(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106083932 B
(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201610463620.8

(22)申请日 2011.12.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106083932 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(30)优先权数据
1060350 2010.12.10 FR

(62)分案原申请数据
201180059905.0 2011.12.09

(73)专利权人 法国古士塔柏罗斯学院
地址 法国维勒瑞夫市

(72)发明人 安戈洛·帕奇 蒂埃里·马腾斯
米歇尔·里瓦德
帕特里克·库夫勒尔
迪迪尔·德斯麦尔
约阿希姆·卡隆

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
代理人 刘慧 杨青

(51)Int.Cl.
C07F 9/6584(2006.01)
A61K 31/675(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
JP S55154984 A,1980.12.02,
US 4770870 A,1988.09.13,
US 4623742 A,1986.11.18,
JP S55154984 A,1980.12.02,
Habib, Asif D et al..Effect of stereochemistry on the oxidative metabolism of the cyclophosphamide metabolite aldophosphamide.《 Biochemical Pharmacology》.1995,
Przybylski, M et al..Mass spectrometric characterization of activated N-(2-chloroethyl) amidooxazaphosphorine derivatives.《 Biomedical Mass Spectrometry》.1977,
Hirano, Takashi et al..Synthesis of activated cyclophosphamide derivatives bearing functionalgroups.《Tetrahedron Letters》.1979,
Hohorst, Hans Juergen et al..The enzymic basis of cyclophosphamide specificity.《Advances in Enzyme Regulation》.1986,
Hirano, Takashi et al..Antitumor activity of monomeric and polymeric cyclophosphamide derivatives compared with in vitro hydrolysis.《Cancer Research》.1980,
Zon, Gerald et al..NMR spectroscopic studies of intermediary metabolites of cyclophosphamide. A comprehensive kinetic analysis of the interconversion of cis-andtrans-4-hydroxycyclophosphamide with aldophosphamide and the concomitant partitioning of aldophosphamide.《Journal of Medicinal Chemistry》.1984,

审查员 王建芳

权利要求书2页 说明书23页

(54)发明名称

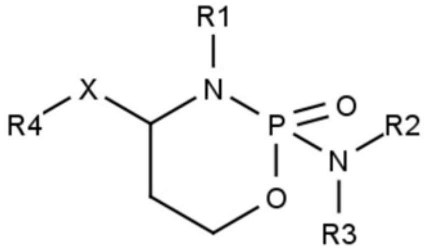
新型的预活化的氧氮杂膦衍生物、应用和制备方法

(57)摘要

本发明涉及新型的预活化的氧氮杂膦衍生物、应用和制备方法,含有它们的药物组合物,特别是用于治疗癌症的治疗性应用。

CN 106083932 B

1.式(I)的化合物或其药学可接受的盐，



其中

X是O或S；

R1、R2和R3定义如下：

R1是H，R2是$-(CH_2)_2-Cl$且R3是$-(CH_2)_2-Cl$；

R4由式$R_5(Y)_a$表示，其中：

Y选自$-(CH_2)_m-$、$-CONH(CH_2)_m-$、$-NHCO(CH_2)_m-$、$-COO(CH_2)_m-$和$-OCO(CH_2)_m-$，其中m是1至10范围内的整数；

a是0或1；以及

R5是3至30个碳原子的直链或支链的不饱和的烃基。

2.根据权利要求1的化合物，其中R5包含一个或多个甲基作为支链。

3.根据权利要求1的化合物，其中R5包含一个或多个异戊二烯单元。

4.根据权利要求1的化合物，其中R5包含1-4个不饱和键以及包含1-6个甲基支链。

5.根据权利要求4的化合物，其中不饱和键是双键。

6.根据权利要求1的化合物，其中R5选自：

(a)$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-[C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2]_m-$，其中m是0至5范围内的整数；以及

(b)$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-[C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2]_p-[CH=C(CH)_3-CH_2-CH_2]_q-$，其中p是1至5范围内的整数，并且q是1至5范围内的整数。

7.由权利要求1的化合物或其药学可接受的盐形成的纳米粒子。

8.包含权利要求1的化合物或其药学可接受的盐的药物组合物。

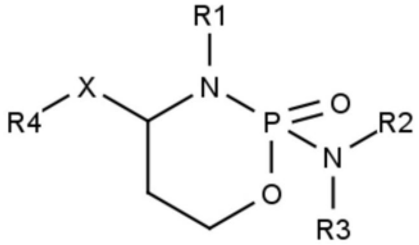
9.包含权利要求7所述的纳米粒子的药物组合物。

10.治疗有效量的药物组合物在制备用于治疗患者的癌症的药物中的应用，所述药物组合物包含：

a)权利要求1的化合物或其药学可接受的盐；或

b)由权利要求1的化合物或其药学可接受的盐形成的纳米粒子。

11.制备式(I)的氧氮杂膦衍生物的方法，



(I)

其中

X是O或S；

R1、R2和R3定义如下：

R1是H，R2是$-(CH_2)_2-Cl$且R3是$-(CH_2)_2-Cl$；

R4由式$R_5(Y)_a$表示，其中：

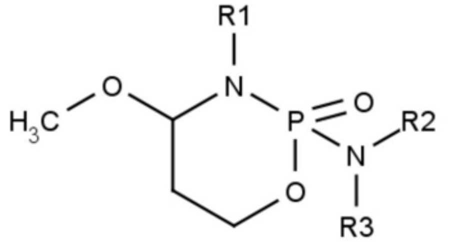
Y选自$-(CH_2)_m-$、$-CONH(CH_2)_m-$、$-NHCO(CH_2)_m-$、$-COO(CH_2)_m-$和$-OCO(CH_2)_m-$，其中m是1至10范围内的整数；

a是0或1；以及

R5是3至30个碳原子的直链或支链的不饱和的烃基；

所述方法包括：

提供式(II)的化合物



(II)

其中R1、R2和R3如式(I)中所定义；以及

-将式(II)的化合物与R4-XH在作为路易斯酸的$BF_3.OEt_2$的存在下进行反应，其中X和R4如式(I)中所定义。

新型的预活化的氧氮杂膦衍生物、应用和制备方法

[0001] 本申请为国际申请PCT/FR2011/052914于2013年6月13日进入中国国家阶段、申请号为201180059905.0、发明名称为“新型的预活化的氧氮杂膦衍生物、应用和制备方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及医学领域，具体来说涉及肿瘤学领域。本发明涉及新型的预活化的氧氮杂膦药物衍生物。

背景技术

[0003] 来自于氧氮杂膦类的药物是用于治疗癌症(例如淋巴瘤和白血病，肉瘤，实体肿瘤、尤其是肺、乳腺、前列腺和卵巢的实体肿瘤)的烷基化剂和免疫抑制性抗肿瘤剂(CPM)。异环磷酰胺(IFM)和环磷酰胺(CPM)是药物前体，其细胞毒活性与在4位处引入羟基的细胞色素P450依赖性代谢活化相关。氧氮杂膦(异环磷酰胺和环磷酰胺)的毒性是泌尿系的毒性，由烷基化氮芥释放后形成的代谢物丙烯醛的积累引起。此外，由于分子的侧链通过细胞色素P450的作用而氧化所产生的代谢物氯乙醛的存在，这些药剂还引起神经毒性和肾毒性。与丙烯醛相关的毒性可以通过共同施用巯基乙磺酸钠来减弱。

[0004] 已描述了4位处的甲氧基化衍生物的电化学合成路线(Paci等，2001，Bioorg Med Chem Lett，11，1347-1349)。这些衍生物被认为是预活化的类似物，因为它们表现出与氧化的代谢物相当并且比初始的未氧化产物高得多的细胞毒活性。事实上，它们允许在没有细胞色素P450介入的情况下释放烷基化氮芥。

[0005] 此外，已开发了旨在降低毒性的其他氧氮杂膦衍生物。具体来说，这些衍生物的甲基化侧链的产毒性氧化都被消除或受到限制，同时保留它们的烷基化能力。综述可参见Giraud等(2010，Expert Opin Drug Metab Toxicol，6，919-938)。作为示例，可以提到两种环磷酰胺衍生物即葡磷酰胺和马磷酰胺以及C7，C9-二甲基-异环磷酰胺。

[0006] 专利申请GB2095256描述了氧氮杂膦-4-硫基-烷基磺酸，特别是环磷酰胺的衍生物。Hirano等(Tetrahedron Letters，10，883-886)也描述了通过将4-过氧羟基环磷酰胺与巯基烷烃进行反应而获得的在4位处取代的环磷酰胺衍生物。

[0007] GB2095256和Hirano等没有描述在4位处取代的任何异环磷酰胺衍生物。

[0008] 具有更强的细胞毒活性或更加靶向的作用的氧氮杂膦衍生物、特别是异环磷酰胺衍生物将是非常有用的，从而降低了所需的剂量并因此减低毒副作用。

[0009] 本发明人开发了一种用于制备预活化的并在4位处具有载体化或制剂化基团的氧氮杂膦衍生物的方法。

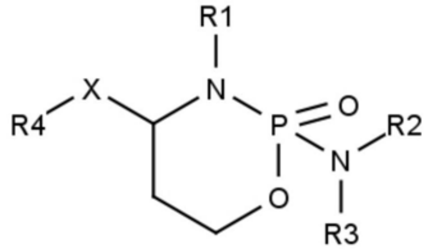
[0010] 载体化基团可以允许药物靶向靶组织(肿瘤组织或癌细胞)，从而可以降低所有待施用的剂量并同时保留良好的治疗功效。

[0011] 制剂化基团可以帮助保护活性部分免于在其到达靶组织之前降解，和/或通过调节烷基化氮芥的释放速率、特别是通过使该分子稳定来调节所述活性部分的活性。事实上，

氧氮杂膦是快速降解的药物。总的来说，该基团能够改变氧氮杂膦的物理化学、药物动力学或药效学性质。

发明内容

[0012] 因此，本发明涉及一种用于制备式(I)的预活化氧氮杂膦衍生物的方法，

[0013] 

(I)

[0014] 其中

[0015] X是O或S；

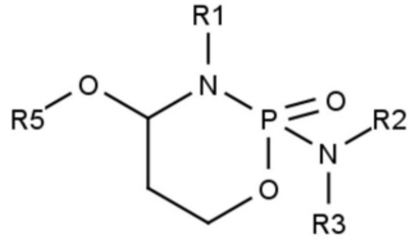
[0016] R1和R2独立地是H、$-CH(CH_3)-CH_2-Cl$或$-(CH_2)_2-Cl$，其前提在于两者中的至少一个是$-CH(CH_3)-CH_2-Cl$或$-(CH_2)_2-Cl$；

[0017] R3是$-CH(CH_3)-CH_2-Cl$或$-(CH_2)_2-Cl$；并且

[0018] R4是包含至少3个碳原子的制剂化或载体化基团；

[0019] 所述方法包括

[0020] -提供式(II)的化合物

[0021] 

(II)

[0022] 其中R1、R2和R3如式(I)中所定义，并且R5是甲基或乙基；以及

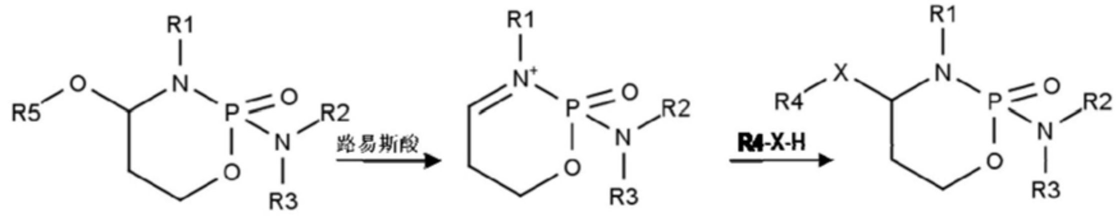
[0023] -将式(II)的化合物与式(III)R4-XH的醇或硫醇在路易斯酸存在下进行反应，其中X和R4如式(I)中所定义。

[0024] 在本发明的情形中，“制剂化基团”被理解为是指允许使氧氮杂膦稳定，特别是降低烷基化氮芥的释放速率的基团。具体来说，通过提高制剂化基团中碳的数目，可以增加预活化的氧氮杂膦的半衰期。此外，该基团能够使用于肠胃外特别是静脉内施用的氧氮杂膦稳定或提高其稳定性。在最优选实施方式中，所述基团允许形成纳米粒子、胶束或脂质体。

[0025] 在本发明的情形中，“载体化基团”被理解为是指允许靶向肿瘤、也就是说更特异性地将氧氮杂膦递送到肿瘤或癌细胞以便增强作用的特异性并减少副作用的基团。

[0026] 任选地，所述基团含有至少4、5、6、7或8个碳。

[0027] 化学反应可以被更详细地描述在下面的路线中。

[0028] 

[0029] 因此，它可以被细分为形成亚胺正离子的步骤以及与亲核剂R4-XH反应的步骤(也称为酰胺烷基化)。具体来说，路易斯酸可以是TMSOTf、$AlCl_3$或$BF_3.OEt_2$。在优选实施方式中，路易斯酸优选为BF_3OEt_2。优选地，BF_3路易斯酸与$O(CH_2-CH_3)_2$一起使用。路易斯酸的摩尔数与化合物(II)的摩尔数之间的比率一般小于1.5。小于1.5的摩尔比包括小于1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、1.0、0.9、0.8、0.7、0.6和0.5的摩尔比。具体来说，路易斯酸的摩尔数与化合物(II)的摩尔数之间的比率可以被包含在0.01至0.7、优选0.05至0.5的范围内。作为实例，当R4-XH是1-戊醇时，可以在0.05当量至0.5当量的$BF_3.OEt_2$存在下进行反应，或者当R4-XH是角鲨烯醇(squalenol)时，在约1.1当量的$BF_3.OEt_2$存在下进行反应。

[0030] 尽管R5可以是甲基或乙基，但甲基是优选的。

[0031] 溶剂必须适合于溶解式(II)和(III)的化合物。例如，取决于所涉及的试剂，溶剂可以是THF(四氢呋喃)或CH_2Cl_2(二氯甲烷)。不用说，人们应该避免使用可能与式(III)的化合物(即R4-XH)竞争的亲核性溶剂例如醇。在优选实施方式中，溶剂是二氯甲烷(CH_2Cl_2)。

[0032] 可以在-80℃和0℃之间的温度范围内进行反应，优选在约-78℃下开始。反应时间可以根据化合物进行调整，并且可以为例如在30分钟和12小时之间，优选为约60分钟。

[0033] 优选地，XH官能团是醇或伯硫醇。

[0034] 式(II)的化合物可以通过阳极氧化来制备，特别是例如在Paci等的文章(2001，Bioorg Med Chem Lett，11，1347-1349)中所描述的。具体来说，可以在甲苯磺酸四乙基铵(Et_4NOTs)或四氟硼酸四乙基铵($TEABF_4$)存在下，使用碳石墨电极在甲醇或乙醇中通过阳极氧化来制备所述化合物。

[0035] 正如在实施例中所示，本发明的方法特别适合于制备其中R2是H并且R1和R3彼此独立地选自$-CH(CH_3)-CH_2-Cl$和$-(CH_2)_2-Cl$的式(II)的氧氮杂膦化合物。

[0036] 可以使用任何类型的R4-XH化合物来执行本发明的方法。在下面更详细地示出了优选的R4基团。

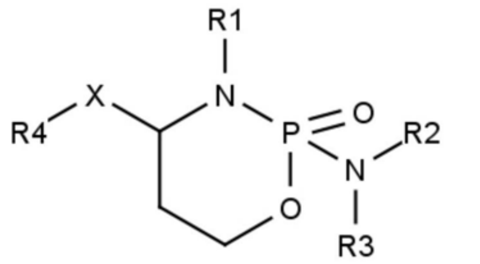
[0037] 注意，本发明方法的得率一般高于通过在R4-XH亲核剂存在下对氧氮杂膦化合物进行电化学氧化的常规合成方法所获得的得率。

[0038] 令人吃惊地，本申请人显示，R4基团的链长不是反应的限制因素，因为链长非常不同的烷基衍生物例如戊醇或三正角鲨烯醇(tris-nor squalenol)可以以相似的得率和反应时间进行偶联。

[0039] 在特定实施方式中，提供式(II)的化合物和在路易斯酸存在下与R4-XH化合物反应的步骤，可以在相同的反应介质中联合进行。

[0040] 或者，式(I)的化合物可以通过直接阳极氧化法来制备，其前提在于R4部分的大小被限制为7个碳。这不是优选的方法，因为它需要大量亲核剂并需要使用对氧化条件有耐受性的化合物。在这种实施方式中，甲醇或乙醇被式R4-OH的化合物代替。

[0041] 本发明还涉及新型的式(I)的化合物

[0042] 

（I）

[0043] 其中

[0044] X是O或S；

[0045] R1和R2独立地是H、-CH(CH$_3$)-CH$_2$-Cl或-(CH$_2$)$_2$-Cl，其前提在于两者中的至少一个是-CH(CH$_3$)-CH$_2$-Cl或-(CH$_2$)$_2$-Cl；

[0046] R3是-CH(CH$_3$)-CH$_2$-Cl或-(CH$_2$)$_2$-Cl；并且

[0047] R4是至少3个碳的制剂化或载体化基团。

[0048] 在一种实施方式中，R1是H，并且R2和R3独立地是-(CH$_2$)$_2$-Cl或-CH(CH$_3$)-CH$_2$-Cl。在这种情况下，化合物(I)或(II)是环磷酰胺的衍生物。优选地，R2和R3是-(CH$_2$)$_2$-Cl。

[0049] 在另一种实施方式中，R1、R2和R3独立地是-(CH$_2$)$_2$-Cl或-CH(CH$_3$)-CH$_2$-Cl。在这种情况下，化合物(I)或(II)是氯乙环磷酰胺的衍生物。优选地，R1、R2和R3独立地是-(CH$_2$)$_2$-Cl。

[0050] 更具体来说，本发明涉及异环磷酰胺的衍生物。因此，在优选实施方式中，R2是H并且R1和R3独立地是-(CH$_2$)$_2$Cl或-CH(CH$_3$)CH$_2$Cl。在某些实施方式中，R1和R3是-(CH$_2$)$_2$Cl。

[0051] 在其他实施方式中，R1和R3是-CH(CH$_3$)CH$_2$Cl。

[0052] 在其他实施方式中，R1是-(CH$_2$)$_2$Cl并且R3是-CH(CH$_3$)CH$_2$Cl。在另一种实施方式中，R3是-(CH$_2$)$_2$Cl并且R1是-CH(CH$_3$)CH$_2$Cl。

[0053] 一般来说，R4可以包含连接基或间隔基，所述连接基或间隔基位于近端并因此连接于X基团。连接基和间隔基是本领域技术人员公知的，例如半胱氨酸衍生物。任选地，它们允许引入XH基团。优选地，XH基团是伯硫醇或醇。

[0054] 制剂化或载体化基团在本领域中是公知的。作为示例，可以提到下列文章：Singh等(2008，Curr Med Chem，15，1802-1826)，Das等(2009，Curr Opin Drug Deliv，6，285-304)，等等。

[0055] 优选地，式(I)和(III)中的R4选自下列基团或包含这样的基团：

[0056] -3至40个碳原子、优选3至30个碳原子(优选4、5、6、7或8至30个碳原子)的饱和或不饱和的直链或支链的烃基，其任选被一个或多个选自下列的基团取代：-OR，-C(O)OR，-OC(O)R，-OC(O)OR，-C(O)R，-NRR'，-C(O)NRR'，-NC(O)R，-NRC(O)R'，-SR，卤素，氰基(-CN)，芳基，杂芳基，芳烷基；R和R'是氢或C$_1$-C$_3$烷基；

[0057] -脂质；

[0058] -氨基酸；

[0059] -肽或蛋白质，优选为肽；

[0060] -维生素；

[0061] -适配体；

[0062] -聚合物;以及

[0063] -多元醇。

[0064] “C_1-C_3烷基”被理解为是指甲基、乙基、丙基或异丙基。

[0065] “卤素”被理解为是指选自Cl、Br、I和F的卤素原子。

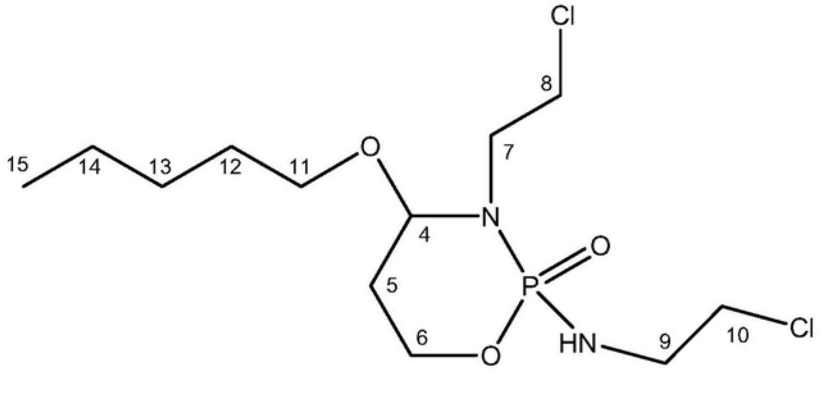
[0066] “芳基”被理解为是指取代或未取代的、优选具有6至14个碳原子的芳香族烃基。优选地,本发明的芳基选自苯基、萘基(例如1-萘基或2-萘基)、联苯基(例如2-、3-或4-联苯基)、蒽基或芴基。取代或未取代的苯基是特别优选的。

[0067] “杂芳基”被理解为是指取代或未取代的、优选具有6至14个碳原子并具有一个或多个杂原子例如氮、硫和氧的芳香族烃基。可以提到的实例是吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基(pyrazyl)、三嗪基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、(1,2,3)-和(1,2,4)-三唑基、吡嗪基(pyrazinyl)、嘧啶基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噻唑基、噁唑基或异噁唑基等。

[0068] “芳烷基”被理解为是指被烷基取代的芳基。术语“烷基”和“芳基”如上所定义。芳烷基的实例包括甲苯基、mesithyl和二甲苯基。

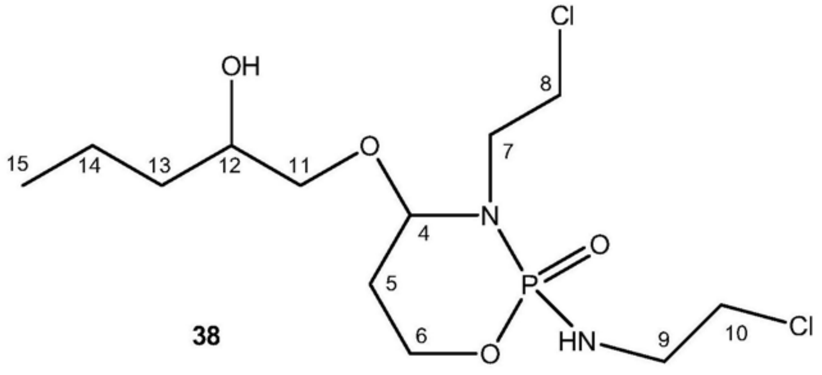
[0069] 当R4是3至30个碳原子的烃基时,R4是例如直链或支链的任选包含一个或多个羟基的C_3-C_7烷基或烯基,或C_3-C_7羟基酸残基。优选地,R4是直链的。在特定实施方式中,R4可以选自戊基、己基或庚基,其可以任选包括一个或多个不饱和键,并可以被一个或多个羟基取代。优选地,R4可以选自戊基、己基或庚基,其可以任选包含不饱和键并被羟基取代。优选地,羟基不是伯羟基而是仲羟基或叔羟基。

[0070] 本发明的具体化合物如下:

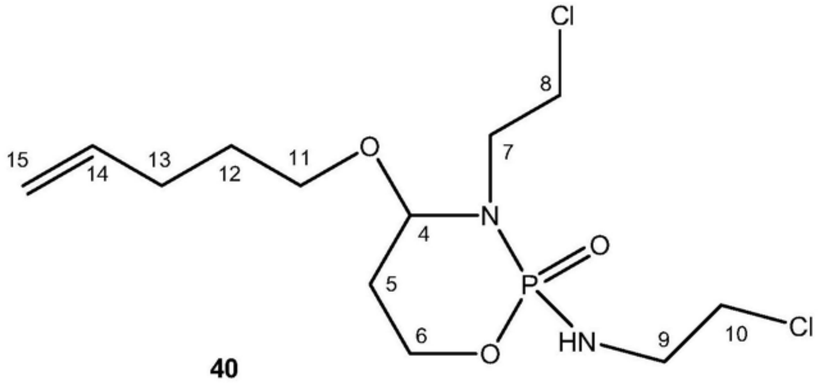


36

[0071]



38



40

[0072] 当R4是脂质时，它可以选自脂肪酸、类花生酸、酰基甘油、磷酰基甘油、鞘脂、甾醇和糖脂。具体来说，R4可以是饱和或不饱和的直链或支链的脂肪酸。优选地，脂肪酸具有至少18个碳的链。更具体来说，脂肪酸具有至少18个碳的不饱和支链。在优选实施方式中，R4是角鲨烯酰基(squalenoyl)。事实上，角鲨烯在药物制剂中具有极大的重要性(WO2006/090029)。或者，R4可以是甾醇。在优选实施方式中，R4是胆甾醇。更具体来说，本发明考虑到了允许特别是在极性溶剂、优选水性相中形成纳米粒子、胶束或脂质体的脂质基团。这样的脂质是本领域技术人员公知的。它们包括但不限于胆甾醇、磷脂和角鲨烯酰基。

[0073] 当R4是氨基酸时，所述氨基酸可以是天然氨基酸或非天然氨基酸。

[0074] 当R4是肽时，已知允许通常经由细胞受体来靶向组织或细胞、特别是肿瘤和癌细胞或新生血管的任何肽，均适用于本发明。这些肽是本领域技术人员是公知的，并包括肽模拟物。作为示例，可以提到的有允许靶向肿瘤的那些靶向肽或肽模拟物(WO2008/120098、

WO2000/032237)，例如包含天冬酰胺-甘氨酸-精氨酸(NGR)、甘氨酸-丝氨酸-亮氨酸(GSL)或精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)部分的那些肽或肽模拟物(WO2008/045252、WO2006/095234、WO2005/123767、WO2002/026776、WO98/010795)或在申请WO00/032237中所描述的那些肽或肽模拟物。此外，已描述了靶向特定器官例如肺(WO2003/105907)、跨过血脑屏障(WO2003/070755、WO2003/059394、WO2003/026701、WO2003/026700、WO2002/067994、WO00/032236)、促进药物的细胞或核渗透(WO2005/016960、WO2001/064738)的肽。R4也可以是外源凝集素、EGF(表皮生长因子)或抗体或其具有抗原结合结构域的片段，优选为对癌症或靶组织或器官特异性的抗原。

[0075] 当R4是多元醇时，优选为糖或多糖。例如，R4可以是葡萄糖。或者，R4可以是壳聚糖。

[0076] 当R4是维生素时，叶酸是优选的。叶酸常用于将药物载体化，特别是在肿瘤学领域中。或者，R4可以是维生素B12。

[0077] 当R4是适配体时，所述适配体优选对肿瘤抗原特异性的。

[0078] 当R4是聚合物时，优选的是允许形成纳米粒子的聚合物。这样的聚合物是本领域技术人员公知的。作为示例，可以提到的是聚(烷基氰基丙烯酸酯)例如WO 1999/043359中所描述的、多胺、N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)、聚乙二醇、乳酸聚合物或聚谷氨酸。

[0079] 在本发明的某些实施方式中，R4由式(IV)$R_5(Y)_a$表示，其中Y是间隔基；a是0或1；并且R5是3至30个碳原子的直链或支链的饱和或不饱和的烃基，其任选被一个或多个OH取代。

[0080] 优选地，Y选自-$(CH_2)_m$-、-CONH$(CH_2)_m$-、-NHCO$(CH_2)_m$-、-COO$(CH_2)_m$-和-OCO$(CH_2)_m$-，其中m是1至10范围内的整数。

[0081] “a是1”是指R4基团具有间隔基，以致存在Y。“a是0”表示R4基团没有间隔基并且不存在Y。

[0082] R5可以包含1、2、3或4个不饱和键，其可以独立地是不饱和双键或叁键。R5也可以包含1、2、3、4、5或6个支链，所述支链优选为甲基。

[0083] 在某些实施方式中，R5选自：

[0084] (i)任选被羟基取代的C_2-C_9烷基；

[0085] (ii)C_2-C_9烯基，优选为式-$H_2C=CH(CH_2)_n$-的烯基，其中n是1至8范围内的整数；以及

[0086] (iii)包含一个或多个源自于异戊二烯的部分的烃基，其优选选自：

[0087] (a)$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-[C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2]_m$-，其中m是0至5范围内的整数；以及

[0088] (b)$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-[C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2]_p-[CH=C(CH)_3-CH_2-CH_2]_q$-，其中p是1至5范围内的整数，并且q是1至5范围内的整数。

[0089] R5基团中存在的双键可以独立地是顺式或反式构型。在某些实施方式中，双键是反式的。

[0090] 上面已示出了其中R5对应于点(i)或(ii)中定义的基团的本发明化合物的具体实例(参见各个化合物36、38和40)。在本发明化合物的某些实施方式中，R4由式R5$(Y)_a$表示，其中

[0091] ■R5选自：

[0092] (a) $(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_m$-，其中m是0至5范围内的整数；以及

[0093] (b) $(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_p$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_q$-，其中p是1至5范围内的整数，并且q是1至5范围内的整数；

[0094] ■Y选自-$(CH_2)_m$-、-$CONH(CH_2)_m$-、$NHCO(CH_2)_m$-、-$COO(CH_2)_m$-和-$OCO(CH_2)_m$-，其中m是1至10范围内的整数；并且

[0095] ■a是0或1。

[0096] 在某些特定实施方式中，R5是选自下列的基团：

[0097] ■ $(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_2$-，

[0098] ■ $(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]-；以及

[0099] ■ $(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-。

[0100] 在本发明的优选实施方式中，R4是任选包含间隔基的角鲨烯酰基。根据本发明，角鲨烯酰基是包含下述部分的基团：$(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_2$-。在特定实施方式中，R4是下式的角鲨烯酰基：$(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_2$-$(Y)_a$，其中Y和a如上所定义。

[0101] 在上述方法的特定实施方式中，化合物R4-XH是三正角鲨烯醇，在本文中也称为角鲨烯醇，其意味着R4-XH是式R5-Y-H的化合物，其中：

[0102] R5是$(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_2$-，Y是CH_2，并且X是O。

[0103] 在另一种特定实施方式中，化合物R4-XH是连接到-C(O)NH-$(CH_2)_2$-SH的角鲨烯酰基(即化合物为：$(CH_3)_2C$＝CH-CH_2-CH_2-[$C(CH_3)$＝CH-CH_2-CH_2]$_2$-[CH＝$C(CH)_3$-CH_2-CH_2]$_2$-C(O)NH-$(CH_2)_2$-SH)。

[0104] 特别优选的式(I)的化合物如下：

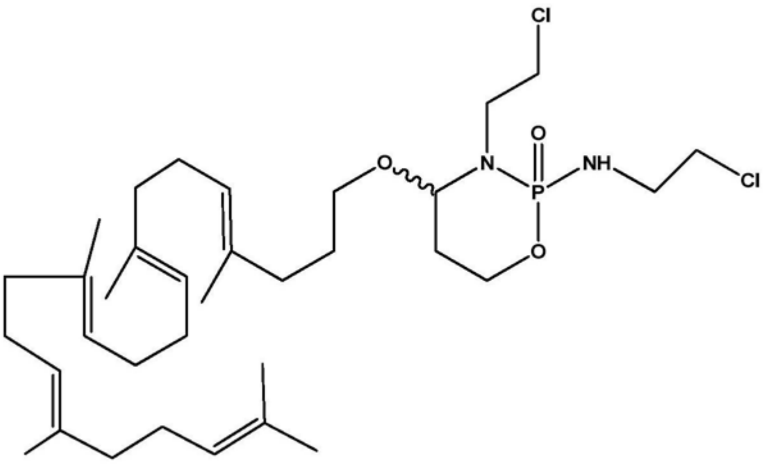
[0105] -R1和R2独立地是H、-$CH(CH_3)$-CH_2-Cl或-$(CH_2)_2$-Cl，其前提在于两者中的至少一个是-$CH(CH_3)$-CH_2-Cl或-$(CH_2)_2$-Cl；

[0106] -R3是-$CH(CH_3)$-CH_2-Cl或-$(CH_2)_2$-Cl；并且

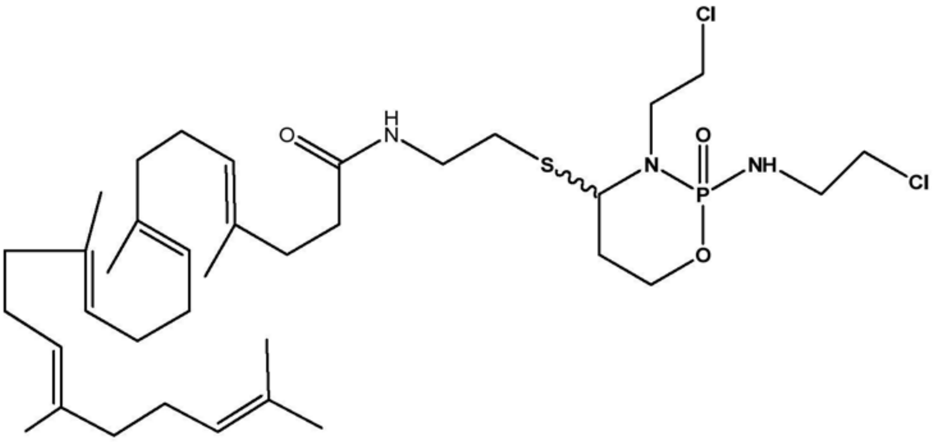
[0107] -X是O并且R4是角鲨烯酰基；或者R4X是角鲨烯酰基-C(O)NH-$(CH_2)_2$-S-。

[0108] 在更优选实施方式中，R2是H，并且R1和R3独立地选自-$CH(CH_3)$-CH_2-Cl和-$(CH_2)_2$-Cl。更具体来说，R2是H，并且R1和R3是-$(CH_2)_2$-Cl。或者，R2可以是H，并且R1和R3是-$CH(CH_3)$-CH_2-Cl。

[0109] 本发明的具体化合物如下：

[0110] 

[0111] 和/或

[0112] 

[0113] “约”意在指差不多10％，优选差不多5％。

[0114] 当R4被选择成使其是允许纳米粒子、胶束或脂质体形成的基团、特别是脂质基团时，本发明还涉及由本发明的式(I)的化合物形成的纳米粒子。在本发明的优选实施方式中，R4是角鲨烯酰基，即包含下列部分的基团：$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-[C(CH_3)=CH-CH_2-CH_2]_2-[CH=C(CH)_3-CH_2-CH_2]_2$。

[0115] 更具体来说，R2是H，R1和R3是$-(CH_2)_2-Cl$，并且R4是角鲨烯酰基，X可以是O或S。或者，在式(I)的化合物中，R2是H，R1和R3是$-CH(CH_3)-CH_2-Cl$，并且R4是角鲨烯酰基，X可以是O或S。在一种特别优选的实施方式中，化合物选自如上所述的包含角鲨烯酰基的化合物。可以通过以下方式来获得式(I)的化合物的纳米粒子：将所述化合物溶解在有机溶剂例如丙酮或乙醇中，然后在有或没有表面活性剂的条件下将该混合物在搅拌下加入到水性相中，导致纳米粒子形成。表面活性剂包括例如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、磷脂衍生物、以及聚乙二醇的亲脂性衍生物。优选地。纳米粒子具有30-500nm或70-200nm范围内的平均尺寸。

[0116] 化合物可以以任何药学可接受的盐的形式使用。药学可接受的盐的非限制性实例包括药学可接受的酸或碱加成盐、水合物、酯、溶剂化物。术语药学可接受的盐是指无毒性的盐，其通常可以通过将游离碱与适合的有机或无机酸进行反应来制备。这些盐保留了游离碱的生物有效性和性质。作为这样的盐的代表性实例，可以提到的是水溶性和水不溶性盐，例如乙酸盐、N-甲基葡糖胺铵盐、ansonate(4,4-二氨基芪-2,2’-二磺酸盐)、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、氢溴酸盐、溴化物、丁酸盐、右旋樟脑

磺酸盐、碳酸盐、盐酸盐、氯化物、柠檬酸盐、克拉维酸盐、二盐酸盐、二磷酸盐、依地酸盐、依地酸钙、乙二磺酸盐、依托酸盐(estolate)、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、glycolylarsanylate、六氟磷酸盐、己基间苯二酸盐、海巴明(hydrabamine)、羟基萘甲酸盐、碘化物、异硫代硫酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月硅酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、3-羟基-2-萘甲酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐(1,1-亚甲基-双-2-羟基-3-萘甲酸盐或双羟萘酸(emboate))、泛酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、对甲苯磺酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、磺基水杨酸盐、suramate、丹宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘、三氟乙酸盐、戊酸盐。

[0117] 本发明还涉及包含式(I)的氧氮杂膦衍生物或如上所定义的纳米粒子的药物组合物。药物组合物可以有利地包含药学可接受的载体或赋形剂。药学可接受的载体可以根据各施用方式选自常规使用的载体。取决于预期的施用方式,化合物可以是固体、半固体或液体形式。对于固体组合物例如处于自由状态或被包含在胶囊中的颗粒剂、粉剂、丸剂、或片剂来说,可以将活性物质与下列物质合并:a)稀释剂,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、纤维素和/或甘氨酸;b)润滑剂,例如二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁盐或钙盐和/或聚乙二醇;c)粘合剂,例如硅酸镁和硅酸铝、淀粉糊、明胶、黄耆树胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;d)崩解剂,例如淀粉、琼脂、藻酸或其钠盐或泡腾混合物;和/或e)吸附剂、着色剂、调味剂和甜味剂。赋形剂可以是例如甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁和药品级类似物。对于半固体组合物例如栓剂来说,赋形剂可以是例如乳液或油状悬液或聚亚烷基二醇例如聚丙二醇。液体组合物,特别是可注射的或被包含在软胶囊中的液体组合物,可以通过例如将活性物质溶解、分散等在药物纯的溶剂例如水、生理盐水溶液、右旋糖水溶液、甘油、乙醇、油等中来制备。

[0118] 组合物还可以包含另一种活性成分。在具体实施方式中,附加的活性剂是抗癌剂。非限制性实例包括特别是干扰素、顺铂、博来霉素、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、长春新碱、放线菌素、长春瑞滨、紫衫烷类例如紫杉醇和多西紫杉醇、或蒽环类抗生素。此外,可以向药物组合物添加用于抵消氧氮杂膦的毒性的活性成分,特别是巯基乙磺酸钠。药物组合物也可以与放射疗法组合使用。

[0119] 可以通过任何适合的途径来施用本发明的组合物,所述途径不限于:肠胃外途径,例如作为可注射制剂,通过皮下、肌内或静脉内途径;口服途径(经口),例如以包衣或未包衣片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、口服溶液或悬液的形式(这样的用于口服施用的形式可以是立即释放或持续或延迟释放的);直肠途径,例如以栓剂的形式;局部、特别是经皮途径,例如以贴片、软膏或凝胶的形式;鼻内途径,例如以气溶胶和喷雾剂的形式;舌下途径;眼内途径。

[0120] 药物组合物通常包含有效剂量的本发明的式(I)的氧氮杂膦衍生物。这里所述的“治疗有效剂量”被理解为是指对于给定的病症和施用方案来说产生治疗效果的剂量。这通常是被施用以显著改善与疾病或病理状态相关的某些症状的活性物质的平均剂量。

[0121] 活性物质的“治疗有效剂量”不一定治愈疾病或障碍,但是将为该疾病或障碍提供治疗,以便延迟、抑制或防止其发作,或者减弱其症状,或者改变其进程或例如严重性降低,或者加速患者的恢复。应该理解,对于特定对象来说,“治疗有效剂量”取决于多种因素,包

括活性物质的活性/功效、施用时间、施用途径、其排泄和代谢速率、药物组合/相互作用、和预防性或治愈性治疗的疾病(或障碍)的严重性,以及患者的年龄、体重、整体健康状况、性别和/或饮食。

[0122] 对于全身性治疗来说,可以设想以每日约25至500mg/kg体重、优选约25至300mg/kg的剂量施用式(I)的化合物。

[0123] 本发明还涉及用于癌症治疗或作为免疫抑制剂的本发明的药物组合物。本发明还涉及本发明的药物组合物、式(I)的氧氮杂膦衍生物或如上所定义的纳米粒子在制造用于治疗癌症的药物或免疫抑制剂中的应用。最后,本发明涉及用于治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物、式(I)的氧氮杂膦衍生物或如上所定义的纳米粒子。本发明还涉及用于治疗需要免疫抑制的对象的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的本发明的药物组合物、式(I)的氧氮杂膦衍生物或如上所定义的纳米粒子。

[0124] 所述癌症可以是实体肿瘤或造血系统的癌症。因此,癌症可以选自慢性白血病、急性淋巴细胞白血病、霍奇金氏病、霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌和卵巢癌、肉瘤、成神经细胞瘤、骨髓瘤、黑素瘤等。

具体实施方式

[0125] 在阅读了下面的实施例后,本发明的其他方面和优点将变得显而易见,所述实施例在本质上仅仅是示例性的,并不限制本申请的范围。

[0126] 实施例1:4-取代的IFO(异环磷酰胺)类似物的制备

[0127] 异环磷酰胺在甲醇中的阳极氧化提供了化学实体(4-MeO-IFO),4-MeO-IFO的细胞毒效力与IFO的活性代谢物等同。然而,从化学观点来看,该4-MeO-IFO相当不稳定,快速释放出异磷酰胺氮芥。为了调节该极性非常高的小分子的释放动力学并促进其细胞内渗透,本发明人考虑在其4位处插入较长的脂族链。这个想法是修饰异环磷酰胺以将其插入到亲脂性载体化形式例如脂质体或纳米粒子系统中的第一步。

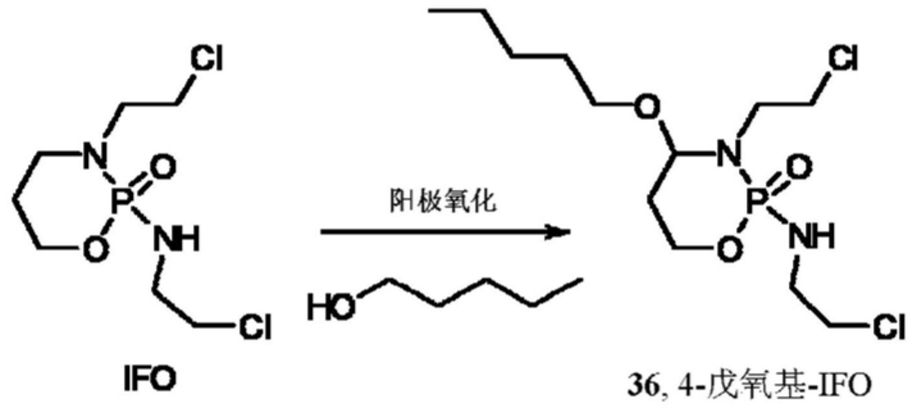
[0128] 通过直接路线取代

[0129] 异环磷酰胺的氧化产生亚胺正离子。它被介质中存在的亲核剂捕获,产生4-取代的氧氮杂膦。该描述的目的是研究这种合成路线的可行性并评估与这种直接路线相容的底物和最小量。

[0130] 异环磷酰胺在1-戊醇存在下的电化学氧化:

[0131] 在第一步中,本发明人使用伯戊醇来研究在长链脂族醇存在下这种反应的可行性。

[0132] 为了尽可能有效地确定方法,本发明人改变了反应路线1中所描述的实验反应条件。

[0133] 

[0134] 反应路线1:IFO在伯戊醇存在下的阳极氧化

[0135] 在乙腈中,在1-戊醇存在下,以通过石墨电极的恒定电流进行IFO的电解。四氟硼酸四乙基铵($TEABF_4$)是所使用的支持性电解质。通过薄层层析法(TLC)跟踪反应,并在所有IFO被消耗时停止反应。在停止反应后,加入碳酸氢钠以中和电解产生的酸性。获得的产物可以被分离,然后通过柱层析法进行纯化。

[0136] 由于磷所赋予的手性,IFO是外消旋混合物。与甲氧基化相同,戊氧基化产生四种非对映异构体、成对的对映异构体。

[0137] 对映异构体不能通过性质进行物理区分。另一方面,两对非对映异构体的^{31}P-NMR化学位移是不同的。

[0138] 因此通过^{31}P-NMR来测定各种产物的比例。

[0139] 根据甲氧基化类推,可以将^{1}H-NMR信号指派给不同的非对映异构体形式:事实上,在氮的α碳上添加烷氧基产生的基团,具有对应于C4和C6所携带的氢的3个信号,并且所述信号在不同非对映异构体之间不同。

[0140] 醇的量的影响

[0141] 通过改变导入的醇的量进行电解。对于给定量的支持性电解质(1当量)来说,结果总结在表1中。

[0142] 表1:亲核剂的量的影响

[0143]

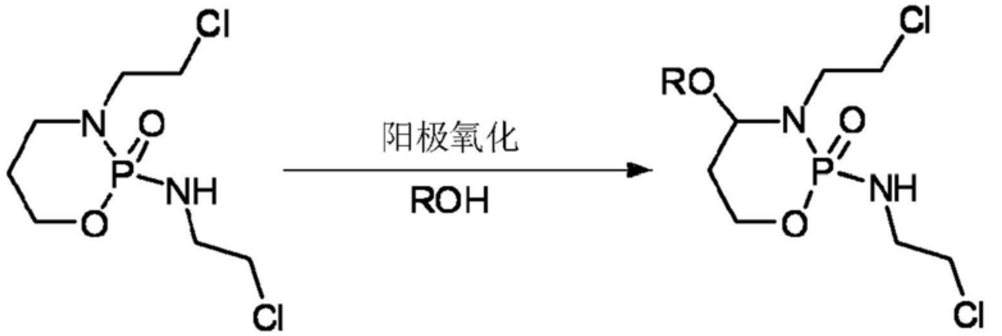
试验	戊醇的当量	电流（mA）	停止反应	得率（%）
A	9	20	3.75 F/mol	< 15
B	15	20	3.60 F/mol	34
C	30	20	3.75 F/mol	41

[0144] 开始时,似乎需要至少15当量的醇来获得令人满意的得率(参照IFO进行计算)。另一方面,当从15增加到30当量时,获得的增量小。

[0145] <u>IFO在不同醇存在下的阳极氧化</u>

[0146] 这里的目的是使用利用1-戊醇开发的条件来研究醇上的不同官能团与电化学方法的相容性。

[0147] 总反应示出在反应路线2中。

[0148] 

[0149] 反应路线2:IFO的烷氧基化总反应

[0150] 因此,在乙腈中,在具有5个碳原子的各种醇存在下对IFO进行电化学氧化。如由TLC所监测到的,当所有起始材料看起来都被消耗时,停止反应。在反应结束时,向介质加入碳酸氢钠(1当量)以中和电解产生的吸水性水分子(hydron)。在粗反应混合物上通过^{31}P-NMR确定各种非对映异构体的比例,然后通过“快速层析法”进行分离。

[0151] 这些操作的结果被描述在表2中。

[0152] 表2:各种烷氧基化试验的总结

[0153]

醇	停止(F/mol)	结果	
		非对映异构体的比例	总得率(%)
1-戊醇	3.6	80/20	34
3-戊醇	2.7	55/45	0*
1,2-戊二醇	2.5	52/48	22
1,4-戊二醇	3.5	53/47	0*
4-戊烯-1-醇	2.9	ND	19
1,7-庚二醇	2.7	80/20	27

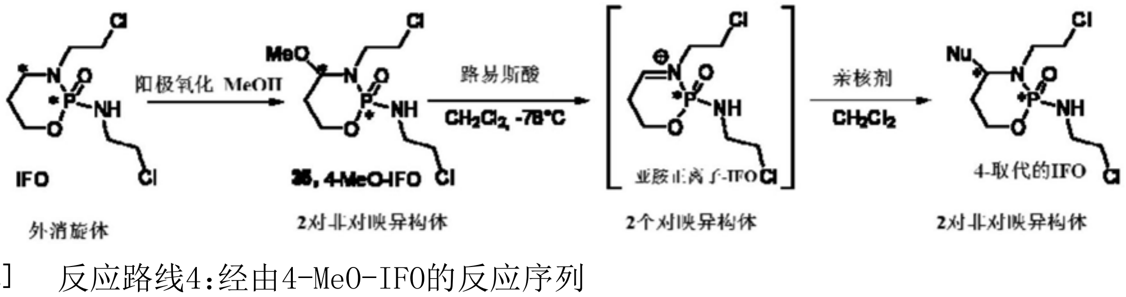
[0154] *产物未分离。

[0155] 首先,观察到仲醇似乎比伯醇更难以连接到IFO上。事实上,粗电解物的NMR谱仅显示出痕量的烷氧基化。形成的少量烷氧基化产物不能被分离。空间位阻会阻止该醇接近IFO的亚胺正离子。

[0156] 此外,在伯醇和仲醇之间竞争的情况下,固定几乎独占地由伯醇进行,其余链保持不变。在使用二元醇的试验期间,粗反应混合物的NMR谱揭示出存在与预期加成物相容的产物。这在1,2-戊二醇的情形中得到证实。然而,在1,4-戊二醇的情况下,尽管产物存在于粗反应物中,但无法将产物纯化。

[0157] 使用具有两个伯醇官能团的化合物能够将当量数降低至10当量(与此相比,使用其他醇时为15),同时维持等同的得率。在所使用的条件下,没有对连接有两个醇的形式进行表征。

[0158] 这些结果使得可以通过伯醇官能团来选择性固定多元醇。这是在载体化情形中将

醇(ose)固定在IFO上的第一步。
[0159] C＝C双键的存在不阻止伯醇固定到IFO上，并且它在电化学反应期间没有被修饰。
[0160] 不同官能团与直接氧化方案的相容性
[0161] 除了使用大量亲核剂之外，直接氧化方案需要使用对氧化条件耐受的化合物。
[0162] 胺
[0163] 胺可以在所使用的条件下被氧化。因此，在这些条件中，并且在异环磷酰胺存在下，存在着两种化合物(IFO和胺)的同时氧化。
[0164] 硫醇
[0165] 在氧化条件下，硫醇通过形成二硫桥而二聚化(反应路线3)。
[0166]
$$2\ R\text{-}SH \xrightarrow{[O]} R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + H_2O$$
[0167] 反应路线3：硫醇在氧化条件下的二聚化。
[0168] 亲核中心(硫原子)不再可用于亚胺正离子上的取代。
[0169] 结论和展望
[0170] 在15当量的醇存在下，IFO的阳极氧化方案是可行的。它允许简单地获得从未描述过的新型化合物。该方案也适用于其他氧氮杂膦例如环磷酰胺和氯乙环磷酰胺。为了优化该反应，有必要使用无水反应介质以便消除竞争性亲核剂。
[0171] 然而，这种直接路线的缺点是多方面的。
[0172] 需要使用15当量的亲核剂造成了数个问题：该方法仅限于不昂贵的试剂，并且这种过量的试剂阻碍了敏感产物的纯化。最后，不可能使用具有可氧化官能团的亲核化合物。
[0173] 通过间接路线取代
[0174] 捕获亚胺正离子然后再生
[0175] 该方案由3个阶段构成：
[0176] -阳极甲氧基化，
[0177] -酰胺烷基化，其被细分为
[0178] ○亚胺正离子的再生，然后
[0179] ○与亲核剂原位反应。
[0180] 这种3阶段的反应序列在2种反应介质中进行(反应路线4)。
[0181]


[0182] 反应路线4：经由4-MeO-IFO的反应序列
[0183] 在实践中，异环磷酰胺在甲醇中经历水解，然后将4-MeO-IFO衍生物在非亲核溶剂中与路易斯酸进行接触，以再生与亲核剂反应的亚胺正离子。
[0184] 这种技术允许使用与阳极氧化不相容的亲核剂。与直接路线相比，这种技术的另一个优点是使用较少的亲核剂当量数。

[0185] 亚胺正离子通过在甲醇中阳极氧化而电解产生，因此以4-MeO-IFO形式被捕获。

[0186] 在异环磷酰胺被全部消耗后(转变超过2.5-3.0F/mol)，将溶剂在碱碳酸钠(Na_2CO_3)存在下蒸发，以防止介质酸化。将残留物溶解在二乙醚中，然后简单过滤以获得甲氧基化的产物。当残留少量起始材料时，或者如果希望分离非对映异构体，需要层析柱。

[0187] 最后，对在数十毫克到数克范围内的不同量的IFO进行许多甲氧基化。在15mL电化学池中，进行例如2克IFO的氧化。在转变4.0F.mol^{-1}后，以82%的得率(1.8g)获得甲氧基化的衍生物。因此，这种电化学反应似乎适合用于合成：它实施起来相当简单，尽管纯化需要一定的专业知识。此外，获得的产物相对稳定，并且可以在惰性气氛下在冰箱中储存数周。

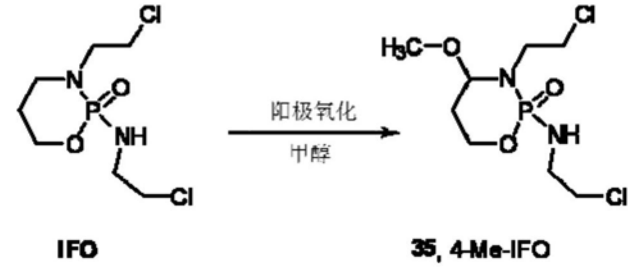
[0188] 在路易斯酸作用下，甲氧基能够再生亚胺正离子，所述亚胺正离子被多种亲核剂捕获以产生多种结构。酰胺烷基化是由以下构成的反应：从甲氧基化衍生物再生亚胺正离子，然后在该亚胺正离子上进行亲核加成。

[0189] 通过使用路易斯酸，从甲氧基化衍生物再生亚胺正离子中间体。最常用的路易斯酸包括：$BF_3.OEt_2$，$TiCl_4$，$Yb(OTf)_2$，TMSOTf。

[0190] 路易斯酸仅参与亚胺正离子从甲氧基化衍生物的再生，不参与加成的非对映异构选择性。

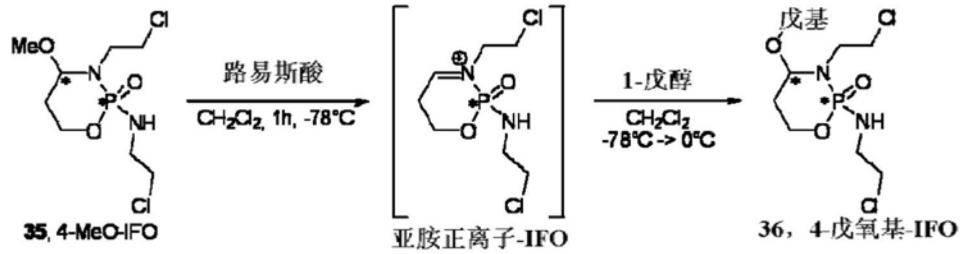
[0191] 电解-通过阳极氧化来甲氧基化

[0192] Angelo Paci和Thierry Martens描述了IFO和CPM在单腔室池中的阳极氧化(Paci等，2001b)(反应路线5)。

[0193] 

[0194] 反应路线5：IFO的电化学4-甲氧基化

[0195] 为了获得已知的终产物，研究主要集中在下面使用1-戊醇作为亲核剂的序列(反应路线6)。

[0196] 

[0197] 反应路线6：酰胺烷基化序列

[0198] 将4-MeO-IFO与路易斯酸在低温(-78℃)下接触1小时(任意)。然后向混合物加入亲核剂(1当量的戊醇)，将其在0℃下放置15分钟。由于戊氧基-IFO已经被鉴定，因此允许使用简单的^{31}P-NMR谱来快速确定反应效率，如表3中所总结的。

[0199] 表3：酰胺烷基化中使用的路易斯酸的影响

[0200]

路易斯酸		结果	
种类	量（当量）	转化率（%）	非对映异构体比例 (9.6 / 9.3 ppm)
TMSOTf	0.1	30 (+降解)	85/15
	0.5	降解	ND
	1	降解	ND
$Ti(OEt)_4$	0.1	0%	残留的4-MeO-IFO和降解产物
	0.5	0%	
	1	0%	
$BF_3.OEt_2$	0.1	59	82/18
	0.5	48	80/20
	1	降解	ND

[0201] 似乎$Ti(OEt)_4$没有足够的反应性以从4-MeO-IFO再生亚胺正离子。此外，TMSOTf似乎诱导4-MeO-IFO的降解，除了当以催化量(10mol%)使用时，此时导致以差的得率形成非对映异构体。所使用的路易斯酸似乎不影响反应的非对映异构选择性，而是影响产生的中间体亚胺正离子的得率和稳定性，对粗反应产物的纯度有贡献。在该研究中发现，以催化量使用的三氟化硼乙醚化物(BF_3OEt_2)是所测试的最有效的路易斯酸。

[0202] 上面鉴定的条件(0.1当量的$BF_3.OEt_2$，1小时，-78℃，在CH_2Cl_2中)随后被用于评估1-戊醇的量对转化率的影响。结果总结在表4中。

[0203] 表4:亚胺正离子的反应时间的影响

[0204]

1-戊醇		结果	
量（当量）	时间（min）	转化率（%）	非对映异构体比例(9.6 / 9.3 ppm)
1	15	59	82/18
2	15	60	81/19
2	30	64	85.4/14.6
2	45	62	83.5/16.5
2	120	61	82/18

[0205] 1-戊醇的量似乎不影响转化率或形成的非对映异构体的比例。尽管转化率水平相

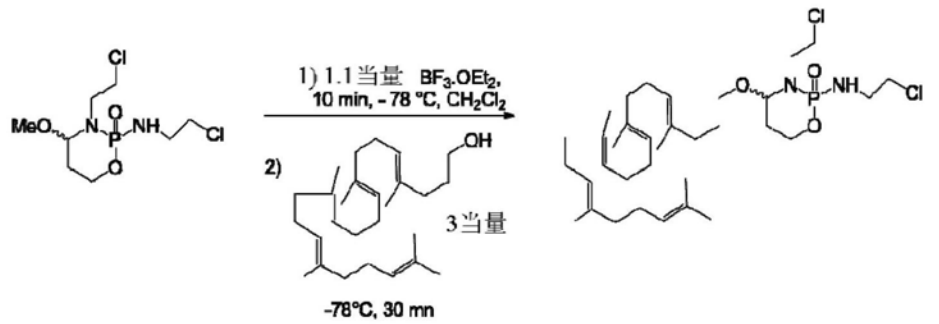
当，但似乎最佳反应时间为半小时，其转化率为64％，非对映异构体比率为85.4/14.6。

[0206] 在某些实验中，本发明人证实，使用THF代替二氯甲烷不改变观察到的结果。

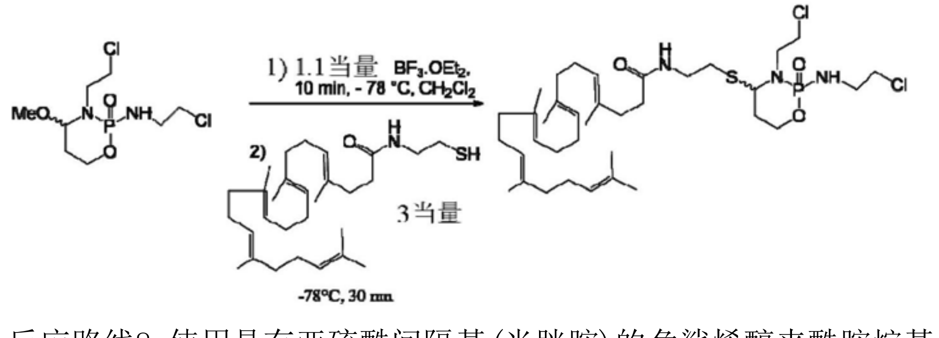
[0207] 竞争性亲核剂是与亚胺正离子同时产生的甲醇以及介质中存在的残留的水。本发明人尝试添加活化的4A分子筛以螯合残留的水和释放出的甲醇。这种添加似乎不显著提高观察到的得率。

[0208] 其他物质例如胺、多官能化化合物或脂质的偶联是可行的，并且设想了通过连接脂肪酸或其他脂质、肽或糖来允许形成靶向并载体化至肿瘤的预活化的IFO类似物。

[0209] 例如，最近且最有希望的应用涉及通过这种方法，在BF_3,ET_2O存在下，在从4-甲氧基-MFI产生的磷酰基-亚胺正离子上添加角鲨烯醇或角鲨烯-硫醇(反应路线7和8)来连接角鲨烯残基。形成的化合物SQ-4-O-MFI和SQ-4-S-MFI具有两种有趣的性质。第一种性质是由于4位中的氧化，它们是MFI的预活化形式，其能够在微酸性水性介质中，不需代谢活化而直接释放烷基化氮芥。第二种性质是它们能够在水性介质中自组装成尺寸为约160nm的纳米粒子的形式。

[0210] 

[0211] 反应路线7：使用角鲨烯醇来酰胺烷基化

[0212] 

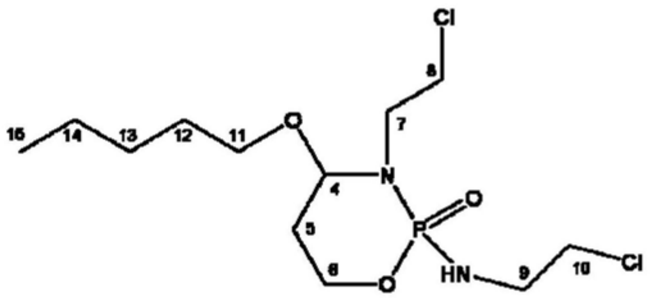
[0213] 反应路线8：使用具有亚硫酰间隔基(半胱胺)的角鲨烯醇来酰胺烷基化

[0214] 对环磷酰胺或氯乙环磷酰胺也考虑了相同类型的反应，两者以4-甲氧基形式也可以在4位处氧化以产生磷酰基亚胺形式。

[0215] 这种双阶段的方法产生异环磷酰胺的4-取代的类似物。与直接氧化相比，这种技术的主要优点在于使用少量的亲核剂。在使用昂贵的亲核剂时，这将是重要优点。此外，这种技术与更广泛种类的亲核剂相容。最后，在大量IFO上产生4-MeO-IFO是可行的。

[0216] 结构分析

[0217] (2-氯-乙基)-[3-(2-氯-乙基)-2-氧代-4-戊氧基-2λ5-[1,3,2]氧氮杂膦烷-2-基]-胺或4-戊氧基-IFO

[0218] 

36a和36b

[0219] 流程：在8mL电化学池中，将110mg IFO(0.4mmol)溶解在4.0mL无水乙腈中。加入1当量的支持性电解质(95mg三氟硼酸四乙基铵)，然后加入15当量(7.1mmol，0.77mL)1-戊醇。通过鼓入氮气将混合物脱气，并置于冰浴中。通过磁力搅拌器提供搅拌。在池中引入两个电极。

[0220] 在以20mA转变3.6F/mol后，通过关闭电流来停止反应。向介质加入1当量碳酸氢钠以中和反应期间释放的可能降解产物的吸水性水分子。

[0221] 将溶剂在减压下蒸发，并将残留物溶解在8mL乙腈中两次，以去除最大量的醇。然后加入15mL乙醚以使支持性电解质析出。在对醚相过滤后，将其在减压下蒸发。

[0222] 将得到的产物通过层析法进行纯化(洗脱液：乙醚/甲醇；95/5)。以90％的分离获得非对映异构体36a和36b。

[0223] 感官特征：微黄色油状物

[0224] 对于X1和X2来说Rf＝0.24和0.39(Et_2O)。

[0225] 分子式：$C_{12}H_{25}Cl_2N_2O_3P$。

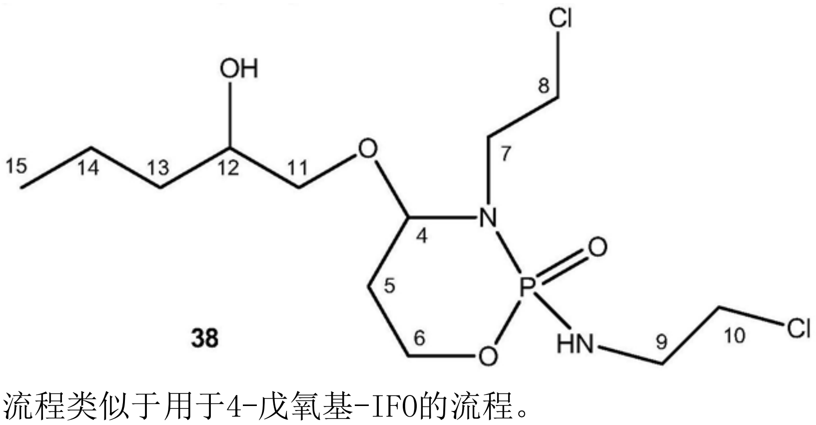
[0226] 在$CDCl_3$中的NMR

[0227] ^{31}P δ(ppm)：9.6(非对映异构体36a)，9.3(非对映异构体36b)。

[0228] ^{13}C δ (ppm)：13.9(C_{15})；22.4(C_{14})；28.4(C_{13})；29.5(C_5)；42.7(C_7)；44.0(C_8)；46.6(C_{10})；49.5(C_9)；62.5(C_{11})；68.5(C_6)；89.3(C_4)。

[0229] ^1H δ (ppm)：0.92(t，3H，H_{15})；1.40(m，4H，H_{13}，H_{14})；1.62(m，2H，H_{12})；2.10(m，1H，$H_{5Eq.}$)；2.26(td，1H，$H_{5Ax.}$)；3.33(m，2H，H_9)；3.45(m，2H，H_7)；3.56(m，2H，H_{11})；3.73(m，4H，H_{10}，H_8)；4.15(m，1H，$H_{6Eq.}$)；4.45(m，1H，$H_{6Ax.}$)；4.60(m，1H，H_4)。

[0230] 1-[3-(2-氯-乙基)-2-(2-氯-乙基氨基)-2-氧代-2λ^5-[1,3,2]氧氮杂膦烷-4-基氧基]-2-戊醇或4-(2OH)-戊氧基-IFO

[0231] 

38

[0232] 流程类似于用于4-戊氧基-IFO的流程。

[0233] 使用2根连续的柱，将得到的产物通过层析法进行纯化(洗脱液：乙醚/甲醇；90/10)。

[0234] 感官特征：微黄色油状物

[0235] 对于X1和X2来说分别为Rf＝0.32和0.50(几乎不能分辨的点)(Et_2O/MeOH 90/10)。

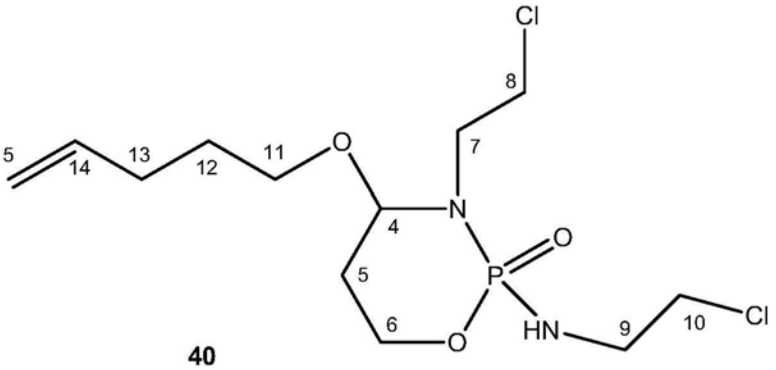
[0236] 分子式：$C_{12}H_{25}Cl_2N_2O_4$。

[0237] 在$CDCl_3$中的NMR

[0238] $^{31}P\delta$(ppm)：9.78(非对映异构体38a)，9.88(非对映异构体38b)。

[0239] $^{1}H\delta$(ppm)：0.95(t，3H，H_{15})；1.30(bs，1H，OH)；1.40(m，4H，$2H_{13}$，$2H_{14}$)；1.92(m，2H，H_5)；2.25(bs，1H，NH)；3.30(m，4H，$2H_7$，$2H_9$)；3.40(m，3H，$2H_{11}$，H_{12})；3.70(m，4H，$2H_8$，$2H_{10}$)；4.15(m，1H，$H_{6Eq.}$)；4.50(m，1H，$H_{6Ax.}$)；4.70(m，1H，H_4)。

[0240] (2-氯-乙基)-[3-(2-氯-乙基)-2-氧代-4-戊-4-烯基氧基-2λ^5-[1,3,2]氧氮杂膦烷-2-基]-胺或4-戊烯氧基-IFO

[0241] 

40

[0242] 流程类似于用于4-戊氧基-IFO的流程。

[0243] 将得到的产物通过层析法进行纯化(洗脱液：乙醚/甲醇；97/3)。

[0244] 感官特征：微黄色油状物。

[0245] 对于X1和X2来说分别为Rf＝0.68和0.78(几乎不能分辨的点)(Et_2O/MeOH 95/5)。

[0246] 分子式：$C_{12}H_{23}Cl_2N_2O_3$。

[0247] IR(膜)；ν(cm^{-1})：2924(C-H)，2361，1640(C＝C)，1434(P-N)，1257(P＝O)，1065-1113(P-O-C)。

[0248] 在$CDCl_3$中的NMR

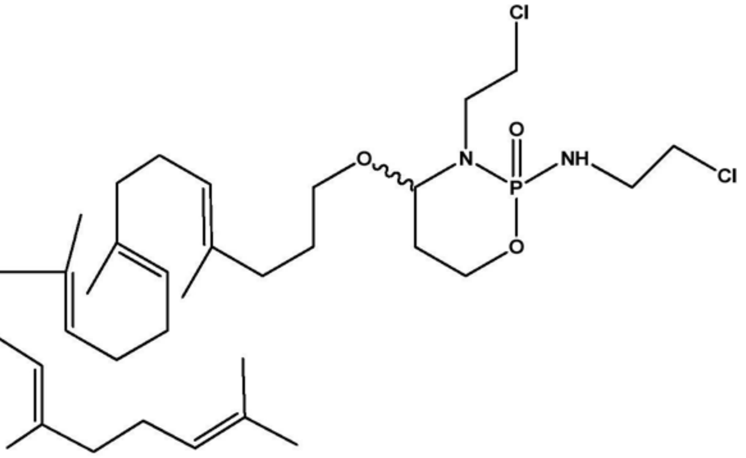
[0249] $^{31}P\delta$(ppm)：9.51(非对映异构体40a)，9.23(非对映异构体40b)。

[0250] $^{13}C\delta$ (ppm)：28.9(C_5)；35.6(C_{12})；36.9(C_{13})；42.6(C_9)；44.5(C_7)；47.3(C_8)；50.0(C_{10})；62.5(C_6)；67.8(C_{11})；89.5(C_4)；115.9(C_{15})；138.0(C_{14})。

[0251] $^{1}H\delta$(ppm)：0.95(bs，1H，NH)；1.30(m，2H，$2H_{13}$)；1.48(s，1H，$1H_{11}$)；1.75(q，2H，H_{12})；1.90(d，1H，$H_{11'}$)；2.25(m，2H，$2H_5$)；3.20(m，2H，$2H_9$)；3.35(m，2H，$2H_7$)；3.65(m，2H，$2H_8$)；3.75(m，2H，$2H_{10}$)；4.25(m，1H，$H_{6Eq.}$)；4.50(m，1H，$H_{6Ax.}$)；4.65(m，1H，H_4)；5.10(m，2H，$2H_{15}$)；5.80(m，1H，H_{14})。

[0252] (2-氯-乙基)-[3-(2-氯-乙基)-2-氧代-4-角鲨烯基-[1,3,2]氧氮杂膦烷-2-基]-胺或4-SQ-IFO

[0253]



[0254] 流程:从4-甲氧基-异环磷酰胺开始,在与前述产物类似的条件下(-78℃,CH_2Cl_2,BF_3,EtO_2,30min)加入1当量的三正角鲨烯醇,以53%的得率形成所需化合物。

[0255] 将得到的产物通过层析法进行纯化。

[0256] 感官特征:微黄色油状物。

[0257] 分子式:$C_{34}H_{61}Cl_2N_2O_3P$

[0258] IR(膜);ν(cm^{-1}):2956(C-H),2352,1638(C=C),1432(P-N),1258(P=O),1063-1109(P-O-C)。

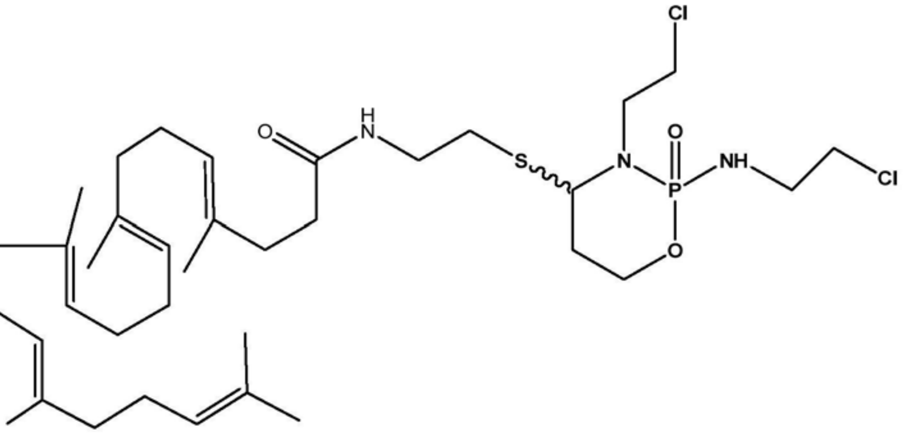
[0259] 在$CDCl_3$中的NMR

[0260] ^{13}C δ (ppm):33.4(C_5);35.6(C_{12});36.9(C_{13});42.6(C_9);44.5(C_7);47.3(C_8);50.0(C_{10});63.5(C_6);67.8(C_{11});89.5(C_4);125.9($C_{ethylen.}$);132.0(C_{quat})。

[0261] ^1H δ (ppm):0.95(bs,1H,NH);1.30(m,2H,$2H_{13}$);1.55(s,18H);1.95(m,20H);3.20(m,2H,$2H_9$);3.35(m,2H,$2H_7$);3.55(m,2H,$2H_8$);3.65(m,2H,$2H_{10}$);4.25(m,1H,$H_{6Eq.}$);4.50(m,1H,$H_{6Ax.}$);4.65(m,1H,H_4);5.05(m,5H,$H_{ethylen}$)。

[0262] (2-氯-乙基)-[3-(2-氯-乙基)-2-氧代-4-巯基乙酰胺基角鲨烯-[1,3,2]氧氮杂膦烷-2-基]-胺或4-硫基SQ-IFO

[0263]



[0264] 流程:从4-甲氧基-异环磷酰胺开始,在与前述产物类似的条件下(-78℃,CH_2Cl_2,BF_3,EtO_2,30min)加入1当量的半胱氨酰基角鲨烯酸,以60%的得率形成所需化合物。

[0265] 将得到的产物通过层析法进行纯化。

[0266] 感官特征:微黄色油状物。

[0267] 分子式：$C_{36}H_{64}Cl_2N_3O_3PS$

[0268] IR(膜)；ν(cm^{-1})：2956(C-H)，2352，1746，(C＝O)，1638(C＝C)，1432(P-N)，1258(P＝O)，1063-1109(P-O-C)。

[0269] 在$CDCl_3$中的NMR

[0270] $^{13}C\delta$ (ppm)：33.4(C_5)；35.6(C_{12})；36.9(C_{13})；42.6(C_9)；44.5(C_7)；47.3(C_8)；50.0(C_{10})；63.5(C_6)；67.8(C_{11})；89.5(C_4)；125.9($C_{ethylen.}$)；132.0(C_{quat})。

[0271] $^{1}H\delta$ (ppm)：0.95(bs，1H，NH)；1.30(m，2H，$2H_{13}$)；1.55(s，18H)；1.95(m，20H)；3.20(m，2H，$2H_9$)；3.35(m，2H，$2H_7$)；3.55(m，2H，$2H_8$)；3.65(m，2H，$2H_{10}$)；4.25(m，1H，$H_{6Eq.}$)；4.50(m，1H，$H_{6Ax.}$)；4.65(m，1H，H_4)；5.05(m，5H，$H_{ethylen}$)，7.35(bs，1H，NH)。

[0272] 注意：半胱氨酰基角鲨烯酸和三正角鲨烯醇可以通过常规合成方法从角鲨烯醛获得。角鲨烯的醛衍生物的合成被描述在Ceruti等，J.Chem.Soc，Perkin Trans.1，2002，1477-1486中(参见图2，1479页)。

[0273] 实施例2：化合物4-硫基SQ-IFO和4-SQ-IFO的生物学评估

[0274] I.体外细胞毒性的评估

[0275] I.1.材料和方法：

[0276] 细胞培养和培养条件

[0277] 在数种细胞系中研究了SQ-IFO和SQ-硫基-IFO纳米粒子的细胞毒性：

[0278] ■A549：人类肺泡基底上皮细胞腺癌

[0279] ■MCF-7：人类乳腺癌

[0280] ■MCF-7MDR：多药耐药的人类乳腺癌

[0281] ■B16F10：小鼠黑素瘤

[0282] ■KB 3.1：人类鳞状细胞癌

[0283] ■M109：小鼠肺肿瘤细胞

[0284] ■MiaPaCa-2：人类胰腺癌

[0285] ■UW-479：人类小儿神经胶质瘤

[0286] ■IGR OV1：人类卵巢癌

[0287] ■SK-N-MC：成神经细胞瘤，被重新分类为Ewing(表达EWS/Flip-1癌基因)

[0288] 在37℃培养箱中，在湿润的5％二氧化碳气氛下，将细胞系维持在增补有10％胎牛血清和1％抗生素(100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素)的DMEM或RPMI培养基中。

[0289] 将细胞接种在96孔板(TPP)中。对于72小时的温育时间，对每种细胞系的接种进行优化。

[0290] A549、MCF-7、B16F10、M109、MiaPaCa-2细胞以5.10^3个细胞/孔的量接种。KB 1.3细胞以2.10^3个细胞/孔的量接种，IGR-OV1细胞以10^4个细胞/孔的量接种，UW479和SK-N-MC细胞以5.10^4个细胞/孔的量接种。

[0291] 纳米粒子悬液的制备

[0292] 按照上面描述的流程合成化合物SQ-IFO和SQ-硫基-IFO。对于每种化合物，使用由Fessi，Int.J.Pharm，1989，55，R1-R4所描述的技术制备纳米粒子的水性悬液。获得的纳米粒子是球形的，并具有182nm的平均尺寸。

[0293] 对于每种化合物来说，通过将2mg/mL的SQ-IFO储用溶液和10mg/mL的SQ-硫基-IFO储用溶液在培养基中连续稀释，测试0.1和100μM之间的不同浓度。

[0294] 细胞存活率试验

[0295] 在温育72小时后，通过观察MTS试剂向甲臜的还原来确定细胞存活率(Kit Cell titer 96Aquerus one solution,Promega)。向每个孔加入20μL 5mg/mL的在PBS中的MTS溶液。优化每种细胞系的MTS温育时间；然后使用酶标仪(EL808,Biotek)读取490nm处的吸光度。

[0296] 结果表示成未处理细胞的百分率。用Prism 4软件(Graph Pad软件,San Diego)对数据进行处理。由此计算每种细胞系的IC50值。使用异环磷酰胺和角鲨烯醇作为对照。

[0297] I.2.结果

[0298] 下面的表5示出了每种测试的化合物在每种细胞系中获得的IC50。

[0299] 显然，化合物IFO-SQ和IFO-硫基-SQ表现出高的体外细胞毒性：因此这些化合物无需通过细胞色素P450预先活化，即能释放烷基化氮芥。

[0300] 引人注意的是，取决于癌细胞系，观察到了IFO-硫基-和IFO-SQ的不同的活性分布情况。IFO-硫基-SQ对M109细胞系、SK-N-MC(Ewing)、UW 479(神经胶质瘤)和IGR-OV1(卵巢癌)细胞具有高细胞毒活性。对于化合物IFO-SQ来说没有观察到这样的活性。

[0301] 角鲨烯醇和IFO在所测试的浓度下没有表现出显著的细胞毒性。

[0302] 表5：IFO、IFO-SQ和IFO-硫基-SQ在所测试的每种细胞系上的IC50。

[0303]

IC50 (μM)	异环磷酰胺	异环磷酰胺 SQ	异环磷酰胺-硫基-SQ
A549	> 100	32.5	5.3
MCF-7	> 100	43.6	10.9
MCF-7 MDR	> 100	78.8	80
B16F10	> 100	73	16.9
KB 3.1	> 100	50	2.96
M109	> 100	> 100	9.2
MiaPaCa-2	> 100	32.5	4.4
SK-N-MC（Ewing）	> 100	> 100	19
UW 479（神经胶质瘤）	> 100	> 100	65
IGR-OV1（卵巢癌）	> 100	> 100	81

[0304] II.体内功效的评估

[0305] 首先在被异种移植在裸鼠中的人类横纹肌肉瘤的模型上评估体内细胞毒功效。所使用的模型是RD人类小儿横纹肌肉瘤模型。首先将细胞在培养中进行扩增并计数。将

10.10^6个细胞皮下注射到每只小鼠的两肋腹。在移植物摄取后，当肿瘤体积达到>80mm^{3}时，将小鼠用IFO-SQ或安慰剂进行处理。该研究的初步结果显示，与用安慰剂处理的小鼠相比，在用IFO-SQ处理的小鼠中肿瘤体积显著减小。对于化合物IFO-硫基-SQ，预期将获得类似结果。