I381852

（此處由本局於收文時黏貼條碼）

公告本

850883

發明專利說明書

（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：95134322

※申請日期：95 年 09 月 15 日　　※IPC 分類：A61K 51/04 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)

一、發明名稱：

(中) 生物素二胺基衍生物類及其與大環螯合劑之共軛物

(英) Biotin diaminoderivatives and their conjugates with macrocyclic chelating agents

二、申請人：(共 1 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.史提法諾　馬瑞諾
（英）1.MARINO, STEFANO
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

三、發明人：(共 4 人)

1.姓　名：（中）帕洛　卡密內堤
（英）CARMINATI, PAOLO
國　籍：（中）義大利
（英）ITALY

2.姓　名：（中）毛洛　吉安尼奇
（英）GINANNESCHI, MAURO
國　籍：（中）義大利
（英）ITALY

3.姓　名：（中）吉歐法尼　帕加尼利
（英）PAGANELLI, GIOVANNI
國　籍：（中）義大利
（英）ITALY

4.姓　名：（中）馬可　吉諾

（S）

（英）CHINOL, MARCO
國　籍：（中）義大利
（英）ITALY

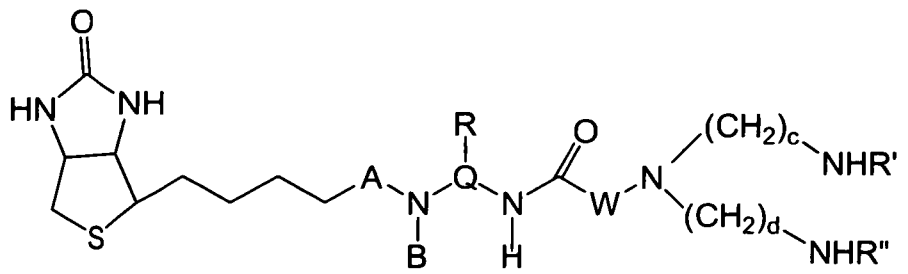
四、聲明事項:

◎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.歐洲　　；2005/09/27；05021034.3 ☑有主張優先權

五、中文發明摘要

發明之名稱：生物素二胺基衍生物類及其與大環螯合劑之共軛物

本發明揭示一種式(I)化合物



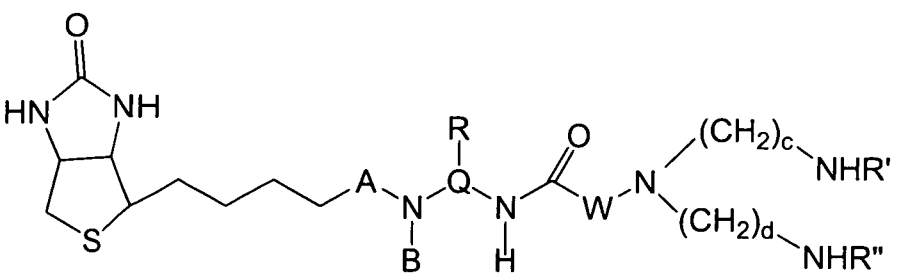
(I)

(其中基團係如說明書中所定義者)、製備彼之方法、及彼與放射性核素於製備用於人和動物之治療和診斷(特別是病症(諸如腫瘤)之診斷和治療)的共軛物上之用途。

六、英文發明摘要

發明之名稱：Biotin diaminoderivatives and their conjugates with macrocyclic chelating agents

Formula (I) compounds are described:



(I)

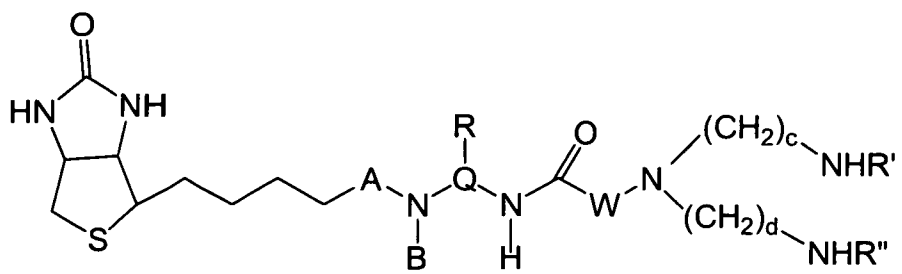
where the radicals are as defined in the description, processes for their preparation, and their uses for the preparation of conjugates with radionuclides for use in human and animal therapy and diagnostics, particularly for the diagnosis and therapy of pathological conditions such as tumours.

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：式(I)



(I)

（S）

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明關於經修飾之生物素，其係用於製備與放射性核素之共軛物，該共軛物係用於人和動物之診斷和治療，特別係用於病症(諸如腫瘤)之診斷和治療。

【先前技術】

腫瘤治療主要係藉由使用標的性破壞癌細胞之物質。使用細胞毒性物質可達成腫瘤治療，該細胞毒性物質必須穿透腫瘤細胞方能顯現其完整功效，或藉由使用具有足夠能量之輻射處理以殺死腫瘤細胞。對該兩種情況，主要的問題是如何以選擇性之方式運送該物質至標的細胞以避免對周圍健康細胞造成可能的傷害。對使用放射性藥物(即帶有放射活性部分之物質)，選擇性運送該活性部分(即該放射活性部分)至腫瘤標的以避免放射性核素於體內可能之擴散或避免與腫瘤周圍之健康細胞的交互作用之問題被認爲係特別重要的。

對所涉及之所有爭論的討論及迄今所提出之解決方法，請參閱 NeoRx Corporation 所擁有之美國專利號 5,283,342、5,608,060 及 5,955,605。

該等文獻尤其討論到帶有放射性核素之分子抗拒身體代謝攻擊之問題。特別地，最爲經周密研究的是生物素分子，由於生物素與抗生物素蛋白習知之交互作用，生物素係用於運送放射性核素至腫瘤細胞之首要選擇之一。生物

(2)

素係經由連接子與放射性核素螯合部分(例如四氮雜環十二烷四乙酸[DOTA]分子)結合。使用生物素-DOTA 共軛物之主要問題之一係該含有生物素分子之複合物(其中該生物素係經由連接子與放射性核素連接)對生物素釋放酶(即使該複合物中之肽鍵斷裂之酶)之抗性。該肽鍵係由該螯合劑與生物素之結合所產生。

在該複合物之許多所欲之特性中，該複合物必須能迅速且有效地自體內除去且必須夠小(分子量<1000)而易於分佈至細胞外體液中，其中該複合物將與腫瘤細胞結合。此外，須證明該複合物於活體內具有安定性、被非腫瘤細胞攝取之量極少且可被迅速(腎臟)清除，且必須不會被代謝。

再者，螯合部分必須是於活體內不會被釋出，因而能於體內有效地運送毒性化合物。此領域之專家清楚地明瞭藉由該螯合部分釋出放射性核素所遭遇之問題，該放射性核素包括對身體完全爲外來物之金屬離子，且該螯合部分可被賦與不同類型之放射活性及甚至是高能量輻射，因而具有高度危害性。

在相同申請人之先前專利申請案(WO 02/066075)中，已報告一種新穎之生物素-DOTA 共軛物之合成以及對該新穎衍生物之結合、安定性及親和性之研究。該新穎共軛物之新穎性係在於醯胺羧基被還原爲亞甲基，因此產生 N-胺基己基生物素醯胺基衍生物(r-BHD)，其中該醯胺被轉化爲仲胺而未影響涉及 Av/Sav 結合之生物素側鏈之長度

(5)

(3)

。該化合物之 DOTA 配體係經由四個 N-乙酸側鏈之一直接與經還原之生物素六亞甲基二胺衍生物之胺基連接。

再者，r-BHD 之合成撓性能產生不同之新穎生物素衍生物(例如與兩個 DOTA 螯合劑者)，該兩個 DOTA 螯合劑係與生物素之側鏈共軛以藉由運送較高輻射劑量至腫瘤而增加標的性放射性核素治療之功效。

Axworthy Donald B. et al.之美國專利申請案號 2004/0241172 揭示經由特定之連接子而併有兩個 DOTA 基團之生物素衍生物類，該連接子係經由苄基而直接與 DOTA 分子之核心結合。該 DOTA 基團之修飾作用可降低螯合部分之結合能力。

爲改進輻射/劑量比例，本案發明人設計並合成新穎類型之生物素衍生物。

【發明內容】

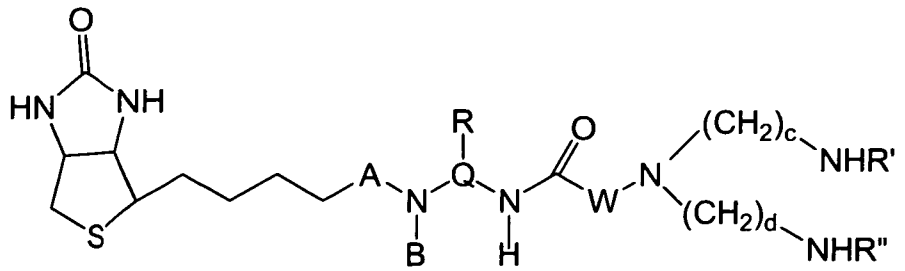
本發明之主要目標係提供新穎之生物素衍生物類，其能滿足高輻射/劑量比例之要求。

特別的是，本發明在於新穎類型之生物素衍生物，其帶有兩個螯合基團/生物素分子。

藉由此方式使用相同莫耳量之生物素衍生物可使達到腫瘤細胞之放射活性加倍。

因此，本發明之目標之一係提供下述之式(I)化合物：

(4)



(I)

其中

A 係 CH_2 或 CO；

B 係 H、CHO 或 COOH；惟其

當 A 係 CH_2 時，Q 係 $-(CH_2)_n-$，其中 n 係 4 至 12 之整數，此時 R 係不存在；當 A 係 CO 時，Q 係選自 $-(CH_2)_a-CH(R-)-(CH_2)_b-$，其中 a 和 b 係各別爲 0 至 n-1 之整數，且 R 係如下述所定義者；

W 係 C_1-C_{12} 烷撐基或 C_2-C_{12} 烯撐基直鏈或官能化之聚乙二醇；或 C_6-C_{10} 芳香族殘基；或糖呋喃糖殘基；或

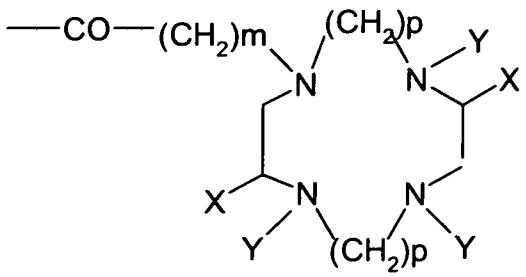
W 單獨係或與連接 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈之氮原子一起形成含有一或多個選自 O、N 或 S 之雜原子的 5 或 6 員雜環基；

當 W 係芳香族殘基、雜環基或糖部分時，連接 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈之氮原子係可選擇地不存在且該 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈係直接且各別與該芳香族環和雜環之碳或氮原子結合或與該糖呋喃糖殘基之氧原子結合；

c 和 d 各別爲 3 至 10 之整數；

R'和 R"各別爲 -Λ，其中 -Λ係式(II)大環：

(5)



(II)

其中 Y 係相同或不同且係選自氫、直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基、或 $-(CH_2)_m-COOH$，其中 m 係 1 至 3 之整數；

X 係氫或 $-CH_2$-U 基團，其中 U 係選自甲基、乙基或對胺基苯基，或 X 係 $-(CHJ)_o-Z$ 基團，其中 o 係 1 至 5 之整數，J 係氫、甲基或乙基，且 Z 係含有一或多個選自 O、$N-R_1$(其中 R_1 係氫原子或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基)或 S 之雜原子的 5 或 6 員雜環基，或 Z 係選自 $-NH_2$、$-NH-C(=NH-)-NH_2$、或 $-S-R_2$，其中 R_2 係直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基；

p 係 2 或 3 之整數；

R 係選自直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基、環烷基、雜環或 $-(CH_2)_q-T$，其中 T 係選自 $S-CH_3$、$-OH$ 或 $-COOH$，且 q 係 0、1 或 2。

直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基表示甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、另丁基、異丁基或特丁基。

5 或 6 員雜環係環中含有至少一個選自 O、$N-R_1$ 或 S 雜原子之芳香族或非芳香族雜環，諸如例如 2-、3-或 4-吡啶基或 2-、4-或 5-咪唑基。

本發明之第一群適宜化合物係由式(I)化合物(其中 A 係 CH_2，B 係 H，Q 係 $-(CH_2)_n-$，其中 n 係 4 至 8 之整數(適宜地係 6)，c 和 d 皆爲 3 或 6，R'和 R"係 -Λ，其中 Y 始終是 $-CH_2-COOH$，X 係氫，且 p 係 2)所構成。

本發明之另一目標係由用於診斷及/或治療之式(I)化合物與放射性同位素所構成。該等同位素之實例係 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、及 Au-198。

本發明之第一群適宜複合物係爲其中式(I)化合物(其中 A 係 CH_2，B 係 H，Q 係 $-(CH_2)_n-$，其中 n 係 4 至 8 之整數(適宜地係 6)，c 和 d 皆爲 3 或 6，R'和 R"係 -Λ，其中 Y 始終是 $-CH_2-COOH$，X 係氫，且 p 係 2)與放射性同位素 Y-90 者。

本發明之另一目標係製備式(I)化合物及其與放射性藥物之複合物之方法。

本發明之另一目標係醫藥及/或診斷組成物，其含有上述之式(I)化合物及其複合物。

本發明之其他目標係式(I)化合物及其與放射性同位素之複合物作爲藥物或診斷工具之用途，特別是於製備用於腫瘤治療或診斷的藥物上之用途。

本發明之該等和其他目標將由下述之部分及實驗實例加以詳細說明。

(7)

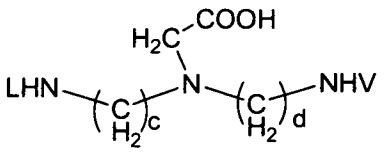
依據下述之反應流程可製備本發明之化合物，該反應流程包括步驟：

a) 生成生物素之羧基與 $H_2N-Q-NH_2$ 二胺之伯胺基間的醯胺鍵，如有需要另一個伯胺基係經適當地保護(例如藉由使用 Boc 基團)；或可選擇地，使用α,ω-二胺基酸(即Lys)之 $\alpha-\alpha-NH_2$ 基(其中ω-胺基係適當地被保護)可進行偶合反應；

b) 令該伯胺基去保護；

c) 若 A 係 CH_2 基，還原該醯胺基爲胺；

d) 令該胺與下述式(III)之 N-經保護的 N,N-雙經取代之甘胺酸胺偶合，



(III)

該式(III)之 N-經保護的 N,N-雙經取代之甘胺酸胺可藉由此技藝習知之方法製備；

其中 V 和 L 係適當之保護基且 c 和 d 各別爲 3 至 10；

e) 與所欲之式(II)螯合劑-A共軛。

生物素和胺基酸 Lys 係可購得之商品。$H_2N-Q-NH_2$ 二胺係爲市場上可購得者且可藉由習知之方法經數個步驟加以製備。

(8)

使用適當之保護基(諸如例如 Boc 或 Fmoc)可輕易達成伯胺基之保護，且該等保護基業已描述於文獻(參閱例如 T.W. Greene，P.G.M. Wuts，"Protective groups in organic synthesis"，3rd Ed.，J. Wiley & Sons，Inc.，New York，1999；Handbook of Reagents for Organic Synthesis，"Oxidizing and Reducing Agents"，Edited by S.D. Burke and R.L. Danheiser，J. Wiley & Sons，Inc.，New York，1999)中。

可替代地，依據上述之反應流程但缺少其中之步驟 c 可製備式(I)化合物(其中 A 係 CO 基)。

依據肽合成之習知方法(參閱文獻 P. Lloyd-Williams，F. Albericio，E. Giralt，"Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins"，CRC Press，Boca Raton，New York，1997)可達成生物素之-COOH 基之活化；若使用α,ω-二胺基酸(即 Lys)進行偶合反應，則藉由懸吊/固定該胺基酸於適當之樹脂上並隨後使用固相肽合成技術中習知之方法可進行該反應。

使用此領域中習知之傳統方法(例如文獻 Paganelli，Chinol et al. European Journal of Nuclear Medicine Vol. 26，No 4; April 1999; 348-357 所描述者)，可進行本發明之化合物與放射性同位素之共軛反應以生成本發明所描述之複合物。

本發明之適宜化合物之一係其中 A 係 CH_2，Q 係 $-(CH_2)_n-$ (其中 n 適宜地係 6)，c = d 係 3 或 6，R' = R''

係-Λ（其中 m 係 1），Y 始終是-CH_2-COOH，X 係氫，且 p 係 2（DOTA 螯合劑）者。

製備該適宜化合物之方法包含下述之步驟：

a) 生成生物素之羧基與六亞甲基二胺之伯胺基間之醯胺鍵，如有需要該醯胺鍵係適當地經保護（例如藉由使用 Boc 基）；

b) 令六亞甲基二胺之胺基去保護；

c) 還原該醯胺基爲胺基；

d) 與式(III)之胺（其中 c = d = 3 或 6，V = L 係 Fmoc 保護基）共軛；

e) 令所得之胺去保護；

f) 與螯合劑-Λ共軛。

本發明方法中之步驟 a)係由生成生物素之羧基與六亞甲基二胺-Boc 之伯胺基間之醯胺鍵所構成。該生物素係與 HATU 反應以於原位(in situ)生成極具活性之酯，該酯係與六亞甲基二胺-Boc 之胺基反應以生成相關之醯胺。用於上述固相肽合成之活化機構需要鹼性基質。爲防止該鹼與該活性酯反應，使用叔有機鹼（諸如二異丙基乙胺(DIPEA)或 N-甲基嗎啉(NMM)。爲防止生物素與該二胺鏈之兩端結合，使用 Boc（特丁氧羰基）以保護六亞甲基二胺之兩個胺基之一係必要的。經蒸發溶劑(DMF)及使用水進行沉澱後，自反應基質分離終產物。經於丙醇中再結晶析出後之產物係藉由 ^{1}H-NMR、元素分析及 ESI-MS 進行性質分析。反應產率約爲 88%。

於步驟 b)中，令生物素化之六亞甲基二胺-Boc 溶解於 AcOEt/HCl 之混合液(約 3M)中以使該 Boc 基脫離。經除去該溶劑混合液後，令產物經冷凍乾燥以完全除去 HCl。於鹼性 pH 之水溶液中藉由再結晶析出以純化樣品，隨後藉由 ^{1}H-NMR 和 TLC 進行性質分析。

於步驟 c)中，使用 BH_3·THF 還原醯胺基。因該還原劑極具活性，該方法必須於無水條件下進行。於反應前將起始物置於真空下並隨後溶解於無水 THF (經鈉和二苯甲酮蒸餾)中。於氮氣下回流反應混合物直至該醯胺基完全還原爲止(藉由 ^{1}H-NMR 光譜監測)。經減壓下蒸發溶劑後，令該反應混合物與 HCl 水溶液反應。經冷凍乾燥該酸溶液後，於鹼性 pH 之水溶液中藉由再結晶析出以純化產物，隨後進行逆相管柱層析。使用分析性 TLC 分析產物以顯示其純度。反應產率約爲 55%。

步驟 d)提供於溶劑 NMP 中且藉由 HATU/NMM 系統活化，令經還原之生物素化六亞甲基二胺與經保護之胺(III)進行共軛反應。

於步驟 e)中，使用哌啶作爲鹼以除去該 Fmoc 基團。

步驟 f)提供兩個 DOTA 基團之偶合，其係使用特定之反應劑以於水性基質中生成醯胺鍵：1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺氫氯化物(EDC)和磺基-NHS。令 DOTA (相對於該生物素衍生物爲 4 莫耳當量)溶解於水中並調整其爲適宜主要活化四個羧基之一的 pH 值(G. Sabatino，M. Chinol，G. Paganelli，S. Papi，M. Chelli，G. Leone，A.

M. Papini，A. DeLuca and M. Ginanneschi，J. Med. Chem. 2003，46，3170-3173)。藉由此方式可減少得到副產物之可能性。先後將磺基-NHS 和 EDC 加入至該鹼性溶液中。經於原位(in situ)生成該活性酯後，加入經還原之生物素化六亞甲基二胺的 N,N-二烷基胺基甘胺酸衍生物，檢查該溶液之 pH 係維持於約 7.5。藉由固相萃取(SPE)先期純化粗產物並藉由半製備性 RP-HPLC 進行純化。

本發明之目標係醫藥或診斷組成物，其含有作爲活性成份之至少一種式(I)化合物(其亦可爲與放射性同位素之複合物)，或於該式(I)化合物之情況下，併有用於治療本發明所述疾病之其他活性成份(例如具有抗癌活性之其他產物)，該等成份亦可爲各別之劑型或爲適於組合治療之型式。本發明之活性成份可爲與藥學技藝慣用之適當載體及/或賦形劑的混合物型式，該載體和賦形劑係諸如例如文獻“Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook”(最新版本)所描述者。本發明之組成物含有治療上有效量之活性成份。此技藝之專家(例如臨床醫師或主要照顧醫師)當能依據欲治療之疾病類型和病患症狀或共同投遞之其他活性成份決定劑量。

醫藥組成物之實例係允許非經腸或局部投服者。適宜此目的之醫藥組成物係溶液、懸浮液、或使用時再回復原狀之冷凍乾燥型式。

本發明適於產業上使用之型式係用於癌放射性治療之組套，如例如歐洲專利號 0 496 074、文獻 Paganelli，

Chinol et al. European Journal of Nuclear Medicine，Vol. 26，No 4，April 1999，348-357、美國專利號 5,968,405、及相關文獻所描述者。

本發明之另一目標係一種藉由放射活性用於腫瘤之治療或診斷之組套，其特徵在於該組套之至少一種成份含有式(I)化合物或其與適當之放射性同位素之複合物。

本發明之化合物係用於製備用於腫瘤之治療和診斷之治療劑及/或診斷劑。

本發明之化合物經與診斷及/或治療用之放射性同位素(如上所述)結合後係用於放射性標記抗生物素蛋白膠體製劑以用於不同之醫療用途。

例如，該製劑可用於使用抗癌放射性藥物之腫瘤治療方法，該方法係諸如例如歐洲專利號 0 496 074、文獻 Paganelli，Chinol et al. European Journal of Nuclear Medicine，Vol. 26，No 4，April 1999，348-357、美國專利號 5,968,405、及相關文獻所描述者。

下述之實施例係進一步說明本發明。

【實施方式】

製備雙 DOTA-C_3-化合物 4

依循下述之步驟製備化合物 4。

合成經還原之生物素醯胺基己胺(r-BHD) - 化合物 1

化合物 1之詳細合成方法及理化性質係描述於文獻 G.

Sabatino，M. Chinol，G. Paganelli，S. Papi，M. Chelli，G.Leone，A. M. Papini，A. De Luca，and M. Ginanneschi，J. Med. Chem.，2003，46，3170-3173 中。使用 Varian 400 且於 DMSO-d_6 溶液中測得產物之 NMR 光譜。此實施例之 N,N-雙[3-(Fmoc-胺基)丙基]甘胺酸之硫酸鉀鹽係購自 Fluka (瑞士)。

合成與 N,N-雙[(3-胺基)丙基]甘胺酸之 r-BHD 共軛物-化合物 2

將 HATU (66.5 mg，0.175 毫莫耳，0.7 莫耳當量)之 NMP(0.5 mL)溶液加入至 N,N-雙[3-(Fmoc-胺基)丙基]甘胺酸硫酸鉀(115.5 mg，0.15 毫莫耳，0.6 莫耳當量)和 NMM (33.05 μL，0.3 毫莫耳，1.2 莫耳當量)之 NMP(1 mL)溶液中。以 5 分鐘之時間將該溶液逐滴加入至含有 NMM (27.5 μL，0.25 毫莫耳，1 莫耳當量)之 r-BHD(化合物 1；100 mg，0.25 毫莫耳)的 NMP(5 mL)懸浮液中。室溫下攪拌該反應混合物並藉由 RP-HPLC (流洗液：30 至 100%之 B，20 分鐘；t_R = 13.4 分鐘)監測該反應。經 2.5 小時後，再次將化合物 1 (57.7 mg，0.08 毫莫耳，0.3 莫耳當量)加入至該反應混合物中。經 2.5 小時後，中止該反應並於減壓下蒸發溶劑。於 0°C 和攪拌下令黃橙色油狀物懸浮於水中，得到白色沉澱物，其係經 RP-CC (LiChroprep RP-8，40-63 μm；170 x 20 mm；流洗液：$CH_3CN/H_2O/HCl$ = 50:50:0.1，1 mL/分鐘)純化以生成化合物 2 (130 mg；55%

產率)。經 TLC 檢測($CH_3CN/H_2O/HCl$ = 50:50:0.1)發現該 Fmoc 經保護之雙胺基衍生物(化合物 2)係已經純化。^1H NMR (200 MHz，DMSO)：δ 9.63 (br s，1H)，8.64 (br s，3H)，7.87 (d，4H)，7.65 (d，4H)，7.43-7.27 (m，8H)，6.41 (d，2H)，4.31-4.14 (m，8H)，3.85 (s，2H)，3.14-3.03 (m，11H)，2.82-2.76 (m，4H)，2.6 (d，2H)，1.76-1.25 (m，20H)；ESI-MS (m/e)：計算爲 $[M+H]^+$ 944.5，結果爲 944.5。

令該 Fmoc 經保護之雙胺基衍生物(化合物 2；88 mg，0.09 毫莫耳)溶解於含有 25%之哌啶的 DMF (5 mL)中。於室溫和攪拌下維持該溶液達 6 小時並藉由 RP-HPLC (流洗液：30 至 100%之 B，20 分鐘；t_R = 16.7 分鐘)監測該反應。減壓下蒸發該反應混合物，令粗油狀物溶解於最少量之 MeOH 中，隨後經 Et_2O 沉澱。利用乙醚沖洗所收集之固體兩次，隨後溶解於水中並經冷凍乾燥，生成白色產物，其係經 SPE (固相萃取；LiChroprep RP-18，25-40 μm；170 x 20 mm；流洗液：H_2O 100%至 MeOH 自 4 至 100%)純化。收集經流洗之分級液，經冷凍乾燥後生成去保護之二胺(化合物 3；30 mg，75%產率)。

^1H NMR (200 MHz，$CDCl_3$)：δ 8.12 (br s，2H)，6.45 (s，2H)，4.26 (m，1H)，4.12 (m，1H)，3.59-2.95 (m，7H)，2.95-2.70 (m，12H)，2.50 (d，2H)，1.80-1.20 (m，20H)；ESI-MS (m/e)：計算爲 $[M+H]^+$ 443.6，結果爲 443.1。

化合物 3 與經活化之 DOTA 之共軛反應以生成雙 DOTA-C_3 化合物 4

將磺基-NHS (26 mg，0.12 毫莫耳)加入至 DOTA·0.31H_2O (49.2 mg，0.12 毫莫耳)之 H_2O (0.750 mL)溶液中。利用 0.1 M NaOH 調整其 pH 至 6.5，且於 0°C 下逐滴加入 EDC (23 mg，0.12 毫莫耳)之 H_2O (0.5 mL)溶液。

0°C 下攪拌該反應混合物 30 分鐘，隨後以 5 分鐘之時間逐滴加入化合物 3 (15 mg，0.03 毫莫耳)之 H_2O (0.750 mL)溶液，pH 7.8。

藉由 RP-HPLC (流洗液：5 至 100%之 B，30 分鐘；t_R = 16.4 分鐘)檢驗該反應。

經 2 小時後，令該反應混合物經冷凍乾燥並藉由 SPE (固相萃取；LiChroprep RP-18，25-40 μm；15 x 65 mm；流洗液：a) H_2O；b) 4% MeOH 水溶液；c) 100% MeOH)先期純化該粗化合物。經萃取之分級液的 HPLC 測試證實分級液 c 中主要爲化合物 4。蒸發該甲醇溶液並藉由 RP-HPLC (流洗液：5 至 30%之 B，30 分鐘；t_R = 16.4 分鐘)純化產物，得到白色固體之純雙 DOTA 產物(化合物 4；15 mg，24%產率)。

ESI-MS：m/e 計算爲 $[M+H]^+$ 1272.7，結果爲 1272.7；$[M-H]^+$ 1270.7，結果爲 1270.9。分析 ($C_{56}H_{101}N_{15}O_{16}S$·6TFA·5$H_2O$) C，H，N。

利用上述實施例所述之化合物進行標記試驗、放射化學純度分析及血清安定性試驗。

利用雙 DOTA-C_3 之 Milli Q 水溶液(2 mg/mL)進行標記試驗。將 1.0 mM 之乙酸鈉緩衝液(pH 5.0)加入至雙 DOTA-C_3 中，隨後加入特定活性爲 1 mCi/7.2 μg 之放射性同位素氯化物溶液(MCl_3，M = ^{111}In、^{90}Y、^{177}Lu)。最後於 95°C 下培育該溶液 30 分鐘。

使用矽膠立即薄層層析(Silica Gel Instant Thin Chromatography；ITLC-SG)以測定放射化學純度(RCP)。將一份該放射性標記混合物加入至莫耳過量之抗生物素蛋白和 DTPA 中，隨後將一滴滴在 ITLC 試條上並經鹽水顯影。利用放射性 TLC 裝置分析該試條；於此系統中，經雙 DOTA-C_3 與抗生物素蛋白所形成之複合物係停留在原處，而未經結合之放射性金屬係經 DTPA 複合並隨溶劑向前移動。典型上所得到之 RCP 值係>96%。

在使用和不使用抗壞血酸(AA)作爲基團清除劑之情況下進行安定性分析。於 37°C 下培育數份經標記之分子與 4 倍體積之鹽水或 AA 溶液(4 mg/mL 之 1.0 M 乙酸鈉緩衝液，pH 5.0)。於 24 和 48 小時進行安定性分析並使用上述之 ITLC-SG 方法計算 RCP 值。結果顯示在 AA 之存在下該經放射性標記之 M-雙 DOTA-C_3 對輻射分解係安定達至 48 小時。

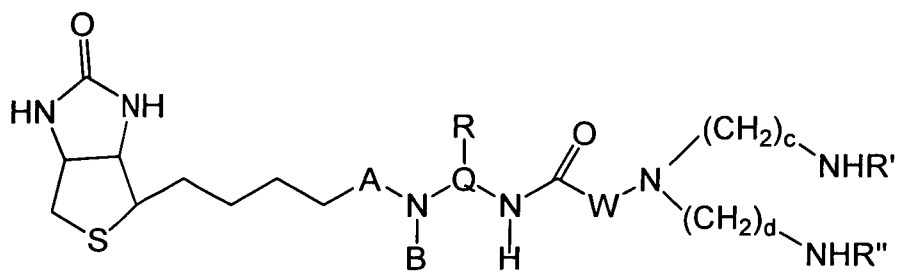
公告本　101年7月09日修正本

附件 3A ：第 095134322 號申請專利範圍修正本

民國 101 年 7 月 9 日修正

十、申請專利範圍

1. 一種式(I)化合物



(I)

其中

A 係 CH_2 或 CO；

B 係 H、CHO 或 COOH；惟其

當 A 係 CH_2 或 CO 時，Q 係 $-(CH_2)_n-$，其中 n 係 4 至 12 之整數，此時 R 係不存在；

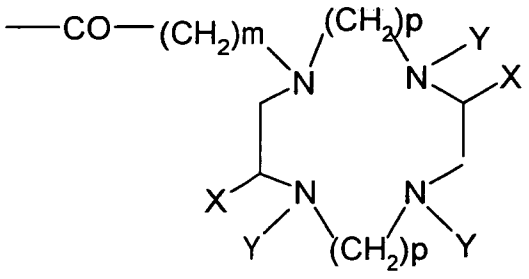
W 係 C_1-C_{12} 烷撐基或 C_2-C_{12} 烯撐基直鏈或官能化之聚乙二醇；或 C_6-C_{10} 芳香族殘基；或糖呋喃糖殘基；或

W 單獨係或與連接 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈之氮原子一起形成含有一或多個選自 O、N 或 S 之雜原子的 5 或 6 員雜環基；

當 W 係芳香族殘基、雜環基或糖部分時，連接 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈之氮原子係可選擇地不存在且該 $-(CH_2)_c-NHR'$ 和 $-(CH_2)_d-NHR''$ 鏈係直接且各別與該芳香族環和雜環之碳或氮原子結合或與該糖呋喃糖殘基之氧原子結合；

c 和 d 各別爲 3 至 10 之整數；

R'和 R"各別爲 -Λ，其中 -Λ係式(II)大環：



(II)

其中 Y 係相同或不同且係選自氫、直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基、或 $-(CH_2)_m-COOH$，其中 m 係 1 至 3 之整數；

X 係氫或 $-CH_2$-U 基團，其中 U 係選自甲基、乙基或對胺基苯基，或 X 係 $-(CHJ)_o-Z$ 基團，其中 o 係 1 至 5 之整數，J 係氫、甲基或乙基，且 Z 係含有一或多個選自 O、$N-R_1$(其中 R_1 係氫原子或直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基)或 S 之雜原子的 5 或 6 員雜環基，或 Z 係選自 $-NH_2$、$-NH-C(=NH-)-NH_2$、或 $-S-R_2$，其中 R_2 係直鏈或支鏈 C_1-C_4 烷基；

p 係 2 或 3 之整數。

2. 如申請專利範圍第 1 項之式(I)化合物，其中各別地 A 係 CH_2，B 係 H，Q 係 $-(CH_2)_n-$，其中 n 係 4 至 8 之整數，c 和 d 皆爲 3 或 6，R'和 R"係 -Λ，其中 Y 始終是 $-CH_2$-COOH，X 係氫，且 p 係 2。

3. 一種如申請專利範圍第 1 項之式(I)化合物與放射

性同位素之複合物。

4. 如申請專利範圍第 3 項之複合物，其中放射性同位素係選自 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 或 Au-198。

5. 如申請專利範圍第 3 或 4 項之複合物，其中 Q 係 $-(CH_2)_n-$，n 係 4 至 8 之整數，Y 係 $-CH_2-COOH$，且該放射性同位素係 Y-90。

6. 一種醫藥及/或診斷組成物，其含有如申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物與適當之載體及/或賦形劑的混合物。

7. 一種如申請專利範圍第 1 或 2 項之化合物於製備用於腫瘤治療的藥物之用途。

8. 一種醫藥及/或診斷組成物，其含有如申請專利範圍第 3 至 5 項中任一項之複合物與適當之載體及/或賦形劑的混合物。

9. 一種如申請專利範圍第 3 至 5 項中任一項之複合物作爲抗癌放射性藥物之用途。

10. 一種用於腫瘤之放射性治療或診斷之套組，其特徵在於該套組之至少一種成份含有如申請專利範圍第 1 項之化合物或如申請專利範圍第 3 項之複合物。