

發明專利說明書 200538125

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

A61K 31/438

※申請案號：94114403

A61K 31/40

※申請日期：94 年 05 月 04 日

※IPC 分類：

A61K 31/335

一、發明名稱：

A61P 35/00

(中) 在位置 20 與整合素拮抗劑相軋合之喜樹鹼衍生物

(英) Camptothecin derivatives conjugated in position 20 with integrin antagonists

二、申請人：(共 2 人)

1. 姓 名：(中) 西格瑪 陶製藥廠

(英) SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.

代表人：(中) 1. 史提法諾 馬瑞諾

(英) 1. MARINO, STEFANO

地 址：(中) 義大利羅馬莎士比亞路四十七號

(英) 47, Viale Shakespeare, 00144 Rome, Italy

國籍：(中英) 義大利 ITALY

2. 姓 名：(中) 國立腫瘤研究治療團體

(英) ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI

代表人：(中) 1. 勞瑞達納 馬斯皮斯

(英) 1. MASPES, LOREDANA

地 址：(中) 義大利米蘭文蘭森路一號

(英) 1, Via Venezian, 20133 Milan, Italy

國籍：(中英) 義大利 ITALY

三、發明人：(共 11 人)

1. 姓 名：(中) 艾爾瑪 達帕索

(英) DAL POZZO, ALMA

國 籍：(中) 義大利

(英) ITALY

2. 姓 名：(中) 倪明紅

(英) NI, MING HONG

國 籍：(中) 義大利

(英) ITALY

- 3.姓 名：(中) 賽吉歐 潘柯
(英) PENCO, SERGIO
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 4.姓 名：(中) 路西歐 莫寧尼
(英) MERLINI, LUCIO
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 5.姓 名：(中) 莎賓娜 德拉瓦雷
(英) DALLAVALLE, SABRINA
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 6.姓 名：(中) 葛斯佩 珍尼尼
(英) GIANNINI, GIUSEPPE
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 7.姓 名：(中) 瑪麗亞 汀恩堤
(英) TINTI, MARIA ORNELLA
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 8.姓 名：(中) 克勞迪歐 彼沙諾
(英) PISANO, CLAUDIO
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 9.姓 名：(中) 多明尼克 艾羅亞堤
(英) ALLOATTI, DOMENICO
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 10.姓 名：(中) 羅瑞達納 維希
(英) VESCI, LOREDANA
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY
- 11.姓 名：(中) 法蘭哥 蘇尼諾
(英) ZUNINO, FRANCO
國 籍：(中) 義大利
(英) ITALY

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 義大利 ; 2004/05/13 ; RM2004A000241 ☒ 有主張優先權

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於具有細胞毒活性且由包含RGD序列(其與喜樹鹼衍生物相輓合)之環肽化物所組成的化合物，其製造方法，其被用為藥物的用途以及含彼之組成物。

尤其是，本發明中所述之化合物兼具對整合素受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之高度親和力以及在微莫耳濃度對人類腫瘤細胞系之選擇性細胞毒活性。

【先前技術】

化學治療性抗癌劑係為一種具有最高程度限制性治療範圍的藥物。事實上，因為它們的細胞毒活性是無選擇性的，所以，它們可能毫無選擇的損害與其接觸之個體的所有細胞。

現今存在著如何選擇性導引細胞毒性葯劑對抗腫瘤細胞，使其施展活性而不損及周圍健康組織細胞，或者，至少使其損害減至最低的問題。

據文獻記載使用選擇性環肽化物可以阻斷整合素 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ ，其提及之化合物係為c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)(JACS 1997, 119, 1328-35; 國際專利申請案WO 97/06791)，或利用單株抗體以阻斷血管新生與減低腫瘤成長(Cell, 1994, 79, 1157-64)。此外，亦發現ANTIMETAASATIC作用(J. Clin. Invest., 1995, 96, 1815)。Brooks et al.(Science, 1994, 264, 569-71)載及腫瘤脈管系統

(2)

之內皮細胞本身較正常組織之被動細胞優先表現於整合素 $\alpha_v\beta_3$ 中。在臨床發展進一步階段之化合物中，吾人可提及者係為 c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)，或 EMD 或西連基太 (cilengitide)。

Ruoslati 與其同僚 (Current Opinion in Oncology, 1998, 10, 560-5) 証明了結合至腫瘤內皮細胞之 RGD 類似物一旦軛合至細胞毒性葯劑阿黴素 (doxorubicin) 即會形成相較於單獨阿黴素 (doxorubicin) 而言，效力更強但毒性較低的化合物。這些學者亦證明出由於結合係受到解離肽本體所拮抗，故毫無疑問地較強效力係出自於 RGD 之軛合作用所致 (Arap, Pasqualini and Ruoslati, Science, 1998, 279, 377-380)。稍後，相同學者進行包含化學結合促脫輔基 (pro-apoptotic) 肽序列至 RGD 類似物之實驗證明出新化合物在鼯鼠體內，對血管新生的內皮細胞具有選擇毒性及抗癌性 (Ruoslati, Nature, Medicine, 1999, 5, 1032-8)。

Marcus 及其他人述及利用間隔子 (包含一或多個胺基酸) 軛合至整合素 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之非肽抑制拮抗劑的細胞毒性葯劑 (諸如，喜樹鹼) 具有專一抗癌性。

Aoki et al., Cancer Gene Therapy, 2001, 8, 783-787 記載軛合至 RGD 序列之組氨醯寡賴氨酸在鼯鼠體內具有自動導引作用 (homing effect) 的專一抗癌性。

由整合素媒介而結合至細胞表面的觀點已被建議於基因轉移 (Hart et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 12468-12474)。

(3)

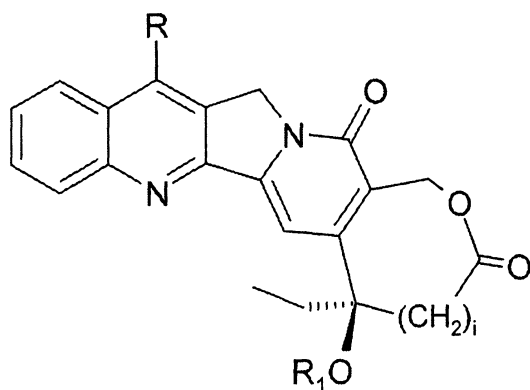
現在，吾人發現在位置 20，可能利用適當間隔子與含有 RGD 序列之環肽化物衍生物相軛合的 7-亞胺甲基或 7-連氧基喜樹鹼衍生物係為具有高選擇性抗癌活性的化合物而有利於用以製備治療腫瘤的藥物。

依本發明之化合物因其對腫瘤細胞具有選擇性細胞毒活性而可產製具有較小及較輕微副作用之藥物。

【發明內容】

本發明之目的係在於與含有 RGD 序列之環肽化物衍生物相軛合的喜樹鹼衍生物。所得分子相對於未軛合環肽化物而言，兼具未改變之原始喜樹鹼細胞毒性性質與具親合性之整合素結合性質。此一加總結果有助於細胞毒性葯劑集中於 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 型態之整合素內(自動導引)。細胞毒性葯劑經由酶催化或水解作用而以軛合和/或解離型態施展出細胞內活性。

因此，本發明之主要目的係在於式(I)化合物：



式中：

i 為 0 或 1；

R 為 $-\text{CH}=\text{N}-(\text{O})_m-\text{R}_2$ 基團；

(4)

R_1 為 U-X-Y 基團，其中， m 為 0 或 1；

R_2 為選自下列所組成之群：飽和或不飽和、直鏈或支鏈 C_1 - C_7 烷基，唯其先決條件為：當 i 為 0 時， R_2 不為特丁基；飽和或不飽和 C_3 - C_{10} 環烷基； C_6 - C_{14} 芳基；包含至少一個選自 O,N,S 之雜原子的芳族或非芳族 C_3 - C_{14} 雜環基；經飽和或不飽和 C_3 - C_{10} 環烷基取代之飽和或不飽和、直鏈或支鏈 C_1 - C_7 烷基； C_6 - C_{14} 芳基；包含至少一個選自 O,N,S 之雜原子的芳族或非芳族 C_3 - C_{14} 雜環基；式 $-(CH_2)_{m_1}-NR_8-(CH_2)_{n_1}-NR_9-(CH_2-CH_2-CH_2-NR_9)_{p_1}-H$ 所示之多胺基烷基，其中， m_1 和 n_1 為相同或不相同之 2-6 整數而 p_1 係為 0-3 之整數， R_8 和 R_9 可為相同或不相同且選自下列所組成之群：H，直鏈或支鏈 C_1 - C_6 烷基，Boc，Cbz，諸如 6-D-半乳糖基或 6-D-葡萄糖基之單醣類；每一前述基團可能經一或多個選自下列所組成族群之基團所取代： $-CN$ ， $-NO_2$ ， $-NH_2$ ， $-OH$ ， $-SH$ ， $-COOH$ ， $-COO-(\text{烷基})(C_1-C_5)$ ， $-SO_3H$ ； $-SO_3-(\text{烷基})(C_1-C_5)$ ，其中，烷基係為直鏈或支鏈；鹵原子；

U 係不存在或為 H 或為下列基團之一： $-COCHR_{10}NH-$ 或 $-CON[(CH_2)_{n_2}NHR_7]-CH_2-$ ， R_{10} 為 H 或選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1 - C_4 烷基，其選擇性地經 C_6 - C_{14} 芳基或胺基- C_1 - C_4 烷基取代； R_7 為 H 或直鏈或支鏈 C_1 - C_4 烷基； n_2 為 2-6 之整數；

X 係不存在或為 H 或選自下列所組成群之基團： $-COCHR_3NH-$ ， $-COCHR_6(CH_2)_{n_3}R_4-$ ， $-R_4-CH_2(OCH_2CH_2)_{n_4}OCH_2R_4-$ ，

(5)

$-R_4(Q)R_4-$, $-R_5[\text{Arg-NH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{CO}]_{n_6}R_5-$, $-R_5-[N-\text{胍基丙基-Gly}]_{n_6}R_5-$, 其中, n_3 係為 0-5 之整數, n_4 係為 0-50 之整數, n_5 係為 2-6 之整數, n_6 係為 2-7 之整數;

R_3 為 H 或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基, 其選擇性地經 $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$ 取代;

R_4 係為 $-\text{NH}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$;

R_5 係不存在或為 $-R_4(Q)R_4-$;

R_6 為 H 或 NH_2 ;

Q 係選自下列所組成之群: 直鏈或支鏈 C_1-C_6 伸烷基; 直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烷基; 直鏈或支鏈 C_2-C_6 伸烯基; 直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烯基; C_6-C_{14} 伸芳基; 伸芳基 (C_6-C_{14})-伸烷基; (C_1-C_6)伸烷基 (C_1-C_6)伸芳基 (C_6-C_{14}); 包含至少一個選自 O, N, S 之雜原子的芳族或非芳族雜環基 (C_3-C_{14});

Y 係不存在或為 H 或為 $c(\text{Arg-Gly-Asp-AA}_1\text{-AA}_2)$, 其中:

c 係指環狀;

AA_1 係選自下列所組成之群: (D)-Phe, (D)-Trp, (D)-Tyr, (D)-2-萘基-Ala, (D)-4-特丁基-Phe, (D)-4,4'-聯苯基-Ala, (D)-4-CF₃-Phe, (D)-4-乙醯胺基-Phe;

AA_2 係選自下列所組成之群: $\text{NW-CH}[(\text{CH}_2)_{n_7}\text{-CO}]\text{-CO}$, $\text{NW-CH}[(\text{CH}_2)_{n_7}\text{-NH}]\text{-CO}$, $\text{NW-[4-(CH}_2)_{n_1}\text{-CO}]\text{-Phe}$, $\text{NW-[4-(CH}_2)_{n_1}\text{-NH}]\text{-Phe}$, [NW]-Gly, NW-Val, 其中, W 係選自 H, 直鏈或支鏈 (C_1-C_6) 烷基, $-(\text{CH}_2)_{n_7}\text{-COOH}$, 其中

(6)

n_7 係為 0-5 之整數，4-羧基苯甲基，4-胺基苯甲基；

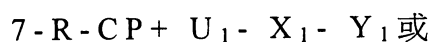
唯其先決條件為 X 和 Y 不能同時不存在；

其 N_1 -氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其 E 及 Z 型式，其混合物，藥學上可接受之鹽類。

式 (I) 化合物可用以下所述方法與依本發明較佳化合物所例示之方法製成。此一方法構成本發明之另一目的。

基本上而言，本發明標的之式 (I) 化合物係利用 7-經取代喜樹鹼 (係為 7-R-CP) 可能經由適當橋 (係為 U_1-X_1) 官能化而與環肽衍生物 (係為 Y_1) 縮合反應製成。

縮合反應可依以下反應機構之一進行：



其中，7-R-CP 代表 7-經取代之喜樹鹼或其類似化合物，其中，R 悉如通式 (I) 中定義， U_1 ， X_1 及 Y_1 分別代表如通式 (I) 中所定義之 U，X 及 Y，其最後經適當的官能化和保護。

吾人需指出通式 (I) 化合物 (係為中，U，X 或 Y 不存在) 亦具有抗增殖活性或細胞毒性藥劑活性，因此，視為本發明之一部份。

這些反應係使用傳統方法進行，其諸如 Journal of

(7)

Controlled Release 2003, 91, 61-73; S.S. Dharap et al; Journal of Medicinal Chem. 2003, 46, 190-3, R.Bhatt所述。

含經調整內酯環(i=1)之喜樹鹼可依專利案WO2003/101995(以申請人名字申請)中所述方法製成。

環肽化物Y1可依傳統肽合成技術製成，其係如實例4-6中所述。肽合成反應可於固態或溶液中完成。

一旦製得所要之環肽化物，即可以其保護型態用於縮合反應中而其保護基僅於得到最後化合物之後移除。去保護反應係使用已知方法進行，例如，使用純三氟乙酸之酸性條件或於經氯化有機溶劑存在下。

喜樹鹼衍生物係使用熟習此藝之士習知的方法製成。

本發明中所述之化合物係為局部異構酶1(topoisomerase 1)抑制劑，因此，可用為藥物，特別是用以治療可由抑制前述局部異構酶獲益之疾病。特別是，本發明化合物具有抗增殖活性而可利用其治療性質，且其具有適供調配藥學組成物之物化性質。

藥學組成物包含至少一種式(I)化合物作為主成分，其數量為，諸如，產生治療作用之數量。本發明涵括之組成物係完全傳統的且由藥物工業通常使用之方法製得。根據所選擇之投藥途徑，此等組成物可為固態或液態型態且適供經口，非經腸或靜脈內投藥。依本發明之組成物包含主成分以及至少一種藥學上可接受之賦形劑或載劑。調配佐藥，諸如，溶解劑，分散劑，懸浮劑或乳化劑可能特別有

(8)

用。

式(I)化合物亦可和其他活性成分(諸如，抗癌劑或其他具有抗寄生蟲或抗病毒活性之藥劑)以分開型態或單一劑量型態綜合使用。

本發明化合物可用為具抗癌(例如，非小細胞癌(non-microcytoma)與小細胞肺癌，結腸直腸癌，前列腺癌，神經膠母細胞瘤與神經母細胞瘤，子宮頸癌，卵巢癌，胃腸癌，肝癌，卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)，直腸癌，肉瘤與骨肉瘤，睪丸癌，乳癌，胰腺癌，黑色素細胞瘤，泌尿膀胱癌及頭和頸癌)活性之藥物。本發明化合物所提供之一優點係為綜合抗局部異構酶活性(由分子之喜樹鹼部分提供)以及整合素抑制活性(由分子之喜樹鹼部分提供)。其結果是為本發明化合物的可能綜合作用，其將利於熟習此藝之士接受用於腫瘤學領域中。事實上，包含 Arg-Gly-Asp 序列之環肽化物部分不僅將分子導向腫瘤表現整合素中，而且，一旦標的達成，還可產生多重功能，其範圍從分子之細胞毒性部分的內在化至整合素抑制活性，所得優點於抑制腫瘤血管新生方面尤為有用。環肽部份一旦從喜樹鹼部分分離，亦可由遠離腫瘤位置處發揮作用，因此，本發明化合物亦經證明可用於預防或治療轉移型態。

本發明標的之藥物亦可用於寄生蟲疾病之治療中。

【實施方式】

以下實例進一步說明本發明。

(9)

所用縮寫如下：

Aad(胺基己二酸)；

Amb(胺甲基苯甲基)；

Amp(胺甲基苯基丙氨酸)；

Boc(特丁氧基羰基)；

CSA(樟腦磺酸)；

CTH(催化移轉氫化反應)；

DCC(二環己基碳化二亞胺)；

DCM(二氯甲烷)；

DIEA(二異丙基乙胺)；

DMF(二甲基甲醯胺)；

Dy(OTf)₃ (dysprosium triflate)；

Fmoc(9-芴基甲氧基羰基)；

HOBT(羥基苯並三唑)；

NMP(N-甲基-吡咯烷酮)；

Pht(酞醯基)；

Pmc(五甲基色滿-6-磺醯基)；

TBTU(四氟硼酸-O-苯並三唑-1-基-四甲基糖醛)；

TFA(三氟乙酸)。

實例

實例 1

合成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp)(經保護之
ST2581)

(10)

1.587 mmol Fmoc-Gly-Res(Res=Sasrin Resin®, Bachem)於30分鐘內，攪拌下懸浮於75 ml DMF，其後，加入18 ml 吡啶且持續再攪拌30分鐘。將經過濾且經DMF洗滌過之樹脂於15分鐘內懸浮於NMP(N-甲基吡咯烷酮)中，之後，再加入Fmoc-Arg(Pmc)-OH, HOBT, TBTU及DIEA(各3.174 ml)。攪拌2小時後，過濾懸浮液並用DMF洗滌。用吡啶去保護之後，依序用其他胺基酸，亦即：Fmoc-Amp(Cbz)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, 與Fmoc-Asp(OtBu)-OH進行偶合反應(每次均如上操作)。於最後一次去保護Fmoc-N-終端之後，用45 ml 1% DCM中之TFA而從樹脂釋出直鏈戊肽。將其溶於約1 L CH₃CN內，再加入4.761 mmol HOBT與TBTU以及10 ml DIEA；持續攪拌溶液30分鐘，蒸發溶劑至小體積且用水完成沉澱。將過濾出之粗產物溶於27 ml MeOH 與DMF (1:1)之混合物中，加入5 mmol 甲酸銨及0.55 g 10% Pd/C且於室溫下攪拌30分鐘。於硅藻土上過濾且使其乾燥。殘餘物利用製備級RP-HPLC(管柱:Alltima® C-18, Alltech; 流動相 50% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA; 駐留時間(Rt)=9.13分鐘)純化而得483 g白色粉末。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.3, 8.07, 8.04, 7.90, 7.80, 7.33, 7.15, 7.07, 4.62, 4.50, 4.35, 4.12, 4.01, 3.15, 3.03, 2.96-2.65, 2.58, 2.48, 2.32, 2.02, 1.75, 1.50, 1.35, 1.23.

分子質譜 (Maldi-Tof): 973

實例 2

(11)

合成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Aad)(經保護之 ST2650)

0.69 mmol Fmoc-Gly-Res如實例1中所述處理，但其差別在於第3與第4胺基酸係以 Fmoc-D-Phe-Aad(OBzl)-OH型態加入。利用 CTH去保護之後，粗產物利用製備級 RP-HPLC(流動相 66% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA; 駐留時間 (Rt)=17.29分鐘)純化而得 187g 純肽化物。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ 7.23, 4.58, 4.20-3.90, 3.28, 3.05, 2.99, 2.85, 2.74-2.35, 2.15, 2.05, 1.85-1.25.

分子質譜 (Maldi.Tof): 940

實例 3

合成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Me-Amp)(經保護之 ST2700)

於回流下，在無水甲苯中之 Fmoc-Phe(4-Pht-N-CH₂)-COOH懸浮液中加入 2eq CSA與 20eq 對甲醛(於15分鐘內分成四部份加入)。令混合物達於室溫，用 120ml 甲苯稀釋且用 5% NaHCO₃和水洗滌。蒸發溶劑後，將殘餘物溶入 15ml CHCl₃ + 15ml TFA + 700μl Et₃SiH中。讓混合物於黑暗中攪拌 42小時。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上過濾純化。總產率：90%。

直鏈肽化物如實例1中所述而於固態下合成，插入 Fmoc-N-Me-Phe(4-Pht-N-CH₂)-COOH作為第三胺基酸且如上所述製成。在此例中，樹脂上 N-Fmoc-終端的去保護反

(12)

應係使用30%二異丙胺(300eq)之DMF溶液(因為酞醯亞胺的存在)。環化反應後，將500mg 肽趁熱溶於10ml 無水乙醇中，在於其中加入0.9ml $\text{NH}_2\text{-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 之1M 乙醇溶液。回流下加熱2小時，蒸發溶劑後，殘餘物於劇烈攪拌下溶於10ml DCM+10ml 碳酸鈉溶液中。最後粗產物係於蒸發後，由有機層回收並利用製備級RP-HPLC(流動相52% CH_3CN (水中) + 0.1% TFA; 駐留時間(R_t)=10分鐘)純化。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 8.29-7.76, 7.38-7.07, 4.95-4.77, 4.09, 3.41, 3.05-2.81, 2.51, 2.05, 1.74, 1.40, 1.26.

分子質譜(Maldi.Tof): 987

實例 4

合成 $\text{c}[\text{Arg}(\text{Pmc})\text{-Gly-Asp}(\text{OtBu})\text{-D-Phe-Amp}(\text{CO}-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH})$ (經保護之ST2649)

將120mg 環肽化物 $\text{c}[\text{Arg}(\text{Pmc})\text{-Gly-Asp}(\text{OtBu})\text{-D-Phe-Amp}]$ (如實例1中所述製成)以及計量數量之TFA和琥珀酐一起溶入3.6ml DCM-DMF 2:1混合物中。1小時後，反應混合物用30ml DCM稀釋及用水洗滌。有機層經乾燥及濃縮而得100mg粗產物。

分析級RP-HPLC:管柱:Purosphere STAR[®], Merck; 流動相 45% CH_3CN (水中) + 0.1% TFA; 駐留時間(R_t)=13.17分鐘。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 8.20-7.75, 7.19-7.02, 4.58,

(13)

4.45, 4.36, 4.30, 4.20, 4.05, 3.00, 2.97-2.57, 1.83, 1.62, 1.32.

分子質譜 (Maldi.Tof): 1073

實例 5

合成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Amb-gly)(經保護之 ST2701)

於 6ml THF 中之 1.22mmol Boc-經單保護之伸對二甲苯基二胺溶液中加入 1.83ml THF 及逐滴加入 2ml THF 中之 1.22mmol 溴基乙酸苯甲酯。混合物經攪拌過夜後，蒸發溶劑且於閃蒸管柱 (CHCl₃-EtOAc, 9:1) 上純化殘餘物而得 0.69mmol N-(4-Boc-NH-CH₂-苯甲基)-甘胺酸苯甲酯。

將 250mg Fmoc-D-Phe-OH 溶於 27ml DCM 中且加入 40μl 雙光氣與 230μl 均一可利丁；15 分鐘後，加入 190mg 先前製得之酯，溶入 3ml DCM 中。加入 80μl N-Me-哌嗪並攪拌 10 分鐘，用 10ml DCM 稀釋且用水，HCl 0.5N，水，5% NaHCO₃ 和水萃取。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上閃蒸層析 (DCM-EtOAc, 9:1) 純化。產率：80%。

於溶在 6ml MeOH 中之 100ml 如此製得產物中加入 76μl AcOH 和 42mg HCOONH₄ 並冷卻混合物至 0℃，加入 50mg 10% Pd/C。30 分鐘後，反應混合物在硅藻土上過濾。乾燥濾液且於閃蒸管柱 (CHCl₃-EtOAc, 9:1) 上純化。產率：90%。

190mg 如此製得產物溶入 1.2ml TFA 中且使其乾燥

(14)

(Boc 之去保護)，殘餘物再溶於 9ml 10% Na_2CO_3 +6ml 二噁烷中，冷卻至 0°C 且逐滴加入用 3ml 二噁烷稀釋之 120 μ l 苯甲氧羰醯氯溶液。於室溫下攪拌 1 小時後，在真空下蒸發至小體積，其後，用水稀釋混合物，用 HCl 酸化至 pH=1 及用 EtOAc 萃取。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上過濾(用 CHCl_3 -MeOH(8:2)洗滌)。純二肽化物:82%。

0.69mmol Fmoc-Gly-Ree 如實例 1 中所述處理。於 Arg 之後，依序加入先前製得之二肽化物 Fmoc-D-Phe-N(4-Cbz-NH-CH₂-苯甲基)-GL。利用 CTH 去保護 Cbz 之後，粗產物利用製備級 RP-HPLC(流動相 50% CH_3CN (水中) +0.1% TFA; 駐留時間(Rt)=10.5 分鐘)。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.29-7.66, 7.44-6.90, 5.15, 4.72-4.18, 4.20, 4.05-3.32, 3.15, 3.06, 2.70, 2.51, 2.49, 2.01, 1.80-1.35, 1.49, 1.35, 1.23.

分子質譜(Maldi.Tof): 973

實例 6

合 成 $\text{c}(\text{Arg}(\text{Pmc})\text{-Gly-Asp}(\text{OtBu})\text{-D-Phe-Amp}(\text{CO-CH}_2\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-O-CH}_2\text{-COOH}))$

4ml 3:1 DCM-DMF 混合物中之 200mg $\text{c}(\text{Arg}(\text{Pmc})\text{-Gly-Asp}(\text{OtBu})\text{-D-Phe-Amp})$.TFA (如上所述製得)溶液中加入實質過量之甘醇二酸。於相同溶液中加入 DIEA(3eq)及 DCC(2eq)。攪拌混合物過夜後，用 DCM 稀釋且用水洗滌。

蒸發有機層而得粗產物且利用閃蒸層析純化(流動相

(15)

: CHCl_3 -MeOH 7:3+1% AcOH)；混合包含產物部分，用水洗滌，脫水並使其乾燥而得 157mg 純產物。

分析級 RP-HPLC:(管柱:Purosphere STAR[®], Merck; 流動相 50% CH_3CN (50% 水中) +0.1% TFA; R_t =10.96)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 8.35-7.92, 7.20-7.00, 4.65, 4.50, 3.94, 3.60-3.45, 3.00-2.60, 2.55 2.45, 2.30, 2.00, 1.70, 1.50, 1.30, 1.20.

分子質譜 (Maldi.Tof): 對應於所用不同分子量之不同甘醇。

實例 7

合成 7-R-CP (20-O-Val)

1 mmol 7-R-CP, 0.6 mmol $\text{Dy}(\text{OTf})_3$, 3 mmol 二甲胺基吡啶和 3 mmol Boc-Val-OH 懸浮於 15ml CH_2Cl_2 中且使其達於 -10°C ；30 分鐘後，加入 3.1 mmol DCC 且於 -10°C 下再經 30 分鐘後，使反應混合物達於室溫。2 小時後，反應用另外 20ml CH_2Cl_2 稀釋，用 1N HCl, NaHCO_3 洗滌，再於 Na_2SO_4 上乾燥。粗產物利用層析純化 (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3)。

中間產物【N-Boc】於 DCM/TFA(75/25) 中， 0°C 下去保護而得定量產率。如此置得之化合物直接用於結合環肽化物 Y_1 ，或者用為可以用以結合第二殘基之另一中間體 (見於實例 8-9)。

(16)

複實例 7

合成 7- 【 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{N})-\text{嗎啉}$ 】 -CP(20-O-Val)-
(ST2896)

進行如上所述之實例 7而得通式(I)化合物，式中，R
係為 $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{嗎啉}$ (亦即，其中， $m=0$, R_2 係為乙
撐(N)嗎啉)， $i=0$ ， $R_1=\text{Val}$)。中間體【N-Boc】-經保護之
產物顯係為下列實驗數據：

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.09, 8.20-8.25, 7.81-7.88, 7.68-
7.75, 7.32, 5.65-5.74, 5.38-5.47, 5.41, 5.00-5.04, 4.57-
4.59, 4.31-4.38, 3.77-3.81, 2.89-2.94, 2.66-2.71, 2.14-
2.38, 1.54, 0.92-1.07.

分子質譜(ESI-): 702.5(M-1)

此一中間體於DCM/TFA(75/25)， 0°C 下去保護而得計
量產率之ST2896。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.09, 8.20-8.25, 7.81-7.88, 7.68-
7.75, 7.32, 5.65-5.74, 5.38-5.47, 5.41, 5.00-5.04, 4.57-
4.59, 4.31-4.38, 3.77-3.81, 2.89-2.94, 2.66-2.71, 2.14-
2.38, 1.54, 0.92-1.07.

分子質譜(ESI+): 702.5(M+1)

實例 8

合成 7-R-CP (20-O-Val-Asp)

1 mmol實例 7中製得之化合物與3.7mmol DIPEA於 0°C
下依序加至DMF中之1.2mmol 適當經保護門冬氨酸，

(17)

1.8 mmol HOBt和 1.4 mmol EDC的溶液中。反應混合物於室溫下過夜後，於水及二氯甲烷間分配，如此所得之粗產物利用層析純化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 96:4)而得黃色固態產物，產率：66%。

羧基之去保護

苯甲酯於 20psi 下，用 H₂/10% Pd-C 氫解反應且使用 CH₂Cl₂/MeOH 94:6 純化。產率：70%。

複實例 8

合成 7-【CH=N-O-CH₂CH₂-(N)-嗎啉】-CP(20-O-Val-Asp)-(ST3240)

進行如上所述之實例 8 而得通式(I)化合物，式中，R 係為 -CH=N-O-CH₂CH₂-嗎啉(亦即，其中，m=0, R₂係為乙撐(N)嗎啉)，i=0，R₁=Val-Asp)。中間體【N-Boc】-經保護之產物顯係為下列實驗數據：

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.09, 8.18-8.30, 7.66-7.83, 7.24-7.37, 7.19, 5.72-5.91, 5.63-5.72, 5.38-5.46, 5.40, 4.70-4.72, 4.49-4.59, 3.75-3.80, 3.10-3.21, 2.82-2.87, 2.58-2.66, 2.11-2.39, 1.74-1.88, 0.92-1.06.

分子質譜(ESI-): 641.6(M-1)

此一中間體於 DCM/TFA(75/25)，0℃ 下去保護而得計量產率之 ST3240。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.09, 8.18-8.30, 7.66-7.83, 7.24-

(18)

7.37, 7.19, 5.72-5.91, 5.63-5.72, 5.38-5.46. 5.40, 4.70-4.72, 4.49-4.59, 3.75-3.80, 3.10-3.21, 2.82-2.87, 2.58-2.66, 2.11-2.39, 1.74-1.88, 0.92-1.06.

分子質譜 (ESI+): 543.7(M+1)

實例 9

合成 7-R-CP (20-O-Val-COCH₂CH₂COOH)

1mmol實例7中製得之化合物溶入10ml無水吡啶中且於溶液達0℃後，加入2.5mmol琥珀酐；混合物再度貯存於室溫下經一小時。移除溶劑，殘餘物用二氯甲烷吸收而有機層以0.5N HCl洗滌。粗產物利用層析純化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 95:5)而得黃色固態預期產物，產率：90%。

合成與環肽化物相軛合之喜樹鹼衍生物-式(I)化合物

實例 10

合成 20-O-(7-R-CP)-c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp)軛合物

於冷至0℃無水DMF中之1.2mmol實例8或9中製得化合物溶液中加入2.1mmol HOBt及1.4mmol EDC且攪拌所得混合物30分鐘，再依序加入1mmol實例1中製得之經保護ST2581與DIPEA。靜置過夜後，混合物於水及二氯甲烷間分配，再於硫酸鈉上乾燥有機層，粗產物利用層析純化(SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 92:8)而得預期產物，產率：55-65%。

(19)

軛合產物之去保護

最後之去保護係利用 CH_2Cl_2 /TFA 1:1 進行 2 小時，使混合物從 0°C 達於室溫。此一操作隨之以離子交換樹脂步驟而得氫氨酸鹽型態產物。

複實例 10

合成 20-O-[7-(CH=N-O-CH₂CH₂-嗎啶)]-CP)-c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp)軛合物-(ST3241)

進行如上所述之實例 10 以及經保護 ST 2581 與複實例 8 中製得之喜樹鹼衍生物 ST3240 間的軛合作用而得 ST3241 化合物，其具有以下性質：

分子質譜 (ESI+): 1367.5(M+1)

實例 11

生化結果

結合至整合素受體 $\alpha_v\beta_3$

純化之受體 $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon, cat.CC1020) 稀釋於 $0.5\mu\text{g/ml}$ 濃度下之緩衝液 (20mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2) 中。將其 $100\mu\text{l}$ 加至 96 分格板且於 $+4^\circ\text{C}$ 下孵養過夜。該板用緩衝液 (50mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1mM MnCl_2 , 1% 胎牛血清白朊) 洗滌一次後，於室溫下再孵養二小時。該板用相同緩衝液洗滌 2 次後，於室溫及競爭配合

(20)

基 [^{125}I] 艾契亭 (echistatin)(Amersham Pharmacia Biotech) 0.05 nM 存在下孵養 3 小時。孵養完後，洗滌各分格且用 γ 計數器 (Packard) 測定其放射活性。在過量冷艾契亭 (echistatin)(1 μM) 存在下測得配合基之非專一性結合。

結合至整合素受體 $\alpha_v\beta_5$

純化之受體 $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon, cat.CC1020) 稀釋於 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度下之緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2) 中。將其 100 μl 加至 96 分格板且於 +4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵養過夜。該板用緩衝液 (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1% 胎牛血清白朊) 洗滌一次後，於室溫下再孵養 2 小時。該板用相同緩衝液洗滌 2 次後，於室溫及競爭配合基 [^{125}I] 艾契亭 (echistatin)(Amersham Pharmacia Biotech) 0.15 nM 存在下孵養 3 小時。孵養完後，洗滌各分格且用 γ 計數器 (Packard) 測定其放射活性。在過量冷艾契亭 (echistatin)(1 μM) 存在下測得配合基之非專一性結合。

評估 IC_{50} 參數

產物對玻連蛋白 (vitronectin) 受體之親和力係利用 $\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ 值 (亦即，可抑制 50% 專一放射性配合基－受體結合之濃度) 表係為。 IC_{50} 參數係使用 ALLFIT 軟體詳細說明。

結果

(21)

所有檢測之RGD肽化物由其 IC_{50} 值(毫微莫耳等級)顯係為出對 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 整合素受體之顯著親和力。尤其是, ST2581具有最大的抑制艾契亭(echistatin)結合至 $\alpha_v\beta_3$ 整合素活性。

表 1

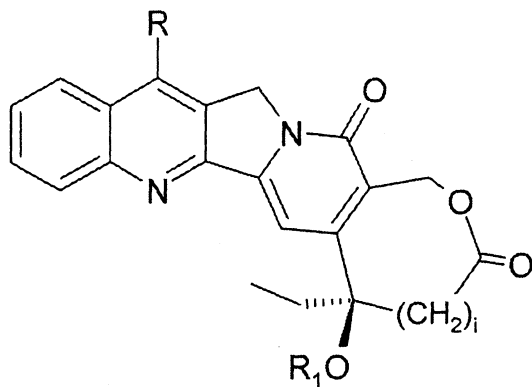
RGD肽化物對玻連蛋白(vitronectin)受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之親和力

化合物	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
	$IC_{50}\pm SD(Nm)$	
ST2581	1.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1

五、中文發明摘要

發明之名稱：在位置 20 與整合素拮抗劑相輓合之喜樹鹼衍生物

本發明係關於一種式 (I) 的化合物：



(I)

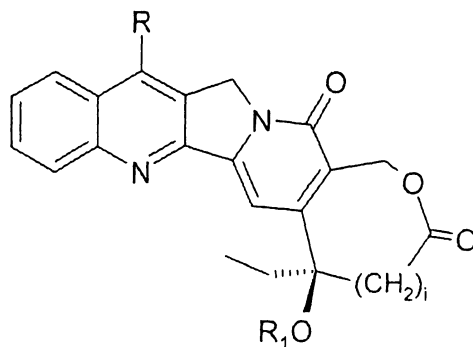
式中，R 和 R₁ 悉如以下所定義且其包含喜樹鹼分子在 20 位置上與含有 RGD 序列之環肽化物的縮合。前述化合物兼具對整合素受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之高度親和力以及在微莫耳濃度對人類腫瘤細胞系之選擇性細胞毒活性。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

Camptothecin derivatives conjugated in position 20 with integrin antagonists

Compounds or formula (I) are described, in which the R and R₁ groups are as defined here below and include the condensation of the camptothecin molecule in position 20 with a cyclopeptide containing the RGD sequence. Said compounds are endowed both with high affinity for integrin receptors $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ and with selective cytotoxic activity on human tumour cell lines at micromolar concentrations.

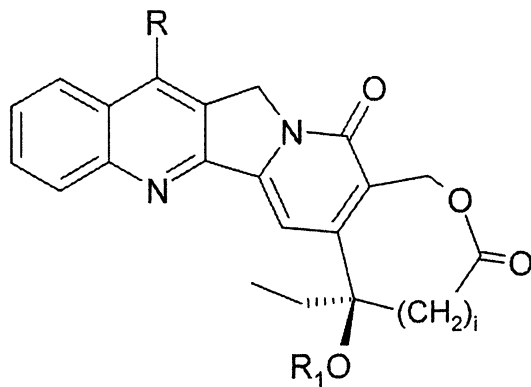


(I)

(1)

十、申請專利範圍

1. 一種式 [I] 的化合物：



(I)

式中：

 i 為 0 或 1； R 為 $-CH=N-(O)_m-R_2$ 基團； R_1 為 $U-X-Y$ 基團，其中， m 為 0 或 1；

R_2 為選自下列所組成之群：飽和或不飽和、直鏈或支鏈 C_1-C_7 烷基，唯其先決條件為：當 i 為 0 時， R_2 不為特丁基；飽和或不飽和 C_3-C_{10} 環烷基； C_6-C_{14} 芳基；包含至少一個選自 O, N, S 之雜原子的芳族或非芳族 C_3-C_{14} 雜環基；經飽和或不飽和 C_3-C_{10} 環烷基取代之飽和或不飽和、直鏈或支鏈 C_1-C_7 烷基； C_6-C_{14} 芳基；包含至少一個選自 O, N, S 之雜原子的芳族或非芳族 C_3-C_{14} 雜環基；式 $-(CH_2)_{m_1}-NR_8-(CH_2)_{n_1}-NR_9-(CH_2-CH_2-CH_2-NR_9)_{p_1}-H$ 所示之多胺基烷基，其中， m_1 和 n_1 為相同或不相同之 2-6 整數而 p_1 係為 0-3 之整數， R_8 和 R_9 可為相同或不相同且選自下列所組成之群：H，直鏈或支鏈 C_1-C_6 烷基，Boc，Cbz，諸如 6-D-半乳糖基或 6-D-葡萄糖基之單醣類；每一前述基團可能經一或多個選

(2)

自下列所組成族群之基團所取代： $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COO}-(\text{烷基})(\text{C}_1-\text{C}_5)$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ ； $-\text{SO}_3-(\text{烷基})(\text{C}_1-\text{C}_5)$ ，其中，烷基係為直鏈或支鏈；鹵原子；

U係不存在或為H或為下列基團之一： $-\text{COCHR}_{10}\text{NH}-$ 或 $-\text{CON}[(\text{CH}_2)_{n_2}\text{NHR}_7]-\text{CH}_2-$ ， R_{10} 為H或選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 C_6-C_{14} 芳基或胺基- C_1-C_4 烷基取代； R_7 為H或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基； n_2 為2-6之整數；

X係不存在或為H或選自下列所組成群之基團： $-\text{COCHR}_3\text{NH}-$ 、 $-\text{COCHR}_6(\text{CH}_2)_{n_3}\text{R}_4-$ 、 $-\text{R}_4-\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n_4}\text{OCH}_2\text{R}_4-$ 、 $-\text{R}_4(\text{Q})\text{R}_4-$ 、 $-\text{R}_5[\text{Arg}-\text{NH}(\text{CH}_2)_{n_5}\text{CO}]_{n_6}\text{R}_5-$ 、 $-\text{R}_5-[\text{N}-\text{胍基丙基}-\text{Gly}]_{n_6}\text{R}_5-$ ，其中， n_3 係為0-5之整數， n_4 係為0-50之整數， n_5 係為2-6之整數， n_6 係為2-7之整數；

R_3 為H或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$ 取代；

R_4 係為 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCO}-$ ；

R_5 係不存在或為 $-\text{R}_4(\text{Q})\text{R}_4-$ ；

R_6 為H或 NH_2 ；

Q係選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_6 伸烷基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烷基；直鏈或支鏈 C_2-C_6 伸烯基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烯基； C_6-C_{14} 伸芳基；伸芳基(C_6-C_{14})-伸烷基；(C_1-C_6)伸烷基(C_1-C_6)伸芳基(C_6-C_{14})；包含至少一個選自O,N,S之雜原子的芳族或非芳族雜環基(C_3-

(3)

C₁₄) ;

Y係不存在或為H或為c(Arg-Gly-Asp-AA₁-AA₂)，其中

:

c係指環狀；

AA₁係選自下列所組成之群：(D)-Phe, (D)-Trp, (D)-Tyr, (D)-2-萘基-Ala, (D)-4-特丁基-Phe, (D)-4,4'-聯苯基-Ala, (D)-4-CF₃-Phe, (D)-4-乙醯胺基-Phe；

AA₂係選自下列所組成之群：NW-CH[(CH₂)_{n₇}-CO]-CO, NW-CH[(CH₂)_{n₇}-NH]-CO, NW-[4-(CH₂)_{n₁}-CO]-Phe, NW-[4-(CH₂)_{n₁}-NH]-Phe, [NW]-Gly, NW-Val, 其中，W係選自H，直鏈或支鏈(C₁-C₆)烷基，-(CH₂)_{n₇}-COOH，其中n₇係為0-5之整數，4-羧基苯甲基，4-胺基甲基苯甲基；

唯其先決條件為X和Y不能同時不存在；

其N₁-氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其E及Z型式，其混合物，藥學上可接受之塩類。

2. 如申請專利範圍第1項之化合物，式中，m係為1。

3. 如申請專利範圍第2項之化合物，式中，R₂係為飽和或不飽和、直鏈或支鏈C₁-C₃烷基。

4. 一種製備申請專利範圍第1-3項中任一項化合物的方法，其係根據下列反應機構之一進行：



(4)

$$7-R-CP-U_1+X_1+Y_1 \text{ 或}$$

$$7-R-CP-U_1-X_1+Y_1 ;$$

其中，7-R-CP代表7-經取代之喜樹鹼或其類似化合物，其中，R悉如式(I)中定義， U_1 、 X_1 及 Y_1 分別代表如式(I)中所定義之U、X及Y，其最後經適當的官能化和保護。

5. 一種藥學組成物，其包含至少一種申請專利範圍第1-2項之化合物作為混合物中之主成分，以及至少一種藥學上可接受之賦形劑和／或載劑。

6. 一種申請專利範圍第1-2項化合物的用途，其係用以製造藥物。

7. 一種申請專利範圍第1-2項化合物的用途，其係用以製造具有局部異構酶1(topoisomerase 1)抑制活性的藥物。

8. 如申請專利範圍第7項的用途，其係用以製造具有抗癌活性的藥物。

9. 如申請專利範圍第8項的用途，其中，所述藥物係用以治療非小細胞癌(non-microcytoma)與小細胞肺癌，結腸腫瘤，前列腺癌，神經膠母細胞瘤與神經母細胞瘤，子宮頸癌，卵巢癌，胃腸癌，肝癌，卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)，直腸癌，肉瘤與骨肉瘤，睪丸癌，乳癌，胰腺癌，黑色素細胞瘤，泌尿膀胱癌及頭和頸癌。

10. 一種申請專利範圍第1-2項化合物的用途，其係用以製造供預防或治療轉移型態的藥物。

11. 如申請專利範圍第7項的用途，其係用以製造具

(5)

有抗寄生生物活性的藥物。

12. 如申請專利範圍第7項的用途，其係用以製造具有抗病毒活性的藥物。

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無