

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/48

A61P 35/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94190775.9

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138565C

[22] 申请日 1994.9.21 [21] 申请号 94190775.9

[30] 优先权

[32] 1993.10.8 [33] GB [31] 9320781.9

[71] 专利权人 药制品公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 F·安格鲁希 A·苏拉托

审查员 赵喜元

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

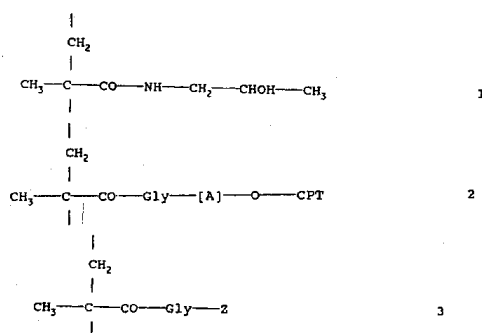
代理人 张元忠

权利要求书 5 页 说明书 24 页

[54] 发明名称 聚合物链接的喜树碱衍生物

[57] 摘要

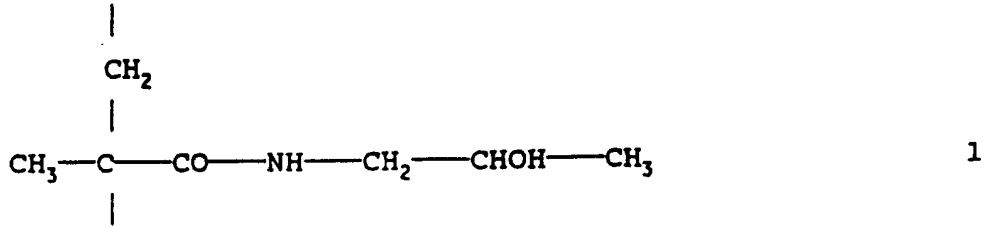
一种聚合共轭体，它主要由以下单元组成：(i) 60-99 摩尔%由通式 1 表示的 N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺，(ii) 1-40 摩尔%由通式 2 表示的 20-O-(N-甲基丙烯酰甘氨酸-氨酰)喜树碱单元，其中 [A] 是具有由至少三个原子隔开的各端氨基和羰基的间隔基，O-CPT 表示喜树碱残基，喜树碱的 C-20 羟基连接到间隔基 [A] 的端羰基；和 (iii) 0-10% 摩尔%由通式 3 表示的 N-甲基丙烯酰甘氨酸或 N-(2-羟基-丙基)甲基丙烯酰甘氨酸单元，其中 Z 表示羟基或通式为 -NH-CH₂-CH(OH)-CH₃ 的残基。



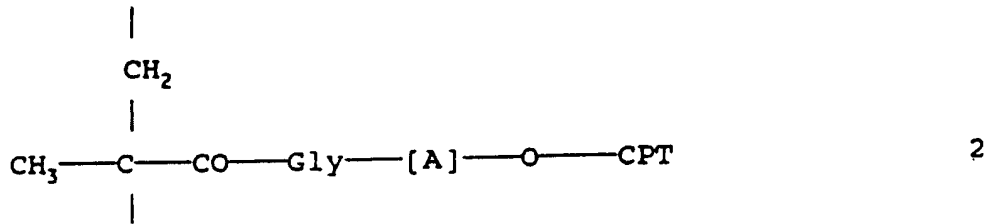
ISSN 1008-4274

1. 一种聚合共轭体，它由以下单元组成：

(i) 60—99 摩尔%由通式 1 表示的 N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰胺单元：

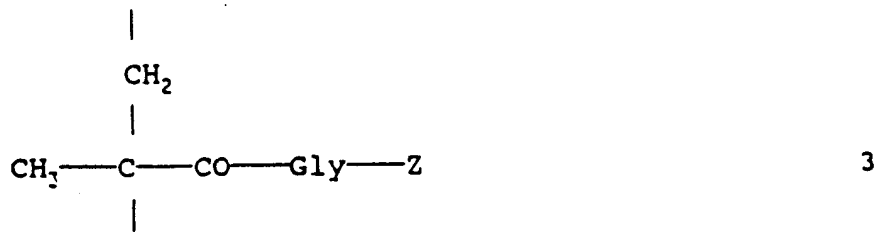


(ii) 1—40 摩尔%由通式 2 表示的 20—O—(N—甲基丙烯酰甘氨酸—氨基酰基) 喜树碱单元：



其中 [A] 是具有由至少三个原子隔开的各端氨基和羰基的间隔基，O—CPT 表示喜树碱残基，喜树碱的 C—20 羟基连接到间隔基 [A] 的端羰基；和

(iii) 0—10 摩尔%由通式 3 表示的 N—甲基丙烯酰甘氨酸或 N—(2—羟基—丙基) 甲基丙烯酰甘氨酸单元：



其中 Z 表示羟基或结构式为 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ 的残基。

2. 根据权利要求 1 的共轭体，其中间隔基 [A] 选自：

Ala-Gly, Phe-Gly, Phe-Phe,
Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly,
Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe,
Phe-Phe-Gly

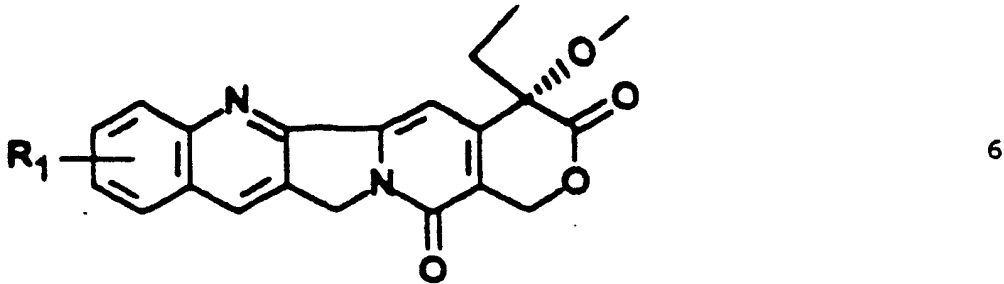
和 Phe-Leu-Gly-Phe.

3. 根据权利要求 1 的共轭体，其中间隔基 [A] 是：结构式为 $-\text{NH}-\text{Y}-\text{CO}-$ 的基团，这里 Y 是 C_3-C_6 直链或支链烷基；或结构式为

Ala-Gly-NH-Y-CO-,
Phe-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Phe-NH-Y-CO-, Leu-Gly-NH-Y-CO-, Val-
Ala-NH-Y-CO-, Phe-Ala-NH-Y-CO-, Leu-Phe-NH-Y-CO-, Leu-Ala-NH-
Y-CO-, Phe-Leu-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Phe-Leu-NH-Y-CO-, Leu-Leu-
Gly-NH-Y-CO-, Phe-Tyr-Ala-NH-Y-CO-, Phe-Gly-Phe-NH-Y-CO-, Phe-
Phe-Gly-NH-Y-CO-, 或 Phe-Leu-Gly-Phe-NH-Y-CO-

的基团，这里 Y 具有与以上同样的意义。

4. 根据权利要求1-3中任一项的共轭体, 其中O-CPT表示通式6的喜树碱残基:



这里R₁表示氢、羟基、硝基或氨基或者连接到A环上两相邻碳原子上的亚甲二氧基。

5. 根据权利要求1的共轭体, 其中存在1-10摩尔%的该通式2单元。

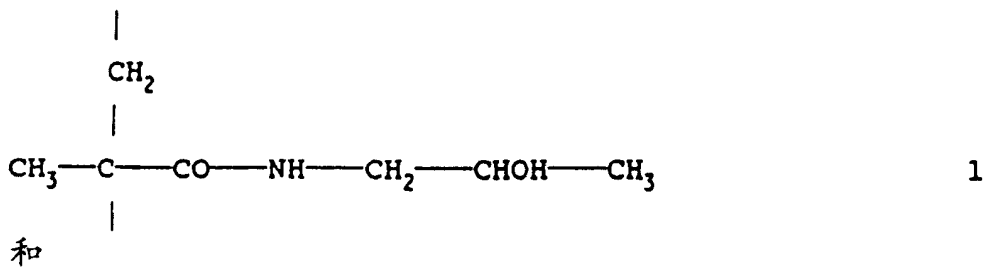
6. 根据权利要求1的共轭体, 其中喜树碱的含量是1-10% (W/W)。

7. 一种制备按照权利要求1所定义的聚合共轭体的方法, 该方法包括让通式7的20-O-酰氨基-喜树碱衍生物:

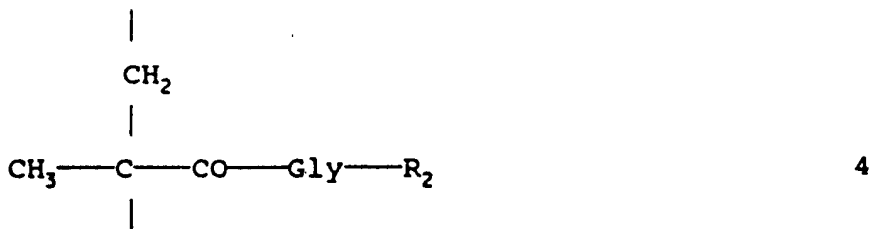


其中[A]和O-CPT与权利要求1中所定义的相同, 与由以下单元组成的聚合物进行反应:

(i) 60-99摩尔%由通式1表示的N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺单元:



(iv) 40—1 摩尔%由通式 4 表示的 N—甲基丙烯酰甘氨酸单元:

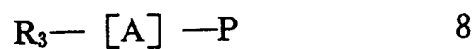


其中 R_2 是 (a) 活性酯残基或 (b) 羟基;

以及可以用 1—氨基—2—丙醇置换剩余活性酯基。

8. 按照权利要求 7 定义的通式 7 的 20—O—酰氨基—喜树碱衍生物, 其中间隔基 [A] 与权利要求 2 或 3 中所定义的相同。

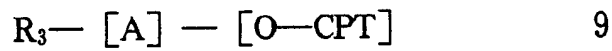
9. 一种制备按照权利要求 7 中所定义的通式 7 的 20—O—酰氨基—喜树碱衍生物的方法, 该方法包括让喜树碱与通式 8 的 N—保护了的一氨酰基衍生物:



其中 [A] 是具有与权利要求 2 或 3 中相同的定义, R_3 表示氨基保护基和 P 是活性酯残基,

在活化剂存在下缩合, 得到由通式 9 表示的 N—保护了的—

20—O— (酰氨基) 化合物:



其中 R_3 和 $[A]$ 具有与以上相同的定义, $O—CPT$ 具有与权利要求 1 中相同的定义;

以及从所得化合物中脱除 $N—$ 保护基。

10. 药物组合物, 它包括药理上可接受的稀释剂或载体及作为活性成分的、按照在权利要求 1—6 中任一项要求的聚合共轭体。

聚合物键接的喜树碱衍生物

本发明涉及具有抗癌活性的水溶性聚合物键接的喜树碱和聚合物键接的喜树碱衍生物,制备它们的方法及含有它们的药物组合物。

喜树碱是一种从喜树的叶和树皮分离出来的生物碱;喜树碱的其它类似物也是已知的并能通过从喜树碱进行半合成或通过总体合成来制备:参见 J. Amer. Chem. Soc. 94 (10), 3631 (1972); J. Chem. Soc. D (7), 404 (1970); US—A—4, 981, 969 (1991年1月1日); US—A—5, 049, 668 (1991年9月17日)。

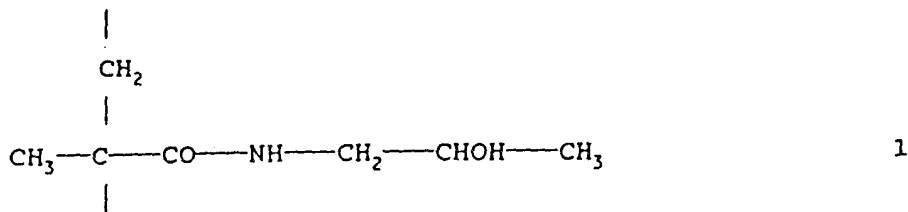
喜树碱具有由稠环体系组成的五环结构,稠环形成喹啉环(环A和B),吡咯烷环(环C),吡啶酮环(环D)和 α -羟基- δ -内酯部分(环E)。喜树碱和几种其A环被取代的衍生物都对各种固体癌(细胞)谱系,包括耐临床上可使用的化学治疗剂的细胞谱系,表现出抗癌活性[参见:J. Clin. Pharmacol. 30, 770(1990); Cancer Chemother. Pharmacol. 28, 192 (1991)]。

喜树碱,以及其绝大多数衍生物,由于酰氮原子的弱碱性,几乎不溶于适合肠胃外施药的赋形剂。为了溶解喜树碱,曾推出几种水溶性前药(Prodrug),如20-O-磷酸酯或20-O-酰氨基衍生物,它们能被无机酸质子化,从而具有水溶解性:参见 US—A—4, 943, 579 (1990年7月24日)。在施用这些药物时,会伴随而来一些毒副

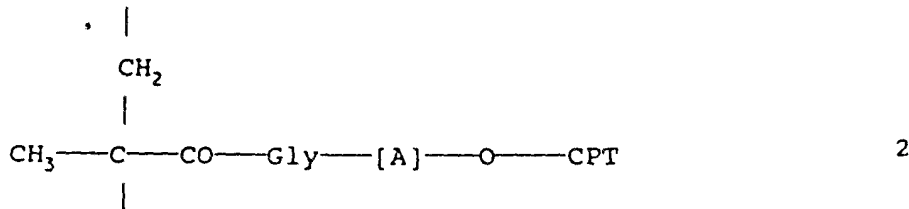
作用，包括血液和胃肠毒副作用。已经作了许多尝试，通过改善其结构来改进喜树碱的治疗指数。

本发明提供水溶性的及在体内具有抗癌活性和低毒性的喜树碱的聚合共轭体。更具体地说，本发明提供了聚合共轭体，它在这里表示为 A 并主要由以下单元组成：

(i) 60~99 摩尔%的由以下通式 1 表示的 N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺单元：



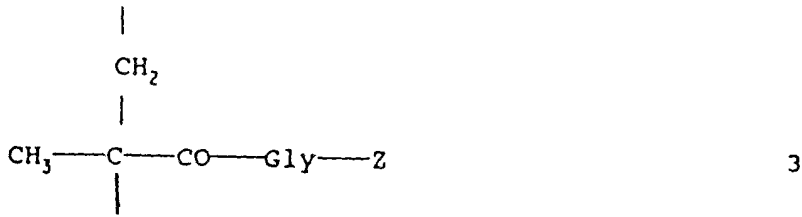
(ii) 1~40 摩尔%的由以下通式 2 表示的 20-O-(N-甲基丙烯酰甘氨酸-氨基酰基)喜树碱单元：



其中 [A] 是具有由至少三个原子隔开的各端氨基和羰基的间隔基，O-CPT 表示喜树碱残基，喜树碱的 C-20 基团连接到间隔基 [A] 的端羰基；和

(iii) 0~10 摩尔%的由以下通式 3 表示的 N-甲基丙烯酰甘氨酸

酸或 N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰胺单元:



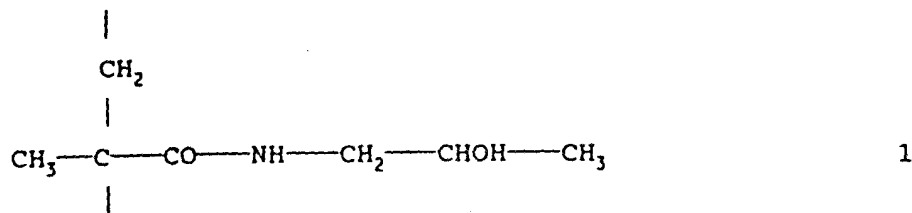
其中 Z 表示羟基或结构式为 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$ 的残基。

本发明还提供了制备如上定义的聚合共轭体的方法, 该方法包括让通式 7 的 20—O—酰氨基—喜树碱衍生物:



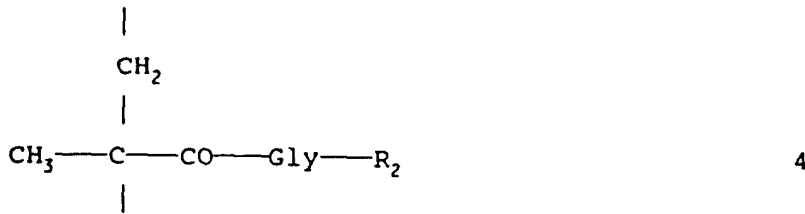
其中 [A] 和 O—CPT 如上所定义, 与主要由以下单元组成的聚合物进行反应:

(i) 60~99 摩尔% 的由通式 1 表示的 N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰胺单元:



和

(iv) 40~1 摩尔%的由通式 4 表示的 N-甲基丙烯酰甘氨酸单元:



其中 R_2 是 (a) 活性酯残基或 (b) 羟基;

及选择性地用 1-氨基-2-丙醇置换剩余活性酯基。

该聚合共轭体 A 含有比例达 60 摩尔%或更高的, 例如至少 80 摩尔%或至少 85 摩尔%的, 由通式 1 表示的 N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺单元。这些单元可以以 91-98 摩尔%的量存在。该共轭体还可含有 1~40 摩尔%的由通式 2 表示的 20-O-(N-甲基丙烯酰甘氨酸-氨基酰基) 喜树碱单元, 例如 1~20% 摩尔%的此类单元。该共轭体可含有 1~8 摩尔%的, 例如 2~6 摩尔%的这些单元。

间隔基 [A] 可以是 3~12, 例如 6~9 个原子长。一般地, 该基团易发生细胞内水解。优选其耐细胞内水解。该间隔基可以是多肽间隔基, 例如 1~4 或 2~4 个氨基酸残基那样长。该间隔基可以是二肽、三肽或四肽。

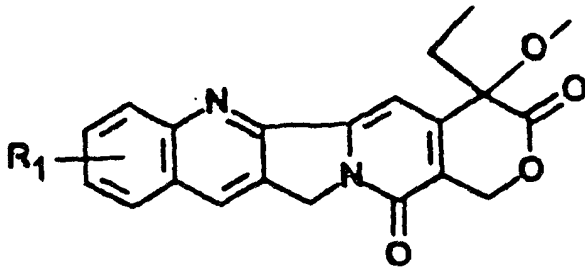
优选的间隔基 [A] 是选自:

Ala-Gly, Phe-Gly, Phe-Phe, Leu-Gly, Val-Ala, Phe-Ala, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu-Gly, Phe-Phe-Leu, Leu-Leu-Gly, Phe-Tyr-Ala, Phe-Gly-Phe, Phe-Phe-Gly 和 Phe-Leu-Gly-Phe. 此外, 间隔基 [A] 是结构式为 $\text{HN}-\text{Y}-\text{CO}-$ 的基团, 其中 Y 是 C_3- C_6 直链或支链烷基, 如 $-(\text{CH}_2)_n-$, 这里 n 是 3, 4, 5 或 6。

此外, 间隔基 [A] 是结构式为
 Ala-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Phe-NH-Y-CO-, Leu-
 Gly-NH-Y-CO-, Val-Ala-NH-Y-CO-, Phe-Ala-NH-Y-CO-, Leu-Phe-NH-
 Y-CO-, Leu-Ala-NH-Y-CO-, Phe-Leu-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Phe-Leu-
 NH-Y-CO-, Leu-Leu-Gly-NH-Y-CO-, Phe-Tyr-Ala-NH-Y-CO-, Phe-Gly-
 Phe-NH-Y-CO-, Phe-Phe-Gly-NH-Y-CO- 或 Phe-Leu-Gly-Phe-NH-Y-
 CO-

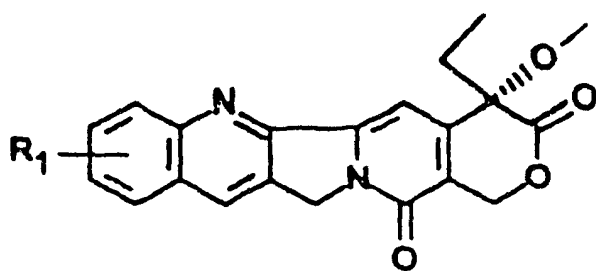
的基团, 其中 Y 具有与以上同样的定义。

喜树碱残基由 O—CPT 表示。该喜树碱可以是喜树碱本身或其类似物如 A—环类似物。这种 A—环类似物因而是在 A—环上被取代的喜树碱。该喜树碱可以是天然 S 形式或 R 形式, 或者是 R 和 S 形式的混合物 (外消旋混合物)。适宜的喜树碱残基 O—CPT 由通式 5 表示:



5

其中 R₁ 表示, 例如氢、羟基、硝基或氨基或者连接到 A 环上两相邻碳原子上的亚甲二氧基。优选 R₁ 表示氢, 9—, 10—, 11—或 12—羟基, 9—或 10—硝基, 9—或 10—氨基或 10, 11—亚甲二氧基。更优选的是通式 6 的喜树碱残基:

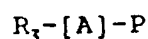


6

其中 R_1 是如上所定义。

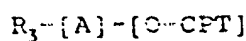
优选地，通式 2 单元以 1—10 摩尔%，如 0.5—5 摩尔%的量存在。同时还优选地，喜树碱含量占聚合共轭体体的 1—10% (W/W)，更优选 4—8% (W/W)。

本发明还提供如上所定义的通式 7 的 20—O—酰氨基—喜树碱衍生物。本发明进一步提供了制备通式 7 的 20—O—酰氨基—喜树碱衍生物的方法，该方法包括在活化剂如 4—二甲氨基吡啶存在下，让喜树碱与通式 8 的 N—保护的氨基酰基衍生物进行缩合：



8

其中 [A] 如上所定义，以及 R_3 表示氨基保护基，如 t-boc, CBZ, FMOC, 三苯甲硅烷基、二苯亚甲基或三苯甲基，和 P 是活化酯残基，如对—硝基苯氧基，五氟苯氧基或 N—羟基琥珀酰亚胺基，制得由通式 9 表示的 N—保护的—20—O—(酰氨基) 化合物：



其中 R_3 , [A] 和 [O—CPT] 是如上定义；和从所得化合物脱去 N—保护基

通式 8 的化合物的制备是采用了文献中已知的标准合成工艺步骤。合适的通式 8 的 N—保护的—氨基酰基衍生物包括 N—三苯

甲基—L—苯基丙酰胺基—L—亮氨酸—甘氨酸（对硝基苯）酯（8a）或N—三苯甲基—甘氨酸—L—亮氨酸—甘氨酸（对硝基苯）酯（8b），或6—N—三苯甲基—己酸（对硝基苯）酯（8c）。一些通式8的衍生物及它们的制备方法还在我们等待审查的国际专利申请PCT/EP94/01100中有叙述。

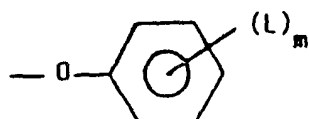
因此，比方说，在活化剂如4—二甲氨基吡啶的存在下，喜树碱能够在无水溶剂如无水二甲基甲酰胺或二甲亚砷中与摩尔过量的，例如接近5倍摩尔过量或更多的，尤其2摩尔当量的通式5的N—保护了的—氨基酰基衍生物进行反应。以这种方式，该保护了的氨基酸被连接在喜树碱分子的C—20位上。该反应一般可进行8—24小时。该反应一般在15—40℃的温度下进行。应该注意，在此类反应条件下，9—氨基喜树碱因9—氨基的弱碱性而能够部位专一地在C—20—羟基位发生反应。

氨基保护基R₃可由适当的解保护剂来脱除，得到通式7的20—O—酰氨基—喜树碱衍生物。因而，解保护可由中等强度的酸来实现，如用乙酸处理，或者由还原来实现。从而可使用氢解方法。

通式7的20—O—酰氨基—喜树碱衍生物与主要由60—99摩尔%通式1的N—（2—羟丙基）—甲基丙烯酰胺单元和40—1摩尔%通式4的N—甲基丙烯酰胺单元所组成的聚合物的缩合，以及随后可以进行的剩余活性酯基的置换，都是在能够保留喜树碱和间隔基[A]之间的键合性质及保留共轭体的性质的条件下进行的。

按照在Makromol. Chem. 178, 2159 (1977)中所描述的那样，主要由60—99摩尔%通式1的N—（2—羟丙基）—甲基丙烯酰胺单元和40—1摩尔%通式4的N—甲基丙烯酰甘氨酸单元组成的聚合物

是通过 N—(2—羟丙基) 甲基丙烯酰胺与 N—甲基丙烯酰甘氨酸或 N—甲基丙烯酰甘氨酸活性酯衍生物进行共聚而制备的。R₂ 可以表示苯氧基，它能够在苯环上被一个或多个吸电子基团取代。适宜的吸电子基团的例子包括硝基和卤素。R₂ 优选是离去基团：



其中 L 是吸电子基团，例如—NO₂ 或卤素如氟或氯，和 m 是 1—5 之间的整数，一般为 1—3，优选为 1 或 2。R₂ 优选是对硝基苯氧基或 2, 4—二氯苯氧基。

优选地，在其中 R₂ 表示 (a) 活性酯残基的聚合物和通式 7 的化合物之间发生的制备本发明聚合物共轭体的反应是在无水极性有机溶剂如二甲基甲酰胺或二甲亚砜中进行的。该反应一般进行 8—24 小时。该反应一般在 15—30℃ 的温度下，优选在室温下进行 15 小时；然后，剩余活性酯的氨解可以在室温下在 1—氨基—2—丙醇存在下进行 0.5—1 小时。该共轭体可适当地用丙酮沉淀，溶于乙醇中，然后用丙酮沉淀。

在另一个方法中，为了制备本发明的聚合物共轭体，在其中 R₂ 表示羟基 (b) 的聚合物和通式 7 的化合物之间发生的反应是在缩合剂 2—乙氧基—1—乙氧基羰基—1, 2—二氢喹啉存在下在无水极性溶剂如二甲基甲酰胺或二甲亚砜中进行的。该反应一般进行 8 至 24 小时。该反应一般在 15—30℃ 的温度下，优选在室温下反应 15 小时；然后，共轭体用丙酮沉淀，溶于乙醇中，接着用丙酮沉淀。

例如, 其中 R_2 表示活性酯残基 (a) 的、在无水的二甲亚砜中以 15% (重量/体积) 的浓度提供的聚合物是在室温下用 3% (W/V) 的通式 7 的 20-O-氨基酰基喜树碱衍生物处理 15 小时。然后, 加入 0.1% (W/V) 的 1-氨基-2-丙醇, 该反应混合物在室温下保持 1 小时。该共轭体可用丙酮沉淀, 然后以 10% (W/V) 的浓度用绝对乙醇溶解, 接着再次用丙酮沉淀, 得到根据本发明的中性喜树碱共轭体。

在另一个实施例中, 其中 R_2 表示羟基 (b) 的、在无水的二甲亚砜中以 15% (重量/体积) 的浓度提供的聚合物是在室温下在 1.3% (W/V) 的 2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1, 2-二氢喹啉存在下用 3% (W/V) 的通式 7 的 20-O-氨基酰基喜树碱衍生物处理 15 小时。然后, 加入丙酮引起沉淀, 以 10% (W/V) 的浓度用绝对乙醇溶解沉淀物, 接着再次加入丙酮引起沉淀, 得到根据本发明的聚合共轭体。

在本发明的聚合共轭体中活性药物如喜树碱或其 A-环类似物的含量是通过 HPLC 或吸收光谱分析法测定的。

在本发明中描述的喜树碱及其 A-环类似物的聚合物共轭体具有改进的水溶性和较低的毒性。该共轭体表现出良好的水溶性、生物相容性并通过酶催裂解将喜树碱释放在血浆中或在内化后进入细胞中。

生物活性

N-(2-羟基丙基) 甲基丙烯酰胺, 20-O-[N-甲基丙烯酰甘氨酸-L-苯基丙酰胺基-L-亮氨酸甘氨酸] 喜树碱和 N-(2-

羟丙基)甲基丙烯酰基甘氨酸胺(A₂)的共聚物对移植有HT29/Colon Carcinoma (表1)的裸(nude)鼠和对有早期和后期M5076鼠网状细胞内瘤(表2和表3)的鼠进行试验,与游离的喜树碱(CPT)相比较。

当与喜树碱对比时,对于聚合物链接的喜树碱衍生物A₂来说,在所有的实验中都观察到了很高的活性。值得注意的是,在对HT29/Colon Carcinoma的实验中发现治愈的鼠。

用同样的治疗程序测试A₂和CPT的抗癌活性。

应该注意,聚合物链接的喜树碱A₂被发现高度溶于水并能溶于盐水及可以静脉(iv)注射,而CPT溶于水和吐温80(Tween 80,聚环氧乙烷山梨糖醇单月桂酸酯)的混合物中。

药物制剂和施用

化合物A₂在使用前溶于蒸馏水中,其浓度在370nm(EL% 57.18)处用分光光度分析法检测。喜树碱(CPT)溶于有10%吐温的灭菌水中。

以体重的10ml/kg的容积进行静脉(iv)注射治疗,对比鼠用灭菌水进行治疗。

瘤

使用15—20mg瘤浆将HT29 Colon Carcinoma皮下(S.C.)移植在athymic Swiss/nu/mice体内。

M5076鼠网状细胞肉瘤由一连串i、m、(肌内)通道保藏并被皮下移植(5×10⁵细胞/鼠)在可相容的C57B1/6鼠体内)。

所有的动物来自 Charles River Calco, Como, Italy。

普通鼠 10 只一组，无胸腺鼠 8 只一组

普通鼠重量为 20—22g，并保持在标准实验室条件下。

该鼠群被定期试验一组病原体（包括鼠肝炎，Sendai Virus 和 Myco Plasma Pulmonis）的抗体的消失。

抗癌活性和毒性的评价

由长规测量鉴别瘤的生长并根据 Geran 等（参见：Cancer Chem. Rep. , Part 3, 3 (2) ed. 3, PP1—103, 1972）估计瘤重量。抗癌活性使用下式表达为瘤生长的抑制百分数（%T/I）：

$$100 - \frac{\text{被治疗鼠的中等瘤重}}{\text{对比鼠的中等瘤重}} \times 100$$

使用下式计算存活时间（T/C%）的中等增长：

$$\frac{\text{被治疗鼠的中等存活时间}}{\text{对比鼠的中等存活时间}} \times 100$$

治愈的鼠是在实验结束时没有瘤的鼠。

以体重的减少和全部尸体剖检为基础，主要根据脾脏和肝的大小的减少来评价毒性。

表 1. 化合物 A2 与喜树碱（CPT）对 HT29/
Colon Carcinoma 的抗癌活性的比较

化合物	剂量 ⁽¹⁾ mg/kg	治疗程序	%瘤抑制率	毒性 ⁽²⁾	治愈的鼠 ⁽³⁾
A2	7.5	iv q4dx6	96	0/18	3/18
CPT	7.5	iv q4dx6	83	0/10	0/10

(1) 表示为 CPT 当量。

(2) 毒死鼠的数目/鼠的总数

(3) 瘤移植 90 天后无瘤的鼠。

表 2. 化合物 A2 与喜树碱 (CPT) 对早期 M5076 鼠网状细胞肉瘤的抗癌活性的比较

化合物	剂量 ⁽¹⁾ mg/kg	治疗程序	%瘤抑制率 ⁽³⁾	T/C	毒性 ⁽²⁾
A2	7.5	iv 1, 6, 9	100	171	0/10
CPT	7.5	ip 1, 6, 9	100	165	0/10

(1) 表示为 CPT 当量。

(2) 毒死鼠的数目/鼠的总数

(3) 在最后治疗后的一星期时间估计瘤抑制率%。

表 3. 化合物 A2 与喜树碱 (CPT) 对后期 M

5076 鼠网状细胞肉瘤的抗癌活性的比较。

在第 16、20、24、28、31、35 天的治疗程序 iv (静脉注射)

化合物	剂量 ⁽¹⁾ mg/kg	% 瘤抑制率 ⁽³⁾	T/C 8	毒性 ⁽²⁾
A2	10.0	80	174	0/10
	15.0	95	183	0/10
CPT	7.5	72	173	0/10

(1) 表示为 CPT 当量。

(2) 毒死鼠的数目/鼠的总数

(3) 在第 34 天评估瘤抑制率%。

毒性

N—(2—羟丙基) 甲基丙烯酰胺, 20—O— [N—甲基丙烯酰基甘氨酸—L—苯基丙酰胺基—L—亮氨酸甘氨酸] 喜树碱和 N—(2—羟丙基) 甲基丙烯酰甘氨酸 (A2) 的共聚物的毒性是以健康 C 57 B1/F 鼠进行评价的, 与喜树碱比较静脉注射治疗。

C57 B1/F 鼠的 LD₁₀⁽¹⁾ 和 LD₅₀⁽²⁾ 值如下:

化合物	LD ₁₀ mg/kg	LD ₅₀ mg/kg
A2	129	151
CPT	16.9	43.4

(1) LD₁₀: 诱发 10% 的死鼠的剂量。

(2) LD₅₀: 诱发 50% 的死鼠的剂量。

聚合物键接的喜树碱衍生物 A2 的低毒性使得能施用较大剂量的产物并能达到与喜树碱相当的或更好的效果。

该聚合物键接的喜树碱具有抗癌活性。它们抑制 topoisomerase 1。它们尤其用于治疗白血病及结肠癌和直肠癌。

因此，人或动物可由这样一种方法进行治疗：包括向他（它）们施用治疗有效量的本发明的聚合共轭体。从而可以改善病人或患病动物的状况。

所使用的剂量范围将取决于施药途径和取决于患者的年龄、重量和状况。该聚合物共轭体一般通过肠胃外途径施药，例如肌内注射、静脉注射或通过快速浓注施药。适宜的剂量范围是每 m² 体表面积 1—1000mg 喜树碱当量，例如 10—50mg/m²。

该聚合共轭体可与药理上可接受的载体或稀释剂一起配成药物组合物。该聚合共轭体一般经配制后用于肠胃外施药，例如溶于水

或生理盐水中用于注射。

下面实施例是为了说明本发明，而不是限制定。在本说明书的上下文中，氨基酸残基都是以根据 Eur. J. Biochem, 138, 9—37, 1984 的三字母编码表示的。

以如下方式测试聚合共轭体在鼠或人的血浆中的稳定性：向 1ml 鼠或人的血浆中，加入不同浓度的本发明聚合共轭体，然后在适当的时间（24, 48, 72, 96 小时）收集 100 μ l 样品并在 -70 $^{\circ}$ C 下贮藏直到进一步处理为止。

每一样品通过加入 100 μ l 的 0.25M 磷酸，500 μ l CH₃CN 和 700 μ l 乙酸乙酯及在 4 $^{\circ}$ C 下剧烈振荡 20 分钟来进行萃取。然后，样品以 15000 \times g 离心旋转 10 分钟，分离出上层清液。向残余物中加入 300 μ l CH₃CN 和 500 μ l 乙酸乙酯，以 15000 \times g 离心旋转 10 分钟。分离出上层清液。合并有机相，使用高真空离心进行蒸发。通过加入 500 μ l MeOH/水 (70/30, 体积比) (PH 为 2) 回收样品，并注射入 HPLC 装置（高效液体色谱）中测定药的总百分含量。

HPLC 体系

柱： μ Bondapak C10 (Waters) 3.9 \times 300mm

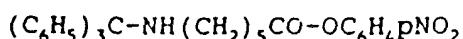
流速：1.5ml/min

检测器：Spectrophotometer Fluorescence 650—40 (Perkin Elmer)；
发射 434nm（窄缝 5）；激发 370nm（窄缝 5）

注射：10 μ l

流动相：51.5% MeOH, 47.5% 水, 1% 磷酸

实施例 1

6-N-三苯甲基-己酸对硝基苯酯 (8C)

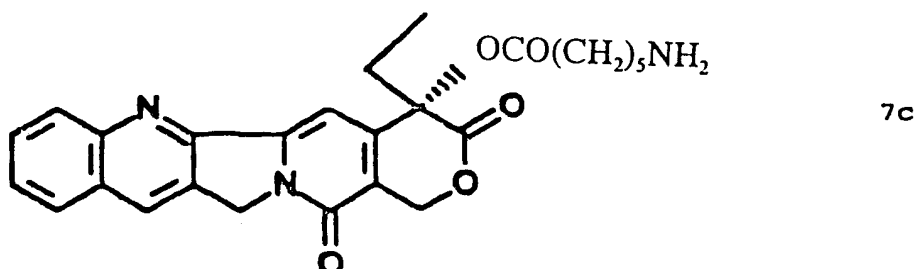
8C

6-氨基己酸 (6.5g, 50mmol) 悬浮在干燥氯仿 (75ml) 和干燥乙腈 (acetonitrile) (15ml) 的混合物中, 添加氯化三甲基硅 (6.3ml, 50mmol) 并在剧烈搅拌下回流 2 小时。然后, 冷却该混合物, 按顺序添加三乙胺 (13.7ml, 100mmol) 和已溶于干燥氯仿 (100ml) 的三苯甲基氯 (14g, 50mmol)。该混合物在室温下放置过夜, 然后加入甲醇 (10ml), 反应混合物在减压下浓缩。残余物用 5% 冷柠檬酸水溶液 (200ml) 溶解, 用乙酸乙酯 (200ml) 萃取。分离出有机相, 用冷的 1N 氢氧化钠水溶液 (200ml) 萃取。分离出有机相, 用冰冷却, 用乙酸调 PH 至 5, 然后用乙酸乙酯 (2×100ml) 萃取。在减压下除去有机溶剂, 在从乙酸乙酯中结晶出来后, 得到 6-N-三苯甲基-己酸 (16g)。这一物质溶于无水四氢呋喃 (150ml) 和在搅拌下在 0°C 用对硝基苯酚 (5.6g, 400mmol) 和二环己基碳二亚胺 (8.4g, 40mmol) 处理 1 小时, 然后在 8°C 下放置过夜。然后, 过滤该反应混合物, 在 0°C 下冷冻 2 小时, 再一次过滤。最后, 在减压下除去有机溶剂, 残余物用乙醚结晶, 得到标题化合物 8C (16.4g)。在 Kieselgel (白色硅藻土载体) 板 F₂₄₅ (Merck) 上做 TLC, 洗脱体系乙醚/正己烷 (1:1, 按体积) R_f=0.6;

FD-MS: m/z [M+H]⁺ 495 H¹NMR (90 MHz, CDCl₃)

δ:

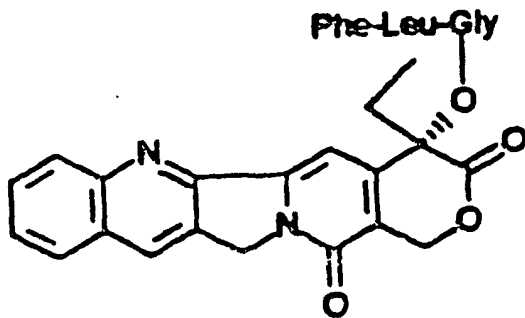
1.1-1.9 (m, 6H); 2-2.5 (m, 4H); 5.7-5.9 (m, 2H, NH, -COOH);
7.2-7.7 (m, 15 H).

实施例 220-O-(6-氨基己酰)喜树碱 (7C)

将喜树碱 (6a, $R_1 = H$, 0.7g, 2mmol) 溶于干燥二甲亚砜 (100ml), 添加按照在实施例 1 中所叙述的那样制备的 6-N-三苯甲基-己酸对硝基苯酯 (8C, 2g, 4mmol), 及 4-二甲氨基吡啶 (0.24g, 2mmol)。反应混合物在室温下保持 48 小时, 然后用氯仿稀释 (400ml), 用水 ($3 \times 100\text{ml}$) 洗涤。分离出有机相, 经无水硫酸钠干燥, 在减压下浓缩至较小的体积。该粗物质在硅胶柱上进行快速色谱分离, 用氯仿洗脱, 得到 20-O-(6-N-三苯甲基-己酰)喜树碱 (0.6g)。在 Kieselgel 板 F₂₄₅ (Merck) 上做 TLC, 洗脱体系氯仿/甲醇 (95:5, 按体积) $R_f = 0.4$ 。该 N-保护的衍生物在室温下用 95% 的三氟乙酸 (10ml) 处理 50 分钟。在减压下除酸之后, 用乙醚收集标题化合物 7C。收率 0.4g。在 Kieselgel 板 F₂₄₅ (Merck) 上做 TLC, 洗脱体系二氯甲烷/甲醇/乙酸/水 (80:20:7:3) $R_f = 0.6$ 。FD-MS: $m/z [M+H]^+ 462$

实施例 3

20-O-(L-苯基丙酰胺基-L-亮氨酸-甘氨酸)喜树碱
(7b)



7b

按照前面在UK申请号930 9663.4中叙述的那样所制备的N-三苯甲基-L-苯基丙酰胺基-L-亮氨酸甘氨酸对硝基苯酯(8a, 1.4g, 2mmol), 喜树碱(6a, R₁=H, 0.35g, 1mmol)和4-二甲氨基吡啶(0.12g, 1mmol)用干燥二甲亚砜(50ml)溶解, 在室温下搅拌20小时。然后, 反应混合物用氯仿(400ml)稀释并用水(3×100ml)洗涤。分离出有机相, 经无水硫酸钠干燥, 然后在减压下浓缩至较小的体积。该粗物质在硅胶柱上进行快速色谱分离, 用氯仿/甲醇(99.5/0.5, 按体积)的混合物洗脱。合并含有标题化合物的N-保护的衍生物的级分, 浓缩至干燥, 用75%乙酸水溶液(30ml)溶解, 然后在室温下保持1小时。反应混合物用固体碳酸氢钠调至PH7, 然后用氯仿(400ml)萃取。在除去有机溶剂之后, 标题化合物7b从乙醚中结晶出来。收率0.16g。在Kieselge(板F₂₄₅

(Merck) 上做 TLC, 洗脱体系氯仿/甲醇 (9 : 1, 按体积) $R_f=0.35$ 。

FD-MS: m/z $[M+H]^+$ 667

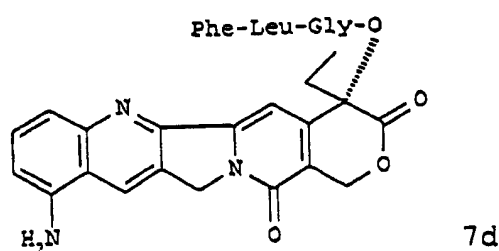
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ :

0.81 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H, δ -Leu); 0.82 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H, δ' -Leu);
 0.98 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 1.25 (m, 1H, β -Leu); 1.39 (m,
 1H, α -Leu); 1.56 (m, 1H, β' -Leu); 1.98 (dd, $J=6.4\text{Hz}$,
 $J=13.5\text{Hz}$, 1H, β -Phe); 2.1-2.4 (m, 2H, CH_2CH_3); 2.48 (d,
 $J=7.0\text{Hz}$, 1H, NH-Phe); 2.77 (dd, $J=4.7\text{Hz}$, $J=13.5\text{Hz}$, 1H, β' -
 Phe); 3.41 (m, 1H, α -Phe); 4.0-4.3 (m, 3H, α -Gly + α' -Gly +
 α -Leu); 5.20-5.27 (two-d, $J=19.9\text{Hz}$, 2H, 5- CH_2); 5.41-5.68
 (two-d, $J=17.3\text{Hz}$, 2H, 17- CH_2); 6.35 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H, NH-Gly);
 6.76 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H, NH-Leu); 6.8-7.3 (m, 21H,
 $4 \times (\text{C}_6\text{H}_5) + 14\text{-H}$).

实施例 4

9-氨基-20-O-(L-苯基丙酰胺基-L-亮氨酸-甘氨酸)

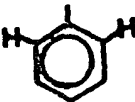
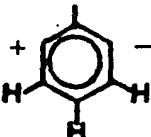
喜树碱 (7d)



按照在实施例 3 中所叙述的那样, N-三苯甲基-L-苯基丙酰

氨基-L-亮氨酸甘氨酸对硝基苯酯 (8a, 1.14g, 2mmol), 9-氨基-喜树碱 (6b, $R_1 = \text{NH}_2$, 0.363g, 1mmol), 4-二甲氨基吡啶 (0.12g, 1mmol) 在室温下在干燥二甲亚砜 (20ml) 中进行反应, 得到标题化合物 7C (0.31g)。在 Kieselgel 板 F₂₄₅ (Merck) 上做 TLC, 洗脱体系 氯仿/甲醇 (9:1, 按体积) $R_f = 0.2$;

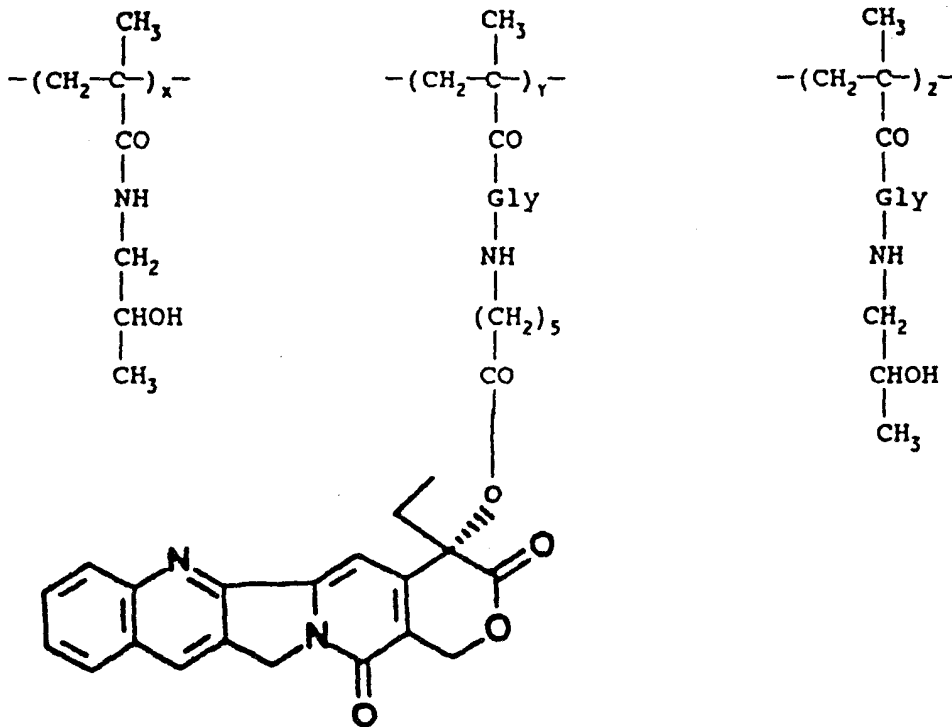
FD-MS: m/z $[M+H]^+$ 682; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ :
 0.82 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H, $\delta\text{-Leu} + \delta'\text{-Leu}$); 1.00 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H, CH_2CH_3); 1.25 (m, 1H, $\beta\text{-Leu}$); 1.41 (m, 1H, -Leu); 1.59 (m, 1H, $\beta'\text{-Leu}$); 1.99 (dd, $J=6.2\text{Hz}$, $J=13.5\text{Hz}$, 1H, $\beta\text{-Phe}$); 2.1-2.4 (m, 2H, CH_2CH_3); 2.47 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 1H, NH-Phe); 2.79 (dd, $J=4.7\text{Hz}$, $J=13.5\text{Hz}$, 1H, $\beta'\text{-Phe}$); 3.43 (m, 1H, $\alpha\text{-Phe}$); 4.0-4.3 (m, 5H, $9\text{-NH}_2 + \alpha\text{-Leu} + \alpha\text{-Gly} + \alpha'\text{-Gly}$); 5.04-5.15 (two-d, $J=19.9\text{Hz}$, 2H, CH_2); 5.39-5.66 (two-d, $J=17.0\text{Hz}$, 2H, 17-CH_2); 6.44 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H, NH-Gly); 6.81 (d, $J=7.6\text{Hz}$,

1H, NH-Leu); 6.85 (m, 3H, $10\text{-H} +$ ); 7.0-7.4 (m, 19H, $3 \times (\text{C}_6\text{H}_5) +$ ); 7.51 (m, 1H, 11-H).

实施例 5

N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺, 20-O-[N-甲基丙烯酰甘氨酸-(6-氨基己酰)]喜树碱和 N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰甘

脲酰胺的共聚物 (A1: X=96, Y=3, Z=1)

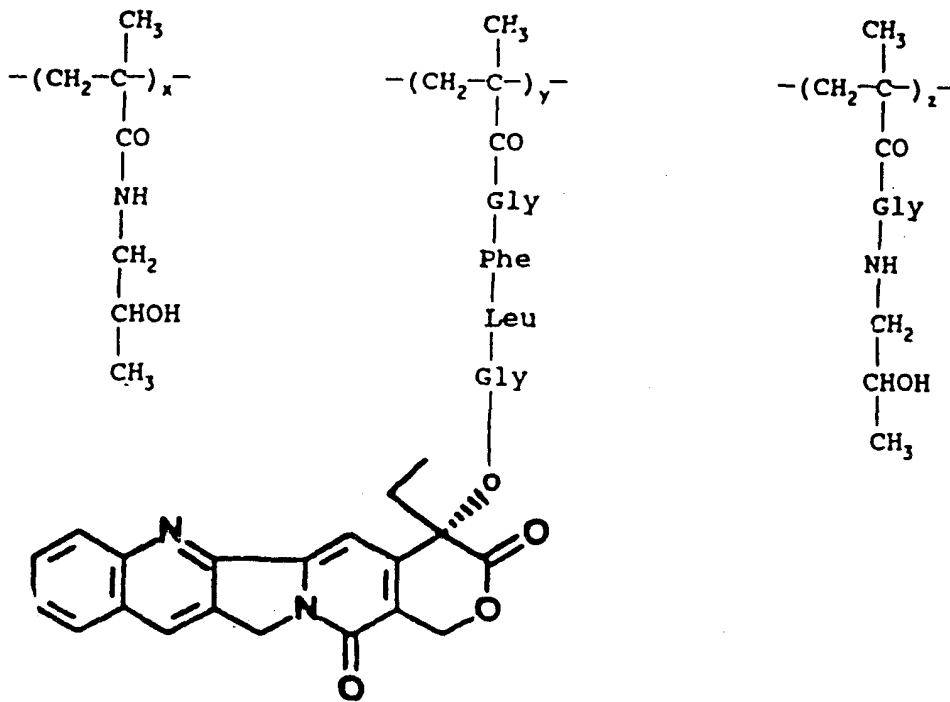


按照在 Makromol. Chem., 178, 2159 (1977) 中描述的那样所制备的含有 2.7×10^3 当量对硝基苯酯的 N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酸酰胺和 N-甲基丙烯酰甘氨酸对硝基苯酯的共聚物 (0.15g), 与按照在实施例 2 中描述的那样所制备的 20-O-(6-氨基己酰) 喜树碱 (7C, 18mg) 在室温下在干燥二甲亚砜 (1ml) 中反应 18 小时, 然后, 在室温下与 1-氨基-2-丙醇 (2 μ l) 反应 1 小时。然后, 用丙酮 (70ml) 处理反应混合物。收集沉淀, 用无水乙醇 (5ml) 再次溶解,

然后用丙酮 (50ml) 再次沉淀, 得到含有 5% (W/W) 喜树碱的标题共轭体 A1 (0.14g)。在经过血浆培育 120 小时后, 共轭体 A1 释放出 10% 喜树碱。

实施例 6

N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰胺, 20—O—[N—甲基丙烯酰甘氨酸—L—苯基丙酰胺基—L—亮氨酸甘氨酸] 喜树碱和 N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰甘氨酸的共聚物 (A2; X=96, Y=2.2, Z=1.8)



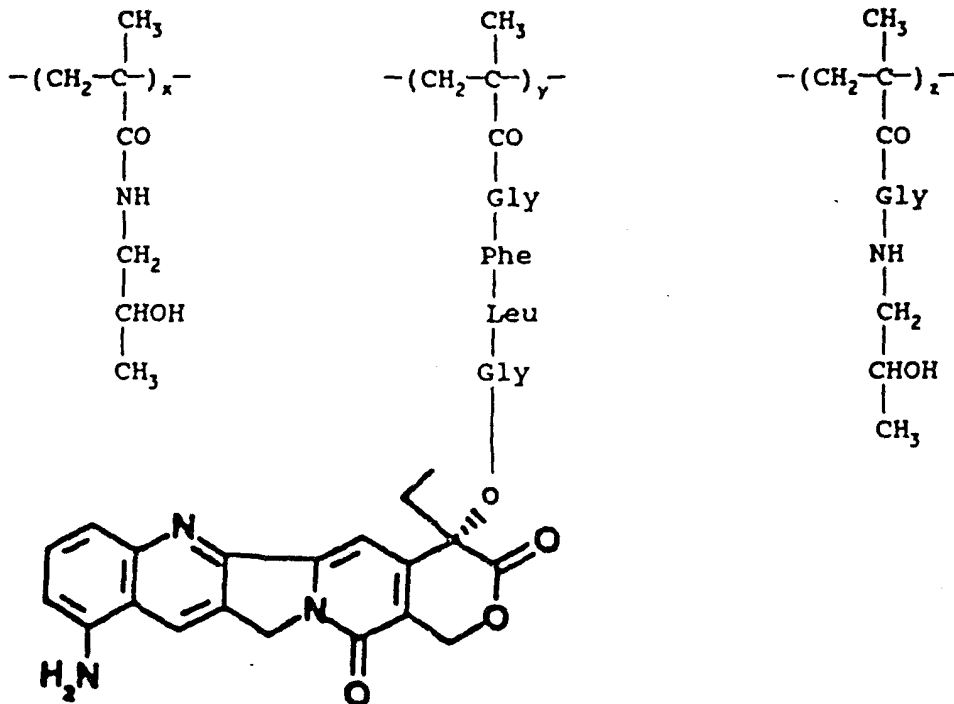
N—(2—羟基丙基) 甲基丙烯酰胺和 N—甲基丙烯酰甘氨酸对硝基苯酯的共聚物 (0.15g, 含有 2.7×10^3 当量的对硝基苯酯) 和按

照在实施例3中描述的那样所制备的20-O-(甘氨酸-L-亮氨酸-L-苯基丙酰胺基)喜树碱(7b, 20mg)在干燥二甲亚砜(1ml)中进行反应, 然后与1-氨基-2-丙醇进行反应(都按照在实施例6中描述的那样), 得到含4.8%W/W喜树碱的标题共轭体A2(0.14g)。在经过血浆培育60小时之后, 共轭体A2释放100%的喜树碱。

实施例7

N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺, 9-氨基-20-O-[N-甲基丙烯酰甘氨酸-L-苯基丙酰胺基-L-亮氨酸甘氨酸]喜树碱和N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰甘氨酸的共聚物

(A3; X=96, Y=3, Z=1)



按照在实施例5中所描述的那样,通过让N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺和N-甲基丙烯酰甘氨酸对硝基苯酯的共聚物(0.15g, 含有 2.7×10^{-3} 当量的对硝基苯酯)和按照在实施例4中描述的那样所制备的9-氨基-20-O-(甘氨酸-L-亮氨酸-L-苯基丙酰胺基)喜树碱(7d, 20mg)在干燥二甲亚砜(1ml)中进行反应,然后与1-氨基-2-丙醇进行反应而制备出标题共轭体。收率0.14g, 含有6.3%W/W9-氨基-喜树碱。在经过血浆培育50小时之后,共轭体A3释放出100%的喜树碱。