



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I382851B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：098131213

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K49/10 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)
新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：王雲銘 WANG, YUN MING (TW)；陳亭蓉 CHEN, TING JUNG (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(56)參考文獻：

Chemistry-A EUROPEAN JOURNAL, vol.11, 2005, p3064-3076

審查人員：傅玉妃

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：1 共 0 頁

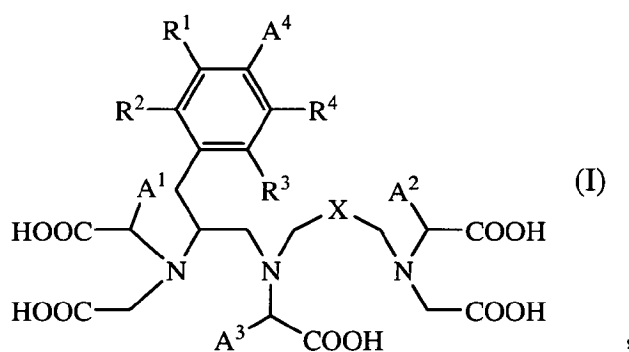
(54)名稱

配位化合物及用於製備血池及目標化對比劑之金屬錯合物

LIGAND AND METAL COMPLEX FOR PREPARING A BLOOD POOL AND TARGETING
CONTRAST AGENT

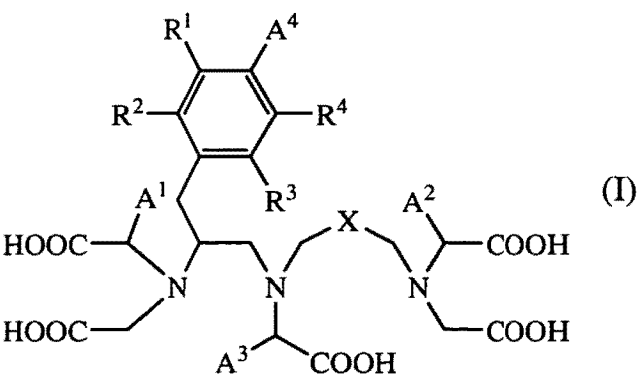
(57)摘要

本發明提供一種由下式(I)所示之配位化合物：



式(I)之各個取代基的定義如說明書及申請專利範圍所界定。本發明亦提供一種穩定的金屬錯合物，可用於製備血池對比劑或目標化對比劑。

The present invention provides a ligand of formula (I):



the definitions of the substituted groups in formula (I) are defined as set forth in the specification and claim. The present invention also provides a stable metal complex for preparing a blood pool contrast agent or a targeting contrast agent.

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 98131213

※ 申請日： 98.9.16

※IPC 分類： A61K 49/10 (2006.01)

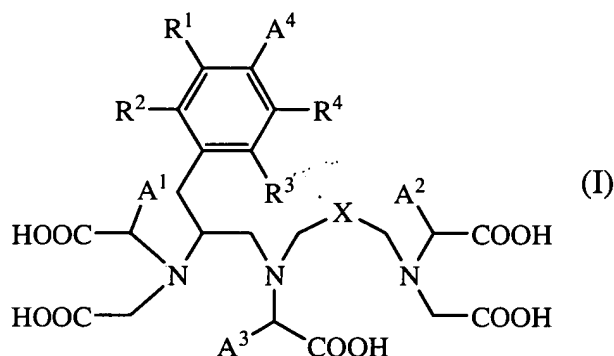
一、發明名稱：(中文/英文)

配位化合物及用於製備血池及目標化對比劑之金屬錯合物/

LIGAND AND METAL COMPLEX FOR PREPARING A BLOOD POOL
AND TARGETING CONTRAST AGENT

二、中文發明摘要：

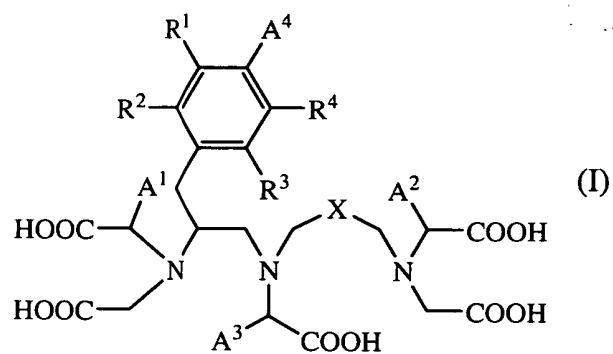
本發明提供一種由下式(I)所示之配位化合物：



式(I)之各個取代基的定義如說明書及申請專利範圍所界定。
本發明亦提供一種穩定的金屬錯合物，可用於製備血池對比劑或目標化對比劑。

三、英文發明摘要：

The present invention provides a ligand of formula (I):



the definitions of the substituted groups in formula (I) are defined as set forth in the specification and claim. The present invention also provides a stable metal complex for preparing a blood pool contrast agent or a targeting contrast agent.

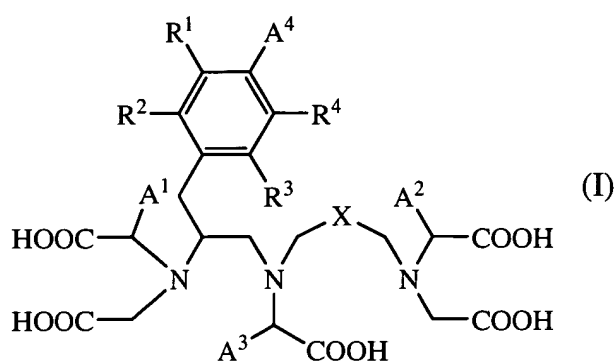
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、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)之各個取代基的定義如說明書及申請專利範圍所界定]

六、發明說明：

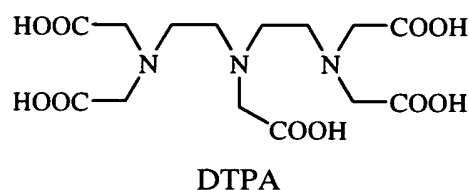
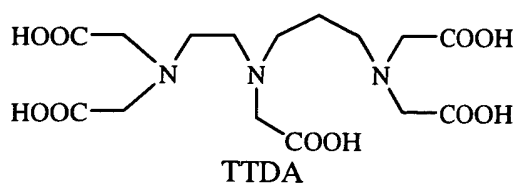
【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種配位化合物及由該配位化合物所製得且供作為磁振造影對比劑之金屬錯合物，特別是指一種配位化合物及用於製備血池對比劑及目標化對比劑之金屬錯合物。

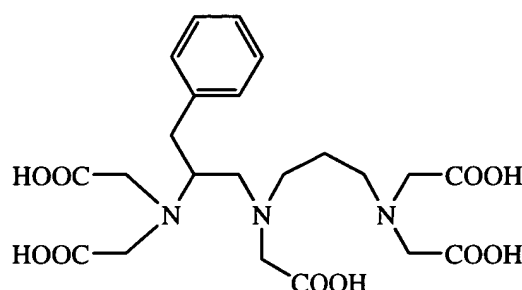
【先前技術】

依據磁場下之特性，磁振造影對比劑可分為兩類：(1)主要用於減少縱向弛緩時間(spín-lattice relaxation time, T_1)之 T_1 對比劑，其功能是用來增加組織訊號；(2)主要用來減少橫向弛緩時間(spín-spin relaxation time, T_2)之 T_2 對比劑，其目的是減少組織訊號，以有效辨別組織之正常與否，例如氧化鐵奈米粒子。

T_1 對比劑是以金屬錯合物為主，此金屬錯合物包含一順磁性金屬離子中心以及多數個與金屬中心螯合之配位化合物。針對配位化合物，本案發明人於 *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 1998, p.4113-4118 中揭示 3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三氮雜十二烷二酸[3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic acid，以下簡稱為「TTDA」]具備較二伸乙基三胺五醋酸(diethylene triamine-pentaacetic acid，以下簡稱為「DTPA」)更佳物性及化性：



磁振造影對比劑可依據所欲偵測目標物的不同而對結構進行修飾，本案發明人亦曾以 TTDA 為基本骨架進行結構修飾，如 *Helv. Chim. Acta*, **2002**, 85, 1033 所揭示之 (S)-4-Bz-TTDA：



(S)-4-Bz-TTDA

(S)-4-Bz-TTDA 主要適於作為肝膽(hepatobiliary)造影對比劑，如欲用來偵測其他目標物，則需再進行結構修飾，以有效地與待偵測目標物進行結合。

依目前磁振造影技術而言，各類的對比劑都尚待研究開發中，其中以血池造影對比劑以及具有生物活性之目標化對比劑的需求最大，因此，如能設計一種可用於製備血池對比劑及目標化對比劑之配位化合物及金屬錯合物，應有利於增進磁振造影技術的發展。

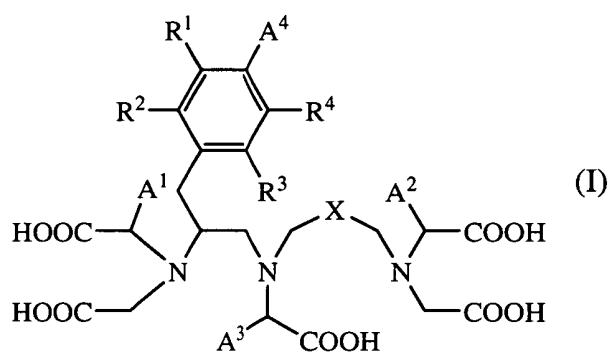
【發明內容】

血池對比劑一般需具有適度脂溶性且易於與人類血清蛋白進行鍵結，而目標化對比劑則需具有可與特異性胜肽序列鍵結之官能基團，鑑於上述的各項需求，本案發明人嘗試以具備高弛緩率之 TTDA 作為基本骨架，並於適當位置設計可同時增進脂溶性及可與特異性胜肽序列鍵結之官能基團，藉此製得一配位化合物。

因此，本發明之目的，即在提供一種與順磁性金屬離子具有極佳螯合作用之配位化合物。

本發明之另一目的在於提供一種由上述配位化合物與一順磁性金屬離子進行螯合反應所製得之金屬錯合物，此金屬錯合物具備高穩定性、高弛緩率及生物相容性，並適用於製備血池對比劑及目標化對比劑。

於是，本發明配位化合物是如下式(I)所示：



，其中，

X 表示伸甲基、1,1-伸環丁基、1,1-伸環戊基或 1,1-伸環己基；

A¹、A² 及 A³ 各自表示氫、C₁~C₃ 之烷基、C₁~C₃ 之苯烷基、C₁~C₃ 之甲氧基苯烷基、二苯甲基或 C₁~C₃ 之異硫氰苯烷基；

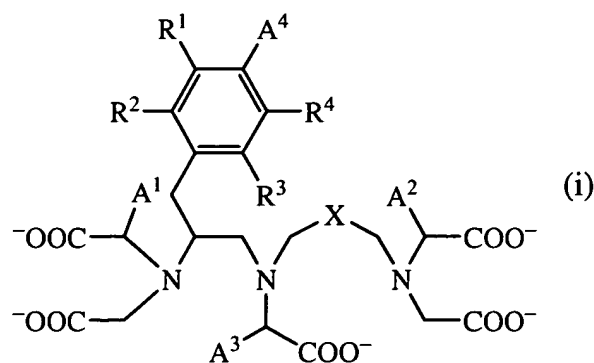
A⁴ 為氫、硝基、胺基、硫氰基、或—Z—Y，Z 是用於與具有生物相容性之分子鍵結之二價連結基，以及 Y 是衍生自具有生物相容性之分子的基團；及

R¹、R²、R³ 及 R⁴ 各自表示氫、硝基、胺基或硫氰基；

其條件是當 X 為伸甲基時，A⁴ 不可為氫或硝基。

本發明之用於製備血池及目標化對比劑之金屬錯合物包含：一順磁性金屬離子；以及一與金屬離子螯合且由下

式所示之配位化合物：



式(i)中之 X、A¹、A²、A³、A⁴、R¹、R²、R³及 R⁴的定義如上所述。

本發明金屬錯合物藉由 A⁴ 的多樣設計，再加上苯基及 A¹、A² 及 A³ 的選擇性引入，讓金屬錯合物不僅具備高穩定性及高弛緩率，更具備適當脂溶性，並可與人類血清蛋白及具備特異性的胜肽序列進行鍵結，而適於製備或作為血池對比劑及目標化對比劑。

【實施方式】

上述之「具有生物相容性之分子」係泛指可與生物體之細胞或組織(即待偵測之目標物)相容之分子，例如胜肽序列或抗體等等。以血池對比劑而言，此分子必須可與人類血清蛋白結合；以目標化對比劑而言，此分子必須可與目標化細胞或組織結合。

當式(I)之 A⁴ 為氫、硝基、胺基或硫氰基時，對應之式(I)配位化合物所製得之金屬錯合物主要適用於製備血池對比劑。而當式(I)之 A⁴ 為—Z—Y時，對應之式(I)配位化合物所製得之金屬錯合物主要適用於製備目標化對比劑。

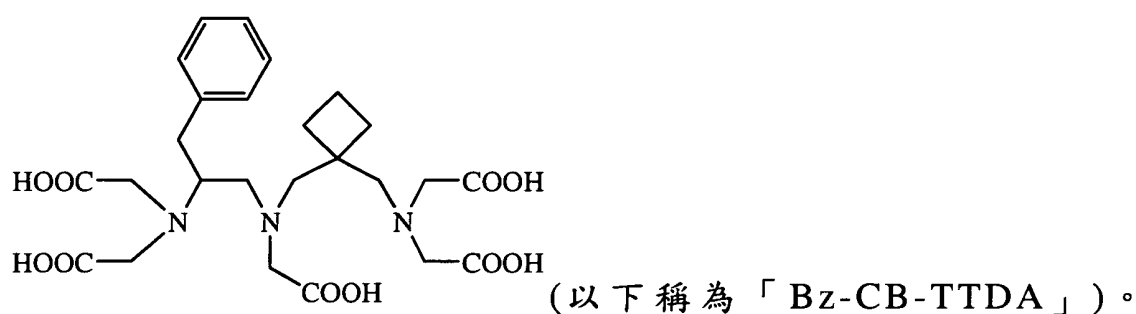
較佳地，該 A⁴ 為氫或硫氰基。

較佳地，該 A^4 為 $-Z-Y$ ， Z 是選自於 $-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{N}}}}-\text{C}-$ 或 $-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{N}}}}-\text{C}-$ ， Y 是衍生自目標化胜肽序列之基團。「目標化胜肽序列」可依據待偵測目標物進行設計及選擇，較佳地，該目標化胜肽序列是選自於介白素-11(interleukin 11，以下簡稱為「IL-11」)、鈴蟾素(bombesin，以下簡稱為「BN」)、環(精胺酸-甘胺酸-天門冬醯胺酸)[cyclo(Arg-Gly-Asp)，以下簡稱為「CRGD」]或白胺酸-丙胺酸-精胺酸-白胺酸-白胺酸-蘇胺酸(Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr，以下簡稱為「D4」)。

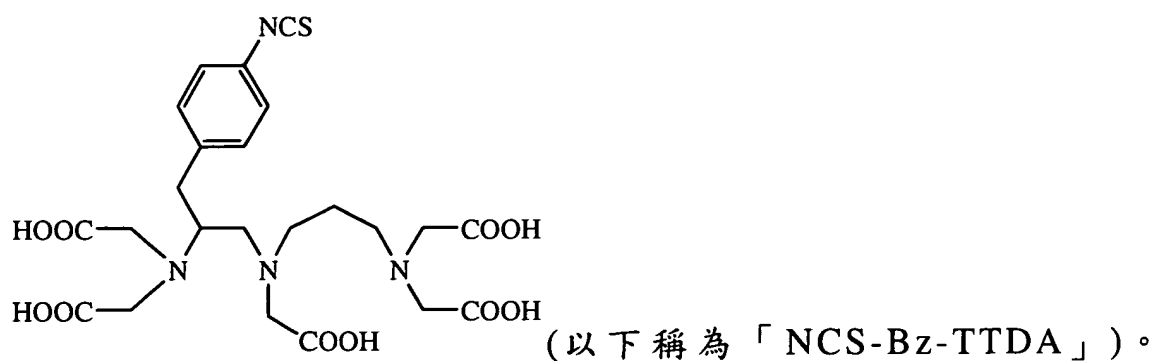
較佳地，該 X 為伸甲基或 1,1-伸環丁基。

A^1 、 A^2 及 A^3 主要係用於增加脂溶性，可依據實際需要來選擇。較佳地， A^1 、 A^2 及 A^3 各自選自於氫、甲基、苯甲基、甲氧基苯甲基、二苯甲基或異硫氰苯甲基。

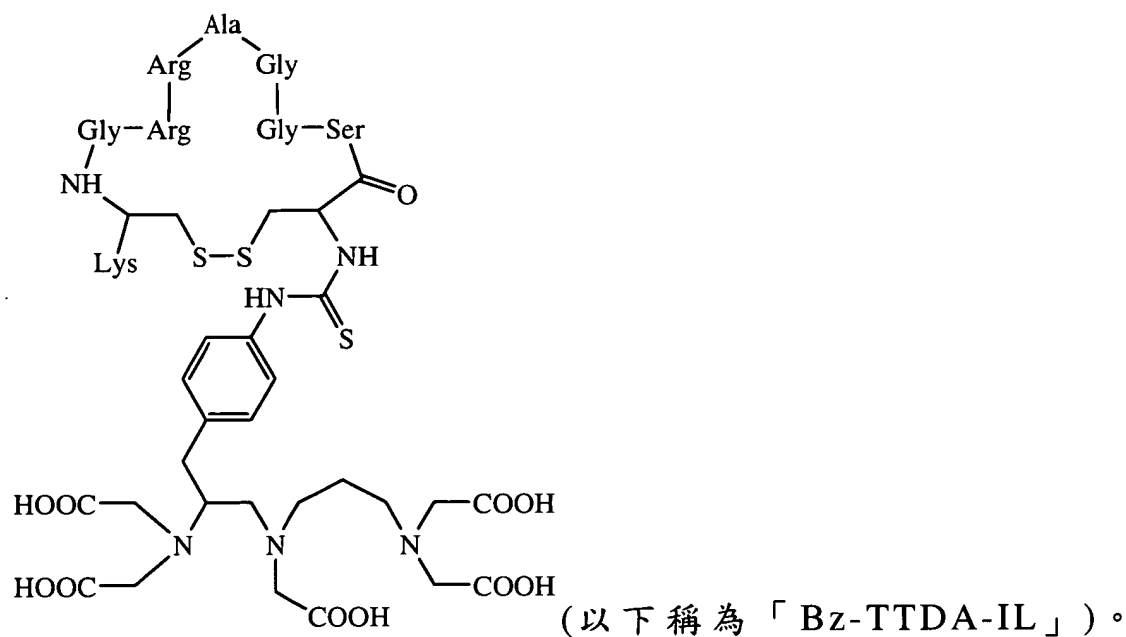
於本發明配位化合物之一具體例中， X 為 1,1-伸環丁基， A^1 、 A^2 、 A^3 及 A^4 各自為氫，以及 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 各自為氫，即如下式所示：



於本發明配位化合物之另一具體例中， X 為伸甲基， A^1 、 A^2 及 A^3 各自為氫， A^4 為硫氰基及 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 各自為氫，即如下式所示：



於本發明配位化合物之再一具體例中，X 為伸甲基，
 A^1 、 A^2 及 A^3 各自為氫， A^4 為 $-Z-Y$ ，Z 是選自於 $-\overset{\text{S}}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}-\text{C}-$ ，
 Y 是衍生自介白素-11 之基團，以及 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 各自為氫，即如下式所示：



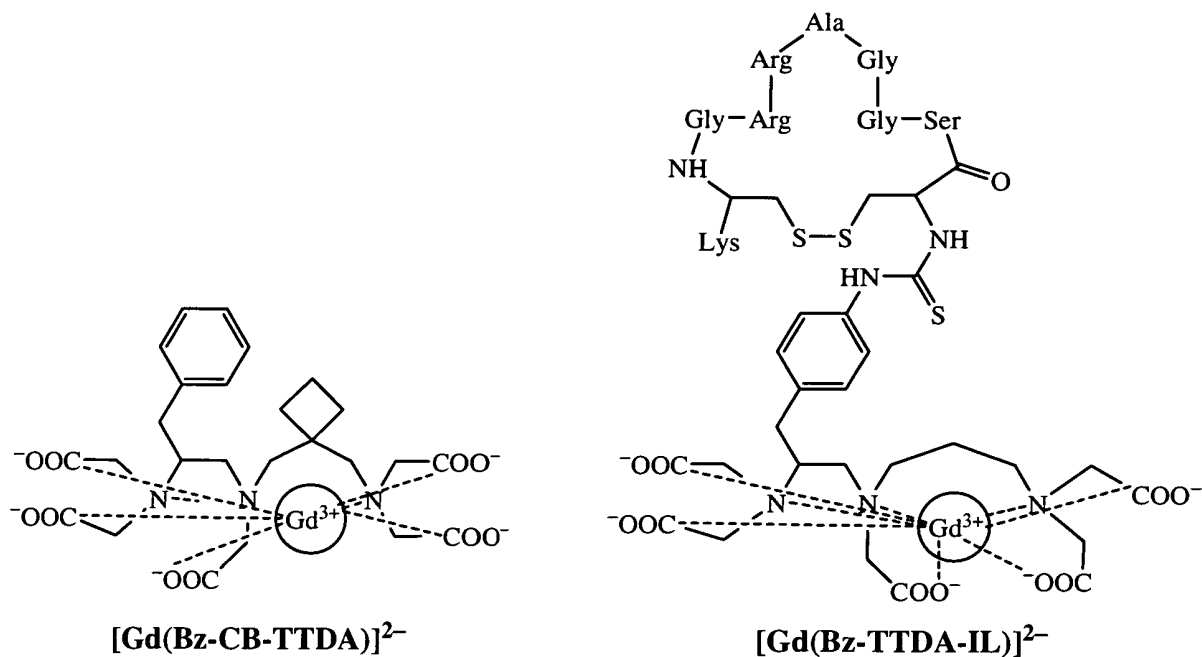
式(I)所示之配位化合物可依據習知方法進行製備。

在本發明之金屬錯合物中，該順磁性金屬離子可為任何對生物體無害之用於磁共振造影技術的金屬離子。較佳地，該金屬離子是選自於銅系金屬離子、錳離子或鐵離子；更佳地，該金屬離子是選自於釷離子(+3 價)、錳離子(+2 價)或鐵離子(+3 價)。於本發明之一具體例中，該金屬離子為

釷離子。

該金屬錯合物中之配位化合物的界定及變化態樣如上所述，在此不多加贅述。

在本發明之二具體例中，該金屬錯合物分別如下所示：



本發明之金屬錯合物可依據後續待偵測之目標物進行結構修飾，以製得符合需求之磁共振造影對比劑。於本發明之一具體例中，該金屬錯合物是用作為血池造影對比劑；於另一具體例中，該金屬錯合物是用作為目標化對比劑。

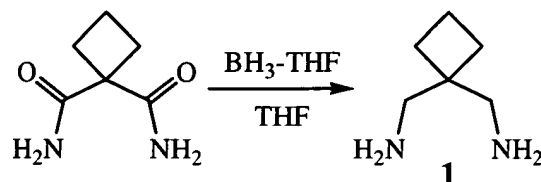
本發明將就以下實施例來作進一步說明，但應瞭解的是，該實施例僅為例示說明之用，而不應被解釋為本發明實施之限制。

< 實施例 >

[實施例 1] 配位化合物 Bz-CB-TTDA 的製備

實施例 1 之各步驟所製得之產物分別利用 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、質譜儀及元素分析儀進行結構鑑定：

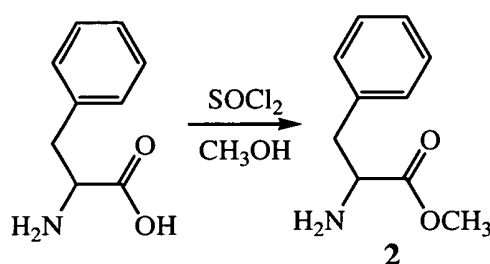
1. 碳-(1-甲胺基-環丁基)-甲胺 [C-(1-aminomethyl-cyclobutyl)-methylaniline, 1]之合成：



在氮氣及冰浴下，使 5.2 g (36.6 mmol) 之環丁烷-1,1-二羧酸二胺 (cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid diamine)、250 mL 無水四氫呋喃與 300 mL 之濃度為 1M 之甲硼烷-四氫呋喃溶液 [BH₃: THF=1:8 (莫耳比)] 進行混合，以製得一反應液。使此反應液於冰浴下反應 1 小時，接著再將反應液加熱至 70°C 並反應 36 小時，之後再加入甲醇中止反應，再以減壓濃縮機去除溶劑，以獲得一粗產物。使粗產物與 250 mL 之乙醇及 50 mL 濃度為 6N 之鹽酸溶液進行混合而獲得一混合液。將混合液加熱至 80°C 並迴流反應 12 小時。待反應結束後，再以減壓濃縮機去除溶劑，而獲得一黃色油狀物。加水溶解此油狀物，並利用鹽酸，將油狀物之 pH 值調至 2，然後放入充填有 100 mL 之 AG 50 W×8 陽離子交換樹脂(購自 Aldrich 公司，200~400 mesh，此樹脂為 H⁺型式)的管柱(3×20 cm)中，透過使用不同濃度(0.5~3.0 N)之鹽酸溶液來沖提管柱並收集 1.0~2.0N 之鹽酸沖提液，最後進行濃縮後，即獲得 3.0 g (26.3 mmol，產率為 70.9%) 之碳-(1-甲胺基-環丁基)-甲胺 1。結構鑑定結果為： ^1H -NMR(D₂O, 400MHz), δ (ppm): 2.95(s, 4H,

$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CCH}_2\text{NH}_2$), 1.87-1.81 (m, 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C -NMR(D_2O , 100MHz), $\delta(\text{ppm})$: 49.93, 49.81, 36.91, 27.73, 26.28, 14.46; ESI-MS (m/z): 計算值為 114.19, 發現值為 114.76 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 3\text{HCl}$ 的分析計算值(發現值): C, 32.44(32.23); H, 7.20(7.66); N, 12.24(12.53)。

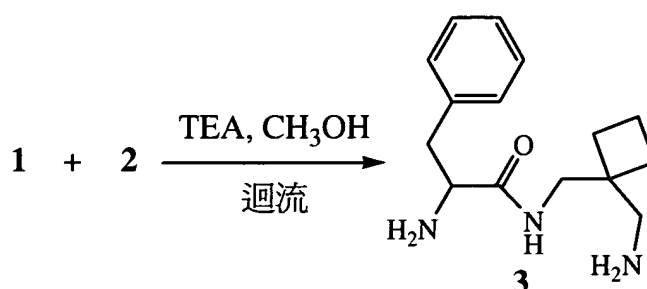
2. L-苯基丙胺酸甲酯(L-phenylalanine methyl ester, **2**)之合成:



在冰浴下，將 6.61 mL 之亞硫醯氯(SOCl_2)加入 40 mL 之甲醇中，接著攪拌 30 分鐘，再與 10 g 之 L-苯胺混合，而獲得一反應液。將反應液加熱至 70°C 並進行迴流反應 24 小時。待反應結束後，以減壓濃縮機將反應液之溶劑予以去除，再用乙醚進行再結晶及過濾乾燥，即獲得 11.5 g (產率為 88.3%) 之呈白色固體之 L-苯基丙胺酸甲酯。結構鑑定結果為： ^1H -NMR(D_2O , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.36-7.20 (m, 5H, Ar), 4.36-4.34 (t, 1H, $J=6$, H_2NHCH), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.30-3.12 (m, 2H, CH_2Ar); ^{13}C -NMR(D_2O , 100MHz), $\delta(\text{ppm})$: 170.2, 133.9, 129.5, 129.4, 129.3, 128.3, 128.1, 54.2, 53.7, 35.7; ESI-MS (m/z): 計算值為 179.22, 發現值為 180.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ 的分析計算值(發現值): C, 55.69(55.32); H, 6.45(6.54); N, 6.49(6.35)。

3. 2-胺基-氮-((1-(胺甲基)環丁基)甲基)-3-苯丙醯胺 [2-

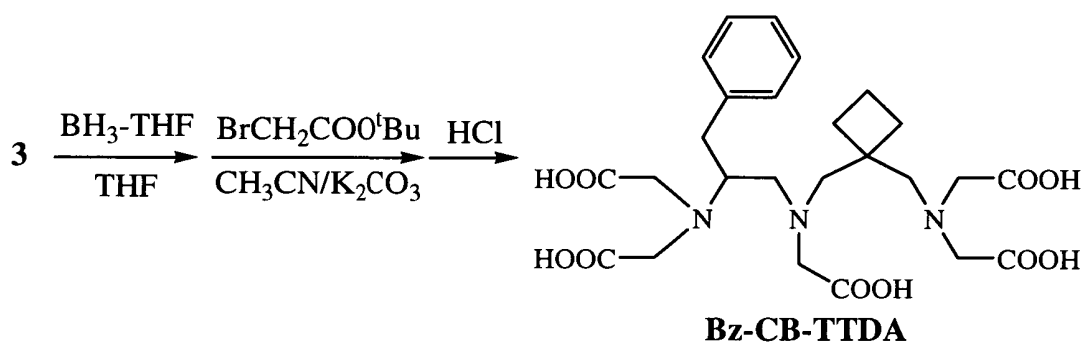
amino-N-((1-(aminomethyl)cyclobutyl)methyl)-3-phenylpropanamide, 3]之合成：



將 3.6 g(31.5 mmol)之 2-氨基-3-苯基丙酰胺 1 與 100 mL 甲醇混合，接著利用三乙基胺將 pH 值調整到 9~10，即獲得一第一反應液。將 5.1 g(28.7 mmol)之 L-苯基丙胺酸甲酯 2 與 100 mL 甲醇混合，即獲得一第二反應液。將第二反應液慢慢滴入第一反應液中，以獲得一混合液。使混合液加熱至 60~70°C 並進行迴流反應 19 小時。待反應結束後，以減壓濃縮機將混合液之溶劑予以去除，即獲得一粗產物。利用少量氨水來溶解粗產物，再以氯仿及水進行萃取，最後收集有機層，再以減壓濃縮機將有機層之溶劑予以去除，即得到 2.9 g (11.1 mmol，產率為 38.6%)呈淡黃色油狀物之 2-氨基-氮-((1-(胺甲基)環丁基)甲基)-3-苯丙醯胺 3。結構鑑定結果為：¹H-NMR(D₂O, 400MHz), δ(ppm): 7.29-7.15 (m, 5H, Ar), 3.57 (t, 1H, *J*=3, H₂NCH), 3.20-2.95 (m, 2H, NHCH₂), 2.89-2.76 (m, 2H, CH₂Ar), 2.21-2.05 (m, CH₂NH₂), 1.69-1.66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.52-1.45 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂) ; ¹³C-NMR(D₂O, 100MHz), δ(ppm): 176.88, 137.37, 129.38, 128.90, 127.11, 56.60,

45.82, 43.99, 42.36, 40.90, 26.59, 26.51, 14.27 ; ESI-MS (m/z): 計算值為 261.36, 發現值為 262.18 $[M+H]^+$; $C_{15}H_{23}N_3O \cdot HCl$ 的分析計算值(發現值) : C, 60.94(60.49); H, 8.43(8.12); N, 14.53(14.11)。

4. 4-苯甲基-8-環丁基-3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三氮癸二酸 (4-benzyl-8-cyclobutyl-3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic acid, **Bz-CB-TTDA**)之合成 :



於氮氣及冰浴下，將 36.7 mL 之濃度為 1M 的甲硼烷-四氫呋喃溶液 $[BH_3 : THF = 1:4$ (莫耳比)] 慢慢滴入 2.4 g (9.2 mmol) 之 2-胺基-氮-(1-(胺甲基)環丁基)甲基)-3-苯丙醯胺 **3** 中，以獲得一反應液。使該反應液於冰浴下反應 1 小時，接著再由冰浴中移出，然後加熱至 $70^\circ C$ 並反應 36 小時。待反應結束後，於反應液中加入甲醇，再以減壓濃縮機將甲醇去除，然後在反應液中加入 50 mL 之乙醇以及 10 mL 濃度為 6N 之鹽酸溶液，接著加熱至 $80^\circ C$ 並進行迴流反應 12 小時。待反應結束後，以減壓濃縮機將反應液之溶劑予以去除，再利用少量氨水來溶解，並以氯仿及水進行萃取，最後收集有機層，再以減壓濃縮機將有機層之溶劑予以

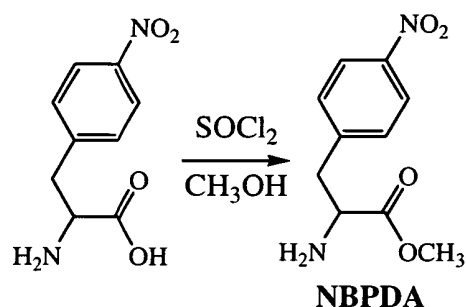
去除，即得到 1.9 g (7.7 mmol，產率為 38.6%) 呈黃色油狀物。

將此黃色油狀物溶解於 250 mL 之氯甲烷中，以獲得一起始液。於起始液中加入 8.0 g (57.8 mmol) 之碳酸鉀，使起始液的 pH 值維持在約 10。接著在起始液中加入 6.1 mL (42.4 mmol) 之 $\text{BrCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$ ，而獲得一反應液。使反應液於 70°C 加熱迴流 48 小時，再將反應液進行過濾及濃縮，然後加入氯仿及水進行萃取，取出氯仿層並進行濃縮，接著加入 100 mL 濃度為 3N 之鹽酸溶液而獲得一混合液。使混合液於室溫下反應 24 小時，待反應結束後，以減壓濃縮機將混合液的溶劑移除而獲得一粗產物。利用水來溶解粗產物並利用氨水調整粗產物的 pH 值至 11~12，最後將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG1×8 陰離子交換樹脂(購自 Aldrich 公司，200~400 mesh，此樹脂為 HCOOH 型式)的管柱(3×20 cm)中，透過使用不同濃度(0.1~3.0N)之甲酸溶液來沖提管柱並收集沖提液，最後收集 0.8N 之甲酸沖提液並進行濃縮後，即獲得 1.4 g (2.7 mmol，產率為 34.8%) 之 Bz-CB-TTDA。結構鑑定結果為： ^1H -NMR(D_2O , 400MHz), $\delta(\text{ppm})$: 7.34-7.23 (m, 5H, Ar), 3.82-3.60(s, 10H, CH_2COOH), 3.58-3.28(m, 6H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2$), 3.16 (d, 2H, $J=14$, CH_2NH_2), 2.71 (m, 1H, H_2NCH), 1.87 (m, 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C -NMR(D_2O , 100MHz), $\delta(\text{ppm})$: 185.04, 136.48, 129.59, 129.30, 127.52, 62.05, 60.68, 60.27, 58.30, 57.36, 55.36, 54.41, 53.09, 39.39, 33.14, 30.14, 15.86; ESI-

MS (m/z): 計算值為 537.56, 發現值為 537.84 $[M+H]^+$;
 $C_{25}H_{35}N_3O_{10} \cdot 3HCl \cdot 5H_2O$ 的分析計算值(發現值): C,
 40.52(40.74); H, 6.57(6.56); N, 5.42(5.70)。

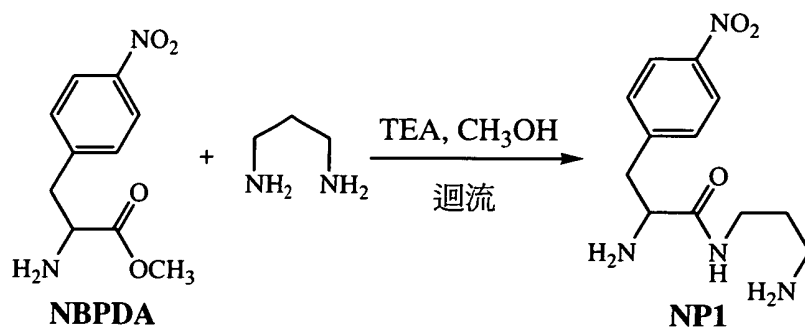
[實施例 2] 配位化合物 **Bz-TTDA-IL** 的製備

1. 對-硝基苯基丙胺酸甲酯 [p-Nitrophenylalanine methylester, **NBPDA**]之合成：



在冰浴下，將 10 mL 的亞硫醯氯加入 40 mL 的甲醇中，並在室溫下攪拌 30 分鐘。接著，加入 0.51 g 的對-硝基苯基丙胺酸(p-nitrophenyl-alanine)，而獲得一反應液。將此反應液加熱到 70°C 並迴流反應 24 小時。反應結束後，以減壓濃縮機將反應液抽乾，然後用乙醚再結晶。最後過濾而獲得 0.53 g(產率 97.0%)呈白色固體之 **NBPDA**。

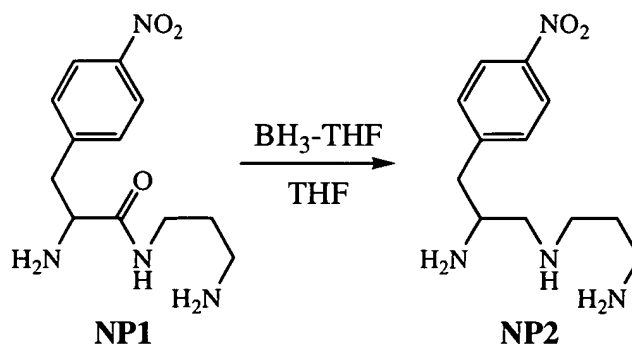
2. 2-氨基-氮(1-胺甲基)-3-(4-硝基苯基)丙醯胺[2-Amino-N-(1-aminomethyl)-3-(4-nitro-phenyl)-propionamide, **NP1**]的合成：



將 2.00 g(0.0175 mol)之 1-胺甲基-甲基胺[(1-amino-

methyl)-methyllamine]與 50 mL 之甲醇混合，再加入適量的三乙基胺將 pH 值調至 9~10，以獲得一反應液。將 2.10 g (0.0093 mol)之 NBPDA 與 100 mL 之甲醇予以混合後，再快速滴入反應液中，接著反應 12 小時。反應結束後，以減壓濃縮將反應液抽乾，可得黃色油狀物。將此油狀物加水溶解並以鹽酸將 pH 值調至 2，以獲得一粗產物。最後將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG 50W×8 陽離子交換樹脂的管柱(3×20 cm)進行純化，透過使用不同濃度之鹽酸溶液來沖提管柱並收集 2.5~3.5N 之鹽酸沖提液，最後進行濃縮後，即獲得 1.43 g (0.019 mol，產率為 40.4%)呈橘黃色之 N P1。

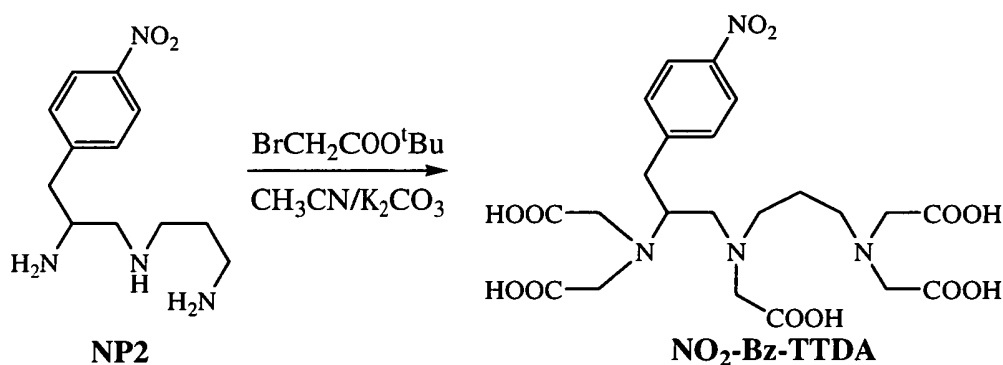
3. 氮 1-(1-(胺基甲基)甲基)-3-(4-硝基苯基)丙胺-1,2-二胺 [N1-(1-(aminomethyl) methyl)-3-(4-nitrophenyl)propane-1,2-diamine，NP2]的合成：



在氮氣及冰浴下，使 6.37 g(0.038 mol)之 NP1、50 mL 之無水四氫呋喃，300 mL 之濃度為 1M 之甲硼烷-四氫呋喃溶液 [BH₃：THF=1:8 (莫耳比)]進行混合，以製得一反應液。使此反應液於冰浴下反應 1 小時，接著將反應液加熱至 70°C 並反應 36 小時。反應結束後，以減壓濃縮將反應液抽乾，然後加入 100 mL 之乙醇和 10 mL 之 6N 鹽酸，

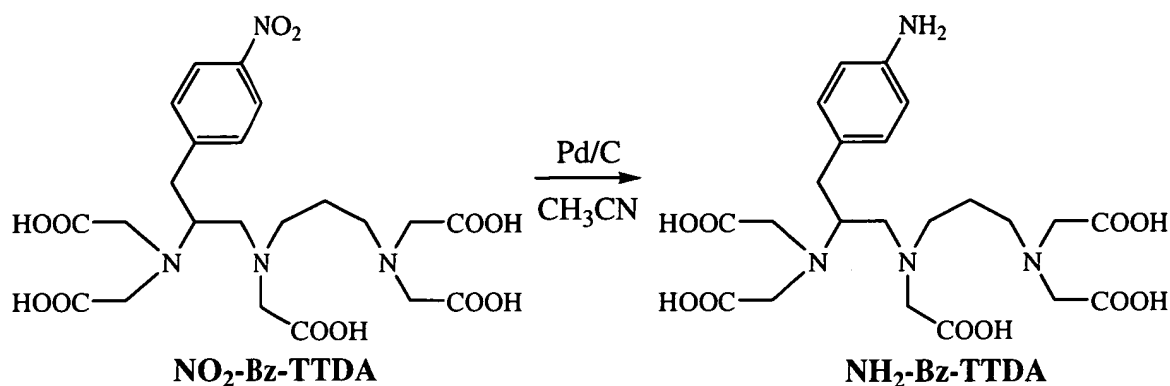
獲得一混合液。使此混合液加熱迴流反應 12 小時。反應結束後，以減壓濃縮將混合液抽乾可得黃色油狀物。將此油狀物加水溶解並以鹽酸將 pH 值調至 2，以獲得一粗產物。最後將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG 50W×8 陽離子交換樹脂的管柱(3×20 cm)進行純化，透過使用不同濃度之鹽酸溶液來沖提管柱並收集 3.5~4.0N 之鹽酸沖提液，最後進行濃縮後，即獲得 2.98 g (0.019 mol，產率為 50.0%)之 NP2。

4. 4-[(4-硝基)苯甲基]-3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三氮癸二酸 [4-(4-nitrobenzyl)-3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic acid, **NO₂-Bz-TTDA**]的合成：



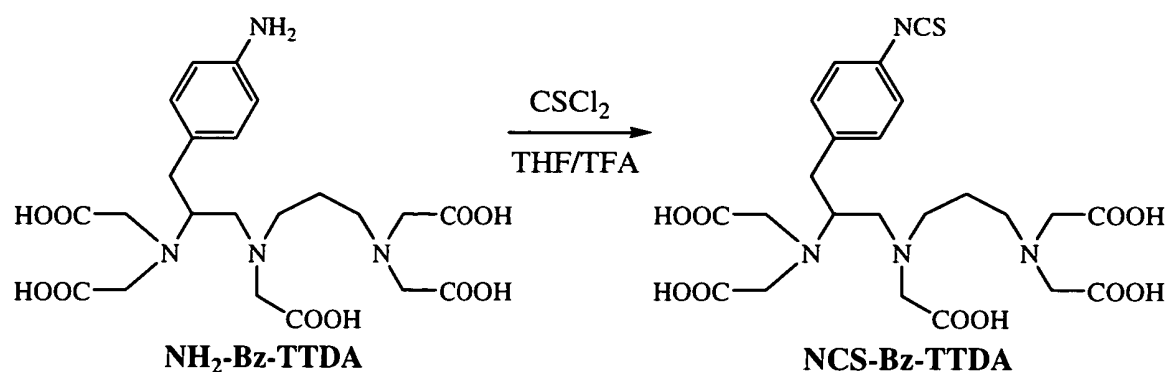
將 2.98 g (0.019 mol)之 NP2 溶於 250 mL 之氯甲烷中，再加入 10 g 之碳酸鉀，使 pH 值維持在 10 左右後，加入 21.19 mL (0.143 mol)之 $\text{BrCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$ ，以獲得一反應液。使此反應液加熱迴流 48 小時，然後將反應液進行過濾，將濾液以減壓濃縮抽乾而獲得一粗產物。於粗產物中加入氯仿及水進行萃取，收集氯仿層並將其抽乾，然後再利用矽膠管柱層析法(層析液為二氯甲烷：甲醇 = 19：1)純化，可得到 4.92 g (6.18 mmol，產率為 35.4%)之 NO₂-Bz-TTDA。

5. 4-[(4-胺基)苯甲基]-3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三氮癸二酸
[4-(4-aminobenzyl)-3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic acid, **NH₂-Bz-TTDA**]的合成：



使 1.03 g (1.25 mmol) 之 **NO₂-Bz-TTDA** 溶解於 50 mL 之氘甲烷中，然後加入 24.8 mg 之碳鈀 (Pd/C)，而獲得一反應液。使反應液於真空系統抽 3 分鐘，再通入 H₂，使內部壓力達到 1.5 kg/cm²，並在室溫下攪拌 4 小時。待壓力不改變 (表示反應結束) 時，將反應液進行減壓濃縮，而獲得一粗產物。再利用矽膠管柱層析法 (層析液為二氯甲烷：甲醇 = 19：1) 進行粗產物的純化，可得 0.82 g (1.03 mmol，產率為 82.4%) 之 **NH₂-Bz-TTDA**。

6. 4-[(4-硫氰基)苯甲基]-3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三氮癸二酸
[4-(4-thiocyanatobenzyl)-3,6,10-tri-(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic acid, **NCS-Bz-TTDA**]的合成：



於冰浴下，將 1.9 mL (3.09 mmol) 之二氯硫化碳 (thiophosgene, CSCl_2)、0.82 g (1.03 mmol) 之 $\text{NH}_2\text{-Bz-TTDA}$ 、40 mL 之四氫呋喃與 2 mL 之三乙基胺進行混合，而獲得一反應液。然後使反應液在氮氣下反應 12 小時。待反應完，利用減壓濃縮將反應液抽乾而取得一粗產物。然後再利用矽膠管柱層析法(層析液為二氯甲烷：甲醇 = 19：1)進行粗產物的純化，可得 0.72 g (3.05 mmol，產率為 83.7%) 呈黃色油狀物之 NCS-Bz-TTDA 。

7. Bz-TTDA-IL 的合成：

(1) 附著有介白素-11 之樹脂的製作

以下過程是利用固相肽合成儀進行製備。於氮氣下，將 156 mg (0.1 mmol) 之樹脂(購自科羅耐公司，樹脂類型為 rink amide)與 5 mL 之二甲基甲醯胺放置於反應瓶中並攪拌 30 分鐘，使樹脂得以膨脹，然後再將二甲基甲醯胺自反應瓶中移除。

(去保護步驟) 於反應瓶中加入 10 mL 之體積比為 20% 之哌啶-二甲基甲醯胺混合液，以進行去保護反應，待 10 分鐘後，再重複此步驟一次。利用二甲基甲醯胺清洗樹脂，再取出微量樹脂進行 Kaiser test，以確認是否去保護成

功(呈藍紫色代表去保護成功)。

(胺基酸配製) 將 0.4 mmol 之胺基酸(介白素-11 之胺基酸序列中的一胺基酸)與 208 mg(0.4 mmol)之苯并三唑-1-基-氧-參-吡咯啉鎂六氟磷酸鹽 (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphate, PyBOP) 置於胺基酸專用瓶中。將 3 mL 之活化試劑[0.4 M 之氮-甲基嗎啉(N-methylmorpholine, NMM)-二甲基甲醯胺混合液]加入胺基酸專用瓶內，並在室溫下混合 10 分鐘。

(胺基酸鍵結步驟) 將胺基酸專用瓶內之試劑全部加入反應瓶中並進行 4~6 小時之偶合反應，反應完成後，以二甲基甲醯胺清洗樹脂，並取出微量樹脂進行 Kaiser test，以確認胺基酸是否鍵結至樹脂(樹脂未變色表示胺基酸成功鍵結至樹脂)。

依據介白素-11 之胺基酸序列，反覆進行上述之(去保護步驟)、(胺基酸配製)及(胺基酸鍵結步驟)，最後即製得附著有介白素-11 之樹脂。

(2) Bz-TTDA-IL 的合成

將 0.72 g(0.862 mmol)之 NCS-Bz-TTDA 與 0.5 g (0.31 mmol)之附著有介白素-11 之樹脂放置於 PS3 反應瓶中，接著將 10 mL 之二甲基亞砜(DMSO)以及 5 mL 之氮-二異丙基乙基胺(DIPEA)加入反應瓶中，於 25°C 下反應 24 小時。待反應完，取 0.5 g 之反應後樹脂與 10 mL 之切除試劑及去保護基溶劑(將三氟醋酸、去離子水、乙二硫醇(ethanedithiol, EDT)及三異丙基矽烷(TIS)依據 94.5 : 2.5

：2.5：1 之體積比例進行混合所製得)進行震盪攪拌，待 1 小時 30 分後，用甲醇及甲苯清洗反應後之樹脂，接著過濾並收集濾液。於濾液中加入三乙基胺，以中和剩餘的三氟醋酸，接著以減壓濃縮機去除濾液中的溶劑，再於冰浴下緩慢滴入冰乙醚，利用離心機進行離心約 5 分鐘(轉速為 1500 轉)，此時濾液將分為固體及液體兩層。反覆以乙醚清洗濾液，直至上層液體呈無色透明，再利用滴管將上層液體取出。於上層液體中加入去離子水，並放入冰箱冷凍，最後利用冷凍乾燥方法製得一紅色粉末。此紅色粉末在經乾燥後即製得粗產物，然後利用液相層析儀來純化該粗產物，以製得 Bz-TTDA-IL。

[實施例 3] 金屬錯合物[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻之製備

將 0.2 mmol 之實施例 1 所製得之配位化合物 Bz-CB-TTDA 與 0.25 mmol 之氯化釷進行混合，接著再加入 5 mL 去離子水，以獲得一反應液。使此反應液進行加熱迴流反應，待 24 小時後中止反應。將反應液之 pH 值調整至 8 後，可發現有固體析出。待固體已大致析出，再將反應液之 pH 值調整至 7，然後將反應液進行過濾及乾燥，即製得無色之[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻晶體。

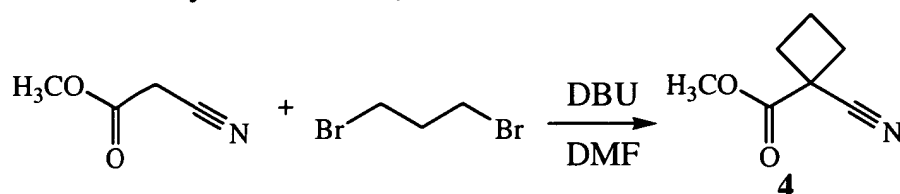
[實施例 4] 金屬錯合物[Gd(Bz-TTDA-IL)]²⁻之製備

除了將 Bz-CB-TTDA 置換為 Bz-TTDA-IL 之外，其餘製法與實施例 3 相同，最後製得無色之[Gd(Bz-TTDA-IL)]²⁻晶體。

[比較例 1] 配位化合物 8-環丁基-3,6,10-三羧甲基-3,6,10-三

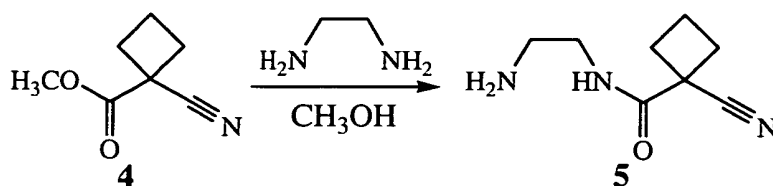
**氮雜十二烷二酸 (8-cyclobutyl-3,6,10-tri-
(carboxymethyl)-3,6,10-triazadodecanedioic
acid, CB-TTDA)之製備**

1. 1-氰基-環丁基羧酸甲酯 (1-cyano-cyclobutylcarboxylic acid methyl ester, 4)的合成：



將 10 g(0.1 mol)之氰乙酸甲酯(methyl cyanoacetate)與 10 mL 之無水二甲基甲醯胺進行攪拌混合，待攪拌 10 分鐘後，於 10~20°C 下，加入 33.4 g(0.22 mol)之 1,8-二氮雜二環[5,4,0]十一碳-7-烯(1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene, DBU)，再加熱至 50°C 並持續反應 15 分鐘，然後在液態氮及丙酮混合的冰浴中(-5~-10°C)，加入溶於 10 mL 之無水二甲基甲醯胺之 20.4 g(0.10 mol)之 1,3-二溴丙烷(1,3-dibromopropane)，而獲得一反應液。於 25°C 下，使反應液反應 15 分鐘，再將溫度升至 70°C，反應 30 分鐘。反應結束後，以減壓濃縮將反應液抽乾，加入二氯甲烷與去離子水進行萃取。收集有機層以減壓濃縮機抽乾，再以矽膠管柱層析法(層析液為丙酮：己烷=8：1)進行純化並以減壓濃縮抽乾後，可得 8.74 g(0.063mol，產率為 62.85 %)之 1-氰基-環丁基羧酸甲酯 4。

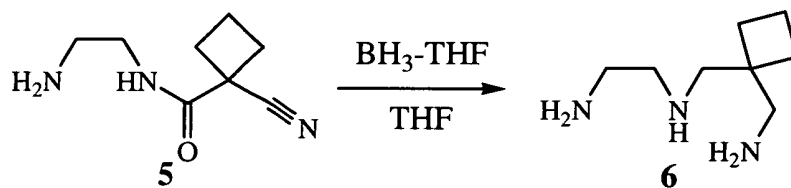
2. 1-氰基-環丁基羧酸(2-胺乙基)醯胺[1-cyano-cyclobutylcarboxylic acid (2-amino-ethyl) amide, 5]的合成：



將 8.74 g(0.063mol)之 1-氰基-環丁基羧酸甲酯 **4** 與 50 mL 之甲醇進行混合，再慢慢滴入 3.77 g(4.25 mL)之乙二胺而獲得一反應液。使反應液於室溫下反應 15 小時。反應結束後，以減壓濃縮將反應液抽乾可得黃色油狀物，將此油狀物加水溶解並以鹽酸將 pH 值調至 2，以獲得一粗產物。最後將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG 50W×8 陽離子交換樹脂的管柱(3×20 cm)進行純化，先以去離子水將未反應之乙二胺沖提出來，再使用不同濃度之鹽酸溶液來沖提管柱並收集 0.5~1.0N 之鹽酸沖提液，最後進行濃縮後，即獲得 6.37 g (0.038 mol，產率為 60.49%)之 1-氰基-環丁基羧酸(2-胺乙基)醯胺 **5**。

3. 氮'-((1-(胺甲基)-環丁基)甲基)乙烷-1,2-二胺 [N'-((1-(aminomethyl)-cyclobutyl)methyl)ethane-1,2-diamine

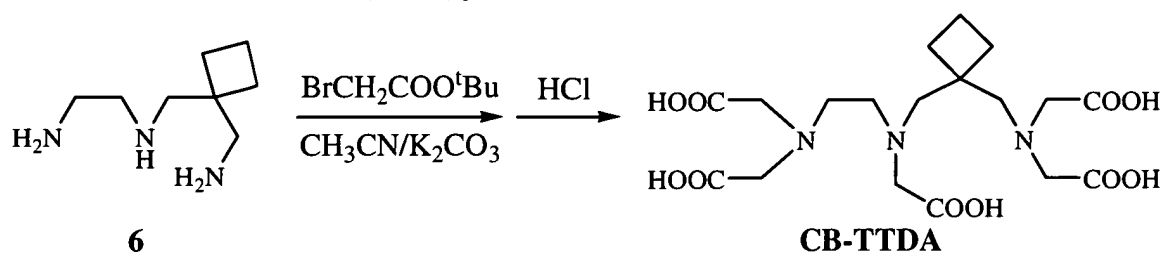
6]的合成：



6.37 g(0.038 mol)之 1-氰基-環丁基羧酸(2-胺乙基)醯胺 **5** 與 50 mL 之無水四氫呋喃進行混合，再於液態氮及丙酮混合的冰浴(-10°C)中及氮氣下，加入 300 mL 之 1M 甲硼烷-四氫呋喃而獲得一反應液。使反應液於-5~0°C 下反應 1 小時，接著將溫度加熱至 70°C 並反應 36 小時。反應結束

後，以減壓濃縮將反應液抽乾。將抽乾之固體加入 100 mL 之乙醇和 10 mL 之 6N 鹽酸，再加熱迴流反應 12 小時。反應結束後，以減壓濃縮將溶液抽乾可得黃色油狀物，將此油狀物加水溶解並以鹽酸將 pH 值調至 2，以獲得一粗產物。最後將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG 50W×8 陽離子交換樹脂的管柱(3×20 cm)進行純化，透過使用不同濃度之鹽酸溶液來沖提管柱並收集 3.5~4.0N 之鹽酸沖提液，最後進行濃縮後，即獲得 2.98 g (0.019 mol，產率為 50%)之氮'-((1-(胺甲基)-環丁基)甲基)乙烷-1,2-二胺 **6**。

4. CB-TTDA 的合成：



將 2.98 g(0.019 mol)之氮'-((1-(胺甲基)-環丁基)甲基)乙烷-1,2-二胺 **6** 溶於 250 mL 之氯甲烷中，加入 10 g 之碳酸鉀，使 pH 值維持在 10 左右後，加入 21.19 mL(0.143 mol)之 $\text{BrCH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$ 而獲得一反應液，使反應液加熱迴流 48 小時後，將反應混合物過濾，將濾液以減壓濃縮抽乾，加入氯仿及水進行萃取，取氯仿層並將其抽乾，加入 100 mL 之 3N 鹽酸並於室溫下反應 24 小時。反應結束後，以減壓濃縮將溶液抽乾後，加水溶解並以氨水將 pH 值調至 11.2 以獲得一粗產物。將粗產物放入充填有 100 mL 之 AG1×8 陰離子交換樹脂的管柱(3×20 cm)中，透過使用不同濃度(0.1~3.0 N)之甲酸溶液來沖提管柱並收集沖提液，最

後收集 1.2N 之甲酸沖提液並進行濃縮後，即獲得 2.72 g(0.006 mol，產率為 31.98%)之 CB-TTDA。

[比較例 2] 金屬錯合物[Gd(CB-TTDA)]²⁻之製備

除了將 Bz-CB-TTDA 置換為 CB-TTDA 之外，其餘製法與實施例 3 相同，最後製得無色之[Gd(CB-TTDA)]²⁻晶體。

[測試]

1. 配位化合物 Bz-CB-TTDA 之內層水分子數的測試：

首先依據實施例 3 之步驟並將氯化釷置換為氯化鎔，以分別製備鎔金屬錯合物[Eu(Bz-CB-TTDA)]²⁻及[Eu(CB-TTDA)]²⁻。

利用螢光方法測定，以 D₂O 及 H₂O 分別配製 4 mM 的鎔金屬錯合物[Eu(Bz-CB-TTDA)]²⁻及[Eu(CB-TTDA)]²⁻，再利用螢光光譜儀(購自 Varian 公司，型號為 Cary-Eclipse)分別測定半生期 τ 值，接著將所測得之 τ 值代入下式(i)及(ii)，即可求得內層水分子數(q)，測試結果如下表 1 所示：

$$q = A[1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}] \quad A=1.05 \quad (i)$$

$$q = ([1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}] - 0.25) \times 1.2 \quad (ii)$$

表 1

金屬錯合物	式(i)所得之 q	式(ii)所得之 q
[Eu(Bz-CB-TTDA)] ²⁻	1.26±0.02	1.14±0.03
[Eu(CB-TTDA)] ²⁻	1.21±0.01	1.09±0.02

[結果]

由上述測試及計算結果，可知[Eu(Bz-CB-TTDA)]²⁻及

[Eu(CB-TTDA)]²⁻的內層水分子數大約為 1，證明 Bz-CB-TTDA 及 CB-TTDA 與 TTDA 的基本架構相同，皆可與釷離子螯合而產生穩定的八配位金屬錯合物，其中有一個位點可與一內層水分子進行螯合。

2. 金屬錯合物[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻之弛緩率(*r*₁)測試：

利用 20 MHz 之弛緩量測儀並在 *T*₁ 模式下進行 *T*₁ 量測，再將所得 *T*₁ 之倒數對不同濃度之[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻作圖，再計算圖式之斜率，即可獲得弛緩率 *r*₁ 為 4.29 mM⁻¹s⁻¹。

依據上述相同方式量測比較例 2 之[Gd(CB-TTDA)]²⁻的弛緩率，最後測試及計算結果如下表 2 所示。
([Gd(TTDA)]²⁻的數據是取自 *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 382；及 [Gd(DTPA)]²⁻的數據是取自 *Am. J. Roentgenol.*, **1984**, 142, 619-624。)

表 2

金屬錯合物	pH 值	弛緩率 <i>r</i> ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Gd(Bz-CB-TTDA)] ²⁻	7.4±0.1	4.29±0.03
[Gd(CB-TTDA)] ²⁻	7.4±0.1	4.12±0.05
[Gd(TTDA)] ²⁻	7.5±0.1	3.85±0.03
[Gd(DTPA)] ²⁻	7.6±0.1	3.89±0.03

[結果]

由表 2 可知，[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻的弛緩率高於 [Gd(CB-TTDA)]²⁻及 [Gd(TTDA)]²⁻，顯示當結構中同時引入苯甲基及 1,1-伸環丁基，除了可提高分子量之外，還可提高弛緩率。此外，[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻的弛緩率亦高於市

售對比劑 $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ ，證明本發明之金屬錯合物適於製備磁共振造影對比劑。

3. 金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 之內層水分子交換速率 (k_{ex}) 及分子轉動相關時間 (τ_{R}) 測試：

金屬錯合物之弛緩率主要受到內層水分子數及相關時間 (τ_{c}) 的影響 (參見 *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2293-2352)。由先前測試可知 Bz-CB-TTDA 及 CB-TTDA 的內層水分子數相似，因此可知弛緩率主要是受到相關時間 (τ_{c}) 的影響。相關時間 τ_{c} 主要受到以下三因素影響：(1) 分子轉動相關時間 τ_{R} ；(2) 電子縱向及橫向自旋弛緩時間 $T_{1\text{e}}$ 、 $T_{2\text{e}}$ 及 (3) 內層水分子存在時間或其交換速率 $\tau_{\text{m}}^{-1} = k_{\text{ex}}$ 。

此三因素是利用 ^{17}O -NMR 進行測試，並透過在磁場 9.4T 下，測定不同溫度 (273~343K) 之金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 及 $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ 的 ^{17}O 弛緩率時間 (T_1 、 T_2) 及化學位移 (ω)、以及酸水的 ^{17}O 弛緩率時間 ($T_{1\text{A}}$ 、 $T_{2\text{A}}$) 及化學位移 (ω_{A})。此外，再計算出弛緩率及化學位移間的差值 ($1/T_{1\text{r}}$ 、 $1/T_{2\text{r}}$ 、 $\Delta \omega_{\text{r}}$)。接著，將上述數值利用 Scientist[®] 代入相關公式，同時進行數據逼近 (data fitting)，而得到溫度對 T_1 、 T_2 及化學位移的分析圖，並進一步得到表 3 之 k_{ex}^{298} 及 τ_{R}^{298} (k_{ex}^{298} 表示 298K 溫度下之內層水分子交換速率； τ_{R}^{298} 表示 298K 溫度下之分子轉動相關時間)。

表 3

參數 (單位)	金屬錯合物			
	[Gd(Bz-CB-TTDA)] ²⁻	[Gd(CB-TTDA)] ²⁻	[Gd(TTDA)] ²⁻	[Gd(DTPA)] ²⁻
k_{ex}^{298} (10 ⁶ s ⁻¹)	271±3.0	232±4.0	146±17.0	4.1
τ_R^{298} (ps)	151±3.0	112±2.0	104±12.0	103

(結果)

表 3 之結果顯示 [Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 的內層水分子交換速率與 [Gd(CB-TTDA)]²⁻ 接近，並高於 [Gd(TTDA)]²⁻，且遠比 [Gd(DTPA)]²⁻ 高很多。[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 的分子轉動相關時間高於 [Gd(CB-TTDA)]²⁻、[Gd(TTDA)]²⁻ 及 [Gd(DTPA)]²⁻。由上述結果證明，[Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 的內層水分子交換速率較快且分子轉動相關時間較長，因而可讓 [Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 的弛緩率較佳。

4. 金屬錯合物 [Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 與人類血清蛋白(以下簡稱 HSA)之鍵結弛緩率(r_1^b)測試：

金屬錯合物 [Gd(Bz-CB-TTDA)]²⁻ 及 [Gd(CB-TTDA)]²⁻ 與 HSA 之鍵結能力是利用質子弛緩增強法 [proton relaxation enhancement (PRE) method] 所測得之鍵結弛緩率(r_1^b)進行評估，測試結果整理於下表 4 中。([Gd(BOPTA)]²⁻、MS-325 及 [Gd(S)-EOB-DTPA]²⁻ 為市售商品，結構分別如下且數據分別取自 *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 633-642、*J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, 4, 766-774 及 *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 196-200。

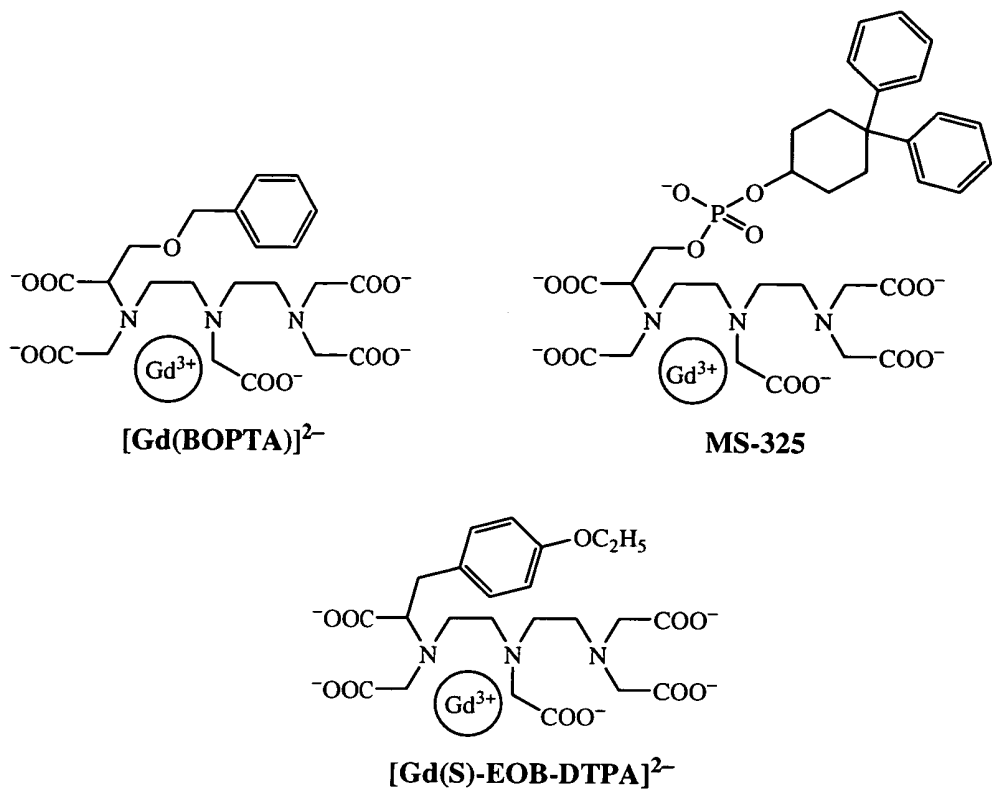


表 4

金屬錯合物	$r_1^b(\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$
$[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$	66.7 ± 2.2
$[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$	29.3 ± 0.8
$[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$	33.0
MS-325	47.0 ± 4.0
$[\text{Gd}(\text{S})\text{-EOB-DTPA}]^{2-}$	44.1

(結果)

$[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 的鍵結弛緩率明顯較其他金屬錯合物高，推測是因為 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 之內層水分子交換速率快及脂溶性高，而易與 HSA 產生鍵結。

由上述測試，可證明本發明之金屬錯合物明顯具備較佳之鍵結能力，適於製備血池造影對比劑。

5. 金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 之動力學穩定測試：

替換版

第098131213號專利申請案補充、修正後無劃線之說明書替換頁

替換日期：101年9月

人體內的鈣、鋅及銅等金屬離子可能會和金屬錯合物產生金屬交換而釋出有毒金屬離子，其中又以濃度較高之鋅離子最易發生。因此，動力學穩定測試將以鋅離子進行測試。

分別將 2.5 mM 之 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 、 $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ 及 $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ 置於 pH 值為 7.4 之磷酸鹽緩衝液 (Phosphate Buffer saline, PBS) 中，接著再分別加入 2.5 mM 之氯化鋅，以分別獲得一樣品。分別使以上所有樣品於 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 下進行反應，接著在反應 3 天後 ($t=3$ 天)，利用 20 MHz 之核磁共振光譜儀測量各個樣品之縱向弛緩時間 $T_1(t)$ ，其倒數為縱向弛緩速率 $R_1^P(t)$ ，最後以 $R_1^P(t)/R_1^P(0)$ 表示金屬錯合物對鋅離子之穩定性，所得結果整理於下表 5 中。

表 5

金屬錯合物	$R_1^P(t)/R_1^P(0)$
$[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$	46.14
$[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$	47.4
$[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$	49.79

(結果)

由上述結果可發現， $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 所測得數值與 $[\text{Gd}(\text{CB-TTDA})]^{2-}$ 和已商業化之 $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ 相似，顯示 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 的動力學穩定度與 $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ 相近，證明 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 對鋅離子有足夠之動力學穩定性。

替換版

第098131213號專利申請案補充、修正後無

101年9月12日修(更)正替換頁
劃線之說明書替換頁

替換日期：101年9月

6. 金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 之體內(*In vivo*)影像研究：

選用三隻大鼠(屬遠交系大鼠，購自國家實驗動物中心)，分別對其靜脈注射 $10 \mu\text{mol/kg}$ 之金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 與市售商品 Gadovist，接著放入動物線圈(直徑 3.8 cm)，再以 3.0 T 之整體磁共振造影掃描儀進行掃描(條件為 T1 dynamic pulse sequence，TR/TE=800/12)，所得影像如圖 1 所示(圖 1 之(A)為 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 所得影像；(B)為 Gadovist 所得影像)。

(結果)

由圖 1 之影像可發現， $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 與 Gadovist 在老鼠的動脈血管皆有影像。進一步比較影像訊號強度可知， $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 的訊號強度與 Gadovist 近似，證明本發明之金屬錯合物具有發展為血池造影對比劑之潛力。

7. 金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-TTDA-IL})]^{2-}$ 之體外(*In vitro*)影像研究：

選用對 IL-11R α 過度表現之負型細胞株(negative cell line)：MDA-MB-231[購自生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, BCRC)]以及對 IL-11R α 低度表現之正型細胞株(positive cell line)：HT-1080(購自生物資源保存及研究中心)。依據下表 6 之成分及濃度或細胞數，分別將金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-TTDA-IL})]^{2-}$ 及/或正型細胞株及負型細胞株進行混合，接著放置在 37.0

替換版

第098131213號專利申請案補充、修正後無劃線之說明書替換頁

替換日期：101年9月

$\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 下培養 1 小時，再以 PBS 反覆清洗三次，即獲得樣品 A~D。然後使樣品 A~D 分別利用 3.0T 之磁共振造影掃描儀的 T1 加權影像進行掃描並取得影像，而所得訊號強度則整理於下表 6 中。

表 6

樣品 編號	[Gd(Bz-TTDA-IL)] ²⁻ 濃度(mM)	正型細胞株 細胞數(個)	負型細胞株 細胞數(個)	訊號強度
A	未加入	10^6	未加入	285 ± 1
B	1.0	10^6	未加入	496 ± 3
C	未加入	未加入	10^6	273 ± 2
D	1.0	未加入	10^6	299 ± 1

(結果)

由表 6 可發現，樣品 B 的訊號強度遠高於 A，而樣品 D 的訊號強度也高於 C，如此顯示當樣品中含有 [Gd(Bz-TTDA-IL)]²⁻ 時，訊號強度明顯較高，且在正型細胞株中有更顯著的顯影效果。由此可證明本發明之金屬錯合物適於製備目標化之磁共振造影對比劑。

綜上所述，本發明金屬錯合物具備不錯的弛緩率，且與人類血清蛋白具備不錯的鍵結能力，且在磁共振造影中也可呈現明顯的顯影效果，顯示本發明之金屬錯合物適於用來製備血池造影對比劑或目標化之磁共振造影對比劑。

惟以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍，即大凡依本發明申請專利範圍及發明說明內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆仍屬本發明專利涵蓋之範圍內。

【圖式簡單說明】

替換版

第098131213號專利申請案補充、修正後無劃線之說明書替換頁

101年 9月 / 27日 修正(更)正替換頁

替換日期：101 年 9 月

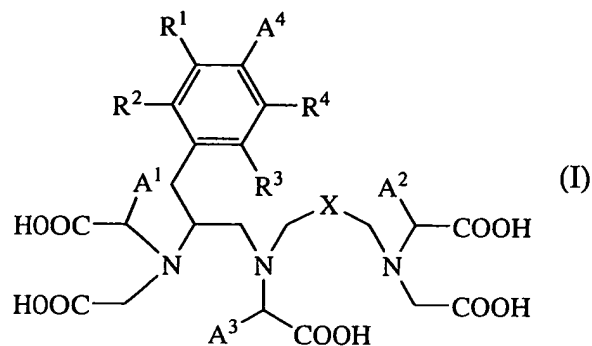
圖 1 是一照片，說明注射金屬錯合物 $[\text{Gd}(\text{Bz-CB-TTDA})]^{2-}$ 與市售商品 Gadovist 之大鼠以整體磁振造影掃描儀進行掃描所得之影像結果。

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1. 一種式(I)所示之配位化合物：



，其中，

X 表示 1,1-伸環丁基、1,1-伸環戊基或 1,1-伸環己基；

A^1 、 A^2 及 A^3 各自表示氫、 $C_1\sim C_3$ 之烷基、 $C_1\sim C_3$ 之苯烷基、 $C_1\sim C_3$ 之甲氧基苯烷基、二苯甲基或 $C_1\sim C_3$ 之異硫氰苯烷基；

A^4 為氫、硝基、胺基、硫氰基、或 $-Z-Y$ ，Z 為 $-\overset{\text{H}}{\underset{\text{S}}{\parallel}}{\text{N}}-\text{C}-$ ，以及 Y 是衍生自介白素-11；及

 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 各自表示氫。

2. 依據申請專利範圍第 1 項所述之配位化合物，其中， A^1 、 A^2 及 A^3 各自選自於氫、甲基、苯甲基、甲氧基苯甲基、二苯甲基或異硫氰苯甲基。

3. 依據申請專利範圍第 1 項所述之配位化合物，其中，X 為 1,1-伸環丁基，及 A^1 、 A^2 、 A^3 及 A^4 各自為氫。

4. 一種用於製備血池及目標化對比劑之金屬錯合物，包含：

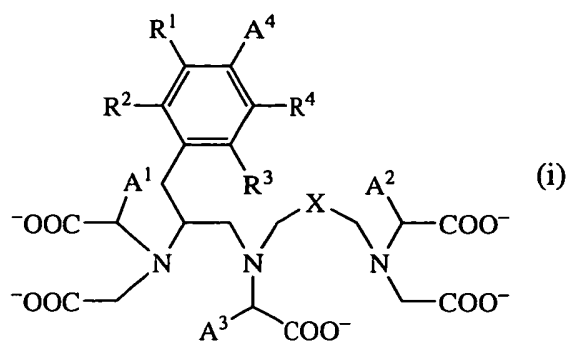
一順磁性金屬離子；以及

一與金屬離子螯合且由下式所示之配位化合物：

替換版

第098131213號專利申請案補充、修正後無劃線之說明書替換頁

替換日期：101 年 9 月



，於式(i)中，

X 表示 1,1-伸環丁基、1,1-伸環戊基或 1,1-伸環己基；

A^1 、 A^2 及 A^3 各自表示氫、 $C_1 \sim C_3$ 之烷基、 $C_1 \sim C_3$ 之苯烷基、 $C_1 \sim C_3$ 之甲氧基苯烷基、二苯甲基或 $C_1 \sim C_3$ 之異硫氰基苯烷基；

A^4 為氫、硝基、胺基、硫氰基、或 $-Z-Y$ ，Z 為 $-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{S})-$ ，以及 Y 是衍生自介白素-11；及

R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 各自表示氫。

5. 依據申請專利範圍第 4 項所述之金屬錯合物，其中，該金屬離子係選自於鎳系金屬離子、錳離子或鐵離子。
6. 依據申請專利範圍第 5 項所述之金屬錯合物，其中，該金屬離子是選自於鈦離子、錳離子或鐵離子。
7. 依據申請專利範圍第 4 項所述之金屬錯合物，其中， A^1 、 A^2 及 A^3 各自選自於氫、甲基、苯甲基、甲氧基苯甲基、二苯甲基或異硫氰基苯甲基。
8. 依據申請專利範圍第 4 項所述之金屬錯合物，其中，X 為 1,1-伸環丁基，及 A^1 、 A^2 、 A^3 及 A^4 各自為氫。

八、圖式

101年9月12日修(更)正替換頁

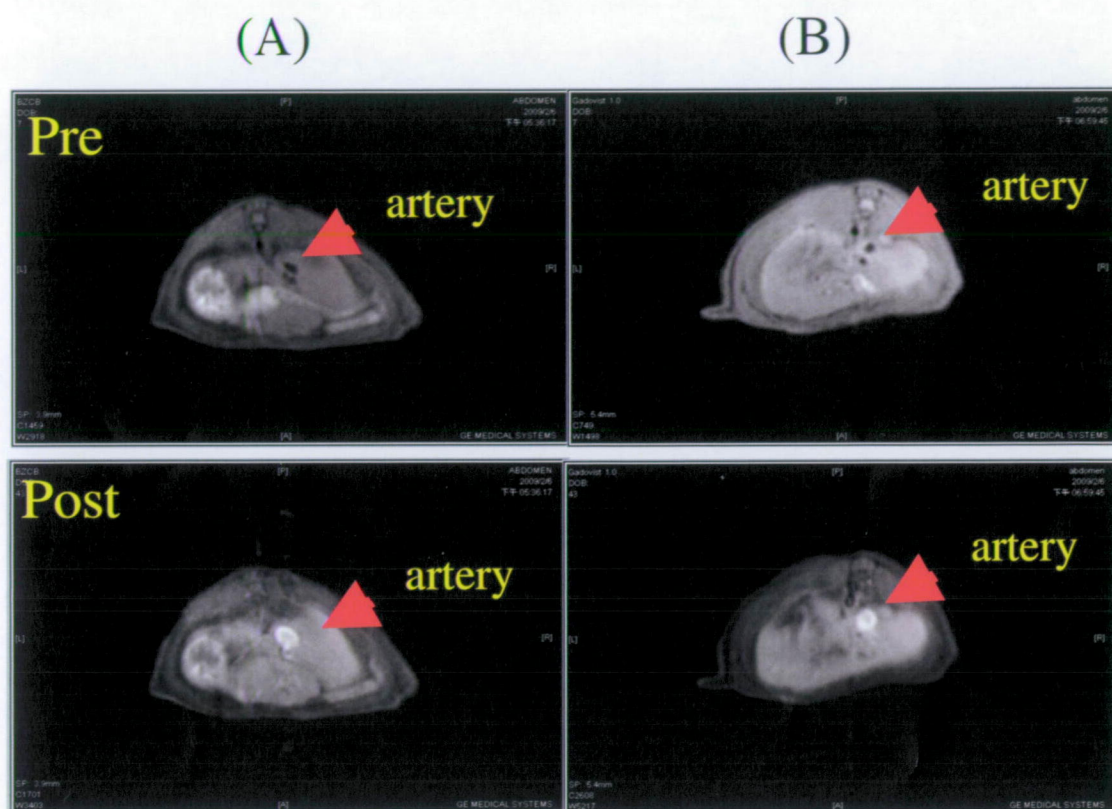


圖1