[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 200610002510.8

[51] Int. Cl.
C07F 7/18 (2006.01)
C07C 229/30 (2006.01)
C07C 227/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100415753C

[22] 申请日 2002.8.6

[21] 申请号 200610002510.8

分案原申请号 02815348.0

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 7 [33] US [31] 60/310646

[73] 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 S·K·拉宾兰 J·J·小吉邦斯
J·L·康斯丁 邱瓦伦
S·戴尼奥特 S·M·邓肯
S·伊拉 任建新

[56] 参考文献

CN1069492A 1993.3.3

stereoselectivities of the intramolecular diels – alder reaction inthe azanona – and azadecatriene series. preparation of somepolyhydroisoindoles, polyhydroisoquinolines, decahydropyrido [2, 1 – a] isoindoles anddecahydro – 2H – pyrido [1,2 – b] isoquinolines. anders tsirk et al. tetrahedron, Vol. 54 . 1998

审查员 刘 芳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝

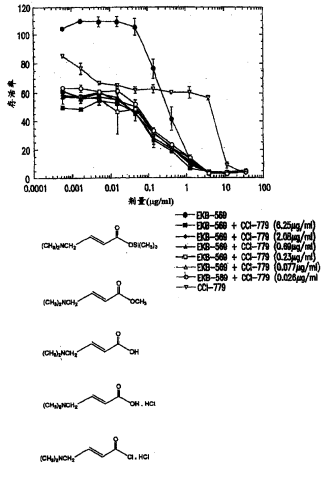
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 5 页

[54] 发明名称

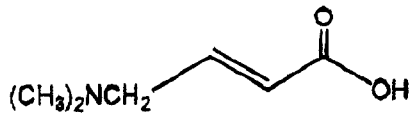
4 – 二甲氨基巴豆酸以及其衍生物及它们的制备方法

[57] 摘要

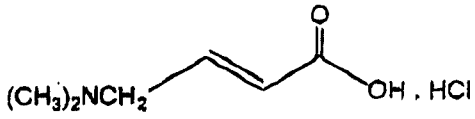
本发明涉及以下的化合物以及其制备方法。



1. 制备具有下式的化合物的方法，



或



所述方法包括:

(a)使4-溴巴豆酸三甲基甲硅烷基酯或4-溴巴豆酸甲酯与二甲胺反应，得到相应的4-二甲氨基巴豆酸甲酯;

(b)水解步骤(a)的4-二甲氨基巴豆酸甲酯，形成相应的4-二甲氨基巴豆酸;和

(c)任选氯化步骤(b)的4-二甲氨基巴豆酸，形成其HCl盐。

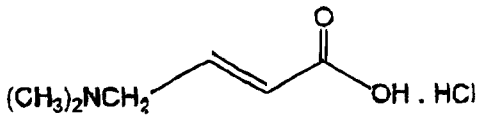
2. 权利要求1的方法，其中水解步骤(b)包括使4-二甲氨基巴豆酸甲酯在MeOH的存在下与NaOH反应。

3. 权利要求1或2的方法，其中氯化步骤(c)包括使4-二甲氨基巴豆酸与HCl反应。

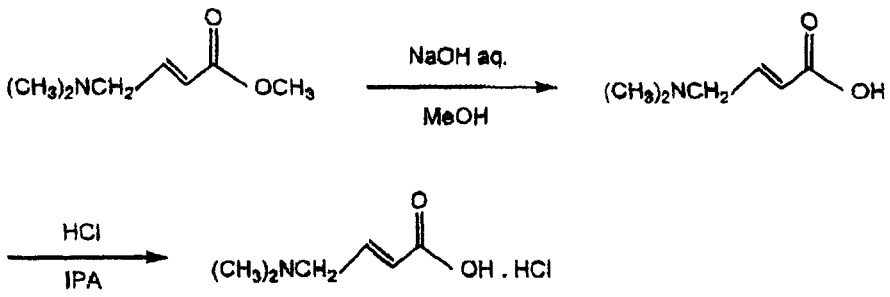
4. 权利要求1或2的方法，其中所述反应采用4-溴巴豆酸三甲基甲硅烷基酯进行。

5. 权利要求1或2的方法，其中所述反应采用4-溴巴豆酸甲酯进行。

6. 制备具有下式的权利要求1的化合物的方法，



其包括下述反应顺序:


(CH3)2NCH2
OCH3
NaOH aq.
MeOH
(CH3)2NCH2
OH
HCl
IPA
(CH3)2NCH2
OH . HCl

。

4-二甲氨基巴豆酸以及其衍生物及它们的制备方法

本申请是中国专利申请号为 02815348.0、国际申请号为 PCT/US02/24841、申请日为 2002 年 8 月 6 日、发明名称为“抗肿瘤联合药物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及雷帕霉素 42-酯与 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸(CCI-779)和 4-二甲氨基-丁-2-烯酸[4-(3-氯-4-氟-苯基氨基)-3-氰基-7-乙氧基-喹啉-6-基]-酰胺(EKB-569)的联合药物的用途。

背景技术

雷帕霉素是由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的、在体外和体内均有抗真菌活性、特别是抗白色念珠菌(*Candida albicans*)活性的大环三烯类抗生素[C. Vezina 等, J. Antibiot. 28, 721 (1975); S.N. Sehgal 等, J. Antibiot. 28, 727 (1975); H. A. Baker 等, J. Antibiot. 31, 539 (1978); 美国专利 3,929,992 和美国专利 3,993,749]。另外，已经表明，雷帕霉素单独使用(美国专利 4,885,171)或者与溶血性链球菌制剂联合使用(美国专利 4,401,653)都具有抗肿瘤活性。

FASEB 3, 3411 (1989)中公开了雷帕霉素的免疫抑制作用。同样也表明其它大环分子如环孢菌素 A 和 FK-506 可有效作为免疫抑制药，因此可用于预防移植物排斥[FASEB 3, 3411 (1989); FASEB 3, 5256 (1989); R. Y. Calne 等, Lancet 1183 (1978)和美国专利 5,100,899]。R. Martel 等[Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 48 (1977)]公开了雷帕霉素在变应性脑脊髓炎实验模型(即多发性硬化模型)、佐剂关节炎模型(即类风湿性关节炎模型)和有效抑制 IgE 样抗体的形成中是有效的。

雷帕霉素也可用于预防或治疗系统性红斑狼疮[美国专利 5,078,999]、肺部炎症[美国专利 5,080,899]、胰岛素依赖性糖尿病[美国专利 5,321,009]、皮肤疾病例如牛皮癣[美国专利 5,286,730]、肠疾病[美国专利 5,286,731]、血管损伤后平滑肌细胞增殖和内膜增厚[美国专利 5,288,711 和 5,516,781]、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤[欧洲专利

申请 525,960 A1]、眼部炎症[美国专利 5,387,589]、恶性癌[美国专利 5,206,018]、心脏炎性疾病[美国专利 5,496,832]和贫血[美国专利 5,561,138]。

雷帕霉素 42-酯与 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸(CCI-779)是雷帕霉素的酯，在体外和体内模型中均已证明该药物对肿瘤生长有显著的抑制作用。雷帕霉素羟基酯(包括 CCI-779)的制备和应用公开于美国专利 5,362,718。

CCI-779 表现出与细胞毒性特性相反的抑制细胞特性，并且可以延迟肿瘤进程的时间或肿瘤复发的时间。人们认为，CCI-779 的作用机制与西罗莫司相似。CCI-779 与胞质蛋白 FKBP 结合并形成复合物，从而抑制酶 mTOR (雷帕霉素的哺乳动物靶，也称为 FKBP12-雷帕霉素相关蛋白[FRAP])。mTOR 激酶活性的抑制作用可抑制各种信号转导途径，包括细胞因子刺激的细胞增殖、调节细胞周期 G1 期的几种关键蛋白的 mRNA 的翻译和 IL-2 诱导的转录，导致抑制细胞周期从 G1 期进行至 S 期。导致 G1 S 期阻断的 CCI-779 的作用机制是抗肿瘤药物的一个新发现。

已经表明，CCI-779 在体外抑制多种组织多样化肿瘤细胞的生长。中枢神经系统(CNS)癌症、白血病(T-细胞)、乳癌、前列腺癌和黑素瘤系中大多数对 CCI-779 敏感。所述化合物使细胞停止在细胞周期的 G1 期。

裸鼠的体内研究已经证明，CCI-779 具有抗多种组织类型的人肿瘤异种移植物的活性。神经胶质瘤对 CCI-779 特别敏感，并且所述化合物在原位神经胶质瘤裸鼠模型中有活性。人成胶质细胞瘤细胞系体外的生长因子(血小板源性)诱导的刺激被 CCI-779 显著抑制。数种人类胰腺肿瘤在裸鼠体内的生长以及所研究的两种乳癌系之一的体内生长也受到 CCI-779 的抑制。

蛋白酪氨酸激酶是一类催化磷酸基团从 ATP 或 GTP 转移至位于蛋白底物上的酪氨酸残基上的酶。蛋白酪氨酸激酶在正常细胞生长

中起重要作用。许多生长因子受体蛋白起酪氨酸激酶的作用，并且它们正是通过该过程发送信号。生长因子与这些受体的相互作用在细胞生长的正常调节中是一个必不可少的事件。然而，在某些情况下，由于突变或者由于过量表达，这些受体可以变得不受控制(deregulated)；其结果是不受控制的细胞增殖，因而可以引起肿瘤生长，最终引起被称为癌症的疾病[Wilks A.F., *Adv. Cancer Res.*, *60*, 43 (1993)和 Parsons, J.T.; Parsons, S.J., *Important Advances in Oncology*, DeVita V.T.编著, J. B. Lippincott Co., Phila., 3 (1993)]。其中，已鉴定的并且是本发明化合物的靶的生长因子受体激酶及其原癌基因是表皮生长因子受体激酶(EGF-R 激酶, erbB 癌基因的蛋白产物)和由 erbB-2 (也称为 neu 或 HER2)癌基因产生的产物。由于磷酸化事件是细胞分裂发生所必不可少的信号，并且由于突变激酶的过量表达与癌症相关，因此这些事件的抑制剂如蛋白酪氨酸激酶抑制剂将具有治疗价值，以治疗特征为不受控制或异常的细胞生长的癌症或其它疾病。例如，所述 erbB-2 癌基因的受体激酶产物的过量表达与人类乳癌和卵巢癌相关[Slamon, D.J.等, *Science, 244*, 707 (1989)和 *Science, 235*, 1146 (1987)]。EGF-R 激酶的去调节与以下肿瘤相关：表皮样瘤[Reiss, M.等, *Cancer, Res., 51*, 6254 (1991)]、乳腺肿瘤[Macias, A.等, *Anticancer Res., 7*, 459 (1987)]和涉及其它重要器官的肿瘤[Gullick, W.J., *Brit. Med. Bull., 47*, 87 (1991)]。因为去调节受体激酶在癌症的发病机理中起重要的作用，所以最近的许多研究主要致力于将特异性 PTK 抑制剂作为潜在抗肿瘤治疗药物的研发工作[某些最新综述参见 Burke. T.R., *Drugs Future, 17*, 119 (1992)和 Chang, C.J., Geahlen, R.L., *J. Nat. Prod., 55*, 1529 (1992)]。

4-二甲氨基-丁-2-烯酸[4-(3-氯-4-氟-苯基氨基)-3-氰基-7-乙氧基-喹啉-6-基]-酰胺(EKB-569)是 EGFR 激酶抑制剂，在体外和体内模型中对肿瘤生长均具有显著的抑制作用。EGFR 激酶抑制剂例如 EKB-569 的制备和应用公开于美国专利 6,002,008。

附图说明

图 1 显示 EKB-569、CCI-779 和 EKB-569 + CCI-779 的联合药物在 HCT116 细胞中的细胞毒性曲线。

图 2 显示 EKB-569 + CCI-779 联合药物的等效线图(有效浓度 50%)。

图 3 显示从范围为 50-65%的不同终点获得的 EKB-569 + CCI-779 联合药物的等效线图。

图 4 显示 EKB-569 + CCI-779 联合药物的协同相互作用的三维分析。

图 5 显示 EKB-569 + CCI-779 联合药物的三维协同作用图的等高线图。

发明内容

本发明提供 CCI-779 和 EKB-569 联合药物作为抗肿瘤联合化学治疗药物的用途。具体地说，这些联合药物可用于治疗肾癌、软组织癌、乳癌、肺部神经内分泌性肿瘤、宫颈癌、子宫癌、头颈部癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌、胃癌、白血病、结肠直肠癌和未知的原发性癌。本发明也提供用作抗肿瘤联合化学治疗药物的 CCI-779 和 EKB-569 联合药物，其中 CCI-779 或 EKB-569 或者 CCI-779 和 EKB-569 两者的剂量都为亚治疗有效剂量。

本发明所用的术语“治疗”是指通过给罹患肿瘤疾病的哺乳动物提供有效量的一种 CCI-779 和 EKB-569 联合药物而治疗所述哺乳动物，以抑制所述哺乳动物的肿瘤生长、根除肿瘤或减轻所述哺乳动物的痛苦。

本发明所用的术语“提供”就提供所述联合药物而言是指直接给予所述联合药物或者给予所述联合药物中一种或两种组分的前药、衍生物或类似物，以在生物体内生成有效量的所述联合药物。

CCI-779 的制备方法描述于美国专利 5,362,718，所述专利通过引用结合到本文中。CCI-779 的改进制备方法公开于美国专利申请 SN 09/670,358，所述专利申请通过引用结合到本文中。如果将 CCI-779 用作抗肿瘤药，则考虑在每日一次的给药方案(每隔 2-3 周，连续每日给药 5 天)中，首次静脉内输注剂量在约 0.1 mg/m^2 至 100 mg/m^2 之间；而在每周一次的给药方案中，首次静脉内输注剂量在约 0.1 mg/m^2 至 1000 mg/m^2 之间。口服或静脉内输注是优选的给药途径，其中更优选静脉内输注。

EKB-569 可以依照美国专利 6,002,008 中描述的方法来制备，所述专利通过引用结合到本文中。EKB-569 的优选制备方法在本文中提供。当将 EKB-569 用作抗肿瘤药时，则考虑首次口服剂量在 1 mg/天至 100 mg /天之间。根据患者的耐受性，EKB-569 可以每日给予达一个治疗期，例如 14 天，然后进入休息期(不给予药物)，或者可以在连续给药的基础上给予一个较长治疗期(例如 6 个月或更长时间)。

CCI-779 + EKB-569 联合药物的抗肿瘤活性在体外标准药理学实验方法中得到证实；下面概述所用方法和所得结果。

细胞增殖方法 – 将 HCT 116 结肠腺癌细胞在 7% CO_2、37℃下保持在补充 10%胎牛血清(FBS, Life Technologies)和 50 μg/ml 庆大霉素(Life Technologies)的 RPMI 1640 培养基(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)中。将细胞平板接种到 200 μl 含有 5% FBS 和 50 μg/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基的 96 孔微量滴定板(6000 细胞/孔)中并于 37℃孵育过夜。用同一培养基以 5X 终浓度制备化合物稀释液，然后向含有细胞的各孔中加入 50 μl 所述药物稀释液。为了对两种药物的组合进行研究，在存在固定剂量的第二种化合物的情况下，制备其中一种化合物的系列稀释液。或者，使用方格图案稀释系列。将细胞在所述药物存在下培养 3 天。用未处理的细胞作为对照。采用蛋白结合染料磺基若丹明 B (sulforhodamine B) (SRB, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)测定存活细胞的百分率。通过加入 50 μl 50%冷

的三氯乙酸，沉淀各孔中的细胞蛋白。1 小时后，该板用水充分洗涤并干燥。加入 SRB 染料试剂(含 0.4% SRB 的 1%乙酸溶液, 80 μl/孔)，并将各板在室温下保持 10 分钟。然后各板用 1%乙酸溶液充分洗涤并干燥。将细胞相关染料溶于 10 mM Tris (150 μl)中，用微量滴定板读出仪读出 540 nm 的吸光度。通过将细胞存活率(相对于未处理的细胞)对化合物剂量作图，确定引起固定的生长抑制百分率的化合物浓度。

协同作用评价 – 用等效线图研究这两种药物的相互作用。等效线图的两条坐标轴分别标出各药物单独给药产生某一终点的浓度(例如细胞生长的 50%抑制, IC_{50})。连接两点的直线表示当这两种药物的相互作用为纯粹的叠加作用时，这两种药物的所有组合的等效剂量。当等效线图偏移至预测细胞毒性曲线的左侧(形成凹形曲线)时表示为协同相互作用。相反，偏移至右侧(形成凸形曲线)表示为拮抗性相互作用。当在同一坐标体系上作不同终点的等效线图时，各药物的浓度以产生相同效应的各单独药物的浓度百分比表示。这产生一幅对称的等效线图，各轴上无单位，因而允许对不同终点进行直接比较。

Prichard 和 Shipman [Antiviral Research. 14：181-206 (1990)]提出了用于研究药物相互作用的第二种模型。该模型是三维模型：各药物之一和第三种药物的生物学效应。基于叠加作用的不相似位点模型(Bliss 独立性)，根据独立的剂量-反应曲线，计算叠加相互作用的理论值。实验曲面减去代表预测细胞毒性的计算叠加曲面，得出毒性增加(协同作用)或毒性降低(拮抗作用)的面积。当相互作用为叠加作用时，所得曲面在计算的叠加曲面之上在 0%抑制时表现为水平面。偏离该平面的峰和谷分别表示协同作用和拮抗作用。运用基于微软公司的 Excel 软件的 MacSynergyll 自动进行所有的计算。该电子表格计算理论叠加相互作用，并且对在 95%置信水平显著的协同相互作用或拮抗性相互作用定位和定量。将所得结果绘成三维图或等高线图。

结果 - HCT 116 细胞由于它们表达低，但 EGFR 的水平可检测且对 EGFR 抑制剂的抑制敏感而被选择。该细胞对 CCI-779 有点抗性，但受高剂量(5-10 μg/ml)的所述药物抑制。将 HCT-116 细胞在存在单独的 EKB-569、单独的 CCI-779 或者 EKB-569 与固定剂量的 CCI-779 的稀释系列的情况下进行培养。生长 3 天后，采用 SRB 实验方法测定细胞存活率。细胞毒性曲线示于图 1。EKB-569 对 HCT116 细胞的 IC_{50} 值为 0.31 μg/ml。当该化合物与 2.08 μg/ml CCI-779 联合使用时(当单独给予时引起 41%的生长抑制)，IC_{50} 值降至 0.03 μg/ml，即降低 10 倍。当与 0.026 μg/ml CCI-779 联合使用时(其单独抑制 36%的细胞增殖)，IC_{50} 值降至 0.051 μg/ml，即降低 6 倍。当在固定剂量的 EKB-569 存在下用 CCI-779 作剂量-反应曲线时，观察到相似的结果。为了鉴定该药物相互作用的性质，制作 EKB-569 和 CCI-779 联合药物的等效线图 (在 50%的有效水平) (图 2)。所述等效线图曲线具有深深凹入的凹形，表示在这两种药物间存在显著的协同相互作用。在协同作用最强的点，0.03 μg/ml EKB-569 和 0.077 μg/ml CCI-779 的联合药物与单独的 0.31 μg/ml EKB-569 或单独的 4.3 μg/ml CCI-779 (各药物单独的 IC_{50})的效力相同。因此，与任一单独的药物相比，当所述药物联合使用时，EKB-569 的剂量降低 10 倍和 CCI-779 的剂量降低 50 倍就可抑制 50%的细胞增殖。还检查从范围在 50-65%的不同终点获得的等效线图。如图 3 所示，所产生的等效线图几乎重叠，表示在所有所测的有效水平都为协同作用。

还运用三维分析来评价 EKB-569 和 CCI-779 之间的相互作用。在此，药理相互作用以三维图形表示，其中平面在 0%时表示相加相互作用，而峰和谷分别表示这两种药物之间协同作用或拮抗作用的面积。在图 4 中，EKB-569 和 CCI-779 的组合产生大面积的协同相互作用，与等效线图研究中所得结果一致。三维协同作用的等高线图便于鉴定各药物在发生最大协同毒性时的浓度(图 5)。在 0.0005-3 μg/ml CCI-779 和 0.16-0.4 μg/ml EKB-569 时观察到大面积的协同作

用。在该面积内，0.0005-0.003μg/ml 和 0.05-0.3 μg/ml CCI-779 以及 0.25-0.37 μg/ml EKB-569 时存在 2 个最大协同作用峰。

根据这些标准药理学实验方法的结果，CCI-779 和 EKB-569 的各种组合起协同作用，并且可用作抗肿瘤药物。更具体地讲，这些联合药物可用于治疗肾癌、软组织肉瘤、乳癌、肺部神经内分泌性肿瘤、宫颈癌、子宫癌、头颈部癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤、黑素瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌、胃癌、白血病、结肠直肠癌和未知的原发性癌。由于这些联合药物含有至少两种活性抗肿瘤药，因此这类联合药物也可以以其中一种或两种所述药物以亚治疗有效剂量使用的各药物的联合药物进行使用，从而降低与单个化疗药相关的毒性。

在用于化学疗法时，多种具有不同作用模态的药物通常用作化疗“混合剂”的一部分。根据待治疗肿瘤的性质，预期本发明的联合药物将用作可含有一种或多种其它抗肿瘤药的化疗混合剂的一部分。例如，本发明也包括结合如下所述其它化疗药一起使用的 CCI-779/EKB-923 联合药物的用途：抗代谢药(即 5-氟尿嘧啶、氟尿苷、硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、吉西他滨、卡培他滨、喷司他丁、三甲曲沙或克拉屈滨)；DNA 交联剂和烷基化剂(即顺铂、卡铂、streptazoin、美法仑、苯丁酸氮芥、卡莫司汀、methclorethamine、洛莫司汀、bisulfan、噻替派、异环磷酰胺或环磷酰胺)；激素类药(即他莫昔芬、roloxifen、托瑞米芬、阿那曲唑或来曲唑)；抗生素(即普卡霉素、博莱霉素、米托蒽醌、伊达比星、放线菌素 D、丝裂霉素、多柔比星或柔红霉素)；免疫调节药(即干扰素、IL-2 或 BCG)、抗有丝分裂药(即雌莫司汀、紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春新碱或长春瑞滨)；拓扑异构酶抑制剂(即托泊替康、伊立替康、依托泊苷或替尼泊苷)；和其它药物(即羟基脲、曲妥单抗、六甲蜜胺、retuximab、L-天冬酰胺酶或吉姆单抗奥佐米星)。

本发明所用的联合药物方案可以同时给予或者可以以交错给药

方案给予，其中在化疗过程中，CCI-779 可以在与 EKB-923 不同的时间给药。给予这两种药物之间时间的间隔范围为数分钟、数小时、数天、数周或更长的时间。因此，术语联合药物不一定是指同时给药或者作为一药剂给予，但各组分在所要求治疗期间内给予。所述药物也可以通过不同的途径给予。例如，在 CCI-779 和 EKB-569 的联合药物中，预期 CCI-779 可口服或经胃肠外给予，其中优选经胃肠外给予；而 EKB-569 可以通过胃肠外、口服或其它可接受的方式给予。这些联合药物可以每日、每周或者甚至每月一次给予。作为一个典型的化学治疗方案，化学疗法的疗程可以在数周后重复，并且这两种药物可以在同一时间段内给予或者可以根据患者的反应而有所变动。

作为一个典型的化学疗法，由主治医师根据包括疾病的严重程度、对疾病的反应、任何治疗相关毒性、患者的年龄、健康状况和其它伴发疾病或治疗在内的各种因素来密切监视给药方案。

基于用所述 CCI-779 和 EKB-569 联合药物获得的结果，考虑 CCI-779 的首次静脉内输注剂量在约 0.1 mg/m^2 至 100 mg/m^2 之间，其中优选在约 2.5 mg/m^2 至 70 mg/m^2 之间。也优选通常在 30 分钟内通过静脉内给予所述 CCI-779，并且以每周约给予一次。EKB-569 的首次日剂量在约 1 mg 至 100 mg 之间，优选 5 mg 至 75 mg。在一个或多个治疗周期后，所用剂量可以根据所得结果和所观察到的副作用作上下调整。

含有本发明活性化合物的口服制剂可以包含任何常用的口服剂型，包括片剂、胶囊剂、口含片、糖锭剂、锭剂和口服液体剂、混悬剂或溶液剂。胶囊剂可以含有所述活性化合物和惰性填充剂和/或稀释剂的混合物，所述填充剂和/或稀释剂例如药学上可接受的淀粉(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉或木薯淀粉)、糖、人工甜味剂、粉状纤维素例如结晶纤维素和微晶纤维素、面粉、明胶、树胶等。有用的片剂制剂可以通过常规压制法、湿制粒法或干制粒法来制备，并且

可利用药学上可接受的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面改性剂(包括表面活性剂)、悬浮剂或稳定剂，包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉、十二烷基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、藻酸、阿拉伯树胶、黄原胶、柠檬酸钠、复合硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石粉、干淀粉和粉糖。优选的表面改性剂包括非离子表面改性剂和阴离子表面改性剂。表面改性剂的代表性实例包括但不限于泊洛沙姆 188、苯扎氯铵、硬脂酸钙、十六醇十八醇混合物、聚西托醇乳化蜡、脱水山梨醇酯、胶态二氧化硅、磷酸酯、十二烷基硫酸钠、硅酸铝镁和三乙醇胺。本文的口服制剂可以利用标准延迟或定时释放制剂来改变所述活性化合物的吸收。所述口服制剂也可以包括给予所述有效成分的水溶液或果汁溶液，必要时含有合适的增溶剂或乳化剂。

在某些情况下，可能最好将所述化合物以气雾剂的形式直接给予气道。

所述化合物也可以经胃肠外或腹膜内给予。这些活性化合物的游离碱或药学上可接受的盐的溶液剂或混悬剂可以在适宜与诸如羟丙基纤维素的表面活性剂混合的水中制备。也可以制备在甘油、液体聚乙二醇和它们的混合物油溶液中的分散剂。在贮藏和使用的常规条件下，这些制备含有防腐剂，以防止微生物的生长。

适合于注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散剂，以及用以临时制备无菌注射液或分散剂的无菌粉末。在所有情况下，所述剂型必需无菌并且必需为易于注射的液体。所述制剂在生产和贮藏条件下必需是稳定的，并且必需防止微生物例如细菌和真菌的污染。所述载体可以是溶剂或者是含有例如以下组分的分散介质：水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适的混合物和植物油。

对于本说明书而言，人们知道，透皮给药包括透过机体表面和

包括上皮组织和粘膜组织在内的机体通道内衬的所有给药方式。这样的给药可以用含有本发明化合物或其药学上可接受的盐的洗液、乳油、泡沫剂、贴剂、混悬剂、溶液剂和栓剂(直肠和阴道)来进行。

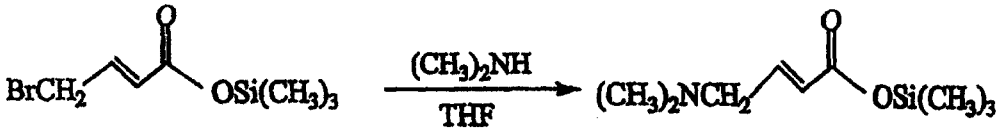
可以通过使用含有所述活性化合物和对所述活性化合物而言为惰性的载体的透皮贴剂来完成透皮给药，所述透皮贴剂对于皮肤无毒并且允许将供系统吸收的药物通过皮肤传递至血流中。所述载体可以为任何形式，例如乳油和软膏剂、糊剂、凝胶剂和闭合装置。所述乳油和软膏剂可以是粘稠的液体或者水包油型或油包水型半固体乳剂。由分散在含有有效成分的石油或亲水石油中的吸收粉末组成的糊剂也可能是合适的。可以用各种各样的闭合装置使所述活性化合物释放到血流中，例如包括含有所述有效成分以及含有或不含载体的贮库(reservoir)或者含有所述有效成分的基质的半透膜。在文献中可了解其它的闭合装置。

栓剂制剂可以用包括可可脂、加有或不加用以改变栓剂熔点的蜡和甘油在内的传统材料来制备。也可使用水溶性栓剂基质，例如各种分子量的聚乙二醇。

具体实施方式

下面提供从市售原料或可依照可利用的文献方法制备的原料制备 EKB-569。

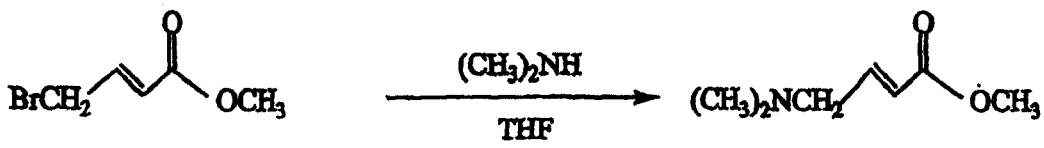
由 4-溴巴豆酸三甲基甲硅烷基酯制备 4-二甲氨基巴豆酸



将 211 ml 二甲胺(2M, THF 溶液, 0.422 摩尔)于 0-50℃及 N_2 保护下滴加到 50 g 4-溴巴豆酸三甲基甲硅烷基酯(0.211 摩尔, 75.9% (通过 GC-MS 测定))的 250 ml THF 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 30

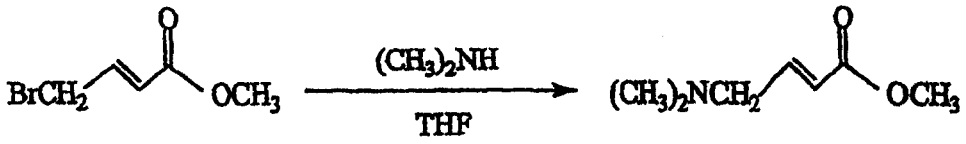
分钟。滤出白色固体副产物。向该滤液中加入 2ml 水，然后放入晶种。滤出所形成的晶体并用乙醚洗涤，得到 18.3 g (分两批)灰白色固体产物。收率为 67.2% (通过 GC-MS 测定的纯度为 98%, NMR 测试证实该结构)。

由 4-溴巴豆酸甲酯制备 4-二甲氨基巴豆酸甲酯



将 120 ml 二甲胺(2M, THF 溶液, 0.24 摩尔)于 0-50℃及 N_2 保护下滴加到 20 g 4-溴巴豆酸甲酯(纯度 85%, 0.095 摩尔)的 150 ml THF 溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 15 分钟。TLC (9:1 CH_2Cl_2:MeOH 和几滴 Et_3N)显示有残留的 4-溴-巴豆酸甲酯。将反应混合物加热至 40-45℃达 15 分钟。滤出白色固体副产物。将滤液蒸发至得到黄色油状物(14 g)。将该黄色油状物溶于 100 ml CH_2Cl_2 中，并用 H_2O 洗涤 2 次。水层再次用 100 ml CH_2Cl_2 萃取。合并 CH_2Cl_2 层，经 $MgSO_4$ 干燥并过滤。蒸发滤液至得到油状物(12 g)。收率为 88%。NMR 测试显示所需产物中含有痕量 4-溴巴豆酸甲酯。

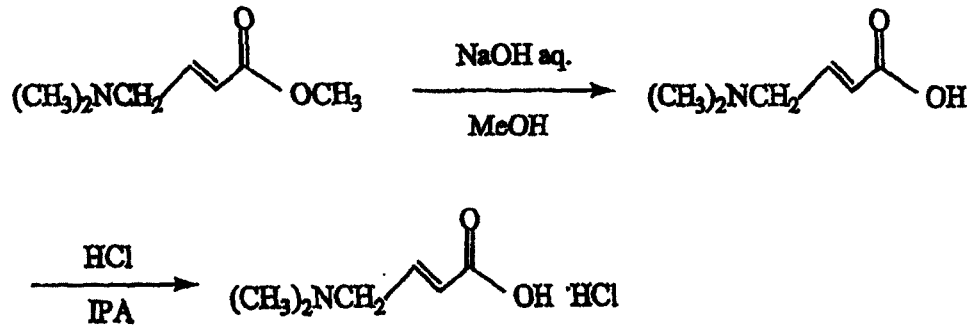
4-N,N-二甲氨基巴豆酸甲酯盐酸盐的大规模制备:



一个 3L 烧瓶装有四氢呋喃(0.71 kg, 0.80 L)。加入 4-溴巴豆酸甲酯(0.20 kg, 0.13 L, d = 1.522 g/mL)，用四氢呋喃(0.18 kg, 0.20 L)冲洗。搅拌溶液并冷却至 0-10℃。一加液漏斗装有二甲胺的四氢呋喃溶液，保持温度在 0-10℃下，在 1 小时 15 分钟内将漏斗的内容物加入所溶液中，搅拌混合物最少 30 分钟，并通过 TLC 检查反应完成的情况。当存在≤2%可检测原料(4-溴-巴豆酸甲酯)时，反应完成。将混合物

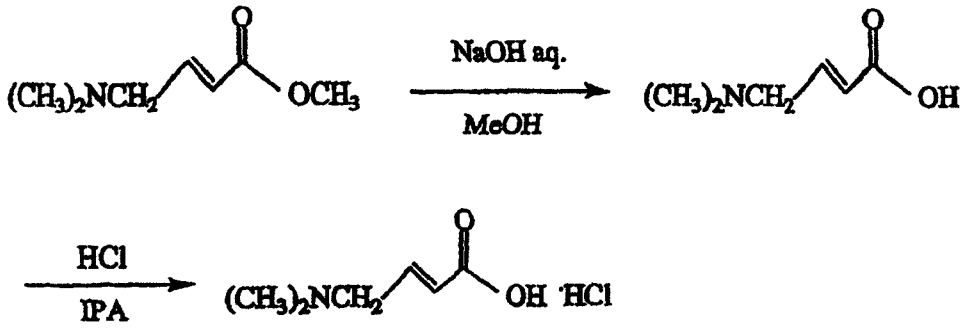
在布氏漏斗(Buchner funnel)上冷过滤到一个 3 L 多颈烧瓶中，用预冷(0-10℃)四氢呋喃(2 x 0.18 kg, 2 x 0.20 L)冲洗，并保持抽吸直至液滴滴干为止。所述烧瓶装有一个搅拌器、一支温度计和一个真空蒸馏装置。减压(125-200 mm Hg)蒸馏，最高釜温 40℃，将该溶液浓缩至体积为 200 mL。加入异丙醇(0.22 kg, 0.28 L)，将混合物冷却至 0-10℃。将蒸馏头改装为一个装有盐酸的异丙醇溶液的加液漏斗，并将所述溶液在 45 分钟内加入直至达到 pH 2.0-3.0，同时保持温度在 0-10℃。将该混合物静置最少 30 分钟，在布氏漏斗上过滤，用异丙醇(2 x 0.12 kg, 2 x 0.15 L)冲洗。将滤饼打湿并保持抽吸直至液滴滴干为止。产物在真空炉中于 50℃和 10 mm Hg 下干燥 18-20 小时。

由 4-二甲氨基巴豆酸甲酯制备 4-二甲氨基巴豆酸盐酸盐



将 NaOH 溶液(3.35 g, 25ml 水溶液, 0.084 摩尔)在室温下滴加到 12 g 4-二甲氨基巴豆酸甲酯(0.084 摩尔)的 100 ml MeOH 溶液中。将反应混合物加热至 40-45℃达 1 小时，然后冷却至室温。用 5 N HCl 将 pH 调至 1~2。将混合物浓缩至粘稠油状物，与无水乙醇一起研磨，得到固体。滤出固体副产物。将滤液蒸发至成为油状物，与 IPA 一起研磨。得到 7.0 g 白色固体产物。收率为 50%，纯度为 86.3% (通过 GC-MS 测定)。

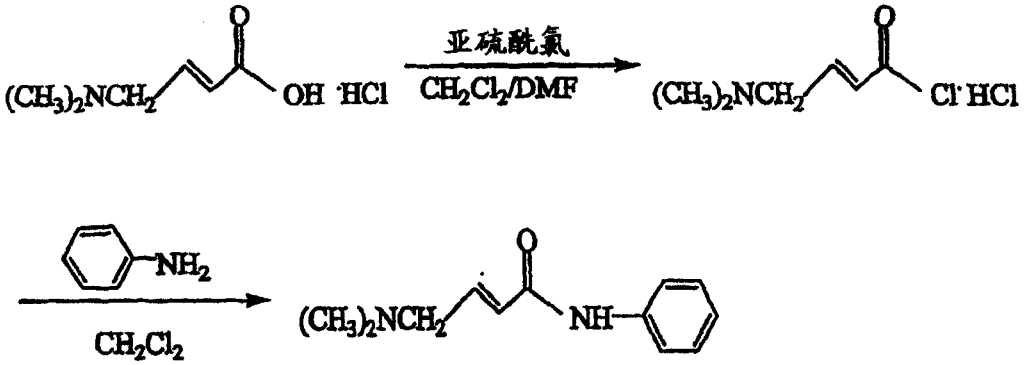
4-N,N-二甲氨基巴豆酸盐酸盐的大规模制备



一个 2 L 多颈烧瓶装有一个搅拌器、一支温度计、一个加液漏斗和一个氮气保护装置。该烧瓶装有乙醇(0.39 kg, 0.50 L)。加入 4-N,N-二甲氨基巴豆酸甲酯盐酸盐(0.125 kg)，用乙醇(0.10 kg, 0.125 L)冲洗。搅拌悬浮液并冷却至 0-10℃。往所述加液漏斗中装入氢氧化钠(50%) (0.11 kg, 0.072 L, d=1.53 g/mL)，并将所述氢氧化钠溶液在 20 分钟内加入烧瓶中，保持温度在 0-10℃。观察到轻微放热并且混合物变为黄色。将混合物最少搅拌 15 分钟，然后温至 18-22℃，并且最少保持 4 小时。通过 TLC 检查反应完成的情况。当存在≤2%可检测原料(4-N,N-二甲氨基巴豆酸甲酯盐酸盐)时，反应完成。将混合物冷却至 0-10℃。往加液漏斗内装入盐酸的异丙醇溶液并在 40 分钟内加入烧瓶中直至达到 pH 2.0-3.0，同时保持釜温在 0-10℃。将该混合物最少搅拌 30 分钟，在布氏漏斗上冷过滤到一个 2 L 多颈烧瓶中，用冷乙醇(0-10℃) (2 x 0.05 kg, 2 x 0.063 L)冲洗并保持抽吸直至液滴滴干。所述烧瓶装有一个搅拌器、一支温度计和一个真空蒸馏装置。减压(50-100 mm Hg)蒸馏，最高釜温 40℃，除去溶剂，至体积为 160-180 mL。加入异丙醇(0.049 kg, 0.063 L)，将混合物在 10 分钟内温至 35-40℃。在 20 分钟内加入丙酮(0.10 kg, 0.13 L)，同时保持釜温在 35-40℃。加入混合物并冷却至环境温度 25-35℃，且保持该温度最少 12-18 小时。将混合物冷却至 0-10℃，并保持该温度最少 1 小时。制备异丙醇(0.049 kg, 0.063 L)和丙酮(0.10 kg, 0.13 L)的混合物，搅拌至均匀，并冷却至 0-10℃。将混合物在布氏漏斗上冷过滤，用异丙醇/丙酮(2 x 0.074 kg, 2 x 0.096 L)冲洗，将滤饼打湿，同时保持抽吸直至液滴滴干

为止。产物在真空炉中于 50℃和 10 mm Hg 下干燥 18-20 小时。

由 4-二甲氨基巴豆酸盐酸盐制备 4-二甲氨基 N-巴豆酰苯胺



将亚硫酰氯(0.36 ml, 0.005 摩尔)于 0℃及 N_2 保护下滴加到含有 0.33 g 4-二甲氨基巴豆酸盐酸盐(0.002 摩尔)和 2 滴 DMF 的 15 ml CH_2Cl_2 溶液中。将反应混合物回流 30 分钟。然后于 0℃向该反应混合物中滴加 0.72 ml 苯胺(0.008 摩尔)并在室温下搅拌 1 小时。将固体副产物过滤。滤液蒸发至得到油状物(0.6 g)。GC-MS 数据显示该油状物为 11.7% 4-二甲氨基巴豆酸盐酸盐和 85%所需产物。

4-N,N-二甲氨基巴豆酰氯盐酸盐的制备和分离

将充分搅拌的 4-二甲氨基巴豆酸盐酸盐(5.0 g, 30 mmol)的冷(0℃) THF (40 mL)和 DMF (2 滴)的悬浮液用草酰氯(3.15 mL, 36 mmol)处理。将混合物于 20-25℃搅拌 3 小时，然后冷却至 0℃并保持 30 分钟。在布氏漏斗(氮气保护)上收集固体，用冷(0℃) THF (3 x 5 mL)溶液洗涤。产物于 40-50℃真空(-1 托)干燥 3 小时，得到 4.0 g 4-二甲氨基巴豆酰氯盐酸盐。用甲醇处理所述固体，经表征该物质为其甲酯。

或者，可以用 CH_3CN 制备标题化合物，并将其直接用于下述偶合步骤:

EKB-569 的制备

一个 3 L 多颈烧瓶装有一个搅拌器、一支温度计、一个浸渍试

管和一个氮保护装置。该烧瓶装有 N-甲基吡咯烷酮(0.77 kg, 0.75 L, d=1.033 g/mL)。在环境温度下，加入 4-[3-氯-4-氟苯基]氨基-6-氨基-3-氰基-7-乙氧基喹啉(0.0748 kg) [参见美国专利 6,002,008]，搅拌混合物，同时加热至 40-45℃并保持 15 分钟。将该烧瓶冷却至 0-10℃。将含有 4-N,N-二甲氨基巴豆酰氯盐酸盐的混合物通过浸渍试管和氮气正压力下在 30-45 分钟内转移至 3 L 烧瓶中，同时保持温度在 0-10℃下。将混合物在 0-10℃下静置最少 2 小时。通过 HPLC 检查反应完成的情况。当存在≤2%原料(4-[3-氯-4-氟苯基]-氨基-6-氨基-3-氰基-7-乙氧基喹啉)时，反应完成。往一个装有一个搅拌器、一支温度计、一个浸渍试管和一个氮气保护装置的 12 L 多颈烧瓶中装入水(2.61 kg, 2.61 L)。加入碳酸氢钠(0.209 kg)并进行搅拌直至形成溶液。将该溶液冷却至 20-24℃。将 NMP-CH_3CN 混合物通过浸渍试管和氮气正压力下在 45-60 分钟内转移至该 12 L 烧瓶中，同时保持温度在 20-24℃下。将该混合物在 20-24℃下最少保持 1 小时，在布氏漏斗上过滤，用水(3 x 0.40 kg, 3 x 0.40 L)冲洗并保持抽吸直至液滴滴干为止。产物在真空烘箱中于 50℃和 10 mm Hg 下干燥 28-30 小时，得到 78.5 g (收率 86%)产物。

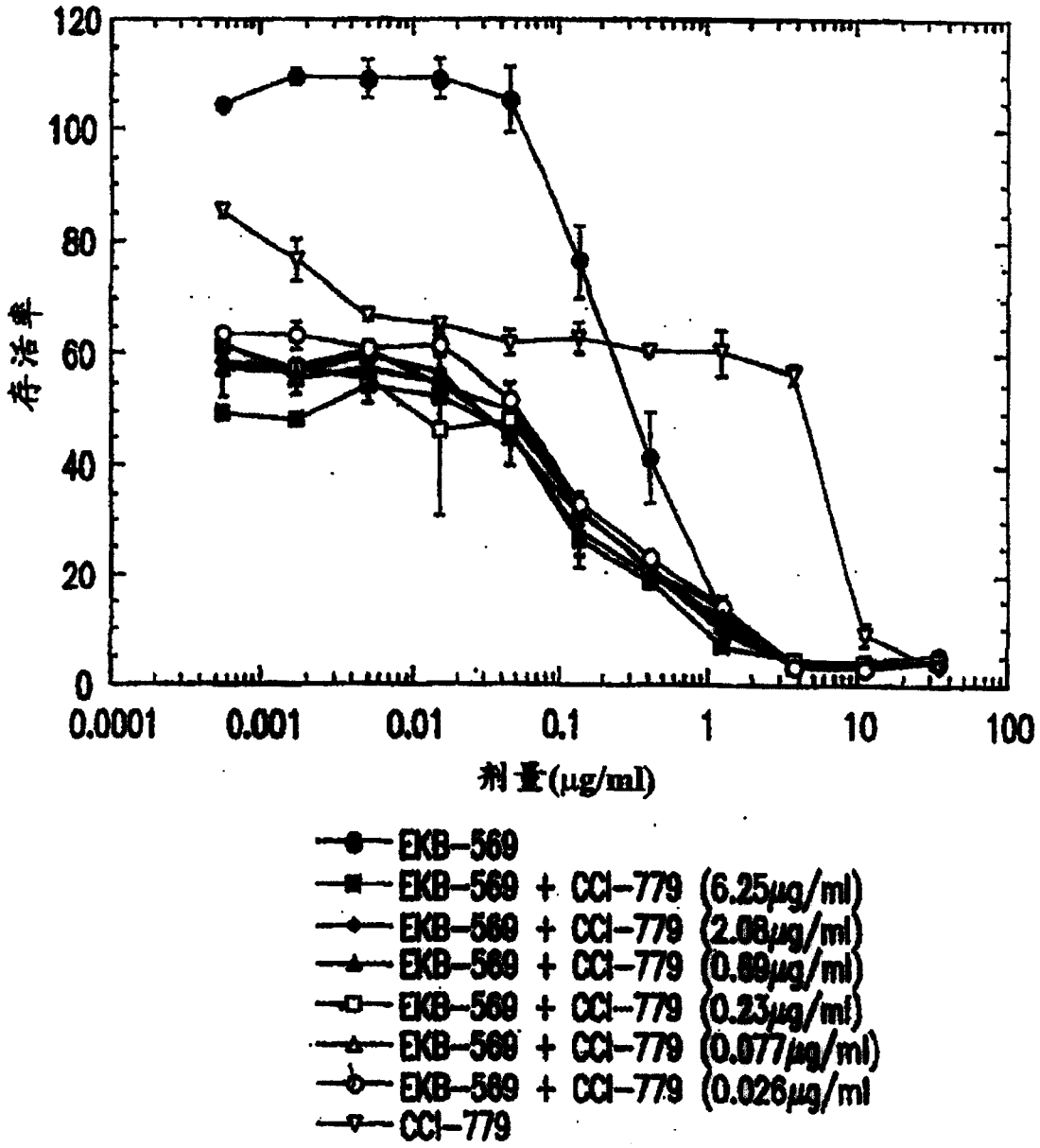

120
100
80
60
40
20
0
存活率
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
剂量(μg/ml)
EKB-569
EKB-569 + CCI-779 (6.25μg/ml)
EKB-569 + CCI-779 (2.08μg/ml)
EKB-569 + CCI-779 (0.69μg/ml)
EKB-569 + CCI-779 (0.23μg/ml)
EKB-569 + CCI-779 (0.077μg/ml)
EKB-569 + CCI-779 (0.026μg/ml
CCI-779

图 1

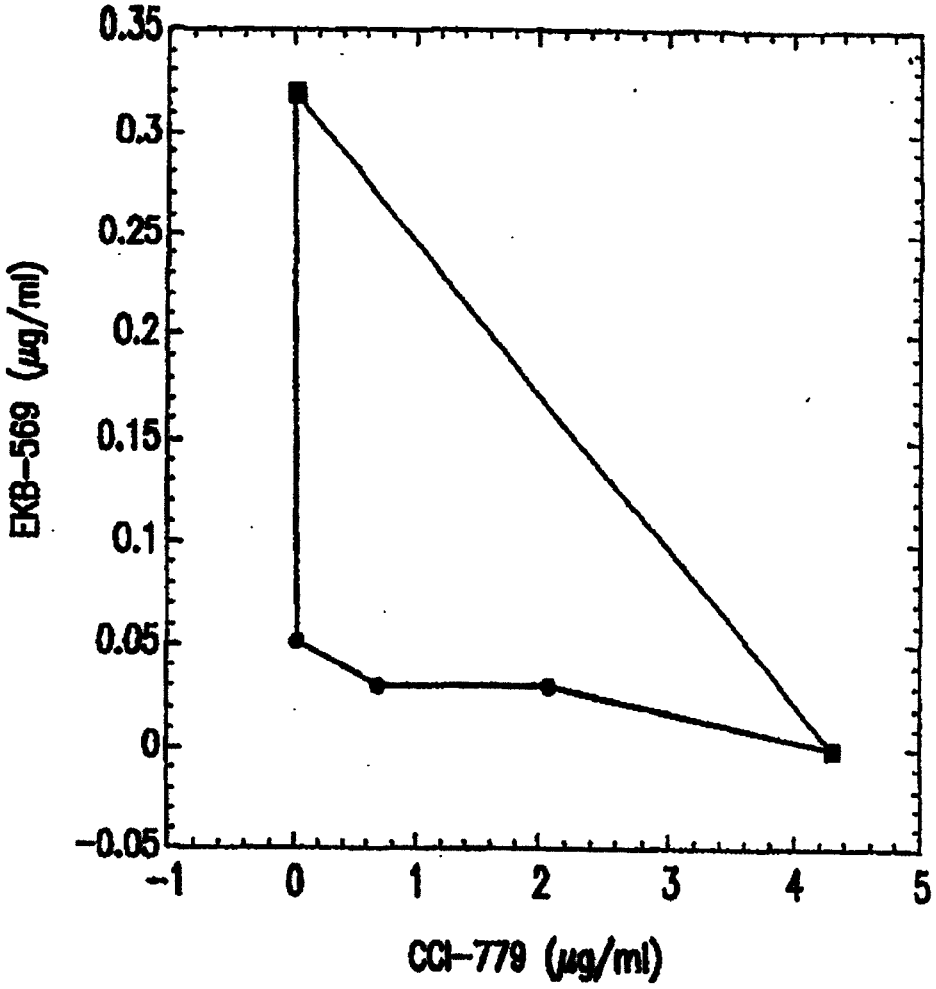


图 2

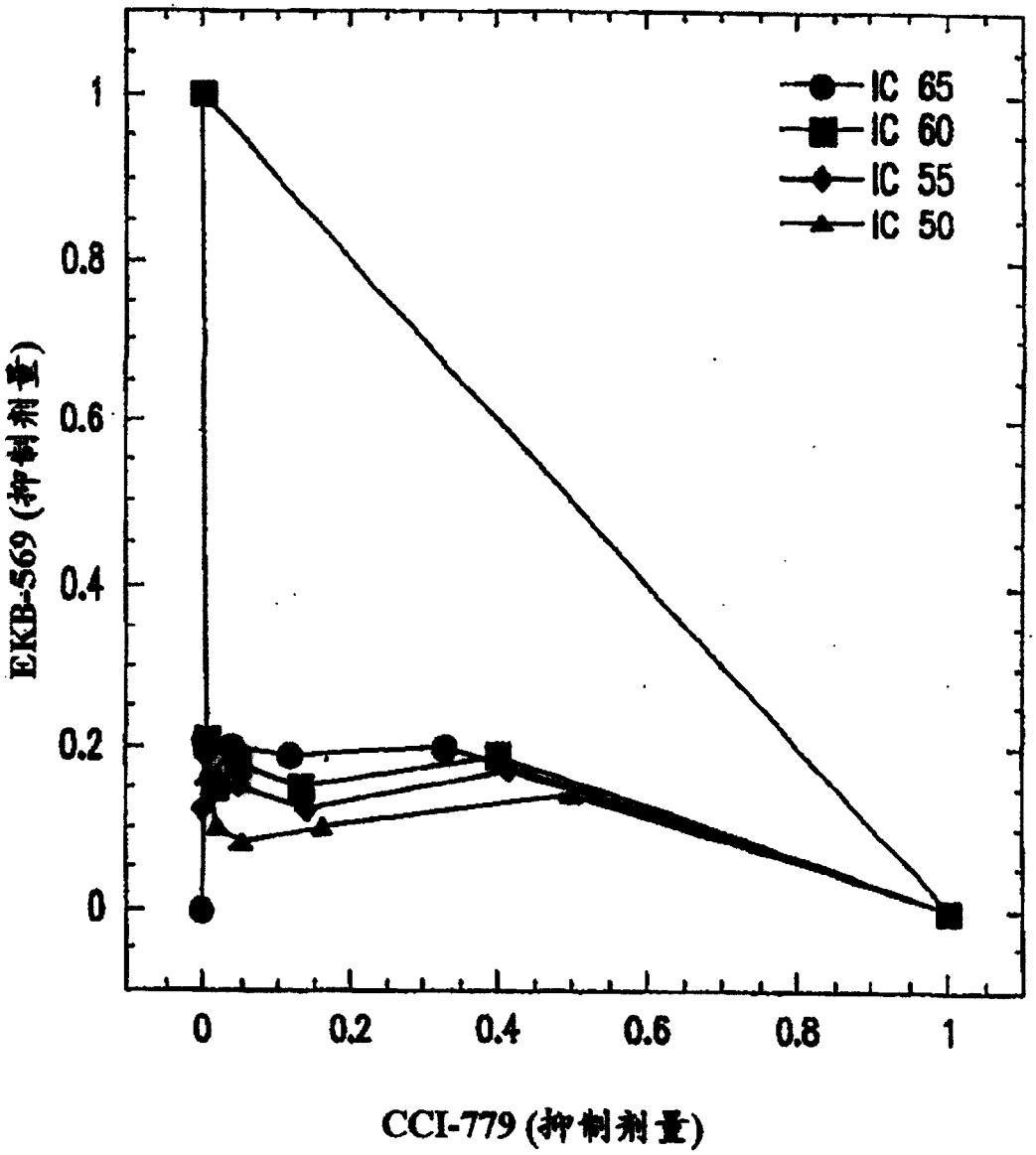


图 3

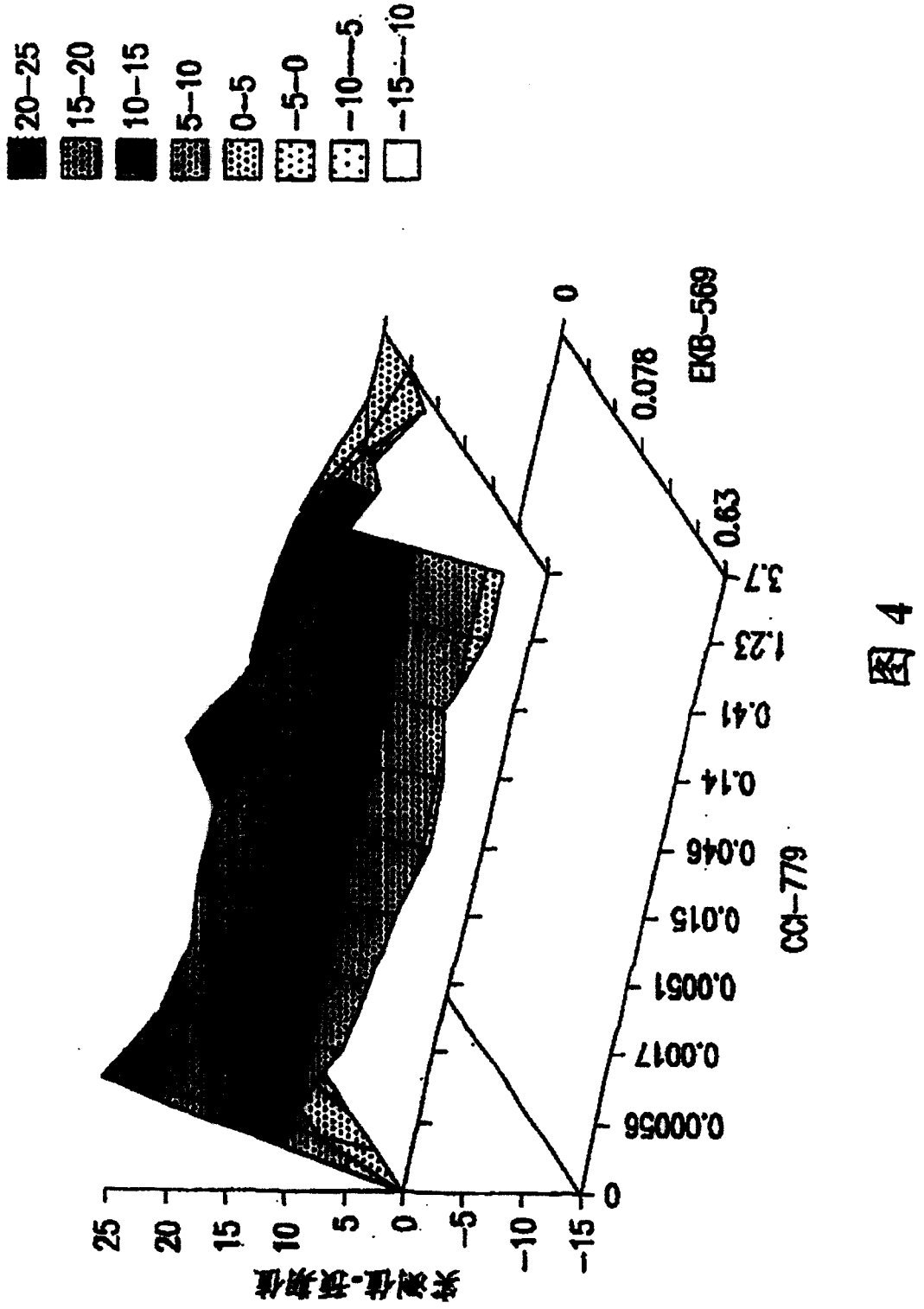

20—25
15—20
10—15
5—10
0—5
—5—0
—10—5
—15—10
实测值-预测值
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
EKB-569
0
0.078
0.63
3.7
CO-779
0
0.00056
0.0017
0.0051
0.015
0.046
0.14
0.41
1.23
3.7

图 4

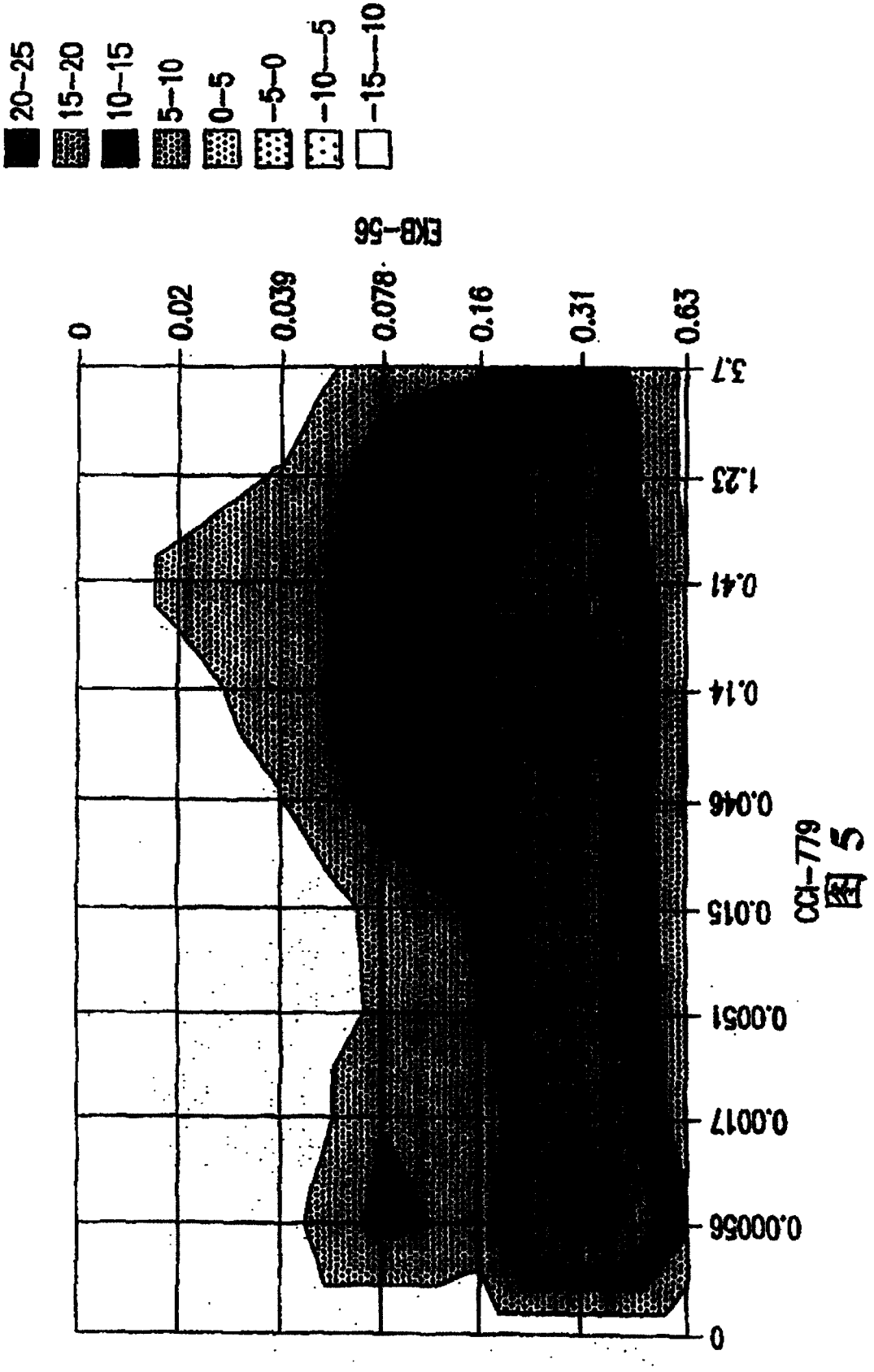

20-25
15-20
10-15
5-10
0-5
-5-0
-10--5
-15--10
EKB-56
0
0.02
0.039
0.078
0.16
0.31
0.63
3.7
1.23
0.41
0.14
0.046
0.015
0.0051
0.0017
0.00056
0
CCI-779

图 5