



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115160244 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 11

(21) 申请号 202210732490.9

(22) 申请日 2022.06.24

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号

(72) 发明人 王秋泉 胡星旺 严晓文

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所 (普通合伙) 35200

专利代理师 张素斌

(51) Int. Cl.

C07D 257/02 (2006.01)

C07D 493/10 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

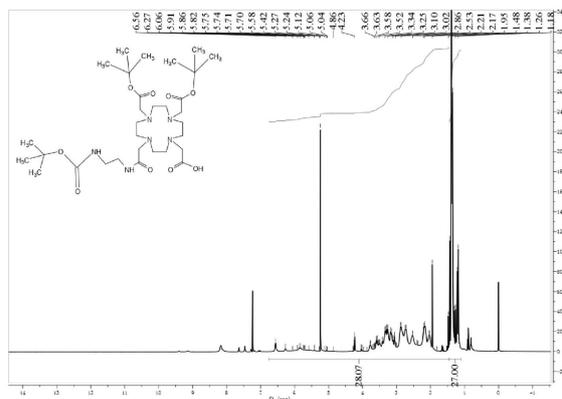
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

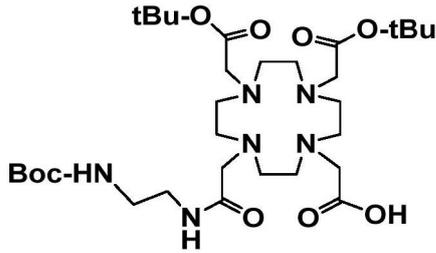
一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的制备方法与应用

(57) 摘要

一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的制备方法与应用,相比于现有的DOTA类螯合剂中间体,所合成中间体的主要结构特点为在含氮杂环的两条相邻侧链上分别具有一个不相同但方便衍生的化学基团。合成路线主要利用卤代碳与含氮杂环的仲胺取代反应共五步实现两种功能侧链的组装,得到含有Boc-氨基和裸露羧基的新DOTA类螯合剂中间体,基于该中间体可以仅通过两次酰胺缩合合成三功能DOTA类标签,应用于医学、药学以及化学和材料等领域。



1. 一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体,其特征在于结构式如下:



**NHBoc-DO2AtBu-COOH**。

2. 权利要求1所述的一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 利用氯乙酰氯和N-Boc氨基乙二胺的缩合反应,经过碱水、饱和盐水的洗涤纯化,得到具有Boc保护氨基的叔丁基(2-(2-氯乙酰氨基)乙基)氨基甲酸酯(化合物1);

2) 利用轮环藤宁(Cyclen)仲胺与溴乙酸叔丁酯间的取代反应,得到D02AtBu(化合物2);

3) 利用化合物2上的仲胺和含氯代碳的化合物1在加热的条件下发生取代反应生成NHBoc-D02AtBu(化合物3);

4) 利用化合物3上的仲胺和溴乙酸乙酯在加热的条件下发生取代反应,得到NHBoc-D02AtBu-Et(化合物4);

5) 在碱性加热条件下将化合物4上的乙酯基脱去,得到NHBoc-D02AtBu-COOH(化合物5),即所述三功能DOTA类螯合剂中间体。

3. 权利要求1所述的一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的应用,其特征在于:将三功能DOTA类螯合剂中间体用于制备三功能DOTA类螯合剂。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于所述制备三功能DOTA类螯合剂包括以下步骤:

1) 在N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)的活化体系下,所述三功能DOTA类螯合剂中间体与含氨基和功能基团的分子酰胺缩合,得到NHBoc-D02AtBu-R<sub>1</sub>(化合物6);

2) 化合物6经三氟乙酸(TFA)脱去叔丁酯基和Boc保护基,再利用重结晶的方法得到NH<sub>2</sub>-DOTA-R<sub>1</sub>(化合物7);

3) 化合物7上的氨基与含N-羟基琥珀酰亚胺酯和功能基团或含异硫氰酸酯基团和功能基团的分子反应,得到R<sub>2</sub>-DOTA-R<sub>1</sub>(化合物8);

4) 在pH中性条件下,化合物8与镧系金属离子(Ln<sup>3+</sup>)进行配位螯合,得到R<sub>2</sub>-DOTALn-R<sub>1</sub>(化合物9)。

## 一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的制备方法与应用

[0001] 关于资助研究或开发的声明：

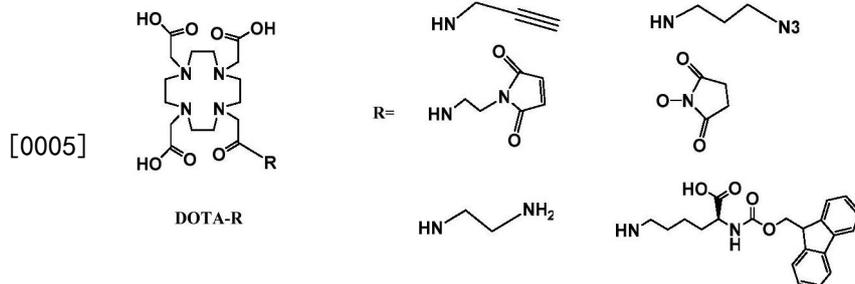
[0002] 本发明在国家自然科学基金重大项目(基金号:22193053)和国家自然科学基金面上项目(基金号:21874112)资助下进行。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及有机合成领域,尤其涉及一种新型三功能DOTA类螯合剂中间体的制备方法与应用。

### 背景技术

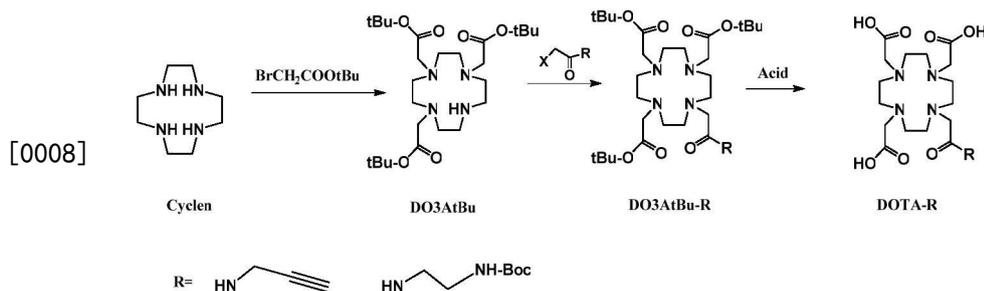
[0004] DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)是一种可以和金属离子稳定结合的螯合剂。目前,对于DOTA类螯合剂的应用研究报道主要为其一取代衍生物(DOTA-R),该类化合物在医学、药学以及化学和材料等领域有着非常广泛的应用。基于镧系金属非常独特的光学和磁学以及相对较低的电离能特性,一方面,通过DOTA与镧系金属离子配位形成稳定的螯合物,另外一方面,通过R基团的进一步化学修饰链接特异性靶向基团,标记复杂生物体系中的目标物,实现核磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)(1.Satya Narayana Murthy Chilla,Céline Henoumont,Luce Vander Elst,Robert N Muller,Sophie Laurent.Importance of DOTA derivatives in bimodal imaging[J].Israel Journal of Chemistry,2017,57(9):800-808)、放射性治疗(2.Wouter A.P.Breeman,Ho Sze Chan,Rory M.S.de Zanger,Mark K.Konijnenberg,Erik de Blois.Overview of Development and Formulation of Lu-177-DOTA-TATE for PRRT[J].Current Radiopharmaceuticals,2016,9(1):8-18)以及电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)化学定量等应用(3.Gunnar Schwarz,Larissa Mueller,Sebastian Beck,Michael W.Linscheid.DOTA based metal labels for protein quantification:a review[J].Journal of Analytical Atomic Spectrometry,2014,29(2):221-233)。



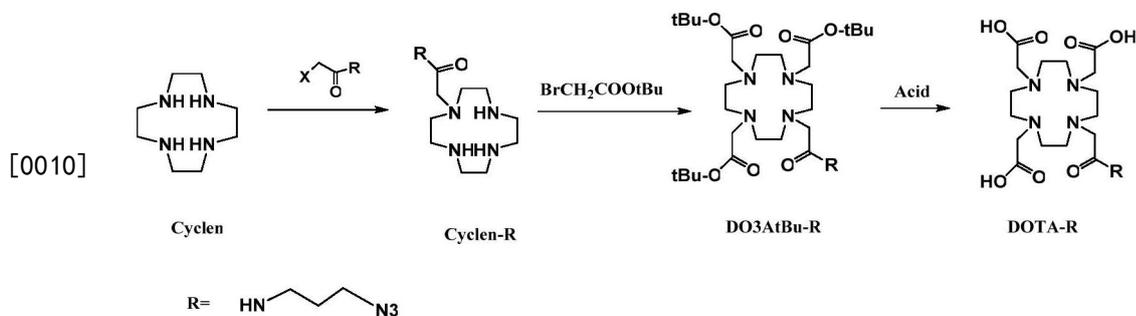
[0006] 目前,市场上双功能螯合剂DOTA-R主要由美国Macrocylics公司销售(4.Subha Viswanathan,Zoltan Kovacs,Kayla N.Green,S.James Ratnakar,A.Dean Sherry.Alternatives to Gadolinium-Based Metal Chelates for Magnetic Resonance Imaging[J].Chemical Reviews,2010,110(5):2960-3018),其中R基团主要为NHS酯、氨基、马来酰亚胺、炔基、叠氮等功能基团,合成路线主要有以下三种:

[0007] 1)以轮环藤宁(Cyclen)为起始原料,首先通过溴乙酸叔丁酯与Cyclen上的仲胺发

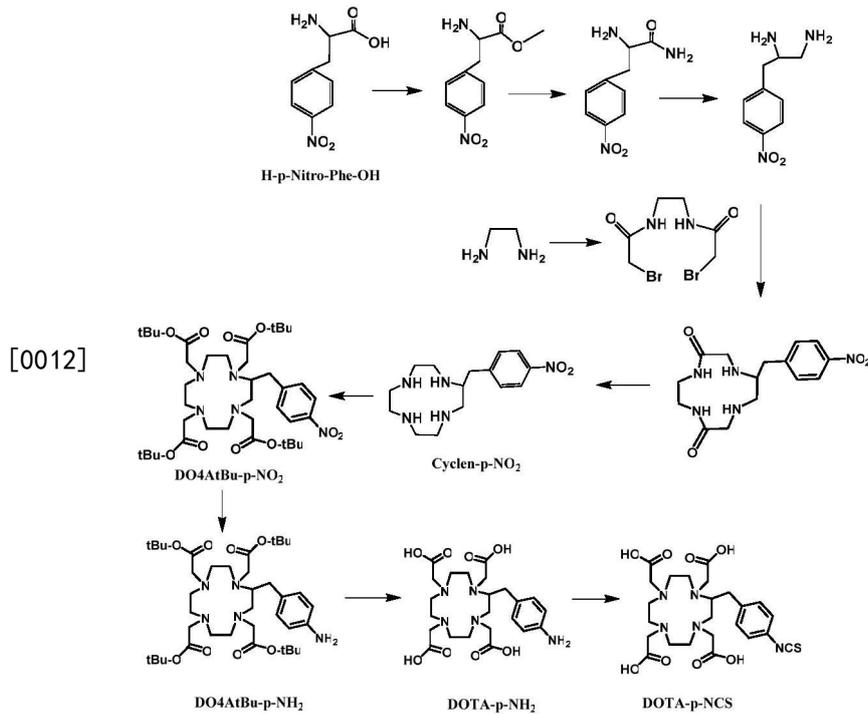
生取代反应生成具有三个乙酸叔丁酯基的中间产物DO3AtBu;再用含卤乙酰基的化合物(X-CO-R)与剩余的一个仲胺反应得到具有不同功能基团(R)的DO3AtBu-R杂环产物,通过三氟乙酸(TFA)或者盐酸将杂环上的叔丁酯保护基脱去得到双功能整合剂产物DOTA-R。在该方法的合成步骤中,DO3AtBu为重要中间体,通过对卤代分子(X-CO-R)不同的设计可以得到不同的双功能整合剂(5.Cong Li,Wing-Tak Wong.A selective one-step synthesis of tris N-alkylated cyclens[J].Tetrahedron.2004,60(26):5595-5601;6.Cong Li,Paul T.Winnard,Tomoyo Takagi,Dmitri Artemov,Zaver M.Bhujwalla.Multimodal Image-Guided Enzyme/Prodrug Cancer Therapy[J].Journal of the American Chemical Society,2006,128(47):15072-15073)。



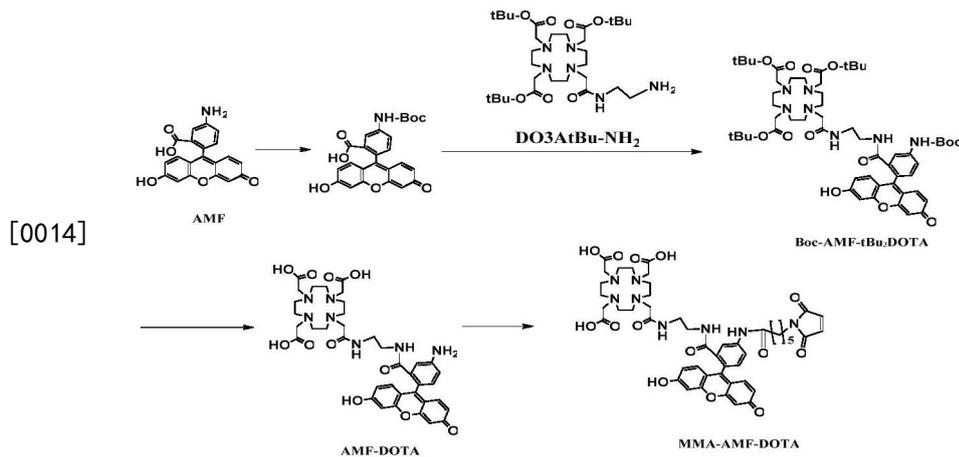
[0009] 2) 首先通过卤代功能分子和Cyclen上的一个仲胺反应得到含功能基团(R)的杂环产物Cyclen-R,再通过溴乙酸叔丁酯和杂环上剩下的三个仲胺发生取代反应得到产物DO3AtBu-R,最后,用强酸将叔丁酯基脱去得到双功能整合剂DOTA-R。文献7以该路线合成了含叠氮基团的DOTA双功能整合剂(7.Pershagen Elias,Nordholm Johan,Borbas K Eszter.Luminescent lanthanide complexes with analyte-triggered antenna formation[J].Journal of the American Chemical Society,2012,134(24):9832-9835)。



[0011] 3) 文献8以对硝基苯丙氨酸和乙二胺为原料,经酯化、胺解、成环、烷基化、还原、取代等反应合成了目标产物2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA-p-NCS)(8.段玉春,程作用.偶联剂2-(4-异硫氰基苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸的合成工艺改进[J].化学研究与应用,2014,26(01):140-144)。

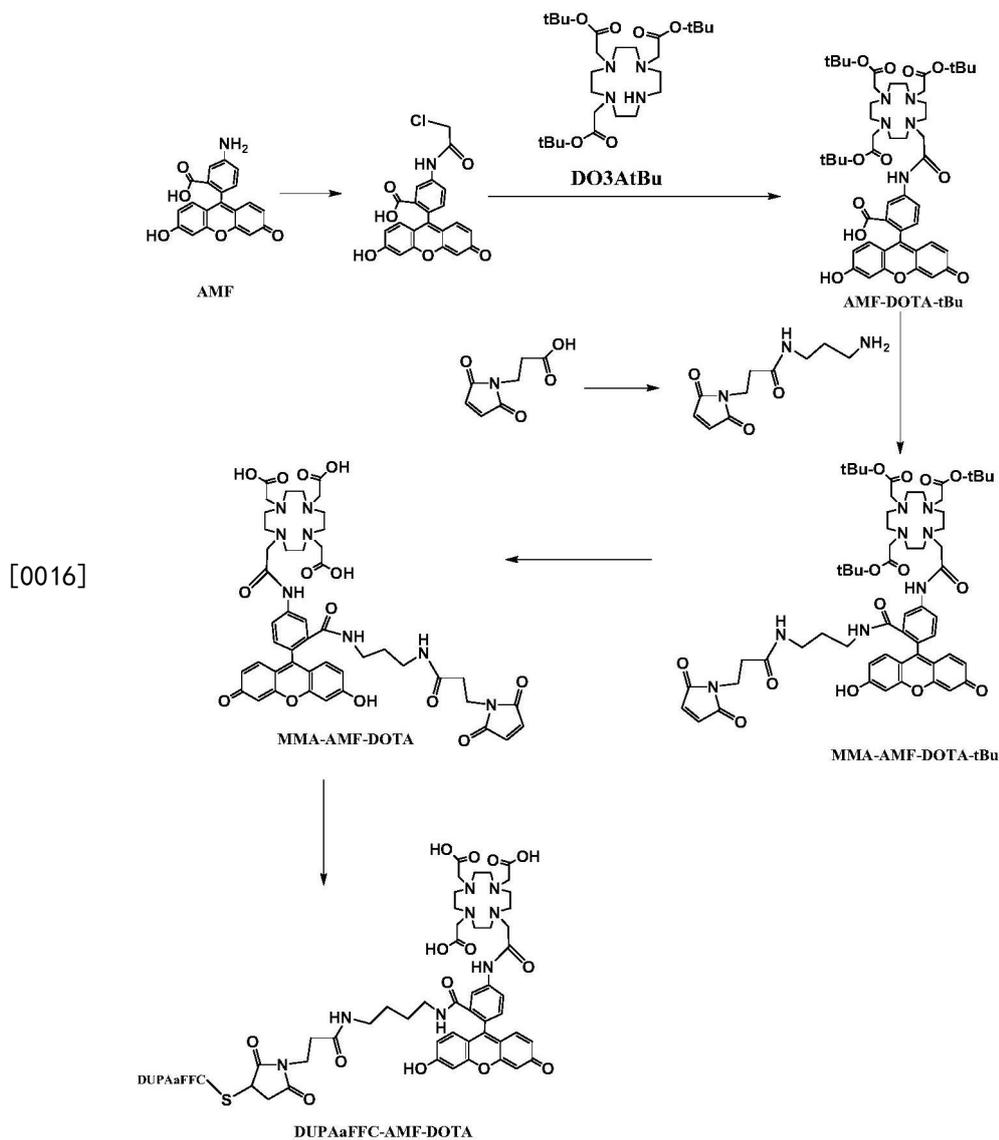


[0013] 以上三种方法主要利用了D03AtBu和D03AtBu-R等中间体进行不同的功能化衍生，可以合成出含一个可后修饰基团R(如，炔基、叠氮或p-NCS等)的双功能螯合剂DOTA-R。随着研究水平的不断提升和实际需要，其应用已经不再局限于双功能螯合剂。例如，为了同时获取待测物的含量和空间分布信息，文献9报道了基于D03AtBu-NH<sub>2</sub>为中间体的三功能DOTA类螯合剂的合成方法，除了满足镧系金属离子螯合和靶向标记以外，还具有荧光成像的功能(9.Zhubao Zhang,Qiang Luo,Xiaowen Yan,Zhaoxin Li,Yacui Luo,Limin Yang,Bo Zhang,Haifeng Chen,and Qiuquan Wang.Integrin-Targeted Trifunctional Probe for Cancer Cells:A“Seeing and Counting”Approach[J].Analytical Chemistry,2012,84(21):8946-8951)。



[0015] 此外，文献10还报道了以D03AtBu为中间体合成同时含荧光基团和马来酰亚胺基团的DOTA类三功能螯合剂的方法。该三功能螯合剂上的马来酰亚胺通过和具有特异性识别作用的多肽偶联后，应用于癌细胞表面生物标志物和癌细胞本身的定量与成像分析(10.Chunlan Liu,Shu Lu,Limin Yang,Peijie Chen,Peiming Bai,and Qiuquan Wang.Near-Infrared Neodymium Tag for Quantifying Targeted Biomarker and

Counting Its Host Circulating Tumor Cells[J].Analytical Chemistry,2017,89(17):9239-9246)。



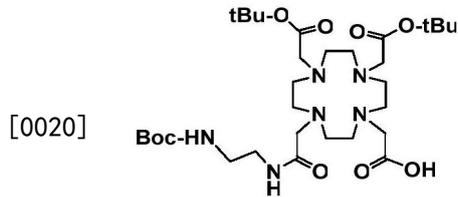
[0017] 文献9和文献10所报道的三功能DOTA类螯合剂合成方法都是基于现有的DOTA-R或DO3AtBu-R分子作为中间体展开进一步设计制备。该类螯合剂中间体的共同结构特点是在含氮杂环的一条侧链上含有一个方便化学修饰的基团。在利用该类螯合剂中间体进行三功能螯合剂的合成过程中,往往需要对荧光基团上的氨基和羧基进行衍生,但由于荧光基团上的苯胺活性低且羧基常以内酯的形式存在,在利用酰胺缩合反应链接荧光基团时,反应产物收率通常低于20%,不利于大量三功能DOTA类螯合剂的制备与应用。

### 发明内容

[0018] 本发明的目的在于解决现有技术中的上述问题,提供一种简单、低成本的三功能DOTA类螯合剂中间体,2-(4,7-双(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-10-(2-((2-((叔丁氧羰基)氨基)乙基)氨基)-2-氧代乙基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1-基)乙酸(2-(4,7-bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-10-(2-((2-((tert-butoxycarbonyl) amino) ethyl) amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetic acid, BocNH-DO2AtBu-

COOH), 该结构上含氮杂环的两条相邻侧链上同时具有乙酸叔丁酯基, 另外两条相邻的侧链上分别含有一个乙酸基团和Boc保护的氨基。

[0019] 本发明提供了该整合剂中间体的合成方法以及利用该中间体分子合成三功能整合剂的方法, 并展示了所制备三功能整合剂在癌细胞表面糖的定位与定量研究中的应用。



NHBoc-DO2AtBu-COOH

[0021] 本发明整合剂中间体的制备与应用包括以下步骤:

[0022] 步骤一: 利用氯乙酰氯和N-Boc氨基乙二胺的缩合反应, 经过碱水、饱和盐水的洗涤纯化, 得到具有Boc保护氨基的叔丁基(2-(2-氯乙酰氨基)乙基)氨基甲酸酯(化合物1);

[0023] 步骤二: 利用Cyclen仲胺与溴乙酸叔丁酯间的取代反应, 通过控制原料当量比并辅以溶剂效应, 提升乙酸叔丁酯基邻氮位二取代的收率, 后续用硅胶柱色谱纯化得到DO2AtBu(化合物2);

[0024] 步骤三: 利用化合物2上的仲胺和含氯代碳的化合物1在加热的条件下发生取代反应生成NHBoc-DO2AtBu(化合物3); 该步骤通过控制化合物2与化合物1之间的当量比提升化合物3的收率, 经硅胶柱色谱纯化除去副产物, 得到化合物3;

[0025] 步骤四: 利用化合物3上的仲胺和溴乙酸乙酯在加热的条件下发生取代反应, 后续经硅胶色谱柱纯化得到NHBoc-DO2AtBu-Et(化合物4);

[0026] 步骤五: 在碱性加热条件下将化合物4上的乙酯基脱去, 用水溶解粗产物后, 经过萃取、重结晶纯化得到NHBoc-DO2AtBu-COOH(化合物5);

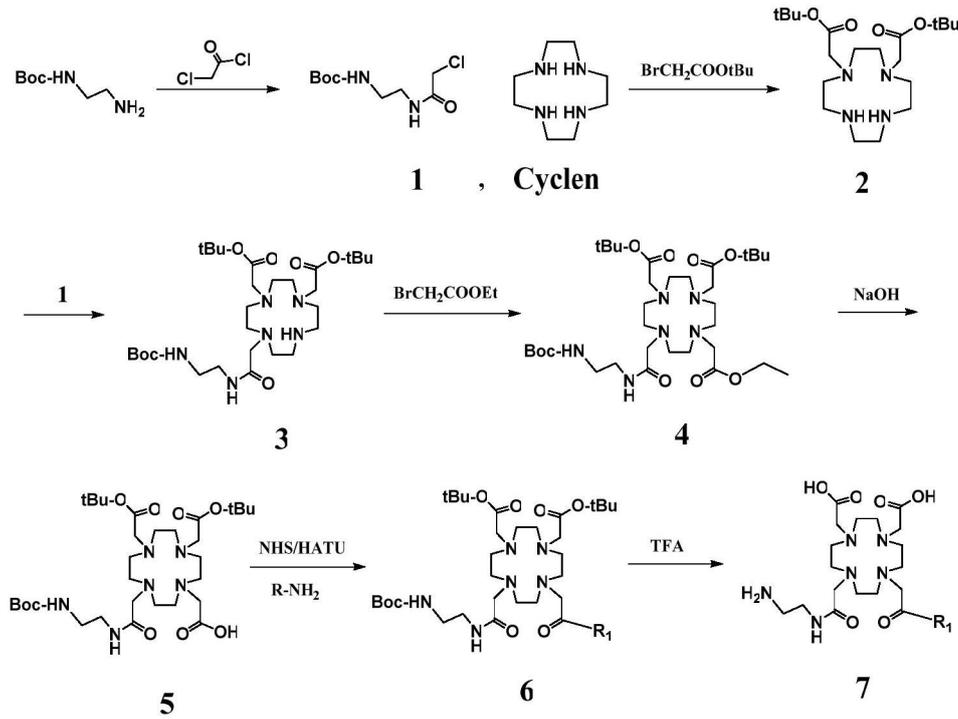
[0027] 步骤六: 在N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)的活化体系下, 化合物5与含氨基和功能基团(炔基、叠氮等)的分子酰胺缩合, 经过硅胶柱纯化得到NHBoc-DO2AtBu-R<sub>1</sub>(化合物6);

[0028] 步骤七: 化合物6经TFA脱去叔丁酯基和Boc保护基, 再利用乙醚重结晶的方法得到NH<sub>2</sub>-DOTA-R<sub>1</sub>(化合物7);

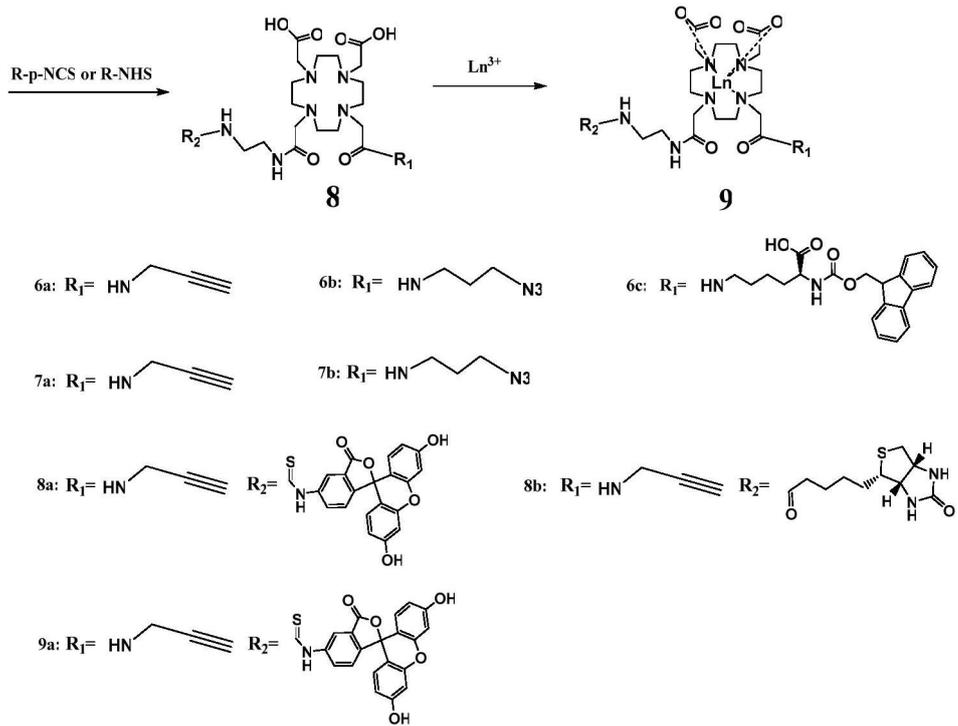
[0029] 步骤八: 化合物7上的氨基与含N-羟基琥珀酰亚胺酯和功能基团(荧光基团、Biotin基团等)或含异硫氰酸酯基团和功能基团的分子反应, 经过C-18反相制备色谱纯化得到R<sub>2</sub>-DOTA-R<sub>1</sub>(化合物8);

[0030] 步骤九: 在pH中性条件下, 化合物8与镧系金属离子(Ln<sup>3+</sup>)进行配位整合, 经过C-18反相制备色谱纯化得到R<sub>2</sub>-DOTALn-R<sub>1</sub>(化合物9)。

[0031] 以上步骤的合成路线如下:



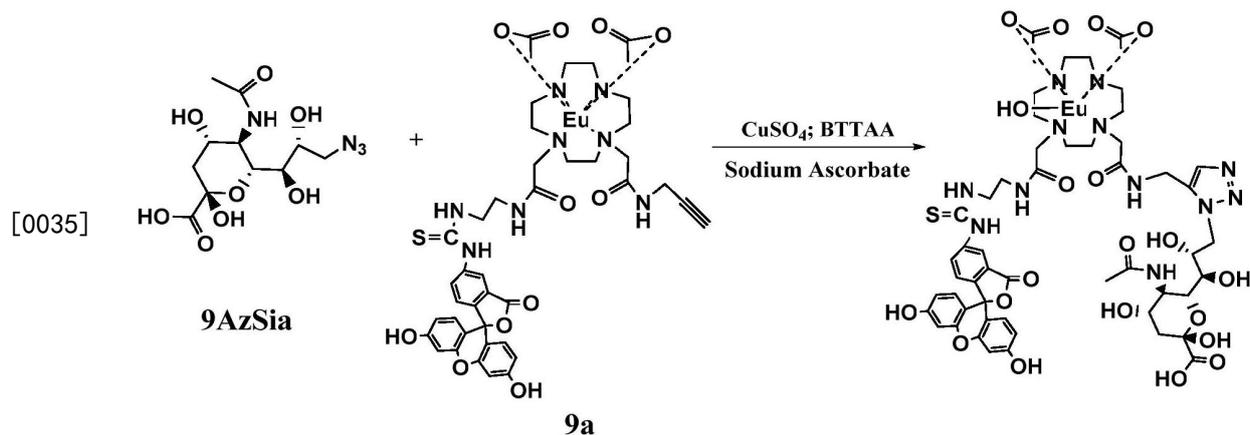
[0032]



[0033] 其中,所得到的化合物5为重要的三功能DOTA类螯合剂中间体。一方面,分子上的羧基可以先在NHS/HATU活化体系中进行酰胺缩合反应偶联上炔基、叠氮、马来酰亚胺、NHS酯的等基团;另一方面,在酸性条件下脱去Boc保护后的氨基可以与荧光素、生物素等功能基团在温和的碱性条件下偶联,利用该方法可以灵活地组装合成多功能DOTA类螯合剂。

[0034] 所合成的FITC-DOTA-Eu-Alk(化合物9a)可用于细胞表面唾液酸的定量分析。首先,利用非天然唾液酸的细胞特定补偿代谢途径将9-叠氮唾液酸(9AzSia)代谢至细胞表面的糖链末端,之后通过含炔基的化合物9a与含叠氮的唾液酸之间生物正交点击反应将化合物9a按化学计量比1:1特异性标记于细胞表面的唾液酸上。利用荧光成像技术和ICP-MS单

细胞检测装置分别进行荧光成像和检测Eu的质量信号,可以快速确定唾液酸的空间位置和含量信息,从而达到二维分析的目的。



[0036] 作为优选,在步骤一中,氯乙酰氯和N-Boc氨基乙二胺的当量比为1.2:1.0。

[0037] 步骤一中的溶剂可以为二氯甲烷或者四氢呋喃。

[0038] 步骤一中的反应在缚酸剂作用下进行;作为优选,步骤一中所用的缚酸剂为三乙胺。

[0039] 步骤一中的反应需要先后在冰浴和室温下进行;作为优选,在步骤一中的冰浴反应时间为1h,室温反应时间为3h;室温的温度范围优选为20-25℃。

[0040] 步骤一中的碱水可选用NaOH溶液或者KOH溶液,pH为11。饱和盐水可选用KCl溶液或者NaCl溶液。饱和盐水洗涤后的有机溶液利用无水硫酸钠或者无水硫酸镁干燥。

[0041] 作为优选,步骤二中,溴乙酸叔丁酯和Cyclen的当量比为2.0:1.0。

[0042] 步骤二的反应在缚酸剂的作用下进行;进一步,步骤二的缚酸剂优选为三乙胺,缚酸剂和Cyclen的当量比优选为5.0:1.0。

[0043] 步骤二中,Cyclen和缚酸剂先加入溶剂当中,溶剂可以为二氯甲烷或者三氯甲烷。

[0044] 步骤二中,作为优选,溴乙酸叔丁酯在冰浴下缓慢均匀加入反应体系中;进一步,加入时间为30min。

[0045] 作为优选,步骤二中,溴乙酸叔丁酯加入完毕后,在室温下继续反应24h。作为优选,室温范围为20-25℃。

[0046] 作为优选,步骤二中的粗产物用30倍质量的300-400目的硅胶柱色谱纯化,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=30:1。

[0047] 在步骤三中,化合物1和化合物2的当量比优选为0.8:1.0。

[0048] 步骤三的反应在缚酸剂的作用下进行,缚酸剂优选为碳酸钾,缚酸剂和化合物2的当量比优选为5:1。

[0049] 作为优选,步骤三的溶剂为乙腈;步骤三的反应温度为60℃;步骤三的反应时间为12h。

[0050] 作为优选,步骤三中的粗产物用30倍质量的300-400目硅胶柱色谱纯化,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=40:1。

[0051] 在步骤四中,溴乙酸乙酯和化合物3的当量比优选为1.5:1.0。

[0052] 步骤四的反应在缚酸剂的作用下进行,缚酸剂优选为碳酸钾,缚酸剂和化合物3的当量比优选为5:1。

[0053] 作为优选,步骤四的溶剂为乙腈;步骤四的反应温度为60℃;步骤四中的反应时间

为12h。

[0054] 作为优选,步骤四中的粗产物用20倍质量的300-400目硅胶柱色谱纯化,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=30:1。

[0055] 作为优选,步骤五的碱性反应条件由体积比为2:1的1,4-二氧六环和0.1M NaOH水溶液提供。

[0056] 作为优选,步骤五的反应温度为55℃;步骤五的反应时间为6h。

[0057] 作为优选,步骤五的粗产物用1体积当量的水溶解后,用1体积当量的二氯甲烷萃取,萃取次数为3次。萃取后的二氯甲烷溶液用无水硫酸钠或者无水硫酸镁干燥。

[0058] 作为优选,步骤五中萃取后得到的粗产物用无水乙醚在4℃下重结晶24h纯化产物。

[0059] 步骤六的反应溶剂可以为乙腈或者N,N-二甲基甲酰胺(DMF)。

[0060] 作为优选,步骤六的反应中先用NHS和HATU对羧基活化;NHS、HATU和化合物5的当量比为1.2:1.2:1.0;优选,在室温下活化反应12h。

[0061] 步骤六中含氨基和功能基团的化合物可以是炔丙胺、3-叠氮基丙胺、N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺和Fmoc-赖氨酸。

[0062] 作为优选,步骤六中含氨基和功能基团的化合物与活化后的化合物5在pH 8.0的条件下反应3h。

[0063] 作为优选,步骤六中的反应pH用三乙胺调节。

[0064] 作为优选,步骤六中的粗产物用30倍质量的300-400目硅胶柱色谱纯化,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇=30:1。

[0065] 作为优选,步骤七用TFA脱叔丁酯基和Boc基,TFA和化合物6的当量比为100:1。

[0066] 作为优选,步骤七中的反应产物经重结晶纯化,重结晶的体系优选为乙醚:甲醇=40:1(体积比)。

[0067] 步骤八中含N-羟基琥珀酰亚胺酯和功能基团的化合物可以是Biotin-NHS,含异硫氰酸酯功能基团的分子可以是异硫氰酸荧光素(FITC)。

[0068] 作为优选,步骤八中的反应在pH 8.0的条件下进行,用三乙胺调节pH。

[0069] 作为优选,步骤八的溶剂为DMF。

[0070] 作为优选,步骤八的粗产物用C-18反相制备色谱纯化,流动相为乙腈和水。

[0071] 作为优选,步骤九中的金属离子为三价镧系金属离子,镧系金属离子与化合物8的当量比为1.5:1.0。

[0072] 作为优选,步骤九的反应时间为1h。

[0073] 作为优选,步骤九的粗产物用C-18反相制备色谱纯化,流动相为乙腈和水。

[0074] 本发明提供了一种区别于DOTA-R和D03AtBu-R螯合剂中间体的新型DOTA类螯合剂中间体化合物5及其合成方法,共五步反应,总收率达23%。在化合物5杂环的两条侧链上分别含有一个羧基和一个Boc保护的氨基。利用该新型螯合剂中间体,以杂环分子本身为偶联骨架高效地进行多功能修饰。首先通过HATU/NHS体系将羧基转为NHS酯中间体后再与含氨基的炔基、叠氮等功能化基团偶联,该步反应收率在70%以上;之后在酸性条件下将Boc保护的氨基与叔丁酯基一同脱去,后利用乙醚/甲醇体系重结晶便可纯化出该步产物,该步反应收率85%以上;最后,与含异硫氰酸酯或者NHS酯的分子进一步功能化衍生得到三功能

DOTA类螯合剂。

[0075] 相对于现有技术,本发明技术方案取得的有益效果是:

[0076] 本发明设计合成了一种新型的DOTA类螯合剂中间体,并展示了以该中间体分子进行三功能螯合剂的合成路线与应用。与现有的双功能螯合剂中间体D03AtBu-R结构相比,该分子在杂环的两条侧链上分别含有不同的可修饰基团,可分步利用酰胺缩合反应在杂环的两条侧链上实现不同化学基团的修饰。由此从中间体出发,制备DOTA类三功能螯合剂的步骤将大大简化。在DOTA杂环两条侧链上同时进行不同化学衍生的方法及应用目前尚未有报道。本发明提供的合成路线原料成本低、合成步骤少、反应条件温和、反应收率高、纯化步骤简单。使用人员可以根据实际需求,在本发明所提供的中间体和合成方法基础上,进行灵活地再设计制备新颖的DOTA类多功能分子。

### 附图说明

[0077] 图1为化合物5<sup>1</sup>H NMR谱图;

[0078] 图2为化合物5<sup>13</sup>C NMR谱图;

[0079] 图3为化合物5 ESI-MS谱图;

[0080] 图4为化合物9a对结直肠癌腺细胞HCT15标记实验的荧光成像结果;

[0081] 图5为化合物9a对结直肠癌腺细胞HCT15标记实验的单细胞ICP-MS检测结果;

[0082] 图6为单细胞ICP-MS检测结果的高斯分布统计图。

### 具体实施方式

[0083] 为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚、明白,以下结合附图和实施例,对本发明做进一步详细说明。

[0084] 实施例1

[0085] 取1.6g N-Boc氨基乙二醇溶于50mL二氯甲烷,加入1.01g三乙胺,并在冰浴下搅拌均匀。取1.13g氯乙酰氯缓慢加入反应体系中。待氯乙酰氯滴加完毕,在冰浴下反应1h后转室温反应3h。停止反应后,加入50mL pH 11的NaOH溶液对有机相洗涤。将有机相收集后继续用饱和NaCl水溶液进行洗涤,接着用无水硫酸钠对有机相干燥。将有机相经减压蒸馏除去溶剂,得到1.75g白色固体即为化合物1(收率为74%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.45(s,9H), 3.32(d,J=4.4Hz,2H), 3.42(dd,J=5.51,11.31Hz,2H), 4.04(s,2H), 5.03(s,1H) ppm; <sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ28.34,39.75,41.17,42.49,79.86,156.80,166.81ppm.ESI-MS(+)*m/z*: Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,236.09,found 259.0824[M+Na]<sup>+</sup>。

[0086] 实施例2

[0087] 取1.72g Cyclen溶于200mL二氯甲烷中,加入5.05g三乙胺,在冰浴下搅拌15min。取3.9g溴乙酸叔丁酯溶于20mL二氯甲烷中,然后将溴乙酸叔丁酯溶液缓慢的滴加至Cyclen溶液中,滴加时间为30min。滴加完毕后,在25℃下反应24h。减压蒸馏除去溶剂得到黄色油状粗产物。用300-400目硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=30:1)纯化得到2.81g无色油状物,即为化合物2(收率为70%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.46(s,18H), 2.90-3.00(m,16H), 3.30-3.39(m,4H) ppm; <sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ28.10,46.04,46.56,49.78,50.95,53.49,81.49,170.16ppm.ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>,400.30,found 401.3058[M+H]<sup>+</sup>。

## [0088] 实施例3

[0089] 取0.600g化合物2溶于30mL乙腈中,加入1.050g碳酸钾,再加入0.255g化合物1。在25℃下搅拌15min后,升温至60℃回流反应12h。将反应体系中固体沉淀过滤后,得到黄色油状粗产物。经300-400目硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=40:1)纯化得到0.513g无色玻璃状物即为化合物3(收率为57%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.42(s,9H),1.45-1.46(d,J=4.95Hz,18H),2.65-3.17(m,16H),3.17-3.45(m,10H),5.66(s,1H),7.90(s,1H),9.95(s,1H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDC<sub>13</sub>) δ28.14,28.42,39.65,40.77,45.65,46.12,46.54,49.34,50.73,51.51,52.13,57.34,61.28,78.56,81.85,162.39,170.03,171.21ppm。ESI-MS(+) m/z:Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>,600.42,found 601.3895[M+H]<sup>+</sup>。

## [0090] 实施例4

[0091] 取0.300g化合物3溶于10mL乙腈中,加入0.350g碳酸钾,再加入0.125g溴乙酸乙酯。在25℃下搅拌15min后,升温至60℃回流反应12h。将固体沉淀过滤后得到黄色油状粗产物。经300-400目硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=30:1)纯化得到0.282g无色玻璃状物即为化合物4(收率为82%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ4.37-1.57(m,27H),1.60-1.27(m,27H),1.20(dd,J=10.0,5.7Hz,6H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDC<sub>13</sub>) δ172.46,172.16,156.40,82.10,81.99,78.69,61.34,56.33,55.80,53.43,42.57,39.95,31.56,30.05,29.68,28.48,28.33,28.12,28.01,27.95,22.56,14.18ppm。ESI-MS(+) m/z:Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>62</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>,686.46,found 687.4341[M+H]<sup>+</sup>。

## [0092] 实施例5

[0093] 取0.200g化合物4溶于10mL二恶烷中,加入5mL 0.1M NaOH水溶液,在55℃下搅拌反应6h后,将反应液减压蒸馏除去溶剂得到黄色油状物。用10mL水溶解得到白色乳状液,用3×10mL二氯甲烷对水相萃取后,合并有机相,并用无水硫酸钠干燥有机相。减压蒸馏除去二氯甲烷得到无色油状物,用10mL无水乙醚溶解后在4℃下重结晶24h得到0.182g白色固体化合物5(收率为95%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ6.72-1.67(m,28H),1.60-1.27(m,27H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDC<sub>13</sub>) δ176.25,173.02,172.55,172.21,158.28,82.18,81.79,80.69,65.53,55.60,53.37,31.38,30.53,30.02,29.60,28.42,28.03,22.58,19.12,13.67ppm。ESI-MS(+) m/z:Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>,658.43,found 659.4288[M+H]<sup>+</sup>。图1为化合物5<sup>1</sup>H NMR谱图;图2为化合物5<sup>13</sup>C NMR谱图;图3为化合物5 ESI-MS谱图。

## [0094] 实施例6

[0095] 取0.100g化合物5溶于10mL乙腈中,加入0.017g NHS和0.057g HATU后在室温下搅拌反应12h,加入0.009g炔丙胺并用三乙胺调节pH至8.0后在室温下反应3h,减压蒸馏除去溶剂后将粗产物用300-400目的硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=30:1)纯化得到0.091g无色玻璃状NHBoc-D02AtBu-Alk(化合物6a)(收率为88%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.33-1.40(dd,J=7.82,18.36Hz,27H),1.74-3.34(m,31H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDC<sub>13</sub>) δ27.81,28.24,42.57,48.64,51.95,52.39,53.44,53.72,76.79,77.25,82.63,85.25,160.67,164.55,170.27ppm。ESI-MS(+) m/z:Calcd for C<sub>34</sub>H<sub>61</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>,695.46,found 696.55[M+H]<sup>+</sup>,718.60[M+Na]<sup>+</sup>。

## [0096] 实施例7

[0097] 取0.091g化合物6a溶于2mL二氯甲烷中,加入1mL TFA后在室温下搅拌反应3h,减

压蒸馏除去溶剂后得到棕色油状物,使用乙醚:甲醇=40:1重结晶得到0.062g白色固体NH<sub>2</sub>-DOTA-Alk(化合物7a)(收率为99%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.02(s,1H),2.51(s,1H),2.70-4.13(m,30H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ28.77,36.56,39.66,54.68,54.97,65.99,72.12,79.23,162.80,163.08ppm.ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>,483.28,found 484.35[M+H]<sup>+</sup>,242.80[M+2H]<sup>+</sup>.

#### [0098] 实施例8

[0099] 取0.030g化合物7a,溶于5mL DMF溶液中,加入0.022g Biotin-NHS-ester,用三乙胺调节pH至8.0,在室温下反应3h,使用C-18反相制备色谱(5%乙腈-95%乙腈梯度洗脱)纯化得到0.032g白色固体产物Biotin-DOTA-Alk(化合物8b)(收率为75%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,MeOD) δ4.51(dt,J=7.9,4.0Hz,2H),4.32(dd,J=7.8,4.4Hz,2H),3.98(s,4H),3.69-3.66(m,2H),3.61(dd,J=14.1,7.0Hz,1H),3.49-3.09(m,19H),2.94(dd,J=12.7,4.7Hz,2H),2.73-2.48(m,5H),2.34-2.18(m,3H),2.18-1.34(m,12H),1.18(t,J=7.0Hz,1H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(500MHz,MeOD) δ176.23,175.25,164.84,160.80,160.42,61.98,60.27,60.24,55.64,55.60,39.66,39.16,38.28,35.39,33.29,33.16,30.62,28.36,28.34,28.27,28.10,27.95,25.35,24.57,24.29,16.92ppm.ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub>S,709.36,found 710.65[M+H]<sup>+</sup>,355.85[M+2H]<sup>+</sup>.

#### [0100] 实施例9

[0101] 取0.030g化合物5溶于5mL乙腈中,加入0.006g NHS和0.020g HATU后在室温下搅拌反应12h,加入0.005g 3-叠氮基丙胺并用三乙胺调节pH至8.0后在室温下反应3h,减压蒸馏除去溶剂后将粗产物用300-400目的硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=30:1)纯化得到0.023g无色玻璃状NHBoc-D02AtBu-N<sub>3</sub>(化合物6b),将化合物6b溶于2mL二氯甲烷中,加入1mL TFA后在室温下搅拌反应3h,减压蒸馏除去溶剂后得到棕色油状物,使用乙醚:甲醇=40:1重结晶得到0.016g白色固体NH<sub>2</sub>-D02AtBu-N<sub>3</sub>(化合物7b)(收率为67%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ1.02(m,1H),1.73(m,1H),2.82-4.39(m,34H)ppm.ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>,528.31,found 265.1662[M+2H]<sup>+</sup>.

#### [0102] 实施例10

[0103] 取0.050g化合物5溶于5mL DMF中,加入0.006g NHS和0.020g HATU后在室温下搅拌反应12h,加入0.030g Fmoc-赖氨酸并用三乙胺调节pH至8.0后在室温下反应3h,减压蒸馏除去溶剂后将粗产物用300-400目的硅胶柱色谱(二氯甲烷:甲醇=30:1)纯化得到0.048g无色玻璃状NHBoc-D02AtBu-NHFmoc(化合物6c)(收率为63%)。ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>,1008.59,found 1009.5615[M+H]<sup>+</sup>,477.2590[M+2H]<sup>+</sup>.

#### [0104] 实施例11

[0105] 取0.030g化合物7a溶于5mL DMF中,加入0.051g FITC后,用三乙胺调节pH至8.0,在室温下避光反应12h后使用C-18反相制备色谱(5%乙腈-95%乙腈梯度洗脱)纯化得到0.045g黄色固体FITC-DOTA-Alk(化合物8a)(收率为82%)。ESI-MS(+)*m/z*:Calcd for C<sub>42</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S,872.32,found 873.2733[M+H]<sup>+</sup>,437.1443[M+2H]<sup>+</sup>.

#### [0106] 实施例12

[0107] 取0.045g化合物8b溶于浓度为100mM的醋酸铵缓冲溶液(pH 6.8)中,加入0.028g六水合氯化铈,在室温下避光反应1h后使用C-18反相制备色谱(5%乙腈-95%乙腈梯度洗

脱)纯化得到0.045g FITC-DOTA-Eu-Alk (化合物9a) (收率为87%)。ESI-MS (+) m/z: Calcd for  $C_{42}H_{46}EuN_8O_{11}S$ , 1023.22, found 1023.2369 [M]<sup>+</sup>, 512.1263 [M+H]<sup>+</sup>。

[0108] 实施例13

[0109] 取500 $\mu$ L浓度100mM的醋酸铵缓冲溶液 (pH 6.8), 加入9AzSia至浓度为200 $\mu$ M, 加入1 $\mu$ L 10mM的化合物9a水溶液、1 $\mu$ L 50mM的硫酸铜水溶液、1 $\mu$ L 100mM的2-(4-((双((1-叔丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙酸 (BTAA) 水溶液、10 $\mu$ L 100mM的抗坏血酸钠水溶液, 在室温下避光反应30min后, 用ESI-MS检测反应结果。ESI-MS (+) m/z: Calcd for  $C_{53}H_{64}EuN_{12}O_{19}S$ , 1357.33, found 1375.30 [M+OH+H]<sup>+</sup>。

[0110] 实施例14

[0111] 将人结直肠癌腺细胞 (HCT15) 在含10% PBS缓冲溶液的Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 培养基中培养, 并加入9AzSia至终浓度为200 $\mu$ M孵育48h, 然后用100mM的PBS缓冲溶液将过量9AzSia洗去并用胰蛋白酶将细胞固定。取 $1 \times 10^7$ 个经9AzSia孵育的HCT15细胞分散在400 $\mu$ L 100mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲溶液中, 加入1 $\mu$ L浓度10mM的化合物9a水溶液、1 $\mu$ L 50mM的硫酸铜水溶液、1 $\mu$ L 100mM的BTAA水溶液、10 $\mu$ L 100mM的抗坏血酸钠水溶液, 在室温下避光反应30min, 在500 $\times$ g的条件下离心三次, 每次离心3min并重新用400 $\mu$ L 100mM的HEPES缓冲溶液分散细胞, 最后将细胞分散在1mL 100mM的HEPES缓冲溶液中。分别利用荧光成像显微镜 (Zeiss LSM 780激光扫描共聚焦显微镜, 配备40 $\times$ 油浸物镜) 和单细胞ICP-MS进样装置 (PerkinElmer NexION 2000) 进行成像和定量。荧光成像设置两组对照, 对照组1用化合物9a对未经9AzSia孵育的细胞进行标记, 对照组2不用化合物9a对经9AzSia孵育的细胞进行标记, 由附图4结果可知只有在同时加入9AzSia孵育和化合物9a标记的细胞表面才有稳定的绿色荧光信号, 证明化合物9a和9AzSia之间通过生物正交的点击反应特异性结合。而由单细胞ICP-MS的检测结果 (附图5和附图6) 可知, 每个HCT15细胞表面的平均<sup>153</sup>Eu含量为5525.98ag, 按化学计量比1:1换算可知平均每个HCT15细胞上的9AzSia含量为 $3.61 \times 10^{-17}$ mol。

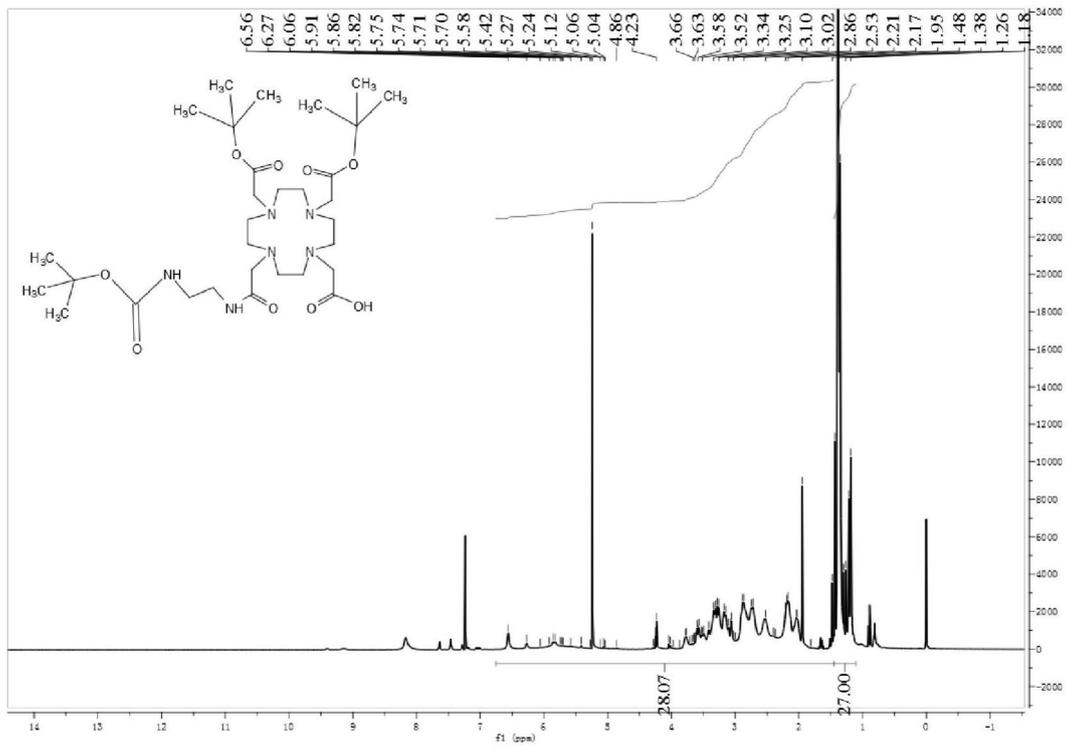


图1

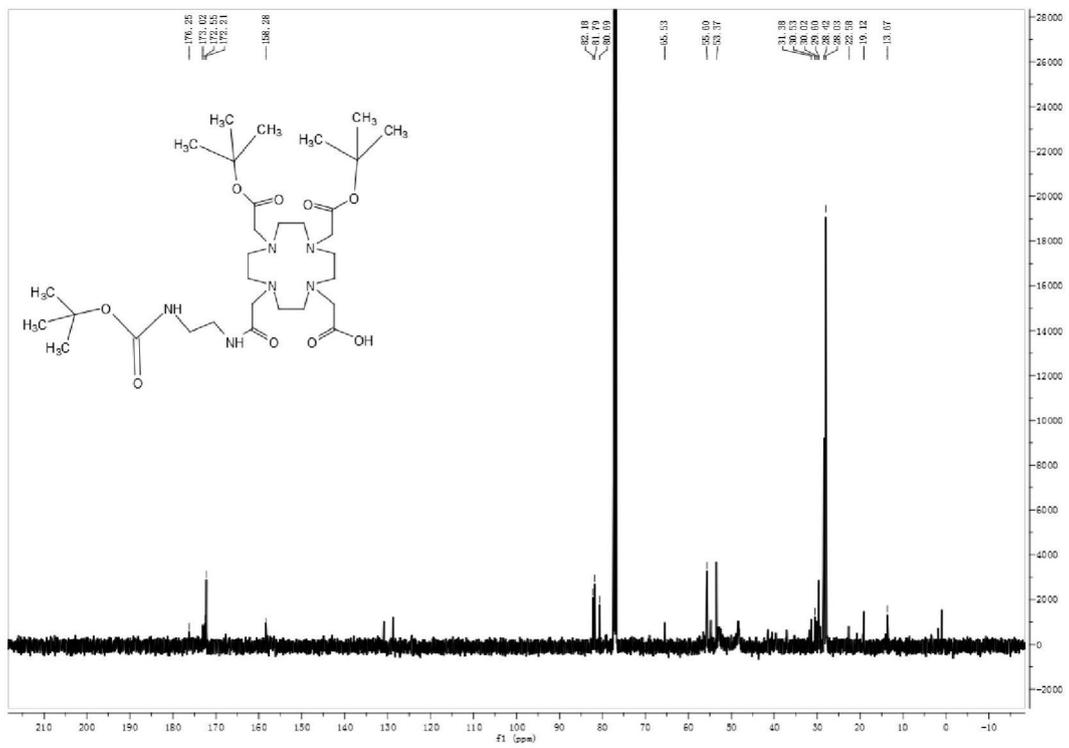


图2

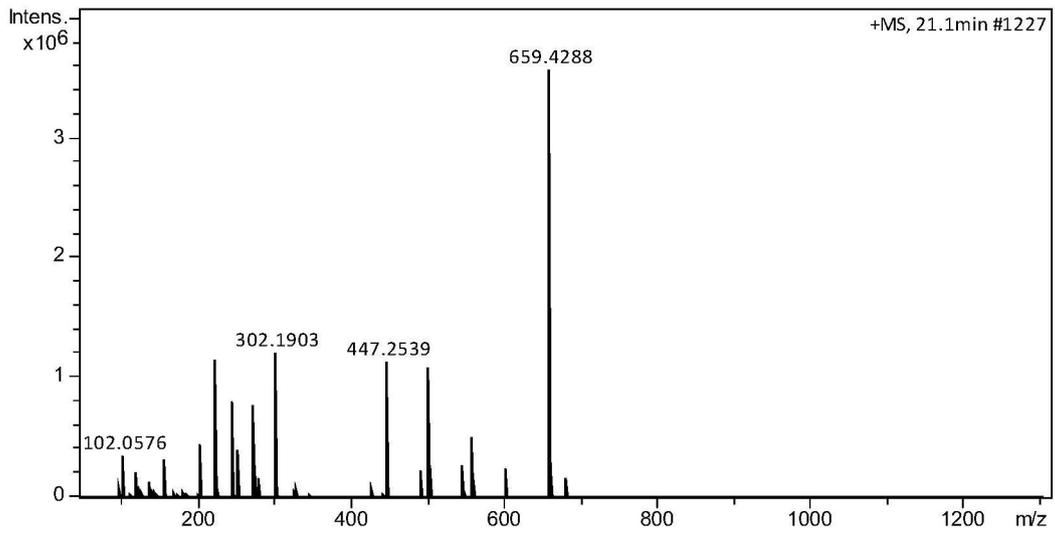


图3

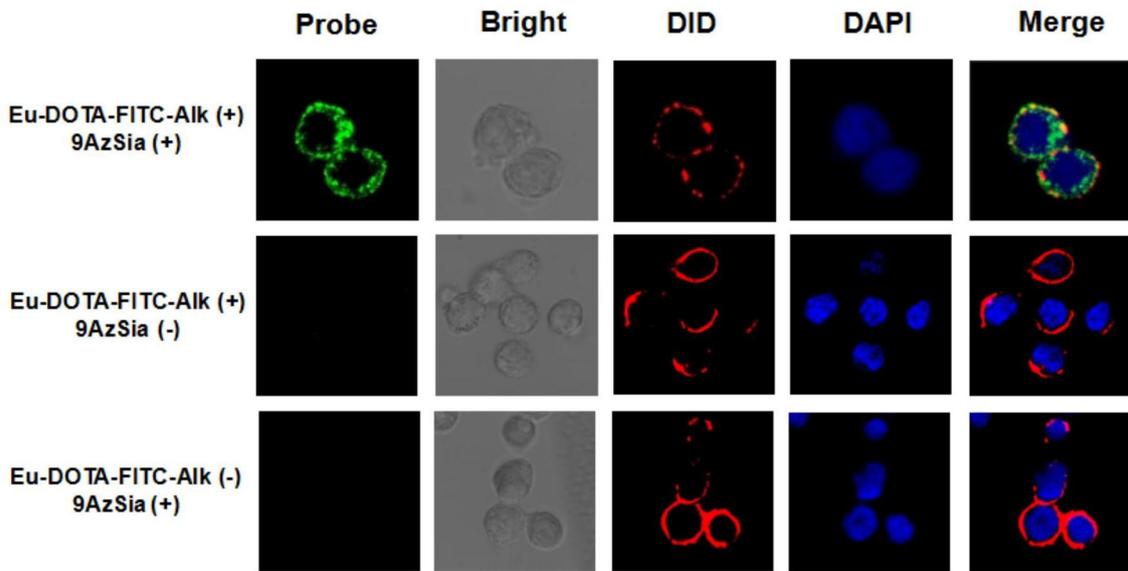


图4

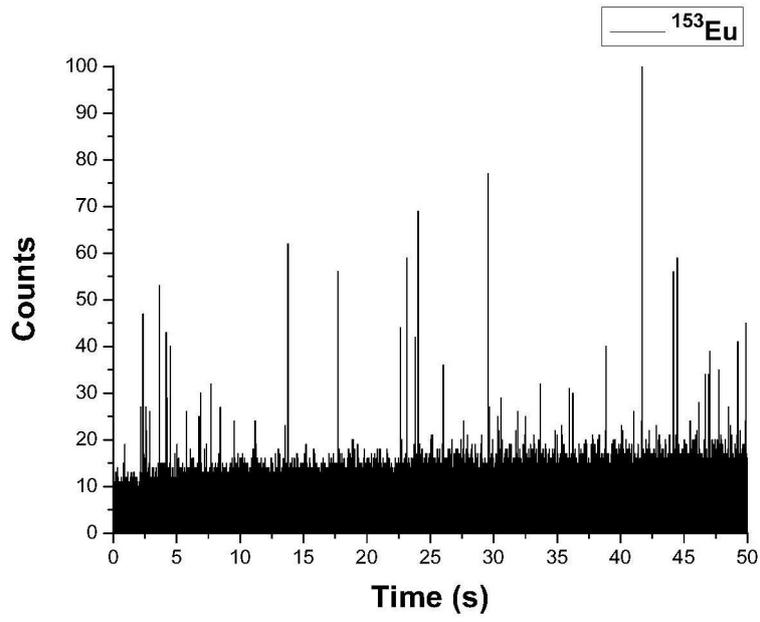


图5

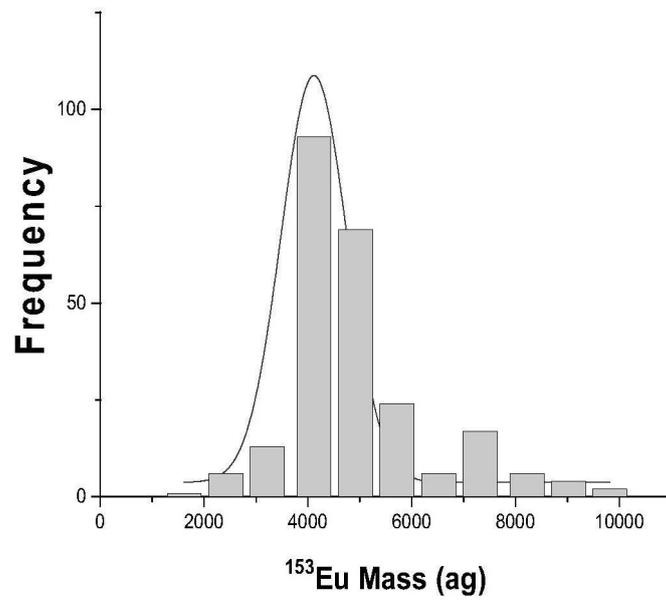


图6