



HU000229160B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 160**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 03 03151**(22) A bejelentés napja: **2002. 02. 15.**(40) A közzététel napja: **2003. 12. 29.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 09. 30.**(51) Int. Cl.: **A61K 51/04** (2006.01)(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/IT 02/00091(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 02066075

(30) Elsőbbségi adatok: RM01A000079 2001. 02. 16. IT	(73) Jogosult(ak): Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Rinnite S.p.A., Róma (IT)
(72) Feltaláló(k): Paganelli, Giovanni, Milánó (IT) Chinol, Marco, Milánó (IT) Ginanneschi, Mauro, Firenze (IT)	(74) Képviselő: Kmethy Boglárka, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Biotin aminoszármazékai és ezek makrociklusos kelátképző szerekkel képzett konjugátumai**

(57) Kivonat

A találmány (I) általános képletű vegyületekre, ezek radionuklidokkal képzett komplexeire és ezeket tartalmazó gyógyászati és diagnosztikai készítményekre vonatkozik, amelyek a daganatterápiában hasznosak. Az (I) általános képletben a helyettesítők jelentése:

Q jelentése $-(CH_2)_n-$, ahol n jelentése 4-12; $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$, ahol a és b jelentése 0-n; vagy ciklohexil- vagy fenilcsoport;

R jelentése hidrogénatom vagy $-\Lambda$, ahol $-\Lambda$ jelentése (II) általános képletű makrociklus, ahol Y jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, $-(CH_2)_m-COOH$, ahol m jelentése 1-3; X jelentése hidrogénatom vagy $-CH_2-U$, ahol U jelentése metil-, etil-, p-aminofenilcsoport, vagy X jelentése $-(CHW)_o-Z$, ahol o jelentése 1-5, W jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport, Z jelentése heterociklusos csoport; vagy $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$ vagy $-S-R_2$, ahol R_2 jelentése alkilcsoport;

p értéke 2 vagy 3,

R' jelentése hidrogénatom, alkilcsoport, $-(CH_2)_q-T$, ahol T jelentése $-S-CH_3$, $-OH$ vagy $-COOH$ képletű csoport és q értéke 1 vagy 2;

R" jelentése megegyezik R jelentésével az alábbi feltételekkel: ha R jelentése $-\Lambda$, akkor R" jelentése hidrogénatom; ha R jelentése hidrogénatom, akkor R" jelentése $-\Lambda$, vagy R illetve R" rendre $-(CH_2)_r-\Lambda$, ahol r értéke 4-12 illetve $-\Lambda$, Q jelentése $-(CH_2)_n-$, ahol n jelentése 4-12.

BIOTIN AMINOSZÁRMAZÉKAI ÉS EZEK MAKROCIKLUSOS KELÁTKÉPZŐ
SZEREKKEL KÉPZETT KONJUGÁTUMAI

A találmány módosított biotinokra vonatkozik, amelyek
5 hasznosak radionuklidokkal képzett konjugátumok előállításá-
sára humán és állatgyógyászati diagnosztikában és kezelés-
ben történő alkalmazásra, különösen olyan patológiai álla-
potok, mint daganatok diagnózisára és kezelésére.

A találmány a gyógyászati készítmények előállításának
10 szakterületére esik.

A találmány vegyületekre, ezek előállítási eljárásaira,
alkalmazási eljárásaira és ezeket tartalmazó készítményekre
vonatkozik, amelyek alkalmasak ipari alkalmazásra a gyógy-
szerészeti területen.

15 A találmány vegyületekre, készítményekre és diagnosztikai
és terápiás orvostudományban, valamint szervek és szö-
vetek patológiai rendellenességeinek kezelésében hasznos
anyagok bejuttatására alkalmas eljárásokra vonatkozik.

Közelebbről de nem kizárólag a találmány a rákellenes
20 radiológyszerek területére esik és egyaránt ide tartoznak
olyan anyagok, amelyek hasznosak diagnosztikai célokra és
olyan anyagok, amelyek hasznosak rák megelőzésére és keze-
lésére.

A daganatterápia leginkább a rákos sejtek lerombolását
25 célzó anyagok alkalmazásán keresztül valósul meg. Ez elér-
hető citotoxikus anyagokkal, amelyeknek be kell hatolniuk a
daganatos sejtekbe abból a célból, hogy kifejtsék teljes
hatásukat, vagy a daganatos sejteknek a sejtek elpusztításá-
hoz elegendő energiájú besugárzással végzett kezeléssel.

Mindkét esetben az a feladat, hogy az anyagot a lehető leg-szelektívebb módon juttassuk be a célsejtekbe úgy, hogy el-kerüljük a lehetséges károsodást a környező egészséges sej-tekben. Radiológyszerek, azaz radioaktív részt tartalmazó
5 anyagok esetében különösen fontos az, hogy az aktív részt (azaz a radioaktív részt) szelektíven juttassuk be a daga-natos célhelyre, a lehető legnagyobb mértékben elkerülve a radionuklid diffúzióját a testben, vagy annak kölcsönhatá-sát a daganatot körülvevő egészséges sejtekkel.

10 A felmerülő kérdések és az eddig javasolt megoldások diszkussziójával kapcsolatba hivatozunk az 5 283 342, 5 608 060 és 5 955 605 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokra (Neorex), amelyek egy 1992. július 9-
-én benyújtott szabadalmi bejelentésen alapulnak. Ezeknek
15 a szabadalmi iratoknak a tartalmát hivatozási célokkal a kitanítás részének tekintjük.

Ezekben a dokumentumokban többek között a radionuklidot hordozó molekulának a test metabolikus támadásaival szembe-ni ellenállásának problémáját tárgyalják. Közelebbről a
20 legtöbb figyelmet a biotin nevű molekulának szentelik, amely az egyik első választás a radionuklid daganatos sej-tekbe történő bejuttatásához az avidinekkal való jól ismert kölcsönhatásának köszönhetően. A biotin, ahogyan azt az ál-landósult gyakorlatból tudjuk, egy kapcsolócsoporton ke-
25 resztül kötődik a radionuklid-kelátképző részhez, például egy DOTA molekulához. A Neorex szabadalmi irataiban tulaj-donképpen egy kapcsolócsoporton keresztül a radionuklidhoz kötődő biotin molekulából álló komplex biotinidázokkal

szembeni ellenállásának problémáját vetik fel, mely enzimek lebontják a komplexben jelenlévő peptidkötést. Ez a kötés a kelátképzőszer és a biotin összekapcsolódásából ered.

A legkívánatosabb jellemzők közé tartozik az, hogy a
5 molekulának a testből gyorsan és hatékonyan kell eliminálódnia és elegendően kicsinek (a molekulatömeg kisebb, mint 1000) kell lennie ahhoz, hogy könnyen el tudjon oszlanı az extracelluláris fluidumban, ahol összekapcsolódik a daganattal. Ezenkívül *in vivo* bizonyított stabilitást kell mutatnia csak nagyon minimális nem daganatos sejtek általi felvétellel és gyors (vese általi) kiürüléssel, és nem szabad metabolizálódnia.

Ehhez a jellemzőkhöz hozzá kell adni azt, hogy szükség van bizonyos mértékű stabilitásra a molekula biotinrésze és
15 kelátképző része között.

A kelátképző résznek valójában nem szabad felszabadulnia *in vivo* szabaddá téve a molekula olyan részeit, amelyek potenciálisan veszélyesek a test számára. A szakterületen jártas szakemberek jól ismerik a test számára
20 teljesen idegen és különféle típusú radioaktivitással, sőt nagy energiájú sugárzással rendelkező fémionokat tartalmazó radionuklid kelátképző rész általi felszabadulásának problémáját, ami tehát nagy mértékben károsító.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmány szerinti
25 megoldást.

Azt találtuk, hogy a (I) általános képletű vegyületek nemcsak teljesítik az ilyen vegyületekkel szemben a daganatok és más olyan betegségek kezelésében és diagnosztikájá-

ban szükséges követelményeket, amelyek detektálhatók és kezelhetők ilyen típusú vegyületekkel, hanem rendelkeznek az-
 5 zal az előnnyel is, hogy nem mennek keresztül olyan metabolikus reakciókon, amelyek képesek felszabadítani a molekula komplexképző részét. Ily módon a molekula teljesen
 eliminálódik a testből változatlan formában, így elkerüljük a fémionokat magába záró kelátképző rész lehetséges felsza-
 badulásának problémáját.

A találmány tehát egyrészt (I) általános képletű vegyü-
 10 letre vonatkozik, ahol a képletben:

Q jelentése $-(CH_2)_n-$ csoport, ahol n jelentése 4-től 12-
 -ig terjedő egész szám, mely esetben R' nincs jelen,
 vagy Q jelentése $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$ általános kép-
 15 letű csoport, ahol a és b jelentése egymástól függetle-
 nül 0-tól n-ig terjedő egész szám és R' jelentése az
 alábbiakban megadott, vagy Q jelentése ciklohexilcso-
 port vagy fenilcsoport, mely esetben R' egy szubsztit-
 tuens a ciklohexil- vagy fenilgyűrűn;

R jelentése hidrogénatom vagy $-A$, ahol $-A$ jelentése (II)
 20 általános képletű makrociklus,
 ahol a különféle Y csoportok - amelyek lehetnek egyfor-
 mák vagy különbözőek - jelentése hidrogénatom, egyenes
 vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport,
 $-(CH_2)_m-COOH$ képletű csoport, ahol m jelentése 1-től
 25 3-ig terjedő egész szám; X jelentése hidrogénatom vagy
 $-CH_2-U$ képletű csoport, ahol U jelentése metil-,
 etil-, p-aminofenilcsoport, vagy X jelentése $-(CHW)_o-2$
 képletű csoport, ahol o jelentése 1-től 5-ig terjedő

egész szám, W jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport, Z jelentése oxigénatom, $N-R_1$ - ahol R_1 jelentése hidrogénatom vagy egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport - és kénatom közül választott egy vagy több heteroatomot tartalmazó 5- vagy 6-
 5 -tagú heterociklusos csoport; vagy Z jelentése $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$ vagy $-S-R_2$ képletű csoport, ahol R_2 jelentése egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport;

10 p értéke 2 vagy 3,

R' jelentése hidrogénatom, egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport, $-(CH_2)_q-T$ képletű csoport, ahol T jelentése $-S-CH_3$, $-OH$ vagy $-COOH$ képletű csoport és q értéke 1 vagy 2;

15 R'' jelentése megegyezik R jelentésével az alábbi feltételekkel:

ha R jelentése $-A$, akkor R'' jelentése hidrogénatom; ha R jelentése hidrogénatom, akkor R'' jelentése $-A$ vagy R illetve R'' rendre $-(CH_2)_r-A$ (R esetén), ahol r értéke
 20 4-től 12-ig terjedő egész szám illetve $-A$ (R'' esetén), Q jelentése $-(CH_2)_n-$ képletű csoport, ahol n jelentése 4-től 12-ig terjedő egész szám.

Egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport alatt metil-, etil-, propil-, izopropil-, n-butil-, szek-
 25 -butil-, izobutil- vagy terc-butilcsoportot értünk.

5- vagy 6-tagú heterociklus alatt aromás vagy nem aromás heterociklust értünk, amely a gyűrűben legalább egy heteroatomot tartalmaz oxigénatom, $-N-R_1$ vagy kénatom kö-

zúl, ezekre példák a 2-, 3- vagy 4-piridilcsoport vagy a 2-, 4- vagy 5-imidazolilcsoport.

A találmány szerinti vegyületek egy első előnyös csoportját alkotják az olyan (I) általános képletű vegyületek, amelyekben R jelentése hidrogénatom, Q jelentése $-(CH_2)_n-$ képletű csoport, ahol n jelentése 4-től 8-ig terjedő egész szám, előnyösen 6, R'' jelentése -A, Y jelentése minden esetben $-CH_2-COOH$ képletű csoport; X jelentése hidrogénatom és p értéke 2.

10 A találmány további tárgyát képezik (I) általános képletű vegyületek radioizotópokkal, diagnosztikai és/vagy terápiás alkalmazásra. Ezekre az izotópokra példák: Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131, F-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, 15 Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177 és Au-198.

A találmány szerinti komplexek egy első előnyös csoportját képezik azok, ahol az (I) általános képletű vegyületekben R jelentése hidrogénatom, Q jelentése $-(CH_2)_n-$ képletű csoport, ahol n értéke 4-től 8-ig terjedő egész szám, előnyösen 6, R'' jelentése -A, Y jelentése minden esetben $-CH_2-COOH$ képletű csoport, X jelentése hidrogénatom, p értéke 2 és a radioizotóp Y-90.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások az (I) 25 általános képletű vegyületek és ezek radiofarmakonokkal képzett komplexeik előállítására.

A találmány tárgyát képezik továbbá gyógyászati és/vagy diagnosztikai készítmények, amelyek (I) általános képletű

vegyületeket és ezek komplexeit tartalmazzák a fentiek szerint.

A találmány más tárgyai közé tartozik az (I) általános képletű vegyületek és ezek radioizotópokkal képzett komplexei alkalmazása gyógyszerekként vagy diagnosztikai eszközöként különösen daganatterápia vagy diagnózis területén hasznos gyógyszerek előállítására.

A találmányhoz kapcsolódó említett és más tárgyakat az alábbiakban részletesen szemléltetjük kísérleti példákkal is.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

Az itt ismertetett találmány szerinti vegyületeket az alábbi lépéseket tartalmazó séma szerint állítjuk elő:

- 15 a) amidkötést képzünk a biotin karboxilcsoportja és egy $H_2N-Q-NH_2$ diamin egyik primer aminocsoportja között és a másik primer aminocsoportot szükség esetén alkalmasan védjük például egy Boc csoporttal;
- b) a primer aminocsoportról a védőcsoportot eltávolítjuk;
- 20 c) az amidcsoportot aminocsoporttá redukáljuk;
- d) a kívánt -A (II) általános képletű kelátképző szerrel konjugálást hajtunk végre.

A biotin egy kereskedelmi forgalomban kapható termék. A $H_2N-Q-NH_2$ általános képletű diaminok kereskedelmi forgalomban kaphatóak és bármely esetben előállíthatók ismert eljárásokkal.

A primer aminocsoport védését könnyen elérhetjük ismert védőcsoportok, mint például Boc-csoport alkalmazásával, és

ezek bármely esetben megtalálhatók az árukatalógusokban és az általános szakirodalomban.

A találmány szerinti (I) általános képletű vegyületeket előállíthatjuk az alábbiak szerint is, ha R jelentése hidrogénatom és R'' jelentése -A makrociklusos kelátképző szer:

- a) amidkötést képzünk a biotin karboxilcsoportja és egy $H_2N-Q-NH_2$ diamin egyik primer aminos csoportja között és a másik primer aminos csoportot szükség esetén alkalmasan védjük például egy Boc csoporttal;
- b) ha a védőcsoport BH_3 -THF-fel végzett kezelésre érzékeny alkil-uretán típusú védőcsoport, így például Boc csoport, akkor a védőcsoportot eltávolítjuk;
- c) az említett primer aminos csoportot szelektív védésnek vetjük alá egy, a szakirodalomban a következő redukciónak ellenállóként ismertetett és a biotinyűrű károsodása nélkül eltávolítható csoportok közül választott védőcsoporttal [T. W. Greene, P. G. M. Wuts, "Protective groups in organic synthesis", 3. kiadás, kiadó: J. Wiley & Sons, Inc., New York, (1999); Handbook of Reagents for Organic Synthesis, "Oxidizing és Reducing Agents", szerkesztő: S. D. Burke és R. L. Danheiser, kiadó: J. Wiley & Sons, Inc., New York, (1999)];
- d) az amidcsoportot aminos csoporttá redukáljuk BH_3 -THF-fel;
- e) a szekunder aminos csoportot védjük az előző védőcsoportokkal ortogonális védéssel;
- f) a primer aminos csoportról a védőcsoportot eltávolítjuk;

- g) a fentiekben definiált kívánt kelátképző szerrel konjugáljuk;
- h) a szekunder aminosocsoportról a védőcsoportot eltávolítjuk;
- i) vagy ha R jelentése -A makrociklusos kelátképzőszer és
5 R' ' jelentése hidrogénatom, akkor a d) lépés után:
- j) a kívánt -A kelátképző szerrel konjugálást hajtunk végre;
- k) a primer aminosocsoportról a védőcsoportot eltávolítjuk.

A primer aminosocsoport a) lépés szerinti védését már a
10 fentiekben ismertettük. Ami a c) lépésben végrehajtott aminosocsoport-védést és a szekunder aminosocsoport védését illeti, átlagos tudású szakember képes a szaktudása alapján kiválasztani a megfelelő védőcsoportot.

Ha R jelentése $-(CH_2)_r-A$ általános képletű csoport és
15 R' ' jelentése -A, akkor az (I) általános képletű vegyület előállíthatjuk az alábbi reakcióvázlat szerint:

- a) a biotin -COOH csoportját aktiváljuk a peptidszintézis egyik ismert eljárása szerint [P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt: "Chemical Approaches to the
20 Synthesis of Peptides és Proteins", CRC Press, Boca Raton, New York, (1997)];
- b) az aktivált biotint $BocNH(CH_2)_nNH(CH_2)_qNHBoc$ általános képletű vegyülettel konjugáljuk, ahol a képletben n és q jelentése változó lehet és értékük egymástól függetlenül 4-től 12-ig terjed;
25
- c) a Boc védőcsoportot eltávolítjuk;
- d) az amidot kívánt esetben redukáljuk és ezt a fentiek szerint hajtjuk végre;

e) a kívánt $-A$ kelátképző szerrel konjugálást hajtunk végre.

Számos a b) lépésben illusztrált szekunder amin kapható kereskedelmi forgalomban; másokat előállíthatunk szokásos eljárások módosításaival [például lásd J. B. Hansen, M. C. Nielsen, U. Ehrbar, O. Buchardt: *Synthesis*, 404 (1982)].

A találmány szerinti vegyület radioizotóppal való konjugálását, amit a találmány összefüggésében célul kitűzött komplexek előállítása céljából hajtunk végre, a szakterületen ismert szokásos eljárások alkalmazásával végezzük, ahogyan azt például a Paganelli, Chinol és munkatársai: *European Journal of Nuclear Medicine* 26. kötet, No 4; 348-357, 1999 április, szakirodalmi helyen ismertetik.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány előnyös megvalósítási módját.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük az előnyös találmány szerinti vegyület – azaz amelyben R jelentése hidrogénatom, Q jelentése $-(CH_2)_n-$ képletű csoport, ahol n értéke előnyösen 6, R' jelentése $-A$, Y jelentése minden esetben $-CH_2-COOH$; X jelentése hidrogénatom és p értéke 2 – előállítását.

Az eljárás értelmében:

- a) egy amidkötést képzünk a biotin karboxilcsoportja és a szükség esetén alkalmas módon, például Boc csoporttal védett hexametilén-diamin primer aminocsoportja között;
- b) a hexametiléndiamin aminocsoportjáról a védőcsoportot eltávolítjuk;

- c) az amidcsoportot aminocsoporttá redukáljuk;
d) kívánt kelátképző szerrel konjugálást hajtunk végre.

Az itt ismertetett találmány szerinti eljárás a) lépése egy amidkötés képzéséből áll a biotin karboxilcsoportja és a hexametiléndiamin-Boc primer aminocsoportja között. A biotint HATU-val kezeltük, így *in situ* egy különösen aktív észter képződik, amely reagál a hexametiléndiamin-Boc aminocsoportjával a megfelelő amid képzésével. Ehhez az aktiválási mechanizmushoz, amelyet mindenekelőtt szilárd fázisú peptidszintézisnél használnak, bázikus közegre van szükség. Ahhoz, hogy megakadályozzuk, hogy a bázis az aktív észterrel reagáljon, tercier szerves bázisokat, így például diizopropil-etil-amint (DIPEA) vagy N-metilmorfolint (NMM) használunk. A hexametiléndiamin két aminocsoportja közül az egyik Boc (terc-butiloxikarbonil) csoporttal történő védel-
se szükséges annak a megakadályozására, hogy a biotin a diamin lánc mindkét végéhez hozzákötődjön. A végterméket a reakcióelegyből az oldószer (DMF) elpárologtatása és vízzel történő kicsapás után különítjük el. A propanollal átkristályosított terméket ^1H -NMR, elemanalízis és ESI-MS módsze-
rekkel jellemeztük. A reakció hozama 88% körüli.

A b) lépésben a biotin-hexametiléndiamin-Boc vegyületet etil-acetát és sósav mintegy 3M koncentrációjú elegyében szolubilizáljuk a Boc csoport eltávolítása céljából. Az oldószerkelet eltávolítása után a terméket liofilizáltuk, hogy teljesen elimináljuk a hidrogén-kloridot. A mintát átkristályosítással tisztítottuk vizes közegből bázikus pH-n és ^1H -NMR és TLC módszerrel jellemeztük.

A c) lépésben az amidcsoport redukálását BH_3 /THF-fel végeztük. Mivel a redukálószer különösen reaktív, az eljárást vízmentes körülmények között kell végrehajtani. A kiindulási terméket vákuum alatt tartottuk a reakció előtt, majd vízmentes (nátriummal és benzofenonnal desztillált) THF-ben szolubilizáltuk. A reakcióelegyet nitrogéngáz amoszférában visszafolyatós hűtő alkalmazásával forraltuk, amíg az amidcsoport redukciója teljes mértékben (^1H -NMR spektrometriával monitorozva) le nem játszódott. Az oldószert csökkentett nyomáson elpárologtattuk, majd a reakcióelegyet vizes sósavoldattal kezeltük. A savas oldatot liofilizáltuk, majd a terméket vizes oldatból lúgos pH-n végzett átkristályosítással, majd fordított fázisú oszlopkromatográfiás eljárással tisztítottuk. A termék elemzését analitikai TLC módszerrel végeztük, amely képet adott a tisztaságról. A reakció hozama mintegy 55%.

A d) lépés a redukált biotínil-hexametiléndiamin és a DOTA konjugációs reakciója, amelyet vizes közegben amidképzés kialakításához szükséges specifikus reagensekkel hajtottunk végre: 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid-hidroklorid (EDC) és szulfo-NHS. A DOTA-t vízben szolubilizáltuk és a pH-értéket a $\text{pK}_{\text{a}3}$ és $\text{pK}_{\text{a}4}$ értékek közé állítottuk be, hogy a négy karboxilcsoport közül főként egyet aktiváljuk. Ilyen módon csökkenthetjük a melléktermékek képződésének valószínűségét. A bázikus oldathoz szulfo-NHS-t és végül EDC-t adtunk. Az aktív észter *in situ* képződése után hozzáadtuk a redukált biotínil-hexametiléndiamint és ellenőriztük, hogy a reakcióelegy

pH-értéke 8,6 körül maradjon. A nyers termék tisztítását félpreparatív HPLC alkalmazásával végeztük (C_{18} $CH_3CN/H_2O/TFA$ 0,1%, CH_3CN 5-25% 20 perc alatt).

A találmány tárgyát képezik gyógyászati készítmények
5 vagy diagnosztikai készítmények, amelyek hatóanyagként legalább egy (I) általános képletű vegyületet tartalmaznak, radioizotóppal képzett komplex formájában is, vagy az említett (I) általános képletű vegyület esetén más olyan hatóanyagokkal együtt, amelyek hasznosak az itt ismertetett találmánynál jelzett betegségek kezelésére, például más rák-
10 ellenes aktivitással rendelkező termékekkel; akár különálló dózisformákban akár pedig kombinált terápiához alkalmas formákban. A találmány szerinti hatóanyag egy keverék formájában van alkalmas hordozó és/vagy segédanyagokkal, amelyek a gyógyszertechnológiában szokásosan alkalmaznak, és
15 amelyek a "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook" legutóbbi kiadásában ismertetnek. A találmány szerinti készítmények a hatóanyagot terápiásan hatásos mennyiségben tartalmazzák. A dózisokat a szakterületen jártas szakember
20 például klinikus vagy az elsődleges ellátó orvos állapítja meg a kezelendő betegség típusa és a beteg állapota szerint, vagy más hatóanyagok beadásával együtt.

A gyógyászati készítményekre példák azok, amelyek lehetővé tesznek parenterális vagy helyi-regionális beadást.
25 Az e célra alkalmas gyógyászati készítmények oldatok, szuszpenziók vagy a felhasználás időpontjában feloldandó liofilizált formák.

A találmány ipari alkalmazására alkalmas formák a rákos sugárterápiához való készletek (kitek), amelyeket például a 0 496 074 számú európai szabadalmi iratban, Paganelli, Chinol és munkatársai *European Journal of Nuclear Medicine* 26. kötet, 4. szám; 1999 április; 348-357. cikkében, az 5 968 405 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban és a vonatkozó szakirodalomban ismertetnek.

A találmány további tárgyát képezi egy készlet daganatok kezelésére vagy diagnosztizálására radioaktivitás útján, melyre jellemző, hogy az említett készlet legalább egyik összetevője egy (I) általános képletű vegyületet vagy ennek alkalmas radioizotóppal alkotott komplexét tartalmazza.

A találmány szerinti vegyületek hasznosak daganatok kezelésére és diagnosztizálására való terápiás és/vagy diagnosztikai szerek előállítására.

Használhatjuk ezeket például daganat kezelési eljárásokban rákellenes radiológyszerekkel, így például azokkal, amelyeket a 0 496 074 számú európai szabadalmi iratban, Paganelli, Chinol és munkatársai *European Journal of Nuclear Medicine* 26. kötet, 4. szám; 1999 április; 348-357. szakirodalmi helyen, az 5 968 405 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban és a vonatkozó szakirodalomban ismertetnek.

Az alábbi példák tovább szemléltetik a találmányt.

Példa

Az NMR spektrumokat DMSO- d_6 -os oldatban vettük fel.

1 g (4,1 mmol) biotin és 0,451 ml (1 ekvimoláris mennyiség) NMM vízmentes DMF-fel készült oldatához hozzáadtuk 1,03 g (1 ekvimoláris mennyiség) N-Boc-hexametiléndiamin-HCl és 0,451 ml (1 ekvimoláris mennyiség) NMM vízmentes DMF-fel készült oldatát. Néhány perc elteltével hozzáadtuk 1,56 g (1 ekvimoláris mennyiség) HATU DMF-fel készült oldatát. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertük, majd csökkentett nyomáson bepároltuk. Az így kapott olajat víz hozzáadásával kristályosítottuk és n-propanollal átkristályosítottuk, így 1,6 g (3,6 mmol; 88% hozam) 1 vegyületet kaptunk. A termék TLC megfigyelése alapján tisztának bizonyult (eluens DCM/MeOH 5:1; detektálás fluoreszcanciával vagy Cl_2 /o-tolidinnel).

Olvadáspont: 174-176°C;

1H-NMR, δ_{H} : 1,1-1,65 [14 H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_3$ és $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4$], 1,34 (s, 9 H, tBu), 2,05 (t, 2 H, CH_2CO), 2,54 (d, 1 H, HCHS), 2,74-3,15 (6 H, 2 x CH_2N , HCHS és CHS), 4,12 (m, 1 H, CHCHNH), 4,28 (m, 1 H, CH_2CHNH), 6,36 és 6,42 (két s, 2 x biotin NH), 6,74 (t, 1 H, Boc NH), 7,74 (t, 1 H, amid NH);

ESI-MS: m/e számított: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 443,1, mért: 443,1;

A $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ összegképletre vonatkozó elemanalízis: számított: C 55,85; H 8,7; N 12,4; mért: C 56,2; H 8,8; N 12,4.

1,6 g biotinil-hexametiléndiamin-Boc (1) etil-acetáttal készült szuszpenziójához 37%-os vizes sósavat adtunk, amíg mintegy 3M koncentrációjú sósavoldatot nem kaptunk. Az oldatot mágneses keverés alatt tartottuk 30 percig és ezu-

tán csökkentett nyomáson bepároltuk. Az olajos terméket
vízzel liofilizáltuk, pH-értékét 12-re állítottuk be 2M
nátrium-hidroxid oldattal, és jéggel hűtöttük, majd az ol-
datot ismét liofilizáltuk. A kapott szilárd anyagot (2 ve-
gyület) többször kezeltük metanollal a jelenlévő sók eltá-
volítása céljából, majd kicsapással tisztítottuk úgy, hogy
etil-étert adtunk a metanolos elegyhez, így 1,1 g (90% ho-
zam) 2 vegyületet kaptunk. A vegyület szilikagéllal végzett
TLC elemzés (eluens: n-propanol/AcOH/H₂O 1:1:1) alapján
tisztának bizonyult, a detektálást fluorezcamin acetonos
oldatával 366 nm-en és Cl₂/o-tolidinnal végeztük.

Olvadáspont: 179-182°C; ¹H-NMR megfelel az 1 vegyület
spektrumának, de hiányzik belőle a tBu jele.

8,8 ml, THF-fel készült, nitrogénatmoszféra alatt 0°C
hőmérsékleten tartott 1M BH₃ oldathoz hozzáadtunk 1,5 g
(4,3 mmol) 2 amint finoman elporítva és 15 ml vízmentes
THF-ben szuszpendálva. Az elegyet mágneses keverés közben
0 °C hőmérsékleten tartottuk mintegy 30 percig, majd
visszafolyatós hűtő alkalmazásával forraltuk, amíg a reakció
teljes mértékben végbe nem ment (a reakció előrehaladását
¹H-NMR elemzéssel ellenőriztük, a reakcióelegyből vett, me-
legen 3M sósavoldattal kezelt és csökkentett nyomáson
bepárolt mintákon). A reakció végén 3M sósavoldatot adtunk
hozzá; a reakcióelegyet ezután 3 órán át visszafolyatós hűtő
alkalmazásával forraltuk és csökkentett nyomáson bepárol-
tuk. A nyers reakcióterméket (3 vegyület) vízzel kicsaptuk
mintegy pH=12 értéken, és fordított fázisú oszlopkroma-
tográfiás eljárással tisztítottuk (LiChroprep RP-8, 40-63

μm ; eluens: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 92:8:0,1), így 1,3 g (2,3 mmol, 55% hozam) **3** vegyületet kaptunk, amely TLC megfigyelés alapján tiszta volt (ugyanazt az eljárást használuk, mint amelyet a **2** vegyületnél).

5 ^1H -NMR, δ_{H} : 1,30–1,58 [16 H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_4$ és $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4$], 2,53 (d, 1 H, HCHS), 2,82 (7 H, HCHS és 3 x CH_2N), 3,05 (m, 1 H, CHS), 4,12 (m, 1 H, CHCHNH), 4,28 (m, 1 H, CH_2CHNH), 6,38 (széles, 2 x biotin NH), 8,03 (széles, NH_3^+), 8,9 (széles, NH_2^+), ESI-MS: m/e számított: $[\text{M}+\text{H}]^+$
10 328,23; mért 328,2.

100 mg (0,2 mmol) DOTA- $3\text{H}_2\text{O}$ vízzel készült, 9,2 pH-értékre beállított oldatához hozzáadtuk 86,8 mg (0,4 mmol) szulfo-NHS 1 ml vízzel készült oldatát. Néhány perc elteltével cseppeként hozzáadtuk 76,7 mg (0,4 mmol) EDC 0,5 ml vízzel készült oldatát és jéggel hűtöttük. A reakcióelegyet mintegy 20 percig kevertük, majd 111 mg (0,2 mmol) **3** amin 1 ml vízzel készült 8,6 pH-értékű oldatát adtuk hozzá cseppeként. Mintegy 3 óra elteltével a reakcióelegyet liofilizáltuk és a nyers terméket (**4**) fordított fázisú HPLC
15 eljárással tisztítottuk (C_{18} , A: 0,1% TFA acetonitrilben; B: 0,1% TFA vízben; 10–15% B 20 perc alatt; Rt: 12,6 perc), így 53 mg (20%) terméket kaptunk, amely TLC alapján tiszta volt (ugyanazt az eljárást használtuk, mint amelyet a **2** vegyületnél). Az acetonban fluoreszcamiinnal végzett, a
20 primer aminocsoport jelenlétét igazoló vizsgálat negatív eredményt hozott.

^1H NMR, δ_{H} : 1,3–1,6 [16 H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_4$ és $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4$], 2,60 (d, 1 H, HCHS), 2,8–2,9 (7 H, HCHS és 3 x CH_2N),

3,04 (széles s, 16 H, 8 x DOTA-gyűrű CH₂), 3,11 (m, 1 H, CHS), 3,61 (széles s, 8 H, 4 x DOTA CH₂CO), 4,15 (m, 1 H, CHCHNH), 4,33 (m, 1 H, CH₂CHNH), 6,40 és 6,44 (két s, 2 x biotin NH), 8,27 (széles, amid NH), 8,54 (széles, NH₂⁺);

5 FAB-MS: [M+H]⁺ számított: 715,9; mért 715,6;

ESI-MS: [M+H]⁺ mért 715,4;

A C₃₂H₅₆N₈O₈S·4TFA·H₂O összegképletre vonatkozó elemanalízis:

számított:	C, 40,41; H, 5,43; N, 9,42,
mért:	C, 40,48; H, 5,45; N, 9,09.

10 Jelzővizsgálatokat, avidin kötődési vizsgálatokat és szérum stabilitási vizsgálatokat hajtottunk végre a fenti példában szemléltetett vegyülettel.

Kötődési vizsgálatok

Avidint reagáltattunk ⁹⁰Y-DOTA-biotinnal növekvő mennyiségű jelzett biotin mellett. Az avidin-biotin komplex mellett más radioaktív csúcsok jelenlétét FPLC módszerrel vizsgáltuk a fentiekben említett izokratikus körülmények között. A ⁹⁰Y-DOTA-biotin/avidin komplexnek megfelelő radiocsúcs 9 perc retenciós idővel rendelkezett, míg a nem kötött ⁹⁰Y-DOTA-biotin 15 percnél eluálódott.

20

Az avidin és a ⁹⁰Y-nal jelzett 1. példa szerinti biotinszármazék közötti affinitási vizsgálatok eredményeit a természetes 1:4 molarány mellett és az avidin (1:2) móláris feleslege mellett az 1. táblázatban foglaljuk össze.

25

1. táblázat

Avidin/biotin-DOTA molarányok

Avi:Biot molarány	1:2	1:4
⁹⁰ Y-DOTA-Biotin (µg)	1	2
Avidin (µg)	51	51
Kötődés (%)	99,8	99,7

Az avidin moláris feleslegével kezdve a radiokromatogramon csak egy csúcs jelent meg, amely megfelelt az avidin-biotin komplexnek. Ugyanezt az FPLC profilt kaptuk ⁹⁰Y-DOTA-biotin kétszeresen megnövelt mennyiségével, ami igazolta, hogy a rendszer természetes affinitása fennmaradt.

Affinitási vizsgálatok

Vizsgáltuk a ⁹⁰Y-DOTA-biotin természetes biotin (H-vitamin) hatására bekövetkező kiszorulását az avidin mellől 1:4 avidin:biotin aránytól kiindulva. Az 1:4 avidin:biotin molaránynál a teljes kötődést először méretkizárásos FPLC módszerrel ellenőriztük a fent említett körülmények között. Ebből az oldatból vett alikvot részekhez H-vitamin növekvő moláris mennyiségeit adtuk és szobahőmérsékleten 15 perc inkubálás után mindegyiket FPLC módszerrel megemeleztük. A kiszorítás mértékét az avidin-biotin radiocsúcs csökkenéséből számoltuk a kiszorított ⁹⁰Y-DOTA-biotin radiocsúcs növekedésével összehasonlítva.

Az eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

Affinitási vizsgálatok biotinnal

Avi:H-vitamin molarány	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
⁹⁰ Y-DOTA-biotin (µg)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Kapcsolt avidin (µg)	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
Hozzáadott biotin (µg)	0,047	0,094	0,188	0,376	0,752
Kiszorítás (%)	0,2	0,0	0,8	0,0	0,0

5 Az 1%-nál kisebb eredményeket a kísérleti hiba alatti-
nak tartjuk.

Látható, hogy a H-vitamin nagy moláris feleslege sem tudta kiszorítani a már avidinhez kötődött ⁹⁰Y-DOTA-biotint.

10 Stabilitási vizsgálatok

50 µl, 1,85 MBq ⁹⁰Y-nak megfelelő jelzőkeveréket 20-
-szorosra hígítottunk sóoldattal vagy humán szérummal és
37 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Az oldatot különböző idő-
pontokban elemeztük meg a jelzés utáni 144. óráig. Az elem-
15 zés végrehajtásához az inkubációs keverék egy alikvot ré-
széhez moláris feleslegben avidint adtunk. A ⁹⁰Y-DOTA-
-biotin/avidin komplex arányát a szabad ⁹⁰Y-hoz képest FPLC
módszerrel határoztuk meg a fentiek szerint.

A stabilitási vizsgálatok azt mutatták, hogy sóoldatban
20 a radiojelzés 144 óráig még mindig teljesen az avidin-
-biotin komplexhez társult.

Szérumban kezdetben csak 1 radiocúcsot detektáltunk a
48 óráig inkubált minták kromatogramjaiban, azonban a
DOTA-biotinból a ⁹⁰Y egy egyensúlyi disszociációját figyel-

tuk meg ezután, melynek maximális értéke 55% volt 144 órá-
nál.

A 72 óráig inkubált mintától kezdve egy második csúcs jelent meg kisebb retenciós időnél (8,2 perc) a 5 radiokromatogramon, amely jelezte, hogy a ^{90}Y aktivitása egy nagy molekulatömegű specieszhez társult, feltehetőleg a szérum transferrinhez.

Szabadalmi igénypontok

1. (I) általános képletű vegyület, ahol a képletben

Q jelentése $-(CH_2)_n-$ csoport, ahol n jelentése 4-től 12-
 5 -ig terjedő egész szám, mely esetben R' nincs jelen,
 vagy Q jelentése $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$ általános képletű csoport, ahol a és b jelentése egymástól függetlenül 0-tól n-ig terjedő egész szám és R' jelentése az alábbiakban megadott, vagy Q jelentése ciklohexilcsoport vagy fenilcsoport, mely esetben R' egy szubsztituens a ciklohexil- vagy fenilgyűrűn;

R jelentése hidrogénatom vagy -A, ahol -A jelentése (II) általános képletű makrociklus,

ahol a különféle Y csoportok – amelyek lehetnek egyformák vagy különbözőek – jelentése hidrogénatom, egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport,
 15 $-(CH_2)_m-COOH$ képletű csoport, ahol m jelentése 1-től 3-ig terjedő egész szám; X jelentése hidrogénatom vagy $-CH_2-U$ képletű csoport, ahol U jelentése metil-,
 20 etil-, p-aminofenilcsoport, vagy X jelentése $-(CHW)_o-Z$ képletű csoport, ahol o jelentése 1-től 5-ig terjedő egész szám, W jelentése hidrogénatom, metil- vagy etilcsoport, Z jelentése oxigénatom, N-R₁ – ahol R₁ jelentése hidrogénatom vagy egyenes vagy elágazó láncú
 25 1-4 szénatomos alkilcsoport – és kénatom közül választott egy vagy több heteroatomot tartalmazó 5- vagy 6-tagú heterociklusos csoport; vagy Z jelentése $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$ vagy $-S-R_2$ képletű csoport, ahol R₂ je-

1311878

lentése egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport;

p értéke 2 vagy 3,

5 R' jelentése hidrogénatom, egyenes vagy elágazó láncú 1-4 szénatomos alkilcsoport, $-(CH_2)_q-T$ képletű csoport, ahol T jelentése $-S-CH_3$, $-OH$ vagy $-COOH$ képletű csoport és q értéke 1 vagy 2;

R'' jelentése megegyezik R jelentésével az alábbi feltételekkel:

10 ha R jelentése $-A$, akkor R'' jelentése hidrogénatom; ha R jelentése hidrogénatom, akkor R'' jelentése $-A$ vagy R illetve R'' rendre $-(CH_2)_r-A$ (R esetén), ahol r értéke 4-től 12-ig terjedő egész szám illetve $-A$ (R'' esetén), Q jelentése $-(CH_2)_n-$ képletű csoport, ahol n je-
15 lentése 4-től 12-ig terjedő egész szám.

2. Egy (I) általános képletű vegyület és egy terápiás és/vagy diagnosztikai célokra hasznos radioizotóp komplexe.

3. A 2. igénypont szerinti komplex, ahol a radioizotóp Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111,
20 I-123, I-125, I-131, P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177 vagy Au-198.

4. A 2. és 3. igénypont szerinti komplex, ahol az (I) általános képletű vegyület képletében Q jelentése $-(CH_2)_n-$,
25 ahol n értéke 4-től 8-ig terjedő egész szám, előnyösen 6, Y jelentése $-CH_2-COOH$ csoport és a radioizotóp Y-90.

1311878

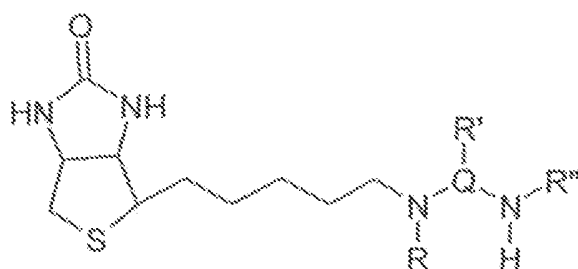
5. Gyógyászati és/vagy diagnosztikai készítmény, amely 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyületet tartalmaz alkalmas hordozó és/vagy segédanyagokkal együtt.

6. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyület alkalmazása 5 sa daganatok kezelésére hasznos gyógyászati készítmény előállítására.

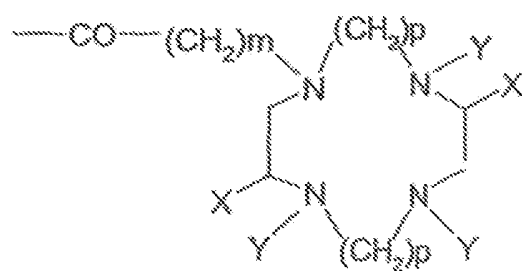
7. Gyógyászati és/vagy diagnosztikai készítmény, amely a 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti komplexet tartalmazza alkalmas hordozó és/vagy segédanyagokkal együtt.

10 8. A 2., 3. vagy 4. igénypont szerinti komplex alkalmazása 10 gyógyszer mint rákellenes radiológyszer előállítására.

9. Daganatok sugárkezelésére vagy diagnózisára szolgáló készlet, ahol a készlet legalább egyik összetevője egy 1. 15 vagy 2. igénypont szerinti vegyületet tartalmaz.



(I)



(II)