



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101906077 A

(43) 申请公布日 2010.12.08

(21) 申请号 200910069095.1

(22) 申请日 2009.06.02

(71) 申请人 中国医学科学院放射医学研究所  
地址 300192 天津市南开区白堤路 238 号

(72) 发明人 施培基 王浩 周晓靓 王荣先  
李美佳 武明芬 尹鹏

(51) Int. Cl.

*C07D 259/00* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

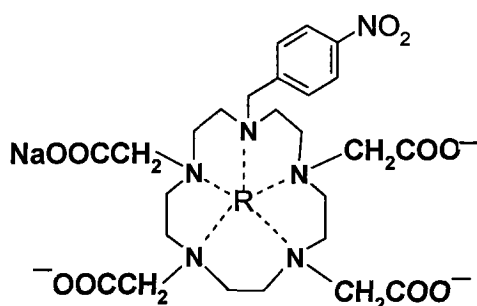
### (54) 发明名称

对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法

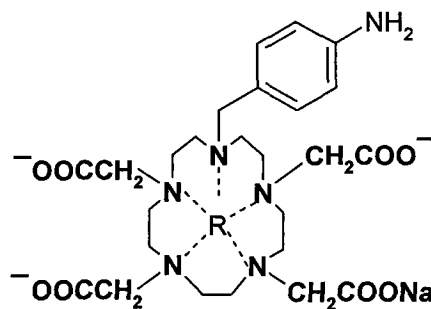
### (57) 摘要

本发明涉及异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法,其中包括:缩合、水解、取代反应,生成物与溴乙酸缩合,再和镧系元素螯合得到对硝基苄基五氮杂环四乙酸,再经 5% Pd/C 还原,最后和硫代光气反应,得到目标化合物 I。本发明的对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物为未知化合物,形成的刚性穴状化合物和镧、铈、钆、铽等镧系元素螯合,经元素分析、红外光谱、紫外光谱、核磁及质谱确定其结构,所制备的螯合物主要用做时间分辨荧光免疫分析。





X



XI

其中 R 为铈、钇、铽或镱离子；

(7) 化合物 X 与硫代光气反应, 得到化合物 I。

3. 如权利要求 2 所述螯合物的制备方法, 其中化合物 VII 与对硝基溴化苯的摩尔比为 1 : 0.2-0.6mol ; 反应温度 25-50°C, 反应时间 5-8 小时。

4. 如权利要求 2 所述螯合物的制备方法, 其中化合物 VIII : 溴乙酸的摩尔比为 1 : 2-4mol, 反应温度 40-60°C, 反应时间 5-8 小时。

5. 如权利要求 2 所述螯合物的制备方法, 其中化合物 IX 还原所用还原剂为 5-10% Pd/C, 化合物 IX 与还原剂的摩尔比为 1 : 0.03-0.06mol, 反应温度 15-30°C, 反应时间 3-5 小时。

6. 如权利要求 2 所述螯合物的制备方法, 其中化合物 X 与硫代光气的摩尔比为 1 : 3-5mol, 反应温度 20-30°C, 反应时间 3-5 小时。

7. 权利要求 1 所述螯合物在制备用于时间分辨荧光免疫分析方面的应用。

8. 权利要求 1 所述螯合物在标记抗体或抗原进行荧光免疫分析方面的应用。

9. 如权利要求 8 所述螯合物, 其特征在于所述螯合物为对异硫氰基苄基 -1,4,7,10,13- 五氮杂环十五烷四乙酸铈螯合物。

## 对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于有机杂环化合物合成技术领域,涉及对-异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法以及该螯合物作为均相时间分辨荧光免疫分析试剂用于免疫分析的应用。

### 背景技术

[0002] 时间分辨荧光免疫分析法以其灵敏度高、快速、自动化分析仪器的使用及技术的发展使这一分析法得到迅速的发展和广泛的应用。该方法是以镧系元素为标记物,用来标记抗体(或抗原)、寡核苷酸、生物大分子、靶细胞等,然后进行抗原抗体的免疫反应生成免疫复合物,或进行核酸杂交分析、检测 DNA 序列等,其原理是镧系离子如铕、钐、铽、镱等与具有紫外吸收的配基螯合,受某一波段的紫外光激发后,配基能将激发态能转移给镧系离子,发射强度高且寿命长的荧光光谱,不同的元素具有不同的荧光光谱且谱线窄。而且激发光(300-350nm)与所要测量的发射光谱(490-643nm)之间有很长的 Stokes 位移,发射的荧光寿命长(从微秒到毫秒级),所以用其作标记物通过光谱分辨和时间分辨,待本底荧光(纳秒级)淬灭后再进行标记物或标记物复合物的荧光测量,用作微量生物活性物的测量大大提高了灵敏度。

[0003] 近年来,国内外文献大量的报道了时间分辨荧光分析的研究进展并对 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷的衍生物作为核磁共振显像造影剂和放射性药物的潜在配体已进行了广泛的研究。但是将其衍生物与镧系元素螯合作为时间分辨荧光免疫分析试剂尚未见有研究报道。

### 发明内容:

[0004] 本发明的目的在于提供了一种全新的对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物,它是刚性穴状化合物,可螯合铕、钐、铽等镧系元素形成螯合物。

[0005] 本发明的另一个目的在于公开了对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合剂的制备方法。

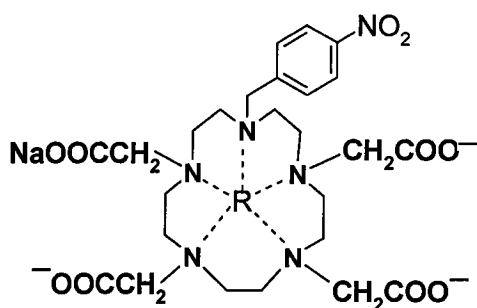
[0006] 本发明的再一个目的在于公开了对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸镧系元素螯合物用来标记抗体(或抗原)进行荧光免疫分析,遗传学诊断,各种病原体诊断,癌基因、抑癌基因的检出等,还可标记 DNA 做成探针进行基因诊断、酶分析、受体分析等等。

[0007] 发明的技术方案如下:

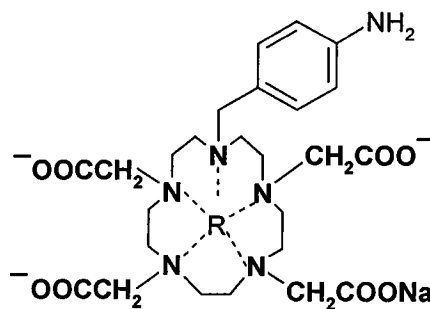
[0008] 具有下述结构的对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物:

[0009]





X



XI

[0021] 本发明所述的对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物的制备方法：其中化合物 VII 与对硝基溴化苄的摩尔比为 1 : 0.2-0.6mol；反应温度 25-50℃，反应时间 5-8 小时。

[0022] 其中化合物 VIII：溴乙酸的摩尔比为 1 : 2-4，反应温度 40-60℃，反应时间 5-8 小时。

[0023] 其中化合物 IX 还原所用还原剂为 5-10% Pd/C，化合物 IX 与还原剂的摩尔比为 1 : 0.03-0.06mol，反应温度 15-30℃，反应时间 3-5 小时。

[0024] 其中化合物 X 与硫代光气的摩尔比为 1 : 3-5，反应温度 20-30℃，反应时间 3-5 小时。

[0025] 本发明所述的 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷四乙酸，其制备方法中对现有文献方法做了一定的改进：

[0026] 参考文献：① EUR. J. MED. CHIM. THER. 1984. 19(5) :42；② Inors. Chem. 1991. 30 : 2092；③ CN 1225461C；具体如下：

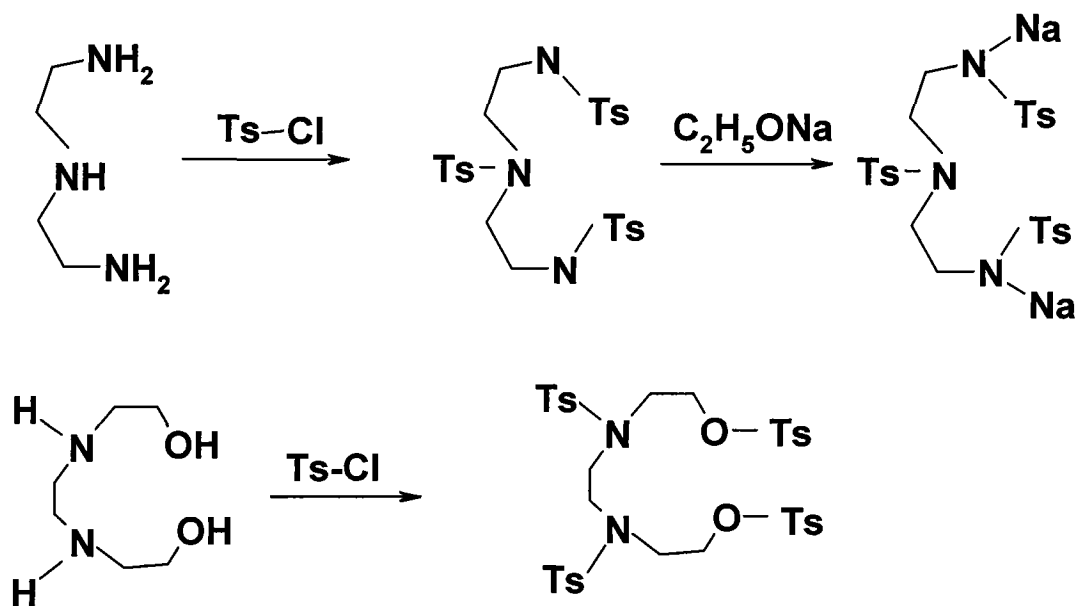
[0027] 1) 生成 N, N', N'' - 三对甲苯磺酰二乙烯三胺，反应温度 20-35℃，反应时间 2-5 小时，重结晶溶剂甲醇或乙醇。

[0028] 2) 生成的 N, N' - 二对甲苯磺酰羟乙基 -N, N' - 二对甲苯磺酰乙二胺，反应温度 -5-5℃，反应时间 1-3 小时，重结晶溶剂：甲醇或乙醇。

[0029] 3) N, N', N'' - 三对甲苯磺酰二乙烯三胺可和甲醇钠（乙醇钠）或 NaH 成盐。4) 1,4,7,10,13-五对甲苯磺酰五氮杂环十五烷：反应温度：100-120℃，反应时间：3-5 小时。

[0030] 本发明的对 - 异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合剂的合成路线如下：

[0031]



## III

[0032] 本发明进一步公开了对-异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物作为在制备用于时间分辨荧光免疫分析方面的应用。特别是在标记抗体或抗原进行荧光免疫分析方面的应用。具有代表意义的螯合物为对-异硫氰基苄基-1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷四乙酸铯钠。用此螯合剂标记抗体(或抗原)用于时间分辨荧光免疫分析,检测激素,癌标志物,或用于标记寡核苷酸,进行基因诊断等等。

## 具体实施方式

[0033] 为了更充分的解释本发明的实施,提供下述对-异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合剂制备实施实例。典型的是对-异硫氰基苄基-1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷四乙酸铯钠螯合物制备方法,这些实施实例仅仅是解释、而不是限制本发明的范围。

[0034] 下面是对异硫氰基苄基-1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷四乙酸铯钠螯合物的合成路线:

[0035]



[0048] 先加入 100ml DMF, 然后通氮气, 100℃加热, 搅拌下缓慢同时滴加 76.4g (0.1mol) 化合物 III 在 200ml DMF 的溶液和 61g (0.1mol) 化合物 V 在 200ml DMF 的溶液, 滴毕, 棕色反应液在 100-110℃反应 3 小时。冷却, 搅拌下, 倒入水中, 滤出沉淀, 水洗, 醇洗, 用乙醇重结晶得白色晶体 mp : 289-290℃ (文献 : 290-291℃, 278-280℃) (65%)。

[0049] 实施例 2

[0050] 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 (化合物 VII)

[0051] 2.0g (2.03mmol) 化合物 VI 和 10ml 98% 浓硫酸混合, 通氮气, 在 180℃加热搅拌, 水解反应 4-5 小时, 得棕灰色液体。冰水冷却下缓慢从滴液漏斗加入 50ml 乙醚, 灰色沉淀很快过滤立即用乙醚洗, 然后溶解在 20ml 水中, 用过量 NaOH 片碱, 调成 pH 8 左右, 用 CHCl<sub>3</sub> 提取, 除去溶剂得到白色结晶, 乙醚重结晶, 得到结晶 mp : 90-91℃ (文献 : 100-102℃) (80%)。<sup>1</sup>HNMR,  $\delta$  = 2.774 (s, 20H, CH<sub>2</sub>); 1.829 (s, 5H, NH)。

[0052] 实施例 3

[0053] 1-对硝基苄基 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 (化合物 VIII)

[0054] 0.5g (2.3mmol) 化合物 VII 加 10ml 无水甲苯, 搅拌下, 在 25-30℃滴加 0.2g (0.9mmol) 对硝基溴化苄在 10ml 甲苯中的溶液, 滴毕继续反应 5-6 小时, 甲苯溶液用水提取 (15ml × 3), 水溶液用 NaCl 固体饱和后, 用氯仿提取 (15ml × 3), 合并氯仿提取液, 用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 除去氯仿, 得淡黄色粘稠物, 0.307g (95.9%)。<sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 8.176 (d, 2H), 7.559 (d, 2H), 3.694 (s, 2H), 2.810-2.767 (m, 9H), 2.671-2.640 (m, 12H), 2.146 (s, 6H)。

[0055] 实施例 4

[0056] N-对硝基苄基 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 4,7,10,13-四乙酸 (化合物 IX)

[0057] 0.233g (0.665mmol) 化合物 VIII, 加入 4ml 去离子水, 用 2N NaOH 调节 pH = 9-10, 在 25-30℃滴加 0.47g (3.38mmol) 溴乙酸在 1ml 水中的溶液, 保持反应液 pH = 10, 继续搅拌 5-6 小时, 停止反应过夜, 用 6NHCl 调节 pH = 3, 反应水层上大孔吸附树脂柱 (Amberlite XAD-1600) 先用蒸馏水洗脱, 洗脱液无 Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> 后, 用甲醇洗脱, 蒸除甲醇得到黄色固体 0.23g, (59.9%)。<sup>1</sup>HNMR 400MHz (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 8.271 (s, 2H), 8.250 (s, 2H), 7.733-7.711 (d, 2H), 4.261 (s, 2H),

[0058] 3.674 (s, 4H), 3.540 (s, 4H), 3.414-3.426 (m, 4H), 3.354-3.333 (m, 12H), 3.320-3.299 (m, 4H), 3.256 (s, 4H)。

[0059] 实施例 5

[0060] N-对硝基苄基 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 4,7,10,13-四乙酸铊钠 (化合物 X)

[0061] 0.23g (0.395mmol) 加入磷酸缓冲液 pH = 5-6, 室温滴加 0.102g (0.395mmol) 三氯化铊, 搅拌 1-2 小时, 用 HPLC 分离, 得到 29mg 淡黄色晶体。

[0062] <sup>1</sup>HNMR 300MHz (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 17.833 (s, 1H), 17.188 (s, 1H), 13.863 (s, 1H), 10.134-10.109 (d, 2H), 8.977-8.951 (d, 2H), 8.687 (s, 1H), 7.885-7.818 (d, 2H), 7.321 (s, 1H), 6.216 (s, 1H), 4.980 (s, 2H), 4.807 (s, 1H), 4.159-4.111 (m, 1H), 3.923 (s, 1H), 3.678 (s, 1H), 3.152 (s, 1H), 0.348 (s, 1H), -0.629--0.629 (d, 1H), -0.877 (s, 1H), -1.097 (s, 1H), -2.062--2.238 (m, 3H), -3.186 (s, 3H), -3.422--3.445 (d, 1H), -4.263--4.320 (d, 1H), -5.564--5.698 (m, 3H), -6.825--6.770 (d,

1H), -11.514--11.574(d, 1H)。

[0063] 实施例 6

[0064] N-对氨基苄基 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 4,7,10,13-四乙酸铈钠(化合物 XI)

[0065] 0.028g(0.037mmol) 化合物 X, 加入 3ml 水, 加入 18ml 10% Pd/C, 用 2N NaOH 调节 pH = 9-10, 室温氢化大约 4-6 小时, 过滤反应液, 滤液冷藏用于下步反应。

[0066] 实施例 7

[0067] N-对异硫氰基苄基 1,4,7,10,13-五氮杂环十五烷 4,7,10,13-四乙酸铈钠(化合物 XII)

[0068] 化合物 XI 的水溶液(约 8ml), 加入  $\text{NaHCO}_3$  0.052g, 调节 pH 8-8.5, 保持温度 25°C, 滴加 0.034g 硫代光气的 6ml 氯仿溶液, 加毕, 继续搅拌 3.5 小时, 用氯仿提取反应液, 除去原料, 水溶液调节 pH = 7, 过滤, 用 HPLC 分离 (C18, 5  $\mu$ , 10 × 250mm, 10% 甲醇 / 水, UV = 270nm) 得到 10mg, 纯度为 95% 以上 (HPLC)。

专利名称(译)	对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101906077A</a>	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	CN200910069095.1	申请日	2009-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院放射医学研究所		
[标]发明人	施培基 王浩 周晓靓 王荣先 李美佳 武明芬 尹鹏		
发明人	施培基 王浩 周晓靓 王荣先 李美佳 武明芬 尹鹏		
IPC分类号	C07D259/00 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物及其制备方法，其中包括：缩合、水解、取代反应，生成物与溴乙酸缩合，再和镧系元素螯合得到对硝基苄基五氮杂环四乙酸，再经5% Pd/C还原，最后和硫代光气反应，得到目标化合物I。本发明的对异硫氰基苄基五氮杂环四乙酸螯合物为未知化合物，形成的刚性穴状化合物和铕、镱、钐、铽等镧系元素螯合，经元素分析、红外光谱、紫外光谱、核磁及质谱确定其结构，所制备的螯合物主要用做时间分辨荧光免疫分析。

