



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

C07F 9/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 233/61 (2006.01)

C07D 209/20 (2006.01)

C07C 229/26 (2006.01)

C07C 279/14 (2006.01)

C07C 229/08 (2006.01)

C07C 215/10 (2006.01)

C07C 215/12 (2006.01)

C07C 211/14 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003110410/04, 12.09.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.09.2001(30) Конвенционный приоритет:
07.12.2000 (пп.1-27) US 60/251,921

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2004

(45) Опубликовано: 27.09.2006 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 92/16486 A, 01.10.1992. Pettit GR.,
"Antineoplastic agents 393. Synthesis of the
trans-isomer of combretastatin A-4 prodrug".
Anticancer Drug Des. 1998 Dec; 13(8):981-993.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
14.04.2003(86) Заявка РСТ:
US 01/28401 (12.09.2001)(87) Публикация РСТ:
WO 02/22626 (21.03.2002)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ВЕНИТ Джон Дж. (US),
ДАЛИ Мандар В. (US),
ДАЛИ Маниша М. (US),
ХУАНГ Янде (US),
ДАЛХЕЙМ Чарльз Е. (US),
ТЕДЖВАНИ Равиндра У. (US)

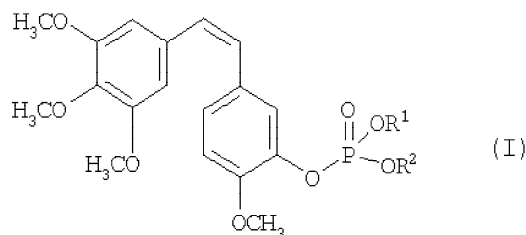
(73) Патентообладатель(и):

БРИСТОЛЬ-МЕЙЕРЗ СКВИББ КОМПАНИ (US)

(54) СОЛИ АЛИФАТИЧЕСКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ АМИНОВ, СОЛИ АМИНОКИСЛОТ И СОЛИ
ЭФИРОВ АМИНОКИСЛОТ ФОСФАТА КОМБРЕТАСТАТИНА А-4 ДЛЯ МОДУЛИРОВАНИЯ РОСТА
ОПУХОЛЕЙ ИЛИ МЕТАСТАЗОВ И РОСТА ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ СОСУДИСТЫХ
ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к солям органических
аминов, солям аминокислот и к солям эфиров
аминокислот фосфата комбретастина А-4.
Описывается соединение, имеющее общую
структуру формулы I



где один из
заместителей -OR¹ или -OR² представляет
собой -O-QH⁺, а другой представляет собой

гидроксил или $-O-QH^+$; и Q представляет собой (А) необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; (В) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; (С) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все

карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров. Также описываются фармацевтические композиции для модулирования роста опухолей или метастазов и роста доброкачественных сосудистых пролиферативных расстройств, применение соединения формулы (I) и способ получения соединения формулы (I). Технический результат - получены новые соли комбретастатина А-4 с полезными физико-химическими свойствами, которые повышают растворимость комбретастатина А-4. 6 н. и 21 з.п. ф-лы, 13 ил.

Изотерма адсорбции/десорбции



ФИГ. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

C07F 9/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 233/61 (2006.01)
C07D 209/20 (2006.01)
C07C 229/26 (2006.01)
C07C 279/14 (2006.01)
C07C 229/08 (2006.01)
C07C 215/10 (2006.01)
C07C 215/12 (2006.01)
C07C 211/14 (2006.01)
A61K 31/661 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2003110410/04, 12.09.2001

(24) Effective date for property rights: 12.09.2001

(30) Priority:
07.12.2000 (cl.1-27) US 60/251,921

(43) Application published: 20.09.2004

(45) Date of publication: 27.09.2006 Bull. 27

(85) Commencement of national phase: 14.04.2003

(86) PCT application:
US 01/28401 (12.09.2001)(87) PCT publication:
WO 02/22626 (21.03.2002)

Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

VENIT Dzhon Dzh. (US),
DALI Mandar V. (US),
DALI Manisha M. (US),
KhUANG Jande (US),
DALKhEJM Charl'z E. (US),
TEDZhVANI Ravindra U. (US)

(73) Proprietor(s):

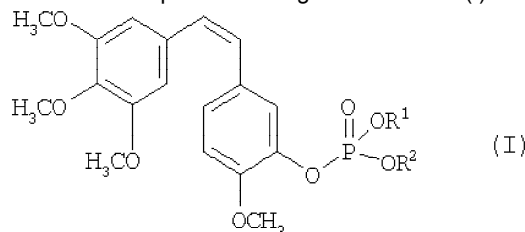
BRISTOL'-MEJERZ SKVIBB KOMPANI (US)

(54) ORGANIC AMINE SALTS, AMINO ACIDS SALTS AND COMBRESTATIN A-4 PHOSPHATE
AMINO ACID ESTER SALTS FOR MODULATING TUMOR OR METASTASIS PROLIFERATION AND
BENIGN VASCULAR PROLIFERATIVE DISORDER GROWTH

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, medicine, oncology.

SUBSTANCE: invention relates to organic amine salts, amino acid salts and combrestatin A-4 phosphate amino acid ester salts. Invention describes compound of the general formula (I):



wherein one of substitute -OR¹ or -OR represents -O-QH⁺ and another one represents hydroxyl or -O-QH⁺; Q represents (A) optionally substituted aliphatic organic amine comprising at least one nitrogen atom that in common with proton forms quaternary

ammonium cation QH⁺; (B) amino acid comprising at least two nitrogen atoms wherein one of nitrogen atoms in common with proton forms quaternary ammonium cation QH⁺; (C) amino acid comprising one or some nitrogen atoms wherein one of nitrogen atoms in common with proton forms quaternary ammonium cation QH⁺ and wherein, except for, all carboxyl groups of amino acids are in ester form. Also, invention describes pharmaceutical compositions used in modulation of tumor or metastasis proliferation and growth of benign vascular proliferative disorders, using compound of the formula (I) and a method for synthesis of compound of the formula (I). Invention provides preparing new combrestatin A-4 salts showing useful physicochemical properties that enhance solubility of combrestatin A-4.

EFFECT: valuable medicinal properties of compounds and pharmaceutical compositions.

27 cl, 13 dwg, 5 ex



RU 2 2 8 4 3 3 1 C 2

RU 2 2 8 4 3 3 1 C 2

По настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке США, регистрационный номер №60/232568, поданной 14 сентября 2000 г., и по заявке США, регистрационный номер №60/251921, поданной 7 декабря 2000 г., причем обе указанные предварительные заявки включены здесь в качестве ссылки.

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к новым и полезным пролекарственным моно- и ди-солям органических аминов, моно- и ди-солям аминокислот и моно- и ди-солям эфиров аминокислот фосфата комбретастина А-4 (CA4), и эти соли имеют более высокую растворимость, чем природный комбретастин А-4 и легко регенерируют комбретастин А-4 при физиологических условиях.

10 Уровень техники

Рак считается серьезным и повсеместно распространенным заболеванием. По оценкам Национального института рака только в США 1 человек из 3 будет поражен раком в течение его жизни. Более того, приблизительно от 50 до 60% людей, заболевших раком, в конечном итоге умрет. Как следствие, с момента основания Национального института рака в начале 70-х гг. средства, затраченные на изучение рака, резко выросли.

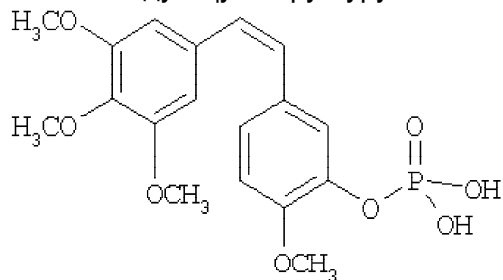
Хотя рак, как обычно считают, является одним заболеванием, на самом деле он включает семейство заболеваний, при которых нормальная дифференциация клеток модифицируется таким образом, что она становится аномальной и неконтролируемой. В результате такие злокачественные клетки быстро разрастаются. В итоге клетки распространяются и метастазируют из своего источника и колонизируют другие органы, в конце концов убивая своего хозяина. Из-за широкого многообразия видов рака, выявленных на сегодняшний день, разработано множество стратегий искоренения рака в организме. По одному из таких способов используют цитотоксичные химиотерапевтические средства. Такие соединения вводят больным раком с целью разрушения злокачественных клеток, не затрагивая при этом живые нормальные клетки. Конкретными примерами таких соединений являются 5-фторурацил, цисплатин и метотрексат.

Комбретастин А-4 сначала был выделен из ствола Африканского дерева *Combretum saffrum* (Combretaceae) и было обнаружено, что он является эффективным ингибитором микротрубоччатых структур. Кроме того, комбретастин А-4, как установлено, обладает значительной активностью в отношении линии клеток мышинного L1210 и P338 лимфоцитарного лейкоза по классификации Национального института рака США (НИР). Помимо этого, комбретастин А-4, как установлено, конкурирует с комбретастином А-1, еще одним соединением, выделенным из *Combretum saffrum* в качестве ингибитора связывания колхицина с тубулином. Он также сильно задерживает развитие VoLo, DLD-1 и HCT-15 рака толстой кишки человека ($ED_{50} < 0,01$ мкг/мл) и является одним из более сильных антимитотических агентов, найденных среди компонентов *Combretum saffrum* (патент США 4996237).

Соответственно были проведены исследования по определению эффективности комбретастина А-4 в качестве химиотерапевтического агента при лечении различных видов рака человека. К сожалению, комбретастин А-4 по существу не растворяется в воде. Такое свойство в значительной степени препятствует разработке фармацевтических композиций, содержащих комбретастин А-4. Для повышения растворимости, а также эффективности, были предприняты попытки создания пролекарственных производных комбретастина А-4, которые будут регенерировать комбретастин А-4 при физиологических условиях. Например, Koji Ohsumi с соавторами описал синтез HCl-аминокислотных пролекарств аналогов комбретастина, в которых соль аминокислоты присоединена к аминогруппе производного комбретастина, содержащего основную аминогруппу [такие производные описаны в работе Ohsumi et.al, Anti-Cancer Drug Design, 14, 539-548 (1999)]. Хотя такие пролекарства могут иметь повышенную растворимость по сравнению с растворимостью природного комбретастина А-4, им присуще ограничивающее их применение свойство, заключающееся в том, что регенерация комбретастина А-4 зависит от эндогенной аминопептидазы в крови больного, которому

введено пролекарство.

Свободная кислота фосфата комбретастина А-4 ("свободная кислота СА4Р", которая имеет следующую структуру:



существует только в виде масла. Свободная кислота СА4Р по своей природе очень мало растворима (по определению Фармакопеи США) в воде при 25°C, причем растворимость в воде повышается с увеличением pH. Кислота имеет две кислотные группы со значениями рK_a 1,2 и 6,2, которые способны образовывать соли. Поскольку на практике существуют проблемы при работе со свободной кислотой СА4Р из-за ее физического состояния, желательно получение кристаллической, стабильной солевой формы этого соединения.

Попытки получить производные комбретастина А-4 включали получение солевых производных фосфата комбретастина А-4 (солевые производные "СА4Р"). Конкретные примеры таких солей представлены в патенте США 5561122. Хотя такие пролекарственные соли обладают более высокой растворимостью, чем природный комбретастин А-4, для них также характерны присущие им недостатки, такие как гигроскопичность.

Гигроскопичность является одним из весьма важных критериев выбора соли. См. К. Morris et al, "An Integrated Approach to the Selection of Optimal Salt Form for a New Drug Candidate", Int. J. Pharm., 105, 209-217 (1994). Степень гигроскопичности для многих лекарственных веществ оказывает сильное влияние на работу с ними и их стабильность в период срока годности лекарственного продукта.

Таким образом, существует необходимость в новых и полезных пролекарственных солях комбретастина А-4 с полезными физико-химическими свойствами, которые повышают растворимость и предпочтительно эффективность комбретастина А-4 при лечении широкого спектра новообразований.

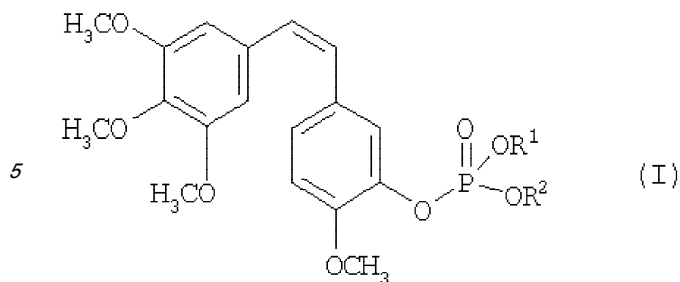
Также необходимы новые и полезные пролекарственные соли комбретастина А-4, которые легко регенерируют природный комбретастин А-4 in vivo и не продуцируют нежелательных или потенциально вредных побочных продуктов при регенерации.

Цитирование какой-либо ссылки в данном документе не следует толковать как признание, что такая ссылка является пригодной в качестве уровня техники для данной заявки.

Сущность изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предложены новые и полезные пролекарственные моно- и ди-соли органических аминов, моно- и ди-соли аминокислот и моно- и ди-соли эфиров аминокислот фосфата комбретастина А-4, и эти соли имеют более высокую растворимость, чем природный комбретастин А-4 и легко регенерируют комбретастин А-4 in vivo. Настоящее изобретение также относится к соединениям, которые значительно менее гигроскопичны, чем известные до сих пор пролекарственные соли комбретастина А-4 (например, они не меняют в значительной степени физическую форму в условиях обычной температуры и влажности). С этими соединениями легче работать, они более стабильны и могут образовывать растворы при значениях pH, которые сводят до минимума или исключают боль на участке инъекции. Таким образом, соединения по настоящему изобретению обеспечивают существенные преимущества при фармацевтическом применении.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к соединению, имеющему общую структуру формулы I:



10 где один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и

Q представляет собой

(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

15 (B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

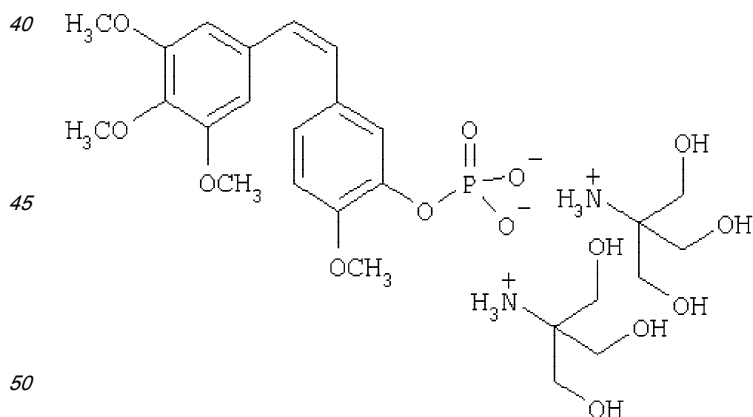
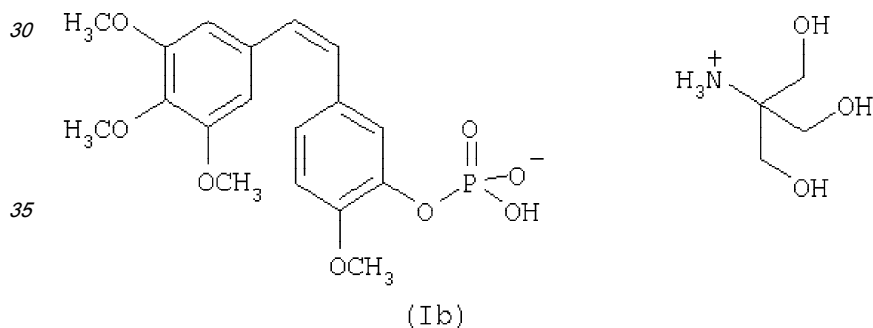
(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

20 По всему описанию, когда оба заместителя $-OR^1$ и $-OR^2$ представляют собой $-O-QH^+$, Q предпочтительно одинаковый в обеих группах $-OR^1$ и $-OR^2$.

Когда Q имеет определение (A), предпочтительный органический амин, в данном случае представляет собой трометамин (то есть, трис(гидроксиметил)аминометан, который далее обозначают сокращением ТРИС (ТРИС)).

25 Трометаминные соли формулы I иллюстрируются следующими формулами Ia и Ib, которые представляют моно-трометаминную и ди-трометаминную соли формулы I, соответственно:

(Ia)



Моно-трометаминная соль формулы Ia предпочтительна.

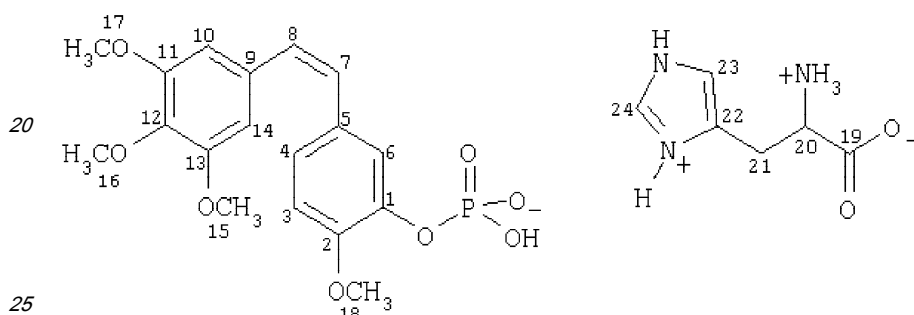
Когда Q имеет определение (B), любая аминокислота, содержащая, по меньшей мере,

два атома азота, может использоваться в данном случае. Любые атомы азота аминокислоты могут образовывать четвертичный аммониевый катион формулы I, например любой атом азота боковой цепи аминокислоты или атом азота α -аминогруппы.

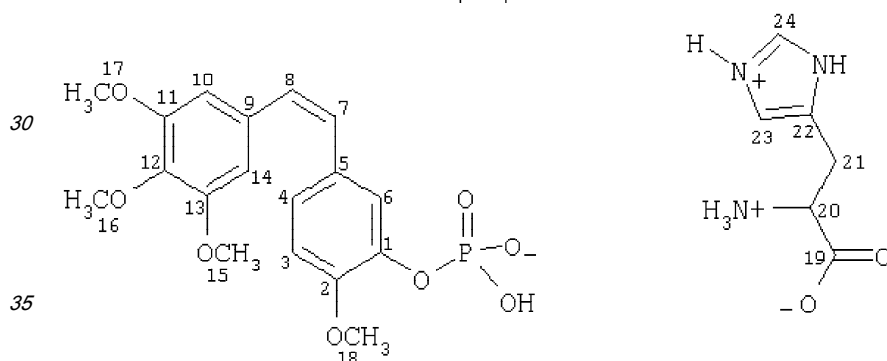
Аминокислоты, которые могут использоваться в данном случае, представляют собой, но, конечно, не ограничиваются только ими, орнитин, гистидин, лизин, аргинин, триптофан и др.

Когда Q имеет определение (B), предпочтительной аминокислотой в данном случае является гистидин. Например, или атомы азота имидазольной группы боковой цепи гистидина или, с другой стороны, атом азота α -аминогруппы гистидина могут образовывать четвертичный аммониевый катион формулы I. Как можно легко увидеть, вследствие ароматической природы имидазольной группы любой атом азота имидазольной группы боковой цепи гистидина может образовывать структуру формулы (I). Предпочтительные моно-гистидиновые структуры формулы I иллюстрируются следующими формулами Ic или Id:

(Ic)



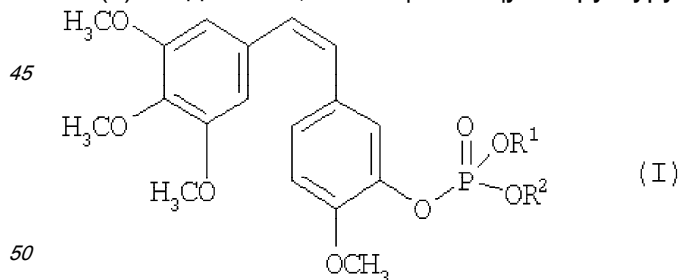
(Id)



Когда Q имеет определение (C), любая аминокислота может использоваться в данном случае, например, такая как глицин, но это не ограничивается. Предпочтительными эфирами являются алкиловые эфиры, такие как метиловый или этиловый эфиры.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей:

(а) соединения, имеющие общую структуру формулы I:



где:

один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой

представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и

Q представляет собой

(А) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

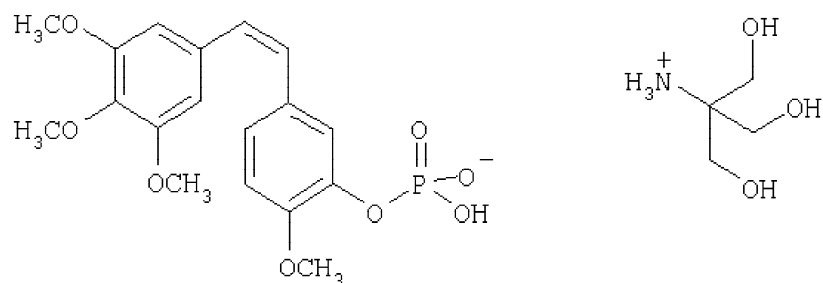
(В) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

(С) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в виде эфиров; и

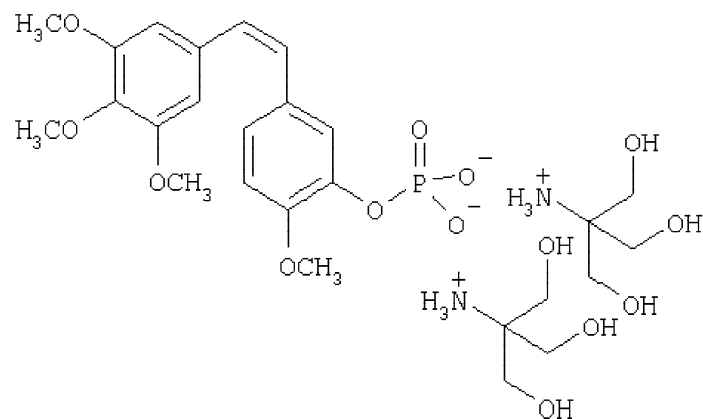
(b) фармацевтически приемлемый носитель.

Конкретные примеры соединений по настоящему изобретению, используемых в таких фармацевтических композициях, описаны выше. Кроме того, любой фармацевтически приемлемый носитель находит применение в фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Конкретные примеры описаны ниже. Конкретный вариант фармацевтической композиции по настоящему изобретению включает соединение по настоящему изобретению, в котором трометамин представляет собой органический амин и которое предпочтительно представляет собой трометаминную соль, имеющую структуру формулы Ia или Ib, наиболее предпочтительно Ia:

(Ia)

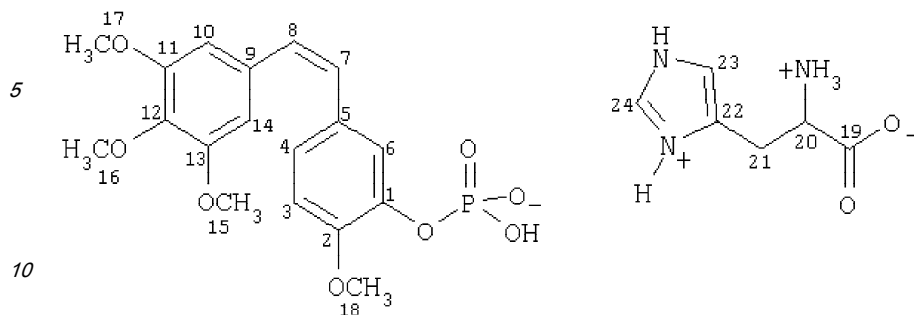


(Ib)

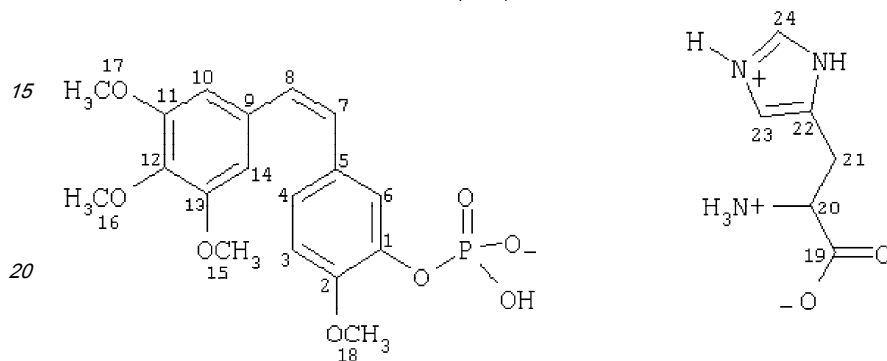


Другой конкретный вариант фармацевтической композиции по настоящему изобретению включает соединение по настоящему изобретению, в котором гистидин является аминокислотой и которое предпочтительно является моно-гистидиновой солью, имеющей структуру формулы Ic или Id:

(Ic)



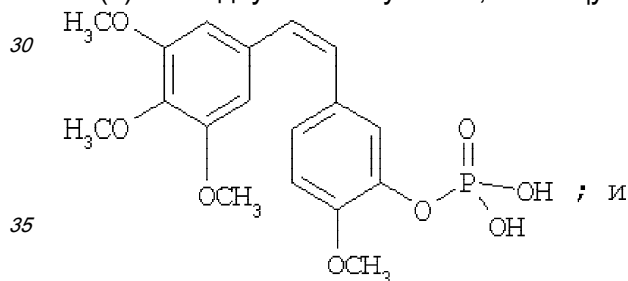
(Id)



Конечно, такая фармацевтическая композиция также должна включать фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение также охватывает композиции, содержащие соль по настоящему изобретению. В частности, композиция по настоящему изобретению может быть получена путем смешивания соединений, включающих:

(a) свободную кислоту CA4P, имеющую структуру:



(b) соединение Q, где Q представляет собой

(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который способен вместе с протоном образовывать четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

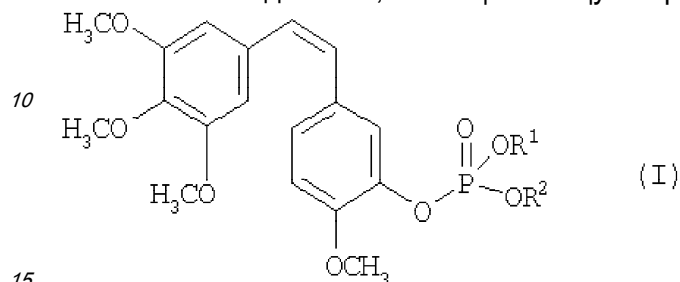
(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

Необязательно композиция по настоящему изобретению также может включать фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, когда Q имеет определение (A), любой органический амин, который определен в данном описании, может использоваться в композиции по настоящему изобретению. Конкретными примерами являются, но не ограничиваются только ими, трометамин, диэтаноламин, глюкамин, N-метилглюкамин, этилендиамин и 2-(4-имидазолил)этиламин. Когда Q имеет определение (B), любая аминокислота, содержащая, по меньшей мере, два атома азота, может использоваться в композиции по настоящему

изобретению. Конкретными примерами являются орнитин, гистидин, лизин, аргинин, триптофан и др. Когда Q имеет определение (C), любой эфир аминокислоты, который определен в данном описании, может использоваться в композиции по настоящему изобретению. Конкретным примером является глицин.

5 В другом варианте настоящее изобретение относится к способу модулирования роста опухоли или метастаза у животного, который включает введение ему эффективного количества соединения, имеющего общую структуру:



где:

один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и Q представляет собой

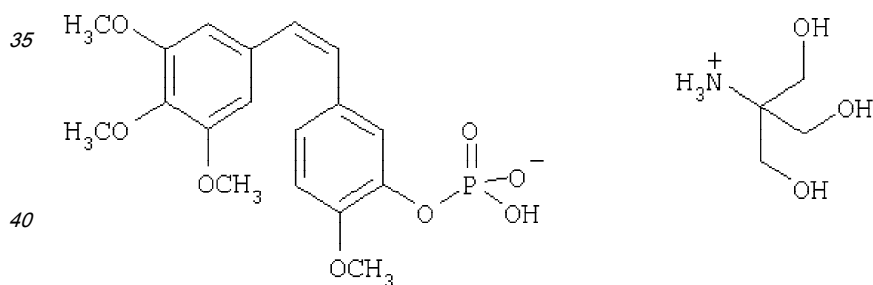
20 (A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

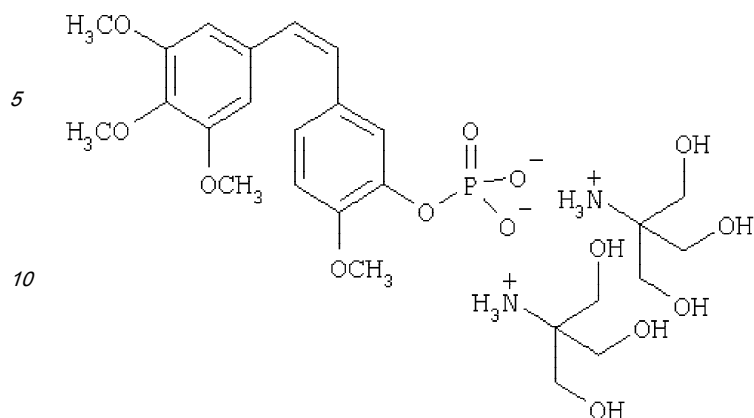
25 (C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в виде эфиров.

В конкретном варианте настоящее изобретение относится к способу модулирования роста опухоли или метастаза у животного, который включает введение ему эффективного количества соединения, в котором трометамин представляет собой органический амин и которое предпочтительно является трометаминной солью, имеющей структуру формулы Ia или Ib, наиболее предпочтительно, Ia:

(Ia)

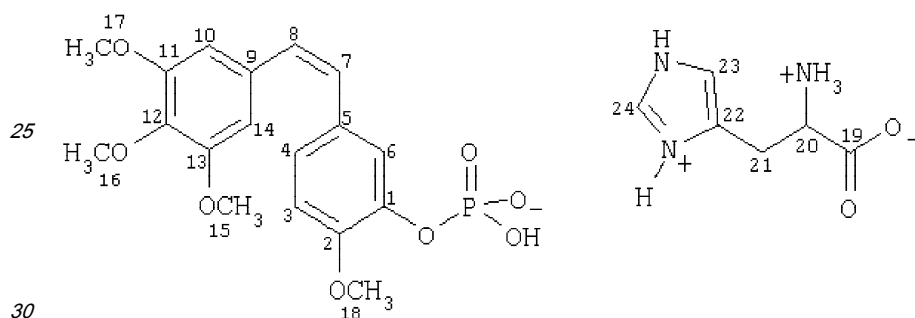


(Ib)

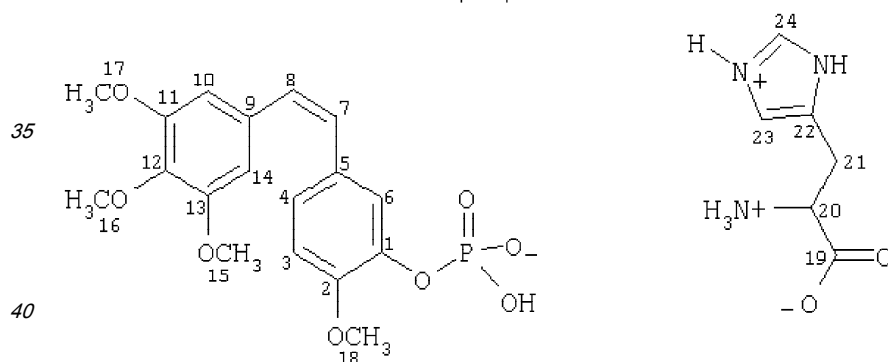


15 В другом конкретном варианте настоящее изобретение относится к способу модулирования роста опухоли или метастаза у животного, который включает введение ему эффективного количества соединения, в котором гистидин представляет собой аминокислоту и которое предпочтительно является моно-гистидиновой солью, имеющей структуру формулы Ic или Id:

20 (Ic)



(Id)



Таким образом, настоящее изобретение относится к новым и полезным пролекарственным моно- и ди-солям органических аминов, моно- и ди-солям аминокислот и моно- и ди-солям эфиров аминокислот фосфата комбретастина A4, и эти соли более растворимы в водных растворах, чем природный комбретастин A-4. Таким образом, эффективность этого лекарства может быть повышена.

Настоящее изобретение также относится к пролекарственным моно- и ди-солям органических аминов, моно- и ди-солям аминокислот и моно- и ди-соли эфиров аминокислот фосфата комбретастина A4, эти соли легко регенерируют комбретастин A4 in vivo, и эти соли при диссоциации высвобождают органический амин, аминокислоту или эфир аминокислоты в виде физиологически переносимого побочного продукта.

В наиболее предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к новой кристаллической (1:1) пролекарственной трометаминовой (ТРИС) соли антивазкулярного

противоопухолевого агента фосфата комбретастина А4, имеющей структуру формулы Ia. Это соединение представляет собой пролекарственную соль фосфата сложного эфира, в котором фосфатный фрагмент подвергается дефосфорилированию в физиологических условиях, образуя активный лекарственный остаток комбретастин А-4 (как упоминается

ниже, олефиновая группа, соединяющая мостиком фенильные остатки ядра комбретастина А4, находится в цисконфигурации; олефиновая группа предпочтительной моно-ТРИС соли фосфата комбретастина А4 также находится в цисконфигурации). ТРИС-соль 1:1 (моно) СА4Р обладает хорошими свойствами в твердом состоянии и неожиданно практически негигроскопична. Эти и другие предпочтительные свойства делают ТРИС-соль СА4Р предпочтительным соединением для фармацевтического дозированного лекарственного препарата.

Краткое описание чертежей

На Фиг.1 представлен график сорбции/десорбции влаги моно-ТРИС соли СА4Р (полученной в примере 1) при 25°C. Данные получены с использованием рычажных весов со шкалой, проградуированной в процентах влажности, VTI Model MB-300W, с пределами относительной влажности от 10 до 90% при интервале увеличения 10%. Максимальное время установления равновесия при каждом значении влажности установлено на 4 часа.

На Фиг.2 представлены спектры порошковой рентгенографии образцов моно-ТРИС соли СА4Р (полученной в примере 1), которая находится в виде суспензии в различных растворителях (вода, изопропанол, этанол, ацетонитрил и ацетон) вначале при температуре от 70 до 75°C в течение 5-10 мин, а затем при комнатной температуре в течение ночи. Рентгеновские дифрактограммы записаны с использованием рентгеновского дифрактометра Rigaku Model Miniflex с источником Cu-K α при скорости сканирования 1° в минуту от 2° до 40° 2 θ .

На Фиг.3 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (прибор Model DSC 2910, TA) моно-ТРИС соли СА4Р (полученной в примере 1), полученная в токе азота при скорости нагрева 10 градусов в минуту.

На Фиг.4 представлен график pH-растворимость моно-ТРИС соли СА4Р (полученной в примере 1) при 25°C. Значение pH устанавливают с помощью гидроксида натрия.

На Фиг.5 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3) (образец 2,0900 мг).

На Фиг.6 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.7 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.8 представлены спектры порошковой рентгенографии моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.9 представлены спектры порошковой рентгенографии моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.10 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) безводной моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.11 представлены спектры порошковой рентгенографии безводной моно-L-гистидиновой соли СА4Р (полученной в примере 3).

На Фиг.12 представлена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) моно-соли метилового эфира глицина и СА4Р (полученной в примере 4).

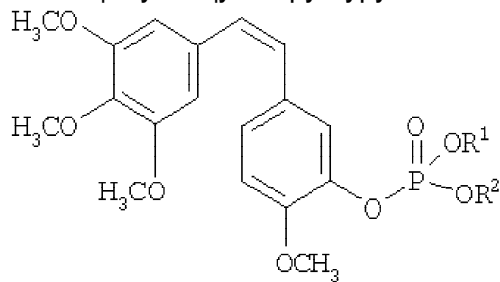
На Фиг.13 представлены спектры порошковой рентгенографии моно-соли метилового эфира глицина и СА4Р (полученной в примере 4).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на удивительном и неожиданном открытии, что могут быть получены пролекарственные моно- и ди-соли органических аминов, моно- и ди-соли аминокислот и моно- и ди-соли эфиров аминокислот фосфата комбретастина А-4, которые имеют повышенную растворимость *in vivo* по сравнению с растворимостью природного комбретастина А-4, легко регенерируют комбретастин А-4 в

физиологических условиях, и при регенерации выделяют физиологически переносимые органические амины или физиологически переносимые аминокислоты или эфиры аминокислот, которые легко метаболизируют *in vivo*.

Если говорить более широко, то настоящее изобретение относится к соединению, имеющему общую структуру:



где:

один из заместителей -OR¹ или -OR² представляет собой -O-QH⁺, а другой представляет собой гидроксил или -O-QH⁺; и

Q представляет собой

(А) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺;

(В) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺; или

(С) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

Все изомеры рассматриваемых соединений (например, изомеры, которые могут существовать из-за наличия асимметричных атомов углерода, например, на различных заместителях), в том числе энантиомерные формы и диастереомерные формы, входят в объем по настоящему изобретению. Отдельные стереоизомеры соединений изобретения могут, например, по существу не содержать другие изомеры (например, чистые или по существу чистые оптические изомеры, имеющие удельную активность) или могут быть смешаны, например, в виде рацематов или со всеми другими или другими выбранными стереоизомерами. Хиральные центры соединений по настоящему изобретению могут иметь S или R конфигурацию в соответствии с рекомендациями IUPAC 1974. Рацемические формы могут быть разделены физическими способами, такими как, например, дробная кристаллизация, разделение или кристаллизация диастереомерных производных, или путем разделения с помощью хиральной колоночной хроматографии. Индивидуальные оптические изомеры могут быть получены из рацематов любым подходящим способом. Олефиновая группа, связывающая мостиком фенильные остатки ядра комбретастина А-4, находится в цисконфигурации, которая является предпочтительной конфигурацией соединений по настоящему изобретению. Использование определения "комбретастина А-4" или "СА4" в качестве названия или части названия соединения в данном случае означает соединение в этой цисконфигурации. Также подразумеваются сольваты соединения формулы I, такие как гидраты.

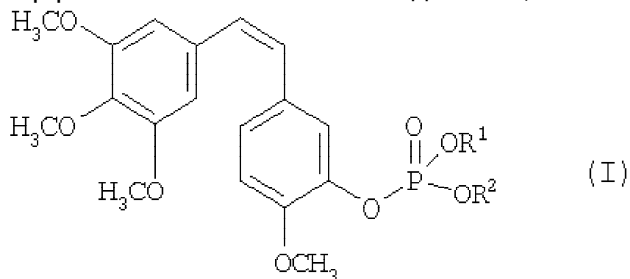
По всему описанию группы и заместители могут быть выбраны так, чтобы были получены стабильные остатки и соединения.

Варианты осуществления изобретения, представленные в документе как примеры или в качестве предпочтительных вариантов, предназначены только для иллюстрации изобретения и не ограничивают его.

В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Конечно, соединения по настоящему изобретению могут быть использованы в любой форме, такой как твердая форма или раствор (особенно водный раствор), которые также описаны ниже. Например, соединение

по настоящему изобретению может быть получено и использовано в лиофилизированной форме отдельно или с подходящими вспомогательными веществами.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу модулирования роста опухоли или метастаза у животного, который включает введение ему эффективного количества соединения, имеющего общую структуру формулы I:



где:

один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и Q представляет собой

(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

Конечно, соединение по настоящему изобретению может быть введено отдельно или в фармацевтической композиции.

Термины и выражения, используемые в документе, определены ниже и имеют указанные значения, если не оговорено особо.

В описании термины "модулируют", "модулирование" или "модуляция" относятся к изменению скорости, при которой происходит конкретный процесс, к ингибированию конкретного процесса, к обращению конкретного процесса в другую сторону и/или предупреждению начала определенного процесса. Таким образом, когда конкретный процесс включает, например, рост опухоли или метастаз, "модуляция" процесса заключается в снижении скорости, при которой развивается опухоль и/или имеет место метастаз, в ингибировании роста опухоли и/или метастаза, в обращении в обратную сторону роста опухоли и/или метастаза (включая уменьшение и/или исчезновение) и/или предупреждении роста опухоли и/или метастаза, особенно у субъекта, который предрасположен к этому процессу.

Используемое в описании выражение "эффективное количество" или "эффективное для этого количество" соединения, введенного животному, означает количество, достаточное для модулирования роста опухоли или метастаза у животного. Специалист в данной области может легко определить, например, с помощью обычных методик, эффективное количество соединения по настоящему изобретению, которое должно быть введено животному. Примеры дозированных количеств для взрослого человека составляют приблизительно от 0,05 до 1000 мг/кг веса тела активного соединения в день, которые могут быть введены в виде единичной дозы (например, в виде ударной разовой дозы или в виде вливания в течение некоторого времени до предельно допустимой дозы или ниже) или в форме отдельных поделенных доз (например, путем последовательного введения доз ниже предельно допустимой дозы), например от 1 до 4 раз в день. Следует понимать, что конкретный уровень доз и частота введения дозы любому конкретному субъекту может меняться и зависит от ряда факторов, в том числе от активности конкретного используемого соединения, массы тела, общего состояния здоровья, пола и режима питания субъекта, способа и времени введения, скорости выделения, концентрации

лекарства и серьезности конкретного состояния.

Как используется в данном описании, понятие "животное" предпочтительно включает таких субъектов, как домашние животные и, наиболее предпочтительно, людей.

Используемый в описании термин "пролекарство" относится к предшественнику

5 соединения, который будет подвергаться метаболической активации *in vivo* с образованием активного лекарственного соединения. Таким образом, например, соединение по изобретению, введенное субъекту, будет подвергаться метаболической активации, и регенерировать комбретастин А-4 вследствие диссоциации соединения по
10 настоящему изобретению, например, под действием эндогенных неспецифических фосфатаз в плазме.

Используемое в описании понятие "органический амин" относится к органическому (то есть содержащему углерод) соединению, содержащему, по меньшей мере, одну первичную (то есть $-NH_2$), вторичную (то есть $-NH-$) или третичную (то есть $\begin{array}{c} | \\ -N- \end{array}$) аминогруппу,

15 способную образовывать фосфатную соль соединения формулы I по настоящему изобретению. Когда присутствует более одной первичной, вторичной и/или третичной аминогруппы в указанном органическом амине, то любая такая группа, обладающая указанным свойством, может образовывать четвертичную аммониевую группу QH^+ формулы I. Настоящее определение "органический амин" не охватывает ни
20 аминокислотные соединения (см. предыдущую заявку под названием "Combretastatin A-4 Phosphate Mono- and Di-Amino Acid Salt Prodrugs", которая была подана Venit в виде заявки США с регистрационным номером №60/232568 14 сентября 2000, включенная в описание в качестве ссылки), ни некоторые соединения, описанные в публикации WO 99/35150 (глюкозамин, пиперазин, пиперидин, 6'-метоксицинхонан-9-ол, цинхонан-9-ол,
25 пиразол, пиридин, тетрациклин, имидазол, аденозин, верапамил, морфолин), которые введены в описание в качестве ссылки. Используемый органический амин предпочтительно представляет собой физиологически переносимое соединение, выбранное из следующих групп:

(а) органические амины, имеющие значение pK_a , больше или равное 7, более
30 предпочтительно значение pK_a , больше или равное 8;

(b) органические амины, где атом азота, образующий четвертичный аммониевый катион QH^+ в формуле I, связан с необязательно замещенной алифатической группой или с необязательно замещенной гетероциклической неароматической группой (или двумя или тремя такими необязательно замещенными алифатическими и/или гетероциклическими
35 неароматическими группами в случае вторичных или третичных аминов, соответственно). "Алифатическая группа" представляет собой линейный или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный углеводород (например, алкан, алкен или алкин), содержащий от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 12, более предпочтительно от 1 до 6 атомов углерода в цепи. "Гетероциклическая неароматическая группа" представляет собой насыщенное или
40 частично ненасыщенное кольцо, содержащее атом азота, образующий четвертичный аммониевый катион QH^+ в формуле I, а также необязательно другие гетероатомы в кольце, такие как O, S или дополнительные атомы N. "Необязательные заместители" предпочтительно представляют собой один или несколько заместителей, присутствующих в органическом амине, которые при использовании в формуле I по настоящему изобретению,
45 приводят к фосфатным солям формулы I, которые являются кристаллическими и по существу негигроскопичными или негигроскопичными. Предпочтительными "необязательными заместителями" являются гидроксильная группа, аминогруппа (то есть $-NH_2$) или алкокси-группа (то есть $-O$ -алкил), наиболее предпочтительны одна или несколько гидроксильных групп; и/или

50 (с) органические амины, где атом азота, образующий четвертичный аммониевый катион QH^+ в формуле I, представляет собой первичный амин, связанный с необязательно замещенной алифатической группой, или вторичный амин, связанный с двумя необязательно замещенными алифатическими группами, где предпочтительные

необязательные заместители представляют собой одну или несколько гидроксильных или аминогрупп, наиболее предпочтительно, гидроксильные группы.

Конечно, любой данный органический амин, выбранный в качестве предпочтительного амина для использования в настоящем изобретении, может обладать свойствами двух или

5 более групп (a)-(c), описанных выше (например, иметь значение pK_a , больше или равное 7, и быть необязательно замещенным алифатическим амином, описанным в пункте (c)).

Любой органический амин, определенный таким образом, подходит для применения в соединениях формулы I по настоящему изобретению, а также в рассматриваемых фармацевтических композициях и способах. Понятие "органический амин" включает

10 соединения в солевой форме с другими кислотными и/или основными фрагментами (где, например, одна аминогруппа образует фосфатную соль формулы I, а другая аминогруппа образует соль с кислотным остатком). Следовательно, остальная часть органического амина, входящая в соединение по настоящему изобретению, также может содержать солевые остатки.

15 Примерами органических аминов являются, но не ограничиваются только ими, трометамин, диэтаноламин, глюкамин, N-метилглюкамин, этилендиамин и 2-(4-имидазолил)этиламин.

"Моно-соль органического амина" фосфата комбретастина A-4 формулы I содержит одну органическую аминогруппу Q как часть заместителей R^1 или R^2 , как это определено

20 выше; "ди-соль органического амина" фосфата комбретастина A-4 формулы I содержит две органические аминогруппы Q, одну как часть заместителя R^1 и одну как часть заместителя R^2 , как это определено выше. Предпочтительными являются "моно-соли органических аминов" формулы I. Соответствующие определения применяются к "моно-

25 соли аминокислоты", "ди-соли аминокислоты", "моно-соли эфира аминокислоты" и "ди-соли эфира аминокислоты".

Любая подходящая аминокислота находит применение в данном случае, включая множество природных и неприродных аминокислот, находящих применение в соединении по настоящему изобретению. Конкретными примерами являются, но, конечно, не

30 ограничиваются только ими, орнитин, гистидин, лизин, аргинин и триптофан. Как используется в данном описании, определение "аминокислота" относится к соединению, содержащему основную аминогруппу (NH_2) и кислотную карбоксильную

группу ($COOH$), в том числе такие соединения в форме цвиттер-иона (где амино- и карбоксильные группы вместе образуют цвиттер-ион или внутреннюю соль) или в солевой

35 форме с другими кислотными и/или основными остатками (где, например, аминокислота содержит карбоксильную группу, помимо α - $COOH$ -группы, и первая находится в солевой форме со щелочным металлом). Таким образом, остальная часть аминокислоты,

находящаяся в соединении по настоящему изобретению, также может содержать солевые фрагменты. Определение включает неприродные, а также природные аминокислоты, такие

40 как α -аминокислоты (в особенности L-аминокислоты), многие из которых являются строительными блоками белков. Определение "природные аминокислоты" относится к 20 аминокислотам, которые являются типичными для всех белков, то есть, глицин, аланин,

валин, лейцин, изолейцин, пролин, серин, треонин, цистеин, метионин, аспарагин, глутамин, фенилаланин, тирозин, триптофан, лизин, аргинин, гистидин, аспартат и

45 глутамат. Определение "неприродные аминокислоты" относится к аминокислотам, которые не являются обычными в белках, такие как 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, N-метиллизин, γ -карбоксиглутамат, селеноцистеин, орнитин и цитруллин. Аминокислоты,

содержащие два или несколько атомов азота, подходят для использования в соединениях формулы I по настоящему изобретению, когда Q имеет определение (B), а также в рассматриваемых фармацевтических композициях и способах.

50 Используемое в данном описании в связи с аминокислотой выражение "боковая цепь" означает такой остаток аминокислоты, который является разным для каждой аминокислоты, и особенно к группе, связанной с атомом углерода, соединяющим $-NH_2$ и $-COOH$ группы аминокислоты.

Используемое в описании определение "по существу негигроскопично", в отношении соединения, предпочтительно означает менее чем 1%-ное увеличение массы воды на массу соединения (более предпочтительно менее чем 0,5%-ное увеличение массы воды на массу соединения), измеренное при следующих условиях: температура приблизительно

25 °C, относительная влажность от 20 до 95% и при равновесном состоянии (например, измеренная тогда, когда скорости сорбции и десорбции влаги выравниваются) относительно измерений, проведенных при 25°C и при относительной влажности 0%.

Используемое в данном описании определение "негигроскопично", в отношении соединения, предпочтительно означает не измеряемое увеличение массы воды на массу соединения в описанных выше условиях.

Используемое в данном описании со ссылкой на аминокислоту определение "эфир" относится к карбоксильной группе кислоты (то есть, к группе -COOH) аминокислоты, которая находится в форме -COO(G), где G представляет собой органический остаток, такой как незамещенная или замещенная алкильная, алкенильная, алкинильная,

циклоалкильная, циклоалкенильная, арильная или гетероциклическая группа. Предпочтительными в качестве групп G являются C₁₋₆-алкильные группы, такие как метильная или этильная. Наиболее предпочтительными в качестве эфиров аминокислот являются C₁₋₆-алкиловые эфиры глицина, такие как метиловый эфир глицина или этиловый эфир глицина.

Используемое в данном описании определение "соль" относится к соединению по настоящему изобретению, которое представляет собой ионное соединение, например, имеющее ионную связь между четвертичным атомом азота фрагмента QN⁺ органического амина, аминокислоты или эфира аминокислоты и фосфатным остатком фосфата комбретастина A4.

Используемое в описании понятие "ионная связь" представляет собой химическую связь, которая образована электростатическим притяжением между положительным и отрицательным ионами или химическими структурами. Такая связь может легко диссоциироваться (или ионизироваться) в водном растворе. Растворение соединения по настоящему изобретению в растворителе, в особенности в водном растворителе, а также лиофилизация такого раствора, представляют собой варианты осуществления, охватываемые настоящим изобретением.

Используемое в настоящем изобретении выражение "физиологически допустимый" при описании химического образца, присутствующего *in vivo*, такого как органический амин,

аминокислота или эфир аминокислоты, относится к неспособности химического образца индуцировать побочные эффекты, неприемлемые в условиях лечения животного.

Предпочтительно "физиологически допустимые" химические образцы не вызывают вредных побочных эффектов.

Как объяснялось выше, настоящее изобретение относится к способу модулирования роста или метастаза опухолей, предпочтительно твердых опухолей, с использованием соединения по настоящему изобретению. Используемое в данном описании понятие "опухоль" или "рост опухоли" можно применять взаимозаменяемо, и оно относится к аномальному росту ткани в результате неконтролируемого прогрессирующего увеличения числа клеток и не выполняющих никакой физиологической функции. Твердая опухоль может быть злокачественной, например, иметь тенденцию давать метастазы и угрожать жизни, или доброкачественной. Примерами твердых опухолей, которые можно лечить в соответствии со способом по настоящему изобретению, являются саркомы и карциномы, такие как, но без ограничения ими: фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, лимфома, такая как non-Hodgkin's лимфома, остеогенная саркома, хордома, опухоли пищевода, ангиосаркома, остеосаркома, эндотелиальная саркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиальная саркома, синовиома, синовиальная саркома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак легких, такой как метастатический рак легких, рак яичников, рак простаты, плоскоклеточный

рак, базально-клеточный рак, аденокарцинома, аденокарцинома толстой кишки и прямой кишки, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатома, метастазы печени, рак желчных протоков, кардиокарцинома, семинома, эмбриональный рак, рак щитовидной железы, такой как недифференцированный мелкоклеточный рак щитовидной железы, медуллярный рак щитовидной железы, опухоль Вильмса, цервикальный рак, тестикулярная опухоль, опухоли легких, такие как немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, эпителиальный рак, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая невриома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Некоторые опухоли, включающие диспролиферативные изменения (такие как метаплазия и дисплазия), можно лечить или предупреждать с помощью соединения или способа по настоящему изобретению в эпителиальных тканях, таких как шейка, пищевод и легкие. Таким образом, настоящее изобретение предлагает лечение состояний, для которых известно или предполагается прогрессирующее развитие новообразования или рака, в особенности, когда имеет место не образующий опухоли рост клеток, включающий гиперплазию, метаплазию и в особенности дисплазию (для знакомства с такими состояниями аномального роста см. публикацию Robbins, Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.68-79). Гиперплазия имеет форму неконтролируемой пролиферации клеток, которая включает рост числа клеток в ткани или органе без значительного изменения структуры или функции. Одним из примеров является эндометриальная гиперплазия, часто предшествующая эндометриальному раку. Метаплазия представляет собой форму контролируемого роста клеток, при котором один тип зрелых или полностью дифференцированных клеток замещается другим типом зрелых клеток. Метаплазия может иметь место в клетках эпителиальных или соединительных тканей. Нетипичная метаплазия создает до некоторой степени беспорядочный метапластичный эпителий. Дисплазия часто является предшественником рака и выявлена в основном в эпителии; она является наиболее беспорядочной формой не образующего опухоли роста клеток, которая вызывает потерю индивидуальной клеточной информации и архитектурной ориентации клеток. Диспластичные клетки часто имеют аномально большие, сильно окрашенные ядра, и проявляют плеоморфизм. Обычно дисплазия имеет место, когда существует хроническое раздражение или воспаление, и часто идентифицируется на шейке, дыхательных путях, в ротовой полости и желчном пузыре. Обзор таких заболеваний см., например, в публикации Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia.

Другие виды опухолей, которые являются доброкачественными и которые можно лечить с помощью соединения и способа по настоящему изобретению, представляют собой артериовенозные (АВ) мальформации, в частности во внутричерепных участках, и myoleomas.

Соединения по настоящему изобретению также могут быть полезны при лечении не злокачественных сосудистых пролиферативных заболеваний, таких как дегенерация желтого пятна, псориаз и рестеноз, и в целом при лечении воспалительных заболеваний, характеризующихся сосудистой пролиферацией. Такие заболевания и расстройства описаны в публикации WO 00/48606, которая введена в описание в качестве ссылки.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение по настоящему изобретению, описанное выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Выражение "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным объектам и композициям, которые физиологически допустимы и предпочтительно не дают аллергических или аналогичных нежелательных реакций, таких как желудочно-кишечные расстройства, головокружение и т.д., при введении человеку. Предпочтительно, как используется в данном описании, "фармацевтически приемлемый"

означает одобрение регулирующим органом Федерального или Национального правительства или перечисление в Фармакопее США или в другой общеизвестной Фармакопее для применения у животных и в особенности у человека. Определение "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, наполнителю и растворителю, с которым

5 вводится соединение. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного и синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, кунжутное масло, спирты, например этанол, пропанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, сорбит, глицерин и др., Cremophor и др., в том числе их смеси. Вода,

10 водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также предпочтительно используются в качестве носителей, в особенности в качестве растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические носители описаны в публикации "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W.Martin.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть предназначена

15 для введения путем инъекции или для перорального, легочного, назального, трансдермального, внутриглазного введения или для других форм введения. Обычно в настоящем изобретении подразумеваются фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество соединения по настоящему изобретению, например, вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, солюбилизующими

20 агентами, эмульгирующими агентами, адъювантами и/или другими носителями. Такие композиции включают разбавители с различным содержанием буферов (таких как, например, ТРИС и другие амины, карбонаты, фосфаты, аминокислоты, например, гидрохлорид глицинамида (особенно при значениях pH в физиологическом интервале), N-глицилглицин, фосфат натрия или калия (двухосновный, трехосновный) и др. или ТРИС-HCl

25 или -ацетат), с различными значениями pH или ионной силы; добавки, такие как детергенты и солюбилизующие агенты (например, поверхностно-активные вещества, такие как Pluronic, Tween 20, Tween 80 (Polysorbate 80), Cremophor, полиолы, такие как полиэтилен-гликоль, пропиленгликоль и др.), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислоты, метабисульфит натрия), консерванты (например, Thimersol, бензиловый спирт,

30 парабены и др.) или создающие объем вещества (например, сахара, такие как сахароза, лактоза, маннит, полимеры, такие как поливинил-пирролидоны или декстран, и др.); и/или предполагают введение материала в рецептуры в виде частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и др., или в липосомы. Гиалуроновая кислота также может быть использована. Такие соединения могут

35 быть использованы для влияния на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения in vivo и скорость расщепления in vivo соединения по настоящему изобретению. См., например, публикацию "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th-Edition, (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), pp.1435-1712, которая включена в описание в качестве ссылки. Композиции, например, могут быть получены в жидкой форме

40 или могут находиться в виде сухого порошка, такого как лиофилизированная форма. Конкретные способы введения таких композиций описаны ниже.

Если необходимо, то значение pH можно регулировать. Например, для увеличения растворимости соединений по настоящему изобретению предпочтительно доводить значение pH фармацевтических композиций, содержащих эти соединения, до значения pH

45 больше чем 7, более предпочтительно до значения pH более 8 (например, до 8,5).

В случае пролекарственных солей CA4P формулы I по настоящему изобретению образование активного исходного соединения (CA4) происходит при низких значениях pH. Заявители по настоящему изобретению установили, что добавление буфера/(агента, регулирующего pH) предотвращает падение pH во время вымораживания, обеспечивая в

50 результате более стабильный лиофильный препарат. Также неожиданно установлено, что в случае лиофильных препаратов пролекарственных солей CA4P, таких как соли формулы I по настоящему изобретению, использование для регулирования pH гидроксида натрия в качестве pH-регулирующего агента может привести к образованию активного исходного

соединения (цис) СА4 (которое минимально растворимо в воде и может образовывать нежелательные осадки в водном растворе) и что применение рН-регулирующего агента, отличающегося от гидроксида натрия, может уменьшить образование СА4. Применение ТРИС в качестве рН-регулирующего агента и буфера уменьшает, например, образование

5 активного исходного соединения (цис) СА4 в сравнении с использованием гидроксида натрия в качестве рН-регулирующего агента и, следовательно, особенно предпочтительно для использования в композициях по настоящему изобретению. Например, в случае соединений формулы I, когда Q представляет собой ТРИС или гистидин, отмечено, что
 10 лиофильные препараты, полученные с использованием NaOH в качестве рН-регулирующего агента, при хранении гидролизуются до исходного цис-СА4, тогда как использование для регулирования рН подходящего буферного агента, отличного от NaOH, например ТРИС, снижает образование нерастворимого исходного вещества. Таким образом, в соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтическим лиофильным композициям по настоящему изобретению и рН-регулирующему агенту, отличному от
 15 гидроксида натрия, предпочтительно содержащему органическое основание, такое как аминокислота или органический амин, в особенности ТРИС, в качестве рН-регулирующего агента. Таким образом, хотя использование гидроксида натрия в лиофильных композициях по настоящему изобретению входит в объем изобретения, такое применение менее предпочтительно, например, в случае фармацевтических композиций, которые должны
 20 быть введены внутривенно, когда образование твердых веществ нежелательно.

Могут быть получены фармацевтические композиции, например, растворы (в особенности водные растворы, например, при концентрации 15 мг/мл, 30 мг/мл и 60 мг/мл), содержащие соединение по настоящему изобретению и рН-регулирующий агент, в том числе гидроксид натрия, предпочтительно содержащее органическое основание, такое
 25 как аминокислота, такая как аргинин, глицин, или органический амин, например, этаноламин, в особенности ТРИС, в качестве рН-регулирующего агента. Стабильность водных растворов повышается по мере увеличения рН препарата от 9,0 до 10,5. Стабильность раствора также становится выше при более высоких значениях ионной силы. Например, препарат в виде раствора с NaOH в качестве рН-регулирующего агента при рН
 30 10 может проявлять стабильность, сравнимую со стабильностью лиофилизированного препарата, полученного с ТРИС в качестве буферного агента при рН 8,5.

В случае композиций по настоящему изобретению предпочтительно используется защита от света.

Способы модулирования роста опухолей или метастаза

35 Комбретастатин А-4 представляет собой очень эффективный антимиотический агент, полученный из древесного ствола *Combretum saffrum*, и проявляет высокую токсичность в отношении широкого спектра линий раковых клеток человека. Следовательно, введение соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту может уменьшить рост опухоли и/или метастаз у больного и, с другой стороны, если у
 40 больного нет обнаруживаемого метастаза или роста опухолей, будет предупреждать метастаз и/или рост опухоли. Конечно, соединение по настоящему изобретению может быть введено отдельно или вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способам модулирования роста опухоли или метастаза, который включает введение эффективного количества
 45 пролекарственной моно- или ди-соли органического амина фосфата комбретастатина А-4 по настоящему изобретению, которая легко регенерирует комбретастатин А-4 *in vivo*. Как указывалось выше, выражение "эффективное количество", используемое в описании, относится к количеству соединения по настоящему изобретению, которое введено субъекту и которого достаточно для модулирования роста опухоли или метастаза так, чтобы
 50 уменьшить рост опухоли и метастаз у животного или, с другой стороны, предупредить образование раковой опухоли у животного, у которого до введения соединения образования опухоли не наблюдалось. Квалифицированный в данной области специалист может легко определить эффективное количество соединения по настоящему изобретению

для введения, например, с использованием обычных методик.

Кроме того, в способе по настоящему изобретению находят применение многочисленные средства введения соединения по настоящему изобретению. В частности, соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть
 5 введена парентерально, через слизистые, например перорально, назально или ректально, или трансдермально. Предпочтительно введение осуществляют парентерально, например, путем внутривенной инъекции, а также, в том числе, но без ограничения, путем
 10 внутриартериального, внутримышечного, интрадермального, подкожного, внутрибрюшинного, интравентикулярного и интракраниального введения. Соединение или фармацевтическая композиция могут быть, например, введены путем инъекции в
 опухоль(и), которая(ые) подвергается(ются) лечению, или в ткани, окружающие опухоль(и). Понятие "агент, повышающий проницаемость слизистых", относится к реагенту, который
 15 увеличивает скорость или способность проникновения через слизистые соединения по настоящему изобретению, к такому как, но без ограничения, соль желчных кислот, жирная
 20 кислота, поверхностно-активное вещество или спирт. В конкретном варианте осуществления изобретения агент, повышающий проницаемость, может представлять собой холат натрия, додецилсульфат натрия, деоксихолат натрия, тауродооксихолат, гликохолат натрия, диметилсульфоксид или этанол. Подходящие агенты, повышающие проницаемость, также включают глицирретиновую кислоту (патент США №5112804,
 Kowarski) и полисорбат-80, причем последний в комбинации с неионным поверхностно-активным веществом, таким как ноноксинол-9, лаурет-9, полоксамер-124, октоксинол-9 или лаурамид-DEA (Европейский патент EP 0242643 B1, Stoltz).

В другом варианте осуществления метода по настоящему изобретению соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут доставляться в
 25 везикуле, в особенности в липосоме (см. Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., Liposomes in the therapy of infectious disease and cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp.353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, pp. 317-327; см. в целом там же).

В еще одном варианте по настоящему изобретению такое соединение и такая
 30 фармацевтическая композиция могут быть доставлены с помощью системы с контролируемым высвобождением, например, с использованием внутривенного вливания, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В специальном варианте осуществления изобретения может быть использован насос [см. Langer, см. выше; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201
 35 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)]. В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы [см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J.
 40 Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983; см. также Levy et al., Science 228: 190 (1985); During et al., Ann Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71: 105 (1989)]. В еще одном варианте осуществления изобретения система с контролируемым высвобождением может быть помещена в непосредственной близости от целевых тканей субъекта, потребляя, таким образом, только часть системной дозы [см., например,
 45 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, см. выше, Vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. Предпочтительно устройство с контролируемым высвобождением вводят животному в непосредственной близости к участку с неадекватной иммунной активацией или опухолью. Другие системы с контролируемым высвобождением лекарства обсуждаются в обзоре Langer [Science 249:1527-1533 (1990)].

50 Парентеральное введение

Как указывалось выше, соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть введены больному парентерально и, следовательно, исключается введение через желудочно-кишечный тракт. Конкретные методики парентерального

введения, находящие применение, включают, но без ограничения, внутривенные инъекции (путем введения разовой ударной дозы или вливанием), внутривенные инъекции, подкожные инъекции, внутримышечные инъекции или катетеризации, причем называются только некоторые из них. Примерами композиций для парентерального введения являются

- 5 инъектируемые растворы или суспензии, которые могут содержать, например, подходящие нетоксичные приемлемые для парентерального введения разбавители или растворители, такие как маннит, 1,3-бутандиол, вода, буферные водные системы, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и другие подходящие диспергирующие или смачивающие и суспендирующие агенты, включая синтетические
- 10 моно- или диглицериды, и жирные кислоты, включая олеиновую кислоту, спирты и/или Cremophor. Если необходимо, то можно отрегулировать значение pH.

Назальная доставка

- Для соединения или композиции по настоящему изобретению также предусмотрена назальная доставка или доставка через слизистые. Назальная доставка дает возможность
- 15 такому соединению поступать в кровяной поток непосредственно после введения эффективного количества соединения в нос без необходимости осаждения продукта в легком. Препараты для назальной доставки включают препараты с декстраном или циклодекстрином, а также с другими полимерами, такими как поливинилпирролидон, метилцеллюлоза или другие целлюлозы.

- 20 В случае назального введения приемлемым устройством является небольшой, твердый флакон, к которому прикреплен дозирующий распылитель. В одном из вариантов отмеренная доза высвобождается за счет продвижения соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в камеру определенного объема, которая имеет отверстие, имеющее размеры такие, чтобы высвобождать аэрозольную рецептуру путем
- 25 формирования распыла, когда жидкость в камере сжимается. Камеру сжимают, чтобы ввести соединение или фармацевтическую композицию. В конкретном варианте осуществления изобретения камера выполнена с поршневым устройством. Такие устройства являются коммерчески доступными.

- С другой стороны, может быть использован пластиковый сдавливаемый флакон,
- 30 имеющий отверстие или щель с размерами, обеспечивающими высвобождение аэрозольного препарата. Образование аэрозоля происходит тогда, когда флакон сдавливают. Отверстие обычно находится в верхней части флакона, и верхняя часть обычно сужается так, чтобы входить в носовые проходы для обеспечения эффективного введения аэрозольного препарата. Предпочтительно, назальный ингалятор будет давать
- 35 отмеренное количество аэрозольного препарата для введения отмеренной дозы соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Для высвобождения через слизистые также подразумевается использование агентов, повышающих проницаемость.

Легочная доставка

- 40 Также подразумевается легочная доставка соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть доставлены к легким млекопитающего во время ингаляции и проходят через внутренний эпителиальный слой легкого в кровеносную систему. Другие сообщения на эту тему включают публикации Adjei et al.,
- 45 [Pharmaceutical Research, 7:565-569 (1990); Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (1990)(ацетат лейпролида), Braquet et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13 (suppl. 5):143-146 (1989) (эндотелин-1-); Hubbard et al., Annals of Internal Medicine, Vol.III, pp.206-212 (1989) (α 1-антитрипсин); Smith et al., J. Clin. Invest., 84:1145-1146 (1989) (α 1-протеиназа); Oswein et al., "Aerosolization of
- 50 Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March (1990) (рекомбинантный фактор роста человека); Debs et al., J. Immunol. 140:3482-3488 (1988) (γ -интерферон и фактор некроза опухоли), Platz et al., патент США №5284656 (фактор стимуляции роста колоний гранулоцитов)]. Способ и

композиция для легочной доставки лекарства системного действия описаны в патенте США №5451569, выданном 19 сентября 1995 (Wong et al.).

В практике по настоящему изобретению предполагается использование широкого спектра механических устройств, выполненных для легочной доставки терапевтических
 5 продуктов, включая, но без ограничения, распылители, дозирующие ингаляторы и порошковые ингаляторы, которые все известны квалифицированным в данной области специалистам. Что касается конструкции устройства для доставки, то в практике по настоящему изобретению может быть использована любая форма создания аэрозолей, известная в данной области, включая, но без ограничения, распылительные флаконы,
 10 распыление, диспергирование или создание аэрозоля с помощью насоса из жидких композиций, а также распыление сухого порошкового препарата.

Некоторые конкретные примеры коммерчески доступных устройств, приемлемых в практике по настоящему изобретению, включают распылитель Ultravent, производимый Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; распылитель Acorn II, производимый Marquest
 15 Medical Products, Englewood, Colorado; дозирующий ингалятор Ventolin, производимый Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; и порошковый ингалятор Spinhaler, производимый Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Такие устройства требуют использования препаратов, подходящих для диспергирования фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Обычно такой препарат
 20 является специфичным для используемого типа устройства и может включать использование подходящего пропелланта, помимо обычных разбавителей, адъювантов и/или других носителей, находящих применение в терапии. Также подразумевается использование липосом, микрокапсул или микросфер, комплексов включения или других типов носителей. Также может быть получена химически модифицированная
 25 фармацевтическая композиция по настоящему изобретению в различных препаратах в зависимости от типа химической модификации или типа используемого устройства.

Препараты, приемлемые для использования в распылителе, или в струйном или ультразвуковом, обычно будут включать соединение фармацевтической композиции по настоящему изобретению, растворенное в воде при концентрации приблизительно от 0,1
 30 до 25 мг биологически активных ингредиентов на мл раствора. Препарат может включать буфер или простой сахар (например, для стабилизации или регулирования осмотического давления фармацевтической композиции по настоящему изобретению). Препарат для распыления может также содержать поверхностно-активное вещество, чтобы уменьшить или исключить поверхность, индуцирующую образование агрегатов соединения или
 35 фармацевтической композиции по настоящему изобретению, вызванное распылением раствора при образовании аэрозоля.

Препараты для использования в дозирующих ингаляторах обычно будут содержать, например, тонко измельченный порошок, содержащий соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, суспендированные в пропеллантах с помощью
 40 поверхностно-активного вещества. Пропелланта может представлять собой любой подходящий материал, используемый для этих целей, такой как хлорфторуглерод, хлорфторуглеводород, фторуглеводород или углеводород, в том числе трихлорфторметан, дихлордифторметан, дихлортетрафторэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан или их комбинации. Подходящими поверхностно-активными веществами являются сорбитантриолеат и соевый
 45 лецитин. Олеиновая кислота также может быть использована в качестве поверхностно-активного вещества.

Жидкие аэрозольные препараты содержат соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и диспергирующий агент в физиологически приемлемом разбавителе. Сухие порошковые аэрозольные препараты могут содержать
 50 тонко измельченную твердую форму соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и диспергирующий агент. Независимо от того, является ли препарат жидким или сухим порошковым аэрозольным препаратом, он должен быть распылен. То есть он должен быть разбит до жидких или твердых частиц, чтобы

гарантировать, что распыленная доза действительно достигает слизистых мембран носовых проходов или легкого. Определение "аэрозольная частица" используется в данном случае для описания жидких и твердых частиц, подходящих для назального или легочного введения, то есть которые будут достигать слизистых мембран. Другими заслуживающими

5 внимания вопросами являются конструкция устройства для доставки, дополнительные компоненты в рецептуре и характеристики частиц. Эти аспекты назального или легочного введения лекарства также хорошо известны в данной области и манипуляции с препаратами, средствами получения аэрозоля и конструкциями устройства для доставки легко могут быть осуществлены квалифицированными в данной области специалистами.

10 В конкретном варианте осуществления изобретения среднемассовый динамический диаметр составляет 5 мкм или менее для того, чтобы гарантировать, что частицы лекарства достигают легочных альвеол (Wearley L.L., 1991, 1991, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems, 8:333).

Как указывалось выше, в конкретном варианте осуществления изобретения устройство для распыления представляет собой дозирующий ингалятор. Дозирующий ингалятор обеспечивает конкретную дозу при применении, а не различные дозы в зависимости от применения. Такой дозирующий ингалятор можно использовать или с жидким или с сухим порошковым аэрозольным препаратом. Дозирующие ингаляторы также хорошо известны в данной области.

20 Часто распыление жидкого или сухого порошкового препарата для ингаляции в легкие требует использования пропелланта. Пропелланта может представлять собой любой подходящий материал, обычно используемый в данной области. Конкретными не ограничивающими примерами таких полезных пропелланта являются хлорфторуглерод, хлорфторуглеводород, фторуглеводород или углеводород, в том числе трихлорфторметан,

25 дихлордифторметан, дихлортетрафторэтанол и 1,1,1,2-тетрафторэтан или их комбинации. Системы доставки аэрозолей, такие как работающие под давлением дозирующие ингаляторы и ингаляторы для сухого порошка описаны в публикации Newman S.P., Aerosols and the Lung, Clarke S.W., Davia D., editors, pp. 197-22, и они могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением.

30 Жидкие аэрозольные препараты

Настоящее изобретение предлагает жидкие аэрозольные препараты и дозированные лекарственные формы соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В целом, такие дозированные формы содержат соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в фармацевтически

35 приемлемом разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают, но не ограничиваются только ими, стерильную воду, физиологический раствор, буферный физиологический раствор, раствор декстрозы и др. В конкретном варианте осуществления изобретения разбавитель, который может быть использован в настоящем изобретении или в фармацевтическом препарате по настоящему изобретению, представляет собой

40 физиологический раствор с фосфатным буфером или буферный физиологический раствор обычно с pH 7,0-8,0 или воду.

Жидкий аэрозольный препарат по настоящему изобретению может включать в качестве необязательных ингредиентов фармацевтически приемлемые носители, разбавители, солюбилизующие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества и

45 наполнители.

Препараты рассматриваемого варианта изобретения также могут включать другие агенты, полезные для поддержания pH, стабилизации раствора или регулирования осмотического давления. Примерами таких агентов являются, но не ограничиваются только ими, соли, такие как хлорид натрия или хлорид калия, и углеводы, такие как глюкоза,

50 галактоза или манноза, и др.

Аэрозольные сухие порошковые препараты

Также подразумевается, что рассматриваемый аэрозольный препарат может быть получен в виде сухого порошкового препарата, содержащего тонкоизмельченную

порошкообразную форму соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и дисперсант.

Препараты для диспергирования из устройства для ингаляции порошка могут содержать тонко измельченный сухой порошок, содержащий соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, и также могут включать создающий объем агент, такой как лактоза, сорбит, сахароза или маннит, в количествах, которые облегчают рассеивание порошка из устройства, например, от 50 до 90% масс. из расчета на препарат. Соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению преимущественно должны быть получены в форме частиц со средним размером частиц менее 10 мкм, наиболее предпочтительно от 0,5 до 5 мкм, для наиболее эффективной доставки к отдаленным участкам легкого.

В другом варианте осуществления изобретения сухой порошковый препарат может содержать тонко измельченный сухой порошок, содержащий соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, диспергирующий агент и создающий объем агент. Создающие объем агенты, которые могут быть использованы в комбинации с рассматриваемой композицией, включают такие агенты, как лактоза, сорбит, сахароза или маннит, в количествах, которые облегчают рассеивание порошка из устройства.

Трансдермальное введение

В данной области известны различные и многообразные способы трансдермального введения лекарственного средства, например, с помощью трансдермальных пластырей. Трансдермальные пластыри описаны, например, в патенте США №5407713, выданном 18 апреля 1995 Rolando et al.; патенте США №5352456, выданном 4 октября 1994 Fallon et al.; патенте США №5332213, выданном 9 августа 1994 D'Angelo et al.; патенте США №5336168, выданном 9 августа 1994 Sibalis; патенте США №5290561, выданном 1 марта 1994 Farhadieh et al.; патенте США №5254346, выданном 19 октября 1993 Tucker et al.; патенте США №5164189, выданном 17 ноября 1992 Berger et al.; патенте США №5163899, выданном 17 ноября 1992 Sibalis; патентах США №№5088977 и 5087240, выданных 18 февраля 1992 Sibalis; патенте США №5008110, выданном 16 апреля 1991 Benecke et al.; и патенте США №4921475, выданном 1 мая 1990 Sibalis; описание каждого из патентов введено целиком в качестве ссылки.

Можно легко заметить, что трансдермальный способ введения может быть улучшен за счет агента, усиливающего дермальную проницаемость, например, таких усиливающих агентов, которые описаны в патенте США №5164189 (см. выше), патенте США №5008110 (см. выше) и патенте США №4879119 (см. выше), выданном 7 ноября 1989 Aruga et al., причем описание каждого из патентов введено в качестве ссылки.

Более того, соединение и фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть введены местно. Например, соединение может быть смешано с мазью-носителем с получением композиции, которую можно втирать в кожу. С другой стороны, соединение по настоящему изобретению может быть растворено в растворителе, который известен как хорошо проникающий через кожу. Конкретным примером такого растворителя является диметилсульфоксид (ДМСО). Также подразумевается использование гелевых препаратов.

Пероральная доставка

В данном случае подразумевается использование пероральных твердых дозированных лекарственных форм, которые описаны в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-th Ed., 1990 (Mack Publishing Co., Easton PA 18042), в главе 89, которая включена в данное описание в качестве ссылки. Твердые дозированные лекарственные формы включают, например, таблетки, капсулы, пилюли, пастилки или лепешки, облатки или пеллеты. Кроме того, для приготовления препаратов соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть использовано липосомальное или протеиноидное капсулирование (как, например, протеиноидные микросферы, представленные в патенте США №4925673). Может быть использовано липосомальное

капсулирование, и липосомы могут быть дериватизированы различными полимерами (см., например, патент США №5013556). Описание возможных дозированных лекарственных форм для терапевтического применения приведено в публикации: Marshall K. "Modern Pharmaceutical", Ed. G.S. Banker, C.T. Rhodes, Chapter 10, 1979, которая введена в

- 5 описание в качестве ссылки. Препарат может содержать соединение или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и инертные ингредиенты, которые обеспечивают защиту от желудочной среды и высвобождают биологически активный материал в кишечнике.

- Также подразумеваются пероральные дозированные лекарственные формы соединения
10 по настоящему изобретению, в которых соединение может быть химически модифицировано, для того чтобы пероральная доставка производного была эффективной. Обычно рассматриваемая химическая модификация представляет собой присоединение, по меньшей мере, одного фрагмента к самой молекуле, где фрагмент обеспечивает (а) ингибирование протеолиза; и (b) поглощение в кровяной поток из желудка или кишечника.
15 Также желательно повышение общей стабильности соединения по настоящему изобретению и увеличение времени циркуляции в организме. Примерами таких фрагментов являются: полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и полипролин (Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", Enzymes as
20 Drugs, Hecenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp.367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem., 4:185-189. Другими полимерами, которые могут быть использованы, являются поли-1,3-диоксолан и поли-1,3,6-тиоксокан. Предпочтительными для названного выше фармацевтического применения являются полиэтиленгликолевые фрагменты.

- 25 Для соединения по настоящему изобретению участком высвобождения может быть желудок, тонкий кишечник (двенадцатиперстная кишка, тонкая кишка или подвздошная кишка) или толстая кишка. Квалифицированный в данной области специалист может легко приготовить препараты, которые не будут растворяться в желудке, но, тем не менее, будут высвобождать соединение по настоящему изобретению в двенадцатиперстной кишке
30 или в любом месте кишечника. Предпочтительно такое высвобождение будет исключать отрицательное действие желудочной среды или за счет защиты соединения или в результате высвобождения биологически активного материала ниже желудочной среды, например, в кишечнике.

- Для обеспечения полной желудочной устойчивости важным является покрытие,
35 непроницаемое, по меньшей мере, при pH 5,0. Примерами более обычных инертных ингредиентов, которые могут быть использованы в качестве кишечных покрытий, являются тримеллитат ацетата целлюлозы (ТАЦ), фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (ФГПМЦ), ФГПМЦ 50, ФГПМЦ 55, фталат поливинилацетата (ФПА), Eudragit L30D, Aquateric, фталат ацетата целлюлозы (ФАЦ), Eudragit L, Eudragit S и Shellac. Такие покрытия также могут
40 быть использованы в виде смешанных пленок.

- На таблетках также могут быть использованы покрытие или смесь покрытий, которые не предназначены для защиты от желудочной среды. Они могут включать покрытия из сахара или покрытия, которые делают таблетки более легкопроглатываемыми. Капсулы могут состоять из твердой оболочки (такой как желатиновая оболочка) для высвобождения
45 сухого терапевтического средства, например порошка; в случае жидких форм может быть использована мягкая желатиновая оболочка. Материал оболочки облаток может представлять собой толстую крахмальную или другую пищевую бумагу. В случае пилуль, лепешек, формованных таблеток или растертых в порошок таблеток могут быть использованы методики увлажнения массы.

- 50 Соединения по настоящему изобретению, например, могут быть включены в препарат в виде тонко измельченных мультичастиц в форме гранул или пеллет с размером частиц приблизительно 1 мм. Препарат материала для введения в капсулах также может быть в виде порошка, слегка спрессованной массы или даже в виде таблеток. Кроме того,

соединение или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть получены путем прессования.

Также могут быть использованы красители и вещества, корректирующие вкус и запах. Например, соединение может быть приготовлено в виде препарата (например, путем

5 капсулирования в липосомы или микросферы), а затем дополнительно введено в пищевой продукт, такой как охлажденный напиток, содержащий красители и вкусовые добавки.

Можно разбавлять или увеличивать объем соединения по настоящему изобретению или фармацевтической композиции с помощью инертного материала. Такие разбавители могут включать углеводы, в особенности маннит, α -лактозу, безводную лактозу, целлюлозу, 10 сахарозу, модифицированные декстраны и крахмал. Некоторые неорганические соли также могут быть использованы в качестве наполнителей, включая трифосфат кальция, карбонат магния и хлорид натрия. Некоторыми коммерчески доступными разбавителями являются Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress и Avicell.

В препарат фармацевтической композиции по настоящему изобретению в твердой 15 дозированной лекарственной форме могут быть включены разрыхлители. Материалы, используемые в качестве разрыхлителей, представляют собой, но не ограничиваются только ими, крахмал, включая коммерческий разрыхлитель на основе крахмала, Explotab. Могут быть использованы натриевая соль гликолата крахмала, Amberlite, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, ультрамилопектин, альгинат натрия, желатин, кожура 20 апельсина, кислая карбоксиметилцеллюлоза, природная губка и бентонит. Другой формой разрыхлителей являются нерастворимые катионообменные смолы. В качестве разрыхлителей и связующих веществ могут быть использованы порошкообразные камеди, и они включают измельченные камеди, такие как агар, Karaya или трагакант. Также в качестве разрыхлителей можно использовать альгиновую кислоту и ее натриевую соль.

25 Связующие вещества могут быть использованы для удержания соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению вместе в форме твердой таблетки, и к ним относятся материалы из природных продуктов, такие как аравийская камедь, трагакант, крахмал и желатин. Другими примерами являются метилцеллюлоза (МЦ), этилцеллюлоза (ЭЦ) и карбоксиметил-целлюлоза (КМЦ). Поливинилпирролидон 30 (ПВП) и гидроксипропил-метилцеллюлоза (ГПМЦ) могут быть использованы в спиртовых растворах для гранулирования лекарственного средства.

Для предупреждения прилипания в процессе получения препарата в препарат фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть добавлен агент, уменьшающий трение. Смазывающие вещества могут быть использованы в виде слоя 35 между лекарственным средством и стенками фильеры, и они могут включать, но без ограничения, стеариновую кислоту, в том числе ее магниевую и калиевую соли, политетрафторэтилен (ПТФЭ), жидкий парафин, растительные масла и воски. Также могут быть использованы растворимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния, полиэтиленгликоли с различными молекулярными 40 массами, Carbowax 4000 и 6000.

Могут быть добавлены агенты, способствующие скольжению, которые могут улучшить текучие характеристики соединения по настоящему изобретению при получении препарата и способствуют перераспределению в процессе прессования. Способствующие 45 скольжению агенты могут включать крахмал, тальк, пирогенный диоксид кремния и гидратированный алюмосиликат.

Добавки, которые эффективно увеличивают поглощение соединения по настоящему изобретению, введенного перорально, представляют собой, например, жирные кислоты, олеиновую кислоту, линолевую кислоту и линоленовую кислоту.

Могут быть желательны пероральные препараты с контролируемым высвобождением. 50 Лекарство может быть введено в инертную матрицу, которая обеспечивает высвобождение или за счет диффузии или посредством механизма вымывания, например, в камеди. В препарат также могут быть введены медленно распадающиеся матрицы. Некоторые энтеросолубильные покрытия также обладают замедляющим высвобождением действием.

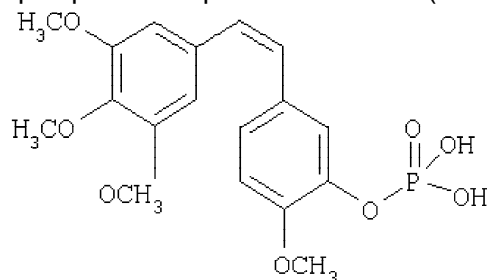
Другие формы контролируемого высвобождения соединения по настоящему изобретению заключаются в способе, основанном на терапевтической системе Oros (Alza Corp.), то есть лекарство заключают в полупроницаемую мембрану, которая позволяет воде входить и выталкивать лекарство через единственное небольшое отверстие за счет осмотических эффектов.

В препарате могут быть использованы другие покрытия. К ним относится ряд сахаров, которые могут быть нанесены в поддоне для нанесения покрытия. Соединение по настоящему изобретению также может быть получено в виде покрытой пленкой таблетки, и используемые в этом случае материалы могут быть разделены, например, на две группы. Первую группу составляют не энтеросолубильные материалы, и она включает метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, метилгидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, провидон и полиэтиленгликоли. Вторая группа включает энтеросолубильные материалы, которые обычно представляют собой эфиры фталевой кислоты.

Для получения оптимального покрытия необходимо использовать смесь материалов. Нанесение пленочного покрытия может быть осуществлено в машине для нанесения покрытия на поддоне или в псевдооживленном слое или путем нанесения покрытия под давлением.

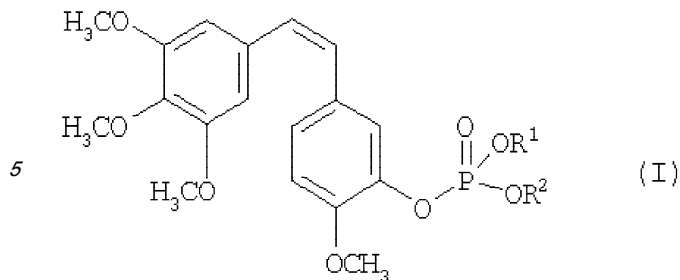
Способы получения

Соединения формулы I, описанные выше, могут быть получены любым подходящим способом, например при контактировании желаемого соединения Q (особенно органического амина, аминокислоты или эфира аминокислоты) со свободной кислотой фосфата комбретастина А-4 ("свободная кислота СА4Р"), которая имеет структуру:



в соответствующих количествах, достаточных для получения моно- или ди-соли органического амина, моно- или ди-соли аминокислоты или моно- или ди-соли эфира аминокислоты формулы I по настоящему изобретению (например, при мольном отношении 1:1 с получением моно-соли органического амина или моно-соли аминокислоты, или при молярном избытке органического амина в подходящем растворителе (например, в растворителе, выбранном по желаемому рКа) с получением ди-соли органического амина). Свободная кислота СА4Р может быть получена из динатриевой соли СА4Р, например, как описано ниже в примерах. Соединение Q, такое как органический амин или аминокислота и свободная кислота СА4Р, могут быть, например, введены в контакт в подходящем растворителе (предпочтительно, в C₁-C₆-спирте, таком как изопропанол, или в их водных смесях), после чего предпочтительно следует сбор соединения формулы I в виде кристаллического соединения, например, посредством фильтрации. Определение "растворитель" включает один растворитель, смеси двух или более растворителей с образованием смешивающейся или двухфазной смесей растворителей. Если желательно, то соединение Q может быть добавлено в форме соли, предпочтительно фармацевтически приемлемой соли, как описано ниже в примерах.

Таким образом, настоящее изобретение включает способ получения соединения, имеющего общую структуру формулы I:



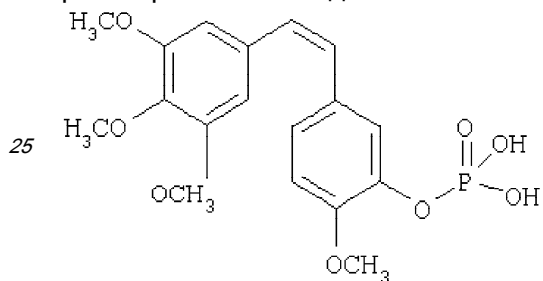
10 где один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и Q представляет собой

(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

15 (B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

20 Такой способ по настоящему изобретению включает стадию контактирования в растворителе свободной кислоты CA4P, имеющей структуру:



30 с соединением Q, где Q представляет собой

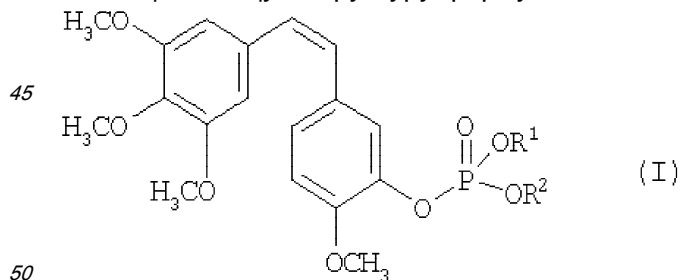
(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

35 (C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

40 Необязательно соединение по настоящему изобретению, получаемое способом, описанным в документе, может выпадать из растворителя в осадок в кристаллической форме.

Кроме того, настоящее изобретение охватывает способ получения соединения, имеющего общую структуру формулы I:



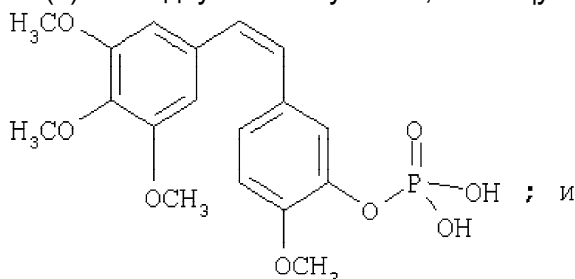
которая описана выше, и этот способ включает стадии контактирования свободной кислоты CA4P с предпочтительным соединением Q (таким как гистидин, C_{1-6} -алкиловый эфир глицина, или наиболее предпочтительно трометамин) в растворителе и

последующего сбора из растворителя полученной в кристаллической форме соли CA4P с гистидином, C₁₋₆-алкиловым эфиром глицина или наиболее предпочтительно с трометамином. Конечно, как объяснялось выше, в способе по настоящему изобретению применение находит ряд растворителей. Конкретными примерами являются, но не

ограничиваются только ими, C₁₋₆-спирты, такие как изопропанол, или их водные смеси. В предпочтительном варианте по настоящему изобретению описанный здесь способ дает моно-трометаминовую соль CA4P (моно-соль ТРИС CA4P или моно-ТРИС соль CA4P). В другом предпочтительном варианте по настоящему изобретению описанный способ дает моно-L-гистидиновую соль CA4P.

Смеси соединения Q (органический амин, аминокислота или эфир аминокислоты) и свободной кислоты CA4P, предпочтительно в растворе, например в водном растворе, также рассматриваются в качестве вариантов осуществления изобретения. Следовательно, настоящее изобретение дополнительно предлагает композиции, полученные путем смешения соединений, включающих:

(а) свободную кислоту CA4P, имеющую структуру:



(b) соединение Q, где Q представляет собой

(A) органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺; или

(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH⁺ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

Необязательно композиция по настоящему изобретению также содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение станет более понятным при обращении к следующим не ограничивающим его примерам, которые являются иллюстрацией изобретения.

Приведенные ниже примеры представлены для более полного пояснения предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Они не должны никоим образом рассматриваться как ограничивающие изобретение.

Пример 1

Пролекарственная моно-трометаминовая соль CA4P

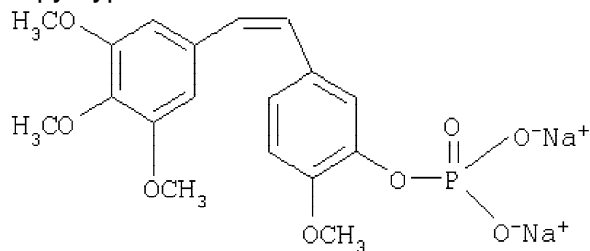
В данном варианте осуществления по настоящему изобретению описана пролекарственная моно-трометаминовая соль CA4P в качестве неограничивающего примера соединения по настоящему изобретению. Используя представленную в документе информацию, квалифицированный в данной области специалист может легко получить различные пролекарственные моно- или ди-соли органических аминов CA4P, например, путем добавления требуемого органического амина к свободной кислоте CA4P по методике, аналогичной описанной ниже, причем все что требуется представлено в настоящем изобретении и прилагаемой формуле изобретения.

Реагенты и способы

Все реагенты и химикаты получены из коммерческих источников и используются без дополнительной очистки: трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС, TRIS) (Aldrich Chemical Co. категория 99.9 +%, партия # 01404PU), изопропиловый спирт (сорт B&J, растворитель высокой степени чистоты). Мультиядерные спектры ЯМР записаны на спектрометре Bruker

DRX 400. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C приведены в м.д. относительно тетраметилсилана. (Химические сдвиги ЯМР ^{13}C определяют с использованием метанола (MeOH) в качестве внешнего стандарта). Спектры ЯМР ^{13}C записаны с развязкой по протонам $\{^1\text{H}\}$.

Эксперименты по двумерному ЯМР НМРС [спектроскопия с гетероядерной мультиплетной квантовой корреляцией, обратная корреляция химического сдвига для определения, какой из ^1H молекулы связан с каким ядром ^{13}C (или другим ядром X)]; и НМБС [спектроскопия с гетероядерной мультиплетной корреляцией связей, модификация НМРС, используемая для определения дальнего взаимодействия ^1H - ^{13}C , а также для определения структуры и отнесения ^1H и ^{13}C в молекуле] проводят для отнесения сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C к структуре. "Динатриевая соль СА4Р" представляет собой соединение со следующей структурой:



(см. упомянутый выше патент США №5561122).

Моно-триметаминная соль СА4Р

Водный раствор ИПС-ТРИС (0,19 М). 0,19 М раствор ТРИС готовят путем растворения 1,61 г ТРИС (13,3 ммоль) в 7 мл деионизированной воды, и к полученному раствору добавляют 63 мл изопропилового спирта (ИПС) (10% воды в ИПС).

Исходный раствор свободной кислоты СА4Р в изопропиловом спирте (0,19 М).

Динатриевую соль СА4Р (12,15 г, 27,6 ммоль) растворяют в 70 мл деионизированной воды. К полученному раствору при быстром перемешивании добавляют этилацетат (250 мл) и насыщенный водный раствор хлорида натрия (150 мл). Образуется белый осадок.

Порциями добавляют 0,5 н. соляную кислоту (325 мл) для растворения осадка (конечное значение pH водной фазы составляет приблизительно 1 по индикаторной бумаге).

Органическую фазу отделяют. Водную фазу экстрагируют этилацетатом (3x200 мл).

Органические фазы объединяют и сушат безводным Na_2SO_4 . После фильтрования и упаривания растворителей (ротаторный испаритель, температура водяной бани 40°C)

получают густую пленку свободной кислоты СА4Р, которую растворяют в 100 мл ИПС.

Концентрацию полученного раствора, которая должна составлять 0,19 М, определяют методом ЯМР ^1H . Используют следующую методику титрования: с помощью пипетки в сосуд для ВЭЖХ объемом 4 мл вносят 45 мкл раствора L-гистидина (0,17 М) и 30 мкл раствора свободной кислоты СА4Р. Растворители упаривают досуха на ротаторном испарителе. Твердое вещество растворяют в 0,7 мл D_2O и анализируют с помощью ЯМР ^1H , получают соотношение гистидина к свободной кислоте СА4Р 1:0,75. Всего получают 19 ммоль свободной кислоты СА4Р (выход 69%).

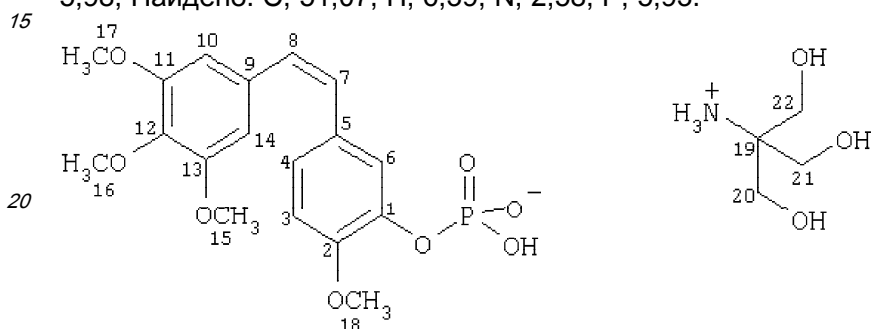
Моно-ТРИС соль СА4Р. В круглодонную колбу объемом 200 мл загружают 70 мл раствора свободной кислоты СА4Р, полученного выше (0,19 М, 13,3 ммоль). При интенсивном перемешивании к раствору свободной кислоты СА4Р порциями добавляют водный раствор ИПС-ТРИС, приготовленный выше (0,19 М, 13,3 ммоль). Полученную суспензию перемешивают при комнатной температуре 18 час (в течение ночи), затем охлаждают до 0°C (ледяная баня) в течение 30 мин. Кристаллическое твердое вещество фильтруют с отсасыванием через фильтровальную бумагу Whatman #54, промывают холодным изопропиловым спиртом и сушат в токе воздуха 5 час, затем в вакууме (вакуумный эксикатор) в течение 113 час, получают 7,01 г моно-ТРИС соли СА4Р в виде белого твердого вещества. Результаты анализа методом ЯМР ^1H показывают, что конечный продукт содержит ИПС (приблизительно 0,9% масс.) в качестве остаточного растворителя (13,4 ммоль, количественный выход). Моно-ТРИС соль СА4Р имеет структуру

формулы Ia, в которой олефиновая группа, соединяющая фенильные фрагменты ядра, находится в цисконфигурации, как и в исходном соединении - фосфате комбретастина А-4.

Характеристика моно-ТРИС соли СА4Р

5 Анализ ЯМР и элементный анализ

^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 3,52 (с, 6Н, C(15) H_3 и C(17) H_3), 3,56 (с, 6Н, C(20) H_2 , C(21) H_2 , C(22) H_2), 3,59 (с, 3Н, C(16) H_3), 3,67 (с, 3Н, C(18) H_3), 6,38 (д, $J=11,7$ Гц, 1Н, C(8)Н), 6,46 (д, $J=11,7$ Гц, 1Н, C(7)Н), 6,48 (с, 2Н, C(10)Н и C(14)Н), 6,79 (д, $J=8,8$ Гц, 1Н, C(3)Н), 6,85 (ушир.д, $J=8,8$ Гц, 1Н, C(4)Н), 7,06 (ушир.с, 1Н, C(6)Н); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 56,9 (2С, C15, C17), 57,0 (C18), 60,3 (3 С, C20, C21, C22), 62,0 (C16), 62,4 (C19), 107,5 (2С, C10, C14), 113,9 (C3), 122,6 (д, $J_{\text{PC}}=3,1$ Гц, C6), 125,9 (C4), 130,0 (C8), 130,8 (C7), 131,2 (C5), 134,7 (C9), 136,8 (C12), 142,2 (д, $J_{\text{PC}}=7,7$ Гц, C1), 150,6 (д, $J_{\text{PC}}=6,1$ Гц, C2), 153,2 (2С, C11 и C13), Вычислено для $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_{11}\text{P}$: С, 51,06; Н, 6,23; N, 2,70; Р, 5,98, Найдено: С, 51,07; Н, 6,39; N, 2,58; Р, 5,93.



25 Гигроскопичность

Моно-ТРИС соль СА4Р данного примера, как оказалось, является практически негигроскопичной при 25°C при комнатных условиях и в условиях высокой влажности. Этот результат является неожиданным, поскольку другие солевые формы свободной кислоты СА4Р гигроскопичны в таких же условиях. График сорбции влаги моно-ТРИС соли СА4Р приведен на Фиг.1. Дифракция рентгеновских лучей при различной относительной влажности ("ОВ-ДРЛ") показывает, что порошковая дифрактограмма остается неизменной при выдерживании при различных относительных влажностях при 25°C.

Полиморфизм

Изучение монокристалла моно-ТРИС соли СА4Р рассматриваемого примера с помощью рентгеноструктурного анализа показывает, что соль представляет собой ахиральную компактную форму (N-1), которая не содержит никаких участков с растворителем, и что она имеет центрально-симметричную моноклинную кристаллическую структуру. Симулированная дифрактограмма порошка, которую получают из уточненных атомных параметров моноклинного монокристалла при комнатной температуре, согласуется с наблюдаемой дифрактограммой. Несколько порций моно-ТРИС соли, полученных из смеси ИПС/вода, как оказалось, согласно данным ЯМР ^1H , дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), термогравиметрии (ТГ) и дифракции рентгеновских лучей на порошке (рентгенофазовый анализ, РФА) оказались воспроизводимыми. Моно-ТРИС соль СА4Р суспендируют в различных растворителях, таких как этанол, изопропанол, ацетон, ацетонитрил и вода, сначала при 70-75°C в течение 5-10 мин и затем при комнатной температуре в течение ночи. Полученные твердые фазы анализируют методами ДСК, ТГ и РФА. Ни у одного из суспендированных образцов не выявлено присутствия растворителя ни в суспензии, ни в сухом виде. В термограммах ДСК и дифрактограммах РФА (см. Фиг.2) не обнаружено разницы образцов по сравнению с веществом как таковым. Это показывает, что N-1 форма является относительно стабильной единственной полиморфной формой.

Другие физико-химические свойства

На термограмме ДСК моно-ТРИС соли СА4Р наблюдается единственная эндотерма плавления при 196°C (Фиг.3). Термогравиметрический анализ не показывает потери веса

из-за испарения при температуре ниже 150°C. Равновесная растворимость моно-ТРИС соли СА4Р в воде составляет 3,37 мг/мл (рН 4,8) при 25°C. Растворимость в воде растет с увеличением рН и достигает величины 191 мг/мл при рН 8,2. Это свойство особенно подходит для приготовления дозированных форм соединения настоящего примера в интервале значений рН 8-9 для внутривенного введения (включая, но, не ограничиваясь только ими, растворы, непосредственно вводимые пациенту ("Готовые к применению растворы"), или загрузочные растворы для лиофилизации). График растворимости моно-ТРИС соли СА4Р приведен на Фиг.4. Моно-ТРИС соль также проявляет хорошую химическую стабильность в твердом состоянии при выдерживании при комнатных условиях, а также в более жестких условиях по температуре и влажности.

Моно-ТРИС соль СА4Р настоящего примера обладает отличными физико-химическими свойствами для использования в фармацевтических рецептурах, например, предназначенных или для перорального или для парентерального введения. Хотя другие солевые формы СА4Р здесь не рассматриваются, моно-ТРИС соль имеет неожиданно прекрасные свойства в твердом состоянии, в частности негигроскопичность. Это является особенно неожиданным с точки зрения степени растворимости в воде самого ТРИС.

Моно-триметаминная соль СА4Р (масштабный переход)

Раствор свободной кислоты СА4Р в ИПС. Трехгорлую круглодонную колбу объемом 12 л снабжают механической мешалкой и капельной воронкой. В колбу помещают раствор динатриевой соли СА4Р (99,92 г, 0,227 моль) в 1,5 л деионизированной воды, и в колбу добавляют этилацетат (2,0 л). При быстром перемешивании из капельной воронки добавляют раствор соляной кислоты (0,5 н, 950 мл, 0,475 моль, конечное значение рН водной фазы составляет приблизительно 1 по индикаторной бумаге). Органическую фазу отделяют. Водную фазу экстрагируют этилацетатом (5×1,6 л). Объединенные органические фазы сушат Na₂SO₄. Этилацетат упаривают на ротационном испарителе, получают густое масло, которое растворяют в ИПС (800 мл).

Моно-ТРИС соль СА4Р. В трехгорлую круглодонную колбу объемом 12 л помещают раствор ТРИС (25,0 г, 0,206 моль) в 800 мл деионизированной воды. При интенсивном перемешивании через капельную воронку медленно добавляют приготовленный выше раствор свободной кислоты СА4Р в ИПС. После добавления в полученный раствор вносят затравку моно-ТРИС соли СА4Р и перемешивают механической мешалкой при комнатной температуре 1 час. Затем к суспензии медленно добавляют дополнительное количество ИПС (2,0 л) и перемешивание продолжают еще один час. Кристаллическое твердое вещество фильтруют с отсасыванием, промывают ИПС (800 мл) и сушат в вакуумной печи приблизительно при 40°C в течение 4 дней, получают 101,55 г моно-ТРИС соли СА4Р. Результаты анализа методом ЯМР ¹H показывают, что конечный продукт содержит ИПС (приблизительно 0,4% масс.) в качестве остаточного растворителя (0,196 моль, общий выход 86%). Элементный анализ для C₂₂H₃₂NO₁₁P. Вычислено, %: С 51,06, Н 6,23, N 2,70, Р 5,98. Найдено: С 50,95, Н 6,14, N 2,69, Р 5,82.

Пример 2

ТРИС-Препарат пролекарственной моно-триметаминной соли СА4Р

Фармацевтические композиции в виде водного раствора и лиофилизата (т.е. высушенные вымораживанием) соединения примера 1 (моно-ТРИС соль СА4Р) получают следующим образом.

Водный раствор соединения примера 1 получают путем растворения соединения в воде для инъекций (Фармакопея США) до концентрации 60 мг/мл с добавлением ТРИС (триметамин в виде основания) в количестве, достаточном для получения рН 8,5. Растворение проводят при защите от света.

Затем получают лиофилизат по следующей методике. Полученный выше раствор фильтруют через подходящий стерилизующий фильтр на 0,2 микрона, и аликвоты помещают в стерильные стеклянные пузырьки. Растворы лиофилизируют в лиофилизаторе Virtis при -35°C в высоком вакууме в течение от 24 до 72 час и затем дополнительно сушат при 5°C в высоком вакууме в течение от 24 до 48 час, получают лиофилизат.

В соответствии с этими методиками могут быть получены другие фармацевтические композиции, содержащие соединение примера 1. Например, как показано ранее, к описанному выше раствору могут быть добавлены создающие объем агенты (например, аминокислоты, такие как аргинин или лизин, сахара, такие как сахароза, лактоза, маннит, полимеры, такие как поливинилпирролидоны или декстран и т.п.) или другие эксципиенты.

Например, получают водный раствор соединения примера 1 путем растворения соединения в воде для инъекций (Фармакопея США) до концентрации 30 мг/мл с добавлением подходящего создающего объем агента, такого как маннит, декстран или их комбинации, до концентрации 100 мг/мл и ТРИС (триметамина в виде основания) в количестве, достаточном для получения pH 8,6. Растворение проводят при защите от света.

Затем получают лиофилизат по следующей методике. Полученный выше раствор фильтруют через подходящий стерилизующий фильтр на 0,2 микрона, и аликвоты помещают в стерильные стеклянные пузырьки. Растворы лиофилизируют в лиофилизаторе Virtis при -10°C в умеренном вакууме в течение от 24 до 72 час и затем дополнительно сушат при 5°C в высоком вакууме в течение от 24 до 48 час, получают лиофилизат.

Как описано выше, любые подходящие органические амины, включая, но не ограничиваясь только ими, диэтаноламин, глюкамин, N-метилглюкамин, этилендиамин и 2-(4-имидазолил)-этиламин, могут легко заменять триметамин в описанных выше примерах с получением соединения или композиции по настоящему изобретению. Аналогично могут быть получены композиции, в которых Q имеет другие определения в пределах формулы I.

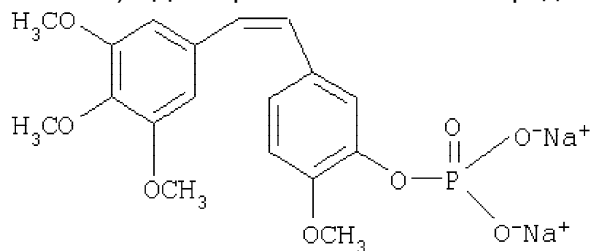
Пример 3

Пролечкарственная моно-L-гистидиновая соль CA4P

В этом варианте осуществления по настоящему изобретению описана пролечкарственная моно-L-гистидиновая соль CA4P в качестве неограничивающего примера соединения по настоящему изобретению. Используя представленную в описании информацию, квалифицированный в данной области специалист может легко получить различные пролечкарственные моно- или ди-соли аминокислот CA4P, например, путем добавления требуемой аминокислоты к свободной кислоте CA4P по методике, аналогичной описанной ниже, причем все что требуется, представлено в настоящем изобретении и прилагаемой формуле изобретения.

Реагенты и способы

Все реагенты и химикаты получены из коммерческих источников и используются без дополнительной очистки: L-гистидин (Aldrich Chemical Co. категория 98%, партия # 04821JR), метанол и изопропиловый спирт (сорт B&J, растворитель высокой степени чистоты). "Динатриевая соль CA4P" представляет собой соединение, имеющее формулу:



(см. упомянутый выше патент США №5561122).

Мультиядерные спектры ЯМР записаны на спектрометрах Bruker DPX 300 и DRX 400. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в м.д. относительно тетраметилсилана (химические сдвиги ЯМР ^{13}C определяют с использованием метанола в качестве внешнего стандарта). Химические сдвиги ЯМР ^{31}P приведены в м.д. относительно 85% H_3PO_4 (внешний стандарт). Спектры ЯМР ^{13}C и ^{31}P записаны с развязкой по протонам $\{^1\text{H}\}$. Эксперименты по двумерному ЯМР (HMQC и HMBC) проведены для отнесения сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C к структуре. ДСК проводят на

дифференциальном сканирующем калориметре DSC/2920, TA Instruments.

Гидратированная моно-L-гистидиновая соль CA4P

Исходный водный раствор L-гистидина (0,2 М). В 10 мл деионизированной воды растворяют L-гистидин (0,3167 г, 2,0 ммоль), получают 0,2 М раствор.

- 5 Исходный раствор CA4P в виде свободной кислоты в метаноле (0,6 М). Динатриевую соль CA4P (1,9194 г) растворяют в 5 мл деионизированной воды. К полученному раствору добавляют насыщенный водный раствор хлорида натрия (40 мл). Образуется белый осадок. Добавляют этилацетат (50 мл), и полученную суспензию перемешивают с помощью магнитной мешалки, подкисляют 0,5 н. соляной кислотой до тех пор, пока двухфазная
- 10 смесь не станет прозрачной (водная фаза имеет кислую реакцию по индикаторной бумаге). Органическую фазу отделяют. Водную фазу экстрагируют этилацетатом (2×50 мл). Органические фазы объединяют и сушат Na_2SO_4 . После фильтрования и упаривания растворителей (ротаторный испаритель, температура водяной бани 37°C) получают густую пленку свободной кислоты CA4P, которую растворяют в 10 мл метанола. Метанол
- 15 упаривают на ротаторном испарителе (37°C), получают практически белую пену (1,52 г), которую повторно растворяют в MeOH (4,79 мл), получают раствор с ожидаемой концентрацией 0,8 М.

- Определенную выше концентрацию дополнительно подтверждают путем смешения 100 мкл 0,2 М раствора L-гистидина (0,20 ммоль) с 25 мкл раствора свободной кислоты
- 20 CA4P. Растворители из полученного раствора упаривают досуха. Твердое вещество анализируют с помощью ЯМР ^1H , получают молярное соотношение гистидина к свободной кислоте CA4P 1:0,75. Следовательно, концентрация свободной кислоты CA4P составляет 0,6 М (это свидетельствует о том, что пена свободной кислоты CA4P содержит растворитель).

- 25 Гидратированная моно-L-гистидиновая соль CA4P. В сосуд для ВЭЖХ объемом 4 мл добавляют L-гистидин (900 мкл, 0,2 М, 180 ммоль), раствор свободной кислоты CA4P (300 мкл, 0,6 М, 180 ммоль) и изопропиловый спирт (1,0 мл). Полученный раствор упаривают на ротаторном испарителе (температура водяной бани 39-40°C) до уменьшения объема приблизительно до 1,5 мл. Добавляют еще 1,0 мл изопропилового спирта, и объем снова
- 30 уменьшают приблизительно до 1,5 мл. В растворе наблюдают образование небольшого кристалла. Процесс упаривания прекращают, сосуд закрывают и оставляют при комнатной температуре на 5 час. Кристаллическое твердое вещество фильтруют с отсасыванием через фильтровальную бумагу Whatman #54, промывают изопропиловым спиртом (приблизительно 2 мл) и сушат в токе азота в течение ночи, получают 82,7 мг моно-L-
- 35 гистидиновой соли CA4P в виде белого твердого вещества. Полученная пролекарственная моно-L-гистидиновая соль CA4P представляет собой кристаллическое твердое вещество; анализ по Карлу-Фишеру твердого вещества показывает, что содержание воды составляет 4,66%, то есть, согласно расчетам, кристаллическое твердое вещество гидратировано 1,5 молекулами воды на молекулу соли (143 ммоль, выход 79%). ^1H ЯМР (300
- 40 МГц, D_2O) δ 3,33 (д, $J=6,59$ Гц, 2H, C(21) H_2), 3,67 (с, 6H, C(15) H_3 и C(17) H_3), 3,74 (с, 3H, C(16) H_3), 3,82 (с, 3H, C(18) H_3), 4,01 (т, $J=6,50$ Гц, 1H, C(20)H), 6,53 (д, $J=12,25$ Гц, 1H, C(8)H), 6,62 (д, $J=12,25$ Гц, 1H, C(7)H), 6,62 (с, 2H, C(10)H и C(14)H), 6,94 (д, $J=8,00$ Гц, 1H, C(3)H), 7,01 (д, $J=8,00$ Гц, 1H, C(4)H), 7,21 (с, 1H, C(6)H), 7,37 (с,
- 45 1H, C(23)H), 8,63 (с, 1H, C(24)H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 26,12 (C21), 53,93 (C20), 56,26 (2C, C15, C17), 56,35 (C18), 61,32 (C16), 106,86 (2C, C10, C14), 113,26 (C3), 118,03 (C23), 122,04 (д, $J_{\text{PC}}=2,3$ Гц, C6), 125,52 (C4), 127,80 (C22), 129,40 (C8), 130,05 (C7), 130,57 (C5), 133,99 (C9), 134,34 (C24), 136,18 (C12), 141,37 (д, $J_{\text{PC}}=6,90$ Гц, Cl), 150,01 (д, $J_{\text{PC}}=4,60$ Гц, C2), 152,52 (2C, C11 и C13), 172,87 (C19); ^{31}P ЯМР (121 МГц, $\{^1\text{H}\}$
- 50 , D_2O) δ - 2,61 (с), Вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$: C, 49,83; H, 5,75; N, 7,26, Найдено: C, 50,13; H, 5,78; N, 7,26.

Анализ по методу Карла-Фишера и элементный анализ продукта данного способа показывают, что кристаллическая соль представляет собой полуторный гидрат. Анализ ДСК

показывает наличие одной основной кристаллической формы с эндотермой плавления 158,6°C (см. Фиг.5). Данные порошковой дифрактограммы, полученные для этого продукта, приведены на Фиг.8, верхний график.

Различия в полиморфизме наблюдаются при комнатной температуре как функция количества ммоль свободной кислоты СА4Р по отношению к общему объему кристаллизационной смеси. В указанной выше методике используют 0,2 ммоль свободной кислоты СА4Р на 1 мл общего объема кристаллизационной смеси. Модификация вышеуказанной методики с использованием 0,03 ммоль свободной кислоты СА4Р на 1 мл общего объема кристаллизационной смеси дает моно-*L*-гистидиновую соль СА4Р, содержащую 1,8 молекул воды на молекулу соли (см. Фиг.6, размер образца 3,8500 мг); анализ методом ДСК показывает наличие одной кристаллической формы с эндотермой плавления при 184,9°C. Анализ методом ЯМР ^1H дает отношение СА4Р: гистидин = 1:1. Данные порошкового рентгеноструктурного анализа, полученные для этого вещества, приведены на Фиг.8, нижний график. В другой модификации описанной выше методики используют 0,07 ммоль свободной кислоты СА4Р на 1 мл общего объема кристаллизационной смеси, получают смесь форм моно-*L*-гистидиновой соли СА4Р, одна из которых содержит 1,5 молекулы воды на молекулу соли, другая 1,8 молекулы воды на молекулу соли (см. Фиг.7, размер образца 4,4500 мг); анализ методом Карла-Фишера и элементный анализ смеси показывает, что кристаллическая соль представляет собой полуторный гидрат. Анализ методом ДСК показывает наличие двух кристаллических форм. Эндотермы подобны эндотермам, приведенным на Фиг.5 и 6, соответственно. Данные порошкового рентгеноструктурного анализа приведены на Фиг.9. Данные ДСК и порошкового рентгеноструктурного анализа показывают, что формы с соотношением вода: соль 1,5:1 и 1,8:1 представляют собой различные кристаллические формы. Как также указано выше, смесь этих двух форм образуется легко. При внесении затравки каждая форма может быть получена в чистом состоянии.

Полугептагидратная форма моно-*L*-гистидиновой соли СА4Р также может быть получена в присутствии воды. Однако эта форма превращается в полуторный гидрат моно-*L*-гистидиновой соли СА4Р.

Как указывалось выше, различные природные или неприродные аминокислоты, включая, но не ограничиваясь только ими, орнитин, лизин, аргинин и триптофан, могут быть использованы вместо гистидина в приведенном выше описании с получением соединений по настоящему изобретению.

Гидратированная моно-*L*-гистидиновая соль СА4Р (масштабный переход)

Исходный водный раствор *L*-гистидина (0,2 М). В 60 мл деионизированной воды растворяют *L*-гистидин (1,90 г, 12,0 ммоль), получают 0,2 М раствор. (Раствор также может быть приготовлен *in situ*).

Исходный раствор свободной кислоты СА4Р в изопропиловом спирте (ИПС) (0,17 М). Свободная кислота СА4Р может быть приготовлена по следующей методике. Эквивалент кислоты может быть уменьшен до 2,1; добавление хлорида натрия не является необходимым. В качестве примера приведена следующая методика: динатриевую соль СА4Р (8,94 г, 20,3 ммоль) растворяют в 50 мл деионизированной воды. К полученному раствору при быстром перемешивании добавляют этилацетат (200 мл) и насыщенный водный раствор хлорида натрия (100 мл). Образуется белый осадок. Порциями прибавляют 0,5 н. соляную кислоту (220 мл) для растворения осадка (конечное значение pH водной фазы составляет приблизительно 1 по индикаторной бумаге). Органическую фазу отделяют. Водную фазу экстрагируют этилацетатом (1×200 мл и затем 2×150 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na_2SO_4 . После фильтрования и упаривания растворителей (ротаторный испаритель, температура водяной бани 40°C) получают густую пленку свободной кислоты СА4Р, которую растворяют в 100 мл ИПС. Концентрацию раствора определяют методом ЯМР ^1H , и она составляет 0,17 М.

Для подтверждения определенной выше концентрации с помощью пипетки в сосуд для ВЭЖХ объемом 4 мл вносят 60 мкл раствора гистидина (0,2 М) и 70 мкл раствора

свободной кислоты СА4Р. Растворители упаривают досуха на роторном испарителе. Твердое вещество растворяют в 0,7 мл D₂O и анализируют с помощью ЯМР ¹H, получают отношение гистидина к свободной кислоте СА4Р 1:1. Всего выделяют 17 ммоль свободной кислоты СА4Р (выход 84%).

5 Гидратированная моно-L-гистидиновая соль СА4Р (масштабный переход). В круглодонную колбу объемом 250 мл добавляют раствор свободной кислоты СА4Р (0,17 М, 12,0 ммоль) и 50 мл изопропилового спирта. К раствору свободной кислоты СА4Р при быстром перемешивании порциями добавляют раствор L-гистидина (60 мл, 0,2 М, 12,0 ммоль). Полученную суспензию перемешивают при 40°C в течение 30 мин, при комнатной
10 температуре 3 час, затем охлаждают при 0°C (ледяная баня) 1 час. Кристаллическое твердое вещество фильтруют с отсасыванием через фильтровальную бумагу Whatman #54, промывают холодным изопропиловым спиртом и сушат в вакууме (вакуумный эксикатор) в течение 88 час, получают 6,07 г моно-L-гистидиновой соли СА4Р в виде белого твердого вещества. Анализ методом Карла-Фишера твердого вещества показывает, что содержание
15 воды составляет 4,48%, что соответствует кристаллическому твердому веществу, гидратированному 1,5 молекулами воды на молекулу соли (10,5 ммоль, выход 87%). ¹H ЯМР (300 МГц, D₂O) δ 3,32 (д, J=6,6 Гц, 2H, C(21)H₂), 3,68 (с, 6H, C(15)H₃ и C(17)H₃), 3,74 (с, 3H, C(16)H₃), 3,82 (с, 3H, C(18)H₃), 4,00 (т, J=6,6 Гц, 1H, C(20)H), 6,53 (д, J=12,1 Гц, 1H, C(8)H), 6,62 (д, J=12,1 Гц, 1H, C(7)H), 6,64 (с, 2H, C(10)H и C(14)H), 6,95
20 (д, J=8,3 Гц, 1H, C(3)H), 7,02 (д, J=8,3 Гц, 1H, C(4)H), 7,20 (ушир.с, 1H, C(6)H), 7,36 (ушир.с, 1H, C(23)H), 8,62 (д, J=1,3 Гц, 1H, C(24)H); ¹³C ЯМР (100 МГц, {¹H}, D₂O) δ 26,11 (C21), 53,92 (C20), 56,22 (2C, C15, C17), 56,32 (C18), 61,28 (C16), 106,82 (2C, C10, C14), 113,20 (C3), 118,03 (C23), 122,01 (д, J_{pc}=2,3 Гц, C6), 125,48 (C4),
25 127,78 (C22), 129,38 (C8), 129,97 (C7), 130,54 (C5), 133,92 (C9), 134,31 (C24), 136,16 (C12), 141,38 (д, J_{pc}=6,1 Гц, C1), 149,98 (д, J_{pc}=5,4 Гц, C2), 152,48 (2C, C11 и C13), 172,86 (C19). Вычислено для C₂₄H₃₀N₃O₁₀P·1,5H₂O: C, 49,82; H, 5,75; N, 7,26; P, 5,35. Найдено: C, 49,92; H, 5,84; N, 7,26; P, 5,44. Кроме того, с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии определено, что соединение имеет
30 основную эндотерму при 158°C и второстепенную эндотерму при 174°C.

В настоящей методике могут быть легко использованы любые подходящие природные или не природные аминокислоты с получением других соединений по настоящему изобретению.

При кристаллизации моно-L-гистидиновой соли СА4Р при комнатной температуре
35 обычно образует(я)ся гидрат(ы). Проведение кристаллизации при температурах выше комнатной температуры, особенно при температуре выше 70°C, позволяет получить безводную соль. Гидрат гистидиновой соли может быть преобразован в безводную кристаллическую форму (особенно с температурой плавления 210°C), например, путем суспендирования гидратированной формы в таком растворителе, как этанол, метанол,
40 изопропанол или ацетон, при таких температурах, как 40°C (например, в течение 2 дней), с последующим фильтрованием, промывкой и сушкой в вакууме при температуре 45°C (в течение ночи). Практически негигроскопичная безводная форма является предпочтительной.

Безводная моно-L-гистидиновая соль СА4Р

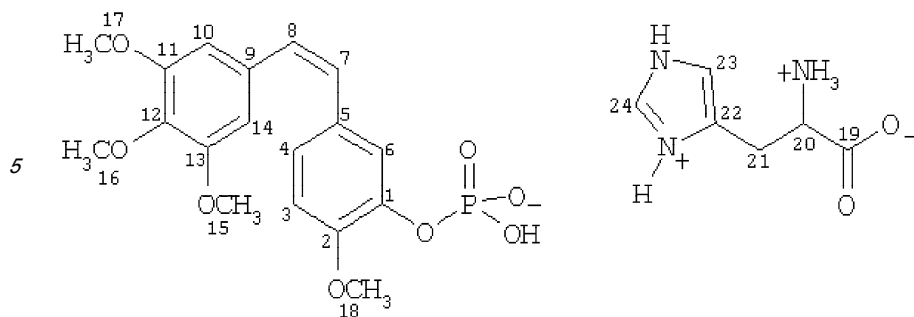
45 В круглодонную колбу объемом 200 мл загружают L-гистидин (0,2620 г, 1,65 ммоль) и 16,5 мл деионизированной воды. Полученный раствор нагревают при 74-76°C (температура масляной бани) при перемешивании магнитной мешалкой. Добавляют раствор свободной кислоты СА4Р (8,7 мл, 0,19 М раствор в ИПС, 1,65 ммоль), затем добавляют изопропиловый спирт (90 мл). Полученный приблизительно через 1 мин раствор
50 становится молочным. Перемешивание продолжают при 75-76°C в течение 2 час, затем при комнатной температуре 1 час. Фильтрованием через бумагу Whatman #4 с отсасыванием отделяют игольчатое кристаллическое вещество и сушат в токе воздуха (отсасывание) в течение ночи (19,5 час), затем в вакуумном эксикаторе в течение 24

час, получают 0,7788 г моно-L-гистидиновой соли СА4Р в виде белого твердого вещества (1,41 ммоль, выход 86%), т.пл. 211,49°C (ДСК). ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 3,30 (д, $J=6,5$ Гц, 2H, H-21), 3,65 (с, 6H, H-15 и H-17), 3,72 (с, 3H, H-16), 3,80 (с, 3H, H-18), 3,99 (т, $J=6,5$ Гц, 1H, H-20), 6,50 (д, $J=12,3$ Гц, 1H, H-8), 6,59 (д, $J=12,3$ Гц, 1H, H-7), 6,60 (с, 2H, H-10 и H-14), 6,92 (д, $J=8,5$ Гц, 1H, H-3), 6,97 (ушир.д, $J=8,5$ Гц, 1H, H-4), 7,19 (ушир.с, 1H, H-6), 7,33 (ушир.с, 1H, H-23), 8,58 (ушир.с, 1H, H-24); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 27,11 (C-21), 54,88 (C-20), 57,17 (2C, C-15, и C-17), 57,24 (C-18), 62,24 (C-16), 107,77 (2C, C-10 и C-14), 114,17 (C-3), 118,90 (C-23), 122,93 (д, $J_{\text{PC}}=2,3$ Гц, C-6), 126,40 (C-4), 128,88 (C-22), 130,29 (C-8), 131,00 (C-7), 131,47 (C-5), 134,93 (C-9), 135,32 (C-24), 137,08 (C-12), 142,31 (д, $J_{\text{PC}}=6,1$ Гц, C-1), 150,91 (д, $J_{\text{PC}}=4,6$ Гц, C-2), 153,45 (2C, C-11 и C-13), 173,84 (C-19). Вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$: C, 52,27; H, 5,48; N, 7,62; P, 5,61. Найдено: C, 52,03; H, 5,43; N, 7,57; P, 5,57.

Безводная моно-L-гистидиновая соль СА4Р (масштабное увеличение)

Круглодонную трехгорлую колбу объемом 2000 мл снабжают механической мешалкой, капельной воронкой объемом 500 мл и термопарой, соединенной с прибором Therm-O-Watch L7-1100SA/28T, который регулирует нагревательный кожух. В колбу загружают L-гистидин (3,42 г, 21,6 ммоль), затем 216 мл деионизированной воды. Полученный раствор нагревают до 74-80°C при перемешивании. Добавляют раствор свободной кислоты СА4Р (120 мл, 0,18 М в ИПС, 21,6 ммоль), затем из капельной воронки добавляют изопропиловый спирт (1176 мл), поддерживая температуру раствора 73-74°C (требуется 14 мин). После добавления ИПС в прозрачный раствор вносят затравку безводной L-гистидиновой соли СА4Р (следовые количества). Температуру раствора поднимают до 80 °C, и кристаллизация начинается приблизительно через 3 мин после внесения затравки. Температуру медленно понижают до 74°C в течение 30 мин и поддерживают при 73-74°C в течение еще 1,5 час. Реакционную смесь оставляют медленно охлаждаться до 31°C в течение 3,5 час. Фильтрованием через бумагу Whatman #4 с отсасыванием отделяют игольчатое кристаллическое вещество, промывают ИПС (100 мл) и сушат в токе воздуха (отсасывание) в течение ночи (16 час), затем в вакуумном эксикаторе в течение 21,5 час. Получают 10,11 г безводной моно-L-гистидиновой соли СА4Р в виде белого твердого вещества (18,3 ммоль, выход 85%), т.пл. 213,65°C (ДСК). ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 3,30 (д, $J=6,5$ Гц, 2H, H-21), 3,65 (с, 6H, H-15 и H-17), 3,72 (с, 3H, H-16), 3,80 (с, 3H, H-18), 3,99 (т, $J=6,5$ Гц, 1H, H-20), 6,49 (д, $J=12,0$ Гц, 1H, H-8), 6,58 (д, $J=12,0$ Гц, 1H, H-7), 6,59 (с, 2H, H-10 и H-14), 6,91 (д, $J=8,5$ Гц, 1H, H-3), 6,97 (дд, $J=8,3$, 1,7 Гц, 1H, H-4), 7,19 (ушир.т, $J=1,7$ Гц, 1H, H-6), 7,34 (ушир.с, 1H, H-23), 8,60 (д, $J=1,4$ Гц, 1H, H-24); ^{13}C ЯМР (100 МГц, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 27,07 (C-21), 54,86 (C-20), 57,18 (2C, C-15 и C-17), 57,26 (C-18), 62,24 (C-16), 107,78 (2C, C-10 и C-14), 114,18 (C-3), 118,94 (C-23), 122,95 (д, $J_{\text{PC}}=2,3$ Гц, C-6), 126,43 (C-4), 128,79 (C-22), 130,31 (C-8), 130,98 (C-7), 131,49 (C-5), 134,91 (C-9), 135,29 (C-24), 137,10 (C-12), 142,31 (д, $J_{\text{PC}}=6,9$ Гц, C-1), 150,92 (д, $J_{\text{PC}}=4,6$ Гц, C-2), 153,45 (2C, C-11 и C-13), 173,82 (C-19). Вычислено для $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$: C, 52,27; H, 5,48; N, 7,62; P, 5,61. Найдено: C, 52,23; H, 5,35; N, 7,60; P, 5,55.

Безводная L-гистидиновая соль СА4Р может быть получена воспроизводимо в виде одной кристаллической формы. На фиг.10 приведен график ДСК (размер образца 2,3600 мг); на фиг.11 приведены данные порошковой рентгенографии для этого вещества.



Пример 4

Получение моно-соли метилового эфира глицина цис-CA4P

Для получения моно-соли метилового эфира глицина CA4P предпочтительна следующая методика получения из динатриевой соли CA4P. В методике используется гидрохлорид метилового эфира глицина непосредственно в присутствии N,N-диизопропилэтиламина, что обеспечивает повышенную стабильность по сравнению с использованием метилового эфира глицина в виде свободного основания. Кроме того, значительно улучшается получение свободной кислоты CA4P, так как при нейтрализации используют концентрированную серную кислоту (а, например, не разбавленную соляную кислоту, в результате исключается использование, например, этилацетата для экстракции и упаривания). По улучшенной методике исключается образование свободной кислоты транс-CA4P.

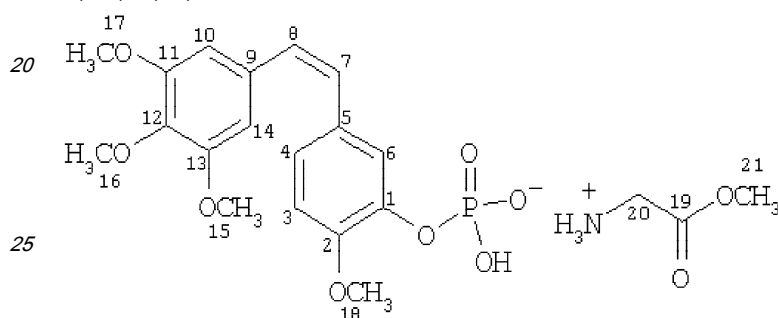
Реагенты и способы

Следующие реагенты и химикаты получены из коммерческих источников и используются без дополнительной очистки: изопропиловый спирт (ИПС) (сорт B&J, растворитель высокой степени чистоты), серная кислота (EM Science, 95-98%, партия #35310), гидрохлорид метилового эфира глицина (Aldrich Chemical Co. категория 99%, партия #03214MU), N,N-диизопропилэтиламин (Aldrich Chemical Co. категория 99,5%, партия #02819ER). Мультиядерные спектры ЯМР записаны на спектрометре Bruker DRX 400. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в м.д. относительно тетраметилсилана. (Химические сдвиги ЯМР ^{13}C определяют с использованием MeOH в качестве внешнего стандарта). Эксперименты по двумерному ЯМР HMQC [спектроскопия с гетероядерной мультиплетной квантовой корреляцией, обратная корреляция химического сдвига для определения, какой из ^1H молекулы связан с каким ядром ^{13}C (или другим ядром X)]; и HMBC [спектроскопия с гетероядерной мультиплетной корреляцией связей, модификация HMQC, используемая для определения дальнего взаимодействия ^1H - ^{13}C , а также для определения структуры и отнесения ^1H и ^{13}C в молекуле] проводят для отнесения сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C к структуре. ДСК проводят на дифференциальном сканирующем калориметре DSC/2920, TA Instruments.

Моно-соль метилового эфира глицина цис-CA4P

В круглодонную колбу объемом 100 мл загружают натриевую соль цис-CA4P (2,866 г, 6,51 ммоль) и ИПС (30 мл). Полученную суспензию перемешивают с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре. К суспензии порциями добавляют раствор серной кислоты (0,365 мл, 6,51 ммоль) в ИПС (60 мл). Смесь непрерывно перемешивают в течение 10 мин и фильтруют с отсасыванием с использованием фильтровальной бумаги Whatman #1. Твердое вещество (Na_2SO_4 , нерастворимо в ИПС) промывают ИПС (10 мл). Фильтрат и промывную порцию, содержащие свободную кислоту CA4P, объединяют в другой круглодонной колбе объемом 100 мл. К объединенному раствору добавляют гидрохлорид метилового эфира глицина (0,826 г, 6,51 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (1,254 мл, 7,16 ммоль). Полученную смесь нагревают на водяной бане с перемешиванием магнитной мешалкой. При 60°C смесь становится прозрачным раствором. При 65°C раствор превращается в суспензию. При 78°C суспензия растворяется, образуется прозрачный раствор. Нагревание прекращают, и раствор оставляют медленно охлаждаться в масляной

бане. При 60°C к раствору добавляют затравку моно-соли метилового эфира глицина цис-СА4Р, образуется суспензия. Перемешивание продолжают при температуре от 60°C до комнатной температуры в течение приблизительно 1 час и затем при комнатной температуре в течение ночи. Белое кристаллическое вещество отфильтровывают с отсасыванием с использованием фильтровальной бумаги Whatman #1, промывают ИПС (3 × 10 мл) и сушат в токе воздуха 6 час, получают 2,609 г моно-соли метилового эфира глицина цис-СА4Р (5,38 ммоль, выход 82,6%). Анализ методом ВЭЖХ: 100% цис-СА4Р, т.пл. 136,40°C (ДСК). ¹Н ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 3,52 (с, 6Н, Н-15 и Н-17), 3,61 (с, 3Н, Н-16), 3,71 (с, 3Н, Н-18), 3,77 (с, 3Н, Н-21), 3,87 (с, 2Н, Н-20), 6,26 (д, J=12,1 Гц, 1Н, Н-8), 6,42 (с, 2Н, Н-10 и Н-14), 6,43 (д, J= 12,1 Гц, 1Н, Н-7), 6,70 (д, J=8,8 Гц, 1Н, Н-3), 6,79 (ушир.д, J=8,8 Гц, 1Н, Н-4), 7,16 (ушир.с, 1Н, Н-6); ¹³С ЯМР (100 МГц, {¹Н}, D₂O) δ 41,27 (С-20), 54,58 (С-21), 56,99 (2С, С-15, и С-17), 57,21 (С-18), 62,09 (С-16), 107,60 (2С, С-10 и С-14), 113,89 (С-3), 122,98 (С-6), 126,22 (С-4), 130,25 (С-8), 130,69 (С-7), 131,37 (С-5), 134,61 (С-9), 137,09 (С-12), 142,42 (д, 2 J_{PC}=6,9 Гц, С-1), 150,89 (д, ³J_{PC}=4,6 Гц, С-2), 153,33 (2С, С-11 и С-13), 169,95 (С-19), Вычислено для C₂₁H₂₈NO₁₀P: С, 51,96; Н, 5,81; N, 2,88; Р, 6,38, Найдено: С, 51,74; Н, 5,79; N, 2,87; Р, 6,30.



(Примечание: система нумерации, приведенная выше, и где бы в описании такая система нумерации не приводилась, введена только с целью удобства и может не соответствовать номенклатуре IUPAC).

На фиг.12 приведен график ДСК моно-соли метилового эфира глицина цис-СА4Р (размер образца 3,7400 мг); на фиг.13 приведены данные порошковой рентгенографии для этого вещества (2 партии).

Пример 5

Получение соли этилового эфира глицина и свободной кислоты СА4Р

В сосуд для ВЭЖХ помещают этилацетат (2 мл), раствор СА4Р в изопропанол (150 мкл 0,42 М раствора, 63 мкмоль) и раствор этилового эфира глицина в трет-бутиловом эфире (800 мкл 0,08 М раствора, 64 мкмоль) и интенсивно перемешивают приблизительно 3 мин. В полученный прозрачный раствор вносят затравку с помощью капли суспензии из другого опыта, и смесь оставляют при комнатной температуре на ночь. Образующееся белое твердое вещество, как оказывается, не является кристаллическим согласно микроскопическому исследованию, и поэтому смесь оставляют при комнатной температуре еще на три дня. Добавляют метил-трет-бутиловый эфир (1 мл), и смесь перемешивают 10 мин. Исследование под микроскопом показывает, что полученная смесь превратилась в игольчатые кристаллы. Иглы отфильтровывают под вакуумом и сушат, получают соль этилового эфира глицина СА4Р (22,4 мг, выход 66%). Анализ протонного спектра ЯМР показывает, что соотношение этилового эфира глицина к СА4Р составляет 1,7:1. Данные ЯМР ¹Н для соли этилового эфира глицина и СА4Р: ¹Н ЯМР (300 МГц, D₂O) δ 1,20 (т, J - 7,2 Гц, 3Н, CH₃), 3,60 (с, 6Н, Н-15 и Н-17), 3,66 (с, 3Н, Н-16), 3,74 (с, 3Н, Н-18), 3,79 (с, 2Н, CH₂N), 4,21 (кв, J=7,2 Гц, 2Н, CH₂CH₃), 6,44 (д, J=12,2 Гц, 1Н, Н-8), 6,55 (д, J=12,2 Гц, 1Н, Н-7), 6,57 (с, 2Н, Н-10 и Н-14), 6,80 (д, J=8,7 Гц, 1Н, Н-3), 6,85 (ушир.д, J=8,7 Гц, 1Н, Н-4), 7,23 (ушир.с, 1Н, Н-6).

Настоящее изобретение не ограничено описанными здесь конкретными вариантами. На

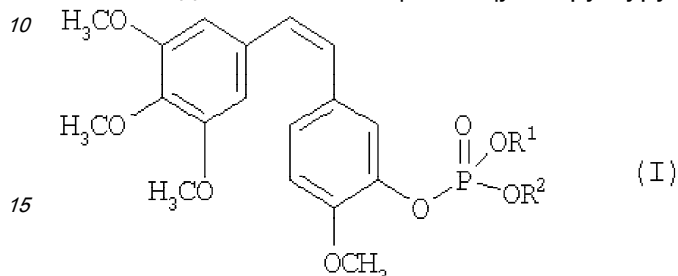
самом деле различные модификации изобретения, в дополнение к описанным здесь, будут очевидны для специалиста в данной области из предшествующего описания.

Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

- 5 В документе процитированы различные публикации и патентные документы, описания которых включено целиком в качестве ссылок.

Формула изобретения

1. Соединение, имеющее общую структуру формулы I



где один из заместителей $-OR^1$ или $-OR^2$ представляет собой $-O-QH^+$, а другой представляет собой гидроксил или $-O-QH^+$; и Q представляет собой

- 20 (A) необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион OH^+ ;

- (B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

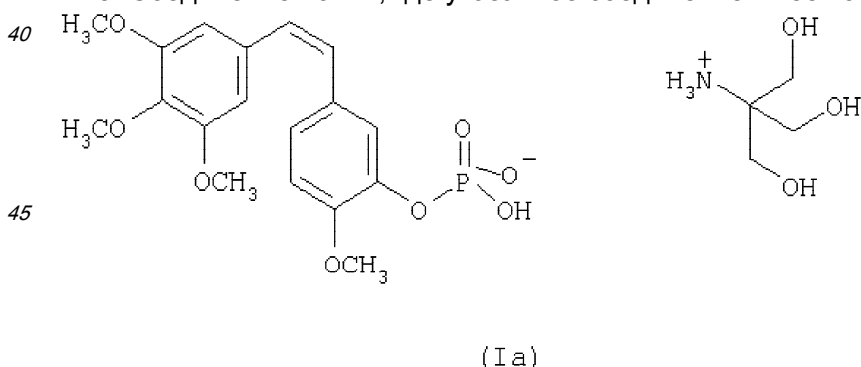
- 25 (C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

- 30 2. Соединение по п.1, где Q представляет собой необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ .

- 35 3. Соединение по п.2, где азот Q, образующий четвертичный аммониевый катион QH^+ в формуле I, представляет собой первичный амин, связанный с необязательно замещенной алифатической группой, или вторичный амин, связанный с двумя необязательно замещенными алифатическими группами, где необязательные заместители представляют собой одну или несколько гидроксильных групп или аминогрупп.

4. Соединение по п.2, где указанный необязательно замещенный алифатический органический амин представляет собой трометамин и его стереомерные формы.

5. Соединение по п.2, где указанное соединение имеет структуру формулы Ia

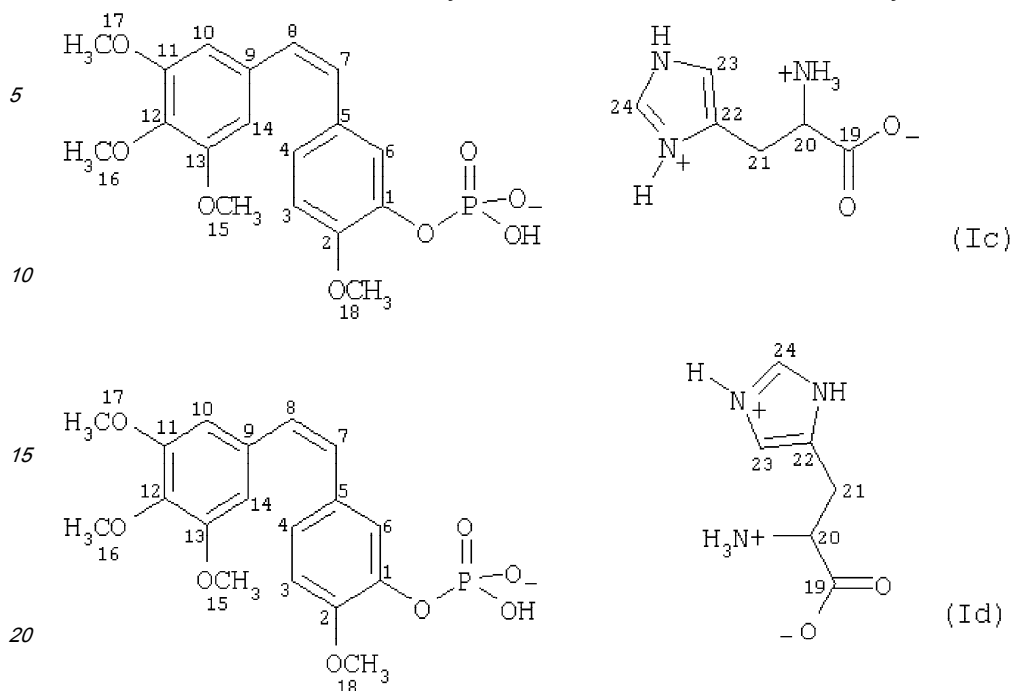


- 50 6. Соединение по п.1, где Q представляет собой аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ .

7. Соединение по п.6, где указанная аминокислота представляет собой гистидин и его

стереомерные формы.

8. Соединение по п.6, где указанное соединение имеет одну из следующих структур:



9. Соединение по п.1, где Q представляет собой аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

10. Соединение по п.9, где Q представляет собой C_{1-6} -алкиловый эфир глицина.

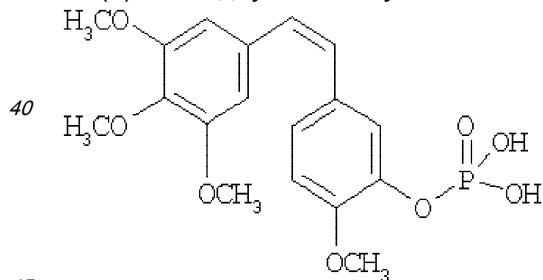
11. Фармацевтическая композиция для модулирования роста опухолей или метастазов и роста доброкачественных сосудистых пролиферативных расстройств, содержащая

- (a) соединение по любому из предыдущих пунктов и
(b) фармацевтически приемлемый носитель.

12. Применение соединения формулы (I) по любому из пп.1-10 в производстве лекарственного средства для модулирования роста опухолей и метастазов у животного.

13. Фармацевтическая композиция для модулирования роста опухолей или метастазов и роста доброкачественных сосудистых пролиферативных расстройств, образованная смешиванием соединений, включающих

- (a) свободную кислоту CA4P, имеющую структуру



- (b) соединение Q, где Q представляет собой

(A) необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который способен вместе с протоном образовывать четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; и где, кроме

того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

14. Композиция по п.13, где Q представляет собой необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который способен вместе с протоном образовывать четвертичный аммониевый катион QH^+ .

15. Композиция по п.14, где указанный необязательно замещенный алифатический органический амин представляет собой трометамин и его стереомерные формы.

16. Композиция по п.13, где Q представляет собой аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном способен образовывать четвертичный аммониевый катион QH^+ .

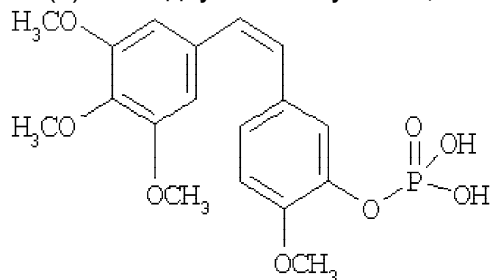
17. Композиция по п.16, где указанная аминокислота представляет собой гистидин и его стереомерные формы.

18. Композиция по п.13, где Q представляет собой аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

19. Композиция по п.18, где Q представляет собой C_{1-6} -алкиловый эфир глицина.

20. Фармацевтическая композиция для модулирования роста опухолей или метастазов и роста доброкачественных сосудистых пролиферативных расстройств, образованная смешиванием соединений, включающих

(а) свободную кислоту CA4P, имеющую структуру



(b) соединение Q, где Q представляет собой

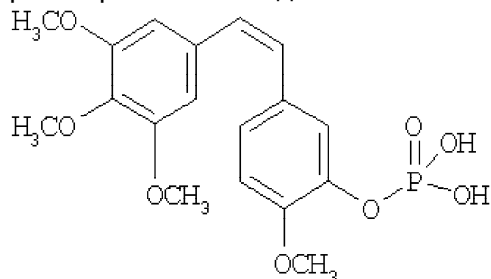
(A) необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который способен вместе с протоном образовывать четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(B) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

(C) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров;

и (с) фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ получения соединения по п.1, включающий стадию контактирования в растворителе свободной кислоты CA4P, имеющей структуру



с соединением Q, где Q представляет собой

(A) необязательно замещенный алифатический органический амин, содержащий, по меньшей мере, один атом азота, который способен вместе с протоном образовывать

четвертичный аммониевый катион QH^+ ;

(В) аминокислоту, содержащую, по меньшей мере, два атома азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ ; или

5 (С) аминокислоту, содержащую один или несколько атомов азота, где один из атомов азота вместе с протоном образует четвертичный аммониевый катион QH^+ и где, кроме того, все карбоксильные группы аминокислоты находятся в форме эфиров.

22. Способ по п.21, где указанное соединение по п.1 образует в указанном растворителе осадок в форме кристаллов.

10 23. Способ по п.21, где указанный необязательно замещенный алифатический органический амин представляет собой трометамин и его стереомерные формы.

24. Способ по п.21, где указанная свободная кислота CA4P контактирует с трометамином в водном изопропанол в качестве указанного растворителя, с последующим сбором моно-триметаминной соли CA4P в кристаллической форме из указанного растворителя.

15 25. Способ по п.21, где упомянутая аминокислота представляет собой гистидин или его стереомерные формы,

26. Способ по п.22, где указанная свободная кислота CA4P контактирует с гистидином в изопропанол в качестве растворителя, с последующим сбором моно-L-гистидиновой соли CA4P в кристаллической форме из указанного растворителя.

20 27. Способ по п.21, где указанная свободная кислота CA4P контактирует с C_{1-6} -алкиловым эфиром глицина.

25

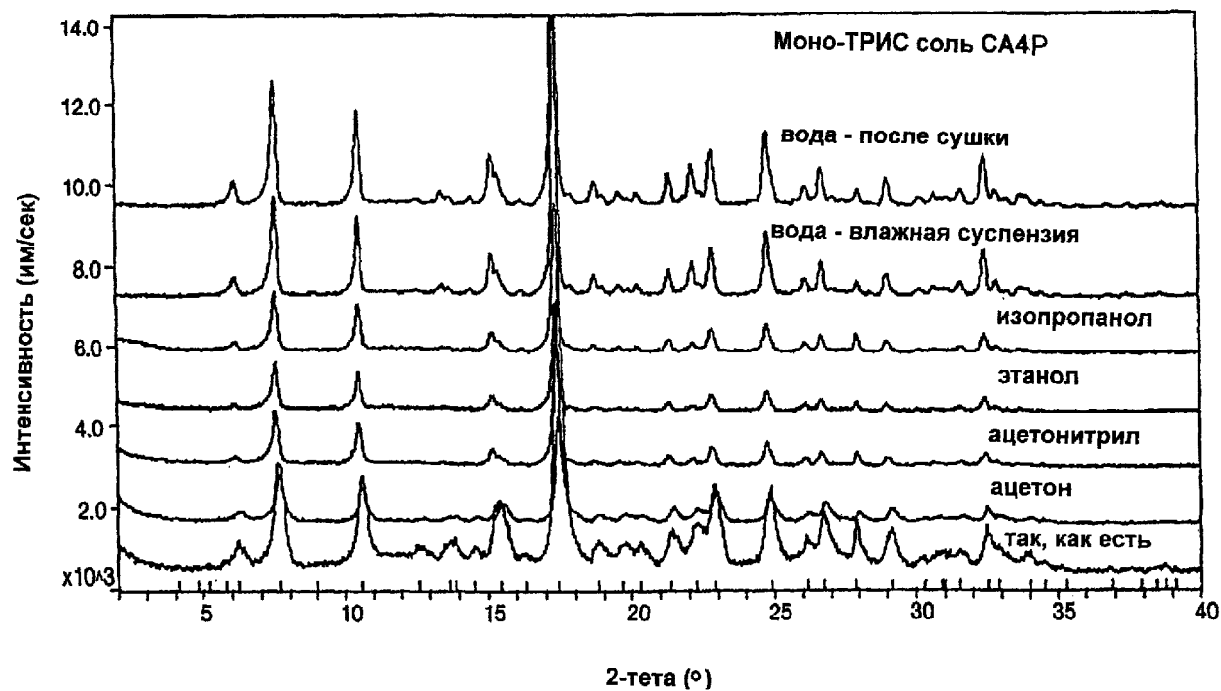
30

35

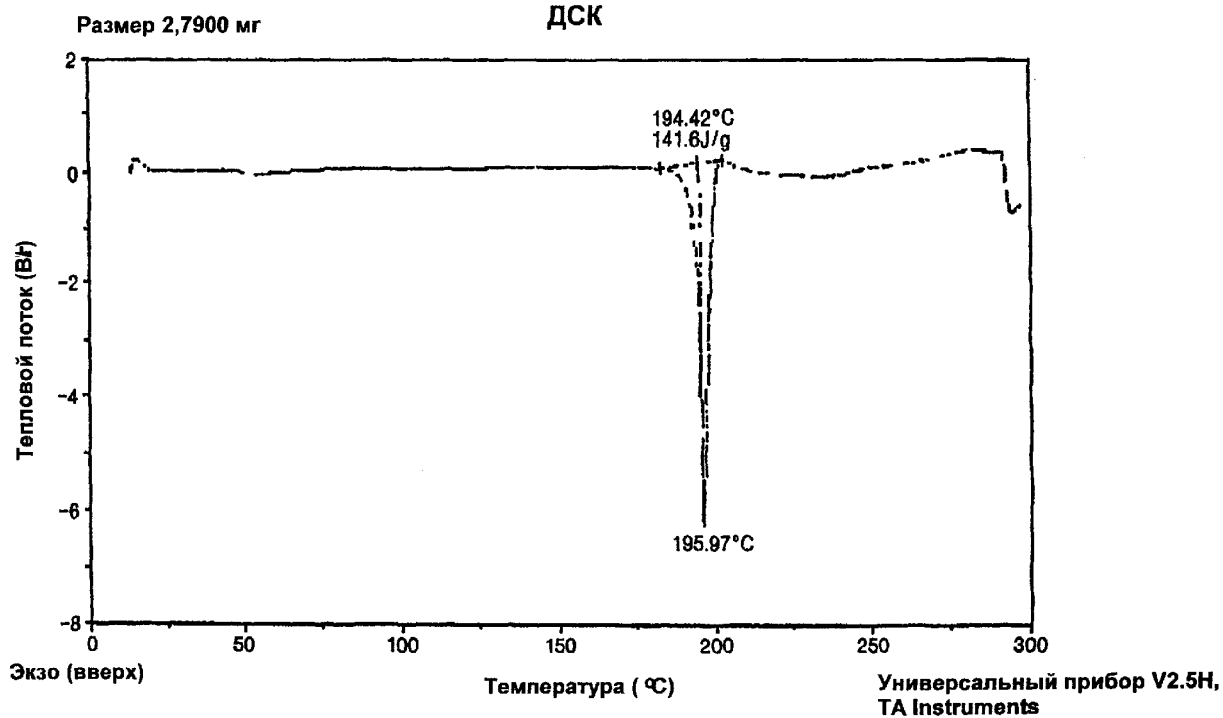
40

45

50

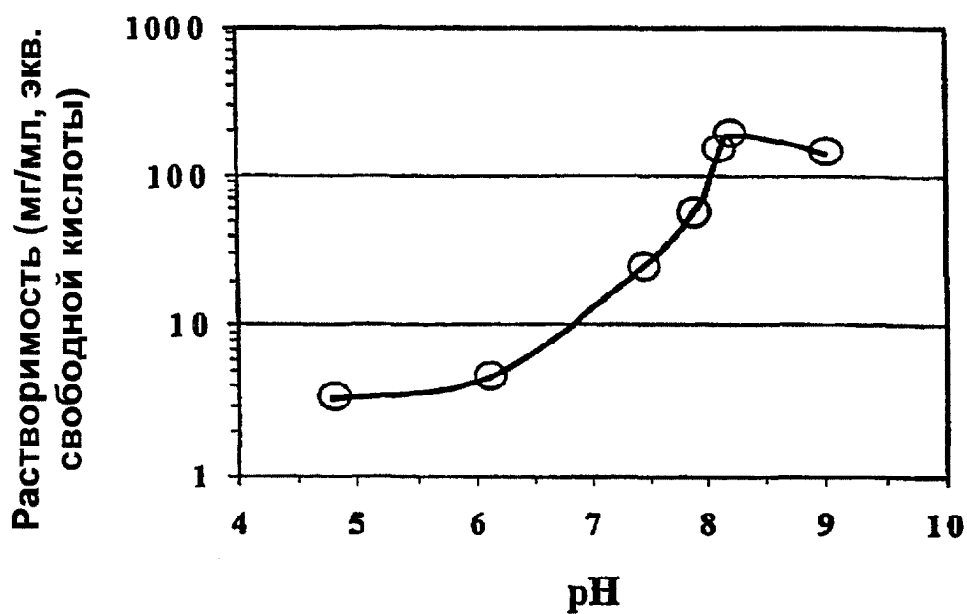


ФИГ. 2



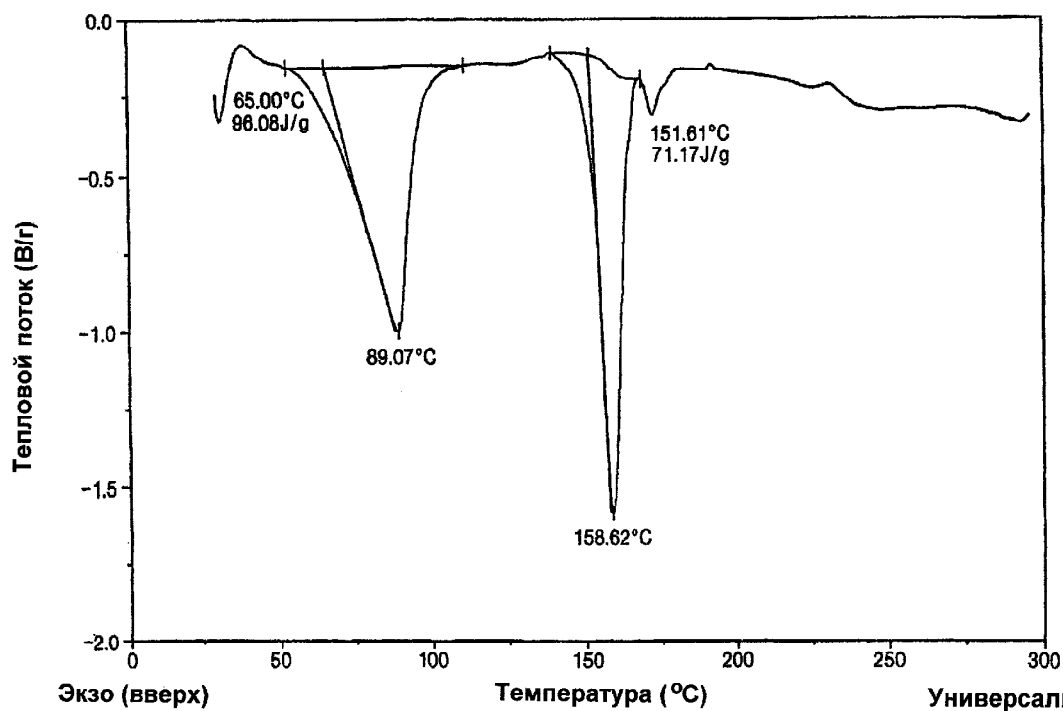
ФИГ. 3

Растворимость в воде моно-ТРИС соли СА4Р при 25°С



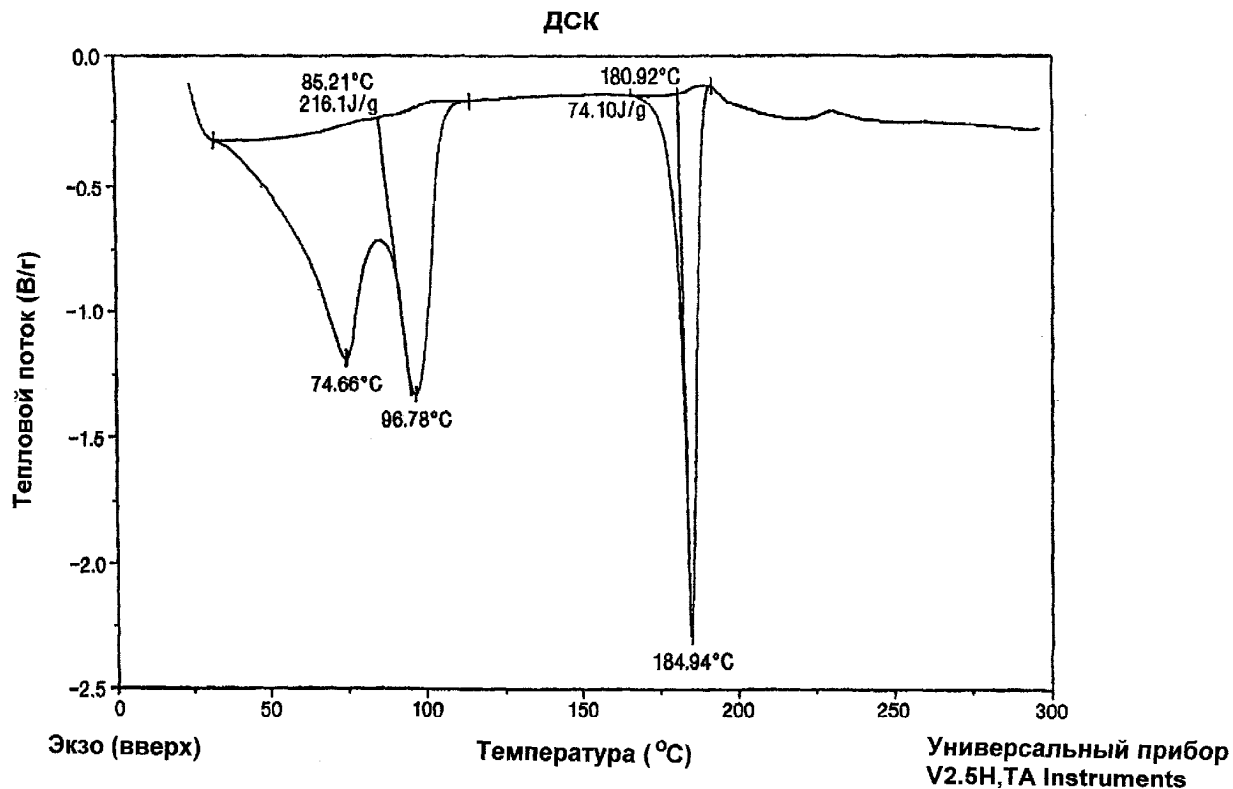
ФИГ. 4

ДСК

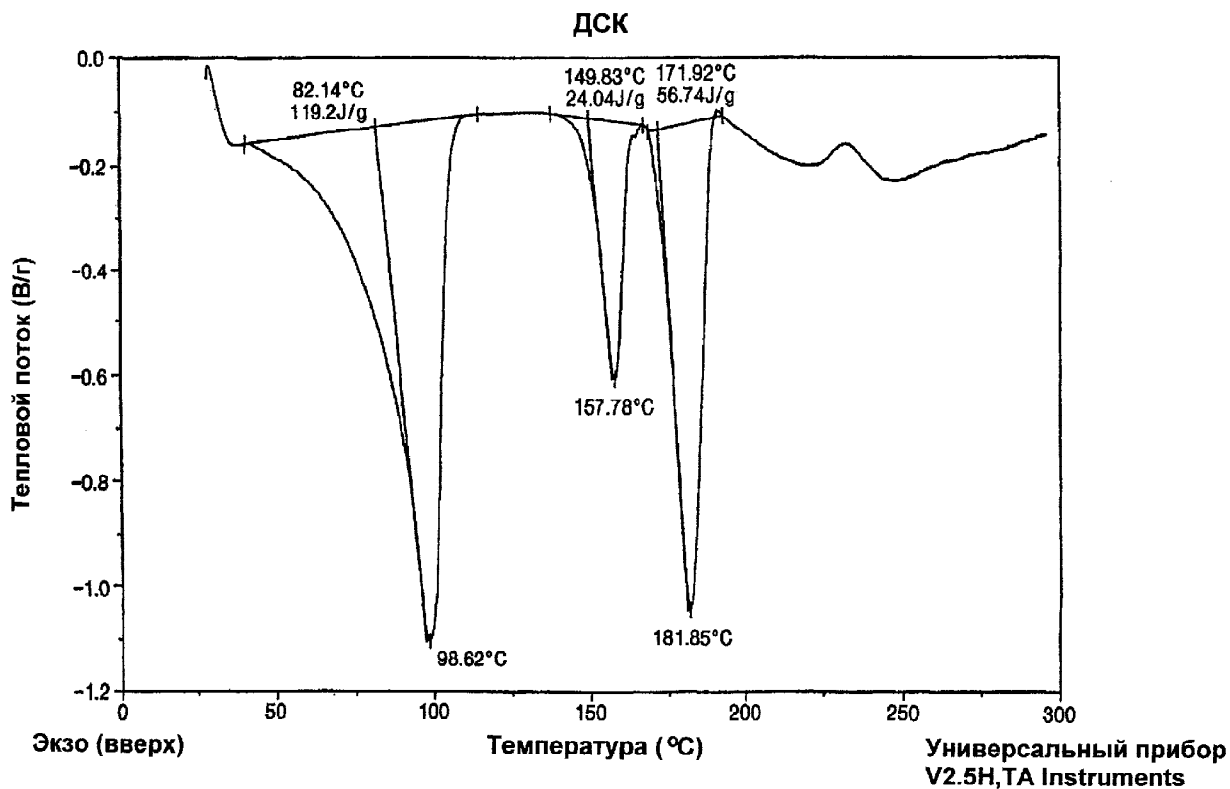


ФИГ. 5

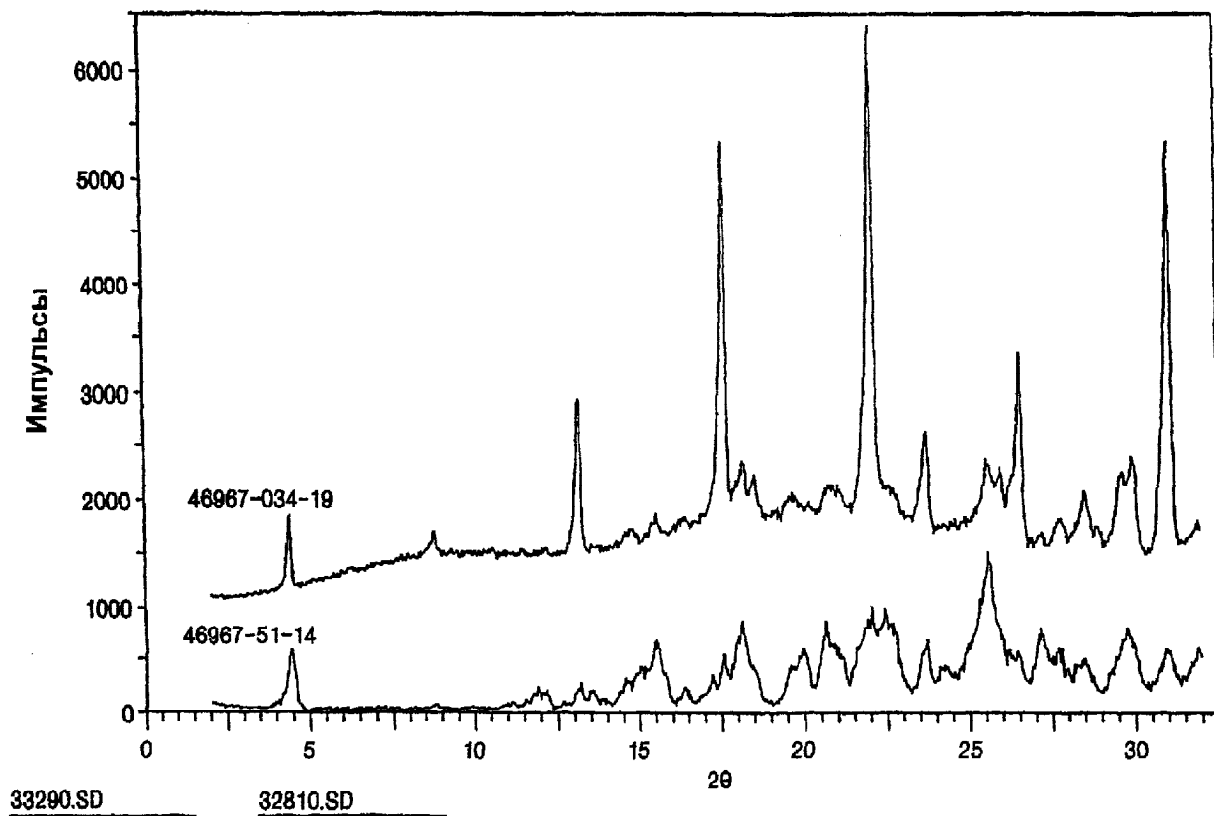
Универсальный прибор
V2.5H, TA Instruments



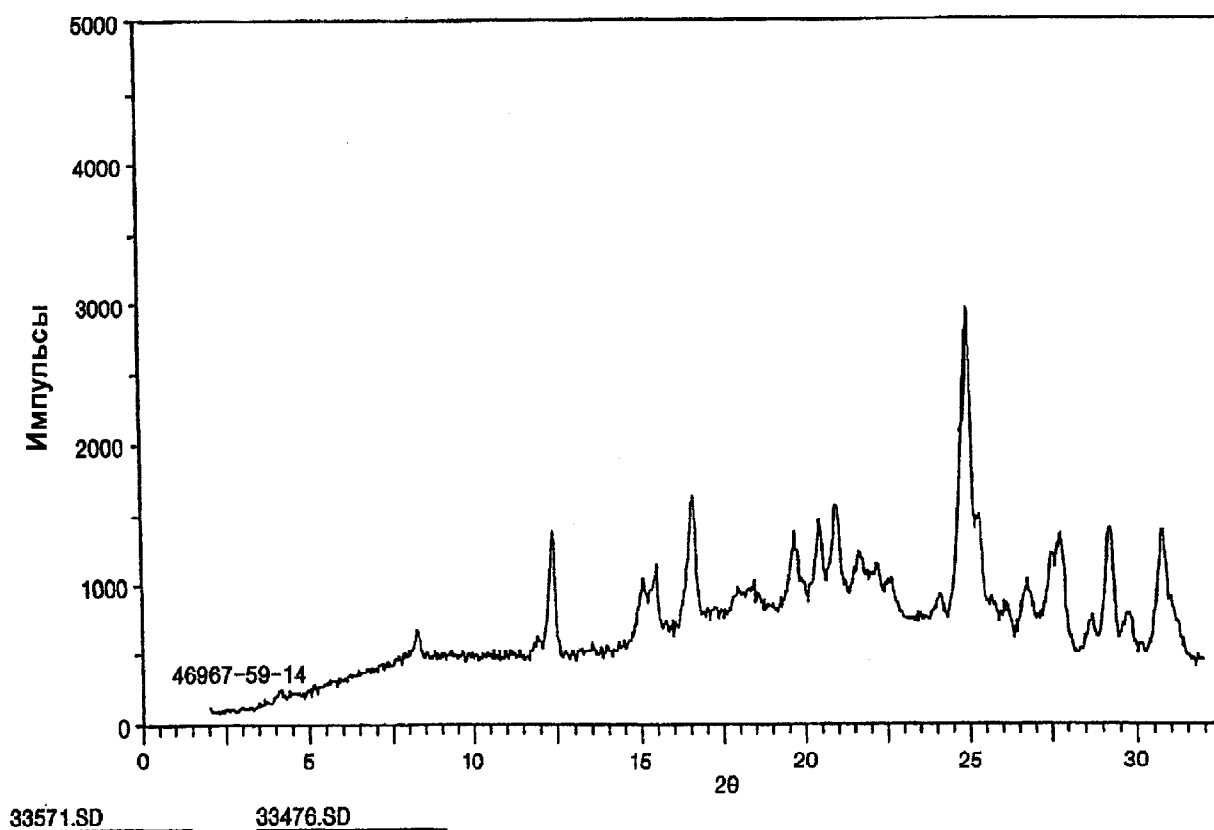
ФИГ. 6



ФИГ. 7

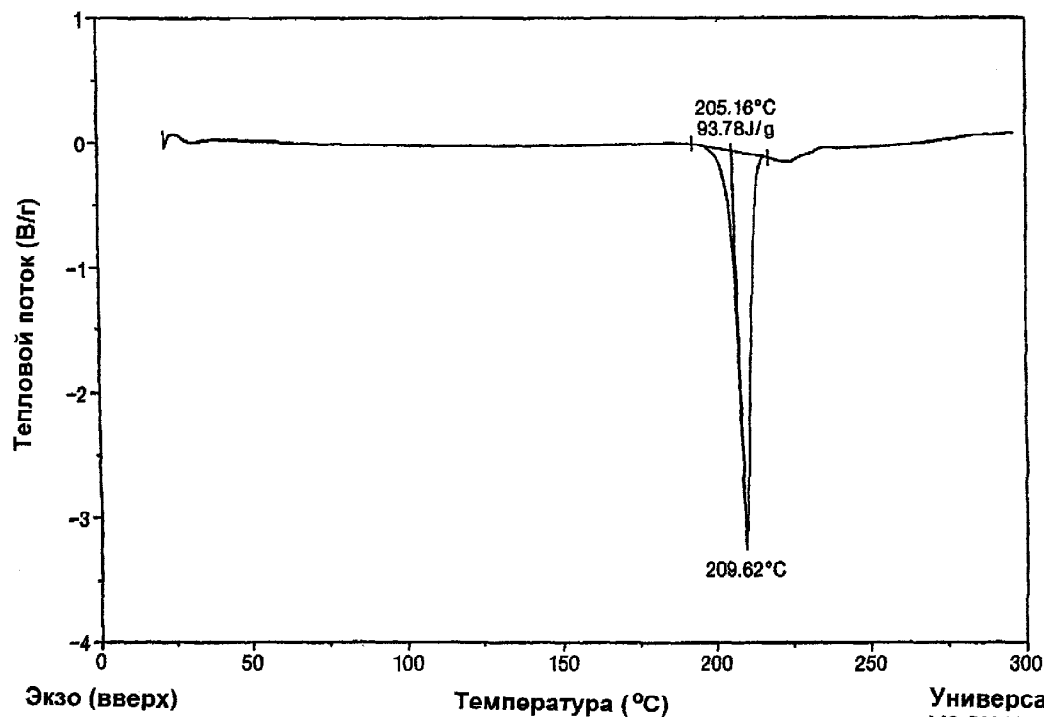


ФИГ. 8

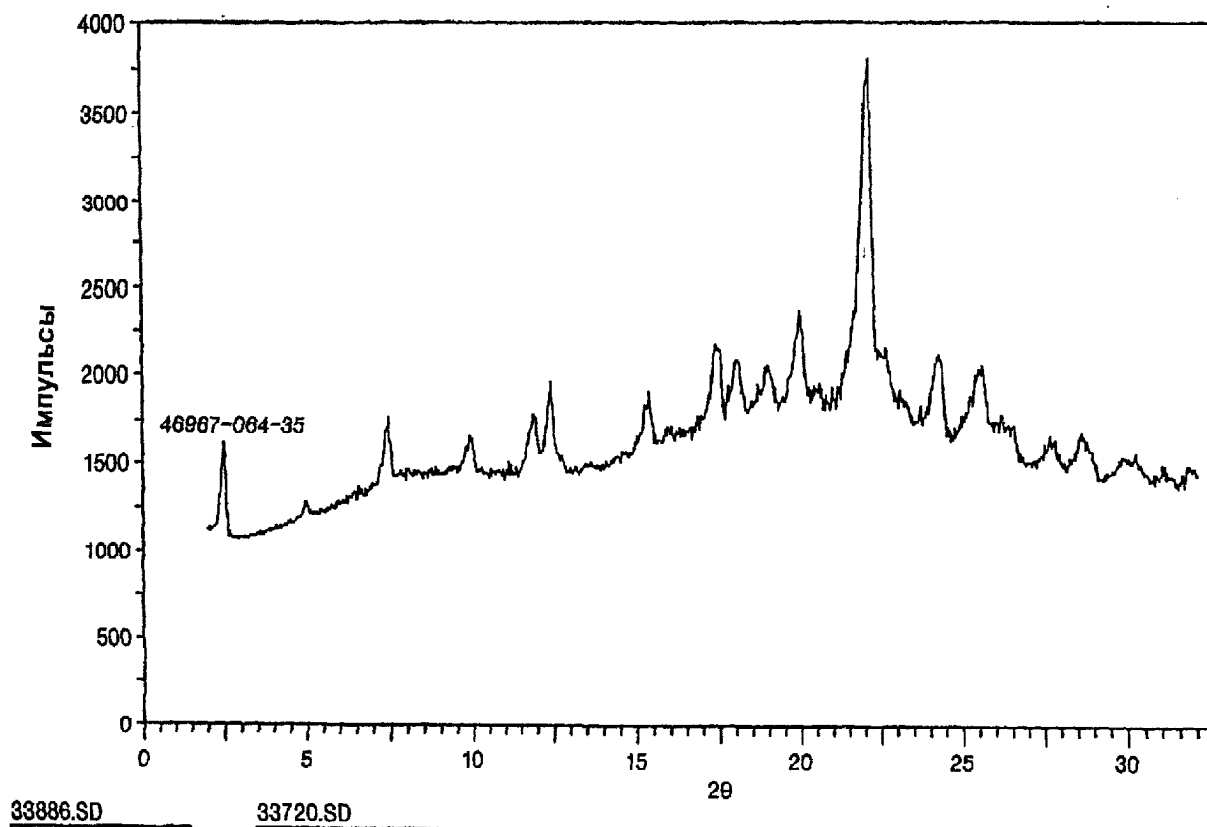


ФИГ. 9

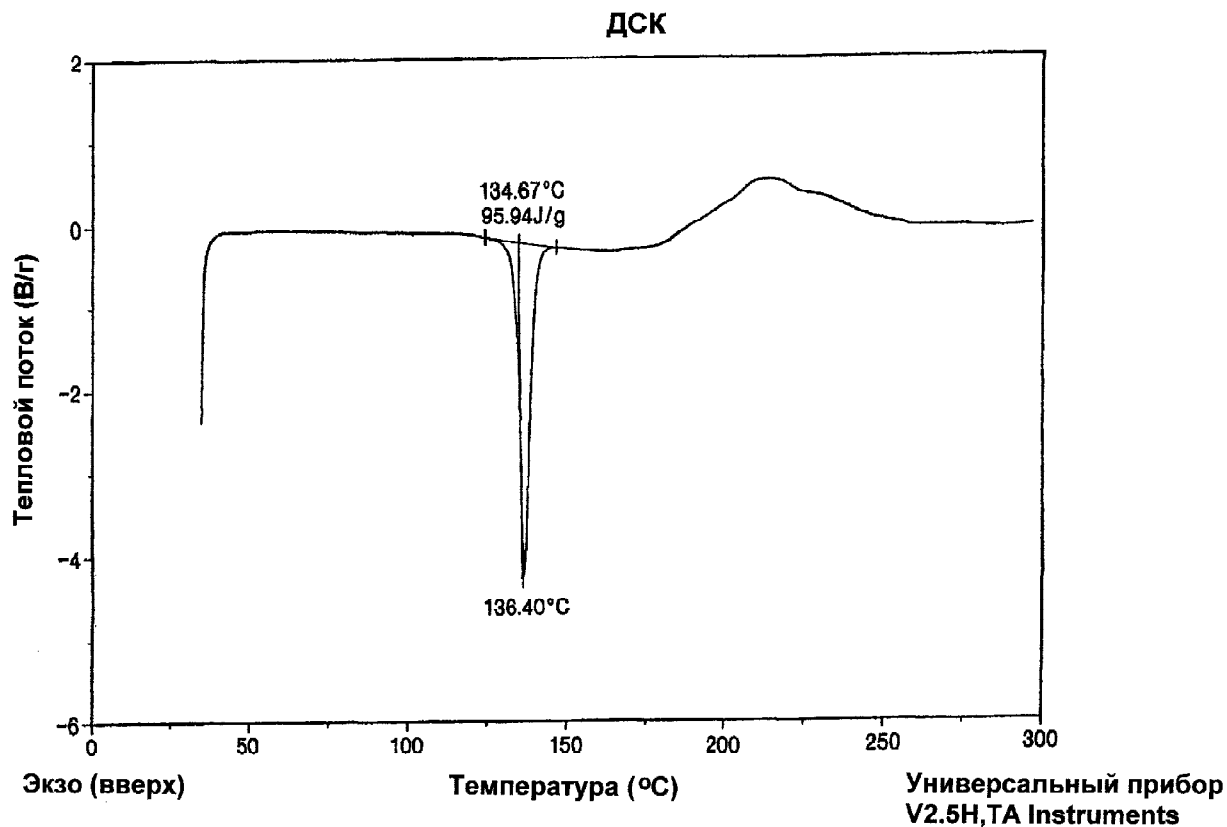
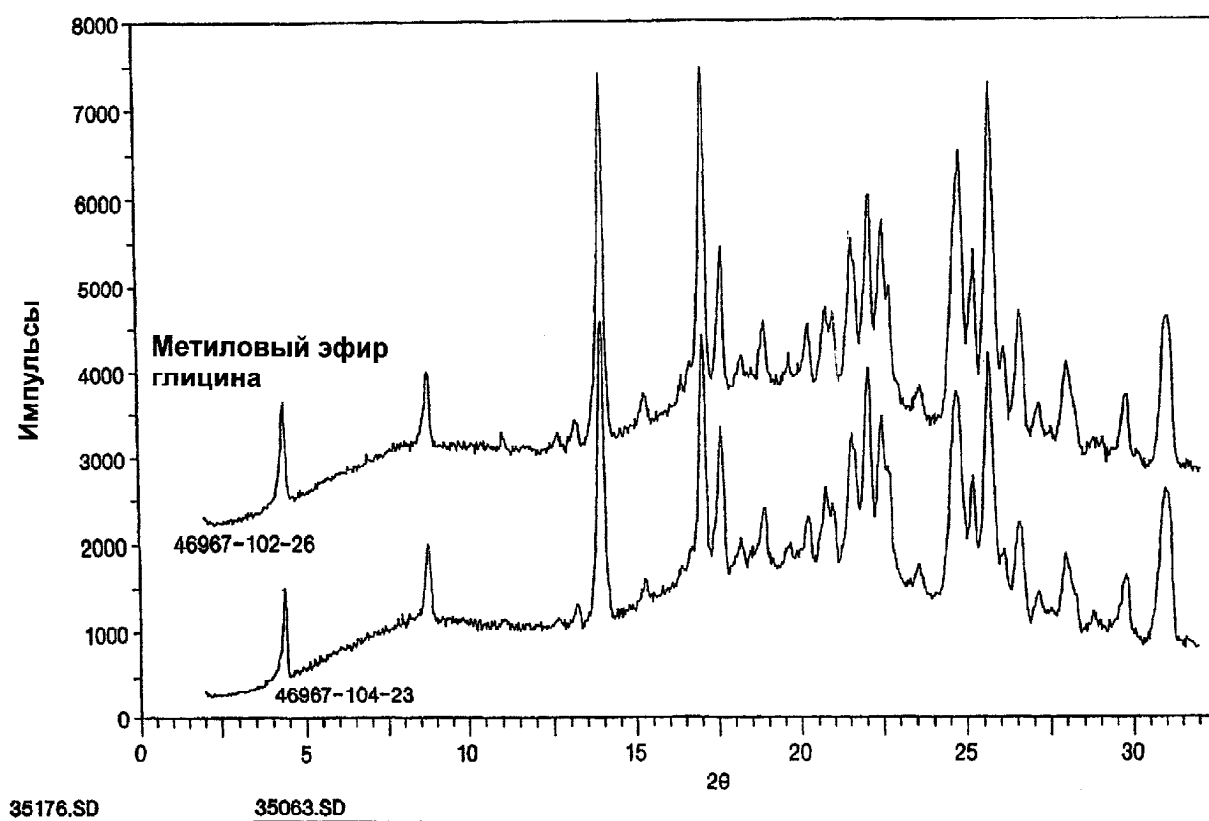
ДСК



ФИГ. 10



ФИГ. 11

**ФИГ. 12****ФИГ. 13**