

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96116652

※ 申請日期：96.5.10.

※IPC 分類：G07D; A61K

C07D 403/12 (2006.01)

C07F 9/547 (2006.01)

A 61K 31/661 (2006.01)

A 61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎的共結晶體

NOVEL CO-CRYSTAL

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞典商阿斯特捷利康公司

ASTRAZENECA AB

代表人：(中文/英文)

凱文 比爾

BILL, KEVIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞典賽得特來SE-15185

SE-151 85 SODERTALJE, SWEDEN

國 籍：(中文/英文)

瑞典 SWEDEN

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 喬治 約瑟夫 瑟本達
SEPENDA, GEORGE JOSEPH

2. 理察 史托瑞
STOREY, RICHARD

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.

2. 英國 U.K.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 英國；2006年05月16日；0609621.8

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種新穎的共結晶體，且尤其關於一種磷酸二氫2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯(在本文中被稱作AZD1152)之新穎共結晶體形式，其為適用於治療過度增生性疾病(諸如癌症)的極光激酶抑制劑。更特定言之，本發明係關於一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體、一種製備AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之方法、含有AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之醫藥組合物、AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體在製造用於治療過度增生性疾病(諸如癌症)之藥物中的用途，及藉由投與治療有效量之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體在人體或動物體中治療過度增生性疾病(諸如癌症)的方法。本發明亦係關於一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之特定結晶形式。

【先前技術】

癌症(及其他過度增生性疾病)之特徵在於不受控制的細胞增殖，其在喪失細胞增殖之正常調節時發生。此喪失通常似乎是對經由細胞週期控制其細胞發展之細胞路徑的遺傳損傷所產生之結果。

成信在真核細胞中，蛋白質磷酸化之有序級聯會控制細胞週期。人們已鑑別出在此級聯中起關鍵作用之若干蛋白激酶家族。與正常組織相比，眾多該等激酶之活性在人類

腫瘤中增加，此乃見諸於蛋白質之表現程度的增加(例如由於基因擴增)或輔活化子或抑制蛋白之表現的變化。

這些細胞週期調節劑中首先經鑑別且最廣泛研究的為週期素依賴性激酶(或CDK)。近來，結構上不同於CDK家族之蛋白激酶已經被鑑別，且發現其在調節細胞週期中起關鍵作用。該等激酶亦似乎在形成腫瘤中為重要的，且包括果蠅(*Drosophila*)極光及釀酒酵母(*S.cerevisiae*)Ipl1蛋白之人類同源物。該等基因之三種人類同源物極光-A、極光-B及極光-C(亦分別被稱作極光2、極光1及極光3)編碼調節細胞週期之絲胺酸-蘇胺酸蛋白激酶(概述於Adams等人，2001, Trends in Cell Biology. 11(2): 49-54中)。該等物質經由G2及有絲分裂展示表現及激酶活性之峰。若干觀測暗示在癌症中涉及人類極光蛋白。極光-A基因定位於染色體20q13，其為通常在人類腫瘤(包括乳房腫瘤及結腸腫瘤)中擴增的區域。極光-A可為此擴增子之主要目標基因，因為極光-A DNA在大於50%之原發性人類結腸直腸癌中擴增且mRNA在其中過度表現。與相鄰正常組織相比，在這些腫瘤中，極光-A蛋白含量似乎極大提高。另外，以人類極光-A轉染齧齒動物纖維母細胞會產生轉化，其賦予在軟瓊脂中生長且在裸小鼠中形成腫瘤的能力(Bischoff等人，1998, The EMBO Journal. 17(11): 3052-3065)。其他著作(Zhou等人，1998, Nature Genetics. 20(2): 189-93)已展示極光-A之人工過度表現使得中心體數目增大且非整倍性增加，其為癌症發展中之已知事件。

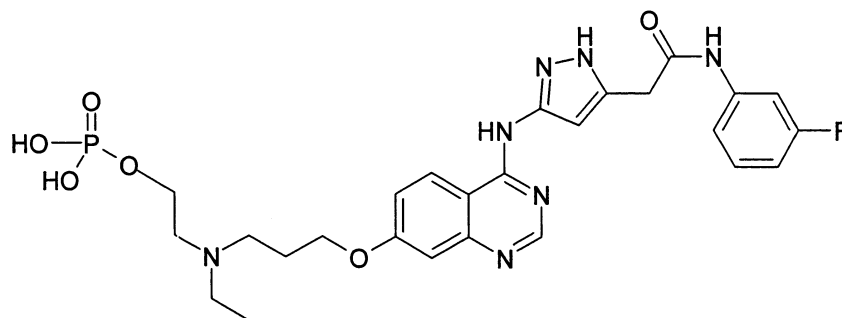
亦已展示與正常細胞相比，在腫瘤細胞中存在極光-B (Adams 等人，2001, Chromsoma. 110(2):65-74)及極光-C (Kimura 等人，1999, Journal of Biological Chemistry, 274(11): 7334-40)之表現的增加。極光-B在癌症細胞中過度表現且增大含量之極光-B已展示與晚期結腸直腸癌相關 (Katayama 等人(1999) J. Natl. Cancer Inst. 91:1160)。此外，一個報導暗示極光-B之過度表現會經由組蛋白H3在絲胺酸10處增加之磷酸化來誘發非整倍性且過度表現極光-B之細胞會形成逐步展開轉移之侵襲性更強之腫瘤 (Ota, T. 等人，2002, Cancer Res. 62: 5168-5177)。極光-B為存在於具有至少三種其他乘客蛋白 Survivin、INCENP及Borealin之穩定複合物中之染色體乘客蛋白 (Carmena M. 等人，2003, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 842-854)。Survivin亦在癌症中經上調且含有BIR(桿狀病毒細胞凋亡抑制蛋白(IAP)重複序列)域且因此可在保護腫瘤細胞免受細胞凋亡及/或有絲分裂突變中起作用。

關於極光-C，原以為其表現限於睪丸中，但已發現其在各種癌症株中過度表現。(Katayama H 等人，2003, Cancer and Metastasis Reviews 22: 451-464)。

重要地，亦已證實由人類腫瘤細胞株之反義寡核苷酸處理造成之極光-A表現及功能的終止(WO 97/22702及WO 99/37788)使得細胞週期停止且在該等腫瘤細胞株中發揮抗增生性作用。另外，已證實極光-A及極光-B之小分子抑制劑在人類腫瘤細胞中具有抗增生性作用(Keen 等人，2001,

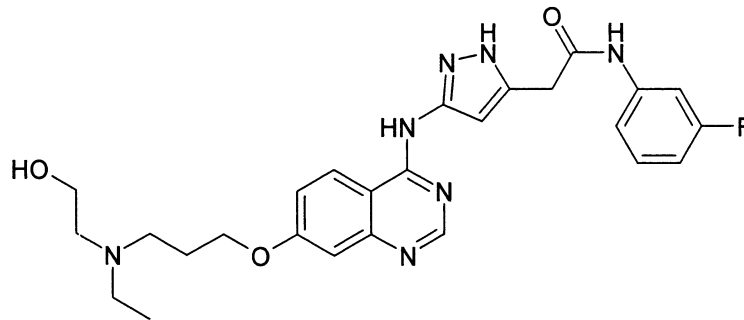
Poster #2455, American Association of Cancer Research annual meeting), 儘管具有單獨由 siRNA 處理之極光-B 表現之選擇性終止 (Ditchfield 等人, 2003, Journal of Cell Biology, 161(2): 267-280)。此指示極光-A 及/或極光-B 功能之抑制應具有可適用於治療人類腫瘤及其他過度增生性疾病之抗增生性作用。作為該等疾病之治療方法之極光激酶的抑制可具有優於在細胞週期上游靶向信號路徑(例如由諸如表皮生長因子受體(EGFR)或其他受體之生長因子受體酪胺酸激酶活化的那些路徑)的顯著優點。因為細胞週期最後在所有該等不同信號事件之下游, 所以可預測細胞週期定向之療法(諸如極光激酶之抑制)在所有增生性腫瘤細胞中具活性, 同時可預測以特異性信號分子(例如 EGFR)定向之方法僅在表現彼等受體之腫瘤細胞之子集中具活性。亦咸信在該等信號路徑之間存在顯著"干擾", 其意謂一種組份之抑制作用可由另一種組分來補償。

極光激酶之抑制劑描述於國際專利申請案 WO 03/55491 及 WO 2004/058781 中, 且尤其 WO 2004/058781 揭示具有以下結構式之化合物, 其在本文中被稱作 AZD1152:



AZD1152

AZD1152為迅速且完全轉變(在人類血漿中)為在本文中被稱作AZD1152 HQPA之活性部分之前藥：



AZD1152 HQPA

AZD1152 HQPA為極光激酶的ATP競爭性且可逆抑制劑，具有抗極光A、B-INCENP及C-INCENP (K_i 分別為 1369 ± 419.2 nM、 0.359 ± 0.386 nM及 17.03 ± 12.2 nM)之有效活性。已發現AZD1152以統計顯著性抑制一系列人類結腸直腸腫瘤異種移植物(SW620、HCT116、Colo205)及肺腫瘤異種移植物(A549、Calu-6)中之腫瘤生長。

AZD1152以二鹽酸鹽形式以及以水合形式之游離鹼揭示於WO 2004/058781中。尤其以三水合物至四水合物形式揭示游離形式。

自製造觀點來看，當在製造、乾燥、儲存及加工期間其需要控制在適當位置時，水合形式產生問題。另外，獲得具有一致化學計量的化合物與水之比率的化合物樣品且將其保持為困難的。在先前揭示之AZD1152之形式的情況下，且尤其關於游離形式，水分子僅鬆散地結合至每一AZD1152分子上，因此水分子與AZD1152藥物之締合程度

及解離程度隨著溫度及相對濕度而極大改變。因此，對於給定重量之 AZD1152，以 AZD1152 之分子數目計之 AZD1152 的實際量會依賴於溫度及相對濕度(因為水含量同樣會改變)。由重量決定之任何劑量之有效性因而亦依賴於其所暴露之溫度及相對濕度而定。動態蒸氣吸附法已用於量測與 AZD1152 相關之水含量隨著濕度的變化。

WO 2004/058781 概括地揭示本文中揭示之化合物之某些醫藥學上可接受的鹽。AZD1152 僅以二鹽酸鹽形式及游離形式揭示。未提及 AZD1152 之其他形式。詳言之，WO 2004/058781 未揭示 AZD1152 之任何其他共結晶體且其無疑未考慮特定化合物之任何特定共結晶體是否會具有驚人之益處，且尤其未考慮其是否會具有可改善本文中論述之問題之益處。

【發明內容】

吾人已出乎意料且驚人地發現 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體以無水形式存在，其大體上為非吸濕性的。此外，儘管藥物與順丁烯二酸鹽之化學計量比率可在(例如) 0.8:1 至 1.2:1，或 0.9:1 至 1.1:1 之範圍內改變，但吾人已發現本文中揭示之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體具有大體上 1:1 之藥物與順丁烯二酸鹽之可再現性化學計量比率。因此，AZD1152 順丁烯二酸鹽共結晶體在與已經評估之 AZD1152 之游離形式、二鹽酸鹽及其他共結晶體形式相比之下，其重量劑量之有效性受溫度及相對濕度影響之程度較小。另外，AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體更易於

製造，因為在製造過程中較不需要控制濕度量。順丁烯二酸鹽共結晶體之無水本質進一步意謂由於在使用含水環境之加工條件(例如濕式造粒)期間較低之水合/脫水風險，故有可能使用有限之含水條件及/或高溫環境予以調配。

另外，吾人已發現AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體驚人地比游離形式含有更少之雜質。詳言之，似乎在游離形式轉變為順丁烯二酸鹽形式之後，某些存在於游離形式中之頑抗雜質驚人地以遠為較低之數量存在。

因此，本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體。

為避免疑問，術語"AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體"、"AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體"或"AZD1152順丁烯二酸鹽"(或本文中使用的任何其他類似術語)係指AZD1152與順丁烯二酸之間的任何締合形式，其包括鹽形式。詳言之，該等術語涵蓋：

- (i) AZD1152與順丁烯二酸之間的非離子性締合(亦即其中在藥物與順丁烯二酸之間未發生質子轉移)；
或
- (ii) 離子性相互作用，其中在AZD1152與順丁烯二酸之間已發生質子轉移以形成AZD1152之順丁烯二酸鹽，或
- (iii) 上述(i)與(ii)之混合物。

在本發明之一特定實施例中，順丁烯二酸鹽共結晶體包含AZD1152藥物與順丁烯二酸之間之非離子性締合(亦即

其中在藥物與順丁烯二酸之間未發生質子轉移)。

在本發明之另一特定實施例中，順丁烯二酸鹽共結晶體為AZD1152之順丁烯二酸鹽。

在一特定實施例中，AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體係藉由在適合溶劑(諸如甲醇、二甲亞砜(DMSO)或DMSO與甲醇、乙腈及其他類似溶劑之混合物)中將AZD1152游離形式與順丁烯二酸混合來形成。順丁烯二酸鹽共結晶體可藉由使結晶發生且隨後分離所得結晶物質來分離。本發明之AZ1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的身份可由質子核磁共振(NMR)分析來確定。

亦應瞭解本發明之化合物或共結晶體可顯示互變異構現象且本說明書中之圖式僅可表示可能之互變異構形式中之一者。應瞭解本發明涵蓋具有極光激酶抑制活性且尤其極光-A及/或極光-B激酶抑制活性之任何互變異構形式且並不僅限於在圖式中所用之任一種互變異構形式。

本發明亦係關於一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之特定結晶形式。此結晶形式係藉由使AZD1152之順丁烯二酸鹽結晶體自有機溶劑(諸如甲醇與二甲亞砜(DMSO)之混合物)中結晶來製備。其他實驗細節在實例中提供。

因此，本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式。

AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式的特徵在於其提供大體上如圖1中所示之X射線粉末繞射圖。

AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式之最主要

X射線粉末繞射峰展示於表1中：

表 1

角 2 θ	相對強度 %	角 2 θ	相對強度 %
5.118	100	22.425	18.8
6.446	18.8	23.228	26.8
8.158	28.1	23.583	37.7
10.171	13.1	23.994	25.7
11.917	5.9	24.271	24.1
12.861	18	24.671	23.3
13.849	48.3	25.32	19.1
14.909	25.2	25.574	32.9
15.234	36	25.813	43.8
15.738	27.6	26.21	35.3
16.506	18.8	27.122	16
16.884	23	27.946	45.4
17.232	42.5	28.418	31.6
18.134	13.8	28.847	21.7
19.327	62.7	29.725	26.1
19.82	38.8	30.521	18.8
20.082	61	31.74	15.4
20.582	61.4	33.424	14.7
21.008	32	36.181	15.3
21.663	87.3	38.106	10.8

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=15.2^\circ$ 下具有至少一個特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=12.9^\circ$ 下具有特

定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=15.2^\circ$ 或 10.2° 下具有特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=18.1^\circ$ 下具有特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=10.2^\circ$ 、 12.9° 、 15.2° 或 18.1° 下具有至少一個特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=12.9^\circ$ 及 15.2° 及/或 10.2° 下具有特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約 $2\theta=10.2^\circ$ 、 12.9° 、 15.2° 及 18.1° 下具有特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有在約表1中所示之 $2\theta^\circ$ 值之任一者或組合下具有特定峰之X射線粉末繞射圖。

根據本發明提供一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式，其中該共結晶體具有與圖1中所示之X射線粉末繞射圖大體上相同之X射線粉末繞射圖。

當本文中陳述本發明係關於一種AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式時，如由X射線粉末繞射資料所測

定之結晶度便利地大於約60%，更便利地大於約80%，較佳大於約90%。

在定義AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式的X射線粉末繞射峰之前述段落中，在表達"…在約 $2\theta = \dots$ "中使用之術語"在約"指示峰之精確位置(亦即敘述之 2θ 角度值)不應理解為絕對值，因為如熟習此項技術者應瞭解，在不同機器、不同樣品之間，或由於所用之量測條件之輕微變化，該等峰之精確位置可輕微改變。在前述段落中亦陳述AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之結晶形式提供與圖1中所示之X射線粉末繞射圖"大體上"相同之X射線粉末繞射圖，且大體上具有表1中所示之最主要之峰(2θ 角度值)且尤其在約 $2\theta = 10.2^\circ$ 、 12.9° 、 15.2° 或 18.1° 下。應瞭解在上下文中術語"大體上"之使用亦意欲指示X射線粉末繞射圖之 2θ 角度值可在不同機器、不同樣品之間，或由於所用之量測條件之輕微變化而輕微改變，因此再次重申圖中所示或表中提供之峰位置不應理解為絕對值。

就此而論，此項技術中已知視量測條件(諸如設備、樣品製備或所使用之機器)而定可獲得具有一或多個量測誤差之X射線粉末繞射圖。詳言之，通常已知X射線粉末繞射圖之強度可視量測條件及樣品製備而波動。舉例而言，熟習X射線粉末繞射之技術者應瞭解峰之相對強度可受到(例如)尺寸大於30微米之晶粒及非單一縱橫比(其可影響樣品之分析)的影響。熟習此項技術者亦應瞭解反射之位置可受到樣品處於繞射儀中之精確高度及繞射儀之零校正的

影響。樣品之表面平坦度亦可具有較小影響。因此熟習此項技術者應瞭解本文中呈現之繞射圖資料不應理解為絕對的(進一步資訊參見Jenkins, R及Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996)。因此, 應瞭解本發明之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的結晶形式不限於提供與圖1中所示之X射線粉末繞射圖相同之X射線粉末繞射圖的晶體及提供與處於本發明之範疇內的圖1中所示之X射線粉末繞射圖大體上相同之X射線粉末繞射圖的任何晶體。熟習X射線粉末繞射之技術者能夠判斷X射線粉末繞射圖之大體上一致性。

通常, X射線粉末繞射圖中繞射角之量測誤差為約 $2\theta=0.5^\circ$ 或更小(或, 更適合地, 約 $2\theta=0.2^\circ$ 或更小), 且當考慮圖1中之X射線粉末繞射圖且當說明上文中及表1中提及之峰位置時, 應考慮此量測誤差之程度。因此, 若陳述(例如)共結晶體具有在約 $2\theta=15.2^\circ$ (或以上提及之其他角之任一者)下具有至少一個特定峰之X射線粉末繞射圖, 則此可理解為 $2\theta=15.2^\circ$ 加或減 0.5° , 或 $2\theta=15.2^\circ$ 加或減 0.2° 。

根據本發明之另一態樣, 提供一種製備如本文中所定義之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的方法, 該方法包含在適合溶劑(諸如甲醇、N-甲基-2-吡咯啉酮、二甲亞砜(DMSO)或DMSO與甲醇、乙腈及其他類似溶劑之混合物)中將AZD1152游離形式之溶液與順丁烯二酸混合的步驟。該方法可進一步包含結晶及(視情況)分離所形成之結晶之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的步驟。

該方法可額外包含其他步驟：以適合溶劑洗滌AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體；且乾燥該AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體。

適合地，將AZD1152游離形式溶解於適合溶劑(諸如二甲亞砷、甲醇、其混合物或N-甲基-2-吡咯啉酮)中且通常與順丁烯二酸(將其溶解於相同或相容性溶劑中)之溶液混合。或者，可將固體順丁烯二酸添加至AZD1152游離形式溶液中(或反之亦然，亦即將AZD1152游離形式溶液添加至固體順丁烯二酸中)。適合地，將溶液攪拌以促進AZD1152游離形式與添加之順丁烯二酸之混合。該等物質(理想但並非唯一地，以1:1比率)可在周圍溫度下混合，但該程序亦可在更高溫度下進行。

可使用此項技術中已知之任何用於分離結晶之AZD1152之順丁烯二酸鹽形式的適合方法。適合地，藉由過濾收集AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體。

經洗滌之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體較佳在真空下乾燥。

一般而言，需要1:1之AZD1152游離形式：順丁烯二酸之比率。此所需之1:1比率可藉由將組成在0.6-1.4 AZD1152游離形式：1.0順丁烯二酸之範圍內的AZD1152游離形式與順丁烯二酸混合來獲得。適合地，混合物中AZD1152游離形式：順丁烯二酸之比率在0.9-1.1且尤其在1.0-1.1 AZD1152游離形式：1.0-1.1順丁烯二酸之範圍內。通常應使用過量順丁烯二酸且尤其混合物中AZD1152游離

形式：順丁烯二酸之比率在 0.6-1.0 且尤其在 0.9-1.0 AZD1152 游離形式：1.0 順丁烯二酸之範圍內。

AZD1152 順丁烯二酸鹽共結晶體通常自結晶，但熟習此項技術者應瞭解需要時或必要時可使用播晶種技術以促進共結晶體形成。

根據本發明之另一態樣，提供一種醫藥組合物，其包含與醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑結合之如本文中所定義的 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。

本發明之組合物可為適於口服使用之形式(例如以錠劑、口含劑、硬膠囊或軟膠囊、水性或油性懸浮液、乳液、可分散散劑或顆粒、糖漿或酏劑形式)、適於局部使用之形式(例如以乳膏、軟膏、凝膠，或水性或油性溶液或懸浮液形式)、適於藉由吸入投藥之形式(例如以細粉狀粉末或液體氣溶膠形式)、適於藉由吹入投藥之形式(例如以細粉狀粉末形式)或適於非經腸投藥之形式(例如以無菌水性或油性溶液形式用於靜脈內、皮下、肌肉內或肌肉內給藥，或以栓劑形式用於直腸給藥)。

本發明之組合物可使用此項技術中熟知之習知醫藥賦形劑由習知程序獲得。因此，意欲用於口服使用之組合物可含有(例如)一或多種著色劑、甜味劑、芳香劑及/或防腐劑。

用於錠劑調配物之適合醫藥學上可接受之賦形劑包括(例如)：惰性稀釋劑，諸如乳糖、碳酸鈉、磷酸鈣或碳酸鈣；成粒劑及崩解劑，諸如玉米澱粉或褐藻酸；黏合劑，

諸如澱粉；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石；防腐劑，諸如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸丙酯；及抗氧化劑，諸如抗壞血酸。錠劑調配物可未經塗佈或(在兩種情況下)使用此項技術中熟知之習知塗佈劑及程序經塗佈以改變其崩解作用及隨後活性成份在胃腸道內之吸收，或改良其穩定性及/或外觀。

用於口服使用之組合物可為硬明膠膠囊之形式，其中活性成份係與惰性固體稀釋劑(例如，碳酸鈣、磷酸鈣或高嶺土)混合；或為軟明膠膠囊之形式，其中活性成份係與水或油(諸如花生油、液體石蠟、大豆油、椰子油，或較佳橄欖油，或任何其他可接受之媒劑)混合。

水性懸浮液通常含有呈細粉狀形式之活性成份，以及一或多種懸浮劑，諸如羧甲基纖維素鈉、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、褐藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃蓍膠及阿拉伯膠；分散或濕潤劑，諸如卵磷脂或氧化烯與脂肪酸之縮合產物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)，或氧化乙烯與長鏈脂族醇(例如十七伸乙基氧基十六醇)之縮合產物，或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯之縮合產物(諸如聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯)，或氧化乙烯與長鏈脂族醇(例如十七伸乙基氧基十六醇)之縮合產物，或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇之偏酯之縮合產物(諸如聚氧乙烯山梨糖醇單油酸酯)，或氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇酐之偏酯之縮合產物(諸如聚乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)。

水性懸浮液也可含有一或多種防腐劑(諸如對羥基苯甲酸

乙酯或對羥基苯甲酸丙酯)、抗氧化劑(諸如抗壞血酸)、著色劑、芳香劑及/或甜味劑(諸如蔗糖、糖精或阿斯巴甜糖(aspartame))。

油性懸浮液可藉由將活性成份懸浮於植物油(諸如花生油、橄欖油、芝麻油或椰子油)或礦物油(諸如液體石蠟)中來調配。油性懸浮液也可含有增稠劑, 諸如蜂蠟、固體石蠟或十六醇。可添加諸如上述彼等之甜味劑及芳香劑以提供可口之口服製劑。該等組合物可藉由添加抗氧化劑(諸如抗壞血酸)來防腐。

適用於藉由添加水來製備水性懸浮液或溶液之可分散或凍乾粉末及顆粒通常含有活性成份以及分散或濕潤劑、懸浮劑及一或多種防腐劑。適合分散或濕潤劑及懸浮劑係由上文已提及之彼等來例示。亦可存在其他賦形劑, 諸如甜味劑、芳香劑及著色劑。

本發明之醫藥組合物亦可呈水包油乳液之形式。油性相可為植物油(諸如橄欖油或花生油)或礦物油(諸如液體石蠟或任何該等油之混合物)。適合乳化劑可為(例如)天然存在膠, 諸如阿拉伯膠或黃蓍膠; 天然存在磷脂, 諸如大豆、卵磷脂; 衍生自脂肪酸及己糖醇酐之酯或偏酯(例如脫水山梨糖醇單油酸酯); 及該等偏酯與氧化乙烯之縮合產物, 諸如聚氧乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯。該等乳液亦可含有甜味劑、芳香劑及防腐劑。

糖漿及酞劑可以甜味劑(諸如甘油、丙二醇、山梨糖醇、阿斯巴甜糖或蔗糖)調配, 且亦可含有緩和劑、防腐

劑、芳香劑及/或著色劑。

醫藥組合物亦可為無菌可注射水性或油性懸浮液、溶液、乳液或特定系統之形式，其可使用適當分散或濕潤劑及懸浮劑(其已在上文提及)中之一或多者根據已知程序來調配。無菌可注射製劑亦可為於無毒非經腸可接受之稀釋劑或溶劑中之無菌可注射溶液或懸浮液，例如於聚乙二醇中之溶液。

栓劑調配物可藉由將活性成份與適合非刺激性賦形劑一起混合來製備，該賦形劑在平常溫度下為固體，但在直腸溫度下為液體，且因此會在直腸中熔融以釋放藥物。適合賦形劑包括(例如)可可脂及聚乙二醇。

局部調配物(諸如乳膏、軟膏、凝膠及水性或油性溶液或懸浮液)通常可使用此項技術中熟知之習知程序藉由將活性成份與習知、局部可接受之媒劑或稀釋劑一起調配來獲得。

用於藉由吹入投藥之組合物可為含有平均直徑為(例如) 30 μm 或更小、較不佳5 μm 或更小且更佳介於5 μm 與1 μm 之間之粒子之細粉狀散劑的形式，該散劑自身包含單獨或經一或多種生理學上可接受之載劑(諸如乳糖)稀釋之活性成份。用於吹入之散劑隨後便利地保持在含有(例如) 1 mg至50 mg活性成份之膠囊中與一渦輪-吸入器裝置一起使用，諸如用於吹入已知藥劑色甘酸鈉。

用於藉由吸入投藥之組合物可為呈含細粉狀固體之氣溶膠或含液體液滴之氣溶膠形式的經安排以分配活性成份之

習知加壓氣溶膠的形式。可使用諸如揮發性氟化烴或烴之習知氣溶膠推進劑且氣溶膠裝置經便利安排以分配計量量之活性成份。

關於調配物之其他資訊，讀者可查閱 Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990之第5卷第25.2章。

因此在本發明之另一態樣中，提供一種適用於療法中之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。進一步提供用作藥物之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。本發明之另一態樣提供一種用作藥物之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體，其中該藥物係用於治療過度增生性疾病，諸如癌症且尤其結腸直腸癌、乳癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或胰腺癌或白血病或淋巴瘤。本文中提及之該等白血病及淋巴瘤可為骨髓系之腫瘤(諸如急性骨髓白血病)或淋巴系之腫瘤。

另外提供一種適用於由療法治療溫血動物(諸如人)之方法中的 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。本發明之另一態樣提供一種適用於治療過度增生性疾病(諸如癌症且尤其結腸直腸癌、乳癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或胰腺癌或白血病或淋巴瘤)之方法中的 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。

在本發明之另一態樣中，提供 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體在製備藥物中的用途，其中該藥物係用於治療其中一或多種極光激酶之抑制作用為有益之疾病。詳言之，

預期極光A激酶及/或極光B激酶之抑制作用可為有益的。較佳地，極光B激酶之抑制作用為有益的。在本發明之另一態樣中，提供AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體在製備藥物中之用途，其中該藥物係用於治療過度增生性疾病，諸如癌症且尤其結腸直腸癌、乳癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或胰腺癌或白血病或淋巴瘤。

根據另一態樣，提供一種適用於治療患有一或多種極光激酶之抑制作用為有益之疾病的人類之方法中之AZD1152的順丁烯二酸鹽共結晶體，其中該方法包含向需要其之人投與治療有效量之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的步驟。詳言之，預期極光A激酶及/或極光B激酶之抑制作用可為有益的。較佳地，極光B激酶之抑制作用為有益的。進一步提供一種適用於治療患有過度增生性疾病(諸如癌症且尤其結腸直腸癌、乳癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌或胰腺癌或白血病或淋巴瘤)之人類之方法中的AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體，其中該方法包含向需要其之人投與治療有效量之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的步驟。AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體在上述治療人類之方法之任一者中的用途亦構成本發明之態樣。

對於上述治療用途，投與之劑量應隨著所使用之化合物、投藥模式、所需之治療、指示病症及動物或患者之年齡及性別而改變。劑量大小因此應根據熟知醫學原則來計算。

在使用AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體用於治療或預

防目的中，通常應投藥以使得接收在(例如)每公斤體重0.05 mg至50 mg之範圍內之每日劑量，假設需要時分次給藥。一般而言，當使用非經腸途徑時，應投與較低劑量。因此，例如，對於靜脈內投藥，通常應使用在(例如)每公斤體重0.05 mg至25 mg之範圍內之劑量。類似地，對於藉由吸入投藥，應使用在(例如)每公斤體重0.05 mg至25 mg之範圍內之劑量。

本文中定義之治療可用作單獨療法或可包括除本發明之化合物之外的習知手術或放射線療法或化學療法。此化學療法可包括以下抗腫瘤劑之種類中之一或多者：

(i) 如醫學腫瘤學中所使用之抗增生性/抗贅生性藥物及其組合，諸如烷基化劑(例如順鉑(cis-platin)、卡鉑(carboplatin)、環磷醯胺、氮芥、美法侖(melphalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、馬利蘭(busulphan)及亞硝基脲)；抗代謝物(例如抗葉酸物，諸如氟嘧啶，如5-氟尿嘧啶及喃氟啶 tegafur)、雷替曲賽(raltitrexed)、甲胺喋呤(methotrexate)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)及羥基脲；抗腫瘤抗生素(例如蒽環黴素(anthracyclines)、如阿黴素(adriamycin)、平陽黴素(bleomycin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾黴素(daunomycin)、表柔比星(epirubicin)、黃膽素(idarubicin)、絲裂黴素-C(mitomycin-C)、放線菌素D(dactinomycin)及米拉黴素(mithramycin)；抗有絲分裂劑(例如長春花生物鹼，如長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春花鹼醯胺

(vindesine)及長春瑞賓(vinorelbine)，及紫杉醇，如紫杉酚(taxol)及克癌易(taxotere))；及拓撲異構酶抑制劑(例如表鬼臼素(epipodophyllotoxins)，如足葉乙甙(etoposide)及替尼泊甙(teniposide)、安吖啶(amsacrine)、拓撲替康(topotecan)及喜樹鹼(camptothecin))；

(ii) 細胞生長抑制劑，諸如抗雌激素(例如他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、雷諾昔酚(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)及依多昔芬(idoxyfene))、雌激素受體下調劑(例如fulvestrant)、抗雄激素(例如必卡他鹽胺(bicalutamide)、氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)及環丙孕酮乙酸酯(cyproterone acetate)、LHRH拮抗劑或LHRH促效劑(例如戈舍瑞林(goserelin)、亮丙瑞林(leuporelin)及布舍瑞林(buserelin))、孕激素(例如甲地孕酮乙酸酯(megestrol acetate)、芳香酶抑制劑(例如安美達錠(anastrozole)、來曲唑(letrozole)、沃拉唑(vorazole)及依西美坦(exemestane))及5 α -還原酶之抑制劑，諸如非那雄安(finasteride)；

(iii) 抑制癌症細胞入侵之藥劑(例如金屬蛋白酶抑制劑(如馬立馬斯他(marimastat)))及尿激酶纖溶酶原活化子受體功能之抑制劑；

(iv) 生長因子功能之抑制劑，例如該等抑制劑包括生長因子抗體、生長因子受體抗體(例如抗-erbB2抗體曲妥珠單抗(trastuzumab)[Herceptin™]及抗-erbB1抗體西圖西美(cetuximab)[C225])、法呢基轉移酶抑制劑、酪胺酸激酶抑

制劑及絲胺酸-蘇胺酸激酶抑制劑，例如表皮生長因子家族之抑制劑(例如EGFR家族酪胺酸激酶抑制劑，諸如N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-(3-嗎啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺(吉非替尼(gefitinib)、AZD1839)、N-(3-乙炔基苯基)-6,7-雙(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(埃羅替尼(erlotinib)、OSI-774)及6-丙烯醯胺基-N-(3-氯-4-氟苯基)-7-(3-嗎啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺(CI 1033))，例如血小板源生長因子家族之抑制劑及例如肝細胞生長因子家族之抑制劑；

(v) 抗血管生成劑，諸如抑制血管內皮生長因子之作用之彼等(例如抗血管內皮細胞生長因子抗體貝法滋美(bevacizumab)[Avastin™]，諸如國際專利申請案WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856及WO 98/13354中揭示之彼等化合物)及由其他機制起作用之化合物(例如間四羥基苯二氫吡吩(linomide)，整合素 $\alpha v \beta 3$ 功能之抑制劑及血管生長抑素)；

(vi) 血管破壞劑，諸如康柏斯達汀A4 (Combretastatin A4)及國際專利申請案WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434及WO 02/08213中揭示之化合物；

(vii) 反義療法，例如針對以上列出之目標之那些療法，諸如ISIS 2503，抗-ras反義；

(viii) 基因療法方法，其包括例如替代異常基因(諸如異常p53或異常BRCA1或BRCA2)之方法、GDEPT(基因導向性酶前藥療法)方法(諸如使用胞嘧啶去胺酶、胸苷激酶或細

菌硝基還原酶之彼等方法)及增加患者對化學療法或放射線療法之耐受性的方法(諸如多藥物抵抗基因療法);及
(ix) 免疫療法方法, 其包括例如增加患者腫瘤細胞之免疫原性之離體及活體內方法, 諸如以細胞激素(諸如介白素2、介白素4或顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子)轉染, 減少T-細胞無反應性之方法, 使用經轉染之免疫細胞(諸如經細胞激素轉染之樹枝狀細胞)之方法, 使用經細胞激素轉染之腫瘤細胞株之方法及使用抗遺傳型抗體之方法。

另外, AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體可與一或多種細胞週期抑制劑組合使用。詳言之為抑制bub1、bubR1或CDK之細胞週期抑制劑。

此聯合治療可藉助於同時、連續或分別給與治療之個別組份來達成。該等組合產物使用在本文中描述之劑量範圍內之本發明的化合物及在其有效劑量範圍內之其他醫藥活性劑。

根據本發明之一態樣, 提供一種適用於治療細胞增生性病徵(諸如癌徵)之組合, 其包含上文中所定義之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體及上文中所定義之另一抗腫瘤劑。

根據本發明之此態樣, 提供一種醫藥產物, 其包含用於聯合治療細胞增生性病徵(諸如癌徵)之上文中所定義之AZD1152的順丁烯二酸鹽共結晶體及上文中所定義之另一抗腫瘤劑。

除其在治療醫學中之用途之外, AZD1152之順丁烯二酸

鹽共結晶體亦用作用於評估實驗動物(諸如貓、犬、兔、猴、大鼠及小鼠)中細胞週期活性之抑制劑之效果的活體外及活體內試驗系統之發展及標準化中的藥理學工具，作為研究新穎治療劑之部分。

在上述其他醫藥組合物、過程、方法、用途及藥物製造特徵中，本文中描述之本發明之化合物的替代性及較佳實施例亦適用。

本發明之順丁烯二酸鹽共結晶體抑制極光激酶(尤其極光A激酶及/或極光B激酶)之絲胺酸-蘇胺酸激酶活性，且因此抑制細胞週期及細胞增殖。尤其關注抑制極光B激酶之化合物。該等性質可(例如)使用以下提出之程序中之一或多者來評估。

(a)活體外極光A激酶抑制測試

此檢定測定測試化合物抑制絲胺酸-蘇胺酸激酶活性之能力。編碼極光A之DNA可藉由總基因合成或藉由選殖來獲得。此DNA隨後可表現於適合表現系統中以獲得具有絲胺酸-蘇胺酸激酶活性之多肽。在極光A之情況下，編碼序列係藉由聚合酶鏈反應(PCR)自cDNA分離且選殖入桿狀病毒表現載體pFastBac HTc (GibcoBRL/Life technologies)之BamH1及Not1限制性核酸內切酶位點中。5' PCR引子含有編碼極光A之序列之限制性核酸內切酶BamH1 5'的識別序列。此容許將極光A基因插入由pFastBac HTc載體編碼之具有6個組胺酸殘基、間隔區及rTEV蛋白酶斷裂位點之框架中。3' PCR引子經額外編碼序列、接著終止密碼子及限

制性核酸內切酶NotI之識別序列替代極光A終止密碼子。此額外編碼序列(5' TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TCT TAA 3')編碼多肽序列YPYDVPDYAS。來源於流感血球凝集素蛋白之此序列通常用作可使用特異性單株抗體鑑別之標記抗原決定基序列。重組pFastBac載體因此編碼N末端經6 his標記、C末端經流感血球凝集素抗原決定基標記之極光-A蛋白。用於組裝重組DNA分子之方法之細節可見於標準教科書中，例如Sambrook等人，1989, Molecular Cloning-A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory press及Ausubel等人，1999, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc.。

重組病毒之產生可根據來自GibcoBRL之製造商之方案進行。簡言之，將帶有極光A基因之pFastBac-1載體轉化入含有桿狀病毒基因組(穿梭載體DNA)之大腸桿菌(E. coli) DH10Bac細胞中且經由該等細胞中之換位事件，含有健他黴素(gentamycin)抵抗基因及包括桿狀病毒多角體蛋白啟動子之極光A基因之pFastBac載體的區直接換位入穿梭載體DNA中。通過對健他黴素、康黴素(kanamycin)、四環素(tetracycline)及X-gal的選擇，所得白色菌落應含有編碼極光A之重組穿梭載體DNA。將穿梭載體DNA自若干BH10Bac白色菌落之小規模培養物萃取且根據製造商之指示使用CellFECTIN試劑(GibcoBRL)轉染入生長於含有10%血清之TC100培養基(GibcoBRL)中的草地貪夜蛾

(*Spodoptera frugiperda*) Sf21細胞中。藉由在轉染後72小時收集細胞培養基來採集病毒粒子。將0.5 ml培養基用於感染100 ml每毫升含有 1×10^7 個細胞之Sf21的懸浮液培養物。在感染後48小時採集細胞培養基且使用一標準空斑檢定程序測定病毒效價。以3之感染複數(MOI)將病毒儲備用於感染Sf9及"高5"細胞以確定重組極光A蛋白之表現。

對於極光A激酶活性之大規模表現，Sf21昆蟲細胞在28°C下生長於在3 r.p.m.之Wheaton旋轉臺上補充有10%胎牛血清(Viralex)及0.2% F68 Pluronic (Sigma)之TC100培養基中。當細胞密度達到每毫升 1.2×10^6 個細胞時，其在1之感染複數下以空斑-純極光A重組病毒感染且在48小時後採集。所有隨後純化步驟均在4°C下進行。將含有總數為 2.0×10^8 個細胞之冷凍昆蟲細胞小球解凍且以溶解緩衝液(25 mM HEPES (N-[2-羥乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]))(pH 7.4，在4°C下)、100 mM KCl、25 mM NaF、1 mM Na_3VO_4 、1 mM PMSF(苯基甲基磺醯基氟化物)、2 mM 2-巰基乙醇、2 mM咪唑、1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蛋白酶、1 $\mu\text{g/ml}$ 抑肽素、1 $\mu\text{g/ml}$ 亮抑蛋白酶肽)稀釋，每 3×10^7 個細胞使用1.0 ml。使用杜恩斯均質機(dounce homogeniser)達成溶解，其後在41,000 g下將細胞溶菌液離心35分鐘。將經吸氣上層清液抽吸於一含有500 μl Ni NTA(氮基三乙酸)瓊脂糖(Qiagen，產品號30250)(其已於溶解緩衝液中平衡)之5 mm直徑層析管柱上。在以12 ml溶解緩衝液、接著7 ml洗滌緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.4，在4°C下)、100 mM KCl、20

mM咪唑、2 mM 2-巰基乙醇)洗滌該管柱之後，達到溶離劑之UV吸光度之基準線。使用溶離緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.4，在4°C下)、100 mM KCl、400 mM咪唑、2 mM 2-巰基乙醇)將結合極光A蛋白自管柱溶離。收集對應於UV吸光度之峰之溶離份(2.5 ml)。將含有活性極光A激酶之溶離份對透析緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.4，在4°C下)、45%甘油(v/v)、100 mM KCl、0.25% Nonidet P40 (v/v)、1 mM二硫蘇糖醇)徹底透析。

藉由以酶稀釋劑(25 mM Tris-HCl pH 7.5、12.5 mM KCl、0.6 mM DTT)稀釋將極光A酶之每一批新料在檢定中滴定。對於典型批料(其可獲自Upstate)，以每毫升1微升酶稀釋劑來稀釋儲備酶且將20 μ l稀釋酶用於每一檢定孔。以水稀釋測試化合物(於二甲亞砷(DMSO)中為10 mM)且將10 μ l稀釋化合物轉移至檢定板之孔中。"全部"及"空白"對照孔含有2.5% DMSO，而非化合物。將20微升新鮮稀釋之酶添加至除"空白"孔之外的所有孔中。將20微升酶稀釋劑添加至"空白"孔中。隨後將20微升含有0.2 μ Ci [γ^{33} P]ATP (Amersham Pharmacia，特異活性 ≥ 2500 Ci/mmol)之反應混合物(25 mM Tris-HCl、12.7 mM KCl、2.5 mM NaF、0.6 mM二硫蘇糖醇、6.25 mM MnCl_2 、7.5 mM ATP、6.25 μ M 肽底物[生物素-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG])添加至所有測試孔中以起始反應。將該等板在室溫下培養60分鐘。為終止反應，將100 μ l 20% v/v正磷酸添加至所有孔中。使用96孔板採集器(TomTek)將肽底物捕捉於帶正

電之硝基纖維素P30過濾墊(Whatman)上且隨後以Beta板計數器檢定 ^{33}P 之併入。"空白"(無酶)及"全部"(無化合物)對照值係用於確定測試化合物之稀釋範圍，其給出酶活性之50%抑制(IC₅₀值)。

(b)活體外極光B激酶抑制測試

此檢定測定測試化合物抑制絲胺酸-蘇胺酸激酶活性之能力。編碼極光B之DNA可藉由總基因合成或藉由選殖來獲得。此DNA隨後可表現於適合表現系統中以獲得具有絲胺酸-蘇胺酸激酶活性之多肽。在極光B之情況下，編碼序列係藉由聚合酶鏈反應(PCR)自cDNA分離且以類似於上述關於極光A之方式選殖入pFastBac系統中(亦即以導向經6-組胺酸標記之極光B蛋白之表現)。

對於極光B激酶活性之大規模表現，Sf21昆蟲細胞在28°C下生長於在3 r.p.m.之Wheaton旋轉臺上補充有10%胎牛血清(Viralex)及0.2% F68 Pluronic (Sigma)之TC100培養基中。當細胞密度達到每毫升 1.2×10^6 個細胞時，其在1之感染複數下以空斑-純極光B重組病毒感染且在48小時後採集。所有隨後純化步驟均在4°C下進行。將含有總數為 2.0×10^8 個細胞之冷凍昆蟲細胞小球解凍且以溶解緩衝液(50 mM HEPES (N-[2-羥乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]))(pH 7.4，在4°C下)、1 mM Na_3VO_4 、1 mM PMSF(苯基甲基磺醯基氟化物)、1 mM 二硫蘇糖醇、1 $\mu\text{g/ml}$ 抗蛋白酶、1 $\mu\text{g/ml}$ 抑肽素、1 $\mu\text{g/ml}$ 亮抑蛋白酶肽)稀釋，每 2×10^7 個細胞使用1.0 ml。使用超音均質機達成溶解，其後在41,000 g

下將細胞溶菌液離心35分鐘。將經吸氣上層清液抽吸於一含有1.0 ml CM瓊脂糖Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech)(其已於溶解緩衝液中平衡)之5 mm直徑層析管柱上。在以12 ml溶解緩衝液、接著7 ml洗滌緩衝液(50 mM HEPES (pH 7.4, 在4°C下)、1 mM二硫蘇糖醇)洗滌該管柱之後,達到溶離劑之UV吸光度之基準線。使用溶離緩衝液之梯度(50 mM HEPES (pH 7.4, 在4°C下)、0.6 M NaCl、1 mM二硫蘇糖醇,以0.5 ml/min之流速經15分鐘自0%溶離緩衝液流至100%溶離緩衝液)將結合極光B蛋白自管柱溶離。收集對應於UV吸光度之峰之溶離份(1.0 ml)。將該等溶離份對透析緩衝液(25 mM HEPES (pH 7.4, 在4°C下)、45%甘油(v/v)、100 mM KCl、0.05% (v/v) IGEPAL CA630(Sigma Aldrich)、1 mM二硫蘇糖醇)徹底透析。檢定經透析溶離份之極光B激酶活性。

極光B-INCENP酶(如由Upstate供應)係藉由在30°C下以0.1 mg/ml GST-INCENP [826-919]於50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM EGTA、0.1% 2-巰基乙醇、0.1 mM鈳酸鈉、10 mM乙酸鎂、0.1 mM ATP中活化極光B(5 μ M) 30分鐘來製備。

藉由以酶稀釋劑(25 mM Tris-HCl pH 7.5、12.5 mM KCl、0.6 mM DTT)稀釋將極光B-INCENP酶之每一批新料在檢定中滴定。對於典型批料,以每毫升15 μ l酶稀釋劑來稀釋儲備酶且將20 μ l稀釋酶用於每一檢定孔。以水稀釋測試化合物(於二甲亞砷(DMSO)中為10 mM)且將10 μ l稀釋化

合物轉移至檢定板之孔中。"全部"及"空白"對照孔含有2.5% DMSO，而非化合物。將20微升新鮮稀釋之酶添加至除"空白"孔之外的所有孔中。將20微升酶稀釋劑添加至"空白"孔中。隨後將20微升含有0.2 μCi [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP (Amersham Pharmacia，特異活性 ≥ 2500 Ci/mmol)之反應混合物(25 mM Tris-HCl、12.7 mM KCl、2.5 mM NaF、0.6 mM二硫蘇糖醇、6.25 mM MnCl_2 、15 mM ATP、6.25 μM 肽底物[生物素-LRRWSLGLRRWSLGLRRWSLGLRRWSLG])添加至所有測試孔中以起始反應。將該等板在室溫下培養60分鐘。為終止反應，將100 μl 20% v/v正磷酸添加至所有孔中。使用96孔板採集器(TomTek)將肽底物捕捉於帶正電之硝基纖維素P30過濾墊(Whatman)上且隨後以Beta板計數器檢定 ^{33}P 之併入。"空白"(無酶)及"全部"(無化合物)對照值係用於確定測試化合物之稀釋範圍，其給出酶活性之50%抑制(IC_{50} 值)。

(c)活體外細胞表型及底物磷酸化檢定

此檢定用於在活體外於SW620人類結腸腫瘤細胞上測定化合物之細胞效應。化合物通常會抑制磷酸組蛋白H3之含量且增大細胞之核區。

將每孔 10^4 個SW620細胞塗於costar 96孔板中之100 μl DMEM培養基(含有10% FCS及1%麩醯胺酸)(DMEM為Dulbecco改良伊氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D6546))且在37°C及附著5% CO_2 下保持隔夜。隨後將該等細胞以於培養基中稀釋之化合物給藥(添

加 50 μl 至每一孔中以得到 0.00015 μM -1 μM 濃度之化合物) 且在以化合物治療 24 小時後，將細胞固定。

首先使用一光學顯微鏡觀測細胞且記錄任何細胞形態變化。隨後將 100 μl 3.7% 甲醛添加至每一孔中，且使板在室溫下保持至少 30 分鐘。於紙巾上傾析且輕拍板移除固定物且隨後使用自動板洗滌器於 PBS (Dulbecco 之經磷酸鹽緩衝之鹽水 (Sigma D8537)) 中將板洗滌一次。添加 100 μl PBS 及 0.5% 氫核 X-100 且將板置於震盪器上 5 分鐘。將板於 100 μl PBS 中洗滌且將溶液傾倒出。添加 50 μl 一級抗體、於 PBS 1% BSA (牛血清白蛋白) 中之 1:500 兔抗磷酸組蛋白 H3 及 0.5% 非離子活性劑。抗磷酸組蛋白 H3 兔多株 06-750 係購自 Upstate Biotechnology。將板在室溫下於震盪器上保持 1 小時。

第二天，傾倒出抗體且以 PBS 將板洗滌兩次。在無燈光區域中，添加 50 μl 二級抗體、於 PBS 1% BSA 中之 1:10,000 Hoechst 及 1:200 Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG (目錄號 11008 分子探針)、0.5% 非離子活性劑。將板包裹於錫箔中且在室溫下震盪 1 小時。傾倒出抗體且以 PBS 將板洗滌兩次。添加 200 μl PBS 至每一孔中，且將板震盪 10 分鐘，移除 PBS。添加 100 μl PBS 至每一孔中且將板密封以備分析。使用 Arrayscan 標靶活性算法進行分析以量測磷酸組蛋白 H3 之細胞含量及核區之變化。結果報導為 50% 抑制磷酸組蛋白 H3 含量及類似地 50% 增大細胞之核區域所需之有效濃度 (EC50 值)。

在本文中本發明係藉助於非限制性實例、資料及圖式來說明，其中，除非另外指出，否則：

- (i) 產率僅為說明而給出且並非必定為可獲得之最大值；
- (ii) 若產物係用於播晶種，則其可由先前已知方法(諸如 WO 2004/058781 中描述之那些方法)獲得；
- (iii) 如本文中所述製備之 AZD1152 順丁烯二酸鹽共結晶體之身份係於六氬化二甲亞碲中在 400 MHz 下藉由 ^1H NMR 來確定，其中添加四甲基矽烷(TMS)作為參照(TMS=0.00 ppm)。

如本文中所述，AZD1152 及 AZD1152 HQPA 揭示於 WO 2004/058781 中。關於 AZD1152、AZD1152 HQPA 之方法細節提供於 WO 2004/058781 中且該等化合物之途徑中之所有中間物係以引用的方式全部併入本文中。

製備方法 1

步驟 1 - 製備 7-(3-羥基丙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮

將 2-氨基-4-氟苯甲酸與 1,3-丙二醇一起攪拌且加熱至 120°C。添加甲脒乙酸鹽且將混合物攪拌 3.5 小時以產生 7-氟喹唑啉-4-酮。隨後經 2 小時 50 分鐘之時期將氫氧化鉀於 1,3-丙二醇中之溶液添加至混合物中，隨後將其冷卻 15°C。此後，將該混合物加熱至 125°C 歷時 5 小時，隨後冷卻至 75°C。將稀鹽酸(約 6% w/w)逐漸添加至反應混合物中直至 pH 值達到 4.5。經 6 小時將混合物冷卻至 0°C 且又在彼溫度下保持一小時，隨後藉由離心分離粗產物。將粗物質

以水洗滌且在真空中乾燥，隨後在平緩回流下溶解於甲醇中且在42°C之溫度下在減壓下部分濃縮。隨後經3小時之時期將此溶液冷卻至0°C且藉由過濾分離所得產物，隨後在真空中乾燥。以73%產率回收7-(3-羥基丙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6): 11.90 (br s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.10 (m, 2H), 4.17 (t, 2H), 3.58 (t, 2H), 1.92 (m, 2H):
MS (+ve ESI): 221 (M+H) $^+$ 。

步驟2 - 製備4-氯-7-(3-氯丙氧基)喹唑啉

將7-(3-羥基丙氧基)喹唑啉-4(3H)-酮、甲苯及*N,N*-二異丙基-甲醯胺(DIPF)一起混合且加熱至76°C，隨後在76°C下經1小時之時期添加亞硫醯氯。隨後經1小時之時期又添加亞硫醯氯，其後將溫度在76°C下保持1小時。將混合物回流11小時以產生澄清溶液，將其冷卻至38°C且經受真空蒸餾以移除甲苯及亞硫醯氯。隨後添加甲苯且將溶液保持在35°C下，同時以助濾劑(矽藻土或harborlite及活性碳)將其澄清。將所得溶液部分濃縮，隨後添加庚烷且將混合物冷卻至0°C且攪拌23小時。將形成之淺棕色懸浮液藉由過濾分離、以冷庚烷洗滌，隨後在30°C下在真空中乾燥以產生4-氯-7-(3-氯丙氧基)喹唑啉(63.6%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6): 13.25 (br s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 4.21 (t, 2H), 3.83 (t, 2H), 2.23 (m, 2H):
MS (+ve ESI): 257, 259 (M+H) $^+$ 。

步驟3 - 製備(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡

唑-5-基)乙酸

將4-氯-7-(3-氯丙氧基)喹唑啉添加至1莫耳當量之(3-胺基-1*H*-吡唑-5-基)乙酸於*N*-甲基吡咯啉酮(NMP)中之溶液中且隨後保持12小時之時期。在播晶種及未播晶種之情況下以及在添加作為反溶劑之乙腈及未添加乙腈之情況下觀測到產物的結晶作用。將所得固體藉由過濾分離、以*N*-甲基吡咯啉酮及乙腈洗滌且隨後在真空中乾燥以產生呈灰白色固體狀的(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)乙酸.鹽酸鹽：

¹H-NMR (DMSO d₆ ; 含有NMP作為溶劑合物): 8.92 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.46 (雙重峰之pr, 1H), 7.38 (d, 1H), 6.7 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.85 (t, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.3 (t, 2H), 2.7 (s, 3H), 2.51 (m, 6H), 2.27 (m, 2H), 2.18 (t, 2H), 1.93 (m, 2H)。

MS (+ve ESI): 362.1015 (M+H)⁺。

步驟4 - 製備2-(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)-*N*-(3-氯苯基)乙醯胺

將4-二甲胺基吡啶(DMAP)、*N*-甲基嗎啉及3-氯苯胺(大量過量)添加至(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)乙酸.鹽酸鹽於*N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)中之懸浮液中且在室溫下或低於室溫下攪拌所得漿料。隨後經8小時之時期以受控方式添加先前溶解於水中之1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDCI.HCl)之溶液以將反應保持在周圍溫度。將混合物以少量產物播晶種且

使其攪拌若干小時。亦添加反溶劑乙腈，接著添加水以沉澱更多產物。藉由過濾分離物質且將濾餅以 *N,N*-二甲基乙醯胺：水：乙腈之混合物、溫乙腈洗滌且隨後乾燥（在真空中或在氮氣流下）以產生 2-(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹啉-4-基]胺基}-1*H*-吡啶-5-基)-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺。

¹H-NMR (DMSO *d*₆；含有殘餘 DMA): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (多重峰之 pr, 1H), 7.46 (雙重峰之 pr, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s):

MS (+ve ESI): 455 (M+H)⁺。

步驟 5 - 製備 2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥乙基)胺基]丙氧基}-喹啉-4-基)胺基]-1*H*-吡啶-5-基}-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺 (AZD1152 HQPA)

在惰性氣氛下（諸如由氮提供）將 2-(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹啉-4-基]胺基}-1*H*-吡啶-5-基)-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺及 2-(乙胺基)乙醇（12 莫耳當量）添加至 *N,N*-二甲基乙醯胺中且在攪拌下將混合物加熱至 90°C。12 小時後，以受控方式添加水且在熱時以產物播晶種批料。以小心受控方式將混合物冷卻至 20°C 以結晶所需形式之產物。隨後將產物過濾且以水/*N,N*-二甲基乙醯胺之混合物及乙腈洗滌。此後，將濾餅以溫乙腈（40°C）製成漿料一段時期、過濾、以更多乙腈洗滌且隨後乾燥（在真空中或在氮氣流下）以得到以約 90% 產率之呈灰白色固體狀的無水 2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥

乙基)胺基]丙氧基}-喹唑啉-4-基)胺基]-1*H*-吡唑-5-基}-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺。

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (多重峰之 pr, 1H), 7.47 (雙重峰之 pr, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H):

MS (+ve ESI): 508.4 (M+H)⁺。

步驟6 - 製備磷酸單(第三丁基) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯[AZD1152 t-Bu P(5)酯]

將 2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥乙基)胺基]丙氧基}-喹唑啉-4-基)胺基]-1*H*-吡唑-5-基}-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺及吡啶·鹽酸鹽混合於 *N,N*-二甲基乙醯胺中且將溶液冷卻至 -15°C。隨後添加二第三丁基二乙基胺基磷酸酯(1.5-2.1 莫耳當量)，同時保持溫度。以 30% w/w 過氧化氫(約 4.2 莫耳當量)原位處理反應混合物，同時將溫度保持在低於周圍溫度下。藉由添加偏亞硫酸氫鈉(以 10% w/v 水溶液形式)來破壞剩餘過氧化氫，同時將溫度保持在低於 40°C 下。隨後將所得磷酸二(第三丁基)2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯溶液加熱至 40°C 且添加氫氧化鈉溶液(2 M)以調節至 pH 5-6.5。在播晶種下將溫度及 pH 值保持約 90 分鐘之時期。隨後饋入水且將 pH 值進一步調節至 pH 8-9 之範圍

內以優化回收。將溫反應混合物直接過濾以得到磷酸單(第三丁基)2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯，將其以*N,N*-二甲基乙醯胺/水之混合物及水洗滌且最後乾燥(在真空中或適合惰性氣體流中)以得到產率介於86%-93%之間之呈灰白色固體狀的磷酸單(第三丁基)2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯。

¹H-NMR (DMSO *d*₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (多重峰之pr, 1H), 7.48(雙重峰之pr, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI): (M+H)⁺ 644.2761片段(較少丁基)588.2147。

步驟7 - 製備磷酸二氫2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯(AZD1152)

將磷酸單(第三丁基)2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯懸浮於水/四氫呋喃(THF)之1:1混合物中且在高溫下(較佳50°C-60°C)以過量介於1.5莫耳當量與3.0莫耳當量之間的鹽酸處理約1小時之時期。隨後使用2.0

M 氫氧化鈉將熱溶液鹼化至 pH 4.5-5.5 之範圍內，冷卻至 60°C 且播晶種。以受控方式將水添加至漿料中，同時將結晶混合物受控冷卻至室溫且藉由過濾分離產物。將濾餅以水洗滌且在真空中乾燥。乾燥後，將固體磷酸二氫 2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯在周圍條件下平衡至恆定重量以得到呈淡黃色針狀物質之水合形式。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6):

MS (+ve ESI): 587.8 (M+H) $^+$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6): 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H):

MS (+ve ESI): 588 (M+H) $^+$ 。

$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{FN}_7\text{O}_6\text{P} + 3.0 \text{ H}_2\text{O}$ 要求 C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%;
實驗值 C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%。

步驟 8 - 製備磷酸二氫 2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯.順丁烯二酸鹽[AZD1152順丁烯二酸鹽]

將 2-丁烯二酸(Z)(1.57 莫耳當量；449.80 微莫耳；52.21 mg)溶解於甲醇(123.54 毫莫耳；5.00 ml；3.96 g)中且向此溶液中添加先前製備之 AZD1152 之甲醇溶液(呈游離形式三水合物-1.00 莫耳當量，286.14 微莫耳；40.00 mL；31.87

g)，接著添加更多甲醇(123.54毫莫耳；5.00 mL；3.96 g)。使混合物在室溫下攪拌隔夜。生成白色懸浮液且將固體藉由過濾回收，隨後在真空中乾燥。藉由NMR分析確定共結晶體為順丁烯二酸鹽。

替代性步驟8：

將粗AZD1152(估計為7.44 g @ 100%，11.61毫莫耳)添加至二甲亞砜(36 ml)且留在周圍條件下以生成淡棕色溶液。向此溶液中添加順丁烯二酸(1.76 g，15.16毫莫耳，1.31莫耳當量)於甲醇(36 ml)中之溶液且使混合物在周圍溫度下靜置隔夜。第二天將澄清溶液之等分試樣轉移至一小瓶中，劃線且密封保持若干小時。形成白色固體之沈積物且將此轉移至燒瓶中且對其攪拌。溶液逐漸變混濁且固體沈積。將漿料靜置若干天且最後過濾。將濾餅以二甲亞砜/甲醇之1:1混合物(總共15 ml)洗滌，以甲醇(3×25 ml)原位製成漿料且隨後在真空中乾燥。NMR確定固體為AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體(約78.7%產率)。

製備方法2

步驟1 - 製備2-(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)-*N*-(3-氯苯基)乙醯胺

向(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹唑啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)乙酸·鹽酸鹽(如上文製備方法1中所述經製備)於*N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)中之懸浮液中添加4-二甲胺基吡啶(DMAP)，同時將溫度保持在15°C-25°C(理想地為15°C)，接著添加*N*-甲基嗎啉，同時亦保持該溫度。以保持溫度低

於25°C的速率添加3-氟苯胺(大量過量，其理想地為10莫耳當量-15莫耳當量)。同時將1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDCI.HCl)溶解於水中以得到約42% w/v之溶液(存在之水量對後來過程中結晶之結果為重要的)。經8小時之時期以受控方式將此溶液添加至漿料中以保持反應介於20°C-25°C之間；隨後以產物之較佳形式晶體(理想地為預期產率之約1%之量)播晶種混合物。將混合物攪拌約16小時，同時保持溫度(理想地為20°C-25°C)，隨後以受控方式添加反溶劑乙腈，接著添加水，且保持溫度介於20°C-25°C之間，接著延長攪拌約21小時；此舉為優化回收且形成產物。藉由過濾分離物質且將濾餅以*N,N*-二甲基乙醯胺：水：乙腈之混合物(體積比為5:3:2)、乙腈洗滌且隨後乾燥(在真空中或在氮氣流下)以得到約76%-78%產率之含有一些DMA之2-(3-{[7-(3-氟丙氧基)喹啉-4-基]胺基}-1*H*-吡啶-5-基)-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺。

¹H-NMR (DMSO d₆；含有殘餘DMA): 10.4 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.59 (多重峰之pr, 1H), 7.46(雙重峰之pr, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 3.85 (t, 4H), 2.95 (s), 2.83 (s), 2.56 (s), 2.25 (m, 2H), 1.95 (s):

MS (+ve ESI): 455 (M+H)⁺。

步驟2 - 製備2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥乙基)胺基]丙氧基}-喹啉-4-基)胺基]-1*H*-吡啶-5-基}-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺 (AZD1152 HQPA)

在惰性氣氛下(諸如由氮提供)將2-(3-{[7-(3-氯丙氧基)喹啉-4-基]胺基}-1*H*-吡唑-5-基)-*N*-(3-氯苯基)乙醯胺及2-(乙胺基)乙醇(理想地為12莫耳當量)添加至*N,N*-二甲基乙醯胺中且在攪拌下將混合物加熱至90°C。在12-16小時(理想地為12小時)之時期後,將反應冷卻回至約85°C且以受控方式添加水以保持溫度介於80°C-85°C之間。將批料調節至80°C且以產物之較佳形式之晶體(理想地為預期產率之約1%之量)播晶種。經約20小時之時期以小心受控方式將混合物冷卻至20°C以結晶呈所需形式且具有足以提供良好過濾速率之尺寸的產物。隨後將該產物過濾且以水/*N,N*-二甲基乙醯胺之混合物及乙腈洗滌且適當脫水以得到產物之水合形式。此後,將濾餅以溫乙腈(理想地在40°C之溫度下)原位製成漿料一段時期(理想地為2小時),隨後過濾、以更多乙腈洗滌且隨後乾燥(在真空中或在氮氣流下)以得到85%-90%之產率之呈灰白色固體狀的幾乎無水2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥乙基)胺基]丙氧基}-喹啉-4-基)胺基]-1*H*-吡唑-5-基}-*N*-(3-氯苯基)乙醯胺。

¹H-NMR (DMSO d₆): 10.55 (s, 1H), 9.45 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.8 (d, 1H), 7.63 (多重峰之pr, 1H), 7.47 (雙重峰之pr, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.32 (d, 1H), 6.9 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.32 (t, 2H), 3.83 (br s, 2H), 3.76 (t, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.25 (m, 4H), 2.25 (m, 2H), 1.25 (t, 3H):

MS (+ve ESI): 508.4 (M+H)⁺。

步驟3 - 製備磷酸單(第三丁基) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氯苯基)

胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯[AZD1152 t-Bu P(5)酯]

經延長之時期(理想地為3小時)向吡啶.鹽酸鹽於*N,N*-二甲基乙醯胺中之漿料中饋入2-{3-[(7-{3-[乙基(2-羥乙基)胺基]丙氧基}-喹唑啉-4-基)胺基]-1*H*-吡唑-5-基}-*N*-(3-氟苯基)乙醯胺及二(第三丁基)二乙基胺基磷酸酯(理想地為1莫耳當量)於*N,N*-二甲基乙醯胺中之溶液且將溫度保持在-20℃至-10℃之間(理想地為-15℃)。此後在1小時之時期內接著進一步添加二(第三丁基)二乙基胺基磷酸酯(理想地為0.5莫耳當量)，亦將溫度保持在-20℃至-10℃之間(理想地為-15℃)。

以30% w/w過氧化氫(約4.2莫耳當量)原位處理反應混合物，同時將溫度保持在低於-10℃(理想地為-12℃至-8℃)下且在此溫度下保持一段時期(理想地為16小時)。藉由添加偏亞硫酸氫鈉(呈10% w/v水溶液形式)來破壞剩餘過氧化氫，同時保持溫度低於40℃。

隨後將所得磷酸二(第三丁基)2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯之溶液加熱至40℃且添加氫氧化鈉溶液(理想地為2 M)以調節至pH 5.5-6.5(理想地為pH 6)，其中以適合結晶物質播晶種。保持溫度且藉由添加額外氫氧化鈉溶液保持pH 5-6之範圍至少2小時之時期。隨後饋入水且將pH值進一步調節至pH 8-9之範圍內(理想地為pH 8.8)，同時保持溫度(理想地40℃，但在35℃-

45°C之範圍內)16小時之時期以優化回收。將溫反應混合物直接過濾以得到磷酸單(第三丁基) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯，將其以水洗滌若干次且最後乾燥(在真空中或適合惰性氣體流中)以得到產率介於86%-93%之間的呈灰白色固體狀的磷酸單(第三丁基) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯。

¹H-NMR (DMSO *d*₆): 10.48 (s, 1H), 9.75 (br s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.85 (d, 1H), 7.67 (多重峰之pr, 1H), 7.48(雙重峰之pr, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 4.34 (t, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.3 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (t, 3H):

MS (+ve ESI): (M+H)⁺ 644.2761片段(較少丁基)588.2147。

步驟4 - 製備磷酸二氫2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯(AZD1152)

將磷酸單(第三丁基) 2-[[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]-喹唑啉-7-基}氧基)丙基](乙基)胺基]乙基酯懸浮於水/四氫呋喃(THF)之混合物中且以過量介於1.5莫耳當量與3.0莫耳當量之間的鹽酸(理想地為2 M之濃度且含有1.5莫耳當量)處理。將混合物加熱至55°C-65°C(理想地60°C)且在60°C下保持約1小時。隨後

使用氫氧化鈉(較佳為2 M濃度且含有1.7莫耳當量)將熱溶液鹼化以得到在pH 5.0-5.5之範圍內之pH值且隨後在55°C-65°C(理想地為60°C)下以產物之較佳形式之晶體(理想地為預期產率之約0.05% w/w之量)播晶種。將混合物在此溫度下攪拌至少一小時，隨後添加水且將漿料攪拌且經約12小時之時期以受控方式冷卻，隨後在周圍溫度下攪拌至少4小時且隨後藉由過濾分離產物。將濾餅以水、隨後THF依次洗滌且在真空中或使用增濕程序乾燥，藉此使經水蒸氣濕潤之惰性氣體穿過固體直至獲得恆定重量。在真空中乾燥後，將固體磷酸二氫2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯在周圍條件下平衡至恆定重量以得到呈淡黃色針狀物質之水合形式。獲得約81%產率之產物。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6):

MS (+ve ESI): 587.8 (M+H) $^+$

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6): 10.53 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.54 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.21 (d, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.27 (t, 2H), 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.21 (t, 2H), 3.13 (q, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.24 (t, 3H):

MS (+ve ESI): 588 (M+H) $^+$ 。

$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{FN}_7\text{O}_6\text{P}+3.0 \text{ H}_2\text{O}$ 要求 C, 48.7%; H, 5.8%; N, 15.3%;
實驗值 C, 48.8%; H, 5.35%; N, 15.15%。

步驟5 - 製備磷酸二氫2-{乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺

基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]噻唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯.順丁烯二酸鹽[AZD1152順丁烯二酸鹽]

將2-丁烯二酸(Z)(1.57莫耳當量；449.80微莫耳；52.21 mg)溶解於甲醇(123.54毫莫耳；5.00 ml；3.96 g)中且向此溶液中添加先前製備之AZD1152之甲醇溶液(呈游離形式三水合物-1.00莫耳當量，286.14微莫耳；40.00 mL；31.87 g)，接著添加更多甲醇(123.54毫莫耳；5.00 mL；3.96 g)。使混合物在室溫下攪拌隔夜。生成白色懸浮液且將固體藉由過濾回收，隨後在真空中乾燥。藉由NMR分析確定共結晶體為AZD1152之順丁烯二酸鹽。

上述步驟5之替代步驟：

將粗AZD1152(估計為7.44g @ 100%，11.61毫莫耳)添加至二甲亞碲(36 ml)中且留在周圍條件下以製備淡棕色溶液。向此溶液中添加順丁烯二酸(1.76 g，15.16毫莫耳，1.31莫耳當量)於甲醇(36 ml)中之溶液且使混合物在周圍溫度下靜置隔夜。第二天將澄清溶液之等分試樣轉移至一小瓶中，劃線且密封保持若干小時。形成白色固體之沈積物且將此轉移至燒瓶中且對其攪拌。溶液逐漸變混濁且固體沈積。將漿料靜置若干天且最後過濾。將濾餅以二甲亞碲/甲醇之1:1混合物(總共15 ml)洗滌，以甲醇(3×25 ml)原位製成漿料且隨後在真空中乾燥。由NMR分析確定共結晶體為AZD1152之順丁烯二酸鹽(約78.7%產率)。

上述步驟5之另一替代步驟：

將AZD1152(呈游離形式三水合物-1.00莫耳當量，8.51

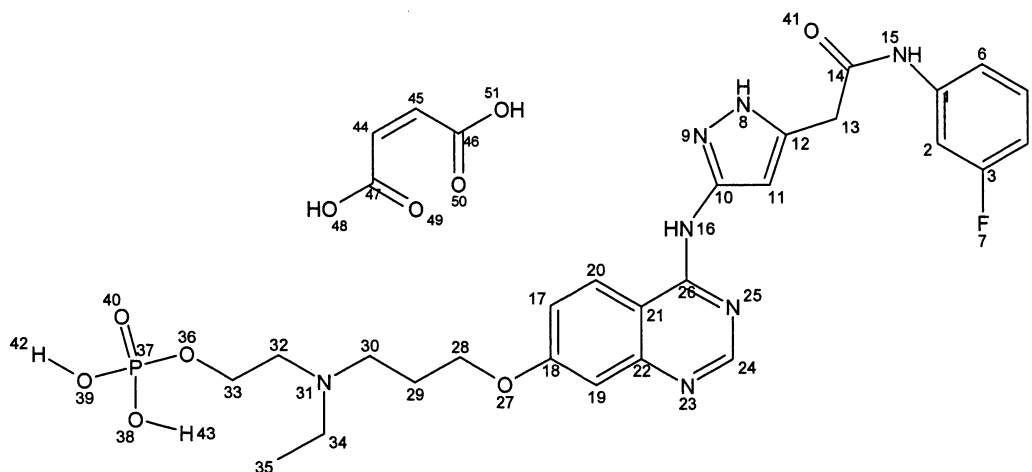
毫莫耳；5.74 g)及2-丁烯二酸(Z)(1.20毫莫耳當量；10.2毫莫耳；1.19 g)溶解於二甲亞砜(35 ml)中且加熱至60℃。將反溶劑乙腈(20 ml)添加至熱混合物中，隨後將該混合物以產物AZD1152順丁烯二酸鹽之較佳形式之晶體(0.005毫莫耳當量；42.6微莫耳；30.7 mg-理想地為預期產率之約0.5% w/w之量)播晶種。將反應混合物在60℃下保持4小時，隨後經3小時之時期又添加乙腈餵料(40 ml)。將混合物在60℃下攪拌12-20小時(理想地為16小時)。以受控方式將反應冷卻至20℃且藉由過濾分離產物。將濾餅以二甲亞砜/乙腈(1:2體積比)之混合物洗滌、接著以乙腈洗滌。將固體在真空中或在溫惰性氣體流下乾燥(理想地為40℃)以得到約88%產率之呈白色固體狀的AZD1152順丁烯二酸鹽。

【實施方式】

表徵資料

核磁共振譜

共結晶體中組份之結構及近似比可由質子NMR譜來確定。典型資料展示於下。



化學位移/ppm		化學位移/ppm	
原子	¹ H	原子	¹ H
1	NR	27	NR
2	7.63 (m)	28	4.32 (2H t, 5.8)
3	NR	29	2.25 (m)
4	6.89 (m)	30	3.37 (m)
5	7.33 (m)	31	NR
6	7.37 (m)	32	3.48 (m)
7	NR	33	4.22 (m)
8	9.76* (s, 寬)	34	3.30 (2H q, 7.1)
9	NR	35	1.28 (3H t, 7.1)
10	NR	36	NR
11	6.77 (s)	37	NR
12	NR	38	NR
13	3.85 (s)	39	NR
14	NR	40	NR
15	10.51 (s)	41	NR
16	11.99* (s, 寬)	42	14.0 (s, 寬)
17	7.48 (dd, 9.1, 2.4)	43	14.0 (s, 寬)
18	NR	44	6.28 (s)
19	7.29 (d, 2.4)	45	6.28 (s)
20	8.81(d, 9.3)	46	NR
21	NR	47	NR
22	NR	48	14.0 (s, 寬)
23	NR	49	NR
24	8.98(s)	50	NR
25	NR	51	14.0 (s, 寬)
26	NR		

NR=無共振

NMR積分約符合1:1.04之順丁烯二酸與AZD1152比率。

差示掃描熱量測定

使用一Mettler DSC820e對根據製備方法1及2製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體進行差示掃描熱量測定(DSC)分析。以每分鐘10°C之恆定加熱速率將包含於一裝

備有一穿孔蓋之40 μ l鋁盤中之通常小於5 mg物質的樣品在25 $^{\circ}$ C至325 $^{\circ}$ C之溫度範圍內加熱。使用為氮氣之淨化氣體-流動速率為每分鐘100 ml。

根據上述方法1製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之批料的結果(參見圖2)指示順丁烯二酸鹽共結晶體展示具有180 $^{\circ}$ C之起始溫度(歸因於熔融)之大的尖銳吸熱峰。在熔融之後，歸因於順丁烯二酸在熔融後降解，觀測到大的吸熱事件。應瞭解DSC之起始及/或峰值溫度值可在不同機器、不同方法或不同樣品之間輕微改變，且因此提供之值不應理解為絕對值。

由上述方法2製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之結果(參見圖3)指示順丁烯二酸鹽共結晶體展示具有183 $^{\circ}$ C之起始溫度(歸因於熔融)之大的尖銳吸熱峰。在熔融之後，歸因於順丁烯二酸在熔融後降解，觀測到大的吸熱事件。應瞭解DSC之起始及/或峰值溫度值可在不同機器、不同方法或不同樣品之間輕微改變，且因此提供之值不應理解為絕對值。

動態蒸氣吸附

分析儀器：表面量測系統動態蒸氣吸附分析儀

在25 $^{\circ}$ C下在以下相對濕度(RH)下：0%、20%、40%、60%、80%、95%、80%、60%、40%、20%、0% RH下，使在特定溫度下包含於一石英固持器中之約5 mg物質經受氮流動速率為每分鐘200 ml之濕潤氮，重複兩次。

監測在特定相對濕度下之物質重量直至根據由10分鐘所

平均的每分鐘0.002%重量變化之重量標準其為穩定的。若重量仍改變，則將其保持在特定相對濕度下直至重量穩定(直至12小時之最大時間)。

根據方法1製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之批料之結果展示於圖4中。根據上述方法2製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之批料之結果展示於圖5中。

圖4及圖5中展示之動態蒸氣吸附結果指示樣品為非吸濕性的且重量上升歸因於表面吸附。在循環1中圖5中觀測到之重量損失歸因於因製造存在於樣品中的少量溶劑。此由在0% RH下降低之重量證實。一旦此溶劑蒸發，則在0% RH下物質維持其重量。熟習此項技術者應完全瞭解此觀測。

AZD1152游離形式之動態蒸氣吸附展示於圖6中。

AZD1152游離形式之動態蒸氣吸附指示視儲存之相對濕度而定，水之含量為完全可變的。此水含量之變化係歸因於不同水合狀態，其可在脫水狀態至四水合狀態及更高水合狀態之範圍內。

X射線粉末繞射

上文陳述AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體之X射線粉末繞射圖展示於圖1中。

AZD1152順丁烯二酸鹽之另一製造方法已呈現於上文方法2中。由方法2製造之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體的X射線粉末繞射圖展示於圖7中。關鍵峰展示於以下表2中。

表 2

角(2 θ)	相對強度(%)	角(2 θ)	相對強度(%)
5.13	80.3	22.45	13.5
6.45	57.9	23.22	21.8
8.14	40.5	23.58	33.8
10.18	9.1	23.98	20.8
11.96	7.8	24.30	14.8
12.85	58.4	24.65	16.1
13.85	14.3	25.56	27.8
14.96	12.5	25.83	52.5
15.27	25.7	26.37	35.6
15.75	13	27.98	38.4
16.53	19.7	28.44	34.3
17.29	23.6	28.91	16.9
19.31	100	29.72	29.6
19.78	55.1	30.34	13
20.10	99.5	32.72	14.5
20.60	40.5	36.21	22.3
21.01	20.5	38.18	11.9
21.68	82.3		

如上所述，此項技術中已知視量測條件(諸如設備、樣品製備或所使用之機器)而定可獲得具有一或多個量測誤差之X射線粉末繞射圖。詳言之，通常已知X射線粉末繞射圖之強度可視量測條件及樣品製備而波動。舉例而言，熟習X射線粉末繞射之技術者應瞭解峰之相對強度可受到(例如)尺寸大於30微米之晶粒及非單一縱橫比(其可影響樣品之分析)的影響。熟習此項技術者亦應瞭解反射之位置可受到樣品處於繞射儀中之精確高度及繞射儀之零校正的影響。樣品之表面平坦度亦可具有較小影響。因此熟習此項技術者應瞭解本文中呈現之繞射圖資料不應理解為絕對的(進一步資訊參見Jenkins, R及Snyder, R.L. 'Introduction

to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons, 1996)。

一般而言，以上亦陳述X射線粉末繞射圖中繞射角之量測誤差為約 $2\theta=0.5^\circ$ 或更小(或，更適合地，約 $2\theta=0.2^\circ$ 或更小)，且當考慮圖1中之X射線粉末繞射圖且當說明上文中及表1中提及之峰位置時，應考慮此量測誤差之程度。

鑒於此，熟習此項技術者應瞭解上文圖7及表2中呈現之資料指示由方法2生成之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體為與由方法1生成之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體(且展示於圖1及表1中)相同的結晶形式。

【圖式簡單說明】

圖1為AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體(由上述方法1製備)之X射線粉末繞射圖，其中 2θ 值繪於水平軸上且相對譜線強度(計數)繪於垂直軸上。

圖2為根據上述方法1製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之差示掃描熱量測定溫度記錄圖。

圖3為根據上述方法2製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之差示掃描熱量測定溫度記錄圖。

圖4為根據上述方法1製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之批料之動態蒸氣吸附等溫線圖。

圖5為根據上述方法2製備之AZD1152順丁烯二酸鹽共結晶體之批料之動態蒸氣吸附等溫線圖。

圖6為AZD1152游離形式之動態蒸氣吸附等溫線圖。

圖7為AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體(由上述方法2製備)之X射線粉末繞射圖，其中 2θ 值繪於水平軸上且相對譜線強度(計數)繪於垂直軸上。

五、中文發明摘要：

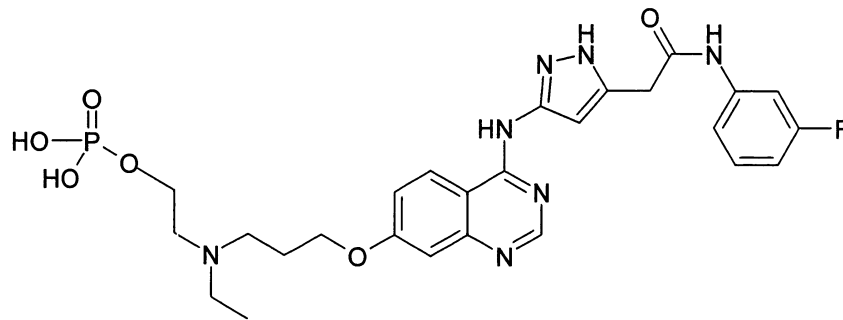
本發明係關於一種磷酸二氫2-{\乙基[3-({4-[(5-{2-[(3-氟苯基)胺基]-2-側氧基乙基}-1*H*-吡唑-3-基)胺基]喹唑啉-7-基}氧基)丙基]胺基}乙酯(AZD1152)之新穎共結晶體，其為適用於治療過度增生性疾病(諸如癌症)的極光激酶(aurora kinase)抑制劑。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a novel co-crystal of 2-{ethyl[3-({4-[(5-{2-[(3-fluorophenyl)amino]-2-oxoethyl}-1*H*-pyrazol-3-yl)amino]quinazolin-7-yl}oxy)propyl]amino}ethyl dihydrogen phosphate (AZD1152) which is an aurora kinase inhibitor that is useful in the treatment of hyperproliferative diseases such as cancer.

十、申請專利範圍：

1. 一種 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體，其中 AZD1152 為



2. 一種如請求項 1 之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體的結晶形式。
3. 如請求項 2 之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體的結晶形式，其中該共結晶體具有一在約 $2\theta=12.9^\circ$ 及 15.2° 及 / 或 10.2° 下具有特定峰之 X 射線粉末繞射圖。
4. 一種用於製備如請求項 1 之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體的方法，該方法包含在諸如甲醇、二甲亞砜 (DMSO) 或其混合物之適合溶劑中將 AZD1152 游離形式之溶液與順丁烯二酸混合的步驟。
5. 一種醫藥組合物，其包含與醫藥學上可接受之稀釋劑或載劑結合的如請求項 1 之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體。
6. 如請求項 1 之 AZD1152 的順丁烯二酸鹽共結晶體，係用於療法中。
7. 一種如請求項 1 之 AZD1152 之順丁烯二酸鹽共結晶體用於製備藥物的用途，其中該藥物係用於治療一或多種極光激酶之抑制作用為有益的疾病。

8. 一種如請求項1之AZD1152之順丁烯二酸鹽共結晶體用於製備藥物的用途，其中該藥物係用於治療過度增生性疾病，諸如癌症。

十一、圖式：

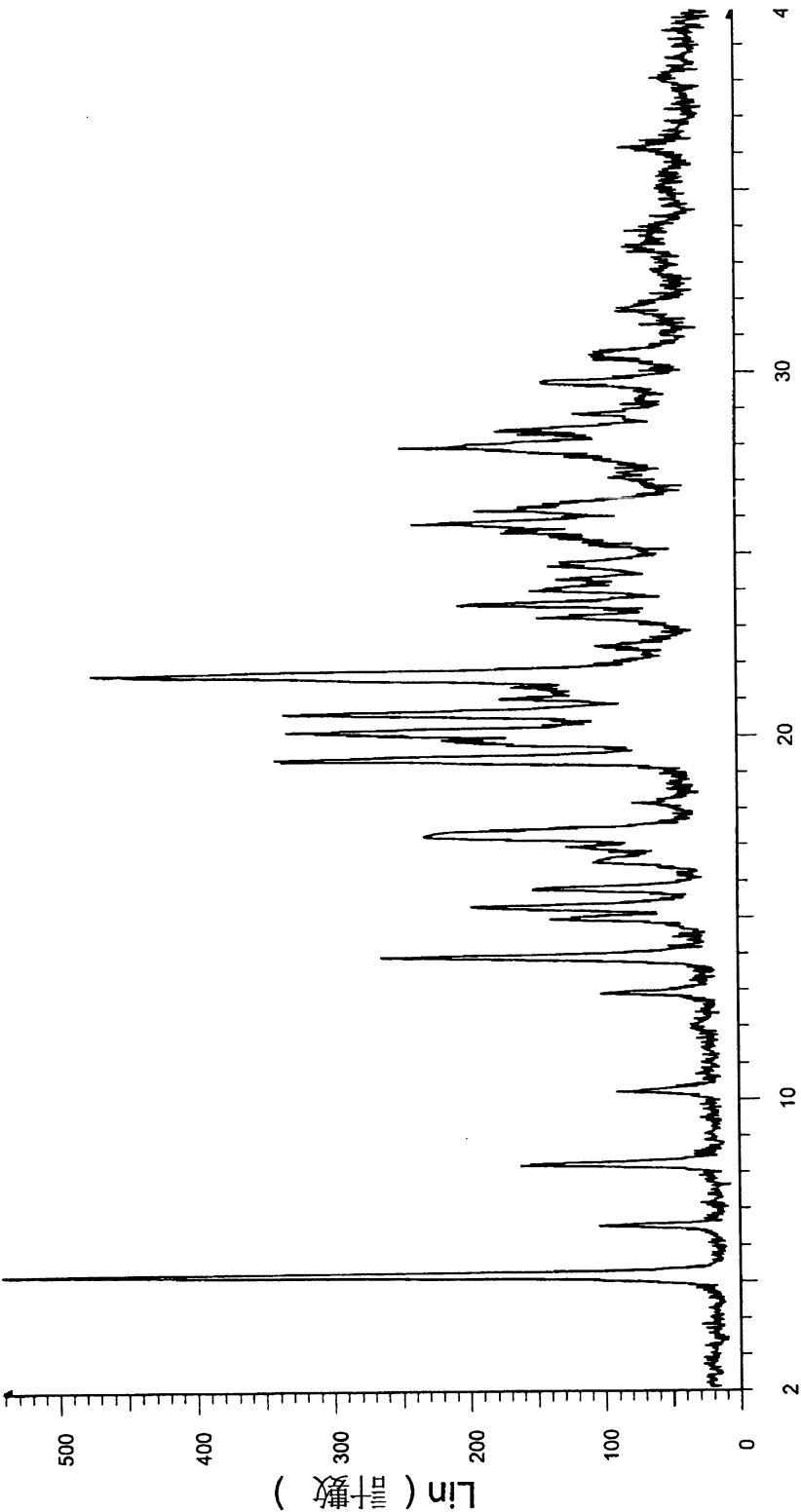


圖1
2θ範圍

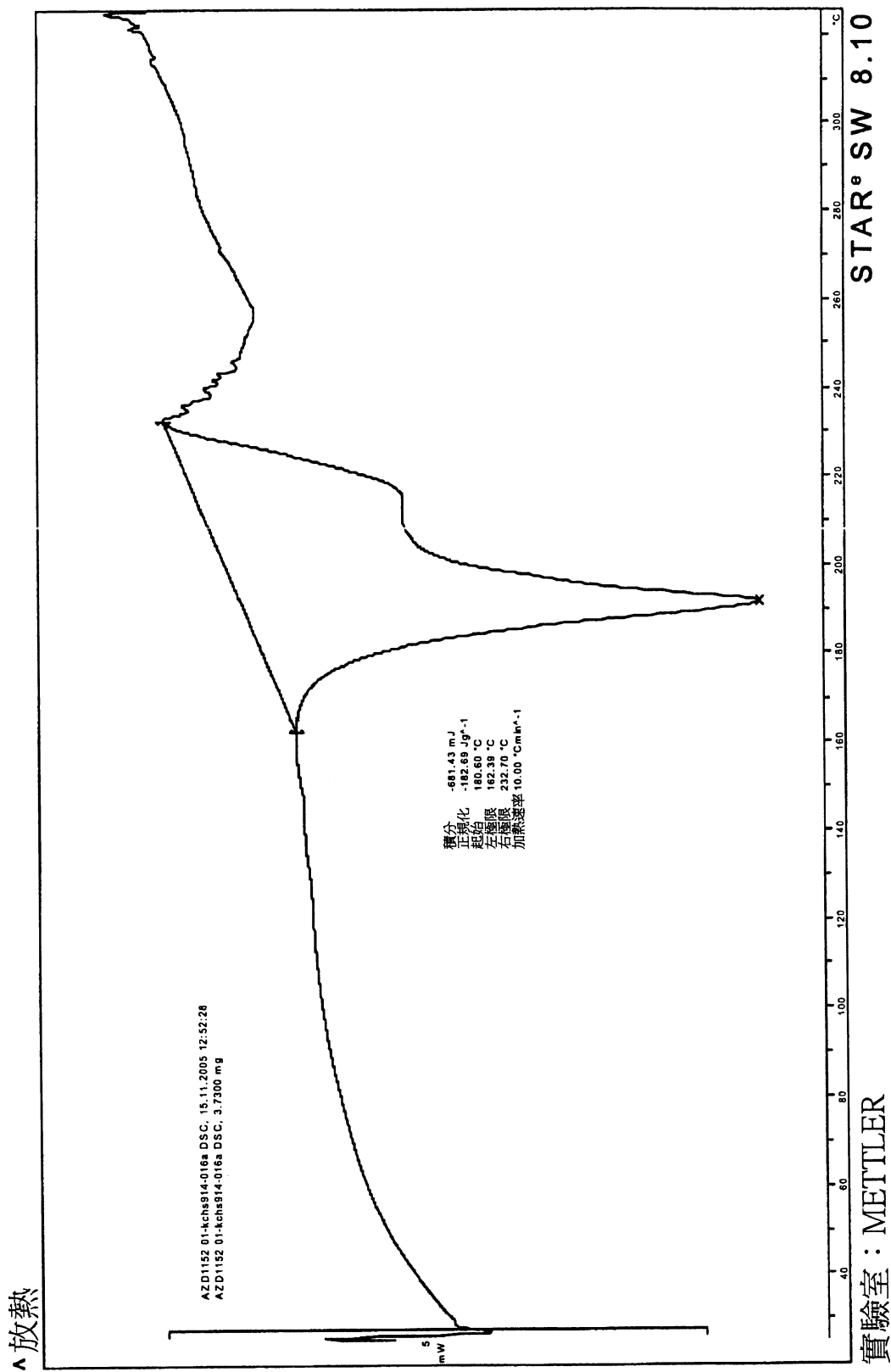


圖2

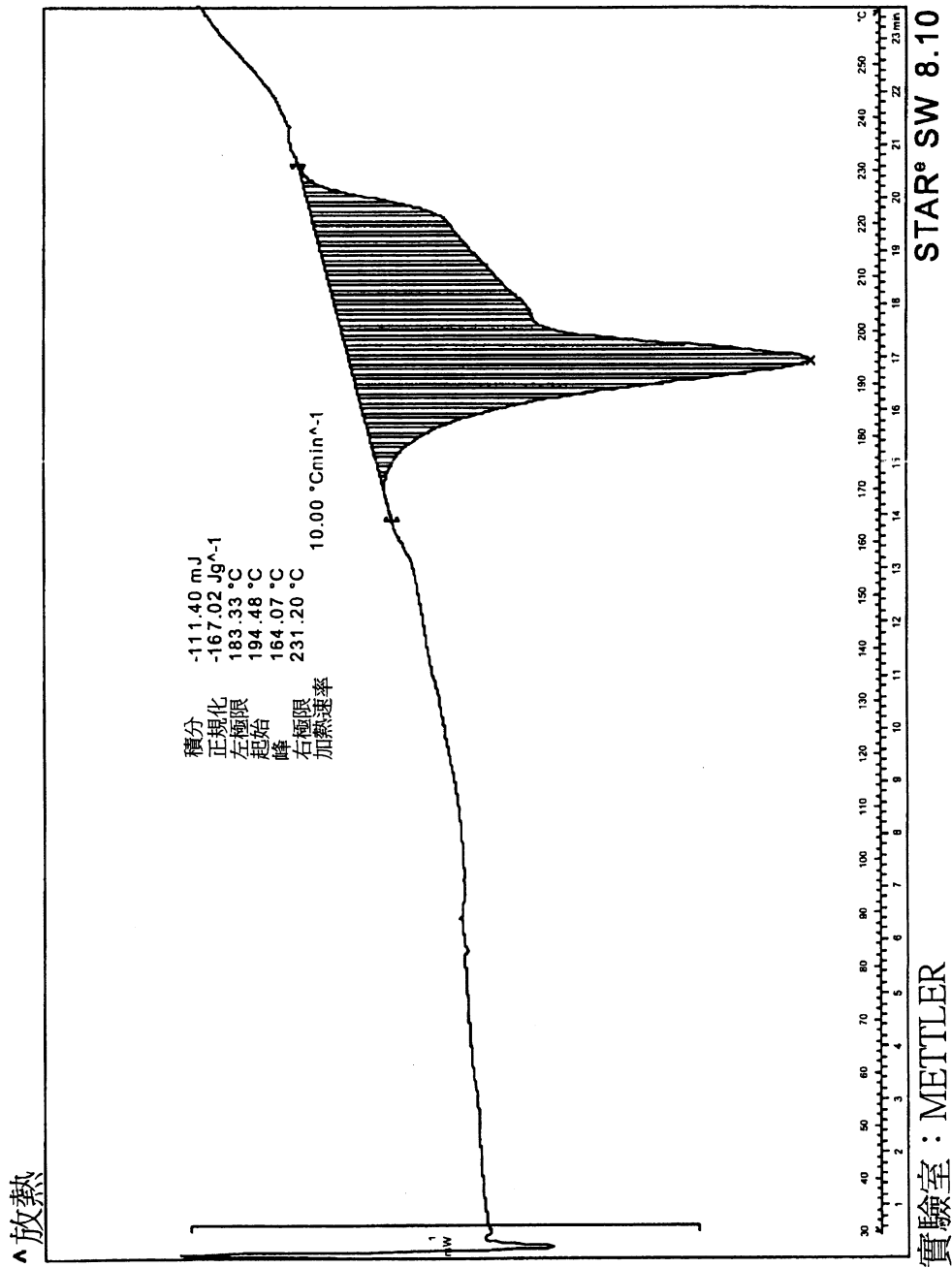
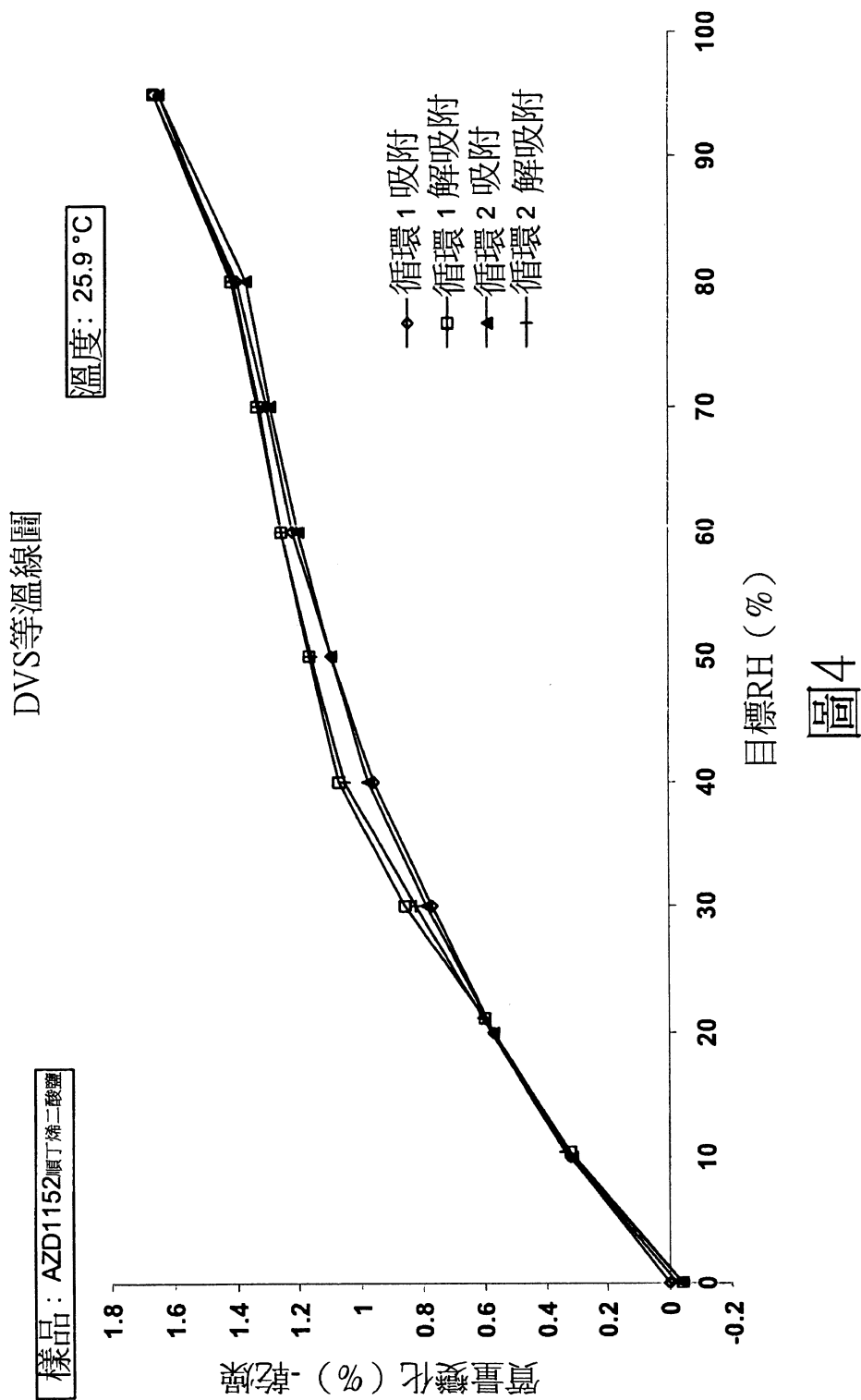


圖3



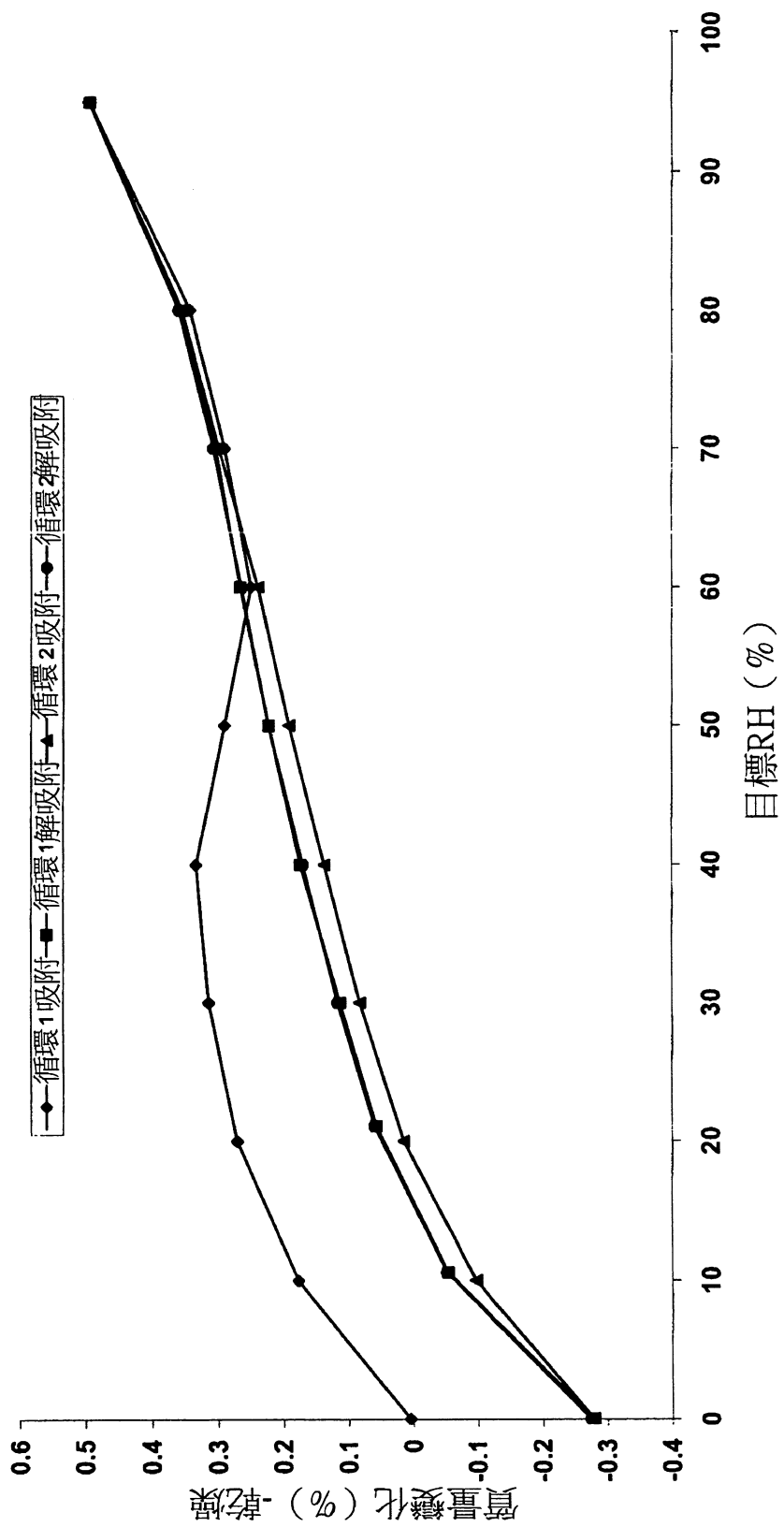


圖5

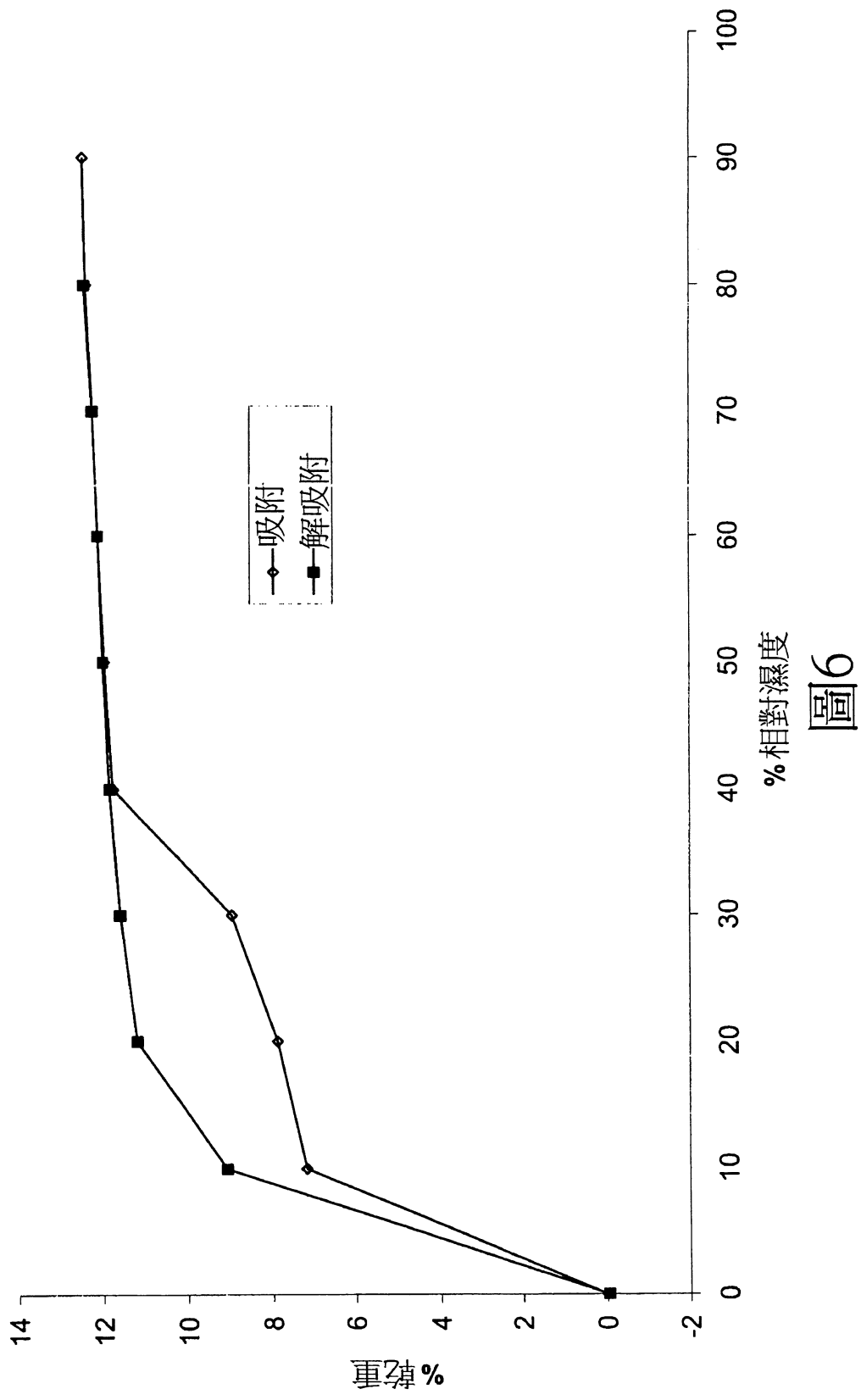
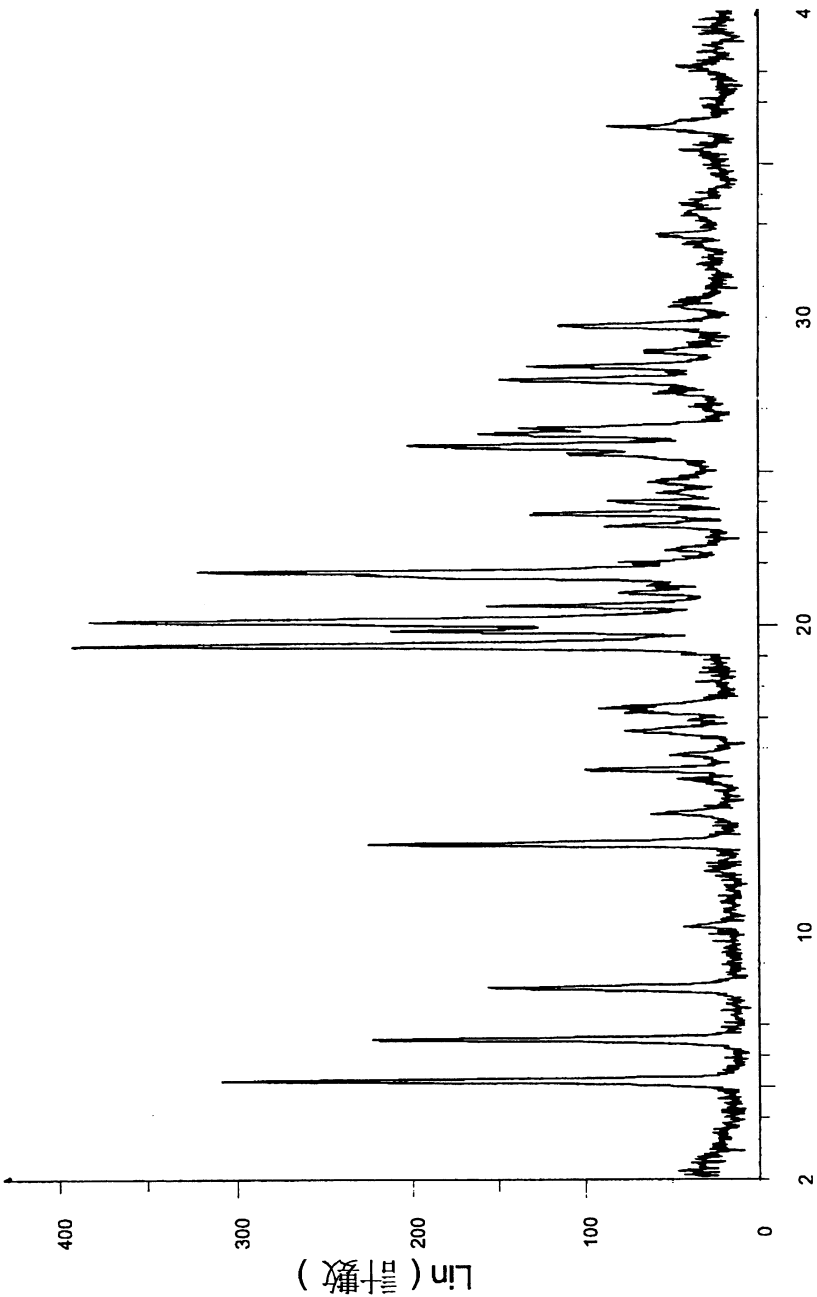


圖6



2θ範圍
圖7

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

