

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480017040.1

[43] 公开日 2006 年 7 月 26 日

[11] 公开号 CN 1809385A

[22] 申请日 2004.4.20

[21] 申请号 200480017040.1

[30] 优先权

[32] 2003.4.23 [33] US [31] 60/464,796

[86] 国际申请 PCT/US2004/012158 2004.4.20

[87] 国际公布 WO2004/093918 英 2004.11.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.19

[71] 申请人 惠氏控股公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 T·朱 K·于 J·卢卡斯

J·古 A·扎斯克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 王景朝

权利要求书 11 页 说明书 33 页 附图 5 页

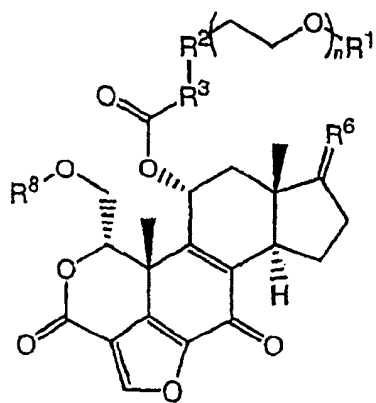
[54] 发明名称

聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物

[57] 摘要

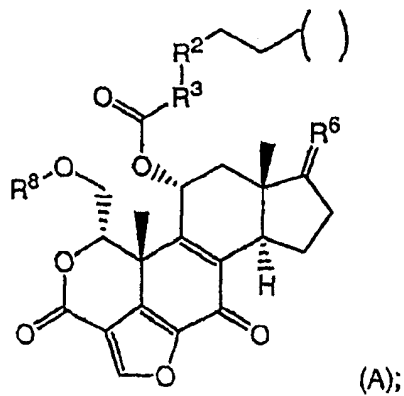
本发明涉及利用水溶性聚合物为载体的用于药物的可溶性渥曼青霉素衍生物，并包括具有说明书中所述结构的化合物。

1. 一种具有通式 P-X-D 的水溶性药物-聚合物轭合物：
其中，
 - 5 P 为水溶性聚合物；
 D 为渥曼青霉素衍生物； 和
 X 为水溶性聚合物与所述渥曼青霉素衍生物之间的共价键。
2. 一种药用组合物，所述组合物包含权利要求 1 的水溶性药物-聚合物轭合物和药学上可接受的载体。
- 10 3. 一种在哺乳动物中治疗或抑制介导的病症或疾病的方法，所述方法包括提供所述哺乳动物有效量的权利要求 1 的水溶性药物-聚合物轭合物。
 4. 权利要求 3 的方法，其中所述有效量的水溶性药物-聚合物为 10-1000mg/kg。
- 15 5. 权利要求 3 的方法，其中所述有效量的水溶性药物-聚合物为 0.5-10mg/kg。
 6. 权利要求 3-5 中任一项的方法，其中治疗或抑制包括 PI3 激酶或 TOR 激酶的抑制。
 7. 权利要求 3-6 中任一项的方法，其中所述病症为非小细胞肺
- 20 癌、脑癌、缺血性心脏病、再狭窄、炎症、血小板凝集、硬化症、呼吸性疾病、HIV 和骨吸收疾病。
 8. 权利要求 3-7 中任一项的方法，其中单独提供或与其它调节生长因子信号、细胞因子应答和细胞周期控制的药物联合提供有效量。
 9. 权利要求 8 的方法，其中所述药物为 α -干扰素或聚乙二醇化
- 25 雷帕霉素。
 10. 权利要求 8 的方法，其中所述药物为细胞毒药物。
 11. 一种式 I 轭合物



其中:

R^1 为烷基或式(A)药物-聚合物轭合物



5 R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

R^6 为=O 或 OR^7 ;

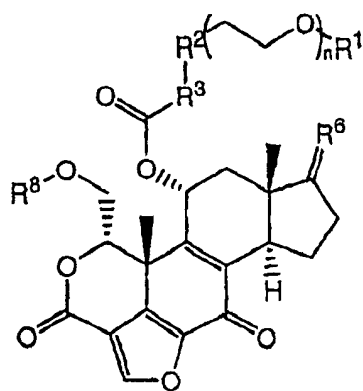
R^7 为 H、 COR^9 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

10 R^9 为烷基、H、芳基或 $-CH_2Ar$; 且

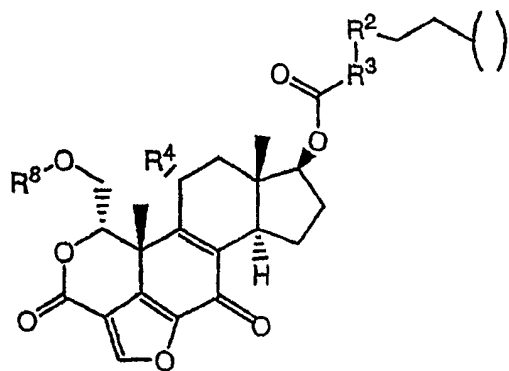
n 为 1-1000。

12. 一种式 I 轭合物:



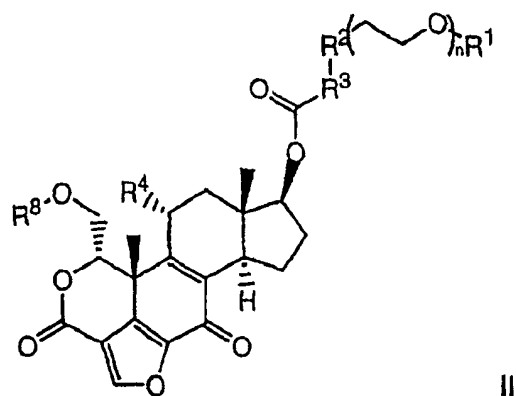
其中:

R^1 为烷基或式(B)药物-聚合物轭合物



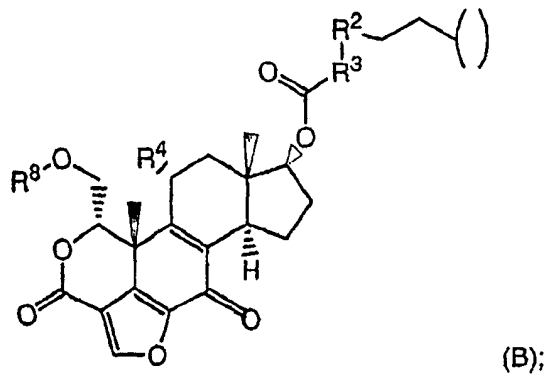
(B);

- 5 R^2 为 O、NH 或 S;
 R^3 为烷基、环烷基或芳基;
 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;
 R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;
 R^8 为烷基或 H;
10 R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar; 且
 n 为 1-1000。
13. 一种式 II 轭合物:



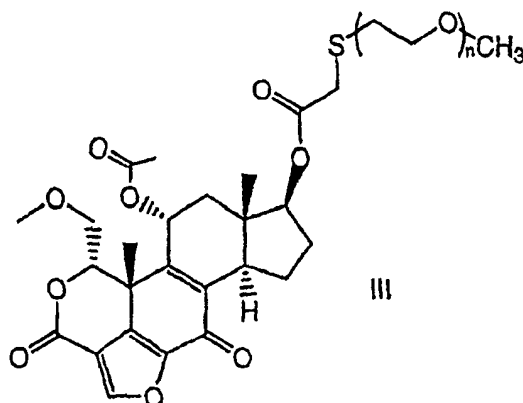
其中：

R¹ 为烷基或式(B)药物-聚合物轭合物



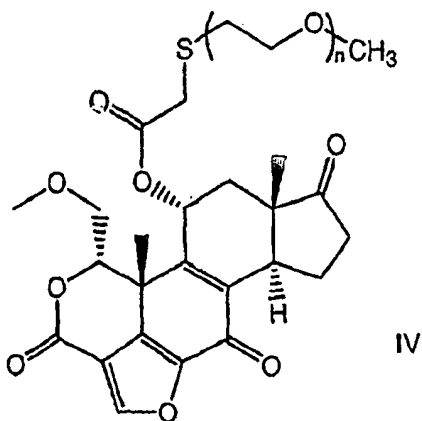
- 5 R^2 为 O、NH 或 S;
 R^3 为烷基、环烷基或芳基;
 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;
 R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;
 R^8 为烷基或 H;
10 R^9 为烷基、H、芳基或 -CH₂Ar; 且
n 为 1-1000。

14. 一种式 III 化合物:



n 为 1-1000。

15. 一种式 IV 化合物:



5 其中 n=1-1000。

16. 权利要求 11-15 中任一项的水溶性药物-聚合物化合物, 其中 n 为 250-400。

17. 权利要求 11-15 中任一项的水溶性药物-聚合物化合物, 其中 n 为 50-150。

10 18. 权利要求 11-15 中任一项的水溶性药物-聚合物化合物, 其中所述聚合物的分子量为约 400 至约 80,000。

19. 权利要求 11-15 中任一项的水溶性药物-聚合物化合物, 其中所述聚合物的分子量为约 1000 至约 8000。

20. 权利要求 11-15 中任一项的水溶性药物-聚合物化合物, 其中
15 所述聚合物的分子量为约 4000 至约 6000。

21. 一种药用组合物, 所述组合物包含权利要求 11-20 中任一项

的轭合物和药学上可接受的载体。

22. 一种在哺乳动物中治疗或抑制介导的病症或疾病的方法，所述方法包括提供所述哺乳动物有效量的权利要求 11-20 中任一项的轭合物。

5 23. 权利要求 22 的方法，其中所述有效量的轭合物为 10-1000mg/kg。

24. 权利要求 22 的方法，其中所述有效量的轭合物为 0.5-10mg/kg。

25. 权利要求 22-24 中任一项的方法，其中治疗或抑制包括 PI3
10 激酶或 TOR 激酶的抑制。

26. 权利要求 22-25 中任一项的方法，其中所述病症为非小细胞肺癌、脑癌、缺血性心脏病、再狭窄、炎症、血小板凝集、硬化症、呼吸性疾病、HIV 和骨吸收疾病。

27. 权利要求 22-26 中任一项的方法，其中单独提供或与其它调
15 节生长因子信号、细胞因子应答和细胞周期控制的药物联合提供有效量。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述药物为 α -干扰素或聚乙二醇化雷帕霉素。

29. 权利要求 27 的方法，其中所述药物为细胞毒药物。

20 30. 一种制备权利要求 14 的轭合物的方法，所述方法包括：

a. 将溶剂加至 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素以得到溶液；

b. 向该溶液中加入叔胺或碳酸氢钠；

c. 向步骤(b)的溶液中加入 mPEG-巯基 5000；

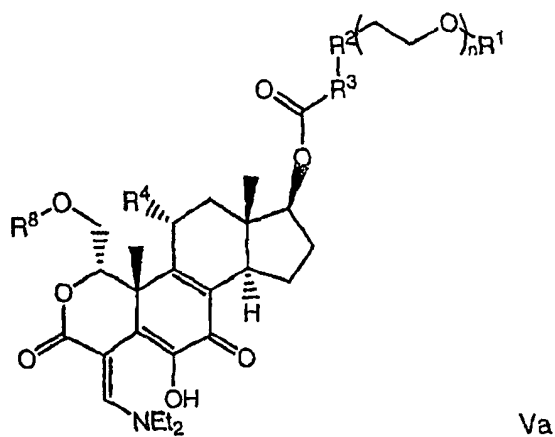
25 d. 搅拌步骤(c)的溶液 30 分钟；

e. 向所搅拌的溶液中加入醚；

f. 收集固体；和

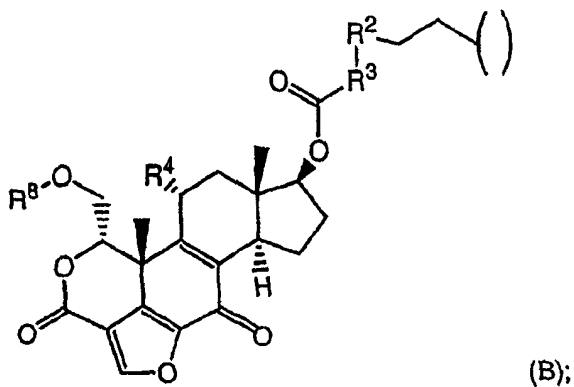
g. 用醚洗涤所收集的固体得到所述聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物。

31. 一种式 Va 化合物:



5 其中:

R^1 为烷基或单独不重复的式(B)药物-聚合物化合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

10 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

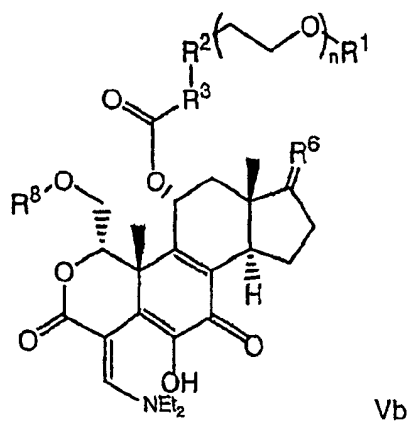
R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar; 且

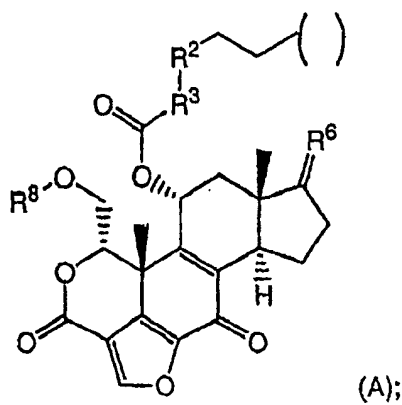
n 为 1-1000。

15 32. 一种式 Vb 化合物:

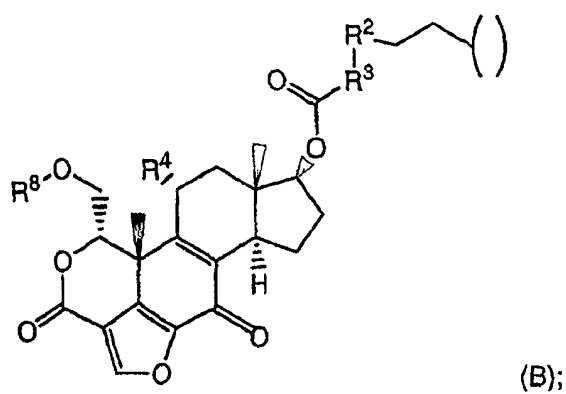


其中:

R^1 为烷基或式(A)药物-聚合物羧合物



5 或式(B)药物-聚合物羧合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

10 R^6 为=O 或 OR⁷;

R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 $-\text{CH}_2\text{Ar}$; 且

n 为 1-1000。

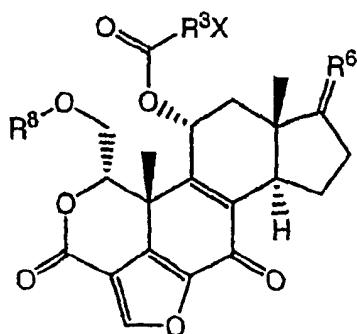
33. 一种制备权利要求 31 的化合物的方法, 所述方法包括向权利要求 13 的化合物中加入胺以得到需要的产物。

34. 一种制备权利要求 32 的化合物的方法, 所述方法包括向权利要求 11 或权利要求 12 的化合物中加入胺以得到需要的产物。

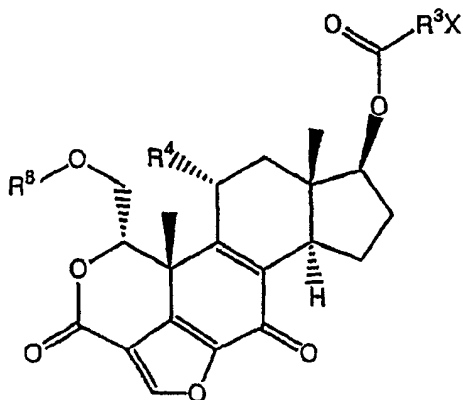
35. 权利要求 33 或权利要求 34 的方法, 其中所述胺包含二乙胺。

36. 一种制备权利要求 1-10 中任一项的化合物的方法, 所述方法包括使其中 P 和 X 如权利要求 1 中定义的式 P-XH 聚合物与其中 X 为卤素的式 DX 化合物反应, 以提供需要的产物。

37. 一种制备权利要求 11-14 中任一项的化合物的方法, 所述方法包括使下式化合物



15 或下式化合物



其中:

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

R^6 为=O 或 OR⁷;

R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

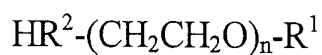
R^8 为烷基或 H;

5 R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar; 且

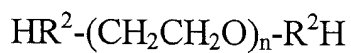
n 为 1-1000,

和 X 为卤素,

与下式化合物



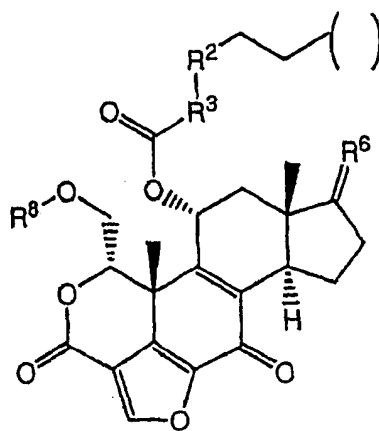
10 或下式化合物



其中 R^2 为 O、NH 或 S;

n 为 1-1000 且

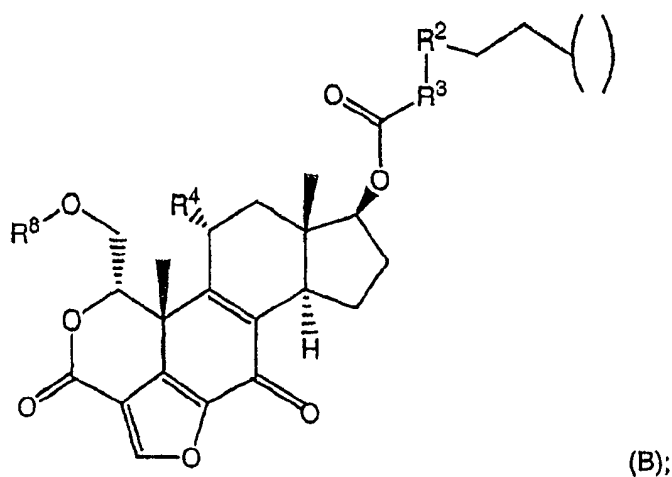
R^1 为烷基或式(A)药物-聚合物轂合物



(A);

15

或式(B)药物-聚合物轂合物



且 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^8 和 n 定义同上，
反应得到需要的产物。

38. 一种制备权利要求 15 的化合物的方法，所述方法包括：

- 5 a) 向 11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素中加入溶剂以得到溶液；
- b) 向该溶液中加入叔胺；
- c) 向步骤(b)的溶液中加入 mPEG-巯基 5000；
- d) 搅拌步骤(c)的溶液 30 分钟；
- 10 e) 向所搅拌的溶液中加入醚；
- f) 收集固体；和
- g) 用醚洗涤所收集的固体得到所述聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物。

聚乙二醇化渥曼青霉素衍合物

5 发明背景

渥曼青霉素是一种真菌代谢物，已发现为信号转导途径中磷脂酰肌醇-3(OH)-激酶(PI3K)和 TOR 激酶作用的有效催化抑制剂。(Norman, Bryan H. 等, (1996)"Studies on the Mechanism of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Wortmannin and Related
10 Analogs(渥曼青霉素及相关类似物抑制磷脂酰肌醇 3-激酶的机理研究)"、J. Med. Chem., 39, 1106-111 和 Creemer, Lawrence C. (1996)"Synthesis and in Vitro Evaluation of New Wortmannin Esters: Potent Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase (新渥曼青霉素酯: 磷脂酰肌醇 3-激酶活性抑制剂的合成及体外评价)", J. Med. Chem, 39, 5021-
15 5024)。

1a 类 PI3K (称为 PI3K)是由 p85 调节亚单位和 p110 催化亚单位组成的异二聚体酶。响应生长因子受体的刺激, PI3K 催化产生细胞膜中的脂质第二信使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)。PIP3 又帮助激活宽范围的下游细胞底物。PI3K 下游最重要的信号介质包括丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 和雷帕霉素(mTOR)的哺乳动物靶。AKT 通过多细胞死亡/凋亡蛋白和细胞周期因子的直接磷酸化而获得显性存活信号并促进增殖。mTOR 通过控制细胞蛋白质翻译而成为细胞生长的中心调控因子。因此, PI3K/AKT/TOR 途径对细胞增殖、生长、存活和血管生成至关重要。人类癌症中, PI3K/AKT/TOR 途径下调是发生在所有成年人肿瘤中最常见的事件之一。肿瘤抑制基因 PTEN 是一种 PIP3 磷酸酶和一种 PI3K 信号的负向调节因子, 据估计 30-50%
25 的所有人类癌症中发生肿瘤抑制基因 PTEN 的遗传损失, 这些癌症包括肺癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌、肾癌、黑素瘤、卵巢癌、子

宫内膜癌、甲状腺癌和淋巴瘤。另外,已发现 PI3K 表达的结构性提高与肺癌、卵巢癌和胰腺癌有关。最后,细胞表面的致癌基因如 Her-2、EGFR 和 Ras 引起乳腺、前列腺、结肠和肺肿瘤中结构性 PI3K 信号。这些临床数据为开发 PI3K 抑制剂为新的抗癌药提供有力的理论依据。

5 (Cantley, L. and Neel, B. (1999) "New Insights into Tumor Suppression: PTEN Suppresses Tumor Formation by Restraining the Phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway (肿瘤抑制的新观点: PTEN 通过抑制磷酸肌醇 3-激酶/AKT 路径抑制肿瘤形成)", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 4240-4245)。PI 3 激酶和 TOR 激酶在癌症(Vivanco, I. and Sawyer, C. (2002) "The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT Pathway in Human Cancer (人癌症中的磷脂酰肌醇 3-激酶-AKT 路径)", Nature Reviews Cancer, 2, 489-501)、缺血性心脏病和再狭窄(Shiojima, I. And Walsh, K. (2002) "Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis (血管内环境稳定和血管生成中 Akt 信号的作用)", Circulation Research, 90, 1243-1250 和 Ruygrok P.等, (2003) "Rapamycin in Cardiovascular Medicine (心血管药物中雷帕霉素)", Intern Med J., 33, 103-109)、炎症(Wymann, M.等, (2003) "Phosphoinositide 3-kinase gamma: A Key Modulator in Inflammation and Allergy (γ 磷酸肌醇 (Phosphoinositide)3-激酶: 炎症和变态反应中重要的调节剂)" Biochem Soc Trans, 31, 275-280 和 Kwak, Yong-Geun 等, (April 2003) "Involvement of PTEN in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma (支气管哮喘中气道高反应性和炎症中涉及 PTEN)", The Journal of Clinical Investigation, 111: 7, 1083-1092)、血小板凝集(Watanabe, N. 等, (2003 年 3 月) "Functional Phenotype of Phosphoinositide 3-kinase p85 (alpha) Null Platelets Characterized by an Impaired Response to GP VI Stimulation (以对 GP VI 刺激减少反应为特征的磷酸肌醇 3-激酶 p85 (α)无效血小板功能性表型)", Blood (epub))、硬化症(Kenerson, H.等, (2002) "Activated Mammalian Target of

10

15

20

25

Rapamycin in the Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex Renal Tumors (雷帕霉素在结节性硬化复合性肾瘤发病中的活化哺乳动物靶)", Cancer Res., 62, 5645-5650)、呼吸性疾病(Kitaura, J.等, (2000) "AKT-dependent Cytokine Production in Mast Cells (肥大细胞中 AKT-依赖性细胞因子的产生)", J. Exp. Med., 192, 729-739 和 Stewart A. (2001) "Airway Wall Remodeling and Hyper-responsiveness: Modeling Remodeling in vitro and in vivo (气道壁改变和高反应性: 体外和体内模型化改变)", Pulm Pharmacol Ther, 14, 255-265)、HIV (Francois, F. and Klotman, M. "Phosphatidylinositol 3-kinase Regulates Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication Following Viral Entry in Primary CD4 (+) T Lymphocytes and Macrophages (病毒进入初级 CD4 (+)T 淋巴细胞和巨噬细胞后磷脂酰肌醇 3-激酶调节 1 型人免疫缺陷病毒复制)", J. Virol., 77, 2539-2549)和骨吸收疾病(Pilkington, M.等, (1998) "Wortmannin Inhibits Spreading and Chemotaxis of Rat Osteoclasts in vitro (体外渥曼青霉素抑制大鼠破骨细胞扩散和趋化性)", J Bone Miner Res, 13, 688-694)中已显示出活性。

PI 3-激酶以 85 kDa 调节亚单位和 110 kDa 催化亚单位紧密结合的异二聚体存在, 并在由几乎所有配基活化生长因子受体和致癌基因蛋白酪氨酸激酶组成的细胞复合物中发现(Cantley, L. C.等, Cell, 64:281-302 (1991))。显然, 85 kDa 调节亚单位作为 PI 3-激酶的接合物与生长因子受体和酪氨酸磷酸化蛋白质相互作用(Margolis, C. Cell Growth Differ., 3:73-80 (1992))。

尽管 PI 3-激酶看起来是信号转导中重要的酶, 与细胞的有丝分裂和恶性转化有特定关联, 但是已确定只有少数水溶性药物-聚合物轆合物对 PI 3-激酶有抑制活性(见, 如 Matter, W.F.等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 186:624-631 (1992))。与本发明方法中使用的水溶性药物-聚合物轆合物的选择性 PI 3-激酶活性相反, Matter 等使用的生物类黄酮素(bioflavonoid)水溶性药物-聚合物轆合物特别是槲皮

昔及其某些类似物抑制 PI 3-激酶和其它激酶如蛋白质激酶 C 和 PI 4-激酶(同上)。

1995 年 1 月 3 日颁布的美国专利号 5,378,725 提供了使用渥曼青霉素或其某些类似物之一抑制哺乳动物中 PI 3-激酶的方法。渥曼青霉素的缺点之一是其对活体生物的毒性。即使在低剂量时, 纯品渥曼青霉素全身剂量也常常限于实验动物使用。

本领域熟知渥曼青霉素的生物合成产物, 其衍生物由渥曼青霉素合成。(Dewald, Beatrice 等, (1988) "Two Transduction Sequences Are Necessary for Neutrophil Activation by Receptor Agonists (受体激动剂活化嗜中性粒细胞需要两种转导序列)", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 263, 11 月 5 日发行, pp 16179-16184; Norman, Bryan H. 等, (1996) "Studies on the Mechanism of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Wortmannin and Related Analogs (渥曼青霉素及相关类似物抑制磷脂酰肌醇 3-激酶机理的研究)", J. Med. Chem., 39, pp 1106-1111; Varticovski, L. 等 (2001) "Water-soluble HPMA copolymer-wortmannin conjugate retains phosphoinositide 3-kinase inhibitory activity in vitro and in vivo (水溶性 HPMA 共聚物-渥曼青霉素钼合物在体外和体内保留磷酸肌醇-3 激酶抑制活性)", Journal of Controlled Release, 74, pp 275-281), 所有文献通过引用结合到本文中。

由渥曼青霉素用乙硼烷还原制备的渥曼青霉素衍生物 17 β -羟基渥曼青霉素显示出的活性比渥曼青霉素大 10 倍, 其 IC_{50} 为 0.50nM, 使得 PI3K IC_{50} 在亚纳摩尔级。然而, 17 β -羟基渥曼青霉素在 C3H 乳腺模型中的抗肿瘤活性显示出剂量为 0.5(mg/kg)时无抑制作用, 而剂量为 1.0 mg/kg 时有毒性。这些发现使作者作出推断: “亲核加成至渥曼青霉素及相关类似物的亲电性 C-21 位, 对于抑制能力和抗肿瘤活性是必需的。遗憾的是, 这种机制看来与观察到的毒性相关”(Norman, Bryan H. 等, (1996) "Studies on the Mechanism of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Wortmannin and Related

Analogs (渥曼青霉素及相关类似物抑制磷脂酰肌醇 3-激酶机理的研究)", J. Med. Chem., 39, 1106-1111, 1109-1110)。

在 C-17 羟基乙酰化的渥曼青霉素衍生物显示出的活性大大降低, 作者据此推断: “C-17 位活性位点不能容纳亲脂性或空间大基团” (Creemer, Lawrence C.等, (1996) "Synthesis and in Vitro Evaluation of New Wortmannin Esters: Potent Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase (磷脂酰肌醇 3-激酶活性抑制剂: 新渥曼青霉素酯的合成及体外评价)", J. Med. Chem., 39, 5021-5024, 5022)。这个结论与随后阐述的 PI3K 结合渥曼青霉素的 X-射线晶体结构一致(Walker, Edward H.等 (2000) "Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine (渥曼青霉素、LY294002、槲皮苷、大麻双酮和星孢素抑制磷脂酰肌醇 3-激酶的结构决定因素)", Molecular Cell 6 (4), 909-919)。

连接聚乙二醇(PEG)已成功地应用于药物化学以改善药物的水溶性和给药。(同上)然而, 共价连接的 PEG 不一定会改善所连接药物的水溶性和有效性(Bebbington, David 等, (2002) "Prodrug and Covalent Linker Strategies for the Solubilization of Dual- Action Antioxidants/Iron Chelators (用于双重作用抗氧化剂/铁螯合剂增溶的前药和共价连接策略)", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12, 3297-3300, 3299)和(Feng, Xia 等, (2002) "Synthesis and Evaluation of Water-Soluble Paclitaxel Prodrugs (水溶性紫杉醇前药的合成及评价)", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12, 3301- 3303, 3302)。

总观 PEG 药物, 20 年来制备的低分子量(<20,000) PEG 小分子药物轭合物还没有成为临床批准产品(Greenwald, R.B. (2001) "PEG drugs: an overview (PEG 药物概述)", Journal of Controlled Release, 74, pp 159-171, 摘要)。事实上, 只有少数小有机分子抗癌药已经通过固定键轭合至 PEG 上, 但那些也没有成为临床上更优的水溶性药物-聚合物轭合物(Greenwald, R. B.等, (2003) "Effective Drug Delivery by

PEGylated Drug Conjugates (通过 PEG 化药物轭合物有效释放药物)",
Advanced Drug Delivery Reviews, 55, pp 217-250, 220)。使用 PEG-
CPT, 证明了 PEG-CPT 40,000、20,000 和 8,000 结构的致死率分别为
约 50%、10%和 0%。显然, 用聚合物 M_w 5000 轭合药物得到快速排
5 泄的药物类型, 该类药物在体内的作用小或无作用(同上, 225)。并不是
说连接 PEG 40,000 加上它在肿瘤中积聚的能力便会自动使药物具
有更好的抗肿瘤活性(同上, 235)。

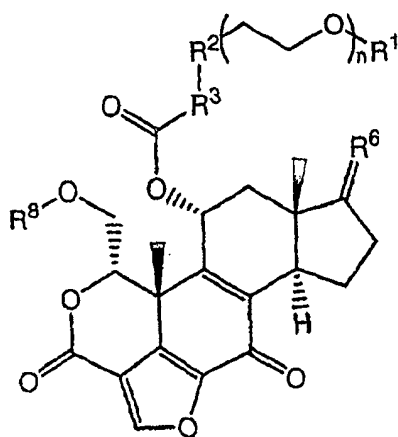
在本发明中, 为了以水溶性形式自结合渥曼青霉素衍生物的水
溶性聚合物释放渥曼青霉素衍生物, 所得到聚合物-药物轭合物为可
10 溶的。将水溶性聚合物如 PEG 结合到本发明水不溶性分子或水溶性
差的分子上使其变成水溶性分子, 并降低它们的毒性。

发明概述

本发明涉及利用水溶性聚合物为药物载体的可溶性渥曼青霉素
15 衍生物。

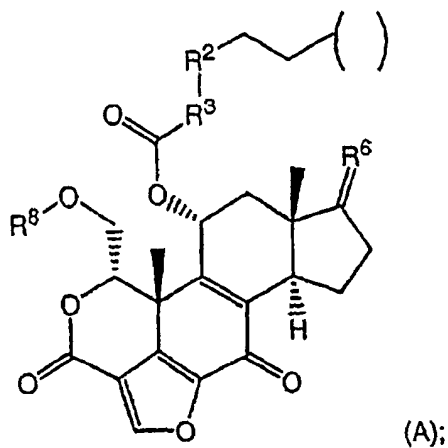
本发明提供式 P-X-D 的水溶性药物-聚合物轭合物, 其中 P 为水
溶性聚合物; D 为渥曼青霉素衍生物; X 为水溶性聚合物与渥曼青霉
素衍生物之间的共价键。

在本发明的一个实施方案中, 利用水溶性聚合物的渥曼青霉素
20 衍生物具有式 I 结构



其中:

R^1 为烷基或式(A)药物-聚合物轭合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

5 R^6 为 $=O$ 或 OR^7 ;

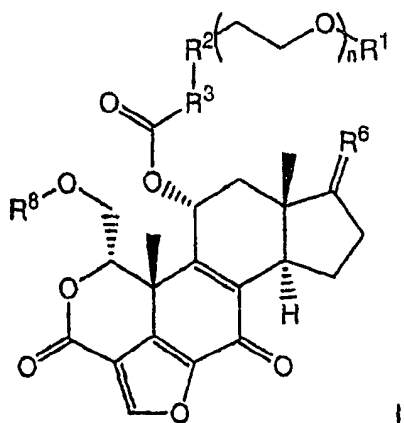
R^7 为 H、 COR^9 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 $-CH_2Ar$; 且

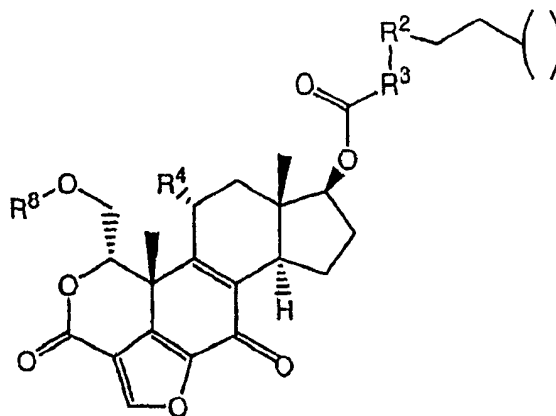
n 为 1-1000。

10 在本发明的一个实施方案中, 利用水溶性聚合物的渥曼青霉素衍生物具有式 I 结构



其中:

R^1 为烷基或式(B)药物-聚合物轭合物



(B);

R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

5 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

R^6 为=O 或 OR⁷;

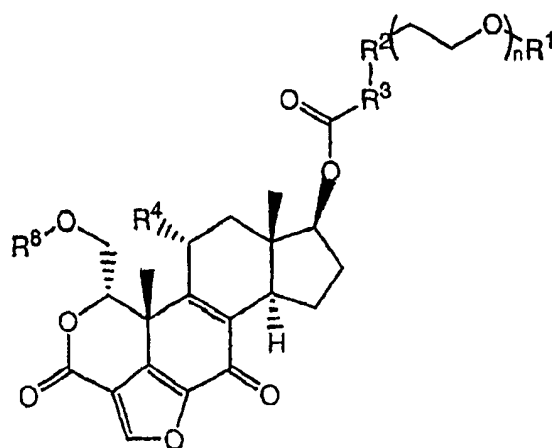
R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar; 且

10 n 为 1-1000。

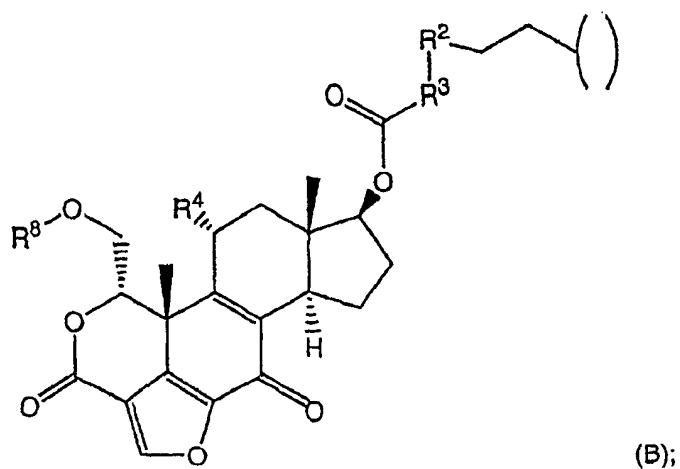
在本发明的另一个实施方案中, 利用水溶性聚合物的渥曼青霉素衍生物具有式 II 结构



II

其中:

R^1 为烷基或式(B)水溶性药物-聚合物轭合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

5 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

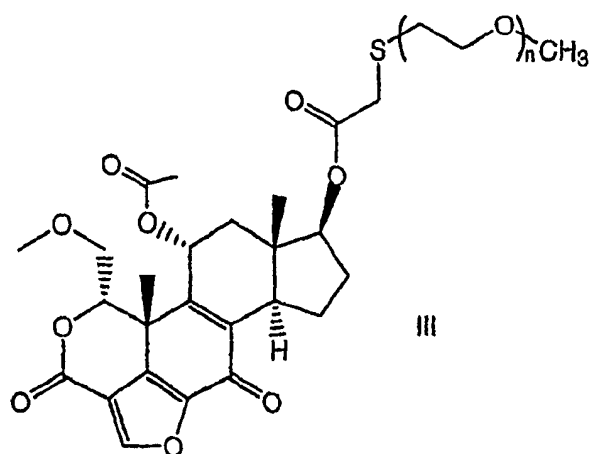
R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 -CH₂Ar; 且

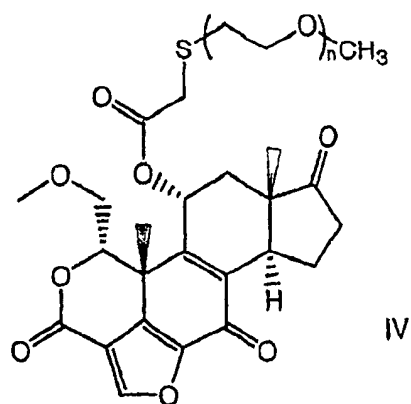
n 为 1-1000。

10 在本发明的一个实施方案中, 利用水溶性聚合物的渥曼青霉素衍生物具有式 III 结构:



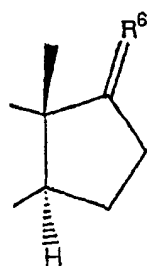
n 为 1-1000。

在本发明的一个实施方案中，利用水溶性聚合物的渥曼青霉素衍生物具有式 IV 结构：

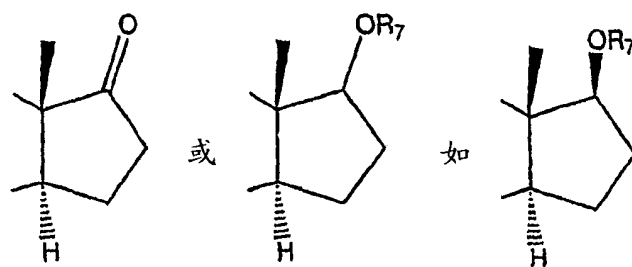


其中 $n=1-1000$ 。

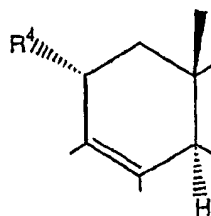
5 在本文中使用时，下面部分



表示结构：

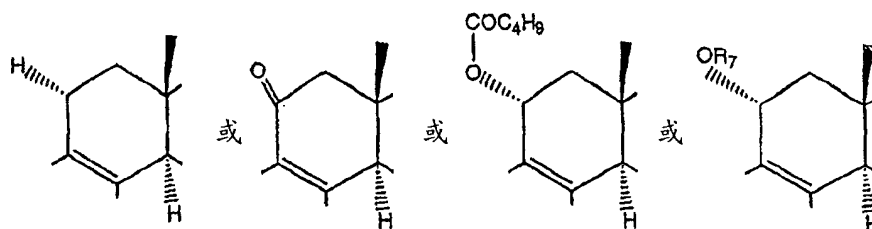


在本文中使用时，下面部分



10

表示结构:



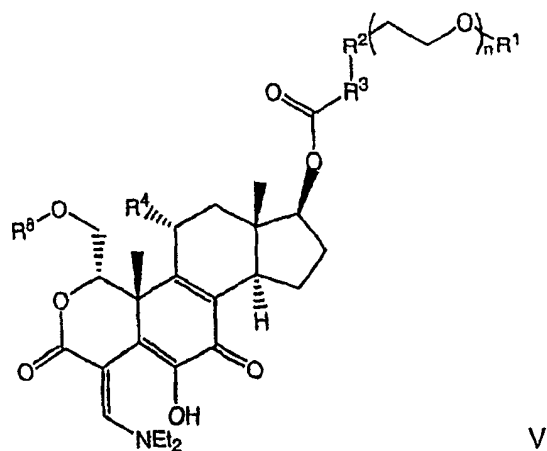
在本发明另一个实施方案中,公开了一种制备式(III)水溶性药物-聚合物轭合物的方法,该方法包括:

- 5 a). 将溶剂加至 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素以得到溶液;
- b). 向该溶液中加入叔胺或碳酸氢钠;
- c). 向步骤(b)的溶液加 mPEG-巯基 5000;
- d). 搅拌步骤(c)的溶液 30 分钟;
- 10 e). 向所搅拌的溶液中加入醚;
- f). 收集固体; 和
- g). 用醚洗涤所收集的固体得到聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物。

在本发明另一个实施方案中,公开了一种制备式(IV)水溶性药物-聚合物轭合物的方法,该方法包括:

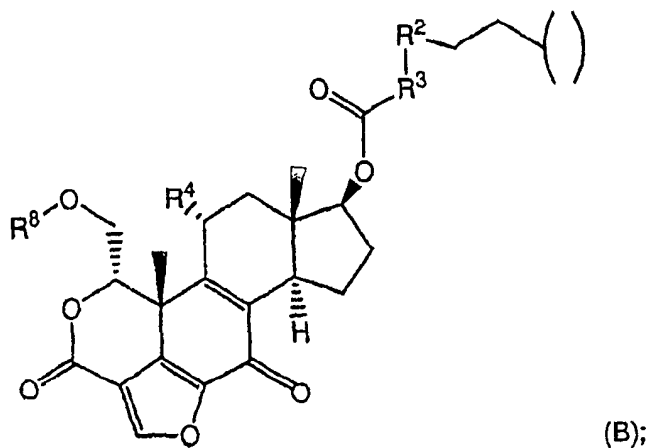
- 15 a) 向 11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素中加入溶剂得到溶液;
- b) 向该溶液加入叔胺或碳酸氢钠;
- c) 向步骤(b)的溶液加 mPEG-巯基 5000;
- d) 搅拌步骤(c)的溶液 30 分钟;
- 20 e) 向所搅拌的溶液加入醚;
- f) 收集固体; 和
- g) 用醚洗涤所收集的固体得到聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物。

在本发明的一个实施方案中，水溶性药物-聚合物轭合物具有式 V 结构：



其中：

5 R^1 为烷基或单一非重复的式(B)药物-聚合物轭合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

10 R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

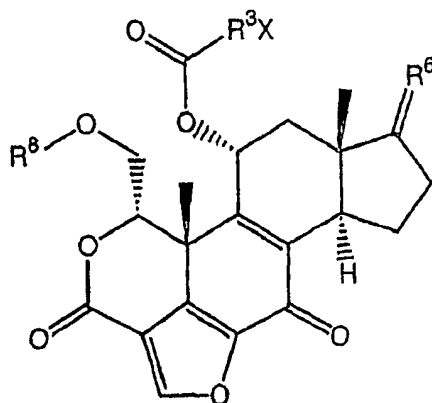
R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 -CH₂Ar; 且

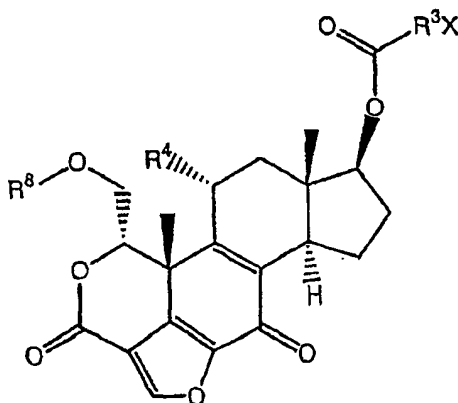
n 为 1-1000。

本发明的另一个实施方案包括一种用于制备式(V)化合物的方法，该方法包括向式(I、II、III 和 IV)化合物中加胺，得到式(V)化合物或相应的开环结构。在一个优选的实施方案中，胺为二乙胺。

5 本发明也提供一种用于制备上述化合物的方法，该方法包括将下式化合物



或下式化合物

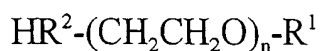


其中：

- 10 R^3 为烷基、环烷基或芳基；
 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷；
 R^6 为=O 或 OR⁷；
 R^7 为 H、COR⁹ 或烷基；
 R^8 为烷基或 H；
15 R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar；且
n 为 1-1000，

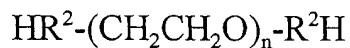
且 X 为卤素, 如 Br、Cl 或 I,

与下式化合物



或下式化合物

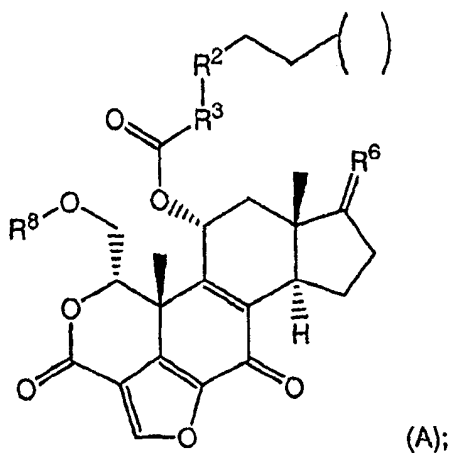
5



其中 R^2 为 O、NH 或 S;

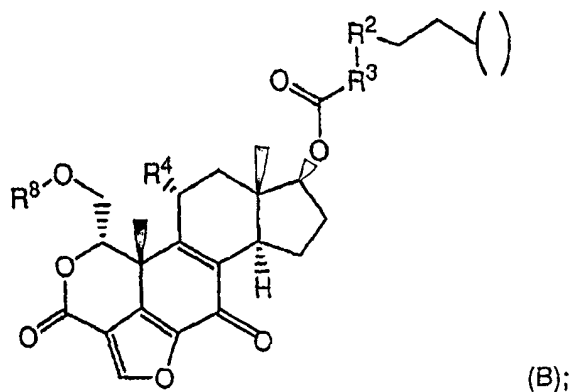
n 为 1-1000 且

R^1 为烷基或式(A)药物-聚合物轭合物



10

或式(B)药物-聚合物轭合物



和 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^8 和 n 定义同上,

反应得到需要的轭合物。

本发明还提供一种用于制备式 P-X-D 化合物或聚合物的方法:

15

其中:

P 为水溶性聚合物;

D 为渥曼青霉素衍生物；且

X 为水溶性聚合物和渥曼青霉素衍生物之间的共价键。

该方法包括使式 P-XH 聚合物(其中 P 和 X 定义同上)与式 DX 化合物(其中 X 为卤素，如 Br、Cl 或 I)反应得到需要的产物。

- 5 本发明的轭合物优选水溶性轭合物，更优选水溶性药物-聚合物轭合物。

附图简述

10 图 1 表示聚乙二醇化-17-羟基-渥曼青霉素相对于未聚乙二醇化-17-羟基-渥曼青霉素的抗肿瘤活性。将脑瘤的肿瘤细胞系 PTEN (-/-) U87MG 神经胶质瘤植入小鼠中。小鼠于第 0-4 天静脉注射给药。该图表示在溶媒；15 mg/kg、5 mg/kg、1.5 mg/kg、0.5 mg/kg 聚乙二醇化-17-羟基-渥曼青霉素；1 mg/kg 和 0.5 mg/kg 未聚乙二醇化-17-羟基-渥曼青霉素剂量(x-轴)时，相关的肿瘤生长情况(y-轴)(1、1.5、2、2.5、
15 3、3.5 和 4mm)。

 图 2 表示渥曼青霉素衍生物在体内抗 PTEN (-/-) U87MG 神经胶质瘤的抗肿瘤活性。在该实验中，于第 0 天开始观察在裸小鼠中皮下异种移植的 U87MG 神经胶质瘤生长，并于第 0-4 天以 0.15、0.5、1.5、5 和 15 mg/kg/剂量给予本发明的渥曼青霉素衍生物。如图 2 所示，
20 最小有效剂量(MED)为 0.5mg/kg/剂量(MED)，该剂量在第 7 天达到 50%抑制肿瘤生长。显然进一步增加抗癌活性为剂量依赖性。该实验中的最大耐受剂量(MTD)为 15 mg/kg/剂量。

 图 3 表示在 U87MG 神经胶质瘤模型中渥曼青霉素衍生物与紫杉醇抗肿瘤活性的联合。在图 3 所示的 U87MG 神经胶质瘤研究中，
25 于第 0-4 天静脉注射给予本发明渥曼青霉素衍生物。于第 0 天和第 7 天腹膜内给予紫杉醇。按照每周一次的给药方案，紫杉醇的 MTD 为 60 mg/kg/剂量。将小鼠用 1mg/kg/剂量的本发明渥曼青霉素衍生物、30 和 60mg/kg/剂量的紫杉醇治疗，或用 1mg/kg/剂量的本发明渥曼青

霉素衍生物与 30mg/kg/剂量的紫杉醇联合治疗。单独的本发明渥曼青霉素衍生物活性与 30mg/kg/剂量的紫杉醇活性相同。两种药物联合使用比单用任一种更有效。联合药物组的肿瘤抑制效果与用 60 mg/kg/剂量的紫杉醇所达到的肿瘤抑制效果相似。

5 图 4 表示使用 NSCLC A549 模型的两个实验的合并数据。于第 0-4 天、14-18 天静脉注射给予渥曼青霉素衍生物。于第 0、7 和 14 天腹腔内给予紫杉醇。将小鼠用 5mg/kg/剂量的渥曼青霉素衍生物、30mg/kg/剂量的紫杉醇治疗，或用两种药物联合治疗。单用 5mg/kg/剂量的渥曼青霉素衍生物的活性与 30mg/kg/剂量的紫杉醇相似。显然，联合治疗产生了最令人关注的抗肿瘤活性，获得了肿瘤生长的完全停止。

10 图 5 表示在 U87MG 神经胶质瘤模型中与有效 TOR 抑制剂聚乙二醇化-雷帕霉素(Peg-rapa)联合使用时抗肿瘤活性的评价。于第 0-4 天，单独或联合静脉注射给予 1mg/kg/剂量的渥曼青霉素衍生物和 0.1mg/kg/剂量的 Peg-rapa。图 5 中数据显示，联合治疗明显比单独任一种药物产生了更好的抗肿瘤活性。

发明详述

20 下面的实验旨在帮助理解本发明，无意且不应以任何方式视为限定权利要求书描述的本发明。

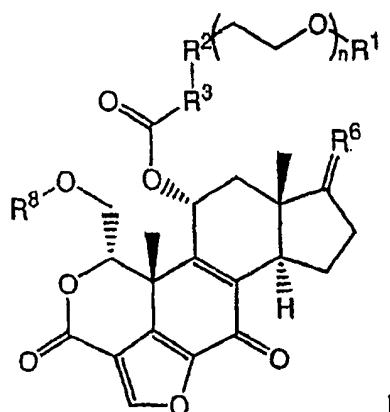
本发明涉及利用水溶性聚合物的渥曼青霉素衍生物的发现。

25 本发明涉及水溶性药物聚合物。具有聚乙二醇(PEG)结构的水溶性聚合物为具有多种分子量的线性或支化中性聚合物，溶于水 and 大多数有机溶剂。分子量小于 1000 的 PEGs 为粘性无色液体，更高分子量的 PEGs 为蜡状白色胶体。该固体的熔点与分子量成比例，在 67 °C 达到坪值。分子量从几百到大约 80,000。可以用于提高药物释放能力的水溶性聚合物实例包括如聚乙二醇(PEG)、PEG 甲醚、PEG-嵌段-PEG-嵌段-PEG、聚乙烯醇、聚羟乙基(polyhydroxyethyl)、聚甲基

丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸、聚乙基噁唑啉、聚乙烯吡咯烷酮和多糖。在本发明的一个优选实施方案中，含 1-1000 个单体的水溶性聚合物连接到渥曼青霉素衍生物，更优选的单体数量为 250-400，最优选的数量为 50-150。连接的水溶性聚合物分子量范围可为约 400 至约 80,000。在一个优选的实施方案中，分子量为约 1000 至约 8000 的范围，在最优选的实施方案中，分子量为约 4000 至约 6000 的范围。

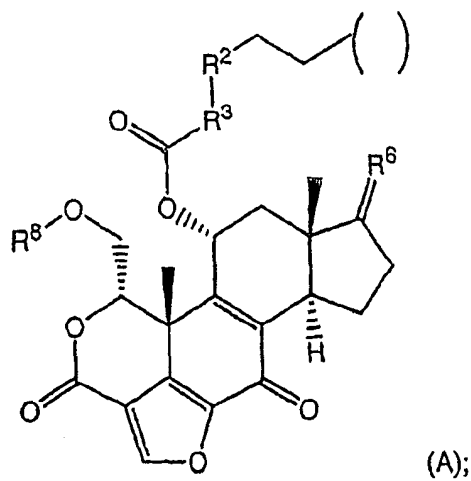
水溶性聚合物通过共价键连接至渥曼青霉素衍生物。这种共价键可为酯、二酯、尿烷、酰胺、肿胺或叔胺、醚或任何能使水不溶性或水溶性差的药物以可溶形式释放进入哺乳动物体内的共价键。

本发明的渥曼青霉素衍生物包括具有如下结构的水溶性药物-聚合物轭合物：



其中：

R^1 为烷基或式(A)的药物-聚合物轭合物



R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

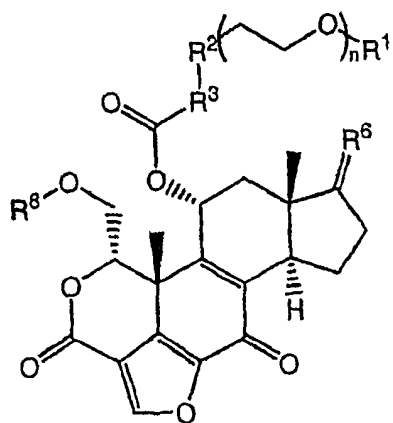
5 R^6 为=O 或 OR^7 ;

R^7 为 H、 COR^9 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 $-CH_2Ar$; 且

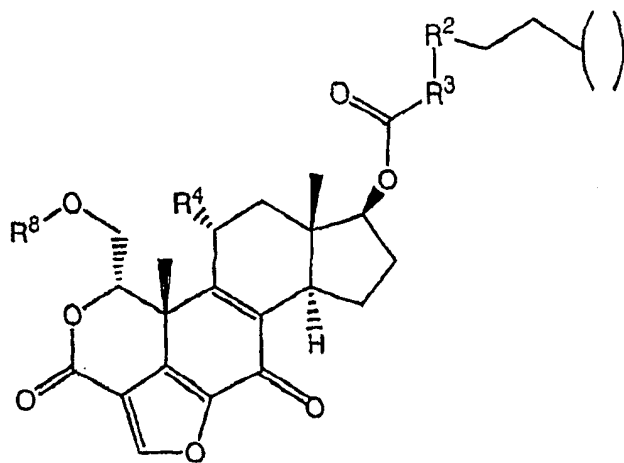
n 为 1-1000。



10

其中:

R^1 为烷基或式(B)的药物-聚合物轭合物



(B);

R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

5 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

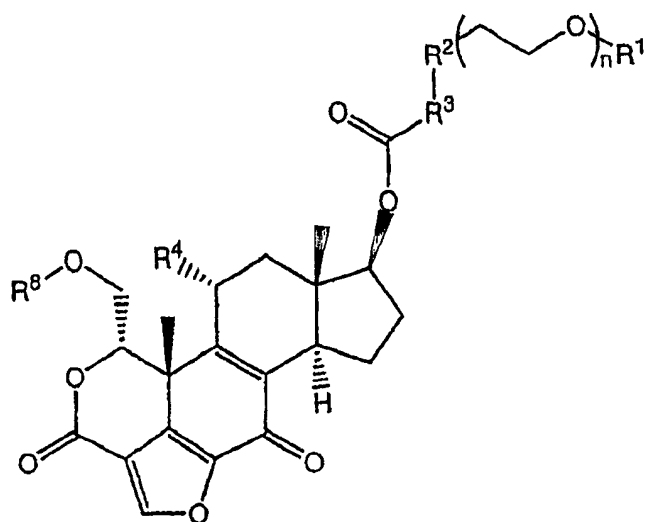
R^6 为=O 或 OR⁷;

R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或-CH₂Ar; 且

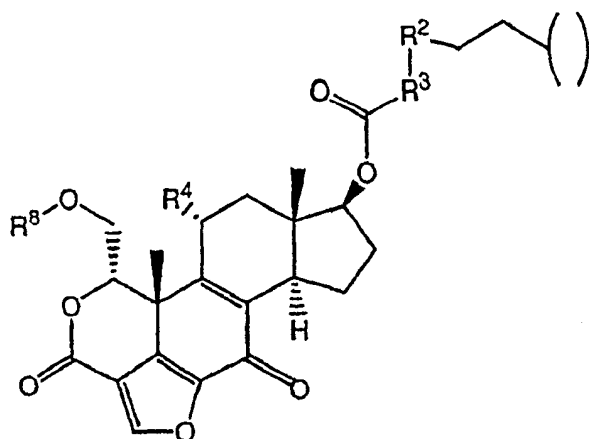
10 n 为 1-1000。



II

其中:

R^1 为烷基或式(B)的药物-聚合物轭合物



(B);

R^2 为 O、NH 或 S;

R^3 为烷基、环烷基或芳基;

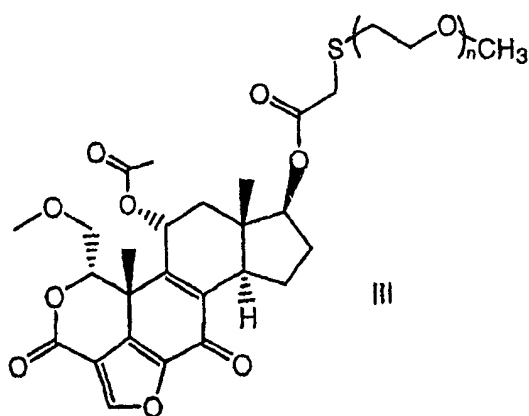
5 R^4 为 H、=O、-O-COC₄H₉ 或 OR⁷;

R^7 为 H、COR⁹ 或烷基;

R^8 为烷基或 H;

R^9 为烷基、H、芳基或 -CH₂Ar; 且

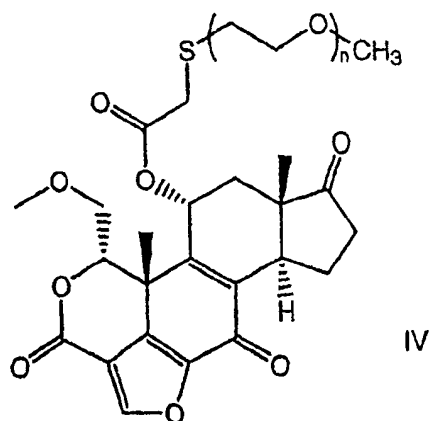
n 为 1-1000。



III

10

n 为 1-1000。



其中 $n=1-1000$ 。

本发明中，术语“烷基”包括直链和支链烷基部分且可以是被取代的或未被取代的，优选 1-8 个碳原子。术语“环烷基”指具有 3-12 个碳原子的脂环烃基并包括但不限于：环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或降冰片基(norbornyl)。

本发明中，术语“芳基”或“Ar”指芳烃部分且可以是被取代的或未被取代的。芳基可以选自但不限于苯基。

本发明中，“酰基”指式 $-(C=O)-$ 烷基或 $-(C=O)-$ 全氟烷基的基团，其中烷基或全氟烷基含 1-7 个碳原子；优选的实例包括但不限于乙酰基、丙酰基、丁酰基、三氟乙酰基。

本发明中，“溶剂”为可溶解 PEGSH 的极性化合物，包括如二噁烷、乙腈、四氢呋喃(THF)或二甲基甲酰胺(DMF)。

本发明中，“叔胺”包括如 *N,N*-二异丙基乙胺、三乙胺、三丁基胺。

本发明中，不是叔胺的胺可包括但不限于烷基胺、杂芳基胺、芳胺、吡啶、哌嗪、二-氨基丙烷、氨基酸或任何伯胺或仲胺。

R^1 优选甲基。 R^2 优选 S。 R^3 优选 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 。 R^4 优选 $-\text{OR}^7$ 。 R^6 优选 $=\text{O}$ 。 R^7 优选 CO^9 。 R^8 优选甲基。 R^9 优选甲基。本发明的一个实施方案包含化合物：其中 R^1 为甲基； R^2 为 S； R^3 为 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ； R^4 为 $-\text{OR}^7$ ； R^7 为 $-\text{COR}^9$ ； R^8 为甲基且 R^9 为甲基。本发明的再一个实施方案包含化合物：其中 R^1 为甲基； R^2 为 S； R^3 为 $-\text{CH}_2-$ 或

$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$; R^6 为 O 且 R^8 为甲基。 n 为 1-1000, 优选 50-400, 包括 50-150 和 250-400。

在本发明的一个实施方案中, 取代芳基可任选被选自但不限于以下的取代基单、二、三或四取代: 烷基、酰基、烷氧羰基、烷氧基、
5 烷氧烷基、烷氧基烷氧基、氰基、卤素、羟基、硝基、三氟甲基、三氟甲氧基、三氟丙基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、二烷基氨基烷基、羟烷基、烷氧基烷基、烷硫基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}$ 烷基、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{烷基})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 CO_2NH_2 、 CO_2NH 烷基和 $-\text{CO}_2\text{N}(\text{烷基})_2$ 。

在另一个实施方案中, 本发明提供一种用于在哺乳动物中治疗
10 或预防介导的病症或疾病的方法。相应地, 本发明为哺乳动物提供一种药用组合物, 该组合物包含联合或组合应用的本发明水溶性药物-聚合物轭合物与药学上可接受的载体。本发明水溶性药物-聚合物轭合物可以单独给药或与其它治疗有效化合物或疗法联合给药, 其它治疗有效化合物或疗法用于治疗或预防哺乳动物中介导的病症或
15 疾病。

当水溶性药物-聚合物轭合物在哺乳动物中治疗或抑制介导的病症或疾病时, 优选以口服或皮下途径提供。水溶性药物-聚合物轭合物可以下列途径提供: 损害内、腹膜内、肌内或静脉内注射; 输注; 脂质体调节释药; 局部、鼻内、肛门、阴道、舌下、尿道(urethral)、
20 透皮、鞘内、经眼或经耳释药。为了在提供本发明水溶性药物-聚合物轭合物时获得一致, 优选本发明水溶性药物-聚合物轭合物为单位剂量形式。合适的单位剂量形式包括片剂、胶囊剂和小袋装或小瓶装粉剂。这些单位剂量形式可含 0.1-100mg 轭合至本发明水溶性药物-聚合物的渥曼青霉素衍生物, 优选 2-50mg。更优选的单位剂型含 5-
25 25mg 结合至本发明水溶性药物-聚合物的渥曼青霉素衍生物。本发明水溶性药物-聚合物轭合物可以约 10-1000mg/kg 的剂量范围经口给药, 或优选 0.5-10mg/kg 的剂量范围。这类水溶性药物-聚合物轭合物可以按每天 1-6 次给药, 每天 1-4 次更常用。本领域技术人员已知

其有效量；它也取决于水溶性药物-聚合物轭合物的形式。本领域技术人员通常可进行经验活性测试以测定水溶性药物-聚合物轭合物在生物测定中的生物活性，从而确定给药剂量。

5 本发明水溶性药物-聚合物轭合物可以与常规赋形剂一起配制，如填充剂、崩解剂、粘合剂、滑润剂、调味剂、着色剂或载体。载体可以是例如稀释剂、气雾剂、局部用载体、水溶液、非水溶液或固体载体。载体可以为聚合物或牙膏。本发明中的载体包括药学上可接受的任何标准载体，如磷酸盐缓冲盐水溶液、醋酸盐缓冲盐水溶液、水、乳状液如油/水乳状液或甘油三酸酯乳状液、各种润湿剂、
10 片剂、包衣片剂和胶囊剂。

当经口或局部提供时，这种水溶性药物-聚合物轭合物将在不同载体中释放来提供给患者。典型地，这类载体包含赋形剂如淀粉、乳、糖、某类粘土、明胶、硬脂酸、滑石粉、植物脂肪或油、胶或二醇。具体所需载体根据理想的释药方法选择，例如，磷酸盐缓冲
15 盐水溶液(PBS)可用于静脉内或全身释药，植物脂肪、乳膏、油膏、软膏或凝胶可用于局部释药。

本发明水溶性药物-聚合物轭合物可与合适的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、助剂和/或载体一起释药，用于治疗或预防哺乳动物中介导的病症或疾病。这些组合物为液体或者冻干制剂或其它干燥制剂，包括各种缓冲物(如 Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释剂、防止表面吸收的添加剂如白蛋白或明胶、清洁剂(如
20 TWEEN 20、TWEEN 80、PLURONIC F68、胆汁酸盐)、增溶剂(如甘油、聚乙烯甘油)、抗氧化剂(如 BHA 和 BHT、抗坏血酸、偏硫酸氢钠)、防腐剂(如硫汞撒、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、增量剂或张力调节剂(如乳糖、甘露醇)、聚合物的共价连接物如聚乙二醇、金属离子络合物，或水溶性药物-聚合物轭合物结合到水凝胶或脂质体、微乳、胶束、单层囊或多层囊、红细胞影或原生质球的粒状制剂中
25 或上。这些组合物影响水溶性药物-聚合物轭合物或组合物的物理状

态、溶解性、稳定性、体内释放速度和体内清除速率。组合物的选择将取决于能治疗或抑制哺乳动物中介导的病症或疾病的水溶性药物-聚合物轭合物的物理和化学性质。

5 本发明水溶性药物-聚合物轭合物可以通过胶囊剂局部释药，使水溶性药物-聚合物轭合物于一段时间内缓释。控释或缓释的组合物包括亲脂性贮库(如脂肪酸、蜡、油)制剂。

10 本发明中，哺乳动物中介导的病症或疾病包括表达 PI 3 激酶和/或 TOR 激酶的任何病症，其表达水平比健康哺乳动物中发现的表达水平更高。本发明水溶性药物-聚合物轭合物用作 PI 3 激酶和 TOR 激酶的抑制剂。PI 3 激酶和 TOR 激酶抑制剂有效治疗或抑制哺乳动物中介导的病症或疾病有缺血性心脏病、再狭窄、炎症、血小板凝集、硬化症、呼吸性疾病、HIV、骨吸收疾病、非小细胞肺癌和脑癌。

本发明化合物可以单一化合物提供或与其它化合物联合提供。

15 预期抑制 PI3K 可提高其它药物的治疗活性，这些药物调节生长因子信号、细胞因子应答和细胞周期控制。渥曼青霉素衍生物与 α -干扰素在导致肿瘤缩小及提高 mTOR 激酶的特异性抑制剂聚乙二醇化雷帕霉素抗癌活性方面具协同作用。

20 PI3K 或 AKT 的细胞抑制导致存活率降低，这个重要过程是许多标准癌症疗法抗癌活性的基础。然而，在许多情况中，肿瘤细胞迅速产生化学抗性。化学抗性的一个细胞机制涉及 PI3K/AKT 途径的结构性提高。因此，细胞毒药物与 PI3K 抑制剂的联合治疗可以在最初治疗中进一步增加功效，也可以在复发治疗中帮助恢复化学敏感性。渥曼青霉素衍生物在肺癌和神经胶质瘤中显示出可加强紫杉醇的抗癌功效(见图 3 和图 4)。

25

17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素的制备

1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲基氨基吡啶和渥曼青霉素购自 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)。平均分子量为 5000 的甲

氧基-PEG-SH (mPEG-SH 5000) 购自 Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL)。所有溶剂均为 HPLC 级, 所有其它化学制品为分析级试剂或等同试剂。制备高效液相色谱仪(HPLC)由来自 Rainin Instrument Inc. (Woburn, MA)的两个 Dynamax 溶剂输送系统(SD-1 型)和一个 Dynamax 吸收度检测器(UV-1 型)组成。另外的设备包括来自 Savant Instruments, Inc. (Holbrook, NY)的自动真空离心蒸发浓缩器(Savant, Model AS 160)和来自 Buchi (Flawil, Switzerland)的 BUCHI 旋转蒸发系统(RE 260 和 R 124)。¹H-NMR 图谱用 CDCl₃ 作溶剂在 400 MHz NMR 分光光度计上记录。

HPLC 方法-制备 HPLC 在 Prep Nova-pak HR C18 柱(300 × 19mm, 来自 Waters)上用梯度方法运行, 梯度为最初 5 分钟 80% A 和 20% B, 在 30 分钟内 80% A 和 20% B 至 30% A 和 70% B。缓冲液 A 为 90% 水和 10%乙腈。缓冲液 B 为 10%水和 90%乙腈。流速为 20mL/分钟, UV 波长为 254 nm。收集第 27 分钟的组分(水溶性药物-聚合物轭合物 III)或第 15 分钟的组分(水溶性药物-聚合物轭合物 IV), 用二氯甲烷萃取并进行后处理。从 HPLC 收集的组分用二氯甲烷萃取。将有机层用无水硫酸钠干燥并按如下方法进行后处理。将从 HPLC 收集的组分用二氯甲烷萃取。将有机层用无水硫酸钠干燥。用旋转蒸发系统除去有机溶剂。将残留物转移至小瓶, 在真空离心蒸发浓缩器中干燥过夜。

在氮气下, 将 60 mg 渥曼青霉素(0.14 mmol, 来自 Aldrich)的 12mL 四氢呋喃(THF)溶液于 0℃冰浴中冷却。加入 1M 硼烷的 THF 溶液(134 μl, 0.14mmol, 来自 Aldrich), 于 0℃搅拌该反应混合物 3.5 小时。用 1mL 水将反应猝灭。升温至室温后, 将反应混合物用水稀释并用乙酸乙酯萃取。后处理后得到约 60mg 固体(90%纯的 17-羟基-渥曼青霉素, 由 HPLC 检测)。将该固体(约 0.126mmol 17-羟基-渥曼青霉素)溶解入 15mL 二氯甲烷中, 与碘乙酸(24mg, 0.13mmol)、二环己基碳二亚胺(DCC)(27mg, 0.13mmol)和 4-*N,N*-二甲基氨基吡啶

(DMAP)(0.1mg, 作为催化剂)反应。将该反应混合物于室温保持 1 小时。后处理后, 得到约 75 mg 粗品(黄色固体)。经制备 HPLC 分离得到纯的 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素。共得到 54 mg 白色固体。 $[M+H]$ 在 m/z 599, $[M+NH_4]$ 在 m/z 616, $[M+H]$ 离子的精确质量: 599.0758 Da, $C_{25}H_{28}O_9I$ 的计算质量: 599.0772 Da。

1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0.94 (s, 3H), 1.54 (dd, $J=12.16$, 10.06, 1H), 1.69 (m, 1H), 1.69 (m, 3H), 1.78 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.31 (m, 1H), 2.56 (dd, $J=12.16$, 7.36, 1H), 2.63 (ddd, $J=2.7$, 1H), 2.85 (ddd, $J=20.12$, 9.91, 2.7, 1H), 2.99 (dd, $J=11.11$, 7.21, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.46 (dd, $J=11.11$, 1.8, 1H), 3.69 (d, $J=10.6$, 1H), 3.72 (d, $J=10.6$, 1H), 4.76 (dd, $J=7.21$, 1.8, 1H), 4.87 (dd, $J=7.51$, 9.46, 1H), 6.10 (ddd, $J=10.06$, 7.36, 3.0, 1H), 8.23 (s, 1H). ^{13}C -NMR δ -5.62, 12.79, 21.14, 24.65, 26.58, 27.04, 40.11, 40.72, 44.07, 44.99, 59.44, 72.90, 88.88, 114.25, 141.11, 142.72, 144.93, 148.68, 149.84, 157.66, 168.94, 169.54, 172.77.

M-PEG-SH 5000 与 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素的轭合物(III)的制备

在氮气下, 将 40mg(0.067mmol)17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素溶解入 15mL 乙腈和 10mL 0.1M 碳酸氢钠中。于 1 小时内加入共 345mg 的 M-PEG-SH-5000(0.069mmol)(分 4 批)。于室温再搅拌 1 小时后, 将反应混合物用二氯甲烷萃取并进行后处理。得到约 320mg 粗品。从 260mg 粗品经制备 HPLC 后得到共 209mg 纯水溶性药物-聚合物轭合物 III。

1H -NMR ($CDCl_3$) δ 0.92 (s, 3H), 1.53 (dd, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.77 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.32 (m, 1H), 2.53 (dd, 1H), 2.63 (s, 1H), 2.85 (overlap, 1H), 2.85 (t, $J=6.56$, 2H), 2.99 (dd, $J=11.03$, 7.3, 1H), 3.2 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.47 (dd, $J=11.03$, 1.79, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.64 (m), 3.7 (s, 2H), 4.76 (dd, $J=7.3$, 1.79, 1H), 4.86 (dd, 1H), 6.15 (s, 1H), 8.24 (s, 1H). ^{13}C -NMR δ 12.85, 21.11, 24.68, 26.48, 27.39, 34.01, 40.19, 40.68, 44.05, 44.81, 59.03, 59.42, 70.3, 70.35, 70.57, 70.88, 71.93, 72.88, 80.69, 88.86, 114.21, 141.19, 142.68, 144.92, 148.63, 149.88, 157.63, 169.58, 170.52, 172.75.

11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素的制备

将 42mg(0.11mmol)11-O-去乙酰基渥曼青霉素(由渥曼青霉素制备, J. Med Chem, 1996, 39, 5021)溶解入 8mL 二氯甲烷中, 与碘乙酸(24mg, 0.13mmol)、DCC(27mg, 0.13mmol)和 DMAP(0.1mg, 作为催
5 化剂)反应。将该反应混合物于室温保持 2 小时。后处理后, 得到约 80mg 粗品(黄色固体)。经制备 HPLC 分离得到纯的 11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素。共得到 41 mg 微黄色固体。[M+H]⁺在 m/z 555, [M+NH₄]⁺在 572, [M+NH₄]⁺离子的精确质量: 572.0783Da, C₂₃H₂₇O₈NI 的计算质量: 572.0775Da。

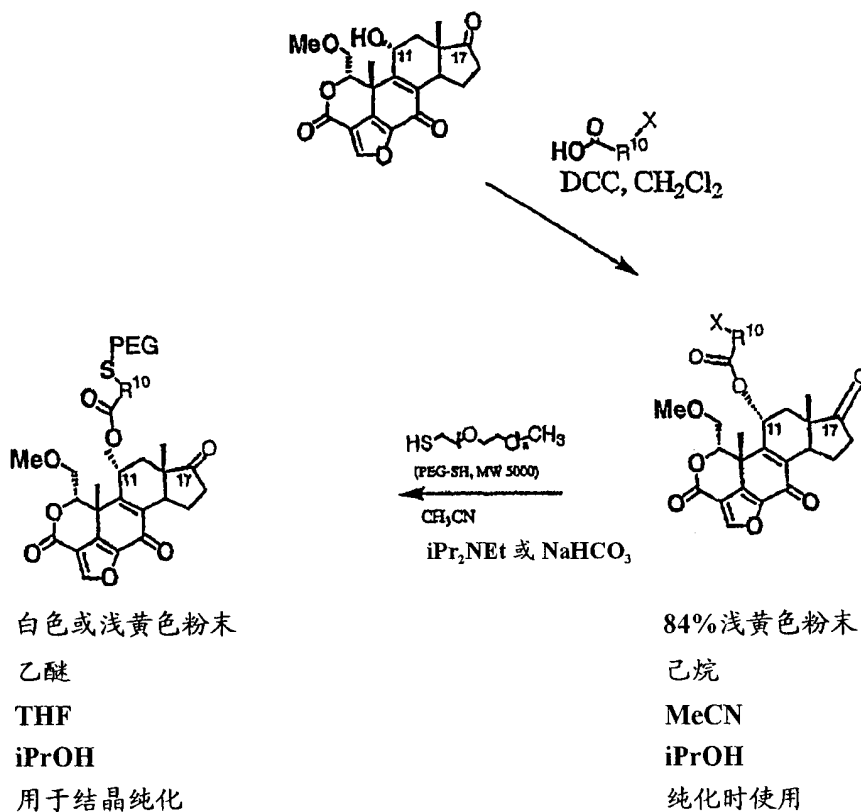
¹H-NMR (CDCl₃) δ 0.97 (s, 3H), 1.66 (dd, J=12.84, 8.80 Hz, 1H), 1.75 (s, 3H), 2.06 (ddd, J=22.25, 12.72, 8.93 Hz, 1H), 2.27 (dt, J=19.68, 8.93 Hz, 1H), 2.65 (dd, J=12.84, 7.58 Hz, 1H), 2.61-3.18 (m, 2H), 2.92 (ddd, J=12.72, 5.99, 2.57 Hz, 1H), 3.01 proR (ddd, J=11.25, 6.72 Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.46 proS (dd, J=11.25, 1.59 Hz, 1H), 3.65 (d, J=9.9 Hz, 1H), 3.89 (d, J=9.9 Hz, 1H), 4.83 (dd, J=6.72, 1.59 Hz, 1H), 6.15 (ddd, J=8.8, 7.58, 2.57 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H). ¹³C-NMR δ -6.68, 14.65, 22.93, 26.48, 35.05, 35.74, 40.87, 44.11, 49.04, 59.69, 71.84, 73.31, 88.54, 114.28, 140.92, 142.74, 144.81, 148.77, 150.09, 157.52, 167.8, 172.48, 215.89.
10

M-PEG-SH 5000 与 11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素的 15 轭合物(IV)的制备

在氮气下, 将 30mg(0.054mmol)11-去乙酰基-11-(1-碘乙酰基)-渥
曼青霉素溶解入 15mL 乙腈和 10mL 0.1M 碳酸氢钠中。于 1 小时内
加入共 300mg M-PEG-SH-5000(0.060mmol)(分 3 批)。于室温再搅拌
1 小时后, 将反应混合物用二氯甲烷萃取并进行后处理。得到约 274 mg
粗品。经制备 HPLC 后得到总量 172 mg 的纯水溶性药物-聚合物轭合
物 IV。

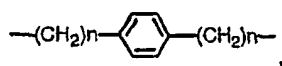
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0.98 (s, 3H), 1.64 (dd, $J=12.88$, 8.87, 1H), 1.74 (s, 3H), 2.06 (ddd, $J=22.25$, 12.72, 9.03, 1H), 2.27 (dd, $J=19.58$, 9.37, 1H), 2.6 (dd, $J=19.58$, 8.53, 1H), 2.63 (dd, $J=12.88$, 7.53, 1H), 2.84 (t, $J=6.36$, 2H), 2.91 (ddd, $J=12.72$, 5.86, 2.68, 1H), 3.01 proR (dd, $J=11.38$, 6.36, 1H), 3.16 (s, 3H), 3.19 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.46 proS (dd, $J=11.38$, 6.36, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.65 (m), 3.7 (s, 2H), 3.34 (d, $J=9.87$, 2H), 4.91 (dd, $J=6.36$, 1.84, 1H), 6.15 (ddd, $J=8.87$, 7.53, 2.68, 1H), 8.27 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ 14.6, 22.93, 26.51, 31.99, 33.64, 35.72, 35.76, 40.82, 44.08, 49.1, 59.02, 59.47, 70.36, 70.55, 70.87, 71.18, 71.92, 73.05, 88.35, 114.35, 140.52, 142.97, 144.74, 149.08, 150.07, 157.68, 169.02, 172.52, 215.97.

PEG 11-羟基渥曼青霉素的合成



5

X 为 Br、Cl 或 I 且 R^{10} 为 $(\text{CH}_2)_n$ 或

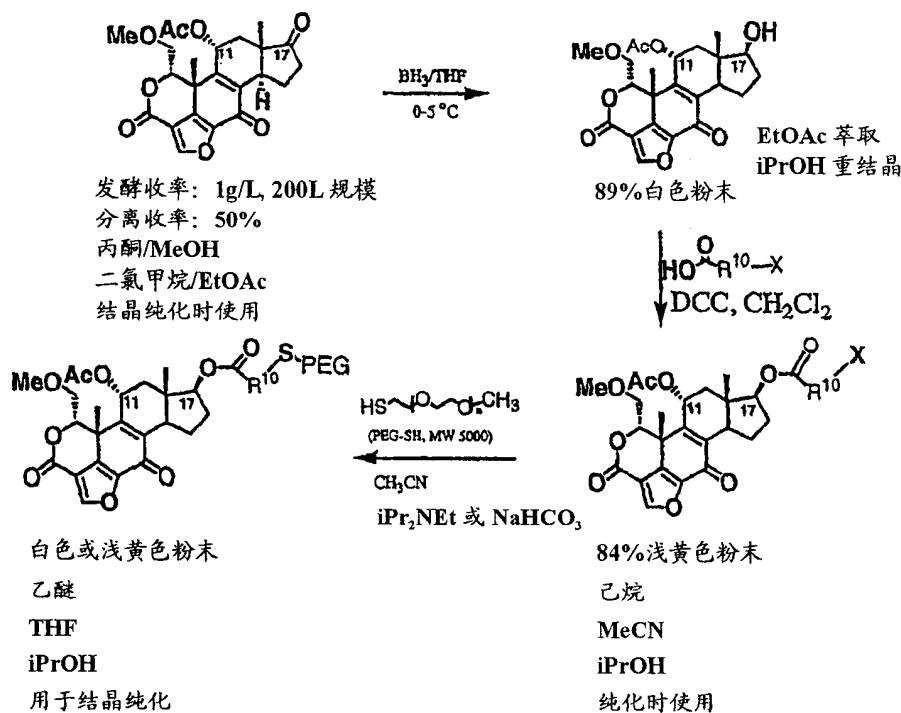
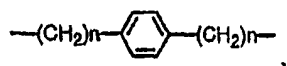


其中 $n=0-5$ 。

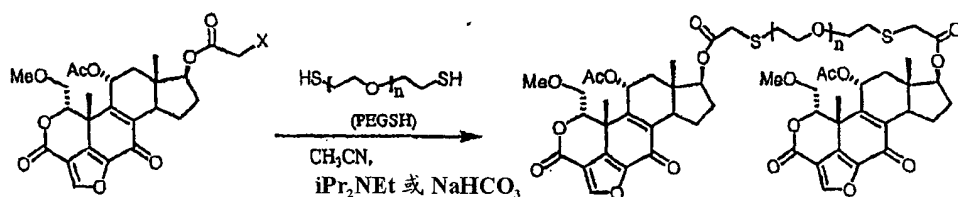
10

PEG 17-羟基渥曼青霉素的合成

(适用于 10-100 g)

X 为 Br、Cl 或 I 且 R^{10} 为 $(\text{CH}_2)_n$ 或其中 $n=0-5$ 。

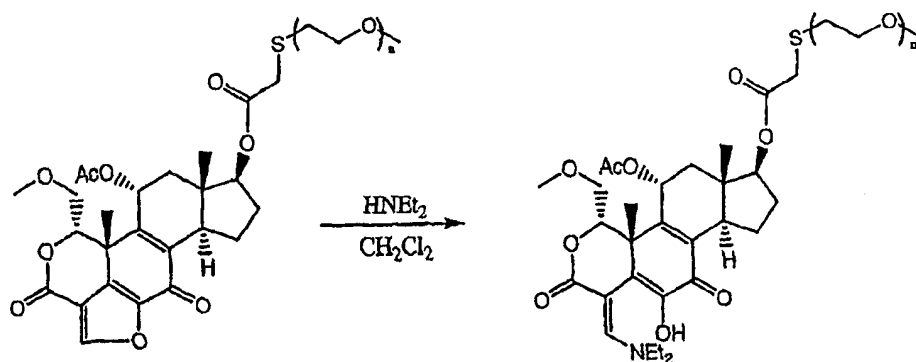
制备 mPEGSH 5000 和 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素的
 衍生物(III) (聚乙二醇化渥曼青霉素衍生物)的另一种方法



向 17-二氢-17-(1-碘乙酰基)-渥曼青霉素(215mg, 0.36 mmol)的乙腈(20 mL)溶液中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(150 mg, 1.16 mmol), 然后加入 PEG-(巯基)₂5000(PEGSH, 780 mg)。然后将混合物搅拌 30 分钟, 加入乙醚(400 mL), 用 Buchner 漏斗收集固体, 用乙醚洗涤, 得到 PEG-二-渥曼青霉素衍生物产物, 为类白色固体。

羧合物 V 的制备

向羧合物 III($n=100-110$)(3 g)的二氯甲烷(12 mL)溶液中加入二乙胺(200 μ L)。18h 后将易挥发物在真空中除去。将所得黄色固体溶解入少量的二氯甲烷。加入乙醚,经过滤收集所得黄色粉末。得到题
5 述化合物,为黄色粉末(2.8 g)。 $n=109$ 时,质谱 m/z 计算值为 5526,实测值 = 5526。



体内异种移植研究

10 在用于实验前,将 Balb/c nu/nu(无胸腺)小鼠按照 Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (实验动物管理与使用认证协会)(AALAACC)标准饲养至少一周。将动物于微型隔离笼中饲养并且只在层流罩超净台中操作。所有食物和水经高压灭菌。用 25-26 号消毒针和注射器将 200 μ L 细胞悬浮液接种至小鼠左肋。将细胞重悬浮
15 在完全生长培养基中,并按每只小鼠 1000 万个细胞给予。当所致肿瘤达到开始实验的合适大小时,将小鼠按相等大小重新编组($n=10$)。一旦试验开始,将小鼠静脉注射给予 0.2 cc 重悬浮在无菌蒸馏水中的水溶性药物-聚合物羧合物 II 和水溶性药物-聚合物羧合物 IV。将渥曼青霉素和其它非聚乙二醇化水溶性药物-聚合物羧合物在小鼠注射
20 前配制成 10mg/ml 的二甲亚砜(DMSO)溶液,并用磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释。按每 2 周重复、每天 5 次的剂量方案给予处理,直到肿瘤达到动物体重的 10%。实验期间按每周两次监测实体瘤的生长情况。肿瘤大小用滑动游标卡尺测定,其质量按 mm 用式 $L \times W$ 除以 2

计算。单位密度将立方 mm 转换成 mg。肿瘤生长不能超过小鼠体重的 15%，达到该程度时将小鼠处死。

在异种移植 U87MG 成胶质细胞瘤模型中的抗癌活性

5

		肿瘤体积(mm ³)							
组	剂量 IV 给药	0 天	第 4 天	第 7 天	第 11 天	第 14 天	第 17 天		
溶媒	(mg/kg) 方案 d 0-4	均值	135.7	283.9	322.6	585.1	1100.2	2122.4	
		se	12.8	28.2	44.9	106.4	215.3	321.8	
水溶性药物-聚合物 羧合物 IV	0.7 mg/kg d 0-4	均值	131.0	185.0	147.9	349.0	707.4	1454.9	
		se	6.6	15.4	15.2	42.0	86.1	210.6	
		t/c	0.97	0.58	0.46	0.60	0.64	0.69	
		P 值	0.3752	0.0010	0.0010	0.0278	0.0548	0.0543	
水溶性药物-聚合物 羧合物 III	0.7 mg/kg d 0-4	均值	137.4	144.0	120.2	300.2	547.0	926.8	
		se	12.6	12.8	11.5	30.6	87.8	162.0	
		t/c	1.01	0.51	0.37	0.51	0.50	0.44	
		P 值	0.4612	0.0002	0.0002	0.0102	0.0151	0.0037	
无水溶性部分的化合物 IV	0.7 mg/kg d 0-4	均值	137.0	155.0	132.6	276.3	529.6	1068.8	
		se	46	52	44	92	177	356	
		t/c	1.01	0.55	0.41	0.47	0.48	0.50	
		P 值	0.4655	0.0009	0.0007	0.0077	0.0167	0.0080	
无水溶性部分的化合物 III	0.7 mg/kg d 0-4	均值	136.3	192.6	198.8	489.0	745.9	1281.7	
		se	6.2	21.8	21.2	68.8	104.9	209.8	
		t/c	1.00	0.68	0.62	0.84	0.68	0.60	
		P 值	0.4816	0.0104	0.0120	0.2296	0.0792	0.0240	

用于渥曼青霉素衍生物的细胞培养和增殖试验

A549(人非小细胞肺癌)和 H-157 细胞系购自 American Type Culture Collection(ATCC) (Rockville, MD)。在 37℃含 5% CO₂ 的培养器中, 将细胞置于含 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI 培养基 1640 中培养。所有细胞培养试剂均购自 Gibco-BRL(Grand Island, NY)。按每孔约 3000 个细胞将细胞接种于 96-孔培养板中。接种 1 天后, 将水溶性药物-聚合物轭合物或溶媒对照物加入细胞中。在处理开始后三天进行增殖实验。至于非放射性细胞增殖试验, 通过测量染料 MTS tatrazolium 染料的代谢转化(通过活细胞)而测定活细胞密度, MTS 试验为本领域技术人员所熟知的细胞增殖试验, 为先前确定的细胞增殖试验。该试验用购自 Promega Corp. (Madison, WI)的试验试剂盒进行。将试验板温育 1-2 小时, 在 96-孔式板阅读器中通过测量在 490nm 的吸收度读出结果。至于胸苷结合实验, 将细胞用[甲基-³H]-胸苷(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)标记 5 小时。然后在玻璃纤维滤膜上收获细胞, 并用 Wallac 1205 β 板液体闪烁计数器计数。各药物的治疗效果以对照细胞生长的百分比计算, 该对照细胞生长得自于相同板中溶媒处理后的细胞生长。

对人肿瘤细胞体外增殖的影响

化合物	胸苷试验 IC ₅₀ (μg/mL)		MTS 试验 IC ₅₀ (μg/mL)	
	H-157	A549	H-157	A549
渥曼青霉素	3.2	2.5	10.0	9.0
水溶性 药物-聚合物 化合物 IV	> 3	> 3	> 3	> 3
水溶性 药物-聚合物 化合物 III	> 3	> 3	> 3	> 3
无水溶性 部分的 化合物 IV	3.0	4.0	2.9	6.2
无水溶性 部分的 化合物 III	9	10	8	10.5

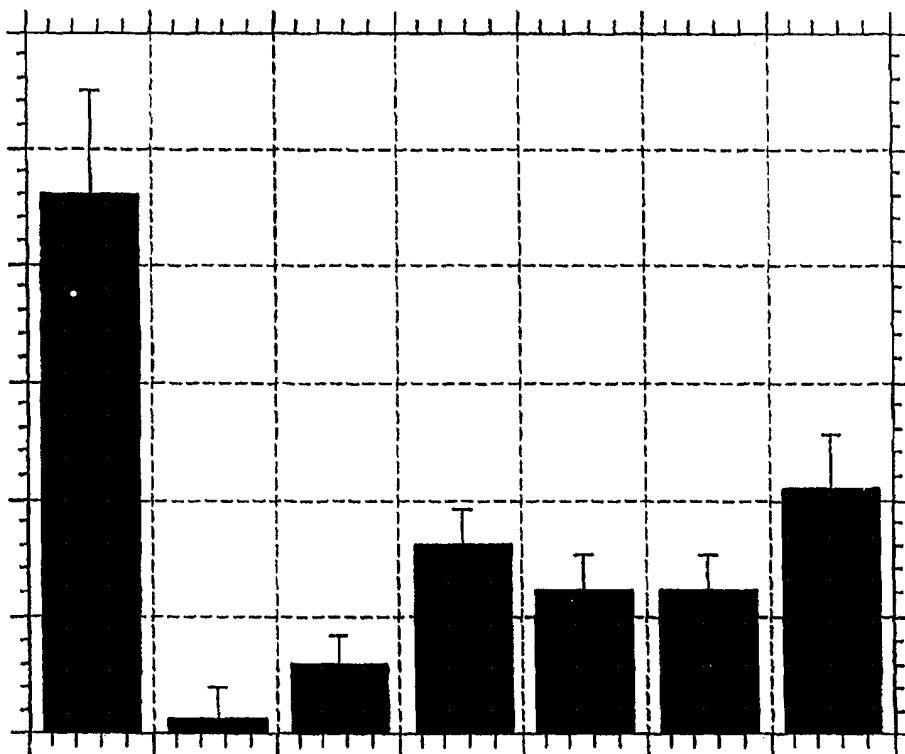


图 1

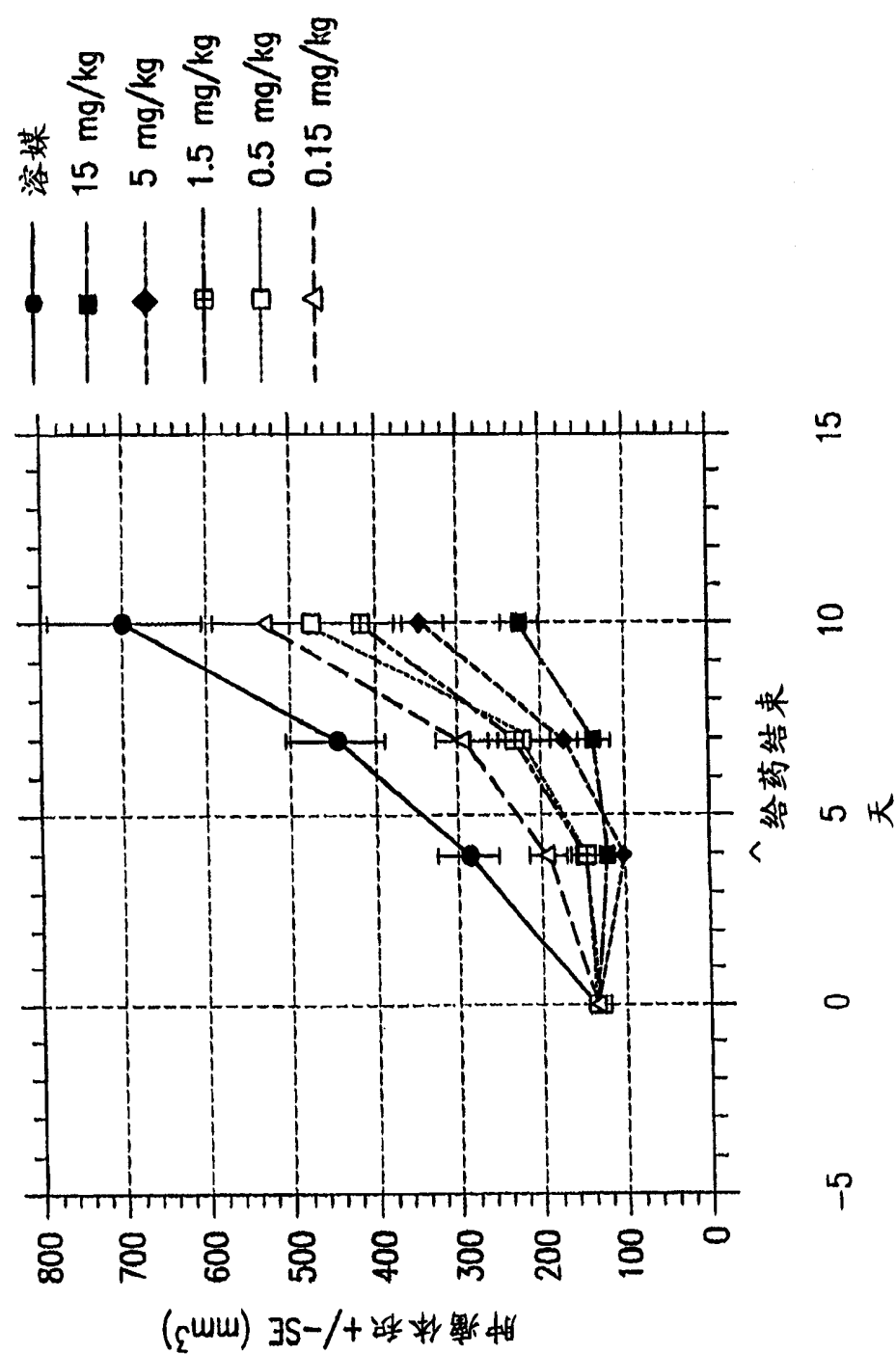


图 2

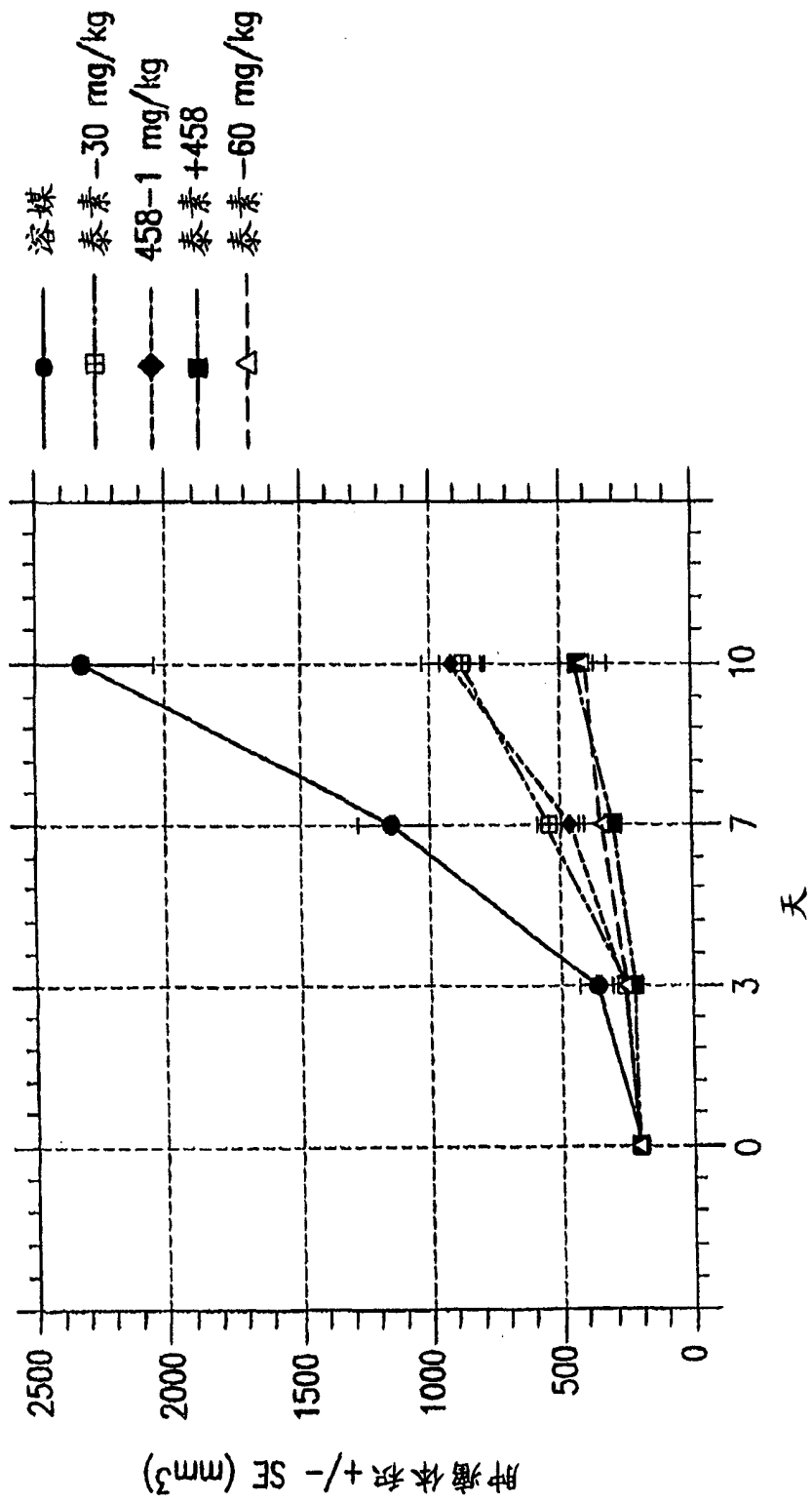


图 3

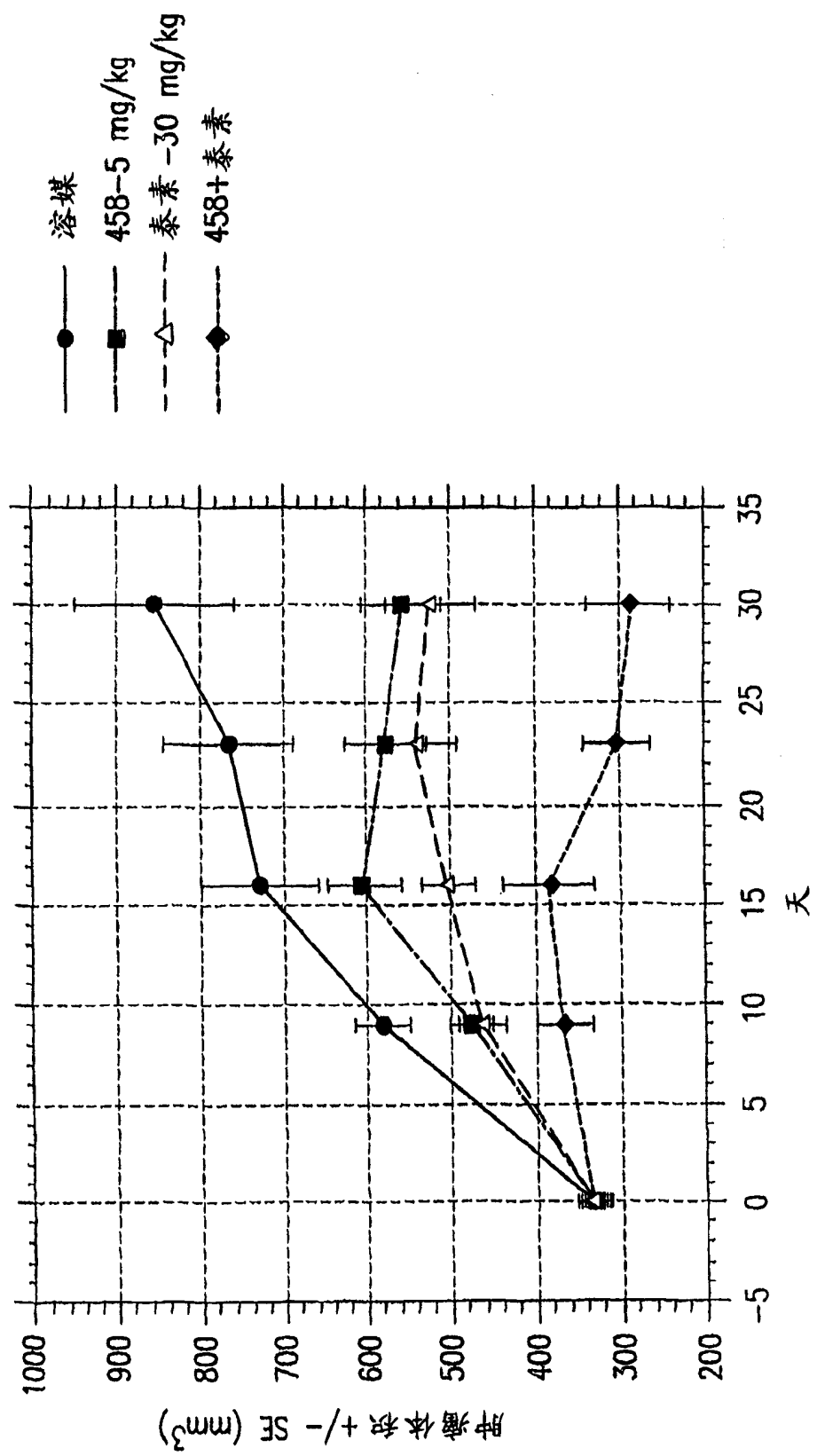


图 4

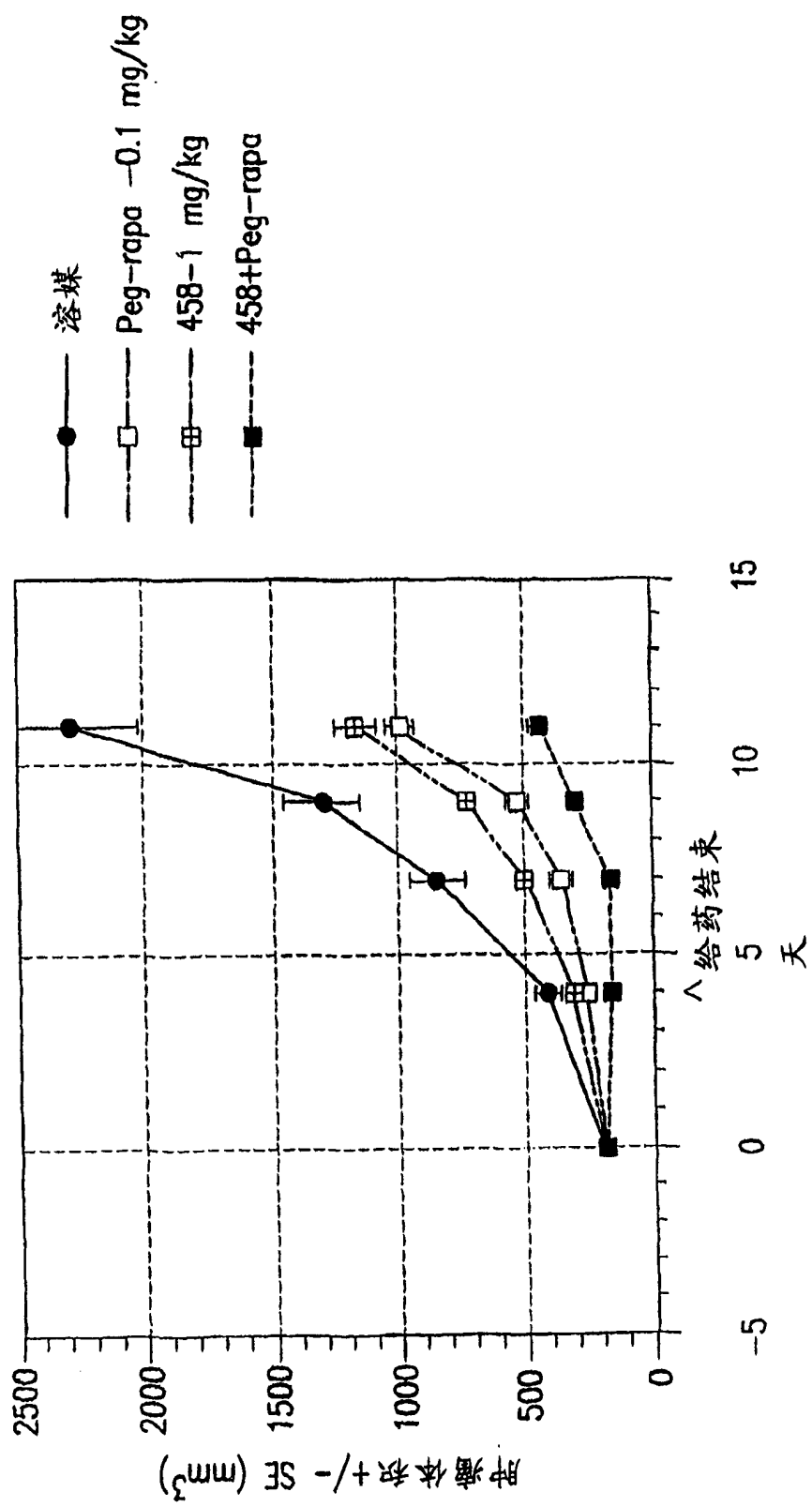


图 5