



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102300842 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 201080006295. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 01. 29

C07C 243/38 (2006. 01)

A61K 51/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

0901483. 8 2009. 01. 29 GB

61/148410 2009. 01. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/051053 2010. 01. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02010/086398 EN 2010. 08. 05

(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 M·阿沃里 J·布朗 P·B·艾夫森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李进 林森

权利要求书 3 页 说明书 16 页

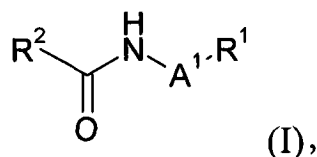
(54) 发明名称

放射性碘标记方法

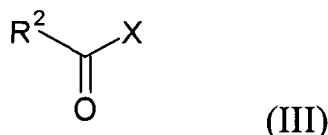
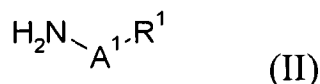
(57) 摘要

本发明提供了一种优于现有技术方法的用于合成放射性碘标记化合物的方法。在间接放射性碘标记法中用胍或氨氧基代替伯胺促进更快反应,从而缩短反应时间并且增加产量。此外,其中有伯胺的待放射性碘标记的分子,比如肽的N端或赖氨酸残基,在胍或氨氧基处的反应极为有利。

1. 用于合成式 I 的放射性碘标记化合物或其盐或溶剂化物的方法：



所述方法包含式 II 化合物和式 III 化合物的反应：



其中：

A^1 为 NH 或 O；

R^1 和 R^2 中的一个为 $-\text{L}^1-\text{Ar}^1$ 基团，其中：

L^1 为键或包含 1-3 个 L^* 连接体单元的二价连接体，其中 L^* 选自 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CR}'_2-$ 、 $-\text{CR}'=\text{CR}'-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CR}'_2\text{CO}_2-$ 、 $-\text{CO}_2\text{CR}'_2-$ 、 $-\text{NR}'-$ 、 $-\text{NR}'\text{CO}-$ 、 $-\text{CONR}'-$ 、 $-\text{NR}'_2-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{NR}'-$ 、 $-\text{NR}'(\text{C}=\text{S})\text{NR}'-$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}'-$ 、 $-\text{NR}'\text{SO}_2-$ 、 $-\text{CR}'_2\text{OCR}'_2-$ 、 $-\text{CR}'_2\text{SCR}'_2-$ 、 $-\text{C}(\text{R}'_2\text{NR}')\text{CR}'_2-$ 、 C_{5-12} 亚芳基和 C_{3-12} 杂亚芳基，其中， R' 为氢或 C_{1-3} 烷基；和，

Ar^1 为 6 元 C_{3-6} 芳基，经放射性碘取代，且经 0-3 个其他取代基所取代，所述其他取代基选自 C_{1-3} 烷基、卤素、氨基、羧基、羟基或它们的被保护形式，且其中所述芳基具有 0-3 个选自 N、S 和 O 的杂原子；

和 R^1 和 R^2 中另外一个为 $-\text{L}^2-\text{R}^*$ 基团，其中：

L^2 为键或包含 1-6 个 L^* 连接体单元的二价连接体，其中 L^* 与对 L^1 所定义的相同；和， R^* 为生物分子；

其中 R^1 和 R^2 任选地包含适当的保护基；

和其中 X 代表活性酯基团。

2. 权利要求 1 中的方法，其中 A^1 为 NH。

3. 权利要求 1 中的方法，其中 A^1 为 O。

4. 权利要求 1-3 中任意一项的方法，其中 L^1 为键或 C_{1-3} 亚烷基连接体。

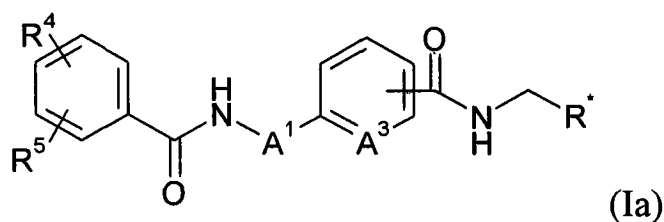
5. 权利要求 1-4 中任意一项的方法，其中 L^2 为键或 C_{1-3} 亚烷基连接体。

6. 权利要求 1-5 中任意一项的方法，其中 R^1 为 $-\text{L}^2-\text{R}^*$ 基团，且 R^2 为 $-\text{L}^1-\text{Ar}^1$ 基团。

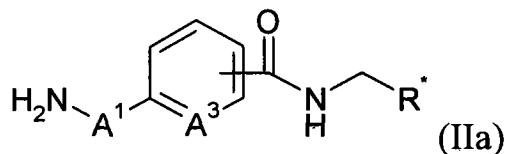
7. 权利要求 1-6 中任意一项的方法，其中 Ar^1 为由放射性碘取代和任选地由羟基或胍取代的苯基。

8. 权利要求 1-7 中任意一项的方法，其中 R^* 为生物分子，所述生物分子为抗体、肽或蛋白质。

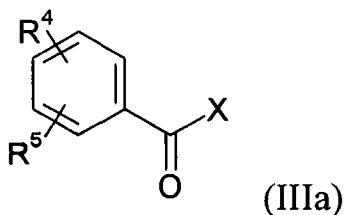
9. 权利要求 1 中的方法，其中：所述式 I 化合物为式 Ia 的化合物：



所述式 II 化合物为式 IIa 的化合物：



所述式 III 化合物为式 IIIa 的化合物：



其中 A³ 为 N 或 CH, R* 与权利要求 1 或 8 中任意一项所定义的相同, R⁴ 和 R⁵ 中的一个为放射性碘, R⁴ 和 R⁵ 中另一个为氢或羟基, 和 X 与权利要求 1 中所定义的相同。

10. 权利要求 9 的方法, 其中 A¹ 为 NH。

11. 权利要求 9 的方法, 其中 A¹ 为 O。

12. 权利要求 9-11 中任意一项的方法, 其中 A³ 为 CH。

13. 权利要求 9-12 中任意一项的方法, 其中 R⁴ 和 R⁵ 中的一个为放射性碘, 且另一个为氢。

14. 权利要求 1-13 中任意一项的方法, 其中放射性碘标记化合物为体内显像剂, 且 Ar¹ 的放射性碘取代基包含 ¹²³I, ¹²⁴I 或 ¹³¹I。

15. 权利要求 1-14 中任意一项的方法, 其进一步包含任意顺序的以下一个或多个步骤：

(i) 从式 I 的放射性碘标记化合物去除任意保护基；和 / 或，

(ii) 将式 I 的放射性碘标记化合物和生物相容性载体混合, 形成放射性药物组合物；和 / 或，

(iii) 对步骤 (ii) 的放射性药物组合物进行消毒；和 / 或，

(iv) 对步骤 (ii) 的放射性药物组合物去除热原。

16. 权利要求 1-15 中任意一项的方法, 其为自动化的。

17. 权利要求 16 的方法, 其在自动化合成装置中进行。

18. 放射性药物组合物, 所述组合物包含权利要求 1-14 中任意一项的方法中的式 I 的放射性碘标记化合物以及生物相容性载体, 其为适于哺乳动物给药的形式。

19. 用于进行权利要求 1-17 中任意一项的方法的试剂盒, 所述试剂盒包含：

(i) 第一容器, 其包含权利要求 1-8 中任意一项的方法中的式 II 化合物或权利要求 9-12 中任意一项的方法中的式 IIa 的化合物；和，

(ii) 第二容器, 其包含权利要求 1 和 4-8 中任意一项的方法中的式 III 化合物或权利

要求 9 或权利要求 13 的方法中的式 IIIa 的化合物。

20. 用于进行权利要求 17 的方法的卡盒,所述卡盒包含对权利要求 19 的试剂盒所定义的第一和第二容器。

21. 权利要求 19 中的试剂盒的用途,用于进行权利要求 1-17 中任意一项的方法。

22. 权利要求 20 中的卡盒的用途,用于进行权利要求 17 的方法。

放射性碘标记方法

[0001] 发明的技术领域

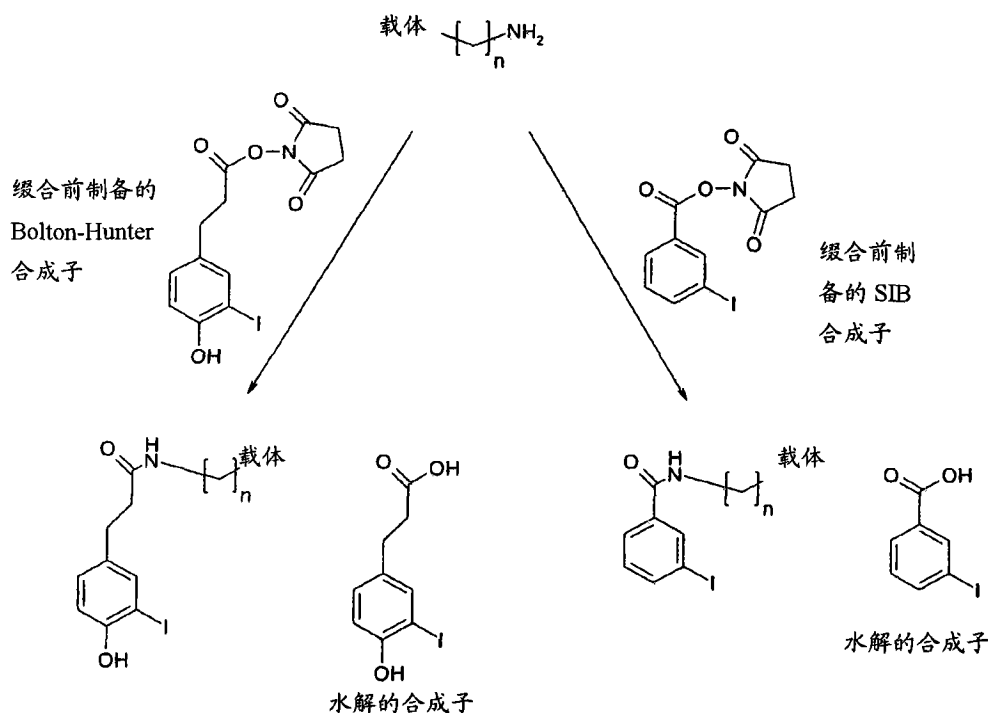
[0002] 本发明涉及放射性碘标记化合物的合成, 尤其涉及间接的放射性碘标记方法。本发明的方法提供超过目前已知的间接放射性碘标记方法的优点。

[0003] 相关技术描述

[0004] 放射性碘标记最容易通过将放射性碘与适当的前体化合物发生反应的直接放射性碘标记进行。例如, 该前体化合物可包含: 芳基碘化物或芳基溴化物 (从而得以与放射性碘交换); 活性前体化合物芳环 (例如苯酚基团); 有机金属前体化合物 (例如三烷基锡、三烷基甲硅烷基或有机硼化合物); 或者有机前体化合物 (比如三氮烯) 或是对于亲核取代的良好的离去基 (比如碘鎓盐)。

[0005] 直接放射性碘标记虽然操作简单, 但是却有诸多缺点, 尤其是在用于对如蛋白质的生物分子进行放射性碘标记时。例如, 通过对酪氨酸残基中的羟基直接亲电取代的蛋白质放射性碘标记不能用于缺乏酪氨酸残基的蛋白质。此外, 通过亲电方法的放射性碘标记蛋白质因直接暴露在氧化条件下, 通常展现出降低的生物功能。直接放射性碘标记的另外一个问题在于, 由于碘化酪氨酸残基与甲状腺激素的结构相似性, 导致以这种方法标记的蛋白质经常会体内脱碘。为了解决这些问题, 已经开发了间接放射性碘标记方法。已知的间接放射性碘标记方法包括: 形成放射性碘标记的合成子, 然后将其通过改变赖氨酸 ϵ -氨基在温和的条件下与蛋白质进行缀合 (综述参见 Wilbur 1992 Bioconj Chem ;3 :433-70)。目前最常用的间接放射性碘标记方法包括将碘代 Bolton-Hunter 试剂或更典型的 N-琥珀酰亚胺基-3-碘-苯甲酸酯 (SIB) 缀合至载体中存在的伯胺, 如以下方案 1 中所示:

[0006]



[0007] 方案 1: 已知的间接放射性碘标记途径

[0008] 典型的这类反应在 37°C、pH 7.5-8、50mM 下,在磷酸钠缓冲液中进行 30 分钟。在较高 pH 下,该反应通常进行得更快。但是随着 pH 值的增加,NHS 酯的水解也增加,后续产量会由于该步骤而折衷。产量还会因载体、其溶解度、胺功能性位置以及选择用于缀合的系统而发生变化。

[0009] 已知通过肼作用于酮或醛的形成脎的反应(March 的 Advanced Organic Chemistry(高等有机化学)第五版,2001,Smith 和 March 著;第 16 章 1192-4 页),并可用于肼功能化化合物与羰基功能性的化学选择性偶联。在放射化学领域中,肼功能化化合物 6-肼基烟酸(HYNIC)是公知的用于生物分子的 ^{99m}Tc 标记的双功能配体(参见例如 Abrams 等人 1990 J Nuc Med ;31 :2022-8)。最近,HYNIC 已报道为用 ^{18}F 标记生物分子的引人注目的途径。Chang 等人(2005 Bioconj Chem ;16 :1329-33)描述了通过形成脎将 [^{18}F] 氟苯甲醛([^{18}F]FBA)与 HYNIC-HSA 进行缀合,制备 ^{18}F 标记的人血清白蛋白(HSA)。同一小组还报告了该方法在 ^{18}F 标记的 RGD 肽的制备中的应用(Lee 等人 2006 Nuc Med Biol ;33 :677-83)。Bruus-Jensen 等人(2006 Nuc Med Biol ;33 :173-83)在各种其他 ^{18}F 标记肽的形成中研究了该方法,并且报告它是快速、直接的放射性标记方法,在温和酸性条件下产生高产量。在这些报告中,发现形成脎的最佳温度的范围在 50-70°C。这个温度范围对包含生物分子的反应并非最理想的,理想情况下这些反应在接近于生理温度的温度下进行。

[0010] 有余地提供用于生物分子的放射性碘标记的改进方法。

[0011] 发明概述

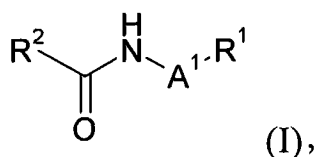
[0012] 本发明提供了用于放射性碘标记生物分子的合成的方法,其比目前已知的方法更好。与已知的胺和活性酯之间的反应相比,使用肼或氨氧基衍生物与活性酯之间的反应促进更快的反应,从而缩短反应时间、增加产量。此外,在待进行放射性碘标记的分子中有伯胺时,比如肽的 N 端或赖氨酸残基,则在肼或氨氧基基团上的反应极为有利。另外,本发明的方法能在模拟生物细胞分子天然状态的温度下提供良好的产量。这提供了使生物分子的结构和功能得到最佳保持的优点。

[0013] 发明详述

[0014] 放射性碘标记化合物的合成方法

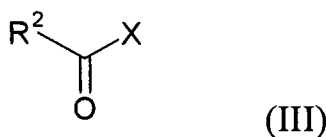
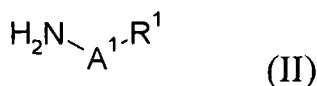
[0015] 一方面,本发明涉及合成式 I 的放射性碘标记化合物或其盐或溶剂化物的方法:

[0016]



[0017] 所述方法包含式 II 的化合物与式 III 的化合物的反应:

[0018]



[0019] 其中：

[0020] A^1 为 NH 或 O；

[0021] R^1 和 R^2 中的一个为 $-L^1-Ar^1$ 基团，其中：

[0022] L^1 为键或包含 1-3 个 L^* 连接体单元的二价连接体，其中 L^* 选自 $-CO-$ 、 $-CR'_2-$ 、 $-CR'=CR'-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-CR'_2CO_2-$ 、 $-CO_2CR'_2-$ 、 $-NR'-$ 、 $-NR'CO-$ 、 $-CONR'-$ 、 $-NR'-$ 、 $-(C=O)NR'-$ 、 $-NR'(C=S)NR'-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $-NR'SO_2-$ 、 $-CR'_2OCR'_2-$ 、 $-CR'_2SCR'_2-$ 、 $-CR'_2NR'CR'_2-$ 、 C_{5-12} 亚芳基和 C_{3-12} 杂亚芳基，其中， R' 为氢或 C_{1-3} 烷基；和

[0023] Ar^1 为 6 元 C_{3-6} 芳基，经放射性碘取代，且经 0-3 个选自 C_{1-3} 烷基、卤素、氨基、羧基、羟基或它们的被保护形式的其他取代基所取代，且其中所述芳基具有 0-3 个选自 N、S 和 O 的杂原子；

[0024] 和 R^1 和 R^2 中另外一个为 $-L^2-R^*$ 基团，其中：

[0025] L^2 为键或包含 1-6 个 L^* 连接体单元的二价连接体，其中 L^* 与对 L^1 所定义的相同；和，

[0026] R^* 为生物分子；

[0027] 其中 R^1 和 R^2 任选地包含适当的保护基；

[0028] 和其中 X 代表活性酯基团。

[0029] 本发明方法的定义

[0030] 术语“放射性碘标记化合物”意为包含放射性碘的化合物，即，包含至少一个放射性碘原子的化合物，具体到本发明上下文中，指含有放射性碘芳基的化合物。如本文定义的“放射性碘芳基”为包含有放射性碘原子的芳基。“放射性碘原子”可以是碘的任何放射性同位素，优选 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 或 ^{131}I ，并最优选 ^{123}I 、 ^{124}I 或 ^{131}I 。

[0031] 在本发明中使用的按照短语“其盐或溶剂化物”的适当的盐包括：(i) 生理学可接受的酸加成盐，比如衍生自无机酸（例如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸）以及衍生自有机酸（例如酒石酸、三氟醋酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸、甲磺酸和对甲苯磺酸）的那些盐；和 (ii) 生理学可接受的碱性盐比如铵盐、碱金属盐（例如钠盐和钾盐），碱土金属盐（例如钙盐和镁盐）、带有有机碱（比如三乙醇胺、N-甲基-D-葡萄糖胺、哌啶、吡啶、哌嗪和吗啉）的盐以及带有氨基酸（比如精氨酸和赖氨酸）的盐。

[0032] 从最广义上讲，术语“的反应”指将式 II 化合物的溶液与式 III 化合物的溶液混合。该溶液可以是含水或有机溶液。“含水”溶液是其中溶剂包含水的溶液。术语“有机”在指溶液时表示其中溶剂为含碳溶剂（包括诸如四氢呋喃 (THF)、二氯甲烷 (DCM) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 的溶剂）的溶液。通常，式 II 化合物的溶液与式 III 化合物的溶液的混合在规定的温度下规定的时间段中进行。本发明的方法优选在低于 50°C 的温度下进行，但不要显著低于室温。因此，进行本发明方法的优选温度在 $15-45^\circ\text{C}$ 的范围中，最优选在 $20-40^\circ\text{C}$ 的范围中，尤其优选在 $35-40^\circ\text{C}$ 的范围中。本发明较之现有技术方法的优点是其可在 37°C 下顺利完成。”

[0033] “活性酯”是用醇制备的酯，其结构使其能够容易地被亲核物质比如胺所置换，形成稳定的连接。在一个优选实施方案中，该活性酯选自 N-羟基琥珀酰亚胺基 (NHS) 酯、五

氟苯基酯和羟基苯并三唑 (HOBt) 酯。最优选的活性酯为 NHS 酯。

[0034] 独立使用或作为另一基团的部分使用的术语“烷基”在本文中定义为任意直链或支链的饱和或不饱和的 C_nH_{2n+1} 基团, 其中除非另外说明, n 为 1-10 的整数。烷基基团包括例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、1-甲基丙基、戊基、异戊基、仲戊基、己基、庚基和辛基。

[0035] 术语“环烷基”指如本文定义的为环状的烷基。

[0036] 术语“芳基”在本文定义为含有至少一个芳环, 并优选每个环中都具有 5-6 个环成员的任意的单-、双-、三环的 C_{5-14} 分子片段或基团。该术语芳基涵盖纯粹的芳族基团 (比如苯基、萘基、四氢萘基、茚满和联苯基) 以及包含至少一个芳环的基团, 该芳环与一个或多个环烷基或杂环烷基环稠合。

[0037] 术语“氨基”表示 $-NH_2$ 基团。

[0038] 术语“羟基”表示 $-OH$ 基团。

[0039] 术语“硝基”表示 $-NO_2$ 基团。

[0040] 术语“卤素”涉及选自碘、氟、溴和氯的卤素原子。

[0041] 术语“羧基”表示 $-COOH$ 基团。

[0042] 术语“杂原子”意为烃组成部分中非碳或氢的任何原子。在本发明上下文中, 杂原子选自氮、氧和硫。

[0043] 本文使用的术语“生物分子”意为细胞的成分或产物, 如: 肽、蛋白质、抗体、碳水化合物、脂质或核酸或它们的合成形式。因为它们会变性 (例如在高温下或由于强酸性或碱性条件), 生物分子有利地在尽可能接近于生理温度下和间接地进行放射性碘标记。

[0044] 术语“生理温度”在本文中特别指 20-40°C 范围内的温度, 并优选为 35-40°C。

[0045] 术语“亚烷基”不管单独使用还是组合使用, 表示具有特定数目碳原子的直链或支链或环状的二价脂肪族基团。本文使用的亚烷基的实例包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基等。

[0046] 术语“环亚烷基”指环状二价脂肪族基团。

[0047] 术语“亚芳基”不管单独使用还是组合使用, 表示二价不饱和芳族羧基, 其具有单个环 (如亚苯基), 或多个稠环 (如亚萘基和亚蒽基)。本文使用的亚芳基的实例包括但不限于苯-1,2-二基、苯-1,3-二基、苯-1,4-二基、萘-1,8-二基等。

[0048] 术语“杂亚芳基”指包含有选自 N、S 或 O 的一个或多个杂原子的亚芳基。

[0049] “适当的保护基”指阻止或抑制不期望的化学反应的基团, 但其被设计为具有充分的反应性, 这样这些保护基就可以在足够温和、不致改变分子的其余部分的条件下从所讨论的官能团上断开。在去保护后, 获得所需的产物。保护基对于本领域的技术人员是公知的, 并适当地选自: 对于胺基团: Boc (Boc 为叔丁氧基羰基)、Fmoc (Fmoc 为芴基甲氧基羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde [即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基) 乙基] 或 Npys (即 3-硝基-2-吡啶氧硫基); 和对于羧基基团: 甲基酯、叔丁基酯或苯甲基酯。对于羟基, 适当的保护基为: 甲基、乙基或叔丁基; 烷氧甲基或烷氧基乙基; 苯甲基; 乙酰基; 苯甲酰基; 三苯甲基 (Trt) 或三烷基甲硅烷基 (比如四丁基二甲基甲硅烷基)。另外的保护基的使用描述于“Protective Groups in Organic Synthesis (有机合成中的保护基)”, Theodor W. Greene 和 Peter G. M. Wuts, (第四版, John Wiley & Sons Inc., 2007)。

[0050] 怎样获得式 II 和 III 的化合物

[0051] 式 II 和 III 的化合物可通过本领域技术人员已知的方法来获得。

[0052] 要获得包含 $-L^1-Ar^1$ 基团（即包含放射性碘芳基）的式 II 或 III 的化合物，可使用含有衍生物的初始化合物，该衍生物进行亲电或亲核放射性碘标记或与标记过的醛或酮进行缩合。

[0053] 第一类的实例为：

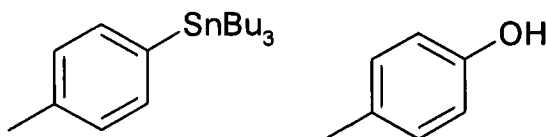
[0054] (1) 有机金属衍生物，比如三烷基锡烷（例如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基）或三烷基硅烷（例如三甲基甲硅烷基）或有机硼化合物（例如硼酸酯或有机三氟硼酸盐（酯））；

[0055] (2) 对于亲电碘化的活性芳环（例如苯酚）和对于亲核碘化的活性芳环（例如芳基碘鎓盐、芳基重氮、芳基三烷基铵盐或硝基芳基衍生物）。

[0056] 初始化合物优选包含：芳基碘化物或溴化物（以得以进行放射性碘交换）；活性前体化合物芳环（例如苯酚基团）；有机金属前体化合物（例如三烷基锡、三烷基甲硅烷基或有机硼化合物）；或有机前体化合物比如三氮烯或对于亲核取代的良好的离去基，比如碘鎓盐。Bolton(J. Lab Comp Radiopharm 2002 ;45 :485-528) 描述了前体化合物和将放射性碘引入到有机分子中的方法。Wilbur(Bioconj Chem 1992 ;3(6) :433-470) 描述了前体化合物和将放射性碘引入到蛋白质中的方法。Kabalaka 等人(Nucl Med Biol,2002 ;29 :841-843 和 2003 ;30 :369-373) 描述了适当的硼酸酯有机硼化合物以及它们的制备。Kabalaka 等人(Nucl Med Biol,2004 ;31 :935-938) 描述了适当的有机三氟硼酸盐（酯）以及它们的制备。对于放射性碘标记优选的初始化合物包括有机金属前体化合物，最优选为三烷基锡。

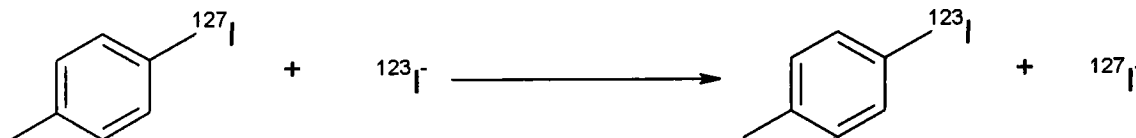
[0057] 可以连接放射性碘的芳基的实例给出如下：

[0058]



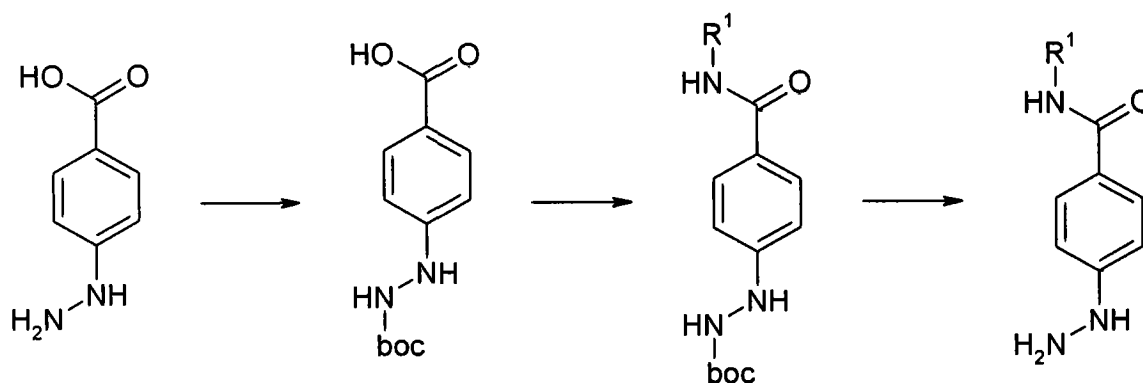
[0059] 两者都包含取代基，其可以使得在芳环上容易地发生放射性碘取代从而形成 Ar^1 基团。包含放射性碘的 Ar^1 取代基可通过经放射性卤素交换的直接碘化来合成，例如，

[0060]



[0061] 在一个实施方案中，式 II 的 A^1 为 NH，这样式 II 的化合物为胍。许多种胍化合物是容易购得的，使用有机化学标准方法能够将其转化为其中 A^1 为 NH 的式 II 的化合物。例如，碘苯基胍市售可得，其能够通过放射性碘交换转化为式 II 的化合物，其中 A^1 为 NH， R^1 为放射性碘苯基。市售可得的还有胍基苯甲酸，其也可以容易地转化为式 II 的胍化合物，例如：

[0062]



[0063] 其中 boc 为叔丁氧基羰基保护基,且 R^1 为如本文中所定义。

[0064] 当 R^1 为 $-L^2-R^*$ 时,获得式 II 化合物的途径必须充分温和,以适于在功能化的同时不造成生物分子功能的损失。与上述途径相似的途径中,初始含肼化合物为 HYNIC,其在放射性化学领域对于用肼的生物分子功能化是公知的。HYNIC 部分对于引入肼官能团的优势为,其可以在温和的条件下相对容易地缀合至生物分子。例如,可使用 N-羟基琥珀酰亚胺基-HYNIC 处理肽或蛋白质中的赖氨酸残基 (Rennen 等人 2000 Nuc Med Biol; 27:599-604),或可通过将马来酰亚胺基团与半胱氨酸残基反应使用 HYNIC-马来酰亚胺 (Banerjee 等人 2005 Dalton Trans;24:3886-97)。

[0065] 使用 HYNIC 部分来实现生物分子 ^{99m}Tc 标记的早期报告 (Abrams 等人 1990 J Nuc Med;31:12) 描述了怎样通过连接 HYNIC 到 IgG 以将肼基团并入 IgG 中。产生的烟碱基肼修饰的 IgG 能够与 ^{99m}Tc -葡庚糖酸根缀合,这样肼的端氮能够作用完成 ^{99m}Tc 的配位。其他人运用相似的方法实现了其它蛋白质的 ^{99m}Tc 标记和肽的 ^{99m}Tc 标记,体现了该方法的通用性。Blankenberg 等人 (1998 PNAS;95(11):6349-54) 描述了膜联蛋白 V 的 ^{99m}Tc 标记,Rennen 等人 (2004 Chest;126(6):1954-61) 描述了白细胞间介素-8 的 ^{99m}Tc 标记,Oyen 等人 (2000 Eur J Nuc Med;27:392-9) 描述了糖蛋白 IIa/IIIb 受体拮抗物 DMP444 的 ^{99m}Tc 标记,且 Faintuch 等人 (2005 Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry (无机、金属有机和纳米金属化学中的合成和反应性);35(1):43-51) 描述了铃蟾肽 $_{7-14}$ NH₂ 的 ^{99m}Tc 标记。

[0066] HYNIC 基团可通过以下方法位点特异性地缀合至肽:将被保护的肽固定于固相上,与 HYNIC 偶联,对肽去保护,然后从固体载体上将去保护的肽断开 (Surfraz 等人 2007 J Med Chem;50:1418-22)。

[0067] HYNIC 还报告于用于生物分子 ^{18}F 标记的途径中,参见例如 Lee 等人 (2006 Nuc Med Biol;33:677-83);和 Bruus-Jensen 等人 (2006 Nuc Med Biol;33:173-83)。这些出版物公开了用 HYNIC 的生物分子功能化。HYNIC 功能化的生物分子的肼基团与 ^{18}F -氟苯甲醛的醛发生反应形成稳定的腙键,从而提供 ^{18}F 标记的生物分子。

[0068] 在本发明方法的一个优选实施方案中,式 II 化合物中的 A^1 为 NH,且 R^1 为 $-L^2-R^*$ 基团。在本发明上下文中优选的生物分子为肽、蛋白质或抗体。术语“肽”、“蛋白质”和“抗体”具有它们在本领域中的普通含义,现在作简要说明。肽是由氨基酸以特定顺序连接形成的短聚合体,其中一个氨基酸残基与下一个氨基酸残基通过酰胺键连接。一般认为肽中包含至多 50 个氨基酸残基。蛋白质是多肽分子或由多个多肽亚单位组成。抗体,也称为免疫球蛋白,是由脊椎动物免疫系统所使用的 γ 球蛋白。

[0069] 在另一个实施方案中,式 II 的 A^1 为 O,由此式 II 的化合物是氨基化合物。和胍一样,氨基化合物为高亲核物质而且因为更活泼所以提供超过氨基化合物的优点。一些氨基化合物市售可得,能够作为获取多种其中 A^1 为 O 的式 II 化合物的起点,例如 L- α -氨基- β -苯丙酸溴化氢 (Apollo Scientific Ltd.),氨基异丁酸氯化氢 (Fine and Performance Chemicals Ltd.)。

[0070] 现有技术描述了怎样通过用氨基替换氨基从而获得肽化合物的氨基类似物 (参见例如 Briggs 和 Morely 1979 JCS Perkin I :2138-43;Yang 等人 2001 J Org Chem ; 66(22) :7303-12;Yang 等人 1999 J Am Chem Soc ;121(3) :589-590)。Perouzel 等人 (2003 Bioconj Chem ;14 :884-98) 报告了氨基功能化的脂质。

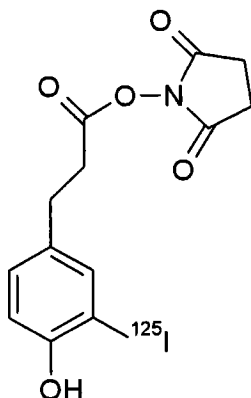
[0071] 式 III 化合物为活性酯。其中 R^2 为 $-L^1-Ar^1$ 时,式 III 化合物是用活性酯功能化的放射性碘芳基。其中 R^2 为 $-L^2-R^*$ 时,式 III 化合物是用活性酯功能化的生物分子。

[0072] 许多活性酯都容易购得。将羧酸转化为活性酯可通过与碳二亚胺/苯酚或转酯试剂 (例如三氟乙酸五氟苯基酯或三氟乙酸对硝基苯基酯) 反应实现。在肽化合物的合成中使用活性酯是本领域公知的 (参见例如 Grant “Synthetic Peptides (合成肽)” 2002; Oxford University Press :137-139;Anderson 等人 1963 J Am Chem Soc ;85 :3039)。本发明优选的活性酯为 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯。

[0073] 在一个优选实施方案中,式 III 化合物包含 $-L^1-Ar^1$,且这类化合物在间接放射性碘标记领域中是已知的。优选 L^1 为键或者 C_{1-3} 亚烷基连接体。 Ar^1 优选是放射性碘苯或放射性碘苯酚,即用放射性碘取代和任选地用羟基取代的苯基。

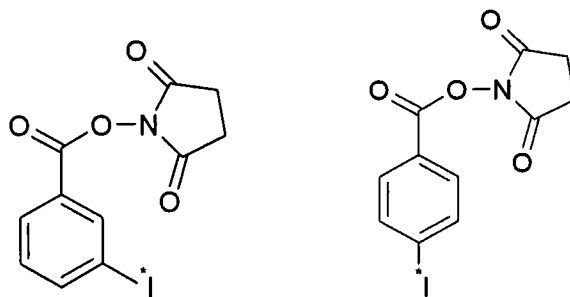
[0074] 间接放射性碘标记方法通常包含经 NHS 酯功能化的碘部分与伯胺的缀合。例如, Bolton 和 Hunter (1973 Biochem J ;133 :529-39) 描述了用 ^{125}I 标记蛋白质,其在蛋白质分子中通过 ^{125}I 碘标记的 3-(4-羟基苯基)丙酸 NHS 酯 (如下图) 与游离氨基的反应进行。

[0075]



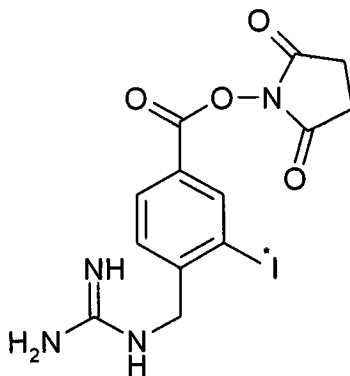
[0076] Koziorowski 等人 (1998 Appl Radiat Isot ;49(8) :955-9) 教导了怎样获得放射性碘标记的 3-和 4-碘苯甲酸 NHS 酯 (如下图,其中 *I 为放射性碘),它们是通常使用的间接放射性碘标记剂。

[0077]



[0078] 另一方案包括将蛋白质的游离氨基与4-胍基甲基-3- ^{125}I 碘苯甲酸N-琥珀酰亚胺基酯进行反应(如下图,Vaidyanathan & Zalutsky 2007 Nature Protocols ;2 :282-6)。

[0079]



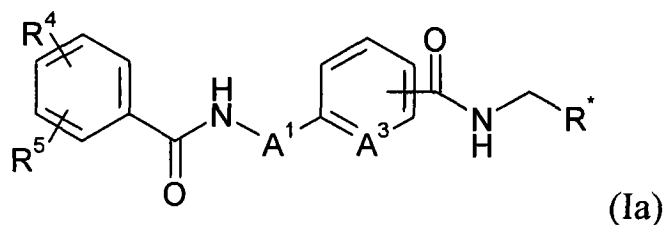
[0080] 优选将上述的放射性碘标记 NHS 酯化合物在本发明的方法中使用作为其中 R^2 为 $-\text{L}-\text{Ar}^1$ 的式 III 化合物。

[0081] 在一个优选实施方案中, L^1 和 L^2 独立地为键或 C_{1-3} 亚烷基连接体。

[0082] 优选化合物

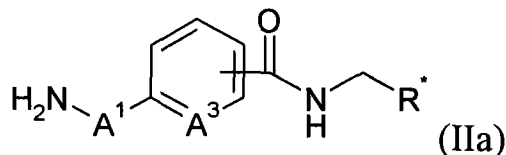
[0083] 在一个优选实施方案中,所述式 I 化合物为式 Ia 化合物:

[0084]



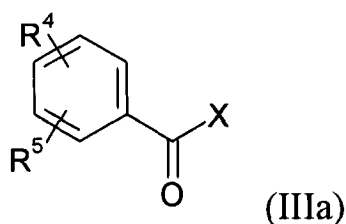
[0085] 所述式 II 化合物为式 IIa 化合物:

[0086]



[0087] 所述式 III 化合物为式 IIIa 化合物:

[0088]



[0089] 其中 A^3 为 N 或 CH, R^* 如上所述, R^4 和 R^5 中有一个为放射性碘, 且 R^4 和 R^5 中另一个为氢或羟基, 和 X 为如上所述的活性酯。

[0090] 优选 A^3 为 CH, 由于芳环上缺少杂原子, 其提供的优势在于反应能够更加特异性地在 A^1-NH_2 处进行。这是由于 N 杂原子能从胍 NH_2 上吸电子, 使其对于活性酯较不活泼。当 A^3 为 CH 时, 即该环为苯环, 吸电子效应就不会显现。

[0091] 在一个优选实施方案中, 本发明的方法用于获得放射性药物组合物 (在下文中作为本发明的一个单独的方面描述)。这种情况下, 本发明的方法进一步包含一个或多个以下步骤:

[0092] (i) 从式 I 的放射性碘标记的化合物中去除任意保护基; 和 / 或,

[0093] (ii) 将式 I 的放射性碘标记化合物和生物相容性的载体混合, 形成放射性药物组合物; 和 / 或,

[0094] (ii) 对步骤 (ii) 的药物组合物进行消毒; 和 / 或,

[0095] (iv) 对步骤 (ii) 的药物组合物去除热原。

[0096] 去除保护基可通过本领域技术人员熟知的方法进行 (Greene 和 Wuts, *supra*)。

[0097] 消毒和去除热原的方法也是技术人员熟知的。

[0098] “消毒”指有效杀灭或去除表面、设备、食物或药物制品或生物培养基中可传播介质 (比如真菌、细菌、病毒、孢子形式等) 的任意方法。消毒可通过施用热、化学品、辐射、高压或过滤来实现。

[0099] “去除热原”指去除溶液中的致热原, 大多数情况下是从可注射药物中去除热原。“致热原”定义为可以导致发热的任意物质, 例如细菌物质脂多糖 (LPS) 就是一种致热原, 它存在于一些细菌的细胞壁中。去除热原可通过过滤、蒸馏、色谱法或灭活来实现。

[0100] 自动化合成

[0101] 在一个优选方面, 本发明的方法, 如本文所适当和优选地定义, 为自动化的。自动化方法在放射性化合物的合成中尤为有用, 因为减少了操作人员的放射线暴露。特别是 PET 放射示踪剂现在通常方便地在自动化的放射合成装置中制备。有数种可以买到的这类装置的实例, 包括 TRACERlab™ 和 FASTlab™ (二者都来自 GE Healthcare)。这类装置一般包含有“卡盒”, 卡盒通常为一次性的, 在其中进行放射化学, 将其安装至该装置, 以进行放射合成。该卡盒通常包括流体通道、反应容器和用于接收试剂管瓶以及任何用于放射合成后清洁步骤中的固相萃取柱的口。

[0102] 放射性碘标记化合物

[0103] 式 I 的放射性碘标记化合物, 如本文对本发明方法的适当和优选地定义的, 是体内显像剂, 其中 Ar^1 的放射性碘取代基包含 ^{123}I , ^{124}I 或 ^{131}I 。术语“体内显像剂”意为设计用于在哺乳动物中靶向特定生理学或病理生理学的化合物, 且它在体内给药至哺乳动物体后能够被检测到。当由本发明方法获取的含放射性碘的化合物是一种体内显像剂时, 放射性

碘芳基部分中的碘原子选自 ^{123}I , ^{124}I 和 ^{131}I 。 ^{123}I 和 ^{131}I 同位素发射 γ 射线,其能够使用单光子发射断层摄影术 (SPECT) 检测到。 ^{124}I 同位素发射正电子,其可以使用正电子发射断层摄影术 (PET) 检测到。本发明体内显像剂优选的碘同位素为 ^{123}I 和 ^{124}I ,最优选 ^{123}I 。

[0104] 放射性药物组合物

[0105] 由本发明方法获取的放射性碘标记化合物可用于放射性药物组合物的制备,该组合物中包含本文所定义的式 I 的放射性碘标记化合物以及生物相容性载体,其适合用于哺乳动物给药。

[0106] “放射性药物组合物”在本发明中定义为一种配方,其包含本发明的放射性碘标记化合物和生物相容性载体,其为适合哺乳动物给药形式,优选适合对人给药。

[0107] “生物相容性载体”为流体,尤其是液体,其中如本文定义的含放射性碘的化合物为悬浮或溶解的,由此放射性药物组合物为生理学可耐受的,即,可以给药到哺乳动物体而不伴随毒性或过度的不适。生物相容性载体介质为适当的可注射的载液,比如注射用无菌、无致热原的水;水溶液比如盐水(其可为有利地平衡的,使最终产物为等渗或非低渗的);含有一种或多种张力调整物质(例如带有生物相容性抗衡离子的血浆阳离子的盐)、糖类(例如葡萄糖或淀粉)、糖醇(例如山梨醇或甘露醇)、二醇(例如甘油)或其他非离子多元醇物质(例如聚乙二醇、丙二醇等)的水溶液。生物相容性载体介质可能也含有生物相容性有机溶剂比如乙醇。这类有机溶剂有益于增溶更亲脂的化合物或配方。优选该生物相容性载体介质是无致热原的注射用水,等渗盐水或含水乙醇溶液。用于静脉注射的生物相容性载体介质的 pH 适当地在范围 4.0-10.5 内。

[0108] 该放射性药物组合物可以胃肠外给药,即,通过注射,并且最优选为水溶液。这样的组合物可任选地含有另外的成分,比如缓冲物;药用可接受的增溶剂(例如环糊精或表面活性剂比如普朗尼克 (Pluronic)、吐温或磷脂);药用可接受的稳定剂或抗氧化剂(比如抗坏血酸,龙胆酸或对-氨基苯甲酸)。

[0109] 试剂盒 (Kit) 与卡盒 (Cassette)

[0110] 本发明的方法可方便地通过试剂盒来完成。因此,在另一方面,本发明提供用于进行本发明方法的试剂盒,正如本文中适当和优选地定义的,其中所述试剂盒包含:

[0111] (1) 第一容器,其包含如本文定义的式 II 的化合物或如本文定义的式 IIa 的化合物;和,

[0112] (2) 第二容器,其包含如本文定义的式 III 的化合物或如本文定义的式 IIIa 的化合物。

[0113] 当使本发明的方法自动化时,试剂盒的第一和第二容器可收纳在一次性或可移动的卡盒中,该卡盒设计用于自动化合成装置。因此,在另一方面,本发明进一步提供用于自动化合成装置的卡盒,其包含如上文所述的用于本发明试剂盒中的成分。

[0114] 使用上述试剂盒或卡盒来制备本发明的放射性药物组合物尤其方便。因此在一个优选实施方案中,如本文所述,本发明的放射性药物组合物的制备中可使用本发明的试剂盒或卡盒。

[0115] 在又一个方面,本发明提供了本发明的试剂盒或卡盒的用途,其用来进行如本文所述的本发明的方法。

[0116] 对于试剂盒及其用途、卡盒及其用途,式 I-III 和式 Ia-IIIa 及其优选实施方案,

与上文中对本发明的方法所描述的相同。

[0117] 实施例简述

[0118] 除非另外说明,以下实施例中描述的所有试剂都是从 Sigma-Aldrich 或 BDH 获得的。

[0119] 50mM pH7.4 磷酸盐缓冲液使用 40.5ml 0.2M Na_2HPO_4 +9.5ml 0.2M NaH_2PO_4 用水加至 200ml 而制备。

[0120] 0.2M pH4 醋酸铵缓冲液使用 18ml 0.2M NH_4OAc +82ml 0.2M HOAc 用水加至 1 升而制备。

[0121] 实施例 1 是描述间接碘标记途径的比较实施例,其基于涉及 ^{18}F 标记(经由 HYNIC 功能化生物分子与 ^{18}F - 氟苯甲醛的缀合)的现有技术的教导。在 70°C 进行放射性碘标记步骤的放射化学纯度(RCP)为 15%。

[0122] 实施例 2 描述了包含 HYNIC 型肼、2- 肼基吡啶与琥珀酰亚胺基-3- 碘苯甲酸反应的本发明的间接碘标记方法。RCP 在 37°C 下为 21%。这个实施例的方法具有超出实施例 1 中描述的现有技术方法的优点,该优点在于它在生理温度下进行,该温度对于保持生物分子的结构和功能是最佳的。此外,实施例 2 的方法显示比实施例 1 的现有技术方法增加的产量。

[0123] 实施例 3 描述了实施例 2 方法中使用的中间产物 3- 三甲基甲锡烷基- 苯甲酸 2,5- 二氧代- 吡咯烷-1- 基酯的合成。

[0124] 实施例 4 证明 NHS 酯与肼基团的反应比与氨基的反应要更容易。

[0125] 实施例中使用的缩写

[0126] Ac 乙酰基

[0127] DCC 二环乙基碳二亚胺

[0128] DMF 二甲基甲酰胺

[0129] h 小时

[0130] HPLC 高效液相色谱法

[0131] LCMS 液相色谱- 质谱联用

[0132] Lys 赖氨酸

[0133] MeOH 甲醇

[0134] min 分钟

[0135] MS 质谱分析法

[0136] m/z 质荷比

[0137] NHS N- 羟基琥珀酰亚胺

[0138] NMR 核磁共振

[0139] RCP 放射化学纯度

[0140] TFA 三氟醋酸

[0141] THF 四氢呋喃

[0142] Thr 苏氨酸

[0143] TLC 薄层色谱法

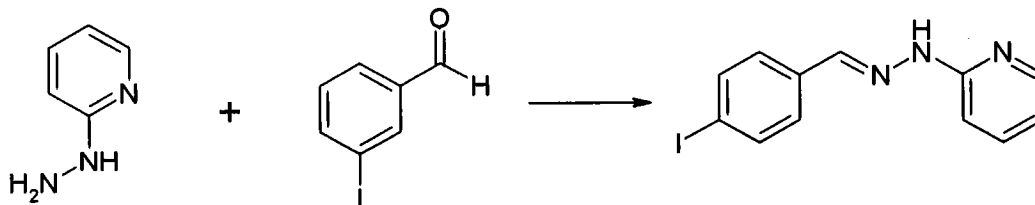
[0144] t_R 保留时间

[0145] UV 紫外线

实施例

[0146] 比较实施例 1 :N-[1-(4-碘苯基)-甲-(E)-亚基]-N'-吡啶-2-基-肼的合成

[0147]



[0148] 1(i) 用 ^{127}I 进行的反应

[0149] 用 4-碘苯甲醛和 2-肼基吡啶进行 ^{127}I 缀合,从而纯化产物并用质谱分析法分析以确认其本体。

[0150] 将 2-肼基吡啶和 4-碘苯甲醛溶解于乙醇中得到 9.2mM 和 4.3mM 的溶液。

[0151] 将下列物品按给定顺序加入到硅烷化(silanised)密封的 10ml 玻璃管瓶中:-

[0152] 10 μl 2-肼基吡啶 (9.2×10^{-8} 摩尔)

[0153] 170 μl 50mM pH7.4 磷酸盐缓冲液

[0154] 21 μl 4-碘苯甲醛 (9.1×10^{-8} 摩尔)

[0155] 配制品在用 HPLC 分析前以 37°C 加热 20 分钟:

[0156] 柱-Phenomenex Luna C18(2) 5 μm 4.6 $\times$ 150mm

[0157] 流速-1ml/min

[0158] 检测-UV 254nm 和 Bioscan 放射性检测器

[0159] 溶剂 A-0.1% TFA 水溶液

[0160] 溶剂 B-0.1% TFA 乙腈溶液

[0161] 梯度-0min 0% B

[0162] 20min 70% B

[0163] 25min 90% B

[0164] 27min 90% B

[0165] 28min 0% B

[0166] 35min 0% B

[0167] N-[1-(4-碘苯基)-甲-(E)-亚基]-N'-吡啶-2-基肼的峰用 HPLC 纯化。质谱分析法显示 324 的峰,这也是所期待产物的正确质量。

[0168] 1(ii) 用 ^{123}I 进行的反应

[0169] 将 2-肼基吡啶溶解于乙醇得到 9.2mM 的溶液。将 5 μl 过氧乙酸在 5ml 的水中稀释得到 5mM 的溶液。

[0170] 合成子制备

[0171] 将 37 μl 2.8mM 4-三正丁基锡苯甲醛(按 Sessler 等人, J Am Chem Soc 1995; 117(2):704-14 的方法制备)乙醇溶液 (1.0×10^{-7} 摩尔)加入硅烷化密封的 1.5ml 的“V”形管瓶中。将 200 μl 0.2M pH4 醋酸铵缓冲液和 10 μl 1mM ^{127}I 的 0.05M NaOH 溶液 (1.0×10^{-8} 摩尔)加入 ^{123}I 管瓶。将 10 μl 5mM 过氧乙酸加入 ^{123}I 管瓶。将 ^{123}I 管瓶的内

含物转移入该硅烷化密封的 1.5ml “V”形管瓶中。

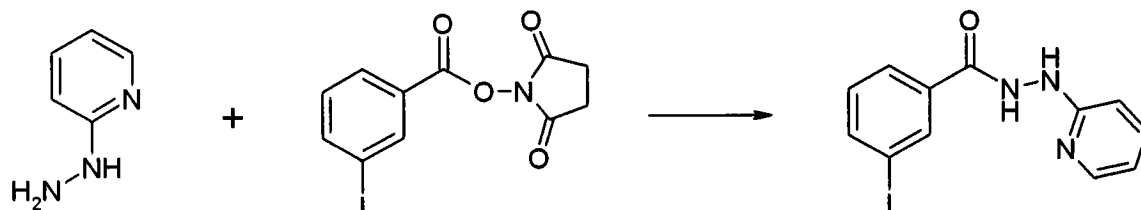
[0172] 缀合

[0173] 将 4.4 μ l 2-胍基吡啶 (4.0×10^{-8} 摩尔)、100 μ l 粗 4-碘苯甲醛和 100 μ l 50mM pH7.4 磷酸盐缓冲液加入到硅烷化密封的 10ml 玻璃管瓶中,将配制品在 70°C 下加热 10 分钟。

[0174] 按实施例 1 进行 HPLC,在 41.1 分钟的 t_r 显示 15% 缀合。有 38% 的碘化物和 47% 合成子剩余。

[0175] 实施例 2:3-碘苯甲酸 N'-吡啶-2-基酰肼的合成

[0176]



[0177] 2(i) 用 ^{127}I 进行的反应

[0178] 通过 3-碘苯甲酸 (1g, 4mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (464mg, 4mmol) 和二环乙基碳二亚胺 (DCC) (4ml 的 1M 二氯甲烷溶液, 4mmol) 的反应制备 3-碘苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯。反应混合物于室温下在 10ml DMF 中搅拌 6 小时。产生的白色沉淀物经过滤后除去,得到的滤液经真空浓缩和柱色谱法纯化得到 29% 的产量。

[0179] 进行 3-碘苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯和 2-胍基吡啶的 ^{127}I 缀合,从而纯化产物并用质谱分析法分析以确认其本体。

[0180] 2-胍基吡啶溶解于乙醇得到 9.2mM 的溶液。

[0181] 将下列物品按给定顺序加入到 10ml 硅烷化密封的玻璃管瓶中:

[0182] 20 μ l 2-胍基吡啶 (1.8×10^{-7} 摩尔)

[0183] 180 μ l 50mM pH7.4 磷酸盐缓冲液

[0184] 63 μ l 2.9mM 3-碘苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯 (1.8×10^{-7} 摩尔)

[0185] 在使用与对实施例 1 所述相同的 HPLC 分析前,将配制品在 37°C 下加热 30 分钟。3-碘苯甲酸 N'-吡啶-2-基酰肼的峰经 HPLC 纯化并用质谱分析法分析。质谱分析法显示 340 的峰,这正是所期待产物的正确质量。

[0186] 2(ii) 用 ^{123}I 进行的反应

[0187] 2(ii)(a) 合成子的制备

[0188] 将 2-胍基吡啶溶解于乙醇中得到 17mM 的溶液。将 10 μ l 过氧乙酸稀释在 5ml 水中,然后用水将 100 μ l 此溶液稀释到 1ml 得到 1mM 溶液。将 3-三甲基甲锡烷基-苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯 (在下面的实施例 3 中描述了合成) 溶解于 1% 的乙酸的甲醇溶液得到 0.26mM 的溶液。用 5ml 乙腈然后用 10ml 的水来调节 C18 SepPak。

[0189] 将 38 μ l 3-三甲基甲锡烷基苯甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷-1-基酯溶液 (1.0×10^{-8} 摩尔) 加入到硅烷化密封的 1.5ml “V”形管瓶中。

[0190] 将 200 μ l 0.2M pH4 醋酸铵缓冲液和 10 μ l 1mM Na^{127}I 的 0.05M NaOH 溶液 (1.0×10^{-8} 摩尔) 加入到 ^{123}I 管瓶中。

[0191] 将 ^{123}I 管瓶的内含物转移到硅烷化密封的 1.5ml “V”形管瓶中。

[0192] 将粗合成子加载到预先准备的 C18 Sep-Pak 上。用 5ml 水洗提碘化物。用 2.5ml 乙腈洗提合成子到硅烷化密封的管瓶中。在高真空下除去乙腈。

[0193] 2(ii)(c) 缀合

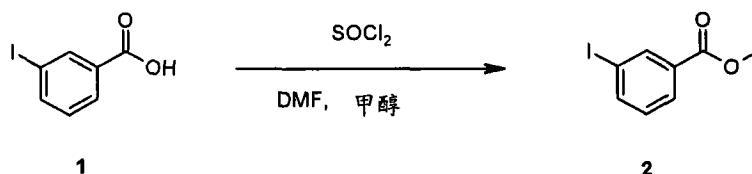
[0194] 将 6 μ l 2- 胍基吡啶 (1.0×10^{-7} 摩尔) 和 194 μ l 50mM pH7.4 磷酸盐缓冲液加入到干燥的合成子中, 配制品在 37°C 下加热 30 分钟。

[0195] HPLC 显示在 11.3 分钟的 t_R 有 21% 的产物。有 8% 的合成子留在粗反应中。

[0196] 实施例 3: 3- 三甲基甲锡烷基 - 苯甲酸 2,5- 二氧化代 - 吡咯烷 -1- 基酯的合成:

[0197] 3(i) 3- 碘苯甲酸甲酯 (2)

[0198]

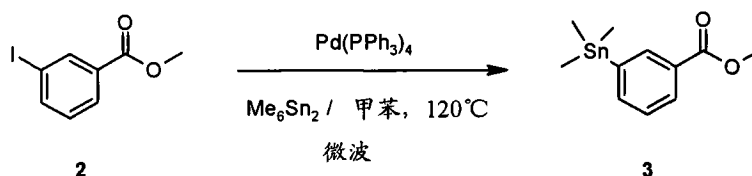


[0199] 将一滴二甲基甲酰胺加入 3- 碘苯甲酸 (1.0g, 4.03mmol) 在亚硫酰氯 (20ml) 中的搅拌悬浮液中。然后将混合物在 80°C 下加热 18 小时。冷却到室温后, 将溶剂完全蒸除, 然后缓慢加入甲醇 (20ml), 将混合物在室温下搅拌 30 分钟。甲醇的蒸发得到为油状的粗产物, 其在室温下静置而固化。粗产物用乙酸乙酯 / 己烷 (1 : 1) 经快速色谱法纯化, 获得为淡黄色晶体的纯净产物 (824mg, 78.4%)。

[0200] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ 3.95 (s, 3H, CH_3), 7.20 (t, 1H), 7.9 (d, 1H), 8.0 (d, 1H), 8.20 (s, 1H)

[0201] 3(ii) 3- 三甲基甲锡烷基 - 苯甲酸甲酯 (3)

[0202]



[0203] 向 3- 碘苯甲酸甲酯 (200mg, 0.76mmol) 和六甲基二锡 (643 μ l, 3.1mmol) 混合物的甲苯 (8ml) 溶液中加入四 (三苯基膦) 钯 (0) (180mg, 0.155mmol) (10mol%)。反应管用氩冲洗, 加盖后在微波炉中 120°C 下加热 15 分钟。冷却后, TLC (乙酸乙酯 / 己烷, 1 : 1) 显示全部转化为产物。然后将黑色悬浮液过滤 (滤纸), 将所得的黑色溶液蒸干。将残留物溶于乙酸乙酯 (15ml) 再用水 (6x10ml) 萃取。

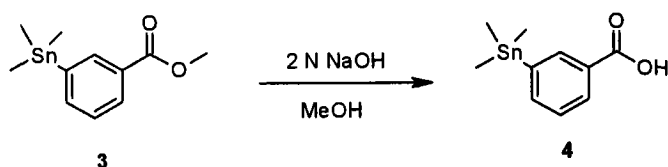
[0204] 然后将有机相进行干燥 (MgSO_4)、过滤和减压蒸发, 产生粗产物, 为深色油状物 (463mg), 其经快速色谱法 (乙酸乙酯 : 己烷, 1 : 1) 纯化, 得到微黄色油状物。产量 : 344mg (74%)

[0205] NB: 微波辐射是在 Personal Chemistry Emrys 合成仪中进行的。

[0206] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ 0.32 (s, 9H, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3$), 3.95 (s, 3H, CH_3), 7.40 (t, 1H), 7.69 (d, 1H), 8.0 (d, 1H), 8.20 (s, 1H)

[0207] 3(iii) 3- 三甲基甲锡烷基 - 苯甲酸 (4)

[0208]

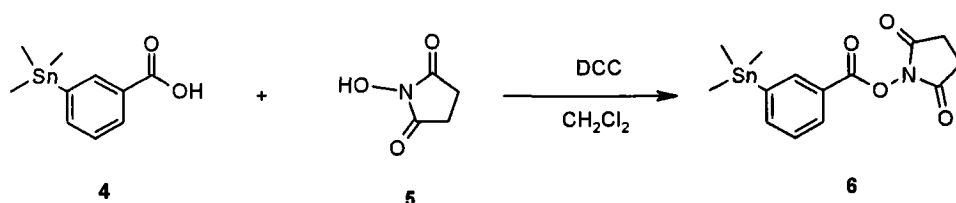


[0209] 将 3-三甲基甲锡烷基-苯甲酸甲酯 (148mg, 0.50mmol) 溶解到甲醇 (3ml) 中, 一边在室温下进行搅拌, 一边将含水的 2N 氢氧化钠 (1ml, 2mmol) 缓慢加入, 之后将混合物在该温度下搅拌 3 小时, 此时用 HPLC 监测指示水解已完成。然后将混合物蒸干并将残留物再次溶解于水 (4ml) 中, 通过缓慢加入 1M 盐酸进行酸化导致产物的沉淀。用二氯甲烷 (3x10ml) 萃取该混合物, 并将合并的二氯甲烷相干燥 (Na_2SO_4)、过滤和蒸发得到粗产物, 为白色固体物质。将其不经进一步纯化在下一步中使用。产量: 107mg (76%)。

[0210] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ 0.39 (s, 9H, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3$), 7.42 (t, 1H), 7.72 (d, 1H), 8.02 (d, 1H), 8.15 (s, 1H)

[0211] 3(iv) 3-三甲基甲锡烷基-苯甲酸 2,5-二氧代-吡咯烷-1-基酯 (6)

[0212]

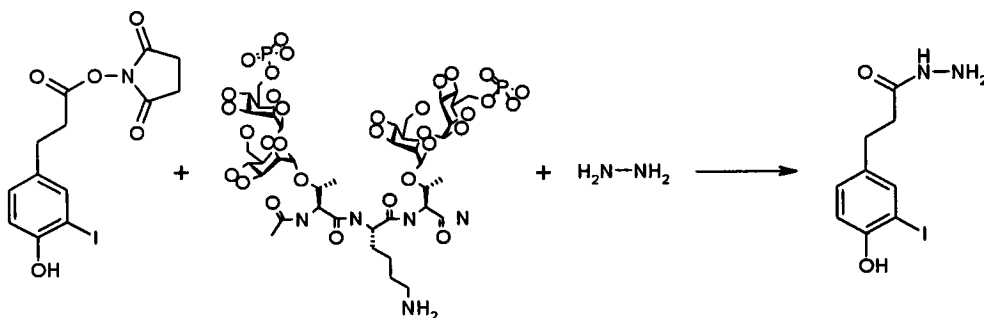


[0213] 先后将 N, N'-二(2-乙基-2-氧-1,3-二氧六氢-5H-苯并[d][1,2,4]氧杂噻吩-5-基)乙二胺, DCC (72mg, 0.35mmol) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (40.28mg, 0.35mmol) 加入到 3-三(三甲基甲锡烷基)-苯甲酸 (101mg, 0.35mmol) 的二氯甲烷溶液 (3ml) 中。将无色透明的混合物在室温下搅拌, 白色沉淀物在约 15 分钟后开始出现。在 1 小时后当 TLC (乙酸乙酯 / 己烷, 1 : 1) 显示初始物质完全消失时停止反应。将混合物过滤, 将蒸发掉溶剂后回收的残留物用乙酸乙酯 / 己烷 (1 : 1) 经快速色谱法纯化。得到纯净产物为无色油状。产量 : 90mg (67%)。

[0214] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ 0.25 (s, 9H, $\text{Sn}(\text{CH}_3)_3$), 2.88 (宽 s, 4H, $(\text{CH}_2)_2$), 7.42 (t, 1H), 7.74 (d, 1H), 8.03 (d, 1H), 8.20 (s, 1H)

[0215] 实施例 4:3-(4-羟基-3-碘-苯基)-丙酸酰肼的合成

[0216]



[20217] 将 5mg Ac-Thr(甘露糖-6-磷酸盐-甘露糖)-Lys-Thr(甘露糖-6-磷酸盐-甘露糖)-NH₂(“糖肽”;通过由 Chrstensen 等人, J Chem Soc Perkin Trans 1994;10:1299-1310 公开的方法合成)与 1.7mg 碘标记 Bolton-Hunter NHS 酯(“BH”;Wako pure chemical industries 199-09341)和对称可力丁(sym-collidine, 1.1 μL;Fluka 27690)在 1ml

DMF (Rathburn PTS6020) 中混合, 将混合物 (浑浊溶液) 在 35℃ 下加热 2 小时。消耗了所有的 BH, 并观察到与 BH- 胍缀合物对应的新峰, 其为唯一产物。加入更多的 BH (0.5mg) 和对称可力丁 (1.1 μ L), 继续在 35℃ 下搅拌 2 小时。绝大部分 BH 被消耗掉, 并且与 BH- 胍缀合物对应的峰升高了。加入丙酮 (100 μ L) 以与剩余的残留胍反应, 并在室温下搅拌混合物过夜。然后加入更多的 BH (2.0mg) 并在 35℃ 下继续搅拌 90 分钟。没有观察到 BH 的消耗, 表明所有的胍都已耗尽。加入更多的对称可力丁 (2.2 μ L) 并在 35℃ 下继续搅拌 2 小时。没有形成产物。加入水 (500 μ L) 以更好地溶解初始物质并在 35℃ 下继续搅拌过夜。形成少量产物。加入更多水 (2mL) 和 BH (1.8mg), 然后加入 THF (2mL) 以更好地溶解 BH, 并继续搅拌整夜。伴随水解的 BH 形成更多产物。真空下去除部分溶剂, 并用水 /0.1% TFA (8mL) 稀释残留物, 并进行 HPLC 纯化。

[0218] 上述反应的监测通过使用 Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20x2mm 柱经 LCMS 进行, 在 214nm 检测。溶剂 A :H₂O/0.1% TFA ; 溶剂 B :CH₃CN/0.1% TFA ; 流速 :0.6mL/min ; 梯度 : 经 5 分钟 0-30% B, t_R :3.11 分钟 (产物) ;3.40 分钟 (BH- 胍), 所得 m/z :1471.9 (产物) ; 306.9 (BH- 胍), 期望 MH⁺ :1472.3 (P (产物)) ;307 (BH- 胍)。

[0219] 纯化通过使用 Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250x21.20mm 柱经 HPLC 进行, 在 214nm 检测。溶剂 A :H₂O/0.1% TFA ; 溶剂 B :CH₃CN/0.1% TFA ; 流速 :10mL/min ; 梯度 : 经 40 分钟 0-30% B ; t_R :36-40 分钟。

[0220] 经纯化产物的分析通过使用 Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 20x2mm 柱经 LCMS 进行, 在 214nm 检测。溶剂 A :H₂O/0.1% TFA ; 溶剂 B :CH₃CN/0.1% TFA ; 流速 :0.6mL/min ; 梯度 : 经 5 分钟 0-30% B ; t_R :3.13 分钟 (产物)。所得 m/z :1471.9。期望 MH⁺ :1472.3。产量 :0.9mg (15%)。