

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020年5月7日 (07.05.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/087794 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*A61K 51/04* (2006.01) *C07C 229/22* (2006.01)  
*A61K 101/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/073553

(22) 国际申请日: 2019年1月29日 (29.01.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201811264446.X 2018年10月29日 (29.10.2018) CN

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 庄晓青 (ZHUANG, Xiaoqing) [CN/CN]; 中国宁夏回族自治区银川市金凤区湖畔嘉苑一期29号楼1-902, Ningxia 750001 (CN)。

(74) 代理人: 北京弘权知识产权代理事务所 (普通合伙) (CHINABLE IP); 中国北京市朝阳区安定路35号六层35-10-2内620室, Beijing 100029 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) **Title:** F-18 LABELED 5-AMINOLEVULINIC ACID DERIVATIVE, SYNTHESIS METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) **发明名称:** 一种F-18标记的5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用

(57) **Abstract:** The present application discloses an F-18 labeled 5-aminolevulinic acid derivative, a synthesis method therefor, and an application thereof. A radioactive probe provided in an implementation of the present application has a long radioactive half-life, and the stability and fat solubility thereof are clearly higher than those of 5-aminolevulinic acid. Compared with 5-aminolevulinic acid, the F-18-labeled 5-aminolevulinic acid derivative can form higher concentrations in diseased tissues, while having lower concentrations and toxicity in normal tissues. Furthermore, because the fat-solubility of the derivative is better, the derivative has an improved ability to penetrate the blood-brain barrier, and can accurately locate tumor tissues throughout the body, and has the potential to be a broad-spectrum tumor imaging agent.

(57) **摘要:** 本申请公开了一种F-18标记的5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用。本申请实施提供的放射性探针放射性半衰期长, 稳定性和脂溶性都明显要高于5-氨基乙酰丙酸。与5-氨基乙酰丙酸相比, F-18标记的5-氨基乙酰丙酸衍生物可以在病变组织内形成更高的浓度, 而在正常组织内浓度更低, 毒性也更小。并且因为它的脂溶性更好, 穿透血脑屏障的能力更强, 可以对全身肿瘤组织进行精确的定位, 成为广谱型肿瘤显像剂。



WO 2020/087794 A1

# 一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用

## 技术领域

本申请实施例涉及有机化合物合成技术领域，特别涉及一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用。

## 5 背景技术

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 是人体血红素代谢的内源性前体物质，在线粒体内由甘氨酸和琥珀酰辅酶 (Succinyl CoA) 在 5-ALA 合成酶的催化下合成。其本身无光敏性，但它在体内代谢后会产生具有近红外荧光和光敏性的原卟啉 IX (protoporphyrin IX, PpIX)。正常细胞中原卟啉 IX 的形成过程非常缓慢，并且在亚铁螯合酶 (Ferrochelatase) 的作用下和  $\text{Fe}^{2+}$  离子形成不具有光活性的血红素。但在恶性肿瘤细胞内原卟啉 IX 的合成效率高且大量积聚，并发出近红外荧光 (Near Infrared, NIR)。并且，PpIX 是一种非常有效的光敏剂，它在一定波长光的照射下，发生光化学反应，产生单重态氧和氧化物，引起细胞膜、线粒体和核酸的损伤，从而使癌症细胞坏死、凋亡，起到治疗的作用。因此 5-ALA 被广泛应用于各种恶性肿瘤的诊断，治疗肿瘤的光动力学疗法以及光动力诊断导向的肿瘤切除手术中。

鉴于 5-ALA 在肿瘤显像方面的优势：1) 小分子化合物；2) 光敏剂原卟啉 PpIX 的前体；3) 肿瘤和正常组织中代谢高度的差异性，如果可以被放射性核素标记，将可以构建一个具有非常高灵敏度的近红外荧光-放射性核素显像双模式探针，对肿瘤进行靶向性的全身显像。

许多放射性核素都有非常理想的物理、化学性质，但是由于 5-ALA 的分子很小，因此只能用不会对其分子结构造成较大影响的正电子核素进行标记。Suzuki 等人首先报道了用席夫碱活化的前体在 5 位上进行  $^{11}\text{C}$  甲基化反应，得到  $^{11}\text{C}$  标记的放射性探针  $^{11}\text{C}$ -MALA。然后他们初步评价了  $^{11}\text{C}$ -MALA 在多种肿瘤细胞和肿瘤模型中摄取，并得出结论， $^{11}\text{C}$ -MALA 的摄取与 PpIX 的聚集高度相关。同时，从他们的数据中也能看出，从注射后 1 分钟到 60 分钟内， $^{11}\text{C}$ -MALA 摄取的肿瘤比肌肉的比值一直在升高，这个数值很有可能在此时间段内并没有到达最高点。但是对于半衰期只有 20 分钟的核素  $^{11}\text{C}$  来说，注射后 1 小时进行检测已经是极限。Pippin 等通过用  $^{13}\text{N}$  进行标记，完全不改变 5-ALA 的结构合成了  $^{13}\text{N}$ -5-ALA，反应速度快且效率高，并且用

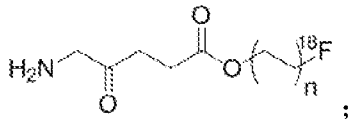
-2-

PET 可在肿瘤鼠模型中观测到肿瘤内的聚集。但是从他们的数据可以看出，在原位胶质瘤模型中，肿瘤脑组织中的摄取与正常脑组织的摄取在 10 分钟峰值的时比值只有 1.3 左右，这很大原因是因为  $^{13}\text{N}$  的半衰期只有 9.96 分钟，而 5-ALA 在体内的生物半衰期约为 1 小时，因此很难达到理想的效果。对于一个理想的放射性探针来说，它的放射性半衰期应该大于该分子在体内的生物代谢半衰期，这样才能使在非靶器官的分子有足够时间进行体内运输、代谢以及体外排出，得到高的靶/本底的比值。

## 发明内容

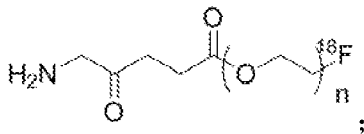
本申请的目的在于提供一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用，以解决现有技术中放射性探针半衰期短的问题。

10 第一方面，根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物，包括  $^{18}\text{F}$ -ALA，其化学结构为：



其中， $n=1-6$ 。

15 第二方面，根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物，包括  $^{18}\text{F}$ -O-ALA，其化学结构为：



其中， $n=2-4$ 。

第三方面，根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法，包括：

20 将 5-氨基乙酰丙酸溶于水，调节 pH 值到 8.5，滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯，室温搅拌 18h，反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯，将水溶液调至酸性，用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸；

25 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸，二甲氨基吡啶和二醇在冰浴下搅拌，加入碳二亚胺，冰浴搅拌 2h，室温继续搅拌 48h，反应后旋干溶剂，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10% 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相，最后进行

柱分离，得到淡黄色粉末状的 HBA，所述二醇包括乙二醇，二丁醇或二己醇；

在干燥吡啶中加入所述 HBA，在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜，反应后溶液浓缩后柱分离，得到前体 THBA；

5 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂，在反应管中加入所述前体 THBA 溶于干燥乙腈中，回流加热进行反应，反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团，加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用高效液相色谱法进行柱分离，得到  $^{18}\text{F}$ -ALA。

第四方面，根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法，包括；

10 将 5-氨基乙酰丙酸溶于水中，调节 pH 值到 8.5，滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯，室温搅拌 18h，反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯，将水溶液调至酸性，用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸；

15 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸，二甲氨基吡啶，以及，二乙二醇，三乙二醇和四乙二醇中的一种在冰浴下搅拌，加入碳二亚胺，冰浴搅拌 2h，室温继续搅拌 48h，反应后旋干溶剂，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10% 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相，最后进行柱分离，得到淡黄色粉末状的 HEBA；

在干燥吡啶中加入所述 HEBA，在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜，反应后溶液浓缩后柱分离，得到前体 TEBA；

20 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂，在反应管中加入所述前体 TEBA 溶于干燥乙腈中，回流加热进行反应，反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团，加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用高效液相色谱法进行柱分离，得到  $^{18}\text{F}$ -O-ALA。

第五方面，根据本申请的实施例，提供了 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，用于检测肿瘤。

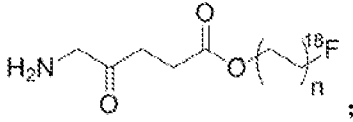
25 第六方面，根据本申请的实施例，提供了 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，用于检测肿瘤。

由以上技术方案可知，本申请实施例提供一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用。本申请实施例提供的放射性探针放射性半衰期长，稳定性和脂溶性都明显要高于 5-ALA。与 ALA 相比，F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物

可以在病变组织内形成更高的浓度，而在正常组织内浓度更低，毒性也更小。并且因为它的脂溶性更好，穿透血脑屏障的能力更强，可以对全身肿瘤组织进行精确定位，成为广谱型肿瘤显像剂。

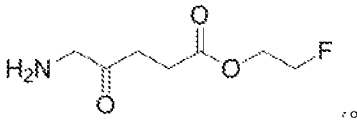
### 具体实施方式

- 5 根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物，包括  $^{18}\text{F}$ -ALA，其化学结构为：



其中， $n=1-6$ 。

当  $n=1$  时， $^{18}\text{F}$ -ALA-1 的化学结构为：



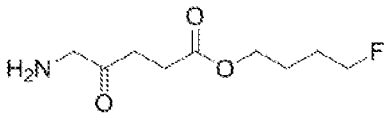
10

$^{18}\text{F}$ -ALA-1 的化合物鉴定数据：

质谱 (ES+)  $m/z$ : 177.08

氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.52(t,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.28(t,2H),  $\delta$  4.37(t,2H)。

- 15 当  $n=2$  时， $^{18}\text{F}$ -ALA-2 的化学结构为：



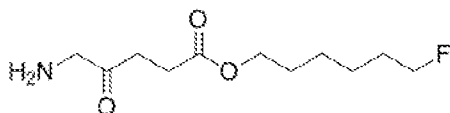
$^{18}\text{F}$ -ALA-2 的化合物鉴定数据：

质谱 (ES+)  $m/z$ : 205.11

- 20  $\delta$  1.49(m,2H),  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  1.62(m,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.09(t,2H),  $\delta$  4.13(t,2H)。

当  $n=3$  时， $^{18}\text{F}$ -ALA-3 的化学结构为：

-5-

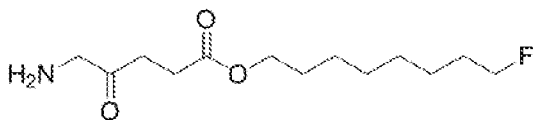


$^{18}\text{F}$ -ALA-3 的化合物鉴定数据:

质谱 (ES+) m/z: 233.14

5 氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.43(m,2H),  $\delta$  1.49(m,2H),  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  1.62(m,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.84(t,2H),  $\delta$  4.13(t,2H)。

当 n=4 时,  $^{18}\text{F}$ -ALA-4 的化学结构为:

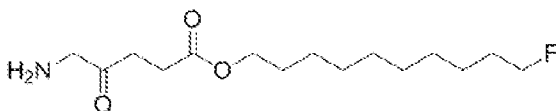


$^{18}\text{F}$ -ALA-4 的化合物鉴定数据:

质谱 (ES+) m/z: 261.17

10 氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.29(m,6H),  $\delta$  1.43(m,2H),  $\delta$  1.49(m,2H),  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  1.62(m,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.09(t,2H),  $\delta$  4.13(t,2H)。

当 n=5 时,  $^{18}\text{F}$ -ALA-5 的化学结构为:

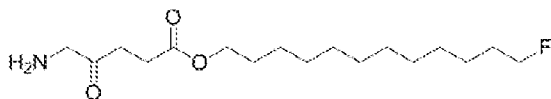


$^{18}\text{F}$ -ALA-5 的化合物鉴定数据:

15 质谱 (ES+) m/z: 289.21

氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.29(m,10H),  $\delta$  1.43(m,2H),  $\delta$  1.49(m,2H),  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  1.62(m,2H),  $\delta$  2.74 (t,2H),  $\delta$  2.84(t, 2H),  $\delta$  3.81 (t,2H),  $\delta$  4.09 (t,2H),  $\delta$  4.13 (t,2H)。

当 n=6 时,  $^{18}\text{F}$ -ALA-6 的化学结构为:



20

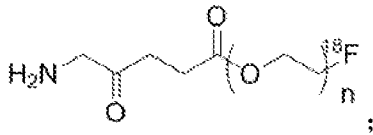
$^{18}\text{F}$ -ALA-6 的化合物鉴定数据:

-6-

质谱 (ES+) m/z: 317.24

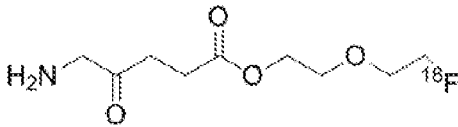
氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.26(m,4H),  $\delta$  1.29(m,10H),  $\delta$  1.43(m,2H),  $\delta$  1.49(m,2H),  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  1.62(m,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.09(t,2H),  $\delta$  4.13(t,2H)。

5 根据本申请的实施例, 提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物, 包括  $^{18}\text{F}$ -O-ALA, 其化学结构为:



其中,  $n=2-4$ 。

当  $n=2$  时,  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 的化学结构为:



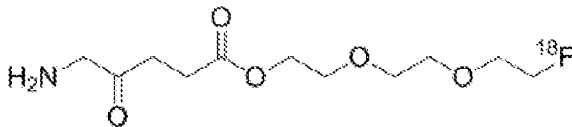
10

$^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 的化合物鉴定数据:

质谱 (ES+) m/z: 220.11

氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.57(t,2H),  $\delta$  3.65(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.20(t,2H),  $\delta$  4.26(t,2H)。

15 当  $n=3$  时,  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-3 的化学结构为:



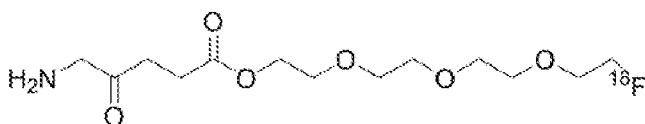
$^{18}\text{F}$ -O-ALA-3 的化合物鉴定数据:

质谱 (ES+) m/z: 264.14

20 氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.54(m,4H),  $\delta$  3.57(t,2H),  $\delta$  3.65(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.20(t,2H),  $\delta$  4.26(t,2H)。

当  $n=4$  时,  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-4 的化学结构为:

-7-



$^{18}\text{F}$ -O-ALA-4 的化合物鉴定数据:

质谱 (ES+) m/z: 308.16

5 氢谱  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.53(t,2H),  $\delta$  2.74(t,2H),  $\delta$  2.84(t,2H),  $\delta$  3.54(m,8H),  $\delta$  3.57(t,2H),  $\delta$  3.65(t,2H),  $\delta$  3.81(t,2H),  $\delta$  4.20(t,2H),  $\delta$  4.26(t,2H)。

根据本申请的实施例, 提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法, 包括:

10 将 5-氨基乙酰丙酸溶于水中, 调节 pH 值到 8.5, 滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯, 室温搅拌 18h, 反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯, 将水溶液调至酸性, 用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸;

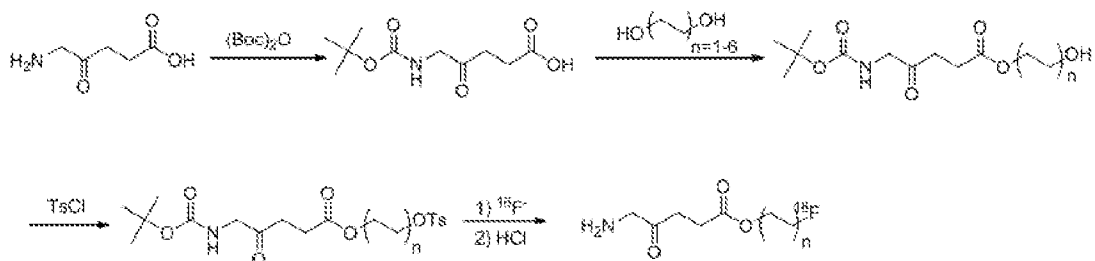
15 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸, 二甲氨基吡啶和二醇在冰浴下搅拌, 加入碳二亚胺, 冰浴搅拌 2h, 室温继续搅拌 48h, 反应后旋干溶剂, 加入水, 用乙酸乙酯进行萃取, 收集有机层后用 10% 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相, 最后进行柱分离, 得到淡黄色粉末状的 HBA (6-hydroxyhexyl 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoate), 所述二醇包括二乙醇, 二丁醇或二己醇;

在干燥吡啶中加入所述 HBA, 在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯, 然后逐渐恢复到室温, 搅拌过夜, 反应后溶液浓缩后柱分离, 得到前体 THBA (6-(tosyloxy)hexyl 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoate);

20 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获, 然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管, 加乙腈反复除干溶剂, 在反应管中加入所述前体 THBA 溶于干燥乙腈中, 回流加热进行反应, 反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团, 加水稀释后用固相萃取柱初步纯化, 最后用高效液相色谱法进行柱分离, 得到  $^{18}\text{F}$ -ALA。

$^{18}\text{F}$ -ALA 合成路线如下。

- 8 -



以  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 为例，合成方法如下：

①前体化合物 THBA 的合成。

A. Boc-5-ALA (5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoic acid) 的合成。

- 5 将 5-ALA 溶于 5mL 水中，并且用 1N 的 NaOH 调节 pH 值到 8.5，然后滴加溶于 5mL 二氧六环的二碳酸二叔丁酯 ((Boc)<sub>2</sub>O) (相对于 5-ALA 的 1-2 倍摩尔量)，室温下搅拌 18h。反应后多余的(Boc)<sub>2</sub>O 用乙醚萃取去除，水溶液用 1N 的 HCl 溶液调至酸性，然后用乙酸乙酯萃取得到 Boc-5-ALA，减压蒸馏旋干后得到无色油状物。

10 B. HBA 的合成。

Boc-5-ALA，二甲氨基吡啶 (DMAP)，和 1,6-二己醇按照 1:1:1 的摩尔比例在冰浴下搅拌加入与 Boc-5-ALA 同摩尔量的碳二亚胺，然后在冰浴下搅拌 2h，之后在室温下继续搅拌 48h。反应后旋干溶剂，加入水，然后用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10% 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液清洗有机相。最后进行柱分离 (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=40:1) 得到淡黄色粉末状 HBA。

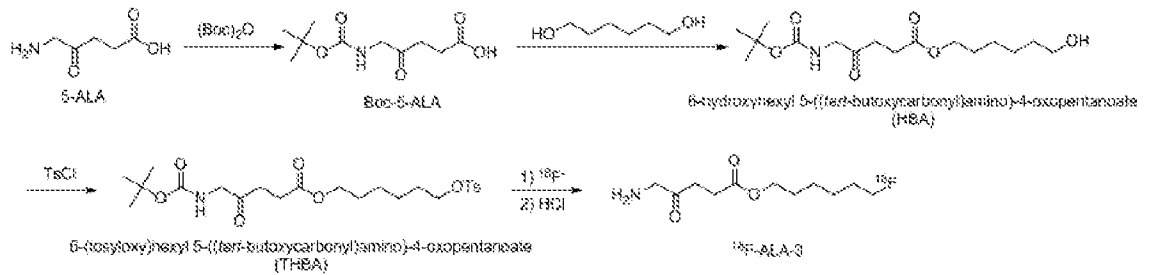
C. 前体 THBA 的合成。

在干燥的 5mL 吡啶中加入 HBA，在冰浴下分批加入 2-3 倍摩尔量的对甲苯磺酰氯 (TsCl)，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜。反应后溶液浓缩后柱分离。

②放射性探针  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 的标记合成。

- 20 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂。然后在反应管中加入 5-20 mg 的 HBA 溶于 1mL 干燥乙腈中，回流加热进行反应。反应后加入 2M HCl 溶液加热脱除保护基团，然后加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用 HPLC 进行柱分离，最后得到  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 的放射化学纯度 >95%。

$^{18}\text{F}$ -ALA-3 合成路线如下:



根据本申请的实施例，提供了一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法，包括：

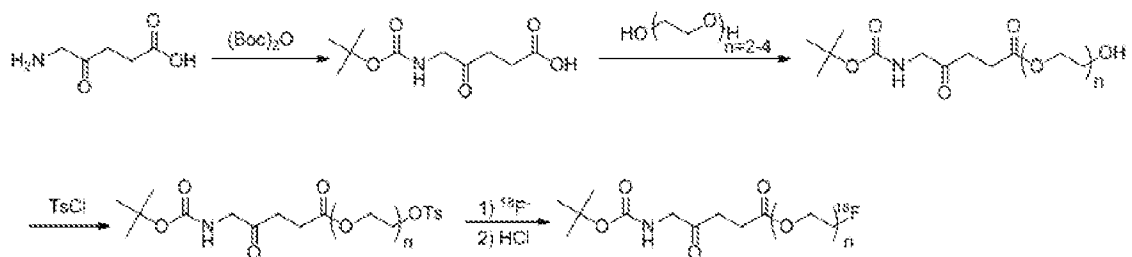
- 5 将 5-氨基乙酰丙酸溶于水，调节 pH 值到 8.5，滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯，室温搅拌 18h，反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯，将水溶液调至酸性，用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸；

- 10 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸，二甲氨基吡啶，以及，二乙二醇，三乙二醇和四乙二醇中的一种在冰浴下搅拌，加入碳二亚胺，冰浴搅拌 2h，室温继续搅拌 48h，反应后旋干溶剂，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10% 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相，最后进行柱分离，得到淡黄色粉末状的 HEBA (2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoate)；

- 15 在干燥吡啶中加入所述 HEBA，在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜，反应后溶液浓缩后柱分离，得到前体 TEBA (2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethyl 5-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-oxopentanoate)；

加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂，在反应管中加入所述前体 TEBA 溶于干燥乙腈中，回流加热进行反应，反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团，加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用高效液相色谱法进行柱分离，得到  $^{18}\text{F}$ -O-ALA。

- 20  $^{18}\text{F}$ -O-ALA 合成路线如下。



-10-

以  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 为例，合成方法如下：

① 前体化合物 TEBA 的合成。

A. Boc-5-ALA 的合成。

5 将 5-ALA 溶于 5mL 水中，并且用 1N 的 NaOH 调节 pH 值到 8.5，然后滴加溶于 5mL 二氧六环的二碳酸二叔丁酯 ((Boc)<sub>2</sub>O) (相对于 5-ALA 的 1-2 倍摩尔量)，室温下搅拌 18h。反应后多余的(Boc)<sub>2</sub>O 用乙醚萃取去除，水溶液用 1N 的 HCl 溶液调至酸性，然后用乙酸乙酯萃取得到 Boc-5-ALA，减压蒸馏旋干后得到无色油状物。

B. HEBA 的合成。

10 Boc-5-ALA，二甲氨基吡啶 (DMAP)，和二乙二醇按照 1:1:1 的摩尔比例在冰浴下搅拌加入同摩尔量的碳二亚胺，然后在冰浴下搅拌 2h，之后在室温下继续搅拌 48h。反应后旋干溶剂，加入水，然后用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10%的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液清洗有机相。最后进行柱分离 (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=40:1) 得到淡黄色粉末状 HEBA。

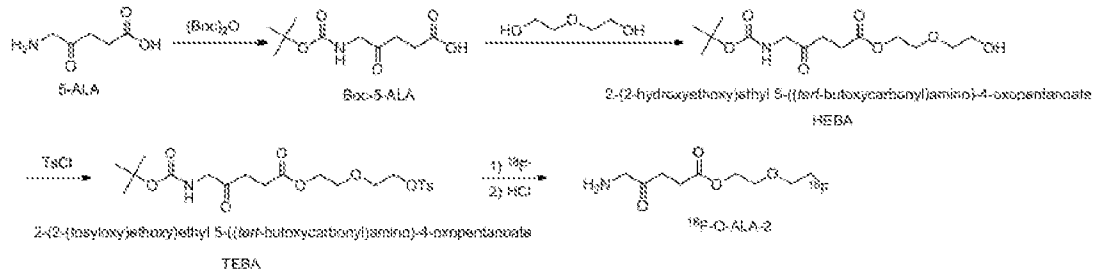
15 C. 前体 TEBA 的合成。

在干燥的 5mL 吡啶中加入 HEBA，在冰浴下分批加入 2-3 倍摩尔量的对甲苯磺酰氯 (TsCl)，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜。反应后溶液浓缩后柱分离。

② 放射性探针  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 的标记合成。

20 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂。然后在反应管中加入 5-20 mg 的 TEBA 溶于 1mL 干燥乙腈中，回流加热进行反应。反应后加入 2M HCl 溶液加热脱除保护基团，然后加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用 HPLC 进行柱分离，最后得到  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 的放射化学纯度 >95%。

$^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 合成路线如下。



根据本申请的实施例，提供了 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，所述 5-氨基乙酰丙酸衍生物包括  $^{18}\text{F}$ -ALA，用于检测肿瘤。

5 使用裸鼠制作肿瘤模型，将荷瘤鼠麻醉后置于动物 PET/CT 上，然后从尾静脉注射 0.1-0.5mCi 的  $^{18}\text{F}$ -ALA 溶液，在体内代谢 0.5-2 小时后进行 PET/CT 显像。

用 AsPC-1 细胞构建肿瘤模型，从尾静脉注射 0.1-0.5mCi 的  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 探针，分别在注射后 10 分钟、1 小时和 2 小时后检测肿瘤鼠中各器官的  $\gamma$  计数的值，即放射性药物  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 的量，以及肿瘤和肌肉的比值，实验结果如表 1 所示。

表 1

	10 分钟	60 分钟	120 分钟
血	4.56 ± 1.34	1.14 ± 0.47	0.96 ± 0.11
脑	0.62 ± 0.21	1.02 ± 0.33	1.24 ± 0.18
心脏	2.78 ± 0.41	1.48 ± 0.09	0.96 ± 0.09
肺	4.21 ± 0.62	2.64 ± 0.29	1.26 ± 0.20
肝	9.67 ± 0.63	3.32 ± 0.52	2.37 ± 0.31
脾	13.92 ± 0.58	4.30 ± 0.12	3.20 ± 0.29
胰腺	2.24 ± 0.15	1.64 ± 0.30	1.08 ± 0.09
胃	2.99 ± 0.47	1.24 ± 0.31	1.02 ± 0.08
肠	7.17 ± 0.59	3.98 ± 0.53	2.15 ± 0.76
肾	74.30 ± 7.97	38.64 ± 5.20	18.48 ± 3.24
肌肉	1.02 ± 0.08	0.61 ± 0.09	0.59 ± 0.08

- 12 -

骨	$3.02 \pm 0.26$	$1.10 \pm 0.47$	$1.02 \pm 0.23$
肿瘤	$3.98 \pm 0.74$	$5.89 \pm 0.65$	$5.94 \pm 0.38$
肿瘤/肌肉	$3.90 \pm 0.71$	$9.66 \pm 0.93$	$10.07 \pm 0.98$

由表 1 可见， $^{18}\text{F}$ -ALA-3 在肿瘤鼠的体内分布数据表明  $^{18}\text{F}$ -ALA-3 在肿瘤内有较高的摄取，并且肿瘤与肌肉的比值较高，可以作为靶向肿瘤的显像剂。

根据本申请的实施例，提供了 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，所述 5-氨基乙酰丙酸衍生物包括  $^{18}\text{F}$ -O-ALA，用于检测肿瘤。

- 5 用 AsPC-1 细胞构建肿瘤模型，从尾静脉注射 0.1-0.5mCi 的  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 探针，分别在注射后 10 分钟、1 小时和 2 小时后检测肿瘤鼠中各器官的  $\gamma$  计数的值，即放射性药物  $^{18}\text{F}$ -O-ALA-2 的量，以及肿瘤和肌肉的比值，实验结果如表 2 所示。

表 2

	10 分钟	60 分钟	120 分钟
血	$4.02 \pm 1.55$	$1.02 \pm 0.35$	$0.87 \pm 0.23$
脑	$0.53 \pm 0.16$	$0.87 \pm 0.26$	$1.02 \pm 0.24$
心脏	$3.64 \pm 0.87$	$1.76 \pm 0.22$	$0.95 \pm 0.07$
肺	$4.89 \pm 1.02$	$3.42 \pm 0.43$	$1.33 \pm 0.27$
肝	$7.69 \pm 1.27$	$3.04 \pm 0.67$	$1.99 \pm 0.43$
脾	$11.34 \pm 2.04$	$3.89 \pm 0.46$	$2.87 \pm 0.22$
胰腺	$2.36 \pm 0.75$	$1.56 \pm 0.45$	$1.01 \pm 0.06$
胃	$3.45 \pm 0.96$	$1.99 \pm 0.57$	$1.43 \pm 0.07$
肠	$8.78 \pm 1.69$	$4.84 \pm 1.24$	$2.96 \pm 0.24$
肾	$79.9 \pm 6.86$	$49.96 \pm 6.32$	$20.32 \pm 2.68$
肌肉	$1.32 \pm 0.07$	$0.66 \pm 0.08$	$0.52 \pm 0.06$
骨	$3.45 \pm 0.31$	$1.14 \pm 0.55$	$0.99 \pm 0.35$

- 13 -

肿瘤	$4.01 \pm 0.53$	$5.97 \pm 1.02$	$6.26 \pm 0.47$
肿瘤/肌肉	$3.04 \pm 0.35$	$9.05 \pm 1.24$	$12.04 \pm 0.66$

由表 2 可见， $^{18}\text{F-O-ALA-2}$  探针在肿瘤鼠的体内分别表明， $^{18}\text{F-O-ALA-2}$  在肿瘤内有较高摄取，肿瘤和肌肉的比值较高，可以作为靶向肿瘤的显像剂。

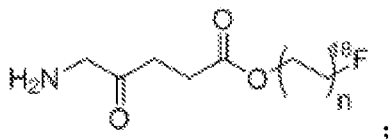
由以上技术方案可知，本申请实施例提供一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物、合成方法及应用。本申请实施例提供的放射性探针放射性半衰期长，稳定性和脂溶性都明显要高于 5-ALA。与 ALA 相比，F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物可以在病变组织内形成更高的浓度，而在正常组织内浓度更低，毒性也更小。并且因为它的脂溶性更好，穿透血脑屏障的能力更强，可以对全身肿瘤组织进行精确定位，成为广谱型肿瘤显像剂。

本领域技术人员在考虑说明书及实践这里公开的申请后，将容易想到本申请的其它实施方案。本申请旨在涵盖本申请的任何变型、用途或者适应性变化，这些变型、用途或者适应性变化遵循本申请的一般性原理并包括本申请未公开的本技术领域中的公知常识或惯用技术手段。说明书和实施例仅被视为示例性的，本申请的真正范围和精神由下面的权利要求指出。

应当理解的是，本申请并不局限于上面已经描述并在附图中示出的精确结构，并且可以在不脱离其范围进行各种修改和改变。本申请的范围仅由所附的权利要求来限制。

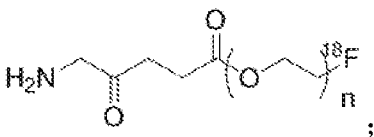
## 权 利 要 求

1、一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物，其特征在于，包括  $^{18}\text{F}$ -ALA，其化学结构为：



5 其中， $n=1-6$ 。

2、一种 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物，其特征在于，包括  $^{18}\text{F}$ -O-ALA，其化学结构为：



10 其中， $n=2-4$ 。

3、一种如权利要求 1 所述的 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法，其特征在于，包括：

15 将 5-氨基乙酰丙酸溶于水中，调节 pH 值到 8.5，滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯，室温搅拌 18h，反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯，将水溶液调至酸性，用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸；

20 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸，二甲氨基吡啶和二醇在冰浴下搅拌，加入碳二亚胺，冰浴搅拌 2h，室温继续搅拌 48h，反应后旋干溶剂，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10%的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相，最后进行柱分离，得到淡黄色粉末状的 HBA，所述二醇包括二乙醇，二丁醇或二己醇；

在干燥吡啶中加入所述 HBA，在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜，反应后溶液浓缩后柱分离，得到前体 THBA；

25 加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂，在反应管中加入所述前体 THBA 溶于干燥乙腈中，回流加热进行反应，反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团，加水稀释后用固相萃取柱初步纯化，最后用高效液相色谱法进行柱分离，得到  $^{18}\text{F}$ -ALA。

4、一种如权利要求 2 所述的 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物合成方法，

其特征在于，包括：

将 5-氨基乙酰丙酸溶于水中，调节 pH 值到 8.5，滴加溶于二氧六环的二碳酸二叔丁酯，室温搅拌 18h，反应后去除多余的二碳酸二叔丁酯，将水溶液调至酸性，用乙酸乙酯萃取得到 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸；

5 将所述 5-N-叔丁氧羰基氨基乙酰丙酸，二甲氨基吡啶，以及，二乙二醇，三乙二醇和四乙二醇中的一种在冰浴下搅拌，加入碳二亚胺，冰浴搅拌 2h，室温继续搅拌 48h，反应后旋干溶剂，加入水，用乙酸乙酯进行萃取，收集有机层后用 10%的  $\text{NaHCO}_3$  溶液清洗有机相，最后进行柱分离，得到淡黄色粉末状的 HEBA；

10 在干燥吡啶中加入所述 HEBA，在冰浴下分批加入对甲苯磺酰氯，然后逐渐恢复到室温，搅拌过夜，反应后溶液浓缩后柱分离，得到前体 TEBA；

加速器传出来的  $^{18}\text{F}$  离子被 QMA 柱捕获，然后用氨基聚醚/碳酸钾洗脱至反应管，加乙腈反复除干溶剂，在反应管中加入所述前体 TEBA 溶于干燥乙腈中，回流加热进行反应，反应后加入 HCl 溶液加热脱除保护基团，加水稀释后用固

15 相萃取柱初步纯化，最后用高效液相色谱法进行柱分离，得到  $^{18}\text{F}$ -O-ALA。

5、一种如权利要求 1 所述的 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，其特征在于，用于检测肿瘤。

20 6、一种如权利要求 2 所述的 F-18 标记的 5-氨基乙酰丙酸衍生物应用，其特征在于，用于检测肿瘤。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/073553

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 51/04(2006.01)i; A61K 101/02(2006.01)i; C07C 229/22(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K51/-; A61K101/-; C07C229/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, VEN: 氨基, 酰 w 酸, 显像, 成像, 肿瘤, 癌症, F, 标记, 放射性, amino, levulinic acid, imag+, tumor, cancer, label+, radio+		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109369433 A (ZHUANG, XIAOQING) 22 February 2019 (2019-02-22) claims 1-6	1-6
A	PIPPIN, A.B. et al. "Radiochemical Synthesis and Evaluation of <sup>13</sup> N-Labeled 5-Aminolevulinic Acid for PET Imaging of Gliomas" <i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i> , Vol. 8, No. (12), 15 November 2017 (2017-11-15), ISSN: 1948-5875, page 1236, and page 1237, Scheme 1	1-6
A	CN 101723850 A (BEIJING NORMAL UNIVERSITY) 09 June 2010 (2010-06-09) description, paragraphs 3 and 25-42	1-6
A	US 5856566 A (DUSA PHARMACEUTICALS INC.) 05 January 1999 (1999-01-05) entire document	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>19 June 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 June 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/073553**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)	
CN	109369433	A	22 February 2019	None		
CN	101723850	A	09 June 2010	CN	101723850 B	21 November 2012
US	5856566	A	05 January 1999	NO	327985 B1	02 November 2009
				WO	9911604 A1	11 March 1999
				AU	747730 B2	23 May 2002
				NO	20001055 A	18 April 2000
				DE	69824422 D1	15 July 2004
				JP	2001514243 A	11 September 2001
				CA	2302228 C	25 October 2011
				EP	1007504 A1	14 June 2000
				WO	9911604 A9	08 July 1999
				AU	9215598 A	22 March 1999
				DE	69824422 T2	09 June 2005
				NZ	503644 A	27 September 2002
				EP	1007504 B1	09 June 2004
				BR	9812164 A	18 July 2000
				US	6335465 B1	01 January 2002

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/073553

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>A61K 51/04(2006.01)i; A61K 101/02(2006.01)i; C07C 229/22(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K51/-; A61K101/-; C07C229/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNKI, VEN: 氨基, 酰 w 酸, 显像, 成像, 肿瘤, 癌症, F, 标记, 放射性, amino, levulinic acid, imag+, tumor, cancer, label+, radio+</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109369433 A (庄晓青) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 权利要求1-6</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Adam B.Pippin等. "Radiochemical synthesis and evaluation of 13N-labeled 5-aminolevulinic acid for PET imaging of gliomas" ACS Medicinal Chemistry Letters, 第8卷, 第12期, 2017年 11月 15日 (2017 - 11 - 15), ISSN: 1948-5875, 第1236页, 第1237页Scheme 1</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101723850 A (北京师范大学) 2010年 6月 9日 (2010 - 06 - 09) 说明书第3段, 第25-42段</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5856566 A (DUSA PHARMACEUTICALS INC) 1999年 1月 5日 (1999 - 01 - 05) 全文</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109369433 A (庄晓青) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 权利要求1-6	1-6	A	Adam B.Pippin等. "Radiochemical synthesis and evaluation of 13N-labeled 5-aminolevulinic acid for PET imaging of gliomas" ACS Medicinal Chemistry Letters, 第8卷, 第12期, 2017年 11月 15日 (2017 - 11 - 15), ISSN: 1948-5875, 第1236页, 第1237页Scheme 1	1-6	A	CN 101723850 A (北京师范大学) 2010年 6月 9日 (2010 - 06 - 09) 说明书第3段, 第25-42段	1-6	A	US 5856566 A (DUSA PHARMACEUTICALS INC) 1999年 1月 5日 (1999 - 01 - 05) 全文	1-6
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 109369433 A (庄晓青) 2019年 2月 22日 (2019 - 02 - 22) 权利要求1-6	1-6															
A	Adam B.Pippin等. "Radiochemical synthesis and evaluation of 13N-labeled 5-aminolevulinic acid for PET imaging of gliomas" ACS Medicinal Chemistry Letters, 第8卷, 第12期, 2017年 11月 15日 (2017 - 11 - 15), ISSN: 1948-5875, 第1236页, 第1237页Scheme 1	1-6															
A	CN 101723850 A (北京师范大学) 2010年 6月 9日 (2010 - 06 - 09) 说明书第3段, 第25-42段	1-6															
A	US 5856566 A (DUSA PHARMACEUTICALS INC) 1999年 1月 5日 (1999 - 01 - 05) 全文	1-6															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 6月 19日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 6月 28日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>尹晓娟</p> <p>电话号码 010-62084570</p>															

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/073553

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109369433	A	2019年 2月 22日	无			
CN	101723850	A	2010年 6月 9日	CN	101723850	B	2012年 11月 21日
US	5856566	A	1999年 1月 5日	NO	327985	B1	2009年 11月 2日
				WO	9911604	A1	1999年 3月 11日
				AU	747730	B2	2002年 5月 23日
				NO	20001055	A	2000年 4月 18日
				DE	69824422	D1	2004年 7月 15日
				JP	2001514243	A	2001年 9月 11日
				CA	2302228	C	2011年 10月 25日
				EP	1007504	A1	2000年 6月 14日
				WO	9911604	A9	1999年 7月 8日
				AU	9215598	A	1999年 3月 22日
				DE	69824422	T2	2005年 6月 9日
				NZ	503644	A	2002年 9月 27日
				EP	1007504	B1	2004年 6月 9日
				BR	9812164	A	2000年 7月 18日
				US	6335465	B1	2002年 1月 1日