



(21)申請案號：102140964

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 12 日

(51)Int. Cl. : C07D235/16 (2006.01)

A61K31/4184(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/12 美國

61/725,213

2013/03/12 美國

61/776,951

(71)申請人：伊格尼塔公司(美國)IGNYTA, INC. (US)

美國

(72)發明人：巴克勒 羅傑 P BAKALE, ROGER P. (US)；布朗 彼得 D BROWN, PETER D.

(US)；陳健 CHEN, JIAN (CN)；德拉格 安東尼 S DRAGER, ANTHONY S.

(US)；拉貝爾 瑞秋 Y LABELL, RACHEL Y. (US)；麥克基恩 羅伯特 E

MCKEAN, ROBERT E. (US)；帕特爾 皮尤須 R PATEL, PIYUSH R. (US)；羅摩

勒 芮妮 C ROEMMELE, RENEE C. (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

CN 102281871A

US 2006/0165987A1

US 2010/0111984A1

JI Tzeng, et al. "A NOVEL ESTER DERIVATIVE OF KETOROLAC, IN RABBITS", Kaohsiung J Med Sci 2005;21:365-70.

A. Nayak and A. Jain, "In Vitro and In Vivo Study of Poly(ethylene glycol) Conjugated Ibuprofen to Extend the Duration of Action", Sci Pharm. 2011; 79: 359-373.

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：62 項 圖式數：24 共 86 頁

(54)名稱

苯達莫司汀衍生物及其使用方法

BENDAMUSTINE DERIVATIVES AND METHODS OF USING SAME

(57)摘要

本發明係有關苯達莫司汀(bendamustine)酯及苯達莫司汀醯胺以及其用於治療癌症之用途。

The present invention is directed to bendamustine esters and bendamustine amides and their use for the treatment of cancer.

指定代表圖：

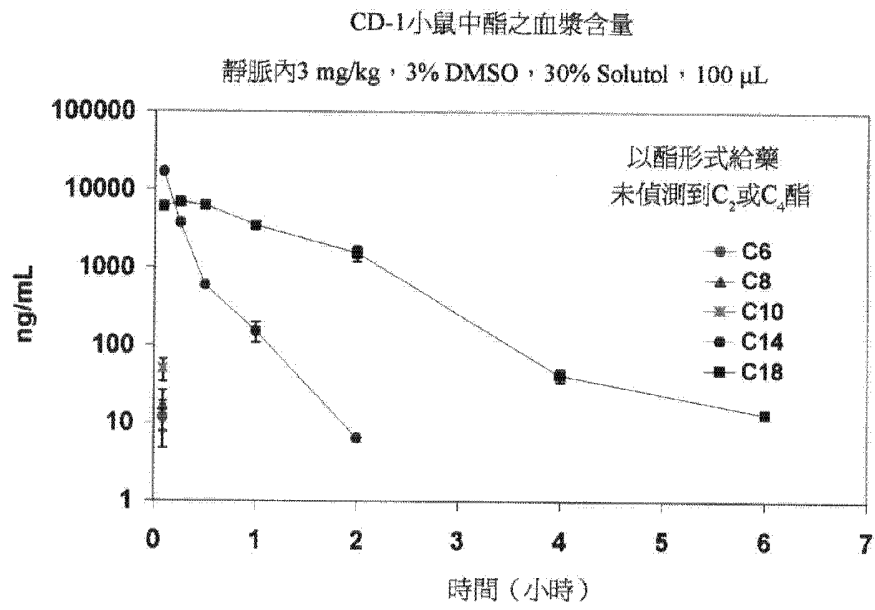
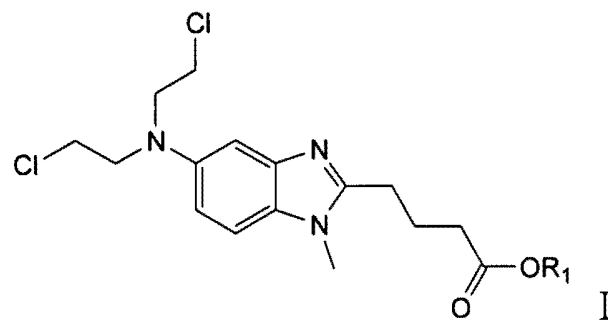


圖1

特徵化學式：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

苯達莫司汀衍生物及其使用方法

BENDAMUSTINE DERIVATIVES AND METHODS OF USING SAME

相關申請案之交叉參考

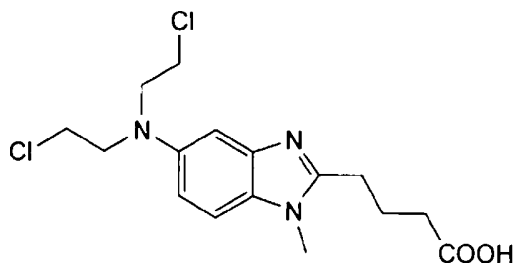
【0001】 本申請案主張 2012 年 11 月 12 日申請之美國臨時申請案第 61/725,213 號及 2013 年 3 月 12 日申請之美國臨時申請案第 61/776,951 號之權益，該等臨時申請案之全文均以引用的方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本發明係有關苯達莫司汀 (bendamustine) 之酯及鹽胺，其係用於治療癌症。

【先前技術】

【0003】 苯達莫司汀，4-[5-[雙(2-氯乙基)胺基]-1-甲基苯并咪唑-2-基]丁酸：



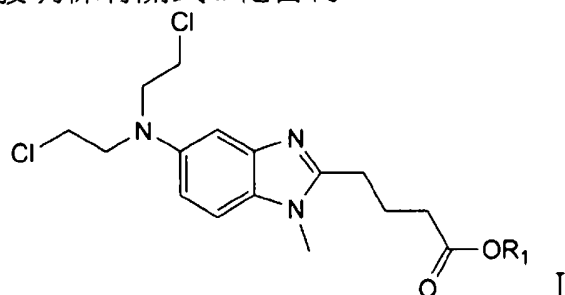
係以鹽酸鹽形式以商標名 RIBOMUSTIN 及 TREANDA 市售且為已成功用於治療血液癌症 (諸如慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病 (Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma) 及多發性骨髓瘤) 之化合物。該等產品係以靜脈內輸注液形式投予。

【0004】 然而，使用苯達莫司汀治療實體腫瘤受到化合物在水性環境中之化學不穩定性的限制。實際上，已報導苯達莫司汀在活體內之半衰期僅為約 6-10 分鐘。因此，苯達莫司汀之循環含量無法持續足夠長的時間使

苯達莫司汀到達循環系統外部之腫瘤。需要增加苯達莫司汀之循環時間的方法。

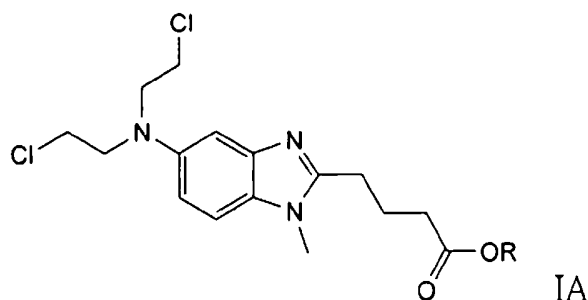
【發明內容】

【0005】 本發明係有關式 I 化合物：



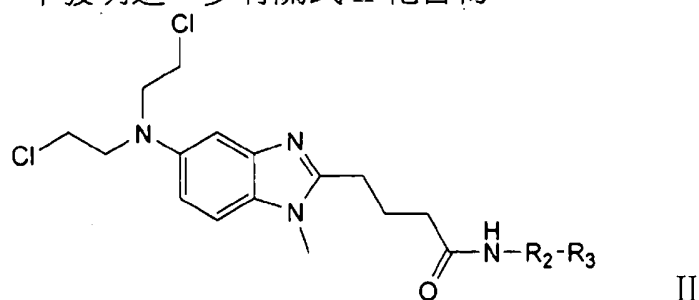
其中 R₁ 為 C₆-C₂₄ 烷基或聚乙二醇；或其醫藥學上可接受之鹽形式。亦描述使用式 I 化合物治療實體及非實體癌症腫瘤之方法。

【0006】 本發明亦有關式 IA 化合物或其醫藥學上可接受之鹽形式之用途：



其中 R 為 C₁-C₂₄ 烷基或聚乙二醇，其係用於治療實體及非實體癌症腫瘤。

【0007】 本發明進一步有關式 II 化合物：



其中 R₂ 為 C₁-C₂₄ 伸烷基；且 R₃ 為 -COOC₁₋₃ 烷基；或 R₂-R₃ 為 C₁-C₂₄ 烷基；或其醫藥學上可接受之鹽形式。使用式 II 化合物治療實體及非實體癌症腫瘤之方法。

【0008】 包括式 I 或式 IA 化合物之奈米粒子以及包含該等奈米粒子之凍乾組成物亦在本發明之範疇內。

【圖式簡單說明】

【0009】

圖 1 描述 CD-1 小鼠中本發明之某些具體實例之血漿含量，於 3% DMSO、30% Solutol 中以 100 μ L 按 3 mg/kg 靜脈內給予。

圖 2 描述鹽酸苯達莫司汀及本發明之某些具體實例對負載 MDA-MB-231 異種移植植物之小鼠中之腫瘤體積的作用。

圖 3 描述在用本發明之某些具體實例處理 MDA-MB-231 乳房腫瘤 S9 之後，隨時間推移而觀測到之苯達莫司汀之量。

圖 4 描述在用本發明之某些具體實例處理 H460 非小細胞肺腫瘤 S9 之後，隨時間推移而觀測到之苯達莫司汀之量。

圖 5 描述在使用不同調配物在大鼠中給予本發明之一個具體實例之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿含量。

圖 6 描述在使用不同調配物在大鼠中給予本發明之一個具體實例之後，大鼠中該具體實例之血漿含量。

圖 7 描述本發明之一個具體實例（苯達莫司汀 C₁₄ 酯）之奈米粒子的 Cryo-TEM 影像。

圖 8 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之血漿含量。

圖 9 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之血液含量。

圖 10 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具

體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之腦含量。

圖 11 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之肝臟含量。

圖 12 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之肺含量。

圖 13 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之脾含量。

圖 14 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯之後，苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體及奈米粒子調配物形式）之腎含量。

圖 15 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給藥之後，在投予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體調配物形式）之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿、血液及器官含量。

圖 16 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈液體調配物形式）之後，大鼠中苯達莫司汀 C₁₂ 酯之血漿、血液及器官含量。

圖 17 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給藥之後，在投予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈奈米粒子調配物形式）之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿、血液及器官含量。

圖 18 描述在以 30 mg/kg（1 mL/kg）靜脈內對大鼠給予本發明之一個具體實例苯達莫司汀 C₁₂ 酯（呈奈米粒子調配物形式）之後，大鼠中苯達莫司

汀 C₁₂ 酯之血漿、血液及器官含量。

圖 19 描述在以 3 mg-eq/kg (1 mL/kg) 靜脈內對大鼠給藥之後，在投予本發明之具體實例苯達莫司汀 PEG-2000 酯及苯達莫司汀 PEG-5000 酯之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿含量。與 TREANDA 進行比較。

圖 20 描述在以 3 mg/kg 靜脈內給予本發明之具體實例 (3% DMSO、30% Solutol) 之後，CD-1 小鼠中苯達莫司汀之血漿含量。

圖 21 描述在 52,000x 放大率下之本發明之代表性奈米粒子具體實例。在樣品中觀測到：看來比周圍緩衝液更均勻地密集的球狀粒子 (最左側箭頭)、背景中之小粒子 (最右側箭頭)。插圖以較大比例展示由最左側箭頭表示的兩個粒子。左側影像中十字標之間的距離為 28 nm，右側插圖中十字標之間的距離為 43 nm。比例尺：200 nm。

圖 22 描述在 52,000x 放大率下之本發明之代表性奈米粒子具體實例。在樣品中觀測到：看來比周圍緩衝液更均勻地密集的球狀粒子 (最左側箭頭)、背景中之小粒子 (最右側箭頭)。插圖以較大比例展示由最左側箭頭表示的兩個粒子。左側影像中十字標之間的距離為 28 nm，右側插圖中十字標之間的距離為 43 nm。比例尺：200 nm。

圖 23 描述在投予 VELCADE®、苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子後之腫瘤體積。

圖 24 描述在投予 VELCADE®、苯達莫司汀及苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子後之體重量測值。

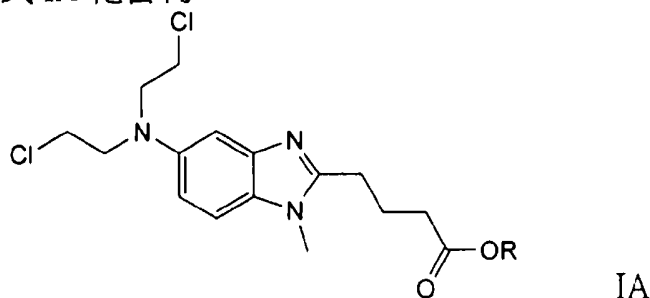
【實施方式】

【0010】 已發現將苯達莫司汀之羧酸部分轉化為 C₁-C₂₄ 烷基酯基、聚乙二醇酯基或 C₁-C₂₄ 烷基醯胺基團可產生會提供更長的苯達莫司汀循環時間之化合物。儘管不希望受任何特定理論約束，但假設酯或醯胺部分會降低苯達莫司汀分子之溶解度，從而產生針對水性環境之保護作用。隨時間

推移，酯或醯胺部分水解，從而暴露活性苯達莫司汀分子之羧酸部分。整體結果為隨時間推移而產生苯達莫司汀。

【0011】 藉由改變酯/醯胺部分中碳之數目，可對所得苯達莫司汀衍生物之親脂性進行改質。已將親脂性增加與酯/醯胺之穩定性增加及苯達莫司汀之循環時間延長相關聯。

【0012】 式 IA 化合物：



其中 R 為 C₁-C₂₄ 烷基或聚乙二醇；或其醫藥學上可接受之鹽形式在本發明之範疇內。式 IA 化合物適用於治療患者中之實體或非實體癌症腫瘤。

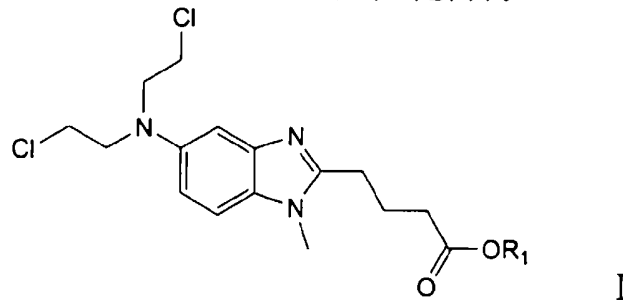
【0013】 本發明之化合物可調配成醫藥組成物，其包含式 IA 化合物或其醫藥學上可接受之鹽形式及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。在本發明之較佳醫藥組成物中，R 為 C₁₀-C₂₄ 烷基。R 較佳為 C₁₀ 烷基。亦較佳為其中 R 為 C₁₂ 烷基。其他較佳具體實例包括其中 R 為 C₁₄ 烷基之具體實例。其中 R 為 C₁₆ 烷基之組成物亦為較佳。

【0014】 本發明之其他具體實例包括奈米粒子，其包含式 IA 化合物。

【0015】 治療患者中之實體或非實體癌症腫瘤之方法亦在本發明之範疇內，其包含向患者投予式 IA 化合物。較佳實體或非實體腫瘤包括慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病、惰性非霍奇金氏淋巴瘤（T 細胞淋巴瘤、B 細胞淋巴瘤）、侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、急性淋巴球性白血病、乳癌或肺癌（例如小細胞肺癌（SCLC）及非小細胞肺癌（NSCLC））。亦預想可使用本發明之化合物及組成物治療其他實體及非實體癌症腫瘤，諸如肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、睪丸癌、黑素瘤、神經膠母細胞瘤、結腸

癌、頭頸癌、卵巢癌及前列腺癌。亦預想可使用本發明之化合物治療其他實體及非實體癌症腫瘤，例如乳癌、胰臟癌及胃癌。

【0016】 本發明之較佳化合物為式 I 化合物：



其中 R_1 為 C_6 - C_{24} 烷基或聚乙二醇；或其醫藥學上可接受之鹽形式。式 I 化合物適用於治療患者中之實體或非實體癌症腫瘤。

【0017】 在較佳具體實例中， R_1 為 C_8 - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{10} - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{12} - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{14} - C_{24} 烷基。亦較佳為其中 R_1 為 C_{16} - C_{24} 烷基之式 I 化合物。在其他具體實例中， R_1 為 C_{18} - C_{24} 烷基。

【0018】 在其他具體實例中， R_1 為 C_{10} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{12} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{14} 烷基。在其他具體實例中， R_1 為 C_{16} 烷基。

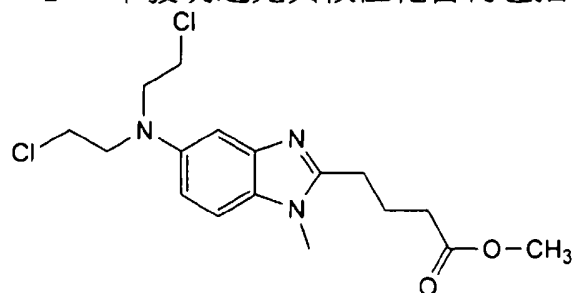
【0019】 醫藥組成物亦在本發明之範疇內，其包含式 I 化合物及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

【0020】 本發明之其他具體實例包括奈米粒子，其包含式 I 化合物。

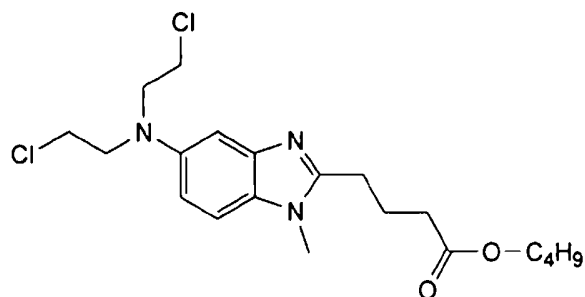
【0021】 治療癌症之方法亦在本發明之範疇內，其包含向患者投予式 I 化合物。該治療可對多種癌症起作用，包括涉及實體腫瘤之癌症以及不涉及實體腫瘤之癌症。該等癌症包括慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病、惰性非霍奇金氏淋巴瘤（T 細胞淋巴瘤、B 細胞淋巴瘤）、侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、急性淋巴球性白血病、乳癌或肺癌（例如小細胞肺癌（SCLC）及非小細胞肺癌（NSCLC））。亦預想可由本發明之化合物

及組成物治療之其他癌症為特徵在於存在實體腫瘤之癌症，包括肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、睪丸癌、黑素瘤、神經膠母細胞瘤、結腸癌、頭頸癌、卵巢癌及前列腺癌。亦預想可使用本發明之化合物治療其他實體及非實體癌症腫瘤，例如乳癌、胰臟癌及胃癌。

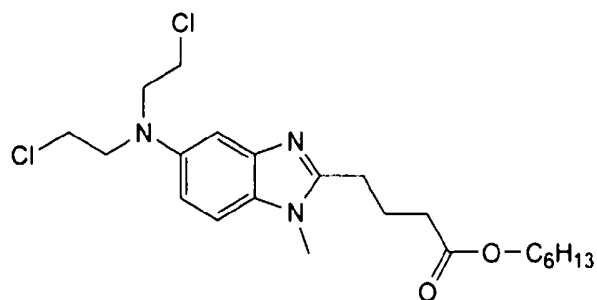
【0022】 本發明之尤其較佳化合物包括：



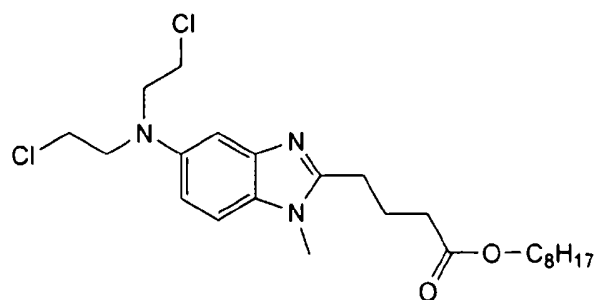
苯達莫司汀甲酯



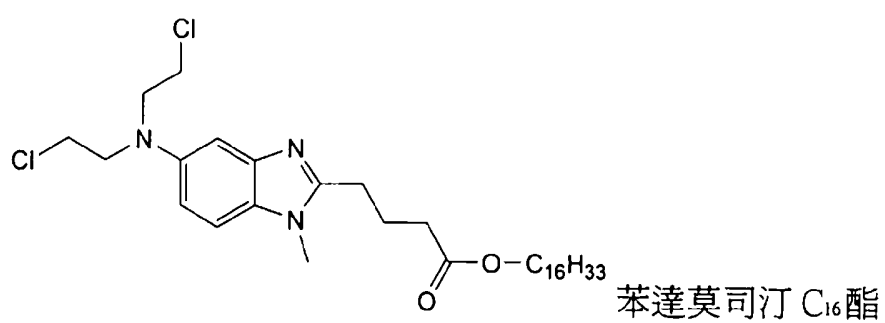
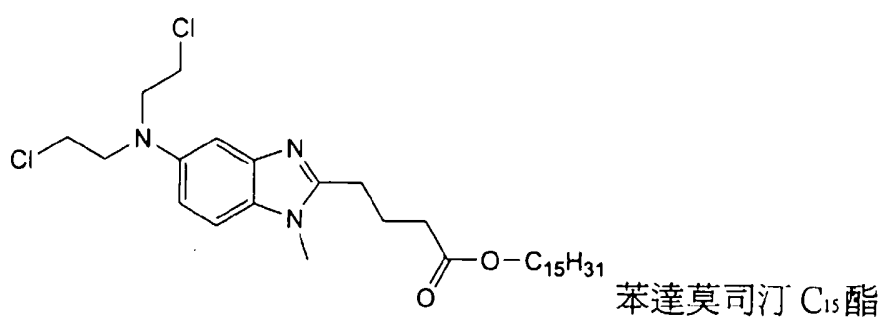
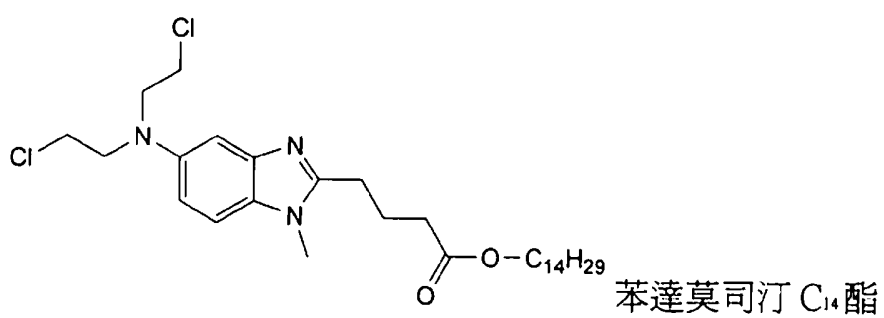
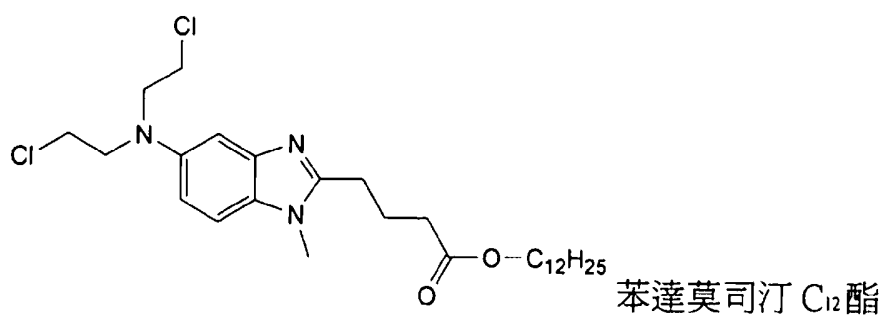
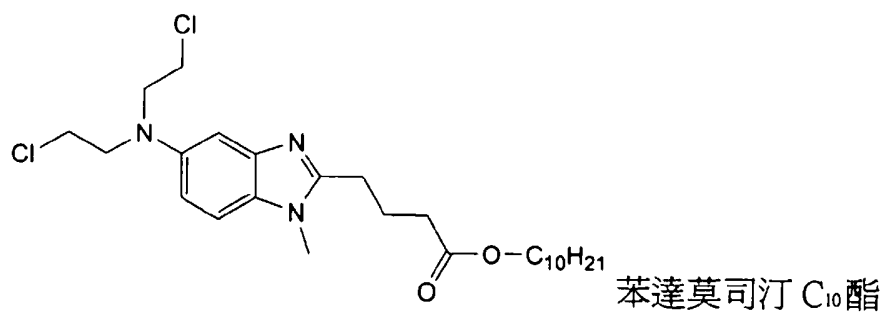
苯達莫司汀 C₄酯

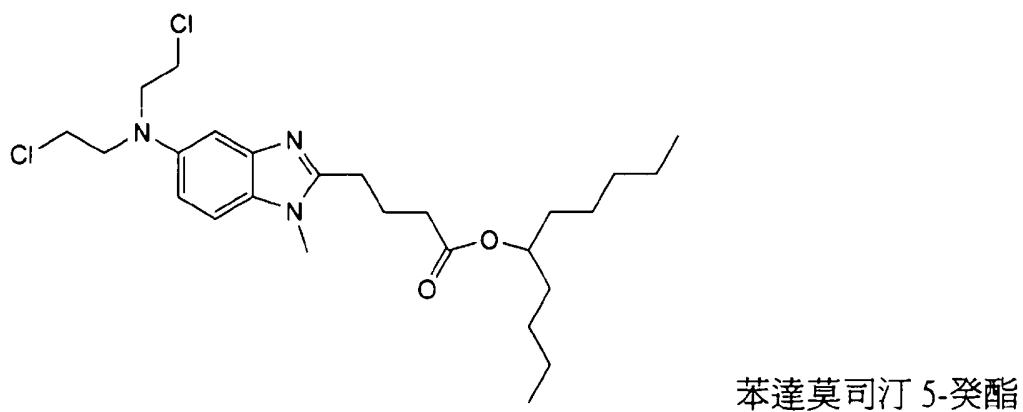
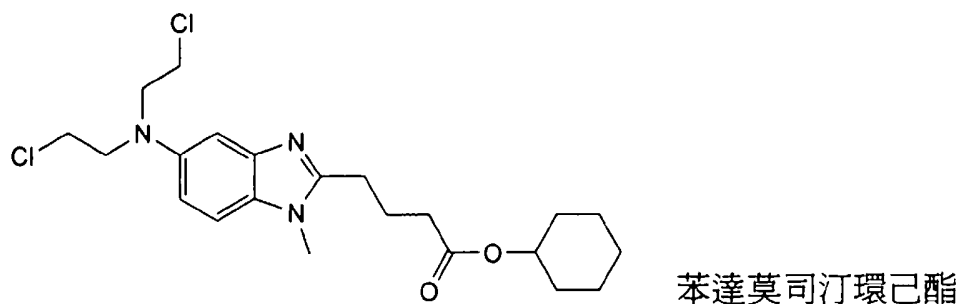
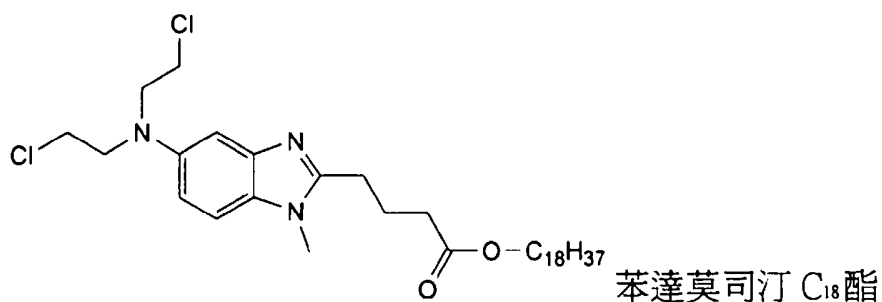


苯達莫司汀 C₆酯

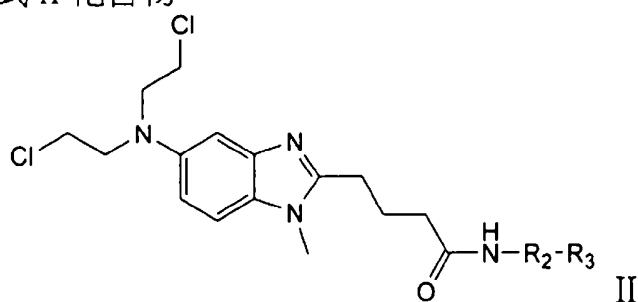


苯達莫司汀 C₈酯





【0023】 式 II 化合物：



其中 R₂ 為 C₁-C₂₄ 伸烷基；且 R₃ 為 -COOC₁₋₃ 烷基；或 R₂-R₃ 為 C₁-C₂₄ 烷基；或其醫藥學上可接受之鹽形式亦在本發明之範疇內。式 II 化合物適用於治療患者中之實體或非實體癌症腫瘤。

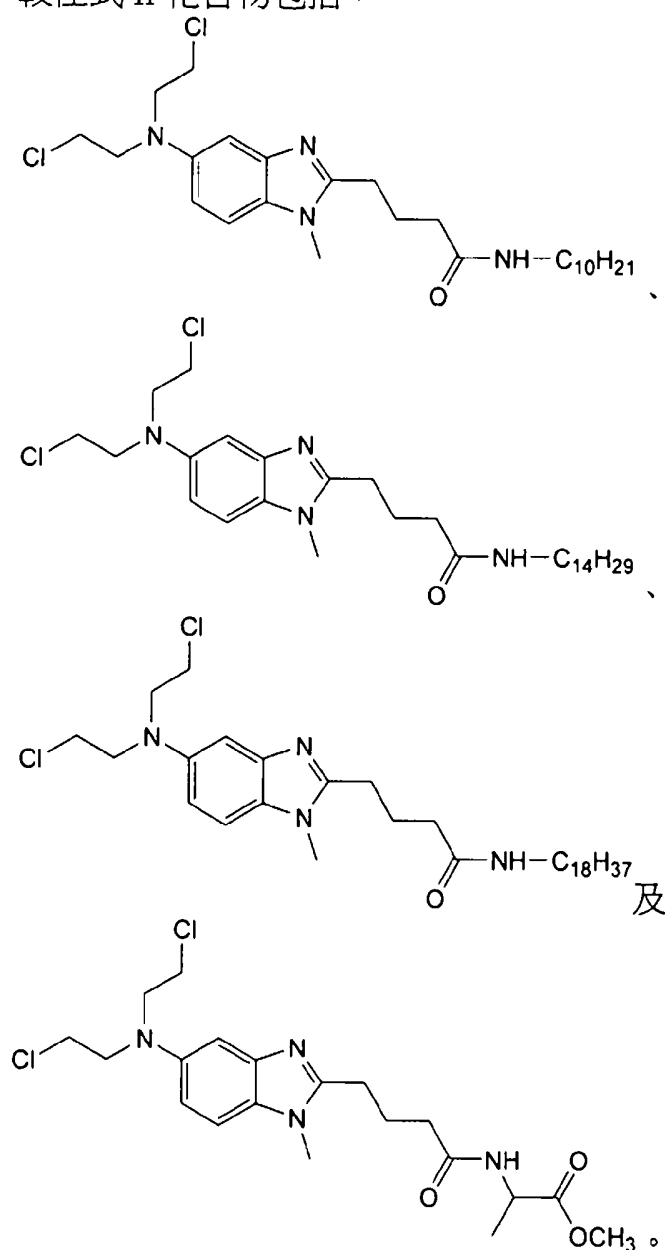
【0024】 在式 II 化合物之較佳具體實例中，R₂-R₃ 為 C₈-C₂₄ 烷基。在其

他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{10} - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{12} - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{14} - C_{24} 烷基。亦較佳為其中 R_2 - R_3 為 C_{16} - C_{24} 烷基。在其他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{18} - C_{24} 烷基。

【0025】 對於式 II 化合物， R_2 - R_3 較佳為 C_{10} 烷基。亦較佳為其中 R_2 - R_3 為 C_{12} 烷基。在其他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{14} 烷基。在其他具體實例中， R_2 - R_3 為 C_{16} 烷基。

【0026】 在其他具體實例中， R_2 為 C_2 伸烷基且 R_3 為 $-COOCH_3$ 。

【0027】 較佳式 II 化合物包括：



【0028】 醫藥組成物亦在本發明之範疇內，其包含式 II 化合物及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

【0029】 本發明之其他具體實例包括奈米粒子，其包含式 II 化合物。

【0030】 在本發明之一個具體實例中，本發明之化合物及組成物係用於治療對一或多種化學治療劑（諸如烷化劑）具有抗性之患者。患者可抵抗之例示性烷化劑包括：氮芥；乙烯亞胺；烷基磺酸酯；三氮烯；哌吡；及亞硝基脲。患者可變得具有抵抗性之各種類型之化學治療劑之更特定實例列舉於下文中。對該等試劑中之一或多者具有抗性之患者將得益於用本發明之化合物及組成物進行之治療。

氮芥

【0031】 二氯甲基二乙胺（Mechlorethamine）（以商標名 Mustargen® 市售）係藉由注射提供以治療霍奇金氏疾病及非霍奇金氏淋巴瘤，且作為乳癌及肺癌之緩解性療法提供，且作為蕁樣真菌病（皮膚 T 細胞淋巴瘤）之皮膚病變之局部治療法提供。

【0032】 異環磷醯胺（Ifosfamide）（以商標名 Ifex® 出售）係用於治療霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤，以及復發性睪丸癌及生殖細胞腫瘤、肉瘤、肺癌、膀胱癌、頭頸癌及子宮頸癌。

【0033】 美法侖（Melphalan）為以商標名 Alkeran® 出售之化學療法藥物，且亦稱為 L-PAM 或苯丙胺酸氮芥。其係用於治療多發性骨髓瘤、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤及乳癌。

【0034】 苯丁酸氮芥（Chlorambucil）係以商標名 Leukeran® 出售，且最廣泛地用於治療慢性淋巴球性白血病、惡性淋巴瘤，包括淋巴肉瘤、巨濾泡性淋巴瘤及霍奇金氏疾病。其亦已成功地用於治療非霍奇金氏淋巴瘤、乳癌、卵巢癌及睪丸癌、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症（Waldenstrom's macroglobulinemia）、血小板增多及絨膜癌。

【0035】 環磷醯胺 (Cyclophosphamide) 係以 Cytosan®或 Neosar®市售，且用於治療霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、慢性淋巴球性白血病、慢性髓細胞性白血病、急性髓細胞性白血病、急性淋巴球性白血病、t 細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)；乳癌、睪丸癌、子宮內膜癌、卵巢癌及肺癌。

亞硝基脲

【0036】 鏈脲佐菌素 (Streptozocin) 係以商標名 Zanosar®出售，且用於治療胰島細胞胰臟癌。

【0037】 卡莫司汀 (Carmustine) 亦稱為 BiCNU®或 BCNU，且係用於一些種類之腦腫瘤、神經膠母細胞瘤、腦幹神經膠質瘤、神經管胚細胞瘤、星形細胞瘤、室管膜瘤及轉移性腦腫瘤。其亦用於治療多發性骨髓瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、黑素瘤、肺癌及結腸癌。

【0038】 洛莫司汀 (Lomustine) (亦稱為 CCNU 或 CccNU®) 係用於治療原發性及轉移性腦腫瘤、霍奇金氏疾病及非霍奇金氏淋巴瘤，且亦已用於黑素瘤、肺癌及結腸癌。

烷基磺酸酯

【0039】 白消安 (Busulfan) (以商標名 Busulfex®及 Myleran®出售) 係用於治療慢性骨髓性白血病。

三吡

【0040】 達卡巴吡 (Dacarbazine) 係以商標名 DTIC-Dome®出售且用於治療轉移性惡性黑素瘤、霍奇金氏疾病、軟組織肉瘤、神經母細胞瘤、纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤、胰島細胞癌瘤及甲狀腺髓質癌。

【0041】 替莫唑胺 (Temozolomide) 係以商標名 Temodar®出售且用於治療特定類型之腦腫瘤退行性星形細胞瘤及多形性膠質母細胞瘤。

伸乙基亞胺

【0042】 噻替派 (Thiotepa) (以商標名 Thioplex® 已知) 為用於治療乳癌、卵巢癌、霍奇金氏疾病及非霍奇金氏淋巴瘤之烷化劑。

【0043】 六甲蜜胺 (Altretamine) 係以商標名 Hexalen® 出售且亦稱為六甲三聚氰胺或 HMM。其係用於治療卵巢癌。

【0044】 如本文中所用,「C₁-C₂₄ 烷基」係指含有 1 至 24 個碳原子之直鏈或分支鏈、飽和烴基團。代表性烷基包括 (但不限於) 甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正十二烷基等。在本發明之範疇內,「C₁-C₂₄ 烷基」亦涵蓋「環烷基」,其係指單環、雙環及三環飽和烴,例如環丙基、環丁基、環戊基、環丁基、雙環[2.1.1]己烷、雙環[2.2.1]庚基、金剛烷基及其類似基團。

【0045】 如本文中所用,「聚乙二醇」(亦稱為「PEG」)係指通式 H(OCH₂CH₂)_nO- 或 H(OCH₂CH₂)_nOCH₃ 之聚合物,其中 n 至少為 4。較佳 PEG 之平均分子量為約 200 至約 5000 道爾頓,更佳 PEG 之平均分子量為約 2000 至約 5000 道爾頓。

【0046】 如本文中所用,術語「醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑」係指生理學上可相容之溶劑、分散介質、塗層、增積劑、穩定劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑以及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之實例包括水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇、糖 (諸如海藻糖及蔗糖)、多元醇 (諸如甘露糖醇、山梨糖醇)、糖與多元醇之混合物及氯化鈉中之一或多者。醫藥學上可接受之載劑可進一步包括輔助物質,諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑及緩衝劑。

【0047】 如本文中所用,「醫藥組成物」係指適於在醫學或獸醫學用途中投予之組成物。該等化合物將較佳包括本發明化合物與一或多種載劑

及/或稀釋劑之組合。該等組成物亦稱為「調配物」。

【0048】 如本文中所用，「投予」係指此項技術中可用於將本發明化合物遞送至患者的任何手段。較佳投予方法包括局部投予，亦即向需要化合物作用之位置直接投予本發明化合物；及全身投予。投予方法之實例包括（但不限於）經口、經腸、舌下、唇下、皮下、經鼻、靜脈內、動脈內、肌肉內及腹膜內投予。

【0049】 如本文中所用，「實體腫瘤」係指呈局部組織塊之惡性腫瘤。實體癌症腫瘤之實例包括淋巴瘤、肉瘤及癌瘤且包括乳癌、腦癌、骨癌、結腸癌、胰臟癌、肺癌及其類似癌症。

【0050】 如本文中所用，「非實體腫瘤癌症」最通常係指血液學癌症，亦即血液之惡性癌症。非實體腫瘤癌症之實例包括慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病、惰性非霍奇金氏淋巴瘤（T 細胞淋巴瘤、B 細胞淋巴瘤）、多發性骨髓瘤及其類似癌症。

【0051】 如本文中所用，「奈米粒子」係指平均直徑為約 0.2 μm 或 0.2 μm 以下，較佳為約 0.1 μm 或 0.1 μm 以下（如由 Malvern Zetasizer 量測）之粒子。

實驗部分

製備 4-{5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸甲酯 (苯達莫司汀 C₁ 酯)：

【0052】 方法 A：將 4-(5-胺基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸甲酯 (10.2 g, 41.2 mmol, 1.0 當量) 及氯乙酸 (81.9 g, 866 mmol) 及 20 mL 無水四氫呋喃 (THF) 饋入配備有頂置式攪拌器、具有氮氣吹掃器之冷凝器及具有溫度控制器之熱電偶的 1 L 三頸圓底燒瓶中。將漿料在自來水浴中攪拌以使所有固體溶解。經由加料漏斗經 25 分鐘緩慢添加硼烷-THF (288 mL, 288 mmol)。當 BH₃-THF 添加完成時，將所得反應溶液在室溫下攪拌 1.5 小時且

接著使用加熱套 (heat mantle) 在 58°C 下加熱 45 分鐘。冷卻反應物且保持在室溫下隔夜且接著用甲醇 (10 mL) 淬滅。用旋轉蒸發器藉由蒸發將所得溶液濃縮至約三分之一重量且在冰-水浴中用氫氧化鈉水溶液中中和至 pH 8-9。藉由真空過濾收集固體，用水 (200 mL) 洗滌，接著用稀碳酸氫鈉水溶液 (50 mL) 再漿化 20 分鐘。過濾，接著在室溫下在室內真空下乾燥隔夜，得到棕褐色固體 (9.6 g, 63% 產率, 93A% 純度)。¹H 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, 與 DMSO 部分重疊), 2.01 (五重峰, J = 7.4 Hz, 2H); LC/MS (ESI, m/z) 372 (M+1), mp 60-63°C。

【0053】 方法 B：將鹽酸苯達莫司汀 (50.0 g, 126.7 mmol, 1.0 當量)、甲醇 (500 mL) 及甲烷磺酸 (2.47 mL, 38.1 mmol) 饋入配備有加熱套、熱電偶、冷凝器、氮氣入口/出口及頂置式攪拌器之 2 L 三頸玻璃容器中。反應混合物加熱至回流且在 65°C 下攪拌一小時。反應溶液冷卻至 40°C 且在真空中濃縮。向濃縮殘餘物中添加水 (500 mL)，且使用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (150 mL) 經 1.5 小時將混合物中和至 pH 6。藉由過濾收集產物，用水 (150 mL) 洗滌且在真空中於 40°C 下乾燥，得到 44.2 g (94% 產率) 白色、粉狀固體，藉由 HPLC 測定純度為 98.4A%。

製備 4-[5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]-丁酸乙酯 (苯達莫司汀 C₂ 酯)：

【0054】 方法 B：將鹽酸苯達莫司汀 (30.0 g, 76 mmol, 1.0 當量)、乙醇 (300 mL) 及甲烷磺酸 (1.48 mL, 22.8 mmol) 饋入配備有加熱套、熱電偶、冷凝器、氮氣入口/出口及頂置式攪拌器之 1 L 三頸玻璃容器中。反應混合物在 70°C 下加熱一小時。反應溶液冷卻至 40°C 且在真空中濃縮。向濃縮殘餘物中添加水 (300 mL)，且使用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (115 mL) 經

1.5 小時將混合物中和至 pH 6。藉由過濾收集產物，用水（100 mL）洗滌且在真空中於 40°C 下乾燥，得到 28.6 g（97% 產率）白色固體，藉由 HPLC 測定純度為 99.2A%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 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 (五重峰, *J* = 7.12 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, 與 DMSO 部分重疊), 2.00 (五重峰, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.12 Hz, 3H)。

【0055】 方法 B：將 4-(5-胺基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸乙酯(6.4 g, 1.0 當量)、氯乙酸（42.5 g）及四氫呋喃（THF, 13 mL）饋入配備有加熱套、熱電偶、冷凝器、氮氣入口/出口及頂置式攪拌器之 500 mL 三頸玻璃燒瓶中。將所得混合物在室溫下於水浴中攪拌 1.5 小時。經 20 分鐘添加硼烷-THF（150 mL）。一旦饋料完成，將反應混合物加熱至 55°C-58°C 且攪拌 1.5 小時。藉由 HPLC 進行之過程中分析（in-process analysis）表明存在 94A% 所需產物。將反應物冷卻至室溫且直接進行下一水解步驟以產生苯達莫司汀。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸丁酯(苯達莫司汀 C₁ 酯)：

【0056】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g（25.34 mmol）鹽酸苯達莫司汀、1.9 g（2.35 mL, 25.6 mmol, 1.01 當量）1-丁醇、5.3 g（25.6 mmol, 1.01 當量）二環己基碳化二亞胺（DCC）、100 mL MDC 及 0.31 g（2.54 mmol, 0.1 當量）DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液（2×100 mL）、去離子水（1×100 mL）及鹽水（1×100 mL）洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到褐色油狀物。該油狀物用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 25 mL MDC 洗滌。濾液在真

空中濃縮至乾燥，得到 9.5 g (22.8 mmol, 90%) 呈透明淺褐色油狀之產物，HPLC 純度為 94.5A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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)。

製備 4-[5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]丁酸己酯(苯達莫司汀 C₆酯)：

【0057】 方法 A：使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、2.62 g (3.22 mL, 25.6 mmol, 1.01 當量) 1-己醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL)、去離子水 (1×100 mL) 及鹽水 (1×100 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到褐色油狀物。該油狀物用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 25 mL MDC 洗滌。濾液在真空中濃縮至乾燥，得到 8.91 g (20.1 mmol, 79%) 呈透明淺褐色油狀之產物，HPLC 純度為 91.9A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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)。

【0058】 方法 B：將 30 g (76.0 mmol) 鹽酸苯達莫司汀及 300 mL 二氯甲烷饋入配備有頂置式攪拌器、熱電偶及氮氣入口/出口之 1 公升 4 頸圓底燒瓶中。開始攪拌且經注射器添加 10.6 mL (7.69 g, 76.0 mmol) 三乙胺，

接著在室溫下攪拌 15 分鐘，隨後添加 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺 (EDAC, 21.86 g, 114 mmol) 及正己醇 (9.57 mL, 7.84 g, 76.8 mmol)。在攪拌 20 分鐘後，混濁白色反應混合物變為澄清溶液。在室溫下繼續攪拌 22.5 小時且在 30°C 下攪拌 1 小時直至 HPLC 分析表明反應完成。添加去離子水 (300 mL) 以淬滅反應物且使用 1 N HCl 調節 pH 至 6。分離各層，水層用二氯甲烷 (100 mL) 萃取，接著合併有機相且經硫酸鈉乾燥。在過濾且在真空中濃縮至乾燥後，獲得透明黃色油狀物，藉由管柱層析 (含 25% 至 50% 乙酸乙酯之庚烷) 純化。總共回收 16.5 g (37.3 mmol, 49.1%) 黏稠黃色油狀物，藉由 HPLC 測定純度為 99.1A%。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸辛酯 (苯達莫司汀 C₈ 酯):

【0059】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、3.33 g (4.03 mL, 25.6 mmol, 1.01 當量) 1-辛醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL)、去離子水 (1×100 mL) 及鹽水 (1×100 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到褐色油狀物。該油狀物用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 5 mL MDC 洗滌。濾液在真空中濃縮至乾燥，得到 9.7 g (20.5 mmol, 81%) 呈透明淺褐色油狀之產物，HPLC 純度為 91.9A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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)。

製備 4-[5-[雙-(氯癸基)-胺基]-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-2-基]丁酸癸酯(苯達莫司汀 *C₁₀* 酯):

【0060】 方法 A: 將 10.0 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、4.9 mL (4.08 g, 25.6 mmol, 1.01 當量) 癸醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL 二氯甲烷及 0.31 g (2.53 mmol, 0.1 eq 當量) *N,N*-二甲基胺基吡啶 (DMAP) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 18 小時, 此時 HPLC 分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且濾液用去離子水 (2×100 mL) 及飽和碳酸氫鈉 (1×100 mL) 洗滌, 隨後經硫酸鈉乾燥。過濾有機相以移除乾燥劑, 接著在真空中濃縮至乾燥, 得到 9.6 g (19.2 mmol, 75.9%) 呈低熔點白色固體狀之所需產物, HPLC 純度為 94.1A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, 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* = 7.08 Hz, 2H), 2.18 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.32 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 6.68 Hz, 3H)。

【0061】 方法 B: 將 10 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀及 100 mL 二氯甲烷饋入配備有磁性攪拌棒、熱電偶及氮氣入口/出口之 250 mL 4 頸圓底燒瓶中。開始攪拌且經注射器添加 3.53 mL (2.56 g, 25.3 mmol) 三乙胺, 接著在室溫下攪拌 15 分鐘, 隨後添加 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺 (EDAC, 7.28 g, 38 mmol) 及正癸醇 (4.88 mL, 4.04 g, 25.5 mmol)。在攪拌 20 分鐘後, 混濁白色反應混合物變為澄清溶液。在室溫下繼續攪拌 20 小時, 直至 HPLC 分析表明反應完成。饋入去離子水 (100 mL) 以淬滅反應物且使用 1 N HCl 調節 pH 至 6-7。分離各層, 水層用二氯甲烷 (25 mL) 萃取, 接著合併有機相且經硫酸鈉乾燥。在過濾且在真空中濃縮至乾燥後, 獲得透明黃色油狀物, 藉由管柱層析 (含 20%至 60%乙酸乙酯之庚烷) 純

化。總共回收 11.2 g (22.42 mmol, 88.6%) 黏稠黃色油狀物，藉由 HPLC 測定純度為 98.9A%。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十二烷基酯 (苯達莫司汀 C₁₂ 酯)：

【0062】 方法 A：使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、4.77 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 1-十二烷醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL)、去離子水 (1×100 mL) 及鹽水 (1×100 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到灰白色半固體。此固體用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 5 mL MDC 洗滌。濾液在真空中濃縮至乾燥，得到 11.53 g (21.9 mmol, 86.4%) 呈灰白色半固體狀之產物，HPLC 純度為 93.7A%。

【0063】 方法 B：將苯達莫司汀之游離鹼 (374 g, 1.04 mol, 1.0 當量)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺 (EDAC, 300 g, 1.57 mol, 1.5 當量) 及二氯甲烷 (DCM, 3.74 L, 10 體積) 饋入配備有熱電偶、加熱器/冷卻器、氮氣入口/出口、加料漏斗及真空管線之 20 公升夾套圓柱形 ChemGlass 反應容器中。在攪拌下添加 1-十二烷醇 (292.1 g, 1.57 mol, 1.5 當量)。將反應混合物加熱至 27°C，接著在 27°C 下攪拌 4 小時。冷卻批料且保持在 20°C 下隔夜。接著用 3.75 L 水洗滌批料且分離各層。水性部分用 1.2 L 二氯甲烷再萃取，且合併之二氯甲烷部分經 Na₂SO₄ 乾燥。在過濾以移除乾燥劑後，在真空中濃縮濾液以產生呈粗油狀之產物。用 374 g 苯達莫司汀之游離鹼在相同條件下對另一批進行此反應。合併來自兩個批次之粗產物，與 4494 mL

庚烷混合且加熱至 45°C-50°C。使所得溶液緩慢冷卻至室溫，沈澱出灰白色固體。將漿料在室溫下攪拌隔夜且在 10°C 下藉由真空過濾分離固體。濕濾餅用 1 L 庚烷洗滌且在 20°C-22°C 下用 2.5 L 庚烷再漿化隔夜。藉由過濾收集產物且每次用 500 mL 庚烷洗滌兩次。在 20°C-22°C 下乾燥濕濾餅隔夜，得到 653 g (59%產率) 白色固體，藉由 HPLC 測定純度為 99.0 A%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 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, 與 DMSO 部分重疊), 2.01 (五重峰, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.54 (五重峰, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.24 (m, 18H), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H)。

製備 4-[5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-2-基]丁酸十四烷基酯 (苯達莫司汀 C₁₄ 酯) :

【0064】 方法 A：將 10.0 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、6.5 g (30.4 mmol, 1.2 當量) 十四烷基醇、6.3 g (30.4 mmol, 1.2 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL 二氯甲烷及 0.62 g (5.1 mmol, 0.2 當量) *N,N*-二甲基胺基吡啶 (DMAP) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶及氮氣入口/出口之 500 mL 三頸圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 20 小時，此時 HPLC 分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且濕濾餅用 50 mL 二氯甲烷洗滌，接著在真空中濃縮濾液至乾燥。所得淺橙色油狀物用 50 mL 二氯甲烷濕磨且藉由真空過濾移除不需要的固體。在真空中將濾液再一次濃縮至乾燥，得到 16.5 g 半固體，藉由 ¹H NMR 證實其含有十四烷基醇及 DMAP。用 150 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 對殘餘物進行層析 (用 1500 mL MDC、1000 mL 0.5% 甲醇/MDC 及 2000 mL 1% 甲醇/MDC 溶離)，收集 100-150 mL 溶離份。合併含有所需產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥。殘餘物再用 30 mL MDC 濕磨且藉由過濾移除不需要的固體。在真空中濃縮濾液，得到 5.0 g (9.2 mmol, 36.4%) 呈淺紫色固體狀之所需產物，純度為 95.0A%。

【0065】 方法 B：將苯達莫司汀之游離鹼（10.6 g，44.6 mol，1.0 當量）、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺（EDAC，9.42 g，49.2 mol）、1-十四烷醇（10.6 g，49.2 mmol）及二氯甲烷（120 mL）饋入配備有熱電偶、冷凝器、氮氣入口/出口及頂置式機械攪拌器之 150 mL 三頸玻璃容器中。將反應混合物在 27°C 下攪拌隔夜。反應溶液冷卻至室溫且用 100 mL 水洗滌。在攪拌下添加 1 M 鹽酸水溶液以將水層之 pH 調節至 pH 3-4。分離各層。水性部分用 100 mL 二氯甲烷再萃取，且合併之二氯甲烷部分經 MgSO_4 乾燥。在過濾以移除乾燥劑後，在真空中濃縮濾液以產生呈蠟狀黃色固體狀之產物。固體在室溫下於 80 mL 庚烷中漿化隔夜。藉由過濾收集產物且乾燥，得到 20.6 g (83.4% 產率) 白色固體，藉由 HPLC 測定純度為 97.2A%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 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, 與 DMSO 部分重疊), 2.01 (五重峰, J = 7.3 Hz, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.23 (m, 18H), 0.85 (t, J = 7.12 Hz, 3H)。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十五烷基酯 (苯達莫司汀 C_{15} 酯)：

【0066】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、5.85 g (25.6 mmol，1.01 當量) 十五烷醇、5.3 g (25.6 mmol，1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol，0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL)、去離子水 (1×100 mL) 及鹽水 (1×100 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到灰白色半固體。此固體用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 5 mL MDC 洗滌。濾液在真

空中濃縮至乾燥，得到 10.8 g (19.0 mmol, 75%) 呈灰白色固體狀之產物，HPLC 純度為 94.6A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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)。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸十六烷基酯 (苯達莫司汀 C₁₆酯)：

【0067】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、6.2 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 十六烷醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺(DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用飽和碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL)、去離子水 (1×100 mL) 及鹽水 (1×100 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到灰白色半固體。此固體用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 5 mL MDC 洗滌。濾液在真空中濃縮至乾燥，得到 13.1 g (22.5 mmol, 88.8%) 呈灰白色固體狀之產物，HPLC 純度為 94.0A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 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)。

製備 4-{5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}-丁酸油酸酯 (苯達莫司汀 C₁₈酯)：

【0068】 方法 A：將 1-十八烷醇 (50 g, 185 mmol, 7.3 當量) 饋入配備有頂置式攪拌器、具有氮氣吹掃器之冷凝器、具有溫度控制器之加熱套

及熱電偶之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。加熱固體以使其熔融，隨後緩慢添加 4-(5-胺基-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸 (10 g, 25.3 mmol, 1.0 當量) 及硫酸 (0.5 mL)。將所得漿料在 70°C 下攪拌 6 小時且接著冷卻至 56°C，其中添加二氯甲烷 (150 mL)。反應混合物冷卻至室溫且用水 (100 mL) 洗滌。在相分離後，再用二氯甲烷 (100 mL) 進行萃取。合併有機相且經 MgSO_4 乾燥。藉由過濾移除乾燥劑。濃縮濾液且經 SFC 分離。藉由在減壓下蒸發 SFC 溶離份中之溶劑而獲得白色固體且在室溫下於室內真空中乾燥 5 天，得到 1.2 g 所需產物 (7.1% 產率及 95.4% 純度)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 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 (五重峰, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.60 (五重峰, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.28 (m, 30H), 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); LC/MS (ESI, m/z) 610 ($M+1$)。

【0069】 方法 B：將鹽酸苯達莫司汀 (5.04 g, 12.8 mmol)、1-十八烷醇 (4.15 g, 15.3 mmol)、N,N'-二環己基碳化二亞胺 (DCC, 3.17 g, 15.4 mmol)、4-二甲基胺基吡啶 (DMAP, 0.31 g, 2.56 mmol) 及二氯甲烷 (250 mL) 饋入配備有攪拌棒、氮氣吹掃器及熱電偶之 500 mL 三頸圓底燒瓶中。在室溫下攪拌所得漿料 16 小時。產生固體且藉由過濾自反應混合物移除。濾液用水 (150 mL) 洗滌。在相分離後，有機相經 MgSO_4 乾燥。藉由過濾移除乾燥劑，且濃縮濾液且經 ISCO 層析純化 (使用 EtOAc 與庚烷之混合物)，得到 5.68 g (73% 產率) 白色固體，純度為 99A%。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸二十二烷基酯 (苯達莫司汀 C_{22} 酯)：

【0070】 將 5.0 g (12.7 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、4.2 g (12.9 mmol, 1.01 當量) 十四烷基醇、2.7 g (12.9 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、50 mL 二氯甲烷 (MDC) 及 0.16 g (1.27 mmol, 0.1 當量) N,N'-二甲

基胺基吡啶 (DMAP) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌隔夜，此時 HPLC 分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且濕濾餅用 50 mL 洗滌。研發兩種替代性純化程序。濾液用去離子水 (2×150 mL) 洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥。所得蠟狀殘餘物用 80 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 進行層析 (用以 100% MDC 開始，接著 0.5% 甲醇/MDC 且最終 1% 甲醇/MDC 之梯度溶離)，收集 100-150 mL 溶離份。合併含有所需產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥。殘餘物再用 20 mL MDC 濕磨且藉由過濾移除不需要的固體。在真空中濃縮濾液，得到 3.65 g (5.5 mmol, 43.1%) 呈蠟狀固體狀之所需產物，純度為 95.7A%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, 2 H), 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)。

製備 4-{5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基}丁酸 2-十二烷基酯 (分支鏈苯達莫司汀 C₁₂ 酯)：

【0071】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10.0 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、4.77 g (5.75 mL, 25.6 mmol, 1.01 當量) 2-十二烷醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。將反應物在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 25 mL MDC 洗滌。濾液用 200 mL MDC 稀釋，接著用 4% 碳酸氫鈉水溶液 (1×500 mL) 洗滌，隨後經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到灰白色固體。此固體用 25 mL MDC 濕磨，且藉由真空過濾移除固體雜質且用 5 mL MDC 洗滌。在真空中濃縮濾液至乾燥，得到粗產物，藉由 ¹H NMR 證實其含有殘餘 2-十二烷醇。使用 100 g 矽膠 60

(230-400 篩目) 對粗產物進行層析 (首先用 1 L 庚烷, 接著用 500 mL 3:1 庚烷/EtOAc、500 2:1 庚烷/EtOAc 且最終 500 mL 1:1 庚烷/EtOAc 溶離), 收集 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥, 得到 5.35 g (10.16 mmol, 40%) 呈淺紫色黏性油狀之產物, HPLC 純度為 99.5A%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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)。

製備苯達莫司汀 C₁₂ 酯

【0072】 將 428 g (1.10 mmol) 經預處理之鹽酸苯達莫司汀於 10 體積微量 GC 分析級二氯甲烷中之漿料饋入配備有熱電偶、加熱器/冷卻器、氮氣入口、加料漏斗、冷凝器及真空管線之 20 公升夾套圓柱形 ChemGlass 反應容器中。攪拌設定在 100 RPM 下且夾套設定在 20°C 下。經由加料漏斗經 10 分鐘向此混合物中添加二異丙基乙基胺 (213 ml, 1.1 當量)。在靜置 34 分鐘後, 一次性添加熔融十二烷醇 (227 g, 1.1 當量)。在靜置 11 分鐘後, 向批料中添加 EDCI (320.3 g, 1.5 當量)。所得澄清黃色溶液在約 20°C 下攪拌 23.5 小時。此時, IPC 表明剩餘 0.54% 起始物質。添加十體積水且再攪拌反應物 15 分鐘。排出下部有機層, 經 5 微米濾筒過濾且濾筒用 1 體積 GC 分析級二氯甲烷沖洗。在真空中濃縮二氯甲烷溶液, 得到呈黏性黃色油狀之粗產物。將五體積經過濾之正庚烷添加至油狀物中且在真空中濃縮混合物以移除殘餘二氯甲烷, 得到 615 g 粗固體, 其中 92.9 wt% 轉換為 98.0% 產率。以乾量基準計, 最終純度為 98.4%。

純化苯達莫司汀 C₁₂ 酯

【0073】 將粗 CEP-40125 (1100 g API, 1250 g 粗物質) 溶解於正庚烷 (6 體積) 中且轉移至配備有熱電偶、加熱器/冷卻器、氮氣入口、冷凝器及

真空管之 20 公升夾套圓柱形 ChemGlass 反應容器中。將漿料溫熱至 40°C 以溶解所有固體。溶解在達到 32.6°C 時發生。接著經 2.5 小時將反應混合物冷卻至 17.7°C，此時產物沈澱。接著經 26 分鐘將反應混合物再溫熱至 23°C 以使精細粒子溶解，且經 2 小時冷卻至 4°C。固體經密封過濾器過濾且用 2 體積冷的正庚烷洗滌 4.5 小時。IPC 表明存在 0.20% 殘餘十二烷醇。固體在真空中於 30°C 下乾燥 24 小時達到恆定重量，得到 1018 g（表示 92.5% 產率）CEP-40125，純度為 98.3%。

製備 4-[5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]丁酸 5-癸酯(分支鏈苯達莫司汀 C₁₀酯)：

【0074】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 3.0 g (7.6 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、1.21 g (7.7 mmol, 1.01 當量) 5-癸醇、1.59 g (7.7 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、30 mL 1,2-二氯乙烷 (EDC) 及 0.1 g (0.76 mmol, 0.1 當量) DMAP。反應物在 75°C 下攪拌五天直至過程中分析表明反應完成。藉由真空過濾移除固體且用 5 mL EDC 洗滌。濾液用 4% 碳酸氫鈉水溶液 (1×50 mL) 洗滌，隨後經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥。將殘餘物與來自在相同條件下處理之 10 g 批料之殘餘物合併且對合併之批料進行層析。層析係使用 100 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 進行 (首先用 2 L 庚烷，接著用 1 L 3:1 庚烷/EtOAc 及 1 L 2:1 庚烷/EtOAc 溶離)，收集 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥，得到 3.97 g (7.96 mmol, 24.2%) 呈透明黃色油狀之產物，HPLC 純度為 99.4A%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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)。

製備 4-[5-[雙-(氯乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]丁酸環己酯：

【0075】 使 250 mL 三頸圓底燒瓶配備有頂置式攪拌器、熱電偶、溫度控制器及氮氣吹掃器，接著饋入 10 g (25.34 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、2.56 g (2.7 mL, 25.6 mmol, 1.01 當量) 環己醇、5.3 g (25.6 mmol, 1.01 當量) 二環己基碳化二亞胺 (DCC)、100 mL MDC 及 0.31 g (2.54 mmol, 0.1 當量) DMAP。反應漿料在室溫下攪拌 18 小時，直至過程中分析表明反應完成。觀測到兩個新的主要產物峰。藉由真空過濾移除固體且用 5 mL MDC 洗滌。濾液用 4% 碳酸氫鈉水溶液 (2×100 mL) 洗滌，隨後經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥，得到黃色油狀物 (其中存在一些固體)。¹H NMR 分析表明除所需產物外，亦存在殘餘 DMAP 及環己醇以及 DCC 副產物。殘餘物用 50 mL MDC 漿化以移除殘餘環己醇，接著在真空中濃縮且進行層析。層析法係使用 50 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 進行 (用 1:1 庚烷/EtOAc 溶離)，收集 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥，得到 3.11 g (7.06 mmol, 27.9%) 呈灰白色固體狀之產物，HPLC 純度為 97.8A%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 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)。

製備 4-{5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-2-基}-丁酸 PEG-2000 酯 (苯達莫司汀 PEG-2000 酯)：

【0076】 將鹽酸苯達莫司汀 (2.0 g, 5.1 mmol, 1.0 當量) 及二氯甲烷 (30 mL) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷凝器及氮氣入口/出口之 100 mL 三頸玻璃容器中。在 22°C 下將三乙胺 (0.71 mL, 5.1 mmol) 添加至漿料中且攪拌 20 分鐘。添加甲氧基聚乙二醇 2000 (PEG-OMe-2000, 12.2 g, 6.1 mmol) 及 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺 (EDAC, 1.5 g, 7.6 mol)。反應混合物在 22°C 下攪拌 5.5 小時，此時添加 PEG-OMe-2000 (1.0 g)，接著攪拌

3 天度過週末。添加水 (20 mL) 且藉由添加 1 M 鹽酸將 pH 調節至 pH 5-6。緩慢分離各相。水性部分用 20 mL 二氯甲烷再萃取，且合併之二氯甲烷部分經 MgSO_4 乾燥。在過濾以移除乾燥劑後，在真空中濃縮濾液以產生呈蠟狀固體狀之產物。固體在室溫下於 10 mL 庚烷中漿化。藉由過濾收集產物且在真空中於 30°C 下乾燥，得到 11.7 g (99% 產率) 白色且呈粉狀固體，藉由 HPLC 測定純度為 97.9A%。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 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, 58H), 2.84 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.45 (2H, 與 DMSO 部分重疊), 2.01 (五重峰, J = 7.3 Hz, 2H)。

製備 4-(5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基)-丁酸 PEG-5000 酯 (苯達莫司汀 PEG-5000 酯):

【0077】 將鹽酸苯達莫司汀 (0.5 g, 1.27 mmol, 1.0 當量) 及二氯甲烷 (15 mL) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷凝器及氮氣入口/出口之 50 mL 三頸玻璃容器中。在 22°C 下將三乙胺 (0.18 mL, 1.28 mmol) 與甲氧基聚乙二醇 5000 (PEG-OMe-5000, 6.33 g, 1.27 mmol) 及 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺 (EDAC, 0.36 g, 1.88 mol) 一起添加至漿料中且攪拌 20 分鐘。反應混合物在 22°C 下攪拌隔夜。添加水 (20 mL) 且藉由添加 1 M 鹽酸將 pH 調節至 pH 3-4。緩慢分離各相。水性部分用 10 mL 二氯甲烷再萃取。合併之二氯甲烷部分用鹽水 (20 mL) 洗滌且經 MgSO_4 乾燥。在過濾以移除乾燥劑後，在真空中濃縮濾液以產生呈蠟狀固體狀之產物。固體在室溫下於 20 mL 庚烷中漿化。藉由過濾收集產物且在真空中於 30°C 下乾燥，得到 5.24 g (77% 產率) 白色且呈粉狀固體，藉由 HPLC 測定純度為 99A%。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) 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, 28H), 2.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 2.45 (t, 2H, 與 DMSO 部分重疊), 2.01 (五重峰, $J = 7.3$ Hz, 2H)。

用於苯達莫司汀甲酯之酯基轉移之一般程序

【0078】 將苯達莫司汀甲酯 (0.5 g, 1.27 mmol, 1.0 當量)、催化劑 (0.05-1.4 當量)、適當溶劑 (5-15 體積) 及過量十二烷醇 (5-10 當量) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、具有迪安-斯塔克分離器 (Dean-Stark trap) 之冷凝器及氮氣入口/出口之 50 mL 三頸玻璃容器中。將所得反應混合物加熱至回流且藉由 HPLC 進行監測。在不同條件下之結果概述於下文中。

催化劑	催化劑 (當量)	溶劑	溶劑體 積	醇當 量	溫度 (°C)	迪安- 斯塔克 分離器	時間 (h)	起始物質 (HPLC A%)	產物 (HPL C A%)
CH ₃ SO ₃ H	1.40	NA	NA	2.50	30	N	3	3.8	94.5
CH ₃ SO ₃ H	1.40	DCM	10	2.50	30	N	47	22.0	76.2
CH ₃ SO ₃ H	1.40	甲苯	10	2.50	70	N	24	19.3	69.7
I ₂	0.25	甲苯	5	2.50	75	N	7	96.0	0.2
TiO(acac) ₂	0.05	二甲苯	10	1.01	130	N	7	92.7	4.0
TiO(acac) ₂	0.10	二甲苯	5	10.0	130	N	6	10.5	85.5
TiO(acac) ₂	0.10	二甲苯	5	10.0	160	N	5	9.0	78.6
TiO(acac) ₂	0.10	二甲苯	15	5.00	160	Y	6	1.0	97.0
H ₂ SO ₄	0.5	甲苯	10	5.0	100	N	23	78.9	13.5
DMAP	0.5	甲苯	10	5.0	100	N	23	83	0
p-TSA	0.5	二甲苯	10	5.0	130	N	21	67.2	15.6
Sm(Oi-Pr) ₃	0.5	THF	10	5.0	25-45	N	27	2.6	90.5
超強鹼 (Superbase)	0.5	THF	10	5.0	25-45	N	27	3.3	49.8
Sm(Oi-Pr) ₃	0.1	二甲苯	15	5.0	160	N	8	72.8	24.3
Sm(Oi-Pr) ₃	0.5	THF	10	5.0	40	N	16	95.8	2.5
TiO(acac) ₂	0.05	二甲苯	15	5.0	150	Y	3	0.3	96.9
TiO(acac) ₂	0.05	甲苯	15	5.0	105	N	70	78.9	15.9
TiO(acac) ₂	0.10	甲苯	15	5.0	115	Y	22	ND	96.4
TiO(acac) ₂	0.05	甲苯	15	5.0	130	N	24	83.2	4.1
TiO(acac) ₂	0.05	甲苯	15	5.0	115	Y	21	0.4	97.7

製備鹽酸苯達莫司汀醯胺

4-[5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]-N-癸基-丁醯胺
(苯達莫司汀 C₁₀ 醯胺):

【0079】 將 10.0 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、10.6 g (27.8 mmol)

HATU 及 100 mL N,N-二甲基甲醯胺 (DMF) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷卻浴、60 mL 壓力平衡滴液漏斗及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。向此經攪拌之黃色溶液中添加 4.41 mL (3.27 g, 25.3 mmol) N,N-二異丙基乙胺 (DIPEA)。注意到放熱至 27.1°C 且溶液變為深黃色。將反應物冷卻至 6.6°C，其中在 2.7°C-7.6°C 下經 13 分鐘逐滴添加 6.2 mL (4.59 g, 35.5 mmol) DIPEA、5.11 mL (4.1 g, 25.6 mmol) 癸胺於 20 mL DMF 中之溶液。一旦添加完成，將反應物在低於 10°C 之溫度下攪拌 1.5 小時，此時過程中分析表明反應完成。批料用 200 mL 去離子水淬滅且用乙酸乙酯 (2×175 mL) 萃取。合併有機相，用 10% 磷酸氫二鈉 (1×200 mL)、8% 碳酸氫鈉水溶液 (1×200 mL) 及鹽水 (1×200 mL) 洗滌，隨後在真空中濃縮至乾燥，得到黏性白色固體。此固體用庚烷 (75 mL) 濕磨且變為可流動固體，藉由真空過濾分離該固體。濕濾餅在真空烘箱中於 25°C 下乾燥隔夜，得到 13.33 g (25.3 mmol, 100%) 呈白色固體狀之所需產物，HPLC 純度為 98.01A%。¹H 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)。

4-[5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-2-基]-*N*-十四烷基-丁醯胺 (苯達莫司汀 C₁₄ 醯胺):

【0080】 將 10.0 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、10.6 g (27.8 mmol) HATU 及 100 mL N,N-二甲基甲醯胺 (DMF) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷卻浴、60 mL 壓力平衡滴液漏斗及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。向此經攪拌之黃色溶液中添加 4.41 mL (3.27 g, 25.3 mmol) N,N-二異丙基乙胺 (DIPEA)。注意到放熱至 27.1°C 且溶液變為深黃色。將反應物冷卻至 3.3°C，其中在低於 10°C 之溫度下經 6 分鐘逐滴添加 6.2 mL (4.59 g, 35.5

mmol) DIPEA、5.75 g (25.6 mmol) 十四烷基胺於 40 mL DMF 中之溶液。一旦添加完成，則反應物變為極稠密且難以攪拌。將其轉移至配備有頂置式攪拌器及熱電偶之 500 mL 三頸圓底燒瓶中，接著在室溫下攪拌三小時，此時過程中分析表明反應完成。批料用 400 mL 去離子水淬滅且用乙酸乙酯 (2×300 mL) 萃取。合併有機相，用 10% 磷酸氫二鈉 (1×300 mL)、8% 碳酸氫鈉水溶液 (1×300 mL) 及鹽水 (1×300 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥。殘餘物使用 100 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 藉由層析 (用 1% MeOH/MDC (2 L)、2.5% MeOH/MDC (1 L) 及 5% MeOH/MDC (1 L) 溶離) 純化，收集約 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥，得到 7.86 g (14.6 mmol, 57.6%) 呈白色固體狀之所需產物，HPLC 純度為 97.3A%。¹H 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)。

4-[5-[雙-(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-2-基]-N-十八烷基-丁醯胺 (苯達莫司汀 C₁₈ 醯胺):

【0081】 將 10.0 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、10.6 g (27.8 mmol) HATU 及 100 mL N,N-二甲基甲醯胺 (DMF) 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷卻浴、60 mL 壓力平衡滴液漏斗及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。向此經攪拌之黃色溶液中添加 4.41 mL (3.27 g, 25.3 mmol) N,N-二異丙基乙胺 (DIPEA)。注意到放熱至 27.1°C 且溶液變為深黃色。將反應物冷卻至 2.0°C，其中經吸管添加 6.2 mL (4.59 g, 35.5 mmol) DIPEA、7.65 g (25.6 mmol) 十八烷基胺於 0 mL DMF 中之懸浮液。一旦添加完成，則反應物變為極稠密且難以攪拌。將其溫熱至室溫且用頂置式攪拌器替換磁性攪拌棒。批料在室溫下攪拌隔夜，此時過程中分析表明反應完成。批料用 300 mL

去離子水淬滅且用二氯甲烷 (2×150 mL) 萃取。合併有機相，用 10% 磷酸氫二鈉 (1×300 mL)、8% 碳酸氫鈉水溶液 (1×300 mL) 及鹽水 (1×300 mL) 洗滌，接著經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中濃縮至乾燥。殘餘物使用 100 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 藉由層析 (用 1% MeOH/MDC (2 L)、2.5% MeOH/MDC (1 L) 及 5% MeOH/MDC (1 L) 溶離) 純化，收集約 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥，得到 5.11 g (8.38 mmol, 33%) 呈白色固體狀之所需產物，HPLC 純度為 90.9A%。證實主要雜質為 C-16 醯胺，其係由起始胺中之雜質產生。¹H 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)。

(S)-2-(4--{5-[雙(2-氯-乙基)-胺基]-1-甲基-1*H*-苯并咪唑-2-基})-丁醯基胺)-丙酸甲酯：

【0082】 將 10 g (25.3 mmol) 鹽酸苯達莫司汀、10.6 g (27.8 mmol) HATU 及 100 mL DMF 饋入配備有攪拌棒、熱電偶、冷卻浴、加料漏斗及氮氣入口/出口之 250 mL 三頸圓底燒瓶中。將批料冷卻至 1.9°C，其中經 2 分鐘添加 8.8 mL (6.54 g, 50.6 mmol) DIPEA。反應物放熱至 9°C 且變為橙色。在 4.9°C-5.7°C 下經 10 分鐘逐滴添加 3.57 g (25.6 mmol) L-丙胺酸甲酯鹽酸鹽及 6.2 mL (4.57 g, 35.4 mmol) DIPEA 於 20 mL DMF 中之溶液。經一小時將反應物緩慢溫熱至室溫且攪拌三小時，此時過程中分析法表明反應完成。批料用 400 mL 1:1 乙酸乙酯/去離子水淬滅。分離各層，有機層用 10% 磷酸氫二鈉 (1×200 mL)、8% 碳酸氫鈉 (1×200 mL) 及鹽水 (1×200 mL) 洗滌，隨後經硫酸鈉乾燥，過濾且在真空中蒸發至乾燥。殘餘物使用 100 g 矽膠 60 (230-400 篩目) 藉由層析 (用 1% MeOH/MDC (3 L)、2.5% MeOH/MDC

(1 L) 及 5% MeOH/MDC (500 mL) 溶離) 純化, 收集約 100 mL 溶離份。合併含有產物之溶離份且在真空中濃縮至乾燥, 得到 7.1 g (16.0 mmol, 63.3%) 呈白色固體狀之所需產物, HPLC 純度為 97.4A%。¹H 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)。

用於製備本發明之苯達莫司汀酯之溶液調配物之一般程序：

【0083】 將本發明之苯達莫司汀酯之儲備溶液以約 100 mg/mL 濃度溶解於二甲基乙醯胺(「DMA」)及 Solutol® HS-15 之 60/40 (v/v) 混合物中。在室溫下攪拌混合物直至溶解。所得儲備溶液可穩定數月, 用 0.9%生理食鹽水稀釋至所需濃度且在約 2 小時內給藥。

【0084】 苯達莫司汀 C₁₄酯溶液調配物：藉由將 320.1 mg 苯達莫司汀 C₁₄酯溶解於 4 mL DMA 與 Solutol® HS-15 之 60/40 (v/v) 混合物中來製備儲備溶液。將混合物攪拌約 2 小時直至溶解。在給藥之前, 藉由移除 1.00 mL 儲備溶液且添加 16.20 mL 生理食鹽水且在室溫下攪拌 5 分鐘來稀釋儲備溶液。所得調配物為 3 mg-equ/mL 苯達莫司汀。

進行預處理以移除殘餘乙醇：

【0085】 將鹽酸苯達莫司汀 (277 g) 饋入 5 L 蒸發燒瓶中, 接著饋入 2 體積去離子水及 5 體積丙酮。在 40°C 之最高溫度下在真空中經 5.5 小時蒸餾溶劑。再添加 5 體積丙酮且用旋轉蒸發器將所得漿料在 35°C 下於大氣壓力下旋轉 15 分鐘。接著批料經密封燒結玻璃漏斗過濾且所得白色固體用 2 體積丙酮沖洗。將固體轉移至乾燥盤且在 40°C 下經 17 小時乾燥至恆定重量, 接著分離得到 266 g (96.0%) 產物, 純度為 99.8A% 且 KF 為 0.26%。

用於製備本發明之苯達莫司汀酯之人類血清白蛋白(「HAS」)奈米粒

子調配物之一般程序

【0086】 奈米粒子係由使用二氯甲烷及 HSA 作為界面活性劑之 O/W 乳液形成。藉由將所需量之苯達莫司汀酯以約 120 mg/mL 之濃度溶解於二氯甲烷中來製備油相。藉由將 2-4 倍量之 HSA（基於苯達莫司汀酯之 w/w）溶解於 5-15 倍體積之水（基於二氯甲烷之 w/w）中來製備水相。典型地，向水相中添加 5%-10% 甘露糖醇以使溶液等張以用於注射且在凍乾後提供醫藥學上適當的產物。藉由使用 IKA 手持型均質器將油相及水相在中等強度下乳化約 30 秒來形成 O/W 乳液。奈米粒子係藉由經 Microfluidizer® 高壓均質器（在約 30,000 psi 下通過 5 次）處理粗 O/W 乳液以提供 50-100 nm 尺寸粒子（如使用動態光散射（Malvern Zetasizer）量測）而形成。在真空中移除溶劑且在給藥之前將所得濃縮物凍乾或冷凍儲存。該等調配物呈現優良物理及化學穩定性。

【0087】 將凍乾之奈米粒子復原且使用低溫穿透式電子顯微鏡（c-TEM）分析。大部分奈米粒子為 20-40 nm 實心球體，其容易分散於水中。少數粒子在 125 nm 範圍內。粒子皆具有光滑表面。

【0088】 苯達莫司汀 C₁₂ 酯 HSA 奈米粒子：藉由將 600 mg 苯達莫司汀 C₁₂ 酯溶解於 5 mL 二氯甲烷中來製備油相。使用 IKA Ultra-Turrex 手持型均質器將油相與包含 60 mL 去離子（「DI」）水、2.4 g HSA（來自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 之凍乾固體）及 6.6 g 甘露糖醇之水相一起乳化以獲得粗乳液。此乳液在約 30,000 psi 下通過 Microfluidics M-110P 高壓均質器五次。使用旋轉蒸發器自所得奈米粒子懸浮液移除二氯甲烷且用去離子水稀釋所得水性懸浮液使總體積達到 100 mL。接著將此懸浮液以 10 mL 等分試樣分配於 30 mL 血清小瓶中且凍乾。

【0089】 具有聚乳酸乙醇酸（PLGA）之苯達莫司汀 C₁₂ 酯 HSA 奈米粒子：藉由將 300 mg 苯達莫司汀 C₁₂ 酯及 500 mg PLGA（50/50 乳酸:乙醇

酸，MW 為 7,000-17,000；Aldrich Part#719897）溶解於 2.5 mL 二氯甲烷中來製備油相。使用 IKA Ultra-Turrex 手持型均質器將油相與包含 30 mL 去離子水、1.2 g HSA（來自 Sigma-Aldrich 之凍乾固體）及 3.3 g 甘露糖醇之水相一起乳化以獲得粗乳液。此乳液在約 30,000 psi 下通過 Microfluidics M-110P 高壓均質器五次。使用旋轉蒸發器自所得奈米粒子移除二氯甲烷且用去離子水稀釋所得水性懸浮液使總體積達到 50 mL。所得奈米粒子之粒子尺寸為 90.5 nm (Z_{avg})，如由 Malvern Zetasizer 量測。接著將此懸浮液以 10 mL 等分試樣分配於 30 mL 血清小瓶中且凍乾。

【0090】 製備本發明之苯達莫司汀酯之聚乙二醇化奈米粒子調配物：製備一系列具有 PEG 塗層之奈米粒子調配物，文獻 (Alexis, F., *Molecular Pharmaceutics*, 5, (2008), 505-515) 中報導其可提供「隱匿 (stealth)」塗層且有助於粒子回避身體免疫系統之能力。PEG 之併入如下進行：使用基於 PEG 之界面活性劑 (PEG 與聚乳酸之共聚物) 替代 HSA 或使用生物結合化學方法將 PEG 基團共價連接至 HSA 奈米粒子表面上之自由 NH_2 基團。兩種系統在 PK 研究中皆展示血漿循環時間增加。

【0091】 具有聚乙二醇 (PEG) 塗層之苯達莫司汀 C_{12} 酯 HSA 奈米粒子：藉由將 600 mg 苯達莫司汀 C_{12} 酯溶解於 5 mL 二氯甲烷中來製備油相。使用 IKA Ultra-Turrex 手持型均質器將油相與包含 60 mL 去離子水、2.4 g HSA（來自 Sigma-Aldrich 之凍乾固體）及 6.6 g 甘露糖醇之水相一起乳化以獲得粗乳液。此乳液在約 30,000 psi 下通過 Microfluidics M-110P 高壓均質器五次。使用旋轉蒸發器自所得奈米粒子懸浮液移除二氯甲烷且用去離子水稀釋所得水性懸浮液使總體積達到 50 mL。接著在 200 mL 100 mM pH 8.5 硼酸鹽緩衝液中稀釋奈米粒子之懸浮液且使用 Malvern Zetasizer 量測所得奈米粒子之粒子尺寸及 ζ -電位。奈米粒子之粒子尺寸為 78.9 nm (Z_{avg}) 且表面電荷為 -13.0 mV。攪拌懸浮液且添加 150 mg 甲氧基-PEG_{5,000}-n-羥基丁二醯亞胺酯

(Laysan Polymer)。反應物在室溫下混合約 90 分鐘且再量測粒子尺寸及 ζ -電位。發現奈米粒子之粒子尺寸為 83.6 nm (Z_{avg}) 且 ζ -電位為 -7.35 mV。對奈米粒子進行緩衝液交換且使用 6.6% (wt/wt) 甘露糖醇溶液及 50,000 MWCO 透濾筒進行濃縮。接著將此懸浮液以 10 mL 等分試樣分配於 30 mL 血清小瓶中且凍乾。

【0092】 具有聚乳酸乙醇酸 (PLGA) 及聚環氧乙烷乳酸共聚物 (PELA) 界面活性劑之苯達莫司汀 C_{12} 酯奈米粒子：藉由將 300 mg 苯達莫司汀 C_{12} 酯及 500 mg PLGA (50/50 乳酸:乙醇酸, MW 為 7,000-17,000; Aldrich Part#719897) 溶解於 2.5 mL 二氯甲烷中來製備油相。使用 IKA Ultra-Turrex 手持型均質器將油相與包含 30 mL 去離子水、0.6 g PEG-5,000-聚乳酸 1,000 之共聚物 (使用來自 A. Lucke, *Biomaterials*, 21, (2000), 2361-2370 之程序製備之共聚物) 及 3.3 g 甘露糖醇一起乳化以獲得粗乳液。此乳液經 Microfluidics M-110P 高壓均質器在約 30,000 PSI 下處理 5 分鐘。使用旋轉蒸發器自所得奈米粒子懸浮液移除二氯甲烷且用去離子水稀釋所得水性懸浮液使總體積達到 50 mL。所得奈米粒子之粒子尺寸為 248.0 nm (Z_{avg})，如由 Malvern Zetasizer 量測。接著將此懸浮液以 10 mL 等分試樣分配於 30 mL 血清小瓶中且凍乾。

【0093】 來自濃縮物之苯達莫司汀 C_{12} 酯 HSA 奈米粒子：藉由將 4.8 g 苯達莫司汀 C_{12} 酯溶解於 13.4 g 二氯甲烷中來製備油相。使用 IKA Ultra-Turrex 手持型均質器將油相與包含 111 g 去離子 (「DI」) 水及 9 g HSA 之水相一起乳化以獲得粗乳液。此乳液在約 30,000 psi 下通過 Microfluidics M-110P 高壓均質器五次。藉由添加 12 g NaCl 且混合直至溶解來使所得奈米乳液濃縮物穩定化。亦可使用此項技術中已知的其他方法，例如其他鹽、受控加熱及/或 pH 調節來實現穩定化。與例如戊二醛之交聯亦可幫助防止聚集。

【0094】 使用旋轉蒸發器自所得奈米粒子懸浮液移除二氯甲烷。所得

水性懸浮液與 12 g 蔗糖混合且添加去離子水使總重量達到 480 g。接著將此懸浮液以 7.5 mL 等分試樣分配於 20 mL 血清小瓶中且凍乾。

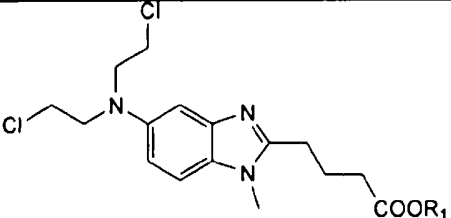
【0095】 HSA 奈米粒子之溶液呈現隨時間推移之緩慢粒子尺寸增加。一些溶液在 12-24 小時內達到約 200 nm 尺寸，如由動態光散射量測。使用 c-TEM 研究此增加之性質以便確定奈米粒子是否聚集或是否存在將調配物中之過量蛋白質添加至粒子表面從而使粒子尺寸增加。將凍乾奈米粒子之小瓶復原且使用 c-TEM 成像（圖 21）。使奈米粒子之同一小瓶在室溫下靜置 24 小時，接著再成像（圖 22）。原始樣品含有尺寸分佈介於 25-60 nm 之間的球狀粒子。老化樣品呈現尺寸分佈增加至 35-130 nm 且無粒子聚集跡象。兩種樣品皆含有 1-3 nm 粒子之群體，其與「自由」蛋白質一致。該等結果表明在溶液中，「自由」HSA 添加至奈米粒子表面，從而引起粒子尺寸緩慢增加。若干策略可用於減少此過程，包括 pH 改變、容積莫耳滲透濃度改變、用於移除過量蛋白質之溶劑添加及透濾。

【0096】 用於製備腫瘤細胞分離物之方案：將攜帶 MDA-MB-231 乳癌細胞系皮下異種移植物（基質膠中 5×10^6 個細胞）之 Charles River Labs 無胸腺裸小鼠處死以製備腫瘤分離物。使用無菌器具且在無菌條件下操作，自安樂死之動物移出腫瘤。將腫瘤置於 50 mL 無菌錐形管中且添加 5 mL 胰蛋白酶。將腫瘤切割成小片且在 37°C 下培育 30 分鐘。在培育後，將細胞過濾置於第二無菌 50 mL 錐形管上且將第一管中之內含物置於細胞過濾器中。使用注射器柱塞之平坦端迫使組織通過過濾器。細胞過濾器用 5 mL 含有 FBS 之培養基洗滌。使細胞短暫離心且棄去上清液。將細胞再懸浮於 20 mL 含有 P/S 之完全培養基中且置於 75 cm 燒瓶中。此資料闡述於表 1 中。

【0097】 用於 MTS 細胞分析法之一般程序：人類癌瘤細胞（2,000 個細胞/孔）與所需濃度之測試分子（0-200 μ M）一起培育 72 小時。接著細胞與 MTS 溶液（Promega）一起培育 1-2 小時，且藉由量測在 490 nm 下之吸

光度來測定化合物對細胞增殖之作用。細胞生長表示為相對適當對照物（安慰劑）之百分比。使用此資料計算各化合物之 IC_{50} 。所有報導之資料皆為三次獨立實驗之平均值 $\pm$ SE。此資料闡述於表 1 中。

表 1

	MB-231 (HBC)		H-460 (NSCLC)	
	IC_{50} (μ M)	R^2	IC_{50} (μ M)	R^2
R_1				
-OH	13-16	0.88-0.95	4-26	0.83-0.95
-CH ₃	66	0.95	1.2	0.9
-C ₄ H ₉	13.3	0.91	15.73	0.9
-C ₆ H ₁₃	43.7	0.93	7.4	0.89
-C ₈ H ₁₇	53.1	0.86	49	0.89
-C ₁₀ H ₂₁	38.89	0.87	23.76	0.93
-C ₁₂ H ₂₅	33.3	0.78	28.8	0.69
-C ₁₄ H ₂₉	>200	0.83	129.9	0.87
-C ₁₅ H ₃₁	>200	0.93	>200	0.66
-C ₁₆ H ₃₃	>200	0.85	77.8	0.9
-C ₁₈ H ₃₇	N.D.	N.D.	29	

R^2 = 決定係數

【0098】 上述生物學資料亦描述於圖 1 中。投予前述酯之後苯達莫司汀之血漿含量描述於圖 20 中。

腫瘤功效

【0099】 用於裸小鼠 MDA-MB-231 腫瘤功效研究之程序：對 Charles River Labs 無胸腺裸小鼠皮下注射含 5×10^6 個人類腫瘤細胞之基質膠。監測腫瘤體積，直至獲得小鼠群體中約 150 mm³ 之平均腫瘤尺寸。接著將小鼠隨機分配至九個處理組（概述於下表中）中之一組中，其中每組具有 10 隻小鼠之群體（n=10）。在研究之第 1 天及第 2 天將各調配物以 100 μ L 固定體積經尾靜脈注射給藥。將小鼠稱重且在 3 週研究持續時間內每 3-4 天量測一次腫瘤體積。此資料描述於表 2 及圖 2 中。

表 2. 苯達莫司汀 (BM1)、苯達莫司汀 C₁₂ 酯及苯達莫司汀 C₁₄ 酯針對 MB-231 之腫瘤功效資料之概述：腫瘤抑制%、發病率/死亡率%以及腫瘤及血漿含量。

					1 小時之時之含量 (ng/mL)			
					酯		BM1	
		mg/kg	腫瘤抑制%	發病率/死亡率%	腫瘤	血漿	腫瘤	血漿
溶液	BM1	37.5	77	10/0	-	-	558	906
	C ₁₂	55	84	40/0	425	0	1932	4110
	C ₁₂	80	94	80/20	644	16	4400	11650
	C ₁₄	80	90	40/0	396	14	7	21
HSA 奈米 粒子	C ₁₂	55	79	10/0	261	2	1845	6307
	C ₁₂	80	91	70/40	762	292	7320	18757
	C ₁₂	100	97	100/70	1565	39	15050	23933
	C ₁₄	80	86.5	60/0	10430	5727	5500	15110

【0100】 用於裸小鼠 H460 腫瘤功效研究之程序：H460 腫瘤細胞（大細胞肺癌）在 37°C 下於含有 10% FBS 之 RPMI-1640 培養基中在 95% 空氣及 5% CO₂ 下培養。當達到 80%-90% 匯合時，藉由 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液在 5-10 分鐘內使細胞脫離，用新鮮培養基中和且藉由細胞計數器 (Cellometer, Auto T4, Nexcelom) 進行計數。將 2×10⁶ 個細胞/100 μl 之培養基與基質膠 (1:1 比率) 溶液之混合物注射至各 nu/nu 小鼠之右背側腹中。監測經植入之小鼠且用電測徑規進行量測。在腫瘤達到約 150 mm³ 尺寸時開始研究。量測小鼠且根據下表隨機分成 9 個組，其中每組 10 隻小鼠：

腫瘤功效給藥組

化合物	調配物	劑量 (mg/kg 自由鹼當量)
媒劑對照物	溶液	NA
鹽酸苯達莫司汀	TREANDA	37.5
苯達莫司汀 C ₁₂ 酯	溶液	55
苯達莫司汀 C ₁₂ 酯	溶液	80
苯達莫司汀 C ₁₂ 酯	奈米粒子	55
苯達莫司汀 C ₁₂ 酯	奈米粒子	80
苯達莫司汀 C ₁₂ 酯	奈米粒子	100
苯達莫司汀 C ₁₄ 酯	溶液	80
苯達莫司汀 C ₁₄ 酯	奈米粒子	80

【0101】 在調配化合物之後，調配物係以 100 μL 劑量體積經尾靜脈

注射在 30 分鐘內投予。將所有小鼠稱重且每週量測腫瘤兩次。在研究中之最後一天，在給藥後兩小時收集血漿、腫瘤、肺、肝臟、脾、左腎、腦及腿且快速冷凍以用於進一步分析。結果展示於表 3 中。

表 3. 苯達莫司汀 (BM1)、苯達莫司汀 C₁₂ 酯及苯達莫司汀 C₁₄ 酯針對 H-460 之腫瘤功效資料之概述：腫瘤抑制%、發病率/死亡率%以及腫瘤及血漿含量。

					1 小時之時之含量 (ng/mL)			
					酯		BM1	
		mg/kg	腫瘤抑制%	發病率/死亡率%	腫瘤	血漿	腫瘤	血漿
溶液	BM1	37.5	41.5	0/0	-	-	1472	1550
	C ₁₂	55	66	20/20	163	12	3760	6943
	C ₁₂	80	75	100/50	206	12	5180	13600
	C ₁₄	80	81	100/40	8570	32233	4650	24633
HSA 奈米 粒子	C ₁₂	55	47	10/0	154	0	1761	4743
	C ₁₂	80	64	40/0	321	0	2997	8053
	C ₁₂	100	70	50/0	437	2	3565	12386
	C ₁₄	80	40	10/0	4570	3648	1872	4467

藥物動力學研究實驗

【0102】 用於裸小鼠腫瘤功效 PK 組之程序：向一部分攜帶腫瘤之小鼠給藥作為衛星 PK 組 (satellite PK group)。各組係如關於腫瘤功效組所描述給藥，然而在第 2 天在給藥後 1、3 及 6 小時將 PK 組處死且收集組織樣品。收集之組織包括血液、肺、肝臟及腫瘤。如 LC-MS 方案部分中所描述針對鹽酸苯達莫司汀及相應酯類似物分析樣品。

【0103】 用於 PK 研究之 LC-MS 實驗方案：在使用含有內標之乙腈使蛋白質沈澱後，根據標準方案準備血漿及其他組織以進行高效液相層析 (HPLC) / 質譜分析。接著經由與串聯質譜分析聯合之 HPLC 針對本發明之鹽酸苯達莫司汀及苯達莫司汀酯以及烯丙洛爾 (alprenolol) (內標) 分析樣品。將組織樣品在磷酸鈉緩衝液中均質化且將自分析法獲得之值乘以 3 以校正在處理期間之稀釋作用。

【0104】 用於 PK 研究之動物給藥方案：所有實驗中皆使用成年動物

(Charles River, Kingston, New York; $n=3$ 或 4/時間點)。小鼠或大鼠在經側尾靜脈進行靜脈內劑量投予之前未禁食隔夜。靜脈內劑量係以 100 μL 固定劑量體積 (小鼠中) 或 1 mL/kg 劑量體積 (大鼠中) 投予。藉由斷頭術處死小鼠且在規定之取樣時間將軀幹血液收集至肝素化管中。對於血液收集，將各大鼠 (未麻醉) 置於透明 Plexiglas® 約束管中，且在規定之取樣時間自側尾靜脈抽吸血液樣品 (約 0.25 mL) 至肝素化收集管中 (注意：未獲得給藥前樣品)。此程序之例外情況為最後一次取樣時間，此時藉由斷頭術處死大鼠且經尾靜脈獲得軀幹血液而非血液。將血液樣品置於濕冰上直至進行離心以分離血漿。將血漿部分轉移至潔淨、乾燥管中，在乾冰上冷凍且在約 -20°C 下儲存以待分析。在預定時間點快速移出全腦及其他經高度灌注之器官 (肝臟、肺、脾、腎及心臟) 且在乾冰上冷凍。所有組織樣品亦在約 -20°C 下儲存以待分析。

【0105】 藥物動力學分析：將所有小鼠及大鼠之血漿濃度資料輸入 Excel 試算表中以便為藥物動力學分析作準備。使用 WinNonlin 軟體 (專業版 4.1, Pharsight 公司, Palo Alto, CA) 藉由血漿濃度對時間資料之非室體模型分析 (Gibaldi 及 Perrier 1982) 來估算平均藥物動力學參數。藉由半對數血漿濃度對時間之曲線之末端部分之線性回歸來估算血漿之最終清除速率常數 (β)。表觀終末半衰期 ($t_{1/2}$) 計算為 0.693 除以 β 。藉由線性梯形法則測定在單次劑量後自時間零至最後可量測濃度之時間，血漿濃度對時間之曲線下面積 (AUC_{0-t})。自零至無限之曲線下面積 ($\text{AUC}_{0-\infty}$) 計算為 AUC_{0-t} 與自最後可量測濃度外推至無限之曲線下面積 (Clast/β) 之和。出於計算 AUC 之目的，將給藥前濃度皆假設為零。出於計算 AUC 之目的，最後可定量取樣時間之後的任何低於定量限制 (BLQ) 之濃度皆視為空值；其對於既定取樣時間之平均濃度計算皆作為零加以處理。

【0106】 藥物動力學研究之資料描述於表 4-17 中。

表 4

血漿	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	5.7	ND	6.0	ND
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	66885	ND	55296	ND
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	67131	ND	55417	ND

【0107】 表 4 中之資料亦描述於圖 8 中。

表 5

血液	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	6.3	ND	5.7	ND
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	91549	4424	58021	951
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	91856	ND	58112	ND

【0108】 表 5 中之資料亦描述於圖 9 中。

表 6

腦	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	ND	ND	ND	ND
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	9284	299	1010	149
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	ND	ND	ND	ND

【0109】 表 6 中之資料亦描述於圖 10 中。

表 7

肝臟	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	4.2	0.8	2.6	4.5
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	13901	2564	43785	13355
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	14111	2586	44713	13586

【0110】 表 7 中之資料亦描述於圖 11 中。

表 8

肺	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	2.0	7.6	5.1	8.5
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	22229	12619	15075	28327
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	22286	13246	15590	32297

【0111】 表 8 中之資料亦描述於圖 12 中。

表 9

脾	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	2.3	3.1	1.6	5.4
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	10201	25874	2598	13111
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	10362	25927	2735	13578

【0112】 表 9 中之資料亦描述於圖 13 中。

表 10

腎	液體調配物		奈米粒子調配物	
	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯	苯達莫司汀	C ₁₂ 酯
t _{1/2} (h)	6.4	5.3	7.0	4.9
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	19489	2383	9665	1766
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	19966	2605	10725	1802

【0113】 表 10 中之資料亦描述於圖 14 中。

表 11.在以 30 mg/mL、1 mL/kg 投予苯達莫司汀 C₁₂ 酯液體調配物之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿、血液及器官含量（圖 15）

	血漿	血液	腦	肝臟	肺	脾	腎
t _{1/2} (h)	5.7	6.3	ND	4.2	2.0	2.3	6.4
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	66885	91549	9284	13901	22229	10201	19489
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	67131	91856	ND	14111	22286	10362	19966

【0114】 表 11 中之資料亦描述於圖 15 中。

表 12.在以 30 mg/mL、1 mL/kg 投予苯達莫司汀 C₁₂ 酯液體調配物之後，苯達莫司汀 C₁₂ 酯之血漿、血液及器官含量（圖 16）

	血漿	血液	腦	肝臟	肺	脾	腎
t _{1/2} (h)	ND	ND	ND	0.8	7.6	3.1	5.3
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	ND	4424	299	2564	12619	25874	2383
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	ND	ND	ND	2586	13246	25927	2605

【0115】 表 12 中之資料亦描述於圖 16 中。

表 13.在以 30 mg/mL、1 mL/kg 投予苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子調配物之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿、血液及器官含量（圖 17）

	血漿	血液	腦	肝臟	肺	脾	腎
t _{1/2} (h)	6.0	5.7	ND	2.6	5.1	1.6	7.0
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	55296	58021	1010	43785	15075	2598	9665
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	55417	58112	ND	44713	15590	2735	10725

【0116】 表 13 中之資料亦描述於圖 17 中。

表 14.在以 30 mg/mL、1 mL/kg 投予苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子調配物之後，苯達莫司汀 C₁₂ 酯之血漿、血液及器官含量（圖 18）

	血漿	血液	腦	肝臟	肺	脾	腎
$t_{1/2}$ (h)	ND	ND	ND	4.5	8.5	5.4	4.9
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	ND	951	149	13355	28327	13111	1766
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	ND	ND	ND	13586	32297	13578	1802

【0117】 表 14 中之資料亦描述於圖 18 中。

表 15.在以 3 mg-eq/kg 靜脈內給予苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子之後，大鼠中苯達莫司汀之血漿含量：不同調配物之比較（圖 19）

調配物	Treanda	HSA	HSA/PLGA	PLGA/PELA	HSA w/PEG
$t_{1/2}$ (h)	0.16 ± 0.01	0.63 ± 0.09	0.41 ± 0.04	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.3
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	1609 ± 77	773 ± 58	1120 ± 113	856 ± 93	1194 ± 186
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	1631 ± 81	781 ± 58	1132 ± 115	959 ± 92	1250 ± 203
Vd (L/kg)	0.42 ± 0.04	3.6 ± 0.7	1.6 ± 0.2	10.0 ± 2.2	6.1 ± 1.8
CL (mL/min/kg)	31 ± 2	65 ± 5	46 ± 4	54 ± 5	44 ± 7
平均值 ± SD (n = 4)		苯達莫司汀 C ₁₂ 酯奈米粒子			

【0118】 表 15 中之資料亦描述於圖 5 中。

表 16.在以 3 mg-eq/kg 靜脈內給予苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子之後，大鼠中苯達莫司汀 C₁₂ 酯之血漿含量：不同調配物之比較（圖 20）

調配物	HSA	HSA/PLGA	PLGA/PELA	HSA w/PEG
$t_{1/2}$ (h)	ND	0.12 ± 0.01	2.3 ± 0.0	0.20 ± 0.01
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	21 ± 2	18 ± 5	17 ± 3	55 ± 4
AUC _{0-∞} (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
平均值 ± SD (n = 4)				

【0119】 表 16 中之資料亦描述於圖 6 中。

表 17：在以 3 mg-eq/kg 靜脈內給予溶液調配物之後，大鼠中苯達莫司汀 C₁₆ 酯、環己酯及 5-癸酯之血漿含量。

	苯達莫司汀	酯	苯達莫司汀	酯	苯達莫司汀	酯
血漿	C ₁₆ 苯達莫司汀酯		5-癸酯		環己基苯達莫司汀酯	
$t_{1/2}$ (h)	0.46	0.28	0.16		0.20	
AUC _{0-t} (ng×h/mL)	505	1208	633		504	
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	617	1214	642	全部 <	517	全部

				MQL		< MQL
Vd (L/kg)	3.3	1.0	1.1		1.6	
CL (mL/min/kg)	82	41	78		96	
	1.85%溶劑		1.6%溶劑		1.4%溶劑	
平均值 (n=3)	自 1/1/1 DMA/PG/Solutol 在生理食鹽水中稀釋					

【0120】 根據上述方法將本發明之另一具體實例(苯達莫司汀 C₁₄酯)調配成奈米粒子靜脈內調配物且投予 CD-1 小鼠。測定小鼠血漿中苯達莫司汀 (BM1) 及苯達莫司汀 C₁₄酯之量。該等實驗之結果概述於表 18 中。

表 18

血漿	BM1	C ₁₄ 酯	BM1	C ₁₄ 酯	BM1	C ₁₄ 酯
	30 mg-eq/kg		55 mg-eq/kg		80 mg-eq/kg	
t _{1/2} (h)	1.17	1.52	0.92	0.98	0.95	1.09
AUC ₀₋₆ (ng×h/mL)	4507	31693	4152	48934	6007	46335
AUC _{0-∞} (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
平均值 (n=3)	白蛋白奈米粒子					

【0121】 亦測試聚乙二醇化苯達莫司汀酯。苯達莫司汀之 PEG-2000 及 PEG-5000 酯之資料描述於以下表 19 及 20 中。此資料亦描述於圖 19 中。

表 19：以 3 mg-eq/kg、1 mL/kg 靜脈內給予苯達莫司汀 PEG-2000 酯之大鼠中苯達莫司汀之血漿含量

苯達莫司汀	大鼠 1	大鼠 2	大鼠 3	大鼠 4	平均值	標準差 (st. dev.)	平均標準差 (sem)
t _{1/2} (h)	0.46	0.23	0.50	0.22	0.36	0.15	0.07
AUC ₀₋₆ (ng×h/mL)	2100	2866	1494	1379	1960	682	341
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	2109	2868	1506	1382	1966	680	340
Vd (L/kg)	0.95	0.35	1.46	0.70	0.87	0.46	0.23
CL (mL/min/kg)	24	17	33	36	28	9	4
苯達莫司汀 PEG-2000 酯	3 mg-eq/kg, 1 mL/kg						

表 20：以 3 mg-eq/kg、1 mL/kg 靜脈內給予苯達莫司汀 PEG-5000 酯之大鼠中苯達莫司汀之血漿含量

苯達莫司汀	大鼠 1	大鼠 2	大鼠 3	大鼠 4	平均值	標準差	平均標準差
t _{1/2} (h)	0.16	0.48	0.47	0.48	0.40	0.16	0.08
AUC ₀₋₆ (ng×h/mL)	808	1735	1572	1050	1291	435	217
AUC _{0-∞} (ng×h/mL)	817	1741	1579	1058	1299	434	217
Vd (L/kg)	0.84	1.19	1.29	1.99	1.32	0.48	0.24

CL (mL/min/kg)	61	29	32	48	42	15	8
苯達莫司汀 PEG-5000 酯	3 mg-eq/kg, 1 mL/kg						

苯達莫司汀酯之試管內穩定性分析

【0122】 腫瘤 S9 製備：將攜帶乳癌(MB-231)或非小細胞肺癌(H460)之 Charles River Labs 無胸腺裸小鼠處死。立即移出腫瘤且用冰冷 1.15% KCl 沖洗。將腫瘤稱重、切割且切碎。將切碎之組織與 4X (v/w) 冰冷 SET 緩衝液 (250 mM 蔗糖、5.4 mM Na₂EDTA 及 20 mM Tris, pH 7.4) 混合且用組織均質器均質化。將均質物轉移至潔淨的聚碳酸酯超離心管中且在 4°C 下於 10,000g 下離心 20 分鐘。用棉拭移除超離心管頂部之脂質且將上清液 (S9) 等分試樣儲存於 -80°C 冷凍器中。

【0123】 試管內培育：將含有 50 mM 磷酸鹽緩衝液(pH 7.4)、NADPH- (還原之菸鹼醯胺二磷酸腺苷) 再生系統及 1 mg/mL 腫瘤 S9 之培育混合物在 37°C 水浴中預溫熱。藉由將 1 μ L 苯達莫司汀 C₆、C₈、C₁₂ 或 C₁₄ 酯添加至各別培育混合物中以獲得 10 μ M 之各苯達莫司汀酯之最終濃度來起始反應。在經設計之時間點，移出培育混合物之 100 μ L 等分試樣且與 400 μ L 停止溶液 (含 4 μ M 或 8 μ M 噻加賓 (tiagabine) [IS]之 0.1%甲酸/乙腈溶液) 混合。將所有樣品渦旋混合且置於冰上持續至少 10 分鐘，且接著藉由在 Eppendorf 5417R 離心機中以 14000 rpm 離心 8 分鐘來使蛋白質沈澱。將上清液轉移至 HPLC 小瓶中且注射 10 μ L 以使用高效液相層析及串聯質譜偵測進行分析。

【0124】 LC-MS/MS 方法：LC-MS/MS 系統係由 Shimadzu HPLC 及 Sciex API 4000 MS 組成。層析係在 Phenomenex 00B-4448-B0 之 Luna PFP (2) 管柱 (50x2 mm, 5 μ m 粒子尺寸) 上進行。總移動相流動速率為 0.5 mL/min。梯度以 70%移動相 A (0.1%三氟乙酸水溶液) 及 30%移動相 B (100%乙腈) 開始。移動相 B 之比例接著在 0.5 分鐘內線性增加至 95%且在該比率下保持

1.3 分鐘，在 1 分鐘內再平衡至初始條件。將質譜儀調諧至各苯達莫司汀酯之各別最佳條件，監測 442.2/340.1 (C6)、470.2/340.1 (C8)、526.3/340.1 (C12) 及 554.3/340.1 (C14) 之轉變。

【0125】 試管內穩定性研究之資料闡述於圖 3 及圖 4 中。

電子顯微術實驗

【0126】 用於 c-TEM 研究之樣品製備：藉由向樣品中添加 7.8 mL 注射用水 (WFI) 來使樣品溶解且用手倒置使其混合。樣品在約 2-5 分鐘內快速溶解且溶液中無可見的不溶解粒子。將樣品保存於 400 篩目銅柵格上由碳塗佈之有孔碳膜支撐之玻璃化冰中。藉由將 3 μ L 未經稀釋之樣品溶液液滴塗覆至潔淨的柵格，用濾紙吸取且立即在液體乙烷中進行玻璃化來製備樣品。將柵格儲存在液氮下直至轉移至電子顯微鏡用於成像。

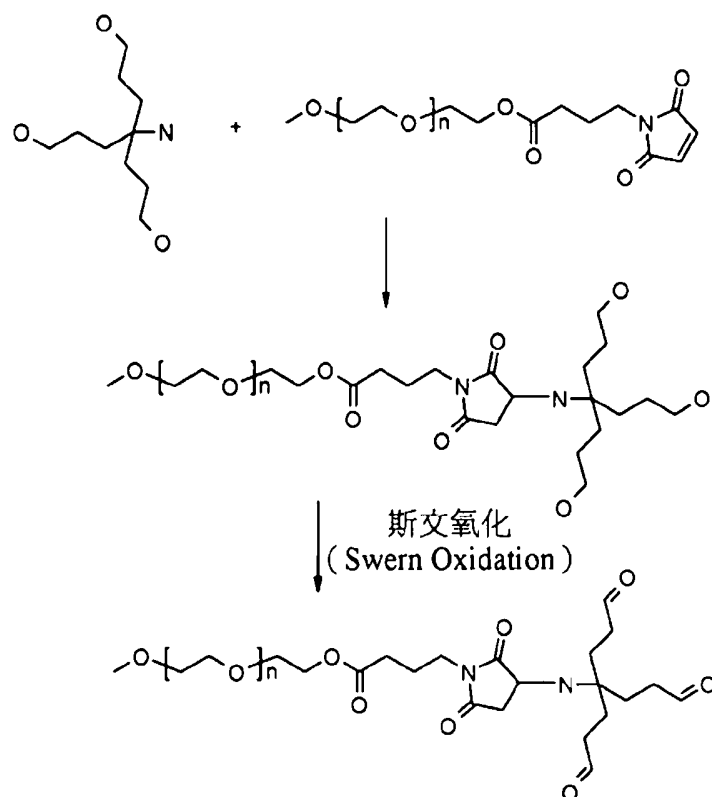
【0127】 c-TEM 成像參數：使用配備有 FEI Eagle 4Kx4K CCD 攝影機之 FEI Tecnai T12 電子顯微鏡（在 120 KeV 下操作）進行電子顯微術。使用低溫台將柵格轉移至電子顯微鏡中，該低溫台保持柵格溫度低於 -170°C。以多種比例獲得柵格之影像以評估試樣之整體分佈。在較低放大率下鑑別可能適用於成像之目標區域之後，在 52,000x (0.21 奈米/像素) 及 21,000x (0.50 奈米/像素) 之標稱放大率下獲得高放大率影像。在 -4 μ m (52,000x) 及 -5 μ m (21,000x) 之標稱弱焦點及約 10-15 e/Å² 之電子劑量下獲得影像。

【0128】 電子顯微術實驗之結果描述於圖 7 中。

使用苯達莫司汀酯之 HSA 奈米粒子調配物之交聯實驗

【0129】 可使用基於 HSA 之奈米粒子調配物延長本發明之苯達莫司汀及苯達莫司汀酯之循環時間，在該調配物中蛋白質部分在奈米粒子結構形成之後共價交聯。參見例如 K. Langer 等人 *International Journal of Pharmaceutics* 347 (2008) 109-117。此將使表面塗層之結構化程度更高且將防止奈米粒子內含物之快速釋放。此亦可藉由將 PEG 基團引入交聯劑中來提

供奈米粒子之「隱匿」保護。使用市售二醛（戊二醛）證明 HSA 奈米粒子之有效封裝及硬化。可使用例如如下文所展示而製備之三官能 PEG 交聯劑來引入適當定尺寸的 PEG 部分：



【0130】 程序：HSA 奈米粒子用去離子水稀釋至每毫升苯達莫司汀 C14 酯 1.5 毫克之濃度，其對應於 6 mg/mL 之 HSA 濃度。接著將所得奈米粒子懸浮液以 1 mL 部分等分至五個裝備有磁性攪拌棒之玻璃小瓶中。添加適量 50%戊二醛溶液且封蓋各小瓶且在室溫下攪拌隔夜。接著將各樣品在 N-甲基吡咯啉酮（NMP）中稀釋 1 至 10 倍且使用微離心器將樣品離心約 2 分鐘以移除 HSA 及交聯 HSA 奈米粒子。接著藉由 HPLC 分析上清液且測定苯達莫司汀 C₁₄酯之濃度（峰面積）以確認粒子封裝。下表展示隨戊二醛之 μL 數而變之未封裝之苯達莫司汀 C₁₄酯之濃度：

戊二醛之 μL 數	HPLC 峰面積
0	4882.02
2	4788.99
5	4778.11
10	4714.02
20	29.55

【0131】 資料展示以每毫克 HSA 3.33 μ L 之比率添加戊二醛適於產生交聯之含有苯達莫司汀酯之奈米粒子之系統。

活體內多發性骨髓瘤模型

材料及方法

RPMI 8226 (人類漿細胞瘤, 骨髓瘤 B 細胞) ATCC # CCL-155 ;

ECM GeL (基質膠), Sigma-Aldrich, 目錄號 E1270, 5 ml

RPMI (Beit Haemek, 批號: 1110235)

Velcade® (硼替佐米) 3.5 mg 凍乾, 於小瓶中, 批號 BIZSC00

苯達莫司汀 (批號 TD-D0815, API 批號 00039P0012)

苯達莫司汀 C₁₂ 酯奈米粒子 (C12NP), 批號 2861-241-22, 17.6 毫克/小瓶

氯化鈉

注射用水 (DEMO S.A.)

測試動物

【0132】 80 CB.17 SCID 雌性小鼠, 4-6 週齡, 16-20 公克, 自 Harlan 動物繁殖中心 (Harlan animal breeding center) 獲得

細胞製備

【0133】 細胞 (來源於 ATCC) 在 RPMI 培養基上培養。將細胞懸浮液離心且再懸浮於 50% 基質膠/HBSS 中達到 7×10^7 個細胞/毫升之最終濃度。將懸浮液以 100 μ l 體積皮下植入經麻醉之小鼠之右側腹中。

化合物製備

【0134】 每週製備 VELCADE® 一次。將 7 ml 生理食鹽水添加至含有 3.5 mg 粉末之原始小瓶中, 達到 0.5 mg/ml。將 3 ml 此溶液添加至 27 ml 生理食鹽水中以達到 0.05 mg/ml 濃度。

【0135】 苯達莫司汀製備: 在即將處理前, 將 13.5 mg 溶解於 3.6 ml

0.9%生理食鹽水/5%甘露糖醇之 1:1 混合物中。將 1.05 ml 此溶液添加至 0.95 ml 稀釋劑中以獲得 2 mg/ml 溶液。

【0136】 C12NP 製備：在即將處理前，將 3.1 ml SWFI 添加至含有 17.62 mg 之樣品小瓶中。將 1.05 ml 此溶液添加至 0.95 ml 稀釋劑中以獲得 2 mg/ml 溶液。

實驗設計

【0137】 在第 0 天對小鼠進行皮下植入，其中每隻小鼠 7×10^6 個 RPMI 8226 細胞（於 50%基質膠/HBSS 中）。在第 21 天，藉由最佳平均腫瘤體積（約 150 mm^3 ）對小鼠進行分類且將其分配至八個組中，每組 9 隻小鼠。

組	數目	試劑	途徑	劑量及時程
1	9	WFI	靜脈內	第 1 天及第 2 天
2	9	Velcade	靜脈內	0.5 mg/kg，每週兩次
3	9	苯達莫司汀	靜脈內	20 mg/kg，第 1 天及第 2 天
4	9	苯達莫司汀	靜脈內	37.5 mg/kg，第 1 天及第 2 天
5	9	C12NP	靜脈內	20 mg/kg，第 1 天及第 2 天
6	9	C12NP	靜脈內	37.5 mg/kg，第 1 天及第 2 天

【0138】 應注意，SCID 小鼠之性質（亦即嚴重免疫功能降低）使其成為更脆弱/敏感的動物，且因此其不太能耐受裸小鼠（其免疫功能降低程度相對較低）中所用之 C12NP 劑量。特定言之，以 100 mg/kg 及 70 mg/kg 向 SCID 小鼠給藥顯示不可接受的耐受性問題（亦即超過 20%之體重損失）（資料未圖示）。咸信此現象（裸小鼠對 SCID 小鼠之間的耐受性差異）為菌株相關現象。因此，使用 37.5 mg/kg 及 20 mg/kg 劑量之 C12NP 進行研究。

統計分析

【0139】 腫瘤體積計算如下： $\pi \times \left(\frac{\text{寬度}}{2} \right)^2 \times \text{長度}$ 。使用單因子 ANOVA，接著進行塔基事後比較（Tukey post-hoc comparisons）來分析體重增加及腫瘤體積進程。

結果

【0140】 處理反應概述於圖 23 及圖 24 中。與對照組相比，除 C12NP (20 mg/kg) 以外，所有處理皆顯著抑制腫瘤生長（參見表 21 中之資料）。在 37.5 mg/kg 下，苯達莫司汀與 C12NP 之功效類似，其中腫瘤生長受到 81% 及 70% 抑制。然而，如圖 24 中可見，C12NP 之可耐受性優於苯達莫司汀，如藉由經 C12NP 處理之動物中體重損失較小所量測。

表 21：結果之概述（第 46 天）

化合物	方案	平均腫瘤體積（平均值±標準差）	%TGI	PR 數目	CR 數目	最大體重（平均值）降低	TRD 數目	nTRD 數目
1. 媒劑	靜脈內投予 WFI，第 1 天及第 2 天	597 ± 71		0	0		0	0
2. Velcade® 0.5 mg/kg	靜脈內，每週兩次	226 ± 35	62***	0	0	-0.4% 第 20 天	0	0
3. 苯達莫司汀 20 mg/kg	靜脈內，第 1 天及第 2 天	205 ± 44	66***	0	0	-2.7% 第 22 天	0	0
4. 苯達莫司汀 37.5 mg/kg	靜脈內，第 1 天及第 2 天	113 ± 23	81***	0	0	-6.2% 第 25 天	0	0
5. C12NP 20 mg/kg	靜脈內，第 1 天及第 2 天	408 ± 49	32	0	0	-1.5% 第 25 天	0	0
6. C12NP 37.5 mg/kg	靜脈內，第 1 天及第 2 天	180 ± 31	70***	0	0	-3.1% 第 25 天	0	0

*** p < 0.001 (單因子 Anova, 塔基事後測試)

【符號說明】

【0141】

無

發明摘要

※ 申請案號： 102140964

※ 申請日： 102/11/12

C07D 235/16 (2006.01)

※IPC 分類： A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

苯達莫司汀衍生物及其使用方法

BENDAMUSTINE DERIVATIVES AND METHODS OF USING SAME

【中文】

本發明係有關苯達莫司汀（bendamustine）酯及苯達莫司汀醯胺以及其用於治療癌症之用途。

【英文】

The present invention is directed to bendamustine esters and bendamustine amides and their use for the treatment of cancer.

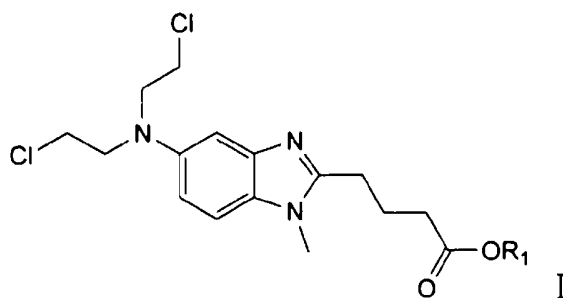
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

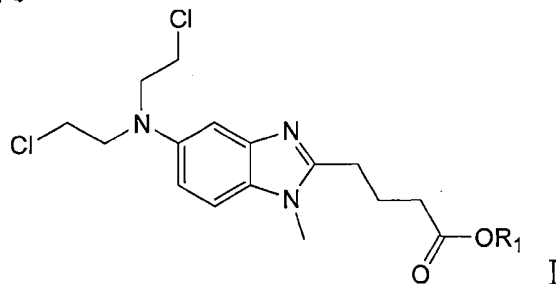
無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



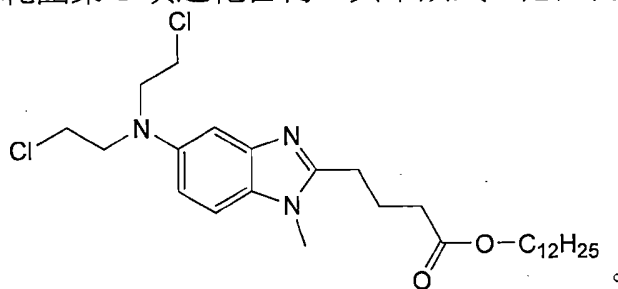
申請專利範圍

1. 一種式 I 化合物，

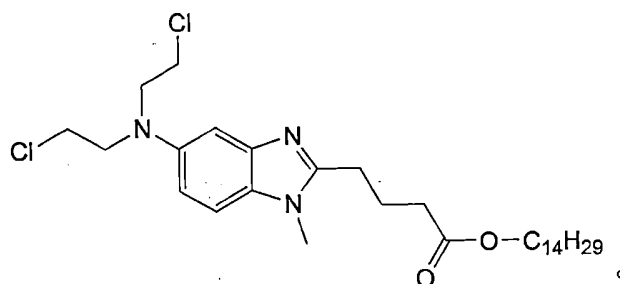


其中 R₁ 為 C₈-C₂₄ 烷基。

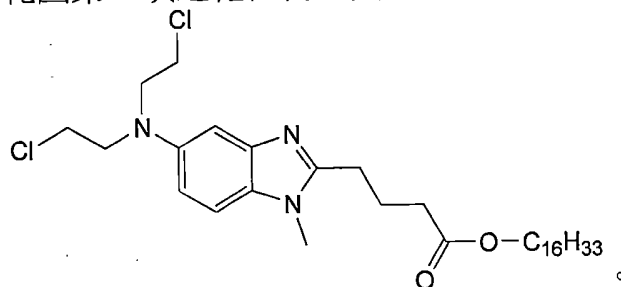
2. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₀-C₂₄ 烷基。
3. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₂-C₂₄ 烷基。
4. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₄-C₂₄ 烷基。
5. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₆-C₂₄ 烷基。
6. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₈-C₂₄ 烷基。
7. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₀ 烷基。
8. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₂ 烷基。
9. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₄ 烷基。
10. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中 R₁ 為 C₁₆ 烷基。
11. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該式 I 化合物為



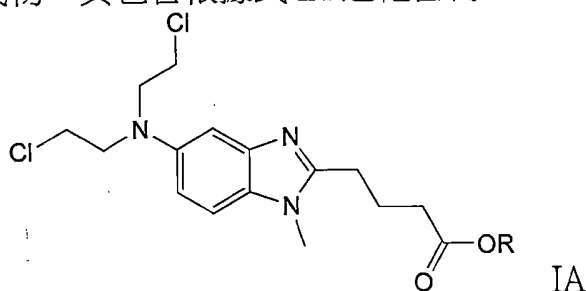
12. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該式 I 化合物為



13. 如申請專利範圍第 1 項之化合物，其中該式 I 化合物為



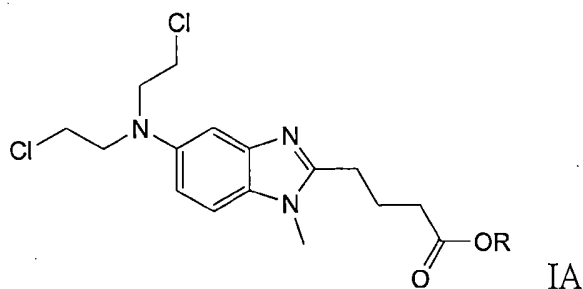
14. 一種醫藥組成物，其包含根據式 IA 之化合物：



其中 R 為 C₈-C₂₄ 烷基；及

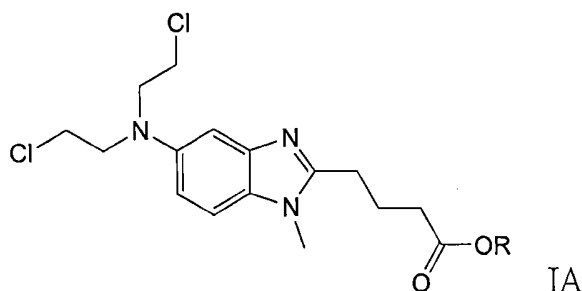
醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

15. 如申請專利範圍第 14 項之醫藥組成物，其中 R 為 C₁₀-C₂₄ 烷基。
16. 如申請專利範圍第 14 項之醫藥組成物，其中 R 為 C₁₀ 烷基。
17. 如申請專利範圍第 14 項之醫藥組成物，其中 R 為 C₁₂ 烷基。
18. 如申請專利範圍第 14 項之醫藥組成物，其中 R 為 C₁₄ 烷基。
19. 如申請專利範圍第 14 項之醫藥組成物，其中 R 為 C₁₅ 烷基。
20. 一種奈米粒子，其包含根據式 IA 之化合物：



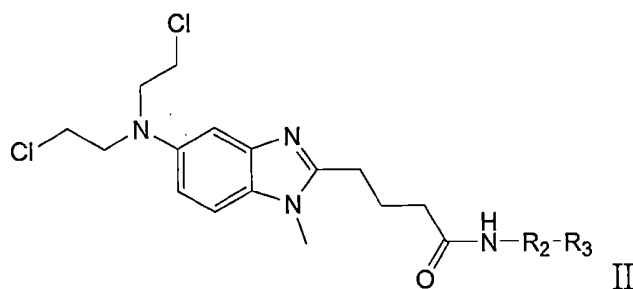
其中 R 為 C₈-C₂₄ 烷基。

21. 一種根據式 IA 之化合物的用途，其係用於製造用於治療患者中之癌症的醫藥品：



其中 R 為 C₈-C₂₄ 烷基。

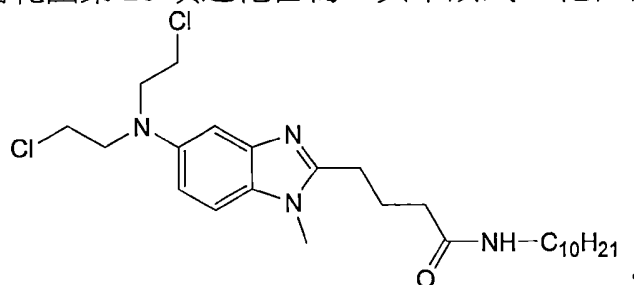
22. 如申請專利範圍第 21 項之用途，其中該癌症為慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病 (Hodgkin's disease)、惰性非霍奇金氏淋巴瘤 (indolent non-Hodgkin's lymphoma)、侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、急性淋巴球性白血病、乳癌或肺癌。
23. 如申請專利範圍第 21 項之用途，其中該癌症係選自肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、睪丸癌、黑素瘤、神經膠母細胞瘤、結腸癌、頭頸癌、卵巢癌及前列腺癌。
24. 如申請專利範圍第 21 項至第 23 項中任一項之用途，其中該患者對一或多種化學治療劑具有抗性。
25. 如申請專利範圍第 24 項之用途，其中該一或多種化學治療劑為烷化劑。
26. 一種式 II 化合物，



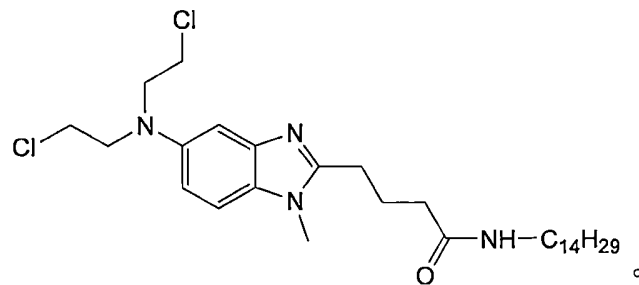
其中 R_2 為 C_1 - C_{24} 伸烷基；且 R_3 為 $-\text{COOC}_{1-3}$ 烷基；或 R_2 - R_3 為 C_1 - C_{24} 烷基；

或其醫藥學上可接受之鹽形式。

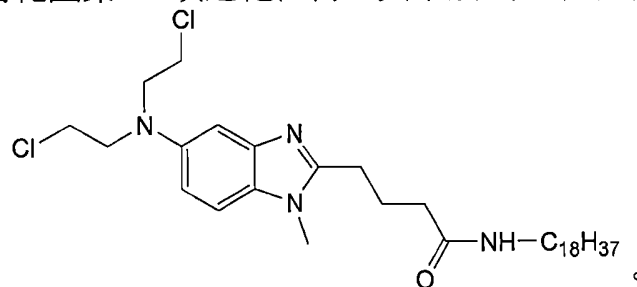
27. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_8 - C_{24} 烷基。
28. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{10} - C_{24} 烷基。
29. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{12} - C_{24} 烷基。
30. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{14} - C_{24} 烷基。
31. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{16} - C_{24} 烷基。
32. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{18} - C_{24} 烷基。
33. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{10} 烷基。
34. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{12} 烷基。
35. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{14} 烷基。
36. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 - R_3 為 C_{16} 烷基。
37. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中 R_2 為 C_2 伸烷基且 R_3 為 $-\text{COOCH}_3$ 。
38. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中該式 II 化合物為



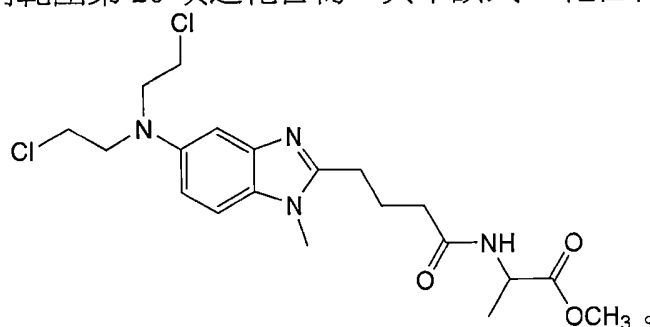
39. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中該式 II 化合物為



40. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中該式 II 化合物為



41. 如申請專利範圍第 26 項之化合物，其中該式 II 化合物為



42. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 26 項之化合物及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。
43. 一種奈米粒子，其包含如申請專利範圍第 26 項之化合物。
44. 一種如申請專利範圍第 26 項之化合物的用途，其係用於製造用於治療患者中之癌症的醫藥品。
45. 如申請專利範圍第 44 項之用途，其中該癌症為慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病、惰性非霍奇金氏淋巴瘤、侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、急性淋巴球性白血病、乳癌或肺癌。
46. 如申請專利範圍第 44 項之用途，其中該癌症係選自肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、睪丸癌、黑素瘤、神經膠母細胞瘤、結腸癌、頭頸癌、卵巢

癌及前列腺癌。

47. 如申請專利範圍第 44 項至第 46 項中任一項之用途，其中該患者對一或多種化學治療劑具有抗性。
48. 如申請專利範圍第 47 項之用途，其中該一或多種化學治療劑為烷化劑。
49. 一種奈米粒子，其包含如申請專利範圍第 1 項至第 13 項中任一項之化合物。
50. 如申請專利範圍第 49 項之奈米粒子，其進一步包含人類血清白蛋白。
51. 如申請專利範圍第 49 項或第 50 項之奈米粒子，其進一步包含聚乳酸乙醇酸。
52. 如申請專利範圍第 49 項或第 50 項之奈米粒子，其進一步包含聚乙二醇。
53. 如申請專利範圍第 49 項或第 50 項之奈米粒子，其進一步包含聚乳酸乙醇酸（PLGA）及聚環氧乙烷乳酸共聚物。
54. 如申請專利範圍第 50 項之奈米粒子，其中該人類血清白蛋白與二醛交聯。
55. 如申請專利範圍第 54 項之奈米粒子，其中該二醛為戊二醛。
56. 一種凍乾組成物，其包含如申請專利範圍第 49 項至第 55 項中任一項之奈米粒子。
57. 如申請專利範圍第 56 項之凍乾組成物，其進一步包含甘露糖醇、海藻糖、蔗糖或 NaCl 中之一或多者。
58. 一種如申請專利範圍第 49 項至第 55 項中任一項之奈米粒子的用途，其係用於製造治用於治療患者中之癌症的醫藥品。
59. 如申請專利範圍第 58 項之用途，其中該癌症為慢性淋巴球性白血病、霍奇金氏疾病、惰性非霍奇金氏淋巴瘤、侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、急性淋巴球性白血病、乳癌或肺癌。

60. 如申請專利範圍第 58 項之用途，其中該癌症係選自肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、睪丸癌、黑素瘤、神經膠母細胞瘤、結腸癌、頭頸癌、卵巢癌及前列腺癌。
61. 如申請專利範圍第 58 項至第 60 項中任一項之用途，其中該患者對一或多種化學治療劑具有抗性。
62. 如申請專利範圍第 61 項之用途，其中該一或多種化學治療劑為烷化劑。