



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0086308  
 (43) 공개일자 2015년07월27일

- |   |   |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br><i>C07D 235/16</i> (2006.01) <i>A61K 31/4184</i> (2006.01) | (71) 출원인<br>이그나타, 인코포레이티드<br>미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 플린트코트<br>에비뉴 11111   |
| (52) CPC특허분류<br><i>C07D 235/16</i> (2013.01)<br><i>A61K 31/4184</i> (2013.01)       | (72) 발명자<br>바케일, 로저, 피.<br>미국 19355 웨슬레이니아주 멜번 테본샤어 래인 8<br>브라운, 피터, 디.<br>미국 19380 웨슬레이니아주 웨스트 체스터 쇼난도<br>아 래인 908<br>(뒷면에 계속) |
| (21) 출원번호 10-2015-7015682   | (74) 대리인<br>양영준, 김영   |
| (22) 출원일자(국제) 2013년11월12일<br>심사청구일자 없음  |   |
| (85) 번역문제출일자 2015년06월12일  |   |
| (86) 국제출원번호 PCT/US2013/069550   |   |
| (87) 국제공개번호 WO 2014/075035<br>국제공개일자 2014년05월15일                                    |   |
| (30) 우선권주장<br>61/725,213 2012년11월12일 미국(US)<br>61/776,951 2013년03월12일 미국(US)        |   |

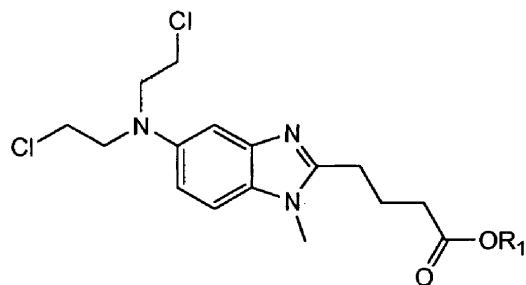
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 벤다무스틴 유도체 및 그의 사용 방법

### (57) 요 약

본 발명은 벤다무스틴 에스테르 및 벤다무스틴 아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태 및 암 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.

<화학식 I>



상기 식에서, (I) R1은 C6-C24알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이고; (II) R2는 C1-C24알킬렌이고, R3은 -COOC1-3알킬이거나; R2-R3은 C1-C24알킬이다.

(72) 발명자

챈, 지안

미국 19382 펜실베이니아주 웨스트 체스터 피켓 웨  
이 631

드레이저, 앤쏘니, 에스.

미국 19372 펜실베이니아주 토론판데일 도랄 코트 16  
라벨, 레이첼, 와이.

미국 19320 펜실베이니아주 코特斯빌 엔. 샌디 힐  
로드 561

맥킨, 로버트, 이.

미국 19425 펜실베이니아주 체스터 스프링스 하운  
드스투쓰 래인 16

파렐, 피유쉬, 알.

미국 19086 펜실베이니아주 월링포드 스코트 래인  
716

로엠멜르, 리니, 씨.

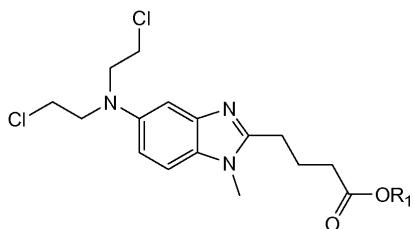
미국 19002 펜실베이니아주 메이플 글렌 풀톤 로드  
1030

---

**명세서****청구범위****청구항 1**

하기 화학식 I의 화합물.

<화학식 I>



상기 식에서,

R<sub>1</sub>은 C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

**청구항 2**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 6**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>10</sub>알킬인 화합물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>12</sub>알킬인 화합물.

**청구항 10**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>14</sub>알킬인 화합물.

**청구항 11**

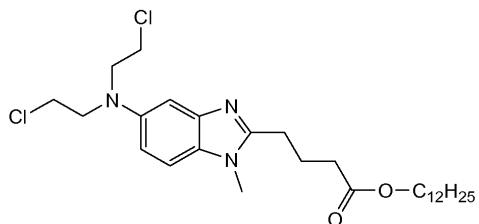
제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>16</sub>알킬인 화합물.

**청구항 12**

제1항에 있어서, R<sub>1</sub>이 C<sub>6</sub>알킬인 화합물.

**청구항 13**

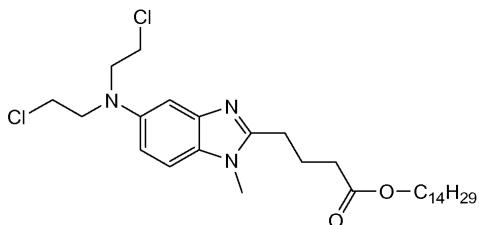
제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이



인 화합물.

**청구항 14**

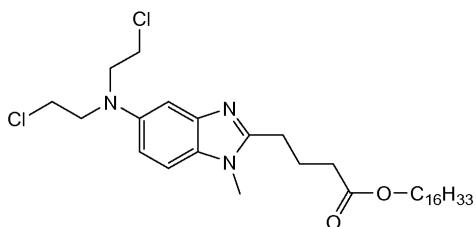
제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이



인 화합물.

**청구항 15**

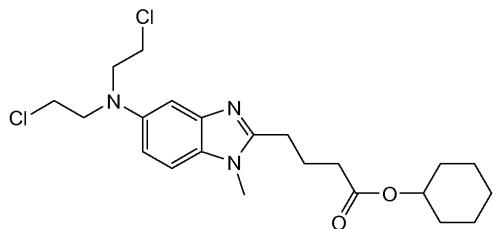
제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이



인 화합물.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물이

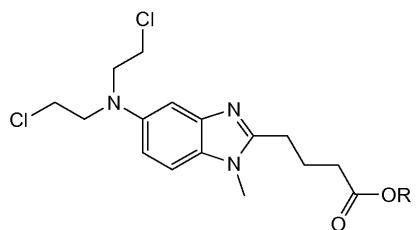


인 화합물.

**청구항 17**

하기 화학식 IA에 따른 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.

<화학식 IA>



상기 식에서,

R은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

**청구항 18**

제17항에 있어서, R이 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 제약 조성물.

**청구항 19**

제17항에 있어서, R이 C<sub>10</sub>알킬인 제약 조성물.

**청구항 20**

제17항에 있어서, R이 C<sub>12</sub>알킬인 제약 조성물.

**청구항 21**

제17항에 있어서, R이 C<sub>14</sub>알킬인 제약 조성물.

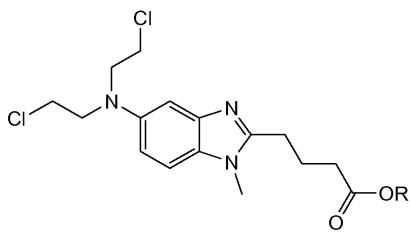
**청구항 22**

제17항에 있어서, R이 C<sub>16</sub>알킬인 제약 조성물.

**청구항 23**

하기 화학식 IA에 따른 화합물을 포함하는 나노입자.

&lt;화학식 IA&gt;

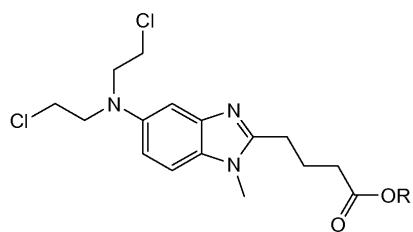


상기 식에서,

R은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.**청구항 24**

하기 화학식 IA에 따른 화합물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암을 치료하는 방법.

&lt;화학식 IA&gt;



상기 식에서,

R은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.**청구항 25**

제24항에 있어서, 암이 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 림프종, 공격성 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 유방암 또는 폐암인 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 암이 육종, 방광암, 자궁경부암, 고환암, 흑색종, 교모세포종, 결장암, 두경부암, 난소암 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 27**

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1종 이상의 화학요법제에 대해 내성이 있는 것인 방법.

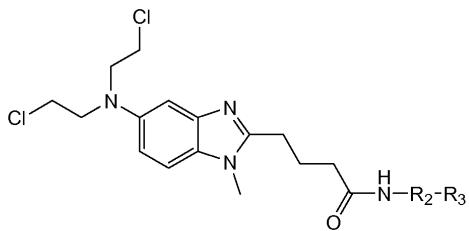
**청구항 28**

제27항에 있어서, 1종 이상의 화학요법제가 알킬화제인 방법.

**청구항 29**

하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태.

&lt;화학식 II&gt;

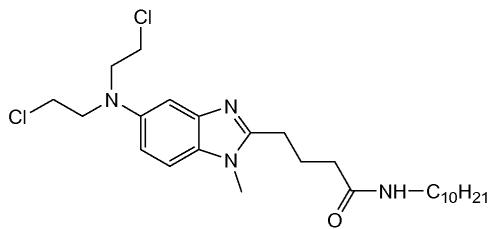


상기 식에서,

R<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬렌이고, R<sub>3</sub>은 -COOC<sub>1-3</sub>알킬이거나; R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다.**청구항 30**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 31**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 32**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 33**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 34**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 35**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화합물.**청구항 36**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>10</sub>알킬인 화합물.**청구항 37**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>12</sub>알킬인 화합물.**청구항 38**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>14</sub>알킬인 화합물.**청구항 39**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>16</sub>알킬인 화합물.**청구항 40**제29항에 있어서, R<sub>2</sub>가 C<sub>2</sub>알킬렌이고, R<sub>3</sub>이 -COOCH<sub>3</sub>인 화합물.

**청구항 41**

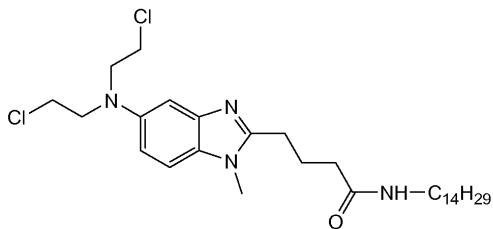
제29항에 있어서, 화학식 II의 화합물이



인 화합물.

**청구항 42**

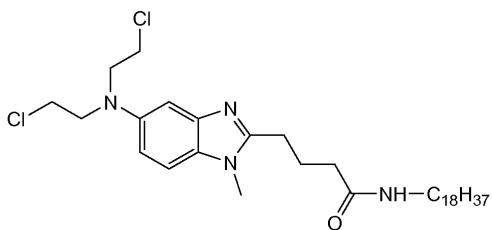
제29항에 있어서, 화학식 II의 화합물이



인 화합물.

**청구항 43**

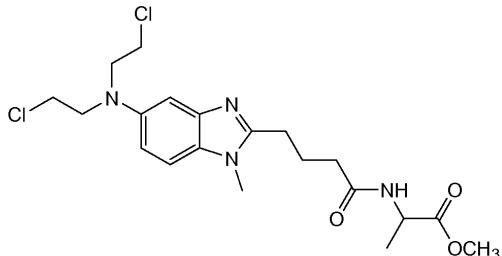
제29항에 있어서, 화학식 II의 화합물이



인 화합물.

**청구항 44**

제29항에 있어서, 화학식 II의 화합물이



인 화합물.

**청구항 45**

제29항에 따른 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 46**

제29항에 따른 화합물을 포함하는 나노입자.

**청구항 47**

제29항에 따른 화합물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암을 치료하는 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 암이 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 림프종, 공격성 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 유방암 또는 폐암인 방법.

**청구항 49**

제47항에 있어서, 암이 육종, 방광암, 자궁경부암, 고환암, 흑색종, 교모세포종, 결장암, 두경부암, 난소암 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 50**

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1종 이상의 화학요법제에 대해 내성이 있는 것인 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 1종 이상의 화학요법제가 알킬화제인 방법.

**청구항 52**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 나노입자.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 인간 혈청 일부민을 추가로 포함하는 나노입자.

**청구항 54**

제52항 또는 제53항에 있어서, 폴리-락트산 글리콜산을 추가로 포함하는 나노입자.

**청구항 55**

제52항 또는 제53항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜을 추가로 포함하는 나노입자.

**청구항 56**

제52항 또는 제53항에 있어서, 폴리-락트산 글리콜산 (PLGA) 및 폴리옥시에틸렌 락트산 공중합체를 추가로 포함하는 나노입자.

**청구항 57**

제53항에 있어서, 인간 혈청 일부민이 디알데히드와 가교되는 것인 나노입자.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 디알데히드가 글루타르알데히드인 나노입자.

**청구항 59**

제52항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 포함하는 동결건조 조성물.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 만니톨, 트레할로스, 수크로스 또는 NaCl 중 하나 이상을 추가로 포함하는 동결건조 조성물.

**청구항 61**

제52항 내지 제58항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 암을 치료하는 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 암이 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 림프종, 공격성 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 유방암 또는 폐암인 방법.

**청구항 63**

제61항에 있어서, 암이 육종, 방광암, 자궁경부암, 고환암, 흑색종, 교모세포종, 결장암, 두경부암, 난소암 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 64**

제61항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 1종 이상의 화학요법제에 대해 내성이 있는 것인 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 1종 이상의 화학요법제가 알킬화제인 방법.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

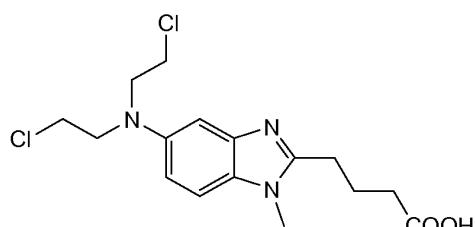
[0002] 본 출원은 2012년 11월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 61/725,213 및 2013년 3월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 61/776,951을 우선권 주장하며, 이를 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 암 치료에 사용하기 위한 벤다무스틴의 에스테르 및 아미드에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 벤다무스틴, 4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸벤즈이미다졸-2-일]부탄산:



[0006]

[0007] 은 히드로클로라이드 염으로서 상표명 리보무스틴(RIBOMUSTIN) 및 트레안다(TREANDA)로 시판되고, 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 비호지킨 림프종 및 다발성 골수종과 같은 혈액암의 치료에 있어서 성공적으로 사용되어온 화합물이다. 이러한 제품은 정맥내 주입으로 투여된다.

**발명의 내용****해결하려는 과제**

[0008] 그러나 수성 환경에서의 화합물의 화학적 불안정성에 의해 고형 종양의 치료를 위한 벤다무스틴의 사용은 제한

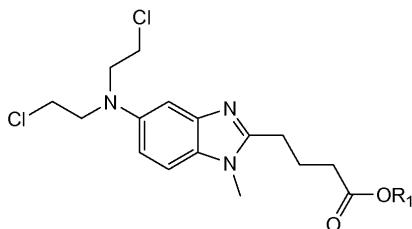
적이다. 실제로, 벤다무스틴은 생체내에서 단지 약 6-10분의 반감기를 갖는 것으로 보고되었다. 그 결과, 벤다무스틴의 순환 수준은 벤다무스틴이 순환계 외부의 종양에 도달할 때까지의 충분히 긴 시간 동안 지속되지 않는다. 벤다무스틴의 순환 시간을 증가시키는 방법이 요구된다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 개요

[0010] 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태에 관한 것이다.

[0011] <화학식 I>



[0012]

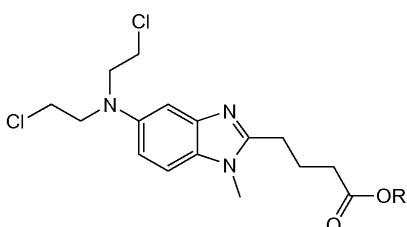
[0013] 상기 식에서,

[0014] R<sub>1</sub>은 C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0015] 고형 및 비-고형 암 종양의 치료를 위한 화학식 I의 화합물의 사용 방법이 또한 기재된다.

[0016] 본 발명은 또한 고형 및 비-고형 암 종양의 치료를 위한 하기 화학식 IA의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태의 용도에 관한 것이다.

[0017] <화학식 IA>



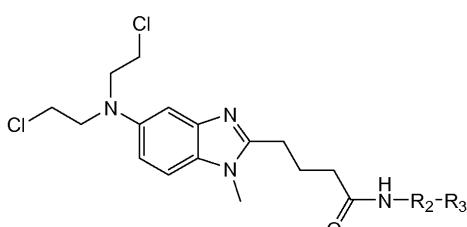
[0018]

[0019] 상기 식에서,

[0020] R은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0021] 본 발명은 추가로 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태에 관한 것이다.

[0022] <화학식 II>



[0023]

[0024] 상기 식에서,

[0025] R<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬렌이고, R<sub>3</sub>은 -COOC<sub>1-3</sub>알킬이거나; R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다.

[0026]

고형 및 비-고형 암 종양의 치료를 위한 화학식 II의 화합물의 사용 방법이 또한 기재된다.

[0027]

화학식 I 또는 IA의 화합물을 포함하는 나노입자, 뿐만 아니라 이러한 나노입자를 포함하는 동결건조 조성물이 또한 본 발명의 범주 내에 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 3% DMSO, 30% 솔루톨(Solutol), 100 $\mu$ l를 3mg/kg i.v. 투여한 CD-1 마우스에서의 본 발명의 특정 실시양태의 혈장 수준을 나타낸다.

도 2는 MDA-MB-231 이종이식편을 지니는 마우스의 종양 부피에 대한 벤다무스틴 히드로클로라이드 및 본 발명의 특정 실시양태의 효과를 나타낸다.

도 3은 MDA-MB-231 유방 종양 S9를 본 발명의 특정 실시양태로 치료한 후 시간이 경과함에 따라 관찰되는 벤다무스틴의 양을 나타낸다.

도 4는 H460 비소세포 폐 종양 S9를 본 발명의 특정 실시양태로 치료한 후 시간이 경과함에 따라 관찰되는 벤다무스틴의 양을 나타낸다.

도 5는 여러 제제를 사용하여 래트에서 본 발명의 한 실시양태를 투여한 후 래트에서의 벤다무스틴의 혈장 수준을 나타낸다.

도 6은 여러 제제를 사용하여 래트에서 본 발명의 한 실시양태를 투여한 후 래트에서의 그 실시양태의 혈장 수준을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르의 나노입자의 저온-TEM 영상을 나타낸다.

도 8은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 혈장 수준을 나타낸다.

도 9는 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 혈액 수준을 나타낸다.

도 10은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 뇌 수준을 나타낸다.

도 11은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 간 수준을 나타낸다.

도 12는 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 폐 수준을 나타낸다.

도 13은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 비장 수준을 나타낸다.

도 14는 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 벤다무스틴 및 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 및 나노입자 제제로서)의 신장 수준을 나타낸다.

도 15는 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 제제로서)를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 래트에서의 상기 투여 후의 벤다무스틴의 혈장, 혈액 및 기관 수준을 나타낸다.

도 16은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (액체 제제로서)를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 혈장, 혈액 및 기관 수준을 나타낸다.

도 17은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (나노입자 제제로서)를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 래트에서의 상기 투여 후의 벤다무스틴의 혈장, 혈액 및 기관 수준을 나타낸다.

도 18은 래트에 본 발명의 한 실시양태인 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 (나노입자 제제로서)를 30mg/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 래트에서의 상기 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 혈장, 혈액 및 기관 수준을 나타낸다.

도 19는 래트에 본 발명의 실시양태인 벤다무스틴 PEG-2000 에스테르 및 벤다무스틴 PEG-5000 에스테르를 30mg-eq/kg i.v., 1mL/kg 투여한 후, 래트에서의 상기 투여 후의 벤다무스틴의 혈장 수준을 나타낸다. 비교에는 트레안다를 사용했다.

도 20 본 발명의 실시양태를 3mg/kg i.v., 3% DMSO, 30% 솔루톨 투여한 후 CD-1 마우스에서의 벤다무스틴의 혈장 수준을 나타낸다.

도 21은 52,000x 배율의 본 발명의 대표 나노입자 실시양태를 나타낸다. 샘플에서 관찰되는 것은 다음과 같다: 주변 완충제보다 균일하게 조밀하게 보이는 구형 입자 (가장 왼쪽 화살표), 배경의 작은 입자 (가장 오른쪽 화살표). 삽도는 보다 큰 크기로 가장 왼쪽 화살표로 표시된 두 입자를 나타낸다. 왼쪽 영상에서 두 엑스포 사이의 거리는 28nm이고, 오른쪽 삽도에서 두 엑스포 사이의 거리는 43nm이다. 축적 막대: 200nm.

도 22는 52,000x 배율의 본 발명의 대표 나노입자 실시양태를 나타낸다. 샘플에서 관찰되는 것은 다음과 같다: 주변 완충제보다 균일하게 조밀하게 보이는 구형 입자 (가장 왼쪽 화살표), 배경의 작은 입자 (가장 오른쪽 화살표). 삽도는 보다 큰 크기로 가장 왼쪽 화살표로 표시된 두 입자를 나타낸다. 왼쪽 영상에서 두 엑스포 사이의 거리는 28nm이고, 오른쪽 삽도에서 두 엑스포 사이의 거리는 43nm이다. 축적 막대: 200nm.

도 23은 벨케이드(VELCADE)®, 벤다무스틴 및 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자의 투여 후 종양 부피를 나타낸다.

도 24는 벨케이드®, 벤다무스틴 및 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자의 투여 후 체중 측정치를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

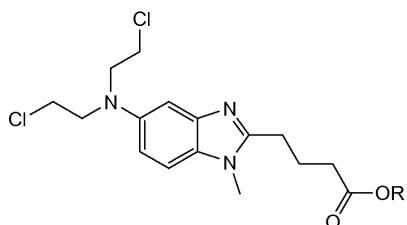
[0029] 예시적 실시양태의 상세한 설명

[0030] 벤다무스틴의 카르복실산 모이어티의 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 에스테르 기, 폴리에틸렌 글리콜 에스테르 기 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 아미드 기로의 전환이 벤다무스틴의 보다 긴 순환 시간을 제공하는 화합물을 초래하는 것을 발견했다. 어떠한 특정 이론에 얹매이지 않길 바라면서, 에스테르 또는 아미드 모이어티가 벤다무스틴 분자의 용해도를 감소시켜, 수성 환경에 대한 보호 효과를 초래하는 것으로 여겨진다. 시간이 지남에 따라 에스테르 또는 아미드 모이어티가 가수분해되어 활성 벤다무스틴 분자의 카르복실산 모이어티를 드러낸다. 전체적인 결과는 시간이 경과함에 따라 벤다무스틴이 생성되는 것이다.

[0031] 에스테르/아미드 모이어티 중 탄소의 수를 다르게 함으로써, 생성된 벤다무스틴 유도체의 친지성이 개질될 수 있다. 친지성을 증가시키는 것은 에스테르/아미드의 증가된 안정성 및 벤다무스틴의 보다 긴 순환 시간과 상관관계가 있다.

[0032] 본 발명의 범주 내에는 하기 화학식 IA의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태가 있다.

[0033] <화학식 IA>



[0034]

[0035] 상기 식에서,

[0036] R은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0037] 화학식 IA의 화합물은 환자에서의 고형 또는 비-고형 암 종양의 치료에 유용하다.

[0038] 본 발명의 화합물은 화학식 IA의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태 및 제약상 허용되는 담체 또는 희

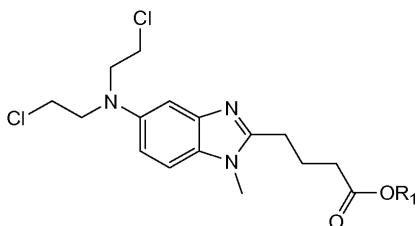
석제를 포함하는 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 제약 조성물에서, R은 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 바람직하게는, R은 C<sub>10</sub>알킬이다. R이 C<sub>12</sub>알킬인 경우가 또한 바람직하다. 기타 바람직한 실시양태는 R이 C<sub>14</sub>알킬인 경우를 포함한다. R이 C<sub>16</sub>알킬인 조성물이 또한 바람직하다.

[0039] 기타 본 발명의 실시양태는 화학식 IA의 화합물을 포함하는 나노입자를 포함한다.

[0040] 또한 본 발명의 범주 내에는 환자에게 화학식 IA의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 고형 또는 비-고형 암 종양을 치료하는 방법이 있다. 바람직한 고형 또는 비-고형 종양에는 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 림프종 (T-세포 림프종, B-세포 림프종), 공격성 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 유방암 또는 폐암 (예를 들어, 소세포 폐암 (SCLC) 및 비소세포 폐암 (NSCLC))이 포함된다. 기타 고형 및 비-고형 암 종양, 예를 들어 육종, 방광암, 자궁경부암, 고환암, 흑색종, 교모세포종, 결장암, 두경부암, 난소암 및 전립선암이 또한 본 발명의 화합물 및 조성물로 치료가능한 것으로 생각된다. 기타 고형 및 비-고형 암 종양, 예를 들어 유방암, 췌장암 및 위암이 또한 본 발명의 화합물로 치료가능한 것으로 생각된다.

[0041] 본 발명의 바람직한 화합물은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태이다.

[0042] <화학식 I>



[0043]

[0044] 상기 식에서,

[0045] R<sub>1</sub>은 C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>알킬 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.

[0046] 화학식 I의 화합물은 환자에서의 고형 또는 비-고형 암 종양의 치료에 유용하다.

[0047] 바람직한 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 기타 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또한 바람직한 것은, R<sub>1</sub>이 C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>알킬인 화학식 I의 화합물이다. 기타 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다.

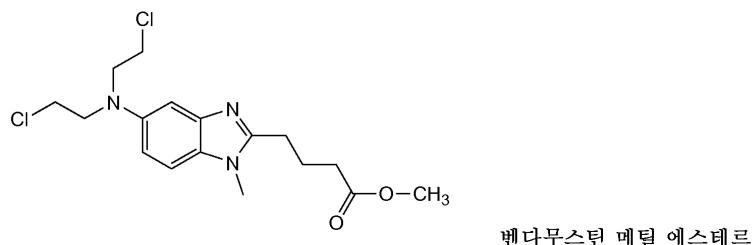
[0048] 기타 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>10</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>12</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>14</sub>알킬이다. 기타 실시양태에서, R<sub>1</sub>은 C<sub>16</sub>알킬이다.

[0049] 또한 본 발명의 범주 내에는 화학식 I의 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물이 있다.

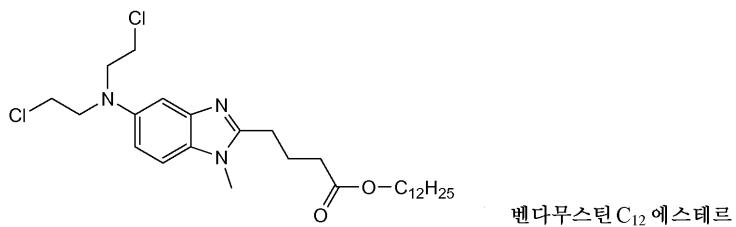
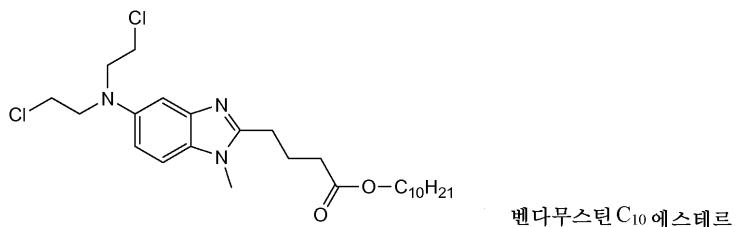
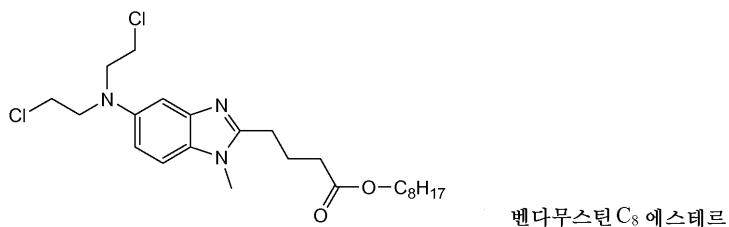
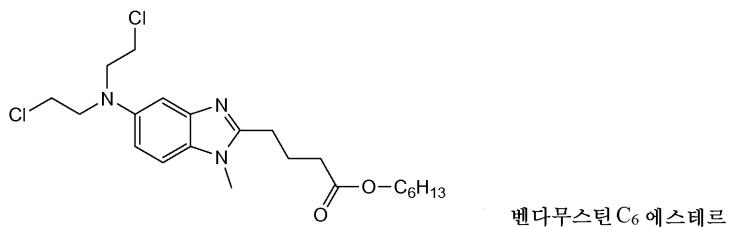
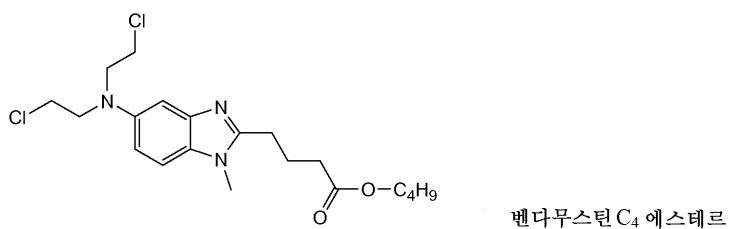
[0050] 기타 본 발명의 실시양태는 화학식 I의 화합물을 포함하는 나노입자를 포함한다.

[0051] 또한 본 발명의 범주 내에는 환자에게 화학식 I의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 있다. 고형 종양을 포함하는 것 및 또한 고형 종양을 포함하지 않는 것을 비롯한 다수의 암은 이러한 치료로 치료가능할 수 있다. 이러한 암에는 만성 림프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 림프종 (T-세포 림프종, B-세포 림프종), 공격성 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 유방암 또는 폐암 (예를 들어, 소세포 폐암 (SCLC) 및 비소세포 폐암 (NSCLC))이 포함된다. 또한 본 발명의 화합물 및 조성물로 치료가능한 것으로 생각되는 추가의 암은 육종, 방광암, 자궁경부암, 고환암, 흑색종, 교모세포종, 결장암, 두경부암, 난소암 및 전립선암을 비롯한 고형 종양의 존재를 특징으로 하는 것이다. 기타 고형 및 비-고형 암 종양, 예를 들어 유방암, 췌장암 및 위암이 또한 본 발명의 화합물로 치료가능한 것으로 생각된다.

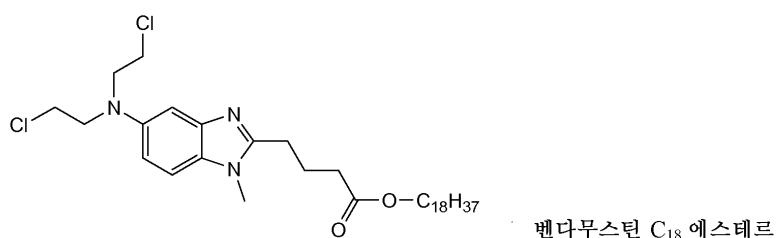
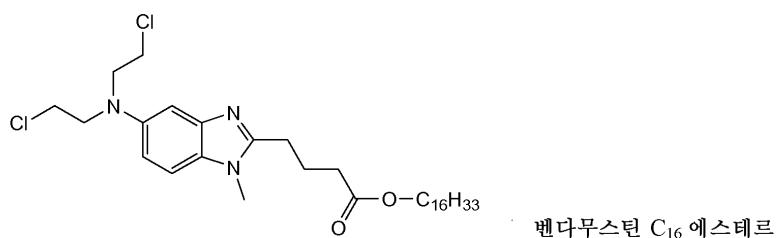
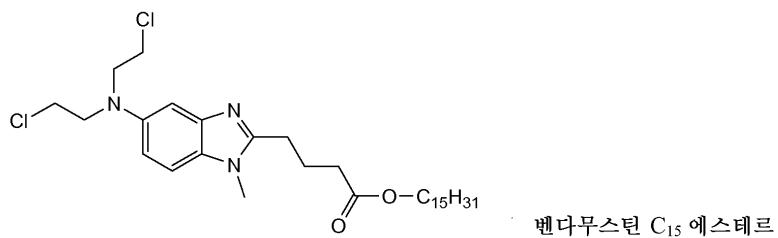
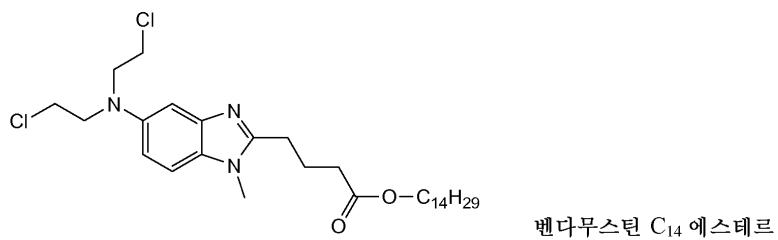
[0052] 본 발명의 특히 바람직한 화합물에는 다음이 포함된다:



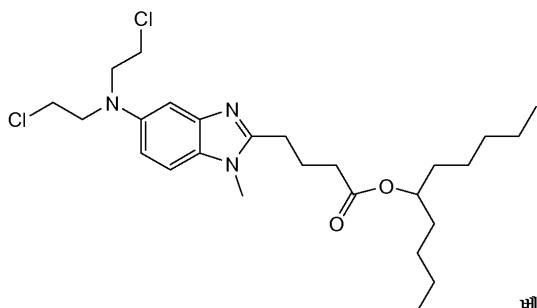
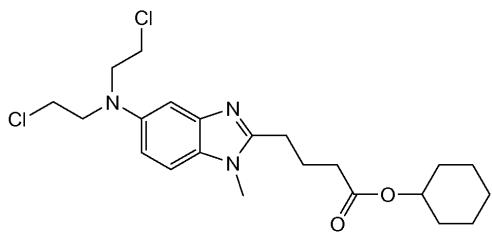
[0053]



[0054]



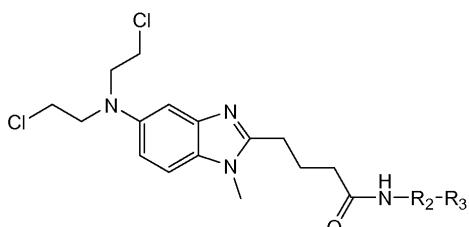
[0055]



[0056]

본 발명의 범주 내에는 또한 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 형태가 있다.

<화학식 II>



[0059]

상기 식에서,

R<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬렌이고, R<sub>3</sub>은 -COOC<sub>1-3</sub>알킬이거나; R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다.

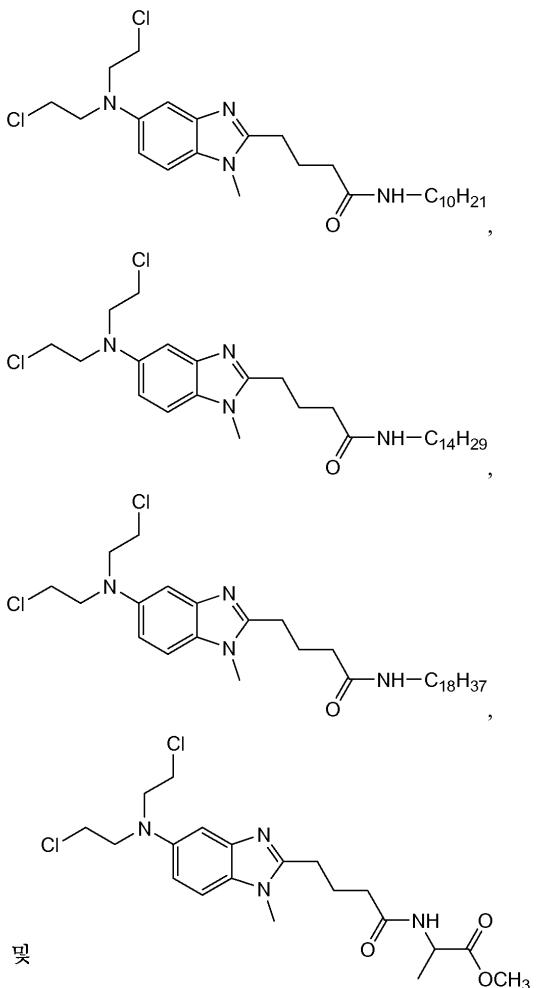
화학식 II의 화합물은 환자에서의 고형 또는 비-고형 암 종양의 치료에 유용하다.

화학식 II의 화합물의 바람직한 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 기타 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다. 또한 바람직한 것은 R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>알킬일 때이다. 기타 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>알킬이다.

바람직하게는, 화학식 II의 화합물에 있어서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>10</sub>알킬이다. 또한 바람직한 것은 R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>이 C<sub>12</sub>알킬일 때이다. 기타 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>14</sub>알킬이다. 또 다른 실시양태에서, R<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>은 C<sub>16</sub>알킬이다.

기타 실시양태에서, R<sub>2</sub>는 C<sub>2</sub>알킬렌이고, R<sub>3</sub>은 -COOCH<sub>3</sub>이다.

[0066] 바람직한 화학식 II의 화합물에는 다음이 포함된다:



[0067]

[0068] 또한 본 발명의 범주 내에는 화학식 II의 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제약 조성물이 있다.

[0069]

본 발명의 다른 실시양태는 화학식 II의 화합물을 포함하는 나노입자를 포함한다.

[0070]

본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 화합물 및 조성물은 1종 이상의 화학요법제, 예를 들어 알킬화제에 대해 내성인 환자의 치료에 사용된다. 환자에게 내성이 생길 수 있는 예시적 알킬화제에는 다음이 포함된다: 질소 머스타드; 에틸렌이민; 알킬술포네이트; 트리아젠; 피페라진 및 니트로스우레아. 환자에게 내성이 생길 수 있는 화학요법제의 다양한 유형의 더 구체적인 예는 아래 열거한다. 이러한 제제 중 하나 이상에 내성이 있는 환자는 본 발명의 화합물 및 조성물을 이용한 치료의 혜택을 받을 것이다.

[0071]

질소 머스타드

[0072]

상표명 머스타르겐(Mustargen)®으로 시판되는 메클로레타민은 호지킨병 및 비호지킨 림프종을 치료하기 위해, 그리고 유방암 및 폐암의 완화 요법으로서 주사되고, 균상 식육종의 피부 병변 (피부 T-세포 림프종)의 국소적 치료로서 제공된다.

[0073]

상표명 이펙스(Ifex)®로 시판되는 이포스파미드는 호지킨병 및 비호지킨 림프종, 뿐만 아니라 재발성 고환암 및 배세포 종양, 육종, 폐암, 방광암, 두경부암 및 자궁경부암을 치료하기 위해 사용된다.

[0074]

멜팔란은 브랜드명 알케란(Alkeran)®으로 시판되는 화학요법 약물이고, L-PAM 또는 폐닐알라닌 머스타드로 지칭된다. 이는 다발성 골수종, 난소암, 신경모세포종, 횡문근육종 및 유방암의 치료에 사용된다.

- [0075] 클로람부실은 상표명 류케란(Leukeran)®으로 시판되고, 만성 림프구성 백혈병, 림프육종, 거대 여포 림프종을 비롯한 악성 림프종 및 호지킨병의 치료에 가장 널리 사용된다. 이는 또한 비호지킨 림프종, 유방암, 난소암 및 고환암, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 혈소판혈증 및 융모막암종의 치료에 성공적으로 사용되어 왔다.
- [0076] 시클로포스파미드는 시톡산(Cytoxan)® 또는 네오사르(Neosar)®로 시판되고, 호지킨병 및 비호지킨 림프종, 베켓 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, T-세포 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 망막모세포종, 횡문근육종, 유잉 육종; 유방암, 고환암, 자궁내막암, 난소암 및 폐암의 치료에 사용된다.
- [0077] 니트로소우레아
- [0078] 스트렙토조신은 상표명 자노사르(Zanosar)®로 시판되고, 도세포 췌장암의 치료에 사용된다.
- [0079] 카르무스틴은 또한 BiCNU® 또는 BCNU로 공지되고, 이는 일부 종류의 뇌 종양, 교모세포종, 뇌간 신경교종, 수모세포종, 성상세포종, 상의세포종 및 전이성 뇌 종양에 있어서 사용된다. 이는 또한 다발성 골수종, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 흑색종, 폐암 및 결장암의 치료에 사용된다.
- [0080] 또한 CCNU 또는 CeeNU®로 공지된 로무스틴은 1차 및 전이성 뇌 종양, 호지킨병 및 비호지킨 림프종의 치료에 사용되고, 흑색종, 폐암 및 결장암의 치료에 또한 사용되어 왔다.
- [0081] 알킬 술포네이트
- [0082] 상표명 부술렉스(Busulfex)® 및 밀레란(Myleran)®으로 시판되는 부술판은 만성 골수 백혈병의 치료에 사용된다.
- [0083] 트리아진
- [0084] 다카르바진은 상표명 DTIC-Dome®으로 시판되고, 전이성 악성 흑색종, 호지킨병, 연부 조직 육종, 신경모세포종, 섬유육종, 횡문근육종, 도세포 암종 및 수질 갑상선 암종의 치료에 사용된다.
- [0085] 테모졸로미드는 상표명 테모다르(Temodar)®로 시판되고, 특정 유형의 뇌 종양 역형성 성상세포종 및 다형성 교모세포종의 치료에 사용된다.
- [0086] 에틸렌이민
- [0087] 티오텐파는 상표명 티오플렉스(Thioplex)®로 공지되어 있고, 이는 유방암, 난소암, 호지킨병 및 비호지킨 림프종을 치료하는 데 사용되는 알킬화제이다.
- [0088] 알트레타민은 상표명 헥살렌(Hexalen)®으로 시판되고, 또한 헥사메틸멜라민 또는 HMM으로 지칭된다. 이는 난소암의 치료에 사용된다.
- [0089] 본원에서 사용되는 "C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬"은 1 내지 24개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄, 포화 탄화수소 기를 지칭한다. 대표적 알킬기에는 비제한적으로 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, n-도데실 등이 포함된다. 본 발명의 범주 내에서, "C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>알킬"은 또한 모노시클릭, 비시클릭 및 트리시클릭 포화 탄화수소를 지칭하는 "시클로알킬", 예를 들어 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로부틸, 비시클로[2.1.1]헥산, 비시클로[2.2.1]헵틸, 아다만틸 등을 포함한다.
- [0090] 본원에서 사용되는 "폴리에틸렌 글리콜"은 또한 화학식 H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O- 또는 H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub> (여기서, n은 4 이상임)의 중합체를 지칭하는 "PEG"를 나타낸다. 바람직한 PEG는 약 200 내지 약 5000달톤, 더 바람직한 PEG는 약 2000 내지 약 5000달톤의 평균 분자량을 가진다.
- [0091] 본원에서 사용되는 "제약상 허용되는 담체 또는 희석제"는 생리학적으로 상용성인 용매, 분산 매질, 코팅제, 벌크제, 안정화제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수지연제 등이다. 제약상 허용되는 담체의 예에는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 엑스트로스, 글리세롤, 에탄올, 당, 예컨대 트레할로스 및 수크로스, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 당 및 폴리알콜의 혼합물 및 염화나트륨 중 하나 이상이 포함된다. 제약상 허용되는 담체는 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 완충제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0092] 본원에서 사용되는 "제약 조성물"은 의학 또는 수의학적 용도로 투여하기에 적합한 조성물을 지칭한다. 이러한 화합물은 바람직하게는 1종 이상의 담체 및/또는 희석제와 조합으로 본 발명의 화합물을 포함할 것이다. 이러한

한 조성물은 또한 "제제"로 지칭된다.

[0093] 본원에서 사용되는 "투여"는 본 발명의 화합물을 환자에게 전달할 수 있는 관련 기술분야의 임의의 수단을 지칭한다. 바람직한 투여 방법에는 국부 투여, 즉 화합물의 효과가 요구되는 위치에의 직접적인 본 발명의 화합물의 투여, 및 전신 투여가 포함된다. 투여 방법의 예에는 비제한적으로 경구, 장, 설하, 입술밑, 피하, 코, 정맥내, 동맥내, 근육내 및 복강내 투여가 포함된다.

[0094] 본원에서 사용되는, "고형 종양"은 국부화된 조직 뎅어리인 악성 종양을 지칭한다. 고체 암 종양의 예에는 립프종, 육종 및 암종, 및 유방암, 뇌암, 골암, 결장암, 췌장암, 폐암 등이 포함된다.

[0095] 본원에서 사용되는, "비-고형 종양 암"은 가장 통상적으로 혈액암, 즉 혈액의 악성 암을 지칭한다. 비-고형 종양 암의 예에는 만성 립프구성 백혈병, 호지킨병, 무통성 비호지킨 립프종 (T-세포 립프종, B-세포 립프종), 다발성 골수종 등이 포함된다.

[0096] 본원에서 사용되는 "나노입자"는 말번 제타사이저(Malvern Zetasizer)로 측정시 약  $0.2\mu\text{m}$  이하, 바람직하게는 약  $0.1\mu\text{m}$  이하의 평균 직경을 가지는 입자를 지칭한다.

[0097] 실험 섹션

[0098] 4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-부티르산 메틸 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>1</sub> 에스테르)의 제조:

[0099] 방법 A: 오버헤드 교반기, 질소 스위프가 있는 응축기 및 온도 제어기가 있는 열전쌍이 장착된 1L 3구 등근 바닥 플라스크에 4-(5-아미노-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일)-부티르산 메틸 에스테르 (10.2g, 41.2mmol, 1.0eq) 및 클로로아세트산 (81.9g, 866mmol) 및 20mL의 건조 테트라히드로푸란 (THF)을 충전했다. 슬러리를 수돗물 조내에서 교반하여 모든 고체가 용해되도록 했다. 보란-THF (288mL, 288mmol)를 첨가 할때기를 통해 25분에 걸쳐 천천히 첨가했다. BH<sub>3</sub>-THF의 첨가가 완결되었을 때, 생성된 반응 용액을 실온에서 1.5시간 동안 교반한 후 가열 맨틀을 사용하여 45분 동안 58°C에서 가열했다. 반응을 냉각시키고 실온에서 밤새 유지한 후, 메탄올 (10mL)로 켄칭시켰다. 생성된 용액을 회전 증발기 상에서의 증발을 통해 대략 1/3 중량으로 농축시키고, 냉수조 내에서 수산화나트륨 수용액을 사용하여 pH 8-9로 중화시켰다. 고체를 진공 여과로 수집하고, 물 (200mL)로 세척한 후, 중탄산나트륨의 묽은 수용액 (50mL)으로 20분 동안 재슬러리화시켰다. 여과한 후, 밤새 실온에서 하우스 진공으로 건조시켜 황갈색의 고체를 수득했다 (9.6g, 63% 수율, 93A% 순도).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.32 (d, *J* = 8.8

Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 3.70 (br s, 8H), 3.66 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.01 (quint, *J* = 7.4Hz, 2H); LC/MS (ESI, m/z) 372 (M+1), mp 60-63 °C dec.

[0100] [0101] 방법 B: 가열 맨틀, 열전쌍, 응축기, 질소 유입구/유출구 및 오버헤드 교반기가 장착된 2L 3구 유리 용기에 벤다무스틴 HC1 (50.0g, 126.7mmol, 1.0eq.), 메탄올 (500mL) 및 메탄솔폰산 (2.47mL, 38.1mmol)을 충전했다. 반응 혼합물을 환류 가열하고, 65°C에서 1시간 동안 교반했다. 반응 용액을 40°C로 냉각시키고 진공 하에서 농축시켰다. 물 (500mL)을 농축된 잔류물에 첨가하고, NaHCO<sub>3</sub>의 포화 수용액 (150mL)을 사용하여 1.5시간에 걸쳐 혼합물을 pH 6으로 중화시켰다. 생성물을 여과하여 수집하고, 물 (150mL)로 세척하고, 40°C 진공 하에서 건조시켜 백색 분말상 고체 44.2g (94% 수율)를 HPLC에 따른 98.4A% 순도로 수득했다.

[0102] 4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-부티르산 에틸 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>2</sub> 에스테르)의 제조:

[0103] 방법 A: 가열 맨틀, 열전쌍, 응축기, 질소 유입구/유출구 및 오버헤드 교반기가 장착된 1L 3구 유리 용기에 벤다무스틴 HC1 (30.0g, 76mmol, 1.0eq.), 에탄올 (300mL) 및 메탄솔폰산 (1.48mL, 22.8mmol)을 충전했다. 반응 혼합물을 70°C에서 1시간 동안 가열했다. 반응 용액을 40°C로 냉각시키고, 진공 하에서 농축시켰다. 물 (300mL)을 농축된 잔류물에 첨가하고, NaHCO<sub>3</sub>의 포화 수용액 (115mL)을 사용하여 1.5시간에 걸쳐 혼합물을 pH 6으로 중화시켰다. 생성물을 여과하여 수집하고, 물 (100mL)로 세척하고, 40°C 진공 하에서 건조시켜 백색 고체 28.6g (97% 수율)을 HPLC에 따른 99.2A% 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 4.04 (quint, *J* = 7.12 Hz, 2H), 3.70 (br s, 8H), 3.66 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.00 (quint, *J* = 7.4Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.12 Hz, 3H).

[0104]

[0105] 방법 B: 가열 맨틀, 열전쌍, 응축기, 질소 유입구/유출구 및 오버헤드 교반기가 장착된 500mL 3구 유리 플라스크에 4-(5-아미노-1-메틸-1H-벤이미다졸-2-일)-부티르산 에틸 에스테르 (6.4g, 1.0eq.), 클로로아세트산 (42.5g) 및 테트라히드로푸란 (THF, 13mL)을 충전했다. 생성된 혼합물을 실온의 수조 내에서 1.5시간 동안 교반했다. 보란-THF (150mL)를 20분에 걸쳐 첨가했다. 충전이 완결되면, 반응 혼합물을 55-58°C로 가열하고, 1.5시간 동안 교반했다. HPLC에 의한 공정중 분석은 94A%의 목적하는 생성물을 보였다. 반응을 실온으로 냉각시키고 벤다무스틴을 생성하기 위한 가수분해인 다음 단계로 텔레스코핑시켰다(telescopied).

[0106]

4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 부틸 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>4</sub> 에스테르)의 제조: 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 1.9g (2.35mL, 25.6mmol, 1.01eq)의 1-부탄올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 실온에서 밤새 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과로 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 갈색 오일을 수득했다. 오일을 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 9.5g (22.8mmol, 90%)의 생성물을 투명한 밝은 갈색 오일로서 94.5A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.32 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.36, 8.8 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.76 Hz, 2 H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 2H), 0.89 (t, *J* = 4.56 Hz, 3H).

[0107]

[0108] 4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 헥실 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>6</sub> 에스테르)의 제조:

[0109] 방법 A: 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 2.62g (3.22mL, 25.6mmol, 1.01eq)의 1-헥산올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 갈색 오일을 수득했다. 오일을 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 8.91g (20.1mmol, 79%)의 생성물을 투명한 밝은 갈색 오일로서 91.9A%HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.32 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.36, 8.8 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.76 Hz, 2 H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 6H), 0.89 (t, *J* = 4.56 Hz, 3H).

[0110]

[0111] 방법 B: 1L 4구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍 및 질소 유입구/유출구를 장착하고 30g (76.0mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드 및 300mL의 디클로로메탄을 충전했다. 교반을 시작했고, 10.6mL (7.69g, 76.0mmol)의 트리에틸아민을 주사기를 통해 첨가한 후, 15분 동안 실온에서 교반한 후, 1-에틸-3-(3-메틸아미노프로필) 카르보보디이미드 (EDAC, 21.86g, 114mmol) 및 n-헥실 알콜 (9.57mL, 7.84g, 76.8mmol)을 첨가했다. 흐린 백색 반응 혼합물이 20분의 교반 후 투명한 용액이 되었다. 교반을 22.5h 동안 실온에서 그리고

30°C에서 1시간 동안 HPLC 분석으로 반응이 완결될 때까지 계속했다. DI 수 (300mL)를 충전하여 반응을 켄칭시 키고, 1N HCl을 사용하여 pH를 6으로 조정했다. 충을 분리하고 수성층을 디클로로메탄 (100mL)으로 추출한 후, 유기상을 합하고 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 여과하고 건조되도록 진공 하 농축시킨 후, 투명한 황색 오일을 수득했고, 이를 칼럼 크로마토그래피로 정제했다 (헵탄 중 25 내지 50% 에틸 아세테이트). 총 16.5g (37.3mmol, 49.1%)을 농후한 황색 오일로서 HPLC에 의한 99.1A% 순도로 회수했다.

[0112] 4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 옥틸 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>8</sub> 에스테르)의 제조: 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 3.33g (4.03mL, 25.6mmol, 1.01eq)의 1-옥탄올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 갈색 오일을 수득했다. 오일을 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 수율 9.7g (20.5mmol, 81%)의 생성물을 투명한 밝은 갈색 오일로서 91.9A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.28 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.4, 8.76 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.12 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 10H), 0.89 (t, *J* = 6.72 Hz, 3H).

[0113] [0114] 4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 테실 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>10</sub> 에스테르)의 제조:

[0115] 방법 A: 교반 막대, 열전쌍 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 10.0g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 4.9mL (4.08g, 25.6mmol, 1.01eq)의 테실 알콜, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 100mL의 디클로로메탄 및 0.31g (2.53mmol, 0.1eq)의 N,N-디메틸아미노 피리딘 (DMAP)을 충전했다. 반응 혼합물을 실온에서 18시간 동안 교반했고, 그 동안 HPLC 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 여과물을 DI 수 (2 X 100mL) 및 포화 중탄산나트륨 (1 X 100mL)으로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 유기상을 여과하여 건조제를 제거한 후, 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 9.6g (19.2mmol, 75.9%)의 목적하는 생성물을 저용접 백색 고체로서 94.1A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.32 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.4, 8.76 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.76 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.08 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 6.68 Hz, 3H).

[0116] [0117] 방법 B: 자기 교반 막대, 열전쌍 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 4구 등근 바닥 플라스크에 10g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드 및 100mL의 디클로로메탄을 충전했다. 교반을 시작했고, 3.53mL (2.56g, 25.3mmol)의 트리에틸아민을 주사기를 통해 첨가한 후, 15분 동안 실온에서 교반한 후, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDAC, 7.28g, 38mmol) 및 n-테실 알콜 (4.88mL, 4.04g, 25.5mmol)을 첨가했다. 흐린 백색 반응 혼합물은 20분의 교반 후 투명한 용액이 되었다. HPLC 분석에 따라 반응이 완결될 때까지 실온에서 20h 동안 교반을 계속했다. DI 수 (100mL)를 충전하여 반응을 켄칭하고, 1N HCl을 사용하여 pH를 6-7로 조정했다. 충을 분리하고, 수성층을 디클로로메탄 (25mL)으로 추출한 후, 유기상을 합하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시킨 후, 투명한 황색 오일을 수득하였고, 이를 칼럼 크로마토그래피로 정제했다 (헵탄 중 20 내지 60% 에틸 아세테이트). 총 11.2g (22.42mmol, 88.6%)을 농후한 황색 오일로서 HPLC의 의한 98.9A% 순도로 회수했다.

[0118] 4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 도데실 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르)의 제조:

[0119]

방법 A: 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 4.77g (25.6mmol, 1.01eq)의 1-도데칸올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 회백색 반-고체를 수득했다. 이러한 고체를 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 11.53g (21.9mmol, 86.4%)의 생성물을 회백색 반고체로서 93.7A%의 HPLC 순도로 수득했다.

[0120]

방법 B: 열전쌍, 가열기/냉각기, 질소 유입구/유출구, 첨가 칼때기 및 진공 라인이 장착된 20L 재킷형 원통형 켐글라스(ChemGlass) 반응 용기에 벤다무스틴의 유리 염기 (374g, 1.04mol, 1.0eq.), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDAC, 300g, 1.57mol, 1.5당량) 및 디클로로메탄 (DCM, 3.74L, 10부피)을 충전했다. 교반하면서 1-도데칸올 (292.1g, 1.57mol, 1.5당량)을 첨가했다. 반응 혼합물을 가열한 한 후, 27 °C에서 4시간 동안 교반했다. 회분을 냉각시키고, 20°C에서 밤새 유지했다. 회분을 그 후, 3.75L의 물로 세척하고, 충을 분리했다. 수성 부분을 1.2L의 디클로로메탄으로 재추출하고, 합한 디클로로메탄 부분을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 건조제를 제거하기 위하여 여과한 후, 여과물을 진공 하 농축시켜 생성물을 조 오일로 제조했다. 374g의 벤다무스틴의 유리 염기를 사용한 이러한 반응의 또 다른 회분을 동일한 조건 하에서 수행했다. 두 회분으로부터의 조 생성물을 합하고, 4494mL의 헵탄과 혼합하고, 45-50°C로 가열했다. 생성된 용액을 실온으로 천천히 냉각시켜 회백색 고체를 침전시켰다. 슬러리를 실온에서 밤새 교반하고, 고체를 10°C에서 진공 여과를 통해 단리했다. 습윤 케이크를 1L의 헵탄으로 세척하고, 2.5L의 헵탄으로 20-22°C에서 밤새 재슬러리화했다. 생성물을 여과하여 수집하고, 매번 500mL의 헵탄으로 2회 세척했다. 밤새 20-22°C에서 습윤 케이크를 건조시켜 653g (59% 수율)의 백색 고체를 HPLC에 의한 99.0A%로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 6.64 Hz, 2H), 3.70 (br s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.01 (quint, *J* = 7.4Hz, 2H), 1.54 (quint, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.24 (m, 18H), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

[0121]

[0122]

4-[5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일]부티르산 테트라데실 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르)의 제조:

[0123]

방법 A: 교반 막대, 열전쌍 및 질소 유입구/유출구가 장착된 500mL 3구 등근 바닥 플라스크에 10.0g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 6.5g (30.4mmol, 1.2eq)의 테트라데실 알콜, 6.3g (30.4mmol, 1.2eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 100mL의 디클로로메탄 및 0.62g (5.1mmol, 0.2eq)의 N,N-디메틸아미노 피리딘 (DMAP)을 충전했다. 반응 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하고, 그 동안 HPLC 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 습윤 케이크를 50mL의 디클로로메탄으로 세척한 후, 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 생성된 밝은 오렌지색 오일을 50mL의 디클로로메탄으로 연화처리하고 목적하지 않는 고체는 진공 여과하여 제거했다. 여과물을 다시 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 <sup>1</sup>H NMR로 테트라데칸올 및 DMAP를 함유하는 것으로 보여지는 16.5g의 반-고체를 수득했다. 잔류물을 150g의 실리카겔 60, 230-400 메쉬 상에서 크로마토그래피하고, 1500mL의 MDC, 1000mL의 0.5% 메탄올/MDC 및 2000mL의 1% 메탄올/MDC로 용리하여 100-150mL 분획을 수집했다. 목적하는 생성물을 함유하는 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 잔류물을 다시 30mL의 MDC로 연화처리하고 목적하지 않는 고체는 여과하여 제거했다. 여과물을 진공 하에서 농축시켜 5.0g (9.2mmol, 36.4%)의 목적하는 생성물을 밝은 보라색 고체로서 95.0A%의 순도로 수득했다.

[0124]

방법 B: 열전쌍, 응축기, 질소 유입구/유출구 및 오버헤드 기계적 교반기가 장착된 150mL 3구 유리 용기에 벤다무스틴의 유리 염기 (16.0g, 44.6mmol, 1.0eq.), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDAC, 9.42g, 49.2mol), 1-테트라데칸올 (10.6g, 49.2mmol) 및 디클로로메탄 (120mL)을 충전했다. 반응 혼합물을 27 °C에서 밤새 교반했다. 반응 용액을 실온으로 냉각시키고 100mL의 물로 세척했다. 교반하면서, 1M HCl 수용액을 첨가하여 수성 층의 pH를 pH 3-4로 조정했다. 충을 분리했다. 수성 부분을 100mL의 디클로로메탄으로 재추

출하고, 합한 디클로로메탄 부분을  $MgSO_4$  상에서 건조시켰다. 건조제를 제거하기 위해 여과한 후, 여과물을 진공 하에서 농축시켜 생성물을 왁스질 황색 고체로서 제조했다. 고체를 실온에서 밤새 80mL의 헵탄 중에서 슬러리화했다. 생성물을 여과하여 수집하고 건조하여, 백색 고체 20.6g (83.4% 수율)을 HPLC에 의한 97.2A% 순도로 수득했다.

 $^1H$  NMR (400

MHz, DMSO-d6)  $\delta$  7.32 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 3.98 (t,  $J$  = 6.64 Hz, 2H), 3.70 (br s, 8H), 3.66 (s, 3H), 2.83 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.01 (quint,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.23 (m, 18 H), 0.85 (t,  $J$  = 7.12 Hz, 3H).

[0125]

[0126]

4-[5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일]부티르산 웬타데실 에스테르 (벤다무스틴  $C_{15}$  에스테르)의 제조: 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 5.85g (25.6mmol, 1.01eq)의 웬타데칸올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 회백색 고체를 수득했다. 이러한 고체를 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 10.8g (19.0mmol, 75%)의 생성물을 회백색 고체로서 94.6A%의 HPLC 순도로 수득했다.

 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.17 (d,  $J$  = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 2.32 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 2.4, 8.76 Hz, 1H), 4.05 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t,  $J$  = 7.08 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 24H), 0.88 (t,  $J$  = 6.68 Hz, 3H).

[0127]

[0128]

4-[5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일]부티르산 혼사데실 에스테르 (벤다무스틴  $C_{16}$  에스테르)의 제조: 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 6.2g (25.6mmol, 1.01eq)의 혼사데칸올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 중탄산나트륨 포화 수용액 (2 X 100mL), DI 수 (1 X 100mL) 및 염수 (1 X 100mL)로 세척한 후 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 회백색 고체를 수득했다. 상기 고체를 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 13.1g (22.5mmol, 88.8%)의 생성물을 회백색 고체로서 94.0A%의 HPLC 순도로 수득했다.

 $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.17 (d,  $J$  = 8.76 Hz, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 2.32 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 2.36, 8.72 Hz, 1H), 4.05 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t,  $J$  = 7.08 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 26H), 0.88 (t,  $J$  = 6.68 Hz, 3H).

[0129]

[0130]

4-[5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일]-부티르산 올레오일 에스테르 (벤다무스틴  $C_{18}$  에스테르)의 제조:

[0131]

방법 A: 오버헤드 교반기, 질소 스위프가 있는 응축기, 온도 제어기가 있는 가열 맨틀 및 열전쌍이 장착된 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 1-옥타데칸올 (50g, 185mmol, 7.3eq)을 충전했다. 고체가 용융되도록 가열한 후, 4-(5-아미노-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일)-부티르산 (10g, 25.3mmol, 1.0eq) 및 황산 (0.5mL)을 천천히

첨가했다. 생성된 슬러리를 70°C에서 6시간 동안 교반한 후, 56°C로 냉각시키고, 여기에 메틸렌 클로라이드 (150mL)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 물 (100mL)로 세척했다. 상 분리 후, 또 다른 추출을 메틸렌 클로라이드 (100mL)를 사용하여 수행했다. 유기상을 합하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 건조제를 여과하여 제거했다. 여과물을 농축시키고, SFC 단리했다. 백색 고체를 감압 하 SFC 분획에서 용매의 증발로부터 수득하고, 실온에서 하우스 진공으로 5일 동안 건조시켜 1.2g의 목적하는 생성물을 7.1% 수율 및 95.4A% 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.74 (m, 7H), 3.62 (m, 4H), 2.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.22 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.60 (quint, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.28 (m, 30H), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); LC/MS (ESI, m/z) 610(M+1).

[0132]

[0133] 방법 B: 교반 막대, 질소 스위프 및 열전쌍이 장착된 500mL 3구 등근 바닥 플라스크에 벤다무스틴 HCl (5.04g, 12.8mmol), 1-옥타데칸올 (4.15g, 15.3mmol), N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC, 3.17g, 15.4mmol), 4-디메틸아미노페리딘 (DMAP, 0.31g, 2.56mmol) 및 메틸렌 클로라이드 (250mL)를 충전했다. 생성된 슬러리를 16시간 동안 실온에서 교반했다. 고체가 제조되었고 반응 혼합물로부터 여과에 의해 제거했다. 여과물을 물 (150mL)로 세척했다. 상 분리 후, 유기상을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 건조제를 여과하여 제거하고 여과물을 농축시키고, EtOAc 및 헵탄의 혼합물을 사용하여 ISCO 크로마토그래피 정제하여 백색 고체 5.68g (73% 수율)을 99A% 순도로 수득했다.

[0134]

4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 도코실 에스테르 (벤다무스틴 C<sub>22</sub> 에스테르)의 제조: 교반 막대, 열전쌍 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 5.0g (12.7mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 4.2g (12.9mmol, 1.01eq)의 테트라데실 알콜, 2.7g (12.9mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 50mL의 디클로로메탄 (MDC) 및 0.16g (1.27mmol, 0.1eq)의 N,N-디메틸아미노 피리딘 (DMAP)을 충전했다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 HPLC 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 습윤 케이크를 50mL로 세척했다. 두 교대 정제 절차를 전개했다. 여과물을 DI 수로 세척하고 (2 X 150mL), 황산나트륨 상에서 건조시키고 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 생성된 왁스질 잔류물을 80g의 실리카겔 60, 230-400 메쉬 상에서 크로마토그래피하고, 100% MDC에서 시작한 후, 0.5% 메탄올/MDC 그리고 마지막으로 1% 메탄올/MDC의 구배로 용리하여 100-150mL 분획을 수집했다. 목적하는 생성물을 함유하는 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 잔류물을 다시 20mL의 MDC로 연화처리하고 목적하지 않는 고체는 여과하여 제거했다. 여과물을 진공 하에서 농축시켜 3.65g (5.5mmol, 43.1%)의 목적하는 생성물을 왁스질 백색 고체로서 95.7A%의 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.17 (d, *J* = 8.72 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.28 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 2.36, 8.72 Hz, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.76 Hz, 2H), 3.72 (m, 4H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (m, 4H), 2.91 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.08 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 38H), 0.88 (t, *J* = 6.64 Hz, 3H).

[0135]

[0136] 4-{5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일}부티르산 2-도데실 에스테르 (분지형 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르)의 제조: 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10.0g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 4.77g (5.75mL, 25.6mmol, 1.01eq)의 2-도데칸올, 5.3g (25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 밤새 실온에서 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 25mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 200mL의 MDC로 희석한 후, 4% 중탄산나트륨 수용액 (1 X 500mL)으로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 회백색 고체를 수득했다. 상기 고체를 25mL의 MDC로 연화처리하고 고체 불순물을 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 <sup>1</sup>H NMR에 의해 잔류 2-도데칸올을 함유하는 것을 보여지는 조 생성물을 수득했다. 조 생성물을 100g의 실리카겔 60, 230-400 메쉬를 사용하여 크로마토그래피하고, 먼저 1L의 헵탄, 그 후 500mL의 3:1 헵탄/EtOAc, 500의 2:1 헵탄/EtOAc 그리고 마지막으로 500mL의 1:1 헵탄/EtOAc로 용리하여 100mL 분획을 수집했다. 생성물 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 2.5g (2.5mmol, 2.5%)의 목적하는 생성물을 회백색 고체로서 95.7A%의 순도로 수득했다.

록 농축시켜 5.35g (10.16mmol, 40%)의 생성물을 밝은 보라색 점성 오일로서 99.5A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.31 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.28 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 2.36, 8.76 Hz, 1H), 4.8 (m, 1H), 3.7 (s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.42 (t, *J* = 7.36 Hz, 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* = 6.68 Hz, 3H).

[0137]

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 제조

열전쌍, 가열기/냉각기, 질소 유입구, 첨가 할때기, 응축기 및 진공 라인이 장착된 20L 재킷형 원통형 켐글라스 반응 용기에 10부피의 트레이스(trace) GC 분석 등급 메틸렌 클로라이드 중 428g (1.10mmol)의 전처리 벤다무스틴 히드로클로라이드의 슬러리를 충전했다. 교반을 100RPM으로 설정하고 재킷을 20°C로 설정했다. 상기 혼합물에 디이소프로필에틸아민 (213 ml, 1.1eq)을 첨가 할때기를 통해 10분에 걸쳐 첨가했다. 34분 동안 유지한 후, 용융된 도데칸올 (227g, 1.1eq)을 한 번에 첨가했다. 11분 동안 유지한 후, EDCI (320.3g, 1.5eq)를 회분에 첨가했다. 생성된 투명한 황색 용액을 ~20°C에서 23.5시간 동안 교반했다. 이 시점에서, IPC는 0.54%의 출발 물질이 남아있음을 나타내었다. 10부피의 물을 첨가하고, 반응을 추가 15분 동안 교반했다. 하부 유기층을 따라내고, 5μm 필터 카트리지를 통해 여과하고, 필터 카트리지를 1부피의 GC 분석 등급 메틸렌 클로라이드로 헹구었다. 메틸렌 클로라이드 용액을 진공 하에서 농축시켜 조 생성물을 점성 황색 오일로 수득했다. 5부피의 여과한 n-헵탄을 오일에 첨가하고, 혼합물을 진공 하에서 농축시켜 잔류 메틸렌 클로라이드를 제거하여 98.0% 수율로 전환되는 92.9중량%의 615g의 조 고체를 수득했다. 최종 순도는 건조물 기준으로 98.4%이었다.

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 정제

조 CEP-40125 (1100g API, 1250g 조물질)를 n-헵탄 (6부피) 중에 용해시키고, 열전쌍, 가열기/냉각기, 질소 유입구, 응축기 및 진공 라인이 장착된 20L 재킷형 원통형 켐글라스 반응 용기로 전달했다. 슬러리를 40°C로 가온시켜 모든 고체를 용해시켰다. 32.6°C에 도달하면, 용해가 이루어졌다. 반응 혼합물을 그 후 17.7°C로 2.5시간에 걸쳐 냉각시키고, 이 시점에서 생성물이 침전되었다. 반응 혼합물을 그 후 23°C로 재가온시켜 미세 입자를 26분에 걸쳐 용해시키고, 4°C로 2시간에 걸쳐 냉각시켰다. 고체를 밀봉 필터를 통해 여과하고 2부피의 저온 n-헵탄으로 4.5시간에 걸쳐 세척했다. IPC는 0.20% 잔류 도데칸올을 나타내었다. 고체를 진공 하에서 24시간 동안 30°C에서 일정한 중량으로 건조시켜 1018g CEP-40125를 92.5% 수율을 나타내는 98.3% 순도로 수득했다.

4-[5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일]부티르산 5-데실 에스테르 (분지형 벤다무스틴 C<sub>10</sub> 에스테르)의 제조: 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 3.0g (7.6mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 1.21g (7.7mmol, 1.01eq)의 5-데칸올, 1.59g (7.7mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 30mL의 1,2-에틸렌 디클로라이드 (EDC) 및 0.1g (0.76mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응을 75°C에서 5일 동안 공정중 분석이 반응이 완결되었음을 나타낼 때까지 교반했다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 5mL의 EDC로 세척했다. 여과물을 4% 중탄산나트륨 수용액 (1 X 50mL)으로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 잔류물과 동일한 조건 하에서 시행한 10g 회분으로부터의 잔류물을 합하고, 합한 회분을 크로마토그래피했다. 크로마토그래피를 100g의 실리카겔 60, 230-400 메쉬를 사용하여 수행하고, 먼저 2L의 헵탄, 그 후 1L의 3:1 헵탄/EtOAc 및 1L의 2:1 헵탄/EtOAc로 용리하여 100mL 분획을 수집했다. 생성물 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 3.97g (7.96mmol, 24.2%)의 생성물을 투명한 황색 오일로서 99.4A% HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.31 (d, *J* = 8.76

Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.28 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 2.40, 8.80 Hz, 1H), 4.8 (m, 1H), 3.7 (s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 2.02 (m, 2H), 1.48 (m, 4H), 1.25 (s, b, 10H), 0.84 (m, 6H).

4-[5-[비스-(클로로에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤즈이미다졸-2-일]부티르산 시클로헥실 에스테르의 제조: 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 온도 제어기 및 질소 스위프를 장착한 후, 10g (25.34mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 2.56g (2.7mL, 25.6mmol, 1.01eq)의 시클로헥산올, 5.3g

(25.6mmol, 1.01eq)의 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 100mL의 MDC 및 0.31g (2.54mmol, 0.1eq)의 DMAP를 충전했다. 반응 슬러리를 RT에서 18h 동안 공정중 분석이 반응이 완결되었음을 나타낼 때까지 교반했다. 두 신규한 주요 생성물 피크가 관찰되었다. 고체를 진공 여과하여 제거하고 5mL의 MDC로 세척했다. 여과물을 4% 중탄산나트륨 수용액 (2 X 100mL)으로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 일부 고체가 존재하는 황색 오일을 수득했다.  $^1\text{H}$  NMR 분석은, 잔류 DMAP 및 시클로헥산올이 DCC 부산물과 함께 목적하는 생성물에 추가로 존재함을 나타내었다. 잔류물을 50mL의 MDC로 슬러리화하여 잔류 시클로헥산올을 제거한 후, 진공 하에서 농축시키고 크로마토그래피했다. 크로마토그래피는 50g의 실리카겔 60, 230-400 메쉬를 사용하여 수행하고, 1:1 헵탄/EtOAc로 용리하여 100mL 분획을 수집했다. 생성물 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 3.11g (7.06mmol, 27.9%)의 생성물을 회백색 고체로서 97.8A%의 HPLC 순도로 수득했다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.31 (d,  $J$  = 8.76 Hz, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 2.28 Hz, 1H), 6.77 (dd,  $J$  = 2.40, 8.80 Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 3.7 (s, 8H), 3.65 (s, 3H), 2.83 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.44 (t,  $J$  = 7.36 Hz, 2H), 2.00 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.65 (m, 2H), 1.33 (m, b, 6H).

[0145]

4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-부티르산 PEG-2000 에스테르 (벤다무스틴 PEG-2000 에스테르)의 제조: 교반 막대, 열전쌍, 응축기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 100mL 3구 유리 용기에 벤다무스틴 히드로클로라이드 (2.0g, 5.1mmol, 1.0eq.) 및 디클로로메탄 (30mL)을 충전했다. 트리에틸 아민 (0.71mL, 5.1mmol)을 슬러리에 22°C에서 첨가하고, 20분 동안 교반했다. 메톡시폴리에틸렌 글리콜 2000 (PEG-OMe-2000, 12.2g, 6.1mmol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDAC, 1.5g, 7.6mol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 22°C에서 5.5시간 동안 교반했고, 이 시점에서 PEG-OMe-2000 (1.0g)을 첨가한 후, 주말 3일 동안 교반했다. 물 (20mL)을 첨가하고 1M 염산을 첨가하여 pH를 pH 5-6으로 조정했다. 상이 천천히 분리되었다. 수성 부분을 20mL의 디클로로메탄으로 재-추출하고, 합한 디클로로메탄 부분을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 건조제를 제거하기 위해 여과한 후, 여과물을 진공 하에서 농축시켜 생성물을 왁스질 고체로 제조했다. 고체를 10mL의 헵탄 중에 실온에서 슬러리화했다. 생성물을 여과하여 수집하고 30°C 진공 하에서 건조시켜, 백색이고 분말상인 고체 11.7g (99% 수율)을 HPLC에 의한 97.9A% 순도로 수득했다.

 $^1\text{H}$  NMR

(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.32 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.12 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 3.70 (m, 12H), 3.60 (m, 3H), 3.51 (m, 224H), 3.43 (m, 4 H), 3.32 (m, 58 H), 2.84 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.01 (quint,  $J$  = 7.3 Hz, 2H).

[0147]

4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-부티르산 PEG-5000 에스테르 (벤다무스틴 PEG-5000 에스테르)의 제조: 교반 막대, 열전쌍, 응축기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 50mL 3구 유리 용기에 벤다무스틴 히드로클로라이드 (0.5g, 1.27mmol, 1.0eq.) 및 디클로로메탄 (15mL)을 충전했다. 트리에틸 아민 (0.18mL, 1.28mmol)을 슬러리에 22°C에서 첨가하고, 20분 동안 메톡시폴리에틸렌 글리콜 5000 (PEG-OMe-5000, 6.33g, 1.27mmol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDAC, 0.36g, 1.88mol)와 함께 교반했다. 반응 혼합물을 22°C에서 밤새 교반했다. 물 (20mL)을 첨가하고 1M 염산을 첨가하여 pH를 pH 3-4로 조정했다. 상이 천천히 분리되었다. 수성 부분을 10mL의 디클로로메탄으로 재-추출했다. 합한 디클로로메탄 부분을 염수 (20mL)로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조시켰다. 건조제를 제거하기 위해 여과한 후, 여과물을 진공 하에서 농축시켜 생성물을 왁스질 고체로 제조했다. 고체를 20mL의 헵탄 중 실온에서 슬러리화했다. 생성물을 여과하여 수집하고 30°C 진공 하에서 건조시켜, 백색이고 분말상인 고체 5.24g (77% 수율)을 HPLC에 의한 99A% 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.38 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.72 (br s, 8H), 3.68 (m, 5H), 3.59 (m, 3H), 3.51 (m, 436 H), 3.42 (m, 3H), 3.31 (m, 28 H), 2.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (t, 2H, DMSO와 부분적으로 중첩), 2.01 (quint, *J* = 7.3 Hz, 2H).

[0149]

벤다무스틴 메틸 에스테르의 에스테르교환의 일반적 절차

교반 막대, 열전쌍, 딘-스타크(Dean-Stark) 트랩이 있는 응축기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 50mL 3구 유리용기에 벤다무스틴 메틸 에스테르 (0.5g, 1.27mmol, 1.0eq.), 촉매 (0.05-1.4 eq.), 적절한 용매 (5-15부피) 및 과량의 도데칸올 (5-10eq.)을 충전했다. 생성된 반응 혼합물을 환류 가열하고, HPLC로 모니터링했다. 다양한 조건 하에서의 결과를 아래에 요약했다.

촉매	촉매 (eq)	용매	용매 부피	알콜 당량	온도 (°C)	딘-스타크 트랩	시간 (h)	출발 물질 (HPLC A%)	생성물 (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	톨루엔	10	2.50	70	N	24	19.3	69.7
I <sub>2</sub>	0.25	톨루엔	5	2.50	75	N	7	96.0	0.2
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.05	크실렌	10	1.01	130	N	7	92.7	4.0
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.10	크실렌	5	10.0	130	N	6	10.5	85.5
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.10	크실렌	5	10.0	160	N	5	9.0	78.6
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.10	크실렌	15	5.00	160	Y	6	1.0	97.0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5	톨루엔	10	5.0	100	N	23	78.9	13.5
DMAP	0.5	톨루엔	10	5.0	100	N	23	83	0
p-TSA	0.5	크실렌	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
슈퍼베이스	0.5	THF	10	5.0	25-45	N	27	3.3	49.8
Sm(Oi-Pr) <sub>3</sub>	0.1	크실렌	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	크실렌	15	5.0	150	Y	3	0.3	96.9
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.05	톨루엔	15	5.0	105	N	70	78.9	15.9
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.10	톨루엔	15	5.0	115	Y	22	ND	96.4
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.05	톨루엔	15	5.0	130	N	24	83.2	4.1
TiO(acac) <sub>2</sub>	0.05	톨루엔	15	5.0	115	Y	21	0.4	97.7

[0152]

벤다무스틴 히드로클로라이드 아미드의 제조

4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-N-데실-부티르아미드 (벤다무스틴 C<sub>10</sub> 아미드): 교반 막대, 열전쌍, 냉각조, 60mL 균압 적하 깔때기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 동근 바닥 플라스크에 10.0g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 10.6g (27.8mmol)의 HATU 및 100mL의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF)를 충전했다. 이러한 교반한 황색 용액에 4.41mL (3.27g, 25.3mmol)의 N,N-디이소프로필 에틸아민 (DIPEA)을 첨가했다. 27.1°C로의 발열이 보였고 용액이 보다 어두운 황색이 되었다. 반응을 6.6°C로 냉각시키고, 여기에 20mL의 DMF 중 6.2mL (4.59g, 35.5mmol)의 DIPEA, 5.11mL (4.1g, 25.6mmol)의 테실 아민의 용액을 13분에 걸쳐 2.7-7.6°C에서 적가했다. 일단 첨가가 완결되면, 반응을 <10°C에서 1.5시간 동안 교반했고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 회분을 200mL의 DI 수상에서 켄칭시키고 에틸 아세테이트 (2 X 175mL)로 추출했다. 유기상을 합하고, 10% 인산수소나트륨 (1 X 200mL), 8% 수성 중탄산 나트륨 (1 X 200mL) 및 염수 (1 X 200mL)로 세척한 후, 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 끈적한 백색 고체를 수득했다. 상기 고체를 헵坦 (75mL)으로 연화처리하자 유동성 고체가 되었고, 이를 진공 여과로 단리했다. 습윤 케이크를 진공 오븐 내 25°C에서 밤새 건조시켜 13.33g (25.3mmol, 100%)의 목적하는 생성물을 백색 고체로서 98.01A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.28 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 2.36, 8.8 Hz), 3.7 (s, 8H), 3.66 (s, 3H), 3.01 (q, *J* = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.22 (s, b, 14), 0.84 (t, *J* = 6.68 Hz, 3H).

[0155]

[0156]

4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-N-테트라데실-부티르아미드 (벤다무스틴 C<sub>14</sub> 아미드): 교반 막대, 열전쌍, 냉각조, 60mL 균압 적하 깔때기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 10.0g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 10.6g (27.8mmol)의 HATU 및 100mL의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF)를 충전했다. 이러한 교반한 황색 용액에 4.41mL (3.27g, 25.3mmol)의 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIPEA)을 첨가했다. 27.1°C로의 발열이 보였고 용액이 보다 어두운 황색이 되었다. 반응을 3.3°C로 냉각시키고, 여기에 40mL의 DMF 중 6.2mL (4.59g, 35.5mmol)의 DIPEA, 5.75 gf (25.6mmol)의 테트라데실 아민의 용액을 6분에 걸쳐 <10°C에서 적가했다. 일단 첨가가 완결되면, 반응이 매우 농후해져 교반하기 어려워진다. 이를 오버헤드 교반기 및 열전쌍이 장착된 500mL 3구 등근 바닥 플라스크로 옮긴 후, RT에서 3시간 동안 교반하고, 그 동안 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 회분을 400mL의 DI 수 상에서 켄칭시키고 에틸 아세테이트 (2 X 300mL)로 추출했다. 유기상을 합하고, 10% 인산수소나트륨 (1 X 300mL), 8% 수성 중탄산나트륨 (1 X 300mL) 및 염수 (1 X 300mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 잔류물을 100g의 실리카겔 60, 230~400 메쉬를 사용하여 크로마토그래피로 정제하고, 1% MeOH/MDC (2L), 2.5% MeOH/MDC (1L) 및 5% MeOH/MDC (1L)로 용리하여 ~100mL 분획을 수집했다. 생성물 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 7.86g (14.6mmol, 57.6%)의 목적하는 생성물을 백색 고체로서 97.3A%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.84 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.22 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 2.36, 8.84 Hz), 3.71 (s, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.01 (q, *J* = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.28 (s, b, 22), 0.84 (t, *J* = 7.04 Hz, 3H).

[0157]

[0158]

4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-N-옥타데실-부티르아미드 (벤다무스틴 C<sub>18</sub> 아미드): 교반 막대, 열전쌍, 냉각조, 60mL 균압 적하 깔때기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 등근 바닥 플라스크에 10.0g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 10.6g (27.8mmol)의 HATU 및 100mL의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF)를 충전했다. 이러한 교반한 황색 용액에 4.41mL (3.27g, 25.3mmol)의 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIPEA)을 첨가했다. 27.1°C로의 발열이 보였고 용액이 보다 어두운 황색이 되었다. 반응을 2.0°C로 냉각시키고, 여기에 0mL의 DMF 중 6.2mL (4.59g, 35.5mmol)의 DIPEA, 7.65g (25.6mmol)의 옥타데실 아민의 혼탁액을 피펫을 통해 첨가했다. 일단 첨가가 완결되면 반응이 매우 농후해져 교반하기 어려워진다. 이를 실온으로 가온시키고 자기 교반 막대를 오버헤드 교반기로 교체했다. 회분을 RT에서 밤새 교반했고, 이 시간 이후 공정중 분석은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 회분을 300mL의 DI 수 상에서 켄칭시키고, 디클로로메탄 (2 X 150mL)으로 추출했다. 유기상을 합하고, 10% 인산수소나트륨 (1 X 300mL), 8% 수성 중탄산나트륨 (1 X 300mL) 및 염수 (1 X 300mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켰다. 잔류물을 100g의 실리카겔 60, 230~400 메쉬를 사용하여 크로마토그래피로 정제하고, 1% MeOH/MDC (2L), 2.5% MeOH/MDC (1L) 및 5% MeOH/MDC (1L)로 용리하여 ~100mL 분획을 수집했다. 생성물 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 5.11g (8.38mmol, 33%)의 목적하는 생성물을 백색 고체로서 90.9A%의 HPLC 순도로 수득했다. 주요 불순물은 출발 아민 중 불순물로부터 초래되는 C-16 아미드인 것으로 나타났다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,

DMSO-d6) δ 7.72 (s, b, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.84 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 2.22 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 2.36, 8.84 Hz), 3.71 (s, 8H), 3.70 (s, 3H), 3.01 (q, *J* = 6.8, 12.68, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.44 Hz, 2H), 2.18 (t, *J* = 7.36 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.28 (s, b, 30H), 0.85 (t, *J* = 6.32 Hz, 3H).

[0159]

[0160]

(S)-2-(4-{5-[비스-(2-클로로-에틸)-아미노]-1-메틸-1H-벤조이미다졸-2-일}-부티릴아미노)-프로피온산 메틸 에스테르: 교반 막대, 열전쌍, 냉각조, 첨가 깔때기 및 질소 유입구/유출구가 장착된 250mL 3구 등근 바닥 플라

스크에 10g (25.3mmol)의 벤다무스틴 히드로클로라이드, 10.6g (27.8mmol)의 HATU 및 100mL의 DMF를 충전했다. 회분을 1.9°C로 냉각시키고, 여기에 8.8mL (6.54g, 50.6mmol)의 DIPEA를 2분에 걸쳐 첨가했다. 반응이 9°C로 발열되었고 오렌지색이 되었다. 20mL의 DMF 중 3.57g (25.6mmol)의 L-알라닌 메틸 에스테르 히드로클로라이드 및 6.2mL (4.57g, 35.4mmol)의 DIPEA의 용액을 10분에 걸쳐 4.9–5.7°C에서 적가했다. 반응을 천천히 1시간에 걸쳐 RT로 가온시키고 3시간 동안 교반했고, 이 때 공정중 검정은 반응이 완결되었음을 나타내었다. 회분을 400mL의 1:1 에틸 아세테이트/DI 수 상에서 켄칭시켰다. 층을 분리하고, 유기층을 10% 인산수소나트륨 (1 X 200mL), 8% 중탄산나트륨 (1 X 200mL) 및 염수 (1 X 200mL)로 세척한 후, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에서 건조되도록 증발시켰다. 잔류물을 100g의 실리카겔 60, 230–400 메쉬를 사용하여 크로마토그래피로 정제하고, 1% MeOH/MDC (3L), 2.5% MeOH/MDC (1L) 및 5% MeOH/MDC (500mL)로 용리하여 ~100mL 분획을 수집했다. 생성물을 함유 분획을 합하고 진공 하에서 건조되도록 농축시켜 7.1g (16.0mmol, 63.3%)의 목적하는 생성물을 백색 고체로서 97.4%의 HPLC 순도로 수득했다.

<sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.25 (d, *J* = 6.92 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.84 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 2.32, 8.88 Hz), 4.25 (q, 1H), 3.72 (s, 8H), 3.71 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.87 (t, *J* = 7.48 Hz, 2H), 2.25 (t, *J* = 7.52 Hz, 2H), 1.99 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 7.32 Hz, 3H).

[0161]

[0162] 본 발명의 벤다무스틴 에스테르의 용액 제제를 제조하는 일반적 절차:

[0163] 본 발명의 벤다무스틴 에스테르의 원액을 디메틸아세트아미드 ("DMA") 및 솔루톨® HS-15의 60/40 (v/v) 혼합물 중에 약 100mg/mL 농도로 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 용해될 때까지 교반했다. 수 개월 동안 안정한, 생성된 원액을 0.9% 염수를 사용하여 목적하는 농도로 희석시키고 약 2시간 이내에 투여했다.

[0164] 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르 용액 제제: 320.1mg의 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르를 4mL의 DMA 및 솔루톨® HS-15의 60/40 (v/v) 혼합물 중에 용해시켜 원액을 제조했다. 혼합물을 약 2시간 동안 용해될 때까지 교반했다. 투여 전, 1.00mL의 원액을 제거하여 원액을 희석시키고, 16.20mL 염수를 첨가하고, 5분 동안 실온에서 교반했다. 생성된 제제는 3mg-equ/mL 벤다무스틴이었다.

[0165] 잔류 에탄올을 제거하기 위한 전처리:

[0166] 벤다무스틴 히드로클로라이드 (277g)를 5L 증발 플라스크에 충전한 후, 2부피의 DI 수 및 5부피의 아세톤을 충전했다. 용매를 진공 하 40°C의 최대 온도에서 5.5시간 동안 증류했다. 추가로 5부피의 아세톤을 첨가하고, 생성된 슬리리를 대기압 하 35°C에서 회전 증발기 상에서 15분 동안 회전시켰다. 그 후, 회분을 밀봉 소결 유리 깔때기를 통해 여과하고, 생성된 백색 고체를 2부피의 아세톤으로 행구었다. 고체를 건조 트레이로 옮기고 40°C에서 일정한 중량이 되도록 17시간 동안 건조시킨 후, 266g (96.0%)의 생성물을 0.26%의 KF를 갖는 99.8A% 순도로 단리했다.

[0167] 본 발명의 벤다무스틴 에스테르의 인간 혈청 알부민 ("HSA") 나노입자 제제를 제조하는 일반적 절차

[0168] 디클로로메탄 및 계면활성제로서 HSA를 사용하여 O/W 에멀젼으로부터 나노입자를 형성했다. 약 120mg/mL의 농도로 디클로로메탄 중 목적하는 양의 벤다무스틴 에스테르를 용해하여 오일상을 제조했다. 5–15x 부피의 물 (디클로로메탄 기준 w/w) 중에 2–4x 양의 HSA (벤다무스틴 에스테르 기준 w/w)를 용해시켜 수상을 제조했다. 전형적으로, 만니톨을 수성상에 5–10%로 첨가하여 주사용으로 등장성인 용액을 제조하고, 동결건조 후 제약상 적절한 생성물을 제공했다. IKA 핸드-헬드 균질화기를 중간 강도로 약 30초 동안 사용하여 오일상 및 수상을 유화시켜 O/W 에멀젼을 형성했다. 마이크로플루이다이저(Microfluidizer)® 고압 균질화기 (약 30,000psi에서 5회 통과)를 통해 조 O/W 에멀젼을 가공하여 나노입자를 형성하여, 동적 광산란 (말번 제타사이저)으로 측정시 50–100nm 크기 입자를 제공했다. 용매를 진공하에서 제거하고 생성된 농축물을 투여 전 동결건조시키거나 동결 상태로 저장했다. 상기 제제는 우수한 물리적 및 화학적 안정성을 지녔다.

[0169] 동결건조된 나노입자를 재구성하고 저온 투과 전자 현미경검사 (c-TEM)를 이용하여 분석했다. 대부분의 나노입자는 물 중에 쉽게 분산되는 20–40nm 고령 구체였다. 소수의 입자는 125nm 범위였다. 입자는 모두 매끈한 표면을 가졌다.

[0170] 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 HSA 나노입자: 5mL의 디클로로메탄 중에 600mg의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 용해시켜 오일상을 제조했다. 오일상과 60mL 탈이온 ("DI") 수, 2.4g HSA (미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드

리치(Sigma-Aldrich)로부터의 동결건조된 고체) 및 6.6g 만니톨로 이루어진 수성상을 IKA 울트라-투렉스(Ultra-Turrex) 핸드 헬드 균질화기를 사용하여 유화시켜 거친 에멀젼을 수득했다. 상기 에멀젼을 약 30,000psi에서 마이크로플루이딕스(Microfluidics) M-110P 고압 균질화기에 5회 통과시켰다. 디클로로메탄을 생성된 나노입자 혼탁액으로부터 회전-증발기를 사용하여 제거하고 생성된 수성 혼탁액을 총 부피 100mL가 되도록 DI 수로 희석시켰다. 상기 혼탁액을 그 후 30mL 혈청 바이알 내에 10mL 분취량으로 나누고 동결건조시켰다.

[0171] 폴리-락트산 글리콜산 (PLGA)을 갖는 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 HSA 나노입자: 2.5mL의 디클로로메탄 중에 300mg의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 및 500mg의 PLGA (7,000-17,000의 MW인 50/50 락트산 대 글리콜산; 알드리치 파트# 719897)을 용해시켜 오일상을 제조했다. 오일상과 30mL DI 수, 1.2g HSA (시그마-알드리치로부터의 동결건조된 고체) 및 3.3g 만니톨로 이루어진 수성상을 IKA 울트라-투렉스 핸드 헬드 균질화기를 사용하여 유화시켜 거친 에멀젼을 수득했다. 상기 에멀젼을 약 30,000psi에서 마이크로플루이딕스 M-110P 고압 균질화기에 5회 통과시켰다. 디클로로메탄을 생성된 나노입자로부터 회전-증발기를 사용하여 제거하고 생성된 수성 혼탁액을 총 부피 50mL가 되도록 DI 수로 희석시켰다. 생성된 나노입자는 말번 제타사이저로 측정시 90.5nm ( $Z_{avg}$ )의 입자 크기를 갖는다. 상기 혼탁액을 그 후 30mL 혈청 바이알 내에 10mL 분취량으로 나누고 동결건조시켰다.

[0172] 본 발명의 벤다무스틴 에스테르의 PEG화 나노입자 제제의 제조: 일련의 나노입자 제제를 문헌 [Alexis, F., Molecular Pharmaceutics, 5, (2008), 505-515]에 보고된 PEG 코팅하여 제조함으로써 "스텔스" 코팅을 제공하고 신체의 면역체계를 피하는 입자의 능력을 보조했다. PEG의 혼입은 HSA 대신 PEG 기재 계면활성제 (PEG 및 폴리 락트산의 공중합체)를 사용하여 또는 PEG 기를 HSA 나노입자의 표면 상의 유리 NH<sub>2</sub> 기에 공유 결합시키기 위한 바이오컨쥬게이트 화학을 사용하여 수행했다. 두 시스템은 PK 연구에서 증가된 혈장 순환 시간을 보였다.

[0173] 폴리에틸렌글리콜 (PEG) 코팅을 갖는 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 HSA 나노입자: 5mL의 디클로로메탄 중에 600mg의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 용해시켜 오일상을 제조했다. 오일상과 60mL DI 수, 2.4g HSA (시그마-알드리치로부터의 동결건조된 고체) 및 6.6g 만니톨로 이루어진 수성상을 IKA 울트라-투렉스 핸드 헬드 균질화기를 사용하여 유화시켜 거친 에멀젼을 수득했다. 상기 에멀젼을 ~30,000psi에서 마이크로플루이딕스 M-110P 고압 균질화기에 5회 통과시켰다. 디클로로메탄을 생성된 나노입자 혼탁액으로부터 회전-증발기를 사용하여 제거하고 생성된 수성 혼탁액을 총 부피 50mL가 되도록 DI 수로 희석시켰다. 나노입자의 혼탁액을 그 후 200mL의 100mM pH 8.5 보레이트 완충제로 희석시키고, 생성된 나노입자의 입자 크기 및 제타-전위를 말번 제타사이저로 측정했다. 나노입자는 78.9nm ( $Z_{avg}$ )의 입자 크기 및 -13.0mV의 표면 전하를 가졌다. 혼탁액을 교반하고 150mg의 메톡시-PEG<sub>5,000</sub>-n-히드록시숙신이미드 에스테르 (레이산(Laysan) 중합체)를 첨가했다. 반응을 ~90분 동안 실온에서 혼합하고 입자 크기 및 제타-전위를 재측정했다. 나노입자 입자 크기는 83.6nm ( $Z_{avg}$ )로 확인되었고, 제타-전위는 -7.35mV이었다. 나노입자를 완충제 교환하고, 6.6% (wt/wt) 만니톨 용액 및 50,000 MWCO 정용여과 카트리지를 사용하여 농축시켰다. 상기 혼탁액을 그 후 30mL 혈청 바이알 내에 10mL 분취량으로 나누고 동결건조시켰다.

[0174] 폴리-락트산 글리콜산 (PLGA) 및 폴리옥시에틸렌 락트산 공중합체 (PELA) 계면활성제를 갖는 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자: 2.5mL의 디클로로메탄 중에 300mg의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 및 500mg의 PLGA (7,000-17,000의 MW인 50/50 락트산 대 글리콜산; 알드리치 파트# 719897)을 용해시켜 오일상을 제조했다. 오일상과 30mL DI 수, 0.6g의 PEG-5,000-폴리 락트산 1,000의 공중합체 (문헌 [A. Lucke, *Biomaterials*, 21, (2000), 2361-2370]으로부터의 절차를 사용하여 제조한 공중합체) 및 3.3g 만니톨로 이루어진 수성상을 IKA 울트라-투렉스 핸드 헬드 균질화기를 사용하여 유화시켜 거친 에멀젼을 수득했다. 상기 에멀젼을 ~30,000PSI에서 마이크로플루이딕스 M-110P 고압 균질화기를 통해 5분 동안 가공했다. 디클로로메탄을 생성된 나노입자 혼탁액으로부터 회전-증발기를 사용하여 제거하고 생성된 수성 혼탁액을 총 부피 50mL가 되도록 DI 수로 희석시켰다. 생성된 나노입자는 말번 제타사이저로 측정시 248.0nm ( $Z_{avg}$ )의 입자 크기를 갖는다. 상기 혼탁액을 그 후 30mL 혈청 바이알 내에 10mL 분취량으로 나누고 동결건조시켰다.

[0175] 농축물로부터의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 HSA 나노입자: 13.4g의 디클로로메탄 중에 4.8g의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르를 용해시켜 오일상을 제조했다. 오일상과 111g 탈이온 ("DI") 수 및 9g HSA로 이루어진 수성상을 IKA 울트라-투렉스 핸드 헬드 균질화기를 사용하여 유화시켜 거친 에멀젼을 수득했다. 상기 에멀젼을 약 30,000psi에서 마이크로플루이딕스 M-110P 고압 균질화기에 5회 통과시켰다. 생성된 나노에멀젼 농축물에 12g NaCl을 첨가

하고 용해될 때까지 혼합하여 안정화시켰다. 안정화는 또한 관련 분야에 공지된 기타 방법, 예를 들어 기타 염, 제어된 가열 및/또는 pH 조정을 이용하여 달성할 수 있다. 예를 들어, 글루타르알데히드를 이용한 가교는 또한 응집 방지에 도움을 줄 수 있다.

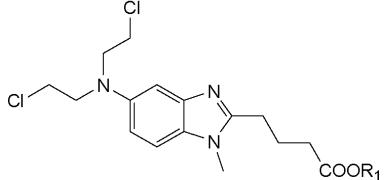
[0176] 디클로로메탄을 생성된 나노입자 혼탁액으로부터 회전-증발기를 사용하여 제거했다. 생성된 수성 혼탁액을 12g의 수크로스와 혼합하고 DI 수를 첨가하여 총 중량을 480g으로 만들었다. 상기 혼탁액을 그 후 20mL 혈청 바이알 내에 7.5mL 분취량으로 나누고 동결건조시켰다.

[0177] HSA 나노입자의 용액은 시간에 따른 느린 입자 크기 증가를 보였다. 일부 용액은 동적 광산란으로 측정시 12-24시간 이내에 크기가 ~200nm에 도달했다. 이러한 증가의 성질은, 나노입자가 응집되거나 제제 중 과량의 단백질이 입자의 표면 상에 첨가되어 입자 크기를 증가시키는지 알아보기 위해 c-TEM을 사용하여 조사했다. 동결건조된 나노입자의 바이알을 재구성하고 c-TEM을 사용하여 영상화했다 (도 21). 나노입자의 동일한 바이알을 실온에서 24시간 동안 정치시킨 후, 재영상화했다 (도 22). 원 샘플은 25-60nm 크기 분포의 구형 입자를 함유했다. 숙성시킨 샘플은 입자 응집 없이 35-130nm의 크기 분포로의 증가를 보였다. 두 샘플은 "유리" 단백질과 일치하는 1-3nm 입자의 집단을 함유했다. 이러한 결과는 용액일 때 나노입자의 표면 상에 "유리" HSA가 첨가되어 입자 크기의 느린 증가를 야기함을 제안한다. pH의 변화, 삼투도의 변화, 과량의 단백질을 제거하기 위한 용매 첨가 및 정용여과를 비롯한 여러 전략을 사용하여 이러한 과정을 완화시킬 수 있다.

[0178] 종양 세포 단리물을 제조하기 위한 프로토콜: MDA-MB-231 유방 암종 세포주 피하 이종이식편 (매트리겔 중 5 x 10<sup>6</sup>개 세포)를 지니는 찰스 리버 랩스(Charles River Labs) 무흉선 누드 마우스를 회생시켜 종양 단리물을 제조했다. 멸균 기구를 사용하고 무균 작업하여, 종양을 안락사시킨 동물로부터 제거했다. 종양을 50mL 멸균 원추형 튜브 안에 넣고 5mL의 트립신을 첨가했다. 종양을 작은 조각으로 절단하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션 했다. 인큐베이션 후, 세포 스트레이너를 제2 멸균 50mL 원추형 튜브 안에 넣고, 제1 튜브의 내용물을 세포 스트레이너에 위치시켰다. 주사기 플런저의 편평한 말단을 사용하여 필터를 통과하도록 조직을 눌렀다. 세포 스트레이너를 FBS를 함유하는 5mL의 배지로 세척했다. 세포를 스피나운시키고 상청액을 폐기했다. 세포를 20mL의 P/S 함유 완전 배지 중에 재현탁시키고, 75cm<sup>2</sup> 플라스크 내에 위치시켰다. 이러한 데이터를 표 1에 기재했다.

[0179] MTS 세포 검정의 일반적 절차: 인간 암종 세포 (2,000개 세포/웰)를 목적하는 농도의 시험 분자 (0 - 200 μM)와 함께 72시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 세포를 MTS 용액 (프로메가(Promega))과 1-2시간 동안 인큐베이션하고, 세포 증식에 대한 화합물 효과를 490nm에서의 흡광도를 측정하여 결정했다. 세포 성장을 적절한 대조군 (위약)의 퍼센트로 표현했다. 이러한 데이터를 사용하여 각 화합물에 대한 IC<sub>50</sub>을 계산했다. 모든 보고한 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 ± SE이었다. 상기 데이터는 표 1에 기재했다.

표 1

	<b>MB-231 (HBC)</b>		<b>H-460 (NSCLC)</b>	
<b>R<sub>1</sub></b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
-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>	N.D.	N.D.	29	

$$R^2 = \text{결정 계수}$$

[0180]

[0181] 상기 생물학적 데이터는 또한 도 1에 나타내었다. 상기 에스테르의 투여 후 벤다무스틴의 혈장 수준은 도 20에 나타내었다.

[0182] 종양 효능

[0183] 누드 마우스 MDA-MB-231 종양 효능 연구에 대한 절차: 캠스 리버 램스 무흉선 누드 마우스에 매트리겔 중 5 x 10<sup>6</sup>개 인간 종양 세포를 피하 주사했다. 마우스 집단에서 ~150mm<sup>3</sup>의 평균 종양 크기가 수득될 때까지 종양 부피를 모니터링했다. 마우스를 그 후 군 당 10마리 마우스의 집단 (n=10)의 9개 처리 군 중 1개 군으로 무작위화 했다 (아래 표에 요약됨). 각각의 제제를 연구의 제1일 및 제2일에 꼬리 정맥 주사를 통해 100μl 고정 부피로 투여했다. 마우스를 칭량하고 종양 부피를 연구 기간 3주 동안 매 3-4일 마다 측정했다. 상기 데이터를 표 2 및 도 2에 나타내었다.

표 2

벤다무스틴 (BM1), 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 및 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르의 MB-231에 대한 종양 효능 테이터의 요약: %종양 억제율, %이환율/사망률, 및 종양 및 혈장 수준.

					1 시간에서의 수준 (ng/mL)			
				에스테르		BM1		
		mg/kg	%종양 억제율	%이환율/사망률	종양	혈장	종양	혈장
HSA 5%	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 10%	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

[0184]

누드 마우스 H460 종양 효능 연구를 위한 절차: H460 종양 세포 (대세포 폐암)를 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지 내에서 95% 공기 및 5% CO<sub>2</sub>로 37°C에서 배양했다. 80-90% 전면생장률에 도달했을 때, 세포를 0.25% 트립신-EDTA 용액으로 5-10분 이내에 탈착시키고, 신선한 배양 배지로 중화시키고, 세포 계수기 (셀로미터 (Cellometer), 넥셀롬(Nexcelom)의 오토 T4)로 계수했다. 배지 및 매트리겔 (1:1 비율) 용액의 혼합물 중 2 x 10<sup>6</sup> 개 세포/100μl를 각 nu/nu 마우스의 오른등쪽 옆구리에 주사했다. 이식받은 마우스를 모니터링하고 전기 캘리퍼스로 측정했다. 종양 크기가 ~150mm<sup>3</sup>에 도달했을 때 연구를 시작했다. 마우스를 측정하고 아래 표에 따라 각 군 당 10마리의 마우스를 갖는 9개 군으로 무작위화했다.

## 종양 효능 투여 군

화합물	제제	용량 (mg/kg 유리 염기 당량)
비히클 대조군	용액	NA
벤다무스틴 HCl	트레안다	37.5
벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르	용액	55
벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르	용액	80
벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르	나노입자	55
벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르	나노입자	80
벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르	나노입자	100
벤다무스틴 C <sub>14</sub> 에스테르	용액	80
벤다무스틴 C <sub>14</sub> 에스테르	나노입자	80

[0186]

화합물을 제제화 한 후 30분 이내에 제제를 100μl 투여량 부피로 꼬리 정맥 주사를 통해 투여했다. 모든 마우스로 침량하고 종양을 주당 2회 측정했다. 연구의 마지막 날에, 혈장, 종양, 폐, 간, 비장, 왼쪽 신장, 뇌 및 다리를 수집하고, 투여 2시간 후의 추가 분석을 위해 신속하게 동결시켰다. 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

벤다무스틴 (BM1), 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 및 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르의 H-460에 대한 종양 효능 데이터의 요약: %종양 억제율, %이환율/사망률, 및 종양 및 혈장 수준.

					1 시간에서의 수준 (ng/mL)			
				에스테르		BM1		
	mg/kg	%종양 억제율	%이환율/사망률	종양	혈장	종양	혈장	
HSA 단백 수용체	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 단백 수용체	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

[0188]

## 약동학적 연구 실험

[0189]

누드 마우스 종양 효능 PK 군에 있어서의 절차: 종양을 지닌 마우스의 일부에 위성 PK 군을 투여했다. 각 군에 종양 효능 군에 기재된 바와 같이 투여했으나, PK 군을 안락사시키고 조직 샘플을 제2일에 투여한 1, 3 및 6시간 후 수집했다. 수집한 조직은 혈액, 폐, 간 및 종양을 포함했다. LC-MS 프로토콜 섹션에 기재된 바와 같이 샘플을 벤다무스틴 HCl 및 상응하는 에스테르 유사체에 대해 분석했다.

[0190]

PK 연구를 위한 LC-MS 실험 프로토콜: 표준 프로토콜에 따른 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)/질량 분광측정 분석을 위해 혈장 및 기타 조직을 준비한 후, 내부 표준물 함유 아세토니트릴을 사용하여 단백질을 침전시켰다. 그 후, 샘플을 텐덤 질량 분광측정법과 커플링된 HPLC를 통해 본 발명의 벤다무스틴 HCl 및 벤다무스틴 에스테르 및 아프레놀롤 (내부 표준물) 둘 다에 대해 분석했다. 조직 샘플을 인산나트륨 완충제 중에서 균질화시키고 검정으로부터 수득된 값을 3배하여 가공 동안의 희석에 대해 보정했다.

[0191]

PK 연구를 위한 동물 투여 프로토콜: 동물 성체 (뉴욕주 킹스턴 소재의 찰스 리버; n=3 또는 4/시점)를 모든 실험에 사용했다. 마우스 또는 래트는 측면 꼬리 정맥을 통한 IV 투여량 투여 전에 밤새 단식시키지 않았다. IV 투여는 마우스에서 100 $\mu$ g의 고정 투여 부피로 또는 래트에서는 1mL/kg의 투여 부피로 투여했다. 마우스를 단두술로 희생시키고 명기된 샘플링 시간에 트렁크 혈액을 혈액판화 튜브 안에 수집했다. 혈액 수집을 위해, 각 래트 (비안락사됨)를 투명한 플렉시글라스(Plexiglas)® 리스트레이닝 튜브 내에 위치시키고, 혈액 샘플 (대략 0.25mL)을 명기된 샘플링 시간에 측면 꼬리 정맥으로부터 혈액판화 수집 튜브 안으로 취하였다 (비고: 투여 전 샘플은 수득하지 않음). 이러한 절차에서 예외사항은 래트를 단두술에 의해 희생시킨 마지막 샘플링 시간 및 꼬리 정맥을 통한 혈액 대신 트렁크 혈액을 수득했다는 것이다. 원심분리하여 혈장을 분리할 때까지 혈액 샘플을 습식 얼음 위에 두었다. 혈장 분획을 깨끗하고 건조한 튜브로 옮기고, 건식 얼음 상에서 동결시키고, 분석할 때까지 대략 -20°C에서 저장했다. 전체 뇌 및 기타 고도로 분포된 기관 (간, 폐, 비장, 신장 및 심장)를 미리결정된 시점에서 빠르게 제거하고, 건식 얼음 위에서 동결시켰다. 모든 조직 샘플을 또한 분석할 때까지 대략 -20°C에서 저장했다.

[0192]

약동학적 분석: 약동학적 분석을 준비하기 위해 모든 마우스 및 래트에 대한 혈장 농도 데이터를 엑셀 스프레드시트 안에 입력했다. 평균 약동학적 파라미터는 윈Nonlin (WinNonlin) 소프트웨어 (프로페셔널 버전 4.1, 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 파사이트 코퍼레이션(Pharsight Corporation))를 사용하여 혈장 농도 대 시간 데이터의 비-구획 분석 (Gibaldi and Perrier 1982)으로 추정했다. 혈장으로부터의 제거를 위한 말단 속도 상수 ( $\beta$ )는 반-로그 혈장 농도 대 시간 곡선의 말단 부분의 선형 회귀로 추정했다. 겉보기 말단 반감기 ( $t_{1/2}$ )는 0.693을  $\beta$ 로 나누어 계산했다. 시간 0에서부터 단일 투여 후 마지막 측정가능한 농도의 시간 사이 ( $AUC_{0-t}$ )의 혈장 농도 대 시간 곡선 아래의 면적을 선형 사다리꼴 공식으로 결정했다. 0에서 무한대 사이 ( $AUC_{0-\infty}$ )의 면적은  $AUC_{0-t}$  및 마지막 측정가능 농도에서부터 무한대까지 외삽한 면적 ( $Clast/\beta$ )의 합으로 계산했다. AUC의 계산 목적으로 투여 전 농도는 모두 0으로 가정했다. 마지막 정량가능 샘플링 시간 후 정량 한계 미만 (BLQ)의

임의의 농도는 AUC의 계산 목적으로 빈 값으로 고려했고, 주어진 샘플링 시간 동안 평균 농도의 계산을 위해 0으로 처리했다.

[0194]

약동학적 연구로부터의 데이터를 표 4-17에 나타내었다.

표 4

혈장	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
t <sub>1/2</sub> , h	5.7	ND	6.0	ND
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	66885	ND	55296	ND
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	67131	ND	55417	ND

[0195]

표 4로부터의 데이터는 또한 도 8에 나타내었다.

표 5

혈액	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
t <sub>1/2</sub> , h	6.3	ND	5.7	ND
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	91549	4424	58021	951
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	91856	ND	58112	ND

[0197]

표 5로부터의 데이터는 또한 도 9에 나타내었다.

표 6

뇌	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
t <sub>1/2</sub> , h	ND	ND	ND	ND
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	9284	299	1010	149
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	ND	ND	ND	ND

[0199]

표 6으로부터의 데이터는 또한 도 10에 나타내었다.

표 7

간	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
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

[0201]

표 7로부터의 데이터는 또한 도 11에 나타내었다.

표 8

폐	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
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

[0203]

표 8로부터의 데이터는 또한 도 12에 나타내었다.

표 9

비장	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
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

[0205]

표 9로부터의 데이터는 또한 도 13에 나타내었다.

표 10

신장	액체 제제		나노입자 제제	
	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르	벤다무스틴	C <sub>12</sub> 에스테르
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

[0207]

표 10으로부터의 데이터는 또한 도 14에 나타내었다.

**표 11**

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 액체 제제, 30 mg/mL, 1 mL/kg 의 투여 후 래트에서의  
벤다무스틴의 혈장, 혈액 및 기관 수준, 도 15

	혈장	혈액	뇌	간	폐	비장	신장
t <sub>1/2</sub> , h	5.7	6.3	ND	4.2	2.0	2.3	6.4
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	66885	91549	9284	13901	22229	10201	19489
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	67131	91856	ND	14111	22286	10362	19966

[0209]

표 11로부터의 데이터는 또한 도 15에 나타내었다.

**표 12**

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 액체 제제, 30 mg/mL, 1 mL/kg 의 투여 후  
벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 혈장, 혈액 및 기관 수준, 도 16

	혈장	혈액	뇌	간	폐	비장	신장
t <sub>1/2</sub> , h	ND	ND	ND	0.8	7.6	3.1	5.3
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	ND	4424	299	2564	12619	25874	2383
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	ND	ND	ND	2586	13246	25927	2605

[0211]

표 12로부터의 데이터는 또한 도 16에 나타내었다.

**표 13**

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자 제제, 30 mg/mL, 1 mL/kg 의 투여 후 래트에서의  
벤다무스틴의 혈장, 혈액 및 기관 수준, 도 17

	혈장	혈액	뇌	간	폐	비장	신장
t <sub>1/2</sub> , h	6.0	5.7	ND	2.6	5.1	1.6	7.0
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	55296	58021	1010	43785	15075	2598	9665
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	55417	58112	ND	44713	15590	2735	10725

[0213]

표 13으로부터의 데이터는 또한 도 17에 나타내었다.

**표 14**

벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자 제제, 30 mg/mL, 1 mL/kg 의 투여 후  
벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 혈장, 혈액 및 기관 수준, 도 18

	혈장	혈액	뇌	간	폐	비장	신장
t <sub>1/2</sub> , h	ND	ND	ND	4.5	8.5	5.4	4.9
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/mL	ND	951	149	13355	28327	13111	1766
AUC <sub>0-∞</sub> , ng*h/mL	ND	ND	ND	13586	32297	13578	1802

[0215]

[0216]

표 14로부터의 데이터는 또한 도 18에 나타내었다.

### 표 15

**벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자 3 mg-eq/kg, i.v. 투여 후 래트에서의 혈장 수준: 상이한 제제의 비교, 도 19**

제제	트레안다	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
평균 ± SD, n = 4					벤다무스틴 C <sub>12</sub> 에스테르 나노입자

[0217]

[0218]

표 15로부터의 데이터는 또한 도 5에 나타내었다.

### 표 16

**벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르 나노입자 3 mg-eq/kg, i.v. 투여 후 래트에서의 벤다무스틴 C<sub>12</sub> 에스테르의 혈장 수준: 상이한 제제의 비교, 도 20**

제제	HSA	HSA/PLGA	PLGA/PELA	HSA w/PEG
t <sub>1/2</sub> , h	ND	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	ND	21 ± 7	36 ± 5	56 ± 4
Vd, L/kg	ND	47 ± 15	428 ± 59	23.3 ± 2.5
CL, mL/min/kg	ND	4194 ± 1071	2109 ± 252	1335 ± 99
평균 ± SD, n = 4				

[0219]

[0220]

표 16으로부터의 데이터는 또한 도 6에 나타내었다.

표 17

용액 제제 3 mg-eq/kg i.v. 투여 후 래트에서의 벤다무스틴 C<sub>16</sub> 에스테르, 시클로헥실  
에스테르 및 5-데카닐 에스테르의 혈장 수준

	벤다무스틴	에스테르	벤다무스틴	에스테르	벤다무스틴	에스테르
혈장	C16 벤다무스틴 에스테르		5-데카닐 에스테르		시클로헥실 벤다무스틴 에스테르	
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	모두 < MQL	517	모두 < MQL
Vd, L/kg	3.3	1.0	1.1		1.6	
CL, mL/min/kg	82	41	78		96	
	1.85% 용매		1.6% 용매		1.4% 용매	
평균, n=3	1/1/1 DMA/PG/솔루톨에서 염수로 희석시킴					

[0221]

[0222] 본 발명의 또 다른 실시양태, 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르를 상기한 방법에 따라 나노입자 정맥내 제제로 제제화하고, CD-1 마우스에 투여했다. 벤다무스틴 (BM1) 및 벤다무스틴 C<sub>14</sub> 에스테르의 양을 마우스 혈장에서 측정했다. 이러한 실험의 결과를 표 18에 요약했다.

표 18

혈장	BM1	C <sub>14</sub> 에스테르	BM1	C <sub>14</sub> 에스테르	BM1	C <sub>14</sub> 에스테르
	<b>30 mg-eq/kg</b>		<b>55 mg-eq/kg</b>		<b>80 mg-eq/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	ND	3.2	ND	2.5	ND	5.2
CL, mL/min/kg	ND	24	ND	29	ND	56
평균, n=3	일부만 나노입자					

[0223]

[0224] 벤다무스틴의 PEG화 에스테르를 또한 시험했다. 벤다무스틴의 PEG-2000 및 PEG-5000 에스테르에 대한 데이터를 아래 표 19 및 20에 나타내었다. 이러한 데이터를 또한 도 19에 나타내었다.

표 19

벤다무스틴 PEG-2000 에스테르, 3 mg-eq/kg i.v., 1 mL/kg 을 투여한 래트에서의  
벤다무스틴의 혈장 수준

벤다무스틴	래트 1	래트 2	래트 3	래트 4	평균	표준 편차	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
벤다무스틴 PEG-2000 에스테르	3 mg-eq/kg, 1 mL/kg						

[0225]

표 20

벤다무스틴 PEG-5000 에스테르, 3 mg-eq/kg i.v., 1 mL/kg 을 투여한 래트에서의  
벤다무스틴의 혈장 수준

벤다무스틴	래트 1	래트 2	래트 3	래트 4	평균	표준 편차	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
벤다무스틴 PEG-5000 에스테르	3 mg-eq/kg, 1 mL/kg						

[0226]

#### 벤다무스틴 에스테르의 시험관내 안정성의 분석

종양 S9 제조: 유방암 (MB-231) 또는 비소세포 폐암 (H460)을 지니는 찰스 리버 랩스 무흉선 누드 마우스를 희생시켰다. 종양을 즉시 제거하고 빙냉 1.15% KCl로 행구었다. 종양을 칭량하고, 절단하고 다졌다. 다진 조직을 4X (v/w) 빙냉 SET 완충제 (250mM 수크로스, 5.4mM Na<sub>2</sub>EDTA 및 20mM 트리스, pH 7.4)와 혼합하고, 조직 균질화기로 균질화했다. 균질화물을 깨끗한 폴리카르보네이트 초원심분리튜브로 옮기고 10,000g으로 4°C에서 20min 동안 스피닝했다. 초원심분리튜브의 상부에 있는 지질을 면봉으로 제거하고, 상청액 (S9) 분취량을 -80°C 냉동기에 저장했다.

시험관내 인큐베이션: 50mM 포스페이트 완충제 (pH 7.4), NADPH- (환원된 니코틴아미드 아데노신 디포스페이트) 재생성 시스템 및 1mg/mL 종양 S9를 함유하는 인큐베이션 혼합물을 37°C 수조 내에서 예비-가온시켰다. 1μl의 벤다무스틴 C6, C8, C12 또는 C14 에스테르를 개별 인큐베이션 혼합물에 첨가하여 반응을 개시하여, 각 10 μM의 벤다무스틴 에스테르의 최종 농도를 수득했다. 설계한 시점에, 인큐베이션 혼합물의 100-μl 분취량을 제거해내어 400μl의 정지 용액과 혼합했다 (0.1% 포름산/아세토니트릴의 용액 중 4 또는 8 μM 티아가빈 [IS]). 모든 샘플을 볼텍스-혼합하고 10분 이상 동안 얼음 위에 둔 후, 단백질을 에펜도르프(Eppendorf) 5417R 원심분리기로 14000rpm x 8min으로 원심분리하여 침전시켰다. 상청액을 HPLC 바이알로 옮기고 고성능 액체 크로마토그래피와 텐덤 질량 분광측정 검출을 사용하는 분석을 위해 10μl를 주사했다.

LC-MS/MS 방법: LC-MS/MS 시스템은 시마즈(Shimadzu) HPLC 및 사이엑스(Sciex) API 4000 MS로 이루어졌다. 크로마토그래피를 폐노메넥스(Phenomenex) 00B-4448-B0, 루나(Luna) PFP(2) 칼럼 (50 x 2mm, 5μm 입자 크기) 상에서 수행했다. 총 이동상 유량은 0.5mL/min이었다. 구배는 70% 이동상 A (0.1% 수성

트리플루오로아세트산) 및 30% 이동상 B (100% 아세토니트릴)로 시작했다. 이동상 B의 비율을 그 후 95%로 0.5min 이내에 선형적으로 증가시키고, 1.3min 동안 그 비율을 유지하고, 1min 이내에 초기 조건으로 재-평형시켰다. 질량 분광계를 각 벤다무스틴 에스테르에 대한 각각의 최적의 조건으로 조정하고 442.2/340.1 (C6), 470.2/340.1 (C8), 526.3/340.1 (C12) 및 554.3/340.1 (C14)의 전이를 모니터링했다.

[0231] 시험관내 안정성 연구로부터의 데이터를 도 3 및 4에 기재했다.

[0232] 전자 현미경 실험

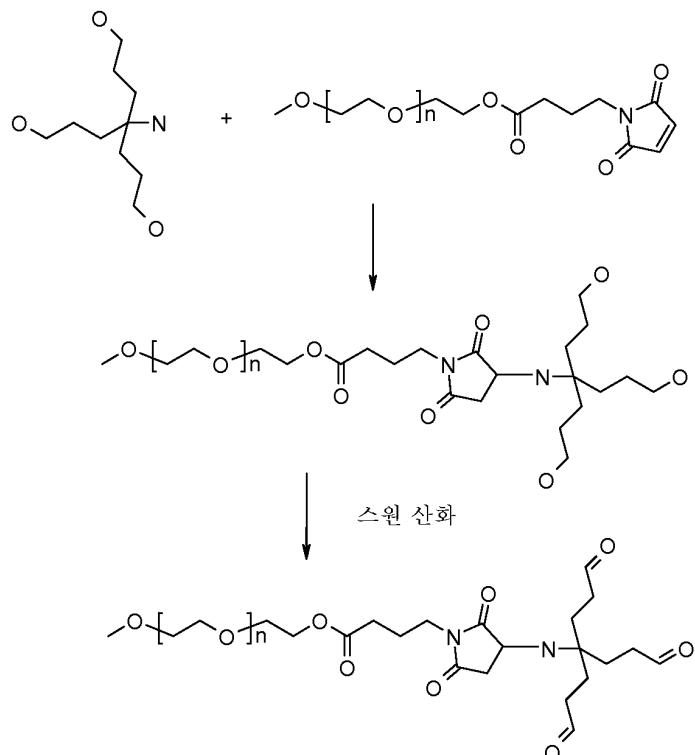
c-TEM 연구를 위한 샘플 제조: 7.8mL의 주사용수 (WFI)를 샘플에 첨가하고 수동으로 뒤집어 혼합하여 샘플을 가용화시켰다. 샘플은 빠르게 ~2-5분 안에 용해되었고, 용액 중 미용해 입자가 보이지 않았다. 샘플을 400 메쉬 구리 그리드 상의 탄소 코팅된 구멍이 많은 탄소 필름으로 지지된 유리화 얼음 내에서 보존했다. 3 $\mu$ L 방울의 비희석 샘플 용액을 깨끗한 그리드에 적용하고, 여과지로 블로팅해내고 즉시 액체 에탄 중 유리화를 진행하여 샘플을 제조했다. 영상화를 위해 전자 현미경으로 옮길 때까지 그리드를 액체 질소 하에 저장했다.

c-TEM 영상화 파라미터: 전자 현미경검사를, FEI 이글 4K x 4K CCD 카메라가 장착되고 120KeV에서 작동하는 FEI Tecnai T12 전자 현미경을 사용하여 수행했다. 그리드의 온도를 -170°C 미만으로 유지시키는 저온 단계를 사용하여 전자 현미경으로 그리드를 옮겼다. 그리드의 영상을 여러 크기로 획득하여 시편의 전체적인 분포를 평가했다. 보다 낮은 배율에서 영상화에 잠재적으로 적합한 표적 영역을 확인한 후, 고 배율 영상을 명목 배율 52,000x (0.21nm/픽셀), 및 21,000x (0.50nm/픽셀)에서 획득했다. -4 $\mu$ m (52,000x) 및 -5 $\mu$ m (21,000x)의 명목 언더포커스 및 ~10-15 e/Å<sup>2</sup>의 전자 투입량에서 영상을 획득했다.

[0235] 전자 현미경검사 실험의 결과를 도 7에 나타내었다.

[0236] 벤다무스틴 에스테르의 HSA 나노입자 제제를 사용한 가교 실험

벤다무스틴 및 본 발명의 벤다무스틴 에스테르의 순환 시간은 HSA-기재 나노입자 제제를 사용하여 연장시킬 수 있는데, 여기서 단백질 모이어티는 나노입자 구조가 형성된 후 공유적으로 가교된다. 예를 들어 문헌 [K. Langer et al. International Journal of Pharmaceutics 347 (2008) 109-117]을 참조한다. 이는 표면 코팅에 보다 많은 구조를 제공할 것이고, 나노입자 내용물의 빠른 방출을 방지할 것이다. 이는 또한 가교제에 PEG 기를 도입하여 나노입자의 "스텔스" 보호를 제공할 수 있다. HSA 나노입자의 효과적인 캡슐화 및 경화는 시판 디알데히드, 글루타르알데히드를 사용하여 실시했다. 적절한-크기 PEG 모이어티의 혼입은, 예를 들어 아래 보여지는 바와 같이 제조된 삼관능성 PEG 가교제를 사용하여 첨가할 수 있다:



[0238]

[0239]

절차: HSA 나노입자를 DI 수를 사용하여 1.5mg/mL 벤다무스틴의 C14 에스테르의 농도로 희석시켰고, 이는 6mg/mL의 HSA 농도에 상응한다. 그 후, 나노입자의 생성된 혼탁액을 자기 교반 막대가 장착된 5개의 유리 바이알 내에 1mL 부분으로 분취했다. 적절한 양의 5% 글루타르알데히드 용액을 첨가하고, 각 바이알을 캐핑하고 실온에서 밤새 교반했다. 각 샘플을 그 후, N-메틸피롤리돈 (NMP) 내로 1에서 10까지 희석시키고 샘플을 마이크로-원심분리기를 사용하여 ~2분 동안 스피닝하여 HSA 및 가교된 HSA 나노입자를 제거했다. 그 후, 상청액을 HPLC로 분석하고, 벤다무스틴의 C14 에스테르의 농도 (피크 면적)를 측정하여 입자 캡슐화를 확인했다. 아래 표는 글루타르알데히드의  $\mu$ L의 함수로서의 비-캡슐화된 벤다무스틴의 C14 에스테르의 농도를 나타낸다.

글루타르알데히드의 $\mu\text{L}$	HPLC 피크 면적
0	4882.02
2	4788.99
5	4778.11
10	4714.02
20	29.55

[0240]

[0241]

데이터는  $3.33\mu\text{l}/\text{mg}$ 의 HSA 비율의 글루타르알데하이드의 첨가가 가교된, 벤다무스틴 에스테르-함유 나노입자의 시스템을 초래하는 데 적합한 것을 보인다.

[0242]

## 생체내 다발성 골수종 모델

[0243]

물질 및 방법

[0244]

RPMI 8226 (인간 혈장낭종, 골수종 B 세포) ATCC # CCL-155;

[0245]

ECM 젤 (매트리겔), 시그마-알드리치, Cat # E1270, 5ml

[0246]

설정된  $\Theta$  (1000000) 만큼의 초기값을 갖는 0.5x0.5x1000000 드로파크트 (Dropout)

500-103

베타문서팀 (Lot # TD-D0815 ABI Lot # 00039P0012)

503401

베다무스틴 C12 에스테르 나노입자 (C12NP) Lot # 2861-242-22 17.6mg/바이알

- [0250] 염화나트륨
- [0251] 주사용수 (데모 에스.에이.(DEMO S.A.))
- [0252] 시험 동물
- [0253] 80 CB.17 SCID 암컷 마우스, 4-6주령, 16-20그램, 하를란 애니멀 브리딩 센터(Harlan animal breeding center)에서 입수함
- [0254] 세포 준비
- [0255] 세포 (ATCC로부터 가져옴)를 RPMI 배지 상에서 배양했다. 세포 혼탁액을 원심분리하고 50% 매트리겔/HBSS 중에 최종 농도  $7 \times 10^7$  개 세포/ml로 재현탁시켰다. 혼탁액을  $100\mu\text{l}$  부피로 마취한 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식했다.
- [0256] 화합물 제조
- [0257] 벨케이드®를 일주일에 1회 제조했다. 7ml의 염수를 3.5mg 분말 함유 원 바이알에 첨가하여 0.5mg/ml를 초래했다. 3ml의 상기 용액을 27ml 염수에 첨가하여 0.05mg/ml 농도를 만들었다.
- [0258] 벤다무스틴 제조: 처리 직전에 13.5mg을 3.6mL의 0.9% 염수/5% 만니톨의 1:1 혼합물에 용해시켰다. 1.05mL의 상기 용액을 0.95ml 희석제에 첨가하여 2mg/ml 용액을 만들었다.
- [0259] C12NP 제조: 처리 직전에 3.1ml SWFI를 17.62mg 함유 샘플 바이알에 첨가했다. 1.05mL의 상기 용액을 0.95ml 희석제에 첨가하여 2mg/ml 용액을 만들었다.
- [0260] 실험 설계
- [0261] 제0일에 마우스에  $7 \times 10^6$  개 RPMI 8226 세포/마우스 (50% 마트리겔/HBSS 중)를 피하 이식했다. 제21일에 마우스를 최적의 평균 중앙 부피 ( $\sim 150\text{mm}^3$ )로 선별하고, 각 9마리 마우스의 8개 군으로 할당했다.

군	N	작용제	경로	용량 및 스케줄
1	9	WFI	iv	제 1 일 및 제 2 일
2	9	벨케이드	iv	0.5mg/kg 격주로
3	9	벤다무스틴	iv	20mg/kg 제 1 일 및 제 2 일에
4	9	벤다무스틴	iv	37.5mg/kg 제 1 일 및 제 2 일에
5	9	C12NP	iv	20mg/kg 제 1 일 및 제 2 일에
6	9	C12NP	iv	37.5mg/kg 제 1 일 및 제 2 일에

- [0262]
- [0263] SCID 마우스의 성질이 (즉, 심각하게 면역 손상됨) 이를 더 취약하고/예민한 동물로 만들고, 따라서 누드 마우스 (이는 비교적 덜 면역-손상됨)에서 사용되는 투여량의 C12NP를 덜 견뎌낼 수 있다는 것을 인지해야 한다. 구체적으로, SCID 마우스에 100mg/kg 및 70mg/kg을 투여하자 허용가능하지 않은 내약성 문제 (즉, 20% 초과 체중 감소)(데이터 보여지지 않음)가 나타났다. 이러한 점 (누드 대 SCID 사이의 내약성 차이)은 세포주-관련 현상인 것으로 여겨진다. 그러므로, 37.5mg/kg 및 20mg/kg의 C12NP의 투여량을 사용하여 연구를 진행한다.

#### 통계적 분석

$$\pi \times \left( \frac{\frac{\pi}{4}}{2} \right)^2 \times \text{길이}$$

[0265] 종양 부피를 다음과 같이 계산했다: . 일원 ANOVA에 이어 터키 사후 비교를 이용하여 체중 증가 및 종양 부피 진행을 분석했다.

[0266] 결과

[0267] 처리 반응을 도 23 및 24에 요약했다. C12NP 20mg/kg을 제외한 모든 치료가 대조군과 비교하여 유의하게 종양 성장을 억제했다 (표 21의 데이터 참고). 37.5mg/kg에서, 벤다무스틴 및 C12NP의 효능은 81% 및 70% 종양 성장 억제로 유사했다. 그러나, 도 24에서 볼 수 있는 바와 같이, C12NP의 내약성은, C12NP로 처리한 동물에서의 적은 체중 감소로 측정되는 바와 같이 벤다무스틴보다 우수했다.

표 21

## 결과의 요약 (제46일)

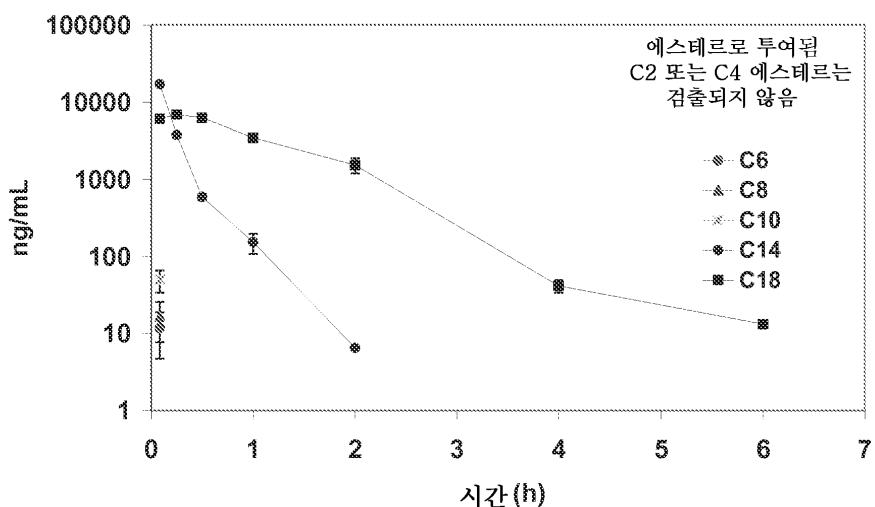
화합물	요법	평균 종양 부피 (평균±se)	%TGI	PR의 번호	CR의 번호	최대 BW (평균) 감소	TRD의 번호	nTRD의 번호
1. 비히클	제1 및 2일에 WFI iv	597 ± 71						
2. 벨케이드® 0.5mg/kg	격주로 i.v.	226 ± 35	62***	0	0	-0.4% 제20일	0	0
3. 벤다무스틴 20 mg/kg	제1 및 2일에 iv	205 ± 44	66***	0	0	-2.7% 제22일	0	0
4. 벤다무스틴 37.5 mg/kg	제1 및 2일에 iv	113 ± 23	81***	0	0	-6.2% 제25일	0	0
5. C12NP 20 mg/kg	제1 및 2일에 iv	408 ± 49	32	0	0	-1.5% 제25일	0	0
6. C12NP 37.5 mg/kg	제1 및 2일에 iv	180 ± 31	70***	0	0	-3.1% 제25일	0	0

\*\*\* p &lt; 0.001 (일원 Anova, 터키 사후 검정)

## 도면

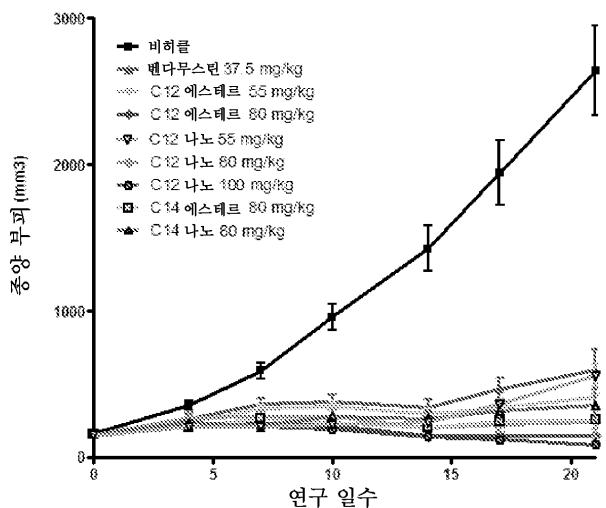
## 도면1

CD-1 마우스에서의 에스테르의 혈장 수준  
3 mg/kg i.v., 3% DMSO, 30% 솔루션, 100 uL



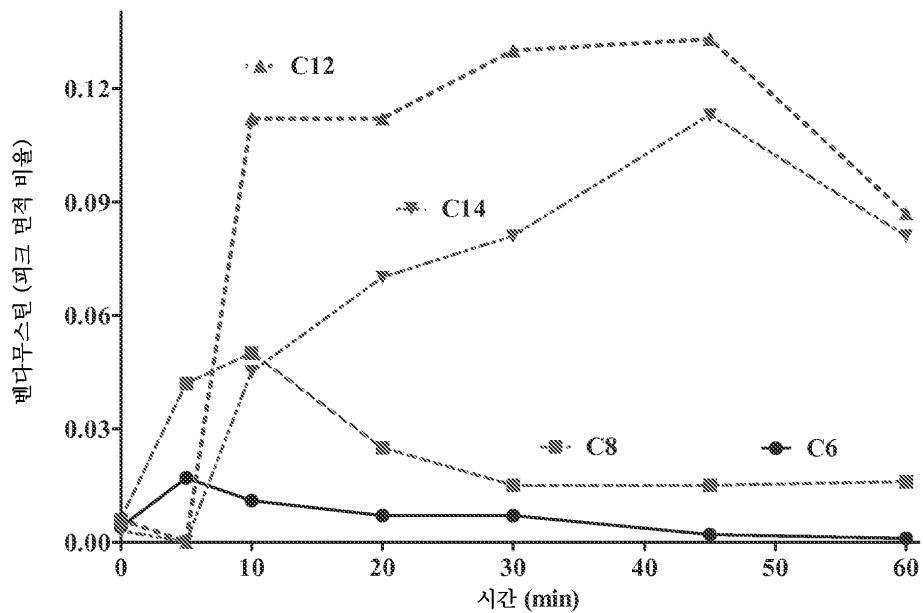
## 도면2

벤다무스틴, 및 벤다무스틴 등가물: C12 용액 및 C12-나노와 C14 용액 및 C14-나노 제제로 투여한 에스테르 제제의 MDA-MB-231 이종이식편을 지니는 마우스의 종양 부피에 대한 효과



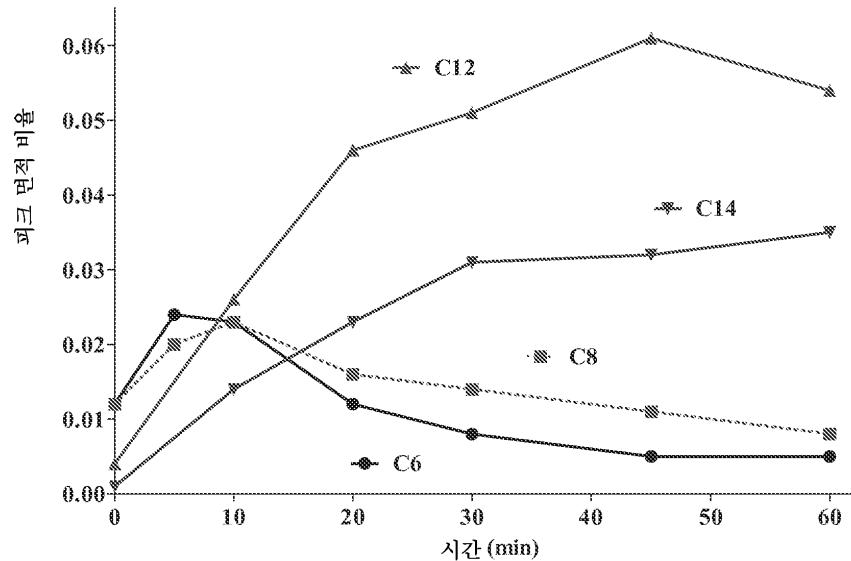
## 도면3

MDA-MB-231 유방 종양 S9와 제2 인큐베이션한 후 모든 4가지 에스테르로부터 형성된 벤다무스틴

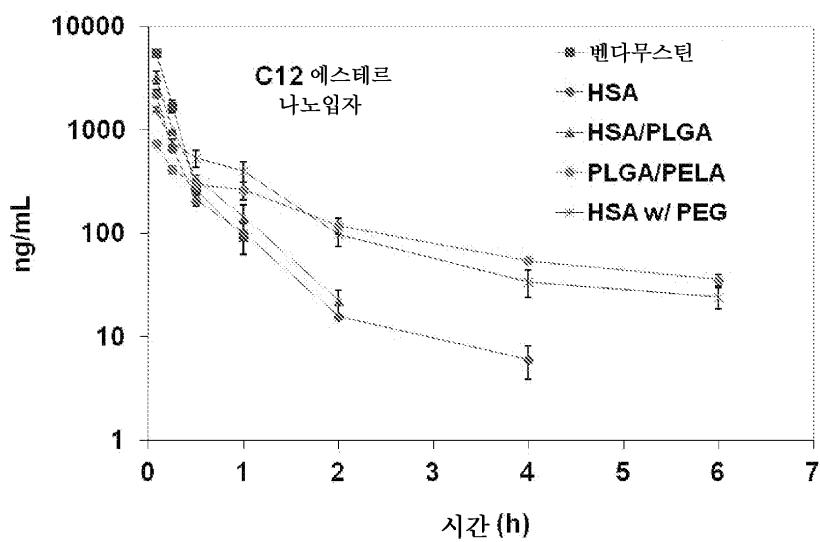


**도면4**

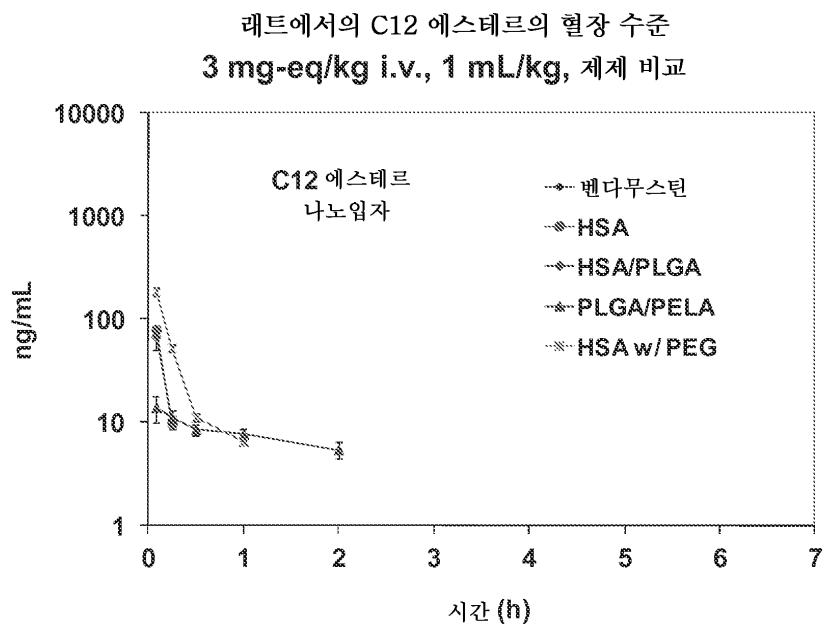
H460 비소세포 폐 종양 S9와 인큐베이션한 후 모든 4가지  
에스테르로부터 형성된 벤다무스틴

**도면5**

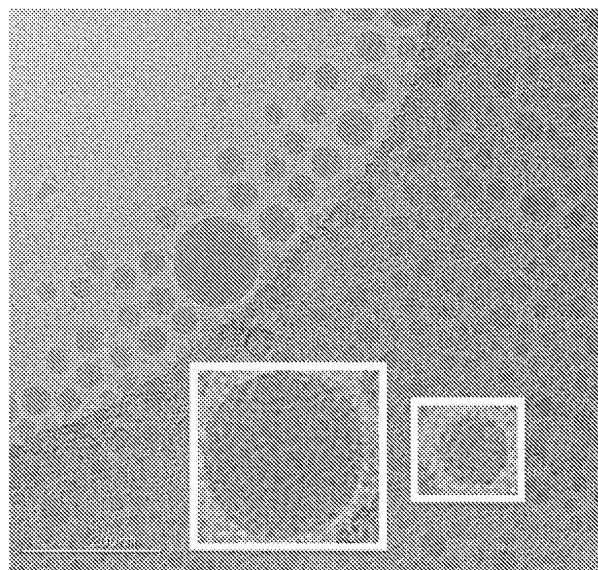
래트에서의 벤다무스틴의 혈장 수준  
3 mg-eq/kg i.v., 1 mL/kg, 제제 비교



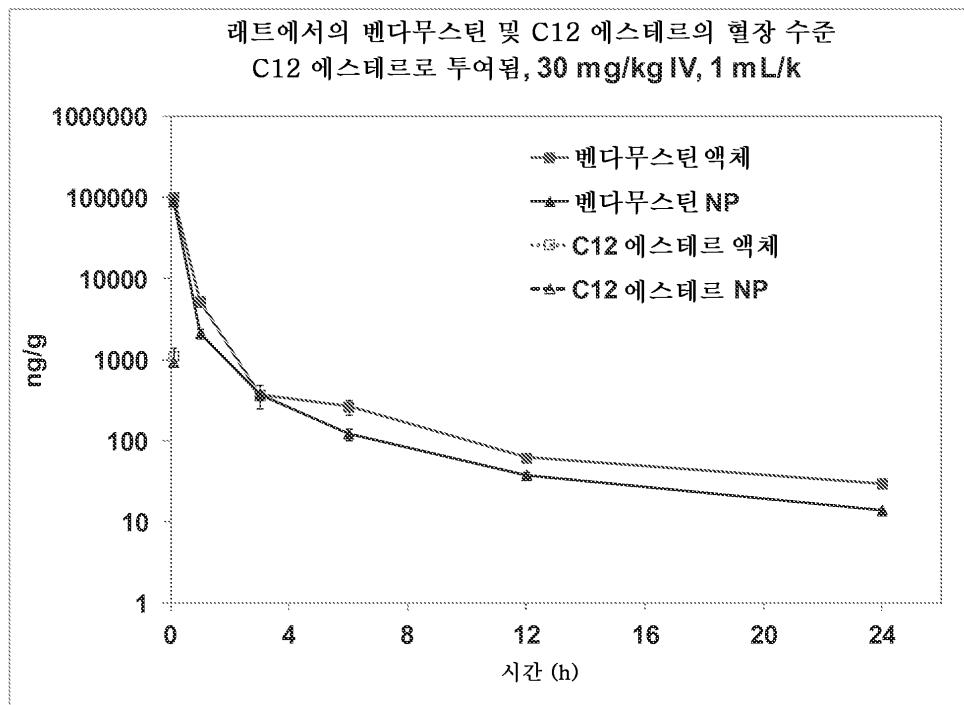
도면6



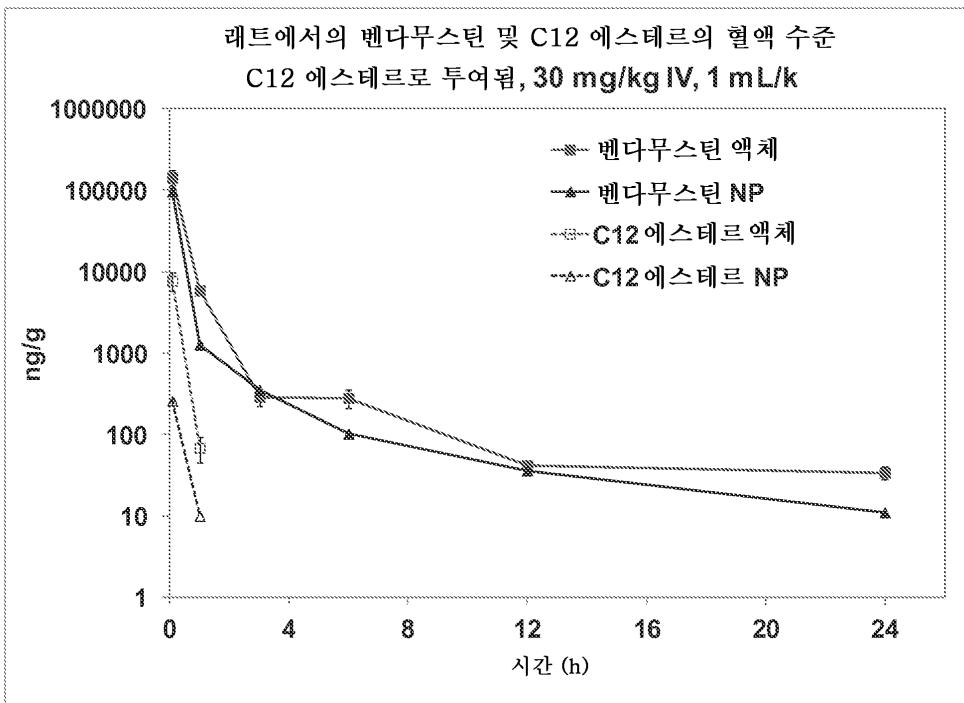
도면7



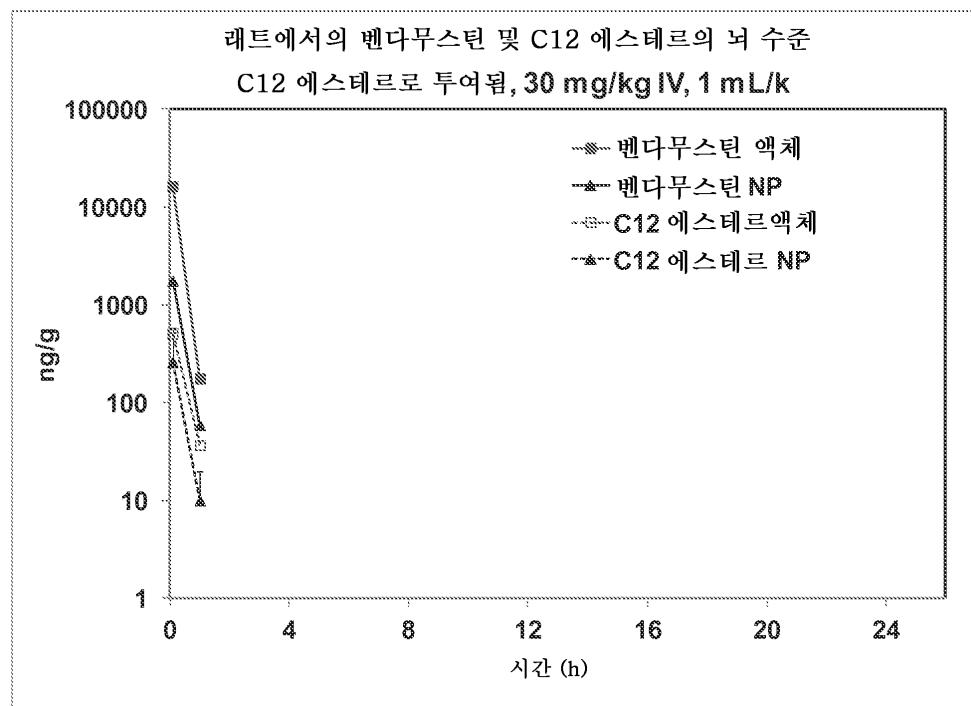
## 도면8



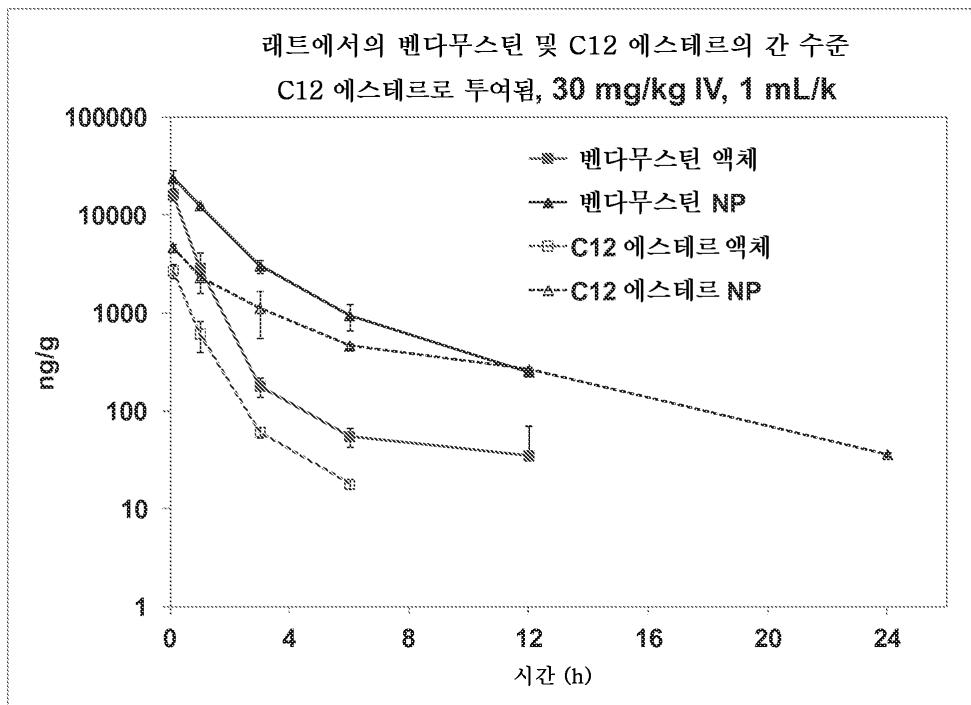
## 도면9



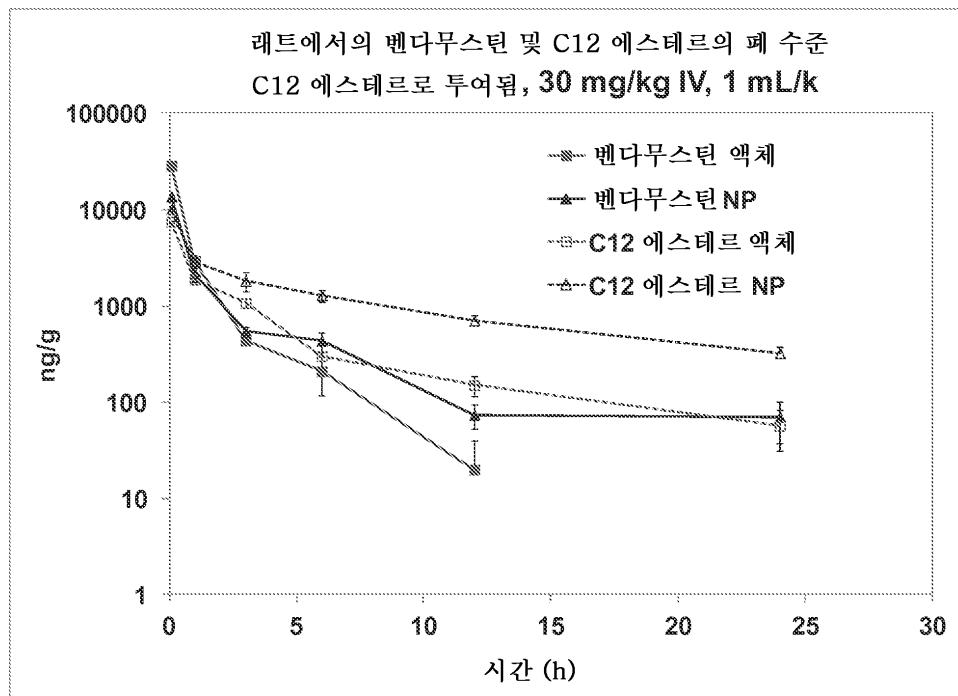
## 도면10



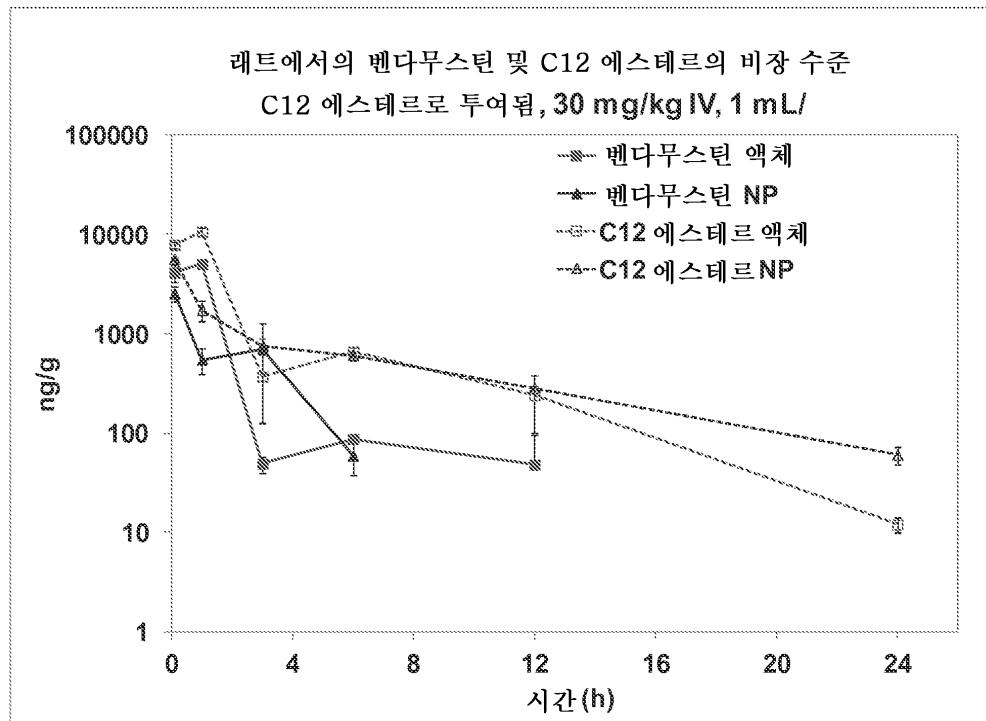
## 도면11



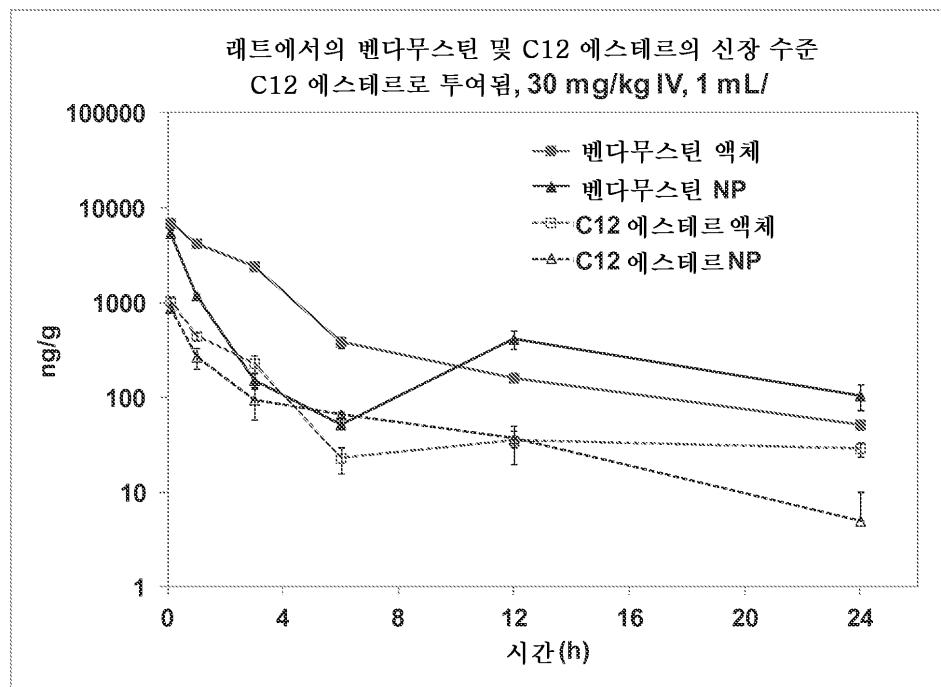
도면12



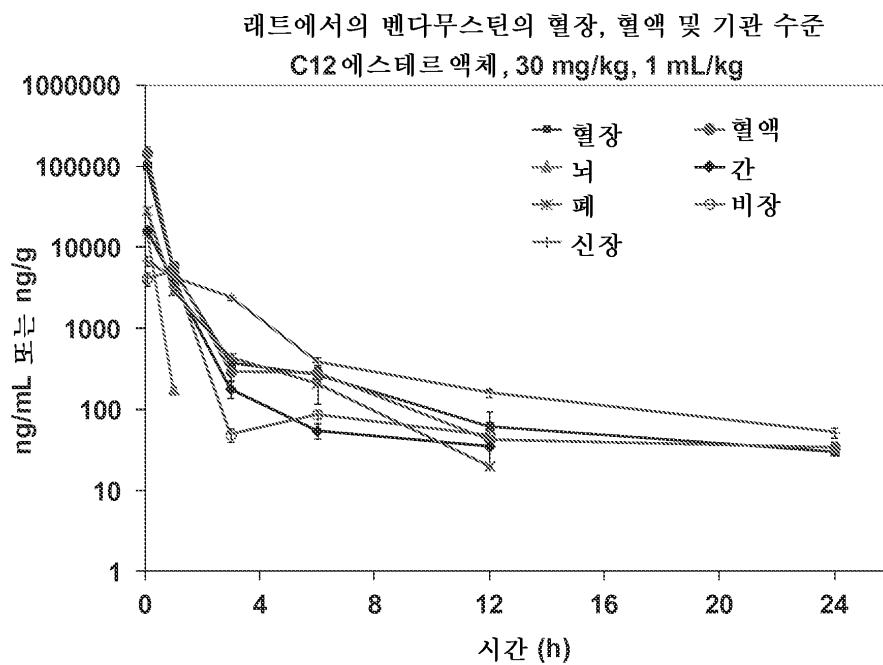
도면13



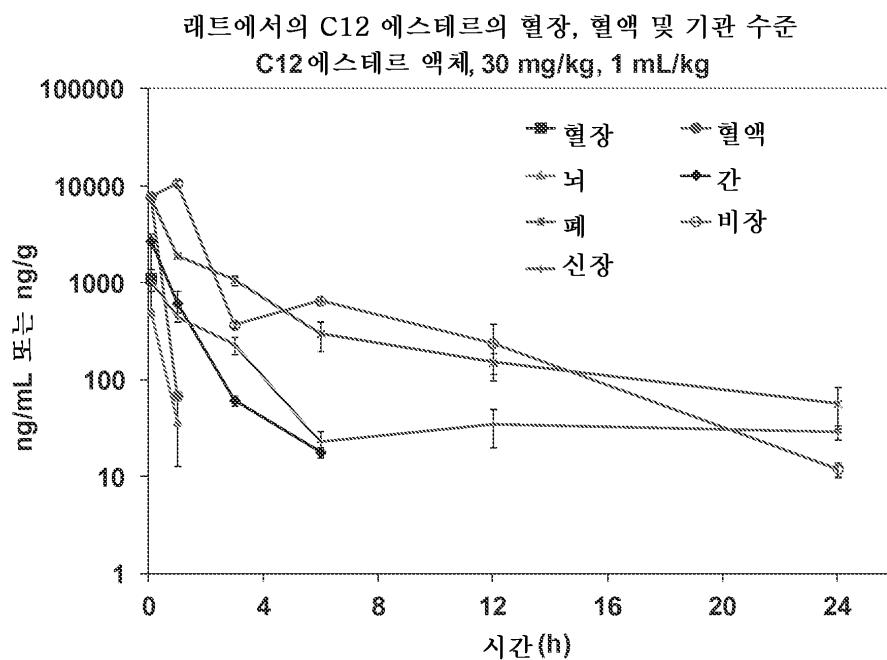
## 도면14



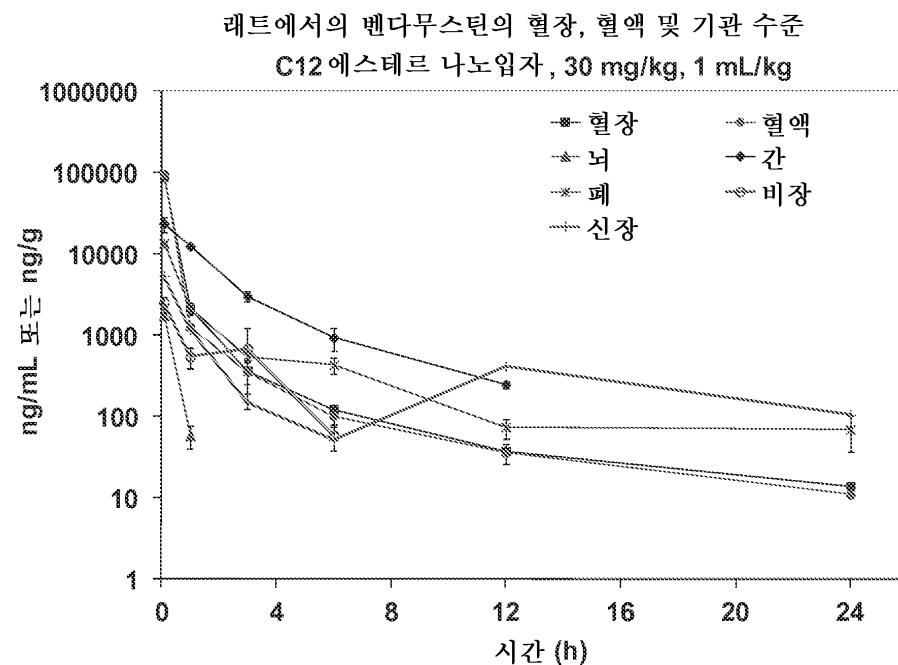
## 도면15



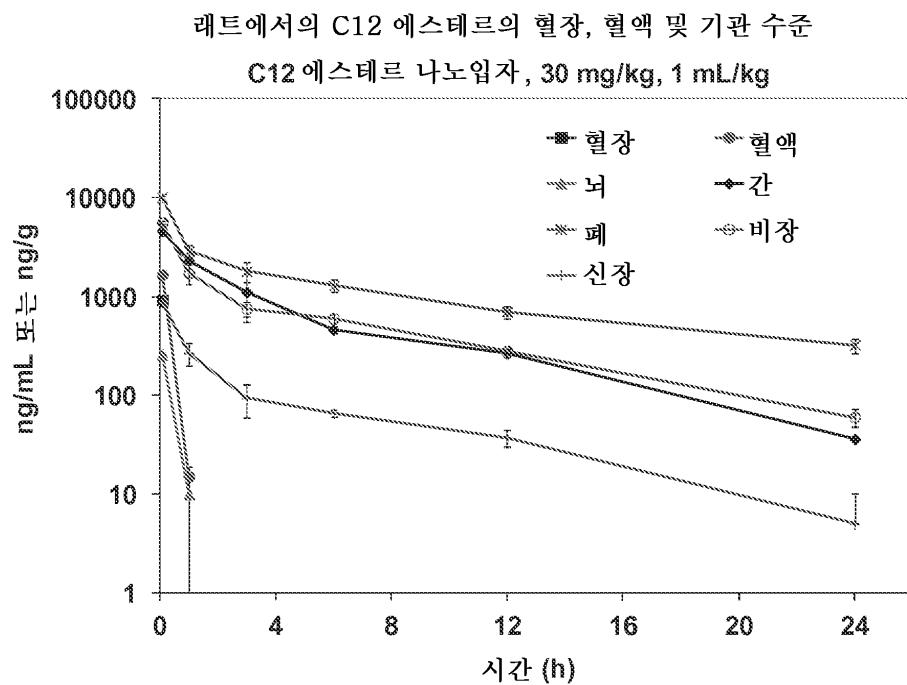
## 도면16



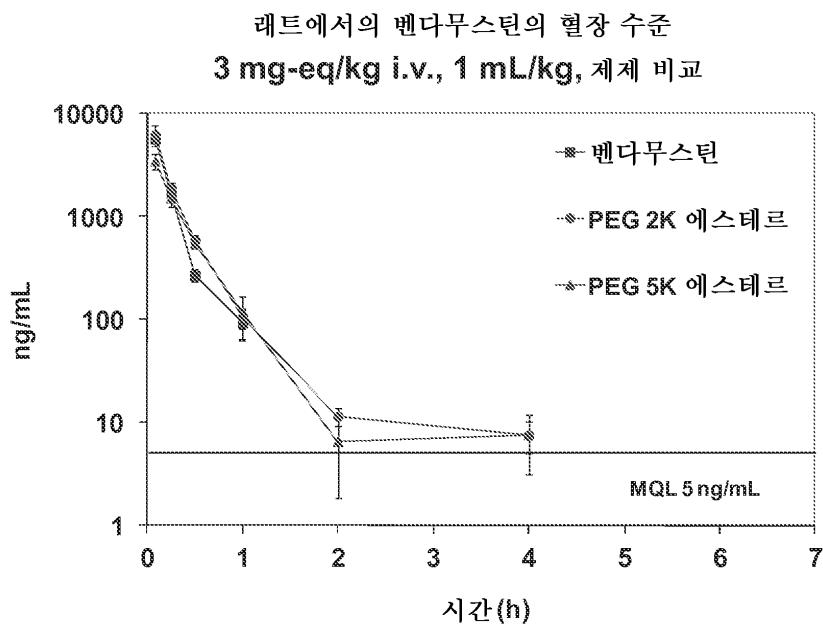
## 도면17



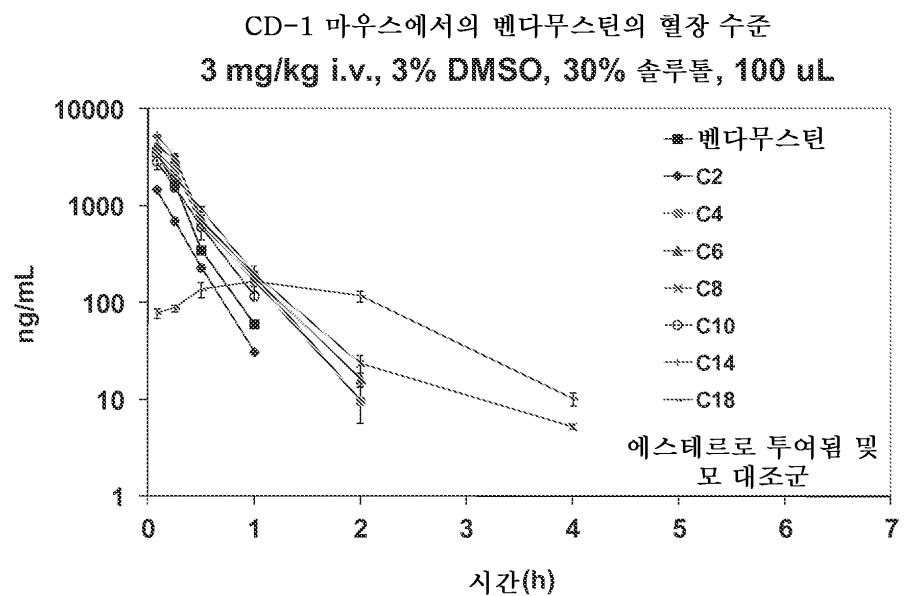
## 도면18



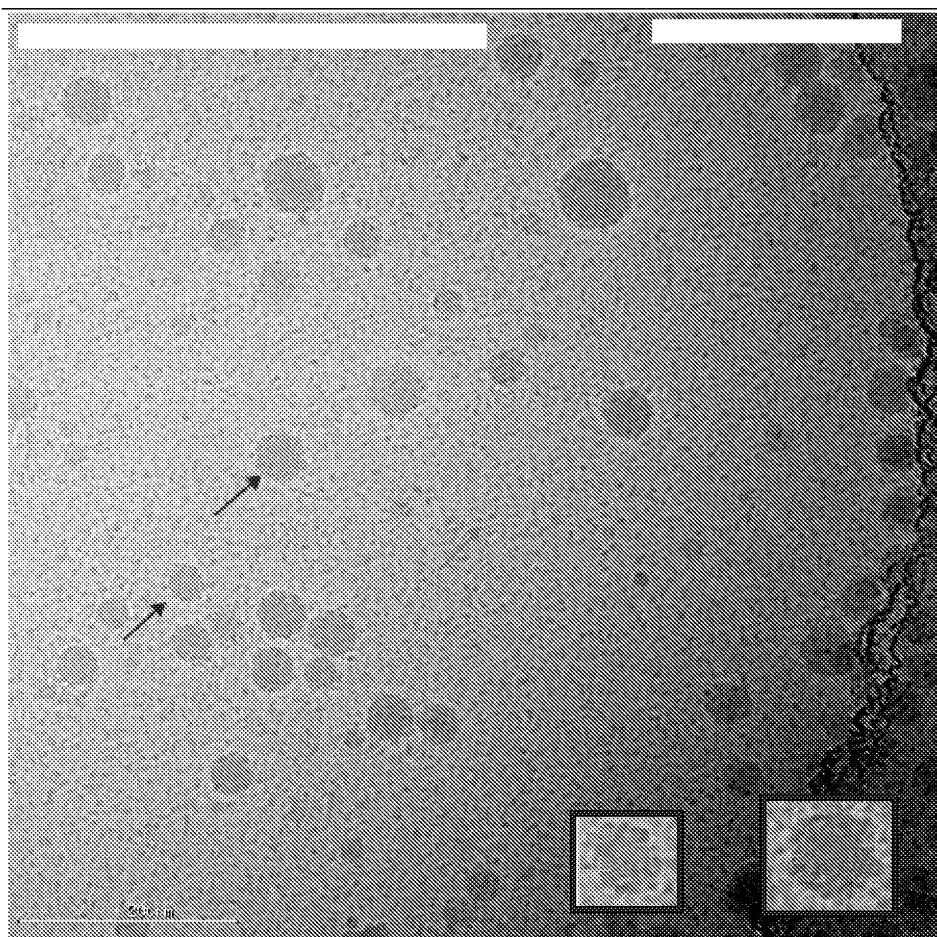
## 도면19



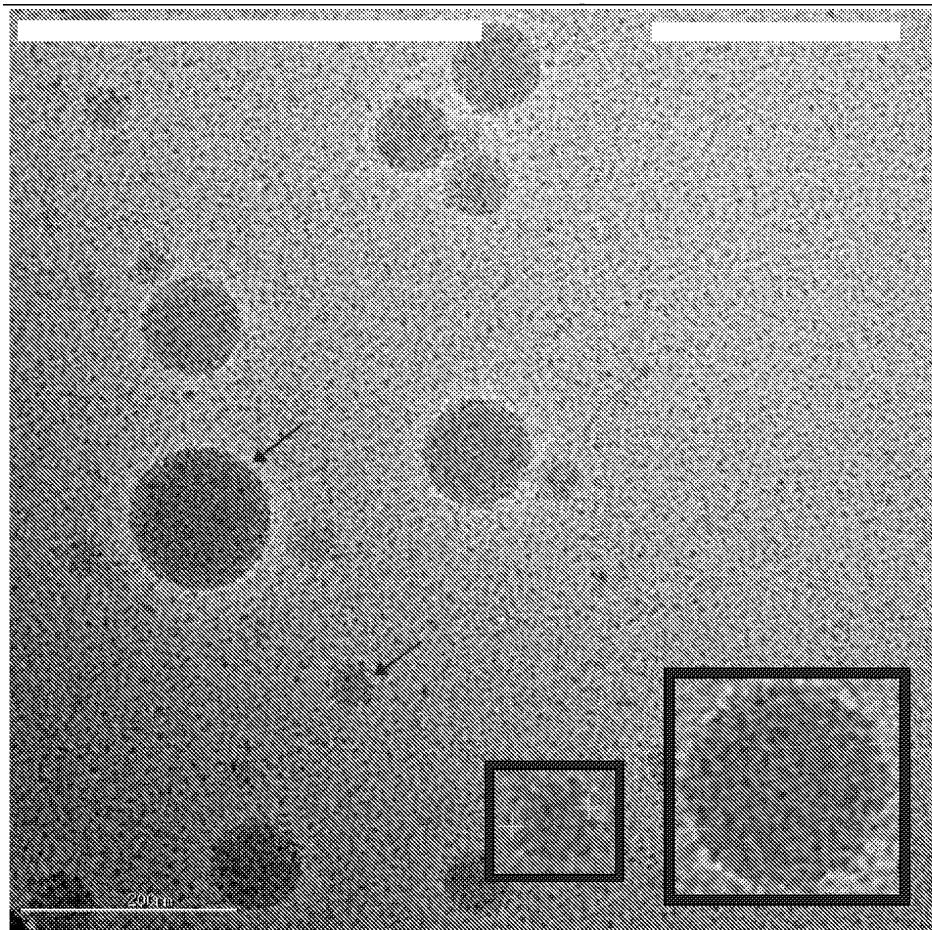
도면20



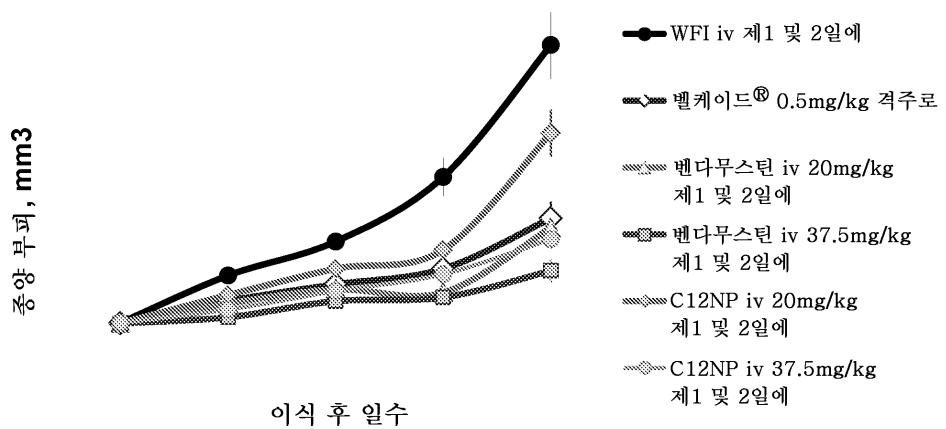
도면21



도면22



도면23



도면24

