



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101268085 B

(45) 授权公告日 2012.06.20

(21) 申请号 200680030178.4

C07D 475/04 (2006.01)

(22) 申请日 2006.08.17

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0501847-8 2005.08.19 SE

0501903-9 2005.08.30 SE

CN 1154073 A, 1997.07.09, 全文.

CN 1124821 A, 1996.06.19, 全文.

Xing Q. Pan ET AL. Boron-containing

folate receptor-targeted liposomes as

potential delivery agents for neutron

capture therapy. 《bioconjugate chem》. 2002,

第 13 卷 435-442.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008.02.19

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/SE2006/000952 2006.08.17

审查员 李宗韦

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/021234 EN 2007.02.22

(73) 专利权人 海默尔凯普股份公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 L-I·奥尔松 E·阿泽尔 A·埃克

(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 李华英

(51) Int. Cl.

C07F 5/02 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

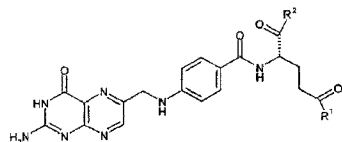
权利要求书 2 页 说明书 13 页

(54) 发明名称

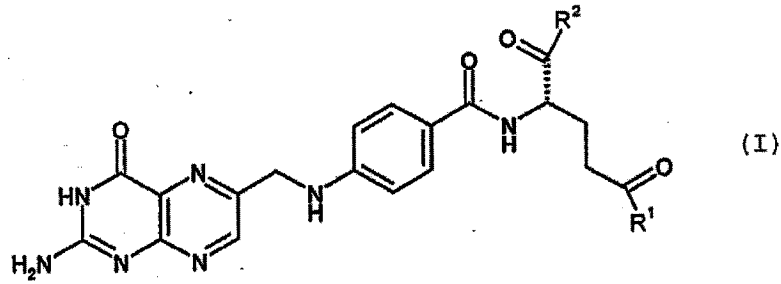
用于硼中子俘获治疗的硼化合物

(57) 摘要

本发明涉及新的含硼化合物, 包含所述化合物的药物组合物、所述化合物的治疗用途, 以及所述化合物的制备方法。该化合物是用于硼中子俘获治疗 (BNCT) 的。



1. 一种根据式 (I) 的化合物



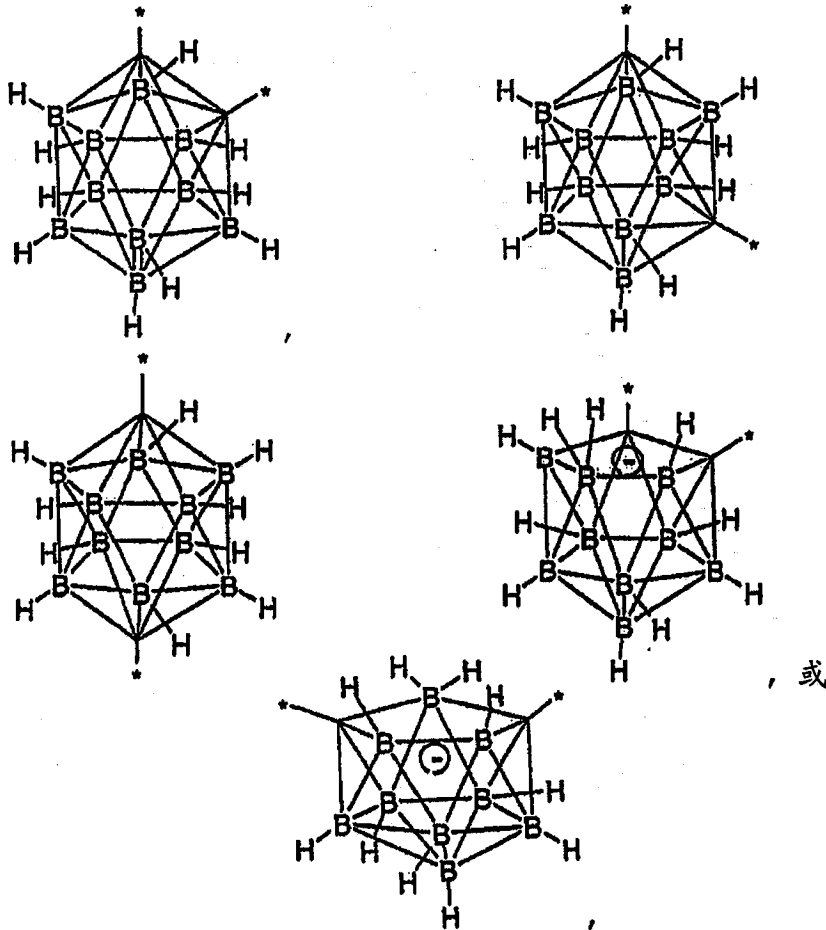
其中

R^1 和 R^2 中的一个是 $-NH-X-Y-Z$, 并且另一个是 $-OH$ 或 $-NH-X-Y-Z$;

其中

X 是 $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是 0、1、2、3 或 4;

Y 是



其中

* 表示连接到 X 或 Z 的键的位置;

并且至少一个硼原子是 ^{10}B ;

Z 是 H ;

及其药学上可接受的盐和立体异构体。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其是 N^2 -(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基)甲基]氨基)苯甲酰基)- N -{3-[(1R,9S)-2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1]

十二烷-1-基]丙基}- α -谷酰胺或 N^2 -(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基)甲基]氨基)苯甲酰基)-N-[3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环[7.2.1]十二烷-1-基)丙基]-L-谷酰胺。

3. 根据权利要求1的化合物,其中 R^1 是-NH-X-Y-Z,并且 R^2 是OH。

4. 根据权利要求1到3任意一项的化合物,其中至少一个碳原子是 ^{11}C 。

5. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1到4任意一项的化合物和药学上可接受的载体、稀释剂或辅助剂。

6. 根据权利要求1到4任意一项所定义的式(I)化合物用于制备肿瘤治疗所用的药物的用途。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述的肿瘤治疗是肿瘤的硼中子俘获治疗。

8. 根据权利要求6或7的用途,其中所述肿瘤源于中枢神经系统。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述肿瘤为神经胶质瘤;脑膜瘤;外周神经上皮瘤;原始神经外胚层瘤;神经母细胞瘤;生殖细胞瘤;垂体瘤;脑转移瘤;或动静脉畸形。

10. 根据权利要求9的用途,其中所述神经胶质瘤为胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、低级别星形细胞瘤、毛细胞形星形细胞瘤、少突神经胶质瘤或脑干神经胶质瘤。

11. 根据权利要求6或7的用途,其中所述肿瘤是恶性肿瘤或转移性肿瘤进程。

12. 根据权利要求11的用途,其中所述肿瘤为黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌或肉瘤。

13. 根据权利要求4所定义的式(I)化合物用于制备正电子发射断层扫描中所用的药物的用途。

14. 根据权利要求1到4任意一项所定义的式(I)化合物的制备方法,其中将式 $\text{NH}_2\text{-X-Y-Z}$ 的化合物与叶酸反应,其中的X、Y和Z如权利要求1到4任意一项所定义。

用于硼中子俘获治疗的硼化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新的含硼化合物,包含所述化合物的药物组合物,所述化合物的治疗用途,以及所述化合物的制备方法。

背景技术

[0002] 硼中子俘获治疗 (BNCT) 是一种放射治疗的形式,其需要两个要素: ^{10}B 和低能量的热中子。 ^{10}B 是以在肿瘤中积聚的含硼化合物的形式对要治疗的对象进行给药的。然后,使用来自核反应器或回旋加速器的低能热中子对要治疗的对象进行辐射。

[0003] 当低能热中子撞击 ^{10}B 时,它们生成了 α 粒子和 ^7Li 。热中子具有相对低的能量。然而,当生成 ^7Li 和 α 粒子时,就产生了足够破坏细胞的能量。因为 α 粒子和 ^7Li 相对较大,它们在组织中仅能被传送大约 5-10 μm ,即相当于肿瘤细胞直径的距离。因此, BNCT 可以被用于选择性照射肿瘤,同时最小化对非恶性组织的辐射损伤。

[0004] BNCT 中一个主要的问题是为硼原子寻找无毒的载体分子,使其在肿瘤细胞中聚集从而确保足够的选择性。为了获得高治疗比,这样的化合物在肿瘤中应当优选释放出 15-30 $\mu\text{g/g}$ (ppm, 即百万分之一) 的 ^{10}B 平均浓度,这样具有高选择性 (肿瘤与血以及肿瘤与正常组织的比例理想地 > 5) 和低毒性。一种方法曾经使用含硼的核苷、核苷酸或寡核苷酸 (EP 1 113 020 A2)。另一个方法曾经使用包含硼化氨基磷酸酯的核苷和寡核苷酸 (WO 94/01440 A1)。进一步地,碳硼烷基 (carboranyl) 嘧啶已经被制备用于 BNCT 中。含有连接在嘌呤或嘧啶碱基上的碳硼烷基基团的嘌呤和嘧啶核苷也已经被报道。也已经进行可以用于中子俘获治疗法中的巢型碳硼烷 (nidocarborane) - 钴胺素共轭物的合成 (H. P. C. Hogenkamp 等人, Nuclear Medicine and Biology (2000), 27, 89-92)。

[0005] 目前处于 I/II 期临床试验的两种硼中子俘获剂是巯基 - 闭合式 - 十二烷硼酸二钠 (BSH) 和 1-4- 二羟基硼基苯丙氨酸 (BPA)。虽然 BSH 和 BPA 已经在动物模型中被证明是安全有效的,但是这两种试剂仅具有对肿瘤细胞中等的选择性以及在肿瘤中的低保留时间。而且,由于 BSH 有被空气氧化的倾向,因此具有有限的化学稳定性,而 BPA 虽然在化学方面是无毒的,但其仅含有低重量百分比的硼 (5%),以致于为了在肿瘤组织中获得治疗量的硼浓度时需要大量使用该药物。

[0006] Leamon, C. P. 和 Reddy, J. A., Advanced Drug Delivery Reviews, 56 (2004) 1127-1141, 讨论了用于治疗目的的叶酸受体和叶酸药物共轭物。

[0007] WO 00/45857 公开了由源于生物或合成的 Gd^{3+} 配合物部分和对肿瘤有特异性的部分组成的、生理学上可配伍的化合物用于制备用于中子俘获和光子活化治疗的制剂的用途。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供用于硼中子俘获治疗 (BNCT) 的化合物。

[0009] 另一个目的是提供具有高重量水平的硼和 / 或对肿瘤细胞具有选择性的这样的

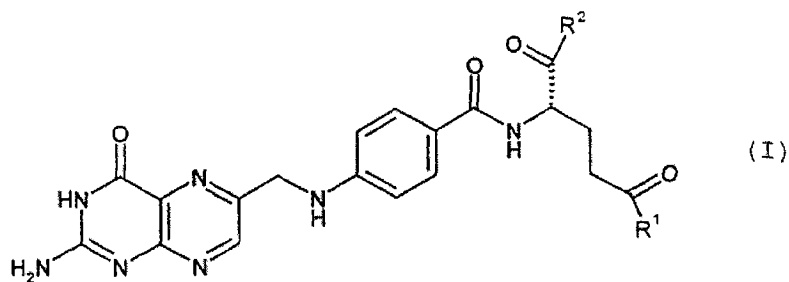
化合物。另一个目的是提供稳定和 / 或无毒的这样的化合物。

[0010] 本发明的还一个目的是提供包含所述化合物的药物组合物, 以及提供所述化合物在治疗中的用途。

[0011] 进一步的目的是提供由已知起始原料制备所述化合物的方法。

[0012] 上述提及的目的以及在研究了以下说明书后对本领域技术人员来说应是显而易见的本发明的其它目的, 是通过根据式 (I) 的化合物实现的

[0013]



[0014] 其中

[0015] R^1 和 R^2 中的一个 是 $-NH-X-Y-Z$ 、 $-O-X-Y-Z$ 或 $-S-X-Y-Z$, 并且另一个是 $-OH$ 、 $-NH-X-Y-Z$ 、 $-O-X-Y-Z$ 或 $-S-X-Y-Z$;

[0016] 这其中

[0017] X 是 $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是 0、1、2、3 或 4, 或者 $-(CH_2)_p-O-(CH_2)_q-$, 其中 p 和 q 独立地是 1、2、3 或 4;

[0018] Y 是硼烷或碳硼烷, 其中至少一个硼原子是 ^{10}B ; 并且

[0019] Z 是 H 或亲水基团, 例如氨基甲基、2-氨基乙基、3-氨基丙基、1,3-丙二醇-2-基-甲氧基、乙烯基乙醛酰基 (ethyleneglycoxy) 或二乙烯基乙醛酰基 (diethyleneglycoxy);

[0020] 及其药学上可接受的盐、溶剂化物和立体异构体。

[0021] 优选地, Y 的硼烷或碳硼烷中 ^{10}B 的丰度高于 ^{10}B 的天然同位素的丰度。例如, 在 Y 的硼烷或碳硼烷中, 超过 10% 或者超过 20%, 优选超过 25%, 更优选超过 50% 或者超过 75% 的硼原子可以是 ^{10}B 。

[0022] 根据式 (I) 的化合物可以是药学上可接受的盐的形式。例如, 这样的盐是与无机酸形成的盐, 如盐酸; 与胺形成的铵盐, 例如三乙胺或碱性药; 碱金属盐, 例如钠或钾盐; 或碱土金属盐, 例如钙或镁盐。

[0023] 根据式 (I) 的化合物可以是药学上可接受的溶剂化物形式, 例如水合物, 以及非溶剂化物的形式。

[0024] 当分子中存在一个或多个立体中心时, 根据式 (I) 的化合物可以是药学上可接受的立体异构的混合物, 例如非对映异构体混合物和 / 或对映异构体混合物。非对映异构体是其分子不互为镜像的立体异构体。对映异构体是其分子互为镜像的立体异构体。进一步地, 根据式 (I) 的化合物可以是药学上可接受的单一立体异构体的形式, 即单一对映异构体和 / 或非对映异构体。根据式 (I) 的化合物还可以是药学上可接受的外消旋混合物的形式, 即对映异构体的等摩尔混合物。

[0025] 硼烷在这里被定义为一种多面体硼烷, 参见 Gmelin Handbook of Inorganic and Organometallic Chemistry (第 8 版, 1991)。碳硼烷在这里被定义为至少一个碳原子被纳

入到多面体硼烷中的化合物。碳硼烷可以根据 Carboranes (R. Grimes ed. 1970)、Gmelin Handbook of Inorganic and Organometallic Chemistry (第 8 版, 1991) 和 Science 1972, 78, 462 中的描述进行合成。

[0026] 根据式 (I) 的化合物适用于 BNCT 中。根据式 (I) 的化合物包含一个叶酸部分, 即叶酸分子的有效部分。所述化合物进一步包含一个含硼的部分, 并且任选地包含一个连接部分。该连接部分被定义为位于叶酸部分和含硼部分之间的一个部分。含硼部分被定义为一个含硼基团, 并且可以是硼烷或碳硼烷。快速生长的细胞例如肿瘤细胞显示出增加摄取叶酸以及相关结构的化合物。

[0027] BNCT 可以被用于治疗许多肿瘤。肿瘤可以根据世界卫生组织定义的规则 (世界卫生组织, International Histological Classification of Tumours, 1967-1978) 在组织学上进行分类。利用根据上述式 (I) 化合物使用 BNCT 所能治疗的肿瘤类型包括, 源于中枢神经系统的肿瘤, 优选神经胶质瘤, 例如胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、低级别星形细胞瘤、毛细胞形星形细胞瘤、少突神经胶质瘤或脑干神经胶质瘤; 脑膜瘤; 外周神经上皮瘤; 原始神经外胚层瘤; 神经母细胞瘤; 生殖细胞瘤; 垂体瘤; 脑转移瘤; 或动静脉畸形。也可以在 BNCT 中使用根据式 (I) 的化合物治疗 i. a. 恶性肿瘤或转移性肿瘤进程, 优选黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌或肉瘤。

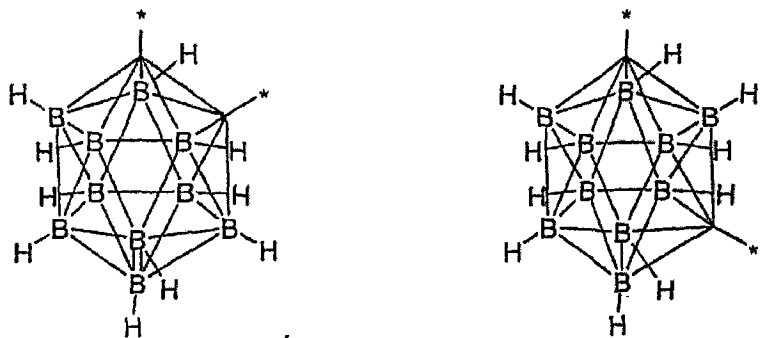
[0028] 这里所用的词语“硼中子俘获治疗”(BNCT) 被定义为一种肿瘤治疗方法, 其包括将含硼化合物给药于需要进行治疗的对象和用热中子辐射所述对象的步骤。

[0029] 这里所用的术语“肿瘤”依照 Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 第 26 版, 1985, Saunders 中的定义, 即被定义为细胞繁殖不受控制的并且累进的组织的生长。不受控制的繁殖被定义为一种不同于正常细胞繁殖的状态, 例如一种细胞繁殖率明显增加的状态。上下文中的术语“累进的”被定义为强烈地进展或增加。肿瘤细胞被定义为所述组织学中的细胞。

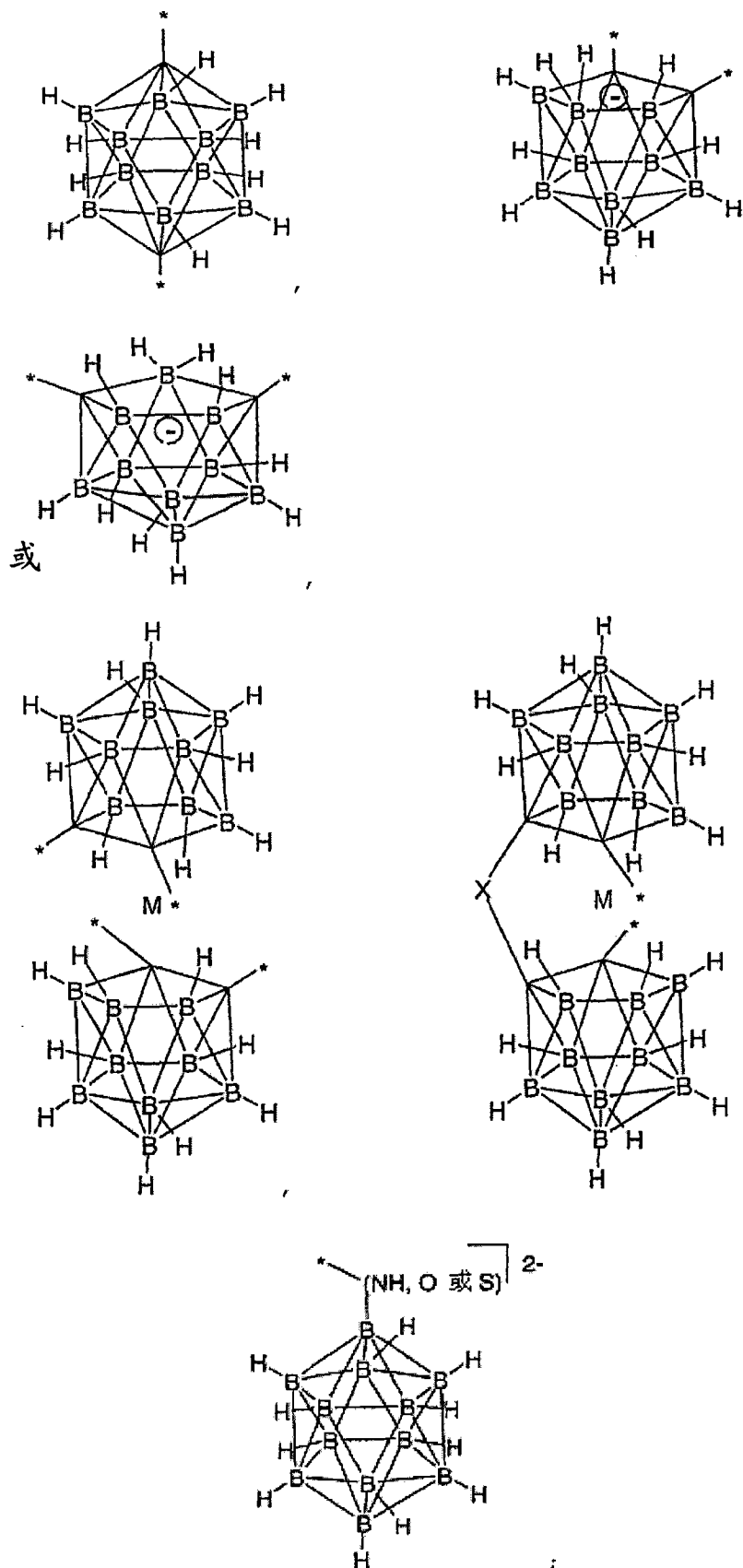
[0030] 如这里所使用的术语“治疗”依照 Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 第 26 版, 1985, Saunders 中的定义, 即被定义为对疾病的治疗。术语“治疗性”和“治疗”应当据此诠释。因此, 这里所用的词语“肿瘤治疗”被定义为对由肿瘤引起或与肿瘤相关的疾病的治疗。

[0031] 式 (I) 中的构成 Y 的硼烷或碳硼烷可以是

[0032]



[0033]



[0034] 其中

[0035] * 表示连接到 X 或 Z 的键的位置；

[0036] M 是钴, 钴 -57 或铁 ; 并且

[0037] X 如上所定义。

[0038] 根据式 (I) 的化合物的例子是 N-(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基)甲基]氨基)苯甲酰基)-N-[3-[(1R,9S)-2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基]丙基]- α -谷酰胺和 N-(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基)甲基]氨基)苯甲酰基)-N-[3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基)丙基]-L-谷酰胺。

[0039] 在一个实施方式中,在根据式 (I) 的化合物中, R^1 是 -NH-X-Y-Z、-O-X-Y-Z 或 -S-X-Y-Z, 并且 R^2 是 OH。这样的化合物非常近似于叶酸的结构, 并且因此能够保持叶酸所显示的所有或部分的生物活性。

[0040] 在一个实施方式中,在根据式 (I) 的化合物中,至少一个碳原子是 ^{11}C 。这样的实施方式允许通过正电子发射断层扫描 (PET) 技术检测化合物。

[0041] 或者,式 (I) 化合物中的 Y 部分可以是含钆的实体。

[0042] 本发明目的进一步通过根据式 (I) 化合物的制备方法而实现, 其中将式 $\text{NH}_2\text{-X-Y-Z}$ 、 OH-X-Y-Z 或 SH-X-Y-Z 的化合物与叶酸反应, 其中 X、Y 和 Z 如式 (I) 中所定义。

[0043] 药物制剂

[0044] 本发明的目的还通过包含根据式 (I) 的化合物和药学上可接受的载体、稀释剂或辅助剂的药物组合物而实现。

[0045] 为了临床使用,根据式 (I) 的含硼化合物依照本发明适当地被配制成用于肠胃外给药的药物组合物。并且,直肠、口服或任何其它的给药途径也是制剂领域技术人员可以预期的。因此,将根据式 (I) 的含硼化合物与至少一种药学和药理学上可接受的载体或辅助剂一起配制。所述载体可以是固体、半固体或液体稀释剂的形式。

[0046] 肠胃外给药的溶液可以制备成一种本发明的化合物在药学上可接受的溶剂中的溶液。这些溶液还可以含有稳定成分和/或缓冲成分, 并且分配成单位计量的安瓿或药瓶。肠胃外给药的溶液也可以制备成一种在使用前临时用适当的溶剂重制的干燥制品。

[0047] 在根据本发明的口服药物组合物的制备中,将需要配制的根据式 (I) 的含硼化合物与固体、粉末成分(例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、支链淀粉、纤维素衍生物、明胶或另外适当的成分), 以及与崩解剂和润滑剂(例如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂富马酸钠和聚乙二醇蜡)混和。然后将该混合物加工成颗粒或压制成片。

[0048] 软明胶胶囊可以用含有活性化合物或本发明化合物、植物油、脂肪或者其它适于软明胶胶囊的赋形剂的混合物的胶囊制备。硬明胶胶囊可以含有与固体粉末成分(例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、马铃薯淀粉、玉米淀粉、支链淀粉、维生素衍生物或明胶)混和的活性化合物。

[0049] 用于直肠给药的剂量单位可以 (i) 以栓剂的形式制备, 其含有与中性脂肪基混和的活性物质; (ii) 以明胶直肠胶囊的形式制备, 其含有与植物油、石蜡油或其它适于明胶直肠胶囊赋形剂混合的活性物质; (iii) 以预先制成的微型灌肠剂的形式制备; 或者 (iv) 以在给药前在适当溶剂中重制的干燥的微型灌肠剂制剂的形式制备。

[0050] 用于口服给药的液体制剂可以以糖浆或混悬剂(例如溶液或混悬剂), 以及与乙醇、水、甘油、丙二醇和聚乙二醇的混合物的形式制备, 所述糖浆或混悬剂含有活性化合物并且制剂的剩余部分由糖或糖醇组成。如果需要, 这样的液体制剂可以含有着色剂、调味

剂、糖精和羧甲基纤维素或其它增稠剂。用于口服给药的液体制剂还可以在使用前用适当溶剂重制的干燥粉末的形式制备。

[0051] 在本发明的一个方面中,根据式 (I) 的含硼化合物可以在对要治疗的对象进行中子辐射之前的 24 小时内给药,典型的在中子辐射之前 30-60 分钟。在本发明的进一步方面中,含硼化合物的剂量可以是波动的。根据式 (I) 的含硼化合物的典型剂量在每公斤体重 0.01-100mg 范围内。

[0052] 治疗

[0053] 本发明的目的还通过用于治疗的根据式 (I) 的化合物而实现,或者通过根据式 (I) 的化合物在制备用于治疗肿瘤的药物方面的用途而实现。

[0054] 在一个实施方式中,所述药物可以用于治疗源于中枢神经系统的肿瘤,优选神经胶质瘤,例如胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、低级别星形细胞瘤、毛细胞形星形细胞瘤、少突神经胶质瘤或脑干神经胶质瘤;脑膜瘤;外周神经上皮瘤;原始神经外胚层瘤;神经母细胞瘤;生殖细胞瘤;垂体瘤;脑转移瘤;或动静脉畸形。

[0055] 或者,该药物可以用于治疗恶性肿瘤或转移性肿瘤进程,优选黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌或肉瘤。

[0056] 本发明一个有效的实施方式还通过用于诊断的、其中至少一个碳原子是 ^{11}C 的根据式 (I) 的化合物而实现,或者通过其中至少一个碳原子是 ^{11}C 的根据式 (I) 的化合物在制备用于正电子发射断层扫描 (PET) 中的药物方面的用途而实现。

[0057] 所述目的进一步通过将药理学和药理学有效量的根据式 (I) 的化合物给药于需要这种与硼中子俘获治疗相结合的处理的对象的肿瘤的治疗方法而实现。

[0058] 所述肿瘤治疗可以是治疗源于中枢神经系统的肿瘤,优选神经胶质瘤,例如胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、低级别星形细胞瘤、毛细胞形星形细胞瘤、少突神经胶质瘤或脑干神经胶质瘤;脑膜瘤;外周神经上皮瘤;原始神经外胚层瘤;神经母细胞瘤;生殖细胞瘤;垂体瘤;脑转移瘤;或动静脉畸形。

[0059] 或者,所述肿瘤治疗可以是治疗恶性肿瘤或转移性肿瘤进程,优选黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌或肉瘤。

[0060] 本发明一个有用的实施方式进一步通过将药理学和药理学有效量的、其中至少一个碳原子是 ^{11}C 的根据式 (I) 的化合物给药于需要诊断的对象并与正电子发射断层扫描相结合的肿瘤诊断方法而实现。

[0061] 以上所提到的治疗可以作为单独的治疗而应用,或者除了硼中子俘获治疗之外可以包括常规的手术或化学疗法。这样的化学疗法可以包括一种或多种以下种类的抗肿瘤剂:

[0062] (i) 用于内科肿瘤学的抗增殖/抗肿瘤药物及其组合物,例如烷化剂(例如顺铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、苯丙氨酸氮芥、,苯丁酸氮芥、白消安和亚硝基脲);抗代谢药(例如抗叶酸剂,比如氟代嘧啶类如 5-氟尿嘧啶和替加氟、雷替曲塞、氨甲蝶呤、阿糖胞苷和羟基脲);抗肿瘤抗生素(例如蒽环类如阿霉素(adriamycin)、博莱霉素、阿霉素(doxorubicin)、道诺霉素、表阿霉素、依达比星、丝裂霉素-C、更生霉素和光神霉素);抗有丝分裂剂(例如长春花生物碱类如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨,以及紫杉烷类如紫杉醇和泰素帝);和拓扑异构酶抑制剂(例如表鬼臼毒素类如依托泊苷和替尼泊苷、胺

苯吡啶、拓扑替康和喜树碱)；

[0063] (ii) 细胞生长抑制剂例如抗雌激素类(例如三苯氧胺、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和 iodoxyfene), 雌激素受体衰减调节剂(例如氟维司群), 抗雄激素类(例如比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特和醋酸环丙孕酮), LHRH 拮抗剂或 LHRH 激动剂(例如戈舍瑞林、亮丙瑞林和布舍瑞林), 孕激素类(例如醋酸甲地孕酮), 芳香化酶抑制剂(例如阿那曲唑、来曲唑、伏氯唑和依西美坦)以及 5α -还原酶抑制剂例如非那雄胺；

[0064] (iii) 癌细胞侵入抑制剂(例如金属蛋白酶抑制剂如马立马司他, 以及尿激酶型纤溶酶原激活物功能受体)；

[0065] (iv) 生长因子功能抑制剂, 例如如下抑制剂, 其包括生长因子抗体, 生长因子受体抗体(例如抗-erbB2 抗体曲妥珠单抗 [HerceptinTM] 和抗-erbB1 抗体西妥昔单抗), 法尼基转移酶抑制剂, 酪氨酸激酶抑制剂和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂, 例如表皮生长因子类抑制剂(例如 EGFR 类酪氨酸激酶抑制剂例如 N-(3-氯-4-氟代苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺(吉非替尼(gefitinib)), N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(埃洛替尼(erlotinib)) 和 6-丙烯酰胺基-N-(3-氯-4-氟代苯基)-7-(3-吗啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺), 例如血小板衍生的生长因子类抑制剂以及例如肝细胞生长因子类抑制剂；

[0066] (v) 抗血管增生剂例如抑制血管内皮细胞生长因子作用的那些(例如抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗 [AvastinTM], 例如公开在国际专利申请 WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 和 WO 98/13354 中的那些化合物)以及通过其它机理作用的化合物(例如利诺胺, 整合素 $\alpha v \beta 3$ 功能抑制剂和血管抑素)；

[0067] (vi) 血管损伤剂例如康普立停 A-4 (Combretastatin A4) 和公开在国际专利申请 WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 和 WO 02/08213 中的那些化合物；

[0068] (vii) 反义治疗, 例如针对以上所列靶点的那些, 比如 ISIS 2503, 抗-ras 反义物质；

[0069] (viii) 基因治疗方法, 包括例如取代异常基因的方法, 所述异常基因例如是异常的 p53 或异常的 BRCA1 或 BRCA2, GDEPT (基因导向的酶前药治疗), 例如使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的方法, 以及增加病人对化疗或放疗耐受性的方法例如多重耐药性基因治疗；和

[0070] (ix) 免疫治疗方法, 包括例如增加病人肿瘤细胞免疫原性的离体和体内方法, 例如用细胞因子进行的转染, 所述细胞因子例如是白介素 2、白介素 4 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 减小 T 细胞功能低下的方法, 使用转染的免疫细胞例如细胞因子转染的树突状细胞的方法, 使用细胞因子转染的肿瘤细胞株的方法以及使用抗独特型抗体的方法。

[0071] 实施例

[0072] 根据本发明的化合物的制备

[0073] 所有使用的溶剂都是分析级的, 并且反应中常规使用的是市售无水溶剂。典型地, 反应在氮气或氩气的惰性气氛下进行。

[0074] ¹H NMR 谱是在装有具有 Z-梯度的 5mm BBO 探头的 Varian Unity+400NMR 光谱仪, 或装有 5mm BBI 探头的 Varian Gemini 300NMR 光谱仪, 或装有具有 Z-梯度的 60 μ l

双回流探头的 Bruker Avance 400NMR 光谱仪,或装有具有 Z- 梯度的 4- 核探头的 Bruker DPX400NMR 光谱仪上记录的。除非在实施例中特别指明,波谱都是在 400MHz 下对质子进行记录的。使用了以下参比信号:CDCl₃ 的中线在 δ 7.26 (¹H)。

[0075] 质谱是在由 Alliance 2795(LC)、Waters PDA 2996 和 ZQ 单四极质谱仪组成的 Waters LCMS 上记录的。该质谱仪装有以阳离子或阴离子方式操作的电喷射离子源(ESI)。毛细管电压为 3kV,锥孔电压为 30V。所述质谱仪在 m/z100-700 之间进行扫描,扫描时间为 0.3s。分离是在 Waters X-Terra MS C8 (3.5 μ m, 50 或 100mm \times 2.1mm 直径)或由 ScantecLab 获得的 ACE 3 AQ(100mm \times 2.1mm 直径)上进行的。流速分别调节到 1.0 或 0.3ml/min。柱温设置在 40 $^{\circ}$ C。使用中性或酸性流动相系统的线性梯度,该梯度由 100% A(A:5% MeCN 中的 10mM NH₄OAc,或者 5% MeCN 中的 8mM HCOOH)起始,在 100% B(MeCN)下结束。

[0076] 或者,质谱是在由 Alliance 2690 分离模块、Waters 2487 二元 1 吸收检测器(220 和 254nm)和 Waters ZQ 单四极质谱仪组成的 Waters LCMS 上记录的。该质谱仪装有以阳离子或阴离子方式操作的电喷射离子源(ESI)。毛细管电压为 3kV,锥孔电压为 30V。所述质谱仪在 m/z 97-800 之间进行扫描,扫描时间为 0.3s 或 0.8s。分离是在 Chromolith Performance RP-18e(100 \times 4.6mm)上进行的。采用线性梯度,在 5 分钟内,由 95% A(A:0.1% HCOOH(水溶液))起始,在 100% B(MeCN)下结束。流速:2.0ml/min。

[0077] HPLC 分析是在由 G1379A 微型真空脱气装置、G1312A 二元泵、G1367A 孔盘自动进样器、G1316A 柱温箱和 G1315B 二极管阵列检测器组成的 AgilentHP1000 系统上进行的。柱: X-Terra MS, Waters, 3.0 \times 100mm, 3.5 μ m。柱温设置为 40 $^{\circ}$ C,流速为 1.0ml/min。二极管阵列检测器在 210-300nm 下扫描,步幅和峰宽分别设置为 2nm 和 0.05min。采用线性梯度,在 4 分钟内,由 100% A(A:5% MeCN 中的 10mM NH₄OAc)起始,在 100% B(B:MeCN)下结束。

[0078] 反应之后典型的操作程序是由使用例如乙酸乙酯的溶剂对产物进行萃取、水洗、接着通过 MgSO₄ 或 Na₂SO₄ 对有机相进行干燥、过滤和真空下对溶液进行浓缩所组成。

[0079] 薄层色谱(TLC)是在 Merck TLC 板(硅胶 60F₂₅₄)上进行的,并且对斑点进行紫外显色。快速色谱是在使用 RediSepTM 正相快速柱的 Combi Flash[®] CompanionTM 上进行的。用于快速色谱的典型的溶剂是氯仿/甲醇、二氯甲烷/甲醇、庚烷/乙酸乙酯、氯仿/甲醇/NH₃(水溶液)、以及二氯甲烷/甲醇/NH₃(水溶液)混合物。

[0080] 制备色谱是在具有二极管阵列检测器的 Waters 自动纯化 HPLC 上进行的。柱: XTerra MS C8, 19 \times 300mm, 10 μ m。在具有 5% MeCN 的 MilliQ 水中, MeCN/0.1M NH₄OAc 的梯度在 13min 内从 20% MeCN 变到 60% MeCN。流速 20ml/min。或者,纯化是在具有由 Waters Symmetry[®]柱(C18, 5 μ m, 100mm \times 19mm)装备的 Shimadzu SPD-10A UV-vis- 检测器和半制备 Shimadzu LC-8AHPLC 上完成的。在 MilliQ 水中, MeCN/0.1% 三氟乙酸的梯度在 15min 内从 5% MeCN 变到 100% MeCN。流速 10ml/min。

[0081] 使用了以下缩写:

[0082] DMAP 4- 二甲基氨基吡啶;

[0083] DMF N, N- 二甲基甲酰胺;

[0084] EDC 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺;

[0085] EtOAc 乙酸乙酯;

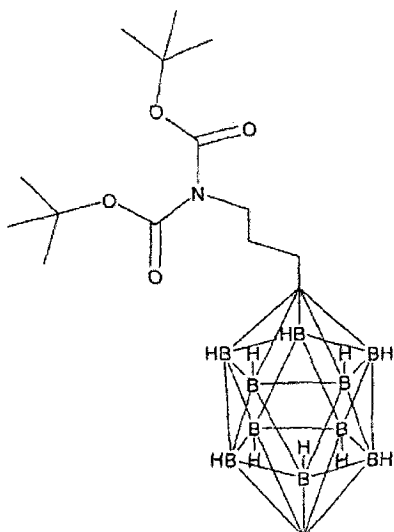
[0086] HCl 盐酸;

- [0087] CH_2Cl_2 二氯甲烷；
 [0088] CDCl_3 氘代氯仿；
 [0089] Ether 乙醚；
 [0090] MeCN 乙腈；
 [0091] Na_2CO_3 碳酸钠；
 [0092] NaOH 氢氧化钠；
 [0093] Na_2SO_4 硫酸钠
 [0094] QHSO_4 硫酸氢四丁铵；
 [0095] r. t. 室温。

[0096] 所使用的起始原料是从商业来源可以获得的,或者是根据文献步骤制备并具有与所报导相符的试验数据的。

[0097] 实施例 1、[3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷 -1-基) 丙基] 亚胺二碳酸二叔丁酯的制备

[0098]

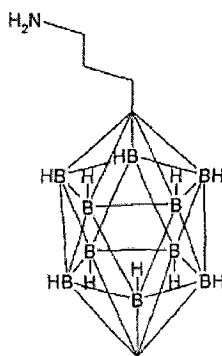


[0099] 向搅拌的 QHSO_4 (3.04g, 8.96mmol) 和 NaOH 1M 水溶液 (18ml) 的混合物中加入 CH_2Cl_2 (20ml), 接着逐滴加入在 CH_2Cl_2 (15ml) 中的 1-(3-溴丙基)-2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷 (Tetrahedron Lett. 1996, 37(38), 6905-6908) (2.16g, 8.15mmol)。所得溶液在回流下加热 2h 并冷却到 r. t.。加入水 (10ml)。用 CH_2Cl_2 (30ml) 萃取水层。混合的有机层用水 (10ml) 洗涤、通过 Na_2SO_4 干燥并浓缩。剩余物用醚 (30ml) 进行搅拌。将沉淀物用干醚 (2×20ml) 进行萃取,并且在真空下浓缩混合的萃取物。粗品通过快速色谱进行纯化。产率:62% (2.21g)。

[0100] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ ppm 3.35 (t, 2H, $J = 7.07\text{Hz}$), 2.62 (s, 1H), 1.68-1.56 (m, 4H), 1.49-1.44 (m, 18H)。LC/MS (ESI) m/z 402 (M+1)。

[0101] 实施例 2、[3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷 -1-基)-丙烷 -1-胺的制备

[0102]



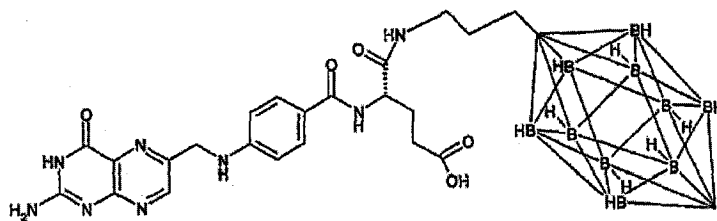
[0103] 将来自实施例 1 的 [3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基) 丙基] 亚胺二碳酸二叔丁酯 (2.21g, 5.50mol) 溶于在 EtOAc (100ml) 中的 HCl 饱和溶液。将溶液在 r. t. 下搅拌过夜, 然后蒸发。用干醚洗涤白色絮状沉淀。然后将沉淀溶于水, 溶液用 Na_2CO_3 的饱和水溶液 (40ml) 进行碱化。水层用醚进行萃取并将混合的有机萃取物用盐水 ($3 \times 10\text{ml}$) 洗涤。在真空下除去溶剂从而得到游离的胺。

[0104] 产率: 76% (841mg)

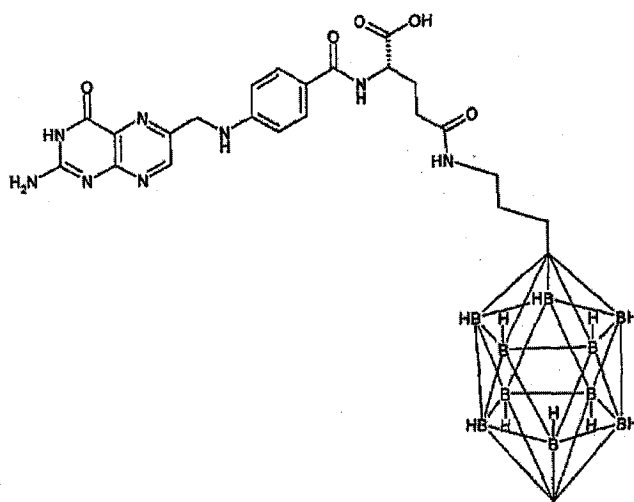
[0105] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ ppm 2.62 (s, 1H), 2.54-2.42 (m, 2H), 1.69-1.58 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 2H)。LC/MS (ESI) m/z 202 (M+1)。

[0106] 实施例 3、N-(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基) 甲基] 氨基} 苯甲酰基)-N-{3-[(1R,9S)-2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基] 丙基}- α -谷酰胺和 N-(4-[(2-氨基-4-氧代-3,4-二氢蝶啶-6-基) 甲基] 氨基} 苯甲酰基)-N-[3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基) 丙基]-L-谷酰胺的制备

[0107]



和



[0108] 将叶酸 (1.84g, 4.17mmol), EDC (799mg, 4.17mmol) 和 DMAP (509mg, 4.17mmol) 溶于干燥的 DMF (200ml) 中。溶液在 20°C 和氩气气氛下搅拌 3h。然后加入在 DMF (40ml) 中的来自实施例 2 的 3-(2,3,4,5,6,7,8,10,11,12-十硼二环 [7.2.1] 十二烷-1-基) 丙烷-1-胺 (839mg, 4.17mmol), 并将混合物搅拌 1 天。溶剂在真空下除去。剩余物用醚/CH₂Cl₂ 混合物洗涤两次。粗产品用制备色谱进行纯化。

[0109] 产率: 7.5% (190mg)。

[0110] 两个异构体都具有 LC/MS (ESI) m/z 623 (M-1)。保留时间在 12min。方法: 8.48 和 8.78min。(在该情况下使用具有 2.5mM 的乙酸水溶液的等浓度洗脱方法)。

[0111] 根据本发明的化合物的体外研究

[0112] 对来自实施例 3 的纯化材料 (以下称作 BF) 进行的体外试验使用四种不同的来源于人的肿瘤细胞株, 包括人的神经胶质瘤细胞株 U343mg、人的肝癌细胞株 Hep3B、人的乳腺癌细胞株 MCF7 和人的肉瘤细胞株 4SS。将细胞平铺在未涂覆的组织培养塑料皿上, 并且在 37°C 下在具有用 5% CO₂ 平衡的湿润空气的温育器中进行培养。它们在推荐的组织培养基中生长, 所述培养基添加了 10% 的 FCS 和 PEST (青霉素 100IU/ml 和链霉素 100mg/ml)。为了细胞的通过, 将细胞用胰蛋白酶-EDTA (具有 0.25% 的胰蛋白酶和 0.02% 的 EDTA、不含钙和镁的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)) 进行胰蛋白酶化。

[0113] 总之, 正如以下实施例 4-6 中将显示的, BF 已经在体外试验中显示出预期的结果, 其在肿瘤细胞摄取、积累和保留方面都优于 BPA, 并没有出现任何毒性的迹象。

[0114] 实施例 4、BF 的细胞摄取

[0115] 将 U343mga 细胞以 75% 细胞密度平铺在 Petri 培养皿上, 并且用溶于组织培养基的硼酸 (BA)、与维生素 B₁₂ 共轭的硼 (BB)、1-4- 二羟基硼基苯丙氨酸 (BPA) 或 BF 中的一种温育 6 小时。全部四种含硼化合物以相对于硼含量 (5×10^{-4} M 硼) 的等摩尔浓度加入并溶解在组织培养基中。通过除去含硼组织培养基以及为了从细胞上洗去过量的培养基而加入冷 PBS 缓冲液来结束温育。通过使用橡胶刮帚从塑料皿上刮铲下来而立刻收获细胞。它们在冷的 PBS 中收集并且通过离心形成沉淀。

[0116] 根据 Bradford 标准程序对细胞样品进行总蛋白分析。通过直流原生质原子发射光谱 (DCP-AES) 对沉淀细胞进行硼分析。在 60°C 下用硫酸 / 硝酸 (1/1) 对样品 (50-130mg) 消化。加入 Triton X-100 和水从而得到 50mg 组织 / ml、15% 总酸 v/v 和 5% Triton X-100 v/v 的浓度。硼浓度是基于已知对照样品的。

[0117] 结果在下表 1 中给出。叶酸与 BF 形式的硼之间的共价连接导致了人的恶性胶质瘤细胞株 U343mga 的活性摄取, 也就是说其优于对作为硼酸 (BA)、硼苯丙氨酸 (BPA) 或与维生素 B₁₂ 共轭的硼 (BB) 的硼的摄取。

[0118] 表 1 不同的硼化合物的细胞摄取。

[0119] 对于两个平行试验 (试验 1 和试验 2) 中的不同的硼化合物来说, 硼含量 表示为 U343mga 细胞中总细胞蛋白的函数 (μ g 硼 / g 细胞蛋白) (在试验 1 和试验 2 中分别为 7.2 和 7.7 μ g 硼 / ml 培养基)。

[0120]

硼化合物	试验 1	试验 2
BA	8	-
BB	-	60
BPA	65	38
BF	560	440

[0121] 实施例 5、不同肿瘤细胞对 BF 的摄取

[0122] 将四种来源于人的不同肿瘤细胞株 : U343mga、Hep3B、MCF7 和 4SS 以 40-50% (低) 以及 90-100% (高) 细胞密度 (汇合) 平铺在 Petri 培养皿上, 并且如上所述用溶于组织培养基的 BF 温育 6 小时。通过除去含硼培养基以及为了从细胞上洗去过量的培养基而加入冷的 PBS 缓冲液来结束温育。通过使用橡胶刮帚从塑料皿上刮铲下来而立刻收获细胞, 它们在冷的 PBS 中收集并且通过离心形成沉淀。根据标准程序进行总蛋白和硼分析 (如上)。

[0123] 结果在下表 2 中给出。对于以低和高细胞密度测试的所有四种人的肿瘤细胞株 (胶质母细胞瘤 (U343mga)、肝癌 (Hep3B)、乳腺癌 (MCF7)、肉瘤 (4SS)) 中, 发现 BF 是一种高效的硼载体。

[0124] 表 2BF 的细胞摄取。硼含量表示为总细胞蛋白的函数 (μ g 硼 / g 细胞蛋白)。

[0125]

细胞株	低细胞密度	高细胞密度
U343mga	108	172
Hep3B	171	219
MCF7	108	169
4SS	263	367

[0126] 实施例 6BF 的细胞内保留

[0127] 将 U343mga 细胞以 75% 细胞密度平铺在 Petri 培养皿上, 并且用于组织培养基中的 1-4- 二羟基硼基苯丙氨酸 (BPA) 或 BF 中的一种温育 18 小时。全部两种硼化合物以相对于硼含量 (5×10^{-4} M 硼) 的等摩尔的浓度加入组织培养基中。通过用没有硼的培养基代替含硼培养基而结束温育。细胞样品在时间点 0、2 和 7 小时进行取样, 其中 0 时间点代表刚好用硼化合物温育 18 小时之后。

[0128] 细胞用冷的 PBS 洗涤, 并通过使用橡胶刮帚从塑料皿上刮铲下来而将其收获, 它们在冷的 PBS 中收集并且通过离心形成沉淀。如上所述对细胞沉淀进行总蛋白和硼含量的分析。

[0129] 结果在下表 3 中给出。随着细胞内的摄取, 在培养基中的 BF 完全耗尽后 7 小时, 保留在肿瘤细胞中的 BF 为总摄取的 40%。

[0130] 表 3 在清除含硼培养基之后的 0、2 和 7 小时 U343mga 细胞中的硼含量 (μ g 硼 /g 细胞沉淀)。

[0131]

硼化合物	0 小时	2 小时	7 小时
BPA	0.075	0	0
BF	0.79	0.59	0.3