



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 06 599 T2 2006.06.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 359 943 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 51/04 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 06 599.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IT02/00091**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 703 851.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/066075**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.02.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **29.08.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.11.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.06.2006**

(30) Unionspriorität:

RM20010079 16.02.2001 IT

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:

**Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A., Rom/Roma, IT**

(72) Erfinder:

**PAGANELLI, Giovanni, I-20141 Milan, IT; CHINOL,
Marco, I-20141 Milan, IT; GINANNESCHI, Mauro,
I-50019 Sesto Fiorentino, IT**

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITL, 81925 München

(54) Bezeichnung: **BIOTIN-DERIVATE UND IHRE KONJUGATEN MIT CHELATIERUNGSMITTELN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die hierin beschriebene Erfindung betrifft modifizierte Biotine, die zur Herstellung von Konjugaten mit Radionukleiden zur Verwendung bei der menschlichen und tierischen Diagnose und Therapie, insbesondere zur Diagnose und Behandlung von pathologischen Zuständen wie Tumoren nützlich sind.

[0002] Die hierin beschriebene Erfindung betrifft das technische Gebiet der Erzeugung von Medikamenten.

[0003] Die hierin beschriebene Erfindung gibt Verbindungen, Verfahren zu deren Herstellung, Verfahren zu deren Verwendung und Zusammensetzungen an, die diese enthalten, die für industrielle Anwendung beim pharmazeutischen Gebiet geeignet sind.

[0004] Die hierin beschriebene Erfindung gibt Verbindungen, Zusammensetzungen und Verfahren an, die für die Freisetzung und Abgabe von Substanzen nützlich sind, die zur diagnostischen und therapeutischen Medizin und bei der Behandlung von pathologischen Störungen von Organen und Geweben nützlich sind.

[0005] Insbesondere, obwohl nicht exklusiv, betrifft die hierin beschriebene Erfindung das Gebiet der Antikrebs-Radiopharmazeutika, womit sowohl Substanzen, die für diagnostische Zwecke nützlich sind, als auch Substanzen gemeint sind, die für die Krebsvorbeugung und -therapie nützlich sind.

Hintergrund der Erfindung

[0006] Die Tumortherapie wird durch die Verwendung von Substanzen hauptsächlich implementiert, die Krebszellen zerstören sollen. Dies kann mit cytotoxischen Substanzen erreicht werden, die in die Tumorzellen eindringen müssen, um ihre vollständige Wirkung zu entfalten, oder mit Hilfe der Behandlung der Tumorzellen durch Bestrahlung mit ausreichender Energie, um die Zellen zu töten. In beiden Fällen gibt es das Problem der Freisetzung der Substanzen in möglichst selektiver Art bei den Zielzellen, um so eine mögliche Schädigung der umgebenden gesunden Zellen zu vermeiden. Bei Radiopharmazeutika, d.h. Substanzen, die radioaktive Bereiche tragen, wird das Problem der selektiven Abgabe des aktiven Teils (d.h. des radioaktiven Anteils) an die Tumorzelle als besonders wichtig angesehen, wobei möglichst stark die Diffusion des Radionukleides in den Körper oder die Interaktion mit gesunden Zellen vermieden werden soll, die den Tumor umgeben.

[0007] Für eine Diskussion aller involvierter Punkte und der bisher vorgeschlagenen Lösungen wird der Leser auf die US-Patente 5,283,342, 5,608,060 und 5,955,605, übertragen auf Neorex und basierend auf einer Patentanmeldung, die am 9. Juni 1992 angemeldet ist, verwiesen. Diese Patente werden hierin für Referenzzwecke spezifisch eingefügt.

[0008] In diesen Dokumenten wird unter anderem das Problem der Resistenz des Moleküls, das das Radionuklid trifft, für metabolische Attacken des Körpers diskutiert. Spezifisch ist der Fall, der die meiste Aufmerksamkeit erregte, das Molekül von Biotin, das eine der ersten Wahl für die Abgabe des Radionuklides an die Tumorzellen darstellt, und zwar aufgrund seiner gutbekannten Wechselwirkung mit Avidinen. Biotin ist, soweit wir aufgrund der bisherigen Praxis schließen, an dem Radionuklid-chelatisierenden Teil, z.B. einem Molekül von DOTA, über einen Linker gebunden. Tatsächlich zeigen die Neorex-Patienten das Problem der Resistenz des Komplexes, der aus dem Biotinmolekül besteht, wenn er mit dem Radionuklid über den Linker verbunden ist, bezüglich Biotinidasen, Enzymen, die die Peptidbindung brechen, die in dem Komplex vorhanden ist. Diese Bindung stammt von der Vereinigung des Chelatisierungsmittels und Biotin.

[0009] Unter den sehr erwünschten Eigenschaften muß das Molekül vom Körper schnell und effizient eliminiert werden und muß aus ausreichend klein ($M_w < 1000$) sein, um die leichte Verteilung in extrazelluläre Flüssigkeit zu ermöglichen, wo es an den Tumor bindet. Zusätzlich muß es eine erwiesene Stabilität in vivo mit nur einer minimalen Aufnahme durch Nicht-Tumorzellen und eine schnelle (renale) Beseitigung zeigen und darf nicht metabolisiert werden.

[0010] Zu diesen Charakteristiken sollte man das Bedürfnis für eine bestimmte Menge der Stabilität zwischen dem Biotinteil und dem chelatisierenden Anteil des Moleküls hinzufügen.

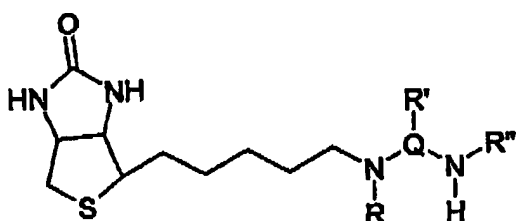
[0011] Tatsächlich darf der chelatisierende Anteil nicht in vivo freigesetzt werden, wobei Teile des Moleküls freigesetzt werden, die potentiell für den Körper schädlich sind. Experten auf dem Gebiet sind sich des Pro-

blems der Freisetzung des Radionukleotides des chelatisierenden Anteils sehr bewußt, einschließlich Metallionen, die für den Körper vollständig fremd sind, die mit Radioaktivität verschiedener Arten und sogar hochenergetischer Strahlung versehen sein können, was daher sehr schädigend ist.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Es wurde nun festgestellt, daß die Verbindung mit der Formel (I), die unten angegeben ist, nicht nur die Erfordernisse für eine solche Verbindung in der Therapie und Diagnose von Tumoren oder anderen Erkrankungen erfüllt, die mit Verbindungen dieser Art ermittelt und behandelt werden können, sondern ebenfalls den Vorteil präsentiert, daß sie keine metabolische Reaktionen eingeht, die den komplexierenden Teil des Moleküls freisetzen. Auf diese Weise wird das Molekül vollständig durch den Körper in unveränderter Form eliminiert, wodurch das Problem der möglichen Freisetzung des chelatisierenden Teils vermieden wird, der die Metallionen enthält, die darin eingefangen sind.

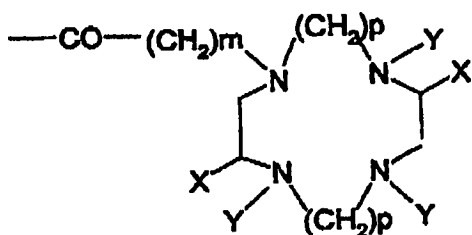
[0013] Eines der Ziele der hierin beschriebenen Erfindung ist daher die Verbindung mit der Formel (I):



worin:

Q eine $-(CH_2)_n$ -Gruppe ist, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist, wenn R' nicht existiert, oder Q ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-(CH_2)_a-CH(R')-(CH_2)_b-$, worin a und b unabhängig voneinander ganze Zahlen von 0 bis n sind und R' wie unten definiert ist, oder Q Cyclohexyl, Phenyl ist, wenn R' ein Substituent am Cyclohexyl- oder Phenylring ist;

R Wasserstoff oder -A ist, worin -A ein Makrocyclus der Formel (II) ist:



(II)

worin die verschiedenen Gruppen Y, die gleich oder verschieden sein können, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, geradkettigem oder verzweigtem C_{1-4} -Alkyl, $-(CH_2)_m-COOH$, worin m eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist; X Wasserstoff oder $-CH_2-U$ -Gruppe ist, worin U ausgewählt ist aus Methyl, Ethyl, p-Aminophenyl oder X die $-(CHW)_o-Z$ -Gruppe ist, worin o eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist, W Wasserstoff, Methyl oder Ethyl ist, Z eine heterocyclische Gruppe mit 5 oder 6 Gliedern ist, umfassend ein oder mehrere Heteroatome ausgewählt aus O, N- R_1 , wobei R_1 ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte C_{1-4} -Alkyl-Gruppe ist, und S; oder Z ausgewählt ist aus $-NH_2$, $-NH-C(=NH)-NH_2$ oder $-S-R_2$, worin R_2 eine geradkettige oder verzweigte C_{1-4} -Alkyl-Gruppe ist;

p eine ganze Zahl von 2 oder 3 ist;

R' ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, geradkettigem oder verzweigtem C_{1-4} -Alkyl, $-(CH_2)_q-T$, worin T ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus S- CH_3 , -OH oder -COOH und q die ganze Zahl von 1 oder 2 ist;

R'' die gleiche Bedeutung wie R hat, mit den folgenden Bedingungen:

wenn R -A ist, ist R'' Wasserstoff; wenn R Wasserstoff ist, ist R'' -A, oder R und R'' sind $-(CH_2)_r-A$ (für R), wenn R eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist, bzw. -A (für R''), wobei Q eine $-(CH_2)_n$ -Gruppe ist, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist.

[0014] Mit einer geradkettigen oder verzweigten C_{1-4} -Alkyl-Gruppe ist Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sek-Butyl, Isobutyl oder tert-Butyl gemeint.

[0015] Mit einem Heterocyclus mit 5 oder 6 Gliedern ist ein aromatischer oder nicht-aromatischer Heterocyclus gemeint, der im Ring zumindest ein Heteroatom enthält, ausgewählt aus O, N-R₁ oder S wie zum Beispiel 2-, 3- oder 4-Pyridyl oder 2-, 4- oder 5-Imidazolyl.

[0016] Eine erste Gruppe von bevorzugten Verbindungen gemäß dieser Erfindung besteht in Verbindungen der Formel (I), worin R Wasserstoff, Q -(CH₂)_n-, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 8 ist, bevorzugt 6, R'' -A, Y immer -CH₂-COOH, X Wasserstoff und p 2 sind.

[0017] Ein weiteres Ziel der hierin beschriebenen Erfindung besteht in Verbindungen der Formel (I) mit Radioisotopen für die diagnostische und/oder therapeutische Verwendung. Beispiele dieser Isotopen sind: 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, Pm-149, Re-186, Re-188, At-211, Bi-212, Bi-213, Rh-105, Sm-153, Lu-177 und Au-198.

[0018] Eine erste Gruppe von bevorzugten Komplexen dieser Erfindung sind solche, worin bei den Verbindungen mit der Formel (I) R Wasserstoff, Q -(CH₂)_n-, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 8, bevorzugt 6 ist, R'' -A ist, Y immer -CH₂-COOH ist; X Wasserstoff, p 2 und das Radioisotop Y-90 sind.

[0019] Weitere Ziele der hierin beschriebenen Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I) und deren Komplexe mit Radiopharmazeutika.

[0020] Weitere Ziele der hierin beschriebenen Erfindung sind pharmazeutische und/oder diagnostische Zusammensetzungen, umfassend Verbindungen der Formel (I) und deren Komplex wie oben angegeben.

[0021] Andere Ziele der hierin beschriebenen Erfindung sind die Verwendung von Verbindungen der Formel (I) und deren Komplexen mit Radioisotopen als Medikamente oder diagnostische Werkzeuge, insbesondere die Herstellung von Medikamenten, die in der Tumorthherapie oder Diagnose nützlich sind.

[0022] Diese und andere Ziele, die die hierin beschriebene Erfindung betreffen, werden detailliert in dem nachfolgenden Teil ebenso durch experimentelle Beispiele beschrieben.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0023] Die Verbindung gemäß der hierin beschriebenen Erfindung wird entsprechend dem folgenden Schema hergestellt, umfassend die folgenden Schritte:

- Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxyl-Gruppe von Biotin und einer primären Amin-Gruppe von H₂N-Q-NH₂-Diamin, wobei die andere primäre Amin-Gruppe geeignet zum Beispiel mit einer Boc-Gruppe, falls erforderlich, geschützt ist;
- Abspaltung der Schutzgruppe der primären Amin-Gruppe;
- Reduktion der Amid-Gruppe in eine Amin-Gruppe;
- Konjugation mit dem gewünschten Chelatisierungsmittel der Formel (II) -A.

[0024] Biotin ist ein kommerzielles Produkt. H₂N-Q-NH₂-Diamine sind auf dem Markt erhältlich und können in jedem Fall unter Anwendung bekannter Verfahren hergestellt werden.

[0025] Der Schutz der primären Amin-Gruppe wird leicht unter Verwendung von bekannten Schutzgruppen wie zum Beispiel Boc erzielt, die in jedem Fall in den Verkaufskatalogen und der allgemeinen Literatur gefunden werden können.

[0026] Alternativ kann die Verbindung der Formel (I) gemäß der Erfindung entsprechend dem folgenden Schema hergestellt werden, wenn R Wasserstoff und R'' ein makrocyclisches Chelatisierungsmittel -A ist:

- Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxyl-Gruppe von Biotin und einer primären Amin-Gruppe des H₂N-Q-NH₂-Diamins, wobei die andere primäre Amin-Gruppe beispielsweise mit einer Boc-Gruppe, falls erforderlich, geeignet geschützt ist;
- Abspaltung der Schutzgruppe der primären Amin-Gruppe, wenn die Schutzgruppe vom Alkylurethan-Typ ist, die empfindlich für die Behandlung mit BH₃-THF ist, wie zum Beispiel eine Boc-Gruppe;
- selektiver Schutz der primären Amin-Gruppe mit einer Schutzgruppe, ausgewählt aus solchen, die in der Literatur als resistent für die anschließende Reduktion angegeben sind und die abgespalten werden können, ohne den Biotinring zu schädigen (T.W. Greene, P.G.M. Wuts, "Protective groups in organic synthesis", 3. Auflage, J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1999; Handbook of Reagents for Organic Synthesis, "Oxidizing and Reducing Agents", Herausgeber S.D. Burke und R.L. Danheiser, J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1999);

- d) Reduktion der Amid-Gruppe in eine Amin-Gruppe mit $\text{BH}_3\text{-THF}$;
- e) Schutz der sekundären Amin-Gruppe mit einem Schutz, der orthogonal zu den oben genannten Schutzgruppen ist;
- f) Abspaltung der Schutzgruppe der primären Amin-Gruppe;
- g) Konjugation mit dem gewünschten Chelatisierungsmittel wie oben definiert;
- h) Abspaltung der Schutzgruppe der sekundären Amin-Gruppe;
- i) oder, wenn R ein makrocyclisches Chelatisierungsmittel -A und R" Wasserstoff ist, nach dem Schritt d);
- j) Konjugation mit dem gewünschten Chelatisierungsmittel -A; k) Abspaltung der Schutzgruppe der primären Amin-Gruppe.

[0027] Der Schutz der primären Amin-Gruppe in Schritt a) wurde bereits oben erläutert. Im Hinblick auf den Schutz der Amin-Gruppe bei Schritt c) und den Schutz der sekundären Amin-Gruppe ist der Durchschnittsfachmann in der Lage auf der Grundlage seines oder ihres Wissens auf dem Gebiet, die angemessene Schutzgruppe auszuwählen.

[0028] Wenn R $-(\text{CH}_2)_r\text{-A}$ und R" -A ist, kann die Verbindung der Formel (I) entsprechend dem folgenden Schema hergestellt werden:

- a) Aktivierung der $-\text{COOH}$ -Gruppe von Biotin entsprechend bekannten Verfahren der Peptidsynthese (P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press, Boca Raton, New York 1997);
- b) Konjugation von Biotin, das mit einem Amin mit der allgemeinen Formel aktiviert ist: $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{NHBoc}$, worin n und q unabhängig von 4 bis 12 variieren können;
- c) Abspaltung der Schutzgruppe Boc;
- d) Reduktion des Amides, falls gewünscht, was wie oben durchgeführt werden kann;
- e) Konjugation mit dem gewünschten Chelatisierungsmittels -A.

[0029] Eine Anzahl von sekundären Aminen, erläutert in Schritt b), kann auf dem Markt erhalten werden; andere können geeignet unter Modifizierung von konventionellen Verfahren hergestellt werden (siehe zum Beispiel J.B. Hansen, M.C. Nielsen, U. Ehrbar, O. Buchardt, Synthesis, 1982, 404).

[0030] Die Konjugation der Verbindung gemäß dieser Erfindung mit dem Radioisotop zur Erzeugung der Komplexe, die im Kontext der hierin beschriebenen Erfindung bezweckt sind, wird unter Anwendung der bekannten traditionellen Verfahren auf dem Gebiet durchgeführt, wie zum Beispiel in Paganelli, Chinol et al., European Journal of Nuclear Medicine, Bd. 26, Nr. 4; April 1999, 348-357 beschrieben ist.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung

[0031] Nachfolgend folgt eine detaillierte Beschreibung der Herstellung der bevorzugten Verbindungen der Formel (I), d.h. solcher, worin R Wasserstoff, Q $-(\text{CH}_2)_n\text{-}$ ist, worin n bevorzugt 6 ist, R" -A ist, Y immer $-\text{CH}_2\text{-CO-OH}$ ist; X Wasserstoff und p 2 ist.

[0032] Das Verfahren umfaßt:

- a) Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxyl-Gruppe von Biotin und der primären Amin-Gruppe von Hexamethyldiamin, die geeignet beispielsweise mit einer Boc-Gruppe, falls erforderlich, geschützt ist;
- b) Abspaltung der Schutzgruppe der Amin-Gruppe von Hexamethyldiamin;
- c) Reduktion der Amid-Gruppe in eine Amin-Gruppe;
- d) Konjugation mit dem gewünschten Chelatisierungsmittel.

[0033] Der Schritt a) im Verfahren der hierin beschriebenen Erfindung besteht in der Bildung einer Amidbindung zwischen der Biotin-Carboxyl-Gruppe und primären Amin-Gruppe von Hexamethyldiamin-Boc. Das Biotin wurde mit HATU zur Bildung eines extrem aktiven Esters in situ behandelt, der mit der Amin-Gruppe von Hexamethyldiamin-Boc reagiert unter Bildung des relevanten Amides. Dieser Aktivierungsmechanismus, der vor allem für die Peptidsynthese in der festen Phase verwendet wird, erfordert ein Basismedium. Zur Verhinderung einer Reaktion der Base mit einem aktiven Ester werden tertiäre organische Basen wie Diisopropylethylamin (DIPEA) oder N-Methylmorpholin (NMM) verwendet. Der Schutz einer der beiden Amin-Gruppen des Hexamethyldiamins mit Boc (tert-Butyloxycarbonyl) ist notwendig, um zu verhindern, daß das Biotin an beide Enden der Diaminkette bindet. Das Endprodukt wird von dem Reaktionsmedium nach Verdampfung des Lösungsmittels (DMF) und Ausfällung mit Wasser isoliert. Das Produkt, das mit Propanol rekristallisiert ist, wurde durch $^1\text{H-NMR}$, Elementaranalyse und ESI-MS charakterisiert. Die Reaktionsausbeute ist etwa 88 %.

[0034] Beim Schritt b) wird Biotinyl-Hexamethylendiamin-Boc in einer Mischung aus AcOEt/HCl, ungefähr 3 M, zum Abspalten der Boc-Gruppe löslich gemacht. Nach Entfernung der Lösungsmittelmischung wurde das Produkt zum vollständigen Eliminieren von HCl lyophilisiert. Die Probe wurde mit Hilfe der Rekrystallisierung mit einer wäßrigen Lösung bei einem basischen pH gereinigt und durch ¹H-NMR und TLC charakterisiert.

[0035] Beim Schritt c) erfolgte die Reduktion der Amid-Gruppe mit BH₃-THF. Weil das Reduktionsmittel extrem reaktiv ist, muß das Verfahren in wasserfreien Verbindungen durchgeführt werden. Das Ausgangsprodukt wurde im Vakuum vor der Reaktion gehalten und dann in wasserfreiem THF (destilliert mit Natrium und Benzophenon) löslich gemacht. Die Reaktionsmischung wurde in einer Stickstoffatmosphäre unter Rückfluß gehalten, bis eine vollständige Reduktion der Amid-Gruppe (wie durch ¹H-NMR-Spektren aufgezeichnet) stattgefunden hat. Nach Verdampfung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde die Reaktionsmischung mit einer wäßrigen Lösung HCl behandelt. Nach Lyophilisieren der sauren Lösung wurde das Produkt durch Rekrystallisierung von einer wäßrigen Lösung bei basischem pH und dann durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie gereinigt. Die Analyse des Produktes erfolgte durch analytische TLC, die seine Reinheit ergab. Die Reaktionsausbeute ist ungefähr 55 %.

[0036] Der Schritt d) ergibt die Konjugationsreaktion des reduzierten Biotinyl-Hexamethylendiamins mit DOTA, die mit den spezifischen Reagenzien für die Bildung der Amidbindungen in einem wäßrigen Medium durchgeführt wird: 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) und Sulfo-NHS. DOTA wird in Wasser löslich gemacht und auf einen pH zwischen pK_{a3}- und pK_{a4}-Werten eingestellt, um hauptsächlich eine der vier Carboxyl-Gruppen zu aktivieren. Auf diese Weise können wir die Wahrscheinlichkeit des Erhalts von Nebenprodukten reduzieren. Zu der basischen Lösung wurden Schwefel-NHS und schließlich EDC gegeben. Nach der Bildung des aktiven Esters in situ wurde das reduzierte Biotinyl-Hexamethylendiamin zugegeben, wobei geprüft wurde, daß der pH der Lösung bei etwa 8,6 verblieb. Die Reinigung des rohen Produktes erfolgte durch semipräparative HPLC (C₁₈; CH₃CN/H₂O/TFA 0,1 %; CH₃CN von 5 % bis 25 % in 20 min).

[0037] Die Ziele der hierin beschriebenen Erfindung sind pharmazeutische oder diagnostische Zusammensetzungen, die als ihren aktiven Bestandteil zumindest eine Verbindung der Formel (I) ebenso in der Form eines Komplexes mit einem Radioisotop oder bei der Verbindung mit der Formel (I) in Assoziation mit anderen aktiven Bestandteilen enthalten, die bei der Behandlung der in der hierin beschriebenen Erfindung angezeigten Erkrankungen nützlich sind, zum Beispiel andere Produkte, die eine Antikrebsaktivität entfalten; ebenfalls in getrennten Dosierungsformen oder in Formen, die für die kombinierte Therapie geeignet sind. Der aktive Bestandteil gemäß der Erfindung liegt in der Form einer Mischung zusammen mit geeigneten Vehikeln und/oder Exzipienten vor, die allgemein bei der pharmazeutischen Technologie verwendet werden, wie beispielsweise solche, die in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", letzte Ausgabe, beschrieben sind. Die Zusammensetzungen dieser Erfindung sollen eine therapeutisch effektive Menge des aktiven Bestandteil enthalten. Die Dosierungen werden durch den Experten auf dem Gebiet, zum Beispiel dem Arzt der Klinik oder der Erstversorgung, entsprechend der zu behandelnden Erkrankung und dem Zustand des Patienten oder zusammen mit der Verabreichung mit anderen aktiven Bestandteilen bestimmt.

[0038] Beispiele von pharmazeutischen Zusammensetzungen sind solche, die die parenterale oder loco-regionale Verabreichung erlauben. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die für den Zweck geeignet sind, sind Lösungen, Suspension oder lyophilisierte Formen, die zum Zeitpunkt der Verwendung erzeugt werden.

[0039] Geeignete Formen für die industrielle Anwendung der Erfindung sind Kits für die Krebsradiotherapie wie zum Beispiel in dem europäischen Patent Nr. 0 496 074, in dem Papier von Paganelli, Chiol et al., veröffentlicht in European Journal of Nuclear Medicine, Bd. 26, Nr. 4; April 1999; 348-357, in dem US-Patent 5,968,405 und in der relevanten Literatur beschrieben ist.

[0040] Ein weiteres Ziel der hierin beschriebenen Erfindung ist ein Kit für die Therapie oder Diagnose von Tumoren mit Hilfe der Radioaktivität, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine der Verbindungen des Kits eine Verbindung der Formel (I) oder einen ihrer Komplexe mit einem geeigneten Radioisotop enthält.

[0041] Die Verbindungen gemäß der Erfindung sind nützlich für die Herstellung von therapeutischen und/oder diagnostischen Mitteln für die Behandlung und Diagnose von Tumoren.

[0042] Beispielsweise können sie bei Tumorbehandlungsverfahren mit Antikrebs-Radiopharmazeutika wie zum Beispiel solchen verwendet werden, die in dem europäischen Patent 0 496 074, in dem Papier von Paganelli, Chinol et al., veröffentlicht in European Journal of Nuclear Medicine, Bd. 26, Nr. 4; April 1999; 348-357, in dem US-Patent 5,968,405 und in der relevanten Literatur beschrieben sind.

[0043] Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiterhin.

Beispiel

[0044] Die NMR-Spektren wurden in DMSO- d_6 -Lösung aufgezeichnet.

[0045] Zu einer Lösung aus Biotin (1 g, 4,1 mmol) und NMM (0,451 ml, 1 äq) in wasserfreiem DMF wurde eine Lösung aus N-Boc-Hexamethylendiamin-HCl (1,03 g, 1 äq) und NMM (0,451 ml, 1 äq) in wasserfreiem DMF gegeben. Nach einigen Minuten wurde eine Lösung aus HATU (1,56 g, 1 äq) in DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann unter vermindertem Druck verdampft. Das somit erhaltene Öl wurde durch Zugabe von Wasser kristallisiert und mit n-Propanol rekristallisiert, unter Erhalt von 1,6 g (3,6 mmol, 88 % Ausbeute) der Verbindung 1.

[0046] Das Produkt war aufgrund der TLC-Beobachtung (Eluent: DCM/MeOH = 5:1; ermittelt durch Fluorescamin oder Cl_2/o -Tolidin) rein.

Smp.: 174-176°C;

1H -NMR, δ^H : 1,1 – 1,65 [14H, $CH(CH_2)_3$ und $NHCH_2(CH_2)_4$], 1,34 (s, 9H, tBu), 2,05 t, 2H, CH_2CO), 2,54 (d, 1H, HCHS), 2,74 – 3,15 (6H, $2 \times CH_2N$, HCHS und CHS), 4,12 (m, 1H, CHCHNH), 4,28 (m, 1H, CH_2CHNH), 6,36 und 6,42 (zwei 5, $2 \times$ Biotin NH), 6,74 (t, 1H, Boc NH), 7,74 (t, 1H, Amid-NH);

ESI-MS: m/e berechnet $[M + H]^+$ 443,1. gefunden 443,1.

Elementaranalyse: Berechnet für $C_{21}H_{38}N_4O_4S \cdot 0,5H_2O$: C 55,85; H 8,7; N 12,4; Gefunden: C 56,2; H 8,8; N 12,4.

[0047] Zu einer Suspension aus Biotinyl-Hexamethylendiamin-Boc (1) (1,6 g) in AcOEt wurden 37%iges wäßriges HCl gegeben, bis eine Lösung von ungefähr 3 M in HCl erhalten wurde. Die Lösung wurde unter magnetischem Rühren 30 min lang gehalten und dann unter vermindertem Druck verdampft. Das ölige Produkt wurde dann mit Wasser lyophilisiert, mit NaOH 2M auf pH 12 eingestellt und mit Eis gekühlt, woraufhin die Lösung einmal erneut lyophilisiert wurde. Der erhaltene Feststoff (Verbindung 2) wurde mehrere Male mit MeOH zum Eliminieren der vorhandenen Salze behandelt und dann durch Ausfällung durch Zugabe von Ethylether zu der Methanollösung gereinigt, unter Erhalt von 1,1 g (90%ige Ausbeute) der Verbindung 2. Die Verbindung war bei TLC auf Silicagel (Eluent: n-Propanol/AcOH/h₂O, 1:1:1) rein, wie mit einer Lösung von Fluorescamin in Aceton bei 366 nm und mit Cl_2/o -Tolidin untersucht wurde.

Smp.: 179-182°C);

1H -NMR: entsprechend Verbindung 1, wobei das tBu-Signal nicht vorlag.

[0048] Zu einer Lösung aus 8,8 ml 1 M BH_3 in THF, gehalten unter Stickstoffatmosphäre bei 0°C, wurde das Amin 2 (1,5 g, 4,3 mmol), das fein pulverisiert und in 15 ml wasserfreiem THF suspendiert war, gegeben. Die Mischung wurde unter magnetischem Rühren bei 0°C für ungefähr 30 min gehalten und dann unter Rückfluß gebracht, bis die Reaktion vollständig war (der Fortschritt der Reaktion wurde durch 1H -NMR bei Aliquoten der Reaktionsmischung, die heiß mit 3 M HCl behandelt und unter vermindertem Druck verdampft war, geprüft. Am Ende der Reaktion wurde 3M HCl zugegeben; die Reaktionsmischung wurde 3 Stunden unter Rückfluß gehalten und unter vermindertem Druck verdampft. Das rohe Reaktionsprodukt (Verbindung 3) wurde mit Wasser bei einem pH von ungefähr 12 ausgefällt und durch RP-CC (LiChroprep RP-8, 40-63 μ m; Eluent: $H_2O/CH_3CN/TFA$ -92:8:0,1) gereinigt, unter Erhalt von 1,3 g (2,3 mmol, 55%ige Ausbeute) der Verbindung 3, die bei der TLC-Beobachtung rein war (das gleiche Verfahren wurde für die Verbindung 2 verwendet).

1H -NMR, δ^H : 1,30 – 1,58 [16H, $CH(CH_2)_4$ und $NHCH_2(CH_2)_4$ und $NHCH_2(CH_2)_4$], 2,53 (d, 1H, HCHS), 2,82 (7H, HCHS und $3 \times CH_2N$), 3,05 (m, 1H, CHS), 4,12 (m, 1H, CHCHNH), 4,28 (m, 1H, CH_2CHNH), 6,38 (br, $2 \times$ Biotin NH), 8,03 (br, NH_3^+), 8,9 (br, NH_2^+).

ESI-MS: m/e berechnet $[M + H]^+$ 328,23; gefunden 328,2.

[0049] Zu einer Lösung aus DOTA- $3H_2O$ (100 mg, 0,2 mmol) in Wasser, eingestellt auf pH 9,2, wurde eine Lösung aus Sulfo-NHS (86,8 mg, 0,4 mmol) in 1 ml Wasser gegeben. Nach einigen Minuten wurde eine Lösung aus EDC (76,7 mg, 0,4 mmol) in 0,5 ml Wasser tropfenweise zugegeben und mit Eis gekühlt. Die Reaktionsmischung wurde für ungefähr 20 Minuten gerührt, danach wurde eine Lösung aus Amin 3 (111 mg, 0,2 mmol), aufgelöst in 1 ml Wasser bei pH 8,6, tropfenweise zugegeben. Nach ungefähr 3 Stunden wurde die Reaktionslösung lyophilisiert und das rohe Produkt 4 wurde durch Umkehrphasen-HPLC (C_{18} , A: 0,1 % TFA in CH_3CN ; B: 0,1 % TFA in Wasser; von 10 bis 15 % B in 20 min; Rt: 12,6 min) gereinigt, unter Erhalt von 53 mg (20 %) des Produktes, das bei TLC rein war (gleiches Verfahren für die Verbindung 2 angewandt). Der Versuch mit Fluorescamin in Aceton zum Sicherstellen des Vorhandenseins einer primären Amin-Gruppe ergab negative Ergebnisse.

$^1\text{H-NMR}$, δ^{H} : 1,3 – 1,6 [16H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_4$ und $\text{NHCH}_2(\text{CH}_2)_4$], 2,60 (d, 1H, HCHS), 2, – 2,92 (7H, HCHS und $3 \times \text{CH}_2\text{N}$), 3,04 (br a, 16H, $8 \times \text{DOTA-Ring CH}_2$), 3,11 (m, 1H, CHS), 3,61 (br s, 8H, $4 \times \text{DOTA CH}_2\text{CO}$), 4,15 (m, 1H, CHCHNH), 4,33 (m, 1H, CH_2CHNH), 6,40 und 6,44 (zwei s, $2 \times \text{Biotin NH}$), 8,27 (br, Amid NH), 8,54 (br NH_2 +).

FAB-MS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ berechnet 715,9; gefunden 715,6;

ESI-MS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ gefunden 715,4,

Elementaranalyse: Berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_8\text{O}_8\text{S-4TFA}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 40,41; H, 5,43; N, 9,42. Gefunden: C, 40,48; H, 5,45; N, 9,09.

[0050] Markierungsversuche, Avidin-Bindeversuche und Serumstabilitätsversuche wurden mit der Verbindung durchgeführt, die in dem vorgenannten Beispiel erläutert ist.

Bindeversuche

[0051] Avidin wurde mit $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin}$ bei zunehmenden Mengen an markiertem Biotin reagiert. Das Vorhandensein von anderen radioaktiven Peaks neben dem des Avidin-Biotin-Komplexes wurde durch FPLC unter Anwendung der isokratischen Bedingungen, die oben beschrieben sind, überprüft. Der Radiopeak, der dem $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin/Avidin-Komplex}$ entspricht, zeigte eine Retentionszeit von 9 min, während der Peak des nicht-gebundenen $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin}$ bei 15 min eluierte.

[0052] Die Ergebnisse der Affinitätsuntersuchungen zwischen Avidin und dem ^{90}Y -markierten Biotin-Derivat von Beispiel 1 bei dem natürlichen 1:4 molaren Verhältnis und im molaren Überschuss von Avidin (1:2) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Molare Verhältnisse Avidin/Biotin-DOTA

Avidin:Biotin molares Verhältnis	1:2	1:4
$^{90}\text{Y-DOTA-Biotin}$ (μg)	1	2
Avidin (μg)	51	51
Binung (%)	99,8	99,7

[0053] Beginnend mit einem molaren Überschuss an Avidin wurde nur ein Peak in dem Radiochromatogramm beobachtet, der dem Avidin-Biotin-Komplex entsprach. Das gleiche FPLC-Profil wurde mit einer zweifach erhöhten Menge an $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin}$ erhalten, was demonstriert, daß die natürliche Affinität des Systems aufrechterhalten wurde.

Affinitätsstudien

[0054] Der Ersatz von $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin}$ von Avidin durch die Wirkung von natürlichem Biotin (Vitamin H), ausgehend von einem Verhältnis von 1:4 Avidin:Biotin, wurde untersucht. Das komplette Binden bei dem molaren Verhältnis von Avidin:Biotin von 1:4 wurde anfangs durch Größenexklusion-FLPC unter Anwendung der oben erwähnten Bedingungen geprüft. Aliquote von dieser Lösung wurden mit erhöhenden molaren Mengen an Vitamin H zugegeben und nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden diese durch FPLC analysiert. Das Ausmaß des Ersatzes wurde durch die Reduktion des Avidin-Biotin-Radiopeaks im Vergleich zum Ansteigen des verschobenen $^{90}\text{Y-DOTA-Biotin-Radiopeaks}$ berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Affinitätsstudien mit Biotin

Avidin:Vitamin H molares Verhältnis	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
^{90}Y -DOTA-Biotin (μg)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gekuppeltes Avidin (μg)	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
Zugegebenes Biotin (μg)	0,047	0,094	0,188	0,376	0,752
Ersatz (%)	0,2	0,0	0,8	0,0	0,0

[0055] Die Ergebnisse < 1 % wurden als unterhalb des experimentellen Fehlers angesehen.

[0056] Es ist ersichtlich, daß selbst ein großer molarer Überschuß an Vitamin H das ^{90}Y -DOTA-Biotin, das bereits an Avidin gebunden war, nicht ersetzen konnte.

Stabilitätsstudien

[0057] 50 μl der markierenden Mischung, entsprechend 1,85 MBq von ^{90}Y wurden 20-fach mit Saline oder menschlichem Serum verdünnt und bei 37°C inkubiert. Lösungen wurden bei unterschiedlichen Zeitpunkten an bis zu 144 Stunden nach dem Markieren analysiert. Zur Durchführung der Analyse wurde ein Aliquot der Inkubationsmischung zu einem molaren Überschuß von Avidin gegeben. Das ^{90}Y -DOTA-Biotin/Avidin-Komplexverhältnis gegenüber freiem ^{90}Y wurde wie oben beschrieben durch FPLC bestimmt.

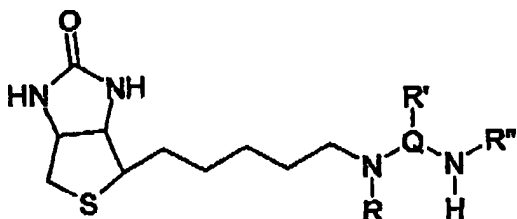
[0058] Die Stabilitätsstudien zeigten, daß in Saline die Radiomarkierung noch vollständig mit dem Avidin-Biotin-Komplex bis zu 144 Stunden assoziiert war.

[0059] Im Serum wurde nur ein Radiopeak anfangs in den Chromatogrammen der Proben, die bis 48 h inkubiert waren, ermittelt, jedoch wurde danach eine ständige Dissoziation von ^{90}Y von DOTA-Biotin beobachtet, wobei ein Maximum von 55 % bei 144 h erreicht wurde.

[0060] Beginnend in der Probe, die 72 h inkubiert war, wurde ein zweiter Peak bei einer niedrigeren Retentionszeit (8,2 min) in dem Radiochromatogramm beobachtet, was anzeigt, daß die ^{90}Y -Aktivität mit einer hochmolekularen Spezies assoziiert war, vermutlich Serumtransferrin.

Patentansprüche

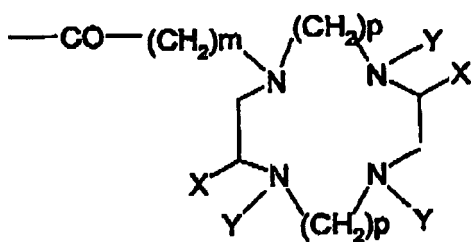
1. Verbindung der Formel (1):



worin:

Q eine $-(\text{CH}_2)_n$ -Gruppe ist, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist, wenn R' nicht existiert, oder Q ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus $-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}(\text{R}')-(\text{CH}_2)_b-$, worin a und b unabhängig voneinander ganze Zahlen von 0 bis n sind und R' wie unten definiert ist, oder Q Cyclohexyl, Phenyl ist, wenn R' ein Substituent am Cyclohexyl- oder Phenylring ist;

R Wasserstoff oder -A ist, worin -A ein Makrocyclus der Formel (II) ist:



(II)

worin die verschiedenen Gruppen Y, die gleich oder verschieden sein können, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, geradkettigem oder verzweigtem C_{1-4} -Alkyl, $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOH}$, worin m eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist; X Wasserstoff oder $-\text{CH}_2\text{-U}$ -Gruppe ist, worin U ausgewählt ist aus Methyl, Ethyl, p-Aminophenyl oder X die $-(\text{CH}_2)_o\text{-Z}$ -Gruppe ist, worin o eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist, w Wasserstoff, Methyl oder Ethyl ist, Z eine heterocyclische Gruppe mit 5 oder 6 Gliedern ist, umfassend ein oder mehrere Heteroatome ausgewählt aus O, N- R_1 , wobei R_1 ein Wasserstoffatom oder eine geradkettige oder verzweigte C_{1-4} -Alkyl-Gruppe ist, und S; oder Z ausgewählt ist aus $-\text{NH}_2$, $-\text{NH-C(=NH)-NH}_2$ oder $-\text{S-R}_2$, worin R_2 eine geradkettige oder verzweigte C_{1-4} -Alkyl-Gruppe ist;

p eine ganze Zahl von 2 oder 3 ist;

R' ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, geradkettigem oder verzweigtem C_{1-4} -Alkyl, $-(\text{CH}_2)_q\text{-T}$, worin T ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus S- CH_3 , $-\text{OH}$ oder $-\text{COOH}$ und q die ganze Zahl von 1 oder 2 ist;

R'' die gleiche Bedeutung wie R hat, mit den folgenden Bedingungen:

wenn R -A ist, ist R'' Wasserstoff; wenn R Wasserstoff ist, ist R'' -A, oder R und R'' sind $-(\text{CH}_2)_r\text{-A}$ (für R), wenn R eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist, bzw. -A (für R''), wobei Q eine $-(\text{CH}_2)_n$ -Gruppe ist, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 12 ist.

2. Komplex der Verbindung der Formel (I) mit einem Radioisotop nützlich für therapeutische und/oder diagnostische Zwecke.

3. Komplex nach Anspruch 2, worin das Radioisotop aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus 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 und Au-198.

4. Komplex nach den Ansprüchen 2 und 3, worin in der Verbindung der Formel (I) Q $-(\text{CH}_2)_n-$ ist, worin n eine ganze Zahl von 4 bis 8, bevorzugt 6 ist, Y $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ist und das Radioisotop Y-90 ist.

5. Pharmazeutische und/oder diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, in einer Mischung mit geeigneten Vehikeln und/oder Exzipienten.

6. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei der Behandlung von Tumoren nützlich ist.

7. Pharmazeutische und/oder diagnostische Zusammensetzung, umfassend einen Komplex nach einem der Ansprüche 2, 3 oder 4, in einer Mischung mit geeigneten Vehikeln und/oder Exzipienten.

8. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 2, 3 oder 4 zur Herstellung eines Arzneimittels als Antikrebs-Radiopharmazeutikum.

9. Kit für die Radiotherapie oder Diagnose von Tumoren, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine der Komponenten des Kits eine Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 enthält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen