



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102001900909435
Data Deposito	16/02/2001
Data Pubblicazione	16/08/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

AMMINODERIVATI DELLA BIOTINA E LORO CONIUGATI CON CHELANTI MACROCICLICI.

**AMMINODERIVATI DELLA BIOTINA E LORO CONIUGATI
CON CHELANTI MACROCICLICI**

Settore tecnico

La presente invenzione si riferisce a biotine modificate, utili per
5 la preparazione di coniugati con radionuclidi per uso in terapia e
diagnosi umana e animale, in particolare per la diagnosi e il
trattamento di alterazioni patologiche, quali i tumori.

La presente invenzione si riferisce al settore tecnico della
preparazione di medicinali.

10 La presente invenzione fornisce composti, metodi per la loro
preparazione, metodi per il loro utilizzo e composizioni che li
comprendono atte all'applicazione industriale nel settore
farmaceutico.

La presente invenzione fornisce composti, composizioni e
15 metodi adatti per il trasporto e il rilascio di sostanze utili in medicina
diagnostica e terapeutica, come le tecniche di acquisizione di
immagine e i trattamenti di alterazioni patologiche di organi e
tessuti.

In particolare, ma non in modo esclusivo, la presente
20 invenzione si riferisce al settore dei radiofarmaci antitumorali,
intendendo sia le sostanze utili a scopo diagnostico, sia le sostanze
utili a scopo preventivo o terapeutico.

Sfondo dell'invenzione

La terapia dei tumori è per la maggior parte esercitata mediante l'utilizzo di sostanze mirate all'uccisione della cellula neoplastica. Questo può essere ottenuto con sostanze citotossiche, che devono entrare nella cellula tumorale per poter esercitare appieno il loro effetto, oppure mediante trattamento della cellula tumorale con radiazioni aventi un'energia sufficiente ad uccidere la cellula stessa. In entrambi i casi, esiste il problema di portare la sostanza quanto più selettivamente possibile sulla cellula bersaglio, in modo da evitare possibili danni alle cellule sane circostanti. Nel caso di radiofarmaci, ossia sostanze che recano delle porzioni radioattive, è particolarmente sentito il problema di portare selettivamente la parte attiva (ossia la porzione radioattiva) sul bersaglio tumorale, evitando quanto possibile la diffusione del radionuclide nell'organismo o l'interazione con cellule sane circostanti il tumore.

Come discussione di tutta la problematica, e le soluzioni proposte finora, si vedano i brevetti US 5.283.342, US 5.608.060 e US 5.955.605, della Neorex, facenti capo a una domanda depositata il 9 giugno 1992. Tali brevetti sono qui specificamente incorporati per riferimento.

In questi documenti si affronta, tra l'altro, il problema della resistenza della molecola recante il radionuclide agli attacchi metabolici dell'organismo. Nello specifico, il caso trattato con

maggior attenzione è la molecola di biotina, che rappresenta una delle scelte primarie nel portare il radionuclide sul tumore bersaglio, grazie alla sua nota interazione con le avidine. La biotina, come da prassi consolidata, è legata alla porzione chelante il radionuclide, ad esempio una molecola di DOTA, attraverso un ponte ("linker").
5 Infatti, i brevetti della Neorex si pongono il problema della resistenza del complesso costituito dalla molecola di biotina, così collegata al radionuclide attraverso il "linker", alle biotinidasi, enzimi che spaccano il legame peptidico presente nel complesso. Tale legame è
10 originato dall'unione del chelante e la biotina.

Tra le caratteristiche altamente desiderate, la molecola deve essere eliminata dall'organismo in maniera rapida ed efficiente, e deve essere sufficientemente piccola (p.m. < 1000) per permettere la sua facile distribuzione nel fluido extracellulare dove si legherà al
15 tumore. Inoltre, deve dimostrare di essere stabile in vivo con minimo grado di cattura da parte delle cellule non tumorali, rapida eliminazione (renale) e non deve essere metabolizzata.

A queste caratteristiche si aggiunge la necessità di una certa stabilità tra la parte biotina e la porzione chelante della molecola.

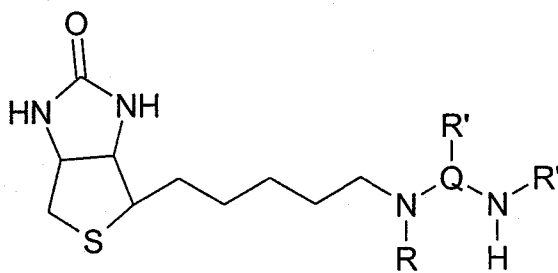
20 Infatti, la porzione chelante non si deve liberare in vivo, rilasciando parti della molecola potenzialmente pericolose per l'organismo. È evidente all'esperto del settore il problema del rilascio del radionuclide dalla parte chelante, comprendente ioni di metalli del tutto estranei all'organismo, quando addirittura dotati di

radioattività di vario tipo, fino ad arrivare a radiazioni ad elevata energia, quindi altamente dannose.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora trovato che il composto di formula (I), come sotto
 5 rappresentato, non solo risponde ai requisiti richiesti a un tale
 composto nella terapia e diagnostica dei tumori o di altre patologie
 rilevabili e trattabili con tale genere di composti, ma anche presenta
 il vantaggio di non sottostare a reazioni metaboliche che possano
 liberare la parte complessante della molecola. In tal modo, la
 10 molecola sarà eliminata dall'organismo in forma inalterata e
 completa, ovviando così al problema della possibile liberazione della
 parte chelante, comprensiva dello ione metallico imprigionato nella
 stessa.

Pertanto, è un oggetto della presente invenzione un composto
 15 di formula (I)

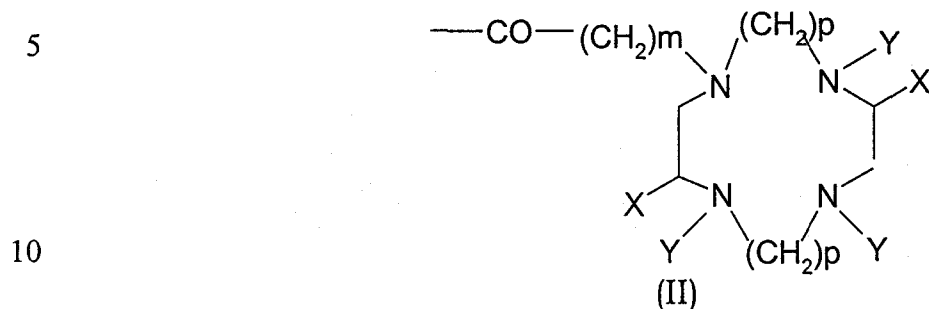


20 dove:

Q è un gruppo $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero compreso tra 4 e 12, nel qual caso R' non esiste, oppure Q è scelto nel gruppo che consiste di $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$, dove a e b sono, indipendentemente, un numero intero compreso fra 0 e n, R' è

definito di seguito, oppure Q è cicloesile, fenile, nel qual caso R' è un
sostituente sull'anello cicloesile o fenile;

R è idrogeno oppure -Λ, dove -Λ è un macrociclo di formula (II)



dove i vari Y, che possono essere uguali o diversi fra loro, sono
scelti nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄ lineare o
ramificato, -(CH₂)_m-COOH, dove m è un numero intero compreso fra
15 1 e 3; X è idrogeno, oppure il gruppo -CH₂-U, dove U è scelto fra
metile, etile, p-amminofenile, oppure X è il gruppo -(CHW)_o-Z, dove o
è un numero intero compreso fra 1 e 5, W è idrogeno, metile o etile,
Z è un gruppo eterociclico a 5 o 6 membri contenente uno o più
eteroatomi scelti fra O, N-R₁, essendo R₁ un atomo di idrogeno
20 oppure un gruppo alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, ed S; oppure Z è
scelto tra -NH₂, -NH-C(=NH)-NH₂, -S-R₂ dove R₂ è un gruppo C₁-C₄
alchile lineare o ramificato,

p è il numero intero 2 o 3

R' è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄
25 lineare o ramificato, -(CH₂)_q-T, dove T è scelto nel gruppo che
consiste di S-CH₃, -OH, -COOH, e q è il numero intero 1 o 2;

R'' ha gli stessi significati di R, con le seguenti condizioni:

se R è - Λ , R'' è idrogeno, se R è idrogeno, R'' è - Λ , oppure R e R'' sono entrambi, rispettivamente, $-(CH_2)_r-\Lambda$ (per R) dove r è un numero intero compreso fra 4 e 12, e - Λ (per R'') essendo Q un gruppo $-(CH_2)_n-$ dove n è un numero intero compreso fra 4 e 12.

5 Per gruppo alchile C₁-C₄ lineare o ramificato si intende metile, etile, propile, isopropile, n-butile, sec-butile, iso-butile, ter-butile.

Per eterociclo a 5 o 6 termini si intende un eterociclo aromatico o non aromatico avente almeno un eteroatomo nell'anello scelto fra O, N-R₁, S, come ad esempio 2-, 3- o 4-piridile, 2-, 4-, o 5-
10 imidazolile.

Un primo gruppo di composti preferiti secondo la presente invenzione sono i composti di formula (I) dove R è idrogeno, Q è $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero compreso tra 4 e 8, preferibilmente 6, R'' è - Λ , Y è sempre -CH₂-COOH; X è idrogeno, p è
15 2.

Sono un ulteriore oggetto della presente invenzione anche i complessi del composto di formula (I) con radioisotopi per uso diagnostico e/o terapeutico. Esempi di tali radioisotopi sono: Fe-52, Mn-52m, Co-55, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-
20 125, 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, Au-198.

Un primo gruppo di complessi preferiti secondo la presente invenzione sono quelli dove nei composti di formula (I), R è idrogeno,

Q è $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero compreso tra 4 e 8, preferibilmente 6, R" è -Λ, Y è sempre $-CH_2-COOH$; X è idrogeno, p è 2 e il radioisotopo è Y-90.

Sono ulteriori oggetti della presente invenzione procedimenti per la preparazione dei composti di formula (I) e dei loro complessi con radiofarmaci.

Ulteriori oggetti della presente invenzione sono composizioni farmaceutiche e/o diagnostiche comprendenti i composti di formula (I) e i loro complessi come sopra indicato.

Sono altri oggetti della presente invenzione l'uso dei composti di formula (I) e dei loro complessi con radioisotopi come medicinali o diagnostici, in particolare per preparazione di medicinali utili per la terapia o diagnosi dei tumori.

Questi ed altri oggetti attinenti la presente invenzione saranno illustrati in dettaglio nella parte che segue, anche per mezzo di esempi sperimentali.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il composto secondo la presente invenzione è preparato secondo lo schema seguente, comprendente gli stadi di:

- a) formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico della biotina e un gruppo amminico primario della diammina $H_2N-Q-NH_2$, essendo l'altro gruppo amminico primario opportunamente protetto, ad esempio con un gruppo Boc, se necessario

- b) deprotezione del gruppo amminico primario;
- c) riduzione del gruppo ammido a gruppo ammino,
- d) coniugazione con il desiderato chelante $-\Lambda$ di formula (II).

La biotina è un prodotto commerciale. Diammine $H_2N-Q-NH_2$
5 sono disponibili in commercio e comunque preparabili con metodi
noti.

La protezione del gruppo amminico primario viene facilmente
condotta ricorrendo ai noti gruppi protettori, ad esempio il Boc, e
comunque reperibili nei cataloghi commerciali e nella letteratura
10 generale.

In alternativa, il composto di formula (I) secondo la presente
invenzione, se R è idrogeno e R' un chelante macrociclico $-\Lambda$, può
essere preparato secondo lo schema seguente:

- a) formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico
15 della biotina e un gruppo amminico primario della diammina
 $H_2N-Q-NH_2$, essendo l'altro gruppo amminico primario
opportunamente protetto, ad esempio con un gruppo Boc, se
necessario
- b) deprotezione del gruppo amminico primario se il gruppo
20 protettore è di tipo alchil uretanico, sensibile al trattamento
con $BH_3 \cdot THF$, ad esempio un gruppo Boc;
- c) protezione selettiva di detto gruppo amminico primario con un
gruppo protettore scelto fra quelli riportati in letteratura come
resistenti alla successiva riduzione e distaccabili senza

danneggiare l'anello biotinico (T. W. Greene, P. G. M. Wuts, "Protective groups in organic synthesis", 3^d Ed., J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1999; Handbook of reagents for Organic Synthesis, "Oxidizing and Reducing Agents", Edited by S. D. Burke e R. L. Danheiser, J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1999);

- d) riduzione del gruppo ammido a gruppo ammino con $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$;
- e) protezione del gruppo amminico secondario con protezione ortogonale ai precedenti gruppi protettori;
- f) deprotezione del gruppo amminico primario;
- g) coniugazione con il desiderato chelante come definito sopra;
- h) deprotezione del gruppo amminico secondario; oppure se R è un macrociclo chelante $-\Lambda$ e R" è idrogeno, dopo il passaggio d):

- i) coniugazione con il desiderato chelante $-\Lambda$;
- j) deprotezione del gruppo amminico primario.

La protezione del gruppo amminico primario del passaggio a) è già stata illustrata sopra. Per quanto riguarda la protezione del gruppo amminico del passaggio c) e la protezione del gruppo amminico secondario, il tecnico medio è in grado, ricorrendo alla sua conoscenza del settore, di scegliere l'adatto gruppo protettore.

Se R è $-(\text{CH}_2)_r-\Lambda$ ed R" è $-\Lambda$, il composto (I) può essere preparato secondo lo schema seguente:

- a) attivazione del gruppo -COOH della biotina secondo i metodi conosciuti nella sintesi peptidica (P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, "Chemical approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press, Boca Raton, New York, 5 1997);
- b) coniugazione della biotina attivata con una ammina della formula generale: $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{NHBoc}$ dove n e q possono variare, indipendentemente, da 4 a 12;
- c) distacco del gruppo protettore Boc;
- 10 d) riduzione dell'ammide come sopra;
- e) coniugazione con il desiderato chelante - Λ .

Alcune ammine secondarie illustrate nel passaggio b) sono reperibili in commercio; altre possono essere preparate secondo metodo convenzionali.

15 La coniugazione del composto secondo l'invenzione con il radioisotopo, a dare i complessi previsti nell'ambito della presente domanda, è condotta con i metodi tradizionali noti nel settore, ad esempio come descritto in Paganelli, Chinol e al. *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No4; April 1999; 348-357

20 Descrizione della realizzazione preferita dell'invenzione

Verrà ora fornita la descrizione dettagliata della preparazione del composto preferito di formula (I), ovvero quello in cui R è idrogeno, Q è $-(\text{CH}_2)_n-$, dove n è preferibilmente 6, R" è - Λ , Y è sempre $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; X è idrogeno, p è 2.

Il procedimento comprende:

- a) formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico della biotina e il gruppo amminico primario dell'esametildiammina, opportunamente protetta, ad esempio con un gruppo Boc; se necessario
- b) deprotezione del gruppo amminico dell'esametildiammina;
- c) riduzione del gruppo ammido a gruppo ammino,
- d) coniugazione con il desiderato chelante.

Il passaggio a) del procedimento secondo la presente invenzione consiste nella formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico della biotina, ed il gruppo amminico primario dell'esametildiammina-Boc. La biotina è stata trattata con l'HATU per formare in situ un estere estremamente attivo che reagisce con il gruppo amminico dell'esametildiammina-Boc per formare l'ammide. Questo meccanismo di attivazione, usato soprattutto per la sintesi peptidica in fase solida, necessita di un ambiente basico. Per evitare che la base reagisca con l'estere attivo si usano delle basi terziarie organiche come la diisopropilettilamina (DIPEA) oppure la *N*-metilmorfolina (NMM). E' necessaria la protezione di uno dei due gruppi amminici dell'esametildiammina con il Boc (*ter*-butilossicarbonile) per evitare di legare la biotina ad entrambe le estremità della catena diamminica. Il prodotto finale viene isolato dall'ambiente di reazione dopo evaporazione del solvente (DMF) e precipitazione con acqua. Il prodotto, ricristallizzato da propanolo è

stato caratterizzato tramite $^1\text{H-NMR}$, analisi elementare ed ESI-MS.
La resa della reazione è circa l'88%.

Nel passaggio b), la biotinil-esametilendiammina-Boc viene solubilizzata in una miscela di AcOEt/HCl circa 3 M per effettuare il
5 distacco del gruppo Boc. Dopo aver allontanato la miscela di solventi il prodotto è stato liofilizzato per eliminare completamente HCl. Il campione è stato purificato tramite ricristallizzazione da una soluzione acquosa a pH basico e caratterizzato tramite $^1\text{H-NMR}$ e TLC.

10 Nel passaggio c), la riduzione del gruppo ammidico è stata effettuata con $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. Poiché il riducente è estremamente reattivo, bisogna lavorare in condizioni anidre. Il prodotto di partenza è stato tenuto sotto vuoto prima della reazione quindi solubilizzato in THF anidro (distillato con Sodio e Benzofenone). La miscela di reazione è
15 stata tenuta a riflusso, in atmosfera di azoto, fino alla completa riduzione del gruppo ammidico (monitorata tramite spettri $^1\text{H-NMR}$). Dopo aver evaporato il solvente a pressione ridotta, la miscela di reazione è stata trattata con una soluzione acquosa di HCl. Dopo aver liofilizzato la soluzione acida, il prodotto viene purificato sia
20 tramite ricristallizzazione da una soluzione acquosa a pH basico sia tramite cromatografia su colonna in fase inversa. L'analisi del prodotto, effettuata tramite TLC analitica, evidenzia la sua purezza. La resa della reazione è circa il 55%.

Il passaggio d) prevede la reazione di coniugazione della biotinesametildiammina ridotta con il DOTA, effettuata con dei reagenti specifici per la formazione di legami ammidici in ambiente acquoso: 1-(3-Dimetilamminopropil)-3-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC), e sulfo-NHS. Il DOTA è stato solubilizzato in acqua e portato ad un pH circa uguale alla sua pK_{a3} . In questo modo si ha solo un gruppo carbossilico in forma acida, e quindi si riduce la probabilità di ottenere prodotti secondari. Alla soluzione basica è stata aggiunta la Sulfo-NHS ed infine la EDC. Dopo la formazione dell'estere attivo *in situ* è stata aggiunta la biotinesametildiammina ridotta, controllando che il pH della soluzione rimanga circa 8,5. La purificazione del grezzo di reazione è stata effettuata tramite HPLC semipreparativa (C_{18} ; $CH_3CN/H_2O/TFA$ 0,1 %; CH_3CN dal 5% al 25% in 20 min).

Sono oggetto della presente invenzione composizioni farmaceutiche o diagnostiche comprendenti come principio attivo almeno un composto di formula (I), anche sotto forma di complesso con un radioisotopo oppure, nel caso di detto composto di formula (I) in associazione con altri principi attivi utili nel trattamento delle patologie indicate nella presente invenzione, ad esempio altri prodotti con attività antitumorale; anche in forme di dosaggio separate o in forme adatte a terapie combinate. Il principio attivo secondo la presente invenzione sarà in miscela con opportuni veicoli e/o eccipienti di comune uso in tecnica farmaceutica, come ad

esempio descritto in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", ultima edizione. Le composizioni secondo la presente invenzione conterranno una quantità terapeuticamente efficace del principio attivo. I dosaggi saranno determinati dall'esperto del settore, ad esempio il clinico o il medico curante a seconda del tipo di patologia da trattare e le condizioni del paziente, oppure in concomitanza con la somministrazione di altri principi attivi.

Esempi di composizioni farmaceutiche sono quelle che permettono la somministrazione per via parenterale o locoregionale. Composizioni farmaceutiche adatte allo scopo sono soluzioni, sospensioni, o forme liofilizzate da ricostituire al momento dell'uso.

Forme adatte all'applicazione industriale della presente invenzione sono anche i kit per radioterapia di tumori, come ad esempio descritto in EP 0 496 074, il lavoro di Paganelli, Chinol e al. pubblicato su *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357, US 5.968.405 e la letteratura connessa.

È un ulteriore oggetto della presente invenzione un kit per la terapia o diagnosi di tumori mediante radioattività, caratterizzato dal fatto che almeno uno dei componenti di detto kit comprende un composto di formula (I) o un suo complesso con un opportuno radioisotopo.

I composti secondo la presente invenzione sono utili per la preparazione agenti terapeutici e/o diagnostici per la cura e diagnosi di tumori.

Ad esempio, sono utilizzabili in metodi di trattamento di tumori
5 con radiofarmaci antitumorali, come ad esempio descritto nel brevetto europeo 0 496 074, il lavoro di Paganelli, Chinol e al. pubblicato su *European Journal of Nuclear Medicine* Vol.26, No 4; April 1999; 348-357, US 5.968.405 e la letteratura connessa.

Il seguente esempio illustra ulteriormente l'invenzione.

10

ESEMPIO

Gli spettri NMR sono stati registrati in soluzione di DMSO-d₆.

Ad una soluzione di Biotina (1 g, 4,1 mmol) ed NMM (0,451 ml, 1 eq) in DMF anidra è stata aggiunta una soluzione di N-Boc-esametilendiammina HCl (1,03 g, 1 eq) ed NMM (0,451ml, 1 eq) in
15 DMF anidra. Dopo qualche minuto è stata aggiunta una soluzione di HATU (1,56 g, 1 eq) in DMF. La miscela di reazione è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte e successivamente evaporata a pressione ridotta. L'olio così ottenuto è stato cristallizzato per aggiunta di acqua e ricristallizzato con n-
20 propanolo ottenendo 1,6 g (3,6 mmol; resa 88%) del composto 1.

Il prodotto appare puro alla TLC (DCM/MeOH 5:1) rivelata con Cl₂/Tolidina.

H-NMR, δ (ppm): 1,1-1,658 (14 H, 7xCH₂), 1,34 (9H, tBu), 2,05 (2H, CH₂CO), 2,54 (1H, CH₂S), 2,74-3,15 (CH₂S e 2xCH₂N), 4,12 e

4,28 (2H, 2xCH biotina), 6,40 (2H, 2xNH biotina), 6,74 (1H, NH Boc),
7,74 (1H, NH ammido).

Analisi elementare. Calcolato per $C_{21}H_{38}N_4O_4S \cdot 0,5H_2O$: C
55,85; H 8,7; N 12,4. Trovato: C 56,2; H 8,8; N 12,4.

5 ESI-MS: $[M+H]^+$ calcolato 443,6; trovato 443,1.

p.f.: 174-176°C

Ad una sospensione di BiotinilesametildiamminaBoc (**1**) (1,6
g) in AcOEt è stato aggiunto HCl al 37% in acqua fino ad ottenere
una soluzione circa 3 M in HCl. La soluzione è stata tenuta sotto
10 agitazione magnetica per 30 minuti ed infine evaporata a pressione
ridotta. Il prodotto oleoso è stato successivamente liofilizzato con
acqua, portato a pH 12 con NaOH 2M, raffreddando con ghiaccio, e
la soluzione nuovamente liofilizzata. Il solido ottenuto (composto **2**) è
stato trattato più volte con MeOH per eliminare i sali presenti ed
15 infine purificato per precipitazione con etere etilico dalla soluzione
metanolica, ottenendo 1,1 g (resa 90%) di **2**. Il composto appare
puro alla TLC su gel di silice (eluente: n-propanolo/AcOH/H₂O,
1:1:1) rivelata con una soluzione di fluoescamina in acetone a 366
nm e con Cl₂/o-toluidina.

20 ¹H-NMR, δ (ppm): 1,1-1,64; 2,05; 2,52; 2,80; 2,93-3,13; 4,12 e
4,28; 6,4; 7,86.

p.f.: 179-182°C

Ad una soluzione di 8,8 ml di BH_3 1 M in THF, tenuta sotto
atmosfera di azoto a 0°C , è stata aggiunta l'ammina **2** (1,5 g, 4,3
mmol) finemente triturrata e sospesa in 15 ml di THF anidro. La
miscela è stata tenuta sotto agitazione magnetica a 0°C per circa 30
5 min e, successivamente, a riflusso fino a completamento della
reazione (l'avanzamento della reazione è stato controllato tramite ^1H -
NMR su aliquote della miscela di reazione trattate con HCl 3 M a
caldo ed evaporate a pressione ridotta). Alla fine della reazione è
stato aggiunto HCl 3M; la miscela di reazione è poi stata tenuta a
10 riflusso per 3 ore ed evaporata a pressione ridotta. Il grezzo di
reazione (composto **3**) è stato precipitato da acqua a pH circa 12 e
purificato tramite RP-CC (LiChroprep RP-8, 40-63 μm ; eluente:
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ -92:8:0,1) ottenendo 1,3 g (2,3 mmol, 55%) del
composto **3**, che appare puro alla TLC (stesso procedimento usato
15 per il composto **2**).

^1H -NMR δ (ppm): 1,30-1,58; 2,53; 2,77-3,15; 4,14 e 4,29; 6,38;
8,03 (3H, NH_3^+); 8,9 (2H, NH_2^+).

ESI-MS. $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcolato 328,23; trovato 328,2

Ad una soluzione di DOTA- $3\text{H}_2\text{O}$ (100 mg, 0,2 mmol) in acqua,
20 portata a pH 9,2, è stata aggiunta una soluzione di sulfo-NHS (86,8
mg, 0,4 mmol) in 1 ml di acqua. Dopo qualche minuto è stata
aggiunta goccia a goccia una soluzione di EDC (76,7 mg, 0,4 mmol)
in 0,5 ml di acqua a raffreddata con ghiaccio. La miscela di reazione
è stata tenuta sotto agitazione per circa 20 min; successivamente è

stata aggiunta goccia a goccia una soluzione dell'ammina **3** (111 mg, 0,2 mmol) sciolta in 1 ml di acqua a pH 8,6. Dopo circa 3 ore la soluzione di reazione è stata liofilizzata e il composto **4** grezzo è stato purificato tramite HPLC in fase inversa (C₁₈, A: 0,1% TFA in CH₃CN; B 0,1% TFA in acqua; dal 10 al 15% di B in 20 min; Rt: 12,6 min) ottenendo 53 mg (20%) di prodotto, puro alla TLC (stesso procedimento usato per il composto **2**). Il test con fluorescamina in acetone, per saggiare la presenza di un gruppo amminico primario, risulta negativo.

Analisi elementare. Calcolato per C₃₂H₅₈N₈O₈S·4TFA·H₂O: C, 40,41; H, 5,43; N, 9,42. Trovato: C, 40,48; H, 5,45; N, 9,09.

FAB-MS: [M+H]⁺ calcolato 715,9; trovato 715,6.

ESI-MS: [M+H]⁺ calcolato 715,9; trovato 715,4.

Sono state eseguite prove di marcatura, legame con avidina e stabilità in siero con il composto illustrato nell'esempio precedente. La stabilità in siero è stata valutata fino a 4 giorni. La valutazione è stata fatta mediante radiocromatografia HPLC, colonna gel-filtrazione tipo superdex (destrano legato a granelli di agarosio), eluizione isocratica con soluzione fisiologica (cloruro di sodio 0,9%), flusso 0.8 ml/min, con la seguente procedura: la biotina marcata (con In-111 o Y-90) si mette ad incubare a 37°C insieme ad 1,0 ml di siero umano. Ai tempi desiderati (24, 48h etc.) si preleva una piccola aliquota di siero (20 microlitri) si mescola con un forte eccesso di avidina (100 microlitri = 1,0 mg) e dopo 15 minuti si inietta all'HPLC.

In una prima prova, il composto dell'esempio è stato marcato con ¹¹¹In acetato e posto ad incubare. Dopo incubazione si aggiunge al campione avidina. Dal controllo con HPLC, il composto risulta completamente legato all'avidina, non essendo stati rilevati altri picchi (marcatura 100%).

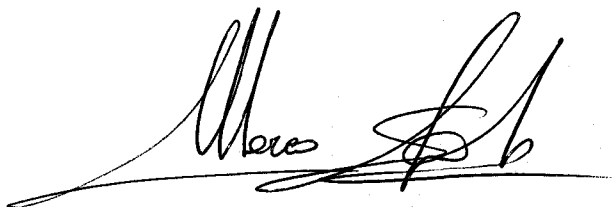
In una seconda prova, il complesso del composto dell'esempio con ¹¹¹In è stato incubato in siero a 37°C per 24 ore. Dopo incubazione si aggiunge al campione avidina. Dal controllo con HPLC, il composto risulta completamente legato all'avidina, non essendo stati rilevati altri picchi (marcatura 100%).

In una terza prova, è stato ripetuto l'esperimento precedente, prolungando l'incubazione in siero fino a 96 ore. Dal controllo con HPLC, il composto risulta sempre completamente legato all'avidina, non essendo stati rilevati altri picchi (marcatura 100%).

15

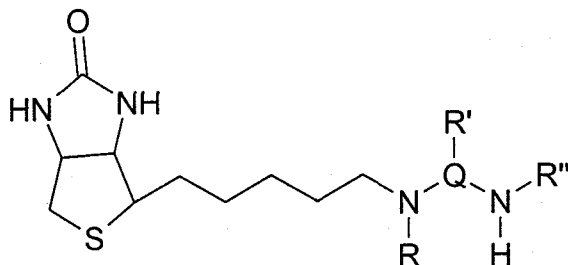
16 FEB. 2001

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA



RIVENDICAZIONI

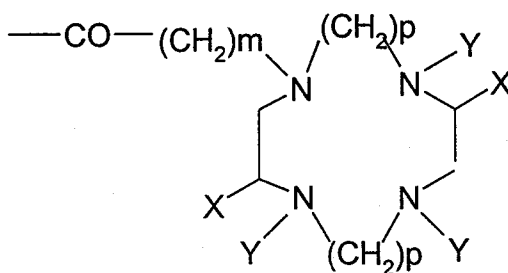
1. Composto di formula (I)



dove:

Q è un gruppo $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero intero compreso tra 4 e 12, nel qual caso R' non esiste, oppure Q è scelto nel gruppo che consiste di $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$, dove a e b sono, indipendentemente, un numero intero compreso fra 0 e n, R' è definito di seguito, oppure Q è cicloesile, fenile, nel qual caso R' è un sostituito sull'anello cicloesile o fenile;

15 R è idrogeno oppure $-\Lambda$, dove $-\Lambda$ è un macrociclo di formula (II)



(II)

25 dove i vari Y, che possono essere uguali o diversi fra loro, sono scelti nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄ lineare o ramificato, $-(CH_2)_m-COOH$, dove m è un numero intero compreso fra 1 e 3; X è idrogeno, oppure il gruppo -

CH₂-U, dove U è scelto fra metile, etile, p-amminofenile,
oppure X è il gruppo -(CHW)_o-Z, dove o è un numero intero
compreso fra 1 e 5, W è idrogeno, metile o etile, Z è un
gruppo eterociclico a 5 o 6 membri contenente uno o più
eteroatomi scelti fra O, N-R₁, essendo R₁ un atomo di
idrogeno oppure un gruppo alchile C₁-C₄ lineare o
ramificato, ed S; oppure Z è scelto tra -NH₂, -NH-C(=NH)-
NH₂, -S-R₂ dove R₂ è un gruppo C₁-C₄ alchile lineare o
ramificato,

5

10

p è il numero intero 2 o 3

R' è scelto nel gruppo che consiste di idrogeno, alchile C₁-C₄
lineare o ramificato, -(CH₂)_q-T, dove T è scelto nel gruppo
che consiste di S-CH₃, -OH, -COOH, e q è il numero intero
1 o 2;

15

R'' ha gli stessi significati di R, con le seguenti condizioni:

se R è -Λ, R'' è idrogeno, se R è idrogeno, R'' è -Λ, oppure R
e R'' sono entrambi, rispettivamente, -(CH₂)_r-Λ (per R) dove r
è un numero intero compreso fra 4 e 12, e -Λ (per R'')
essendo Q un gruppo -(CH₂)_n- dove n è un numero intero
compreso fra 4 e 12.

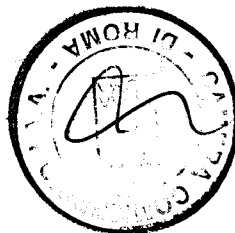
20

2. Complesso di un composto di formula (I) con un radioisotopo utile nella terapia e/o diagnostica.
3. Complesso secondo la rivendicazione 2, dove il radioisotopo è scelto nel gruppo che consiste di Fe-52, Mn-52m, Co-55,

Cu-64, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, In-111, I-123, I-125, I-131,
P-32, Sc-47, Cu-67, Y-90, Pd-109, Ag-111, I-131, Pm-149,
Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153,
Lu-177, Au-198.

- 5 4. Complesso secondo la rivendicazione 2 e 3, dove, nel
 composto di formula (I) Q è $-(CH_2)_n-$, dove n è un numero
 intero compreso tra 4 e 8, preferibilmente 6, Y è $-CH_2-COOH$
 e il radioisotopo è Y-90.
5. Composizione farmaceutica e/o diagnostica comprendente
10 un composto della rivendicazione 1 o 2, in miscela con
 opportuni veicoli e/o eccipienti.
6. Uso del composto della rivendicazione 1 o 2 per la
 preparazione di un farmaco utile nel trattamento dei tumori.
7. Composizione farmaceutica e/o diagnostica comprendente
15 un complesso di una delle rivendicazioni 2, 3 o 4, in miscela
 con opportuni veicoli e/o eccipienti.
8. Uso di un complesso di una delle rivendicazioni 2, 3 o 4
 come radiofarmaco antitumorale.
9. Kit per la radioterapia o diagnosi di tumori, caratterizzato
20 dal fatto che almeno uno dei componenti di detto kit
 comprende un composto della rivendicazione 1 o della
 rivendicazione 2.

16 FEB. 2001



SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Mores" followed by a flourish and a period.