

發明專利說明書 200538123

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94114400

※申請日期：94年05月04日

※IPC分類：

Ab1K 31/437

Ab1K 31/35

Ab1P 35/

Ab1P 31/12

一、發明名稱：

(中) 在位置 20 與整合素拮抗劑相軛合之 7 - t - 丁氧亞胺甲基喜樹鹼

(英) 7-t-Butoxyiminomethylcamptothecin conjugated in position 20 with integrin antagonists

二、申請人：(共 2 人)

1. 姓 名：(中) 西格瑪 陶製藥廠

(英) SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.

代表人：(中) 1. 古利亞 泰格利亞菲可

(英) 1. TAGLIAFICO, GIULIA

地 址：(中) 義大利羅馬莎士比亞路四十七號

(英) 47, Viale Shakespeare, 00144 Rome, Italy

國籍：(中英) 義大利 ITALY

2. 姓 名：(中) 國立腫瘤研究治療團體

(英) ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI

代表人：(中) 1. 勞瑞達納 馬斯皮斯

(英) 1. MASPES, LOREDANA

地 址：(中) 義大利米蘭文蘭森路一號

(英) 1, Via Venezian, 20133 Milan, Italy

國籍：(中英) 義大利 ITALY

三、發明人：(共 11 人)

1. 姓 名：(中) 艾爾瑪 達帕索

(英) DAL POZZO, ALMA

國 稷：(中) 義大利

(英) ITALY

2. 姓 名：(中) 倪明紅

(英) NI, MING HONG

國 稷：(中) 義大利

(英) ITALY

3. 姓 名：(中) 賽吉歐 潘柯
 (英) PENCO, SERGIO
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

4. 姓 名：(中) 路西歐 莫寧尼
 (英) MERLINI, LUCIO
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

5. 姓 名：(中) 莎賓娜 德拉瓦雷
 (英) DALLAVALLE, SABRINA
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

6. 姓 名：(中) 葛斯佩 珍尼尼
 (英) GIANNINI, GIUSEPPE
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

7. 姓 名：(中) 瑪麗亞 汀恩堤
 (英) TINTI, MARIA ORNELLA
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

8. 姓 名：(中) 克勞迪歐 彼沙諾
 (英) PISANO, CLAUDIO
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

9. 姓 名：(中) 多明尼克 艾羅亞堤
 (英) ALLOATTI, DOMENICO
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

10. 姓 名：(中) 羅瑞達納 維希
 (英) VESCI, LOREDANA
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

11. 姓 名：(中) 法蘭哥 蘇尼諾
 (英) ZUNINO, FRANCO
 國 籍：(中) 義大利
 (英) ITALY

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 義大利 ; 2004/05/13 ; RM2004A000242 有主張優先權

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於具有細胞毒活性且由包含 RGD 序列之環肽化物與喜樹鹼衍生物所組成之化合物，其製造方法，其被用為藥物的用途以及含彼之組成物。

尤其是，本發明中所述之化合物兼具對整合素受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之高度親和力以及在微莫耳濃度對人類腫瘤細胞系之選擇性細胞毒活性。

【先前技術】

化學治療性抗癌劑係為一種具有最高程度限制性治療範圍的藥物。事實上，因為它們的細胞毒活性是無選擇性的，所以，它們可能毫無選擇的損害與其接觸之個體的所有細胞。

故而，現今存在著如何選擇性導引細胞毒性藥劑對抗腫瘤細胞，使其施展活性而不損及周圍健康組織細胞，或者，至少使其損害減至最低的問題。

據文獻記載使用選擇性環肽化物可以阻斷整合素 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ ，其提及之化合物係為 c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)(JACS 1997, 119, 1328-35；國際專利申請案 WO 97/06791)，或利用單株抗體以阻斷血管新生與減低腫瘤成長 (Cell, 1994, 79, 1157-64)。此外，亦發現 ANTIMETABOLIC 作用 (J. Clin. Invest., 1995, 96, 1815)。Brooks et al. (Science, 1994, 264, 569-71) 載及腫瘤脈管系

(2)

統之內皮細胞本身較正常組織之被動細胞優先表現於整合素 $\alpha_v\beta_3$ 中。在臨床發展進一步階段之化合物中，吾人可提及者係為 c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)，或 EMD 或西連基太 (cilengitide)。

Ruoslati 與其同僚 (Current Opinion in Oncology, 1998, 10, 560-5) 証明了結合至腫瘤內皮細胞之 RGD 類似物一旦結合至細胞毒性藥劑阿黴素 (doxorubicin) 即會形成相較於單獨阿黴素 (doxorubicin) 而言，效力更強但毒性較低的化合物。這些學者亦證明出由於結合係受到解離肽本體所拮抗，故毫無疑問地較強效力係出自於 RGD 之結合作用所致 (Arap, Pasqualini and Ruoslati, Science, 1998, 279, 377-380)。稍後，相同學者進行包含化學結合促脫輔基 (pro-apoptotic) 肽序列至 RGD 類似物之實驗證明出新化合物在鼴鼠體內，對血管新生的內皮細胞具有選擇毒性及抗癌性 (Ruoslati, Nature Medicine, 1999, 5, 1032-8)。

Marcus 及其他人述及利用間隔子 (包含一或多個胺基酸) 結合至整合素 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之非肽抑制拮抗劑的細胞毒性藥劑 (諸如，喜樹鹼) 具有專一抗癌性。

Aoki et al., Cancer Gene Therapy, 2001, 8, 783-787 記載結合至 RGD 序列之組氨酸寡賴氨酸在鼴鼠體內具有自動導引作用 (homing effect) 的專一抗癌性。

由整合素媒介而結合至細胞表面的觀點已被建議於基因轉移 (Hart et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 12468-12474)。

(3)

7-t-丁 氧 亞 胺 甲 基 喜 樹 鹼 (或 CPT184 或 ST1481 或 Gimatecan) 係 為 喜 樹 鹼 (其 為 口 服 活 性 的 且 載 於 歐 洲 專 利 案 EP1044977 中) 之 衍 生 物 。

現 在 ， 吾 人 發 現 在 位 置 20 ， 可 能 利 用 適 當 間 隔 子 與 含 有 RGD 序 列 之 環 肽 化 物 衍 生 物 相 輄 合 的 7-t-丁 氧 亞 胺 甲 基 喜 樹 鹼 係 為 具 有 高 選 擇 性 抗 癌 活 性 的 化 合 物 ， 其 利 供 製 備 治 療 腫 瘤 的 藥 物 。

依 本 發 明 之 化 合 物 因 其 對 腫 瘤 細 胞 具 有 選 擇 性 細 胞 毒 活 性 而 可 產 製 具 有 較 小 及 較 輕 微 副 作 用 之 藥 物 。

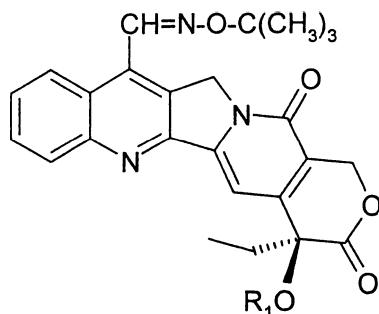
【發明內容】

本 發 明 之 目 的 係 在 於 與 含 有 RGD 序 列 之 環 肽 化 物 衍 生 物 相 輄 合 的 7-t-丁 氧 亞 胺 甲 基 喜 樹 鹼 。 所 得 分 子 相 對 於 未 輄 合 環 肽 化 物 而 言 ， 兼 具 未 改 變 之 原 始 喜 樹 鹼 細 胞 毒 活 性 性 質 與 具 親 合 性 之 整 合 素 結 合 性 質 。 此 一 加 總 結 果 有 助 於 細 胞 毒 性 藥 劑 集 中 於 $\alpha_1\beta_3$ 與 $\alpha_1\beta_5$ 型 態 之 整 合 素 內 (自 動 導 引) 。 細 胞 毒 性 藥 劑 經 由 酶 催 化 或 水 解 作 用 而 以 輄 合 和 / 或 解 離 型 態 施 展 出 細 胞 內 活 性 。

因 此 ， 本 發 明 之 主 要 目 的 係 在 於 一 種 式 (I) 的 化 合 物

:

(4)



式中：

R_1 係爲 $U-X-Y$ 基團，其中：

U 係不存在或爲下列基團之一： $-COCHR_{10}NH-$ 或 $CON[(CH_2)_{n_2}NHR_7]-CH_2-$ ，其中， R_{10} 為 H 或選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 C_6-C_{14} 芳基或胺基- C_1-C_4 烷基所取代； R_7 係爲 H 或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基； n_2 是 2-6 之整數；

X 係不存在或爲 H 或爲一選自下列之基團：
 $-COCHR_3NH-$ ， $-COCHR_6(CH_2)_{n_3}R_4-$ ，
 $-R_4-CH_2(OCH_2CH_2)_{n_4}OCH_2R_4-$ ，
 $-R_4(Q)R_4-$ ， $-R_5[Arg-NH(CH_2)_{n_5}CO]_{n_6}R_5-$ ， $-R_5-[N-\text{脲基丙基}-Gly]_{n_6}R_5-$ ，其中， n_3 係爲 0-5 之整數， n_4 係爲 0-50 之整數， n_5 係爲 2-6 之整數， n_6 係爲 2-7 之整數；

R_3 係爲 H 或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 $-COOH$ ， $-CONH_2$ ， $-NH_2$ 或 $-OH$ 取代；

R_4 係爲選自下列所組成之群： $-NH-$ ， $-CO-$ ， $-CONH-$ ， $-NHCO-$ ；

R_5 係不存在或爲 $-R_4(Q)R_4-$ 基團；

R_6 係爲 H 或 NH_2 ；

(5)

Q 係選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_6 伸烷基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烷基；直鏈或支鏈 C_2-C_6 伸烯基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烯基； C_6-C_{14} 伸芳基；伸芳基 (C_6-C_{14}) -伸烷基； (C_1-C_6) 伸烷基 (C_1-C_6) 伸芳基 (C_6-C_{14}) ；包含至少一個選自 O, N, S 之雜原子的芳族或非芳族雜環基 (C_3-C_{14}) ；

Y 係不存在或為 H 或為 c(Arg-Gly-Asp-AA₁-AA₂) 之基團，其中：

c 係指環狀；

AA₁ 係選自下列所組成之群： (D) -Phe, (D) -Trp, (D) -Tyr, (D) -2-萘基-Ala, (D) -4-特丁基-Phe, (D) -4,4'-聯苯基-Ala, (D) -4-CF₃-Phe, (D) -4-乙醯胺基-Phe；

AA₂ 係選自下列所組成之群： NW -CH[$(CH_2)_{n_7}$ -CO]-CO, NW -CH[$(CH_2)_{n_7}$ -NH]-CO, NW -[4- $(CH_2)_{n_7}$ -CO]-Phe, NW -[4- $(CH_2)_{n_7}$ -NH]-Phe, [NW]-Gly, NW -Val, 其中，W 係選自 H, 直鏈或支鏈 C_1-C_6 烷基, $-(CH_2)_{n_7}$ -COOH, 其中 n_7 係為 0-5 之整數, 4-羧基苯甲基, 4-氨基甲基苯甲基；

唯其先決條件為 X 和 Y 不能同時不存在；

及其 N_1 -氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其 E 及 Z 型式，其混合物，藥學上可接受之鹽類。

本發明包含化合物之用途，其係以前述式(I)化合物作為可用為具有局部異構酶 1 (topoisomerase 1) 抑制劑之藥物主成分。源自局部異構酶 1 (topoisomerase 1) 抑

(6)

制作用之治療用途中，吾人提及的是寄生蟲與病毒感染。

賦予特定藥物特性，式(I)化合物亦可用以製造治療腫瘤及其轉移型態之藥物。

本發明亦包括藥學組成物，其包含式(I)化合物作為主成分以及至少一種藥學上可接受之賦形劑和／或載劑。

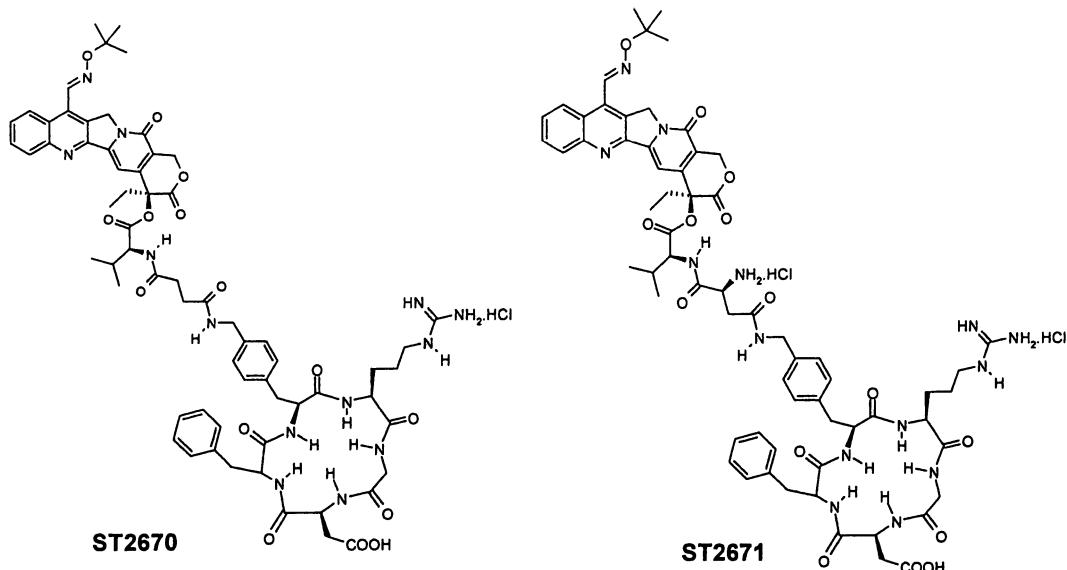
依本發明之化合物係為7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼於20位置上與含Arg-Gly-Asp(RGD)序列之環肽化合物官能化反應的結果。此一結構結合有助於細胞毒性藥劑(喜樹鹼)集中於 α_1 ， β_3 與 α_5 ， β_5 型態之整合素內。細胞毒性藥劑經由酶催化或水解作用而施展其活性。

上述式(I)中，各種官能基與殘餘基之定義以及藥學上可接受鹽類之定義係為任何有經驗化學家通常習知的而不需特別定義。然而，前述基團之參考資料可見於技術及專利文獻中，例如，國際專利申請案WO 00/53607，WO 03/101995與WO 03/101996。

較佳化合物之首選群係為一種式(I)化合物，式中，U和／或X係不存在。

依本發明之較佳化合物係如下：

(7)



一種式(I)的化合物可用以下所述方法與依本發明較佳化合物所例示之方法製成。此一方法構成本發明之另一目的。

基本上而言，本發明目的之一的式(I)化合物係利用7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼(係爲爲7-t-but-CP)可能經由適當橋(係爲爲U1-X1)官能化而與環肽衍生物(係爲爲Y1)縮合反應製成。

縮合反應可依以下反應機構之一進行：

7-t-but-CP + U₁ - X₁ - Y₁ 或

7 - t - b u t - C P - U₁ + X₁ - Y₁ 或

7 - t - but - CP - U₁ - X₁ + Y₁ 或

7- t-but -CP + U₁ + X₁ + Y₁ 或

7 - t - but - CP - U₁ + X₁ + Y₁ ;

(8)

其中，7-t-but-CP 代表 7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼，U₁，X₁ 及 Y₁ 分別代表如通式 I 中所定義之 U，X 及 Y，其最後經適當的官能化和/或經保護。

這些反應係使用傳統方法進行，其諸如 Journal of Controlled Release 2003, 91, 61-73；S.S. Dharap et al；Journal of Medicinal Chem. 2003, 46, 190-3, R. Bhatt 所述。

環肽化物 Y₁ 可依傳統肽合成技術製成，其係如實例 1-6 中所述。肽合成反應可於固態或溶液中完成。

一旦製得所要之環肽化物，即可以其保護型態用於縮合反應中而其保護基僅於得到最後化合物之後移除。去保護反應係使用已知方法進行，例如，使用純三氟乙酸之酸性條件或於經氯化有機溶劑存在下。

本發明中所述之化合物係為局部異構酶 1 (topoisomerase 1) 抑制劑，因此，可用為藥物，特別是用以治療可由抑制前述局部異構酶獲益之疾病。特別是，本發明化合物具有抗增殖活性而可利用其治療性質，且其具有適供調配藥學組成物之物化性質。藥學組成物包含至少一種式(I)的化合物作為主成分，其數量為，諸如，產生治療作用之數量。本發明涵括之組成物係完全傳統的且由藥物工業通常使用之方法製得。根據所選擇之投藥途徑，此等組成物可為固態或液態型態且適供經口，非經腸或靜脈內投藥。依本發明之組成物包含主成分以及至少一種藥學上可接受之賦形劑或載劑。調配佐藥，諸如，溶解劑，分

(9)

散劑，懸浮寄或乳化劑可能特別有用。

一種式(I)的化合物亦可和其他活性成分(諸如，抗癌劑或其他具有抗寄生蟲或抗病毒活性之藥劑)以分開型態或單一劑量型態綜合使用。

本發明化合物可用為具抗癌(例如，非小細胞癌(non-microcytoma)與小細胞肺癌，結腸直腸癌，前列腺癌，神經膠母細胞瘤與神經母細胞瘤，子宮頸癌，卵巢癌，胃腸癌，肝癌，卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)，直腸癌，肉瘤與骨肉瘤，睪丸癌，乳癌，胰腺癌，黑色素細胞瘤，泌尿膀胱癌及頭和頸癌)活性之藥物。本發明化合物所提供之優點係為綜合抗局部異構酶活性(由分子之喜樹鹼部分提供)以及整合素抑制活性(由分子之喜樹鹼部分提供)。其結果是為本發明化合物的可能綜合作用，其將利於熟習此藝之士接受用於腫瘤學領域中。事實上，包含Arg-Gly-Asp序列之環肽化物部分不僅將分子導向腫瘤表現整合素中，而且，一旦標的達成，還可產生多重功能，其範圍從分子之細胞毒性部分的內在化至整合素抑制活性，所得優點於抑制腫瘤血管新生方面尤為有用。環肽部份一旦從喜樹鹼部分分離，亦可由遠離腫瘤位置處發揮作用，因此，本發明化合物亦經證明可用於預防或治療轉移型態。

本發明標的之藥物亦可用於寄生蟲疾病之治療中。

【實施方式】

以下實例進一步說明本發明。

(10)

所用縮寫如下：

Aad(腺基己二酸)；

Amب(腺甲基苯甲基)；

Amp(腺甲基苯基丙氨酸)；

Boc(特丁氧基羧基)；

CSA(檀腦磺酸)；

CTH(催化移轉氫化反應)；

DCC(二環己基碳化二亞胺)；

DCM(二氯甲烷)；

DIEA(二異丙基乙胺)；

DMF(二甲基甲醯胺)；

Dy(OTf)₃ (dysprosium triflate)；

Fmoc(9-芴基甲氧基羰基)；

HOBt(羅基苯並三唑)；

NMP(N-甲基-吡咯烷酮)；

Pht(酰醯基)；

Pmc(五甲基色滿-6-磺醯基)；

ST1481(7-特奧基亞胺甲基喜樹鹼，亦名為 gimatecan)；

TBTU(四氟硼酸-O-苯並三唑-1-基-四甲基糖醛)；

TFA(三氟乙酸)。

實例

實例 1

(11)

合 成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp)(經保護之
ST2581)

1.587 mmol Fmoc-Gly-Res(Res=Sasrin Resin®, Bachem) 於 30 分鐘內，攪拌下懸浮於 75 ml DMF，其後，加入 18 ml 哌啶且持續再攪拌 30 分鐘。將經過濾且經 DMF 洗滌過之樹脂於 15 分鐘內懸浮於 NMP(N-甲基吡咯烷酮)中，之後，再加入 Fmoc-Arg(Pmc)-OH, HOBt, TBTU 及 DIEA(各 3.174 ml)。攪拌 2 小時後，過濾懸浮液並用 DMF 洗滌。用哌啶去保護之後，依序用其他胺基酸，亦即：Fmoc-Amp(Cbz)-OH, Fmoc-D-Phe-OH，與 Fmoc-Asp(OtBu)-OH 進行偶合反應(每次均如上操作)。於最後一次去保護 Fmoc-N-終端之後，用 45 ml 1% DCM 中之 TFA 而從樹脂釋出直鏈戊肽。將其溶於約 1 L CH₃CN 內，再加入 4.761 mmol HOBt 與 TBTU 以及 10 ml DIEA；持續攪拌溶液 30 分鐘，蒸發溶劑至小體積且用水完成沉澱。將過濾出之粗產物溶於 27 ml MeOH 與 DMF (1:1)之混合物中，加入 5 mmol 甲酸銨及 0.55 g 10% Pd/C 且於室溫下攪拌 30 分鐘。於矽藻土上過濾且使其乾燥。殘餘物利用製備級 RP-HPLC(管柱：Alltima® C-18, Alltech；流動相 50% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA；駐留時間(Rt)=9.13 分鐘)純化而得 483 g 白色粉末。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.3, 8.07, 8.04, 7.90, 7.80, 7.33, 7.15, 7.07, 4.62, 4.50, 4.35, 4.12, 4.01, 3.15, 3.03, 2.96-2.65, 2.58, 2.48, 2.32, 2.02, 1.75, 1.50, 1.35, 1.23.

(12)

分子質譜 (Maldi-Tof) : 973

實例 2

合成 $c(\text{Arg(Pmc)}-\text{Gly-Asp(OtBu)}-\text{D-Phe-Aad})$ (經保護之 ST2650)

0.69 mmol Fmoc-Gly-Res 如實例 1 中所述處理，但其差別在於第 3 與第 4 肽基酸係以 Fmoc-D-Phe-Aad(OBzl)-OH 型態加入。利用 CTH 去保護之後，粗產物利用製備級 RP-HPLC(流動相 66% CH_3CN (水中) + 0.1% TFA；駐留時間 (R_t) = 17.29 分鐘)純化而得 187g 純肽化物。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.23, 4.58, 4.20-3.90, 3.28, 3.05, 2.99, 2.85, 2.74-2.35, 2.15, 2.05, 1.85-1.25.

分子質譜 (Maldi.Tof) : 940

實例 3

合成 $c(\text{Arg(Pmc)}-\text{Gly-Asp(OtBu)}-\text{D-Phe-N-Me-Amp})$ (經保護之 ST2700)

於回流下，在無水甲苯中之 Fmoc-Phe(4-Pht-N-CH₂)-COOH 懸浮液中加入 2 eq CSA 與 20 eq 對甲醣(於 15 分鐘內分成四部份加入)。令混合物達於室溫，用 120 ml 甲苯稀釋且用 5% NaHCO_3 和水洗滌。蒸發溶劑後，將殘餘物溶入 15 ml CHCl_3 + 15 ml TFA + 700 μl of Et_3SiH 中。讓混合物於黑暗中攪拌 42 小時。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上過濾純化。總產率：90%。

(13)

直鏈肽化物如實例 1 中所述而於固態下合成，插入 Fmoc-N-Me-Phe(4-Pht-N-CH₂)-COOH 作為第三胺基酸且如上所述製成。在此例中，樹脂上 N-Fmoc-終端的去保護反應係使用 30% 二異丙胺 (300 eq) 之 DMF 溶液 (因為酰醯亞胺的存在)。環化反應後，將 500 mg 肽趁熱溶於 10 ml 無水乙醇中，在於其中加入 0.9 ml NH₂-NH₂ · H₂O 之 1M 乙醇溶液。回流下加熱 2 小時，蒸發溶劑後，殘餘物於劇烈攪拌下溶於 10 ml DCM+10 ml 碳酸鈉溶液中。最後粗產物係於蒸發後，由有機層回收並利用製備級 RP-HPLC (流動相 52% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA；駐留時間 (R_t) = 10 分鐘) 純化。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8.29-7.76, 7.38-7.07, 4.95-4.77, 4.09, 3.41, 3.05-2.81, 2.51, 2.05, 1.74, 1.40, 1.26.

分子質譜 (Maldi.Tof) : 987

實例 4

合 成 c[Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp(CO-(CH₂)₂-COOH) (經保護之 ST2649)

將 120 mg 環肽化物 c[Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp] (如實例 1 中所述製成) 以及計量數量之 TFA 和琥珀酐一起溶入 3.6 ml DCM-DMF 2:1 混合物中。1 小時後，反應混合物用 30 ml DCM 稀釋及用水洗滌。有機層經乾燥及濃縮而得 100 mg 粗產物。

分析級 RP-HPLC : 管柱 : Purosphere STAR[®], Merck ;

(14)

流動相 45% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA；駐留時間
(R_t) = 13.17 分鐘。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.20-7.75, 7.19-7.02, 4.58,
4.45, 4.36, 4.30, 4.20, 4.05, 3.00, 2.97-2.57, 1.83, 1.62, 1.32.

分子質譜 (Maldi.Tof) : 1073

實例 5

合成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Amb-gly)(經保護之 ST2701)

於 6 ml THF 中之 1.22 mmol Boc-經單保護之伸對二甲苯基二胺溶液中加入 1.83 ml THF 及逐滴加入 2 ml THF 中之 1.22 mmol 溴基乙酸苯甲酯。混合物經攪拌過夜後，蒸發溶劑且於閃蒸管柱 (CHCl₃-EtOAc, 9 : 1) 上純化殘餘物而得 0.69 mmol N-(4-Boc-NH-CH₂-苯甲基)-甘氨酸苯甲酯。

將 250 mg Fmoc-D-Phe-OH 溶於 27 ml DCM 中且加入 40 μl 雙光氣與 230 μl

均-可利丁；15分鐘後，加入 190 mg 先前製得之酯，溶入 3 ml DCM 中。加入 80 μl N-Me-哌嗪並攪拌 10 分鐘，用 10 ml DCM 稀釋且用水，HCl 0.5 N, 水，5% NaHCO₃ 和水萃取。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上閃蒸層析 (DCM-EtOAc, 9 : 1) 純化。產率：80%。

於溶在 6 ml MeOH 中之 100 ml 如此製得產物中加入 76 μl AcOH 和 42 mg HCOONH₄ 並冷卻混合物至 0°C，

(15)

加入 50 mg 10% Pd/C。30 分鐘後，反應混合物在矽藻土上過濾。乾燥濾液且於閃蒸管柱 (CHCl₃-EtOAc, 9:1) 上純化。產率：90%。

190 mg 如此製得產物溶入 1.2 ml TFA 中且使其乾燥 (Boc 之去保護)，殘餘物再溶於 9 ml 10% Na₂CO₃+6 ml 二噁烷中，冷卻至 0°C 且逐滴加入用 3 ml 二噁烷稀釋之 120 μl 芬甲氧羰醯氯溶液。於室溫下攪拌 1 小時後，在真空下蒸發至小體積，其後，用水稀釋混合物，用 HCl 酸化至 pH=1 及用 EtOAc 萃取。蒸發溶劑後，殘餘物於矽膠上過濾 (用 CHCl₃-MeOH(8:2)洗滌)。純二肽化物：82%。

0.69 mmol Fmoc-Gly-Res 如實例 1 中所述處理。於 Arg 之後，依序加入先前製得之二肽化物 Fmoc-D-Phe-N(4-Cbz-NH-CH₂-芬甲基)-GL。利用 CTH 去保護 Cbz 之後，粗產物利用製備級 RP-HPLC (流動相 50% CH₃CN(水中) + 0.1% TFA；駐留時間 (Rt)=10.5 分鐘)。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.29-7.66, 7.44-6.90, 5.15, 4.72-4.18, 4.20, 4.05-3.32, 3.15, 3.06, 2.70, 2.51, 2.49, 2.01, 1.80-1.35, 1.49, 1.35, 1.23.

分子質譜 (Maldi.Tof) : 973

實例 6

合 成 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp(CO-CH₂-(OCH₂CH₂)_n-O-CH₂-COOH)

4 ml 3:1 DCM-DMF 混合物中之 200 mg c(Arg(Pmc)-

(16)

Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp).TFA (如上所述製得)溶液中加入實質過量之甘醇二酸。於相同溶液中加入 DIEA (3 eq) 及 DCC (2 eq)。攪拌混合物過夜後，用 DCM 稀釋且用水洗滌。

蒸發有機層而得粗產物且利用閃蒸層析純化 (流動相 : CHCl₃-MeOH 7 : 3 + 1% AcOH)；混合包含產物部分，用水洗滌，脫水並使其乾燥而得 157 mg 純產物。

分析級 RP-HPLC : (管柱 : Purosphere STAR[®], Merck；流動相 50% CH₃CN (50% 水中) + 0.1% TFA；R_t = 10.96)。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.35-7.92, 7.20-7.00, 4.65, 4.50, 3.94, 3.60-3.45, 3.00-2.60, 2.55, 2.45, 2.30, 2.00, 1.70, 1.50, 1.30, 1.20.

分子質譜 (Mass Spectrometry) : 對應於所用不同分子量之不同甘醇。

合成 gimatecan 的衍生物

實例 7

合成 20-O-Val-gimatecan-ST2678

1 mmol 如 EP 1044977 專利案之實例 2 中所述製得之 ST1481, 0.6 mmol Dy(OTf)₃, 3 mmol 二甲胺基吡啶與 3 mmol Boc-Val-OH 懸浮於 15 ml 無水 CH₂Cl₂ 中且使其達於 -10°C；30 分鐘後，加入 3.1 mmol DCC；於 -10°C 下經 30 分鐘後，加熱反應混合物至室溫。二小時後，反應混

(17)

合物用另 20 ml CH_2Cl_2 稀釋，用 1 N HCl , NaHCO_3 洗滌並於硫酸鈉上乾燥。粗產物利用層析 (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97: 3) 純化而得黃色固態產物。產率：92%。 $R_f = 0.72$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96: 4 中)。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C18, Phenomenex®；流動相 45% CH_3CN (水中)； $R_t = 23.0$)。

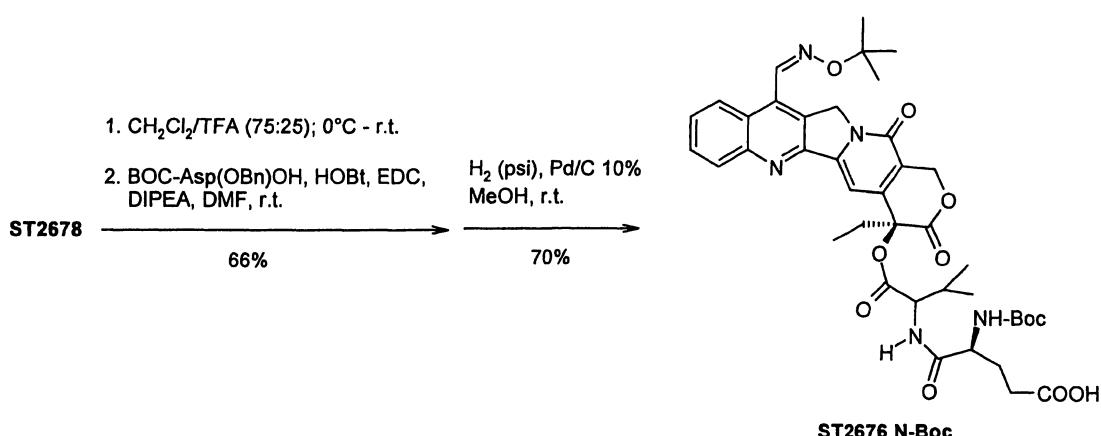
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.05, 8.3-8.2, 7.9-7.7, 7.3, 5.8-5.7, 5.5-5.4, 5.05-4.95, 4.4-4.3, 2.4-2.2, 1.6-1.4, 1.1-0.9.

分子質譜 (Maldi.Tof)：646。

中間體產物 ST2678[N-Boc] 於 DCM/TFA (75/25) 中，0°C 下去保護而得定量產物。如此製得之 ST 2678 可用以直接結合 RGD 衍生物或作為可用以結合第二殘餘物之中間體。

實例 8

合成 20-O-Val-Asp-gimatecan-ST2676[N-Boc]



1 mmol ST2678 與 3.7 mmol DIPEA 於 0°C 下依序加至 DMF 中之 1.2 mmol 適當經保護丁氨酸，1.8

(18)

mmol HOBt 和 1.4 mmol EDC 溶液中。反應混合物於室溫下過夜後，於水與二氯甲烷間分配。如此製得之粗產物利用層析 (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96 : 4) 純化而得黃色固態產物。產率：66%。 $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96 : 4 中)。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C18, Phenomenex®；流動相 45% CH_3CN (水中)； $R_t = 23.3$)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.05, 8.3-8.2, 7.9-7.7, 7.4-7.2, 6.0-5.9, 5.7-5.6, 5.5-5.4, 5.1, 4.8-4.7, 4.6-4.5, 3.3-3.1, 3.0-2.8, 2.4-2.2, 1.6-1.4, 1.1-0.9.

分子質譜 (Mass Spectrometry) : 851。

羧基之去保護

苯甲酯用 $\text{H}_2/10\% \text{Pd-C}$ ，於 20 psi 下氫化反應而在使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 94 : 6 純化後得到 70% 產物。 $R_f = 0.52$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 92 : 8 中)。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C18, Phenomenex®；流動相 50% CH_3CN (50% 水中) + 0.1% TFA； $R_t = 10.96$)。

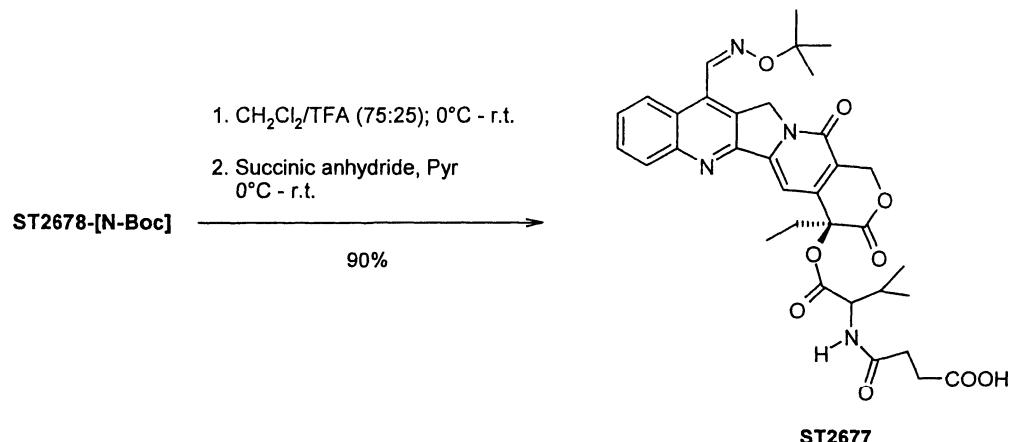
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.05, 8.3-8.2, 7.9-7.7, 7.5, 6.0-5.9, 5.7-5.6, 5.5-5.4, 4.8-4.7, 4.5-4.4, 3.3-3.1, 2.9-2.8, 2.4-2.2, 1.6-1.4, 1.1-0.9.

分子質譜 (Mass Spectrometry) : 761。

實例 9

(19)

合成化合物 [ST2677]



1 mmol 經去保護之 ST2678-[N-Boc] 溶於 10 ml 無水
吡啶中且於溶液達於 0°C 後加入 2.5 mmol 琥珀酐，反應
混合物回至室溫經一小時。移除溶劑，殘餘物溶入 CH₂Cl₂
中而有機層用 0.5 N HCl 洗滌。粗產物利用層析 (SiO₂ ;
CH₂Cl₂ / MeOH 97 : 3) 純化而得黃色固態預期產物。產率
：90%。R_f = 0.41 (CH₂Cl₂ / MeOH 92 : 8 中)。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C18, Phenomenex®；流動相 45% CH_3CN (水中)； $\text{R}_t = 17.0$)。

¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.05, 8.4-8.2, 7.9-7.7, 7.5, 6.4-6.3, 5.7-5.6, 5.5-5.4, 4.6-4.5, 3.7, 3.0-2.1, 1.5, 1.1-0.9.

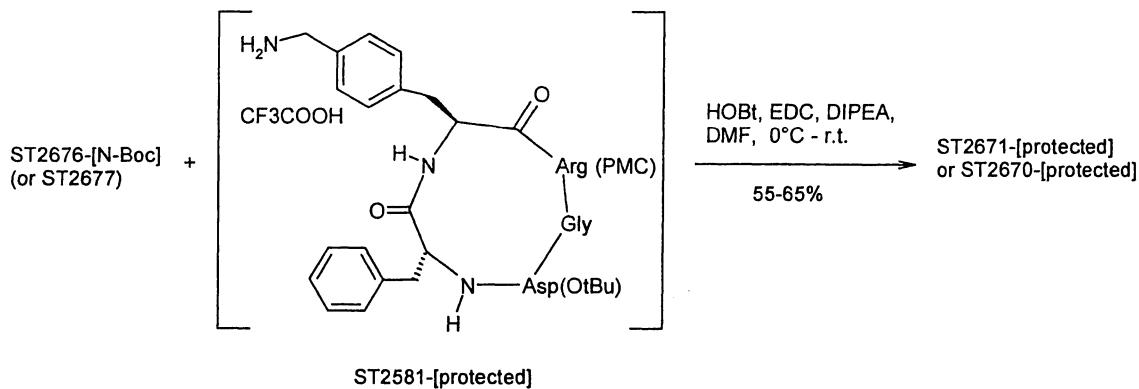
分子質譜 (Maldi.Tof) : 646。

合成 軛 合 衍 生 物

實例 10

合成化合物 ST2670(或 ST2671)

(20)



兩者均使用相同合成方法。

於冷卻至 0°C 之無水 DMF 中之 1.2 mmol ST2676[N-Boc] (或 ST2677) 中加入 2.1 mmol HOBT 和 1.4 mmol EDC 並攪拌 30 分鐘後，依序加入 1 mmol ST2581 與 DIPEA。留置過夜後，反應混合物於水與二氯甲烷間分配。有機層用硫酸鈉乾燥。粗產物利用層析 (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$ 92 : 8) 純化而得預期產物，經保護 ST2670 (經保護 ST2671)。產率：55% - 65%。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C₁₈, Phenomenex®；流動相 45% CH_3CN (水中)； $\text{Rt} = 20.1$ (經保護 ST2670) 及 $\text{Rt} = 23.2$ (經保護 ST2671))。

分子質譜 (ESI)：1718 (經保護 ST2671)

分子質譜 (ESI)：1601 (經保護 ST2670)

軛合產物之去保護

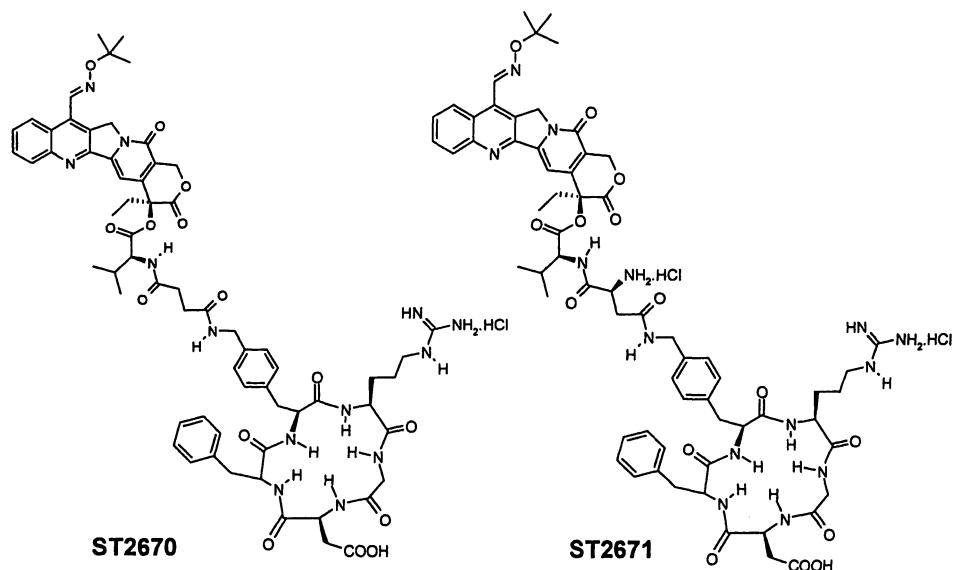
最後之去保護反應以得化合物 ST2670 與 ST2671 係使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{TFA}$ 1 : 1 進行二小時，使混合物從 0°C 至室溫；此一操作隨著在離子交換樹脂上之步驟，其產生氫氯

(21)

酸 塒 型 態 產 物 。

分析級 RP-HPLC：(管柱：Luna C₁₈, Phenomenex®；流動相 35% CH₃CN(水中)；R_t = 14.5 (ST2670) 及 R_t = 14.3 (ST2671)。

分子質譜 (ESI) : 1294 (ST2671)



分子質譜 (ESI) : 1279 (ST2670)

生化結果

結合至整合素受體 $\alpha_5 \beta_3$

純化之受體 α ， β (Chemicon, cat. CC1020) 稀釋於 0.5 μ g / ml 濃度下之緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) 中。將其 100 μ l 加至 96 分格板且於 +4°C 下孵養過夜。該板用緩衝液 (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1% 胎牛血清白朮) 洗滌一次後，於室溫下再孵養二小時。該板用相同緩衝液洗滌 2 次後，於室

(22)

溫及競爭配合基 [^{125}I] 艾契亭 (echistatin) (Amersham Pharmacia Biotech) 0.05 nM 存在下孵養 3 小時。孵養完後，洗滌各分格且用 γ 計數器 (Packard) 測定其放射活性。在過量冷艾契亭 (echistatin) (1 μM) 存在下測得配合基之非專一性結合。

結合至整合素受體 $\alpha_5\beta_5$

純化之受體 $\alpha_5\beta_5$ (Chemicon, cat. CC1020) 稀釋於 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度下之緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) 中。將其 100 μl 加至 96 分格板且於 +4°C 下孵養過夜。該板用緩衝液 (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1% 胎牛血清白朮) 洗滌一次後，於室溫下再孵養 2 小時。該板用相同緩衝液洗滌 2 次後，於室溫及競爭配合基 [^{125}I] 艾契亭 (echistatin) (Amersham Pharmacia Biotech) 0.15 nM 存在下孵養 3 小時。孵養完後，洗滌各分格且用 γ 計數器 (Packard) 測定其放射活性。在過量冷艾契亭 (echistatin) (1 μM) 存在下測得配合基之非專一性結合。

評估 IC₅₀ 參數

產物對玻連蛋白 (vitronectin) 受體之親和力係利用 IC₅₀ \pm SD 值 (亦即，可抑制 50% 專一放射性射配合基 - 受體結合之濃度) 表係為。IC₅₀ 參數係使用 ALLFIT 軟體詳細說

(23)

明。

結果

下表係為出喜樹鹼-RGD 輪合物與 RGD 肽化物對玻連蛋白 (vitronectin) 受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之親和力結果。輪合物顯係為出對二種整合素受體的親和力強於 RGD 肽化物。

表 1

喜樹鹼-RGD 輪合物對玻連蛋白 (vitronectin) 受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之親和力

Compound	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
	IC ₅₀ ± DS (nM)	
ST2670	47.7 ± 0.9	74 ± 0.8
ST2671	22.8 ± 1.2	54.2 ± 0.5

(24)

表 2

RGD 肽化物對 vitronectin 受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之親和力

Compound	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$
	IC ₅₀ ±DS (nM)	
ST2581	1.7±0.1	3.4±0.1
ST2650	28.6±0.7	0.17±0.01
ST270	7.2±0.07	0.9±0.005
ST2649	37.6±0.9	5.1±0.07
ST2701	36.7±0.7	2.9±0.1

軛合物對不同腫瘤細胞系之胞毒性

使用測試評估化合物對存活細胞之作用。使用 PC3 人體前列腺癌，A498 人體腎癌，A2780 人體卵巢癌細胞及 NCI-H460 非小細胞肺癌測試化合物對細胞成長之作用。A2780，NCI-H460 與 PC3 腫瘤細胞於包含 10% 胎牛血清 (GIBCO) 之 RPMI 1640 中成長而 A498 腫瘤細胞則於包含 10% 胎牛血清 (GIBCO) 之 EMEM 中成長。

腫瘤細胞於約 10%匯合下接種於 96 分格組織培養板 (Corning) 中且使其連接與回收至少 24 小時。加入不同濃度藥物於每一分格中以計算其 IC₅₀ 值 (抑制 50% 細胞存活之濃度)。該板於 37°C 下孵養 72 小時或 2 小時，隨之，72 小時回收。處理完後，洗滌該板以移除上清層且加入 PBS 三次。加入 200 μ l PBS 和 50 μ l 冷的 80% TCA。該板於冰

(25)

上孵養至少一小時。移除 TCA，該板浸漬於蒸餾水中洗滌三次且於紙上及 40°C 下乾燥 5 分鐘。

然後，加入 1% 乙酸中之 200 μl 0.4% 硫二胺 B (sulphorodiamine B)。該板於室溫下再孵養 30 分鐘。移除硫二胺 B (sulphorodiamine B)，該板浸漬於 1% 乙酸中洗滌三次且於紙上及 40°C 下乾燥 5 分鐘。

然後，加入 200 μl Tris (10 mM)，持續攪拌該板 20 分鐘。存活細胞係利用 Multiskan 燐光分光計測其 540 nm 下之光學密度而得。細胞之殺死數量係以相對於對照培養組而言，於硫二胺 B (sulphorodiamine B) 結合中之降低百分比計算。

IC₅₀ 值係利用 "ALLFIT" 程式計算。

軛合物 ST2670 由 IC₅₀ 值為 0.4 μM 而證明對 A2780 卵巢腫瘤細胞具有最強細胞毒活性。此外，軛合物 ST2670 顯係為出具有與 ST2677 (解離喜樹鹼) 相當之對腫瘤細胞的細胞毒活性 (表 3)。軛合物 ST2671 亦顯係為出與解離喜樹鹼 ST2676 相當之對 PC3 腫瘤細胞的細胞毒活性。

(26)

表 3

軛合物 ST2670 ST2671 以及解離喜樹鹼 (ST2676 及 ST2677)
對 PC3, A498 與 A2780 腫瘤細胞的細胞毒性 (72 小時處理)

Compound	PC3	A498	A2780
	IC ₅₀ ±SD, μM		
ST2670	9.6±0.6	1.6±0.3	0.4±0.05
ST2671	0.35±0.08	n.d.	n.d.
ST2676	0,038±0,004	0,047±0,005	<0,00097
ST2677	5,42±0,55	1,37±0,3	0,079±0,003

n.d.=not determined

表 4

解離喜樹鹼 20-O 衍生物 (ST2676, ST2677, ST2678) 對
H460 非小細胞肺癌細胞的細胞毒性 (72 小時處理)

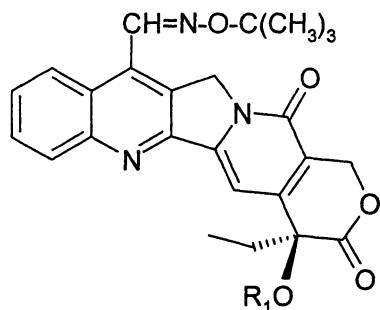
Compound	NCI-H460
	IC ₅₀ ±SD, μM
ST2676	0.17±0.02
ST2677	>1
ST2678	0.025±0.002

五、中文發明摘要

發明之名稱：在位置 20 與整合素拮抗劑相軛合之 7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼

本發明係關於一種式(I)的化合物：

(I)



式中，R₁悉如說明書中所定義且其包含 7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼在 20 位置上與含有 RGD 序列之環肽化物的縮合。前述化合物兼具對整合素受體 $\alpha_v\beta_3$ 與 $\alpha_v\beta_5$ 之高度親和力以及在微莫耳濃度對人類腫瘤細胞系之選擇性細胞毒活性。

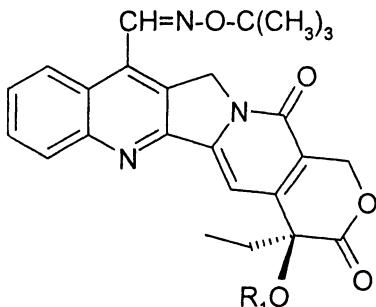
六、英文發明摘要

發明之名稱：

7-t-Butoxyiminomethylcamptothecin conjugated in position 20 with integrin antagonists

Compounds of Formula (I) are described:

(I)

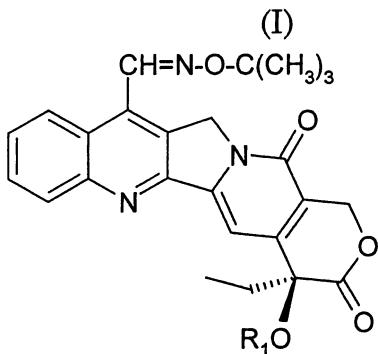


in which the R₁ group is as defined in the specification and includes the condensation of 7-t-butoxyiminomethylcamptothecin in position 20 with a cyclopeptide containing the RGD sequence. Said compounds are endowed both with high affinity for integrin receptors $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ and with selective cytotoxic activity on human tumour cell lines at micromolar concentrations.

(1)

十、申請專利範圍

1. 一種式 [I] 的化合物：



式中：

R_1 係爲 $U-X-Y$ 基團，其中：

U 係不存在或爲下列基團之一： $-COCHR_{10}NH-$ 或 $CON[(CH_2)_{n_2}NHR_7]-CH_2-$ ，其中， R_{10} 為 H 或選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 C_6-C_{14} 芳基或胺基- C_1-C_4 烷基所取代； R_7 係爲 H 或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基； n_2 是 2-6 之整數；

X 係不存在或爲 H 或爲一選自下列之基團：

$-COCHR_3NH-, -COCHR_6(CH_2)_{n_3}R_4-,$
 $-R_4-CH_2(OCH_2CH_2)_{n_4}OCH_2R_4-, -R_4(Q)R_4-,$
 $-R_5[Arg-NH(CH_2)_{n_5}CO]_{n_6}R_5-, -R_5-[N-胍基丙基-Gly]_{n_6}R_5-,$

其中， n_3 係爲 0-5 之整數， n_4 係爲 0-50 之整數， n_5 係爲 2-6 之整數， n_6 係爲 2-7 之整數；

R_3 係爲 H 或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基，其選擇性地經 $-COOH, -CONH_2, -NH_2$ 或 $-OH$ 取代；

R_4 係爲選自下列所組成之群： $-NH-, -CO-, -CONH-, -NHCO-$ ；

(2)

R_5 係不存在或爲 $-R_4(Q)R_4$ -基團；

R_6 係爲 H 或 NH_2 ；

Q 係選自下列所組成之群：直鏈或支鏈 C_1-C_6 伸烷基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烷基；直鏈或支鏈 C_2-C_6 伸烯基；直鏈或支鏈 C_3-C_{10} 伸環烯基； C_6-C_{14} 伸芳基；伸芳基 (C_6-C_{14}) -伸烷基； (C_1-C_6) 伸烷基 (C_1-C_6) 伸芳基 (C_6-C_{14}) ；包含至少一個選自 O, N, S 之雜原子的芳族或非芳族雜環基 (C_3-C_{14}) ；

Y 係不存在或爲 H 或爲 c(Arg-Gly-Asp-AA₁-AA₂) 之基團，其中：

c 係指環狀；

AA₁ 係選自下列所組成之群： (D) -Phe, (D) -Trp, (D) -Tyr, (D) -2-萘基-Ala, (D) -4-特丁基-Phe, (D) -4,4'-聯苯基-Ala, (D) -4-CF₃-Phe, (D) -4-乙醯胺基-Phe；

AA₂ 係選自下列所組成之群： $NW-CH[(CH_2)_{n_7}-CO]-CO$, $NW-CH[(CH_2)_{n_7}-NH]-CO$, $NW-[4-(CH_2)_{n_7}-CO]-Phe$, $NW-[4-(CH_2)_{n_7}-NH]-Phe$, [NW]-Gly, NW-Val, 其中，W 係選自 H, 直鏈或支鏈 C_1-C_6 烷基, $-(CH_2)_{n_7}-COOH$, 其中 n_7 係爲 0-5 之整數, 4-羧基苯甲基, 4-氨基甲基苯甲基；

唯其先決條件爲 X 和 Y 不能同時不存在；

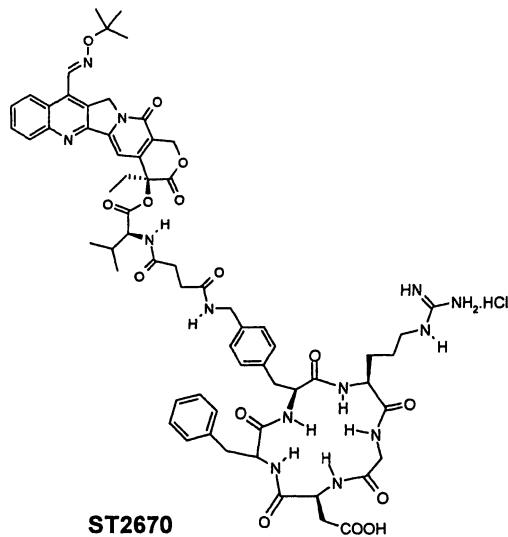
及其 N_1 -氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其 E 及 Z 型式，其混合物，藥學上可接受之鹽類。

2. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，式中，U 和 X

(3)

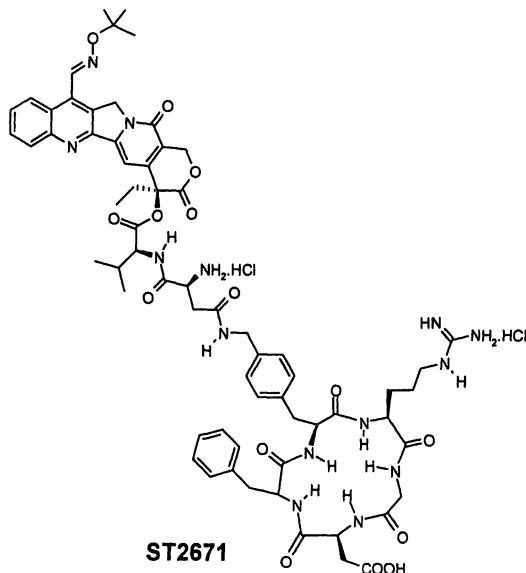
存在。

3. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其具有以下化學式：



其 N_1 -氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其 E 及 Z 型式，其混合物，藥學上可接受之鹽類。

4. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其具有以下化學式：



(4)

其 N_1 -氧化物，消旋混合物，單一對掌異構物，單一非鏡像異構物，其 E 及 Z 型式，其混合物，藥學上可接受之鹽類。

5. 一種製備申請專利範圍第 1-4 項化合物的方法，其係根據下列反應機構之一進行：

7-t-but-CP+U₁-X₁-Y₁ 或

7-t-but-CP-U₁+X₁-Y₁ 或

7-t-but-CP-U₁-X₁+Y₁ 或

7-t-but-CP+U₁+X₁+Y₁ 或

7-t-but-CP-U₁+X₁+Y₁；

其中，7-t-but-CP 代表 7-t-丁氧亞胺甲基喜樹鹼，U₁，X₁ 及 Y₁ 分別代表如式 I 中所定義之 U, X 及 Y，其最後經適當的官能化及 / 或經保護。

6. 一種藥學組成物，其包含至少一種申請專利範圍第 1-4 項之化合物作為混合物中之主成分，以及至少一種藥學上可接受之賦形劑和／或載劑。

7. 一種申請專利範圍第 1-4 項化合物的用途，其係用以製造藥物。

8. 一種申請專利範圍第 1-4 項化合物的用途，其係用以製造具有局部異構酶 1 (topoisomerase 1) 抑制活性的藥物。

9. 如申請專利範圍第 8 項的用途，其係用以製造具

(5)

有抗癌活性的藥物。

10. 如申請專利範圍第 9 項的用途，其中，所述藥物係用以治療非小細胞癌 (non-microcytoma) 與小細胞肺癌，結腸直腸腫瘤，前列腺癌，神經膠母細胞瘤與神經母細胞瘤，子宮頸癌，卵巢癌，胃腸癌，肝癌，卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)，直腸癌，肉瘤與骨肉瘤，睪丸癌，乳癌，胰腺癌，黑色素細胞瘤，泌尿膀胱癌及頭和頸癌。

11. 一種申請專利範圍第 1-4 項化合物的用途，其係用以製造供預防或治療轉移型態的藥物。

12. 如申請專利範圍第 8 項的用途，其係用以製造具有抗寄生物活性的藥物。

13. 如申請專利範圍第 8 項的用途，其係用以製造具有抗病毒活性的藥物。

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(I)

