



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103269721 B

(45)授权公告日 2016. 11. 30

(21)申请号 201180049714.6

S.M. 范登博世 M.S. 罗比拉德

(22)申请日 2011.10.11

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103269721 A

代理人 徐厚才 汪扬

(43)申请公布日 2013.08.28

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据
10187619.1 2010.10.14 EP

A61K 51/04(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.04.15

(56)对比文件

CN 102395380 A, 2012.03.28,

WO 2010/051530 A2, 2010.05.06,

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2011/054481 2011.10.11

Melissa L. Blackman, et al. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. 《J. AM. CHEM. SOC.》. 2008, 第130卷第13518-13519页.

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/049624 EN 2012.04.19

审查员 沈小春

(73)专利权人 皇家飞利浦电子股份有限公司
地址 荷兰艾恩德霍芬

(72)发明人 J. 卢布 W. 坦霍伊维 R. 罗斯辛

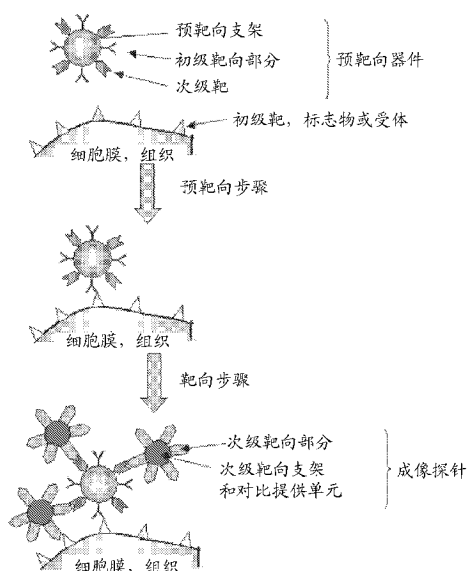
权利要求书6页 说明书46页 附图15页

(54)发明名称

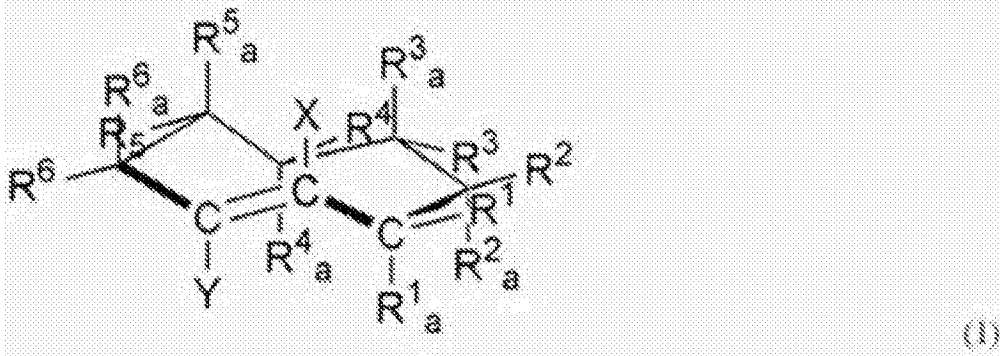
预靶向试剂盒、方法和其中使用的试剂

(57)摘要

本发明描述了用于靶向的医学成像和/或治疗的预靶向方法和相关的试剂盒,其中使用彼此显示出生物正交反应性的非生物反应性化学基团。本发明涉及使用[4+2]逆电子需求(逆)Diels-Alder化学来提供预靶向探针和效应物探针之间的耦合。为此,这些探针中的一个包含缺电子四嗪或其它合适二烯,而另一个是具有一个或多个直立取代基的E-环辛烯。

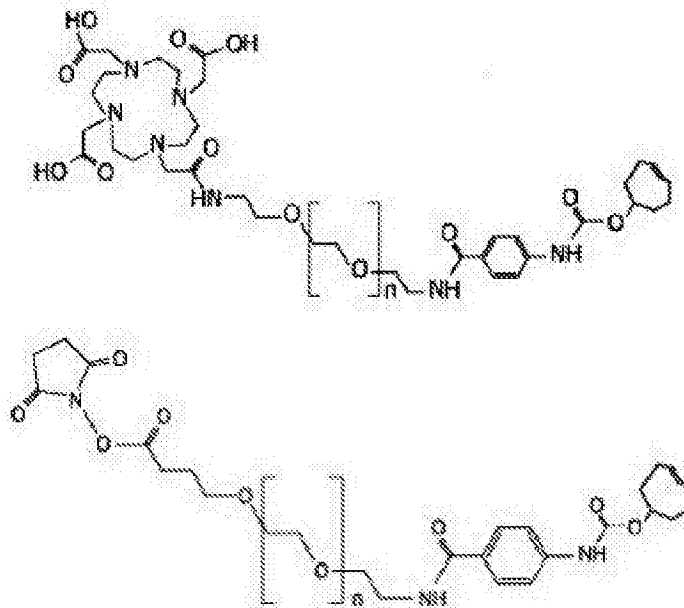


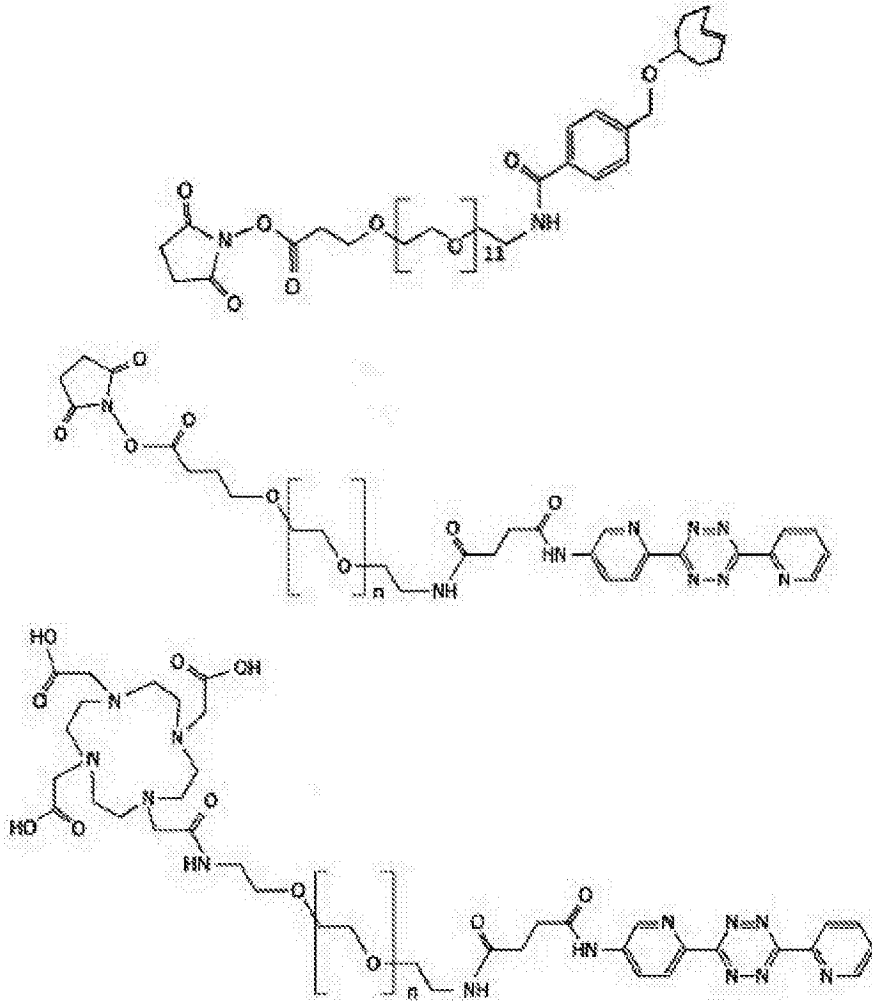
1. 用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒,其包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物探针,其中所述预靶向探针包含初级靶向部分和第一生物正交反应性基团,和其中所述效应物探针包含效应物部分,和第二生物正交反应性基团,其中所述第一和第二生物正交反应性基团的任一个是亲双烯体并且所述第一和第二生物正交反应性基团的另一个是二烯,其中所述亲双烯体是符合式(1)的8元环亲双烯体:



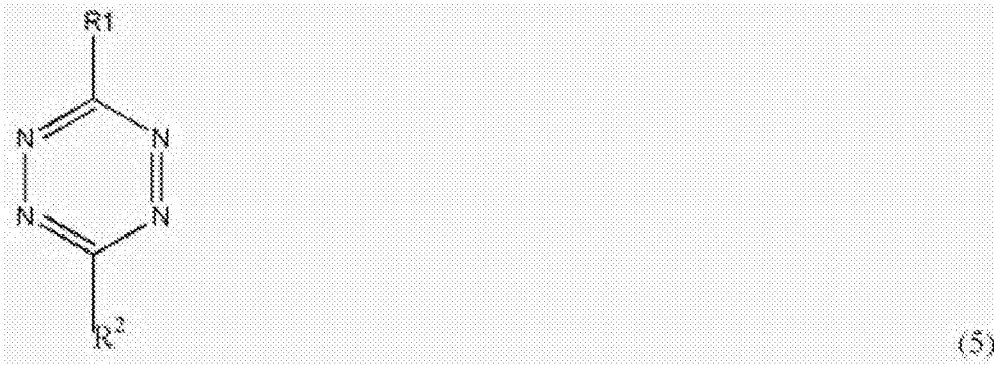
其中R的位置为平伏的和Ra的位置为直立的,其中X、Y、R、和Ra的每一个独立地代表H,或者最多六次代表选自以下组成的组的取代基:烷基、芳基、O-芳基、O-烷基、OCONR'-烷基其中R'是H、烷基或芳基、OCONR'-芳基其中R'是H、烷基或芳基;其中Ra中的一个包含在,任选地通过间隔体,至所述预靶向探针或所述效应物探针的连接体部分中;其中两个R或Ra部分能够一起形成环;和其中至少一个且最多四个Ra不是氢,

其中所述8元环亲双烯体不包括如下化合物:





其中所述二烯选自以下定义的式(5)的化合物：



其中R¹和R²各自独立地代表选自由以下组成的组的取代基：H、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、2,5-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基或苯基，任选地被一个或多个吸电子基团取代，所述吸电子基团选自NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、或Ar，其中R是C₁-C₆烷基和Ar代表芳基；和其中所述二烯包含至少一个，任选地通过间隔体，至所述预靶向探针或所述效应物探针的键。

2. 根据权利要求1的试剂盒，其中所述式(1)的亲双烯体符合以下一个或多个要求：

- a) X是甲基；
- b) Y是甲基。

3. 根据权利要求1的试剂盒,其中Ar代表苯基、吡啶基或萘基。

4. 预靶向试剂,其包含初级靶向部分和生物正交反应性基团,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求1或2任意一项中限定的式(1)的亲双烯体。

5. 成像探针,其包含可探测的标记物和生物正交反应性基团,该可探测的标记物是选自由以下组成的组的同位素: ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 和 ^{203}Pb ,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求1或2中限定的式(1)的亲双烯体。

6. 治疗探针,其包含药学活性化合物和生物正交反应性基团,该药学活性化合物是选自由以下组成的组的同位素: ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac ,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求1或2中限定的式(1)的亲双烯体。

7. 根据权利要求4的预靶向试剂在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于预靶向方法,该方法包括向受试者给予根据权利要求4的预靶向试剂并使所述试剂在所述受试者的体系中循环有效实现所述初级靶向部分到初级靶的结合的一段时间,接着从身体清除未结合的试剂。

8. 根据权利要求5的成像探针在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于成像方法,该方法包括:

—实施根据权利要求7的预靶向方法,接着给予成像探针,其包含可探测的标记物和生物正交反应性基团,该可探测的标记物是选自由以下组成的组的同位素: ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 和 ^{203}Pb ,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求3中限定的式(5)的二烯,或

—实施预靶向方法,其包括向受试者给予预靶向试剂,所述预靶向试剂包含初级靶向部分和生物正交反应性基团,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求3中限定的式(5)的二烯,并使所述试剂在所述受试者的体系中循环有效实现所述初级靶向部分到初级靶的结合的一段时间,接着从身体清除未结合的试剂,接着给予根据权利要求5的成像探针,

其中所述预靶向试剂和所述成像探针中的所述生物正交反应性基团一起形成所述[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

9. 根据权利要求6的治疗探针在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于受试者中的靶向的医学治疗方法,该方法包括:

—实施根据权利要求7的预靶向方法,接着给予治疗探针,其包含药学活性化合物和生物正交反应性基团,该药学活性化合物是选自由以下组成的组的同位素: ^{24}Na 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{76}As 、 ^{77}As 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Nb 、 ^{90}Y 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{121}Sn

、 ^{127}Te 、 ^{131}I 、 ^{140}La 、 ^{141}Ce 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{144}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{149}Tb 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{159}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{172}Tm 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{214}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac ,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求3中限定的式(5)的二烯,或

一实施预靶向方法,其包括向受试者给予预靶向试剂,所述预靶向试剂包含初级靶向部分和生物正交反应性基团,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求3中限定的式(5)的二烯,并使所述试剂在所述受试者的体系中循环有效实现所述初级靶向部分到初级靶的结合的一段时间,接着从身体清除未结合的试剂,接着给予根据权利要求6的治疗探针,

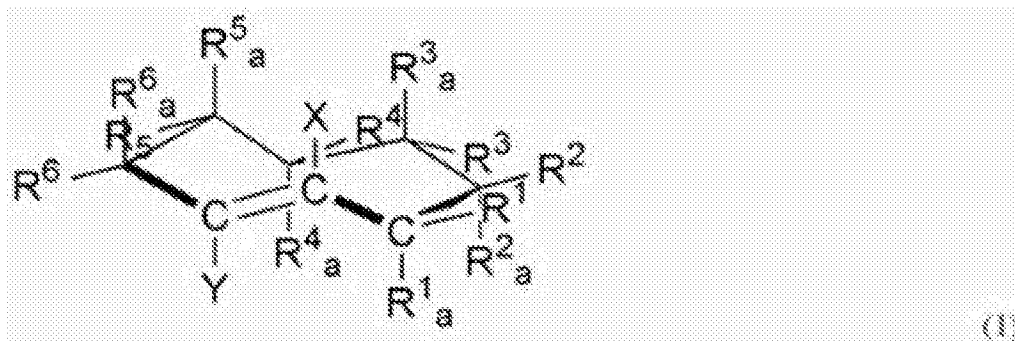
其中所述预靶向试剂和所述治疗探针中的所述生物正交反应性基团一起形成所述[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

10. 根据权利要求4的试剂在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于根据权利要求7到9任意一项的方法中。

11. 符合权利要求1或2任意一项中定义的式(1)的化合物在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于动物或人中的预靶向方法中。

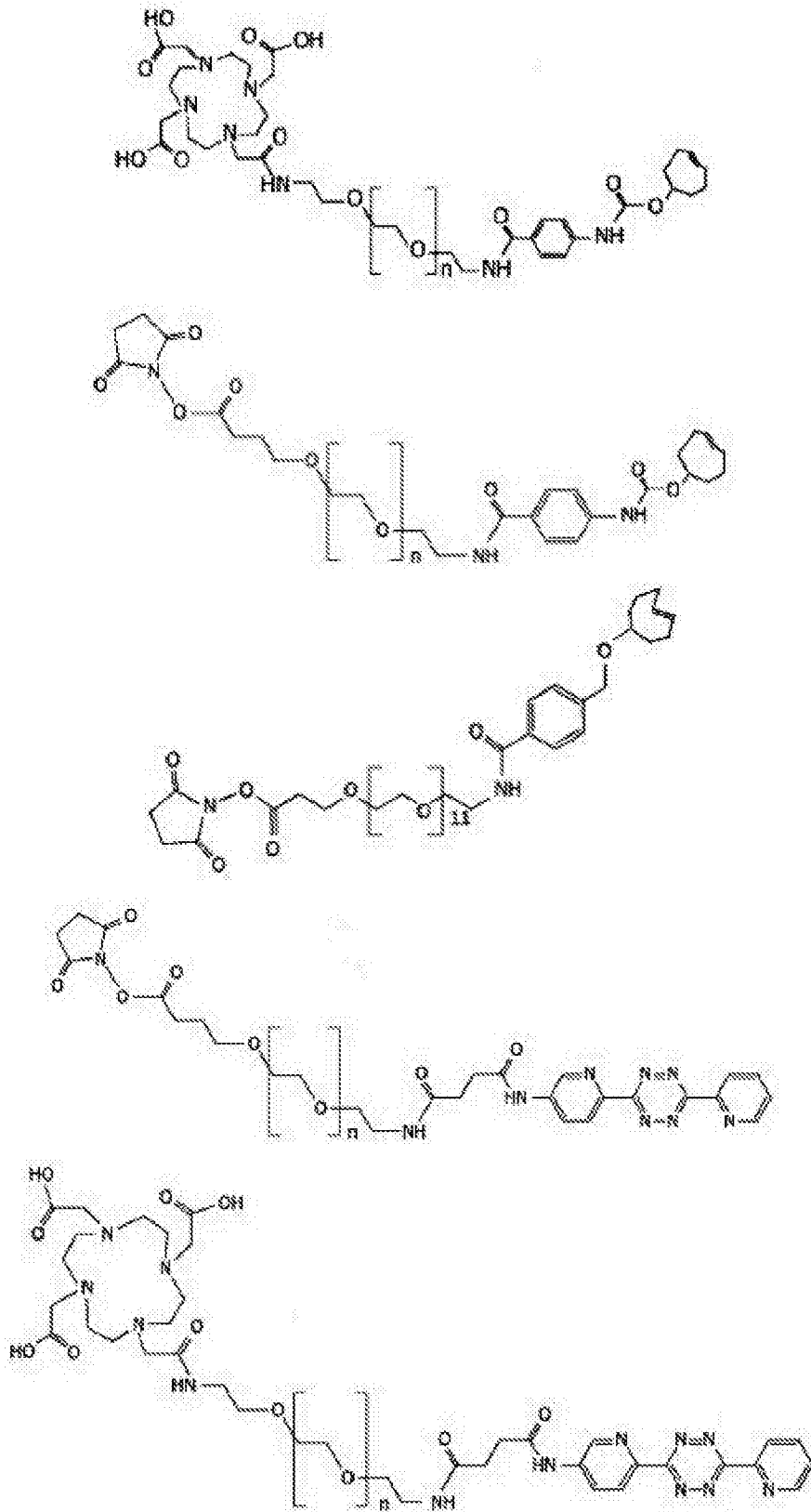
12. 具有一个或多个直立取代基的反式环辛烯,符合权利要求1或2中式(1)的化合物,在基于逆Diels-Alder反应的预靶向方法中作为亲双烯体反应物的用途。

13. 用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒,其包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物探针,其中所述预靶向探针包含初级靶向部分和第一生物正交反应性基团,和其中所述效应物探针包含效应物部分,和第二生物正交反应性基团,其中所述第一和第二生物正交反应性基团的任一个是亲双烯体和所述第一和第二生物正交反应性基团的另一个是二烯,其中所述亲双烯体是符合式(1)的8元环亲双烯体:

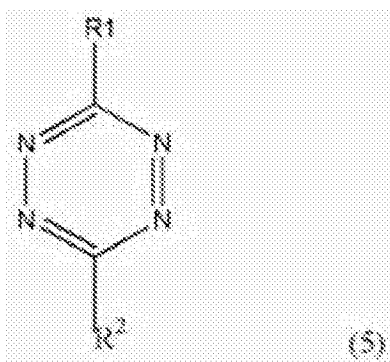


其中R的位置为平伏的和R_a的位置为直立的,其中X、Y、R和R_a的每一个独立地代表H,或最多六次代表选自由以下组成的组的取代基:烷基、O-烷基、O-芳基、OCONR' 烷基其中R' 是H或烷基、OCONR' 芳基其中R' 是H或烷基;其中R_a中的一个包含在,任选地通过间隔体,至所述预靶向探针或所述效应物探针的连接体部分中;其中两个R或R_a部分能够一起形成环;和其中至少一个且最多四个R_a不是氢,

其中所述8元环亲双烯体不包括如下化合物:



其中所述二烯选自以下定义的式(5)的化合物：



其中R¹和R²各自独立地表示选自由以下组成的组的取代基:2-吡啶基、苯基或被一个或多个吸电子基团取代的苯基,所述吸电子基团选自NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、或Ar,其中R是C₁-C₆烷基和Ar代表芳基。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其中Ar代表苯基、吡啶基或萘基。

15. 预靶向试剂,其包含初级靶向部分和生物正交反应性基团,其中所述生物正交反应性基团是根据权利要求13中定义的式(5)的二烯和根据权利要求13中定义的式(1)的亲双烯体之间的[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

16. 根据权利要求1或13的试剂盒,其中所述效应物部分为标记物或药学活性化合物。

预靶向试剂盒、方法和其中使用的试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于靶向的医学成像和/或治疗的预靶向方法(pretargeting method),其中使用彼此显示出生物正交(bio-orthogonal)反应性的非生物(abiotic)反应性化学基团。本发明还涉及含有至少一种预靶向探针(pre-targeting probe)和至少一种效应物探针(effector probe)的预靶向试剂盒(kit),其中所述预靶向探针包含初级靶向部分(primary targeting moiety)和第一生物正交反应性基团,和其中所述效应物探针包含效应物部分,例如标记物或药学活性化合物,和第二生物正交反应性基团。本发明还涉及在上述方法和试剂盒中使用的预靶向试剂。本发明特别地涉及核成像和放射疗法。

背景技术

[0002] 在医学诊断和治疗的许多领域中,希望选择性地将试剂,例如治疗剂(药物)或诊断(例如成像)剂递送到受试者(subject)例如病人体内的特定位置或有限区域。

[0003] 器官或组织的活性靶向通过所希望的活性部分(例如对比增强剂或细胞毒素化合物)对靶向结构的直接或间接结合实现,其与细胞表面结合或促进在感兴趣的靶位点处或附近的细胞摄取。用于靶向此类试剂的靶向部分典型地是对细胞表面靶(例如膜受体)、结构蛋白(例如淀粉样斑)或细胞内靶(例如RNA、DNA、酶、细胞信号通路)具有亲和性的结构。这些部分可以是抗体(片段)、蛋白质、适体(aptamers)、寡肽、寡核苷酸、寡糖以及肽、拟肽(peptoids)和已知在特定疾病或障碍处积累的有机药物化合物。作为选择,对比/治疗剂可以靶向代谢途径,其在疾病(例如感染或癌症)期间表达升高,例如DNA、蛋白质和膜合成和碳水化合物摄取。在患病组织中,上述标志物可以将患病细胞从健康组织区分并提供早期检测、特异性诊断和(靶向的)治疗的独特可能性。

[0004] 通常对于成功的分子成像/治疗剂和特别对于核成像/治疗剂一个重要标准是它们呈现高靶摄取,同时显示出从非靶组织和从血液的快速清除(通过肾脏和/或肝胆体系)。但是,这经常存在问题:例如,人中的成像研究已经显示,在肿瘤位置处经放射标记的抗体在24小时内可达到最大浓度,但需要另外几天在循环中的所述经标记的抗体的浓度才下降到低至足以发生成功成像的水平。

[0005] 在靶组织中的缓慢或不充分积累以及从非靶区域缓慢清除所带来的这些问题(特别是对于核成像和治疗)已经导致预靶向方法的应用。

[0006] 预靶向是指在靶向方法中的步骤,其中向初级靶(例如细胞表面)提供有预靶向探针。后者包括次级靶,其最后将通过装备有次级靶向部分的进一步的探针(所述效应物探针)进行靶向。

[0007] 这样,在预靶向中,将预靶向探针结合到初级靶。所述预靶向探针还携带次级靶,其促进对诊断(成像)和/或治疗剂,所述效应物探针的特异性结合。在形成所述预靶向探针的结构已经定位在靶位点处之后(花费时间例如24小时),如果自然清除不充分,则可以使用清除剂从血液除去过量的部分。在第二培育步骤(优选采取较短的时间,例如1-6小时)中,所述效应物探针通过它的次级靶向部分(secondary targeting moiety)结合到所述

(预)结合的预靶向探针。所述次级靶(存在于所述预靶向探针上)和所述次级靶向部分(存在于所述效应物探针上)应该以高特异性和高亲和性快速结合,并且在体内应该是稳定的。

[0008] 对于成像,预靶向的一般概念在图1中绘出。在这里,所述效应物探针是包含用于成像模式的检测标记物的成像探针。所述效应物探针通过其次级靶向基团结合到所述(预)结合的预靶向探针。

[0009] 次级靶/次级靶向部分对的一般例子是生物素/抗生物素蛋白链菌素或抗体/抗原体系。为了有效,所述效应物探针必需快速从体内排出(例如通过肾脏)以提供所希望的具有相对低的非靶积累的高肿瘤积累。因此,这些探针通常很小。

[0010] 在核成像和放射疗法中,预靶向的概念具有进一步的益处,因为花费时间的预靶向步骤可以不必使用放射性核素实施,而使用放射性核素的次级靶向步骤能够更快地实施。后者使得能够使用较短寿命的放射性核素,具有将对病人的放射剂量最小化的优点,例如使用PET试剂代替SPECT试剂。结合多齿配体体系(抗生物素蛋白链菌素、树枝状聚合物(dendrimers))在MRI中使用预靶向方法能够在靶位点处提供信号放大。此外,通常该方法有利于通用对比剂的使用。

[0011] 通常在生物学中(如抗体-抗原)和特别在预靶向中(生物素-抗生物素蛋白链菌素、抗体/半抗原、反义寡核苷酸)实施高度选择性相互作用的实体非常大。因此,使用肽和小有机部分作为初级靶向基团的预靶向,以及代谢成像和细胞内靶成像,由于次级靶的尺寸使得小初级基团的使用毫无意义而仍然无法实现。

[0012] 而且,现有的预靶向体系被与它们的生物特性相关的因素所限制。生物素是内源分子,并且它的缀合物(conjugates)能够通过血清酶生物素酶断开。当使用反义预靶向时,所述寡核苷酸会受到RNase和DNase的攻击。蛋白质和肽也经历自然分解途径。这些相互作用可被它们的非共价和动态特性以及有限的靶上驻留时间进一步削弱。而且,内源性生物素与生物素缀合物竞争抗生物素蛋白链菌素结合。最后,抗生物素蛋白链菌素是高度免疫原性的。

[0013] 近来的一个发展是避免与仅基于天然/生物靶向结构(即生物素/抗生物素蛋白链菌素、抗体/半抗原、反义寡核苷酸)的预靶向相关的缺点。

[0014] 这方面的一篇文献是WO 2010/051530,其中基于某些二烯例如四嗪类和亲双烯体例如反式-环辛烯醇(*trans*-cyclooctenol, TCO)之间的反应性对预靶向进行了讨论。

[0015] 这方面的一篇进一步的文献是Li等, *Chemical Communications*, 2010, 46 (42), p. 8043-8045,其描述了基于3,-二芳基-s-四嗪和¹⁸F-标记的反式-环辛烯之间的Diels-Alder反应的用于生物结合的放射标记方法。

[0016] Rossin等, *Angew. Chem. Int., Ed* 2010, 49, p. 3375-3378涉及通过使用逆电子需求的Diels-Alder反应(inverse-electron-demand Diels-Alder reaction)的肿瘤预靶向。

[0017] Blackman等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, p. 13518-13519描述了基于逆电子需求的Diels-Alder反应性的快速生物结合。

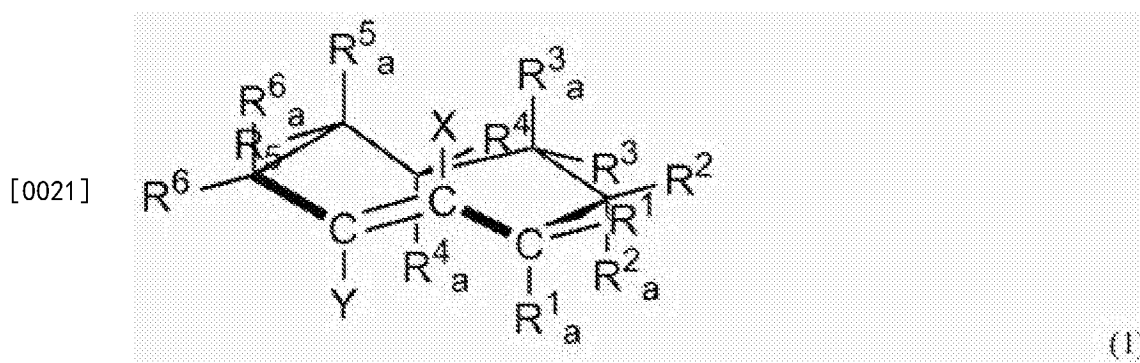
[0018] Royzen等, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, p. 3760-3761涉及通过金属络合驱动的官能化的反式-环辛烯的光化学合成。

[0019] 尽管在这些体系的基础上能够获得相对快速的反应,但这还远不如上述生物素-抗生物素蛋白链菌素体系的反应性。因此,避免后者的缺点,却牺牲了所述反应的主要要求,即

速度。因此,希望提供一种体系,其不以如上讨论的生物分子为基础,并且还具有理想的快速反应速率。

发明内容

[0020] 为了更好地满足上述愿望,本发明一方面提供了用于靶向的医学成像和/或治疗的试剂盒(kit),其包含至少一种预靶向探针和至少一种效应物探针,其中所述预靶向探针包含初级靶向部分和第一生物正交反应性基团,和其中所述效应物探针包含效应物部分(例如标记物或药学活性化合物)和第二生物正交反应性基团,其中所述第一和第二生物正交反应性基团的任一个是亲双烯体(dienophile),而所述第一和第二生物正交反应性基团中的另一个是二烯,其中所述亲双烯体是满足式(1)的8元环亲双烯体:



[0022] 其中R的位置是平伏的(equatorial)和R_a的位置是直立的(axial),其中X、Y、R、和R_a的每一个独立地代表H,或者最多六次(in at most six instances)代表选自自由以下组成的组的取代基:烷基、芳基、O-芳基、O-烷基、S-芳基、S-烷基、S(O)-芳基、S(O)-烷基、S(O)₂-芳基、S(O)₂-烷基、Si-芳基、Si-烷基、Si-O-烷基、OCO-烷基、OCO-芳基、SCO-烷基、SCO-芳基、OCS-烷基、OCS-芳基、SCS-烷基、SCS-芳基、F、Cl、Br、I、N₃、SO₂H、SO₃H、SO₄H、PO₄H、OH、SH、NO₂、NO、CN、OCN、SCN、NCO、NCS、CF₃、NR'R''其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基、C(=O)-烷基、C(=O)-芳基、C(=S)-烷基、C(=S)-芳基、C(=O)S-烷基、C(=O)S-芳基、C(=S)S-烷基、C(=S)S-芳基、C(=O)NR'R''其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基、NR'CO-烷基其中R'是H、烷基或芳基、NR'CO-芳基其中R'是H、烷基或芳基、NR'C(=O)-烷基其中R'是H、烷基或芳基、NR'(C=O)-芳基其中R'是H、烷基或芳基、OCONR'-烷基其中R'是H、烷基或芳基、OCONR'-芳基其中R'是H、烷基或芳基、NR'CONR''-烷基其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基、NR'CONR''-芳基其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基、NR'CSNR''-烷基其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基和NR'CSNR''-芳基其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基、CR'NR''其中R'和R''各自独立地是H、烷基或芳基;其中R_a中的一个包含在任选地通过间隔体至所述预靶向探针或效应物探针的连接体部分(Linker Moiety)中;其中两个R或R_a部分可以一起形成环;和其中至少一个且最多四个R_a不是氢。

[0023] 另一方面,本发明提供了预靶向方法,以及其中使用的预靶向试剂,和其中使用该试剂盒的靶向的医学成像或疗法。

[0024] 再一方面,本发明是满足上述式(1)的化合物,其用于动物或人类中的预靶向方法中。

[0025] 又一方面,本发明在于具有一个或多个直立取代基(axial substituents)的反

式-环辛烯在基于逆Diels-Alder反应的预靶向方法中作为亲双烯体反应物的用途。

附图说明

[0026] 图1描绘了如上所述的预靶向概念的一般方案。

[0027] 图2提供了用于[4+2]Diels-Alder反应的反应方案；在(3,6)-二-(2-吡啶基)-s-四嗪和E-环辛烯之间,接着是其中形成产物和分子氮的逆Diels-Alder反应。因为所述反式-环辛烯衍生物不像经典Diels-Alder反应中那样包含吸电子基团,所以这种类型的Diels-Alder反应与经典的Diels-Alder反应不同,并且通常称为“逆电子需求Diels-Alder反应”。在下文中,两个反应步骤序列即最初的Diels-Alder环加成反应(典型地是逆电子需求Diels-Alder环加成)和后续的逆Diels-Alder反应将简称为“逆Diels-Alder反应”或“逆DA”。图3(a和b)描绘了利用逆Diels-Alder化学用于预靶向的一般方案。

[0028] 图4提供了利用涉及TCO-改性的mAb(B)和放射标记的四嗪(A)的逆-DA的肿瘤预靶向方案。

[0029] 图5到图10示出了实施例中涉及的化合物的合成方案。

[0030] 图11示出了环辛烯醇的以下讨论的E-次要和E-主要异构体,以及Z异构体的对比,示出了立体化学。

[0031] 图12示出了四嗪-DOTA探针28的结构。

[0032] 图13描绘了三种不同的环辛烯亲双烯体在小鼠中的体内稳定性。

[0033] 图14示出了活小鼠的SPECT/CT投影。

[0034] 图15描绘了四嗪探针28的替代合成过程,和相应的Gd-络合物,28-Gd^{III}的合成。

[0035] 图16示出了四嗪模型探针35、38、40和42的合成路线。

[0036] 图17示出了新型TCOs的合成路线。

[0037] 图18提供了在PBS中在低浓度下TCO(20a或20b)和载体加入的(carrier added) ¹⁷⁷Lu-四嗪28(1eq.)之间的归一化反应收率。

[0038] 图19提供了对血液清除进行校正的CC49-结合的TCO 20b的体内稳定性。所述数据点代表平均值和所述误差棒代表一个标准偏差(n=3)。

[0039] 图20示出了CC49-TCO(20b)结构的血液曲线。数据点代表平均值和误差棒表示一个标准偏差(n=3)。

[0040] 图21提供了无肿瘤小鼠中CC49-TCO(20b)结构的生物分布。柱代表平均值和误差棒代表一个标准偏差(n=3)。

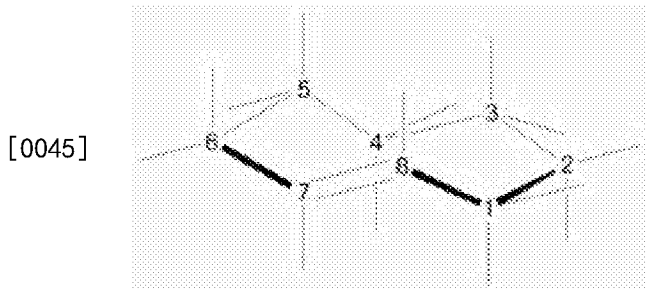
[0041] 图22示出了¹²⁵I-CC49和¹²⁵I-CC49-TCO 44b(7.5)在无肿瘤小鼠(n=3)中的血液动力学。数据以具有一个标准偏差(误差棒)的百分比注射剂量/克(%ID/g)给出。

[0042] 图23提供了mAb注射 4天后¹²⁵I-CC49(空心柱)和¹²⁵I-CC49-TCO 44b(7.5)(实心柱)在无肿瘤小鼠中(n=3)中的生物分布。所述柱代表具有一个标准偏差(误差棒)的百分比注射剂量/克(%ID/g)。

[0043] 图24示出了结合到CC49的TCO 44b的体内稳定性。数据点是具有一个标准偏差(误差棒)的三次测量的平均,拟合为二阶多项式(Prism GraphPad v. 5.01)。

具体实施方式

[0044] 下文中以E-环辛烯表示本发明中使用的张力环辛烯(strained cyclooctene)亲双烯体。根据常规命名法,将理解作为取代X或Y的结果,取决于取代基的位置和分子量,相同的环辛烯异构体形式上可以变成表示为Z-异构体。在本发明中,本发明的任何取代变体,无论是否形式上是“E”或“Z”,或“顺式”或“反式”异构体,都将被认为是未取代的反式-环辛烯,或未取代的E-环辛烯的衍生物。术语“反式-环辛烯”(TCO)以及E-环辛烯可以互换使用并且对于根据本发明的所有亲双烯体,以及对于取代基形式上将需要相反的命名的情况,都适用。即本发明涉及其中如下编号的碳原子1和6位于E(*entgegen*)或反式位置的环辛烯。



[0046] 在一般意义上,本发明基于这样一个认识:在使用衍生的反式-环辛烯,例如以反式-环辛烯醇的形式,作为亲双烯体的体系中,选择其中用于衍生成连接体结构的羟基处于直立位置的异构体。E-环辛烯醇,其处于所谓的冠式构象(*crown conformation*),具有两种异构体,在平伏位置(*equatorial position*)具有OH的一种是主要异构体和直立位置具有OH的一种是次要异构体。根据本发明选择所述后一种异构体,并且在下文以“E-次要”表示。

[0047] 不希望被理论所限,本发明人相信,基于这一发现,TCO上一个或多个直立取代基的存在为解决基于所述逆Diels-Alder反应的预靶向中对于更高反应性的需求提供了答案。

[0048] 广义上,本发明因此扩展到超出关于如上提供的式(1)给出的取代基定义。存在一个或多个直立取代基的事实据信导致较高的HOMO能量。HOMO,如本领域技术人员所知,代表最高占据分子轨道。根据本发明,使用MOPAC模拟来确定所述TCO的HOMO能量。MOPAC (Molecular Orbital Package, 分子轨道包)是计算化学领域中公知的软件。所述MOPAC软件包包括几种众所周知的半经验分子轨道方法,包括AM1和PM3。术语AM1和PM3是指不同的哈密顿函数(Hamiltonians),即Austin Model 1和参数化的模型3哈密顿函数(对于AM1,还请见M. J. S. Dewar等, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902 (1985);对于PM3,还请见J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, 10, 209 (1989)和*J. Comput. Chem.*, 10, 221 (1989))。

[0049] 在本发明中,使用包含以下的方法:在计算机环境中,提供环辛烯的衍生物的分子结构,通过确定最低形成能量优化各分子结构,确定所述AM1和PM3哈密顿函数并从而确定最高占据分子轨道(HOMO)。

[0050] 表6中的MOPAC数据显示直立取代基的存在服务于在所述反式-环辛烯环中提供增加的HOMO能量的目的。

[0051] 将就特定的实施方案并参考某些附图进一步描述本发明,但本发明并不受这些所限制而只由权利要求限制。权利要求中的任何附图标记都不应解释为限制范围。所描述的附图仅仅是示意性的而非限定性的。在所述附图中,出于说明目的一些要素的尺寸可能被

夸大并且不按比例画出。在本说明书和权利要求中当使用术语“comprising”时,其并不排除其它要素或步骤。当涉及单数名词使用不定冠词或定冠词例如“a”或“an”、“the”时,除非另外特别说明否则其包括多个(种)所述名词。

[0052] 此外,还要注意说明书和权利要求中使用的术语“comprising”不应被解释为限于随后列举的设备;其不排除其它要素或步骤。因此,表述“包含设备A和B的装置”的范围不应被限定为仅由组件A和B组成的装置。其表示,就本发明而言,所述装置的仅有相关组件是A和B。

[0053] 在几个化学式中涉及“烷基”和“芳基”。在这方面,“烷基”各自独立地表示不超过十个碳原子的脂肪族直链、支链或环状烷基基团,其可包括1-3个杂原子例如O、N或S,优选具有1-6个碳原子,和“芳基”各自独立地表示不超过十个碳原子的芳基或杂芳基,其可包括1-3个杂原子例如N或S。在几个化学式中,关于字母例如“A”、“B”、“X”、“Y”和各种编号的“R”基团表示了基团或取代基。这些字母的定义将参考各式进行解读,即在不同的式中,除非另外说明,否则这些字母可各自独立地具有不同的意义。

[0054] 在本发明的进一步优选的实施方案中,在以下几个化学式中涉及“烷基”和“芳基”。在这方面,“烷基”各自独立地表示不超过10个碳原子的脂肪族的、直链的、支链的、饱和的、不饱和的和/或环状的烃基,其可包括1-10个杂原子例如O、N、或S,和“芳基”各自独立地表示不超过20个碳原子的芳基或杂环芳基,其可以是被取代的,并且其可以包括1-10个杂原子例如O、N、P或S。“芳基”还包括“烷芳基”或“芳烷基”(简单的例子:苄基)。“烷基”、“芳基”、“烷芳基”和“芳烷基”包含的碳原子数可以通过此类术语前面的称号表示(即C₁-C₁₀烷基指所述烷基可包含1到10个碳原子)。本发明的某些化合物具有手性中心和/或互变异构体,并且所有的对映异构体、非对映异构体(diastereomers)和互变异构体,以及它们的混合物都在本发明的范围之内。

[0055] 逆Diels-Alder反应

[0056] 逆Diels-Alder耦合化学通常包括耦合以形成不稳定中间体的反应物对,所述中间体通过逆Diels-Alder反应消除作为唯一副产物的小分子(取决于起始化合物其可以是例如N₂、CO₂、RCN)以形成稳定产物。所述成对反应物包括作为一种反应物(即一种生物正交反应性基团)的适合的二烯,例如四嗪衍生物如缺电子四嗪,和作为另一种反应物(即另一种生物正交反应性基团)的根据式(1)的张力(strained)环辛烯。

[0057] 例如缺电子(取代的)四嗪与本发明的张力E-环辛烯的异常快速的反应导致了连接反应中间体(ligation intermediate),其在[4+2]逆Diels-Alder环加成中通过消除作为唯一副产物的N₂重排为稳定的二氢哒嗪。这在图2中示出。

[0058] 这两种反应性物类是非生物的,因此不经历快速的体内代谢。它们是生物正交的,例如它们在生理介质中彼此选择性地反应。关于这点的一个优点在于所述二烯和所述环辛烯都基本上对细胞内或细胞表面上的生物分子和所有其它区域如血清等是非反应性的。因此,本发明的化合物和方法能够在活细胞、组织或生物体(organism)中使用。而且,所述反应性基团相对较小并且能够引入生物试样或活生物体中而不显著改变生物学尺寸。利用所述[4+2]逆Diels-Alder反应,可以利用小的反应参与者例如四嗪或环辛烯将大尺寸的初级靶向部分例如抗体与标记物或其它分子结合。甚至更有利地,利用(匹配的)相对小的反应参与者例如四嗪和环辛烯,可以使相对小的初级靶向部分例如肽与标记物或其它分子结

合。所述预靶向探针和效应物探针的尺寸和性质不受所述次级靶和次级靶向部分的大影响,使得(预)靶向方案能够用于小的靶向部分。因为这样,能够靶向其它组织,即所述探针的目的地不限于脉管系统(vascular system)和胞间隙(目前使用抗体-抗生蛋白链菌素的靶向通常是限于脉管系统和胞间隙)。

[0059] 关于逆电子需求Diels-Alder反应和反应性物类对的行为的文献包括: Thalhammer, F; Wallfahrer, U; Sauer, J, Tetrahedron Letters, 1990, 31 (47), 6851-6854; Wijnen, JW; Zavarise, S; Engberts, JBFN, Journal Of Organic Chemistry, 1996, 61, 2001-2005; Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130 (41), 13518-19), R. Rossin, P. Renart Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375, N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, Angew Chem Int Ed 2009, 48, 7013和Devaraj等, Angew.Chem.Int.Ed., 2009, 48, 1-5。

[0060] 应该理解,广义上,根据本发明上述耦合化学基本上可以应用于预靶向中能够使用的任何分子、基团或部分对。即一个这样的对将包含初级靶向部分,其能够结合到初级靶,和进一步包含至少一个次级靶。另一个将是适合用于结合到所述次级靶的次级靶向部分,和进一步包含适合发挥治疗作用(典型地是药理学活性化合物),或适合通过成像技术定位(即标记物)或两者的部分。

[0061] 因此,根据本发明,所述预靶向探针和所述效应物探针中的任一被上面限定的直立取代的环辛烯官能化,而另一个被四嗪或其它适合的二烯官能化。这在图3中示出。上部的方案(图3a)示出了预靶向探针,含有通过连接体部分(任选包含柔性间隔体)与作为初级靶向部分的抗体连接的二吡啶基四嗪,和效应物探针,含有通过连接体(柔性间隔体)与可检测标记物连接的环辛烯(作为次级靶向部分)。下面的方案(图3b)示出了正好相反的方案,即包含环辛烯的预靶向探针和包含四嗪的效应物探针。

[0062] 尽管所述图中没有清楚示出立体化学,应该理解,在本发明中所述环辛烯是依照如上定义的式(1)的直立取代的环辛烯。

[0063] 亲双烯体

[0064] 本发明的一个基本成就在于选择亲双烯体,即根据如上定义的式(1)的直立取代的TCO,其使得对于所述生物正交耦合反应能够获得高达10倍或更多的增加的反应速率。或者换一种说法,反应时间仅是原来需要的时间的10%。或者再换一种说法,一种反应物的浓度可以低10倍。

[0065] 所述亲双烯体,广义上,是具有至少一个直立取代基的反式-环辛烯,即其中至少一个饱和碳原子的至少一个直立位置不是氢。

[0066] 如以上解释的那样,至少一个且最多四个 R_a 不是氢,意味着这种 R_a 是取代基或是连接体结构的一部分。优选地,非氢 R_a 的数量是1或2。

[0067] 更优选地,所述至少一个和最多四个所述非氢 R_a 位于选自由 R_a^2 、 R_a^3 、 R_a^4 和 R_a^5 组成的组的位置。仍更优选地, R_a^2 、 R_a^3 、 R_a^4 和 R_a^5 中的一个或两个不是氢。最优选地,取代基或连接体结构作为 R_a^3 和 R_a^4 中的一个或这两者存在。

[0068] 优选地,所述取代基选自以上关于如上定义的式(1)定义的基团。更优选地,上述

R_a是烷基或O-烷基,更优选地是甲基或O-叔丁基。

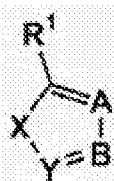
[0069] 应该注意的是,R_a的选择和优选选项与另一碳原子上或相同碳原子上在平伏位置是否存在任何取代基(即如上定义的式(1)中的R基团)无关。优选地,除了一个或两个直立取代基以外,还存在一个或两个平伏取代基,所述取代基优选包括是连接体结构的一部分的R或R_a。但是,在另一优选项中,考虑到在合成工作和反应性之间达成平衡,优选一个或两个R_a不是氢,而所有其它R和R_a都是氢。

[0070] 在一个进一步的优选项中,X和/或Y是O-烷基或烷基,更优选地是甲基。

[0071] 二烯

[0072] 本领域技术人员知道在所述逆Diels-Alder反应中具有反应性的大量二烯。优选的二烯参考式(2)-(5)在下文给出。

[0073]

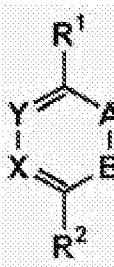


(2)

[0074] 其中R¹选自由以下组成的组:H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、NR'C(=O)NR''R'''、NR'C(=S)NR''R'''其中R'、R''和R'''各自独立地是H、芳基或烷基;A和B各自独立地选自由烷基取代的碳、芳基取代的碳、氮、N⁺O⁻、N⁺R其中R为烷基组成的组,条件是A和B不都是碳;X选自由O、N-烷基和C=O组成的组,和Y是CR其中R选自由以下组成的组:H、烷基、芳基、C(=O)OR'、C(=O)SR'、C(=S)OR'、C(=S)SR'、C(=O)NR'R''其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基;

[0075] 对于环辛烯特别适合作为反应参与者的二烯是:

[0076]

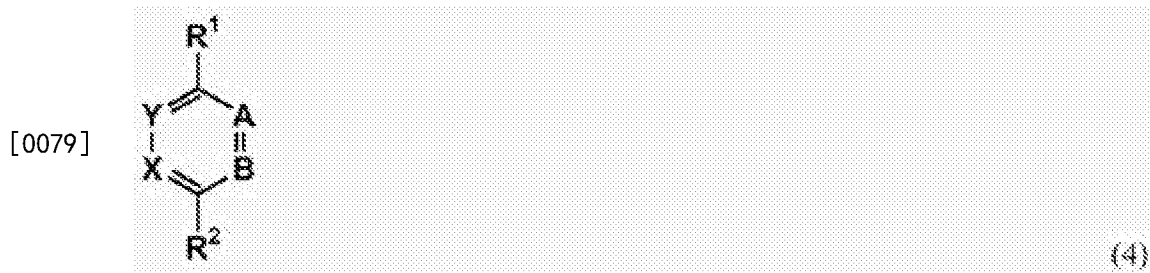


(3)

[0077] 其中R¹和R²各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、NO₂、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R''、SC(=O)R''、OC(=S)R''、SC(=S)R''、S(=O)R'、S(=O)₂R''、S(=O)₂NR''R'''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、OC(=O)NR'R''、SC(=O)NR'R''、OC(=S)NR'R''、SC(=S)NR'R''、NR'C(=O)NR''R'''、NR'C(=S)NR''R'''其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基,和R'''独立地是芳基或烷基;A选自由N-烷基、N-芳基、C=O和CN-烷基组成的组;B是O或S;X选自由以下组成的组:N、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR'R''、CC(=S)NR'R''、R'和R''各自独立地是H、芳基

或烷基和R'''独立地是芳基或烷基;Y选自由CH、C-烷基、C-芳基、N和N⁺O⁻组成的组;

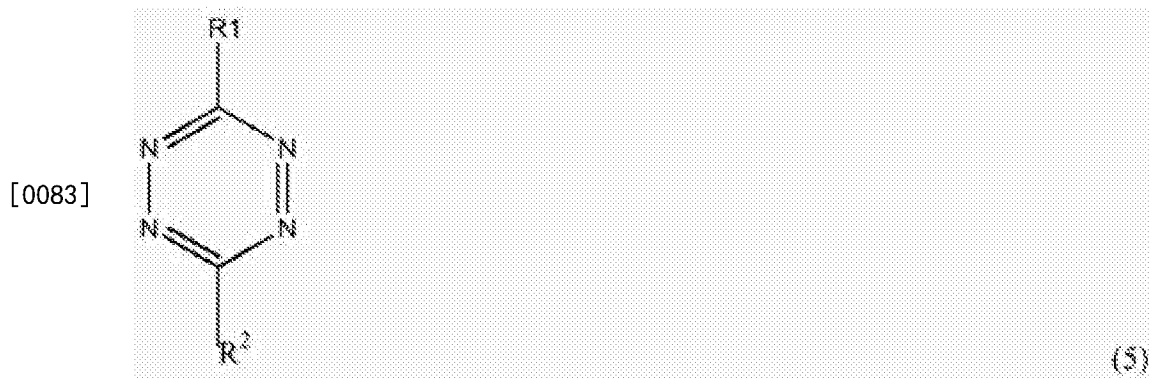
[0078] 对于环辛烯另一种特别适合作为反应参与者的二烯是:



[0080] 其中R¹和R²各自独立地选自由以下组成的组:H、烷基、芳基、CF₃、CF₂-R'、NO₂、OR'、SR'、C(=O)R'、C(=S)R'、OC(=O)R''、SC(=O)R''、OC(=S)R''、SC(=S)R''、S(=O)R'、S(=O)₂R''、S(=O)₂NR'R''、C(=O)O-R'、C(=O)S-R'、C(=S)O-R'、C(=S)S-R'、C(=O)NR'R''、C(=S)NR'R''、NR'R''、NR'C(=O)R''、NR'C(=S)R''、NR'C(=O)OR''、NR'C(=S)OR''、NR'C(=O)SR''、NR'C(=S)SR''、OC(=O)NR'R''、SC(=O)NR'R''、OC(=S)NR'R''、SC(=S)NR'R''、NR'C(=O)NR'R''、NR'C(=S)N'R'R''，其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基，和R'''独立地是芳基或烷基;A选自由N、C-烷基、C-芳基和N⁺O⁻组成的组;B是N;X选自由以下组成的组:N、CH、C-烷基、C-芳基、CC(=O)R'、CC(=S)R'、CS(=O)R'、CS(=O)₂R''、CC(=O)O-R'、CC(=O)S-R'、CC(=S)O-R'、CC(=S)S-R'、CC(=O)NR'R''、CC(=S)NR'R''，其中R'和R''各自独立地是H、芳基或烷基和R'''独立地是芳基或烷基;Y选自由CH、C-烷基、C-芳基、N和N⁺O⁻组成的组;

[0081] 特别有用的四嗪衍生物是缺电子四嗪类,即被通常不被认为供电子的基团或部分取代的四嗪,优选带有吸电子取代基。

[0082] 这些缺电子四嗪类通常符合以下结构式:



[0084] 在此,R¹和R²各自独立地代表选自由以下组成的组的取代基:H、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2,6-嘧啶基、2,5-嘧啶基、3,5-嘧啶基、2,4-嘧啶基、或苯基,任选地被一个或多个吸电子基团例如NO₂、F、Cl、CF₃、CN、COOH、COOR、CONH₂、CONHR、CONR₂、CHO、COR、SO₂R、SO₂OR、NO、Ar取代,其中R是C₁-C₆烷基和Ar代表芳基,特别是苯基、吡啶基或萘基。

[0085] 在根据式(2)-(5)每一个的化合物中,所述R¹和R²基团(包括在X或Y上的那些)可以进一步提供有如下所述的适合的连接体或间隔体部分。类似地,并且与其独立地,如上定义的式(1)的亲双烯体也可以进一步提供有如下所述的适合的连接体或间隔体部分。

[0086] 根据一个实施方案,本发明被用于靶向的成像。

[0087] 根据该实施方案,特定的初级靶的成像通过所述预靶向探针的初级靶向部分的特异性结合以及利用所述效应物探针中包含的可检测标记物检测这种结合实现。

[0088] 初级靶

[0089] 本发明中使用的“初级靶(primary target)”涉及在诊断和/或成像方法中待被检测,和/或待被通过药理学活性化合物或其它治疗形式调制、结合或寻址的靶。

[0090] 所述初级靶可以选自人类或动物体内或病原体或寄生物上的任何适合的靶,例如包含以下的组:细胞例如细胞膜和细胞壁、受体例如细胞膜受体、细胞内结构例如高尔基体或线粒体、酶、受体、DNA、RNA、病毒或病毒颗粒、抗体、蛋白质、碳水化合物、单糖、多糖、细胞活素、荷尔蒙、类固醇、生长抑素受体、单胺氧化酶、毒蕈碱性受体、心肌交感神经系统(myocardial sympatic nerve system)、白三烯受体(例如在白细胞上)、尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂受体(uPAR)、叶酸受体、细胞凋亡标志物、(抗)血管生成标志物、胃泌素受体、多巴胺能系统、serotonergic系统、GABA能系统(GABAergic system)、肾上腺素反应系统、胆碱能系统、阿片受体、GPIIb/IIIa受体和其它血栓相关受体、纤维蛋白、降钙素受体、促吞噬素受体、整合素受体、VEGF/EGF受体、EGF、基质金属蛋白酶(MMP)、P/E/L-选择素受体、LDL受体、P-糖蛋白、神经降压素受体、神经肽受体、P物质受体、NK受体、CCK受体、 σ 受体、白细胞介素受体、单纯疱疹病毒酪氨酸激酶、人酪氨酸激酶。

[0091] 根据本发明的一个特定实施方案,所述初级靶是蛋白质例如受体。作为可选选择,所述初级靶可以是代谢途径,其在疾病例如感染或癌症期间表达上调,例如DNA合成、蛋白质合成、膜合成和碳水化合物摄取。在患病组织中,上述标志物能够不同于健康组织并提供早期检测、特异性诊断和治疗特别是靶向的治疗的独特可能。

[0092] 预靶向探针

[0093] 预靶向探针包含能够与感兴趣的初级靶结合的部分。

[0094] 靶向部分典型地是对细胞表面靶(例如膜受体)、结构蛋白(例如淀粉样斑)或细胞内靶(例如RNA、DNA、酶、细胞信号通路)具有亲和性的结构。这些部分可以是抗体(片段)、蛋白质、适体、寡肽、寡核苷酸、寡糖以及肽、拟肽和已知在特定的疾病或障碍处积累的有机药物化合物。

[0095] 本文描述了用于本发明试剂盒的适合初级靶向部分的特定实施方案,并包括受体结合性肽和抗体。本发明的一个特定实施方案涉及小靶向部分例如肽的使用,从而获得可透过细胞的靶向探针。

[0096] 本发明中使用的“初级靶向部分”涉及结合到初级靶的靶向探针部分。初级靶向部分的特定例子是结合到受体的肽或蛋白质。初级靶向部分的其它例子是结合到细胞化合物的抗体或其片段。抗体可以针对非蛋白质化合物和蛋白质或肽生成。其它初级靶向部分可以由适体、寡肽、寡核苷酸、寡糖、以及拟肽和有机药物化合物构成。初级靶向部分优选以高特异性、高亲和性、任选地甚至共价结合,并且与所述初级靶的结合优选在体内是稳定的。

[0097] 为了使得特异性靶向以上列举的初级靶,所述靶向探针的初级靶向部分可以含有化合物,其包括但不限于:抗体、抗体片段例如Fab2、Fab、scFV、双价抗体(diabodies)、聚合物(依靠EPR效应的肿瘤靶向)、蛋白质、肽例如奥曲肽和衍生物、VIP、MSH、LHRH、趋化肽、铃蟾肽、弹性蛋白、肽类似物、碳水化合物、单糖、多糖、病毒、全细胞(whole cells)、噬菌体、药物、化疗剂、受体激动剂和拮抗剂、细胞活素、荷尔蒙、类固醇。在本发明的内容中设想的有机化合物的例子是或衍生自:雌激素类例如雌二醇、雄激素类、孕激素类、皮质类固醇类、紫杉醇、足叶乙甙、doxorubicin、甲氨喋呤、叶酸和胆固醇。

[0098] 根据本发明的一个特定实施方案,所述初级靶是受体,并且适合的初级靶向部分包括但不限于此类受体的配体或仍结合到该受体的配体部分,例如在受体结合性蛋白质配体的情况下受体结合性肽。

[0099] 蛋白质性质的初级靶向部分的其他例子包括干扰素,例如 α 、 β 和 γ 干扰素,白细胞介素和蛋白质生长因子,例如肿瘤生长因子,例如 α 、 β 肿瘤生长因子,血小板衍生长因子(PDGF),uPAR靶向蛋白,载脂蛋白,LDL,膜联蛋白V,内皮抑素和血管生长抑制素。

[0100] 初级靶向部分的可选择的例子包括DNA、RNA、PNA和LNA,其例如与所述初级靶互补。

[0101] 根据本发明的一个特定实施方案,使用了小的亲脂性初级靶向部分,其能够结合到细胞内初级靶。

[0102] 根据本发明的一个进一步的特定实施方案,选择所述初级靶和初级靶向部分从而导致特异性的或增加的组织或疾病的靶向,所述组织或疾病例如癌症、炎症、感染、心血管疾病例如血栓、动脉粥样硬化病变、缺氧位置例如中风、肿瘤、心血管障碍、脑失调、细胞凋亡、血管生成、器官和报告基因/酶。这可以通过选择具有组织、细胞或疾病特异性表达的初级靶实现。例如,膜叶酸受体介导叶酸盐及其类似物例如甲氨喋呤的细胞内积累。正常组织内表达是有限的,但受体在各种肿瘤细胞类型中被过度表达。

[0103] 根据一个实施方案,所述预靶向探针和所述效应物探针可以是多体化合物(multimeric compounds),其包含多个初级和/或次级靶和/或靶向部分。这些多体化合物可以是聚合物、树枝状聚合物、脂质体、聚合物颗粒或其它聚合物结构。对于放大检测信号特别感兴趣的是具有多于一个次级靶的靶向探针,其使得能够结合数个效应物探针。

[0104] 所述预靶向探针进一步含有上述第一生物正交反应性基团。该基团充当“次级靶”,即作为提供用于所述逆Diels-Alder耦合化学的第一反应参与者的靶向探针部分。

[0105] 如上所述,所述次级靶可以是所述耦合反应的任一参与者。即,在一个实施方案中,其是缺电子四嗪。在另一实施方案中,其是上述式(1)的直立取代的TCO。

[0106] 在所述预靶向探针中,所述初级靶向部分和所述第一生物正交反应性基团可以彼此直接相连。它们还可以通过连接体彼此结合,此外它们可以都与初级靶向支架(scaffold)例如生物聚合物如多肽连接。即在最简单的情况下,所述连接体部分是键。适合的连接体部分进一步包括,但不限于,具有从2到200,特别是3到113和优选5-50个重复单元的聚乙二醇(PEG)链。通过调节PEG链长,能够影响所述探针在生理体系中的循环时间。这对于预靶向探针是特别相关的(因为将所述初级靶向部分连接到所述初级靶的初始靶向步骤可能涉及相对慢的过程,需要相对长的循环时间)。连接体部分任选地包括生物聚合物片段,例如寡-或多肽或聚交酯(poly lactides)。

[0107] 应该理解,本发明包括其中所述二烯和所述亲双烯体与所述预靶向或效应物探针任一连接的任何可想到的方式。实施对这些探针的结合的方法,例如通过反应性氨基酸例如赖氨酸或半胱氨酸,已为本领域技术人员所知晓。

[0108] 效应物探针

[0109] 效应物探针包含能够提供想要的诊断、成像和/或治疗效果的效应物部分。所述效应物探针进一步包含次级靶向部分。

[0110] 所述次级靶向部分涉及形成用于可用的次级靶(即所述预靶向探针中包含的一个

或多个生物正交反应性基团)的反应参与者的效应物探针部分。将理解,在所述次级靶是如上定义的式(1)的直立取代的TCO的情况下,所述次级靶向部分将是二烯例如四嗪,反之亦然。

[0111] 所述效应物部分可以是例如可检测的标记物。这里使用的“可检测标记物”涉及使得例如当存在于细胞、组织或生物体中时所述探针能够被检测的效应物探针部分。在本发明的内容中,所设想的可检测标记物的一种类型是对比提供剂。在本发明的内容中设想了不同类型的可检测标记物并在下文加以描述。

[0112] 因此,根据本发明的一个特定实施方案,本发明的预靶向试剂盒和方法被用于成像,特别是医学成像。为了识别所述初级靶,使用包含一种或多种可检测标记物的成像探针作为所述效应物探针。所述成像探针的可检测标记物的特定例子是用于常规成像体系的对比提供部分例如可MRI-成像的结构、自旋标记物、光学标记物、超声响应结构、X射线响应部分、放射性核素、(生物)发光和FRET类型染料。在本发明的内容中所设想的示例性的可检测标记物包括但不一定局限于荧光分子(例如自发荧光分子(*autofluorescent molecules*)、与试剂接触时发荧光的分子等)、放射标记物;生物素(例如将要经由用抗生物素蛋白结合生物素进行检测的生物素);荧光标签,用于MRI的成像结构,包括顺磁性金属,成像试剂,例如在U.S. Pat. No. 4,741,900和5,326,856中描述的那些)等。用于成像的放射性核素可以例如是选自由以下组成的组的同位素: ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{51}Cr 、 ^{52}Fe 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Zn 、 ^{62}Cu 、 ^{63}Zn 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{70}As 、 ^{71}As 、 ^{72}As 、 ^{74}As 、 ^{75}Se 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{80}Br 、 ^{82}Br 、 ^{82}Rb 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{114}In 、 ^{117}Sn 、 ^{120}I 、 ^{122}Xe 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{166}Ho 、 ^{167}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{193}Pt 、 ^{195}Pt 、 ^{201}Tl 、和 ^{203}Pb 。

[0113] 在某些应用中也可以将其它元素和同位素例如被用于治疗的元素或同位素用于成像。

[0114] 所述可MRI成像的部分可以是例如顺磁性离子或超顺磁性颗粒。所述顺磁性离子可以是选自由以下组成的组的元素:Gd、Fe、Mn、Cr、Co、Ni、Cu、Pr、Nd、Yb、Tb、Dy、Ho、Er、Sm、Eu、Ti、Pa、La、Sc、V、Mo、Ru、Ce、Dy、Tl。所述超声响应部分可以包含微泡,其壳由磷脂和/或(可生物降解的)聚合物、和/或人血清白蛋白构成。所述微泡可以用氟化气体或液体填充。

[0115] 所述X射线响应部分包括但不限于碘、钡、硫酸钡、gastrografin或可以包含用碘化合物和/或硫酸钡填充的囊泡、脂质体或聚合物胶囊。

[0116] 此外,本发明的内容中所设想的可检测标记物还包括能够通过抗体结合进行检测的肽或多肽,例如通过结合可检测的经标记的抗体或通过经由夹心式检验检测结合的抗体。在一个实施方案中,所述可检测标记物是小尺寸有机PET和SPECT标记物,例如 ^{18}F 、 ^{11}C 或 ^{123}I 。由于它们的小尺寸,有机PET或SPECT标记物完美地适合用于监控细胞内的事件,因为它们一般不会很大地影响靶向器件的性能并且特别是其膜输送。包含PET标记物和作为次级靶向部分的任一逆Diels-Alder活性部分的成像探针是亲脂性的并且能够被动地扩散进和扩散出细胞直到它找到它的结合参与者。而且,两种组分都不妨碍越过血脑屏障并从而使得能够在脑内区域成像。

[0117] 当所述效应物探针打算包含基于金属例如用于MRI对比增强的镧系金属(例如Gd)的可检测标记物时,其优选以螯合物的形式提供。在这种情况下,所述效应物探针优选包含能够与此类金属形成配位络合物的结构部分。关于此的一个好例子是衍生自1,4,7,10-四

氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(H₄dota)和1,4,7,10-四氮杂环十二烷- $\alpha, \alpha', \alpha, \alpha''$ -四甲基-1,4,7,10-四乙酸(H₄dotma)的大环镧系元素(III)螯合物。

[0118] 所述效应物部分还可以是治疗部分例如药理学活性化合物。本文提供了药理学活性化合物的例子。治疗探针还可以任选地包含可检测标记物。

[0119] 因此,根据另一实施方案,本发明的预靶向试剂盒和方法被用于靶向的治疗。这通过利用含有次级靶向部分和一个或多个药理学活性试剂(即药物或用于放射疗法的放射性同位素)的效应物探针实现。用于靶向的药物递送情况的适合药物已为本领域所知。任选地,所述治疗探针还可以包括可检测的标记物,例如一种或多种成像剂。用于治疗的放射性核素可以是例如选自以下组成的组的同位素:²⁴Na、³²P、³³P、⁴⁷Sc、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁷⁶As、⁷⁷As、⁸⁰Br、⁸²Br、⁸⁹Sr、⁹⁰Nb、⁹⁰Y、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹²¹Sn、¹²⁷Te、¹³¹I、¹⁴⁰La、¹⁴¹Ce、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁴Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁹Tb、¹⁵¹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁹Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁵Dy、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷²Tm、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²¹⁴Bi、²²³Ra和²²⁵Ac。

[0120] 作为选择,所述治疗探针中的药物选自用于光动力疗法的感光剂(sensitizers)。

[0121] 作为选择,所述治疗探针包含结合到体内治疗实体,例如T细胞、自然杀伤细胞或其它内源性结构例如蛋白质,的识别部分。

[0122] 在所述效应物探针中,所述次级靶向部分即所述第二生物正交反应性基团和所述效应物部分可以直接彼此连接。它们还可以通过连接体彼此结合,此外它们可以都与次级靶向支架连接。所述连接体可以独立地选自如上所述的相同部分,例如聚乙二醇。所述次级靶向支架可以是例如生物聚合物如多肽。

[0123] 本发明还涉及利用逆Diels-Alder反应的预靶向方法。在这里,将包含初级靶向部分(例如抗体和抗体片段或受体结合性肽)的预靶向探针注入到受试者中,其中所述预靶向探针分别用适合的二烯,优选根据上述式(2)-(5)任意一个的化合物,或用根据上述式(1)的环辛烯官能化。在结合到靶(例如原发或转移性肿瘤病变、动脉粥样硬化斑块、梗死区域、炎症或感染位置等)并从循环系统和从非靶组织(例如血液、肝脏、脾脏、肾脏等)清除之后,注入效应物探针,其含有次级靶向部分例如分别携带E-环辛烯或四嗪衍生物(即存在于所述预靶向探针中的生物正交反应性基团的反应性对应物)和药物或可成像标记物。所述效应物探针结合到所述初级靶向部分并提供高对比或选择性治疗所述疾病位点。

[0124] 本发明还涉及一般的代谢途径的靶向,所述一般的代谢途径在疾病(例如感染或癌症)期间表达上调如DNA、蛋白质和膜合成以及碳水化合物摄取。适合的探针包含被二烯或亲双烯体标记的氨基酸、糖、核酸和胆碱,本领域中目前使用的代谢示踪剂类似物,[¹¹C]-蛋氨酸、[¹⁸F]-氟脱氧葡萄糖(FDG)、脱氧-[¹⁸F]-氟胸苷(FLT)和[¹¹C]-胆碱。具有高代谢或增殖的细胞具有对这些构建单元(building block)的较高摄取。在该方法中,例如四嗪或E-环辛烯衍生物进入这些或其它通路并在细胞内和/或细胞上积累。在充分积聚并清除游离探针后,将经可检测地标记的或携带药物的(细胞可透过)的四嗪探针或E-环辛烯探针(或携带根据本发明的其它二烯/亲双烯体的探针)送入以分别结合积累的四嗪或E-环辛烯代谢物。作为优于普通FDG(氟18氟脱氧葡萄糖)类型成像的一个益处,可以获得足够的时间使得能够在送入放射性之前高度积聚所述靶向部分,从而增大靶对非靶比。作为选择,可以靶向疾病特异性的代谢途径和/或代谢物。

[0125] 本发明还涉及细胞内靶的预靶向。由于它们的小尺寸,有机PET标记物(^{18}F , ^{11}C)非常适合用于监控细胞内事件,因为它们通常不会极大地影响所述靶向器件的性能,特别是其膜输送(和大的和极性的放射金属螯合物结构缀合物相反)。尽管在本发明中使用的被取代的四嗪部分和所述E-环辛烯不一定是小的,但是它们是相对非极性的,并且能够用于蛋白质、mRNA、信号通路等的分子内成像。所述次级(例如PET标记的)取代的四嗪部分或E-环辛烯探针(即所述效应物探针)能够被动地扩散进和扩散出细胞直到它找到它的结合参与者或经历活性摄取机理。这些性能还允许将逆Diels-Alder反应用于脑内预靶向,因为两种组分都不妨碍越过血脑屏障。

[0126] 本发明还涉及预靶向的信号放大和/或多价装配。至少一个初级靶向器件与含有多个四嗪部分的树枝状聚合物(dendrimer)、聚合物或纳米颗粒结合。在受体结合后,注入与用于核成像(例如放射金属螯合物、放射性卤素等)或MRI(例如Gd螯合物)的一个或多个对比部分结合的(一种或多种)环辛烯。随后的逆Diels-Alder反应导致在靶组织处MRI对比剂的高浓度。此外,在靶位点的多价将增大与所述直立取代的TCO效应物缀合物的反应动力学,提供例如MRI对比剂的有效靶积累。当然,所述直立取代的TCO也可以用于所述靶向器件缀合物中而所述四嗪(或本发明的其它二烯)连接到报告物(reporter)。

[0127] 连接途径和试剂盒

[0128] 本发明进一步涉及逆Diels-Alder反应作为用于将成像剂和药物连接到靶向结构例如肽的途径的用途。所述效应物可以包含有机PET或SPECT核素标记的辅基、用于PET/SPECT/MRI的金属络合物和用于超声成像的微泡、用于光学成像的荧光团以及用于放射疗法的 α 和 β 辐射源和通常细胞毒素抗癌剂。所述成像/治疗剂可以用侧基四嗪或其它适合的二烯部分官能化和用直立取代的TCO衍生物将靶向基团官能化,反之亦然。

[0129] 本发明的途径对用于核成像和放射疗法的试剂特别有利:考虑到放射性核素的衰变,作为预靶向步骤实施最耗时的步骤(受试者体内的实际靶向)是有益的。根据本发明,选择直立取代的TCO,以获得上述非常快速的逆Diels-Alder化学用于次级靶向,使得能够使用多种放射性核素,包括与现有方法相比使用寿命更短的那些。直立取代的TCO官能化的效应物探针和适合的二烯例如携带四嗪的预靶向探针能够在极低浓度在体内耦合而不需要效应物部分(例如所述放射性核素)的持续血液循环。将理解,这对与二烯特别是四嗪官能化的效应物探针结合的带有直立取代的TCO的预靶向探针同样适用。而且,所述反应性基团有利地是稳定的,并因此展现了较长寿命的反应性而不过于容易地发生副反应。

[0130] 将理解,以上提供了益处例如最小化对病人的放射剂量。而且,其导致能够利用PET即正电子发射断层成像剂代替SPECT即单光子发射计算机断层成像剂(single photon emission computerized tomography agents)。而且,增加的反应性使得能够在体内以较低的浓度应用。

[0131] 本发明特别适合用于多模式成像,任选地使用不同的成像剂以使相同的靶可视化。作为选择,所述成像探针包含至少两种不同的标记物以使得能够实现多模式成像。

[0132] 本发明的改善的[4+2]逆Diels-Alder化学在分子成像中的应用向所有类型和尺寸的靶向结构打开了预靶向之门。这允许细胞内和代谢成像以从可通过预靶向积聚获得的高靶积累和低背景受益。同样,对于较小的和更多种多样的靶向器件,预靶向的信号放大方案例如多四嗪和/或多树枝状聚合物或脂质体变得可行。

[0133] 由于所述反应参与者是非生物的和生物正交的,因此使用利用直立取代的TCO作为上述亲双烯体的[4+2]逆Diels-Alder反应的预靶向不受内源性竞争和代谢/分解妨碍,并提供稳定的共价键。选择靶代谢途径,以及相应的四嗪-代谢物衍生物,凭借其正常细胞相比在例如肿瘤细胞中的高通量,提供了在细胞中或在靶细胞表面上高密度人工四嗪受体或其它化学柄的装配,避免有时可能处于低水平的内源细胞表面受体的使用。

[0134] 本发明的进一步的特定实施方案涉及包含代谢前体和成像探针,更特别地是包含可检测标记物的成像探针的试剂盒,所述可检测标记物是用于常规成像体系的对比剂。此类可检测标记物可以是但不限于选自由可MRI成像的结构、自旋标记物、光学标记物、超声响应试剂、X-射线响应试剂、放射性核素和FRET类染料组成的组的标记物。在本发明的一个特定实施方案中,使用了报告物探针。这种报告物探针可以是酶的底物,更特别地是对于所述细胞不是内源性的,但已经通过基因疗法或使用外来试剂感染而引入的酶。在本文中涉及细胞或组织内的基因的非内源性用于表示所述基因在所述细胞或组织内并不天然存在和/或表达。作为选择,此类报告物探针是通过受体或泵的方式引入到细胞中的分子,其可以是内源性的或通过基因疗法或使用外来试剂感染引入到细胞内。作为选择,所述报告物探针是对细胞或组织环境内的某些(变化)条件起反应的分子。

[0135] 本发明还包括用于上述试剂盒中的试剂。一种此类试剂是包含初级靶向部分和生物正交反应性基团的预靶向剂,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。特定反应参与者在上文描述,即通常是上述缺电子四嗪或其它适合的二烯,或是根据本发明的直立取代的环辛烯。本发明还涉及这些试剂在靶向的医学成像或靶向的治疗中的用途,和涉及用于这种方法中的所述试剂。特别地,本发明涉及这些试剂在预靶向方法中的这些用途,和涉及在这种方法中使用的这些试剂。另一种此类试剂是包含可检测标记物和生物正交反应性基团的成像探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

[0136] 本发明还涉及包含可检测标记物和生物正交反应性基团的成像探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。本发明进一步涉及包含药理学活性化合物和生物正交反应性基团的治疗探针,其中所述生物正交反应性基团是[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

[0137] 本发明的一部分还是预靶向方法,包括将如上所述的预靶向试剂给予受试者并使所述试剂在受试者的体系中循环有效实现所述初级靶向部分对初级靶的结合的一段时间,接着从身体清除未结合的试剂。用于其的典型时间为12到96小时,特别地为约48小时。

[0138] 此外,本发明提供了成像方法,包括如上所述实施预靶向方法,接着给予同样根据本发明的成像探针,其中所述预靶向试剂中和所述成像探针中的生物正交反应性基团一起形成[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。类似地,本发明提供了受试者中靶向的医学治疗方法,其包括如上所述实施预靶向方法,接着给予同样根据本发明的治疗探针,其中所述预靶向试剂中和所述成像探针中的生物正交反应性基团一起形成[4+2]逆Diels-Alder反应的反应参与者。

[0139] 本发明还涉及用于如上所述的成像或治疗方法的上述预靶向试剂。

[0140] 总结而言,在逆Diels-Alder化学的基础上,生物正交预靶向的分子成像和治疗用于给病人带来极大益处。一方面,其用于承担获得靶组织例如癌症和心血管病变的优良图

像。另一方面,能够大大减少源自放射性化合物和通常潜在毒性药物给予的固有副作用,同时增加到达患病组织的有效剂量。此外,其将大大扩展引起疾病的可追踪分子事件的收集。特别地,这种技术能够允许使用远离血管的靶组织并将促进信息丰富的细胞内环境的成像。

[0141] 将参考以下非限定性实施例和随附的非限定性附图说明本发明。

实施例

[0142] 材料

[0143] 所有试剂和溶剂都从商业来源获得(从Sigma-Aldrich、Acros、ABCR、Invitrogen和Merck获得试剂,从Biosolve、Merck和Cambridge Isotope Laboratories获得普通和氘代溶剂),并除非另外说明都不经进一步的纯化即使用。1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧杂三十九烷-39-酸(21)从Polypure获得。 $[^{111}\text{In}]$ 氯化铟和 $[^{125}\text{I}]$ 碘化钠溶液购自PerkinElmer。通过milli-Q水过滤系统(Millipore)蒸馏和去离子化水(18M Ω cm)。用Chelex-100树脂(BioRad Laboratories)处理标记缓冲液过夜,然后经过0.22 μm 过滤并在4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。Indogen碘化管、用于二喹啉甲酸(BCA)检验的试剂盒、gelcode蓝色蛋白染色溶液和Zeba脱盐离心柱(spin columns)(40 kDa MW截止, 0.5-2 mL)购自Pierce Protein Research (Thermo Fisher Scientific)。用于制备磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH7.4的片剂从Calbiochem (Merck)获得。Amicon Ultra-4和Ultra-15离心过滤器单元(50 kDa MW截至)购自Millipore。小鼠血清购自Innovative Research。四嗪28的合成和放射标记如Rossin等, Angew Chem Int Ed 2010, 49, 3375中描述的那样实施。

[0144] 方法

[0145] 使用Bruker DPX300波谱仪或Bruker Avance600波谱仪在 CDCl_3 或 $[\text{D}_6]$ DMSO中记录NMR谱。使用DEPT脉冲序列区分 ^{13}C -NMR多重性(q=四重、t=三重、s=二重和p=一重(primary))。在Agilent ESI-TOF质谱仪上记录了高分辨率ESI质谱(HRMS),以阳离子模式测量。

[0146] 在Combiflash Companion设备 (Teledyne Isco)上使用SiliCycle硅胶柱实施制备柱色谱。使用装配有C18 Zorbax柱(21.2 \times 150 mm, 5 μm 颗粒)的Agilent 1200仪器,应用含有0.1% TFA的水和MeCN梯度,实施制备HPLC。在装配有Gabi放射性探测器(Raytest)的Agilent 1100系统上实施分析放射-HPLC。将试样加载在Agilent Eclipse XDB-C18柱(4.6 \times 150mm, 5 μm 颗粒)上,其用含有0.1% TFA的MeCN在水中的线性梯度以1 mL/min洗脱(10% MeCN 2 min,接着在11 min内增大到45% MeCN)。将UV波长预设254 nm。在装配有Gabi放射性探测器的Agilent 1200系统上实施体积排阻(SEC)HPLC。将试样加载在BioSep-SEC-S 2000柱(300 \times 7.8 mm,5 μm 颗粒,Phenomenex)上并用20 mM磷酸盐、150 mM NaCl、pH 6.8以1 mL/min洗脱。UV波长预设260和280 nm。

[0147] 使用用在0.9% NaCl水溶液中的200 mM EDTA洗脱并在磷光体成像仪(FLA-7000, Fujifilm)上成像的ITLC-SG 条(Pa11)通过放射-TLC测定了 ^{111}In 和 ^{177}Lu 标记产率。在这些条件下,游离 ^{111}In 和 ^{177}Lu 以 $R_f=0.9$ 迁移,而 $^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ -四嗪保留在原位。 ^{125}I -标记产率也通过放射-TLC测定,使用用1:1 MeOH/醋酸乙酯混合物洗脱并在磷光体成像仪上成像的ITLC-SG条。在这些条件下,游离 ^{125}I 和 ^{125}I -SHPP以 $R_f=0.9$ 迁移,而 ^{125}I -mAbs保留在原位。

[0148] 在Phastgel系统上分别使用IEF-3-9凝胶和7.5% PAGE均匀凝胶(homogeneous gels)(GE Healthcare Life Sciences)实施等电聚焦(IEF)分析和SDS-PAGE。IEF校准溶液(宽PI, pH 3-10)购自GE Healthcare和蛋白质MW标准溶液(Precision Plus双色标准)购自BioRad。在电泳时,用gelcode蓝将所述凝胶染色2小时,在水中脱色过夜然后用常规平板扫描仪数字化。

[0149] 用NanoDrop 1000分光光度计(280 nm处的吸光率; Thermo Fisher Scientific)或采用BCA测试测定CC49溶液的浓度。

[0150] LS 174T肿瘤模型(tumor model)。人克隆癌细胞系LS174T从ATCC获得并保存在以10% 热灭活的胎牛血清(Gibco)、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 µg/mL)和2mM Glutamax补充的Eagle's最小必需培养基(Sigma)中。用100 µL无菌PBS中的 5×10^6 细胞对裸雌性Balb/C小鼠(20-25克体重, Charles River Laboratories)进行皮下接种。

[0151] 实施例1

[0152] 如图3a中所示,作为将四嗪衍生的部分连接到抗体的一个实例,制备了分子1(见图5)。相应的探针2(衍生自E-环辛烯)的一个实例在图6中示出。两种分子都含有PEG链。分子1包含用于将所述分子与抗体中存在的氨基基团耦合的N-羟基琥珀酰亚胺基部分。2中DOTA衍生的部分可以用于携带稀土金属离子例如用于MR成像的Gd或用于核成像和治疗(SPECT)的Lu-177。

[0153] 图5中示出了1的合成。根据Blackman等(Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130 (41), 13518-19)制备了起始的四嗪衍生的分子5。通过与戊二酸酐反应将其转化成酸6,接着形成它的N-羟基琥珀酰亚胺基酯7。该N-羟基琥珀酰亚胺基酯用于通过与商购获得(IRIS biochem)的PEG衍生物8反应形成酸9,其进而被转化成它的N-羟基琥珀酰亚胺基酯1。

[0154] 图6中示出了2的合成。根据Yap等(Yap, GPA; Royzen, M; Fox, JM, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130 (12), 3760-61)制备了(E)-环辛-4-烯醇(10)。其在商购获得的(Aldrich)异氰酸酯衍生物11的帮助下被转化成酯12,接着皂化成酸13。使由13形成的N-羟基琥珀酰亚胺基酯14与衍生自DOTA和PEG的胺18反应,以形成终产物2。使17脱保护后制备DOTA衍生物18,所述17进而由DOTA衍生物15和PEG衍生物16(都可商购获得)(分别来自Macrocyclics和 IRIS Biotech)制备。

[0155] 实施例2

[0156] 本实施例阐述了实施例1的分子的相反对,图7中示出了用于结合到抗体后形成所述预靶向部分的所述E-环辛烯衍生物3。能够用作图3b中示出的效应物探针的四嗪/DOTA衍生的探针4在图8中示出。

[0157] E-环辛烯衍生物3通过如下方式形成:商购获得(IRIS biochem)的PEG衍生物8(也见图5)与N-羟基琥珀酰亚胺基酯14反应以形成酸19,接着形成源自这种酸的N-羟基琥珀酰亚胺基衍生物(图7)。

[0158] 图8中示出了所述四嗪/DOTA衍生的探针4的合成。所述探针通过DOTA和PEG衍生的胺18(见图6)与N-羟基琥珀酰亚胺基酯7(见图5)的反应制备。

[0159] 实施例3

[0160] 本实施例示于图9中,其提供了用于合成(E)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 1-(4-((环

辛-4-烯-1-基氧基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯(TCO-O-PEG10-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),主要和次要异构体分别是23a和23b)的方案。

[0161] 标记为(数字)a的化合物代表E-主要和标记为(数字)b的化合物代表E-次要。

[0162] (E-主要)-2,5-二氧化吡咯烷-1-基 4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸酯(20a)。

[0163] 根据文献过程(M. Royzen, G. P. A. Yap, J. M. Fox, J. Am. Chem. Soc. 2008,130, 3760)合成了(E)-环辛-4-烯醇(10a,主要异构体,含有约13%所述Z-异构体)。

[0164] 将60%氢氧化钠分散体(1.8 g,45 mmol)加入冰浴冷却的10a(1.70 g,13.5 mmol)在60 mL DMF中的溶液中。在室温搅拌4小时后,将4-溴甲基苯甲酸(3.85 g,17.9 mmol)分份加入并在室温将悬浮液搅拌过夜。将混合物倒入水(100 mL)中,加入叔丁基甲基醚(100 mL),接着加入37%盐酸(5 mL)。分离后,用叔丁基甲基醚(2×100 mL)提取水层。用水(25 mL)洗涤合并的有机层,用MgSO₄干燥并蒸发。用4:1己烷/乙酸乙酯使剩余物通过薄硅胶层。将蒸发后获得的剩余物在70℃溶解在庚烷(50 mL)中,然后冷却,提供19a。将所述产物溶解在二氯甲烷(40 mL)中,加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.57 g,4.9 mmol),将混合物在冰浴中冷却,接着加入N,N'-二环己基碳二亚胺(1.03 g,4.99 mmol)。30分钟后除去冰浴并在室温搅拌所述反应混合物18小时。过滤并蒸发后,通过柱色谱在硅胶上使用乙酸乙酯在庚烷(0-15%)中的梯度纯化剩余物。接着,将所述剩余物溶解在叔丁基甲基醚(20 mL)中并倒入庚烷(50 mL)中,得到白色固体形式的20a(1.42 g,29%)。

[0165]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ=8.10 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.45 (d, J=8.5 Hz, 2H), 5.60 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 4.54 (d, J=13.4 Hz, 1H), 4.47 (d, J=13.4 Hz, 1H), 3.09 (m, 1H), 2.91 (s, 4H), 2.43-1.40 (m, 10H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=169.0 (q), 161.5 (q), 146.7 (q), 135.1 (t), 132.1 (t), 130.4 (t), 127.0 (t), 123.7 (q), 85.3 (t), 68.0 (s), 40.5 (s), 37.7 (s), 34.2 (s), 32.7 (s), 31.4 (s), 25.4 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 C₂₀H₂₃NO₂Na⁺ ([M-Na]⁺): 380.1474, 实测值: 380.1472。

[0166] (E-主要)-2,5-二氧化吡咯烷-1-基1-(4-((环辛-4-烯-1-基氧基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯(23a)。

[0167] 将20a(100 mg,0.280 mmol)在二氯甲烷(2 mL)中的溶液滴加入在冰浴中搅拌的21(175 mg,0.283 mmol)和三乙胺(290μL,2.08 mmol)在二氯甲烷(2 mL)中的溶液中。将反应混合物在室温搅拌16小时。将蒸发后所获得的粗中间体22a溶解在二氯甲烷(5 mL)中并在冰浴中冷却。加入双(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)碳酸酯(170 mg,0.664 mmol)和吡啶(28μL,0.35 mmol),并在室温将反应混合物搅拌3小时。过滤混合物并蒸发,通过柱色谱在硅胶上使用甲醇在二氯甲烷(5-10%)中的梯度纯化产物,得到粘性油形式的23a(119 mg,39%)。

[0168]

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ =7.79 (d, J =8.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J =8.2 Hz, 2H), 7.00 (s, 1H), 5.59 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 4.49 (d, J =12.5 Hz, 1H), 4.42 (d, J =12.5 Hz, 1H), 3.85 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.8-3.5 (m, 48H), 3.09 (m, 1H), 2.90 (t, J =6.5 Hz, 2H), 2.85 (s, 4H), 2.43-1.40 (m, 10H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ =167.0 (q), 165.4 (q), 164.8 (q), 140.8 (q), 133.5 (t), 131.7 (q), 130.4 (t), 125.3 (t), 83.4 (t), 68.7 (s), 68.4 (s), 68.0 (s), 67.6

[0169]

(s), 68.4 (s), 63.9 (s), 38.9 (s), 37.9 (s), 36.1 (s), 32.6 (s), 31.1 (s), 30.3 (s), 29.8 (s), 23.7 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{H}^+$ ($[M-\text{H}]^+$): 957.5171, 实测值: 957.5174.

[0170] (E-次要)-2,5-二氧化吡咯烷-1-基 4-((环辛-4-烯基氧基)甲基)苯甲酸酯 (20b)。

[0171] 根据上述文献过程合成(E)-环辛-4-烯醇(10b,次要异构体)。将60%氢氧化钠分散体(2.1 g, 53 mmol)加入冰浴冷却的10b(2.53 g, 20.1 mmol)在50 mL 四氢呋喃中的溶液中。在室温搅拌4小时后,将混合物再次冷却并用5分钟的时间分份加入4-溴甲基苯甲酸(4.53 g, 21.1 mmol)。加入25 mL四氢呋喃并在将所述悬浊液在室温搅拌4天。加入冰,接着加入12.0 g柠檬酸。用150 mL叔丁基甲基醚萃取所述混合物两次。有机层用25 mL水洗涤、干燥并蒸发。通过使用80 g 硅胶和含有逐步增加的量的醋酸乙酯的庚烷作为洗脱液的色谱法纯化剩余物。合并产物级分(产物和起始醇之间未完全分离)并从约30 mL庚烷重结晶(冷却到-15°C),得到白色固体形式的19b(0.86 g, 17%)。将其溶解在40 mL二氯甲烷中。加入N-羟基琥珀酰亚胺(0.48 g, 4.17 mmol)并在冰中冷却混合物。加入N,N'-二环己基碳二亚胺(0.80 g, 3.88 mmol)并将混合物在冰中搅拌30分钟,然后在室温搅拌18小时。通过过滤、用二氯甲烷洗涤、旋转蒸发以及在25 g 硅胶上用庚烷-醋酸乙酯作为洗脱液的色谱法提供了产物。将蒸发的产物级分与75 mL叔丁基甲基醚混合并将混合物加温到60°C以提供溶液。将所述溶液浓缩到20 mL。逐步加入50 mL庚烷获得所述产物的沉淀。通过过滤收集和用庚烷洗涤提供1.05 g 20b(15%)。

[0172]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =8.10 (d, J =8.5 Hz, 2H), 7.46 (d, J =8.5 Hz, 2H), 5.73 (m, 1H), 5.52 (m, 1H), 4.60 (d, J =13.4 Hz, 1H), 4.45 (d, J =13.4 Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 2.92 (s, 4H), 2.43-1.10 (m, 10H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ =169.0 (q), 161.5 (q), 146.7 (q), 135.1 (t), 132.1 (t), 130.4 (t), 127.0 (t), 123.7 (q), 85.3 (t), 68.0 (s), 40.5 (s), 37.7 (s), 34.2 (s), 32.7 (s), 31.4 (s), 25.4 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Na}^+$ ($[M-\text{Na}]^+$): 380.1474, 实测值: 380.1472.

[0173] (E-次要)-2,5-二氧化吡咯烷-1-基 1-(4-((环辛-4-烯-1-基氧基)甲基)苯基-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯(23b)。

[0174] 该化合物以与23a相似的方式从20b开始制备。以93%的产率获得粘性油形式的23b。

[0175]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =7.80 (d, J =8.2 Hz, 2H), 7.43 (d, J =8.2 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 5.67 (m, 1H), 5.55 (m, 1H), 4.57 (d, J =12.5 Hz, 1H), 4.48 (d, J =12.5 Hz, 1H), 3.85 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.8-3.5 (m, 49H), 2.90 (t, J =6.5 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.43-0.90 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.2.0 (q), 167.6.4 (q), 167.0 (q), 143.4 (q), 136.2 (t), 133.8 (q), 131.6 (t), 127.4 (t), 127.1 (t), 74.7(t), 71.1 (s), 70.9 (s), 70.6 (s), 70.2 (s), 70.1 (s), 66.1 (s), 40.5 (s), 40.1 (s), 34.9 (s), 33.3 (s), 32.5 (s), 30.2 (s), 28.0 (s), 25.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{H}^+$ ($[M-H]^+$): 957.5171, 实测值: 957.5179.

[0176] 实施例4

[0177] 本实施例示于图10中,其给出了用于合成(E)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 1-(4-(((环辛-4-烯-1-基氧基)羰基)氨基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯的反应方案。

[0178] 标记为(数字)a的化合物代表E-主要和标记为(数字)b的化合物代表E-次要。

[0179] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 4-(((环辛-4-烯-1-基氧基)羰基)氨基)苯甲酸酯14a。

[0180] 将N,N'-二环己基碳二亚胺(9.50 g,0.046 mol)分份加入在冰中冷却的4-氨基苯甲酸(5.84 g,0.043 mol)、N-羟基琥珀酰亚胺(5.0 g,0.044 mmol)和60 mL异丙醇的混合物中。在室温搅拌16小时后过滤悬浊液并用 60 mL异丙醇将所获得的固体再搅拌一小时。将过滤并真空下干燥后获得的粗固体24与100 mL二氯甲烷混合并在冰中冷却。加入20%碳酰氯在甲苯中的溶液(26 mL,49.4 mmol)并搅拌30分钟后获得溶液。将蒸发后获得的固体用100 mL甲苯洗涤两次并在高真空下干燥。获得4.03 g白色固体形式的25(36%)。将所述固体分份加入10a(1.40 g,11.1 mmol)在35 mL二氯甲烷中的溶液中。将所述悬浮液搅拌过夜,并然后在40°C加温2小时。在二氧化硅上用二氯甲烷洗脱,接着从甲苯重结晶后,获得1.77 g固体形式的14a(41%)。所述产物包含约12%的Z-异构体,其不能通过色谱法或结晶除去。

[0181]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =8.06 (d, J =8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, J =8.8 Hz, 2H), 6.82 (m, 1H), 5.57 (m, 2H), 3.48 (m, 1H), 2.91 (s, 4H), 2.40 (m, 3H), 2.23-1.50 (m, 7H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.7 (q), 161.6 (q), 152.7 (q), 135.2 (t), 133.4 (t), 132.5 (t), 119.4.0 (q), 117.9 (t), 82.3 (t), 41.3 (s), 38.9 (s), 34.6 (s), 32.8 (s), 31.3 (s), 26.0 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}^+$ ($[M-\text{Na}]^+$): 409.1376, 实测值: 409.1372.

[0182] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 1-(4-(((环辛-4-烯-1-基氧基)羰基)氨基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯27a。

[0183] 将14a(100 mg,0.26 mmol)在二氯甲烷(2 mL)中的溶液滴加加入在冰浴中搅拌的21(160 mg,0.26 mmol)和三乙胺(400 μL ,2.9 mmol)在二氯甲烷(2 mL)中的溶液中。将所

述反应混合物在室温搅拌16小时。将蒸发后获得的粗中间体26a溶解在二氯甲烷(5 mL)中,并在冰浴中冷却。加入双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)碳酸酯(89 mg,0.35 mmol)和吡啶(28 μ L,0.35 mmol)并将所述反应混合物在室温搅拌16小时。过滤混合物,用3 mL水提取3次和用3 mL盐水提取一次。用硫酸镁干燥并蒸发后获得1.23 g粘性油形式的27a(47%)。

[0184]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =7.77 (d, J =8.7 Hz, 2H), 7.46 (d, J =8.7 Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.56 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 3.84 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.8-3.5 (m, 48H), 2.90 (t, J =6.5 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.43-1.50 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.2 (q), 167.2 (q), 167.1 (q), 153.2 (q), 141.6 (q), 135.2 (t), 133.4 (t), 129.3 (q), 128.6 (t), 118.1 (t), 81.7 (s), 70.9 (s), 70.6 (s), 70.2 (s), 66.1 (s), 41.4 (s), 40.1 (s), 38.9 (s), 34.6 (s), 32.9 (s), 32.5 (s), 31.4 (s), 28.4 (s), 25.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{H}^+$ ($[M-\text{H}]^+$): 986.5073, 实测值: 986.5085.

[0185] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 4-(((环辛-4-烯-1-基氧基)羰基)氨基)苯甲酸酯14b。

[0186] 以与制备14a相似的方式但从10b开始以32%产率获得该化合物。由于获得了纯净的10b,因此该产物不含所述Z-异构体。

[0187]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =8.04 (d, J =8.9 Hz, 2H), 7.55 (d, J =8.9 Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 5.61 (m, 2H), 5.05 (m, 1H), 2.92 (s, 4H), 2.36 (m, 4H), 2.23-1.20 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.8 (q), 161.6 (q), 152.7 (q), 144.6 (q), 135.7 (t), 132.5 (t), 132.1 (t), 119.4 (q), 118.0 (t), 72.1 (t), 41.3 (s), 34.6 (s), 32.9 (s), 30.3 (s), 28.5 (s), 26.0 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ ($[M-\text{Na}]^+$): 409.1376, 实测值: 409.1367.

[0188] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 1-(4-(((环辛-4-烯-1-基氧基)羰基)氨基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-2-氮杂四十一烷-41-酸酯27b:

[0189] 以与制备27a相似的方式,但从14b开始以89%产率获得该化合物。

[0190]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =7.79 (d, J =8.7 Hz, 2H), 7.54 (d, J =8.7 Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 6.90 (m, 1H), 5.60 (m, 2H), 5.03 (m, 1H), 3.83 (t, J =6.5 Hz, 2H), 3.8-3.5 (m, 48H), 2.89 (t, J =6.5 Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.50-1.20 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =169.2 (q), 167.2 (q), 167.0 (q), 153.2 (q), 141.6 (q), 135.7 (t), 132.1 (t), 129.3 (q), 128.5 (t), 118.3 (t), 71.0 (s), 70.9 (s), 70.6 (s), 70.1 (s), 66.0 (s), 41.4 (s), 40.1 (s), 34.6 (s), 32.9 (s), 32.5 (s), 30.3 (s), 28.4 (s), 25.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{H}^+$ ($[M-\text{H}]^+$): 986.5073, 实测值: 986.5058.

[0191] 实施例5

[0192] 四嗪放射标记

[0193] 将DOTA-结合的四嗪(28;图12,在Rossin等 *Angew Chem Int Ed* 2010, 49, 3375中描述)溶解(1 mg/mL)在0.2 M醋酸铵pH 7.0中并且使用前在-80°C贮存。将等分量的28与适合量的 $[^{111}\text{In}]$ 氯化铟或 $[^{177}\text{Lu}]$ 氯化镱组合并在37°C在轻柔搅拌下培育10分钟。然后加入5 μL 10mm DTPA并将所述溶液再额外培育5分钟。通过对于所述四嗪加入0.9摩尔当量的 InCl_3 或 LuCl_3 实施载体加入的标记反应。典型地,采用该方法获得了大于98%的定量标记产率和放射化学纯度。

[0194] 与反式环辛烯(TCO)NHS酯14、20、23、27的mAb结合

[0195] 在这里,以及在后续步骤中,所有化合物编号都是指所述a和b异构体两者。

[0196] 典型地,用总体积为250 μL PBS的0.6摩尔(用于动力学测量)或10摩尔(用于体内研究)当量的TCO-NHS结构改性1 mg CC49(在PBS中的5 mg/mL溶液)。用1M碳酸钠缓冲液将pH调节到9。在黑暗中在搅拌下室温实施反应30分钟。随后,使用Amicon Ultra-15离心装置用PBS彻底洗涤TCO-改性的mAbs。用四嗪滴定(下文描述)确定每个抗体的TCO基团数量。

[0197] 用载体加入的 ^{177}Lu 放射标记四嗪-DOTA 28。将用约0.6摩尔当量的TCO改性的mAb(25 μg)与3摩尔当量的 ^{177}Lu -28(0.5 nM)反应。将用约10摩尔当量的TCO改性的mAb(25 μg)与15摩尔当量的 ^{177}Lu -28(2.5 nM)反应。在50 μL PBS pH 7.4中在37°C实施反应10分钟。通过SDS-PAGE和磷光体成像仪(phosphor imager)分析反应混合物,并从对应所述mAb的谱带中的放射性确定反应产率。计数用AIDA Image Analyzer软件(Raytest)定量。发现TCO-mAb结合产率为80-90%。

[0198] mAb放射标记

[0199] 向在50 μL PBS中的足量 $[^{125}\text{I}]$ 碘化钠(5-15 MBq)加入1 μL 的1 mg/mL Bolton-Hunter试剂(N-琥珀酰亚胺基-3-[4-羟基苯基]丙酸酯(SHPP))在DMSO中的溶液和25 μL 的4 mg/mL 氯胺-T(N-氯4-甲基苯磺酰胺,钠盐)在PBS中的溶液。将所获得的溶液混合10-20秒,向小瓶中加入5 μL DMF和100 μL 甲苯, ^{125}I -SHPP被提取在有机相中,然后将其转移到玻璃小瓶中。在温和 N_2 流下将甲苯吹出,之后加入CC49-TCO溶液(0.1-0.5 mg在50-250 μL PBS中),用1M碳酸盐缓冲液将pH调节到9,并在温和振荡下在RT培育反应混合物30分钟。培育后,通过radio-ITLC确定标记产率。然后将所述粗反应混合物加载到Zeba离心脱盐柱上,所述Zeba离心脱盐柱用盐水溶液预先平衡(pre-equilibrated)。用20 μL 盐水溶液冲洗所述反应小瓶并将所述冲洗液也加载到所述柱上。Zeba纯化后,通过放射-ITLC、放射-HPLC和SDS-PAGE确定 ^{125}I -CC49-TCO溶液的放射化学纯度;通过BCA检测确定蛋白质浓度。

[0200] 典型地,采用这个过程,对于纯化的 ^{125}I -CC49-TCO物种获得大于70%的 ^{125}I -SHPP mAb结合和>98%的放射化学纯度。

[0201] 反应速率

[0202] 用载体加入的 ^{177}Lu 以3 MBq/ μg 的比活度放射标记四嗪-DOTA 28。使 ^{177}Lu -28(33 nM)与用1eq.的TCO改性的增加浓度的CC49(0.33、1和1.67 μM) 在200 μL PBS、pH 7.4中在37°C反应5分钟。在选定的时间(15、30、45、60、90、120、180和300秒)抽取20 μL 试样并用四嗪6(图5;在Rossin等 *Angew Chem Int Ed* 2010, 49, 3375中描述)(1.5 μL , 5mg/mL 在DMF中)猝灭。通过SDS-PAGE和磷光体成像仪分析等分量的各个混合物,并从对应所述mAb的谱带中的放射性确定环加成产率。计数使用AIDA Image Analyzer软件(Raytest)定量。

[0203] 表1:CC49-TCO结构和 ^{177}Lu -28之间反应的二级动力学常数。O = 醚连接;C = 氨基

甲酸酯(carbamate)连接

	无间隔体 [M^1s^{-1}]	PEG ₁₀ 间隔体 [M^1s^{-1}]
[0204]	TCO O 主要 (20a) 19600 ± 1400	(23a) 16500 ± 1400
	TCO O 次要 (20b) 136700 ± 2300	(23b) 156400 ± 3100
	TCO C 主要 (14a) 11350 ± 550	(27a) 11030 ± 250
	TCO C 次要 (14b) 66550 ± 8800	(27b) 111600 ± 1800

[0205] 实施例6

[0206] 反式-环辛烯体内稳定性

[0207] 用CC49-PEG₁₀-TCO-O主要(CC49-23a; 8.4 TC0每CC49; 300 μg/100 μL每小鼠)、CC49-PEG₁₀-TCO-C次要(CC49-27b; 3.3 TC0每CC49, μg/100 μL每小鼠)和无间隔体的CC49-TCO-O主要(CC49-20a; 8.0 TC0每CC49, 300 μg/100 μL每小鼠)对无肿瘤小鼠(n=3每组)进行静脉注射。在选定的时间点(从注射后1小时到不超过4天)从隐静脉(vena saphena)抽取血液试样并收集在包含肝素的小瓶中。称重所述血液试样并加入过量的¹¹¹In-四嗪28。在37 °C培育20分钟后,用PBS将血液等分试样稀释10倍并通过SDS-PAGE分析。从对应所述mAb的谱带中的放射性确定环加成产率,并用AIDA Image Analyzer软件定量计数。在三个单独的小鼠组(n=3)中评估在各个时间点的血液中存在mAb的量(%ID/g血液),其中所述小鼠被注射相应的¹²⁵I-CC49-TCO(300 μg/100 μL每小鼠,约0.2 MBq)。所述数据(对于mAb清除进行校正)归一化到在t=0时的100%ID TC0。

[0208] 该实验的结果表明,除了由于mAb从血液清除导致的TC0生理减少外,在被注射了其中所述TC0通过PEG₁₀间隔体被结合到CC49的结构的两组小鼠中,循环反应性TC0基团的量随着时间存在进一步减少(图13A和B)。对于被注射了其中所述TC0不经间隔体被连接到所述mAb的结构的小鼠则不是这样的情况(图13C)。这表明了体内无间隔体CC49-TCO结构相对于所述CC49-PEG₁₀-TCO结构的更高稳定性。

[0209] 实施例7

[0210] 生物分布实验

[0211] 通过用具有和不具有PEG₁₀间隔体的¹²⁵I-标记的CC49-TCO结构(100 μg/100 μL每小鼠,约0.2 MBq),并在24或72小时后用¹¹¹In-四嗪28(21 μg/75 μL每小鼠,约0.8 MBq)对携带肿瘤的小鼠(n=3)进行静脉注射实施双同位素生物分布实验。给予四嗪三小时后,用异氟醚麻醉所述动物并通过颈脱位处死。通过心脏穿刺抽取血液,并采收、剥离干(blotted dry)并称重感兴趣的器官和组织。在γ-计数器中测量所述试样连同标准物的放射性以确定所述%ID/克。对于¹²⁵I和¹¹¹In分别将所述能量窗设定为10-80 keV和100-510 keV。放射标记的mAbs和¹¹¹In-四嗪的分布在表2-5中示出。

[0212] 表2: 双同位素生物分布数据 注射¹⁷⁷Lu-四嗪 28(21 μg/75 μL每小鼠,约0.5 MBq)3小时后,给予¹²⁵I-CC49-PEG₁₀-TCO-O主要(CC49-23a; 100 μg/100 μL每小鼠,约0.2 MBq)27小时或99小时后。数据以%ID/克±SD给出。

	1 天预靶向 (n=2)		4 天预靶向 (n=2)	
	¹²⁵ I-mAb	¹⁷⁷ Lu-四嗪	¹²⁵ I-mAb	¹⁷⁷ Lu-四嗪
[0213] 血液	5.55 ± 1.85	1.06 ± 0.34	0.23 ± 0.05	0.04 ± 0.01
肿瘤	15.81 ± 0.22	3.09 ± 0.01	10.99 ± 4.24	0.86 ± 0.39
心脏	0.94 ± 0.09	0.20 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.00
肺	1.46 ± 0.31	0.32 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.05
肝脏	2.82 ± 1.56	0.61 ± 0.15	0.67 ± 0.16	0.31 ± 0.03
脾脏	1.21 ± 0.47	0.30 ± 0.09	0.38 ± 0.09	0.20 ± 0.00
肾脏	1.49 ± 0.40	1.73 ± 0.31	0.15 ± 0.03	1.73 ± 0.22
肌肉	0.32 ± 0.13	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01
骨骼	0.47 ± 0.18	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
大脑	0.18 ± 0.09	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00

[0214] 表3:单一同位素生物分布数据 注射¹¹¹In-四嗪28(21 μg/75 μL每小鼠,约0.5 MBq)3小时后,给予CC49-TCO-0主要(CC49-20a;100 μg/100 μL每小鼠)27小时或75小时后。数据以%ID/克±SD给出。

	1 天预靶向 (n=3)	3 天预靶向 (n=2)
	¹¹¹ In-四嗪	¹¹¹ In-四嗪
[0215] 血液	2.39 ± 1.77	0.79 ± 0.39
肿瘤	2.40 ± 0.16	3.11 ± 0.80
心脏	0.84 ± 0.71	0.30 ± 0.03
肺	1.13 ± 0.55	0.58 ± 0.07
肝脏	2.05 ± 1.03	0.88 ± 0.13
脾脏	0.83 ± 0.46	0.43 ± 0.03
肾脏	2.84 ± 0.35	3.16 ± 0.57
肌肉	0.33 ± 0.22	0.21 ± 0.02
骨骼	0.33 ± 0.16	0.15 ± 0.00
大脑	0.10 ± 0.06	0.26 ± 0.11

[0216] 表4:双同位素生物分布数据 注射¹¹¹In-四嗪28(21 μg/75 μL每小鼠,约0.5 MBq)3小时后,给予¹²⁵I-CC49-TCO-C次要(CC49-14b;100 μg/100 μL每小鼠,约0.2 MBq)27小时或75小时后。数据以%ID/克±SD给出。

[0217]

	1 天预靶向 (n=4)		3 天预靶向 (n=4)	
	¹²⁵ I-mAb	¹¹¹ In-四嗪	¹²⁵ I-mAb	¹¹¹ In-四嗪
血液	5.09 ± 0.59	1.12 ± 0.09	1.82 ± 0.76	0.54 ± 0.11
肿瘤	14.52 ± 2.46	2.59 ± 0.35	19.13 ± 5.99	2.76 ± 1.36
心脏	1.87 ± 0.55	0.46 ± 0.12	0.71 ± 0.28	0.24 ± 0.07
肺	3.06 ± 1.08	0.79 ± 0.24	1.44 ± 0.49	0.50 ± 0.11
肝脏	4.99 ± 1.51	1.17 ± 0.35	2.85 ± 0.50	0.84 ± 0.21
脾脏	2.20 ± 0.87	0.53 ± 0.14	1.14 ± 0.34	0.34 ± 0.09
肾脏	1.93 ± 0.71	3.12 ± 0.33	0.74 ± 0.24	2.82 ± 0.28
肌肉	0.73 ± 0.12	0.22 ± 0.07	0.49 ± 0.15	0.16 ± 0.04
骨髓	0.95 ± 0.30	0.27 ± 0.08	0.45 ± 0.19	0.20 ± 0.07
大脑	0.19 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.01

[0218] 表5: 双同位素生物分布数据 注射¹¹¹In-四嗪28(21 μg/75 μL每小鼠, 约0.5 MBq) 3小时后, 给予¹²⁵I-CC49-TC0-0次要(CC49-20b; 100 μg/100 μL每小鼠, 约0.2 MBq) 27小时或75小时后。数据以%ID/克 ± SD给出。

[0219]

	1 天预靶向 (n=3)		3 天预靶向 (n=3)	
	¹²⁵ I-mAb	¹¹¹ In-四嗪	¹²⁵ I-mAb	¹¹¹ In-四嗪
血液	6.45 ± 1.46	1.61 ± 0.45	2.20 ± 0.41	0.59 ± 0.10
肿瘤	18.46 ± 4.14	3.42 ± 0.40	17.56 ± 4.77	2.56 ± 0.65
心脏	1.80 ± 0.30	0.50 ± 0.04	0.70 ± 0.12	0.22 ± 0.03
肺	3.19 ± 0.53	0.97 ± 0.16	1.38 ± 0.28	0.46 ± 0.07
肝脏	4.79 ± 2.22	1.41 ± 0.45	2.17 ± 0.63	0.64 ± 0.06
脾脏	2.07 ± 0.46	0.65 ± 0.12	0.99 ± 0.33	0.35 ± 0.08
肾脏	1.76 ± 0.38	3.39 ± 0.84	0.69 ± 0.09	2.59 ± 0.24
肌肉	0.80 ± 0.20	0.24 ± 0.06	0.40 ± 0.14	0.18 ± 0.09
骨髓	0.75 ± 0.17	0.40 ± 0.05	0.29 ± 0.05	0.16 ± 0.02
大脑	0.25 ± 0.06	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01

[0220] 所述生物分布数据证实了缺少所述间隔体的CC49-TC0结构(constructs)相对于第一代CC49-PEG₁₀-TC0-0主要23a的更高体内稳定性。在注射所述四嗪前用CC49-PEG₁₀-TC0-0主要(CC49-23a)预处理24小时的小鼠中, 由于所述TC0和所述四嗪的之间的反应, 所述肿瘤中存在的大量mAb(15.81 ± 0.22%ID/克)导致3.09 ± 0.01%ID/克的¹⁷⁷Lu积累(表3)。

不幸的是， ^{177}Lu -四嗪与血液中循环的大量mAb-TCO的反应($5.55 \pm 1.85\%$ ID/克)还导致低的肿瘤对血液比($T/B=3.1 \pm 1.0$)。当在所述mAb4天后给予所述放射标记的四嗪时，由于mAb的清除，所述T/B比值显著改善(21.3 ± 4.0)。但是，此时也观察到约四倍低的 ^{177}Lu -四嗪在肿瘤中的积累($0.86 \pm 0.39\%$ ID/克)。绝对四嗪积累的这种减少并非mAb-TCO从组织释放的结果(肿瘤中仍存在 $10.99 \pm 4.24\%$ ID/克 ^{125}I -mAb)，而合理地是由注射之间的4天期间TCO的体内降解所导致。

[0221] 相反，当用缺少所述PEG₁₀间隔体的CC49-TCO结构预处理所述小鼠时，观察到mAb注射3天后 ^{111}In -四嗪的肿瘤摄取相对于mAb注射1天后没有减少(表4-6)。同时，由于mAb-TCO从血液清除，所述T/B比从约2增加到超过4。在这段时间内肿瘤结合的TCO的得到保持的反应性表明其相对于所述第一代CC49-PEG₁₀-TCO的更高稳定性。

[0222] 实施例8

[0223] 成像实验

[0224] 接受100 μg 不含PEG₁₀间隔体(spacer)的CC49-TCO结构3或4天后用 ^{111}In -四嗪28(21 $\mu\text{g}/75\mu\text{L}$ 每小鼠, 20-50 MBq)注射携带肿瘤的小鼠。约1小时后，麻醉所述小鼠并放置在装备有用于麻醉的鼻锥和用于呼吸监控的传感器的动物床上。注射四嗪2小时后采用四头多针孔小动物SPECT/CT成像体系(NanoSPECT, Bioscan Inc.)实施单光子发射计算机断层成像(Single photon emission computed tomography, SPECT)。使用1.4 mm直径的针孔和120-140 秒的采集时间/视图(24次投影)实施所述SPECT采集(总共1小时)。对于 ^{111}In 将所述能量窗设定在 $245 \text{ keV} \pm 15\%$ 和 $171 \text{ keV} \pm 20\%$ 。第一次扫描两到四天后，通过过量麻醉对所述小鼠进行安乐死并过夜获取第二次SPECT/CT扫描。每次SPECT期之前实施CT扫描(2秒/投影, 360次投影)以获得关于放射性分布的解剖学信息。所述采集之后，使用制造商的软件(InVivoScope 1.39, patch 1)迭代重建数据。对于肿瘤、肝脏、肾脏和大腿肌肉，手工绘制感兴趣的区域(ROIs)，一式三份。用填充了已知量的 ^{111}In 的体模来标定用于组织放射性定量的扫描仪。图13A-C中分别示出了注射了CC49-TCO-0次要(CC49-20b)、CC49-TCO-0主要(CC49-20a)和CC49-TCO-C次要(CC49-14b)的三只小鼠在代表性的时间尺度上的图像。

[0225] 图13:(左)给予(A)CC49-TCO-0次要(CC49-20b)，(B)CC49-TCO-0主要(CC49-20a)或(C)CC49-TCO-C次要(CC49-14b)(100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 每小鼠)3-4天后，注射 ^{111}In -四嗪28(21 $\mu\text{g}/75 \mu\text{L}$ 每小鼠, 约40 MBq)2小时后活小鼠的SPECT/CT投影。(右)，所述第一次成像期2-4天后相同小鼠的死后SPECT/CT扫描。白色箭头表示肿瘤。

[0226] 小鼠中纵向SPECT/CT研究显示用CC49-TCO-0(主要和次要两种形式)预处理3天后肿瘤中的高 ^{111}In -四嗪摄取，并因此证实这些TCO-结构的体内稳定性(图13A和B)。此时(左图)，大多数非肿瘤结合的mAb-TCO已经从循环清除，并因此由于 ^{111}In -四嗪的尿排泄除了所述肿瘤以外唯一可见的器官是肾脏和膀胱。重要的是，在血液和富血液的器官例如肝脏中观察不到放射性。非常低的背景放射性是相对于使用第一代CC49-PEG₁₀-TCO(见R. Rossin, P. Renart Verkerk, Sandra M. van den Bosch, R. C. M. Vulderson, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew Chem Int Ed* 2010, 49, 3375)获得的结果的根本改进，并将转化为对病人中骨髓和其它剂量限制器官的更低剂量。

[0227] 值得注意的是，所述用CC49-TCO-0预处理的小鼠的肿瘤在注射 ^{111}In -四嗪72-96小时后仍是高放射性的，表明所述TCO-四嗪环加成产物的高的体内稳定性。在晚的时间点，在

所述小鼠肾脏内仍可见一些活性,并且一些在肝脏中积累,合理地是由于抗原脱落和由于注射四嗪时仍在血液内循环的所述mAb的清除所导致。当目标是癌症病人中的预靶向的RIT时,肿瘤中放射性保持延长的时间也是非常重要的。实际上,治疗性放射性核素被结合到靶组织的时间越长,递送到肿瘤的剂量越高。

[0228] 出人意料地,在给予CC49-TCO-C次要后注射了 ^{111}In -四嗪的小鼠中观察到相当低的放射性摄取(uptake),可能是两次处理之间的4天延迟所导致(图13C)。但是,也是在这种情况下,在早期扫描2天之后,肿瘤中的信号仍存在,证实由所述体内Diels-Alder反应获得的环加成产物的体内稳定性。

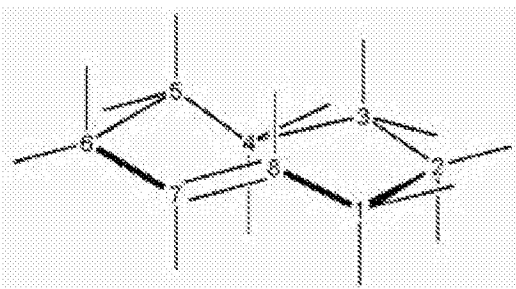
[0229] 实施例9

[0230] 该实施例涉及在反式环辛烯的不同位置上的各种取代基的电脑模拟(*in silico*)测试。对于不同取代的环辛烯,使用MOPAC软件(Cambridge stware Mopac Pro version 8.03)计算了HOMO能量。结果在以下表6中提供。

[0231] 表6

[0232] 通过Mopac对不同取代基确定的HOMO能量。在这里(a)代表直立;(e)代表平伏。

[0233] 碳原子根据以下结构进行编号:



[0235]

1/6	2/5	3/4	7/8	HOMO (eV)
				-9.23
CH2-tBu (a)				-9.24
CH2-tBu (c)				-9.19
	CH2-tBu (a)			-9.17
	CH2-tBu (c)			-9.20
		CH2-tBu (a)		-9.15
		CH2-tBu (c)		-9.20
			CH2-tBu	-8.93
OH (a)				-9.28
OH (c)				-9.39
	OH (a)			-9.28
	OH (c)			-9.41
		OH (a)		-9.23
		OH (c)		-9.40
			OH	-8.80
O-Me (a)				-9.25
O-Me (c)				-9.37
	O-Me (a)			-9.13

[0236]

	O-Me (e)			-9.24
		O-Me (s)		-9.12
		O-Me (c)		-9.37
			O-Me	-8.96
Me (s)				-9.23
Me (e)				-9.23
	Me (a)			-9.22
	Me (c)			-9.22
		Me (s)		-9.17
		Me (c)		-9.22
			Me	-8.93
O-tBu (s)				-9.20
O-tBu (c)				-9.31
	O-tBu (a)			-8.95
	O-tBu (c)			-9.12
		O-tBu (s)		-8.99
		O-tBu (c)		-9.30
			O-tBu	-8.95
tBu (s)				-9.21
tBu (e)				-9.22
	tBu (a)			-9.17
	tBu (c)			-9.22
		tBu (s)		-9.15
		tBu (c)		-9.19
			tBu	-8.88
O-Phe (s)				-8.94
O-Phe (c)				-9.05
	O-Phe (a)			-8.88
	O-Phe (c)			-8.96
		O-Phe (s)		-9.01
		O-Phe (c)		-9.23
			O-Phe	-8.69
O-Bz (s)				-9.36
O-Bz (c)				-9.37
	O-Bz (a)			-9.02
	O-Bz (c)			-9.23
		O-Bz (s)		-9.07
		O-Bz (c)		-9.36
			O-Bz	-8.58

[0237] 实施例10

[0238] 四嗪28的替代性合成过程,和相应的Gd-络合物,28-Gd的合成。

[0239] 参考图15,其示出了合成路线。

[0240] 5-氧代-5-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,4-二氢-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)戊酸(30)。

[0241] 根据文献过程(M. L. Blackman, M. Royzen, M. J. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13518-13519)合成了6-(6-(吡啶-2-基)-1,4-二氢-1,2,4,5-四嗪-3-基)-吡啶-3-胺(29)。将29(428 mg, 1.69 mmol)和戊二酸酐(231 mg, 2.03 mmol)在THF(10 mL)中的混合物在氩气惰性气氛下在60℃加热40小时。冷却后,用THF(5 mL)洗涤橙色沉淀并干燥以获得橙色固体形式的30(537 mg, 87%)。

[0242]

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ=12.1 (br. s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.82 (d, J=1.8 Hz, 1H), 8.64 (d, J=4.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, J₁=8.4 Hz, J₂=2.4 Hz, 1H), 8.0 – 7.9 (m, 3H), 7.53 (dt, J₁=1.8 Hz, J₂=4.8 Hz, 1H), 2.43 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.29 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.83 (q, J=7.4 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ=174.2, 171.6, 148.6, 147.3, 146.3, 146.1, 141.4, 138.9, 137.4, 137.2, 126.6, 125.3, 121.3, 120.9, 35.3, 32.9, 20.2; MS (ESI, m/z): 计算值 C₁₇H₁₈N₅O₅⁺ ([M+H]⁺): 368.15, 实测值: 368.25.

[0243] 5-氧代-5-(6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基氨基)戊酸(6)

[0244] 将化合物30(166 mg; 0.452 mmol)悬浮在醋酸(3 mL)中并加入亚硝酸钠(93.5 mg; 1.36 mmol)。观察到快速着色成紫色悬浮液。搅拌15分钟后,过滤所述反应混合物,用水(2×6 mL)和丙酮(3 mL)洗涤,并干燥,以获得紫色固体形式的产物(152 mg; 92%)。

[0245]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ=12.13 (s, 1H), 10.58 (s, 1H), 9.05 (d, J=2.3 Hz, 1H), 8.94 (d, J=4.2 Hz, 1H), 8.62 (d, J=8.8 Hz, 1H), 8.60 (d, J=8.8 Hz, 1H), 8.43 (dd, J₁=2.3 Hz, J₂=8.8 Hz, 1H), 8.16 (td, J₁=7.8 Hz, J₂=1.7 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J₁=1.1 Hz, J₂=4.4 Hz, J₃=7.4 Hz), 2.50 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.33 (t, J=7.3 Hz, 2H), 1.86 (q, J=7.3 Hz, 2H); ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ=174.1 (q), 172.0 (q), 163.0 (q), 162.7 (q), 150.6 (t), 150.2 (q), 143.8 (q), 141.3 (t), 138.4 (q), 137.7 (t), 126.5 (t), 126.1 (t), 124.8 (t), 124.1 (t), 35.4 (s), 32.9 (s), 20.2 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 C₁₇H₁₆N₅O₅⁺ ([M+H]⁺): 366.1314, 实测值: 366.1313.

[0246] (37,41-二氧代-41-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十一氧杂-36-氮杂四十一烷基)氨基甲酸叔丁酯(31)。

[0247] 将PyBOP(148 mg, 0.284 mmol)加入在0℃的6(94.4 mg, 0.258 mmol)、氨基-PEG₁₀-氨基-Boc(150 mg, 0.233 mmol)和N,N-二异丙基乙基胺(新蒸馏, 100 mg, 0.774 mmol)在DMF(2 mL)中的搅拌混合物中。使所述混合物加温至室温并继续搅拌15分钟。蒸发所述透明的、深红色溶液至干燥,并将产物重新溶解在氯仿(5 mL)中,用0.2 M KH₂PO₄(pH=4.5, 3×3 mL)和饱和Na₂CO₃(2×3 mL)洗涤,然后在二乙基醚(20 mL)中沉淀。通过离心收集并通过在

二氧化硅上使用甲醇在氯仿中的梯度(0-10%)的柱色谱纯化所述沉淀,提供紫色蜡状固体形式的31(148 mg,64%)。

[0248]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ =9.07 (d, J =2.2 Hz, 1H), 8.97 (d, J =4.6 Hz, 1H), 8.73 (d, J =8.8 Hz, 1H), 8.72 (d, J =8.8 Hz, 1H), 8.63 (dd, J_1 =2.3 Hz, J_2 =8.8 Hz, 1H), 8.03 (td, J_1 =7.8 Hz, J_2 =1.7 Hz, 1H), 7.59 (ddd, J_1 =1.1 Hz, J_2 =4.6 Hz, J_3 =7.4 Hz), 7.01 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.9-3.2 (宽 s, 48H), 2.60 (t, J =7.1 Hz, 2H), 2.37 (t, J =7.1 Hz, 2H), 2.09 (q, J =7.1 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ =173.8 (q), 173.1 (q), 163.8 (q), 163.7 (q), 151.3 (t), 150.5 (q), 144.0 (q), 142.7 (t), 139.2 (q), 137.9 (t), 127.0 (t), 126.9 (t), 125.5 (t), 124.7 (t), 79.5 (q), 70.5 (s), 70.1 (s), 40.7 (s), 39.7 (s), 36.5 (s), 35.5 (s), 28.8 (p), 21.9 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_5\text{O}_{15}^+$ ($[M+H]^+$): 992.5304, 实测值: 992.5301.

[0249] 2,2',2''-(10-(2,40,44-三氧代-44-((6-(6-(吡啶-2-基)-1,2,4,5-四嗪-3-基)吡啶-3-基)氨基)-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十一氧杂-3,39-二氮杂四十四烷基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三基)三乙酸(28)。

[0250] 将产物31(72.3 mg,0.0727 mmol)溶解在DCM(1 mL)中,并加入TFA(1 mL)。在室温搅拌所述混合物1小时。蒸发后,将剩余物溶解在乙腈(1.5 mL)中并在二乙基醚(15 mL)中沉淀。通过过滤分离紫色沉淀从而以定量的产率提供32的TFA-盐。将其溶解在DMF(1.5 mL)中,并加入DOTA-NHS(69.6 mg,0.075 mmol)和N,N-二异丙基乙基胺(新蒸馏,44 mg,0.341 mmol)。在室温搅拌所述混合物30分钟。蒸发透明的、深红/紫色溶液后,将粗材料溶解在水中并通过制备HPLC纯化。冷冻干燥后获得28(80.5 mg,87%产率)。

[0251]

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ =9.22 (d, J =2.4 Hz, 1H), 9.10 (dd, J_1 =4.7 Hz, J_2 =1.1 Hz, 1H), 8.78 (d, J =8.7 Hz, 1H), 8.75 (d, J =7.8 Hz, 1H), 8.59 (dd, J_1 =2.4 Hz, J_2 =8.7 Hz, 1H), 8.32 (td, J_1 =7.8 Hz, J_2 =1.7 Hz, 1H), 8.08 (ddd, J_1 =1.1 Hz, J_2 =4.7 Hz, J_3 =7.8 Hz), 3.9-3.1 (m, 80H), 2.60 (t, J =7.3 Hz, 2H), 2.34 (t, J =7.3 Hz, 2H), 2.02 (q, J =7.3 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6): δ =172.8 (q), 172.5 (q), 163.8 (q), 163.5 (q), 151.3 (t), 150.9 (q), 144.5 (q), 142.0 (t), 139.3 (q), 138.5 (t), 127.3 (t), 126.9 (t), 125.6 (t), 124.9 (t), 70.5 (s), 70.3 (s), 69.9 (s), 69.5 (s), 39.2 (s), 36.4 (s), 35.2 (s), 21.7 (s); HRMS (ESI, m/z): 计算值 $\text{C}_{57}\text{H}_{82}\text{N}_{13}\text{O}_{20}^+$ ($[M+H]^+$): 1278.6382, 实测值: 1278.6557.

[0252] 28的 Gd^{III} -络合物,(28- Gd^{III})

[0253] 将化合物28(204 mg,0.160 mmol)溶解在醋酸铵水溶液(0.1 M,pH=5.5, 5 mL)中,并加入醋酸钆(III)水合物(96.8 mg, 0.239 mmol)。在室温搅拌所述混合物30分钟,接着立即通过制备HPLC纯化。冷冻干燥后,获得紫色固体形式的 Gd^{III} -络合物(188 mg,82%产率)。MS(ESI, m/z):计算值 $\text{C}_{57}\text{H}_{89}\text{N}_{13}\text{O}_{20}\text{Gd}^+$ ($[M+H]^+$): 1433.56,实测值: 1433.58。

[0254] 实施例11

[0255] 新模型四嗪探针的化学合成

[0256] 合成了包含可选择的四嗪部分的几种四嗪模型探针。参考图16,其示出了所述合成路线。

[0257] 3-(5-丁酰氨基-2-吡啶基)-6-(5-(三氟甲基)-2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(35)

[0258] 在氩气惰性气氛下将2-氰基-5-三氟甲基-吡啶(200 mg,1.16 mmol)、2-氰基-5-氨基-吡啶(300 mg,2.52 mmol)和硫磺(80 mg,2.52 mmol)在乙醇(2 mL)中搅拌。加入水合肼(0.60 g;12.0 mmol)并将所述混合物在80°C加热过夜。使反应混合物冷却并加入水(2 mL)。离心获得固体,用水/乙醇=1/2洗涤所述固体并将其干燥以提供135 mg粗产物33。向合并的离心上清液加入水,导致进一步批次的粗材料(188 mg)的沉淀,通过离心将其分离并干燥。

[0259] 将该粗胺产物(33)和丁酸酐(285 mg;1.80 mmol)在THF(5 mL)中搅拌并在65°C加热过夜。浓缩所述反应混合物,并在己烷/二乙基醚=3/1中搅拌剩余物。用玻璃过滤器过滤该悬浮液并通过使用己烷/丙酮混合物作为洗脱液的二氧化硅柱色谱纯化剩余物,获得90 mg粗产物34(约60%纯度)。

[0260] 将未精制的酰胺化的二氢四嗪34(62 mg)悬浮在THF(1.5 mL)和水(2.0 mL)的混合物中。搅拌的同时,加入NaNO₂(88 mg;1.28mmol),并然后在0°C滴加硫酸(130 mg;1.33 mmol)在水(1 mL)中的溶液。观察到快速着色成红色悬浮液。搅拌3分钟后,用氯仿和水稀释所述反应混合物,留下紫色沉淀,所述紫色沉淀通过用玻璃过滤器过滤分离。浓缩滤出液中的有机层并用二乙基醚稀释以诱导紫色固体第二次收获的沉淀。用氯仿和二乙基醚的混合物磨碎(triturated)合并的固体,并通过过滤分离以提供纯四嗪35(约25 mg,8%总产率,从2-氰基-5-三氟甲基-吡啶计算)。

[0261] ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = 9.2 (s, 1H), 8.9 (d, 1H), 8.75 (多重信号, 3H), 8.3 (d, 1H), 2.45 (t, 2H), 1.8 (m, 2H), 1.05 (t, 3H) ppm. ¹⁹F NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = -62.9 ppm. LC-MS/PDA: 色谱中的一个峰, m/z = 390.2 (M+H⁺)和800.8 (2M+Na⁺), λ_{max} = 329和526 nm。

[0262] 3-(5-氟-2-吡啶基)-6-(5-丁酰胺基-2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(38)

[0263] 在氩气惰性气氛下在乙醇(1.5 mL)中搅拌2-氰基-5-氟-吡啶(100 mg,0.82 mmol)、2-氰基-5-氨基-吡啶(200 mg,1.68 mmol)和硫磺(55 mg,1.72 mmol)。加入水合肼(0.35 g;7.0 mmol)并在90°C加热所述混合物过夜。使所述反应混合物冷却并加入乙醇(5 mL)。用玻璃过滤器过滤获得固体,用己烷洗涤并然后干燥,以提供90 mg粗产物36。

[0264] 接着,在THF(1.5 mL)中搅拌该粗胺产物36和丁酸酐(93 mg;0.59 mmol)并在65°C加热。在氩气下反应过夜后,将所述反应混合物冷却,用一些己烷(约3 mL)稀释并用玻璃过滤器(glass filter)过滤。通过应用己烷/丙酮混合物作为洗脱剂的二氧化硅柱色谱纯化剩余物,获得纯的酰胺化的产物37(约28 mg,10%总产率,从2-氰基-5-氟-吡啶计算)。

[0265] ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = 9.25 (bs, 1H, NH), 8.7 (s, 1H), 8.5 (s, 1H, NH), 8.4 (多重信号, 2H), 8.2 (m, 1H), 8.1 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.5 (m, 1H), 2.4 (t, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.05 (t, 3H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃/CD₃OD): δ = 172.8, 161.6, 159.0, 146.6, 146.1, 143.5 (d), 141.6, 139.3, 136.8, 136.6, 136.4, 127.0, 124.0, 123.8, 122.6, 121.5, 38.9, 18.8, 13.5 ppm (由于C-F耦合,一些碳的

信号是双重峰)。LC-MS/PDA: 色谱中的一个峰, $m/z = 342.1$ ($M+H^+$), $\lambda_{\max} = 288$ nm。

[0266] 将所述酰胺化的二氢四嗪37(28 mg; 0.082 mmol)悬浮在THF(2 mL)和水(2 mL)的混合物中。搅拌的同时,在0℃滴加 NaNO_2 (85 mg; 1.23 mmol),和硫酸(120 mg; 1.23 mmol)在水(2 mL)中的溶液。观察到快速着色成紫色悬浮液。搅拌3分钟后,加入氯仿和水。用水洗涤所述紫色氯仿层两次,然后浓缩。在少量氯仿中搅拌固体剩余物,然后向其中加入己烷。将几乎无色的上清液倒出,干燥固体以获得21 mg紫色粉末38(产率:75%)。

[0267] ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 8.8$ (多重信号, 5H), 7.75 (m, 1H), 2.45 (t, 2H), 1.8 (m, 2H), 1.05 (t, 3H) ppm. ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = 173.4, 162.9, 162.6, 162.4, 159.8, 146.0, 143.2, 141.3, 139.7$ 和 $139.4, 138.8, 126.9, 125.8$ (d), 125.2, 124.4, 124.2, 39.0, 18.7, 13.5 ppm (由于C-F耦合,一些碳的信号是双重峰)。 ^{19}F NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): $\delta = -120.4$ ppm. LC-MS/PDA: 色谱中的一个峰, $m/z = 340.2$ ($M+H^+$), $\lambda_{\max} = 324$ 和 529 nm。

[0268] 3-(2-吡啶基)-6-甲基-1,2,4,5-四嗪(40)

[0269] 在氩气惰性气氛下在乙醇(5 mL)中搅拌2-氰基吡啶(500 mg, 4.8 mmol)、乙脒盐酸盐(2.00 g, 21.2 mmol)和硫磺(155 mg, 4.8 mmol)。加入水合肼(2.76g; 55.2 mmol)并在20℃搅拌所述混合物过夜。过滤浑浊的混合物并蒸发滤出液至干燥,获得2.9 g橙色的粗产物39。

[0270] 接着,将该粗产物(800 mg)悬浮在THF(3 mL)和醋酸(4 mL)的混合物中。在0℃加入 NaNO_2 (2.0g; 29.0 mmol)在水(3 mL)中的溶液。观察到立刻着色成红色/紫色悬浮液。在0℃搅拌5分钟后,加入氯仿和水。用水洗涤所述紫色氯仿层两次,然后浓缩。在氯仿和己烷的1:1混合物中搅拌固体剩余物,然后过滤。浓缩滤出液并通过应用氯仿/丙酮混合物作为洗脱液的二氧化硅柱色谱纯化所述粗产物,获得纯产物40(48 mg, 21%总产率,从2-氰基吡啶计算)。

[0271] ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 8.96$ (d, 2H), 8.65 (d, 2H), 7.99 (t, 2H), 7.56 (dd, 3H), 3.17 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 168.1, 163.6, 150.9, 150.3, 137.4, 126.3, 123.9, 21.4$ ppm. LC-MS/PDA: 色谱中的一个峰, $m/z = 174.3$ ($M+H^+$), $\lambda_{\max} = 274$ 和 524 nm。

[0272] 3,6-双(4-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(42)

[0273] 在氩气惰性气氛下在90℃加热4-氰基吡啶(858 mg; 8.24 mmol)和一水合肼(1.24 g; 24.7 mmol)16小时。使所述混合物冷却到室温并然后用水(3 mL)稀释。过滤橙色沉淀(41)并用水(3 mL)洗涤,随后将其溶解在DMSO(10 mL)中。向该溶液加入DDQ(372 mg; 1.64 mmol)。观察到立即着色成深红色溶液。60分钟后,加入饱和碳酸氢钠溶液(20 mL)并用氯仿(3次30 mL)提取产物。用 Na_2SO_4 干燥合并的有机层并将其蒸发至干燥以获得粉色固体形式的标题化合物(52 mg; 5%总产率,从4-氰基吡啶计算)。

[0274] ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta 8.97$ (d, 4H), 8.52 (d, 4H) ppm. LC-MS/PDA: 色谱中的一个峰, $m/z = 237.2$ ($M+H^+$), $\lambda_{\max} = 271$ 和 523 nm。

[0275] 实施例12

[0276] 额外的反式-环辛烯结构的化学合成

[0277] 参考图17,其详细描述合成路线。

[0278] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)醋酸酯(44a)

[0279] 向冰冷冷却的10a(1.73 g, 13.73 mmol, 包含约10%顺式异构体)在THF(40 mL)中的溶液加入在油中的氢化钠(60%, 2.60 g, 65.0 mmol)。在RT搅拌所述混合物15分钟, 然后将其加热到50℃达1小时。在冰中冷却所述混合物, 加入溴乙酸(2.50 g, 17.9 mmol)。在冰中搅拌所述悬浮液1小时, 然后在约25℃搅拌64小时, 加入更多的THF以保持可搅拌的悬浮液(总体积约100 mL)。在50℃加热1小时后, 冷却所述混合物, 缓慢加入水。通过旋转蒸发除去大部分THF并加入更多的水(总体积50 mL)。用MTBE(2×75 mL)提取含水混合物, 并用25 mL水洗涤有机层。用16 g柠檬酸酸化合并的水层, 并用2×75 mL MTBE提取产物。干燥并旋转蒸发留下剩余物, 通过柱色谱(40 g SiO₂)将其纯化。合并产物级分, 从含有痕量MTBE的庚烷重结晶剩余物。这提供了810 mg的产物43a(810 mg, 4.40 mmol, 32%, 含有少量顺式异构体)。¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.4 - 2.45 (m, 10H), 3.1 - 3.2 (m, 1H), 3.9 - 4.1 (AB, 2H), 5.3 - 5.65 (m, 2H)。

[0280] 将产物43a溶解在30 mL二氯甲烷中。加入N-羟基琥珀酰亚胺(715 mg, 6.22 mmol)并在冰中冷却混合物。加入DCC(1.42 g, 6.89 mmol)并在冰中搅拌所述混合物30分钟, 然后在RT搅拌4小时。过滤、旋转蒸发和进行在40 g硅胶上使用庚烷/EtOAc梯度的色谱提供44a。合并产物级分, 并从含有少量MTBE的庚烷重结晶。刮擦之后产物结晶。过滤后获得180 mg的产物(0.64 mmol, 15%, 含有约20%顺式异构体)。

[0281]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.4 - 2.45 (m, 10H), 2.8 (s, 4H), 3.1 - 3.2 (m, 1H), 4.3 (s, 2H), 5.3 - 5.65 (m, 2H)。

[0282] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)醋酸酯(44b)

[0283] 向冰冷冷却的10b(0.78 g, 6.19 mmol)在THF(30 mL)中的溶液加入在油中的氢化钠(60%, 0.94 g, 23.5 mmol)。在RT搅拌所述混合物15分钟, 然后加热到50℃达1小时。在冰中冷却所述混合物, 加入溴乙酸(1.41 g, 10.14 mmol)。在约25℃搅拌悬浮液20小时(试样表明还未发生耦合), 然后在55℃搅拌6小时, 在25℃搅拌3天, 并在55℃再搅拌6小时。通过旋转蒸发除去大部分THF, 并加入50 mL MTBE, 接着加入冰和25 mL水。分离层, 并用30 mL MTBE提取水层。用25 mL水洗涤相继的有机层。在冰中冷却合并的水层, 加入50 mL MTBE, 接着加入5.1 g柠檬酸。分离层, 并用50 mL MTBE提取水层。干燥和旋转蒸发留下剩余物(43b), 将其就这样用于下一步骤。¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.2 - 2.45 (m, 10H), 3.65 - 3.75 (m, 1H), 4.1 (s, 2H), 5.45 - 5.65 (m, 2H)。

[0284] 将产物43b溶解在30 mL二氯甲烷中。加入N-羟基琥珀酰亚胺(1.60 g, 13.91 mmol)并在冰中冷却所述混合物。加入DCC(3.11 g, 15.10 mmol)并在冰中搅拌混合物30分钟, 然后在RT搅拌3小时。过滤、旋转蒸发和进行在40 g硅胶上使用甲苯然后是二氯甲烷作为洗脱液的色谱提供了44b, 将其与溴乙酸的NHS酯混合。将混合物溶解在25 mL MTBE中, 向所述溶液加入25 mL庚烷。搅拌2小时后, 过滤混合物(固体是溴乙酸的NHS酯)。旋转蒸发滤出液, 将剩余物溶解在温MTBE中, 加入一些庚烷, 然后将溶液冷却到RT。其沉淀出产物。过滤提供30 mg产物44b(0.11 mmol, 2%)。

[0285]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.1 – 2.45 (m, 10H), 2.85 (s, 4H), 3.65 – 3.75 (m, 1H), 4.4 (s, 2H), 5.4 – 5.7 (m, 2H).

[0286] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)-2-苯基乙酸酯 (46a)

[0287] 向10a(3.0 g, 23.8 mmol, 含有<10%顺式异构体)在THF(40 mL)中的溶液加入在油中的60% NaH(3.0 g, 75.0 mmol)。在RT搅拌混合物10分钟,然后将其加热到50°C达1.5小时。在冰中冷却后,分份加入DL-2-溴苯乙酸(3.87 g, 18.0 mmol)。向稠糊状物加入THF(20 mL)并在25°C搅拌悬浮液18小时。在55°C通过旋转蒸发除去大部分THF并加入50 mL MTBE。在冷水中冷却混合物并加入一些冰,接着加入50 mL水。分离层并用50 mL MTBE提取水层。用25 mL水洗涤相继的有机层。在冰中冷却合并的水层,加入50 mL MTBE,接着加入10 g柠檬酸。分离层并用50 mL MTBE提取水层。干燥和旋转蒸发留下5.05 g产物45a,将其就这样用于下一步骤。

[0288]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.2 – 2.45 (m, 10H), 3.05 – 3.15 (m, 1H), 4.8 (2s, 1H), 5.15 – 5.3 (m, 1H), 5.45 – 5.65 (m, 1H), 7.3 – 7.5 (m, 5H).

[0289] 将产物45a溶解在50 mL二氯甲烷中。加入N-羟基琥珀酰亚胺(2.51 g, 21.8 mmol)并在冰中冷却所述混合物。加入DCC(5.03 g, 24.4 mmol)并在冰中搅拌混合物15分钟,然后在RT搅拌3小时。过滤、旋转蒸发和进行在55 g硅胶上使用甲苯/二氯甲烷梯度的色谱提供2.8 g 46a(7.83 mmol, 33%基于10a, 包含约5%顺式异构体)。

[0290]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.4 – 2.45 (m, 10H), 2.7 (s, 4H), 3.25–3.35 (m, 1H), 3.35 – 3.45 (m, 1H), 5.2 (s, 2H), 5.35 – 5.65 (m, 2H), 7.35 – 7.55 (m, 5H).

[0291] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)-2-苯基乙酸酯 (46b)

[0292] 向在0°C的10b(1.0 g, 7.9 mmol)在THF(60 mL)中的溶液加入在油中的60% NaH(1.26 g, 31.5 mmol),并将混合物加热到50°C 1.5小时。冷却到0°C后,将DL-2-溴苯乙酸(2.22 g, 10.3 mmol)以在THF(5 mL)中的溶液形式加入,并在RT剧烈搅拌粘性悬浮液16小时。再加热到40°C 24小时后,将混合物倒入柠檬酸(9.2 g)在水(100 mL)中的溶液中。用MTBE(3×50 mL)提取含水混合物,用 Na_2SO_4 干燥并蒸发溶剂以获得黄色油。通过柱色谱(SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%)纯化提供产物、未反应的TCO和副产物的混合物。通过溶解在MTBE和水(其用33% NaOH溶液碱化)中实现了进一步纯化。水层用MTBE洗涤,用柠檬酸酸化并然后用MTBE(3×)提取。用 Na_2SO_4 干燥合并的有机层,溶剂蒸发后获得黄色油形式的化合物45b(463 mg, 1.8 mmol, 23%产率)。

[0293]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.2 – 2.45 (m, 10H), 3.7 – 3.8 (m, 1H), 4.9 and 4.95 (2s, 1H), 5.4 – 5.7 (m, 2H), 7.3 – 7.55 (m, 5H).

[0294] 向在0℃的45b(463 mg, 1.8 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(250 mg, 2.2 mmol)在THF(9 mL)中的溶液加入DCC(372 mg, 1.8 mmol)在THF(2 mL)中的溶液。在RT搅拌所述反应混合物16小时,之后通过过滤除去沉淀。在真空中浓缩滤出液并通过柱色谱(SiO₂、庚烷/EtOAc梯度 25%-40%)纯化以提供无色浆形式的46b(451 mg, 1.3 mmol, 71%产率)。

[0295]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.1 - 2.6 (m, 10H), 2.8 (s, 4H), 3.8 - 3.9 (m, 1H), 5.2 and 5.3 (2s, 2H), 5.4 - 5.75 (m, 2H), 7.3 - 7.6 (m, 5H).

[0296] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)-2-甲基丙酸酯(49a)

[0297] 向在冰浴中冷却的10a(3.0 g, 23.8 mmol)在THF(120 mL)中的溶液加入在油中的60%氢化钠(3.8 g, 95 mmol)。除去冰浴并在RT搅拌所述混合物30分钟,然后在50℃搅拌1小时。在冰中冷却后,缓慢加入DL-2-溴丙酸(3.3 mL, 35.6 mmol)。在所述加入期间混合物变得十分粘稠,用THF(50 mL)将其稀释。所述添加完成后,除去冰浴并在RT搅拌所述反应混合物16小时。通过NMR跟踪反应的进度,其在16小时后呈现40%的转化率。然后在35℃将混合物再搅拌24小时,获得84%的转化率。在真空中浓缩反应混合物,用MTBE稀释并然后用水(200 mL)猝灭(quenched)。分离层并用柠檬酸(22.5 g)在水(60 mL)中的溶液酸化水层。用MTBE(3×200 mL)提取所述水层。用Na₂SO₄干燥合并的有机层并蒸发所述溶剂以提供包含47a的混合物(5.19 g)。所述材料未经进一步纯化用于接下来的步骤。

[0298]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.1 - 2.45 (m), 1.4 (d) (13H), 3.1 - 3.2 (m, 1H), 3.9 - 4.0 (q, 1H), 5.3 - 5.65 (m, 2H).

[0299] 向在-70℃的二异丙胺(13 mL, 92 mmol)在THF(200 mL)中的溶液缓慢加入在己烷中的2.5 M正丁基锂(32 mL, 80 mmol)。然后将所述混合物缓慢加温到-20℃并再次冷却到-70℃。以在THF中的溶液形式加入化合物47a(5.19 g)并使所述混合物加温到-20℃。在该温度加入碘甲烷(10.7 mL, 172 mmol)并将所述混合物加温到5℃。取试样并根据NMR分析所述反应完成了。将反应混合物倒入柠檬酸(40 g)在水(200 mL)中的溶液并用MTBE(3×150 mL)提取。用柠檬酸水溶液和盐水洗涤合并的有机层。用Na₂SO₄干燥并蒸发所述溶剂后获得黄色油(9.4 g)。通过柱色谱(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH梯度1%-4%)纯化提供黄色浆形式的纯48a(1.15 g, 5.4 mmol, 两个步骤23%产率)。¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.1 - 2.45 (m)和1.4 (2s) (16H), 3.2 - 3.3 (m, 1H), 5.3 - 5.7 (m, 2H)。向在0℃的48a(1.15 g, 5.4 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(622 mg, 5.4 mmol)在THF(27 mL)中的溶液加入DCC(1.12 g, 5.4 mmol)在THF(5 mL)中的溶液。加入之后,将所述混合物加温至RT并在此温度搅拌16小时。用MTBE稀释混合物,并过滤掉沉淀。蒸发溶剂后,通过柱色谱(SiO₂, 庚烷/EtOAc梯度20%-40%)纯化剩余物。从庚烷/EtOAc结晶提供无色晶体形式的49a(707 mg, 2.3 mmol, 42%产率)。

[0300]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.5 - 2.4 (m), 1.55 (s), 1.60(s) (16H), 2.85 (s, 4H), 3.2 - 3.3 (m, 1H), 5.4 - 5.65 (m, 2H).

[0301] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(环辛-4-烯-1-基氧基)-2-甲基丙酸酯 (49b)

[0302] 向在冰浴中冷却的10b(1.5 g, 11.9 mmol)在THF(60 mL)中的溶液加入在油中的60%氢氧化钠(1.9 g, 48 mmol)。除去冰浴并在50°C搅拌所述混合物1.5小时。在冰中冷却后,缓慢加入DL-2-溴丙酸(1.7 mL, 17.8 mmol)。添加期间混合物变得非常粘稠并用THF(35 mL)稀释。添加完成后除去冰浴并在RT搅拌所述反应混合物16小时。然后将所述混合物加热到43°C保持24小时。在真空中浓缩所述反应混合物,用MTBE稀释并然后用水(200 mL)猝灭。分离层,并用柠檬酸在水中的溶液酸化水层。用MTBE(3×100 mL)提取所述水层。用Na₂SO₄干燥合并的有机层并蒸发溶剂以提供包含47b的混合物(2.26 g)。所述材料未经进一步纯化用于接下来的步骤。

[0303]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.2 - 2.5 (m) 和 1.5 (2d) (13H), 3.65 - 3.75 (m, 1H), 3.95 - 4.15 (2q, 1H), 5.4 - 5.65 (m, 2H).

[0304] 向在-70°C的二异丙胺(5.6 mL, 39.6 mmol)在THF(100 mL)中的溶液缓慢加入在己烷中的2.5 M正丁基锂(13.5 mL, 33.8 mmol)。然后缓慢将所述混合物加温到0°C并再次冷却到-70°C。以在THF中溶液的形式加入化合物47b(2.26 g)并将所述混合物加温到-20°C。在该温度下加入碘甲烷(4.6 mL, 73.9 mmol)并使所述混合物加温到15°C。取样并根据NMR分析所述反应完成了。将反应混合物倒入柠檬酸(20 g)在水(140 mL)中的溶液中并用MTBE(3×100 mL)提取。用柠檬酸水溶液和盐水洗涤合并的有机层。用Na₂SO₄干燥并蒸发溶剂后获得黄色浆(4.6 g)。通过柱色谱(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH梯度1%-4%)重复纯化提供白色结晶固体形式的纯48b(181 mg, 0.85 mmol, 2个步骤7%产率)。

[0305]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.1 - 2.45 (m) 和 1.45 (2s) (16H), 3.9 - 4.0 (m, 1H), 5.45 - 5.65 (m, 2H).

[0306] 向在0°C的48b(181 mg, 0.85 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(98 mg, 0.85 mmol)在THF(5 mL)中的溶液加入DCC(175 mg, 0.85 mmol)在THF中的溶液。加入后,将所述混合物加温到RT并在该温度搅拌5小时。用MTBE稀释混合物并过滤掉沉淀。蒸发所述溶剂后,通过柱色谱(SiO₂, 庚烷/EtOAc梯度25%)纯化剩余物以提供白色固体形式的49b(257 mg, 0.83 mmol, 98%产率)。

[0307]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.8 - 2.6 (m), 1.55 (s), 1.60 (s) (16H), 2.85 (s, 4H), 3.8 - 3.9 (m, 1H), 5.4 - 5.7 (m, 2H).

[0308] (E-主要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 4-(环辛-4-烯-1-基氧基)苯甲酸酯(52a)

[0309] 向冰冷冷却的10a(3.45 g, 27.38 mmol)在THF(50 mL)的溶液加入在油中的氢氧化钠(60%, 2.5 g, 62.5 mmol)。在冰中将所述混合物搅拌15分钟,然后加热到50°C达1小时。在冰中冷却所述混合物,并用5分钟的时间加入溶解在5 mL THF中的4-氟苯甲酰氯(1.72 g,

10.84 mmol)。在25℃搅拌所述混合物2天(试样的NMR表明存在很多产物,但也存在4-氟苯甲酸的TCO-酯),然后在50℃搅拌3小时。用水冷却所述混合物,并缓慢加入10 mL水,接着加入2 g氢氧化钠和5 mL水。通过旋转蒸发除去大部分溶剂,加入THF和2 g氢氧化钠并将所述混合物在50℃加温4小时。通过旋转蒸发除去大部分溶剂并向剩余的糊状物加入甲醇。将所述混合物在50℃加温2小时,接着在55℃旋转蒸发。用50 mL水稀释余下的悬浮液。加入MTBE(100 mL),分离层并用25 mL水洗涤有机层。所述有机层包含a.o.反式环辛烯醇。用20 g柠檬酸处理合并的冰冷却的水层,并用2×75 mL MTBE提取产物。干燥和旋转蒸发留下固体剩余物,其由产物和4-氟苯甲酸的混合物组成。将所述固体用40 mL甲醇加温。将水(15-20 mL)缓慢加入所述温溶液中直到其变得浑浊。过滤并冷却滤出液沉淀出产物。过滤、用1/1甲醇/水洗涤和在真空下干燥提供0.827 g想要的产物51a(3.36 mmol,基于4-氟苯甲酰氯为30%)。

[0310]

¹H-NMR

(CDCl₃): δ 1.5 – 2.5 (m, 10H), 4.0 – 4.1 (m, 1H), 5.45 – 5.75 (m, 2H), 6.8 (d, 2H), 8.05 (d, 2H).

[0311] 用DCC(1.46 g, 7.08 mmol)处理冰冷却的主要反式酸51a(1.14 g, 4.63 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(725 mg, 6.30 mmol)在50 mL二氯甲烷中的混合物。在冰中搅拌所述混合物1小时,然后在RT搅拌3小时。过滤、旋转蒸发和实施在40 g硅胶上使用庚烷/EtOAc梯度的色谱提供52a级分(其被顺式异构体污染)。合并接下来的产物级分,并用庚烷和醋酸乙酯的混合物将其加温到60℃。使悬浮液冷却到RT,然后过滤。这提供了0.973 g产物52a(2.83 mmol, 61%)。

[0312]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.6 – 2.5 (m, 10H), 2.85 (s, 4H), 4.0 – 4.1 (m, 1H), 5.45 – 5.75 (m, 2H), 6.8 (d, 2H), 8.05 (d, 2H).

[0313] (E-次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 4-(环辛-4-烯-1-基氧基)苯甲酸酯(52b)

[0314] 向冰冷却的10b(2.82 g, 22.38 mmol)在THF(40 mL)中的溶液加入在油中的氢化钠(60%, 2.0 g, 50 mmol)。在冰中搅拌所述混合物15分钟,在RT搅拌30分钟,然后加热到50℃达1小时。在冰中冷却所述混合物,并用15分钟的时间加入溶解在8 mL THF中的4-氟苯甲酰氯(1.72 g, 10.84 mmol)。在RT搅拌所述混合物18小时(试样的NMR表明存在许多反式环辛烯醇),然后在50℃搅拌6小时,在25℃搅拌3天,和在50℃再搅拌1小时。缓慢加入2.0 g氢氧化钠在5 mL水中的溶液,接着加入5 mL水。通过旋转蒸发除去大部分THF并向所获得的糊状物加入40 mL甲醇。将混合物在50℃加温3小时,加入20 mL THF并继续加热4小时。在25℃搅拌所述混合物过夜(NMR表明仍存在少量的酯),然后在50℃加热4小时,接着旋转蒸发。用50 mL水稀释余下的悬浮液。加入MTBE(100 mL),分离层并用25 mL水洗涤有机层。所述有机层包含a.o.反式环辛烯醇。用15 g柠檬酸处理合并的冰冷却的水层并用2×75 mL MTBE提取产物。干燥和旋转蒸发留下固体剩余物,其由产物和4-氟苯甲酸的混合物组成。用40 mL甲醇加温所述固体。向所述温溶液缓慢加入水(25 mL),接着使其冷却到RT并然后搅拌过夜。过滤,用1/1甲醇/水洗涤并在真空下干燥提供0.76 g想要的产物51b(3.09 mmol,基于

4-氟苯甲酰氯为28%)。

[0315]

¹H-NMR
(CDCl₃): δ 1.3 – 2.6 (m, 10H), 4.55 – 4.65 (m, 1H), 5.55 – 5.85 (m, 2H), 6.9 (d, 2H), 8.05 (d, 2H).

[0316] 用DCC(0.95 g, 4.61 mmol)处理冰冷却的所述次要反式酸51b(0.66 g, 2.68 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(460 mg, 4.0 mmol)在50 mL二氯甲烷中的混合物。在冰中搅拌所述混合物1小时,然后在RT搅拌16小时。过滤、旋转蒸发和实施在30g硅胶上使用二氯甲烷作为洗脱液的色谱。将产物溶解在5 mL醋酸乙酯中。加入庚烷并在60°C部分旋转蒸发所述溶液直到出现沉淀。加入庚烷并在60°C搅拌所述混合物5分钟,然后使其冷却到RT。过滤提供0.437 g产物52b(1.27 mmol, 47%)。

[0317]

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.4 – 2.6 (m, 10H), 2.9 (s, 4H), 4.55 – 4.65 (m, 1H), 5.55 – 5.8 (m, 2H), 6.9 (d, 2H), 8.05 (d, 2H).

[0318] (E-主要,次要)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(1-甲基环辛-4-烯-1-基)醋酸酯 (58)

[0319] 将35%的过氧化氢溶液(25 mL, 300 mmol)加入醋酸钨(45% Engelhard, 1.0 g, 2 mmol)、苯醌(432 mg, 4mmol)和1,5-环辛二烯(27 mL, 200 mmol)的混合物中。在30°C搅拌所述混合物5天直到NMR分析显示所述起始材料95%的转化率。将所述混合物倒入Et₂O(1 L)中并加入水(1 L)。用33%的NaOH溶液缓慢碱化所述混合物同时用冰冷却。分离层并用Et₂O(2 ×)提取水层。用1 N NaOH洗涤合并的有机层两次并用Na₂SO₄干燥。小心蒸发溶剂提供黄色油形式的粗53(16.1 g, 130 mmol, 65%产率)。

[0320] 将1.6 M正丁基锂在己烷中的溶液(45 mL, 72 mmol)加入二异丙胺(14 mL, 100 mmol)在THF(250 mL)中的溶液中,冷却到-80°C。将所述混合物逐渐加温到0°C并然后冷却到-80°C。加入膦酰基乙酸三乙酯(triethylphosphonoacetate)(15 mL, 75 mmol)在THF(100 mL)中的溶液,并在-70°C搅拌所述混合物45分钟。然后加入53(6.21 g, 50 mmol)在THF(50 mL)中的溶液并将混合物缓慢加温到RT。16小时后将所述混合物进一步加热至回流8小时直到NMR分析显示完全转化。将所述混合物倒入水(250 mL)中并用MTBE(3 ×)提取。用盐水洗涤合并的有机层并用Na₂SO₄干燥。旋转蒸发溶剂并通过柱色谱(SiO₂, 庚烷/EtOAc 5%)纯化后获得无色油形式的54(4.74 g, 24 mmol, 49%产率)。

[0321] 将1.6 M的甲基锂溶液(59 mL, 94 mmol)加入在冰浴中冷却的碘化铜(I)(9.53 g, 50 mmol)在Et₂O(21 mL)中的悬浮液中。在0°C在真空中浓缩灰色溶液并用CH₂Cl₂剥离(stripped)两次。将剩余物悬浮在冷的CH₂Cl₂(100 mL)中并在缓慢加入TMSCl(4.0 mL, 46.5 mmol)前冷却到-80°C。然后通过滴加的方式加入54(4.74 g, 24 mmol)在CH₂Cl₂(60 mL)中的溶液,并用2小时使所述混合物加温到RT。在将所述混合物猝灭入(quenched into)饱和的NH₄Cl水溶液(150 mL)中之前将其在RT另外搅拌16小时。在RT搅拌混合物并加入氨(50 mL)。过滤混合物,用CH₂Cl₂(3 × 75 mL)提取滤出液。用水洗涤并用Na₂SO₄干燥合并的有机层。旋转蒸发溶剂并通过柱色谱(SiO₂, 庚烷/EtOAc 3%)纯化提供无色油形式的55(4.47 g,

21 mmol, 89%产率)。¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.8 - 1.9 (m), 1.05 (s)和1.25 (t) (16H), 2.15 - 2.3 (m, 2H), 4.0 - 4.2 (q, 2H), 5.4 - 5.55 (m, 1H), 5.65 - 5.75 (m, 1H)。

[0322] 用庚烷/Et₂O 3:1v/v(约500 mL)的混合物填充烧瓶,所述烧瓶装配有汞灯并且与泵和填充有10%硝酸银(I)浸渍的硅胶(36 g,在底部具有一些普通等级硅胶)的柱连接。加入55(4.47 g, 21.3 mmol)和苯甲酸甲酯(2.7 mL, 21.3 mmol)在少量Et₂O中的溶液后,开启汞灯。使被照射的溶液连续流动经过所述柱照射20小时后,在反应器内容物的NMR分析中没有观察到起始材料,用在庚烷中的30% MTBE洗涤所述柱。用氨处理柱内容物并用CH₂Cl₂(3×)提取。用Na₂SO₄干燥合并的有机层,在蒸发溶剂并通过柱色谱(SiO₂,庚烷/EtOAc梯度3%>4%)纯化后获得无色油形式的化合物56(1.41 g, 6.7 mmol, 31%产率)。所述主要和次要异构体无法分离,因此所述异构体以混合物形式被进一步使用。

[0323] ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.8 - 1.9 (m), 1.0 (s) 和 1.25 (t) (16H), 2.1 - 2.4 (m, 2H), 4.0 - 4.2 (q, 2H), 5.5 - 5.65 (m, 2H)。

[0324] 将氢氧化锂一水合物(84 mg, 2.0 mmol)在水(1mL)和EtOH(1 mL)中的溶液加入56(210 mg, 1.0 mmol)中。为了更好地溶解所述化合物,加入THF(1 mL)和MeOH(2 mL)。在RT搅拌16小时后转化仍未完全。加入额外的氢氧化锂(85 mg)并将所述混合物加热到45°C 4小时,在30°C 16小时和在50°C 4小时直到转化完全。在真空中浓缩所述混合物并用柠檬酸溶液中和。用MTBE(3×)提取并用Na₂SO₄干燥后,旋转蒸发溶剂提供黄色油形式的57(150 mg, 0.82 mmol, 82%产率)。

[0325] ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.0 (2s, 3H), 1.3 - 2.0 (m, 10H), 2.1 - 2.45 (m, 2H), 5.5 - 5.65 (m, 2H)。

[0326] 向冰冷冷却的57(150 mg, 0.82 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(113 mg, 0.98 mmol)在THF(5 mL)中的溶液加入DCC(170 mg, 0.82 mmol)在THF(1 mL)中的溶液。在RT搅拌所述混合物16小时并然后用MTBE稀释。通过过滤除去沉淀并在蒸发溶剂并通过柱色谱(SiO₂,庚烷/EtOAc梯度 10%>30%)纯化后获得无色油形式的化合物58(197 mg, 0.71 mmol, 86%产率)。

[0327] ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.05和1.1 (2s, 3H), 1.35 - 2.35 (m, 10H), 2.4 (s, 1H), 2.5- 2.75 (AB, 1H), 2.85 (s, 4H), 5.5 - 5.65 (m, 2H)。

[0328] 实施例13

[0329] 新TCOs的反应动力学

[0330] 关于其对四嗪28的反应性评估了所述新合成的TCO结构。实施例5中描述了过程。

[0331] 表 7:CC49-TCO结构和¹⁷⁷Lu-28之间的反应的二级动力学常数。

TCO	[M ⁻¹ s ⁻¹]
44a	20640 ± 485
44b	134800 ± 997
46a	28630 ± 1590
46b	163200 ± 2871
[0332] 49a	25080 ± 3865
49b	148500 ± 12040
52a	20930 ± 3735
52b	333300 ± 625
58	323500 ± 43320

[0333] 对于所有TCOs,在所述主要(平伏)和所述次要(直立)异构体之间都存在深远和一致的反应性差异,后者比前者具有大得多的反应性。此外,TCO 58的高反应性支持了没有至抗体的连接体的直立位置中的取代基仍提供所述反式环辛烯环的增加了的反应性。

[0334] 实施例14

[0335] 新模型四嗪探针的稳定性和反应性

[0336] 关于它们在水中的反应性和稳定性评价了包含可选择的四嗪部分的几种四嗪模型探针。

[0337] 四嗪类的水解稳定性测试

[0338] 用PBS缓冲液(3 mL)稀释10 μL的特定四嗪在DMSO中的溶液(25 mM),并过滤溶液。使用UV光谱监测在525 nm处的吸收带的降低,并从该数据测定水解速率和半衰期。

[0339] 四嗪类对反式-环辛-4-烯-1-醇(次要异构体,10b)的反应性

[0340] 实施竞争实验以确定特定四嗪和3-(5-乙酰胺基-2-吡啶基)-6-(2-吡啶基)-1,2,4,5-四嗪(将其选择作为参比四嗪)在与反式-环辛-4-烯-1-醇(次要异构体,10b)的逆电子需求Diels-Alder反应中的反应性比。

[0341] 向乙腈(0.100 mL)加入5 μL所述特定四嗪在DMSO(25 mM)中的溶液和5 μL所述参比四嗪在DMSO(25 mM)中的溶液。用水(0.9 mL)稀释该混合物,通过LC-MS/PDA分析测定两种四嗪的绝对量。接着,加入反式-环辛-4-烯-1-醇(次要异构体,10b)在DMSO(25 μL 2.5 mM)中的溶液,并搅拌所述混合物5分钟。再次通过LC-MS/PDA分析测定两种四嗪的绝对量,并计算两种四嗪的转化率。从这些转化率确定两种四嗪的反应性比。

[0342] 表8:模型四嗪探针的反应性和稳定性

[0343]

四嗪	k ₂ /k _{2,ref}	t _{1/2} (h)	溶剂
35	1.84	35	ACN/PBS
38	0.95	117	PBS
40	0.25	230	PBS
42	0.83	2.4	PBS

[0344] 从表8清楚地看到在四嗪上的取代基对稳定性和反应性都有深远的影响,因此能够用于为特定应用特制的探针的设计。

[0345] 实施例15

[0346] 主要vs次要TCO, 20a vs 20b与四嗪探针28的体外反应性差异

[0347] 实施该实验以证明在两种试剂的低浓度下更高TCO反应性转化为与放射标记的四嗪的更高反应产率。为了这一目的,我们使用了连接到CC49的TCO主要20a($k_2=19600 \pm 1400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)和TCO次要20b($k_2=136700 \pm 2300 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)(对于主要和次要分别为6.1 和6.6 TCOs/分子)。在PBS中稀释两种mAb溶液以获得 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 到 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 的TCO浓度,并使其与载体加入的 ^{177}Lu -四嗪(相对于mAb 为1当量)在37°C反应1分钟。等分量的反应混合物(20 μL)然后用过量四嗪6猝灭,加入非还原性的试样缓冲液并通过SDS-PAGE分析。从对应所述mAb的谱带中的放射性测定环加成产率并用AIDA Image Analyzer软件定量计数。重复所述实验三次。如对双分子反应所预期的那样,培育1分钟后溶液中所述两种反应性物种的浓度的降低转化为更低的反应产率(图18)。但是,当使用所述直立TCO 20b时,在微摩尔浓度和更低浓度下,由于与所述四嗪的更快的反应动力学,反应产率明显高于使用平伏TCO 20a获得的那些。

[0348] 实施例16

[0349] TCO 20b的体内稳定性

[0350] 实施该实验以扩展实施例6中描述的系列体内TCO稳定性测量。在那个系列中,发现用PEG间隔体结合到CC49的TCOs主要和次要(23a和27b)在体内不稳定,同时发现不含PEG间隔体的TCO主要(20a)在体内稳定至少4天(图13)。在所述新实验中,遵循相同的过程,我们测试了不含PEG间隔体的CC49-结合的TCO次要(20b, 6.9当量结合)的体内稳定性。图19中示出了对mAb清除进行校正的所述体内稳定性数据。发现所述CC49-结合的TCO 20b在体内仅缓慢降解,进一步支持了具有至抗体的短连接体的TCOs在体内比通过更长连接体结合的TCOs更稳定的发现。

[0351] 实施例17

[0352] 用不同量TCO 20b部分官能化的CC49抗体的血液动力学和生物分布

[0353] 实施了一系列研究以评估每个CC49分子上TCO(20b)基团数量对血液循环和肿瘤靶向的影响。预期用过多的TCO部分改性抗体会导致血液循环半衰期的下降并将影响CC49-TCO结构的肿瘤摄取。

[0354] CC49-TCO结构的血液动力学(见图20和21)

[0355] 用携带0、4.9、9.3或15.8 个TCO(20b)基团/mAb的 ^{125}I -CC49对雌性裸Ba1b/C小鼠(20-25 g体重, Charles River Laboratories, n=3)进行注射(100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 每小鼠,约0.5 MBq)。在选择的时间点(5分钟, 3、6小时, 1、2、3天)从隐静脉抽取血液试样,称重并用1 mL PBS稀释。注射mAb四天后,麻醉所述动物并通过颈脱位处死,通过心脏穿刺收集血液并采收、剥离干、称重感兴趣的器官和组织,并加入1 mL PBS。在 γ -计数器(gamma-counter, Wizard II, Perkin Elmer)中连同标准物测量所有试样中的放射性以确定每克组织的百分比注射剂量(%ID/g)。CC49-TCO结构在血液中的半衰期用GraphPad Prism(version 5.01)计算(通过将血液曲线拟合成two-phase decay)。

[0356] 表9:CC49-TCO(20b)的动力学血液参数。

	TCO #	T _{1/2α} (%)	T _{1/2β}	R ²
	0	2.6 h (58)	64.4 h	0.970
[0357]	4.9	2.4 h (50)	74.5 h	0.983
	9.3	2.0 h (61)	23.5 h	0.972
	15.8	1.1 h (79)	10.5 h	0.996

[0358] CC49-TCO(20b)结构的肿瘤靶向

[0359] 用采用0、8.5、12.7或18.7个TCO 20b基团/mAb官能化的¹²⁵I-CC49对携带肿瘤的小鼠(见方法部分;100 mm³ 肿瘤尺寸)进行注射(100 μg/100μL每小鼠,0.2-0.4 MBq,n=4)。注射mAb4天后处死接受了¹²⁵I-CC49的小鼠。注射mAb 72小时后用¹¹¹In-DOTA-四嗪28对接受了¹²⁵I-CC49-TCO 20b的小鼠进行注射(相对于mAb为25 当量,约0.8 MBq)并在注射四嗪后3个小时将其处死。处死时,通过心脏穿刺收集血液并采收、剥离干、称重感兴趣的器官和组织,并加入1 mL PBS。在γ-计数器(Wizard 3,Perkin Elmer)中采用双同位素方案(对于¹²⁵I和¹¹¹In能量窗分别设定为10-80 keV和100-510 keV)连同标准物测定所有试样中的放射性以确定每克组织的百分比注射剂量(%ID/g)。

[0360] 表10:注射mAb 3天后(*除外)¹²⁵I-CC49-TCO 20b结构在携带肿瘤的小鼠中的生物分布。数据以平均%ID/g ± SD(n=4)给出

[0361]

器官	CC49*	CC49-TCO(8.5)	CC49-TCO(12.7)	CC49-TCO(18.2)**
血液	6.80 ± 3.84	1.53 ± 0.55	0.89 ± 0.79	0.13 ± 0.08
肿瘤	73.82 ± 21.37	19.63 ± 4.92	10.58 ± 5.62	2.58 ± 0.61
心脏	1.83 ± 0.55	0.53 ± 0.18	0.28 ± 0.14	0.07 ± 0.02
肺	4.18 ± 1.53	1.06 ± 0.28	0.70 ± 0.29	0.21 ± 0.05
肝脏	3.61 ± 1.05	3.44 ± 0.47	1.18 ± 0.18	0.64 ± 0.15
脾脏	1.95 ± 0.78	1.07 ± 0.19	0.59 ± 0.14	0.34 ± 0.04
肾脏	2.22 ± 0.99	0.66 ± 0.21	0.45 ± 0.25	0.13 ± 0.03
肌肉	1.11 ± 0.26	0.35 ± 0.23	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.01
骨髓	0.90 ± 0.30	0.25 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.06 ± 0.02
大脑	0.30 ± 0.22	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01

[0362] * mAb注射4天后处死小鼠

[0363] **低免疫反应性。

[0364] 表11:¹¹¹In-四嗪 28(注射3小时后)在用CC49-TCO 20b结构预处理的小鼠中的生物分布。数据以平均%ID/g ± SD(n=4)给出

器官	CC49-TCO(8.5)	CC49-TCO(12.7)	CC49-TCO(18.2)
血液	0.45 ± 0.14	0.37 ± 0.28	0.12 ± 0.03
肿瘤	3.72 ± 1.45	3.36 ± 1.69	1.21 ± 0.22
心脏	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.09 ± 0.03
肺	0.42 ± 0.06	0.34 ± 0.10	0.29 ± 0.01
[0365] 肝脏	0.44 ± 0.12	0.29 ± 0.12	0.26 ± 0.05
脾脏	0.25 ± 0.05	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.02
肾脏	1.64 ± 0.28	1.25 ± 0.24	2.15 ± 0.17
肌肉	0.11 ± 0.05	0.05 ± 0.00	0.29 ± 0.43
骨骼	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.02
大脑	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.05

[0366] 从表9-11中的数据可以清楚看到TCO改性比不应超过9。

[0367] 实施例18

[0368] CC49-TCO 44b的血液动力学和体内稳定性

[0369] 血液动力学

[0370] 用¹²⁵I-标记的CC49对无肿瘤的小鼠(n=3/组)进行注射(100 μg每小鼠,0.2-0.4 MBq),CC49已用7.5 TCO 44b基团改性。在选择的时间点(1、3、6、24、48和72小时)从隐静脉抽取血液试样并收集在含有肝素的小瓶中。注射mAb四天后,麻醉所述小鼠并通过颈脱位处死。通过心脏穿刺抽取血液并采收、剥离干、称重感兴趣的器官和组织,加入1 mL PBS,在γ-计数器(Wizard 3,Perkin Elmer)中连同标准物进行计数以确定每个器官的百分比注射剂量(%ID)。

[0371] 在该研究中,TCO-改性的CC49呈现出比未改性的CC49稍快的清除(图22)。对于CC49-TCO和CC49,从曲线下的面积计算的血液中的半衰期($T_{1/2}=1n2 \times AUC/C_0$)分别为22.2小时和26.3小时。我们将这归因于所述mAb上Lys残基的官能化。作为较短血液循环的结果,在所述实验结束时,在大多数器官中还观察到较少量的¹²⁵I-CC49-TCO,所述器官在计数之前不灌注(perfused)(图23)。

[0372] 体内稳定性

[0373] 用¹²⁵I-标记的CC49-TCO 44b(220 μg每小鼠,0.4 MBq)对单独组的无肿瘤小鼠(n=3)进行注射。在选定的时间点(1、3、6、24、48和72小时)从隐静脉抽取血液试样(约50微升)并收集在包含肝素的小瓶中。注射mAb四天后,麻醉所述小鼠并通过颈脱位处死。通过心脏穿刺抽取血液并除去胃和甲状腺,剥离干并在γ-计数器中连同标准物一起计数以确定每个器官的百分比注射剂量(%ID)。这些器官中的低¹²⁵I摄取(在胃中为0.17 ± 0.03%ID和在甲状腺中为0.88 ± 0.33%ID)证实所述放射标记的mAb在4天评价期间保持了体内标记物。

[0374] 称重所述血液试样,用PBS稀释至100 μL并加入过量的以0.1 MBq/μg比活性放射标记的载体加入的¹⁷⁷Lu-四嗪 28。在37°C培育所述混合物20分钟并以400 × g离心5分钟以分离血细胞。然后向Zeba Desalt离心柱(0.5 ml,40 kDa MW截止,Pierce)施加30 μL上清

液。离心后,从筒洗脱高MW Diels-Alder反应产物,同时保留过量的四嗪。在 γ -计数器中采用双同位素方案(对于 ^{125}I 为10-80 keV窗和对于 ^{177}Lu 为155-380 keV窗)测量所述洗出液中包含的放射性。将仅包含 ^{177}Lu -四嗪的血清试样用于校正来自所述筒的 ^{177}Lu 泄露。关于放射性衰减校正 ^{125}I 计数并然后计算 $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比。 $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比的减小表明小鼠血液试样中存在的过量 ^{177}Lu -四嗪和 ^{125}I -CC49-TCO之间更低的反应产率,并且因此表明所述TCO基团的体内失活。图24作为%完好TCO示出了 $^{177}\text{Lu}/^{125}\text{I}$ 比随着时间的变化($t=0$ 时归一化为100%)。值得注意的是,mAb注射后不超过48小时所述TCO 44b基团看起来在体内是完全稳定的($97.8 \pm 1.6\%$ 完好TCO),而在更晚的时间点观察到一些降解(注射mAb4天后为 $80.4 \pm 1.8\%$ 完好TCO)。

[0375] 实施例19

[0376] ^{177}Lu -四嗪28在用CC49-TCO 44b预靶向的携带肿瘤的小鼠中的生物分布

[0377] 用 ^{125}I -CC49对携带肿瘤的小鼠(见方法部分;100 mm³肿瘤尺寸;n=4)进行注射(100 μg 每小鼠,约0.2 MBq),所述 ^{125}I -CC49用7.5 TC044b基团官能化。注射mAb三十和48小时后,小鼠接受一个剂量的清除剂(半乳糖-MSA-四嗪,160 μg /剂量)接着2小时后使其接受 ^{177}Lu -四嗪28(相对于所述mAb为10当量,约0.5 MBq)。注射四嗪三小时后,麻醉所述小鼠并通过颈脱位处死,通过心脏穿刺抽取血液,采收感兴趣的器官和组织并剥离干。称重所有收集的试样并加入1 mL PBS。在 γ -计数器中采用双同位素方案(对于 ^{125}I 为10-80 keV窗口和对于 ^{177}Lu 为155-380 keV窗口)连同标准物测定试样放射性以确定每克组织的百分比注射剂量(%ID/g)。

[0378] 生物分布数据显示 ^{125}I -CC49-TCO 44b的高肿瘤摄取。所述肿瘤摄取高于用其它TCO结构(见下文)获得的那些,合理地是因为用7.5 TC0-44b基团官能化的CC49的长血液循环。相反,由于给予了两剂量的清除剂,所述清除剂捕捉循环CC49-TCO并将其导向肝脏,在那里其被迅速代谢,因此在所有其它器官中mAb保留都是低的。作为肿瘤中较高mAb摄取的结果, ^{177}Lu -四嗪的摄取也明显高于在先前实验中获得的那些(见下文)。而且,由于在给予四嗪之前的追踪步骤(chase step)中除去了非肿瘤结合的CC49-TCO,在所有其它器官中的 ^{177}Lu 摄取是可忽略的。作为四嗪尿排泄的结果只有肾脏呈现相当高的 ^{177}Lu 保留。这导致除肾脏外在所有考虑的器官中高的靶对非靶比。值得注意的是,肿瘤和血液中存在的 $34 \pm 4\%$ 和 $10 \pm 1\%$ 的TCOs已经分别与四嗪反应。

[0379] 表12:注射 ^{177}Lu -四嗪 28(8.5 μg /80 μL 每小鼠,约0.5 MBq)3小时后,给予 ^{125}I -CC49-TCO-44b (100 μg / 100 μL 每小鼠,约0.2 MBq)50小时后的双同位素生物分布数据。数据以%ID/克 \pm SD或肿瘤/器官比 \pm SD(n=4)给出。

[0380]

	¹²⁵ I-CC49- TCO	¹⁷⁷ Lu- 四嗪 %ID/器官	¹²⁵ I-CC49- TCO	¹⁷⁷ Lu- 四嗪 肿瘤/器官
肿瘤	32.88 ± 4.35	9.25 ± 2.16		
血液	0.31 ± 0.13	0.03 ± 0.00	129 ± 74	304 ± 80
心脏	0.62 ± 0.22	0.05 ± 0.01	60 ± 26	187 ± 20
肺	0.99 ± 0.24	0.24 ± 0.02	35 ± 8	39 ± 8
肝脏	2.35 ± 0.82	0.19 ± 0.02	16 ± 6	50 ± 10
脾脏	0.67 ± 0.07	0.09 ± 0.01	49 ± 5	108 ± 22
肾脏	0.47 ± 0.10	1.50 ± 0.24	72 ± 14	6 ± 2
肌肉	0.22 ± 0.08	0.03 ± 0.00	162 ± 62	328 ± 96
骨骼	0.29 ± 0.08	0.08 ± 0.04	119 ± 33	142 ± 59
大脑	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2304 ± 668±	1674 ± 243

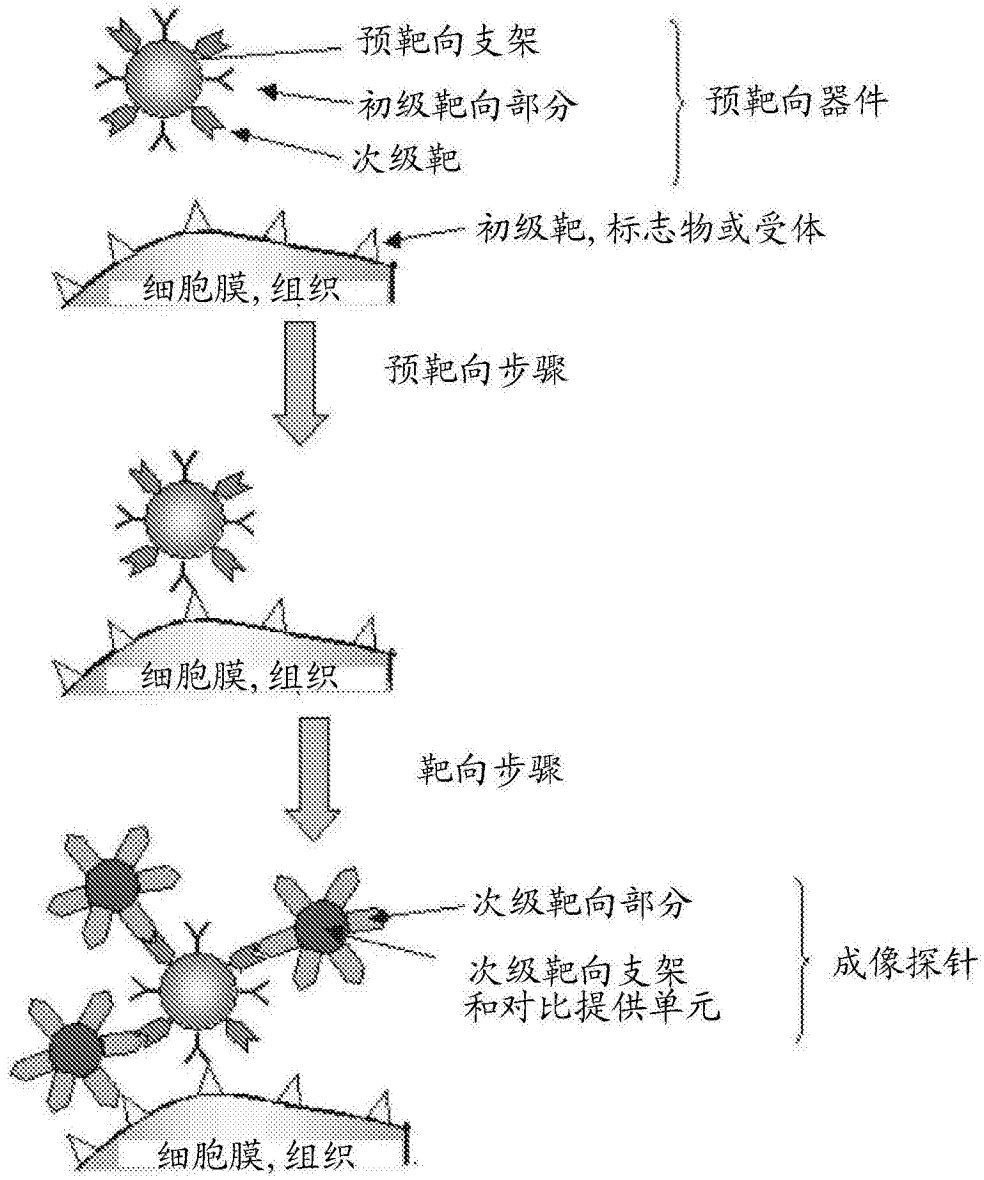


图 1

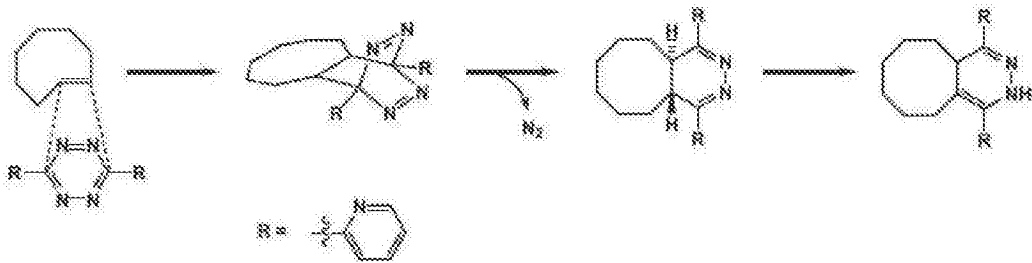


图 2

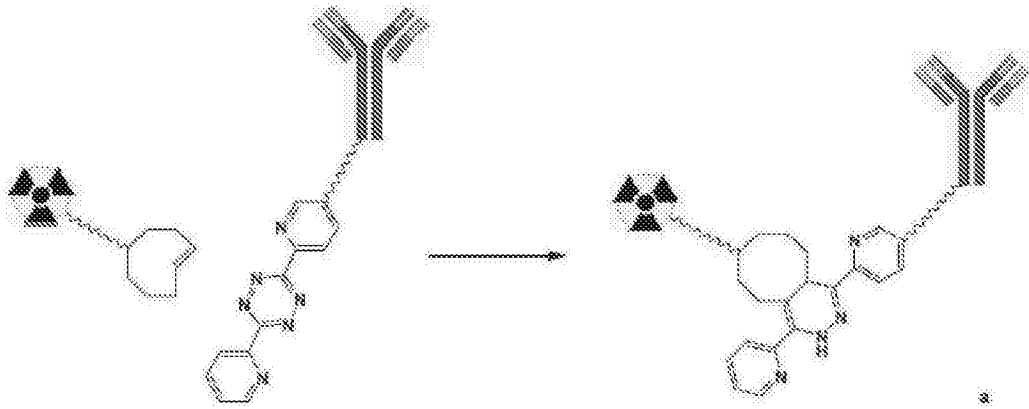


图 3a

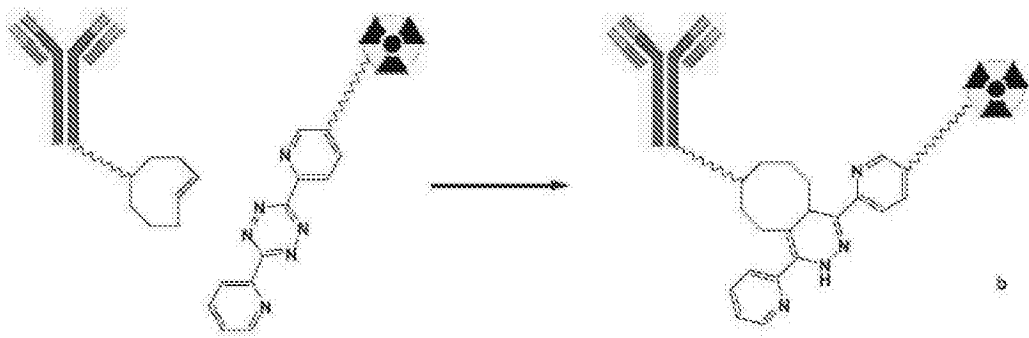


图 3b

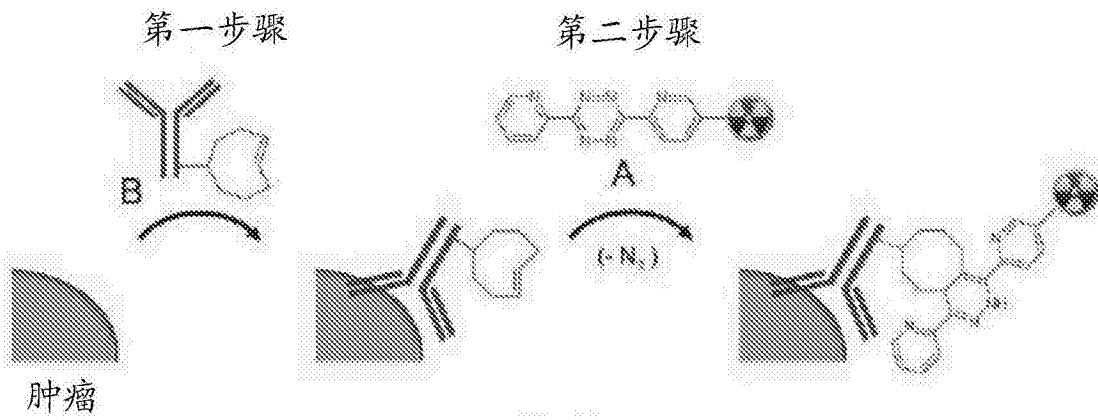


图 4

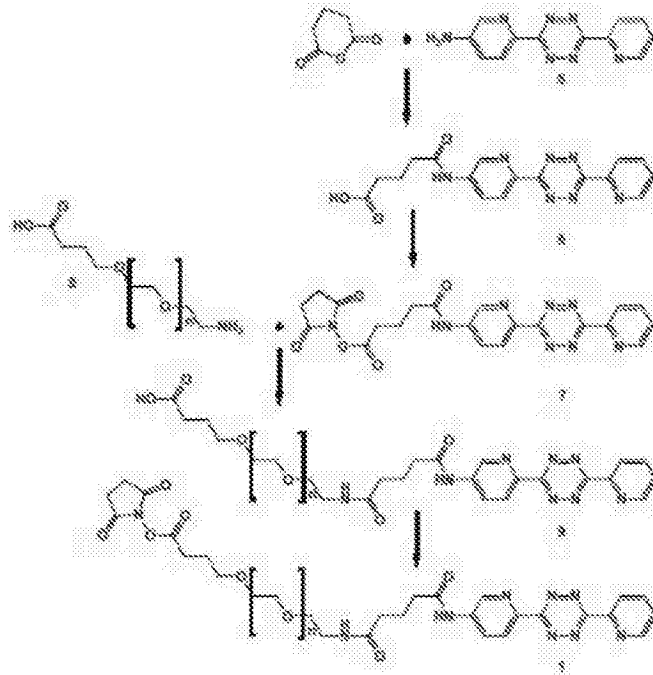


图 5

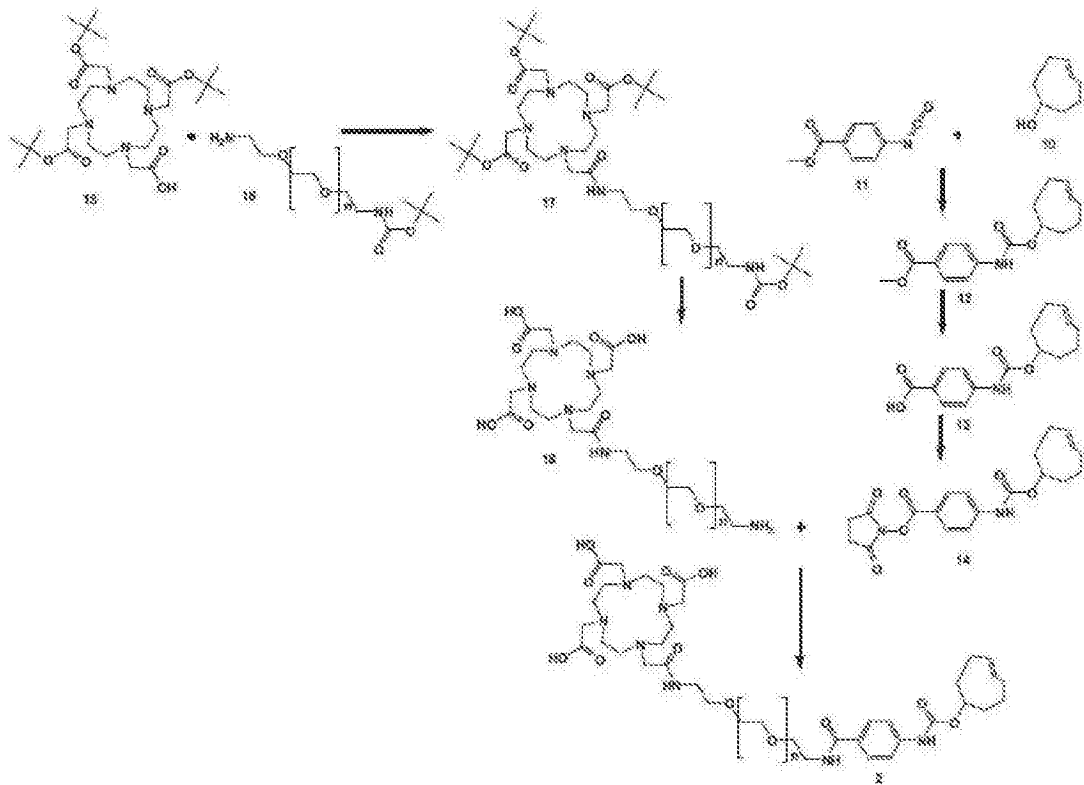


图 6

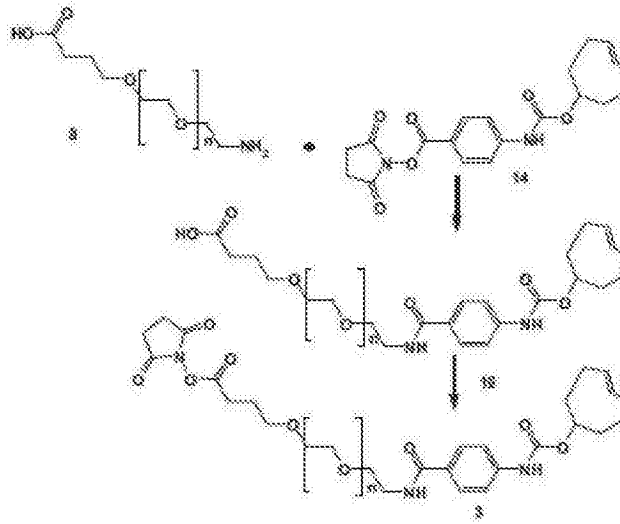


图 7

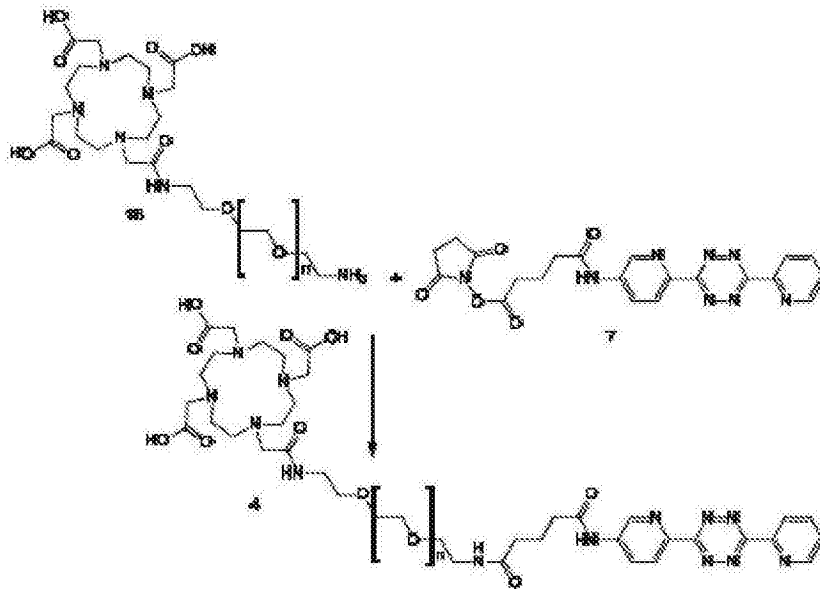


图 8

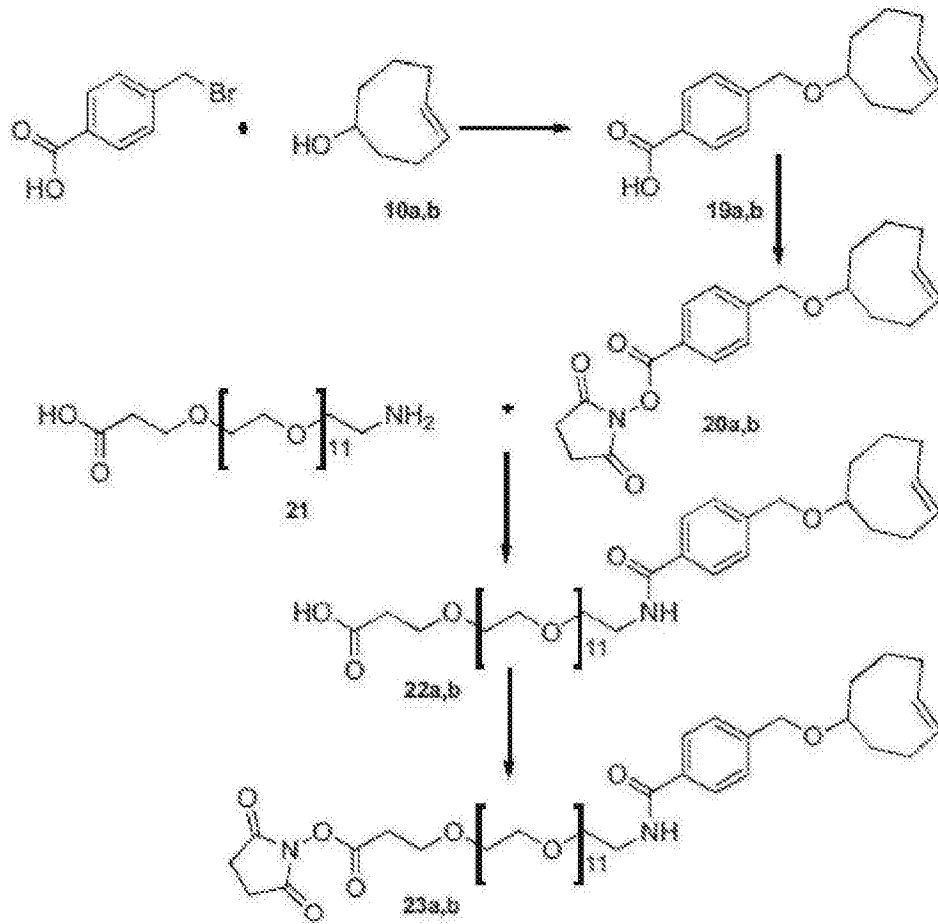


图 9

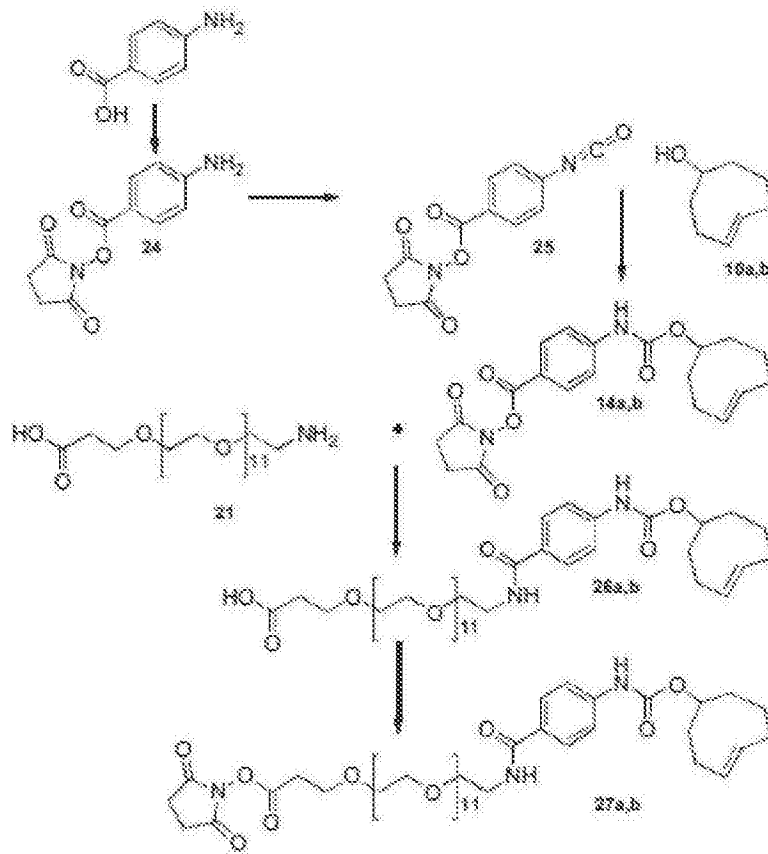


图 10

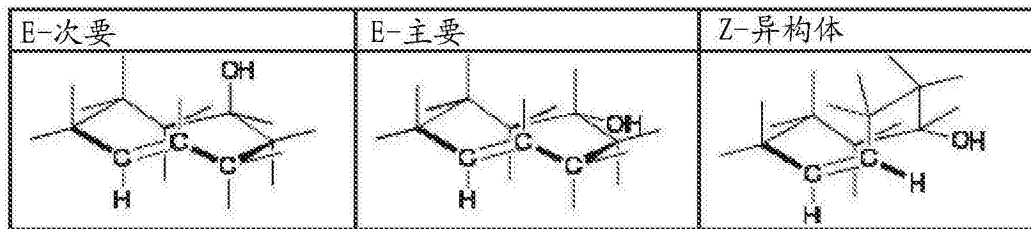


图 11

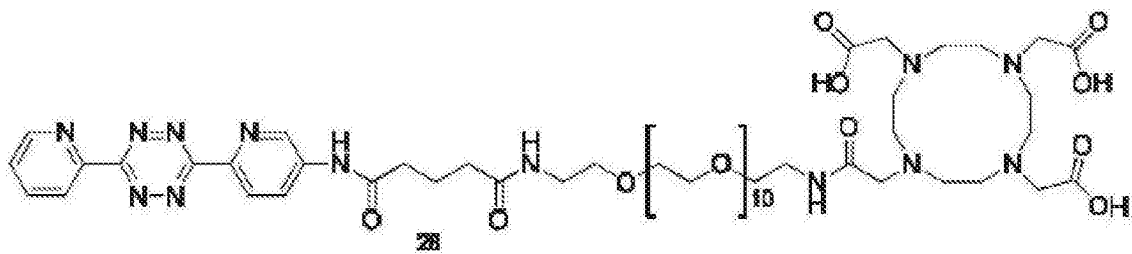


图 12

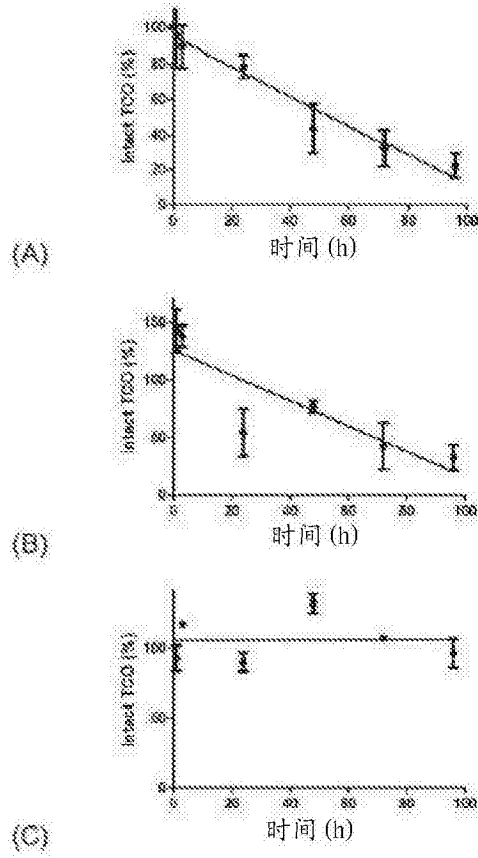


图 13

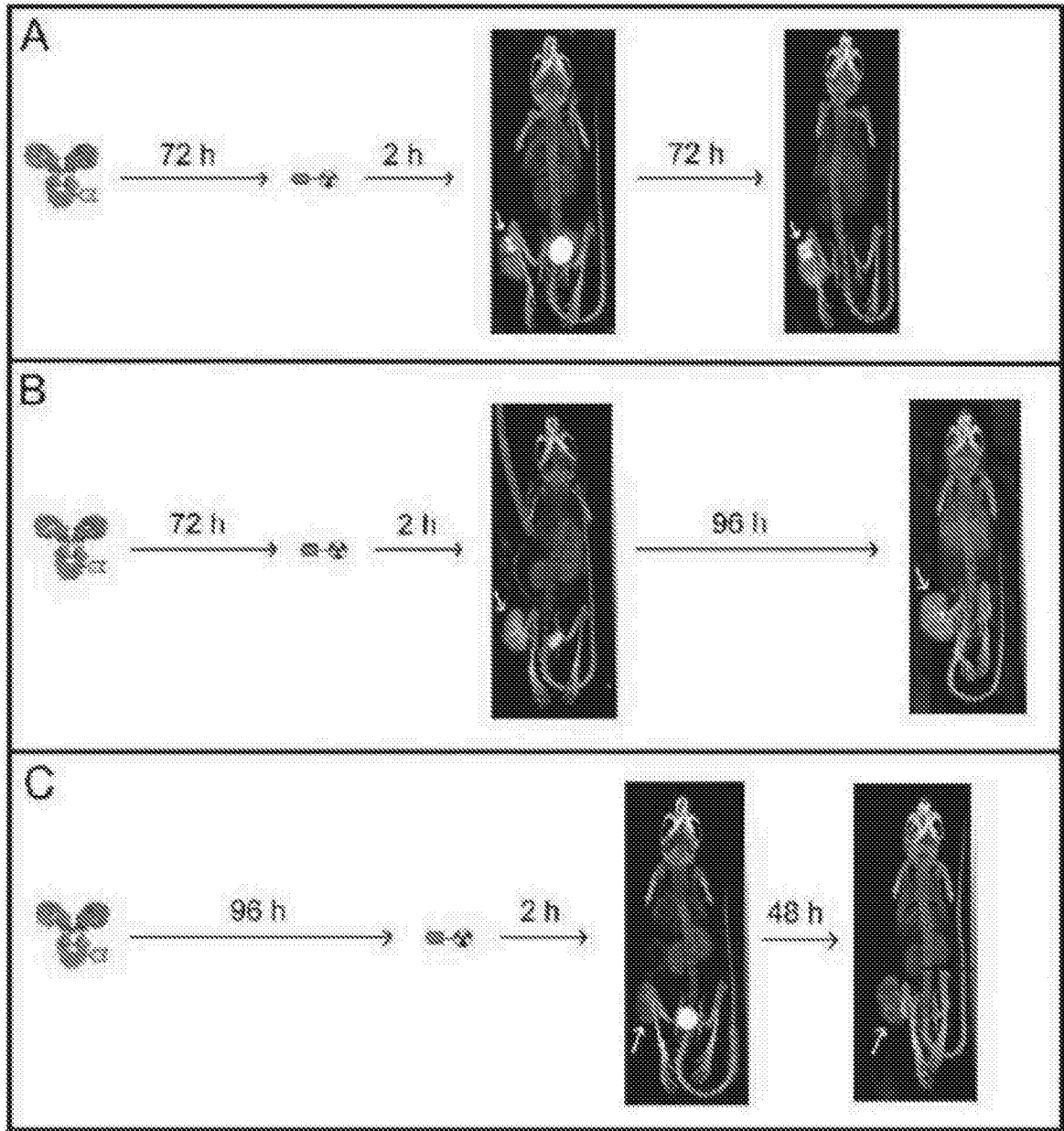


图 14

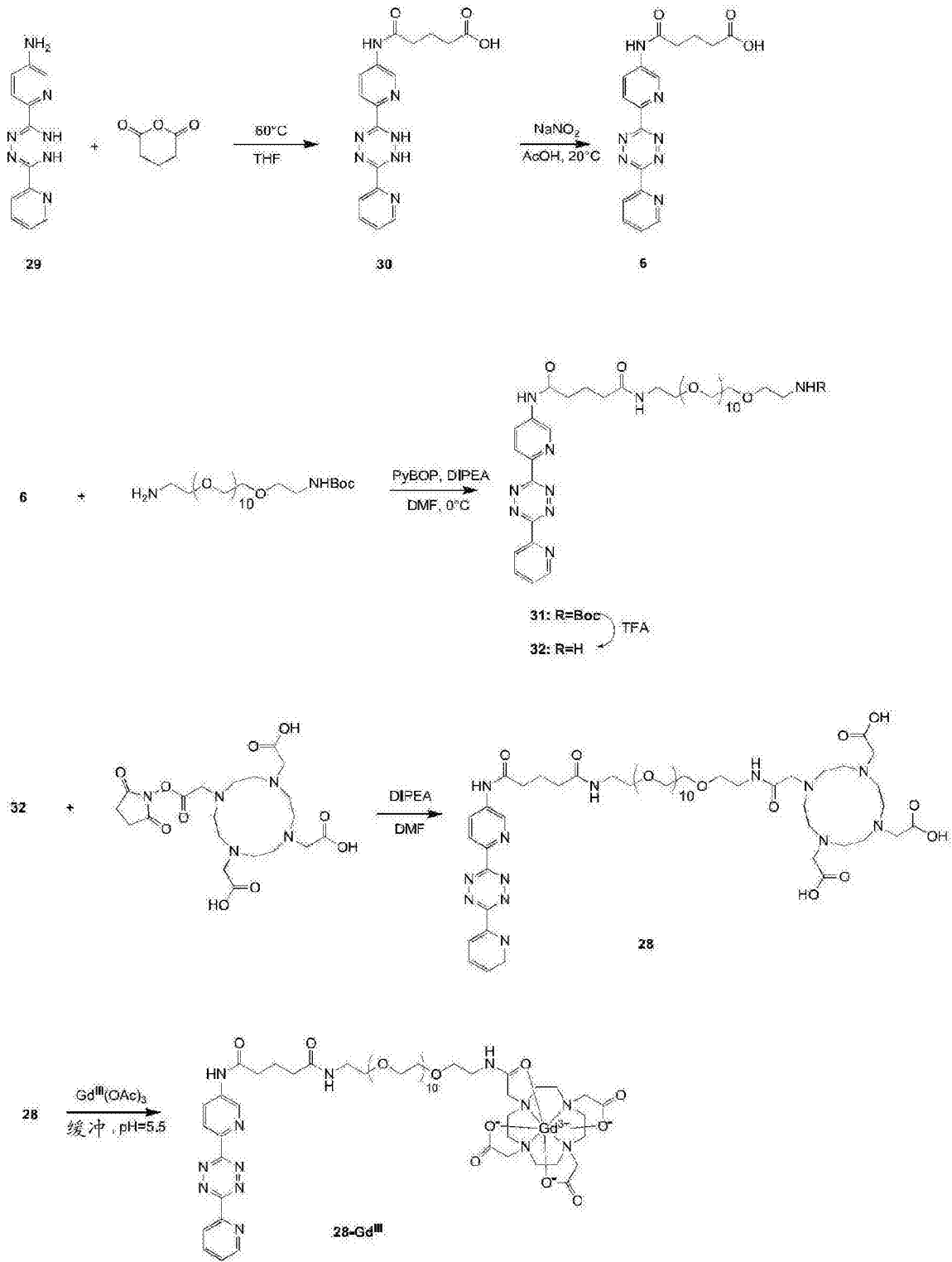


图 15

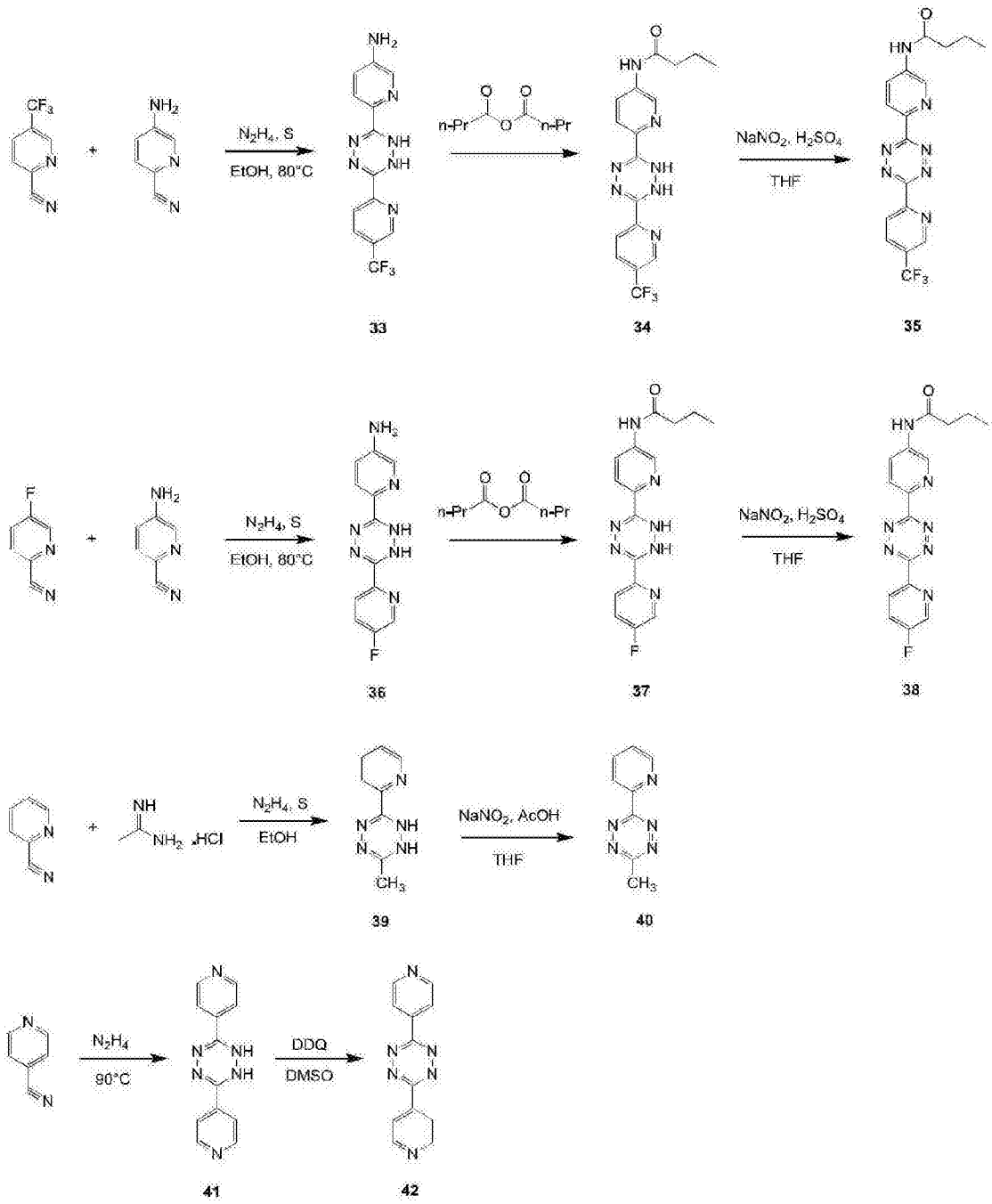


图 16

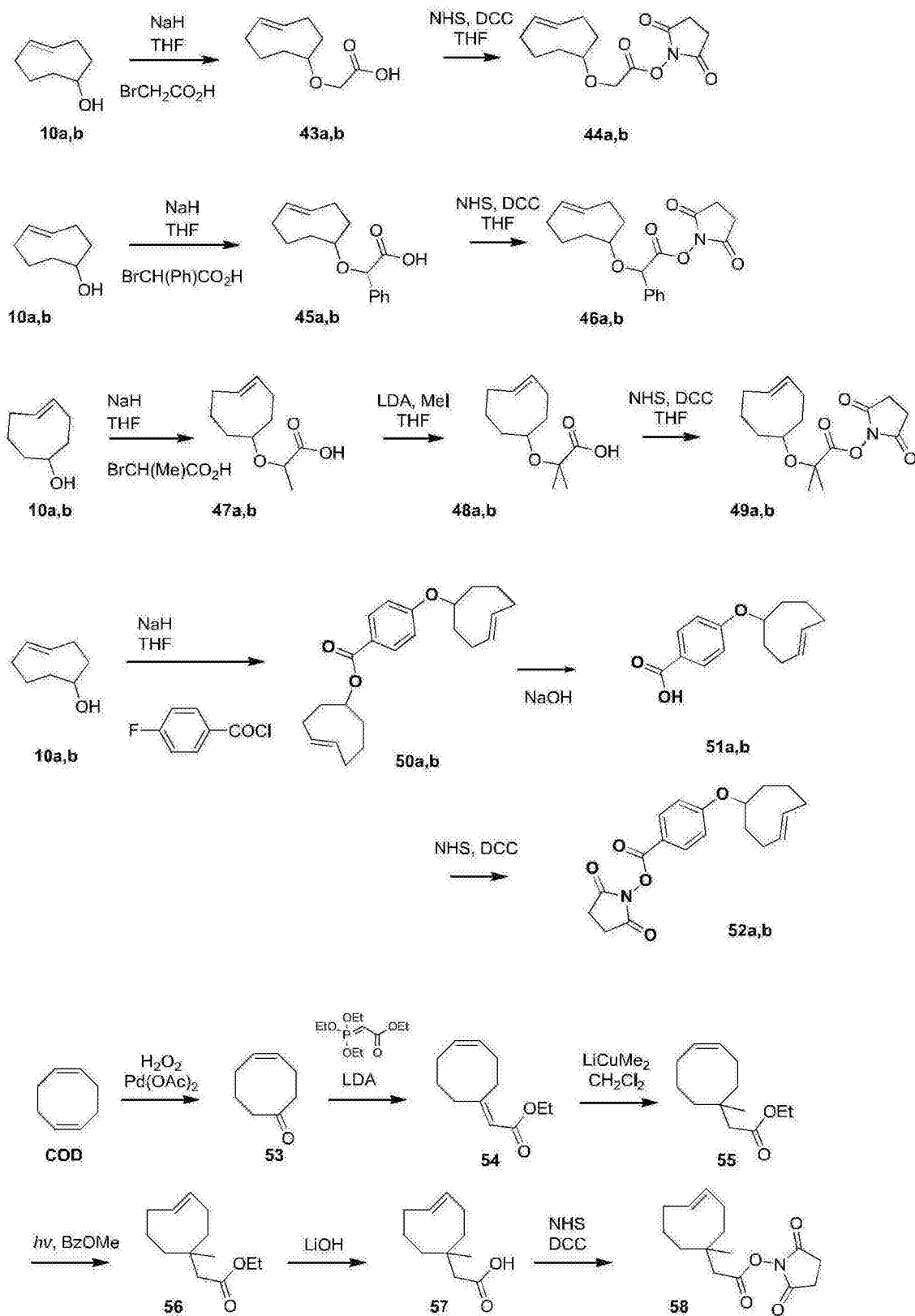


图 17

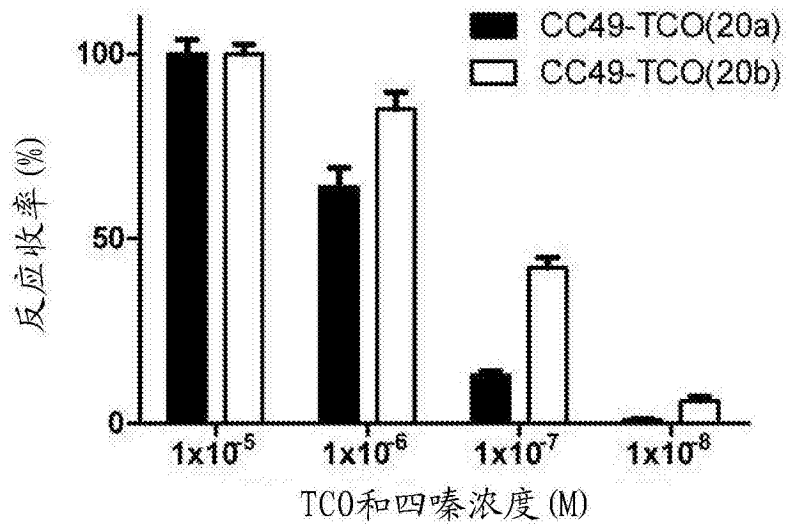


图 18

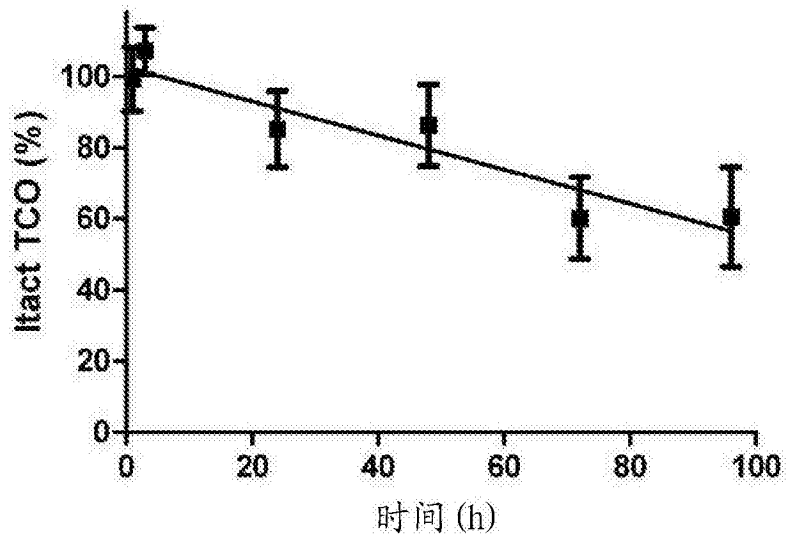


图 19

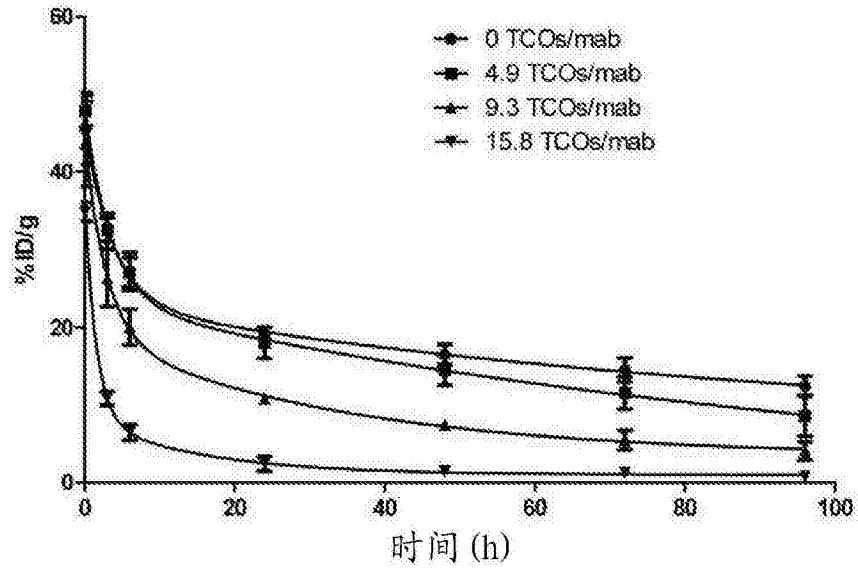


图 20

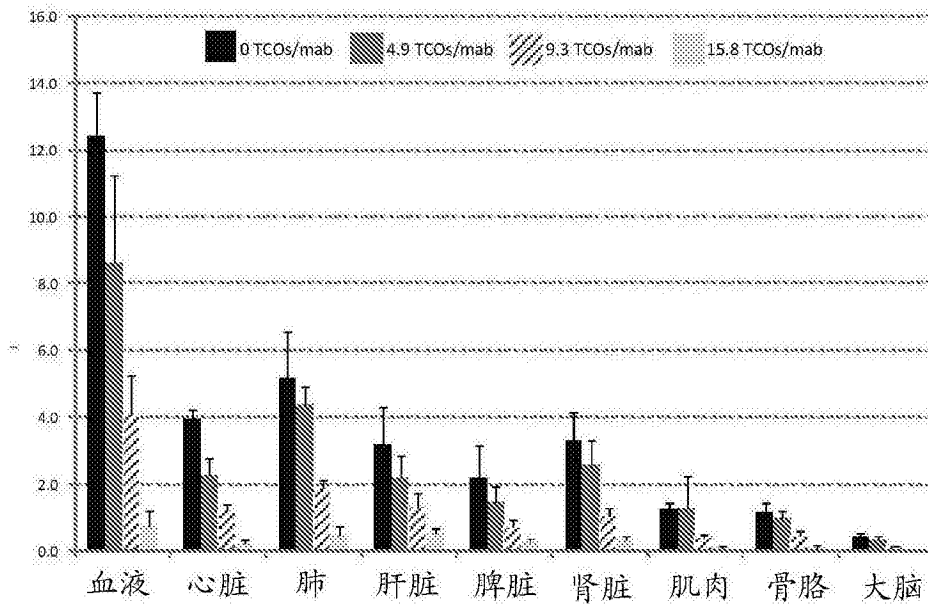


图 21

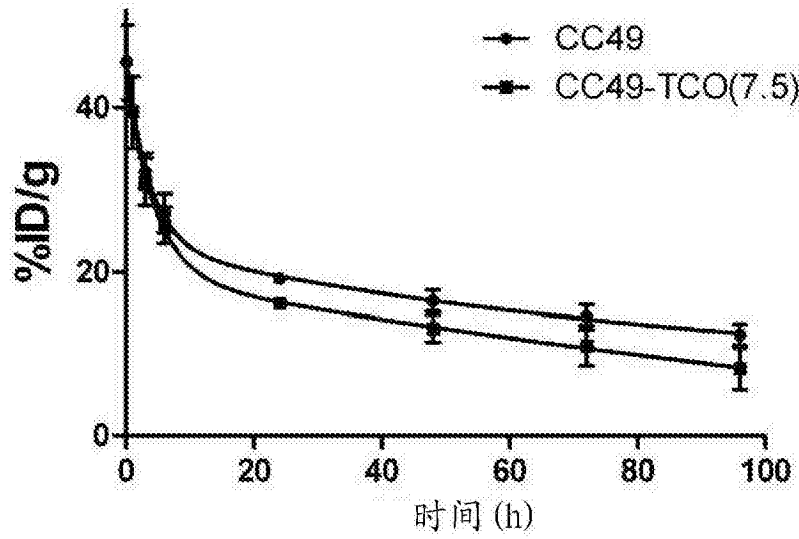


图 22

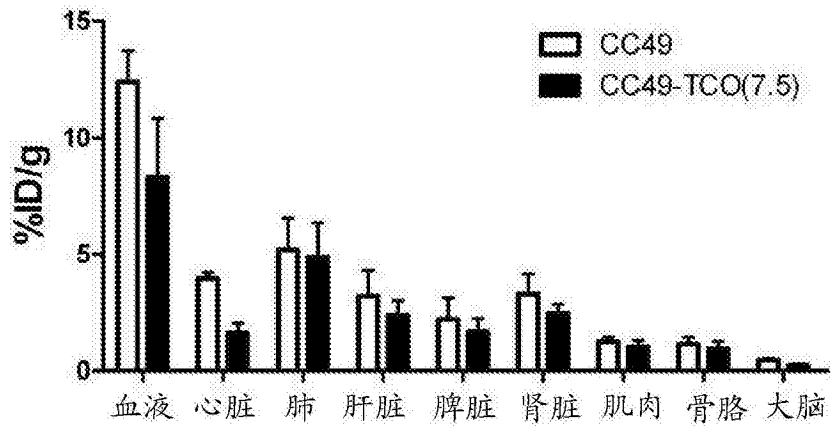


图 23

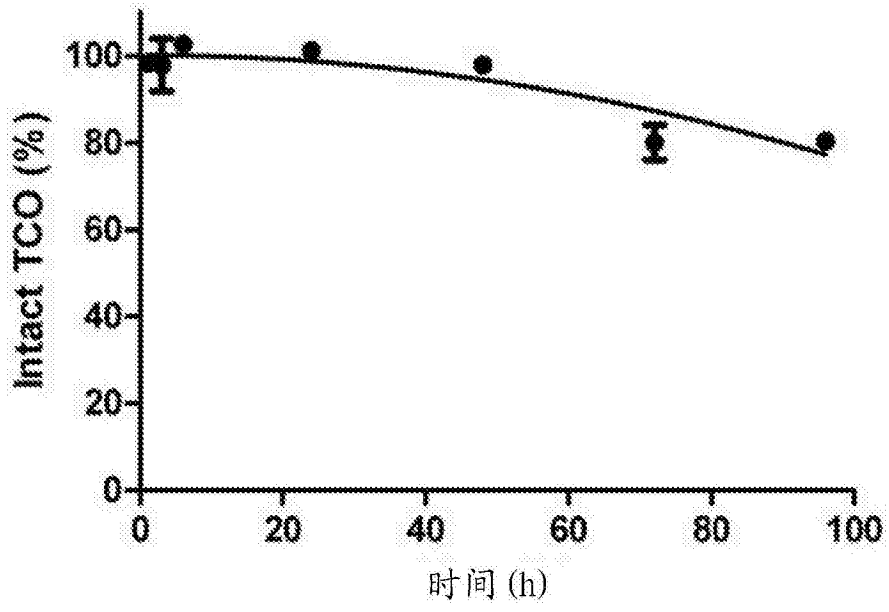


图 24