(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101189242 B
(45)授权公告日 2011.04.13

(21)申请号 200680019752.6

(22)申请日 2006.05.31

(30)优先权数据
RM2005A000345 2005.06.30 IT

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.12.03

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2006/062800 2006.05.31

(87)PCT申请的公布数据
WO2007/003478 EN 2007.01.11

(73)专利权人 希格马托制药工业公司
地址 意大利罗马

(72)发明人 M·马兹 M·迪马佐

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 陈轶兰

(51)Int.Cl.
C07D 495/04(2006.01)

(56)对比文件
WO 2005/037210 A2,2005.04.28, 说明书第165页第15行到第166页第5行，图13.
WO 93/25240 A2,1993.12.23, 全文.
CN 1531445 A,2004.09.22, 说明书第15页12行到21行.

审查员 李强

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54)发明名称

去氧生物素基六亚甲基二胺-DOTA的合成

(57)摘要

本文描述了合成去氧生物素基六亚甲基二胺-DOTA的方法。所述方法包含，在有作为缩合剂的六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷和作为碱的三乙胺存在下，使生物素基六亚甲基二胺与三叔丁基-DOTA反应。

CN 101189242 B

1. 合成去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA 的方法，其包含，在有作为缩合剂的六氟磷酸苯并三唑 -1- 基 - 氧基三吡咯烷基磷和作为碱的三乙胺存在下，使生物素基六亚甲基二胺与三叔丁基 -DOTA 反应，并且其包含在酸性 pH 的含水环境中水解的后续步骤。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中生物素基六亚甲基二胺与三叔丁基 -DOTA 在有机溶剂中反应。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中所述有机溶剂是二氯甲烷。

去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA 的合成

发明领域

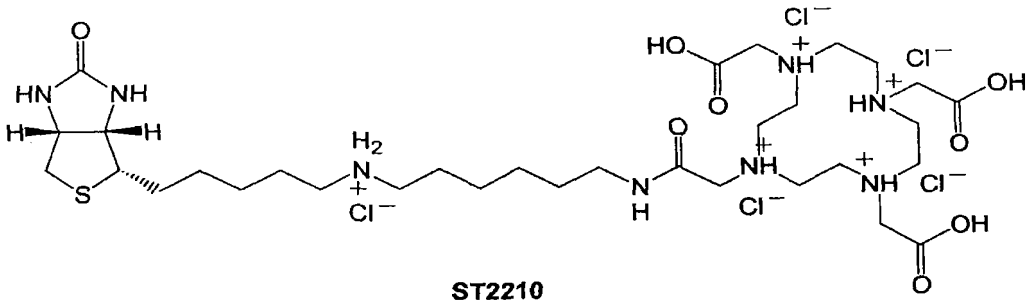
[0001] 本文公开的发明涉及改进的合成去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA 的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在申请人名下的国际专利申请 WO 02066075 中，已经描述了化合物去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA。 DOTA 是 1，4，7，10- 四氮杂环十二烷四乙酸 (1，4，7，10- 四氮杂环十二烷四乙酸)。

[0004] 为完整起见，本文公开去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA 的结构式。

[0005]



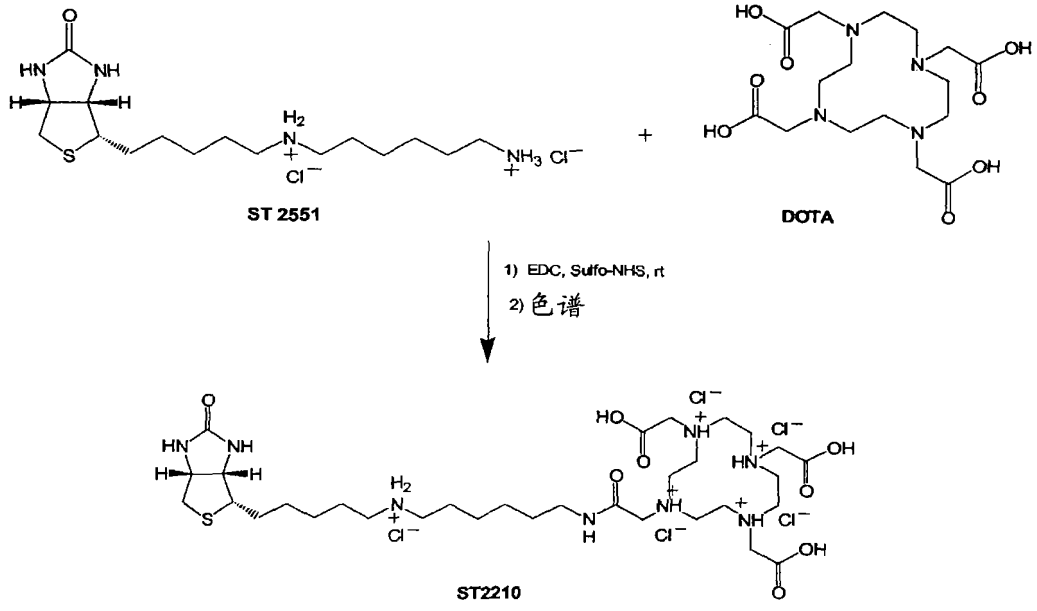
ST2210

[0006] 在同一专利申请 WO 02066075 中，也描述了合成该产物的方法，并在上述申请第 15 页上的实施例中予以报道。 本文报道为 ST2210 的化合物与 WO 02066075 实施例中的化合物 4 相对应。 更具体地，用制备型色谱获得中间产物生物素基六亚甲基二胺盐酸盐 (ST2551 或 WO02066075 实施例中的化合物 3)，产率为 55%，滴定度未限定。

[0007] 如图 1 所示，通过缩合 ST2551 和 DOTA，获得最终的去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA 产物 (ST2210 或 WO02066075 实施例中的化合物 4)。

[0008] 图 1

[0009]



[0010] 以此方式进行的反应产生低的合成产率（在DOTA中存在4个未保护的羧基官能团当量，参与形成多种副产物）和纯化的问题。 实际上，为了得到最终产物，必需使用制备级HPLC，产率为20％。

[0011] 发明描述

[0012] 在放大研究中，为了提高该方法的产率和使纯化过程更容易，检查了替代合成方法：

[0013] 与早前所述的方法相比，改进的合成方法具有下述优点：

[0014] 1.在偶联步骤或缩合（在WO 02066075中描述为″步骤d″）中，三叔丁基-DOTA的应用避免了更多缩合产物的形成，这是由于游离羧基的部分反应性（甚至在控制的pH条件下工作时也发生）；

[0015] 2.仍然在相同步骤中，改变了缩合剂和碱；使用六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷（PyBOP-六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷）作为缩合剂，三乙胺（TEA）作为碱，得到了提高的产率；

[0016] 3.生物素基六亚甲基二胺（ST2251）用作游离碱，已经证实，二盐酸盐的应用会造成不希望的产物的量增加；更具体地，显著形成了与二聚体相对应的副产物，其中ST2551与2分子的三叔丁基-DOTA反应；

[0017] 4.最后一步是在酸性含水溶液中水解3个叔丁基基团，例如使用与产物不同比例的3N-6N HCl，持续时间是1小时至12小时，产率是96％-98％；

[0018] 5.从合成工艺中删除了2个相当费力的制备型色谱阶段；

[0019] 6.获得产品的滴定度为94％-96％。

[0020] 因此，本发明的目的是，合成去氧生物素基六亚甲基二胺-DOTA的方法，其包括，在有作为缩合剂的六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷和作为碱的三乙胺存在下，使生物素基六亚甲基二胺与三叔丁基-DOTA反应。

[0021] 因此，本发明的方法包含，在缩合步骤之后的一个步骤，即在酸性pH水解。

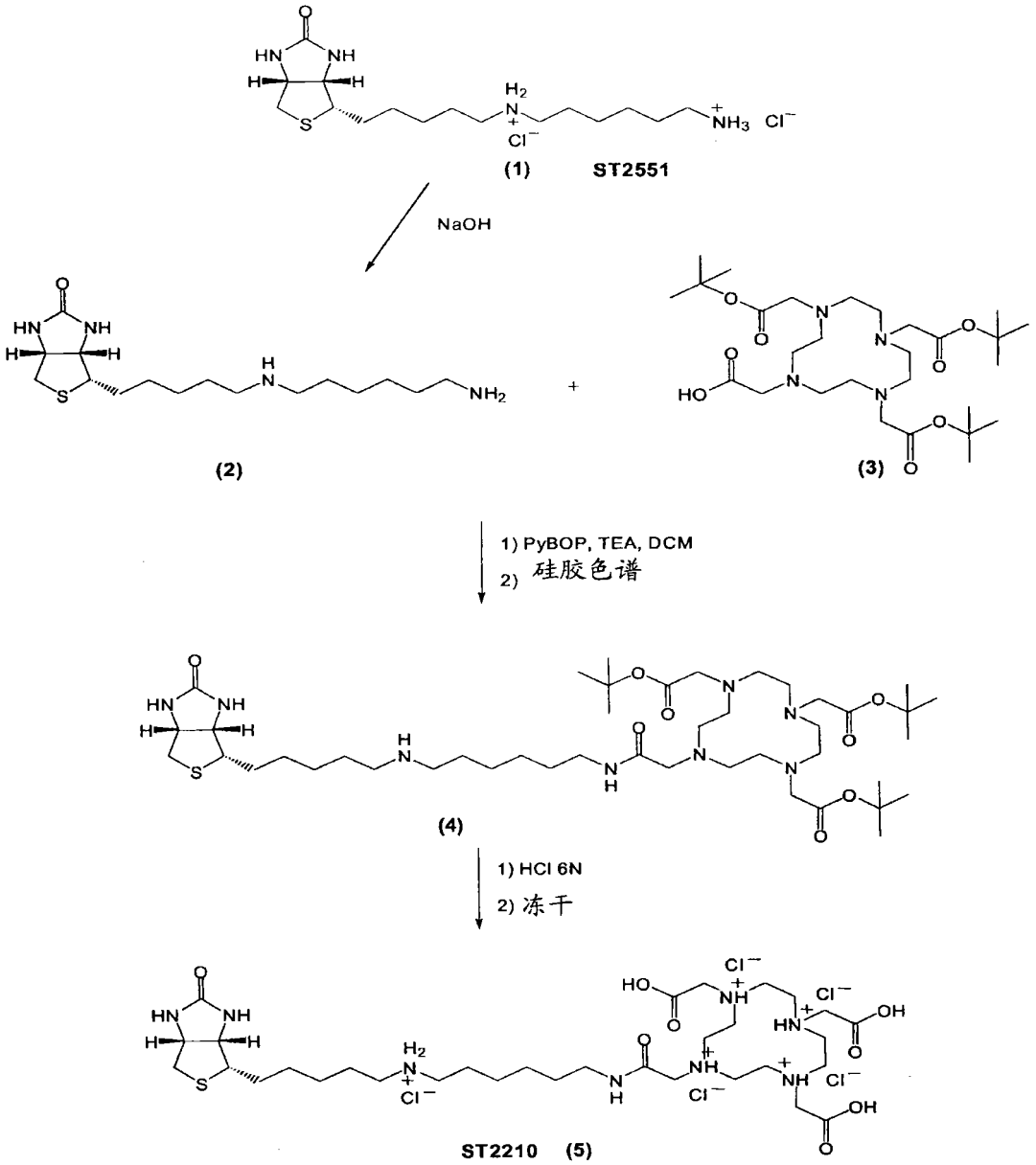
[0022] 缩合优选地在有机溶剂中进行。 更优选地，该溶剂是二氯甲烷。

[0023] 在分析过的方法中，开发的最好的合成方法是包含图2所示的阶段的方法。

[0024] 另外，用实施例解释了本发明，这些实施例不以任意方式限制发明本身。

[0025] 图2

[0026]



[0027] 实施例（化合物的编号参见图 2）

[0028] 方法

[0029] 使用连接到二极管阵列检测器和具有电喷射的质谱仪上的分析型 HPLC 系统，监测进行的试验。 开发的分析方法包含，使用 ACE C-18 分析柱（150×4.60mm，5μ），流速为 1.0mL/min，线性洗脱梯度为在 20min 内 5-95％的 B（A = H_2O+0.1％ TFA；B = AcCN+0.1％ TFA），或在 20min 内 10-90％的 B，或者 10％ B 等度溶液保持 6min，随后在 20min 内梯度 10-90％的 B。 关于最终产物 ST2210，使用在 15％ B 等度溶液中工作的方法 40min。 通过检测器检查的波长范围是 205-400nm。

[0030] 通过 TLC 快速监测包含，使用 OEt 酸类型：异丙醇： NH_3 30％或 DCM ：异丙醇： NH_3 30％（4 ： 5 ： 1）的洗脱液混合物，借助于 I2 或磷钼试剂，揭示分选出的产物（紫外不可见）。

[0031] 作为游离碱的生物素基六亚甲基二胺（ST2551）(2) 的制备

[0032] 将产物 ST2551[(1)，纯度 91％，400mg，1.0mmol) 溶于水 (20mL) 中，将溶液置于分液漏斗中；加入 NaOH 2M 溶液 (20mL)，将沉淀的产物用 DCM(40mL) 萃取 3 次。用无水 Na_2SO_4 脱水合并的有机相，在减压下蒸发。得到的产物 (2) 是白色固体 (290mg，产率＝ 98％)。

[0033] ^{1}H-NMR(200MHz， $CDCl_3$) δ (ppm)：1.25-2.05[m，16H， $CH(CH_2)_4$ 和 $NHCH_2(CH_2)_4$)]；2.50-3.30(m，9H，2xHCHS 和 CHS 和 3xCH_2N)；4.32(m，1H，CHCHNH)；4.51(m，1H，CHCHNH)；5.77(s，1H，CONH)；6.05(s，1H，CONH).

[0034] ES-MS m/z：329.5$[M+H]^+$。

[0035] 去氧生物素基六亚甲基二胺 - 叔丁基 -DOTA(4) 的合成

[0036] 在室温，搅拌三叔丁基 -DOTA[(3)，524mg，0.915mmol，1 当量]，PyBOP(714mg，1.37mmol，1.5 当量) 和三乙胺 (166μL，1.19mmol，1.3 当量) 于 DCM(5mL) 中的溶液 10 分钟，逐滴加入 ST2551- 游离碱 [(2)，300mg，0.915mmol，1 当量) 于 DCM(5mL) 中的溶液中，后一种溶液通过在 40℃加热混合物 5min 得到。在室温反应 3 小时，根据上述方法，通过 TLC 和 LC-MS 监测反应的完全。

[0037] 在反应结束时，在减压下蒸发溶剂，将残余物溶于 DCM 中，用 NaOH 1M 洗涤 2 次。在 Na_2SO_4 上脱水有机相，并在真空下蒸发。将这样得到的残余物接受硅胶柱色谱 (粗产物：二氧化硅的重量比为 1 ： 30)，使用 5 ： 4 的 DCM 混合物：异丙醇作为洗脱液系统，向其中加入递增浓度的 30％氨水 (0.2-1)。给柱填充初始 DCM 混合物：异丙醇：NH_3(5 ： 4 ： 0.2)，用 NH_3 梯度继续该方法 [洗脱液混合物通常在搅拌后变得均匀；只是在洗脱的最后阶段，NH_3 ＝ 1，可能证实必需加入异丙醇来提高混溶性，在该情况下，使用体积比 (4 ： 5 ： 1)(DCM ：异丙醇：NH_3)。得到浅黄色油状产物，其在真空下倾向于产生泡沫状固体 [(4)，600mg，产率＝ 74％)。^{1}H-NMR(300MHz，DMSO-d_6，T ＝ 50℃) δ (ppm)：1.16-1.70(m，43H，$CH(CH_2)_4$ 和 $NHCH_2(CH_2)_4$ 和 9 x CH_3)；2.40-3.32(m，34H，2 xHCHS 和 3 x CH_2N，8 x DOTA- 环 CH_2 和 CHS 和 4 x DOTA CH_2CO 和 NH 胺)；4.13(m，1H，CHCHNH)；4.29(m，1H，CHCHNH)；6.18(s，1H，NH 生物素)；6.21(s，1H，NH 生物素)；8.10(t，1H，NH 酰胺)。

[0038] ^{13}C-NMR(75MHz， DMSO-d_6) δ (ppm)：27.22；27.35；27.56；28.50；28.61；29.04；29.23；30.14；30.25；30.39；39.14；40.42；50.07；52.59；52.82；53.24；54.72；56.14；56.92；57.38；59.31；60.05；61.90；80.75；163.34；170.98；171.25.

[0039] ES-MS m/z：883.4$[M+H]^+$.

[0040] 去氧生物素基六亚甲基二胺 -DOTA[ST2210， (5)] 的合成

[0041] 在室温，搅拌 (4)(210mg，0.238mmol) 于 HCl 6N 中的溶液 [1mL， (4) 的 20％ w/v 溶液]1 小时。然后，在减压下蒸发混合物，将残余物溶于 H_2O(约 1 ： 50w/v) 中，将溶液冷冻干燥。得到白色固体 (205mg，96％)。^{1}H-NMR(200 MHz， DMSO-d_6) δ (ppm)：1.30-1.77[m，16H， $CH(CH_2)_4$ 和 $NHCH_2(CH_2)_4$]；2.59(d，1H， HCHS)；2.77-2.88(m，7H， HCHS 和 3 x CH_2N)；2.98-3.70(m，25H，8 x DOTA- 环 CH_2 和 CHS 和 4x DOTA CH_2CO)；4.15(m，1H，CHCHNH)；4.31(m，1H，CHCHNH)；7.58(br s，2H，2 x 生物素 NH)；8.86(t，1H，NH 酰胺)；9.19(br s，2H， NH_2^+).

[0042] ^{13}C-NMR(75MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) : 25.77 ; 25.85 ; 26.32 ; 26.53 ; 26.70 ; 28.74 ; 29.16 ; 47.08 ; 47.16 ; 48.54 ; 49.00 ; 51.35 ; 53.13 ; 54.51 ; 55.38 ; 56.02 ; 59.90 ; 61.61 ; 163.44 ; 165.58 ; 168.90 ; 172.31.

[0043] ES-MS m/z : 715.4$[M+H]^+$.