



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1982313 B

(45) 授权公告日 2010.12.01

(21) 申请号 200510047974.6

(22) 申请日 2005.12.13

(73) 专利权人 深圳市天和医药科技开发有限公司

地址 518057 广东省深圳市高新区高新中一道生物孵化器大楼2号楼301室

(72) 发明人 李嘉和 王颖实 邓小斌

(74) 专利代理机构 鞍山贝尔专利代理有限公司  
21223

代理人 乔丽艳

(51) Int. Cl.

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5646159 A, 1997.07.08, 说明书第1-9栏.

US 2003/0032624 A1, 2003.02.13, 说明书第1-26页.

US 4604463, 1986.08.05, 说明书实施例10, 第15栏第32-38行、权利要求1-2.

审查员 徐文亮

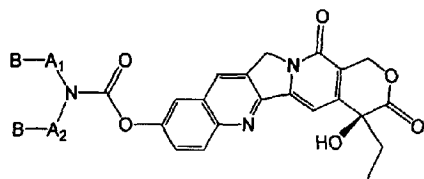
权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

10位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物及其制法与组合物

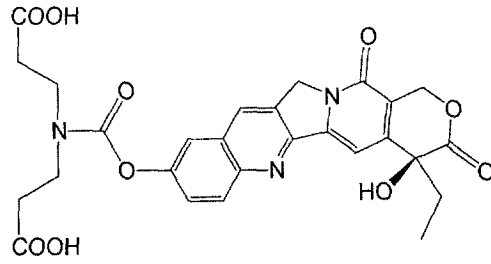
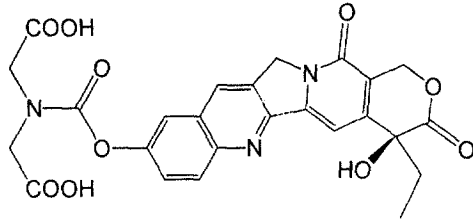
(57) 摘要

本发明涉及如通式(I)所示的10位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物,其特征在于A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>表示C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>直链烷基残基,C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>支链烷基残基或H,条件是A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>不能同时为H,A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>连接成环,B表示有机羧酸或其羧酸盐的功能基,当A<sub>1</sub>表示H时,A<sub>2</sub>表示芳香环基残基,C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>的环烷基残基,4-6元杂环基残基,C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>支链烷基残基,A<sub>2</sub>-B选自-C{(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-CONH-C[(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-COOH]a}a,其中a=1,2或3。其制法与其药物组合物及其作为抗肿瘤药物的用途。

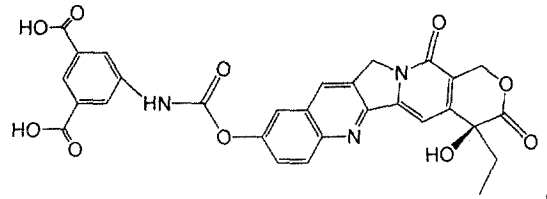


(I)

1. 一种如下述的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物：



或



## 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物及其 制法与组合物

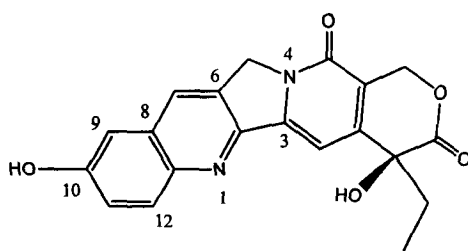
### 技术领域

[0001] 本发明涉及作为细胞毒类药物的一种植物生物碱,尤其是一种喜树碱类化合物,更具体的说,本发明涉及 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物,其制备方法,含有它们的药物组合物及其作为药物,特别是作为抗肿瘤药物的应用。

### 背景技术

[0002] 1966 年美国科学家 Wall 等首次从中国的喜树中分离到喜树碱后,因其独特的化学结构和显著的抗肿瘤活性,引起人们很大的兴趣。但喜树碱由于水溶性差而不能进入临床研究。在 70 年代,中国学者将内酯环用氢氧化钠打开,制备成水溶性的钠盐进行临床研究,结果出现严重的骨髓抑制,呕吐,腹泻和严重的出血性膀胱炎等副作用,而且开环形式活性大大降低,使临床研究终止。1985 年,JohnHopkins 大学的 Hsiang 等研究结果表明,喜树碱是 DNA 拓扑异构酶 I 的特异性抑制剂,而拓扑异构酶 I 是细胞的一种核酶,与 DNA 的复制、转录、修复以及重组有关,其在细胞周期的任何阶段都有表达,且已知肿瘤细胞中拓扑异构酶 I 的含量比正常细胞中的含量高,因而这类抗肿瘤化合物具有一定的选择性。并且拓扑异构酶 I 在增殖期细胞及静止期细胞中以相当高浓度出现,在缓慢增殖及快速增殖的肿瘤细胞中水平相似,表明其对快速增殖的肿瘤和缓慢生长的肿瘤均有抗癌活性。这一重大发现为喜树碱的重新评价打开大门。药物学家以此为靶点,对喜树碱进行了结构改造,取得了大量的成绩。例如 10-羟基喜树碱,从 1977 年在中国上市以来,被广泛使用,对原发性肝癌、胃癌、头颈部腺源性上皮癌、白血病、直肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤均有疗效。其结构式如下所示:

[0003]



[0004] 近年来,研究喜树碱的文献报道很多,例如美国专利 US5,646,159 US4,604,463 ; US6,111,107 ;US6,350,756 等。从喜树碱出发,应用 Manich 反应在 9 位上引入胺甲基,具有较好的水溶性和抗肿瘤活性,其中 10-羟基 9-二甲胺基甲基喜树碱 (Topotecan) 于 1996 年上市,用作卵巢癌病人的二线治疗药物,美国 FDA 又于 1999 年批准其作为小细胞肺癌 (SCLC) 的二线治疗药物。在 10-羟基喜树碱的 7 位上引入乙基得到的化合物 SN-38,具有良好的抗肿瘤活性,其水溶性前体药物伊利替康 (Irinotecan) 于 1994 年上市,用于结直肠癌的治疗。另外,还有国内的喜树碱类化合物研究报道,例如中国专利 200310108532 公开的 9-烷基 10-羟基取代的喜树碱类衍生物,中国专利 200410052756 公开的 10-烷氧基喜树碱衍生物等。尽管如此,仍需要发明疗效高,毒性低,水溶性好的喜树碱类化合物。

### 发明内容：

[0005] 本发明的目的是提供一种通式 (I) 的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物,其具有良好的水溶性,较强的肿瘤细胞毒活性。

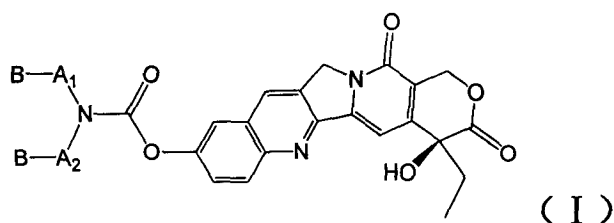
[0006] 本发明的另一目的是提供一种通式 (I) 的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物的制备方法。

[0007] 本发明一方面涉及药物组合物,其包括作为活性成份的通式 (I) 的化合物及其异构体及制药领域中常用的载体。

[0008] 本发明再一方面涉及的是通式 (I) 化合物或含有它们的药物组合物的抗肿瘤用途。

[0009] 按照本发明,如通式 (I) 所示的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物：

[0010]



[0011] 其特征在于其中  $A_1$ 、 $A_2$  各自独立地表示含取代的  $C_1$ - $C_6$  直链烷基残基,  $C_3$ - $C_{20}$  支链烷基残基或 H, 条件是两者不能同时为 H；

[0012]  $A_1$ 、 $A_2$  连接成环,包括芳香环、饱和、不饱和杂环基的残基；

[0013] 其中 B 表示和  $A_1$ 、 $A_2$  连接的含有 1 到 9 个有机羧酸或其羧酸盐的功能基,其羧酸盐包括钠、钾、钙等碱金属盐或碱土金属盐；

[0014] 当  $A_1$  表示 H 时,连接  $A_1$  的 B 无意义,  $A_2$  表示含取代的芳香环基残基,含取代的  $C_5$ - $C_6$  环烷基残基,含取代的选自 N, O 或 S 的单原子 4-6 元杂环基残基,含取代的  $C_3$ - $C_{20}$  支链烷基残基,  $A_2$ -B 选自  $-C\{(CH_2)_a-CONH-C[(CH_2)_a-COOH]a\}a$ ,  $-C\{(CH_2)_a-CONH-C[(CH_2)_a-COO^-]a\}a$ , 其中  $a = 1, 2$  或  $3$ 。

[0015] 按照本发明,优选的是其中  $A_1$ 、 $A_2$  各自独立地表示含取代的  $C_1$ - $C_4$  直链烷基残基,含取代的  $C_3$ - $C_{10}$  支链烷基残基或 H, 条件是两者不能同时为 H；

[0016] 其中 B 表示和  $A_1$ 、 $A_2$  连接的含有 1 到 9 个有机羧酸或其羧酸盐的功能基,其羧酸盐包括钠、钾、钙等碱金属盐或碱土金属盐；

[0017] 当  $A_1$  表示 H 时,连接  $A_1$  的 B 无意义,  $A_2$  表示含取代的苯基或苄基残基,含取代的  $C_3$ - $C_{10}$  支链烷基残基,  $A_2$ -B 选自  $-C\{(CH_2)_a-CONH-C[(CH_2)_a-COOH]a\}a$ ,  $-C\{(CH_2)_a-CONH-C[(CH_2)_a-COO^-]a\}a$ , 其中  $a = 1, 2$  或  $3$ 。

[0018] 本发明的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物的母体结构可以是 10-羟基喜树碱,也可以是在 10-羟基喜树碱结构式上,应用本领域公知的技术而合成的 7, 9, 11 或 20 位上含有取代基的类似物。

[0019] 根据本发明 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物可以异构体的形式存在,而且通常所述的“本发明的化合物”或“本发明的 10 位取代基上含多个有机羧酸基

团的喜树碱化合物”包括该化合物的异构体。

[0020] 本发明的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物可存在双键的顺反异构体,不对称中心具有 S 构型或 R 构型,本发明包括所有可能的立体异构体,以及两种或多种异构体的混合物。如果存在顺 / 反异构体,本发明涉及顺式形式和反式形式以及这些形式的混合物。如果需要单一异构体,可根据常规方法分离或通过立体选择合成制备。

[0021] 根据本发明所述的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物优选自天然的 10- 羟基喜树碱化合物,其光学异构体,或它们的羧酸盐。最优选自天然的 10- 羟基喜树碱化合物,或它们的羧酸盐。

[0022] 本发明的 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物的制备方法包括下列步骤:

[0023] 首先制备相应的含两个或两个以上有机羧酸基团的胺酰氯或异氰酸类化合物,这些化合物的终端含有仲胺基团或伯胺基团,将该含有胺基的化合物与相应的酰化试剂反应,在有机碱催化下得到含有胺酰氯或异氰酸功能基的化合物;再用 10- 羟基喜树碱或它的类似物和相应的胺酰氯或异氰酸类化合物,通过缩合反应制备 10 位取代基上含有机羧酸基团的喜树碱化合物的羧酸酯;最后是所述的羧酸酯水解成相应的羧酸化合物,;该羧酸化合物与碱反应制成盐。其特征在于合成反应步骤包括下列试剂,催化剂及反应条件:

[0024] 首先制备相应的含两个或两个以上有机羧酸基团的胺酰氯或异氰酸类化合物,将含有胺基的化合物与相应的酰化试剂反应,酰化试剂为光气 ( $\text{COCl}_2$ ) 或双光气 ( $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$ ), 催化剂为有机碱,包括三乙胺 ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) 或吡啶,溶剂为乙醇或四氢呋喃 (THF);

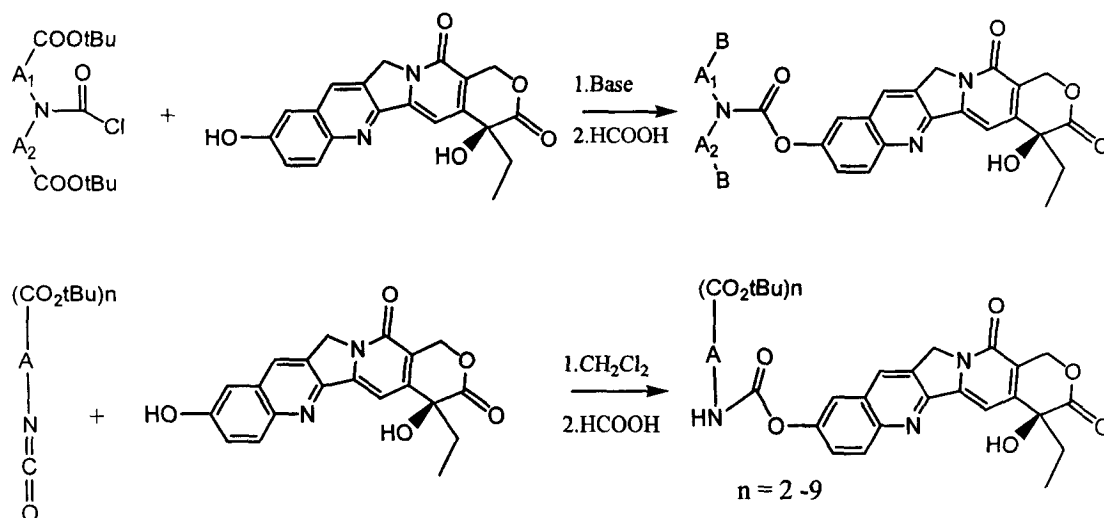
[0025] 再用 10- 羟基喜树碱或它的类似物和相应的含两个或两个以上有机羧酸基团的胺酰氯或异氰酸类化合物,通过缩合反应制备相应的羧酸酯,反应温度为  $0-60^\circ\text{C}$ ,反应的溶剂为无水有机溶剂,包括二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、氯仿 ( $\text{CHCl}_3$ )、N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 或四氢呋喃 (THF),反应的催化剂为有机碱,包括三乙胺 ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) 或吡啶;

[0026] 最后是 10 位取代基上含有机羧酸基团的喜树碱化合物的羧酸酯水解成相应的羧酸化合物,其取代基终端是叔丁基酯的水解,试剂选用甲酸,如果取代基终端是甲酯或乙酯的羧酸酯水解,采用等当量的无机碱,包括氢氧化锂、氢氧化钾或氢氧化钠,反应的温度为  $0-60^\circ\text{C}$ ,优选温度  $20-30^\circ\text{C}$ ,时间为 1-24 小时,水解反应溶剂是甲醇的硷水溶液或 1,4- 二氧六环的硷水溶液。

[0027] 这些 10 位取代基上含有机羧酸基团的喜树碱化合物的多羧酸化合物可以用通用的常规方法与硷反应制成盐,优选的硷为氢氧化钠,氢氧化钾,碳酸钠或碳酸氢钠等。

[0028] 制备本发明化合物的合成反应一般是在常温或室温 ( $10-30^\circ\text{C}$ ) 条件下进行。其合成反应通式如下:(式中 Base 代表吡啶或三乙胺)

[0029]



[0030] 根据本发明的实施方案,所述的本发明 10 位取代基上含多个有机羧酸基团的喜树碱化合物还包括其药效学上可接受的盐、盐的水合物、羧酸酯或前体药物。

[0031] 本发明因此还涉及含有作为活性成分的本发明化合物和常规药物赋形剂或辅剂的药物组合物。通常本发明药物组合物含有 0.1-95 重量%的本发明化合物。

[0032] 本发明化合物的药物组合物可根据本领域公知的方法制备。用于此目的时,如果需要,可将本发明化合物与一种或多种固体或液体药物赋形剂和 / 或辅剂结合,制成可作为人药或兽药使用的适当的施用形式或剂量形式。

[0033] 本发明化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药,给药途径可为肠道或非肠道,如口服、肌肉、皮下、鼻腔、口腔粘膜、皮肤、腹膜或直肠等。

[0034] 本发明化合物或含有它的药物组合物的给药途径可为注射给药,包括静脉注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射和穴位注射等,此外,还包括胸腔注射给药,膀胱、腹腔等的灌注给药以及经动脉对脑、肝、肾、四肢、肠等部位的介入给药等。

[0035] 给药剂型可以是液体剂型、固体剂型。如液体剂型可以是真溶液类、胶体类、微粒剂型、乳剂剂型、混悬剂型。其他剂型,例如片剂、胶囊剂、滴丸、气雾剂、丸剂、粉剂、溶液剂、混悬剂、栓剂或冻干粉针剂等。

[0036] 本发明化合物可以制成普通制剂,也可以是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

[0037] 例如为了将单位给药剂型制成片剂,可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体的例子是,例如稀释剂与吸收剂,如淀粉、糊精、硫酸钙、乳糖、甘露醇、蔗糖、氯化钠、葡萄糖、尿素、碳酸钙、白陶土、微晶纤维素、硅酸铝等;湿润剂如水、甘油、聚乙二醇、乙醇、丙醇等;粘合剂如淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素、甲基纤维素、紫胶、磷酸钾、聚乙烯吡咯烷酮等;崩解剂,如干燥淀粉、海藻酸盐、琼脂粉、褐藻淀粉、碳酸氢钠与枸橼酸、碳酸钙、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等;崩解抑制剂,例如蔗糖、硬脂酸甘油酯、可可脂、氢化植物油等;吸收促进剂,例如季铵盐、十二烷基硫酸钠等;润滑剂,例如滑石粉、二氧化硅、玉米淀粉、硬脂酸盐、硼酸、液状石蜡、聚乙二醇等。还可以将片剂进一步制成包衣片,例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片,或双层片和多层片。

[0038] 例如为了将给药单元制成丸剂,可以广泛使用本领域公知的各种载体。关于载体

的例子是,例如稀释剂与吸收剂,如葡萄糖、乳糖、淀粉、可可脂、氢化植物油、聚乙烯吡咯烷酮、高岭土、滑石粉等;粘合剂,如阿拉伯胶、黄耆胶、明胶、乙醇、蜂蜜、米糊或面糊等;崩解剂,如琼脂粉、干燥淀粉、海藻酸盐、十二烷基磺酸钠、甲基纤维素、乙基纤维素等。

[0039] 例如为了将给药单元制成胶囊剂,将有效成分的本发明化合物与上述的各种载体混合,并将由此得到的混合物置于硬的明胶或软胶囊中。也可将有效成分的本发明化合物制成微囊剂,混悬于水性介质中形成混悬剂,也可装入硬胶囊中,或制成注射剂应用。

[0040] 例如将有效成分的本发明化合物制成注射用制剂,如溶液剂、混悬剂溶液、乳剂、冻干粉针剂等,这种制剂可以是含水或非水的,可含一种和/或多种药效学上可接受的载体,如稀释剂、粘合剂、润滑剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂。如稀释剂可选自水、乙醇、聚乙二醇、1,3-丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、多氧化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯等。另外,为了制备等渗注射液,可以向注射用制剂中添加适量的氯化钠、葡萄糖或甘油,此外,还可以添加常规的助溶剂、缓冲剂、pH调节剂等。这些辅料是本领域常用的。此外,如需要,也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂、甜味剂或其它材料。

[0041] 本发明化合物药物组合物的给药剂量取决于许多因素,例如所要预防或治疗疾病的性质和严重程度,患者或动物的性别、年龄、体重、性格及个体反应,给药途径、给药次数等,因此本发明的治疗剂量可以有大范围的变化。本发明药物成分的使用剂量是本领域技术人员公知的。可以根据本发明化合物组合物中最后的制剂中所含有的实际药物数量,加以适当的调整,以达到其治疗有效量的要求,完成本发明的预防或治疗目的。本发明化合物的每天的合适剂量范围从 0.1-1000mg/m<sup>2</sup> 尤其是 1-100mg/m<sup>2</sup>。上述剂量可以单一剂量形式或分成几个,例如二、三或四个剂量形式给药,这受限于给药医生的临床经验以及包括运用化疗、放疗手段的给药方案。

[0042] 从体外抗肿瘤活性筛选来看,本发明的化合物表现良好的抗肿瘤活性。可作为抗肿瘤药物用于动物,优选用于哺乳动物,特别是人。

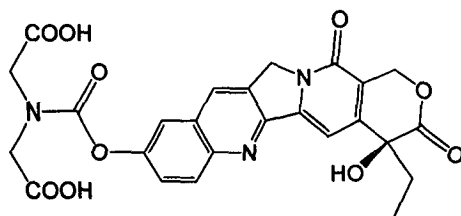
## 具体实施方式

[0043] 下面的实施例用来进一步说明本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0044] 实施例 1:10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 双醋酸及其二钠盐的合成:

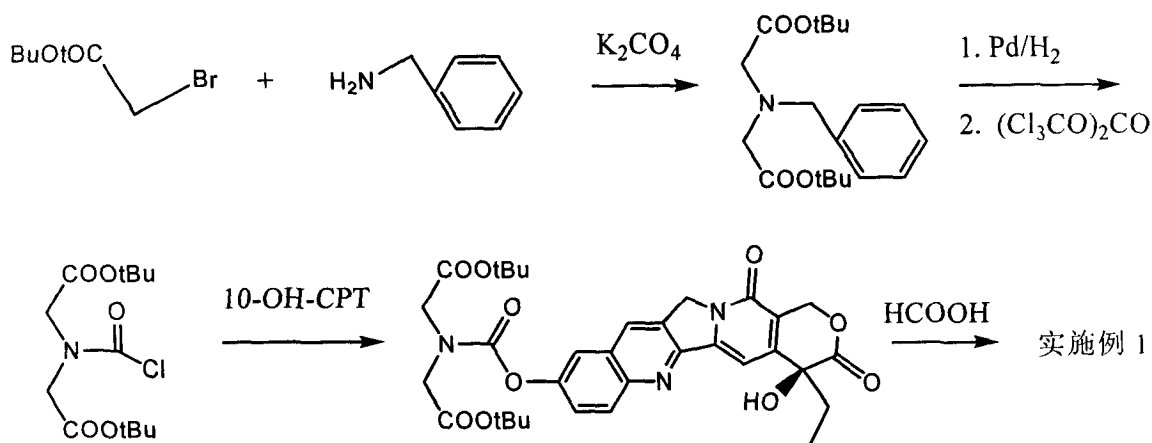
[0045] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 双醋酸的结构式如下:

[0046]



[0047] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 双醋酸的合成路线如下:

[0048]



[0049] 苄胺双乙酸叔丁酯  $BnN(CH_2CO_2-tBu)_2$  的合成：

[0050] 将苄胺 (8.4ml, 0.077mol) 和碳酸钾 (21.5g, 0.156mol) 溶解在 120ml 乙醇中, 室温下将溴代乙酸叔丁酯 (30.0g, 0.158mol) 滴加入苄胺溶液中。将反应液在室温下搅拌, 用硅胶薄层 (TLC) 层析观察, 直到反应物苄胺消失为止。真空下除去乙醇, 将油状物用水和乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取。酯层用水和饱和盐水洗涤, 再用无水硫酸钠干燥。真空下除去 EtOAc 溶剂, 其残留物用硅胶柱层析纯化得到  $BnN(CH_2CO_2-tBu)_2$  (17.9g), 为无色油状物, 收率为 69.2%, 低分辨质谱 LRMS :M+1 = 336.4。

[0051] 胺基双乙酸叔丁酯  $HN(CH_2CO_2-tBu)_2$  的合成：

[0052] 将  $BnN(CH_2CO_2-tBu)_2$  (28.0g, 83.5mmol) 溶解在 200ml 甲醇中, 在  $N_2$  保护下加入钯碳 (Pd/C) (8.74g) 和甲酸铵 (26.5g, 420mmol)。将该混合液体加热回流 12 小时, 过滤除去 Pd/C, 再将滤液的甲醇溶剂除去, 其残留固体用硅胶柱层析纯化 (石油醚 Pet/EtOAc 2 : 1) 得到固体  $HN(CH_2CO_2-tBu)_2$  (15.45g, 75.1%), 低分辨质谱 LRMS :M+1 = 246.4。

[0053] 胺酰氯双乙酸叔丁酯  $ClCON(CH_2CO_2-tBu)_2$  的合成：

[0054] 将以上中间体  $HN(CH_2CO_2-tBu)_2$  (12.87g, 52.46mmol),  $Et_3N$  (10.42mL) 溶解在 50mL THF 中。冰水浴下, 将其加入溶有  $Cl_3COCO_2CCl_3$  (5.70g, 19.24mmol) 的 THF (250mL) 中。将该混合液在室温下搅拌 3h。真空下除去 THF 溶剂, 得到粗品。将该粗品悬浮在 EtOAc 中, 过滤除去固体, 再将滤液的 EtOAc 溶剂除去, 其残留固体用硅胶柱层析纯化 (Pet/EtOAc 10 : 1) 得到无色固体  $ClCON(CH_2CO_2-tBu)_2$  (11g, 68.1%)。RF : 0.31 over 10 : 1 Pet/EtOAc, 低分辨质谱 LRMS :M+1 = 330.3。

[0055] 10-(t-BuO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>- 喜树碱的合成：

[0056] 将 10-羟基喜树碱 (0.311g, 0.856mmol) 和  $ClCON(CH_2CO_2-tBu)_2$  (1.712mmol) 溶解在 21mL 吡啶中, 室温下搅拌 12 小时。真空下除去吡啶溶剂。用  $CHCl_3$  (100mL) 萃取, 用 7% 的  $NaHCO_3$  溶液 100ml 和饱和盐水洗涤  $CHCl_3$  层, 用无水硫酸钠干燥。用硅胶柱层析纯化 ( $CHCl_3$ /EtOAc 1 : 1) 得到黄色固体 10-(t-BuO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>- 喜树碱 0.51g, 收率 93.8%。RF : 0.49 ( $CHCl_3$  : EA : EtOH 1 : 1 : 0.1)。低分辨质谱 LRMS :M+1 = 636.7。

[0057] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 双醋酸的合成：

[0058] 将 10-(t-BuO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>- 喜树碱 (0.44g, 0.6922mmol) 溶解在 8.0mL 甲酸中, 室温下搅拌 12 小时。真空下除去甲酸溶剂, 得到黄色固体。用 EtOAc 和  $CHCl_3$  洗涤得到黄色固体 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 双醋酸 0.31g, 收率 85.6%。核磁共振氢谱  $^1HnMR$  (DMSO-d<sub>6</sub>) :



8

[0059] 0.89(3H, t,  $J = 7.2\text{Hz}$ ), 1.87(2H, m), 4.12(2H, s), 4.28(2H, s), 5.30(2H, s), 5.43(2H, s), 6.54(1H, s), 7.34(1H, s), 7.58(1H, dd,  $J_1 = 9.2\text{Hz}$ ,  $J_2 = 2.8\text{Hz}$ ), 7.88(1H, d,  $J = 2.8\text{Hz}$ ), 8.20(1H, d,  $J = 9.2\text{Hz}$ ), 8.70(1H, s), 12.99(2H, s), 低分辨质谱 LRMS : $M+1 = 524.3$ 。

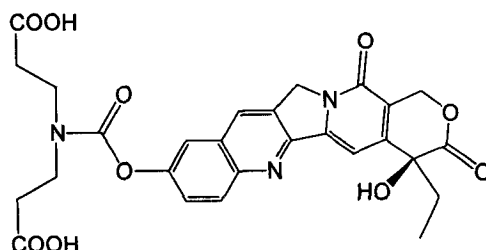
[0060] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双醋酸二钠的合成:

[0061] 将 10-( $t\text{-BuO}_2\text{CCH}_2$ )<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>-喜树碱 (0.340g, 0.6499mmol) 溶解在 1.0mLDMF 中, 然后定量加入 52.0mg 氢氧化钠水溶液, 冷冻真空干燥下除去 DMF 溶剂, 得到淡黄色固体, 用 EtOAc 洗涤得到水溶性固体 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双醋酸二钠盐 0.340g, 收率 92.3%, LRMS : $M-2\text{Na}+1 = 524.3$ 。

[0062] 实施例 2:10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸及其二钠盐的合成:

[0063] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸结构式如下:

[0064]



[0065] 合成路线参见实施例 1, 合成方法相似。

[0066] 苄胺双丙酸叔丁酯  $\text{BnN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  的合成:

[0067] 将苄胺 (5.46mL, 0.05mol) 和碳酸钾 (21.5g, 0.156mol) 溶解在 100ml 乙醇中, 室温下将溴代丙酸叔丁酯 (15.38mL, 0.105mol) 滴加入苄胺溶液中。将反应液加热回流 48 小时, 用 TLC 层析观察, 直到反应物苄胺消失为止。真空下除去乙醇溶剂, 将油状物用水和乙酸乙酯萃取。酯层用水和饱和盐水洗涤, 再用无水硫酸钠干燥。真空下除去 EtOAc 溶剂, 其残留物用硅胶柱层析纯化得到  $\text{BnN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  (14g), 为无色油状物, RF :0.74 (Pet/AcOEt5 : 1), 收率为 77%, 低分辨质谱 LRMS : $M+1 = 364.1$ 。

[0068] 胺基双丙酸叔丁酯  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  的合成:

[0069] 在  $\text{N}_2$  下, 将  $\text{BnN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  (1.09g, 3.0mmol) 溶解在 20ml 甲醇中, 在  $\text{N}_2$  保护下加入 Pd/C (0.32g) 和甲酸铵 (0.946g, 15mmol)。将该混合液体加热回流 12 小时, 过滤除去固体 Pd/C, 再将滤液的甲醇溶剂除去, 其残留固体用硅胶柱层析纯化 (Pet/EtOAc 2 : 1) 得到固体  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  (0.61g, 74.4%), RF :0.29 (Pet/EtOAc 1 : 1), 低分辨质谱 LRMS : $M+1 = 274.0$

[0070] 胺酰氯双丙酸叔丁酯  $\text{ClCON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  的合成:

[0071] 冰水浴下, 将  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  (0.16g, 0.5395mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.29mL, 2.10mmol) 溶解在 10mLTHF 中。将其加入溶有  $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$  (0.16g, 0.5395mmol) 的 THF (10ml) 中。将该混合液在室温下搅拌 3 小时。真空下除去 THF 溶剂, 得到  $\text{ClCON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  粗品。直接进行下一步反应。

[0072] 10-( $t\text{-BuO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>-喜树碱的合成:

[0073] 将 10-羟基喜树碱 (0.311g, 0.856mmol) 和  $\text{ClCON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2-t\text{Bu})_2$  (1.712mmol)

溶解在 20mL 吡啶中, 室温下搅拌 12 小时。真空下除去吡啶溶剂。用  $\text{CHCl}_3$  (100mL $\times$ 2) 萃取, 用 7% 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液和饱和盐水洗涤  $\text{CHCl}_3$  层, 用无水硫酸钠干燥。真空下除去  $\text{CHCl}_3$  溶剂后得固体粗品, 用硅胶柱层析纯化 ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1 : 1) 得到黄色固体 10-(t-BuO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>-喜树碱 0.51g, 收率 93.8%。RF : 0.49 ( $\text{CHCl}_3$  : EA : EtOH 1 : 1 : 0.1), 低分辨质谱 LRMS : M+1 = 662.7。

[0074] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸的合成:

[0075] 将 10-(t-BuO<sub>2</sub>C CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>-喜树碱 (0.4g, 0.60mmol) 溶解在 8.0mL 甲酸中, 室温下搅拌 12 小时。真空下除去甲酸溶剂, 得到黄色固体。用 EtOAc 和乙醚洗涤得黄色固体 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸 0.216g, 收率 65.0%。低分辨质谱 LRMS : M+1 = 552.3。核磁共振氢谱 <sup>1</sup>HMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  : 0.89 (3H, t, J = 7.2Hz), 1.87 (2H, m), 4.12 (2H, s), 2.57 (2H, t, J = 6.8Hz), 2.67 (2H, t, J = 6.8Hz), 3.55 (2H, t, J = 6.8Hz), 3.71 (2H, t, J = 6.8Hz), 5.30 (2H, s), 5.43 (2H, s), 6.53 (1H, s), 7.68 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 9.2Hz, J<sub>2</sub> = 2.8Hz), 7.91 (1H, d, J = 2.8Hz), 8.18 (1H, d, J = 9.6Hz), 8.32 (1H, s), 8.65 (1H, s)。

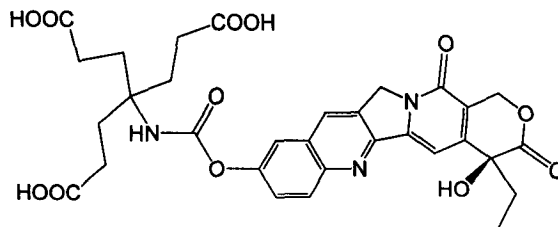
[0076] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸二钠盐的合成:

[0077] 将 10-(t-BuO<sub>2</sub>C CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NCO<sub>2</sub>-喜树碱 (0.212g, 0.3844mmol) 溶解在 1.0mL DMF 中, 然后定量加入 30mg 氢氧化钠水溶液。冷冻真空干燥下除去 DMF 溶剂, 得到淡黄色固体, 用 EtOAc 洗涤得到水溶性固体 10-(羧酰胺)羟基喜树碱-N-双丙酸二钠盐 0.21g, 收率 92%, 低分辨质谱 LRMS : M+1 = 596.5。

[0078] 实施例 3 : 10-[N-(4,4'-二丙酸)丁酸)羧酰胺]羟基喜树碱的合成:

[0079] 10-[N-(4,4'-二丙酸)丁酸)羧酰胺]-羟基喜树碱结构式如下:

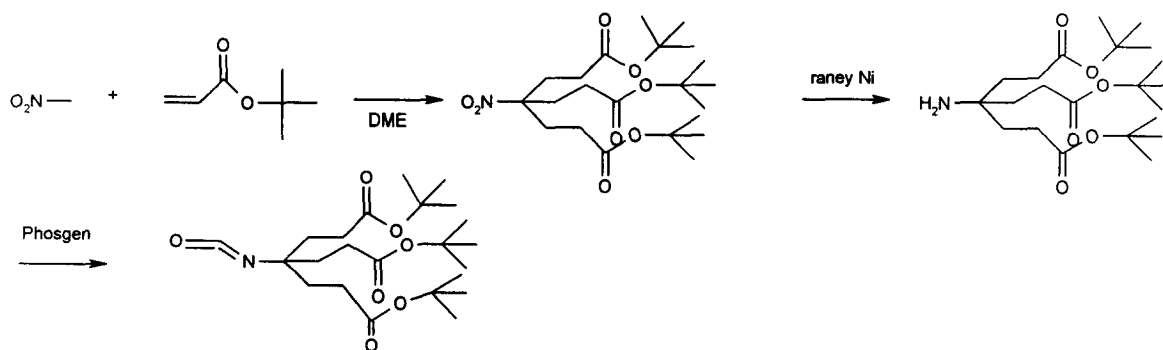
[0080]



[0081] 下列反应式的三羧酸叔丁酯衍生物中间体通过以下方法获得。用硝基甲烷和叔丁基丙烯酸酯, 通过 MICHEAL 加成得到硝基三羧酸叔丁酯衍生物。将该化合物 50g (0.11mol) 置于 1000ml 的圆底烧瓶中, 加入 400ml 无水乙醇使其溶解, 然后加入由 30g 镍铝合金制备得到的 Raney Ni (0.26mol)。常温常压氢反应。反应物反应完全后过滤除去 Raney Ni, 旋转减压蒸去乙醇溶剂, 得到 46.6g 白色固体, 胺基三羧酸叔丁酯衍生物化合物 [1,5-双叔丁氧基酰基-3-[(2-叔丁氧基酰基)乙基]3-氨基戊烷]。产率 100%。Rf = 0.806 (乙酸乙酯); Mp : 60 ~ 62°C。LRMS : M+1 = 416.1 ; M+ 钠 = 438.3。

[0082] 用实施例 1 描述的胺酰氯制备法得到以下异氰酸三羧酸叔丁酯衍生物 (MW = 441), 没有纯化的粗品用于下一步和 10-羟基喜树碱的偶合反应 (反应式中 Phosgen 为光气)。

[0083]



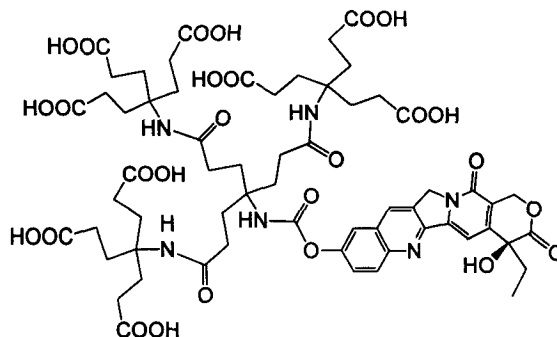
[0084] 将以上异氰酸三羧酸叔丁酯衍生物 (1.5g, 3.2mmol) 和 10-羟基喜树碱 (0.364g, 1.0mmol), 置于吡啶 (81mL) 中。室温搅拌 24 小时。减压下除去吡啶溶剂。浓缩物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200mL) 和水萃取, 再用  $\text{NaHCO}_3$  (7%, 100mL) 和饱和盐水洗有机相, 用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机层。旋转减压蒸去  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶剂得到粗品。硅胶柱层析 ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1 : 1) 后得到浅黄色固体 10-羟基喜树碱三羧酸叔丁酯衍生物 (0.51g, 60%)。RF : 0.3 ( $\text{CHCl}_3$  : EA : EtOH 1 : 1 : 0.1)。

[0085] 将以上的 10-羟基喜树碱三羧酸叔丁酯衍生物 (0.51g) 溶解在甲酸 (10mL) 中, 室温搅拌 12 小时, 旋转减压除去甲酸溶剂, 得到黄色固体。将该固体在乙腈中重结晶得 10-[N-(4,4'-二丙酸)丁酸]羧酰胺]-羟基喜树碱 (0.3g), 低分辨质谱 (LRMS)  $M-1 = 636$ 。

[0086] 实施例 4 : 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 九羧酸的合成 :

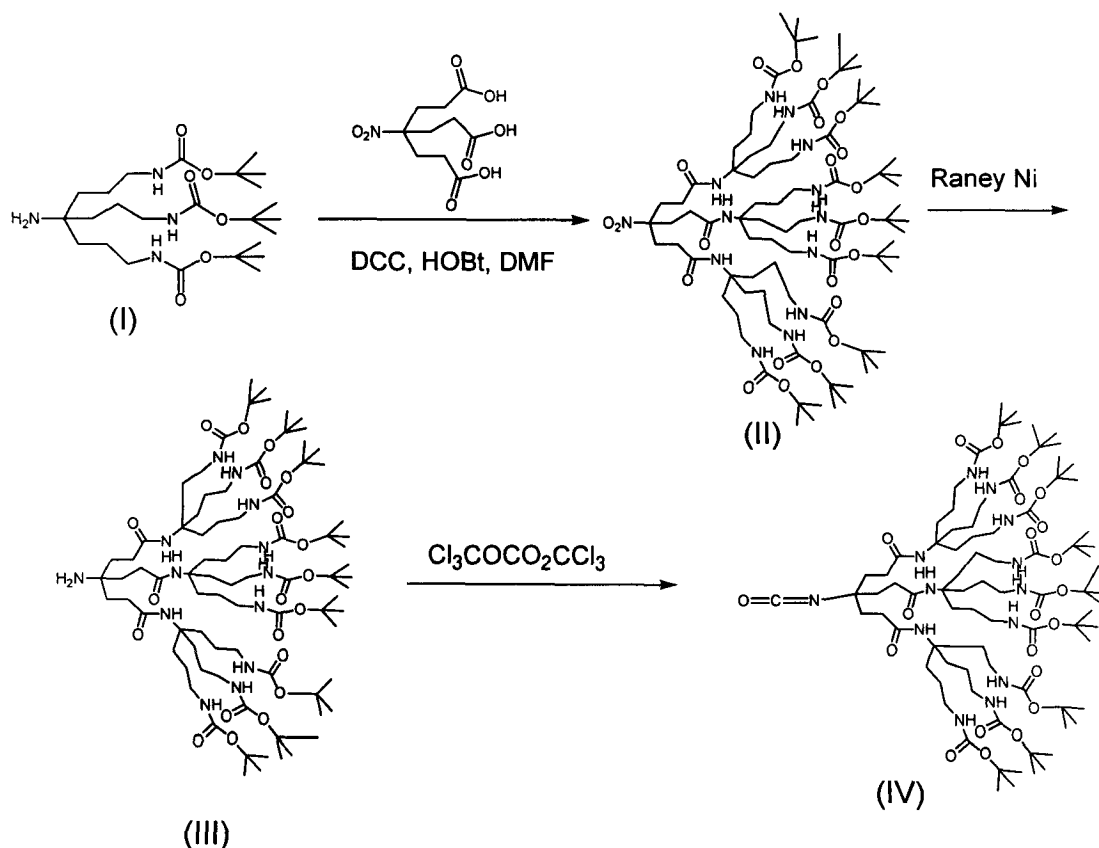
[0087] 10-(羧酰胺)羟基喜树碱 -N- 九羧酸结构式如下 :

[0088]



[0089] 取代基部分的制备 :

[0090]



[0091] 将实施例 3 中 [1,5-双叔丁氧基酰基-3-[(2-叔丁氧基酰基)乙基]3-氨基戊烷]50g(0.12mol) 与化合物三取代丙酸硝基甲烷 10g(0.036mol) (见上图), 置于一个 1000ml 的圆底烧瓶中, 加入 350mLDMF, 待化合物溶解后, 再加入 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 17.9g(0.13mol)。然后取 1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC) 27.3g(0.13mol) 置于一个 100ml 的烧杯中, 加入 50mLDMF 使其溶解, 将其滴加入反应瓶中, 室温搅拌反应 48h, 过滤除去固体, 向反应液中加入 400mL EtOAc, 用水 (100×4mL) 洗, 无水硫酸钠干燥有机层。减压旋转蒸去 DMF 和 EtOAc 等溶剂, 将所得残留物用柱层析分离得到反应式 (上图) 的硝基化合物 (II) 白色固体 36g, 产率为 67.5%。Rf = 0.375(EtOAc : 己烷 = 1 : 2); Mp 151 ~ 153°C; 低分辨质谱 LRMS :M+11470.4M+ 水 = 1487.4。

[0092] 以上化合物 (II) 28g(0.019mol), 置于一个 1000ml 的圆底烧瓶中, 加入 400mL 无水乙醇, 再加入由 30g 镍铝合金制备得到的 RaneyNi (0.26mol)。常温常压下氢化反应。反应完全后过滤除去 Raney Ni, 旋转减压除去乙醇溶剂, 得到白色固体化合物 (III) 27g。产率 100%。Rf = 0.51(D : M = 10 : 1); Mp = 180 ~ 181°C; LRMS :M+11440.3。用实施例 1 描述的胺酰氯制备法得到异氰酸九羧酸叔丁酯衍生物 (IV), 得到的没有进一步纯化的粗品 (IV) 低分辨质谱 LRMS :M+1 = 1726 直接用于下一步和 10-羟基喜树碱的偶合反应。

[0093] 将以上异氰酸九羧酸叔丁酯衍生物 (IV) (15g) 和 10-羟基喜树碱 (0.364g, 1.0mmol), 置于吡啶 (150mL) 中。室温搅拌 74 小时。减压下除去吡啶溶剂。浓缩物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500mL) 和水萃取, 再用  $\text{NaHCO}_3$  7%, (100mL) 和饱和盐水洗有机相, 用无水硫酸钠干燥有机层。旋转减压除去  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶剂, 得到粗品, 将该粗品经硅胶柱层析 ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1 : 1) 后得到白色固体 10-羟基喜树碱九羧酸叔丁酯衍生物 (0.7g)。

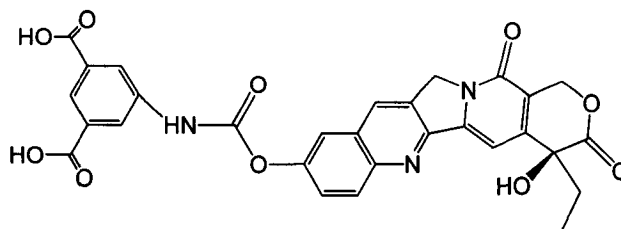
[0094] 将以上的 10-羟基喜树碱九羧酸叔丁酯衍生物 (0.7g) 溶解在甲酸 (10mL), 室温搅

拌 74 小时, 旋转减压除去甲酸溶剂, 得到 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N- 九羧酸产品 (0.1g), 低分辨质谱 (LRMS)  $M-1 = 1324$ 。

[0095] 实施例 5 : 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸的合成 :

[0096] 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸结构式如下 :

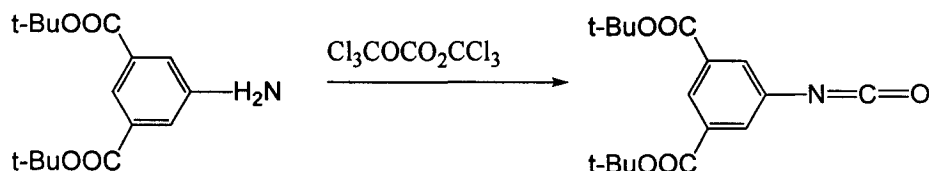
[0097]



[0098] 合成方法 :

[0099] 在冰浴条件下, 将  $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$  (0.15g, 0.5mmol) 和三乙胺 (0.3mL) 置于含 10mL THF 的圆底烧瓶中, 缓慢加入 1,3-(5- 氨基 ) 苯二甲酸 (0.135g, 1.5mmol)。反应液体在搅拌下经过 2 小时升到室温。旋转减压除去 THF 溶剂, 得到的粗品异氰酸化合物 (0.2g) 直接用于下一步和 10- 羟基喜树碱的反应。

[0100]



[0101] 将以上的异氰酸 (0.2g) 溶解于 DMF (5mL) 再将 10- 羟基喜树碱 (0.15g) 溶解于 DMF (10mL) 中。在  $0^\circ\text{C}$  下将前者加入后者之中, 室温搅拌 74 小时。减压下除去 DMF 溶剂。浓缩物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50mL) 和水萃取, 再用水和饱和盐水洗有机相, 用无水硫酸钠干燥有机层。旋转减压除去  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶剂, 得到粗品 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸叔丁酯衍生物。将该粗品经硅胶柱层析 ( $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  1 : 1) 纯化后得到白色固体 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸叔丁酯 (0.07g), 低分辨质谱 (LRMS)  $M+1 = 684$ 。

[0102] 将以上 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸叔丁酯 (0.07g) 溶解在甲酸 (10mL) 中, 室温搅拌 24 小时, 旋转减压除去甲酸溶剂, 将固体在乙醚中进行重结晶得到 10-( 羧酰胺 ) 羟基喜树碱 -N-5- 苯间二甲酸 (0.02g), 低分辨质谱 (LRMS)  $M-1 = 570$ 。

[0103] 药理实验 :

[0104] 样品制备 : 10- 羟基喜树碱 (HCPT) 加几滴二甲基亚砜 (DMSO) 然后用蒸馏水溶解得供试样品, 其他样品用蒸馏水溶解供实验用。

[0105] 实验方法 : 六种人体肿瘤细胞 (SGC-7901, BEL-7404, BEL-7402, Bcap-37, HL-60 和 K562), 一种老鼠肿瘤细胞 P388, 分别悬浮于 RPMI-1640 (Gibco) 培养基中, 提供以 10% 牛血清, 在温度  $37^\circ\text{C}$ , 含 5%  $\text{CO}_2$  空气环境下培养。每种肿瘤细胞浓度为  $(1-5) \times 10^8/\text{L}$ , 不同浓度的 10- 羟基喜树碱和供试的实施例化合物与肿瘤细胞作用 3-5d ; HL-60 作用 12h ; P388 作用 48h。采用 MTT 和台盼蓝排染法测定。体外细胞毒性实验测定结果见表 1 :

[0106] 表 1. 10- 羟基喜树碱及实施例化合物对不同肿瘤细胞作用比较 :

肿瘤细胞	HCPT	IC <sub>50</sub> /mmol. L <sup>-1</sup> (logit 方法)		
		实施例 1 二钠盐	实施例 2 二钠盐	实施例 5
BEL-7404	0.20	0.16	0.20	1.15
[0107] BEL-7402	0.05	0.07	0.03	0.10
SGC-7901	5.80	4.90	5.20	6.20
Bcap-37	0.45	0.30	0.70	1.11
HL-60	0.78	0.42	0.82	1.84
K562	0.08	0.04	0.10	0.04
P338	0.24	0.18	0.22	0.61

[0108] BEL-7402 和 BEL-7404 : 人恶性肝肿瘤细胞株 ;SGC-7901 : 人胃癌细胞株 ; Bcap-37 : 人乳腺癌细胞株 ;HL-60 和 K562 : 人白血病癌细胞株 ;P338 : 鼠白血病癌细胞株。

[0109] 实验结果表明 : 实施例 1, 2, 5 三个化合物都呈现出类似于 10- 羟基喜树碱的肿瘤细胞毒性。实施例 1 化合物的抑制肿瘤细胞的效果最好, 也好于 10- 羟基喜树碱。