

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780045258.1

[51] Int. Cl.

C07D 257/02 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月16日

[11] 公开号 CN 101605768A

[22] 申请日 2007.12.10

[21] 申请号 200780045258.1

[30] 优先权

[32] 2006.12.8 [33] GB [31] 0624587.2

[86] 国际申请 PCT/GB2007/004733 2007.12.10

[87] 国际公布 WO2008/068516 英 2008.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.6.8

[71] 申请人 慕尼黑科技大学

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 塞巴斯蒂安·诺尔 阿明·莫德林格

汉斯-于尔根·韦斯特

霍斯特·凯斯勒

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 曹立莉

权利要求书4页 说明书36页 附图41页

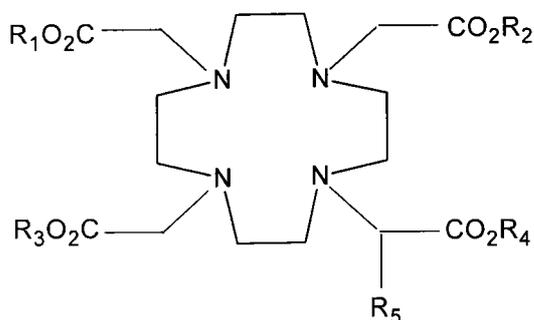
[54] 发明名称

螯合剂

[57] 摘要

下式的化合物：其中 R^1 选自 H、甲基、乙基、羧基保护基和亲水性部分， R^2 和 R^3 独立地选自 H、甲基、乙基和羧基保护基， R^4 选自 H、甲基、乙基、亲水性部分和羧基保护基，且 R^5 为芳基、杂芳基、烷基或这些基团的组合且被羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团取代。本发明的化合物可用作双官能螯合剂，其使得化学选择性连接至靶向分子。

1. 下式的化合物:



其中 R¹ 选自 H、甲基、乙基、羧基保护基和亲水性部分, R² 和 R³ 独立地选自 H、甲基、乙基和羧基保护基, R⁴ 选自 H、甲基、乙基、亲水性部分和羧基保护基, 且 R⁵ 为芳基、杂芳基、烷基或这些基团的组合, 且 R⁵ 被羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团取代。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中所述羰基为酮基。

3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中所述酮基为甲基酮。

4. 根据权利要求 1 的化合物, 其中适合参与环加成反应的官能团为炔基或叠氮基。

5. 根据权利要求 4 的化合物, 其中所述炔基为乙炔基。

6. 根据前述权利要求任一项的化合物, 其中 R⁵ 为包含 1 或 2 个环的 5-9-元芳基或杂芳基。

7. 根据权利要求 6 的化合物, 其中 R⁵ 为 6-元芳基或杂芳基。

8. 根据权利要求 7 的化合物, 其中 R⁵ 为苯基。

9. 根据权利要求 8 的化合物, 其中所述苯基被羰基或适合参与环加成反应的官能团在对位取代。

10. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R⁵ 为长度为 C1 至 C6 的烷基。

11. 根据前述权利要求任一项的化合物, 其中 R¹、R² 和 R³ 为相同或不同的羧基保护基。

12. 根据前述权利要求任一项的化合物, 其中 R⁴ 为 H 或甲基。

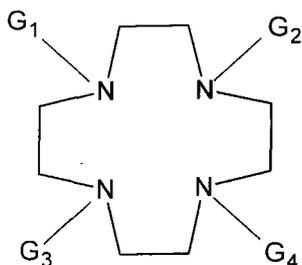
13. 根据前述权利要求任一项的化合物, 其中所述羧基保护基当存在

时，选自苄基、苄基甲基和叔丁基。

14. 根据前述权利要求任一项的化合物，其中 R^1 、 R^2 和 R^3 为叔丁基且 R^4 为 H 或甲基。

15. 根据权利要求 1 的化合物，其中所述亲水性部分为糖。

16. 下式的化合物：



其中基团 G^1 至 G^4 中的 2 至 4 个为 $\text{CH}(\text{CO}_2\text{R}^4)-\text{R}^5$ ，且任何其余的基团 G^1 至 G^4 为 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}^1$ ，其中 R^4 选自 H、甲基、乙基和羧基保护基， R^5 为芳基、杂芳基、烷基或这些基团的组合，且 R^5 被羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团取代，且 R^1 选自 H、甲基、乙基、羧基保护基和亲水性部分。

17. 包含上述任一项权利要求的化合物和衍生的靶向分子的缀合物，其中，当 R^5 被羰基或氨基氧基取代时，所述靶向分子被衍生化以包含互补的氨基氧基部分或羰基部分，且所述化合物和靶向分子通过肟键连接，且当 R^5 被适合参与环加成反应的官能团取代时，所述靶向分子被衍生化以包含用于环加成反应的互补基团，且所述化合物和靶向分子通过环加成反应的杂环产物连接。

18. 根据权利要求 17 的缀合物，其中所述化合物和靶向分子通过 1,2,3-三唑基连接。

19. 螯合物，其包含与权利要求 1 至 16 中任一项的化合物或权利要求 17 或 18 的缀合物络合的放射性核素。

20. 根据权利要求 19 的螯合物，其中所述放射性核素选自铷-225、铋-212、铋-213、铅-203、铜-64、铜-67、镓-66、镓-67、镓-68、镱-177、铟-111、铟-113、钇-86 和钇-90、镉 162、镉 165、镉 167、钆-166、镨-142、镨-143、钷-149 和钷-149。

21. 合成权利要求 1 的化合物的方法, 该合成包括: 使二取代的芳基、杂芳基、烷基或组合 $L^1\text{-CH}(\text{CO}_2\text{R}^4)\text{-R}^5\text{-X}$ 与 1,4,7,10-四氮杂环十二烷进行反应, 其中 R^4 和 R^5 具有与权利要求 1 相同的含义, L^1 为离去基团, 且 X 为羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团, 或这种官能团的被保护的形式; 且使用 $L^2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$ 对 1,4,7,10-四氮杂环十二烷的其它氮原子进行烷基化, 其中 R 为如权利要求 1 定义的 R^1 、 R^2 或 R^3 且 L^2 为离去基团。

22. 根据权利要求 21 的方法, 其中 1,4,7,10-四氮杂环十二烷的 2 至 4 个氮原子与 $L^1\text{-CH}(\text{CO}_2\text{R}^4)\text{-R}^5\text{-X}$ 反应, 其中 R^4 选自 H、甲基、乙基和羧基保护基且 R^5 具有与权利要求 1 相同的含义, 且其中 1,4,7,10-四氮杂环十二烷的其余氮原子使用 $L^2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$ 烷基化, 其中 R 为如权利要求 1 定义的 R^2 或 R^3 。

23. 合成权利要求 17 的缀合物的方法, 其中在任选缀合物与放射性核素络合之前使所述化合物和衍生的靶向分子在一起反应。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述化合物和靶向分子在过渡金属催化剂的存在下通过环加成反应连接在一起。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述金属催化剂基于 Cu 或 Rh。

26. 根据权利要求 19 的螯合物, 其用于治疗或诊断。

27. 根据权利要求 19 的螯合物在制备用于诊断和/或治疗过度增生性病症和/或肿瘤性病症的药物中的用途。

28. 根据权利要求 19 的螯合物, 其用于诊断和/或治疗过度增生性病症和/或肿瘤性病症。

29. 根据权利要求 27 的用途或根据权利要求 28 的螯合物, 其中所述病症为癌症。

30. 根据权利要求 29 的用途或螯合物, 其中所述癌症为对激素有反应的。

31. 诊断或治疗受试者中过度增生性病症和/或肿瘤性病症的方法, 该方法包括向受试者分别给药诊断或治疗有效量的权利要求 19 或 20 的螯合物。

32. 权利要求 1 至 16 中任一项的化合物在合成权利要求 17 或 18 的缀合物中的用途。

33. 权利要求 17 或 18 的缀合物在合成权利要求 19 或 20 的螯合物中的用途。

34. 权利要求 17 或 18 的缀合物或权利要求 19 或 20 的螯合物，其中所述靶向分子为肽。

35. 在双官能螯合剂与具有 1 个或多个二硫键的靶向分子进行金属催化的缀合之后从双官能螯合剂将金属催化剂脱螯合的方法，该方法包括使用硫化钠去除金属离子，然后用 NH_3 和包含乙腈和水的溶剂处理以恢复二硫键。

36. 根据权利要求 35 的方法，其中所述缀合反应包括环加成反应。

37. 根据权利要求 35 或权利要求 36 的方法，其中所述双官能螯合剂为根据权利要求 1 的化合物。

38. 根据权利要求 35-37 中任一项的方法，其中所述金属催化剂基于 Cu 或 Rh。

39. 缀合物，其包含根据权利要求 16 的化合物和通过 R^5 基团连接至该化合物的 2 个或多个靶向分子。

螯合剂

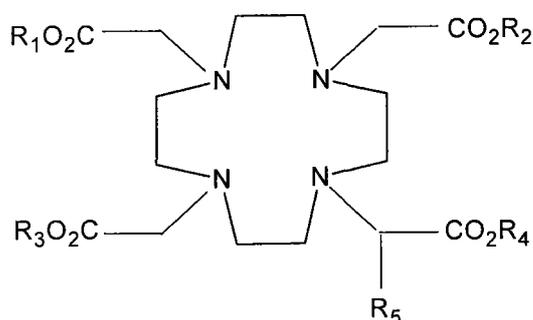
本发明涉及螯合剂。特别是，其涉及一系列选择性连接至靶向分子的双官能螯合剂。

对于非共价结合放射性核素，使用双官能螯合剂(BFCAs)连接放射性标记物和靶向分子。在这些 BFCAs 中，1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)是研究较多的大环络合物配体，其与二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)不同¹，DOTA 已显示其能形成二价和三价金属的极其稳定的络合物^{2,3}。含该配体作为金属螯合剂的放射性药物在治疗和诊断成像中发现具有广泛的用途^{4,5}。

DOTA-肽通常在溶液中⁶或在固体载体上合成，其使用未保护的 DOTA 将 DOTA 残基与树脂结合的肽的游离胺连接¹，或更方便地，使用保护的 DOTA 衍生物以克服 DOTA 的四个羧基的多活化作用引起的副反应。因此，开发了多种 DOTA-衍生物使得可选择性形成单缀合物(monoconjugates)。例如三保护的和商业可得的 DOTA-三(叔丁基)酯⁷和相应的苄基保护的类似物 DOTA-三(苄基)酯⁸，异硫氰酸酯(isothiocyanate)官能化的 p-NCS-Bz-DOTA⁹ 以及含其它未保护的羧基的 DOTAGA(tBu)₄¹⁰ 是广泛使用的 BFCAs。在其他方法中，使用在侧链含 DOTA 部分的衍生的氨基酸¹¹或该 DOTA 部分在树脂结合的肽的 N-端分步合成¹²。所有这些方法的主要限制为 DOTA 残基的连接为亲电方式。该过程不允许有其它 N-或 S-亲核基团进行选择反应。

仍然需要可使多官能化的化合物进行位点选择性官能化的化学选择性方法。然而，这种方法对于合成 DOTA-连接的放射性药物将会是强大的工具；可促成新的合成策略和络合物结构的合成，如我们最近开发的多聚氨基氧基-官能化的 RGD-衍生物¹³，其已成功使用 4-[¹⁸F]氟苯甲醛进行 ¹⁸F-标记¹⁴。在最近的出版物中，Hovinen 报道了通过衍生化 DOTA 的三叔丁酯而合成氨基氧基-官能化的螯合物，其中该 DOTA 与纳曲酮和 2-脱氧-D-核糖缀合¹⁵。然而，该报道的过程需要昂贵的原料且多官能化的化合物如肽的适用性仍然不清楚。

本发明提供下式的化合物:



其中 R^1 选自 H、甲基、乙基、羧基保护基和亲水性部分, R^2 和 R^3 独立地选自 H、甲基、乙基和羧基保护基, R^4 选自 H、甲基、乙基、亲水性部分和羧基保护基, 且 R^5 为芳基、杂芳基、烷基或这些基团的组合, 且被羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团取代。

如果 R^5 为烷基, 优选地, 所述烷基的长度为 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个碳原子。优选地, R^5 为芳基或杂芳基。更优选地, R^5 为包含 1 或 2 个环的 5-9-元芳基或杂芳基。更优选地, R^5 为 6-元芳基或杂芳基。甚至更优选地, R^5 为苯基。最优选地, 所述苯基被羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团在对位取代。

优选地, R^5 被羰基或适合参与环加成反应的官能团取代。

在本发明一个实施方案中, R^5 被羰基取代。优选地, 所述羰基为酮基。优选地, 所述酮基为甲基酮。酮基的优点为其给予化合物长期稳定性, 因为其不是高反应性基团。这使得其能长时间储存。为使化合物储存显著长的时间高反应性基团会产生问题。而且, 酮基允许化学选择性地与多官能化的化合物如肽连接。另一优点为酮基在合成过程中不需要其它保护。

在本发明另一个实施方案中, 所述适合参与环加成反应的官能团为炔基或叠氮基。优选地, 所述炔基为乙炔基。

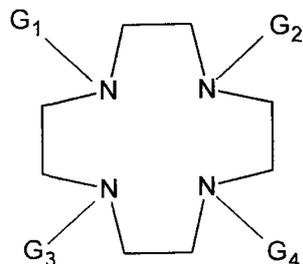
在一个实施方案中, R^1 、 R^2 和 R^3 独立地选自 H 和羧基保护基, 且 R^4 选自 H、甲基、乙基和羧基保护基。优选地, R^1 、 R^2 和 R^3 为相同或不同的羧基保护基。优选地, R^4 为 H 或甲基。更优选地, R^1 、 R^2 和 R^3 为叔丁基且 R^4 为 H 或甲基。

如果存在羰基保护基, 它们优选选自苄基、苄基甲基和叔丁基。

在一个实施方案中, R^1 或 R^4 为亲水性部分。优选地, R^1 和 R^4 均为亲水

性部分。当 R^4 和/或 R^1 为亲水性部分时，该化合物优选用于络合镓-68。优选地，该亲水性部分为糖。将亲水性部分，尤其是糖，与化合物连接的优点为它们改善了化合物的药代动力学特性。

在本发明另一方面，提供下式的化合物：



其中，基团 G^1 至 G^4 中的 2 至 4 个为 $\text{CH}(\text{CO}_2\text{R}^4)\text{-R}^5$ 且任何其余的基团 G^1 至 G^4 为 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}^1$ ，其中 R^4 选自 H、甲基、乙基和羧基保护基， R^5 如上定义且 R^1 如上定义。这使得化合物连接多个靶向分子，在每个 R^5 基团连接一个。

本发明还提供包含如上所述的化合物和衍生的靶向分子的缀合物 (conjugate)，其中，当 R^5 被羰基或氨基氧基取代时，所述靶向分子被衍生化以包含互补的氨基氧基部分或羰基部分，且该化合物和靶向分子通过肟键连接，且当 R^5 被适合参与环加成反应的官能团取代时，所述靶向分子被衍生化以包含用于环加成反应的互补基团，且所述化合物和靶向分子通过环加成反应的杂环产物连接。当 R^5 被羰基或氨基氧基取代时， R^5 优选被羰基取代。

在所述缀合物的一个实施方案中，所述化合物和靶向分子通过 1,2,3-三唑基连接。

本发明还提供螯合物，该螯合物包含与如上所述的化合物或如上所述的缀合物络合的放射性核素。优选地，所述放射性核素选自铜-225、铋-212、铋-213、铅-203、铜-64、铜-67、镓-66、镓-67、镓-68、镱-177、铟-111、铟-113、钇-86 和钇-90、镉 162、镉 165、镉 167、钷-166、镱-142、镱-143、钷-149 和铯-149。

本发明还提供合成本发明化合物的方法，所述合成包括：使二取代的芳基、杂芳基、烷基或组合 R^5 、 $\text{L}^1\text{-CH}(\text{CO}_2\text{R}^4)\text{-R}^5\text{-X}$ 与 1,4,7,10-四氮杂环十二烷(cyclen)进行反应，其中 R^4 和 R^5 具有与如上相同的含义， L^1 为离去基团且 X 为羰基、氨基氧基或适合参与环加成反应的官能团、或这种官能团的被保护的形式；且使用 $\text{L}^2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$ 将 1,4,7,10-四氮杂环十二烷的其它氮原子烷基

化, 其中 R 为如上定义的 R^1 、 R^2 或 R^3 , 且 L^2 为离去基团。优选地, 所述合成包括二取代的芳基或杂芳基 R^5 、 L^1 -CH(CO₂R⁴)-R⁵-X 与 1,4,7,10-四氮杂环十二烷进行反应。

使用 1,4,7,10-四氮杂环十二烷作为原料的优点为与其它化合物(例如, 非常昂贵的 DOTA 三叔丁酯)相比相对便宜。

该合成方法可包括将其它含 R^5 的基团与 1,4,7,10-四氮杂环十二烷反应, 其中 1,4,7,10-四氮杂环十二烷中的 2 至 4 个氮原子与 L^1 -CH(CO₂R⁴)-R⁵-X 反应, 其中 R^4 选自 H、甲基、乙基和羧基保护基, 且 R^5 具有与如上相同的含义, 且其中 1,4,7,10-四氮杂环十二烷中的任何其余的氮原子使用 L^2 CH₂CO₂R 烷基化, 其中 R 为如上定义的 R^1 、 R^2 或 R^3 。

本发明还提供通过将本发明的化合物与衍生的靶向分子进行反应而合成本发明的缀合物的方法。该合成可在缀合物与放射性核素络合形成螯合物之前进行。或者可以通过本发明的化合物与放射性核素络合而合成螯合物, 然后使化合物和衍生的靶向分子在一起反应。在将缀合物与放射性核素络合之前将化合物和衍生的靶向分子反应的优点为: 该螯合剂可首先被进一步操作(例如对于靶向给药的纯化和配制)而不进行放射性核素操作需要的预防措施。而且, 所述缀合物可在中心位置大量制备然后输送至不同的使用位置。另一优点为: 用于将化合物与放射性核素络合的条件可能非常苛刻, 因此在这些苛刻条件(该苛刻条件可能会影响化合物)使用之前形成最终缀合物。

在本发明一个实施方案中, 所述化合物和靶向分子在过渡金属催化剂的存在下通过环加成反应连接在一起。优选地, 所述金属催化剂基于 Cu 或 Rh。

本发明还提供用于治疗或诊断的螯合物。

而且, 本发明提供螯合物在制备用于诊断和/或治疗过度增生性病征和/或肿瘤性病征的药物中的用途。

而且, 本发明提供用于诊断和/或治疗过度增生性(hyperproliferative)病征和/或肿瘤性病征(neoplastic condition)的螯合物。

优选地, 上述用途中的病征为癌症。优选地, 所述癌症为对激素有反应的(hormone responsive)。

本发明还提供在受试者中诊断或治疗过度增生性病征和/或肿瘤性病征的方法, 该方法包括向受试者分别给药诊断或治疗有效量的本发明的螯合物。

本发明根据本发明的化合物在合成本发明的缀合物中的用途。

而且，本发明根据本发明的缀合物在合成本发明的螯合物中的用途。

本发明还提供缀合物或螯合物，其中所述靶向分子为肽。

本发明提供在双官能螯合剂与具有1个或更多个二硫键的靶向分子进行金属催化的缀合之后从双官能螯合剂脱螯合金属催化剂的方法，该方法包括使用硫化钠去除金属离子，然后用NH₃和包含乙腈和水的溶剂处理以恢复二硫键。优选地，该双官能螯合剂为本发明的化合物。

在一个实施方案中，所述缀合反应包括环加成反应。

优选地，所述金属催化剂基于Cu或Rh。

最后，本发明提供包含具有多个R⁵基团的化合物的缀合物，如上所述，且2个或多个靶向分子通过该R⁵基团与化合物连接。

本发明现将更详细的进行描述(仅是举例性的)，其参考以下附图，其中：

图1显示4-乙酰基苯基-DOTA-衍生物1和2和乙炔基-DOTA-衍生物3的结构；

图2显示通过肟连接形成得到的粗DOTA缀合物19的HPLC记录(HPLC trace)；

图3显示在1,3-偶极环加成和随后脱保护(步骤2，流程5)后获得的粗DOTA缀合物24的HPLC记录；

图4显示在带有AR42J肿瘤的裸小鼠中，进行腹腔注射后30和60分钟的⁶⁸Ga]19的生物分布(n=5；对于竞争研究，n=3)。数据以每克组织的%注射剂量(%iD/g)表示，且为平均值±SD；

图5显示在带有AR42J肿瘤的裸小鼠中，进行腹腔注射后30和60分钟(n=5)[⁶⁸Ga]19在肿瘤与非肿瘤中的比率。数据为平均值±SD；

图6显示2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(1)的HPLC记录。梯度：10→80%；30分钟；

图7显示2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸(2)的HPLC记录。梯度：10→60%；30分钟；

图8显示(R/S)-2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙炔基)苯基)乙酸甲酯(3)的HPLC记录。梯度：10→100%；30分钟；

图9显示2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙

酰基苯基)乙酸甲酯(11)的 HPLC 记录。梯度: 10→80%; 30 分钟;

图 10 显示 DOTA-Tyr³-octreotate 衍生物 19 的 HPLC 记录。梯度: 10→60%; 30 分钟;

图 11 显示 DOTA-Tyr³-octreotate 衍生物 24 的 HPLC 记录。梯度: 10→60%; 60 分钟;

图 12 显示通过 1,3-偶极环化加成获得的粗 DOTA 缀合物 26 的 HPLC 记录。梯度: 10→60%; 60 分钟;

图 13 显示 2-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(5)的 NMR 光谱;

图 14 显示 2-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(6)的 NMR 光谱;

图 15 显示 2-(4-乙酰基苯基)-2-溴乙酸甲酯(7)的 NMR 光谱;

图 16 显示 2-(4-乙酰基苯基)-2-溴乙酸叔丁酯(8)的 NMR 光谱;

图 17 显示 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-(4-乙酰基苯基)乙酸甲酯(9)的 NMR 光谱;

图 18 显示 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(10)的 NMR 光谱;

图 19 显示 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸甲酯(11)的 NMR 光谱;

图 20 显示 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸(2)的 NMR 光谱;

图 21 显示 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(1)的 NMR 光谱;

图 22 显示(4-碘苯基)乙酸甲酯(13)的 NMR 光谱;

图 23 显示 2-(4-(2-(三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)乙酸甲酯(14)的 NMR 光谱;

图 24 显示 2-溴-2-(4-(2-(三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)乙酸甲酯(15)的 NMR 光谱;

图 25 显示(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-2-(4-乙炔基)苯基)乙酸甲酯(16)的 NMR 光谱;

图 26 显示(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙炔基)苯基)乙酸甲酯(3)的 NMR 光谱; 和

图 27 显示 N-(3-叠氮基丙基)琥珀酰胺(21)的 NMR 光谱。

新的双官能聚(氨基酸酯)(poly(amino carboxylate))螯合剂的方便的合成使得需要化学选择性连接至高度官能化的生物分子。基于熟知的螯合剂 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA), 新的双官能螯合剂通过用 1 当量的对-官能化的 2-溴苯基乙酸烷基酯和 3 当量的商业可得的 2-溴乙酸烷基酯使 1,4,7,10-四氮杂环十二烷(cyclen)烷基化而合成, 其带有附加的官能团。所得分别具有附加的羰基和炔烃官能团的化合物使得以快速方式定位未保护的和适当官能化的生物分子的特定标记。这通过以化学选择性脗连接(ligation)和 1,3-偶极环加成(“点击化学”)将我们的新的 DOTA-衍生物连接至生长抑素类似物 Tyr³-octreotate 证明。小鼠中的初始生物分布研究表明所需 DOTA 缀合对于用放射金属化的肽进行体内成像研究的适应性。

因此, 我们的目的是开发新的 DOTA-衍生物, 其在多种官能团的存在下能化学选择性连接。因此, 致力于以少数合成步骤从便宜的商业材料获得容易得到的结构, 以使得我们的方法方便且甚至成为广泛使用但非常贵的 DOTA-三(叔丁基)酯的一般替代品。而且, 相应的多官能化的化合物的可实现性是我们考虑的一个重要方面。所述脗连接^{16,17}以及 Huisgen 1,3-偶极环化加成^{18,19} 对于化学选择性偶合都是已被深入研究的和有利的反应, 其满足我们的所有目的需求。脗连接表示在脗键形成下氨基氧基组分和醛或甲基酮之间的高度选择性反应²⁰, 已知该脗键在体外和体内都相当稳定。该反应显示能经受每种游离氨基酸侧链(除了 N-末端半胱氨酸), 且发现有广泛用途, 例如用于合成模板装配的合成蛋白质^{21,22}、放射性标记的肽缀合物^{23,24}、环肽²⁵和蛋白类似物。^{26,27} 叠氮化物和炔烃的化学选择性 Huisgen 1,3-偶极环加成形成三唑最近重新发现为非常有用的“点击”反应²⁸⁻³⁰, 且发现用于多种医药化学研究中³¹⁻³⁶。为向使用者提供不同合成 DOTA-缀合物的方法, 我们致力于用于上述两种反应类型的合适的 DOTA-衍生物。

因此, 在此报道中我们分别提供了化合物 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸 (1)和 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(2)的合成, 因为羰基成分用于与氨基氧基-官能化的化合物的脗连接且 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-(4-三甲基甲硅烷基乙炔基)乙酸甲酯(3)用于与叠氮化物官能化的化合物的“点击”反应(图 1)。此外, 为将这些衍生物通过其甲基酮-和炔烃-官能团连接至生物分子, 化合物 2 和 3 将进一步通

过一个不同的官能化的羧基选择性修饰。这两类衍生物都证明能与合适的 N-末端修饰的未保护的 Tyr³-octreotate(一种生长抑素类似物)高度选择性反应, 该 N-末端修饰的未保护的 Tyr³-octreotate 为已明确的用于肿瘤诊断目的和腔内放射治疗(endoradiotherapeutic)目的的靶向分子³⁷⁻⁴⁰。为证明上述不同的化学选择性缀合方法对于合成新的放射性配体的适用性且不影响各种生物分子的受体亲和力, Tyr³-octreotate 类似物之一用 ⁶⁸Ga 标记且在带有 AR42J 肿瘤的裸小鼠中在初始生物分布研究中评价。

实验过程

一般. 三苯甲基氯聚苯乙烯(TCP)树脂(0.94 mmol/g)购自 PepChem (Tübingen Germany)。偶合试剂和氨基酸衍生物购自 Novabiochem、Neosystem、和 IRIS Biotech GmbH、Merck Biosciences、Perseptive Biosystems GmbH 和 Neosystem。无水溶剂购自 Fluka。所有其它试剂和溶剂购自 Merck、Aldrich 和 Fluka 且按原样使用。使用标准注射技术用于转移无水溶剂。薄层色谱法 (TLC)在镀铝板 Merck 硅胶 60 F₂₅₄上进行。化合物通过在 254 nm 的 UV 吸收或用钼酸铈铵(CAM)显色而可视化。使用指示的洗脱液在硅胶 60 (Merck, 230-400 目)(对于 1g 待分离的材料使用约 50 g)上进行快速色谱法。用于色谱法的溶剂在使用前蒸馏。色谱洗脱溶剂体系以体积/体积比率记录。使用 Omnicrom YMC 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm C₁₈, 1 mL/分钟)进行 RP-HPLC 分析并在 254 nm 检测非肽化合物和在 220 nm 检测肽化合物。该洗脱液为线性梯度, 经 30 分钟从水(0.1% TFA)至乙腈(0.1% TFA)。分析 RP-HPLC 的保留时间(R_t)以分钟给出, 梯度以乙腈的百分比给出。NMR: Bruker AC-250、AV-360、AV-500 和 DMX500。¹H 和 ¹³C NMR 光谱在环境温度记录。光谱校准为各自的溶剂信号 (CDCl₃: ¹H 7.26 ppm, ¹³C 77.0 ppm; MeOH-d₄: ¹H 3.31 ppm, ¹³C 49.05 ppm;)。化学位移(δ)记录为百万分数(ppm)且偶合常数(J 值)以赫兹 (Hz)给出。以下缩写用于解释多重性: s, 单峰; d, 二重峰; t, 三重峰; q, 四重峰; dd, 双二重峰; dt, 双三重峰; m, 多重峰; b, 宽峰。MS: Finnigan MAT 8200 (EI), Finnigan LCQ (ESI)。肽序列分析在 Bruker Ultraflex TOF/TOF 上进行。

2-(4-乙酰基苯基)乙酸甲酯(5)。

在氩气下经 1 小时向 2-溴乙酸甲酯(3.55 mL, 37.5 mmol, 1.0 当量)、Pd(OAc)₂ (252 mg, 1.13 mmol, 3 mol%)、P(邻甲苯基)₃ (1.02 g, 3.35 mmol, 9 mol%)和 K₂CO₃ (26.0 g, 0.19 mmol, 5.0 当量)在 THF (120 mL)中的混悬液中滴加 4-乙酰基苯基硼酸 (7.38 g, 45.0 mmol, 1.2 当量)在 THF/H₂O (120 mL/1.7 mL)中的溶液。在室温搅拌 18 小时后, 过滤混合物且在减压下去除溶剂。将残余物溶于 EtOAc (250 mL)且随后用饱和 NH₄Cl 水溶液(150 mL), 饱和 NaHCO₃ 水溶液(150 mL)和盐水洗涤。用 MgSO₄ 干燥后, 有机层通过硅胶短柱过滤并浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(EtOAc/己烷 1:8)得到淡黄色固体的 **5** (4.73 g, 66%)。R_f=0.13 (EtOAc/己烷, 1:4); mp 44-44°C; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, J=8.3 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 2.57 (s, 3H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 197.5, 171.1, 139.2, 136.0, 129.4 (2C), 128.5 (2C), 52.1, 40.9, 26.5; HRMS (EI) C₁₁H₁₂O₃ 的计算值 192.07864; 实测值 192.07863。

2-(4-乙酰基苯基)-2-溴乙酸甲酯(7)。

向 **5** (3.00 g, 15.6 mmol, 1.0 当量)于无水 CCl₄ (300 mL)中的溶液中添加 N-溴琥珀酰亚胺(3.36 g, 18.9 mmol, 1.2 当量)和 Br₂ (2 滴)。将混合物加热至回流, 用 500W 卤素灯照射 10 分钟并在回流下再搅拌 50 分钟。冷却至室温后, 过滤反应溶液, 浓缩溶剂且粗产物通过在硅胶上使用快速色谱法纯化 (EtOAc/己烷 1:4)以得到淡黄色油状的 **7** (3.75 g, 89%)。R_f=0.18 (EtOAc/己烷, 1:4); ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.63 (d, J=8.4 Hz, 2H), 5.38 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.59 (s, 3H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 197.1, 168.2, 140.4, 137.5, 128.9, 128.6, 53.5, 45.3, 26.6; HRMS (EI) C₁₁H₁₁⁸¹BrO₃ 的计算值 271.98712; 实测值 271.98716, HRMS (EI) C₁₁H₁₁⁷⁹BrO₃ 的计算值 269.98917; 实测值 269.98863。

(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-2-(4-乙酰基苯基)乙酸甲酯(9)。

经 10 小时在室温向 1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (762 mg, 4.43 mmol, 1.2 当量)和 K₂CO₃ (1.27 g, 9.22 mmol, 2.5 当量)在 DMF (100 mL)中的混悬液中滴加 **7** (1.00 g, 3.69 mmol, 1.0 当量)在 DMF (60 mL)中的溶液。过滤混合物并减压浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(梯度 MeOH/CHCl₃ 1:7→7:1, 1% NEt₃)得到

淡黄色固体的 **9** (829 mg, 62%)。 $R_f=0.10$ (MeOH/CHCl₃, 3:1, 1% NEt₃); mp 32-35°C; ¹H NMR (500 MHz, MeOH-d₄) δ 8.04 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.45 (d, J=8.2 Hz, 2H), 5.02 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.37-3.30 (m, 2H), 3.24-3.10 (m, 4H), 3.09-3.01 (m, 4H), 3.00-2.94 (m, 4H), 2.63 (m, 5H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOH-d₄) δ 199.8, 174.1, 139.6, 138.4, 131.2 (2 C), 129.8 (2 C), 66.5, 53.2, 48.0 (2 C), 46.3 (2 C), 43.8 (2 C), 43.8 (2 C), 26.8; MS (ESI) C₁₉H₃₀N₄O₃ 的计算值 362.2; 实测值 363.2 [M+H]⁺。

(R/S)-2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙酰基-苯基)乙酸甲酯(11)。

经 30 分钟在室温向 **9** (723 mg, 1.99 mmol, 1.0 当量)和 K₂CO₃ (1.24 g, 8.98 mmol, 4.5 当量)在 DMF (50 mL)中的混悬液添加 2-溴乙酸叔丁酯 (0.97 mL, 6.58 mmol, 3.3 当量)在 DMF (50 mL)中的溶液。搅拌 4 小时后, 过滤混合物并减压浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(MeOH/CHCl₃ 1:10→7:1, 1% NEt₃)得到淡黄色固体的 **11** (83 mg, 83%)。 99% 纯度; RP-HPLC (10→80%) $R_t=17.4$; $R_f=0.83$ (MeOH/CHCl₃, 3:1, 1% NEt₃); mp 73-75°C; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.16 (d, J=8.1 Hz, 2H), 4.75 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.59 (d, J=17.4 Hz, 1H), 3.42 (d, J=17.5 Hz, 1H), 3.39 (d, J=17.4 Hz, 1H), 3.24-3.05 (m, 3H), 3.02-2.68 (m, 6H), 2.59 (s, 3H), 2.57-2.42 (m, 4H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.14-2.05 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.45 (s, 18H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 197.4, 174.5, 173.6, 173.1, 172.9, 136.9, 136.7, 130.2 (2C), 128.3 (2C), 82.5, 82.2, 82.1, 77.2, 64.8, 55.9, 55.7, 55.5, 52.7, 52.4, 52.3, 48.5, 48.0, 47.9, 47.8, 44.6, 27.9 (3C), 27.8 (3C), 27.7 (3C), 26.6; HRMS (EI) C₂₂H₃₆N₄O₃ 的计算值 404.27875; 实测值 404.27951。

(R/S)-2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙酰基苯基)-乙酸 * ½AcOH (2)。

在室温向 **11** (26.0 mg, 31.7 μmol, 1.0 当量)在 THF (5 mL)中的溶液中添加 LiOH (1.75 mg, 72.9 μmol, 2.3 当量)在水 (150 μL)中的溶液, 并将该混合物搅拌 18 小时。减压浓缩后, 粗产物通过制备 RP-HPLC 纯化 (20→60%, 30 分钟), 冻干出乙酸得到无色固体的 **2** (9.0 mg, 38%, 66%相对于回收的 **11**)。

94% 纯度; RP-HPLC (10→60%) $R_f=25.7$; mp 68-72°C; ^1H NMR (500 MHz, MeOH- d_4) δ 8.06 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 5.12 (s, 1H), 4.04-3.34 (m, 8H), 3.34-3.18 (m, 4H), 3.15-2.66 (m, 10H), 2.63 (s, 3H), 1.99 (s, $\frac{1}{2}\times 3\text{H}$ (AcOH)), 1.53 (s, 9H), 1.52 (s, 18H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOH- d_4) δ 199.7, 175.2, 172.7, 170.4 (br, 3C), 138.8 (2C), 132.7 (2C), 129.8 (2C), 84.1 (br, 3C), 69.9, 56.5, 52.9-51.0 (br, 8C), 20.5 (9C), 26.8, 20.8; MS (ESI) $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_9$ 的计算值 690.4; 实测值 691.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 713.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 729.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

(4-碘苯基)乙酸甲酯(13).

在 0°C 向(4-碘苯基)乙酸 (12) (15.0 g, 57.0 mmol) 在无水甲醇(50 mL) 中的溶液中滴加 SOCl_2 (20.7 mL, 285 mmol, 5 当量)。在室温搅拌 1 小时后, 减压去除溶剂且将残余物溶于 Et_2O (400 mL) 中。有机相随后用饱和 NaHCO_3 水溶液(400 mL)、饱和 NH_4Cl 水溶液 (400 mL) 和盐水(400 mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥。减压浓缩得到 13 (14.7 g, 93%)。 $R_f=0.57$ (EtOAc/己烷, 1:4); ^1H NMR (360 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.56 (s, 3H); ^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 137.6, 133.5, 131.2, 92.5, 52.0, 40.5.

1-叠氮基-3-氨基丙烷(20).

将文献方法(56)稍加修改: 将 1-溴-3-氨基丙烷氢溴酸盐(5.47 g, 25.0 mmol, 1.0 当量)和叠氮化钠 (3.25 g, 50.0 mmol, 2.0 当量)在 20 mL 水中的溶液在 80 °C 加热 24 小时。在冰浴中冷却反应混合物然后加入乙醚(30 mL)。通过加入 KOH 颗粒将 pH 调节至 14, 同时保持温度低于 10 °C。分离有机相后, 水相进一步用乙醚萃取。合并的有机层用 MgSO_4 干燥并小心地真空浓缩。剩余的油状物包含 20 21.0 mmol (84%) 和约等摩尔量的乙醚(基于质子 NMR 的积分), 其不用进一步纯化而使用。光谱数据与文献 20 相等。

3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酸(21).

在室温经 15 分钟向 20 (501 mg, 5.00 mmol, 1.1 当量) 和 NEt_3 (693 μL , 5.00 mmol, 1.1 当量) 在 10 mL 丙酮中的溶液中添加琥珀酸酐 (460 mg, 4.55 mmol, 1.0 当量) 在 5 mL 丙酮中的溶液。将反应混合物在室温再搅拌 15 小时。

真空浓缩后，残余物分配于稀释的 HCl 水溶液 (20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 中，分离且水层进一步用乙酸乙酯 (2 x 10 mL) 萃取。浓缩合并的有机层后，得到白色固体的 **21** (653 mg, 3.27 mmol, 71 %)。¹H NMR (360 MHz, MeOH-d₄) δ 3.34 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.24 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.59 (dt, J=6.5 Hz, 1.1 Hz, 2H), 2.44 (dt, J=6.7 Hz, 1.3 Hz, 2H), 1.74 (q, J=6.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (90 MHz, MeOH-d₄) δ 176.2, 174.7, 50.0, 37.7, 31.5, 30.2, 29.7; MS (ESI) C₁₁H₁₂O₃ 的计算值 200.1; 实测值 201.1 (M+H⁺)。

肽合成

使用 TCP-树脂按照标准 Fmoc-方案(57-60)进行肽合成。

将 N-Fmoc-氨基酸连接至 TCP 树脂上。通用步骤 I。

用无水 DCM(10 mL)膨胀 20 分钟后, TCP 树脂(2.00 g, 理论 0.96 mmol/g, 1.92 mmol)在室温用 Fmoc-保护的氨基酸(1.2 当量, 2.3 mmol)在无水 DCM(19 mL)中的溶液和 DIPEA (980 μL, 3 当量, 5.8 mmol)处理 2 小时。添加 MeOH (2 mL)和 DIPEA (0.4 mL)以封端游离位点(free sites), 将反应混合物摇动 15 分钟。该树脂用 NMP (3×10 mL)、DCM (5×10 mL)和 MeOH (3×10 mL) 洗涤并在真空下干燥以得到树脂结合的 N-Fmoc-氨基酸。

Fmoc 脱保护。通用步骤 II。

该 Fmoc-保护的树脂用 10 mL 20%哌啶在 NMP 中的溶液(3×10 分钟)处理并用 NMP 洗涤(5×10 mL)。

与 TBTU/HOBt 偶联。通用步骤 III。

将 Fmoc-氨基酸 (2.5 当量), TBTU (2.5 当量), HOBt (2.5 当量)和 DIPEA (7 当量)溶于 NMP 以得到 0.2 mmol/L 溶液, 将该溶液添加至树脂中。将反应混合物在室温摇动 90 分钟并用 NMP 洗涤(5×10 mL)。

用三氟乙酸裂解和脱保护。通用步骤 IV。

将树脂用 DCM 洗涤(3×10 mL)并用 TFA、H₂O 和三异丙基硅烷(90:5:5, v/v/v; 20 mL)的混合物处理 3×10 分钟。过滤去除树脂后, 合并滤液并再搅拌 90 分钟。将溶剂减压浓缩以用 Et₂O 沉淀肽。

直链肽的二硫键环化(Disulfide cyclization)。通用步骤 V。

将直链肽以高稀释度(c=1 mM)溶于水中, 且通过加入浓 NaHCO₃ 水溶液将 pH 调节至 7-8。然后, 在剧烈搅动下滴加 30% H₂O₂ 水溶液(3 当量)。30

分钟后停止反应且通过冻干去除溶剂。

合成环[2,7]-AoxAc-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (18)和环[2,7]-3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酰基-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (23)。

以与通用步骤 I-III 类似的方式固相合成直链肽序列 H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH。将样品按照步骤 IV 从树脂裂解且该肽序列通过 MALDI-TOF 肽序列分析证实。MS (MALDI) $C_{49}H_{66}N_{10}O_{12}S_2$ 的计算值 1050.43; 实测值 1051.40 $[M+H]^+$ 。为进一步的步骤将树脂分为两部分:

1) 环[2,7]-AoxAc-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (18): 以与通用步骤 I-III 类似的方式将(Boc-氨基氧基)乙酸偶联至上述树脂结合的肽的一部分, 且将直链肽按照步骤 IV 从树脂裂解。该二硫键环化根据通用步骤 V 完成。必须非常注意在步骤 IV 和 V 中使用的所有溶剂的级别 (HPLC 级别 (quality))。纯化小批的粗产物以得到氨基氧基-官能化的 Tyr³-octreotate 18, 其半制备 RP-HPLC (20→50%, 30 分钟) 纯化后为无色固体。97% 纯度; RP-HPLC (10→60%) $R_t=17.3$; MS (ESI) $C_{51}H_{67}N_{11}O_{14}S_2$ 的计算值 1121.43; 实测值 1122.5 $[M+H]^+$, 562.1 $[(2M+2H)/2]^{2+}$ 。

2) 环[2,7]-3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酰基-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (23)。以与通用步骤 I-III 类似的方式将 21 偶联至上述树脂结合的肽的一部分, 且将直链肽按照步骤 IV 从树脂裂解。该二硫键环化根据通用步骤 V 完成。该二硫键环化根据通用步骤 V 完成。在半制备 RP-HPLC (20→60%, 30 分钟) 纯化后, 获得无色固体的肽。96% 纯度; RP-HPLC (10→50%) $R_t=25.0$; MS (ESI) 的计算值 $C_{56}H_{74}N_{14}O_{14}S_2$ 1230.50; 实测值 1231.6 $[M+H]^+$, 1253.6 $[M+Na]^+$, 1269.3 $[M+K]^+$ 。

合成 3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酰基-Tyr-Glu-Trp-Lys (25):

以与通用步骤 I-III 类似的方式固相合成直链肽, 并按照步骤 IV 从树脂裂解。在半制备 RP-HPLC (20→50%, 30 分钟) 纯化后, 获得无色固体的肽。97% 纯度; RP-HPLC (10→60%, 30 分钟) $R_t=16.8$; MS (ESI) $C_{38}H_{50}N_{10}O_{10}$ 的计算值 806.37; 实测值 807.6 $[M+H]^+$, 829.5 $[M+Na]^+$ 。

合成 DOTA-Tyr-Glu-Trp-Lys 衍生物 26。

在室温向 3 (3.1 mg, 4.1 μmol , 1.0 当量) 在 THF (0.2 mL) 中的溶液中添加 LiOH (0.3 mg, 14 μmol , 3.4 当量) 在水 (30 μL) 中的溶液并将该混合物搅拌 18

小时。然后，顺序添加水 (0.2 mL)、肽 **22** (3.8 mg, 4.1 μmol , 1.0 当量)、0.1M 的 CuSO_4 水溶液(49 μL , 4.9 μmol , 1.2 当量)和铜粉(10 mg)并将混合物搅拌 18 小时。此后，滤掉铜粉且溶解的铜盐通过加入 Na_2S ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 12 mg, 49 μmol , 12.0 当量) 沉淀。过滤混合物且在减压下去除溶剂。该叔丁酯通过用 TFA/TIPS/ H_2O 混合物(95:5:5, v/v/v; 1 mL)处理 2 小时而裂解。其后，在减压下浓缩溶液且粗产物通过半制备 RP-HPLC (20 \rightarrow 50%, 30 分钟)直接纯化以得到 **23** (3.22 mg, 51%)，其在冻干后为无色粉末。95%纯度；RP-HPLC (10 \rightarrow 60%) $R_f=12.6$ ；MS (ESI) $\text{C}_{62}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_{18}$ 的计算值 1310.59；实测值 656.9 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$, 667.9 $[(\text{M}+\text{H}+\text{Na})/2]^+$, 1311.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1333.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1349.5 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 。

2-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(6)。

在氩气下经 1 小时向 2-溴乙酸叔丁酯 (6.80 mL, 46.4 mmol, 1.0 当量)、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (336 mg, 1.50 mmol, 3 mol%)、 $\text{P}(\text{邻甲苯基})_3$ (1.36 g, 4.46 mmol, 10 mol%)和 K_2CO_3 (34.6 g, 0.25 mmol, 5.4 当量)在 THF (160 mL)中的混悬液中滴加 4-乙酰基苯基硼酸 (**4**) (9.84 g, 60.0 mmol, 1.3 当量)在 THF/ H_2O (160 mL/2.2 mL)中的溶液。在室温搅拌 18 小时后，过滤混合物且在减压下去除溶剂。将残余物溶于 EtOAc (250 mL)且随后用饱和 NH_4Cl 水溶液 (150 mL)、饱和 NaHCO_3 水溶液(150 mL)和盐水洗涤。用 MgSO_4 干燥后，有机层通过硅胶过滤并浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(EtOAc/己烷 1:8)得到淡黄色固体的 **6** (6.78 g, 63%)。 $R_f=0.27$ (EtOAc/己烷, 1:4); mp 50-52 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (360 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.59 (s, 3H), 1.43 (s, 9H); ^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 197.7, 170.0, 140.1, 135.8, 129.4 (2C), 128.5 (2C), 81.2, 42.6, 28.0, 26.5; HRMS (EI) $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 的计算值 234.12559; 实测值 234.12532。

2-(4-乙酰基苯基)-2-溴乙酸叔丁酯(8)。

向 **6** (2.84 g, 12.1 mmol, 1.0 当量)于无水 CCl_4 (250 mL)中的溶液中添加 N-溴琥珀酰亚胺(2.58 g, 14.5 mmol, 1.2 当量)和 Br_2 (2 滴)。将混合物加热至回流，用 500 W 卤素灯照射 10 分钟并在回流下再搅拌 50 分钟。冷却至室温后，过滤反应溶液，浓缩溶剂且粗产物通过在硅胶上使用快速色谱法纯化

(EtOAc/己烷 1:10)以得到淡黄色固体的 **8** (3.34 g, 88%)。R_f=0.27 (EtOAc/己烷, 1:4); mp 54-56°C; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.62 (d, J=8.3 Hz, 2H), 5.27 (s, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.45 (s, 9H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 197.2, 166.6, 141.1, 137.3, 128.8 (2C), 128.6 (2C), 83.5, 47.1, 27.6, 26.6; MS (EI) m/z (%) 314 (<1) [M(⁸¹Br)]⁺, 312 (<1) [M(⁷⁹Br)]⁺, 241 (10) [M(⁸¹Br)-OtBu]⁺, 239 (8) [M(⁷⁹Br)-OtBu]⁺; HRMS (EI) C₁₀H₈⁸¹BrO₂ [M(⁸¹Br)-OtBu] 的计算值 240.96872; 实测值 240.96833, HRMS (EI) C₁₀H₈⁷⁹BrO₂ [M(⁷⁹Br)-OtBu] 的计算值 238.97076; 实测值 238.97074。

(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-2-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯 (10)。

在室温经 10 小时向 1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (331 mg, 1.92 mmol, 1.2 当量)和 K₂CO₃ (552 mg, 3.99 mmol, 2.5 当量)在 DMF (60 mL)中的混悬液中滴加 **8** (500 mg, 1.60 mmol, 1.0 当量)在 DMF (50 mL)中的溶液。过滤混合物并减压浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(梯度 MeOH/CHCl₃ 1:7→7:1, 1% NEt₃)得到 **10** (488 mg, 75%), 其为淡黄色固体。R_f=0.10 (MeOH/CHCl₃, 3:1, 1% NEt₃); mp 33-36°C; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.43 (d, J=8.2 Hz, 2H), 4.62 (s, 1H), 2.90-2.67 (m, 11H), 2.64-2.44 (m, 10H), 1.47 (s, 9H); ¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 197.4, 170.7, 142.3, 136.4, 129.3, 128.3, 81.9, 67.8, 49.3, 47.7, 45.9, 45.8, 28.1, 26.5; HRMS (EI) C₂₂H₃₆N₄O₃ 的计算值 404.27875; 实测值 404.27951。

(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙酰基苯基)乙酸叔丁酯(1)。

在室温经 30 分钟向 **10** (700 mg, 1.73 mmol, 1.0 当量)和 K₂CO₃ (1.08 mg, 7.79 mmol, 4.5 当量)在 DMF (50 mL)中的混悬液中添加 2-溴乙酸叔丁酯 (0.84 mL, 5.71 mmol, 3.3 当量)在 DMF (20 mL)中的溶液。搅拌 4 小时后, 过滤混合物并减压浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(MeOH/CHCl₃ 9:1, 1% TEA)得到淡黄色固体的 **11** (930 mg, 72%)。99% 纯度; RP-HPLC (10→100%) R_t=22.0; R_f=0.83 (MeOH/CHCl₃, 3:1, 1% NEt₃); mp 70-71°C; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.11 (d, J=8.2 Hz, 2H), 4.66 (s, 1H), 3.60

(d, $J=17.3$ Hz, 1H), 3.45 (d, $J=17.6$ Hz, 1H), 3.38 (d, $J=17.5$ Hz, 1H), 3.22-3.05 (m, 3H), 2.98-2.70 (m, 6H), 2.61 (s, 3H), 2.61-2.48 (m, 2H), 2.46-2.38 (m, 1H), 2.36-2.24 (m, 2H), 2.22-2.04 (m, 5H), 1.49 (s, 9H), 1.48 (s, 9H), 1.46 (s, 9H), 1.39 (s, 9H); ^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 197.6, 173.4, 173.1, 173.0, 172.9, 137.2, 136.6, 130.3 (2C), 128.1 (2C), 82.9, 82.2, 82.1, 82.0, 65.4, 56.0, 55.8, 55.5, 52.7, 52.4, 52.1, 48.5, 48.1, 48.0, 47.9, 44.5, 27.9 (3C), 27.8 (6C), 27.7 (3C), 26.6; MS (EI) m/z (%) 746.0 (9) $[\text{M}]^+$, 645.1 (47) $[\text{M}-\text{CO}_2\text{tBu}]^+$; HRMS (EI) $\text{C}_{35}\text{H}_{57}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}-\text{CO}_2\text{tBu}]$ 的计算值 645.42273; 实测值 645.42257。

2-(4-(2-(三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)乙酸甲酯(14)。

在 0°C 向(4-碘苯基)乙酸甲酯(13) (12.8 g, 45 mmol, 1.0 当量)、三甲基甲硅烷基-乙炔(9.30 mL, 67.5 mmol, 1.5 当量)和 TEA (14.9 mL, 108 mmol, 2.4 当量)于无水 CH_3CN (120 mL) 中的溶液中添加 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (3.6 g, 3.15 mmol, 0.07 当量)和 CuI (6.00 g, 31.5 mmol, 0.7 当量)。在 0°C 搅拌 30 分钟和在室温搅拌 3 小时后, 通过二氧化硅短柱过滤混合物, 使用 EtOAc/己烷 (1:1) 作为洗脱液。减压去除溶剂且残余物通过在硅胶上使用快速色谱法纯化(梯度 EtOAc/己烷 1:80 \rightarrow 1:20), 得到淡黄色结晶的 14 (10.3 g, 93%)。 $R_f=0.27$ (EtOAc/己烷, 1:10); mp 55-58 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (360 MHz, CDCl_3) δ 7.42 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 0.25 (s, 9H); ^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 134.3, 132.0 (2C), 129.1 (2C), 122.0, 104.7, 94.2, 52.0, 41.0, -0.0 (3C); HRMS (EI) $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{Si}$ 的计算值 246.10761; 实测值 246.10744。

2-溴-2-(4-(2-(三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)乙酸甲酯(15)。

在 -78°C 向 14 (2.07 g, 8.40 mmol, 1.0 当量)在无水 THF (20 mL) 中的溶液中添加 LDA (2M 在 THF/正庚烷/乙基苯中的溶液, 5.04 mL, 10.1 mmol, 1.2 当量), 且将该溶液搅拌 1 小时。此后, 添加 N-溴琥珀酰亚胺(1.79 g, 10.1 mmol, 1.2 当量)在无水 THF (20 mL) 中的混悬液, 且将该混合物经 18 小时温热至室温。减压去除溶剂, 将残余物悬浮于 CCl_4 (30 mL), 过滤并蒸发。通过在硅胶上使用快速色谱法纯化(梯度 EtOAc/己烷 1:80 \rightarrow 1:20, 1% NEt_3)得到 15 (1.28 g, 47%, 92% 相对于回收的 14)。 $R_f=0.42$ (EtOAc/己烷, 1:10); mp 82-84 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (360 MHz, CDCl_3) δ 7.47 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 5.32

(s, 1H), 3.77 (s, 3H), 0.25 (s, 9H); ^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 168.3, 135.7, 132.2 (2C), 128.5 (2C), 124.2, 104.1, 95.8, 53.3, 45.8, 45.8, -0.1 (3C); HRMS (EI) $\text{C}_{14}\text{H}_{17}^{81}\text{BrO}_2\text{Si}$ 的计算值 326.01608; 实测值 326.01622。

(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)]-2-(4-(2-(三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)乙酸甲酯(16)。

在室温经 10 小时向 1,4,7,10-四氮杂环十二烷 (cyclen) (548 mg, 3.18 mmol, 1.2 当量)和 K_2CO_3 (439 mg, 3.18 mmol, 1.2 当量)在 DMF (60 mL)中的混悬液中滴加 **15** (862 mg, 2.65 mmol, 1.0 当量)在 DMF (50 mL)中的溶液。过滤混合物并减压浓缩。在硅胶上使用快速色谱法(梯度 MeOH/ CHCl_3 1:9 \rightarrow 9:1, 1% NEt_3)得到淡黄色固体的 **16** (590 mg, 53%)。 $R_f=0.10$ (MeOH/ CHCl_3 , 3:1, 1% NEt_3); mp 70-75 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, MeOH- d_4) δ 7.49 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 4.90 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.21-3.01 (m, 6H), 3.01-2.82 (m, 8H), 2.71-2.62 (m, 2H), 0.23 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOH- d_4) δ 174.2, 135.6, 133.2 (2C), 130.8 (2C), 124.9, 105.4, 95.9, 67.2, 53.0, 48.4 (2C), 47.0 (2C), 44.9 (2C), 44.4 (2C), -0.0 (3C); MS (ESI) $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2\text{Si}$ 的计算值 416.3; 实测值 417.4 [(M+H)] $^+$, 439.4 [(M+Na)] $^+$ 。

(R/S)- 2-[1-(1,4,7,10-四氮杂环十二烷)-4,7,10-三(乙酸叔丁酯)]-2-(4-乙炔基)苯基)乙酸甲酯(3)。

在室温经 30 分钟向 **16** (530 mg, 1.27 mmol, 1.0 当量)和 K_2CO_3 (634 mg, 4.57 mmol, 3.6 当量)在 DMF (50 mL)中的混悬液中添加 2-溴乙酸叔丁酯 (615 μL , 4.19 mmol, 3.3 当量)在 DMF (20 mL)中的溶液。搅拌 4 小时后, 过滤混合物, 减压浓缩且将残余物溶于 THF (20 mL)。然后, 添加氟化四丁铵(481 mg, 1.52 mmol, 1.2 当量), 搅拌 15 分钟后, 去除溶剂且粗产物通过在硅胶上使用快速色谱法纯化(MeOH/ CHCl_3 1:10, 1% NEt_3)得到淡黄色固体的 **3** (508 mg, 85%)。99% 纯度; RP-HPLC (10 \rightarrow 100%) $R_t=20.0$; $R_f=0.28$ (MeOH/ CHCl_3 , 1:9, 1% NEt_3); mp 63-68 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (500 MHz, MeOH- d_4) δ 7.48 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 4.83 (s, 1H), 3.75 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.55 (s, 1H), 3.54 (d, $J=17.5$ Hz, 1H), 3.51 (d, $J=17.6$ Hz, 1H), 3.26-3.21 (m, 1H), 3.18-3.05 (m, 4H), 2.99-2.92 (m, 3H), 2.89 (d, $J=17.6$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J=17.6$

Hz, 1H), 2.74-2.63 (m, 2H), 2.33 (d, J=11.5 Hz, 1H), 2.28-2.12 (m, 4H), 2.12-2.05 (m, 2H), 1.54 (s, 9H), 1.52 (s, 18H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOH- d_4) δ 176.3, 175.4, 175.1, 174.7, 134.1, 132.8, 131.7, 123.8, 83.8, 83.5, 83.1, 79.7, 66.4, 59.61, 59.59, 59.57, 57.1, 56.8, 56.7, 54.2, 53.9, 53.7, 53.2, 45.9, 28.5, 28.4, 28.3, 24.8; HRMS (EI) $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8$ 的计算值 686.42546; 实测值 686.42532。

化学选择性脗连接(ligation)。合成 DOTA-Tyr³-octreotate 衍生物 19。

将 **1** (3.3 mg, 4.5 μmol , 1.0 当量) 在 10N HCl 水溶液在二噁烷 (50/50, v/v; 2 mL) 中的溶液中脱保护 18 小时, 然后减压去除溶剂。在 pH 4 (TFA, HPLC 级) 将残余物溶于 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v; 0.2 mL, HPLC 级), 且添加 **18** (6.1 mg, 4.5 μmol , 1.0 当量)。搅拌 18 小时后, 浓缩溶剂且粗产物通过半制备 RP-HPLC (20 \rightarrow 50%, 30 分钟) 直接纯化以得到 **19** (6.1 mg, 73%), 其在冻干后为无色粉末。97% 纯度; RP-HPLC (10 \rightarrow 60%) $R_t=18.1$; MS (ESI) $\text{C}_{75}\text{H}_{99}\text{N}_{15}\text{O}_{22}\text{S}_2$ 的计算值 1625.7; 实测值 1626.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1664.6 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 。

化学选择性 1,3-偶极环化加成。“点击(click)”化学)。合成 DOTA-Tyr³-octreotate 衍生物 24。

在室温向 **3** (3.1 mg, 4.1 μmol , 1.0 当量) 在 THF (0.2 mL) 中的溶液中添加 LiOH (0.33 mg, 14 μmol , 3.4 当量) 在 H_2O (30 μL) 中的溶液, 且将混合物搅拌 18 小时。随后, 添加 H_2O (0.2 mL)、肽 **25** (5.5 mg, 4.1 μmol , 1.0 当量)、0.1M CuSO_4 水溶液 (49 μL , 4.9 μmol , 1.2 当量) 和铜粉 (10 mg), 并将混合物搅拌 18 小时。此后, 过滤掉铜粉, 减压去除溶剂, 通过用 TFA/TIPS/ H_2O (95:5:5, v/v; 1 mL) 混合物处理 2 小时裂解叔丁酯。再次去除溶剂且将残余物溶于 THF/ H_2O (1:1, v/v, 1 mL), 通过加入 Na_2S ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 12 mg, 49 μmol , 12.0 当量) 沉淀铜盐。过滤混合物且将粗产物通过半制备 RP-HPLC (20 \rightarrow 50%, 30 min) 直接纯化得到直链 **24** (3.0 mg, 37%), 其在冻干后为无色粉末。该直链肽通过在 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1:0.1, 4 mL) 中搅拌 48 小时以定量的产率再环化。从 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2, v/v, 10 mL, pH 1-3 (TFA)) 蒸发和冻干后, 分离出白色粉末的 **24** (3.0 mg, 相对于 **25** 为 37%)。97% 纯度; RP-HPLC (10 \rightarrow 60%) $R_t=16.1$; MS (ESI) $\text{C}_{80}\text{H}_{106}\text{N}_{18}\text{O}_{22}\text{S}_2$ 的计算值 1734.7; 实测值 868.8 $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$, 1735.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

⁶⁸Ga-标记 19.

将 ⁶⁸GaCl₃ 用 0.1 N HCl 从自用的“OBNINSK” ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-发生器(1.48 GBq; Chemotrade Chemiehandelsgesellschaft mbH, Leipzig, Germany)洗脱。为了 ⁶⁸Ga-标记, 将发生器洗脱液首先真空浓缩至终体积为约 200 μL。尽管一般不进行, 但需要该浓缩步骤以能够充分利用该实验研究使用的旧发生器提供的相对低的 ⁶⁸Ga-活性物(⁶⁸Ga-activity)。然后 ⁶⁸Ga-活性物用 230 μL 的 0.1 N NaOAc (pH = 4.5) 稀释并通过加入 80 μL 1N NaOH 缓冲至 pH 3.5。添加 2.2 μL 0.7 mM 肽 19 储备液(相当于 1.5 nmol (3 μg) 肽)后, 将反应混合物加热至 95°C 保持 15 分钟。冷却至室温后, 反应混合物用 2 mL 水稀释。为去除未反应的 ⁶⁸Ga-活性物, 标记的肽 [⁶⁸Ga]19 固定在 Sep-Pak C-18 柱上, 用 10 mL 水洗涤并用 2 mL 乙醇洗脱。为得到用于注射小鼠的不含乙醇的溶液, 随后将溶剂真空蒸发且将产物再溶于 2 mL PBS 至最终活性物浓度为 38 μCi/100 μL。用于质量控制的分析 HPLC 在 Nucleosil 100 C18 (5 μm, 125 x 4.0 mm) 柱上进行, 使用 Sykam 梯度 HPLC 体系 (Sykam GmbH, Fürstfeldbruck, Germany) 和 UVIS 200 光度计 (LinearTM Instrument Cooperation, Reno, USA)。为测量放射性, 将 UV-光度计的出口与 Na(Tl) 井型闪烁计数器 Ace MateTM 925-Scint (EG&G Ortec, München, Germany) 连接。使用的洗脱液为 H₂O (0.1% TFA; 溶剂 A) 和 CH₃CN (0.1% TFA; 溶剂 B), 且梯度为: 0-2 分钟, 0% B; 2-9 分钟, 0-40% B; 9-15 分钟, 40% B。以恒定流速 1 mL/分钟洗脱肽。UV 检测波长为 220 nm。R_t ([⁶⁸Ga]19) = 15.3 分钟; K' = 8.13。

动物实验。 由于其高 sst₂-生长抑素受体表达, 使用大鼠胰腺肿瘤细胞株 AR42J 作为肿瘤模型⁵⁵。为建立肿瘤生长模型, 使用 1 mM EDTA 的 PBS 溶液将细胞从培养瓶表面分离, 离心且重悬于不含血清的培养基 (RPMI-1640, Biochrom, Berlin, Germany) 中。细胞混悬液的浓度为 3.7 x 10⁶ 细胞/100 μL 血清。将 100 μL 细胞悬浮液皮下注射于裸小鼠 (雌性, 6-8 周) 侧腹。肿瘤移植 10 天后, 所有小鼠显示实体可触及的肿瘤块 (肿瘤重量 0.7-1.4 g) 并用于实验。

为生物分布研究, 将 38 μCi [⁶⁸Ga]19 (相应于 0.15 μg 肽) 在 100 μL PBS 中的溶液静脉内注射于小鼠尾静脉。通过共注射过量的冷竞争剂 (20 μg Tyr³-

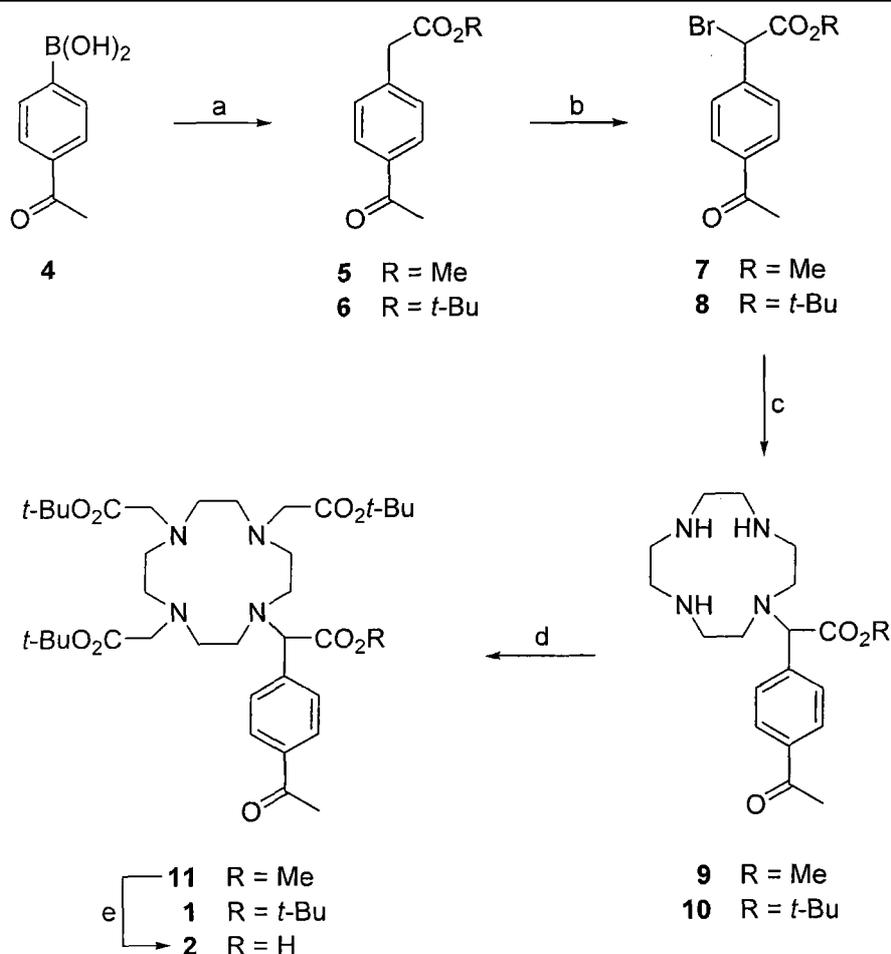
奥曲肽(octreotide)/小鼠)测定放射性配体的非特异性组织蓄积。在放射性配体注射后的不同时间点(腹腔注射后 30 和 60 分钟),小鼠(每时间点 $n=5$; $n=3$ 用于阻断研究,在腹腔注射 60 分钟)被处死和解剖。移除感兴趣的器官,称重并在 γ -计数器(Wallach, Turku, Finland)中计数。数据表示为每克组织的百分注射剂量(%iD/g)。

结果

开发羰基-取代的 DOTA 衍生物,其用于经脒连接(oxime ligation)化学选择性连接至氨基氧基-官能化的肽。

计划好我们的合成方案后,我们决定将羰基官能团连接至 DOTA 部分,因为氨基氧基可容易的作为叔丁基氧基羰基-保护的氨基氧基-官能化的氨基酸构建单位(building block)加入肽中。作为羰基官能团,甲基酮比醛优选,因为甲基酮具有明显高的稳定性。该过程避免其它的保护和脱保护步骤,而这对于使用醛时是必不可少的,且使得最终化合物容易保存更长的时间。而且,我们的想法是拓宽我们的新 DOTA 衍生物的潜在应用。尽管过去主要集中于可选择性形成单缀合物的衍生物,新 DOTA 衍生物的开发提供两个不同的官能团,其可选择性转化,从而提供新的机会,例如,选择性合成均-和杂寡聚物⁴¹或连接其它基团如糖,这已显示导致改善的药物动力学⁴²。因此我们开发了两种不同保护基方案: i) 用一个碱不稳定的保护基的正交保护,其使得选择性脱保护和衍生化一个羧基,和 ii) 用提供一步脱保护的酸不稳定的基团的完全保护,其中仅需要单缀合。

我们的合成开始于 4-乙酰基苯基硼酸 (4),其分别与 2-溴乙酸甲酯和 2-溴乙酸叔丁酯反应,以 Suzuki-型交叉偶联反应以良好产率形成相应的 2-(4-乙酰基苯基)取代的乙酸酯 5 和 6 (流程 1)⁴³。



流程 1. 合成羧基-取代的 DOTA 衍生物 1 和 2^a。

^a 试剂和条件: (a) BrCH₂CO₂R, Pd(OAc)₂/P(o-Tol)₃, K₂CO₃, THF/H₂O, 18 小时; 5: 66%, 6: 63%; (b) NBS, Br₂, hv, CCl₄, 1 小时; 7: 89%, 8: 88%; (c) 1,4,7,10-四氮杂环十二烷, K₂CO₃, DMF, 10 小时; 9: 62%, 10: 75%; (d) BrCH₂CO₂t-Bu K₂CO₃, DMF, 4 小时; 11: 83%, 1: 72%; (e) LiOH, THF/H₂O, 18 小时; 38% (66%相对于回收的 11)。

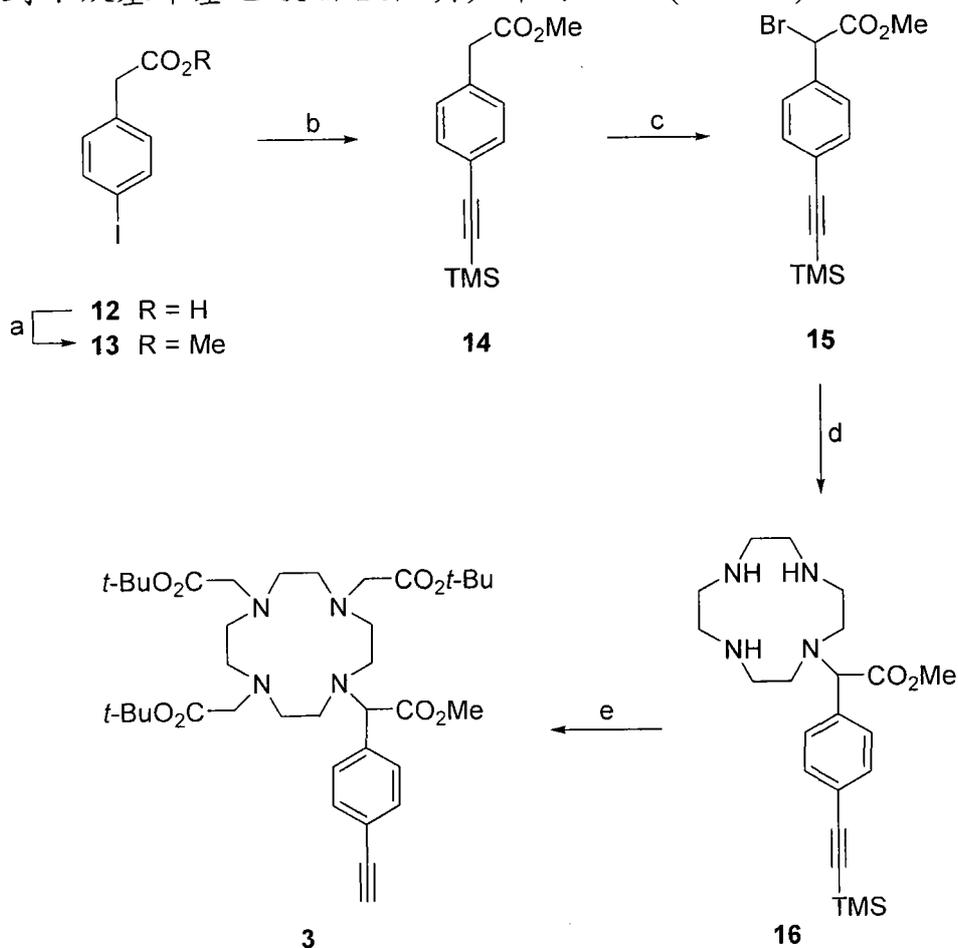
在基本(radical)条件下, 在催化量的溴存在下, 使用 N-溴琥珀酰亚胺并通过光照引发的 α-溴化得到高产率的 α-溴代酯 7 和 8 (分别为 89%和 88%)。在 K₂CO₃ 存在下, 将化合物 7 和 8 缓慢添加至 1,4,7,10-四氮杂环十二烷在 DMF 中的溶液中以得到产率为 62%和 75%的相应的单烷基化的 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-加合物 9 和 10。随后用 2-溴乙酸叔丁酯全烷基化得到四酯 11 和 1 (产率分别为 83%和 72%)。令我们吃惊的是, 在使用 LiOH 皂化甲酯 11 的过程中, 观察到叔丁酯的部分脱保护。然而, 因为该副反应比主要反应进行的慢, 如果该反应在约 50%转化停止以防止产物进一步裂解时, 所需的游离酸 2 可获得良好产率。在这种方式, HPLC 纯化后获得的 2 的产率为

38%(66%, 基于回收的 **11**)。尝试使用 LiI 的皂化导致不可分离的几种产物的混合物, 且当使用碳酸盐(carbonate)时, 没有发生皂化。

开发炔烃-取代的 DOTA 衍生物, 其用于通过 Huisgen 1,3-偶极环化加成化学选择性与叠氮基官能化的肽连接。

在能通过 Huisgen 环加成^{18,19}连接至肽的合适的 DOTA 衍生物的设计中, 我们决定将炔烃官能团与 DOTA 衍生物相连, 例如通过引入叠氮基⁴⁴⁻⁴⁶或通过固相上重氮基-转移⁴⁷, 结果得到叠氮基官能化的肽。在我们得到合成羰基-取代的衍生物的可靠经验后, 我们再次选择 2-溴-2-苯基乙酸作为核心残基用于补充炔烃, 从而实现如上所述的类似合成途径。

首先将商业可得的 4-碘苯基乙酸(**12**)保护为甲酯 **13** (93%产率), 然后使用 Pd(PPh₃)₄/CuI 作为催化剂与三甲基甲硅烷基-乙炔经 Sonogashira 偶联, 得到 4-炔基苯基乙酸酯 **14**, 其产率为 93% (流程 2)。



流程 2. 合成炔烃-官能化的 DOTA 衍生物^a。

^a 试剂和条件: (a) SOCl₂, MeOH, 1 小时; 93%; (b) HC≡C-TMS,

Pd(PPh₃)₄/CuI, NEt₃, CH₃CN, 3 小时; 93%; (c) 1) LDA, THF, 1 小时; 2) NBS, THF, 18 小时; 47% (92%相当于回收的 14); (d) 1,4,7,10-四氮杂环十二烷, K₂CO₃, DMF, 10 小时; 53%; (e) 1) BrCH₂CO₂t-Bu K₂CO₃, DMF, 4 小时; 2) TBAF; THF, 15 分钟; 85%。

不幸的是, 在如上所述对于 7 和 8 的基本条件下, 在 NBS 和 Br₂/hv 作为引发剂时, 14 的 α-溴化都失败了。这很可能是由于三键的存在引起的副反应。因此, 我们通过以亲电方式引入溴化物而克服该问题。出于该目的, 我们按 Evans 等人⁴⁸所述类似的方式将酯 14 转化为烯醇化硼, 随后用 LDA 和 Bu₂BOTf 处理, 然后添加 NBS 作为亲电溴化试剂。然而, α-溴代酯 15 的产率非常低(39%)。为了进一步优化该反应, 我们发现如果用 LDA 脱质子化得到的 14 的烯醇化锂直接与 NBS 反应, 该转化进行的非常完全。以这种方式, 15 可以 47%产率得到, 而未反应的 14 以 49%产率回收。该结果可通过以下解释, 即 α-溴代酯 15 比 14 具有更高的酸性, 其导致在反应过程中用 1 当量的 14 的烯醇化锂所形成的产物快速脱质子化。我们不能进一步增加该产率, 即使该烯醇化物中添加大量过量的 NBS。然而, 基于回收的原料 14, 该产率几乎为定量的。用 α-溴代酯 15 将 1,4,7,10-四氮杂环十二烷单烷基化按与上述类似方式进行, 得到 16, 产率为 53%。随后, 用 2-溴乙酸叔丁酯全烷基化并使用 TBAF 裂解 TMS 保护基, 得到四酯 3 (85%产率, 经两步)。在 2 的合成中, 我们也选择性尝试皂化 3 中的甲酯。但令我们非常惊奇的是, 在 1 当量的 LiOH 存在下, 3 中叔丁酯的裂解进行的甚至更快, 并且我们发现具有叔丁酯和甲酯之一的相应化合物裂解为主要产物。在一个叔丁基都没有的区域异构体中仅能检测到少量所需产物。

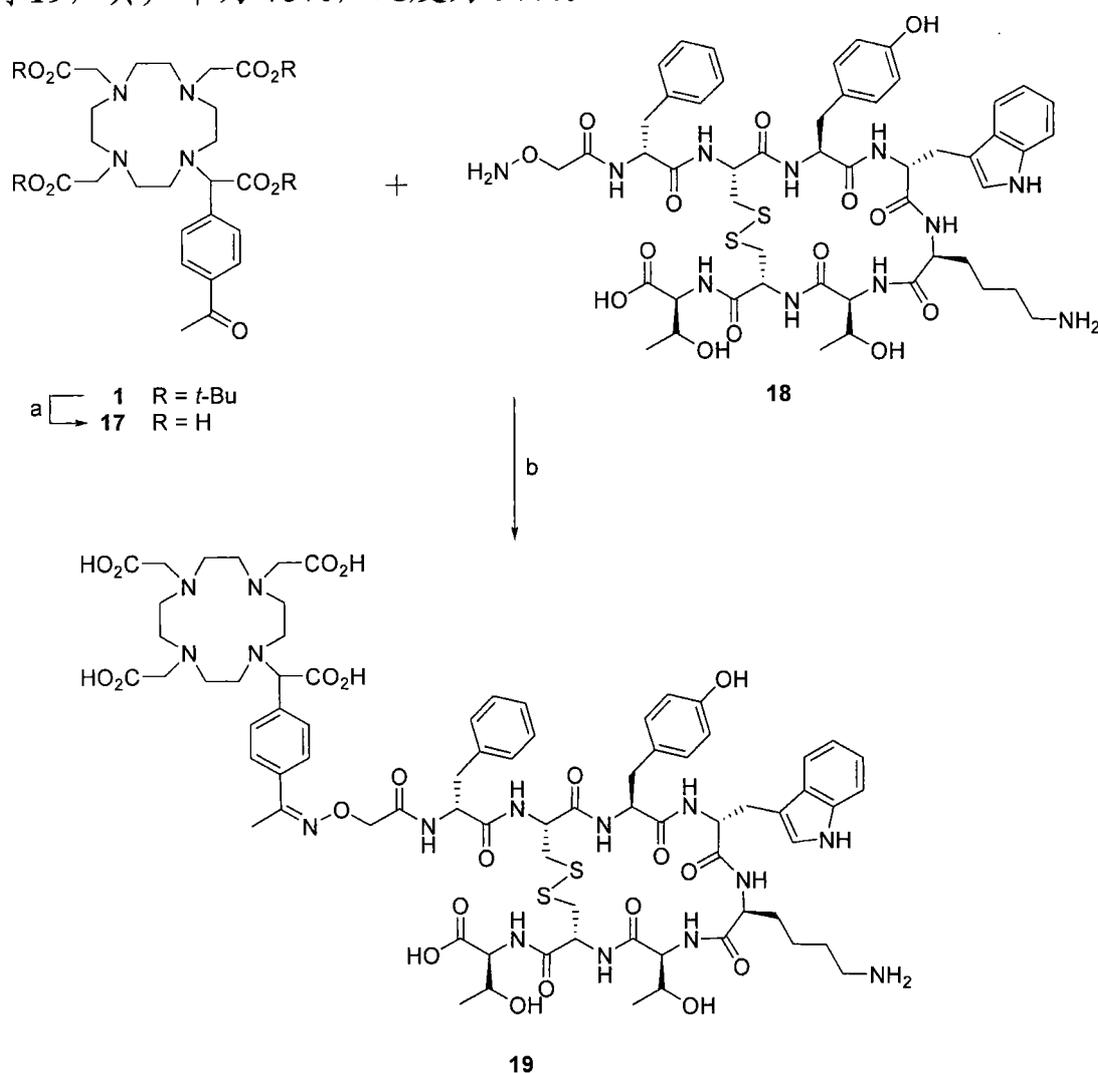
使用 DOTA 酮衍生物 1 通过肟连接化学选择性合成

DOTA-Tyr³-octreotate 缀合物 19。

对这些手头的新的官能化的螯合剂, 我们仔细检查了与 N-末端氨基氧基的化学选择性连接以及基于 Tyr³-octreotate 的炔烃官能化的生长抑素类似物。

在我们最初的实验中, 该叔丁基保护的 DOTA 酮 1 直接用于肟连接, 但尽管该反应进行非常完全, 所得缀合物的肟键在完全脱保护叔丁基所需的强酸性条件下不稳定。因此我们必须在络合物形成之前原位脱保护 1。使用

相对温和的方法(甲酸⁴⁹或50% TFA/H₂O)脱保护没有成功,而使用TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v)混合物⁵⁰-Fmoc肽化学中使用的标准脱保护混合物—导致**1**中的酮还原。当用10N HCl水溶液/二噁烷(50/50, v/v)处理时实现定量裂解(流程3)。然后所得脱保护的螯合剂**17**与等摩尔量的氨基氧基-官能化的 Tyr³-octreotate **18**在CH₃CN/H₂O混合物pH 4 (TFA)中反应以得到所需的缀合物**19**(流程3),其纯度为85%(基于HPLC分析)(图2)。应强调在出现游离氨基氧基官能团的任何反应中,需要高溶剂纯度(HPLC级)以防止与羰基官能化的杂质的副反应。终产物通过制备HPLC进一步纯化以得到**19**,其产率为73%,纯度为97%。

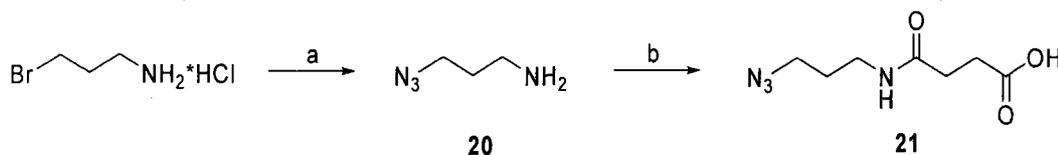


流程 3. DOTA 衍生物 **1** 和氨基氧基官能化的 Tyr³-octreotate **18** 的化学选择性肟连接反应^a。

^a 试剂和条件: (a) 10N HCl/二噁烷 (1:1, v/v), 18 小时; (b) CH₃CN/H₂O (1:1, v/v; HPLC 级) pH 4 (TFA, HPLC 级), 18 小时; 73% (两步)。

使用 DOTA 炔烃衍生物 **3** 通过 Huisgen 1,3-偶极环加成化学选择性合成 DOTA-Tyr³-octreotate 缀合物 **24**。

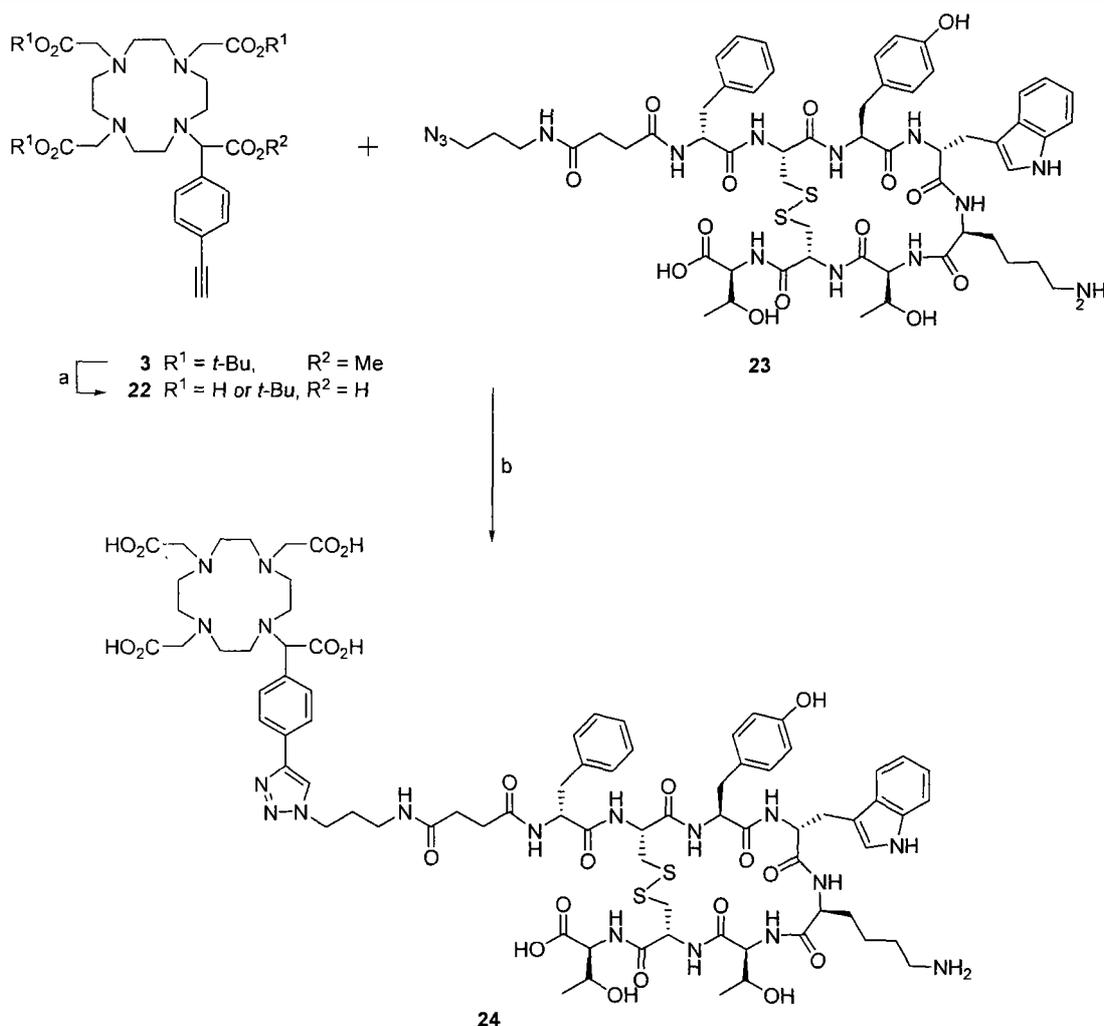
关于 Tyr³-octreotate 的叠氮化物官能化, 我们选择了简单的用 3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酸 **21** 在固体载体上 N-末端延长。因为在多种生物活性肽中, 在 BFCA 和靶向部分之间使用间隔基(spacer)非常重要, 且基于我们组早期经验 **21** 是选择的连接基。起始于 1-溴-3-氨基丙烷的 **21** 的两步合成是廉价的、高产率的、易于扩大规模且不需要任何色谱法 (流程 4)。



流程 4. 合成 3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酸 **21**^a。

^a 试剂和条件: (a) NaN₃, H₂O, 80°C, 24 小时; 84%; (b) 琥珀酸酐, NEt₃, 丙酮, 15 小时; 71%。

在环加成之前, 甲酯 **3** 原位皂化 (如上所述, 该步骤与叔丁酯的裂解一起进行) 且将所得游离酸 **22** 的混合物与叠氮基官能化的 Tyr³-octreotate **23** 在 THF/H₂O 混合物中反应, 该方法使用 Cu/CuSO₄ 作为催化剂体系 (流程 5)。然后将粗产物混合物使用 TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) 混合物⁵⁰ 直接脱保护以得到粗产物 **24** (流程 5), 其具有良好的纯度 (69%, 基于 HPLC 分析, 图 3)。然而, ESI 质谱显示获得的 **24** 为高度稳定的铜络合物, 即使使用酸性洗脱液在 HPLC 纯化过程中也证明是稳定的。尽管该铜盐可通过用硫化钠沉淀方便的去掉。该步的结果是导致分子内的二硫键断开且所述肽在 HPLC 纯化后必须再环化。以定量的产率实现环化以从 **23** 得到所需的缀合物 **24**, 其产率为 37% 且纯度为 97%。



流程 5. 化学选择性 1,3-偶极环加成 DOTA 衍生物 **3** 和叠氮基官能化的 Tyr³-octreotate **23**^a。

^a 试剂和条件: (a) LiOH, THF/H₂O, 18 小时; (b) 1) Cu/CuSO₄, THF/H₂O, 18 小时; 2) TFA/TIPS/H₂O (95:5:5, v/v), 2 小时; 3) Na₂S, THF/H₂O; 4) DMSO, NH₃, CH₃CN/H₂O, 48 小时; 37% (五步)。

为检测我们的方法,我们用叠氮基官能化的不含半胱氨酸的样品肽 3-(3-叠氮基丙基氨基甲酰基)丙酰基-Tyr-Glu-Trp-Lys(**25**, 参见支持信息)重复了该反应。以类似的方式,该环加成导致形成铜络合物,然而在该实例中,该金属离子可被去除而没有副反应。脱保护叔丁酯得到粗产物,其纯度为 76%,基于 HPLC 分析。HPLC 纯化后,得到相应缀合物 **26**,其产率为 51%。

放射性标记. 通常,⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-发生器洗脱液直接用于肽标记而不用进一步处理。然而,在该研究中,洗脱液蒸发至干,然后 ⁶⁸Ga-活性物(activity)再溶于少量体积的反应缓冲液(0.1 N NaOAc, pH 3.5)中,然后将其用于放射性金属化(radiometallation)反应。尽管发生器(generator)几乎耗尽,该过程可

减少有效的放射性金属掺入所需的肽前体的量，且因此，导致 $[^{68}\text{Ga}]\mathbf{19}$ 相当的高特异性活性（在注射至小鼠的时间点为 570 Ci/mmol）。获得的 $[^{68}\text{Ga}]\mathbf{19}$ 的放射化学产率为 55.7%。 $[^{68}\text{Ga}]\mathbf{19}$ 的放射化学纯度为 91.4%。

生物分布研究. 在带有 AR42J 肿瘤的裸小鼠中，腹腔注射后 30 和 60 分钟(30 and 60 min p.i.) $[^{68}\text{Ga}]\mathbf{19}$ 的生物分布数据示于图 4 中。在两个时间点，放射性配体的血液浓度是相当的(在腹腔注射后 30 和 60 分钟分别为 2.37 ± 0.35 和 1.71 ± 0.17 %iD/g)。而肾蓄积在观察期间快速减少(20.0 ± 2.4 至 11.9 ± 1.9 %iD/g)，表明 $[^{68}\text{Ga}]\mathbf{19}$ 的肾清除率，在其它排泄器官(即肝和肠)的示踪物蓄积仅随时间缓慢减少，这可能是由于与排泄不相关的非特异性蓄积。在表达 sst 的组织中，观察到该蓄积在肿瘤和其它 sst-阳性器官间的强差异 (divergence)。尽管在胰、肾上腺和胃中示踪物蓄积在腹腔注射后 30 至 60 分钟之间明显减少，在肿瘤中的蓄积在该期间几乎不变(在腹腔注射后 30 和 60 分钟分别为 7.73 ± 1.52 和 7.46 ± 1.30)。这种以及总体的非特异性示踪物蓄积在其它器官中的减少导致在腹腔注射后 30 至 60 分钟之间的蓄积在肿瘤/器官中的比率增加(图 5)。在肿瘤中的蓄积主要为受体介导的，这通过在竞争研究(腹腔注射后 60 分钟)中共注射过量的未标记的竞争剂($20 \mu\text{g}$ Tyr3-奥曲肽/小鼠)证明。在这些条件下，在肿瘤中的蓄积减少 2.68 ± 0.36 % iD/g。

讨论

由于能与多种二价和三价金属离子形成非常稳定的络合物，DOTA (1,4,7,10-四(羧甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷)和其衍生物成为药物中用于成像技术的一类重要的螯合剂。为方便合成螯合剂缀合的靶向生物分子，描述了带有正交保护的(orthogonally protected)羧基的不同的合适前螯合剂 (prochelator)。然而，到目前为止仅有一个报道关于合成前螯合剂，其使得在靶向分子内不通过胺或羧基官能团进行连接¹⁵。我们研发 BFCAs 的方法(其可通过脲配体或点击化学选择性连接)导致新螯合剂 **1**、**2** 和 **3** 的合成。合成中第一个关键步骤为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷的单烷基化。在文献中，有多个类似单烷基化的实例，其中使用 2⁷ 或 5⁸ 当量的 1,4,7,10-四氮杂环十二烷，且其中定量产率基于烷基化试剂的量计算。也有尝试使用金属作为保护基⁵¹。由于 1,4,7,10-四氮杂环十二烷是序列中最贵的试剂，在我们的合成中我们使用几乎等摩尔量的烷基化试剂并得到满意的产率，基于 1,4,7,10-四氮

杂环十二烷，化合物 **16**、**9** 和 **10** 的产率分别为 53、62 和 75%。尽管粗产物可直接进一步烷基化，该中间体的纯化在该阶段通过快速色谱法进行，因为从高级烷基化产物和未反应的 1,4,7,10-四氮杂环十二烷中将其分离比在后期阶段分离容易，在后期阶段所得化合物仅在烷基化乙酸酯残基的性质上有差异。还应注意，由于扩散带，1,4,7,10-四氮杂环十二烷衍生物在二氧化硅上的一般分离有时非常艰难，而通过制备 RP-HPLC 的纯化是一个良好选择。 α -溴代酯 **7**、**8** 和 **15** 的合成是简单的且产物以良好产率获得。

在 **3** 和 **11** 中的甲酯的最终皂化也导致在多种条件下叔丁酯的水解。对于 **3**，可以在约 50% 转化时停止反应以得到单一产物的 **2**。不幸的是，在炔烃衍生物 **11** 的情况下，叔丁酯的裂解进行的更快。因此，我们用游离酸 **22** 的混合物进行该化学选择性 1,2,3 三唑形成，随后通过用 TFA 处理裂解残余的叔丁基。对于点击反应^{28,29,31-36}，我们使用 1.2 当量的硫酸铜和过量的铜金属，其导致原位产生催化活性的 Cu^{I} 物质。尽管有其中仅使用 1 mol% Cu^{II} 盐的报道⁵²，我们必须使用过量的铜金属，因为事实上 1 当量的 Cu^{II} 立即通过 DOTA 衍生物 **22** 络合。然而，该文献中有太多不同过程⁵²，且对于我们的目的优化催化剂填充 (loading) 不是必需的。

使用模型肽 **25**，观察到至 1,2,3-三唑衍生物的完全转化。面对使用硫化钠以得到所述无金属化合物的必需的沉淀，以及随后 **24** 中断开的二硫键所需的再环化，对于含二硫键的靶向分子不推荐以 Tyr^3 -octreotate 的情况中使用的方式化学选择性引入螯合剂。然而，对于含靶向部分的非-半胱氨酸，我们的炔烃衍生的螯合剂提供了另一良好的选择，用于以高度化学选择性方式连接 BFCAs，正如与模型肽 **25** 的反应所证明的。最近 Lin 和同事通过 Cu^{I} 催化的 1,2,3-三唑形成已经证实了位点专一性蛋白修饰⁵³。使用该方法并使用炔烃官能化的 DOTA 衍生物 **22** 将使得位点专一性 DOTA 标记蛋白。

我们的新的甲基酮官能化的螯合剂 **17** 与未保护的 N-末端氨基氧基-官能化的 Tyr^3 -octreotate 的胍连接顺利进行且没有副产物。从而增加化学选择性缩合甲基酮和羟基胺的另一实例。然而，酮与氨基氧基的反应速率与醛相比慢很多，正如我们在竞争实验中所证明的，在该竞争实验中将 **18** 同时暴露于苯甲醛和苯乙酮，该实验仅得到苯甲醛胍。在 4 小时的反应时间后，使用等摩尔量的甲基酮 **17**，转化为约 60%，当放置过夜后转化完全。因此，我们已成功表明新的操作稳定的 DOTA 衍生物的化学选择性连接，该 DOTA

衍生物适用于氨基氧基-官能化的生物分子的连接。与最近提出的氨基氧基官能化的 DOTA-衍生物相比¹⁵, 我们的逆向方法可在肽序列的任何位置引入我们的螯合剂, 因为用于 SPPS 的合适氨基氧基官能化的构建块是商业可得的(例如 Boc-Ams(Fmoc)-OH 和 Fmoc-Dpr(Boc-Aoa)-OH)。

在带有 AR42J 肿瘤的裸小鼠中的第一次体内评价证明, 在腹腔注射后 30 和 60 分钟^{[68Ga]19} 显示特异性的和高度的肿瘤蓄积, 表明 sst-受体亲和力几乎没有受到使用的连接化学的影响。尽管在相同肿瘤模型中对于^{[68Ga]19} 的肿瘤蓄积和肿瘤与器官的比率不像那些对于“对照”配体 ^{[68Ga]DOTATOC} (DOTA-Tyr³-奥曲肽)和^{[68Ga]DOTATATE} (DOTA-Tyr³-octreotate)记载的一样高,⁵⁴ 本研究提供的基于 DOTA-偶联方法的放射金属化的 octreotate 类似物也可用于体内 sst-成像, 很可能在优化之后用于体内 sst-成像。在本文中, ^{[68Ga]19} 可作为原理证据证明 DOTA-缀合化学的一般应用, 其通过肽连接合成新的受体结合放射性肽(radiopeptide)而不损害其受体结合能力。

结论

本文所述的新的炔烃和酮官能化的 DOTA 衍生物使得可以容易且化学选择性的与多官能化的化合物缀合。而且, 据报道包含游离羧基和羰基部分的双官能衍生物是高级化合物如杂二聚物进行进一步衍生和合成的有用工具。关于我们新的修饰的螯合剂的合成, 我们研发了经济的直接的方法, 避免复杂的保护基团化学, 并考虑 BFCA 的最终应用。这使得可以极少合成步骤方便地得到标记的化合物。所述炔烃和甲基酮官能化的 DOTA 衍生物两者证明能在相应的缀合反应中与合适的 N-末端修饰的 Tyr³-octreotate 高度选择性的反应。而且, ^{[68Ga]19} 在带有 AR42J 肿瘤的裸小鼠中的药物动力学证明该化学选择性 BFC-缀合方法适合体内诊断和治疗应用的新的放射金属化的肽配体的合成。

参考文献

- (1) Camera, L.; Kinuya, S.; Garmestani, K.; Wu, C.; Brechbiel, M. W. 等人
Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* **1994**, *35*, 882-889.
- (2) Fichna, J.; Janecka, A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjug Chem* **2003**, *14*, 3-17.
- (3) Liu, S.; Edwards, D. S. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 7-34.
- (4) Heppeler, A.; Froidevaux, S.; Eberle, A. N.; Maecke, H. R. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7*, 971-994.
- (5) Milenic, D. E.; Brady, E. D.; Brechbiel, M. W. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 488-498.
- (6) Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. Rapid and high-yield solution-phase synthesis of DOTA-Tyr3-octreotide and DOTA-Tyr3-octreotate using unprotected DOTA. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 2393-2396.
- (7) Heppeler, A.; Froidevaux, S.; Mäcke, H. R.; Jermann, E.; Behe, M. 等人
Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatized somatostatin analogue with superb tumour-targeting properties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1974-1981.
- (8) Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Gabellini, M.; Recanati, P. DOTA tris(phenylmethyl) ester: a new useful synthon for the synthesis of DOTA monoamides containing acid-labile bonds. *Bioconjug Chem* **2001**, *12*, 1081-1084.
- (9) McMurry, T. J.; Brechbiel, M.; Kumar, K.; Gansow, O. A. Convenient synthesis of bifunctional tetraaza macrocycles. *Bioconjug Chem* **1992**, *3*, 108-117.

- (10) Eisenwiener, K. P.; Powell, P.; Mäcke, H. R. A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 2133-2135.
- (11) De Leon-Rodriguez, L. M.; Kovacs, Z.; Dieckmann, G. R.; Sherry, A. D. Solid-phase synthesis of DOTA-peptides. *Chemistry* **2004**, *10*, 1149-1155.
- (12) Peterson, J. J.; Pak, R. H.; Meares, C. F. Total solid-phase synthesis of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N', N'',N'''-tetraacetic acid-functionalized peptides for radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem* **1999**, *10*, 316-320.
- (13) Thumshirn, G.; Hersel, U.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD Peptides as potential tools for tumor targeting: solid phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725.
- (14) Poethko, T.; Schottelius, M.; Thumshirn, G.; Hersel, U.; Herz, M. 等人 Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: (18)F-labeled RGD and octreotide analogs. *J Nucl Med* **2004**, *45*, 892-902.
- (15) Hovinen, J. Synthesis of aminoxy-functionalized lanthanide(III) chelates for carbonyl-group conjugation. *Chemistry & Biodiversity* **2006**, *3*, 296-303.
- (16) Rose, K. Facile Synthesis of Homogeneous Artificial Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- (17) Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected Peptides as Building-Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.
- (18) Huisgen, R. Kinetics and Reaction-Mechanisms - Selected Examples from the Experience of 40 Years. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61*, 613-628.
- (19) Huisgen, R.; Knorr, R.; Mobius, L.; Szeimies, G. 1.3-Dipolare Cycloadditionen .23. Einige Beobachtungen Zur Addition Organischer Azide an Cc-Dreifachbindungen. *Chemische Berichte-Recueil* **1965**, *98*, 4014-4021.

- (20) Marceau, P.; Bure, C.; Delmas, A. F. Efficient synthesis of C-terminal modified peptide ketones for chemical ligations. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 5442-5445.
- (21) Tuchscherer, G.; Grell, D.; Mathieu, M.; Mutter, M. Extending the concept of template-assembled synthetic proteins. *J Pept Res* **1999**, *54*, 185-194.
- (22) Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 5730-5739.
- (23) Poethko, T.; Schottelius, M.; Thumshirn, G.; Herz, M.; Haubner, R. 等人 Chemoselective pre-conjugate radiohalogenation of unprotected mono- and multimeric peptides via oxime formation. *Radiochimica Acta* **2004**, *92*, 317-327.
- (24) Kurth, M.; Pelegrin, A.; Rose, K.; Offord, R. E.; Pochon, S. 等人 Site-Specific Conjugation of a Radioiodinated Phenethylamine Derivative to a Monoclonal-Antibody Results in Increased Radioactivity Localization in Tumor. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1255-1261.
- (25) Wahl, F.; Mutter, M. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6861-6864.
- (26) Canne, L. E.; Ferré-D'Amaré, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. Total Chemical Synthesis of a Unique Transcription Factor-Related Protein: cMyc-Max. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2998-3007.
- (27) Zhang, L. S.; Torgerson, T. R.; Liu, X. Y.; Timmons, S.; Colosia, A. D. 等人 Preparation of functionally active cell-permeable peptides by single-step ligation of two peptide modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 9184-9189.
- (28) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar

cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.

(29) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 2004-2021.

(30) Diaz, D. D.; Rajagopal, K.; Strable, E.; Schneider, J.; Finn, M. G. "Click" chemistry in a supramolecular environment: Stabilization of organogels by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6056-6057.

(31) Krasinski, A.; Radic, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P. 等人. In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 6686-6692.

(32) Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A. 等人. Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(i)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 3928-3932.

(33) Khanetsky, B.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. Combining Biginelli multicomponent and click chemistry: generation of 6-(1,2,3-triazol-1-yl)-dihydropyrimidone libraries. *J Comb Chem* **2004**, *6*, 884-892.

(34) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. 等人. Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 3192-3193.

(35) Sen Gupta, S.; Raja, K. S.; Kaltgrad, E.; Strable, E.; Finn, M. G. Virus-glycopolymer conjugates by copper(I) catalysis of atom transfer radical polymerization and azide-alkyne cycloaddition. *Chem Commun (Camb)* **2005**, 4315-4317.

- (36) Punna, S.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G. "Clickable" agarose for affinity chromatography. *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 1536-1541.
- (37) Van Eijck, C. H. Treatment of advanced endocrine gastroenteropancreatic tumours using radiolabelled somatostatin analogues. *Br J Surg* **2005**, *92*, 1333-1334.
- (38) Weckbecker, G.; Lewis, I.; Albert, R.; Schmid, H. A.; Hoyer, D. 等人. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 999-1017.
- (39) Froidevaux, S.; Eberle, A. N. Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy. *Biopolymers* **2002**, *66*, 161-183.
- (40) Kwekkeboom, D. J.; Mueller-Brand, J.; Paganelli, G.; Anthony, L. B.; Pauwels, S. 等人. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* **2005**, *46 Suppl 1*, 62S-66S.
- (41) Wester, H. J.; Kessler, H. Molecular targeting with peptides or peptide-polymer conjugates: just a question of size? *J Nucl Med* **2005**, *46*, 1940-1945.
- (42) Wester, H. J.; Schottelius, M.; Poethko, T.; Bruus-Jensen, K.; Schwaiger, M. Radiolabeled carbohydrate somatostatin analogs: a review of the current status. *Cancer Biother Radiopharm* **2004**, *19*, 231-244.
- (43) Gooßen, L. J. Pd-catalyzed synthesis of arylacetic acid derivatives from boronic acids. *Chem. Comm.* **2001**, 669-670.
- (44) Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11790-11791.
- (45) Lundquist, J. T.; Pelletier, J. C. Improved solid-phase peptide synthesis method utilizing alpha-azide-protected amino acids. *Organic Letters* **2001**, *3*, 781-783.

- (46) Alper, P. B.; Hung, S. C.; Wong, C. H. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6029-6032.
- (47) Rijkers, D. T. S.; van Vugt, H. H. R.; Jacobs, H. J. F.; Liskamp, R. M. J. A convenient synthesis of azido peptides by post-assembly diazo transfer on the solid phase applicable to large peptides. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3657-3660.
- (48) Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A.; Dorow, R. L. The Asymmetric-Synthesis of Alpha-Amino-Acids - Electrophilic Azidation of Chiral Imide Enolates, a Practical Approach to the Synthesis of (R)-Alpha-Azido and (S)-Alpha-Azido Carboxylic-Acids. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 4011-4030.
- (49) Chandrasekaran, S.; Kluge, A. F.; Edwards, J. A. Synthesis of Substituted Beta-Lactams by Addition of Nitromethane to 6-Oxopenicillanates and 7-Oxocephalosporanates. *Journal of Organic Chemistry* **1977**, *42*, 3972-3974.
- (50) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic-Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, *30*, 2739-2742.
- (51) Andre, J. P.; Toth, E.; Fischer, H.; Seelig, A.; Mäcke, H. R. 等人. High relaxivity for monomeric Gd(DOTA)-based MRI contrast agents, thanks to micellar self-organization. *Chemistry-a European Journal* **1999**, *5*, 2977-2983.
- (52) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 51-68.
- (53) Lin, P. C.; Ueng, S. H.; Tseng, M. C.; J.L., K.; Huang, K. T. 等人. Site-Specific Protein Modification through Cu^I-Catalyzed 1,2,3-Triazole Formation and Its Implementation in Protein Microarray Fabrication. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 4286-4290.

- (54) Froidevaux, S.; Eberle, A. N.; Christe, M.; Sumanovski, L.; Heppeler, A. 等人. Neuroendocrine tumor targeting: Study of novel gallium-labeled somatostatin radiopeptides in a rat pancreatic tumor model. *International Journal of Cancer* **2002**, *98*, 930-937.
- (55) Viguerie, N.; Tahiri-Jouti, N.; Esteve, J. P.; Clerc, P.; Logsdon, C. 等人. Functional somatostatin receptors on a rat pancreatic acinar cell line. *Am J Physiol* **1988**, *255*, G113-120.
- (56) Carboni, B.; Benalil, A.; Vaultier, M. Aliphatic Amino Azides as Key Building-Blocks for Efficient Polyamine Syntheses. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 3736-3741.
- (57) Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- (58) Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Chao, H. G.; DeSelm, R. H. [(9-Fluorenylmethyl)oxy]carbonyl (Fmoc) amino acid fluorides. Convenient new peptide coupling reagents applicable to the Fmoc/tert-butyl strategy for solution and solid-phase syntheses. *J Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.
- (59) Merrifield, B. Solid Phase Synthesis (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799-810.
- (60) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

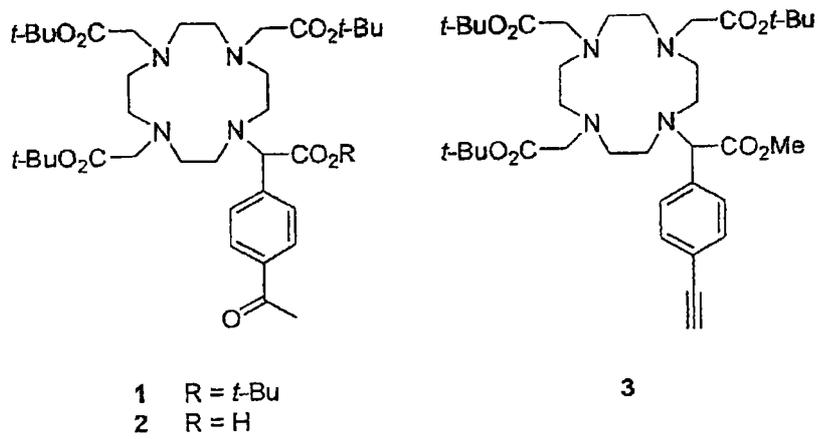


图 1

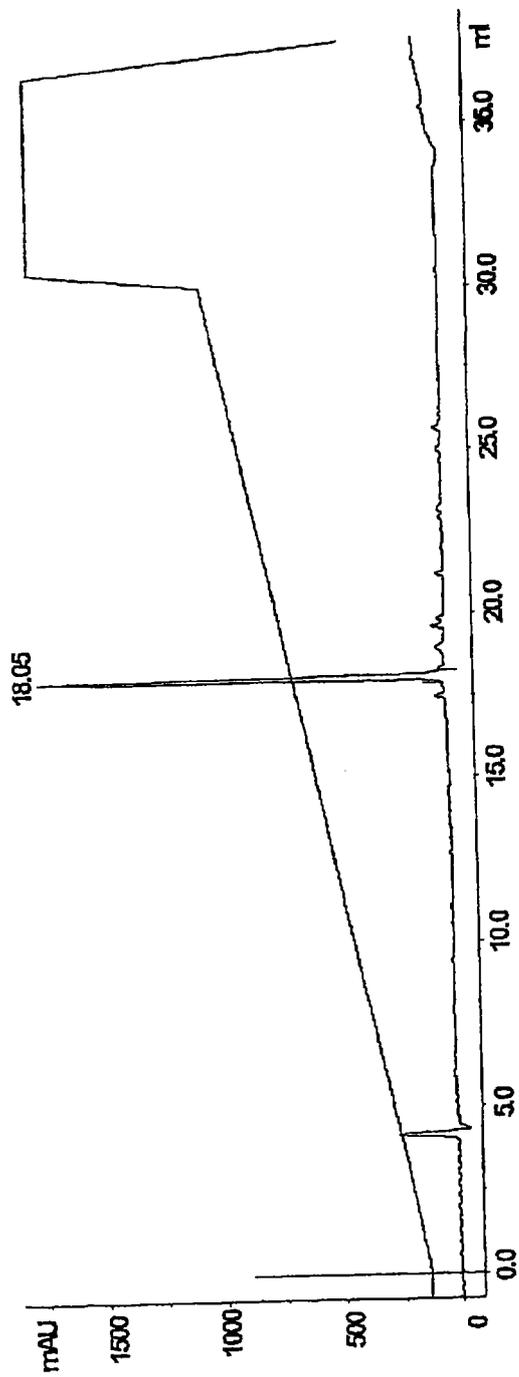


图 2

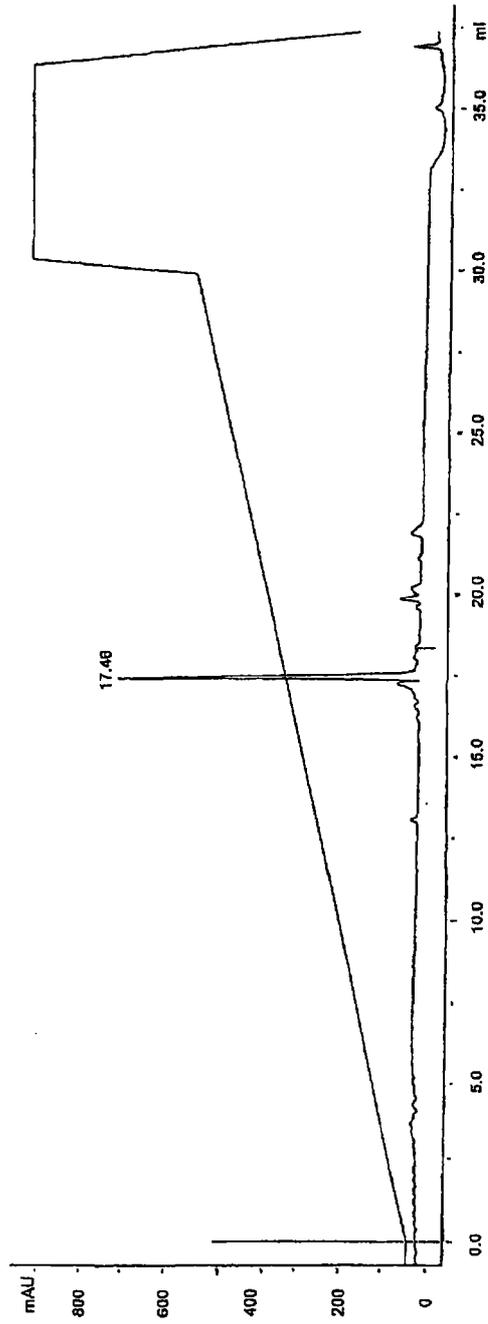


图 3

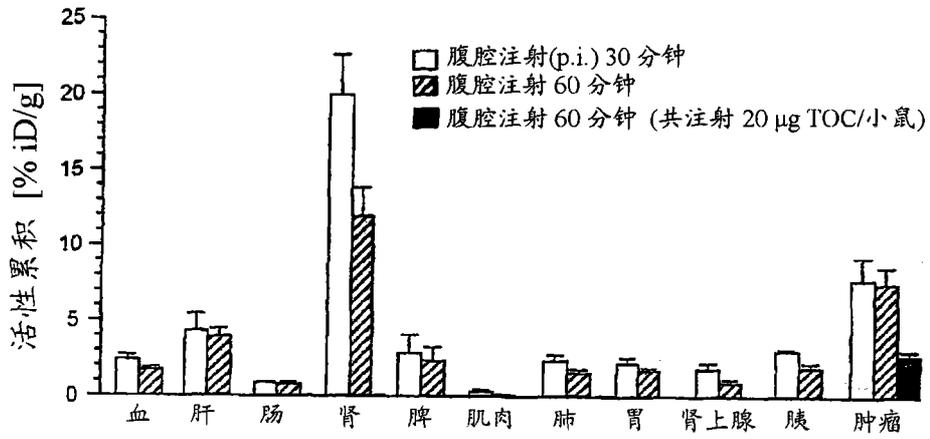


图 4

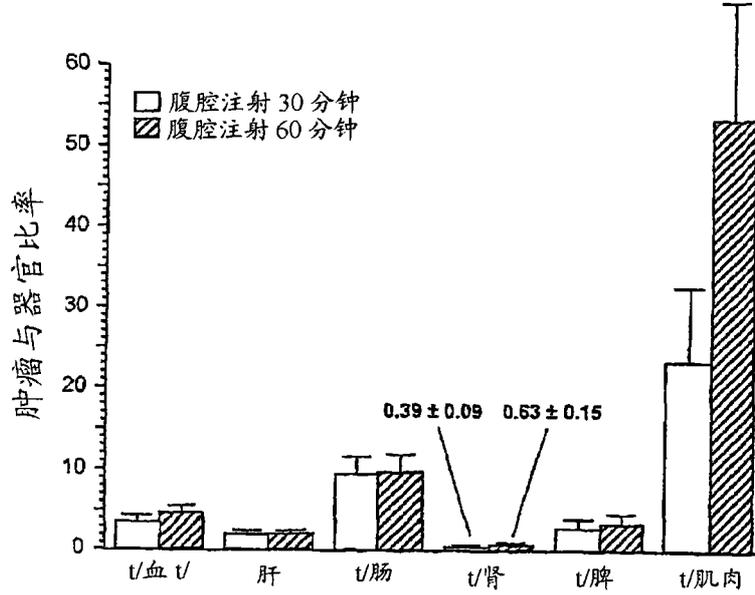


图 5

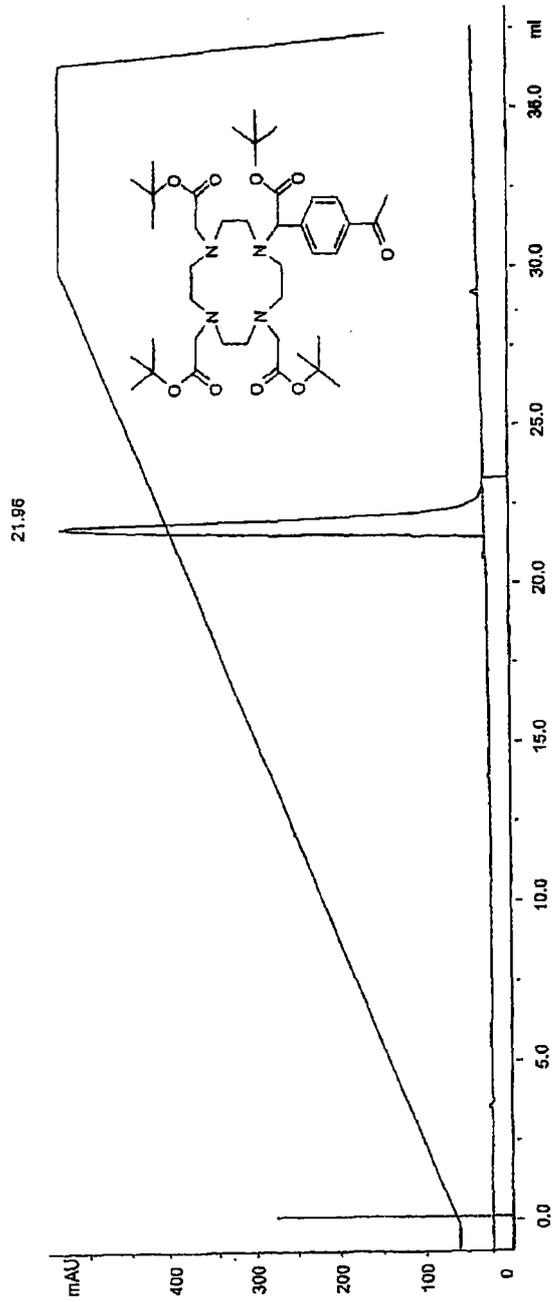


图 6

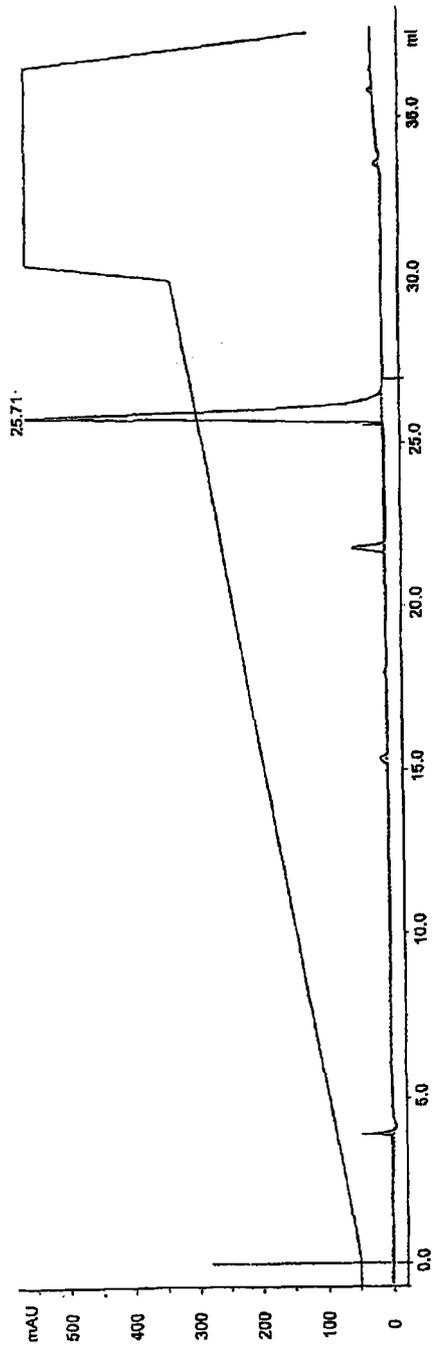


图 7

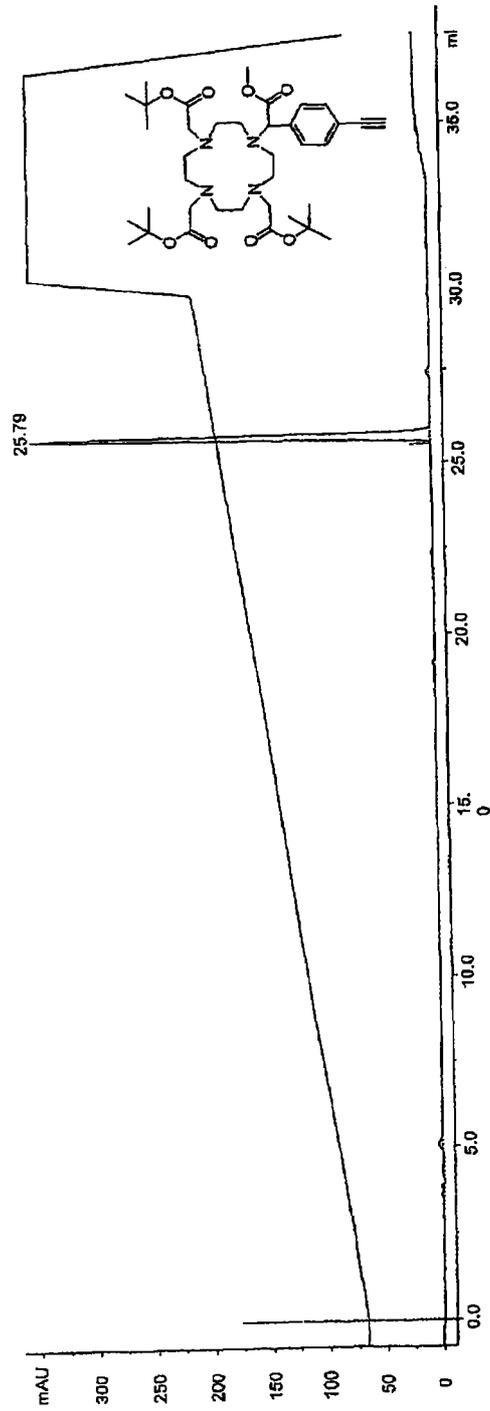


图 8

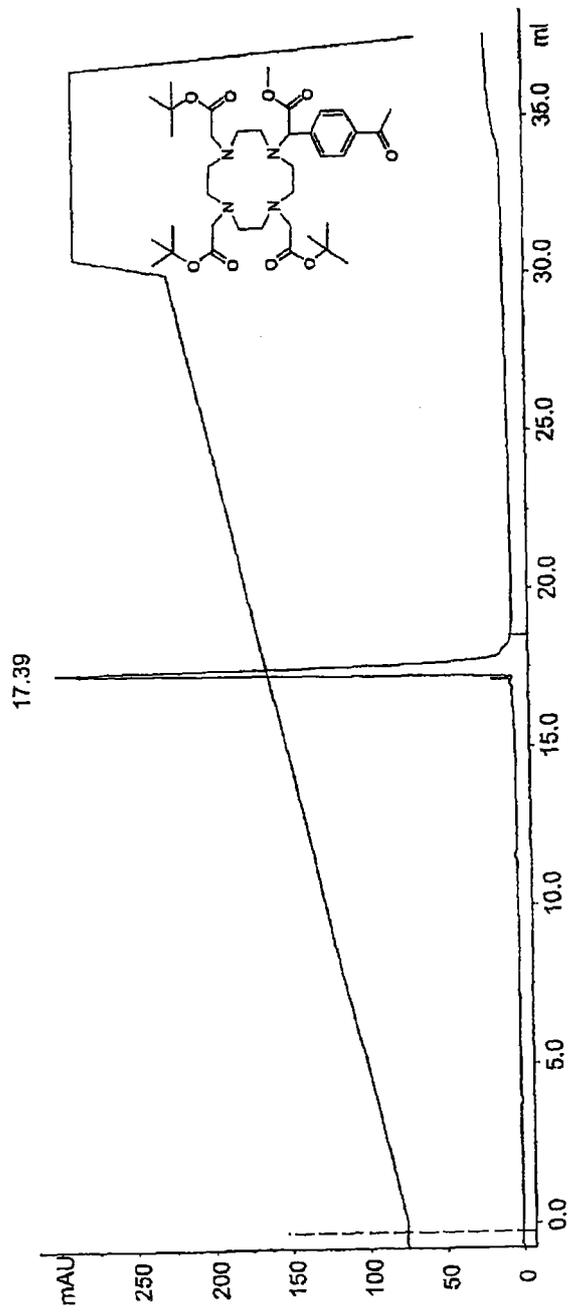


图 9

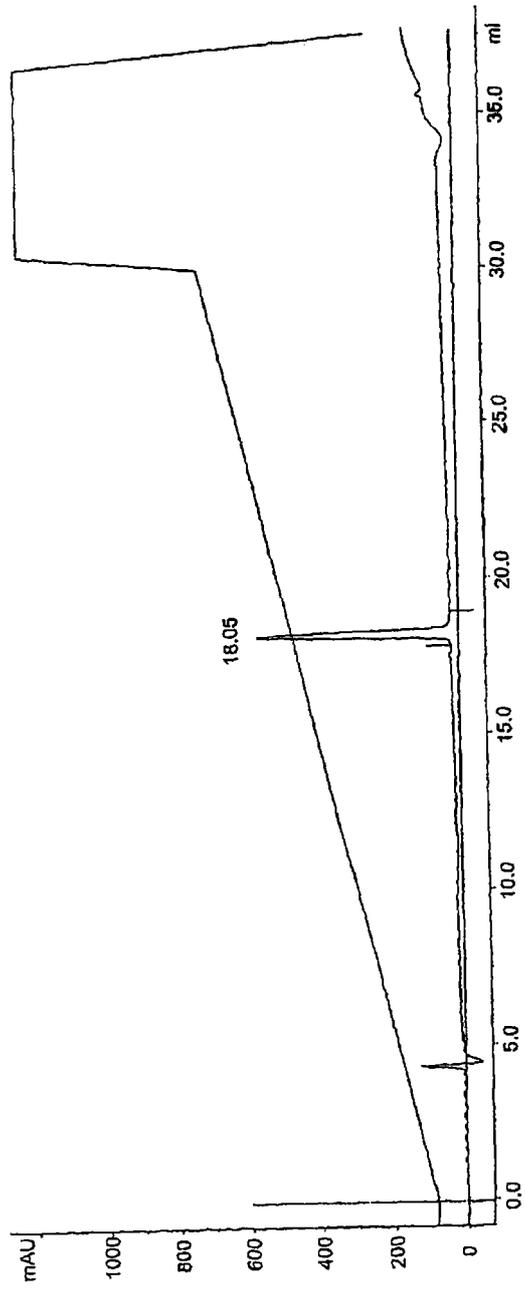


图 10

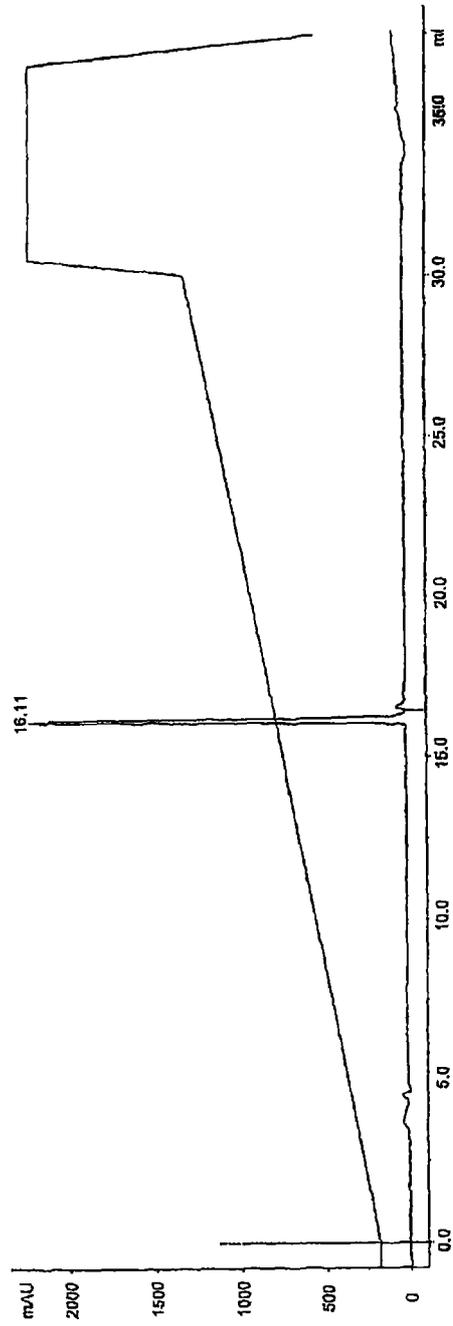


图 11

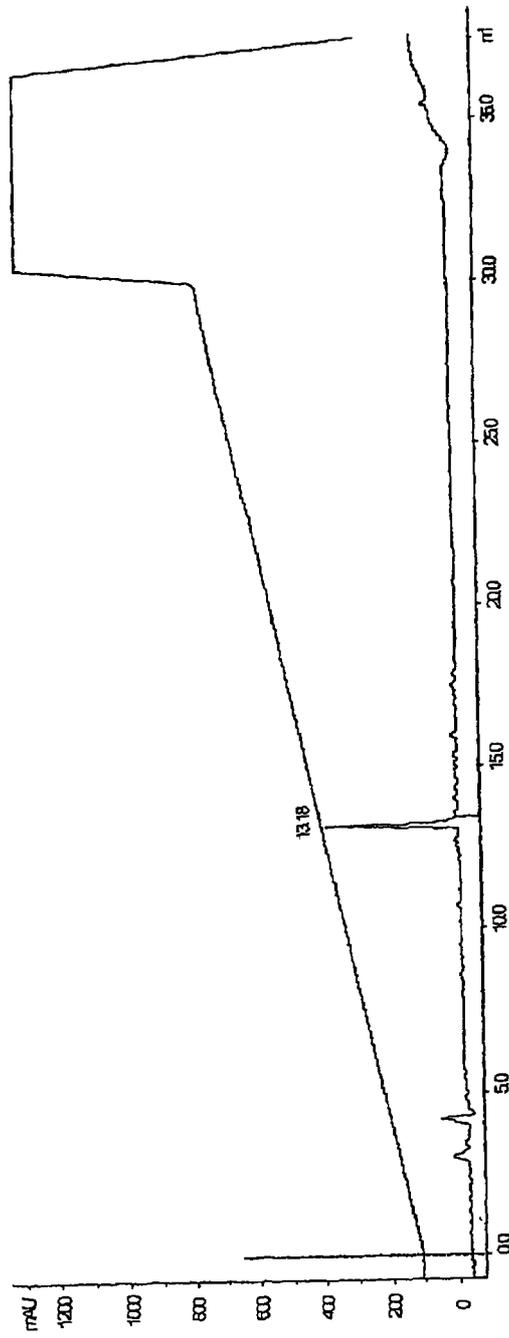


图 12

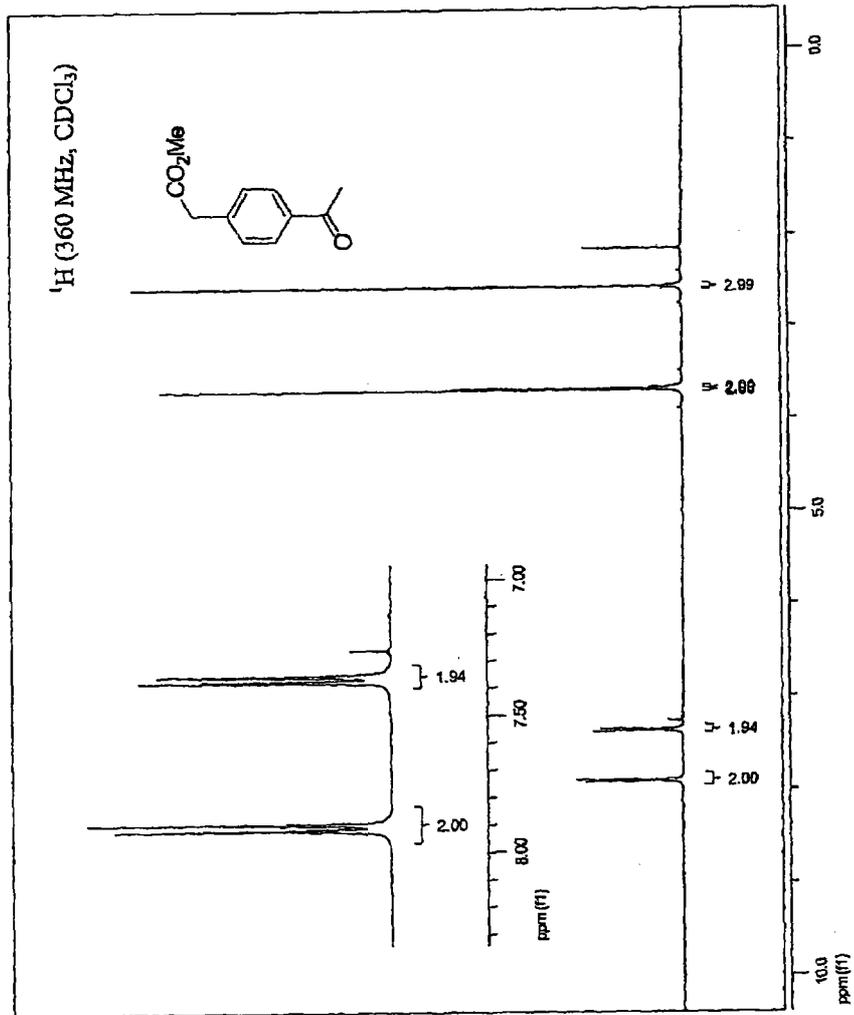


图 13a

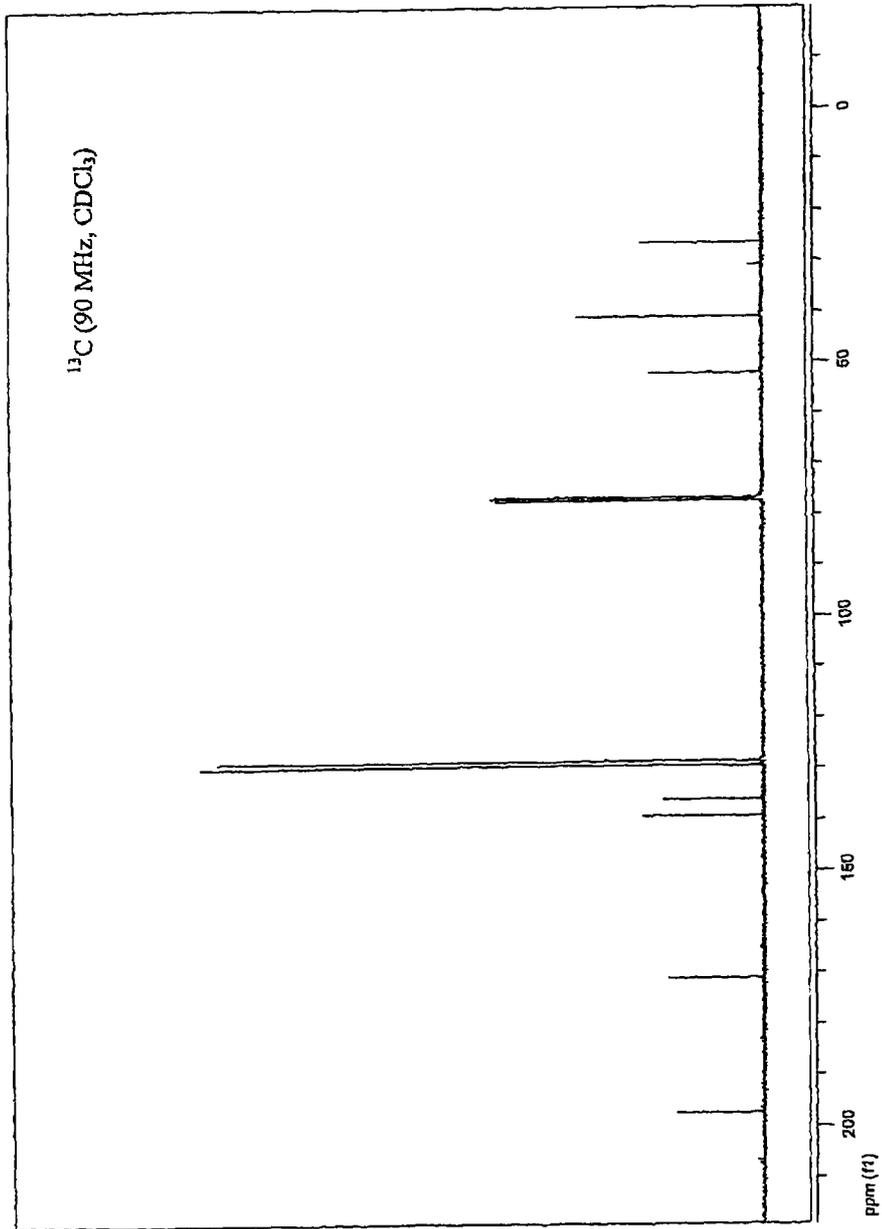


图 13b

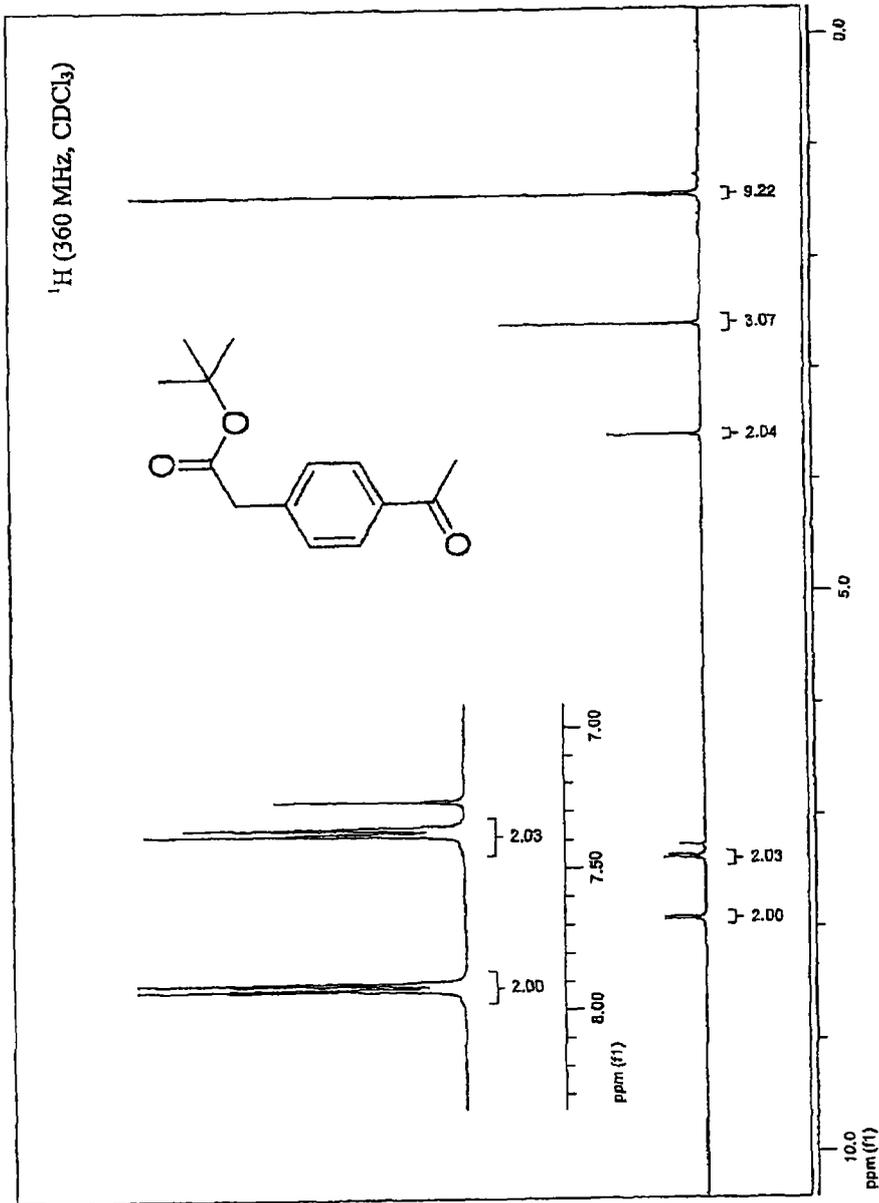


图 14a

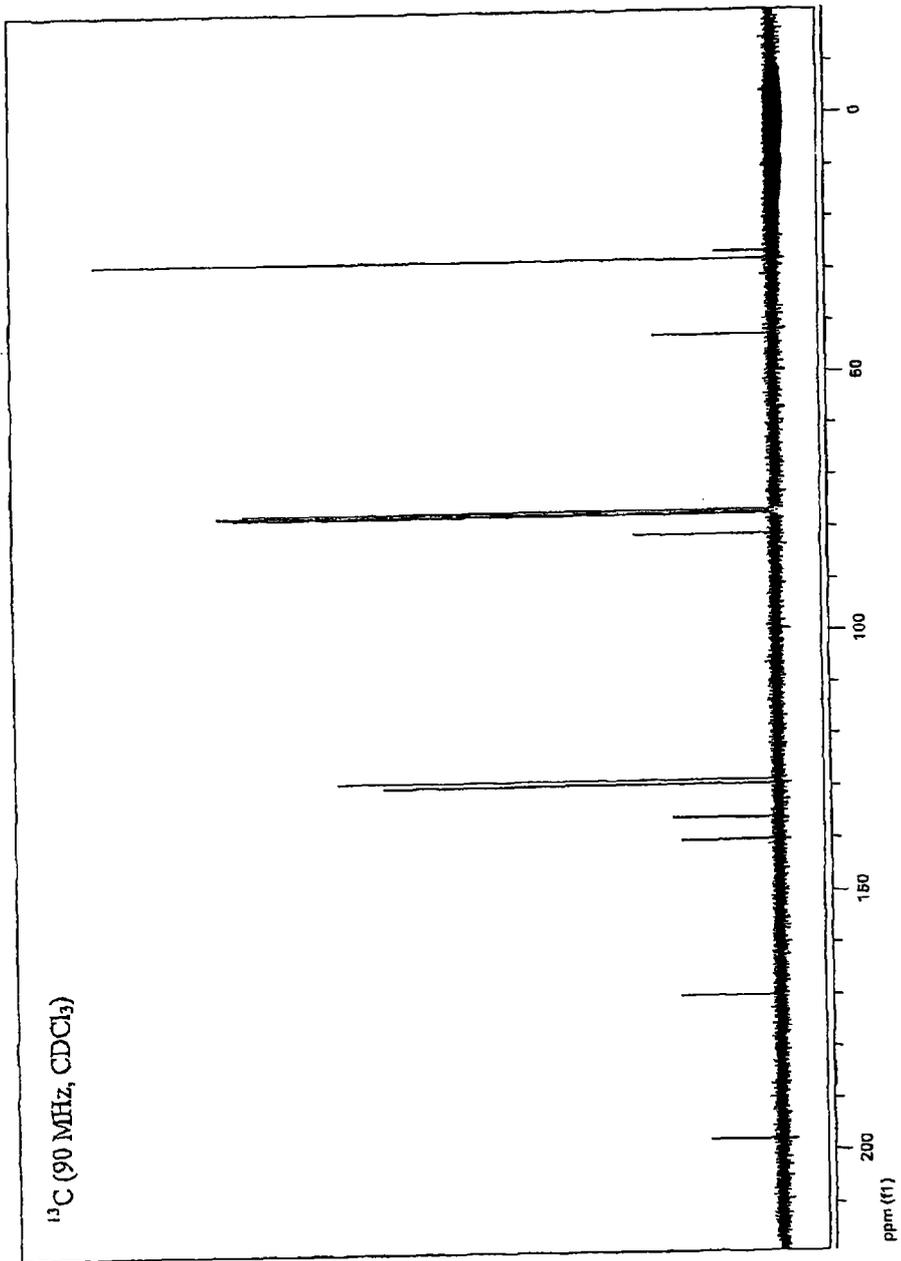


图 14b

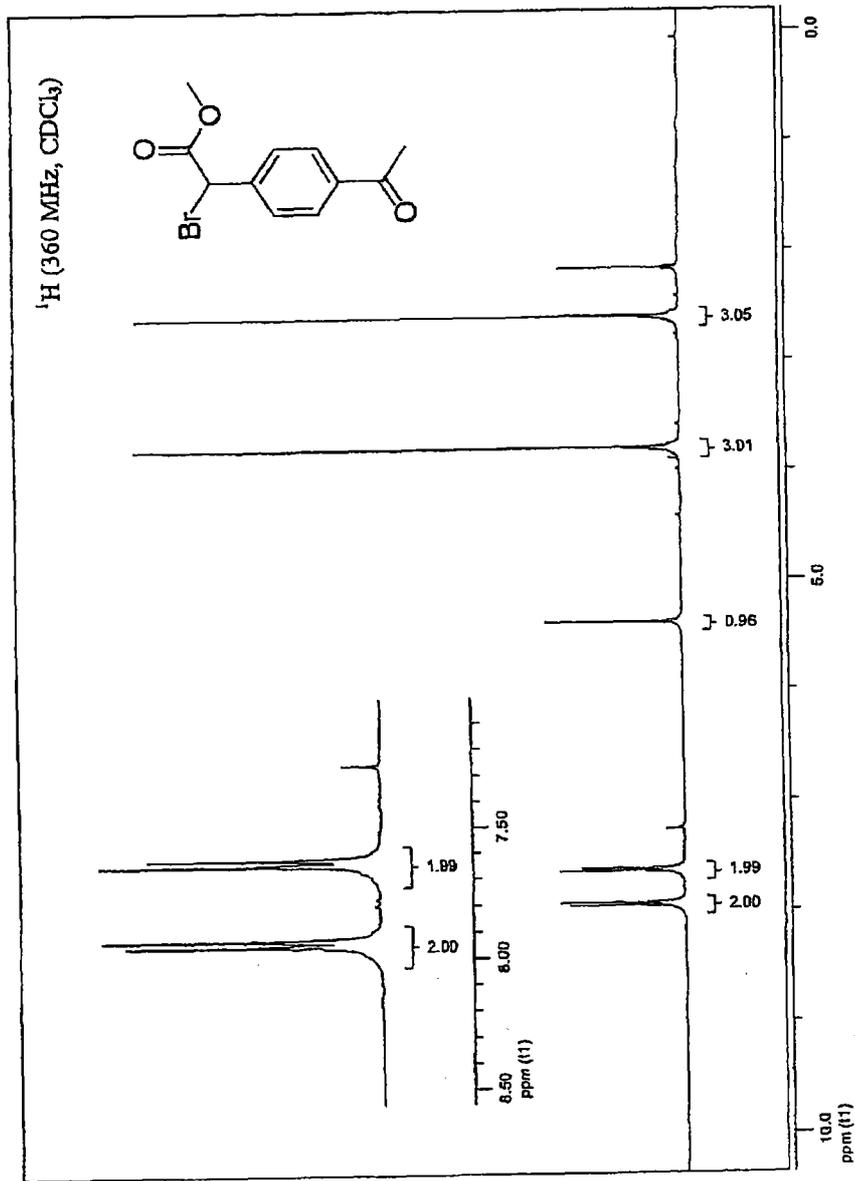


图 15a

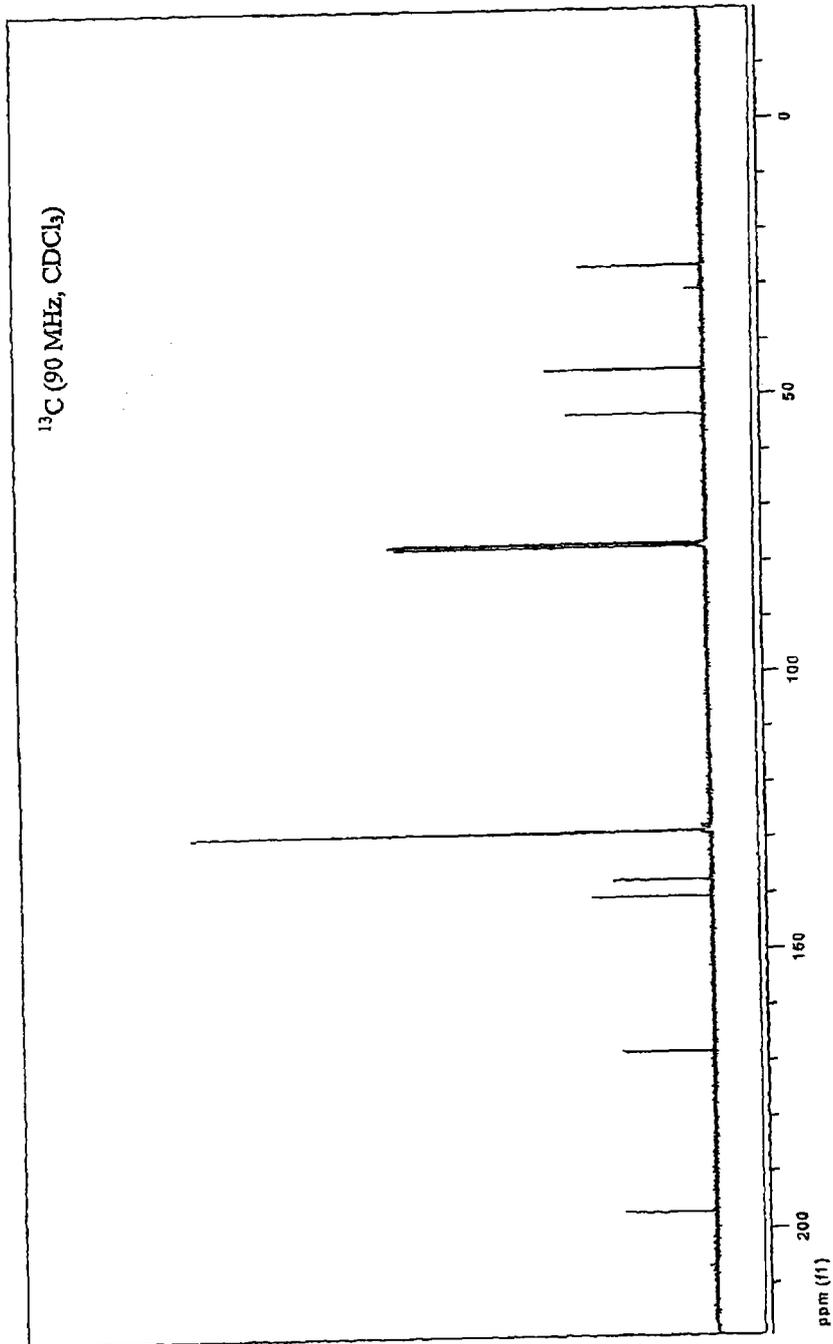


图 15b

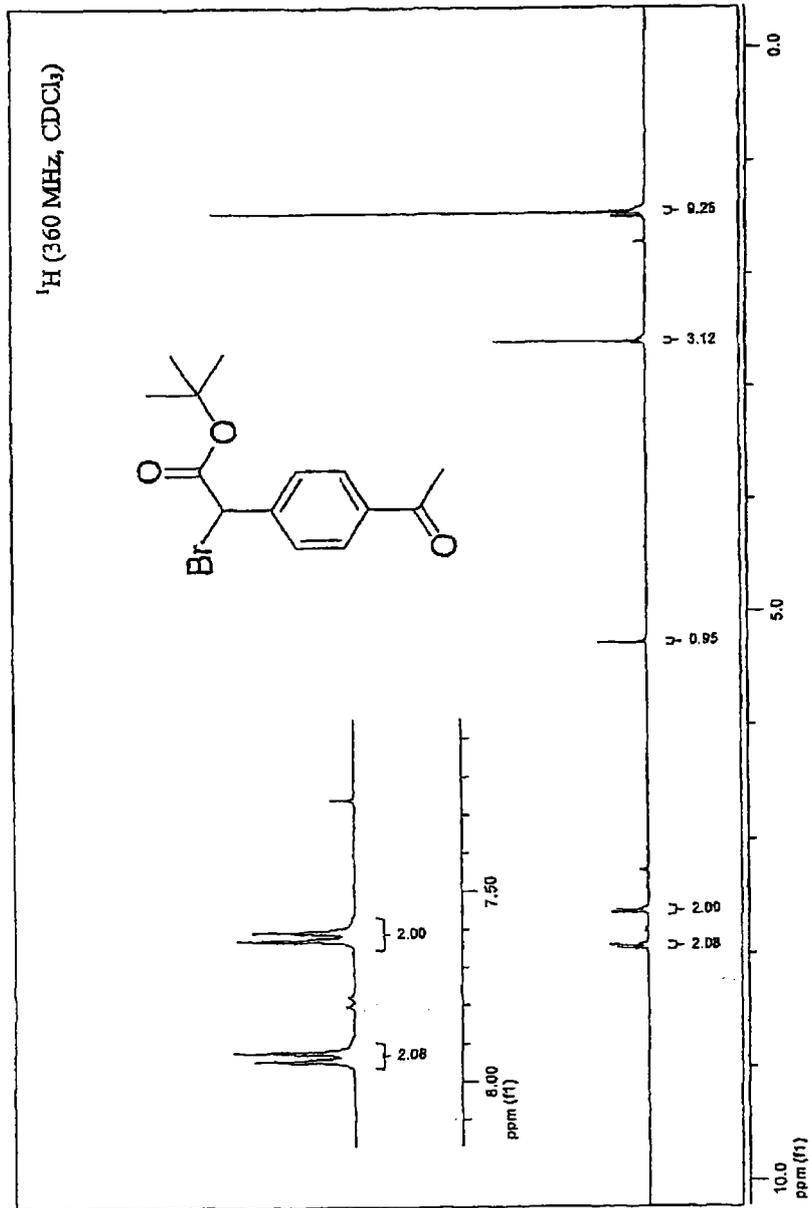


图 16a

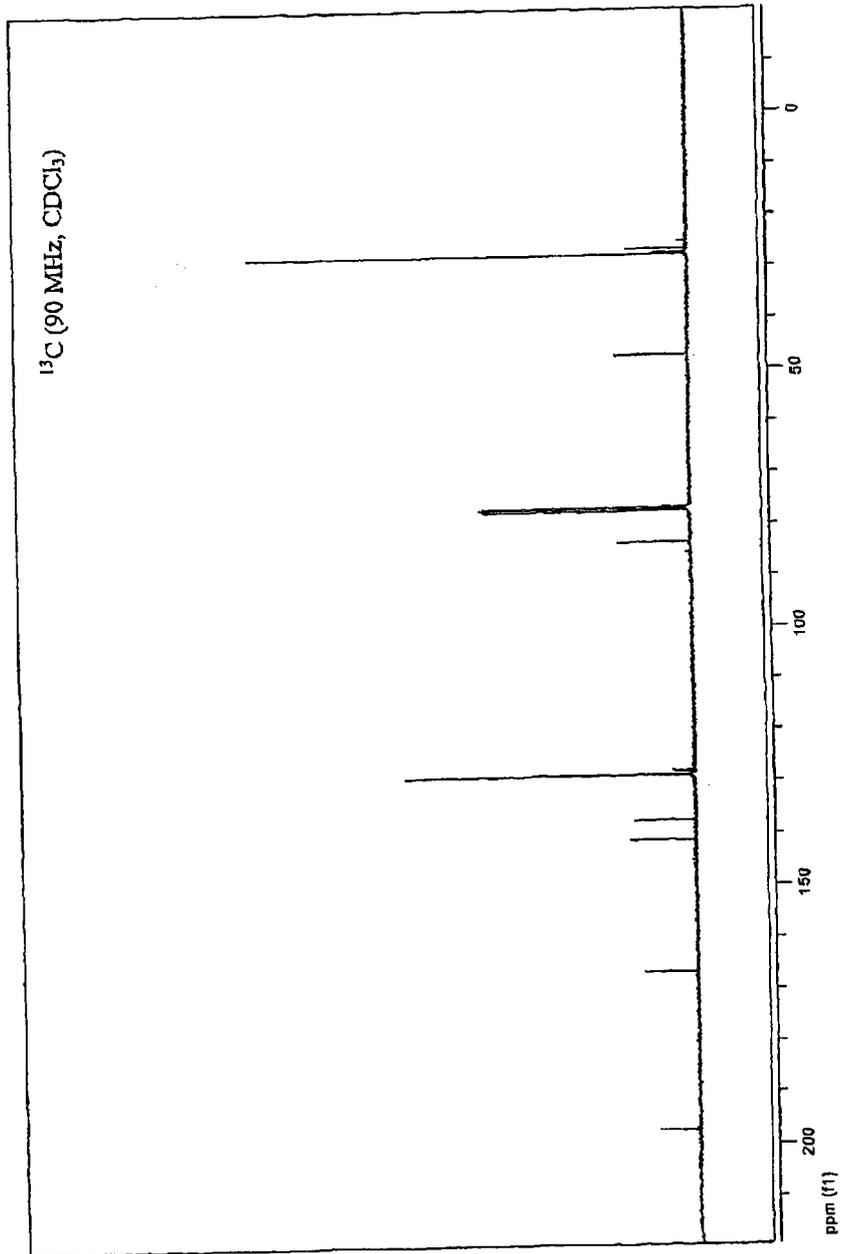


图 16b

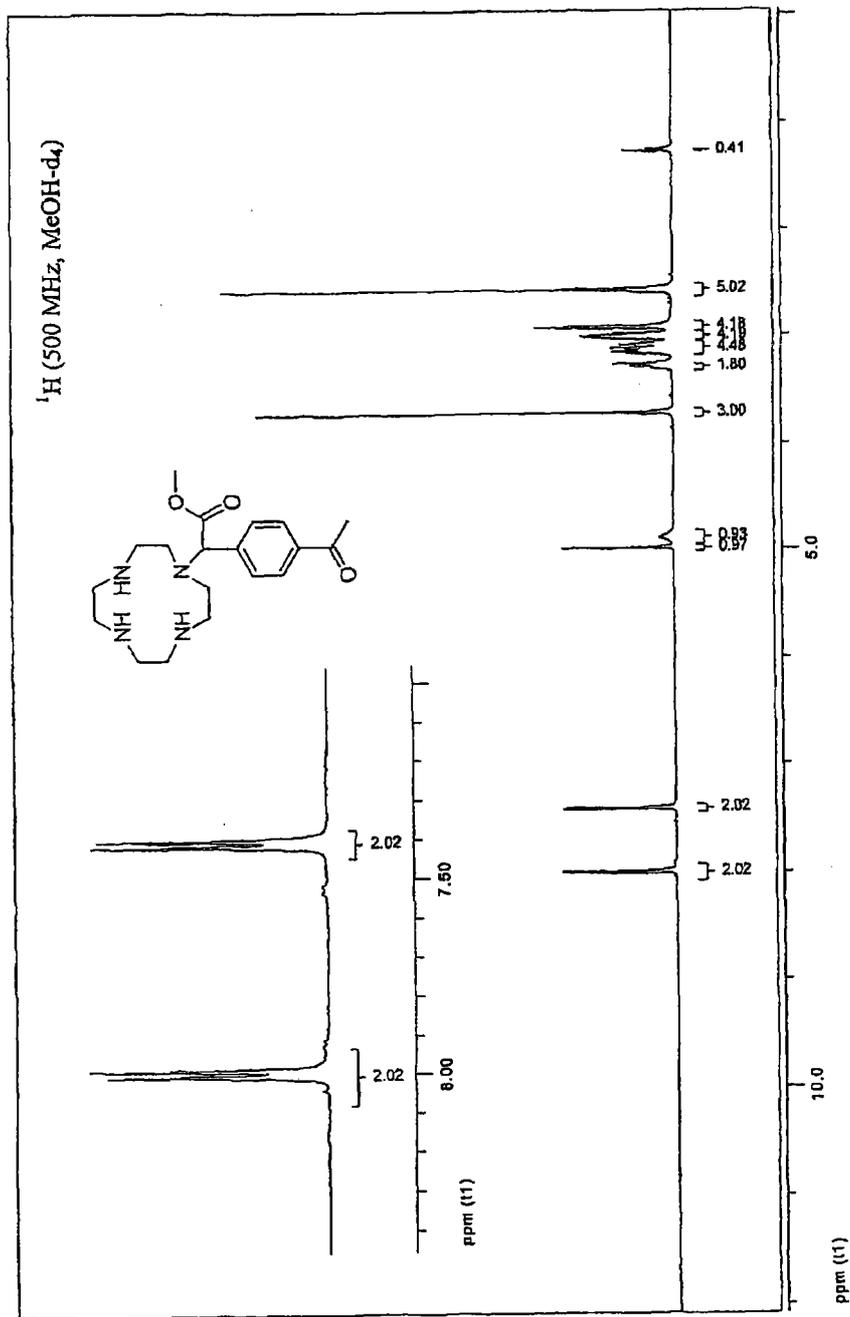


图 17a

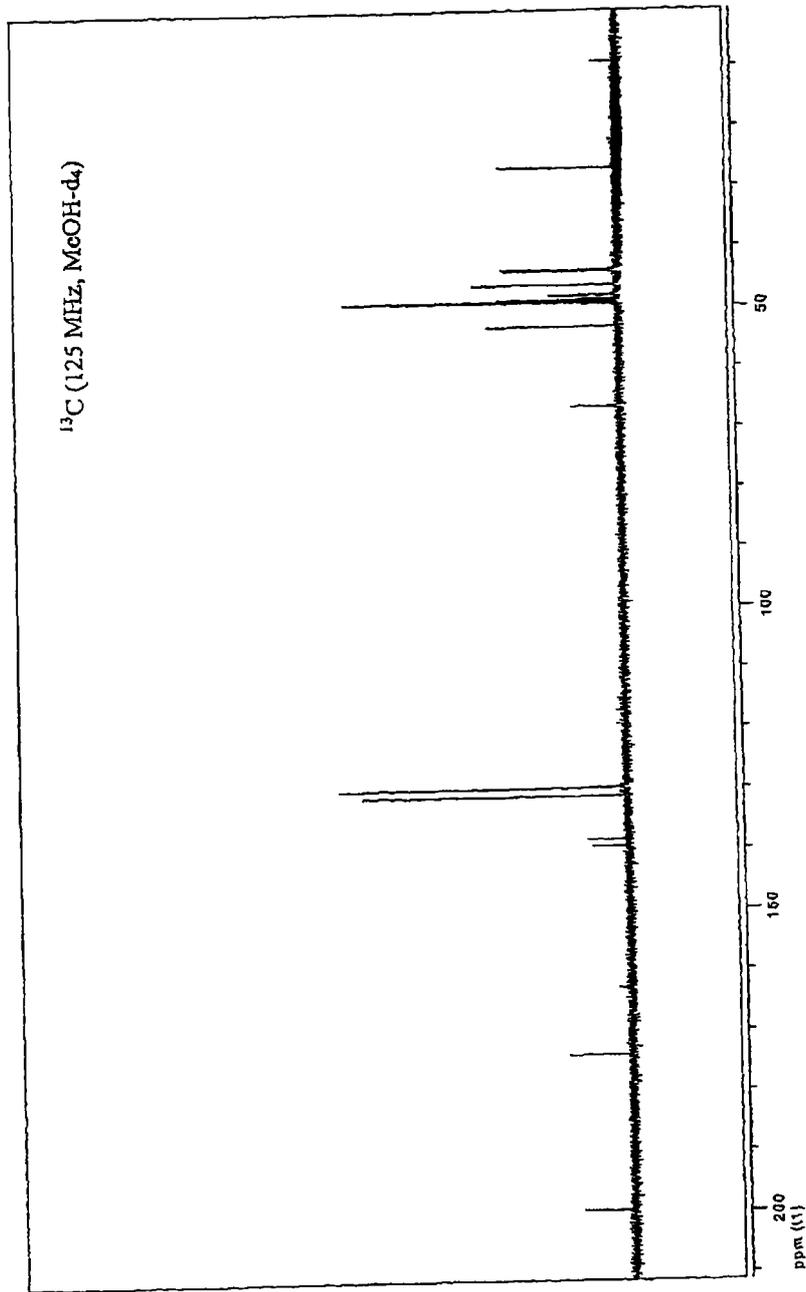


图 17b

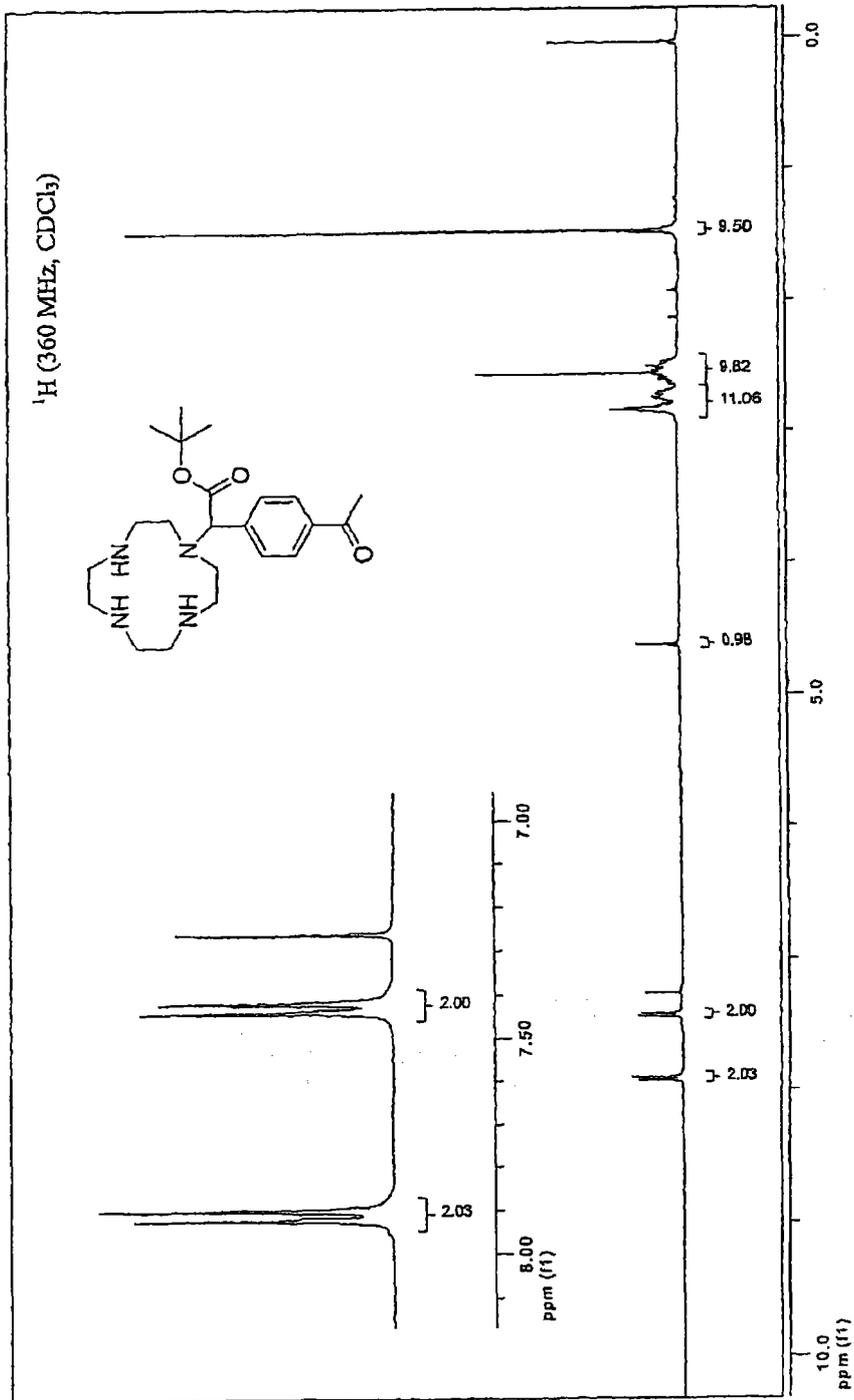


图 18a

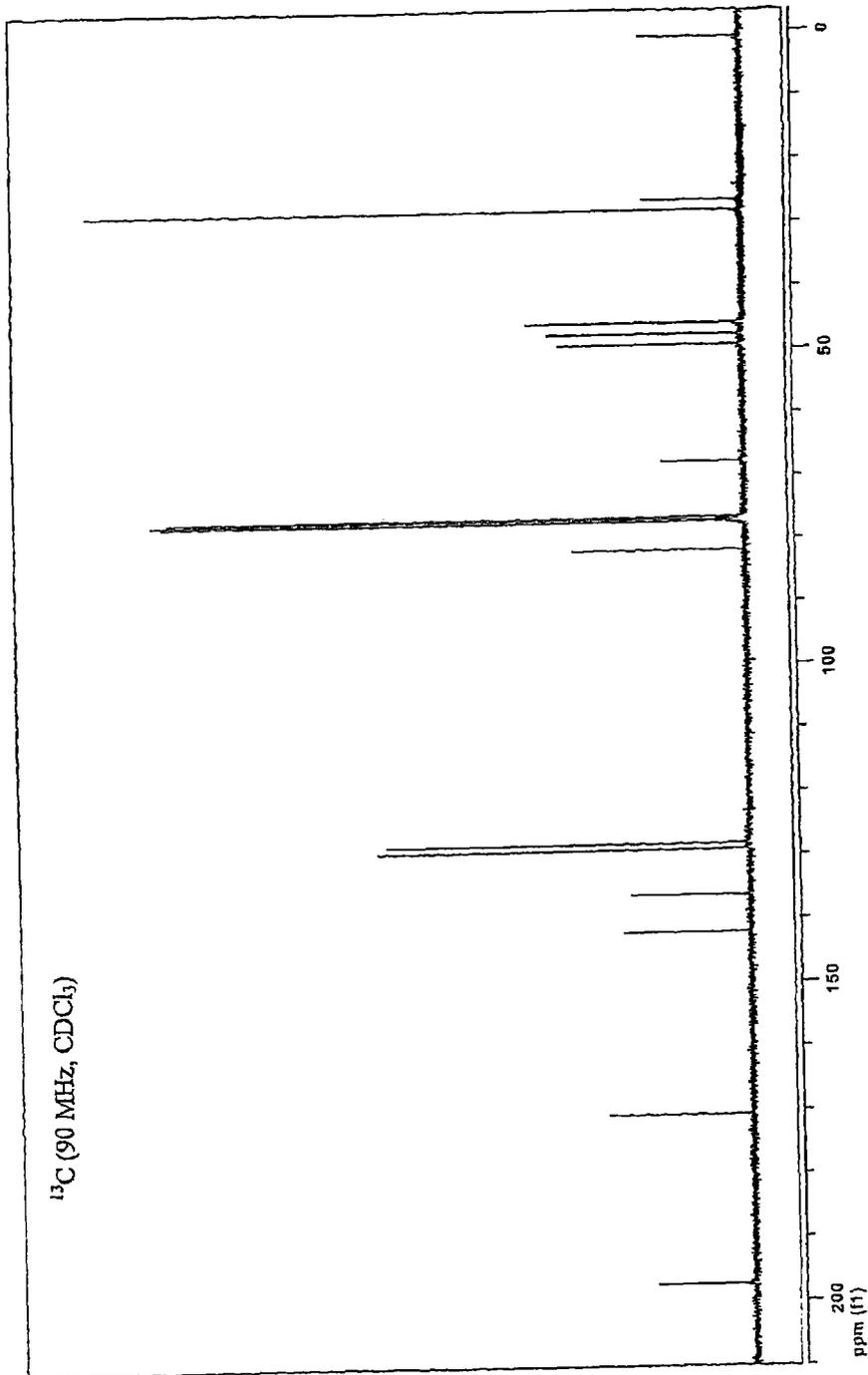


图 18b

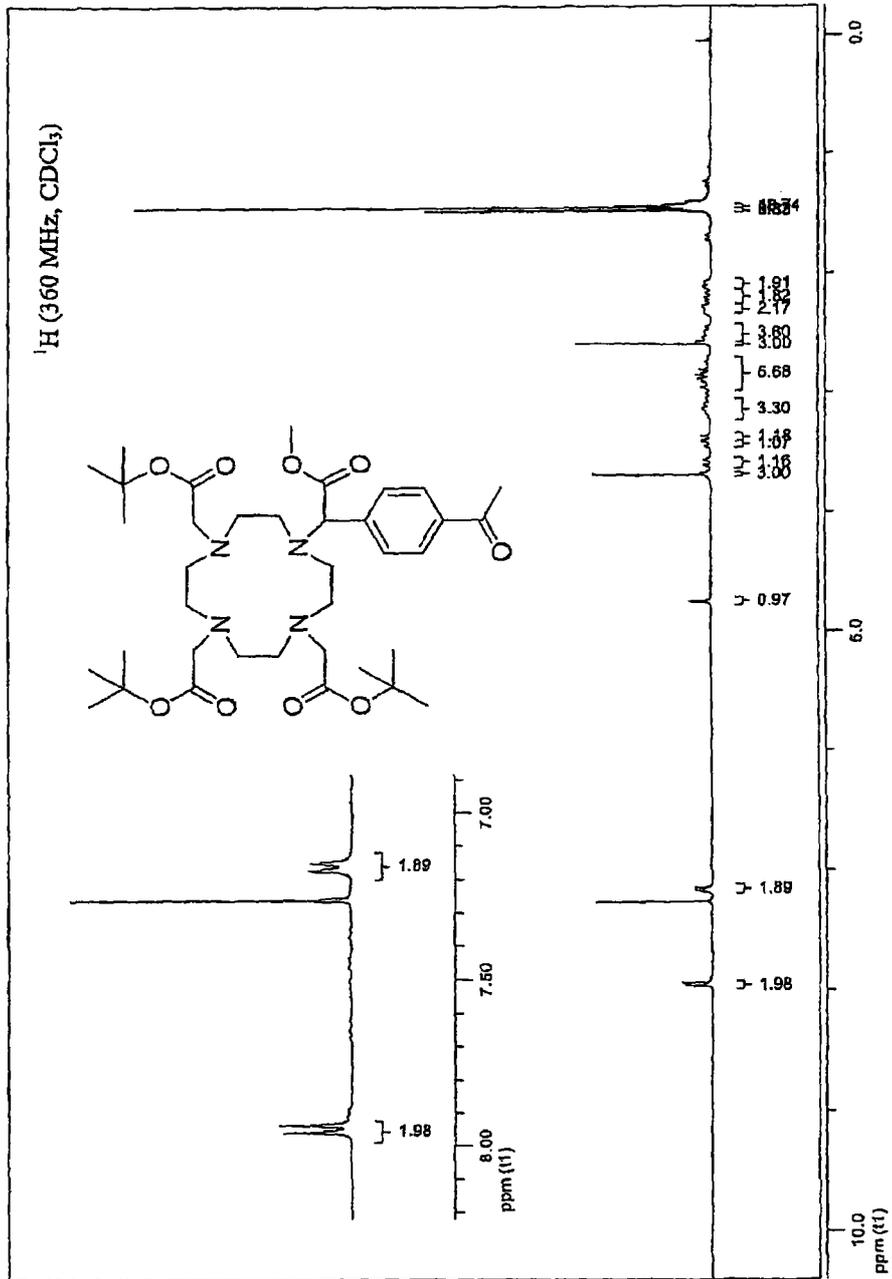


图 19a

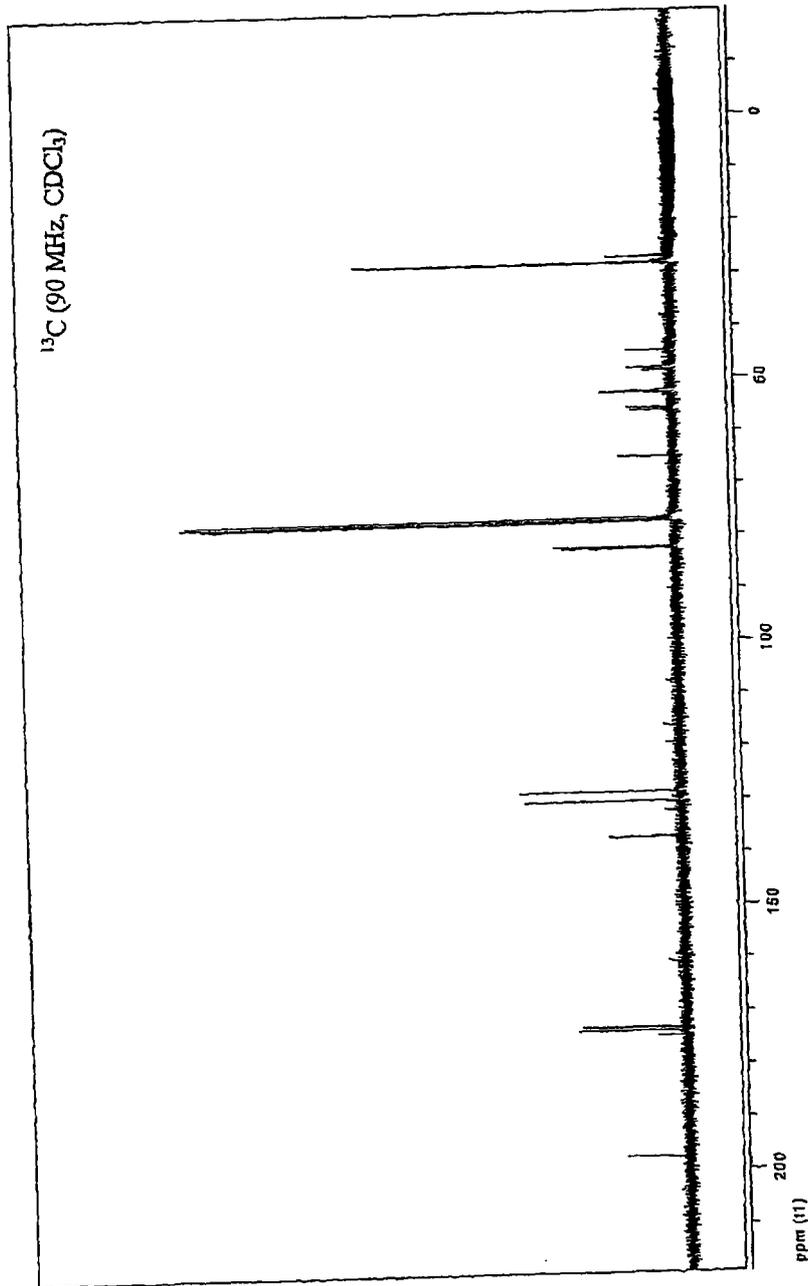


图 19b

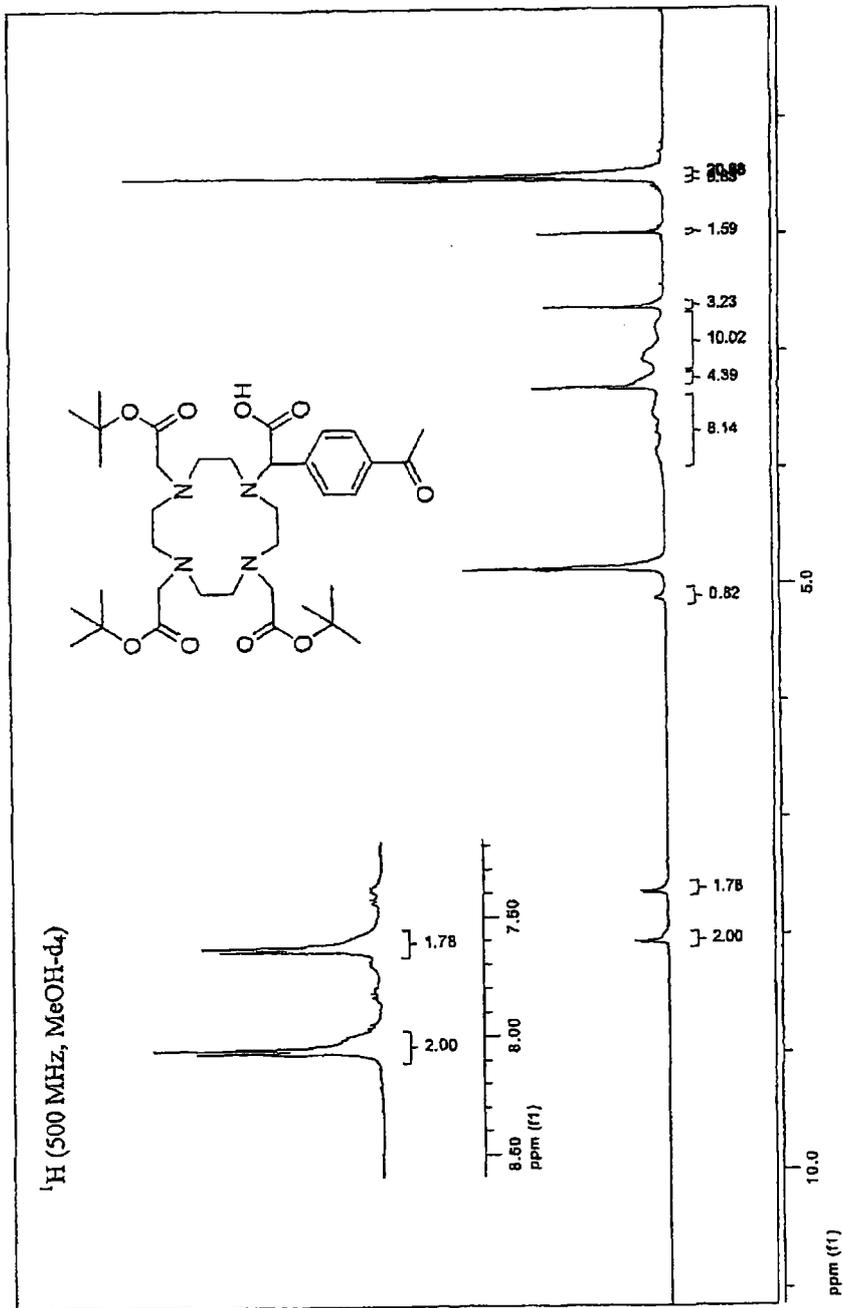


图 20a

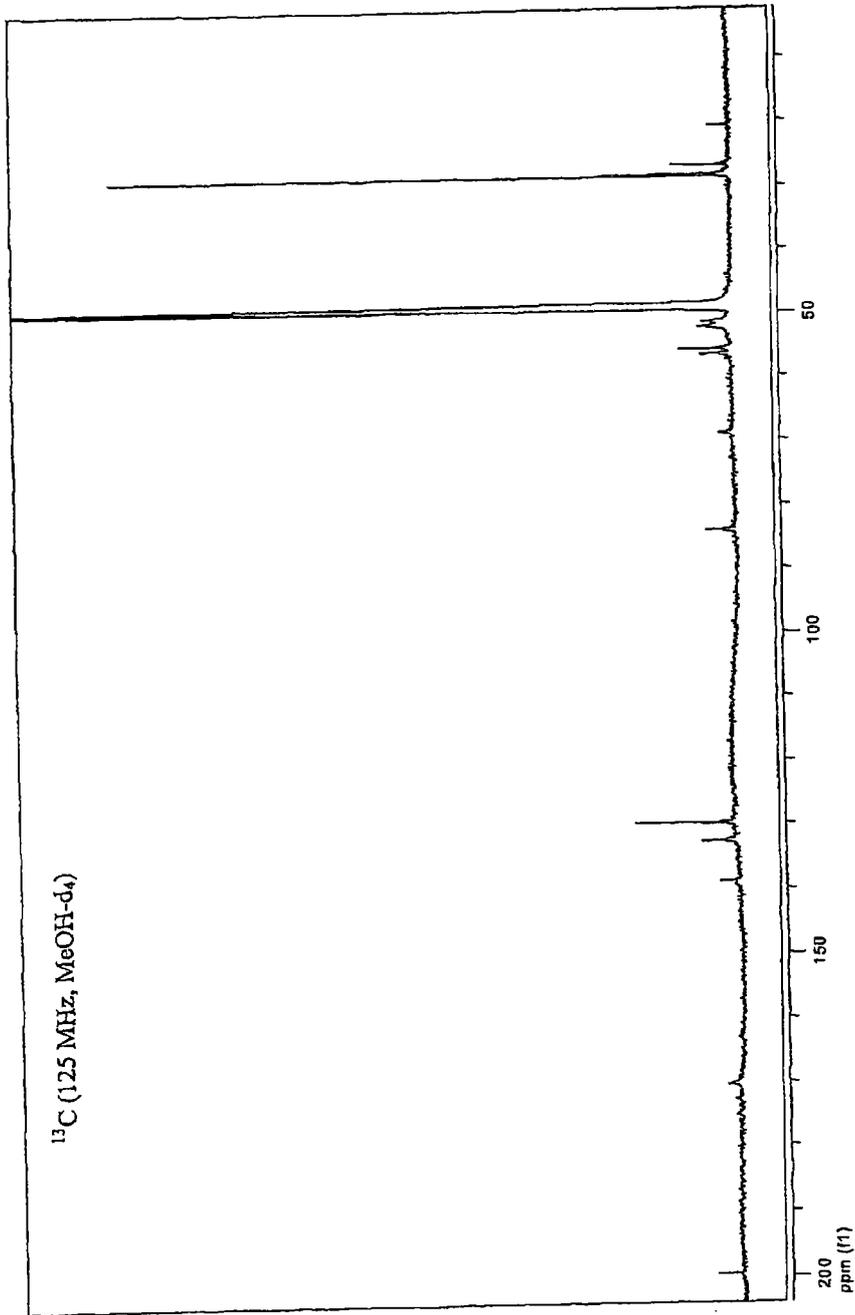


图 20b

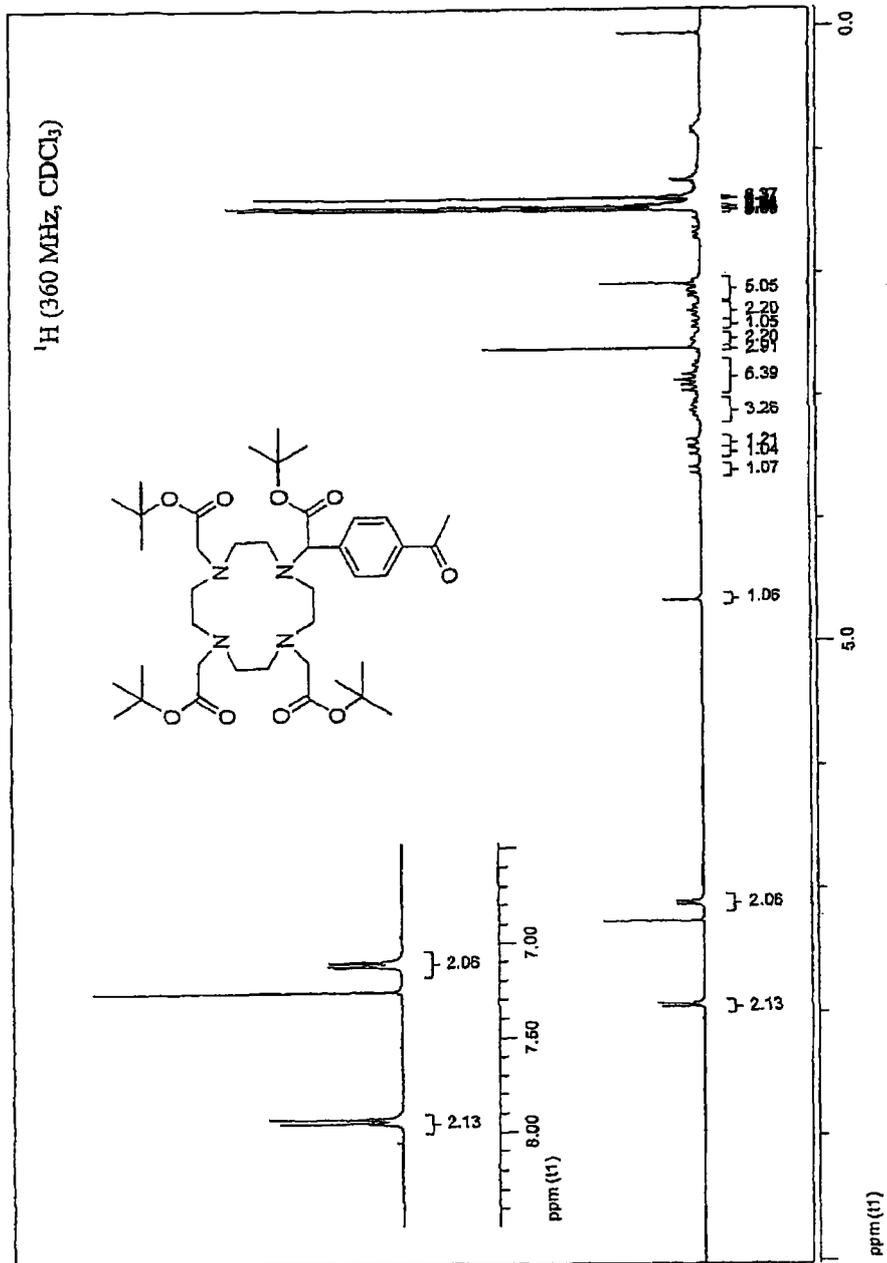


图 21a

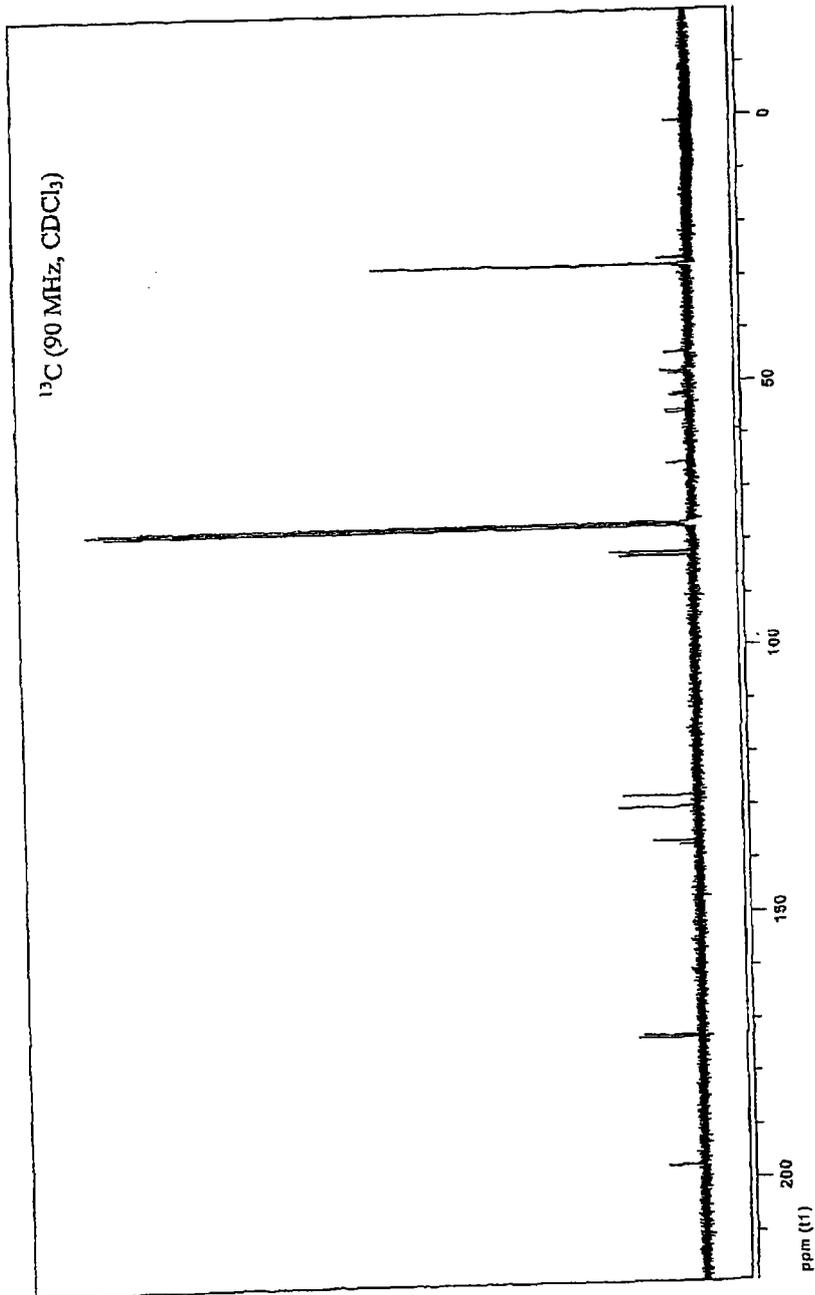


图 21b

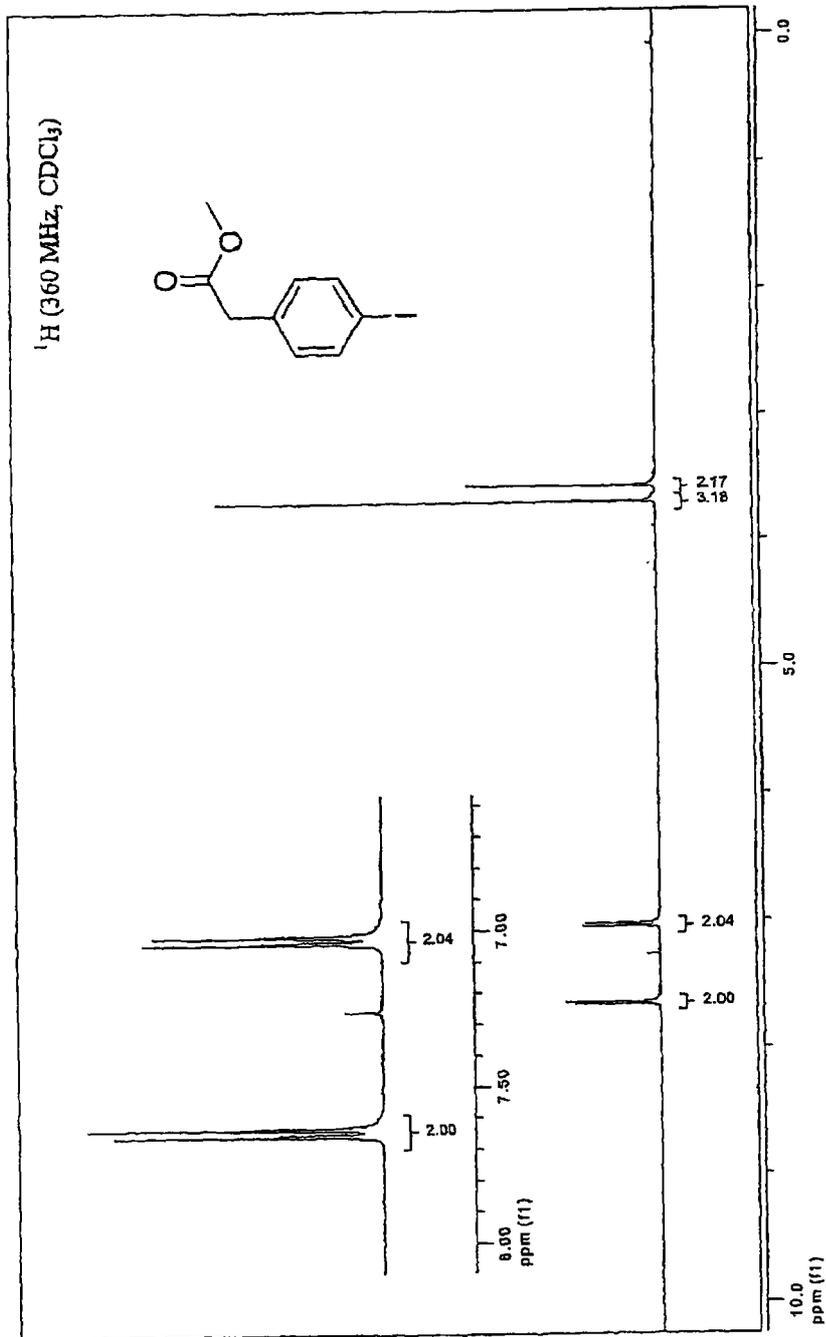


图 22a

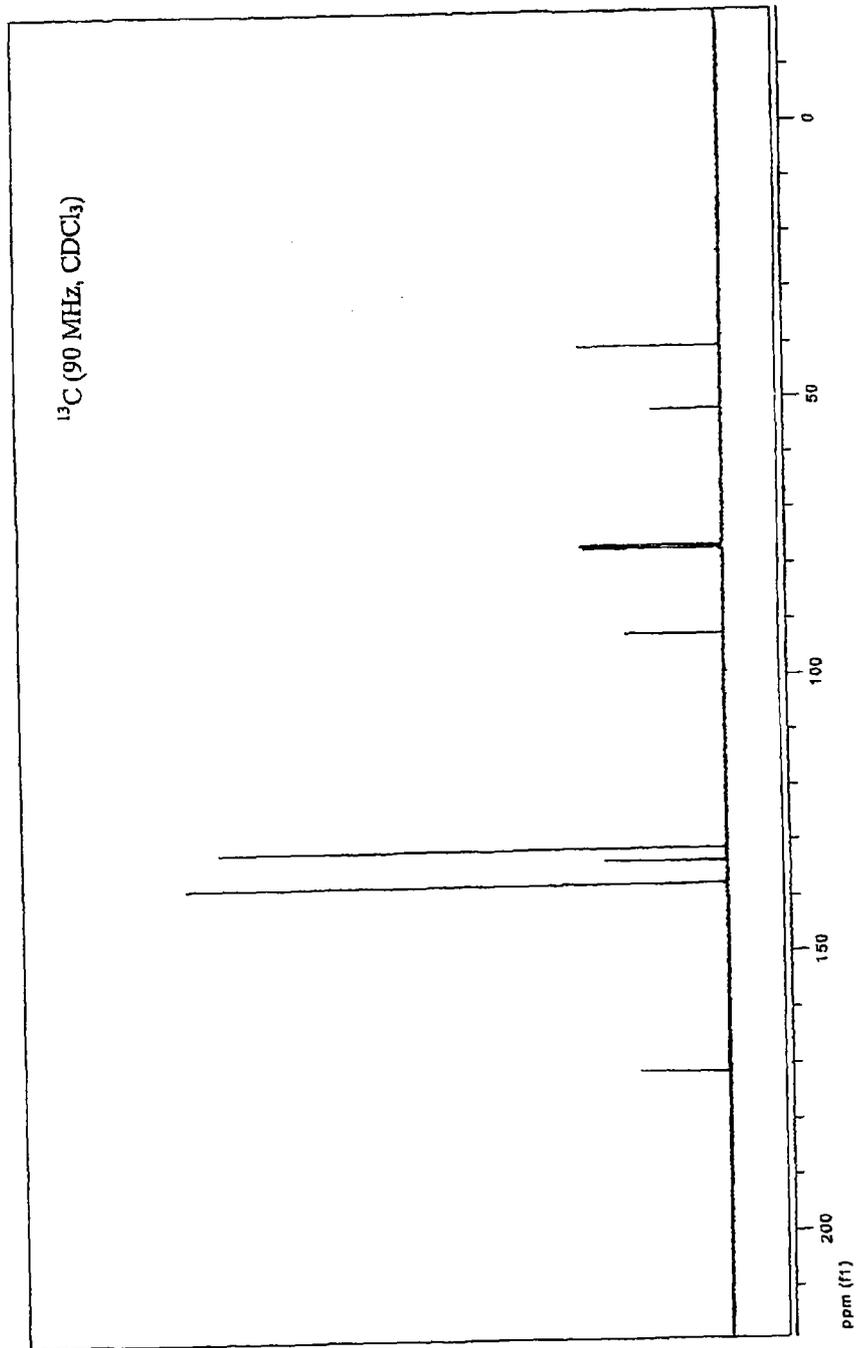


图 22b

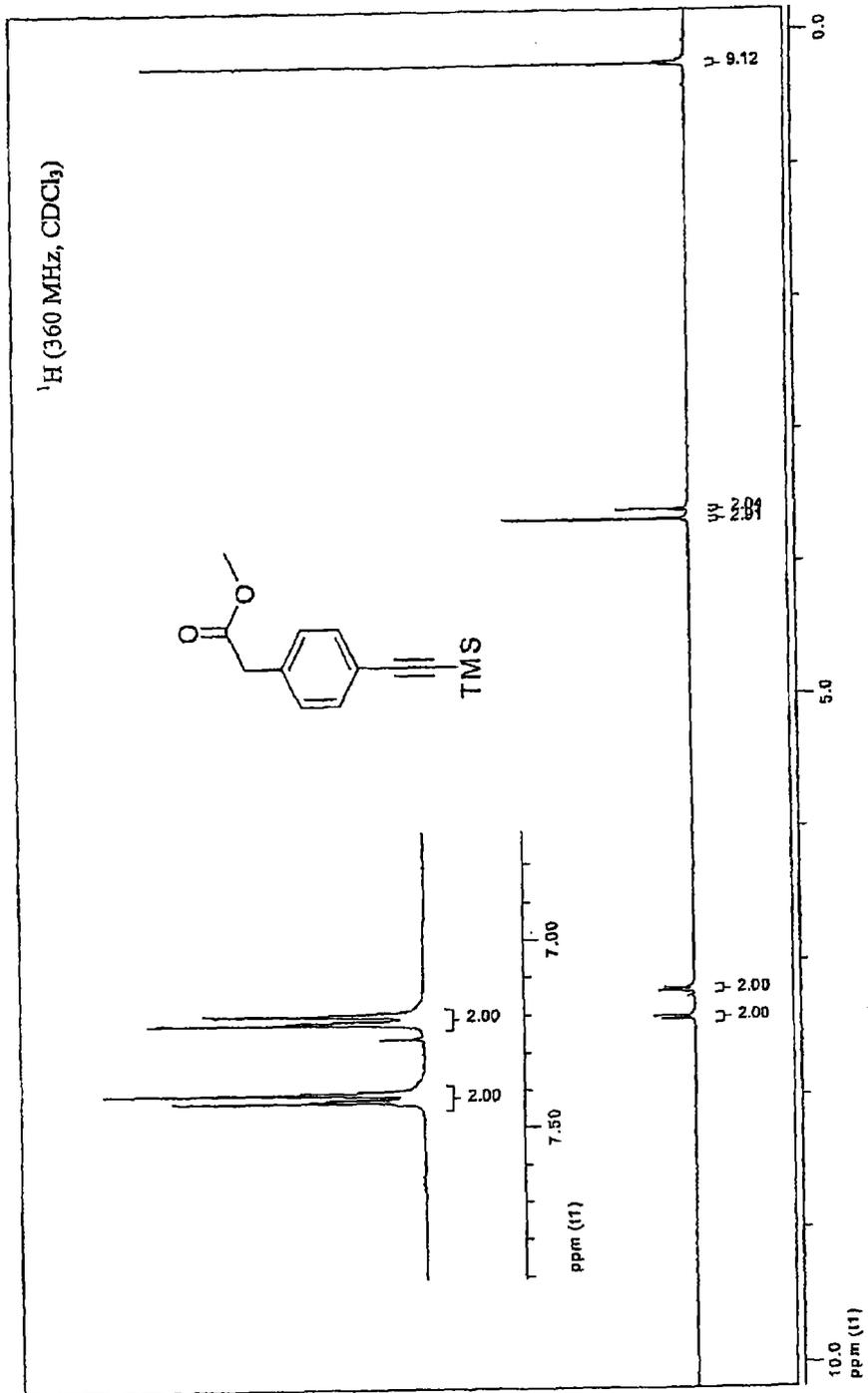


图 23a

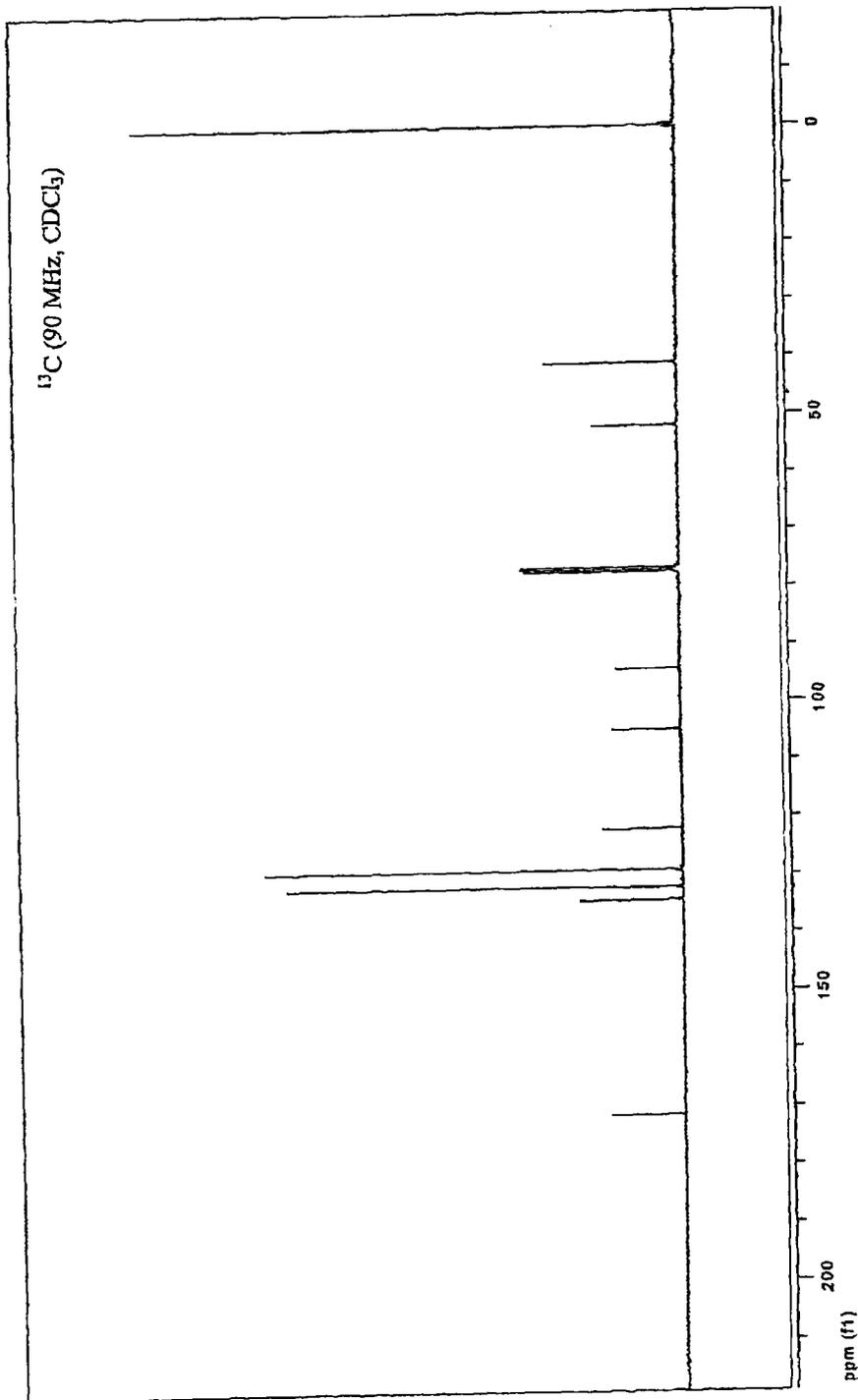


图 23b

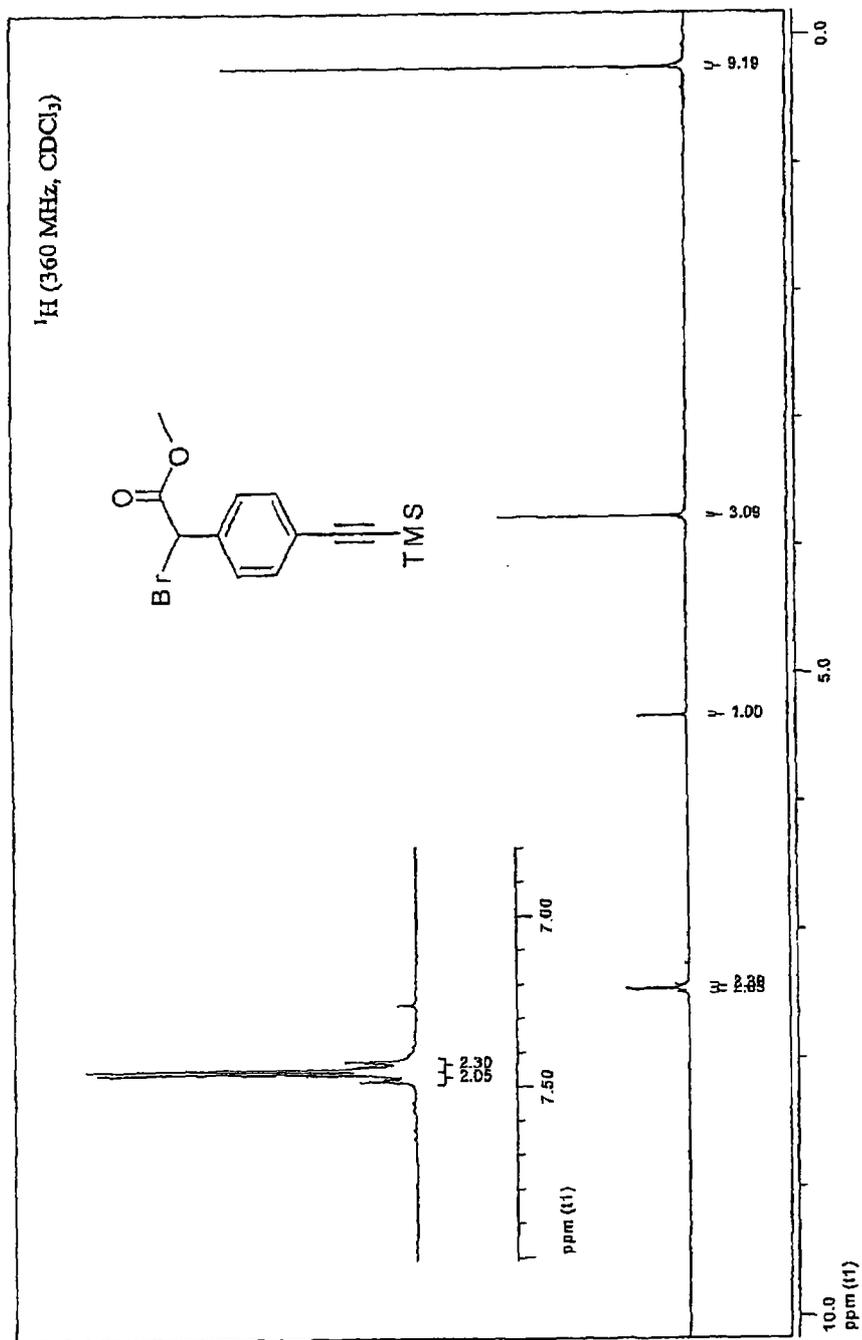


图 24a

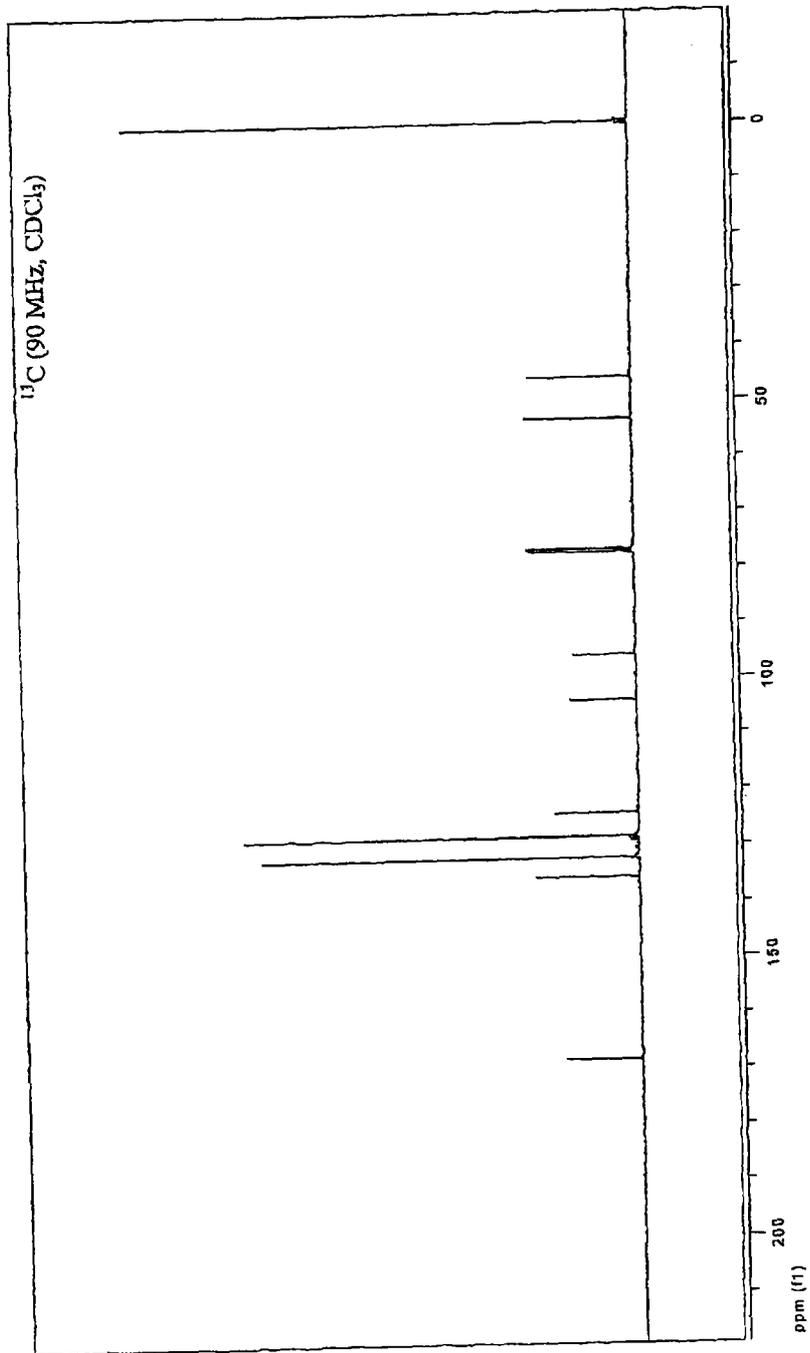


图 24b

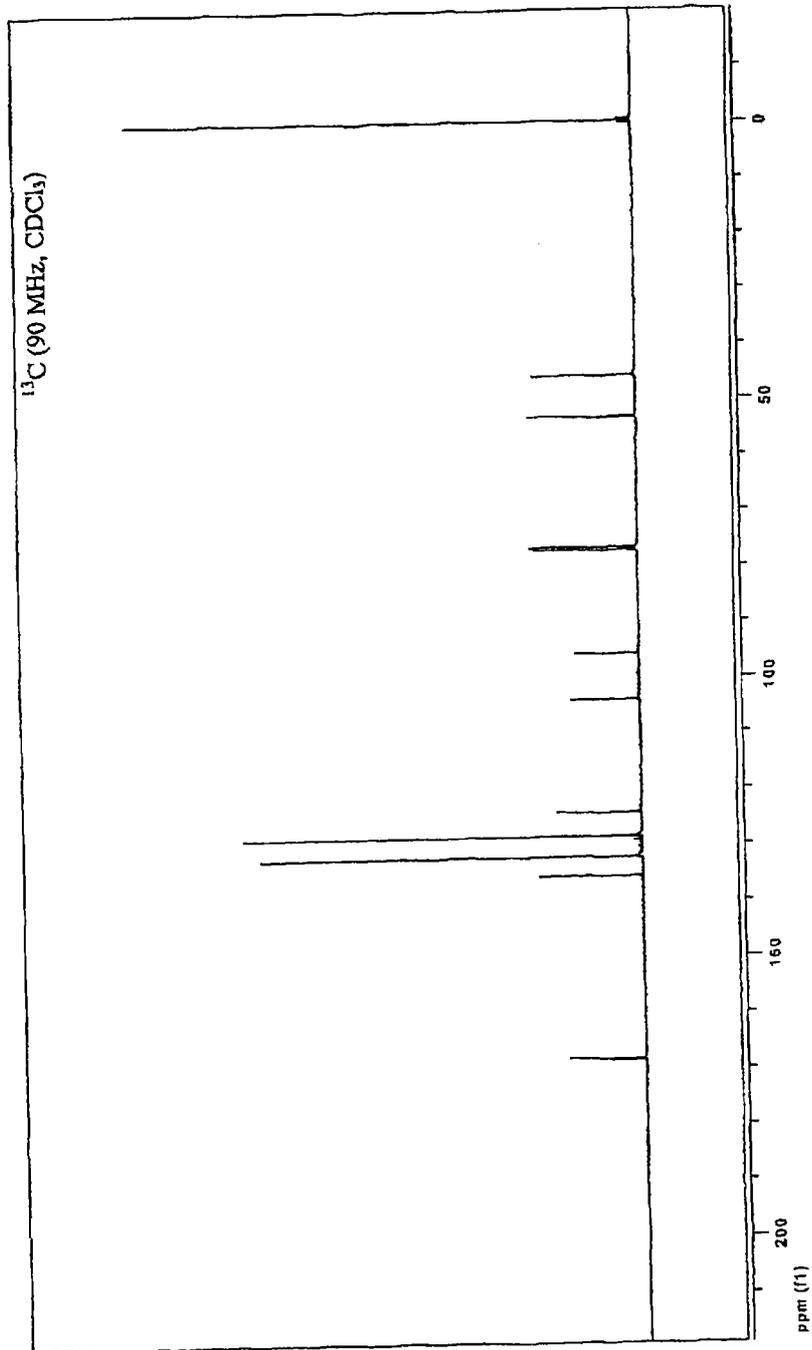


图 24b

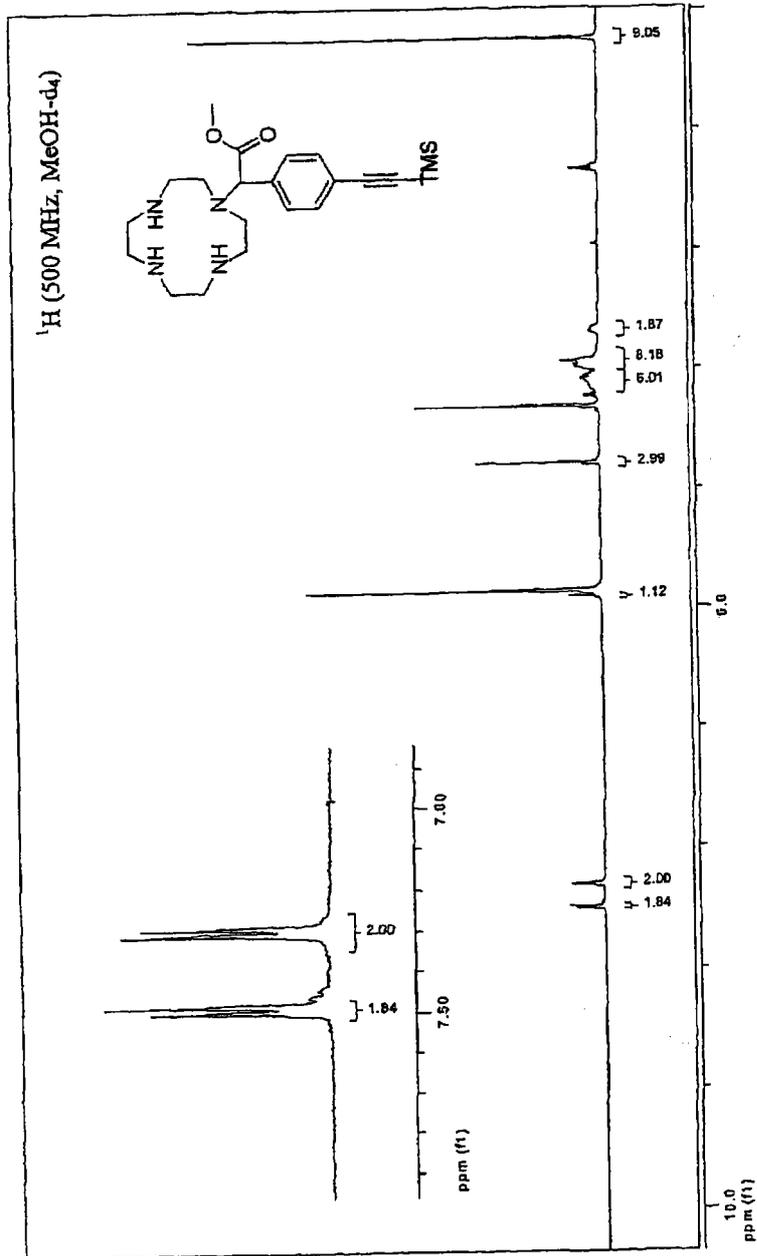


图 25a

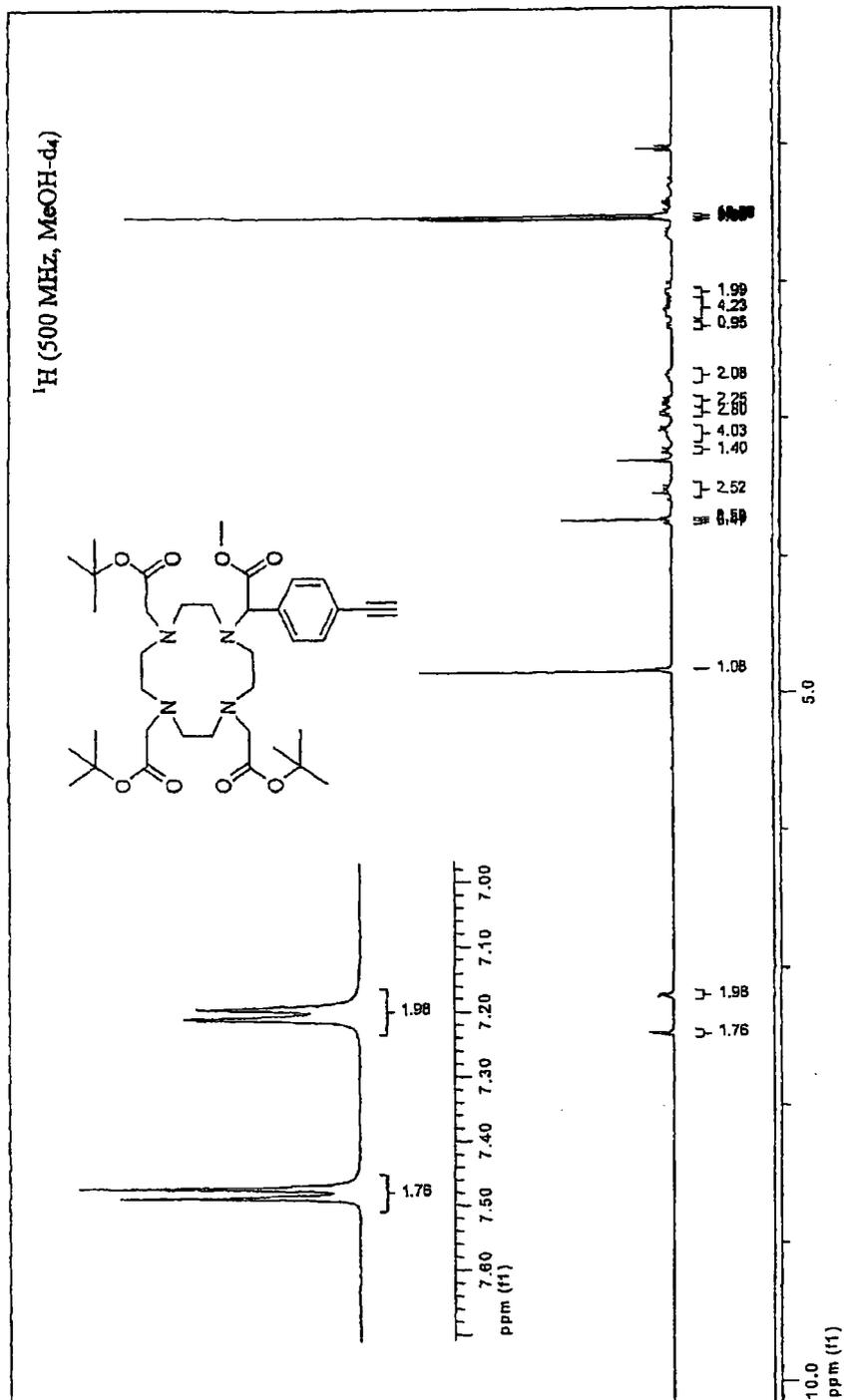


图 26a

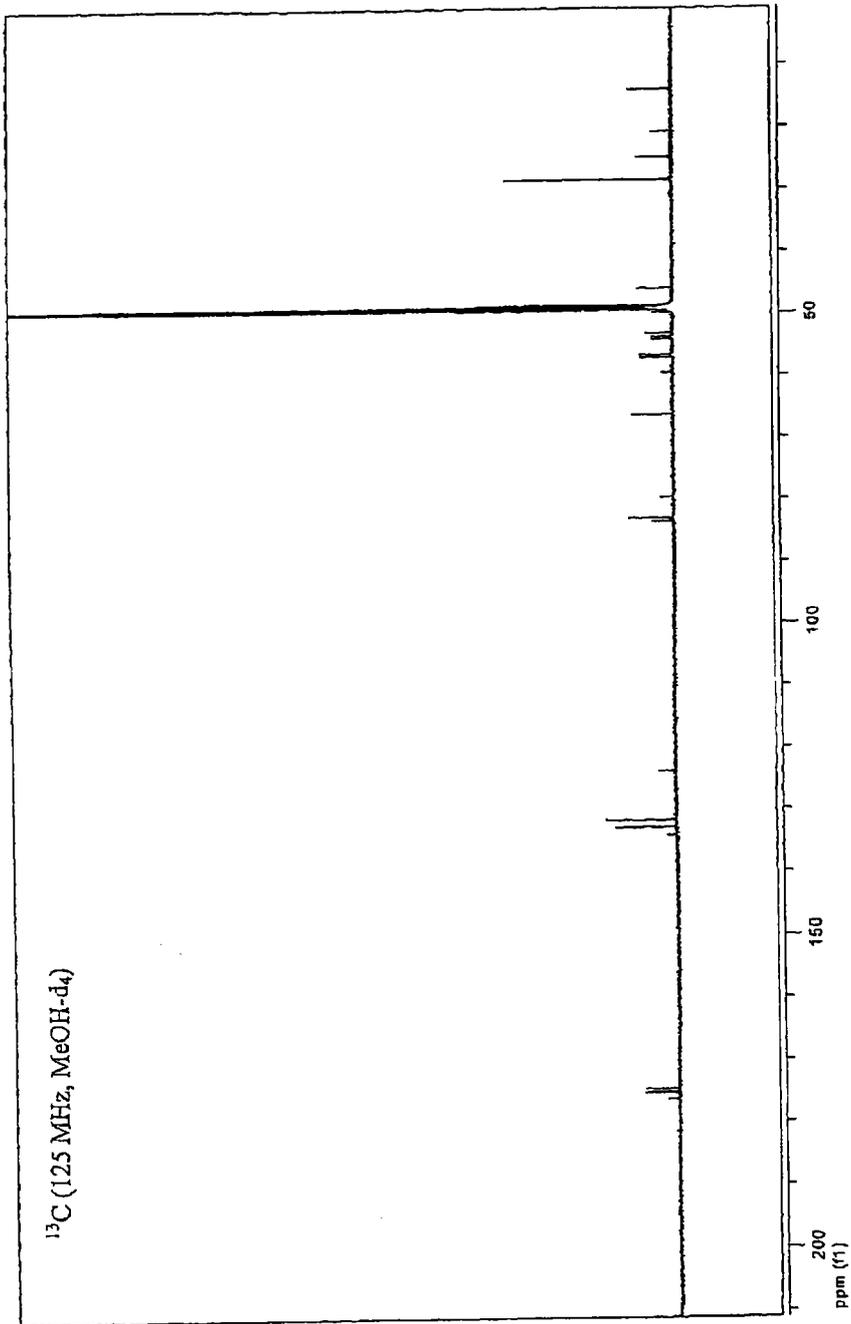


图 26b

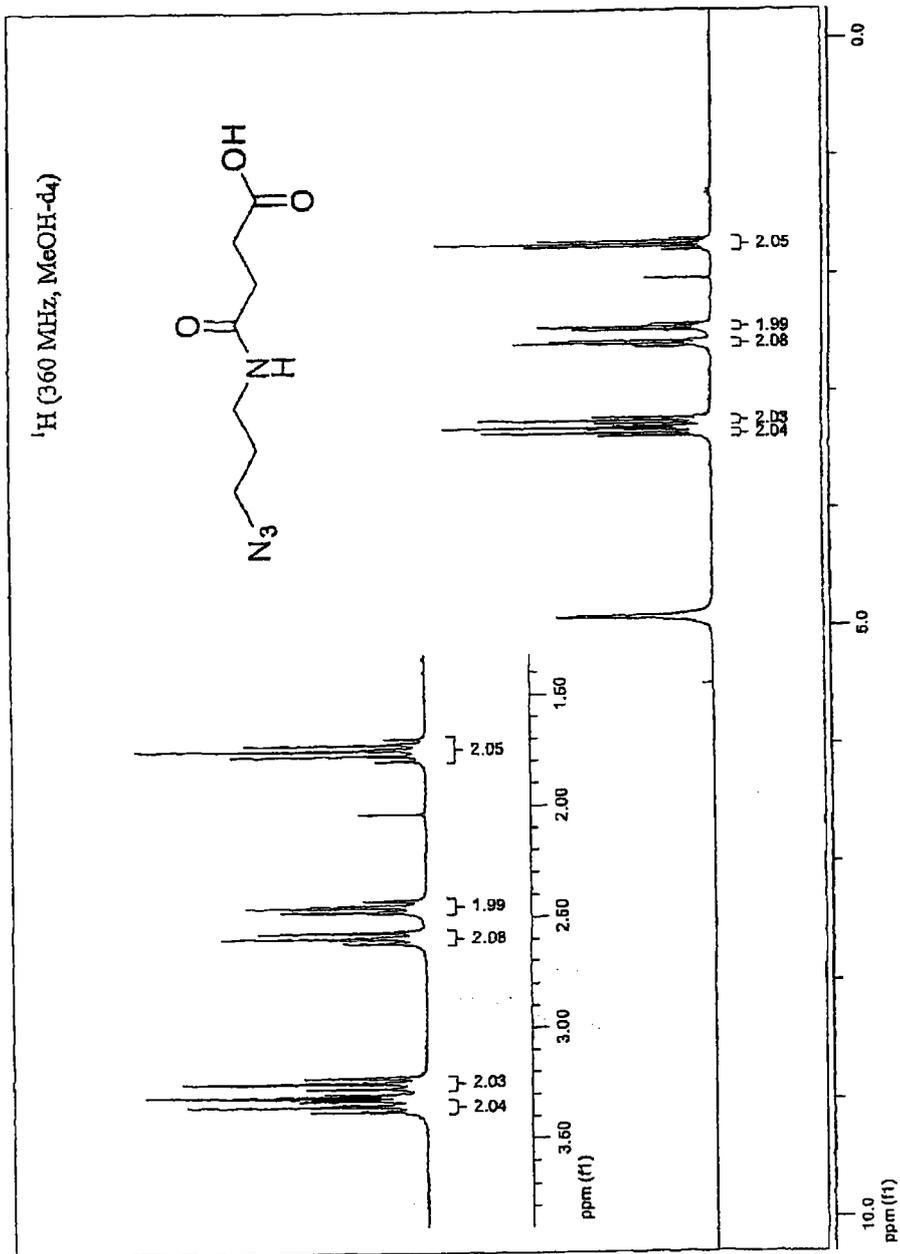


图 27a

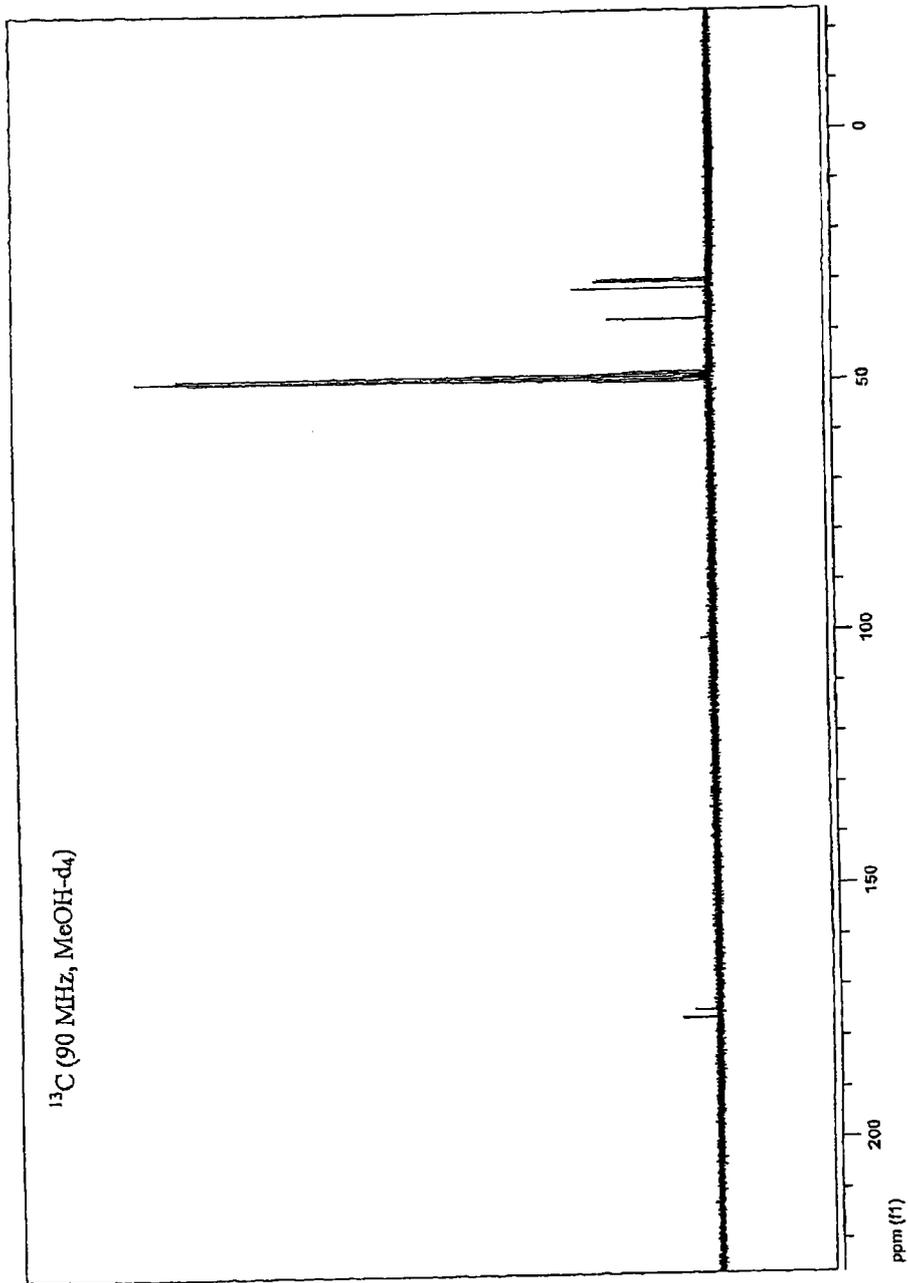


图 27b