



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91105549.5

[51] Int.Cl⁵

C07D305/14

[43] 公开日 1992年3月11日

[22] 申请日 91.8.13

[30] 优先权

[32] 90.8.28 [33] US [31] 573,731

[71] 申请人 弗吉尼亚科技知识产权有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 D·G·I·金斯顿

赵志扬

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 汪 洋

说明书页数: 28

附图页数: 1

[54] 发明名称 紫杉醇的水溶性衍生物

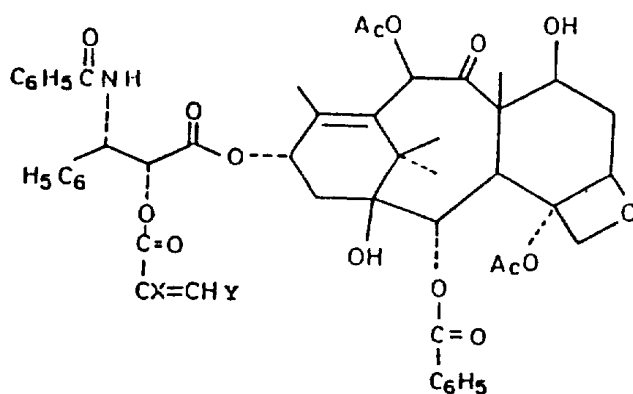
[57] 摘要

合成了经磺化的 2'-丙烯酰紫杉醇和经磺化的 2'-O-酰基紫杉醇衍生物, 它们具有改良的水溶性及稳定性, 同时保有生物活性。具体说, 2'-[(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐系由紫杉醇和丙烯酸反应, 然后再令 2'-丙烯酰紫杉醇和亚硫酸氢盐进行米歇尔反应(Michael reaction)而合成。具改良水溶性之 2'-O-酰基紫杉醇的二醇衍生物系由二醇与 2'-O-酰基紫杉醇反应而合成出。

> 20 <

权 利 要 求 书

1. 以下通式所示的紫杉醇衍生物:

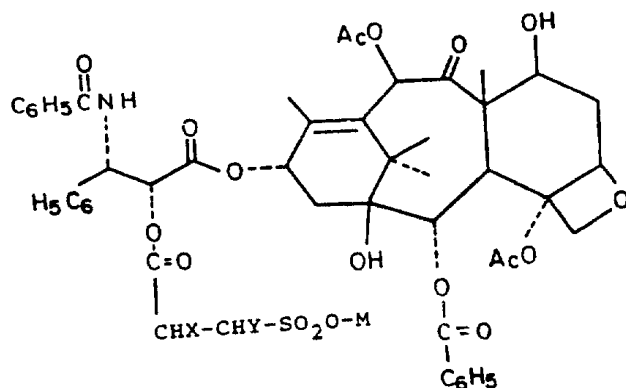


式中:

X为选自 H, 烷基和芳基的基团; 和 Y选自 H, 烷基和芳基。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 X和 Y为 H。

3. 以下通式所示的紫杉醇的水溶性衍生物:

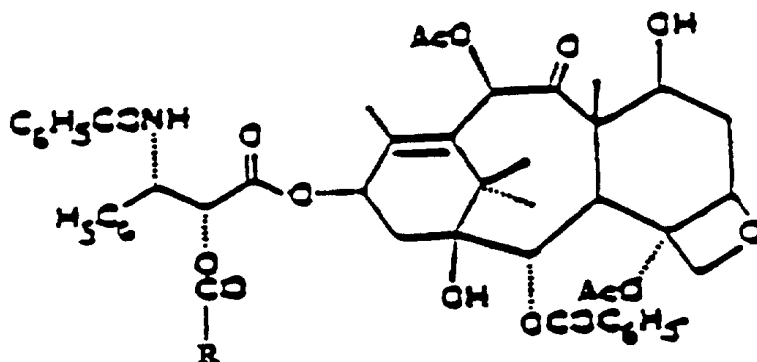


式中:

X系选自 H, 烷基和芳基; Y系选自 H, 烷基和芳基; 和 M系选自 H, 碱金属, 和铵基。

4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 X和 Y为 H, M为Na。

5. 以下通式所示的紫杉醇的水溶性衍生物:



式中 R选自:

$-(CH_y)_n-CO-NH-(CH_2)_z-SO_3^-O-M$, 和 $-(CH_y)_n-CO-O-(CH_2)_z-OH$, 其中,
M系选自 H, 碱金属和铵基;

n 为 1-3 ,

y 为 1-2 , 唯若当 n 为 1 时, y 不为 1, 以及,

z 为 2-3 。

6. 根据权利要求 5 的化合物, 其中, y 为 2, n 为 2, z 为 2。

7. 根据权利要求 5 的化合物, 其中, y 为 2, n 为 2, z 为 3。

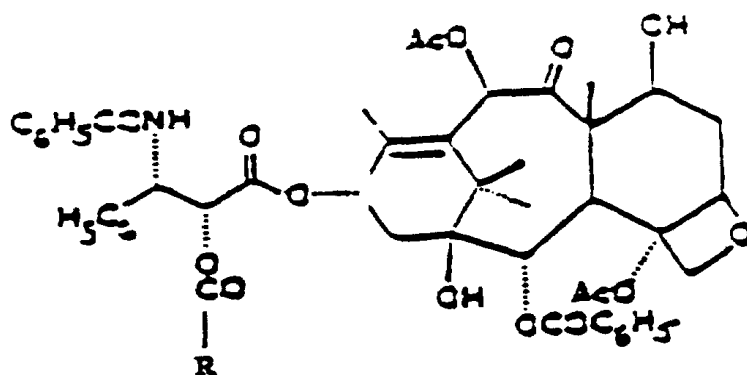
8. 根据权利要求 5 的化合物, 其中, M 为季铵离子。

9. 一种制备 2'-丙烯酰紫杉醇衍生物的方法, 它包括以下步骤:

(a) 用丙烯酸系的酸酯化紫杉醇。

10. 根据权利要求 9 的方法, 它进一步包括以下步骤:

(b) 在步骤(a)形成的 2'-丙烯酰酯的 β -乙烯酯位置上用亲核试剂进行 Michael 反应而形成紫杉醇的水溶性衍生物, 其中, 所述亲核试剂系选自亚硫酸氢根离子和亚硫酸根离子, 所述水溶性衍生物具以下通式:



式中:

R为-CHX-CHX-SO₂O-M ; 以及
X系选自 H, 烷基和芳基; 以及
M系选自 H, 碱金属和氨基。

11. 根据权利要求10的方法, 其中, 上述步骤(a) 系在氯甲酸异丁酯偶合剂的存在下进行。

12. 根据权利要求11的方法, 其中, 步骤(a) 包含以下步骤:

(a1) 在氢气下将三乙胺和前述丙烯酸溶于四氢呋喃中, 形成第一溶液;

(a2) 冷却前述第一溶液至约 0℃;

(a3) 合并前述氯甲酸异丁酯和前述第一溶液, 形成第二溶液; 再温热前述第二溶液至约室温;

(a4) 将紫杉醇加至前述第二溶液中而形成所述2'-丙烯酰紫杉醇衍生物; 以及

(a5) 沉淀及干燥前述2'-丙烯酰紫杉醇衍生物;

步骤(b) 包括以下步骤:

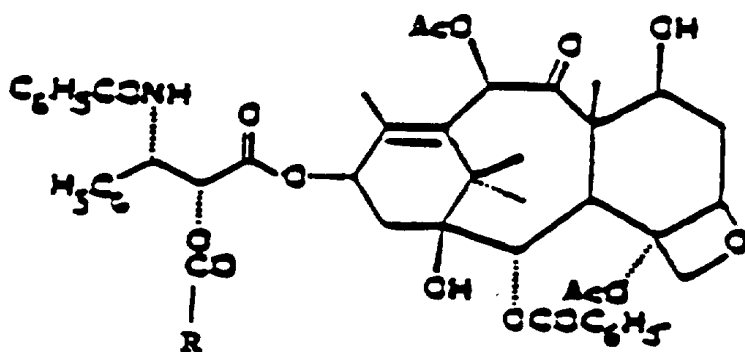
(b1) 溶解前述步骤(a) 的2'-丙烯酰紫杉醇衍生物于异丙醇中而形成第三溶液,

(b2) 溶解偏-亚硫酸氢钠于蒸馏水中而形成第四溶液; 和

(b3) 合并上述第三溶液和上述第四溶液而形成所述水溶性紫杉醇衍生物。

13. 一种制备水溶性紫杉醇衍生物的方法，它包括以下步骤：

(a) 令2'-O-酰基紫杉醇衍生物和有机溶剂可溶的酰基磺酸盐反应而形成具以下通式的2'-O-酰基紫杉醇衍生物，



式中：

R为 $-(CH_y)_n-CO-NH-(CH_2)_z-SO_2O-M$ ，其中

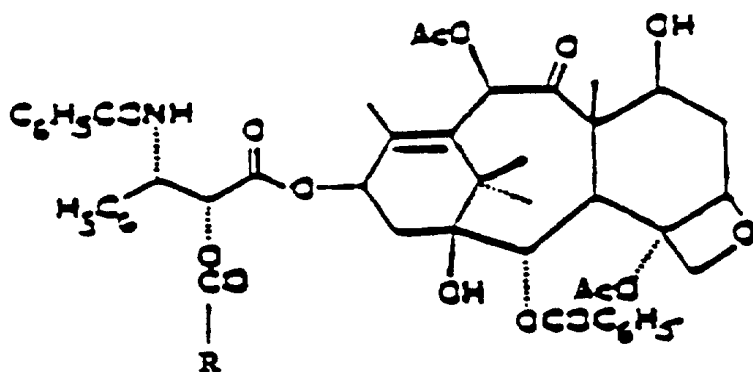
M为氨基，

n为1-3，

y为1-2，唯若当 $n=1$ 时， $y=2$ ，以及

z为2-3。

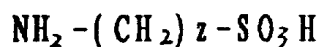
14. 根据权利要求13的方法，其中所述2'-O-酰基紫杉醇衍生物具以下通式：



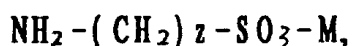
式中：R为 $-(CH_y)-CO-OH$ ，其中：

y 为 1-2 , 以及
 n 为 1-3 , 唯若当 n = 1 时, y = 2 ,
 其中步骤(a) 包括以下步骤:

(a1) 将以下通式所示的化合物:



与铵基化合物之水溶液合并, 形成以下通式所示的盐类:



其中 z 为 2-3 , M 为铵基化合物; 以及

(a2) 令前述 2'-O- 酰基酸紫杉醇衍生物与前述步骤(a1) 的盐类反应。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中还包括以下步骤:

(b) 将前述铵基转化成选自 H 和碱金属的半分子。

16. 一种制备水溶性紫杉醇衍生物的方法, 它包括以下步骤:

(a) 令紫杉醇与以下通式所示的化合物反应:



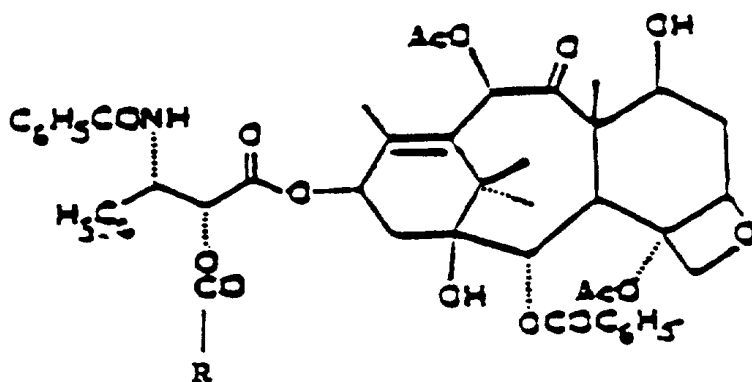
M 为铵基,

n 为 1-3 ,

y 为 1-2 , 唯若当 n = 1 时, y = 2 , 以及

z 为 2-3 ,

上述反应产生以下通式所示的紫杉醇衍生物:



式中：R为 $-(\text{CH}_y)_n-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_z-\text{SO}_2\text{O}-\text{M}$ ，其中：

M为铵基，

n为1-3，

y为1-2 唯若当 $n=1$ 时， $y=2$ ，以及

z为2-3。

17. 根据权利要求16的方法，其中还包括以下步骤：

(b) 将前述铵基转化成为选自 H和碱金属的半分子。

紫杉醇的水溶性衍生物

本发明涉及具有抗肿瘤活性的紫杉醇(taxol)的水溶性衍生物,具体说是涉及经磺化的2'-丙烯酰紫杉醇衍生物、2'-磺基烷基氨基-0-酰胺紫杉醇衍生物、以及2'-乙二醇-0-酰胺紫杉醇衍生物。

紫杉醇是天然产生的双萜类,它具有充作抗癌药物的大潜效,并且在许多肿瘤系统中具有活性。紫杉醇先经分离而其结构由Wani等人载于“Plant Anti-Tumor Agents. VI. The Isolation And Structure of Taxol, A Novel Anti-Leukemic And Anti-Tumor Agent From *Taxus brevifolia*, ”, J. Am. Chem. Soc., 1971, 93, 2325。紫杉醇在紫杉属、*Taxus brevifolia*、以及*T. baccata*和*T. cuspidata*的茎树皮中发现。

紫杉醇的生物活性与其对细胞分裂的作用有关。紫杉醇促进细胞分裂期间形成丝状分裂纺锤的微管的形成。但是,紫杉醇阻碍形成丝状分裂纺锤之微管的小管之去聚合作用,该小管是发生细胞分裂的要素。因此,紫杉醇导致细胞分裂停止。紫杉醇的机制是独一无二的,因为它是促进小管聚合体的形成,而其它抗癌药物(诸如长春花碱及秋水仙素)则阻碍微管的形成。

紫杉醇的深入测试未尝进行,其系因为紫杉醇系短暂供应而未尝成功地合成出。由主要之研究已证明紫杉醇对急性白血病及黑色素瘤具最高活性,且在其他肿瘤中已见及某些活性。此外,由McGuire et al.的研究发现,紫杉醇系为抗药性卵巢癌的活性试剂。见于:“Taxol: A Unique Antineoplastic Agent With Significant Activity In

Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms , ” Ann. Int. Med., 1989, 11, 273-279 , 在此将其并为参考资料。但是, 因紫杉醇的低水溶性, 剂量必需以稀释于葡萄糖溶液中的形式输液注入。

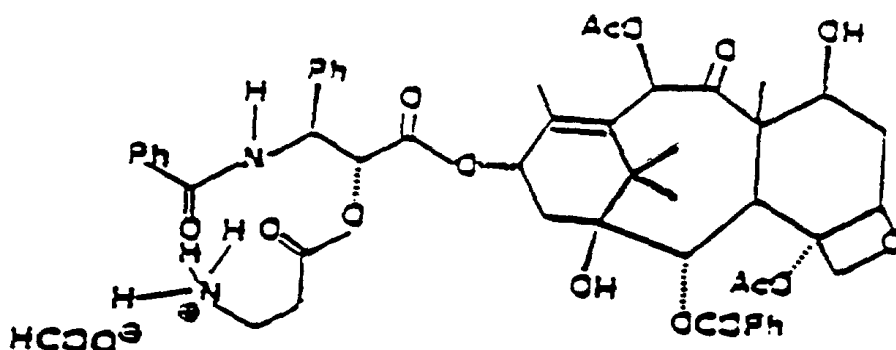
必须注意在第 1 层临床试验中, 紫杉醇本身不具有过度的毒性作用, 但和紫杉醇一起投服以弥补紫杉醇低水溶性的乳化剂引起了严重的过敏反应。事实上, 至少一个病人的死亡是因乳化剂诱起的过敏反应所致。因此, 研究人员已尝试制造保有其抗肿瘤及抗癌活性的紫杉醇水溶性衍生物。

参照图 1, 紫杉醇的结构系藉由紫杉醇样品的 H NMR 光谱证明。NMR 信号是相当分开的, 且涵括 1.0-8.2ppm 的范围。为简化起见, 将光谱分成三区: 介于 1.0 和 2.5ppm 之间的第 1 区, 它是由甲基和乙酸酯基的强 β -质子信号以及某些亚甲基所引起的复合多重峰所形成; 介于 2.5 和 7.0ppm 之间的第 2 区, 代表由紫杉醇骨架和侧链上的大多数质子所产生的信号; 介于 7.0 和 8.2ppm 之间的第 3 区, 是由 C-2 苯甲酸酯、C-3' 苯基和 C-3' 苯甲酰氨基的芳香族质子的信号所形成。图 1 中 NMR 光谱的尖峰是依紫杉醇结构中引起信号的质子所连接的碳原子数目标记。

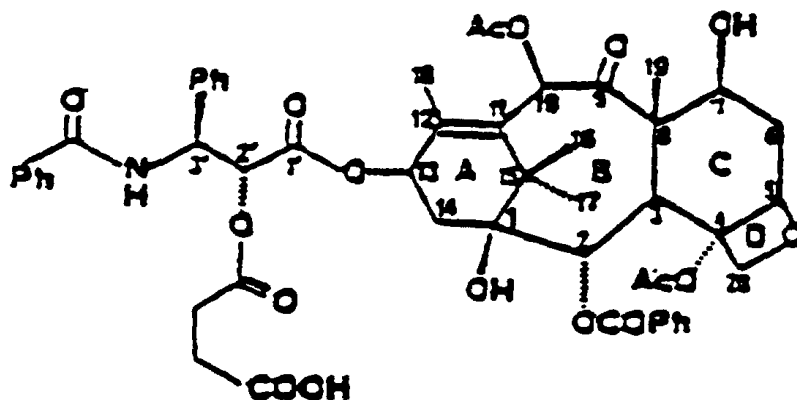
Magri 和 Kingston 报道了及 C-2' 和 C-7 位置上经取代以使其更易溶于水的紫杉醇的生物活性。见于 “Modified Taxols , 4.1 Synthesis And Biological Activity of Taxols Modified In The Side Chain, ” Journal of Natural Products vol. 51, no. 2 pp. 298-306, Mar - April 1988, 在此并为参考资料。2'-(叔丁基二甲基甲硅烷基) 紫杉醇已被合成, 并且发现基本上为无活性的; 这说明紫杉醇侧链的 2' 位置上需为游离羟基, 才具有生物活性。此外, 在 2'-乙酰基紫杉醇和 2', 7-二乙酰基紫杉醇的 2' 位置上的酰基取代基在体内条件下易于水解, 且在细胞培养生物分析中均具有活性。2' 位置上的酰基取代基的不稳定性 (lability) 暗示 2'-乙酰基紫杉醇可作为紫杉醇的前体药物形式。(通

常，前体药物是一种在生化转形后具有药理活性的化合物)。

据Magri 和Kingston报道已制得具有较高水溶性的两种紫杉醇，
2'-(β -丙氨酰) 紫杉醇:



和2'-琥珀酰紫杉醇:



2'-(β -丙氨酰) 紫杉醇据发现在体外及体内均具有活性，但却不稳定。2'-琥珀酰紫杉醇(由使用琥珀酸酐处理紫杉醇而制成)具有远低于紫杉醇的P-388 体内活性。因此，研究人员致力于其他没有不稳定性或在体内或体外无活性的紫杉醇衍生物。

Dentsch 等人在文献 (“Synthesis of Congeners And Prodrugs. 3.1 Water-Soluble Prodrugs of Taxol With Potent Antitumor Activity,” J. Med. Chem. 1989, 32 788-792 在此并为参考资料) 中论及2'-琥珀酰紫杉醇和2'-戊二酰紫杉醇的盐类具有优于游离酸的改

良抗肿瘤活性。因为这些研究人员深信由不同抗衡离子制成的盐类经常具有实际上不同的性质，所以合成并测试了多种2'-经取代的紫杉醇盐类。2'-经取代紫杉醇衍生物的三乙醇氨和N-甲基葡萄糖氨盐较钠盐具有更大的水溶性和更大的活性。此外，据发现一系列的2'-戊二酰紫杉醇具有高于其2'-琥珀酰紫杉醇同系物的活性。特别是，使用N,N'-羰基二咪唑(CDI) 2'-戊二酰紫杉醇和3-(二甲氨基)-1-丙氨偶合反应而得到的紫杉醇盐类具有较佳的溶解度及生物活性。

除了提高紫杉醇的溶解度及生物活性之外，所生成的紫杉醇衍生物还需具有较高的稳定性以增长其使用期限。据信紫杉醇酯的盐类极易产生碱水解，而水溶性基团（诸如羧酸盐或氨盐）易成为碱性。因此，极需合成具有改进或相等于紫杉醇活性的中性水溶性紫杉醇衍生物。有机磺酸盐易成为中性或弱碱性，因此，紫杉醇酯的磺酸盐应具有改进的稳定性。此外，由于在合成紫杉醇酯的羧酸和氨盐中的困难，极需发现较便宜的水溶性紫杉醇衍生物及形成它们的方法。

本发明涉及水溶性紫杉醇衍生物的制备以及紫杉醇的水溶性磺酸盐。在一优选方案中，2'-[(3-磺基-1-氧丙基)连氧基]紫杉醇钠盐系由紫杉醇与丙烯酸反应形成2'-丙烯酰紫杉醇，此2'-丙烯酰紫杉醇再和亚硫酸氢钠进行Michael反应而形成紫杉醇的2'-磺基乙基酯盐。在另一优选方案中，2'-O-酰基酸紫杉醇（诸如2'-琥珀酰紫杉醇和2'-戊二酰紫杉醇）和牛磺酸的四丁基铵盐进行新颖反应而形成2'-O-酰基酸紫杉醇的磺基烷基氨盐。另一优选方案涉及氨基磺酸盐与琥珀酸酐或戊二酸酐的反应，以及该产物和紫杉醇的反应而形成磺基烷基2'-O-酰基酸紫杉醇衍生物。在另一优选方案中系形成2'-O-酰基酸紫杉醇的乙二醇衍生物。这些化合物具有高度的水溶性，并具有抗白血病，抗肿瘤，和/或抗癌活性。

因此，本发明的主要目的是制备具有高度生物活性及稳定性的紫杉

醇的水溶性衍生物。

本发明的再一目的是提供一种形成2'-丙烯酰紫杉醇及其磺酸盐的简单及价廉的方法。

本发明的另一目的是制备2'-O-酰基酸紫杉醇及其磺基烷基胺盐。

本发明的再一目的是由简单而价廉的方法制备2'-O-酰基酸紫杉醇的磺基烷基胺衍生物。

本发明的又一目的是制备2'-O-酰基酸紫杉醇的羟基烷氧基衍生物。

图1示出紫杉醇的结构以及其核磁共振光谱，其尖峰系依其对应的紫杉醇结构的部分而标记。

紫杉醇系得自National Cancer Institute。H-NMR和C-NMR光谱系由Bruker 270SY 270MHz光谱仪测得；2D-NMR系使用Bruker WP200 200MHz光谱仪测得。化学位移在H-NMR中均以距离TMS下磁场之ppm记录，而C-NMR的学位移是基于在77.0ppm下的氘仿位移或在0ppm的TMS位移。样品通常是在CDCl₃或CD₃OD中在室温下记录。质谱系使用Finnegan-MAT112气态层析-质谱及VG7070HF质谱仪（装置有数据系统，FAB来源，以及EI/CI来源）测得。NMR和质谱数据在紫杉醇及其衍生物的研究中最为有用，而其他方法（诸如IR和UV）则提供额外的结构确认资料。

使用的其他分析仪器包括Perkin-Elmer 710B红外线和Perkin-Elmer 330紫外线-可见光光谱仪，以及Perkin Elmer极化器。HPLC系在包含Waters M6000泵，Rheodyne注射阀，Waters Radial-Pak RLM-100 RP-8管柱及Waters 440UV侦测器的装置上进行。

2'-丙烯酰紫杉醇

2'-[(3-磺基-1-羟基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐系由紫杉醇与丙烯酸偶合反应后，再由亚硫酸氢盐离子进行Michael加成反应而制

成。紫杉醇和丙烯酸的偶合反应以氯甲酸异丁酯作为偶合剂。在经急骤层析（硅胶，1/1 二氯甲烷/乙酸乙酯）纯化后产生94%的2'-丙烯酰紫杉醇。利用TLC发现丙烯酸偶合至紫杉醇在60℃下15小时内完成90%。在延长反应时间之后不形成C-2'、C-7的二取代产物。由2'-丙烯酰紫杉醇的质子NMR光谱显示出C-2'质子的信号由未经取代的紫杉醇中的C-2'质子的4.73ppm位移向下磁场移动至3.46ppm。下磁场位移符合C-2'羟基之酰化作用。因为在4.43ppm的C-7质子的信号和未经取代紫杉醇的C-7质子信号(4.38ppm)比较下基本上并无变化，可获结论为C-7位置上未发生任何反应。由质谱的m/z 930(MNa+)及908(MN+)尖峰显示分子量为907。

2'-丙烯酰紫杉醇再和亚硫酸氢钠进行Michael加成反应。使用亚硫酸氢钠的理由为它是优异亲核剂，并且能为该反应提供稳定的pH条件。Michael加成反应产物的质子NMR光谱和2'-丙烯酰紫杉醇的光谱明显不同。在2'-丙烯酰紫杉醇的NMR光谱中因乙烯基质子的存在而产生的信号并不存在于Michael加成产物的光谱中。但是，在3.14ppm及2.93ppm处的二个三重峰显示在Michael加成产物中的二个新的亚甲基。由Michael加成产物的质谱中存在于m/z 1034(MNa+)和1012(MH+)处的尖峰指出分子量为1011。

曾试图在吡啶和DCC(二环己基碳化二酰亚胺)存在下，通过合并紫杉醇和3-羟基-3-合氧基丙基磺酸的一步反应形成2'-〔(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基〕紫杉醇钠盐，但未得到任何产物。这可能是由于磺酰基对反应中间体的分子内进攻所致。

2'-O-酰基紫杉醇衍生物

2'-{〔4-((2-磺基乙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基〕连氧基}紫杉醇钠盐和2'-{〔4-((3-磺基丙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基〕连氧基}紫杉醇钠盐系由2'-琥珀酰紫杉醇分别和牛磺酸(2-氨基乙基磺酸)

和3-氨基磺酸四丁铵盐偶合反应而高产量制得。需知其他季铵盐也可用以令氨基磺酸可溶于有机溶剂中。2'-琥珀酰紫杉醇系由琥珀酸酐和紫杉醇在室温下在吡啶或DMP中反应2小时而得。和紫杉醇之NMR光谱相比较, 2'-琥珀酰紫杉醇的NMR光谱示出C-2'质子信号向下磁场移动至5.51ppm, 而琥珀酰质子则产生多重峰, 且其中心在约2.6ppm。

2'-琥珀酰紫杉醇再和牛磺酸四丁铵盐反应, 使用氯甲酸异丁酯作为偶合试剂。2'-{ [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇四丁铵盐在硅胶上, 使用7/1 二氯甲烷/甲醇之急骤层析纯化后产率为100%。由TLC监视下, 反应在2小时内仅完成80%; 为获致100%产率, 必需延长反应时间。2'-琥珀酰紫杉醇的磺烷基氨衍生物的NMR光谱示出二个亚甲基在3.6ppm和2.94ppm处的新尖峰。2'-{ [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇的钠盐系由令2'-{ [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇四丁铵盐通过Dowex 50离子交换柱(Na⁺形态) 而得。钠盐的NMR光谱证明四丁基的信号不存在。钠盐质谱的m/z 1105(MNa⁺)和1083(MH⁺)尖峰之存在指出分子量为1082。2'-{ [4-((3-磺基丙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐系由磺基乙基氨基紫杉醇所用之相同方法制成, 但是, 牛磺酸系用3-氨基-1-磺基丙酸四丁铵盐取代, NMR光谱确认3-磺基丙氨基衍生物的合成; 新的尖峰存在于3.28, 1.98和2.87ppm, 代表形成丙基部分之3个额外亚甲基。磺基丙氨基-琥珀酰紫杉醇衍生物之钠盐形式系由令四丁铵盐通过Dowex 50离子交换管柱(Na⁺形态) 而形成。由磺基丙氨基琥珀酰紫杉醇衍生物的钠盐的质谱中存在于m/z 1119(MNa⁺)和1097(MH⁺)处的尖峰指出分子量为1096。

亦预期可于氨基磺酸和酸酐或二元酸之间形成酰氨连结, 且此产物可和紫杉醇反应而形成水溶性2'-O-酰基酸紫杉醇衍生物。优选的是, 氨基磺酸系为有机溶剂可溶之盐类。

直接由2'-琥珀酰紫杉醇之一步反应形成2'-{ [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐的尝试并未成功。将2'-琥珀酰紫杉醇与三乙醇氨、氯甲酸异丁酯、四氢呋喃(THF)、牛磺酸、DMF 和水合并。但是, 溶解牛磺酸所需之水会将混合酐中间体水解而回至起始物。当尝试无水条件时, 反应仍不成功, 因为牛磺酸不溶于有机溶剂中。

2'-{ [4-((2-乙烷硫醇) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇系由将2'-琥珀酰紫杉醇和三乙氨、氯甲酸异丁酯、THF、2-硫代乙氨和二氯甲烷合并而低产率制成。用 β -氯代过氧苯酸(MCPBA) 和二氯甲烷氧化硫醇成为所要之磺酸的尝试并未产生显著数量的所要磺基烷氨琥珀酰紫杉醇衍生物。

琥珀酰紫杉醇的乙二醇衍生物:

2'-{ [4-((羟乙基) 连氧基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇系由琥珀酰紫杉醇和乙二醇偶合反应制成。羟乙基连氧基琥珀酰紫杉醇衍生物在室温下, 20小时反应时间后之产率为83%。制得羟乙基连氧基琥珀酰紫杉醇衍生物以转化紫杉醇2'位置上的第2羟基成为第1羟基, 假设产物中羟基的反应性大于紫杉醇中的羟基, 而因此使其可能在温和条件下被制成其他的紫杉醇衍生物。由乙二醇衍生物的NMR 光谱示出在3.7ppm和4.1ppm处的新尖峰的存在, 其被指定为羟乙基连氧基衍生物的二个新的亚甲基。由质谱中存在于 m/z 1020(MNa^+)和998(MHa^+) 处的尖峰指出分子量为997。

2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐:

2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐系由紫杉醇和N-羰基苯甲氧基(CBZ)- γ -氨基丁酸偶合反应后, 再去除氨保护基而得。紫杉醇与N-CBZ- γ -氨基丁酸的反应系使用二环己基碳化二酰亚氨(DCC) 作为偶合剂。所得2'-NCBZ- γ -氨基丁酰紫杉醇在使用硅胶及3/2 己烷/乙酸

乙酯之制备级 HPLC 层析纯化后的产率为75%。DCC 由加入水而分解成二环己基脲，因而用以驱动反应的过量试剂并不产生问题；大部分之二环己基脲和N-CBZ- γ -氨基丁酸系由过滤移除。2'-CBZ- γ -氨基丁酰紫杉醇的去保护系以5% Pd/C 为催化剂及以甲酸为氢原子来源而进行。甲酸产生移除CBZ 保护基用的活化形态氢原子，而反应产生2'- γ -氨基丁酰紫杉醇衍生物的甲酸盐，其水溶性高于中性形态。NMR 证实了2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐的合成。但是，该化合物在甲醇中不稳定且在几小时后分解而回到紫杉醇。该不稳定性排除了以2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐作为紫杉醇前驱药形态之进一步考虑。

水溶性:

所有化合物的水溶性系由1-辛醇和水之间的分配系数测定。使用经蒸馏水饱和的辛醇及用辛醇饱和之蒸馏水以供溶解度之测定。部分实验结果显示2'-[(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐水溶性系210 倍于紫杉醇，2'-{ [4-((2-磺基乙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基]连氧基}紫杉醇钠盐水溶性则系191 倍于紫杉醇，而2'-{ [4-((3-磺基丙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基]连氧基}紫杉醇水溶性则系118 倍于紫杉醇。

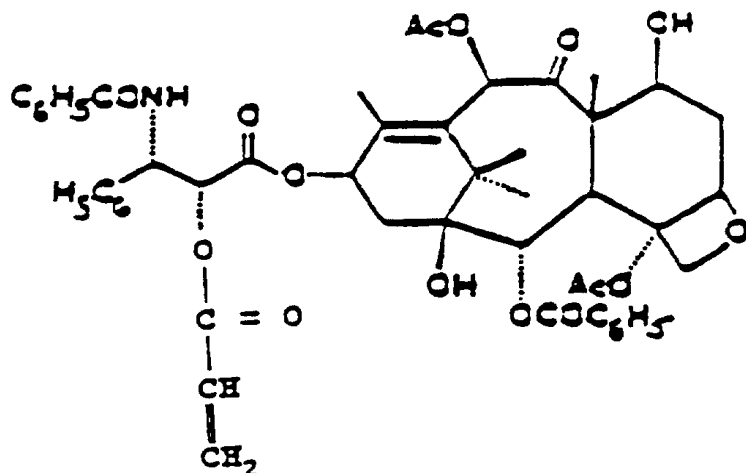
实例:

以下非限制性实例系提供制备本发明水溶性紫杉醇的特定合成方法。所有此文中所用的技术和科学用语和本领域专业人员通常了解的同意义。其他和此文中所述之类似或相同的方法和材料可于本发明之实施或测试中。

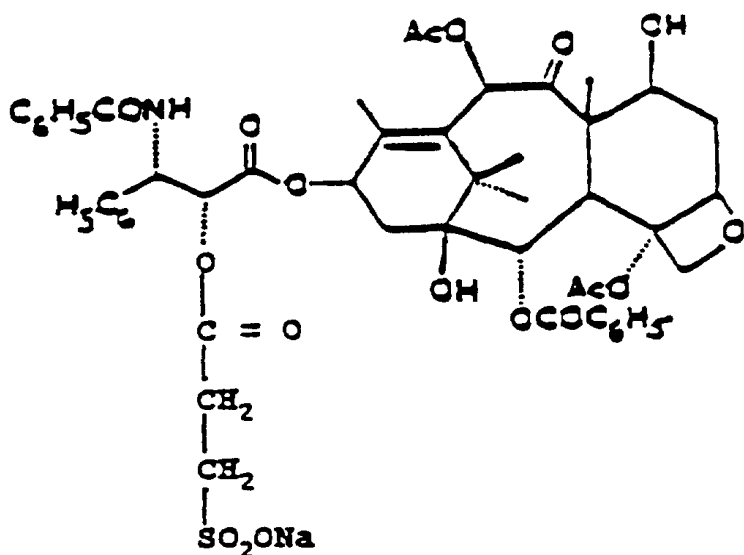
实例 1:

在氩气下，将三乙氨 (50 μ l) 和丙烯酸 (30 μ l) 溶于25ml 圆底瓶内的5ml 无水THF 中。在冰浴中冷却溶液至 0℃后，加入50 μ l 氯甲酸异丁酯，于15分钟内令反应混合物热至室温。在反应混合物中加入100mg

紫杉醇，再于60℃下搅拌溶液15小时，用TLC(用二氯甲烷/乙酸乙酯2/1)监测反应。反应期间沉淀出三乙氨氢氯酸盐，再过滤移除。于真空中移除溶剂，产物由急骤层析(使用硅胶和1/1二氯甲烷/乙酸乙酯)纯化。由此产生100mg(94%)2'-丙烯酰紫杉醇:



2'-丙烯酰紫杉醇上的丙烯酰部分因亲电子性的 β 烯类碳原子(其易于受到亲核性攻击)而为优异的Michael受体。因此,2'-丙烯酰紫杉醇和适当亲电子剂之反应将于2'位置上产生Michael加成。将85mg2'-丙烯酰紫杉醇溶入约3ml蒸馏过的异丙醇中,再将84mg β -亚硫酸氢钠溶入约1ml蒸馏水中。将二溶液混合在一起,再于60℃下搅拌反应混合物约15小时。使用TLC(以10/1二氯甲烷/甲醇洗脱)监控反应。再于真空下移除溶剂,而水系由使用乙腈共沸移除。使用急骤层析(2/1二氯甲烷/异丙醇)纯化产物。得到83.5mg(83.5%)产量的2'-[(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐:



以产物样品进行NMR, MS, UV, 和IR(KBr) , 再测定旋光度及熔点, 特性数据及NMR 数据示于以下表 1 和 2 中。

表 1

2' - [(3-磺基-1-合氧基丙基) 连氧基] 紫杉醇钠盐之特性数据	
m. p.	175-176 °C
$[\alpha]^{20}_D$	-30 ° (0.0012 , Me OH)
IR(KBr) :	3500 , 2950, 1760, 1730, 1660 , 1380, 1250, 1190, 1100 , 800 cm ⁻¹
UV λ (Me OH max) :	279 nm (ε 579), 270 nm(ε 869), 228 nm (ε 15072)
MS (FAB) :	1034 (MNa ⁺) , 1012 (MH ⁺)

表 2

2' - [(3-磺基-1-合氧基丙基) 连氧基] 紫杉醇钠盐之NMR 数据

位置	^1H 位移(ppm from TMS) 耦合(hertz)	^{13}C 位移(ppm from TMS)
C-1		*
C-2	6.2(d, 7)	75
C-3	3.82(d, 7)	45.8
C-4		80.5
C-5	5.0(d, 9)	84
C-6	2.48m	35.2
C-7	4.35m	76
C-8		57.9
C-9		203.8
C-10	6.45s	70.8
C-11		131
C-12		141
C-13	6.09(t, 8)	75.4
C-14	2.48m	35.8
C-15		43
C-16	1.15s	25.9
C-17	1.17s	19.8
C-18	1.95s	13.8
C-19	1.67s	9.4
C-20	4.21s	70.8
C-1'		171

C-2'	5.45(d, 3)	74
C-3'	5.84(d, 7)	53.1
N-H	7.26(t, 9)	
CH ₃ (OAc)	2.2s	21
CH ₃ (OAc)	2.4s	21.9
Bz	7.4-8.1m	126.8-138.1
CO(OAc)		168.4
CO(OAc)		169.9
CO(OBz)		166.2
CO(NBz)		168.2
C-1'		170.2
C-2'	2.93(t, 8)	29.2
C-3'	3.14(t, 8)	63.2

* 在CHCl₃ 讯号下

需指出预期所用的丙烯酸亦可以被其它为优异Michael 受体的丙烯酸系化合物取代，且成盐部分可为另一碱金属，或铵基（诸如四丁铵基）。亦拟想的是该成盐部分可为H取代。2'-[(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐的生化测试证明此化合物除了具有经改良的水溶性之外，亦有生化活性。

实例 2:

206 mg 紫杉醇和2.9 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)和49 mg 琥珀酸酐在25 ml 装有磁力搅拌器之三角瓶中混合。加入2.0 ml 干燥吡啶，再于室温下搅拌溶液2.5 小时。再加入几毫升水以在不透明悬浮液中产生沉淀。再加入几毫升二氯甲烷以萃取产物。加入1 ml 浓HCl 而使白色含水悬浮液消失。加入硫酸钠以干燥二氯甲烷层，再加以过滤及蒸发。由TLC

(7/1CH₂Cl₂/MeOH)显示仅残留微量吡啶。残留吡啶通过庚烷的环状加成及蒸发移除；由此产生218mg 琥珀酰紫杉醇，其代表96.6%产率。产物之质子NMR符合文献中所示之值。结构亦使用2D-NMR HOMO COSY (homonuclear correlation spectroscopy) 确认。

牛磺酸，H₂NCH₂CH₂SO₃H，是高度极性的化合物，它基本上不溶于有机溶剂（诸如氯仿）中，有机酸的牛磺酸衍生物在过去已通过使用牛磺酸在Schotten-Baumann条件（即在碱性含水或含水-乙醇溶液中）处理酰氯而制成。这一方法不适用于紫杉醇，因为它易于在碱中水解，因而在反应条件下分解。为了克服这一问题，发展出一种新的方法，它涉及加牛磺酸至氢氧化四丁铵中，再移除未反应物质并蒸发。由此产生牛磺酸的四丁铵盐而非先前技艺中所用的钠盐。牛磺酸的四丁铵盐可溶于有机溶剂诸如二氯甲烷中。因此，在THF中之2'-琥珀酰牛磺酸和三乙氨可和氯甲酸异丁酯及牛磺酸四丁铵盐反应而形成紫杉醇牛磺酸衍生物的四丁铵盐。需指出中间体为混合酸酐，它在水存在下水解为起始化合物。

用最小体积的蒸馏水溶解250mg 牛磺酸于三角瓶中，再于溶液中加入1ml 含水氢氧化四丁铵。在室温下搅拌溶液1小时，再蒸发至干。将干燥产物溶入干燥THF(约15ml)中，过滤，再蒸发滤液至干为止。干燥产物再溶入2ml 干燥THF中。

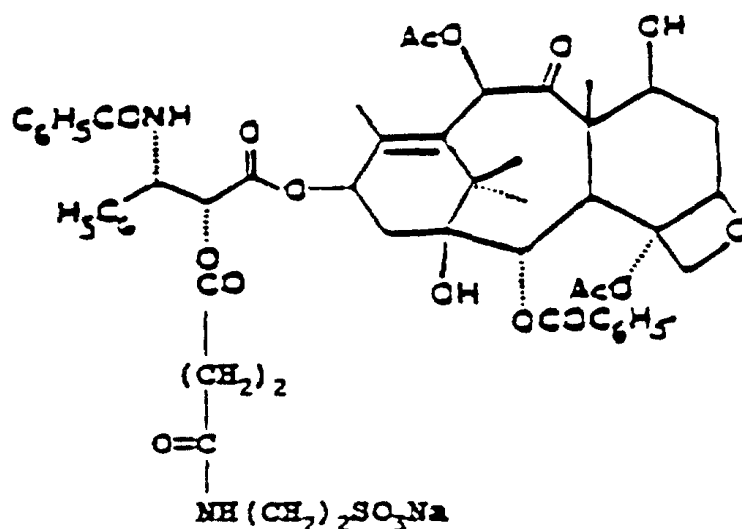
制备2'-{ [4-((2-磺基乙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇四丁钠盐

将由122mg 2'-琥珀酰紫杉醇溶解于4ml 干燥THF和50μl 三乙氨中而形成的2'-琥珀酰紫杉醇溶液冷却至约0℃。此溶液再和50μl 氯甲酸异丁酯混合，在15分钟内将反应混合物热至室温，再加入0.5m在THF溶液中的牛磺酸四丁铵盐（等于91mg牛磺酸四丁铵盐）。加入牛磺酸四丁铵盐之后，在室温下搅拌反应混合物5小时，而由TLC(2/1EtOAc

/Me OH) 监视反应。再过滤反应混合物并蒸发溶剂。通过使用硅胶(300 ×15 mm床, 7/1CH₂Cl₂ /Me OH) 急骤层析纯化得168 mg(100%) 2'-{ [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇四丁铵盐。

通过将160 mg 四丁铵盐置于含有Na⁺形Dowex 50离子交换树脂(在3 ml 去离子水中加约3 ml 树脂) 的烧杯中而将其转化成钠盐。在室温下搅拌1.5 小时之后, 再让混合物通过含有2 ml Na⁺形树脂的小树脂柱中, 用去离子水作为溶剂。

将该溶液用乙腈共沸而产生122 mg(91.7%) 2- { [4-((2-磺基乙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐:



特性数据示于表 3 中, 而NMR 化学位移数据示于以下表 4 中。

表 3

2' - [(4 - ((2 - 磺基乙基) 氨基) - 1, 4 - 二合
氧基丁基) 连氧基} 紫杉醇钠盐之特性数据

m. p.	175-176 °C
$[\alpha]^{20}_D$	-29.8 ° (0.0055, MeOH)
IR (KBr) :	3450, 3000, 1760, 1730, 1660, 1560, 1400, 1260, 1190, 1050 cm^{-1}
UV λ (MeOH max) :	279 nm (ϵ 649), 271 nm (ϵ 9820) , 228 nm (ϵ 12824)
MS (FAB) :	1105 (MNa ⁺) , 1083 (MH ⁺)

表 4

2'-((4-(2-磺基乙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基)连氧基)紫杉醇钠盐之NMR 数据

位置	^1H 位移(ppm from TMS) 耦合(hertz)	^{13}C 位移(ppm from TMS)
C-1		79
C-2	5.66(d, 7)	76.6
C-3	3.8(d, 7)	47.2
C-4		81.6
C-5	5.02(d, 9)	85.4
C-6	2.52m	36
C-7	4.35m	77.3
C-8		58.8
C-9		204.8
C-10	6.43s	72.8
C-11		132.6
C-12		142.2
C-13	6.05(t, 8)	75.9
C-14	2.14m	36.2
C-15		44.1
C-16	1.18s	26.8
C-17	1.18s	21
C-18	1.94s	14.9
C-19	1.67s	10.2
C-20	4.23s	72

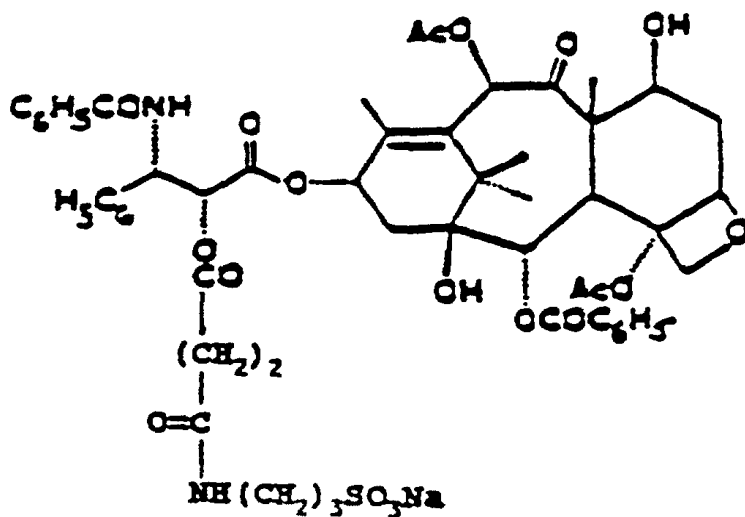
C-1'		173.4
C-2'	5.46(d, 7)	75.8
C-3'	5.8(dd, 7.7)	55
N-H	7.27(t, 7)	
CH ₃ (OAc)	2.2s	22.2
CH ₃ (OAc)	2.4s	23.3
Bz	7.4-8.1m	126.8-138.1
CO(OAc)		170.2
CO(OAc)		170.2
CO(OBz)		167.2
CO(NBz)		171.1
C-1'		173.1
C-2'	2.72m	30
C-3'	2.52m	30
C-4'		173.1
C-1''	3.58m	47
C-2''	2.96m	51
N-H	3.58(t, 7)	

需指出牛磺酸的四丁铵盐可和其他2'-O-酰基紫杉醇(诸如2'-戊二酰紫杉醇)轻易地产生反应。2'-戊二酰紫杉醇可轻易地由使用戊二酸酐取代琥珀酸酐而形成。一般咸信其他草酸系的成员及其他酐类可和紫杉醇反应,其反应性可能高于或等于所详细提示的化合物。需注意的是,在某些情况下,2'-戊二酰紫杉醇宜用于其他之2'-O-酰基紫杉醇。而且,预期成盐部分可用H或另其它碱金属或碱土金属取代。

实例 3:

在蒸馏水中形成280 mg 3-氨基-1-磺基丙酸的溶液，再加入1 ml 氢氧化四丁铵。在60℃下搅拌溶液1小时，再蒸发至干。将产物溶入约15 ml THF 中并滤除过量之3-氨基-1-磺基丙酸。蒸发滤液，再溶入2 ml 干燥THF 中以供次一反应之用。在4 ml 干燥THF 中形成130 mg 2'-琥珀酰紫杉醇和50 μl 三乙氨的溶液，再冷却溶液至0℃。加50 μl 氯甲酸异丁酯的等分试样至反应混合物中，再于约15分钟内使溶液热至室温。随之加入0.6 ml THF 溶液中之3-氨基-1-磺基丙酸四丁铵盐)。反应混合物在室温下搅拌3小时，反应过程由TLC(4/1, 乙酸乙酯/甲醇) 监控。再过滤反应溶液并蒸发，产物则由使用硅胶(300 mm × 15 mm床, 10/1 二氯甲烷/甲醚洗提液) 急骤层析而纯化。得到128 mg(71.2%) 均态的紫杉醇四丁铵盐。

将四丁铵盐置于含有Dowex 50 离子交换树脂(Na⁺形态, 约每3 ml 去离子水加3 ml 树脂) 的烧杯中而转化成钠盐。在室温下搅拌混合物约1.5 小时, 再通过树脂柱, 其包含2 ml Na⁺ 形态的树脂, 并使用去离子水为溶剂。溶液用乙腈共沸而产生84 mg(79.3%) 2'-{ [4-((3-磺基丙基) 氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐:



该化合物之特性数据示于表 5 中, 而 NMR 位移数据示于表 6。

表 5

2' - { [4-((3-磺基丙基) 氨基)-1,4-二氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐之特性数据

m. p.	168-169 °C
$[\alpha]^{20}_D$	-29 ° (0.001, Me OH)
IR (KBr) :	3480 , 3000 , 1760 , 1740 , 1660 , 1550 , 1400 , 1260 , 1050 cm^{-1}
UV λ (Me OH max) :	279 nm (ϵ 579) , 271 nm (ϵ 1240) , 228 nm (ϵ 12719)
MS (FAB) :	1119 (MNa+) , 1097 (MH+)

表 6

2'-{ [4-((3-磺基丙基) 氨基)-1,4-二合
氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐之NMR 数据

位置	¹ H位移(ppm from TMS) 偶合(hertz)	¹³ C 位移(ppm from TMS)
C-1		*
C-2	5.63(d, 7)	74.8
C-3	3.8(d, 7)	46
C-4		80.8
C-5	4.99(d, 9)	84.2
C-6	2.5m	34.7
C-7	4.34m	75.9
C-8		57.5
C-9		204.2
C-10	6.44s	71.3
C-11		131.6
C-12		141.2
C-13	6.05(t, 8)	75.2
C-14	2.14m	35.7
C-15		42.8
C-16	1.16s	25.6
C-17	1.16s	19.4
C-18	1.93s	13.6
C-19	1.67s	8.9
C-20	4.21s	70.8
C-1'		172

C-2'	5.44 (d, 7)	74.2
C-3'	5.79 (dd, 7.7)	53.6
N-H	7.25 (t, 7)	
CH ₃ (OAc)	2.2 s	20.9
CH ₃ (OAc)	2.4 s	21.6
Bz	7.4-8.1 m	126.8-138.1
CO (OAc)		169
CO (OAc)		170.2
CO (OBz)		166.4
CO (NBz)		170.2
C-1'		171.9
C-2''	2.75 (t, 7)	29
C-3''	2.54 (t, 7)	29.8
C-4''		171.9
C-1'''	3.25 m	37.9
C-2'''	1.98 m	28.3
C-3'''	2.85 (t, 7)	**

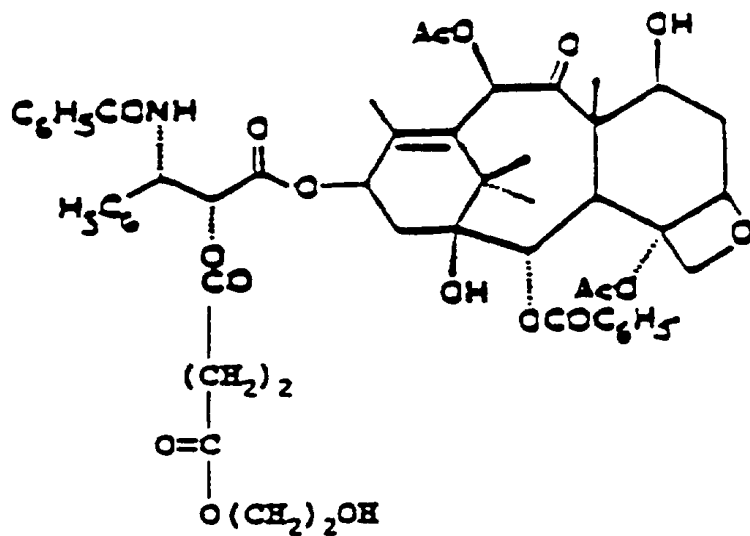
* 在CHCl₃ 讯号下 **在Me OH信号下

需知一般认为钠可为 H或任何其他成盐部分 (诸如其他碱金属或碱土金属, 以及铵基) 取代。

实例 4:

在氩气下制得2ml 干燥THF 中之26mg 2'-琥珀酰紫杉醇和20 μ l 三乙氨的溶液, 再冷却此溶液至-1 $^{\circ}$ C。加入10 μ l 三氯甲酸异丁醇的等份试样, 让反应混合物在15分钟内热至室温。在温热步骤之后, 加入5 μ l 乙二醇, 而反应混合物在室温下搅拌15小时, 反应过程以TLC

(1/1 二氯甲烷 / 乙酸乙酯) 监控。 反应由过滤沉淀物并蒸发溶剂而中止。 不纯产物由制备级TLC(1:3 二氯甲烷 / 乙酸乙酯) 纯化, 产生25mg (83.3%) 2'-{ [4-((2-羟乙基) 连氧基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基 } 紫杉醇钠盐:



特性数据示于表 7 中, NMR 数据示于以下表 8 中。

表 7

2'-{ [4-((2-羟乙基) 连氧基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基 } 紫杉醇钠盐之特性数据

m. p.	164-165 °C
$[\alpha]^{20}_D$	-32.5 ° (0.002, Me OH)
IR (KBr) :	3500 , 2950 , 1760 , 1740 , 1660 , 1390 , 1260 , 1160 , 1080 , 1040 cm^{-1}
UV λ (Me OH max) :	279 nm (ϵ 609) , 272 nm (ϵ 831) , 228 nm (ϵ 14404)
MS (FAB) :	1020 (MNa ⁺) , 998 (MH ⁺)

表 8

2'-{ [4-((2-羟乙基) 合氧基)-1,4-二合
氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐之NMR 数据

位置	¹ H位移(ppm from TMS) 偶合(hertz)	¹³ C 位移(ppm from TMS)
C-1		79.1
C-2	5.7(d, 7)	75.8
C-3	3.8(d, 7)	45.8
C-4		81
C-5	4.95(d, 9)	84.3
C-6	2.56 m	35.6
C-7	4.43 m	75.8
C-8		58.2
C-9		204
C-10	6.29 s	72.1
C-11		132
C-12		142.3
C-13	6.23(t, 8)	75.8
C-14	2.42 m	35.6
C-15		43.2
C-16	1.23 s	26.8
C-17	1.15 s	20.5
C-18	1.94 s	14.3
C-19	1.70 s	9.8

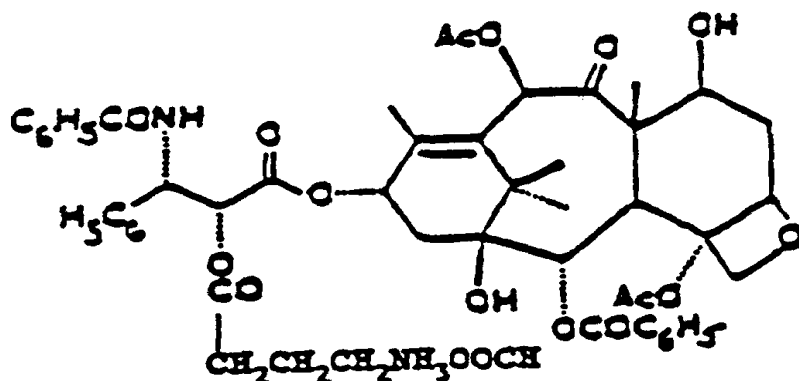
C-20	4.19(d, 8)	72.1
C-1'		172.2
C-2'	5.48(d, 3)	74.3
C-3'	5.97(dd, 3, 9)	52.9
N-H	7.14(d, 9)	
CH ₃ (OAc)	2.25s	22.1
CH ₃ (OAc)	2.45s	22.8
Bz	7.4-8.1m	126.8-138.1
CO(OAc)		168
CO(OAc)		169.9
CO(OBz)		167
CO(NBz)		167.3
C-1''		171
C-2''	2.65m	29
C-3''	2.78m	29
C-4''		171
C-1'''	3.7(t, 7)	66.2
C-2'''	4.1m	61

实例 5:

于10 ml 三角瓶中加入20 mg 紫杉醇, 40 mg 二环己基碳化二酰亚氨, 和 20 mg N-羧基苯甲基- γ -氨基丁酸。将反应物溶入4 ml 干燥乙腈(干燥乙腈系由令乙腈通过经活化氧化铝而得)中。在室温下搅拌反应混合物30小时之后, 过滤溶液以移除沉淀之二环乙基脲。再于真空下移除溶剂, 而不纯产物由制备级TLC(45:55 己烷/乙酸乙酯)分离。如此产生19.1 mg (75.9%) 纯的2'-N-CBz- γ -氨基丁酰紫杉醇。

2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐系由加6 mg 2'-N-CBZ- γ -氨基丁

酰紫杉醇至1.5ml 甲醇中而合成出。在CBZ-紫杉醇衍生物之溶解下，加入1ml 甲酸以形成40% 甲酸/甲醇溶液。反应由加入5mg 之5% Pd/C 至溶液并于室温下搅拌26小时而进行。反应系由滤除Pd/C，再于真空干燥滤液而中止。由此产生2'- γ -氨基丁酰紫杉醇甲酸盐。



几小时之后，由NMR 及TLC(2:1:0.02 二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇) 证明2'- γ -氨基丁酰紫杉醇已分解而回复为紫杉醇。

实例 6:

紫杉醇之水溶解度系由溶解1.6mg 紫杉醇于60ml 分液漏斗中的10ml 经1-辛醇饱和之蒸馏水中，再加入10ml 经蒸馏水饱和的1-辛醇而测定。摇动分液漏斗，再使之静置30分钟直到有机层和水层分开为止。测定水层和/或辛醇层在228nm 下的UV吸收，在测定前，将辛醇层稀释5倍。

依如上所述之相同方法测定0.8mg 2'-[(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基]紫杉醇钠盐，0.8mg 2'-{ [4-((2-磺基乙基)氨基)-1,4-二连氧基丁基]连氧基}紫杉醇钠盐和0.7mg 2'-{ [4-((3-磺基丙基)氨基)-1,4-二连氧基丁基]连氧基}紫杉醇钠盐相对于紫杉醇的水溶性；结果示于以下表9中。

表 9

紫杉醇衍生物相对于紫杉醇之水溶性

化合物	相对溶解度
紫杉醇	1
2' - [(3-磺基-1-合氧基丙基)连氧基] 紫杉醇钠盐	210
2' - { [4-((2-磺基乙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐	191
2' - { [4-((3-磺基丙基)氨基)-1,4-二合氧基丁基] 连氧基} 紫杉醇钠盐	118

表 9 示出 2'-丙烯酰紫杉醇具有较高之水溶性，且为 210 倍于紫杉醇。需知牛磺酸 2'-琥珀酰紫杉醇衍生物之水溶性大大地大于 2'-琥珀酰紫杉醇之 3-氨基-1-磺基丙酸衍生物，二化合物的溶解度均大于紫杉醇 100 多倍。2'-琥珀酰紫杉醇之 3-氨基-1-磺基丙酸衍生物溶解度较低的原因可能在于烷链长度较长。

因此，本发明公开了水溶性高于未衍化紫杉醇的新颖紫杉醇衍生物，且其较某些具有较高水溶性的先前紫杉醇衍生物在更长时间内稳定。这些化合物系由产生高产率的基本上纯化合物的新颖方法制成。由特性数据和 NMR 研究证明了本发明紫杉醇衍生物的结构和性质。除了具有高水溶性及改良的稳定性之外，这些化合物仍保有充作抗肿瘤，抗白血病和抗癌前驱之生物活性及用途。

本发明之水溶性紫杉醇衍生物的预期同等物包括紫杉醇的 2'-丙烯酰和 2'-0-酰基酸衍生物，它具有经非干扰性基团取代的 1 或多个链状或环状取代基（例如，不致严重改变本发明紫杉醇衍生物之所需性质的取代基），诸如（但不限于）对其它非干扰性部分的 -H，-CH，-OR，

-NR , -Ar , 或 =0 之取代。

由以上教示内容显见本发明可以进行许多改良及变化。因此，须明白发明可以非如详细说明之方式实施。

说明书附图

