



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104292155 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410441411. 4

(22) 申请日 2010. 03. 22

(30) 优先权数据

0905438. 8 2009. 03. 30 GB

61/164, 494 2009. 03. 30 US

(62) 分案原申请数据

201080013540. 3 2010. 03. 22

(71) 申请人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 D. E. 奥尔伯格 J. M. 阿鲁克维

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 徐晶 彭昶

(51) Int. Cl.

*C07D 213/80* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

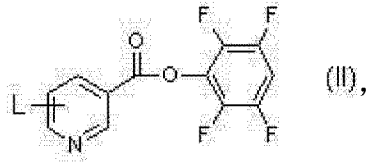
(54) 发明名称

放射性标记的试剂和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于生物分子、特别是肽的<sup>18</sup>F-氟化的试剂和方法。得到的<sup>18</sup>F-标记化合物可用作放射性药物,具体地说用于正电子发射断层摄影(PET)中。

1. 式 (II) 化合物或其盐：



其中 L 为选自氯、溴、碘、硝基和三 (C<sub>1-6</sub> 烷基) 铵的离去基团。

2. 权利要求 1 的式 (II) 化合物或其盐, 其中所述三 (C<sub>1-6</sub> 烷基) 铵为三甲基铵。
3. 权利要求 1 的式 (II) 化合物或其盐, 其中 L 为三 (C<sub>1-6</sub> 烷基) 铵。
4. 权利要求 3 的式 (II) 化合物或其盐, 其中 L 为三甲基铵。

## 放射性标记的试剂和方法

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2010年3月22日；申请号：201080013540.3(PCT/US2010/028078)；发明名称：“放射性标记的试剂和方法”。

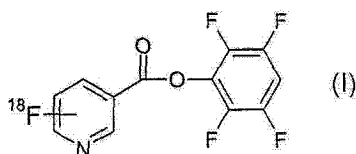
[0002] 本发明涉及用于生物分子、特别是肽的 [ $^{18}\text{F}$ ]-氟化的试剂和方法。得到的  $^{18}\text{F}$ -标记化合物可用作放射性药物，具体地说用于正电子发射断层摄影 (PET) 中。

[0003] 放射性标记生物活性肽用于诊断成像的应用在核医学领域中日益受到重视。与特定细胞类型选择性地相互作用的生物活性分子可用于向靶组织递送放射性。例如，放射性标记肽具有向肿瘤、梗塞和感染组织递送放射性核素的用于诊断成像和放射疗法的重大潜力。半衰期为约 110 分钟的  $^{18}\text{F}$  为选择用于许多受体成像研究的正电子发射核素。因此， $^{18}\text{F}$ -标记生物活性肽因其在 PET 中的效用而在定量检测和表征多种疾病中具有巨大的临床潜力。

[0004] 制备  $^{18}\text{F}$ -标记肽的一个困难是现有的  $^{18}\text{F}$ -标记试剂的制备很耗时。用  $^{18}\text{F}$  对肽和蛋白质的有效标记只有通过使用合适的辅基才能完成。在文献中提供了多种这样的辅基，包括 4- [ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酸 N-琥珀酰亚氨基酯、间马来酰亚氨基-N-(对- [ $^{18}\text{F}$ ] 氟苄基)-苯甲酰胺、N-(对- [ $^{18}\text{F}$ ] 氟苄基)马来酰亚胺和 4- [ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酰甲基溴。现在用  $^{18}\text{F}$  标记肽和蛋白质的普遍使用的几乎所有方法都利用活性酯。最常用的  $^{18}\text{F}$ -标记试剂为 4- [ $^{18}\text{F}$ ] 氟苯甲酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SFB)。SFB 受如下缺点所困：其需要 3 个合成步骤来制备 (氟化、水解和产生活性酯)，接着是耗时的 HPLC 纯化步骤，因此 SFB 的制备难以自动化。此外，在标记试剂中苯环的存在增加了  $^{18}\text{F}$ -标记产物的显著疏水性，这可不利地影响其生物分布特性。因此，仍然需要允许在温和条件下将  $^{18}\text{F}$  迅速地化学选择性地引入特别是肽中以得到  $^{18}\text{F}$ -标记产物的供选的  $^{18}\text{F}$ -标记试剂和方法。另外，还存在对能够在临床条件下自动操作以便利放射性药物制备的这类方法的需求。

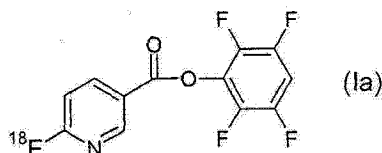
[0005] 根据本发明的第一方面，提供式 (I) 化合物：

[0006]



[0007] 一方面， $^{18}\text{F}$  标记物连接到吡啶基氮的邻位，使得式 (I) 化合物具有式 (Ia)：

[0008]

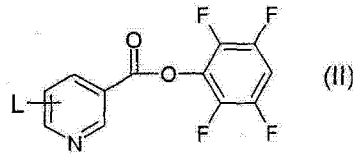


[0009] 式 (I) 和 (Ia) 的化合物将增加对于  $^{18}\text{F}$ -标记生物分子的显著优势。式 (I) 和 (Ia) 的化合物可在一个步骤中进行  $^{18}\text{F}$ -标记，标记是在接近室温下快速进行，纯化可用基于柱的系统 (例如 Oasis MCX 管柱) 进行，这使得更易于自动化。并且，已知吡啶系统的亲水性比苄基类似物高，因此预期增加了对  $^{18}\text{F}$ -产物的生物分布特性的积极影响。如下文说明，已

经发现在  $^{18}\text{F}$ - 标记期间四氟苯酯比其他活性酯稳定。

[0010] 式 (I) 和 (Ia) 的化合物可由相应的式 (II) 化合物或其盐制备，

[0011]

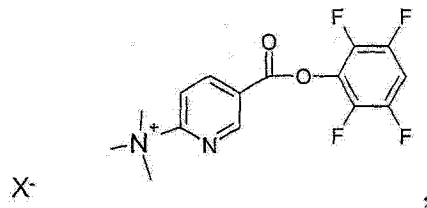


[0012] 其中 L 为选自氯、溴、碘、硝基和三 ( $\text{C}_{1-6}$  烷基) 铵 (合适地为三甲基铵) 的离去基团。这类式 (II) 化合物为新化合物, 因此形成本发明的另一方面。

[0013] 一方面, 式 (II) 化合物中的 L 为三 ( $\text{C}_{1-6}$  烷基) 铵 (合适地为三甲基铵), 其中合适的反荷离子选自来源于以下物质的离子: 无机酸, 例如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、高氯酸、硝酸和硫酸; 有机酸, 例如酒石酸、三氟乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡糖酸、琥珀酸、甲烷磺酸、三氟甲烷磺酸和对甲苯磺酸; 合适地选自氯离子、溴离子、高氯酸根离子、磺酸根离子、硝酸根离子、磷酸根离子和三氟甲烷磺酸根离子, 更合适地为三氟甲烷磺酸根反荷离子。

[0014] 一方面, 式 (II) 化合物为:

[0015]



[0016] 其中  $\text{X}^-$  为如上定义的反荷离子, 且优选为三氟甲烷磺酸根离子。

[0017] 由相应的式 (II) 化合物或其盐制备式 (I) 化合物可通过标准  $^{18}\text{F}$  标记方法进行。 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化物方便地使用 (p, n)-核反应由富  $^{18}\text{O}$  水制备 (Guillaume 等, Appl. Radiat. Isot. 42(1991)749-762) 且通常作为诸如  $\text{Na}^{18}\text{F}$ 、 $\text{K}^{18}\text{F}$ 、 $\text{Cs}^{18}\text{F}$ 、 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化四烷基铵或 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化四烷基磷的盐而分离。为了增加 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化物的反应性, 可加入诸如氨基聚醚或例如 4, 7, 13, 16, 21, 24- 六氧杂 -1, 10- 二氮杂双环 [8, 8, 8] 二十六烷 (Kryptofix 2. 2. 2) 的冠醚的相转移催化剂且在合适溶剂中进行反应。这些条件给出反应性氟离子。任选可使用自由基捕集剂以提高氟化产率, 这点在 WO 2005/061415 中有述。术语“自由基捕集剂”定义为与自由基相互作用且使其钝化的任何试剂。用于该目的合适自由基捕集剂可选自 2, 2, 6, 6- 四甲基哌啶 -N- 氧化物 (TEMPO)、1, 2- 二苯基乙烯 (DPE)、抗坏血酸、对氨基苯甲酸 (PABA)、 $\alpha$ -生育酚、氢醌、二-叔丁基苯酚、 $\beta$ -胡萝卜素和龙胆酸。

[0018] 用 [ $^{18}\text{F}$ ] 氟化物对式 (II) 化合物的处理可在诸如乙腈、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、二甲基乙酰胺、四氢呋喃、二噁烷、1, 2- 二甲氧基乙烷、环丁砜、N- 甲基吡咯烷酮的合适有机溶剂存在下或在诸如咪唑啉衍生物 (例如, 六氟磷酸 1- 乙基 -3- 甲基咪唑啉)、比啉衍生物 (例如, 四氟硼酸 1- 丁基 -4- 甲基吡啶)、磷化合物或四烷基铵化合物的离子液体中在例如  $15^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$  的非极端温度下、优选在诸如  $15^\circ\text{C}$  -  $30^\circ\text{C}$ 、例如  $18^\circ\text{C}$  -  $25^\circ\text{C}$  的周围温度左右下进行

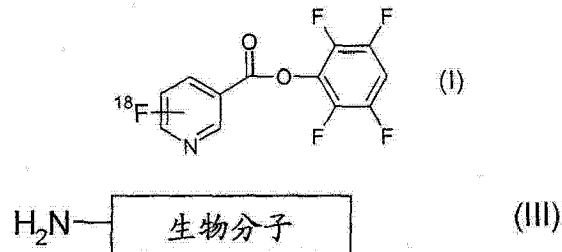
[0019] 式 (II) 化合物和其盐可由诸如 6- 氯 - 烟酸的市售原料制备。整个工艺的产率良

好 (> 50%)。步骤包括用例如通过二环己基碳化二亚胺 (DCC) 活化的四氟苯酚酯化、通过用三甲胺在四氢呋喃 (THF) 中的饱和溶液处理活性 6-氯烟酸-酯产生三甲基铵盐和用三氟甲磺酸银产生三氟甲烷磺酸盐。

[0020] 在制备式 (I) 化合物之后,其可以通过标准方法纯化,通常使用例如用 Oasis MCX™ 管柱的固相提取,式 (I) 化合物可使用合适的有机溶剂/水混合物以良好的纯度从 Oasis MCX™ 管柱中洗脱。

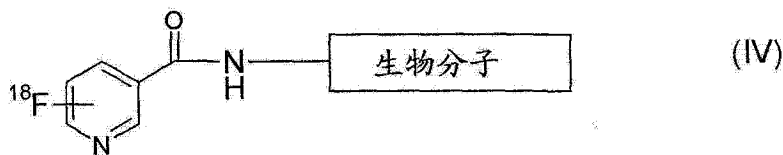
[0021] 根据本发明的另一方面,提供用于  $^{18}\text{F}$ -氟化的方法,其包括使式 (I) 化合物与式 (III) 化合物反应:

[0022]



[0023] 以得到式 (IV) 的  $^{18}\text{F}$ -产物:

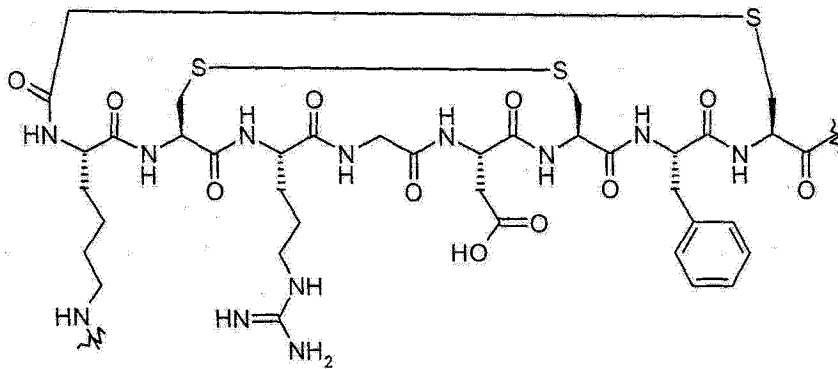
[0024]



[0025] 式 (I) 化合物与式 (III) 化合物的反应可在合适溶剂中、例如在水性缓冲液中在 2-11、合适地 3-11 的 pH 范围下且在 5-70°C 的非极端温度下、优选在周围温度下进行。

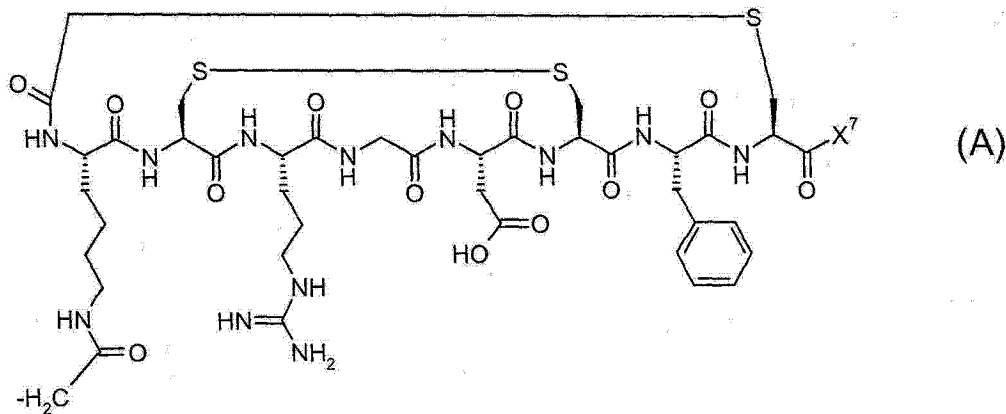
[0026] 在式 (III) 和 (IV) 中,用于标记的合适生物分子为肽,其可包括促生长素抑制素类似物,诸如抑生长肽、铃蟾肽、血管活性肠肽、趋化肽类似物、 $\alpha$ -促黑激素、神经降压肽、Arg-Gly-Asp 肽及其类似物、人胰岛素原连接肽、内皮缩血管肽、血管紧张肽和甲酰基-正亮氨酸酰基-亮氨酸酰基-苯丙氨酸酰基-正亮氨酸酰基-酪氨酸酰基-赖氨酸。用于标记的优选肽为 Arg-Gly-Asp 肽及其类似物,诸如 WO 01/77415 和 W003/006491 中描述的肽。优选的肽包含以下片段:

[0027]



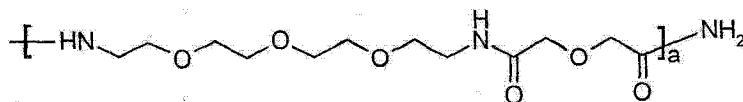
[0028] 在一个特别的方面,式(III)或(IV)中的生物分子为式(A)的肽:

[0029]



[0030] 其中  $X^7$  为  $-NH_2$  或

[0031]



[0032] 其中 a 为 1-10 的整数,优选 a 为 1。

[0033] 技术人员将了解,本发明的方法也可用于诸如蛋白、激素、低聚核苷酸和抗体片段的其他生物分子以及小型药物样分子的  $^{18}F$ - 氟化以提供多种 PET 示踪剂。

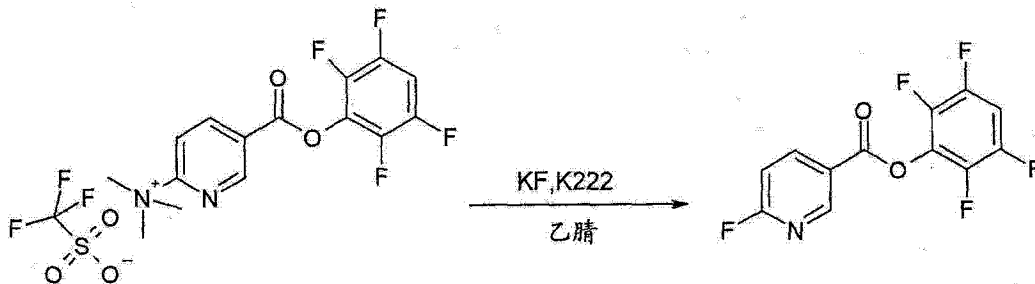
[0034] 式(III)化合物可通过肽合成、例如固相肽合成的标准方法(例如,如 Atherton E. 和 Sheppard, R. C. ;“Solid Phase Synthesis(固相合成)” ;IRL Press :Oxford, 1989 中所述)来制备。在式(III)化合物中引入伯氨基团可通过肽的 N 或 C- 末端或利用肽序列内所含的一些其他官能团的反应完成,其修饰不影响载体的结合特性。伯氨基团优选通过形成由肽的胺官能团与活化酸的反应形成的稳定酰胺键引入且在肽合成期间或在肽合成之后引入。在前体为酸时,伯胺可使用诸如六氟磷酸 2-(1H- 苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓(HBTU)或六氟磷酸 N-[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲铵 N-氧化物(HATU)的原位活化剂引入。

[0035] 现在将仅举例说明本发明。

## 实施例

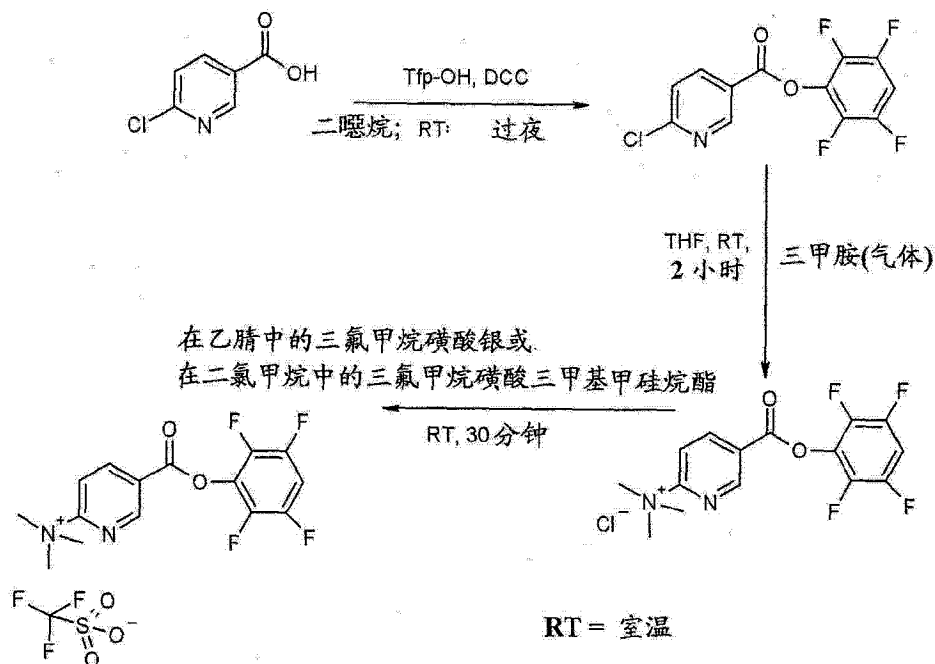
[0036] 实施例 1. 合成 6-氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯

[0037]



[0038] 2-三甲基铵基烟酸的 2,3,5,6-四氟苯酚 (Tfp) 活性酯从 6-氯烟酸 (Sigma-Aldrich) 开始分三个步骤合成。6-氯烟酸 (3g, 19mmol) 用被在 50mL 二噁烷中的二环己基碳化二亚胺 (DCC) (3.96, 19mmol) 活化的 2,3,5,6-四氟苯酚 (3, 25mg, 19mmol) 酯化, 随后从己烷中结晶, 得到 6-氯烟酸 2,3,5,6-四氟苯酚酯, 产率为 73%。通过在三甲胺的四氢呋喃 (THF) (15mL) 饱和溶液中处理 (连续鼓泡 2 小时) 活性 6-氯烟酸 2,3,5,6-四氟苯酚酯 (1g, 3, 27mmol) 产生三甲基铵盐, 反荷离子为氯离子, 产率为 45%。可过滤去掉未反应的物质, 因为盐从四氢呋喃溶液中沉淀出来。三氟甲磺酸酯盐的产生可以两种方法完成: 相应氯化物盐用在乙腈中的 1.2 摩尔过量的三氟甲磺酸银处理或者用三氟甲烷磺酸三甲基甲硅烷酯处理。后者是优选的选择, 因为处理更简单且不需要制备型色谱。两种方法都几乎是定量的。

[0039]



[0040] 合成的前体 (9.2mg) 最初通过在乙腈 (0.7ml) 中的 K222 (10mg) 和 KF (1.1mg) 用

$^{19}\text{F}$  标记。 $^{19}\text{F}$  与 Tfp 酯的反应使用  $^1\text{H-NMR}$  在乙腈- $d_6$  中在  $27^\circ\text{C}$  下研究来分析反应动力学和所形成的杂质。

[0041] 比较实施例

[0042] 2-三甲基铵基烟酸的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯由 6-氯烟酸合成且通过与上述方法类似的方法用  $^{19}\text{F}$  标记。

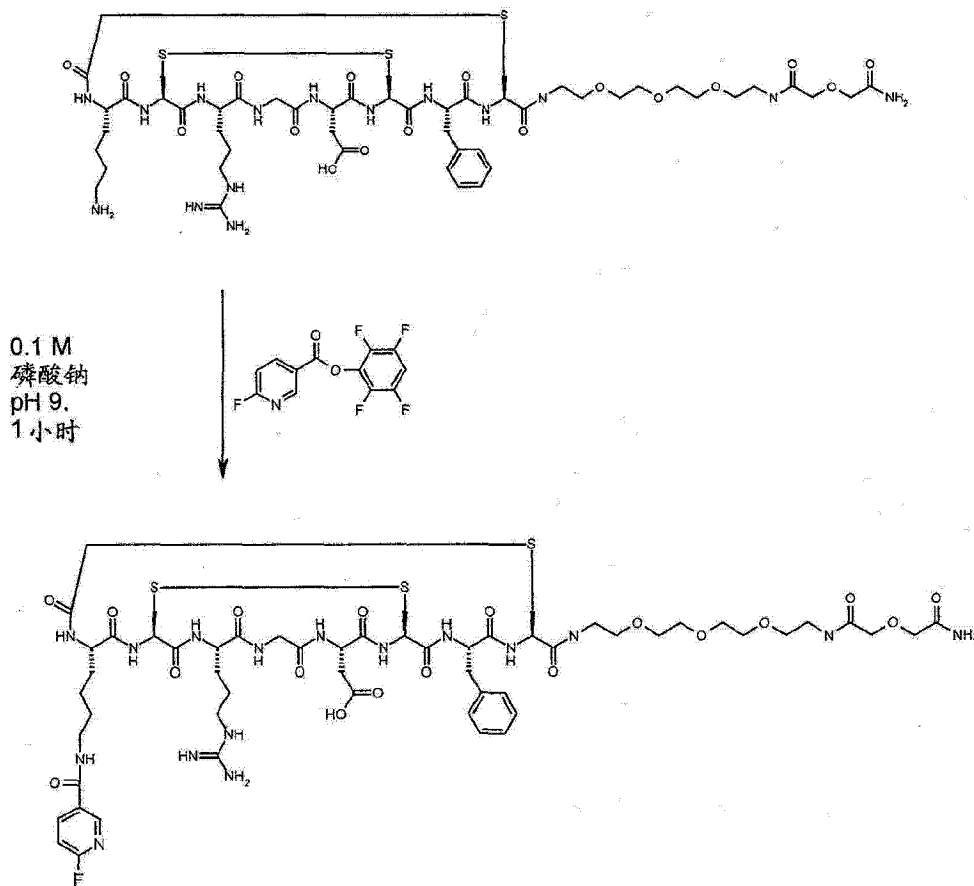
[0043] 结果:

[0044] 两种酯都以良好产率合成 ( $> 30\%$ , 原料为 6-氯烟酸) 且在室温下在乙腈中与氟化物容易地反应。NHS-酯比 Tfp-酯更倾向于水解, 因此不进一步评价。通过  $^1\text{H-NMR}$  经 30 分钟对反应 Tfp-酯的研究显示, 在室温下迅速结合氟化物, 2.5 分钟之后, 32% 的原料转化为所要的氟化产物。在一组实验中, 70% 的氟化产物在小于 20 分钟内得到。两种烟酸衍生物被确定为伴随所要产物的副产物。

[0045] 实施例 2: 6-氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯与官能化 RGD 肽的反应

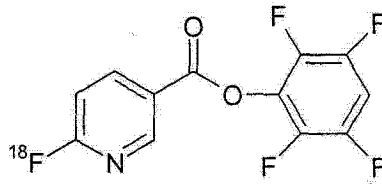
[0046] 实施例 1 的氟化产物 (1mg) 与适当官能化的 RGD 肽 (5mg, 如 WO01/77415 和 WO03/006491 中所述制备) 在乙腈: 磷酸钠 0.1M, pH 9 的 1:1 溶液 (总计 3mL) 中的反应得到如由 LC-MS 所分析的所要产物。LC-MS 条件: Phenomenex Luna C18(2)  $3\mu\text{m}$   $2\times 50\text{mm}$ , 流动相 A: 水/0.1% 三氟乙酸 (TFA), 流动相 B: 乙腈/0.1% TFA, 流速: 0.6mL/min, 10-30% B, 5 分钟。保留时间 ( $R_t$ ) = 3.42min,  $\text{M}+\text{H}^+$  (预期值: 1381.5, 实验值: 1381.6)。

[0047]



[0048] 实施例 3: 6- $^{18}\text{F}$  氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯的放射合成

[0049]



[0050] 将含水  $[^{18}\text{F}]$  氟化物 (至多 150MBq) 在 15mg Kryptofix 222 和 3mg 碳酸氢钾 ( $\text{KHCO}_3$ ) 存在下在  $\text{N}_2$  下加热到  $100^\circ\text{C}$  来共沸干燥 9 分钟。在此期间,加入 2x1mL 乙腈并使其蒸发。在冷却到  $40^\circ\text{C}$  之后,加入甲烷磺酸三甲基-[5-(2,3,5,6-四氟苯氧基羰基)-吡啶-2-基]-铵 (7mg, 在 1mL 乙腈中)。将反应容器加热到  $40^\circ\text{C}$  保持 10 分钟以进行标记。在与冷的参考标准物共注入 (co-injection) 的情况下,使粗反应混合物进行放射-HPLC (高效液相色谱) 和放射-TLC (薄层色谱),以证实产生了目标  $^{18}\text{F}$ -化合物。如通过放射-TLC ( $n = 3$ ) 分析,结合产率通常为 50-80%。

[0051] 放射-TLC: 预涂的硅胶板 60F<sub>254</sub> (Merck), 梯度正己烷 / 乙酸乙酯 50 : 50。使用瞬时成像器 (Packard BioScience) 来测量 TLC-板上的放射性分布。R<sub>f</sub>: 0,65。

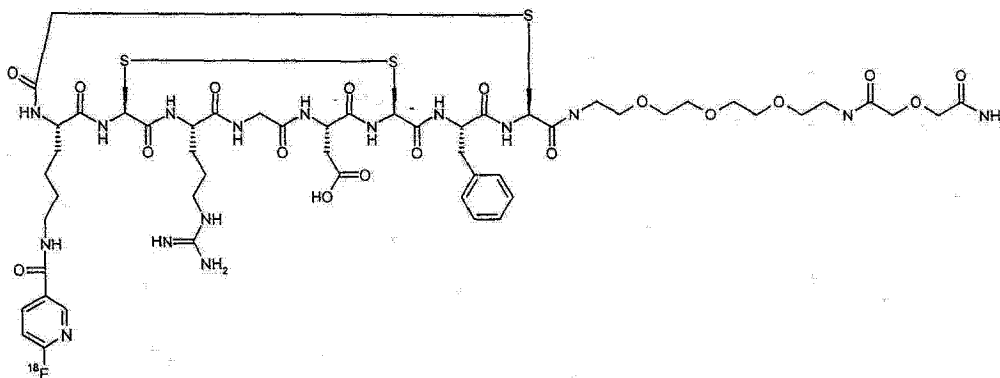
[0052] 放射-HPLC: 分析型放射-HPLC 在具有与  $\gamma$ -检测器 (Bioscan flow-count) 串联装备的 UV 检测的 Agilent 系统 (1100 系列) 上进行。Phenomenex Luna C18(2) 管柱 (150x4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速: 1.0mL/min, 梯度: 20-80% B, 20min。(将在 214nm 和 254nm 下的 UV 检测与  $\gamma$ -检测器组合)。R<sub>t</sub>: 14,4min。

[0053] 纯化

[0054] 将在 2mL 乙腈中的含有  $[^{18}\text{F}]$  氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯的粗反应混合物用蒸馏水稀释到 30% 乙腈。使水溶液通过 Oasis MCX plus 柱 (根据制造商的介绍调节)。随后用 5mL 蒸馏水漂洗柱。随后用 100% 乙腈使纯化的产物从管柱中洗脱,放射化学纯度大于 90%。所有剩下的未反应的前体甲烷磺酸三甲基-[5-(2,3,5,6-四氟苯氧基羰基)-吡啶-2-基]-铵保留在柱上。

[0055] 实施例 4: 6- $[^{18}\text{F}]$  氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯与具有游离氨基官能团的环状 RGD-肽的缀合

[0056]



[0057] 向纯化的 6- $[^{18}\text{F}]$  氟-烟酸 2,3,5,6-四氟苯酯在 1.5mL 乙腈 / 水的 1 : 1 溶液中的溶液中加入溶解于 1mL 的乙腈和 0.1M  $\text{NaHPO}_4$  的 1 : 1 溶液中的 3mg 适当官能化的 RGD 肽 ( $M_w$ : 1258.47)。将 pH 为 9 的所得混合物加热到  $40^\circ\text{C}$ 。30 分钟之后,将混合物的小等分

试样用放射-HPLC分析。放射性色谱图显示以超过65%的产率转化为所要产物。产物与其<sup>19</sup>F-参考标准物共洗脱。

[0058] 放射-HPLC:分析型放射-HPLC在具有与 $\gamma$ -检测器(Bioscan flow-count)串联装备的UV检测的Agilent系统(1100系列)上进行。Phenomenex Luna C18(2)管柱(150x4.6mm,5 $\mu$ m),流速:1.0mL/min,梯度:0-40%B,20min。(将在214nm和254nm下的UV检测与 $\gamma$ -检测器组合)。R<sub>t</sub>:10.0min。