

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A01N 43/42 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780027684.2

[43] 公开日 2009 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 101511188A

[22] 申请日 2007.5.24

[21] 申请号 200780027684.2

[30] 优先权

[32] 2006.5.24 [33] IN [31] 897/CHE/2006

[32] 2007.1.31 [33] US [31] 60/887,416

[86] 国际申请 PCT/US2007/069640 2007.5.24

[87] 国际公布 WO2007/140239 英 2007.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.21

[71] 申请人 雷迪博士实验室有限公司

地址 印度海得拉巴

共同申请人 雷迪博士实验室有限公司

[72] 发明人 V·阿克拉 S·阿利昆于

R·阿贾亚库马 R·马兰吉

R·西里西拉 S·杜伍里

S·拉贾戈帕尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李进 韦欣华

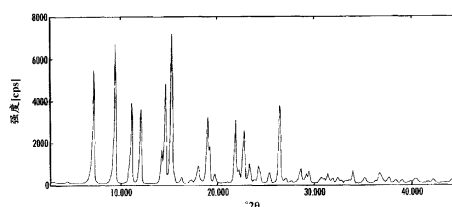
权利要求书 5 页 说明书 36 页 附图 13 页

[54] 发明名称

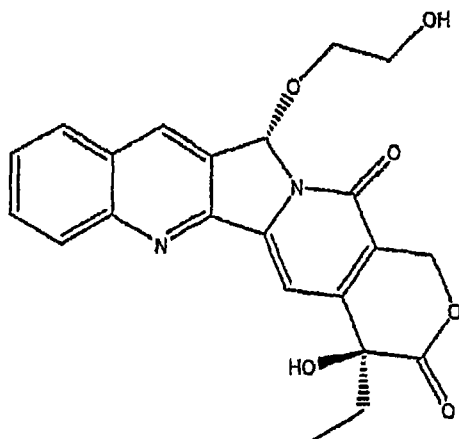
晶型 5(S) - (2'-羟基乙氧基) - 20(S) - 喜树碱

[57] 摘要

本发明描述了 5(RS) - (2'-羟基乙氧基) - 20(S) - 喜树碱的晶型 5(S) - (2'-羟基乙氧基) - 20(S) - 喜树碱非对映异构体, 其特征在于: X 射线粉末衍射图包含一个或多个选自 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.2 ± 0.1 , 18.92 ± 0.1 , 21.86 ± 0.1 , 22.74 ± 0.1 和 $26.42 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 的峰强。还描述了所述化合物的制备和使用方法。



1. 晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其具有结构:



2. 权利要求 1 的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其特征在于 X 射线粉末衍射图包含一个或多个选自 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.2 ± 0.1 , 18.92 ± 0.1 , 21.86 ± 0.1 , 22.74 ± 0.1 和 $26.42 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 的峰强。

3. 权利要求 1 和 2 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其具有单斜晶空间群 $P2_1$ 内的晶体, 晶胞参数 $a=6.308(1)\text{\AA}$, $b=15.924(3)\text{\AA}$, $c=18.771(4)\text{\AA}$, $\beta=95.519(5)^\circ$; $V=1876.8(7)\text{\AA}^3$ 和 $Z=4$, 所述参数用 CCD 面积检测器石墨单色 $\text{MoK}\alpha$ 辐射($\lambda=0.7107\text{\AA}$)通过单晶衍射计测量。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其特征在于差示扫描量热法测量的单熔融吸热峰在约 234°C 至 238°C 之间。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其是无水的。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其全相纯度超过 97%。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其基本不含 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

8. 权利要求 1 至 7 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其在 $7.2 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有 X 射线粉末衍射峰。

9. 权利要求 1 至 8 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 还具有至少一个选自 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 , 和 $18.92 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 的另外的 X 射线粉末衍射峰。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 FT-IR 光谱包含至少一个选自 3271 ± 2 , 1743 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收带。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处包含吸收带。

12. 权利要求 1 至 11 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 FT-IR 光谱还包含至少一个选自 3271 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收带。

13. 权利要求 1 至 12 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线衍射图在 $7.2 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

14. 权利要求 1 至 13 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线衍射图在 $7.2 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 3271 ± 2 和 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

15. 权利要求 1 至 14 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线粉末衍射图在 7.2 ± 0.1 和 $9.4 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

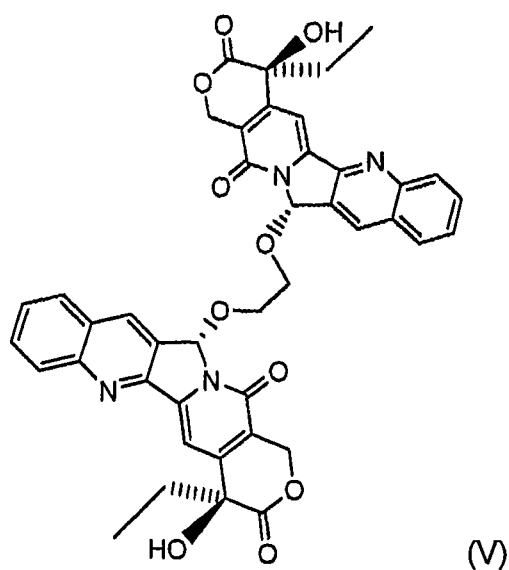
16. 权利要求 1 至 15 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线粉末衍射图在 7.2 ± 0.1 和 $9.4 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 3271 ± 2 和 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

17. 权利要求 1 至 16 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线粉末衍射图在 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 和 $18.92 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR

光谱在 3271 ± 2 , 1743 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

18. 权利要求 1 至 17 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其 X 射线粉末衍射图在 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 和 $18.92 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且熔点范围为约 234°C 至约 238°C 。

19. 权利要求 1 至 18 中任一项的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其包含作为杂质的式 V 喜树碱二聚体



20. 权利要求 19 的晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其中喜树碱二聚体的含量小于约 1.5% w/w。

21. 权利要求 19 的晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其中喜树碱二聚体的含量小于约 0.8% w/w。

22. 权利要求 19 的晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其中喜树碱二聚体的含量小于约 0.5% w/w。

23. 权利要求 19 的晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其中喜树碱二聚体的含量小于约 0.1% w/w。

24. 一种药用组合物, 其包含权利要求 1 至 24 中任一项所述的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱和药学上可接受的载体。

25. 权利要求 24 的药用组合物, 其中所述组合物的成人单次剂量包含约 5mg 至约 25mg 的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

26. 用晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱制备药用组合物的方法,所述方法包括将权利要求 1 至 24 中任一项所述的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱与药学上可接受的载体混合。

27. 制备权利要求 1 中所述晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 将 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱与选自正丁醇或四氢呋喃的溶剂混合;

(b) 回流混合物约 1 至约 4 小时;

(c) 使混合物冷却至约 40℃至约 50℃; 和

(d) 将固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱从混合物中分离。

28. 权利要求 27 的方法, 其还包括步骤:

(e) 用选自正丁醇或四氢呋喃的溶剂洗涤固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱; 和

(d) 干燥固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 得到基本不含 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

29. 用晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱治疗患者癌症的方法,所述方法包括给予患者有效量的权利要求 1 至 24 中任一项所述的晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述患者是哺乳动物。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所述患者是人。

32. 权利要求 30 的方法, 其中晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱是口服给予患者。

33. 权利要求 30 的方法, 其中所述癌症选自: 卵巢癌、骨肉瘤、白血病、淋巴瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、中枢神经系统(CNS)癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、表皮样癌、肺癌、黑素瘤、前列腺癌、子宫癌、软组织肉瘤、胰腺癌和横纹肌肉瘤。

34. 权利要求 30 的方法, 其中所述癌症选自: 结肠癌、卵巢癌和骨肉瘤。

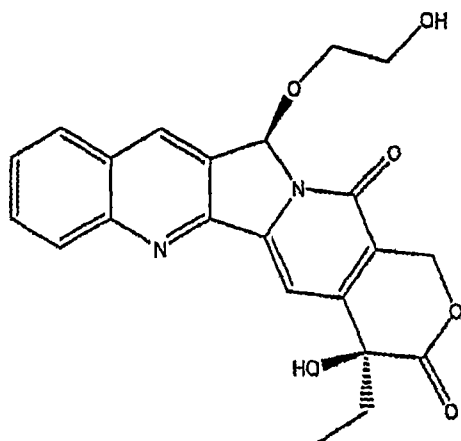
35. 权利要求 30 的方法, 其中所述癌症选自: 骨肉瘤、结肠直肠癌和胰腺癌。

36. 权利要求 30 的方法, 其中所述癌症选自: 膀胱癌、乳腺癌、CNS 癌、结肠癌、表皮样癌、肺癌、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肾癌和子宫癌。

37. 权利要求 30 的方法, 其中晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱给予患者的量为约 0.1 至约 5mg/kg/天。

38. 权利要求 30 的方法, 其中晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱给予患者的量为约 0.2 至约 3mg/kg/天。

39. 5(R)-(2''-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其具有结构:



晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱

相关专利和专利申请的交叉引用

本发明主题涉及2001年1月23日出版的美国专利No. 6,177,439, 和与本申请同一天递交的共同待决且共同拥有的美国非临时专利申请, 名称为: 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱及其制备和治疗癌症的用途, 律师代理案件号为 DRF 3.0-031 US, 它们都通过整体引用而并入本文。

本发明是专利合作条约申请, 并要求获得2006年5月24日递交的印度临时申请 No. 897/CHE/2006 和2007年1月31日递交的美国临时申请 No. 60/887,416 的权益, 它们都被本文所参考, 并通过整体引用而并入本文。

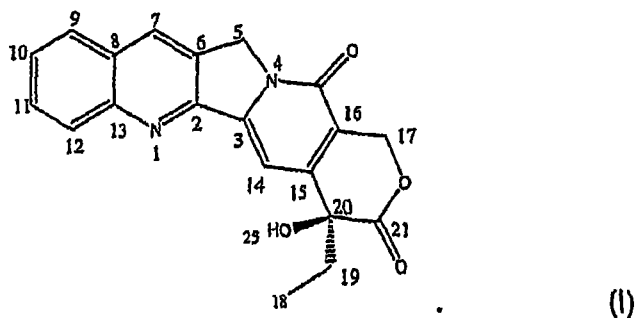
发明背景

(1) 发明领域

本发明总体来讲涉及晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 其制备方法, 及其使用方法和组合物。

(2) 相关技术描述

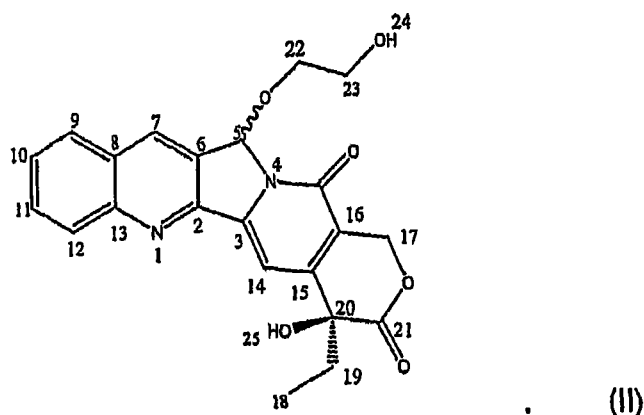
喜树碱(CPT)是五环植物生物碱, 最早由 Wall 等人从中国喜树 (*Camptotheca acuminata*) 中分离得到, J. Am. Chem. Soc, 88: 3888 (1966)。喜树碱的结构如式 I 所示:



未经修饰的喜树碱，亲脂性高而水溶性差。早期使用溶于氢氧化钠水溶液的喜树碱钠进行临床试验，表明该化合物具有抗肿瘤活性，其它研究证明活性归因于化合物作为 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂的作用。然而，由于喜树碱的毒性问题和有限的水溶性，其潜在治疗作用远未得以充分实现。

为改善该化合物的性质进行了尝试，包括合成和检测许多喜树碱类似物。例如，美国专利 No. 5,004,758 描述了水溶性喜树碱类似物，US 5,734,056 描述了喜树碱类似物。美国专利 No. 5,004,758 和美国专利出版物 US 2007/0105885 讨论了喜树碱的类似物，托泊替康 (Topotecan)。

美国专利 No. 6,177,439 描述了 20(S)-喜树碱的各种 C-5 取代的类似物。其中一种类似物，5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的结构如式 II 所示：

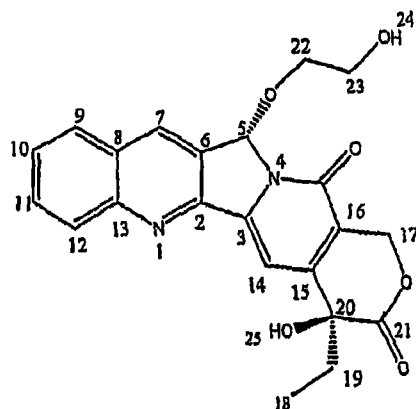


专利 6,177,439，公开了该类似物的非对映异构体混合物的制备方法，—本文称作 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，或者 5-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，是 5-烷氧基取代的具五环结构的 20(S)-喜树碱类似物。其手性中心位于 C-5 和 C-20。C-20 手性中心对应于天然 S-构型。然而，C-5 取代表现为比例大致相等的 R 和 S 非对映异构体。5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的分子式为 $C_{22}H_{20}N_2O_6$ 。化合物的分子量为 408.41 克/摩尔，熔点为 190℃。非对

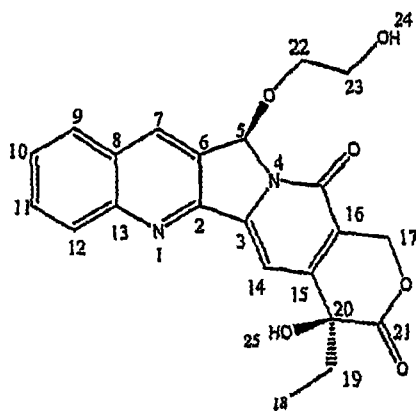
映异构体混合物 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 或 5-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的水溶性不好。

5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱非对映异构体, 化学上描述为 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 而 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱非对映异构体, 化学上描述为 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 还可化学上描述为 4-(S)-乙基-4-羟基-12(S)-(2-羟基乙氧基)-1,12-二氢-4H-2-氧杂-6,12a-二氮杂二苯并[b,h]茛-3,13-二酮, 其具有如式 III 所示的下列化学结构:



(III)

5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱非对映异构体的化学结构如式 IV 所示:



(IV)

一般来讲, 作为对映体的异构体, 当以对称形式存在时, 除能够使平面偏振光旋转角度相同但方向相反之外, 具有相同的化学和物理

性质。另一方面，作为非对映异构体的异构体是立体异构体，而不是对映体。非对映异构体可以具有不同的物理性质和不同的反应性，且通常如此。另一种定义，非对映异构体是在一处或多处手性中心具有相反构型，但互相不为镜象的成对异构体。

众所周知，不同固态形式的化合物可以具有不同的物理性质。在药用化合物中，这种差异对商业化合物的成功具有重要的影响。例如，具有不同固相形态的化合物，可以具有不同的充填性质(packing property)，例如摩尔体积、密度和吸湿性，不同的热力学性质，例如熔融温度和溶解度，不同的动力学性质，例如溶解速率和稳定性(包括在周围条件下的稳定性，特别是对湿度的稳定性，和在贮藏条件下的稳定性)，不同的表面性质，例如表面积、可湿性、界面张力和形状，不同的机械性质，例如硬度、抗张强度、压塑性、处理、流动和混合性质，和/或不同的过滤性质。物理性质上的这些差异，可以影响药用化合物的制备、加工、配方或给予。

药用化合物的另一个重要固态性质，是其在水性液体中的溶解速率。活性成分在患者胃液中的溶解速率，可以对治疗产生影响，因为它给出了口服给药的活性成分可到达患者血流的速率上限。因此，溶解速率可以对给予药物的治疗效果产生重要影响。

通常，药用化合物的溶解速率取决于其稳定的晶型。同样，药用化合物的这个性质，在配制糖浆、酏剂，及其它液体药物时，应作为重要特性加以考虑。化合物的固态形式也可影响其压制行为及其贮藏稳定性。

因此，由上清楚可知，期望提供 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的稳定晶型的活性 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱药用成分，其具有所需的批量处理(bulk handling)和溶解特性。

发明概述

简而言之，因此本发明涉及新的晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，其特征在于 X 射线粉末衍射图包含一个或多个选自 7.2 ± 0.1 ,

9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.2 ± 0.1 , 18.92 ± 0.1 , 21.86 ± 0.1 , 22.74 ± 0.1 和 $26.42 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 的峰强(peak intensity)。

本发明还涉及包含上述晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱和药学上可接受载体的新药组合物。

本发明还涉及用晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱生产药用组合物的新方法, 所述方法包括将上述晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱与药学上可接受载体混合。

本发明还涉及新的制备上述晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的方法, 所述方法包括:

(a) 使 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱与选自正丁醇或四氢呋喃的溶剂混合;

(b) 回流混合物约 1 至约 4 小时;

(c) 使混合物冷却至约 40°C 至约 50°C ; 和

(d) 将固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱从混合物中分离。

本发明还涉及用晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱治疗患者癌症的新方法, 所述方法包括给予患者有效量的上述晶体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

本发明发现取得了几个有益之处, 尤其是提供了 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱具有所需的批量处理(bulk handling)和溶解特性的稳定晶型的活性 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱药用成分。

附图简述

图 1 为本发明固态 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱实施方式的差示扫描量热法(DSC)温谱图;

图 2 为本发明固态 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱实施方式的 X 射线粉末衍射(XRPD)图;

图 3 为本发明固态化合物晶胞中 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的两个独立分子 I & II 的空间关系;

图4为单晶5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的模拟X射线衍射图与本发明晶型5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱实施方式实验粉末X射线衍射图的比较;

图5为本发明固态5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱实施方式的傅立叶变换红外(FT-IR)光谱图;

图6为5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱在DMSO-d₆中的质子核磁共振谱(¹HNMR)图;

图7为5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱在DMSO-d₆中的D₂O交换谱图。

图8为5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱在DMSO-d₆中的C-13核磁共振(¹³CNMR)谱图;

图9为固态5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱实施方式的紫外(UV)谱图。

图10为5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的DSC温谱图;

图11为固态5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的DSC温谱图;

图12为5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的X-射线粉末衍射图; 和

图13为5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的X-射线粉末衍射图;

优选实施方式的详述

本发明涉及5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的固态物理性质, 晶型在制剂中的用途, 和药物活性。依照本发明, 现已发现5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的新晶型5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱非对映异构体, 具有优于外消旋形态化合物和5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱形态化合物的优势。此外, 作为本发明的一个实施方式, 本文所述晶型还提供了在制备、加工、配方和/或给予化合物方面优于其它固态形式的好处。

在其它实施方式中, 本晶型5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱可以是无水的。本晶型5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱可以是非吸湿

性的，具有高度物理稳定性，并且在正常室温环境下具有可接受的固态性质。此外，本晶型组合物可用于治疗和/或预防癌症疾患。

本发明还提供了新晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的制备方法。

本发明还涉及包含新晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱和药学上可接受载体的药用组合物，本发明的各种实施方式可适合于经口服、注射、吸入、滴眼液、静脉内及其它途经给予，如下讨论。

在另一个实施方式中，晶型 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的含水量小于约 1 % w/w，或者小于约 0.5 % w/w，或者更小于约 0.25 % w/w，用库仑卡尔费歇尔(KF)滴定法测定。(见，例如 Poynter, W. G. 和 R.J. Barrios, Oil and Gas Journal, 92:15 (1994)。

选择在生产加工(例如粉碎以获得降低粒径和增大表面积的材料)期间物理稳定的固态形式的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，可以避免特殊的加工条件，以及常与这种特殊加工条件相关的成本增加。类似地，选择在一定范围的贮藏条件下物理稳定的固态形式的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，可有助于避免化合物产生多晶型或其它降解变化，而这些变化会导致产品损失或者产品效力退化。因此，选择具有更好物理稳定性的固态形式的 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，具有优势。

在一个实施方式中，本晶型 5(S)-CPT 的全相(overall phase)纯度超过约 90 %，或超过约 95 %，或超过约 97 %，或超过约 98 %，或超过约 99 %。

本文描述了新晶型 5(S)-CPT。在某些实施方式中，晶体 5(S)-CPT 基本不含 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。当本晶体 5(S)-CPT 被描述为基本不含 5(R)-CPT 时，这是指 CPT 中 5(R)-CPT 的量，小于约 2 % w/w CPT 总量；或小于约 1.5 % w/w；或小于约 1 % w/w；或小于约 0.5 % w/w；或小于约 0.1 % w/w。

本晶体 5(S)-CPT 是有益的，因为其是非吸湿性的，其是稳定的，其以晶体形态存在，且可以无水形态存在。由于其物理稳定性的增加，

与非对映异构体混合物 5(RS)-CPT 相比, 本晶体 5(S)-CPT 更易处理和贮藏。

本申请说明书通篇讨论了本发明的其它方面和实施方式。

如本文所用, 术语“DSC”指差示扫描量热法。

如本文所用, 术语“XRPD”指 X 射线粉末衍射。

如本文所用, 关于核磁共振(^1H NMR), 符号“ δ ”指 ^1H NMR 化学位移; 缩写“d”指 ^1H NMR 双峰; 缩写“m”指 ^1H NMR 多重峰; 缩写“q”指 ^1H NMR 四重峰; 缩写“s”指 ^1H NMR 单峰; 缩写“t”指 ^1H NMR 三重峰。

如本文所用, 关于喜树碱, 术语“C-5 位”指如上式 II 所示, 存在于 5(S)-(2-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的化学结构第 5 位上的碳原子, 术语“C-20 位”指如上式 II 所示, 存在于 5(S)-(2-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的化学结构的第 20 位上的碳原子。

如本文所用, 在本说明书全文中, “5(S)-CPT”是指“5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱”, 其化学名称为“4-(S)-乙基-4-羟基-12-(S)-(2-羟基乙氧基)-1,12-二氢-4H-2-氧杂-6,12a-二氮杂-二苯并[b,h]芴-3,13-二酮”。

如本文所用, 在本说明书全文中, “5(R)-CPT”是指“5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱”, 其化学名称为“4-(S)-乙基-4-羟基-12-(R)-(2-羟基乙氧基)-1,12-二氢-4H-2-氧杂-6,12a-二氮杂-二苯并[b,h]芴-3,13-二酮”。

如本文所用, 在本说明书全文中, “5(RS)-CPT”是指“5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱”或“5-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱”, 其化学名称为“4-(S)-乙基-4-羟基-12-(RS)-(2-羟基乙氧基)-1,12-二氢-4H-2-氧杂-6,12a-二氮杂-二苯并[b,h]芴-3,13-二酮”。

如本文所用, 术语“组合物”是指通过混合或结合多于一种的元素或成分而得到的产品。

如本文所用, 术语“单个晶体”, 也称作单晶, 是指结晶固体, 其中整个样品的晶格是连续且完整的, 直到样品的边缘, 而没有晶界。

如本文所用，关于 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱，术语“晶型”是指固态形式，其中 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱分子的排列形成可区别的晶格，其(i)包含可区别的晶胞，和(ii) 在受 X 射线辐射时产生衍射峰。

如本文所用，术语“相纯度”是指相对于其它固态形式 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的纯度，而不一定是指相对于其它组分的高度化学纯度。

术语“约”，用于本文指测量时，是指测量量的正规变分(normal variation)，可由实施测量的技术人员根据测量目的和测量设备精度进行预测。

如本文所用，术语“无水的”，是指物质基本不含水，并且物质可以包含小于约 1.0 % w/w 水，且物质可以包含小于约 0.5 % w/w 水。如本文所用，术语“无水的”和“无水物”可替换使用。

术语“非吸湿性”，用于本文指物质时，是指在正常室温、压力和湿度条件下，不吸收空气中湿气的物质。

如本文所用，术语“药学上可接受的载体”，是指与组合物中其它成分相适合且不会有害于患者的载体。这种载体可以是药学上可接受的物质、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或胶囊成形材料(encapsulating material)，参予运载或输送化学物质。如下面更加详细的论述，优选的组合物依赖于给药方法。

如本文所用，术语“治疗有效量”，是指可引发研究者或临床医生正寻求的组织、系统或动物的生物学或医学反应的药物或药用物质的量。

如本文所用，术语“治疗”(和相应的术语“治疗的”和“治疗性”)，是指对患者缓解、恢复和预防性的治疗。

如本文所用，术语“预防”，是指采取措施以维持健康并防止患者疾病扩散。

如本文所用，下列术语/符号的意义为：

“kg”指“千克”

“mg”指“毫克”

“μl”指“微升”

“μg”指“微克”

“KBr”指“溴化钾”

“DMSO”指“二甲基亚砷”

晶体 5(S)-CPT 的表征:

卡尔费歇尔滴定法测定水份

使用卡尔费歇尔试剂在 Mettler® DL 31 KF 仪器上测定晶体 5(S)-CPT 的水份。将称定量的晶体 5(S)-CPT 转移至卡尔费歇尔仪器的滴定容器中，其内装有约 40ml 事先中和好的甲醇。搅拌下使样品溶解，然后在剧烈搅拌下用卡尔费歇尔试剂滴定至终点。水份的计算如下：

$$\% \text{ 水份(w/w)} = \frac{\text{滴定值} \times \text{KF 因子} \times 100}{\text{样品重量(g)} \times 1000}$$

在 40℃±2℃/ 765 % RH ± 5 % RH 加速稳定性条件下 6 个月，用卡尔费歇尔分析法测定，未观察到水份变化，且发现产品是非吸湿性的。产品在 6 个月加速条件下稳定。

差示扫描量热法(DSC)分析:

用 Shimadzu® DSC-50 量热计进行晶体 5(S)-CPT 的 DSC 分析。将样品放置在铝盘上，精密记录重量，用盖子把盘子盖上，使夹钳松开。使每个样品平衡，并在氮气下以 5℃/分钟的速率加热。熔融吸热峰的温度报告为熔点。来自 DSC 分析的数据取决于几个因素，包括加热速率、样品的纯度、晶体大小和样品量。本晶体 5(S)-CPT 的特征还在于：用 DSC 测量，如图 1 所示，约 234℃至 238℃，或约 234℃至 236℃有单熔融吸热峰。

X 射线粉末衍射法(XRPD):

用 X 射线粉末衍射法(“XRPD”)分析 5(S)-CPT 的晶体结构。使用配有水平角度计(θ/2θ 几何学)的 Rigaku D/Maz 2200 衍射仪，测量 X

射线粉末衍射光谱。所用 X 射线管为 Cu K- α , 50 KV 和 34 mA 下的波长为 1.5418 Å。发散和散射狭缝设置在 0.5°, 接收狭缝设置在 0.15 毫米。用闪烁计数检测法检测衍射的辐射, 以 3°/分钟从 3 至 45°进行 θ 至 2 θ 连续扫描。

晶体 5(S)-CPT 的例证性 XRPD 图如图 2 所示。表 1 列出了晶体 5(S)-CPT 相应的主要衍射峰(2 θ)值和强度。

表 1: 晶体 5(S)-CPT 的特征 XRPD 峰

2 θ	相对强度百分比(I/I ₀)
7.2	76
9.4	93
11.02	52
12.00	51
14.54	65
15.20	100
18.92	45
21.86	39
22.74	34
26.42	54

应该认识到, 在晶体 5(S)-CPT 与其它相的混合物中, 不是表 1 列出的所有峰都会在混合物的粉末衍射图中明显可见。

可能的异构现象和立体化学的鉴别:

用 5(S)-CPT 样品进行单晶衍射研究, 目的在于确定 5(S)-CPT 的 C-5 位上的绝对立体化学。适于 X 射线衍射研究的晶体从二甲基亚砷中长大。5(S)-CPT 在单斜晶空间群 P2₁ 中结晶, 晶胞参数为 a=6.308(1) Å, b=15.924(3) Å, c=18.771 (4) Å, β =95.519(5) Å; V=1876.8(7) Å³ 和 Z=4。用 CCD 面积检测器(area-detector)石墨单色 MoK α 辐射(λ =0.7107 Å)在 Rigaku AFC-7S 单晶衍射仪上收集 X 射线强度数据。用直接方法(SIR92 软件)得出结构, 并用最小平方法细化(refine)。对于 3713 观测的反射(3713 observed reflections), 最终 R(Rw)为 0.041(0.044)。

晶胞中两个独立分子 I & II (图 3), 在 5(S)-CPT 的 C-5 位侧链上的构象有所不同。

根据 C-20 位上的已知构型是 S 立体中心, 确定 C-5 位上的绝对立体化学为 S 立体中心。

单晶 X 射线衍射的模拟粉末 X 射线图与实验粉末 X 射线衍射的数据相符很好(图 4)。

傅立叶变换红外(FT-IR)光谱法:

晶体 5(S)-CPT 的特征还在于傅立叶变换红外(FT-IR)光谱, 在固态 KBr 分散体中记录。使用 Perkin-Elmer® 1650 傅立叶变换红外分光光度计进行结构确认。实验误差, 除非另有说明, 为 $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 。

晶体 5(S)-CPT 的红外光谱显示, 在约 3271, 2927, 1743, 1669, 1607, 1504, 1465, 1405, 1342, 1225, 1158, 1188, 1080, 1120, 1043, 992, 893, 838, 796, 772, 和 659 cm^{-1} 处具有吸收带。红外光谱基本如图 5 所示。

核磁共振(NMR)研究:

在 400MHz 的 Varian® Mercury Plus Fourier Transform (FT) NMR 波谱仪上检测 5(S)-CPT(DMSO-d₆)的 ¹H 和 ¹³C NMR。 ¹H 和 ¹³C NMR 化学位移以 $\delta(\text{ppm})$ 标度报告, 分别相对于内标 TMS(δ 0.00)和 DMSO-d₆ (δ 39.50)。5(S)-CPT 的 ¹H 和 ¹³C NMR 波谱分别如图 6 和图 8 所示。发现 δ 4.82 和 6.55 ppm 处的信号归属于 D₂O 交换波谱的可交换质子(见图 7)。

紫外分光光度法(UV 光谱):

5(S)-CPT(甲醇中, 浓度 = 0.001 % w/v)的 UV 光谱在 Shimadzu 2100 紫外可见分光光度仪上记录。所得光谱如图 9 所示, 显示在 λ 357, 293, 257 和 207 nm 处有四个最大峰。

5(S)-CPT 的晶型:

在一个实施方式中, 5(S)-CPT 以晶体形式获得分离, 其基本不含水(即, 基本无水)。术语“基本不含水”是指存在少于约 1.0 % 水 w/w, 且特别少于约 0.5 % 水 w/w, 用卡尔费歇尔分析法或 TGA 法测量。在

这种形式中, 5(S)-CPT 的有利性质是, 在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ 条件下 6 个月加速稳定性实验中, 水份用卡尔费歇尔分析法测量, 未发现明显变化, 且发现为非吸湿性的。产品在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ 的加速稳定性实验条件下可稳定 6 个月, 在 $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ 的长期稳定性实验条件下可稳定 24 个月。

本发明的另一个实施方式, 提供了晶体 5(S)-CPT, 其差示扫描量热法温谱图、X 射线粉末衍射图、X 射线晶体结构、傅立叶变换红外光谱、质子核磁共振谱、 D_2O 交换谱、C-13 核磁共振谱、UV 光谱分别如图 1、图 2、图 3、图 5、图 6、图 7、图 8 和图 9 所示。

本发明的一个方面, 提供了晶体 5(S)-CPT, 其差示扫描量热法温谱图、X 射线粉末衍射图、傅立叶变换红外光谱分别如图 1、图 2 和图 5 所示。

本发明的另一个方面, 提供了晶体 5(S)-CPT, 其差示扫描量热法温谱图和 X 射线粉末衍射图分别如图 1 和图 2 所示。

本发明的另一个实施方式, 提供了晶体 5(S)-CPT, 其 X 射线粉末衍射图如图 2 所示。

本发明的另一个实施方式, 提供了无水晶型 5(S)-CPT, 其 XRPD 图具有至少一个选自 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 , 和 $18.92 \pm 0.1^{\circ}2\theta$ 的衍射峰。在一个实施方式中, 该晶型的 XRPD 图在 $7.2 \pm 0.1^{\circ}2\theta$ 处具有衍射峰。在另一个实施方式中, 该晶型的 XRPD 图在 $7.2 \pm 0.1^{\circ}2\theta$ 处具有衍射峰, 此外具有至少一个选自 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 , 和 $18.92 \pm 0.1^{\circ}2\theta$ 的另外的衍射峰。

本发明的另一个实施方式, 提供了晶体 5(S)-CPT, 其 FT-IR 光谱具有至少一个选自 3271 ± 2 , 1743 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收带。在一个实施方式中, 该晶型的 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。在另一个实施方式中, 该晶型的 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带, 此外还具有

至少一个选自 3271 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收带。

在一个适当的实施方式中, 晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 $7.2 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

在另一个实施方式中, 晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 $7.2 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 3271 ± 2 和 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

在另一个实施方式中, 本晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 7.2 ± 0.1 和 $9.4 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

在另一个实施方式中, 晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 7.2 ± 0.1 和 $9.4 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 3271 ± 2 和 $1743 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

在另一个实施方式中, 晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 和 $18.92 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且 FT-IR 光谱在 3271 ± 2 , 1743 ± 2 , 1669 ± 2 , 1607 ± 2 , 1225 ± 2 , 1158 ± 2 , 1043 ± 2 和 $992 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ 处具有吸收带。

在另一个实施方式中, 晶体 5(S)-CPT 的 XRPD 图在 7.2 ± 0.1 , 9.4 ± 0.1 , 11.02 ± 0.1 , 12.00 ± 0.1 , 14.54 ± 0.1 , 15.20 ± 0.1 和 $18.92 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 处具有衍射峰, 且熔点范围为约 234°C 至约 238°C 。

为了对比之目的, 依照美国专利 No. 6,177,439 制备的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 和 5(R)-CPT 的 X 射线粉末衍射图分别如图 12 和图 13 所示。

本发明的另一个实施方式, 提供了基本不含 5(R)-CPT 的晶体 5(S)-CPT。该物质的特征还在于: DSC 测量的单熔融吸热峰在约 236°C 处, 如图 1 所示。相比而言, 依照美国专利 No. 6,177,439 制备的非对映异构体混合物 5-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的 DSC 图(如图 10 所示)要复杂得多, 在约 39°C 处具有吸热峰, 第二个吸热峰在约 173°C 处, 且第三个吸热峰在约 207°C 处, 与美国专利 No. 6,177,439 所列该

化合物的 190℃熔点一致。此外，5(R)-CPT 的 DSC 图如图 11 所示，在约 63℃处有吸热峰，第二个吸热峰在约 186℃，且第三个吸热峰在约 205℃。这再一次确定了 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 的不同固态结构。

此外，晶体 5(S)-CPT 的较高熔点，表明该晶型比 5(R)-CPT 更稳定。

本发明的另一个实施方式，提供了晶体 5(S)-CPT，其 NMR 图如表 2 所给出数值所示。

表 2: 5(S)-CPT 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 归属。

位置*	^1H	$\delta(\text{PPM})$	J (Hz) [#]	^{13}C
2	-	-	-	150.82
3	-	-	-	143.33
5	1H	6.95	-	89.39
6			-	130.39
7	1H	8.78	-	133.22
8	-	-	-	127.79
9	1H	8.16	-	128.93
10	1H	7.73	t(7.6)	128.06
11	1H	7.88	t(7.6)	131.02
12	1H	8.16	-	129.08
13	-	-	-	148.85
14	1H	7.26	S	96.84
15	-	-	-	150.34

16	-	-	-	121.56
16a	-	-	-	157.35
17	2H	5.42	dd(16.4,2.4)	65.13
18	3H	0.90	t(7.6)	7.73
19	2H	1.89	M	30.29
20	-	-	-	72.16
21	-	-	-	172.21
22	Ha	4.17	m	73.02
	Hb	4.00	m	
23	2H	3.65	M	60.84
24	OH	4.82	t(5.2)	-
25	OH	6.55	S	-

*指以上结构式编号。

该列给出了多重性(multiplicity)和偶合常数。

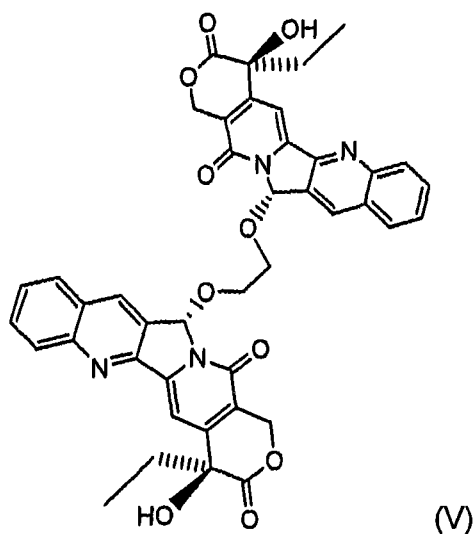
S-单峰, t-三重峰, dd-两组两重峰, m-多重峰。

基本不含 5(R)-CPT 的晶体 5(S)-CPT, 可通过下述方法获得, 这构成了本发明的又一个方面。

本发明的又一个方面, 提供了无水晶型 5(S)-CPT 的制备方法。在该方法中, 将通过美国专利 No. 6,177,439 或类似方法获得的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱, 悬浮于适当的有机溶剂中, 例如正丁醇(n-BuOH)、四氢呋喃(THF)、乙酸乙酯(EtOAc)、异丙醇(IPA)、丙酮、甲基异丁基酮(MIBK)、乙基甲基酮(EMK)、乙腈(ACN)、乙酸正丁酯、甲醇(MeOH)、乙醇(EtOH)、正丙醇(n-PrOH)、异丙醇(i-PrOH)、戊醇等, 或其混合物, 回流约 2 至 6 小时。将悬浮液缓慢冷却至约 40 至 45°C, 使沉淀完全。用常规技术分离沉淀, 例如过滤, 并且可以用相同或其它适当的有机溶剂洗涤, 真空干燥以得到基本不含 5(R)-CPT 的固体 5(S)-CPT。该产物可通过在相同或其它适当的有机溶剂中反复回流约 2 至 4 次而得以富集。

在本发明的另一个实施方式中, 提供的晶体 5(S)-CPT 包含少于约 1.5% 式 V 所示的喜树碱二聚体, 或少于约 1% 式 V 所示的喜树碱

二聚体,或少于约0.8%的喜树碱二聚体,或少于约0.5%的喜树碱二聚体,或少于约0.1%的喜树碱二聚体,全都是基于w/w。



晶型 5(S)-CPT 与非对映异构体混合物 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱,在许多重要性质方面都不同,包括,例如,毒性、体内抗肿瘤活性、生物利用度和拓扑异构酶 I 抑制性。此外,目前还发现,基本不含 5(R)-CPT 的晶体 5(S)-CPT 是理想的抗肿瘤药用化合物。

在本发明中,依照本领域普通技术人员周知的治疗癌症的标准给药途径,来给予患者晶体 5(S)-CPT。

提供的晶体 5(S)-CPT,可以是纯化合物或者药学上的活性盐。例证性的药学上可接受的盐,可由甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、葡糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖醛酸、马来酸、富马酸、丙酮酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、甲磺酸、硬脂酸、水杨酸、对-羟基苯甲酸、苯基乙酸、扁桃酸、双羟萘酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、泛酸、甲苯磺酸、2-羟基乙烷磺酸、磺胺酸、环己基氨基磺酸、藻酸、D-羟基丁酸、半乳糖二酸、半乳糖醛酸制得。

本发明化合物的适当药学上可接受的碱加成盐,包括金属离子盐和有机离子盐。更优选的金属离子盐包括但不限于,适当的碱金属(Ia 族)盐、碱土金属(IIa 族)盐和其它生理学上可接受的金属离子。这种

盐可由铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌离子制得。优选的有机盐可以由叔胺和季铵盐制得，部分包括：三甲基胺、二乙基胺、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N 甲基葡糖胺)和普鲁卡因。所有上述盐，都可以通过本领域技术人员采用常规方法由本发明相应的化合物制得。

提供的本晶体 5(S)-CPT，可以与药学上可接受的载体和赋形剂(其中所有“载体”和“赋形剂”可用任一术语来描述)形成药用组合物。药学上可接受的载体和赋形剂包括但不限于，生理盐水、Ringer's 溶液、磷酸盐溶液或缓冲液、缓冲盐水及本领域周知的其它载体。药用组合物还可以包含稳定剂、抗氧化剂、着色剂和稀释剂。选择药学上可接受的载体和添加剂，使药用化合物的副作用降至最低，同时化合物的性能不被消除或者不被抑制到治疗无效的程度。

在本发明的实施方式中，含 5(S)-CPT 的药用组合物，任选基本不含 5(R)-CPT。

药用组合物通常包含 0.1 至 50 % w/w，或 1 至 20 % w/w 的活性晶体 5(S)-CPT 化合物，组合物的其余部分为药学上可接受的载体、稀释剂或溶剂。优选地，药用组合物为单位剂型，包含适量的活性化合物，例如，获得预期目的之有效量。

本药用组合物，可经肠道和/或非肠道给药。口服(胃内)是优选的给药途经。药学上可接受的载体，可以在适于本发明方法的固体剂型中，包括片剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂，其可用涂层和外壳来制备，例如肠溶包衣及本领域周知的其它技术。适于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮剂、糖浆剂和酏剂。

非肠道给药包括皮下、肌内、皮内、乳房内、静脉内，及本领域周知的其它给药方式。肠道给药包括溶液、片剂、缓释胶囊、肠溶包衣胶囊和糖浆剂。给药时，药用组合物的温度可以为体温或接近体温。

拟口服使用的组合物，可以依照本领域周知的适于生产药用组合物的任何方法来制备，这种组合物可以包含一种或多种选自以下的物质：甜味剂、芳香剂、着色剂和防腐剂，以提供药学上优良且口感良

好的制剂。片剂包含活性成分，混有适合于片剂生产的非毒性药学上可接受的赋形剂。这些赋形剂可以是，例如，惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；成粒剂和崩解剂，例如玉米淀粉或褐藻酸；粘合剂，例如淀粉、凝胶或阿拉伯胶，以及润滑剂，例如，硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是无涂层的，或者它们可经周知技术进行涂层，以延迟胃肠道内的崩解和吸收，从而可在较长时期内持续有效。例如，可以使用延时物质，例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

适于口服使用的制剂，还可以是硬凝胶胶囊，其中晶体 5(S)-CPT 与惰性固体稀释剂(如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合，或者软凝胶胶囊，其中活性成分直接使用(present as such)，或者与水或油介质(如花生油、液体石蜡，或橄榄油)混合。

生产的水性悬浮剂，可以包含晶体 5(S)-CPT，混有适于水性悬浮剂生产的赋形剂。这些赋形剂是助悬剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基丙基甲基-纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶；分散剂或润湿剂，可以是天然存在的磷脂，如卵磷脂，或环氧烷与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或者环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合物，例如 heptadecaethyleneoxycetanol，或者环氧乙烷与偏酯(来自脂肪酸和己糖醇)的缩合物，例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯，或者环氧乙烷与偏酯(得自脂肪酸和己糖醇酐)的缩合物，例如聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯。

水性悬浮剂还可以包含一种或多种防腐剂，如乙基或正丙基对-羟基苯甲酸酯，一种或多种着色剂，一种或多种芳香剂，或一种或多种甜味剂，例如蔗糖或糖精。

油性悬浮液的制备，可以将晶体 5(S)-CPT 悬浮于 ω -3 脂肪酸、植物油(如，花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(如液体石蜡)中。油性悬浮液可以包含增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或十六烷醇。

适于通过加入水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒，得到晶体 5(S)-CPT 与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂的混合物。

适当的分散剂或润湿剂和悬浮剂的例子，上面已论述过。其它赋形剂，例如甜味剂、芳香剂和着色剂，也可以存在。

晶体 5(S)-CPT 和包含晶体 5(S)-CPT 的组合物，还可以无菌注射水性或 oil-in-water 悬浮液的形式经非肠道给药，或皮下，或静脉内，或肌肉内，或膜内(intrasternally)，或者经输注技术给药。这些悬浮液的制备，可依照周知技术使用上述那些适当的分散剂、润湿剂和悬浮剂，或其它可接受的物质。无菌注射制剂，还可以是在非毒性非肠道可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介和溶剂之中，可以使用水、Ringer's 溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌、非挥发性油是常用的溶剂或悬浮介质。为达此目的，可以使用任何温和的非挥发性油，包括合成的单或二甘油酯。此外，发现 n-3 聚不饱和脂肪酸可用于注射剂的制备。

还可以气雾剂或喷雾器溶液的形式，经吸入给药，或者以栓剂形式经直肠给药，通过将药物与适当的非刺激性赋形剂(常温下为固体而在直肠温度下为液体)混合而制成栓剂，因此栓剂在直肠中融化以释放药物。这种物质是可可油和聚乙二醇。

本发明还包括口腔或“舌下”给药，其包括含本文所述化合物的锭剂或咀嚼口香糖。可将化合物沉积在调味基质中，常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶，还有惰性基质(例如凝胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)中包含化合物的锭剂。

本发明还包括局部给药系统，包括膏剂、粉末剂、喷雾剂、霜剂、凝胶剂、洗眼剂、溶液或悬浮剂。

粉末剂的优点是，粘附在湿润表面之上，从而可以较长时间持续有效。因此，粉末剂特别适于治疗例如耳道内的癌症。同理，霜剂也是有效的药学上可接受的载体。

本发明的组合物可以任选加入其它的物质，例如粘性增强剂、防腐剂、表面活性剂和渗透促进剂。

这种粘性强化剂包括，例如，聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧基乙基纤维素、羧甲基纤维素、羧

基丙基纤维素或本领域技术人员周知的其它物质。这些物质的使用量通常为 0.01 % 至 2 % 重量。

任选使用防腐剂，以防止使用期间的微生物污染。适当的防腐剂包括：聚季铵盐-1(polyquaternium-1)、苯扎氯铵、硫柳汞、氯丁醇、尼伯金甲酯、尼伯金丙酯、苯乙醇、依地酸二钠、山梨酸，或本领域技术人员周知的其它物质。优选使用聚季铵盐-1 作为抗菌防腐剂。通常，这种防腐剂的使用量为 0.001% 至 1.0% 重量。

本组合物组分的溶解度，可因组合物中的表面活性剂或其它适当的助溶剂而得以增加。这种助溶剂包括聚山梨醇酯 20、60 和 80，聚氧乙烯/聚氧丙烯表面活性剂(如，Pluronic F-68、F-84 和 P-103)，环糊精，或本领域技术人员周知的其它物质。通常，这种助溶剂的使用量为 0.01 % 至 2 % 重量。

药学上可接受的赋形剂和载体包括所有前述及类似物质。上面关于有效配方和给药方式的考虑，是本领域众所周知的且描述于标准教科书中。见例如 Gennaro A. R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy(药学科学与实践), 第 20 版, (Lippincott, Williams 和 Wilkins), 2000; Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences(雷氏药物科学), Mack Publishing Co., Easton Pennsylvania, 1975; Liberman, 等人, Eds., Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型), Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; 以及 Kibbe, 等人, Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients(药物赋形剂手册) (第三版), American Pharmaceutical Association(美国制药协会), Washington, 1999。

为了本发明的目的，优选晶体 5(S)-CPT 的量包含有效量的化合物。因此本发明包括预防或治疗癌症、肿瘤，和/或肿瘤相关疾病或病患(在本文中统称为“癌症”)的方法，这种治疗可给予需要这种预防或治疗的患者，该方法包括给予患者有效量的本文所述晶体 5(S)-CPT。

在确定晶体 5(S)-CPT 的有效量或剂量时，主治诊断医生会考虑多种因素，包括但不限于，所用化合物的疗效和作用持续时间、受治

疾病的性质和严重程度，以及受治患者的性别、年龄、体重、总体健康状况和个体反应，及其它相关的情况。可以理解的是，用于治疗或预防癌症所需晶体 5(S)-CPT 的量，可在较宽限度内变化，且可根据每个具体病例的个体需要进行调整。

对于任何化合物，治疗有效剂量最初可在细胞培养或动物模型中估计。治疗有效剂量是指改善病情或其症状的活性化合物的量。细胞培养或动物模型中的疗效和毒性，可用标准药学方法来确定(例如，ED₅₀: 总体的 50 % 治疗有效的剂量; LD₅₀: 总体的 50 % 致死剂量)。然后可以使用来自细胞培养和动物模型的数据，得到患者使用化合物的剂量范围。

通常，对于成人给药，适当的日用剂量如本文所述，但确定的优选限度在有利的情况下可以被超过。日用剂量可以作为单次剂量或者分次剂量给予。本领域技术人员会理解，剂量的确定还可参考指南: Goodman & Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第九版(1996), 附录 II, 页码 1707-1711。通常推荐的日用剂量方案，一般为约 0.01 mg/kg/天至约 50 mg/kg/天，或约 0.05 mg/kg/天至约 25 mg/kg/天，或约 0.1 mg/kg/天至约 10 mg/kg/天，或约 0.1 mg/kg/天至约 5 mg/kg/天，乃至为约 0.2 mg/kg/天至约 3 mg/kg/天。

在一个实施方式中，提供的晶体 5(S)-CPT 是可供口服给予的硬凝胶胶囊，每个胶囊含 5(S)-CPT 约 1 mg 至约 1000 mg，或者每个胶囊含 5(S)-CPT 约 2 mg 至约 500 mg，或约 5 mg 至约 250 mg。当给予平均体重约 70 kg 的成人患者 5(S)-CPT 时，5(S)-CPT 的日用剂量可为约 0.01 mg/kg/天至约 50 mg/kg/天，或约 0.05 mg/kg/天至约 25 mg/kg/天，或约 0.1 mg/kg/天至约 10 mg/kg/天，或约 0.1 mg/kg/天至约 5 mg/kg/天，乃至为约 0.2 mg/kg/天至约 3 mg/kg/天。

如本文所用，治疗目的的术语“患者”包括任何患者，且可以是需要治疗癌症的患者。如本文所用，术语“需要的患者”是指患有或易患癌症的任何患者。术语“需要的患者”还指需要低剂量常规癌症治疗物质的任何患者。此外，术语“需要的患者”是指需要减少常规治疗物质

的副作用的任何患者。此外，术语“需要的患者”是指需要改善对癌症治疗的任何常规治疗物质耐受性的任何患者。

所述患者通常是动物，而更通常为哺乳动物。“哺乳动物”，如本文所用的术语，是指分类为哺乳动物的任何动物，包括人类、家养或农场动物、动物园、运动或宠物动物，例如狗、马、猫、牛等。所述患者还可以是有患癌症风险或癌症复发风险的人类患者。

本发明的方法和组合物可用于治疗或预防几种癌症，包括但不限于，卵巢癌、骨肉瘤、白血病、淋巴瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、中枢神经系统(CNS)癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、表皮样癌、肺癌、黑素瘤、前列腺癌、子宫癌、软组织肉瘤、胰腺癌和横纹肌肉瘤。

本发明的化合物和制剂还可用于治疗结肠癌、卵巢癌和骨肉瘤。

本发明的化合物和制剂还可用于治疗骨肉瘤、结肠直肠癌和胰腺癌。

以下实施例描述了本发明的优选实施方式。本文权利要求书范围内的其它实施方式，对于考虑本文所公开的发明说明书或实践的本领域技术人员来讲是显而易见的。说明书和实施例只作例证性考虑，实施例之后的权利要求书，指明了本发明的范围和精神。实施例中给出的所有百分数都是基于重量，除非另有说明。

实施例 1

该实施例阐述 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的制备。

将如美国专利 No. 6,177,439 实施例-26 中所述制备的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱(75 克)，悬浮于正丁醇(约 600ml)中，回流约 2 至 3 小时。在 1 至 4 小时内使反应物料温度降至约 40 至 50℃，过滤所得固体物质，用正丁醇(约 15 至 20ml)洗涤并在约 50 至 55℃ 下真空干燥，得到基本不含 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。通过在正丁醇中反复回流，使产物得到进一步富集(通常 2 至 4 次，产量 25 至 35 克)。最终干燥产物的特征在于 X-射线粉末衍射，XRPD 图如图 2 所示，在约 4.68, 7.22,

9.4, 11.02, 12.00, 14.14, 14.54, 15.20, 16.22, 17.10, 17.32, 17.94, 18.92, 19.16, 19.70, 21.86, 22.22, 22.74, 23.28, 23.72, 24.22, 24.4, 25.36, 26.42, 27.12, 27.66, 28.58, 29.12, 29.46, 30.62, 30.78, 31.42, 31.94, 32.46, 32.78, 33.30, 33.54, 33.98, 35.18, 36.74, 37.62, 38.28, 38.92, 39.82, 40.38, 42.08, 42.22 和 43.98 °2 θ 处具有峰。

实施例 2

该实施例阐述 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的任选制备方法。

将如美国专利 No. 6,177,439 实施例-26 中所述制备的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱样品(75 克), 悬浮于四氢呋喃(THF)(1125ml)中, 回流 2 至 3 小时。在约 1 至 4 小时内使反应物料温度降至 40 至 45°C, 过滤所得固体, 用 THF(15 至 20ml)洗涤并在 50 至 55°C 下真空干燥, 得到固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。通过在 THF 中反复回流, 使产物得到进一步富集(通常 2 至 4 次, 产量 15 至 20 克)。最终干燥产物的特征在于图 2 所示的 X-射线粉末衍射图。

实施例 3

该实施例说明与 5(RS)-CPT 非对映异构体混合物和 5(R)-CPT 非对映异构体相比, 5(S)-CPT 具有出乎意料高的拓扑异构酶 I 抑制活性。

5(S)-CPT, 5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT 的制备:

将如美国专利 No. 6,177,439 实施例-26 中所述制备的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱样品(75 克), 悬浮于正丁醇(约 600ml)中, 回流约 2 至 3 小时。在 1 至 4 小时内使反应物料温度降至约 40 至 50°C, 过滤所得固体物质, 用正丁醇(约 15 至 20ml)洗涤并在约 50 至 55°C 下真空干燥, 得到基本不含 5(R)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱的固体 5(S)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。通过在正丁醇中反复回流, 使产物得到进一步富集, 得到基本不含 5(R)-CPT 的 5(S)-CPT (通常回流 2 至 4 次, 产量 25 至 35 克)。

通过逐滴加入正庚烷, 再用 10 μ Nutche 过滤器过滤, 使 5(R)-CPT 从母液中分离。

得到如美国专利 No. 6,177,439 实施例 26 中所述的 5(RS)-(2'-羟基乙氧基)-20(S)-喜树碱。

拓扑异构酶 I 分析:

拓扑异构酶 I 在特定部位在 DNA 中引入瞬时切口(transient nicks)。这些瞬时 DNA 切口的检测需要用蛋白质变性剂将酶捕获在带切口的中间复合物(nicked intermediate complex)中的 DNA 上。所得的共价 DNA/拓扑 I 复合物包含带切口的开环 DNA, 其可以用琼脂糖凝胶电泳(含溴化乙啶)检测。捕获带切口的中间体效率相对较低, 然而, 抑制剂, 例如天然产物喜树碱, 使中间体稳定并使带切口的 DNA 产物增加。这就构成了机械药物筛选的基础, 设计用于检测通过使切开的中间体复合物稳定化来影响拓扑异构酶 I 的物质。

TopoGEN® Topo I Drug Screening Kit (拓扑异构酶 I 药物筛选试剂盒)(Topogen, Inc., Port Orange, FL)的设计, 使得研究者能快速识别新的拓扑异构酶 I 抑制剂。该试剂盒可以检测新的化合物, 其或者稳定带切口的中间体, 或者抑制拓扑异构酶 I 的催化活性。

所用分析试剂盒: Topogen® 药物筛选试剂盒

厂家: TOPOGEN, Cat No: 1018

每一反应混合物包含:

a. 10x 反应缓冲液	: 2 μ l
b. TOPO I 酶	: 2 μ l
c. pHOT I DNA	: 1.2 μ l (0.5 μ g)
d. 水	: 14.8 μ l
<u>DMSO 中的药物</u>	: <u>1μl</u>
合计	: 20 μ l

方案

使上述反应混合物在 37°C 下培养 30 分钟。通过加入 2 μ l 的 10% SDS 使反应终止, 使混合物迅速涡旋(应在 37°C 下加入 SDS, 因为冷却试管可以重新封住带切口的 DNA)。每管加入约 2.5 μ l 的 10 $\times$ 染料, 再加入等体积的氯仿和异戊醇(24:1)混合物, 以 13000 rpm 离心 10 分

钟。加样于 1% 琼脂糖凝胶上，在 80 伏特下电泳 1 小时。在 UV 透射仪上观察凝胶，并计算带的密度估值。

计算:

用密度仪测定超螺旋型和松弛型 DNA 的 DNA 带密度。记录处理后(用单一浓度供试药物)和无药物(即，对照)的带密度。计算所有通道(包括处理后和对照)的相比于超螺旋型 DNA 的松弛型 DNA 百分数。

拓扑异构酶活性抑制率 % 的计算为:

$$= (100 - (100 \times (1 / \text{对照抑制率} \%)) \times \text{处理后抑制率} \%)$$

表 3 为这些测试的结果以及基本互不包含的 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 的体外拓扑异构酶 I 活性，与 5(RS)-CPT 的活性相比。

表 3: 5(S)-CPT、5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT 的拓扑异构酶 I 活性

化合物	IC ₅₀ (μM)
5(S)-CPT	1.06
5(R)-CPT	22
5(RS)-CPT	12.5

结果显示，5(S)-CPT 抑制拓扑异构酶 I 的活性，是 5(R)-CPT 的约 21 倍，是 5(RS)-CPT 的约 12 倍。这种活性上的差异，无法根据非对映异构体之间结构上的差异来预期，众所周知，特别是考虑到 E-环在酶活性中的重要性。

实施例 4

该实施例说明与 5(RS)-CPT 的活性相比，5(S)-CPT 对抗裸鼠中 NCI-H460 (人小细胞肺癌)异种移植物的抗肿瘤活性。

如实施例 3 中所述，提供 5(S)-CPT 和 5(RS)-CPT 样品。

5(S)-CPT 和 5(RS)-CPT 对抗裸鼠中 NCI-H460 异种移植物的对比研究方案:

为了进行 NCI-H460 异种移植物的研究，将 NCI-H460 肿瘤块 (tumor pieces)(约 60 mm³)植入雌性无胸腺裸鼠的背侧肋(dorsal lateral flank)空间内以引发肿瘤生长。当肿瘤长至约 150 至 1000 mm³ 时，启动治疗之前将动物随机分成 5 组。每克 5(RS)-CPT 配方包含 102.65mg

活性化合物、801.62mg 羟基丙基 β -环糊精、80.62mg 无水右旋糖和 13.33mg 碳酸钠。每克 5(S)-CPT 配方包含 105.57mg 活性化合物、800.99mg 羟基丙基 β -环糊精、80.13mg 无水右旋糖和 13.34mg 碳酸钠。每克安慰剂配方包含 895.2mg 羟基丙基 β -环糊精、89.52mg 无水右旋糖和 14.9mg 碳酸钠。将每种配方溶于 2ml 无菌水中，经口服途径(d $\times$ 5)2 方案给予。用游标卡尺一周两次测量肿瘤直径。

假定肿瘤为椭圆体，用下式计算肿瘤体积：

$$V = (D \times d^2) / 2,$$

其中 $V(\text{mm}^3)$ 是肿瘤体积， D 是最长直径(mm)， d 是最短直径(mm)。用具体观察日的平均肿瘤体积，减去治疗第一天(起始日)的平均肿瘤体积，来计算各治疗组(T)与对照组(C)肿瘤体积的变化(Δ)。这些值用于下式中计算生长百分率(%T/C)

$$\%T/C = (\Delta T / \Delta C) \times 100, \text{ 其中 } \Delta T > 0, \text{ 或}$$

$$\%T/C = (\Delta T / \Delta T_i) \times 100, \text{ 其中 } \Delta T < 0 \text{ 且}$$

T_i 是平均肿瘤体积。

然后用下式计算肿瘤生长抑制百分率(%TGI):

$$\%TGI = 100 - \%TC.$$

所有患约 150 至 800 mm^3 的皮下肿瘤的小鼠，用供试化合物经口服饲法(d $\times$ 5)2 方案治疗。用游标卡尺一周两次测量肿瘤直径，假定肿瘤为椭圆体，用式 $V = (D \times d^2) / 2$ 计算肿瘤体积，其中 $V(\text{mm}^3)$ 是肿瘤体积， D 是最长直径(mm)， d 是最短直径(mm)。用具体观察日的平均肿瘤体积，减去治疗第一天(起始日)的平均肿瘤体积，来计算各治疗组(T)与对照组(C)肿瘤体积的变化(Δ 体积)。这些值用于下式中计算生长百分率(%T/C):

$\%T/C = (\Delta T / \Delta C) \times 100$ ，其中 $\Delta T > 0$ ，或 $= (\Delta T / \Delta T_i) \times 100$ ，其中 $\Delta T < 0$ ，其中 T_i 是治疗开始时的平均肿瘤体积。用下式计算肿瘤生长抑制百分率：肿瘤生长抑制百分率 = $100 - \%TC$ 。

如果肿瘤体积减至治疗开始时肿瘤体积的 50% 或更小而不小于 63 mm^3 ，则定为肿瘤部分衰退。如果肿瘤体积降至测量限以下($<63 \text{ mm}^3$)，则定为完全衰退。

用下式计算与各动物起始日体重相比的体重变化百分比：

体重变化百分比 = [(具体观察日体重-起始日体重)/起始日体重] $\times 100$ 。

其它观察参数是死亡率。

检测结果如表 4 所示，其中两种供试化合物和对照，各显示肿瘤生长抑制率和死亡率。

表 4: 5(S)-CPT 和 5(RS)-CPT 对患 NCI-H460 (人小细胞肺癌) 异种移植物的裸鼠的肿瘤生长抑制和死亡率的影响。

化合物	剂量(mg/kg)	肿瘤生长抑制率 %	死亡率
5(S)-CPT	2	68	0/5
	4	76	0/5
5(RS)-CPT	2	60	0/5
	4	64	0/5

该检测数据表明，5(S)-CPT 对抗裸鼠 NCI-H460 (人小细胞肺癌) 异种移植物的体内活性，优于非对映异构体混合物 5(RS)-CPT。如表 4 所示，与给予 5(RS)-CPT 相比，给予相同剂量的 5(S)-CPT，产生出乎意料更好的肿瘤生长抑制作用(2mg/kg 时 68%对比 60%，4mg/kg 时 76%对比 64%)，而无死亡率增加。

实施例 5

该实施例阐述在 Sulphorhodamine(硫代罗丹明) B (SRB) 分析中 5(S)-CPT 对比 5(R)-CPT 的体外抑制细胞增殖效果

如实施例 3 中所述，提供 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 样品。

体外细胞生长分析方案

用 Sulphorhodamine(硫代罗丹明) B (SRB) 分析来评估细胞增殖，染色后与细胞结合的染料量，可测出细胞生长。参考：JNCI, 第 83 卷, 第 11 期, 1991 年 6 月 5 日，其通过参考而并入本文。

简而言之,将细胞(膀胱癌、乳腺癌、CNS 癌、结肠癌、表皮状癌、肺癌、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肾癌和子宫癌代表的 34 人类癌细胞系),以每孔 10000 个细胞的浓度接种在 96 孔细胞培养板上,并在 CO₂ 培养箱中 37°C 下培养。24 小时之后,用溶于 DMSO 的不同浓度的供试化合物来处理细胞,使培养基中的终浓度为 0.05 %,并暴露 48 小时。通过加入冰冷的 50 % 三氯乙酸(TCA),并在 4°C 下培养 1 小时使细胞固定。培养板用蒸馏水洗涤,风干,并在室温下用 SRB 溶液(0.4% 重量/体积,于 1%乙酸中)染色 10 分钟。用 1 % 乙酸彻底洗去未结合的 SRB,并使培养板风干。用 10 mM Tris 缓冲液使结合的 SRB 染剂溶解,在分光光度板读数器 515nm 单波长处读出光密度。在药物加入时,细胞生长的单独的参考板在 0 小时(药物加入时)也如上所述被终止。用下式由光密度计算生长百分率:

如果 T 大于或等于 T₀, 生长百分率 = $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$, 如果 T 小于 T₀, 生长百分率 = $100 \times [(T - T_0) / T_0]$,

这里 T 是供试品的光密度, C 是对照的光密度, T₀ 是 0 时的光密度。

由生长百分率数据,得出剂量响应曲线,并且由生长曲线内插 GI₅₀ 值。表 5 为结果。

表 5: 5(S)-CPT 对比 5(R)-CPT 的 GI₅₀ 值。

化合物	GI ₅₀ (μM)
5(S)-CPT	5.0
5(R)-CPT	14.6

该检测结果表明试验中 5(S)-CPT 非对映异构体对抗细胞增殖的活性几乎是 5(R)-CPT 非对映异构体的 3 倍。

实施例 6

该实施例阐述 5(S)-CPT 在几种骨肉瘤模型中的效力。

如实施例 3 所述,提供 5(S)-CPT 和 5(RS)-CPT 样品。试验方案见 Cancer Res., 10 月. 15:64(2)7491-9 (2004), 和 Clin. Cancer Res., 11 月. 15:9(15):5442-53 (2003)。

所有患约 0.2 至 1 厘米直径的皮下("sc)肿瘤的小鼠，用供试化合物经口管饲法 $[(d \times 5)^2]3$ 方案治疗。用游标卡尺每七天测量一次肿瘤直径，假定肿瘤为球体，用式 $[\pi/6) \times d^3]$ 计算肿瘤体积，其中 d 是平均直径。肿瘤对供试化合物的响应，如下规定：对于单个肿瘤，若体积衰退>50%但始终有可测量的肿瘤，则定为 PR。若在治疗开始后 12 周内的某点，可测量的肿瘤块消失，则定为 CR。若在 12 周研究时限内没有肿瘤再生长，则定为持续 CR。选择该时间点，是因为所有研究为期至少 12 周。在 12 周研究时间结束之前且获得响应前死亡的小鼠，被认为是肿瘤响应失败。结果(剂量为 28 mg/kg)如表 6 所示。

表 6: 5(S)-CPT 对比 5(RS)-CPT 在小鼠肿瘤衰退模型中的效力。

异种移植物	5(S)-CPT	5(RS)-CPT
骨肉瘤-29	6+	5+
骨肉瘤-17	6+	4+
骨肉瘤-2	6+	5+
骨肉瘤-32	6+	3+

- 6+: 持续完全衰退
- 5+: 完全衰退
- 4+: 部分衰退
- 3+: 稳定疾病

如表 6 数据所示，与给予 5(RS)-CPT 相比，给予 5(S)-CPT 产生了出乎意料更好的结果，用 5(S)-CPT 的所有四个异种移植物种都获得了持续完全衰退(6+)。

实施例 5 和 6 提供的数据证明，5(S)-CPT 在几种试验模型中具有出乎意料更好的活性/效力特征。此外，5(S)-CPT 的效力明显高于 5(R)-CPT，但出乎意料的是，该效力增加的同时，毒性没有相应增加。

实施例 7

该实施例说明 5(S)-CPT 对比 5(R)-CPT 的人骨髓毒性。

如实施例 3 所述，提供 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 样品。

人骨髓分析方案:

包含甲基纤维素/ Iscove's MDM、胎牛血清、牛血清白蛋白、2-巯基乙醇、L-谷氨酰胺(glutamine)、rhStem 细胞因子、rhGM-CSF 和 rhIL-3 的 Methocult™ GF (Cat No: H4534, Poietics, Biowhittakar, USA) 培养基用于分析。将人骨髓单核细胞(Cat No.2M-125C, Poietics, Biowhittakar, USA)与 Methocult™ GF 混合, 调整细胞密度为 3×10^5 细胞/ml。将该制备液制成 500 μ l 的小份, 向每份中加入 2.5 μ l 的 20 $\times$ 药物溶液或媒介物(vehicle), 并充分混合。将 100 μ l 克隆源(clonogenic) 培养基注入每个孔中, 使板在 4 $^{\circ}$ C 下胶化 15 分钟。板在培养箱中 5 % CO₂ 全湿空气中 37 $^{\circ}$ C 下培养 14 天。在倒置显微镜下计数 CFU-GM 集落, 以 50 个或更多细胞的聚集体计。用下式计算集落(colony)抑制百分率:

$$100 - [(\text{药物处理孔内的集落数} / \text{对照孔内的集落数}) \times 100] .$$

将两种非对映异构体(分别为 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT)对抗肿瘤细胞系的体外效力, 与其在健康细胞内的体外毒性进行比较。表 7 为人细胞内骨髓毒性比较研究的结果。

表 7: 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 对体外人骨髓细胞的 GI₉₀ 值。

化合物	GI ₉₀ (μ M)
5(S)-CPT	0.69
5(R)-CPT	0.89

参考表 5 中所示数据, 可以看出, 出乎意料的是, 5(S)-CPT 对抗代表膀胱癌、乳腺癌、CNS 癌、结肠癌、表皮状癌、肺癌、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肾癌和子宫癌的 34 人肿瘤细胞系的效力, 几乎是 5(R)-CPT 的 3 倍, 而两种非对映异构体的毒性相当。事实上, 如果用人细胞毒性 GI₉₀ 与抗癌活性 GI₅₀ 的比值来估计安全范围(safety margin), 如表 8 所示, 显然作为治疗癌症的药用化合物, 5(S)-CPT 要出乎意料地优于 5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT。换句话说, 在治疗癌症方面, 相比 5(R)-CPT 以及 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 的混合物, 5(S)-CPT 化合物的效力有所增加。事实上, 最大程度地减少给予患者的 5(S)-CPT 中 5(R)-CPT 的存在量具有出乎意料的重要性。

表 8: 5(S)-CPT 和 5(R)-CPT 的人细胞毒性 GI_{90} 与抗癌活性 GI_{50} 之比。

化合物	安全范围(GI_{90}/GI_{50})
5(S)-CPT	0.14
5(R)-CPT	0.06

实施例 8

该实施例说明 5(R)-CPT 的存在对大鼠和小鼠体内 5(S)-CPT 生物利用度的影响。

如实施例 3 所述, 提供 5(S)-CPT 和 5(RS)-CPT 样品。

雄性 Wistar 大鼠体内的生物利用度:

给予雄性 Wistar 大鼠 5(S)-CPT (2.5mg/kg) 和 5(RS)-CPT (5 mg/kg, 混合物中含有 2.5mg/kg 的 5(S)-CPT), 以评估口服药代动力学。

将 6 至 8 周龄, 体重 205 至 218 克的雄性 Wistar 大鼠分组, 每组四只大鼠。在过夜禁食情况下进行口服药代动力学试验, 在进食情况下进行静脉内药代动力学试验。供试药物作为溶液经口管饲法给予或经侧尾静脉注射给予。在规定时间点从眼眶静脉丛(retro-orbital plexus)收集约 250 微升的少量血样, 置于含 25 微升 EDTA 的微量离心管中。以 12,800 rpm 离心血液 2 分钟分离血浆, 并冷冻直至分析。

如下检测样品中是否存在供试药物。取 100 μ l 血浆(8°C 下贮藏), 用 400 μ l 冷甲醇沉淀, 以估算总量(内酯+羧酸酯)。混合 2 分钟, 并以 12,800 rpm 离心 4 分钟后, 分出澄清上清液, 置于 300 μ l 自动进样器小瓶中, 取该混合物 20 μ l 注入分析柱进行 HPLC 分析。通过在空白大鼠血浆中加入已知浓度的供试药物来绘制线性图, 由此计算供试药物的浓度。用非房室模型分析计算供试药物的药代动力学。

研究结果如表 9 所示。

表 9: 雄性 Wistar 大鼠体内 5(S)-CPT 的口服药代动力学参数

化合物	剂量	AUC(o-t) $\mu\text{M}\cdot\text{h}$
5(S)-CPT	5mg/kg	5.76
5(RS)-CPT	5mg/kg (2.5mg/kg 5(S)-CPT+2.5mg/kg 5(R)-CPT)	5.08
5(RS)-CPT 中 5(S)-CPT 的贡献	2.5mg/kg	1.21

Swiss Albino 小鼠体内的生物利用度:

给予 Swiss Albino 小鼠 5(S)-CPT (2.5mg/kg)和 5(RS)-CPT (5 mg/kg, 混合物中含有 2.5mg/kg 的 5(S)-CPT), 以评估口服药代动力学。

研究中使用 3 至 6 周龄, 体重 28 至 34 克的 Swiss Albino 小鼠。每次研究使用 12 只小鼠。在过夜禁食情况下进行口服药代动力学试验, 在进食情况下进行静脉内药代动力学试验。供试药物作为溶液经口管饲法给予或经侧尾静脉注射给予。在规定时间点从眼眶静脉丛收集约 250 微升的少量血样, 置于含 25 微升 EDTA 的微量离心管中。以 12,800 rpm 离心血液 2 分钟分离血浆, 并冷冻直至分析。

如下检测样品中是否存在供试药物。取 100 μl 血浆(8°C 下贮藏), 用 400 μl 冷甲醇沉淀, 以估算总量(内酯+羧酸酯)。混合 2 分钟, 并以 12,800 rpm 离心 4 分钟后, 分出澄清上清液, 置于 300 μl 自动进样器小瓶中, 取该混合物 20 μl 注入分析柱进行 HPLC 分析。通过在空白小鼠血浆中加入已知浓度的供试药物来绘制线性图, 由此计算供试药物的浓度。用非房室模型分析计算供试药物的药代动力学。研究结果如表 10 所示。

表 10: Swiss Albino 小鼠体内 5(S)-CPT 的口服药代动力学参数

化合物	剂量	AUC(o-t) $\mu\text{M}\cdot\text{h}$
5(S)-CPT	5mg/kg	5.18
5(RS)-CPT	5mg/kg (2.5mg/kg 5(S)-CPT+2.5mg/kg 5(R)-CPT)	5.20
5(RS)-CPT 中 5(S)-CPT 的贡献	2.5mg/kg	1.10

参考表 9 和 10, “5(S)-CPT 的贡献”是可归因于 5(RS)-CPT 非对映异构体混合物中 5(S)-CPT 的曲线下面积(“AUC”)。从表 9 和 10 可以看出, 5(R)-CPT 的存在出乎意料地降低了所需 5(S)-CPT 非对映异构体的生物利用度。此外, 认为在人类患者中可以观察到所需非对映异构体生物利用度的这种意外降低。基于以上, 非常希望将 5(S)-CPT 中的 5(R)-CPT 量降至最低。

实施例 9

该实施例阐述与 5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT 相比, 5(S)-CPT 对抗 BCRP 突变和乳腺癌耐药蛋白(BCRP)过度表达 Saos-2 细胞的效力。

如实施例 3 所述, 提供 5(S)-CPT、5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT 样品。

乳腺癌耐药蛋白(BCRP)分析方案:

对比非对映异构体混合物 5(RS)-CPT, 评估 5(S)-CPT & 5(R)-CPT 对过度表达功能性 BCRP#4 和非功能性 BCRP mut#10 的 Saos-2 细胞的抗癌作用。人骨肉瘤细胞系, Saos-2, 来自 ATCC (American Type Culture Collection, Cat#HTB-85, Manassas, VA), 保存在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素和 2 毫摩尔/升谷氨酰胺的 DMEM 中。Saos-2 细胞或者用 BCRP#4 转染以过度表达功能性 BCRP, 或者用 BCRP #10 转染以过度表达非功能性 BCRP 运载体(transporter)。以每孔 1000 个细胞的密度将细胞注入 96 孔板 0.1ml 培养基中, 使结合过夜。第二天早上, 轻微抽吸培养基, 并加入供试化合物的连续稀释液。细胞在 5% CO₂ 培养箱中 37°C 下培养。与供试药物接触 6 天之后, 以无菌方式向每个孔中加入 10 μl Alamar 蓝(Alamar blue), 再把板放回培养箱

中 6 小时。在 Cytofluor 2300(Millipore, Bedford, MA)上使用 530 nm 激发波长和 590 nm 发射波长, 测量产生的荧光染料量。所得的相对荧光单位用于计算各个浓度下相对于未处理对照值的生长百分率。由生长百分率值, 得到 IC_{50} (与对照细胞生长相比, 抑制 50% 细胞生长所需的抑制浓度)值。所得 IC_{50} 值如表 11 所示。

表 11: 5(S)-CPT、5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT 对抗 BCRP 突变和乳腺癌耐药蛋白(BCRP)过度表达 Saos-2 细胞的 IC_{50} 值。

药物	$IC_{50}(nM)$	
	BCRP mut#10	BCRP #4
5(RS)-CPT	387	1256
5(S)-CPT	213	788
5(R)-CPT	1299	> 2000

如表 11 所示, 5(S)-CPT 在其对 BCRP 突变和 BCRP 过度表达 Saos-2 细胞的细胞毒活性方面, 优于 5(R)-CPT 和 5(RS)-CPT。这些结果表明, 对 BCRP mut#10 和 BCRP #4 的细胞毒性排序为 5(S)-CPT > 5(RS)-CPT > 5(R)-CPT。5(S)-CPT 对 BCRP mut#10 和 BCRP #4 过度表达 Saos-2 细胞的细胞毒性, 分别是 5(R)-CPT 的约 6 倍和 > 2.5 倍。

尽管在这里参考具体实施方式描述了本发明, 但应明白的是, 这些实施方式仅仅是本发明原理和应用的例证。因此应明白, 可以对例证实施方式做各种修改, 并且可以设计出其它安排(arrangements), 而不脱离下列权利要求书所规定的本发明精神和范围。

说明书中引用的所有出版物, 包括专利出版物和非专利出版物, 说明了与本发明相关的本领域技术人员的技术水平。所有这些出版物通过引用而完全并入本文, 其相同程度好像每个单独出版物都作了专门且个别的“通过引用而并入”的说明。这里对参考文献的讨论, 只是想概述其作者的主张, 未承认任何参考文献构成了现有技术。申请者保留质疑(challenge)所引用参考文献之准确度和相关性的权利。

鉴于以上, 可以看出本发明取得的几个优势, 并获得了其它有利的结果。

由于本领域普通技术人员可以对上述方法和组合物,做出各种改变而不脱离本发明的范围,因此期望,在上述说明书中所含的和附图所示的所有内容,应被解释为例证性而不具有限制性意义。此外,应该明白,各种实施方式的方面可以全部或部分地被掉换。

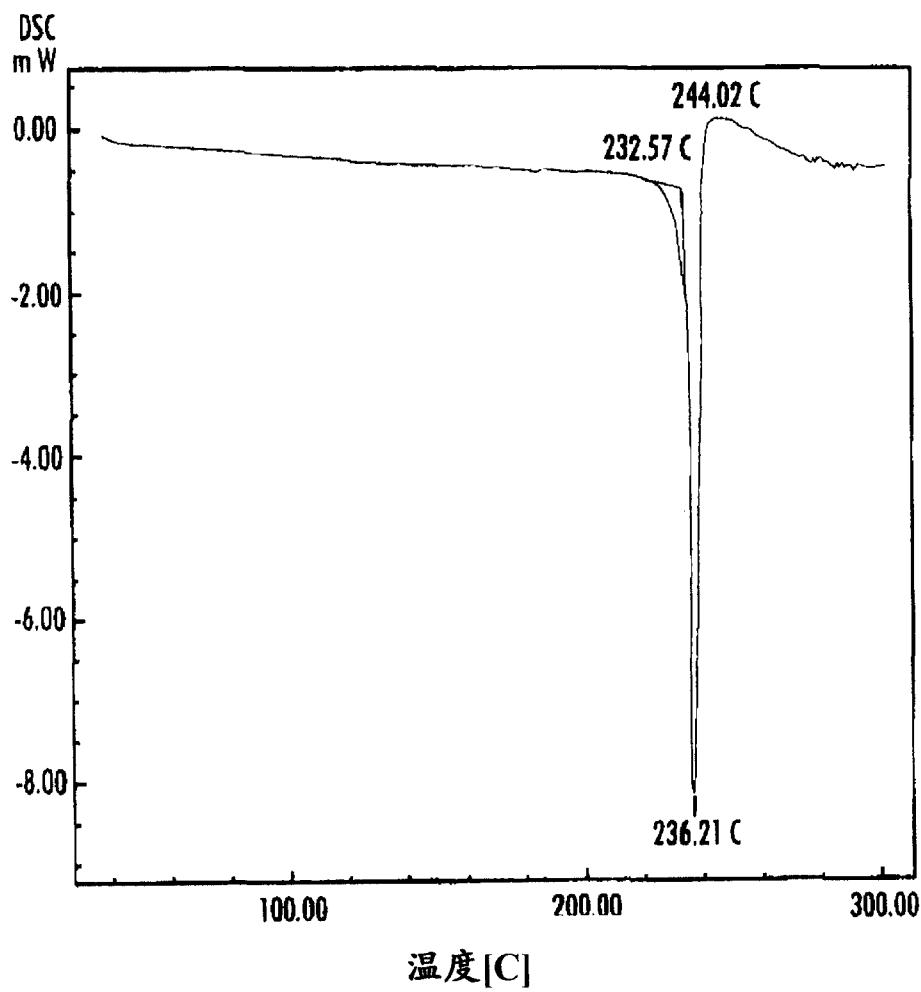


图 1

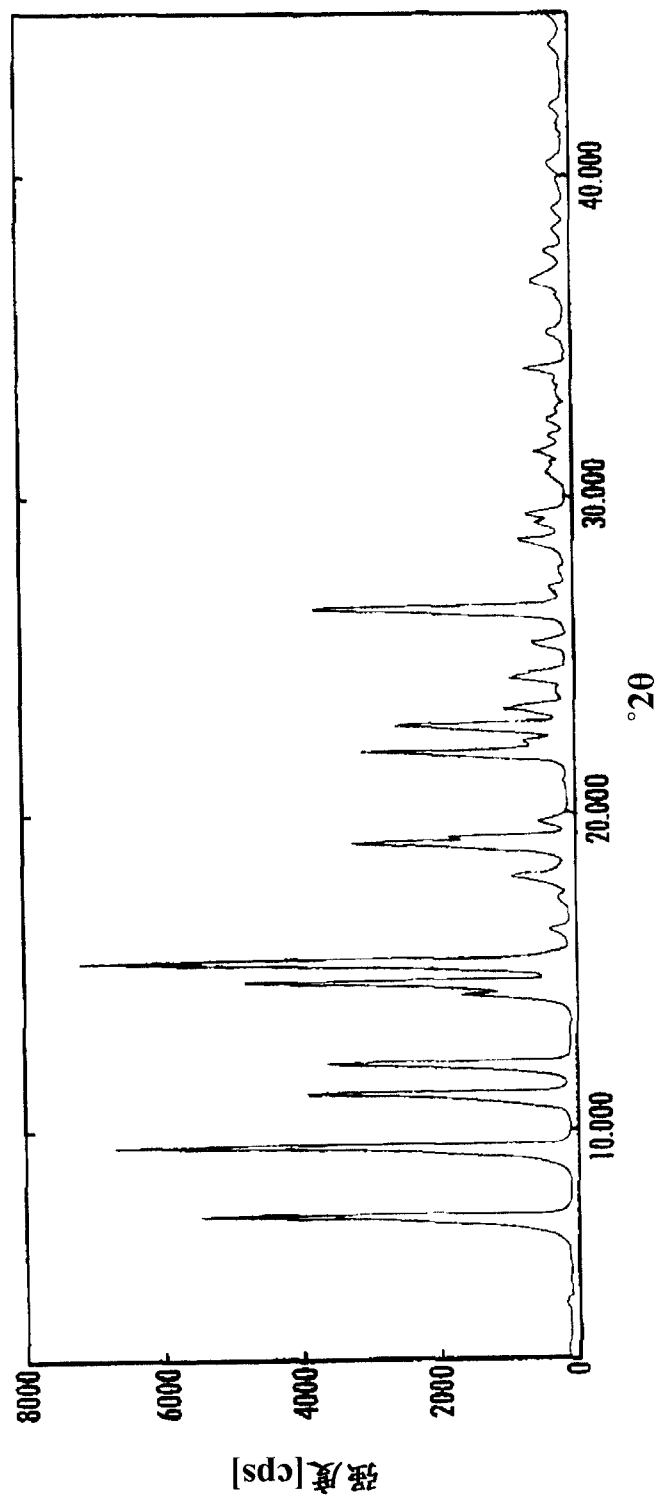


图 2

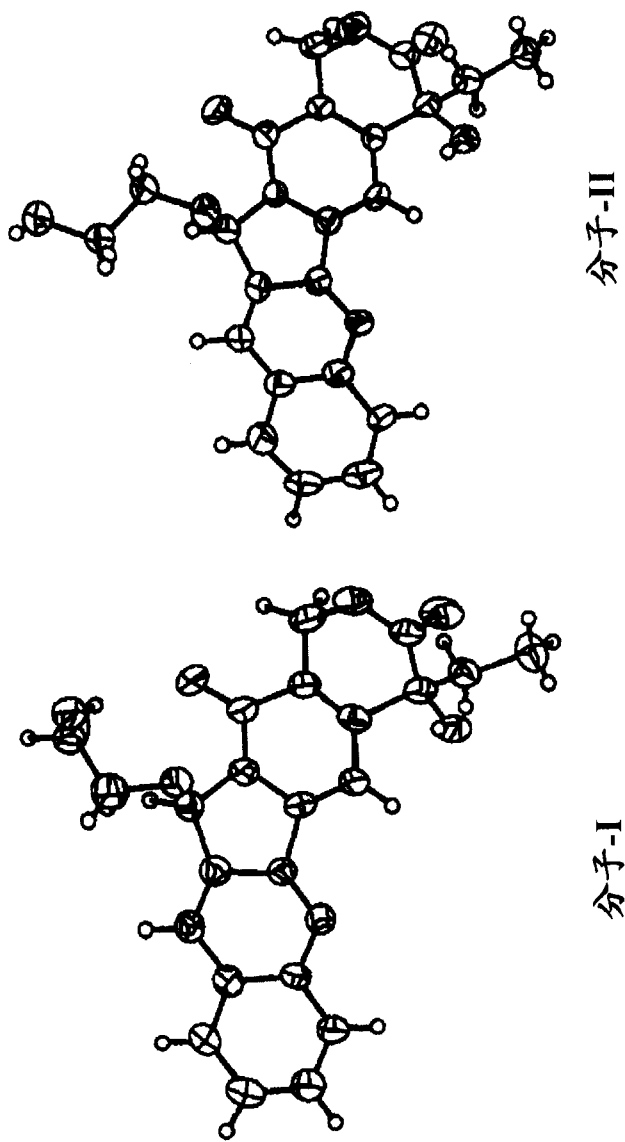
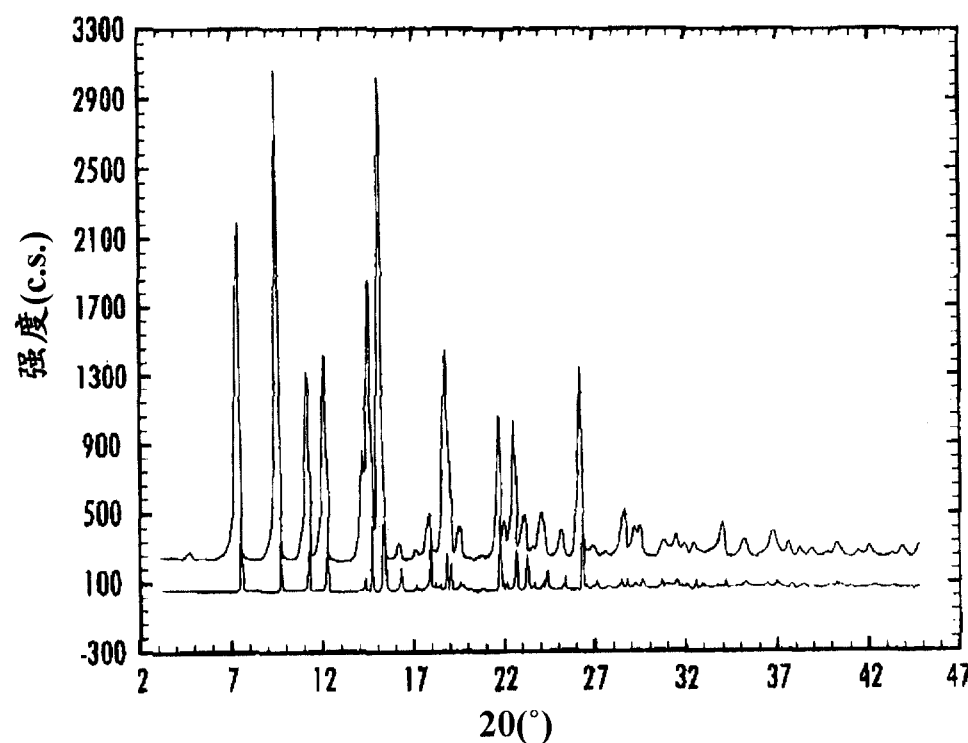
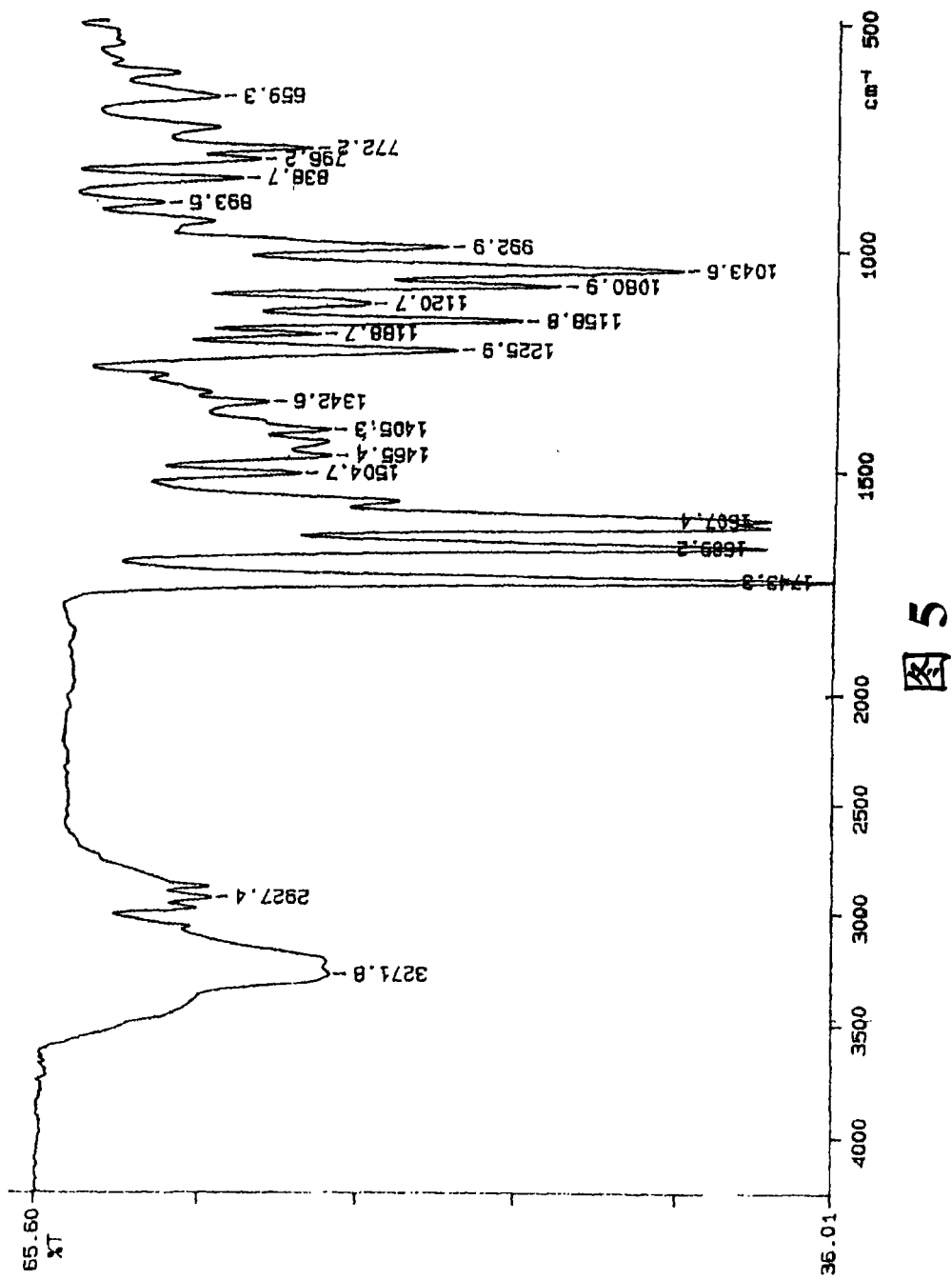


图 3



上: 粉末的试验 X 射线衍射图
下: 单晶模拟的 X 射线衍射图

图 4



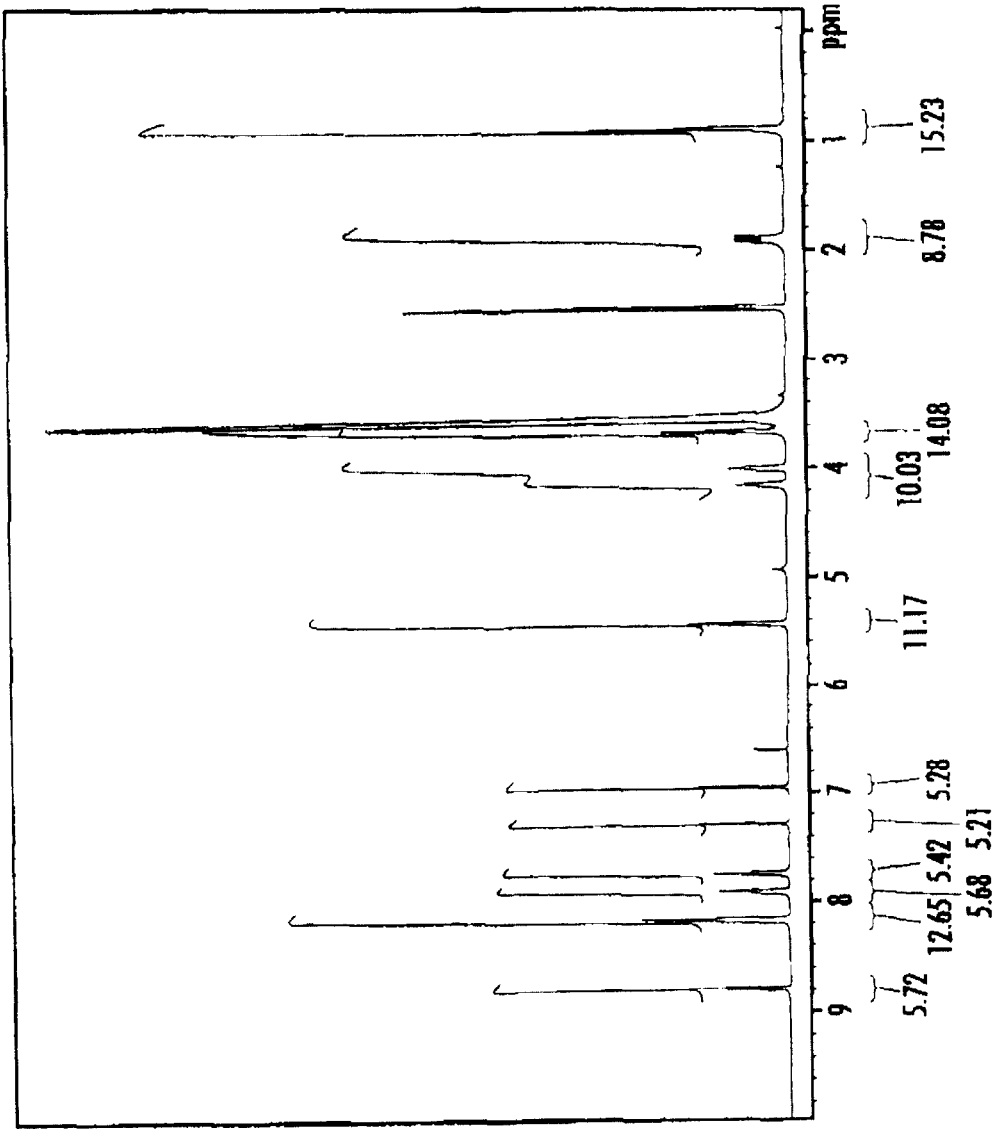


图 6

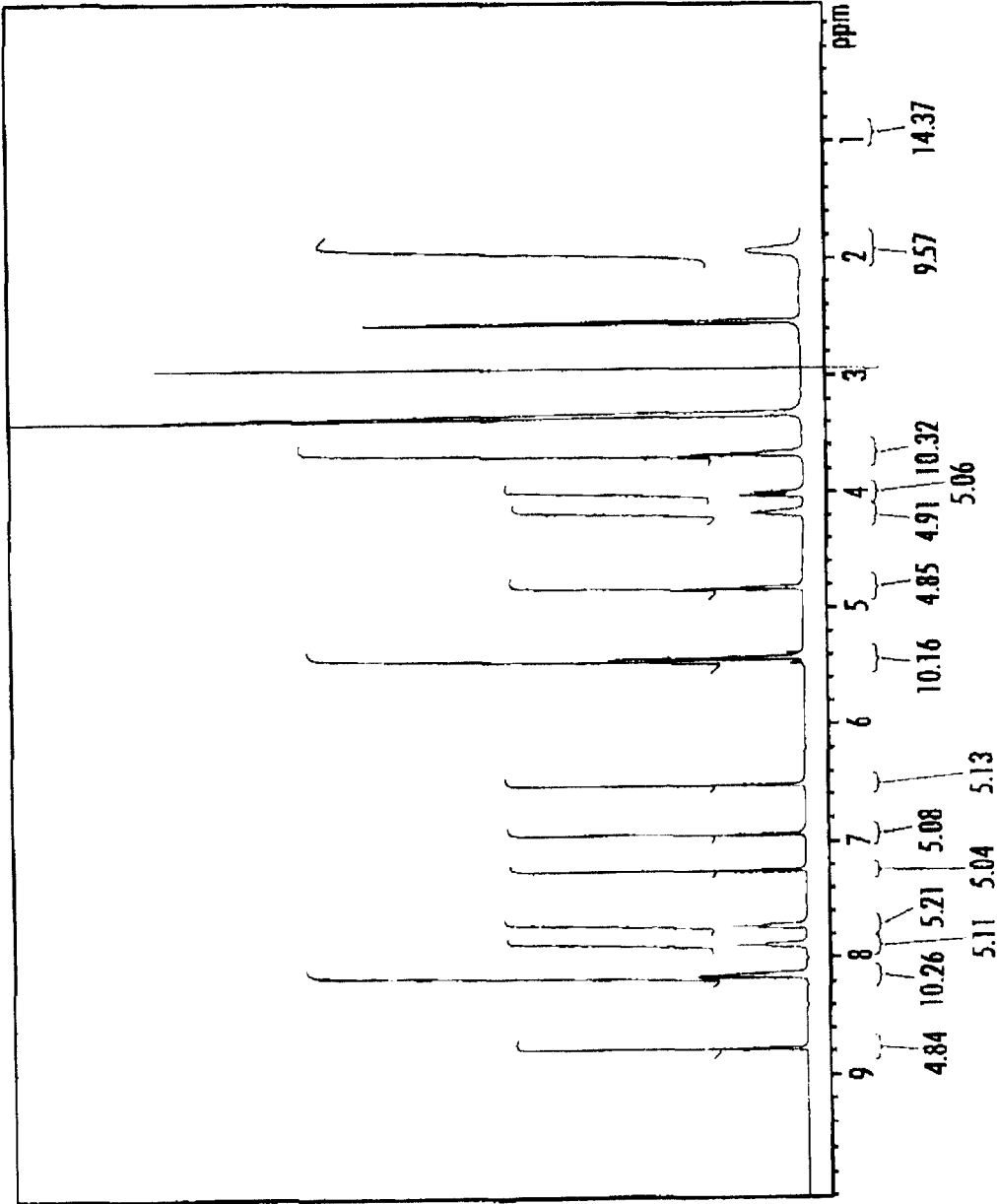
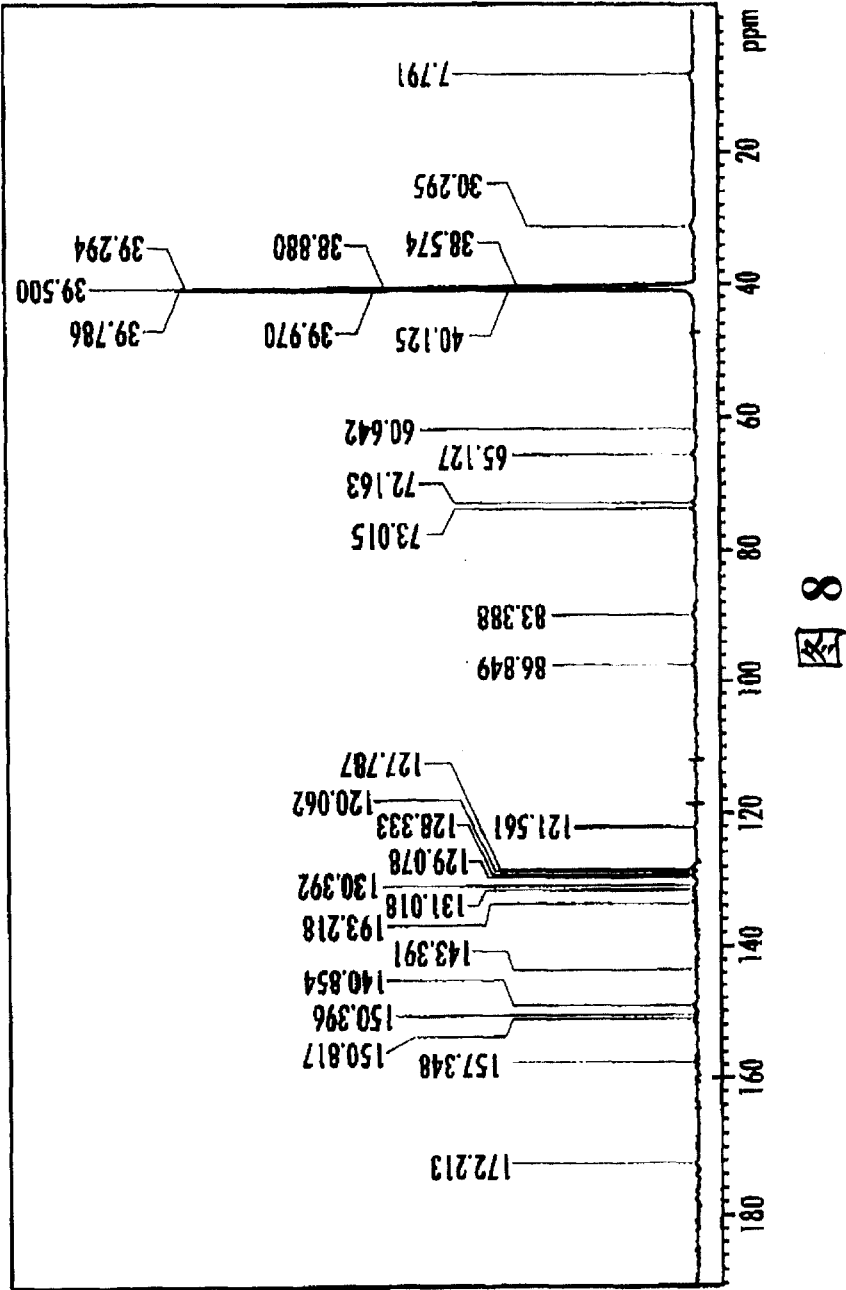


图 7



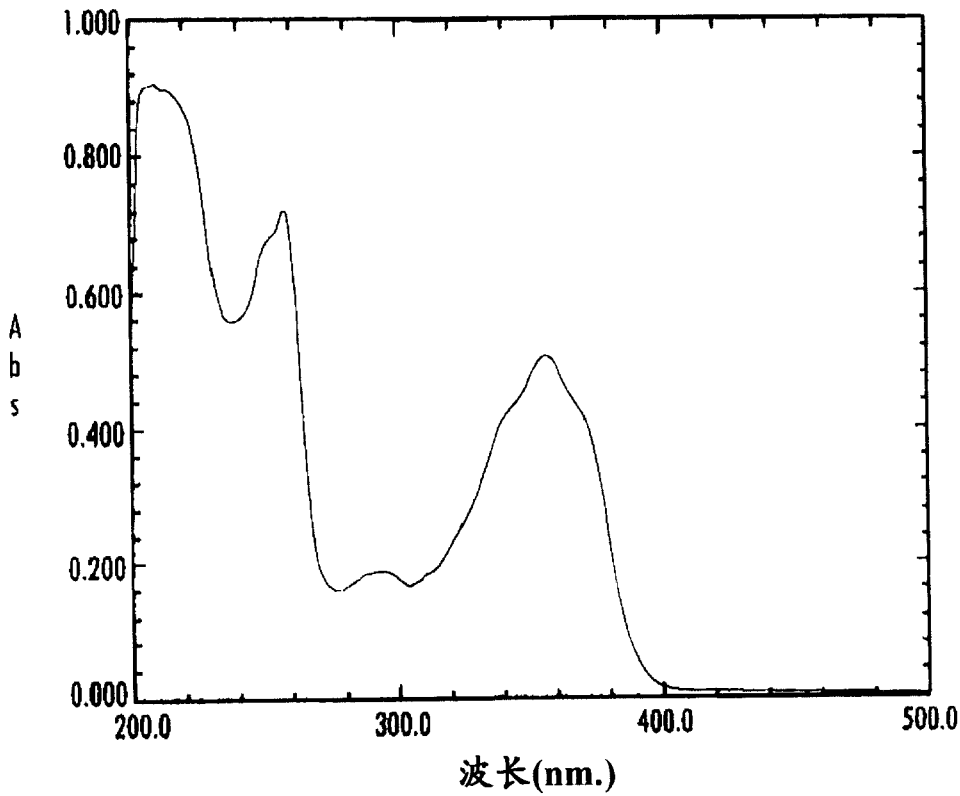


图 9

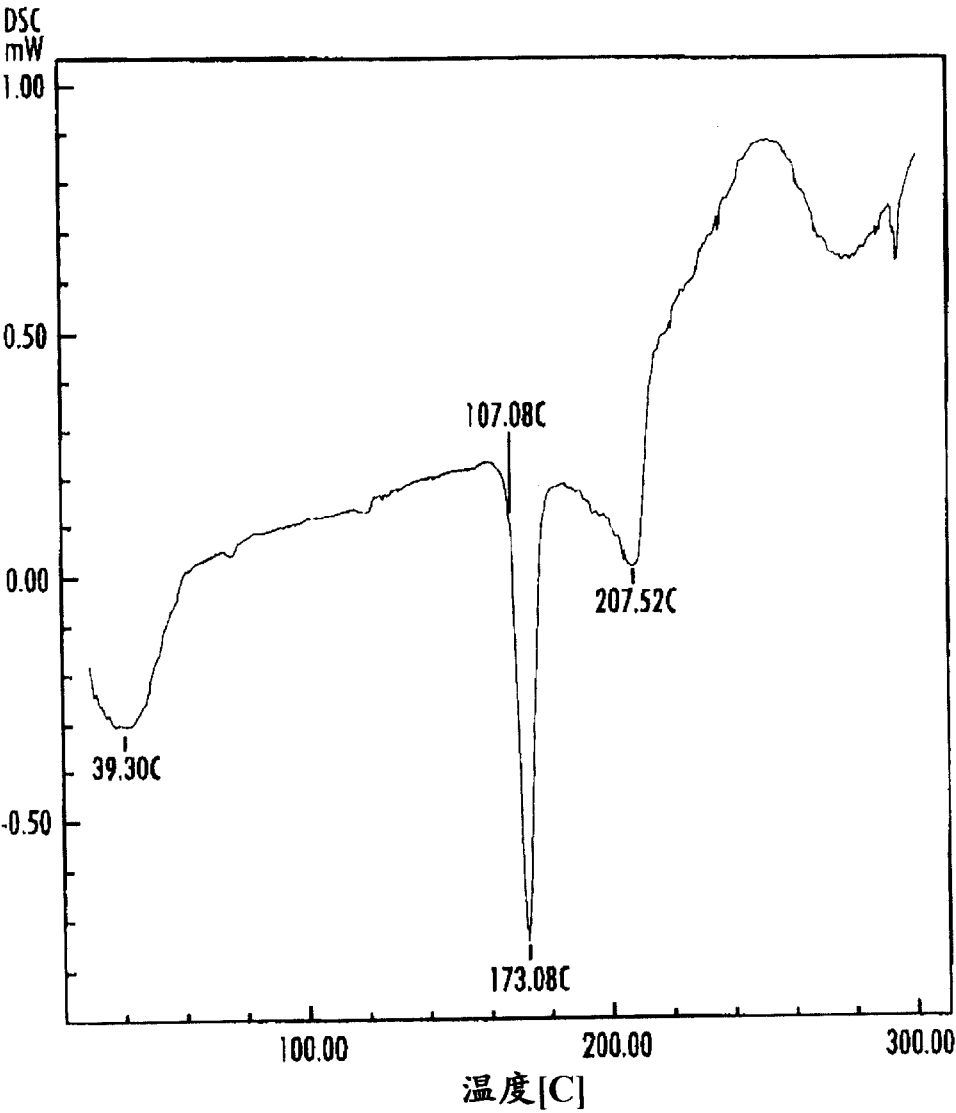


图 10

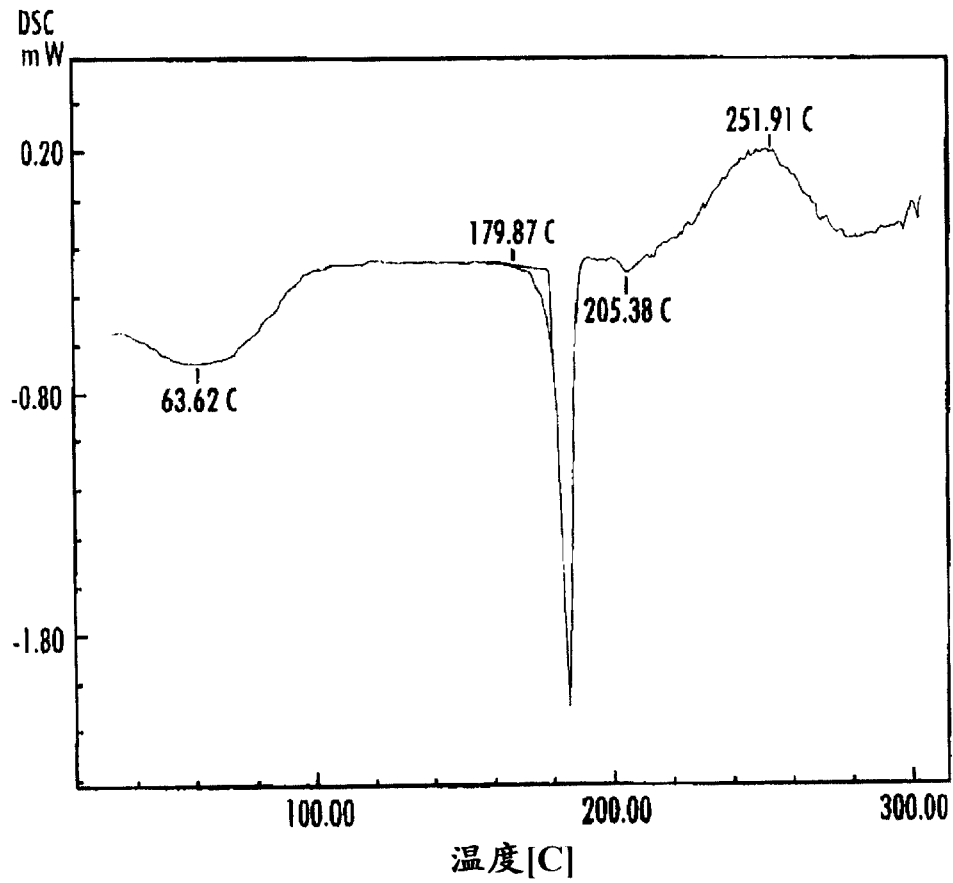


图 11

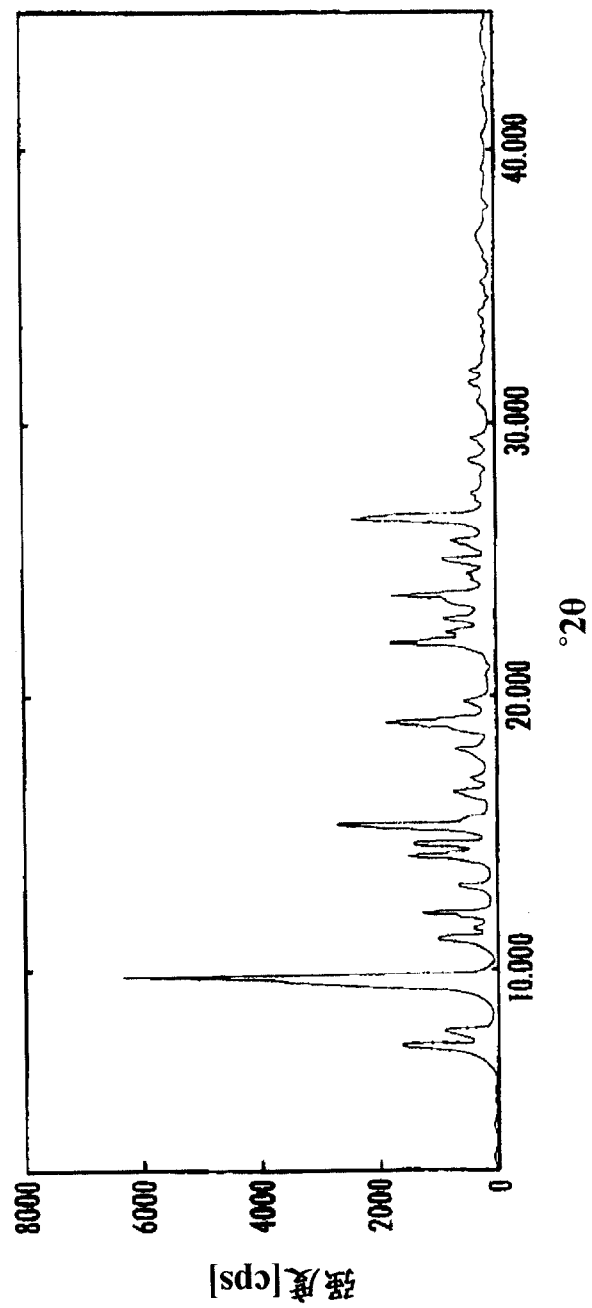


图 12

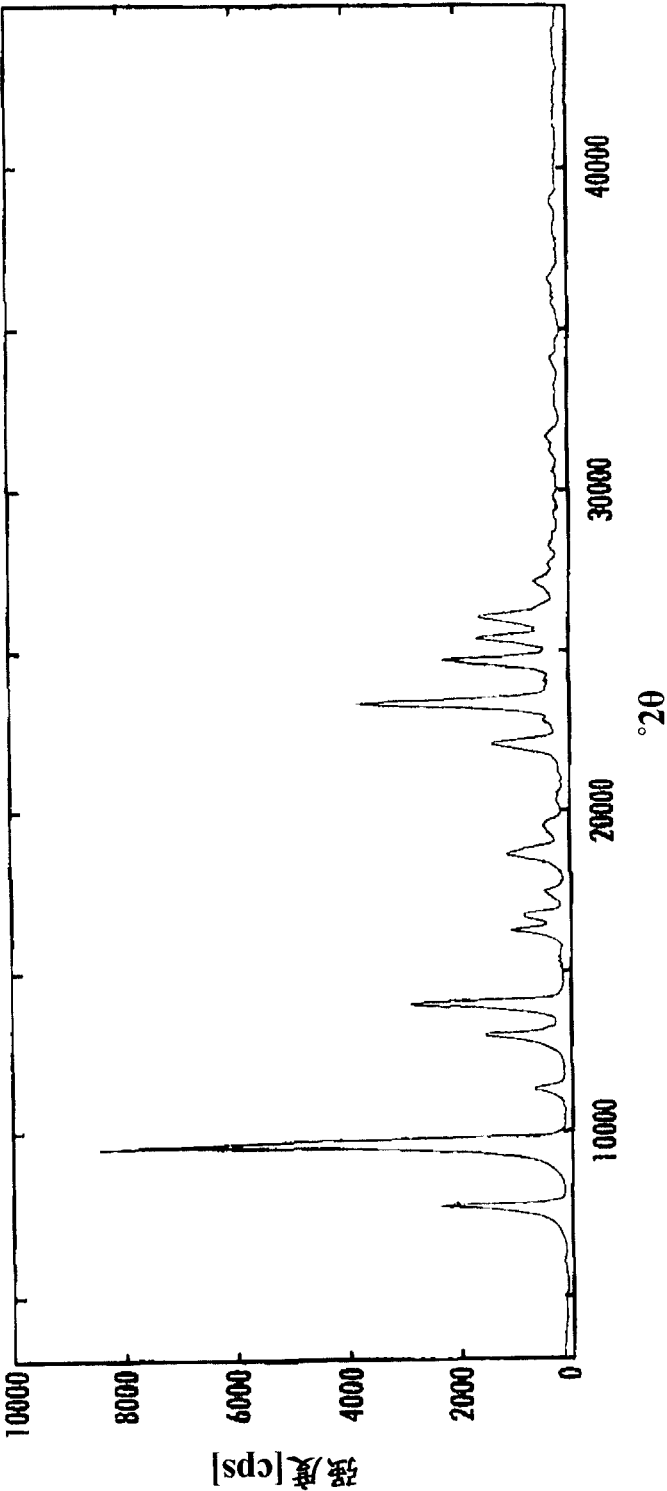


图 13