[19]中华人民共和国专利局

[11] 授权公告号 CN 1033030C

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89106401.X

[51]Int.Cl[6]

C07D257/02

[45]授权公告日 1996年10月16日

[24]颁证日 96.7.12

[21]申请号 89106401.X

[22]申请日 89.6.23

[30]优先权

[32]88.6.24 [33]US[31]211,496

[73]专利权人 唐化学原料公司 地址 美国密歇根州

[72]发明人 罗伯特·C·郑 威廉·A·福代斯

威廉·F·葛凯勒

小威廉·J·克鲁帕 沙朗·包曼

约瑟夫·R·加里希

肯尼思·麦克米伦

钿维·A·威尔逊 加里·基法

贾米·J·西蒙

铸查德·基思·弗兰克

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨厚昌

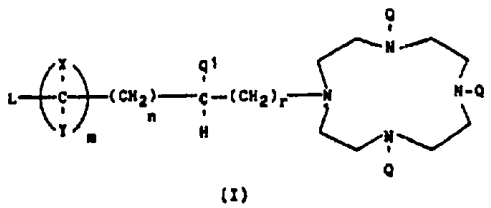
A61K 31/395

权利要求书 34 页 说明书 9 页 附图页数 146 页

[54]发明名称 大环双官能螯合剂及其配合物和抗体共轭物的制备方法

[57]摘要

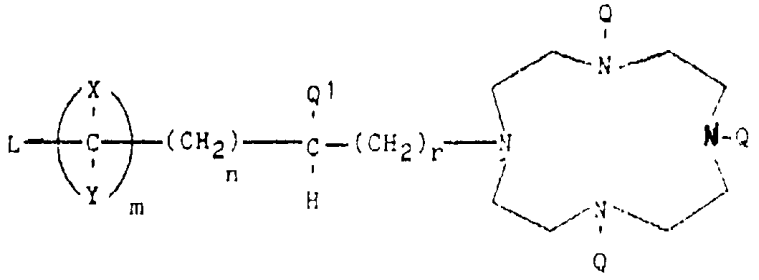
本发明公开了一种制备式（I）的一组官能化聚氨基羧酸盐螯合剂的方法，该螯合剂可与稀土金属离子形成配合物。该配合物能以共价键与抗体或抗体片段连接以形成共轭物和用于治疗和/或诊断。



(I)

权　利　要　求　书

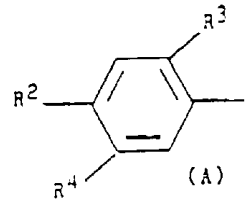
1. 一种制备式(Ⅰ　)化合物或其药学上可接受的盐或其配合物的方法,



(Ⅰ)

其中:

L 为式(A)的连接基团



(A)

X = Y = H; m = 0 − 5; n = r = 0;

每个 Q分别是氢或 $(CHR^5)_pCO_2R$;

Q^1是氢或 CO_2R;

每个 R分别是氢或 C_1-C_4烷基;

条件是: Q 和 Q^1总和中至少两个必须不是氢, 以及当 Q^1是氢时, R^3必须不是氢;

每个 R^5分别是氢或 C_1-C_4烷基;

p = 1或 2;

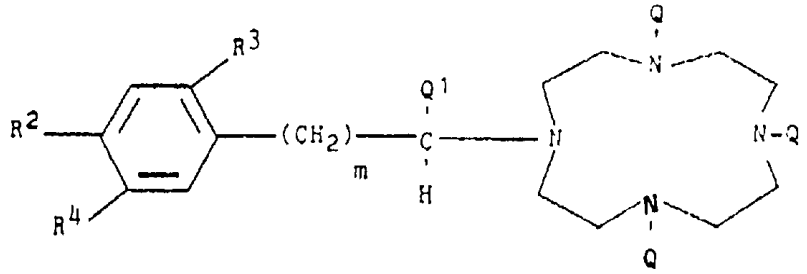
R^2是氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、马来酰亚胺基、溴乙酰胺基或羧基;

R^3是 C_1-C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$ 、羟基或氢;

R^4是氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、马来酰亚胺基、溴乙酰胺基或羧基;

条件是:R^2和R^4不能两个都是氢,但R^2和R^4中的一个必须是氢;该方法包括下列步骤中的任何一个:

(A)下式的化合物:



(V)

其中:

Q^1是 CO_2R; Q 是氢; R^2是硝基; R^3和 R^4是氢;

R是 C_1-C_4烷基;

m是包括0到5 的整数;

与下式的 α - 卤代羧酸酯:

$$BrCH_2CO_2R$$

其中 R是 C_1-C_4烷基;

在 一种有机溶剂和碱的存在下,在0℃到回流的温度下进行反应,生成式(Ⅰ)化合物,其中:

L, X, Y, m, Q^1, n 和 r 的定义如前;

R^3, R^4是氢;

R是 C_1－C_4烷基; Q 是 CH_2CO_2R; 以及

R^2是硝基; 或者

(B) 步骤 (A) 的产物与氢化试剂和氢一起在标准反应条件下进行反应, 生成式(Ⅰ)化合物, 其中:

L, X, Y, m, Q^1, n和 r 的定义如前;

R^3, R^4是氢; Q 是 CH_2CO_2R;

R是 C_1－C_4烷基; 以及

R^2是氨基; 或者

(C) 步骤 (B) 的产物与一脱酯化试剂进行反应, 生成式(Ⅰ)化合物, 其中;

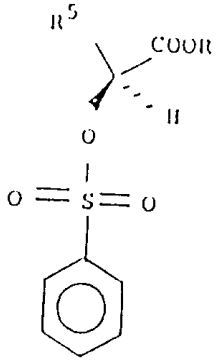
L, X, Y, m, Q^1, n 和 r 的定义如前;

R^3, R^4是氢; Q 是 CH_2CO_2R;

R是氢; 以及

R^2是氨基; 或者

(D) 如上定义的式(Ⅴ)化合物与下式的旋光活性的 α－苯磺酸酯进行反应



其中 R和 R^5定义如前,

生成式(Ⅰ)化合物,其中:

L, X, Y, m, Q^1, R^5, n 和 r 的定义如前;

R^3和 R^4是氢; Q 是 CH_2CO_2R;

R是 C_1-C_4烷基; 以及

R^2是硝基; 或者

(E) 步骤 (D) 的产物与氢化试剂和氢一起在标准反应条件下进行反应,生成式(Ⅰ)化合物,其中:

L, X, Y, m, Q^1, R^5, n 和 r 的定义如前;

R^3和 R^4是氢; Q 是 CH_2CO_2R;

R是 C_1-C_4烷基; 以及

R^2是氨基; 或者

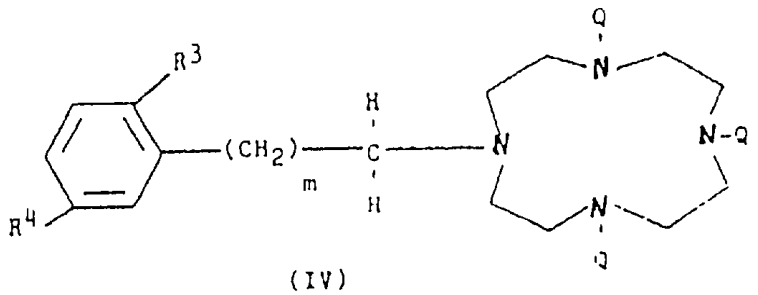
(F) 步骤 (E) 的产物与一脱酯化试剂进行反应,生成式(Ⅰ)的化合物,其中:

L, X, Y, m, Q^1, R^5, n和 r 的定义如前;

R^3、R^4和 R是氢; 以及Q 是 CH_2CO_2R;

R^2是氨基; 或者

(G) 下式化合物:



(IV)

其中:

$R^{3'}$是 C_1－C_4烷氧基，－OCH_2COOH 或 OH；R^4是硝基；Q 是氢；

m是包括 0到 5 的整数；

与下式的 α－卤代羧酸：

$$BrCH_2CO_2H$$

在一种有机溶剂和碱的存在下，在0℃到回流的温度下进行反应，生成式（Ⅰ）化合物，其中：

L，X，Y，m，n 和 r 的定义如前；R^3是 C_1－C_4烷氧基，－OCH_2COOH 或羟基；

Q^1和 R^2是氢；Q 是 CH_2CO_2H 以及

R^4是硝基；或者

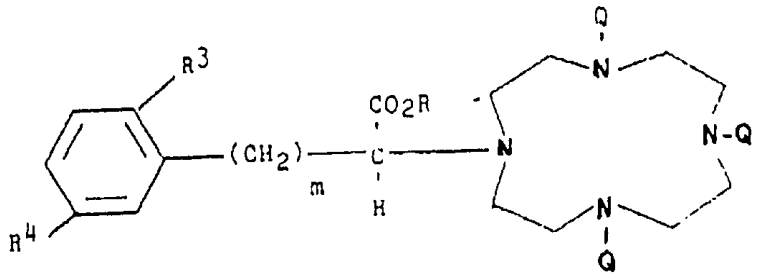
(H) 步骤 (G) 的产物与氢化试剂和氢一起在标准反应条件下进行反应，生成式（Ⅰ）化合物，其中：

L，X，Y，m，n 和 r 的定义如前；R^3是 C_1－C_4烷氧基，－OCH_2COOH或羟基；

Q^1，R和 R^2是氢；Q 是 CH_2CO_2H 以及

R^4是氨基；或者

(I) 下式化合物：



(VIII)

其中：

Q是氢; R^3是甲氧基; R^4是硝基;

R是 C_1-C_4烷基;

m是包括0到5的整数;

与下式的 α－卤代羧酸:

$$BrCH_2CO_2R$$

其中R定义如前;

在一种有机溶剂和碱的存在下, 在0℃至回流的温度下进行反应, 生成式(Ⅰ)化合物, 其中:

L, X, Y, m, Q^1, n 和 r 的定义如前;

R^2是氢; 以及Q 是 CH_2CO_2R;

R^4是硝基; 或者

(J) 步骤 (I) 的产物与一脱酯化试剂在标准反应条件下进行反应, 接着用一氢化试剂和氢一起进行反应, 反应在标准条件下进行, 生成式(Ⅰ)化合物, 其中:

L, X, Y, m, Q^1, n 和 r的定义如前;

R, R^2是氢; 以及 Q 是 CH_2CO_2R;

R^4是氨基;

(K) 将 (B)、(F)、(H) 或 (J) 步骤的产物与硫光气进行反应, 以提供相应的化合物其中 R^2或 R^4是异硫氰基,

当需要其盐时, 将式 (I) 的化合物, 用已知的方法, 与一种制剂进行反应, 以制备作为药学上可接受的盐的钾、钠、锂、铵、钙、镁或氢氯酸的加合物; 和

当需要其配合物时, 将式(Ⅰ)的化合物与选自 La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Y 和 Sc 的放射性金属或金属离子反应, 以制备此化合物与所述金属离子的配合物。

2. 根据权利要求 1 (K) 的制备 1－〔2－(4－异硫氰基苯基〕乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸的方法，此法包括将 1－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸、氢氯酸盐与硫光气进行反应。

3. 根据权利要求 1 (H) 的制备 1－(2－甲氧基－5－氨基苄基)－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸的方法，此法包括将 1－(2－甲氧基－5－硝基苄基)－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸与氢在帕尔弹(Parr bomb)中进行反应。

4. 根据权利要求 1 (H) 的制备 1－(2－羟基－5－氨基苄基)－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸的方法，此法包括将 N－(2－羟基－5－硝基苄基)－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－4, 7, 10－三乙酸与氢和 PtO_2 进行反应。

5. 根据权利要求 1 (E) 的制备 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－三－(R－甲基乙酸)、1－异丙酯－4, 7, 10－三甲酯的方法，此法包括将 α－〔2－(4－硝基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－三(R－甲基乙酸)、1－异丙酯－4, 7, 10－三甲酯与氢和担载在碳上的钯进行反应。

6. 根据权利要求 1 (F) 的制备 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－三(R－甲基乙酸)的方法，此法包括将 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－三－(R－甲苯乙酸)、1－异丙酯－4, 7, 10－三甲酯与氢氯酸进行反应。

7. 根据权利要求 1 (K) 的制备 α－〔2－(4－异硫氰基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－三－(R－甲基乙酸)的方法，此法包括将 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－(R, S)－乙酸－4, 7, 10－

三－(R－甲基乙酸)与硫光气进行反应。

8. 根据权利要求 1 (B) 的制备 α－(4－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7－三乙酸的方法，此法包括将 α－(4－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7－三乙酸与氢和 PtO_2进行反应。

9. 根据权利要求 1 (B) 的制备 α－(4－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 10－三乙酸的方法，此法包括将 α－(4－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 10－三乙酸与氢和 PtO_2进行反应。

10. 根据权利要求 1 (B) 的制备 α－(4－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸的方法，此法包括将 α－(4－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸与氢和 PtO_2进行反应。

11. 根据权利要求 1 (K) 的制备 α－(4－异硫氰基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸的方法，此法包括将 α－(4－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸与硫光气进行反应。

12. 根据权利要求 1 (A) 的制备 α－〔2－(4－硝基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、1, 4, 7, 10－四甲酯的方法，此法包括将 α－〔2－(4－硝基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1－乙酸、1－甲酯与溴代乙酸甲酯进行反应。

13. 根据权利要求 1 (B) 的制备 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、1, 4, 7, 10－四甲酯的方法，此法包括将 α－〔2－(4－硝基苯基)乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、1, 4, 7, 10－四甲酯与氢和担载在碳上的钯进行反应。

14. 根据权利要求 1 (C) 的制备 α－〔2－(4－氨基苯基)乙基〕

－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸的方法，此法包括将 α －〔2－(4－氨基苯基) －乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、1, 4, 7, 10－四甲酯与氢氯酸进行反应。

15. 根据权利要求 1 (K) 的制备 α －〔2－(4－异硫氰基苯基) 乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸的方法，此法包括将 α －〔2－(4－氨基苯基) 乙基〕－1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸与硫光气进行反应。

16. 根据权利要求 1 (J) 的制备 α －(2－甲氧基－5－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸的方法，此法包括将 α －(2－甲氧基－5－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、四甲酯与氢氯酸进行反应。

17. 根据权利要求 1 (J) 的制备 α －(2－甲氧基－5－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、四氨盐的方法，此法包括将 α －(2－甲氧基－5－硝基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸与氢和 PtO_2 进行反应。

18. 根据权利要求 1 (K) 的制备 α －(2－甲氧基－5－异硫氰基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸、四氨盐的方法，此法包括将 α －(2－甲氧基－5－氨基苯基) －1, 4, 7, 10－四氮杂环十二烷－1, 4, 7, 10－四乙酸与硫光气进行反应。

19. 根据权利要求 1 的方法，其中该金属离子是 ^{153}Sm、^{166}Ho、^{90}Y、^{149}Pm、^{159}Gd、^{140}La、^{177}Lu、^{175}Yb、^{47}Sc 或 ^{142}Pr。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中该金属离子是 ^{153}Sm、^{177}Lu 或 ^{90}Y。

21. 根据权利要求 1, 19　20 中的任何一项权利要求的方法，其中将该反应加热。

说　　明　　书

大环双官能螯合剂及其配合物和抗体共轭物的制备方法

已知官能化的螯合剂，或双官能配位体能够共价连接到对癌或肿瘤细胞的抗原决定基或抗原具有特性的抗体上。这种抗体／螯合剂共轭物的放射性核素配合物，可用于诊断和／或治疗，作为运送放射性核素到癌或肿瘤细胞的一个方法。请参见，例如，Meares 等人，Anal. Biochem. 142，68—78，（1984）；和 Krejcarek 等人，Biochem. 和Biophys. Res. Comm. 77，581～585（1977）。

氨基羧酸螯合剂已被认识和研究多年了。典型的氨基羧酸是次氮基三乙酸（NTA）、乙二胺四乙酸（EDTA）、羟乙基乙二胺三乙酸（HEDTA）、二亚乙基三胺五乙酸（DTPA）、反式—1，2—二氨基环已烷四乙酸（CDTA）和1，4，7，10—四氮杂环十二烷四乙酸（DOTA）。许多以氨基羧酸为基础的双官能螯合剂已被提出和制备。例如DTPA的环二酐〔Hnatowich 等人，Science 220，613—615，（1983）；美国专利4，479，930〕和DTPA的混合的羧基碳酸酐〔Gansow，美国专利4，454，106和4，472，509；Krejcarek 等人，Biochem. 和Biophys. Res. Comm. 77，581—585，（1977）〕已被报导过。当这些酐与蛋白质偶联时，偶联是通过酰胺键的形成进行的，这样在二亚乙基三胺（DETA）的主链上原来五个羧基甲基基团留下了四个〔Hnatowich 等人，Int. J. Appl. Isot. 33，327—332，(1982)〕。

此外，美国专利4，432，907和4，352，751公开了双官能螯合剂用于将金属离子连接到“有机类如有机靶分子或抗体上”。如上所述，偶联通过利用二氨基四乙酸二酐经过一个酰胺基而获得。酸酐的实例包括EDTA、CDTA、丙二胺四乙酸和苯—1，2—二胺四乙酸的二酸酐。一份最近的美国专利4，647，447公开了几种由配位酸的阴离子形成的配合物盐，可用于各种诊断技术。通过一个配位酸的羧酸基进行共轭作用已有过论述，该作用通过酰胺键生成键合。

在J. of Radioanalytical Chemistry 57（12），553—564（1980）中，Paik等人公开了P—硝基苄基溴在与封闭的二亚乙基三胺，即双—（2—苯二（甲）酰亚氨基乙基）胺的反应中的使用，该反应随后是解封闭步骤，并用氯代乙酸进行羧基甲基化作用，生成N′—P—硝基苄基二亚乙基三胺N，N，N″，N″—四乙酸。另一方面，由于连接是通过氮原子进行的，所以会得到四乙酸的衍生物。还讨论了双官能螯合剂的共轭作用和与铟的螯合。Eckelman等人，在J. of pharm. Sci. 64（4），704—706（1975）中讲述了氮原子上的取代作用，在羧基甲基化作用前，使胺，如1，2—乙二胺或二亚乙基三胺，与适当的烷基溴化物进行反应。这些化合物被提出来作为可能的放射药学上的成像剂。

另一类以氨基羧酸官能度为基础的双官能螯合剂，在文献中也有很清楚的记载。例如，Sundberg，Meares等人在J. of Med. Chem. 17（12），1304（1974）中，公开了EDTA的双官能类似物。这些化合物的代表是1—（P—氨基苯基）

—1，2—乙二胺四乙酸和1—（P—苯—重氮化）—1，2—乙二胺四乙酸。讨论了通过对位取代基向蛋白质的偶联和放射性金属离子向螯合基团上的结合。在Biochemical and Biophysical Research Communications 75（1），149（1977）和美国专利3，994，966和4，043，998中也公开了这些化合物。有一点很重要值得注意，即向EDTA结构上连接芳香基团是通过1，2—乙二胺主链上的一个碳原子。在美国专利4，622，420中公开了基于EDTA、HEDTA和DTpA的旋光活性的双官能螯合剂。在这些化合物中，亚烷基团将芳族基团（其上含有为连接到蛋白质上所需要的官能度）连接到多胺的碳原子上，多胺中含有螯合官能度。这类化合物的其它参考文献包括Brechbiel 等人，Inorg. Chem. 25，2772—2781（1986），美国专利4，647，447和国际专利公开号WO86／06384。

更为最近的，某些大环双官能螯合剂和它们的铜螯合共轭物在诊断或治疗上的应用，已在美国专利4，678，667中，并被Moi等人，Inorg. Chem. 26，3458—3463（1987）公开。氨基羧酸官能度向双官能螯合分子的其余部分的连结，是通过环多胺主链的一个环碳进行的。例如，一个连接基团，其一端与环多胺的一个环碳相连着，其另一端也可连接一个能够与蛋白质进行反应的官能基团。

同时值得注意的另一类双官能螯合剂，包括这些化合物，其中这个分子的螯合部分，即氨基羧酸，是通过一个氮原子连接到一分子的其中含有能够与蛋白质反应部分的官能基团上。例如，Mikola 等人在专利申请（国际公开号WO84／03698，公开日期9／

27／1984）中公开了一种双官能螯合剂，该螯合剂是通过P—硝基苄基溴与DETA反应，接着与溴代乙酸反应生成氨基羧酸而制备的。其硝基被还原成相应的胺基，然后再与二氯硫化碳反应，转化成异硫氰酸根合基团。这些化合物是能够螯合镧系元素的双官能螯合剂，镧系元素可以共轭到生物有机分子上而用作诊断剂。由于这个分子连接部分的连接，是通过氨基羧酸的多个氮中的一个氮原子进行的，那么对于螯合作用就失去了一个可能的氨基羧酸基团。因此制备的是含四个酸（不是五个酸）基团的DETA一基础上的双官能螯合剂。在这一方面，这类双官能螯合剂相似于那些通过酰胺基团与蛋白质相连而失去一个羧基螯合基团的螯合剂。

最近，Carney、Rogers 和 Johnson 公开了（关于单克隆抗体治癌的第三届国际会议；San Diego，California—2／4～6／88）题为“体内较高级组织不吸收铟—111标记的抗体：在裸露鼠样品中共同施用铟—111和碘—125标记的B72.3”和“在裸露鼠内，螯合剂 Denticity 对铟—111标记的B72.3免疫共轭生物分布的影响”的摘要。公开了与EDTA和DTPA双官能螯合剂配合的铟—111的生物分布。芳香环向EDTA／DTPA部分的连接是通过乙酸酯的亚甲基进行的。在最近的一次会议上，D. K. Johnson 等人〔Florida Conf. on Chem. in Biotechnology，April 26～29（1988），Palm Coast，FL〕公开了EDTA和DTPA的双官能衍生物，其中的P—异硫代氰酸根合苄基部分连在多个羧基甲基基团之一的亚甲基碳上。以前，Hunt 等人在美国专利4，088，747和4，091，088（1978）中，公开了以1，2—

乙二胺二乙酸（EDDA）为基础的螯合剂，其中，芳族环向EDDA部分的连接是通过亚烷基或乙酸酯的亚甲基进行的。这些化合物已被论述可用作螯合剂，用来研究肝胆管的功能。优选的金属是锝—99m。铟—111和铟—113m也被认为是有用的放射性核素，用于成像。

因而，提供一种不易离解，能迅速从整个身体内，除了所需的组织处外排除的，并与抗体共轭产生所需的结果的配合物将是很有利的。

图1—7和15—21说明了 ^{153}Sm 的生物分布，其施用方式是本发明的含 ^{153}Sm 的共轭物，抗体CC49—IgG用在本发明的共轭体中。在带有LS174—T肿瘤的裸露鼠体上测定其生物分布。

图8—14和22—28说明了 ^{153}Sm 的生物分布，其施用方式是本发明的含 ^{153}Sm 的共轭物。本发明的共轭体用CC49—F(ab')$_2$ 作为抗体片段。在带有LS174—T肿瘤的裸露鼠中测定其生物分布。

图29—34说明了以含 ^{177}Lu（PA—DOTMA）的共轭物形式的^{177}Lu的生物分布。该共轭物用CC49—IgG作抗体。在带有LS174—T肿瘤的裸露鼠中测定其生物分布。

令人惊奇的是，本发明的配合物和/或共轭物比较稳定（即不容易离解），并且显示了能从整个身体内，除了所需组织处，被快速地排除。

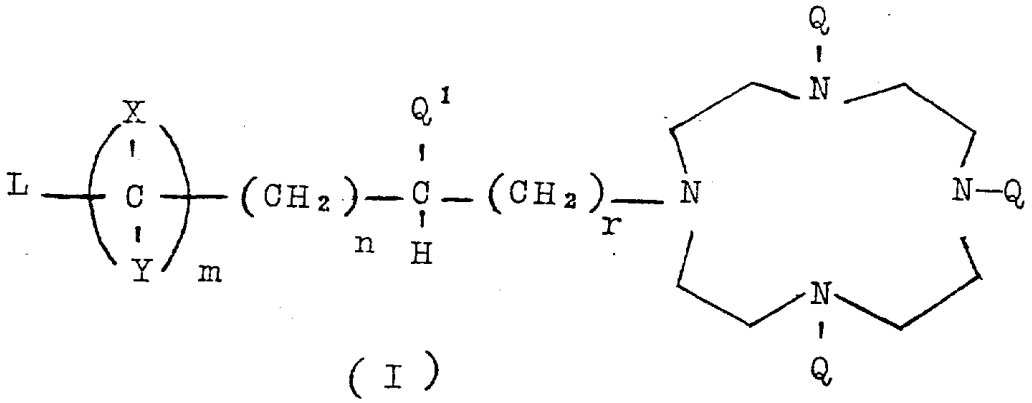
本发明包括新的双官能螯合剂的设计和合成，每种螯合剂含一个螯合官能度和一个以共价键结合于生物分子的化学活性基团。本发明的组成部分还包括制备各种双官能配位体（BFC）—金属配合物的

方法，以及将配合物连接到抗体上以制备适于诊断和／或治疗应用的放射性核素（如钐—153、镥—177和钇—90）标记的抗体和／或片段的方法。

本发明直接公开了新型的双官能螯合剂与金属离子，尤其是具有稀土类化学性质的“放射活性”金属离子形成配合物。优选的稀土类金属离子包括：La，Ce，Pr，Nd，Pm，Sm，Eu，Gd，Tb，Dy，Ho，Er，Tm，Yb，Lu，Y和Sc。优选的放射性稀土类金属离子包括：^{153}Sm，^{166}Ho，^{90}Y，^{149}Pm，^{159}Gd，^{140}La，^{177}Lu，^{175}Yb，^{47}Sc和^{142}Pr。其它可令人感兴趣的放射性金属离子是：^{47}Sc，^{99m}Tc，^{186}Re，^{188}Re，^{97}Ru，^{105}Rh，^{109}Pd，^{197}Pt，^{67}Cu，^{198}Au，^{199}Au，^{67}Ga，^{68}Ga，^{111}In，^{113m}In，^{115m}In，^{117m}Sn和^{212}Pb／^{212}Bi。如此形成的配合物，可以连结（共价键合）到抗体或其片段上，用于治疗和／或诊断的目的。该配合物和／或共轭物可被配制以供体内或体外使用。配制的共轭物的优选应用是治疗动物体，尤其是人体内的癌。

使用本发明的其中包括一个非放射性金属的配合物和／或共轭物，诊断和／或治疗病症，如癌，也是可能的。这种使用是已知的，对于非放射性的金属，用射频可引起高温（Jpn. KoKai TokKyo Koho Jp 61，158，931）和荧光—免疫导向的治疗（FIGS）〔K. Pettersson 等人，Clinical Chemistry 29，（1），60—64（1983）和C. Meares 等人，Acc. Chem. Res. 17，202—209（1984）〕。

更具体地说，本发明公开了式（Ⅰ）的化合物：



（Ⅰ）

其中：

每个Q分别是氢或$(CHR^5)_pCO_2R$；

Q^1 是氢或$(CHR^5)_wCO_2R$；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：Q和Q^1 的总和中至少两个不是氢；

每个R^5 分别是氢或C_1～C_4烷基；

X和Y各自分别是氢或者可以与相邻的X和Y生成另外的碳—碳键；

n是0或1；

m是包括0到10的整数；

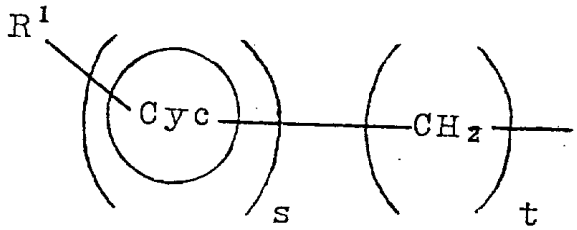
p＝1或2；

r＝0或1；

w＝0或1；

条件是：当X和／或Y生成另外的碳—碳键时，n仅是1，并且r和w的总和是0或1；

L是以共价键键合的连接基／间隔基，取代了与其相连的碳原子之一上的一个氢原子，该连接基／间隔基用下式表示：



其中：

s是0或1的整数；

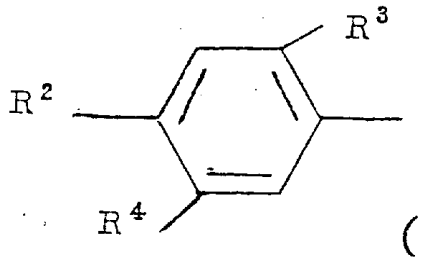
t是包括0到10的整数；

R^1 是一个亲电或亲核部分，其允许共价键合到抗体或其片段上，或者R^1 是一个合成的连接基，其可以连接到抗体或其片段上，或者R^1 是其前体；以及

Cyc 表示一个环脂族部分、芳族部分、脂杂环部分、或芳杂环部分，每个所说的部分可任意地被一个或多个基团取代，这些基团不会干扰向抗体或抗体片段的连接。条件是：当s，t，m，r和n是0时，R^1 不是羧基；

或其药学上可接受的盐。

式（I）化合物优选的部分是：R是氢；R^5 是氢或甲基；n是0；m是0到5；r是0；L是式（A）的化合物：



(A)

其中：

R^2 选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合，脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰氨基和马来酰亚胺组成的基团；

R^3 选自由 $C_1 \sim C_4$ 烷氧基、$-OCH_2CO_2H$、羟基和氢组成的基团；

R^4 选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合，脲氨基，硫代脲氨基、羧基、溴乙酰氨基和马来酰亚胺基组成的基团；

条件是：R^2 和 R^4 不能两者都是氢，但 R^2 和 R^4 中的一个必须是氢；

或其药学上可接受的盐。

当本发明的共轭物是所需要的时，R^2 和 R^4 必须不是硝基。当 R^2 或 R^4 是硝基时，那么就要存在一个连接基部分（L）的前体。这个前体部分可以是任一部分，其为制备式（I）化合物中 R^2 或 R^4 部分而形成，并且不连到抗体或抗体片段上。

本发明也公开了稀土类金属离子配合物，特别是放射性中性的或带电荷的稀土类金属离子配合物，而且还公开了与上述的配合物和抗体或抗体片段所形成的共轭物。另外本发明也包括由本发明共轭物和药学上可接受的载体组成的制剂，特别是药学上可接受载体为液体的制剂。本发明也包括诊断或治疗哺乳动物体内病症特别是癌的方法。其方法包括将有效量的制剂施用于哺乳动物体内。

正如本文使用的，下面被说明的术语具有这些含意：对于 R^1，R^2 或 R^4 的定义来说，亲电部分包括异硫氰酸根合、溴乙酰胺基、马来酰亚胺基、亚氨酸酯、硫代邻苯二甲酰亚胺、N—羟基琥珀酸酯、吡啶基二硫化物和苯基叠氮化物，但不只限于此；合适的亲核部分包括：羧基、氨基、酰（基）肼、脲氨基和硫代脲氨基，但不限于此；“合成的连接基”包括任一合成的有机或无机连接基，它们能共价键合到抗体或抗体片段上。优选的合成连接基是可生物降解的合成连接

基，其在病人血清中是稳定的，但有可能在排除的器官内裂解放射性同位素，例如可生物降解的肽或带基团的肽。亲电部分的异硫氰酸盐是优选的，亲核部分的氨基、脲氨基和硫代脲氨基是优选的。有一点要合乎需要，即R^1的性质和／或位置要明显地不干扰螯合反应。

式（Ⅰ）中，术语“x—c—y”表示在相邻碳原子之间任意存在有双键和三键。不饱和键可以分别存在于包括0到10个碳原子的，如在式（Ⅰ）中用“m”术语所定义的键长中。

正如本文所使用的，术语“哺乳动物”指的是用乳腺的奶养育它们幼子的动物，优选的是温血动物，更优选的是人。“抗体”指的是任何多克隆的、单克隆的、嵌合抗体或杂抗体，优选的是单克隆抗体；“抗体片段”包括Fab片段和$F(ab')_2$片段，以及具有朝着一个目的抗原决定基或多个抗原决定基特性的抗体的任何一个部分。当用术语“金属螯合物／抗体共轭物”或“共轭物”时，“抗体”部分意思是包括整个抗体和／或抗体片段，包括其半合成或遗传工程变异体。

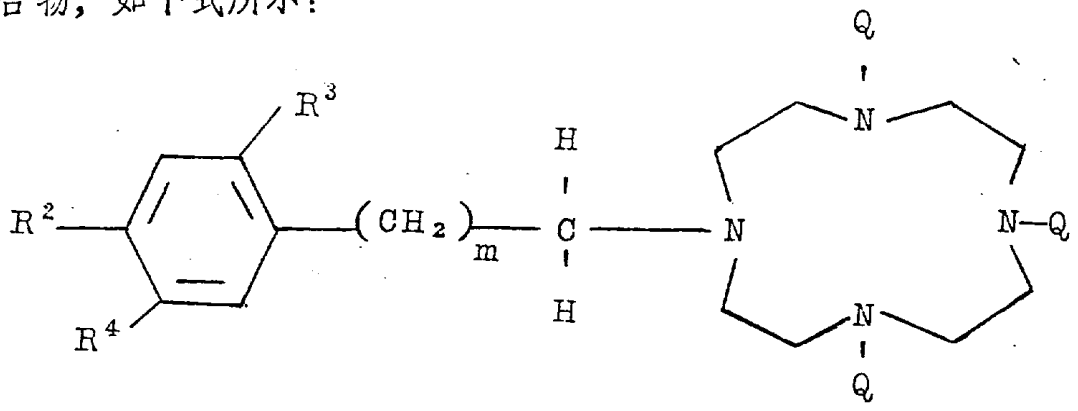
正如本文所使用的，“配合物”指的是本发明如式（Ⅰ）化合物与稀土类金属离子，特别是放射性的稀土类金属离子的配合物，其中至少一个金属原子是螯合的或（多价）螯合的；“放射性金属离子螯合物／抗体共轭物”或“放射性金属离子共轭物”指的是以共价键连接到抗体或抗体片段上的放射性金属离子共轭物；当“放射性”与“金属离子”联合使用时，指的是能放射粒子和／或光子的稀土类元素的一个或多个同位素，如^{153}Sm，^{166}Ho，^{90}Y，^{149}Pm，^{159}Gd，^{140}La，^{177}Lu，^{175}Yb，^{47}Sc和^{142}Pr；术语“双官能配位体”、“双官能螯合剂”和“官能化螯合”是可互换的，

指的是具有能够螯合金属离子的螯合部分和以共价键连接于螯合部分的连接基／间隔基部分的化合物，该化合物可用来以共价键连接于抗体或抗体片段上。

正如本文所使用的，“药学上可接受的盐意思是无毒的，足以用于哺乳动物的治疗或诊断的式（Ⅰ）化合物的任何一种盐。因此，根据本发明，这些盐是有用的，即通过标准反应，从有机的或无机酸制成的盐。这些酸包括：如硫酸，盐酸、磷酸、乙酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、棕榈油酸、粘酸、谷氨酸、d—樟脑酸、戊二酸、乙醇酸、苯二甲酸、酒石酸、甲酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、安息香酸、肉桂酸和其它合适的酸。也包括通过标准反应，从有机碱或无机碱，如铵、碱金属离子、碱土金属离子和其它类似离子制得的盐。特别优选的是式（Ⅰ）化合物的钾、钠、铵或其混合物的盐。

当然，式（Ⅰ）化合物的游离酸也可以使用，也可以是质子化形式的化合物，如当羧酸盐被质子化时，和／或氮原子即当形成HCl盐时。

优选的式（Ⅰ）化合物包括那些其中Q^1是氢，L用A式表示的化合物，如下式所示：



(II)

其中：

每个Q分别是H或CHR^5CO_2R；

每个R分别是H、苄基或C_1～C_4烷基；条件是：至少两个Q必须不是氢；

m是包括0到5的整数；

R^2选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰胺基和马来酰亚胺基组成的基团；

R^3选自由C_1～C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$，羟基和氢组成的基团；

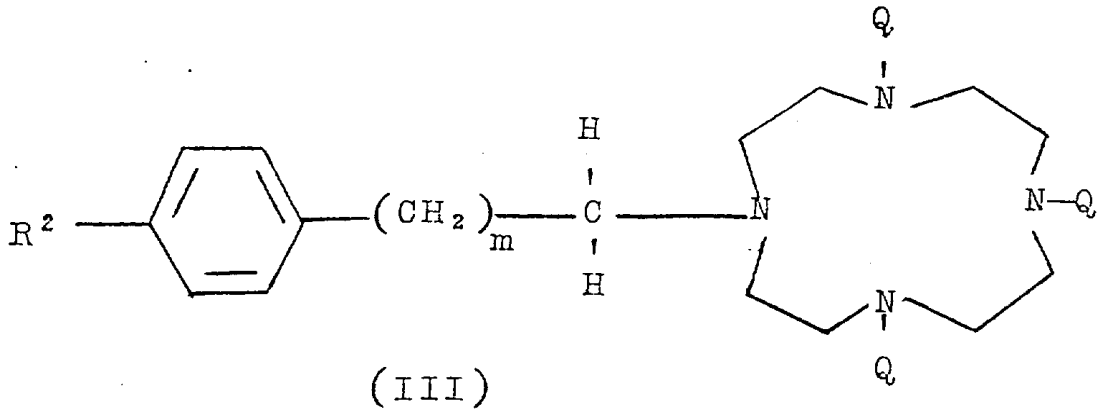
R^4选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合，脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰胺基和马来酰亚胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

条件是：R^2和R^4不能两者都是氢，但R^2和R^4中的一个必须是氢；

或其药学上可接受的盐。

在式（Ⅱ）中，当R^3和R^4两者都是氢时，化合物用下式表示：



(III)

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：至少两个Q必须不是氢；

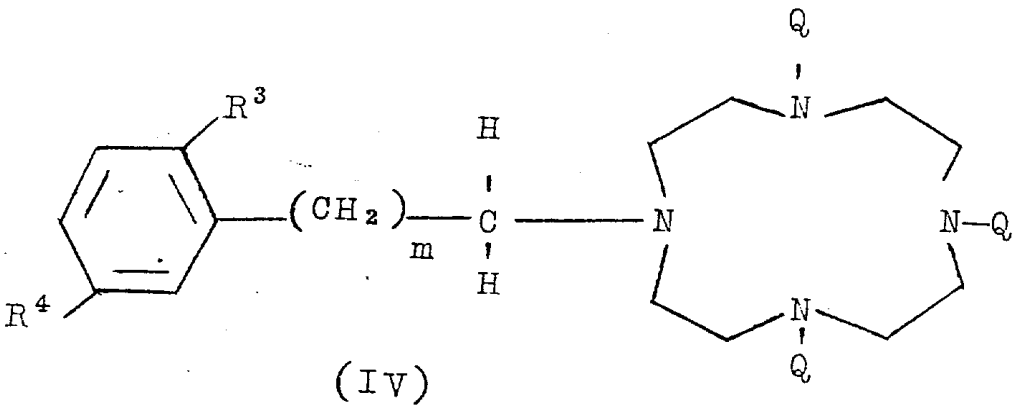
m是包括0到5的整数；

R^2选自由硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰胺基和马来酰亚胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

或其药学上可接受的盐。

在式（Ⅱ）中，当R^2是氢时，化合物用下式表示：



(IV)

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：至少两个Q必须不是氢；

m是包括0到5的整数；

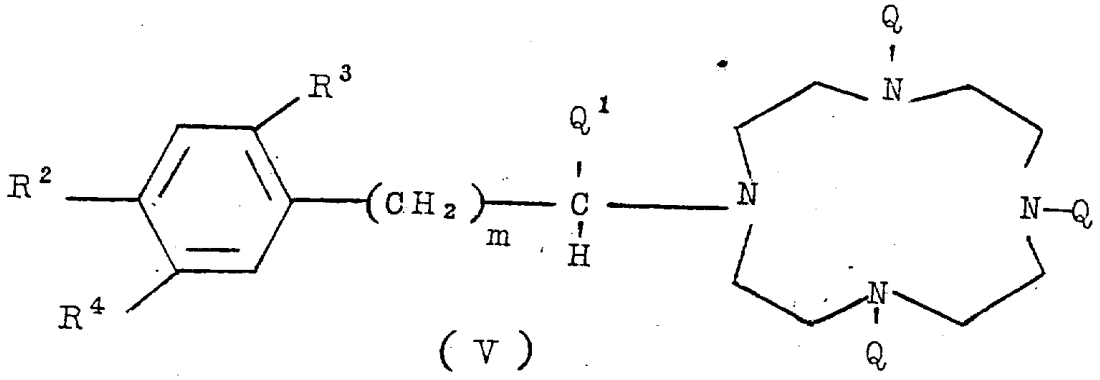
R^3选自由C_1～C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$或羟基组成的基团；

R^4选自由硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰胺基和马来酰亚胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

或其药学上可接受的盐。

另外优选的式（Ⅰ）化合物包括那些其中至少一个Q是氢的化合物，用下式表示：



（Ⅴ）

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

Q^1是氢或$(CHR^5)_wCO_2R$；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：Q和Q^1的总和中至少两个必须不是氢，而Q中之一是氢；

m是包括0到5的整数；

w是0或1；

R^2选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、马来酰亚胺基和溴乙酰胺基组成的基团；

R^3选自由C_1～C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$、羟基和氢组成的基团；

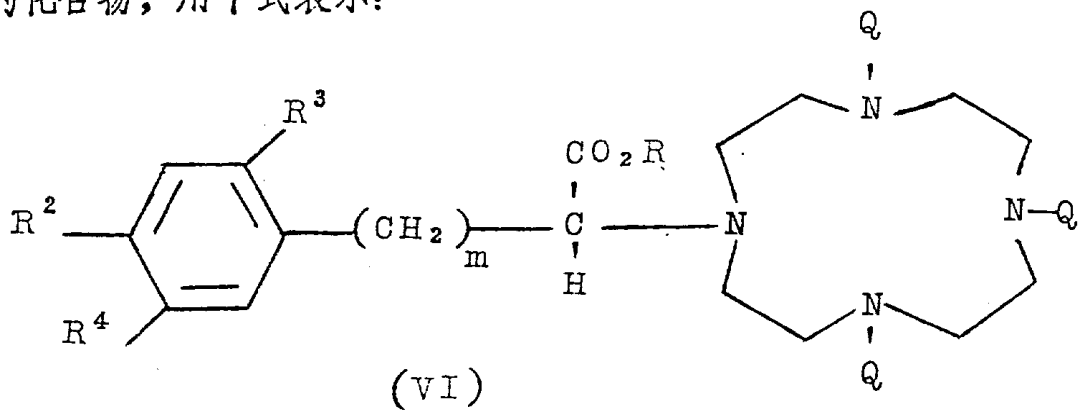
R^4选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合，脲氨基、硫代脲氨基、羧基、马来酰亚胺基和溴乙酰胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

条件是：R^1和R^4不能两者都是氢，但R^2和R^4中的一个必须是氢；

或其药学上可接受的盐。

其它优选的式（Ⅰ）化合物包括那些其中Q^1是CO_2R(W＝O)的化合物，用下式表示：



(Ⅵ)

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：至少一个Q必须不是氢；

m是包括0到5的整数；

R^2选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合，脲氨基、硫代脲氨基、羧基、马来酰亚胺基和溴乙酰胺基组成的基团；

R^3选自由C_1～C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$、羟基和氢组成的基团；

R^4选自由氢、硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、马来酰亚胺基和溴乙酰胺基组成的基团；

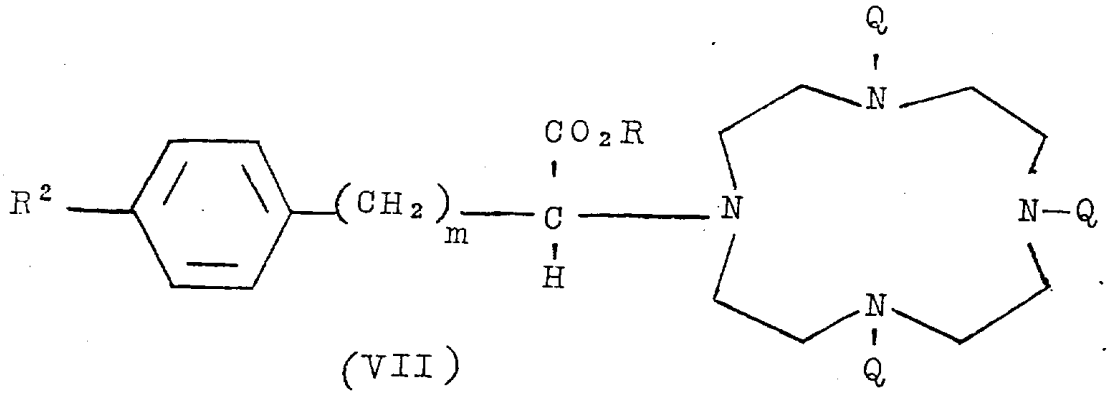
每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

条件是：R^2和R^4不能两者都是氢，但R^2和R^4中之一必须是氢；

或其药学上可接受的盐。

一些优选的式（Ⅶ）化合物是那些其中R^3和R^4两者都是氢的

化合物，用下式表示：



(VII)

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：至少一个Q必须不是氢；

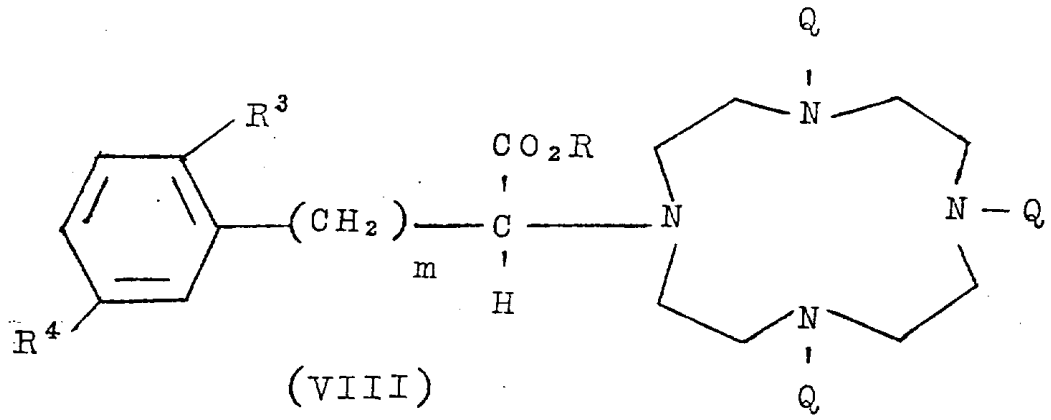
m是包括0到5的整数；

R^2选自由硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、溴乙酰胺基和马来酰亚胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

或是药学上可接受的盐。

其它优选的式(Ⅶ)化合物是那些其中R^2是氢的化合物，用下式表示：



(VIII)

其中：

每个Q分别是氢或CHR^5CO_2R；

每个R分别是氢、苄基或C_1～C_4烷基；

条件是：至少一个Q必须不是氢；

m是包括0到5的整数；

R^3选自由C_1～C_4烷氧基、$-OCH_2CO_2H$和羟基组成的基团；

R^4选自由硝基、氨基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、羧基、马来酰亚胺基和溴乙酰胺基组成的基团；

每个R^5分别是氢或C_1～C_4烷基；

或其药学上可接受的盐。

本文描述的双官能螯合剂〔用式（Ⅰ）—（Ⅷ）中任何一个表示的〕可用于螯合或（多价）螯合稀土类金属离子，特别是放射性的稀土类金属离子，以生成金属离子螯合物（这里也可称为“配合物”）。由于可官能化部分的存在〔在式（Ⅰ）中用R^1表示的〕，配合物可以连到官能化的载体，如官能化的聚合载体上，或优选地，当式（Ⅰ）的配合物，其中的L表示式A，R^2和R^4必须不是硝基时，配合物可以共价连接到蛋白质或比较特殊的抗体或抗体片段上。因此，这里所描述的配合物（用式（Ⅰ）—（Ⅷ）中任一个表示的化合物与稀土类金属离子，特别是放射性稀土类金属离子进行配合的产物）可以共价连接到一个抗体或抗体片段上，在此称为“共轭物”。

本文中所描述的共轭物中可使用的抗体或抗体片段能够用已知技术制备。高特异的单克隆抗体可以用已知的杂交技术制备，参见，例如，Kohler 和 Milstein〔Nature 256，495—497（1975）；和Eur. J. Immunol. 6 511—519

（1976）〕。通常这样的抗体有高特异的反应活性。在放射性金属离子共轭物中，可以使用直接抗任何目的抗原或半抗原的抗体。在放射性金属离子共轭物中所用的优选抗体是单克隆抗体，或其对目的抗原决定基有高特异性的片段。本发明中所用的抗体可以直接抗如肿瘤、细菌、真菌、病毒、寄生物、支原菌属、分化和其它细菌膜抗原、病原体表面抗原、毒素、酶、变应原、药物和任何生物学活性分子。某些抗体或抗体片段的实例是：CC—11，CC—46，CC—49，CC—49F（ab′）$_2$，CC—83，CC—83F（ab′）$_2$和B72.3〔对于CC—49，CC—83和B72.3抗体请参见D. Colcher 等人，Cancer Res. 48，4597—4603（Aug. 15，1988）〕。杂种细胞线B72.3存放在美国类型培养标本（ATCC）中，登记号为HB8108。在美国专利申请7—073，685中，（1987.7.15申请）公开了各种CC抗体，它们可以通过NTIS获得。其它鼠的单克隆抗体粘在TAG—72，一种连在抗原上的肿瘤，的抗原决定基上。比较全面的抗原目录表可在美国专利4，193，983中找到，该专利在此列为参考文献。本发明的放射性金属离子共轭物对于诊断或治疗各种癌症是特别优选的。

本发明优选的稀土类（镧系元素或假镧系元素）配合物用下式表示：

C〔Ln（BFC）〕

（Ⅸ）

其中：Ln是稀土金属（镧系元素）离子，如Ce^{3+}，Pr^{3+}，Nd^{3+}，Pm^{3+}，Sm^{3+}，Eu^{3+}，Gd^{3+}，Tb^{3+}，Dy^{3+}，

Ho^{3+}，Er^{3+}，Tm^{3+}，Yb^{3+}和Lu^{3+}，或假镧系元素金属离子如：Sc^{3+}，Y^{3+}，和La^{3+}，BFC表示双官能螯合剂；C表示药学上可接受的离子或为保证整个配合物呈中性而带有足够电荷的离子的基团。如果BFC含有四个或更多阴电荷部分，那么C是阳离子或阳离子基团，如：H^+，Li^+，Na^+，K^+，Rb^+，Cs^+，Mg^{2+}，Ca^{2+}，Sr^{2+}，Ba^{2+}，NH_4^+，$N(CH_3)_4^+$，$N(C_2H_5)_4^+$，$N(C_3H_7)_4^+$，$N(C_4H_9)_4^+$，$As(C_6H_5)_4^+$，$[(C_6H_5)_3P=]_2N^+$和其它质子化的胺。如果BFC含有三个阴电荷部分，则C是不需要的。如果BFC含有两个阴电荷部分，则C是阴离子，如：F^-，Cl^-，Br^-，I^-，ClO_4^-，BF_4^-，$H_2PO_4^-$，HCO_3^-，HCO_2^-，$CH_3SO_3^-$ $H_3C-C_6H_4-SO_3^-$，PF_6^-，$CH_3CO_2^-$和$B(C_6H_5)_4^-$。

本发明的共轭物，以及在某些情况下本发明的配合物，可以用来做制剂。制剂由式（I）化合物与抗体和／或金属离子和生理学上可接受的载体、赋形剂或媒介物所组成。例如，制剂可由生理学上可接受的载体和配合物（金属离子＋配位体），共轭物（金属离子＋配位体＋抗体）或（配位体＋抗体）组成。制备这种制剂的方法是已知的。制剂可以是悬浮液、注射液或其它合适的制剂形式。可以使用生理学上可接受的悬浮介质，加或不加辅助剂。

本发明的制剂是含有与配位体配合的活性放射性核素的固体或液体形式。这些制剂可以是配套形式，在使用前适当的时间里，将两个成分（即配位体和金属、配合物和抗体，或配位体／抗体和金属）进行混合。无论是予混合形式还是配套形式，制剂通常需要药学上可接受的载体。

本发明的可注射组合物可以是悬浮液形式或溶液形式。在制备合适的制剂时，一般将会看到：盐的水溶解性大于酸的形式。在溶液形式时，配合物（或是所需的单独成分）被溶于生理学上可接受的载体中。这些载体包括合适的溶剂、防腐剂如苄醇，如果需要，还包括缓冲剂。有用的溶剂包括：如水、含水酒精、1，2—乙二醇和膦酸脂或碳酸酯。这种含水溶液含有不大于50%（体积比）的有机溶剂。

注射悬浮液是本发明的组合物，其需要一液态悬浮介质作为载体，可加或不加辅助剂。悬浮介质可以是：如含水聚乙烯吡咯烷酮、惰性油如植物油或高精细矿物油、或含水的羧甲基纤维素。如果必须保持配合物为悬浮液形式，则可以从增稠剂如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐中选择合适的生理学可接受的辅助剂。很多表面活性剂可用作悬浮剂，如卵磷脂、烷基酚、聚环氧乙烷加合物、萘磺酸盐、烷基苯磺酸盐和聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯。

在个别情况下，许多影响液体悬浮介质的亲水性、密度和表面张力的物质会有助于注射悬浮液的制备，例如（聚）硅氧烷消泡剂、山梨糖醇和糖都是有用的悬浮剂。

“有效量”的制剂被用于治疗。剂量将根据被治疗的疾病而改变。虽然可用本发明制剂进行体外诊断，但也期望着用本发明制剂进行体内诊断。本发明的共轭物和制剂也可以用于放射免疫导向外科（RIGS）；然而，能用于此目的的其它金属也包括：^{99m}Tc，^{111}In，^{113m}In，^{67}Ga 和 ^{68}Ga。

本发明的一些螯合剂的其它应用，可包括磁共振成像，例如，式（I）的配合物，特别是式（VI）的配合物，与 Gd^{+3} 一起为各种目的，如作为诊断试剂，连到聚合物载体上，然后通过选择性提取方

式除去镧系元素金属或假镧系元素金属离子。

本发明提供了螯合剂、配合物和抗体共轭物，与已知技术相比，其中一些具有较好的稳定性、和／或改善了的生物分布、和／或能更迅速地从体内排除。

一种合理的、一般的合成式（Ⅰ）所示的本发明近似12大环的双官能螯合剂的方法，包括用一适当的亲电试剂（例如任何适当取代的α—卤代羧酸酯）使大环游离碱（例如1，4，7，10—四氮杂环十二烷）仅在一个氮原子上进行单官能化反应。这个亲电试剂必须具有适当的连接基部分或被适当保护的连接基部分，该部分要允许双官能配位体共价连接到蛋白质、抗体或抗体片段上。

从现有技术中已认识到：用来制备单—N—官能的多氮杂大环的烷基化技术，会导致产品难以分离的混合物〔T. Kaden，Top. Curr. Chem. 121，157—75（1984）〕。这个问题通过已报导的方法，即使用大量过量的大环碱（相当于亲电试剂的5～10当量）已被克服。过量的大环碱有助于单烷基化加合物的生成〔M. Studer 和 T. A. Kaden，Helv. Chim. Acta 69，2081—86（1986）；E. Kimura 等人，J. Chem. Soc.. Chem. Commun 1158—59（1986）〕。

生成单—N—官能的多氮杂大环的其它路线包括过长的保护、官能化作用和脱保护步骤〔P. S. Pallavicini 等人，J. Amer. Chem. Soc. 109，5139—44（1987）；M. F. Tweedle 等人，Eur. Pub. Pat. Appln. No. 0232—751〕。一个关于取代的苯基丙酮酸和胺的还原胺化作用的最近的报导，已由 Abbott Labs 发表，是最近的一次会议

的摘要（D. K. Johnson 等人，Florida Conf. on Chem. in Biotechnology，April 26—29（1988），Palm Coast，FL）。一种制备单—N—烷基化的多氮杂大环的方法被公开在序号为289，163，由W. J. Kraper，于1988，12，22申请的美国专利申请中。该方法是通过使用一种亲电试剂与大约1至5当量之间的适当的大环在一溶剂中进行反应，该溶剂将不促进质子的转移。该公开内容特提出作为参考文献。

本发明螯合物的一般合成路线已公开在后面的合成路线Ⅰ—Ⅳ中，包括适当的亲电试剂与多氮杂大环在适当的有机溶剂中的反应。适当的有机溶剂的例子是任何有助于溶解性的碳氢化合物，如乙腈、异丙醇、二氯甲烷、甲苯、氯仿、n—丁醇、四氯化碳、四氢呋喃、5%乙醇氯仿溶液，其中最好的是氯仿、二氯甲烷、n—丁醇、1，4—二恶烷和乙腈。各种化学计量的反应物、温度和浓度都可以使用。可以使用化学计量差不多的大环和亲电试剂，并以一步反应生成相应的单—N—烷基化产物。反应的温度范围从大约0℃到大约回流温度，最好从0℃到25℃。反应的时间是直到彻底完成大约1到24小时。

为了合成路线Ⅱ到Ⅳ的总的活力，一般需要利用取代的α—卤酸酯。一个合适的途径包括发生在酰卤位上的溴化作用或氯化作用，例如，D. N. Harpp 等人，J. Org. Chem. 40，3420—27（1975）。这个途径考虑到了链烷酸的全部α卤化作用，甚至这个酸含有反应活性的芳基基团。对于取代的酰基卤的一般方法，包括了有机酸与亚硫酰氯或硫酰氯的反应，例如，E. Schwenk等人，J. Amer. Chem. Soc. 70，3626—27（1944）。两个方法都使用游离羧酸，它们常可从商店买到。

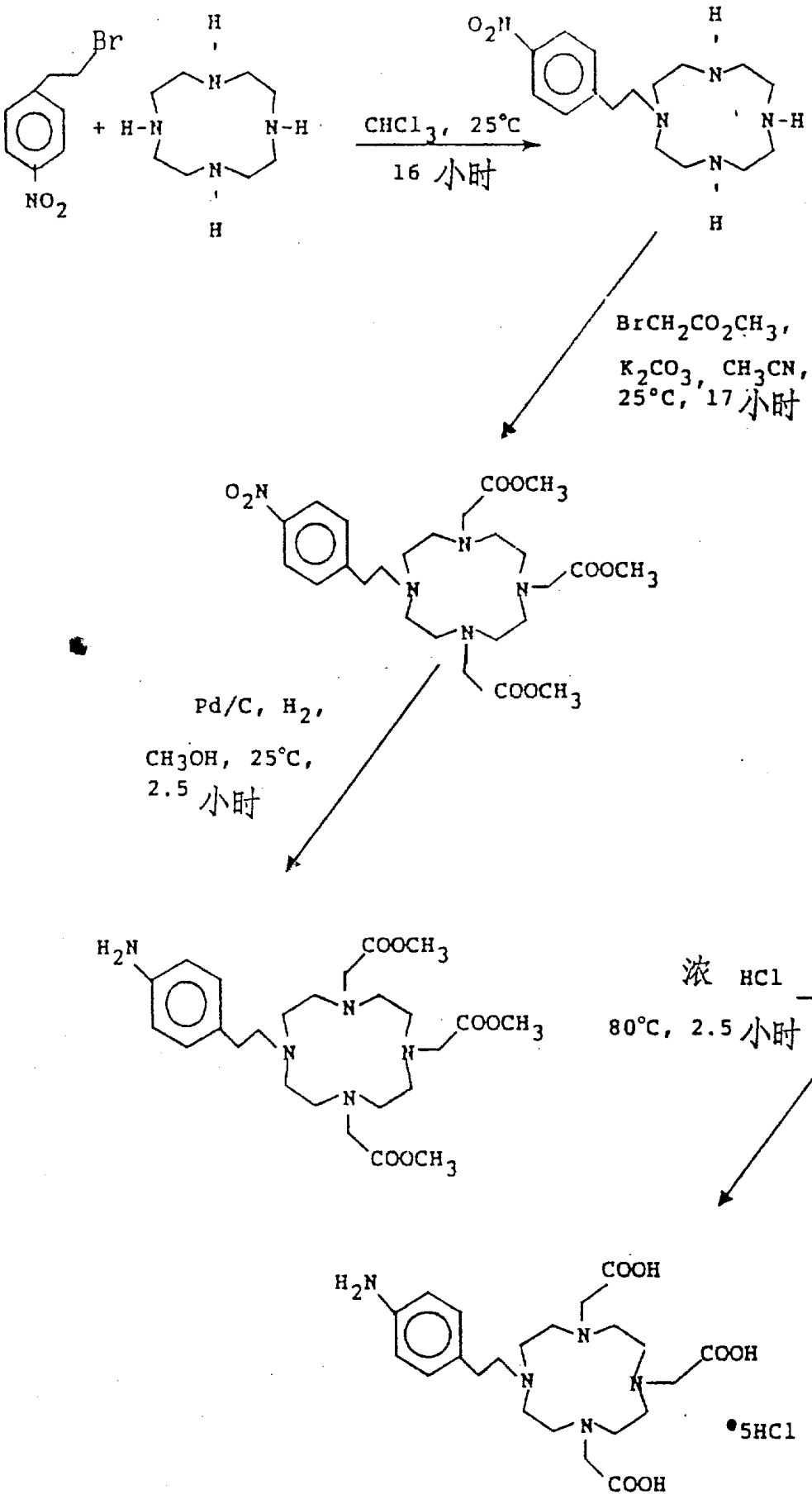
多氮杂大环，如1，4，7，10—四氮杂环十二烷，可以用文献中的方法制得，如T．J．Atkins 等人，J．Amer．Chem．Soc．96，2268—70（1974）和T．J．Richman 等人，Org．Synthesis 58，86—98（1978）。

单—N—官能的大环的羧甲基化作用，可以用溴乙酸衍生物和适当的碱通过Desreux 方法进行〔J．F．Desreux，Inorg．Chem．19，1319—24（1980）〕。

所有制备本发明化合物所需要的起始原料，或者从商店中购买，或是从已知文献叙述的方法制得。

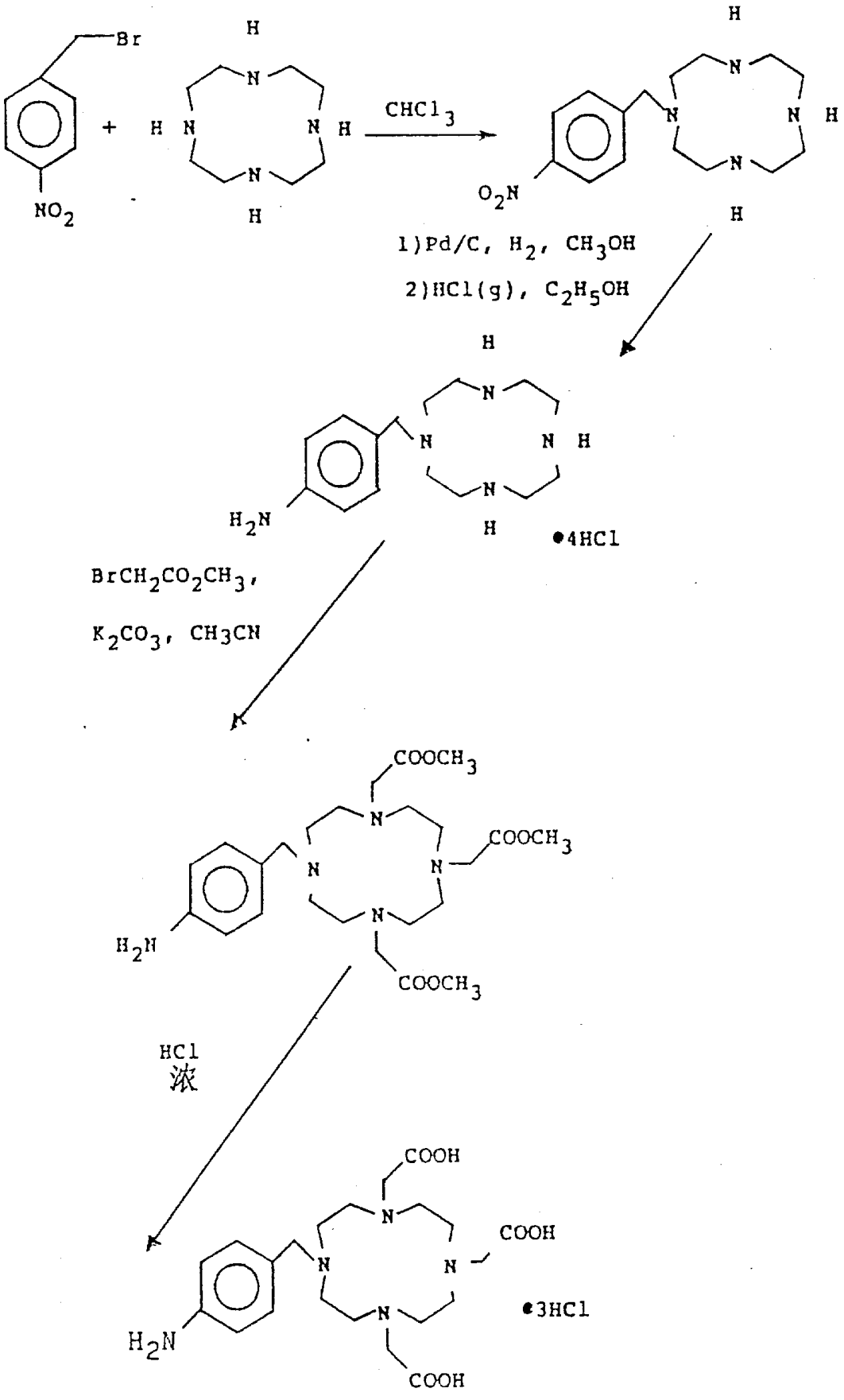
在下面的路线I中，制备了Q^1 是氢的式（I）化合物。虽然图示仅说明了一个化合物，但式（I）中Q^1 是氢，r＝0或1，n＝0或1，及m＝0到10的其它类似部分也可以用这种方法制得。

路线I


Br
NO2
+ H-N
N-H
CHCl3, 25°C
16 小时
O2N
BrCH2CO2CH3,
K2CO3, CH3CN,
25°C, 17小时
COOCH3
Pd/C, H2,
CH3OH, 25°C,
2.5 小时
H2N
浓 HCl
80°C, 2.5小时
COOH
•5HCl

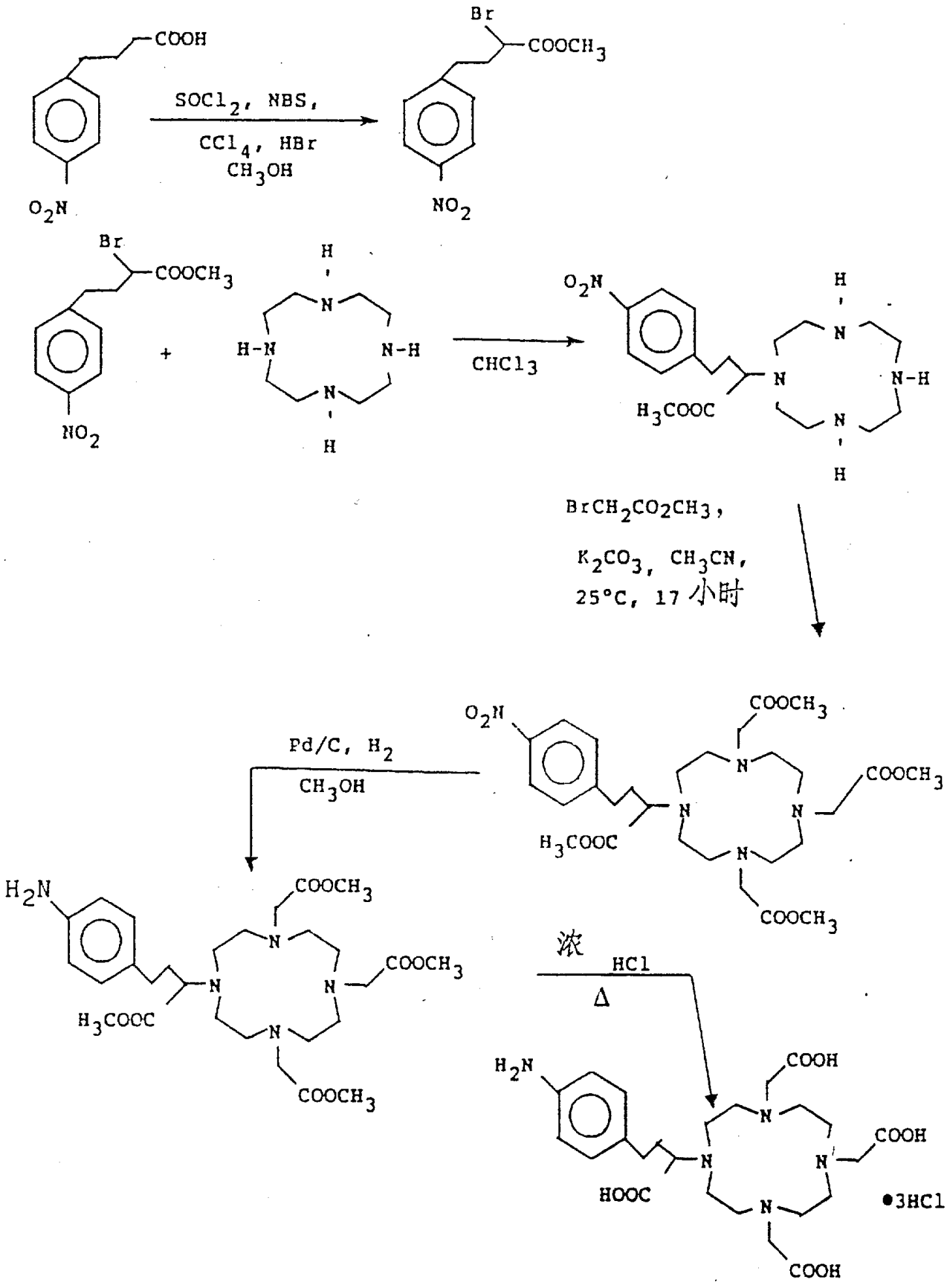
在下述路线Ⅱ中，制备了Q^1是氢的式（Ⅰ）化合物。虽然图示仅说明了一个化合物，但式（Ⅰ）中Q^1是氢、r＝0或1，n＝0或1，及m＝0到10的其它类似部分也可以用这种方法制得。

路线Ⅱ


Br
NO2
CHCl3
O2N
1)Pd/C, H2, CH3OH
2)HCl(g), C2H5OH
H2N
•4HCl
BrCH2CO2CH3,
K2CO3, CH3CN
COOCH3
HCl
浓
COOH
•3HCl

在下面的路线Ⅲ中，制备了Q^1是CO_2R的式（Ⅰ）化合物。虽然图示仅说明了一个化合物，但式（Ⅰ）中Q^1是CO_2R，包括m＝0到10，n＝0或1，及r＝0的其它类似部分也可以用这个方法制得。

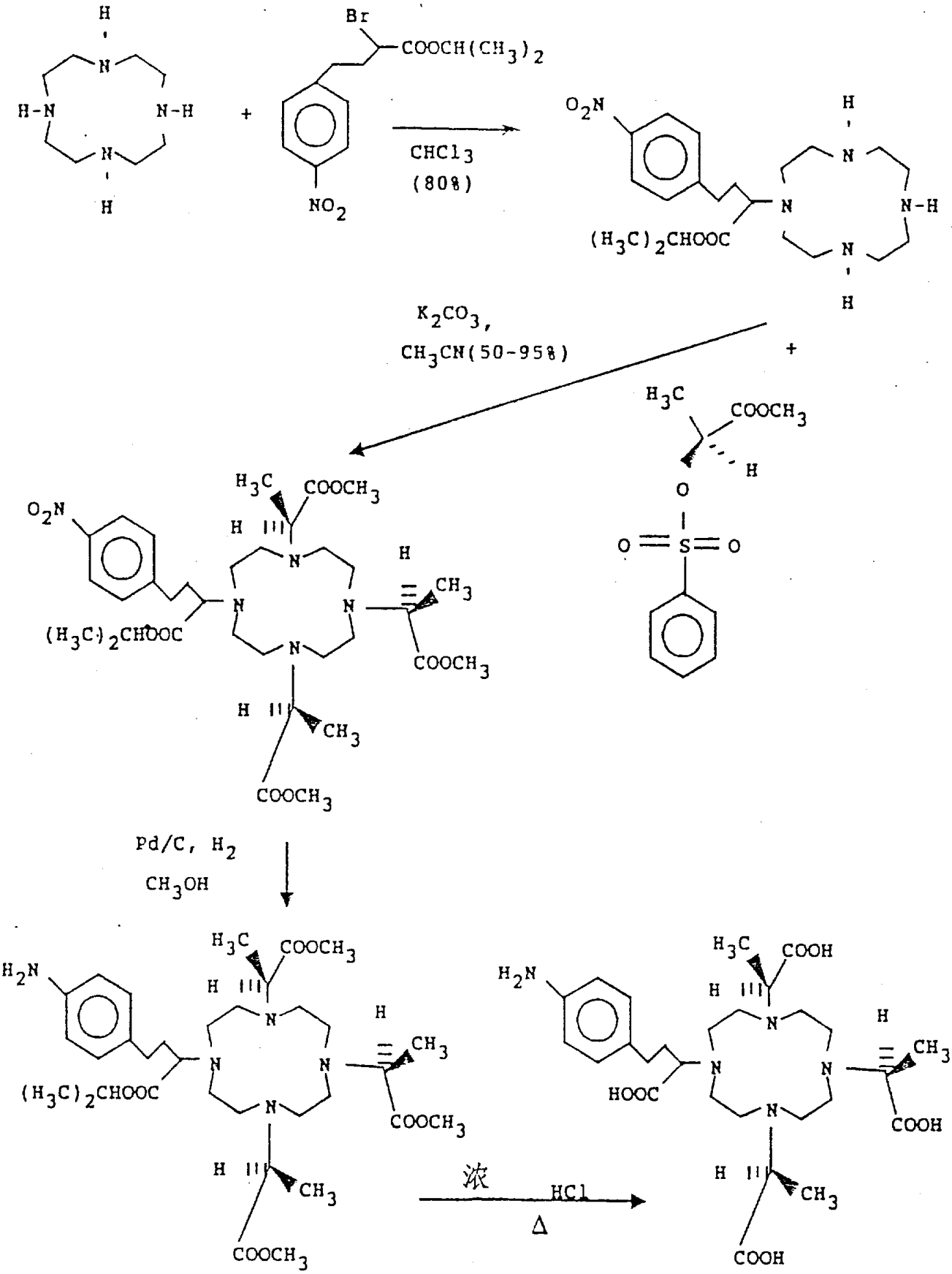
路线Ⅲ


COOH
$SOCl_2$, NBS,
CCl_4, HBr
CH_3OH
Br
$COOCH_3$
O_2N
NO_2
$CHCl_3$
H_3COOC
$BrCH_2CO_2CH_3$,
K_2CO_3, CH_3CN,
25°C, 17 小时
Pd/C, H_2
CH_3OH
H_2N
浓 HCl
Δ
HOOC
•3HCl

在下面的路线Ⅳ中，制备了Q^1是$(CHR^5)_wCO_2R$的式（Ⅰ）化合物。虽然图示仅说明了一个化合物，但式（Ⅰ）中，Q^1是$(CHR^5)_wCO_2R$，包括m＝0到10，n＝0或1，及r＝0的其它类似部分也可以用这个方法制得。

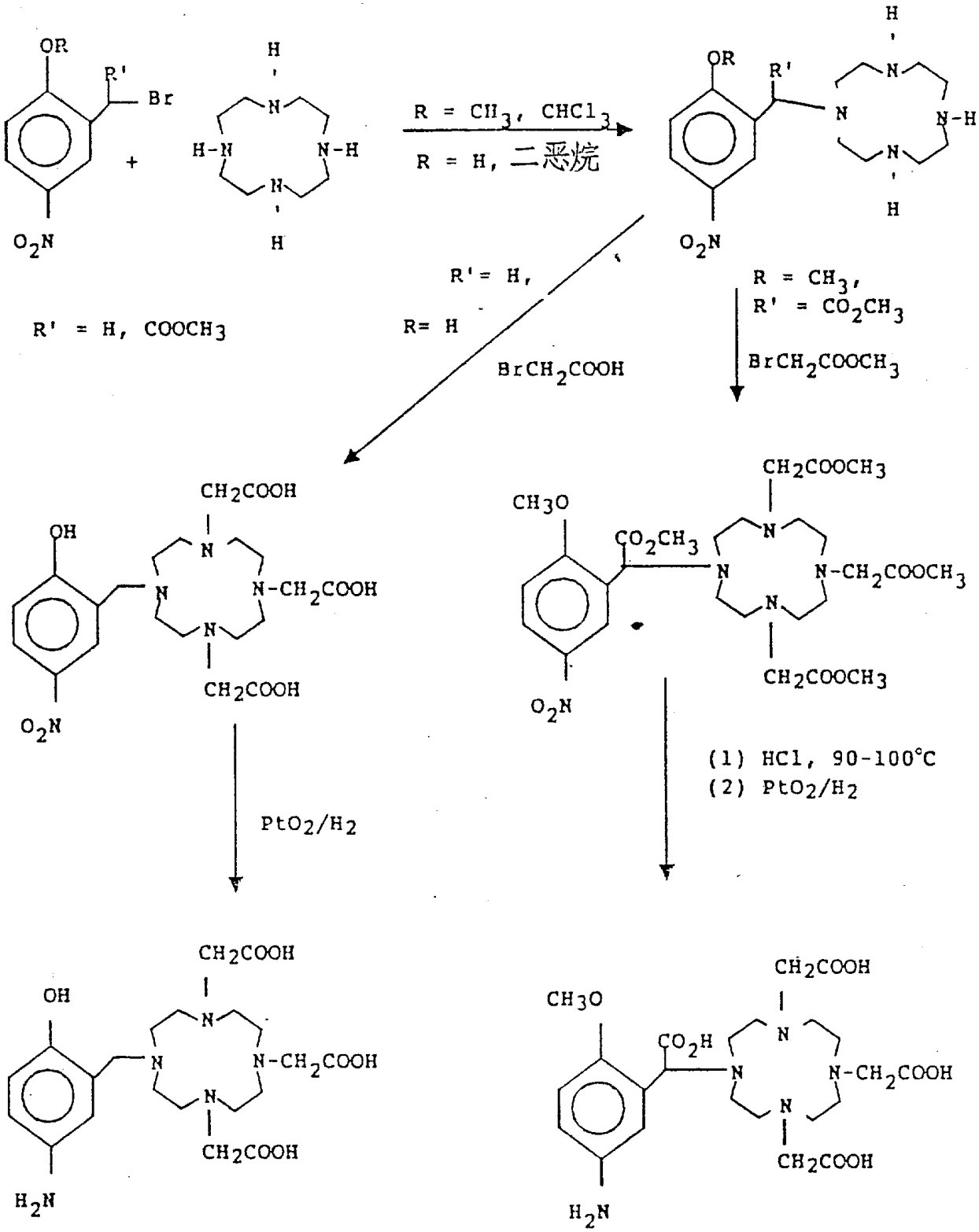
使用一种旋光活性的烷基化试剂能使非对映体减至最小，并简化了合成步骤。为了放射螯合作用及抗体共轭作用，需要分离出单一的能生成单一的、易纯化的镧系元素配合物的非对映体。

路线 IV



在下面的路线V中，制备了Q^1是氢或$(CHR^5)_wCO_2R$和R^2是氢的式（I）化合物。虽然图示仅说明了两个化合物，但式(I)中Q^1是氢或$(CHR^5)_wCO_2R$，Q是氢或$(CHR^5)_pCO_2R$，r＝0或1，n＝0或1，w＝0或1，m＝0到10，p＝1或2，L表示式A，其中R^3定义如前，R^2和R^4选自由氢、氨基、硝基、异硫氰酸根合、脲氨基、硫代脲氨基、马来酰亚胺基、溴乙酰胺基和羧基组成的基团的其它类似部分也可以用这个方法制得。

路线V


R = CH3, CHCl3
R = H, 二恶烷
R' = H, COOCH3
R' = H,
R= H
BrCH2COOH
R = CH3,
R' = CO2CH3
BrCH2COOCH3
PtO2/H2
(1) HCl, 90-100°C
(2) PtO2/H2

亲电试剂部分（式中的“ R^1 ”）也可以用现有技术中已知方法加以制备。这种方法可以在Acc. Chem. Res. 17，202—209（1984）中找到。能够制备其中R^1是异硫氰酸根合部分（当L＝式A时，R^2或R^4是异硫氰酸根合）的式（I）化合物的方法，包括氨基螯合物（当L＝式A时，R^2或R^4是氨基）与硫光气反应，该方法公开在序号为289，172，由M. J. Fazio等人于1988，12，23申请的美国专利申请中。该公开内容特引为参考文献。

放射性核素可以用几种方法制备，在一核反应器中，用中子轰击一核素得到一放射性核素，例如：

$$Sm-152 + 中子 \longrightarrow Sm-153 + \gamma$$

获得放射性核素的另一个方法，是在一线性加速器或回旋加速器中，用粒子轰击核素。此外还有另一种方法是从裂变产物的混合物中离析出放射性核素。获得本发明中所用的核素的方法不是很严格的。

制备本发明的共轭物的方法是，首先形成配合物，然后与抗体或抗体片段连接。这样，该方法包括制备或获得配位体、形成与金属的配合物，然后加到抗体上。另一方面，制备标记的抗体共轭物的方法包括，首先将BFC共轭到抗体上，然后螯合，生成放射性核素—BFC标记的Ab。生成本发明共轭形式的任何适当方法，是在本发明的范围之内。

在下列实施例中，使用下列术语和条件，除非另有说明。

一般实验

质错是用Finnigan TSQ质错仪（Q'MS型）或VG EAB—MS高分辨质错仪（用氩做快速原子轰击，使用3：1二硫

3	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的 NH_4OH
	16 : 4 : 1
	V : V : V
4	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的 NH_4OH
	4 : 2 : 1
	V : V : V
5	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的 NH_4OH
	3 : 2 : 1
	V : V : V
6	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的 NH_4OH
	7 : 3 : 1
	V : V : V
7	盐水（0.85%的NaCl 蒸馏水溶液）：浓缩的 NH_4OH
	4 : 1
	V : V
8	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的 NH_4OH
	4 : 4 : 1
	V : V : V

业已报导，使用这些溶剂体系的Rf 值和工业上另得的、正相、二氧化硅TLC板〔GHLF250微米，Analtech Inc. 或Merck Kiesel 凝胶60F254〕。使用Merck 级60，即60 Å硅胶做制备柱色谱。

苏糖醇：二硫赤藓糖醇）做的。

^{1}H 和 ^{13}C NMR谱图是用Varian VXR—300，Bruker APC300，IBM／BruKer NR—80或Jeol Fx400分光计做的。所用谱图均在30℃下做的，除非另有说明。^{1}H NMR是在300MHz，80MHz或400MHz（分别对应于上面所列仪器）下做的。^{13}C NMR是在75MHz，20MHz或100MHz（分别对应于上面所列仪器）下做的。NMR的值为δ，此值相对于TMS（四甲基硅）或当D_2O为溶剂时相对于DSS（2，2—二甲基—2—硅杂戊烷—5—磺酸，钠盐）。

红外光谱（IR）是用Nicolet 5SX FT／IR仪做的。

用于色谱法的大多数溶剂为Fisher HPLC级原料。乙酸铵是从Aldrich购买的。用Barnstead NANO Pure^{TM}水过滤装置提纯水。有机化合物的制备色谱法既可通过使用标准方法的标准重力色谱法，也可通过由C. W. Still 等，J. org. Chem. 43，2923—24（1978）所描述的闪色谱法来完成。使用下列溶剂体系：

溶剂体系	组　分
1	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的NH_4OH
	2 : 2 : 1
	V : V : V
2	$CHCl_3$: CH_3OH : 浓缩的NH_4OH
	12 : 4 : 1
	V : V : V

所有百分比均为重量百分比，除非另有说明。

用旋转式蒸发器（Buchi 461）和／或真空干燥箱在温度大约为55—60℃下将一些固体干燥几小时。此外，用Virtis 型10—010自动冷冻干燥机或Speed Vac TM 浓缩机去溶剂。

钐—153和镥—177由Research Reactor，Missouri 大学（Columbia，MO）生产。镱—90从OaK Ridge National Laboratory 购买。

通过改进M. W. Brechbiel 等，Inog. Chem. 25，2772—2781（1986）的方法制备1—（4—异硫氰酸根合苄基）二亚乙基三胺—五乙酸（ScN—Bz—DTPA），并在阴离子交换HPLC（Q—Sepharose TM）提纯得到单一物种。所使用的一些化学物质从指定的来源得到：从Behring Diagnostics（La Jolla CA）购买N—2—羟乙基哌嗪—N′—2—乙烷磺酸（HEPES），游离酸和钠盐；从Fisher Scientfic 购买柠檬酸钠（经检定）；从Aldrich Chemicals 购买硫光气；从Sigma Diagnostics 购买乙酸铵，乙酸钠，乙二胺四乙酸（EDTA）和缓冲盐水的磷酸盐（PBS）。

所使用的HPLC柱为：Hand—Packed Q—Sepha rose TM （Pharmacia）1.5cm×25cm或2.5cm×25cm；从Du Pont Instruments 购买的Zorbax TM BIO Series GF—250（9.4mm×25cm）；从Separation Group（Hesperia，CA）购买的Vydac TM （Separations Group，Hesperia，CA的商标）蛋

白质C—4（4．6mm×25cm）；从Pharmacia 购买的Mono—Q TM 和SP—Sephadex TM （Pharmacia Biotechnology Products 的商品名）。从Waters Associates （Milford，MA）购买Sep—Pak TM （Waters Associates 的商品名）C—18过滤器从Isolab Inc.（AKron，OH）购买Sephadex TM G—25易处理的（2．2mt）从Amicon 购买Centricon TM—30（Amicon Division，W. R. Grace & Co.，Danrers，MA的商品名）微型浓缩机。

五个HPLC装置用于分析和试样的分离：

装置I由LKB2150泵，2152控制器，UV检测器—LKB2238 UV电线（Cord），Berthold LB506A HPLC放射监测器（International Berthold Group的产品）和Gilson 馏分收集器201—202（Gilson International，Middleton，WI）所组成。

装置II装备有自动取样器。WISP710B，两个泵（510型），自动梯度控制器（Water Associates 的产品），Perkin—Elmer LC—75 分光光度检测器，Beckman 型170 放射性同位素检测器和馏分收集器（Pharmacia 的 Frac 100）；

装置III由有一个Water 660 溶剂程序器的两个Water M—6000A泵，Waters 型481可变波长检测器和Waters 数据模件所组成，也可使用准备的ISCO馏分收集器；

装置IV为装备有可变波长UV检测器的Dionex BioLC TM

装置；和

装置V带有ISCO型2360梯度程序器的Water 型590泵和Dionex 可变波长检测器。

Sorvall RT6000 B（Du Pont 的致冷式离心机）用于离心分离和浓缩，Speed Vac 浓缩机（Savant Instruments Inc.，Hicksville，N. Y）用于除去挥发性溶剂。用Capintec TM 放射性同位素校准器（Capintec Inc. 的商标）CRC—12，或通过Beckman Ls 9800（Beckman Instrument，Inc.，Irvine，CA）的液体闪烁，或用接触面有3英寸厚的铊漂移的碘化钠完好晶体的（Canberra 35 +）多通道分析仪进行放射性测量。

在涉及配合物形式的实施例中，通过下面所指定的一般方法确定配合物的百分比。

通过阳离子交换确定配合物的百分比

用在水中溶胀的SP—Sephadex TM C—25树脂1至2 ml装填在10 ml塑料柱。通过在柱顶部施加压力除去过量的水。将试验溶液（15μl）加至树脂顶部，然后用2 ml 4：1（V：V）等渗盐水：浓缩的NH_4OH 作为洗脱液。将洗脱液收集至计数管中。使用另外2 ml洗脱液。在洗脱液收集至第二计数管后，在树脂顶部施加空气压力使其干燥。将干燥过的树脂转至第三个计数管。用连接在Canberra 多通道分析仪上的完好的NaI计数器测量每个计数管的活性。作为配合物的金属量用作在洗脱液中发现的总活性的百分率，在自由未配合状态下的金属量用作保留在树脂中的总金属的百分率。

通过离子交换除去未配合的金属

用0．5ml在水中溶胀的SP—Sephadex TM C—25树脂装填在10ml塑料柱。将该柱在3，000rpm下离心4分钟除去过量的水。将200—500μl体积的配合物溶液置于树脂顶部，再将该管子在3，000rpm下离心4分钟。未配合的金属残留在柱中，配合的金属用溶剂洗脱。

钇配合物的制备：

通过制备3×10^{-4} M钇水溶液（$YCl_3\cdot6H_2O$，303.26 g／mole；或$Y(OAC)_3$，12．1%H_2O）来制备配合物。加入放射性Y^{3+}溶液（Oakridge National Laboratories）获得所需的放射性水平。将10μl配位体溶液（为0．03M）加到990μl Y^{3+}溶液中，得到配位体：金属的摩尔比为1：1。为使配位体与金属之比为10：1，需使用10倍的配位体溶液的量。用几微升的HCl或NaOH调节PH至7.4。然后用上面所给的阳离子交换方法测验溶液的配合钇的量。

钐配合物的制备：

除了通过将Sm_2O_3（348．7g／mol溶于0．1M HCl中制备3×10^{-4} M钐外，用上述钇配合物的制备方法制备钐配合物。以大约3×10^{-4} M的0．1M HCl溶液的放射性Sm—153是从Missouri大学，Research Reactor，Columbia，Missouri得到的。

用于全文的一些术语定义如下。

术语汇编：

Conc．为浓缩的；

$^{-}$OAC为乙酸根部分，$^{-}OCOCH_3$；

TLC为薄层色谱；

DIH_2O为去离子NANO Pure^{TM}水；

NANO Pure^{TM}水为由Barnstead NANO Pure^{TM}水过滤装置得到的纯净水；

环境温度为室温或大约20至大约25℃；

过夜为大约9至18小时；

LC为液相色谱；

NBS为N—溴丁二酰亚胺；

MES为2—（N—吗啉代）乙烷磺酸；

HPLC为高性能液相色谱；

PBS为从Sigma购买的用盐水缓冲的磷酸盐，含有120 mM NaCl，2.7 mM KCl和10 mM磷酸盐缓冲液，PH 7.4；

SP—Sephadex^{TM} C—25树脂为有磺酸官能度的阳离子交换树脂，由Pharmacia. Inc. 出售；

rpm＝每分钟转数；

PD为氢氘化的PH；

DOTA＝1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸；

HEPES＝N—2—羟乙基哌嗪—N′—2—乙烷磺酸；

BFC＝双官能螯合剂；

CyCLen＝1，4，7，10—四氮杂环十二烷；

PA—DOTA＝α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，

4，7，10—四氮杂环十二烷—1．4，7，10—四乙酸；

PA—DOTMA＝α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸—4，7，10—三（甲基乙酸）

BA—DOTA＝α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸；

OMe—BA—DOTA＝α—（5—氨基—2—甲氧苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸：

EA—DO3A＝1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸；

DTPA＝二亚乙基三胺五乙酸；

SCN—Bz—DTPA＝1—（4—异硫氰酸根合苄基）二亚乙基三胺五乙酸；

EDTA＝乙二胺四乙酸：

螯合剂相当于配位体；

配合物相当于螯合物，例如；螯合剂连在合适的金属离子上。

共轭意为螯合剂或配合物共价地连接在抗体或抗体的片段上；和

抗体为CC—49，CC—83和B72．3和它们的片段如Fab和$F(ab')_2$。在上文中已给出了其它抗体。hybridoma，细胞系B72．3保藏于American Type Culture Collection，入藏号为ATCC HB8108，其它称为鼠科无性系的抗体结合在TAG—72抗原决定部位，与抗原有关肿瘤上。

通过下列大量实施例，进一步阐明本发明，这些实施例仅为使用本发明的典型例子。

起始原料的制备

实施例A

d，l—2—溴—4—（4—硝基苯基）—丁酸，甲酯的制备

通氮气下将10.46g（0.05mol）的4—（4—硝基苯基）丁酸加到5ml四氯化碳和15ml（0.2mol）亚硫酰氯的溶液中。将溶液回流1小时开始有氯化氢气体和二氧化硫气体释出。将溶于25ml四氯化碳和三滴48%溴化氢水溶液催化剂中的11.0g（0.06mol）N—溴丁二酰亚胺加到热溶液中，注意溴气的释出，将深红色溶液回流35分钟，冷却溶液，然后在搅拌下将溶液倒入100ml甲醇中。TLC分析（60：40乙酸乙酯：已烷V：V）表明为新产物（Rf＝0.69，二氧化硅板）。用旋转式蒸发器除去过量的溶剂，用二氯甲烷作洗脱剂通过闪 硅胶垫板（1英吋×5英吋）过滤深红色油液。蒸发溶剂得到清亮的油液，产量为15.43g，它为标题产物：起始丁酸衍生物的甲酯为85：15的混合物。标题产物的结构特征为：

^{1}H NMR（$CDCl_3$）

8.16（d），7.38（d），4.20（dd），

3.79（S），2.88（m），2.38（m）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$，75MHz）

169.6，147.5，129.3，123.7，

53.0，44.4，35.5，33.0。

实施例B

α—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—乙酸，1—甲酯的制备

在通氮气并搅拌下，在五分钟内将2.07 g（5.82 mmol）d，l—2—溴—4—（4—硝基苯基）丁酸，甲酯（由实施例A的方法制备）加到搅拌的1.72 g（10.0 mmol）的1，4，7，10—四氮杂环十二烷的17 ml用氯仿稳定的戊烯溶液中。在大约25℃下将反应混合物搅拌48小时。TLC（使用溶剂体系2，在Analtech 硅胶板上）表明形成了标题产物（R_f = 0.73）。将黄色氯仿溶液加至1英吋×16英吋闪色谱硅胶柱（用5%甲醇的氯仿溶液预洗脱）中，用250 ml 5%甲醇的氯仿溶液洗脱，接着用溶剂体系2洗脱。合并含有纯标题产物的馏分，蒸发得到2.15 g（5.46 mmol，94%）标题产物，为淡黄色玻璃状。用乙醚研制这种玻璃状物的氯仿溶液得到分析纯的白色粉末沉淀（mp＝156—159℃），其结构特征为：

^{1}H NMR（$CDCl_3$）

8.14（d），7.39（d），3.71（s），3.39（dd），2.5—3.0（m），2.08（m），2.01（m）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$，75 MHz）

172.7，149.3，146.4，129.2，123.6，62.3，51.2，48.9，47.2，45.8，45.4，32.8，30.9。

实施例C

2—溴—2—（4—硝基苯基）乙酸，甲酯的制备

在通氮气下将对硝基苯乙酸（25.0 g，0.14 mol）和溶于无水苯（100 ml）的亚硫酰氯（15.1 ml，0.21mol）

的混合物回流搅拌三小时。然后在真空下将混合物蒸发干燥。将残余物溶于四氯化碳中并通氮气回流搅拌。在三天时间内分小批加入溴（7.2ml，0.14mol）并回流混合物。冷却反应混合物并用甲醇（50ml，慢慢加入）骤冷酰基氯。通过用玻璃单环的六英吋柱减压（BP＝168℃，在1.1mm下）蒸馏回收所得到的溴酯（27g，71%），为黄色油状物。标题产物的结构由下列数据所证实：

^{1}H NMR（$COCl_3$）

8.25（d），7.81（d），5.51（s），

3.86（s）。

实施例D

α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸，1—甲酯的制备

将含有能形成完全溶液的刚好足量的甲醇的354mg（2.068mmol）的1，4，7，10—四氮杂环十二烷的20ml乙腈溶液，一起加到529mg（2.068mmol）2—溴—2—（4—硝基苯基）乙酸，甲酯（由实施例C的方法制备）的20ml乙腈溶液中。将所得的粉红色溶液搅拌1.5小时，然后在真空下于35℃将溶液浓缩至少体积。用硅胶色谱以20%（wt／v）NH_4OAC／CH_3OH洗脱纯化粗的单酯四胺。纯化过的单酯四胺以三乙酸盐离析出来，然后转化为自由胺。270mg的3ml水溶液在0℃用K_2CO_3水溶液（10%wt／wt）调PH为11。然后以10ml×5氯仿萃取该碱性溶液，合并氯仿层，然后用硫酸钠干燥，浓缩得到160mg（产率42%）所要的单酯四胺，其结

构特征由NMR和快速原子轰击质谱（〔M+H〕$^{+}$=366）确证，和结构特征是：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

8.12（d），7.44（d），4.75（s），3.76（s），2.67—2.44（M）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$）

171.5，147.6，144.0，130.0，124.0，67.0，49.8，47.9，46.0，46.9。

实施例E

N—（2—甲氧基—5—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷的制备

将含有2.1克2—甲氧基—5—硝基苄基溴（8.5 mmol）的氯仿溶液（20 ml）一次加到搅拌的含有2.9克1，4，7，10—四氮杂环十二烷（16.8 mmol）的氯仿溶液（20 ml）中。室温搅拌3小时后过滤反应混合物，真空浓缩滤液，得到的残余物进行色谱分离（硅胶，溶剂体系3）。分离得到单烷基化产物，产率为79%（MP=154—156℃），和其结构特征为：

^{13}C NMR（$CDCl_3$）

162.47，140.63，127.92，125.49，124.53，109.91，55.88，53.25，50.90，47.18，45.45，45.29。

实施例F

N—（2—羟基—5—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂

环十二烷的制备

将2—羟基—5—硝基苄基溴（1．2g，7mmol）的二恶烷溶液（15ml）在连续搅拌下一次加到1，4，7，10—四氮杂环十二烷（2．3g，14mmol）的1，4—二恶烷溶液（20ml）中。在几分钟后，加入K_2CO_3（1g）并在室温下连续搅拌1小时。然后过滤反应混合物，真空浓缩滤液，得到的黄色半固体进行硅胶柱色谱分离，用溶剂体系5洗脱。从也含有未反应胺的仅余最后1／3亮黄色洗脱液中分离出所要的单烷基化产物。液缩后，用$CHCl_3$（100ml）研制黄色油液，过滤除去起始原料$CHCl_3$可溶性胺。然后分离出纯的最终产物，为黄色固体（1．2g，55%）；（MP＝142—145℃），其进一步的结构特征为：

^{13}C NMR（D_2O）

25．04，25．28，26．83，31．80，36．54，101．88，107．22，110．92，111．80，115．26，159．99。

实施例G

1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷的制备

将4．00g（17．4mmol）1—（2—溴乙基）—4—硝基苯在通氮气剧烈搅拌下于5分钟内滴加到搅拌的3．50克（20．3mmol）1，4，7，10—四氮杂环十二烷的50ml用稳定氯仿的戊烯溶液中。

在室温下（大约25℃）继续搅拌大约18小时，从溶液中沉淀出溴氢化胺晶体。将全部的反应混合物加至闪色谱硅胶柱（1英吋×

18英吋）中，用5%甲醇的氯仿溶液预洗脱；用200ml该溶液洗脱，接着用溶剂体系3洗脱。从所要的产物中分离出1.45g（9.7mmol）对硝基苯乙烯（R_f=0.98；溶剂体系1）。然后分离出所要的单官能标题产物（2.27g，7.06mmol，40.6%），为橙黄色油液，存放则凝固（R_f=0.73，溶剂体系1）。

从$CHCl_3$／环已烷中再结晶标题产物的试样，表明其结构特征如下：MP=146.5—148.5℃；

^1H NMR（$CDCl_3$）

8.135（d，m），7.395（d，m），2.91（t），2.77（t），2.72（t），2.50（t），2.60（s）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$，75MHz）

148.5，146.7，129.6，123.4，55.5，51.4，46.9，45.9，45.1，33.7。

实施例H

1—（4—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷的制备

将3.5克（20.3mmol）1，4，7，10—四氮杂环十二烷和1.7g（7.87mmol）对硝基苄基溴加到50ml氯仿中，在25℃下通氮气搅拌混合物24小时。然后将溴氢化物的盐的氯仿淤浆加至1英吋×17英吋的闪色谱硅胶柱中（溶剂体系3）。分离得到2.13g（6.93mmol）的标题产物，为分析纯的淡黄色固体，产率为88%（R_f=0.58，溶剂体系3），

MP＝128—129℃，其进一步的结构特征为：

^{1}H NMR（$CDCl_3$）

8.19（d），7.49（d），3.69（s），2.82（t），2.70（t），2.59（m）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$，73MHz）

147.2，128.4，123.8，58.8，51.7，47.1，46.3，45.1。

（为了避免与后面的生物实施例号混淆，没有实施例I）

实施例J

1—（4—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷的制备

将690mg（2.25mmol）的1—（4—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷（由实施例H的方法制备）溶于10ml甲醇中。在该溶液中加入350mg 10%钯的碳催化剂。在25℃下用过量的氢气吹洗该溶液。在45分钟内TLC表明已制备了标题产物（Rf＝0.33，溶剂体系3）。用1英吋×16英吋闪色谱硅胶柱（溶剂体系3）进行形成的标题产物的色谱纯化，得到480mg（77%）的标题产物，为淡黄色清亮油液。

用无水氯化氢鼓泡通入游离碱的乙醇溶液从而将标题产物的游离碱（103mg，0.37mmol）转化为盐酸化物盐，所得的标题产物的四盐酸化物盐，在用冷的乙醇洗涤和真空干燥后，得到产量为147mg（0.347mmol），MP＝255—260℃（del），其结构特征为：

^{1}H（D_2O，PD＝1.9）

7.56(d), 7.47(d), 3.95(s), 3.28(t), 3.23(t), 3.09(t), 2.96(t);

^{13}C NMR(D_2O, PD=1.9, 75MHz)

138.3, 134.2, 132.2, 126.0, 58.5, 50.3, 46.7, 44.6, 44.3。

实施例K

2—甲氧基—5—硝基苄基腈的制备

将2—甲氧基—5—硝基苄基溴(25g, 101.6mmol)的乙醇(15ml)热溶液在搅拌下分小批于70℃下加到氰化钠(6g, 121.9mmol)水溶液(5.3ml)中。然后将反应混合物回流1.5小时，冷却并过滤。滤饼用乙腈洗涤，真空蒸发滤液得2—甲氧基—5—硝基苄基腈(19.5g, 100%)，为棕黄色固体。产物的结构特征为：

^{13}C NMR ($CDCl_3$)

161.4, 141.0, 125.7, 124.6, 119.8, 116.5, 110.2, 56.3, 18.8。

实施例L

2—甲氧基—5—硝基苯乙酸的制备

将2—甲氧基—5—硝基苄基腈(19.5g)(由实施例K的方法制备)的浓盐酸(20ml)的浆液回流3小时。冷却后，过滤得到粗产物并用水洗涤。将固体溶于热氢氧化钠水溶液中并趁热过滤。将此橙红溶液冷却并用盐酸酸化。过滤沉淀，并用水洗，干燥得到2—甲氧基—5—硝基苯乙酸，为白色固体(15g, 70%)。产物的结构特征为：

^{13}C NMR (CDCl$_3$—CD$_3$OD)

172.8, 162.5, 140.7, 126.2, 124.7, 124.1, 109.7, 55.8, 35.0。

实施例M

α—溴—(2—甲氧基—5—硝基苯基)乙酸，甲酯的制备

将亚硫酰氯(4.0ml，54.8mmol)加到2—甲氧基—5—硝基苯乙酸(2.266g，10.74mmol)(按实施例L的方法制备)的无水苯(50ml)浆液中。在烧瓶上装置干燥管和冷凝器，将混合物回流2小时。将得到的黄色溶液真空浓缩至小体积，然后溶于无水四氯化碳中。加入溴(0.6ml，11.6mmol)，溶液在隔绝空气湿度的条件下回流二天。反应混合物浓缩至小体积，加入(50ml)甲醇。真空蒸发过量甲醇后得到的油滴用色谱法提纯(硅胶，二氯甲烷—己烷4：1)。得到标题产物(2.399g，74%)，为黄色油液。产物结构特征为：

^{1}H NMR (CDCl$_3$)

8.45(dd)，8.15(dd)，6.95(d)，5.75(s)，3.99(s)，3.78(s)。

实施例N

α—(2—甲氧基—5—硝基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷，1—乙酸，甲酯

将α—溴(2—甲氧基—5—硝基苯基)—乙酸(2.399g，7.89mmol)(按实施例M的方法制备)的氯仿(10ml)溶液加到搅拌的1，4，7，10—四氮杂环十二烷(2.72g，15.79mmol)的氯仿(50ml)溶液中。室温下搅拌混合

物2小时。然后将混浊的混合物在室温下真空浓缩至小体积。通过色谱法（硅胶，溶剂体系3）提纯粗产物，得到标题化合物，为黄色固体（2.60g，83%）。其结构特征为：

^{13}C NMR （$CDCl_3$）

170.7，161.6，139.9，125.0，124.5，124.2，110.2，59.5，55.5，50.5，48.0，47.3，45.6，44.3，43.5

实施例o

d，l—2—溴—4—（4—硝基苯基）—丁酸异丙酯的制备

使用Harpp 等，J. Org. Chem 40，3420—27（1975）的方法，通氮气将4—（4—硝基苯基）丁酸（21.0g，0.10mol）加到四氯化碳（10ml）和亚硫酰氯（30ml，0.4mol）的溶液中。将溶液回流1小时开始有氯化氢和二氧化硫迅速释出。此时，加入N—溴丁二酰亚胺（22.0g，0.12mol）的四氯化碳（ 50ml）溶液，并将8滴48%溴化氢水溶液催化剂加到热溶液中，注意溴的释出，将此深红色溶液再回流35分钟。将溶液冷却并在搅拌下倒至异丙醇（400ml）中。TLC分析（二氯甲烷，硅胶板）表明为新产物（R_f=0.73）。除去过量溶剂，使用二氯甲烷作洗脱液用闪色谱硅胶垫板（3英吋×6英吋）过滤深红色油液。真空下除去溶剂，将淡黄色油液加至快速硅胶柱（3英吋×18英吋）中，用二氯甲烷洗脱得到25.0g（0.076mol）所题的溴酯产物，为清亮油液，产率为75%，异丙醇溶剂化物中含有少于5%的未溴化的酯，

产物的结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

8.16（d，2H），7.38（d，2H），5.05（t重峰，1H），4.14（dd，1H），2.88（m，4H），2.39（m，4H），1.29（d，6H）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$）

168.7，147.7，129.3，123.8，69.9，45.1，35.6，33.0，21.5，21.2

实施例P

α—〔3—（4—硝基苯基）丙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸，1—甲酯的制备

将4.81g（换算成14.6mmol）的d，l—2—溴—4—（4—硝基苯基）—丁酸异丙酯（按实施例O的方法制备）在通氮气并搅拌下于5分钟内加入3.137g（18.2mmol）Cyclen游离碱的30ml用氯仿稳定的戊烯溶液中。在室温下搅拌反应溶液24小时。TLC分析（溶液体系2）表明已转化为标题所称的单烷基化产物（Rf＝0.78，用水合茚三酮，碘和UV活性测定）。将黄色氯仿溶液加至1英吋×17英吋闪色谱硅胶柱中，用5%甲醇的氯仿溶液预洗脱，再用300ml此溶剂体系洗脱，接着用溶剂体系2洗脱得到含纯标题产物的馏分，合并这些馏分并蒸发得到4.85g（5.46mmol）标题产物的游离碱，为淡色油液，产率为79%，其进一步的结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

8.15（d，2H），7.40（d，2H），5.07

(P, 1H), 3.35(dd, 1H), 2.65—3.0(m, 13H), 2.5—2.64(m, 4H), 2.14(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.28(dd, 6H);

^{13}C NMR ($CDCl_3$)

171.6, 149.5, 146.5, 129.2, 123.6, 68.1, 62.7, 49.2, 47.5, 45.9, 45.7, 32.9, 31.0, 22.1, 22.0;

IR($CDCl_3$) cm^{-1}

3231(N—H), 2978, 2933, 1721(酯羰基), 1601, 1512, 1458, 1345, 1107;

快速原子轰击质谱m/e 422$(M+H)^+$, 408, 392。

最终产物—配位体的制备

实施例1

α—(4—硝基苯基)—1, 4, 7, 10—四氮杂环十二烷—1, 4, 7, 10—四乙酸, —甲酯, 三乙酯的制备

将700mg(1.91mmol)的α—(4—硝基苯基)—1, 4, 7, 10—四氮杂环十二烷—1—乙酸, 1—甲酯(按实施例D的方法制备)溶于含有4.6g(33.3mmol)新鲜粉状无水碳酸钾的46ml乙腈中。将1.022g(6.12mmol)溴乙酸乙酯一次加到此悬浮液中, 在室温下搅拌四小时后, 真空过滤悬浮液, 用15ml乙腈再次洗涤滤饼, 在38℃下真空蒸发滤液得到粗的标题所称的四酯, 为紫色固体。然后用硅胶色谱法提纯四酯, 用5%C_2H_5OH/$CHCL_3$洗脱, 然后用溶剂体系3洗脱得到620mg(0.988mmol, 52%)的所要产物。产物的特征可由

快速原子轰击质谱（〔M＋H〕$^{+}$＝624）证实，并通过下列数据进一步确证其结构特征：

^{1}H HMR （$CDCl_3$）

8.24（d），7.45（d），4.94（s），4.35—4.10（m），3.79（s），3.75—1.84（m），1.34—1.22（m），

^{13}C NMR （$CDCl_3$）

174.3，173.8，173.6，171.5，147.6，138.9，131.5，123.4，64.8，61.5，61.4，60.2，55.4，55.0，53.1，52.9，52.7，52.4，51.9，51.7，48.8，48.3，44.9，19.1，14.1。

实施例2

α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸的制备

将300'mg（0.478mmol）的α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，—甲基，三乙酯（按实施1的方法制备）溶于30ml 6N HCl中，将混和物回流加热过夜。在回流的终点，将溶液在70℃下真空浓缩得到黄色固体。将此固体溶于3ml水中，过滤，蒸发滤液得到253mg（0.378mmol，79%）的粗产物。用制备性TLC〔硅胶，在20%NH4OAC／CH_3OH（wt／v）中展开〕提纯该产物，产物的特征可由快速原子轰击质谱（〔M＋H〕$^{+}$＝526）证实，并通过下列数据进一步确证其结构特征：

^{1}H NMR (D_2O)

8.21(d), *7.42*(d), *4.83*(s), *3.83—2.19*(m), *1.92*(s);

^{13}C NMR(D_2O)

175.0, 173.6, 171.8, 167.0, 166.3, 146.9, 138.3, 130.1, 123.0, 62.2, 54.0, 53.0, 52.2, 50.4, 97.3, 46.8, 44.8, 42.8, 20.0。

实施例3

α—(4—氨基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸(BA—DOTA)的制备

方法A：

用Adams 催化剂(PtO_2)和基本定量的氢气进行四酸(按实施例2的方法制备)的硝基的催化氢化得到标题产物。产物的特征可由快速原子轰击质谱(〔M+H〕$^{+}$=496)和阴离子交换HPLC(在Q—Sepharose^{TM})证实，并通过下列数据进一步确证其结构特征：

^{1}H NMR (D_2O)

8.12(d), *7.86*(d), *5.66*(s), *4.73—4.57*(m), *4.27—3.78*(m), *3.39—2.91*(m);

^{13}C NMR (D_2O)

176.54, 176.52, 176.46, 141.1, 128.9, 120.9, 112.5, 65.0, 55.9,

55.7，53.6，49.7，49.5，49.3，45.7，45.4，44.9，44.6，41.4。

方法B：

此化合物合成的另一方法，是将实施例D的单酯四胺化合物转化为一酸四胺化合物（6N HCl，回流过夜），接着用溴乙酸含水的烷基化，然后将硝基还原成氨基（PtO_2 催化剂）得到上述等同的产物。

实施例4

α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸的制备

将2.0g（5.48mmol）的单酯三胺化合物（按实施例D的方法制备）溶于60ml的6N HCl中。将混合物加热至95℃过夜（大约10小时），在75℃下真空浓缩混合物得到2.53g（5.11mmol，96%）的一酸四胺四盐酸化物，为黄色固体。

将上述的一酸四胺四盐酸化物（0.5g，1.0mmol，溶于15ml水中，用NaOH调PH为9。另外制备溴乙酸溶液（0.71g，5.13mmol）并将它加到一酸四胺水溶液中。再调溶液的PH至9，在反应过程中通过加入少量1.0N NaOH保持溶液的PH为9。一边反应中进行搅拌，一边在不同的时间除去等份试样，用阴离子交换HPLC监测烷基化的进程。当二烷基化产物的量（出现的三乙酸盐的基总量）达到最大值时，将全部反应混合物冷冻干燥得到黑色固体。用硅胶色谱法（用溶剂体系1）纯化这个烷基化产品的混合物，接着用制备型阴离子交换色谱法（用0—100%的1M NH_4OA（梯度洗脱），然后用制备型TLC板（用溶剂体系4展开），

最后用硅胶色谱法（用溶剂体系4洗脱）提纯烷基化产物的粗混合物。用这种彻底的纯化方法得到30mg（0.06mmol，6.0%）的标题产物，为黄色固体。产物的特征可由快速原子轰击质谱（〔M+H〕⁺=468）和阴离子交换HPLC证实，并通过下列数据进一步确证其结构特征：

^{1}H NMR （D_2O）

8.12（bs），7.35（bs），4.76（s），3.57—3.44（M），2.97—1.83（m），1.80（s）。

^{13}C NMR （D_2O）

181.75，180.68，179.00，175.37，147.70，141.22，133.08，123.53，68.44，59.72，56.00，52.80，49.96，49.29，47.86，45.36，44.26，42.78，42.25，23.72。

实施例5

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸五盐酸化物和α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸五盐酸化物的制备。

按照实施例4所述方法制备烷基化产物的粗混合物。用硅胶柱以20%NH_4OAC／CH_3OH（wt：v）洗脱进行色谱分离粗混合物。合并由柱中得到的适宜馏分，蒸发至干燥。将含有大量NH_4OAC的粗产物溶于80ml的NANO Pure™水中，冷冻干燥得到浅棕色固体。将该固体溶于20ml NANO Pure™水中，

用PtO_2作催化剂通H_2，振荡直到停止吸收氢气。真空过滤分离催化剂，冷冻干燥滤液得到黄色固体。将该固体溶于3ml溶剂体系4，用溶剂体系4在硅胶上进行色谱分离。汇集起来的馏分真空汽提，冷冻干燥得到779.6mg浅黄色固体。^{13}C NMR和质子NMR表明该产物内两种可能的几何异构体50／50的混合物。这种异构体混合物与过量HCl接触并冷冻干燥得到548，4mg（61%产率）的标题产物。M．P．＞270℃。阴离子交换色谱（HPLC体系Ⅲ）显示一大峰（＞94%纯度）；快速原子轰击质谱表明几何异构体的〔M＋H〕$^+$＝438。

实施例6

α—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，1，4，7，10—四甲酯的制备

将1.71g（12.34mmol）无水碳酸钾在剧烈搅拌下加到1.43g（3.63mol）的α—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸，1—甲酯（按实施例B的方法制备）的40ml氩吹洗的乙腈溶液中。将1.78g（11.61mmol）的溴乙酸甲酯加到反应混合物中，然后将反应混合物在大约25℃下搅拌48小时。TLC分析表明形成了新产物（Rf＝0.62，溶剂体系2）。将6.0g闪 硅胶加到浆液中，用旋转式蒸发器除去乙腈。将得到的产物加至1英吋×16英吋硅胶柱中，用5%甲醇的氯仿溶液予洗脱，用大约400ml的所制备的溶液洗脱一些非极性杂质和未反应的烷基化剂。然后使用溶剂体系2，收集，合并，蒸发含产物的馏分（Rf＝0.62）得到

2．1g（3．44mmol，95%）的标题产物，为灰黄色玻璃体。^{1}H NMR表明该产物为构象或几何异构体的2：1的混合物。

^{1}H NMR（$CDCl_3$，50℃）

8．137（d），8．128（d），7．398（d），7．385（d），3．82（s），3．76（s），3．75（s），3．74（s），3．68（s），1．5—3．52（m）；

^{13}C NMR（$CDCl_3$，50℃ 75MHz）

175．8，174．2，174．1，174．0，149．0，129．5，129．3，123．6，60．1，55．1，52．8，52．7，52．6，52．4，52．2，52．1，52．0，51．2，51．1，51．0，49．1，48．8，47．5，45．2，34．2，32．6。

实施例7

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，1，4，7，10—四甲酯

将1．41g（2．31mmol）的α—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10四乙酸1，4，7，10—四甲酯（按实施例6的方法制备）通氮气下溶于含400mg 10%钯／碳催化剂25ml的甲醇中。在一大气压下用过量氢气吹洗溶液三小时。TLC表明形成了水合茚三酮强阳性的产物（R_J=0．62，溶剂体系2）。通过硅藻土（Celite）过滤甲醇的催化剂浆液，蒸发溶剂得到标题产物1.21g

（2.08mmol，91%），为白色固体玻璃状（为2：1的构象异构体的混合物）。通过闪 色谱以10%甲醇的氯仿溶液洗脱从大量的异构体中分离出小量的构象或几何异构体，得到标题产物，为灰白色粉末（MP＝89—95℃），其结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$，50℃）

6.94（d），6.89（d），6.69（d），6.66（d），3.91（s），3.80（s），3.78（s），3.74（s），3.73（s），3.72（s），3.71（s），1.5—3.5（m）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$，50℃，75MHz）

176.1，174.0，173.9，172.2，170.4，169.6，144.2，144.1，130.6，130.5，129.5，129.1，115.9，115.8，62.6，58.7，55.1，54.3，52.7，52.5，52.3，52.2，52.1，52.0，51.9，51.8，51.7，50.2，50.0，47.3，44.7，32.8，31.8，30.0，25.2；

快速原子轰击质谱，m／e 602〔M＋Na^+〕，618〔M＋K^+〕$^+$，〔624M＋2Na^+－H^+〕$^+$。

实施例8

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（PA—DOTA）的制备

将1.5g（2.59mmol）的α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四

乙酸，1，4，7，10—四甲酯（按实施例7的方法制备的粗的2：1混合物）溶于50ml浓盐酸中。将反应混合物在大约105℃下回流六小时。TLC分析（溶剂体系1）表明该酯（Rf＝0.88）转化为标题产物的盐酸化物盐（Rf＝0.43）。用旋转式蒸发器除去过量溶剂，干燥得到的白色固体。得标题产物的盐酸化物盐，产量为1.6g，其结构特征为：

^{1}H NMR（D_2O，PD＝1.0，90℃）

7.48（d），7.42（d），2.8—4.3（m），2.23（m），2.03（m）；

^{13}C NMR（D_2O，PD＝1.0，90℃，75MHz）

176.4，174.9，171.6，144.7，132.9，132.8，130.4，125.7，61.7，56.8，56.0，53.7，53.1，51.6，47.9，34.3，37.6，

快速原子轰击质谱m／e 524〔M＋H〕$^{+}$，546〔M＋Na〕$^{+}$，568〔M＋2 Na^{+}－H^{+}〕$^{+}$。

使用闪　色谱法和溶剂体系1从标题产物的盐酸化物盐中除去酯的任何微量的杂质。该1.10g标题产物的盐酸化物盐加至1英吋×23英吋闪蒸硅胶柱中，合并仅含标题产物的混合铵钾盐的馏分得到580mg。HPLC分析表明产物在230和254nm区域纯度大于98％面积。

快速原子轰击质谱，m／e 562（M＋K）$^{+}$，584〔M＋K^{+}＋Na^{+}－H^{+}〕，600〔M＋2 K^{+}－H^{+}〕$^{+}$。

实施例9

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸，混合铵，钾盐的分离。

将含有四和三酸的粗溶液（2.05g）（按实施例8的方法制备，溶于少量的溶剂体系1中，并将溶液加至12英吋×3英吋的闪色谱硅胶柱中，用同样溶剂预洗脱。收集含标题产物（Rf＝0.63用溶剂体系1）的洗脱馏分，得到200mg的α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸，混合铵钾盐。^{1}H和^{13}C NMR分析表明该三酸为对称异构体（1，4，10—三酸位置异构体）：

^{1}H NMR （D_2O，PD＝0.5用DCl，T＝90℃）

7.52（d），7.46（d），3.60（m），3.54（m），3.19（m）；

^{13}C NMR （D_2O，PD＝0.5，T＝90℃）

176.1，170.2，140.0，132.7，131.1，126.1，57.6，57.2，56.1，54.9，53.2，51.5，51.2，31.2。

快速原子轰击质谱，m／e 466〔M＋H$^+$〕$^+$，488〔M＋Na$^+$〕$^+$，504〔M＋K$^+$〕$^+$，526〔M＋K$^+$＋Na$^+$－H$^+$$^+$），542〔M＋2K－H〕$^+$。

实施例10

α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，四甲酯的制备

将溴乙酸甲酯（565μl，5.97mmol）加到搅拌的

α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷，1—乙酸，甲酯（580mg，1.47mmol）（按实施例N的方法制备）和粉状碳酸钾（1.15g，8.32mmol）的乙腈（20ml）溶液的混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2小时。然后过滤混合物，真空浓缩滤液得一油液。用色谱法（硅胶，8%甲醇的二氯乙烷溶液）提纯粗产物。得到标题产物，为黄色固体（469mg，52%），TLC R_f=0.4（硅胶，10% CH_3OH 的 $CHCl_3$ 溶液），产物的进一步结构特征为：

^{13}C NMR（$CDCl_3$）

173.2，172.6，161.2，139.1，125.1，124.6，120.5，110.7，57.0，55.6，53.5，52.6，51.3，50.8，46.8，46.0，44.0。

实施例11

α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸的制备

将α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7；10—四乙酸，四甲酯（按实施例10的方法制备）的浓盐酸（5ml，J.T. Baker ULTREX）溶液通氮气回流5小时。然后真空浓缩溶液至干燥得到固体残余物。用色谱法（硅胶，溶液体系6）提纯该固体得到标题产物，为灰白色固体（209mg）。将这种物质转化为四盐酸化物盐，其结构特征为：

^{13}C NMR（D_2O—DCl，80℃）

171.0，166.9，161.2，139.0，125.5，119.3，110.7，56.8，54.5，52.7，51.0，49.2，49.0，46.3，42.9

实施例12

α—（2—甲氧基—5—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，四铵盐

将氧化铂（20mg）加到α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（157mg）（按实施例11的方法制备）的水（20ml）溶液中。将此混合物在室温下氢化1小时（1个大气压氢气）。过滤后，用色谱法（硅胶，溶剂体系5）进一步提纯该物质得到标题化合物（141mg），为灰白色的固体，其结构特征为：

^{13}C NMR （D_2O—DCl）

175.5，172.6，172.3，159.9，128.8，127.5，124.6，123.8，115.5，61.2，58.1，57.3，55.7，53.4，51.6，49.6，47.4。

实施例13

1—（4—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯的制备

将100mg（0.236mmol）的1—（4—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷四盐酸化物盐（按实施例J的方法制备）。260mg（1.88mmol）的碳酸钾和108mg（0.708mmol）的溴乙酸甲酯在搅拌下加到4ml氩吹

洗的乙腈中，将混合物在25℃下搅拌48小时。然后将含溶液的盐加至1Cm×4Cm闪蒸硅胶柱中，用乙腈洗脱。合并含有所要产物的馏分，并用旋转式蒸发器除去溶剂，得到65mg（0.132mmol，56%）的标题产物，其进一步的结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

7.29（d），6.75（d），4.62（s），4.20（宽s），3.70（s），3.69（s），3.64（s），3.62（t），3.27（s），3.06（t），2.82（宽t），2.79（宽t）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$，75MHz）

171.4，171.0，148.4，132.8，117.5，115.0，55.9，55.3，54.7，53.1，51.7，51.4，50.6，50.5，47.4。

实施例14

1—（4—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，盐酸化物盐的制备

将42mg（0.085mmol）的1—（4—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯（按实施例13的方法制备）的2ml6N盐酸溶液2小时内加热至80℃。TLC分析表明有几种产物（对于所要的标题产物来说R_f=0.60，溶剂体系1），除去溶剂得到41mg粗标题产物。

实施例15

1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮

杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯的制备

将3．17g无水碳酸钾在烈烈搅拌下加到2．24g（6.97mmol）的1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10四氮杂环十二烷（按实施例G的方法制备）的75ml氩吹洗的乙腈溶液中。然后在5分钟内将3．20g（20．9mmol）溴乙酸甲酯滴加到此反应混合物中。将反应混合物通氩气搅拌17小时。TLC分析表明起始原料（Rf＝0.73，溶剂体系1）转化为新产物（Rf＝0．46，溶剂体系1）。将70ml氯仿加到溶液中，然后将有悬浮盐的溶液加至1英吋×7英吋闪色谱硅胶柱中。用10%甲醇的氯仿溶液洗脱产物，得到2．95g标题产物，为淡黄色油液，真空干燥该油液形成易碎的玻璃状物（78%），标题产物的结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

8．17（m，m），7．4—7．66（m），2．38—3．95（m）。

^{13}C NMR （$CDCl_3$，75MHz）

171．5，171．2，146．7，144．5，130．3，123．9，56．0，55．2，53．5，53．4，52．6，51．9，51．8，50．6，48．1，29．5。

实施例16

1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯的制备

将2．8g（5．18mmol）粗的1—〔2—（4—硝基苯

基）乙基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯（按实施例15的方法制备）溶于50ml甲醇中。10%钯／碳催化剂（600mg）加入到在氮气吹洗搅拌过的溶液中。在氮气氛中放置溶液，然后用氢气（1atm，20—25℃）吹洗搅拌的溶液2．5小时。再用氮气吹洗溶液几分钟，通过硅藻土短床过滤除去催化剂。TLC分析（10%甲醇的氯仿溶液）表明为标题产物（Rf＝0．14）。用氯仿从硅胶中洗脱标题产物得到2．2g（4．33mmol，83%），为白色玻璃状，其结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

7．03（d，m），6．63（d），3．4—3．6（m），2．7—3．2（m）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$，75MHz）

171，4，171．2，145．6，129．7，125．6，115．5，55．9，54．4，54．3，53．0，52．8，51．8，51．6，50．3，47．8，28．6；

快速原子轰击质谱，m／e 508〔M＋H^+〕$^+$。

实施例17

1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸盐酸化物盐（—EA—DO3A）的制备

将850mg（1．69mmol）的1—〔2—4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙

酸，4，7，10—三甲酯（按实施例16的方法制备）溶于30ml浓盐酸中。在70—80℃下搅拌溶液2．5小时，然后搅拌冷却溶液至25℃，继续搅拌大约18小时。减压下（10mm，75℃）用旋转式蒸发器除去溶剂。通过真空干燥（10^{-1} mm，45℃）从所得的清亮油液中除去溶剂化物和过量的盐酸。得到标题产物，为白色固体，产量为890mg，（RJ＝0．46，溶剂体系2），其进一步的结构特征为：

^{1}HNMR （D_2O，PD＝1．9，T＝90℃）

7．50（d），7．41（d），4．26（s），3．43—3．68（m），3．0—3．3（m）

^{13}C NMR （D_2O PD＝1．9，T＝90℃）

176．7，170．9，139．8，133．0，131．2，125．9，57．5，57．1，55．4，54．4，52．7，51．0，50．6，31．3；

快速原子轰击质谱，m／e 466（M＋H^+），488〔M＋Na^+〕，510〔M＋2 Na^+－H^+〕$^+$。

使用10cm Partisil—5 ODS3 RACⅡ反相柱的HPLC分析表明区域性纯度（254mm）大于92%。洗脱液为10%乙腈的0．05M PH＝7．0的磷酸钾溶液。

实施例18

1—〔2—（4—异硫氰酸根合苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸（SCN—EA—DO3A）的制备

在通氮气并搅拌下将1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，

4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸盐酸化物盐（按实施例17的方法制备，106mg，0.21mmol）溶于2ml水中。慢慢加入碳酸氢钠（105.6mg，1.26mmol）防止二氧化碳释出起泡（所得PH=8.0）。加入硫光气（16.8μl，0.22mmol）并剧烈搅拌1小时后，TLC分析（20%乙腈水溶液）表明起始原料（Rf=0.12）已转化为标题产物（Rf=0.26）。用旋转式蒸发器从粗产物中除去溶液得到130mg含氯化钠的标题产物。此物质的红外分析（KBr片）证实有异硫氰酸盐的部分（SeN=2150cm^{-1}）存在。

实施例19

1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，三乙酯的制备

将496μl（4.5mmol）溴乙酸乙酯一次加到搅拌的含有395mg（1.12mmol）的1—〔2—（4—硝基苯基）—乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷（按实施例G的方法制备）和1.5g（11mmol）K_2CO_3的5ml乙腈溶液中。在68℃下通氮气加热1小时后过滤所得的悬浮液。用CH_3CN（2×10ml）洗涤滤饼，浓缩滤液得到粗产物，为粘性油液，用30ml二乙酯研制油液，浓缩得到650mg（100%产率）的1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，三乙酯，其结构特征为：

^1H NMR （$CDCl_3$）

8.2（d），7.6（d），4.3（q），2.6—3.8（m），1.55（t）；

快速原子轰击质谱〔M＋H〕$^+$＝588。

实施例20

1—〔2—(4—硝基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸的制备

将59μl NaOH(50%wt／wt，3eq)加到200mg(0.35mmol)的1—〔2—4—硝基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，三乙酯(按实施例19的方法制备)的15ml水悬浮液中，在80℃下搅拌混合物6小时，然后将得到的均匀橙色溶液冷却至室温，并冷冻干燥得到褐色固体，使用线性梯度的0—10%HOAC水溶液通过HPLC(Q—Sepharose TM，HPLC体系III)在60分钟内提纯褐色固体得到(产率50%)水解了的产物1—〔2—(4—硝基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，其结构特征为：

^{1}H NMR (D$_2$O)

8.22(d)，7.55(d)，3.60—3.90(m)，3.10—3.40(m)

实施例21

1—〔2—(4—氨基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，(EA—D03A)的制备

将214mg(0.43mmol)的1—〔2—(4—硝基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸(按实施例20的方法制备)和40mg10%Pd／C的50ml水溶液置于帕尔—氢化器中。振荡该悬浮液直至停止吸收氢

气。过滤后，冷冻干燥水溶液得到197mg（98%）1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，为棕黄色固体，其结构特征为：

^{1}H NMR （D_2O）

7.35（d），7.20（d），3.10—3.70（m）；

^{13}C NMR （D_2O）

173.85，172.50，137.90，131.90，130.22，121.55，56.25，55.14，54.42，50.12，49.65，49.31，31.00

实施例22

1—（2—甲氧基—5—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，4，7，10—三甲酯的制备

将1.6g溴乙酸甲酯（11mmol）一次加到含有1.0g的1—（2—甲氧基—5—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷（3mmol）（按实施例E的方法制备）的搅拌的乙腈溶液（20ml）中，1小时后加入碳酸钾（0.3g），在室温下继续搅拌12小时。然后过滤反应混合物并真空浓缩滤液。得到的残余物进行色谱柱分离（硅胶，CH_3CN／CH_3OH，9：1，V：V）得到三酯，为白色固体，浓缩后产率为68%，其进一步的结构特征为：

^{1}H NMR （$CDCl_3$）

8.19（d），8.14（s），7.18（d），2.58—3.99（m）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$）

173.53, 172.83, 164.59, 142.28, 128.51, 127.69, 126.49, 112.30, 57.25, 56.90, 55.03, 54.21, 53.06, 52.09, 52.00, 51.54, 50.68, 50.30, 49.85, 49.63, 49.31, 49.00, 48.68, 48.37, 48.05, 47.70, 47.39。

实施例23

1—(2—甲氧基—5—硝基苄基)—1, 4, 7, 10—四氮杂环十二烷—4, 7, 10—三乙酸的制备

将含有0.25g的1—(2—甲氧基—5—硝基苄基)—1, 4, 7, 10—四氮杂环十二烷—4, 7, 10—三乙酸4, 7, 10—三甲酯(0.45mmol)(按实施例22的方法制备)的6M盐酸溶液(3ml)在100℃热并搅拌24小时。冷却至室温后，加入5ml水，冷冻干燥水溶液得到棕黄色固体，接着进行柱色谱分离(硅胶，溶剂体系5)得到三酸，产率为60%，为灰白色固体，MP=228—230℃(dec)，其进一步的结构特征为：

^{1}H NMR (D_2O)

8.18(d), 8.09(s), 7.12(d), 3.87(s), 2.10—3.60(m)

^{13}C NMR (D_2O)

180.45, 179.80, 163.66, 140.22, 128.60, 126.24, 122.66, 111.50, 59.91, 59.06, 56.44, 52.75, 50.92, 48.84。

实施例24

1—(2—甲氧基—5—氨基苄基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸的制备

将50mg的1—(2—甲氧基—5—硝基苄基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸(按实施例23的方法制备)加到含50mg pt O_2 的氮气吹洗的水(50ml)溶液中。在帕尔弹中氢化1小时后，过滤溶液，冷冻干燥含水滤液得到苯胺衍生物，为棕黄色固体(95%产率)，M.P＞240℃ dec，其他进一步的结构特征为：

^{1}H NMR (D_2O)

7.54(bs)，7.21(d)，7.09(d)，7.05(s)，6.88(s)，3.84(s)，3.78(s)，2.85—3.56(m)；

^{13}C NMR (D_2O)

180.59，179.77，153.38，124.16，124.03，122.82，120.18，113.68，112.43，59.06，57.02，55.96，53.67，50.52，50.08，49.70，49.04，48.32。

实施例25

1—(2—羟基—5—硝基苄基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸的制备

将溴乙酸(309mg，2.2mmol)和NaOH(3.5ml，≈1M)在室温下搅拌加到1—(2—羟基—5—硝基苄基—1，4，7，10—四氮杂环十二烷(200mg，0.62mmol)

（按实施例F的方法制备）的水溶液（1ml）中。用LC（阴离子交换，Q—Sepharose TM）监测反应进程并通过加入所需的NaOH保持PH为大约8。12小时后冷冻干燥溶液，用硅胶以溶剂体系5洗脱进行固体残余物的（柱）色谱分离。浓缩主要的黄色馏分，并溶于H_2O 中，冷冻干燥得到所要的产物，为亮黄色粉末（150mg，49%）；MP=230—235℃（dec），其进一步的结构特点为：

^{13}C NMR （D_2O）

166.41，165.60，160.00，119.91，116.02，113.85，111.71，104.59，45.20，44.50，43.96，36.43。

实施例26

1—（2—羟基—5—氨基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸的制备

将PtO_2（130mg）加到1—（2—羟基—5—硝基苄基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸（200mg，0.4mmol）（按实施例25的方法制备）氩气吹洗的水溶液（25ml）中，接着通入H_2（帕尔氢化器）。在黄色全部消失后，用氩气吹洗溶液并过滤。然后冷冻干燥水溶液得到产物（146mg，78%）为棕黄色固体

实施例27

α—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—（R.S）—乙酸—4，7，10—三（R—甲基乙酸），1—异丙基（4，7，10—三甲酯（PN—DOTMA三

甲异丙酯）的制备

将1.15g（8.32mmol）无水碳酸钾通氮气并剧烈搅拌下加到1.00g（2.37mmol）的α—〔3—（4—硝基苯基）丙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸，1—甲酯（按实施例P的方法制备）的35ml无水乙腈溶液中。然后加入旋光乳酸甲酯的α—苯磺酸盐（1.79g，7.36mmol）S：R＝98.2），在室温下搅拌混合物60小时。TLC分析表明形成了新产物（对于标题的四酯，Rf＝0.71，溶剂体系2，对于三酯，Rf＝0.89）。将得到的悬浮碳酸盐的溶液倒入40ml氯仿中，滤去沉淀的无机盐。除去此滤液中的溶剂，用1英吋×16英吋闪色谱硅胶柱的溶剂体系2为洗脱液色谱分离粗橙色油液两次，得到标题产物，为自由和烷基化下产物，是四酯非对映体（1.00g，1.47mmol，62%产率）未拆分的混合物。

这种物质的 ^{1}H NMR分析表明其含有大约0.5当量未反应的苯磺酸盐的衍生物。在60℃氯仿中这种物质的NMR谱为不结合的

^{1}H NMR （$CDCl_3$，60℃）

7.9—8.1（m，2H），7.2—7.4（m，2H），5.06（m，1H），3.4—4.0（m，9H），1.7—3.4（m，20H），1.0—1.7（m，15H）；

IR（$CDCl_3$）Cm^{-1}

2980，2840，1725，1710（酯羰基），1590，1510，1440，1340；

快速原子轰击质谱，m／e702〔M＋Na^+〕$^+$，687。

实施例28

α—〔2—(4—氨基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—(R、S)—乙酸—4，7，10—三—(R—甲基乙酸)，1—异丙基—4，7，10—三甲酯；(PA—DOTMA三甲异丙酯)的制备

将含有未反应的α—〔3—(4—硝基苯基)丙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—乙酸，1—甲酯的α—〔2—(4—硝基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—(R，S)—乙酸—4，7，10—三—(R—甲基乙酸)，1—异丙酯—4，7，10—三甲酯(950mg，1.40mmol未校正)(按实施例27的方法制备)通氮气溶于含1.0g10%钯/碳催化剂的10ml的30%甲醇水溶液中。用过量的氢气吹洗溶液7小时。此时TLC检测表明有水合茚三酮试验为强阳性的物质形成(Rf=0.62，溶剂体系2，Rf=0.71为起始物质)。用硅藻土过滤甲醇的催化剂浆液，并蒸发溶剂得到800mg粗标题产物，含有由苯磺酸酯附随物质氢解而得的苯磺酸(Rf=0.09溶剂体系2)的清亮油液。用1英吋×8英吋闪色谱硅胶柱色谱分离粗油液，以10%甲醇的氯仿溶液洗脱浅黄色带为空体积。再以溶剂体系2洗脱得到标题产物(480mg)，产率52%，为未拆分的非对映和几何异构体的混合物。在^{1}H NMR的芳香区域内观察到三个不同的ab四重峰：

^{1}H NMR ($CDCl_3$，30℃)

6.63—8.0(m(四重峰)，4H)，5.07(m，1H，异丙基次甲基H)，3.53—3.9(m，在3.85，

3．73，3．69和3．56处有四个单13H），3．46（m，1H），3．25（宽t，3H），2—3．1（m，14H），1．0—2．0（m，15H）；

^{13}C NMR （$CDCl_3$，30℃）

177．3，177，176．4，176．2，175．9，174．3，172．9，170．6，145．3，144．9，130．8，129．7，129．3，129．1，128．8，128．4，127．5，126．3，115．2，115．1，114．9，69．0，68．4，67．3，61．6，57．8，57．4，56．7，56．5，56．4，52．9，52．7，52．1，50．8，50．7，50．6，47．3，47．1，47．0，46．9，46．5，46．3，46．1，44．8，44．5，44．3，34．1，32．9，32．5，32．2，31．8，24．8，22．2，22．1，22．0，21．8，21．6，15．8，14．9，7．7，7．5，7．4，7．1；

IR （$CDCl_3$） Cm^{-1}

2960，2840，1720，1510，1450，1375；

快速原子轰击质谱，m／e 672〔M＋Na^+〕$^+$，686。

实施例29

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—（R，S）—乙酸—4，7，10—三（R—甲基乙酸），（PA—DOTMA）的制备

将α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四

氮杂环十二烷—1—(R, S)—乙酸—4, 7, 10—三—(R—甲基乙酸), 1—异丙基—4, 7, 10—三甲酯(400mg, 0.59mmol)(按实按例28的方法制备)的非对映的混合物溶于50ml 6N浓盐酸中，并回流30小时。TLC分析(溶剂体系1)表明酯(Rf=0.98，溶剂体系1)转化为两个新斑点(Rf=0.6，高非对映体和Rf=0.54，低非对映体溶剂体系1，两斑点UV，水合茚三酮和碘为阳性)。用旋转式蒸发器除去过量溶剂并干燥后，得到标题产物的粗非对映体混合物(403mg)，为盐酸化物盐。将290mg(0.51mmol)粗盐加至1×13Cm硅胶闪色谱柱中，以溶剂体系8洗脱进行制备标题产物分开的两种非对映体。因为高Rf非对映体从柱中首先洗脱，所以得到的高Rf非对映体(119mg, 0.21mmol)的纯度高于低Rf非对映体(90mg, 0.16mmol)。

^{1}H NMR为高Rf非对映体:

^{1}H NMR (D_2O, 90℃, PD=7.5)

7.12(d, 2H), 6.80(d, 2H), 3.66(m, 1H), 3.57(宽t, 3H), 2—3.4(m, 19H), 1.89(m, 1H), 1.37(m, 1H), 1.15(d, 3H), 1.10(d, 3H), 1.06(d, 3H):

^{13}C NMR (D_2O, 90℃ PD=7.5)

184.4, 184.2, 184.0, 183.3, 135.9, 132.6, 131.7, 119.1, 78.2, 69.0, 61.7, 61.5, 61.1, 57.4, 54.1, 49.7, 49.6, 48.2, 47.7, 47.2, 34.8,

33。8，9。6，9。1，9。0；

快速原子轰击质谱，m／e 566〔M＋H⁺〕⁺，588〔M＋Na⁺〕⁺，604〔M＋K⁺〕⁺，626〔M＋K⁺＋Na⁺－H⁺〕⁺，642〔M＋2K⁺－H⁺〕⁺。

最终产物的制备—配合物

金属配位体配合物可由下述的几种方法制备。这些方法包括金属和配位体的水溶液的混合，并调PH至所需值，配合是在含有盐和／或缓冲剂以及水的溶液中进行。有时发现加热溶液得到的配合物产率比在室温下进行配合得到的产率高。在BFC的合成中使用污迹（work—up）表明也影响配合。

实施例30

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸铵盐，钐（III）配合物；Sm（BA—DOTA）的制备。

将少量试样，53mg（0.094mmol）的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（按实施例3的方法制备）溶于100μl水中，然后在PH6—7下用3ml0.043M Sm（OAC）$_3$溶液（48.8mg，0.128mmol）处理。在100℃下加热此溶液，通过阴离子交换HPLC测定配合的程度。当通过阴离子交换色谱，HPLC体系III，完成配合时，将配合物的溶液冷却至室温（大约25℃），并冷冻干燥。用硅胶色谱（用溶剂体系1洗脱），提纯钐配合物。此方法得到标题产物的产率为82%，这种配合物的特征由TLC，快速原子轰击质谱，阴离子交换HPLC证实，其进一步

的结构特征为：

^{1}H （D_2O）（T=？）

8.94, 7.81, 7.21, 6.97, 6.80, 5.63, 5.01, 4.58, 4.01, 3.56, 1.78, 1.53, 1.24, 1.10, 0.77, −2.80, −2.95, −3.21, −3.91;

^{13}C NMR （D_2O）

190.3, 184.9, 181.4, 146.8, 134.3, 122.7, 116.4, 80.8, 72.6, 64.2, 57.2, 55.8, 54.7, 53.4, 51.5, 49.7, 45.5, 43.5, 23.6（5太多的碳峰）

实施例31

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（III）配合物的制备

通过将Sm—153溶液加到$SmCl_3$溶液中制备150μl Sm—153（3×10^{-4}M，0.1N盐酸溶液）和600μl $SmCl_3$（3×10^{-4}M）的0.1N盐酸溶液。然后加入5.0μl 2.0M NaOAC，接着加入45μl的50mM配位体（按实施例3的方法制备）的HEPES缓冲液，用275μl的0.5m HEPES调溶液的PH至7。将此溶液分为每份50μl的两份，在100℃下加热1小时。

将溶液通过SP—Sephadex™阳离子交换树脂。使用以前描述的方法测定作为配合物的金属百分比。结果表明对于加热试样配合物的金属为99.6%，对于未加热试样为96.6%。

通过ＰＨ剖视图确定螯合物的稳定性

金属配位体配合物的稳定性通过调它们的各种PH值并分析溶液中的配合物进行测定。在低ＰＨ时，配位体的质子化作用引起金属的释出，在高PH时，金属氢氧化物与螯合物的形成竞争。因此，在选择惰性螯合物时，一种所需要的惰性螯合物，应该在高和低PH值的条件下，仍然保持是一种螯合物。

使用下列实施例中所描述的方法得到本发明的一些螯合在各种ＰＨ值下的惰性剖视图，在某些情况下，将溶液通过阳离子交换树脂除去自由金属。用稀释的氢氧化钠和盐酸溶液调配合物溶液的ＰＨ为1至14。用以前所描述的方法测定作为配合物的百分比。

用同样的方法制备几种双官能螯合物的共轭并调ＰＨ为2．8，4和6。使用放射探测器通过ＨＰＬＣ测定保存在溶液中的共轭的量。其结果列于实施例XX的生物学部分中。

实施例32

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（ＩＩＩ）配合物的ＰＨ稳定性

将由实施例30得到的加热和未加热试样分为2×250μl等分试样。用ＨＣｌ调一份250μl等分试样的ＰＨ值列于下表，用NaOH μl量调第二份250μl等分试样得到所需ＰＨ值，一旦达到所需ＰＨ值，则除去25μl等分试样，并用以前所述方法测定作为配合物的金属的百分比，其结果如下：

PH	%配合物	
	加热	未加热
1	98.9	92.7
3	99.6	93.3
5	99.6	92.9
7	99.6	95.7
9	99.9	95.8
11	99.6	95.7
13	99.6	94.5

实施例33

α—(4—氨基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钇(Ⅲ)配合物的制备。

将10μl含有1.4mg／100μl的α—(4—氨基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸(用实施例3的步骤制备)的溶液加入到100μl的掺有Y—90的$Y(OAC)_3$(0.003μ)的溶液中。往该溶液中再加入500μl水，随后加入125μl的NaOAC(0.5μ)溶液。265μl水加入到该溶液中使总体积达到1ml。将这一溶液分成等量的两份。一份加热到100℃一小时。用前面所述的阳离子交换步骤来确定加热和未加热样品中以配合物形式存在的金属的百分数。测试结果表明加热和未加热样品中以配合物形式存在的金属的百分数分别为84%和4%。

实施例34

α—(4—氨基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—

1，4，7，10—四乙酸，镥（Ⅲ）配合物的制备。

将α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸溶液（用实施例3的步骤制备）溶解到蒸馏水中，达到浓度为1．63mg／ml。

将氯化镥溶解到0．1NHCl中，制得浓度为3．9mg／ml（0．01μ）的氯化镥溶液。镥—177（0．3毫摩尔）用作示踪剂。

将体积为30μl的0．01μ的镥溶液加入到2μl的Lu—177溶液中。加入适量的上述配位体，再加入HEPES缓冲液（0．1μ，PH＝7．6）使总体积达到1．0ml。所得溶液中配位体和镥的量为0．3毫摩尔。然后将该溶液加热到100℃一小时，用前面所述的阳离子交换方法测定作为配合物的Lu的百分数为86％。

实施例35

α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

将7mg，（10．8微摩尔）的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物（用实施例30的步骤来制备）的样品溶解到400μl水中。加入过量的硫光气（50μl），随后再加入400μl $CHCl_3$，两相反应在激烈搅拌下进行30分钟。这段时间结束时，水层用500μl $CHCl_3$ 萃取4次，然后将水层冻干，定量地得到所需要的标题产物。

紫外光谱显示出这种化合物在272和282nm处有一谱带。

薄层色谱，硅胶，用75：25（V：V）的CH_3CN：H_2O展开，给出Rf＝0.38。原料具有Rf＝0.19。红外光谱显示出—SCN在2100Cm^{-1}处有伸张；快速原子撞击质谱，〔M＋H^+〕$^+$＝687。

实施例36

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，铵盐，钆（Ⅲ）配合物的制备。

将90mg（160毫摩尔）的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（用实施例3的步骤来制备）样品溶解到1ml水中。向这个溶液中加入3ml含有51mg（192毫摩尔）的$Y(OAC)_3$的水溶液。然后该反应混合物，PH＝6—7，被加热到100℃两小时。然后所得溶液通过玻璃毛，并且冻干得到126mg的黄色固体。这种固体在硅胶上进行色谱分离（溶剂体系1），得到71mg（76%）的所需的配合物的产物。阴离子交换的分析表明，其与类似物钐配合物具有相同的保留时间，标题产物的特征数据为：

^{13}C NMR （D_2O）

180.8，180.5，179.9，146.1，133.4，122.0，116.1，74.9，56.3，55.8，55.4，55.1，54.8，52.2，46.0，44.0，23.6，

^{1}H NMR （D_2O）

6.90（d），6.70（d），4.40（s），3.45—3.06（m），2.71—2.10（m），1.75(s)。

快速原子撞击质谱，〔M＋H⁺〕⁺＝582。

实施例37

α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钠盐，钇（Ⅲ）配合物的制备。

将α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钇配合物（用实施例36的步骤制备）的样品（10mg，17μmole）溶解到400μl水中。向这种溶液中加入64μl硫光气（过量）和400μl $CHCl_3$，所得混合物激烈搅拌40分钟。在这段时间内分几次少量加入固体 $NaHCO_3$ 以保持PH在8左右。反应结束时，分离出水层，用1ml $CHCl_3$ 萃取4次，并且冻干。用薄层色谱和紫外光谱检定标题产物。

实施例38

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钇（Ⅲ）配合物，铵盐的制备；NH_4〔Y(PA—DOTA)〕。

通过一强阳离子交换树脂（SP—Sephadex™C—25，Pharmacia）柱色谱将配位体α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（用实施例8的步骤制备）转化成混合的质子化了的铵盐。该柱子呈质子化了的形式，用蒸馏水洗涤。配位体的液缩的水溶液被用到柱子上，随后用蒸馏水洗涤该柱子。用0.5M NH_4OH 将配位体从柱子上洗脱下来。洗脱液被浓缩至干。

将5ml $Y(OAC)_3 \cdot 4H_2O$（0.0728g，0.215

mmole）的蒸馏水溶液加入到温热的5ml混合的质子化了的铵盐配位体（0.120g，0.215mmole）水溶液中。将溶液进行回流并用0.1M NH_4OH 调PH到大约7.0。回流一小时后，将溶液冷却并浓缩至干。真空条件下，在大约105℃的油浴上加热白色固体以除去过量的 NH_4OAC 标题产物（其含有大约一当量的乙酸铵）的产量为0.142g（94%），并且其特征数据如下：

^{13}C NMR（D_2O，88℃，75MHz）

23.8，27.6，35.4，49.6，55.0，
56.2、56.9，57.1，65.7，68.0，
121.7，132.6，138.8，180.7，
181.4，182.0，183.1，

快速原子撞击质谱，m／e 610（正离子，〔M^-+2H^+〕$^+$，），608（负离子，M^-）。

实施例39

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物，铵盐的制备，NH_4〔Sm(PA—DOTA)〕。

重复实施例38的步骤，用 $Sm(OAC)_3\cdot 3H_2O$（0.082g，0.215mmole）代替 $Y(OAC)_3\cdot 4H_2O$，制备出的标题产物（其含有大约一当量的乙酸铵）的产量为0.155g（94%），其特征数据如下：

^{13}C NMR（D_2O，88℃，75MHz）

23.5，27.2，35.6，50.5，54.5，
56.0，57.2，57.9，69.5，71.5，

122.3，133.0，139.7，181.2，

188.4，189.3，190.9，

快速原子撞击质谱，m／e673（正离子，〔M⁻＋2H⁺〕⁺，Sm同位素型式），m／e671（负离子，M⁻，Sm同位素型式）。

实施例40

α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物，铵盐的制备，NH_4〔Sm（SCN—PA—DOTA）〕。

将10ml $Sm(OAC)_3 \cdot 3H_2O$（27.9mg，381.56g／mole，73.1μmole）的蒸馏水溶液和10ml含有42mg PA—DOTA，混合的铵—钾盐（632.97g／mole，66.4μmole）（用实施例8的步骤制备）的蒸馏水溶液混合，并在蒸汽浴上加热。三十分钟后，（用实施例41中描述的方法）通过HPLC测定形成〔Sm（PA—DOTA）〕的反应已进行完全。在分离漏斗中，通过摇动使该溶液与20ml含有45.4mg $CSCl_2$（114.98g／mole，395μmole）的氯仿溶液反应。大约一分钟后反应进行完全，这是通过HPLC测定的，并通过当把该水溶液点样到硅胶TLC板上时，用茚三酮（0·2%的乙醇液）阳性测示结果消失来测定，（起始螯合物，〔Sm(PA—DOTA)〕测试呈阳性）。除去氯仿层，水层用两份20ml的氯仿洗涤。在氮气流下，并在室温下通过加入100ml乙腈并蒸发使水层浓缩至干，得到标题产物56mg。

快速原子撞击质谱，m／e715（正离子，〔m⁻＋2H⁺〕⁺，

Sm同位素型式），m／e 713（负离子，M⁻ Sm同位素型式）。

实施例41

Y^{3+}与PA—DOTA的螯合速率的HPLC分析。

以在PA—DOTA合成中建立使用的函数形式来研究PA—DOTA与Y^{3+}螯合的速率。通过HPLC用—Alltech Econosphere TM C18 100mm的柱子来监测螯合度。采用的梯度是：A）95：5，PH6.0，0.05M NaOAC缓冲液：CH_3CN，B）30：70，PH6.0，0.05M NaOAC 缓冲液：CH_3CN，A到B用15分钟。均用实施8的步骤制备的PA—DOTA·nHCl溶液（保留时间＝1.31分）和PA—DOTA混合的铵—钾盐溶液（保留时间＝4.55分），被制备成1.6mm，pH6.0，0.5M NaOAC 缓冲液。两种溶液中每一种取一毫升（1.6μmole）与0.2ml（8μmole）的$Y(OAc)_3 \cdot 4H_2O$溶液（40mm的，PH6.0的0.5M NaOAc 缓冲液）反应。通过在保留时间值为3.96分时的峰值的出现来确定螯合物的形成（通过与实施例38的样品比较来证实）。以下示出螯合形成的结果。

PA—DOTA盐	%配合	时间（分）／温度
PA—DOTA·nHCl	＞90	＜1／室温
PA—DOTA混合的	＜10	15／室温
铵—钾盐	＞85	10／90℃

很明显，BFC的纯化方法对螯合速率有影响。

实施例42

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮

杂环十二烷—1—（R·S）—乙—4，7，10—三—（甲基乙）酸，钐（Ⅲ）配合物，铵盐的制备，NH_4〔Sm(PA—DOTA)〕。

将$Sm(OAC)_3 \cdot 3H_2O$的溶液（13.2mg在2ml蒸馏水中）加入到α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1—（R·S）—乙—4，7，10—三—（甲基乙）酸的溶液（30mg在2ml的蒸馏水中）中去，（用实施例29的步骤制备，高Rf的非对映体）。该PH为6.5的溶液在蒸汽浴上加热，并用HPLC来监测反应。加热30分钟后，溶液在旋转蒸发仪上被浓缩至干，并在真空炉中干燥。

快速原子撞击质谱，m／e 715（正离子，〔$M^- + 2H^+$〕$^+$，Sm同位素型式），737（正离子，〔$M^- + H^+ + Na^+$〕$^+$，Sm同位素型式），713（负离子，（M^-），Sm同位素型式）。

在下面的例子中，配合物溶液经过一离子交换柱除去溶液中任何过量的游离金属。不稳定的体系将恢复平衡，且相同量的游离金属将存在于溶液中。惰性体系将不会达到再平衡，且游离金属的量会减少。这样的话既使一配合物形成的产率并不高，令其通过一离子交换树脂的纯化作用也能形成一可用的稳定的无非配合金属的配合物。

实施例43

α—（2—甲氧基—5—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

将5.8mg的α—（2—甲氧基—5—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（用实施例12的步骤制备）溶解在325μl NANOPure^{TM}的水中制成浓度为3×10^{-2} M的溶液。将一份10μl的这种溶液加入到

990μl的掺有Sm—153的3×10^{-4} M的溶液中。$SmCl_3$（在0．1 NHCl中）然后用NaOH调PH到7．0。这溶液被分成每份500μl的两份，一份在100℃时加热一小时，测试加热和未加热的两个样品，用前面所述的阳离子交挟方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。然后将该溶液通过SP—Sephadex TM 树脂。用纯化的样品再测一次其配合程度。结果示于下表中：

	加热的		未加热的	
	纯化	未纯化	纯化	未纯化
配合率%	96	95	97	89

实施例44

α—（2—甲氧基—5—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物的PH稳定性。

实施例43中的加热和未加热的纯化后的样品分别都分成2×250μl的两份。一份用HCl调节，另一份用NaOH调节，分别都达到下表中所表示的PH值。达到了欲期的PH值后，让样品保持10分钟，用前面所述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的量。其结果示于下表中：

PH	配合率%	
	加热的	未加热的
2	95	94
3	97	95
5	98	97
7	96	97
9	98	96
11	97	98
13	100	99

实施例45

α—(2—甲氧基—5—硝基苯基)—1,4,7,10—四氮杂环十二烷—1,4,7,10—四乙酸，钐(Ⅲ)配合物的制备

将7.9mg的α—(2—甲氧基—5—硝基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸(用实施例11的步骤制备)溶解在464μl NANO Pure TM 的水中制成浓度为3×10^{-2} M溶液。将一份10μl的这种溶液加入到950μl的掺有Sm—153的3×10^{-4} M的溶液中。$SmCl_3$(在0.1 NHCl中)然后用NaOH调PH到7.0。这种溶液被分成每份为500μl的两份，一份在100℃加热一小时。测示加热和未加热的两个样品，用前面所述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。然后将这些溶液通过SP—Sepnadex TM 树脂。然后采用前面描述的一般方法测定纯化了的样品的配合程度。其结果示于下表中：

	加热的		未加热的	
	纯化的	未纯化的	纯化的	未纯化的
配合率%	100	72	100	46

实施例46

α—（2—甲氧基—5—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐（Ⅲ）配合物的PH稳定性。

实施例45中的加热和未加热的经纯化的样品分别被分成二份。一份用稀释的HCl调节，另一份用NaOH来调节，使PH值达到下表中所示之值。欲期的PH达到后，将样品保持10分钟，然后用前面所述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的量。其结果示于下表中：

PH	纯化		PH	纯化	
	加热的	未加热的		加热的	未加热的
2	99	99	9	100	100
4	100	100	11	100	100
5	100	100	13	100	100
7	100	100			

实施例47

α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

使0.0219M（100μl，2.195mmole）的α—（4—硝基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸（用实施例4的步骤制备）的溶液与0.043M（25μl，1.075mmole）的$Sm(OAc)_3$的溶液接触。反应混合物经阴离子交换的HPLC处理（Q—Sepharose TM 柱子，1cm×25cm，流速＝2ml／min，用0—1M的NH_4OAc

洗脱，梯度超过30分钟）。一小时后，配合物（保留时间＝11.1分钟）以77%的产率形成（面积百分比），并且从配位体峰（保留时间＝15．5分钟）可被完全分辨出来。标题配合物已形成的进一步的证据是由硅胶TLC（溶剂体系4）得到的，其中配位体有Rf＝0．59，配合物有Rf＝0．00。

实施例48

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

使0．022M（100μl，2．2μmole）的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸（用实施例5的步骤制备）溶液与0．043M（6．4μl，0。275mmole）的$Sm(OAc)_3$溶液接触。反应混合物经阴离子交换的HPLC处理（Q—Sepharose™柱子，1cm×25cm，流速＝2ml／分钟，用0—0．25M NH_4OAc洗脱，梯度超过30分钟）。40分钟后，配合物（保留时间＝9．0分钟）以66%的产率形成（面积百分比），并且从配位体峰（保留时间＝18．5分钟）可被完全分辨出来。

实施例49

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物和α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

将4．2mg的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸五盐酸盐和α—（4—氨基苯基）

—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸五氯化物（用实施例5的步骤制备）溶解在300μl NANO Pure TM 的水中制成浓度为3×10^{-2} M的溶液。将一份10μl的该溶液加入到15μl的掺有S_m—153的2×10^{-2}M的S_mCl_3（0.1NHCl液）中，通过加水使体积达到1ml。然后用NaOH调PH到7.0。该溶液被分成分别为500μl的两份，一份在100℃时加热一小时。

测示加热和未加热的两个样品，用前面描述的阳离子交换的方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。其结果表明对于加热的和未加热的样品，其以配合物形式存在的金属的百分数分别为89%和96%。

实施例50

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物，和α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的PH稳定性。

将实施例49中的加热的和未加热的样品部分成两份。一份用HCl，另一份用NaOH调到PH到下表中所示出的PH值。一但达到所期望的PH，即将样品保持10分钟，然后用前面描述的阳离子交换的方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。下表中表示出了其结果：

PH	配合物%	
	加热的	未加热的
1	86	83
3	99	99
5	99	99
7	89	96
9	99	98
11	96	89
13	97	97

实施例51

α—(4—硝基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的制备。

将13μl 2×10^{-2} M的α—(4—硝基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸(用实施例4的步骤制备)溶液，15μl的$SmCl_3$(0.02M 0.1NHCl)和2μl的Sm—153合并，用NANO Pure TM 水使体积达到1ml。用NaOH调PH到7.0。该溶液被分成各500μl的两份，一份在100℃加热一小时。测示加热和未加热的样品用前面所述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。结果表明对于加热的和未加热的样品，以配合物形式存在的金属的百分数分别为74%和42% 。

实施例52

α—(4—硝基苯基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的PH稳定性。

实施例5 1中的加热的样品被分成二份。一份用ＨＣｌ调节，另一份用ＮａＯＨ调节，使其ＰＨ值达到下表中所给出的ＰＨ值。予期的ＰＨ值达到后，将样品放置十分钟，用前面描述的阳离子交换的方法测定以配合物形式存在的金属的量。下表中给出了其结果：

ＰＨ	配合率%
1	67
2	70
4	70
5	72
7	74
9	76
10	76
12	75
13	76

实施例5 3

1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，镥（Ⅲ）配合物的制备。

将ＥＡ—ＤＯ3Ａ（用实施例17中的步骤制备）固体溶解于水中制备成溶液。最终的浓度为0．01Ｍ。

将氯化镥溶解于0．1Ｎ　ＨＣｌ中制备成氯化镥溶液。最后的浓度为含氯化镥3．9ｍｇ／ｍｌ（0．01ＭＬｕ）。镥—177被用作示踪剂。

将30μｌ0．01Ｍ的Ｌｕ溶液加入到2μｌ的Ｌｕ—177溶液中。加入30μｌ的配位体溶液然后加入ＨＥＰＥＳ缓冲剂

（0．1M，PH＝7．6），使总体积达到1．0ml。最终的溶液对配位体和镥来说是0．3mm。

用前面所述的阳离子交换方法测定的以配合物形式存在的Lu的量为98%。

实施例54

1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钇（Ⅲ）配合物的制备〔Y（EA—DO3A）〕。

通过强阳离子交换树脂（SP—Sephadex TM C—25，Pharmacia）柱色谱将配位体1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸（用实施例17的步骤制备）转化成混合的质子化了的铵盐。色谱柱处于质子化的形式，用蒸馏水洗涤。将浓的配位体水溶液加到柱中，随后用蒸馏水洗涤柱子，用0．5M的NH_4OH从柱子上将配位体洗脱下来。在旋转蒸发仪上将洗脱液浓缩至干，并在蒸空炉中将其干燥。

将10ml $Y(OAc)_3 \cdot 4H_2O$（0。203g，338．101g／mole，0。600mmole）的蒸馏水溶液加到温热的10ml混合的质子化了的铵盐配位体（0．300g，499．615g／mole，0。600mmole）的蒸馏水溶液中。将该溶液进行回流，并用0．1M NH_4OH调PH到大约7．0。回流十五分钟后，将该溶液冷却，并在旋转蒸发仪上浓缩至干。真空条件下，在大约105℃的油浴上通过加热白色固体将过量的乙酸铵除去。得到标题产物（其含有大约一当量的乙酸铵）373mg（99%），并由以下数据来确定：

^{13}C NMR（88℃，D_2O，75MHz）

24.4，28.4，51.2，56.5，57.2（2c），57.7，67.2，67.6，120.5，132.3，135.2，182.1，182.5，183.0；

快速原子撞击质谱，m／e 552（正离子，〔M＋H^+〕$^+$），m／e 610（负离子，〔M＋OAc^-〕$^-$）。

实施例55

1—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐配合物的制备：〔Sm（EA—DO3A）〕。

重复实施例54的步骤，用$Sm(OAc)_3 \cdot 3H_2O$（0.229g 381.531g／mole，0.600mmole）代替$Y(OAc)_3 \cdot 4H_2O$，制备出标题产物（其含有约一当量的乙酸铵）408mg（99%），并用以下数据来确定：

^{13}C NMR（88℃，D_2O，75MHz）

23.8，27.9，51.4，57.5，58.1(3c)，68.7，73.4，120.3，132.2，134.7，185.0，186.8，192.1；

快速原子撞击质谱，m／e 615（正离子，〔M＋H^+〕$^+$，Sm同位素形式），m／e 673（负离子，〔M＋OAc^-〕$^-$，Sm同位素型式）。

实施例56

1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

将10μl1.48mg／100μl（0.03M）的1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸（用实施例20的步骤制备）的溶液加入到15μl掺有Sm—153的$SmCl_3$溶液（0.02M的0.1N HCl溶液）中，加入NANO Pure TM 水使体积达到1ml。这种溶液被分成500μl的两份，将一份在100℃加热一小时，测试加热和未加热的样品，用前面描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。结果表明对于加热的和未加热的样品，以配合物形式存在的金属的百分数分别为81%和43%。

实施例57

1—〔2—（4—硝基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的PH稳定性。

将实施例56的加热的样品分成两份。一份用HCl调节，另一份用NaOH调节，以达到下表中所示出PH值。所期望的PH达到后，将样品放置十分钟，然后用前面所述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的量。下表中示出了其结果。

PH	配合率%
1	20
2	37
4	49
5	58
7	81
9	62
10	64
12	64
13	54

实施例58

1—〔2—(4—氨基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的制备。

将3μl14.65mg／100ml的1—〔2—(4—氨基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸(由实施例20的步骤制备)溶液加入到15μl掺有Sm—153的$SmCl_3$(0.02M的0.1N HCl溶液)溶液中。用NANO Pure TM水使体积达到1ml。用NaOH将溶液的PH值调节到7.3。该溶液被分成两份，一份在100℃加热一小时。测试加热和未加热的样品，用前面描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。结果表明加热的和未加热的样品中以配合物形式存在的金属百分数分别为96%和93%。

实施例59

1—〔2—(4—氨基苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮

杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的ＰＨ稳定性。

将实施例58的加热的和未加热的样品均分成两份。每一样品的其中一份用ＨＣｌ调节，另一份用ＮａＯＨ调节以达到下表中示出的ＰＨ值。达到希望的ＰＨ值后，将样品放置十分钟，然后用前面描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的量。下表中示出了其结果：

ＰＨ	配合率%	
	加热的	未加热的
1	44	13
3	50	42
5	73	55
7	96	93
9	98	98
11	89	90
13	28	37

实施例60

1—（2—羟基—5—硝基苯甲基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐（Ⅲ）配合物的制备。

将3．9ｍｇ1—（2—甲氧基—5—硝基苯甲基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸（用实施例25的步骤制备）溶解在260μｌ ＮＡＮＯ Pure ™ 水中，制成3×10^{-2} Ｍ的溶液。将一份10μｌ这种的溶液加入到15μｌ掺有10μｌ Ｓｍ—153的0．1Ｎ ＨＣｌ溶液（3×10^{-4} Ｍ） 2×10^{-2} Ｍ $SmCl_3$ 的溶液（水溶液）中。加入

965μl DI水使体积达到1ml。然后用NaOH调节PH到7.0。将这个溶液分成500μl的两份，一份在100℃加热一小时。测试加热和未加热的样品，用前面描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。结果表明加热的和未加热的样品中以配合物形式存在的金属的百分数分别为71%和74%。

实施例61

1—(2—羟基—5—硝基苯甲基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的PH值稳定性。

实施例60的加热的和未加热的样品都被分成250μl的两份。一份用HCl调PH，另一份用NaOH来调节PH值以达到下表中示出的PH值。达到期望的PH值后，将样品放置十分钟，然后用前面所描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的量。结果示于下表中：

PH	%配合物	
	加热的	未加热的
1	65	51
3	98	93
5	99	99
7	100	100
9	100	99
11	100	96
13	100	98

实施例62

1—(2—羟基—5—氨基苯甲基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的制备

将3．2mg的1—(2—羟基—5—氨基苯甲基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸(用实施例26的步骤制备)溶解于100μl NANOPure TM 水中制备成3×10^{-2} M的溶液。将一份10μl的这种溶液(稀释到20μl)加入到15μl掺有Sm—153的2×10^{-2} M $SmCl_3$(水溶液)的溶液中。加入950μl DI水和20μl0．1N NaOH使体积达到1ml。这种溶液被分成500μl的两份，一份在100℃加热一小时。测试加热的和未加热的样品，用前面所描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百分数。当被配合的金属少于95%时，将该溶液通过SP—Sephadex TM 树脂。再测定以配合物形式存在的金属的百分数。其结果示于下表中：

	加热的		未加热的	
	纯化的	未纯化的	纯化的	未纯化的
%配合物	99	68	99	21

实施例63

1—(2—羟基—5—氨基苯甲基)—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐(Ⅲ)配合物的PH稳定性

将实施例62的加热的和未加热的经色谱纯化的样品分别分成两个250μl的份，一份用HCl调节，另一份用NaOH调节以达到表中所示的PH值。当希望的PH值达到后，将样品放置10分钟，然后用前面描述的阳离子交换方法测定以配合物形式存在的金属的百

分数。下表中示出了其结果：

PH	%配合物	
	加热的	未加热的
1	60	56
2	74	76
3	84	87
5	97	98
7	99	99
9	99	98
11	99	99
13	99	99

我们已知道，在一些分子内具有金属螯合基团如DTPA和反应活性的连接基（芳胺）的双官能螯合剂能够共价连接到各种对癌或肿瘤细胞抗原决定基或抗原具有特性的直接的生物分子靶上。这种共轭物的放射性核素配合物在诊断和/或治疗的应用上是有效的，是输送放射性核素到癌或肿瘤细胞上的一种手段。〔参考，Mearas 等人，Anal. Biochem. 142，68—78，（1984）；也参看讨论部分，P215—216，J. Protein Chem.，3（2）（1984），Mearas 和 Goodwin；最近的参考文献是Mearas，美国专利4，678，677，1987.7.7发行，Warshawsky 等人，美国专利4，652，519，1987.3.24.发行，和Brechbiel 等人，Inorg. Chem.，25，2772—2781（1986）〕。可以想象到，使用了放射活性的或发光的金属的产物，也可被用于体外免疫检定。

标记抗体的应用决定于一些因素，例如：1）抗体的特性，2）在应用条件下配合物的惰性或稳定性（即，血清稳定性），3）标记技术，即整个抗体可以具有同天然分子一样的特性和免疫反应性。

对于放射核素抗体共轭物用作诊断和／或治疗试剂的效果，其配合物的稳定性或惰性是极为重要的。动力学的不稳定性可能导致不稳定性，例如，在血清中，以及放射性核素从配合物上的离解作用。这样，便降低了诊断和治疗的效果。另外，也形成了对于正常组织的一般放射性损害的巨大潜在性〔Cole 等人，J. Nucl. Med.，28，83—90（1987）〕。

放射性核素向抗体的结合可以采用两种方法进行，或者通过现有技术中已知的步骤使BFC连接到抗体上，然后在与抗体相配伍的条件下进行放射性核素的螯合。或者，将抗体共轭到已成型的（室温或高温）金属—BFC配合物上。〔Meares 等人，Acc. Chem. Res. 17，202—209（1984）〕。后面将提供实施例。

实施例ZA（比较例）

1—（4—异硫氰酰苯甲基）—二亚乙基三胺五乙酸，钐—153配合物向CC—49的IgG和$F(ab')_2$的共轭；〔^{153}Sm（SCN—Bz—DTPA）〕—IgG和〔^{153}Sm（SCN—Bz—DTPA）〕—$F(ab')_2$片段。

通过将150μl ^{153}Sm的0.1N HCl溶液与9μl的1—（4—异硫氰酰苯甲基）二亚乙基三胺五乙酸混合，再向其中加入HEPES缓冲剂（0.5M，PH8.9，大约30μl）使PH达到约6，制备成1—（4—异硫氰酰苯甲基）二亚乙基三胺五乙酸，钐—153配合物〔^{153}Sm（SCN—Bz—DTPA）〕。

为了共轭，将22.5×10⁻⁹ moles 的CC—49的IgG或F(ab′)₂（在50mmole HEPES中，PH8.5，蛋白质浓度约为1×10⁻⁴ M）与 ^{153}Sm 配合物混合，并加入碳酸钠溶液（1.0M，12～15μl）调节PH到8.9。共轭作用在室温（约25℃）下进行大约3小时。^{153}Sm 配合物标记的IgG或F(ab′)₂ 被分离出来，并用与实施例XII 中描述的相似方法进行鉴定。

实施例I和II及对比例A—D

双官能螯合物的体内筛选

某些确定的稀土螯合物的稳定性已在动物体内测试中得到了检验。例如，Rosoff 等人，在 the International Journal of Applied Radiation and Isotopes 14，129—135（1963）中报告了具有放射活性的稀土螯合物在鼠体中对确定的氨基羧酸的分布情况。已发现在体内，“螯合剂与体内成份（无机的和有机的）对稀土离子的竞争决定了它的沉积和排泄”。强的稀土螯合物被认为离解的很少而被排泄出来，而弱的或中等强度的螯合物离解迅速，被沉积在诸如肝脏等器官中。但是，放射性核素在肝脏中的浓度并不总是由于弱的配合物形成的，在一些情况下，是由于金属螯合物对肝脏具有的亲合性。事实上，螯合物早已被制备并用来评价肝脏的功能〔Fritzberg，Alan. R.，Raoliopharma Ceuticals：Progress and Clinical Perspectives，Vol. 1，1986；美国专利4，088，747和4，091，088〕。

实施例3化合物的钇和钐的螯合物的生物分布已被测定，且其在

肝脏中的百分比剂量被用作在体内的掩蔽方法来定性地评估螯合物的稳定性。为比较，包括了NTA和EDTA的螯合物。作为对照，也注射了钐，以未螯合的氯化钐形式。

从Charles River 实验室购进重量在150—200g的Sprague—Dawley 鼠。将这些动物放在笼中，并随意喂以水和食物。使用前让这些动物驯化至少五天。在注射配合物前，将动物放在热的灯下（15—30分钟），使其尾端静脉膨胀。然后将动物放在约束笼中，用酒精棉棍清洁其尾部，通过尾端静脉向动物注射（50—200μl）。注射后，动物被放到另一笼中两小时，在这之后，通过颈脱位使动物死去，然后将动物解剖，各部分用去离子水漂洗，轻拍至干，在一配衡的计量小瓶内称重。制作出注射后的同一材料的至少三个标准，并以动物的组织计数。剂量百分数等于器官中的计数值除以标准中的计数值，乘以100（参看下表）。

表：生物分布数据

实施例号	实施例的配位体*	金属	%肝脏中的注射剂量
I	3	Y	0．17
II	3	Sm	0．29
（A）	EDTA	Sm	8．4
（B）	EDTA	Sm	4．4
（C）	NTA	Sm	8．6
（D）	$SmCl_3$	Sm	39

*配合物是按以下配位体／金属的比例制备的，对实施例I和II为1：1；对实施例A为5：1，对实施例B和C为大约300：1。

实施例Ⅲ和E

用前面所述的方法制备1：1的钇（掺有示踪剂量的 ^{90}Y）与实施例3中的配位体，即BA—DOTA，和EDTA（比较例E）的配合物，然后将几份100μl的溶液转移到离心分离管中。加入过量的Y（Ⅲ），总体积的变化可以乎略，并且记录时间。金属加入一个半小时后，用前面描述的阳离子交换方法测定配合物的百分数，把这个结果与起始的配合物的量进行比较。配合物百分数与加入的金属的比值能表示出配位体—金属配合物的不稳定性。表中给出了其结果。

表：配合物的研究

金属／配位体摩尔比	%配合物	
	BA—DOTA	EDTA
1	80	98
10	——	86
100	——	78
250	88	48
500	80	16

实施例IV

1—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐—153配合物的制备；〔^{153}Sm（SCN—EA—DO3A）〕配合物

向100μl ^{153}Sm的0.1N HCl溶液中加入5μl的SCN—EA—DO3A（5mM，在50mM HEPES中，PH8.2）（实施例18中制备）。该溶液在涡流混合器上混合，

逐渐加入HEPES缓冲液（0．5M，PH8．9）（总共大约25μl）调节PH值到7左右。通过HPLC在GF—250柱上（HPLC体系I）监测螯合过程。得到大约50%的产率。

实施例V

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的制备；〔^{153}Sm（PA—DOTA）〕配合物

向150μl ^{153}Sm的0．1N HCl溶液（大约4．6mCi）中加入1μl的乙酸钠（2．0M）和9μl的α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸混合的铵—钾盐（5mmole，在50mmole HEPES中，PH8．5，用实施例8的步骤制备）。机械振动该混合物，并逐步滴加HEPES缓冲液（0．5M，PH8．9；加入大约31μl）到PH为7。然后在沙浴上于98℃加热该溶液一小时。以上过程结束后，取5μl混合物在Mono—Q^{TM}柱上用HPLC体系II进行分析，用梯度溶剂体系来洗脱（0—15分钟，从0至100%的B；其中A＝水，B＝1．0M乙酸铵和0．1mmole EDTA）。得到85—95%的产率，以^{153}Sm计。这样制备的α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物通过与相同的无放射活性的样品的比较进行鉴定，即通过它们各自的在Mono—Q^{TM}和GF—250柱子上的色谱行为。存在放射活性的配合物的进一步证据是通过其向异硫氰酰衍生物的转化和其后来的向抗体的螯合作用来确定的。配合物也可在不加热

（在环境温度下）通过保温6—18小时来制备，其产率为70—80%。

实施例VI

α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的制备；〔^{153}Sm（SCN—PA—DOTA）〕配合物

向实施例V中得到的反应混合物中加入2μl的HEPES缓冲液（0.5M，PH8.9），2μl的硫光气和0.2ml的氯仿。激烈地机械振动混合物2或3次，每次几秒钟。弃去氯仿层，留下主要含有所需产物的水层，并进一步纯化。采用HPLC，在GF—250柱子上用HPLC体系I测出α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的产率，以活性^{153}Sm计，为85—90%。为了纯化，让水层经过Sep—Pak^{TM}C—18柱体，并用90%的乙腈水溶液洗脱。弃去开始的300μl流出物，随后出来的900μl的SCN—衍生物用HPLC在GF—250柱上检定。活性^{153}Sm的回收率优于90%。然后将溶剂蒸发，历时1.5—2小时，剩余物被用来向抗体螯合。

实施例VII

α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的制备；〔^{153}Sm（BA—DOTA）〕配合物

向200μl ^{153}Sm的0.1N HCl溶液中加入1μl的乙酸钠（2.0M）和12μl的α—（4—氨基苯基）—1，

4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（5 mmole，在50 mmole HEPES中，PH8．5）（用实施例3的步骤制备）。机械振动该混合物，并逐渐滴加HEPES缓冲液（0．5M，PH8．9；加入大约38μl）使PH到7。然后将该溶液在沙浴上98℃下加热一小时。结束后，取5μl的混合物在Mono—Q TM柱上进行分析（HPLC体系II，用梯度溶剂体系洗脱：0—15分钟，从0至100%的B；其中A=水；B=1．0M乙酸铵和0．1mmole EDTA）。通常得到的产率以 ^{153}Sm计为85—95% 。该配合物也可用在室温下将混合物保温12—18小时的方法制备，其标题产物的产率为80—90% 。如此制备的α—（4—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物通过与一个真正的样品进行比较，即比较它们在Mono—Q TM柱上的色谱行为、向异硫氰酰衍生物的转化作用和其后来向抗体的螯合作用来进行检定。

实施例VIII

α—〔4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的制备；〔^{153}Sm（SCN—BA—DOTA）〕配合物

向实施例VII中得到的反应混合物中加入2μl的HEPES缓冲液（0．5M，PH8．9），2μl的硫光气和0．2ml的氯仿。将混合物缴烈地机械振动2或3次，每次几秒钟。弃去氯仿层，留下主要含有所需产物的水层。并进一步纯化。基于^{153}Sm活性，用HPLC体系I，通过HPLC在GF—250柱上分析，α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，

4，7，10—四乙酸，钐—153配合物的产率为90%以上。为了纯化，使水层经过Sep—PakTMC—18柱体，并用90%的乙腈水溶液洗脱，弃去开始的0.3ml流出物，随后出来的1.2ml是所需产物，回收率为86—93%。然后蒸发掉溶剂大约需2小时，剩余物被用来对抗体螯合。

实施例IX

1—〔2—(4—异硫氰酰苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐—153配合物向抗体的螯合；〔^{153}Sm(SCN—EA—DO3A)〕—IgG螯合物

使用的抗体是CC—49，一鼠科单克隆IgG，它可以结合到TAG—72，一个瘤缔合抗原，的抗原决定基上。为了螯合，将187μl的抗体溶液(1.20×10^{-4} M，在50mM HEPES中，PH8.5)与4.5×10^{-8} moles 的^{153}Sm(SCN—EA—DO3A)(按照实施例IV中描述的方法制备)进行混合，随后加入碳酸钠溶液(1.0M)，使PH值升到8.9。反应在室温下持续进行2小时。结束后，在Sepadax G—25(2.2ml)一次应用的柱子上用离心凝胶过滤法将^{153}Sm标记的IgG分离出来，并在GF—250柱子上用HPLC进一步纯化，用柠檬酸缓冲液(0.25M，PH7.4)洗脱。将含有标记IgG的部分沉淀下来，用Centricon^{TM}浓缩器进行浓缩并交换(3×1)到PBS中。如此制备的^{153}Sm标记的IgG的放射性比度大约是0.16μCi／μg蛋白质。通过HPLC(Sivakoff，S.I.，Biochrom 1(1)，42—48(1986))和标准的生物化学方法，例如，十二烷基磺酸钠：聚

丙酰胺凝胶电泳和放射自显影法，及固相放射免疫测定法（ＲＩＡ）〔参见David Colcher 等人，Cancer Res.，43，736—742（1983）〕来鉴定〔^{153}Sm（EA—DO3A）〕—ＩｇＧ制备的定整性。

实施例Ｘ

1—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—4，7，10—三乙酸，钐—153配合物向ＣＣ—49的片段Ｆ（ab′）$_2$ 的螯合；〔^{153}Ｓｍ（ＳＣＮ—ＥＡ—ＤＯ３Ａ）〕—ＣＣ—49的片段Ｆ（ａｂ′）$_2$

使ＣＣ—49的Ｆ（ａｂ′）$_2$ 片段，根据Lamoyi 和Nisonoff 描述的方法，用酶水解方法制备〔E. Lamoyi 和A. Nisonoff，J. Immunol. Methods，56，235—243（1983）〕〔225μl，1×10^{-4} M于50mM HEPES中的溶液，ＰＨ8.5〕与2.9×10^{-8} moles 的^{153}Ｓｍ（ＳＣＮ—ＥＡ—ＤＯ３Ａ）（用实施例ＩＶ中描述的方法制备）进行混合。加入碳酸钠（1.0 M，大约5μl）使ＰＨ到8.9，让反应持续进行大约2.5小时。结束后，将^{153}Ｓｍ标记的片段分离出来，用实施例ＩＸ中描述的方法进行检定。

实施例ＸＩ（Ａ和Ｂ）

〔^{153}Ｓｍ（ＥＡ—ＤＯ３Ａ）〕—ＩｇＧ和〔^{153}Ｓｍ（ＥＡ—ＤＯ３Ａ）—Ｆ（ａｂ′）$_2$ 在体内的定位

^{153}Ｓｍ（ＥＡ—ＤＯ３Ａ）标记的ＩｇＧ（实施例ＩＸ）和ＣＣ—49的Ｆ（ａｂ′）$_2$（实施例Ｘ）的应用可通过异种移植到无胸腺的鼠身上的人类肿瘤对标记材料的吸收来证实。雌性无胸腺

（Nu／Nu，CD-1背景）鼠皮下接种（S．C．（0．1ml／源）以人类结肠癌细胞链，LS—174T（大约1×10⁶个细胞／动物）。接种后大约两周，每一动物都被通过尾部静脉注射以大约2μCi（15—30μg）的在PBS中的 ^{153}Sm 标记的抗体。在不同的时间间隔里，这些鼠都死去了。放血后，癌和选择的组织被切下来并称重。在一γ射线测定器中测定其放射性活性。测定在每一组织中的 ^{153}Sm 的每分钟记数（CPM），并被表示为CPM每克组织每一注射剂量剩以100（%注射剂量／克）。结果示于图1～4和表IA和IB中。在研究中 ^{153}Sm（SCN—Bz—DTPA）标记的IgG和CC—49的F（ab′）$_2$（实施例ZA）被作为比较例。结果示于表IC和ID中。

实施例XII

α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物向抗体的共轭；〔 ^{153}Sm（SCN—PA—DOTA）〕—IgG共轭物

使用的抗体是CC—49，一鼠科单克隆IgG，其结合于TAG—72的抗原决定基，一个肿瘤缔合的抗原。为了共轭，使178μl的抗体溶液（1．26×10⁻⁴ M，在50mmole的HEPES中，PH8．5）与3．4×10⁻⁸ moles的α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐配合物（用实施例VI中描述的步骤制备）进行混合，随后加入碳酸钠溶液（1．0M，大约17μl）使PH值升到大约8．9。使反应在室温下持续2小时。

结束后，用离心凝胶过滤法，在Sephadex TM G—25（2.2ml）一次性应用的柱子上，将 ^{153}Sm 标记的IgG分离出来，并进一步在GF—250柱子上用HPLC纯化，用柠檬酸缓冲液（0.25M，PH7.4）洗脱。含有标记IgG的部分被沉淀下来，用Centricon TM 浓缩器浓缩并交换（3次）到PBS中。如此制备的 ^{153}Sm 标记的IgG的放射性比度大约为0.16μCi／μg蛋白质。采用HPLC和标准的生化方法如实施例IX中描述的来检验α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物—IgG制备的完整性和一致性。

下面的实施例是制备标记抗体共轭物的一种选择方法，它包括先将BFC共轭到抗体上，然后再进行螯合，生成放射性核素—BFC标记的Ab。

实施例XII A

α—〔2—（4—氨基苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸—Ab CC49共轭物（IgG CC49—PA—DOTA）的制备；第二步与 ^{153}Sm 螯合形成 ^{153}Sm 标记的抗体（IgG CC49—PA—DOTA—^{153}Sm）

^{153}Sm（PA—DOTA）标记的抗体可以通过下列步骤制备：首先将BFC，例如，α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸（SCN—PA—DOTA），在PH8～9的条件下偶合到抗体上，然后在PH为6时，室温下与 ^{153}Sm 螯合几小时。

在一典型的实验中，ＣＣ—４９在一Amicon 浓缩器中（截去３０Ｋ分子重量）被浓缩并经三次交换进入到碳酸盐缓冲液中（５０ｍＭ，ＰＨ９．１）使溶液中抗体浓度大于１．５×１０⁻⁴ Ｍ。向形成的共轭物中加入１６１μｌ含有２５×１０⁻⁹ mole的ＩｇＧ ＣＣ—４９并混有５μｌ的ＳＣＮ—ＰＡ—ＤＯＴＡ（５ｍＭ的浓度，在同样的碳酸盐缓冲液中，由实施例１８的方法制备）的抗体溶液。使混合液在室温下放置５小时，最后在５０００转／分的Ｓｏｒｖａｌｌ ＲＴ离心机上，通过Ａｍｉｃｏ 浓缩器中的３０Ｋ膜片过滤。浓缩液进一步用２ｍｌ０．２５Ｍ，ＰＨ值为７．４的ＤＴＰＡ的ＰＢＳ溶液洗涤，并用ＭＥＳ缓冲液（２０ｍＭ，ＰＨ５．８）洗涤５次（２ｍｌ每次），每次洗涤时离心３０分钟。最后，ＰＡ—ＤＯＴＡ—ＩｇＧ共轭物被浓缩到最小体积（大约１００μｌ），在ＧＦ—２５０柱上用ＨＰＬＣ分析证实其完整性。向纯化了的共轭物中加入 ^{153}Sm 的０．１Ｎ ＨＣｌ溶液（５０μｌ）和２０μｌ的ＭＥＳ缓冲液（１．０Ｍ，ＰＨ６）的在涡流混合器上混合后的混合液，并使其在室温下放置过夜。结束后，未结合的 ^{153}Sm 的量，经ＨＰＬＣ分析估计，是０．２２ＢＦＣ—Ｓｍ／抗体。 ^{153}Sm 与抗体的结合是通过与ＢＦＣ的螯合来完成的，它是共价结合到抗体上的，通过对照实验证实了其并不属于非特性结合。在对照实验中，ＩｇＧ ＣＣ—４９溶液，是在相同的条件下与 ^{153}Sm 混合液混合的，并根据相同的方法被分离出来，其没有显示出明显量的 ^{153}Sm 与其结合。

实施例ＸⅢ

α—〔２—（４—异硫氰酰苯基）—乙基〕—１，４，７，１０—四氮杂环十二烷—１，４，７，１０—四乙酸，钐—１５３配合物

向CC—49的片段F(ab′)$_2$的共轭：〔^{153}Sm(SCN—PA—DOTA)〕—F(ab′)$_2$片段

使CC—49的F(ab′)$_2$片段〔根据E. Lamoyi 等人，J. Immunol. Methods 56，235—243(1983)描述的方法，通过酶水解制备〕，(225μl的1×10^{-4} M的溶液，在50 mmoles HEPES中，PH8.5)与2.9×10^{-8} moles 的α—〔2—(4—异硫氰酰苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物(用实施例VI中描述的方法制备)进行混合，加入碳酸钠(1.0M，9μl)使PH值达到8.9左右，反应持续进行约2.5小时。分离出^{153}Sm 标记的片段，并用实施例IX中描述的方法鉴定。其放射性比度大约是0.4μCi／μg。

实施例XIV (A和B)

α—〔2—(4—异硫氰酰苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物标记的IgG和F(ab′)$_2$ 的共轭物的体内定位；〔^{153}Sm(SCN—PA—DOTA)〕—IgG和〔^{153}Sm(SCN—PA—DOTA)〕—F(ab′)$_2$

α—〔2—(4—异硫氰酰苯基)乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物标记的IgG和CC—49的F(ab′)$_2$ (实施例XII和XIII)的共轭物的应用可通过异种移植到无胸腺鼠体内的人类肿瘤对标记材料的吸收来证实。用实施例XI中描述的方法测定生物定位。IgG的结果示于图1—7，F(ab′)$_2$ 的结果示于图8—14中，以及

表ⅡA和ⅡB中。

在研究中，^{153}Sm（SCN—Bz—DTPA）与IgG和F（ab′）$_2$共轭物标记的材料（由实施例ZA制备）被用来作为比较，〔参见表IC和ID〕。

实施例XV

α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物向抗体的共轭；〔^{153}Sm（SCN—BA—DOTA）〕—IgG

将CC—49的整个IgG（174μl，1.2×10^{-4}M，在0.25M HEPES中，PH8.7）与2.0×10^{-8}moles的α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153（2.8mCi）（用实施例ⅧⅢ中的方法制备）进行混合，随后加入碳酸钠溶液（1.0M，大约2μl）以保持PH大约为8.7。在室温下让反应持续2.5小时。结束后，在Sephadex^{TM} G—25（2.2ml）一次性使用的柱子上用离心凝胶过滤法分离出^{153}Sm标记的IgG，并用HPLC在GF—250柱子上进一步纯化，用柠檬酸缓冲液（0.25M，PH7.4）洗脱。将含有标记的IgG部分沉淀下来，利用Centricon^{TM}浓缩器将其浓缩，并交换（3次）到PBS中。通过HPLC和标准的生化方法，如在实施例IX中描述过的，来验证钐—153标记的IgG制备的一致性和完整性。

实施例XVI

α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物向CC—49的

片段F（ab′）$_2$ 的共轭；〔^{153}Sm（SCN—BA—DOTA）〕—CC—49的F（ab′）$_2$ 片段

将CC—49的F（ab′）$_2$（84μl，2.4×10^{-4} M，在0.25M HEPES缓冲液中，PH8.7），根据Lamoyi等描述的方法用酶水解制备，与2.1×10^{-8} moles 的α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物（用实施例VIII的方法制备）进行混合，加入碳酸钠（1.0M，大约2μl）使PH值到8.7，让反应持续进行大约2小时。结束后，分离出 ^{153}Sm 标记的片段，并用实施例XII中描述的方法来鉴定。

实施例XVII（A和B）

α—（4—异硫氰酰苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物标记的IgG（实施例XV）和F（ab′）$_2$（实施例XVI）的体内定位；〔^{153}Sm（BA—DOTA）〕—IgG和〔^{153}Sm（BA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$。

根据实施例XIV或XI中描述的步骤来进行体内研究，结果示于图1—14和表IIIA和IIIB中。

实施例XVIII（A和B）

α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，^{177}Lu—配合物标记的IgG和F（ab′）$_2$ 的体内定位；〔^{177}Lu（PA—DOTA）〕—IgG和〔^{177}Lu（PA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$

根据实施例Ⅴ，ⅤⅠ，ⅩⅡ，和ⅩⅢ中描述的步骤，制备出标题化合物，并进行体内研究，其结果示于表ⅣA和ⅠⅤB中。

实施例XIX（A和B）

α—〔2—（4—异硫氰酰苯基）乙基〕—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钇—90配合物标记的IgG和F（ab′）$_2$ 的体内定位；〔^{90}Y（PA—DOTA）〕—IgG和〔^{90}Y（PA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$

根据实施例Ⅴ，ⅤⅠ，ⅩⅡ，和ⅩⅢ中描述的步骤，制备标题化合物，并进行体内研究，其结果示于表ⅤA和ⅤB中。

实施例XX

〔^{153}Sm（BFC）〕—CC—49—IgG和〔^{177}Lu（BFC）〕—CC—49—IgG的体内PH稳定性

将〔^{153}Sm（BFC）〕—CC—49—IgG或〔^{177}Lu（BFC）〕—CC—49—IgG放置在0．2M NaOAc缓冲液中，其PH值分别为6．0，4．0和2．8，且在室温下，蛋白质的浓度大约为5×10^{-6} M，并有大约0．5配合物／抗体。在一定的时间间隔内取样，用HPLC（GF—250柱）分析活性^{153}Sm或^{177}Lu从蛋白质上的离解作用。通常该研究要进行5天，或直到有90%的放射性同位素都已离解。结果以每天放射性同位素的损失的初始速度来表示。结果证实了^{153}Sm（PA—DOTA），^{177}Lu（PA—DOTA），^{153}Sm（BA—DOTA）和^{153}Sm（OMe—BA—DOTA）与标准的〔^{153}Sm（Bz—DTPA）〕配合物相比较，在酸性PH下具有很好的稳定性。结果示于下表中。

配合物的这个较大的稳定性也与 ^{153}Sm 和 ^{177}Lu 从人体和非目标组织上（如：肾、肝）较快速的排除有密切的关系。参看图1—14。

BFC	同位素	%同位素的损失／天 PH		
		6.0	4.0	2.8
Bz—DTPA	^{153}Sm	<2	35	35
PA—DOTA	^{153}Sm	<2	<2	<2
BA—DOTA	^{153}Sm	<2	<2	<2
PA—DOTA	^{177}Lu	<2	<2	<2
MeOBA—DOTA	^{153}Sm	<2	<2	<2
EA—DO3A	^{153}Sm	<2	90	95

实施例XXI（A和B）

α—（2—甲氧基—5—氨基苯基）—1，4，7，10—四氮杂环十二烷—1，4，7，10—四乙酸，钐—153配合物标记的IgG和F（ab′）$_2$ 的体内定位；〔^{153}Sm（MeO—BA—DOTA）〕—IgG和〔^{153}Sm（MeO—BA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$

根据实施例V，VI，和XII中描述的方法制各标题化合物，用实施例XI中的方法进行体内研究。结果示于表VIA和VIB中。

实施例XXII

^{153}Sm（PA—DOTMA）配合物的制备

向100μl的 ^{153}Sm（0.3×10^{-3} M，在0.01N HCl中；5mCi）中加入6μl的PA—DOTMA（用实施例

29的方法制备的高Rf的非对映体；5mM，在Milli—Q TM水中），20μl的MES缓冲液（1.0M，PH6）和1μl的HEPES缓冲液（0.5M，PH8.7）。该溶液在涡流混合器上混合，且该混合物最终的PH值大约为6。在90℃下，将混合物加热30分钟后，通过HPLC在GF—250柱上分析其螯合效果，一般能得到90%或更好的产率。^{153}Sm—PA—DOTMA配合物的检定可以通过与非放射性活性的Sm配合物比较而得到。非放射性活性的配合物已在实施例42中分别被合成和鉴定过。

实施例XXIII

^{153}Sm（SCN—PA—DOTMA）的制备

向实施例XXII中制备的，并已在室温下冷却了20分钟的^{153}SmPA—DOTMA配合物中加入10μl1%的硫光气在90%的乙腈—水介质中形成的溶液。将该混合物在涡流混合器上激烈地混合，并在室温下放置5～20分钟。反应连续进行，并用HPLC分析来监测。为了纯化具有活性的^{153}Sm配合物，用氯仿将其萃取3次（每次200μl），使水层经过预先用5ml的甲醇和5ml的MES缓冲液（20mM，PH5.8）处理的PRP柱体（PRP柱体＝Mini—Clean TM 柱子。来自Alltech Associates，Deerfield，IL）。先用5ml的MES缓冲液和5ml的Milli—Q TM 水洗涤后，用900μl90%的乙腈将其萃取，回收了大约90%的活性^{153}Sm，将开始的100μl弃去。减压下在温度低于40℃时将混合物蒸发至干，主要含有标题产物的剩余物被用来对抗体进行共轭作用。

实施例XXIV

^{153}Sm（SCN—PA—DOTMA）对IgG和F（ab′）$_2$ CC49的共轭作用

通常在一个Centricon^{TM}浓缩器上（断掉30K分子重量）将抗体浓缩，并交换到碳酸盐缓冲液中（PH9.1或9.5，50mM），使蛋白质的浓度为1.5×10^{-4} M或更大。为了共轭，将少量的碳酸盐缓冲液，利用它使最终的蛋白质浓度达1.5×10^{-4} M，加入到^{153}Sm（PA—DOTMA）的异硫氰酰衍生物中（实施例XXII中制备），随后浓缩抗体，与BFC—^{153}Sm配合物等当量。在涡流混合器上混合该混合物，使反应在室温下进行1小时或直到有40～50%的^{153}Sm结合到了抗体上，经HPLC分析在GF—250柱子上表现出来。通过两个串联的离心凝胶过滤Sephadex^{TM} G—25柱（2.2ml）分离出标记的抗体。标记的抗体的免疫反应性、完整性和一致性通过HPLC和前面所述的标准的生化技术来分析。

实施例XXV

^{153}Sm（PA—DOTMA）标记的IgG和F（ab′）$_2$ CC—49的生物分布研究

利用实施例XI中描述的相似方式进行研究，结果示于表ⅦA和ⅦB中。参看图15—28。

实施例XXVI

^{177}Lu（PA—DOTMA）配合物的制备

向30μl的^{177}Lu（6×10^{-3} M，在1.1N HCl中；4mCi）中加入36μl的PA—DOTMA（用实施例29

的方法制备；5mM milli—Q TM 水溶液）。该溶液在涡流混合器中混合，加入115μl的MES缓冲液（1.0M，PH 6.0）中和溶液使PH约为5.5～6。将该溶液在90℃时加热30分钟，使螯合率大于90%。让混合物经过预先用5ml的甲醇和5ml的MES缓冲液（20mM，PH5.8）处理的PRP柱体，用5ml的milli—Q TM 水洗涤柱体，用1000μl 90%的乙腈萃取络合物，其占起始活性 ^{177}Lu的78%（弃去开始的100μl的萃取液）。

实施例XXVII

^{177}Lu（SCN—PA—DOTMA）的制备

向实施例XXVI中得到的存在于90%的乙腈中的 ^{177}Lu（PA—DOTMA）配合物中加入6μl的10%硫光气在90%的乙腈中形成的溶液。该溶液在涡流混合器上混合，20分钟后，用HPLC分析异硫氰酸盐衍生物的形成。一般地，该反应是定量进行的。在减压条件下，温度低于40℃时，蒸发1～2小时除去溶剂和过量的硫光气，剩余物被用来与抗体进行共轭作用。

实施例XXVIII

^{177}Lu（PA—DOTMA）对IgG CC—49的共轭作用

将在碳酸盐缓冲液（50mM，PH9.1）中的抗体IgG CC—49与在相同缓冲液中的等摩尔量的异硫氰酰衍生物（用实施例XXVII中的方法制备）进行混合，反应持续进行70分钟，抗体浓度为1.5×10^{-4} M，分离出标记的抗体，并根据实施例XXIV中描述的方法进行鉴定。

实施例XXIX

^{177}Lu（PA—DOTMA）标记的IgG CC—49的长期生物分布研究

用 ^{177}Lu 标记的抗体进行长期的动物实验，利用其半衰期长的优点（161小时）。根据实施例XI中描述的方式，该实验在Balb／C老鼠体中进行三个多星期，结果示于表VIIIA中。参看图29—34。

在图中，下表中的点和数据，所用的符号是：

共 轭 物	符号	表	图	生物实验
{^{153}Sm(EA—DO3A)}—IgG—CC—49	△	IA	1—7	IX
{^{153}Sm(EA—DO3A)}—F(ab'2)—CC—49	△	IB	8—14	X
{^{153}Sm(Bz—DTPA)}—IgG—CC—49	○	IC	1—7	ZA
{^{153}Sm(Bz—DTPA)}—F(ab'2)—CC—49	○	ID	8—14	ZA
{^{153}Sm(PA—DOTA)}—IgG—CC—49	□	IIA	1—7	XII
{^{153}Sm(PA—DOTA)}—F(ab'2)—CC—49	□	IIB	8—14	XIII
{^{153}Sm(BA—DOTA)}—IgG—CC—49	⬚	IIIA	1—7	XV
{^{153}Sm(BA—DOTA)}—F(ab'2)—CC—49	⬚	IIIB	8—14	XVI
{^{153}Sm(PA—DOTMA)}—IgG—CC—49	▽	VIIA	15—21	XXIV
{^{153}Sm(PA—DOTMA)}—F(ab'2)—CC—49	▽	VIIB	22—28	XXV
{^{177}Lu(PA—DOTMA)}—IgG—CC—49	○	VIIIA	29—34	XXIX

在附图中，数据表示如下：

图	器官	标题
1	血	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
2	肝	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
3	脾	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
4	肾	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
5	肿瘤	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
6	股	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
7	整体保留	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
8	血	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
9	肝	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
10	肾	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
11	脾	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
12	肿瘤	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
13	股	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
14	整体保留	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
15	血	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
16	肝	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
17	脾	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布

*在带有LS174—T肿瘤的裸体小鼠中。

** 在Blab／C鼠中

图	器官	标题
18	肾	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
19	肿瘤	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
20	股	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
21	整体保留	^{153}Sm—BFC—CC49—IgG * 的生物分布
22	血	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
23	肝	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
24	脾	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
25	肾	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
26	肿瘤	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
27	股	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
28	整体保留	^{153}Sm—BFC—CC49—F(ab′)$_2$*的生物分布
29	血	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布
30	肝	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布
31	脾	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布
32	肾	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布
33	股	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布
34	整体保留	^{177}Lu—BFC—CC49—IgG ** 的生物分布

*在带有LS174—T肿瘤的裸体小鼠中

** 在Blab／C鼠中

表 IA

^{153}Sm 以〔 ^{153}Sm（EA—DO3A）〕—IgG—CC49注入的生物分布

%注入的剂量／克

（n＝5）

器官	5 hr		24 hr		48 hr		120 hr	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	23.08	2.36	17.25	2.40	11.32	*1.06	5.78	*1.69
肝	6.95	1.28	6.58	0.56	6.58	0.62	7.62	0.98
脾	5.17	0.59	5.06	0.96	4.62	0.72	4.92	1.72
肾	4.59	0.68	4.01	0.53	3.74	0.76	3.20	0.59
肿瘤	11.44	4.13	27.19	2.12	53.01	9.10	59.01	13.23
股	—	—	2.58	0.52	2.78	0.20	4.22	0.17
肿瘤重	0.16	0.09	0.20	0.09	0.30	0.17	0.52	0.34

* n＝4

表 IB

^{153}Sm 以〔 ^{153}Sm（EA—DO3A）〕—F（ab′）$_2$ CC—49 注入的生物分布

%注入的剂量／克

（n＝5）

器官	5 hr		24 hr		48 hr		120 hr	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	13.36	0.97	1.52	0.42	0.20	0.06	0.05	0.01
肝	7.13	0.65	8.69	1.3	8.08	0.8	8.11	0.92
脾	5.94	1.24	4.96	1.27	4.81	0.99	5.08	1.43
肾	41.60	5.60	64.32	7.88	64.12	*12.59	37.63	6.57
肿瘤	12.95	1.73	16.84	3.71	11.50	4.56	5.53	1.46
肢	2.74	0.65	2.45	0.26	3.41	0.75	4.99	0.29
肿瘤．重．g	0.25	0.20	0.34	0.25	0.28	0.14	0.44	0.27

* n＝4

表 IC

^{153}Sm 以〔 ^{153}Sm（Bz—DTPA）〕—IgG—CC—49 注入的生物分布

%注入的剂量／克

（n＝10）

器官	5 hr		24 hr		48 hr		120 hr	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	24.97	3.07	16.05	2.45	12.81	2.69	5.84	1.76
肝	7.74	1.35	6.01	0.95	5.68	1.07	5.43	1.45
脾	5.69	1.04	4.86	1.36	4.72	0.81	3.78	0.63
肾	4.52	1.04	3.96	0.88	3.81	0.61	3.76	0.31
肿瘤	13.90	3.18	42.86	14.03	46.33	8.30	61.32	19.80
股	2.36	0.12	1.95	0.38	1.97	0.75	2.25	0.50
整体保留	85.45	4.74	80.16	3.58	77.36	5.32	70.60	3.32

表　ID

^{153}Sm 以〔^{153}Sm（Bz—DTPA）〕—F（ab′）$_2$—CC—49 注入的生物分布

%注入的剂量／克

（n＝10）

器官	5 hr		24 hr		48 hr		120 hr	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	15.03	1.84	2.13	0.48	0.29	0.08	0.04	0.02
肝	7.07	0.83	7.03	1.24	6.14	0.67	5.80	1.0
脾	4.50	0.97	4.22	1.15	3.65	0.62	3.24	0.42
肾	46.74	8.69	80.37	12.76	61.42	9.85	30.17	5.17
肿瘤	15.95	3.88	18.68	5.10	15.55	2.80	6.54	1.14
股	2.48	0.24	1.77	0.28	2.48	0.40	2.85	0.35
整体保留	83.23	4.64	72.17	6.20	58.89	4.40	40.53	2.48

表 IIA

^{153}Sm 以〔 ^{153}Sm（PA—DOTA）〕—IgG—CC—49 注入的生物分布

%注入的剂量／克

（n＝5）

器官	5.5 hr		25 hr		49 hr		121 hr	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	24.65	2.89	16.18	2.10	13.22	1.08	7.34	4.23
肝	8.25	1.14	5.92	0.41	5.59	.0.52	4.16	1.03
脾	6.98	1.70	5.05	0.20	4.27	0.52	4.31	1.95
肾	4.01	0.86	3.16	0.55	3.44	0.39	3.26	0.57
肿瘤	14.31	*2.00	42.81	8.83	72.59	21.53	78.36	33.29
股	2.69	0.41	2.02	0.32	1.69	0.37	1.44	0.69
肿瘤．重．g	0.27	0.29	0.34	0.26	0.16	0.13	0.28	0.15

* n＝4

表 IIB

以〔 ^{153}Sm（PA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$—CC—49注射的 ^{153}Sm的生物分布

%注射的剂量／克

（n＝5）

器官	5小时		24小时		48小时		120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	14.74	0.76	2.25	0.45	0.33	0.08	0.02	*0.01
肝	7.83	0.82	5.04	*0.32	4.48	0.41	1.61	0.26
脾	4.80	0.84	3.27	0.45	3.33	0.82	1.41	0.10
肾	51.28	5.83	78.78	8.40	61.91	8.17	19.79	5.75
瘤	17.99	6.53	22.09	6.07	14.93	1.91	5.81	1.21
股骨	2.43	0.17	1.34	0.25	1.17	0.22	0.51	0.18
瘤重（克）	0.20	0.08	0.19	0.13	0.29	0.10	0.45	0.23

* n＝4

表 ⅢA

以〔^{153}Sm（BA—DOTA）〕—IgG—CC—49注射的 ^{153}Sm的生物分布

%注射的剂量／克

（n＝5）

器官	5．5小时		24小时		48小时		120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	24.89	1.29	17.53	1.79	13.61	0.53	8.68	2.94
肝	7.53	0.79	5.46	*0.62	5.35	*0.40	4.26	*0.58
脾	5.52	0.61	5.83	1.07	4.78	0.35	3.76	1.28
肾	3.84	0.50	3.96	*0.36	3.17	*0.57	3.49	*0.43
瘤	14.41	2.96	38.65	6.45	55.84	11.43	85.26	25.70
股骨	2.54	0.34	1.81	0.35	2.08	0.30	1.17	0.48
瘤重（克）	0.34	0.22	0.13	0.04	0.20	0.06	0.20	0.15

* n＝4

表 ⅢB

以〔 ^{153}Sm（BA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$—CC—49注射的 ^{153}Sm的生物分布

%注射的剂量／克

（n＝5）

器官	5小时		24小时		49小时		120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	15.62	*0.86	2.42	0.42	0.28	0.08	0.03	0.01
肝	7.69	0.71	6.18	0.82	4.22	0.88	1.56	0.25
脾	4.93	0.63	3.94	0.52	2.88	*0.36	1.43	*0.30
肾	50.29	4.99	77.19	*3.22	60.44	7.71	24.98	2.67
瘤	14.58	2.24	24.28	1.81	17.65	3.25	7.39	2.54
股骨	2.13	0.18	1.36	0.15	1.03	0.28	0.68	0.35
瘤重 克	0.17	0.02	0.12	0.07	0.17	0.06	0.12	0.10

* n＝4

表 IVA

以〔^{177}Lu（PA—DOTA）〕—IgG—CC—49注射的^{177}Lu的生物分布

%注射的剂量／克

（n＝5）

器官	5小时		24小时		48小时		121小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	26.50	4.32	*19.43	*1.59	14.89	1.72	11.73	3.14
肝	7.47	1.34	*6.74	*0.31	5.11	0.41	4.71	0.63
脾	6.29	1.56	*5.47	*1.24	4.43	0.31	5.35	1.82
肾	3.86	*0.85	*4.13	*0.45	3.13	*0.30	3.57	1.15
瘤	11.94	3.39	*49.03	*3.21	56.36	*4.24	92.05	*15.32
股骨	2.79	1.08	*2.15	*0.30	2.11	0.39	1.32	*0.19
瘤重（克）	0.13	0.09	*0.09	*0.02	0.08	*0.02	0.10	*0.04

* n＝4

表 IVB

以〔^{177}Lu(PA—DOTA)〕—F(ab')$_2$—CC—49注射的 ^{177}Lu的生物分布

% 注射的剂量／克

(n＝5)

器官	5小时		24小时		48小时		121小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	12.65	*0.87	*2.40	*0.18	0.47	0.08	0.04	*0.02
肝	5.39	*0.27	*5.54	*0.31	3.25	0.45	1.30	*0.24
脾	4.21	0.95	*3.60	*0.55	2.60	0.74	1.33	0.27
肾	38.82	6.42	*74.40	*6.13	48.45	6.47	15.88	2.13
瘤	10.79	2.69	*19.10	*2.08	15.44	2.35	4.69	0.78
股骨	2.13	0.83	*1.45	*0.33	0.95	0.43	0.41	*0.25
瘤重(克)	0.10	0.03	*0.10	*0.03	0.07	0.06	0.19	0.13

* n＝4

表 VA

以〔^{90}Y(PA—DOTA)〕—IgG—CC—49注射的 ^{90}Y 的生物分布

%注射的剂量／克

器官	n＝3 5小时		n＝5 24小时		n＝5 48小时		n＝5 120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	25.15	1.96	18.22	2.69	15.85	*0.81	6.62	2.94
肝	8.25	0.42	7.61	0.77	6.52	0.96	5.68	1.26
脾	5.13	0.26	5.50	0.72	5.66	*0.38	4.19	0.88
肾	3.04	0.58	4.35	1.06	3.66	0.60	2.47	0.33
瘤	12.45	0.79	44.73	**1.43	68.41	*5.48	70.32	21.34
股骨	2.05	0.15	1.81	0.54	1.79	*0.11	1.04	0.45

* n＝4

** n＝3

表 VB

以〔^{90}Y（PA—DOTA）〕—F（ab′）$_2$—CC—49注射的 ^{90}Y的生物分布

%注射的剂量／克

n＝5

器官	5小时		24小时		48小时		120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	13.87	1.19	2.22	0.46	0.31	*0.03	0.04	0.02
肝	6.98	0.84	4.13	*0.42	3.01	0.33	1.56	0.32
脾	4.27	0.35	3.44	*0.49	2.54	0.71	1.33	0.54
肾	44.60	5.52	65.40	5.92	42.31	4.67	12.36	2.60
瘤	13.08	*0.88	22.44	4.77	17.84	5.09	5.83	2.09
股骨	1.42	0.22	1.12	0.14	0.39	0.18	0.38	0.12

*n=4

表 VIA

以〔^{153}Sm(MeO—BA—DOTA)〕—IgG—CC—49注射的 ^{153}Sm 的生物分布

%注射的剂量／克

器官	n＝5 5小时		n＝5 24小时		n＝5 48小时		n＝4 120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	21.06	*0.75	14.57	1.18	13.98	0.78	9.49	1.06
肝	9.00	1.93	6.22	0.68	6.32	0.41	4.34	0.27
脾	5.39	1.40	4.00	0.64	4.69	0.93	4.53	0.41
肾	3.48	*0.24	3.23	0.41	3.47	0.45	3.47	0.19
瘤	18.00	8.91	41.64	3.37	58.34	5.78	69.26	21.92
股骨	2.54	0.27	1.94	0.32	2.05	0.29	1.29	0.16

* n＝4

表 VIB

以〔^{153}Sm(MeO—BA—DOTA)〕—F(ab′)$_2$—CC—49注射的 ^{153}Sm 的生物分布

%注射的剂量／克

n＝5

器官	n＝5 5小时		n＝5 24小时		n＝4 48小时		n＝5 120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	12.98	**0.36	2.13	0.37	0.31	*0.03	0.05	0.03
肝	6.58	**0.16	6.77	1.13	4.62	0.27	2.46	0.55
脾	3.95	0.57	3.53	0.76	2.59	0.40	2.18	0.68
肾	47.07	5.85	74.16	8.03	47.68	6.29	24.25	2.74
瘤	12.59	3.96	17.30	1.68	12.33	*0.80	5.21	*0.63
股骨	2.61	0.30	1.61	0.31	0.90	0.03	0.68	**0.10

* n＝3

** n＝4

表 VIIA

以〔^{153}Sm（PA—DOTMA）〕—IgG—CC—49注射的 ^{153}Sm 的生物分布

%注射的剂量／克

n＝5

	5小时		24小时		48小时		120小时	
器官	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	23.00	1.11	15.58	1.37	11.78	0.36	8.98	0.91
肝	7.71	0.51	6.68	1.16	4.98	0.32	4.72	0.69
脾	6.05	1.03	5.28	0.45	3.66	0.35	3.72	0.53
肾	3.68	*0.23	4.07	0.41	3.95	*0.15	3.17	0.86
瘤	10.40	2.10	31.85	*2.52	44.70	10.03	66.45	13.60
股骨	1.94	0.20	1.66	0.11	1.49	0.10	1.22	0.08

* n＝4

表 VIIB

以〔^{153}Sm（PA—DOTMA）〕—F（ab′）$_2$—CC—49注射的 ^{153}Sm的生物分布

%注射的剂量／克

n＝5

器官	5小时		24小时		48小时		120小时	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准
血	12.85	1.06	1.84	0.13	0.38	0.09	0.07	0.02
肝	6.12	0.52	5.36	0.49	3.65	0.65	1.93	0.32
脾	4.08	0.37	2.88	0.31	2.09	0.62	0.92	*0.13
肾	50.28	5.26	58.59	5.63	45.29	7.04	14.85	*0.66
疱	11.85	2.23	14.27	1.02	15.26	2.83	4.90	2.01
股骨	1.77	0.06	1.06	0.13	0.96	0.28	0.79	0.24

* n＝4

表 VIIIA

以〔^{177}Lu（PA—DOTMA）〕—IgG—CC—49注射的 ^{177}Lu 的生物分布

% 注射的剂量／克

n＝5

器官	24小时		48小时		7 天		14天		21天	
	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平均	标准	平 均	标准
血	31.35	2.66	30.25	*0.93	22.47	0.71	14.13	1.05	9.88	0.83
肝	10.01	0.46	11.22	1.47	8.61	0.79	6.76	0.67	5.41	1.39
脾	10.13	1.16	10.91	*0.67	10.79	*0.36	8.09	0.98	6.03	0.55
肾	6.52	2.06	6.14	0.76	5.21	0.97	3.44	0.43	2.17	0.22
股骨	3.97	0.45	4.53	0.38	2.84	0.16	2.36	0.23	1.67	0.30

* ＝4

根据本文公开的发明说明书和实例，本发明的其它具体实例对于那些熟练的技术人员来说将是明显的，说明书和实施例仅仅是作为例证，发明的真正范围和实质是由下面的权利要求书表示的。

〔^{153}Sm(BFC)〕-CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布

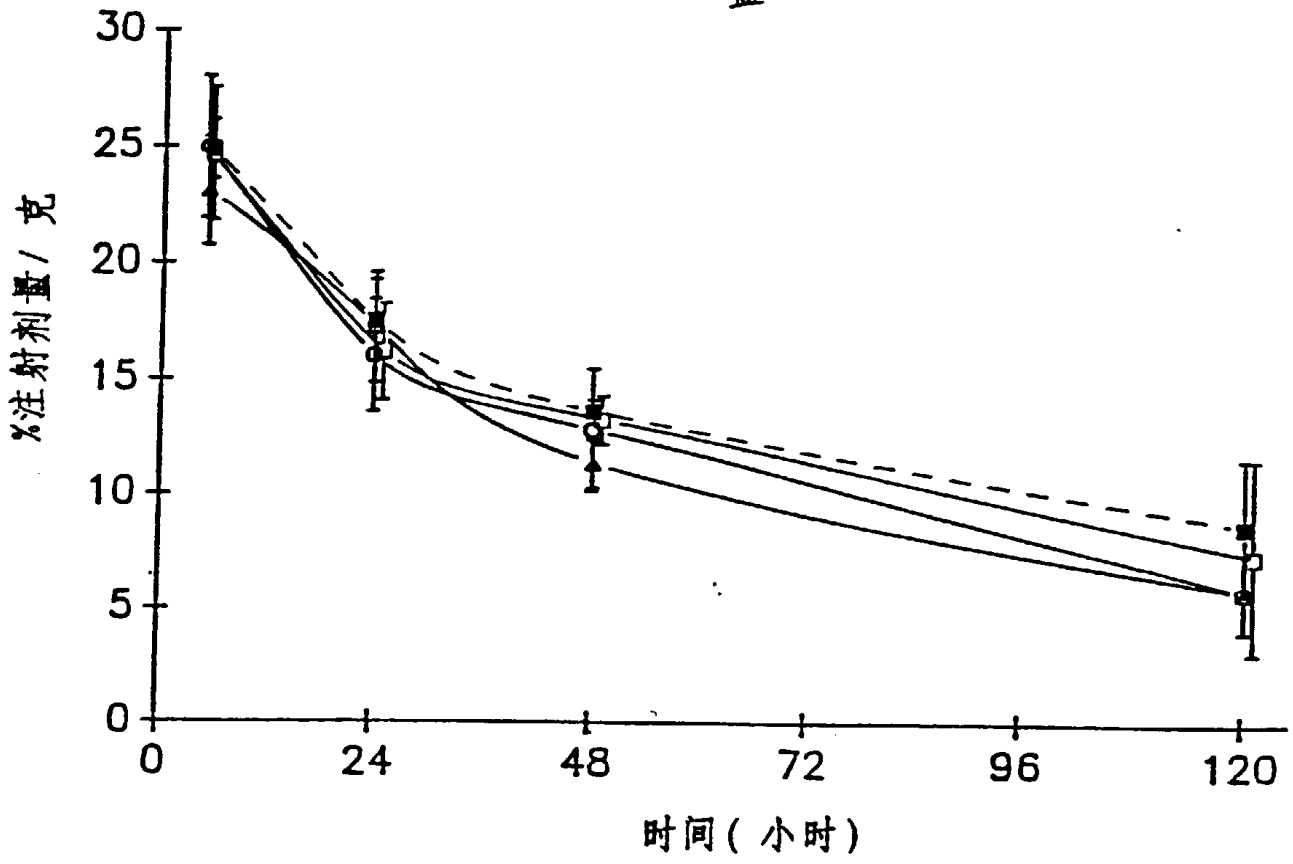


图 1

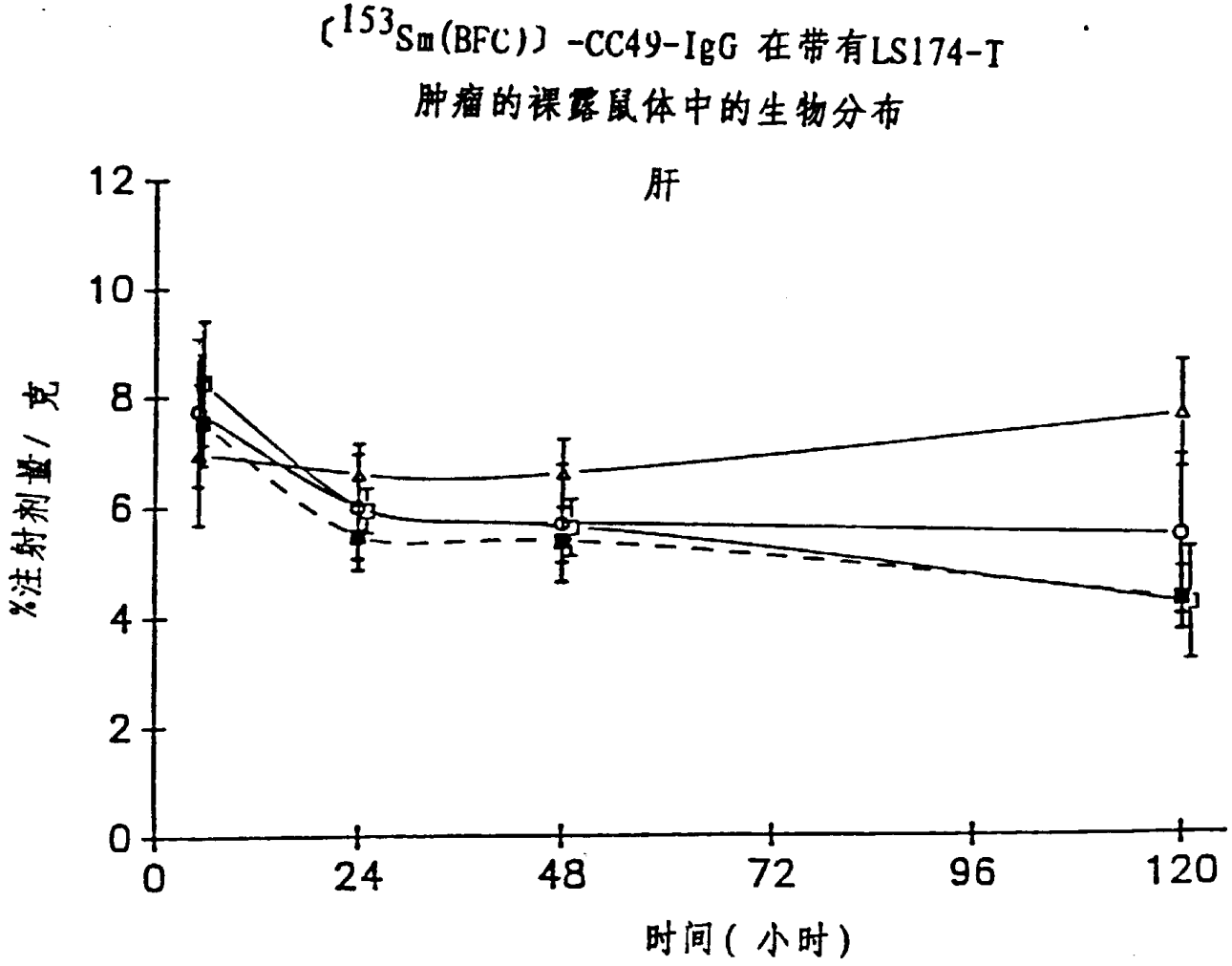

[153Sm(BFC)] -CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
肝
%注射剂量/克
12
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
时间(小时)

图 2

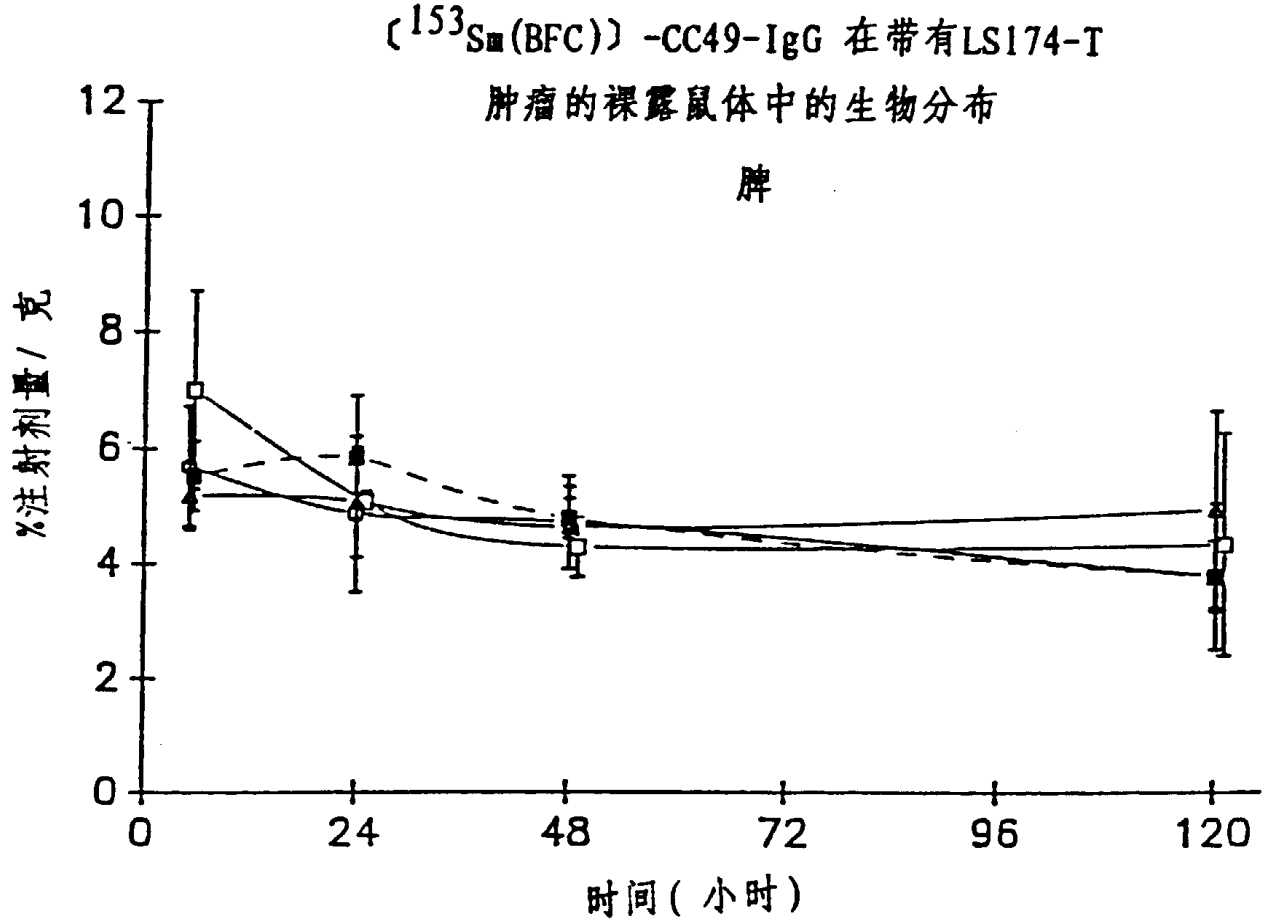

〔153Sm(BFC)〕-CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
脾
%注射剂量/克
12
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
时间(小时)

图 3

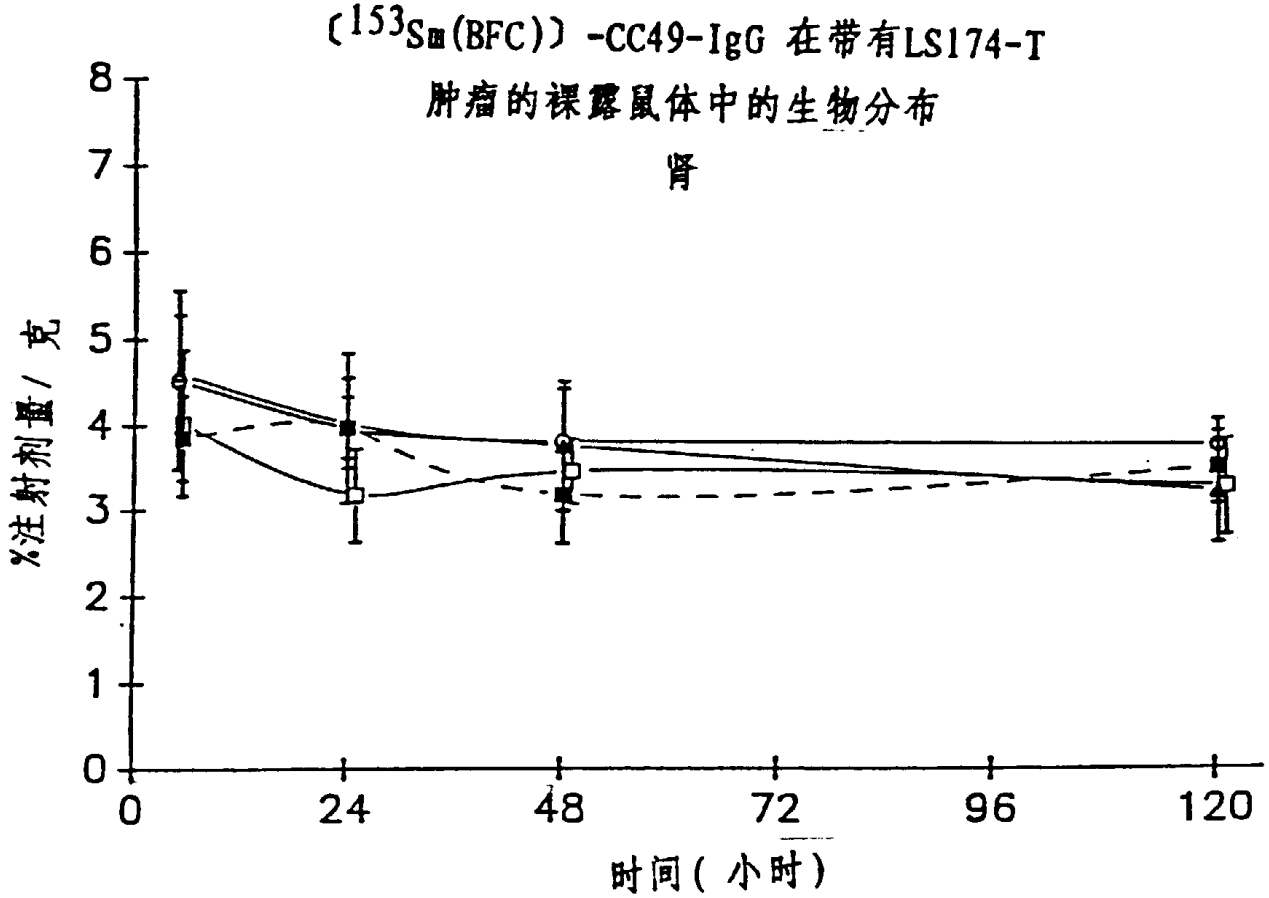

〔153Sm(BFC)〕-CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
肾
%注射剂量/克
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
24
48
72
96
120
时间(小时)

图 4

〔^{153}Sm(BFC)〕-CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布

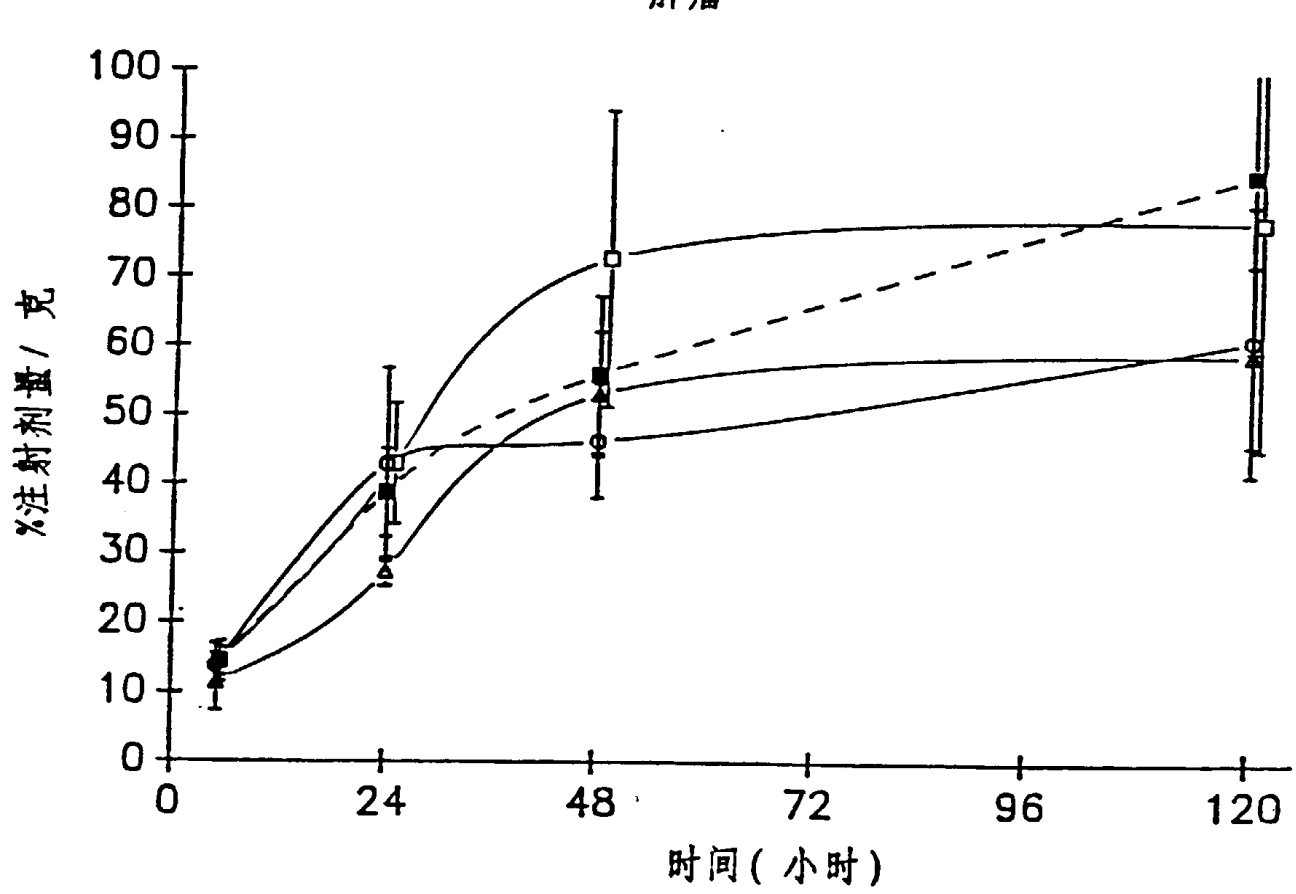


图 5

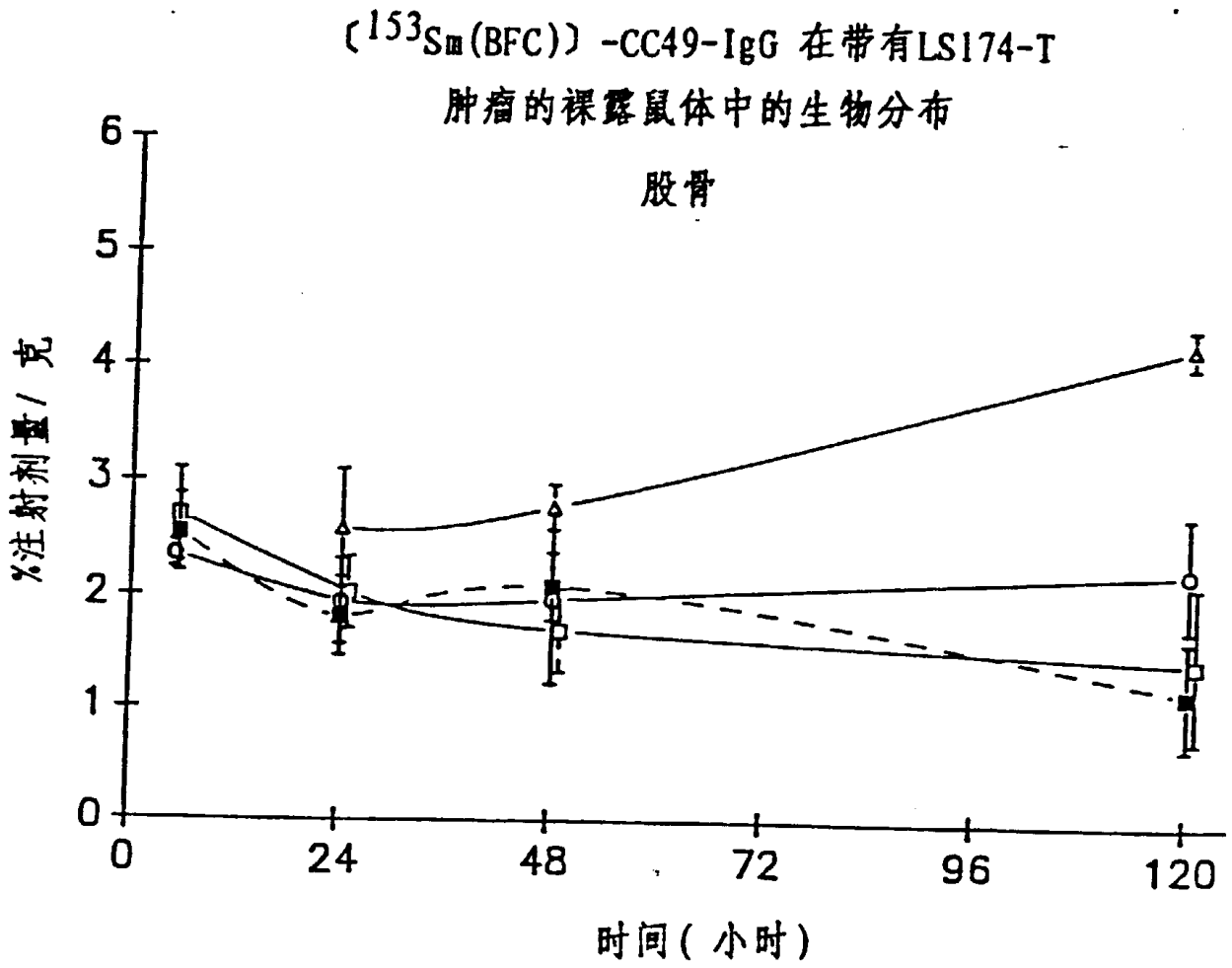

〔153Sm(BFC)〕-CC49-IgG 在带有LS174-T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
股骨
%注射剂量/克
0
1
2
3
4
5
6
0
24
48
72
96
120
时间(小时)

图 6

连在CC49 IgG上的^{153}Sm 螯合剂在带有LS174-T肿瘤的裸露鼠体中的比较

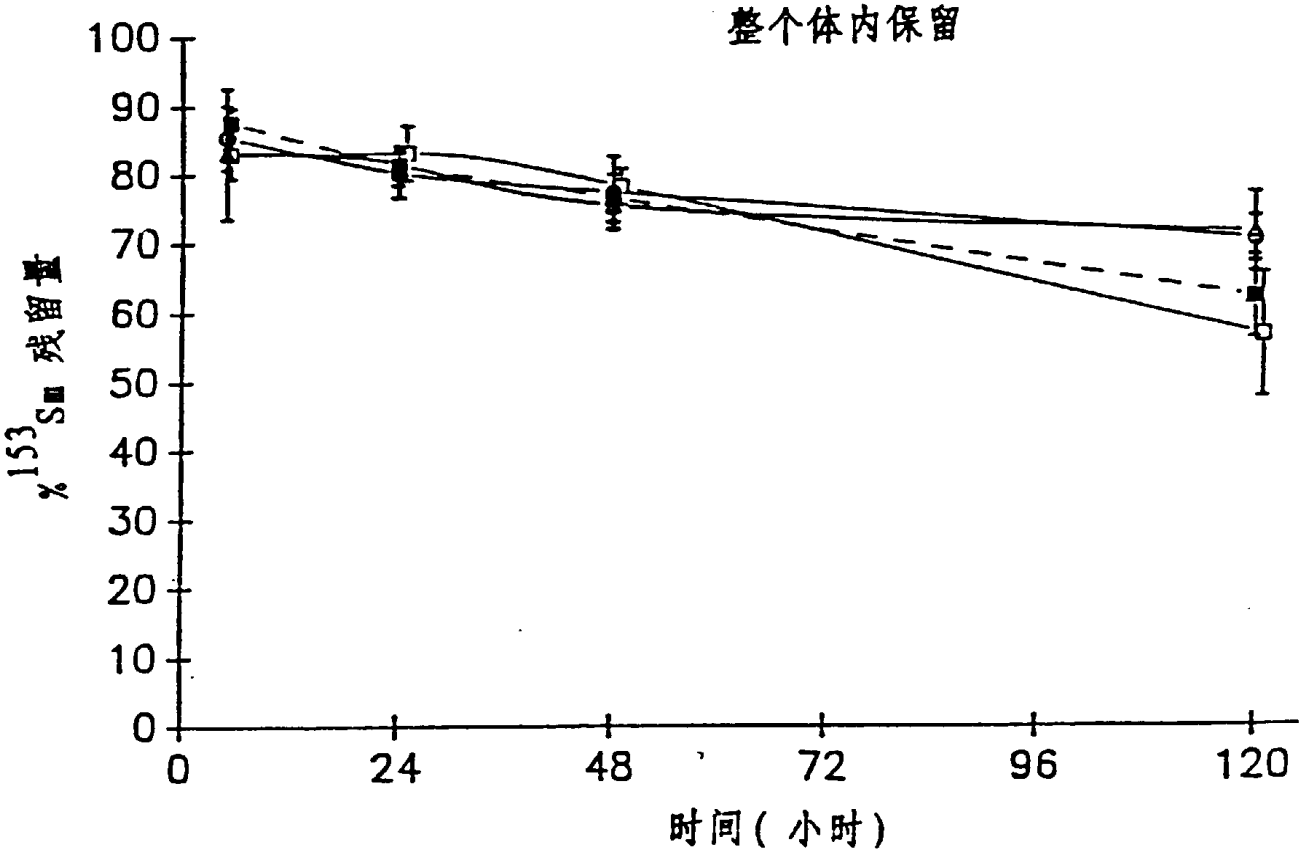


图 7

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T肿瘤的裸露鼠体中的比较

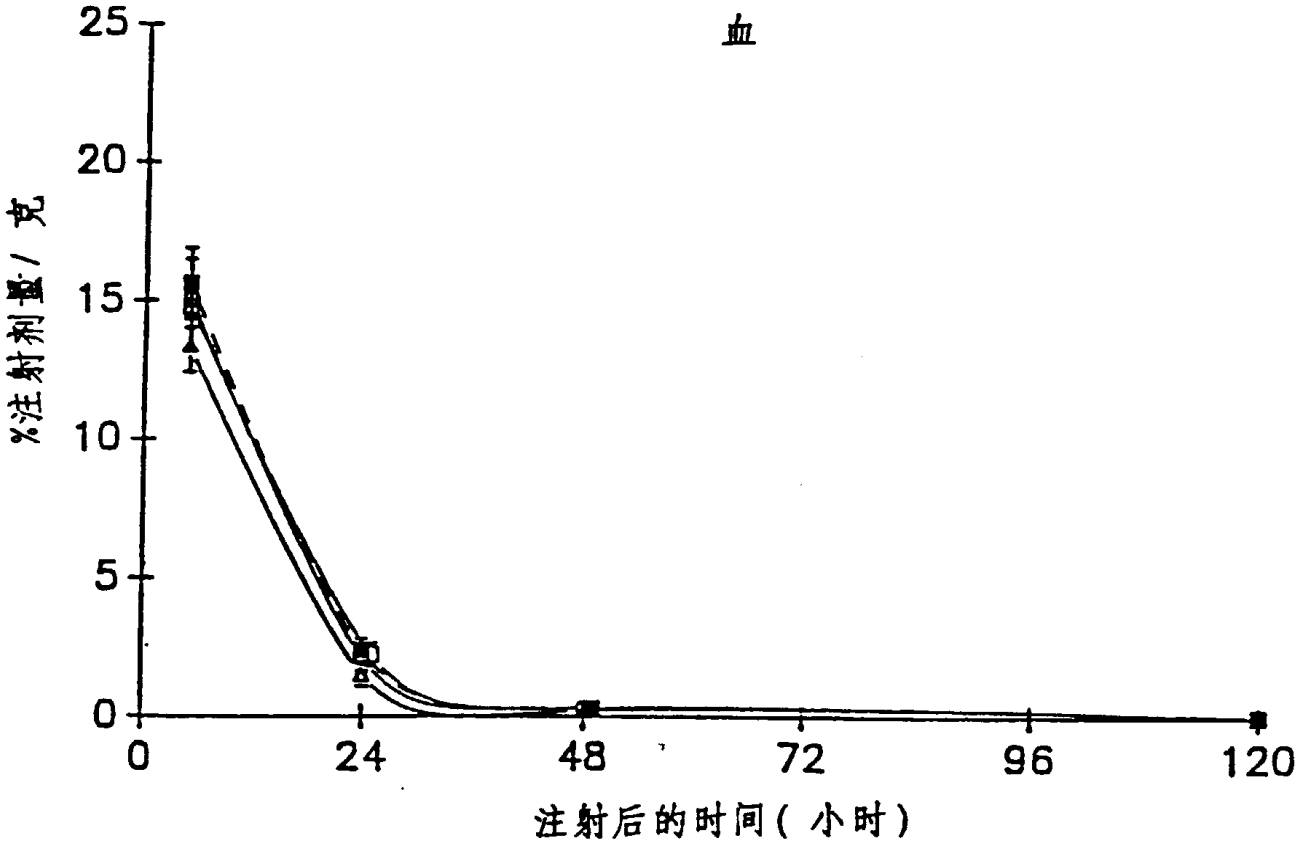


图 8

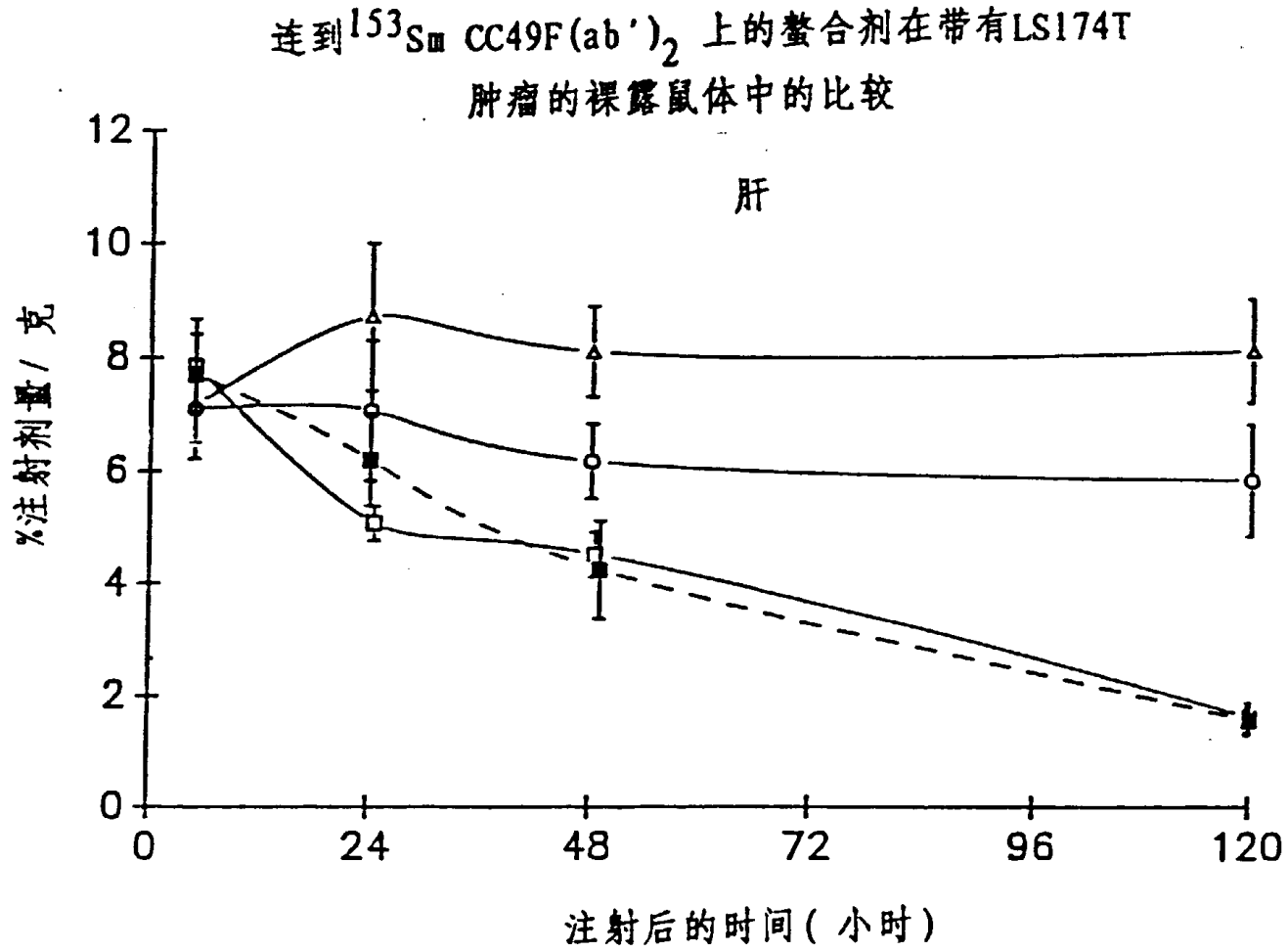

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的比较
肝
%注射剂量/克
12
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 9

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T肿瘤的裸露鼠体中的比较

肾

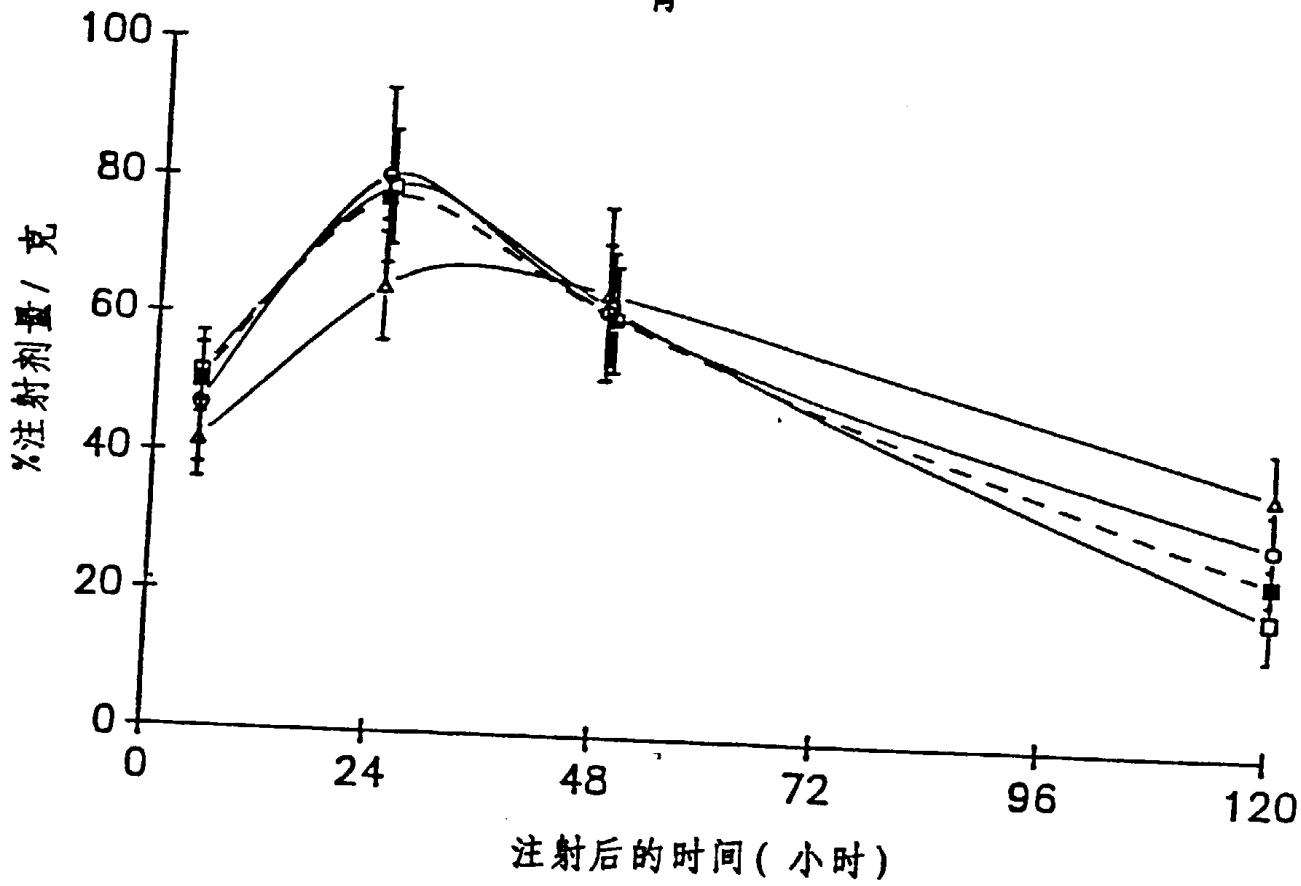


图 10

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T肿瘤的裸露鼠体中的比较

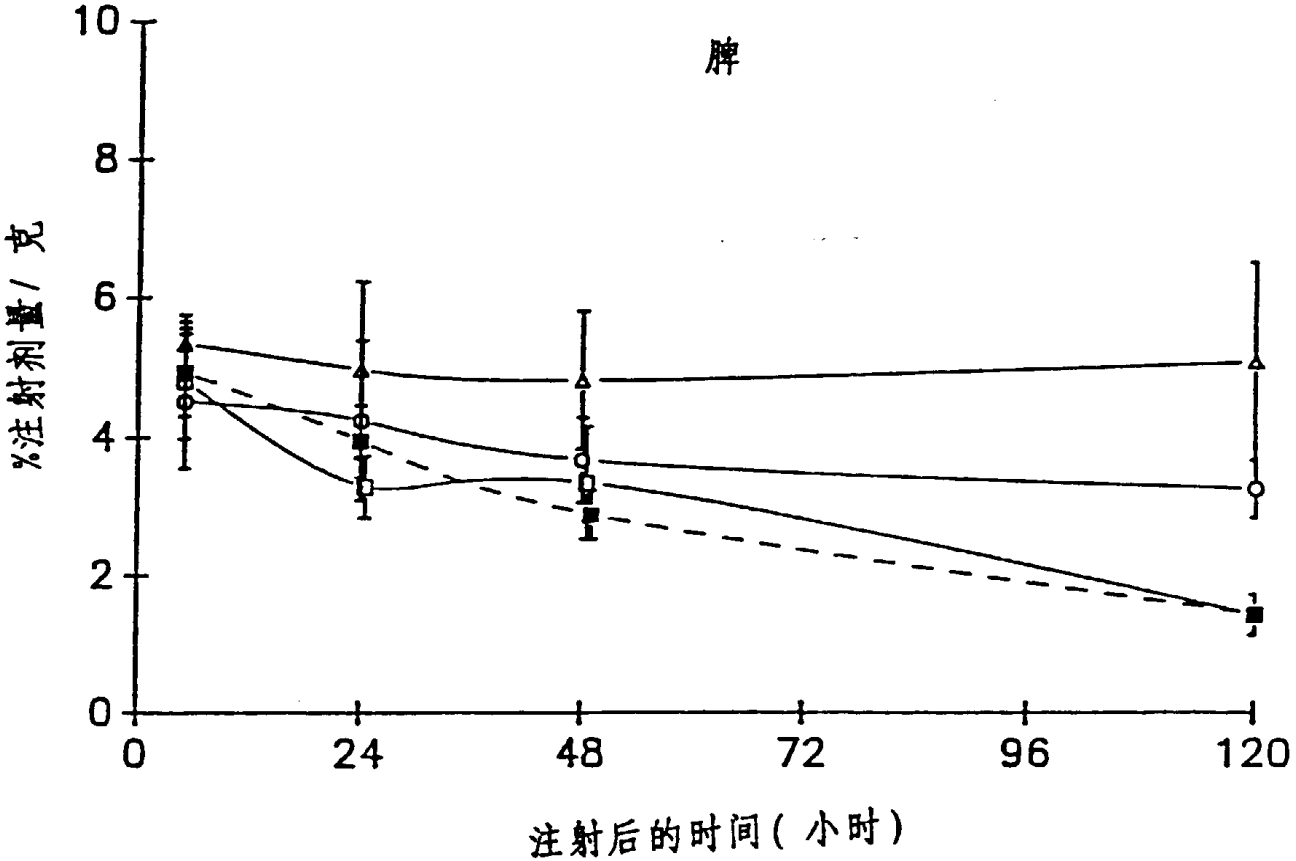


图 11

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T肿瘤的裸露鼠体中的比较

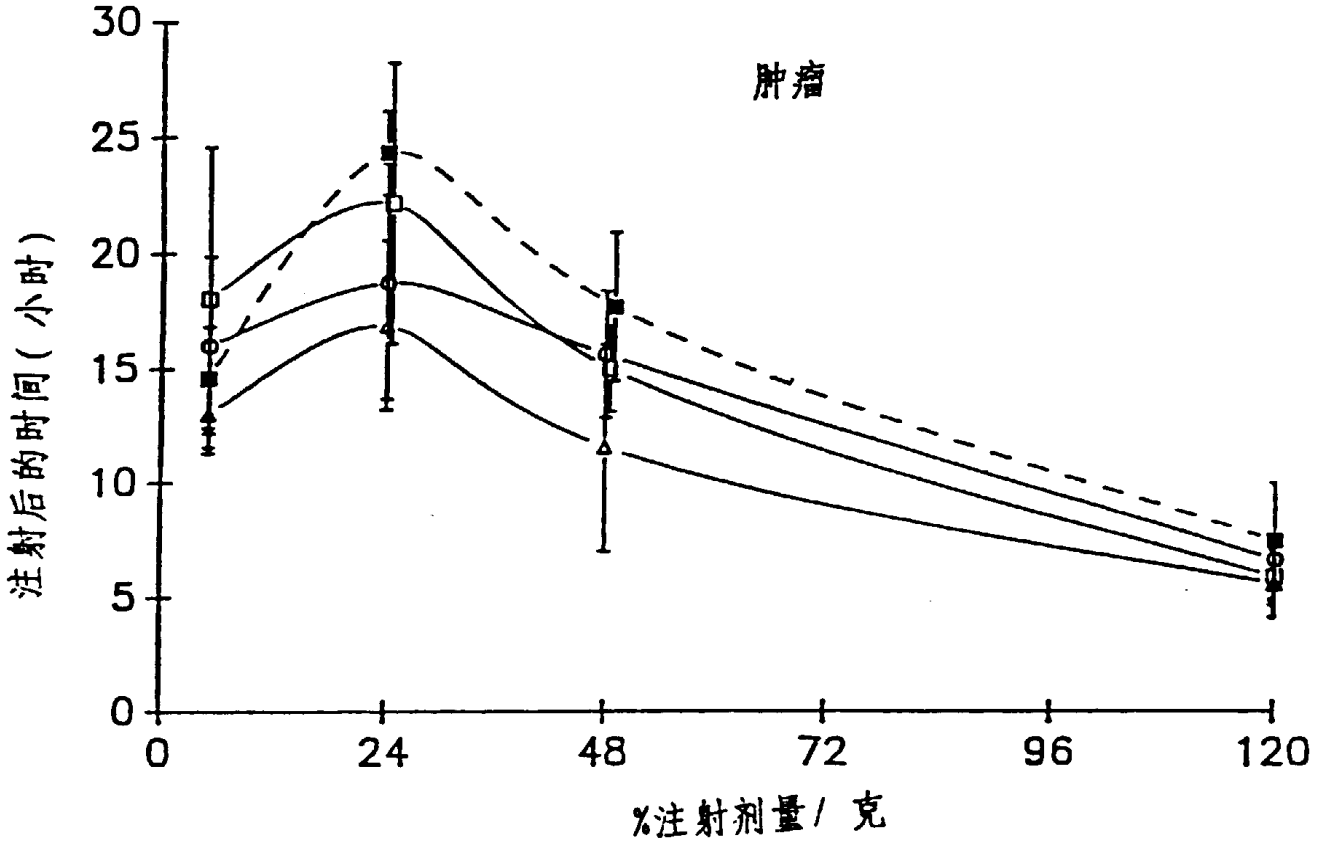


图 12

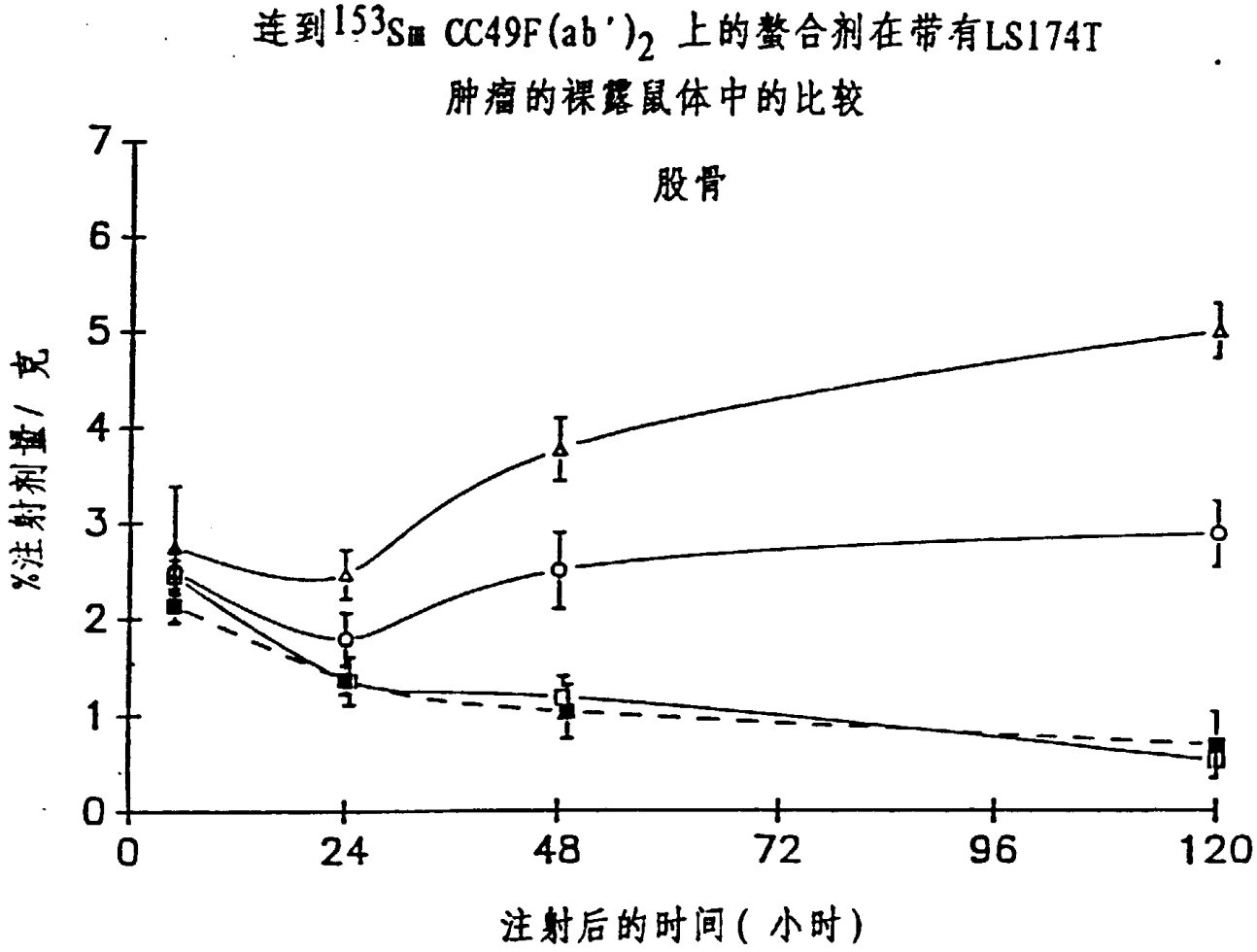

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的比较
股骨
%注射剂量/克
0
1
2
3
4
5
6
7
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 13

连到^{153}Sm CC49F(ab')$_2$ 上的螯合剂在带有LS174T肿瘤的裸露鼠体中的比较

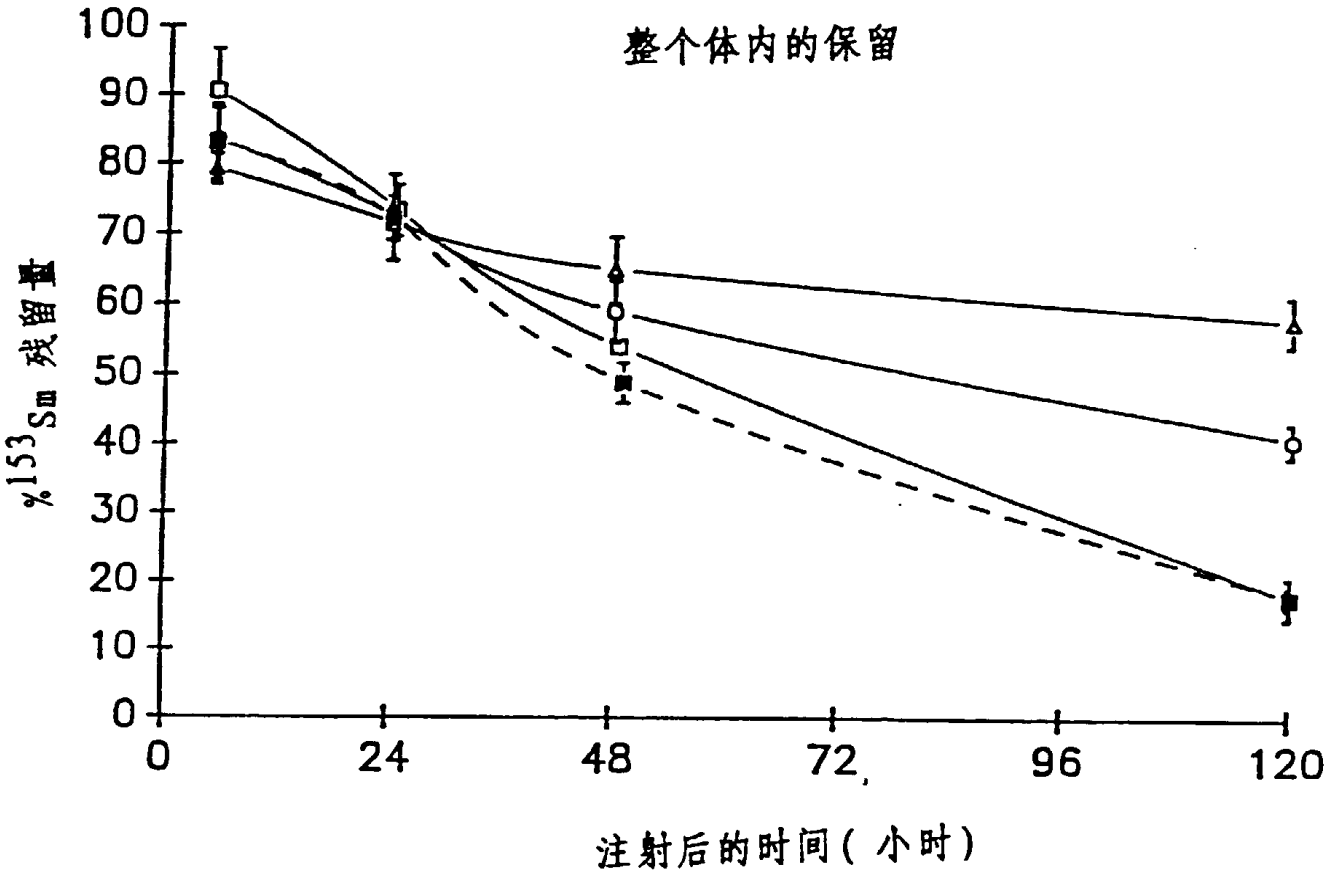


图 14

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布

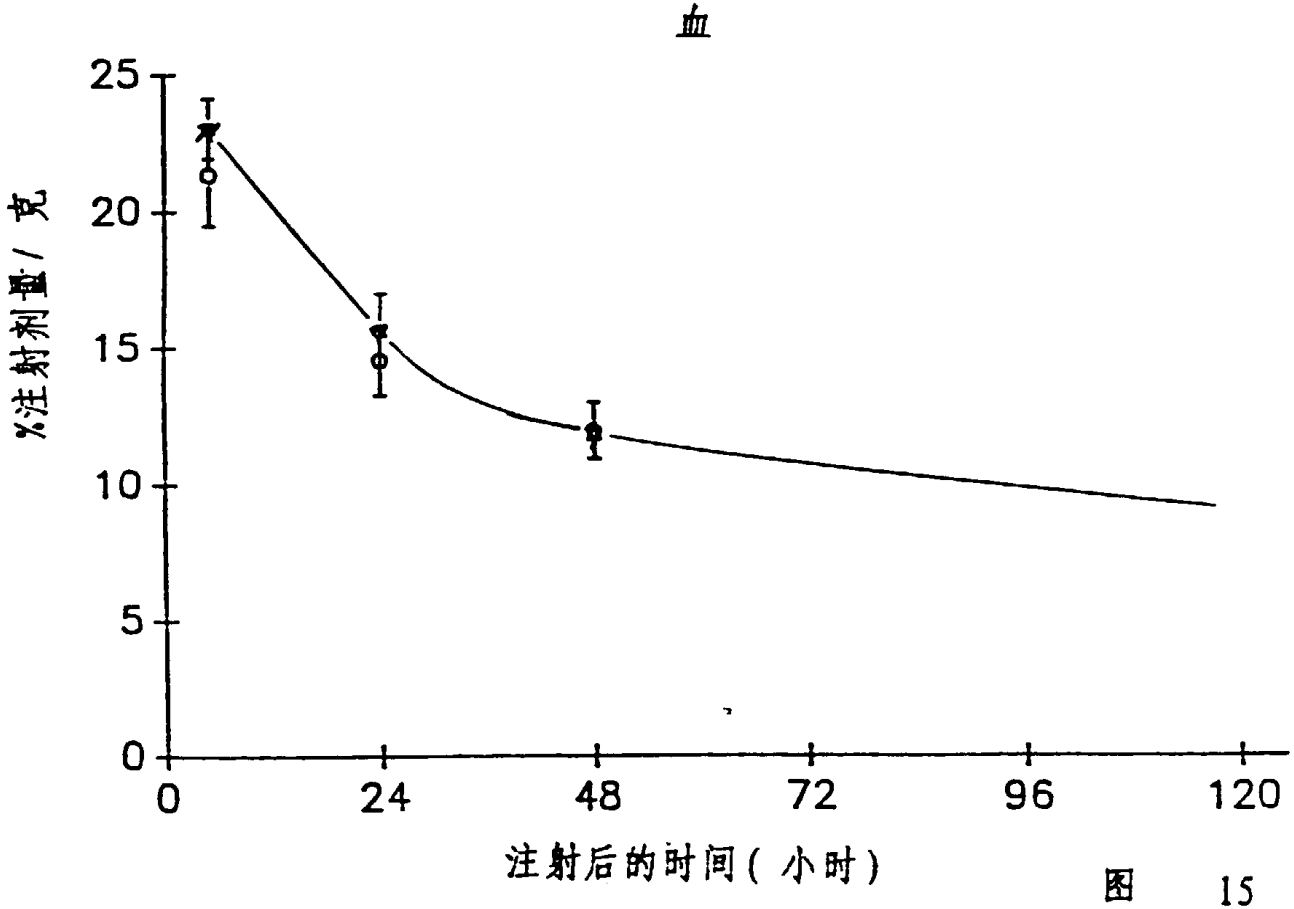


图 15

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布

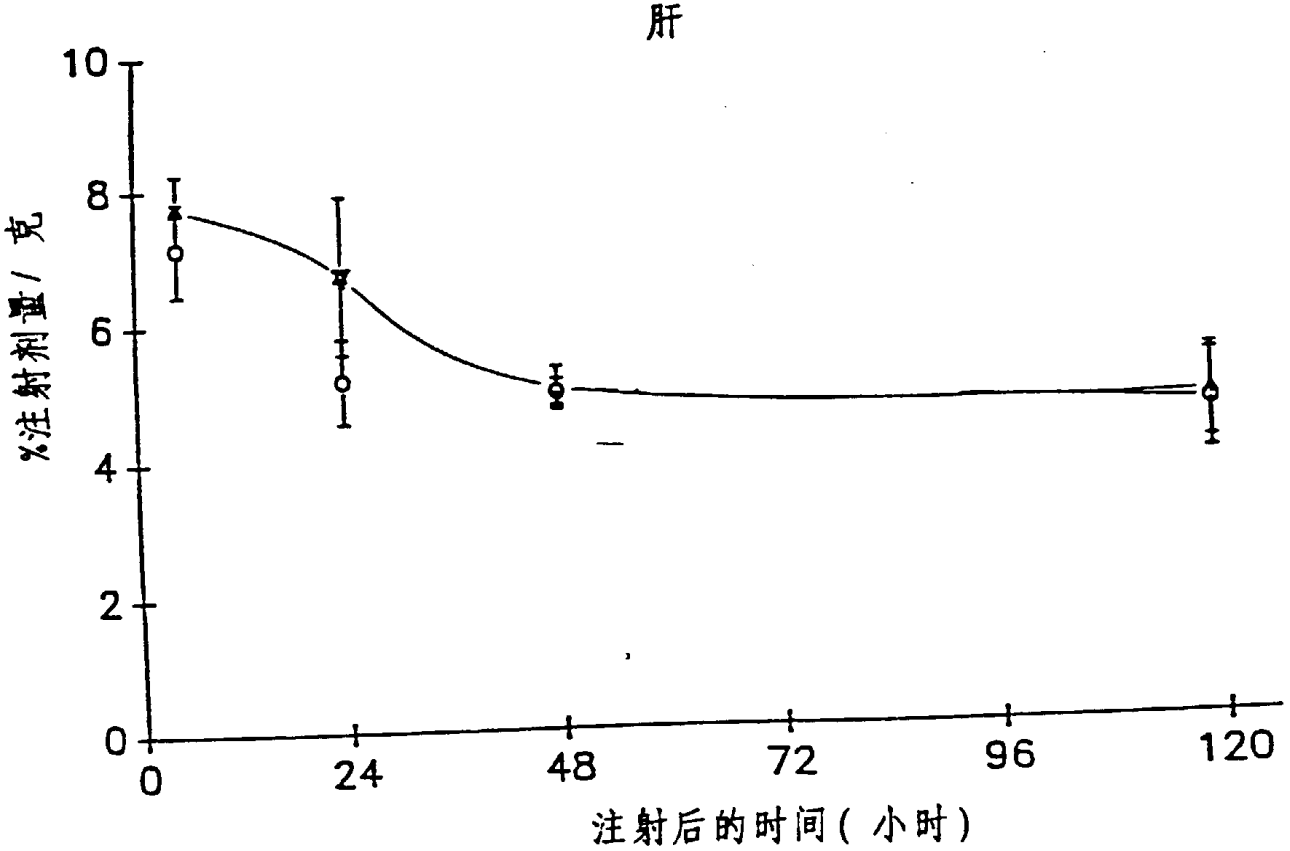


图 16

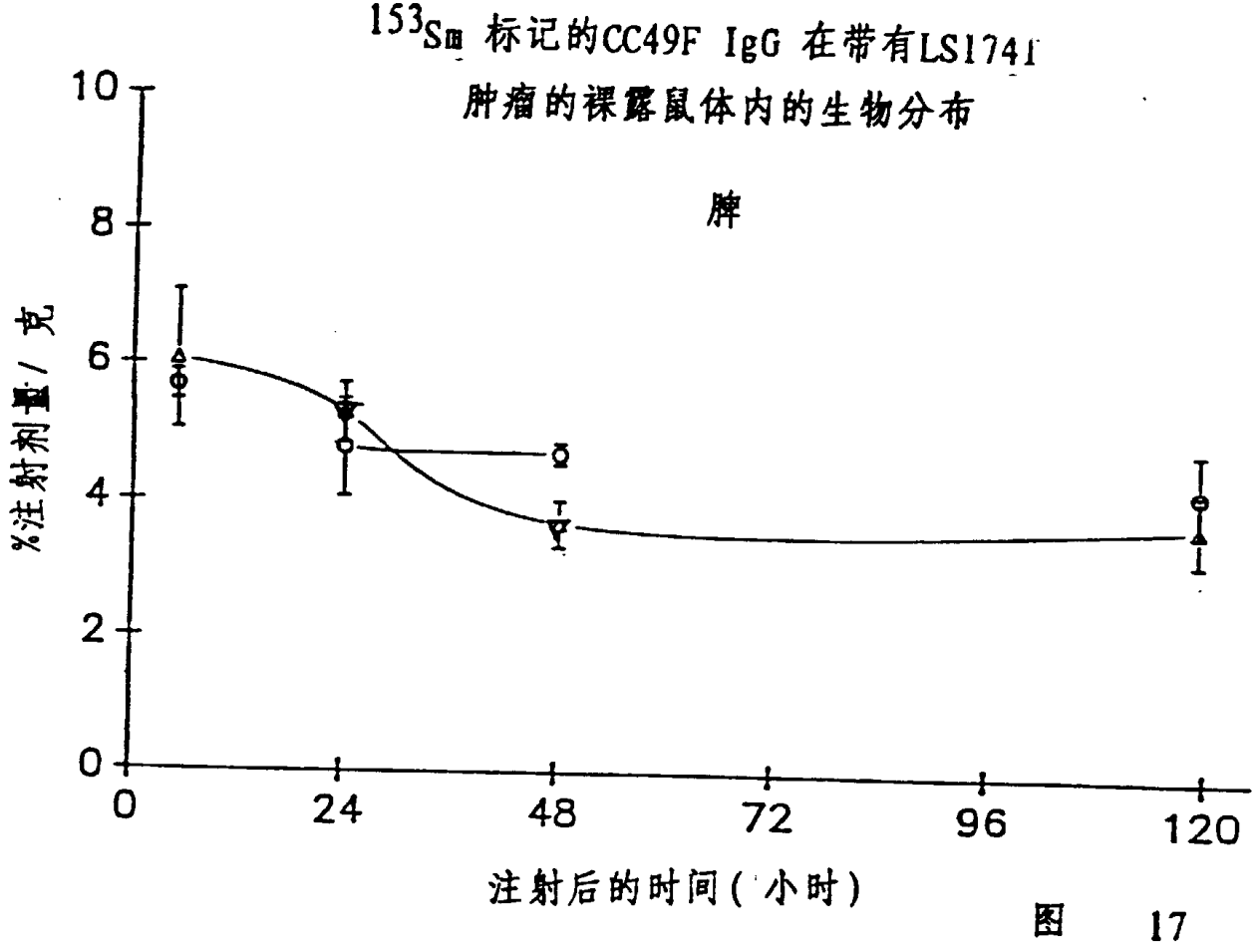

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布
脾
%注射剂量/克
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 17

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布

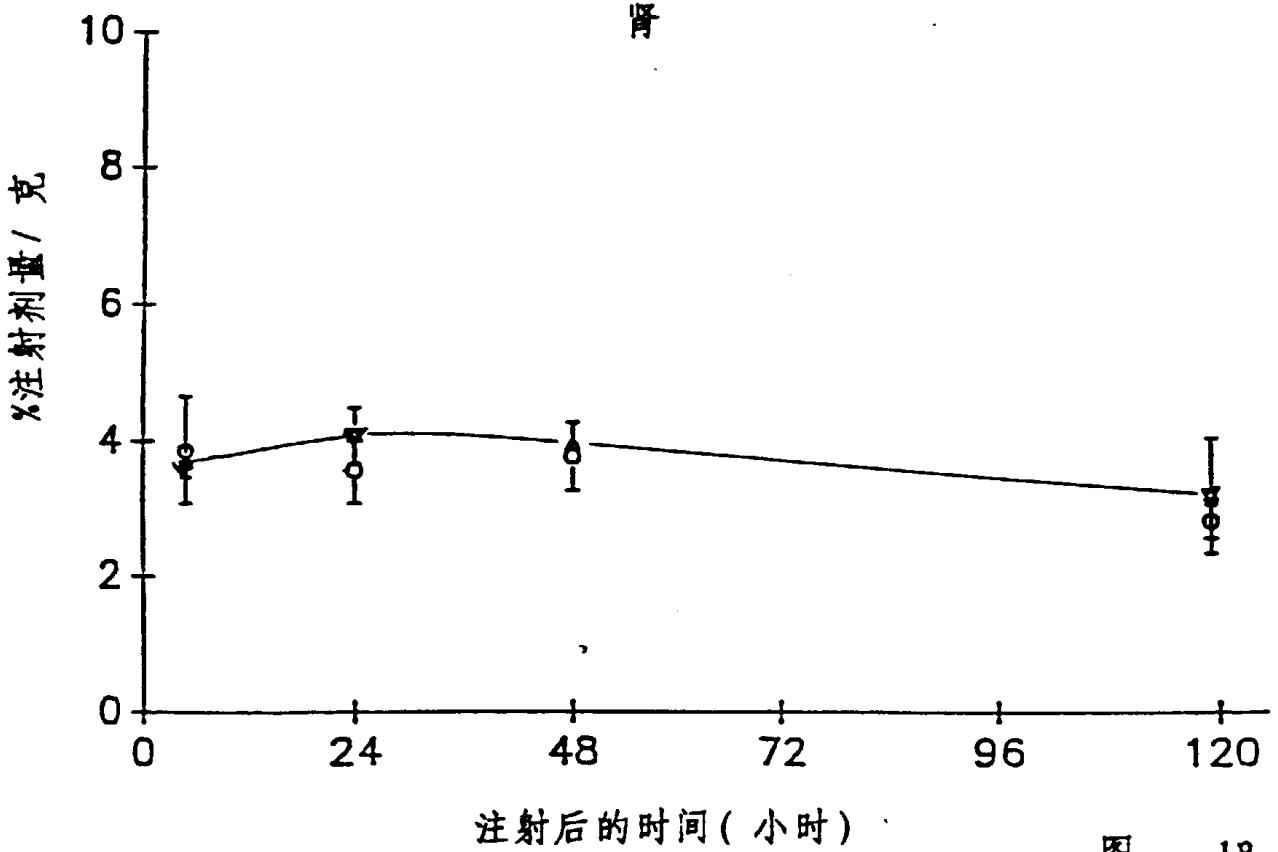


图 18

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布

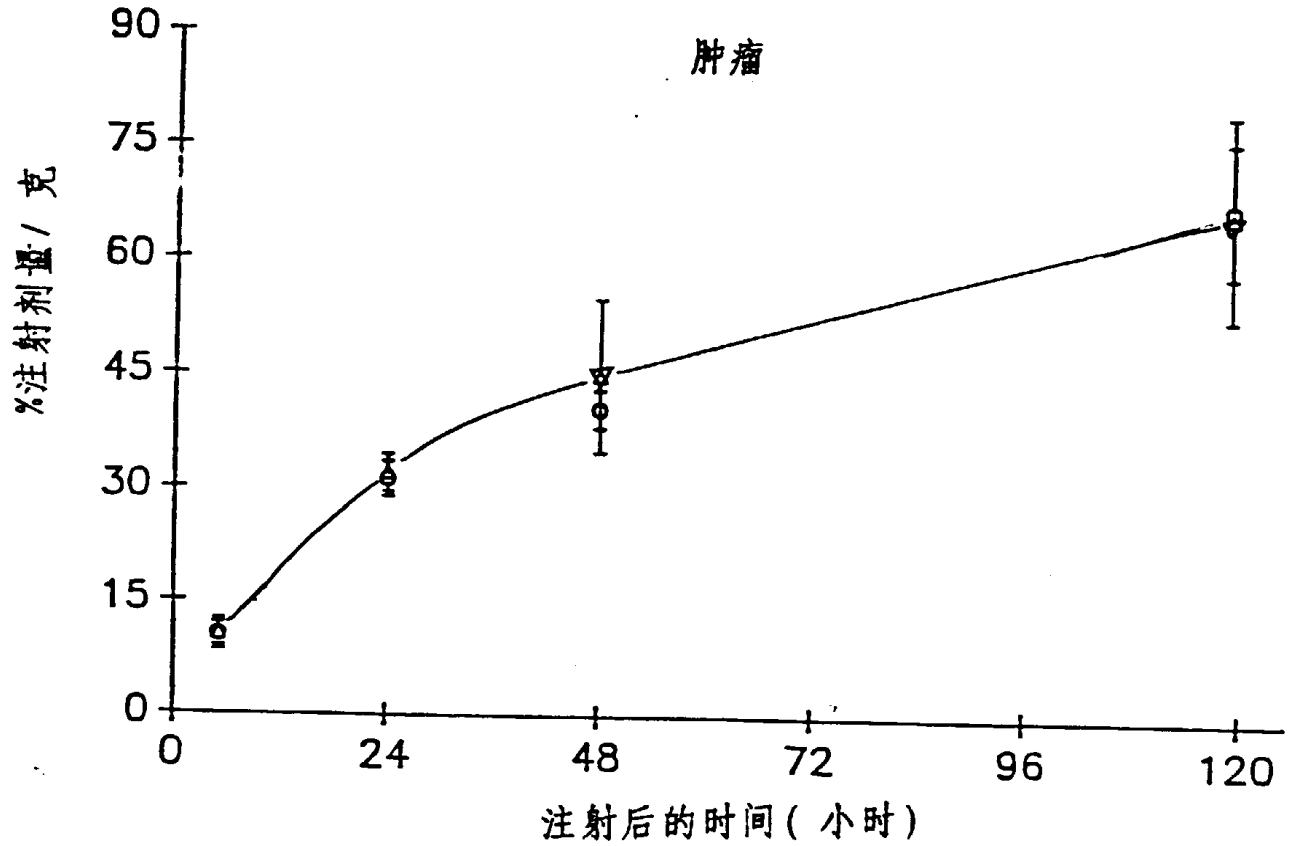


图 19

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布

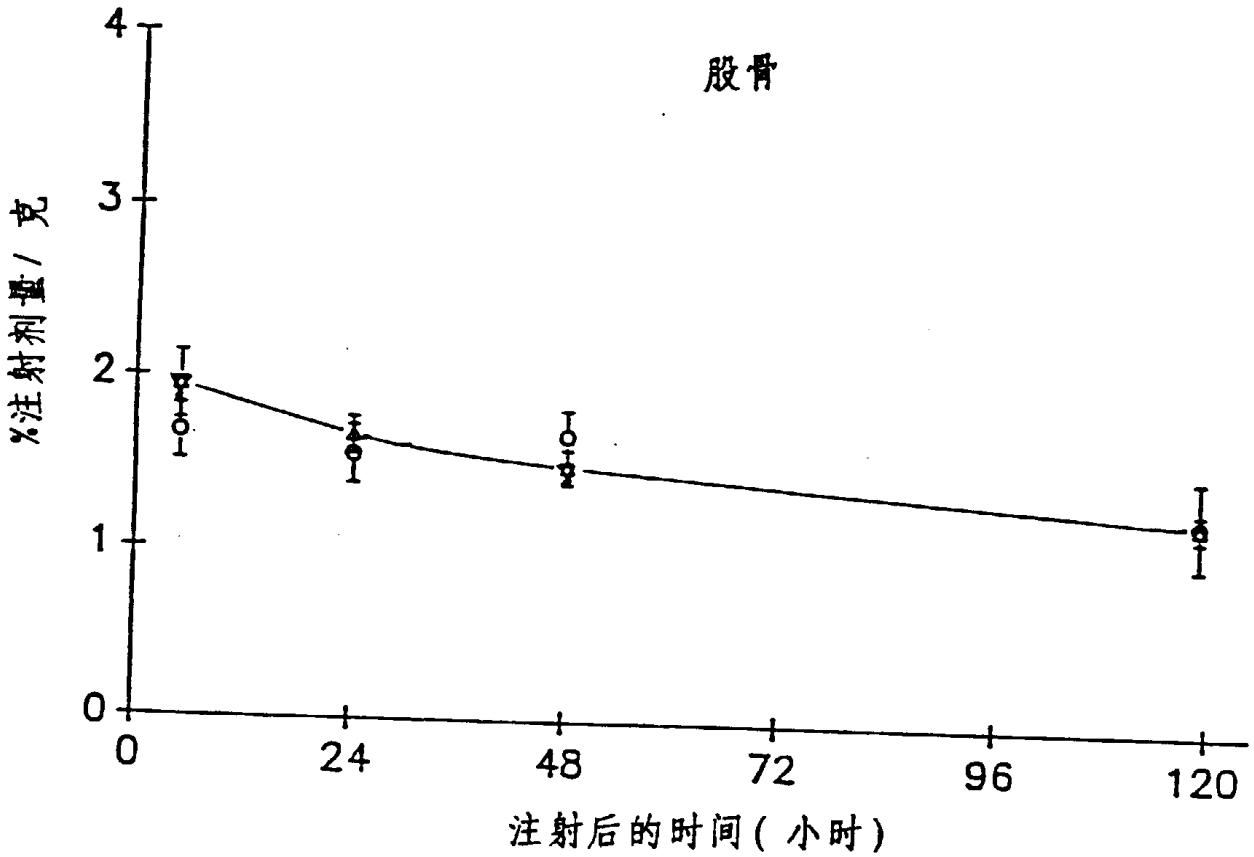


图 20

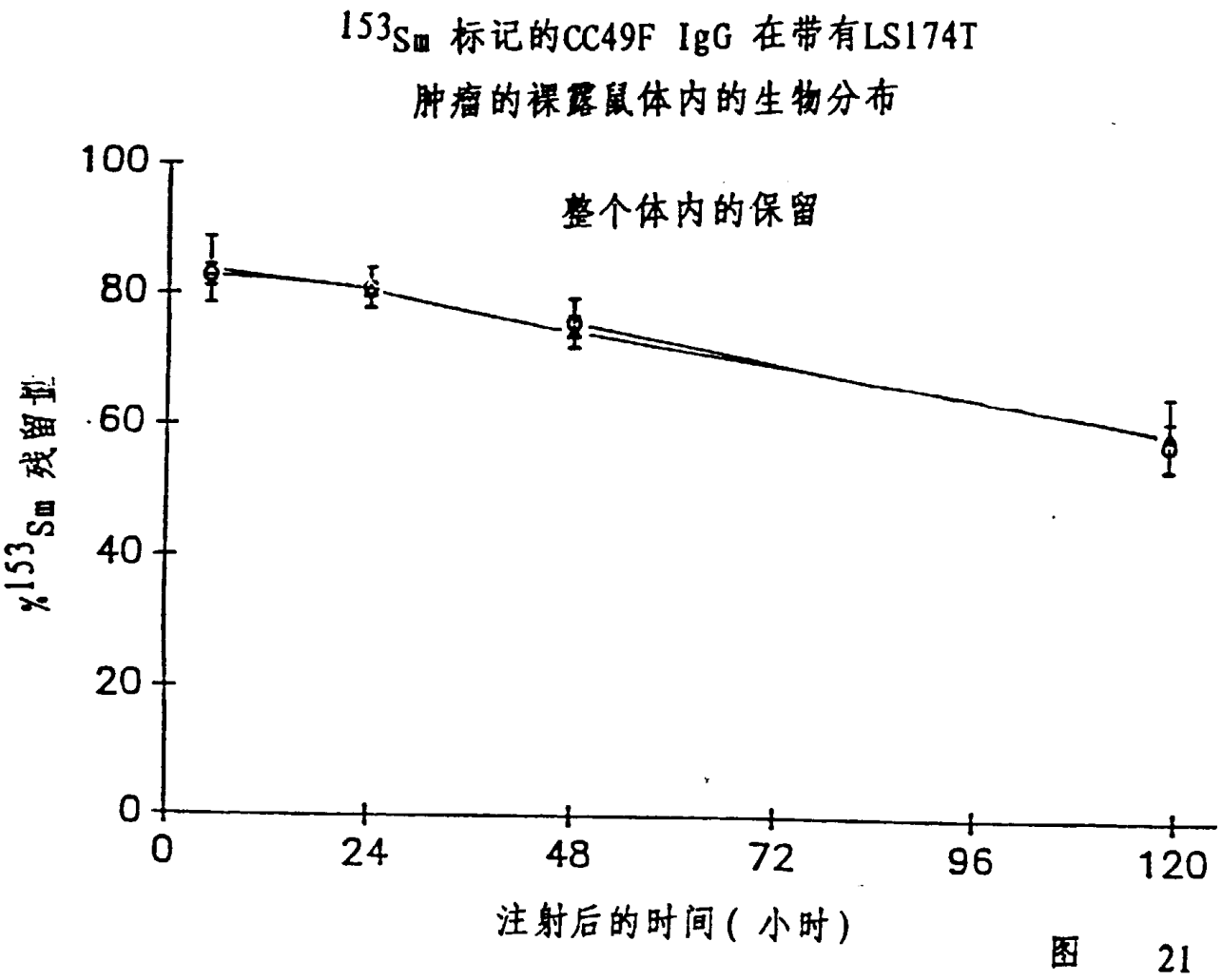

^{153}Sm 标记的CC49F IgG 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布
整个体内的保留
%^{153}Sm 残留量
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间（小时）

图 21

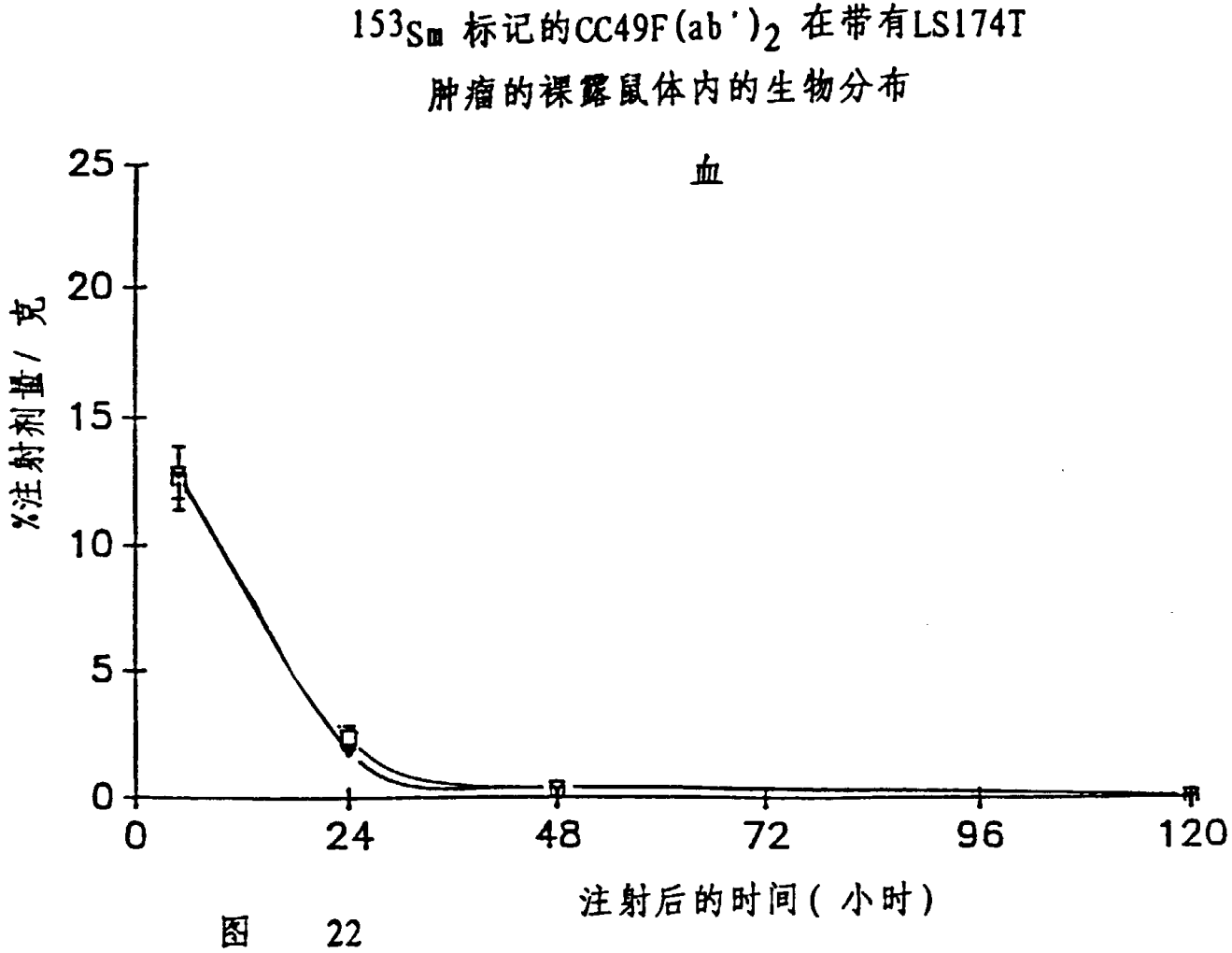

^{153}Sm 标记的CC49F(ab')$_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布
血
%注射剂量/克
25
20
15
10
5
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 22

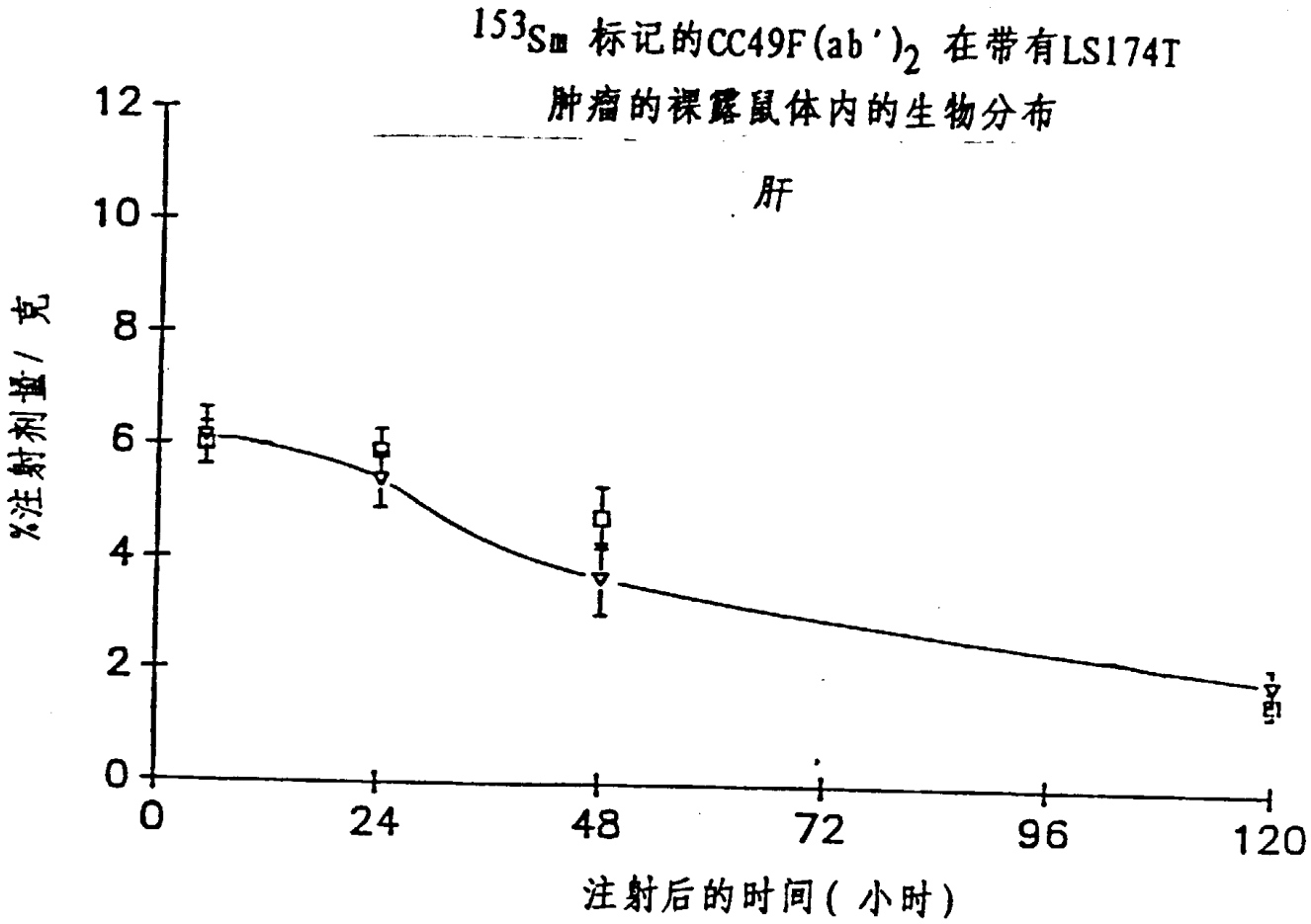

^{153}Sm 标记的CC49F(ab')$_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体内的生物分布
肝
%注射剂量/克
12
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 23

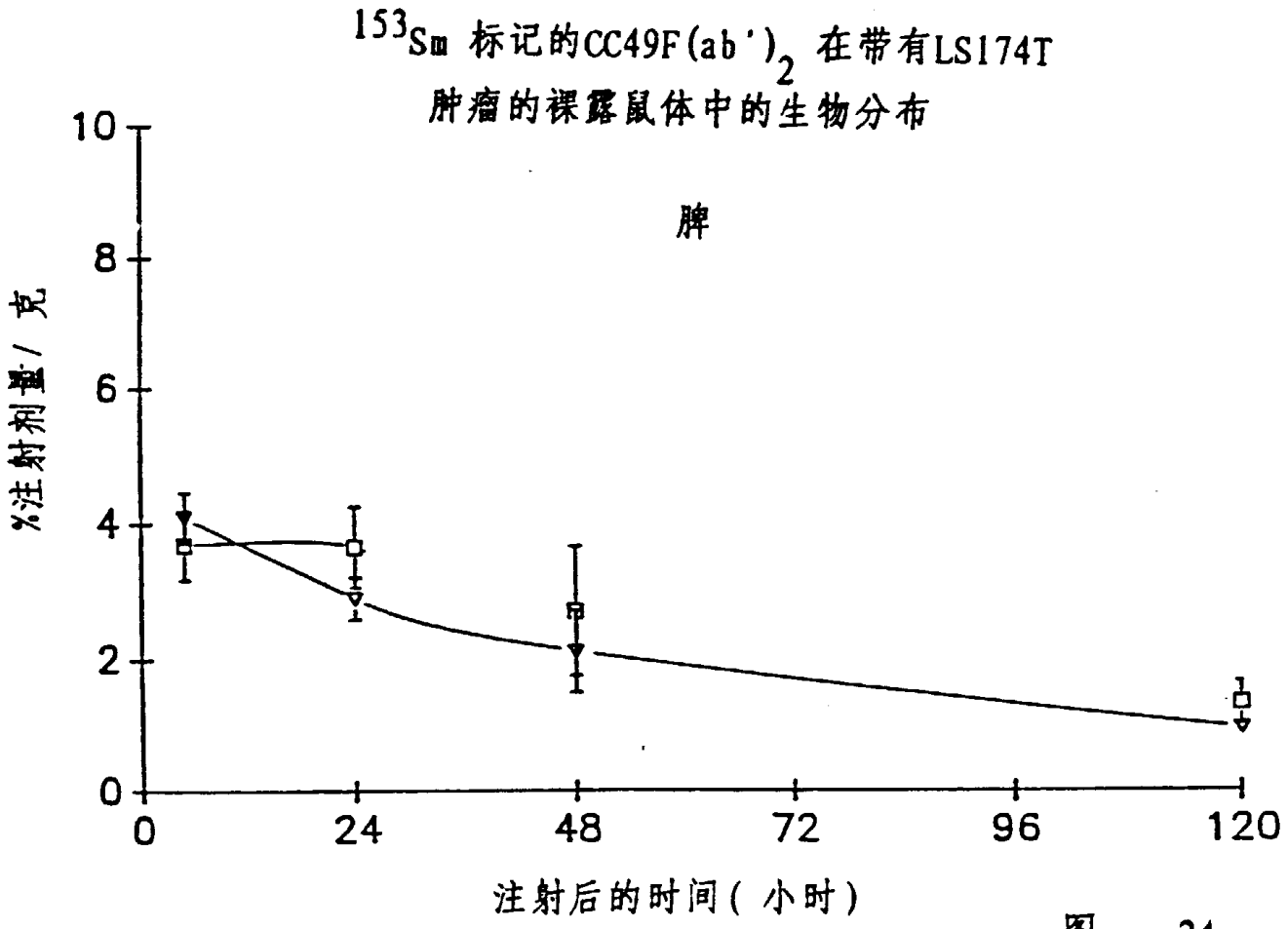

^{153}Sm 标记的CC49F(ab')$_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
脾
%注射剂量/克
10
8
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 24

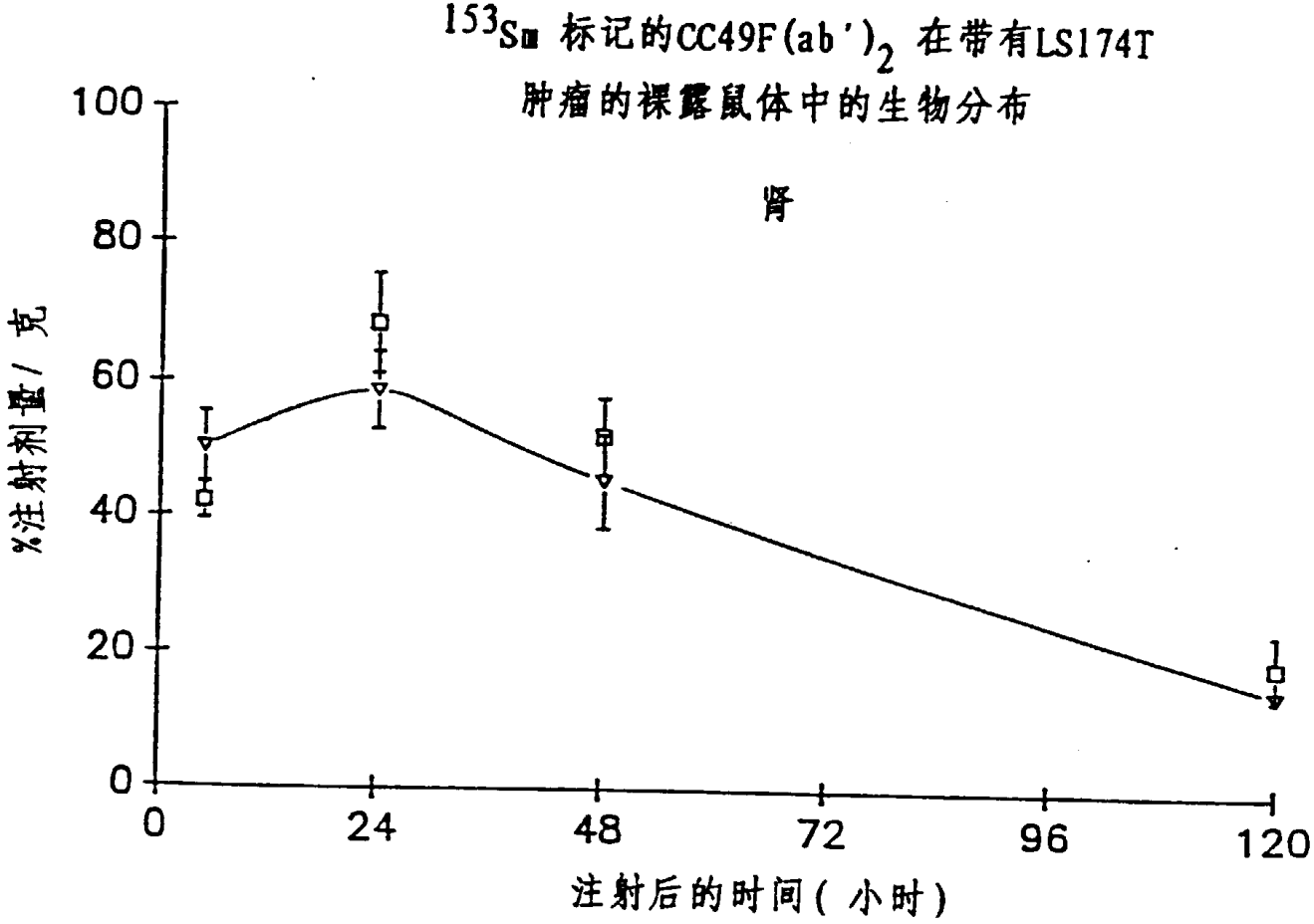

^{153}Sm 标记的CC49F(ab')$_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
肾
%注射剂量/克
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 25

^{153}Sm 标记的$CC49F(ab')_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布

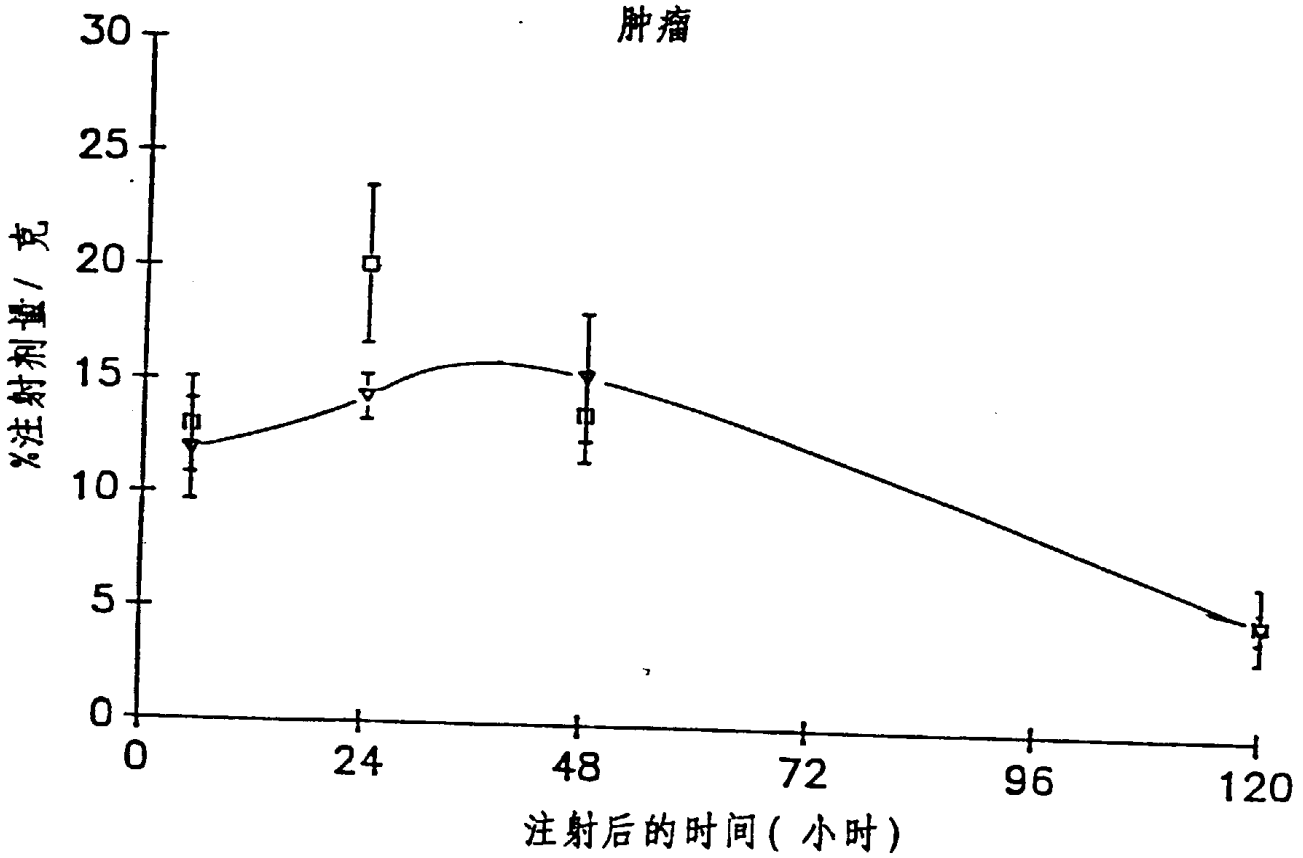


图 26

^{153}Sm 标记的$CC49F(ab')_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布

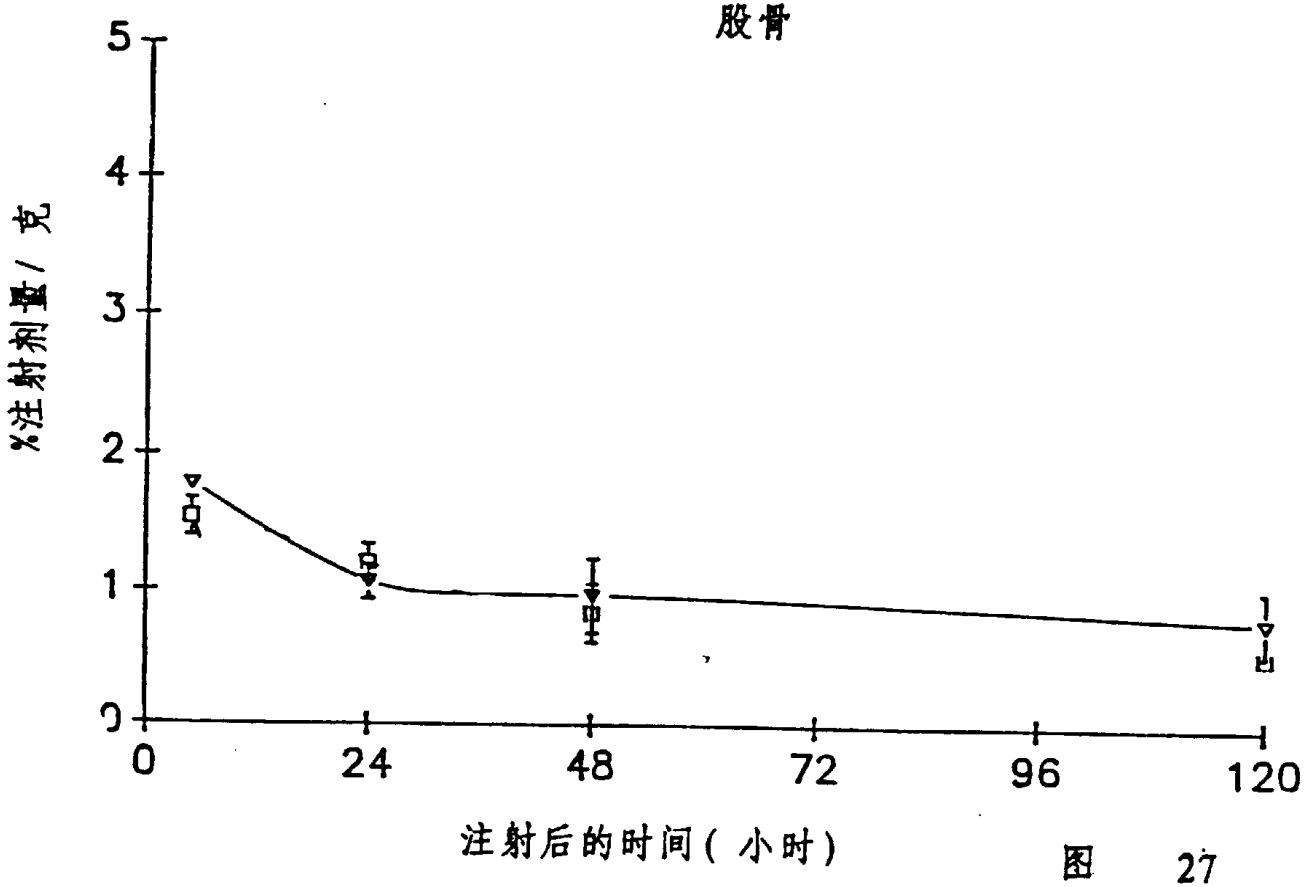


图 27

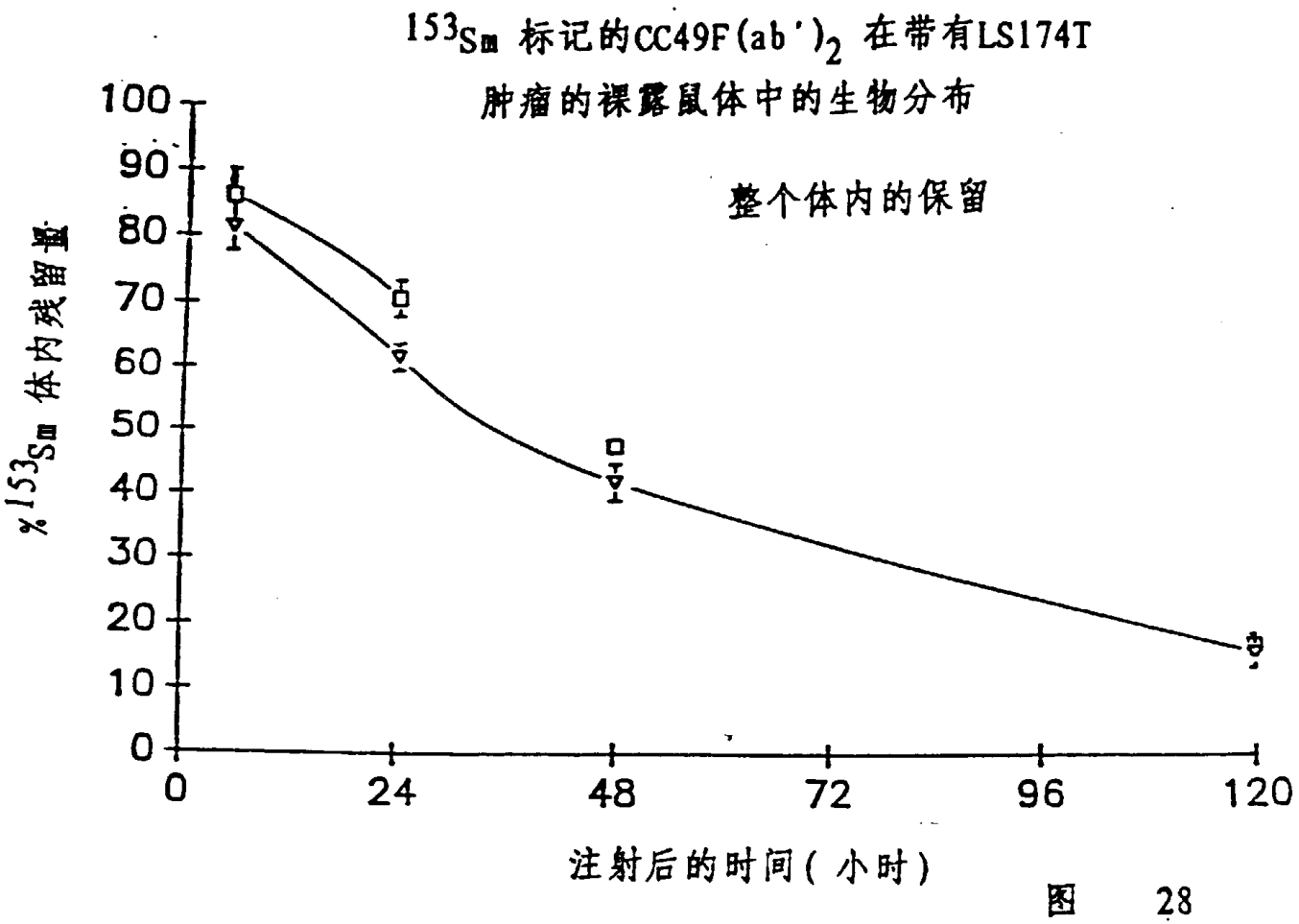

^{153}Sm 标记的CC49F(ab')$_2$ 在带有LS174T
肿瘤的裸露鼠体中的生物分布
整个体内的保留
%^{153}Sm 体内残留量
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
24
48
72
96
120
注射后的时间(小时)

图 28

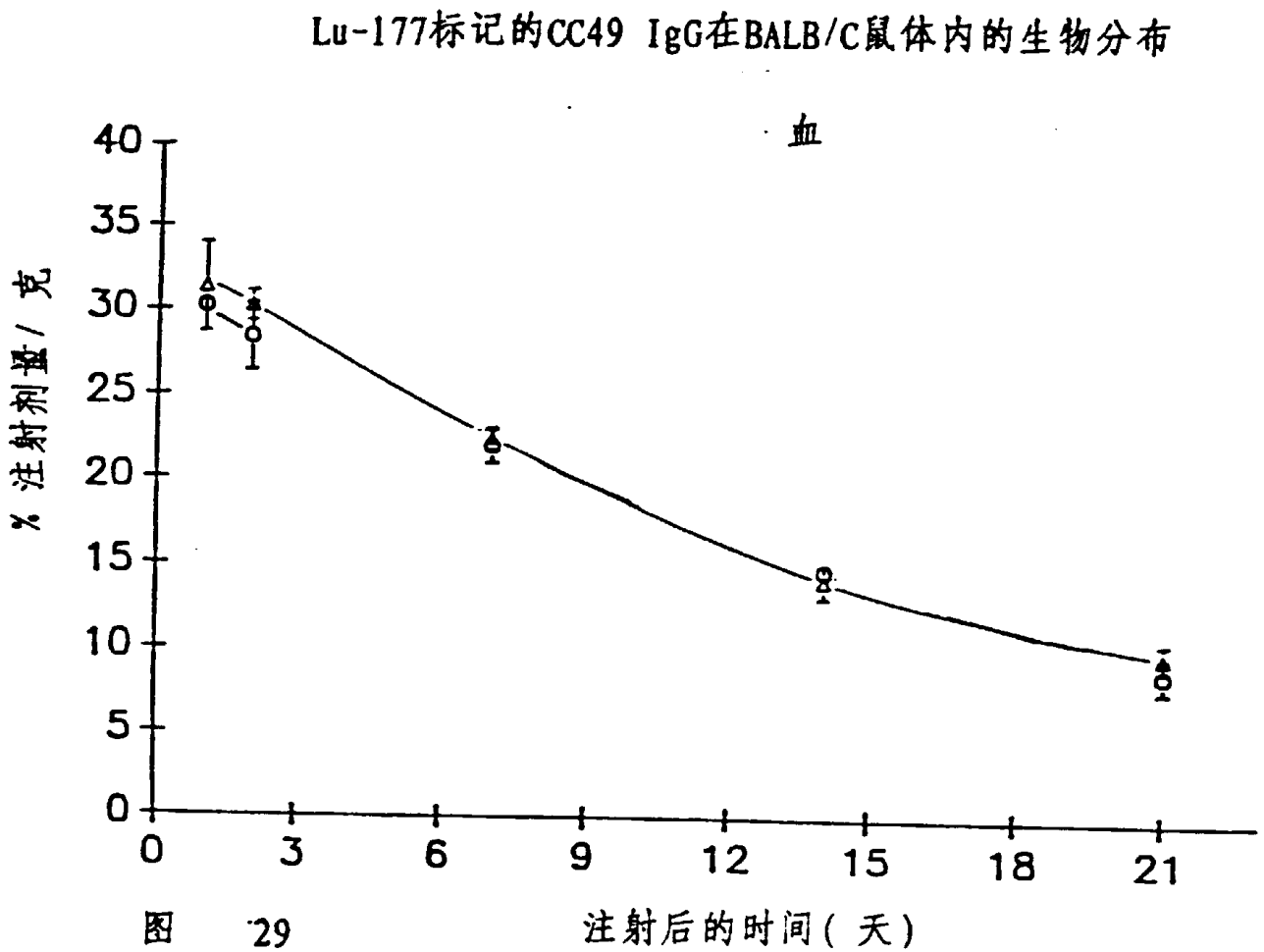

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布
血
% 注射剂量 / 克
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
3
6
9
12
15
18
21
注射后的时间(天)

图 29

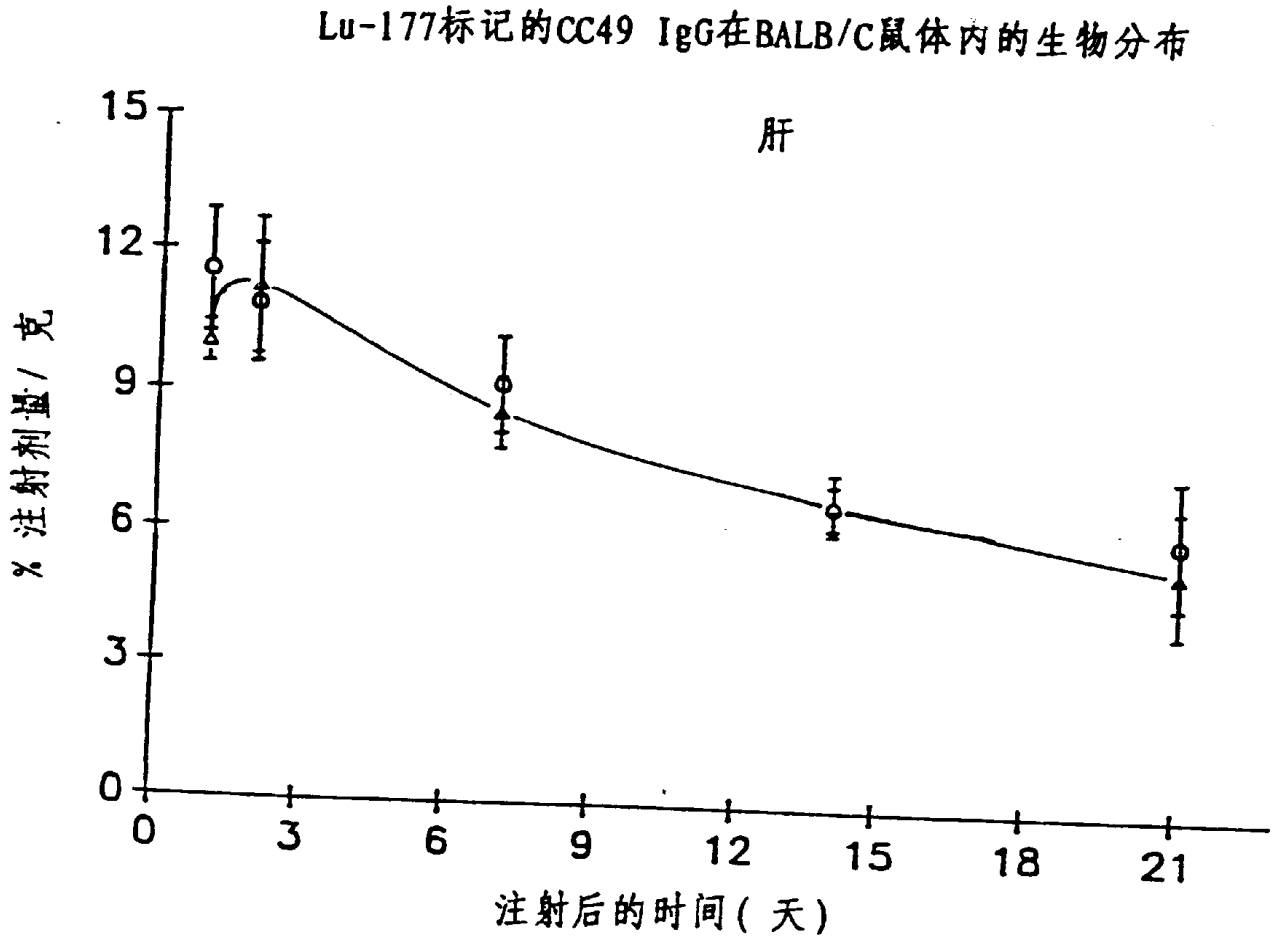

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布
肝
% 注射剂量 / 克
15
12
9
6
3
0
0
3
6
9
12
15
18
21
注射后的时间(天)

图 30

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布

脾

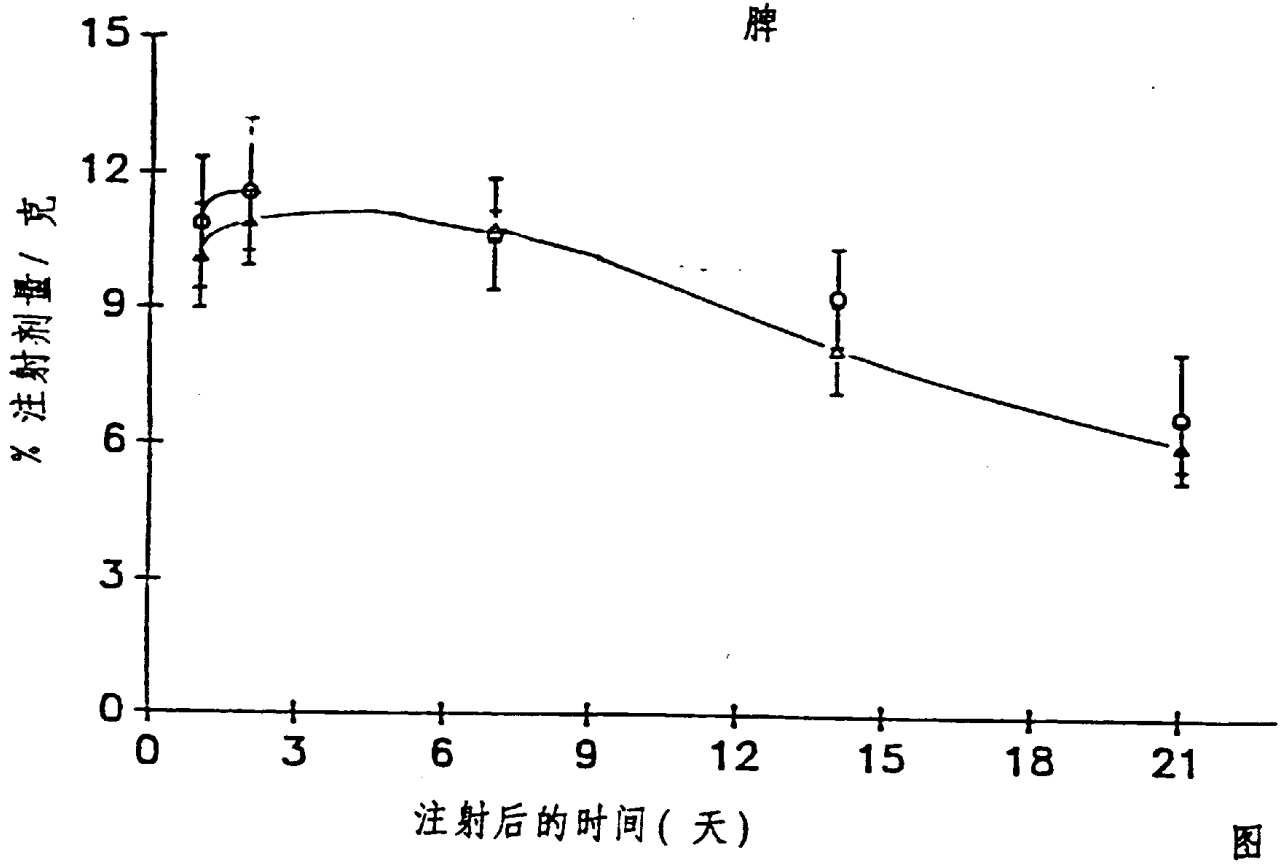


图 31

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布

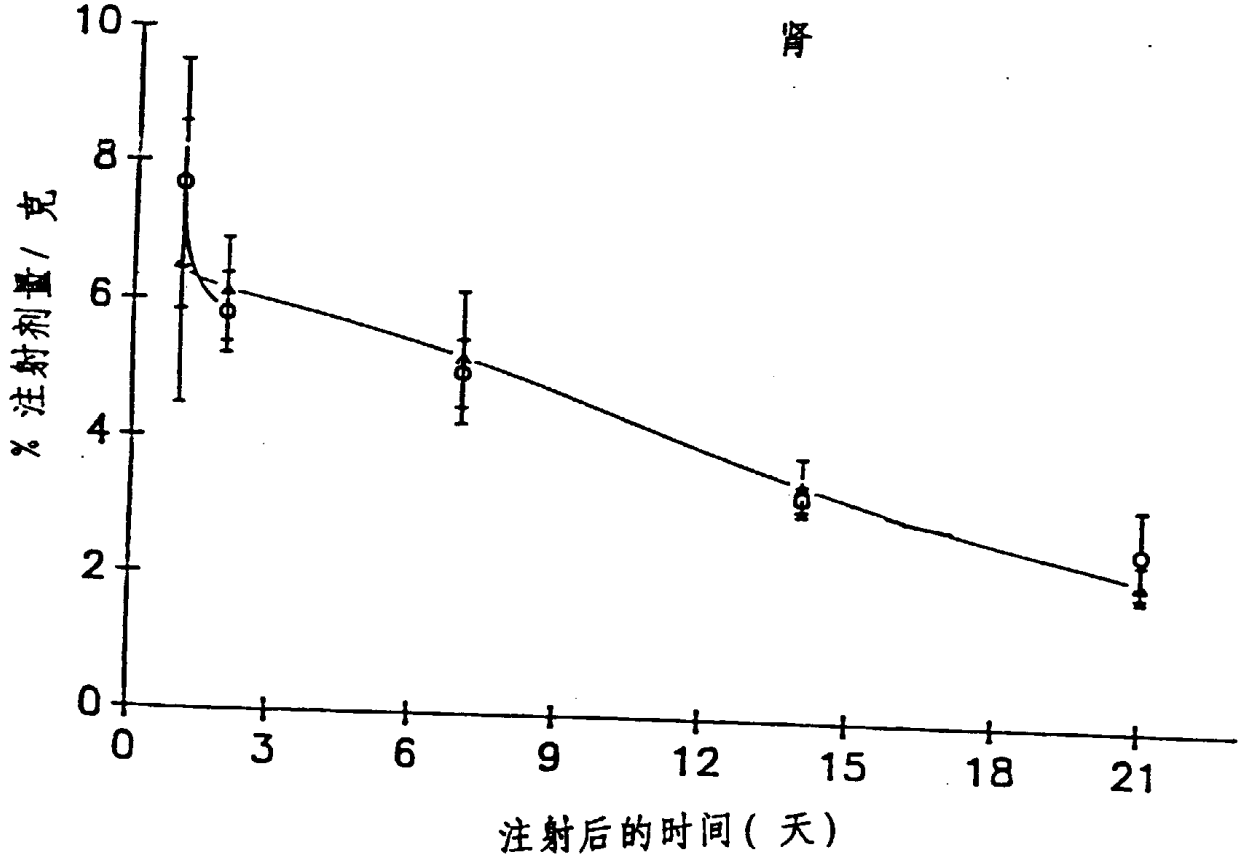


图 32

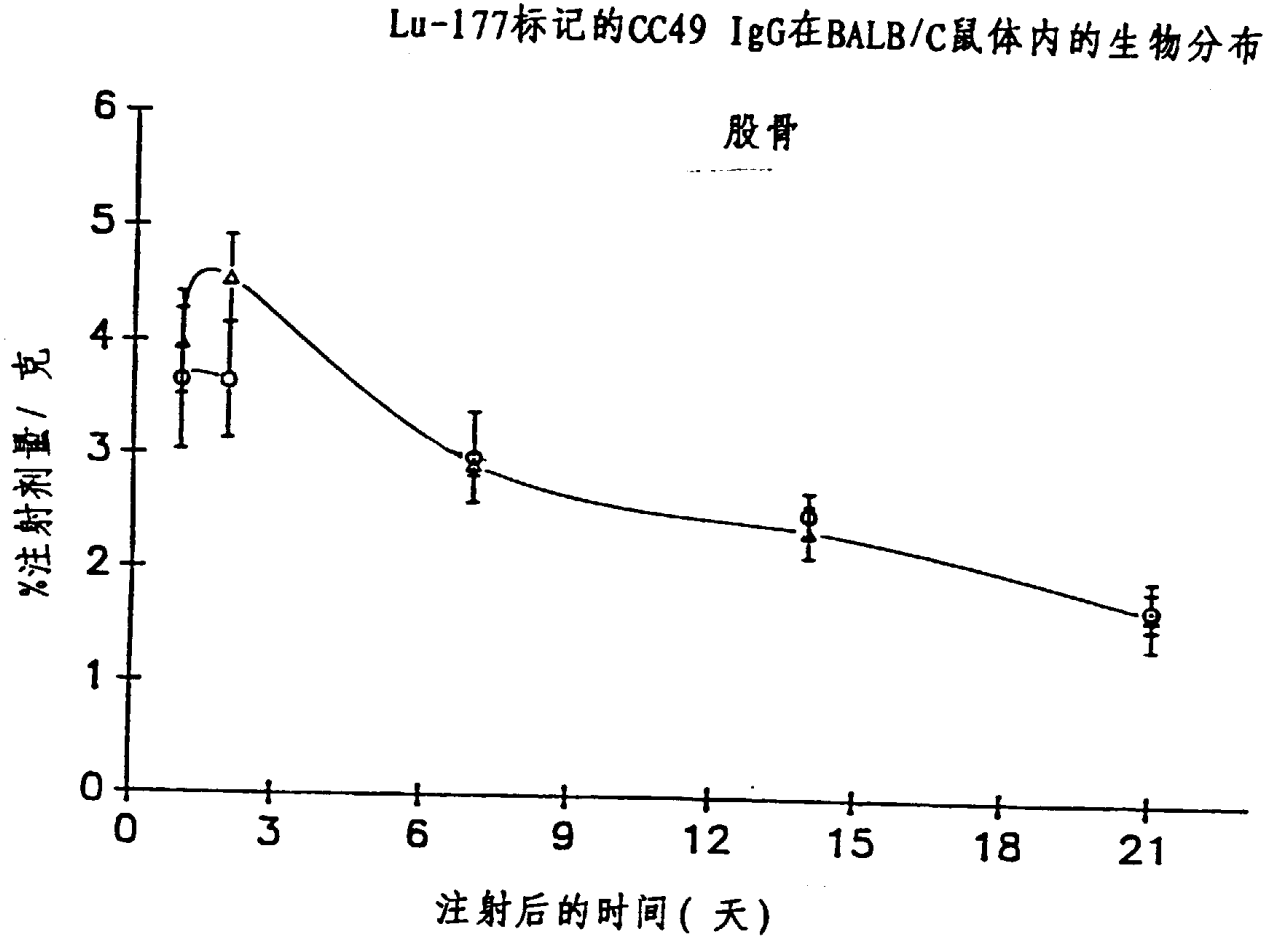

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布
股骨
%注射剂量/克
0
1
2
3
4
5
6
0
3
6
9
12
15
18
21
注射后的时间(天)

图 3 3

Lu-177标记的CC49 IgG在BALB/C鼠体内的生物分布

整个体内的保留

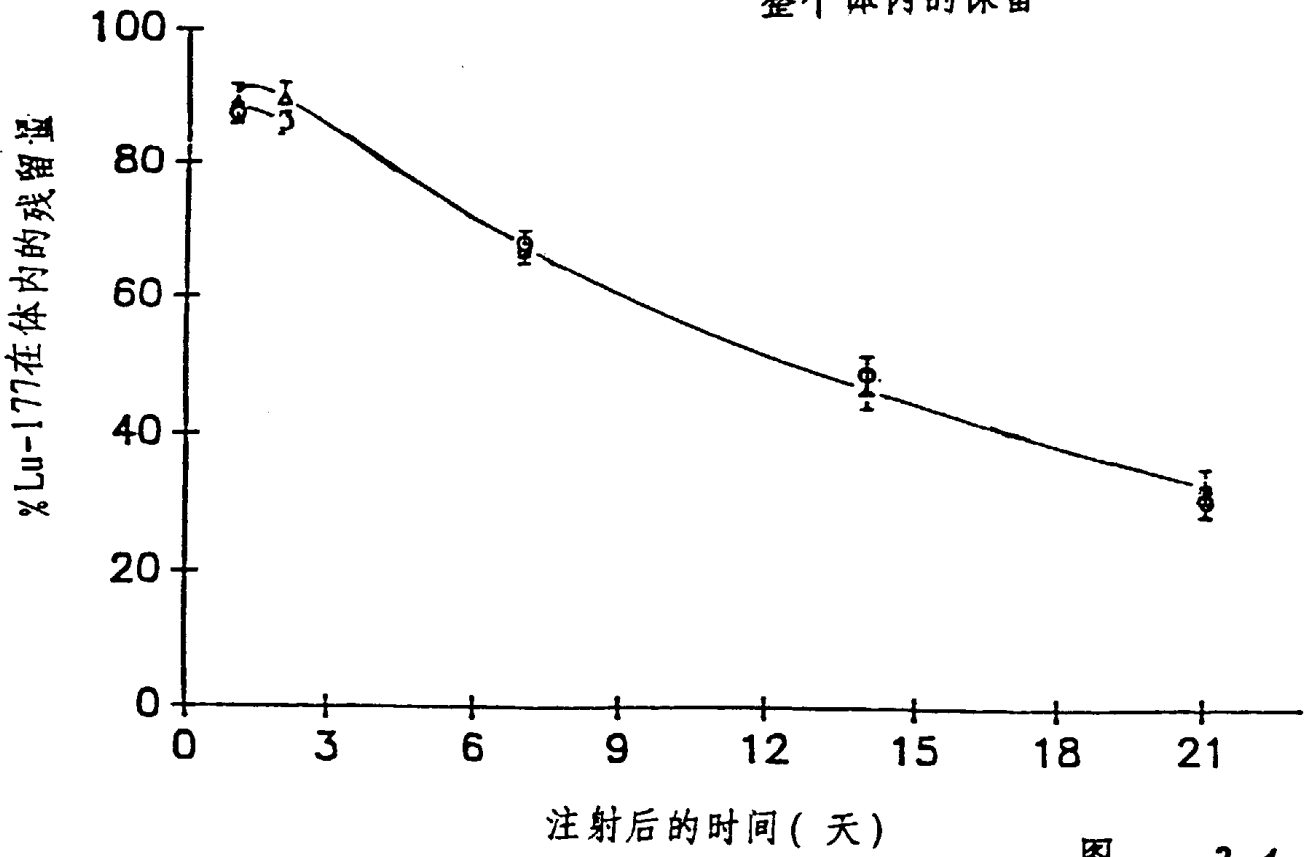


图 34