

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01803140.4

[51] Int. Cl.

C07F 9/12 (2006.01)
C07C 229/26 (2006.01)
C07C 279/14 (2006.01)
C07C 229/08 (2006.01)
C07C 215/10 (2006.01)
C07C 215/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100338077C

[51] Int. Cl. (续)

C07C 211/14 (2006.01)

C07D 233/61 (2006.01)

C07D 209/20 (2006.01)

A61K 31/66 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.9.12 [21] 申请号 01803140.4

[30] 优先权

[32] 2000.9.14 [33] US [31] 60/232,568

[32] 2000.12.7 [33] US [31] 60/251,921

[86] 国际申请 PCT/US2001/028401 2001.9.12

[87] 国际公布 WO2002/022626 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.14

[73] 专利权人 布里斯托-美尔斯奎比公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 约翰·J·维尼特 曼达·V·戴利
曼尼莎·M·戴利 黄严德
查尔斯·E·达赫尔海姆
拉维德里·W·泰吉瓦尼

[56] 参考文献

WO9216486A 1992.10.1

WO9935159A 1999.7.15

审查员 杨 轶

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

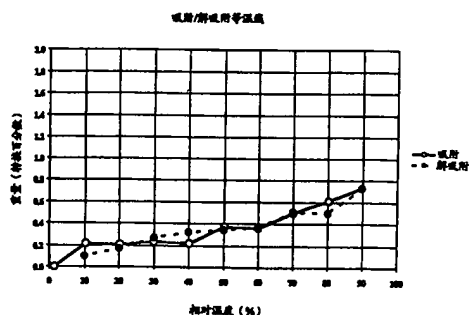
权利要求书 7 页 说明书 62 页 附图 13 页

[54] 发明名称

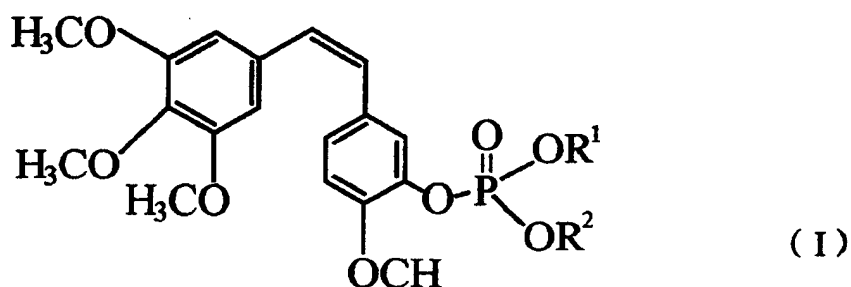
康泼瑞素 A-4 磷酸前体药物单-和双-有机
胺盐,单-和双-氨基酸盐,和单-和双-氨
基酸酯盐

[57] 摘要

本文提供的是新的,有用的康泼瑞素(combretastatin)A-4 前体药物盐,能够增强康泼瑞素(combretastatin)A-4 的可溶性,在正常的生理条件下容易地在体内再生康泼瑞素(combretastatin)A-4,康泼瑞素(combretastatin)A-4 再生的结果是产生了生理可耐受的产物。



1. 一种具有通式 I 的结构化合物:



其中 $-OR^1$ 或 $-OR^2$ 中的一个是 $-O^-QH^+$, 另一个是羟基或 $-O^-QH^+$; 和 Q 是

(A)至少含有一个氮原子的脂族有机胺, 氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ;

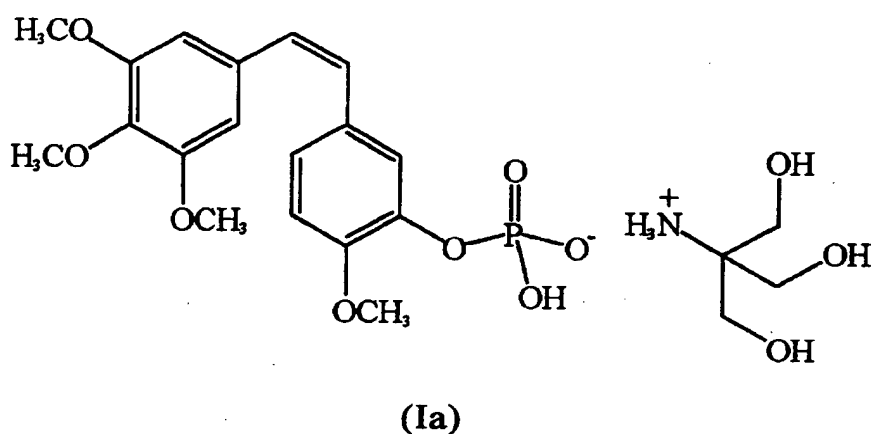
(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ; 或

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且, 氨基酸的所有羧酸基团是酯形式的。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Q 是至少含有一个氮原子的脂族有机胺, 其中氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 。

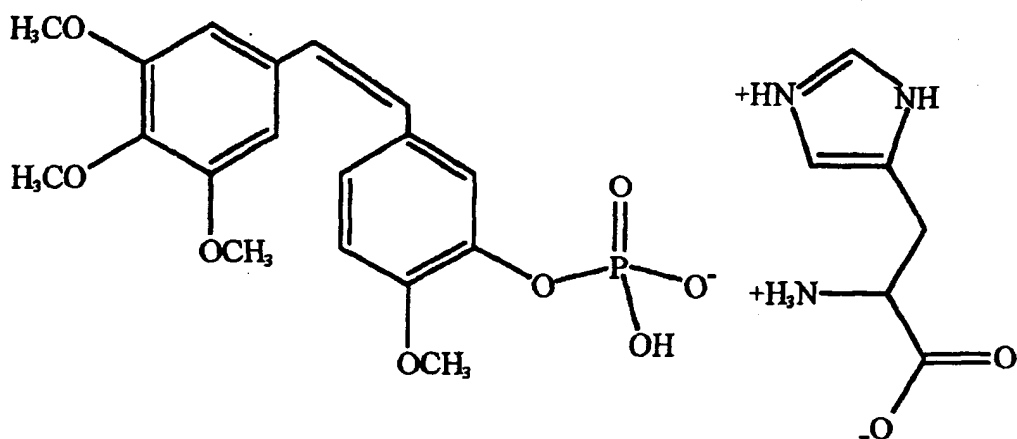
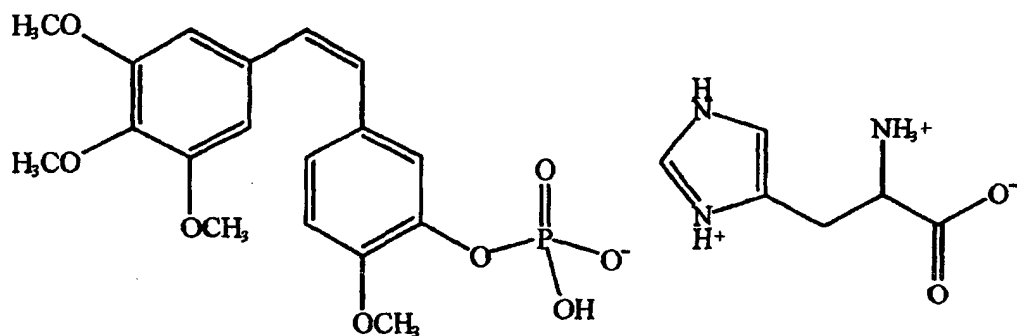
3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中在通式 I 中形成四价铵阳离子 QH^+ 的 Q 的氮是与选择性地取代的脂族基团键合的一级胺或与两个取代脂族基团键合的二级胺, 其中备选的取代基是一个或多个羟基或氨基。

4. 根据权利要求2所述的化合物，其中所述的脂族有机胺选自氨丁三醇，二乙醇胺，葡糖胺，N-甲基葡糖胺，乙二胺，2-(4-咪唑)乙胺。
5. 根据权利要求2所述的化合物，其中所述的化合物具有通式 Ia 的结构：



6. 根据权利要求1的化合物，其中 Q 是至少具有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和质子形成四价铵阳离子 QH^+ 。
7. 根据权利要求6的化合物，其中所述的氨基酸选自组氨酸，赖氨酸，色氨酸，精氨酸，鸟氨酸，脯氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，羟脯氨酸。

8. 根据权利要求 6 所述的化合物, 其中所述的化合物具有如下结构中的一种:



9. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 Q 是含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中这些氮原子中的一个和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且进一步地, 氨基酸的所有羧酸基团是酯形式。
10. 根据权利要求 9 所述的化合物, 其中 Q 是甘氨酸 C_{1-6} 烷基酯。

11. 一种药物组合物，含有：

(a)具有权利要求 1-10 中的任何一种所述的化合物；以及

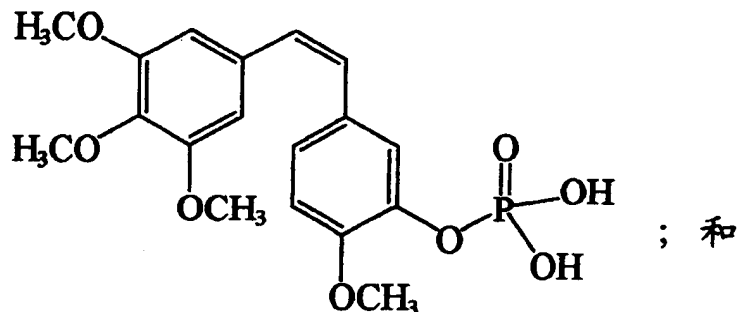
(b)其药物可接受载体。

12. 根据权利要求 11 的药物组合物，其中用氢氧化钠以外的试剂调节 pH。

13. 权利要求 1-10 之任一项所述的化合物在制备在动物中调节肿瘤生长或转移的药物中的应用。

14. 混合化合物形成的组合物，包括：

(a)具有下面结构的 CA4P 游离酸：



(b)化合物 Q，其中 Q 是

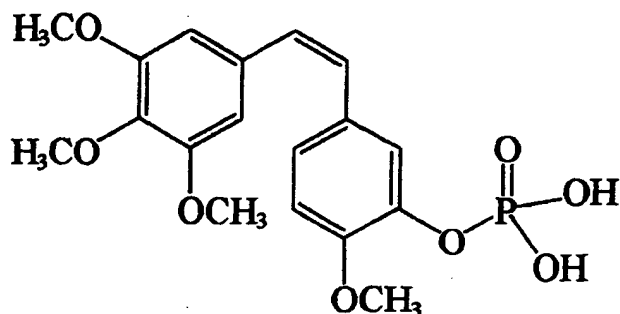
(A)至少含有一个氮原子的脂族有机胺，氮原子能够和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；或

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 和其中另外，氨基酸的所有羧酸基团是酯形式。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物，其中 Q 是至少含有一个氮原子的脂族有机胺，氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 。
16. 根据权利要求 15 所述的组合物，其中所述的脂族有机胺选自氨丁三醇，二乙醇胺，葡糖胺，N-甲基葡糖胺，乙二胺，2-(4-咪唑)乙胺。
17. 根据权利要求 14 所述的组合物，其中 Q 是至少含有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子能够与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 。
18. 根据权利要求 17 所述的组合物，其中所述的氨基酸选自组氨酸，赖氨酸，色氨酸，精氨酸，鸟氨酸，脯氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，羟脯氨酸。
19. 根据权利要求 14 所述的组合物，其中 Q 是含有一个或多个氮原子的氨基酸，其中这些氮原子中的一个和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ，并且进一步地，氨基酸的所有羧酸基团是酯形式。
20. 根据权利要求 19 所述的组合物，其中 Q 是甘氨酸 C_{1-6} 烷基酯。
21. 根据权利要求 14-20 之一所述的组合物，进一步包括一种药物可接受载体。

22. 一种制备根据权利要求 1 所述的化合物的方法，包括步骤：
在溶剂中将具有下面结构的 CA4P 游离酸与化合物 Q 接触：



其中，Q 是

- (A)至少含有一个氮原子的脂族有机胺，氮原子能够和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；
- (B)至少含有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；或
- (C)含有一个或多个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 和其中另外，氨基酸的所有羧酸基团是酯形式。
23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述的根据权利要求 1 的化合物以结晶的形式从所述的溶剂中沉淀。
24. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述的脂族有机胺选自氨丁三醇，二乙醇胺，葡糖胺，N-甲基葡糖胺，乙二胺，2-(4-咪唑)乙胺。
25. 根据权利要求 22 所述的方法，其中将所述的 CA4P 游离酸与作为所述溶剂的异丙醇水溶液中的氨丁三醇接触，接着从所述的溶剂中回收结晶形式的 CA4P 单氨丁三醇盐。

-
26. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述的 CA4P 游离酸与在作为所述溶剂的异丙醇中的组氨酸接触,接着从所述溶剂中以结晶形式回收 CA4P-单-L-组氨酸盐。
27. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述的 CA4P 游离酸与甘氨酸 C₁₋₆ 烷基酯接触。

康泼瑞素 A-4 磷酸前体药物单-和双-有机胺盐，单-和双-氨基酸盐，和单-和双-氨基酸酯盐

本申请要求 2000 年 9 月 14 日递交的美国申请系列编号，60/232,568 和 2000 年 11 月 7 日递交的美国申请系列编号 60/251,921 的优先权，这两个临时申请以全文引入本文作为参考。

本发明的领域

本发明涉及新的，有用的康泼瑞素 (combretastatin) A-4 (CA4) 磷酸前体药物单-和双-有机胺盐，单-和双-氨基酸盐，和单-和双-氨基酸酯盐，它的盐比天然康泼瑞素 (combretastatin) A-4 的溶性更大，并且能够在生理条件下快速再生康泼瑞素 (combretastatin) A-4。

本发明的背景

癌症被认为是严重的，弥漫性疾病。国家癌症研究院已经估计，仅仅在美国，3 分之 1 的人将在生命里受到癌症的攻击。另外，约 50% 到 60% 的患癌症的人最终死于该疾病。所以，自从国家癌症研究院在 1970 年建立，患癌症的人数急剧增加。

虽然癌症通常认为是单一的疾病，但它确实包括一个疾病的族，其中正常的细胞分化改变了，以致它变成不正常的和不受控制的。结果是，这些恶性细胞快速繁殖。最终，这些细胞从它们的起源点传播或转移，并寄居在其他器官中，最终杀死他们的寄主。因为目前已经观察到了许多种癌症，许多破坏体内癌症的方

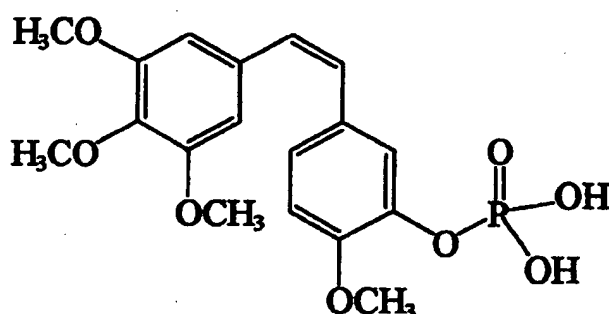
案已经开发。一个这样的方法利用了细胞毒性化学治疗。为了破坏恶性细胞，留下正常的，未受影响的健康细胞，将这些化合物对癌症患者给药。这样的化合物的特别的例子包括 5-氟尿嘧啶，顺铂和甲氨蝶呤。

康泼瑞素(Combretastatin)A-4 最初是从非洲树 *combretum caffrum*(*combretaceae*)的树干中分离的，并且发现是潜在的微管蛋白群体的抑制剂。另外，康泼瑞素(Combretastatin)A-4 发现明显对美国国家癌症科学院 (NCI) 小鼠 L1210 和 P338 淋巴细胞白血病细胞系有活性。另外，发现康泼瑞素(Combretastatin)A-4 与作为结合微管蛋白的秋水仙素的抑制剂的从 *combretum caffrum* 分离的另一个化合物康泼瑞素(Combretastatin)A-1 竞争。也已经确定，它可以大大抑制 VoLo, DLD-1 和 HCT-15 人结肠的癌症 (ED₅₀ < 0.01(微克/毫升)细胞系，并且是 *combretum caffrum* 成分中发现的更强的抗有丝分裂的试剂(美国专利 4, 996, 237)。

后来又进行了研究确定在治疗各种人的癌症中，康泼瑞素(Combretastatin)A-4 作为化学治疗剂的效力。不幸的是，康泼瑞素(Combretastatin)A-4 基本上在水里是不溶的。这一特征已经明显地影响了包括康泼瑞素(Combretastatin)A-4 的药物组合物的开发。为了增强它的可溶性和效力，已经做了工作生产在生理条件下再生康泼瑞素(Combretastatin)A-4 的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 前体药物衍生物。例如，Koji Ohsumi 等人叙述了，康泼瑞素(Combretastatin)类似物的氨基酸 HCl 的前体药物的合成，其中氨基酸盐附着于含有碱性氨基的康泼瑞素(Combretastatin)衍生物的氨基基团上(衍生物如 Ohsumi 等人，抗癌药物设计，14 卷，539-548 (1999 年)所述)。虽然与天然的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 相比，这样的前体药物可能可溶性增强，但他们具有内在的限制，因为康泼瑞素

(Combretastatin)A-4 的再生依赖于给药前体药物的受试者的血液中的内源的氨基肽酶。

康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸的游离酸 (“CA4P 游离酸”) 具有的结构如下:



是以油体的形式存在的。在 25 度的水中, CA4P 游离酸内在地是很轻微地可溶的 (由 USP 定义), 提高 PH 值时, 水溶性增加。它具有两个 pKa 值为 1.2 和 6.2 的酸性基团, 可以调节形成盐。正如物理状态下控制 CA4P 的游离酸的实验所述, 鉴定这一化合物的结晶的, 稳定的盐形式是需要的。

派生康泼瑞素(Combretastatin)A-4 的工作已经包括形成康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸的衍生物 (“CA4P” 的盐衍生物)。这样的盐的特别例子如美国专利 5, 561, 122 所述, 虽然这些前体药物盐比天然康泼瑞素(Combretastatin)A-4 具有更大的可溶性, 它们也具有内在的缺点, 如吸湿性。

吸湿性是选择盐的几个重要原则之一。参见 K.Morris 等人, “选择新药物候选物的最佳盐形式的合并途径”, Int.J.Pharm., 105 卷, 209-217 (1994 年)。任何药物物质的吸湿性已经明显影响了药物产品的寿命的控制和稳定性。

因此,需要的是新的,有用的具有有利的生理化学特性的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 前体药物的盐,这样在治疗各种肿瘤紊乱中增强康泼瑞素(Combretastatin)A-4 的可溶性,优选地效力。

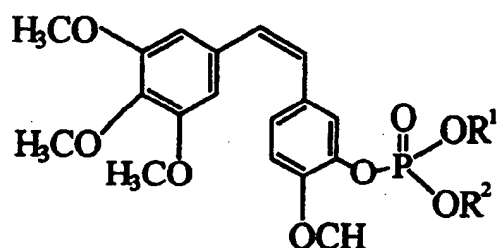
同样需要的是新的有用的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 前体药物,能够在体内再生天然的康泼瑞素(Combretastatin)A-4,当再生时不产生不需要的或潜在的有害的副作用。

本文引证的任何参考文献不应该认可成参考文献是本申请的“现有技术”。

本发明的概述

本发明提供了新的,有用的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸前体药物,单和双有机胺盐,单和双氨基酸盐,和单和双-氨基酸酯盐,它的盐比天然康泼瑞素(Combretastatin)A-4 具有更大的可溶性,容易在体内再生康泼瑞素(Combretastatin)A-4。本发明也提供了吸湿性明显比已知的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 前体药物盐小(例如,大气条件下的温度和湿度时,没有生理形式的明显变化),控制和稳定性提高,在注射点降低或消除疼痛的pH 下形成溶液。本发明的化合物所以提供了具有相当大优点的药物用途。

从广义上说,本发明扩展到了具有通式 I 的一般结构的化合物:



(I)

其中-OR1 或-OR2 中的一个是-O-QH⁺, 另一个是羟基或-O-QH⁺; Q 是

(A)至少含有一个氮原子的有机胺, 氮原子与质子一起形成四价的铵阳离子 QH⁺;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子形成四价的铵阳离子 QH⁺; 或

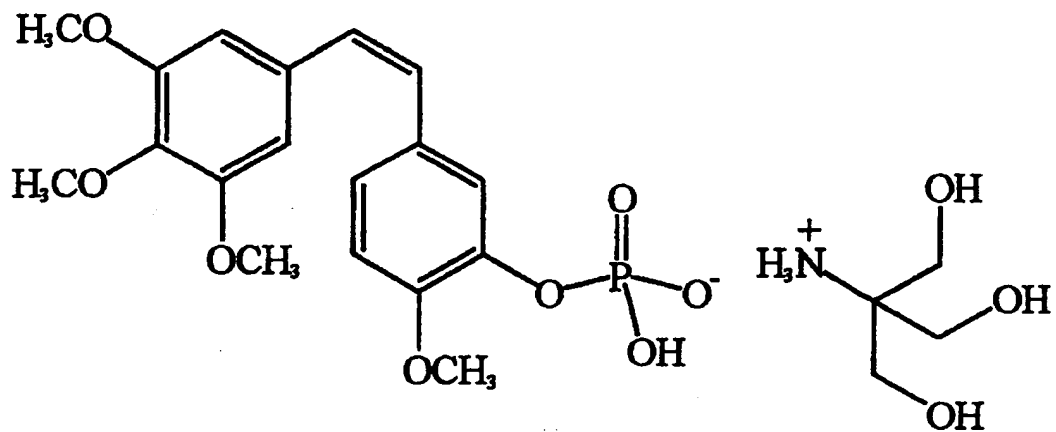
(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子形成四价的铵阳离子 QH⁺, 并且氨基酸的所有羧酸基团是酯形式的。

在整个本说明书中, -OR1 和-OR2 是-O-QH⁺, Q 优选地与-OR1 和 OR2 基团相同。

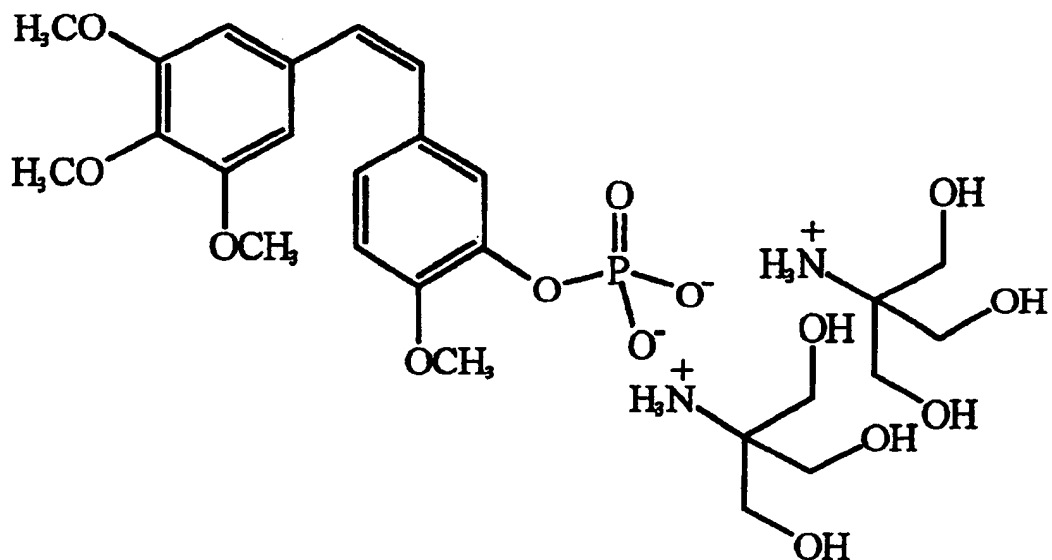
当 Q 具有 (A) 的定义时, 具有本文用途的优选的有机胺是氨丁三醇 (即, 三 (羟甲基) 甲胺, 缩写为 “TRIS”)。

通式 I 的氨丁三醇盐是通过下面的通式 Ia 和 Ib 说明的, 各表示通式 I 的单氨丁三醇和二氨丁三醇盐:

Ia



Ib

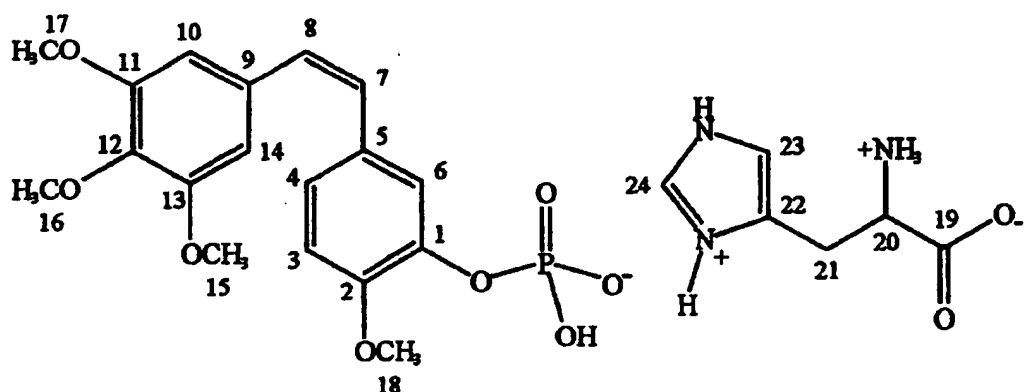


通式 Ia 的单氨丁三醇是优选的。

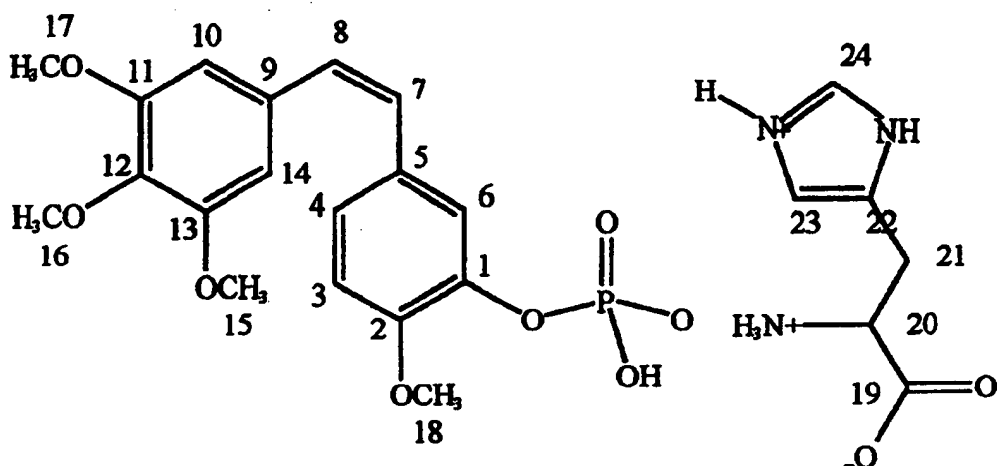
当 Q 具有定义 (B) 时, 任何至少具有两个氮原子的氨基酸具有本文的应用。任何氨基酸的氮可以形成通式 I 的四价铵阳离子, 例如, 任何氨基酸侧链上的氮或 α -氨基基团上的氮。具有本文应用的氨基酸包括, 但不限于鸟氨酸, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 色氨酸等等。

当 Q 具有定义 (B) 时, 具有本文应用的优选的氨基酸是组氨酸。例如, 组氨酸侧链的咪唑基团的氮, 或者, 组氨酸的 α -氨基基团的氮可以形成通式 I 的四价铵阳离子。正如容易理解的, 由于咪唑基团的芳香特性, 组氨酸侧链的咪唑基团的氮可以形成通式 (I) 的结构。通式 I 的优选的单组氨酸结构在下面的通式 Ic 或 Id 中说明了:

Ic



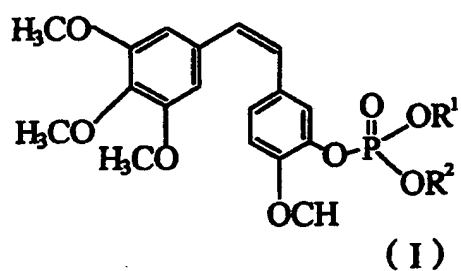
Id



当 Q 具有定义 (C) 时, 任何氨基酸具有本文的应用, 如但不限于甘氨酸。优选的酯是烷基酯如甲基或乙基酯。

另外, 本发明扩展到含有下面物质的药物组合物:

(a) 具有通式 I 的结构式的化合物:



其中:

$-OR^1$ 或 $-OR^2$ 的一个是 $-O^-QH^+$, 另一个是羟基或 $-O^-QH^+$, Q 是

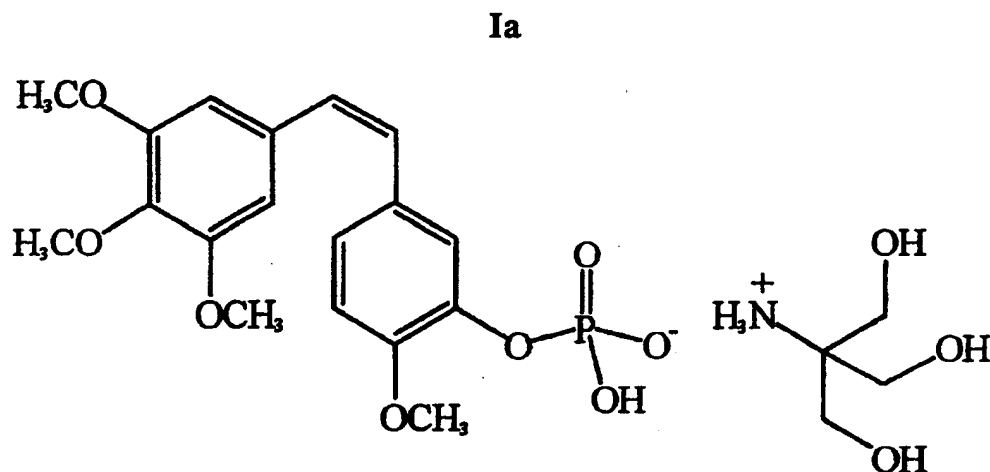
(A)至少含有一个氮原子的有机铵, 氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ; 或

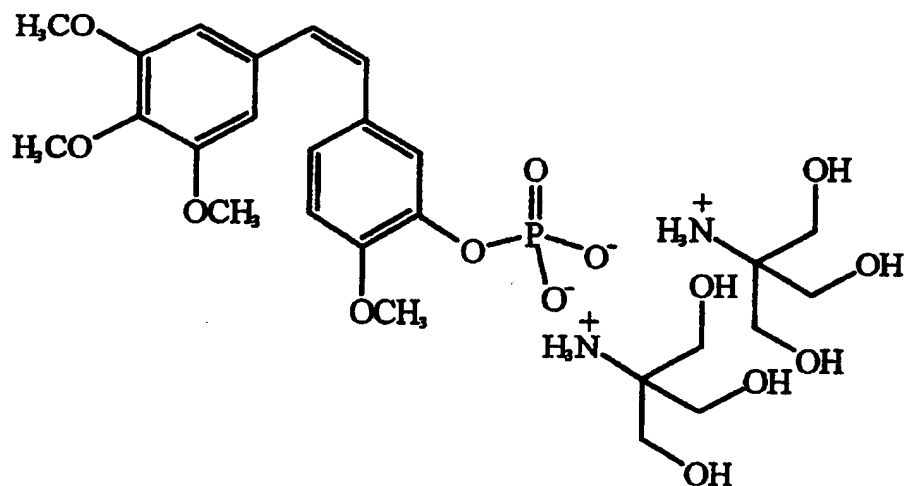
(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 并且其中另外, 氨基酸的所有羧基团是酯形式; 和

(b)其药物组合物。

在这样的药物组合物中具有应用的特定的本发明的化合物的例子如上所述。另外, 任何适当的药物可接受载体可用于本发明的药物组合物中。特定的实施例如下所述。本发明的药物组合物的特定实施方案包括本发明的化合物, 其中氯丁三醇是有机氯, 优选地是具有通式 Ia 或 Ib 的结构式最优选地 Ia 的氯丁三醇盐:

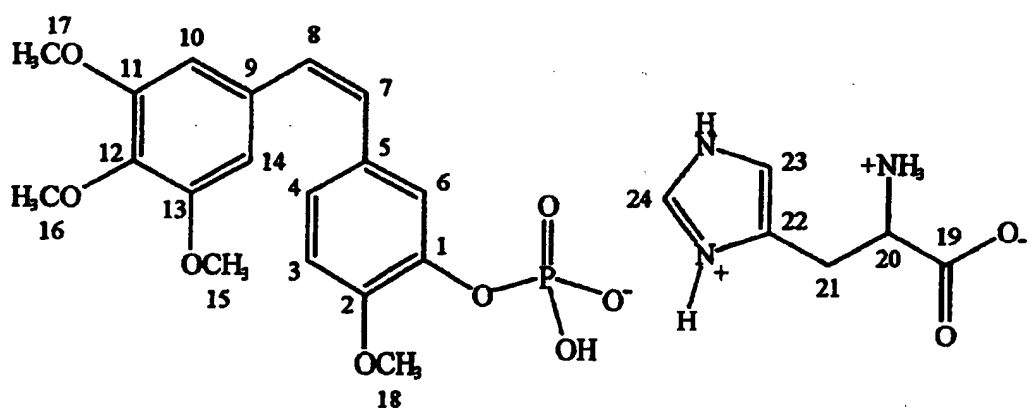


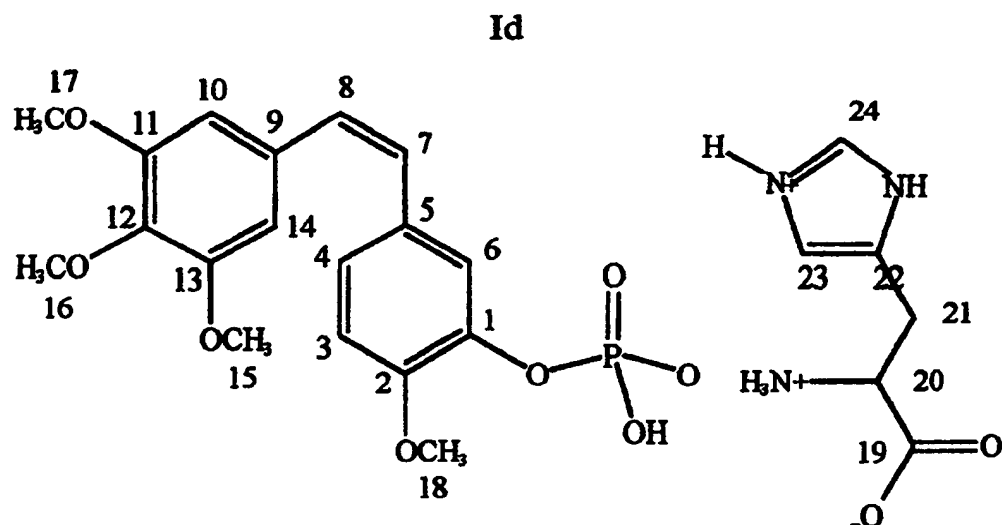
Ib



本发明的药物组合物的另一个特定的实施方案包括组氨酸是氨基酸，优选地是具有通式 Ic 或 Id 的单组氨酸盐的本发明的组合物：

Ic

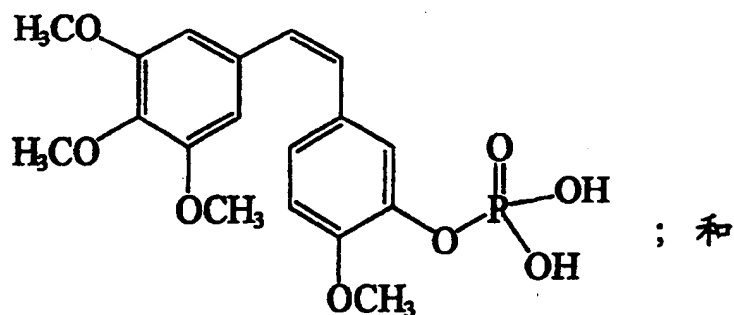




当然，这样的药物组合物将进一步包括药物可接受载体。

另外，本发明进一步扩展到包括本发明的盐的组合物。特别是，本发明的组合物可以通过混合下面化合物形成：

(a)具有下面结构的 CA4P 游离酸：



(b)化合物 Q，其中 Q 是：

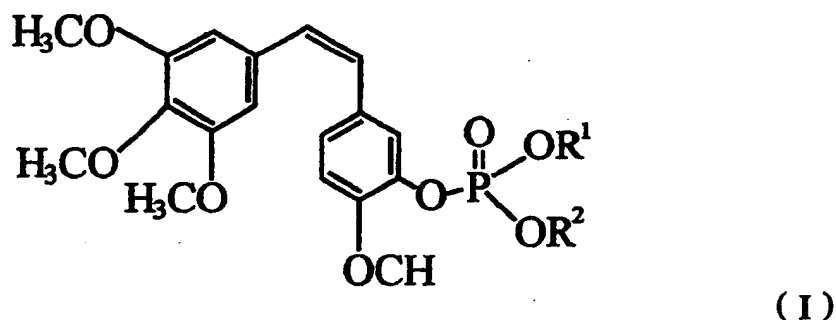
(A)至少含有能够与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 的一个氮原子的有机胺；

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子和一个质子形成四价铵阳离子 QH^+ ；或

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和一个质子形成四价铵阳离子 QH^+ 并且, 其中另外所有氨基酸的羧酸基团是酯形式。或者, 本发明的组合物可以进一步包括药物可接受载体。

另外, 当 Q 具有定义 (A) 时, 任何本文定义的有机胺具有本发明的组合物的应用。特别的例子包括, 但不限于, 氨丁三醇, 二乙醇胺, 葡糖胺, N 甲基葡糖胺, 乙二胺, 和 2-(4-咪唑) 乙胺。当 Q 具有定义 (B) 时, 任何至少具有两个氮原子的氨基酸具有本发明的组合物中的应用。特别的例子包括鸟氨酸, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 色氨酸等等。当 Q 具有定义 (C), 如本文定义的任何氨基酸酯具有本发明的组合物中的应用。特别的例子包括甘氨酸。

在另一个实施方案中, 本发明扩展到调节动物中的肿瘤生长或转移的方法, 包括给药有效量的具有下面通式的化合物:



其中:

一个 OR^1 或 OR^2 是 $-\text{O}^-\text{QH}^+$, 和另一个是羟基或 $-\text{Q}^-\text{QH}^+$; 和 Q 是

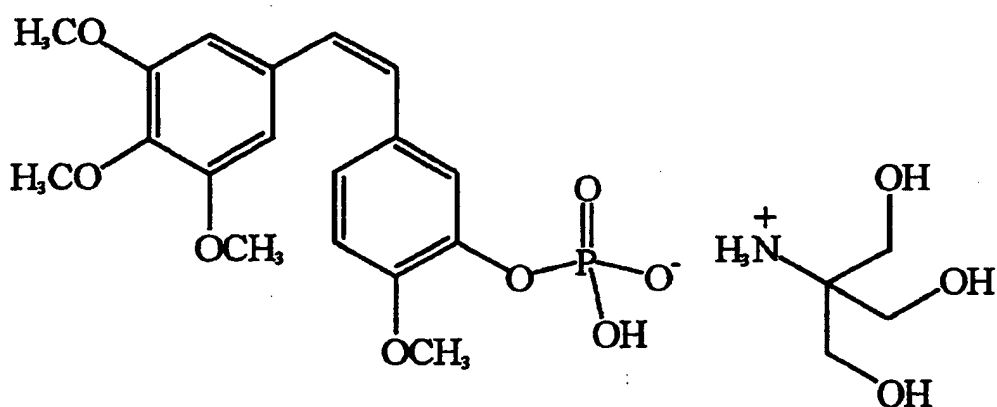
(A)至少含有一个氮原子的有机胺, 氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和一个质子形成四价阳离子 QH^+ ; 或

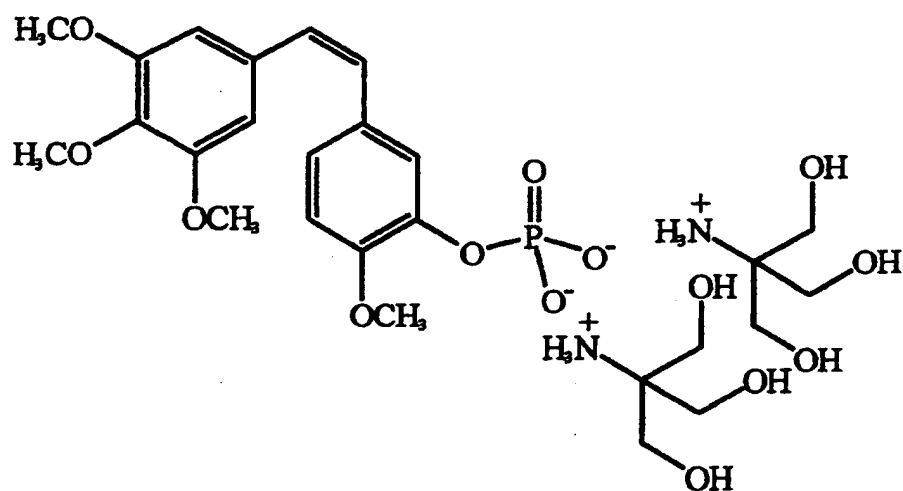
(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和一个质子形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且其中另外所有氨基酸的羧酸基团是酯形式。

在特定的实施方案中, 本发明扩展到调节动物中肿瘤生长或转移的方法, 包括给药有效量的化合物, 其中氨丁三醇是有机胺, 并且优选地是具有下面通式 Ia 或 Ib, 最优选地是 Ia 的结构氨丁三醇盐:

Ia

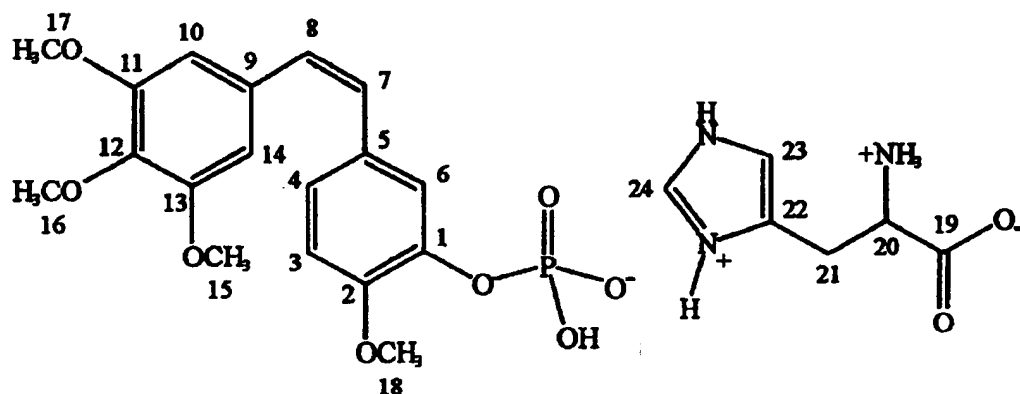


Ib

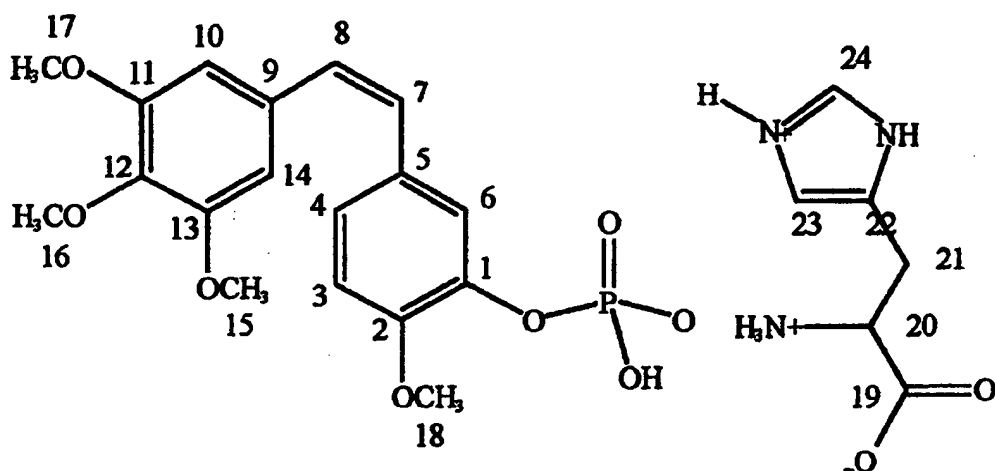


在另一个特定的实施方案中，本发明扩展到调节动物中肿瘤生长或转移的方法，包括给药有效量的化合物，其中组氨酸是氨基酸，并且优选地是具有通式 Ic 或 Id 的结构单组氨酸盐：

Ic



Id



因此，本发明提供了新的有用的康波瑞素（Combretastatin）A4 磷酸前体药物单-和双-有机胺盐，单-和双-氨基酸盐和单-和双-氨基酸酯盐，其盐比天然康波瑞素（Combretastatin）A4 在水溶液中更可溶。所以，这一药物的效力可以增强。

本发明也提供了康泼瑞素 (Combretastatin) A4 磷酸前体药物单-和双-有机胺盐, 单-和双-氨基酸盐和单-和双-氨基酸酯盐, 其盐容易在体内再生康泼瑞素 (Combretastatin) A4, 在离解的基础上, 其盐释放有机胺, 氨基酸或作为生理可耐受的副产物的氨基酸酯。

在最优选的实施方案中, 本发明提供了新的具有通式 Ia 的抗微管抗肿瘤试剂康泼瑞素 (Combretastatin) A4 磷酸前体药物的晶体 1: 1 氨丁三醇 (TRIS) 盐。这一化合物是磷酸酯前体药物盐, 其中磷酸成分在生理条件下进行脱磷酸化产生活性药物成分, 康泼瑞素 (Combretastatin) A4 (如下面提到, 连接康泼瑞素 (Combretastatin) A4 的核心的苯基成分的烯烃基团是顺式构型的; 优选的康泼瑞素 (Combretastatin) A4 磷酸的单 TRIS 盐的烯烃基团是相似的顺式构型)。CA4P 的 1: 1 (单) TRIS 盐具有良好的固态特性并且出乎意料地是非吸湿的。这一和其他有利的特性使 CA4P 的 TRIS 盐成为优选的药物剂量配方化合物。

附图的简要说明

图 1 显示了 25 度时 CA4P (实施例 1 中制备) 的单-TRIS 盐的水分吸收/解吸收方案。数据是利用在 10% 的增长中具有 10% 到 90% 的相对湿度水平的 VTI 型 MB-300W Moisture Balance 得到的。每个湿度下最大的平衡时间定为 4 小时。

图 2 显示了 CA4P (实施例 1 制备的) 的单-TRIS 盐的样品的粉末 X 射线衍射图样, 它在不同的溶剂中 (水, 异丙醇, 乙醇, 丙酮) 糖浆化, 起初在 70 度到 75 度 5 到 10 分钟, 然后在室温过夜。用 Rigaku 型 Miniflex X 射线衍射仪记录 X 射线衍射图, Cu-K α 源, 扫描速度为 1 度/分钟, 从 2 度到 40 度 2θ 。

图 3 表示了加热速度为 10 度/分钟的氮流下得到的 CA4P 单-TRIS 盐（实施例 1 中制备）的差示扫描量热器（DSC）热图（DSC2910 型，TA 仪器）。

图 4 显示 25 度时 CA4P（实施例 1 中制备）的单 TRIS 盐的 pH 可溶性图谱。用氢氧化钠调节 pH。

图 5 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸盐（实施例 3 制备（2.0900mg 样品大小））的差示扫描量热器（DSC）热图。

图 6 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸盐（实施例 3 中制备）的差示扫描量热器（DSC）热图。

图 7 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸盐（实施例 3 中制备）的差示扫描量热器（DSC）的热图。

图 8 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸盐（实施例 3 中制备）的粉末 X 射线衍射图谱。

图 9 表示了 CA4P 的单-L 组氨酸盐（实施例 3 中制备）的粉末 X 射线衍射图样。

图 10 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸盐无水盐（实施例 3 制备）的差示扫描量热器（DSC）热图。

图 11 表示了 CA4P 的单-L-组氨酸无水盐（实施例 3 制备）的粉末 X 射线衍射图样。

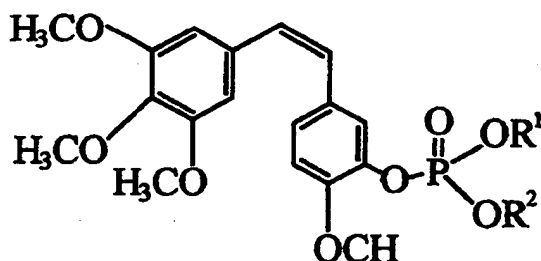
图 12 表示了 CA4P 单甘氨酸甲基酯盐（实施例 4 制备）的差示扫描量热器（DSC）热图。

图 13 表示了 CA4P 单甘氨酸甲基酯盐(实施例 4 中制备)的粉末 X 射线衍射图样。

本发明的详细说明

本发明是基于这样的发现, 惊人而出乎意料地, 形成了单-和双-有机胺, 单-和双-氨基酸和单和双-氨基酸酯康波瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸前体药物盐, 这些盐相对于天然康波瑞素(Combretastatin)A-4 的可溶性, 其体内可溶性已经增强, 并且这些盐容易在生理条件下再生康波瑞素(Combretastatin)A-4, 在再生过程中, 产生生理可耐受有机胺, 或生理可耐受氨基酸或在体内容易转移的氨基酸酯。

从广义上说, 本发明扩展到具有下面通式的化合物:



其中:

-OR¹ 或 -OR² 中的一个是 -O⁻QH⁺, 另一个是羟基或 -O⁻QH⁺;
和 Q 是

(A)至少含有一个氮原子的有机胺, 和质子一起形成四价铵阳离子 QH⁺;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH⁺; 或

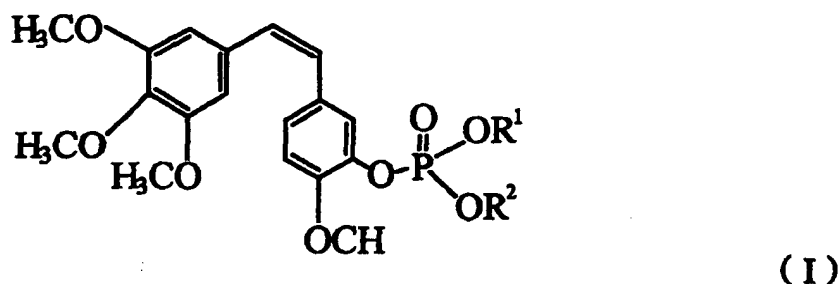
(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且其中另外, 氨基酸的所有羧酸基团是酯形式的。

本化合物的所有异构体(例如, 由于在各种取代基上的不对称碳而可能存在的那些), 包括对映体形式和非对映体形式是本发明的关注的范围。本发明的化合物的个别立体异构体例如可以是基本无其他异构体的(例如, 作为纯净的或基本纯净的具有特别活性的光学异构体), 或可以例如作为消旋体或和所有其他或其他选定的立体异构体混合。本发明的手性中心可以具有如 IUPAC 1974 的介绍定义的 S 或 R 构型。消旋形式可以通过物理方法例如非对映体衍生物的分级结晶, 分离或晶体化或通过手性柱层析来分离。个别光学异构体可以通过适当的方法从消旋体得到。连接康泼瑞素(Combretastatin) A-4 核心的苯基成分的烯基团是在顺式构型中, 优选地是本发明的化合物的构型。利用术语“康泼瑞素(Combretastatin) A-4”或“CA4”作为本文的化合物的名称是指这一顺式构型中的化合物。通式 I 的化合物的溶剂化物如水合物是本文所关注的。

在整个说明书中, 可以选择基团和取代基提供稳定的成分和化合物。作为例证或优选的本文中实施的实施方案只打算用于说明, 而不作为限制。

在另一个实施方案中, 本发明扩展到包括本发明的化合物的药物组合物, 和其药理可接受载体。基本上, 本发明的化合物可以任何形式利用, 人下面进一步叙述的固体或溶液(特定地水溶液)形式。可以得到例如化合物, 并以单独或含有适当的添加剂的冻干形式利用。

仍然是另一个实施方案，本发明扩展到在动物中调节肿瘤生长或转移的方法，包括给药有效量的具有通式 I 的结构式的化合物：



其中： $-OR^1$ 或 $-OR^2$ 的一个是 $-O^-QH^+$ ，另一个是羟基或 $-O^-QH^+$ ；和 Q 是

(A)至少含有一个氮原子的有机胺，氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ；

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸，其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ，并且其中所有氨基酸的羧酸基团是酯形式。

当然，本发明的化合物可以单独或药物组合物形式给药。

本文利用的术语和短语定义如下，并且除非特别说明，具有指示的定义。

如本文所用，术语“调节”指改变特定过程发生的速度，抑制特定的过程，逆转特定的过程和/或防止特定过程的启动。所以，例如，当特定的过程包括肿瘤生长或转移时，过程中的“调节”

包括在易于出现这样的过程的受试者中降低肿瘤生长和/或转移发生的速度,抑制肿瘤生长和或转移,逆转肿瘤生长和/或转移(包括肿瘤收缩和/或发散)和/或防止肿瘤生长和/或转移。

如本文所用,对动物给药的化合物的“有效量”或“其有效的量”的术语是在动物中足以调节肿瘤生长或转移的量。本领域的普通技术人员可以容易地确定例如,利用常规技术对动物给药的本发明的化合物的有效量。对成人的剂量的例子是每天约 0.05 到约 1000 毫克/公斤体重的活性化合物,这一剂量可以单个剂量(例如,在最大耐受剂量或以下的大丸剂或长时间的浸剂)或分开的剂量形式(例如,作为最大耐受剂量下的连续的剂量)如每天 1 到 4 次。容易理解的是对于任何特定的受试者,特定的剂量水平和剂量频度是可以变化的,并且将依赖于各个因子,包括利用的特定的化合物的活性,转移的稳定性,和化合物作用的时间长度,受试者的种类,年龄,体重,健康,性别,和饮食,给药的方式和时间,排泄的速度,药物的结合,和特定症状的严重程度。

如本文所用,术语“动物”优选地包括受试者如家养动物,最优选地是人。

如本文所用,术语“前体药物”指将在体内进行转移活动产生活性药物的前体化合物。所以例如,对受试者给药的本发明的化合物将进行转移活动,并且由于本发明的化合物的离解例如,通过血浆中的内源非特异磷酸酶的作用而再生康泼瑞素(Combretastatin) A-4。

如本文所用,术语“有机胺”指至少含有一个一级(即, $-\text{NH}_2$), 二级(即, $-\text{NH}-$)或三级(即, $-\text{N}-$)胺基团的有机(即, 含碳)的化合物,胺基团在本发明的通式的化合物中

能够形成磷酸盐。当在所述的有机胺中存在不止一个一级，二级和/或三级胺基团，任何能够这样的基团可以形成通式 I 的四价铵基团 QH^+ 。本定义“有机胺”不包括氨基酸化合物（参见 2000 年 9 月 14 日，Venit 递交的，美国申请系列编号 60/232, 568，标题为“康波瑞素（Combretastatin）A-4 酪酸单-和双-氨基酸盐前体药物”的暂定申请，全文引入作为参考），也不包括 WO99/35150 中所述的一些化合物（葡糖胺，哌嗪，哌啶，6'-甲氧基-辛可基-9-ol，吡唑，吡啶，四环素，咪唑，腺嘌呤，微拉帕米，吗啉），全文引入作为参考。利用的有机胺优选地是生理可耐受化合物，化合物选自下面的组：

(a) pK_a 大于或等于 7，更优选地 pK_a 大于或等于 8 的有机胺；

(b) 有机胺，其中在通式 I 中形成四价铵阳离子 QH^+ 的氮与备选的取代脂肪烃基结合，或与备选的取代杂环非芳香结合（或在二级或三级胺中的两个或三个这样的备选取代脂肪烃基和/或杂环非芳香基团）。“脂肪烃基”是直的或分支链，在链中具有 1 到 20，优选地 1 到 20，更优选地 1 到 6 个碳原子的饱和或非饱和烃（例如烷烃，烯烃或炔烃）。“杂环非芳香基团”指在通式 I 中含有形成四价铵阳离子 QH^+ 的氮的饱和或部分非饱和环，以及备选地环中的其他杂环原子如 O，S 或其它 N 原子。“备选取代基”优选地是提供有机胺的一个或多个取代基，有机胺当用于本发明的通式 I 时导致通式 I 的磷酸盐，他们是晶体和基本上是非吸湿或非吸湿的。优选地“备选取代基”包括羟基，胺（即， $-\text{NH}_2$ ），烷氧基（即， $-\text{O}-$ 烷基）基团，最优选地一个或多个羟基基团；和/或

(c) 有机胺，其中在通式 I 中形成四价铵阳离子的氮是与备选的取代脂肪烃基结合的一级胺，或与两个备选取代脂肪烃基结合

的二级胺，其中优选的备选取代基是一个或多个羟基或氨基基团，最优选地是羟基基团。

当然，任何选择作为用于本发明的优选的胺的给定有机胺可以具有上面所述的两个或多个基团(a)到(c)的特性(例如，具有大于或等于7的pKa，和具有备选的如(c)中所述的取代脂肪胺。

这样定义的任何有机胺是适用于本发明的通式I的化合物中的以及本药物组合物和方法中的。术语“有机胺”包括含有其他酸性和/或碱性成分的盐形式的化合物(其中例如，一个胺基团形成通式I的磷酸盐和另一个胺基团形成含有酸成分的盐)。所以，包括在本发明的化合物中的有机胺的残余也可以含有盐成分。

例证的有机胺包括但不限于，氨丁三醇，二乙醇胺，葡糖胺，N甲基葡糖胺，乙二胺，和2-(4-咪唑基)乙胺。

通式I的康泼瑞素(Combretastatin)A-4磷酸“单-有机胺”盐含有作为如上定义的 R^1 或 R^2 部分的一个有机胺基团Q；通式I的康泼瑞素(Combretastatin)A-4磷酸“双-有机胺”盐含有两个有机胺基团Q，如上定义的一个部分 R^1 和一个部分 R^2 。通式I的“单-有机胺”盐是优选的。相关的定义利用了“单-氨基酸”，“双-氨基酸”，“单-氨基酸酯”和“双-氨基酸酯”。

任何适当的氨基酸具有本文的应用包括具有本发明的化合物中的应用的许多天然和非天然氨基酸。特定的例子包括但不限于鸟氨酸，组氨酸，赖氨酸，精氨酸，和色氨酸，只有几个。

如本文所用，术语“氨基酸”指含有碱性氨基基团(NH_2)和酸性羧酸基团(COOH)的化合物，包括这样的两性离子形式

(其中氨基和羧基一起形成两性盐或内盐), 或含有其它酸性和/或碱性成分的盐形式(其中例如, 氨基酸含有羧酸基团和 α -COOH基团, 并且该形式是含有碱性金属的盐形式)的化合物。所以, 在本发明的化合物内包括的氨基酸残余也可以含有盐成分。该术语包括非天然的, 以及天然的氨基酸, 如 α 氨基酸(特别是L-氨基酸), 其中的许多是蛋白质的建筑块。术语“天然氨基酸”指所有蛋白质中常见的20个氨基酸, 即, 甘氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 半胱氨酸, 甲硫氨酸, 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸。术语“非天然氨基酸”指通常所有蛋白质中不存在的氨基酸, 如4-羟基脯氨酸, 5-羟基赖氨酸, N-甲基赖氨酸, γ -羧基谷氨酸, 硒代胱氨酸, 鸟氨酸和瓜氨酸。当Q具有定义(B)时, 具有两个或多个氮原子的氨基酸适用于本发明的通式I的化合物, 以及本药物组合物和方法。

如本文所用, 关于氨基酸的术语“侧链”是与各个氨基酸不同的氨基酸的成分, 特别是结合于连接氨基酸的 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ 基团的碳的基团。

如本文所用, 参照化合物, 术语“实际非吸湿”指在下面的条件下: 温度约25度, 相对湿度20%到95%, 和在平衡条件(即, 在水分吸收和解吸的速度已经平衡的时测定)下测定, 相对于在25度和0%的相对湿度条件下测定每个重量的化合物中的水分重量小于1%(更优选地, 每个重量的化合物中的水分重量小于0.5%)。如本文所用, 参考化合物, 术语“非吸湿”优选地指如上测定的每个重量的化合物的不可测定的水分重量。

如本文所用, 参考氨基酸, 术语“酯”指 $-\text{COO}(G)$ 形式的氨基酸的羧酸基团(机, 基团 $-\text{COOH}$), 其中G是有机成分, 如

非饱和或饱和烷基，烯基，炔基，环烷基，环炔基，芳香基或杂环基团。优选的基团 G 是 C₁₋₆ 烷基基团如甲基或乙基。最优选的氨基酸酯是甘氨酸的 C₁₋₆ 烷基酯基团，如甘氨酸甲基酯或甘氨酸乙基酯。

如本文所用，术语“盐”指本发明的化合物，是阴离子化合物，例如在有机胺的四价氮，氨基酸或氨基酸酯成分 QH⁺和康波瑞素（Combretastatin）A4 酪酸的磷酸成分之间具有阴离子键。

如本文所用，“阴离子键”是在阳离子和阴离子或化学结构之间的静电吸引形成的化学键。这样的键可以容易地在水溶液中离解（或离子化）。本发明化合物在溶剂特别是水溶液中的溶解，以及这样的溶液的冻干是本发明包括的实施方案。

如本文所用，在叙述体内存在的化学物种类如有机胺，氨基酸或氨基酸酯中的术语“生理可耐受”是指诱导治疗动物的条件下不可接受的副作用的化学物种类的无能。优选地“生理可耐受”化学物种类不产生不利的副作用。

如上面所解释的，本发明涉及一种利用本发明的化合物调节肿瘤优选地固体肿瘤的生长或转移的方法。如本文所用，术语“肿瘤”或“肿瘤生长”可以互变地使用，并且是指细胞不受控制的增倍导致的并且没有生理功能的组织的不正常的生长。固体肿瘤可以是恶性的，例如倾向于转移和威胁生命或可以是良性的。可以用本发明的方法治疗的固体肿瘤的例子包括肉瘤和癌如，但不限于：纤维瘤，黏液肉瘤，脂肉瘤，软骨瘤，淋巴瘤，如非 Hodgkin 淋巴瘤，成骨瘤，脊索瘤，食管肿瘤，血管肉瘤，骨肉瘤，内皮瘤，淋巴管瘤，淋巴管内皮瘤，滑膜瘤，滑膜肉瘤，间皮瘤，Ewing 肿瘤，平滑肌肉瘤，横纹肌肉瘤，结肠肉瘤，结肠直肠癌，胃癌，胰癌，肺癌如转移性肺癌，卵巢癌，前列腺癌，鳞状细胞癌，基

底细胞癌，腺癌，结肠和直肠的腺癌，汗腺癌，皮脂腺癌，乳头癌，乳头腺癌，囊腺癌，髓癌，气管源性癌，肾细胞癌，肝细胞瘤，肝转移瘤，胆道癌，绒膜腺瘤，精原细胞瘤，胚胎癌，甲状腺癌如，退行发育的甲状腺癌，髓甲状腺肿瘤，Wilm 肿瘤，宫颈癌，睾丸肿瘤，肺肿瘤如非小细胞肺癌，小细胞肺癌，膀胱癌，上皮癌，神经胶质瘤，星形细胞瘤，成神经管细胞瘤，颅咽管瘤，室管膜瘤，松果体瘤，成血管细胞瘤，听觉神经瘤，少突神经胶质细胞瘤，脑膜瘤，黑素瘤，成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

另外，在上皮组织中如在颈，食管和肺中，利用本发明的化合物或方法可以治疗或防止包括繁殖不正常的变化（如组织变形和发育不良）的肿瘤。所以，本发明提供了治疗已知或怀疑发展成瘤或癌症的病症，特别是，当发生包括增生，组织变形，或最优选地发育异常时的治疗（这样的不正常生长病症的参考，参照 Robbins 和 Angell, 1976 年，基本病理，第二版，W.B.Saunders 公司，Philadelphia, 68-79 页）。增生是包括在组织或器官中细胞数目增加的控制细胞增殖的形式，但结构或功能没有明显改变。正如一个实施例，子宫内膜增生经常发展成子宫内膜癌。组织变形是受控制的细胞生长的形式，其中一种类型的成熟或完全分化的细胞取代了另一种类型的成熟的细胞。组织变形可以发生在内皮或结缔组织细胞中。非典型的组织变形包括有一些紊乱的组织变形上皮；这是非赘生的细胞生长的最紊乱形式，包括失去个别细胞的均一性和细胞的结构学定向。组织变形的细胞经常是不正常地大，颜色深的核，和具有多形性。组织增生特征性地发生在存在慢性刺激或炎症的地方，经常发现是在颈，呼吸道，口腔和肿瘤的膀胱中。这样的紊乱的参考，参见 Fishman 等人，1985 年，医学杂志，第二版，J.B.Lippincott Co., Philadelphia.

可以用本发明的化合物或方法治疗的良性的肿瘤的其它例子包括特别是在颅内位点中的动静脉 (AV) 变形和 myoleomas。

本发明的化合物也用于治疗非恶性微管增殖紊乱如斑点退化, 牛皮癣和再狭窄, 通常用于治疗以微管增殖为特征的炎症疾病的治疗。这样的疾病和紊乱如 WO00/48606 中所述, 全文引入作为参考。

药物组合物

本发明也延伸到含有如上所述的本发明的化合物和其药理可接受载体的药物组合物。术语“药理可接受”指分子整体和组合物是生理可耐受的, 并且优选地当给药给人时, 通常不产生过敏或相似的不利的反应如胃的不适, 头晕等等。优选地, 如本文所用, 术语“药物可接受”是指联邦或国家政府的控制机构同意的或在美国药典或其他通常认可的药典中列出的可用于动物, 更优选地人的。术语“载体”指稀释剂, 佐剂, 赋形剂或化合物给药的载体。这样的药理载体可以是无菌液体, 如水和油, 豆油, 矿质油, 芝麻油, 乙醇, 例如, 甲醇, 丙醇, 聚乙二醇, 丙二醇, 山梨醇, 甘油等等, Cremophor 等等, 包括它们的混合物。优选地利用水或水盐溶液和水葡聚糖和甘油溶液作为载体, 特别是用作可注射溶液。适当的药物载体在 E.W.Martin “Remington’s 药物科学”中有叙述。

本发明的药物组合物可以通过注射, 口服, 肺, 鼻, 经皮, 眼睛或其它形式给药。通常, 根据本发明的理解, 药物组合物包括有效量的本发明的化合物和例如, 药物可接受稀释剂, 防腐剂, 增溶剂, 乳化剂, 佐剂, 和/或其它载体。这样的组合物包括各种缓冲液内容的稀释剂 (例如, TRIS 或其它胺, 碳酸, 磷酸, 氨基酸, 例如甘氨酸, 盐酸 (特别是在生理 pH 范围), N-甘氨酸

甘氨酸, 磷酸钠或磷酸钾(二元, 三元), 等等, 或 TRIS-HCL 或乙酸), pH 和离子强度; 添加剂如去垢剂和增溶剂(例如, 表面活性剂如 Pluromics, Tween20, Tween80(Polysorbate 80), Cremophor, 多元醇如聚乙二醇, 丙二醇, 等等), 抗氧化剂(如, 抗坏血酸, 焦亚硫酸钠), 防腐剂(如 Thimersol, 苯甲醇, 对羟基苯甲酸等等)和膨胀物质(例如, 糖如蔗糖, 乳糖, 甘露醇, 多聚物如聚乙烯吡咯烷酮或葡聚糖等等); 和/或在多聚物化合物如, 聚乳酸, 聚乙醇酸等等的颗粒制剂中, 或在脂质体中掺入物质。透明质酸也可以利用。这样的组合物可以用于影响本发明的化合物的物理状态, 稳定性, 体内释放的速度, 体内清除的速度, 参见例如, Remington's 药物科学, 第 18 版(1990, Mack 出版社公司, Easton, PA 18042), 1435-1712 页, 引入作为参考。组合物可以例如制备成液体形式, 可以是干粉末, 如冻干形式。给药这样的组合物的特定方法如上所述。

如需要可以进行 pH 调节。优选地, 它例如可以增强本发明的化合物的溶解度, 调节含有这些化合物的药物组合物的 pH 到大于 7 的 pH, 更优选地到大于 8 的 pH(如约 8.5 的 pH)。

对于 CA4P 前体药物盐如, 本发明的通式 I 的那些, 活性亲本(CA4)的形成是发生在更低的 pH 的。本发明人已经发现, 在冷冻过程中加入缓冲液/pH 调节剂防止了 pH 下降, 所以提供了更稳定的冻干配方。进一步已经惊人地发现, 对于 CA4P 前体药物盐如, 本发明的通式 I 的那些的冻干配方, 利用氢氧化钠作为 pH 调节剂调节 pH 可以导致形成活性亲本(顺式)CA4(它在水中溶解最小, 并且可以在水溶液中形成不需要的颗粒), 利用 pH 调节剂而不是氢氧化钠可以调节 CA4 的形成。相对于利用氢氧化钠调节 pH, 利用 TRIS 作为 pH 调节剂和缓冲液例如可以调节活性亲本(顺式)CA4 的形成, 所以用于本发明的组合物中时

是特别优选的。例如，对于通式 I 的化合物已经进行了观察，其中 Q 是 TRIS 或组氨酸，所以利用 NaOH 作为 pH 调节剂制备的亲液胶体在储藏时表现出对亲本顺式-CA4 有水解作用，而利用适当的缓冲试剂而不是 NaOH 例如，TRIS 进行 pH 调节能够调节不溶亲本的形成。所以，本发明的另一方面涉及包括本发明的化合物和不是氢氧化钠的 pH 调节试剂，优选地包括作为 pH 调节试剂的有机碱如氨基酸或有机胺，特别是 TRIS 的药物冻干组合物（优选地从 pH 调节溶液制备）。所以，当利用氢氧化钠包括在本发明的冻干组合物中时，这样的利用并不优选，例如，对于待在静脉内给药的药物组合物，固体配方是不需要的。

也可以制备含有本发明的化合物和包括氢氧化钠的 pH 调节试剂，优选地含有作为 pH 调节试剂的有机碱如，氨基酸如，精氨酸，甘氨酸，或有机胺，例如乙醇胺，特别是 TRIS 的药物组合物，例如溶液（特别是水溶液，例如，浓度为 15 毫克/毫升，30 毫克/毫升，和 60 毫克/毫升）当该配方的 pH 从 pH 9.0 提高到 pH10.5 时，水溶液的稳定性提高。在较高的离子强度时，溶液的稳定性更好。例如，用 NaOH 作为 pH 10 时的 pH 调节试剂的溶液配方显示了与利用 TRIS 作为 pH 8.5 时的缓冲试剂制备的冻干配方可比较的稳定性。

优选地，对本发明的药物组合物使用避光保护。

调节肿瘤生长或转移的方法

康泼瑞素(Combretastatin)A-4 是从 *Combretum caffrum* 的树干得到的非常有潜力的抗有丝分裂试剂，并且显示了对各种人的癌细胞系有潜在的毒性。随后，对受试者给药本发明的化合物或药物组合物可以减弱受试者的肿瘤生长和或转移，或者如果受试者

没有可检测的转移或肿瘤生长,将防止转移和/或肿瘤生长。当然,本发明的化合物可以单独或与药物可接受载体一起给药。

所以,本发明涉及调节肿瘤生长或转移的方法,包括特别是,给药有效量的在体内快速再生康泼瑞素(Combretastatin)A-4 的本发明的单-或双-有机胺康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸前体药物盐。如上解释,术语“有效量”,如本文所用是指,对受试者给药本发明的化合物的量足于调节肿瘤的生长或转移,如减弱动物中肿瘤的生长和转移,或者防止在给药前没有任何肿瘤形成的动物中的肿瘤生长的形成。本领域的普通技术人员可以容易地测定例如,利用常规技术给药的本发明的化合物的有效量。

另外,在本发明的方法中已经应用了许多给药本发明的化合物的方法。特定地,部分给的化合物或药物组合物可以不经肠地,经黏膜地例如,口服,鼻,或经直肠或经皮地导入。优选地,给药是不经肠的例如,静脉内注射,也包括但不限于小动脉内的,肌肉内的,皮内的,皮下的,腹膜内的,心室内的和颅内的给药。化合物或药物组合物可以例如,通过在待治疗的肿瘤中或肿瘤周围的组织中注射而导入。“黏膜渗透增强剂”指增强本发明的化合物经黏膜的渗透的速度或容易程度的试剂,如但不限于胆汁盐,脂肪酸,表面活性剂或乙醇。在特定的实施方案中,渗透增强剂可以是胆酸钠,十二烷基硫酸钠,脱氧胆酸钠,牛磺脱氧胆酸,甘胆酸钠,二甲亚砜或乙醇。适当的渗透增强剂也包括甘草次酸(授予 Kowarski 的美国专利编号, 5, 112, 804)和聚山梨酯-80, 后者优选地是与非离子表面活性剂如壬苯醇醚-9, laureth-9, 泊洛沙姆-124, 辛本昔醇-9, 或月桂酰胺-DEA(Stoltz 的欧洲专利 EP0 242 641 B1)。

在另一个实施方案中,根据本发明的方法,本发明的化合物或药物组合物可以在载体中特别是脂质体中给药(参见 Langer,

科学 249: 1527-1533 页 (1990 年); Treat 等人, 感染疾病和癌症的治疗中的脂质体中, Lopez-Berestein 和 Fidler, Liss: 纽约, 353-365 页 (1989); Lopez-Berestein, *ibid*, 317-327 页, 参见 *ibid*).

仍然在另一个实施方案, 这样的化合物或药物组合物可以在受控制的释放系统中如利用静脉内注入, 可植入的渗透泵, 经皮的膏药, 脂质体, 或其他给药方式给药。在特定的实施方案中, 可以利用泵 (参见 Langer, 出处同上; Sefton, *CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.*14:201(1987); Buchwald 等人, 外科, 88 卷: 507 页 (1980 年); Saudek 等人, *N.Engl. J.Med.* 321 卷: 574 页 (1989 年)). 在另一个实施方案中, 可以利用多聚物物质 (参见, 控制释放的医学应用, Langer 和 Wise, CRC 出版: Boca Raton, Florida(1974 年); 控制药物的生物利用率, 药物生产设计和效能, Smolen 和 Ball, Wiley: 纽约 (1984 年); Ranger 和 Peppas, *J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.* 23: 61(1983 年); 也参见 Levy 等人, 科学, 228 卷: 190 页 (1985 年); During 等人, 神经学年评, 25 卷: 351 页 (1989 年); Howard 等人, 神经外科杂志, 71 卷: 105 页 (1989 年)). 仍然在另一个实施方案中, 可以将控制释放系统放置于受试者的目标组织的附近, 所以只需要一部分系统剂量 (参见例如, Goodson, 控制释放的医学应用, 出处同上, 2 卷, 115-138 页 (1984 年)). 优选地, 在动物中不适当免疫活化的位点或肿瘤的附近导入控制释放装置。其它控制释放系统在 Langer(科学, 249 卷: 1527-1533 页 (1990 年))的综述中有讨论。

肠胃外给药

如上面解释, 本发明的化合物或药物组合物可以对受试者在肠胃外给药, 所以避免了通过受试者的肠胃道给药。具有本文的用途的特定的肠胃外给药技术包括但不限于静脉内 (大丸剂或浸

剂)注射,腹膜内注射,皮下注射,肌肉内注射或导管插入,提到的只有几个。肠胃外给药的组合物的例子包括可注射溶液或悬浮液,可以含有例如,适当的非毒性的,肠胃外可接受的赋形剂或溶剂,如甘露醇,1,3-丁二醇,水,缓冲水溶液系统,Ringer溶液,等渗氯化钠溶液,或其它适当的分散或吸湿和悬浮试剂,包括合成的甘油单或二酯,和脂肪酸,包括油酸,乙醇和/或Cremophor。需要时可以调节pH。

鼻用药

本发明的化合物或药物组合物的鼻或经黏膜的给药也得到关注。鼻给药允许在对鼻给药有效量的化合物后直接将这样的化合物传递到血液,而不需要在肺中沉积产物。鼻给药的配方包括含有葡聚糖或环葡聚糖,以及其他多聚物如聚乙烯吡咯烷酮,甲基纤维素或其他纤维素的那些。

对于鼻给药,有用的装置是小的,硬的瓶,瓶上附着有一个计量的剂量喷洒器。在一个实施方案中,计量的剂量是通过在本发明的化合物或药物组合物推入确定体积的室中给药的,室具有一个尺寸为当在室中的液体压缩时形成喷雾气雾化气雾剂的小孔。室压缩给药化合物或药物组合物。在特定的实施方案中,室有一个活塞装置。这样的装置是可以购买得到的。

或者,可以利用具有尺寸能够气雾化气雾剂配方的孔或开口的塑料挤压瓶。当挤压瓶子的时候发生气雾化。开口通常发现是在瓶子的顶部,顶部通常压成部分适于有效给药气雾剂配方的鼻通道。优选地,鼻吸入将提供一个计量的量的气雾剂配方,用于给药测定剂量的本发明的化合物或药物组合物。

对于经黏膜的给药,利用渗透增强剂也得到关注。

肺给药

本文中同样关注的是肺给药本发明的化合物或药物组合物。当吸入时，本发明的化合物或药物组合物可以给药到哺乳动物的肺，并且经过肺的上皮衬里到血液。其它报道包括 Adjei 等人(药物研究, 7 卷: 565-569 页 (1990 年); Adjei 等人, 国际药理学杂志, 63 卷: 135-144 页 (1990 年) (leuprolide acetate); Braquet 等人, 心血管药理学杂志, 13 卷 (增刊 5): 143-146 页 (1989 年) (内皮素-1); Hubbard 等人, 内部医学年刊, III 卷, 206-212 页 (1989 年) (α 1-抗胰蛋白酶); Smith 等人, 临床研究杂志, 84 卷: 1145-1146 页 (1989 年) (α -1-蛋白酶); Oswein 等人, “蛋白质的气雾化”, 呼吸药物给药专题讨论会进展 II, Keystone, Colorado, March, (1990) (重组人生长激素); Debs 等人, 免疫学杂志, 140 卷: 3482-3488 页 (1988 年) (干扰素- γ 和肿瘤坏死因子 α), Platz 等人, 美国专利编号 5, 284, 656 (粒细胞集落刺激因子)). 产生系统效果的肺给药药物的方法和组合物在 1995 年 9 月 19 日授予 Wong 等人的美国专利 5, 451, 569 中有叙述。

在本发明的实践中得到关注的是大范围的设计用于治疗产物的肺给药的机械装置, 包括但不限于雾化器, 计量剂量的吸入器, 和粉末吸入器, 所有这些是本领域技术人员熟悉的。关于构建给药装置, 在本发明的实践可以利用任何本领域已知的气雾化形式, 包括但不限于液体配方的喷洒瓶, 气雾化, 原子化或泵气雾化。

适于本发明的实践的购买可得的装置的一些特定例子是 Mallinckrodt 公司, St.Louis, Missouri 制造的 Ultravent 气雾器; Marquest 医学产品公司, Englewood, Colorado 制造的 AcornII 气雾器; Glaxo 公司, Research Triangle Park, North Carolina 制造的

Ventolin 计量剂量的吸入器; 和 Fisons 公司, Bedford, Massachusetts 制造的 Spinhaler 粉末吸入器。

所有这样的装置需要利用适于分散本发明的药物组合物的配方。通常, 各个配方是特异于利用的装置的类型, 并且可以包括适当的推进剂物质的利用, 以及常见的稀释剂, 佐剂和/或其他治疗中利用的载体。同样, 脂质体, 微囊或微球, 包入复合物, 或其它类型的载体的利用也受到关注。本发明的化学修饰药物组合物也可以根据化学修饰的类型或利用的装置的类型也可以制备成不同的配方。

适于与气雾器, 喷射的或超声波的一起使用的配方通常包括以每毫升溶液 0.1 到 25 毫克的生理活性成分的浓度溶解于水中的本发明的化合物或药物组合物。配方也可以包括缓冲液和简单的糖 (例如, 用于本发明的药物组合物的稳定和渗透压的调节)。气雾器配方也可以含有表面活性剂, 可以降低或防止形成气雾中溶液的原子化引起的本发明的化合物或药物组合物的表面诱导的聚集。

与计量剂量的吸入器装置一起使用的配方通常将包括例如, 在表面活性剂辅助下悬浮于推进剂中含有本发明的化合物或药物组合物的细分的粉末。推进剂可以是任何适当的用于此目的的物质, 如氟氟碳, 羟基氟碳, 羟基氟碳或羟基碳, 包括三氟氟甲烷, 二氟氟甲烷, 二氟四氟乙醇, 和 1, 1, 1, 2-四氟乙烷, 或他们的联合。适当的表面活性剂包括山梨聚糖, 三油酸和大豆卵磷脂。油酸也可以用作表面活性剂。

液体气雾剂配方含有本发明的化合物或药物组合物, 和在生理可接受稀释剂中的分散剂。本发明的干粉气雾剂配方可以含有本发明的化合物或药物组合物的细分固体形式。对于液体的或干

的粉末气雾剂配方，配方必须气雾化。即，为了保证使气雾化剂量真正到达鼻通道或肺的黏膜，它必须分解成液体或固体颗粒。术语“气雾化颗粒”在本文中用于描述适于鼻或肺给药的液体或固体颗粒，即将达到黏膜。其他考虑的事情包括构建给药装置，配方中的其他成分和颗粒特征。药物的鼻或肺给药的这些方面是本领域已知的，配方的操作，气雾化手段和给药装置的构建是本领域普通技术人员可以容易地进行的。

在特定的实施方案中，为了保证药物颗粒能够达到肺泡，质量中位动力直径将是5微米或更小（Wearley, L.L., 1991, Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems 8: 333）。

如上所述，在本发明的特定的方面，气雾化装置是计量的剂量吸入器。计量的剂量吸入器当给药时提供了特定的剂量，而不是依据给药而变化的剂量。这样的计量的剂量吸入器可以与液体或干粉气雾剂配方一起使用。计量剂量吸入器是本领域已知的。

通常，吸入肺的液体或干粉配方的气雾化需要推进剂。推进剂可以是本领域使用的任何推进剂。这样的推进剂的特定非限制例子是氯氟碳，羟基氯碳，羟基氯氟碳，或羟基碳，包括三氟甲烷，二氯二氟甲烷，二氯四氟乙醇，和1, 1, 1, 2-四氟乙烷，或他们的结合。

气雾剂给药系统如压力化的计量的剂量吸入器和干粉吸入器公开在Newman, S.P., 气雾剂和肺，Clarke, S.W.和Davia, D., 1972-22页，可以与本发明结合使用。

液体气雾剂配方

本发明提供了本发明的化合物或药物组合物的液体气雾剂配方和剂量形式。通常，这样的剂量形式含有在药理可接受的稀释剂中的本发明的化合物或药物组合物。药理可接受稀释剂包括但不限于，无菌水，盐，缓冲盐，葡聚糖溶液，等等。在特定的实施方案中，可以用于本发明或本发明的药物配方的稀释剂是磷酸缓冲盐，或通常 pH7.0-8.0 范围的缓冲盐溶液或水。

本发明的液体气雾剂配方可以包括作为备选成分的药物可接受载体，稀释剂，增溶剂或乳化剂，表面活性剂和赋形剂。

本实施方案的配也可以包括用于维持 pH，稳定溶液，或调节渗透压的其他试剂。试剂的例子包括，但不限于盐，如氯化钠，或氯化钾，和碳水化合物，如葡萄糖，乳糖或甘露糖等等。

气雾剂干粉配方

同样受到关注的本气雾剂配方可以作为干粉配方制备，其中包括细分的本发明的化合物或药物组合物的粉末形式和分散剂。

用于从粉末吸入器装置分散的配方可以包括含有本发明的化合物或药物组合物的细分干粉，也可以包括疏松剂，如乳糖，山梨醇，蔗糖，或甘露醇，量为简化从装置分散粉末的量，例如 50 到 90% 的配方的重量。本发明的化合物或药物组合物应该最优选地制备成颗粒形式，平均颗粒大小小于 10 微米，最优选地 0.5-5 微米，用于最有效地给药到肺的远侧。

在另一个实施方案中，干粉配方可以包括含有本发明的化合物或药物组合物的细分干粉，分散试剂和疏松试剂。用于与本配方结合使用的疏松试剂包括的试剂如乳糖，山梨醇，蔗糖，甘露醇，量为简化粉末从装置分散的量。

经皮给药

对于药物的经皮给药，例如经皮的膏药，多种多样的方法是本领域已知的。经皮的膏药叙述在例如，1995年2月18日授予 Rolando 等人的美国专利编号 5, 407, 713; 1994年11月4日授予 Fallon 等人的美国专利编号 5, 352, 456; 1994年8月9日授予 D 'Angelo 等人的美国专利编号 5, 332, 213; 1994年8月9日授予 Sibalis 的美国专利编号 5, 336, 168; 1994年3月1日授予 Farhadieh 等人的美国专利编号 5, 290, 561; 1993年11月19日授予 Tucker 等人的美国专利编号 5, 254, 346; 1992年11月17日授予 Berger 等人的美国专利编号 5, 164, 189; 1992年11月17日授予 Sibalis 的美国专利编号 5, 163, 899; 1992年2月18日授予 Sibalis 的美国专利 5, 008, 977 和 5, 087, 240; 1991年4月16日授予 Benecke 等人的美国专利编号 5, 008, 110; 和 1990年5月1日授予 Sibalis 的美国专利编号 4, 921, 475, 各个公开物全文引入作为参考。

令人满意的是经皮的给药途径可以利用皮渗透增强剂增强，例如美国专利编号 5, 164, 189 (出处同上)，美国专利 5, 008, 110 (出处同上)，和 1989年11月7日授予 Aruga 等人的美国专利 4, 879, 119 中所述的增强剂，各个公开物引入作为参考。

另外，本发明的化合物或药物组合物可以局部给药。例如，化合物可以与药膏载体混合形成可以在皮肤涂抹的组合物。或者，本发明的化合物可以溶解于已知能渗透进入皮肤的溶剂。这样的溶剂的特定例子是二甲亚砜 (DMSO)。凝胶配方也受到关注。

口服给药

在本文中也受到关注的是固体剂量形式，这通常在 Remington 药物科学，第 18 版，1990 年 89 章 (Mack 出版公司，Easton PA 18042) 中有叙述，引入作为参考。固体形式包括例如片剂，胶囊，丸剂，锭剂或糖锭，扁囊剂或药丸。同样，脂质体或类蛋白包囊也可以用于配制本发明的化合物或药物组合物 (例如，美国专利 4,925,673 中报道的类蛋白微球体)。可以利用脂质体包囊，可以用各种多聚体派生脂质体 (例如，美国专利 5,013,556)。治疗用途的可能的固体剂量形式的叙述在 Marshall, K.: 现代医药, G.S.Banker 和 C.T.Rhodes 编辑，第 10 章，1979 年中有叙述，引入作为参考。配方可以包括本发明的化合物或药物组合物和允许保护胃环境和在肠中释放生物活性物质的惰性成分。

同样，特别受关注的是本发明的化合物的口服剂量形式，其中化合物可以进行化学修饰，使衍生物有效给药。通常，受到关注的化学修饰是在成分分子本身至少附着一种成分，其中的附者成分允许 (a) 抑制蛋白质水解；和 (b) 从胃肠吸收进血液。同样需要的是增强本发明的化合物的整体稳定性，和增长在体内的循环时间。这样的成分的例子包括聚乙二醇，乙二醇和丙二醇的共聚物，羟甲基纤维素，葡聚糖，聚乙烯乙醇，聚乙烯吡咯烷酮和聚脯氨酸。Abuchowski 和 Davis, 1981 年，“可溶多聚物-酶加合物”，作为药物的酶，Hocenberg 和 Roberts, Wiley-Interscience, 纽约, NY, 367-383 页；Newmark, 等人，1982 年，应用生物化学杂志，4 卷：185-189 页。可以利用的其它多聚物是聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧戊环。上述药物中优选利用的是聚乙二醇成分。

对于本发明的化合物，释放的位置可以是胃，小肠 (十二指肠，空肠，或回肠)，或大肠。本领域的一个技术人员可以制备在胃中不溶解的，但仍然在十二指肠或肠的其它地方释放本发明

的化合物的配方。优选地，释放能避免不利的胃环境影响。通过保护化合物或在胃环境以外释放生物活性物质，如小肠中。

为了保证完全抵抗胃，需要至少对 pH5.0 不可渗透的包衣。用作肠包衣的更普通的情性成分的例子是乙酸纤维素苯三酸 (CAT) 羟苯甲基纤维素邻苯二甲酸酯 (HPMCP)，HPMCP50，HPMCP55，聚乙烯乙酸邻苯二甲酸盐 (PVAP)，Eudragit6 L30D，Aquateric，乙酸纤维素邻苯二甲酸酯 (CAP)，EudragitL，EudragitS，和 Shellac。这些包衣可以用作混合胶片。

包衣或包衣混合物也可以用在片剂上，这不用于抵抗胃的保护。这可以包括糖包衣，或使片剂容易吞咽的包衣。胶囊可以包括给药干治疗剂，即粉末的硬壳（如明胶），对于液体形式，可以利用软的明胶壳。扁囊剂的壳物质可以是厚的淀粉或其他可食的纸。对于丸剂，锭剂，制模的片剂或片剂研制剂，可以利用潮湿聚集技术。

本发明的化合物例如可以包括在颗粒大小约 1 毫米的胶囊或片剂形式中作为微细多颗粒的配方。用于胶囊给药的物质的配方也可以是粉末，轻微压缩的栓或甚至是药片。同样，本发明的化合物或药物组合物可以压缩制备。

色剂和调味剂都可以包括在内。例如，可以（例如通过脂质体或微球体包囊）配制化合物，然后进一步包含在可食的产品内，如含有色剂和调味剂的冷冻饮料。

可以用情性物质稀释或增加本发明的化合物或药物组合物的体积。这些稀释剂可以包括碳水化合物，特别是甘露醇， α -乳糖，水合乳糖，纤维素，蔗糖，修饰的葡聚糖和淀粉。有些无机盐也可以用作填充物，包括三磷酸钙，碳酸镁和氯化钠。一些

能购买得到的稀释剂是 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx1500, Emcompress 和 Avicell.

崩解剂可以包括在制成固体剂量形式的本发明的药物组合物的配方中。用作崩解剂的物质包括但不限于, 淀粉, 包括购买得到的基于淀粉, Explotab 的崩解剂。乙醇酸淀粉钠, Amberlite, 羧甲基纤维素, 天然海绵和膨润土都可以利用。崩解剂的另一形式是不溶的阳离子交换树脂。粉末化的树胶可以用作崩解剂, 和作为结合物, 并且这些可以包括粉末胶如琼脂, Karaya 或黄氏糖。海藻酸和它的钠盐也可以用作崩解剂。

结合物可以用于将本发明的化合物或药物组合物聚集在一起形成硬的片剂, 并且结合物含有来自天然产物的物质如阿拉伯胶, 黄氏糖, 淀粉和明胶。其它包括甲基纤维素 (MC), 一级纤维素 (EC) 和羧甲基纤维素 (CMC)。聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 都可以用于酒精溶液中将治疗剂颗粒化。

抗摩擦试剂可以包括在本发明的药物组合物的配方中, 防止在配制过程中黏附。润滑剂可以用作治疗剂和干的壁之间的层, 这些可以包括, 但不限于硬脂酸, 包括它的镁和钙盐, 聚四氟乙烷 (PTFE), 液体石蜡, 蔬菜油和石蜡。可溶的润滑剂也可以利用, 如十二烷基硫酸钠, 十二烷基硫酸镁, 各种分子量的聚乙二醇, Carbowax4000 和 6000。

可以加入在配制过程中提高本发明的化合物的流动特性和在压缩过程中辅助重排的 Glidant。Glidant 可以包括淀粉, 滑石, 热硅和水合硅铝酸盐。

潜在地增强口服给药时本发明的化合物的吸收的添加剂是例如，脂肪酸，油酸，亚油酸和亚麻酸。

控制释放口服配方是需要的。药物可以掺入允许扩散或渗出机制释放的惰性基质例如胶。慢慢变性的基质也可以掺入配方中。一些肠包衣也具有推迟释放的效果。

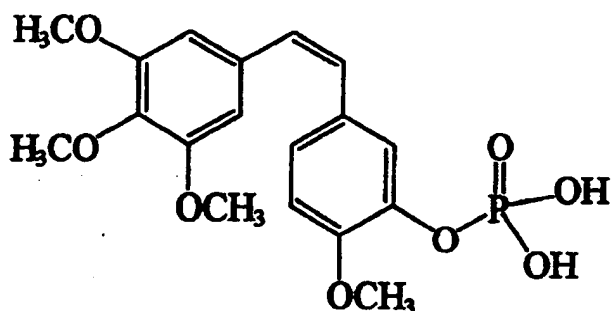
控制释放本发明的化合物的另一形式是通过基于 Oros 治疗系统 (Alza Corp.)，即药物包括在允许水进入并由于渗透效应将药物推出单个的小开口的半渗透膜的方法。

其他包衣可以用于配方中。这些包括可以用于包衣盘中的各种糖。本发明的化合物也可以在包衣药片的胶衣中，这时利用的物质可以是例如，分成两组。第一组是非肠物质，包括甲基纤维素，乙基纤维素，羟乙基纤维素，甲基羟基-乙基纤维素，羟丙基纤维素，羟丙基-甲基纤维素，羧基-甲基纤维素钠，providone 和聚乙二醇。第二组包括肠物质，是常见的邻苯二甲酸的酯。

这些物质的化合物可以用于提供最佳的胶包衣。胶包衣可以在包衣盘中或在流化床或通过压缩包衣进行。

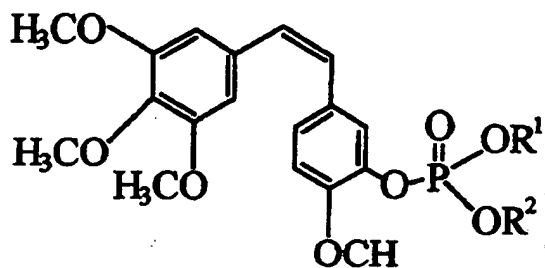
制备方法

如上所述的通式 I 的化合物可以通过任何适当的方法制备，例如通过将需要的化合物 Q (特别是，有机胺，氨基酸或氨基酸酯)与具有下面结构的康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸(“CA4P 游离酸”)接触：



两者的量足以得到本发明的通式 I 的单-或双-有机胺盐, 单-或双氨基酸或单或双-氨基酸酯盐 (例如, 1: 1 摩尔比例得到 1: 1 的单-有机胺盐或单氨基酸盐, 或适当溶剂 (例如, 选择需要的 pKa 的溶剂) 中过量摩尔的有机胺得到双有机胺盐)。如实施例如上所述, 从 CA4P 二钠盐可以得到 CA4P 游离酸。可以例如在适当的溶剂中 (优选地, C₁-C₆ 乙醇如异丙醇或其水溶液混合物) 反应化合物 Q 如有机胺或氨基酸, 和 CA4P 游离酸, 优选地接着通过例如过滤的方法以结晶化合物回收通式 I 的化合物。术语“溶剂”包括单一的溶剂, 或混合或双相溶剂混合物的两种或多种溶剂的混合物。如果需要, 可以盐的形式加入化合物 Q, 优选地加入药物可接受盐, 如上面的实施例所述。

所以, 本发明扩展到制备具有通式 I 的结构化合物:



(I)

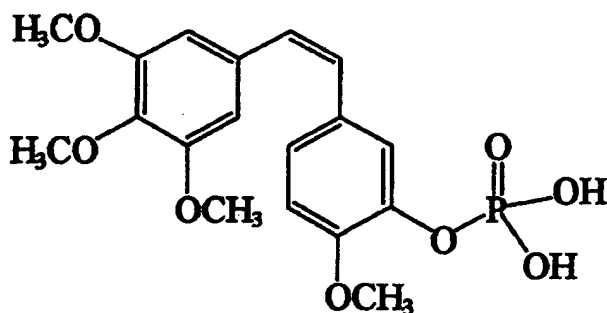
其中 -OR¹ 或 -OR² 中的一个 -O⁻QH⁺, 另一个是羟基或 -O⁻QH⁺, 并且 Q 是

(A)至少含有一个氮的有机胺,氮和质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸,其中一个氮原子和质子一起形成四价阳离子 QH^+ ; 或

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸,其中一个氮原子和质子一起形成四价阳离子 QH^+ , 并且其中另外,氨基酸的所有羧酸基团是酯的形式。

本发明的这样的方法包括步骤: 将在溶剂中的具有下面结构的 CA4P 游离酸:



与 Q 接触, 其中 Q 是

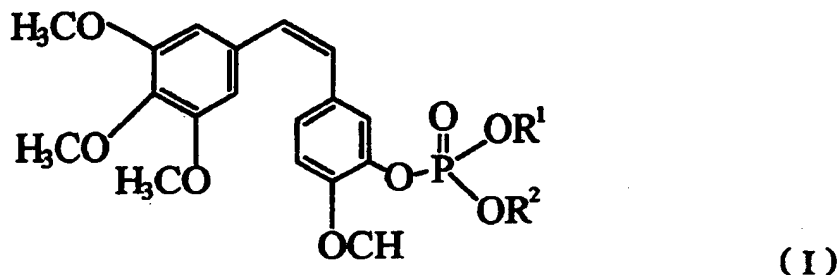
(A)至少含有一个能够与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 的氮原子;

(B)至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ ; 或

(C)含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且其中另外, 氨基酸的所有羧酸基团是酯形式。

或者,用本文所述的方法制备的本发明的化合物可以从溶剂中以结晶形式沉淀。

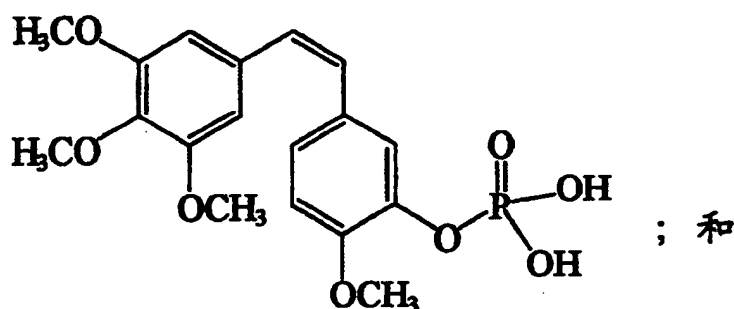
另外,本发明扩展到制备具有通式 I 的结构的方法:



如上所述,该方法包括步骤:将 CA4P 游离酸在溶剂中与优选的化合物 Q (如组氨酸,甘氨酸 C₁₋₆ 烷基酯,或最优选地氨丁三醇)接触,然后从溶剂中以结晶形式回收得到的 CA4P 组氨酸,甘氨酸 C₁₋₆ 烷基酯或最优选地氨丁三醇盐。当然,如上所述,在本发明的方法中可以利用许多溶剂。特别的例子包括但不限于 C₁-C₆ 醇,如异丙酯或其水溶液混合物。在本发明的优选的实施方案中,本文所述的方法产生了化合物 CA4P 单氨丁三醇(“CA4P 的单-TRIS 盐”或“CA4P 单 TRIS 盐”)。在本发明的另一个优选的实施方案中,本文所述的方法产生了化合物 CA4P 单-L-组氨酸。

优选地在溶液中或水溶液中的化合物 Q (有机胺,氨基酸或氨基酸酯)和 CA4P 游离酸的混合物也受到本文的关注,如本发明的实施方案所述。所以,本发明进一步提供混合包括面化合物的化合物形成的组合物:

(a)具有下面结构式的 CA4P 游离酸:



和 (b) 化合物 Q, 其中 Q 是

(A) 至少含有一个与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ 的氮原子的有机胺;

(B) 至少含有两个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子与质子一起形成四价阳离子 QH^+ ; 或

(C) 含有一个或多个氮原子的氨基酸, 其中一个氮原子与质子一起形成四价铵阳离子 QH^+ , 并且另外, 氨基酸的所有羧基基团是酯形式。

或者本发明的化合物可以另外含有药理可接受的载体。

本发明参考下面的非限制实施例可以更好地理解。它们是提供作为本发明的例证的。但是, 他们不应该构成如对本发明的广义范围的限制。

实施例 1

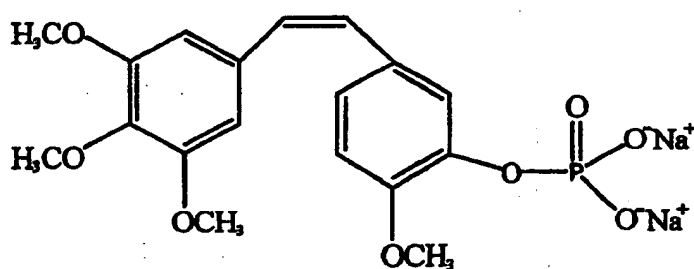
CA4P 前体药物单氨丁三醇盐

在本发明的实施方案中, CA4P 单氨丁三醇盐是如本发明的化合物的非限制实施例所述。在本文所述的信息中, 通过与下面

所述类似的方法，在 CA4P 游离酸中加入需要有机胺，本领域的普通技术人员可以容易地产生各种 CA4P 前体药物单-或双-有机胺盐，所有这些包括在本发明和附加的根据权利要求中。

试剂和方法

从商业来源得到所有试剂和化学物，不进一步而使用：Tris(羟甲基)氨甲烷 (TRIS) (Aldrich Chemical Co. 99.9+% 标记, 批次 #01404PU), 异丙基乙醇 (B&J Brand, 高纯度溶剂级)。在 Bruker DRX400 光谱仪上记录多核 NMR 谱。对于四甲基硅烷，用 ppm 记录 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移。利用甲醇 (“MeOH”) 作为内部标准确定 ^{13}C NMR 的化学位移。 ^{13}C NMR 谱是用解藕的质子 $\{^1\text{H}\}$ 得到的。为了辅助针对结构分配 ^1H 和 ^{13}C NMR 信号，进行了 2D NMR 实验 (HMQC (杂核多量子相关光谱，是确定分子的哪个 ^1H 与 ^{13}C 核(或其他 X 核)结合的逆化学位移相关实验); 和 HMBC (杂核多键相关光谱，是适于确定远程 ^1H - ^{13}C 关系以及分子的结构和 ^1H 和 ^{13}C 派定的修改版)。“CA4P 二钠盐”是具有下面结构的化合物：



(参见上面提到的美国专利编号 5, 561, 122)。

CA4P 单-氨丁三醇盐

IPA TRIS 水溶液 (0.19M)。通过在 7 毫升的去离子水中溶解 1.61 克 TRIS (13.3 毫摩尔) 制备 0.19 M TRIS 溶液, 并且在得到的水溶液中加入 63 毫升异丙醇 (“IPA”)。

在异丙醇中的 CA4P 游离酸储备液 (0.19M)。将 CA4P 二钠盐 (12.15g, 27.6mmol) 溶解于 70 毫升的去离子水中。快速搅拌, 在得到的溶液中加入乙酸乙酯 (250 毫升) 和饱和的氯化钠水溶液 (150 毫升)。形成白色糕。逐步加入 0.5N 的盐酸溶液 (325 毫升) 溶解糕 (水溶液的最后 pH 约为 1 (pH 纸))。分离有机相。用乙酸乙酯 (3X200 毫升) 提取水相。合并有机相, 用无水 Na_2SO_4 过滤干燥。过滤和溶剂蒸发 (Rotavapor, 水浴温度=40 度) 产生溶解于 100 毫升 IPA 的厚的 CA4P 游离酸薄膜。用下面的滴定方法, 通过 ^1H NMR 确定得到的溶液的浓度为 0.19M: 吸取 4 毫升 L-组氨酸溶液 (0.17M) 和 30 微升 CA4P 游离酸溶液在 4 毫升的 HPLC 小瓶中。用 Rotavapor 蒸发溶剂到干燥。在 0.7mL D_2O 中溶解干燥的固体, 通过 ^1H NMR 分析得到 1: 0.75 比例的组氨酸对 CA4P 游离酸。总共得到 19 毫摩尔 CA4P 游离酸 (69% 产量)。

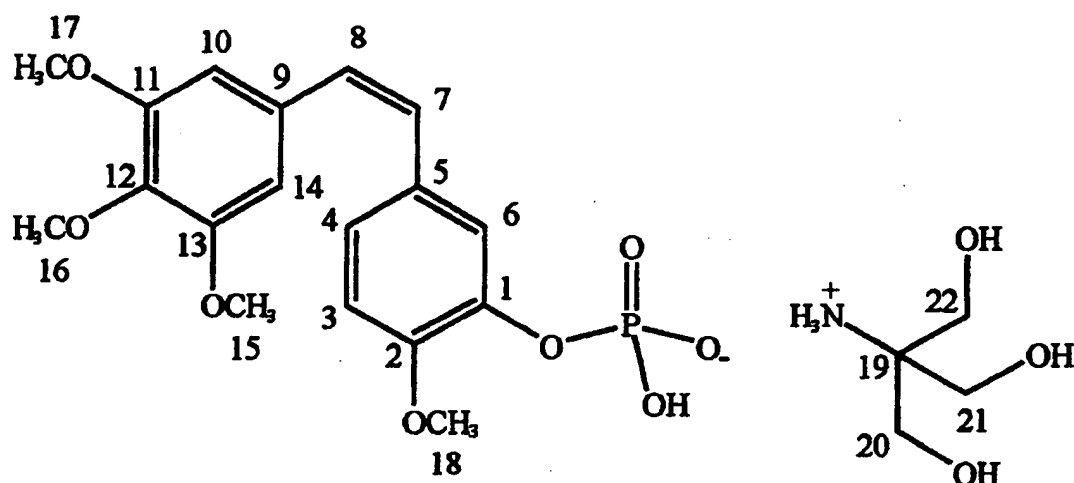
CA4P 单-TRIS 盐 用 70 毫升如上所述制备的 CA4P 游离酸溶液 (0.19M, 13.3mmol) 加入 200 毫升的圆底烧瓶中。将 70 毫升如上制备的 IPA TRIS 溶液 (0.19M, 13.3mmol) 快速搅拌逐步加入 CA4P 游离酸溶液中。在室温下搅拌得到的白色浆液 18 小时 (过夜), 接着冷却到 0 度 (冰浴) 30 分钟。通过 Whatman#54 滤纸吸收过滤, 用冷的异丙醇洗涤, 分离结晶固体, 在空气流中干燥 5 小时, 然后在真空中 (真空干燥器) 113 小时, 产生 7.01g 白色固体 CA4P 单-TRIS 盐。 ^1H NMR 分析的结果表示, 最后的产物含有残留溶剂 IPA (约 0.9wt%) (13.4mmol, 定量的产量)。CA4P 单-TRIS 盐具有通式 I 的结构, 而连接核心的苯基成分的烯

烃基团如康泼瑞素(Combretastatin)A-4 磷酸起始物质是顺式构型。

CA4P 单 TRIS 盐的特征

NMR 和元素分析

^1H NMR(400MHz, D_2O) δ 3.52(s,6H,C(15) H_3 和 C(17) H_3), 3.56(s, 6H, C(20) H_2 , C(21) H_2 , C(22) H_2), 3.59(s, 3H, C(16) H_3), 6.38(d,J=11.72Hz, 1H, C(8)H), 6.46(d,J=11.7Hz, 1H, C(7)H), 6.48(s,2H, C(10)H and C(14)H), 6.79(d, J=8.8Hz, 1H, C(3)H), 6.85(broad d, J=8.8Hz, 1H, C(4)H), 7.06(broad s, 1H, C(6)H); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 56.9(2C, C10,C14), 113.9(C3), 122.6(d, $J_{\text{PC}}=3.1\text{Hz}$, C6), 125.9(C4), 130.0(C8), 130.8(C7), 131.2(C5), 134.7(C9), 136.8(C12), 142.2(d, $J_{\text{PC}}=7.7\text{Hz}$, C1), 150.6(d, $J_{\text{PC}}=6.1\text{Hz}$, C2), 153.2(2C, C11 and C13). $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_{11}\text{P}$ 的计算值: C, 51.06; H, 6.23; N,2.70; P5.98. 实际值: C, 51.07; H, 6.39; N, 2.58; P, 5.93.



吸湿性

发现本实施例的 CA4P 的单 TRIS 盐在 25 度, 大气和高湿度条件下确实是非吸湿的。这是出乎意料的结果, 因为 CA4P 游离酸的其他盐形式在相似的条件是吸湿的。图 1 表示了 CA4P 单 TRIS 盐的吸湿图谱。可变的相关湿度-X 衍射 (“RH-XRD”) 实验已经显示, 粉末的图谱在接触 25 度时的不同湿度后仍然未变。

多形性

对本实施例的 CA4P 单 TRIS 盐的单一结晶 X 射线研究证明它是非手性的纯净形式 (N-1), 不含有任何溶剂位点, 并且它具有一个中央对称的单斜晶体结构。在室温下的单斜单一晶体结构中精确的原子参数派生的类似的粉末图谱是与观察到的粉末图谱一致的。根据 ^1H NMR, 差示扫描量热法 (DSC), 热重量分析法 (TGA) 和粉末 X 衍射 (p-XRD), 发现从 IPA/水制备的几个批次的单 TRIS 盐是可再生的。在几种不同的溶剂中如乙醇, 异丙醇, 丙酮, 乙腈和水中, 开始在 70-75 度 5 到 10 分钟, 然后在室温过夜可以将 CA4P 单 TRIS 盐糖浆化。通过 DSC, TGA 和 p-XRD 分析得到的固相。与 “类似” 的物质比较, 在这些样品中的任何物质中, DSC 热图和 p-XRD 图谱 (参见图 2) 没有差异。这表明 N-1 形式是相对稳定, 单一的多形性形式。

其他物理化学特性

CA4P 单 TRIS 盐的 DSC 热图显示是在 196 度时的单一熔体吸热 (图 3)。热重力分析在低于 150 度下没有发现由于挥发而丢失任何重量。CA4P 单 TRIS 盐在 25 度时的平衡水溶液溶解度确定为 3.37mg/ml(pH4.8)。水溶液的溶解度随着 pH 的提高而提高, 在 pH8.2 时达到 191 毫克/毫升。这特别适用于制备 pH 范围 8-9 的本实施例的化合物的剂量形式 (包括, 但不限于直接对病人给药的溶液 (“准备使用的溶液”), 或用于冻干的分批溶液) 用于

静脉内给药。CA4P 单 TRIS 盐的 pH 溶解图谱表示在图 4 中。在固态与大气和温度和湿度加速条件接触时，单 TRIS 盐也展示了良好的化学稳定性。

所以本实施例的 CA4P 单 TRIS 盐具有良好的用于药物配方如打算口服或肠胃外给药的物理化学特性。不象本文不涉及的 CA4P 的其它盐形式，单 TRIS 盐在固态时，特别是在实践中的非吸湿行为中显示了出乎意料的优越特性。从 TRIS 的水溶解度程度来看，这是特别惊人的。

CA4P 单氨丁三醇盐（放大）

IPA 中的 CA4P 游离酸溶液 用机械搅拌器和其他漏斗装备 12 升的 3 颈圆底烧瓶。在烧瓶中加入 1.5 升去离子水和乙酸乙酯（2.0 升）中的 CA4P 二钠盐的溶液（99.92g, 0.227mol）通过附带的漏斗快速搅拌慢慢加入盐酸溶液（0.5N, 950 毫升, 0.475mol）（水相的最后 pH 约为 1（pH 纸））。分离有机相。用乙酸乙酯提取水相（5X1.6L）。在 Na₂SO₄ 上干燥合并的有机相。旋转蒸发乙酸乙酯形成溶解于 IPA（800 毫升）的厚的油。

CA4P 单-TRIS 盐在 12 升的三颈圆烧瓶中加入 800 毫升去离子水中的 TRIS（25g, 0.206mol）溶液。通过附带的漏斗，快速搅拌慢慢加入上面制备的 IPA 中的 CA4P 游离酸溶液。在加入后，用 CA4P 单-TRIS 盐滴加得到的溶液，在 RT 机械搅拌 1 小时。然后，在浆液中慢慢加入更多的 IPA（2.0L），继续搅拌 1 小时。通过吸收过滤分离结晶白色固体，用 IPA（800 毫升）洗涤，在真空 40 度干燥 4 天，得到 101.55g CA4P 单 TRIS 盐。对最后产物的 ¹H NMR 分析的结果显示，它含有作为残留溶剂的 IPA（0.4wt%）（0.196mol，全部重量的 86%）。C₂₂H₃₂NO₁₁P 的计算结

果是: C, 51.06; H, 6.23; N, 2.70; P, 5.98. 发现结果是: C, 50.95; H, 6.14; N, 2.69; P, 5.82.

实施例 2

CA4P 前体药物单-氨丁三醇盐 TRIS 配方

如下制备了实施例 1 的化合物 (CA4P 单 TRIS 盐) 的水溶液和冻干 (即, 冷冻干燥的) 药物组合物。

在注射用的水 USP 中, 以浓度 60 毫克/毫升溶解化合物, 加入足够量的 TRIS (氨丁三醇碱) 得到 pH8.5 制备实施例 1 的化合物的水溶液。在避光的条件下进行溶解。

通过下面的过程得到冻干粉。将上面形成的溶液通过 0.2 微米的过滤器过滤, 并在无菌的玻璃小瓶中等分。在 Virtis Lyophilizer 中, 在高度真空下, 在 -35 度冻干溶液, 时间 24 到 72 小时, 然后继续在 5 度, 在高度真空中干燥 24 到 48 小时产生冻干粉。

根据这些方法可以制备含有实施例 1 的化合物的其他药物组合物。例如, 如上所述, 在上面的溶液中可以加入疏松剂 (例如, 氨基酸如精氨酸, 赖氨酸, 糖如蔗糖, 乳糖, 甘露醇, 多聚物如聚乙烯吡咯烷酮或葡聚糖, 等等)。

例如, 通过在注射的水, USP 中溶解化合物, 浓度为 30 毫克/毫升, 加入适当的疏松剂甘露醇, 葡聚糖或他们的结合和足够量的 TRIS (氨丁三醇碱) 得到 pH8.6 制备实施例 1 的化合物的水溶液。在避光的条件下进行溶解。

然后，通过下面的方法得到冻干粉。通过适当的 0.2 微米的无菌过滤器过滤上面形成的溶液，在无菌玻璃瓶中等分。在 Virtis Lyophilizer 中，在 -10 度下，在适当的真空中冻干溶液 24 到 72 小时，然后在 5 度高真空中进一步干燥 24 到 48 小时产生冻干粉。

如上解释，任何适当的有机胺，包括但不限于二乙胺，葡糖胺，N 甲基葡糖胺，乙二胺，和 2-(4-咪唑) 乙胺可以容易地用如上所述制备的氨丁三醇取代产生本发明的化合物或组合物。也可以相似地形成通式 I 中的 Q 具有其他定义的组合物。

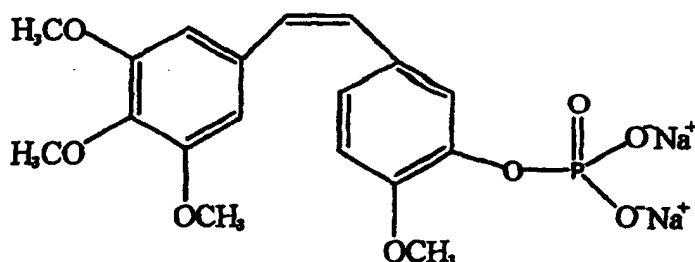
实施例 3

CA4P 单-L-组氨酸盐前体药物

在本发明的实施方案中，CA4P 单-L-组氨酸如本发明的化合物的非限制实施例所述。根据本文的资料，本领域的普通技术人员可以容易地生产各种 CA4P 单或双氨基酸盐前体药物，如通过与下面所述相类似的方法在 CA4P 游离酸中加入需要的氨基酸生产，这些都包括在本发明和附加的根据权利要求中。

试剂和方法

购买得到下面的试剂和化学物，不进一步纯化而利用：L-组氨酸 (Aldrich Chemical Co. 98% 标记, 批次 #04821JR), 异丙醇 (B&J Brand, 高纯溶解级)。“CA4P 二钠盐”是具有下面的结构的化合物:



(参见上面提到的美国专利编号 5, 561, 122)

在 Bruker DPX300 和 DRX400 光谱仪上记录多核 NMR 谱。对于四甲硅烷, 以 ppm 记录 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学位移 (^{13}C NMR 化学位移是用甲醇, 如外部标准确定的)。对于 85% 的 H_3PO_4 , 以 ppm 报道 ^{31}P NMR 化学位移 (外部标准)。用解藕的质子 $\{^1\text{H}\}$ 获取 ^{13}C 和 ^{31}P NMR 谱。为了辅助在结构上派定 ^1H 和 ^{13}C NMR, 进行了 2D NMR 实验 (HMQC 和 HMBC)。在 DSC/2920 差示扫描计量器, TA 仪器上进行 DSC。

CA4P 单-L-组氨酸水合盐

L-组氨酸水溶液储备液 (0.2M) 在 10 毫升去离子水中溶解 L-组氨酸 (0.3167g, 2.0mol), 形成 0.2M 溶液。

在甲醇中的 CA4P 游离酸储备液 (0.6M) 在 5.0 毫升的去离子水中溶解 CA4P 二钠盐 (1.9194g)。在得到的溶液中加入氯化钠饱和水溶液 (40 毫升)。沉淀白色固体。加入乙酸乙酯 (50 毫升), 磁搅拌得到的浆液, 用 0.5N 盐酸酸化直到双相混合物变得纯清 (水相是酸的 (pH 纸))。分离有机相。用乙酸乙酯 (2X50 毫升) 提取有机相。合并有机相, 在 Na_2SO_4 上干燥。过滤和蒸发溶剂 (旋转蒸发, 水浴温度=37 度) 产生厚的 CA4P 游离酸膜, 用 10 毫升甲醇吸收。旋转蒸发甲醇 (37 度) 得到米色泡沫, 溶解于 MeOH (4.79 毫升), 产生希望浓度 0.8M 的溶液。

将 100 微升 0.2M 的组氨酸溶液(20 微摩尔)与 25 微升 CA4P 游离酸溶液混合进一步证实了上面测定的浓度。旋转蒸发得到的溶液的溶剂到干燥。通过 ^1H NMR 分析固体表明了组氨酸: CA4P 游离酸的摩尔比例为 1: 0.75。所以, 计算的 CA4P 游离酸的浓度为 0.6M。(这一结果表明, CA4P 游离酸的泡沫含有溶剂)。

CA4P 单-L-组氨酸水合盐 在 4 毫升 HPLC 小瓶中加入 L-组氨酸 (900 微升, 0.2M, 180 微摩尔), CA4P 游离酸 (300 微升, 0.6M, 180 微升), 和异丙醇 (1.0 毫升)。旋转蒸发得到的溶液 (水浴温度=39-40 度), 将体积减少到约 1.5 毫升。再加入 1.0 毫升异丙醇, 再将体积减少到 1.5 毫升。在溶液中观察到小的结晶。终止蒸发过程, 在小瓶上加盖, 允许在大气温度下保留 5 小时。通过 Whatman#54 滤纸过滤 5 小时分离结晶固体, 用异丙醇洗涤 (约 2 毫升), 在氮气流中过夜干燥, 得到 82.7mg CA4P 单-L-组氨酸白色固体。得到的 CA4P 单-L-组氨酸盐前体药物是结晶固体; Karl Fisher 分析固体表明水含量是 4.66%, 这是对每个盐分子水合 1.5 个水分子的结晶固体 (143 摩尔, 79%产量) 计算的: ^1H NMR(300MHz, D_2O) δ 3.33(d, $J=6.59\text{Hz}$, 2H, C(21) H_2), 3.67(s, 6H, C(15) H_3 and C(17) H_3), 3.74(s, 3H, C(16) H_3), 3.82(s, 3H, C(18) H_3), 4.01(t, $J=6.50\text{Hz}$, 1H, C(20)H), 6.53(d, $J=12.25\text{Hz}$, 1H, C(8)H), 6.62(d, $J=12.25\text{Hz}$, 1H, C(7)H), 6.62(s, 1H, C(6)H), 7.37(s, 1H, C(23)h, 8.63(s, 1H, C(24)H); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 26.12(C21), 53.93(C20), 56.26(2C, C15, C17), 56.35(C18), 61.32(C16), 106.86(2C, C10, C14), 113.26(C3), 118.03(C23), 122.04(d, $J_{\text{PC}}=2.3\text{Hz}$, C6), 125.52(C4), 127.80(C22), 129.40(C8), 130.05(C7), 130.57(C5), 133.99(C9), 134.34(C24), 136.18(C12), 141.37(d, $J_{\text{PC}}=6.90\text{Hz}$, C1), 150.01(d, $J_{\text{PC}}=4.60\text{Hz}$, C2), 152.52(2C, C11 and C13), 172.87(C19); ^{31}P NMR(121 MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ -2.61(s). $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 的计算值: C, 49.83; H, 5.75; N, 7.26. 实际值: C, 50.13; H, 5.78; N, 7.26.

本方法中对产物的 Karl Fisher 和元素分析表明结晶是倍半水合物。DSC 分析显示有一个在 158.6degC 有熔体吸热的主要结晶形式(参见图 5)。从这一物质得到的粉末 X 衍射数据表示在图 8, 顶上的图谱。

在室温下, 作为对结晶混合物的总体积的 CA4P 游离酸毫摩尔的函数观察多形性的差异。在上面的方法中, 每毫升结晶总体积使用 0.2mmol 的 CA4P 游离酸。假如 CA4P 单-L-组氨酸盐形式中每分子盐具有 1.8 分子的水, 修改上面的方法, 每毫升结晶总体积使用 0.03mmol 的 CA4P 游离酸(参见图 6, 样品大小 3.8500mg, DSC 分析表明, 一个结晶形式在 184.9deg C 有一个熔体吸热。¹H NMR 分析表明, CA4P: 组氨酸=1: 1)。图 8 表示了从这一物质得到的粉末 X 衍射数据, 底部的图谱。假如 CA4P 单-L-组氨酸盐形式的混合物中, 一个中每个盐分子具有 1.5 分子的水, 另一个中每个盐分子中具有 1.8 个水分子, 同样修改上面的方法, 每毫升结晶混合物的总体积使用 0.07 毫摩尔 CA4P 游离酸(参见图 7, 样品大小 4.4500mg; 对这一混合物的 Karl Fisher 和元素分析表明结晶盐是倍半水合物)。DSC 分析说明了两种结晶形式。吸热分别和图 5 和 6 相似。DSC 和粉末 X 衍射数据表明, 上面形成的 1.5:1 和 1.8:1 (水和盐) 是两种不同的结晶形式。正如上面注意到的, 这两种形式的混合物是容易得到的。通过滴加, 每种形式都可以制成纯净状态。

在存在水时也可以得到半七水合物 CA4P 单-L-组氨酸盐形式。但是, 这一形式转换成了倍半水合物 CA4P 单-L-组氨酸盐形式。

正如上面解释的, 各种天然或非天然氨基酸包括但不限于鸟氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 和色氨酸可以容易地用如上所述的组氨酸取代, 产生本发明的化合物。

CA4P 单-L-组氨酸水合盐 (放大)

L-组氨酸储备液 (0.2M) 将 L-组氨酸 (1.90g, 12.0mmol) 溶解于 60 毫升去离子水中形成 0.2M 的溶液。(这一溶液可以当时制备)。

在异丙醇 (IPA) 中的 CA4P 游离酸储备液 (0.17M) CA4P 游离酸可以在下面的方法中制备。可以将酸等当物减少到 2.1; 不需要加入氯化钠。下面的过程是例子: 将 CA4P 二钠盐 (8.94g, 20.3mmol) 溶解于 50 毫升去离子水中。在得到的溶液中加入乙酸乙酯 (200 毫升) 和饱和的氯化钠水溶液 (100 毫升), 快速搅拌。形成白色的糕。逐步加入 0.5N 的盐酸溶液 (220 毫升) 溶解糕 (最后水相的 pH 约为 1 (pH 纸))。分离有机相。用乙酸乙酯 (1X200 毫升, 然后 2X150 毫升) 提取水相。合并有机相, 在 Na_2SO_4 上干燥。过滤和蒸发溶剂 (旋转蒸发, 水浴温度=40 度) 产生溶解于 100 毫升 IPA 的 CA4P 游离酸厚膜。通过 ^1H NMR, 得到的溶液的浓度确定为 0.17M。

为了证实上面测定的浓度, 在 4 毫升 HPLC 小瓶中吸入 60 微升组氨酸溶液 (0.2M) 和 70 微升 CA4P 游离酸溶液。旋转蒸发溶剂到干燥。将固体溶解于 0.7ml 的 D_2O , 并通过 ^1H NMR 分析, 得到结果是组氨酸与 CA4P 游离酸的比例是 1: 1。总共得到 17 毫摩尔的 CA4P 游离酸 (84% 的产量)。

CA4P 单-L-组氨酸水合盐 (放大) 在 250 毫升的圆底烧瓶中加入 70.6ml 的 CA4P 游离酸溶液 (0.17M, 12.0mmol) 和 50 毫升的 IPA。在 CA4P 游离酸溶液中逐步加入 L-组氨酸溶液 (60 毫升, 0.2M, 12.0mmol), 快速搅拌。在 40 度下搅拌得到的白色浆液 30 分钟, 在大气温度下搅拌 3 小时, 接着冷却到 0 度 (冰浴) 停留 1 小时。通过在 Whatman#54 滤纸上吸收过滤分离结晶固体, 用

冷的异丙醇洗涤，在真空中干燥 88 小时，得到 6.07 克 CA4P 单-L-组氨酸白色固体。对固体的 Karl Fisher 分析表明水含量是 4.48%，这是对每个盐分子 1.5 个水分子的水合结晶固体（10.5mmol，87% 产量）计算得到的： ^1H NMR(300MHz, D_2O) δ 3.32(d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, C(21) H_2), 3.68(s, 6H, C(15) H_3 and C(17) H_3), 3.74(s, 3H, C(16) H_3), 3.82(s, 3H, C(18) H_3), 4.00(t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, C(20)H), 6.53(d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H, C(8)H), 6.62(d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H, C(7)H), 6.64(s, 2H, C(10)H and C(14)H), 6.95(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H, C(3)H), 7.02(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H, C(4)H), 7.20(broad s, 1H, C(6)H), 7.36(broad s, 1H, C(23)H), 8.62(d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H, C(24)H); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 26.11(C21), 53.92(C20), 56.22(2C, C15, C17), 56.32(C18), 61.28(C16), 106.82(2C, C10, C14), 113.20(C3), 118.03(C23), 122.01(d, $J_{\text{PC}}=2.3\text{Hz}$, C6), 125.48(C4), 127.78(C22), 129.38(C8), 129.97(C7), 130.54(C5), 133.92(C9), 134.31(C24), 136.16(C12), 141.38(d, $J_{\text{PC}}=6.1\text{Hz}$, C1), 149.98(d, $J_{\text{PC}}=5.4\text{Hz}$, C2), 152.48(2C, C11 and C13), 172.86(C19). $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$: C, 49.82; H, 5.75; N, 7.26; P, 5.35。另外，利用差示扫描量热法，测定化合物主要在 158 度吸热，在 174 度也有少量吸热。

在本方法中，可以容易地取代任何适当的天然或非天然氨基酸，产生本发明的其他化合物。

当 CA4P 单-L-组氨酸盐在室温下结晶时，通常能得到水合物。在高于室温的温度，特别是高于 70 度时进行结晶，得到的无水盐。可以将组氨酸盐水合物转换成无水结晶形式（特别是，在 210 度下熔化），方法例如，通过在乙醇，甲醇，异丙醇，或丙酮溶剂中，在如 40 度的温度下（如 2 天）糖浆化水合物，接着过滤，洗涤，并在室温如 40 度（如过夜）真空干燥。实际非吸湿的无水形式是优选的。

CA4P 单-L-组氨酸无水盐

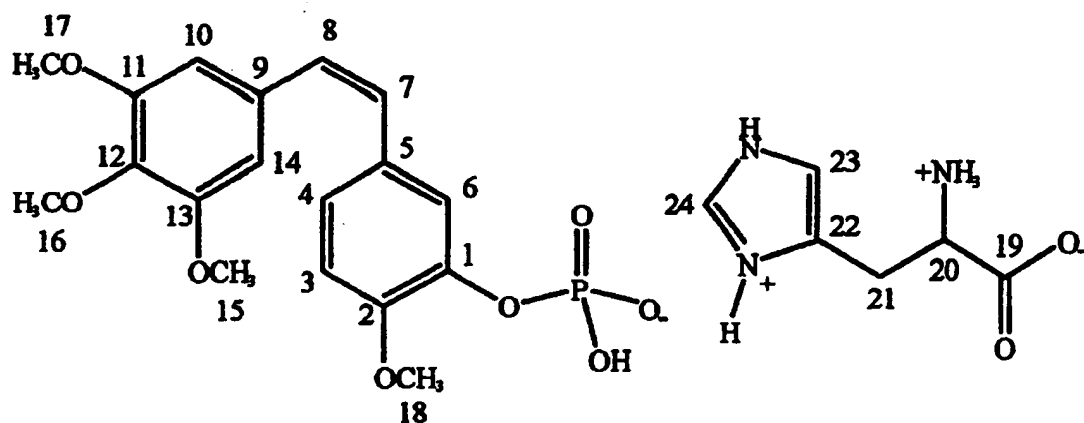
在 200 毫升的圆底烧瓶中加入 L-组氨酸(0.2620g, 1.65mmol) 和 16.5ml 的去离子水。在 74-76 度(油浴温度)加热得到的溶液, 磁搅拌。加入 CA4P 游离酸溶液(8.7ml, IPA 中 0.19M, 1.65mmol) 接着加入异丙醇(90 毫升)。在约 1 分钟内, 得到的溶液变成奶状。继续在 75-76 度下搅拌 2 小时, 然后在室温下 1 小时。通过在 Whatman#4 滤纸上吸收过滤分离针状结晶固体, 在空气流(吸收)中干燥过夜(19.5 小时), 在真空干燥器中 24 小时, 产生 0.7788g CA4P 单-L-组氨酸白色固体(1.41mmol, 86%产量): mp211.49 度(DSC); ^1H NMR(400MHz, D_2O) δ 3.30(d, J=6.5Hz, 2H, H-21), 3.65(s, 6H, H-15 and H-17), 3.72(s, 3H, H-16), 3.80(s, 3H, H-18), 3.99(t, J=6.5Hz, 1H, H-20), 6.50(d, J=12.3Hz, 1H, H=8), 6.59(d, J=12.3Hz, 1H, H-7), 6.60(s, 2H, H-10 and H-14), 6.92(d, J=8.5Hz, 1H, H-3), 6.97(broad d, J=8.5Hz, 1H, H-4), 7.19(broad s, 1H, H-6), 7.33(broad s, 1H, H-23), 8.58(broad s, 1H, H-24); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 27.11(C-21), 54.88(C-20), 57.17(2C, C-15, and C-17), 57.24(C-18), 62.24(C-16), 107.77(2C, C-10 and C-14), 114.17(C-3), 118.90(C-23), 122.93(d, $J_{\text{PC}}=2.3\text{Hz}$, C-6), 126.40(C-4), 128.88(C-22), 130.29(C-8), 131.00(C-7), 131.47(C-5), 134.93(C-9), 135.32(C-24), 137.08(C-12), 142.31(d, $J_{\text{PC}}=6.1\text{Hz}$, C-1), 150.91(d, $J_{\text{PC}}=4.6\text{Hz}$, C-2), 153.45(2C, C-11 and C-13), 173.84(C-19)。C₂₄H₃₀N₃O₁₀P 的计算值是: C, 52.27; H, 5.48; N, 7.62; P, 5.61。实际值是: C, 52.03; H, 5.43; N, 7.57; P, 5.57。

CA4P 单-L-组氨酸无水盐(放大)

在 200 毫升的三颈圆底烧瓶上装备机械搅拌器, 500 毫升的漏斗, 与控制热套的 Therm-O-Watch L7-1100SA/28T 连接的热电藕。在烧瓶中加入 L-组氨酸(3.42g, 21.6mmol), 接着加入 216

毫升去离子水。在 74-80 度加热得到的溶液，搅拌。通过漏斗，以维持溶液温度 73-74 度的速度加入 CA4P 游离酸（120 毫升，在 IPA 中 0.18M，21.6 毫摩尔），接着加入 IPA（1176 毫升）（需要 14 分钟）。在加入 IPA 后，用 CA4P 单-L-组氨酸无水盐（痕量）点得到的清澈溶液。将溶液温度提高到 80 度，约在点后的 3 分钟产生了结晶。在 30 分钟内温度慢慢下降到 74 度，并且往常在 73-74 度再 1.5 小时。允许在 3.5 小时内使反应混合物冷却到 31 度。在 Whatman#4 滤纸上吸收过滤针状结晶，用 IPA（100 毫升）洗涤，在气流（吸收）中干燥，过夜（16 小时），并在真空干燥器中 21.5 小时，得到 10.11g CA4P 单-L-组氨酸无水盐白色固体（18.3mmol，85%产量）：mp213.65 度（DSC）； ^1H NMR（400MHz, D_2O ） δ 3.30(d, $J=6.5\text{Hz}$, 2H, H-21), 3.65(s, 6H, H-15 and H-17), 3.72(s, 3H, H-16), 3.80(s, 3H, H-18), 3.99(t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H, H-20), 6.49(d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H, H-8), 6.58(d, $J=12.0\text{Hz}$, 1H, H-7), 6.59(s, 2H, H-10 and H-14), 6.91(d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H, H-3), 6.97(dd, $J=8.3, 1.7\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.19(broad, $J=1.7\text{Hz}$, 1H, H-6), 7.34(broads, 1H, H-23), 8.60(d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H, H-24); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 27.07(C-21), 54.86(C-20), 57.18(2C, C-15 and C-17), 57.26(C-18), 62.24(C-16), 107.78(2C, C-10 and C-14), 114.18(C-3), 118.94(C-23), 122.95(d, $J_{\text{PC}}=2.3\text{Hz}$, C-6), 126.43(C-4), 128.79(C-22), 130.31(C-8), 130.98(C-7), 131.49(C-5), 134.91(C-9), 135.29(C-24), 137.10(C-12), 142.31(d, $J_{\text{PC}}=6.9\text{Hz}$, C-1), 150.92(d, $J_{\text{PC}}=4.6\text{Hz}$, C-2), 153.45(2C, C-11 and C-13), 173.82(C-19). $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ 的计算值：C, 52.27; H, 5.48; N, 7.62; P, 5.61. 实际值：C, 52.23; H, 5.35; N, 7.60; P, 5.55.

可以可再生地将 CA4P 单-L-组氨酸无水盐制备成单一的结晶形式。图 10 表示了 DSC（样品大小 2.3600mg）；图 11 表示了这一物质的粉末 X 衍射数据。



实施例 4

制备顺式 CA4P 单甘氨酸甲酯盐

下面的从 CA4P 二钠制备 CA4P 单甘氨酸甲基酯的方法是有利的。该方法中在存在 N, N-二异丙基乙胺时直接使用甘氨酸甲基酯盐酸, 提供了与用甘氨酸甲基酯游离碱制备比较提高的稳定性。另外, 在中和时利用浓缩的硫酸(而不是例如, 稀释的盐酸)明显改进了 CA4P 游离酸的制备(结果, 利用例如, 乙酸乙酯提取, 不需要蒸发)。在这个改良的方法中避免了反式 CA4P 游离酸的形成。

试剂和方法

购买获得下面的试剂和化学物, 不需要进一步纯化使用: 异丙醇 (IPA) (B&J Brand, 高纯度溶剂级), 硫酸 (EM Science, 95-98%, 批次#35310), 甘氨酸甲基酯盐酸 (Aldrich Chemical Co. 99% 标记, 批次#03214MU), N, N-二异丙基乙胺 (Aldrich Chemical Co. 99.5% 标记, 批次#02819ER)。在 Bruker DRX400 光谱仪上记录 ^1H 和 ^{13}C NMR 化学物位移(用 MeOH 作为外部标准测定 ^{13}C NMR 的化学物位移)。为了辅助将 ^1H 和 ^{13}C NMR

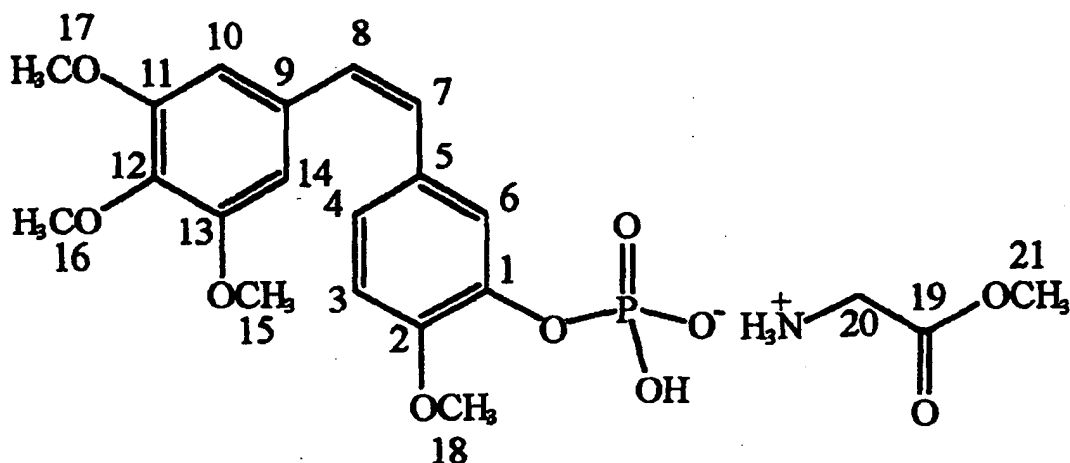
信号分派给结构,进行了 2D NMR 实验 (HMQC (杂核多量相关光谱, 确定分子的哪个 ^1H 与哪个 ^{13}C 核 (或其他 X 核) 连接的逆化学位移实验); 和 HMBC (杂核多键夏管光谱, 适于测定远程 ^1H - ^{13}C 的相关性以及分子的结构和 ^1H 和 ^{13}C 分配的修改版 HMQC)。在 DSC2920 差示扫描量热计, TA 仪器上进行差示扫描量热法 (DSC)。

顺式-CA4P 单甘氨酸甲基酯盐

将顺式 CA4P 二钠盐 (2.866g, 6.51mmol) 和 IPA (30 毫升) 加入 100 毫升的圆底烧瓶。在室温下磁搅拌得到的浆液。在浆液中逐步加入 IPA (60 毫升) 中的硫酸溶液 (0.365 毫升, 6.51mmol)。连续搅拌混合物约 10 分钟, 用 Whatman#1 滤纸吸收过滤。用 IPA (10 毫升) 洗涤固体 (在 IPA 中不溶的 Na_2SO_4)。在另一 100 毫升的圆底烧瓶中合并含有 CA4P 游离酸的过滤物和洗液。在合并的溶液中加入甘氨酸甲基酯盐酸 (0.826g, 6.51mmol) 和 N, N-二异丙基乙胺 (1.254ml, 7.16mmol)。在油浴中加热得到的混合物, 磁搅拌。在 60 度混合物变成清洁的溶液。在 65 度, 溶液变成浆液。在 78 度, 浆液溶解形成清洁的溶液。终止加热, 允许溶液在油浴中慢慢冷却。在 60 度, 在溶液中加入顺式 CA4P 单甘氨酸甲基酯的盐的点形成浆液。继续从 60 度到室温搅拌 1 小时, 然后在室温过夜。通过 Whatman#1 滤纸吸收过滤分离白色结晶, 用 IPA (3X10 毫升) 洗涤, 在气流中干燥 6 小时, 得到 2.609g 顺式 CA4P 单甘氨酸甲基酯盐 (5.38mmol, 82.6%产量):

^1H NMR(400MHz, D_2O) δ 3.52(s, 6H, H-15 and H-17), 3.61(s, 3H, H-16), 3.71(s, 3H, H-18), 3.77(s, 3H, H-21), 3.87(s, 2H, H-20), 6.26(d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H, H-8), 6.42(s, 2H, H-10 and H-14), 6.43(d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H, H-7), 6.70(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H, H-3), 6.79(broad, $J=8.8\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.16(broad s, 1H, H-6); ^{13}C NMR(100MHz, $\{^1\text{H}\}$, D_2O) δ 41.27(C-20), 54.58(C-21), 56.99(2C, C-15, and C-17),

57.21(C-18), 62.09(C-16), 107.60(2C,C-10 and C-14), 113.89(C-13), 122.98(C-6), 126.22(C-4), 130.25(C-8), 130.69(C-7), 131.37(C-5), 134.61(C-9), 137.09(C-12), 142.42(d, ^{23}P C=6.9Hz, C-1), 150.89(d, ^{31}P C=4.6Hz, C-2), 153.33(2C, C-11 and C-13), 169.95(C-19). $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{NO}_{10}\text{P}$ 的计算值是: C, 51.96; H, 5.81; N, 2.88; P, 6.38。实际值: C, 51.74; H, 5.79; N, 2.87; P, 6.30。



(注意: 如上所述的计数系统, 这样的计数系统如本文所示, 只是为了方便, 可以和 IUPAC 命名系统不一致)。

顺式 CA4P 单甘氨酸甲基酯盐(样品大小: 3.7400mg)的 DSC 如图 12 所示; 图 13 表示了这一物质的粉末 X 衍射数据(2 批)。

实施例 5

CA4P 游离酸的甘氨酸酯盐的制备

在 HPLC 小瓶中加入乙酸乙酯(2 毫升), CA4P 异丙醇溶液(150 微升的 0.42M 溶液, 63 微摩尔)和甘氨酸乙酯甲基叔丁基醚溶液(800 微升 0.08M 溶液, 64 微摩尔), 剧烈搅拌约 3 分钟。用另一个实验的浆液滴点得到的清洁溶液, 允许混合物在室温下过夜。形成的白色固体在显微镜观察下不表现成结晶, 所以, 允

许混合物在室温下保留3天多。加入甲基叔丁基醚(1毫升),搅拌混合物约10分钟。得到的混合物的显微镜检测表明,固体已经转换成结晶针。通过真空过滤分离针体,干燥成CA4P的甘氨酸乙酯(22.4mg, 66.M%产量)。质子NMR分析表明,甘氨酸乙酯与CA4P的比例是1.7:1。CA4P甘氨酸乙酯的¹H NMR数据是:
¹H NMR(300MHz, D₂O) δ1.20(t, J=7.2Hz, 3H, CH₃), 3.60(s, 6H, H-15 and H-17), 3.66(s, 3H, H-16), 3.74(s, 3H, H-18), 3.79(s, 2H, CH₂N), 4.21(q, J=7.2Hz, 2H, CH₂ CH₃), 6.44(d, J=12.2Hz, 1H, H-7), 6.57(s, 2H, H-10 and H-14), 6.80(d, J=8.7Hz, 1H, H-3), 6.85(broad, J=8.7Hz, 1H, H-4), 7.23(broad, s, 1H, H-6)。

本发明不限于本文所述的特定的实施方案的范围。确实,本发明的各种修饰,除了已经叙述的那些是可以从前面的叙述中被本领域的技术人员理解的。这样的修改是在附加的根据权利要求的范围内的。

本文引证了各种公开物和专利文件,这些公开物以全文引入作为参考。

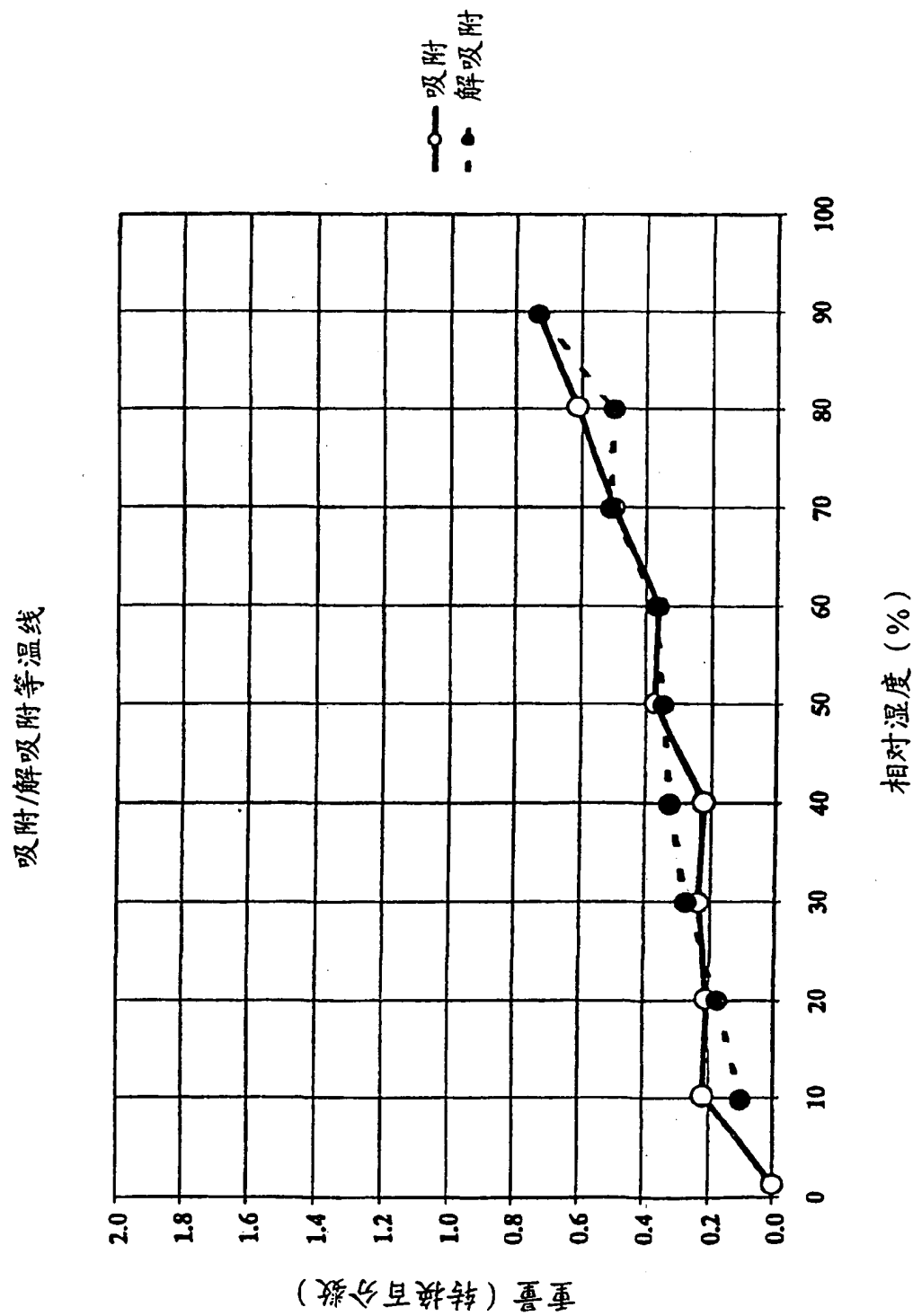


图 1

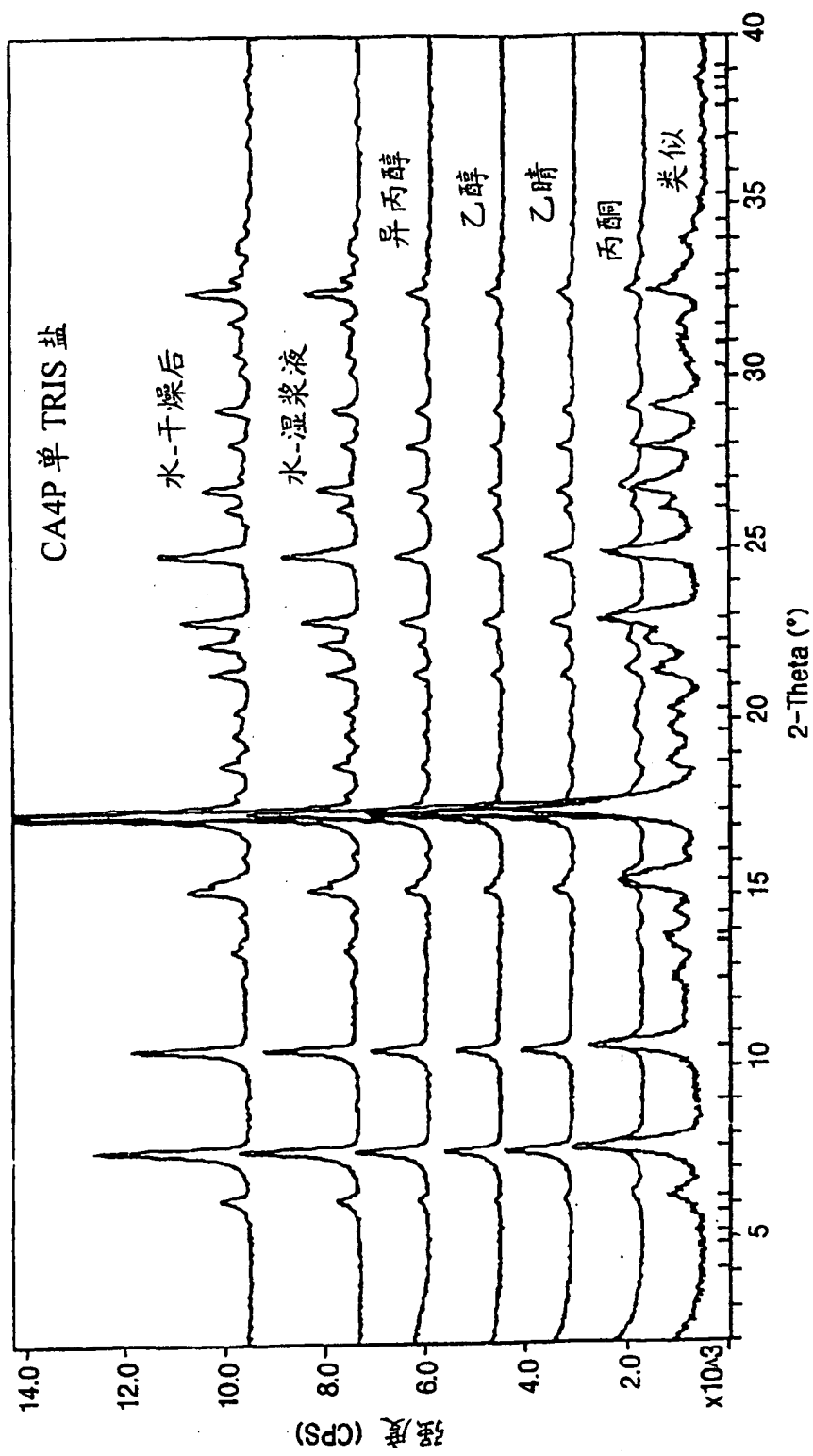


图 2

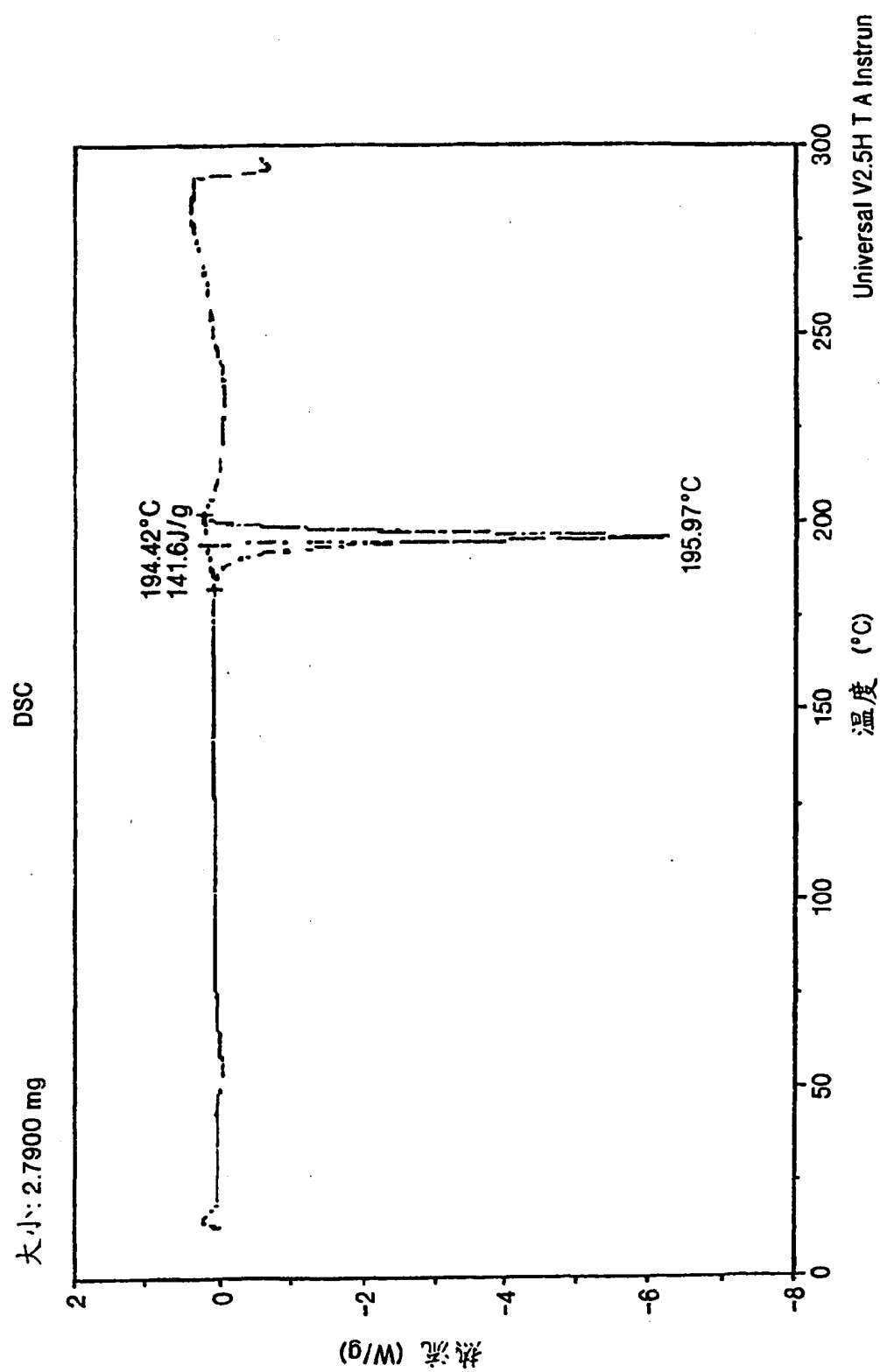


图 3

在 25°C 时 CA4P 单 TRIS 盐的水溶性

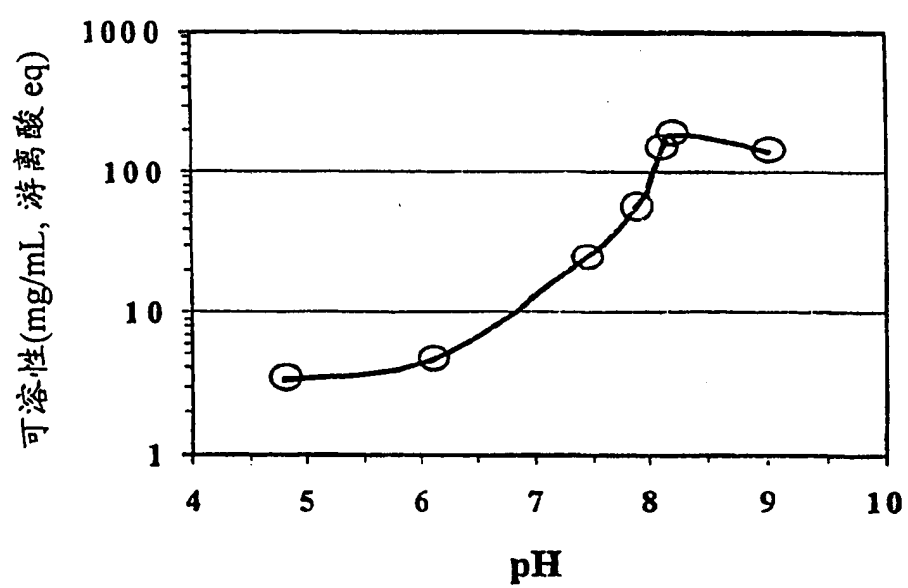


图 4

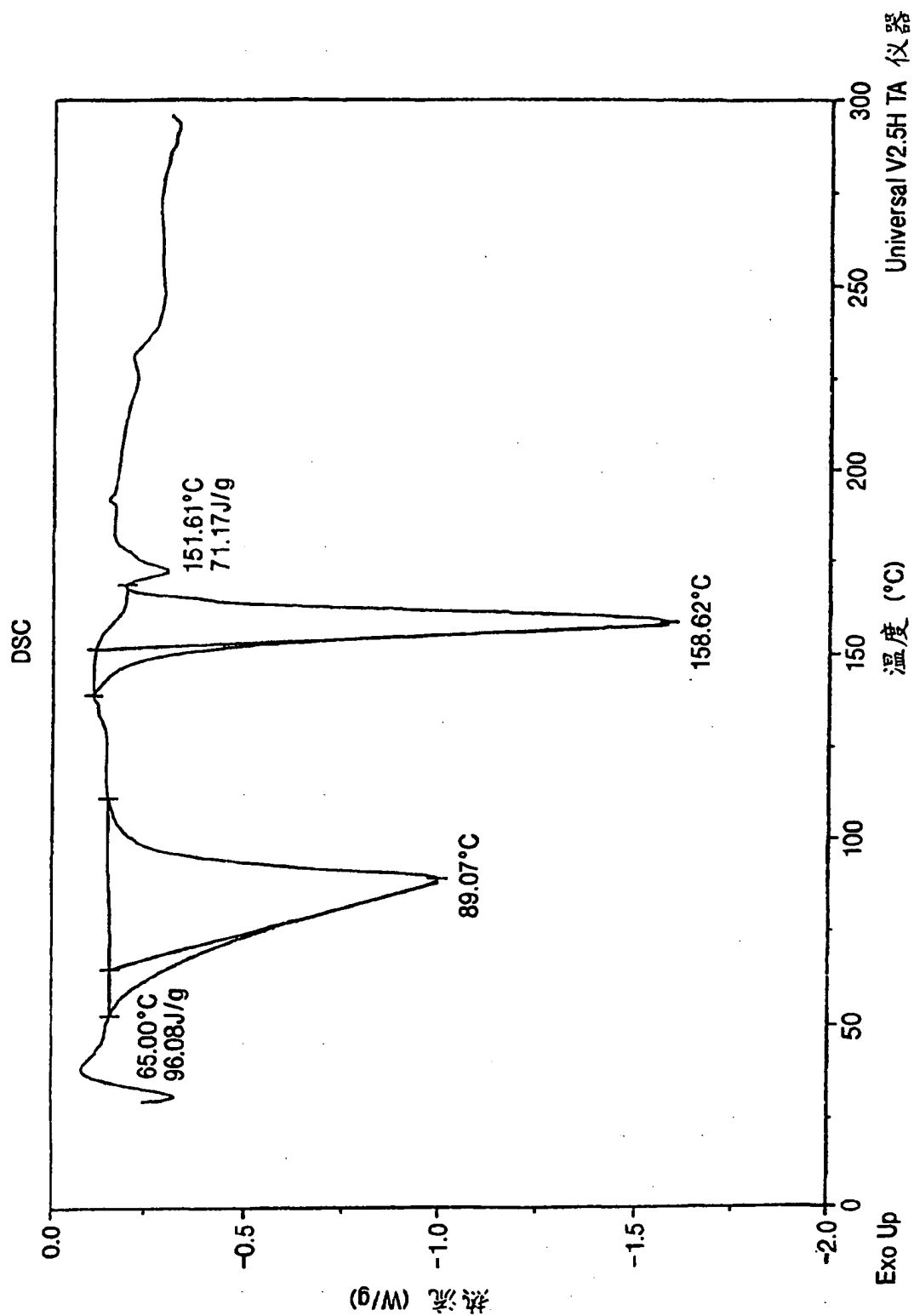


图 5

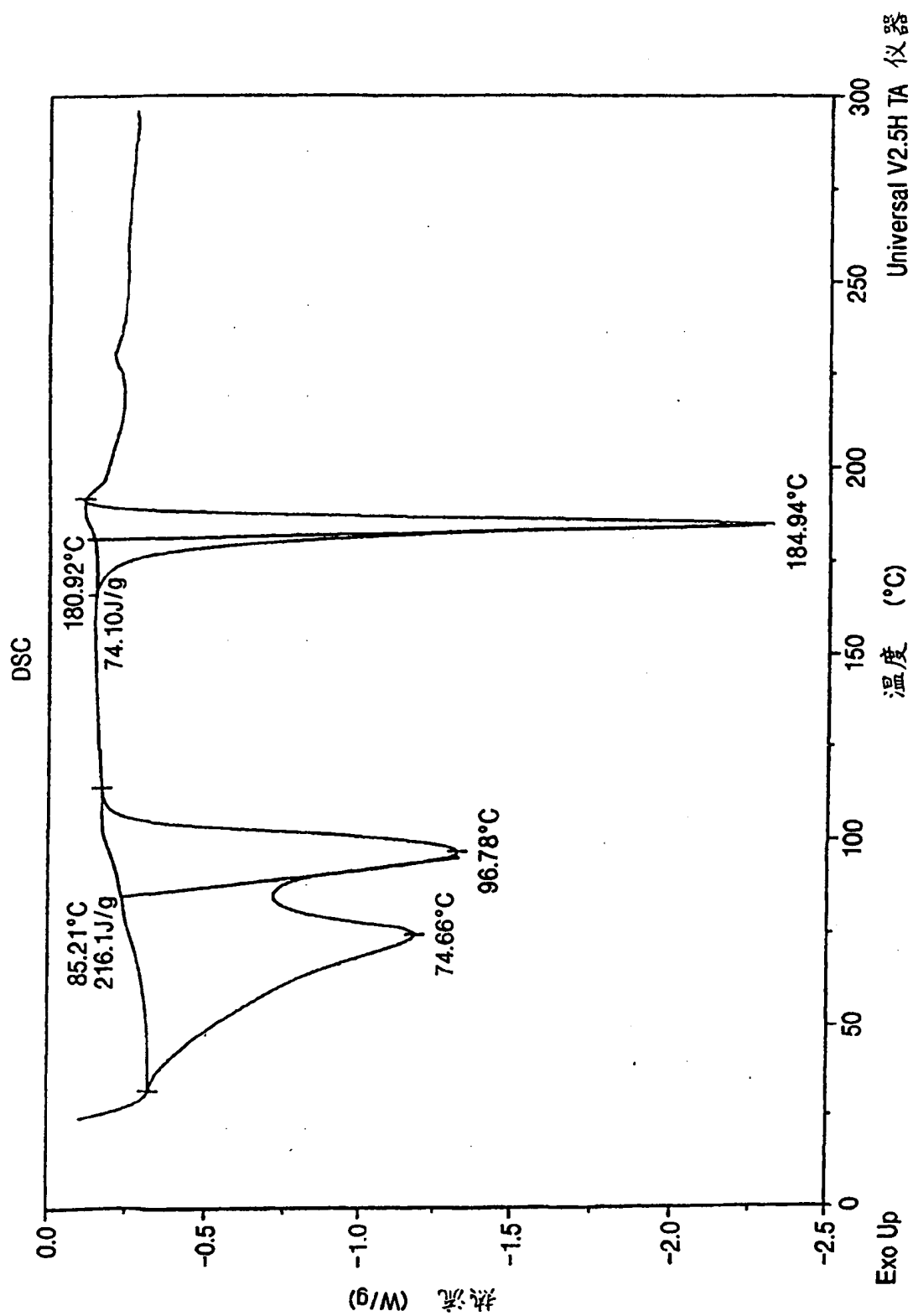


图 6

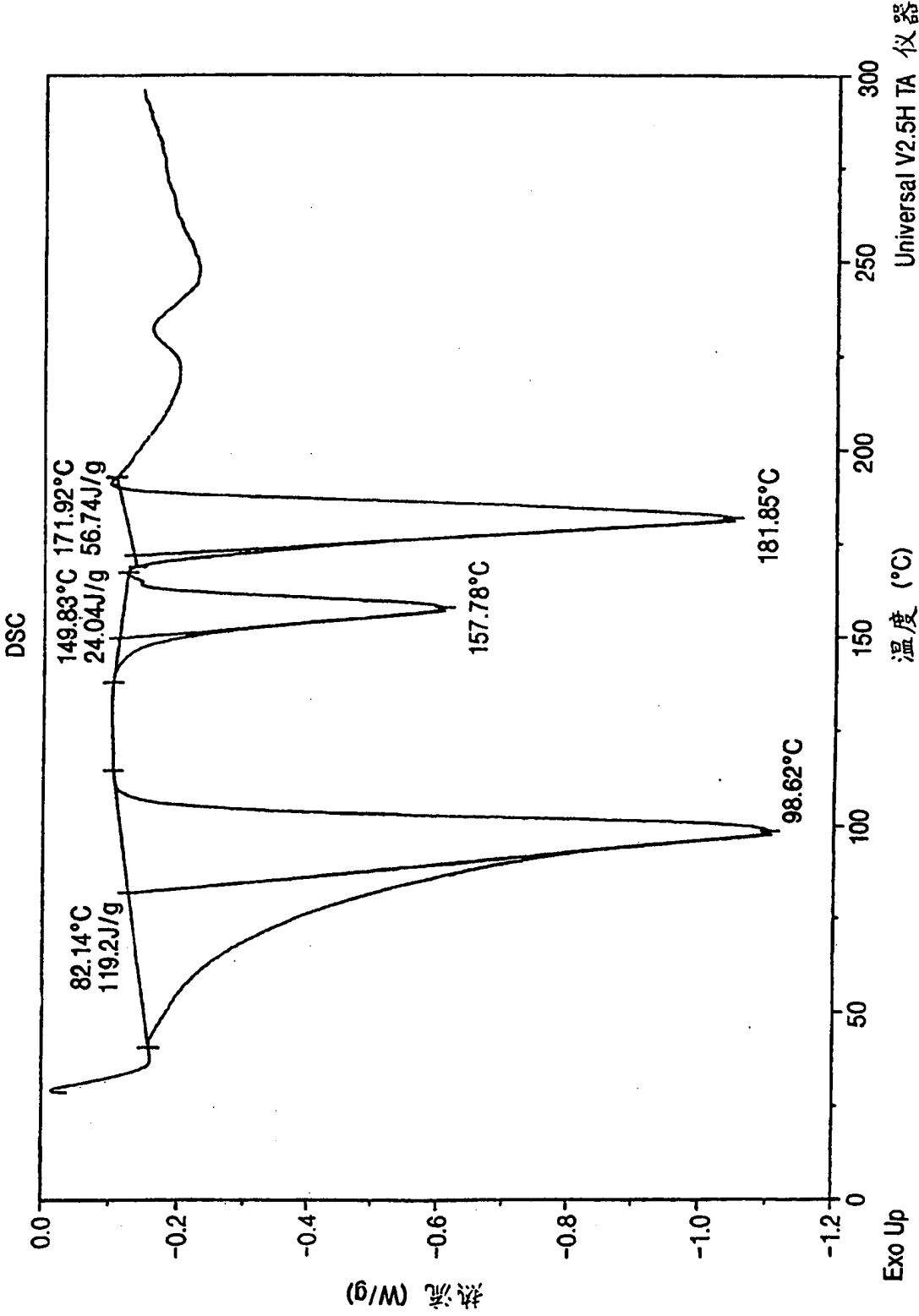


图 7

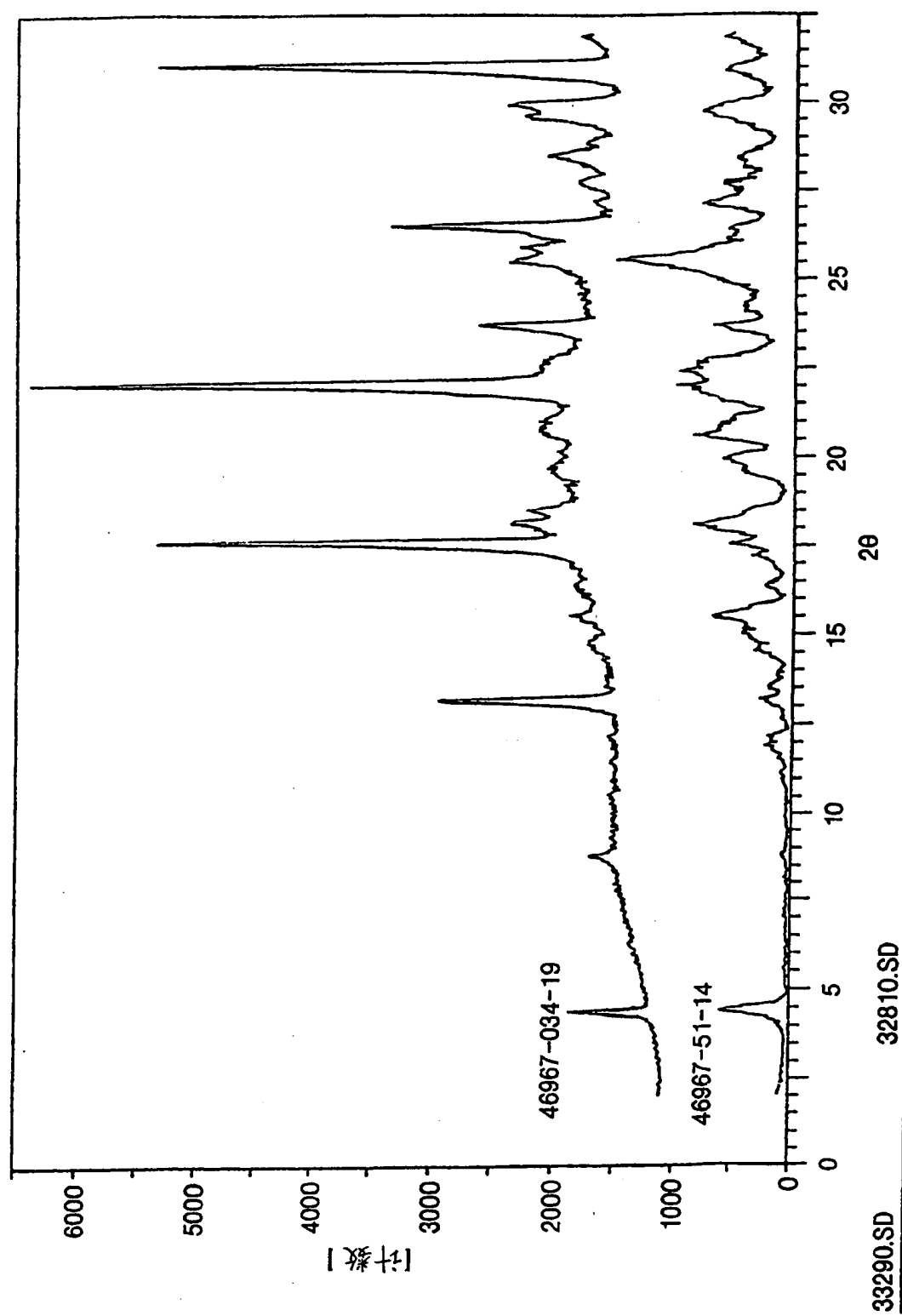


图 8

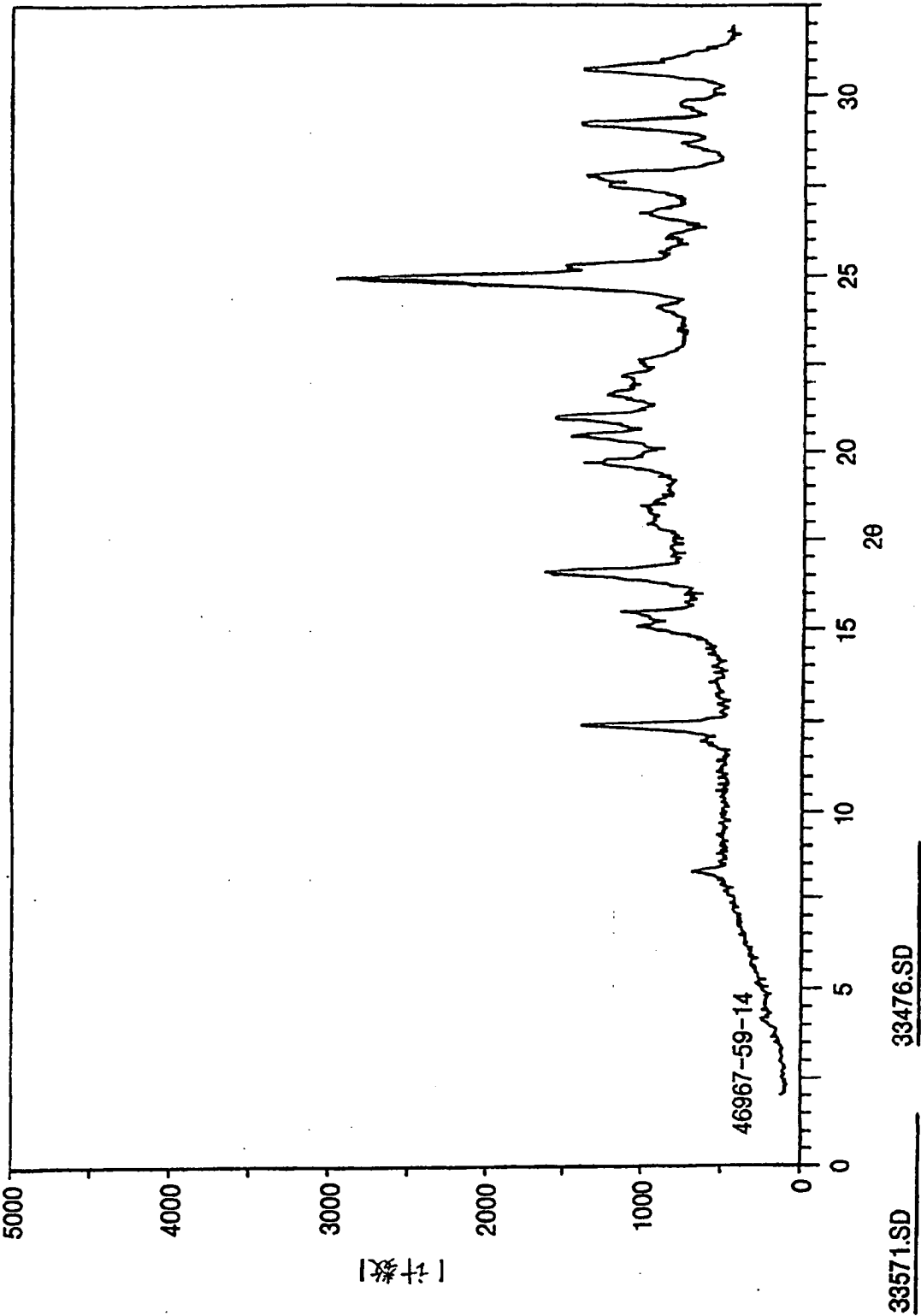


图 9

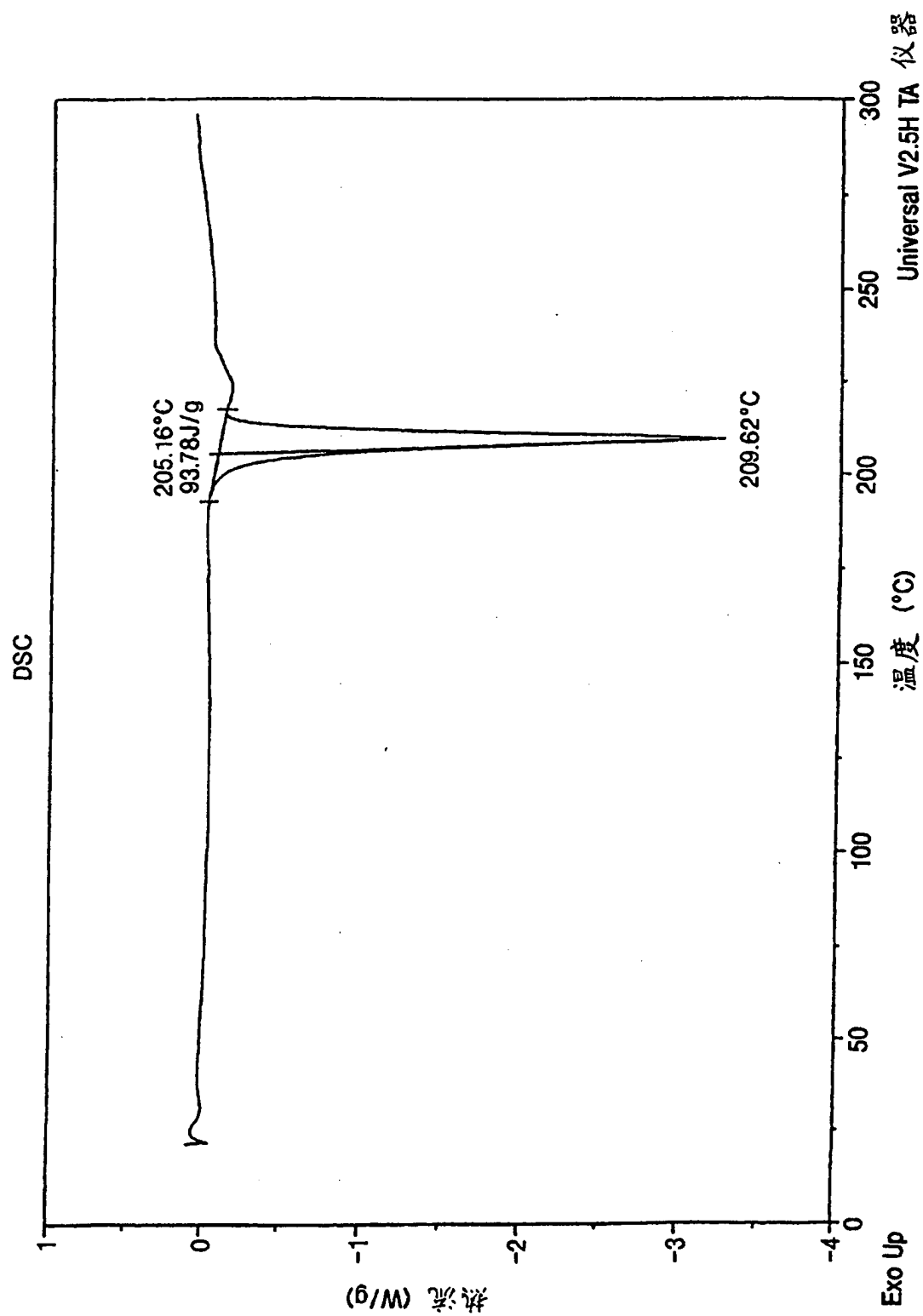


图 10

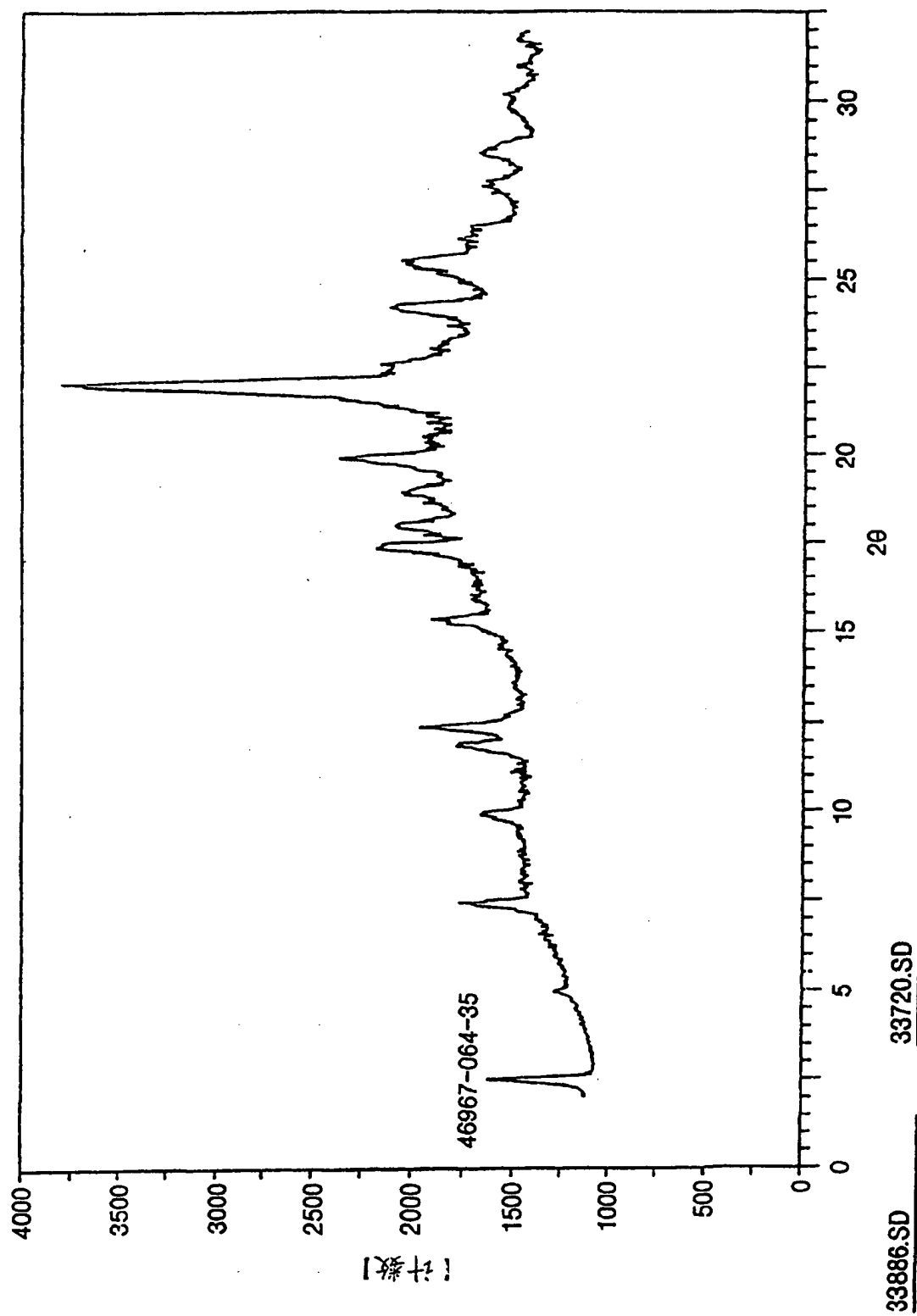


图 11

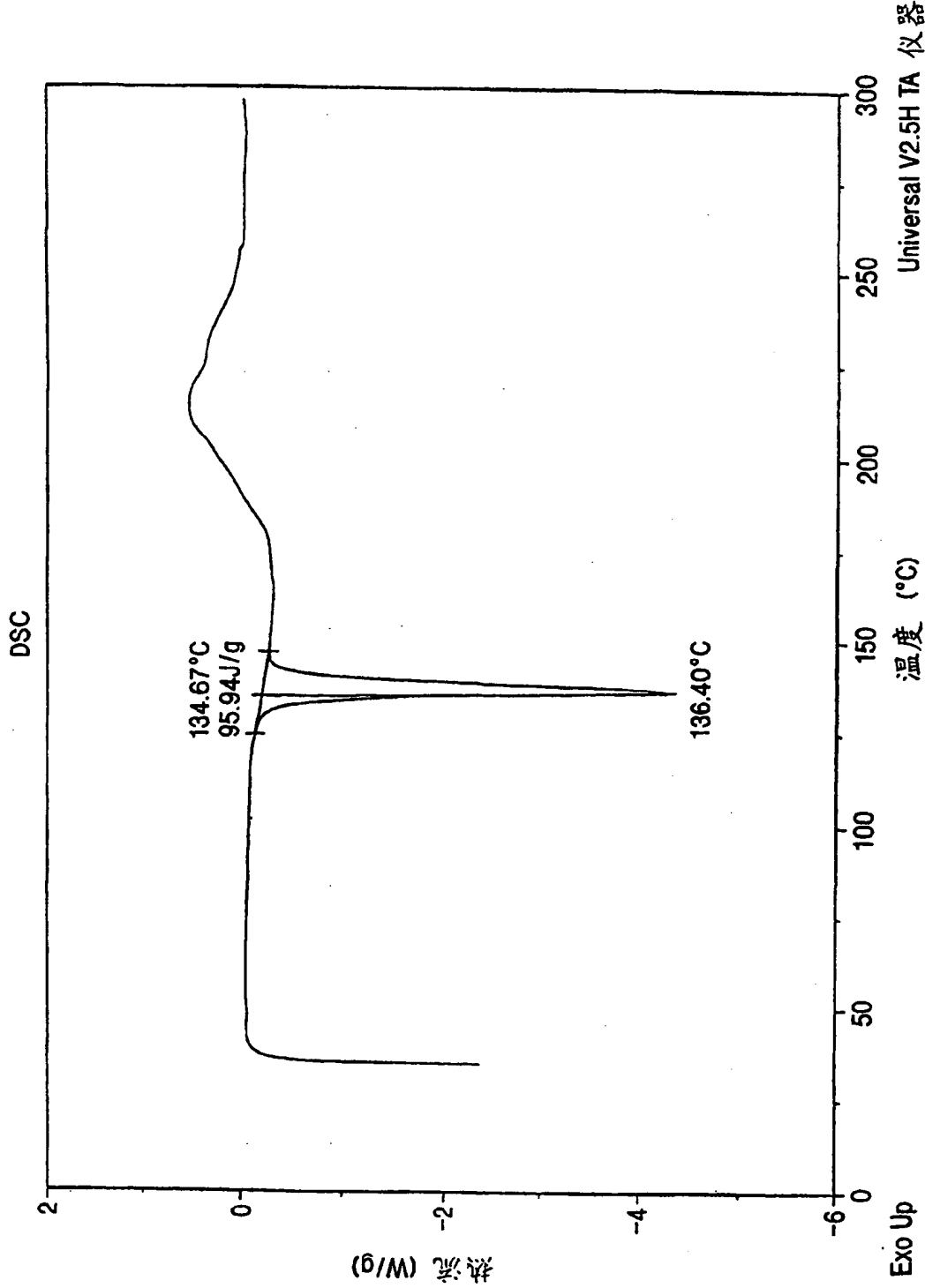


图 12

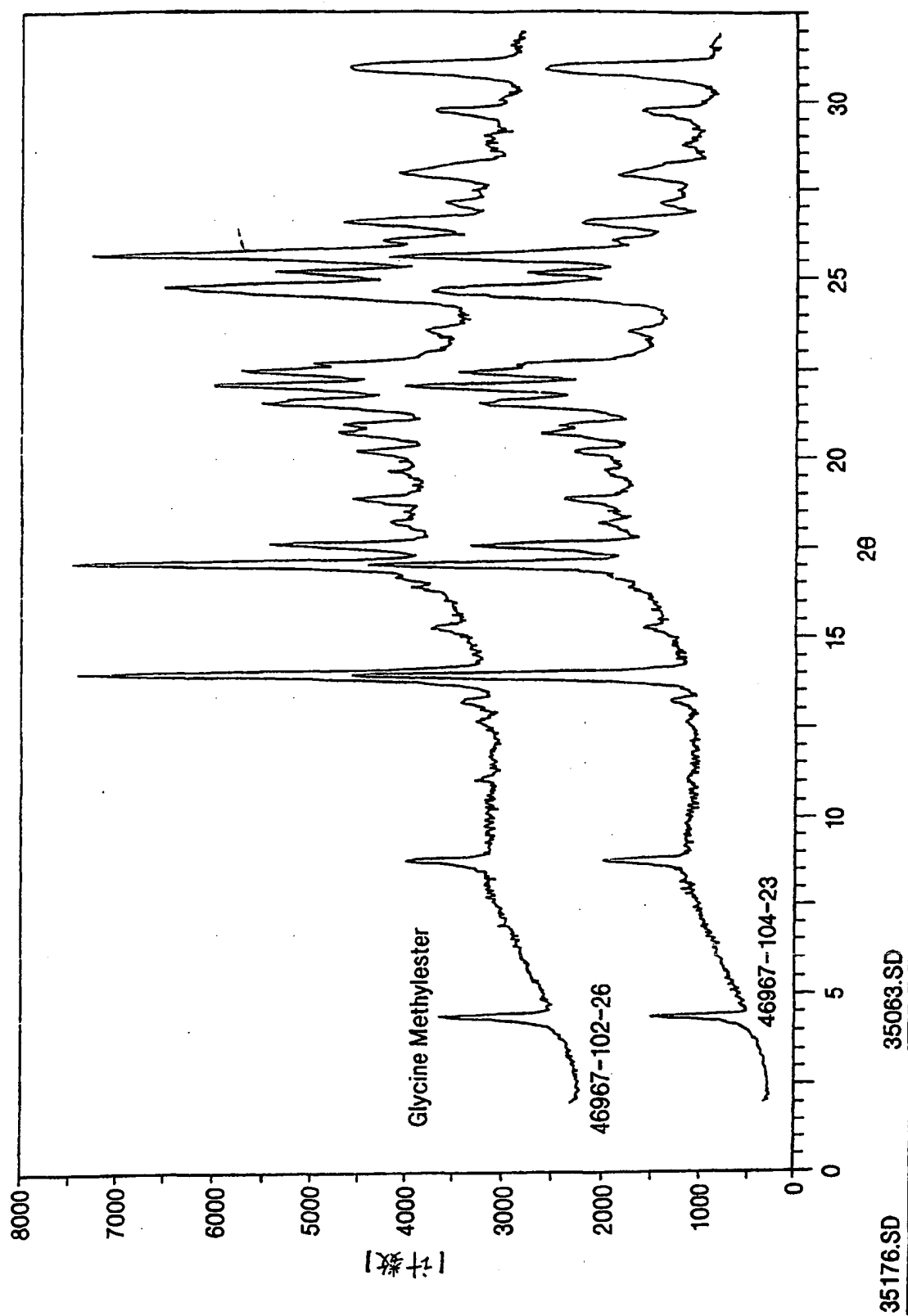


图 13