

[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 03815929.5

[51] Int. Cl.

C07D 401/12 (2006.01)  
A61K 31/47 (2006.01)  
C07D 409/14 (2006.01)  
C07D 217/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 100349888C

[22] 申请日 2003.5.13 [21] 申请号 03815929.5

[30] 优先权

[32] 2002.5.14 [33] US [31] 60/379,759

[86] 国际申请 PCT/GB2003/002060 2003.5.13

[87] 国际公布 WO2003/095447 英 2003.11.20

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.5

[73] 专利权人 埃克森诺瓦有限公司

地址 英国伯克郡

[72] 发明人 D·F·海曼 M·赖特

[56] 参考文献

CN-1241181A 2000.1.12

审查员 代庆伟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 22 页

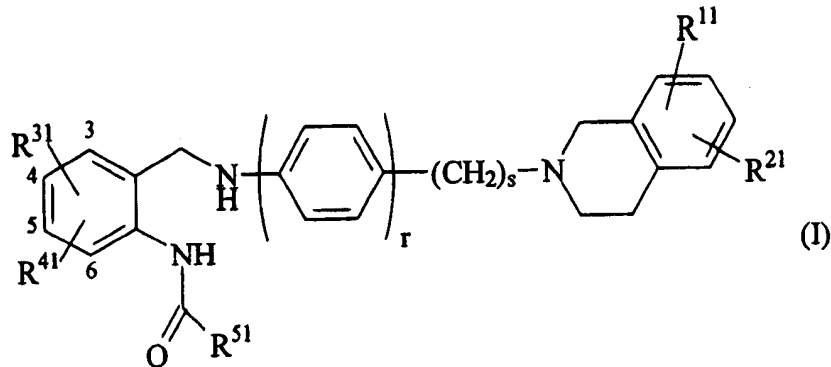
[54] 发明名称

药物化合物

[57] 摘要

制备邻氨基苯甲酸衍生物酸加成双盐水合物的方法,所述方法包括(a)以任何顺序混合邻氨基苯甲酸衍生物,药学上可接受的有机溶剂,过量的水和药学上可接受的强酸,形成混合物;(b)温热该混合物直到形成清澈的溶液;(c)温热时过滤溶液得到滤液;和(d)从滤液中回收上述定义的水合物。所述水合物有确定摩尔数的结晶水,和常规方法生产的这类酸加成双盐水合物比较具有更高的储存稳定性和溶解性能。

## 1. 制备式(I)化合物的酸加成盐水合物的方法:



其中

$R^{11}$  和  $R^{21}$  可以相同或不同, 分别是氢或  $C_1-C_6$  烷基;

$R^{31}$  和  $R^{41}$  可以相同或不同, 分别独立地选自 H,  $C_1-C_6$  烷基,  $CF_3$ , 卤素,  $NH_2$ ,  $NO_2$ ,  $NHOH$ ,  $C_1-C_6$  烷氧基, 羟基和苯基; 或  $R^{31}$  和  $R^{41}$  当位于相邻的碳原子上时同与它们相连的碳原子一起形成苯环或亚甲二氧基取代基;

$R^{51}$  选自吡啶, 喹啉, 异喹啉, 5,6,7,8-四氢喹啉和 5,6,7,8-四氢异喹啉, 所述基团是未取代的或被  $C_1-C_6$  烷基或  $C_1-C_6$  烷氧基取代;

$r$  是 0 或 1, 和

$s$  是 1, 2 或 3;

其中, 所述的水合物包括  $x$  摩尔结晶水/摩尔化合物, 其中  $x$  是 1-6 的整数;

所述方法包括:

- (a) 以任何顺序混合上述定义的化合物式(I), 药学上可接受的有机溶剂, 过量的水和药学上可接受的强酸, 形成混合物;
- (b) 温热该混合物直到形成清澈的溶液;
- (c) 温热时过滤溶液得到滤液; 和
- (d) 从滤液中回收上述定义的水合物。

2. 按照权利要求 1 的方法, 其中水合物通过使用反-溶剂稀释回收滤液。

3. 按照权利要求 2 的方法, 其中反-溶剂是预过滤的丙酮。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其中药学上可接受的溶剂是醇类。
5. 按照权利要求 4 的方法, 其中醇类选自乙醇, 正丙醇, 异丙醇, 苄醇和丙二醇。
6. 按照权利要求 1-5 中任何一项的方法, 其中药学上可接受的强酸是甲磺酸。
7. 如权利要求 1-5 中任何一项所述的方法, 其中式 (I) 化合物是喹啉-3-羧酸(2- {4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4, 5-二甲氧基苯基)酰胺。
8. 与药学上可接受的强酸形成的权利要求 1 定义的式 I 化合物的酸加成盐的水合物, 其中所述水合物含有 x 摩尔结晶水 / 摩尔化合物, 其中 x 是整数 1 - 6。
9. 按照权利要求 8 的水合物, 其中药学上可接受的强酸是甲磺酸。
10. 按照权利要求 8 的水合物, 它是喹啉-3-羧酸(2- {4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4,5-二甲氧基苯基)酰胺双甲磺酸盐的六水合物。
11. 药物组合物, 其中含有如权利要求 8 - 10 任何一项定义的水合物和药学可接受的载体或稀释剂。
12. 权利要求 11 所述的药物组合物其是兽医用组合物, 其中所述的载体或稀释剂是兽医学可接受的载体或稀释剂。
13. 权利要求 8 - 10 任何一项定义的水合物在制造用作 P - 糖蛋白抑制剂的药物中的用途。
14. 权利要求 8 - 10 任何一项定义的水合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途, 其中, 所述的肿瘤表达 P-gp 介导的 MDR。
15. 权利要求 8 - 10 任何一项定义的水合物在制备增强下述试剂的细胞毒性的药物中的用途, 其中, 所述试剂对肿瘤细胞有细胞毒性。
16. 权利要求 8 - 10 任何一项定义的水合物在制备用于增强治疗剂的下述特性的药物中的用途, 其中所述的特性选自渗入, 吸收, 分布, 代谢和消除。

## 药物化合物

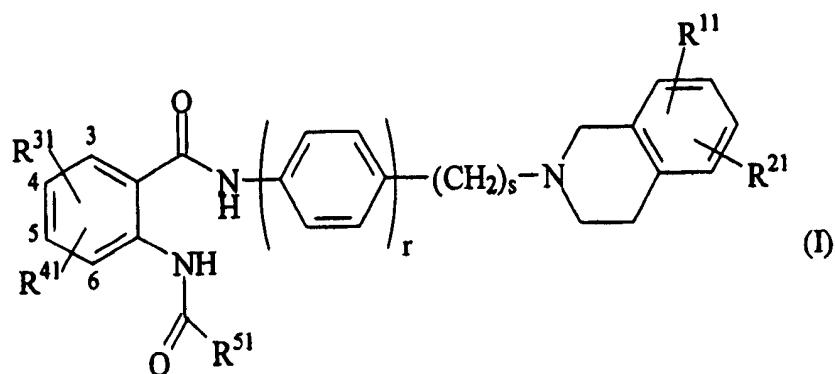
本发明涉及具有作为 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂活性的邻氨基苯甲酸衍生物的酸加成盐的水合形式, 它们的制备方法以及含有它们的药用和兽医用组合物。

WO-A-98/17648 记载了一系列具有基于邻氨基苯甲酸结构的碱性化合物及其酸加成盐。所述化合物具有作为 P-糖蛋白 (P-gp) 抑制剂活性, 可以用作多抗药性的调节剂, 例如克服肿瘤和病原体的多抗药性, 所述化合物在改进某些药物的吸收, 分布, 代谢和排除方面还有潜在的用途。

WO-A-98/17648 记载的许多化合物有两个碱性中心, 因此能够和形成盐的酸形成酸加成双盐。双盐是水合的, 但是不以特定的水合物存在, 确切地说它们以具有不同水含量的中间体水合物得到, 具有收湿性的缺点。

现在令人惊奇地发现往含有二碱价的起始化合物和形成盐的酸的体系中加入过量的水可以促进二碱价的化合物的溶解, 和导致形成作为确定水合物的所需酸加成双盐, 这种水合物在一定干燥条件下是稳定的。

因此本发明提供制备式 (I) 化合物的酸加成双盐的水合物的方法:



其中

$R^{11}$  和  $R^{21}$  可以相同或不同, 各自是氢或  $C_1-C_6$  烷氧基;

$R^{31}$  和  $R^{41}$  可以相同或不同, 各自独立地选自 H,  $C_1-C_6$  烷基,  $CF_3$ , 卤素,  $NH_2$ ,  $NO_2$ ,  $NHOH$ ,  $C_1-C_6$  烷氧基, 羟基和苯基; 或  $R^{31}$  和  $R^{41}$

当位于相邻的碳原子上时同与它们连接的碳原子一起形成苯环或亚甲二氧基取代基;

$R^{51}$  选自吡啶, 喹啉, 异喹啉, 5,6,7,8-四氢喹啉和 5,6,7,8-四氢异喹啉, 所述基团是未取代的或被  $C_1-C_6$  烷基或  $C_1-C_6$  烷氧基取代;

$r$  是 0 或 1, 和

$s$  是 1, 2 或 3;

所述方法包括:

- (a) 以任何顺序混合上述定义的化合物式(I), 药学上可接受的有机溶剂, 过量的水和药学上可接受的强酸, 形成混合物;
- (b) 温热该混合物直到形成清澈的溶液;
- (c) 温热时过滤溶液得到滤液; 和
- (d) 从滤液中回收上面定义的水合物。

按照如此规定的本发明方法制备的水合物也是新的, 因此本发明还提供如上述定义的与药学上可接受的强酸形成的式(I)化合物酸加成盐的水合物, 其中该水合物中每摩尔化合物含有  $x$  摩尔结晶水,  $x$  是 1-6 的整数。

整数  $x$  可以是 1, 2, 3, 4, 5 或 6。

$C_1-C_6$  烷基可以是直链或支链的,  $C_1-C_6$  烷基典型地为  $C_1-C_4$  烷基, 例如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 仲丁基或叔丁基, 卤素是 F, Cl, Br 或 I, 优选 F, Cl 或 Br。

$C_1-C_6$  烷氧基可以是直链或支链的, 典型地为  $C_1-C_4$  烷氧基, 例如甲氧基, 乙氧基, 丙氧基, 异丙氧基, 正丙氧基, 正丁氧基, 仲丁氧基或叔丁氧基。

整数  $s$  是 1-3, 优选 1 或 2。在一系列优选的式(I)化合物中,  $r$  是 1,  $s$  是 2,  $R^{11}$  和  $R^{21}$  两者是甲氧基, 以及  $R^{51}$  是喹啉或四氢喹啉环体系,  $R^{51}$  通过任何合适的环位置连接, 例如连接在 1-, 2-, 3-或 4-位。一般通过 2-或 3-位连接。优选的  $R^{51}$  是 2-喹啉或 3-喹啉基。基团  $R^{11}$  和  $R^{21}$  优选在四氢异喹啉环系的 6 或 7 位。

式(I)化合物的实例如下:

化学名称	化合物号
2-氯-喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	1
4-羟基-7-三氟甲基-喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	2
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-噻吩-3-基)-酰胺	3
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-4-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-二甲基氨基-苯基)-酰胺	4
4-羟基-喹啉-3-羧酸(-2{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	5
喹啉-3-羧酸(3-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-甲基-噻吩-2-基)-酰胺	6
喹啉-3-羧酸[2-(4-{2-[(3,4-二甲氧基-苄基)-甲基-氨基]-乙基}-苯基氨基甲酰基)-苯基]-酰胺	7
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-甲基磺酰基-苯基)-酰胺	8
喹啉-3-羧酸(4-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-噻吩-3-基)-酰胺	9
N-(4-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-噻吩-3-基)-6-甲基-烟酰胺	10
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基磺酰基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	11
喹啉-3-羧酸(3-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹	12

喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-吡嗪-2-基)-酰胺	
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙氧基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	13
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-1-甲基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	14
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二氯-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	15
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(7,8-二氯-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	16
喹啉-3-羧酸(2-{3-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	17
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(7-硝基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	18
喹啉-3-羧酸(2-{4[3-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-2-羟基-丙氧基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	19
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-2-甲基-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	20
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-2-甲氧基-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	21
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-1-甲基-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	22
喹啉-3-羧酸(2-{3-[3-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-丙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	23
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(7,8-二氢-5H-[1,3]二氧杂环戊烯并[4,5-g]以喹啉-6-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	24

喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二乙氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	25
喹啉-3-羧酸(6-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-噻吩并[2,3-b]吡嗪-7-基)-酰胺	26
异喹啉-1-羧酸{2-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基氨基甲酰基]-苯基}-酰胺	27
喹啉-2-羧酸{2-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基氨基甲酰基]-苯基}-酰胺	28
异喹啉-3-羧酸{2-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)乙基氨基甲酰基]-苯基}-酰胺	29
喹啉-3-羧酸{2-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基氨基甲酰基]-苯基}-酰胺	30
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	31
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)乙基]-苯基氨基甲酰基}-5-氟-苯基)-酰胺	32
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-氟-苯基)-酰胺	33
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4,5-二甲氧基-苯基)-酰胺	34
喹啉-3-羧酸(6-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-酰胺	35
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-5-硝基-苯基)-酰胺	36
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-甲基-苯基)-酰胺	37
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹	38

喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-5-甲基-苯基)-酰胺	
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4-氯-苯基)-酰胺	39
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-5-氯-苯基)-酰胺	40
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-5-氨基-苯基)-酰胺	41
喹啉-2-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	42
5,6,7,8-四氢喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	43
喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	44
喹啉-3-羧酸{2-[4-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)甲基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺	45

式(I)化合物的制备方法记载于 WO-A-98/17648。

用于本发明方法的药学上可接受的强酸是能够和式(I)化合物的两个碱性中心形成盐的酸，碱性中心是四氢异喹啉的氮原子和杂环基 R<sup>51</sup> 中的氮原子。这两个中心的 pKa 值可以十分不同，酸必须是足以使两者质子化的强酸。适用于本发明方法的强酸的实例包括芳基磺酸（如对甲苯磺酸），烷基磺酸（如甲磺酸），盐酸和有机二元羧酸如丙二酸和丁二酸。

用于本发明方法的药学上可接受的有机溶剂一般是醇如乙醇，正丙醇，异丙醇，苄醇或丙二醇。

用于本发明方法的过量的水可以单独引入到步骤(a)中的反应混合物中或者与药学上可接受的有机溶剂一起引入。例如含水的醇溶液同时提供了有机溶剂和水。合适的醇水溶液含有 3:1(v/v)的醇/水比例，75%的醇溶液是特别优选的，本发明方法中使用的水一般是软化

水,对于制药学的常规目的更优选纯水。

本发明方法中"过量的水"是指能够溶解式(I)化合物的酸加成双盐和达到双盐水合最佳水平的足量的水,因此过量的水是指摩尔数超过最终水合物中结晶水的摩尔数的水。

水合的程度是双盐中结晶水的摩尔数,并且是整数 1-6,可以是 1, 2, 3, 4, 5 或 6。本发明的水合物一般有基本上整摩尔数的结晶水。固体状态的水合水平依赖的因素包括式(I)化合物的结构和它的尤其是附着水分子的能力,例如通过氢键。

在本发明方法的步骤(b)中,混合物被加热到成为清澈的溶液,一般是将混合物加热到 35℃到有机溶剂的回流温度,例如 35℃到 70℃,更优选 45℃-60℃。

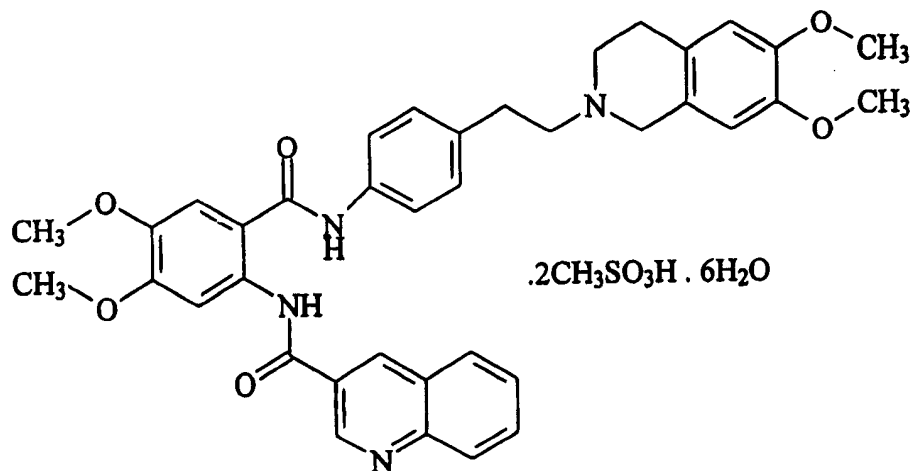
在本发明方法的步骤(c)中,温热时将溶液过滤,就是说保持在足够温度下过滤溶液,以避免所需产品过早沉淀。一般使用温热的玻璃容器,例如使用维持在步骤(b)形成的溶液温度或以上温度的玻璃容器。

本发明方法步骤(d)所需的水合物可以采用任何方便的方法回收,例如滤液用反(anti)-溶剂如丙酮或四氢呋喃稀释。对于制药学的常规目的而言反-溶剂优选药学上可接受的,优选的药学上可接受的反-溶剂的实例是丙酮。因而在本发明方法的一个实施方案中,步骤(d)通过将步骤(c)得到的温热滤液加入到回流的丙酮中完成,优选回流的预过滤的丙酮。

本发明的方法优选在大气环境下进行,相对湿度 40%-80%,更优选 50%-80%。

本发明方法制备的水合物在吸湿性研究中显示在真空加热时失水,但是在潮湿空气中能够恢复到原来的水合水平,该水合物在药物制剂介质中比以前方法得到的常规中间体水合物有更高的储存稳定性(例如货架寿命)和较好的溶解特性(即较高的溶解速度)。

本发明的水合物优选是喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4,5-二甲氧基苯基)-酰胺的双甲磺酸盐的六水合物,该化合物是上述表格中的第 34 号化合物,有以下结构:



上述六水合物优选通过以下方法制备，包括：

(a') 温热时混合喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4,5-二甲氧基-苯基)-酰胺，乙醇和过量的水，往混合物中加入甲磺酸；

(b') 温热混合物直到形成清澈的溶液；

(c') 温热时过滤溶液，得到滤液；和

(d') 从滤液中回收所需的六水合物。

在步骤(a')中可以使用含水的乙醇溶液，也可以将绝对乙醇和水分别加入到反应体系中，在两种情况下乙醇对水的比例为约 3:1，水通常为软化水。

在步骤(b')中将混合物通常温热到 35℃ 到回流温度，优选约 55℃。

在步骤(c')中溶液优选通过温热的玻璃器皿过滤，用乙醇和水的混合物洗涤，通常加入到维持在约滤液温度的滴液漏斗中。

步骤(d')一般通过将滤液加入到搅拌的回流反-溶剂中，优选滤过的丙酮，然后将得到的悬浮液回流几小时，冷却，收集六水合物固体。

本发明的另外一个水合物的具体实例是化合物 31 的双甲磺酸的单水合物，即喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-苯基)酰胺的双甲磺酸盐单水合物。

本发明的水合物提供了将式 (I) 化合物的双盐配制成药物组合物的方便的方法。优选的组合是口服或非肠道给药的液体组合物，因此该水合物可以用于所有对于 WO-A-98/17648 记载的式 (I) 化合物及其盐所设想的药学用途，以下讨论这些用途。

有多抗药性的癌细胞是指如 MDR 细胞，它们和相应的药物敏感

细胞比较显示细胞内药物积累的减少。使用体外得到的 MDR 细胞株进行的研究表明, MDR 通常与血浆膜糖蛋白(P-gp)增加的表达有关, P-gp 有药物结合性能。认为 P-gp 对于许多疏水化合物有如流出泵的功能, 并且使用克隆的 P-gp 进行的转染研究表明, 其过分表达能够在细胞上给予 MDR 表型, 例如参见 *Ann.Rev.Biochem* 58 137-171 (1989)。

在正常组织中 P-gp 的主要功能是从细胞中排出细胞内的毒素, 有证据暗示 P-gp 的过分表达在多抗药性方面可能在临床上起作用。P-gp mRNA 或蛋白质水平的提高在很多类型的人体癌中被发现, 包括白血病, 淋巴瘤, 肉瘤和各种癌。确实在某些情况下发现了 P-gp 水平自化学疗法复发以后得到的肿瘤活组织检查中提高了。

在 P-gp 调解的 MDR 中抑制 P-gp 功能表明导致了细胞中抗癌剂的净积累。例如, 异博停是公知的钙通道阻滞剂, 表明出在体外和体内使 MDR 细胞对长春生物碱敏感 (*Cancer Res.*, 41,1967-1972 (1981))。建议的作用机理包括和抗癌剂竞争结合 P-gp。通过上述机理起作用的结构不相关的一系列阻滞 - 调节剂被记载如他莫西分 (Nolvadex:ICI)及相关化合物, 以及环孢菌素 A 及衍生物。

已发现上述定义的式 I 化合物和它们的药学上可接受的盐在生理学试验中具有 P-gp 药抑制剂活性, 能够在特定的 P-gp 调解的 MDR 中用于调节 MDR, 其结果在以下的实施例 1 中给出。作为 As P-gp 抑制剂这种化合物可以用作多药抗性调节剂, 也称为阻滞调节剂或 RMAs。所述化合物能够调节, 例如减少或消除多抗药性, 特别是 P-gp 调解。

上述化合物可以在增强药物的细胞毒性的方法中使用, 所述药物对肿瘤细胞是有细胞毒害作用的。这种方法包括例如对肿瘤细胞用这类化合物之一给药, 同时将肿瘤细胞暴露于所述的细胞毒性药物下。化学治疗或抗肿瘤药物的治疗效果因此可以提高。肿瘤细胞对细胞毒性药物的多抗药性在化学治疗期间可能降低或消除。

上述化合物也用于治疗疾病的方法, 其中相应的病原体显示有多抗药性, 特别是 P-gp 调解的多抗药性, 例如以下疾病的多抗药性: 疟疾 (*Plasmodium falciparum*), 结核病, 利什曼病, 阿米巴痢疾。所述方法包括例如用上述化合物之一和药物一起给药(单独, 同时或连

续), 相关的病原体对所述药物是有多抗药性的。抗多抗药性病原体的药物的治疗效果因此可能提高。

潜伏肿瘤的人或动物患者可以用包括用上述定义的式(I)化合物之一给药的方法治疗耐药性, 用于给药的该化合物的数量能够有效地增强上述化学治疗药物的细胞毒性。在本发明中所指的化学治疗或抗肿瘤药物的实例优选包括长春生物碱如长春新碱和长春花碱; 蒽环类抗生素如柔红霉素和阿霉素; 米托蒽醌; 放线菌素 D; 紫杉类如紫杉酚; 表鬼白毒素如依托沙武和普卡霉素。

上述定义的式(I)化合物也可以在增强治疗药剂的吸收, 分布, 代谢和/或消除特征的方法中应用, 所述方法包括使用上述化合物之一和所述的治疗剂对患者分别, 同时或连续给药。所述方法特别可用于增强治疗剂渗透到中枢神经系统, 或者提高治疗剂的口服吸收作用。

例如所述化合物能够用于促进药物通过血脑屏障传输的方法, 以及用于治疗 AIDS 或 AIDS 相关的综合症的方法。需要这种治疗的人或动物可以用包括用上述化合物之一给药的方法治疗。

本发明的水合物能够配制成各种给药的剂量形式, 例如口服的液体溶液或悬浮液形式, 或者非肠道的例如肌肉内, 静脉或皮下的形式, 本发明化合物也可以通过注射或灌输给药。

给药剂量依赖于包括年龄, 体重, 患者的状态和给药途径各种因素, 但是一般对于每种给药途径所采用的剂量是达到输入 0.001 - 50 mg/kg 体重, 最普通的范围是 0.01 - 5 mg/kg 体重的式(I)化合物, 所述剂量例如可以通过药丸每天给药 1 - 5 次, 间隔几小时给药和/或重复给药。

本发明的水合物被配制用作药用或兽医用组合物, 其中还含有药学或兽医学上可接受的载体或稀释剂。这种组合物通常采用以下的常规方法制备, 并且以药学或兽医学合适的形式给药。因此提供了含有本发明水合物的用作多抗药性调节剂的药剂。

本发明的水合物可以以任何方便的形式给药, 例如:

A) 口服, 例如以水或油悬浮液, 液体溶液, 乳液, 糖浆或酞剂给药。用于口服的组合物可以按照本领域制备药物组合物的任何公知方法制备, 所述组合物可以含有一种或多种选自脱硫剂, 增香剂, 着色

剂和防腐剂的试剂，以提供药学上优异和可口的制剂。

水悬浮液含有和适于制备水悬浮液的赋形剂混合的活性成分。所述赋形剂是悬浮剂，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，黄耆树胶和金合欢胶；分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂，例如卵磷脂或亚烷基氧化物和脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷和长链脂肪醇的缩合产物，例如十七烷基亚乙基氧鲸蜡醇，或环氧乙烷和从脂肪酸和己糖醇得到的部分酯的缩合产物，如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯，或环氧乙烷和从脂肪酸和己糖醇酐得到的部分酯的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。

所述的水悬浮液也可以含有一种或多种防腐剂，例如，乙基或正丙基的对羟基苯甲酸酯，一种或多种着色剂如蔗糖或糖精。

油悬浮液可以通过在植物油中悬浮活性成分配制。例如花生油，橄榄油，芝麻油或可可油，或者矿物油如液体石蜡。油悬浮液可以含有增稠剂，例如蜂蜡，硬石蜡或鲸蜡醇。

脱硫剂例如是上述提到的，并且可以加入增香剂以提供可口的口服制剂。所述组合物还可以通过加入抗氧化剂防腐，例如抗坏血酸。适合于通过加入水制备的水悬浮液的可分散粉末和颗粒提供活性成分，其与分散剂或润湿剂，悬浮剂以及一种或多种防腐剂混合。合适的分散剂或润湿剂以及悬浮剂是上述所列举的，也可以存在其他赋形剂，例如脱硫剂，增香剂和着色剂。

本发明的药物组合物也可以是水包油的乳液形式，油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油例如液体石蜡或它们的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶，例如金合欢胶或黄耆胶，天然存在的磷脂例如大豆卵磷脂，以及酯或由脂肪酸和己糖醇酐得到的部分酯，例如脱水山梨糖醇单油酸酯，以及所述部分酯和环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。该乳液也可以含有脱硫剂和增香剂。糖浆和酞剂也可以使用脱硫剂配制，例如甘油，山梨醇或蔗糖。特别是为糖尿病患者配制的糖浆可含有仅作为载体的产品，例如山梨醇，它们不代谢为葡萄糖或仅仅代谢为极少量的葡萄糖。

所述制剂还含有润滑药，防腐剂，增香剂和着色剂。

B) 非肠道，皮下，或静脉，或肌内，或胸骨内的给药，或通过灌

输技术以无菌注射水或油性悬浮液形式给药。这种悬浮液使用适当分散如上所述的润湿剂和悬浮剂按照本领域公知的方法配制。无菌注射制剂也可以是在无毒父系可接受稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如 1,3-丁二醇中的溶液。

可以被使用的可接受的赋形剂和溶剂是水，Ringer's 溶液和等渗的氯化钠溶液。另外，无菌的不挥发的油通常可以用作溶剂或悬浮介质。为此目的可以使用任何刺激性少的不挥发油，包括合成的单或二甘油酯。另外，脂肪酸如油酸可以在注射剂中得到应用；

C) 通过吸入法给药，以气溶胶或溶液进行喷雾；

D) 直肠给药，通过混合药物和合适的非刺激性赋形剂制备的栓剂给药，栓剂在常温下是固体，但是在直肠温度下是液体，因此能够在直肠中熔化释放除药物。这种材料是可可油和聚乙二醇；

E) 局部给药，以乳脂，软膏，凝胶，栓剂，溶液或悬浮液形式给药。

日剂量能够在很宽范围内变化，并且对于每种特殊情况能够按照个别需要调节。通常对于成人合适的日剂量是约 5 mg 到约 500 mg 式 (I) 化合物的范围，虽然假如有利时可以超过该上限。日剂量可以一次给药或分几次给药。

本发明用以下实施例进一步说明。

#### 实施例 1: 化合物 34 的双甲磺酸盐六水合物的制备

喹啉-3-羧酸(2-{4-[2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基]-苯基氨基甲酰基}-4,5-二甲氧基-苯基)-酰胺(10.33g, 16mmol)在乙醇(62 ml, 6 体积)和软化水(20.6 ml, 2 体积)的混合物中进行搅拌，加入甲磺酸(3.38g, 35.2 mmol)，将混合物加热到 55℃，得到清澈的橙色溶液，真空下通过预热的漏斗过滤到维持在约 55℃的滴液漏斗中。随后于约 55℃用 1:1 乙醇 / 软化水洗涤(2 x 20 ml, 4 体积)。

合并的滤液和洗涤液于约 20 分钟加入到搅拌着的回流丙酮中(310 ml, 30 体积)，得到粘稠的黄色固体。进一步回流混合物 1 小时以后，于冰浴冷却黄色的悬浮液 2 小时到约 -5℃，过滤收集产品，用过滤的丙酮洗涤(3 x 50ml)，散开干燥约 30 分钟，将浅黄色固体转移到平盘中，在缓和的空气流中于室温和湿度下干燥过夜，得到标题化合物。

重量: 13.86g; 产率: 91.5% (六水合物的理论产率)

水分含量 (Karl Fischer): 12.54%(六水合物的理论量为:  
11.41%)

甲磺酸对碱的比例 ( $^1\text{H NMR}$ ) 是 1.93 : 1 (理论要求 2 : 1)

纯度 (HPLC) 是 99.7% a/a

元素分析:  $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ , 12.54% 的水

测定值: C=50.35%; H=6.15%; N= 5.85%; S=6.71%. [ $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_2$ ,  
12.54% $\text{H}_2\text{O}$

要求: C=50.09%; H=6.24%; N=5.84%; S=6.68%.]

### 实施例 2: 化合物 31 双甲磺酸盐单水合物的制备

喹啉-3-羧酸(2-{4-{2-(6,7-二甲氧基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基)-乙基}-苯基氨基甲酰基}-苯基)-酰胺(3.0g, 5.11 mmol)在乙醇(18 ml, 6 体积)和水(6 ml, 2 体积)的混合物中悬浮液温热到约 50℃, 加入甲磺酸(1.08g, 11.2 mmol), 得到淡橙色溶液。过滤和迅速加入到搅拌着的回流的丙酮中(60 ml, 20 体积), 将烧瓶和过滤器于约 50℃用 1 : 1 乙醇 / 软化水洗涤(6 ml, 2 体积), 并且将其加入到回流的丙酮中, 回流混合物 2 小时以后, 将悬浮液冷却到室温, 过滤收集淡黄色的产物, 用丙酮(9ml)洗涤, 室温真空干燥, 得到 3.8g(产率 93.3%, 对于单水合物)。

水分含量 (Karl Fischer) 是 2.42%(对于单水合物的理论量是 2.26%);

纯度 (HPLC) 是 100 % a/a.

### 实施例 3: 吸湿度和脱水 / 再水合研究

实施例 1 得到的六水合物按照以下方法分析: 准备其中放置有以下饱和盐水的平盘的 4 个干燥橱, 达到以下近似的相对湿度 (RH):

环境温度下的 % RH	饱和盐溶液
33%	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
60%	NaBr
75%	NaCl
95%	$\text{KNO}_3$

将样品放在硅胶或  $\text{P}_2\text{O}_5$  上于减压(65mm Hg)下进行脱水。所有研究在实验室的环境温度下完成(15-22℃)。

### 吸湿性研究

预平衡过的一些称量瓶和瓶盖(在 33% RH 最少储存 24 小时)在 5 位数的配衡分析天平上称重,记录重量。往其中加入水合物(约 2g),记录重量和计算重量差(药物的精确重量)。将这些称量瓶和瓶盖以及其中的药物转移到 33% RH 的橱中,打开瓶盖放在一边。

在适当的时间盖好瓶盖称重,称重以后将样品轻轻搅拌并放回 33% RH 的橱中,再次打开瓶盖放在一边。这种操作进行直到全部样品重量变化达到稳定的终点。当达到稳定终点时,通过将药物转移到预平衡过的称量瓶中,将样品放进下一个% RH 的橱中,如上述记录重量。将样品逐一储存到 33% RH, 60% RH, 75% RH 和 95% RH 的干燥橱中。

#### 脱水/再水合研究

在该研究期间,如前述吸湿性研究那样将样品分配到预平衡过的称量瓶中,无需减压放在硅胶上,然后在硅胶上于减压(65mm Hg)下使水合物脱水。当在  $P_2O_5$  上达到稳定重量时,通过将样品储存在 33% RH - 95% RH 下进行再水合,与上述的吸湿性研究平行。

#### 水分含量的测定

水分含量通过库仑 KF (Karl Fischer) 滴定方法测定。

#### IR 分析

在脱水研究完成后及在再水合和吸湿性研究完成后,将样品提供作 IR 分析(ATR)。

#### 结果

##### 重量变化

吸湿性研究和脱水/再水合研究的结果列于表 1。

表1 脱水/再水合及吸湿性研究结果，直到 60% RH  
(括号中的数字是 KF 湿度，%w/w)

条件	累积时间 (h)	累积%变化	
		脱水/再水合	吸湿性*
硅石，不用真空	3.00	(12.53)	-2.29
	8.50		-3.58
	24.50		-5.92
	30.50		-6.39
	56.00		-8.06
	80.00		-8.50
	237.50		-8.96
	288.50		-9.07
硅石，真空	308.00		-9.07
	401.00		-8.76
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 真空	425.00		-10.85
	452.00		-11.00
	476.75		-11.19
	570.25		-11.43
	641.00		-11.35
	760.50		-11.51
	904.25		-11.46
	1071.00		-11.54
	1144.00		-11.48
	33% RH	1147.25	(3.82)
1150.75			-4.80
1168.00			-2.47
1240.75			-0.68
1268.50			-0.62
			(12.45)

	1312.50	-0.62	-0.49
	1431.25	-0.83	-0.63
	1502.25	-0.66	-0.51
	1672.50	-0.91	-0.70
	1741.50	-0.97	-0.76
60% RH	1744.50	0.19	0.12
	1746.50	0.31	0.13
	1762.50	0.30	0.08
	1835.75	0.54	0.27
	1932.25	0.64	0.37
	2101.50	0.86	0.56
	2147.75	0.62	0.34
	2273.75	0.61	0.34
	2410.25	0.51	0.27
75% RH	2417.25	1.18	0.87
	2434.25	1.21	0.88
	2441.25	1.26	0.88
	2482.00	1.23	0.92
	2577.75	1.35	1.00
	2609.75	1.38	0.96
	2681.25	1.41	1.08
	2770.25	1.36	1.01
	2817.75	1.44	1.09
95% RH	2825.25	2.28	1.85
	2841.75	2.73	2.23
	2915.75	3.06	2.57
	2937.75	3.21	2.71

	2991.25		3.25		2.82
	3082.25		3.86		3.28
	3130.00		4.12		3.51
	3182.25		3.99		3.39
	3252.25		4.19		3.62
	3350.25		4.22		3.65
	3422.25		4.35		3.64
	3636.25		5.31		4.12
	4332.75	(15.81)	5.58	(15.35)	4.45

\* 吸湿性样品的实际累积储存时间是表格数值减去 1144 小时。

### IR 结果

再水合和吸湿性研究后样品的 IR 光谱在波数和主峰相对强度方面没有很大区别。

脱水研究后的样品的 IR 光谱表明在约  $3500\text{cm}^{-1}$  下的主要的宽水带有预期的丢失。除此以外，光谱类似于再水合和吸湿性研究后所记录的样品的光谱，仅在相对强度和分离度方面有一些不同，相对强度的主要差别出现在约  $1650$ ， $1200$  和  $850\text{cm}^{-1}$  处。

### 结论

在提高的干燥条件下实施例 1 水合物的脱水结果导致较迅速的水分损失。最终的重量变化(-11.5%) 类似于样品最初的水分含量(12.5%)。在 33% RH 条件下再水合导致重量损失迅速恢复。在逐一增高的 RH 值下储存再水合的和未处理的样品时样品重量仅仅有很小的增加。储存在 33% RH 和 75% RH 后之间两者样品的重量增加小于 2% (绝对)。

因此实施例 1 的水合物显示出的脱水 / 再水合性质和它们以稳定的水合物存在是一致的，其特征是它能够在再水合时回收脱水时损失的大约相同数量的水。在逐一提高的 RH 储存条件下它没有出现吸湿，再一次说明它和稳定水合物一致。

从得到的数据看，样品的行为和作为六水合物存在一致。实施例

1 水合物的理论水分含量是 11.4 % w/w, 因此脱水前最初的水分含量约 12.5% w/w 相当于湿润的六水合物(水分含量 12.5% w/w 相当于每摩尔双甲磺酸盐 6.7 摩尔水)。

当样品被脱水然后于 33% RH 下再水合时, 净重量变化约-1%, 相当于纯理论水含量约 11.5%, 这一点和恢复其 6 摩尔水(但不是额外的非特定松弛结合的水分)的脱水样品一致。在再水合方后, 样品在重量变化和最终的 IR 光谱方面显示出和没有脱水的样品相同的性质, 这说明脱水大概产生了"开放式"的脱水晶体结构, 其没有倒塌或重排。

因而结果指出实施例 1 的水合物是稳定的六水合物, 含有少量附加的松弛结合的水。在这种水合形式中, 样品不会显示如 WO98/07648 的常规方法得到的实施例 34 的双甲磺酸盐的吸湿性。

#### 实施例 4: 式 (I) 化合物及其盐作为 MDR 调节剂的试验材料和方法

EMT6 小鼠乳房癌细胞株和对 MDR 有抵抗力的亚株 AR 1.0 于 37 °C 和 5%CO<sub>2</sub> 条件下, 在含有 10%胎儿腓肠血清和 2mM 谷氨酰胺的 RPMI 1640 介质中进行培养。受胰蛋白酶作用以后(0.25% 胰蛋白酶, 0.2gl<sup>-1</sup>, EDTA), 细胞于亲本细胞株情况下在 1 / 200 和 1 / 2000 之间传代, 以及于对 MDR 有抵抗力的亚株情况下在 1 / 20 和 1 / 200 之间传代。

##### 1. 药物累积试验

在试验前于 96 穴不透明培养皿(Canberra Packard)将 AR 1.0 细胞被接种 48 小时, 试验介质含氘化的道诺红酶素 (DNR) (0.3 mCi/MI), 细胞毒性剂和未标记的 DNR (2mM)的混合物, 将式 I 化合物用试验介质连续稀释, 浓度范围为 0.508 nM - 10 mM。细胞于 37 °C 培育 1 小时, 然后洗涤并且测定细胞伴生的放射性。其结果以 IC<sub>50</sub> 累积表示, 其中 100% 累积是于公知的浓度 100 mM RMA 维拉帕米存在下被观察到的。

其结果列于以下表 A。

表 A

化合物 No.	IC <sub>50</sub> (mM) 累积
1	0.425
2	>10
3	0.087
4	0.37
5	>10
6	0.431
7	0.098
8	0.213
9	0.113
10	0.203
11	0.453
12	0.207
13	1.89
14	0.347
15	2.27
16	>10
17	0.593
18	6.955
19	0.038
20	0.061
21	0.071
22	0.135
23	6.424
24	1.679
25	0.389
26	8.672
27	2.0
28	1.2
29	1.8
30	10
31	0.05
32	0.022
33	0.019

34	0.064
35	0.084
36	0.015
37	0.36
38	0.094
39	0.014
40	0.18
41	1.0
42	0.8
43	0.097
44	0.32
45	0.04

## 2. 阿霉素细胞毒性的增强

(a)选择的式(I)化合物试验其在 AR1.0 细胞中的增强阿霉素毒性的能力。在最初的增生试验中, 试验化合物对固定浓度的阿霉素滴定(0.34mM), 它独自对于 AR 1.0 细胞是非毒性的。用阿霉素培育 4 天以后使用库仑硫诺丹明 B 试验(Skehan et al ; J Natl. Cancer Inst. 82 pp 1107-1112 (1990) )测定增生, 结果列于表 B

(b) 在固定浓度的每个化合物存在下通过滴定阿霉素(0.263nM-17.24mM) 培养细胞 4 天, 如 Skehen 等人 (loc cit) 所述定量测定增生。得到对于阿酶素独自和每个化合物的  $IC_{50}$  (未处理的对照减少 50% 增生所需要的浓度), 用于计算增生指数(PI):

$$PI = IC_{50} (\text{仅对于阿酶素}) / IC_{50} (\text{对于阿酶素} + \text{RMA})$$

结果列于表 C1 和 C2.

表 B

化合物	化合物毒性 ( $IC_{50}$ mM)	细胞毒性剂的毒性 ( $IC_{50}$ mM)
27	40	1.0
28	40	0.55
29	30	0.3
33	0.32	0.005

34	0.93	0.0018
35	0.9	0.0014
36	0.31	0.0038
37	8.6	0.015
38	6.7	0.005
39	7.0	0.005
40	7.4	0.04
41	36.8	4.4
42	1.7	0.07
43	9.5	0.05
44	7.7	0.00035
45	9.2	0.022

表 C1

化合物 No.	不同RMA浓度的增强指数				
	100 nM	50nM	30 nM	20 nM	10 nM
3	601	307	159		11
4	45	2.99	1.93		1.45
6	68	19	7.4	3.4	1.4
	171	149	95		11
7	168	97	35		3
8	175	85	23		2
9	185	143	142		13
10	81	15	4		1.5
11	25	4.4	1.6	1.3	1.0
12	79	46	15	8	1.8
14	60	7	4		1
17	13.7	3.4	1.3		1.0
19			34		16
20	33	14	3		3
21	2.2	1.1			

23	1.4	1.2	1.1		
24	116	37	1.9		1
25	50	28	7		1.4

表 C2

化合物 No.	不同RMA浓度的增强指数:				
	500 nM	300 nM	100 nM	30 nM	10 nM
31		150	120	67	15
32			100	100	38
33			94	60	16
34			280	225	78
35				188	43
36				300	90
37				36	2.1
38				68	6
39				57	6
40				6	5
41				1	1
44			112	18	2.2
45				7.2	1.3

### 3. 各种细胞毒性剂的细胞毒性增强

按照上述对于阿霉素所述的方法, 使用除了阿霉素以外的各种细胞株和各种细胞毒素测定选择化合物的增强指数, 结果列于表 D。

表 D

化合物 No.	细胞株	细胞毒性	不同RMA浓度的增强指数		
			50 nM	30 nM	10 nM
3	2780AD	紫杉酚	1126	425	18
3	H69/LX4	长春新碱	356	79	2
3	AR 1.0	紫杉酚	407	308	50
6	H69/LX4	紫杉酚	9	3	1
7	H69/LX4	紫杉酚	877	236	2.2
34	AR 1.0	依托泊甙	51	45	26