



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105051016 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201380059118. 5

雷内·C·勒姆麦尔

(22) 申请日 2013. 11. 12

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

(30) 优先权数据

代理人 杨青 穆德骏

61/725,213 2012.11.12 US

61/776,951 2013.03.12 US

(51) Int. Cl.

C07D 235/16(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/069550 2013. 11. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/075035 EN 2014. 05. 15

(71) 申请人 易格尼塔公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 罗格·P·巴卡列 彼得·D·布朗

陈建 安东尼·S·查格尔

拉切尔·Y·拉贝尔

罗伯特·E·麦凯恩

皮约什·R·帕特尔

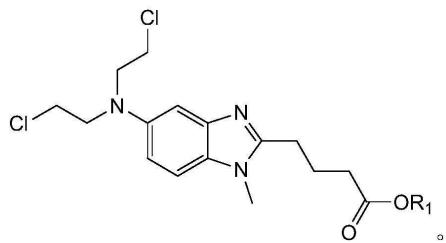
权利要求书5页 说明书36页 附图21页

(54) 发明名称

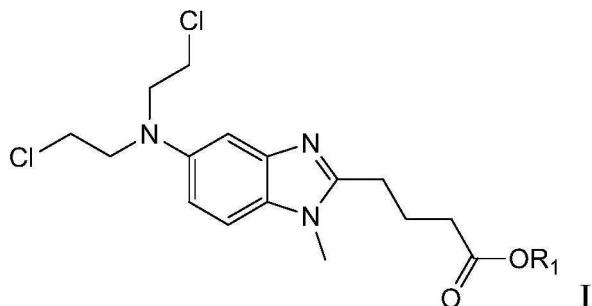
苯达莫司汀衍生物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及苯达莫司汀酯和苯达莫司汀酰胺以及它们用于治疗癌症的用途：(I) 其中 R1 是 C6-C24 烷基或聚乙二醇；并且 (II) 其中 R2 是 C1-C24 亚烷基；并且 R3 是 -COOC1-3 烷基；或者 R2-R3 是 C1-C24 烷基；或其药用可接受的盐形式

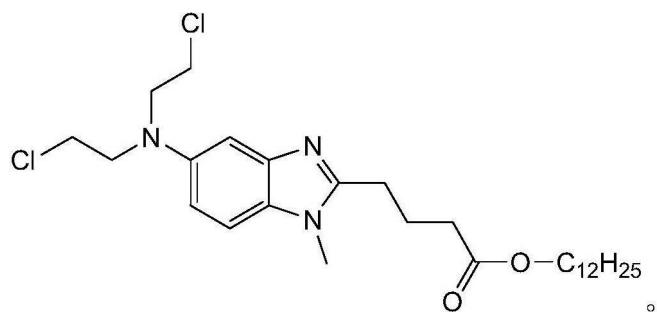


## 1. 式 I 的化合物：

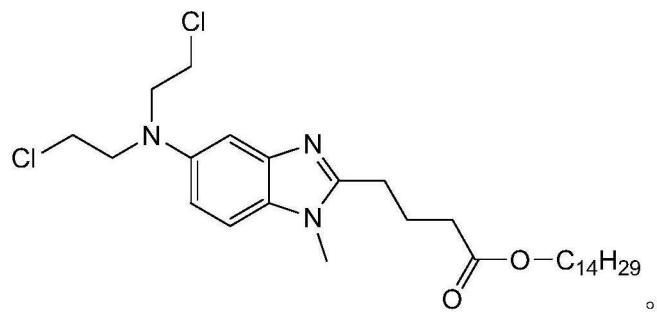


其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>6</sub>—C<sub>24</sub>烷基或聚乙二醇。

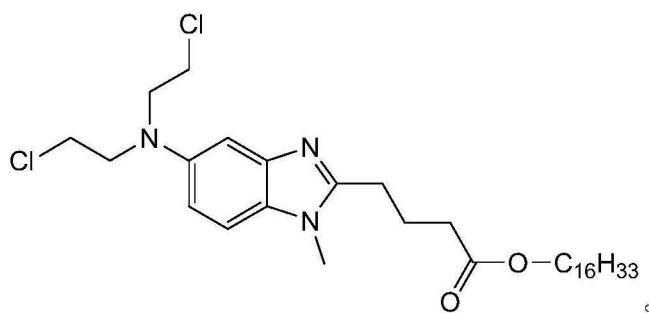
2. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>8</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
3. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>10</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
4. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>12</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
5. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>14</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
6. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>16</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
7. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>18</sub>—C<sub>24</sub>烷基。
8. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>10</sub>烷基。
9. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>12</sub>烷基。
10. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>14</sub>烷基。
11. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>16</sub>烷基。
12. 权利要求 1 的化合物, 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>6</sub>烷基。
13. 权利要求 1 的化合物, 其中式 I 的化合物是



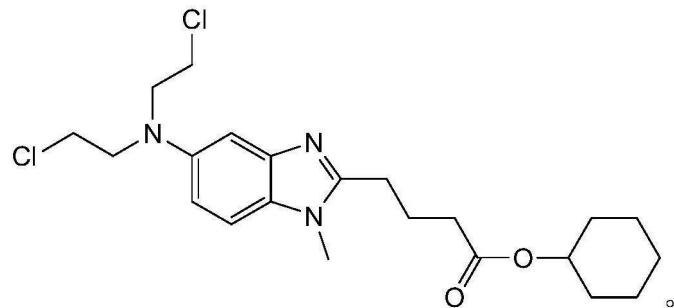
14. 权利要求 1 的化合物, 其中式 I 的化合物是



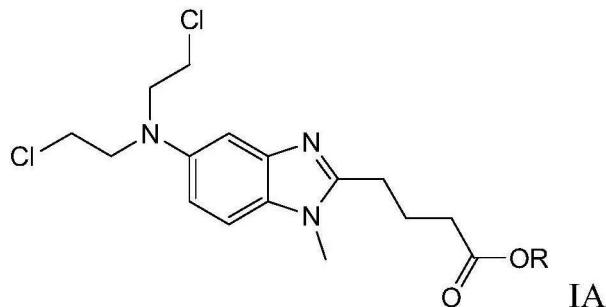
15. 权利要求 1 的化合物, 其中式 I 的化合物是



16. 权利要求 1 的化合物, 其中式 I 的化合物是



17. 一种药物组合物, 其包含式 IA 的化合物和药用可接受的载体或稀释剂 :



其中 R 是 C<sub>1</sub>—C<sub>24</sub> 烷基或聚乙二醇。

18. 权利要求 17 的药物组合物, 其中 R 是 C<sub>10</sub>—C<sub>24</sub> 烷基。

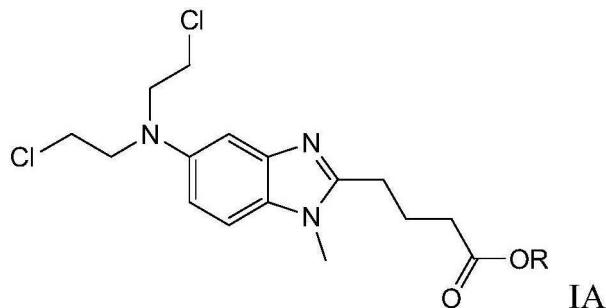
19. 权利要求 17 的药物组合物, 其中 R 是 C<sub>10</sub> 烷基。

20. 权利要求 17 的药物组合物, 其中 R 是 C<sub>12</sub> 烷基。

21. 权利要求 17 的药物组合物, 其中 R 是 C<sub>14</sub> 烷基。

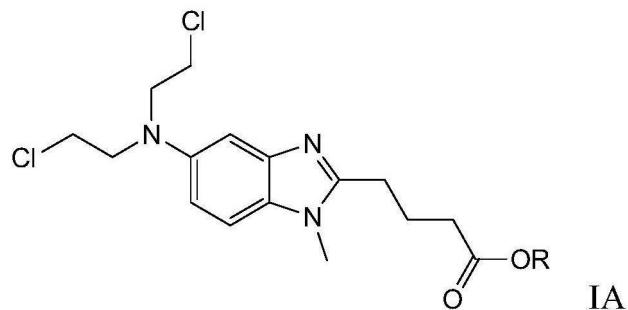
22. 权利要求 17 的药物组合物, 其中 R 是 C<sub>16</sub> 烷基。

23. 纳米粒子, 其包含式 IA 的化合物 :



其中 R 是 C<sub>1</sub>—C<sub>24</sub> 烷基或聚乙二醇。

24. 一种治疗患者中的癌症的方法, 其包含向患者施用式 IA 的化合物 :



其中 R 是  $C_1-C_{24}$  烷基或者聚乙二醇。

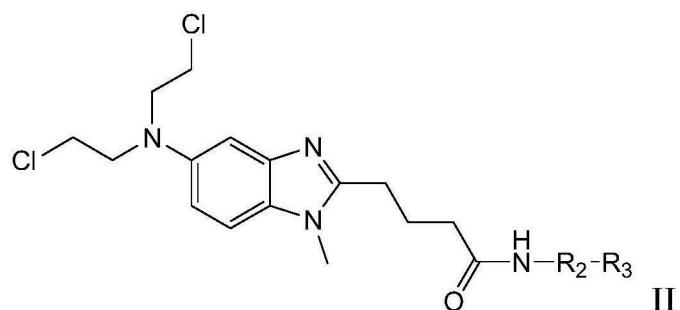
25. 权利要求 24 的方法, 其中所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤、侵袭性非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或肺癌。

26. 权利要求 24 的方法, 其中所述癌症选自肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、睾丸癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、结肠癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。

27. 权利要求 24 ~ 26 中任一项的方法, 其中所述患者对一种或多种化疗剂是耐受的。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述一种或多种化疗剂是烷化剂。

29. 式 II 的化合物 :



其中  $R_2$  是  $C_1-C_{24}$  亚烷基 ; 并且  $R_3$  是  $-COOC_{1-3}$  烷基 ; 或者  $R_2-R_3$  是  $C_1-C_{24}$  烷基 ; 或其药用可接受的盐形式。

30. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_8-C_{24}$  烷基。

31. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{10}-C_{24}$  烷基。

32. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{12}-C_{24}$  烷基。

33. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{14}-C_{24}$  烷基。

34. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{16}-C_{24}$  烷基。

35. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{18}-C_{24}$  烷基。

36. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{10}$  烷基。

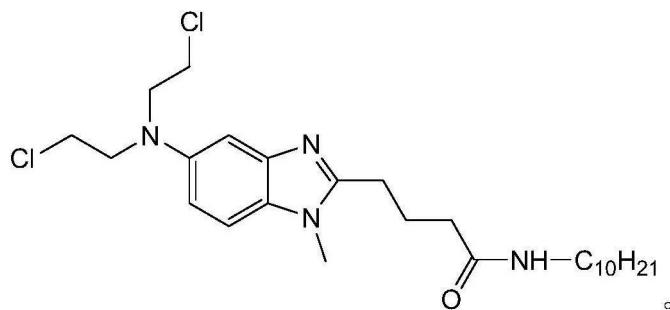
37. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{12}$  烷基。

38. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{14}$  烷基。

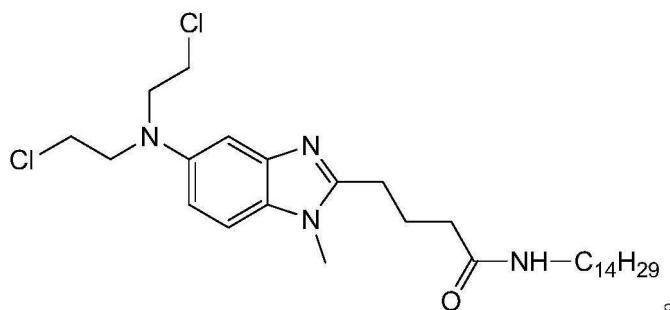
39. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2-R_3$  是  $C_{16}$  烷基。

40. 权利要求 29 的化合物, 其中  $R_2$  是  $C_2$  亚烷基并且  $R_3$  是  $-COOCH_3$ 。

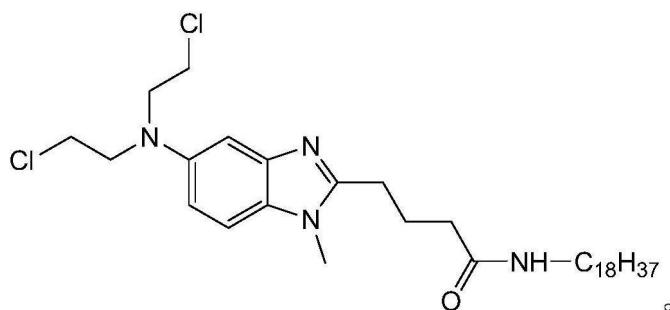
41. 权利要求 29 的化合物, 其中式 II 的化合物是



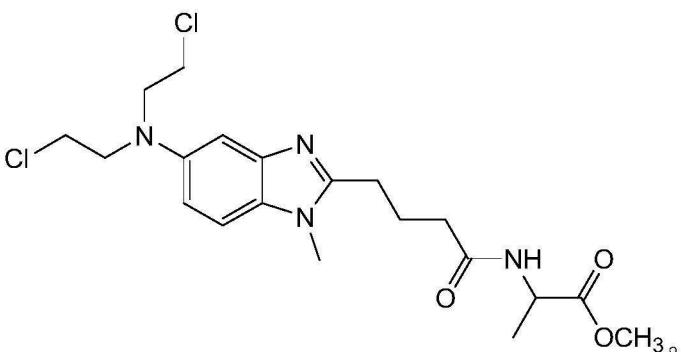
42. 权利要求 29 的化合物, 其中式 II 的化合物是



43. 权利要求 29 的化合物, 其中式 II 的化合物是



44. 权利要求 29 的化合物, 其中式 II 的化合物是



45. 一种药物组合物, 其包含权利要求 29 的化合物和药用可接受的载体或稀释剂。

46. 纳米粒子, 其包含权利要求 29 的化合物。

47. 一种治疗患者中的癌症的方法, 其包含向患者施用权利要求 29 的化合物。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤、侵袭性非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或肺癌。

49. 权利要求 47 的方法, 其中所述癌症选自肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、睾丸癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、结肠癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。

50. 权利要求 47 ~ 49 中任一项的方法,其中所述患者对一种或多种化疗剂是耐受的。
51. 权利要求 50 的方法,其中所述一种或多种化疗剂是烷化剂。
52. 纳米粒子,其包含权利要求 1 ~ 16 中任一项的化合物。
53. 权利要求 52 的纳米粒子,其还包含人血清白蛋白。
54. 权利要求 52 或 53 的纳米粒子,其还包含聚乳酸乙醇酸。
55. 权利要求 52 或 53 的纳米粒子,其还包含聚乙二醇。
56. 权利要求 52 或 53 的纳米粒子,其还包含聚乳酸乙醇酸 (PLGA) 和聚氧乙烯乳酸共聚物。
57. 权利要求 53 的纳米粒子,其中使用二醛将人血清白蛋白交联。
58. 权利要求 57 的纳米粒子,其中所述二醛是戊二醛。
59. 一种冻干组合物,其包含权利要求 52 ~ 58 中任一项的纳米粒子。
60. 权利要求 59 的冻干组合物,其还包含甘露醇、海藻糖、蔗糖或 NaCl 中的一种或多种。
61. 一种治疗患者中的癌症的方法,其包含向患者施用权利要求 52 ~ 58 中任一项的纳米粒子。
62. 权利要求 61 的方法,其中所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤、侵袭性非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或肺癌。
63. 权利要求 61 的方法,其中所述癌症选自肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、睾丸癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、结肠癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。
64. 权利要求 61 ~ 63 中任一项的方法,其中所述患者对一种或多种化疗剂是耐受的。
65. 权利要求 64 的方法,其中所述一种或多种化疗剂是烷化剂。

## 苯达莫司汀衍生物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2012 年 11 月 12 号提交的美国临时申请号 61/725,213 和 2013 年 3 月 12 号提交的美国临时申请号 61/776,951 的权益,所述申请的整体通过参考并入本文中。

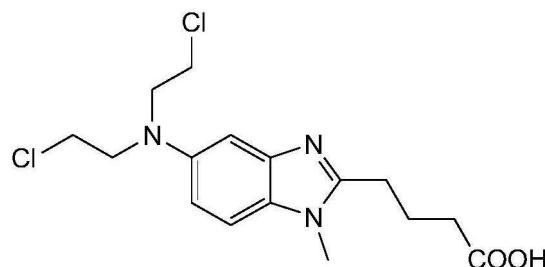
### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗癌症的苯达莫司汀的酯和酰胺。

### 背景技术

[0004] 苯达莫司汀即 4-[5-[双(2-氯乙基)氨基]-1-甲基苯并咪唑-2-基]丁酸:

[0005]



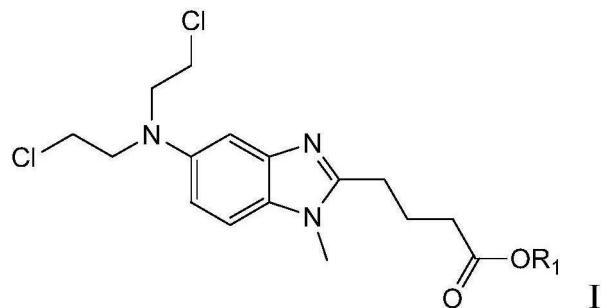
[0006] 作为盐酸盐在 RIBOMUSTIN 和 TREANDA 的商品名下市售,并且是已经成功用于治疗如下疾病的化合物:血癌例如慢性淋巴细胞性白血病,霍奇金病,非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。这些产品作为静脉内输注液进行施用。

[0007] 然而,苯达莫司汀治疗固体肿瘤的用途被该化合物在水性环境中的化学不稳定性所限制。的确,已报道苯达莫司汀在体内具有仅约 6-10 分钟的半衰期。结果,苯达莫司汀的循环水平没有维持足够长的时间,以使得苯达莫司汀到达循环系统外的肿瘤。需要增加苯达莫司汀循环时间的方法。

### 发明内容

[0008] 本发明涉及式 I 的化合物或其药用可接受的盐形式:

[0009]

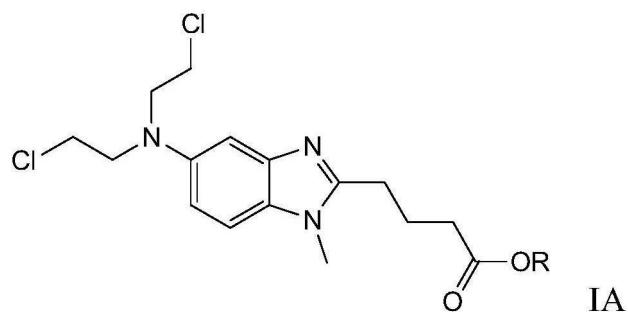


[0010] 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>烷基或聚乙二醇。还描述了使用式 I 的化合物治疗固体和非固体肿瘤的方法。

[0011] 本发明还涉及式 IA 的化合物或其药用可接受的盐形式用于治疗固体和非固体癌

瘤的用途：

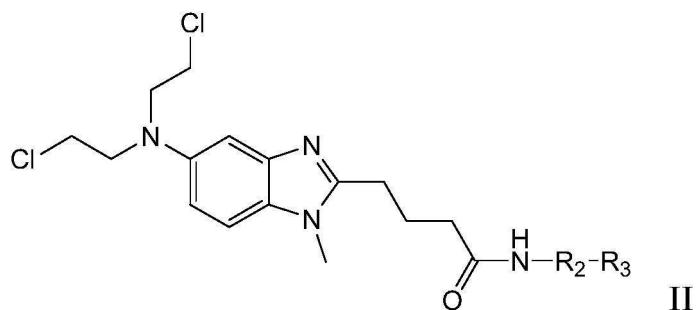
[0012]



[0013] 其中 R 是  $C_1-C_{24}$  烷基或聚乙二醇。

[0014] 本发明还涉及式 II 的化合物或其药用可接受的盐形式：

[0015]



[0016] 其中  $R_2$  是  $C_1-C_{24}$  亚烷基；并且  $R_3$  是  $-COOC_{1-3}$  烷基；或者  $R_2-R_3$  是  $C_1-C_{24}$  烷基。使用式 II 的化合物治疗固体和非固体瘤瘤的方法。

[0017] 包含式 I 或 IA 的化合物的纳米粒子和包含这些纳米粒子的冻干组合物也在本发明的范围内。

#### 附图说明

[0018] 图 1 示出了 CD-1 小鼠中本发明特定实施方式的血浆水平，以  $3mg/kg$  静脉注射给药，在  $3\% DMSO$ 、 $30\% Solutol$ 、 $100\mu L$  中。

[0019] 图 2 示出了苯达莫司汀盐酸盐和本发明的特定实施方式对具有 MDA-MB-231 移植瘤的小鼠的肿瘤体积的影响。

[0020] 图 3 示出了在使用本发明的特定实施方式治疗 MDA-MB-231 乳腺肿瘤 S9 后随时间观察到的苯达莫司汀的量。

[0021] 图 4 示出了在使用本发明的特定实施方式治疗 H460 非小细胞肺肿瘤 S9 后随时间观察到的苯达莫司汀的量。

[0022] 图 5 示出了使用不同的制剂在大鼠中给药本发明的一个实施方式后，大鼠中苯达莫司汀的血浆水平。

[0023] 图 6 示出了使用不同的制剂在大鼠中给药本发明的一个实施方式后，大鼠中所述实施方式的血浆水平。

[0024] 图 7 示出了本发明的一个实施方式苯达莫司汀  $C_{14}$  酯的纳米粒子的低温 TEM 图像。

[0025] 图 8 示出了在以  $30mg/kg$  静脉注射 ( $1mL/kg$ ) 向大鼠给药苯达莫司汀  $C_{12}$  酯后，苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀  $C_{12}$  酯（作为液体和纳米粒子制剂）的血浆

水平。

[0026] 图 9 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的血液水平。

[0027] 图 10 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的脑水平。

[0028] 图 11 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的肝水平。

[0029] 图 12 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的肺水平。

[0030] 图 13 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的脾水平。

[0031] 图 14 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯后, 苯达莫司汀和本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体和纳米粒子制剂) 的肾水平。

[0032] 图 15 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药后, 在施用本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体制剂) 后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆、血液和器官水平。

[0033] 图 16 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为液体制剂) 后, 大鼠中本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的血浆、血液和器官水平。

[0034] 图 17 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药后, 在施用本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为纳米粒子制剂) 后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆、血液和器官水平。

[0035] 图 18 示出了在以 30mg/kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 (作为纳米粒子制剂) 后, 大鼠中本发明的一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的血浆、血液和器官水平。

[0036] 图 19 示出了在以 3mg 当量 /kg 静脉注射 (1mL/kg) 向大鼠给药后, 在施用本发明的实施方式苯达莫司汀 PEG-2000 酯和苯达莫司汀 PEG-5000 酯后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆水平。与 TREANDA 进行比较。

[0037] 图 20 示出了在以 3mg/kg 静脉注射 (3% DMSO, 30% Solutol) 给药本发明的实施方式后, CD-1 小鼠中苯达莫司汀的血浆水平。

[0038] 图 21 示出了在 52,000x 的放大率下的本发明的代表性纳米粒子实施方式。在样品中观察到: 显得比周围的缓冲液更加均匀致密的球形粒子 (最左的箭头), 背景中的小粒子 (最右的箭头)。插图以更大比例显示由最左边的箭头表示的两个粒子。在左图中的十字之间的距离为 28nm, 在右边插图中的十字之间的距离为 43nm。比例尺: 200nm。

[0039] 图 22 示出了在 52,000x 的放大率下的本发明的代表性纳米粒子实施方式。在样品中观察到：显得比周围的缓冲液更加均匀致密的球形粒子（最左的箭头），背景中的小粒子（最右的箭头）。插图以更大比例显示由最左边的箭头表示的两个粒子。在左图中的十字之间的距离为 28nm，在右边插图中的十字之间的距离为 43nm。比例尺：200nm

[0040] 图 23 示出了在施用 VELCADE®、苯达莫司汀和苯达莫司汀 C12 酯纳米粒子后的肿瘤体积。

[0041] 图 24 示出了在施用 VELCADE®、苯达莫司汀和苯达莫司汀 C12 酯纳米粒子后的体重测量。

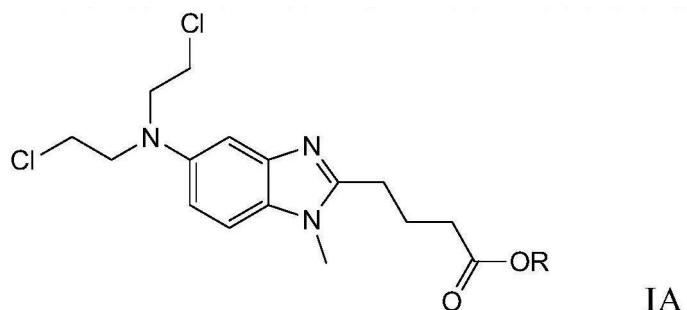
### 具体实施方式

[0042] 已经发现，将苯达莫司汀的羧酸部分转化为 C<sub>1</sub>–C<sub>24</sub> 烷基酯基团、聚乙二醇酯基团或 C<sub>1</sub>–C<sub>24</sub> 烷基酰胺基团产生提供苯达莫司汀较长循环时间的化合物。尽管不希望束缚于任何特定理论，但认为酯或酰胺部分降低了苯达莫司汀分子的溶解度，产生针对水性环境的保护效果。随着时间推移，酯或酰胺部分被水解，从而暴露出活性苯达莫司汀分子的羧酸部分。整体结果是随着时间推移产生了苯达莫司汀。

[0043] 通过改变酯 / 酰胺部分中的碳数目，可以修饰所得苯达莫司汀衍生物的亲脂性。增加的亲脂性与酯 / 酰胺的增加的稳定性和苯达莫司汀更长的循环时间相关。

[0044] 在本发明范围内的是式 IA 的化合物或其药用可接受的盐形式：

[0045]



[0046] 其中 R 是 C<sub>1</sub>–C<sub>24</sub> 烷基或聚乙二醇。式 IA 的化合物对于治疗患者中的固体或非固体癌瘤是有用的。

[0047] 可将本发明的化合物配制成包含如下的药物组合物：式 IA 的化合物或其药用可接受的盐形式，和药用可接受的载体或稀释剂。在本发明的优选药物组合物中，R 是 C<sub>10</sub>–C<sub>24</sub> 烷基。优选地，R 是 C<sub>10</sub> 烷基。其中 R 是 C<sub>12</sub> 烷基的情形也是优选的。其它优选实施方式包括其中 R 是 C<sub>14</sub> 烷基的实施方式。其中 R 是 C<sub>16</sub> 烷基的组合物也是优选的。

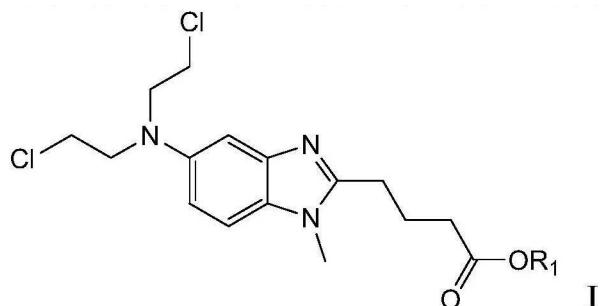
[0048] 本发明的其它实施方式包括包含式 IA 的化合物的纳米粒子。

[0049] 同样在本发明范围内的是治疗患者中的固体或非固体癌瘤的方法，所述方法包括向患者施用式 IA 的化合物。优选的固体或非固体肿瘤包括慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤（T 细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤）、侵袭性非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或肺癌（例如，小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC)）。据预测，也可用本发明的化合物和组合物治疗其它固体和非固体癌瘤，例如肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、睾丸癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、结肠癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。据

预测,也可用本发明的化合物治疗其它固体和非固体癌瘤,例如乳腺癌、胰腺癌、和胃癌。

[0050] 本发明的优选化合物是式 I 的化合物或其药用可接受的盐形式:

[0051]



[0052] 其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>6</sub>—C<sub>24</sub>烷基或聚乙二醇。式 I 的化合物对于治疗患者中的固体或非固体癌瘤是有用的。

[0053] 在优选实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>8</sub>—C<sub>24</sub>烷基。在其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>10</sub>—C<sub>24</sub>烷基。在另外的其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>12</sub>—C<sub>24</sub>烷基。在还有的其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>14</sub>—C<sub>24</sub>烷基。其中 R<sub>1</sub>是 C<sub>16</sub>—C<sub>24</sub>烷基的式 I 的那些化合物也是优选的。在其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>18</sub>—C<sub>24</sub>烷基。

[0054] 在其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>10</sub>烷基。在另外的其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>12</sub>烷基。在还有的其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>14</sub>烷基。在其它实施方式中, R<sub>1</sub>是 C<sub>16</sub>烷基。

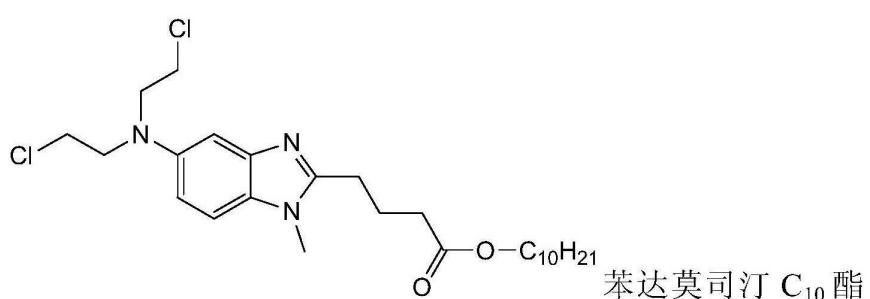
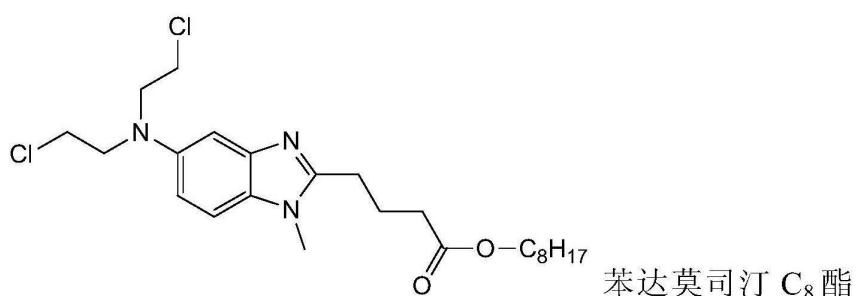
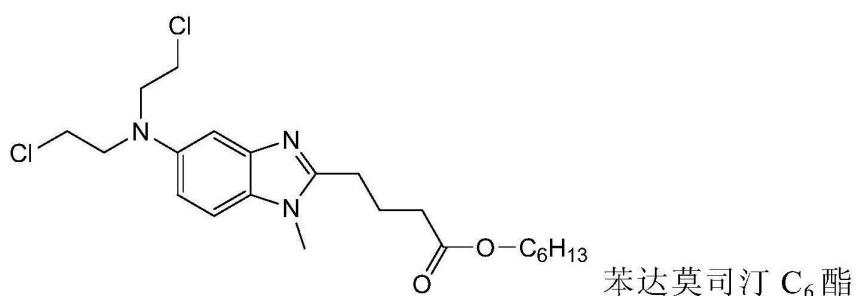
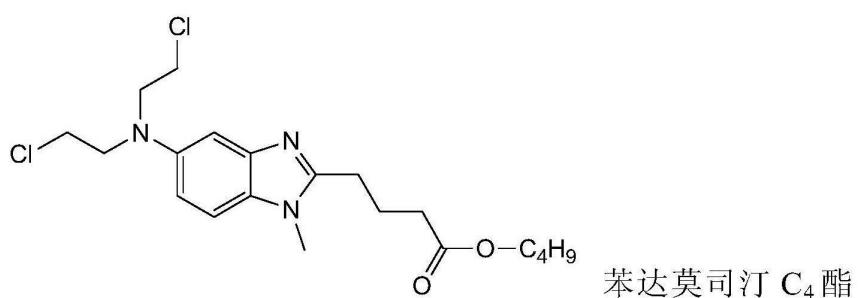
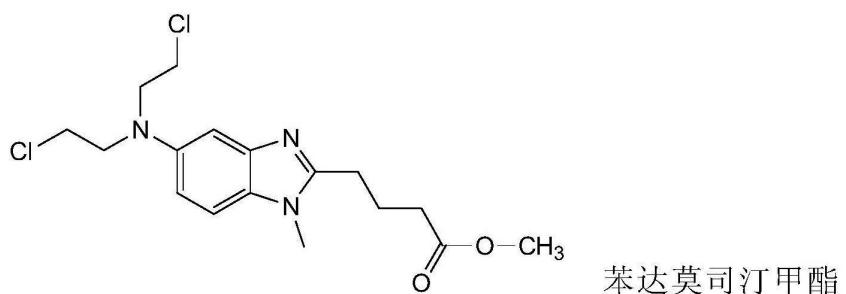
[0055] 同样在本发明范围内的是包含式 I 的化合物和药用可接受的载体或稀释剂的药物组合物。

[0056] 本发明的其它实施方式包括包含式 I 的化合物的纳米粒子。

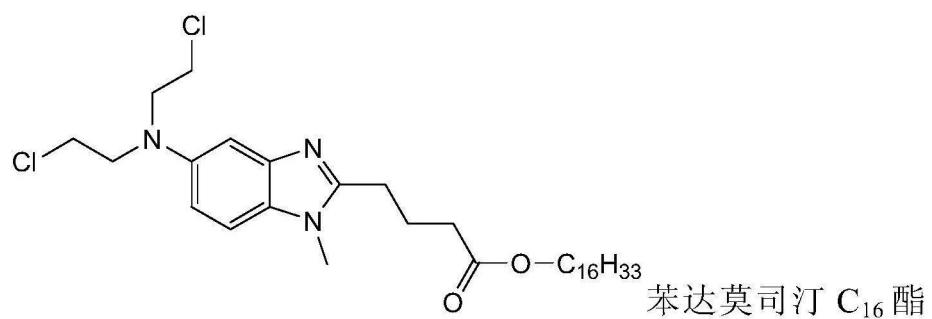
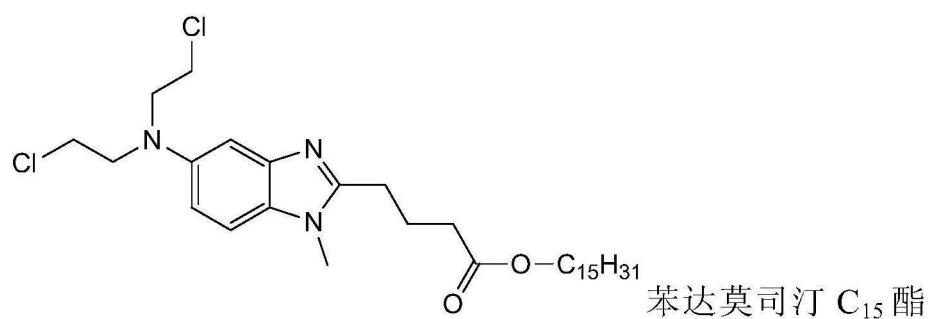
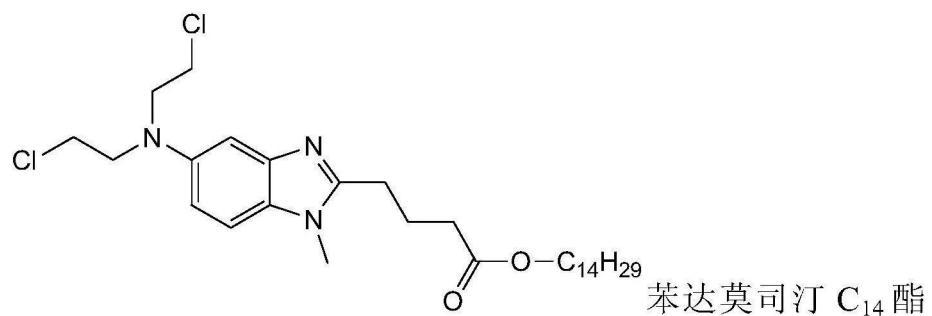
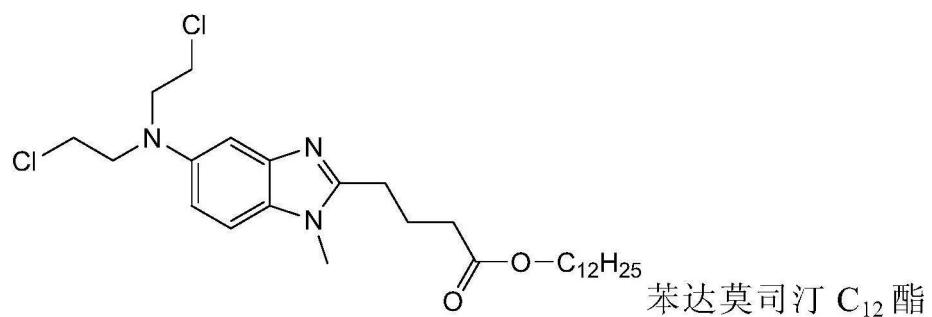
[0057] 同样在本发明范围内的是治疗癌症的方法,所述方法包括向患者施用式 I 的化合物。一些癌症,包括涉及固体肿瘤的癌症和不涉及固体肿瘤的癌症,可以对这种治疗作出相应。这些癌症包括慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤 (T 细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤)、侵袭性非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或肺癌 (例如,小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC))。据预测也可用本发明的化合物和组合物治疗的其它癌症是特征为存在固体肿瘤的癌症,包括肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、睾丸癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、结肠癌、头颈癌、卵巢癌和前列腺癌。据预测,也可用本发明的化合物治疗其它固体和非固体癌瘤,例如乳腺癌、胰腺癌、和胃癌。

[0058] 本发明特别优选的化合物包括:

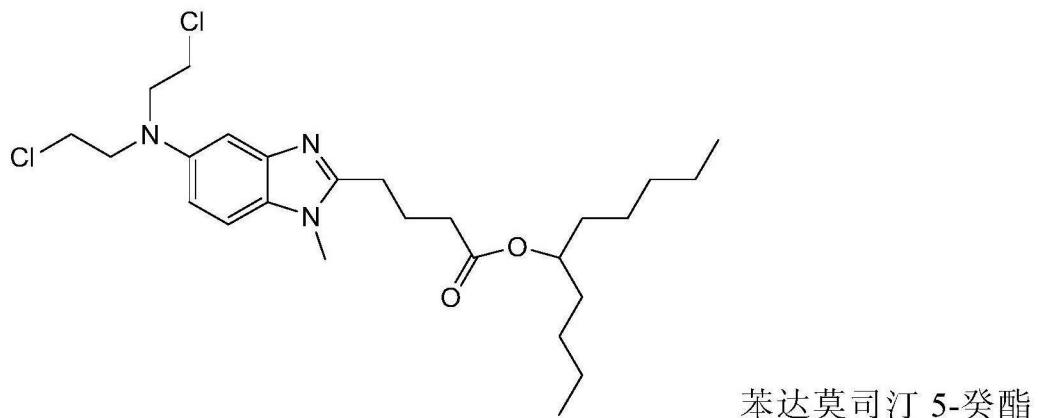
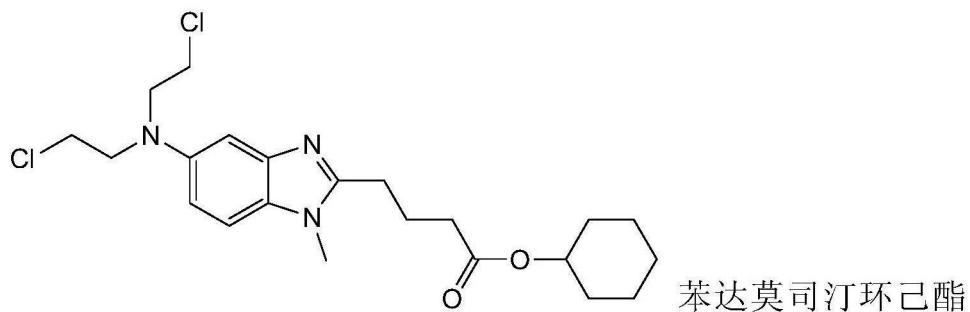
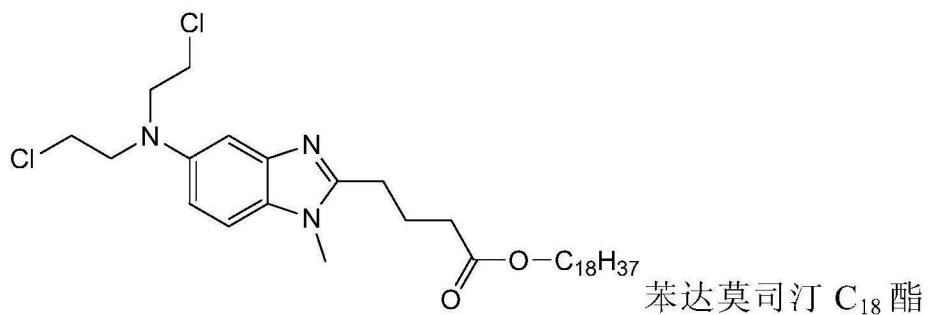
[0059]



[0060]

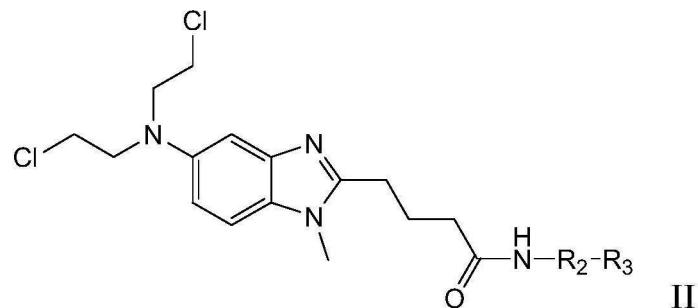


[0061]



[0062] 同样在本发明范围内的是式 II 的化合物或其药用可接受的盐形式：

[0063]



[0064] 其中  $R_2$  是  $C_1-C_{24}$  亚烷基；并且  $R_3$  是  $-COOC_{1-3}$  烷基；或者  $R_2-R_3$  是  $C_1-C_{24}$  烷基。式 II 的化合物对于治疗患者中的固体或非固体癌瘤是有用的。

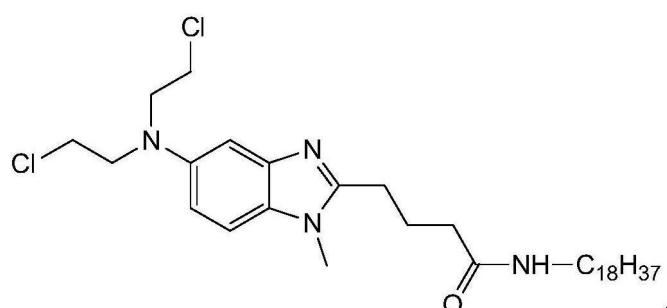
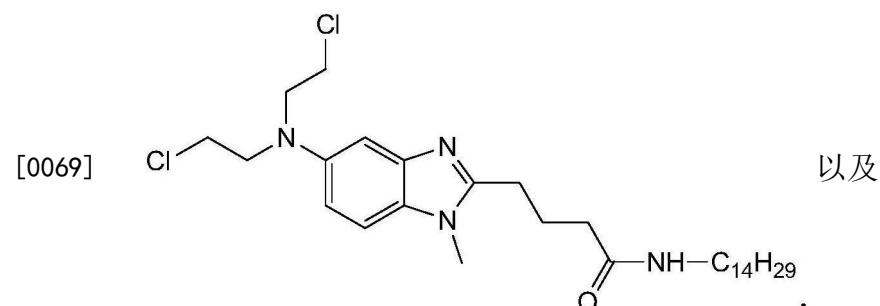
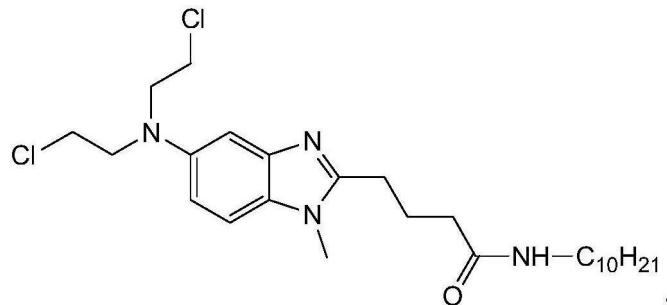
[0065] 在式 II 的化合物的优选实施方式中,  $R_2-R_3$  是  $C_8-C_{24}$  烷基。在其它实施方式中,  $R_2-R_3$  是  $C_{10}-C_{24}$  烷基。在还有的其它实施方式中,  $R_2-R_3$  是  $C_{12}-C_{24}$  烷基。在另外的其它实施方式中,  $R_2-R_3$  是  $C_{14}-C_{24}$  烷基。当  $R_2-R_3$  是  $C_{16}-C_{24}$  烷基时也是优选的。在其它实施方式中,

R<sub>2</sub>—R<sub>3</sub>是C<sub>18</sub>—C<sub>24</sub>烷基。

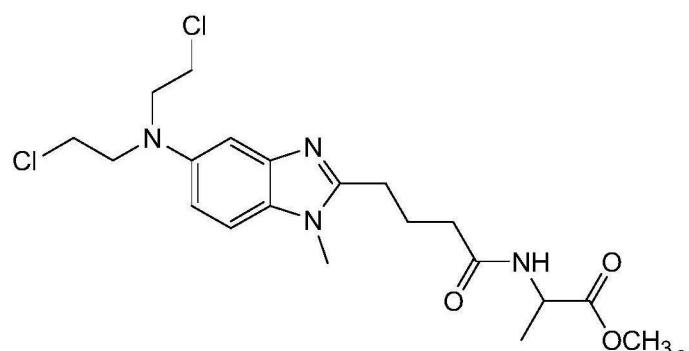
[0066] 优选地,对于式 II 的化合物来说, R<sub>2</sub>—R<sub>3</sub>是C<sub>10</sub>烷基。当 R<sub>2</sub>—R<sub>3</sub>是C<sub>12</sub>烷基时也是优选的。在其它实施方式中, R<sub>2</sub>—R<sub>3</sub>是C<sub>14</sub>烷基。在另外的其它实施方式中, R<sub>2</sub>—R<sub>3</sub>是C<sub>16</sub>烷基。

[0067] 在其它实施方式中, R<sub>2</sub>是C<sub>2</sub>亚烷基并且 R<sub>3</sub>是-COOCH<sub>3</sub>。

[0068] 式 II 的优选化合物包括:



[0070]



[0071] 同样在本发明范围内的是包含式 II 的化合物和药用可接受的载体或稀释剂的药物组合物。

[0072] 本发明的其它实施方式包括包含式 II 的化合物的纳米粒子。

[0073] 在本发明的一个实施方式中,使用本发明的化合物和组合物治疗对一种或多种化疗剂如烷化剂耐受的患者。患者可能耐受的示例性烷化剂包括:氮芥类;乙撑亚胺类

(ethylenimes) ;烷基磺酸酯类 ;三氮烯类 ;哌嗪类 ;和亚硝基脲类。下面列出了患者对其可以变得耐受的各种化疗剂的更多具体实例。对这些化疗剂中的一种或多种耐受的患者将通过利用本发明的化合物和组合物进行治疗而受益。

[0074] 氮芥类

[0075] 在商品名 Mustargen® 下市售的二氯甲基二乙胺通过注射给药来治疗霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤, 并作为乳腺癌和肺癌的姑息性治疗, 并且作为局部治疗给药而用于蕈样真菌病的皮肤损伤 (皮肤 T 细胞淋巴瘤)。

[0076] 在商品名 Ifex® 下销售的异环磷酰胺被用来治疗霍奇金和非霍奇金淋巴瘤两者, 以及复发性睾丸癌和生殖细胞肿瘤、肉瘤、肺癌、膀胱癌、头颈癌和宫颈癌。

[0077] 美法仑是在品牌名 Alkeran® 下销售的化疗药, 并且也称作 L-PAM 或苯丙氨酸氮芥。它用于治疗多发性骨髓瘤、卵巢癌、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤和乳腺癌。

[0078] 苯丁酸氮芥以商品名 Leukeran® 销售, 并且被最广泛用于治疗慢性淋巴细胞白血病, 包括淋巴肉瘤、巨滤泡性淋巴瘤的恶性淋巴瘤, 和霍奇金病。其也已经被成功地用于治疗非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌和睾丸癌、沃尔登斯特伦氏巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia)、血小板增多症和绒毛膜上皮癌。

[0079] 环磷酰胺作为 Cytoxan® 或 Neosar® 市售, 并且被用于治疗霍奇金和非霍奇金淋巴瘤, 伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma), 慢性淋巴细胞性白血病, 慢性髓细胞性白血病, 急性髓细胞性白血病, 急性淋巴细胞性白血病, T 细胞淋巴瘤, 多发性骨髓瘤, 成神经细胞瘤, 视网膜母细胞瘤, 横纹肌肉瘤, 尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma) ;乳腺癌, 睾丸癌, 子宫内膜癌, 卵巢癌, 和肺癌。

[0080] 亚硝基脲类

[0081] 链脲菌素在商品名 Zanosar® 下销售, 并且被用于治疗胰岛细胞胰腺癌。

[0082] 卡莫司汀也称为 BiCNU® 或 BCNU, 并且被用于一些种类的脑瘤、成胶质细胞瘤、脑干胶质瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、室管膜瘤, 和转移性脑瘤。其还被用于治疗多发性骨髓瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、黑素瘤、肺癌和结肠癌。

[0083] 洛莫司汀, 也被称为 CCNU 或 CeeNU®, 被用于治疗原发性脑瘤和转移性脑瘤、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤, 并且还已经被用于黑素瘤、肺癌和结肠癌。

[0084] 烷基磺酸酯类

[0085] 在商品名 Busulfex® 和 Myleran® 下销售的白消安被用于治疗慢性骨髓性白血病。

[0086] 三氮烯类

[0087] 达卡巴嗪在商品名 DTIC-Dome® 下销售, 并且被用于治疗转移性恶性黑素瘤、霍奇金病、软组织肉瘤、成神经细胞瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、胰岛细胞癌和甲状腺髓样癌。

[0088] 替莫唑胺在商品名 Temodar® 下销售, 并且被用于治疗特定类型的脑瘤间变性星形细胞瘤和多形性成胶质细胞瘤。

[0089] 乙撑亚胺类

[0090] 在商品名 Thioplex® 下已知的噻替派是用于治疗乳腺癌、卵巢癌、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤的烷化剂。

[0091] 六甲蜜胺在商品名 Hexalen® 下销售，并且还被称作六甲基三聚氰胺或HMM。其被用于治疗卵巢癌。

[0092] 当在本文中使用时，“C<sub>1</sub>–C<sub>24</sub>烷基”指直链的或支链的、含有1～24个碳原子的饱和烃基。代表性烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正十二烷基等。在本发明的范围内，“C<sub>1</sub>–C<sub>24</sub>烷基”也包括“环烷基”，所述环烷基指单环、双环和三环饱和烃，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、双环[2.1.1]己烷、双环[2.2.1]庚基、金刚烷基等。

[0093] 当在本文中使用时，也指作“PEG”的“聚乙二醇”指通式H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-或H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>的聚合物，其中n为至少4。优选的PEG具有约200～约5000道尔顿的平均分子量，更优选的PEG为约2000～约5000道尔顿。

[0094] 当在本文中使用时，“药用可接受的载体或稀释剂”指生理相容的溶剂、分散介质、包衣剂、填充剂、稳定剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。药用可接受的载体的实例包括以下一种或多种：水，盐水，磷酸盐缓冲的盐水，右旋糖，甘油，乙醇，糖如海藻糖和蔗糖，多元醇如甘露醇、山梨醇，糖和多元醇的混合物，以及氯化钠。药用可接受的载体还可包括辅助物质如润湿剂或乳化剂、防腐剂和缓冲剂。

[0095] 当在本文中使用时，“药物组合物”指适合在医药或兽用应用中施用的组合物。这种化合物优选包括本发明的化合物与一种或多种载体和/或稀释剂的组合。这种组合物也被称作“制剂”。

[0096] 当在本文中使用时，“施用”指可以将本发明的化合物递送至患者的本领域内的任何方法。优选的施用方法包括局部施用和全身施用，所述局部施用是将本发明的化合物直接施用到其中需要所述化合物的效果的位置处。施用方法的实例包括但不限于口服施用、经肠施用、舌下施用、锁骨下施用、皮下施用、经鼻施用、静脉内施用、动脉内施用、肌内施用和腹膜内施用。

[0097] 当在本文中使用时，“固体肿瘤”指作为组织的局部肿块的恶性肿瘤。固体癌瘤的实例包括淋巴瘤、肉瘤、和癌，并且包括乳腺癌、脑癌、骨癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌等。

[0098] 当在本文中使用时，“非固体癌瘤”最常见地是指血癌，即血液的恶性癌症。非固体癌瘤的实例包括慢性淋巴细胞性白血病、霍奇金病、顽性非霍奇金淋巴瘤（T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤）、多发性骨髓瘤等。

[0099] 当在本文中使用时，“纳米粒子”指如由Malvern Zetasizer测定的，平均粒径为约0.2 μm以下、优选为约0.1 μm以下的粒子。

## [0100] 实验部分

[0101] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸甲酯（苯达莫司汀C<sub>1</sub>酯）的制备：

[0102] 方法A：向装配有顶置式搅拌器、具有氮气吹扫的冷凝器和具有温度控制器的热电偶的1L三颈圆底烧瓶装载4-(5-氨基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸甲酯(10.2g, 41.2mmol, 1.0当量)和氯乙酸(81.9g, 866mmol)以及20mL的无水四氢呋喃

(THF)。在自来水浴中搅拌该浆料以允许所有固体溶解。在 25 分钟内通过另外的漏斗缓慢添加硼烷 -THF (288mL, 288mmol)。当完成  $\text{BH}_3\text{-THF}$  的添加后, 在室温下搅拌所得反应溶液 1.5 小时, 然后利用加热幔 (heat mantle) 在 58°C 下加热 45 分钟。将反应冷却并在室温下保持过夜, 然后用甲醇 (10mL) 淬灭。通过在旋转蒸发仪上蒸发将所得溶液浓缩至约三分之一重, 并且在冰水浴中用氢氧化钠水溶液中和至 pH 8-9。通过真空过滤收集固体, 用水 (200mL) 洗涤, 然后用稀碳酸氢钠水溶液 (50mL) 重新浆化 20 分钟。在过滤后利用室内真空 (house vacuum) 在室温下干燥过夜, 得到棕褐色固体 (9.6g, 63% 产率, 93A% 纯度)。  
 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d6)  $\delta$  7.32 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 1H), 6.92 (d,  $J = 2.3\text{Hz}$ , 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.8, 2.3\text{Hz}$ , 1H), 3.70 (br s, 8H), 3.66 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 2.83 (t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.48 (t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.01 (五重峰,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H); LC/MS (ESI, m/z) 372 (M+1), mp 60-63°C 已分解。

[0103] 方法 B: 向装配有加热幔、热电偶、冷凝器、氮气入口 / 出口和顶置式搅拌器的 2L 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀 HC1 (50.0g, 126.7mmol, 1.0 当量)、甲醇 (500mL) 和甲磺酸 (2.47mL, 38.1mmol)。将反应混合物加热至回流并在 65°C 下搅拌 1 小时。将反应溶液冷却至 40°C 并在真空下浓缩。将水 (500mL) 添加至浓缩的残余物, 用饱和的  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (150mL) 在 1.5 小时内将混合物中和至 pH 6。产物经过滤收集, 用水 (150mL) 洗涤并在 40°C 下真空干燥, 得到白色粉末固体 44.2g (94% 产率), 经 HPLC 测定纯度为 98.4A%。

[0104] 4-[5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]-丁酸乙酯 (苯达莫司汀 C<sub>2</sub>酯) 的制备:

[0105] 方法 A: 向装配有加热幔、热电偶、冷凝器、氮气入口 / 出口和顶置式搅拌器的 1L 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀 HC1 (30.0g, 76mmol, 1.0 当量)、乙醇 (300mL) 和甲磺酸 (1.48mL, 22.8mmol)。将反应混合物在 70°C 下加热 1 小时。将反应溶液冷却至 40°C 并在真空下浓缩。将水 (300mL) 添加至浓缩的残余物, 用饱和的  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (115mL) 在 1.5 小时内将混合物中和至 pH 6。产物经过滤收集, 用水 (100mL) 洗涤并在 40°C 下真空干燥, 得到白色固体 28.6g (97% 产率), 经 HPLC 测定纯度为 99.2A%。  
 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d6)  $\delta$  7.32 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 1H), 6.92 (d,  $J = 2.3\text{Hz}$ , 1H), 6.78 (dd,  $J = 8.8, 2.3\text{Hz}$ , 1H), 4.04 (五重峰,  $J = 7.12\text{Hz}$ , 2H), 3.70 (br s, 8H), 3.66 (s, 3H), 2.83 (t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.45 (t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.00 (五重峰,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 1.18 (t,  $J = 7.12\text{Hz}$ , 3H)。

[0106] 方法 B: 向装配有加热幔、热电偶、冷凝器、氮气入口 / 出口和顶置式搅拌器的 500mL 三颈玻璃烧瓶装载 4-(5-氨基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸乙酯 (6.4g, 1.0 当量)、氯乙酸 (42.5g) 和四氢呋喃 (THF, 13mL)。在室温下, 将所得混合物在水浴中搅拌 1.5 小时。在 20 分钟内添加硼烷 -THF (150mL)。一旦完成装载, 则将反应混合物加热至 55-58°C 并搅拌 1.5 小时。经 HPLC 的进程分析显示出 94A% 的期望产物。将反应冷却至室温并套入下一步的水解从而产生苯达莫司汀。

[0107] 4-[5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]-丁酸丁酯 (苯达莫司汀 C<sub>4</sub>酯) 的制备: 250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 10.0g (25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、1.9g (2.35mL, 25.6mmol, 1.01 当量) 的 1-丁醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g (2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜, 进程分析显示反应

在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液 (2 X 100mL)、DI 水 (1 X 100mL) 和盐水 (1 X 100mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干以得到棕色油。用 25mL 的 MDC 研制所述油, 并且将固体杂质经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液真空浓缩至干, 从而得到 9.5g (22.8mmol, 90%) 作为清澈浅棕色油的产物, HPLC 纯度为 94.5A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, J = 8.76Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.32Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 2.36, 8.8Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.76Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.1Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 2H), 0.89 (t, J = 4.56Hz, 3H)。

[0108] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸己基酯 (苯达莫司汀 C<sub>6</sub>酯) 的制备 :

[0109] 方法 A :250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 10.0g (25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、2.62g (3.22mL, 25.6mmol, 1.01 当量) 的 1-己醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g (2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜, 进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液 (2 X 100mL)、DI 水 (1 X 100mL) 和盐水 (1 X 100mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干以得到棕色油。用 25mL 的 MDC 研制所述油, 并且将固体杂质经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液真空浓缩至干, 从而得到 8.91g (20.1mmol, 79%) 作为清澈浅棕色油的产物, HPLC 纯度为 91.9A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, J = 8.76Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.32Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 2.36, 8.8Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.76Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.1Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 6H), 0.89 (t, J = 4.56Hz, 3H)。

[0110] 方法 B :向装配有顶置式搅拌器、热电偶和氮气入口 / 出口的一升 4 颈圆底烧瓶装载 30g (76.0mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐和 300mL 的二氯甲烷。开始搅拌并通过注射器添加 10.6mL (7.69g, 76.0mmol) 的三乙胺, 然后在室温下搅拌 15 分钟, 然后添加 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDAC, 21.86g, 114mmol) 和正己醇 (9.57mL, 7.84g, 76.8mmol)。在搅拌 20 分钟后, 该浑浊的白色反应混合物变为清澈溶液。在室温下继续搅拌 22.5 小时, 在 30°C 继续搅拌 1 小时, 直到经 HPLC 分析反应完全。装入 DI 水 (300mL) 以淬灭反应, 并使用 1N HCl 将 pH 调节至 6。进行分层, 用二氯甲烷 (100mL) 萃取水层, 然后与有机相合并并在硫酸钠上干燥。在过滤和真空下浓缩至干后, 得到了清澈黄色油, 所述黄色油通过柱色谱 (含 25%~50% 乙酸乙酯的庚烷溶液) 纯化。回收了共计 16.5g (37.3mmol, 49.1%) 的黄色稠油, HPLC 纯度为 99.1A%。

[0111] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸辛酯 (苯达莫司汀 C<sub>8</sub>酯) 的制备 :250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 10.0g (25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、3.33g (4.03mL, 25.6mmol, 1.01 当量) 的 1-辛醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g (2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜, 进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液 (2 X 100mL)、DI 水 (1 X 100mL) 和盐水 (1 X 100mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤

并真空浓缩至干以得到棕色油。用 25mL 的 MDC 研制所述油，并且将固体杂质经真空过滤移除并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液真空浓缩至干，从而得到 9.7g (20.5mmol, 81%) 作为清澈浅棕色油的产物，HPLC 纯度为 91.9A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, J = 8.76Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.28Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 2.4, 8.76Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.8Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, J = 7.44Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.12Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 10H), 0.89 (t, J = 6.72Hz, 3H)。

[0112] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸癸酯(苯达莫司汀 C<sub>10</sub>酯)的制备：

[0113] 方法 A：向装配有搅拌子、热电偶和氮气入口/出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 10.0g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、4.9mL (4.08g, 25.6mmol, 1.01 当量) 的癸醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的二氯甲烷和 0.31g (2.53mmol, 0.1 当量) 的 N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP)。将反应混合物在室温下搅拌 18 小时，HPLC 分析显示反应在此时间完成。固体通过真空过滤移除，将滤液用 DI 水 (2 X 100mL) 和饱和碳酸氢钠 (1 X 100mL) 洗涤，然后在硫酸钠上干燥。将有机相过滤以移除干燥剂，然后真空浓缩至干，从而得到 9.6g (19.2mmol, 75.9%) 作为低熔点白色固体的期望产物，HPLC 纯度为 94.1A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, J = 8.76Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.32Hz, 1H), 6.77 (dd, J = 2.4, 8.76Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.76Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.08Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 14H), 0.87 (t, J = 6.68Hz, 3H)。

[0114] 方法 B：向装配有磁力搅拌子、热电偶和氮气入口/出口的 250mL 4-颈圆底烧瓶装载 10g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐和 100mL 的二氯甲烷。开始搅拌并通过注射器添加 3.53mL (2.56g, 25.3mmol) 的三乙胺，然后在室温下搅拌 15 分钟，然后添加 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDAC, 7.28g, 38mmol) 和正癸醇 (4.88mL, 4.04g, 25.5mmol)。在搅拌 20 分钟后，该浑浊的白色反应混合物变为清澈溶液。在室温下继续搅拌 20 小时，直到经 HPLC 分析反应完全。装入 DI 水 (100mL) 以淬灭反应，并使用 1N HCl 将 pH 调节至 6-7。进行分层，水层用二氯甲烷 (25mL) 萃取，然后与有机相合并并在硫酸钠上干燥。在过滤和真空下浓缩至干后，得到了清澈黄色油，所述黄色油通过柱色谱 (含 2%~60% 乙酸乙酯的庚烷溶液) 纯化。回收了共计 11.2g (22.42mmol, 88.6%) 的黄色稠油，HPLC 纯度为 98.9A%。

[0115] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十二烷基酯(苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯)的制备：

[0116] 方法 A：250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配，然后装载 10.0g (25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、4.77g (25.6mmol, 1.01 当量) 的 1-十二烷醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g (2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜，进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液 (2 X 100mL)、DI 水 (1 X 100mL) 和盐水 (1 X 100mL) 洗涤，然后在硫酸钠上干燥，过滤并真空浓缩至干以得到灰白色半固体。用 25mL 的 MDC 研制这一固体，并且将固体杂质经真空过滤移除并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液真空浓缩至干，从而得到 11.53g (21.9mmol, 86.4%) 作为

灰白色半固体的产物, HPLC 纯度为 93.7A%。

[0117] 方法 B: 向装配有热电偶、加热器 / 冷却器、氮气入口 / 出口、添加漏斗和真空管路的 20 升带夹套的圆柱形 ChemGlass 反应容器装载苯达莫司汀 (374g, 1.04mol, 1.0 当量) 的游离碱、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDAC, 300g, 1.57mol, 1.5 当量)、和二氯甲烷 (DCM, 3.74L, 10 倍体积)。在搅拌的同时添加 1-十二烷醇 (292.1g, 1.57mol, 1.5 当量)。将反应混合物加热, 然后在 27°C 下搅拌 4 小时。将该批次冷却并在 20°C 下保持过夜。然后, 将该批次用 3.75L 的水洗涤并分层。用 1.2L 的二氯甲烷对水性部分进行再萃取, 将合并的二氯甲烷部分在  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上干燥。在过滤移除干燥剂后, 将滤液在真空下浓缩, 从而制得作为粗油的产物。使用 374g 的苯达莫司汀的游离碱在相同条件下进行这一反应的另一批次。将来自两批次的粗产物合并, 与 4494mL 的庚烷混合并加热至 45–50°C。允许所得溶液缓慢冷却至室温, 析出灰白色固体。在室温下对该浆料搅拌过夜, 通过真空过滤在 10°C 下分离固体。用 1L 的庚烷洗涤湿饼, 并用 2.5L 的庚烷将其在 20–22°C 下重新浆化过夜。产物经过滤收集并每次用 500mL 的庚烷洗涤两次。在 20–22°C 下将湿饼干燥过夜, 得到 653g (59% 产率) 通过 HPLC 测定为 99.0A% 的白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d6)  $\delta$  7.32 (d,  $J$  = 8.8Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 2.3Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 8.8, 2.3Hz, 1H), 3.99 (t,  $J$  = 6.64Hz, 2H), 3.70 (br s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.83 (t,  $J$  = 7.4Hz, 2H), 2.45 (t,  $J$  = 7.4Hz, 2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.01 (五重峰,  $J$  = 7.4Hz, 2H), 1.54 (五重峰,  $J$  = 6.9Hz, 2H), 1.24 (m, 18H), 0.85 (t,  $J$  = 6.8Hz, 3H)。

[0118] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十四烷基酯 (苯达莫司汀  $\text{C}_{14}$  酯) 的制备:

[0119] 方法 A: 向装配有搅拌子、热电偶和氮气入口 / 出口的 500mL 三颈圆底烧瓶装载 10.0g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、6.5g (30.4mmol, 1.2 当量) 的十四烷醇、6.3g (30.4mmol, 1.2 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的二氯甲烷和 0.62g (5.1mmol, 0.2 当量) 的  $\text{N},\text{N}$ -二甲基氨基吡啶 (DMAP)。将反应混合物在室温下搅拌 20 小时, HPLC 分析显示反应在此时间完成。通过真空过滤移除固体, 用 50mL 的二氯甲烷洗涤湿饼, 然后将滤液真空浓缩至干。用 50mL 的二氯甲烷研磨所得淡橙色油, 通过真空过滤移除不想要的固体。再次, 将滤液真空浓缩至干, 从而得到 16.5g 的半固体, 通过  $^1\text{H}$  NMR 显示其包含十四烷醇和 DMAP。将残余物在 150g 的 230–400 目硅胶 60 上进行色谱分离, 用 1500mL 的 MDC、1000mL 的 0.5% 甲醇 / MDC 和 2000mL 的 1% 甲醇 / MDC 洗脱, 收集 100–150mL 级分。将含有期望产物的级分合并, 并真空浓缩至干。再次, 用 30mL 的 MDC 研磨残余物, 通过过滤移除不想要的固体。将滤液真空浓缩, 从而得到 5.0g (9.2mmol, 36.4%) 作为浅紫色固体的期望产物, 纯度为 95.0A%。

[0120] 方法 B: 向装配有热电偶、冷凝器、氮气入口 / 出口和顶置式机械搅拌器的 150mL 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀的游离碱 (16.0g, 44.6mmol, 1.0 当量)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDAC, 9.42g, 49.2mol)、1-十四烷醇 (10.6g, 49.2mmol) 和二氯甲烷 (120mL)。将反应混合物在 27°C 下搅拌过夜。将反应溶液冷却至室温并用 100mL 的水洗涤。在搅拌的同时加入 1M HCl 水溶液以将水层的 pH 调节至 pH 3–4。进行分层。用 100mL 的二氯甲烷对水性部分进行再萃取, 将合并的二氯甲烷部分在  $\text{MgSO}_4$  上干燥。在过滤移除干燥剂后, 将滤液真空浓缩, 从而产生作为蜡状黄色固体的产物。用 80mL 的庚烷将该固体在

室温下过夜浆化。通过过滤收集产物并干燥,得到 20.6g(83.4%产率)的白色固体, HPLC 纯度为 97.2A%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d6)  $\delta$  7.32(d,  $J$  = 8.8Hz, 1H), 6.91(d,  $J$  = 2.3Hz, 1H), 6.78(dd,  $J$  = 8.8, 2.3Hz, 1H), 3.98(t,  $J$  = 6.64Hz, 2H), 3.70(br s, 8H), 3.66(s, 3H), 2.83(t,  $J$  = 7.4Hz, 2H), 2.45(t,  $J$  = 7.4Hz, 2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.01(五重峰,  $J$  = 7.3Hz, 2H), 1.54(m, 2H), 1.23(m, 18H), 0.85(t,  $J$  = 7.12Hz, 3H)。

[0121] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十五烷基酯(苯达莫司汀 C<sub>15</sub>酯)的制备:250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配,然后装载 10.0g(25.34mmol)的苯达莫司汀盐酸盐、5.85g(25.6mmol, 1.01 当量)的十五烷醇、5.3g(25.6mmol, 1.01 当量)的二环己基碳二亚胺(DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g(2.54mmol, 0.1 当量)的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜,进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液(2 X 100mL)、DI 水(1 X 100mL)和盐水(1 X 100mL)进行洗涤,然后在硫酸钠上干燥,过滤并真空浓缩至干以得到灰白色固体。用 25mL 的 MDC 研制这一固体,通过真空过滤移除不需要的固体杂质并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液在真空中浓缩至干,从而得到 10.8g(19.0mmol, 75%)作为灰白色固体的产物,HPLC 纯度为 94.6A%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.17(d,  $J$  = 8.76Hz, 1H), 7.08(d,  $J$  = 2.32Hz, 1H), 6.78(dd,  $J$  = 2.4, 8.76Hz, 1H), 4.05(t,  $J$  = 6.8Hz, 2H), 3.72(m, 4H), 3.69(s, 3H), 3.63(m, 4H), 2.91(t,  $J$  = 7.4Hz, 2H), 2.49(t,  $J$  = 7.08Hz, 2H), 2.18(m, 2H), 1.60(m, 2H), 1.32(m, 24H), 0.88(t,  $J$  = 6.68Hz, 3H)。

[0122] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十六烷基酯(苯达莫司汀 C<sub>16</sub>酯)的制备:250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配,然后装载 10.0g(25.34mmol)的苯达莫司汀盐酸盐、6.2g(25.6mmol, 1.01 当量)的十六烷醇、5.3g(25.6mmol, 1.01 当量)的二环己基碳二亚胺(DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g(2.54mmol, 0.1 当量)的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜,进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用饱和碳酸氢钠水溶液(2 X 100mL)、DI 水(1 X 100mL)和盐水(1 X 100mL)进行洗涤,然后在硫酸钠上干燥,过滤并真空浓缩至干以得到灰白色固体。用 25mL 的 MDC 研制这一固体,通过真空过滤移除不需要的固体杂质并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液在真空中浓缩至干,从而得到 13.1g(22.5mmol, 88.8%)作为灰白色固体的产物,HPLC 纯度为 94.0A%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.17(d,  $J$  = 8.76Hz, 1H), 7.08(d,  $J$  = 2.32Hz, 1H), 6.78(dd,  $J$  = 2.36, 8.72Hz, 1H), 4.05(t,  $J$  = 6.8Hz, 2H), 3.72(m, 4H), 3.69(s, 3H), 3.63(m, 4H), 2.91(t,  $J$  = 7.4Hz, 2H), 2.49(t,  $J$  = 7.08Hz, 2H), 2.18(m, 2H), 1.60(m, 2H), 1.32(m, 26H), 0.88(t,  $J$  = 6.68Hz, 3H)。

[0123] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸油酰基酯(苯达莫司汀 C<sub>18</sub>酯)的制备:

[0124] 方法 A:向装配有顶置式搅拌器、具有氮气吹扫的冷凝器、具有温度控制器的加热幔和热电偶的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 1-十八烷醇(50g, 185mmol, 7.3 当量)。在缓慢添加 4-(5-氨基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸(10g, 25.3mmol, 1.0 当量)和硫酸(0.5mL)之前,将固体加热以使其熔化。将所得浆料在 70℃下搅拌 6 小时,然后冷却至 56℃,向其中添加二氯甲烷(150mL)。将反应混合物冷却至室温并用水(100mL)洗涤。在相分离之后,用二氯甲烷(100mL)进行另一次萃取。将有机相合并,并在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥。通过过滤

移除干燥剂。将滤液浓缩并进行 SFC 分离。通过在减压下蒸发 SFC 级分中的溶剂, 获得了白色固体, 利用室内真空在室温下将其干燥 5 天, 以 7.1% 的产率和 95.4A% 的纯度得到 1.2g 的期望产物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.09 (d, J = 2.3Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 8.8, 2.4Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.8Hz, 2H), 3.74 (m, 7H), 3.62 (m, 4H), 2.93 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.1Hz, 2H), 2.22 (五重峰, J = 7.1Hz, 2H), 1.60 (五重峰, J = 7.1Hz, 2H), 1.28 (m, 30H), 0.88 (t, J = 7.1Hz, 3H); LC/MS (ESI, m/z) 610 (M+1)。

[0125] 方法 B: 向装配有搅拌子、氮气吹扫和热电偶的 500mL 三颈圆底烧瓶装载苯达莫司汀 HC1 (5.04g, 12.8mmol)、1-十八烷醇 (4.15g, 15.3mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC, 3.17g, 15.4mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (DMAP, 0.31g, 2.56mmol) 和二氯甲烷 (250mL)。将所得浆料在室温下搅拌 16 小时。产生了固体并通过过滤将其从反应混合物中移除。用水 (150mL) 洗涤滤液。在相分离之后, 将有机相在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥。通过过滤移除干燥剂, 浓缩滤液, 并使用 EtOAc 和庚烷的混合物对滤液进行 ISCO 色谱纯化, 得到具有 99A% 纯度的白色固体 5.68g (73% 产率)。

[0126] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸二十二烷基酯 (苯达莫司汀 C<sub>22</sub>酯) 的制备: 向装配有搅拌子、热电偶和氮气入口 / 出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 5.0g (12.7mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、4.2g (12.9mmol, 1.01 当量) 的二十二烷醇 (teradecyl alcohol)、2.7g (12.9mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、50mL 的二氯甲烷 (MDC) 和 0.16g (1.27mmol, 0.1 当量) 的 N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP)。将反应混合物在室温下搅拌过夜, HPLC 分析显示反应在此时间完成。通过真空过滤移除固体, 用 50mL 洗涤湿饼。进行两个交替的纯化步骤。将滤液用 DI 水 (2 X 150mL) 洗涤, 在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干。所得蜡状残余物在 80g 的 230-400 目硅胶 60 上进行色谱分离, 以从 100% MDC 开始、然后 0.5% 甲醇 / MDC 和最后 1% 甲醇 / MDC 的梯度进行洗脱, 收集 100-150mL 的级分。将含有期望产物的级分合并, 并真空浓缩至干。再次, 用 20mL 的 MDC 研制残余物, 通过过滤将不想要的固体移除。滤液在真空被浓缩, 从而得到 3.65g (5.5mmol, 43.1%) 作为蜡状白色固体的期望产物, 纯度为 95.7A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, J = 8.72Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.28Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 2.36, 8.72Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.76Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, J = 7.44Hz, 2H), 2.49 (t, J = 7.08Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 38H), 0.88 (t, J = 6.64Hz, 3H)。

[0127] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸 2-十二烷基酯 (支链的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯) 的制备: 250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 10.0g (25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、4.77g (5.75mL, 25.6mmol, 1.01 当量) 的 2-十二烷醇、5.3g (25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g (2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在室温下搅拌过夜, 进程分析显示反应在此时间完成。固体经真空过滤移除并用 25mL 的 MDC 洗涤。将滤液用 200mL 的 MDC 稀释, 然后用 4% 的碳酸氢钠水溶液 (1 X 500mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干以得到灰白色固体。用 25mL 的 MDC 研制这一固体, 通过真空过滤将固体杂质移除并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液在真空中浓缩至干, 从而得到粗产物, 所述粗产物经 <sup>1</sup>H NMR 显示含有残余的 2-十二烷醇。使用 100g 的 230-400 目硅胶 60 对粗产物进行色谱分离, 先用 1L 庚烷、然后用 500mL 的 3:1 庚烷 / EtOAc、500mL 的 2:1 庚烷 / EtOAc 并

在最后用 500mL 的 1 :1 庚烷 /EtOAc 进行洗脱, 收集 100mL 的级分。将含有产物的级分合并, 并真空浓缩至干, 从而产生 5.35g (10.16mmol, 40%) 作为浅紫色粘性油的产物, HPLC 纯度为 99.5A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.31 (d, J = 8.76Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.28Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 2.36, 8.76Hz, 1H), 4.8 (m, 1H), 3.7 (s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.82 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.42 (t, J = 7.36Hz, 2H), 2.00 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.25 (s, b, 16H), 1.14 (d, J = 6.24, 2H), 0.84 (t, J = 6.68Hz, 3H)。

[0128] 莱达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的制备

[0129] 向装配有热电偶、加热器 / 冷却器、氮气入口、添加漏斗、冷凝器和真空管路的 20 升带夹套的圆柱形 ChemGlass 反应容器装载 428g (1.10mmol) 的预处理的苯达莫司汀盐酸盐在 10 倍体积的痕量 GC 分析级二氯甲烷中的浆料。将搅拌设置在 100RPM, 将夹套设置在 20℃。经添加漏斗在 10 分钟内将二异丙基乙胺 (213ml, 1.1 当量) 添加至这一混合物。在保持 34 分钟后, 在一个级分中添加熔化的十二烷醇 (227g, 1.1 当量)。在保持 11 分钟后, 将 EDCI (320.3g, 1.5 当量) 添加至该批次。在 ~20℃ 下将所得清澈黄色溶液搅拌 23.5 小时。这时, IPC 表明剩余 0.54% 的原料。添加 10 倍体积的水, 将反应搅拌另外的 15 分钟。将下面的有机层排出, 经 5 微米筒式滤芯过滤, 用 1 倍体积的 GC 分析级二氯甲烷清洗筒式滤芯。在真空中浓缩二氯甲烷溶液, 从而提供作为黄色粘性油的粗产物。将 5 倍体积的过滤的正庚烷添加至所述油, 将混合物在真空中浓缩以移除残余的二氯甲烷, 从而以 92.9 重量% 得到 615g 的粗固体, 对应于 98.0% 的产率。基于干重, 最终纯度为 98.4%。

[0130] 莱达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的纯化

[0131] 将 CEP-40125 粗品 (1100g API, 1250g 粗品) 溶解在正庚烷 (6 倍体积) 中, 并且转移至装配有热电偶、加热器 / 冷却器、氮气入口、冷凝器和真空管路的 20 升带夹套的圆柱形 ChemGlass 反应容器。将浆料加热至 40℃ 以溶解所有固体。在达到 32.6℃ 后, 发生溶解。然后, 将反应混合物在 2.5 小时内冷却至 17.7℃, 在这一点产物析出。然后, 将反应混合物重新加热至 23℃ 以在 26 分钟内溶解细粒子, 并在 2 小时内冷却至 4℃。将固体经密封的过滤器进行过滤, 并用 2 倍体积的冷正庚烷在 4.5 小时内进行洗涤。IPC 表明 0.20% 的残余十二烷醇。将固体在真空下、在 30℃ 干燥 24 小时至恒重, 从而以 98.3% 的纯度提供 1018g 的 CEP-40125, 表示 92.5% 的产率。

[0132] 4-[5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]丁酸 5-癸酯 (支链的苯达莫司汀 C<sub>10</sub>酯) 的制备: 250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 3.0g (7.6mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、1.21g (7.7mmol, 1.01 当量) 的 5-癸醇、1.59g (7.7mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺 (DCC)、30mL 的 1,2-二氯乙烷 (EDC) 和 0.1g (0.76mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应在 75℃ 下搅拌 5 天, 直到进程分析表明反应完成。通过真空过滤移除固体, 并用 5mL 的 EDC 洗涤。将滤液用 4% 的碳酸氢钠水溶液 (1 X 50mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干。将残余物与来自在相同条件下进行的 10g 批次实验的残余物合并, 对合并的批次进行色谱分离。使用 100g 的 230-400 目硅胶 60 进行色谱分离, 用 2L 的庚烷、然后 1L 的 3:1 庚烷 /EtOAc 和 1L 的 2:1 庚烷 /EtOAc 进行洗脱, 收集 100mL 的级分。将含有产物的级分合并, 并在真空中浓缩至干, 从而得到 3.97g (7.96mmol, 24.2%) 作为清澈黄色油的产物, HPLC 纯度为 99.4A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.31 (d, J = 8.76Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.28Hz, 1H), 6.78 (dd, J =

2.40, 8.80Hz, 1H), 4.8(m, 1H), 3.7(s, 8H), 3.65(s, 3H), 2.83(t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.44(t,  $J = 7.36\text{Hz}$ , 2H), 2.02(m, 2H), 1.48(m, 4H), 1.25(s, b, 10H), 0.84(m, 6H)。

[0133] 4-{5-[双-(氯乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸环己酯的制备: 250mL 三颈圆底烧瓶用顶置式搅拌器、热电偶、温度控制器和氮气吹扫进行装配, 然后装载 10g(25.34mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、2.56g(2.7mL, 25.6mmol, 1.01 当量) 的环己醇、5.3g(25.6mmol, 1.01 当量) 的二环己基碳二亚胺(DCC)、100mL 的 MDC 和 0.31g(2.54mmol, 0.1 当量) 的 DMAP。将反应浆料在 RT 下搅拌 18h, 直到进程分析表明反应完成。观察到了两个新的主要产物峰。通过真空过滤移除固体, 并用 5mL 的 MDC 洗涤。将滤液用 4% 的碳酸氢钠水溶液(2 X 100mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干, 从而得到具有存在的一些固体的黄色油。 $^1\text{H}$  NMR 分析表明, 除期望的产物外, 还存在残余的 DMAP 和环己醇以及 DCC 副产物。用 50mL 的 MDC 浆化残余物以移除残余的环己醇, 然后真空干燥并色谱分离。使用 50g 的 230-400 目硅胶 60 进行色谱分离, 用 1:1 庚烷/EtOAc 洗脱, 收集 100mL 的级分。将含有产物的级分合并, 并真空浓缩至干, 从而得到 3.11g(7.06mmol, 27.9%) 作为灰白色固体的产物, HPLC 纯度为 97.8A%。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.31(d,  $J = 8.76\text{Hz}$ , 1H), 6.93(d,  $J = 2.28\text{Hz}$ , 1H), 6.77(dd,  $J = 2.40, 8.80\text{Hz}$ , 1H), 4.65(m, 1H), 3.7(s, 8H), 3.65(s, 3H), 2.83(t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.44(t,  $J = 7.36\text{Hz}$ , 2H), 2.00(m, 2H), 1.76(m, 4H), 1.65(m, 2H), 1.33(m, b, 6H)。

[0134] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸 PEG-2000 酯(苯达莫司汀 PEG-2000 酯)的制备: 向装配有搅拌子、热电偶、冷凝器和氮气入口/出口的 100mL 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀盐酸盐(2.0g, 5.1mmol, 1.0 当量)和二氯甲烷(30mL)。在 22℃ 下将三乙胺(0.71mL, 5.1mmol)添加至浆料并搅拌 20 分钟。添加甲氧基聚乙二醇 2000(PEG-OMe-2000, 12.2g, 6.1mmol)和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC, 1.5g, 7.6mol)。将反应混合物在 22℃ 下搅拌 5.5 小时, 这时添加 PEG-OMe-2000(1.0g), 然后搅拌 3 天经过周末。添加水(20mL), 通过添加 1M 盐酸将 pH 调节至 pH 5-6。相缓慢分离。用 20mL 的二氯甲烷对水性部分进行再萃取, 将合并的二氯甲烷部分在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥。在过滤移除干燥剂后, 将滤液在真空中浓缩, 从而产生作为蜡状固体的产物。在室温下, 在 10mL 的庚烷中将固体浆化。产物经过滤收集并在 30℃ 下、在真空中干燥, 得到 11.7g(99% 产率) 的白色粉末状固体, HPLC 纯度为 97.9A%。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.32(d,  $J = 8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.92(d,  $J = 2.2\text{Hz}$ , 1H), 6.78(dd,  $J = 8.8, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 4.12(t,  $J = 4.8\text{Hz}$ , 2H), 3.70(m, 12H), 3.60(m, 3H), 3.51(m, 224H), 3.43(m, 4H), 3.32(m, 58H), 2.84(t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.45(2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.01(五重峰,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 2H)。

[0135] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸 PEG-5000 酯(苯达莫司汀 PEG-5000 酯)的制备: 向装配有搅拌子、热电偶、冷凝器和氮气入口/出口的 50mL 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀盐酸盐(0.5g, 1.27mmol, 1.0 当量)和二氯甲烷(15mL)。在 22℃ 下将三乙胺(0.18mL, 1.28mmol)添加至浆料, 并且与甲氧基聚乙二醇 5000(PEG-OMe-5000, 6.33g, 1.27mmol)和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC, 0.36g, 1.88mol)一起搅拌 20 分钟。将反应混合物在 22℃ 下搅拌过夜。添加水(20mL)并且通过添加 1M 盐酸将 pH 调至 pH 3-4。相缓慢分离。用 10mL 的二氯甲烷对水性部分再次萃取。将合并的二氯甲烷部分用盐水(20mL)洗涤并在 MgSO<sub>4</sub> 上干燥。在过滤移除干燥剂

之后,将滤液在真空中浓缩,从而产生作为蜡状固体的产物。在室温下,将固体在 20mL 的庚烷中浆化。产物经过滤收集并在 30℃下、在真空下干燥,得到 5.24g (77% 产率) 的白色粉末状固体, HPLC 纯度为 99A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.38 (d, J = 12Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.4Hz, 1H), 6.82 (d, J = 10Hz, 1H), 4.12 (t, J = 4.7Hz, 2H), 3.72 (br s, 8H), 3.68 (m, 5H), 3.59 (m, 3H), 3.51 (m, 436H), 3.42 (m, 3H), 3.31 (m, 28H), 2.88 (t, J = 7.4Hz, 2H), 2.45 (t, 2H, 与 DMSO 部分重叠), 2.01 (五重峰, J = 7.3Hz, 2H)。

[0136] 莱达莫司汀甲酯的酯交换反应的一般步骤

[0137] 向装配有搅拌子、热电偶、具有迪安-斯达克分水器 (Dean-Stark trap) 的冷凝器、和氮气入口 / 出口的 50mL 三颈玻璃容器装载苯达莫司汀甲酯 (0.5g, 1.27mmol, 1.0 当量)、催化剂 (0.05-1.4 当量)、合适的容积 (5-15 倍体积)、和过量的十二烷醇 (5-10 当量)。将所得反应混合物加热至回流并通过 HPLC 监测。在各种条件下的结果总结如下。

[0138]

| 催化剂                               | 催化剂<br>(当量) | 溶剂  | 溶剂<br>体积 | 醇当量  | 温度<br>(℃) | 迪安-斯<br>达克分<br>水器 | 时间<br>(h) | 原料<br>(HPLC A%) | 产物<br>(HPLC A%) |
|-----------------------------------|-------------|-----|----------|------|-----------|-------------------|-----------|-----------------|-----------------|
| CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H | 1.40        | NA  | NA       | 2.50 | 30        | N                 | 3         | 3.8             | 94.5            |
| CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H | 1.40        | DCM | 10       | 2.50 | 30        | N                 | 47        | 22.0            | 76.2            |
| CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H | 1.40        | 甲苯  | 10       | 2.50 | 70        | N                 | 24        | 19.3            | 69.7            |
| I <sub>2</sub>                    | 0.25        | 甲苯  | 5        | 2.50 | 75        | N                 | 7         | 96.0            | 0.2             |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.05        | 二甲苯 | 10       | 1.01 | 130       | N                 | 7         | 92.7            | 4.0             |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.10        | 二甲苯 | 5        | 10.0 | 130       | N                 | 6         | 10.5            | 85.5            |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.10        | 二甲苯 | 5        | 10.0 | 160       | N                 | 5         | 9.0             | 78.6            |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.10        | 二甲苯 | 15       | 5.00 | 160       | Y                 | 6         | 1.0             | 97.0            |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>    | 0.5         | 甲苯  | 10       | 5.0  | 100       | N                 | 23        | 78.9            | 13.5            |
| DMAP                              | 0.5         | 甲苯  | 10       | 5.0  | 100       | N                 | 23        | 83              | 0               |
| p-TSA                             | 0.5         | 二甲苯 | 10       | 5.0  | 130       | N                 | 21        | 67.2            | 15.6            |
| Sm(Oi-Pr) <sub>3</sub>            | 0.5         | THF | 10       | 5.0  | 25-45     | N                 | 27        | 2.6             | 90.5            |
| 超强碱                               | 0.5         | THF | 10       | 5.0  | 25-45     | N                 | 27        | 3.3             | 49.8            |
| Sm(Oi-Pr) <sub>3</sub>            | 0.1         | 二甲苯 | 15       | 5.0  | 160       | N                 | 8         | 72.8            | 24.3            |
| Sm(Oi-Pr) <sub>3</sub>            | 0.5         | THF | 10       | 5.0  | 40        | N                 | 16        | 95.8            | 2.5             |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.05        | 二甲苯 | 15       | 5.0  | 150       | Y                 | 3         | 0.3             | 96.9            |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.05        | 甲苯  | 15       | 5.0  | 105       | N                 | 70        | 78.9            | 15.9            |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.10        | 甲苯  | 15       | 5.0  | 115       | Y                 | 22        | 无数据             | 96.4            |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.05        | 甲苯  | 15       | 5.0  | 130       | N                 | 24        | 83.2            | 4.1             |
| TiO(acac) <sub>2</sub>            | 0.05        | 甲苯  | 15       | 5.0  | 115       | Y                 | 21        | 0.4             | 97.7            |

[0139] 莱达莫司汀盐酸盐酰胺的制备

[0140] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-N-癸基-丁酰胺 (莱达莫司汀 C<sub>10</sub>酰胺): 向装配有搅拌子、热电偶、冷却浴、60mL 压力均衡滴液漏斗和氮气入口 / 出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 10.0g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、10.6g (27.8mmol) 的 HATU 和 100mL 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。向这一搅拌的黄色溶液添加 4.41mL (3.27g, 25.3mmol) 的 N,N-二异丙基乙二胺 (DIPEA)。注意到了放热至 27.1℃, 并且溶液变为较暗的黄色。将反应冷却至 6.6℃, 其中在 2.7-7.6℃下, 在 13 分钟

内滴加 6.2mL (4.59g, 35.5mmol) 的 DIPEA、5.11mL (4.1g, 25.6mmol) 的癸胺在 20mL 的 DMF 中的溶液。一旦完成添加, 则让反应在 <10°C 下搅拌 1.5 小时, 进程分析表明反应在此时完成。用 200mL 的 DI 水将该批次淬灭, 并用乙酸乙酯 (2 X 175mL) 进行萃取。合并有机相, 用 10% 的磷酸氢钠 (1 X 200mL)、8% 的碳酸氢钠 (1 X 200mL) 和盐水 (1 X 200mL) 洗涤, 然后真空浓缩至干, 从而得到粘性白色固体。用庚烷 (75mL) 研制这一固体并使其变为可流动的固体, 通过真空过滤将其分离。在 25°C 下的真空烘箱中将湿饼干燥过夜, 从而产生 13.33g (25.3mmol, 100%) 作为白色固体的期望产物, HPLC 纯度为 98.01A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, J = 8.76Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.28Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 2.36, 8.8Hz), 3.7 (s, 8H), 3.66 (s, 3H), 3.01 (q, J = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, J = 7.44Hz, 2H), 2.18 (t, J = 7.36Hz, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.22 (s, b, 14), 0.84 (t, J = 6.68Hz, 3H)。

[0141] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-N-十四烷基-丁酰胺 (苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酰胺) : 向装配有搅拌子、热电偶、冷却浴、60mL 压力均衡滴液漏斗和氮气入口 / 出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 10.0g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、10.6g (27.8mmol) 的 HATU 和 100mL 的 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF)。向这一搅拌的黄色溶液添加 4.41mL (3.27g, 25.3mmol) 的 N, N- 二异丙基乙二胺 (DIPEA)。注意到了放热至 27.1°C, 并且溶液变为较暗的黄色。将反应冷却至 3.3°C, 其中在 <10°C 下, 在 6 分钟内滴加 6.2mL (4.59g, 35.5mmol) 的 DIPEA、5.75g (25.6mmol) 的十四烷基胺在 40mL 的 DMF 中的溶液。一旦完成添加, 反应就变得非常粘稠和难以搅拌。将其转移至装配有顶置式搅拌器和热电偶的 500mL 三颈圆底烧瓶, 然后在 RT 下搅拌 3 小时, 进程分析表明反应在此时完成。该批次在 400mL 的 DI 水上淬灭, 并用乙酸乙酯 (2 X 300mL) 进行萃取。合并有机相, 用 10% 的磷酸氢钠 (1 X 300mL)、8% 的碳酸氢钠 (1 X 300mL) 和盐水 (1 X 300mL) 洗涤, 然后在硫酸钠上干燥, 过滤并真空浓缩至干。通过色谱法, 使用 100g 的 230-400 目硅胶 60 对残余物进行纯化, 使用 1% 的 MeOH/MDC (2L)、2.5% 的 MeOH/MDC (1L) 和 5% 的 MeOH/MDC (1L) 进行洗脱, 收集 ~ 100mL 的级分。合并含有产物的级分, 并在真空中浓缩至干, 从而得到 7.86g (14.6mmol, 57.6%) 作为白色固体的期望产物, HPLC 纯度为 97.3A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, J = 8.84Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.22Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 2.36, 8.84Hz), 3.71 (s, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.01 (q, J = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, J = 7.44Hz, 2H), 2.18 (t, J = 7.36Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.28 (s, b, 22), 0.84 (t, J = 7.04Hz, 3H)。

[0142] 4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-N-十八烷基-丁酰胺 (苯达莫司汀 C<sub>18</sub>酰胺) : 向装配有搅拌子、热电偶、冷却浴、60mL 压力均衡滴液漏斗和氮气入口 / 出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 10.0g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、10.6g (27.8mmol) 的 HATU 和 100mL 的 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF)。向这一搅拌的黄色溶液添加 4.41mL (3.27g, 25.3mmol) 的 N, N- 二异丙基乙二胺 (DIPEA)。注意到了放热至 27.1°C, 并且溶液变为较暗的黄色。将反应冷却至 2.0°C, 其中通过移液管添加 6.2mL (4.59g, 35.5mmol) 的 DIPEA、7.65g (25.6mmol) 的十八烷基胺在 0mL 的 DMF 中的混悬液。一旦完成添加, 反应变得非常粘稠和难以搅拌。将其加热至室温, 并用顶置式搅拌器代替磁力搅拌子。将该批次在 RT 下搅拌过夜, 进程分析表明反应在此时间之后完成。将该批次在 300mL 的

DI 水上淬灭，并用二氯甲烷 (2 X 150mL) 进行萃取。合并有机相，用 10% 的磷酸氢钠 (1 X 300mL)、8% 的碳酸氢钠 (1 X 300mL) 和盐水 (1 X 300mL) 洗涤，然后在硫酸钠上干燥，过滤并真空浓缩至干。通过色谱法，使用 100g 的 230–400 目硅胶 60 对残余物进行纯化，使用 1% 的 MeOH/MDC (2L)、2.5% 的 MeOH/MDC (1L) 和 5% 的 MeOH/MDC (1L) 进行洗脱，收集 ~100mL 的级分。合并含有产物的级分，并在真空中浓缩至干，从而得到 5.11g (8.38mmol, 33%) 作为白色固体的期望产物，HPLC 纯度为 90.9A%。主要的杂质显示为 C-16 酰胺，其来自起始胺中的杂质。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, J = 8.84Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.22Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 2.36, 8.84Hz), 3.71 (s, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.01 (q, J = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, J = 7.44Hz, 2H), 2.18 (t, J = 7.36Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.28 (s, b, 30H), 0.85 (t, J = 6.32Hz, 3H)。

[0143] (S)-2-(4-{5-[双-(2-氯-乙基)-氨基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酰基氨基)-丙酸甲酯：向装配有搅拌子、热电偶、冷却浴、添加漏斗和氮气入口 / 出口的 250mL 三颈圆底烧瓶装载 10g (25.3mmol) 的苯达莫司汀盐酸盐、10.6g (27.8mmol) 的 HATU 和 100mL 的 DMF。将该批次冷却至 1.9°C，其中在 2 分钟内添加 8.8mL (6.54g, 50.6mmol) 的 DIPEA。反应放热至 9°C 且变为橘色。在 4.9–5.7°C 下，在 10 分钟内滴加 3.57g (25.6mmol) 的 L-丙氨酸甲酯盐酸盐和 6.2mL (4.57g, 35.4mmol) 的 DIPEA 在 20mL 的 DMF 中的溶液。将反应在 1 小时内缓慢加热至 RT，并搅拌 3 小时，进程分析表明反应在此时完成。将该批次在 400mL 的 1:1 乙酸乙酯 / DI 水上淬灭。进行分层，将有机层用 10% 的磷酸氢钠 (1 X 200mL)、8% 的碳酸氢钠 (1 X 200mL) 和盐水 (1 X 200mL) 洗涤，然后在硫酸钠上干燥，过滤并在真空中蒸发至干。通过色谱法，使用 100g 的 230–400 目硅胶 60 对残余物进行纯化，使用 1% 的 MeOH/MDC (3L)、2.5% 的 MeOH/MDC (1L) 和 5% 的 MeOH/MDC (500mL) 进行洗脱，收集 ~100mL 的级分。合并含有产物的级分，并在真空中浓缩至干，从而得到 7.1g (16.0mmol, 63.3%) 作为白色固体的期望产物，HPLC 纯度为 97.4A%。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ 8.25 (d, J = 6.92Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.84Hz, 1H), 6.92 (d, J = 2.2Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 2.32, 8.88Hz), 4.25 (q, 1H), 3.72 (s, 8H), 3.71 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.87 (t, J = 7.48Hz, 2H), 2.25 (t, J = 7.52Hz, 2H), 1.99 (m, 2H), 1.26 (d, J = 7.32Hz, 3H)。

[0144] 用于制备本发明的苯达莫司汀酯的溶液制剂的一般步骤：

[0145] 将本发明的苯达莫司汀酯的储液以约 100mg/mL 的浓度溶于二甲基乙酰胺 (“DMA”) 和 Solutol® HS-15 的 60/40 (v/v) 混合物中。在室温下搅拌该混合物直至溶解。所得的储液在数月内是稳定的，将其用 0.9% 的盐水稀释至期望的浓度并在约 2 小时内给药。

[0146] 苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酯溶液制剂：通过将 320.1mg 的苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酯溶于 DMA 和 Solutol® HS-15 的 60/40 (v/v) 的 4mL 混合物中来制备储液。将混合物搅拌约 2 小时直至溶解。在给药前，通过取出 1.00mL 的储液并添加 16.20mL 的盐水且在室温下搅拌 5 分钟来稀释储液。所得制剂为 3mg 当量 / mL 苯达莫司汀。

[0147] 移除残余乙醇的预处理：

[0148] 将苯达莫司汀盐酸盐 (277g) 装入 5L 的蒸发烧瓶中，然后装入 2 倍体积的 DI 水和 5 倍体积的丙酮。在 40°C 的最大温度下，在真空下将溶剂在 5.5 小时内蒸馏掉。添加另外的 5 倍体积的丙酮，将所得浆料在旋转蒸发仪上、在大气压下、在 35°C 旋转 15 分钟。然后，将该

批次经密封的烧结玻璃漏斗过滤，并将所得白色固体用 2 倍体积的丙酮清洗。将固体转移至干燥盘并在 40℃ 干燥 17 小时至恒重，然后分离 266g (96.0%) 的产物，纯度为 99.8A%，KF 为 0.26%。

[0149] 用于制备本发明的苯达莫司汀酯的人血清白蛋白（“HSA”）纳米粒子制剂的一般步骤：

[0150] 纳米粒子由使用二氯甲烷和 HSA 作为表面活性剂的 O/W 乳液形成。通过将期望量的苯达莫司汀酯按约 120mg/mL 的浓度溶于二氯甲烷中来制备油相。通过将 2-4x 量的 HSA (w/w, 基于苯达莫司汀酯) 溶于 5-15x 体积的水 (w/w, 基于二氯甲烷) 中来制备水相。通常，将甘露醇以 5-10% 添加至水相以使得溶液对于注射来说是等渗的，并且在冻干后提供药用合适的产物。通过使用 IKA 手持均化器将油相和水相以中等强度乳化约 30 秒来形成该 O/W 乳液。通过以下步骤来形成纳米粒子：通过 Microfluidizer® 高压均化器（在约 30,000psi 下通过 5 次）处理该粗 O/W 乳液以提供如使用动态光散射 (Malvern Zetasizer) 测定的大小为 50-100nm 的粒子。在真空下移除溶剂，并将所得浓缩物冻干或冷冻储存，直至给药。这些制剂显示出良好的物理和化学稳定性。

[0151] 将冻干的纳米粒子复溶并使用低温透射电镜 (c-TEM) 进行分析。大多数纳米粒子是易于分散在水中的 20-40nm 固体球。少数粒子在 125nm 范围内。所有粒子具有光滑表面。

[0152] 苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 HSA 纳米粒子：通过将 600mg 的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯溶于 5mL 的二氯甲烷来制备油相。使用由 60mL 去离子（“DI”）水、2.4g HSA（来自 Sigma-Aldrich 的冻干固体，圣路易斯，MO）和 6.6g 甘露醇组成的水相，使用 IKA Ultra-Turrex 手持均化器乳化油相，从而获得粗乳液。在约 30,000psi 下，使这一乳液通过 Microfluidics M-110P 高压均化器 5 次。使用旋转蒸发仪将二氯甲烷从所得纳米粒子混悬液移除，用 DI 水稀释所得水性混悬液，从而使总体积为 100mL。然后，以 10mL 的等份将这一混悬液分配到 30mL 的血清瓶中并且冻干。

[0153] 具有聚乳酸乙醇酸 (PLGA) 的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 HSA 纳米粒子：通过将 300mg 的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯和 500mg 的 PLGA (50/50 乳酸对乙醇酸，MW 为 7,000-17,000；Aldrich Part#719897) 溶于 2.5mL 的二氯甲烷中来制备油相。使用由 30mL DI 水、1.2g HSA（来自 Sigma-Aldrich 的冻干固体）和 3.3g 甘露醇组成的水相，使用 IKA Ultra-Turrex 手持均化器乳化油相，从而获得粗乳液。在约 30,000psi 下，使这一乳液通过 Microfluidics M-110P 高压均化器 5 次。使用旋转蒸发仪将二氯甲烷从所得纳米粒子移除，用 DI 水稀释所得水性混悬液，从而使总体积为 50mL。如通过 Malvern Zetasizer 测定的，所得纳米粒子具有 90.5nm 的粒径 (Z<sub>平均</sub>)。然后，以 10mL 的等份将这一混悬液分配到 30mL 的血清瓶中并且冻干。

[0154] 本发明的苯达莫司汀酯的 PEG 化的纳米粒子制剂的制备：使用文献 (Alexis, F., Molecular Pharmaceutics, 5, (2008), 505-515) 中报道的 PEG 涂层制备了一系列的纳米粒子制剂，以提供“秘密 (stealth)”涂层并辅助粒子避开身体免疫系统的能力。通过使用基于 PEG 的表面活性剂 (PEG 和聚乳酸的共聚物) 代替 HSA 或利用生物偶联化学将 PEG 基团共价地连接至 HSA 纳米粒子表面上的游离 NH<sub>2</sub>基团，完成 PEG 的掺入。两个系统均在 PK 研究中显示出增加的血浆循环时间。

[0155] 具有聚乙二醇 (PEG) 涂层的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 HSA 纳米粒子：通过将 600mg 的苯

达莫司汀 C<sub>12</sub>酯溶于 5mL 的二氯甲烷中来制备油相。使用由 60mL DI 水、2.4g HSA (来自 Sigma-Aldrich 的冻干固体) 和 6.6g 甘露醇组成的水相, 使用 IKA Ultra-Turrex 手持均化器乳化油相, 从而获得粗乳液。在 ~ 30,000psi 下, 使这一乳液通过 Microfluidics M-110P 高压均化器 5 次。使用旋转蒸发仪将二氯甲烷从所得纳米粒子混悬液移除, 用 DI 水稀释所得水性混悬液, 从而使总体积为 50mL。然后, 将纳米粒子的混悬液稀释至 200mL 的 100mM pH 8.5 硼酸盐缓冲液, 使用 Malvern Zetasizer 测定所得纳米粒子的粒径和  $\zeta$  电势。纳米粒子具有 78.9nm 的粒径 ( $Z_{\text{平均}}$ ) 和 -13.0mV 的表面电荷。搅拌该混悬液, 并添加 150mg 的甲氧基-PEG<sub>5,000</sub>-正羟基丁二酰亚胺酯 (Laysan 聚合物)。将反应在室温下混合 ~ 90 分钟, 重新测定粒径和  $\zeta$  电势。发现纳米粒子粒径为 83.6nm ( $Z_{\text{平均}}$ ) 并且  $\zeta$  电势为 -7.35mV。使用 6.6% (重量 / 重量) 的甘露醇溶液和 50,000MWCO 渗滤筒, 对纳米粒子进行缓冲液交换和浓缩。然后, 以 10mL 的等份将这一混悬液分配到 30mL 的血清瓶中并且冻干。

[0156] 具有聚乳酸乙醇酸 (PLGA) 和聚氧乙烯乳酸共聚物 (PELA) 表面活性剂的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯纳米粒子: 通过将 300mg 的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯和 500mg 的 PLGA (50/50 乳酸对乙醇酸, MW 为 7,000–17,000; Aldrich Part#719897) 溶于 2.5mL 的二氯甲烷中来制备油相。使用由 30mL DI 水、0.6g PEG-5,000-聚乳酸 1,000 的共聚物 (使用来自 A. Lucke, Biomaterials, 21, (2000), 2361–2370 的步骤制备的共聚物) 和 3.3g 甘露醇组成的水相, 使用 IKA Ultra-Turrex 手持均化器乳化油相, 从而获得粗乳液。在 ~ 30,000PSI 下, 使这一乳液通过 Microfluidics M-110P 高压均化器处理 5 分钟。使用旋转蒸发仪将二氯甲烷从所得纳米粒子混悬液移除, 用 DI 水稀释所得水性混悬液, 从而使总体积为 50mL。如通过 Malvern Zetasizer 测定的, 所得纳米粒子具有 248.0nm 的粒径 ( $Z_{\text{平均}}$ )。然后, 以 10mL 的等份将这一混悬液分配到 30mL 的血清瓶中并且冻干。

[0157] 来自浓缩物的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯 HSA 纳米粒子: 通过将 4.8g 的苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯溶于 13.4g 的二氯甲烷中来制备油相。使用由 111g 去离子 (“DI”) 水和 9g HSA 组成的水相, 使用 IKA Ultra-Turrex 手持均化器乳化油相, 从而获得粗乳液。在约 30,000psi 下, 使这一乳液通过 Microfluidics M-110P 高压均化器 5 次。通过添加 12g NaCl 并混合直至溶解来使所得纳米乳剂浓缩物稳定化。也可以使用本领域中已知的其它方法例如其它盐、受控的加热和 / 或 pH 调节实现稳定化。例如使用戊二醛进行交联也可以帮助防止聚集。

[0158] 使用旋转蒸发仪将二氯甲烷从所得纳米粒子混悬液移除。将所得水性混悬液与 12g 蔗糖混合, 添加 DI 水使总重量为 480g。然后, 以 7.5mL 的等份将这一混悬液分配到 20mL 的血清瓶中并且冻干。

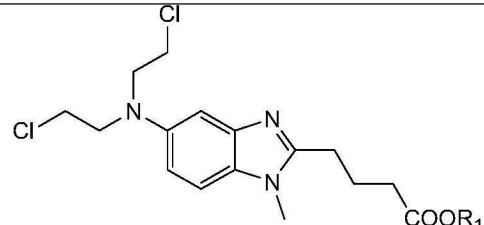
[0159] HSA 纳米粒子的溶液显示出粒径随时间缓慢增加。如通过动态光散射测定的, 一些溶液的尺寸在 12–24 小时内达到 ~ 200nm。为了确定纳米粒子是否聚集或制剂中的过量蛋白是否加在粒子的表面上以增加粒径, 使用 c-TEM 研究这一增加的性质。将一瓶冻干的纳米粒子复溶, 并使用 c-TEM 成像 (图 21)。让同一瓶纳米粒子在室温放置 24 小时, 然后重新成像 (图 22)。最初样品含有粒径分布在 25–60nm 之间的球形粒子。老化的样品显示出粒径分布增加至 35–130nm, 没有粒子聚集的迹象。两个样品均含有 1–3nm 粒子的群体, 与“游离”蛋白相一致。这些结果暗示在溶液中时, “游离”HSA 添加在纳米粒子的表面上, 从而引起粒径缓慢增加。可以采用数种策略来缓和这一过程, 所述策略包括改变 pH、改变渗透性、添加溶剂和渗滤以移除过量的蛋白。

[0160] 制备肿瘤细胞分离物的方案:将具有 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系皮下移植瘤(在基质胶中的  $5 \times 10^6$  个细胞)的查尔斯河实验室(Charles River Lab)无胸腺的裸鼠处死以制备肿瘤分离物。使用无菌仪器和无菌操作,从安乐死的动物中取出肿瘤。将肿瘤放在 50mL 的无菌锥管中并添加 5mL 的胰酶。将肿瘤切成小块并在 37°C 下孵育 30 分钟。在孵育后,将细胞过滤网放置在第二个 50mL 无菌锥管上并将第一个管的内含物放入细胞过滤网中。使用注射器柱塞的平端强迫组织穿过该过滤器。用 5mL 含有 FBS 的介质洗涤该细胞过滤网。将细胞离心,丢弃上清液。将细胞重新悬浮在 20mL 含有 P/S 的完整介质中,并置于 75cm 烧瓶中。这一数据在表 1 中示出。

[0161] MTS 细胞分析的一般步骤:将癌细胞(2,000 个细胞/孔)与期望浓度(0-200  $\mu$ M)的试验分子孵育 72 小时。然后,将细胞与 MTS 溶液(普洛麦格(Promega))孵育 1-2 小时,并通过测定在 490nm 下的吸光度来确定化合物对细胞增殖的影响。将细胞生长表示为合适对照(安慰剂)的百分比。使用这一数据计算各个化合物的  $IC_{50}$ 。所有报道的数据是三个独立实验的平均值  $\pm$  标准误。这一数据在表 1 中示出。

[0162] 表 1

[0163]

|  | MB-231 (HBC)  |           | H-460 (NSCLC) |           |
|--|---------------|-----------|---------------|-----------|
|  | $IC_{50}$ (M) | $R^2$     | $IC_{50}$ (M) | $R^2$     |
| -OH  | 13-16         | 0.88-0.95 | 4-26          | 0.83-0.95 |
| -CH <sub>3</sub>   | 66            | 0.95      | 1.2           | 0.9       |
| -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 13.3          | 0.91      | 15.73         | 0.9       |
| -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 43.7          | 0.93      | 7.4           | 0.89      |
| -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 53.1          | 0.86      | 49            | 0.89      |
| -C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>   | 38.89         | 0.87      | 23.76         | 0.93      |
| -C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>   | 33.3          | 0.78      | 28.8          | 0.69      |
| -C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>   | >200          | 0.83      | 129.9         | 0.87      |
| -C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>   | >200          | 0.93      | >200          | 0.66      |
| -C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>   | >200          | 0.85      | 77.8          | 0.9       |
| -C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>   | 无数据           | 无数据       | 29            |           |

[0164]  $R^2$ =确定系数

[0165] 前述生物数据也被示出在图 1 中。在图 20 中描述了在施用前述酯后,苯达莫司汀的血浆水平。

[0166] 肿瘤疗效

[0167] 裸鼠 MDA-MB-231 肿瘤疗效研究的步骤:用在基质胶中的  $5 \times 10^6$  个人肿瘤细胞对查尔斯河实验室无胸腺的裸鼠进行皮下注射。监测肿瘤体积,直到在小鼠群体中获得了  $\sim 150\text{mm}^3$  的平均肿瘤尺寸。然后将小鼠随机分组到九个治疗组中的一组中(总结于下表),每组总数为 10 只小鼠( $n = 10$ )。在研究的第 1 天和第 2 天,经尾静脉注射以  $100 \mu\text{L}$  固定体积给药各个制剂。在 3 周的研究时间内,每 3-4 天对小鼠称重和测量肿瘤体积。这一数

据在表 2 和图 2 中示出。

[0168] 表 2. 苯达莫司汀 (BM1)、苯达莫司汀 C<sub>12</sub> 酯和苯达莫司汀 C<sub>14</sub> 酯针对 MB-231 的肿瘤疗效数据的总结：%肿瘤抑制、%发病率 / 死亡率、以及肿瘤和血浆水平。

[0169]

|             |                 |       |       |          | 在 1 小时的水平(ng/mL) |      |       |       |
|-------------|-----------------|-------|-------|----------|------------------|------|-------|-------|
|             |                 | mg/kg | %肿瘤抑制 | %发病率/死亡率 | 酯                |      | BM1   |       |
|             |                 |       |       |          | 肿瘤               | 血浆   | 肿瘤    | 血浆    |
| 液<br>溶      | BM1             | 37.5  | 77    | 10/0     | -                | -    | 558   | 906   |
|             | C <sub>12</sub> | 55    | 84    | 40/0     | 425              | 0    | 1932  | 4110  |
|             | C <sub>12</sub> | 80    | 94    | 80/20    | 644              | 16   | 4400  | 11650 |
|             | C <sub>14</sub> | 80    | 90    | 40/0     | 396              | 14   | 7     | 21    |
| HSA<br>纳米粒子 | C <sub>12</sub> | 55    | 79    | 10/0     | 261              | 2    | 1845  | 6307  |
|             | C <sub>12</sub> | 80    | 91    | 70/40    | 762              | 292  | 7320  | 18757 |
|             | C <sub>12</sub> | 100   | 97    | 100/70   | 1565             | 39   | 15050 | 23933 |
|             | C <sub>14</sub> | 80    | 86.5  | 60/0     | 10430            | 5727 | 5500  | 15110 |

[0170] 裸鼠 H460 肿瘤疗效研究的步骤：用 95% 空气和 5% CO<sub>2</sub>，在 37°C 下，在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养 H460 肿瘤细胞（大细胞肺癌）。当达到 80-90% 汇合时，通过 0.25% 的胰酶 -EDTA 溶液在 5-10 分钟内将细胞分开，用新鲜的培养基中和，并通过细胞计数器 (Cellometer, Auto T4, 由 Nexcelom 制造) 计数。将在培养基和基质胶 (1:1 比率) 溶液的混合物中的 2 x 10<sup>6</sup> 个细胞 / 100ul 注射到各 nu/nu 小鼠的后背侧面。监测植入后的小鼠，并用电动卡尺 (electric caliper) 测量。当肿瘤尺寸达到 ~ 150mm<sup>3</sup> 时开始研究。测量小鼠，并根据下表将其随机分为 9 组，每组 10 只小鼠：

[0171] 肿瘤疗效给药组

[0172]

| 化合物                     | 制剂      | 剂量<br>(mg/kg 游离碱当量) |
|-------------------------|---------|---------------------|
| 介质对照                    | 溶液      | 无                   |
| 苯达莫司汀 HCl               | TREANDA | 37.5                |
| 苯达莫司汀 C <sub>12</sub> 酯 | 溶液      | 55                  |
| 苯达莫司汀 C <sub>12</sub> 酯 | 溶液      | 80                  |
| 苯达莫司汀 C <sub>12</sub> 酯 | 纳米粒子    | 55                  |
| 苯达莫司汀 C <sub>12</sub> 酯 | 纳米粒子    | 80                  |
| 苯达莫司汀 C <sub>12</sub> 酯 | 纳米粒子    | 100                 |
| 苯达莫司汀 C <sub>14</sub> 酯 | 溶液      | 80                  |
| 苯达莫司汀 C <sub>14</sub> 酯 | 纳米粒子    | 80                  |

[0173] 在配制化合物之后的 30 分钟内，经尾静脉注射以 100 μL 剂量施用制剂。每周两次对所有小鼠称重并测量肿瘤。在研究的最后一天，收集血浆、肿瘤、肺、肝、脾、左肾、脑和腿，并将它们快速冷冻，用于在给药两小时后进一步分析。结果示于表 3 中。

[0174] 表 3. 苯达莫司汀 (BM1)、苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯和苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酯针对 H-460 的肿瘤疗效数据的总结 : %肿瘤抑制、%发病率 / 死亡率、以及肿瘤和血浆水平。

[0175]

|          |                 |       |       |          | 在 1 小时的水平(ng/mL) |       |      |       |
|----------|-----------------|-------|-------|----------|------------------|-------|------|-------|
|          |                 | mg/kg | %肿瘤抑制 | %发病率/死亡率 | 酯                |       | BM1  |       |
|          |                 |       |       |          | 肿瘤               | 血浆    | 肿瘤   | 血浆    |
| 溶液       | BM1             | 37.5  | 41.5  | 0/0      | -                | -     | 1472 | 1550  |
|          | C <sub>12</sub> | 55    | 66    | 20/20    | 163              | 12    | 3760 | 6943  |
|          | C <sub>12</sub> | 80    | 75    | 100/50   | 206              | 12    | 5180 | 13600 |
|          | C <sub>14</sub> | 80    | 81    | 100/40   | 8570             | 32233 | 4650 | 24633 |
| HSA 纳米粒子 | C <sub>12</sub> | 55    | 47    | 10/0     | 154              | 0     | 1761 | 4743  |
|          | C <sub>12</sub> | 80    | 64    | 40/0     | 321              | 0     | 2997 | 8053  |
|          | C <sub>12</sub> | 100   | 70    | 50/0     | 437              | 2     | 3565 | 12386 |
|          | C <sub>14</sub> | 80    | 40    | 10/0     | 4570             | 3648  | 1872 | 4467  |

[0176] 药动学研究实验

[0177] 裸鼠肿瘤疗效 PK 组的步骤 :一部分具有肿瘤的小鼠作为卫星 PK 组给药。如肿瘤疗效组所描述的对各个组给药,但是在第 2 天给药后 1、3 和 6 小时将 PK 组安乐死并收集组织样品。收集的组织包括血液、肺、肝和肿瘤。如在 LC-MS 方案部分所描述的,对苯达莫司汀 HC1 和相应的酯类似物进行样品分析。

[0178] PK 研究的 LC-MS 实验方案 :根据标准方案,在用含有内标的乙腈沉淀蛋白后,制备血浆和其它组织用于高效液相色谱 (HPLC) / 质谱分析。然后,通过与串联质谱结合的 HPLC,对本发明的苯达莫司汀 HC1 和苯达莫司汀酯两者以及阿普洛尔 (内标) 进行样品分析。在磷酸钠缓冲液中均化组织样品,并将从分析获得的值乘以 3 以对处理期间的稀释进行校正。

[0179] PK 研究的动物给药方案 :在所有实验中使用成年动物 (查尔斯河, 金斯敦, 纽约 ;n = 3 或 4/ 时间点)。将小鼠或大鼠禁食过夜,然后通过侧尾静脉施用 IV 剂量。IV 剂量以 100  $\mu$ L 的固定剂量体积施用于小鼠,或以 1mL/kg 的剂量体积施用于大鼠。通过断头将小鼠处死,在规定的采样时间将躯干血收集在肝素抗凝管中。对于血液收集,将每只大鼠 (未麻醉的) 放在清澈的 Plexiglas® 控制管中,在规定的采样时间将血液样品 (约 0.25mL) 从侧尾静脉抽入肝素抗凝收集管中。(注意 :没有获得给药前样品)。这一步骤的例外之处是,在最后的采样时间,通过断头将大鼠处死并获得躯干血,而不是经尾静脉获得血液。将血液样品放置在湿冰上直到离心分离血浆。将血浆分级转移到干净、干燥的管中,在干冰上冷冻,并储存在约 -20°C 直到分析为止。在预定的时间点将整个大脑和其它高度灌注的器官 (肝、肺、脾、肾、和心) 快速取出并在干冰上冷冻。将所有的组织样品也储存在约 20°C 直到分析为止。

[0180] 药动学分析 :将所有小鼠和大鼠的血浆浓度数据输入 Excel 表格中,以准备进行药动学分析。使用 WinNonlin 软件 (专业版 4.1, Pharsight 公司, 帕洛阿尔托, CA), 通过血浆浓度对时间数据的非隔室分析 (Gibaldi 和 Perrier 1982) 来估算平均药动学参数。通

通过对半对数血浆浓度-时间曲线的末端部分进行线性回归来估算从血浆清除的末端速率常数( $\beta$ )。表观末端半衰期( $t_{1/2}$ )被计算为0.693除以 $\beta$ 。通过线性梯形法则确定单次给药后从时间0到最后可测量浓度的时间的血浆浓度-时间曲线下面积( $AUC_{0-t}$ )。从0到无穷的面积( $AUC_{0-\infty}$ )被计算为 $AUC_{0-t}$ 和从最后可测量浓度到无穷的推算面积( $C_{\text{最后}}/\beta$ )的总和。出于计算AUC的目的,将给药前浓度全部假设为0。出于计算AUC的目的,将在最后可量化采样时间之后低于定量限(BLQ)的任何浓度视为空值;为了计算给定采样时间的平均浓度,将其作为0处理。

[0181] 来自药动学研究的数据在表4-17中示出。

[0182] 表4

[0183]

| 血浆                         | 液体制剂  |            | 纳米粒子制剂 |            |
|----------------------------|-------|------------|--------|------------|
|                            | 苯达莫司汀 | $C_{12}$ 酯 | 苯达莫司汀  | $C_{12}$ 酯 |
| $t_{1/2}$ , h              | 5.7   | 无数据        | 6.0    | 无数据        |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 66885 | 无数据        | 55296  | 无数据        |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 67131 | 无数据        | 55417  | 无数据        |

[0184] 来自表4的数据也在图8中示出。

[0185] 表5

[0186]

| 血液                         | 液体制剂  |            | 纳米粒子制剂 |            |
|----------------------------|-------|------------|--------|------------|
|                            | 苯达莫司汀 | $C_{12}$ 酯 | 苯达莫司汀  | $C_{12}$ 酯 |
| $t_{1/2}$ , h              | 6.3   | 无数据        | 5.7    | 无数据        |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 91549 | 4424       | 58021  | 951        |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 91856 | 无数据        | 58112  | 无数据        |

[0187] 来自表5的数据也在图9中示出。

[0188] 表6

[0189]

| 脑                          | 液体制剂  |            | 纳米粒子制剂 |            |
|----------------------------|-------|------------|--------|------------|
|                            | 苯达莫司汀 | $C_{12}$ 酯 | 苯达莫司汀  | $C_{12}$ 酯 |
| $t_{1/2}$ , h              | 无数据   | 无数据        | 无数据    | 无数据        |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 9284  | 299        | 1010   | 149        |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 无数据   | 无数据        | 无数据    | 无数据        |

[0190] 来自表6的数据也在图10中示出。

[0191] 表7

[0192]

| 肝                            | 液体制剂  |                   | 纳米粒子制剂 |                   |
|------------------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|
|                              | 苯达莫司汀 | C <sub>12</sub> 酯 | 苯达莫司汀  | C <sub>12</sub> 酯 |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 4.2   | 0.8               | 2.6    | 4.5               |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 13901 | 2564              | 43785  | 13355             |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 14111 | 2586              | 44713  | 13586             |

[0193] 来自表 7 的数据也在图 11 中示出。

[0194] 表 8

[0195]

| 肺                            | 液体制剂  |                   | 纳米粒子制剂 |                   |
|------------------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|
|                              | 苯达莫司汀 | C <sub>12</sub> 酯 | 苯达莫司汀  | C <sub>12</sub> 酯 |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 2.0   | 7.6               | 5.1    | 8.5               |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 22229 | 12619             | 15075  | 28327             |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 22286 | 13246             | 15590  | 32297             |

[0196] 来自表 8 的数据也在图 12 中示出。

[0197] 表 9

[0198]

| 脾                            | 液体制剂  |                   | 纳米粒子制剂 |                   |
|------------------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|
|                              | 苯达莫司汀 | C <sub>12</sub> 酯 | 苯达莫司汀  | C <sub>12</sub> 酯 |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 2.3   | 3.1               | 1.6    | 5.4               |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 10201 | 25874             | 2598   | 13111             |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 10362 | 25927             | 2735   | 13578             |

[0199] 来自表 9 的数据也在图 13 中示出。

[0200] 表 10

[0201]

| 肾                            | 液体制剂  |                   | 纳米粒子制剂 |                   |
|------------------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|
|                              | 苯达莫司汀 | C <sub>12</sub> 酯 | 苯达莫司汀  | C <sub>12</sub> 酯 |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 6.4   | 5.3               | 7.0    | 4.9               |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 19489 | 2383              | 9665   | 1766              |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 19966 | 2605              | 10725  | 1802              |

[0202] 来自表 10 的数据也在图 14 中示出。

[0203] 表 11. 在施用苯达莫司汀 C<sub>12</sub> 酯液体制剂 (30mg/mL, 1mL/kg 图 15) 后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆、血液和器官水平。

[0204]

|                            | 血浆    | 血液    | 脑    | 肝     | 肺     | 脾     | 肾     |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| $t_{1/2}$ , h              | 5.7   | 6.3   | 无数据  | 4.2   | 2.0   | 2.3   | 6.4   |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 66885 | 91549 | 9284 | 13901 | 22229 | 10201 | 19489 |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 67131 | 91856 | 无数据  | 14111 | 22286 | 10362 | 19966 |

[0205] 来自表 11 的数据也在图 15 中示出。

[0206] 表 12. 在施用苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯液体制剂 (30mg/mL, 1mL/kg 图 16) 后, 苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的血浆、血液和器官水平。

[0207]

|                            | 血浆  | 血液   | 脑   | 肝    | 肺     | 脾     | 肾    |
|----------------------------|-----|------|-----|------|-------|-------|------|
| $t_{1/2}$ , h              | 无数据 | 无数据  | 无数据 | 0.8  | 7.6   | 3.1   | 5.3  |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 无数据 | 4424 | 299 | 2564 | 12619 | 25874 | 2383 |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 无数据 | 无数据  | 无数据 | 2586 | 13246 | 25927 | 2605 |

[0208] 来自表 12 的数据也在图 16 中示出。

[0209] 表 13. 在施用苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯纳米粒子制剂 (30mg/mL, 1mL/kg 图 17) 后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆、血液和器官水平。

[0210]

|                            | 血浆    | 血液    | 脑    | 肝     | 肺     | 脾    | 肾     |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| $t_{1/2}$ , h              | 6.0   | 5.7   | 无数据  | 2.6   | 5.1   | 1.6  | 7.0   |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 55296 | 58021 | 1010 | 43785 | 15075 | 2598 | 9665  |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 55417 | 58112 | 无数据  | 44713 | 15590 | 2735 | 10725 |

[0211] 来自表 13 的数据也在图 17 中示出。

[0212] 表 14. 在施用苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯纳米粒子制剂 (30mg/mL, 1mL/kg 图 18) 后, 苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的血浆、血液和器官水平。

[0213]

|                            | 血浆  | 血液  | 脑   | 肝     | 肺     | 脾     | 肾    |
|----------------------------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|------|
| $t_{1/2}$ , h              | 无数据 | 无数据 | 无数据 | 4.5   | 8.5   | 5.4   | 4.9  |
| $AUC_{0-t}$ , ng*h/mL      | 无数据 | 951 | 149 | 13355 | 28327 | 13111 | 1766 |
| $AUC_{0-\infty}$ , ng*h/mL | 无数据 | 无数据 | 无数据 | 13586 | 32297 | 13578 | 1802 |

[0214] 来自表 14 的数据也在图 18 中示出。

[0215] 表 15. 在以 3mg 当量 /kg 静脉注射给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯纳米粒子后, 大鼠中苯达莫司汀的血浆水平 : 不同制剂的比较 (图 19)。

[0216]

| 制剂                           | Treanda         | HSA       | HSA/PLGA  | PLGA/PELA | HSA w/PEG |
|------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| t <sub>1/2</sub> , h         | 0.16±0.01       | 0.63±0.09 | 0.41±0.04 | 2.1±0.3   | 1.6±0.3   |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 1609±77         | 773±58    | 1120±113  | 856±93    | 1194±186  |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 1631±81         | 781±58    | 1132±115  | 959±92    | 1250±203  |
| Vd, L/kg                     | 0.42±0.04       | 3.6±0.7   | 1.6±0.2   | 10.0±2.2  | 6.1±1.8   |
| CL, mL/min/kg                | 31±2            | 65±5      | 46±4      | 54±5      | 44±7      |
| 平均值 ± SD, n = 4              | 苯达莫司汀 C12 酯纳米粒子 |           |           |           |           |

[0217] 来自表 15 的数据也在图 5 中示出。

[0218] 表 16. 在以 3mg 当量 /kg 静脉注射给药苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯纳米粒子后, 大鼠中苯达莫司汀 C<sub>12</sub>酯的血浆水平 : 不同制剂的比较 (图 20)。

[0219]

| 制剂                           | HSA  | HSA/PLGA  | PLGA/PELA | HSA w/PEG |
|------------------------------|------|-----------|-----------|-----------|
| t <sub>1/2</sub> , h         | 无数据  | 0.12±0.01 | 2.3±0.0   | 0.20±0.01 |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 21±2 | 18±5      | 17±3      | 55±4      |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 无数据  | 21±7      | 36±5      | 56±4      |
| Vd, L/kg                     | 无数据  | 47±15     | 428±59    | 23.3±2.5  |
| CL, mL/min/kg                | 无数据  | 4194±1071 | 2109±252  | 1335±99   |
| 平均值 ± SD, n = 4              |      |           |           |           |

[0220] 来自表 16 的数据也在图 6 中示出。

[0221] 表 17: 在以 3mg 当量 /kg 静脉注射给药溶液制剂后, 大鼠中苯达莫司汀 C<sub>16</sub>酯、环己酯、和 5-癸酯的血浆水平。

[0222]

|                              | 苯达莫司汀                        | 酯    | 苯达莫司汀  | 酯       | 苯达莫司汀  | 酯        |
|------------------------------|------------------------------|------|--------|---------|--------|----------|
| 血浆                           | 苯达莫司汀 C16 酯                  |      | 5-癸酯   |         |        | 苯达莫司汀环己酯 |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 0.46                         | 0.28 | 0.16   |         | 0.20   |          |
| AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL | 505                          | 1208 | 633    |         | 504    |          |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 617                          | 1214 | 642    | 全部< MQL | 517    | 全部< MQL  |
| Vd, L/kg                     | 3.3                          | 1.0  | 1.1    |         | 1.6    |          |
| CL, mL/min/kg                | 82                           | 41   | 78     |         | 96     |          |
|                              | 1.85%溶剂                      |      | 1.6%溶剂 |         | 1.4%溶剂 |          |
| 平均值, n=3                     | 从 1/1/1 DMA/PG/Solutol 稀释成盐水 |      |        |         |        |          |

[0223] 根据上述方法将本发明的另一个实施方式苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酯配制成纳米粒子静脉内制剂并施用至 CD-1 小鼠。确定小鼠血浆中苯达莫司汀 (BM1) 和苯达莫司汀 C<sub>14</sub>酯的量。将这些实验的结果总结在表 18 中。

[0224] 表 18

[0225]

| 血浆                           | BM1                | C <sub>14</sub> 酯 | BM1                | C <sub>14</sub> 酯 | BM1                | C <sub>14</sub> 酯 |
|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                              | <b>30 mg 当量/kg</b> |                   | <b>55 mg 当量/kg</b> |                   | <b>80 mg 当量/kg</b> |                   |
| t <sub>1/2</sub> , h         | 1.17               | 1.52              | 0.92               | 0.98              | 0.95               | 1.09              |
| AUC <sub>0-6</sub> , ng*h/mL | 4507               | 31693             | 4152               | 48934             | 6007               | 46335             |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 4524               | 31741             | 4188               | 49020             | 6068               | 46485             |
| Vd, L/kg                     | 无数据                | 3.2               | 无数据                | 2.5               | 无数据                | 5.2               |
| CL, mL/min/kg                | 无数据                | 24                | 无数据                | 29                | 无数据                | 56                |
| 平均值, n=3                     | 白蛋白纳米粒子            |                   |                    |                   |                    |                   |

[0226] 还对苯达莫司汀的 PEG 化的酯进行试验。苯达莫司汀的 PEG-2000 酯和 PEG-5000 酯的数据在下表 19 和 20 中示出。这一数据还在图 19 中示出。

[0227] 表 19 :作为苯达莫司汀 PEG-2000 酯以 3mg 当量 /kg 静脉注射、1mL/kg 给药的苯达莫司汀在大鼠中的血浆水平。

[0228]

| 苯达莫司汀                        | 大鼠 1                | 大鼠 2 | 大鼠 3 | 大鼠 4 | 平均值  | 标准偏差 | sem  |
|------------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|
| t <sub>1/2</sub> , h         | 0.46                | 0.23 | 0.50 | 0.22 | 0.36 | 0.15 | 0.07 |
| AUC <sub>0-6</sub> , ng*h/mL | 2100                | 2866 | 1494 | 1379 | 1960 | 682  | 341  |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 2109                | 2868 | 1506 | 1382 | 1966 | 680  | 340  |
| Vd, L/kg                     | 0.95                | 0.35 | 1.46 | 0.70 | 0.87 | 0.46 | 0.23 |
| CL, mL/min/kg                | 24                  | 17   | 33   | 36   | 28   | 9    | 4    |
| 苯达莫司汀 PEG-2000 酯             | 3 mg 当量/kg, 1 mL/kg |      |      |      |      |      |      |

[0229] 表 20 :作为苯达莫司汀 PEG-5000 酯以 3mg 当量 /kg 静脉注射、1mL/kg 给药的苯达莫司汀在大鼠中的血浆水平。

[0230]

| 苯达莫司汀                        | 大鼠 1                | 大鼠 2 | 大鼠 3 | 大鼠 4 | 平均值  | 标准偏差 | sem  |
|------------------------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|
| t <sub>1/2</sub> , h         | 0.16                | 0.48 | 0.47 | 0.48 | 0.40 | 0.16 | 0.08 |
| AUC <sub>0-6</sub> , ng*h/mL | 808                 | 1735 | 1572 | 1050 | 1291 | 435  | 217  |
| AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL | 817                 | 1741 | 1579 | 1058 | 1299 | 434  | 217  |
| Vd, L/kg                     | 0.84                | 1.19 | 1.29 | 1.99 | 1.32 | 0.48 | 0.24 |
| CL, mL/min/kg                | 61                  | 29   | 32   | 48   | 42   | 15   | 8    |
| 苯达莫司汀 PEG-5000 酯             | 3 mg 当量/kg, 1 mL/kg |      |      |      |      |      |      |

[0231] 苯达莫司汀酯的体外稳定性分析

[0232] 肿瘤 S9 的制备 :将具有乳腺癌 (MB-231) 或非小细胞肺癌 (H460) 的查尔斯河实验室无胸腺裸鼠处死。立即将肿瘤取出并用冰冷的 1.15% KC1 清洗。将肿瘤称重、切割和切碎。将切碎的组织与 4X(v/w) 冰冷的 SET 缓冲液 (250mM 蔗糖, 5.4mM Na<sub>2</sub>EDTA 和 20mM Tris, pH 7.4) 混合并用组织均化器均化。将匀浆物转移到干净的聚碳酸酯离心管中, 并在 10,000g、4℃下旋转 20 分钟。用棉签将超离心管顶部处的脂质移除, 并将上清液 (S9) 等分试样储存在 -80℃冰箱中。

[0233] 体外孵育 :在 37℃的水浴中, 对含有 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)、NADPH- (还原型烟酰胺腺苷二磷酸) 再生系统和 1mg/mL 肿瘤 S9 的孵育混合物进行预热。通过将 1 μL 的苯达莫司汀 C6、C8、C12 或 C14 酯添加到单独的孵育混合物中以获得各个苯达莫司汀酯的 10 μM 的最终浓度来开始反应。在设计的时间点, 取出孵育混合物的 100– μL 等分试样

并与 400  $\mu$  L 的终止溶液 (4 或 8  $\mu$  M 噻加宾 [IS] 在 0.1% 甲酸 / 乙腈的溶液中) 混合。将所有样品涡旋混合，并放置在冰上至少 10 分钟，然后通过在 Eppendorf 5417R 离心仪中以 14,000 rpm 离心 8 分钟来沉淀蛋白。将上清液转移到 HPLC 瓶中，并注射 10  $\mu$  L，用于使用具有串联质谱检测的高效液相色谱进行分析。

[0234] LC-MS/MS 方法：由 Shimadzu HPLC 和 Sciex API 4000MS 构成的 LC-MS/MS 系统。在 Phenomenex 00B-4448-B0, Luna PFP (2) 柱 (50x2mm, 5  $\mu$  m 粒径) 上进行色谱法。总的流动相流速为 0.5 mL/min。梯度以 70% 流动相 A (0.1% 的三氟乙酸水溶液) 和 30% 流动相 B (100% 的乙腈) 开始。然后，将流动相的比例在 0.5 分钟内线性增加至 95%，并维持在该比例 1.3 分钟，在 1 分钟内重新平衡至初始条件。将质谱仪调节至各个苯达莫司汀酯的相应最佳条件，监测 442.2/340.1 (C6)、470.2/340.1 (C8)、526.3/340.1 (C12) 和 554.3/340.1 (C14) 的转变。

[0235] 来自体外稳定性研究的数据在图 3 和 4 中示出。

[0236] 电子显微镜实验

[0237] c-TEM 研究的样品制备：通过向样品添加 7.8 mL 的注射用水 (WFI) 使样品溶解，并通过用手翻转进行混合。样品在 ~2-5 分钟快速溶解，在溶液中没有可见的不溶粒子。将样品保持在 400 目铜网格上由碳涂布的多孔碳膜所负载的玻璃化冰中。样品通过如下制备：将 3  $\mu$  L 未稀释的样品溶液滴施加至干净的网格，用滤纸吸干并立即在液体乙烷中进行玻璃化。将网格储存在液氮下直到转移至电子显微镜用于成像。

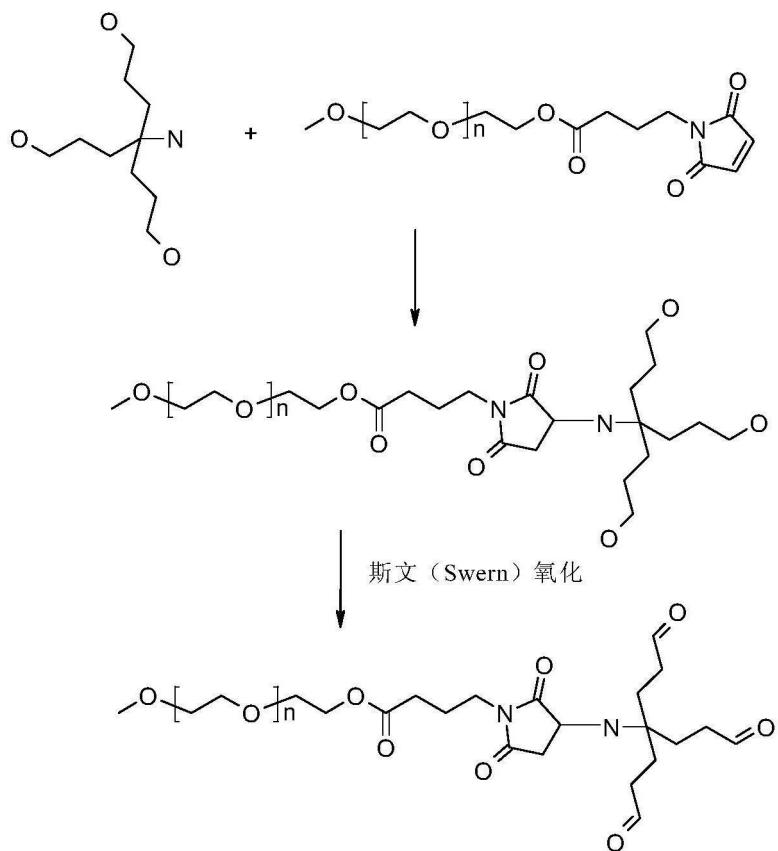
[0238] c-TEM 成像参数：使用在 120KeV 下运作、装配有 FEI Eagle 4Kx4K CCD 照相机的 FEI Tecnai T12 电子显微镜进行电子显微镜分析。将网格转移到使用低温恒温器的电子显微镜中，所述低温恒温器将网格维持在低于 -170  $^{\circ}$ C 的温度。以多个比例获取网格的图像，从而评价样本的整体分布。在较低的放大率下鉴定了潜在合适的目标成像区域后，在 52,000x (0.21 nm/ 像素) 和 21,000x (0.50 nm/ 像素) 的标称放大率下获取高放大率图像。在 -4  $\mu$  m (52,000x) 和 -5  $\mu$  m (21,000x) 的标称弱焦点 (underfocus) 和 ~10-15 e/ $\text{\AA}^2$  的电子剂量下获取图像。

[0239] 电子显微镜实验的结果在图 7 中示出。

[0240] 苯达莫司汀酯的 HSA 纳米粒子制剂的交联实验

[0241] 使用基于 HSA 的纳米粒子制剂可以延长本发明的苯达莫司汀和苯达莫司汀酯的循环时间，其中在形成纳米粒子结构后，蛋白部分被共价交联，参见例如 K. Langer 等，International Journal of Pharmaceutics 347 (2008) 109 - 117。这向表面涂层提供更多结构并防止纳米粒子内含物的快速释放。这还可通过向交联剂引入 PEG 基团来提供纳米粒子的“秘密”保护。使用可商购的二醛戊二醛，证实了 HSA 纳米粒子的有效包封和硬化。使用例如如下所示制备的三官能 PEG 交联剂，可以添加引入合适大小的 PEG 部分：

[0242]



[0243] 步骤:用 DI 水将 HSA 纳米粒子稀释至 1.5mg/mL 的苯达莫司汀的 C14 酯浓度,其对应于 6mg/mL 的 HSA 浓度。然后,将所得纳米粒子的混悬液以 1mL 部分等分到装配有磁力搅拌子的 5 个玻璃瓶中。添加合适量的 50% 戊二醛溶液,将各个瓶盖上盖并在室温下搅拌过夜。然后在 N- 甲基吡咯烷酮 (NMP) 中将各个样品稀释 1 至 10 倍,使用微离心机将样品旋转~2 分钟以移除 HSA 和交联的 HSA 纳米粒子。然后通过 HPLC 分析上清液,确定苯达莫司汀的 C14 酯的浓度 (峰面积) 以确认粒子包封。下表显示未包封的苯达莫司汀的 C14 酯的浓度随戊二醛  $\mu$  L 的变化 :

[0244]

| 戊二醛 $\mu$ L | HPLC 峰面积 |
|-------------|----------|
| 0           | 4882.02  |
| 2           | 4788.99  |
| 5           | 4778.11  |
| 10          | 4714.02  |
| 20          | 29.55    |

[0245] 数据显示以 3.33  $\mu$  L/mg HSA 的比率添加戊二醛对于产生交联的含有苯达莫司汀酯的纳米粒子是合适的。

[0246] 体外多发性骨髓瘤模型

- [0247] 材料和方法
- [0248] RPMI 8226(人浆细胞瘤,骨髓瘤 B 细胞)ATCC#CCL-155;
- [0249] ECM 胶(基质胶),Sigma-Aldrich, Cat#E1270, 5ml
- [0250] RPMI(Beit Haemek, 批号:1110235)
- [0251] Velcade® (Bortezomib) 3.5mg 在瓶中冻干, 批号 BIZSC00
- [0252] 莱达莫司汀(批号 TD-D0815, API 批号 00039P0012)
- [0253] 莱达莫司汀 C12 酯纳米粒子(C12NP), 批号 2861-242-22, 17.6mg/瓶
- [0254] 氯化钠
- [0255] 注射用水(DEMO S. A.)
- [0256] 试验动物
- [0257] 80CB.17SCID 雌性小鼠, 4-6 周龄, 16-20 克, 从 Harlan 动物饲养中心获得。
- [0258] 细胞的准备
- [0259] 在 RPMI 培养基中培养细胞(来自 ATCC)。将细胞混悬液离心, 并在 50% 基质胶 / HBSS 中重新悬浮成  $7 \times 10^7$  个细胞/ml 的最终浓度。将混悬液以  $100 \mu l$  的体积皮下植入到麻醉小鼠的右侧中。
- [0260] 化合物的准备
- [0261] 每周准备 VELCADE® 一次。将 7ml 的盐水添加至含有 3.5mg 粉末的初始瓶中, 产生 0.5mg/ml。将 3ml 的这一溶液添加至 27ml 盐水中以得到 0.05mg/ml 浓度。
- [0262] 莱达莫司汀的准备:在治疗前片刻, 将 13.5mg 溶于 0.9% 盐水 / 5% 甘露醇的 3.6ml 1:1 混合物中。将 1.05ml 的这一溶液添加至 0.95ml 的稀释剂中, 得到 2mg/ml 溶液。
- [0263] C12NP 的准备:在治疗前片刻, 将 3.1ml SWFI 添加至含有 17.62mg 的样品瓶中。将 1.05ml 的这一溶液添加至 0.95ml 的稀释剂中, 得到 2mg/ml 溶液。
- [0264] 实验设计
- [0265] 在第 0 天, 使用  $7 \times 10^6$  个 RPMI 8226 细胞 / 小鼠(在 50% 基质胶 / HBSS 中)对小鼠进行皮下植人。在第 21 天, 按最佳平均肿瘤体积( $\sim 150 \text{mm}^3$ )分选小鼠并分配到 8 个组中, 每组 9 只小鼠。
- [0266]

| 组 | 数量 | 剂量和时间表  |      |                        |
|---|----|---------|------|------------------------|
|   |    | 试剂      | 途径   | 剂量和时间表                 |
| 1 | 9  | WFI     | 静脉注射 | 第 1 天和第 2 天            |
| 2 | 9  | Velcade | 静脉注射 | 0.5mg/kg, 每两周一次        |
| 3 | 9  | 莱达莫司汀   | 静脉注射 | 20mg/kg, 第 1 天和第 2 天   |
| 4 | 9  | 莱达莫司汀   | 静脉注射 | 37.5mg/kg, 第 1 天和第 2 天 |
| 5 | 9  | C12NP   | 静脉注射 | 20mg/kg, 第 1 天和第 2 天   |
| 6 | 9  | C12NP   | 静脉注射 | 37.5mg/kg, 第 1 天和第 2 天 |

- [0267] 应注意, SCID 小鼠的性质(即严重免疫缺陷的)使得它们是更加脆弱 / 敏感的动物, 因此, 它们不太能够耐受在裸鼠(其是相比较而言较不免疫缺陷的)中使用的 C12NP 剂量。具体地, 以 100mg/kg 和 70mg/kg 对 SCID 小鼠给药显示了不可接受的耐受问题(即, 超过 20% 的体重损失)(数据未显示)。认为这(裸鼠和 SCID 鼠之间的耐受差异)是与品种相关的现象。因此, 使用 37.5mg/kg 和 20mg/kg 的 C12NP 剂量进行研究。

## [0268] 统计学分析

[0269] 如下计算肿瘤体积： $\pi \times \left( \frac{\text{宽度}}{2} \right)^2 \text{长度}$  使用单因素方差分析和之后的 Tukey。

事后比较 (Tukey post-hoc comparison) 对体重增加和肿瘤体积进展进行分析。

## [0270] 结果

[0271] 将治疗反应总结在图 23 和 24 中。与对照组相比,除 C12NP 20mg/kg 外的所有治疗都显著抑制肿瘤生长 (参见表 21 中的数据)。在 37.5mg/kg 下,苯达莫司汀和 C12NP 的疗效相似,具有 81% 和 70% 的肿瘤生长抑制。然而,如在图 24 中可以看出,如通过在用 C12NP 治疗的动物中较少的体重损失所测定的, C12NP 的耐受性比苯达莫司汀好。

## [0272] 表 21 :结果总结 (第 46 天)

## [0273]

| 化合物                                   | 方案                        | 平均<br>肿瘤体积,<br>(平均值±标准<br>误差) | %TGI  | PR 编号 | CR 编号 | 最大体重<br>(平均值)<br>减少 | TRD 编号 | log nTRD<br>编号 |
|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|---------------------|--------|----------------|
| 1. 介质                                 | WFI 静脉注射,<br>在第 1 天和第 2 天 | 597 ± 71                      |       |       |       |                     |        |                |
| 2. Velcade?<br>0.5 mg/kg              | 静脉注射,<br>每两周一次            | 226 ± 35                      | 62*** | 0     | 0     | -0.4%<br>第 20 天     | 0      | 0              |
| 3. 苯达莫司汀<br>20 mg/kg                  | 静脉注射,<br>在第 1 天和第 2<br>天  | 205 ± 44                      | 66*** | 0     | 0     | -2.7%<br>第 22 天     | 0      | 0              |
| 4. 苯达莫司汀<br>37.5 mg/kg                | 静脉注射,<br>在第 1 天和第 2<br>天  | 113 ± 23                      | 81*** | 0     | 0     | -6.2%<br>第 25 天     | 0      | 0              |
| 5. C12NP 20 mg/kg                     | 静脉注射,<br>在第 1 天和第 2<br>天  | 408 ± 49                      | 32    | 0     | 0     | -1.5%<br>第 25 天     | 0      | 0              |
| 6. C12NP 37.5 mg/kg                   | 静脉注射,<br>在第 1 天和第 2<br>天  | 180 ± 31                      | 70*** | 0     | 0     | -3.1%<br>第 25 天     | 0      | 0              |
| *** p < 0.001 ( 单因素方法分析, Tukey 事后检验 ) |                           |                               |       |       |       |                     |        |                |

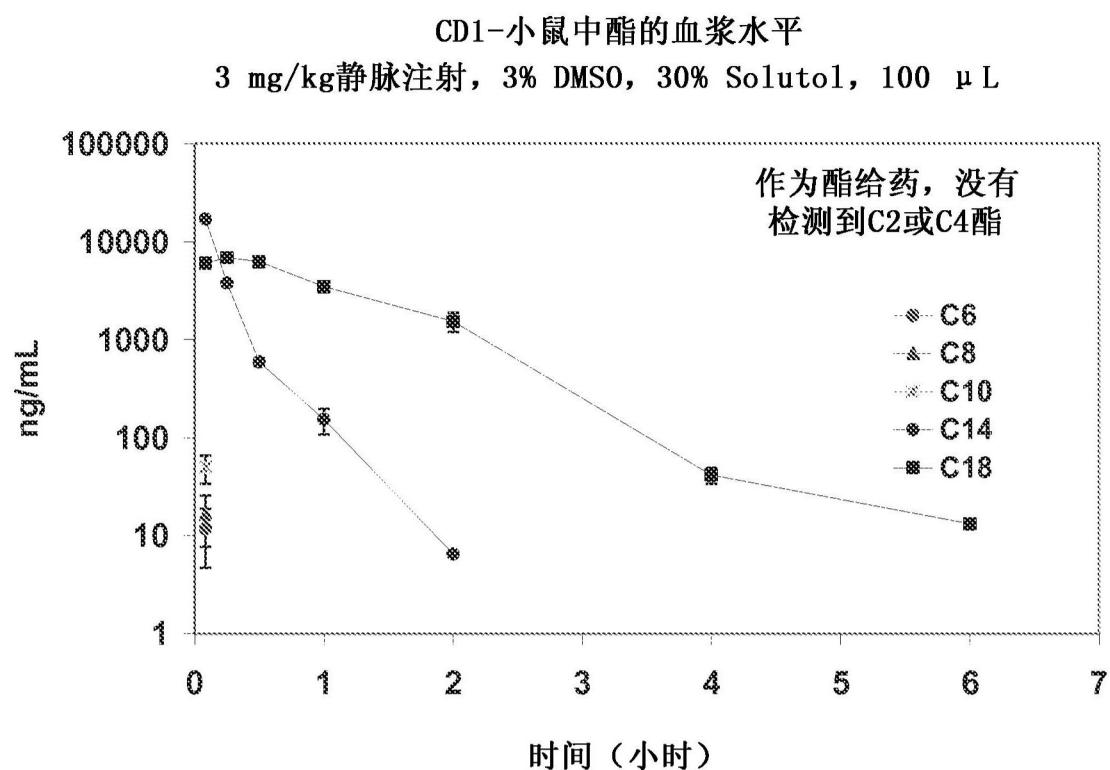
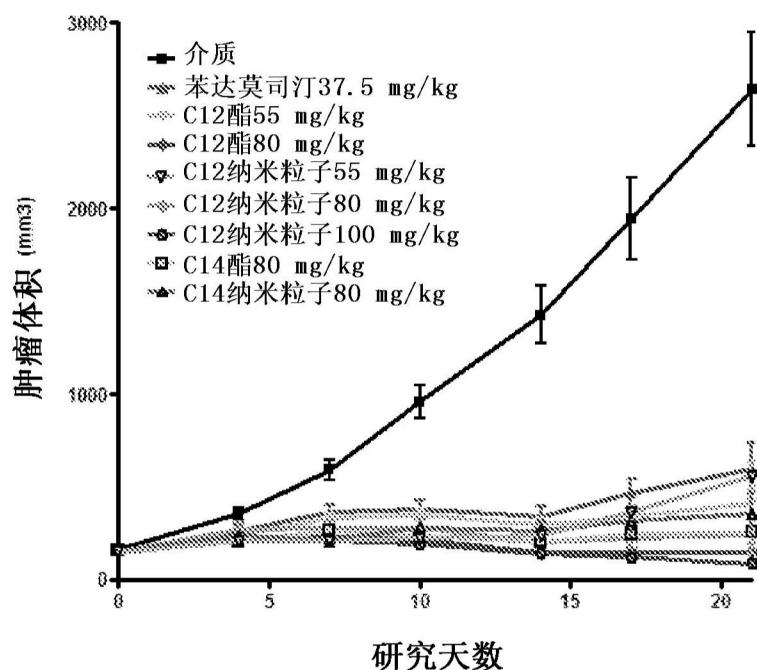


图 1

苯达莫司汀和作为苯达莫司汀等价物给药的酯制剂：  
C12溶液和C12纳米粒子与C14溶液和C14纳米粒子制  
剂对具有MDA-MB-231移植瘤的小鼠的肿瘤体积的影响



在与MDA-MB-231乳腺肿瘤S9第2次孵育之后，  
由全部4种酯形成的苯达莫司汀

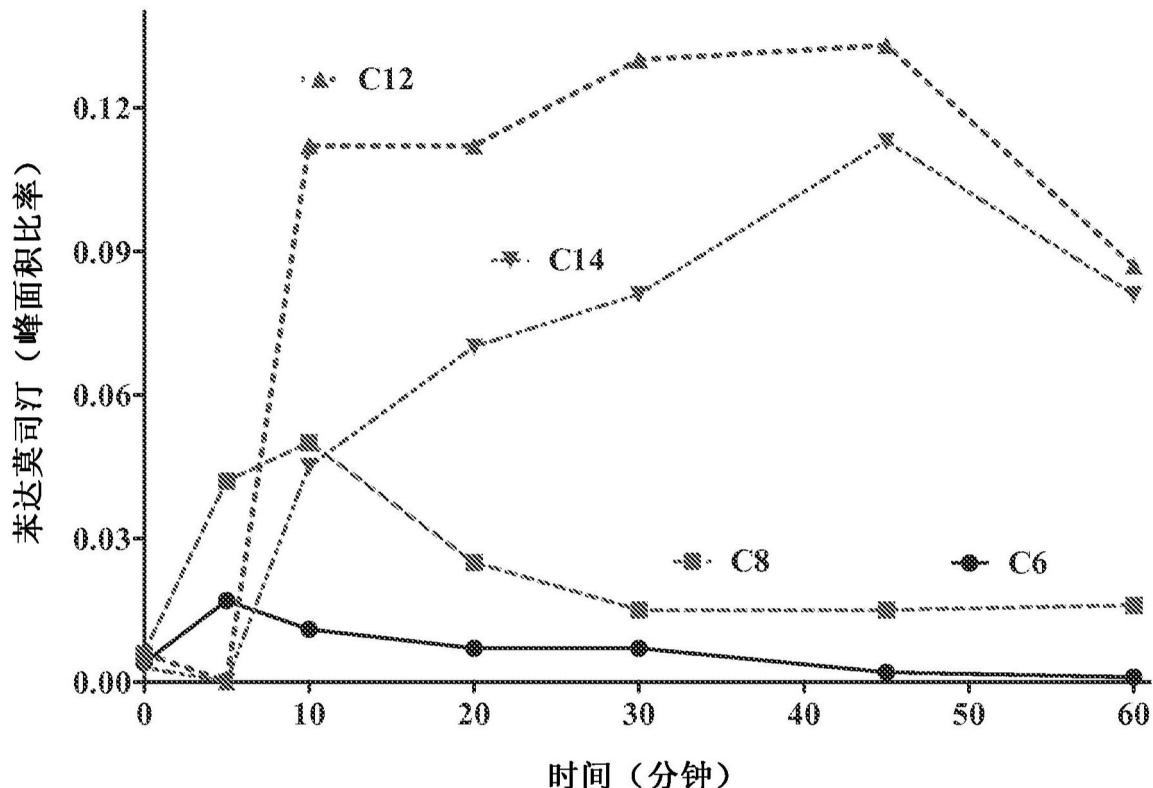


图 3

在与H460非小细胞肺癌肿瘤S9孵育之后，由全部4种酯形成的苯达莫司汀

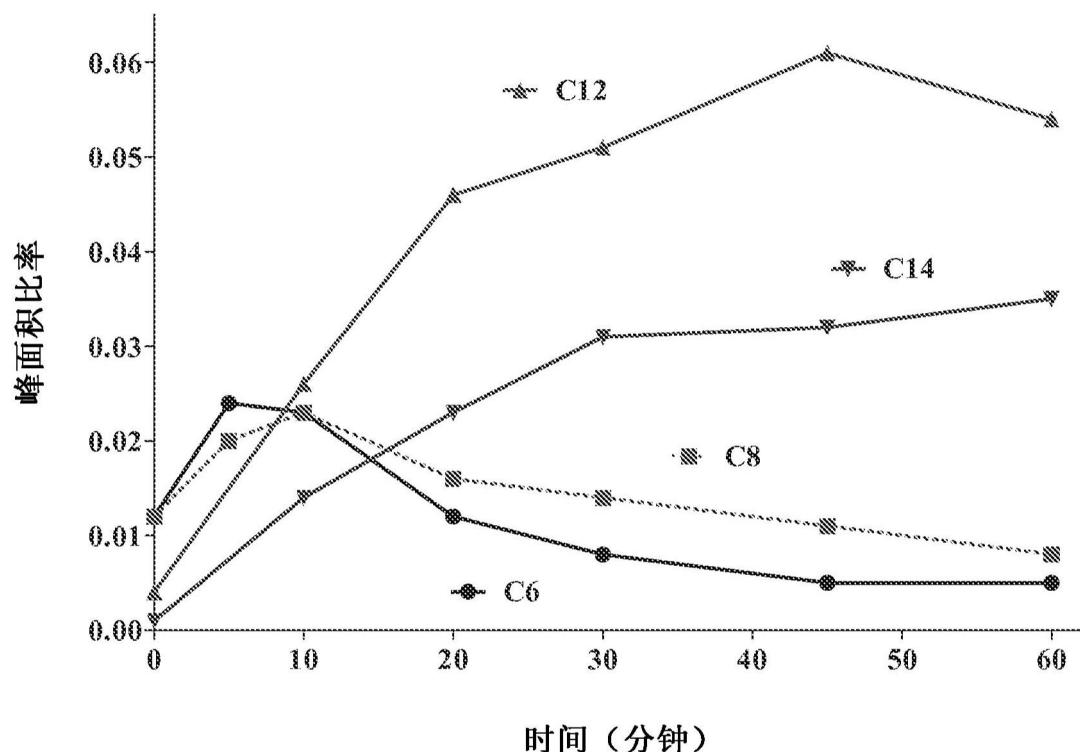


图 4

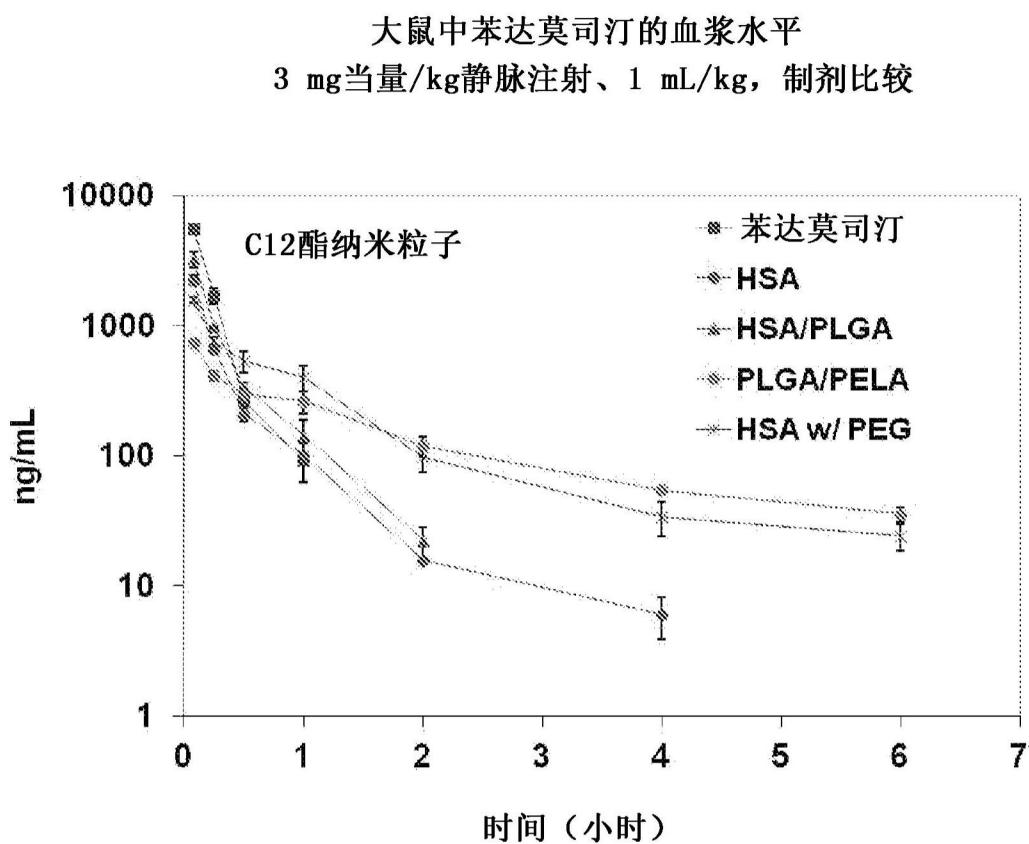


图 5

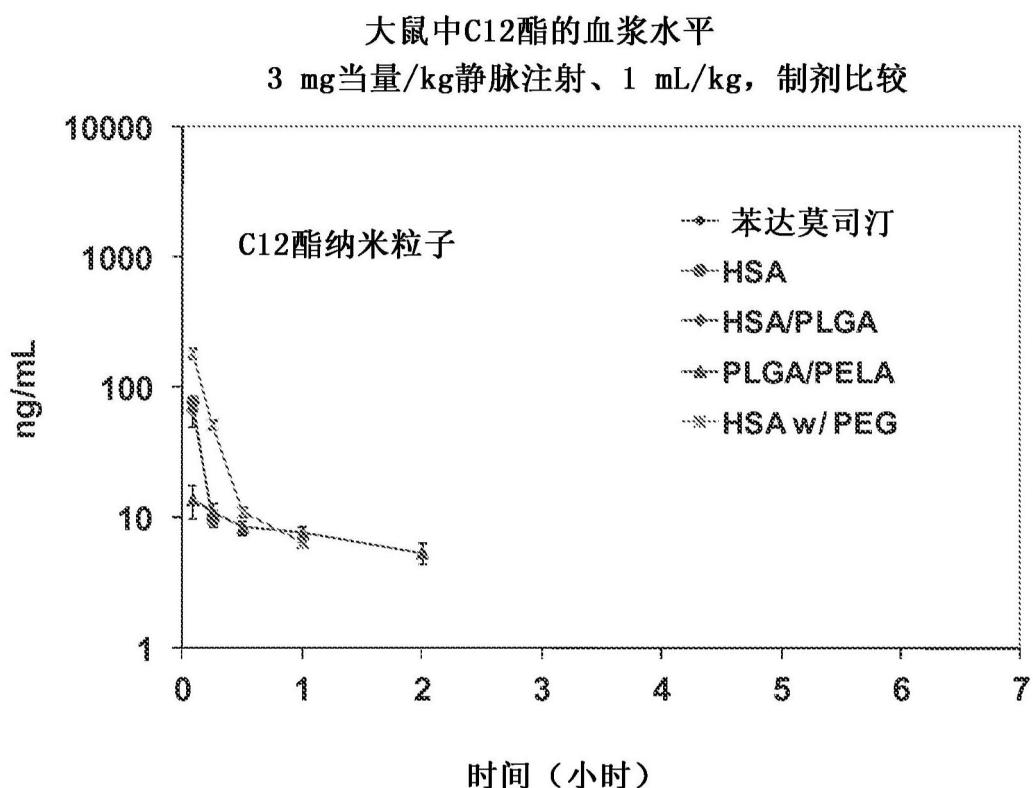


图 6

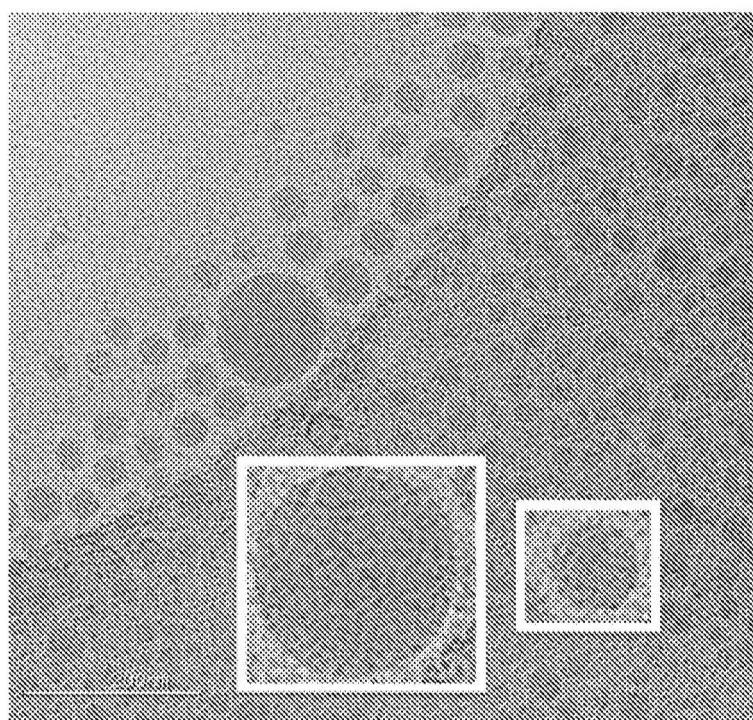


图 7

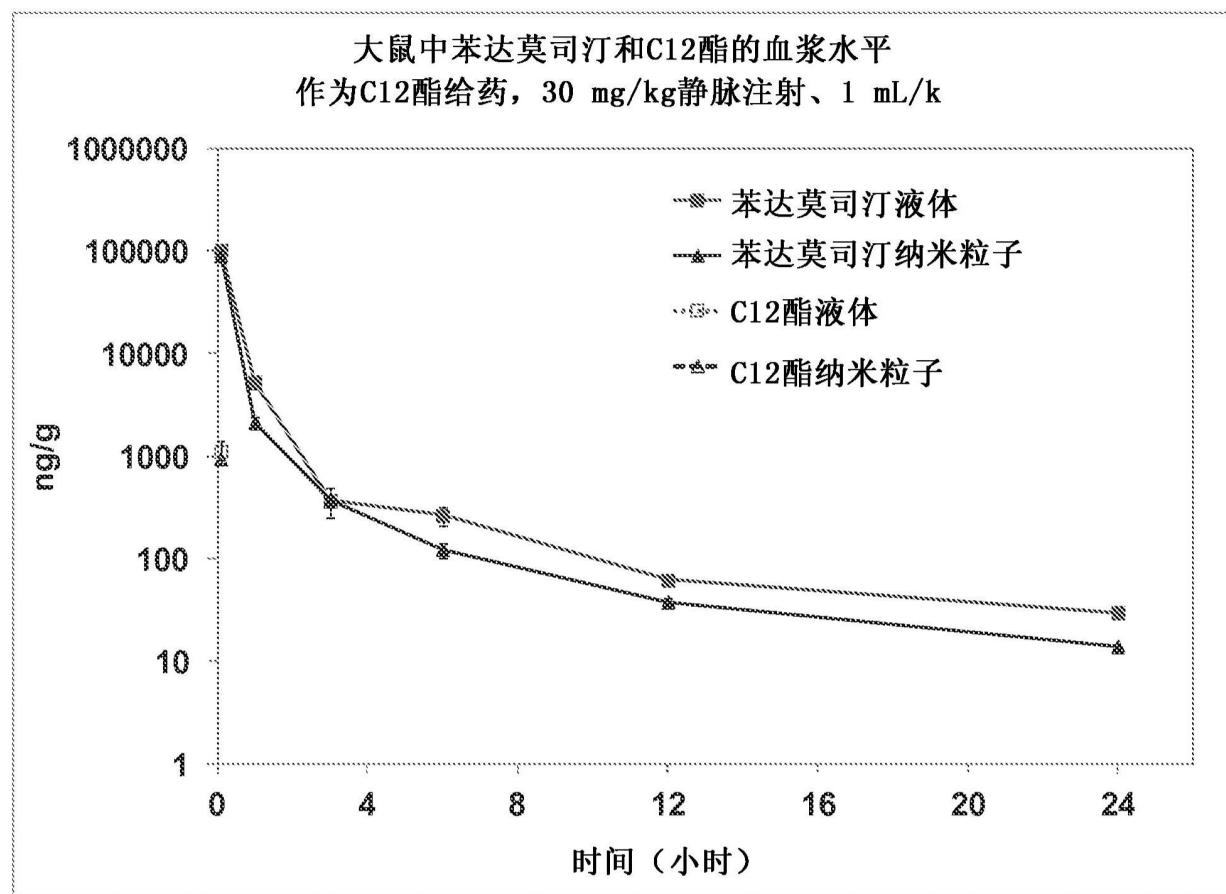


图 8

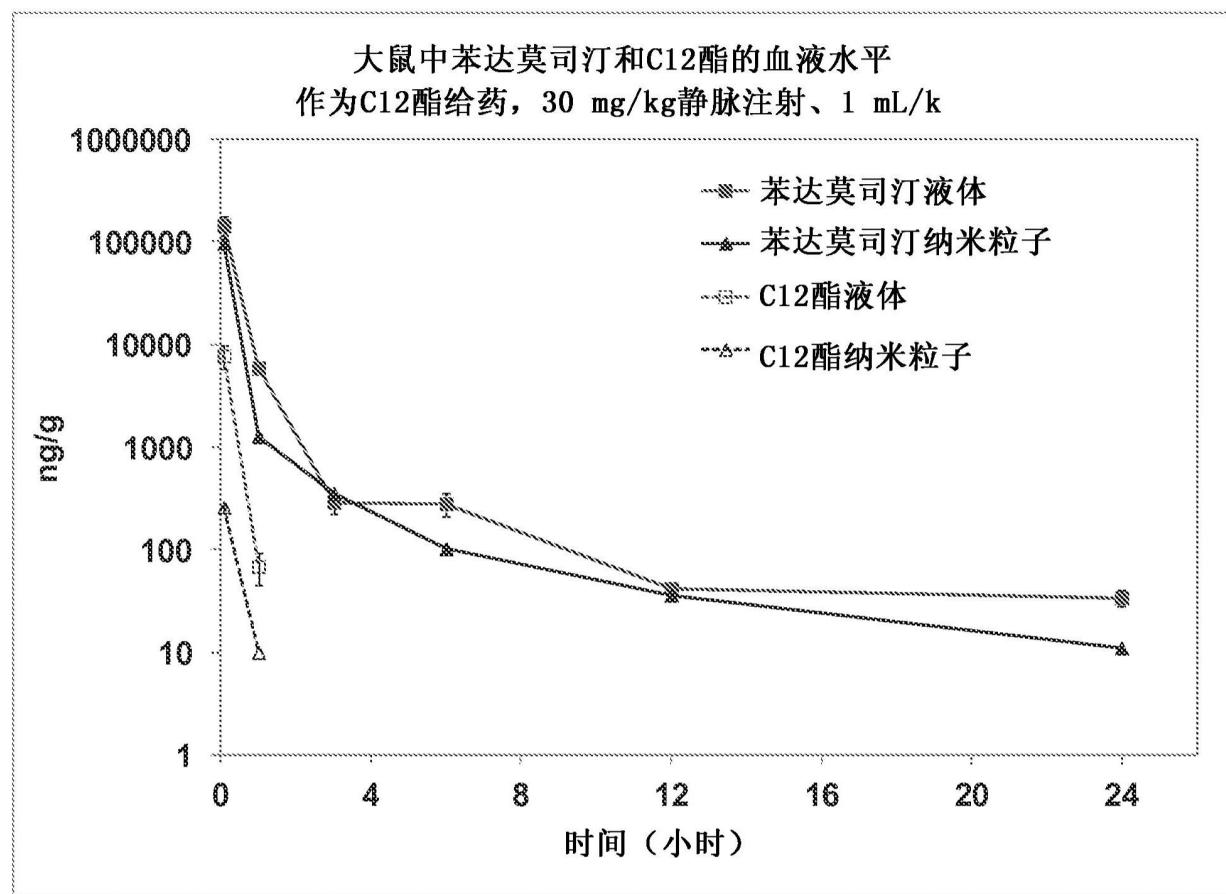


图 9

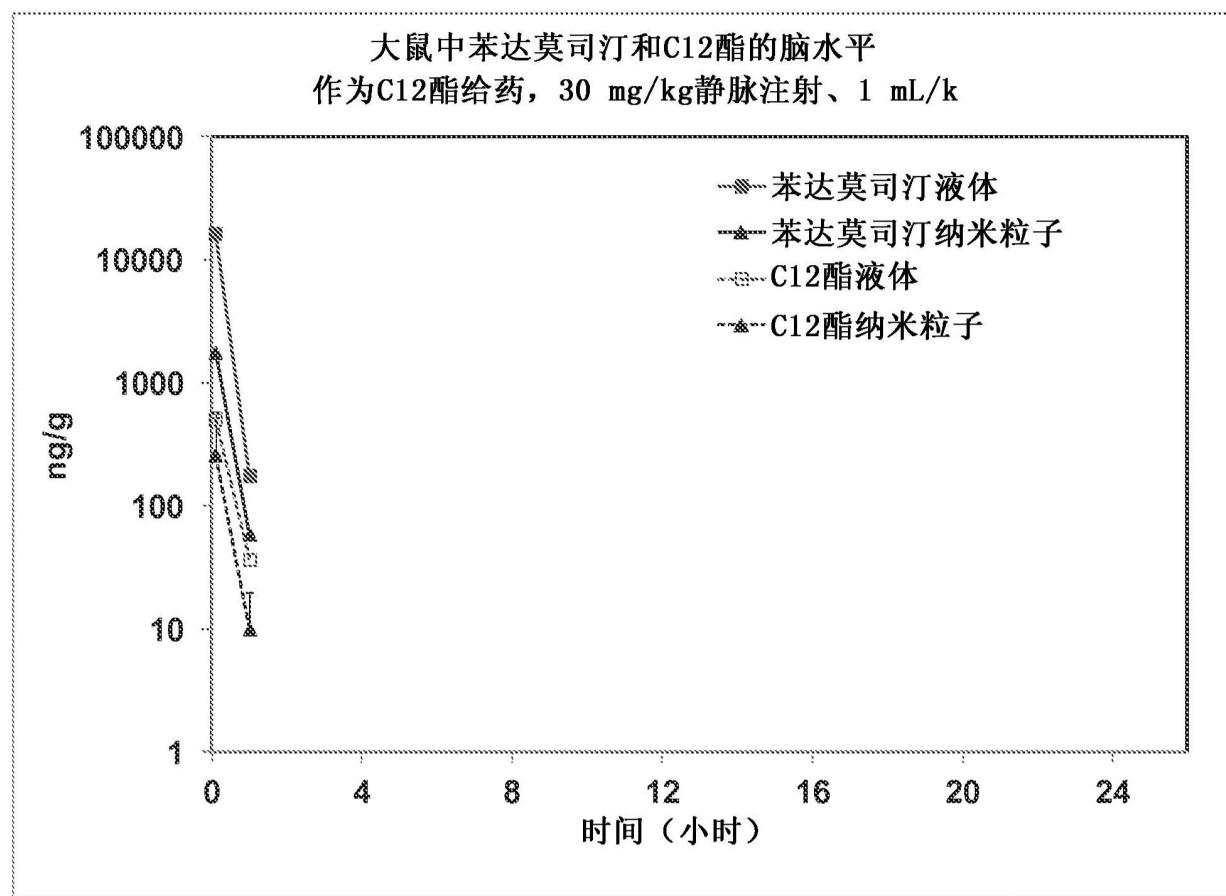


图 10

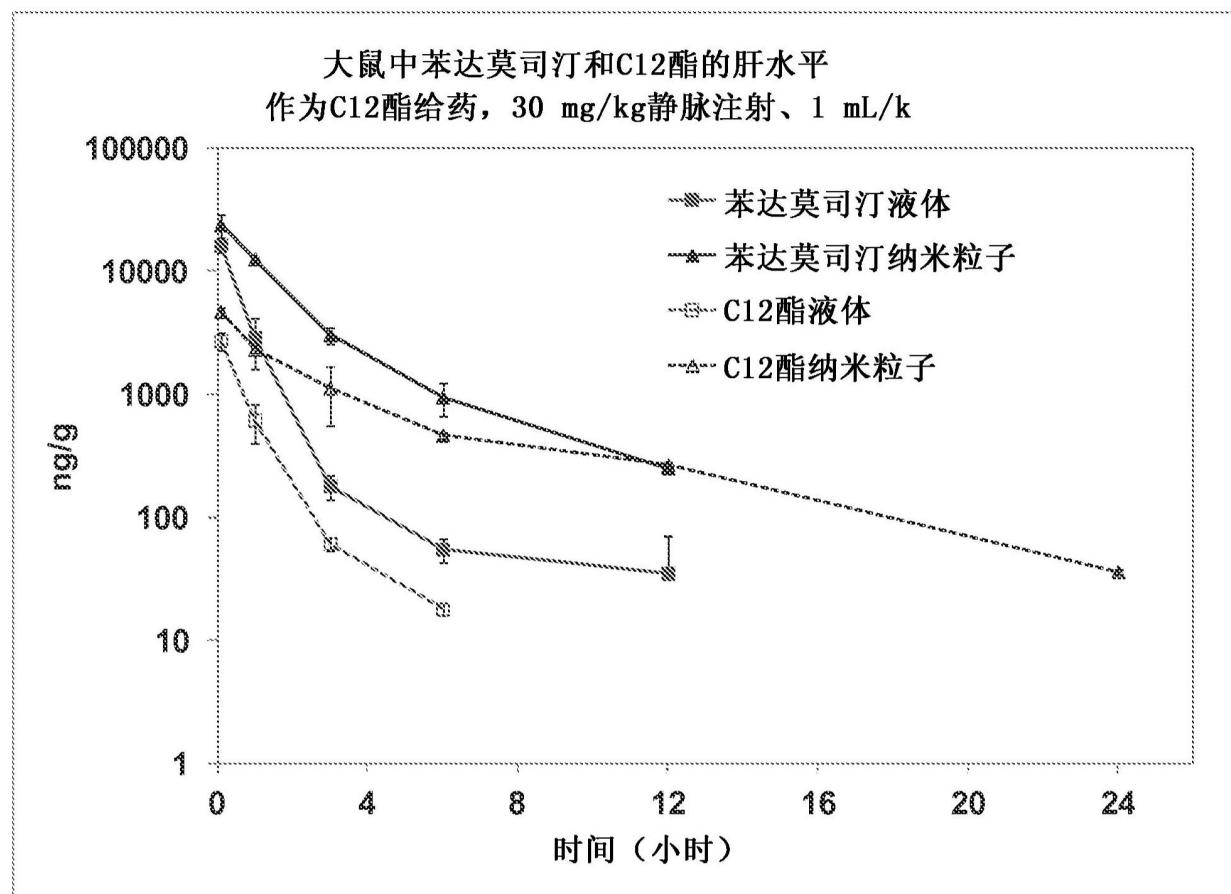


图 11

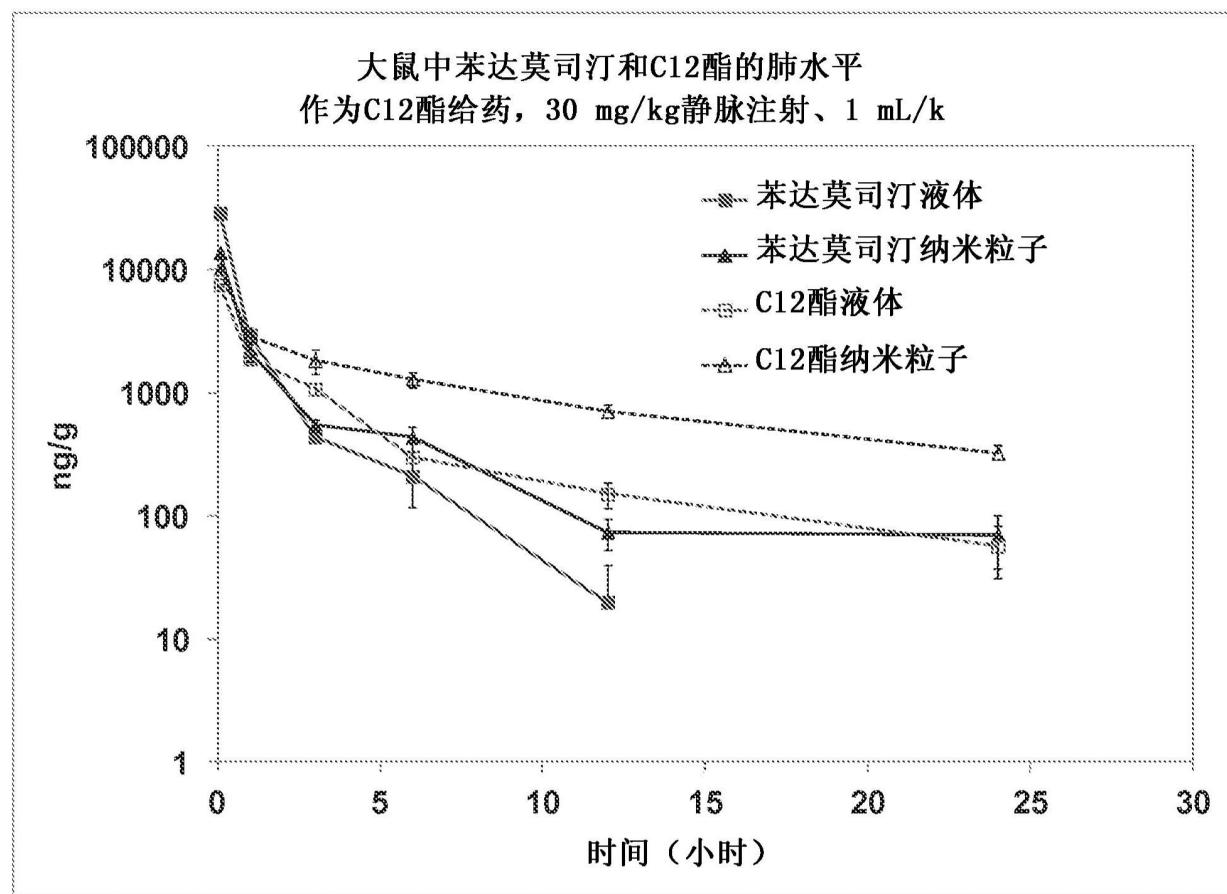


图 12

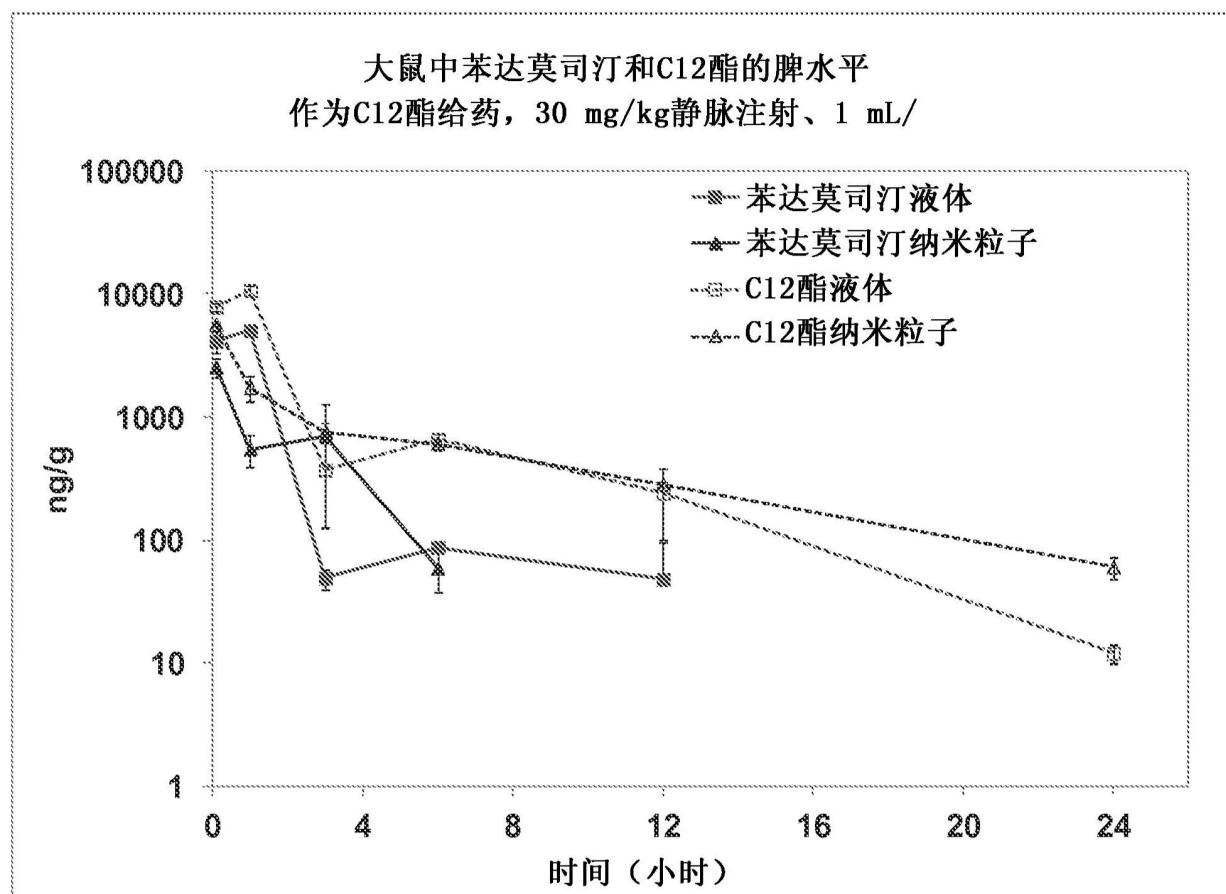


图 13

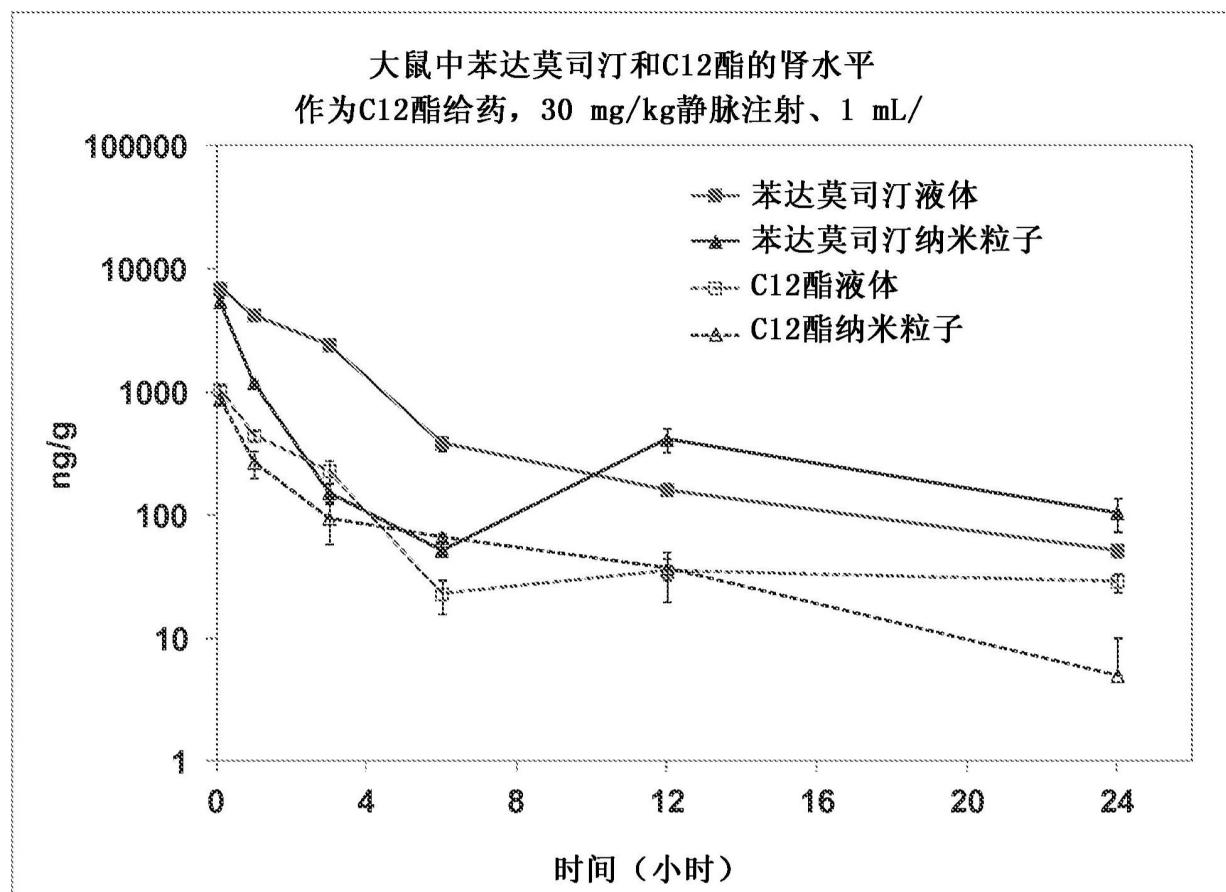


图 14

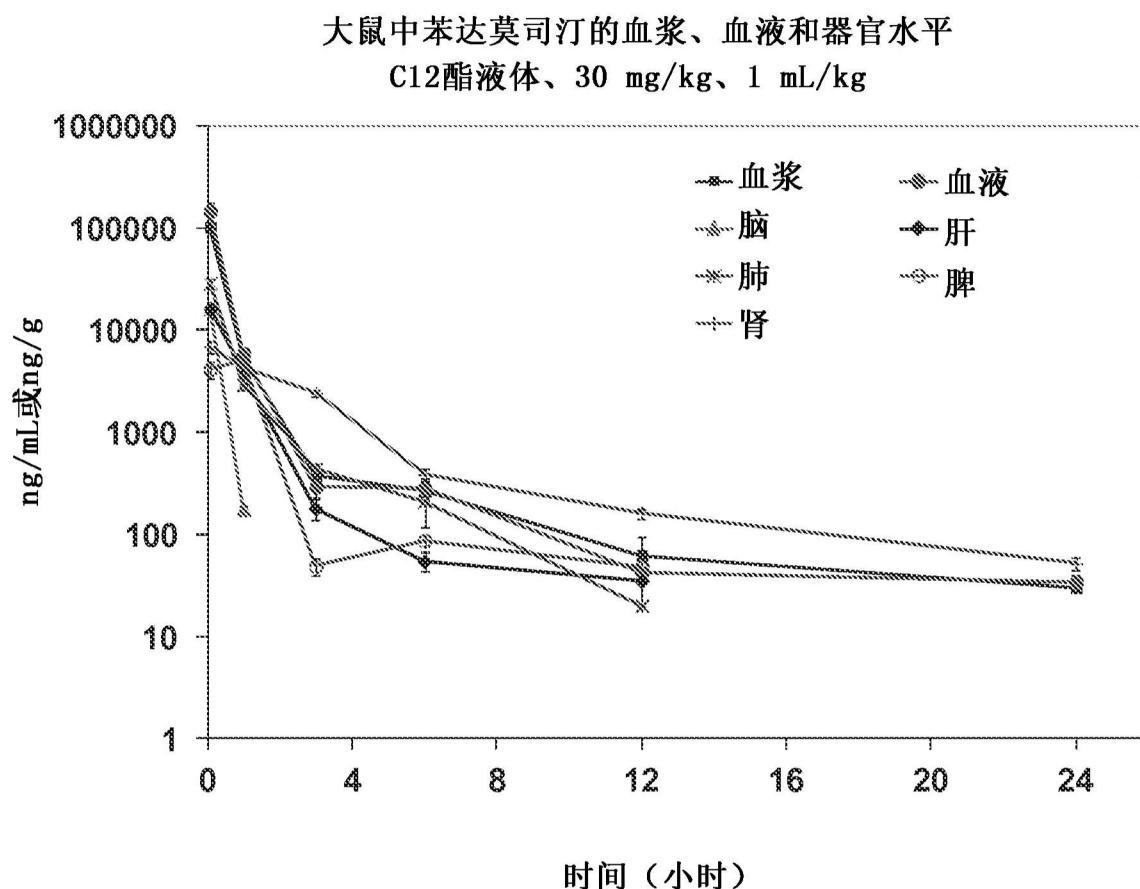


图 15

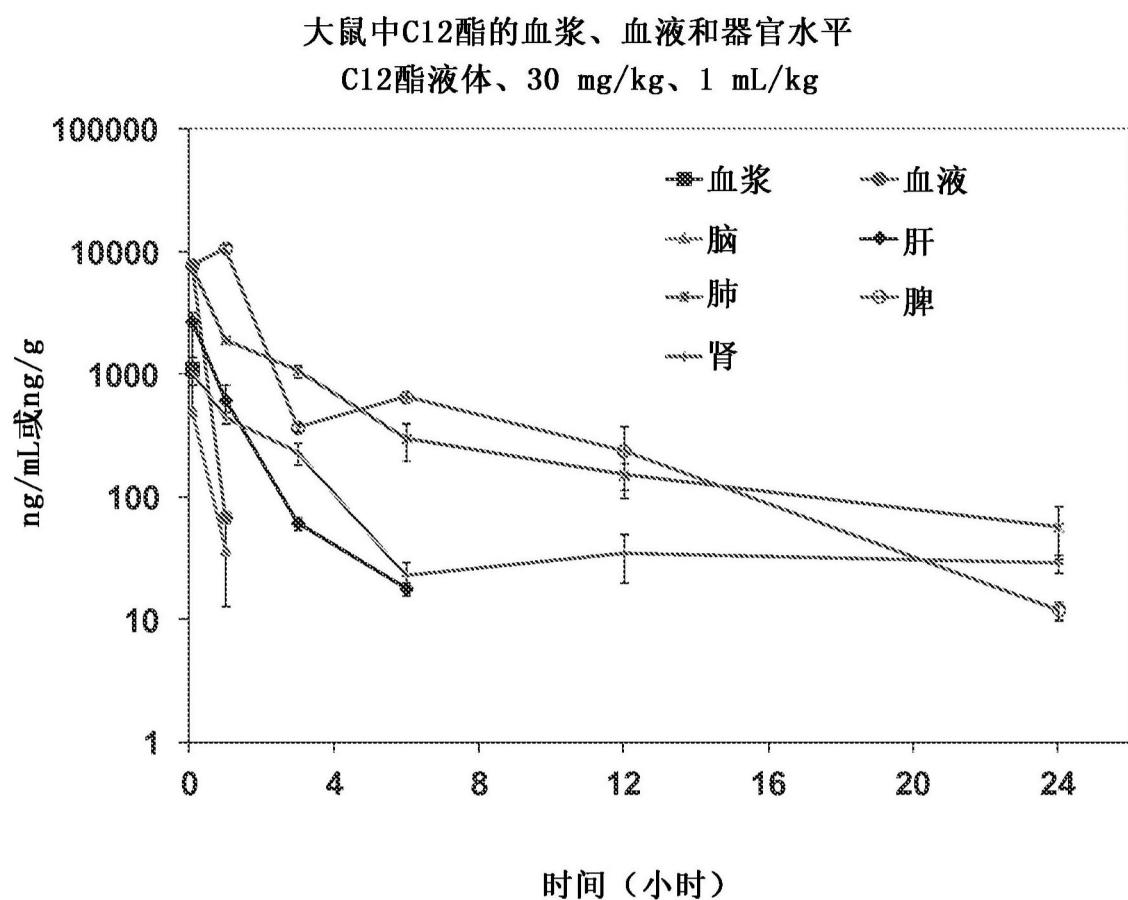


图 16

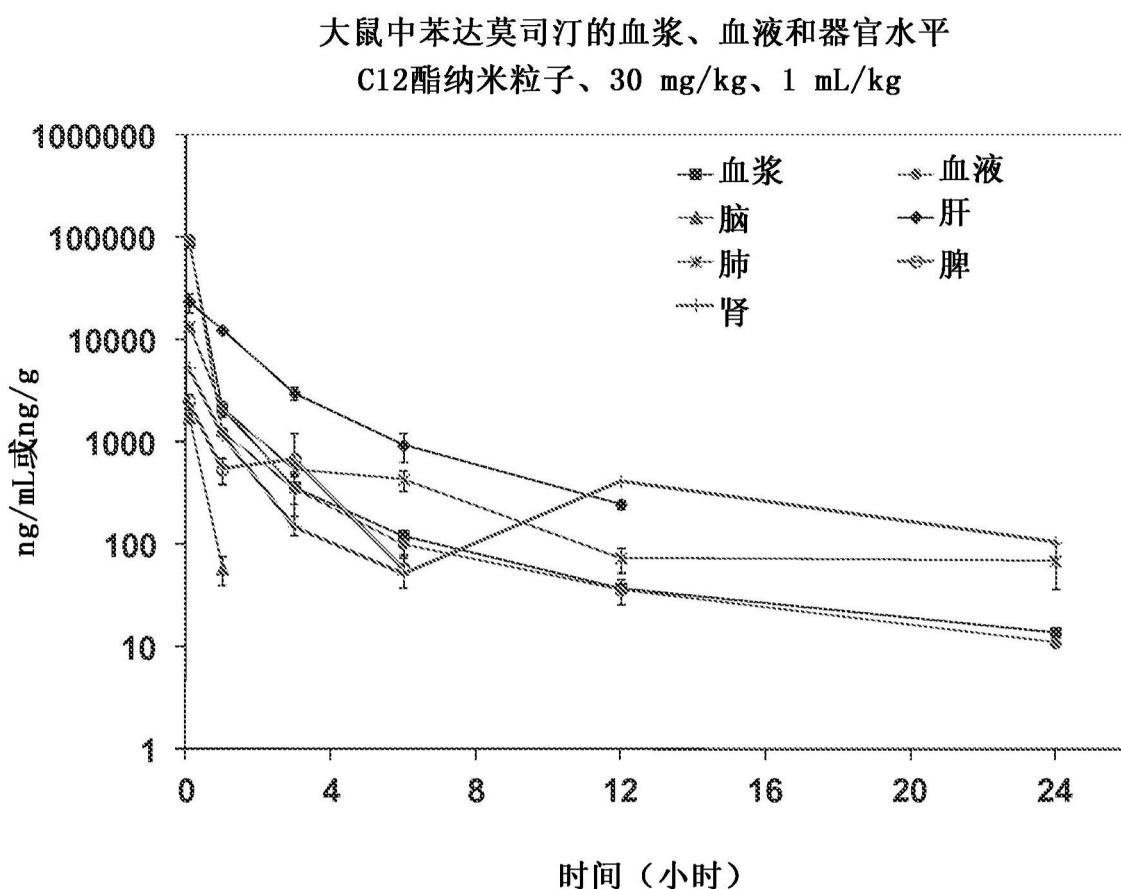


图 17

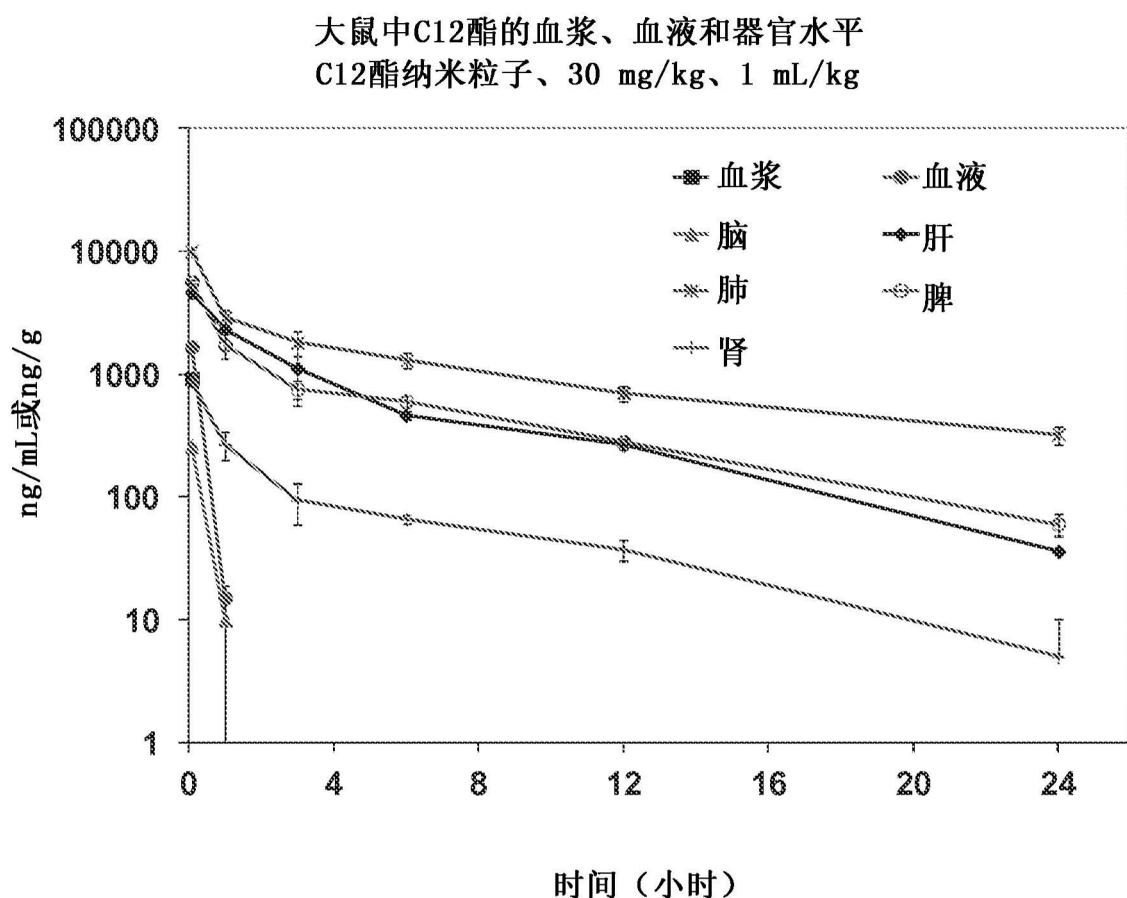


图 18

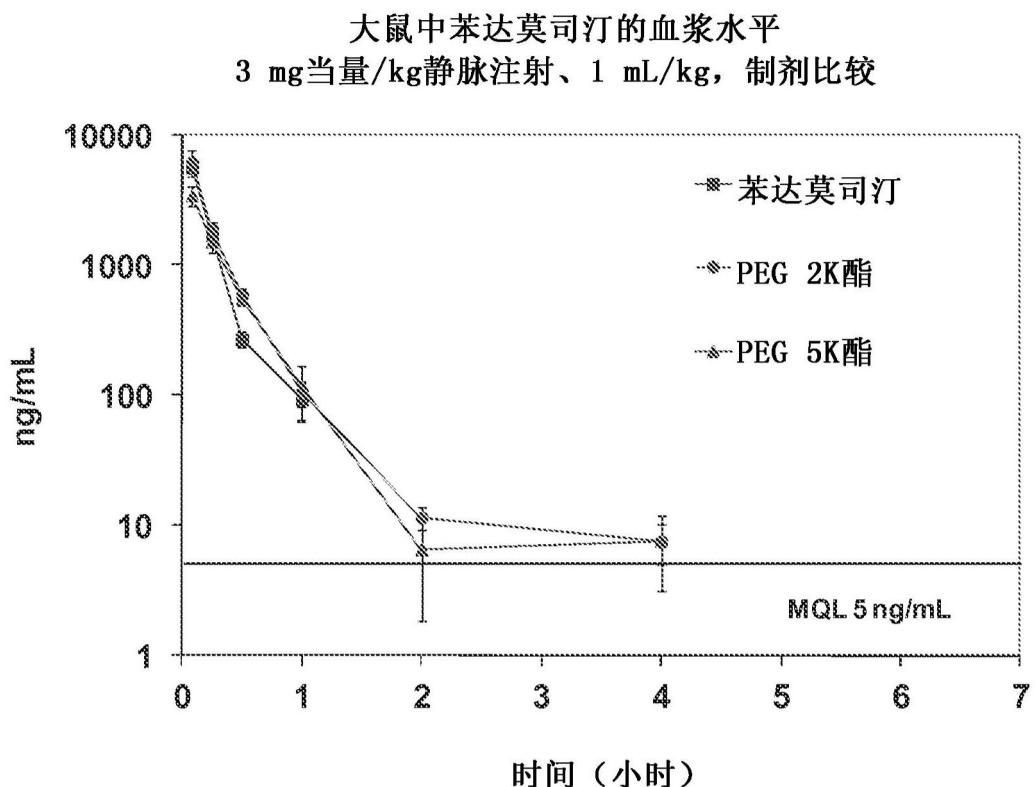


图 19

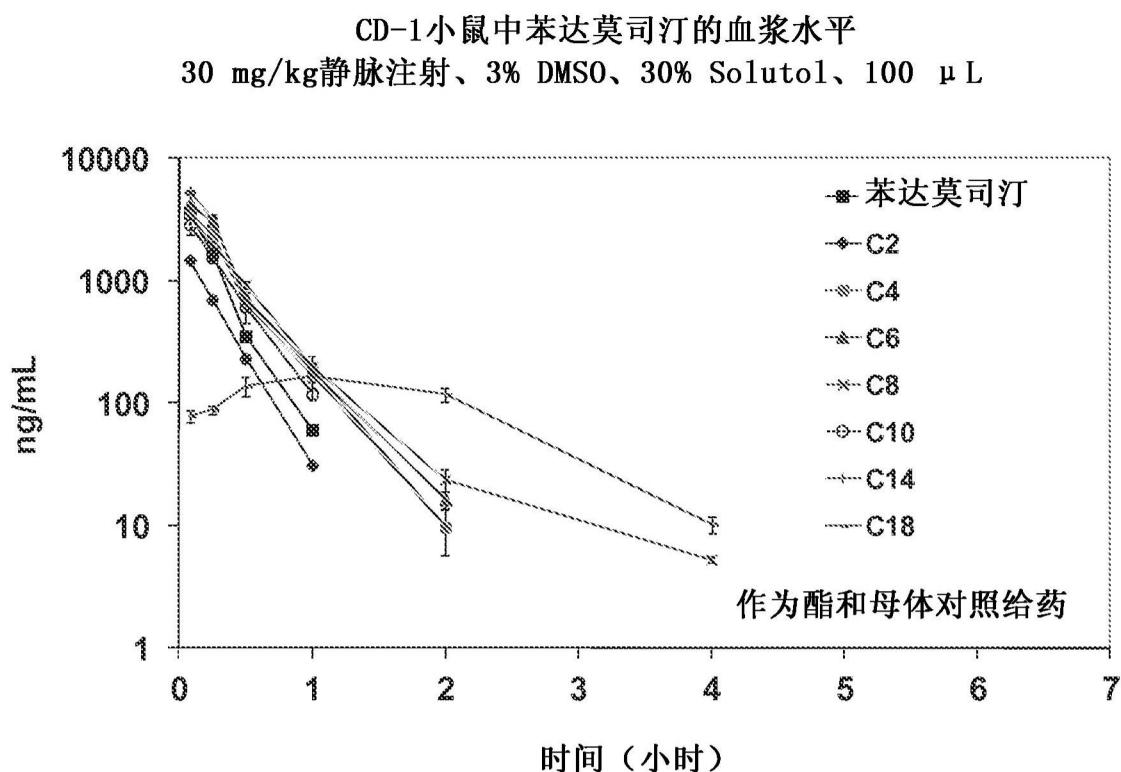


图 20

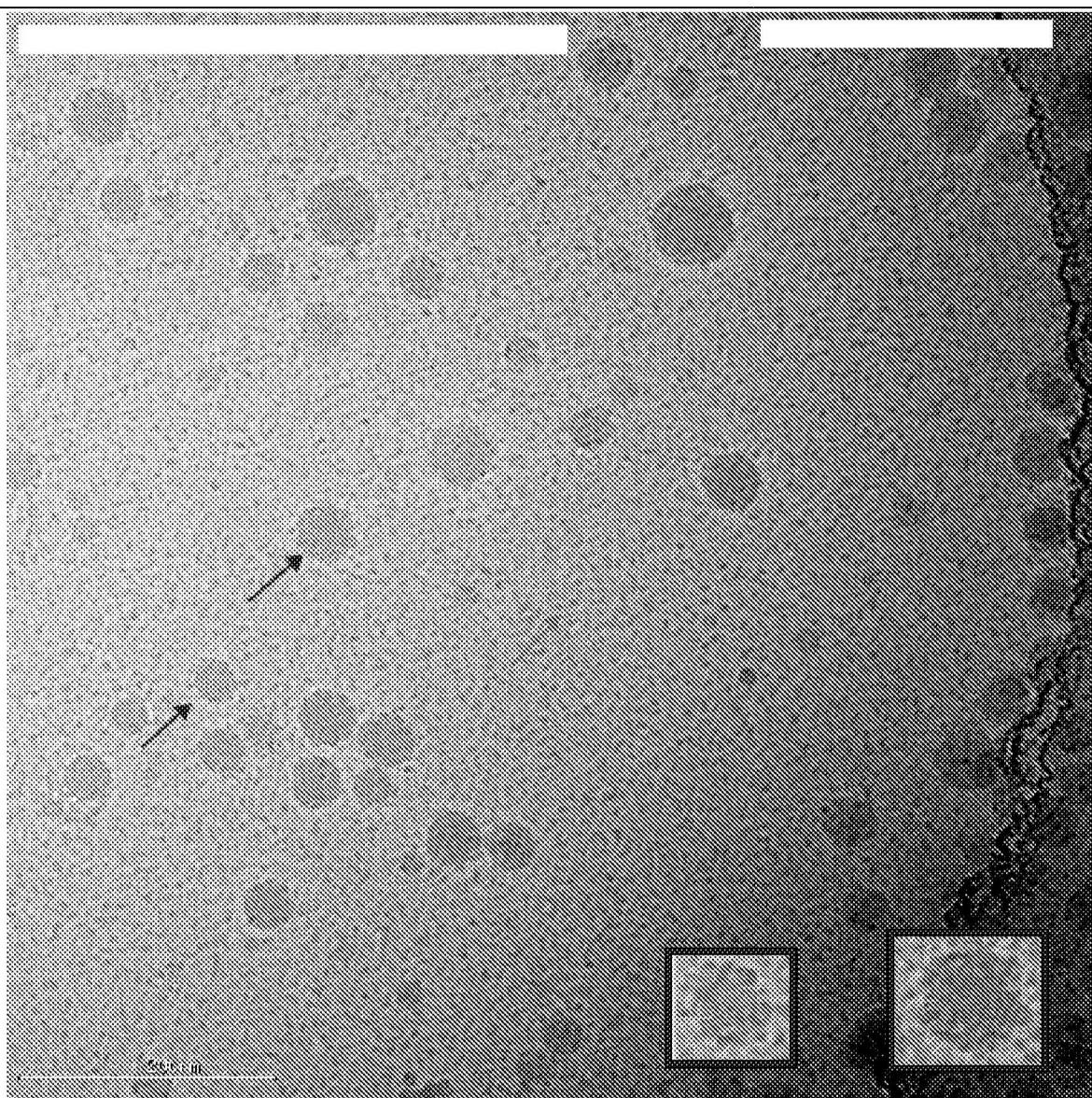


图 21

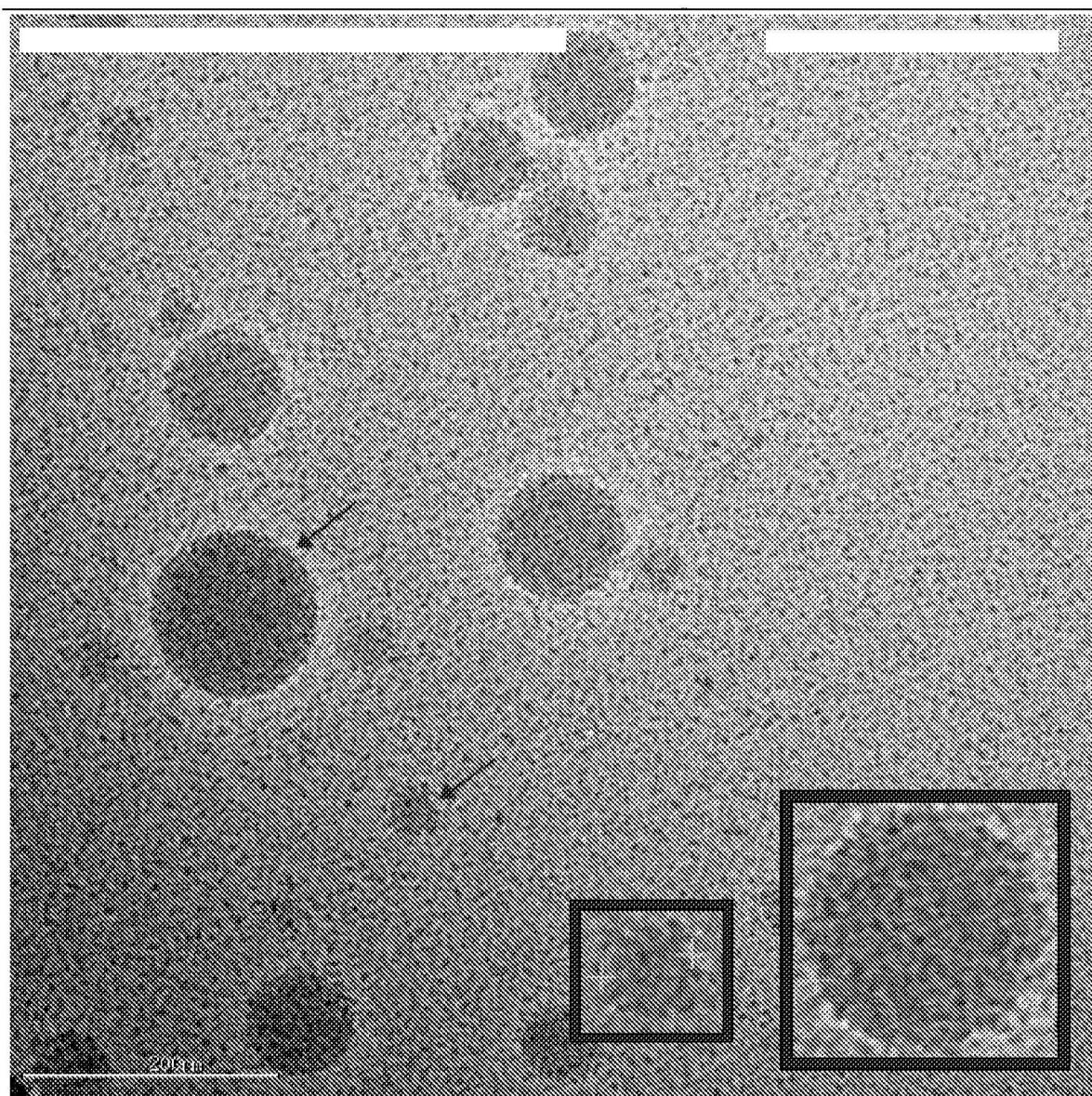


图 22

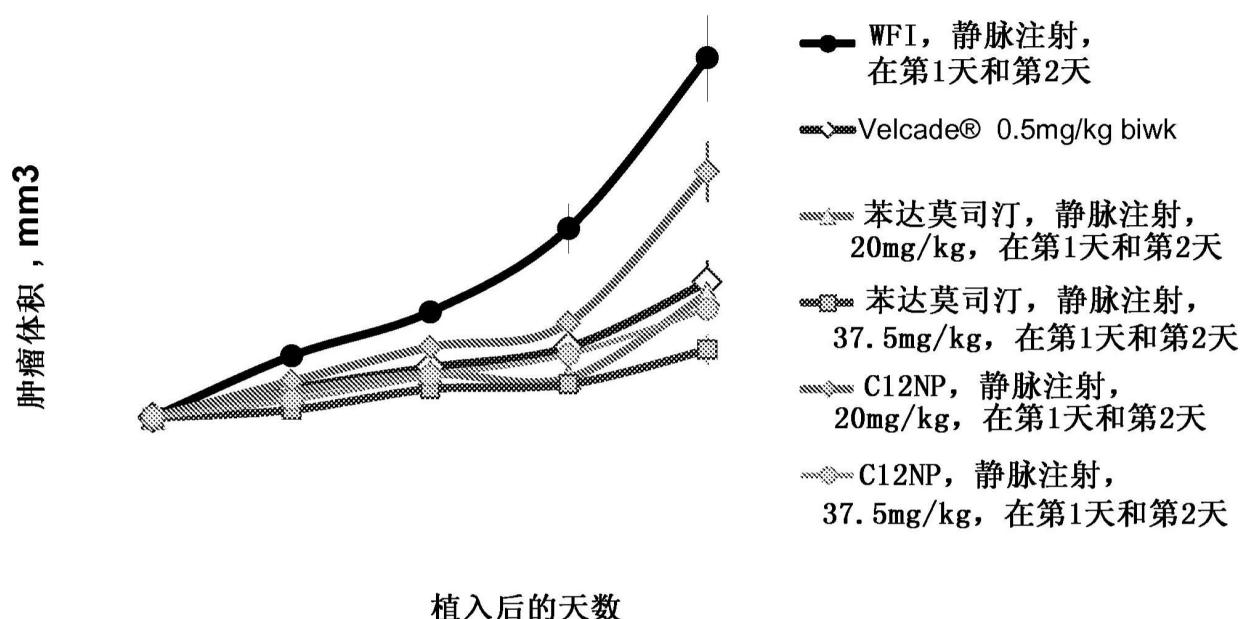


图 23

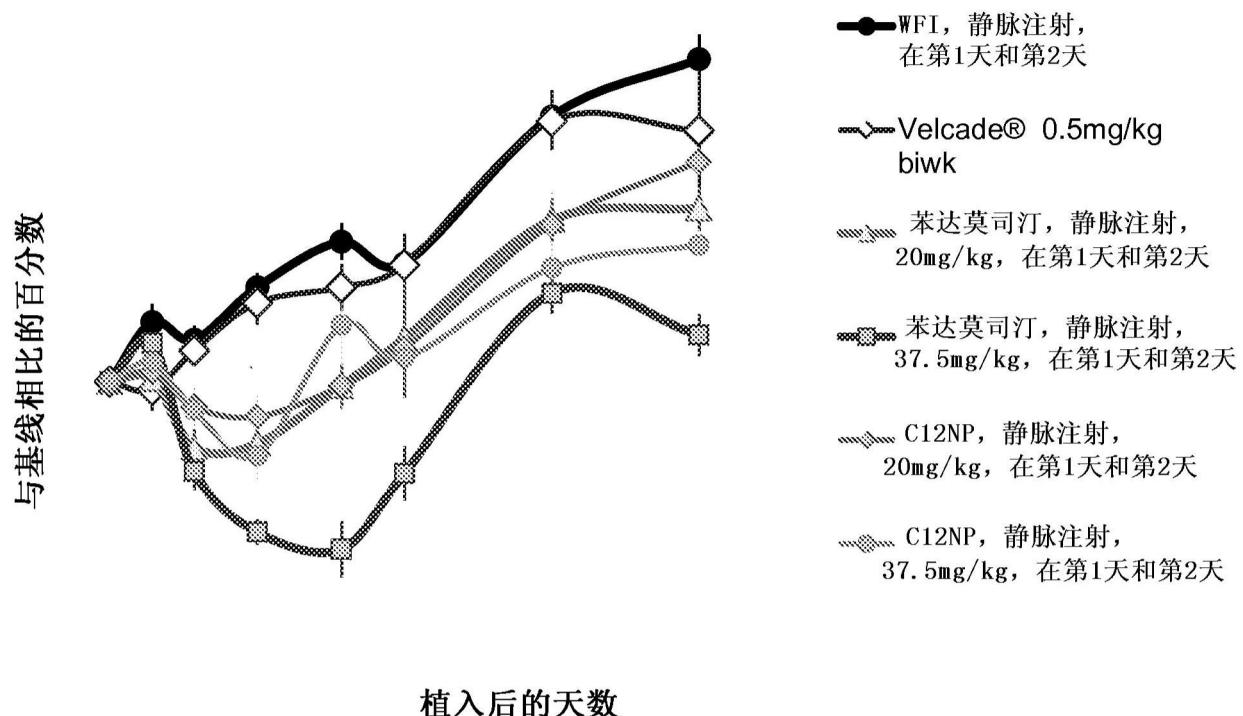


图 24

## **Abstract**

The present invention is directed to bendamustine esters and bendamustine amides and their use for the treatment of cancer: (I) wherein R1 is C6-C24alkyl or polyethylene glycol; and (II) wherein R2 is C1-C24alkylene; and R3 is -COOC1-3alkyl; or R2-R3 is C1-C24alkyl; or a pharmaceutically acceptable salt form thereof.