



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785175 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880041788.7

(22)申请日 2018.01.05

(30)优先权数据

62/524,997 2017.06.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/012687 2018.01.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/005207 EN 2019.01.03

(71)申请人 MBC制药公司

地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 A·卡佩斯基 S·金宁

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 何箴 顾云峰

(51)Int.Cl.

A61K 31/7042(2006.01)

A61K 31/7052(2006.01)

A61K 31/7084(2006.01)

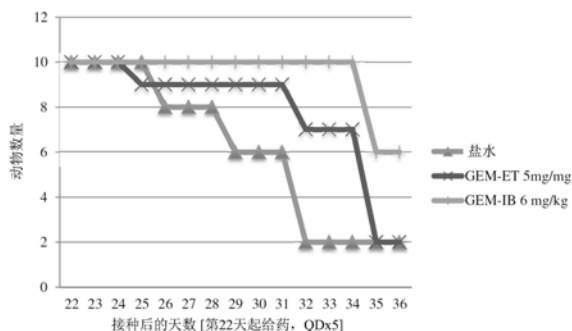
权利要求书3页 说明书11页 附图2页

### (54)发明名称

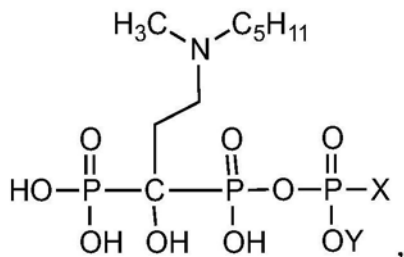
核苷抗代谢物的伊班膦酸盐缀合物

### (57)摘要

本申请提供了核苷抗代谢物及其类似物与伊班膦酸盐的缀合物、包含一种或多种所述缀合物的药物组合物、其合成方法以及使用其治疗疾病和/或病症的方法。

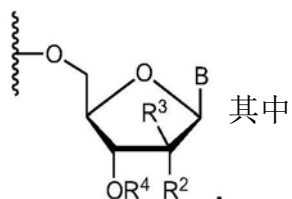


1. 一种化合物或其药学上可接受的酸加成盐,所述化合物包含:



其中X为抗癌化合物,并且Y选自H、烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中X是具有以下结构的核苷抗代谢物:



B是天然的或修饰的核酸碱基,

R<sub>4</sub>=H, 并且

R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立地选自H、OH、F和Cl。

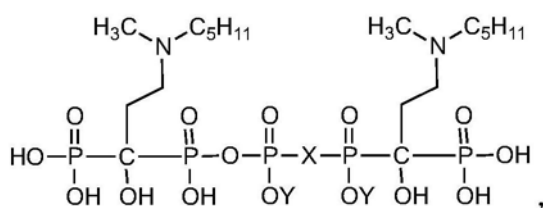
3. 根据权利要求1所述的化合物,其中X是具有以下结构的核苷抗代谢物:



B是天然的或修饰的核酸碱基,并且

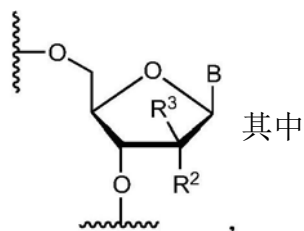
R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立地选自H、OH、F和Cl。

4. 一种化合物或其药学上可接受的酸加成盐,所述化合物包含:



其中X为抗癌化合物,并且Y选自H、烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基。

5. 根据权利要求4所述的化合物,其中X是具有以下结构的核苷抗代谢物:



B是天然的或修饰的核酸碱基,

R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立地选自H、OH、F和Cl。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物,其中X选自阿糖胞苷、吉西他滨、氟达拉滨、克拉屈滨、维达莎(vidaza)、达珂、氟达拉滨、氟尿苷、奈拉滨和喷司他丁。

7. 一种药物组合物,其包含权利要求1-6中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体或稀释剂。

8. 一种治疗癌症引起的骨病或原发性骨癌的方法,所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求1至6中任一项所述的化合物或包含权利要求1至6中任一项所述的化合物的药物组合物。

9. 一种将核苷抗代谢物递送至骨骼或周围组织的方法,所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求1至6中任一项所述的化合物或包含权利要求1至6中任一项所述的化合物的药物组合物。

10. 一种预防骨转移的方法,所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求1至6中任一项所述的化合物或包含权利要求1至6中任一项所述的化合物的药物组合物。

11. 一种治疗癌症引起的骨病或原发性骨癌的方法,所述方法包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求1至6中任一项所述的化合物或包含权利要求1至6中任一项所述的化合物的药物组合物。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述化合物与一种或多种治疗剂组合施用。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述化合物或所述药物组合物通过皮下、静脉内、皮内、肌内、鼻内或口服施用。

14. 一种治疗或改善骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状,或降低骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状的频率或严重程度的方法,所述方法包括向有需要的对象施用权利要求1至6中任一项所述的化合物或包含权利要求1至6中任一项所述的化合物的药物组合物。

15. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,或根据权利要求7所述的药物组合物,其用于治疗或改善骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状,或降低骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状的频率或严重程度,其中所述骨癌或癌症引起的骨病得到改善或严重程度降低,或与所述骨癌或癌症引起的骨病相关的疼痛得到预防、改善或严重程度降低。

16. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,或根据权利要求7所述的药物组合物在制备用于治疗或改善骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状的药物,或用于降低骨癌或癌症引起的骨病的至少一种症状的频率或严重程度的药物中的用途,其中所述骨癌或癌症引起的骨病得到改善或严重程度降低,或与所述骨癌或癌症引起的骨病相关的疼痛得到预防、改善或严重程度降低。

17. 一种合成核苷抗代谢物-伊班膦酸盐缀合物的方法,所述方法包括在有机溶剂中在叔胺碱存在下使核苷-5'-磷酸酯或核苷-2'-或3'-磷酸酯与三氟乙酸酐反应,随后添加亲核催化剂,随后添加伊班膦酸盐,随后添加水,并通过离子交换或反相色谱法纯化。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述叔胺选自三乙胺、二甲基苯胺和吡啶。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述亲核催化剂选自二甲基氨基吡啶和N-甲基咪唑。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述有机溶剂选自乙腈、吡啶、二甲基甲酰胺和

二甲基乙酰胺。

## 核苷抗代谢物的伊班膦酸盐缀合物

### 技术领域

[0001] 本文提供了涉及化学、生物化学和医学领域的化合物和使用它们的方法。更具体地,本文公开了核苷抗代谢物及其类似物与伊班膦酸盐的缀合物、包含一种或多种所述缀合物的药物组合物、其合成方法以及使用其治疗疾病和/或病症的方法。

### 背景技术

[0002] 通常通过全身给药(例如经由静脉内或口服途径)将活性化合物递送至有需要的患者。虽然仅在身体的特定区域需要药物,但是这种全身性递送也会使健康的细胞和组织暴露于药物。结果,药物可能会不利地影响健康的细胞和组织,并且需要显著更高浓度的药物以将药理学相关的量递送至需要治疗的部位。

[0003] 本文提供的组合物和方法解决了本领域中的这个问题和其他问题。

[0004] 发明概述

[0005] 本文提供了化合物、包含那些化合物的组合物、制备那些化合物的方法和使用那些化合物的方法。

[0006] 一方面涉及式I的化合物或其药学上可接受的盐。

[0007] 另一方面涉及式II的化合物或其药学上可接受的盐。

[0008] 本文进一步公开了式I和II化合物的合成方法。

[0009] 本文还进一步公开了通过使所述化合物与伊班膦酸盐缀合而将核苷抗代谢物及其类似物递送至骨的方法。

[0010] 本文还公开了药物组合物,其包含一种或多种式I和/或II的化合物、一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或其组合。

[0011] 本文所公开的方法的一些方面涉及通过向有需要的患者施用治疗有效量的一种或多种式I和/或II的化合物或包含所述化合物的药物组合物,来治疗疾病和/或改善疾病的症状,包括但不限于癌症、癌症引起的骨病、原发性骨癌、骨转移和疼痛。这些化合物可以用来制造用于治疗所述疾病的药物。这些化合物可以用于治疗多种疾病。

[0012] 附图简述

[0013] 图1提供了Kaplan-Meier存活曲线:用盐水、吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物(GEM-IB)或吉西他滨-依替膦酸盐缀合物(GEM-ET)治疗的具有小鼠乳腺癌的小鼠模型。

[0014] 图2显示了未经处理的(盐水)或用吉西他滨-伊班膦酸盐处理(2mg/kg,每周五天)的前列腺癌引起的骨病模型的图像分析。

[0015] 图3显示了在前列腺癌引起的骨病的小鼠模型中的转移情况。

[0016] 用盐水或等摩尔剂量的伊班膦酸盐(Iband)、吉西他滨(Gem)、吉西他滨-依替膦酸盐缀合物(Gem-Eti)或吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物5(Gem-Ibad)处理小鼠。

### 发明内容

[0017] 核苷抗代谢物代表一类具有广泛治疗用途和生物学活性(例如抗肿瘤活性和/或

抗病毒活性)的核苷类似物。这些化合物在吸收和代谢方面模仿生理核苷,并被掺入至新合成的DNA中,从而抑制DNA合成并终止链生长。这些药物中的一些还影响核苷酸产生、RNA合成,和激活胱天蛋白酶级联反应。所有这些活动导致细胞死亡。这样的核苷类似物在治疗上是无活性的,并被宿主的或病毒的酶转变成它们的活性形式,并随后抑制参与细胞或病毒代谢和存活的核苷酸聚合酶和其他核苷酸依赖性酶。该活化通过将核苷类似物代谢转化为它们各自的5'-单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯而发生。

[0018] 伊班膦酸盐是用于治疗骨质疏松症的第三代含氮双膦酸盐;机制上,该化合物通过抑制小GTP结合蛋白的异戊二烯化来影响破骨细胞。除了其对骨的作用外,越来越多的证据表明伊班膦酸的抗癌活性<sup>1-8</sup>。但是,对这些作用所涉及的机制仍知之甚少。

[0019] 此前已经提出了由于双膦酸盐对骨骼矿物质的高亲和力而使用双膦酸盐将其他药物递送至骨骼的用法(参见例如,Karpeisky,M.等人的美国专利6,214,812;Karpeisky,A.等人的美国专利8,586,781;Karpeisky,A.等人的美国专利9,216,204;以及最近的综述<sup>9</sup>)。目前正在临床开发一种这样的化合物:MBC-11,其为阿糖胞苷与依替膦酸盐的缀合物(参见例如,Dixon等人的美国专利号7,598,246;Karpeisky等人的美国专利号6,896,871)。本文公开了已确定在乳腺癌或前列腺癌引起的骨病的动物模型中具有改善的存活率的伊班膦酸盐的缀合物:分别参见图1和图2。还观察到继发性非骨转移的减少。本来不会预期这些缀合物具有这种活性,这表明当伊班膦酸盐是骨靶向部分时,会产生新颖且独特的改善和益处。

[0020] 本文公开了核苷抗代谢物及其类似物的新型伊班膦酸盐衍生物,其用于治疗例如肿瘤性疾病和骨病。

[0021] 除非另有定义,否则贯穿本申请所使用的所有技术和科学术语均具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0022] 如本文所使用,“烷基”是指饱和的脂肪烃,包括直链或支链烷基。在一些实施方式中,烷基具有1至20个碳。在一些方面,烷基是具有1至10个碳或1至6个碳的低级烷基。烷基可以是取代的或非取代的。当被取代时,取代基可包括羟基、氰基、烷氧基、NO<sub>2</sub>或N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、氨基、N<sub>3</sub>或SH。

[0023] 如本文所使用,“环烷基”是指具有3个至10个,或例如5个或6个形成烷基环的碳原子的环状烷基。

[0024] 如本文所使用,“芳基”是指具有至少一个具有共轭 $\pi$ 电子体系的环的芳族基团,并且包括碳环芳基、杂环芳基和联芳基,其中任何一个可以任选地被取代。这些基团上的取代基可以包括卤素、三卤甲基、羟基、SH、氰基、烷氧基、烷基、烯基、炔基和氨基。

[0025] 如本文所使用,“杂芳基”是指在芳族环中具有1至3个杂原子且该环中其余原子为碳原子的芳族环。合适的杂原子包括氧、硫和氮,示例性的杂芳基包括呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、吡咯并、嘧啶基、吡嗪基和咪唑基。这些杂芳基环也可以被取代。这些杂芳基上的取代基可包括卤素、三卤甲基、羟基、SH、氰基、烷氧基、烷基、烯基、炔基和氨基。

[0026] 如本文所使用,“抗癌化合物”或“具有抗癌活性的化合物”是指表现出临床前或临床抗癌活性或在临床上用于治疗患有癌症的患者的任何化合物。

[0027] 如本文所使用,“未修饰的核酸(或杂环)碱基”或“天然核酸碱基”是在核酸中存在的不具有其他取代基或修饰的任何碱基,包括腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶和胸腺嘧啶。

[0028] 如本文所使用,“修饰的核酸(或杂环)碱基”是在核酸中存在的,相对于未修饰的核酸碱基在化学结构中包含任何修饰的任何碱基。

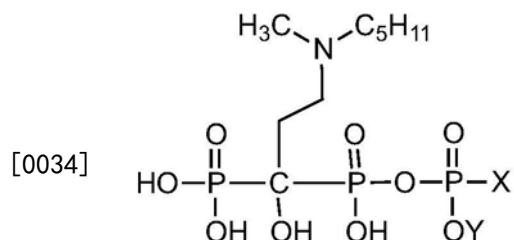
[0029] 如本文所使用,“未修饰的糖”是 $\beta$ -D-呋喃核糖或2-脱氧- $\beta$ -D-呋喃核糖。

[0030] 如本文所使用,“修饰的糖”是在未修饰的糖的化学结构中包含任何修饰的任何糖部分。

[0031] 核苷抗代谢物X通过其分子中5'-OH、2'-OH或3'-OH位的氢原子取代而作为残基或部分(moiety)连接至本文提供的化学结构。

[0032] 应当理解,在本文描述的具有一个或多个手性中心的任何化合物中,如果没有明确指出绝对立体化学构型,则每个中心可以独立地具有R-构型或S-构型或其混合物。因此,本文提供的化合物可以是对映纯的或是立体异构体的混合物。还应理解,在本文所述的任何具有一个或多个双键(其可产生定义为E或Z的几何异构体)的化合物中,每个双键可独立地为E或Z或其混合物。同样,本文还意图包括所有互变异构形式。

[0033] 在一些实施方式中,本文公开的化合物具有化学结构I

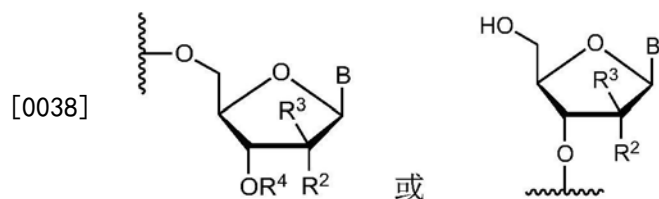


I

[0035] 其中X是抗癌化合物,并且Y选自H、烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基。该抗癌化合物选自在细胞、动物或人的水平上显示出抗癌活性的化合物。

[0036] 在本文的其他实施方式中公开了式I所示的化合物,其中X是核苷抗代谢物或核苷类似物。核苷抗代谢物或核苷类似物的实例包括但不限于阿糖胞苷、吉西他滨、氟达拉滨、克拉屈滨、维达莎、达珂、氟达拉滨、氟尿苷、奈拉滨和喷司他丁。

[0037] 在本文的其他实施方式中还公开了式I所示的化合物,其中X选自包含核苷抗代谢物并具有以下结构的基团:

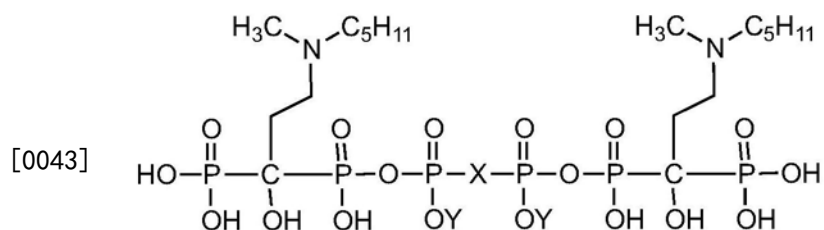


[0039] 其中B是天然的或修饰的核酸碱基,

[0040] R4=H,

[0041] R2和R3独立地选自H、OH、F、Cl。

[0042] 另一个实施方式涉及具有化学结构II的化合物:

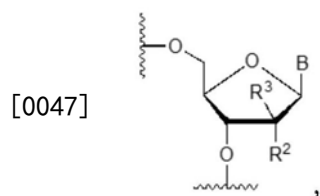


## II

[0044] 其中X是抗癌化合物,并且Y选自H、烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基。该抗癌化合物选自在细胞、动物或人的水平上显示出抗癌活性的化合物。

[0045] 在本文的其他实施方式中公开了式II所示的化合物,其中X是核苷抗代谢物或核苷类似物。核苷抗代谢物或核苷类似物的实例包括但不限于阿糖胞苷、吉西他滨、氯法拉滨、克拉屈滨、维达莎、达珂、氟达拉滨、氟尿苷、奈拉滨和喷司他丁。

[0046] 在本文的另一个实施方式中公开了式II所示的化合物,其中X包括

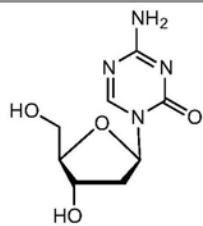
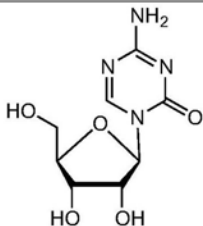
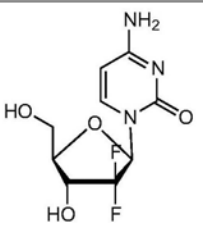
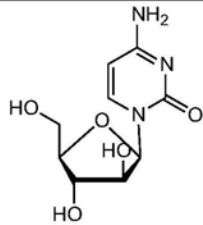
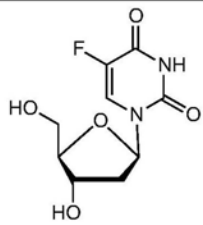
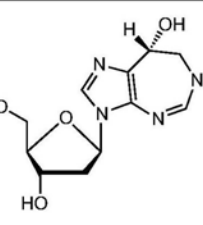
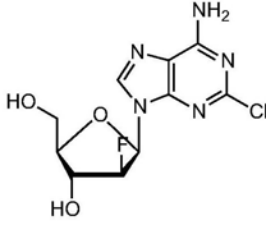
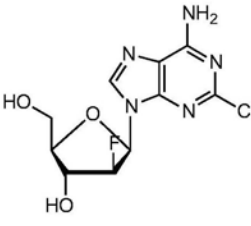
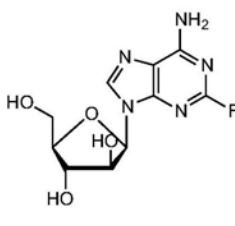
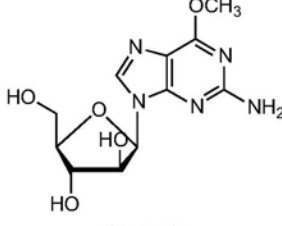


[0048] 其中B是天然的或修饰的核酸碱基,

[0049]  $R^2$ 和 $R^3$ 独立地选自H、OH、F、Cl。

[0050] 表1:示例性的抗癌核苷抗代谢物

[0051]

|                                                                                     |                                                                                   |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|    |  |  |
| 维达莎                                                                                 | 达珂                                                                                | 吉西他滨                                                                                |
|    |  |  |
| 阿糖胞苷                                                                                | 氟尿苷                                                                               | 喷司他丁                                                                                |
|    |  |  |
| 克拉屈滨                                                                                | 氟达拉滨                                                                              | 氟达拉滨                                                                                |
|  |                                                                                   |                                                                                     |
| 奈拉滨                                                                                 |                                                                                   |                                                                                     |

[0052] 表1中所示的示例性核苷可以通过其5'-、2'或3'-核苷基残基或类似物形式作为X进行连接,例如可以通过5'-0-,2'-0-或3'-0-进行连接。

[0053] 本文还考虑了本文所述化合物的药学上可接受的无毒的酸加成盐,和包含它们的药学上可接受的制剂。这样的盐包括衍生自有机酸和无机酸的那些,所述有机酸和无机酸例如但不限于盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、甲磺酸、乙酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、马来酸、山梨酸、乌头酸、水杨酸、邻苯二甲酸、亚甲基双羟萘酸、庚酸等。

[0054] 本文所述的药物组合物优选地配制成单位剂型,意指适合作为单一剂量的物理上离散的单位,或是以单剂量或多剂量方案施用至人类受试者和其他哺乳动物的单一剂量的预定的部分,每个单位包含预定量的活性物质,意在与一种或多种合适的药用赋形剂组合产生期望的治疗效果。可以通过使用本领域公知的方法配制组合物,以在施用至患者后提供活性成分的持续释放或延迟释放。

[0055] 本文提供的药物组合物包含与至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的一种或多种式I和/或II所示的化合物。在制备这样的组合物时,通常将活性成分与赋形剂混合或由赋形剂稀释,或包封在可以呈胶囊或小袋形式的载体中。当赋形剂用作稀释剂时,它可以是固体、半固体或液体材料,它们充当活性成分的运载体、载体或介质。因此,

组合物可以是片剂、丸剂、粉剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、明胶软胶囊和硬胶囊剂、栓剂、无菌注射溶液和无菌包装的粉末形式。

[0056] 合适的赋形剂的实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、硅酸钙、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍树脂、明胶、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆和甲基纤维素。制剂可以另外包括：润滑剂（例如滑石、硬脂酸镁和矿物油）、润湿剂、乳化和悬浮剂、防腐剂（例如苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯）、甜味剂，以及调味剂。

[0057] 在制备包含一种或多种本文所述的化合物的药物制剂时，可能有必要在与其他成分组合之前研磨活性化合物以提供合适的粒度。如果活性化合物基本上不溶，则通常将其研磨成小于200目的粒度。如果活性化合物基本上溶于水，则通常通过研磨来调节粒度以实现在制剂中基本上均匀的分布，例如约40目。

[0058] 本文提供的另一个实施方式涉及通过将抗癌化合物与伊班膦酸盐缀合来将抗癌化合物递送至骨的方法。在一些方面，所得的缀合物具有式I或II中公开的一般结构。

[0059] 本文提供的另一个实施方式是用于改善或治疗肿瘤性疾病、骨病和癌症引起的骨病（包括例如来自任何组织的任何癌症、包括原发性骨癌和转移性癌症）的式I或II所示的新型化合物或包含式I或II所示的新型化合物的药物组合物。

[0060] 本文提供的另一个实施方式是用于改善或治疗疼痛的式I或II所示的新型化合物或包含式I或II所示的新型化合物的药物组合物。

[0061] 如本文所使用，术语“改善”表示疾病、感染、病症或疼痛的好转或向好，例如使其更可以被忍受的。

[0062] 如本文所使用，术语“治疗”既指治疗性治疗，又指预防性、维持性或防止性措施，其中目的是防止不希望的生理状况，或获得有益的或期望的临床结果，包括降低症状的严重程度或削弱症状的根本病因。典型的症状包括骨痛、病理性骨折、脊柱压缩以及整体生活质量下降。治疗包括引起临床上显著的反应，而没有过多的副作用。成功的治疗包括观察到的骨骼相关事件的减少，所述骨骼相关事件例如病理性骨折、脊髓受压、对骨骼进行放射治疗（因为疼痛或即将发生骨折）或对骨骼进行手术的需求。参见Ibrahim A, Scher N, Williams G等人, Approval summary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases. Clin Cancer Res. 2003;9:2394-9。

[0063] 肿瘤性疾病包括但不限于癌症、白血病和转移性疾病。

[0064] 本文提供的其他实施方式是用于改善或治疗疼痛的式I或II所示的新型化合物或其药物组合物。

[0065] 在其他实施方式中，任何根据式I或II所示的化合物或其药物组合物都可以用作药物。

[0066] 在进一步的实施方式中，任何根据式I或II所示的化合物或其药物组合物都可以用于治疗肿瘤性疾病或疼痛。

[0067] 在更进一步的实施方式中，任何根据式I或II所示的化合物或其药物组合物都可以用于制备用于治疗肿瘤性疾病或疼痛的药物。

[0068] 本文提供的另一个实施方式是使用式I或II所示的化合物或包含此类化合物的药物组合物将抗癌核苷抗代谢物及其类似物递送至骨骼和周围组织的方法。

[0069] 本领域普通技术人员将认识到，本发明的化合物在结构上类似于核苷三磷酸酯。

本发明的化合物与常规的核苷三磷酸酯的区别在于 $\beta$ 和 $\gamma$ 磷原子之间的桥连原子:O(三磷酸酯)相比于C(本发明的化合物)。本文提供了基于Bogachev的核苷三磷酸酯合成法制备伊班膦酸盐缀合物的方法<sup>10,11</sup>。核苷三磷酸酯的合成方法是本领域已知的(参见例如Vaghefi<sup>12</sup>),并且可以由技术人员进行修改以用于制备本发明的伊班膦酸盐缀合物。

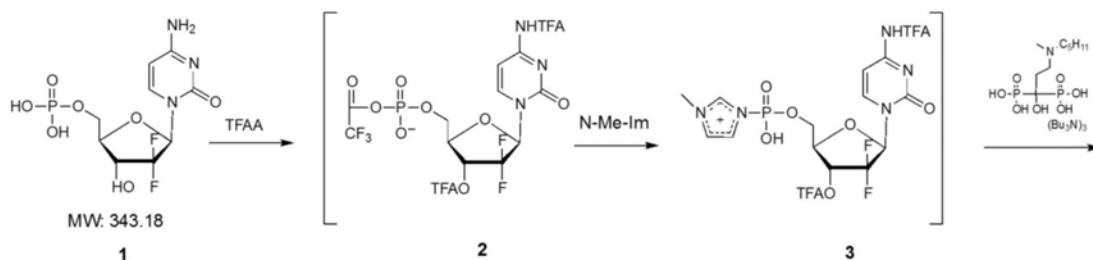
[0070] 通过研究以下实施例,本领域技术人员很容易了解本发明其他的目的、优点和新的特征,而这些实施例并不旨在是限制性的。

[0071] 本文引用了多份出版物,其公开内容通过引用整体并入本文。这样的出版物能够提供示例性的、程序性的或其他的细节,以补充本文的内容。本文中的任何内容均不应解释为承认本公开无权凭借在先发明而早于该出版物。此外,提供的发布日期可能与实际发布日期有所不同,实际发布日期可能需要独立确认。

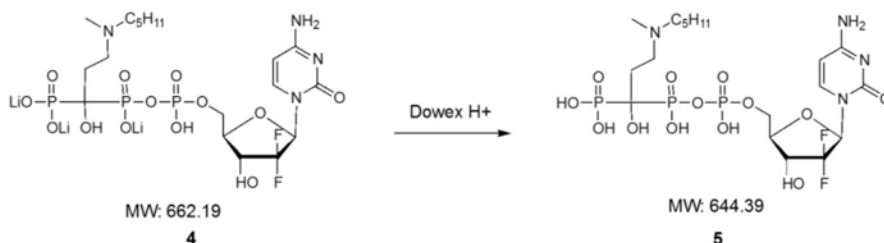
[0072] 尽管已经展示和描述了本发明的实施方式,但是本领域技术人员可以在不脱离本公开的精神和教导的情况下对其进行修改。本文描述的实施方式仅是示例性的,并且不意味着是限制性的。本文公开的化合物和方法可能存在许多变化和修饰/修改,这些变化和修饰/修改也在本发明的范围内。在明确指出数值范围或限制的情况下,应将这种明确范围或限制理解为包括落入明确说明的范围或限制内的类似幅度的迭代范围或限制。应当理解的是,使用的诸如包括、包含、具有等较宽泛的术语也支持较狭义的术语,例如“由……组成”、“基本上由……组成”、“主要由……构成”等。相应地,保护范围不受前文陈述的限制,而仅受权利要求书的限制,该范围包含权利要求书的主题的所有等同形式。每个原始权利要求作为本发明的实施方式并入说明书中。因此,权利要求是进一步的描述,并且是对本文公开的优选的实施方式的补充。

## 实施例

### [0073] 实施例1. 吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物5



[0074]



[0075] 将三氟乙酸酐(TFAA, 2.5ml, 18mmol)的MeCN(10ml)冷溶液逐滴加入处于正压的氩气(气球)和搅拌中的冰浴冷却的在无水MeCN(10ml)中的吉西他滨-5'-磷酸酯(1, 1.03g, 3mmol)、二甲基苯胺(1.51ml, 12.01mmol)和三乙胺(418.31 $\mu$ l, 3mmol)混合物。悬浊液变成澄清溶液,表明形成了酸酐2(深黄色溶液)。在室温下搅拌反应混合物15分钟,随后将其连

接至真空管以除去过量的TFAA/TFA。15分钟后,在0℃的搅拌下加入在MeCN (10ml) 中的N-甲基咪唑 (NMI, 1.2ml, 15.01mmol) 和Et<sub>3</sub>N (3.35ml, 2.24mmol) 混合物。5分钟后,移去冰浴,在室温下搅拌反应混合物20分钟(浅黄色溶液)。随后通过导管添加伊班膦酸Bu<sub>3</sub>N盐的MeCN溶液 (20ml, 在分子筛上储存1小时), 反应在室温下搅拌10分钟。随后加入50mM乙酸三乙铵 (TEAA) 缓冲液pH 5.4 (60ml), 溶液用DCM (2×60ml) 提取。用缓冲液 (60ml) 反提取合并的有机提取物。分离合并的水提取物,并用50%的水性AcOH将pH调节至5.3-5.5,分成等体积 (40mL) 的4份,冷冻直至纯化。将1份融化,用50mM TEAA pH 5.3-5.5稀释至100mL,随后上样到含有Septra C18-E (50μm, 65A; 50mL) 的柱子上。用50mM TEAA pH 5.3 (800ml) 洗脱,随后用含有4%MeCN的50mM TEAA pH 5.3溶液洗脱,最后用含有10%MeCN的相同缓冲液洗脱。合并适当的级分,并加入1M LiOAc以使LiOAc的最终浓度为60mM。在<30℃的浴温下,在旋转蒸发仪上将溶液浓缩至15ml,用200mL丙酮-MeOH混合物 (4:1) 沉淀标题化合物。将混合物在冰箱中放置60分钟,并通过离心 (3000rpm, 3min, 4℃) 分离残留物。将沉淀用同样的混合物洗涤两次,并在高真空下干燥以产生230mg呈锂盐形式的缀合物。将后者溶于水中,通过Dowex 50Wx8 (H<sup>+</sup>), 冻干,得到200mg缀合物5。

[0076] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) : 7.9 (d, J=10Hz, 1H) , 6.3 (m, 1H) , 6.1 (d, J=9.6Hz, 1H) , 4.7 (m, 1H) , 4.4 (m, 2H) , 4.2 (m, 1H) , 1.54 (t, J=20Hz, 3H) . <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) δ (ppm) : 17.2 (m, 1P) , 15.9-15.3 (m, 1P) , -9.0 (d, 1P) .

[0077] HPLC条件:

[0078] • 柱子: Kinetex 5u XB-C18 100A 4.6x100mm (Phenomenex)。

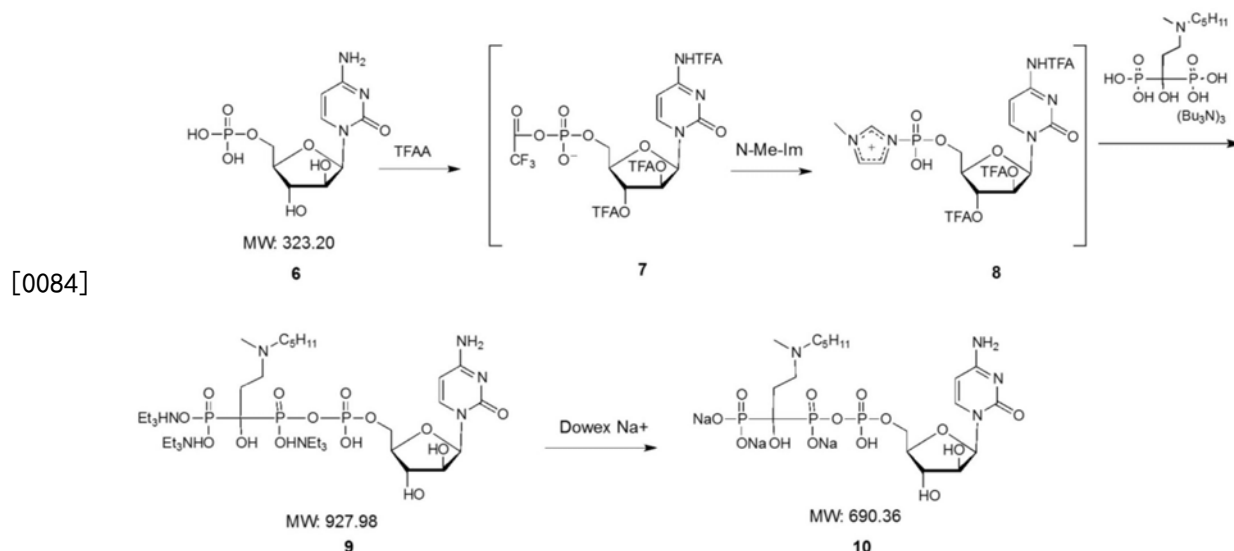
[0079] • 流动相: A-20mM乙酸三乙铵 (TEAA) ; B-50%乙腈/20mM TEAA

[0080] • 15分钟内从0到20%B的线性梯度

[0081] • 流量: 1ml/min

[0082] • 检测-274nm

[0083] 实施例2. 阿糖胞苷-伊班膦酸盐缀合物



[0085] 将TFAA (1.02mL, 13.6mmol) 的MeCN (10ml) 冷溶液逐滴加入处于正压的氩气 (气球) 和搅拌中的冰浴冷却的在无水的MeCN (10ml) 中的阿糖胞苷-5'-磷酸酯 (araCMP, 850mg, 2.63mmol) 、N,N-二甲基苯胺 (1.28mL, 10.24mmol) 和Et<sub>3</sub>N (374μL, 2.73mmol) 的混合物。悬浊

液变成澄清溶液,表明形成酸酐7(深黄色溶液)。在室温下搅拌反应混合物15分钟,随后将其连接至真空管以除去过量的TFAA/TFA。15分钟后,在0℃的搅拌下加入CH<sub>3</sub>CN(10mL)中的NMI(629μL,14.14mmol)和Et<sub>3</sub>N(1.84mL,23.8mmol)的混合物。5分钟后,移去冰浴,并在室温下搅拌反应混合物20分钟(浅黄色溶液)。随后通过导管添加伊班膦酸Bu<sub>3</sub>N盐(7g)的MeCN溶液(35mL,在分子筛上储存1小时),并将反应在室温下搅拌10分钟。

[0086] 通过添加水(40mL)淬灭反应,并用DCM(2×40mL)提取以除去有机碱。用三乙胺碳酸氢盐缓冲液(TEAB,0.1M,pH 6.8)稀释水层,并上样至含有Amberchrome CG61M(113mL)的柱子上。加载完成后,柱子先后用TEAB(5CV)和去离子水(DI,8CV)进行洗脱。最后,用CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O(1:4至1:3)洗脱缀合物。合并适当的级分,并在浴温<30℃的条件下真空浓缩至小于50mL的体积。将获得的浓缩物冻干,得到呈Et<sub>3</sub>N盐形式的缀合物(9)。产量:512mg(33%)

[0087] 实施例3.阿糖胞苷-伊班膦酸盐缀合物的钠盐

[0088] 将如上获得的缀合物的三乙基铵盐的一部分(330mg,0.35mmol)溶解于水(10mL)中,并通过Dowex 50WX8(Na形式)(7mL,10x)。用水连续洗脱柱子,收集UV活性部分并通过HPLC分析。收集纯的级分并冻干,得到呈钠盐形式的缀合物(10)。产量:144mg,60%。

[0089] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,D<sub>2</sub>O) δ(ppm):8.0(d,J=10.2Hz,1H),6.2(d,J=7.2Hz,10,2H),4.7(m,1H),4.1(m,1H),4.3(m,2H),4.4(m,1H),3.6(m,1H),3.4-3.3(m,1H),3.3-3.2(m,1H),3.0(m,1H),2.8(s,3H),2.5-2.3(m,2H),1.7(m,2H),1.3(m,4H),0.9(m,3H)。<sup>31</sup>P NMR(D<sub>2</sub>O) δ(ppm):16.8(m,1P),10.4-9.8(m,1P),-8.8(d,1P)。

[0090] 实施例4.吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物5和吉西他滨-依替膦酸盐缀合物在乳腺癌啮齿类动物模型中提供存活益处的示例

[0091] 对8周龄的雌性哈兰(Harlan)裸鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu)进行心内注射施用100μL的在Dulbecco磷酸盐缓冲液中10<sup>6</sup>细胞/mL的MDA-MB-231-luc-D3H2LN细胞(Caliper/Xenogen)。植入后第22天,将动物随机分为10组。每组每周5天(QDx5)以100μL腹膜内注射接受如下药剂中的一种,以实现如下给药:盐水、5mg/kg吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物、6mg/kg吉西他滨-依替膦酸盐缀合物、等摩尔游离依替膦酸盐、等摩尔游离伊班膦酸盐、等摩尔游离吉西他滨。游离的依替膦酸盐、伊班膦酸盐或吉西他滨对存活没有显著影响,然而,如图1所示,吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物和吉西他滨-依替膦酸盐缀合物均改善了存活率,其中吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物可提供最大的益处。

[0092] 实施例5.吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物5在前列腺癌引起的骨病的啮齿类动物模型中提供存活益处的示例

[0093] 向6周龄雄性SCID小鼠注射10μL的10<sup>6</sup> 22RV1-Luc+前列腺癌细胞到胫骨中。第6天发光确认植入成功,将小鼠随机分成10组,并在第7天开始给药。小鼠5天/周接受腹膜内注射盐水或2mg/kg吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物(实施例1中的化合物5)直至第6周结束,且每7天进行一次成像。Xenogen成像工作站用于可视化肿瘤细胞。热力图从浅蓝色到红色显示肿瘤细胞数量增加。如图2所示,所有用化合物5(实施例1)处理的小鼠在42天结束时仍存活,而未经处理的盐水对照组10只小鼠中仅有6只存活。此外,图像分析表明,从第28天开始到之后,用化合物5处理的小鼠中存在更少的癌细胞。

[0094] 实施例6.吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物和吉西他滨-依替膦酸盐缀合物减少前列腺癌引起的骨病的啮齿类动物模型中的转移发生率的示例

[0095] 如以上实施例5中所述,向6周龄的雄性SCID小鼠注射10uL的 $10^6$  22RV1-Luc+前列腺癌细胞到胫骨中。第6天发光确认植入成功,将小鼠随机分为10-13组,并在第7天开始给药。小鼠QDx5 (5天/周) 接受腹膜内注射盐水或2mg/kg吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物或等摩尔的吉西他滨-依替膦酸盐缀合物、游离伊班膦酸盐或游离吉西他滨,直到第6周结束,每7天进行一次成像。Xenogen成像工作站用于可视化肿瘤细胞和胫骨的植入部位远端的转移。如图3所示,吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物和吉西他滨-依替膦酸盐缀合物在第34天和第41天降低了具有远端转移的小鼠的百分比。观察到了用吉西他滨-伊班膦酸盐缀合物治疗的小鼠具有更优异的益处。

[0096] 出版物

[0097] 1. Baron, R., Ferrari, S. 和 Russell, R. G. G., (2011) Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects, *Bone* 48, 677-692.

[0098] 2. Caraglia, M., Santini, D., Marra, M., Vincenzi, B., Tonini, G. 和 Budillon, A., (2006) Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates, *Endocr Relat Cancer* 13, 7-26.

[0099] 3. Graaf, M. R., Richel, D. J., van Noorden, C. J. F. 和 Guchelaar, H. -J., (2004) Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer, *Cancer Treatment Reviews* 30, 609-641.

[0100] 4. Kucukzeybek, Y., Gorumlu, G., Cengiz, E., Karabulut, B., Sezgin, C., Atmaca, H., Sanli, U. A., Uzunoglu, S. 和 Uslu, R., (2010) Apoptosis-mediated cytotoxic effects of ibandronic acid on hormone- and drug-refractory prostate cancer cells and human breast cancer cells, *J Int Med Res* 38, 1663-1672.

[0101] 5. Luckman, S. P., Hughes, D. E., Coxon, F. P., Graham, R., Russell, G. 和 Rogers, M. J., (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras, *J Bone Miner Res* 13, 581-589.

[0102] 6. Nilsson, S., Huelsenbeck, J. 和 Fritz, G., (2011) Mevalonate pathway inhibitors affect anticancer drug-induced cell death and DNA damage response of human sarcoma cells, *Cancer Lett* 304, 60-69.

[0103] 7. Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P. 和 Monkkonen, J., (2011) Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates, *Bone* 49, 34-41.

[0104] 8. Walker, K. 和 Olson, M. F., (2005) Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics, *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 62-68.

[0105] 9. Cole, L. E., Vargo-Gogola, T. 和 Roeder, R. K., (2016) Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands, *Advanced drug delivery reviews* 99, 12-27.

[0106] 10. Bogachev, V. S., (1995) Study of the reaction of trifluoroacetic anhydride with thymidine-5'-phosphate, *Bioorganicheskaya Khimia (Russ)* 21, 212-

217.

[0107] 11. Bogachev, V.S., (1996) Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphate using trifluoroacetic anhydride as an activating reagent, *Bioorganicheskaya Khimia* (Russ) 22, 699-705.

[0108] 12. Monir-Vaghefi, S.-M., (2005) *Nucleoside triphosphates and their analogs: chemistry, biotechnology, and biological applications*, Taylor & Francis, Boca Raton.

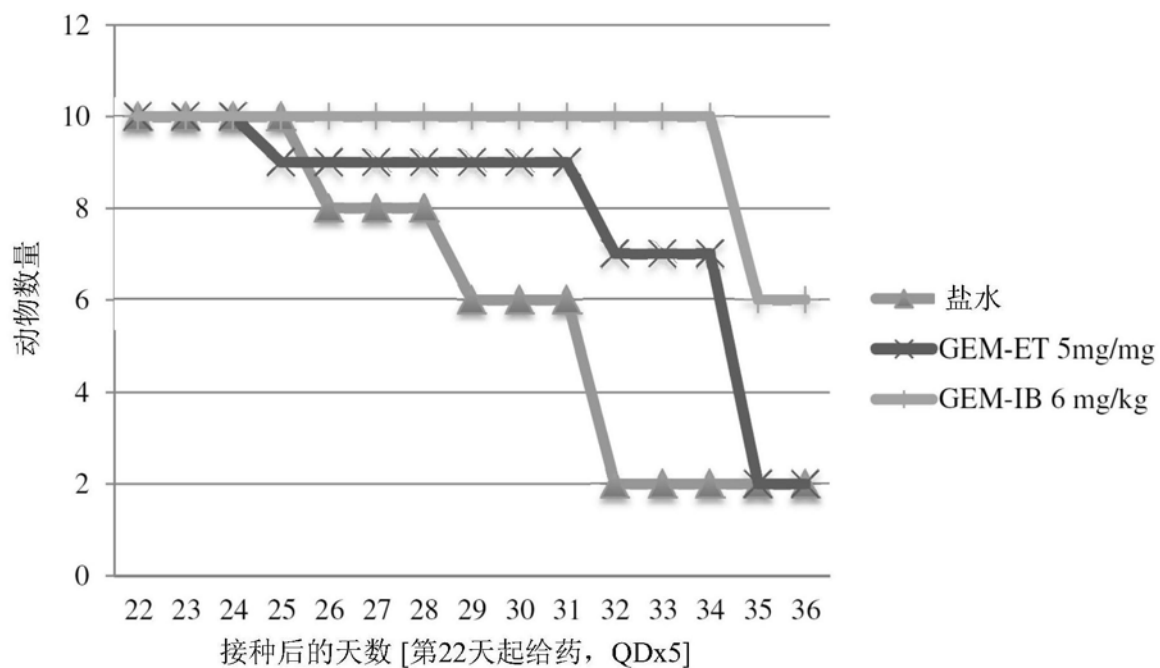


图1

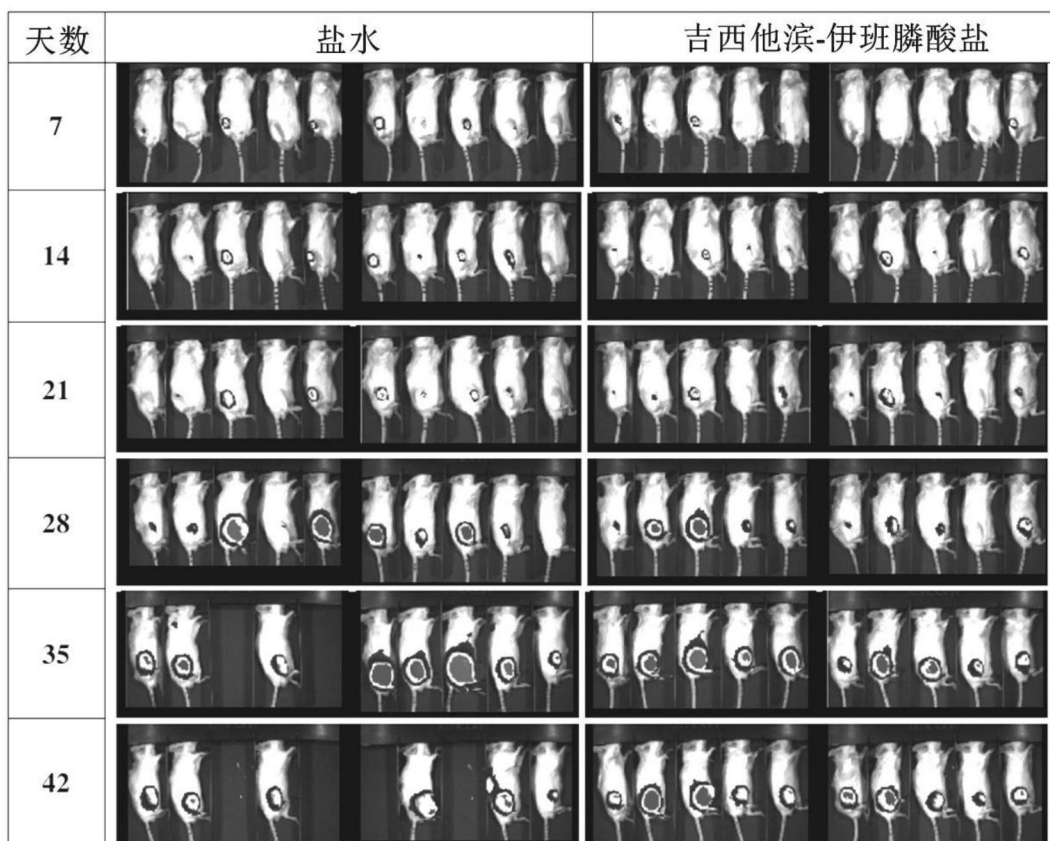


图2

发生转移的荷胫骨瘤小鼠的百分比  
N=10-13

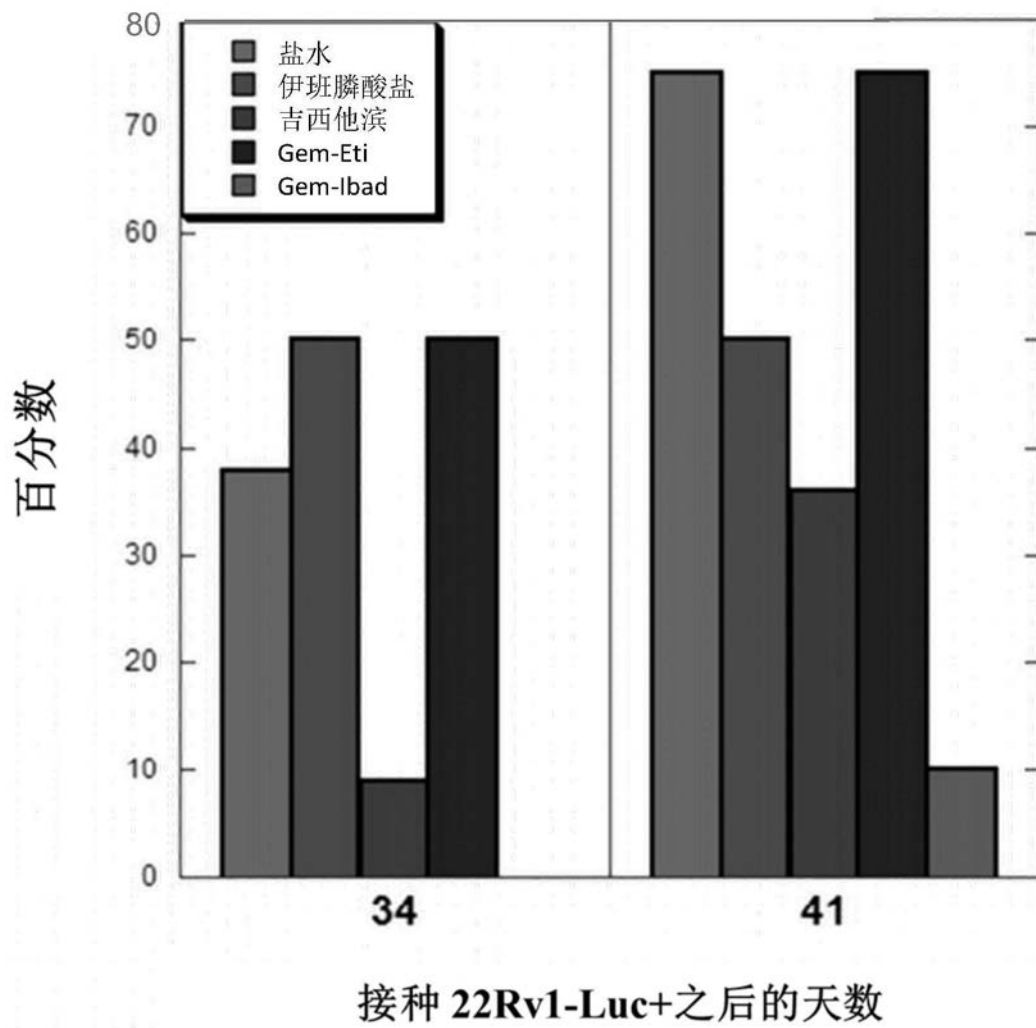


图3