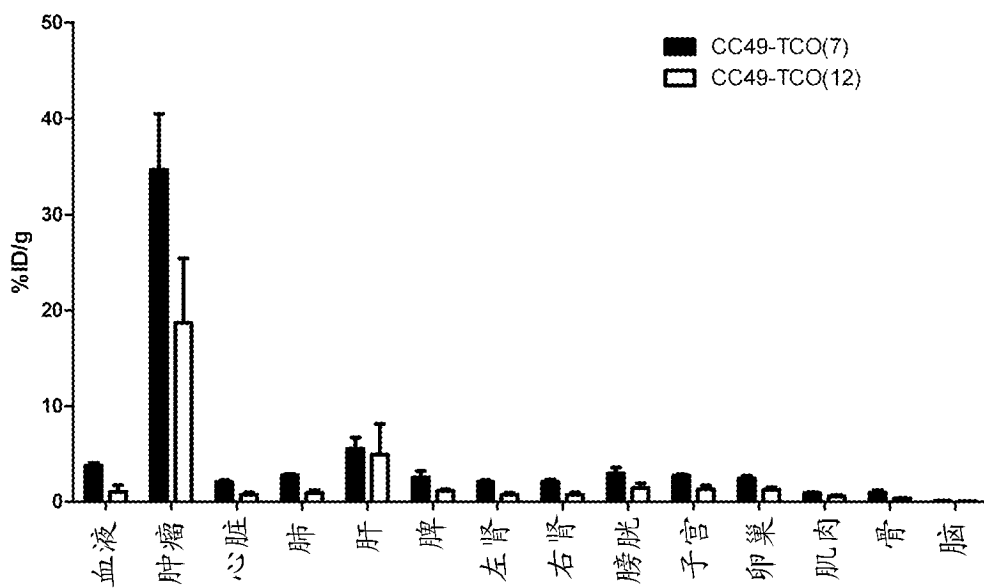


图 21

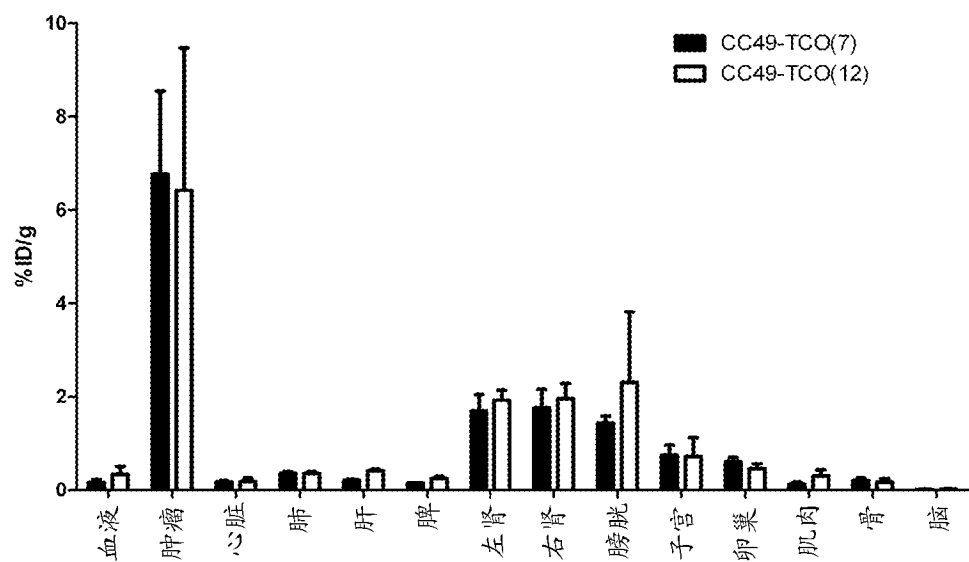


图 22

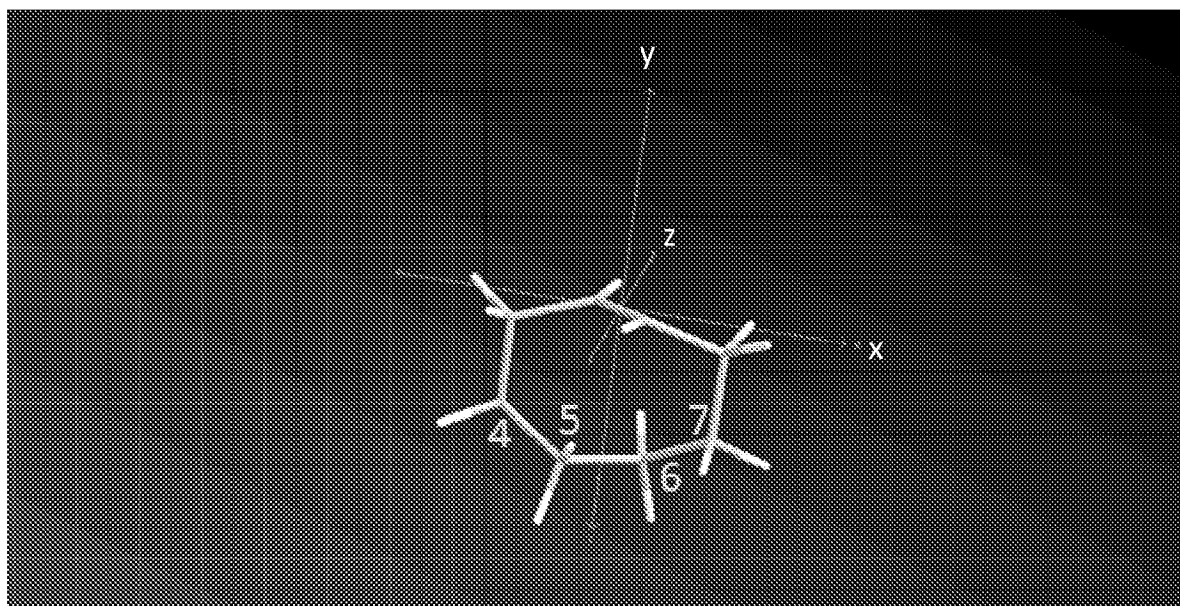


图 23