

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/48

A61K 9/20 A61K 9/14

A61K 38/00 A61K 38/28

A01N 37/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02805596.9

[43] 公开日 2004年5月5日

[11] 公开号 CN 1494420A

[22] 申请日 2002.3.1 [21] 申请号 02805596.9

[30] 优先权

[32] 2001.3.1 [33] US [31] 60/272,726

[32] 2001.8.24 [33] US [31] 60/314,783

[32] 2001.9.17 [33] US [31] 60/323,139

[86] 国际申请 PCT/US2002/006610 2002.3.1

[87] 国际公布 WO02/069937 英 2002.9.12

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.27

[71] 申请人 埃米斯菲尔技术公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 廖俊 D·克施内德纳

J·J·韦德纳 王乃方

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐晓峰

权利要求书7页 说明书28页

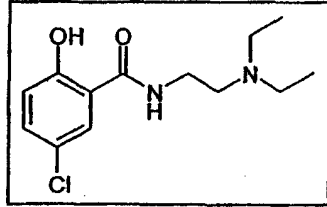
[54] 发明名称 释放活性成分的化合物和组合物

[57] 摘要

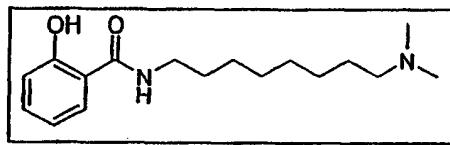
提供了用于释放活性成分的化合物和组合物。
还提供了给药和制备的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

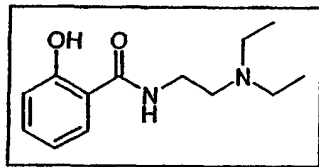
1、化合物，选自由化合物 1 - 18 及其盐组成的组：



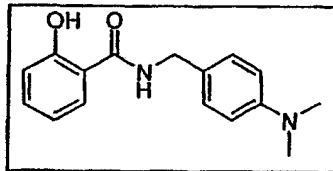
化合物 1



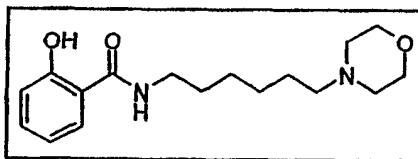
化合物 2



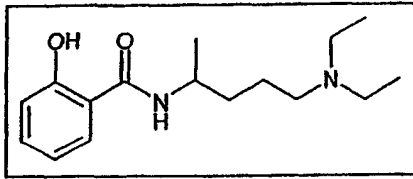
化合物 3



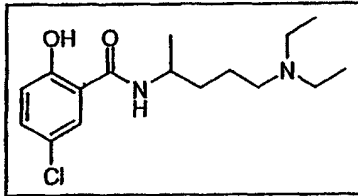
化合物 4



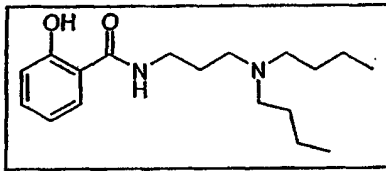
化合物 5



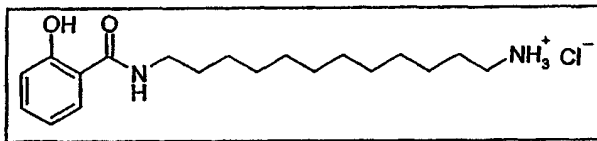
化合物 6



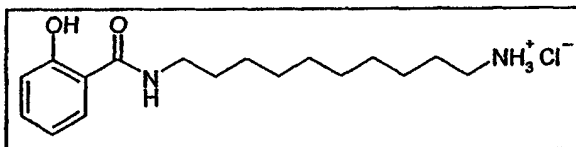
化合物 7



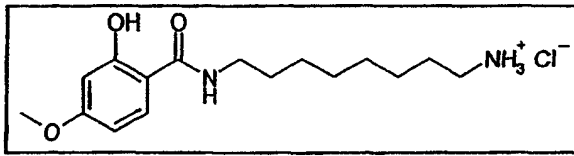
化合物 8



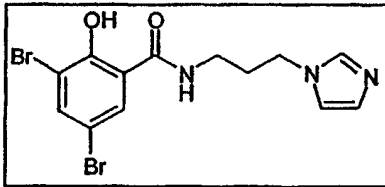
化合物 9



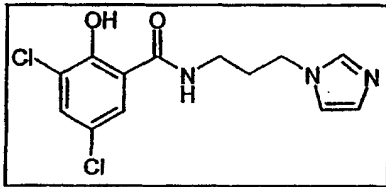
化合物 10



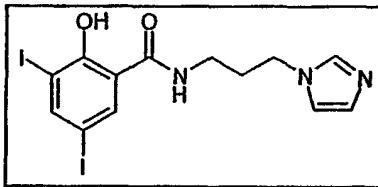
化合物 11



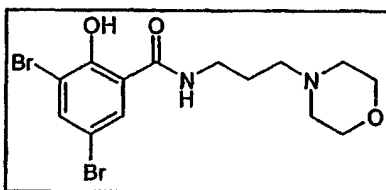
化合物 12



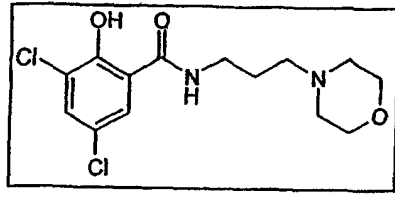
化合物 13



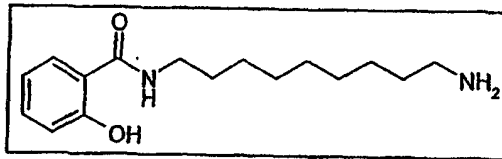
化合物 14



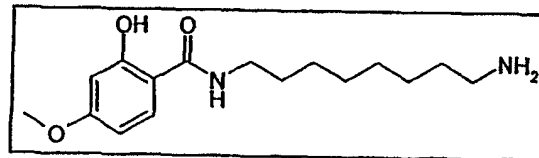
化合物 15



化合物 16



化合物 17



化合物 18

2、组合物，包含

(A) 活性成分，和

(B) 至少一种权利要求 1 的化合物。

3、权利要求 2 的组合物，其中该活性成分选自由生物学活性成分、化学活性成分及其组合组成的组。

4、权利要求 3 的组合物，其中该生物学活性成分包含至少一种蛋白质、多肽、肽、激素、多糖、粘多糖、碳水化合物或脂质。

5、权利要求 3 的组合物，其中该生物学活性成分选自下组：
BIBN-4096BS、生长激素、人生长激素、重组人生长激素(rhGH)、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放因子、干扰素、 α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、白介素-1、白介素-2、胰岛素、猪胰岛素、牛胰岛素、人胰岛素、人重组胰岛素、胰岛素样生长因子

(IGF)、IGF-1、肝素、未分离的肝素、类肝素、皮肤素、软骨素、低分子量肝素、极低分子量肝素、超低分子量肝素、降钙素、鲑鱼降钙素、鳗鱼降钙素、人降钙素、红细胞生成素(EPO)、心钠素、抗原、单克隆抗体、促生长素抑制素、蛋白酶抑制剂、促肾上腺皮质激素、促性腺素释放激素、催产素、促黄体生成激素释放激素、促卵泡成熟激素、葡糖脑苷脂酶、血小板生成素、人粒细胞集落刺激因子、前列腺素、环孢菌素、后叶加压素、色甘酸钠、色甘酸二钠、万古霉素、去铁敏(DFO)、甲状旁腺激素(PTH)、PTH的片段、抗微生物剂、抗真菌剂、维生素；这些化合物的类似物、片段、模拟物和聚乙二醇(PEG)修饰的衍生物；及其任意组合。

6、权利要求3的组合物，其中该生物学活性成分包含胰岛素、BIBN-4096BS、降钙素、甲状旁腺激素、红细胞生成素、生长激素或其组合。

7、权利要求3的组合物，其中该生物学活性成分包含BIBN-4096BS。

8、权利要求3的组合物，其中该生物学活性成分包含胰岛素。

9、剂量单元形式，包含

(A) 权利要求2的组合物，和

(B) (a) 赋形剂，

(b) 稀释剂，

(c) 崩解剂，

(d) 润滑剂，

(e) 增塑剂，

(f) 着色剂，

(g) 给药载体，或

(h) 其任意组合。

10、权利要求9的剂量单元形式，其中该活性成分选自由生物学活性成分、化学活性成分及其组合组成的组。

11、权利要求10的剂量单元形式，其中该生物学活性成分包含至

少一种蛋白质、多肽、肽、激素、多糖、粘多糖、碳水化合物或脂质。

12、权利要求 10 的剂量单元形式，其中该生物学活性成分选自下组：BIBN-4096BS、生长激素、人生长激素、重组人生长激素(rhGH)、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素、生长激素释放因子、干扰素、 α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素、白介素-1、白介素-2、胰岛素、猪胰岛素、牛胰岛素、人胰岛素、人重组胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF)、IGF-1、肝素、未分离的肝素、类肝素、皮肤素、软骨素、低分子量肝素、极低分子量肝素、超低分子量肝素、降钙素、鲑鱼降钙素、鳗鱼降钙素、人降钙素、红细胞生成素(EPO)、心钠素、抗原、单克隆抗体、促生长素抑制素、蛋白酶抑制剂、促肾上腺皮质激素、促性腺素释放激素、催产素、促黄体生成激素释放激素、促卵泡成熟激素、葡糖脑苷脂酶、血小板生成素、人粒细胞集落刺激因子、前列腺素、环孢菌素、后叶加压素、色甘酸钠、色甘酸二钠、万古霉素、去铁敏(DFO)、甲状旁腺激素(PTH)、PTH 的片段、抗微生物剂、抗真菌剂、维生素；这些化合物的类似物、片段、模拟物和聚乙二醇(PEG)修饰的衍生物；及其任意组合。

13、权利要求 10 的剂量单元形式，其中该生物学活性成分包含胰岛素、BIBN-4096BS、降钙素、甲状旁腺激素、红细胞生成素、人生长激素或其组合。

14、权利要求 9 的剂量单元形式，其中该活性成分包含重组 BIBN-4096BS。

15、权利要求 9 的剂量单元形式，其中该活性成分包含胰岛素。

16、权利要求 9 的剂量单元形式，其中该剂量单元形式包含给药载体，该载体包含片剂、胶囊剂、粉剂或液体。

17、权利要求 9 的剂量单元形式，其中该给药载体是液体，选自由水、1,2-丙二醇、乙醇和任意组合组成的组。

18、对需要的动物给以生物学活性成分的方法，该方法包含对动物口服给以权利要求 3 的组合物。

19、制备组合物的方法，包含混合：

- (A) 至少一种活性成分,
- (B) 权利要求 1 的化合物, 和
- (C) 可选的给药载体。

释放活性成分的化合物和组合物

本申请要求保护 2001 年 3 月 1 日提交的美国临时申请 No. 60/272,726、2001 年 8 月 24 日提交的美国临时申请 No. 60/314,783 和 2001 年 9 月 17 日提交的美国临时申请 No. 60/323,139 的利益，所有这些均引用在此作为参考。

发明领域

本发明涉及用于向靶释放活性成分、例如生物学或化学活性成分的化合物。这些化合物非常适合于与活性成分生成非共价的混合物，用于对动物口服、结肠内、肺和其他途径给药。这类组合物的制备和给药方法也被公开过。

发明背景

用于释放活性成分的常规手段经常受到生物学、化学和物理屏障的严重限制。通常，这些屏障是由释放所经过的环境、释放靶的环境和/或靶本身所强加的。生物学与化学活性成分特别容易受到这类屏障的影响。

在向动物释放生物活性与化学活性药理与治疗剂时，屏障是由机体所强加的。物理屏障的实例是皮肤、脂质双分子层和各种器官膜，它们对某些活性成分而言是相对不能渗透的，但是在到达靶之前又是必须经过的，例如循环系统。化学屏障包括但不限于胃肠(GI)道中的 pH 差异和降解酶。

这些屏障对于口服释放系统的设计具有特别的意义。如果不是生物学、化学和物理屏障的话，很多生物学或化学活性成分的口服释放将成为对动物给药的途径选择。通常不适合口服给药的成分有生物学或化学活性肽，例如降钙素和胰岛素；多糖，确切为粘多糖，包括但不限于肝素；类肝素；抗生素；和其他有机物。这些成分可能在胃肠道内因酸水解、酶等迅速失效或破坏。另外，大分子药物的大小和结

构也可能阻止吸收。

早期用于口服给以易受影响的药理成分的方法依赖于佐剂的共同给药（例如间苯二酚和非离子表面活性剂，例如聚氧乙烯油醚和正十六烷基聚乙醚），以人工增加肠壁的渗透性，以及酶抑制剂共同给药（例如胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代磷酸酯(DFF)和抑肽酶 trasylol），以抑制酶的降解作用。脂质体已被描述为胰岛素和肝素的药物释放系统。不过，这类药物释放系统的广泛使用受到了阻碍，因为：(1)这些系统需要中毒量的佐剂或抑制剂；(2)适合的低分子量货物、即活性成分不是可得到的；(3)这些系统的稳定性差，保存期限不长；(4)这些系统是难以制造的；(5)这些系统不能保护活性成分（货物）；(6)这些系统不利地改变活性成分；或者(7)这些系统不能允许或促进活性成分的吸收。

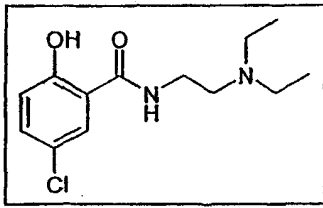
类蛋白质微球体已经用于释放药物。例如参见美国专利 No. 5,401,516、5,443,841 和 Re. 35,862。另外，某些改性氨基酸也已经用于释放药物。例如参见美国专利 No. 5,629,020、5,643,957、5,766,633、5,776,888 和 5,866,536。

最近，有人已将聚合物经由连接基团与改性氨基酸或其衍生物缀合，以提供聚合的释放剂。改性聚合物可以是任意的聚合物，但是优选的聚合物包括但不限于聚乙二醇(PEG)及其衍生物。例如参见国际专利公报 No. WO 00/40203。

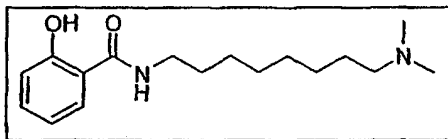
不过，仍然需要简单、经济的释放系统，它们是容易制备的，并且能够通过各种途径释放广泛的活性成分。

发明概述

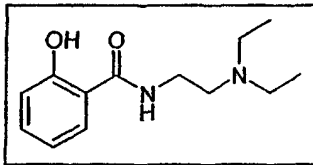
本发明提供促进活性成分释放的化合物和组合物。本发明的释放剂化合物包括具有下式的那些：



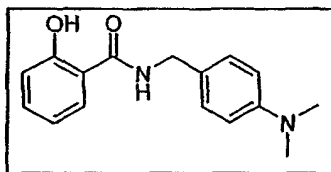
化合物 1



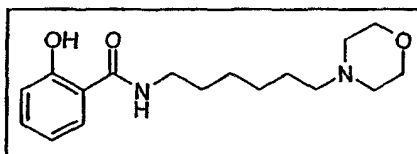
化合物 2



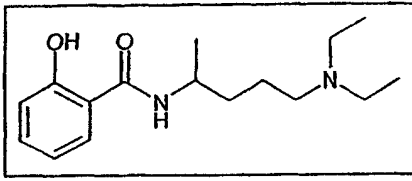
化合物 3



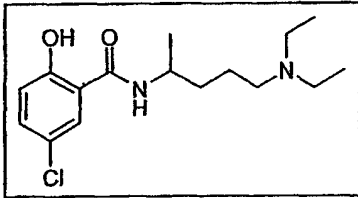
化合物 4



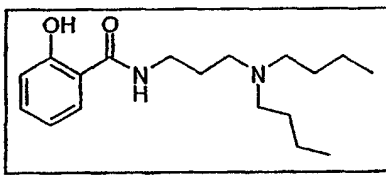
化合物 5



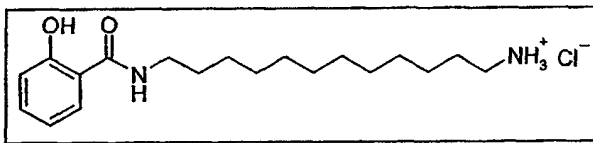
化合物 6



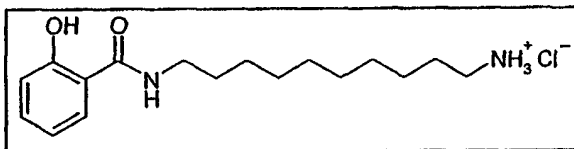
化合物 7



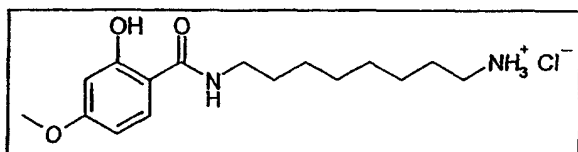
化合物 8



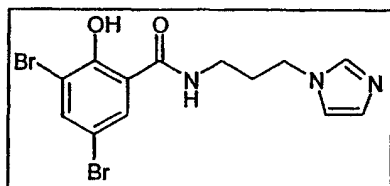
化合物 9



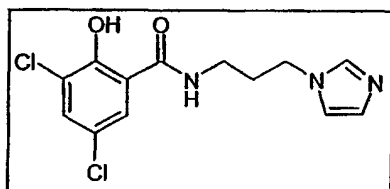
化合物 10



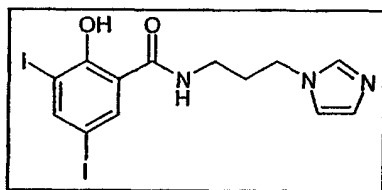
化合物 11



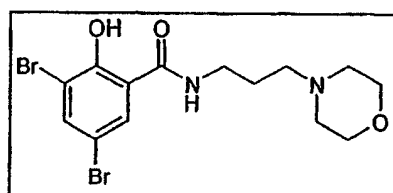
化合物 12



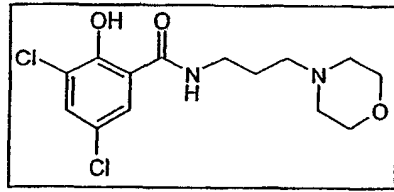
化合物 13



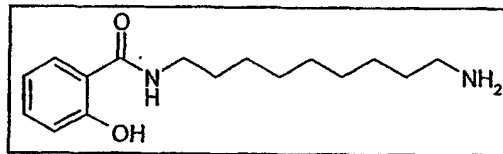
化合物 14



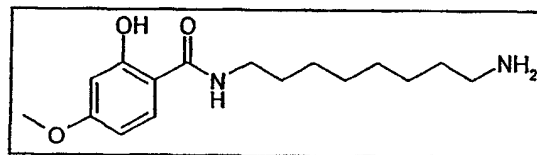
化合物 15



化合物 16



化合物 17



化合物 18

及其盐。这些释放剂化合物的混合物也可以用于促进活性成分的释放。

本发明还提供包含至少一种上式的释放剂化合物和至少一种活性成分的组合物。这些组合物释放活性成分至选定的生物系统，与活性成分在没有该释放剂化合物时的给药相比，增加或提高了活性成分的生物利用度。

还提供包含这些组合物的剂量单元形式。剂量单元可以是液体或固体的形式，例如片剂、胶囊剂或颗粒剂，包括粉剂或药囊剂。

另一种实施方式是对需要活性成分的动物给以该活性成分的方法，该方法对动物给以包含至少一种上式的释放剂化合物和该活性成分的组合物。优选的给药途径包括口服、结肠内和肺途径。

另一种实施方式是治疗动物疾病或达到所需生理效果的方法，该

方法给以本发明的组合物。

另一种实施方式是制备本发明组合物的方法，该方法将至少一种上式的释放剂化合物与至少一种活性成分混合。

发明的详细说明

释放剂化合物

本文所用的术语“烷基”和“链烯基”分别包括直链和支链烷基和链烯基取代基。

释放剂化合物可以是游离碱或其盐的形式。适合的盐包括但不限于有机和无机盐，例如盐酸盐、铵盐、乙酸盐、柠檬酸盐、卤化物、氢氧化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、醇化物、高氯酸盐、四氟硼酸盐、羧酸盐、甲磺酸盐、富马酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、乙酸盐、葡萄糖酸盐和马来酸盐。盐也可以是溶剂化物，包括乙醇化物和水合物。甲磺酸盐可以这样生成，使释放剂化合物的游离碱与甲磺酸反应。

本发明释放剂化合物的盐可以通过本领域已知的方法制备。例如，柠檬酸盐可以在乙醇、甲苯和柠檬酸中制备。盐也可以是溶剂化物，包括乙醇化物和水合物。

释放剂化合物可以通过重结晶或者在一种或多种固体色谱载体上通过分离加以纯化，载体单独使用或者串连使用。适合的重结晶溶剂系统包括但不限于乙醇、水、庚烷、乙酸乙酯、乙腈、甲醇和四氢呋喃(THF)及其混合物。分离可以在适合的色谱载体上进行，例如矾土，使用甲醇/正丙醇作为移动相；反相色谱使用三氟乙酸/乙腈混合物作为移动相；离子交换色谱使用水或适当的缓冲液作为移动相。在进行阴离子交换色谱时，优选地采用0-500mM氯化钠梯度。

释放剂可以含有通过连接基团与之缀合的聚合物，连接基团选自自由-NHC(O)NH-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-OOC-、-COO-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH-、-CH₂NH-NHCH₂-、-CH₂NHC(O)O-、-OC(O)NHCH₂-、-CH₂NHCOCH₂O-、-OCH₂C(O)NHCH₂-、-NHC(O)CH₂O-、-OCH₂C(O)NH-、-NH-、-O-和碳-碳键组成的组，其条件是聚合的释放剂不是多肽或聚氨基酸。

聚合物可以是任意的聚合物，包括但不限于交替共聚物、嵌段共聚物和无规共聚物，它们对哺乳动物而言是使用安全的。优选的聚合物包括但不限于聚乙烯；聚丙烯酸酯；聚甲基丙烯酸酯；聚(氧乙烯)；聚(丙烯)；聚丙二醇；聚乙二醇(PEG)；和它们的衍生物与组合。聚合物的分子量通常从约100至约200,000道尔顿。聚合物的分子量优选从约200至约10,000道尔顿。在一种实施方式中，聚合物的分子量从约200至约600道尔顿，更优选从约300至约550道尔顿。

活性成分

适用于本发明的活性成分包括生物学活性成分和化学活性成分，包括但不限于农药、药理成分和治疗剂。适合的活性成分包括在胃肠道内因酸水解、酶等而减效、失效或破坏的那些。适合的活性成分还包括那些大分子成分，它们的理化特征、例如大小、结构或电荷在口服给药时阻止或阻碍吸收。

例如，适用于本发明的生物学或化学活性成分包括但不限于蛋白质；多肽；肽；激素；多糖，确切为粘多糖的混合物；碳水化合物；脂质；小的极性有机分子（也就是分子量为500道尔顿或以下的极性有机分子）；其他有机化合物；确切为这样的化合物，它们独自不会穿过（或者仅有一部分给药剂量穿过）胃肠粘膜，和/或对胃肠道内的酸和酶的化学裂解作用是敏感的；或其任意组合。

进一步的实例包括但不限于如下，包括其合成、天然或重组的来源：生长激素，包括人生长激素(hGH)、重组人生长激素(rhGH)、牛生长激素和猪生长激素；生长激素释放激素；生长激素释放因子、干扰素，包括 α 、 β 和 γ ；白介素-1；白介素-2；胰岛素，包括猪、牛、人和人重组的，可选地具有抗衡离子，包括锌、钠、钙和铵；胰岛素样生长因子，包括IGF-1；肝素，包括未分离的肝素、类肝素、皮肤素、软骨素、低分子量肝素、极低分子量肝素和超低分子量肝素；降钙素，包括鲑鱼、鳗鱼、猪和人的；红细胞生成素；心钠素；抗原；单克隆抗体；促生长素抑制素；蛋白酶抑制剂；促肾上腺皮质激素、促性腺素释放激素；催产素；促黄体生成激素释放激素；促卵泡成熟激素；

葡糖脑苷脂酶；血小板生成素；人粒细胞集落刺激因子；前列腺素；环孢菌素；后叶加压素；色甘酸钠（色甘酸钠或二钠）；万古霉素；去铁敏(DFO)；双膦酸酯，包括阿仑膦酸、替鲁膦酸、依替膦酸、氯膦酸、帕米膦酸、olpadronate 和英卡膦酸；甲状旁腺激素(PTH)，包括它的片段；抗偏头痛剂，例如 BIBN-4096BS 和其他降钙素基因相关性蛋白质拮抗剂；抗微生物剂，包括抗生素、抗细菌剂和抗真菌剂；维生素；这些化合物的类似物、片段、模拟物或聚乙二醇(PEG)修饰的衍生物；或其任意组合。抗生素的非限制性实例包括作用于革兰氏阳性菌的、杀菌的、脂肽的和环状肽的抗生素，例如达托霉素及其类似物。

释放系统

本发明组合物包含一种或多种本发明的释放剂化合物和一种或多种活性成分。在一种实施方式中，一种或多种释放剂化合物、或这些化合物的盐、或由这些化合物或盐构成其一个或多个单元的聚氨基酸或肽可以用作释放剂，在给药之前与活性成分混合，形成给药组合物。

给药组合物可以是液体的形式。溶解介质可以是水（例如用于鲑鱼降钙素、甲状旁腺激素和红细胞生成素）、25%含水丙二醇（例如用于肝素）和磷酸盐缓冲液（例如用于 rhGH）。其他给药载体包括聚乙二醇。给药溶液可以这样制备，在即将给药之前，将释放剂化合物的溶液与活性成分溶液混合。作为替代选择，可以将释放剂化合物（或活性成分）的溶液与固体形式的活性成分（或释放剂化合物）混合。释放剂化合物和活性成分还可以以干粉形式混合。释放剂化合物和活性成分还可以在制造过程期间混合。

给药溶液可以可选地含有添加剂，例如磷酸盐缓冲盐、柠檬酸、二醇或其他分散剂。可以向溶液掺入稳定剂，浓度优选地在约 0.1 与 20% (w/v) 之间。

在一种实施方式中，含有 BIBN-4096BS 的给药溶液的 pH 小于 8。按照另一种实施方式，含有 BIBN-4096BS 的给药溶液的 pH 小于 7。

给药组合物或者可以是固体的形式，例如片剂、胶囊剂或颗粒剂，例如粉剂或药囊剂。固体剂型可以这样制备，将固体形式的化合物与

固体形式的活性成分混合。作为替代选择，也可以通过本领域已知的方法从化合物与活性成分的溶液得到固体，例如冷冻干燥（冻干）、沉淀、结晶和固体分散。

本发明的给药组合物还可以包括一种或多种酶抑制剂。这类酶抑制剂包括但不限于放线酰胺素或表放线酰胺素及其衍生物等化合物。其他酶抑制剂包括但不限于抑肽酶(Trasylo1)和 Bowman-Birk 抑制剂。

用在本发明给药组合物中的活性成分的量是有效达到特定活性成分用于目标适应症的目的的量。活性成分在组合物中的含量通常是药理学、生物学、治疗学或化学上的有效量。不过，含量可以小于当组合物以剂量单元形式使用时的量，因为剂量单元形式可以含有大量释放剂化合物/活性成分组合物，或者可以含有分开的药理学、生物学、治疗学或化学上的有效量。可以在累积的单元中给以总的有效量，其中含有全部有效量的活性成分。

所用活性成分的总量可以通过本领域技术人员已知的方法加以确定。不过，因为本发明组合物可以比含有单独活性成分的组合物更加有效地释放活性成分，所以可以对受治疗者给以比以前的剂量单元形式或释放系统中的用量更少量的生物学或化学活性成分，而仍然达到相同的血液水平和/或治疗效果。

目前所公开的释放剂化合物促进生物学和化学活性成分的释放，特别是在口服、鼻内、舌下、十二指肠内、皮下、颊、结肠内、直肠、阴道、粘膜、肺、透皮、真皮内、肠胃外、静脉内、肌内和眼用系统中，还有利于跨越血脑屏障。

剂量单元形式还可以包括任意一种或组合形式的赋形剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、增塑剂、着色剂、矫味剂、味道掩蔽剂、糖、甜味剂、盐和给药载体，包括但不限于水、1,2-丙二醇、乙醇、橄榄油或其任意组合。

本发明的化合物和组合物可用于对任意动物给以生物学或化学活性成分，包括但不限于鸟类，例如鸡；哺乳动物，例如啮齿动物、牛、

猪、狗、猫、灵长类，确切为人；和昆虫。

该系统特别有利于释放这样的化学或生物学活性成分，它们将在活性成分到达其靶区域（也就是释放组合物的活性成分所要被释放的区域）和它们所要给药的动物体内之前被所遭遇的条件破坏或减效。确切而言，本发明的化合物和组合物可用于口服给以活性成分，尤其是普通口服不可释放的那些或者需要提高释放率的那些。

包含化合物和活性成分的组合物可用于释放活性成分至选定的生物系统，与没有释放剂的活性成分给药相比增加或提高活性成分的生物利用度。释放率可以这样提高，在一定时间内释放更多的活性成分，或者在特定的时间阶段释放活性成分（例如为了实现更快或延迟的释放），或者在具体时间或一定时间内释放活性成分（例如持续释放）。

本发明的另一种实施方式是动物疾病的治疗或预防方法或达到所需生理效果的方法，例如列在下表中的那些，该方法将本发明的组合物给药。活性成分的具体适应症可以参见Physicians' Desk Reference (54th Ed., 2000, Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ), 引用在此作为参考。下表中的活性成分包括它们的类似物、片段、模拟物和聚乙二醇修饰的衍生物。

活性成分	疾病和生理效果
生长激素	生长障碍
干扰素, 包括 α 、 β 和 γ	病毒感染, 包括慢性癌症和多发性硬化
白介素-1; 苯甲酸-2	病毒感染; 癌症
胰岛素; 胰岛素样生长因子 IGF-1	糖尿病
肝素	血栓形成; 血液凝固的防止
降钙素	骨质疏松; 骨疾病
红细胞生成素	贫血
心钠素	血管舒张
抗原	感染
单克隆抗体	预防移植物排斥; 癌症
促生长素抑制素	出血性溃疡; 腐蚀性胃炎
蛋白酶抑制剂	AIDS
促肾上腺皮质激素	高胆固醇 (为了降低胆固醇)
促性腺素释放激素	排卵功能障碍 (为了刺激排卵)
催产素	分娩功能障碍 (为了刺激收缩)
促黄体生成激素释放激素; 促卵泡成熟激素	调节生殖功能
葡糖脑苷脂酶	高歇氏病 (为了使脂蛋白)
血小板生成素	血小板减少
人粒细胞集落刺激因子	减少化疗患者感染
前列腺素	高血压
环孢菌素	移植排斥
后叶加压素	遗尿; 制尿
色甘酸钠; 万古霉素	气喘; 变态反应
去铁敏 (DFO)	铁过载
甲状旁腺激素 (PTH), 包括它的片段	骨质疏松; 骨疾病
抗微生物剂	感染, 包括革兰氏阳性细菌感染
维生素	维生素缺乏
双膦酸酯	骨质疏松; 佩吉特氏病; 抑制破骨细胞
BIBN4096BS- (1-哌啶酰胺, N-[2-[[5-氨基-1-[[4-(4-吡啶基)-1-哌嗪基]羰基]戊基]氨基]-1-[(3,5-二溴-4-羟基苯基)甲基]-2-氧代乙基]-4-(1,4-二氢-2-氧代-3(2H)-喹唑啉基)-, [R-(R*, S*)]-)	抗偏头痛; 降钙素基因相关性拮抗剂

例如, 本发明的一种实施方式是治疗患有或易感糖尿病的患者们的的方法, 该方法将胰岛素和至少一种本发明的释放剂化合物给药。

给药之后, 存在于组合物或剂量单元形式中的活性成分被摄取进

入循环。药物的生物利用度是容易评估的，测量血液中已知的药理活性，例如由肝素导致的凝血时间的增加或由降钙素导致的循环钙水平的降低。作为替代选择，可以直接测量活性成分本身的循环水平。

优选实施方式的说明

下列实施例非限制性地阐述本发明。所有份数均为重量，另有指定除外。

下列关于化合物的质子核磁共振 ($^1\text{H NMR}$) 分析是在 300MHz Bruker 分光计上进行的，使用二甲基亚砜 (DMSO-d_6) 作为溶剂，另有指定除外。

液相色谱/质谱 (LC-MS) 分析是利用 Agilent Technologies, LC/MSD 1100 (single quad) 进行的，参数如下：

移动相 A: 50:950:5 乙腈:水:乙酸 (v/v/v)

移动相 B: 950:50:5 乙腈:水:乙酸 (v/v/v)

梯度洗脱: 4 分钟线性梯度 0-100% B; 每次注射的总时间是 11 分钟

注射体积: 5 μL

柱子: ZORBAX 快速拆分药筒, SB-C18, 2.1 x 30mm, 3.5 μm

粒径: 目录# 873700-902

柱温: 40 $^\circ\text{C}$

UV 检测: 244nm

MSD 参数:

光源: API-ES, 正极性

扫描参数:

质量范围: 125.00 - 600.00

碎裂器: 60V

增益: 1.0EMV

阈: 150

喷射腔:

气温: 350 度 D

干燥气: 12.0 l/min

Neb 压: 40psig

VCap: 4000V 正/负

实施例 1: 化合物的制备

1a: 化合物 2 的制备

将 40%二甲胺/水 (30ml, 26.9g, 239mmol) 与乙醇 (50ml) 的溶液用 8-溴-1-辛醇 (15.13g, 72.3mmol) 与乙醇 (20ml) 的溶液处理, 历经 10 分钟滴加。将反应混合物搅拌 75 小时, 用乙酸乙酯 (80ml) 稀释, 用饱和碳酸氢钠溶液洗涤。含水相用乙酸乙酯萃取。合并有机相, 用饱和碳酸氢钠溶液 (50ml) 和盐水 (2 x 40ml) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 浓缩。分离到 11.4g 8-二甲氨基-1-辛醇, 为黄色的油, 原样使用。

将卡沙兰 (10.80g, 66.2mmol)、8-二甲氨基-1-辛醇 (11.4g, 65.8mmol)、三苯膦 (17.53g, 66.8mmol) 与四氢呋喃 (40ml) 的浆液用偶氮二羧酸二异丙酯 (13.0ml, 13.35g, 66.0mmol) 与四氢呋喃 (20ml) 的溶液处理, 历经 25 分钟滴加, 导致温度上升至 50°C。待反应混合物冷却回到 25°C, 搅拌 40 小时。将溶液用含水 2N NaOH (70ml, 140mmol) 处理, 温热至 60°C 达 180 分钟。冷却了的反应混合物用乙酸乙酯洗涤 (2 x 50ml)。将含水相用 4%含水 HCl 酸化至 pH 略小于 0, 用乙酸乙酯洗涤 (2 x 40ml)。用固体碳酸氢钠处理后, 含水相的 pH 上升至 9.5。含水相用二氯甲烷萃取 (10 x 40ml)。合并二氯甲烷萃取液, 经硫酸钠干燥, 浓缩, 得到 0.6g 产物。其余产物见于前面的乙酸乙酯萃取液。这些乙酸乙酯层用 1N 含水 NaOH 萃取 (4 x 30ml)。合并这四个含水相, 用 4%含水 HCl 酸化至 pH 0.7, 用乙酸乙酯洗涤 (2 x 30ml)。水溶液的 pH 用含水 2N NaOH 调至 5。溶液用固体碳酸氢钠处理, 直至不再发生起泡, 用乙酸乙酯萃取 (6 x 50ml)。合并乙酸乙酯层, 经硫酸钠干燥, 浓缩至固体。将固体溶于四氢呋喃, 用 HCl 气处理。加入水, 导致固体从溶液中沉淀出来。过滤分离到共计 4.73g 盐酸 N-(8-二甲氨基辛基)水杨酰胺。

m.p. 78-80° C; ^1H NMR (DMSO- d_6), δ (ppm): 10.5 (bs, 1H), 8.9 (t, 1H), 7.9 (dd, 1H), 7.4 (td, 1H), 6.9 (m, 2H), 3.3 (q, 2H), 3.0 (m, 2H), 2.7 (s, 6H), 1.6 (t, 4H), 1.3 (m, 8H). KF value = 5.19% water. Elemental analysis: %C: 58.86 (calculated), 58.87 (found); %H: 9.01 (calculated), 8.98 (found); %N: 8.08 (calculated), 7.98 (found).

1b: 化合物 4 的制备

向单颈 250ml 圆底烧瓶装入二盐酸 4-(二甲氨基)苄胺 (8.0g, 0.0358mol) 和 50ml 二氯甲烷。搅拌溶液，在冰浴中冷却。向反应混合物加入三乙胺 (20.0ml, 0.1432mol) 和催化量的 4-(二甲氨基)吡啶 (DMAP)。向冷却了的反应烧瓶加入乙酰水杨酰氯 (7.12g, 0.1432mol) 的二氯甲烷 (30ml) 溶液。加入完全后，将反应混合物温热至室温，搅拌过夜。

反应混合物用 2N HCl 稀释，分离各层。将有机相用水洗涤，经硫酸钠干燥，在真空中浓缩。将所得油在 2N NaOH 中搅拌 4 小时，用乙酸乙酯洗涤。在真空中浓缩含水相，除去所有残留的乙酸乙酯。将含水相的 pH 调至 7，通过真空过滤收集所得固体。粗固体的重量为 1.76g。重复反应，得到另外 0.88g 粗产物。合并固体，从乙醇/水中重结晶，得到 2.64g N-(4-二甲氨基苄基)水杨酰胺，为白色固体。

m.p. 129-132° C; ^1H NMR (d_6 -DMSO), δ (ppm): 9.3 (s, 1H), 7.87 (dd, 1H), 7.39 (dt, 1H), 7.16 (d, 2H), 6.87 (t, 2H), 6.69 (d, 2H), 4.38 (d, 2H), 2.86 (s, 6H). Elemental analysis: %C: 71.09 (calc.), 70.84 (found); %H: 6.71 (calc.), 6.50 (found); %N: 10.36 (calc.), 10.14 (found).

1c: 化合物 5 的制备

将吗啉 (3.30ml, 3.30g, 37.8mmol)、6-溴-1-己醇 (6.72g, 72.3mmol)、乙醇 (20ml) 与碳酸钾 (6.23g, 45.1mmol) 的悬液在 25°C 下搅拌 36 小时，开始时有轻微的放热。将反应混合物用乙酸乙酯 (30ml) 稀释，过滤，浓缩。将残余物溶于乙酸乙酯，过滤，浓缩。分离到 7.0g

4-(6-羟基己基)吗啉，为黄色的油，原样使用。

将卡沙兰(6.13g, 37.6mmol)、4-(6-羟基己基)吗啉(7.0g, 37.4mmol)、三苯膦(9.97g, 35.0mmol)与四氢呋喃(40ml)的浆液用偶氮二羧酸二异丙酯(7.40ml, 7.60g, 37.6mmol)与四氢呋喃(10ml)的溶液处理，历经15分钟滴加。将反应混合物在25°C下搅拌60小时。将溶液用含水2N NaOH(50ml, 100mmol)处理，温热至60°C达180分钟。浓缩冷却了的反应混合物，除去四氢呋喃。将水性残余物用乙酸乙酯洗涤(2 x 40ml)，用4%含水HCl酸化至pH 0.84(导致有二氧化碳气体放出)。含水相的pH用2N含水NaOH调至7.8。加入固体碳酸氢钠。用乙酸乙酯萃取(8 x 40ml)，经硫酸钠干燥，浓缩，得到油，放置后固化。分离到4.26g 4-(6-吗啉-4-基己基)水杨酰胺。

m.p. 70-73°C; ^1H NMR(d_6 -DMSO), δ (ppm): 8.8 (t, 1H), 7.8 (dd, 1H), 7.4 (td, 1H), 6.9 (m, 2H), 3.5 (t, 4H), 3.3 (q, 2H), 2.3 (t, 4H), 2.2 (t, 2H), 1.5 (t, 2H), 1.3-1.4 (m, 6H). KF value = 5.39 % water. Elemental analysis: %C: 63.05 (calculated), 63.06 (found); %H: 8.70 (calculated), 8.53 (found); %N: 8.65 (calculated), 8.73 (found).

1d: 化合物 1、7 的柠檬酸盐的制备

N-羟基琥珀酰亚胺-O-乙酰基-5-氯水杨酸酯的合成

在搅拌下，向乙酸酐(14g, 137mmol)与冰乙酸(16.4g, 274mmol)的溶液加入5-氯水杨酸(17.3g, 100mmol)和三滴浓硫酸(98%)。将反应混合物缓慢加热至70°C，搅拌2小时。将反应混合物冷却至室温，逐渐加入到冰水(500ml)中，沉淀出乙酰化的产物。收集这些固体，用水洗涤。合并两批产物，在乙酸乙酯中重结晶。经由真空过滤收集纯晶体，得到16.3g O-乙酰基-5-氯水杨酸(76mmol, 76%收率)。

Elemental analysis calculated for $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4\text{Cl}$: C 50.37%, H 3.29%, N 0.0%; Found: C 50.36%, H 3.20%, N <0.02%.

将 N-羟基琥珀酰亚胺(8.6g, 82mmol)溶于二甲基甲酰胺(DMF)(8ml)。在室温下将该溶液与 O-乙酰基-5-氯水杨酸(16g, 74.6mmol)

的二氯甲烷(DCM) (150ml)溶液混合。在水浴中搅拌该混合物。将1,3-二环己基碳二亚胺(DCC) (17g, 82mmol)溶于二氯甲烷(55ml), 逐渐加入到该混合物中。使反应平衡至室温, 搅拌24小时。将混合物冷却至-10°C, 过滤除去所有固体。滤液用二氯甲烷(100ml)稀释。将溶液用1N HCl (2 x 200ml)、盐水(2 x 200ml)、5%碳酸氢钠(2 x 200ml)和盐水(2 x 200ml)洗涤。二氯甲烷层经无水硫酸钠干燥。在真空中蒸发溶剂。收集产物, 得到22.5g (72mmol, 97%)。

化合物 7: 2-(5-氯-2-羟基苯甲酰基)氨基-5-(N', N'-二乙氨基)戊烷单柠檬酸盐

IUPAC 名称: N-[5-(二乙氨基)-1-甲基戊基]-5-氯-2-羟基苯甲酰胺单柠檬酸盐

将上面得到的 N-羟基琥珀酰亚胺-O-乙酰基-5-氯水杨酸酯(3.1g, 10mmol)溶于二氯甲烷(15ml)。在搅拌下将该溶液缓慢加入到 2-氨基-5-二乙氨基戊烷(3.2g, 20mmol)的二氯甲烷(35ml)溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。HPLC 指示反应完全。反应混合物用5%碳酸氢钠洗涤(3 x 100ml)。有机层经无水硫酸钠干燥。在真空中蒸发二氯甲烷, 得到游离的叔胺产物(2.3g, 7.4mmol, 74%)。

将上面得到的 2-(5-氯-2-羟基苯甲酰氨基)-5-(N, N-二乙氨基)戊烷(2.3g, 7.4mmol)和柠檬酸(1.4g, 7.4mmol)溶于无水乙醇(8ml)。向该溶液加入二乙醚(~30ml), 直至溶液变浑浊。将浑浊溶液冷冻过夜, 沉淀出柠檬酸盐。经由真空过滤收集最终产物 2-(5-氯-2-羟基苯甲酰氨基)-5-(N, N-二乙氨基)戊烷单柠檬酸盐, 在氮流下干燥, 得到2.0g (4.0mmol, 54%)。

m.p. 57-59°C; ¹HNMR (DMSO-d₆) δ(ppm): 1.18 (m, 9H), 1.60 (m, 4H), 2.57 (q_{ab}, 4H), 3.08 (m, 6H), 4.04 (q, 1H), 4.11 (s, 1H), 6.98 (d, 1H), 7.47 (dd, 1H), 8.01 (d, 1H), 8.70 (s, 1H). KF value = 0.59%. Elemental analysis for calculated C₂₂H₃₃N₂O₉Cl: C 52.33, H 6.54, N 5.55. Found: C 52.21, H 6.79, N 5.20.

化合物 1: N-(5-氯-2-羟基苯甲酰基)-N', N'-二亚乙基二胺单柠檬

酸盐

IUPAC 名称: N-[2-(二乙氨基)乙基]-5-氯-2-羟基苯甲酰胺单柠檬酸盐

利用适当的原料, 通过与化合物 7 相同的工艺制备化合物 1。

m.p. 107-109° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 1.16 (t, 6H), 2.61 (q_{ab}, 4H), 3.09 (m, 6H), 3.59 (s, 2H), 6.98 (d, 1H), 7.44 (dd, 1H), 7.88 (d, 1H), 9.09 (s, 1H), 9.95-11.20 (s, 3H).
Elemental analysis for calculated C₁₉H₂₇N₂O₉Cl: C 49.30, H 5.84, N 6.05; found: C 49.30, H 5.78, N 5.94.

1e: 化合物 11、18 的制备

N-羧基琥珀酰亚胺-0-乙酰基-4-甲氧基水杨酸酯的合成

利用适当的原料, 通过与 N-羧基-0-乙酰基-5-氯水杨酸酯相同的工艺制备 N-羧基琥珀酰亚胺-0-乙酰基-4-甲氧基水杨酸酯。

化合物 11: 8-(2-羧基-4-甲氧基苯甲酰氨基)辛胺盐酸盐

IUPAC 名称: N-(8-氨基辛基)-2-羧基-4-甲氧基苯甲酰胺盐酸盐

将上面得到的 N-羧基琥珀酰亚胺-0-乙酰基-4-甲氧基水杨酸酯 (13g, 42.3mmol) 溶于二氯甲烷 (70ml), 在搅拌下, 在水浴中滴加到 1,8-二氨基辛烷 (13g, 90mmol) 的二氯甲烷 (230ml) 溶液中。将反应搅拌过夜。产物从溶液中沉淀出来, 经由真空过滤收集。将沉淀用二氯甲烷洗涤, 风干, 得到 9.0g 粗产物。将沉淀用水 (50ml) 洗涤, 在搅拌下用 0.1N HCl 水溶液 (50ml) 萃取 0.5 小时。过滤酸性水溶液, 除去不溶物。将滤液用乙醚 (150ml) 洗涤, 调至 pH 10。立即发生沉淀。将混合物在室温下放置过夜。过滤收集沉淀, 风干, 得到 2.6g (8.8mmol, 21%)。

将上面得到的游离伯胺 (1.7g, 5.8mmol) 悬浮在 20ml 无水乙醇中。向该混合物通入 HCl 气达 10 分钟, 得到澄清的溶液。向该溶液通入氨气, 以冲洗过量的 HCl 和蒸发乙醇, 直至溶液的体积为 10ml。将该溶液冷冻 2 小时, 使产物沉淀出来。经由真空过滤收集产物, 用乙醚洗涤, 在真空中干燥, 得到 1.7g 盐酸盐 (5.1mmol, 89%)。

m.p. 162-164° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.36 (s, 8H), 1.53 (m, 4H), 2.71 (sex, 2H), 3.22 (q, 2H), 3.76 (s, 3H), 6.42 (m, 2H), 7.83 (d, 1H), 7.93-8.11 (s, 3H), 8.77 (t, 1H), 13.12 (bs, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₆H₂₇N₂O₃Cl: C 58.08, H 8.23, N 8.47; found: C 57.46, H 8.24, N 8.63.

化合物 18: N-(2-羟基-4-甲氧基苯甲酰基)-1,8-二氨基辛烷
IUPAC 名称: N-[2-(二乙氨基)乙基]-2-羟基-4-甲氧基苯甲酰胺
利用适当的原料, 通过与化合物 11 相同的工艺制备化合物 18.

m.p. 151-153° C; ¹HNMR (DMSO-d₆), δ(ppm): 1.16-1.40 (m, 8H), 1.46 (m, 4H), 2.64 (t, 2H), 3.23 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 6.13 (d, 1H), 6.17 (s, 1H), 7.67 (d, 1H), 10.05 (s, 1H). KF value = 0.93%. Elemental analysis for calculated C₁₆H₂₆N₂O₃*0.16H₂O: C 64.67, H 8.86, N 9.43; found: C 64.26, H 8.84, N 9.65.

1f: 化合物 3、6、8 和化合物 9、10、17 的柠檬酸盐的制备
N-羟基琥珀酰亚胺-0-乙酰水杨酸酯的合成

将 N-羟基琥珀酰亚胺(12g, 104mmol)溶于 DMF (15ml)。在室温下将该溶液与 O-乙酰水杨酰氯(20g, 101mmol)的二氯甲烷(150ml)溶液混合。在搅拌下向该混合物滴加三乙胺(11g, 109mmol)。将反应混合物搅拌 2 小时。过滤混合物, 除去所有不溶物。收集滤液, 在真空中蒸发溶剂。将所得油溶于 200ml 乙酸乙酯。过滤除去所有残留的固体。将滤液用 1N HCl (3 x 150ml)、盐水(1 x 150ml)、4%碳酸氢钠(3 x 150ml)和盐水(1 x 150ml)洗涤。乙酸乙酯层经无水硫酸钠干燥。通过真空蒸发除去乙酸乙酯, 然后用氮冲洗。生成 20g (72mmol, 72%) N-羟基琥珀酰亚胺-0-乙酰水杨酸酯。

化合物 3: N-(2-羟基苯甲酰基)-N',N'-二亚乙基二胺单柠檬酸盐
IUPAC 名称: N-[2-(二乙氨基)乙基]-2-羟基苯甲酰胺单柠檬酸盐
利用适当的原料, 通过与化合物 7 相同的工艺制备化合物 3.

m.p. 111-113° C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm): 1.17 (t, 6H), 2.59 (q_{ab}, 4H), 3.09 (m, 6H), 3.61 (q, 2H), 6.95 (m, 2H), 7.44 (t, 1H), 7.85 (d, 1H), 9.07 (s, 1H), 10.25 (bs, 2H). KF value= 0.30%. Elemental analysis for calculated $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9$: C 53.27, H 6.54, N 6.54; found: C 52.96, H 6.28, N 6.37.

2-(2-羟基苯甲酰基)氨基-5-(N,N-二乙氨基)戊烷单柠檬酸盐

IUPAC 名称: N-[5-(二乙氨基)-1-甲基戊基]-2-羟基苯甲酰胺单柠檬酸盐

利用适当的原料,通过与化合物 7 相同的工艺制备 2-(2-羟基苯甲酰基)氨基-5-(N,N-二乙氨基)戊烷单柠檬酸盐。

m.p. 62-64° C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm): 1.18 (m, 9H), 1.61 (m, 4H), 2.57 (q_{ab}, 4H), 3.02 (m, 6H), 4.03 (q, 1H), 4.11 (s, 1H), 6.91 (m, 2H), 7.41 (t, 1H), 7.89 (d, 1H), 8.58 (s, 1H), 10.6-11.8 (s, 2H). Elemental analysis for calculated $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_9$: C 56.17, H 7.23, N 5.96; found: C 55.77, H 7.35, N 5.71.

化合物 8: N-(2-羟基苯甲酰基)-N',N'-二(正丁基)-1,3-二氨基丙烷单柠檬酸盐

IUPAC 名称: N-{3-[二丁氨基]丙基}-5-氯-2-羟基苯甲酰胺单柠檬酸盐

除了原料以外,工艺与化合物 7 所述那些相同。

m.p. 87-89° C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6), δ (ppm): 0.89 (t, 6H), 1.30 (sex, 4H), 1.53 (m, 4H), 1.77 (quin, 2H), 2.59 (q_{ab}, 4H), 2.84-3.04 (m, 6H), 3.36 (t, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.44 (dd, 1H), 7.90 (d, 1H), 8.97 (s, 1H). Elemental analysis for calculated $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_9\text{Cl}$: C 54.08, H 6.95, N 5.26; found: C 54.13, H 7.00, N 5.10.

化合物 9: N-(2-羟基苯甲酰基)-1,12-二氨基十二烷盐酸盐

IUPAC 名称: N-(12-氨基十二烷基)-2-羟基苯甲酰胺盐酸盐

利用适当的原料,通过与化合物 7 相同的工艺制备化合物 9。

m.p. 140-142° C; ¹HNMR (DMSO-*d*₆), δ(ppm): 1.21 (s, 16H), 1.53 (m, 4H), 2.72 (sex, 2H), 3.27 (q, 2H), 6.89 (m, 2H), 7.37 (t, 1H), 7.7.91 (d, 1H), 7.96-8.20 (s, 3H), 8.93 (s, 1H); 12.87 (s, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₉H₃₃N₂O₂Cl: C 63.94, H 9.32, N 7.85, Cl 9.93; found: C 63.33, H 9.45, N, 7.28, Cl 10.87.

化合物 10: 10-(2-羟基苯甲酰氨基)癸胺盐酸盐

IUPAC: N-(10-氨基癸基)-2-羟基苯甲酰胺盐酸盐

利用适当的原料, 通过与化合物 11 相同的工艺制备化合物 10.

m.p. 136-138° C; ¹HNMR (DMSO-*d*₆), δ(ppm): 1.24 (s, 12H), 1.51 (m, 4H), 2.71 (t, 2H), 3.26 (q, 2H), 6.87 (m, 2H), 7.37 (t, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.89-8.13 (s, 3H), 8.91 (t, 1H), 12.76 (s, 1H). Elemental analysis for calculated C₁₇H₂₉N₂O₂Cl: C 62.09, H 8.89, N 8.52; found: C 60.66, H 9.11, N 8.73.

化合物 17: N-(2-羟基苯甲酰基)-1,9-二氨基壬烷

IUPAC 名称: N-(8-氨基壬基)-2-羟基苯甲酰胺

利用适当的原料, 通过与游离胺化合物 11 相同的工艺制备化合物 17.

¹HNMR (DMSO-*d*₆), δ(ppm): 1.21-1.42 (m, 12H), 1.51 (m, 2H), 2.60 (t, 2H), 3.27 (t, 2H), 6.63 (t, 1H), 6.70 (d, 1H), 7.22

(t, 1H), 7.78 (d, 1H), 9.80 (s, 1H). KF value= 0.91%.

Elemental analysis for calculated C₁₆H₂₆N₂O₂ (0.91% H₂O): C 68.61, H 9.33, N 9.97; Found: C 68.54, H 9.41, N 10.31.

1g: 化合物 12 的制备

向 20ml 闪烁小瓶装入 3,5-二溴水杨酸(1.299g, 4.39mmol)、1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺*HCl (0.99g, 5.2mmol)和 1-羟基苯并三唑水合物(0.79g, 5.8mmol)。通过自动吸移管加入 1-(3-氨基丙基)咪唑(476μl, 3.99mmol)。加入 THF (10ml), 将小瓶密封, 在 60°C 下放置在轨道摇动器上过夜。关掉热源, 待小瓶冷却回到室温。

加入三甲醇氨基甲烷树脂(200mg, 0.85mmol), 将小瓶放回轨道摇动器上达 4 小时。向小瓶加入 Amberlyst-15 (2g, 9.4mmol) 和 Amberlyst-21 (2g, 9.4mmol) 离子交换树脂以及 DCM (5ml), 使树脂悬浮。将小瓶放回轨道摇动器上过夜。过滤反应混合物, 树脂用 DCM 清洗(2 x 5ml)。合并滤液, 放置在氮气流下过夜。回收到 2.3985g 物质。

LC-MS: rt = 2.39min, 89%, M + H = 404

1h: 化合物 13 的制备

向 20ml 闪烁小瓶装入 3,5-二氯水杨酸(0.9082g, 4.39mmol)、1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺*HCl (0.99g, 5.2mmol) 和 1-羟基苯并三唑水合物(0.79g, 5.8mmol)。通过自动吸移管加入 1-(3-氨基丙基)咪唑(476 μ l, 3.99mmol)。加入 THF (10ml), 将小瓶密封, 在 60 $^{\circ}$ C 下放置在轨道摇动器上过夜。关掉热源, 待小瓶冷却回到室温。加入三甲醇氨基甲烷树脂(200mg, 0.85mmol), 将小瓶放回轨道摇动器上达 4 小时。向小瓶加入 Amberlyst-15 (2g, 9.4mmol) 和 Amberlyst-21 (2g, 9.4mmol) 离子交换树脂以及 DCM (5ml), 使树脂悬浮。将小瓶放回轨道摇动器上过夜。过滤反应混合物, 树脂用 DCM 清洗(2 x 5ml)。合并滤液, 放置在氮气流下过夜。回收到 2.0343g 物质。

LC-MS: rt = 2.24min, 79%, M + H = 315

1i: 化合物 14 的制备

向 20ml 闪烁小瓶装入 3,5-二碘水杨酸(1.700g, 4.39mmol)、1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺*HCl (0.99g, 5.2mmol) 和 1-羟基苯并三唑水合物(0.79g, 5.8mmol)。通过自动吸移管加入 1-(3-氨基丙基)咪唑(476 μ l, 3.99mmol)。加入 THF (10ml), 将小瓶密封, 在 60 $^{\circ}$ C 下放置在轨道摇动器上过夜。关掉热源, 待小瓶冷却回到室温。加入三甲醇氨基甲烷树脂(200mg, 0.85mmol), 将小瓶放回轨道摇动器上达 4 小时。向小瓶加入 Amberlyst-15 (2g, 9.4mmol) 和 Amberlyst-21 (2g, 9.4mmol) 离子交换树脂以及 DCM (5ml), 使树脂

悬浮。将小瓶放回轨道摇动器上过夜。过滤反应混合物，树脂用 DCM 清洗(2 x 5ml)。合并滤液，放置在氮气流下过夜。回收到 2.7305g 物质。

LC-MS: $rt = 2.62\text{min}$, 84%, $M + H = 498$

1j: 化合物 15 的制备

向 20ml 闪烁小瓶装入 3,5-二溴水杨酸(1.299g, 3.8mmol)、1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺*HCl (0.84g, 4.39mmol)和 1-羟基苯并三唑水合物(0.59g, 4.38mmol)。通过自动吸移管加入 4-(3-氨基丙基)吗啉(506 μl , 3.47mmol)。加入 THF (10ml)，将小瓶密封，在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置在轨道摇动器上过夜。关掉热源，待小瓶冷却回到室温。加入三甲醇氨基甲烷树脂(200mg, 0.85mmol)，将小瓶放回轨道摇动器上达 4 小时。向小瓶加入 Amberlyst-15 (2g, 9.4mmol)和 Amberlyst-21 (2g, 9.4mmol)离子交换树脂以及 DCM (5ml)，使树脂悬浮。将小瓶放回轨道摇动器上过夜。过滤反应混合物，树脂用 DCM 清洗(2 x 5ml)。合并滤液，放置在氮气流下过夜。回收到 2.103g 物质。

LC-MS: $rt = 2.36\text{min}$, 74%, $M + H = 423$

1k: 化合物 16 的制备

向 20ml 闪烁小瓶装入 3,5-二氯水杨酸(0.786g, 3.8mmol)、1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺*HCl (0.84g, 4.39mmol)和 1-羟基苯并三唑水合物(0.59g, 4.38mmol)。通过自动吸移管加入 4-(3-氨基丙基)吗啉(506 μl , 3.47mmol)。加入 THF (10ml)，将小瓶密封，在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下放置在轨道摇动器上过夜。关掉热源，待小瓶冷却回到室温。加入三甲醇氨基甲烷树脂(200mg, 0.85mmol)，将小瓶放回轨道摇动器上达 4 小时。向小瓶加入 Amberlyst-15 (2g, 9.4mmol)和 Amberlyst-21 (2g, 9.4mmol)离子交换树脂以及 DCM (5ml)，使树脂悬浮。将小瓶放回轨道摇动器上过夜。过滤反应混合物，树脂用 DCM 清洗(2 x 5ml)。合并滤液，放置在氮气流下过夜。回收到 1.648g 物质。

LC-MS: $rt = 2.23\text{min}$, 75%, $M + H = 334$

1k: 化合物 12、13、14、15、16 的替代制备

利用适当的原料, 通过与制备化合物 7 所述相同的工艺合成化合物 12、13、14、15 和 16。

实施例 2

2A: 胰岛素 - 口服释放

在去离子水中制备释放剂化合物和人锌胰岛素(最低 26IU/mg, 可从 Calbiochem-Novabiochem Corp, La Jolla, CA 得到) 的口服给药 (PO) 组合物。通常, 向 1.5ml 水加入 500mg 释放剂化合物。使溶液涡旋, 然后加入(约 37°C), 声波处理。用 NaOH 或 HCl 调节 pH 7 至 8.5。如果必要的话, 加入另外的 NaOH, 以实现均匀的溶解, 再次调节 pH 7 至 8.5。然后加入水至总体积达约 2.4ml, 涡旋。向溶液加入相当于约 1.25mg 胰岛素的胰岛素储备溶液(15mg/ml, 由 0.5409g 胰岛素和 18ml 去离子水制成, 用 HCl 和 NaOH 调节 pH 8.15, 得到澄清的溶液, 用到 40ml 浓 HCl、25ml 10N NaOH 和 50ml 1N NaOH), 颠倒混合之。溶液可以立即用于给药, 或者作为替代选择, 可以在给药前将溶液置于 37°C 水浴中达一小时。最终的释放剂化合物剂量、胰岛素剂量和给药体积量列在下表 1 中。

典型的给药和取样方案如下。体重在约 200 - 250g 之间的雄性 Sprague-Dawley 大鼠禁食 24 小时, 在给药前 15 分钟给以氯胺酮 (44mg/kg) 和氯丙嗪 (1.5mg/kg), 并且可以根据需要再次给药, 以维持麻醉。对给药组五只动物给以给药溶液之一。关于口服给药, 采用 11cm Rusch 8 French 导管和带有吸移管尖的 1ml 注射器。通过导管抽入给药溶液, 然后擦干, 使注射器充满溶液。将导管置于食管下方, 留出 1cm 通道通过门齿。按压注射器活塞, 给以给药溶液。

从尾动脉连续收集血样, 时间通常在 15、30、60、120 和 180 分钟。利用胰岛素 ELISA 试剂盒 (Kit# DSL-10-1600, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX) 测定血清胰岛素水平, 调整标准方案, 目的是优化标准曲线关于用在本方案中的样本体积与

浓度的灵敏度和线性范围。在每个时间点测量每个给药组每只动物的血清人胰岛素浓度($\mu\text{U}/\text{ml}$)。对每个时间点的五个数值取平均,结果绘制成血清胰岛素浓度-时间图。(前人的实验揭示,用单独的人胰岛素口服给药后没有可测量水平的人胰岛素)。最大值(峰值)和曲线下面积(AUC)报告在下表1中。

表1: 胰岛素-口服释放

释放剂 化合物	释放剂化合物剂 量(mg/kg)	胰岛素剂量 (mg/kg)	体积剂量 (ml/kg)	平均峰血清 [INS] \pm SD
15	200	0.25	1	60.42 \pm 117.16
16	200	0.25	1	61.27 \pm 116.59
12	200	0.25	1	83.4 \pm 14.69
13	200	0.25	1	76.8 \pm 6.80

2B: 生物素基化核糖核酸酶 A (bRNA 酶 A) 口服释放

在去离子水中混合释放剂化合物与 bRNA 酶 A (Sigma (Milwaukee, WI): 来自牛胰腺的 XII-A 型核糖核酸酶 A), 制备口服管饲(PO)给药溶液。在磷酸盐缓冲液中制备释放剂化合物溶液, 搅拌。如果必要的话, 加入适当当量浓度的 NaOH 等分试样, 向上调节混合物的 pH, 直至释放剂化合物完全溶解。所溶解的释放剂化合物的最终 pH 在 7.5 与 9.5 之间。将 9 体积释放剂化合物溶液与 1 体积 bRNA 酶 A 储备溶液(含有 20mg bRNA 酶 A 的磷酸盐缓冲盐水(PBS))混合, 制备最终的给药溶液。最终的浓度为 150mg/ml 释放剂化合物和 2mg/ml bRNA 酶 A。

给药和取样方案如下。体重在约 200 - 250g 之间的雄性 Sprague-Dawley 大鼠禁食 24 小时, 在给药前 15 分钟给以氯胺酮(44mg/kg)和氯丙嗪(1.5mg/kg), 并且可以根据需要再次给药, 以维持麻醉。以下列方式对给药组五只动物给以给药溶液之一。采用 11cm Rusch 8 French 导管和带有吸移管尖的 1ml 注射器。通过导管抽入给药溶液, 然后擦干, 使注射器充满溶液。将导管置于食管下方, 留出 1cm 通道通过门齿。按压注射器活塞, 给以给药溶液。在 15、30、45、60 和 90 分钟从尾动脉连续收集血样。通过下述改性免疫测定法量化

血清 bRNA 酶 A 浓度。

核糖核酸酶 A 的生物素基化

为了用一个生物素分子标记每个 RNA 酶 A 分子，活化生物素的比例保持在 3 摩尔生物素/1 摩尔 RNA 酶 A。在代表性生物素基化反应中，将 500mg RNA 酶 A 溶于 20ml 50mM NaHCO₃ pH 7.6，向溶液加入 57.08mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC 生物素 (Pierce Chemical Company, Rockford, IL)，溶解，在冰上放置 2 小时。然后将反应混合物对 4°C 4 升 PBS 透析过夜 (10,000MW 截留透析膜 (Pierce, Rockford, Illinois))。将反应混合物置于 4 升新鲜 PBS 中，透析另外 4 小时。从透析膜上除去经过透析的 bRNA 酶 A，用 PBS 稀释至最终体积为 25ml (bRNA 酶 A 的最终浓度 20mg/ml)，贮存在 4°C 下。

口服给药的 bRNA 酶 A 的血清水平的测定

一般而言，将在不同时间点收集的 100 μ l 等分试样大鼠血清置于 96 孔 Reacti-Bind 链霉抗生物素涂覆的聚苯乙烯平板 (Pierce) 的适当小孔中。培育 2 小时后，洗涤平板，然后与多克隆兔抗 RNA 酶 A (Chemicon, Pittsburgh, PA) 培育。洗涤后，将平板与多克隆山羊抗兔 IgG (Chemicon, Pittsburgh, PA) 培育 2 小时，后者是与碱性磷酸酶缀合的。培育后洗涤平板，加入对-硝基苯基磷酸酯 (碱性磷酸酶底物) (Pierce, Rockford, Illinois)，检测最初捕获的 bRNA 酶 A 的量。通过与标准 bRNA 酶 A 曲线对比，量化在原始大鼠血清中循环的 bRNA 酶 A 的量，从 1000 到 0.1ng/ml 两倍稀释十五次。下表 2 给出最大值 \pm 标准偏差。

表 2: RNA 酶的口服释放

释放剂 化合物	释放剂化合物剂 量 (mg/kg)	bRNA 酶剂量 (mg/kg)	体积剂量 (ml/kg)	平均峰血清 ng/ml
1	150	1	1	2.38 \pm 2.2
3	150	1	1	2.98 \pm 1.66

2c: BIBN4096BS 的口服释放

在水中制备释放剂化合物和降钙素基因相关性肽拮抗剂 1-嘧啶酰

胺。N-[2-[[5-氨基-1-[[4-(4-吡啶基)-1-咪唑基]羰基]戊基]氨基]-1-[(3,5-二溴-4-羟基苯基)甲基]-2-氧代乙基]-4-(1,4-二氢-2-氧代-3(2H)-喹唑啉基)-。[R-(R*,S*)]- (BIBN4096BS) 的口服管饲(P0)给药溶液。通常,在水中制备释放剂化合物的溶液,搅拌。将释放剂化合物与 BIBN4096BS 储备溶液混合,稀释至所需体积(通常 1.0ml),制备最终的给药溶液。如果必要的话,加入适当当量浓度的等分试样盐酸水溶液,调节混合物的 pH,直至给药溶液的最终 pH 在 7.0 以下。每剂化合物的最终剂量为 25mg/kg BIBN4096BS、200mg/kg 释放剂化合物,总体积 1ml/kg。

典型的给药和取样方案如下。体重在约 200 - 250g 之间的雄性 Sprague-Dawley 大鼠禁食 24 小时,在给药前 15 分钟给以氯胺酮 (44mg/kg) 和氯丙嗪 (1.5mg/kg)。以下列方式对给药组五只动物给以给药溶液之一。关于口服管饲(P0)给药,采用 11cm Rusch 8 French 导管和带有吸移管尖的 1ml 注射器。通过导管抽入给药溶液,然后擦干,使注射器充满溶液。将导管置于食管下方,留出 1cm 通道通过门齿。按压注射器活塞,给以给药溶液。从尾动脉连续收集血样,时间通常在 0、15、30、45 和 60 分钟。利用液相色谱/质谱测定法量化血浆 BIBN4096BS 浓度,使用 UV 检测。标准测定范围为 5 - 2,000ng/ml。前人的研究表明基线值约 10ng/ml。最大值报告在下表 3 中。

表 3: 口服 BIBN4096BS 的释放

释放剂 化合物	释放剂化合物剂 量(mg/kg)	BIBN4096BS 剂量 (mg/kg)	体积剂量 (ml/kg)	平均峰血清 ng/ml
1	200	25	1	28±19
4	200	25	1	23±14
2	200	25	1	453±300*
5	200	25	1	402±608*
13	200	25	1	12±3.6
15	200	25	1	0
16	200	25	1	15±8.1

***有些给药溶液的 pH \geq 8.0**

上述专利、申请、试验方法和出版物全文引用在此作为参考。

上述说明将启发本领域技术人员很多本发明的变化。所有这类明显的变化都属于权利要求书所主张的完整范围。