

用作抗血管发生剂的喹唑啉衍生物的马来酸盐

申请号：[200480038665.6](#)

申请日：2004-12-18

申请(专利权)人 [阿斯利康\(瑞典\)有限公司](#)

地址 [瑞典南泰利耶](#)

发明(设计)人 [J 麦卡布](#)

主分类号 [C07D403/12\(2006.01\)I](#)

分类号 [C07D403/12\(2006.01\)I](#) [A61K31/505\(2006.01\)I](#)
[A61P35/00\(2006.01\)I](#)

公开(公告)号 1898232

公开(公告)日 2007-01-17

专利代理机构 [中国专利代理\(香港\)有限公司](#)

代理人 [程淼 李连涛](#)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480038665.6

[51] Int. Cl.

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 17 日

[11] 公开号 CN 1898232A

[22] 申请日 2004.12.18

[21] 申请号 200480038665.6

[30] 优先权

[32] 2003.12.24 [33] GB [31] 0330002.7

[86] 国际申请 PCT/GB2004/005359 2004.12.18

[87] 国际公布 WO2005/061488 英 2005.7.7

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.23

[71] 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 J·麦卡布

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 李连涛

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 10 页

[54] 发明名称

用作抗血管发生剂的喹唑啉衍生物的马来酸盐

[57] 摘要

本发明涉及 AZD2171 马来酸盐, 涉及 AZD2171 马来酸盐的特定结晶形式, 涉及它们的制备方法, 涉及含有它们作为活性成分的药物组合物, 涉及它们在生产用于在温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物的用途, 还涉及它们用于治疗与血管发生和/或增加的血管渗透性有关的疾病状态的方法的用途。

1. AZD2171 的马来酸盐。

2. 根据权利要求 1 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A。

3. 根据权利要求 1 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 B。

4. 根据权利要求 2 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 21.5^\circ$ 有至少一个特定峰。

5. 根据权利要求 2 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 16.4^\circ$ 有至少一个特定峰。

6. 根据权利要求 2 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 21.5^\circ$ 和 16.4° 有至少两个特定峰。

7. 根据权利要求 2 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 21.5^\circ$ 、 16.4° 、 24.4° 、 20.7° 、 25.0° 、 16.9° 、 12.1° 、 22.2° 、 17.4° 和 17.6° 有特定峰。

8. 根据权利要求 2 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 A，其中所述盐具有与图 5 中所示的 X 射线粉末衍射图基本相同的 X 射线粉末衍射图。

9. 根据权利要求 3 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 B，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 有至少一个特定峰。

10. 根据权利要求 3 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 B，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 22.7^\circ$ 有至少一个特定峰。

11. 根据权利要求 3 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 B，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 和 22.7° 有至少两个特定峰。

12. 根据权利要求 3 的 AZD2171 的马来酸盐，其为结晶形式：形式 B，其中所述盐的 X 射线粉末衍射图在约 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 、 22.7° 、 15.7° 、

12.0、27.1、25.0、17.7、15.0、23.1 和 12.6°有特定峰。

13. 根据权利要求3的AZD2171的马来酸盐，其为结晶形式：形式B，其中所述盐具有与图8中所示的X射线粉末衍射图基本相同的X射线粉末衍射图。

14. 药物组合物，其包含与可药用赋形剂或载体结合的权利要求1的AZD2171的马来酸盐。

15. 根据权利要求14的药物组合物，其中AZD2171马来酸盐是结晶形式：形式A。

16. 根据权利要求14的药物组合物，其中AZD2171马来酸盐是结晶形式：形式B。

17. 制备如权利要求2中要求保护的结晶形式的形式A的AZD2171的马来酸盐的方法，其包括：

(i)将AZD2171游离碱溶解在有机溶剂中形成溶液；

(ii)加入马来酸的水溶液或者加入马来酸在有机溶剂中的溶液；

(iii)允许发生自发成核；

(iv)使混合物在溶剂中成为浆液直到所有AZD2171马来酸盐都是形式A；和

(v)分离所形成的结晶固体。

18. 制备如权利要求2中要求保护的结晶形式的形式A的AZD2171的马来酸盐的方法，其包括：

(i)将AZD2171游离碱溶解在有机溶剂中形成溶液；

(ii)加入马来酸的水溶液或者加入马来酸在有机溶剂中的溶液；

(iii)得到溶液并加入AZD2171马来酸盐形式A的种子以引发AZD2171马来酸盐形式A的结晶；和

(iv)分离所形成的结晶固体。

19. 制备如权利要求3中要求保护的结晶形式的形式B的AZD2171的马来酸盐的方法，其包括：

(i)将AZD2171马来酸盐溶解在有机溶剂中形成溶液；

(ii)将所述溶液加入到溶剂中，其中AZD2171马来酸盐在该溶剂中的溶解度小于在NMP中的溶解度；

(iii)然后发生AZD2171马来酸盐形式B的结晶；和

(iv)分离所形成的结晶固体。

20. 如权利要求 1 中要求保护的 AZD2171 的马来酸盐的用途, 用于生产用于在温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物。

21. 在需要治疗的温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的方法, 其包括对所述动物施用有效量的如权利要求 1 中要求保护的 AZD2171 的马来酸盐。

用作抗血管发生剂的噻唑啉衍生物的马来酸盐

本发明涉及 AZD2171 马来酸盐, 涉及 AZD2171 马来酸盐的特定结晶形式, 涉及它们的制备方法, 涉及含有它们作为活性成分的药物组合物, 涉及它们在生产用于在温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物的用途, 还涉及它们用于治疗与血管发生和/或增加的血管渗透性有关的疾病状态的方法的用途。

正常的血管发生在多种过程中起重要作用, 所述过程包括胚胎发育、伤口愈合和女性生殖功能的一些组成部分。不希望的或者病理性血管发生与疾病状态有关, 所述疾病状态包括糖尿病性视网膜病、牛皮癣、癌症、类风湿性关节炎、粉瘤、卡波西肉瘤和血管瘤(Fan et al, 1995, Trends Pharmacol. Sci. 16: 57-66; Folkman, 1995, Nature Medicine 1: 27-31)。血管渗透性的改变被认为在正常的和病理性生理过程中起作用(Cullinan-Bove et al, 1993, Endocrinology 133: 829-837; Senger et al, 1993, Cancer and Metastasis Reviews, 12: 303-324)。已经鉴定了具有体外内皮细胞生长促进活性的一些多肽, 它们包括酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF & bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)。由于它的受体的受限的表达, VEGF 的生长因子活性与 FGF 的相比, 对于内皮细胞是相对特异的。最近的证据表明 VEGF 是正常的和病理性血管发生(Jakeman et al, 1993, Endocrinology, 133: 848-859; Kolch et al, 1995, Breast Cancer Research and Treatment, 36:139-155)和血管渗透性(Connolly et al, 1989, J. Biol. Chem. 264: 20017-20024)的重要刺激剂。用抗体整合 VEGF 拮抗 VEGF 的作用可以引起肿瘤生长的抑制(Kim et al, 1993, Nature 362: 841-844)。

受体酪氨酸激酶(RTK)在生化信号穿过细胞的质膜传输中是重要的。这些跨膜分子特征性地由质膜中的片段将细胞外配体结合结构域连接到细胞内酪氨酸激酶结构域而组成。配体与受体的结合导致受体相关的酪氨酸激酶活性的激活, 其导致受体和其他细胞内分子上酪氨酸残基的磷酸化。酪氨酸磷酸化中的这些改变引起信号级联, 导致多种细胞应答。迄今为止, 已经鉴定了通过氨基酸序列同源性定义的至少 19 种不同的 RTK 亚家族。这些亚家族之一当前包括 fms-样酪氨

酸激酶受体、Flt-1、含有激酶插入结构域的受体、KDR(也称作 Flk-1), 和另一种 fms-样酪氨酸激酶受体 Flt-4。已经表明这些相关的 RTKs 中的两种, Flt-1 和 KDR, 以高亲和力结合 VEGF(De Vries et al, 1992, *Science* 255: 989-991; Terman et al, 1992, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992, 187: 1579-1586)。VEGF 对异源细胞中表达的这些受体的结合已经与细胞蛋白质和钙通量 (calcium fluxes) 中酪氨酸磷酸化状态的改变有关。

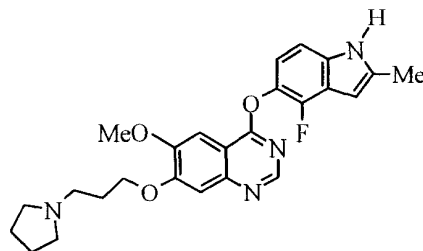
VEGF 是血管生成和血管发生的关键刺激物。该细胞因子通过诱导内皮细胞增殖、蛋白酶表达和迁移以及随后的细胞组织以形成毛细血管而诱导血管芽生式表型 (sprouting phenotype) (Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T., *Science* (Washington DC), 246: 1309-1312, 1989; Lamoreaux, W.J., Fitzgerald, M.E., Reiner, A., Hasty, K.A., and Charles, S.T., *Microvasc. Res.*, 55: 29-42, 1998; Pepper, M.S., Montesano, R., Mandroita, S.J., Orci, L. and Vassalli, J.D., *Enzyme Protein*, 49: 138-162, 1996.)。此外, VEGF 引起明显的血管渗透性 (Dvorak, H.F., Detmar, M., Claffey, K.P., Nagy, J.A., van de Water, L., and Senger, D.R., (*Int. Arch. Allergy Immunol.*, 107: 233-235, 1995; Bates, D.O., Heald, R.I., Curry, F.E. and Williams, B. *J. Physiol. (Lond.)*, 533: 263-272, 2001), 促进超渗透的、不成熟的血管网络的形成 (其是病理性血管发生特征性的)。

已经表明仅 KDR 的激活就足够促进对 VEGF 的所有主要表型应答, 包括内皮细胞增殖、迁移和存活, 和血管渗透性的诱导 (Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H-J., and Dehio, C., *EMBO J.*, 18: 363-374, 1999; Zeng, H., Sanyal, S. and Mukhopadhyay, D., *J. Biol. Chem.*, 276: 32714-32719, 2001; Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N. and Ferrara, N., *J. Biol. Chem.*, 276: 3222-3230, 2001)。

抑制 VEGF 的效应的化合物在治疗与血管发生和/或增加的血管渗透性有关的疾病状态中是有价值的, 所述疾病状态为诸如癌症 (包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤)、糖尿病、牛皮癣、类风湿性关节炎、卡波西肉瘤、血管瘤、急性和慢性肾病、粉瘤、动脉再狭窄、自

身免疫病、急性炎症、过度瘢痕形成和粘连、子宫内膜异位、淋巴管性水肿、功能障碍性子宫出血和具有视网膜血管增生的眼病，包括黄斑变性。

在 WO 00/47212 中描述了喹唑啉衍生物，它们是 VEGF 受体酪氨酸激酶的抑制剂。化合物 AZD2171 在 WO 00/47212 中作为实例（见实施例 240），是式 I 的 4-((4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基)氧基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹唑啉：



(I)

AZD2171 在 WO 00/47212 和下文描述的体外 (a) 酶和 (b) HUVEC 测定中显示出极好的活性。酶测定中抑制分离的 KDR (VEGFR-2) 和 Flt-1 (VEGFR-1) 酪氨酸激酶活性的 AZD2171 IC_{50} 值分别是 <2 nM 和 5 ± 2 nM。AZD2171 强烈抑制 VEGF-刺激的内皮细胞增殖 (HUVEC 测定中 0.4 ± 0.2 nM 的 IC_{50} 值)，但是在 >1250 倍的更大浓度下没有测到其抑制基底内皮细胞增殖 (IC_{50} 值 >500 nM)。分别用 1.5、3 和 6 mg/kg/天 AZD2171 每天一次口服治疗 28 天后下文中描述的体内 (c) 实体瘤模型中 Calu-6 肿瘤异种移植物的生长分别被抑制 49%^{**}、69%^{***} 和 91%^{***} ($P^{**} < 0.01$, $P^{***} < 0.0001$; 单尾 t 检验)。

药学活性化合物的更稳定形式，例如，更稳定的结晶形式为制剂和在商业规模上加工所优选。这是因为所用形式的稳定性越大，在配制步骤如压缩过程中它转化成另一种形式的危险越低。这又提供了最终制剂的性质，如片剂的溶解速率、活性成分的生物利用率的更好的预测性。使用活性成分的更稳定形式使对制剂的物理形式进行更强的控制成为可能。

AZD2171 游离碱(4-((4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基)氧基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹唑啉)是环境条件下的结晶一水合物。根据下文描述的方法进行差示扫描量热法 (DSC) 分析，该分析显示其由于损失水和溶解而导致的 95° 到 170° C 之间很宽的吸热 (图 1)。热

重分析法 (TGA) 分析 (下文给出细节) 显示在 80° C 到 115° C 重量损失 4.02% (图 1)。Karl Fischer 水分析 (下文给出细节) 得到 3.9% 的数字, 提示所有重量损失都是由于失水。

应理解 DSC 的起始/峰温度值可以在一台机器与另一台机器或者在一个样品到另一个样品之间稍微不同, 因此所引用的值不应理解为是绝对的。

AZD2171 游离碱的特征是提供了使用 CuK α 辐射测量的下面的 2 θ 值的至少一个: 18.3 和 20.8。AZD2171 游离碱的特征是提供了如图 2 中 X 射线粉末衍射图。10 个最突出的峰在表 1 中显示。

表 1: AZD2171 游离碱的 10 个最突出的 X 射线粉末衍射峰

角度 2-Theta (2 θ)	强度计数	相对强度
18.287	100	vs
20.807	66.7	vs
27.277	48.9	vs
23.370	42.8	vs
14.684	39.8	vs
25.070	37.6	vs
13.966	32.2	vs
21.711	26.6	vs
22.898	23.1	vs
26.790	22.9	vs

vs = 非常强

已经发现当 AZD2171 游离碱的样品脱水时, 例如, 加热到 100 °C 时, 样品变得无定形 (图 3) 并且之后不再水合而是保持无定形。如果要将 AZD2171 游离碱配制成药物组合物, 那么这将是存在问题的, 因为 AZD2171 游离碱在某些过程如颗粒大小减小 (如研磨)、批量药物干燥、配制、生产期间可以脱水。为了将 AZD2171 游离碱配制成药物组合物, 将必须在某点减小颗粒大小, 并且这将具有脱水的危险并且因此具有形成无定形物质的危险。通过将 AZD2171 游离碱一水合物的样品通过微粉化进行颗粒减小然后对其进行分析以寻找无定形材料, 对该问题进行了研究。图 4 表明在 AZD2171 游离碱的颗粒大小减小期间

确实形成无定形材料。这通过峰的增宽和无定形“隆起”的形成来证明 - 见图 4。AZD2171 游离碱的无定形或者半 - 无定形形式可以引起生产问题和不可再现的生物利用率。

AZD2171 的备选形式、与游离碱不同并且具有改进的固态性质的形式的鉴定是本发明的主题。

不同形式的一个实例是 AZD2171 的盐。在 WO 00/47212 中声称其中的发明化合物的可药用盐可以包括该发明化合物的酸加成盐，所述化合物足够碱性而形成此类盐。此类酸加成盐据说包括与提供药学上可接受的阴离子的无机酸或有机酸的盐，所述酸为诸如卤化氢，特别是氢氯酸或氢溴酸，或者硫酸或磷酸，或者三氟乙酸、柠檬酸或者马来酸。此外，WO 00/47212 还宣称当其中的发明化合物足够酸性时，可以与提供药学上可接受的阳离子的无机或有机碱形成可药用盐。据说此类与无机或者有机碱的盐包括碱金属盐，如钠盐或钾盐，碱土金属盐，如钙盐或镁盐，铵盐或者例如，与甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉或者三-(2-羟基乙基)胺形成的盐。

WO 00/47212 中的优选盐是盐酸盐和氢溴酸盐，特别是盐酸盐。

在 WO 00/47212 中没有任何地方陈述其中的特定化合物的特定盐将具有令人惊奇的有益性质。

出乎意外并且令人惊奇地，我们现在发现 AZD2171 的马来酸盐是 AZD2171 的有利的稳定形式，其比游离碱和已经测试的其他盐具有改进的固态性质。

AZD2171 马来酸盐是容易结晶的、是高度结晶的、非吸湿的并且具有药物与平衡离子 (counter ion) 1:1 的可再现的化学剂量比。

从而，AZD2171 马来酸盐是容易结晶的、是高度结晶的、非吸湿的并且具有药物与平衡离子 1:1 的可再现的化学剂量比。

制备了 AZD2171 的一些盐并且发现有七种是结晶的：丙二酸盐、琥珀酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、己二酸盐和苹果酸盐。测试了这 7 种盐的固态性质并且在表 2 中显示了结果：

表 2: AZD2171 盐的性质

盐	结晶的 (是/否)	药物:平衡 离子化学 剂量 ^a	80% RH 时的水分 含量 ^b	水合物形 成的证据 ^b (是/否)	多形 体数 ^c
丙二酸盐	是	-	-	是	≥ 3
琥珀酸盐	是	1:0.63	11.4	否	≥ 2
延胡索酸盐	是	1:0.5	3.5	否	≥ 3
马来酸盐	是	1:1	0.4	否	≥ 2
酒石酸盐	是	1:0.75	9.3	否	≥ 1
己二酸盐	是	1:0.75	-	否	≥ 3
苹果酸盐	是	-	7.7	是	-

^a 药物:平衡离子化学计量来自 ¹H NMR 谱数据

^b 80%相对湿度 (RH) 下的水分含量。水合证据来自蒸汽吸收研究 (观察到的滞后现象和水的吸收) 或者热重分析法 (TGA)

^c 来自差示扫描量热法 (DSC) 差示热分析图的多形现象的证据。
术语“非吸湿的”指在 80% RH 下吸收 <1% 水分。

AZD2171 马来酸盐令人惊奇地好于其他盐,因为在可能结晶的这 7 种盐中,发现 AZD2171 马来酸盐是唯一的非吸湿性盐,是高度结晶的并且具有药物与平衡离子为 1:1 的可再现的化学计量比。

从而发现 AZD2171 马来酸盐是唯一的非吸湿性盐,是高度结晶的并且具有药物与平衡离子为 1:1 的可再现的化学计量比。

AZD2171 马来酸盐基本上没有无定形物质并且可以预期比 AZD2171 游离碱更容易配制并且提供了更容易再现的给药结果。“基本上无无定形物质”指无定形物质的量小于 10%, 优选小于 5%, 更优选小于 2%。

AZD2171 马来酸盐是非吸湿的,其将防止或者减少与在诸如微粉化的步骤期间活性成分的重量改变有关的问题。

根据本发明,提供了 AZD2171 的马来酸盐。

AZD2171 马来酸盐具有两种结晶形式 A 和 B。

根据本发明,提供了第一种结晶形式:形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐。

AZD2171 马来酸盐形式 A 的特征是使用 CuKα 辐射时提供下面的 2θ 值的至少一个: 21.5 和 16.4。AZD2171 马来酸盐形式 A 的特征是提

供基本如图 5 中所示的 X 射线粉末衍射图。10 个最突出的峰在表 3 中显示：

表 3

AZD2171 马来酸盐形式 A 的 10 个最突出的 X 射线粉末衍射峰

角度 2-Theta (2θ)	强度计数	相对强度
21.522	100	vs
16.366	78.3	vs
24.381	73.7	vs
20.721	71.7	vs
25.025	71.5	vs
16.921	55.5	vs
12.085	44.1	vs
22.177	42.2	vs
17.444	40.7	vs
17.627	39.1	vs

vs = 非常强

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 21.5° 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 16.4° 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 21.5° 和 16.4° 处有至少两个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 21.5, 16.4, 24.4, 20.7, 25.0, 16.9, 12.1, 22.2, 17.4 和 17.6° 处有特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图与图 5 中所示的 X-射线粉末衍射图基本上相同。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来

酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 $2\text{-theta} = 21.5^\circ \pm 0.5^\circ$ 2-theta 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 $2\text{-theta} = 16.4^\circ \pm 0.5^\circ$ 2-theta 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-theta} = 21.5^\circ$ 和 16.4° 处有至少两个特定峰，其中所述值可以是 $\pm 0.5^\circ$ 2-theta 。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 $2\text{-theta} = 21.5, 16.4, 24.4, 20.7, 25.0, 16.9, 12.1, 22.2, 17.4$ 和 17.6° 处有特定峰，其中所述值可以是 $\pm 0.5^\circ$ 2-theta 。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-theta} = 21.5^\circ$ 有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-theta} = 16.4^\circ$ 有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-theta} = 21.5^\circ$ 和 16.4° 处有至少两个特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-theta} = 21.5, 16.4, 24.4, 20.7, 25.0, 16.9, 12.1, 22.2, 17.4$ 和 17.6° 处有特定峰。

根据本发明，提供了第一种结晶形式：形式 A 的 AZD2171 的马来酸盐，其中所述盐具有如图 5 中所示的 X-射线粉末衍射图。

DSC 分析表明 AZD2171 马来酸盐形式 A 是高熔点固体，在 198.3°C 开始熔解，峰值为 200.08°C （图 6）。

从而 DSC 分析表明 AZD2171 马来酸盐形式 A 是高熔点固体，在约 198.3°C 开始熔解，峰值为约 200.08°C 。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐。

AZD2171 马来酸盐形式 B 的特征是使用 CuK α 辐射时提供下面的 2 θ 值的至少一个：24.2 和 22.7。AZD2171 马来酸盐形式 B 的特征是提供基本如图 8 中所示的 X 射线粉末衍射图。10 个最突出的峰在表 4 中显示：

表 4

AZD2171 马来酸盐形式 B 的 10 个最突出的 X 射线粉末衍射峰

角度 2-Theta (2 θ)	强度计数	相对强度
24.156	100	vs
22.740	84.3	vs
15.705	64.0	vs
11.995	63.7	vs
27.087	60.9	vs
25.032	56.8	vs
17.724	37.7	vs
15.044	35.4	vs
23.102	34.5	vs
12.625	34.2	vs

vs = 非常强烈

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 24.2° 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 22.7° 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 24.2° 和 22.7° 处有至少两个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在约 2-theta = 24.2、22.7、15.7、12.0、27.1、25.0、17.7、15.0、23.1 和 12.6° 处有特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图与图 8 中显示的 X-射线粉末衍射

图基本相同。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ \pm 0.5^\circ$ $2\text{-}\theta$ 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 22.7^\circ \pm 0.5^\circ$ $2\text{-}\theta$ 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 和 22.7° 处有至少两个特定峰，其中所述值可以是 $\pm 0.5^\circ$ $2\text{-}\theta$ 。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 、 22.7° 、 15.7° 、 12.0° 、 27.1° 、 25.0° 、 17.7° 、 15.0° 、 23.1° 和 12.6° 处有特定峰，其中所述值可以是 $\pm 0.5^\circ$ $2\text{-}\theta$ 。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 22.7^\circ$ 处有至少一个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 和 22.7° 处有至少两个特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐的 X-射线粉末衍射图在 $2\text{-}\theta = 24.2^\circ$ 、 22.7° 、 15.7° 、 12.0° 、 27.1° 、 25.0° 、 17.7° 、 15.0° 、 23.1° 和 12.6° 处有特定峰。

根据本发明，提供了第二种结晶形式：形式 B 的 AZD2171 马来酸盐，其中所述盐具有如图 8 中所示的 X-射线粉末衍射图。

DSC 分析表明 AZD2171 马来酸盐形式 B 是高熔点固体，在 194.43°C 开始熔解，峰值为 195.97°C （图 9）。

从而 DSC 分析表明 AZD2171 马来酸盐形式 B 是高熔点固体，在约 194.43°C 开始熔解，峰值为约 195.97°C 。

形式 B 相对形式 A 是亚稳定的 (meta-stable) (形式 B 的熔点和溶解热低于形式 A 的)。形式 A 是热力学更稳定的形式。形式 A 和 B 的混合物当在 40°C 的甲醇中搅拌 4 天时形成形式 A (图 10)。

形式 A 比形式 B 优选。

AZD2171 马来酸盐是非吸湿的, 在 80% 相对湿度下吸收 <1% 水分 (图 7)。

在实施例中马来酸盐制备后给出 NMR 细节, 其显示 1:1 比例的化学计量数据。

根据本发明的另一方面, 提供了 AZD2171 的马来酸氢盐。可以通过向一摩尔 AZD2171 游离碱加入两摩尔马来酸形成马来酸氢盐。

当陈述本发明涉及 AZD2171 游离碱的结晶形式, 或者 AZD2171 马来酸盐形式 A 或 AZD2171 马来酸盐形式 B 时, 结晶度有利的是大于约 60%, 更有利的是大于约 80%, 优选大于约 90%, 更优选大于约 95%。最优选地, 结晶度大于约 98%。

AZD2171 马来酸盐形式 A 和 B 分别提供了与图 5 和 8 中所示 X 射线粉末衍射图基本上相同的 X 射线粉末衍射图并且分别具有图 3 和图 4 中基本上 10 个最突出的峰 (角度 2-theta 值)。应理解 X 射线粉末衍射图的 2-theta 值可以随一个机器与另一机器和一个样品与另一样品而稍微不同, 并且因此所引用的值不应被理解成绝对的。

已知可以得到这样的 X 射线粉末衍射图, 其取决于测量条件 (如所用的设备和机器) 而具有一个或多个测量误差。具体地, 通常已知 X 射线粉末衍射图中的强度可以随测量条件波动。因此, 应理解本发明的 AZD2171 马来酸盐形式不限于提供与图 5 和 8 中所示 X 射线粉末衍射图相同的 X 射线粉末衍射图的晶体, 并且提供与图 5 和 8 中所示 X 射线粉末衍射图基本相同的 X 射线粉末衍射图的任何晶体都在本发明范围内。X 射线粉末衍射领域的技术人员能够判断 X 射线粉末衍射图的基本相同性。

X 射线粉末衍射领域的技术人员会认识到峰的相对强度可以受到例如大小大于 30 微米的颗粒和非单一纵横比的影响, 其可以影响样品的分析。技术人员还将认识到反射的位置可以受到样品在衍射仪中的精确高度和衍射仪的零校准的影响。样品的表面平面性也可以具有小的影响。因此, 不应该将所给出的衍射图数据认为是绝对值 (Jenkins, R

& Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, London; Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures).

通常, X 射线粉末衍射图的衍射角的测量误差为约 5% 或更小, 尤其 $\pm 0.5^\circ$ 2-theta, 并且当考虑图 2、3、4、5、8 和 10 中的 X 射线粉末衍射图和读表 1、3 和 4 时, 应考虑这种测量误差程度。此外, 应该理解强度可以依赖实验条件和样品制备 (优选的定向) 而波动。

为了避免不确定, 术语如 "AZD2171 马来酸盐" 和 "AZD2171 的马来酸盐" 指 AZD2171 马来酸盐的每一种形式, 而 "AZD2171 马来酸盐形式 A" 指称作形式 A 的特定结晶形式并且 "AZD2171 马来酸盐形式 B" 指称作形式 B 的特定结晶形式。

根据本发明的另一方面, 提供了药物组合物, 其包含与可药用赋形剂或载体结合的如上文定义的 AZD2171 马来酸盐。

组合物可以为适于经口施用 (例如, 作为片剂、糖锭、硬胶囊或软胶囊、水性或油性混悬剂、乳剂、可分散的粉剂或者粒剂、糖浆剂或者酏剂), 适于通过吸入施用 (例如, 作为细分的粉剂或者液体气溶胶), 适于通过吹入施用 (例如, 作为细分的粉剂), 适于肠胃外注射 (例如, 作为用于静脉内、皮下、肌内、血管内或者输注给药的无菌溶液剂、混悬剂或者乳剂), 适于局部施用 (例如, 作为霜剂、软膏剂、凝胶剂或者水性或油性溶液剂或混悬剂), 或者适于直肠施用 (例如, 作为栓剂) 的形式。优选经口施用 AZD2171 马来酸盐。通常, 可以用常规赋形剂, 以常规方式制备上面的组合物。

本发明的组合物有利地以单位剂型存在。AZD2171 马来酸盐将通常以 $1\text{-}50\text{mg}/\text{m}^2$ 动物身体面积的单位剂量施用于温血动物, 例如, 在人中约 $0.03\text{-}1.5\text{mg}/\text{kg}$ 。设想例如 $0.01\text{-}1.5\text{mg}/\text{kg}$, 例如 $0.05\text{-}0.75\text{mg}/\text{kg}$, 优选 $0.03\text{-}0.5\text{mg}/\text{kg}$ 范围内的单位剂量并且这通常是治疗有效剂量。单位剂型如片剂或者胶囊剂将通常含有例如, $1\text{-}50\text{mg}$ 活性成分。优选地, 使用 $0.03\text{-}0.5\text{mg}/\text{kg}$ 范围内的日剂量。特定疾病状态的治疗性或预防性治疗所需的剂量大小将必须取决于所治疗的宿主、施用途径和正在治疗的疾病的严重性而变。因此, 可以由正在治疗任何特定患者的开业医生确定最佳剂量。

根据本发明的另一方面，提供了如上文定义的 AZD2171 马来酸盐，其用于通过疗法治疗人或动物体的方法中。

本发明的另一特征是如上文定义的 AZD2171 马来酸盐用作药物，有利地，如上文定义的 AZD2171 马来酸盐用作在温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物。

从而，根据本发明的另一方面，提供了如上文定义的 AZD2171 马来酸盐的用途，用于生产用于在温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物。

根据本发明的另一特征，提供了在需要此类治疗的温血动物如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的方法，其包括对所述动物施用有效量的如上文定义的 AZD2171 马来酸盐。

AZD2171 马来酸盐是抗血管发生和/或血管渗透性减小剂并且可以作为单一疗法应用或者可以除了 AZD2171 马来酸盐外还包括一种或多种其他物质和/或治疗。可以通过同时、顺序或者分开施用治疗的各自组分实现此类联合治疗。在医学肿瘤学领域，通常使用不同治疗形式的组合来治疗每名癌症患者。在医学肿瘤学中，除了 AZD2171 马来酸盐以外，此类联合治疗的其他组分可以是：手术、放射疗法或化学疗法。此类化学疗法可以覆盖三大类治疗剂：

(i)其他抗血管发生剂，如抑制血管内皮生长因子作用的活性剂（例如，抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗[Avastin™]，和通过与上文定义的不同的机理起作用的活性剂（例如，三羧氨基喹啉（linomide）、整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 功能的抑制剂、血管他丁、razoxin、沙立度胺），并且包括血管靶向剂（例如，磷酸考布他汀（combretastatin phosphate）和国际专利申请 WO00/40529、WO 00/41669、WO01/92224、WO02/04434 和 WO02/08213 中公开的化合物和国际专利申请公开号 WO 99/02166 中描述的血管损伤剂，将这些文件的完整公开并入本文作为参考（例如 N-乙酰基 colchicol-O-磷酸））；

(ii)细胞生长抑制剂，如抗雌激素药（例如，他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛西芬、iodoxyfene），雌激素受体下调剂（例如，氟维司群），孕激素类（例如，乙酸甲地孕酮），芳香酶抑制剂（例如，阿那曲唑、来曲唑、vorazole、依西美坦），抗孕激素、抗雄激素（例如，氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸环丙氯地孕酮），LHRH

激动剂和拮抗剂（例如，醋酸性瑞林、luprolide、布舍瑞林）、 5α -还原酶抑制剂（例如，非那雄胺）、抗侵入剂（例如，金属蛋白酶抑制剂，像马马司他和尿激酶纤溶酶原活化因子受体功能的抑制剂）和生长因子功能抑制剂（此类生长因子包括例如血小板衍生生长因子和肝细胞生长因子），此类抑制剂包括生长因子抗体、生长因子受体抗体（例如，抗-erbb2 抗体曲妥单抗[Herceptin™]和抗-erbb1 抗体西妥昔单抗[C225])、法尼基转移酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂例如表皮生长因子家族的抑制剂（例如 EGFR 家族酪氨酸激酶抑制剂，如 N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉-4-胺 (gefitinib, AZD1839), N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺 (埃罗替尼, OSI-774) 和 6-丙烯基酰氨基-N-(3-氯-4-氟苯基)-7-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉-4-胺 (CI 1033))和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂)；和

(iii)如用于医学肿瘤学中的抗增殖/抗肿瘤药物和它们的组合，如抗代谢物（例如，抗叶酸剂，如甲氨蝶呤、氟嘧啶，像 5-氟尿嘧啶、喃氟啶、嘌呤和腺苷类似物、阿糖胞苷）；抗肿瘤抗生素（例如，蒽环类，像阿霉素、博来霉素、多柔比星、柔红霉素、表阿霉素和伊达比星、丝裂霉素 C、更生霉素、光辉霉素）；铂衍生物（例如，顺铂、卡铂）；烷化剂（例如，氮芥、米尔法兰、苯丁酸氮芥、白消安、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝脲、塞替哌）；抗有丝分裂剂（例如，长春花生物碱类，像长春新碱、长春花碱、长春地辛、长春烯碱和紫杉烷类，像紫杉醇、多西紫杉醇）；拓扑异构酶抑制剂（例如，表鬼白毒素，像依托泊苷和替尼泊苷、胺苯吡啶、拓扑替康、喜树碱和伊立替康）；和酶（例如，门冬酰胺酶）；和胸腺嘧啶核苷酸合酶抑制剂（例如，雷替曲塞）；

并且其它类型的化学治疗剂包括：

(iv)生物反应调节剂（例如，干扰素）；

(v)抗体（例如，依决洛单抗）；

(vi)反义疗法，例如，针对上面列出的靶标的疗法，如 ISIS 2503、抗-ras 反义；

(vii)基因治疗方法，包括例如，替换异常基因，如异常 p53 或异常 BRCA1 或 BRCA2 的方法，GDEPT（基因介导的酶前药治疗）方法，如使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或者细菌硝基还原酶的方法和增加患

者对化学疗法或放射疗法的耐受性的方法，如多种药物抗性基因疗法；和

(viii)免疫治疗方法，包括例如用于增加患者肿瘤细胞的免疫原性的离体和体内方法，如用诸如白介素 2、白介素 4 或者粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的细胞因子转染，减小 T 细胞无反应性的方法，使用转染的免疫细胞如细胞因子转染的树突细胞的方法，使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗独特型抗体的方法。

例如，可以通过同时、顺序或者单独施用如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和 WO 99/02166 中描述的血管靶向剂，如 N-乙酰基 colchicol-O-磷酸（WO 99/02166 的实施例 1）实现此类联合治疗。

从 WO 01/74360 已知可以将抗血管发生剂与抗高血压剂组合。将本发明的盐也可以与抗高血压剂组合施用。抗高血压剂是降低血压的活性剂，见 WO 01/74360，将其引入本文作为参考。

从而，根据本发明，提供了治疗与血管发生有关的疾病状态的方法，其包括对温血动物，如人施用有效量的如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和抗高血压剂的组合。

根据本发明的另一个特征，提供了如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和抗高血压剂的组合的用途，用于生产治疗温血动物，如人中与血管发生有关的疾病状态的药物。

根据本发明的另一个特征，提供了包含如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和抗高血压剂的药物组合物，其用于治疗温血动物，如人中与血管发生有关的疾病状态。

根据本发明的另一方面，提供了在温血动物，如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的方法，其包括对所述动物施用有效量的如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和抗高血压剂。

根据本发明的另一方面，提供了如上文定义的 AZD2171 马来酸盐和抗高血压剂的组合的用途，用于生产在温血动物，如人中产生抗血管发生和/或血管渗透性减小效应的药物。

优选的抗高血压剂是钙通道阻断剂、血管紧张肽转化酶抑制剂（ACE 抑制剂）、血管紧张肽 II 受体拮抗剂（A-II 拮抗剂）、利尿剂、 β -肾上腺素能受体阻断剂（ β -阻断剂）、血管扩张剂和 α -肾上腺素能受体阻断剂（ α -阻断剂）。特定抗高血压剂是钙通道阻断剂、血管

紧张肽转化酶抑制剂 (ACE 抑制剂)、血管紧张肽 II 受体拮抗剂 (A-II 拮抗剂) 和 β -肾上腺素能受体阻断剂 (β -阻断剂), 特别是钙通道阻断剂。

如上述的 AZD2171 马来酸盐对于抗血管发生和/或血管渗透减小效应是重要的。预计 AZD2171 马来酸盐可以用于多种疾病状态, 包括癌症、糖尿病、牛皮癣、类风湿性关节炎、卡波西肉瘤、血管瘤、淋巴管性水肿、急性和慢性肾病、粉瘤、动脉再狭窄、自身免疫病、急性炎症、过度瘢痕形成和粘连、子宫内膜异位、功能障碍性子宫出血和具有视网膜血管增生的眼病, 包括年龄相关的黄斑变性。癌症可以影响任何组织并且包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。具体地, 预计本发明的此类化合物有利地减慢例如, 结肠、乳腺、前列腺、肺和皮肤的原发和复发的实体瘤的生长。更具体地, 预计本发明的此类化合物抑制与 VEGF 相关的任意类型的癌症, 包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤, 以及例如, 与 VEGF 相关的那些原发性和复发性实体瘤的生长, 特别是抑制它们的生长和扩散严重依赖于 VEGF 的那些肿瘤, 例如, 结肠、乳腺、前列腺、肺、脑、外阴和皮肤的某些肿瘤。

除了用于治疗性药物, 上文定义的 AZD2171 马来酸盐还可以用作药理学工具用来研发和标准化体外和体内测试系统, 用以评估 VEGF 受体赖氨酸激酶活性的抑制剂在实验动物如猫、狗、兔、猴、大鼠和小鼠中的效果, 作为新的治疗剂的研究的部分。

在 WO 00/47212 中详述并且用于测试 AZD2171 的测定法如下:

(a) 体外受体赖氨酸激酶抑制试验

该测定法确定受试化合物抑制酪氨酸激酶活性的能力。可以通过完全基因合成(Edwards M, International Biotechnology Lab 5(3), 19-25, 1987)或者通过克隆得到编码 VEGF、FGF 或 EGF 受体细胞质结构域的 DNA。然后它们可以在适当的表达系统中表达得到具有酪氨酸激酶活性的多肽。例如, 发现通过在昆虫细胞中表达重组蛋白质得到的 VEGF、FGF 和 EGF 受体细胞质结构域表现出内在的酪氨酸激酶活性。对于 VEGF 受体 Flt-1 (Genbank 登记号 X51602), 从 cDNA 分离了编码细胞质结构域的大部分的 1.7kb DNA 片段 (从甲硫氨酸 783 开始并且包括终止密码子, 描述于 Shibuya et al (Oncogene, 1990, 5: 519-524)), 并将其克隆到杆状病毒置换型载体 (例如, pAcYM1 (见 The

Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, L.A. King and R. D. Possee, Chapman and Hall, 1992)或 pAc360 或 pBlueBacHis (可以从 Invitrogen Corporation 得到))。将该重组构建体与病毒 DNA(例如, Pharmingen BaculoGold)共转染到昆虫细胞(例如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 21(Sf21))以制备重组杆状病毒。(装配重组 DNA 分子和重组杆状病毒的制备和使用的方法可以见标准教科书,例如, Sambrook et al, 1989, Molecular cloning - A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press and O'Reilly et al, 1992, Baculovirus Expression Vectors - A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Co, New York)。对于 KDR(Genbank 登记号 L04947), 将从甲硫氨酸 806 开始的细胞质片段克隆并以类似方式表达。

为了表达 cFIt-1 酪氨酸激酶活性, 用噬斑纯的 cFIt-1 重组病毒以 3 的感染复数感染 Sf21 细胞并在 48 小时后收获。将收获的细胞用冰预冷的磷酸缓冲盐溶液(PBS)(10mM 磷酸钠 pH7.4, 138mM 氯化钠, 2.7mM 氯化钾)洗涤, 然后重悬浮在冰预冷的 HNTG/PMSF (20mM Hepes pH7.5, 150mM 氯化钠, 10% v/v 甘油, 1% v/v Triton X100, 1.5mM 氯化镁, 1mM 乙二醇-二(β-氧乙基醚) N,N,N',N'-四乙酸(EGTA), 1mM PMSF (苯甲基磺酰氟化物); PMSF 在临用前从新鲜制备的甲醇中的 100mM 溶液加入), 每 1 千万个细胞使用 1ml HNTG/PMSF。

将悬浮液在 4 °C 以 13,000 转/分钟离心 10 分钟, 然后取出上清液(酶原液)并将其以等分试样保存在 -70°C。通过用酶稀释剂(100mM Hepes pH 7.4, 0.2mM 原钒酸钠, 0.1% v/v Triton X100, 0.2mM 二硫苏糖醇)稀释在测定中滴定每个新批次的原液酶。对于典型的批次, 将原液酶用酶稀释剂以 1:2000 稀释并将 50 μl 稀释的酶用于每个测定孔。

从含有酪氨酸的随机共聚物, 例如聚(Glu, Ala, Tyr) 6:3:1 (Sigma P3899)制备基质溶液的原液, 在 -20°C 以 PBS 中的 1 mg/ml 原液保存并用 PBS 以 1:500 稀释用于平板包被。

在测定前一天, 将 100 μl 稀释的基质溶液分散到测定板(Nunc maxisorp 96-孔 immunoplates)的所有孔中, 将板密封并在 4°C 放置过夜。

在测定当天, 弃去基质溶液并将测定板用 PBST (含有 0.05% v/v Tween 20 的 PBS)洗涤一次并用 50mM Hepes pH7.4 洗涤一次。

用 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 稀释受试化合物并将 25 μ l 稀释的化合物转移到经洗涤的测定板的孔中。“总的”对照孔含有 10% DMSO 代替化合物。向除了“空白”对照孔之外的所有孔中加入含有 8 μ M 腺苷-5'-三磷酸 (ATP) 的 25 μ l 40mM 氯化镁 (II)，对照孔含有氯化镁 (II) 而没有 ATP。为开始反应，将 50 μ l 新鲜稀释的酶加入每孔并在室温下孵育板 20 分钟。然后弃去液体并用 PBST 洗涤孔两次。向每孔加入用含有 0.5% w/v 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBST 以 1:6000 稀释的 100 μ l 小鼠 IgG 抗-磷酸酪氨酸抗体 (Upstate Biotechnology Inc. product 05-321) 并在室温下孵育板 1 小时后弃去液体并用 PBST 洗涤孔两次。加入用含有 0.5% w/v BSA 的 PBST 以 1:500 稀释的 100 μ l 辣根过氧化物酶 (HRP)-连接的绵羊抗小鼠 Ig 抗体 (Amersham 产品 NXA 931) 并在室温孵育板 1 小时，然后丢弃液体并用 PBST 洗涤孔两次。将使用 50mg ABTS 片剂 (Boehringer 1204 521) 在 50ml 新鲜制备的 50mM 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 pH5.0 + 0.03% 高硼酸钠 (每 100ml 蒸馏水用 1 磷酸盐柠檬酸盐缓冲液与高硼酸钠 (PCSB) 胶囊 (Sigma P4922) 制备) 中新鲜制备的 2,2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) (ABTS) 100 μ l 加入每孔。然后将平板在室温下孵育 20-60 分钟直到使用平板读数分光光度计在 405nm 测量的“总的”对照孔的光密度值接近 1.0。“空白” (无 ATP) 和“总的” (无化合物) 对照值用于确定引起 50% 的酶活性抑制的受试化合物的稀释范围。

(b) 体外 HUVEC 增殖测定

该测定法确定受试化合物抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的生长因子刺激的增殖。

将 HUVEC 细胞在 MCDB 131 (Gibco BRL) + 7.5% v/v 胎牛血清 (FCS) 中分离并以 1000 个细胞/孔的浓度在 96 孔板中在 MCDB 131 + 2% v/v FCS + 3 μ g/ml 肝素 + 1 μ g/ml 氢化可的松中接种 (2 到 8 代)。最少 4 小时后，对它们施用 VEGF (3 ng/ml) 和化合物。然后将培养物在 37°C 和 7.5% CO₂ 下孵育 4 天。在第 4 天，用 1 μ Ci/孔氚标记的胸苷 (Amersham 产品 TRA 61) 脉冲并孵育 4 小时。用 96 孔板收获器 (Tomtek) 收获细胞然后用 Beta 平板计数器测定氚的掺入。放射性向细胞的掺入 (表示为 cpm) 用于测量化合物对生长因子刺激的细胞增殖的抑制。该方法还用于评估化合物对基础 HUVEC 生长的作用 (即，

不加入外源 VEGF 时 MCDB 131 + 2% v/v FCS + 3 μ g/ml 肝素 + 1 μ g/ml 氢化可的松中内皮细胞增殖)。

(c)体内实体瘤疾病模型

该试验测量化合物抑制实体瘤生长的能力。

通过皮下注射 100 μ l 无血清培养基中 Matrigel 的 50% (v/v)溶液中的 1×10^6 Calu-6 细胞/小鼠, 在雌性无胸腺的 Swiss nu/nu 小鼠的侧腹建立 CaLu-6 肿瘤异种移植物。细胞植入后 10 天, 将小鼠分成 8 组, 每组 8-10 只, 以便实现可比较的组平均大小。用游标卡尺测量肿瘤并如下计算体积: $(l \times w) \times \sqrt{(l \times w) \times (\pi/6)}$, 其中 l 是最长的直径, w 是与最长直径垂直的直径。每天经口施用受试化合物最少 21 天, 对照动物接受化合物稀释液。每周测量肿瘤两次。通过用 Student T test 和/或 Mann-Whitney 秩和检验比较对照组与治疗组的平均肿瘤体积来计算生长抑制的水平。当 $p < 0.05$ 时认为化合物治疗的抑制效果是显著的。

可以通过已知可以应用于制备化学相关的化合物的任意方法准备如上文定义的 AZD2171 马来酸盐。此类方法包括例如, 在国际专利申请号 WO 00/47212 中阐明的方法, 将所述文献引入本文作为参考。此类方法还包括例如, 固相合成。提供此类方法作为本发明的另一特征并且在下文中描述。可以通过有机化学的标准方法得到必要的起始物质。可以根据 WO 00/47212 中描述的任一种方法制备 AZD2171 游离碱, 具体见 WO 00/47212 的实施例 240。备选地, 可以通过有机化学家的普通技术内的与所阐明的那些方法相似的方法得到必要的起始物质。

下面的方法(a)、(b)和(c)构成了本发明的其他特征。

合成 AZD2171 马来酸盐形式 A

(a)此类方法提供了本发明的另一方面并且包括, 例如步骤:

- (i)在有机溶剂中溶解 AZD2171 游离碱以形成溶液;
- (ii)加入马来酸的水溶液或者加入马来酸在有机溶剂中的溶液;
- (iii)允许发生自发成核;
- (iv)任选分离所形成的 AZD2171 形式 A 和 B 的结晶混合物;
- (v)在溶剂, 例如甲醇中使混合物成浆状, 直到所有 AZD2171 马来酸盐都是形式 A, (如可以通过 X 射线粉末衍射确定), 例如, 这可以花费 4 天; 并

(vi)分离所形成的结晶固体。

(b)另一种此类方法提供了本发明的另一方面并且包括例如，步骤：

- (i)在有机溶剂中溶解 AZD2171 游离碱以形成溶液；
- (ii)加入马来酸的水溶液或者加入马来酸在有机溶剂中的溶液；
- (iii)通过加热或者加入更多溶剂，并加入 AZD2171 马来酸形式 A 的种子引发 AZD2171 马来酸盐形式 A 的结晶；和
- (iv)分离所形成的结晶固体。

对于(a)和(b)的部分(i)，如果需要，可以加热回流混合物直到发生溶解。备选地，如果已经发生了所有固体物质的或多或少的溶解，那么可以例如加热混合物到小于溶剂的回流温度的温度。应理解通过过滤升温的混合物可以除去小量不溶性物质。

对于(a)和(b)的部分(i)，有机溶剂优选为醇，例如，甲醇或异丙醇。

对于(a)和(b)的部分(ii)，有机溶剂优选为醇，例如，甲醇。

(C) 合成 AZD2171 马来酸盐形式 B

此类方法提供了本发明的另一方面并且包括例如，步骤：

- (i)在有机溶剂中溶解 AZD2171 马来酸盐以形成溶液；
- (ii)向溶液加入溶剂，其中 AZD2171 马来酸盐在该溶剂中的溶解度低于在 NMP 中的溶解度，所述溶剂为例如甲苯或者乙酸乙酯；
- (iii)然后发生 AZD2171 马来酸盐形式 B 的结晶；和
- (iv)分离所形成的结晶固体。

在(c)中，优选的有机溶剂是高度增溶溶剂，如 1-甲基-2-吡咯烷酮。

对于(c)的部分(i)，如果需要，可以将混合物加热回流直到发生溶解。备选地，如果已经发生了所有固体物质的或多或少的溶解，那么可以例如加热混合物到小于溶剂的回流温度的温度。将理解通过过滤升温的混合物可以除去小量不溶性物质。

在上面的(a)、(b)和(c)中，可以通过任意常规方法，例如，通过过滤可以分离所形成的结晶固体。

以下将通过下面的非限制性实例、数据和附图阐明本发明，除非

另有说明，其中：

- (i)通过真空旋转蒸发进行蒸发并在除去残留固体，处理步骤在通过过滤除去残余固体如干燥剂后进行；
- (ii)给出的产率仅用于说明并且不一定是可得到的最大产率；
- (iii)熔点是未校正的并且使用 Mettler DSC820e 测定；
- (iv)通过核（通常质子）磁共振（NMR）和质谱技术证实式 I 的终产物的结构；在 δ 刻度上测量质子磁共振化学位移值，峰的多样性表示如下：s，单峰；d，双峰；t，三峰；m，多峰；br，宽的；q，四重峰，quin，五重峰；所有样品都在 d_6 -DMSO 中以 300K 在 Bruker DPX 400 MHz 上运行，16 次扫描，脉冲重复时间 10 秒；
- (v)通常不完全表征中间产物，通过 NMR 分析评估纯度；和
- (vi)使用下面的缩写：

DMSO 二甲基亚砷

NMP 1-甲基-2-吡咯烷酮

实施例 1: AZD2171 马来酸盐形式 A

在氮气的惰性气氛下，用异丙醇(58.8 mL)使 AZD2171 粗品游离碱(4.52g)（例如以 WO 00/47212 的实施例 240 中描述的方式制备）成为浆液。回流下加热混合物 15 分钟得到澄清的深色溶液。将混合物冷却到 75° C 并加入炭(0.226g)。将混合物再次加热回流并保持回流 1 小时。然后趁热过滤混合物。用热异丙醇(9 mL)洗涤炭滤饼。调节组合的滤液和洗涤液的温度到 55° C 并在 5 分钟内逐滴加入溶于水(2.71 mL)的马来酸(1.173g)的预过滤的溶液。以前结晶的粗品游离碱在加入期间溶解。加入 line wash 水(0.9 mL)。使混合物保持在 55° C 15 分钟并加入 AZD2171 马来酸盐形式 A (0.023g)的种子。混合物在 55° C 保持 4 小时。在 4 小时的保持期间结晶变得确定。在 8 小时内冷却混合物到 0° C。将混合物保持在 0° C 最少 8 小时。过滤混合物。用异丙醇(9 mL)洗涤滤饼。将固体在真空烘箱中在 50° C 干燥得到 4-([4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基]氧基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹唑啉马来酸盐形式 A。

¹H NMR 光谱: (400 MHz, DMSO): 11.36 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.65 (s,

1H), 7.43 (s, 1H), 7.18 (d, 1H), 7.01 (d, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.33 (t, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.26-3.3.70 (b, 4H), 2.44, (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 2.02 (m, 4H).

m.p.: DSC 分析: 在 198.3° C 开始熔解, 在 200.08° C 达到峰值

实施例 2: AZD2171 马来酸盐形式 A

在氮气的惰性气氛下, 在容器 1 中将 AZD2171 粗品游离碱(23.0g) (如 WO 00/47212 的实施例 240 中描述的制备)在甲醇(223mL)中调成浆液。通过保持在真空中对混合物脱气然后对真空释放氮气。这重复 5 次。然后将浆液加热回流并保持 15 分钟得到澄清的、暗褐色溶液。将溶液冷却到 60°C, 然后通过 Celite® 垫(4.00g)过滤到容器 2 中。将 Celite® 垫用热(60°C)甲醇(78mL)洗涤, 滤液再次进入容器 2 中。

然后向容器 1 加入甲醇(111mL), 将其冷却到 0°C。然后向容器 1 加入马来酸(5.50g)并在 0°C 搅拌混合物 15 分钟直到所有的马来酸已经溶解。

然后将容器 1 的内容物通过内嵌的滤器装入容器 2 中同时保持温度高于 52°C。在 55°C 向容器 2 加入 AZD2171 马来酸盐形式 A 的种子(0.0454g)并保持混合物在 55°C 3 小时。然后在 7 小时内冷却混合物到 40°C, 并在 6 小时内进一步冷却到 -5°C。过滤固体并用 -5°C 的甲醇 (100mL) 洗涤。产物在真空烘箱中干燥 24 小时得到 4-([4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基]氧基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹唑啉马来酸盐形式 A。

实施例 3: AZD2171 马来酸盐形式 B

AZD2171 马来酸盐形式 A (2.31g)溶解在温(~50° C)NMP 中。在环境温度下 2 分钟内将该溶液逐滴加入甲苯 (23 mL) 中。物质最初沉淀为固体, 然后变成油, 然后又变成固体。在环境温度下搅拌 10 分钟后, 将固体过滤并用甲苯 (10ml) 洗涤。将固体在真空烘箱中环境温度下过夜干燥得到 4-([4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基]氧基)-6-甲氧基-7-(3-(吡咯烷-1-基)丙氧基)喹唑啉马来酸盐形式 B。

m.p.: DSC 分析: 在 194.43° C 开始熔解, 在 195.97° C 达到峰值

附图简述

图 1: AZD2171 游离碱一水合物的 DSC 和 TGA 差示热分析图-在水平轴上标绘温度 ($^{\circ}\text{C}$), 纵轴上为热流/%重量损失。

图 2: AZD2171 游离碱的 X 射线粉末衍射图-在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

图 3: 加热到 100°C 的 AZD2171 游离碱的 X 射线粉末衍射图 - 在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

图 4: 微粉化的 AZD2171 游离碱的 X 射线粉末衍射图 - 在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

图 5: AZD2171 马来酸盐形式 A 的 X 射线粉末衍射图 - 在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

图 6: AZD2171 马来酸盐形式 A 的 DSC 差示热分析图 - 在水平轴上标绘温度 ($^{\circ}\text{C}$), 纵轴上标绘吸热热流 (毫瓦(mW))。

图 7: 25°C 下 AZD2171 马来酸盐形式 A 蒸汽吸收等温线- 在水平轴上标绘目的相对适度(RH) (%), 在纵轴上标绘干质量的改变 (%)。

图 8: AZD2171 马来酸盐形式 B 的 X 射线粉末衍射图 - 在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

图 9: AZD2171 马来酸盐形式 B 的 DSC 差示热分析图 - 在水平轴上标绘温度 ($^{\circ}\text{C}$), 纵轴上标绘吸热热流 (毫瓦(mW))。

图 10: AZD2171 马来酸盐浆液实验的 X 射线粉末衍射图-在水平轴上标绘 2θ 值, 纵轴上标绘相对线强度 (计数)。

所用的技术细节

X 射线粉末衍射

表 5

% 相对强度*	定义
25 - 100	vs (非常强)
10 - 25	s (强)
3 - 10	m (中等)
1 - 3	w (弱)

* 相对强度来自固定狭缝时测量的衍射图

分析仪器: Siemens D5000

通过将晶体盐的样品放置在 Siemens single silicon crystal (SSC)薄片支架上并用显微镜载玻片将样品扩散成薄层以确定 X 射线粉末衍射光谱。将样品以 30 转/分钟旋转(以改善计数统计)并用 X 射线照射,所述 X 射线通过以 40kV 和 40mA 操作的铜长细聚焦管产生并且波长为 1.5406 埃。准直 X 线源穿过设置在 V20 的自动可调的发散狭缝并且反射的辐射导向 2mm 防散射狭缝和 0.2mm 检测狭缝。样品以 theta-theta 模式在 2 度到 40 度 2-theta 范围内暴露 1 秒/0.02 度 2-theta 增量(连续扫描模式)。运行时间为 31 分钟 41 秒。仪器装备作为检测器的闪烁计数器。通过运行 Diffract+ 软件的 Dell Optiplex 686 NT 4.0 Workstation 进行控制和数据捕获。X 射线粉末衍射领域的技术人员将认识到峰的相对强度可以受到例如大小大于 30 微米的颗粒和非单一纵横比的影响,非单一纵横比可以影响样品的分析。技术人员将还认识到反射的位置可以受到样品在衍射仪中的精确高度和衍射仪的零校准的影响。样品表面的平面度也可以有小的影响。因此,不应将所给出的衍射图认为是绝对值。

筛滤/微粉化

AZD2171 游离碱在微粉化前使用 1mm 不锈钢筛筛滤,将碱用于产物收集和手工直接送入粉碎机。

筛滤约 7.5g AZD2171 游离碱。

使用清洁的 S/S lined 2"粉碎机。

手工送入速率: 每分钟约 2/3g。

碾磨气压范围 10/20 psi (0.67/1.33 大气压)。

Venturi 气压范围 20/25 psi (1.33/1.67 大气压)。

动态蒸汽吸收

分析仪器：表面测量系统动态蒸汽吸收分析仪（Surface Measurements Systems Dynamic Vapour Sorption Analyser）。

25° C 将石英容器中含有的约 5mg 物质以一式两份置于下面的相对适度（RH）的湿润氮气中：0, 20, 40, 60, 80, 95, 80, 60, 40, 20, 0%RH。

差示扫描量热法

分析仪器： Mettler DSC820e.

通常将装有穿孔盖的 40 μ l 铝锅中所含小于 5mg 物质以每分钟 10° C 的恒定加热速率加热，温度范围为到 25°C 到 325°C。利用采用氮气的吹扫气 - 流速为 100ml/分钟。

热重量分析

分析仪器： Mettler TG851.

通常将 70 μ l 氧化铝坩埚中所含的 3 到 12mg 物质以每分钟 10°C 的恒定加热速率，温度范围为从 25°C 加热到 325°C。利用采用氮气的吹扫气 - 流速为 50ml/分钟。

Karl Fischer 水含量

分析仪器： Mitsubishi Moisture Meter CA-05.

通常使用约 50mg 物质。

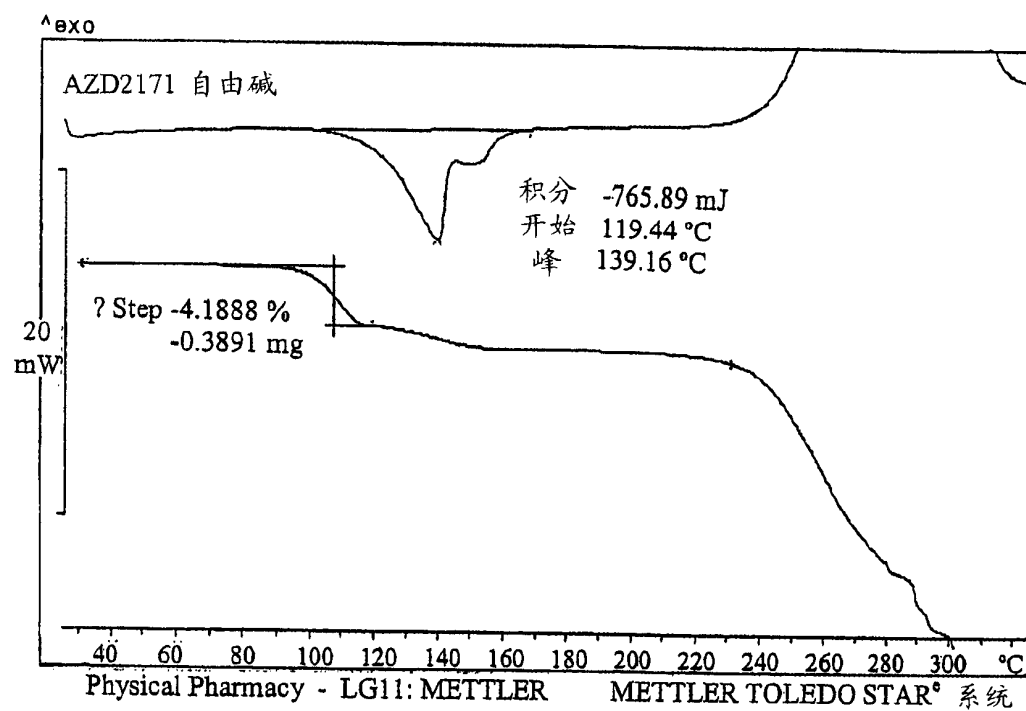


图 1: DSC和TGA热分析图AZD2171游离碱一水合物

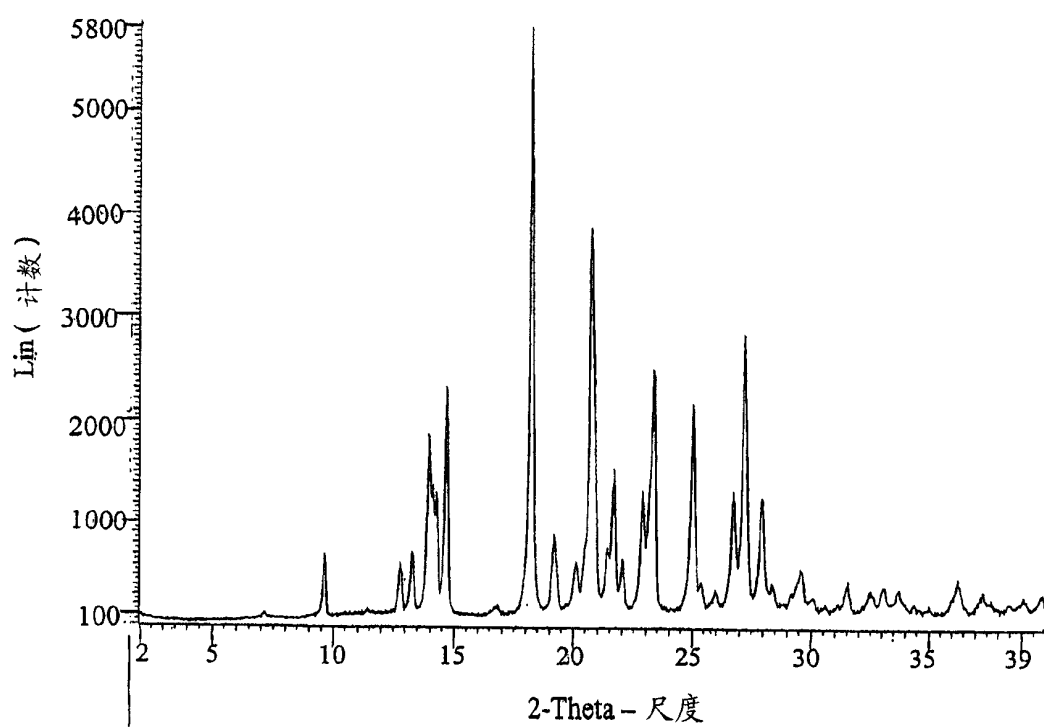


图2: X射线粉末衍射图AZD2171 游离碱

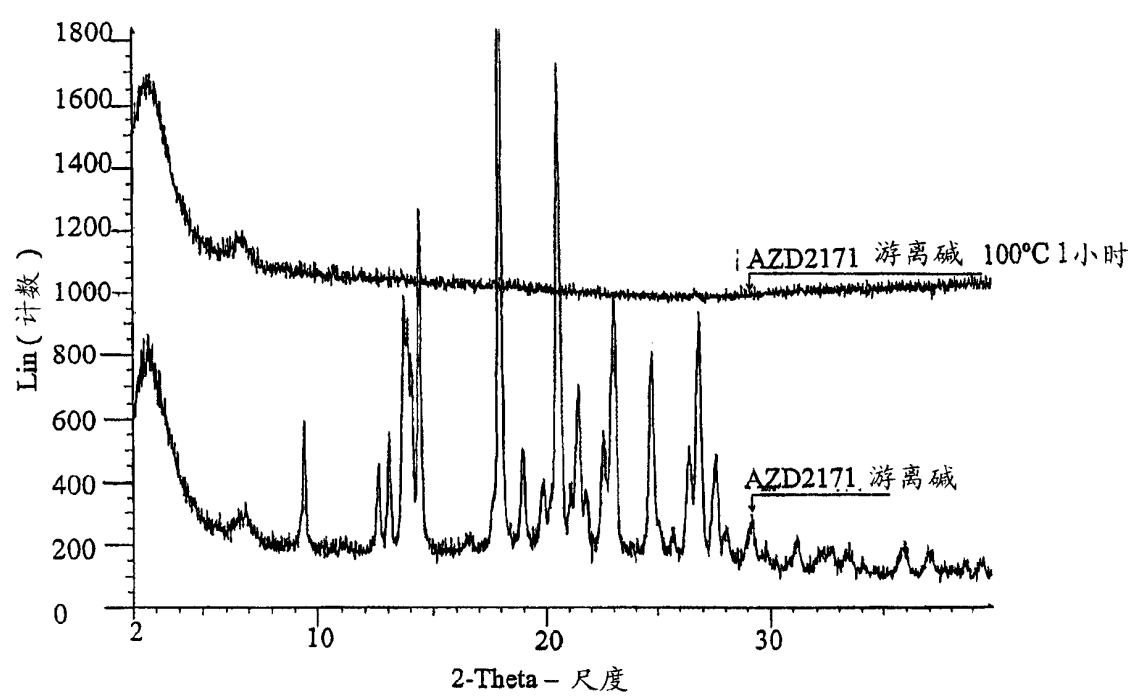


图3: X射线粉末衍射图 加热到100° C 的AZD2171 游离碱一水合物

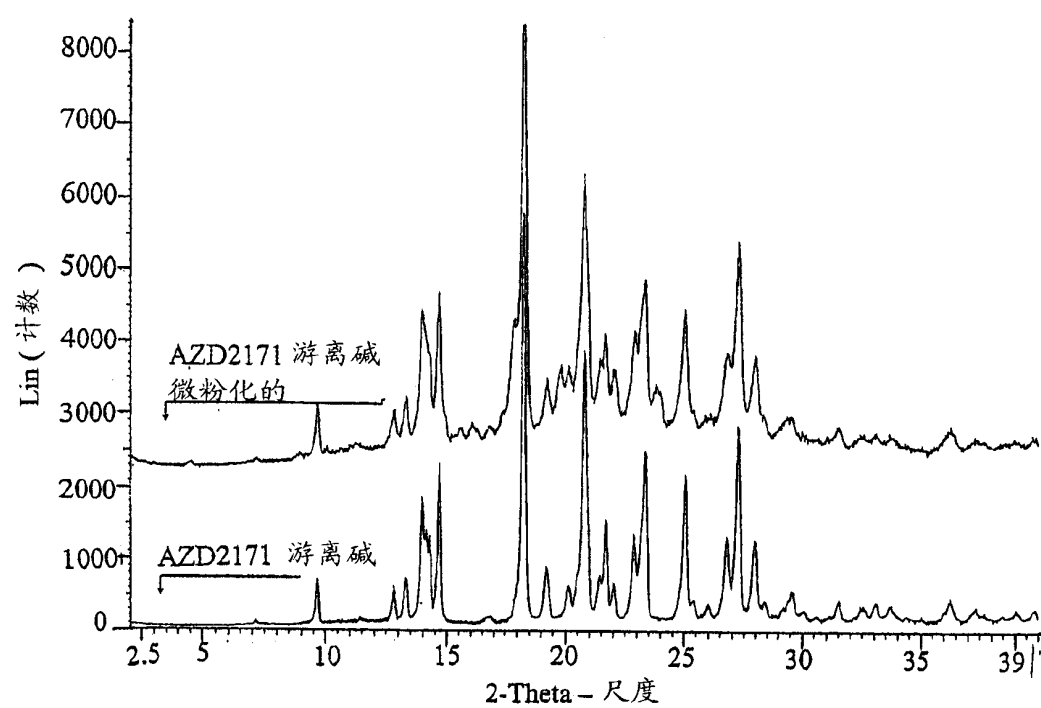


图4: X射线粉末衍射图 微粉化的AZD2171 游离碱

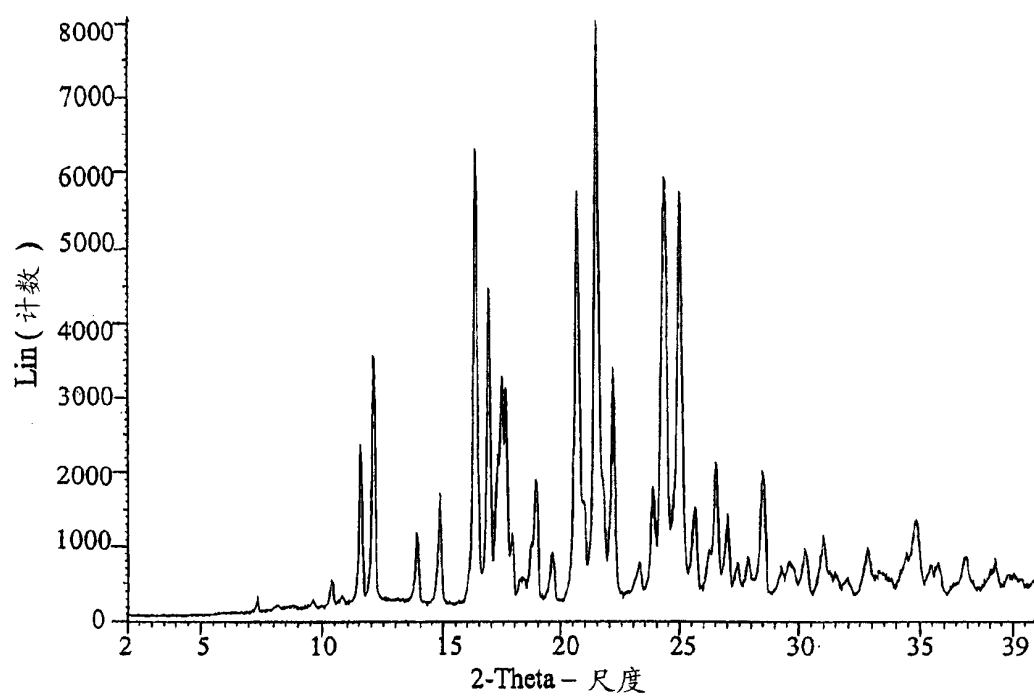


图5: X射线粉末衍射图 AZD2171 马来酸盐形式A

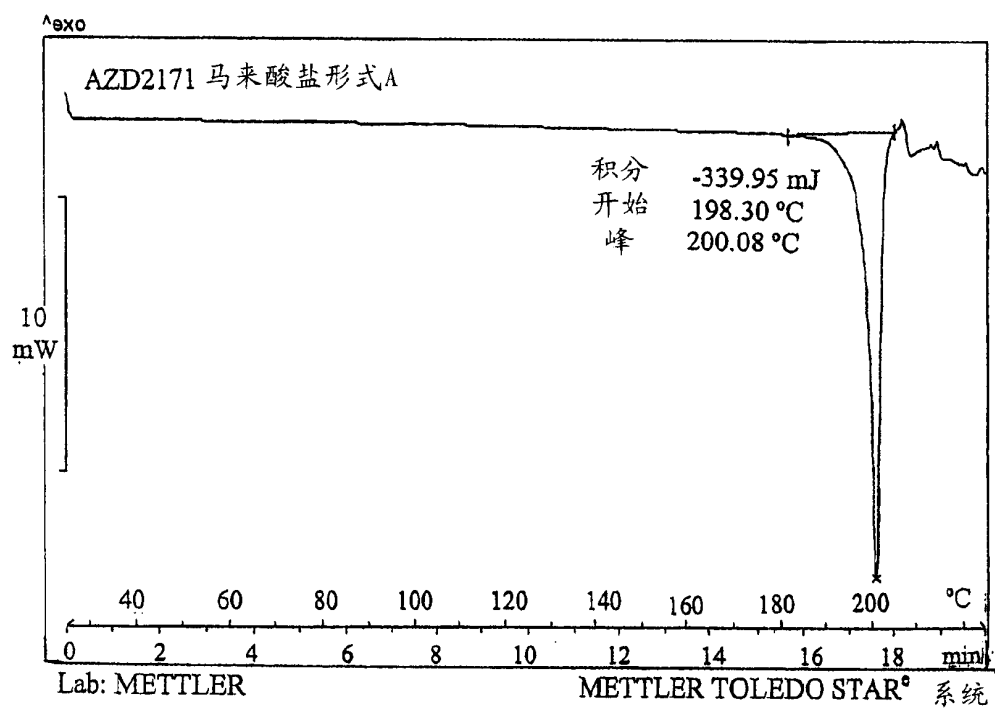


图6: DSC热分析图 AZD2171马来酸盐形式A

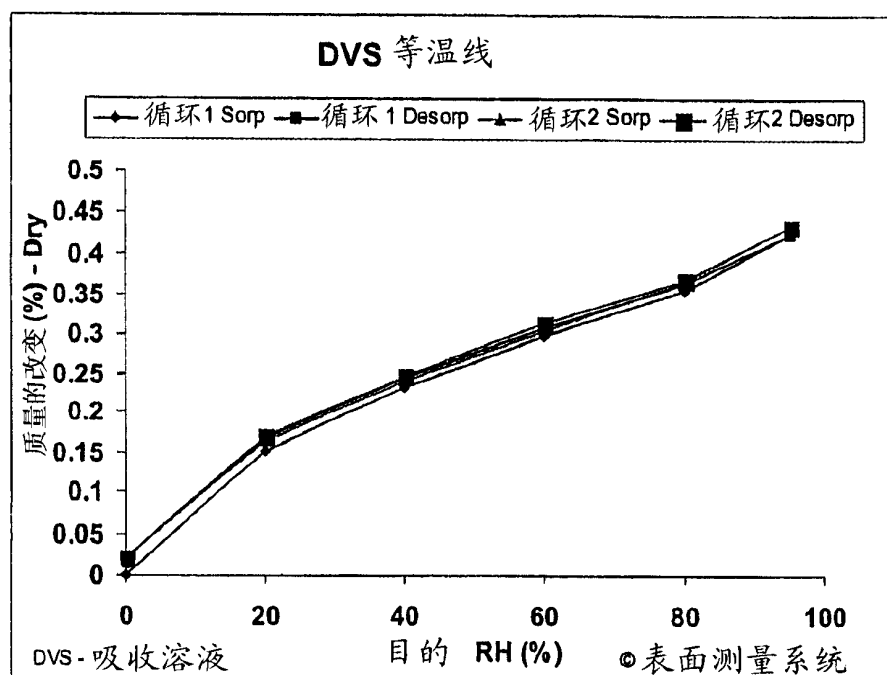


图 7: AZD2171 马来酸盐形式A25°C下蒸汽吸收等温线

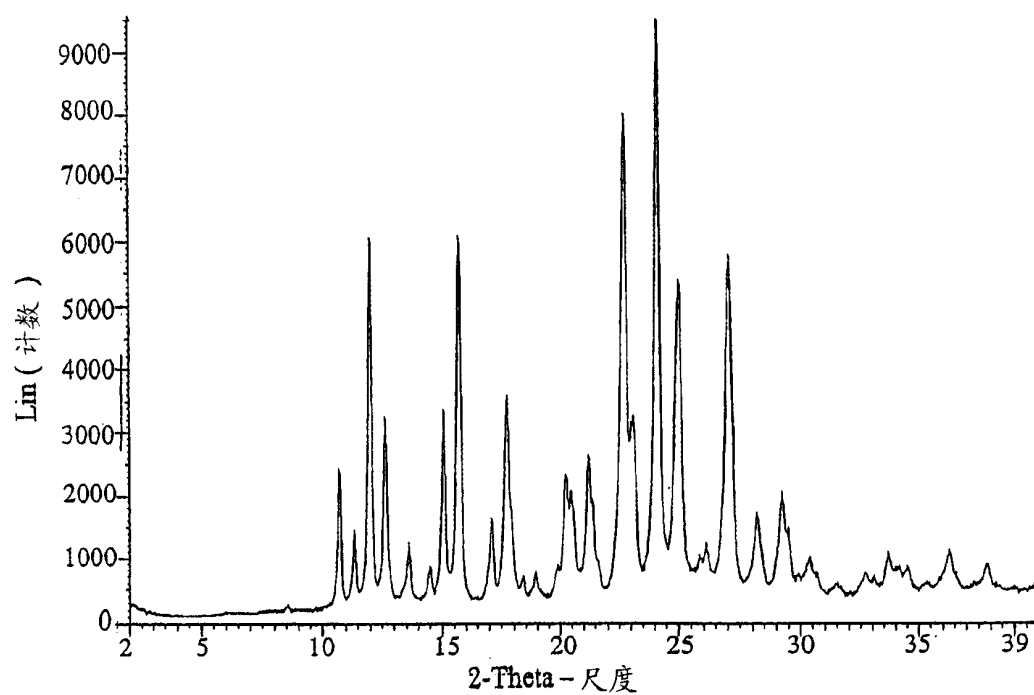


图8: X射线粉末衍射图AZD2171 马来酸盐形式B

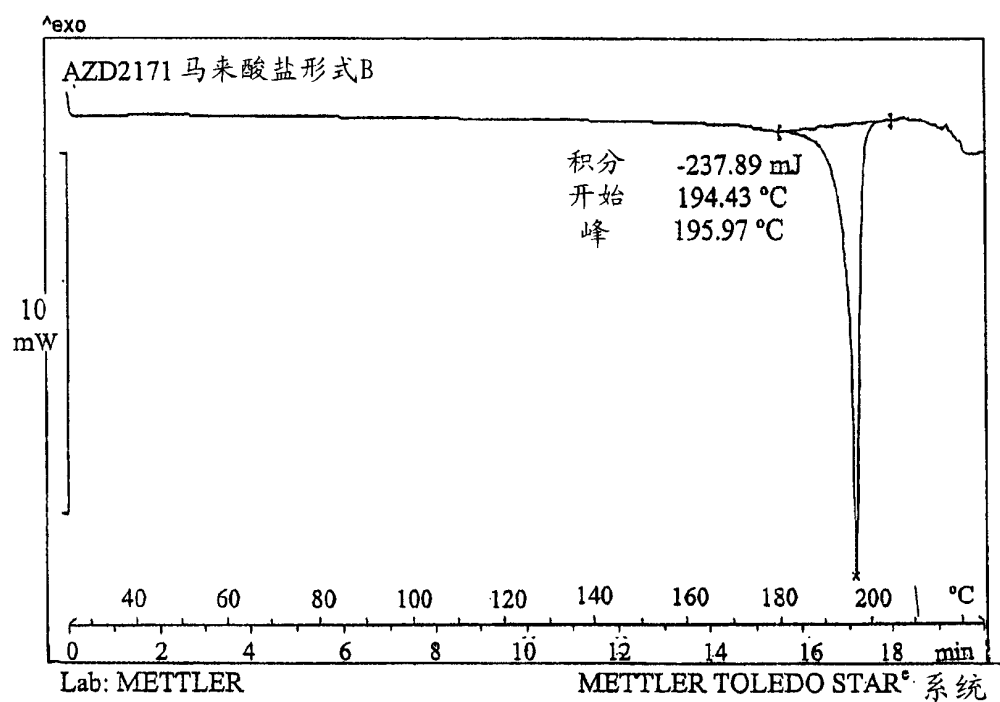


图9: DSC热分析图AZD2171马来酸盐形式B

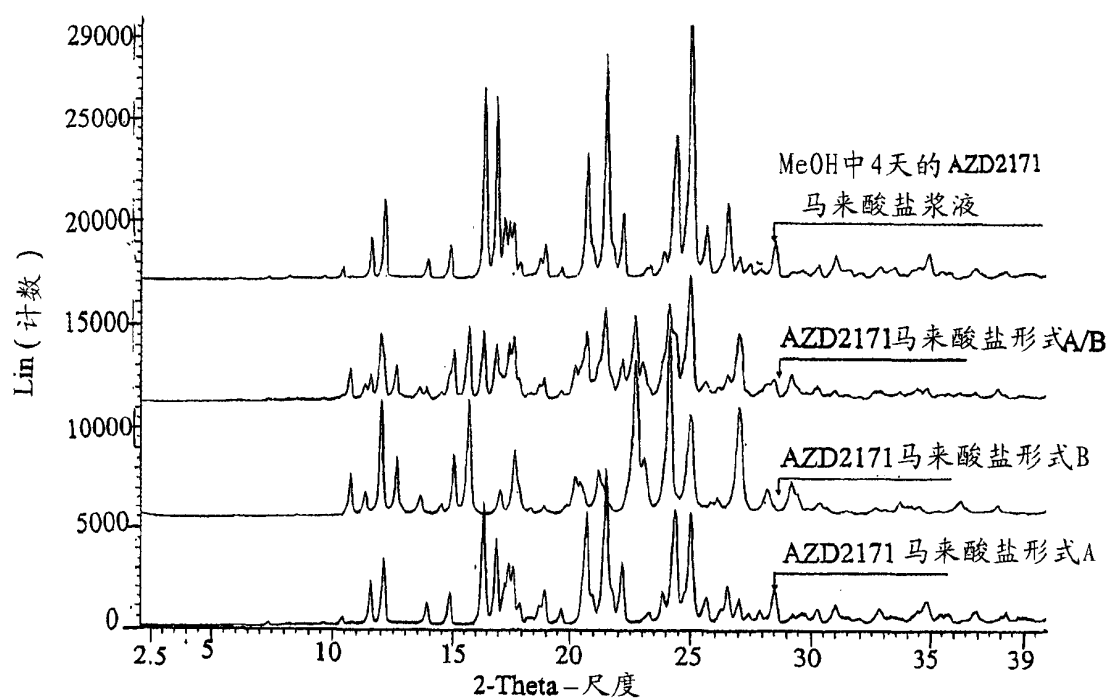


图10: X射线粉末衍射图 AZD2171马来酸盐浆液实验