

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 7/64

A61K 51/08

/(C07K103:00,

A61K103:32,

A61K103:30)



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95115610.1

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1185252C

[22] 申请日 1995.9.5 [21] 申请号 95115610.1

[30] 优先权

[32] 1994.9.6 [33] GB [31] 9417873.8

[71] 专利权人 诺瓦蒂斯有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·艾伯特 C·布朗斯

P·史密夫一琼斯 B·施托兹

G·韦克贝克

审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

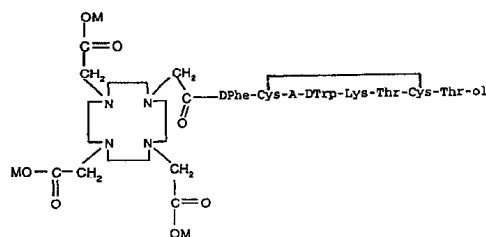
代理人 杨九昌 孟八一

权利要求书 2 页 说明书 11 页

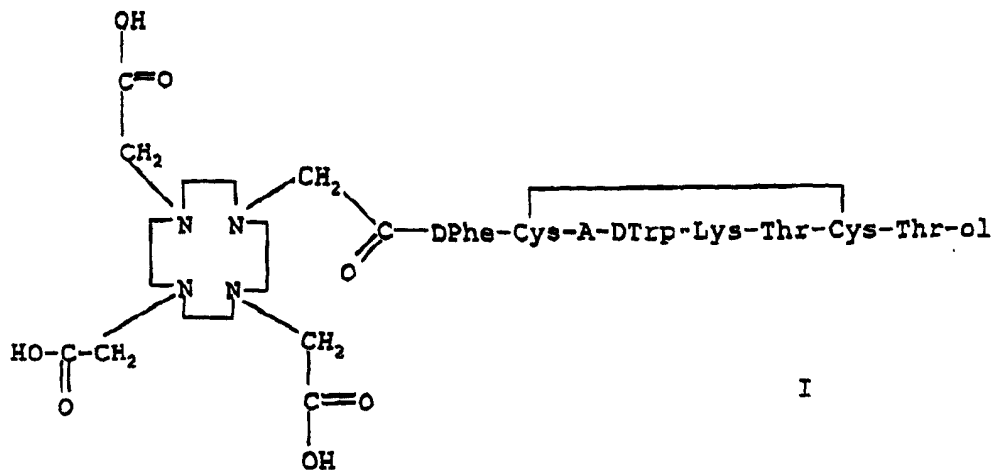
[54] 发明名称 生长激素释放抑制因子肽类

[57] 摘要

游离形式或盐形式的具有如下式 I 的化合物，
当与 α -或 β -射线放射性核素或具俄歇电子级
联核素配合后，用作放射性药物：式中，M 是一当
量的阳离子，A 是苯丙氨酸或酪氨酸。



1. 游离形式、盐形式或与放射性核素配合形式的如下所示的式 I 化合物:



式中,

M 是阳离子, 和

A 是酪氨酸。

2. 按照权利要求 1 的化合物, 其中该化合物与 ^{90}Y 配合。

3. 按照权利要求 1 的化合物, 其中该化合物与 ^{161}Tb 配合。

4. 按照权利要求 1 或 2 的化合物, 其中 M 是 H^+ 。

5. 按照权利要求 3 的化合物, 其中 M 是 H^+ 。

6. 按照权利要求 1 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐作为制造放射性药物组合物的用途。

7. 按照权利要求 6 的用途, 其中作为制造用于治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤和次生肿瘤的放射性药物用途。

8. 一种药物组合物, 该组合物包含按照权利要求 1 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐以及一种或一种以上的药学上可接受

的载体或稀释剂。

9. 按照权利要求 8 的组合物，其中该组合物还包含一种稳定剂。

10. 按照权利要求 9 的组合物，其中所述的稳定剂是从血清白蛋白、抗坏血酸、维生素 A、2,5-二羟基苯甲酸和一种氨基酸溶液选出。

11. 一种将权利要求 1 的式 I 化合物与放射性核素配合的方法，该方法包括使该式 I 化合物与产生放射性核素的化合物在 60~120 °C 以及任选地在一种稳定剂存在下进行反应。

12. 一种组合物，该组合物为用于治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤侵入或与肿瘤生长有关的症状的治疗性组合物，该组合物包括一种药用组合物，该药用组合物含有一种与放射性核素配合的权利要求 1 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐，而且还包括至少一种含有细胞生长抑制剂的药用组合物。

13. 一种组合物，该组合物为用于治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤侵入或与肿瘤生长有关的症状的治疗性组合物，该组合物包括一种药用组合物，该药用组合物含有一种与放射性核素配合的权利要求 1 的式 I 化合物或其药学上可接受的盐，而且还包括具有高含量的赖氨酸和/或精氨酸的一种氨基酸溶液。

生长激素释放抑制因子肽类

技术领域

本发明涉及生长激素释放抑制因子肽类，制备它们的方法，含它们的药物制剂和它们作为放射性药物用于例如放射性治疗生长激素释放抑制因子受体阳性瘤(positive tumors) 的用途。

背景技术

采用放射性化合物的肿瘤的放射性疗法具有选择性地将肿瘤及其次生肿瘤作为目标的优点，所以，可限制对正常组织的放射剂量。放射性治疗剂应该能在靶器官如肿瘤上迅速蓄积和有高的滞留性并迅速从循环系统清除以便减少全身的放射剂量。基于螯合的放射性金属的放射性治疗剂在热力学上和/或动力学上也应该是稳定的，以防止该放射性金属的损失。反复给药的放射性治疗剂不应该是产生免疫的。

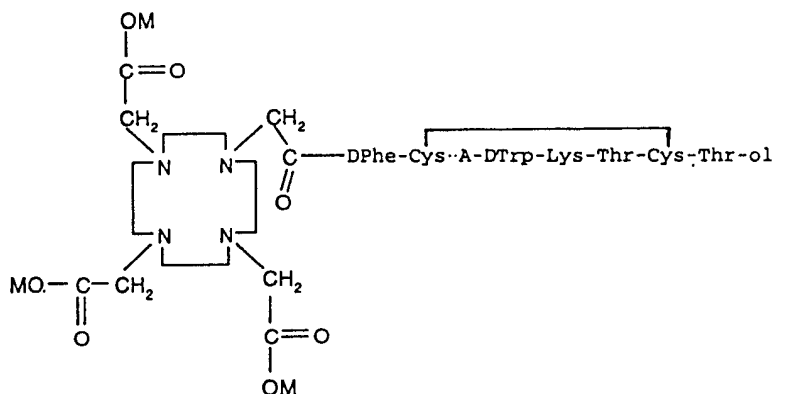
GB-A-2,225,579公开了带至少一个螯合基团的生长激素释放抑制因子肽类，它能被放射性标记用于体内诊断和治疗。这些化合物能与生长激素释放抑制因子受体结合，(例如被肿瘤或次生肿瘤表达或过度表达的受体)。EP-A2-607,103公开生长激素释放抑制因子肽类，它们含借助间隔基(spacer group) 与其末端氨基相接的双官能多氨基多羧酸螯合基团。但是，尽管双官能螯合基团(八齿) 和间隔基存在导致生成的结合物的某些性质的改变，仍然迫切需要进行进一步改良性质的放射性药物，尤其具高的靶/肾比放射性药物，以便将肾中的放射剂量减至最小。

发明内容

正如在下文中公开的，现在已发现含直接(即无间隔基) 与生长激素释放抑制因子肽类的末端氨基结合的单官能DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸) 的生长激素释放抑制因子肽类具有改良的特性。尤其它们具有更好的肿瘤/肾比，因此到达肾的放射

剂量更低。

按照本发明提供游离形式、盐形式或与放射性核素配合形式的具如下式I的化合物：



式中

M是阳离子和

A是苯丙氨酸或酪氨酸。

很容易理解，在上边DOTA式中每个联接二个氮原子的“ $\square$ ”键代表1,2-亚乙基。

当A是苯丙氨酸时，式I化合物的肽部分相当于octreotide。当A是酪氨酸时，肽部分相当于[Tyr³] -octreotide。

A优选酪氨酸。

M可以是H⁺或羧基的任意成盐阳离子，例如一价阳离子或一当量的多价阳离子，例如，碱金属离子如钠、钾离子或取代或未取代的铵离子。

式I化合物也可以如内盐的形式(当M是H⁺时)或酸加成盐形式存在。酸加成盐包括如加入有机、聚合或无机酸所得盐，例如水合氯化物(chlorhydrate)、乙酸盐、三氟乙酸盐或乳酸盐。

所谓放射性核素指 α -或 β -射线核素或带有俄歇电子级联(Auger-c⁻-cascades)的核素。适合的核素包括如⁶⁴Cu、⁶⁷Cu或放射性镧系元素,尤其⁹⁰Y、¹⁴⁰La、¹⁶¹Tb、¹⁶⁹Er、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho或¹⁷⁵Yb,以¹⁶¹Tb和⁹⁰Y为佳,以⁹⁰Y最好。

本发明也包括制备式I化合物的方法。它们可通过与已知方法类似方法制备,例如,式I化合物可按如下过程制备:

- a) 除去至少一个被保护形式式I化合物中存在的保护基团,或
- b) 通过酰胺键联结两个肽单元,其中之一含至少一个保护或未保护形式的氨基醇,而其中另一个含DOTA基团,其中该酰胺键采用的方式应能获得式I的所需的氨基酸顺序,然后可任选完成该过程的步骤a),或
- c) 以这样的方式联接DOTA和保护或未保护形式的所需的生长激素释放抑制因子肽类,以使从DOTA衍生的基团固定在该肽类的末端氨基上,然后可任选完成步骤a),或
- d) 氧化其氨基酸顺序如式I中所述的DOTA-肽,其中半胱氨酸的巯基以游离形式存在以便生成两个半胱氨酸基通过-S-S-桥联接的式I化合物。

于是,获得游离形式、盐形式或以与放射性核素配合形式的式I化合物。

以上的反应可按与已知方法类似的方法完成,例如下例中所述的方法。在这些反应中,需要时,可使用适用于肽类或DOTA螯合基团的保护基团作为官能基团,该官能基团不参与该反应。所谓保护基团也可包括具官能基团的聚合物树脂。DOTA可以游离酸的形式,可作为酸酐或活性酯(例如与N-羧基琥珀酰亚胺)用在步骤c)过程中。

与放射性核素的配合过程可在室温下按照现有技术已知的方法来进行,例如,使未配合的式I化合物与能产生所需放射性核素的盐反

应。

式I的未配合化合物与得到放射性核素的盐的配合过程在 $60^{\circ}\sim 120^{\circ}\text{C}$ 下进行为佳, 以在 $80^{\circ}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 下进行更好。当完成配合过程的温度 $>100^{\circ}\text{C}$ 时, 可在高压釜内进行。加热下的配合过程可容易地在短时间内进行, 例如10~20分钟。当该放射性核素是 ^{90}Y 时, 优选的能生成 ^{90}Y 盐是 $^{90}\text{YCl}_3$ 。

在避免微量金属污染的条件下, 上述反应可容易地进行。优选使用去离子蒸馏水, 超纯试剂, 不加载体放射性物质等, 以便降低微量金属的作用。

式I化合物在与放射性核素配合后具有药物活性, 所以, 它们可作为有效的放射性药物用在体内治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤和次生性肿瘤, 这可由标准试验所表明。

特别是式I化合物对生长激素释放抑制因子受体具有亲合性, 这可通过体外按照J.C. Reubi (Life Sc. 36, 1829(1985)) 和C Bruns等 (Biochem. J., 265, 39(1990)) 公开的结合分析方法对其作评估。

据观察式I化合物例如与 ^{90}Y 或 ^{161}Tb 配合的式I化合物与生长激素释放抑制因子受体结合具有良好的亲合性和专一性, 其 pK_D 值约8.0~10.0。

实施例1化合物以高度亲合性与在小鼠皮质或AR42J胰腺肿瘤细胞上表达的生长激素释放抑制因子受体结合: 它以 $[\text{}^{125}\text{I}][\text{Tyr}^3]\text{-octreotide}$ 作为特定的配位体, 具有的 pK_i 值为 8.9 ± 0.1 。实施例2的化合物是生长激素释放抑制因子受体的特定配位体, 它被 octreotide 从生长激素释放抑制因子受体上置换, 其 $\text{pIC}_{50}=9.0\pm 0.3$ 。

式I的配位化合物对生长激素释放抑制因子受体的亲合性也可按照标准试验方法, 例如在GB-A-2,225,579上公开方法, 通过体内试验来表明。例如, 在一项试验中, 以 $5\mu\text{Ci}$ 的剂量给患外分泌胰腺肿瘤

的小鼠腹膜内注射(i. p. injection) 实施例2的化合物后2小时, 该化合物产生显著的肿瘤部位蓄积; 在生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤部位的存在量为 $9.53 \pm 0.70 \% \text{ID/g}$, 而在生长激素释放抑制因子受体阳性正常组织中蓄积明显较少量的放射性, 例如在胰腺它的量为 $1.52 \pm 0.08 \% \text{ID/g}$ 。所谓 $\% \text{ID/g}$ 指的是每克组织注射的放射性剂量的百分比。实施例2化合物提供注射后24小时的高的肿瘤/肾比, 以及高的肿瘤/肝比和肿瘤/股骨比。骨髓被认为是对放射性最敏感的器官, 只有少量的放射性在骨部位蓄积是有利的。

与放射性核素配合的式I化合物对带有生长激素释放抑制因子受体的肿瘤细胞具有抗增殖作用, 例如像在裸鼠试验中所表明的一样。

AR42J小鼠胰腺肿瘤细胞受胰蛋白酶作用, 将 1×10^7 肿瘤细胞(在0.2ml中)皮下注射到裸鼠的两肋。当肿瘤达到0.1~2ml显著的体积时, 将动物随机分为对照组和治疗组。对照组动物以相应治疗组最高剂量的剂量腹膜内注射给式I的未配合化合物或者相应的式I的冷配合(cold complex)化合物。每只鼠给药量从0.8mCi至到40mCi/kg/100 μ l。用卡尺测量肿瘤的大小。使用公式“体积(椭圆球体) = 长度 $\times$ 深度 $\times$ 高度 $\times 0.52$ ”计算肿瘤的体积(ml)。采用Student's T试验作为统计学计算方法。在该试验中, 在单纯使用实施例2化合物一周后观察到暂时的肿瘤收缩, 肿瘤生长被延迟了两周。相比之下对照组在约七天内肿瘤持续增大, 体积加倍。治疗组的生存率显著增高。

当用实施例2化合物治疗患其它类型肿瘤的小鼠或大鼠时, 如乳房癌或小细胞肺癌, 取得类似的结果。

因此, 在一系列特定的或选择的实施方案中, 本发明也提供:

1. 与放射性核素配合的式I化合物或其药学上可接受的盐作为在体内治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤和次生肿瘤方面的用途

2. 用于在体内治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤和次生肿瘤, 例如用于治疗该肿瘤的侵入或与其生长有关的症状的方法, 该方法给需要这种治疗的患者提供, 它包括给予该患者有效治疗量的与放射性核素配合的式I化合物或药学上可接受的盐。

3. 式I化合物或其药学上可接受的盐在制备放射性药物组合物方面的用途。

当然, 实际采用的本发明的放射治疗的剂量将根据例如被治疗的具体情况而改变, 例如随已知该肿瘤类型的放射敏感性、肿瘤的体积和所需的治疗而改变。通常是根据在每个器官的放射性分布和根据观察到的靶向部位的吸收来计算所用放射剂量。式I的 β -射线配合物可以在1~3周或更长时间内分几次给药。指示的剂量范围是与例如10~100mCi放射性核素如 ^{90}Y 或 ^{161}Tb (对于 ^{161}Tb 优选高放射性范围)配合的5~100 μg 的式I化合物。

与放射性核素配合的式I化合物可按常规途径给药, 特别是静脉注射, 例如以注射溶液或混悬液形式静注。它们也通过输注(infusion)有利给药例如30~60min输注。根据肿瘤的部位, 可尽可能接近肿瘤部位给药, 例如通过导管给药。也可将药物分几次剂量重复给药。

可用与放射性核素配合的式I化合物治疗的肿瘤包括: 例如垂体、胃肠胰、类癌、中枢神经系统、乳房、前列腺、卵巢、或结肠肿瘤、小细胞肺癌、嗜铬细胞瘤、肾癌、皮肤癌、神经母细胞瘤、嗜铬细胞瘤、甲状腺癌、骨髓瘤、淋巴瘤、Hodgking和非Hodgkins病、骨瘤和它们的次生肿瘤。

放射性化合物基本上从肾脏排泄。通过给予赖氨酸或精氨酸或含量高赖氨酸和/或精氨酸的氨基酸溶液可以避免放射性蓄积保护肾脏, 例如, 在注射式I的配合物前或同时给予易购的氨基酸溶液如Vamina^R 18EF或Synthamin^R -14或-10。

与放射性核素配合的式I化合物可以游离酸形式或以药学上可接受盐的形式存在；其盐形式所具有的放射性量级与游离酸形式的配合物相同。

优选与 ^{90}Y 配合的实施例I化合物。

按照本发明的另一方面，提供含式I化合物或与放射性核素配合的式I化合物或其药学上可接受的盐以及一种或一种以上的药学上可接受的载体或稀释剂的药用组合物。该组合物可按常规方法制备。

按照本发明的优选实施方案，基于与放射性核素配合的式I化合物的药用组合物还含稳定剂，如自由基清除剂，它阻止肽类部分自辐解。适合的稳定剂包括例如血清白蛋白、抗坏血酸、维生素A、2,5-二羟基苯甲酸或其衍生物，或氨基酸输注液，例如，优选不含电介质和葡萄糖用作肠道外蛋白补给的如易购的氨基酸输注液如

Proteinsteril KE Nephro。优选抗坏血酸。该稳定剂可按其与未配合式I化合物的重量比为1,000~10,000比1；优选4,000~7,000比1容易地被使用。该药用组合物可含其它添加剂例如调节pH在7.2~7.4之间的pH调节剂，如醋酸钠或醋酸铵或磷酸氢二钠。优选将稳定剂加到未配合的式I化合物中，在稳定剂存在下与放射性核素配合过程或在室温下或优选在60~120℃下进行。该配合过程在不含空气条件下，如在氮气或Ar条件下，可容易地被进行。在配合过程后也可将其它稳定剂加入该组合物中。

与放射性核素配合的式I化合物也可用于呈现生长激素释放抑制因子受体的免疫疾病或炎症，例如类风湿性关节炎的治疗。

按照本发明的另一实施例，与放射性核素配合的式I化合物可用作抑制细胞治疗的添加剂或辅助剂，例如，与细胞抑制剂结合使用，优选通过充当放射致敏剂增强放射性治疗效果的细胞抑制剂。适合的细胞抑制剂或放射致敏剂包括例如顺氯氨铂、5-氟尿嘧啶、环磷酰

胺和阿霉素。

按照前面所述, 本发明在另一方面提供:

4. 用于治疗生长激素释放抑制因子受体阳性肿瘤侵入或与该肿瘤生长有关的症状的方法, 该方法给需要这种治疗的患者使用, 它包括给予该患者有效量的a) 与放射性核素配合的式I化合物或它的药学上可接受的盐和b) 第二种药物, 这第二种药物是细胞抑制剂。

5. 用于治疗肿瘤侵入或与肿瘤生长有关的症状的治疗用组合物, 例如该组合物包括含与放射性核素配合的式I化合物或其药学上可接受的盐的药用组合物且还包括至少一种含细胞抑制剂的药用组合物, 例如医用套盒。

细胞抑制剂可按已知是有效抑制细胞量或放射致敏量中任何量来使用。该细胞抑制剂可与式I放射性药物伴随加入或按顺序安排加入。
具体实施方式 下列实施例用于说明本发明。所有温度均以℃为单位。使用下列缩写词:

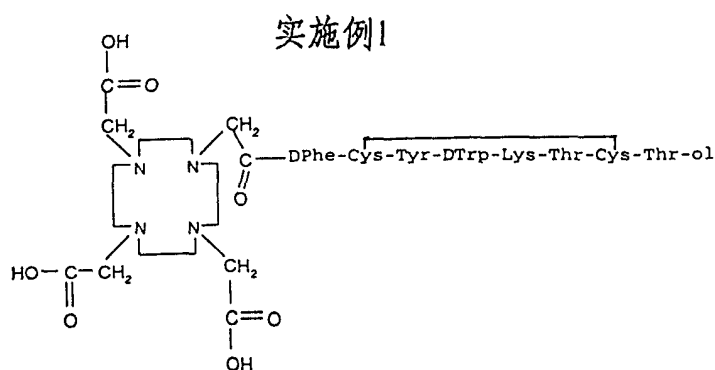
Fmoc = 9-苄基甲氧羰基

Boc = 叔丁氧羰基

DOTA = 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸

DMF = 二甲基甲酰胺

Octreotide = $\text{H-DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH}$



将6g二水合DOTA(游离酸)溶在50ml水(pH~3.7)中,在用60ml DMF稀释后,立即加入1g的N-羟基琥珀酰亚胺,2.7g的N,N-二环己基碳化二亚胺(DCCl)和3g的[Tyr³, ε-Boc-Lys⁵]-octreotide。在持续搅拌下,室温维持反应72小时。通过硅胶60柱纯化将ε-Lys⁵保护化合物分离,用二氯甲烷/甲醇/50%醋酸(9/1/0.125)作为流动相。

随后使用三氟乙酸(TFA, 100%)在室温下用10分钟时间将Lys⁵保护基团裂解,并用硅胶60柱(流动相:二氯甲烷/甲醇/50%醋酸(7/3/1至7/5/2)和RP18-HPLC柱(水/乙腈/1%醋酸作为缓冲液体系)纯化,得到纯的和匀相的,醋酸盐形式的目标化合物。FAB-MH⁺: 1421, [α]_D²⁵ = -14.75°(95%AcOH; C=0.52)。

实施例2: 用⁹⁰Y标记的实施例1化合物

通过将20μl的⁹⁰Y(1.2mCi, 0.04MHCl)加到20μl的50μM实施例1化合物(0.15M NH₄OAc, 0.3%BSA, pH4.5)中制备⁹⁰Y标记螯合物。将该溶液在100℃保温培养15min。等分取出样品并在用C18反相HPLC分析前用4mM DTPA(pH4.5)稀释以便确定在反应混合物中的游离未螯合⁹⁰Y的量(由[⁹⁰YDTPA]²⁻的存在得以证实)。其放射化学纯度一般>99.5%且生成的螯合物在4mMDTPA(4nM的实施例1化合物, pH4.5)中经7天时间在动力学上稳定。

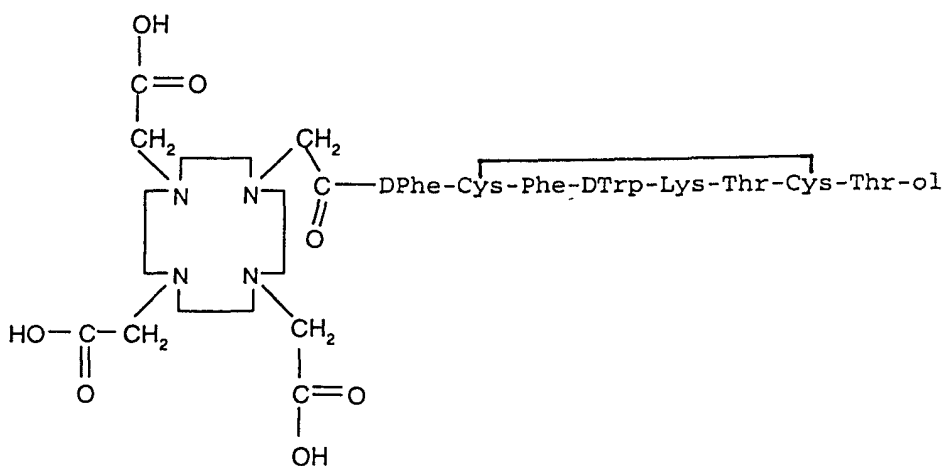
实施例3: 用⁹⁰Y标记的实施例1化合物

将120 μ l 的0.23M抗坏血酸、0.15M醋酸铵(pH4.8)、6 μ l 的1mM的实施例1化合物和120 μ l 的 ^{90}Y (85mCi/ml, 0.04M HCl) 在沸水浴中的管形瓶中加热15min。将所得溶液用乙醚、0.23M的抗坏血酸和0.15M NH_4OAc 或Proteinsteril^R KE Nephro氨基酸输液稀释到1ml并在环境温度下长期贮存。

Proteinsteril^R KE Nephro氨基酸溶液含:

11.4g/l亮氨酸, 9.63g/l赖氨酸、9.53g/l缬氨酸, 7.76g/l苯丙氨酸, 7.52g/l异亮氨酸, 6.78g/l苏氨酸, 6.59g/l蛋氨酸, 4.9g/l组氨酸和2.91g/l色氨酸。

实施例4



重复实施例1过程, 只是使用 ϵ -Boc-Lys^t-octreotide得到目标化合物。

MS(Ion Spray): 1403(M-H)

实施例5: ^{90}Y 标记的实施例4化合物

重复实施例2的标记过程得到 ^{90}Y 螯合物。

实施例6: ^{161}Tb 标记的实施例1或4化合物

使用 ^{161}Tb 生成盐代替 ^{90}Y 生成盐,重复实施例2的标记过程得到 ^{161}Tb 螯合物。