

[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 200380107416.3

[51] Int. Cl.

C07D 493/04 (2006.01)

C07D 417/06 (2006.01)

A61K 31/427 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07C 59/90 (2006.01)

C07D 313/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100384851C

[51] Int. Cl. (续)

C07D 303/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.12.22

[21] 申请号 200380107416.3

[30] 优先权

[32] 2002.12.23 [33] GB [31] 0230024.2

[86] 国际申请 PCT/EP2003/014747 2003.12.22

[87] 国际公布 WO2004/056832 英 2004.7.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.23

[73] 专利权人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 D·登尼-迪斯舍尔

A·弗勒尔斯海默 E·屈斯特斯

L·奥贝尔 G·塞德尔迈尔

[56] 参考文献

US6624310 2003.9.23

审查员 陈真

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

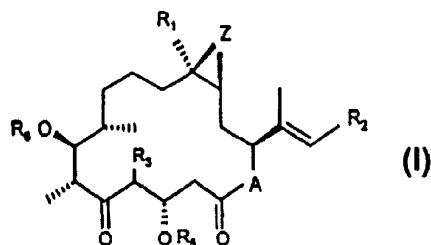
权利要求书 4 页 说明书 35 页

[54] 发明名称

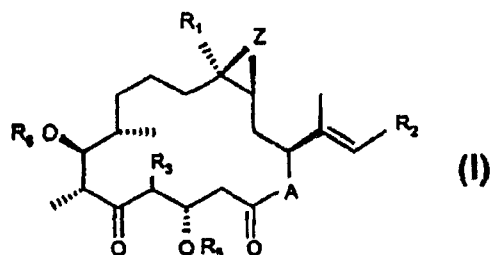
埃坡霉素衍生物

[57] 摘要

本发明涉及式(I)的 C4-脱甲基-埃坡霉素或 C4-双降-埃坡霉素, 它们的药物用途, 含有它们的药物组合物和它们的制备方法。



1. 一种制备式 I 的埃坡霉素或其药物可接受盐的方法，



其中：

A 表示 O 或 NR₇，

R₁ 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基，

R₂ 是具有至少一个氮原子的未取代或取代的杂芳基，

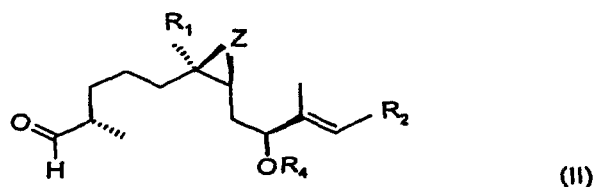
R₃ 表示氢或低级烷基，

R₅ 和 R₆ 是氢，且

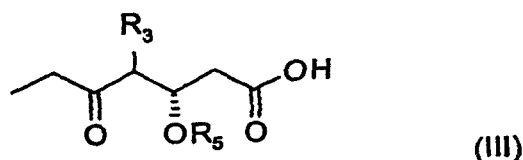
R₇ 是氢或低级烷基，

Z 是 O 或键，所述方法包括如下步骤：

(a) 使式 II 的醛，

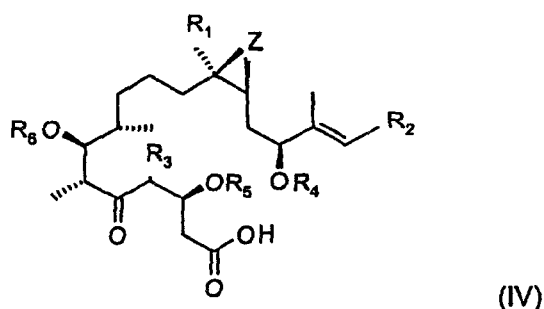


其中 R₁、R₂ 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 R₄ 是保护基，与式 III 的乙酰酮反应，



其中 R₅ 是 H 或与 R₄ 不同或相同的保护基，且 R₃ 具有如上对式 I 化合物所

给出的含义，
得到式 IV 的羟醛，



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是保护基， R_5 是 H 或与 R_4 不同或相同的保护基，且 R_6 是氢，

(b) 使式 IV 的羟醛与能引入与 R_4 不同或相同的保护基的试剂反应，得到式 IV 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是保护基，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是与 R_4 不同或相同的保护基，

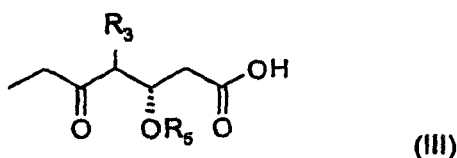
(c) 使式 IV 的羧酸与能在不导致除去保护基 R_5 和 R_6 的条件下除去保护基 R_4 的试剂反应，得到式 IV 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是氢，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基，

(d) 将式 IV 的羧酸进行大环内酯化反应，得到式 I 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， A 是 O，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基，

(e) 使式 I 的埃坡霉素与能除去保护基 R_5 和 R_6 的试剂反应，得到式 I 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 A 是 O，

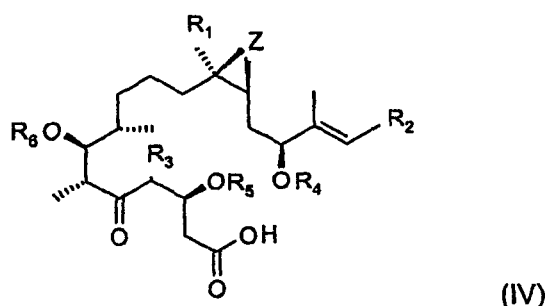
(f) 将该式 I 的埃坡霉素任选进一步转化成式 I 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 A 是 NR_7 ，其中 R_7 是氢或低级烷基。

2. 式 III 的乙酰酮，



其中 R_3 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 R_5 是氢或保护基。

3. 式 IV 的羟醛，



R_1 是氢或低级烷基，其未取代或被以下取代：羟基，低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基、低级酰基氨基，

R_2 是未取代或取代的杂芳基，

R_3 表示氢或低级烷基，

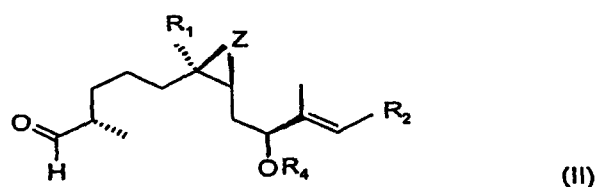
R_4 是氢或保护基，

R_5 是与 R_4 不同或相同的保护基，

R_6 是氢或与 R_4 不同或相同的保护基，且

Z 是 O 或键。

4. 一种制备式 II 的醛的方法，



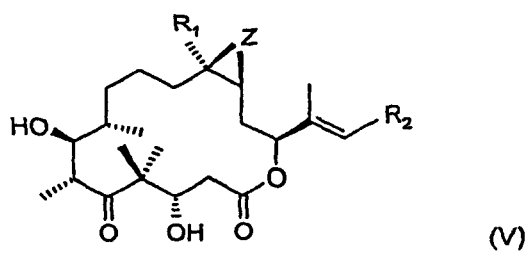
其中：

R_1 是氢或低级烷基，其未取代或被以下取代：羟基，低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基、低级酰基氨基，

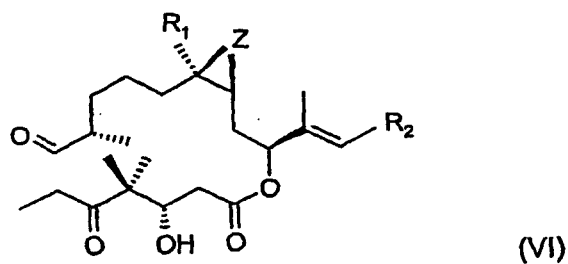
R_2 是未取代或取代的杂芳基，

Z 是 O 或键，所述方法包括如下步骤：

(a) 使式 V 的埃坡霉素，



其中基团 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 II 化合物所给出的含义，
与进行逆羟醛缩合反应的试剂反应，得到式 VI 的酯，



其中基团 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 II 化合物所给出的含义，

(b) 在第二步中，使该酯水解成它的组分，即 4,4-二甲基-3-羟基-5-氧代-庚酸和如上定义的式 II 的醛。

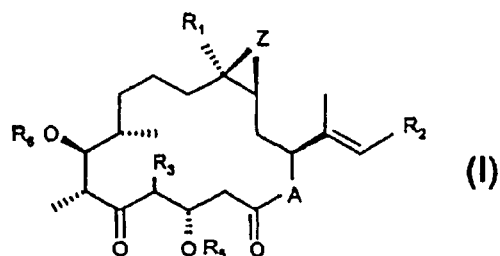
埃坡霉素衍生物

本发明涉及 C4-脱甲基-埃坡霉素(epothilone)或 C4-双降-埃坡霉素及它们的药物用途、含有它们的药物组合物和它们的制备方法。

尽管 Taxol[®]和 Taxotere[®]广泛用于治疗许多不同肿瘤类型,但是紫杉烷对患者生存的影响有限,并且绝大部分的转移性实体肿瘤仍旧不能治愈。紫杉烷治疗涉及许多重大副作用,并且紫杉烷的效力可能因抗药机制的快速发展而受到严重限制。考虑到这些限制以及对标准结合治疗所通常观察到的副作用,明显需要鉴定新的细胞毒性抗癌剂,该抗癌剂表现出改进的总体特性,这包括抗肿瘤活性、对多抗药性肿瘤的功效、安全性和耐受性。

埃坡霉素的微管稳定效应首次由 Bollag 等人描述在 *Cancer Research* 55, 1995, 2325-33 中。使用埃坡霉素、尤其是埃坡霉素 A 或 B 来治疗不同类型的肿瘤、尤其是其它化学治疗剂、尤其是 TAXOL[™] 治疗难以控制的肿瘤的合适治疗方案描述在 WO 99/43320 中。D. Su, A. Balog 等人在 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 2093-2096 页中讨论了埃坡霉素类的构效关系。在所述出版物的 2094 页,他们尤其得出这样的结论:在标记为 C1-C8 的碳原子处修饰天然化合物的结构导致细胞毒性大大损失和在微管蛋白/微管系统中的活性损失。出人意料的是,现已发现式 I 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素具有有益的药理学特性,并且可用于治疗增殖性疾病。

因此,本发明涉及式 I 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素及其盐,



其中:

A 表示 O 或 NR₇,

R₁ 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、呈游离或保护形式的低级烷基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基,

R₂ 是具有至少一个氮原子的未取代或取代的杂芳基,

R₃ 表示氢或低级烷基、优选甲基,

R₅ 和 R₆ 是氢, 且

R₇ 是氢或低级烷基,

Z 是 O 或键,

条件是:

当 R₂ 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是 O 时, R₁ 表示未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基, 和

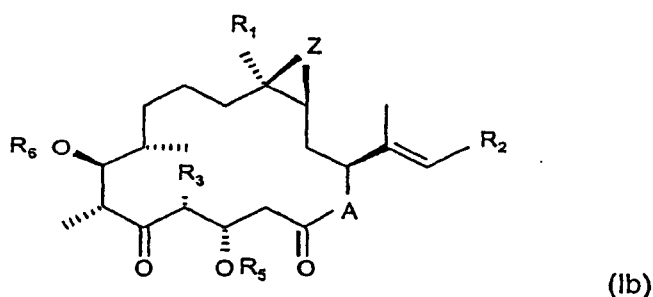
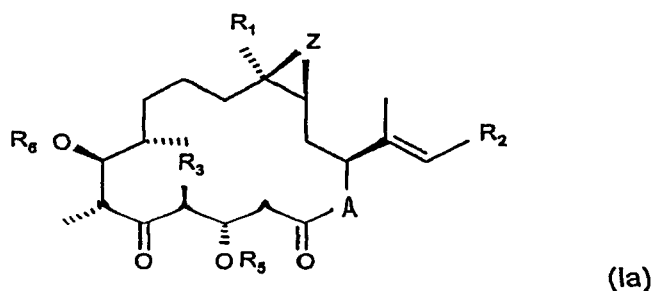
当 R₂ 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是键时, R₁ 表示被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基。

除非另有说明, 否则此前和下文中使用的通用术语优选在本公开的上下文中具有下列含义:

其中用于化合物、盐等的复数形式认为也指单一化合物、盐等。

任何不对称碳原子均可以以(R)-、(S)-或(R,S)-构型存在、优选以(R)-或(S)-构型存在。所述化合物因此可以以异构体的混合物或纯异构体存在、优选以对映体纯的非对映体存在。

式 I 表示两种立体异构体。本发明涉及由式 Ia 和 Ib 二者表示的两种立体异构体、优选式 Ia 化合物,



其中各符号和基团具有如上对式 I 化合物所给出的含义。

前缀“低级”表示具有不超过且包括 7 个、尤其不超过且包括 4 个碳原子的基团，其中所述基团为直链基团或为具有一个或多个分支的支链基团。

“卤素”是氟、氯、溴或碘。

“烷基”优选是低级烷基。

“低级烷基”是直链或支链的；例如它为丁基如正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基；丙基如正丙基或异丙基；乙基或甲基。优选低级烷基是甲基、乙基、正丙基、异丙基或叔丁基。

“烷氧基”优选是低级烷氧基，例如甲氧基、乙氧基、异丙氧基或叔丁氧基。

“酰基”优选是低级酰基，例如乙酰基。

“低级链烷醇”优选是甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1-丁醇或 2-丁醇。

“低级链烷烃”尤其是戊烷、己烷或庚烷。

具有至少一个氮原子的“杂芳基”表示含有至少 1、2 或 3 个环氮原子和 0 或 1 个氧原子和 0 或 1 个硫原子的单-或双环基团，该基团在将该杂芳基与式 I 分子的其余部分相连接的环中是不饱和的，并优选是其中连接环

优选具有 5-12 个、更优选 5 或 6 环原子的基团；并且所述杂芳基可未取代或被一个或多个、尤其是 1 或 2 个优选选自卤素、烷氧基、烷硫基、羟基、烷酰基的取代基或最优选被烷基取代。优选所述单-或双环杂芳基选自：2H-吡咯基、吡咯基、咪唑基、苯并咪唑基、吡唑基、吲唑基、嘌呤基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、2,3-二氮杂萘基、1,5-二氮杂萘基、喹喔啉基、喹唑啉基、quinnolinylyl、蝶啶基、3H-吲哚基、吲哚基、异吲哚基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、苯并[b]噻唑基、三唑基、四唑基、苯并[b]噁唑基和苯并[d]吡唑基。

在带负电基团如羧基或磺基存在下，还可与碱形成盐，例如金属盐或铵盐，如碱金属或碱土金属盐，例如钠、钾、镁或钙盐，或者与氨或合适的有机胺形成的铵盐，如一元叔胺、例如三乙胺或三(2-羟乙基)胺或杂环碱、例如 N-乙基-哌啶或 N,N'-二甲基哌嗪。

当碱性基团和酸性基团存在于同一分子中时，式 I 化合物还可形成内盐。

为了分离或提纯目的，还可使用不可药用盐，例如苦味酸盐或高氯酸盐。对于治疗用途，仅仅使用可药用盐或游离化合物(其中可以药物制剂形式应用)，并因此优选这些盐。

考虑到呈游离形式和呈它们的盐形式(包括可用作例如提纯或鉴定所述新化合物的中间体的那些盐)的新化合物之间的密切关系，在此前和下文中，凡提及游离化合物时均应理解为还指相应的盐，如果合适且有利的话。

式 I 化合物具有有价值的药理学特性，如此前和下文中所述。

式 I 化合物作为微管解聚抑制剂的功效可证明如下：

在 DMSO 中制备各试验化合物的储备溶液(10mM)，并保存在 -20℃ 下。如已知的那样(参见 Weingarten 等人，*Biochemistry* 1974; 13: 5529-37)，通过温度依赖性解聚/聚合的两个循环从猪脑中提取微管蛋白(即微管蛋白 + 微管蛋白相关的蛋白)。然后将猪微管蛋白的工作储备溶液保存在 -70℃ 下。试验化合物诱导的猪微管蛋白的聚合程度基本上按已知的那样测定(参见 Lin 等人，*Cancer Chem. Pharm.*, 1996; 38: 136-140)。总之，将工作

等分试样迅速解冻,然后在冰冷的 2×MEM 缓冲剂(200ml MES、2mM EGTA、2mM MgCl₂, pH 6.7)[MES=2-吗啉代乙烷磺酸, EGTA=乙二醇-双-2(2-氨基乙基)-四乙酸]中稀释至最终所需浓度的 2 倍。在 0.5ml Eppendorf 管中,将药物或媒介(DMSO,最终浓度 5%)于室温下在水中稀释至最终所需浓度的 2 倍,然后置于冰上。在添加等体积(50μl)的微管蛋白(2 x 最终所需浓度,在 2×MEM 缓冲剂中)之后,通过将孵育混合物转移到室温水浴中达 5 分钟启动聚合反应。然后将反应混合物置于 Eppendorf 微量离心管(5415C 型)中,并于室温下再孵育 15 分钟。然后将各样品于室温下以 14'000 rpm 离心 15 分钟。作为微管蛋白聚合的间接量度,上清液(含有未聚合的可溶性微管蛋白的剩余物)的蛋白浓度通过 Lowry 法(DC Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)测定,而颜色反应的光密度用 SpectraMax 340 光度计(Molecular Devices, Sunnydale, CA)在 750nm 处测定。将试验药物引起的光密度的降低与由 25μM 埃坡霉素 B(阳性对照, 100%聚合)引起的光密度的降低进行比较。媒介处理的样品用作阴性对照(0%聚合)。试验药物的聚合活性以相对于阳性对照(100%聚合)的百分比表示。

对抗肿瘤细胞的功效可按下述方式证明:

在 DMSO 中制备各试验化合物的储备溶液(10mM),并保存在-20℃下。人 KB-31 和(多抗药性, P-gp170 过表达)KB-8511 表皮样癌细胞来源于 M. Baker 博士, Roswell Park Memorial Institute(Buffalo, NY, USA)(描述:亦参见 Akiyama 等人, *Somat. Cell. Mol. Genetics* **11**, 117-126(1985)和 Fojo A.等人, *Cancer Res.* **45**, 3002-3007(1985))——KB-31 和 KB-8511 均为 KB 细胞系(ATCC)的衍生物。KB 31 细胞可利用 RPMI-1640 培养基(Amimed, BioConcept, Allschwil, 瑞士)培养形成单层,所述培养基含有 10%胎牛血清(Amimed, BioConcept, Allschwil, 瑞士)、L-谷氨酰胺(Amimed, BioConcept, Allschwil, 瑞士)、青霉素(50 单位/ml)和链霉素(50μg/ml)(Amimed, BioConcept, Allschwil, 瑞士)。KB-8511 是来源于 KB-31 细胞系的变体,其使用秋水仙碱(colchicine)处理循环而获得,并且

与 KB-31 细胞相比, KB-8511 对秋水仙碱的相对抗性为大约 40 倍 (Akiyama 等人, *Somat. Cell. Mol. Genetics* **11**, 117-126(1985)和 Fojo A. 等人, *Cancer Res.* **45**, 3002-3007(1985))。将细胞于 37℃ 下在孵育器中、在 5v/v%CO₂ 和 80%相对湿度下与按如上所述添加的 RPMI-1640 培养基孵育。将细胞在 96 孔微量滴定板中以 1.5×10³ 个细胞/孔的量接种, 并孵育过夜。在第一天添加试验化合物在培养基中的连续稀释液。然后, 将各板再孵育 4 天, 之后将细胞用 3.3v/v%戊二醛固定、用水洗涤并用 0.05w/v% 亚甲蓝染色。在洗涤之后, 用 3%HCl 脱去染料, 并使用 SpectraMax 340(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)在 665nm 处测定光密度。通过拟合数学曲线、使用 SoftProprogramme(2.0 版或更高版; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)并使用公式 $[(OD_{\text{经处理}})-(OD_{\text{起始}})]/[(OD_{\text{对照}})-(OD_{\text{起始}})] \times 100$ 来确定 IC₅₀ 值。IC₅₀ 定义为孵育期结束时试验化合物的浓度, 与对照培养基相比, 其导致细胞量净增长的 50%抑制。式 I 化合物因此优选显示 IC₅₀ 为 0.15-15nM、优选 0.25-5nM。

体内功效可如下证明: 使用的模型是小鼠中的肿瘤如 KB-31 或 KB-8511 表皮样肿瘤的异种移植体。试验化合物的抗肿瘤功效可在雌性 BLB/c nu/nu 小鼠中例如针对相应的皮下植入的细胞系测定。为此, 将约 25mg 的肿瘤片段植入每只小鼠的左侧(例如 6 只动物/剂)。例如在移植后第 11 天, 将试验化合物以不同剂量(例如 0.1; 0.5; 1; 5 和 10mg/kg)施用, 在两天至两周之后, 需要的话重复施用, 需要的话施用若干次。例如在约 2-4 周后(例如从处理开始后两周)测定肿瘤的体积。沿两个垂直排列的轴测定肿瘤直径并根据公开的方法(见 Evans 等人, *Brit. J. Cancer* **45**, 466-8(1982))计算肿瘤体积。抗肿瘤功效确定为经处理动物肿瘤体积的平均增加除以未处理动物(对照)肿瘤体积的平均增加, 之后再乘以 100, 表示为 T/C%。肿瘤消退(以%表示)根据下列公式计算为最小平均肿瘤体积(V_t)相对于处理开始时的平均肿瘤体积(V₀):

$$\% \text{消退} = [1 - (V_t / V_0)] \times 100。$$

在这种情况下, 还可使用其它细胞系、例如以上所命名的那些, 以证明对

抗肿瘤细胞的功效。

基于其作为微管蛋白解聚抑制剂的功效，式 I 的 C4-脱甲基埃坡霉素可有效对抗许多增殖性疾病，如实体瘤疾病、液体肿瘤疾病(如白血病)或银屑病。

术语“实体瘤疾病”尤其指乳癌、结肠癌和通常的包括胃癌、肝细胞瘤在内的胃肠道癌；肺癌尤其是小细胞肺癌和非小细胞肺癌、肾癌、间皮瘤、神经胶质瘤、皮肤鳞状细胞癌、头和颈癌、泌尿生殖癌、例如子宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌或膀胱癌；何杰金氏病、类癌综合征或卡波西肉瘤。在本发明的优选实施方案中，待治疗的实体瘤疾病选自乳癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肾癌、肺癌、尤其是非小细胞肺癌和神经胶质瘤。本文中公开的 C4-脱甲基埃坡霉素还适于防止肿瘤的生长或微转移的生长或发展，尤其是由于它们的抗血管生成活性。

式 I 的 C4-脱甲基埃坡霉素可单独或与一种或多种其它治疗剂组合施用，可能的组合疗法采取如下形式：固定组合，或者交叉或彼此独立地施用本发明化合物与一种或多种其它治疗剂，或者组合施用固定组合与一种或多种其它治疗剂。式 I 的 C4-脱甲基埃坡霉素可尤其与化学疗法、放射疗法、免疫疗法、手术介入或它们的组合相组合、尤其用于肿瘤治疗。长期治疗同样是可能的，作为如上所述其它治疗情况下的辅助治疗。其它可能的治疗是保持患者在肿瘤消退或甚至化学预防治疗之后的状态的治疗，例如在处危患者中。

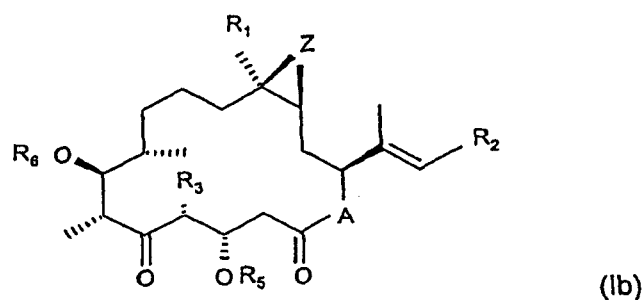
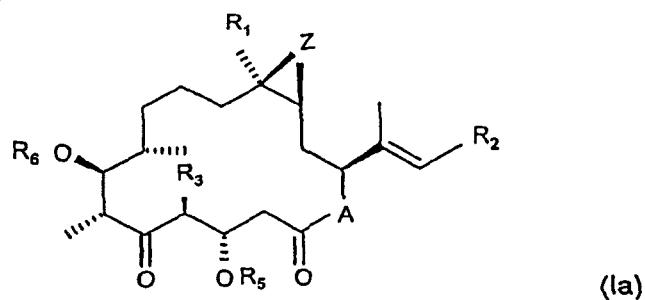
用于可能的组合的治疗剂尤其是一种或多种抗增殖、抑制细胞生长或细胞毒性化合物，例如化学治疗剂或选自下组的几种试剂：该组试剂包括但不限于多胺生物合成抑制剂、蛋白激酶抑制剂、尤其是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(如蛋白激酶 C)或者酪氨酸蛋白激酶(如 EGF 受体酪氨酸激酶例如 PKI166、VEGF 受体酪氨酸激酶例如 PTK787 或 PDGF 受体酪氨酸激酶例如 STI571)的抑制剂、细胞因子、负生长调节剂(如 TGF- β 或 IFN- β)、芳香酶抑制剂(例如来曲唑或阿那曲唑)、SH2 域与磷酸化蛋白相互作用的抑制剂、抗雌激素药、拓扑异构酶 I 抑制剂(如伊立替康)、拓扑异构酶 II

抑制剂、其它微管活性剂(例如紫杉醇或(+)-海绵内酯(discodermolide)、烷化剂、抗肿瘤的抗代谢物(如吉西他滨或卡培他滨)、铂化合物(如卡铂或顺铂)、抗血管生成化合物、促性腺激素释放因子激动剂、抗雄激素药、二膦酸类(例如 AREDIA[®]或 ZOMETA[®])以及司徒曼布。以代码、通用名或商品名鉴别的活性剂的结构可取自现行版的标准纲要“默克索引”或数据库如 Patents International(例如 IMS World Publications)。它们的相应内容据此引入作为参考。

通常而言,本发明涉及式 I 的 C4-脱甲基埃坡霉素或其盐用于在体内或体外稳定微管细胞骨架中的作用。

对于下文中提及的优选的式 I 的 C4-脱甲基埃坡霉素和其盐,来自此前提及的通用定义的各取代基的定义可合理地用于例如用更具体的定义或尤其表征为优选的定义代替更通用的定义。

特别地,本发明涉及式 Ia 或 Ib 的 C4-脱甲基-埃坡霉素和其盐,



其中:

A 表示 O 或 NR₇;

R₁ 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、呈游离或保护形式的低级烷基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基,

R_2 是具有至少一个氮原子的未取代或取代的杂芳基,

R_3 表示氢或低级烷基、优选低级烷基,

R_5 和 R_6 是氢, 且

R_7 是氢或低级烷基,

Z 是 O 或键,

条件是:

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是 O 时, R_1 表示未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基, 和

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是键时, R_1 表示被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基。

本发明尤其涉及式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素及其盐, 其中:

A 表示 O 或 NR_7 ,

R_1 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、呈游离或保护形式的低级烷酰基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基,

R_2 是噻唑基、噁唑基、吡啶基、苯并噻唑基、苯并噁唑基或苯并咪唑基, 它们各自未取代或被取代;

R_3 表示氢或低级烷基、优选低级烷基,

R_5 和 R_6 是氢, 且

R_7 是氢或低级烷基,

Z 是 O 或键,

条件是:

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是 O 时, R_1 表示未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基, 和

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是键时, R_1 表示被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基。

优选的是式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素及其盐, 其中:

A 表示 O 或 NR_7 ,

R_1 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基,

R_2 是噻唑基、噁唑基、吡啶基、苯并噻唑基, 它们各自未取代或被取代,

R_3 表示氢或低级烷基、优选低级烷基,

R_5 和 R_6 是氢, 且

R_7 是氢或低级烷基,

Z 是 O 或键,

条件是:

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是 O 时, R_1 表示未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基, 和

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基且 Z 是键时, R_1 表示被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基或低级酰基氨基取代的低级烷基。

更优选的是式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素及其盐, 其中:

A 表示 O,

R_1 是氢或低级烷基,

R_2 是 2-甲基-噻唑基、2-乙基-噻唑基、2-甲硫基-噻唑基、2-氨基甲基-噻唑基、2-二甲基氨基-噻唑基、2-氟甲基-噻唑基、2-甲基-噁唑基、3-甲基-吡啶基、2-甲基-苯并噻唑基,

R_3 表示氢或低级烷基、优选低级烷基,

R_5 和 R_6 是氢, 且

Z 是 O 或键,

条件是:

当 R_2 是 2-甲基-噻唑基时, Z 是 O 且 R_1 表示低级烷基。

甚至更加优选的是式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-(脱甲基或双降)-埃坡霉素和其盐, 其中:

A 表示 O,

R_1 是氢或低级烷基,

R_2 是 2-甲基-噻唑基、2-乙基-噻唑基、2-甲硫基-噻唑基、2-氨基甲基-噻唑基、2-二甲基氨基-噻唑基、2-氟甲基-噻唑基、2-甲基-噁唑基、3-甲基-吡啶基、2-甲基-苯并噻唑基,

R_3 表示甲基;

R_5 和 R_6 是氢, 且

Z 是 O 或键,

条件是:

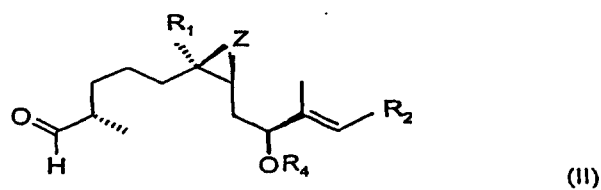
当 R_2 是 2-甲基-噻唑基时, Z 是 O 且 R_1 表示低级烷基。

此外, 本发明涉及式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-脱甲基-埃坡霉素或其可药用盐在治疗肿瘤疾病中的用途和在制备用于治疗肿瘤疾病的药物产品中的用途。

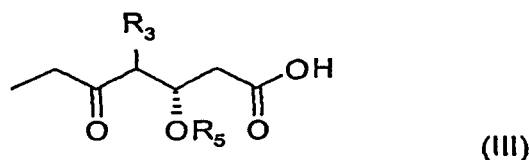
另外, 本发明提供了一种治疗包括人在内的温血动物的方法, 其中向患肿瘤疾病的温血动物施用治疗有效量的式 I 或者式 Ia 或 Ib 的 C4-脱甲基-埃坡霉素或这类化合物的可药用盐。

其中 A 表示 O 或 NR_7 ; R_1 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基, 低级酰基氨基取代的低级烷基; R_2 是未取代或取代的杂芳基; R_7 是氢或低级烷基; R_5 和 R_6 是氢; 且 Z 是 O 或键的式 I 的埃坡霉素可例如通过下述方法制备:

其中在第一步中, 使式 II 的醛,

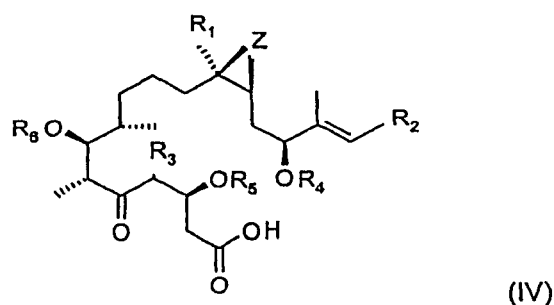


其中 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 R_4 是保护基，与式 III 的乙酰酮反应，



其中 R_5 是 H 或与 R_4 不同或相同的保护基，且 R_3 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，

得到式 IV 的羟醛，



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是保护基， R_5 是 H 或与 R_4 不同或相同的保护基，且 R_6 是氢，

在第二步中，使式 IV 的羟醛与能引入与 R_4 不同或相同的保护基的试剂反应，得到式 IV 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是保护基，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是与 R_4 不同或相同的保护基，

在第三步中，使式 IV 的羧酸与能在不导致除去保护基 R_5 和 R_6 的条件下除去保护基 R_4 的试剂反应，得到式 IV 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是氢，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基，

在第四步中，将式 IV 的羧酸进行大环内酯化反应，得到式 I 的埃坡霉

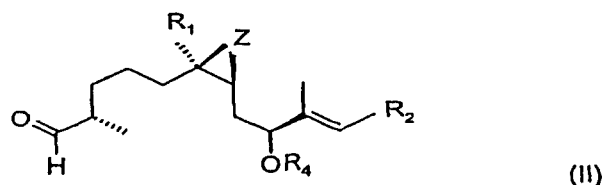
素, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义, A 是 O , 且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基,

在第五步中, 使式 I 的埃坡霉素与能除去保护基 R_5 (如果存在的话) 和 R_6 的试剂反应, 得到式 I 的埃坡霉素, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义, 且 A 是 O ,

将该式 I 的埃坡霉素任选进一步转化成式 I 的埃坡霉素, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义, 且 A 是 NR_7 , 其中 R_7 是氢或低级烷基。

其中 A 表示 O 或 NR_7 ; R_1 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基、低级酰基氨基取代的低级烷基; R_2 是未取代或取代的杂芳基; R_7 是氢或低级烷基; R_5 和 R_6 是氢; 且 Z 是 O 或键的式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素可例如通过下述方法制备:

其中在第一步中, 使式 II 的醛,

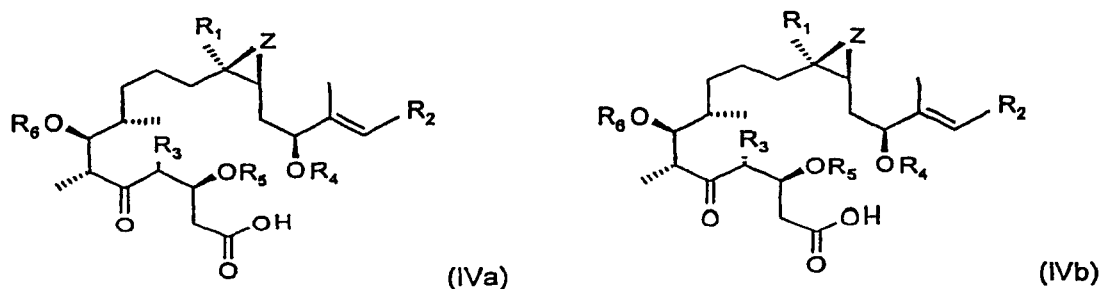


其中 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义, 且 R_4 是保护基, 分别与式 IIIa 或 IIIb 的乙酰酮反应,



其中 R_5 是 H 或与 R_4 不同或相同的保护基, 且 R_3 具有如上对式 I 化合物所给出的含义,

分别得到式 IVa 或 IVb 的羟醛,



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 为保护基， R_5 是 H 或与 R_4 不同或相同的保护基，且 R_6 是氢，

在第二步中，使式 IVa 或 IVb 的羧基与能引入与 R_4 不同或相同的保护基的试剂反应，得到式 IVa 或 IVb 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 为保护基，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是与 R_4 不同或相同的保护基，

在第三步中，使式 IVa 或 IVb 的羧酸与能在不导致除去保护基 R_5 和 R_6 的条件下除去保护基 R_4 的试剂反应，得到式 IVa 或 IVb 的羧酸，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， R_4 是氢，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基，

在第四步中，将式 IVa 或 IVb 的羧酸进行大环内酯化反应，得到式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义， A 是 O，且 R_5 是 H 或 R_5 和 R_6 是保护基，

在第五步中，使式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素与能除去保护基 R_5 和 R_6 的试剂反应，得到式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 A 是 O，

将该式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素任选进一步转化成式 Ia 或 Ib 的埃坡霉素，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 Z 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，且 A 是 NR_7 ，其中 R_7 是氢或低级烷基。

保护基

如果一种或多种其它官能团，例如羧基、羟基、氨基或巯基在本文提及的化合物中被保护或需要被保护(因为它们不应该参与反应)，则这些基

团是经常在合成肽化合物、头孢菌素和青霉素以及核酸衍生物和糖类中使用的那些基团。

保护基团可以已经存在于前体中，并且应该保护所涉及的官能团以防止不需要的副反应，如酰化、醚化、酯化、氧化、溶剂解和类似的反应。保护基团的特征是它们本身易于(即没有不需要的副反应)通常通过溶剂解、还原、光解或还可通过酶活性例如在类似于生理条件的条件下除去，并且它们不存在于最终产物中。专业人士已知或可容易地建立：什么样的保护基适于此前和下文中提及的反应。

所述保护基对所述官能团的保护、保护基本身以及它们的除去反应描述在例如下列标准参考文献中：J. F. W. McOmie, “有机化学中的保护基”，Plenum Press, 伦敦和纽约 1973；T. W. Greene, “有机合成中的保护基”，Wiley, 纽约 1981；“肽”，第 3 卷(编辑：E. Gross 和 J. Meienhofer), Academic Press, 伦敦和纽约 1981；“有机化学方法”，Houben Weyl, 第 4 版，第 15/I 卷，Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974；H. -D. Jakubke 和 H. Jescheit, “氨基酸、肽、蛋白质”，Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach 和 Basel 1982；以及 Jochen Lehmann, “碳水化合物化学：单糖及其衍生物”，Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。

R_5 可以是与 R_4 不同或相同的保护基。当两个保护基相同时，这些基团必须表示可顺序地从式 I 化合物中裂除的保护基，即对这些基团必须存在这样的反应条件：允许 R_4 被 H 或其它保护基替代而在该反应条件下保护基 R_5 保留在式 I 化合物中。

埃坡霉素 B 向相应的内酰胺的转化公开在 WO 99/02514 的方案 21(第 31 和 32 页)和实施例 3(第 48-50 页)中。不同于埃坡霉素 B 的式 I 化合物向相应的内酰胺的转化可类似地进行。其中 R_4 是低级烷基的式 I 的相应埃坡霉素衍生物可通过本领域中已知的方法制备，例如由其中 R_4 是氢的埃坡霉素衍生物开始的还原性烷基化反应来制备。

额外方法步骤

在根据需要进行的额外方法步骤中，不应该参与反应的起始化合物的官能团可以以未保护形式存在或者可例如被一种或多种以上在“保护基”下所提及的保护基保护。然后，根据其中描述的方法之一将这些保护基全部或部分除去。

式 I 化合物与成盐基团的盐可以以本身已知的方式制备。式 I 化合物的酸加成盐因此可通过用酸或用合适的阴离子交换剂处理而获得。

通常可将盐转化成游离化合物，例如通过用合适的碱性试剂、例如用碱金属碳酸盐、碱金属碳酸氢盐或碱金属氢氧化物、典型的是用碳酸钾或氢氧化钠处理来转化。

立体异构混合物、例如非对映体混合物可以以本身已知的方式借助合适的分离方法分离成它们的相应异构体。非对映体的混合物例如可借助分步结晶、色谱法、溶剂分配和类似工序分离成它们的各对映体。该分离可在起始化合物阶段或在式 I 化合物本身中进行。对映体可通过形成非对映盐分离，例如通过与对映体纯的手性酸形成盐或借助色谱法，例如通过 HPLC、使用具有手性配体的色谱底物来分离。

应该强调的是，与该节中提及的转化类似的反应也可在合适的中间体阶段进行。

通用方法条件

这里描述的所有方法步骤都可在已知反应条件下、优选在特别提及的反应条件下进行，在无或通常有溶剂或稀释剂、优选在对所用试剂呈惰性且能溶解它们的那些溶剂或稀释剂存在下，在无或有催化剂、冷凝剂或中和剂、例如离子交换剂、通常是阳离子交换剂、例如 H^+ 形式的阳离子交换剂存在下，取决于反应的类型和/或反应剂，在降低的、正常或升高的温度下、例如在 $-100^{\circ}C$ 至约 $190^{\circ}C$ 、优选约 $-80^{\circ}C$ 至约 $150^{\circ}C$ 、例如 -80 至 $-60^{\circ}C$ 下、在室温下、在 -20 至 $40^{\circ}C$ 下或在所用溶剂的沸点下，在大气压下或在密闭容器中、合适的话在加压下和/或在惰性气氛中、例如在氩气或氮气中进行。

盐可存在于所有起始化合物和中间体中,如果它们含有成盐基团的话。盐还可存在于这类化合物的反应过程中,前提是该反应不受该盐干扰。

在所有反应阶段中,可将产生的异构混合物分离成它们的各异构体,例如非对映体或对映体,或者分离成各异构体的任何混合物、例如外消旋物或非对映体混合物,这通常如在“额外工艺步骤”下所述。

可从中选择的适用所述反应的溶剂包括例如水;酯类,通常为低级链烷酸的低级烷基酯,例如乙酸乙酯;醚类,通常为脂族醚、例如乙醚或环醚、例如四氢呋喃;液体芳族烃类,通常为苯或甲苯;醇类,通常为甲醇、乙醇或者1-或2-丙醇;腈类,通常为乙腈;卤代烃类,通常为二氯甲烷;酰胺类,通常为二甲基甲酰胺;碱类,通常为杂环氮碱、例如吡啶;羧酸,通常为低级链烷羧酸、例如乙酸;羧酸酐,通常为低级链烷羧酸酐、例如乙酸酐;环状、直链或支链烃类,通常为环己烷、己烷或异戊烷,或这些溶剂的混合物、例如水溶液,但对该方法的描述中另有说明的除外。这类溶剂混合物还可用于通过色谱法或分配的处理中。

本发明还涉及该方法的如下形式:其中从可在任何阶段以中间体获得化合物开始并进行缺失步骤或在任何阶段中断该方法,或者在反应条件下生成起始原料,或者使用呈反应性衍生物起始原料或盐形式的所述起始原料,或者产生可借助本发明方法获得的化合物并就地处理所述化合物的方法。在优选实施方案中,从这样的起始化合物开始:即生成以上所述优选的、特别是尤其优选的、主要是优选的和/或首要优选的化合物的起始物质。

在优选实施方案中,式I化合物依照后类似于各实施例中限定的方法和方法步骤来制备。

包括其盐在内的式I化合物也可以以水合物形式获得,或它们的晶体可包括例如结晶用溶剂(以溶剂合物存在)。

药物制剂、方法和用途

本发明还涉及药物组合物,其包含式I化合物作为活性成分并且可尤其用于治疗本文提及的疾病。尤其优选对温血动物、尤其是人经肠施用如

鼻、口含、直肠或者尤其是口服施用和肠胃外施用如静脉内、肌肉或皮下施用的组合物。该组合物包含单独的活性成分或优选还包含可药用载体。活性成分的剂量取决于所要治疗的疾病和物种、年龄、体重和个体条件、个体药物代谢动力学数据和施用方式。

本发明还涉及用于预防性或尤其是治疗性调节人或温血动物的方法中的药物组合物、它们(尤其是用于治疗肿瘤的组合物形式)的制备方法以及治疗肿瘤疾病、尤其是此前提及的那些疾病的方法。

药物制剂含有约 0.000001% 至 95% 的活性成分, 因此单剂施用形式优选含有约 0.00001% 至 90% 的活性成分, 而多剂施用形式在肠胃外施用制剂的情况下优选含有约 0.0001% 至 0.5% 的活性成分, 或者在经肠施用制剂的情况下优选含有 1% 至 20% 的活性成分。单位剂量形式例如有包衣和未包衣片剂、安瓿剂、小瓶剂、栓剂或胶囊剂。其它剂量形式例如是软膏剂、霜剂、糊剂、泡沫剂、酏剂、唇膏剂、滴剂、喷雾剂、分散体等。剂量单位形式如包衣片剂、片剂或胶囊剂含有约 0.0025g 至约 0.1g 活性成分。

本发明的药物制剂以本身已知的方式制备、例如通过常规的混合、制粒、包衣、溶剂或冻干方法制备。

优选使用活性化合物的溶液, 以及还有混悬液或分散体、尤其是等渗水溶液、分散体或混悬液, 它们例如在仅仅含有活性成分或还含有载体的冻干制剂的情况下在使用之前制备。药物制剂可以是经灭菌的和/或可含有赋形剂, 例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、增溶剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂, 并且通过本身已知的方式制备, 例如通过常规的溶解或冻干方法制备。所述溶液或混悬液可含有增加粘度的试剂或还有增溶剂。

在油中的混悬液含有作为油组分的常用于注射目的的植物、合成或半合成油。关于此, 可特别提及含有作为酸组分的具有 8-22 个碳原子的长链脂肪酸的液体脂肪酸酯。这些脂肪酸酯的醇组分具有最多 6 个碳原子, 且为一元或多元醇, 例如是一元、二元或三元醇、尤其是乙二醇和甘油。

用于口服施用的药物组合物可例如通过将活性成分与一种或多种固体载体混合、如果需要将所得混合物制粒, 并且如果需要加工所得混合物或

颗粒形成片剂或片芯，如果需要通过引入额外赋形剂进行。

可口服施用的药物组合物还包括由明胶组成的硬胶囊以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨糖醇组成的软密封胶囊。在软胶囊中，活性成分优选溶解或悬浮在合适的液体赋形剂中，还可向其中加入稳定剂和清洁剂。

合适的可经直肠施用的药物制剂例如是由活性成分和栓剂基质组合而构成的栓剂。

适于肠胃外施用的制剂主要是水溶性形式、例如水溶性盐形式的活性成分的水溶液(例如在生理盐水中，可通过稀释聚乙二醇中的溶液获得)，或含有增稠剂和需要的话稳定剂的可注射水悬液。如果需要的话，活性成分以及赋形剂还可呈冻干物的形式。溶液如例如用于肠胃外施用的那些还可用作输注溶液。

本发明同样涉及一种治疗上述病理状况之一、尤其是相应的肿瘤性疾病的过程或方法。将式 I 化合物就此或尤其以药物组合物的形式预防性地或治疗性地、优选以对所述疾病有效的量施用于需要这种治疗的温血动物、例如人。对于体重为约 70kg 的个体而言，所施用的日剂量为约 0.001g 至约 0.5g、优选约 0.005g 至约 0.25g 本发明化合物。

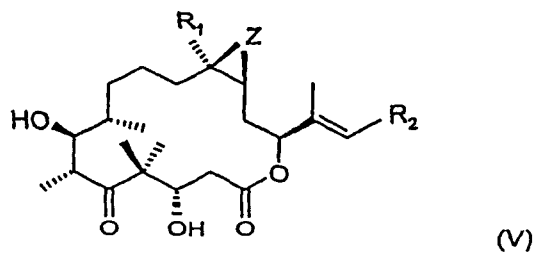
起始原料

新起始原料和/或中间体以及它们的制备方法同样是本发明的主题。在优选实施方案中，所使用的这些起始原料和所选择的反应条件应使得能获得优选化合物。

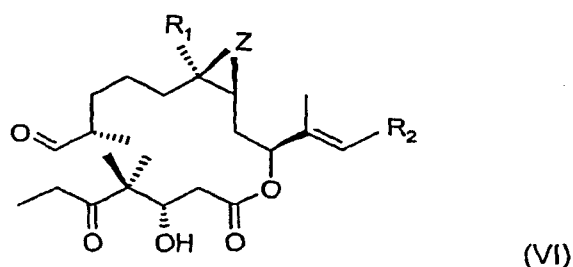
式 II 和 III 的起始原料是已知的、市购可得或者可以以类似于或根据本领域中已知的方法合成。

其中 R_1 是氢或未取代或被羟基、低级酰氧基、低级烷氧基、卤素、氨基、低级烷基氨基、二-低级烷基氨基、低级酰基氨基取代的低级烷基； R_2 是未取代或取代的杂芳基；Z 是 O 或键的式 II 的醛可通过例如下列方法获得：

其中首先使式 V 的埃坡霉素，



其中基团 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 II 化合物所给出的含义，
与进行逆羟醛缩合反应的试剂反应，得到式 VI 的酯，

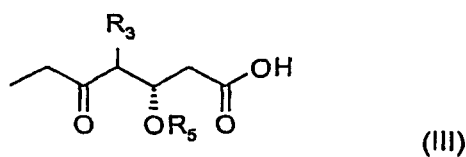


其中基团 R_1 、 R_2 和 Z 具有如上对式 II 化合物所给出的含义，

在第二步中，使该酯水解成它的组分，即 4,4-二甲基-3-羟基-5-氧代-庚酸和如上定义的式 II 的醛。

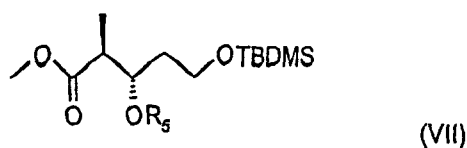
适于作为制备式 II 的醛的起始原料的式 V 的埃坡霉素(见上)公开在 J. Org. Chem.(2002, 67, 7730-7736)、WO 93/10121、WO 97/19086、WO 98/38192、WO 98/08849、WO 98/25929、WO 98/22461、WO 99/65013、WO 99/02514、WO 99/01124、WO 99/43653、WO 99/07692、WO 99/67252、WO 99/67253、WO 00/37473、WO 00/31247 和 US 6,194,181 中，在各种情况下尤其是化合物权利要求和工作实施例的最终产物。各权利要求和各实施例的最终产物的主题据此引入本申请作为参考。同样包括的还有相应的立体异构体以及相应的晶体变体，例如其中公开的溶剂合物和多晶型物。

式 III 的乙基酮，



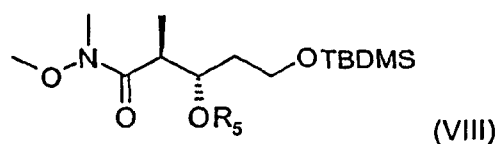
其中 R_5 是保护基且 R_3 具有如上对式 I 化合物所给出的含义，该化合物可例如按 WO 99/07692 的第 20-26 页或 JP3048641 中所述制备。

其中 R_3 是甲基、 R_5 是 TBDMS 且在 4 位上的立构中心具有(S)-构型的式 III 的乙基酮可从式 VII 的羧酸酯开始来制备,



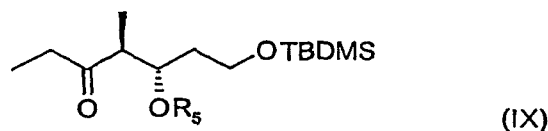
其中 R_5 表示 TBDMS(按 S. Ali 和 G. Georg 在 Tetrahedron Letters 38, 10, 1997, 1703-1706, 方案 2 中所述制备)。

在第一步中, 将其中 R_5 表示 TBDMS 的式 VII 的羧酸酯转化成其中 R_5 代表 TBDMS 的式 VIII 的酰胺,



所述转化通过在等量的三乙基铝存在下于 -10°C 至 $+10^{\circ}\text{C}$ 、例如约 0°C 下在合适的溶剂如甲苯或苯中与 N,O-二甲基盐酸羟胺反应而进行。

然后在第二步中, 将所获得的其中 R_5 表示 TBDMS 的式 VIII 的酰胺在本身已知的条件下采用乙基溴化镁或乙基锂进行格利雅反应, 例如将格利雅试剂在乙醚或四氢呋喃中的溶液在约 0°C 温度下滴加到式 VIII 的酰胺在同一溶剂中的溶液中, 在该方法中, 可将反应混合物温热确定的时间或可加入碘以启动反应。在约 0.5-3 小时、例如在约 1 小时之后停止格利雅反应, 得到式 IX 的酮,

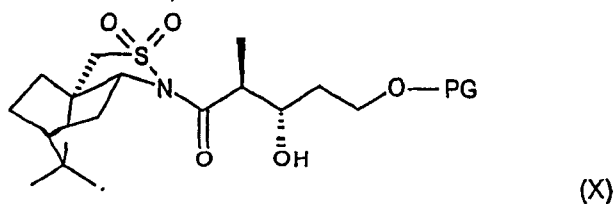


其中 R_5 表示 TBDMS。

然后将所得的式 IX 的酮用 Jones 试剂在合适的溶剂例如丙酮中、在约 -5°C 至 $+5^{\circ}\text{C}$ 、例如 0°C 温度下根据已知程序进行氧化(参见 J. Mulzer 等人, J. Org. Chem. 1996, 61, 566-572), 得到所需的式 III 的乙基酮, 其中 R_3 是甲基, R_5 是 TBDMS, 在 4 位上的立构中心具有(S)-构型。

另一种获得式 VIII 中间体的合成路线是在第一步中用 Oppolzer-N-丙

酰基-磺内酰胺进行逆羟醛型反应开始，得到式 X 的磺内酰胺，



(制备描述在 Oppolzer 等人, THF 34, 4321(1993)中), 式 X 化合物可通过 Weinreb 酰胺化和随后的乙基锂或乙基溴化镁加成而转化成式 VIII 中间体。

此外, 本发明还涉及一种将埃坡霉素 G2 与 C4-脱甲基埃坡霉素 B 分离的方法, 其特征在于使用含有低级烷烃、尤其是己烷和低级链烷醇、尤其是 2-丙醇的洗脱剂在 Chiralpak-AD 柱上进行色谱分离。

另外, 本发明还涉及一种制备 C4-脱甲基-埃坡霉素 B 的方法, 其包括如下步骤:

a) 在用于以生物技术制备埃坡霉素的培养基中浓缩埃坡霉素, 该培养基含有适于制备埃坡霉素的微生物、水和其它合适的培养基的常用成分, 由此向培养基中添加环糊精或环糊精衍生物, 或两种或更多种这些化合物的混合物;

b) 将埃坡霉素彼此分离, 其特征在于使用含有低级烷基氰的洗脱剂在反相柱上进行色谱分离, 其中色谱分离在载有烃链的柱材料上进行, 并使用含有低级烷基腈的洗脱剂, 且其中如果需要的话, 可进行进一步处理步骤和提纯步骤; 以及

c) 最后通过使用含有低级烷烃、尤其是己烷和低级链烷醇、尤其是 2-丙醇的洗脱剂在 Chiralpak-AD 柱上进行色谱分离将埃坡霉素 G2 与 C4-脱甲基-埃坡霉素分离。

实施例

下列实施例用于阐述本发明而并不限制本发明的范围。温度以摄氏度测定。除非另有说明, 否则反应在室温下进行。

缩写

d	天
DMSO	二甲亚砜
EA	乙酸乙酯
FC	闪蒸色谱法
Me	甲基
MS	质谱法
rpm	每分钟的转数
RT	室温
TBDMS	叔丁基-二甲基甲硅烷基
THF	四氢呋喃
v	体积

通用方法：将硅藻土 60(40-63 μ m)用于闪蒸色谱分离，而将得自 E. Merck(Darmstadt, 德国)的 DC 60F₂₅₄-板用于薄层色谱分离。所有试剂都购自 Fluka(Buchs, 瑞士)。

实施例 1: 通过发酵制备 C4-脱甲基-埃坡霉素 B

将来自 500 升 WO 99/42602 的实施例 2D 中描述的主培养基的 450 升体积的收获物使用 SA-20-06 型 Westfalia 澄清分离器(rpm=6500)分离成液相(离心液+冲洗水=650 升)和固相(细胞=约 15kg)。大部分埃坡霉素发现存在于离心液中，经离心的细胞浆含有<15%的确定的埃坡霉素部分，并且不经进一步处理。然后将 650 升离心液置于 4000 升搅拌容器中，与 10 升 Amberlite XAD-16(离心液：树脂体积=65:1)混合并搅拌。在接触约 2 小时之后，在 Heine 溢流离心机中离心掉树脂(篮内容物 40 升；rpm=2800)。从离心机中取出树脂并用 10-15 升去离子水洗涤。通过将树脂分两批、每批用 720 升甲苯分 4 次搅拌约 8 小时，将 591.7kg 负载树脂(载有来自培养基的埃坡霉素的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物树脂 XAD-16)解吸附。甲苯相与

树脂的分离使用吸滤器进行。将合并的甲苯相分两批、每批用 250 升水洗涤。在相分离之后，将甲苯萃取液在 1000 升反应器中浓缩至约 20-40 升，之后在真空下在旋转蒸发器中浓缩至干。将甲苯萃取物溶解在 16.5 升甲醇和 24.5 升环己烷中。在添加 0.8 升水之后，立即进行相分离。将甲醇级分在真空下在旋转蒸发器中蒸发至干。之后将甲醇萃取物在由 2.05 升丙醇和 10.25 升环己烷组成的溶剂混合物中结晶，得到 0.4kg 结晶物。将晶体溶解在 3.2 升乙腈/水=2/3(v/v)中，并将所得进料溶液分 3 批转移到制备型反相柱(25kg RP-18 球形硅胶, YMC-Gel ODS-A 120; 5-15Rm; Waters Corp., Milord, Massachusetts, USA)上。使用乙腈/水=2/3(v/v)作为流动相以 2.7 升/分钟的流速进行洗脱; C4-脱甲基-埃坡霉素 B 和埃坡霉素 G2 的保留时间为 58-65 分钟。使用 UV 检测器在 250nm 处监测馏分。蒸馏保留时间为 58-65 分钟的合并级分中的乙腈，得到 C4-脱甲基-埃坡霉素 B 和埃坡霉素 G2 的混合物。将 3g 该混合物在含有 2.0kg 涂在硅胶上的直链淀粉三-(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯(Chiralpak-AD[®]))的制备柱(40cm x 1cm I.D.)上分 3 批(1g/次; 将混合物溶解在 20ml 己烷和 20ml 2-丙醇中)分离为它的组分。使用己烷/2-丙醇 9/1(v/v)作为流动相以 400ml/分钟的流速在室温下进行洗脱。在 249nm 处进行 UV 检测。C4-脱甲基-埃坡霉素 B 在 90-110 分钟洗脱。合并相应级分并在真空下在 40℃下蒸发至干，并将所得蒸发残余物在相同条件下再次色谱分离 2 次，得到至少 71mg C4-脱甲基-埃坡霉素 B，纯度>97%; ¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆; δ/ppm) 7.31(s, 1H, H19), 6.51(s, 1H, H17), 5.26(d, 9.5Hz, 1H, H15), 5.02(d, 4.8Hz, 1H, 3-OH), 4.42(d, 6.6Hz, 1H, 7-OH), 4.31(m, 1H, H3), 3.47(dd, 9.7Hz, 6.8Hz, 1H, H7), 3.14(m, 1H, H4), 2.89(m, 1H, H6), 2.84(dd, 9.9Hz, 3.3Hz, 1H, H13), 2.63(s, 3H, 21-Me), 2.25(dd, 14.9Hz, 10.5Hz, 1H, H2), 2.10(dd, 14.9Hz, 2.6Hz, 1H, H2), 2.08(s, 3H, 16-Me), 2.05(m, 1H, H14), 1.76(m, 1H, H14), 1.50(m, 1H, H11), 1.40(m, 1H, H10), 1.34(m, 1H, H11), 1.32(m, 1H, H9), 1.29(m, 1H, H8), 1.16(s, 3H, 12-Me), 1.13(m, 1H, H10), 1.11(d, 7.0Hz, 3H, 6-Me), 1.05(m, 1H, H9), 0.93(d, 6.60Hz, 3H, 8-Me), 0.89(d, 7.0Hz, 3H, 4-Me); ESI+ MS:

$[M+H]^+$: 494 D; $[M+Na]^+$: 516 D.

实施例 2: (2S,6R,7S,9S)-6,7-环氧-9-羟基-2,6,10-三甲基-11-(2-甲基-4-噻唑基)-十一碳-10-烯-1-醛

将 300mg(0.6mmol)来自步骤 2.1 的化合物和 0.5g 固定在 Eupergit C(Fluka; 839 U/g)上的猪肝酯酶悬浮在 200ml 1N 磷酸盐缓冲剂(pH=7)中并搅拌 3 天。将产物用乙酸乙酯萃取,并借助 FC(150g 硅胶, $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2/丙酮=4:1$)提纯,得到所需醛,为无色油: $R_f(CH_2Cl_2/丙酮=85:15)$: 0.36; $M+H=338$; $^1H-NMR(500MHz, DMSO-d_6; \delta/ppm)$: 9.55(d, 1.5Hz, 1H, CHO), 7.29(s, 1H, H19), 6.44(1s, 1H, H17), 5.1(d, 5.5Hz, 1H, 15-OH), 4.10(m, 1H, H15), 2.81(m, 1H, H13), 2.63(s, 3H, 20-Me), 2.36(m, 1H, H8), 1.18(s, 3H, 12-Me), 0.99(d, 6Hz, 3H, H9).

步骤 2.1: (3S)-4,4-二甲基-3-羟基-5-氧代-庚酸((2S,6R,7S,9S)-6,7-环氧-2,6,10-三甲基-11-(2-甲基-4-噻唑基)-十一碳-10-烯-1-醛-9-基)酯

将 0.5g(0.99mmol)埃坡霉素 B 溶解在 84ml CH_2Cl_2 中。在添加 43 μ l(0.44mmol)吡啶和 127 μ l(0.44mmol)异丙醇钛(titanium isopropylate)之后,将反应溶液在室温下搅拌 16 小时。在真空浓缩之后,将产物通过 FC(150g 硅胶, $CH_2Cl_2 \rightarrow CH_2Cl_2/丙酮=4:1$)提纯,得到无色油: $R_f(CH_2Cl_2/丙酮=85:15)$: 0.57; $M+H=508$; $^1H-NMR(500MHz, DMSO-d_6; \delta/ppm)$: 9.56(d, 1.5Hz, 1H CHO), 7.37(s, 1H, H19), 6.45(s, 1H, H17), 5.31(m, 1H, H15), 5.10(d, 5.5Hz, 1H, 3-OH), 4.13(m, 1H, H3), 2.74(m, 1H, H13), 2.64(s, 3H, 20-Me), 2.53(t, 7.5Hz, 2H, H6), 2.36(m, 1H, H8), 2.4/2.21(m/m, 2H, H2), 2.06(s, 3H, 16-Me), 1.98/1.77(m/m, 2H, H14), 1.67/1.34(m/m, 2H, H9), 1.45(m, 2H, H10), 1.18(s, 3H, 4-Me), 1(s/s/s, 9H, 4-Me, 8-Me, 12-Me), 0.87(t, 7.5Hz, 3H, 6-Me).

实施例 3: (2S,6R,7S,9S)-6,7-环氧-9-羟基-2,10-二甲基-11-(2-甲基-4-噻唑基)-

十一碳-10-烯-1-醛

将 550mg(1.12mmol)来自步骤 3.1 的化合物溶解在 200ml 乙腈和 2ml 2N NaOH 的混合物中,并搅拌 3 天.将产物用乙酸乙酯萃取并通过 FC(150g 硅胶, CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/丙酮=4:1)提纯, 得到所需的醛, 为无色油: R_f(CH₂Cl₂/丙酮=85:15): 0.27; M+H=324; ¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆; δ/ppm): 9.56(d, 1.5Hz, 1H, CHO), 7.29(1s, 1H, H19), 6.45(s, 1H, H17), 5.11(d, 5.5Hz, 15-OH), 4.13(m, 1H, H15), 3.0(m, 1H, H13), 2.87(m, 1H, H12), 2.63(s, 3H, 20-Me), 2.36(m, 1H, H8), 1.69(m, 2H, H14), 0.99(d, 6Hz, 3H, H9).

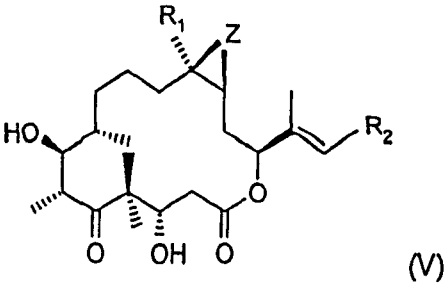
步骤 3.1: (3S)-4,4-二甲基-3-羟基-5-氧代-庚酸((2S,6R,7S,9S)-6,7-环氧-2,10-二甲基-11-(2-甲基-4-噻唑基)-十一碳-10-烯-1-醛-9-基)酯

将 1g(2.03mmol)埃坡霉素 A 溶解在 168ml CH₂Cl₂ 中。在添加 86μl (0.88mmol)哌啶和 254μl(0.88mmol)异丙醇钛之后,将反应溶液在室温下搅拌 16 小时。在真空下浓缩之后,将产物通过 FC(200g 硅胶, CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/丙酮=4:1)提纯, 得到无色油: R_f(CH₂Cl₂/丙酮=85:15): 0.55; M+H=494.

实施例 54:

其中 R₄ 是 H 的下列式 II 的醛可使用实施例 2 和 3 中描述的程序并使用表 1 中列出的式 V 化合物代替埃坡霉素 A 或 B 作为起始原料来制备。

表 1

实施例	 (V)			式 II 的醛, R ₁ = H		
	R ₁	R ₂	Z	R ₁	R ₂	Z
4.1	Me	2-乙基-4-噻唑基	O	Me	2-乙基-4-噻唑基	O
4.2	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O
4.3	Me	2-甲基-4-噁唑基	O	Me	2-甲基-4-噁唑基	O
4.4	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
4.5	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
4.6	Me	5-甲基-2-吡啶基	O	Me	5-甲基-2-吡啶基	O
4.7	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
4.8	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
4.9	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O
4.10	Me	2-甲基-4-噻唑基	键	Me	2-甲基-4-噻唑基	键
4.11	H	2-乙基-4-噻唑基	O	H	2-乙基-4-噻唑基	O
4.12	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O
4.13	H	2-甲基-4-噁唑基	O	H	2-甲基-4-噁唑基	O
4.14	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
4.15	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
4.16	H	5-甲基-2-吡啶基	O	H	5-甲基-2-吡啶基	O
4.17	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
4.18	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
4.19	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O
4.20	H	2-甲基-4-噻唑基	键	H	2-甲基-4-噻唑基	O
4.21	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键

实施例 5: TBDMS-醚

其中 R₁ 是 TBS 的式 II 的醛可根据 WO 00/37473 的实施例 1c 中描述的程序、使用由实施例 4 中获得的式 II 的醛作为起始原料来获得。

	式II的醛, R ₁ =H, 来自实施例4.1-4.21 和实施例2和3			式II的醛, R ₁ =TBS		
实施例	R ₁	R ₂	Z	R ₁	R ₂	Z
5.1	Me	2-乙基-4-噻唑基	O	Me	2-乙基-4-噻唑基	O
5.2	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O
5.3	Me	2-甲基-4-噁唑基	O	Me	2-甲基-4-噁唑基	O
5.4	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
5.5	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
5.6	Me	5-甲基-2-吡啶基	O	Me	5-甲基-2-吡啶基	O
5.7	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
5.8	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
5.9	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O
5.10	Me	2-甲基-4-噻唑基	键	Me	2-甲基-4-噻唑基	键
5.11	H	2-乙基-4-噻唑基	O	Me	2-乙基-4-噻唑基	O
5.12	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O
5.13	H	2-甲基-4-噁唑基	O	H	2-甲基-4-噁唑基	O
5.14	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
5.15	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
5.16	H	5-甲基-2-吡啶基	O	H	5-甲基-2-吡啶基	O
5.17	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
5.18	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
5.19	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O
5.20	H	2-甲基-4-噻唑基	键	H	2-甲基-4-噻唑基	键
5.21	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键
5.22	Me	2-甲基-4-噻唑基 (来自实施例2)	O	Me	2-甲基-4-噻唑基	O
5.23	H	2-甲基-4-噻唑基 (来自实施例3)	O	H	2-甲基-4-噻唑基	O

实施例6: (3S,4S)-3-叔丁基-二甲基甲硅烷氧基-4-甲基-5-氧化-庚酸

该标题化合物可通过使用实施例2.1中描述的程序以来自实施例1的标题化合物作为起始原料来获得。该第一阶段产物的游离羟基可通过实施例5中描述的反应程序转化成相应的 TBDMS 醚。在与固定在 Eupergit

C(Fluka; 839 U/g)上的猪肝酯酶在 1N 磷酸盐缓冲剂(pH=7)中反应之后, 改变后处理程序, 以获得标题化合物而不是醛。

实施例 7: 4,8-二羟基-5,5,7,9,13-五甲基-16-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-氧杂环十六碳-13-烯-2,6-二酮(参比例)

将 0.175ml 三氟乙酸在 5 分钟内于 -20℃ 下滴加到 0.041g 步骤 7.3 的被保护的內酯在 0.7ml CH₂Cl₂ 中的溶液中, 随后将该溶液于 0℃ 下搅拌 1 小时。然后通过蒸发浓缩该溶液, 并将所得残余物通过 FC 在 CH₂Cl₂/甲醇 (100/1 → 100/2) 中提纯。获得标题化合物, 为无色树脂; ESI-MS: 502(M+H)⁺。 ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz), δ(ppm vs. TMS): 7.99(s, 1H); 7.80(d, 1H); 7.36(d, 1H); 5.92(d, d, 1H); 5.15-5.26(m, 1H); 4.21(d, d, 1H); 3.75(t, 1H); 3.1-3.23(m, 1H); 2.84(s, 3H); 1.70(s, ~ 3H)。 [α]_D = -77.39° (c=0.115, 在 CHCl₃ 中)。

步骤 7.1: 羧酸

将 3.41ml 正丁基锂在 THF 中的 1.6M 溶液在 15 分钟内于 0℃ 下滴加到 0.771ml N,N-二异丙基-乙基胺在 6ml THF 中的溶液中。将该溶液于 -4℃/-5℃ 下搅拌 10 分钟, 然后冷却至 -78℃。在该温度下, 添加 0.660g 4,4-二甲基-3-(叔丁基-二甲基甲硅烷氧基)-5-氧代-庚酸的溶液, 然后使该溶液温热至 -40℃ 达 15 分钟, 随后再次冷却至 -78℃。随后添加 0.608g 实施例 5.21 的醛在 THF 中的 3ml 溶液, 并将该溶液在 -78℃ 下搅拌 30 分钟。通过添加 7ml 饱和 NH₄Cl 水溶液停止反应, 加热至室温后, 将该溶液与 0.513ml 乙酸混合, 并用 EA 萃取。将合并的有机萃取液经 Na₂SO₄ 干燥, 蒸发溶剂并将剩余的油状残余物通过 FC 在甲苯/EA(1/1) 中提纯。将得到的羧醛产物溶解在 40ml CH₂Cl₂ 中, 并将该溶液与 0.435ml 2,6-二甲基吡啶混合。在冷却至 0℃ 后, 添加 0.720ml TBS 三氟甲磺酸盐, 并将混合物在 0℃ 下搅拌 2.5 小时。在添加 8ml 20% 柠檬酸之后, 分离有机相, 将水相用 CH₂Cl₂ 反萃取, 经 Na₂SO₄ 干燥并蒸发溶剂。将剩余的油溶解在 20ml 甲醇中, 将溶

液与 2.0g K_2CO_3 和 1ml 水混合，并将混合物在室温下搅拌 90 分钟。滤出未溶解的组分，使用 Dowex50Wx8 离子交换树脂(非常酸性的阳离子交换剂，含有作为活性基团的磺酸基，苯乙烯基质含有 8%DVB 作为交联剂，Dowex[®]是 Dow Chemical Co.的商标)将滤液的 pH 值调节至 4.5，滤出树脂并通过蒸发浓缩新滤液。将残余物分配在 20ml CH_2Cl_2 和 20ml 饱和 NH_4Cl 水溶液中，分离有机相，将水溶液用 CH_2Cl_2 反萃取，将合并的有机萃取液经 Na_2SO_4 干燥并通过蒸发浓缩。将如此获得的油通过 FC 在 $CH_2Cl_2/MeOH(99/1 \rightarrow 99/2)$ 中提纯。将得到的物质再一次进行上述的甲硅烷基化/脱甲硅烷基化，最后获得纯的标题化合物，为油状物；ESI-MS: $862.4(M+H)^+$ 。

步骤 7.2: 羧基酸

将 1.85ml 四丁基氟化铵的 1M 溶液添加到 0.265g 步骤 7.1 的羧酸在 6ml THF 中的溶液中，并在室温下搅拌 6 小时。随后，添加 8ml EA 和 7ml 20% 柠檬酸，分离有机相，并将水溶液用 EA 反萃取。将合并的有机萃取液经 Na_2SO_4 干燥并蒸发溶剂之后获得的油状残余物通过 FC 在 $CH_2Cl_2/甲醇(98/2 \rightarrow 97/3)$ 中提纯。得到 17，为油状物。

ESI-MS: $748.3(M+H)^+$ 。 $^1H-NMR(CDCl_3, 200MHz)$, 5(ppm vs. TMS): 8.23(d, 1H); 7.76(d, 1H); 7.40(d, d, 1H); 5.24(t, 1H); 4.73-4.84(m, 1H); 4.45(t, 1H); 3.67-3.74(m, 1H); 3.10-3.22(m, 1H); 2.82(s, 3H); 1.75(s, 3H); 1.14(d, 3H); 1.08(d, 3H); 0.80-0.95(m, 24H); 0.10(s, 3H); 0.05(s, 3H); 0.04(s, 3H); 0.01(s, 3H)。

步骤 7.3: 4,8-双-(叔丁基-二甲基甲硅烷氧基)-5,5,7,9,13-五甲基-16-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-氧杂环十六碳-13-烯-2,6-二酮

将 0.0866ml 三乙胺和 0.0677ml 2,4,6-三氯苯甲酰氯(Aldrich, Buchs, 瑞士)添加到已经冷却至 $0^\circ C$ 的 0.216g 步骤 7.1 的羧酸在 3ml THF 中的溶液中，并将该溶液在 $0^\circ C$ 下搅拌 1 小时。随后将该溶液在室温下在 5 分钟内

滴加到 0.354g N,N-二甲基氨基吡啶在甲苯中的溶液中,并在室温下搅拌 15 小时。将通过于 35℃下蒸发浓缩悬浮液之后获得的固体残余物悬浮在 30ml 己烷/乙醚 3/2 中、过滤并将过滤残余物洗涤两次,每次使用 15ml 相同的溶剂混合物。将合并的滤液蒸发至干,并将固体残余物通过 FC 在甲苯/丙酮(100/1.25→100/5 或 100/1→100/4)中提纯两次,得到标题化合物,为无色树脂; ESI-MS: 730(M+H)⁺。 ¹H-NMR(CDCl₃, 200MHz), δ(ppm vs. TMS): 7.97(s, 1H); 7.79(d, 1H); 7.37(d, 1H); 5.59(d, 1H); 5.25(t, 1H); 3.93-4.0(m, 1H); 3.90(d, 1H); 2.85(s, 3H); 1.71(s, 3H)。 [α]_D²⁰ = -60.72° (c=0.415, 在 CHCl₃ 中)。

实施例 8-30: C4-脱甲基-埃坡霉素

式 I 的 C4-脱甲基-埃坡霉素可根据实施例 7 中描述的程序、使用来自实施例 5 的醛和来自实施例 6 中的庚酸制备。

		式 I 的 C4-脱甲基-埃坡霉素, 其中 A 是 O, R ₃ 是低级烷基, 且 R ₅ 和 R ₆ 是氢		
实施例	来自下列实施例的醛	R ₁	R ₂	Z
8	5.1	Me	2-乙基-4-噻唑基	O
9	5.2	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O
10	5.3	Me	2-甲基-4-噁唑基	O
11	5.4	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
12	5.5	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
13	5.6	Me	5-甲基-2-吡啶基	O
14	5.7	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
15	5.8	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
16	5.9	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O
17	5.10	Me	2-甲基-4-噻唑基	键
18	5.11	H	2-乙基-4-噻唑基	O
19	5.12	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O
20	5.13	H	2-甲基-4-噁唑基	O
21	5.14	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
22	5.15	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O

23	5.16	H	5-甲基-2-吡啶基	O
24	5.17	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
25	5.18	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
26	5.19	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O
27	5.20	H	2-甲基-4-噻唑基	键
28	5.21	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键
29	5.22	Me	2-甲基-4-噻唑基	O
30	5.23	H	2-甲基-4-噻唑基	O

实施例 31: (缩醛反应步骤: 制备 C4-双降-EPO-B)

将由酵母还原(Mitsubishi Kasei Corp. JP3048641, 1991-03-03)获得的原位 TMS-二甲硅烷基化的 3-(R)-羟基-5-氧代-庚酸(2mmol)在 4ml 无水 THF 中的溶液冷却至-10℃, 并用 THF 中的 2.2 mmol LDA 处理。将该溶液搅拌 20 分钟, 然后冷却至-40℃。向该烯醇化锂中加入实施例 5.22 的经保护的醛(2.5 mmol)在无水 THF 中的溶液。

将反应混合物温热至-30℃并在该温度下保持 2-3 小时。最后, 将反应混合物用柠檬酸水溶液淬灭。分离有机相, 将水相用 EtOAc 萃取两次。将合并的有机相在真空下小心浓缩。将残余物溶解在 EtOAc 中并用水和盐水洗涤。将 EtOAc 相经无水 Na₂SO₄ 干燥, 并最终蒸发至干, 得到羟醛产物, 为粘稠油。

在如实施例 7 中所述类似的条件下, 将该产物通过在 OR₄ 处的选择性去保护和大环内酯化而进一步转化成所需的双降-埃坡霉素衍生物。

实施例 32: C4-双降-埃坡霉素

式 I 的 C4-双降-埃坡霉素可根据实施例 31 中所述的程序、使用实施例 5 的经保护的醛和实施例 31 的庚酸来制备。

		式 I 的 C4-双降-埃坡霉素, 其中 A 是 O, R ₃ 、R ₅ 和 R ₆ 是氢		
实施例	来自下列实施例的醛	R ₁	R ₂	Z
32	5.1	Me	2-乙基-4-噻唑基	O
33	5.2	Me	2-甲硫基-4-噻唑基	O
34	5.3	Me	2-甲基-4-噻唑基	O
35	5.4	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
36	5.5	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
37	5.6	Me	5-甲基-2-吡啶基	O
38	5.7	Me	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
39	5.8	Me	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
40	5.9	Me	2-氟甲基-4-噻唑基	O
41	5.10	Me	2-甲基-4-噻唑基	键
42	5.11	H	2-乙基-4-噻唑基	O
43	5.12	H	2-甲硫基-4-噻唑基	O
44	5.13	H	2-甲基-4-噻唑基	O
45	5.14	H	2-甲基-苯并噻唑-5-基	O
46	5.15	Me	2-甲基-苯并噻唑-6-基	O
47	5.16	H	5-甲基-2-吡啶基	O
48	5.17	H	2-氨基甲基-4-噻唑基	O
49	5.18	H	2-二甲基氨基-4-噻唑基	O
50	5.19	H	2-氟甲基-4-噻唑基	O
51	5.20	H	2-甲基-4-噻唑基	键
52	5.21	Me	2-甲基-苯并噻唑-5-基	键
53	5.22	Me	2-甲基-4-噻唑基	O
54	5.23	H	2-甲基-4-噻唑基	O

实施例 55: 干胶囊

按如下制备 3000 粒胶囊, 每粒含有 0.005g 上述实施例中提及的式 I 的 C4-脱甲基-埃坡霉素之一作为活性成分:

组成

活性成分	1.50g
乳糖	750.00g

Avicel PH 102(微晶纤维素)	300.00g
Polyplasdone XL(聚乙烯基吡咯烷酮)	30.00g
硬脂酸镁	9.00g

制备方法: 将活性成分过 30 号手动筛。将活性成分、乳糖、Avicel PH 102 和 Polyplasdone XL 在混合器中混合 15 分钟。使用足够的水(约 500ml)将混合物制粒, 在烘箱中于 35℃ 下干燥过夜并过 20 号筛。将硬脂酸镁过 20 号筛, 添加到制粒混合物中, 并将混合物在混合器中混合 5 分钟。将混合物包封在 0 号硬明胶胶囊中, 每粒含有的混合物量相当于含有 25mg 活性成分。

实施例 56: PEG 溶液

将 5mg 式 I 的 C4-脱甲基-埃坡霉素溶解在 98-100%丙二醇(1.0ml)中。将该溶液无菌过滤通过 0.22 微米孔径的滤膜, 并装入 1ml 安瓿中。填充的安瓿用于储存和运输。在静脉施用之前, 将安瓿中的内容物添加到 250-1000ml 5%葡萄糖的注射用水溶液中。

实施例 57:

式 I 的 C4-脱甲基-埃坡霉素作为微管解聚抑制剂的功效可通过上述试验程序来确定。试验化合物和猪微管蛋白(Batch #9)的最终试验浓度分别是 4 μ M 和 0.8mg/ml。

表 2

试验化合物	微管蛋白解聚(对照的%)
实施例 1	93.3
埃坡霉素 A(参比例)	76.5
埃坡霉素 B(参比例)	93.3
紫杉醇(参比例)	62.1

实施例 58

对抗肿瘤细胞的功效可按上述程序阐述。

表 3

细胞生长抑制	实施例 1	埃坡霉素 B(参比例)	紫杉醇(参比例)
KB-31, IC ₅₀ (nM)	0.49 ± 0.05	0.28 ± 0.04	3.76 ± 0.52
KB-8511, IC ₅₀ (nM)	0.80 ± 0.16	0.20 ± 0.04	739 ± 86