



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101854957 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 22

(21) 申请号 200880115735. 1

(22) 申请日 2008. 09. 09

(30) 优先权数据

60/971, 007 2007. 09. 10 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/075684 2008. 09. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02009/035959 EN 2009. 03. 19

(73) 专利权人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 A·卡思伯森 M·索尔巴肯

D·E·奥尔伯格

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李进 韦欣华

(51) Int. Cl.

A61K 51/08 (2006. 01)

C07K 1/13 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008/083191 A2, 2008. 07. 10, 权利要求  
书和实施例 1-3.

W0 2006/030291 A2, 2006. 03. 23, 权利要求

1-13.

Dag Erlend Olberg et al. A Novel  
Prosthetic Group for Site-Selective  
Labeling of Peptides for Positron Emission  
Tomography. 《Bioconjugate Chem.》. 2008, 第 19  
卷 (第 6 期), 1301 - 1308.

Steven J. Bark et al. A Highly Efficient  
Method for Site-Specific Modification  
of Unprotected Peptides after Chemical  
Synthesis. 《Journal of the American  
Chemistry Society》. 2000, 第 122 卷 (第 15  
期), 3567-3573.

Michael R. Carrasco et  
al. Chemoselective Alkylation of  
N-Alkylaminoxy-Containing Peptides.  
《ORGANIC LETTERS》. 2006, 第 8 卷 (第 16  
期), 3529-3532.

审查员 左丽

权利要求书2页 说明书21页

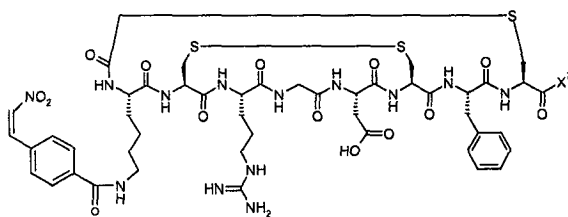
(54) 发明名称

放射性氟化方法

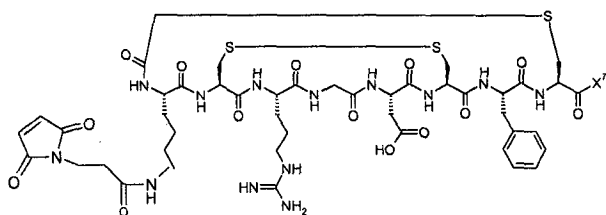
(57) 摘要

本发明涉及式 (V) 或 (VI) 缀合物、它们作为  
放射性药物的用途、它们的制备方法和用于此类  
方法的合成中间体。

1. 一种制备式 (Va) 的放射性氟化肽的方法, 所述方法包括使式 (If) 或 (Ig) 的前体化合物与式 (IIb) 化合物反应:

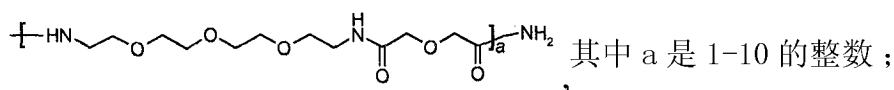


(If)

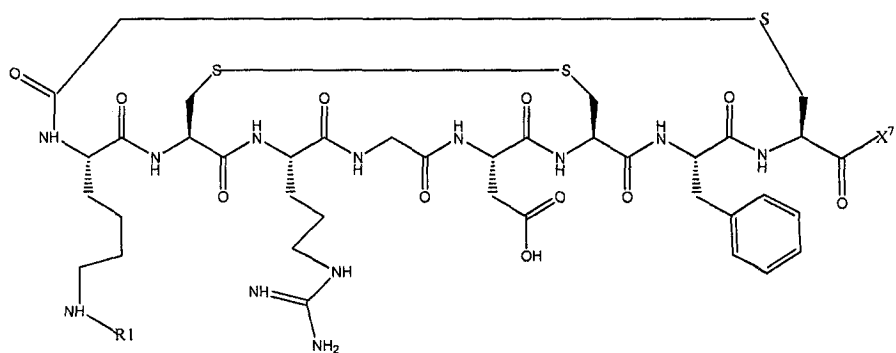


(Ig)

其中  $X^7$  是  $-NH_2$ , 或

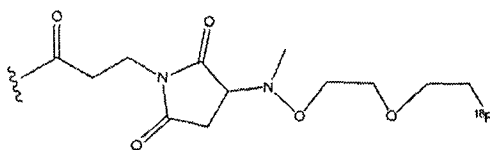


得到式 (Va) 缀合物:

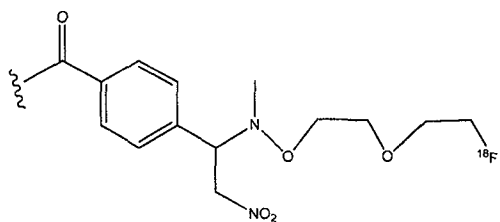


(Va)

其中  $R_1$  是

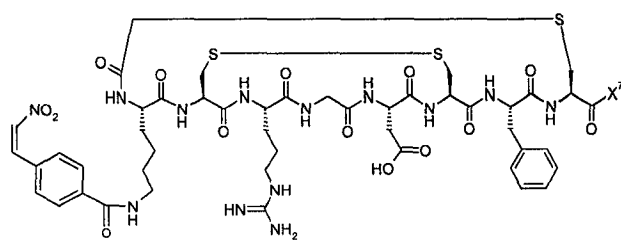


或

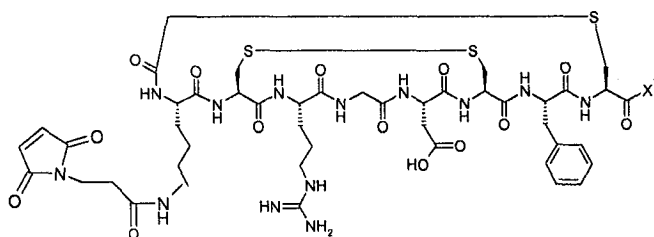


2. 权利要求 1 的方法, 其中式 (IIb) 化合物由  $tBuO(C=O)N(CH_3)-OCH_2CH_2OCH_2CH_2^{18}F$  产生。

3. 式 (If) 或 (Ig) 前体:



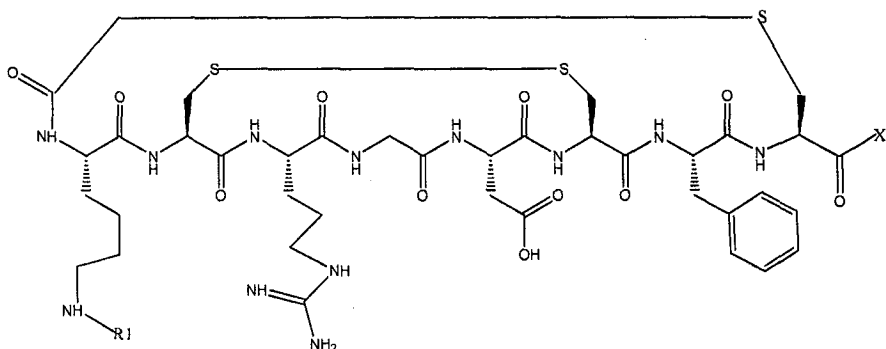
(If)



(Ig)

其中  $X^7$  如权利要求 1 所定义。

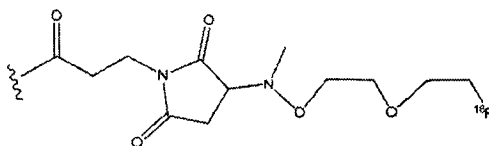
4. 下式的放射性氟化肽：



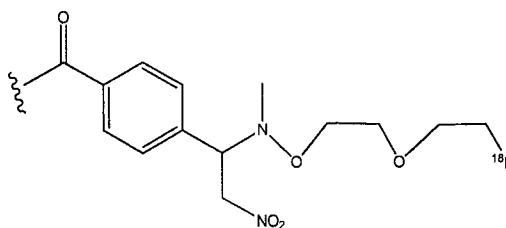
其中：

$X^7$  如权利要求 1 所定义，以及  $a = 1$ ，

$R_1$  是



或



5. 权利要求 1 所定义的式 (Va) 的放射性氟化肽在制备用 PET 产生人或动物体影像的成像剂中的用途。

6. 权利要求 5 的用途，其中所述影像用于监测药物治疗人或动物体的效果的方法，所述药物对抗与癌症有关的病症，所述产生影像在给予所述药物治疗前、期间和之后完成。

7. 权利要求 6 的用途，其中所述与癌症有关的病症为血管发生病症。

## 放射性氟化方法

## 发明领域

[0001] 本发明涉及诊断和放射诊断试剂,包括用正电子发射核素标记的生物活性载体。本发明还涉及用于使载体  $^{18}\text{F}$ - 氟化的方法和试剂,其中载体定义为对特定生物靶具有亲和力的分子,优选为肽。得到的  $^{18}\text{F}$ - 标记的缀合物可用作放射性药物,尤其可用于正电子发射断层扫描 (PET)。

## [0002] 发明背景

[0003] 用于诊断成像的放射性标记的生物活性肽的应用在核医学中越来越重要。与特定细胞类型选择性相互作用的生物活性分子可用于将放射性递送到靶组织。例如,放射性标记的肽具有将放射性核素递送到肿瘤、梗塞和感染组织用于诊断成像和放疗的显著潜力。 $^{18}\text{F}$  的半衰期为约 110 分钟,它是许多受体成像研究选择的正电子发射核素。因为它们在 PET 中具有定量检测和表征各种疾病的实用性,因此  $^{18}\text{F}$ - 标记的生物活性肽具有很大临床潜力。

[0004]  $^{18}\text{F}$ - 标记的肽存在的一个难点是现有  $^{18}\text{F}$ - 标记试剂制备费时。只能通过使用合适的辅基实现肽和蛋白的  $^{18}\text{F}$  的有效标记。文献中提出过几种此类辅基,包括 N- 琥珀酰亚胺基-4- $^{18}\text{F}$  氟苯甲酸酯、间-马来酰亚胺基-N-(对- $^{18}\text{F}$  氟苄基)-苯甲酰胺、N-(对- $^{18}\text{F}$  氟苄基)马来酰亚胺和 4- $^{18}\text{F}$  氟苯甲酰甲基溴。目前使用的用  $^{18}\text{F}$  标记肽和蛋白的几乎所有方法使用氟标记合成子的活性酯。因为肽和蛋白可能含能够与活性酯反应的许多官能团,所以这些当前方法为非位点特异性。例如,含 3 个赖氨酸残基的肽具有 3 个胺官能团,这 3 个胺官能团对标记的合成子的活性均相等。因此,仍然存在对  $^{18}\text{F}$ - 标记辅基和方法的需要,它们在温和条件下允许快速、化学选择性将  $^{18}\text{F}$  尤其引入肽,以高放射性化学收率和纯度得到  $^{18}\text{F}$ - 标记产物。另外,在临床环境下,需要按照自动化,来促进放射性药物的制备的此类方法。尽管我们前期描述过在 PET 标记策略中使用氨基氧基化学 (W003/006491),本发明化合物不易与醛和酮反应,但对某些含卤素的化合物有选择性。与先前公开的氨基氧基相比,N- 烷基氨基氧基部分的较高化学稳定性提供优势,因为副反应减少至最少,且中间体更稳定,这有助于中间体的成功处理和储存。

## [0005] 发明详述

[0006] 本发明提供放射性氟化方法,该方法包括使式 (I) 化合物与式 (II) 化合物反应:

[0007]



[0008]  $^{18}\text{F}$ -(接头)-R2 (II)

[0009] 或,

[0010] 使式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物反应

[0011]



[0012]  $^{18}\text{F}$ -(接头)-R4 (IV)

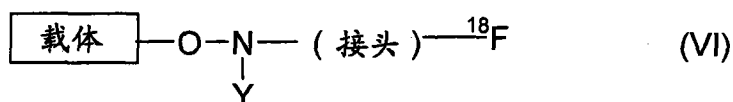
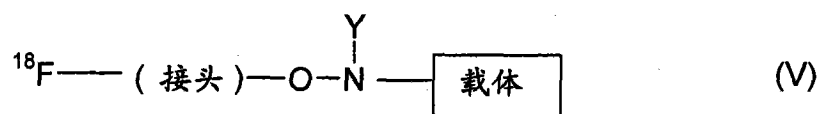
[0013] 其中

[0014] R1 为活性含卤素基团例如卤代乙酰基、卤代烯丙基或苯甲酰甲基卤, 或为所有基团适用于参与烷基化反应的环氧化物环, 或为迈克尔受体例如马来酰亚胺基或丙烯酸或取代的丙烯酸衍生物, 或为乙烯基苯乙炔, 优选硝基乙烯基苯乙炔, 或为乙烯基磺酰胺, 或为乙烯基砜。

[0015] R2 为 N-烷基-氨基氧基基团, 在温和条件下例如缓冲水溶液和微酸性 pH 中, 该基团与 R1 进行位点特异性反应, 得到式 (V) 化合物。

[0016] 其中式 (III) 的 R3 = R2, 且式 (IV) 的 R4 = R1。式 (III) 化合物与式 (IV) 化合物连接, 得到式 (VI) 产物

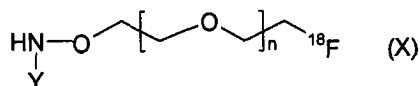
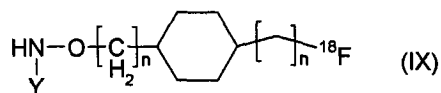
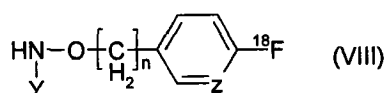
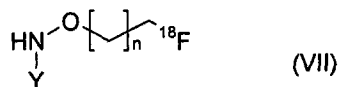
[0017]



[0018] 其中在两种情况下, Y 为烷基, 优选 Y = -CH<sub>3</sub>。

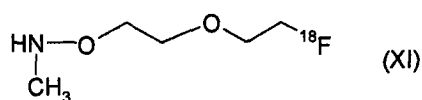
[0019] 最优选式 (V) 化合物, 式 (II) 化合物的  $^{18}\text{F}$ -接头组件优选包含式 (VII-XI) 中所示类型化合物

[0020]



[0021] 优选

[0022]



[0023] 其中 n =

[0024] n 为 0-20 的整数;

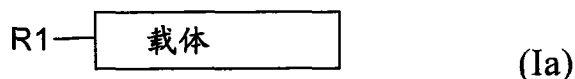
[0025] Z 为 O、N 或 S。

[0026] 也可选择式 (II) 化合物中的接头基团, 以提供最佳体内药代动力学, 例如得到的式 (V) 缀合物的有利排泄特性。具有不同亲脂性接头基团的使用可显著改变肽的体内药代动力学, 以适应诊断需要。例如, 当需要通过肾排泄将机体中的式 (V) 缀合物清除时, 使用亲水性接头, 该接头含由式 X-XI 衍生的接头组件。同样, 需要通过肝胆排泄清除时, 可选择疏水性接头, 该接头含由式 VII-IX 衍生的接头组件。

[0027] 本发明提供更具化学选择性的放射性标记方法, 其中在肽或载体前体的合成期间, 预选择引入标记物的确切位点。连接反应在分子中预定位点发生, 且仅得到单一标记的产物。因此, 该方法具有化学选择性, 据认为, 它是标记多种药物样分子、肽生物分子例如小蛋白的通用方法。

[0028] 在再一方面, 本发明提供放射性氟化方法, 该方法包括使式 (Ia) 化合物与式 (IIa) 化合物反应:

[0029]

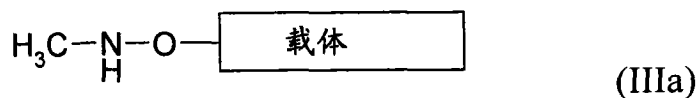


[0030]  $^{18}\text{F} - (\text{接头}) - \text{O} - \text{NH} - \text{CH}_3 \quad (\text{IIa})$

[0031] 或

[0032] 使式 (IIIa) 化合物与式 (IVa) 化合物反应

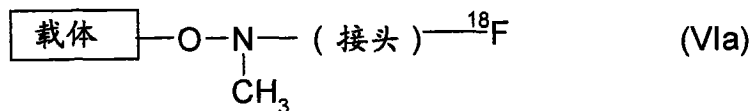
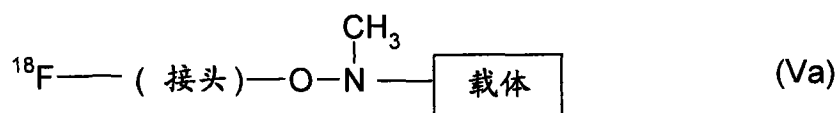
[0033]



[0034]  $^{18}\text{F} - (\text{接头}) - \text{R4} \quad (\text{IVa})$

[0035] 其中 R1 和 R4 定义分别同以上式 (I) 和 (IV) 化合物, 分别得到式 (Va) 或 (VIa) 缀合物:

[0036]

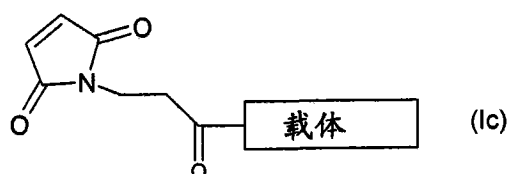
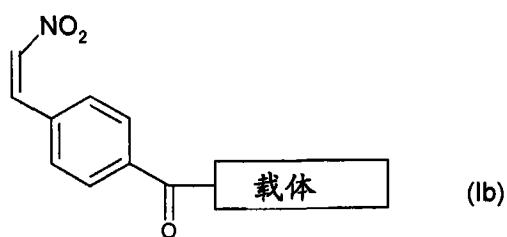


[0037] 其中接头基团定义同以上化合物。

[0038] 可在合适的溶剂例如在 pH 范围 3-11 的缓冲水溶液中, 在 5-70°C 非极端温度下, 但最优选在环境温度下完成该反应。

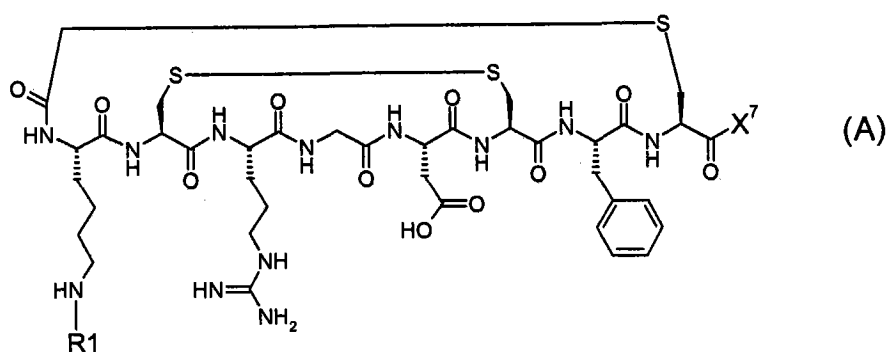
[0039] 在本发明的再一方面, R1 源自马来酰亚胺和乙烯基苯乙烯类化合物, 且最优选下式 Ib 和 Ic 中代表的化合物:

[0040]



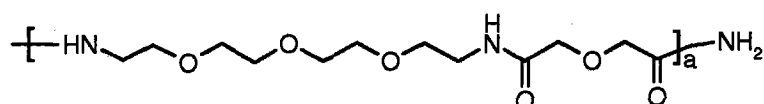
[0041] 在式 (I) 和 (III) 和在本发明的其它方面,除特别说明外,载体可定义为对相关受体具有亲和力的生物制品,该受体与疾病过程有关。生物制品可定义为小分子药物样药效团蛋白或抗体,但优选分子量小于 30kDa 的蛋白,最优选小于 100 氨基酸的肽。用本发明方法标记的优选的肽载体的实例为生长抑素衍生物例如奥曲肽、蛙皮素、血管活性肠肽、趋化肽类似物、 $\alpha$ -促黑激素调节素、神经降压肽、Arg-Gly-Asp 肽、人促胰岛素连接肽、内皮素、血管紧张素和甲酰基-正亮氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸-正亮氨酸-酪氨酸-酪氨酸。优选的用于标记的肽为 Arg-Gly-Asp 肽和类似物,例如在 WO 01/77415 和 WO 03/006491 中描述的那些。优选的肽载体含式 (A) 片段

[0042]



[0043] 其中  $X^7$  为  $-NH_2$  或含乙基乙二醇结构

[0044]



[0045] 其中 'a' 为 1-10 的整数,但最优选 'a' 为 1,

[0046]  $R_1$  与前述式 (I) 相同。

[0047] 技术人员会认识到,本发明方法也可用于其它生物分子例如蛋白、激素、寡核苷酸和抗体片段,以及药物样小分子的放射性氟化,提供各种 PET 示踪剂。

[0048] 可通过标准的肽合成方法例如固相肽合成例如在 Atherton, E. and Sheppard, R. C. ; "Solid Phase Synthesis"; IRL Press : Oxford, 1989 中描述的方法制备式 (I) 和 (III) 化合物。可通过使肽的 N 或 C-末端反应,或与肽序列中含有的一些其它官能团反应,将  $R_1$  和  $R_3$  基团引入式 (I) 或 (III) 化合物中,该修饰不影响载体的结合特性。在优选的

实例中,可用由 Carrasco 等 (Biopolymers, Peptide Science, 2006, Vol 84(4), p 414) 描述的氨基酸,将含 N-烷基氨基氧基的基团即  $Y-NH_2-O-$  直接引入肽序列。优选通过使胺官能团与活化酸反应形成的稳定的酰胺键引入官能团 R1 和 R3,并在肽合成期间或之后引入。当前体为酸时,则可原位使用活化剂例如六氟磷酸 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓 (HBTU) 或六氟磷酸 N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲铵 N-氧化物 (HATU),引入 R1 和 R3。

[0049] 可由相应的式 (XII) 前体制备式 (II) 化合物:

[0050]



[0051] 其中 L 为离去基团,优选对-甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯或甲磺酸酯或卤化物, Y 和接头定义同前,其中 R5 为保护氮原子的合适保护基例如叔-丁氧基羰基,由此与回旋加速器产生的  $[^{18}\text{F}]$ -氟化物水溶液反应,该  $[^{18}\text{F}]$ -氟化物通过在合适的溶剂例如乙腈、N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜中,通常在升高的温度例如 60-150°C,适宜在 60-120°C 下,或通过微波加热,从碱(例如从四丁铵或  $\text{K}_2\text{CO}_3$ /Kryptofix-222)中蒸发来适当的预活化,然后用标准方法例如酸解处理,将任何 N-保护基团除去。

[0052] 可由相应的式 (XX) 前体或其保护的衍生物制备式 (IV) 化合物:

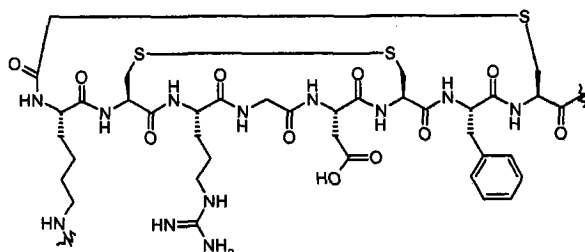
[0053] L-接头-R4 (XX)

[0054] 其中 L 为离去基团,优选对-甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯或甲磺酸酯或卤化物,接头和 R4 定义同前。通过在合适的溶剂例如乙腈、N,N-二甲基甲酰胺或二甲亚砜中,通常在升高的温度例如 60-120°C 下,从碱(例如从四丁铵或  $\text{K}_2\text{CO}_3$ /Kryptofix-222)中蒸发来适当的预活化, L 能够与回旋加速器产生的  $[^{18}\text{F}]$ -氟化物水溶液反应。

[0055] 本发明还提供放射性药物组合物,该组合物含有效量(例如有效用于体内 PET 成像的量)的通式 (V) 或 (VI) 化合物以及一种或多种药学上可接受的助剂、赋形剂或稀释剂。

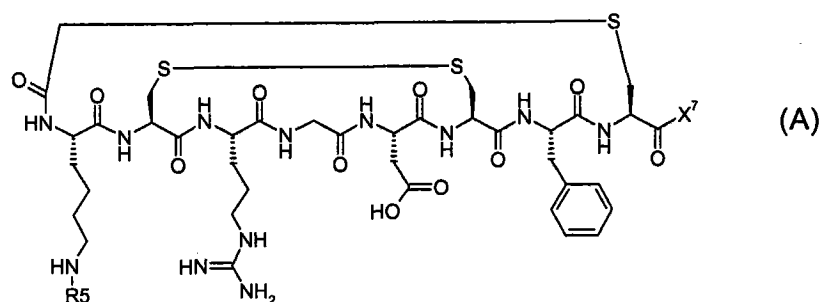
[0056] 本发明优选的实施方案涉及通式 (V) 或 (VI) 化合物,它们用于医疗用途,尤其是用于肿瘤成像(适合通过 PET);其中载体为 Arg-Gly-Asp 肽或其类似物,例如在 WO 01/77415 和 WO 03/006491 中描述的那些,优选含以下片段的肽

[0057]



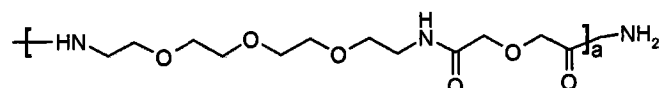
[0058] 更优选式 (A) 的肽:

[0059]



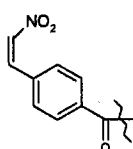
[0060] 其中  $X^7$  为  $-NH_2$  或

[0061]

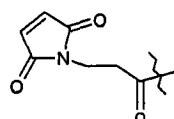


[0062] 其中 'a' 为 1-10 的整数, 优选 a 为 1, 其中 R5 在肽反应后与赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基形成酰胺键, 且由 R1 定义, 但最优选由 Id 和 Ie 结构阐明

[0063]



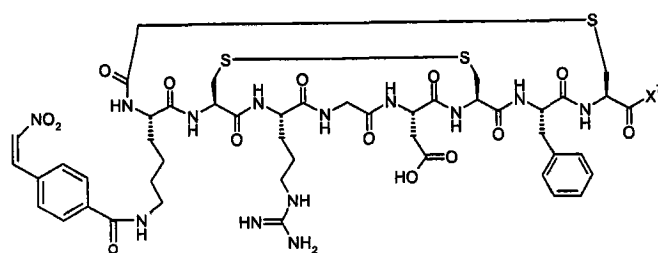
(Id)



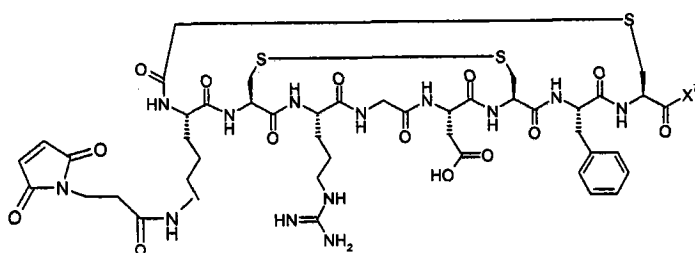
(Ie)

[0064] 得到具有 (If 和 Ig) 中所示结构的式 (I) 化合物

[0065]



(If)



(Ig)

[0066] 可以足以产生需要信号的量, 将本发明的放射性标记缀合物给予患者, 用于 PET 成像, 每 70kg 体重 0.01-100mCi, 优选 0.1-50mCi 的典型放射性核素剂量通常足够。

[0067] 因此, 可按完全在本领域技能范围内的方法, 用生理上可接受的载体或赋形剂, 配制用于给药的本发明放射性标记缀合物。例如, 可使化合物、任选加入的药学上可接受的赋形剂悬浮或溶于含水介质中, 然后将得到的溶液或悬浮液灭菌。

[0068] 从本发明的再一方面看, 提供本发明放射性标记缀合物在制备放射性药物中的用途, 此类药物用于体内成像, 适宜为 PET, 优选肿瘤成像方法; 涉及将所述放射性药物给予

人或动物体,并产生所述机体至少一部分的影像。

[0069] 从本发明的还再一方面看,提供产生人或动物体的影像的方法,该方法涉及将放射性药物给予所述机体,例如给予至血管系统内,和用 PET 在所述放射性药物分布到所述机体后生成所述机体至少一部分的影像,其中所述放射性药物含本发明的放射性标记缀合物。

[0070] 从本发明的再一方面看,提供监测用抗与癌症有关的病症,优选血管发生病症的药物,例如细胞毒药物治疗人或动物体的效果的方法,所述方法包括给予所述机体本发明的放射性标记缀合物,和检测所述缀合物被细胞受体,优选内皮细胞受体,尤其是  $\alpha v \beta 3$  受体的摄取,所述给予和检测任选但优选,例如在用所述药物治疗之前、期间和之后重复完成。

[0071] 在本发明的还另一个实施方案中,提供用于放射性氟化示踪剂制备的试剂盒,该试剂盒含有式 (II) 或 (IV) 的辅基和式 (I) 或 (III) 的化合物。

[0072] 按照本发明的再一方面,提供用于放射性氟化示踪剂制备的试剂盒,该试剂盒含有式 (xx) 的辅基和式 (I) 的化合物。按照本发明的另一方面,提供用于放射性氟化示踪剂制备的试剂盒,所述试剂盒含式 () 或 () 的辅基和式 (III) 的化合物。

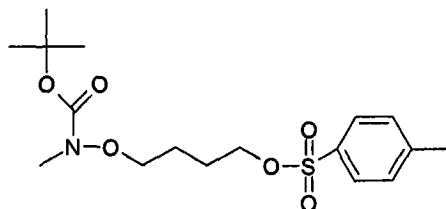
[0073] 在使用试剂盒时,用上述方法,式 () 化合物将转化为相应的式 (II) 化合物,且式 () 或 () 化合物将分别转化为相应的式 (IV) 化合物。优选,可通过使反应混合物通过固相萃取 (SPE) 短柱,将式 (II) 和 (IV) 化合物与废的反应物分离。SPE 短柱可含石墨垫、 $C_{18}$  固定相或离子交换树脂。然后,式 (II) 和 (IV) 化合物将分别加入式 (I) 和 (III) 化合物中,它们可适当的溶于缓冲水溶液 (pH 3-11)。在非极端温度下反应 1-70 分钟后,可将标记的肽例如通过 SPE 纯化,并收集。

## 实施例

[0074] 本发明通过实施例来举例说明,其中使用以下缩写。

|        |                          |                |
|--------|--------------------------|----------------|
| [0075] | HPLC :                   | 高效液相色谱         |
| [0076] | NMR :                    | 核磁共振           |
| [0077] | hr(s) :                  | 小时             |
| [0078] | min(s) :                 | 分钟             |
| [0079] | THF :                    | 四氢呋喃           |
| [0080] | DCM :                    | 二氯甲烷           |
| [0081] | DMF :                    | N, N- 二甲基甲酰胺   |
| [0082] | TBAF :                   | 氟化四丁铵          |
| [0083] | MeOH :                   | 甲醇             |
| [0084] | DMSO :                   | 二甲亚砜           |
| [0085] | Boc :                    | 叔 - 丁氧基羰基      |
| [0086] | RT :                     | 室温             |
| [0087] | i-Pr <sub>2</sub> -Net : | N, N- 二异丙基乙胺   |
| [0088] | t-BDPSiCl :              | 叔 - 丁基二苯基氯化甲硅烷 |
| [0089] | NaH :                    | 氢化钠            |

- [0090] EtOAc : 酸乙酯  
 [0091] MBq : 兆贝克勒耳  
 [0092] 使用以下流动相 / 梯度系统 : 溶剂 A : 水 (0.1%) TFA, 溶剂 B : 乙腈 (0.1% TFA)  
 [0093] 实施例 1 ;  
 [0094] 甲苯-4-磺酸 4-(N-甲基-N-Boc-氨基氧基)-丁酯的制备  
 [0095]



- [0096] 化合物 1  
 [0097] (a) N-Boc-N-甲基羟胺  
 [0098] 搅拌下, 在冰冷却下, 将 N-甲基-羟胺 (4, 2g, 0.05mol) 溶于 50% 四氢呋喃 (THF) 水溶液 (20ml)。将碳酸钾 (3, 6g, 0.0275mol) 加入该冰冷却溶液中, 然后加入溶于 15ml THF 的二碳酸二叔丁酯 (12g, 0.055mol)。将混合物在 0°C 下搅拌 2 小时, 再在室温下搅拌 2 小时。将 THF 减压除去, 将残渣溶于 DCM。将溶液用水洗涤两次, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 浓缩, 得到粉红色低粘性油状物 6, 47g (88%)。产物通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定 (MH<sup>+</sup> 理论值 147, 09; 实测值 147, 6)。产物使用时无需进一步纯化。  
 [0099] (b) 4-溴-丁氧基)-叔丁基-二苯基-硅烷  
 [0100] 在氩气氛下, 向含 i-Pr<sub>2</sub>-Net (10ml) 的 4-溴-1-丁醇 (2, 75g, 18mmol) 的 DCM (10ml) 溶液中加入 t-BDPSiCl (5ml, 18mmol)。将溶液在室温下搅拌 2 小时, 真空浓缩, 色谱纯化 (己烷 / 乙酸乙酯 10 : 1)。得到 4, 39g (62%) 低粘性无色油状物。结构用 NMR 确证。  
 [0101] (c) O-[4-(叔丁基-二苯基-硅烷氧基)-丁基]-N-甲基-N-Boc-羟胺  
 [0102] 将 N-Boc-N-甲基羟胺 (a) (0, 74g, 5mmol) 溶于 10ml DMF, 用 NaH (200mg, 60% 的矿物油分散体, 4, 75mmol) 处理, 在氩气氛下搅拌 1h。将混合物冷却至 0°C, 用 4-溴-丁氧基)-叔丁基-二苯基-硅烷 (b) (1, 56g, 4mmol) 的 DMF (10mL) 溶液处理, 在 0°C 下再搅拌 3 小时。将溶剂减压除去, 将残渣溶于 EtOAc (150mL), 倾入分液漏斗。将有机层用 0, 1M NaOH (5 × 50mL)、H<sub>2</sub>O (50ml)、0, 1M KHSO<sub>4</sub> 和盐水 (50ml) 洗涤, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。将溶剂除去后, 残渣经硅胶层析 (己烷 : EtOAc 10 : 1) 纯化, 得到 0, 588g (24%)。产物通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定 (MH<sup>+</sup> 理论值 457, 26; 实测值 457, 8)  
 [0103] (d) 4-(N-甲基-N-Boc-羟胺)-丁-1-醇  
 [0104] 将 TBAF (1, 6mL, 1, 586mmol) 加入溶于无水 THF 20mL 的 O-[4-(叔丁基-二苯基-硅烷氧基)-丁基]-N-甲基-N-Boc-羟胺 (c) (588mg, 1, 22mmol)。将反应物在氩气下搅拌过夜。将 NH<sub>4</sub>Cl (饱和) 加入溶液 (10mL × 3), 将 THF 蒸发。将溶液用 DCM 萃取, 将有机相干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 蒸发。残渣经硅胶层析 (己烷 / EtOAc 1 : 1) 纯化, 得到 0, 170g (63%)。产物通过 HPLC (柱 : Phenomenex Luna 3 μ C18 (2), 4, 6 × 50mm, 检测 : 214nm, 梯度 : 50% - 100% B 洗脱 10min, 其中 A = H<sub>2</sub>O / 0, 1% TFA, B = 乙腈 / 0, 1% TFA, 流速 : 2mL/min, Rt = 2, 70min) 分析。进一步确证通过 NMR 分析进行。

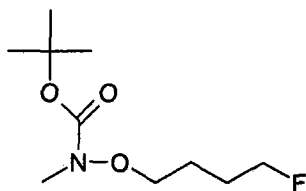
[0105] (e) 甲苯-4-磺酸 4-(N-甲基-N-Boc-羟胺)-丁酯

[0106] 在氩气下,搅拌下,向冰浴冷却的 4-(N-甲基-N-Boc-羟胺)-丁-1-醇(d) (170mg, 0,77mmol) 和三乙胺 (161  $\mu$ L, 1,155mmol) 的无水 DCM(10mL) 溶液中加入 甲苯-4-磺酰氯 (190,8mg,1,001mmol) 的无水 DCM(5mL) 溶液。15 分钟后,将冰浴撤去,将反应混合物保持在室温下。2 小时后,加入新试剂 (三乙胺 (32  $\mu$ L,0,23mmol)、甲苯-4-磺酰氯 (29,36mg, 0,154mmol)。24 小时后,可在 TLC 上观察到预期产物。30 小时:将新试剂加入反应混合物 (三乙胺 (53  $\mu$ L,0,385mmol)、甲苯-4-磺酰氯 (73,5mg,0,385mmol),放置过夜。将有机相用 10%  $\text{NaHCO}_3$  (10mL $\times$ 3) 洗涤,用  $\text{MgSO}_4$  干燥。将有机相真空除去,经硅胶闪层析 (己烷:乙酸乙酯 6:4) 纯化,得到 111mg (41,5%) 产物。NMR 显示产物中存在 甲苯-4-磺酰氯 杂质。需要进一步纯化,以除去 4-磺酰氯。在硅胶闪柱上,用正己烷:EtOAc (8:2) 得到较好分离,4-磺酰氯被除去。收率:64mg (22%)。产物通过 HPLC (柱:Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2), 4,6 $\times$ 50mm,检测:214nm,梯度:20%-80% B 洗脱 10min,其中 A =  $\text{H}_2\text{O}$ /0,1% TFA,B = 乙腈/0,1% TFA,流速:2mL/min, $R_t$  = 2,70min) 分析。产物通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定 ( $\text{MH}^+$  理论值 373,16;实测值 373,9)。进一步确证通过 NMR 分析进行。

[0107] 实施例 2:

[0108] 作为无放射性标准品 (cold standard) 的 0-(4-氟-丁基)-(N-甲基-N-Boc-羟胺)的制备

[0109]

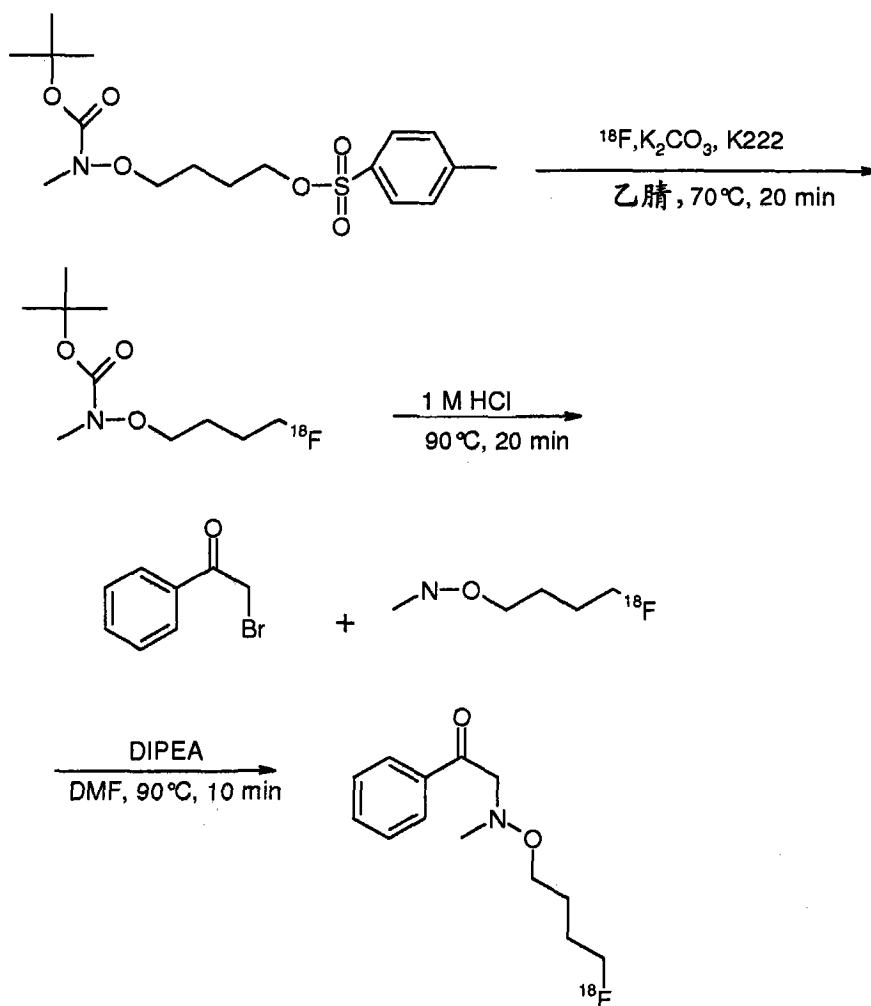


[0110] 化合物 2

[0111] 将 KF (4,64mg,0,080mmol) 和 kryptofix (30,1mg,0,080mmol) 溶于无水乙腈 (0,75mL)。在氩气下,将混合物搅拌 5min,然后加入溶于无水乙腈 (0,250mL) 的化合物 1 (15mg,0,040mmol)。将混合物在 60 $^{\circ}\text{C}$  下加热 1 小时。1 小时后,TLC 显示反应完全。将溶剂蒸发,残渣经硅胶闪层析纯化,用己烷/EtOAc (1:1),得到 4,5mg (51%)。产物通过 HPLC (柱:Phenomenex Luna 3  $\mu$  C18 (2), 4,6 $\times$ 50mm,检测:214nm,梯度:20%-70% B 洗脱 10min,其中 A =  $\text{H}_2\text{O}$ /0,1% TFA,B = 乙腈/0,1% TFA,流速:2mL/min, $R_t$  = 2,70min) 分析。产物通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 鉴定 ( $\text{MH}^+$  理论值 221,14;实测值 221,7)。结构用 NMR 确证。

[0112] 实施例 3:放射合成  $^{18}\text{F}$ -化合物 2 和与 2-溴苯乙酮缀合

[0113]



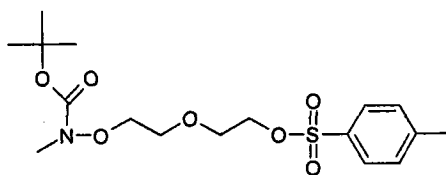
[0114] 在 SynChrom R&D 模块上, 由 Raytest 进行放射合成。

[0115] 在 Kryptofix 222 (39, 1mg/1 mL 乙腈) 和碳酸钾 (65, 7mg/1 mL 水) 的存在下, 通过在  $\text{N}_2$  下加热至  $90^\circ$  保持 9 分钟, 将  $^{18}\text{F}$ - 氟化物 (高达 1GBq) 共沸干燥。在此期间, 加入  $2 \times 1\text{mL}$  乙腈, 蒸发。冷却至  $< 40^\circ$  后, 加入甲苯 -4- 磺酸 4-(N- 甲基 -N-Boc- 氨基氧基)- 丁酯 (化合物 1) (3mg/1mL 乙腈) 溶液。将反应容器加热至  $70^\circ\text{C}$  保持 20 分钟, 完成标记。将粗反应混合物注射到 HPLC, 检测波长 214nm, 等度流速, 用 60/40 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  洗脱。色谱图显示标记化合物的收率良好, 约 86% RCP 与无放射性标准品共洗脱。使粗反应混合物通过 Sep-Pak 铝柱, 用 2mLACN 洗脱, 将游离氟化物除去, 测量游离氟化物的活性 (游离氟化物的贡献度小于 15%)。在 HPLC 上再分析“纯化的”混合物, 以确定游离氟化物是否除去。在  $90^\circ\text{C}$  下, 将 1mL (100MBq) 纯化的产物在 1mL 1M HCl 中水解 20 分钟, 将 BOC- 保护基除去, 得到 100% 未保护的 F-18 放射性标记化合物。将 1mL 水解产物用 10mL milli-Q 水稀释, 将 pH 调至 pH 11-12, 通过预调节的 SEP-PAK C-18 柱洗脱。测量到柱上活性为 30, 1MBq。将柱用 2mL DMF 洗脱到反应瓶中, 得到具有 23MBq 的 2mL 洗脱液。加入含  $10 \mu\text{L}$  二异丙基乙胺的 6mg 溴- 苯乙酮, 在  $90^\circ\text{C}$  下加热 10 分钟。反应混合物通过 HPLC 分析, 由在 5, 46 分钟洗脱的新峰, 显示缀合物形成的证据, 该新峰具有比对应于“游离”前体的峰大的面积 (57%)。HPLC (柱: Xterra(waters)  $5 \mu\text{C}18$  4,  $6 \times 250\text{mm}$ , 检测: 250 和 214nm, NaI 检测器梯度: 等度; 40% A =  $\text{H}_2\text{O}$ , 60% C = 乙腈, 流速: 1mL/min)。

[0116] 实施例 4:

[0117] 甲苯-4-磺酸 2-[2-(N-甲基-N-BOC-氨基氧基)-乙氧基]-乙酯的制备

[0118]



[0119] 化合物 1

[0120] (a) N-Boc-N-甲基羟胺

[0121] 在冰冷却下,搅拌下,将 N-甲基-羟胺 (4, 2g, 0, 05mol) 溶于 50% 四氢呋喃 (THF) 水溶液 (20ml)。将碳酸钾 (3, 6g, 0, 0275mol) 加入该冰冷却溶液,然后加入溶于 15ml THF 的二碳酸二叔丁酯 (12g, 0, 055mol)。将混合物在 0℃ 下搅拌 2 小时,再在室温下搅拌 2 小时。将 THF 减压除去,将残渣溶于 DCM。将溶液用水洗涤两次,干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 浓缩,得到 6, 47g (88%) 粉红色低粘性油状物。产物通过电喷雾质谱 (ESI-MS) 和 NMR 鉴定 (MH<sup>+</sup> 理论值 147, 09; 实测值 147, 6)。产物使用时无需进一步纯化。

[0122] (b) 甲苯-4-磺酸 2-(2-羟基-乙氧基)乙酯

[0123] 向一缩二乙二醇 (22g, 207, 5mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100ml) 溶液中加入三乙胺 (10, 5g, 103, 75mmol)。一次性加入 9, 89 (51, 8mmol) 甲苯-4-磺酰氯。将溶液在室温下搅拌 1 小时。在 5% MeOH/DCM 中进行 TLC。1/2 小时后, TLC 显示产物形成。1 小时又 15 分钟后, 将反应混合物用 0, 1M KHSO<sub>3</sub> 和 5% NaHCO<sub>3</sub> 洗涤。将有机相用 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 干燥, 减压蒸发。将粗反应混合物用硅胶捕集, 经 CombiFlash companion instrument (330g 柱) 闪层析纯化, 用己烷 / EtOAc 50/50。结构通过 NMR 确证。

[0124] (c) 4-甲苯-磺酸 2-[2-(叔丁基-二苯基-硅烷氧基)-乙氧基]-乙酯

[0125] 在氩气氛下, 向含 i-Pr<sub>2</sub>-Net (6mL, 1, 2 当量) 的甲苯-4-磺酸 2-(2-羟基-乙氧基)乙酯 (b) (7, 622g, 29, 28mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30ml) 溶液中加入 t-BDPSiCl (9ml, 1, 2 当量, 35, 136mmol) 和催化量的 DMAP。将溶液在室温下搅拌 2 天。TLC 提示反应完全。将粗反应混合物用 100mL DCM 稀释, 用 2\*100mL 水和 100mL 盐水洗涤。将有机相用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 在真空下蒸去, 经 Companion Combiflash (120g 柱) 闪层析纯化, 用 0% 乙酸乙酯-50% (EtOAc/己烷) 梯度洗脱 30 分钟。外观透明粘性油状物。结构通过 NMR 确证。

[0126] (d) O-{2-[2-(叔-丁基-二苯基-硅烷氧基)-乙氧基]-乙基}-N-甲基-N-BOC-羟胺

[0127] 在氩气下, 在经烘箱干燥的烧瓶 (50mL) 中加入 NaH (60% 的矿物油分散体) 481mg (12, 03mmol)。将分散体用戊烷洗涤 3 次, 将矿物油除去。向纯 NaH 中加入 5mL THF (无水)。缓慢加入 N-BOC-N-甲基羟胺 (a) 1, 53mg (10, 43mmol) 的 5mL THF 溶液。将反应混合物放置 1/2 小时至不再看到气体产生。将溶液置于冰浴上, 搅拌 1/2 小时, 然后滴加 4g (8, 02mmol) 4-甲苯-磺酸 2-[2-(叔-丁基-二苯基-硅烷氧基)-乙氧基]-乙酯 (c)。将溶液在冰浴上放置 1/2 小时, 然后在室温下搅拌过夜。将溶剂减压除去, 将残渣溶于 EtOAc (200mL), 倾入分液漏斗。将有机层用 0, 1M NaOH (5\*50mL)、H<sub>2</sub>O (50mL)、0, 1m KHSO<sub>4</sub> 和盐水 (50mL) 洗涤, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。除去溶剂后。用 Companion Combiflash 闪层析将残渣纯化, 用甲醇 / DCM 梯度 (甲醇: 0-20% 洗脱 19 分钟)。结构通过 NMR 确证。

[0128] (e) 2-[2-(N-甲基-N-BOC-氨基氧基)-乙氧基]-乙醇

[0129] 将 TBAF (6, 78mL, 6, 78mmol) 加入溶于无水 THF (15mL) 的 0-{2-[2-(叔-丁基-二苯基-硅烷氧基)-乙氧基]-乙基}-N-甲基-N-BOC-羟胺 (d) (3g, 6, 33mmol)。将反应物搅拌过夜。将 THF 蒸去, 将残渣溶于 DCM, 用 NH<sub>4</sub>Cl (饱和) (40mL)、水和盐水洗涤。将有机相干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 并蒸去。将残渣用 Companion Combiflash 40g 柱 (梯度 MeOH 0-5% /DCM 洗脱 20 分钟) 闪层析纯化。结构通过 NMR 确证。

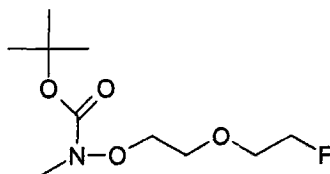
[0130] (f) 甲苯-4-磺酸 2-[2-(N-甲基-N-BOC-氨基氧基)-乙氧基]-乙酯

[0131] 搅拌下, 向 2-[2-(N-甲基-N-BOC-氨基氧基)-乙氧基]-乙醇 (e) 1g (4, 25mmol) 的无水 DCM (15mL) 溶液中加入三乙胺 (910mg, 1254  $\mu$ L, 9mmol) 和甲苯-4-磺酰氯 (1620mg, 8, 5mmol) 的 15mL DCM 溶液。将反应混合物在氩气下搅拌过夜。TLC 显示反应完全 (己烷/乙酸乙酯 6 : 4)。将反应混合物用 50mL DCM 稀释, 将有机相用 NaHCO<sub>3</sub> 5%、盐水和水洗涤。有机相经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 减压蒸发除去。将产物用 Companion combiflash (40g 柱) 纯化, 用己烷/乙酸乙酯梯度, 10-65% 乙酸乙酯/己烷洗脱 20 分钟。结构通过 NMR 确证。

[0132] 实施例 5 :

[0133] 0-[2-(2-氟-乙氧基)-乙基]-N-甲基-N-BOC-羟胺的制备

[0134]



[0135] 化合物 2

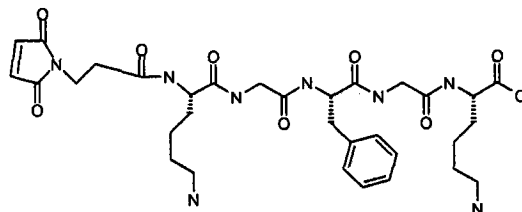
[0136] 将 KF (58mg, 1mmol) 和 kryptofix (376mg, 1mmol) 溶于无水乙腈 (2mL)。将混合物搅拌 5min, 然后在氩气下加入溶于无水乙腈 (0, 250mL) 的化合物 1 (200mg, 0, 51mmol)。将混合物在 80℃ 下加热 1 小时。1 小时后, TLC 显示反应完全。将有机相减压蒸去, 再溶于 DCM, 捕集在硅胶上。将物质用硅胶闪层析纯化, 用己烷/乙酸乙酯 1 : 1 洗脱。

[0137] 收率 : 83mg (0, 35mmol)。结构用 NMR 确证。

[0138] 实施例 6 :

[0139] 马来酰亚胺基-丙酰基-Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH 的制备

[0140]



[0141] 化合物 3

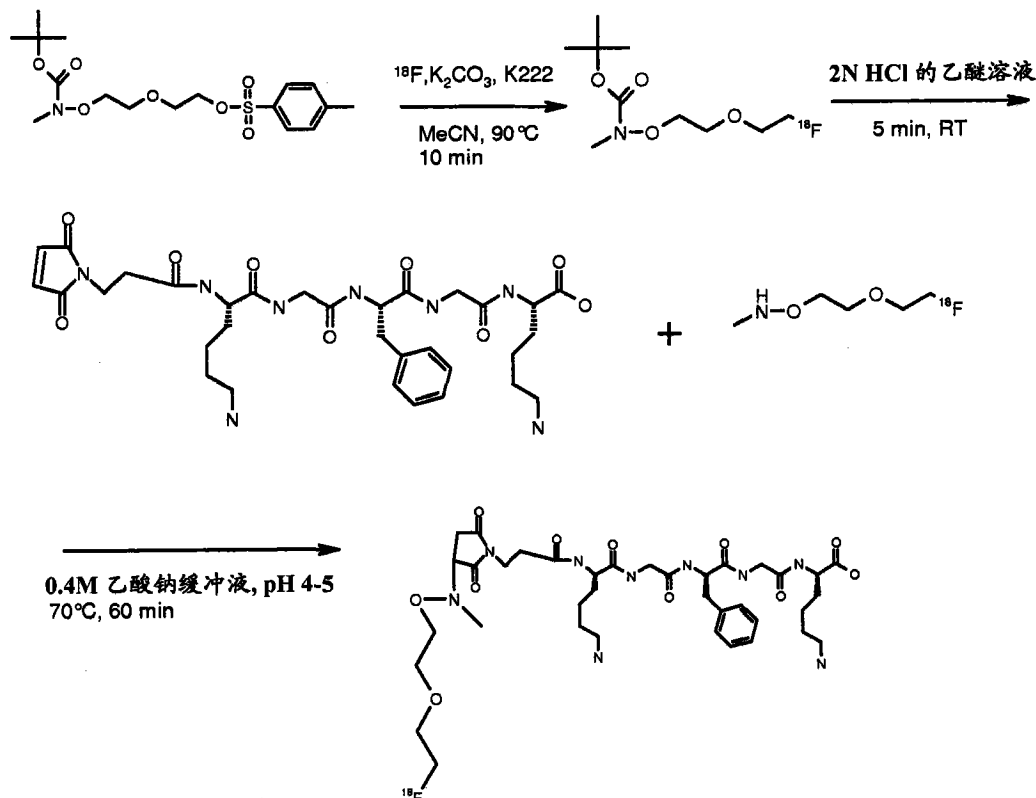
[0142] 在含 Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin 树脂 (0.1mmol) 的全自动化肽合成仪 (ABI 433A 合成机) 上, 用 slowmoc Single Couple 方法, 通过 HBTU 活化, 装配模型五肽 Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH。通过人工, 用 3-(马来酰亚胺基) 丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (0, 52mmol) 使马来酰亚胺基-丙酸偶合。同时将肽从树脂上除去, 在含三异丙基硅烷和水的三氟乙酸 95 : 2.5 : 2.5v/v/v) 中, 进行侧链保护基的脱保护。过滤后, 将溶液减压浓

缩,将残渣用乙醚洗涤。粗产物经反相制备层析(Phenomenex LunaC18(2)柱,250\*50mm,10 $\mu$ m;梯度0-30%溶剂B洗脱60min;流速50mL/分钟)纯化,得到66mg(95%)纯化合物。产物经LC-MS[Phenomenex Luna C 18-(2),50\*2.0mm,5 $\mu$ m;梯度0-30%溶剂B洗脱5min;流速0.6mL/min; $t_R$  = 2.86min]分析, $m/z$  = 687.6(M+H)<sup>+</sup>,理论值 $m/z$  = 687.34(M+H)<sup>+</sup>

[0143] 实施例 7:

[0144] 放射合成<sup>18</sup>F- 化合物 2 和与化合物 3 缀合

[0145]



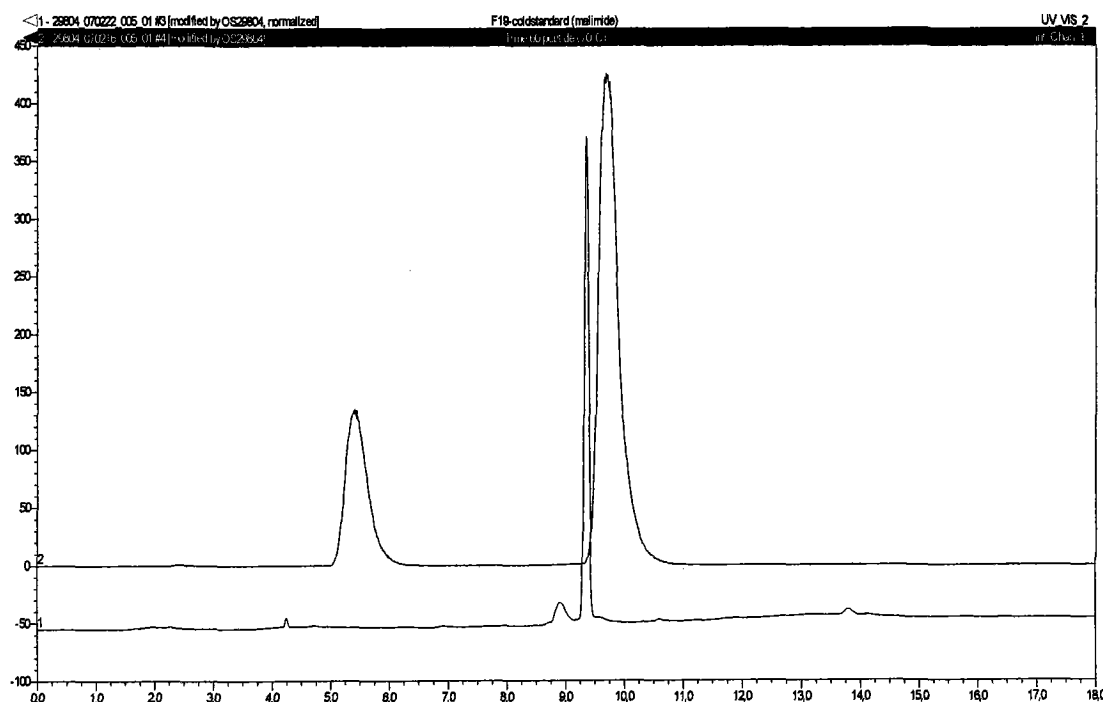
[0146] 在 GE Healthcare 的示踪剂 Lab FxN 模块上进行放射合成。

[0147] 在 Kryptofix 222 (39, 1mg/1mL 乙腈) 和碳酸钾 (65, 7mg/1mL 水) 的存在下, 在 N<sub>2</sub> 下, 通过加热至 100° 保持 9 分钟, 将 <sup>18</sup>F- 氟化物 (高达 350MBq) 共沸干燥。在此期间, 加入 2×0, 7mL 乙腈, 蒸发。冷却至 < 50° 后, 加入 4- 碘苯甲酸 2-[2-(N- 甲基 -N-BOC- 氨基氧基) - 乙氧基] - 乙酯 (化合物 1) (5mg/1 mL 无水乙腈) 的溶液。将反应容器加热至 90°C 保持 10 分钟, 完成标记。将粗反应混合物用 5mL 水稀释。样品用于 TLC, 将 50 μ L 注射到 HPLC (Phenomenex gemine 150mm\*4, 60C185 μ m), 检测波长 214nm、254nm 和 γ - 检测器 (gamme-detector), 梯度流动, 用溶剂 B 20-80% 洗脱 15min。TLC (1 : 1 乙酸乙酯 / 己烷) 给出标记化合物的良好收率 ≈ 70% (n = 3)。化合物与无放射性参照标准品共洗脱。将粗反应混合物再用 4mL 水稀释, 通过 Oasis HLB Sep-Pak 短柱 (预调节的 5mL MeCN 和 10mL H<sub>2</sub>O)。将 Oasis 短柱用 50mL 25% 甲醇的水溶液洗涤, 用 1, 5mL MeCN 将纯化的化合物洗脱出, 将 0, 3mL 2N HCl 的乙醚溶液加入 MeCN 洗脱液, 在室温下搅拌 5 分钟, 将 BOC 基团定量除去, 然后在 N<sub>2</sub> 流下, 将有机相在 65°C 下减压蒸发 3 分钟, 再过 3 分钟后加入 1mL MeCN。

[0148] 将 5mg 化合物 3 在 0,8mL 0,4M 乙酸 Na 缓冲液 pH 5 中的溶液加入干燥混合物中, 将反应物加热至 70°C 保持 60min, 完成缀合。在 0min 和 60min 取样。

[0149] 反应混合物通过 HPLC 分析,通过在 11min 与 F19- 参照标准品共洗脱的新峰,显示化合物 3 的缀合物形成的证据,该新峰的面积 (74%) (图 1)。HPLC:Phenomenex gemine 150mm\*4, 60 C18 5  $\mu$ m, 梯度,溶剂 B 0-40% 10 分钟,溶剂 B 40% 10-15min。

[0150]

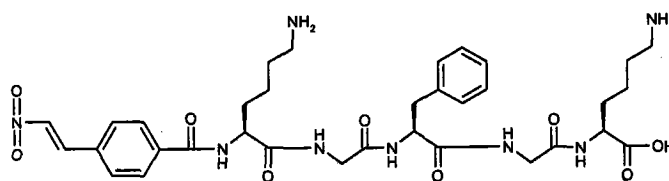


[0151] 图 1:化合物 3 的  $^{18}\text{F}$ - 缀合物的 HPLC 色谱图。上色谱图:左侧峰为未反应的  $^{18}\text{F}$ - 合成子,右侧峰为  $^{18}\text{F}$ - 合成子-化合物 3 缀合物。下色谱图为  $^{19}\text{F}$ - 合成子-化合物 3 参照标准品 (254nm)。

[0152] 实施例 8:

[0153] 4-(2- 硝基乙烯基) 苯甲酰基-Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH 的制备

[0154]



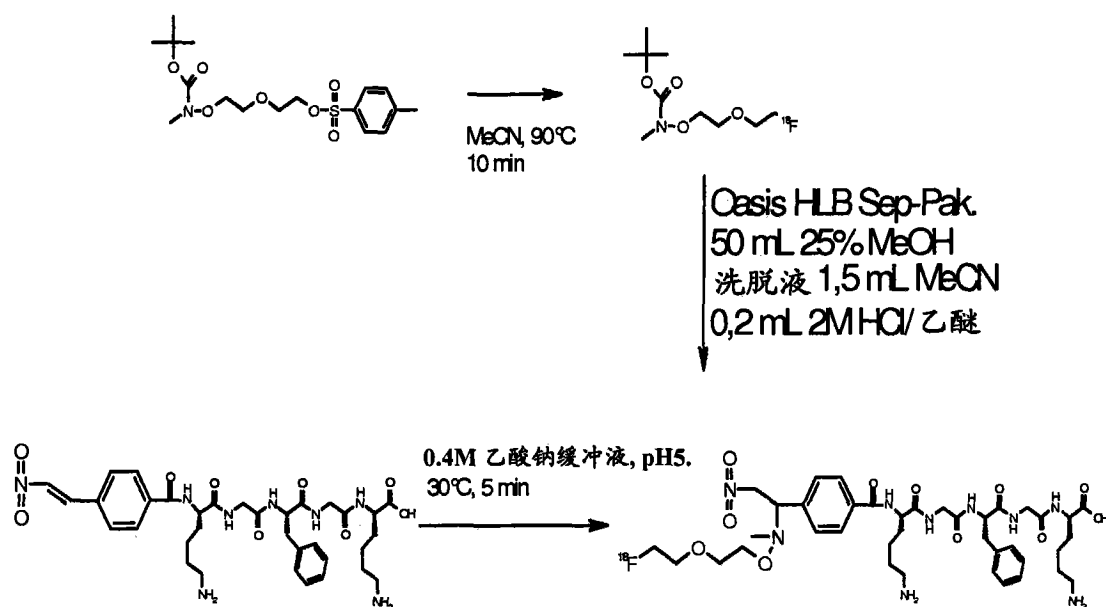
[0155] 化合物 6

[0156] 按实施例 6 中所述装配模型五肽 Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH, 将 58mg (0, 3mmol) 反式- $\beta$ -硝基苯乙烯和 156, 5mg (0, 3mmol) PyAOP 加入树脂 (0, 2mmol)/ 纯 DMF, 然后加入 102  $\mu$ L (0, 6mmol) DIPEA, 将反应物放置 1 小时。同时将肽从树脂上除去, 在含三异丙基硅烷和水的三氟乙酸 95 : 2.5 : 2.5 v/v/v 中, 进行侧链保护基的脱保护。过滤后, 将溶液减压浓缩, 将残渣用乙醚洗涤。粗产物经反相制备层析 (Phenomenex Luna C18(2) 柱, 250\*50mm, 10  $\mu$ m; 梯度 0-40% 溶剂 B 洗脱 60min; 流速 50mL/ 分钟) 纯化, 得到 101mg (70%) 纯化合物。产物经 LC-MS [Phenomenex Luna C18-(2), 50\*2.0mm, 5  $\mu$ m; 梯度 0-30% 溶剂 B 洗脱 5min; 流速 0, 6mL/min;  $t_R$  = 4.10min] 分析,  $m/z$  = 711, 3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 理论值  $m/z$  = 711, 3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0157] 实施例 9:

[0158]  $^{18}\text{F}$ - 化合物 4 与化合物 6 的缀合

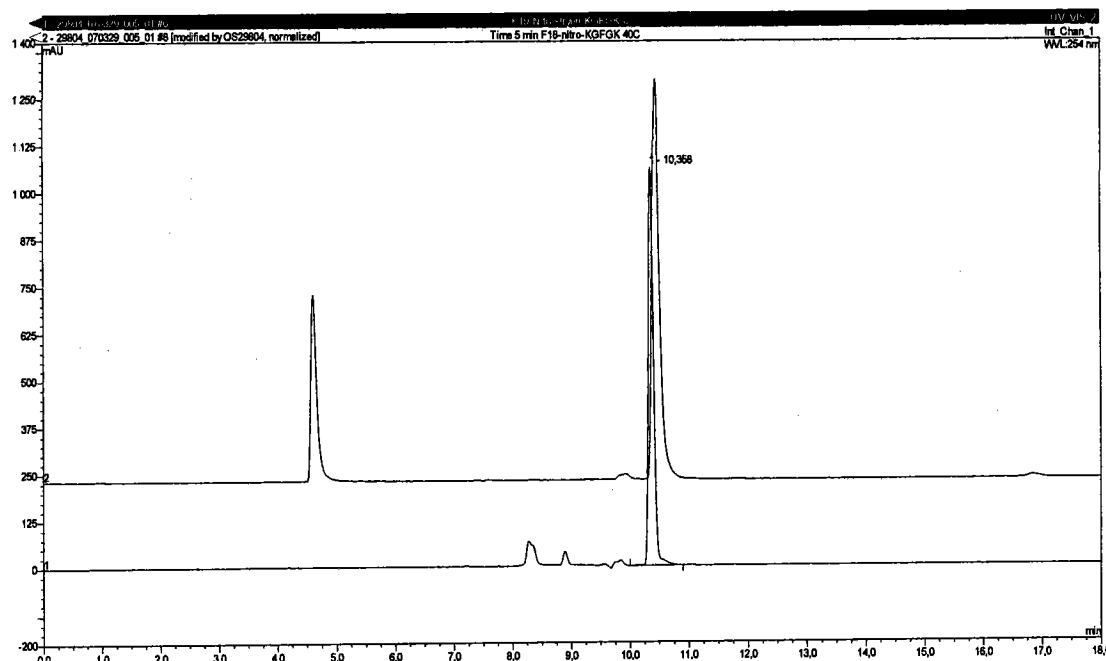
[0159]



[0160] 按以上实施例 7 中所述,进行化合物  $^{18}\text{F}$ -化合物 4 的放射合成和纯化。将 0, 2mL 2N HCl 的乙醚溶液加入含  $^{18}\text{F}$  化合物 4 的 MeCN 洗脱液,在室温下搅拌 5 分钟,将 BOC 基团定量除去,然后在  $\text{N}_2$  流和减压下,将有机层在 65°C 下蒸发 3 分钟,再过 3 分钟后,加入 1mL MeCN。

[0161] 将 5mg 化合物 6 在 0, 8mL 0, 4M 乙酸 Na 缓冲液 pH 5 中的溶液加入干燥混合物,将反应物在 30°C 下加热 5min。反应混合物通过 HPLC 分析,通过在 10, 4min 与  $^{19}\text{F}$ - 参照标准品共洗脱的新峰显示缀合物形成的证据,该新峰的面积 (72%) (图 2)。HPLC: Phenomenex gemine 150mm\*4, 60 C185  $\mu\text{m}$ , 梯度,溶剂 B 0-40% 洗脱 10 分钟,溶剂 B 40% 10-15min。

[0162]



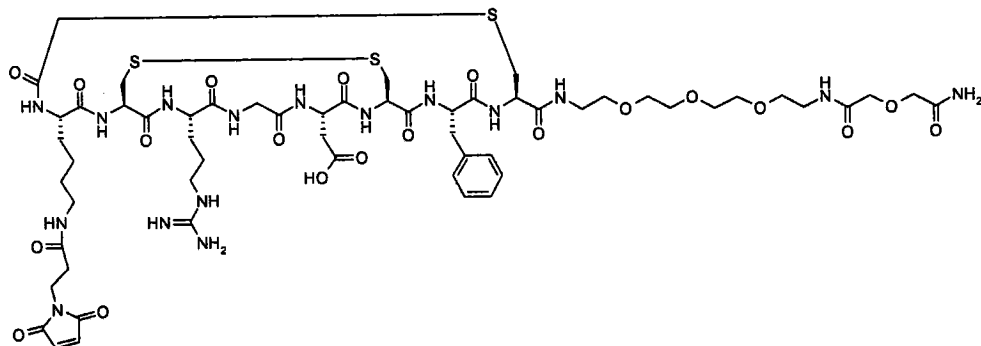
[0163] 图 2. 化合物 6 的  $^{18}\text{F}$ -缀合物的 HPLC 色谱图。上色谱图: 左侧峰为未反应的  $^{18}\text{F}$ -合

成子；右侧峰为  $^{18}\text{F}$ -合成子-化合物6缀合物。下色谱图： $^{19}\text{F}$ -合成子-化合物6参照标准品(254nm)。

[0164] 实施例 10：

[0165] 马来酰亚胺基-丙酰基-RDG-肽的制备：

[0166]



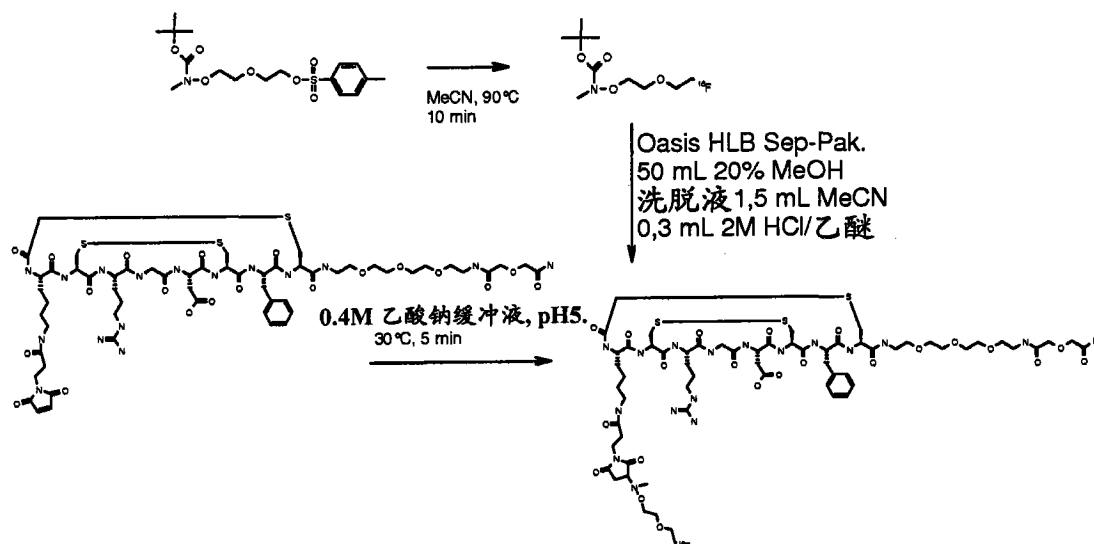
[0167] 化合物 7

[0168] 在 5mL 容器中，将 50mg (0,04mmol) 肽 NC100717 溶于 1mL DMF。将 21,3mg (0,1mmol) 3-(马来酰亚胺基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯溶于含 DIPEA 13,6  $\mu\text{L}$  (0,08mmol) 的 1mL DMF，加入肽溶液中。将反应物在室温下搅拌 1 小时。将 DMF 蒸去。粗产物经反相制备层析 (Phenomenex Luna C18(2) 柱, 250\*50mm, 10  $\mu\text{m}$ ；梯度 0-40% 溶剂 B 洗脱 60min；流速 50mL/分钟) 纯化，得到 23mg (40%) 纯化合物。产物经 LC-MS [Phenomenex Luna C18-(2), 50\*2.0mm, 5  $\mu\text{m}$ ；梯度 5-40% 溶剂 B 洗脱 5min；流速 0,6mL/min； $t_R = 2.74\text{min}$ ] 分析， $m/z = 1409,9 (M+H)^+$ ，理论值  $m/z = 1409,5 (M+H)^+$ 。

[0169] 实施例 11：

[0170]  $^{18}\text{F}$ -化合物 4 与化合物 7 的缀合

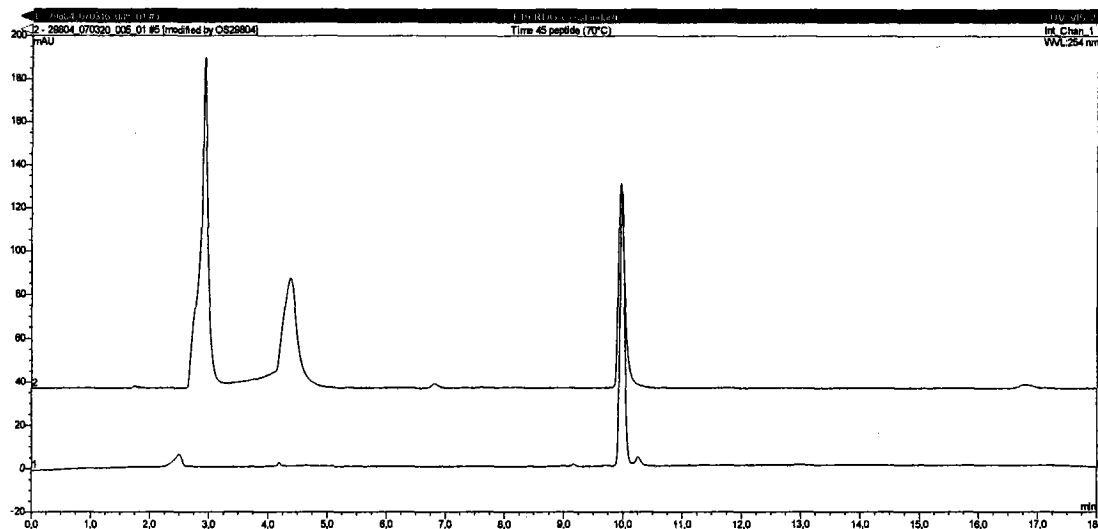
[0171]



[0172] 按以上实施例 7 中所述进行化合物  $^{18}\text{F}$ -化合物 4 的放射合成和纯化。将 0,2mL 2N HCl 的乙醚溶液加入 MeCN 洗脱液，在室温下搅拌 5 分钟，将 BOC 基团定量除去，然后在  $\text{N}_2$  流和减压下，将有机相在 65°C 下蒸发 3 分钟，再过 3 分钟后，加入 1mL MeCN。将溶于 0,6mL 0,4M 乙酸盐缓冲液 pH 5+0,4mL DMF 的 5,75mg 化合物 7 加入干燥残渣。将肽混合物加热至 70°C，

45 后, 取样。45min 后, 粗反应混合物通过放射性 -HPLC 分析, 表明  $^{18}\text{F}$ - 合成子 24% 结合至肽中,  $^{18}\text{F}$ - 化合物与其真实标准品共洗脱。(图 3)。HPLC: Phenomenex gemine 150mm\*4, 60 C18 5  $\mu\text{m}$ , 梯度, 溶剂 B 0-40% 洗脱 10 分钟, 溶剂 B 40% 10-15min。

[0173]

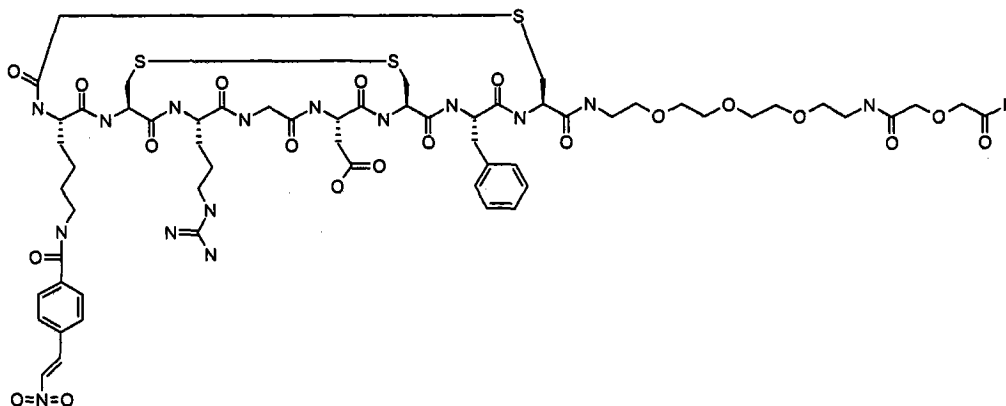


[0174] 图 3: 化合物 7 的  $^{18}\text{F}$ - 缀合物的 HPLC 色谱图。上色谱图: 左侧峰为未反应的  $^{18}\text{F}$ - 合成子; 右侧峰为  $^{18}\text{F}$ - 合成子 - 化合物 6 缀合物。下色谱图:  $^{19}\text{F}$ - 合成子 - 化合物 7 参照标准品 (254nm)。

[0175] 实施例 11:

[0176] 苯甲酰基 - 反式 -  $\beta$  - 硝基苯乙烯 - RDG 的制备:

[0177]



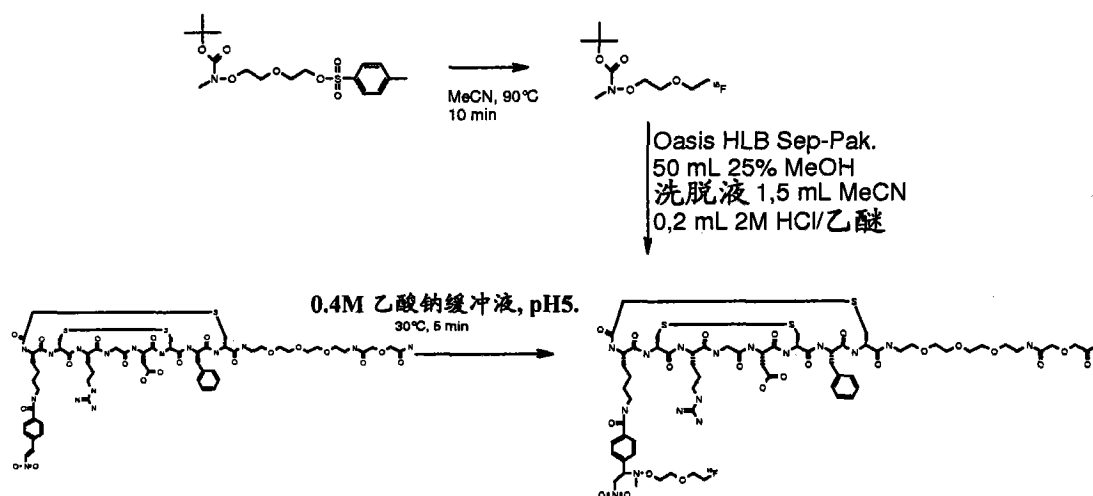
[0178] 化合物 8

[0179] 将 40mg (0.032mmol) 肽 NC100717 溶于 2mL DMF。加入溶于 2mL DMF 和 DIPEA 16  $\mu\text{L}$  (0.096mmol) 的反式 -  $\beta$  - 硝基苯乙烯 12, 3mg (0.064mmol) 和 PyaOP 25mg (0.048mmol)。将混合物预活化 10 分钟, 然后加入肽 (NC100717) 中。15 分钟后, LC-MS 显示反应完全, 将反应混合物用 MeCN/0.1% TFA (20mL) 淬灭。将有机相减压除去。粗产物经反相制备层析 (Phenomenex Luna C18(2) 柱, 250\*50mm, 10  $\mu\text{m}$ ; 梯度 5-45% 溶剂 B 洗脱 60min; 流速 50mL/分钟) 纯化, 得到 12mg (26%) 纯化合物。产物通过 LC-MS [Phenomenex Luna C18-(2), 50\*2.0mm, 5  $\mu\text{m}$ ; 梯度 5-40% 溶剂 B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min;  $t_R$  = 2.74min] 分析,  $m/z$  = 1433, 6 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 理论值  $m/z$  = 1433, 5 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0180] 实施例 12：

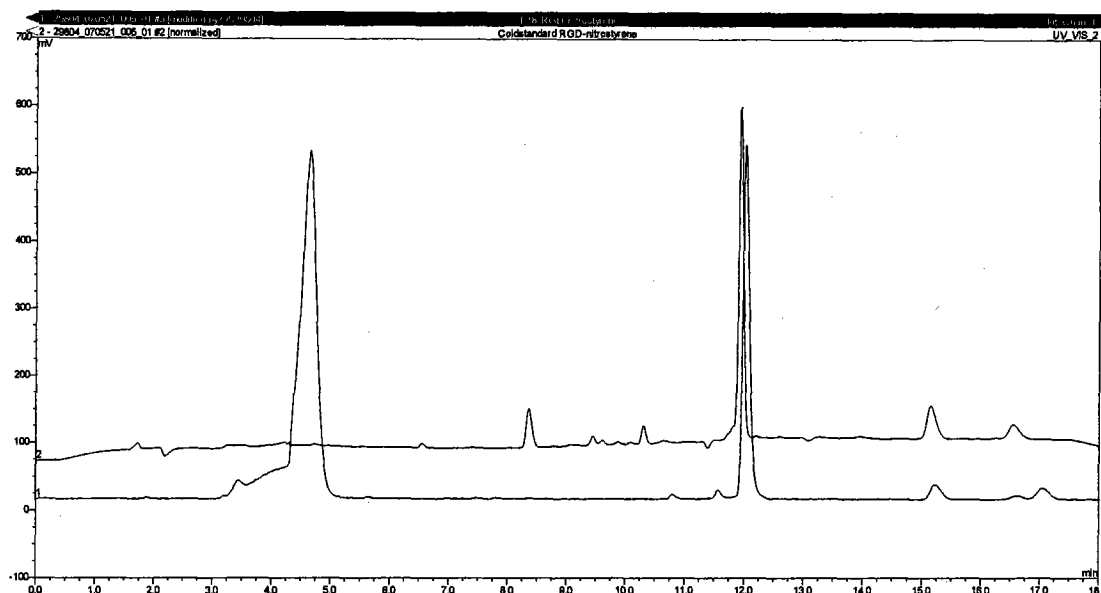
[0181]  $^{18}\text{F}$ - 化合物 4 与化合物 8 的缀合

[0182]



[0183] 按以上实施例 7 中所述,进行化合物  $^{18}\text{F}$ - 化合物 4 的放射合成和纯化。将 0, 2mL 2N HCl 的乙醚溶液加入 MeCN 洗脱液,在室温下搅拌 5 分钟,将 BOC 基团定量除去,然后在  $\text{N}_2$  流和减压下,将有机相在 65°C 下蒸发 3 分钟,再过 3 分钟后,加入 1mL MeCN。将溶于 0, 8mL 0, 4M 乙酸盐缓冲液 pH 5+0, 4mL DMF 的化合物 8 (5mg) 加入干燥残渣。将反应物在 30°C 下放置 5 分钟。粗反应混合物通过放射性 -HPLC 分析,表明 5 分钟后,  $^{18}\text{F}$ - 合成子 25% 结合至肽中,  $^{18}\text{F}$ - 化合物与其真实标准品在 12min 共洗脱。(图 4)。HPLC: Phenomenex gemine150mm\*4, 60 C18 5  $\mu\text{m}$ , 梯度, 溶剂 B 0-40% 洗脱 10 分钟, 溶剂 B 40% 10-15min。

[0184]

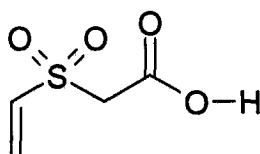


[0185] 图 4. 化合物 8 的  $^{18}\text{F}$ - 缀合物的 HPLC 色谱图。上色谱图: 左侧峰: 未反应的  $^{18}\text{F}$ - 合成子; 右侧峰:  $^{18}\text{F}$ - 合成子 - 化合物 8 缀合物。下色谱图:  $^{19}\text{F}$ - 合成子 - 化合物 8 参照标准品 (254nm)。

[0186] 实施例 13

[0187] 乙烯磺酰基 - 乙酸的合成：

[0188]

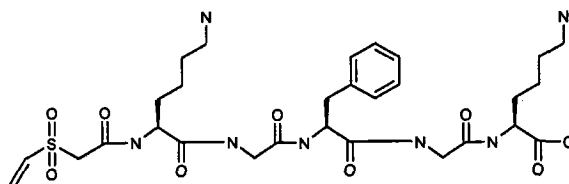


[0189] 化合物 9

[0190] 在 250mL 3 颈圆底烧瓶中, 将 1.1g (47.5mmol, 1.2 当量) 钠溶于 25mL 无水乙醇。 $H_2$  放出和钠消失完全后, 滴加 2- 巯基乙酸乙酯 (4.60mL, 40.7mmol, 1 当量)。将得到的混合物搅拌 20 分钟, 然后加入 57mL (57mmol, 1.4 当量) 溴乙烯 (1M 的 THF 溶液)。将混合物转移到高压釜, 加热至 105°C 保持 1 小时。将反应混合物搅拌 4 小时。然后将 THF 和 EtOH 真空蒸发, 将残渣溶于水 (120mL), 用乙醚 (5×60mL) 萃取。有机相经 ( $MgSO_4$ ) 干燥, 将 XS 溶剂真空除去。然后将粗物质 (2.9g) 溶于 10mL 冰乙酸, 冷却至 0°C。加入过乙酸 36-40% (7.4mL, 40mmol), 将反应混合物在 0°C 下搅拌 30min, 然后让温度升至室温, 继续搅拌 2h。将溶剂再次在真空除去, 在自动 combiflash 机上, 粗产物经闪层析 (20% -100% 乙酸乙酯 / 己烷洗脱 10 分钟) 纯化。NMR 确证结构为亚砷。将所有流分收集, 再用相对于亚砷 (1.5g, 9.2mmol) 的过乙酸 (2 当量) 氧化至所有起始物质消失。粗产物使用时无需进一步纯化。将乙烯磺酰基 - 乙酸乙酯溶于 20mL 0.1M HCl, 将混合物在 100°C 下回流 13 小时, 得到乙烯磺酰基 - 乙酸 (1.2g, 8mmol)。结构通过 NMR 确证。

[0191] 乙烯磺酰基 - 乙酰基 - Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH 的制备

[0192]

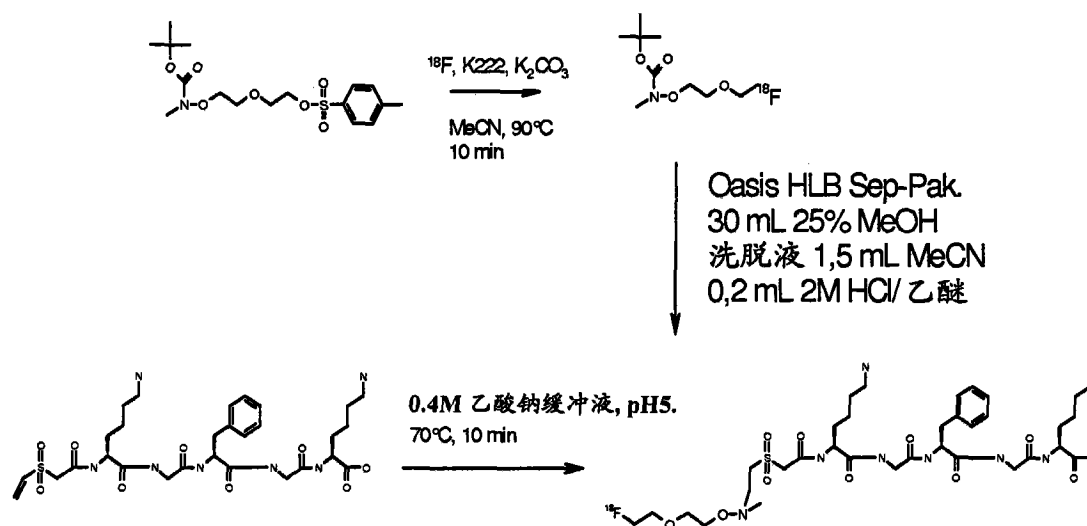


[0193] 化合物 10

[0194] 按实施例 6 中所述装配模型五肽 Lys-Gly-Phe-Gly-Lys-OH。将 75mg (0.5mmol) 乙烯磺酰基 - 乙酸和 261mg (0.5mmol) PyAOP 加入肽 - 结合的树脂 (0.1mmol) / 纯 DMF (5mL) 中, 然后加入 171  $\mu$ L (1mmol) DIPEA, 将反应放置 2h。同时在含三异丙基硅烷和水的三氟乙酸 95 : 2.5 : 2.5v/v/v 中, 将肽从树脂上除去, 并进行侧链保护基的脱保护。过滤后, 将溶液减压浓缩, 将残渣用乙醚洗涤。粗产物经反相制备层析 (Phenomenex Luna C18(2) 柱, 250\*50mm, 10  $\mu$ m; 梯度 0-30% 溶剂 B 洗脱 60min; 流速 10mL/分钟) 纯化, 得到 51mg (76%) 纯化合物。产物通过 LC-MS [Phenomenex Luna C18-(2), 50\*2.0mm, 5  $\mu$ m; 梯度 0-30% 溶剂 B 洗脱 5min; 流速 0.6mL/min;  $t_R$  = 2.61min] 分析,  $m/z$  = 668.4 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 理论  $m/z$  = 668.3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>。

[0195] <sup>18</sup>F- 化合物 4 与化合物 10 的缀合

[0196]



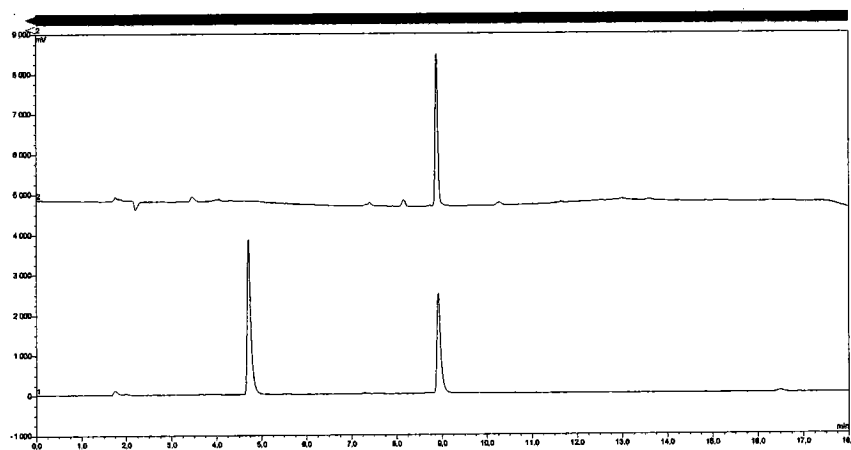
## 11

[0197] 在 GE Medical 系统的 TracerLab FxN 模块上进行放射合成。在 56mg Kryptofix 222 (K<sub>222</sub>: 4,7,13,16,21,24-六氧杂-1,10-二氮杂双环[8.8.8]二十六烷) 和溶于 215  $\mu\text{L}$  水和 785  $\mu\text{L}$  乙腈 (共计 0.8mL) 的 10mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的存在下, 通过在 N<sub>2</sub> 流下, 在 100° 下真空加热 9 分钟, 将  $^{18}\text{F}$ -氟化物 (200MBq) 共沸干燥。在此期间, 加入 2×0,8mL 乙腈, 蒸发。冷却至 < 50° 后, 加入甲苯甲苯-4-磺酸 2-[2-(N-甲基-N-Boc-氨基氧基)-乙氧基]-乙酯 (化合物 3) (3mg/1 mL 无水 MeCN) 溶液。将密闭反应容器加热至 90°C 保持 10 分钟, 完成标记。将粗反应混合物用 9mL 水稀释, 并通过 Oasis HLB Sep-Pak 短柱 (Waters) (预调节的 5mL MeCN 和 10mL H<sub>2</sub>O)。将 Oasis 短柱用 50mL 25% MeOH 的水溶液洗涤, 将纯化的化合物用 1,5mL MeCN 洗脱。将 2N HCl (0.2mL) 的乙醚溶液加入 MeCN 洗脱液, 将混合物在室温下搅拌 5 分钟, 将 Boc 基团定量除去。将有机相在 65°C 下、在 N<sub>2</sub> 流下真空除去, 保持 3 分钟, 然后加入 1mL MeCN, 再在真空下除去, 保持 3 分钟。

[0198] 将 5mg 化合物 10 在 0,8mL 0,4M 乙酸 Na 缓冲液 pH 5 中的溶液加入该干燥混合物, 将反应物加热至 70°C 保持 10min, 完成缀合。

[0199] 反应混合物通过 HPLC 分析, 显示缀合物形成的证据 (在 8,92min 与  $^{19}\text{F}$ -参照标准品共洗脱的新峰, 40% 收率) HPLC: Phenomenex gemine 150mm\*4,60 C18 5  $\mu\text{m}$ , 梯度, 溶剂 B 0-40% 洗脱 10 分钟, 溶剂 B 40% 10-15min。

[0200]



[0201] 化合物 11 的  $^{18}\text{F}$ -缀合物的 HPLC 色谱图。上色谱图： $^{19}\text{F}$ -合成子-化合物 xx 参照标准品 (254nm)。下色谱图：左侧峰：未反应的  $^{18}\text{F}$ -合成子；右侧峰： $^{18}\text{F}$ -合成子-化合物 xx 缀合物。