



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328049**

(13) **B1**

NORGE

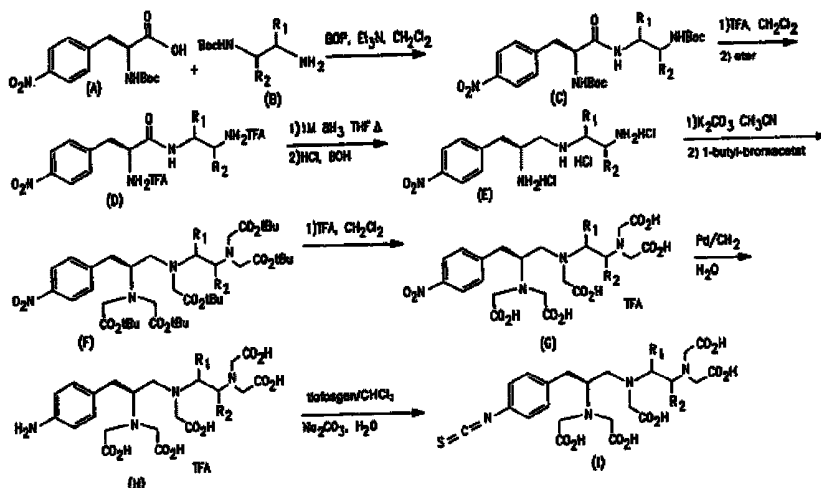
(51) Int Cl.
C07C 331/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014194	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.03.02 PCT/US00/05433
(22)	Inng.dag	2001.08.29	(85)	Videreføringsdag	2001.08.29
(24)	Løpedag	2000.03.02	(30)	Prioritet	1999.03.03, US, 261207
(41)	Alm.tilgj	2001.10.26			
(45)	Meddelt	2009.11.16			
(73)	Innehaver	Biogen Idec Inc, 14 Cambridge Center, MA02142 CAMBRIDGE, US			
(72)	Oppfinner	Albert Charles Gyorkos, 11795 Decatur Drive, CO80234 WESTMINSTER, US Paul Chinn, Vista, CA, US Michael J Labarre, San Diego, CA, US Steve Ruhl, San Diego, CA, US Thomas Ryskamp, Poway, CA, US			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Sammensetning omfattende et DTPA-derivat samt anvendelse derav
(56)	Anførte publikasjoner	J.Chem.Soc.,Perk. Trans. 1, no. 9, 7. Mai 1992, s. 1173-1178, Bioorganic & Medicinal Chemistry, vol. 5, no. 10, 1997, s. 1925-1934, J. Med. Chem., 1998, vol. 41, s 3546-3549
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for høyt utbytte regioselektiv syntese av DTPA-derivatet som eliminerer behovet for ionevekslings kromatografi separering av intermediater. Videre, ettersom denne fremgangsmåte gir en enkel regioisomer av chelatet, tilveiebringer den den regioespesifikke syntese av ønskede chelater nyttige som radiomerkende midler.



Foreliggende oppfinnelsen vedrører en sammensetning omfattende et regioisomert DTPA-derivat som angitt i krav 1. Et slikt regiospesifikt DTPA-derivat er anvendbart som bi-funksjonell chelatdanner i radioimmunoterapi og
5 avbildning.

Teknologisk bakgrunn

Det er en økende interesse i nye radiomerkende midler for avbildning, tumordeteksjon og immunoterapi, som reduserer de forskjellige ulempene til stede ved konvensjonelle mid-
10 ler.

Konvensjonelle midler er generelt basert på radioaktive halo-forbindelser, slik som radioaktive forbindelser basert på jodisotoper. Derimot representerer disse midler et antall begrensninger. For eksempel, er anvendelsen av jodisotoper svært begrenset ved den høye nedbrytningshastighet av karbon-jodbindingen, *in vivo*. En annen begrensning vedrører de mindre enn idelle emisjonskarakteristikker og fysiske halveringstid av jodradionuklider. Henholdsvis har det vært innsatser for å utvikle nye tumordeteksjonsmidler for å
15 overgå ulempene med halogen-baserte radioaktive merkende midler.

En måte å tilveiebringe mer effektiv avbildning og tumordeteksjonsmidler tilbys av organometalliske forbindelser i formen av komplekse metallradionuklider. Å koble av-
25 bildningen og tumordeteksjonsmidlet til proteinet blir vanligvis oppnådd gjennom en kovalent binding dannet mellom chelatet og proteinet ved acylering med aktiverte karbonyler, aromatisk diazoniumkobling, bromacetylalkylering eller gjennom tioureabindinger.

Derimot, tilveiebringer ikke eksisterende organometalliske
30 komplekser optimal effektivitet for radiomerkning og terapi. For eksempel, utover valget av en spesiell radioisotop, avhenger fremgangsrik tumordeteksjon og radioimmunoterapi,

også på valget av et effektivt chelat som lett slutter seg til et spesielt antistoff og tillater radionuklid-innsetting mens antistoffets integritet preserves.

5 Forskjellige faktorer må vurderes i designing av effektive radiometallchelaterte antistoff for avbildning og tumor-deteksjon, og/eller immunoterapi. For eksempel må effektive radionuklider utvelges ifølge deres fysiske, kjemiske og biologiske egenskaper. Et optimalt nuklid bør være rutinemessig tilgjengelig, lett å koble til MAb og ha en passende
10 fysisk halveringstid for selektivt å detektere og/eller eliminere det mål neoplastiske vev mens normalt vev spares.

MAb som tjener til å bære radionuklidet til tumormålet må være valgt basert på fordelingen av dets antigene mål og på spesifisiteten og bindingsaffiniteten av antistoffet til
15 dets mål.

Et annet aspekt å vurdere i designing av effektive radiometall-chelaterte antistoff vedrører valget av chelat-danneren (CA) anvendt for å koble radionuklidet til antistoffene. For eksempel må effektive radiometall-chelaterte
20 antistoff være stabile *in vivo*. Stabilitet *in vivo* avhenger av betingelsen at både chelat-bindingen og de radiomerkende prosedyrer ikke forandrer antistoffspesifisitet og biofordeling.

I tillegg, er valg og syntese av chelat-danneren kritisk
25 for å optimere tilstrekkeligheten mellom chelatet og det utvalgte radionuklid og MAb. Spesielt bør valget og syntesen av chelatet unngå upassende frigivning av radionuklidet *in vivo*. Dette aspekt er av største viktighet ved at de fleste vanlige problemer assosiert med konvensjonelle
30 chelat-dannerer er deres svikt i å binde og sikkert holde seg til antistoffet. Som en konsekvens, er det betydelig dissosiering av radionuklidet *in vivo* fra MAb-CA-komplekset før levering av disse midler til overflaten av tumorcellen. Akkumulering av frie toksiske radionuklider i normalt vev

skader normale vev uten fordelen av å behandle og/eller
detektere tumormålet. Et annet viktig aspekt vedrører
ønsket at den valgte chelat-danner tillater MAb-CA-kom-
plekset å beholde fordelen tilveiebrakt ved spesifisiteten
5 av det valgte MAb.

Derved må forskjellige kriterier vurderes i utvelgelsen av
tilfredsstillende chelater for en valgt MAb. For eksempel,
(a) tilsetning av CA bør ikke forandre spesifisiteten eller
bindeaffiniteten av MAb mot det antigene mål; (b) dets til-
10 setning til MAb bør ikke på annen måte skade antistoffet og
derved forandre dets hastigheter for katabolisering eller
mønstrer av vevsfordeling; (c) det bør holde radiometallet
sterkt slik at det ikke er noen prematur-elusjon av radio-
isotopen fra MAb-CA-komplekset *in vivo*; (d) binding til MAb
15 bør ikke forandre chelatets evnen til å beholde radionu-
klidet; (e) bindingsmåten til MAb bør være så spesifikk som
mulig for å lette utforming av protokoler for den
spesifikke deteksjon og terapi av tumormål samt analysen av
dataene relatert til deteksjonen og behandlingen av
20 tumorene; og (f) chelatet bør være i stand til å hjelpe til
å fjerne radionuklidet etterfølgende katabolisme av MAb-CA-
radionuklidkomplekset.

En gruppe egnete metallchelater er tilveiebrakt ved diety-
lentriaminpentaeddiksyre (DTPA) og etylendiamintetraed-
25 diksyre (EDTA) og deres derivater. Kjemiske modifiserte
derivater av (DTPA) og (EDTA) har blitt utforsket som
metall-ligander i stand til å effektivt chelaterer radio-
aktive metaller, som lett kan kobles til immunoglobuliner.
Derimot, var disse reagenser minimalt effektive grunnet
30 deres reduserte affinitet for det bundede radionuklid, og
konsekvente akkumulering av radiokjemiske forbindelser i
normalt vev.

Et antall konvensjonelle fremgangsmåter er tilgjengelige
for å koble EDTA- og DTPA-metallkomplekser til proteiner.
35 Derimot har disse fremgangsmåter ikke nådd de høye effek-

tivitets hastigheter nødvendig for effektiv avbildning og tumordeteksjon. For eksempel representerer konvensjonelle fremgangsmåter et antall ulemper, slik som behovet for ekstensiv rensing før radiomerking samt utilstrekkeligheten i å chelatere metallet som stammer fra anvendelsen av et metallbindende sete i dannelsen av den kovalente binding med proteinet. Derved har nye måter for proteinbinding blitt studert og nye måter som beholder alle metallbindende seter, har blitt foreslått.

- 10 For eksempel er en detaljert beskrivelse av kjemisk modifiserte ligander som ville reagere raskt og effektivt med antistoff, og som beholder metallet i et tidsrom som er langt sammenlignet med halveringstidene av radionuklider, nyttige for avbildning eller terapi, tilveiebrakt ved Brechbiel et al in "Synthesis of (1-(p-isothiocyanato-benzyl) derivatives DTPA and EDTA. Antibody Labeling and Tumor-Imagning Studies". Inorg. Chem. 1986, 25, 2772-2781.

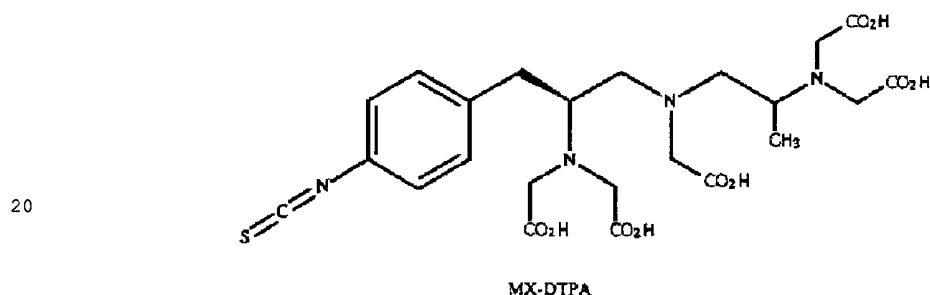
Brechbiel et al foreslår EDTA og DTPA kjemisk modifiserte chelater med en isotiocyanatgruppe som er i stand til effektivt å koble to proteiner. Syntesen av chelatene kan oppsummeres som en "to-trinnsprosess", hvori det første trinnet inkluderer å generere et etylendiamin eller et dietylentriamin etterfulgt av alkylering av aminene for å danne den tilsvarende polyeddiksyre, og det andre trinn inkluderer å konvertere en funksjonell gruppe av benzyl-substitusjon for å oppnå en reaktiv andel anvendbar for proteinkobling.

Derimot er den ovennevnte "totrinns"-prosess for syntesen av MX-DTPA- og EDTA-analogen begrenset til et lavt totalt utbytte på mindre enn 2%. Fremgangsmåten krever langsommelig rensing av intermediatene, som inkluderer kation og anionebytterkromatografi. I tillegg produserer syntesen både regioisomerer av MX-DTPA og har vist dårlig reproduserbarhet.

Oppsummering av oppfinnelsen

Nedenfor er det beskrevet en fremgangsmåte for å fremstille DTPA-derivater nyttige som chelatdannere i radioimmunoterapi og avbildning. Fremgangsmåten tilveiebringer en syntese av DTPA-derivater som gir høyt utbytte. Spesielt kan fremgangsmåten anvendes for regioselektiv syntese av DTPA-derivater egnet for å chelatere radioaktive metaller og kobling til immunoglobuliner. Fremgangsmåten inkluderer å koble et monobeskyttet diamin og en forbindelse inneholdende et amin og en andel i stand til å effektivt koble DTPA-derivatet til immunoglobuliner eller en andel i stand til å bli konvertert til effektivt å koble DTPA-derivatet til immunoglobuliner.

Foreliggende oppfinnelse angår en sammensetning omfattende regioisomeren med formel (I)



En slik forbindelse kan fremstilles ved: (a) å koble N-tert-butoksykarbonyl-p-nitro-L-fenylalanin (A) og monobeskyttet diamin (B) for å danne forbindelse (C); (b) å fjerne de aminbeskyttende grupper i (C) for å danne TFA-salter (D); (c) å redusere (D) for å danne (E); (d) å penta-alkylere (E) for å danne (F); (e) å fjerne de aminbeskyttende grupper i (F) for å danne trifluoreddiksyresaltet (G); (f) å redusere nitrogruppen i (G) for å danne trifluoreddiksyresaltet (H); og (g) å konvertere aminogruppen i (H) for å danne DTPA-derivatet.

Fremgangsmåten tillater å syntetisere MX-DTPA.

Ved fremgangsmåten kan det fremstilles MX-DTPA ved: (a) å koble N-tert-butoksykarbonyl-p-nitro-L-fenylalanin (A) og mono-N-tert-butoksykarbonyl beskyttet diamin (B') for å danne N-(2-N-Tert-butoksykarbonyl-aminopropyl)-N-tert-butoksykarbonyl-p-nitrofenylalaninamid (C'); (b) å fjerne boc-gruppene i (C') for å danne N-(2-Aminopropyl)-p-nitrofenylalaninamid TFA-salt (D'); (c) å redusere (D') for å danne 2-Metyl-6-(p-nitrobenzyl)dietylentriamin trihydroklorid (E'); (d) å penta-alkylere (E') for å danne N,N,-N',N'',N''-Pentakis[(tert-butoksykarbonyl)metyl]-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin (F'); (e) å fjerne boc-gruppene i (F') for å danne N,N,N',N'',N''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt (G'); (f) å redusere nitrogruppen i (G') for å danne N,N,N',N'',N''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-aminofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt (H'); og (g) å konvertere aminogruppen i (H') for å danne 2-(p-Isotiocyantobenzyl)-6-metyldietylentriamin-N,N,N',N'',N''-pentaeddiksyre (MX-DTPA).

Det kan også fremstilles MX-DTPA, hvori trinn (a) inkluderer å anvende benzotriazol-1-yloksytris(dimetyl-amino)fosfonium heksafluorofosfat (BOP) som koblende reagens.

Det kan også anvendes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori trinn (a) inkluderer å anvende bis(2-okso-3oksazolidinyl)fosfinklorid (BOP-Cl) som koblende reagens.

Det kan også fremstilles MX-DTPA, hvori det mono-boc beskyttede diamin (B') er oppnådd ved en fremgangsmåte som inkluderer (i) å behandle et laktonitril med ammoniumhydroksid for å danne α -aminonitril (2); (ii) å behandle (2) med saltsyre for å danne aminhydrokloridsaltet (3); (iii) å beskytte aminet med di-tert-butyldikarbonat for å danne det boc-beskyttede derivat (4); og (iv) å redusere nitrilet anvendende Raneynikkel med en mettet løsning av

etanol under to atmosfærer hydrogen for å danne det mono-boc beskyttede diamin (B').

Det kan også fremstilles MX-DTPA, hvori det mono-boc beskyttede diamin (B') oppnås ved en fremgangsmåte omfattende (i) å alkylere en Schiff Base (5) under faseoverføringsbetingelser for å danne et mono-alkylert produkt (6); (ii) å avbeskytte (6) med 1N-saltsyre etterfulgt av å beskytte aminet med di-tert-butyldikarbonat for å danne det boc-beskyttede amin (4); og (iii) å redusere (4) med Raney-nikkel for å danne det mono-boc beskyttede diamin (B').

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori fjerning av boc-gruppene i (C') for å danne (D') utføres anvendende trifluoreddiksyre i diklormetan.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori trinnet av å redusere (D') inkluderer å behandle (D') med boran-tetrahydrofurankompleks, etterfulgt av behandling av hydrogenklorid for å danne triaminhydrokloridsaltet (E').

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA hvori Penta-alkylering av intermediat (E') utføres anvendende acetonitril og kaliumkarbonat.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori Penta-alkylering av intermediat (E') utføres anvendende brom-tert-butylacetat i dimetylformamid og natriumkarbonat.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori (F') renses anvendende kolonnekromatografi på silikagel.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere MX-DTPA, hvori trinnet for å avbeskytte karboksylsyrene

(F') for å danne penta-eddiksyrederivatet (G') utføres
anvendende trifluoreddiksyre.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere
MX-DTPA, hvori reduisering av nitrogruppen i (G') for å
5 danne (H') utføres anvendende palladium på karbon under to
atmosfærer hydrogen i vann.

Det kan også benyttes en fremgangsmåte for å syntetisere
MX-DTPA, hvori trinnet for å konvertere (H') til MX-DTPA
inkluderer å konvertere aminen (H') "tile" isotiocyanat
10 funksjonalitet via tiofosgen. Konverteringen kan utføres på
forskjellige måter. For eksempel ved (i) å tilsette
tiofosgen til en bifaseblanding inneholdende penta-
eddiksyrederivatet (H) i kloroform og vann; (ii) å raskt
omrøre blandingen i to timer; (iii) å fjerne løsemidlet
15 under redusert trykk for å danne en rest; (iv) å rense
resten på reversert fase silika; og (v) å eluere med 25%
acetonitril i vann inneholdende 1% eddiksyre.
Konverteringen kan også utføres anvendende diklormetan og
trietylamin, eller acetonitril og natriumbikarbonat eller
20 natriumkarbonat.

Oppfinnelsen tilveiebringer en forbedret MX-DTPA-
sammensetning, hvori sammensetningen omfatter den aktuelle
regioisomer, relativt til hver annen regioisomer i en
mengde på minst 90 %, mer fordelaktig minst 95 %, og mest
25 fordelaktig minst 99 %.

I enda et annet aspekt, er oppfinnelsen rettet mot anven-
delsen av slik forbedret MX-DTPA-sammensetning for produk-
sjonen av protein eller antistoff chelator og radiomerket
form derav.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 er et reaksjonsskjema som oppsummerer syvtrinns prosessen for den regiospesifikke syntese av DTPA-derivater med formel (I).

- 5 Figur 2 er et reaksjonsskjema som oppsummerer syvtrinns prosessen for den regiospesifikke syntese av MX-DTPA.

Figur 3 er et firetrinns reaksjonsskjema for syntesen av (B').

- 10 Figur 4 er et alternativt reaksjonsskjema for syntesen for (B').

Figur 5 er et reaksjonsskjema for et alternativt trinn 1 i reaksjonsskjema i figur 2.

- 15 Figur 6 er et reaksjonsskjema som representerer mislykket kondensasjon av (B') med 4-nitro-L-fenylalaninmetylester (a) i metanol og (b) i toluen.

Figur 7 viser to alternative reaksjonsskjemaer (a) og (b) for alkyleringen av (E') for å danne (F').

Figur 8 er et alternativt reaksjonsskjema for konverteringen av (H') til MX-DTPA.

- 20 Figur 9 er et reaksjonsskjema som oppsummerer syvtrinns prosessen for den regiospesifikke syntese av CHx-DTPA.

Figur 10 er et skjema som avbilder regioisomerene av CHx-DTPA selektivt fremstilt ved fremgangsmåten av oppfinnelsen.

- 25 Figur 11 er et totrinns reaksjonsskjema for syntesen av (B'').

Detaljert beskrivelse av foretrukne utførelser

Med mindre annet er definert, har alle tekniske og vitenskapelige betegnelser benyttet heri de samme meningene som vanligvis forstått av fagpersonen som den oppfinnelsen tilhører. Selv om enhver metode og materiale like eller ekvivalente med de beskrevet heri kan benyttes i praksisen eller ut-testing av foreliggende oppfinnelsen, er de foretrukne fremgangsmåter og materialer beskrevet.

Som angitt ovenfor kan den aktuelle regioisomereren MX-DTPA fremstilles ved en fremgangsmåte for høyt utbytte regioselektiv syntese av kjemisk modifiserte DTPA-derivater som eliminerer behovet for ioneveksle kromatografisk separasjon av intermediater. Videre, ettersom denne fremgangsmåten gir en enkel regioisomer av chelatet, tilveiebringer den den regiospesifikke syntese av ønskede chelater nyttige som radiomerkende midler.

Mer spesifikt, er figur 1 et reaksjonsskjema som oppsummerer syvtrinnsprosessen for den regiospesifikke syntesen av DTPA-derivater med formel (I). I denne utførelse, fremstilles et DTPA-derivat med formel (I), ved: (a) å koble N-tert-butoksykarbonyl-p-nitro-L-fenylalanin (A) og et monobeskyttet diamin (B) for å danne forbindelse (C); (b) å fjerne de amin-beskyttende grupper i (C) for å danne TFA-saltet (D); (c) å redusere (D) for å danne (E); (d) å penta-alkylere (E) for å danne (F); (e) å fjerne de amin-beskyttende grupper i (F) for å danne trifluoreddiksyresaltet (G); (f) å redusere nitrogruppen i (G) for å danne trifluoreddiksyresaltet (H); og (g) å konvertere amino-gruppen i (H) for å danne DTPA-derivatet av formel (I).

Figur 2 inneholder et reaksjonsskjema som oppsummerer syvtrinns prosessen for den regiospesifikke syntese av MX-DTPA. Her utføres den regioselektive syntese av MX-DTPA i de følgende trinn: (a) å koble N-tert-butoksykarbonyl-p-nitro-L-fenylalanin (A) og mono-N-tert-butoksykarbonyl

beskyttet diamin (B') for å danne N-(2-N-Tert-butoksykarbonyl-aminopropyl)-N-tert-butoksykarbonyl-p-nitrofenylalaninamid (C'); (b) å fjerne boc-gruppene i (C') for å danne N-(2-Aminopropyl)-p-nitrofenylalaninamid TFA-salt (D'); (c) å redusere (D') for å danne 2-Metyl-6-(p-nitrobenzyl)dietylentriamin trihydroklorid (E'); (d) å penta-alkylere (E') for å danne N,N,N',N'',N''-Pentakis[(tert-butoksykarbonyl)-metyl]-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin (F'); (e) å fjerne boc-gruppene i (F') for å danne N,N,N',N'',N''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt (G'); (f) å redusere nitrogruppen i (G') for å danne N,N,N',N'',N''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-aminofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt (H'); og (g) å konvertere aminogruppen i (H') for å danne 2-(p-Isotiocyanatobenzyl)-6-metyldietylentriamin-N,N,N',N'',N''-pentaeddiksyre (MX-DTPA).

Fremgangsmåten for den regiospesifikke syntese av MX-DTPA har et totalt utbytte på omtrent 20 % som starter fra det mono-boc beskyttede diamin (B') og boc-p-nitro-L-fenylalanin (A) og kan endres til oppskalering. Derved, tillater syntetisering av MX-DTPA å oppnå totale synteseutbytter ved omtrent en størrelsesorden høyere enn det totale utbytte oppnådd med den tidligere fremgangsmåte (mindre enn 2 %). Videre nødvendiggjorde tidligere synteseprosesser rensing av et intermediat via omstendelig anion og kation-utvekslingskromatografi. I motsetning til dette eliminerer den beskrevne fremgangsmåten denne kostbare renseprosess og tilveiebringer målforbindelsen i høy renhet. For eksempel, er det kun nødvendig med normal fasekolonnekromatografi og en reversert fasekolonne for å rense sluttforbindelsen.

Figur 3 er et firetrinns reaksjonsskjema for syntesen av det mono-boc beskyttede diamin (B'). Syntesen av (B') er oppnådd via behandling av kommersielt tilgjengelig laktonitril med ammoniumhydroksid for å få α -aminonitrilet (2)

som ved behandling med saltsyre gir aminsalttsyresalt (3). Beskyttelse av aminet med di-tert-butyldikarbonat resulterer i det boc-beskyttede derivat (4). Reduksjon av nitri-
 5 letet anvendende Raneynikkel med en mettet løsning av etanol under to atmosfærer hydrogen gir det nødvendige mono-boc beskyttede diamin (B'). Denne reaksjonssekvens er delvis attraktivt fra et økonomisk synspunkt fordi det er reproduserbart og lett kan forandres til oppskalering.

Flere andre betingelser for fremstillingen av (B') ble også
 10 undersøkt. For eksempel, viser figur 4 et reaksjonsskjema for syntensen av (B'), hvori (B') er fremstilt ved å alkylere en Schiff-base (5) under faseoverføringsbetingelser for å produsere det mono-alkylerte produkt (6) i moderat utbytte. Avbeskyttelse av (6) med 1N-saltsyre etterfulgt av
 15 beskyttelse med di-tert-butyldikarbonat tilveiebringer det boc-beskyttede aminet (4) som ved reduksjon med Raneynikkel produserer det nødvendige mono-boc beskyttede diamin (B').

I en utførelse vist i figur 1, benytter syntesen N-tert-butoksykarbonyl-p-nitro-L-fenylalanin (A) som er koblet til
 20 det mono-N-tert-butoksykarbonyl beskyttede diamin (B'). Det foretrukne koblingsmiddel for å utføre dette trinn er benzotriazol-1-yloksytris(dimetylamino)fosfonium heksafluorofosfat (BOP). Disse betingelser tilater syntesen av forbindelse (C') i et isolert utbytte som varierer fra 72
 25 til 83%. Rensing av (C') kan oppnås via syre/basevask etterfulgt triturerer med heksaner.

Figur 5 er et reaksjonsskjema som representerer et alternativt trinn 1 i reaksjonsskjema i figur 2. Som vist i
 30 figur 5, resulterer anvendelse av bis(2-okso-3oksazolidinyl)fosfinklorid (BOP-Cl) også i dannelsen av det ønskede produkt (C'); derimot, er utbyttet for denne reaksjon 23% sammenlignet med utbyttet på 83% som kan oppnås med trinn 1 ifølge figur 2.

Andre reaksjonsveier for syntesen av (C') var mislykket. For eksempel, som vist skjematisk i figur 6, var innsatser for å generere et beslektet derivat av (C') via direkte kondensasjon av (B') med 4-nitro-L-fenylalaninmetylester
5 (1) enten ved (a) å omrøre i metanol eller (b) å oppvarme ved reflux i toluen ikke fremgangsrrike.

Når en gjennomførbar syntese er oppnådd for forbindelse (C'), kan de boc-beskyttende grupper deretter fjernes
anvendende trifluorediksyre i diklormetan for å danne
10 diaminet (D'). I denne fremgangsmåte, produseres (D') i kvantitativ utbytte (100 %) som et faststoff.

Som avbildet i figur 2, produserer reduksjonen av amidet (D') med et borantetrahydrofurankompleks, etterfulgt av
behandling med hydrogenklorid, det triaminsaltsyresalt
15 (E'). I tillegg til alkyleringstrinnet avbildet i figur 2, kan andre reaksjonsveier anvendes. For eksempel, viser figur 7 to reaksjonsskjemaer (a) og (b) for alkyleringen av (E') for å danne (F'). Penta-alkylering av intermediat (E') kan oppnås
20 anvendende brom-tert-butylacetat i dimetylformamid og natriumkarbonat som base eller alternativt anvendende acetonitril som løsemiddel og kaliumkarbonat. De siste betingelser er mer konduktive for oppskalering og eliminerer
anvendelsen av dimetylformamid som vanligvis er vanskelig å fjerne. Det isolerte utbytte for dette trinn er
25 i området av 60 % når reaksjonen tillates å fortsette i 72 til 96 timer. Rensing av (F') utføres fortrinnsvis via kolonnekromatografi på silikagel.

Som vist skjematisk i figur 2, kan penta-eddiksyrederivatet (G') oppnås ved avbeskyttelse av karboksylsyrene,
30 fortrinnsvis anvendende trifluorediksyre. Reduksjon av nitrogruppen oppnås anvendende palladium på karbon under to atmosfærer hydrogen i vann. Det bør noteres her at det er unngått
utilstrekkelighetene ved tidligere kjente synteseprosesser. For eksempel blir det unngått å anvende
35 ammoniumhydroksid, som er vanskelig å fjerne, å komplisere

synteseprosessen ved å kreve et trinn for å generere isotiocyanatet grunnet dannelsen av et tiourea biprodukt.

Slutt-trinnet i reaksjonsskjema i figur 2 vedrører å konvertere aminet til det aktuelle isotiocyanatet via
5 tiofosgen. I dette henseende er det undersøkt forskjellige operasjonsbetingelser.

De foretrukne betingelser for å konvertere (H') til MX-DTPA er avbildet i det siste trinnet av skjemaet i figur 2. Disse betingelser inkluderer å tilsette tiofosgen til en
10 bi-faset blanding inneholdende penta-eddiksyrederivatet (H') i kloroform og vann og raskt omrøre blandingen i to timer. Fjerning av løsemidlet under redusert trykk etterfulgt av rensing av resten på reversert fasesilika og eluering med 25% acetonitril i vann inneholdende 1% eddik-
15 syre produserte målforbindelsen MX-DTPA i godt utbytte.

Andre operasjonsbetingelser har også blitt undersøkt. For eksempel viser figur 8 et reaksjonsskjema for konverteringen av (H') til MX-DTPA anvendende diklormetan som løsemiddel og trietylamin som en base. Derimot i tillegg
20 til MX-DTPA, produserer reaksjonen også trietylaminsaltsyre som et biprodukt som ikke lett kunne fjernes.

Konvertering av (H') til MX-DTPA kan også utføres anvendende acetonitril som løsemiddel og natriumbikarbonat eller natriumkarbonat som base. Denne reaksjon produserte også
25 andre urenheter.

MX-DTPA kan effektivt anvendes i forskjellige applikasjoner som krever en chelatdanner. For eksempel tilveiebringer MX-DTPA effektive radiomerkende chelatdannere, antistoff-
chelattannere og protein-chelatdannere. Radiomerket MX-DTPA
30 tilveiebringer et effektivt verktøy for forskjellige applikasjoner, slik som scintigrafi, radioterapi og radioimmunoassy.

I dette henseende, presenterer fremgangsmåten for syntesen av MX-DTPA et antall fordeler. For eksempel, krever ikke prosessen kation og anion utvekslingskromatografi nødvendig for den omstendelige rensing av intermediater. Å unngå behovet for kation og anion utvekslingskromatografi tilveiebringer en fremgangsmåte som lett kan oppskaleres.

En annen fordel vedrører det høye utbytte gitt ved fremgangsmåten. Som beskrevet over, må chelater effektive for anvendelse i radioimmunotester lett være tilgjengelige i tilstrekkelige mengder for å tilfredsstille en potensiell høy etterspørsel. Den aktuelle fremgangsmåten kan tilveiebringe MX-DTPA med et utbytte så høyt som 20%, en størrelsesorden høyere enn eksisterende fremgangsmåter for syntetiserende MX-DTPA.

De aktuelle MX-DTPA-chelater har høy renhet. Å tilveiebringe chelatet i en ren form tilveiebringer et antall fordeler, slik som lettere kondisjonering og fremstilling av chelaterte MAb-er, hvori nærværet av uønskede biprodukter er minimert. Å minimere urenheter i de syntetiserte chelater tillater lettere kondisjonering av chelatet for biologiske anvendelser.

Uten å ønske å være bundet av noen teori, kan regiospesifikk syntese av MX-DTPA oppnås ved å anvende forbindelse (A) i formen av en enkel isomer. Når en spesiell isomer av forbindelse (A) er valgt for å starte synteseprosessen, beholdes konfigurasjonen rundt det chirale karbon i (A) gjennom synteseprosessen.

Å anvende MX-DTPA i formen av en enkel regioisomer presenterer flere fordeler. For eksempel i anvendelse av en enkel isomer av MX-DTPA bedre scintigrafi-resultater og unngår tapet av optisk signal assosiert med anvendelsen av racemiske blandinger. Å anvende en enkel isomer tillater også design av MAb-CA-komplekser med høy spesifisitet. I dette henseende tillater anvendelse av en enkel isomer alle

chelatomolekyler i å bindes til MAb på hovedsakelig samme måte.

En annen fordel med å spesifikt syntetisere en enkel regio-
isomer av MX-DTPA vedrører kontrollen tilveiebrakt for
5 posisjoneringen av det chelaterte radionuklid i relasjon
til MAb og til slutt til måltumoren. Å kontrollere posi-
sjoneringsen av radionuklidet er mulig gjennom anvendelsen
av en enkel isomer av MX-DTPA. Fordeler med å tilveiebringe
en enkel måte for binding ved å anvende en enkel isomer
10 inkluderer den potensielle forbedring i avbildning og immu-
noterapeutiske resultater oppnådd med MAb-CA-komplekset.

De aktuelle MX-DTPA-chelatet er egnet for å chelatere en
variasjon av radionuklider. Chelatet er også egnet for
kompleksring med en variasjon av MAbs og proteiner. Derved
15 er det forventet at MX-DTPA produsert i henhold til den
regiospesifikke syntese tilveiebringer like effektiv
radiomerking og terapeutiske midler når kombinert med
enhver radionuklid eller MAb egnet for kombinasjon med MX-
DTPA.

20 I en utførelse blir MX-DTPA konjugert til 2B8-antistoff for
å danne 2B8-MX-DTPA. 2B8 er et anti-CD20-antistoff vist å
påvirke B-celle utmattelse ved administrasjon til lymfom-
pasienter. Detaljerte protokoler for å danne 2B8-MX-DTPA
beskrevet i detalj i US patentnr. 5.736.137.

25 Derimot, bør det være åpenbart for fagpersonen at de
aktuelle MX-DTPA-chelatdannere kan anvendes i
radiomerkingen av andre anti-CD20-antistoffer, eller
ethvert annet antistoff som har blitt konjugert til DTPA
eller annen polyvalent chelatdanner. MX-DTPA-chelatet kan
30 også bli festet til andre proteiner og peptider, for
eksempel, reseptorer, hormoner, vekstfaktorer, slik som
somatostatoneptider.

Eksempler

Kommersielt tilgjengelige reagenser og HPLC-grad eller vannfrie løsemidler ble anvendt uten videre rensing. Normal fasekolonnekromatografi og TLC ble utført på ICN-silikagel (63-200, 60A) og Merck silikagel (60A) med fluorescerende indikator henholdsvis. Reversert fasekolonnekromatografi og TLC ble utført på EM Science LiChroprep RP-18 (40-63 µm) og Techware RPS-F reversert fasehydrokarbon impregnert silikagel med fluorescerende indikator henholdsvis.

10 Syntese av 1-N-tert-butoksykarbonyl-2-metyl-etylendiamin (B')

a. 2-Aminopropannitrilhydroklorid (3)

En blanding inneholdende 23,1 g (324,99 mol) laktonitril (teknisk grad 90% renhet), 7,1 g (132,74 mmol) ammoniumklorid og 86 ml (2.208,3 mmol) ammoniumhydroksid ble til-

15 latt å omrøres ved romtemperatur i 2 timer. Reaksjonen ble ekstrahert med diklormetan (2 x 500 ml) og den organiske fase tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Blandingen ble filtrert og løsemidlet fjernet under redusert trykk for å

20 produsere 24 g av en gulolje (2). Guloljen ble fortynnet med 250 ml vannfri dietyleter og avkjølt i en isbad. Deretter ble 350 ml (350 mmol) av 1N-saltsyre i eter tilsatt. Etter omrøring i 10 minutter, ble det resulterende faststoff filtrert, vasket med eter og tørket under vakuum

25 for å gi 28,79 produkt med et utbytte på 92,83% basert på renheten av utgangslaktonitrilet.

b. N-tert-butoksykarbonyl-2-aminopropannitril (4):

Til en blanding inneholdende 28,5 g (268,79 mmol) 2-aminopropannitrilhydroklorid i 300 ml vannfritt diklormetan ble

30 det tilsatt 104 ml (746,16 mmol) trietylamin. Blandingen ble avkjølt i et isbad etterfulgt av tilsetning av 64,5 g (295,53 mmol) di-tert-butyldikarbonat i 100 ml vannfri

diklormetan over 30 minutter. Reaksjonen ble tillatt å varme til romtemperatur under omrøring i 48 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom en glass-sintrert trakt og filtratet ble redusert under redusert trykk. 1 l
 5 dietyleter ble tilsatt og blandingen ble tillatt å omrøre i 15 minutter. Blandingen ble igjen filtrert gjennom en glass-sintrert trakt for å fjerne det gjenværende trietylaminhydroklorid. Filtratet ble konsentrert under redusert trykk. Kolonnekromatografi av resten på silikagel
 10 eluert med 30% etylacetat/heksaner ga 18,50 g produkt med et utbytte på 40,44%.

c. 1-N-tert-butoksykarbonyl-2-metyl-etylendiamin (B'):

Til en 500 ml Parr-flaske ble det tilsatt 18,4 g (108,10 mmol) N-tert-butoksykarbonyl-2-aminopropannitril og 200 ml
 15 absolutt etanol mettet med ammoniakk. Raneynikkel ble deretter tilsatt, (10 g av en 50 % slurry i vann) og flasken ble trykksatt til 50 psi hydrogengass og utluftet. Flasken ble igjen trykksatt til 50 psi hydrogengass og utluftet. Deretter ble flasken trykksatt til 50 psi
 20 hydrogengass og ristet inntil det ikke var mer opptak av hydrogen, som vanligvis oppnås over natten. Flasken ble utluftet og blandingen filtrert gjennom en pute celitt 521. Filtratet ble konsentrert under redusert trykk for å gi 19,2 g produkt som en fargeløs olje med fullstendig utbytte
 25 (100 %).

Alternativt kan 2-Amino-propannitrilhydroklorid (3) fremstilles fra N-(Difenylmetylen)aminoacetonitril som følger:

a. N-(Difenylmetylen)-2-metyl-aminoacetonitril (6):

Til en løsning inneholdende 50 g (226,98 mmol) N-(difenyl-
 30 metylen)aminoacetonitril i 250 ml toluen ble det tilsatt 4,5 g (19,76 mmol) benzytrietylammoniumklorid (BTEAC) etterfulgt av tilsetning av 28,3 g (707,50 mmol) natriumhydroksid i 50 ml vann. Reaksjonen ble avkjølt i et isbad

etterfulgt av en dråpevis tilsetning av 22 ml (232,51 mmol) av metylsulfat i 1 time. Reaksjonen ble tillatt å oppvarme seg til romtemperatur over 24 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 1 liter diklormetan og ble vasket med
 5 vann (2 x 1 l). Den organiske fase ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Filtrering, fjerning av løsemiddel og kolonnekromatografi av resten på silikagel ved elusjon med 20% etylacetat/heksaner ga 46,2 g produkt med et utbytte på 62,05%.

10 b. 2-Amino-propannitrilhydroklorid (3):

En blanding inneholdende 3,0 g (12,80 mmol) N-difenylmetylen-2-metyl-aminoacetonitril i 30 ml heksan og 25 ml (25 mmol) 1N vandig saltsyre ble tillatt å omrøres ved romtemperatur i 72 timer. Den vandige fase ble separert og vasket
 15 med heksan. Konsentrasjon av den vandige fase under redusert trykk ga 1,25 g av produkt med et utbytte på 92,10%.

N-(2-N-Tert-butoksykarbonyl-aminopropyl)-N-tert-butoksykarbonyl-p-nitrofenylalaninamid (C'):

Til en løsning inneholdende 25 g (80,57 mmol) av N-t-boc-p-nitro-L-fenylalanin i 300 ml vannfri diklormetan ble det
 20 tilsatt 12,5 ml (89,68 mmol) trietylamin etterfulgt av 37 g (83,66 mmol) benzotriazol-1-yloksytris(dimetylamino)fosfoniumheksafluorofosfat (BOP). Etter omrøring ved romtemperatur i 1 time, ble 15,1 g (86,66 mmol) 1-N-tert-butoksykarbonyl-2-metyl-etylendiamin i 40 ml vannfri diklormetan
 25 tilsatt. Reaksjonen ble tillatt å omrøres ved romtemperatur i 20 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 300 ml diklormetan og vasket med 1N vandig saltsyre (2 x 500 ml), mettet vandig natriumbikarbonat (2 x 500 ml) og vann (1 x
 30 500 ml). Den organiske fase ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Filtrering og fjerning av løsemiddel under redusert trykk ga et gult faststoff. Heksaner ble deretter tilsatt (600 ml) og blandingen tillatt å omrøres i 20

minutter. Faststoffet ble filtrert og tørket for å gi 27,0 g (71,83%) av produkt som et hvitt faststoff.

N-(2-Aminopropyl)-p-nitrofenylalaninamid TFA-salt
(D'):

5 Til en løsning inneholdende 26,50 g (56,80 mmol) av N-(2-N-Tert-butoksykarbonyl-aminopropyl)-N-tert-butoksykarbonyl-p-nitrofenylalaninamid i 300 ml diklormetan ble det tilsatt 65 ml (843,77 mmol) trifluoreddiksyre. Reaksjonen ble til-
latt å omrøres ved romtemperatur i 1 time. Løsemidlet ble
10 fjernet under redusert trykk etterfulgt av tilsetningen av 500 ml vannfri dietyleter. Det resulterende faststoff ble filtrert gjennom en glass-sintrert trakt og vasket med 400 ml dietyleter. Faststoffet ble tørket under vakuum for å gi 32,0 g (100 %) produkt inneholdende noen rest trifluored-
15 diksyre og dietyleter. Materialet anvendes uten videre rensing.

2-Metyl-6-(p-nitrobenzyl)dietylentriamintrihydroklorid
(E')

Til en løsning inneholdende 35 g (70,80 mmol) N-(2-amino-
20 propyl)-p-nitrofenylalaninamid TFA-salt i 500 ml vannfritt tetrahydrofuran ble det tilsatt 500 ml av 1M-boran-tetrahydrofurankompleks over 30 minutter. Reaksjonen ble opp-
varmet ved reflux i 16 timer. Etter avkjøling av reak-
sjonen i et isbad, ble 122 ml metanol sakte tilsatt for å
25 eliminere overskuddet av boranreagens. Etter fullstendig gassutvikling, ble løsemidlet fjernet under redusert trykk. Resten ble tatt opp i 265 ml absolutt etanol og løsningen ble mettet med saltsyre (g) under avkjøling i isbad. Blandingen ble deretter fortynnet med 200 ml vannfritt
30 dietyleter og det resulterende faststoff filtrert og tørket under vakuum for å gi 19,39 g produkt med et utbytte på 75,72 %.

N,N,N',N'',N'''-Pentakis[(tert-butoksykarbonyl)metyl]-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin (F'):

Til en blanding inneholdende 19,0 g (52,53 mmol) 2-metyl-64
p-nitrobenzyl)dietylentriamintrihydroklorid i 550 ml vann-
5 fritt acetonitril ble det tilsatt 86,60 g (626,58 mmol)
kaliumkarbonat etterfulgt av 42 ml (284,44 mmol) tert-
butylbromacetat. Etter omrøring ved romtemperatur i 90
timer, ble reaksjonen fortynnet med 500 ml vann og ekstra-
hert med etylacetat (2 x 500 ml). Den organiske fase ble
10 tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Filtrering og
fjerning av løsemidlet under redusert trykk ga en gul olje.
Kolonnekromatografi av denne olje på silikagel ved eluering
med 30% etylacetat/heksaner ga 26,37 g produkt med et ut-
bytte på 60,99%.

15 N,N,N',N'',N'''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-nitro-
fenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt
(G'):

En løsning inneholdende 5,0 g (6,08 mmol) N,N,N',N'',N'''-
pentakis[(tert-butoksykarbonyl)metyl]-2-[(4-nitrofenyl)-
20 metyl]-6-metyldietylentriamin i 35 ml trifluoreddiksyre ble
tillatt å omrøre ved romtemperatur i 48 timer. Løsemidlet
ble fjernet under redusert trykk og det resulterende fast-
stoff tørket under vakuum for å gi 4,02 g produkt som et
blekt gult faststoff med et utbytte på 74,75%.

25 N,N,N',N'',N'''-Pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-amino-
fenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt
(H'):

Til en Parr-flaske ble det tilsatt 3,40 g (3,84 mmol) N,N,-
N',N'',N'''-pentakis(karboksymetyl)-2-[(4-nitrofenyl)metyl]-
30 6-metyldietylentriamin trifluoreddiksyresalt og 50 ml vann
etterfulgt av tilsetningen av 0,3 g 5% palladium på karbon.
Flasken ble trykksatt til 30 psi hydrogen og utluftet to
ganger. Beholderen ble deretter trykksatt til 45 psi hydro-

gen og ristet. Når hydrogenopptaket sluttet, typisk etter 2 til 4 timer, ble flasken luftet og blandingen filtrert gjennom en pute celitt. Celitten ble vasket med 20 ml vann. Filtratet ble konsentrert under redusert trykk for å gi
 5 3,02 g produkt med et utbytte på 92,03%. De spektrale data oppnådd for dette produkt er sammenfallende med de av en referansestandard.

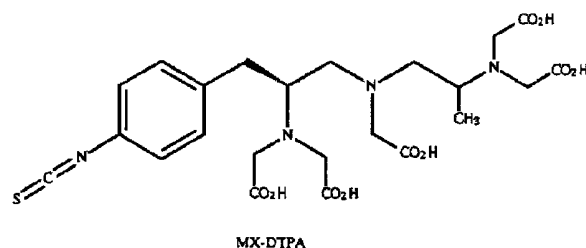
2-(p-Isotiocyanatobenzyl)-6-metyldietylentriamin-N,N,-N',N'',N''-pentaeddiksyre (MX-DTPA)

10 I en 1 l rundbunnet flaske utstyrt med en magnetisk omrører, ble 7,0 g (7,23 mmol) N,N,N',N'',N''-Pentakis-(karboksymetyl)-2-[(4-aminofenyl)metyl]-6-metyldietylentriamin-trifluoreddiksyresalt tilsatt til en blanding inneholdende 150 ml vann og 300 ml kloroform, etterfulgt av
 15 4,67 g (44,06 mmol) natriumkarbonat. Den resulterende løsning hadde en pH på omtrent 9,0. Til denne bifaseblanding ble det tilsatt 0,64 ml (8,39 mmol) tiofosgen og løsningen ble tillatt å omrøre ved romtemperatur i 2 timer. Løsemidlet ble fjernet under redusert trykk for å danne en
 20 rest. Resten ble løst i 15 ml 1 % eddiksyre i vann og plassert på en reversert fase silikagel kolonne som eluerte med 1% eddiksyre etterfulgt av 25% acetonitril/vann inneholdende 1% eddiksyre. Fraksjonene inneholdende produktet ble samlet og løsemidlet fjernet under redusert trykk for å
 25 gi 2,47 g produkt som et blekt gult faststoff i et utbytte på 61,60 %.

P A T E N T K R A V

1. Sammensetning omfattende regioisomeren 2-(p-isotiocyanatobenzyl)-6-metyldietylentriamino-N,N,N',N'',N''-pentaeddiksyre (MX-DTPA) av formelen:

5



10 hvor prosentdelen av nevnte regioisomer i forhold til enhver annen regioisomer, er minst 90%.

2. Anvendelse av sammensetningen ifølge krav 1 for fremstilling av et radiomerket MX7DTPA.

3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor det radiomerkede MX-DTPA er bundet til et protein.

15 4. Anvendelse ifølge krav 3, hvor proteinet er et antistoff.

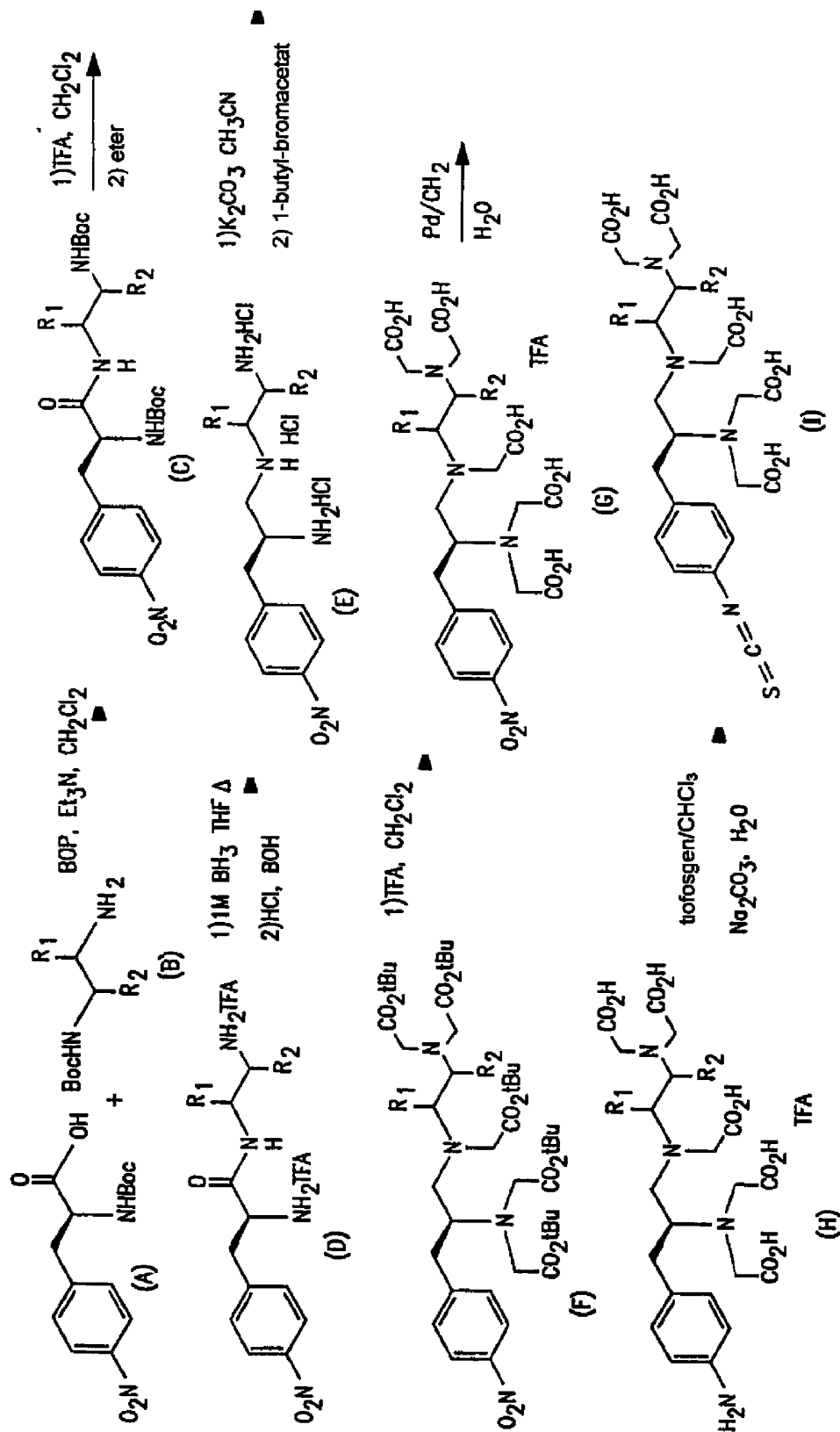


FIG. 1

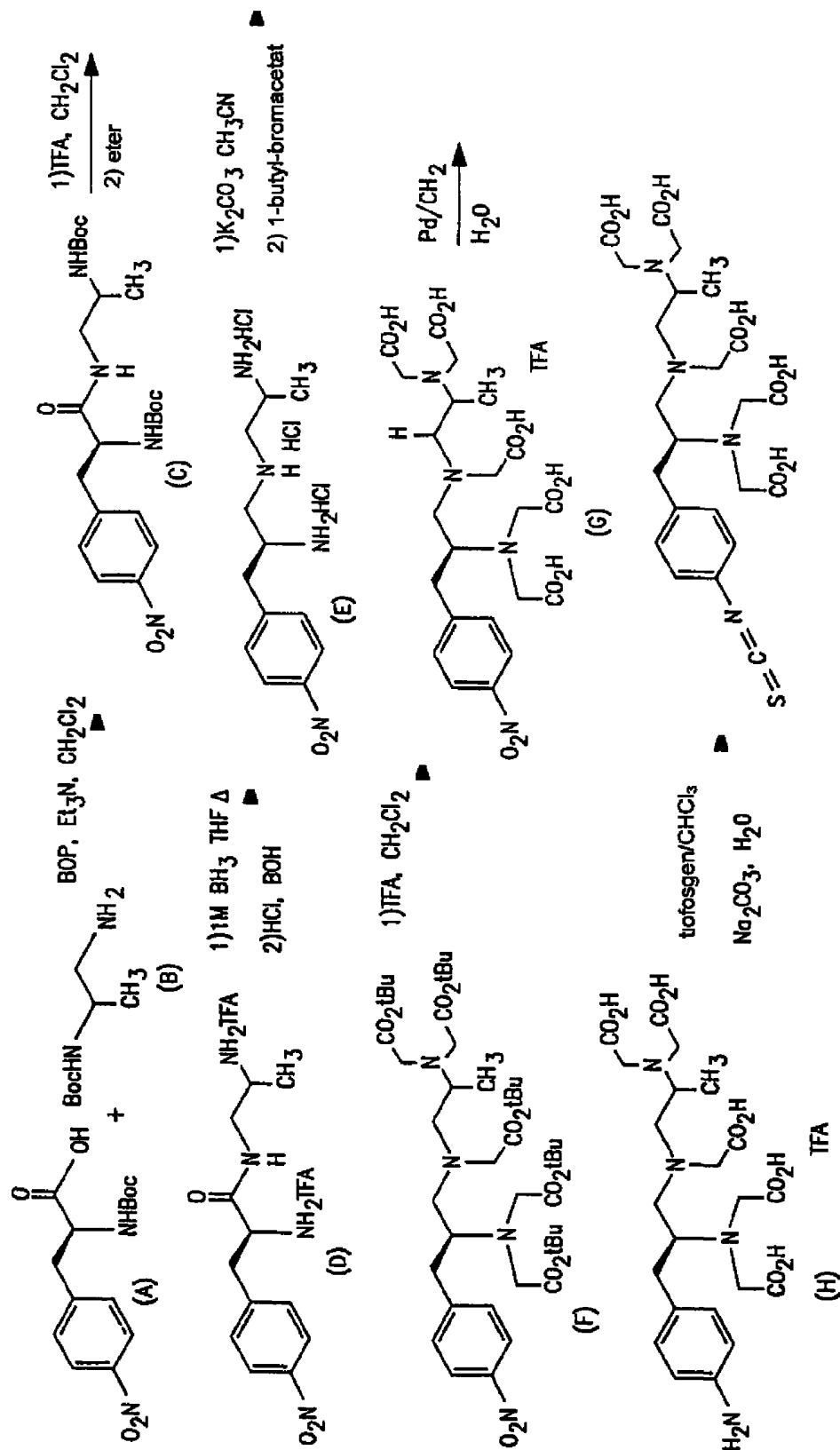


FIG. 2

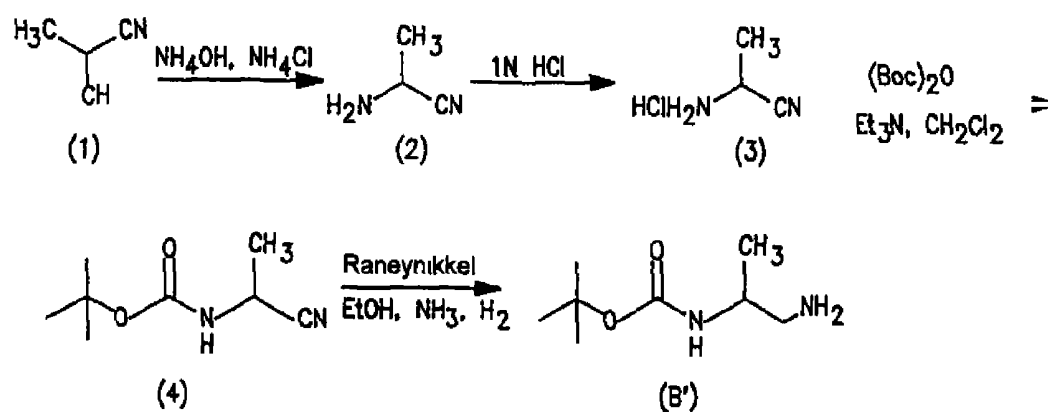


FIG. 3

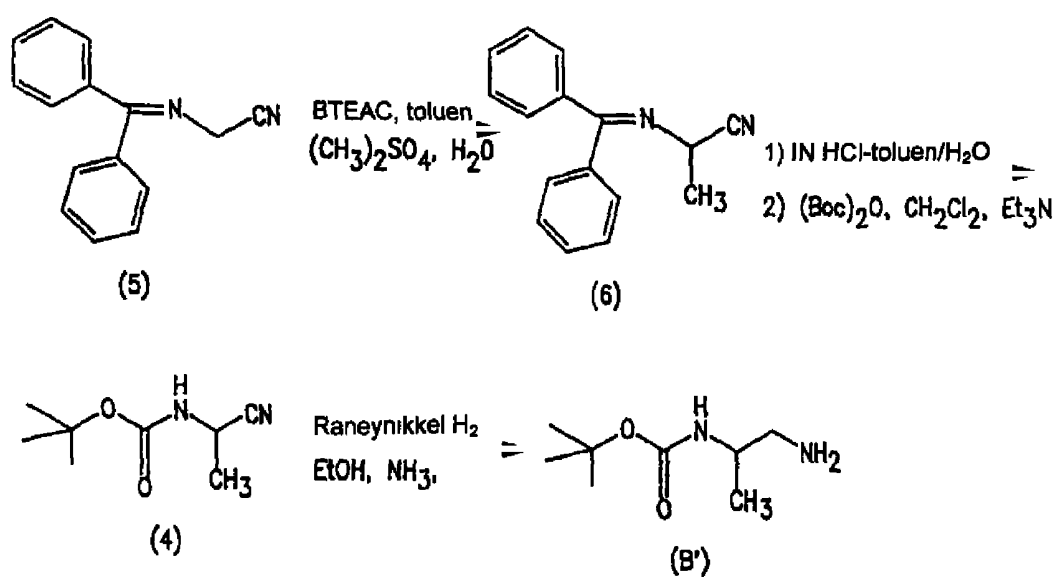


FIG. 4

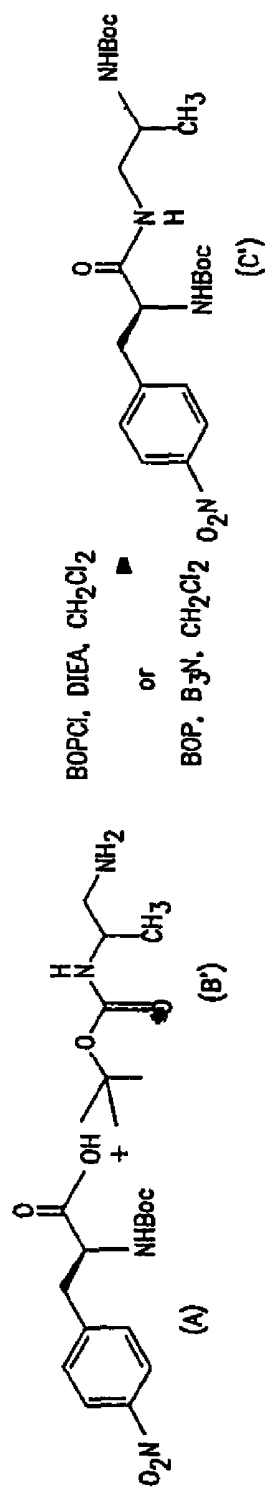
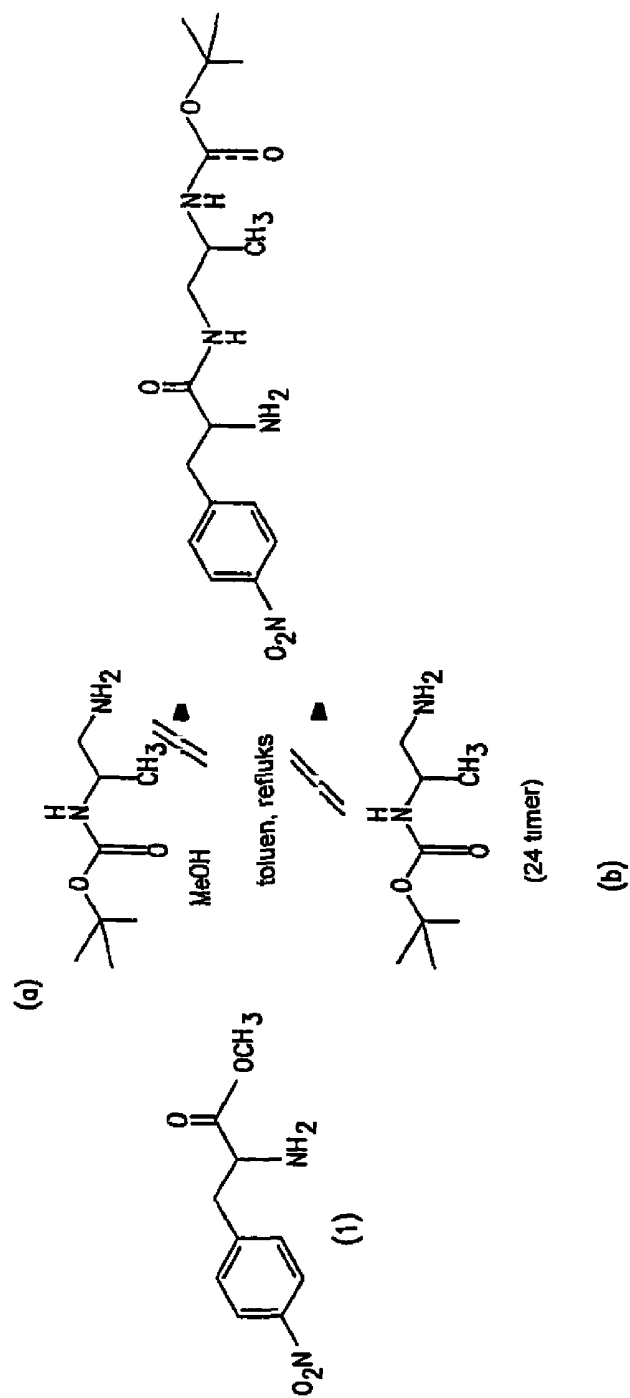


FIG. 5



65F

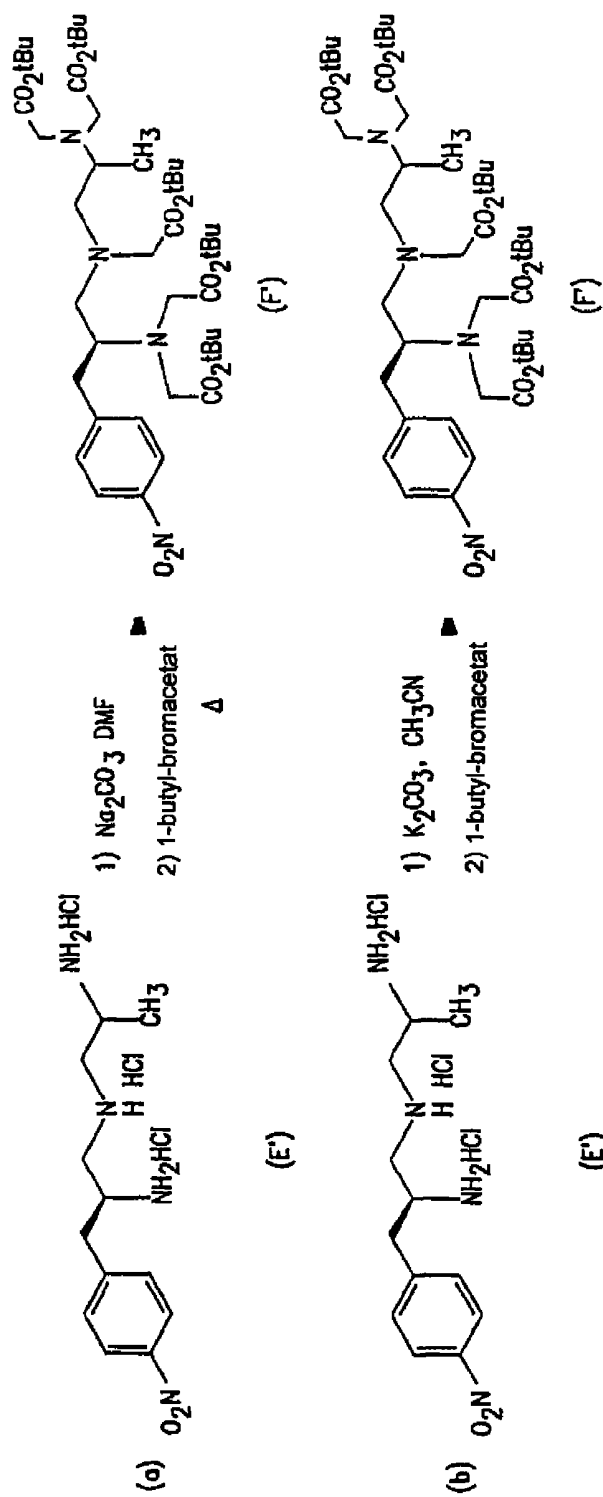


FIG. 7

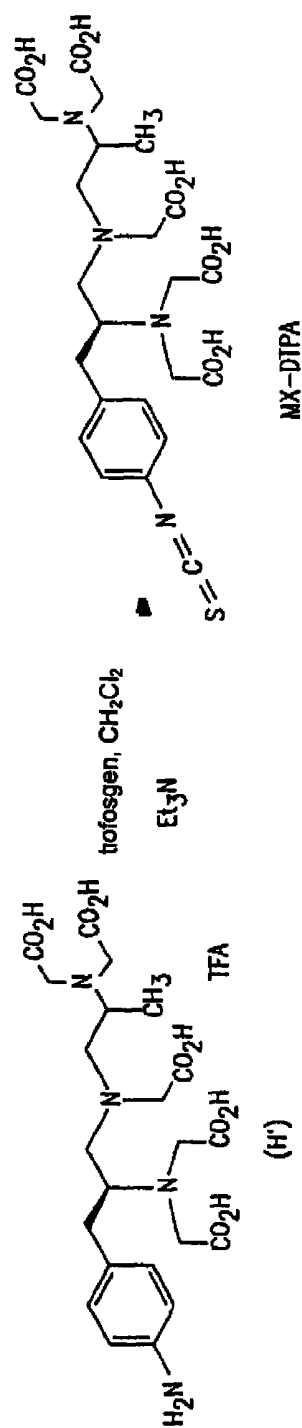


FIG. 8

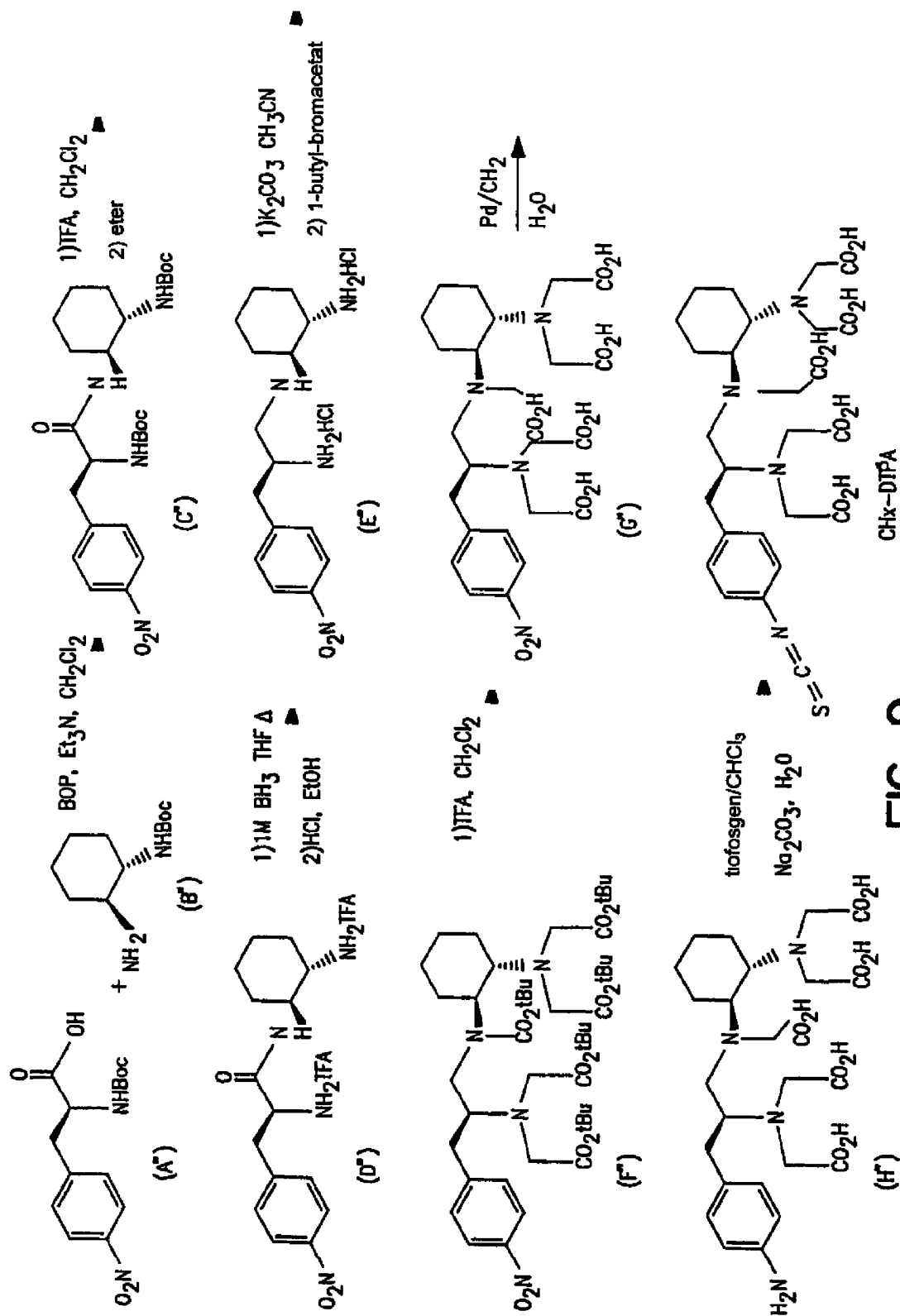


FIG. 9

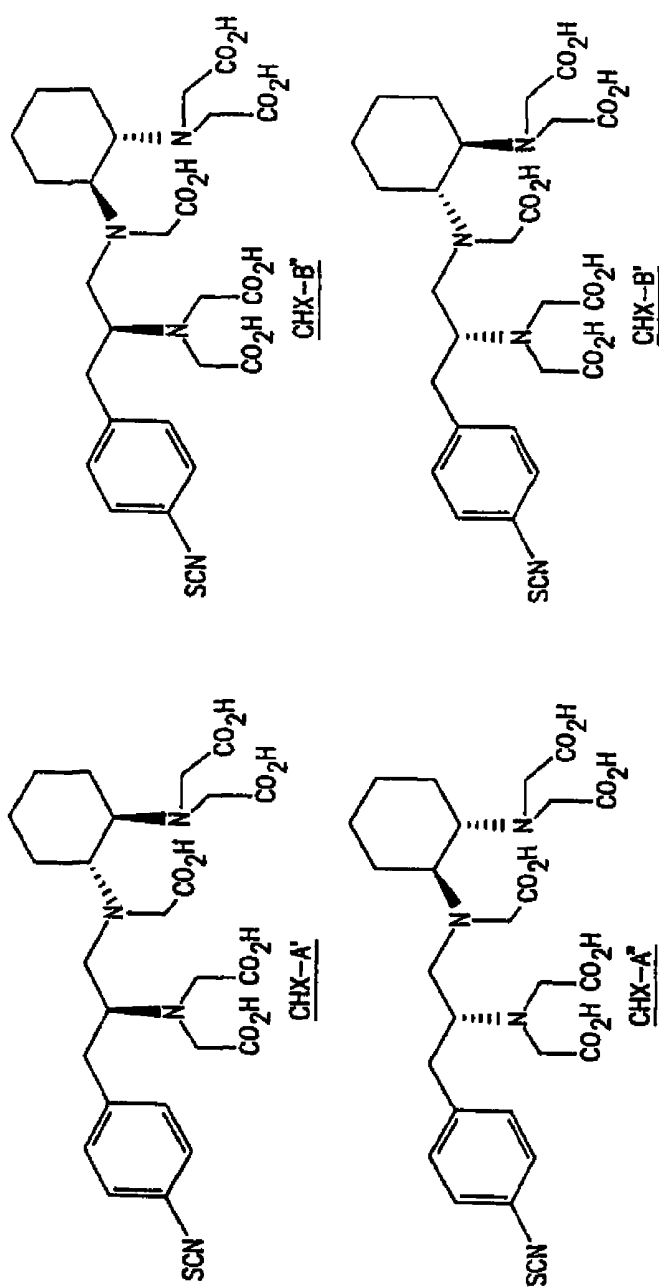


FIG. 10

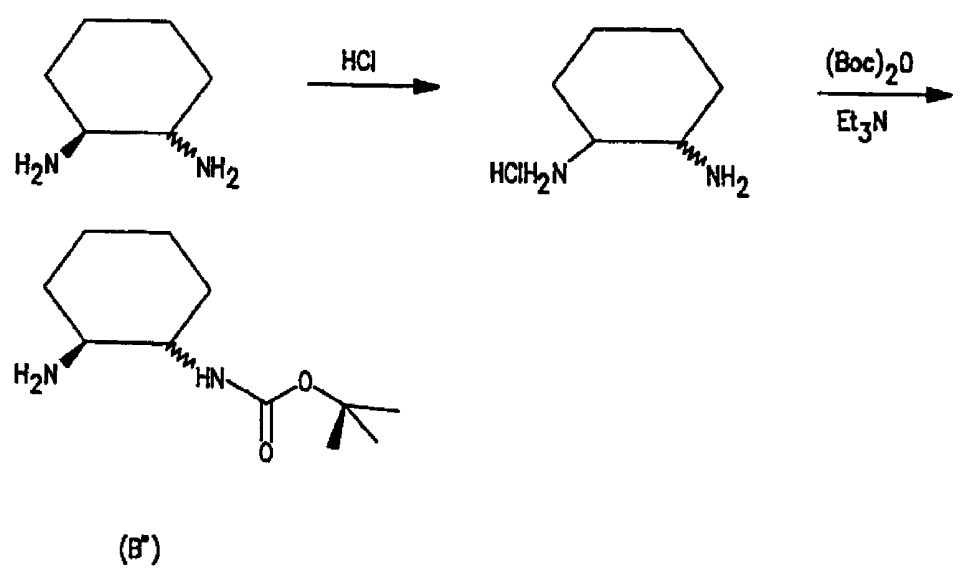


FIG. 11