

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6450678号  
(P6450678)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.	F 1	
C07C 225/36	(2006.01)	C07C 225/36
C07C 221/00	(2006.01)	C07C 221/00
C07C 291/04	(2006.01)	C07C 291/04
A61K 31/136	(2006.01)	A61K 31/136
A61P 1/02	(2006.01)	A61P 1/02

請求項の数 17 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-525943 (P2015-525943)	(73) 特許権者	515030037 バイオステータス リミテッド イギリス国, エルイー12 9エヌビー, レスター・シャー, シェップシェッド, 56 エー チャーンウッド ロード
(86) (22) 出願日	平成25年8月7日(2013.8.7)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(65) 公表番号	特表2015-529660 (P2015-529660A)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(43) 公表日	平成27年10月8日(2015.10.8)	(74) 代理人	100191086 弁理士 高橋 香元
(86) 國際出願番号	PCT/GB2013/052106	(72) 発明者	オグロジンスキー, ステファン イギリス国, エルイー12 9エヌビー, レスター・シャー, シェップシェッド, 56 エー チャーンウッド ロード
(87) 國際公開番号	W02014/023956		最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成26年2月13日(2014.2.13)		
審査請求日	平成28年8月5日(2016.8.5)		
(31) 優先権主張番号	1214169.3		
(32) 優先日	平成24年8月8日(2012.8.8)		
(33) 優先権主張国	英國(GB)		

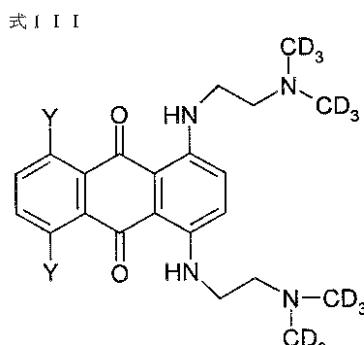
(54) 【発明の名称】新規な化合物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

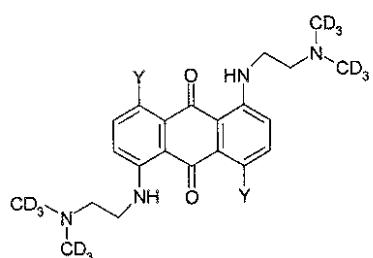
【請求項 1】

式 I I I 、 I V 、 V または V I :

## 【化1】



式 I V

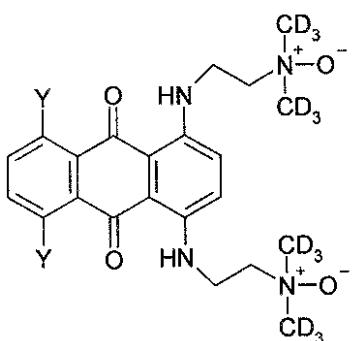


10

## 【化2】

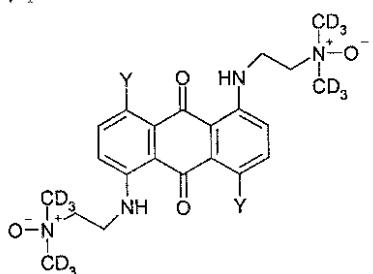
式 V

20



式 V I

30



の化合物であって、式中、Yがそれぞれ独立して、水素、ヒドロキシ、ハロゲノ、アミノ、C<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルコキシおよびC<sub>2</sub>～<sub>8</sub>アルカノキシからなる群より選択される、化合物。

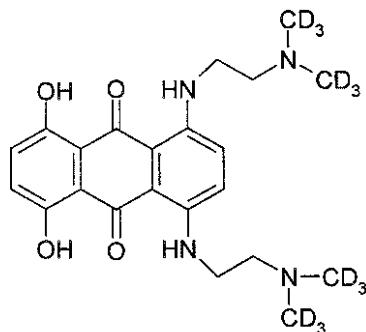
40

## 【請求項2】

前記化合物が、式VII、VIII、IXまたはX

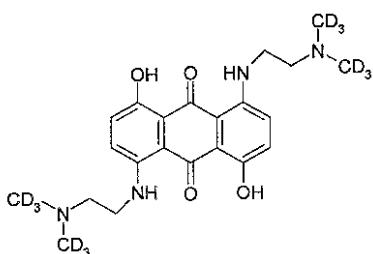
## 【化3】

式VII



10

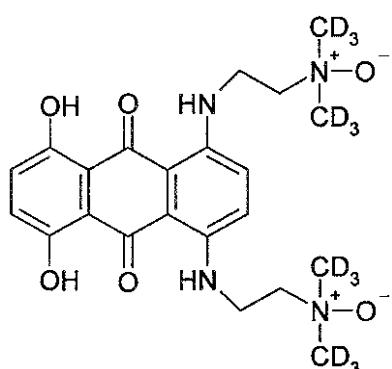
式VIII



## 【化4】

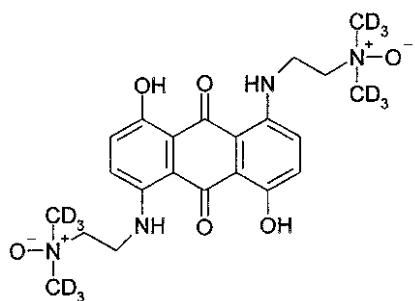
式IX

20



30

式X



の化合物である、請求項1の化合物。

40

## 【請求項3】

請求項1または2に記載の化合物を薬学的に許容される緩衝液、希釈剤、担体、補助剤または補形剤とともに含む、医薬組成物。

## 【請求項4】

請求項1または2に記載の化合物を作製する方法であって、アルキルアミノアルキルアミノアントラキノンの生成に適した条件下でアントラセン-9,10-ジオンと重水素化アルキレンジアミンとを反応させることを含む、方法。

## 【請求項5】

アルキルアミノアルキルアミノアントラキノンのN-オキシド誘導体の生成に適した条件下でアルキルアミノアルキルアミノアントラキノンとモノペルオキシタル酸塩とを反

50

応させる段階をさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

1, 4 - ビス - { [ 2 - (重水素化 - d 6 - ジメチルアミノ) エチル ] アミノ ) - 5 , 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンの生成に適した条件下で 1, 4 - ジフルオロ - 5 , 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンと重水素化 - - N , N - ジメチルエチレン - ジアミンとを反応させることを含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

1, 4 - ビス - { [ 2 - (重水素化 - d 6 - ジメチルアミノ - N - オキシド) エチル ] アミノ ) - 5 , 8 - ジヒドロキシ - アントラセン - 9 , 10 - ジオンの生成に適した条件下で 1, 4 - ビス - { [ 2 - (重水素化 - d 6 - ジメチルアミノ) エチル ] アミノ ) - 5 , 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンとモノペルオキシフタル酸マグネシウムとを反応させる段階をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。 10

**【請求項 8】**

がんの治療に使用するための、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

**【請求項 9】**

前記がんが、膀胱癌、乳癌、骨癌（原発性および続発性、例えば骨肉腫およびユーティング肉腫など）、脳癌（多形神経膠芽腫および星状細胞腫を含む）、子宮頸癌、緑毛癌、結腸および直腸癌、子宮内膜癌、眼癌、胆嚢癌、胃癌、妊娠性腫瘍、頭頸部癌、腎臓（腎細胞）癌、喉頭癌、白血病（ALL、AML、CLL、CML および毛様細胞性白血病など）、肝臓癌、肺癌、リンパ腫（ホドキンリンパ腫（Hodkin's lymphoma）および非ホドキンリンパ腫（non-Hodkin's lymphoma）など）、黒色腫、中皮腫、口腔癌、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、食道癌、卵巣癌、膵臓癌、陰茎癌、前立腺癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、膣癌、外陰癌ならびに子宮癌からなる群より選択される、請求項 8 に記載の化合物。 20

**【請求項 10】**

前記腫瘍またはその一部分が本来低酸素である固形癌の治療に使用するためのまたは転移の治療または予防に使用するための、請求項 8 に記載の化合物。

**【請求項 11】**

抗アンドロゲン剤（ステロイド性および非ステロイド性）、血管破壊剤、抗血管新生剤、抗 VEGFR 剤、IL-8 阻害剤、NO 合成酵素阻害剤、血管収縮剤、血管拡張剤および放射線治療剤 / 療法からなる群より選択される 1 つまたは複数の追加の癌治療と併用するための、請求項 8 または 9 に記載の化合物。 30

**【請求項 12】**

前記抗アンドロゲン剤が、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、フィナステリド、デュタステリド、ベキストステリド、イゾンステリド、ツロステリド、エプリステリドおよびアピラテロンを含むか、これよりなる、請求項 11 に記載の化合物。

**【請求項 13】**

前記抗アンドロゲン剤がビカルタミドを含むか、これよりなる、請求項 12 に記載の化合物。

**【請求項 14】**

*in vitro* または *in vivo* での細胞の酸素化レベルのマーカーとしての、請求項 1 または 2 に記載の化合物の使用。 40

**【請求項 15】**

前記化合物を請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項で定義される化合物の非重水素化型と併用する、請求項 14 に記載の化合物の使用。

**【請求項 16】**

請求項 1 または 2 に記載の化合物を含む、細胞の酸素化レベルの検出に使用するための部分のキット。

**【請求項 17】**

請求項 1 または 2 に記載の化合物の非重水素化型をさらに含む、請求項 16 に記載のキ 50

ット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば癌治療における、新規なアントラキノン化合物およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

抗癌薬の治療上の利点は主として、その薬剤が腫瘍細胞に対して選択的活性を示す程度および非標的組織に対して毒性が低いことによって決まる。多くの場合、成長しつつある腫瘍塊内にある血管系の質に低いと、薬物、栄養素および酸素の送達に支障を来たす。腫瘍では酸素濃度中央値（約1%の酸素； $pO_2$  7.5 mmHg）が正常組織（約5.5%の酸素；42 mmHg）よりもかなり低くなり得ることが認められている（BrownおよびWilson, 2004によって提供されたデータをまとめた）。さらに、腫瘍血管の断続的な開口および閉鎖により、腫瘍全体にわたって酸素化レベルが変化することがあり、特に腫瘍中心部の血管化が不十分であると、酸素が0.1%（1 mmHg）未満の酸素濃度となる場合が多い。様々な程度の低酸素を示す腫瘍細胞は、通常に灌流した組織よりも治療効果が低下し、悪性化の一因となり得る。低酸素選択的薬剤（例えば、生体内還元薬）は、低酸素化状態で選択的に活性化されて細胞毒性型になることによって、極めて低酸素の環境中にある腫瘍細胞を標的とするのに使用することができる1つのクラスの薬剤を含み、非標的組織に対する毒性、低酸素細胞の薬物耐性および癌進行の問題に対処するものである。

【0003】

酸素化が不十分であると、酸素化に支障を来たしていない酸素正常状態に比して相対的に低酸素の状態になる。腫瘍内の酸素化が不十分であると、治療様式に対する応答が変化し、癌進行の一因となり得る。このような低酸素領域内にある細胞は特に、従来用いられてきた抗癌薬による多くの治療に対して抵抗性を示すが、これは、生存しているが休止状態にある細胞に薬物が十分に送達されないこと、および／またはこのような細胞に内因性の腫瘍細胞の感受性が欠如していることに起因する。このほか放射線療法は、酸素の存在によって電離放射線の細胞毒性が増強されるため、酸素濃度が極めて低い場合は効果が低下する（Radiobiology For The Radiologist, Hall EJ, Giaccia AJ, Lippincott WilliamsおよびWilkins, (2005)）。近年得られた証拠から、腫瘍細胞が低酸素条件に適応し、活性な細胞保護機序の誘導を介して抗癌剤に対する薬力学反応を変化させ得ることが示されている（VaupelおよびMayer 2007, Cancer Metastasis Rev 26(2): 225-239）。さらに、低酸素ストレスを生き延びる腫瘍細胞が多くの場合、より悪性の転移表現型を示すことが認められており（Vaupel P, Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in 悪性進行, Exp Oncol 2010; 32, 125-127）、これは患者にとって重大な結果をもたらす。酸素化がより良好な細胞を主要な標的とする様式の治療の後、ストレス抵抗性の低酸素細胞が、遠隔組織に拡散する可能性が増大した細胞を有する腫瘍を再増殖させることが多い。より悪性の転移腫瘍の発現は多くの場合、患者のより重大な疾患に関連する罹病率および死亡の前兆となる。

【0004】

魅力的な方法には、全身組織にみられる十分に酸素化された細胞に対して無毒性であるが、低酸素化条件下では活性化されるか変換されて細胞毒性になる低酸素活性化プロドラッグの使用がある。細胞毒性アルキルアミントラキノンのN-オキシド誘導体は、ほとんど細胞毒性を示さないアントラキノンプロドラッグとなる。重要なのは、このようなプロドラッグが、腫瘍性組織内にみられる無酸素または低酸素条件下においてin vi

10

20

30

40

50

*tro*で変換することが可能なことである。腫瘍以外の全身組織が細胞毒性薬物の生成を促進する程度に低酸素濃度になることはほとんどないため、腫瘍に対する特異性が確保される。

【0005】

アントラキノンN-オキシド、AQ4N(CAS番号136470-65-0)は、低酸素腫瘍細胞内で選択的に生体内還元されて強力なDNAトポイソメラーゼII阻害剤、AQ4になるプロドラッグである。これまでの刊行物には、プロドラッグAQ4Nの基本的特性および*in-vitro/in-vivo*での特徴が教示されている(例えば、米国特許第5,132,327号を参照されたい)。

【0006】

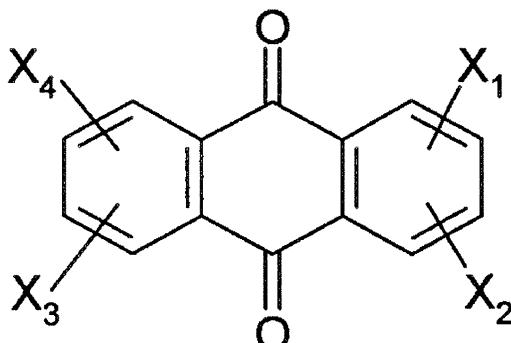
本発明は、好ましい薬理学的特性と低酸素感知特性との組合せを有する新規なアントラキノン化合物を提供することによって、改善された癌治療法の必要性に応えようとするものである。

【発明の概要】

【0007】

本発明の第一の態様は、式I

【化1】



式I

の化合物を提供し、式中、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ および $X_4$ はそれぞれ独立して、水素、ヒドロキシ、ハロゲノ、アミノ、 $C_{1-4}$ アルコキシ、 $C_{2-8}$ アルカノイルオキシ、-NH-A-NHR、-NH-A-NR'R'、および-NH-A-N(O)R'R'からなる群より選択され、Aは少なくとも炭素原子2個の鎖長を有するアルキレン基(NHとNHRまたはN(O)R'R'との間)であり、R、R'およびR''はそれぞれ独立して、 $C_{1-4}$ アルキル基ならびに窒素原子と結合している炭素原子がヒドロキシ基をもたず、いずれの炭素原子も2つのヒドロキシ基によって置換されていない $C_{2-4}$ ヒドロキシアルキルおよび $C_{2-4}$ ジヒドロキシアルキル基から選択されるか、RおよびR''はともに、R'およびR''が結合している窒素原子とともに、環の中に3~7個の原子を有する複素環基を形成している $C_{2-6}$ アルキレン基であり、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ および $X_4$ のうちの少なくとも1つは重水素化型の-NH-A-NHR、-NH-A-NR'R'、および-NH-A-N(O)R'R'からなる群より選択される。

【0008】

したがって、本発明は、新規な重水素化アントラキノン化合物を提供する。

【0009】

「重水素化」には、化合物がジュウテリウムまたは重水素(すなわち、Dまたは $^2H$ )の原子を少なくとも1つ含むことを包含するものとする。当業者には、化合物が部分的に(すなわち、選択的に)重水素化されていても、完全に重水素化されて(すなわち、ジュウテリウムの形態でのみ存在する水素を含んで)いてもよいことが理解されよう。

【0010】

この文脈における「選択的に」は、通常の $^1H$ 水素原子の全部ではなく一部がジュウテリウムに置き換わっていることを意味する。例えば、置換基 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ および $X_4$ のうちの1つまたは複数が重水素化されているが、中央のアントラキノン環はジュウテリ

10

20

30

40

50

ウムを含まないという場合があり得る。

【0011】

一実施形態では、本発明の化合物は、置換基 - N H - A - N H R 、 - N H - A - N R' , R' , および / または - N H - A - N ( O ) R' R' , のうちの 1 つまたは複数が X<sub>1</sub> 、 X<sub>2</sub> 、 X<sub>3</sub> および / または X<sub>4</sub> の位置において選択的に重水素化されている。このような各置換基では、A 、 R 、 R' および R' , が完全に重水素化されていても（すなわち、結果として<sup>1</sup> H を含まない）、部分的に重水素化されていてもよいことが理解されよう。

【0012】

好ましい実施形態では、化合物は、末端基 R , R' および R' , のうちの 1 つまたは複数においてのみ重水素化されている。例えば、R , R' および / または R' , は：

- C D<sup>3</sup> ;
- C H<sub>2</sub> C D<sup>3</sup> ;
- C D<sub>2</sub> C D<sup>3</sup> ;
- C D<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C D<sup>3</sup> ; および
- C D<sub>2</sub> C D<sub>2</sub> C D<sub>2</sub> C D<sup>3</sup>

を表し得る。

【0013】

「C<sub>1</sub> ~ <sub>4</sub> アルキル」という用語は、1 ~ 4 個の炭素を含む直鎖または分岐鎖アルキル基を包含するものとする。R 、 R' および / または R' , が独立して表し得る好ましいアルキル基としては、C<sub>1</sub> および C<sub>2</sub> アルキルが挙げられる。

【0014】

「低級アルキレン」という用語は、これに従って解釈されるべきである。

【0015】

「C<sub>2</sub> ~ <sub>4</sub> ヒドロキシアルキル」および「C<sub>2</sub> ~ <sub>4</sub> ジヒドロキシアルキル」という用語は、1 ~ 4 個の炭素を含み、それぞれ 1 つまたは 2 つのヒドロキシ基が結合している、直鎖または分岐鎖アルキル基を包含するものとする。例えば、R 、 R' および / または R' , は独立して：

- C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> O H
- C H<sub>2</sub> C H ( O H ) C H<sub>3</sub>
- C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H ( O H ) C H<sub>2</sub> O H

を表し得る。

【0016】

「C<sub>1</sub> ~ <sub>4</sub> アルコキシ」という用語は、酸素を介して中心部のアントラキノン（アントラセン - 9 , 10 - ジオン）環と結合している直鎖または分岐鎖 C<sub>1</sub> ~ <sub>4</sub> アルキル基を包含するものとする。例えば、R 、 R' および / または R' , は独立して：

- O C H<sub>3</sub>
- O C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>
- O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>
- O C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>

を表し得る。

【0017】

「C<sub>2</sub> ~ <sub>8</sub> アルカノイルオキシ」という用語は、酸素を介して中心部のアントラキノン（アントラセン - 9 , 10 - ジオン）環と結合している直鎖または分岐鎖 C<sub>2</sub> ~ <sub>8</sub> アルカノイル基を包含するものとする。例えば、R 、 R' および / または R' , は独立して：

- O ( O ) C C H<sub>3</sub>
- O ( O ) C C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>
- O ( O ) C C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>
- O ( O ) C C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H<sub>3</sub>
- O ( O ) C C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> C H ( C H<sub>3</sub> ) C H<sub>3</sub>

を表し得る。

10

20

30

40

50

## 【0018】

「ヒドロキシ」という用語は - OH を表すものとする。

## 【0019】

「ハロゲノ」という用語は - Br、 - Cl および - F などの任意のハロゲン基を表すものとする。

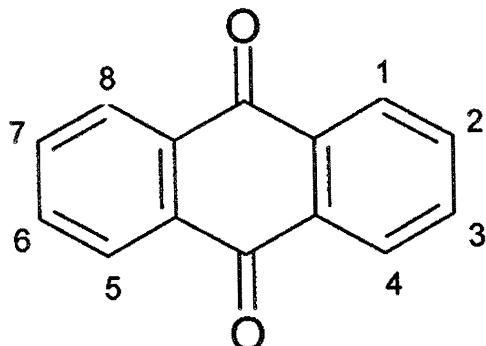
## 【0020】

「アミノ」という用語は、 - NH<sub>2</sub> などの第一級アミン基を包含するものとする。

## 【0021】

当業者には、化合物のアントラキノン環が環の 1 位、 2 位、 3 位、 4 位、 5 位、 6 位、 7 位または 8 位のいずれかにおいて X<sub>1</sub>、 X<sub>2</sub>、 X<sub>3</sub> および X<sub>4</sub> によって置換されていてよいことが理解されよう：

## 【化2】



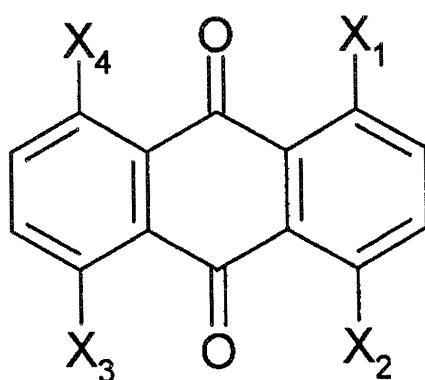
10

20

## 【0022】

本発明の第一の態様一実施形態では、化合物は、式IIの通りに環の 1 位、 4 位、 5 位および 8 位において置換されている：

## 【化3】



式II

30

## 【0023】

一実施形態では、 X<sub>1</sub>、 X<sub>2</sub>、 X<sub>3</sub> および X<sub>4</sub> はそれぞれ独立して、水素、ヒドロキシ、 - NH - A - NHR、 - NH - A - NR'R''、 - NH - A - N(O)R'R'' およびその重水素化型からなる群より選択される。

40

## 【0024】

一実施形態では、 X<sub>1</sub>、 X<sub>2</sub>、 X<sub>3</sub> および X<sub>4</sub> はそれぞれ独立して、ヒドロキシ、 - NH - A - NR'R''、 - NH - A - N(O)R'R'' およびその重水素化型からなる群より選択される。

## 【0025】

一実施形態では、 X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> はともにヒドロキシであり、 X<sub>3</sub> および X<sub>4</sub> はともに - NH - A - N(O)R'R'' またはその重水素化型である。

## 【0026】

一実施形態では、 X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> はともにヒドロキシであり、 X<sub>3</sub> および X<sub>4</sub> はともに

50

NH - A - NR' R'' またはその重水素化型である。

**【0027】**

一実施形態では、Aは不分岐である。例えば、Aはエチレンであり得る。

**【0028】**

一実施形態では、R、R' およびR'' はそれぞれ独立して、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH およびその重水素化型からなる群より選択される。

**【0029】**

一実施形態では、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> およびX<sub>4</sub> のうちの1つまたは2つが独立して、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(CH<sub>3</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)CH(CH<sub>3</sub>)OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(O)(CH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> およびその重水素化型からなる群より選択される。  
10

**【0030】**

一実施形態では、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> およびX<sub>4</sub> のうちの1つまたは2つが独立して、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub> およびその重水素化型からなる群より選択される。  
20

**【0031】**

一実施形態では、本発明の化合物は1つの基-NH-A-N(O)R'R'' と1つの基-NH-A-NHRとを含み、-NH-A-NHR基は、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>3</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH およびその重水素化型から選択される。  
30

**【0032】**

一実施形態では、本発明の化合物は1つの基-NH-A-NR'R'' と1つの基-NH-A-NHRとを含み、-NH-A-NHR基は、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>3</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NHCH<sub>2</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH およびその重水素化型から選択される。

**【0033】**

非限定的な好ましい本発明の化合物では：

- (a) X<sub>1</sub> = -NH-A-N(O)R'R''、X<sub>2</sub> = -HかつX<sub>3</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；  
40
- (b) X<sub>1</sub> = -NH-A-N(O)R'R''、X<sub>2</sub> = -OH、X<sub>3</sub> = -OHかつX<sub>4</sub> = -H；
- (c) X<sub>1</sub> = NH-A-N(O)R'R'' かつX<sub>2</sub> = X<sub>3</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；
- (d) X<sub>1</sub> = X<sub>4</sub> = -NH-A-N(O)R'R'' かつX<sub>2</sub> = X<sub>3</sub> = -OH；
- (e) X<sub>1</sub> = X<sub>2</sub> = -NH-A-N(O)R'R'' かつX<sub>3</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；
- (f) X<sub>1</sub> = X<sub>3</sub> = -NH-A-N(O)R'R'' かつX<sub>2</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；
- (g) X<sub>1</sub> = -NH-A-NR'R''、X<sub>2</sub> = -HかつX<sub>3</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；
- (h) X<sub>1</sub> = -NH-A-NR'R''、X<sub>2</sub> = 4位の-OH、X<sub>3</sub> = -OHかつX<sub>4</sub> = -H；
- (i) X<sub>1</sub> = -NH-A-NR'R'' かつX<sub>2</sub> = X<sub>3</sub> = X<sub>4</sub> = -OH；  
50

( j )  $X_1 = X_4 = -NH - A - NR' R'$  , かつ  $X_2 = X_3 = -OH$  ;  
 ( k )  $X_1 = X_2 = -NH - A - NR' R'$  , かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ;  
 ( l )  $X_1 = X_3 = -NH - A - NR' R'$  , かつ  $X_2 = X_4 = -OH$  ; および  
 その重水素化型である。

## 【0034】

非限定的なさらなる好ましい本発明の化合物では：

( a )  $X_1 = -NH - A - N(O)R' R'$  ,  $X_2 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ;  
 ( b )  $X_1 = -NH - A - N(O)R' R'$  ,  $X_2 = -OH$  ,  $X_3 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_4 = -OH$  ;  
 ( c )  $X_1 = -NH - A - N(O)R' R'$  ,  $X_2 = X_3 = -OH$  かつ  $X_4 = -NH - A - NH R$  ;  
 ( d )  $X_1 = -NH - A - NR' R'$  ,  $X_2 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ;  
 ( e )  $X_1 = -NH - A - NR' R'$  ,  $X_2 = -OH$  ,  $X_3 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_4 = -OH$  ;  
 ( f )  $X_1 = -NH - A - NR' R'$  ,  $X_2 = X_3 = -OH$  かつ  $X_4 = -NH - A - NH R$  ; および  
 その重水素化型である。

## 【0035】

非限定的なさらなる好ましい本発明の化合物では：

( a )  $X_1 = X_2 = -NH - A - N(O)R' R'$  かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ;  
 ( b )  $X_1 = X_3 = -NH - A - N(O)R' R'$  かつ  $X_2 = X_4 = -OH$  ;  
 ( c )  $X_1 = X_2 = -NH - A - NR' R'$  , かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ; および  
 ( d )  $X_1 = X_3 = -NH - A - NR' R'$  , かつ  $X_2 = X_4 = -OH$  であり、式中、  
 $-NH - A - N(O)R' R'$  はともに  $-NH - (CH_2)_2N(O)(CH_3)_2$  もしくは  $-NH - (CH_2)_2N(O)(CH_2CH_2OH)_2$  またはその重水素化型であり、 $NH - A - NR' R'$  はともに  $-NH - (CH_2)_2N(CH_3)_2$  もしくは  $-NH - (CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)_2$  またはその重水素化型である。

## 【0036】

非限定的なさらなる好ましい本発明の化合物では：

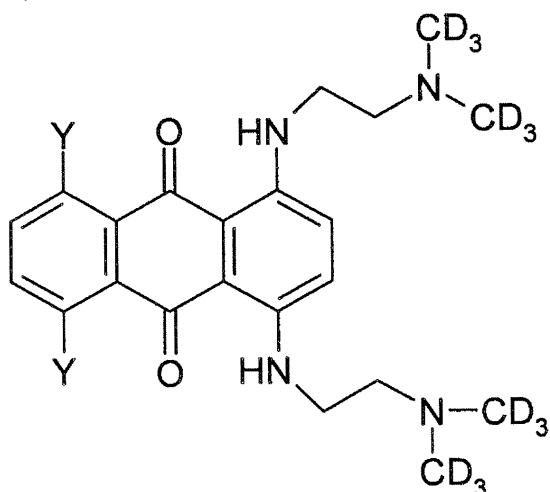
( a )  $X_1 = -NH - A - N(O)R' R'$  ,  $X_2 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ;  
 ( b )  $X_1 = -NH - A - N(O)R' R'$  ,  $X_2 = -OH$  ,  $X_3 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_4 = -OH$  ;  
 ( c )  $X_1 = -NH - A - NR' R'$  ,  $X_2 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_3 = X_4 = -OH$  ; および  
 ( d )  $X_1 = -NH - A - NR' R'$  ,  $X_2 = -OH$  ,  $X_3 = -NH - A - NH R$  かつ  $X_4 = -OH$  であり、式中、  
 $-NH - A - N(O)R' R'$  は  $-NH - (CH_2)_2N(O)(CH_3)_2$  もしくは  
 $-NH - (CH_2)_2N(O)(CH_2CH_2OH)_2$  またはその重水素化型であり、 $-NH - A - NH R$  は  $NH - (CH_2)_2NHCH_3$  もしくは  $-NH(CH_2)_2NHCH_2CH_2OH$  またはその重水素化型であり、 $NH - A - NR' R'$  は  $-NH - (CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)_2$  またはその重水素化型である。

## 【0037】

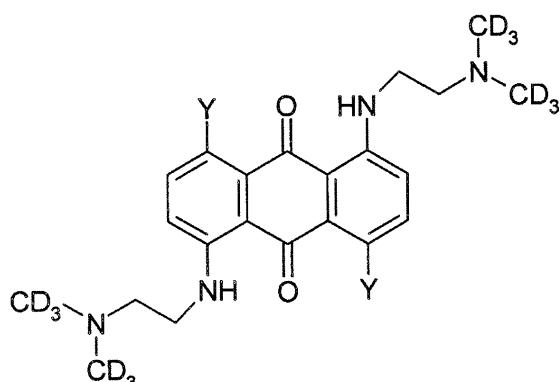
一実施形態では、化合物は式 I II もしくは IV :

## 【化4】

式 I I I



式 I V



の化合物またはそのプロドラッグであり、式中、Yはそれぞれ独立して、水素、ヒドロキシ、ハロゲノ、アミノ、C<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルコキシおよびC<sub>2</sub>～<sub>8</sub>アルカノキシからなる群より選択される。

## 【0038】

この文脈における「プロドラッグ」は、in vivoで容易に式I I IまたはI Vの化合物に変換され得る化合物を包含する。一実施形態では、変換は、プロドラッグが固形腫瘍などの低酸素環境に入ることによって引き起こされる。適切なプロドラッグの例としては、式I I IまたはI Vの化合物のN-オキシド誘導体が挙げられる。

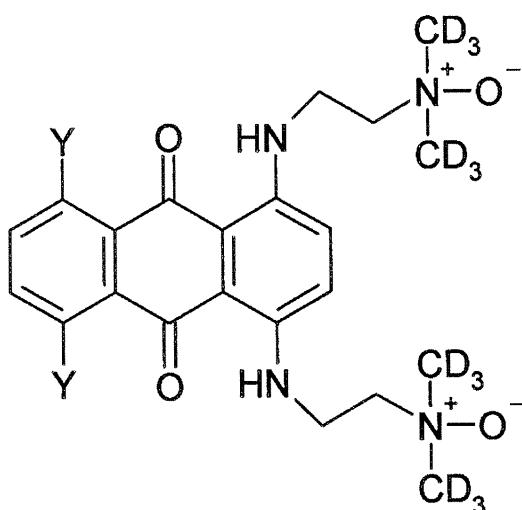
## 【0039】

したがって、一実施形態では、プロドラッグは式VまたはVI：

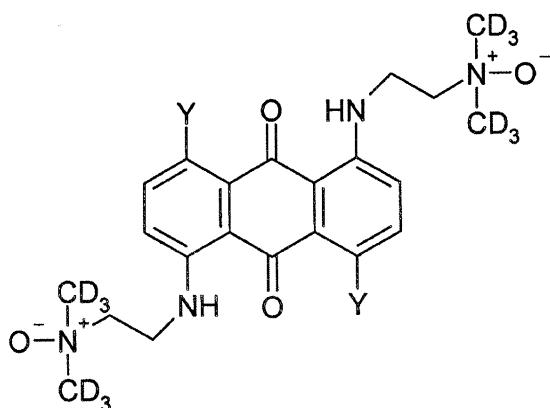
30

## 【化5】

式V



式V I



の化合物のプロドラッグであり、式中、Yはそれぞれ独立して、水素、ヒドロキシ、ハロゲノ、アミノ、C<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルコキシおよびC<sub>2</sub>～<sub>8</sub>アルカノキシからなる群より選択される。

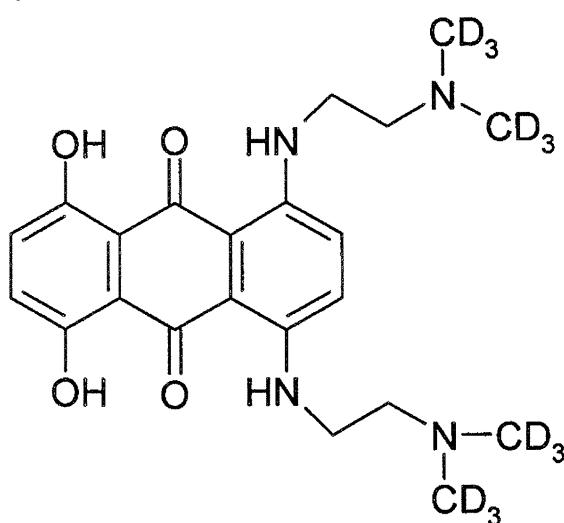
## 【0040】

好ましい一実施形態では、化合物は式V I IまたはV I I I：

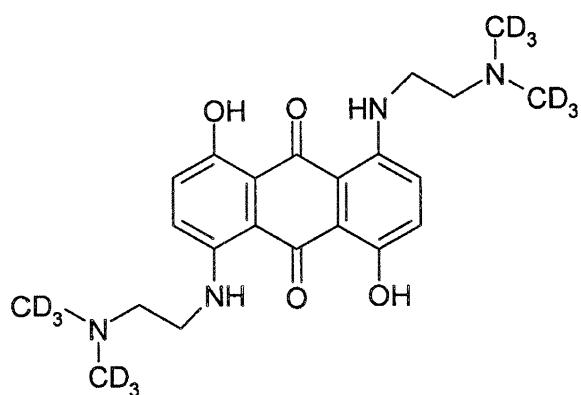
30

【化6】

式V I I



式V I I I



の化合物またはそのプロドラッグである。

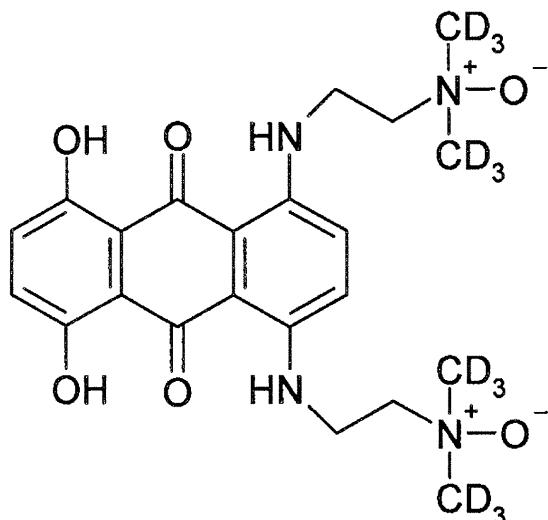
【0041】

さらなる好ましい実施形態では、化合物は式IXまたはX：

30

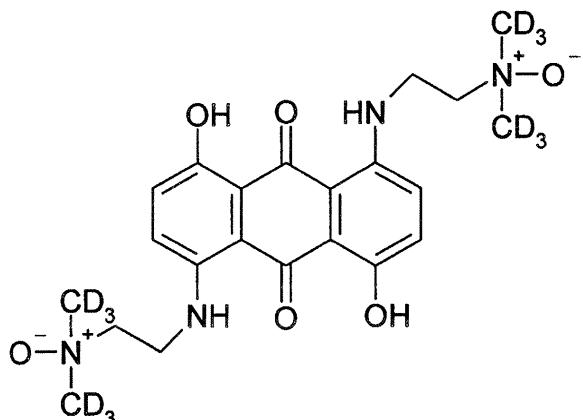
## 【化7】

式IX



10

式X



20

30

のプロドラッグである。

## 【0042】

式I~IXの化合物において、化合物が少なくとも1個のジュウテリウム原子を含む限り、末端アミノ基の窒素と結合している1つまたは複数のメチル基中の1つまたは複数のジュウテリウム原子が通常の水素（すなわち、 $^1\text{H}$ ）に置き換わっていてよいことが当業者に理解されよう。例えば、1つ、2つ、3つまたは4つのメチル基が $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{D}$ または $-\text{CHD}_2$ であってよい。一実施形態では、化合物中のメチル基は $-\text{CH}_3$ または $-\text{CD}_3$ である。

## 【0043】

当業者にはさらに、上式I~Xの特定の化合物が対陰イオンによって相殺されていてよいことが理解されよう。例示的な対陰イオンとしては、特に限定されないが、ハロゲン化物（例えば、フッ化物、塩化物および臭化物）、硫酸（例えば、デシル硫酸）、硝酸、過塩素酸、スルホン酸（例えば、メタニスルホン酸）およびトリフルオロ酢酸が挙げられる。その他の適切な対陰イオンは、当業者には周知であろう。したがって、式I~Xの化合物の薬学的および/または獣医学的に許容される塩および溶媒和物などの誘導体も本発明の範囲内にある。挙げ得る塩としては、酸付加塩、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸およびリン酸などの無機酸とともに形成される塩、カルボン酸とともに形成される塩または有機スルホン酸とともに形成される塩；塩基付加塩；塩基とともに形成される金属塩、例えば、ナトリウム塩およびカリウム塩がある。

## 【0044】

40

50

一実施形態では、化合物はハロゲン化物塩、例えば、塩化物塩の形態である。

**【0045】**

当業者にはさらに、式I～Xの特定の化合物が互変異性を示し得ることが理解されよう。互変異性型およびその混合物はすべて本発明の範囲内にある。

**【0046】**

式I～Xの化合物はこのほか、1つまたは複数の不斉炭素原子を含み、それにより光学異性および/またはジアステレオ異性を示し得る。従来の技術、例えばクロマトグラフィーまたは分別結晶を用いてジアステレオ異性体を分離し得る。従来の技術、例えば分別結晶またはHPLC技術を用いて化合物のラセミ混合物をはじめとする混合物を分離することによって、様々な立体異性体を単離し得る。あるいは、ラセミ化もしくはエピマー化を引き起こさない条件下でしかるべき光学活性出発物質を反応させることによって、または例えはホモキラルな酸による誘導体化の後、従来の手段（例えは、HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー）によるジアステレオマーエステルの分離を実施することによって、所望の光学異性体を作製し得る。立体異性体はすべて本発明の範囲内にある。10

**【0047】**

本発明の化合物の合成に様々な経路を用いることができる。1位および4位に基-NH-A-NR' R''を有する化合物の調製に極めて便利な1つの方法では、しかるべきアミンR' R''N-A-NH<sub>2</sub>と縮合し、アミンとの反応のためのロイコ化合物中で1,4位が活性化されている、適宜置換された2,3-ジヒドロ(ロイコ)-1,4-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンを使用するものである。このような縮合は、メタノール、エタノール、水、ジメチルホルムアミド、2-メトキシエタノール、アセトニトリル、ニトロベンゼン、, , , -テトラ-メチレンジアミンまたはその混合物などの溶媒を用いて、約25または35～50または60の範囲の温度にて1時間またはそれ以上で上手く達成され得る。いくつかの場合には、例えは環状基NR'R''を含む化合物では、これより高い温度、短い反応時間が適切であり得る。次いで、空気酸化または過酸化水素、クロラニル、過ホウ酸ナトリウムもしくは二酸化マンガンによる酸化を適宜用いて、ロイコ誘導体を芳香族のアントラセン-9,10-ジオンに完全に酸化する。20

**【0048】**

ロイコ化合物は、主として2つの-NH-A-NHR'R''基で置換された化合物の調製を目的とするものであるが、このような基を2つ以上含む化合物の調製にこれを用いることが可能である。したがって、2,3-ジヒドロ(ロイコ)-1,4,5,8-テトラヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンおよび過剰なアミン-NH-A-NHR'R''を用いることによって、基-NH-A-NHR'R''を3つ、1位、4位および5位に有する8-ヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンを調製してもよい。30

**【0049】**

ロイコ誘導体自体は、対応する完全に芳香族の1,4-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンを窒素流中、必要に応じて亜ジチオン酸ナトリウムまたは亜鉛末などの適切な還元剤の存在下、90超で1時間またはそれ以上、適宜加熱することによる熱処理によって得ることができる。様々なアントラセン-9,10-ジオン、特にヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンが市販されており、またこのような化合物の様々な合成が文献で報告されている。その調製に適した1つの方法では、塩化アルミニウムおよび水酸化ナトリウムの存在下、適宜置換された無水フタル酸とヒドロキノンとを180で1時間またはそれ以上反応させる。1つの形態の置換基を含むアントラセン-9,10-ジオンを修飾して他の形態の置換基をもたらすことが可能であるため、例えは、アミノ基を含むジオンを水酸化ナトリウム/亜ジチオン酸ナトリウムで処理して、対応するヒドロキシ置換化合物を得ることができる。40

**【0050】**

本発明のN-オキシド化合物に酸化するための中間体の調製に適したその他の方法としては、しかるべきクロロまたはフルオロ置換アントラセン-9,10-ジオンとしかるべき

10

20

30

40

50

きアミン R' ' R' N - - A - - NH<sub>2</sub> とを、例えば、その還流温度で 1 時間またはそれ以上、過剰のアミンとともに加熱することによって、反応させることが挙げられる。これらのクロロ- およびフルオロアントラセン - 9 , 10 - ジオンの特定のものが知られており、またこのような化合物の様々な合成が文献で報告されている。したがって、例えば、K F - Na F の仲介による 3 , 6 - ジクロロフタル酸無水物から 1 , 4 - ジフルオロ - 4 , 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオン作製の前駆物質としての 3 , 6 - ジフルオロフタル酸無水物への変換 (Lee および Denny, 1999, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 : 2755 - 2758 を参照されたい)。さらに、例えば、化学量論量の塩化スルフリルと制御された温度とを用いる 1 , 4 , 5 , 8 - テトラヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンの選択的塩素化によって、1 , 5 - ジクロロ - 4 , 8 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンを調製し得る。次いで、この前駆物質を用いて、1 位および 5 位に基 - NH - A - NR' R' ' ならびに 4 位および 8 位にヒドロキシ基を有する中間体を調製することができ、アミン R' ' R' N - - A - - NH<sub>2</sub> との反応時にヒドロキシ基が適宜保護される。他のクロロヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオン中間体の調製にも同様の方法が適している。  
10

#### 【0051】

本発明の化合物が 1 つまたは複数の基 - N - A - NR' R' ' のほかにも 1 つまたは複数の基 - NH - A - NH R を含む場合、上述の適切な前駆物質と、アミン RN - - A - - NH<sub>2</sub> と R' ' R' N - - A - - NH<sub>2</sub> の混合物とを反応させ、次いで、得られた生成物の混合物を例えればクロマトグラフィーにより分離することによって化合物を分離するのが好都合である。したがって、例えば、2 , 3 - ジヒドロ(ロイコ) - 1 , 4 - ジヒドロキシアントラセン - 9 , 10 - ジオンが 2 - (2 - ヒドロキシエチルアミノ)エチルアミンと 2 - (ジエチルアミノ)エチルアミンとの混合物と反応すると、1 , 4 - ビス { [2 - (ジエチルアミノ) - エチル] アミノ } アントラセン - 9 , 10 - ジオンと、1 , 4 - ビス { [2 - (2 - ヒドロキシエチル - アミノ) - エチル] アミノ } - アントラセン - 9 , 10 - ジオンと、1 - (2 - (ジエチルアミノ)エチル) アミノ - 4 - { [2 - (2 - ヒドロキシエチルアミノ) - エチル] アミノ } アントラセン - 9 , 10 - ジオンとの混合物が得られ、そこから例えばクロマトグラフィーにより、最後に挙げた化合物を分離し得る。酸化では、[2 - (ジエチルアミノ)エチル] アミノ基の第三級窒素原子のみが N - オキシド型に変換される。  
20  
30

#### 【0052】

1 つまたは複数の置換基が存在する場合、合成経路に応じて、これらを最終形態まで全体を通して存在させるか、のちの合成段階で所望の基を生じさせるのが適切であり得る。既知の方法に従いヒドロキシ基を修飾することによってエーテルおよびエステル基 X を容易に調製し得ることは言うまでもないが、ヒドロキシ基 X を含む前駆物質の方が、対応エーテルまたはエステル置換基を含む前駆物質よりも文献に記載されている場合が多い。

#### 【0053】

しかし、化合物およびそのための中間体を調製するためのまた別の方法を用いてもよく、これは、特にこのような中間体に関する文献から明らかであることが理解されよう。本発明の化合物調製のための中間体の調製に関するさらなる詳細を米国特許第 4 , 197 , 249 号および英国特許第 2 , 004 , 293 B 号（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）にみることができる。  
40

#### 【0054】

したがって、本発明の第二の態様は、本発明の第一の態様による化合物を作製する工程を提供し、この工程は、アルキルアミノアルキルアミノアントラキノンの生成に適した条件下でアントラセン - 9 , 10 - ジオンと重水素化アルキレンジアミンとを反応させることを含む。

#### 【0055】

任意選択で、この工程は、アルキルアミノ - アルキルアミノアントラキノンの N - オキシド誘導体の生成に適した条件下でアルキルアミノ - アルキルアミノアントラキノンとモ  
50

ノペルオキシフタル酸塩とを反応させる段階をさらに含む。

**【0056】**

一実施形態では、この工程は、1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンの生成に適した条件下で1,4-ジフルオロ-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン,281-005と、重水素化-N,N-ジメチルエチレン-ジアミンとを反応させることを含む。

**【0057】**

さらなる実施形態では、この工程は、1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンの生成に適した条件下で1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンとモノペルオキシフタル酸マグネシウムとを反応させる段階を含む。

**【0058】**

本発明の第三の態様は、本発明の第一の態様による化合物を薬学的に許容される緩衝液、希釈剤、担体、補助剤または補形剤とともに含む、医薬組成物を提供する。

**【0059】**

「薬学的に許容される」は、本発明の化合物の治療効果を低下させない毒性物質を包含するものとする。このような薬学的に許容される緩衝液、担体または補形剤は当該技術分野で周知である（その開示が参考により本明細書に組み込まれるRemington's

Pharmaceutical Sciences, 第18版, A.R.Gennaro編, Mack Publishing Company (1990) およびhandbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, A.K.ibbe編, Pharmaceutical Press (2000) を参照されたい）。

**【0060】**

「緩衝液」という用語は、pHを安定させることを目的とし酸-塩基混合物を含有する水溶液を意味するものとする。緩衝液の例にはトリズマ、ビシン、トリシン、MOPS、MOPSO、MOBS、トリス、ヘペス、HEPBS、MES、リン酸、炭酸、酢酸、クエン酸、グリコール酸、乳酸、ホウ酸、ACES、ADA、酒石酸、AMP、AMPD、AMPSO、BES、CABS、カコジル酸、CHES、DIPOSO、EPPS、エタノールアミン、グリシン、HEPPSO、イミダゾール、イミダゾール乳酸、PIPES、SSC、SSPE、POPSO、TAPS、TABS、TAPSOおよびTESがある。

**【0061】**

「希釈剤」という用語は、医薬製剤中の薬剤を希釈することを目的とする水溶液または非水溶液意味するものとする。希釈剤は生理食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノールまたは油（ベニバナ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油またはゴマ油など）のうちの1つまたは複数であり得る。

**【0062】**

「補助剤」という用語は、本発明の化合物の生物学的効果を増大させるために製剤に添加する任意の化合物を意味するものとする。補助剤は、様々なアシル組成の亜鉛、銅または銀と様々な陰イオンとの塩、例えば、特に限定されないがフッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物、チオシアニン酸塩、亜硫酸塩、水酸化物塩、リン酸塩、炭酸塩、乳酸塩、グリコール酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、酒石酸塩および酢酸塩のうちの1つまたは複数であり得る。補助剤はこのほか、カチオン性セルロースエーテル、カチオン性セルロースエステル、脱アセチル化ヒアルロン酸、キトサン、カチオン性デンドリマーなどのカチオン性ポリマー、ポリ(ビニルイミダゾール)などのカチオン性合成ポリマーならびにポリヒスチジン、ポリリジン、ポリアルギニンおよびこれらのアミノ酸を含有するペプチドなどのカチオン性ポリペプチドであり得る。

**【0063】**

10

20

30

40

50

補形剤は炭水化物、ポリマー、脂質および鉱物のうちの1つまたは複数であり得る。炭水化物の例としては、ラクトース、グルコース、スクロース、マンニトールおよびシクロデキストリンが挙げられ、これらは、例えば凍結乾燥を容易にするために、組成物に添加される。ポリマーの例にはデンプン、セルロースエーテル、セルロースカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラゲナン、ヒアルロン酸およびその誘導体、ポリアクリル酸、ポリスルホン酸塩、ポリエチレングリコール／ポリエレンオキシド、ポリエレンオキシド／ポリプロピレンオキシドコポリマー、加水分解が様々な程度のポリビニルアルコール／ポリ酢酸ビニルならびにポリビニルピロドンがあり、これらはすべて分子量が異なり、粘度調節のため、生体接着性を持たせるため、または化学分解およびタンパク質分解から脂質を保護するために組成物に添加される。脂質の例には、アシル鎖長および飽和度が異なる脂肪酸、リン脂質、モノトリグリセリド、ジトリグリセリド、トリグリセリド、セラミド、スフィンゴ脂質および糖脂質ならびに卵レシチン、大豆レシチン、水素化卵および大豆レシチンがあり、これらはポリマーと同様の理由で組成物に添加される。鉱物の例にはタルク、酸化マグネシウム、酸化亜鉛および酸化チタンがあり、これらは液体蓄積の軽減または有利な着色性などの有益性を得るために組成物に添加される。

#### 【0064】

本発明の化合物をその送達に適するよう、当該技術分野で公知の任意のタイプの医薬組成物に製剤化し得る。

#### 【0065】

好ましい一実施形態では、医薬組成物を非経口的に、例えば、静脈内に、脳室内に、関節内に、動脈内に、腹腔内に、髄腔内に、心室内に、胸骨内に、頭蓋内に、筋肉内に、または皮下に投与し、またこれを注入技術によって投与し得る。このほか、医薬組成物を腫瘍内および／または腫瘍周囲に投与し得る。

#### 【0066】

このような医薬組成物は、他の物質、例えば、溶液を血液と等張にするのに十分な塩またはグルコースを含有し得る無菌水溶液の形態で使用すると好都合である。必要に応じて、水溶液を適切に（好ましくはpH3～9に）緩衝するべきである。無菌条件下での適切な非経口の調製は、当業者に周知の標準的な製薬技術によって容易に遂行される。

#### 【0067】

非経口投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および製剤を目的とする被投与者の血液と等張にする溶質を含有し得る水性および非水性無菌注射液；ならびに懸濁化剤および増粘剤を含み得る水性および非水性無菌懸濁液が挙げられる。製剤は単位用量または複数回用量の容器、例えば、密閉したアンプルおよびバイアルで提供してもよく、また使用直前に無菌液体担体、例えば注射用水を添加するだけでよい凍結乾燥条件で保管してもよい。既に記載されているような無菌粉末、顆粒および錠剤から即時注射液および懸濁液を調製してもよい。

#### 【0068】

さらなる実施形態では、本発明の医薬組成物はリポソームの形態であり得、この形態では、薬剤を他の薬学的に許容される担体以外にミセル、不溶性单層および液晶として凝集形態で存在する脂質などの両親媒性物質と組み合わせる。リポソーム製剤に適した脂質としては、特に限定されないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられる。適切な脂質としてはこのほか、血流中循環時間を延ばすために極性頭部基をポリ（エチレングリコール）によって修飾した脂質が挙げられる。このようなリポソーム製剤の調製は、例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,235,871号にみることができる。

#### 【0069】

本発明の医薬組成物はこのほか、生分解性マイクロスフェアの形態であり得る。ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、PLAとPGA（PLGA）また

10

20

30

40

50

はポリ(カルプロラクトン(car pro lactone))(PCL)のコポリマーおよびポリ酸無水物などの脂肪族ポリエステルが生分解性ポリマーとしてマイクロスフェアの作製に広く用いられている。このようなマイクロスフェアの調製は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,851,451号および欧州特許第0213303号にみることができる。

#### 【0070】

さらなる実施形態では、本発明の医薬組成物をポリマーゲルの形態で提供し、この場合、薬剤を含有する溶液の粘度を高くするためにポリマー、例えばデンプン、セルロースエーテル、セルロースカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸塩、カラゲナン、ヒアルロン酸およびその誘導体、ポリアクリル酸、ポリビニルイミダゾール、ポリスルホン酸塩、ポリエチレングリコール/ポリエチレンオキシド、ポリエチレンオキシド/ポリプロピレンオキシドコポリマー、加水分解の程度が様々なポリビニルアルコール/ポリ酢酸ビニルならびにポリビニルピロリドンなどを使用する。ポリマーはこのほか、ゼラチンまたはコラーゲンを含み得る。

#### 【0071】

あるいは、化合物を生理食塩水、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノールまたは油(ベニバナ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油またはゴマ油など)、トラガントゴムおよび/または様々な緩衝液に溶かすだけでもよい。

#### 【0072】

本発明の医薬組成物は、活性薬剤の作用の増強のためにイオンおよび定められたpHを含み得ることが理解されよう。さらに、組成物は滅菌などの従来の製薬工程を経、かつ/または保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤、充填剤などの従来の補助剤を含有し得る。

#### 【0073】

本発明による医薬組成物は、当業者に公知の任意の適切な経路で投与し得る。したがって、可能な投与経路としては、非経口(静脈内、皮下および筋肉内)、局所、眼内、経鼻、経肺、頸側、経口、非経口、経膣および経直腸の経路が挙げられる。ほかにも、埋植物からの投与が可能である。

#### 【0074】

あるいは、医薬組成物を鼻腔内に、または吸入により投与し得る(例えば、適切な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロフルオロエタン、1,1,1,2-テトラフルオロエタン(HFA134A3)もしくは1,1,1,2,3,3,3-ヘptaフルオロプロパン(HFA227EA3)などのヒドロフルオロアルカン、二酸化炭素またはその他の適切なガスなどを用いて、加圧容器、ポンプ、スプレーまたは噴霧器からエアロゾルスプレーの形態で投与し得る)。加圧エアロゾルの場合、定量を送達する弁を設けることによって投与単位を決定し得る。加圧容器、ポンプ、スプレーまたは噴霧器は、例えば、滑沢剤、例えばソルビタントリオレアートをさらに含有し得るエタノールと溶媒の噴射剤との混合物を用いた活性なポリペプチドの溶液または懸濁液を含み得る。吸入器または吹入器で使用するカプセルおよびカートリッジ(例えば、ゼラチン製のもの)を、本発明の化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との混合粉末を含むよう製剤化し得る。

#### 【0075】

医薬組成物は薬学的有効量で患者に投与する。本明細書で使用される「治療有効量」、「有効量」または「治療上有効な」は、所与の条件および投与レジメンで治療効果をもたらす量を指す。これは、必要とされる添加剤および希釈剤、すなわち担体または投与溶媒とともに所望の治療効果が得られるよう計算された活性物質の所定量のことである。さらに、これは宿主の活性、機能および応答の臨床的に重要な障害を軽減する、最も好ましくはこれを予防するのに十分な量を意味するものとする。あるいは、治療有効量は、宿主の臨床的に重要な病態の改善をもたらすのに十分なものである。当業者に理解される通り、

10

20

30

40

50

化合物の量はその比活性に応じて異なり得る。適切な投与量は、必要とされる希釗剤とともに所望の治療効果が得られるよう計算された所定量の活性な組成物を含み得る。本発明の組成物製造のための方法および使用では、治療有効量の活性成分が提供される。当該技術分野で周知の通り、治療有効量は年齢、体重、性別、病態、合併症、その他の疾患などの患者の特徴に基づいて、通常の技術を有する医療または獣医学従事者により決定され得る。薬学的有効量の投与は、個々の投与単位または複数のこれより少ない投与単位の形態での単回投与によって実施することが可能であり、また分割した用量を特定の間隔で複数回投与することによっても実施することが可能である。あるいは、長期間にわたる持続注入として投与を実施してもよい。

## 【0076】

10

本発明の組成物を単位投与剤形、すなわち、1つの単位用量または複数もしくは小単位の単位用量を含む別個の部分の形態に製剤化し得ることが理解されよう。

## 【0077】

化合物の用量は特定の化合物の活性および治療する病態に応じて異なるが、指針として述べると、0.1～20mg/(kg体重・日)の範囲、具体的には0.1～5mg/(kg体重・日)の範囲で選択される用量が適切な場合が多いが、化合物によって生じる有害な副作用のレベルが低いことを考えて、これよりも高い用量、例えば、0.1～50mg/(kg体重・日)の範囲(または場合によっては、米国特許第4,197,249号に記載されているものと同程度の高用量)を考慮に入れる場合もある。この投与レジメンは、必要に応じて1日量を複数の別々の投与に分割して、問題の患者に適する日数だけ継続することができる。したがって、例えば進行性乳癌、非ホジキンリンパ腫および肝細胞癌などの病態の場合、1日治療した後、21日などの間隔を空けて反復投与するのが適切であり得るのに対して、急性非リンパ球性白血病の治療では、5日間連続の治療がより適切であり得る。

20

## 【0078】

本発明の第四の態様は、医療(臨床および/または獣医学)に使用するための、本発明の第一の態様による化合物を提供する。

## 【0079】

本発明の第五の態様は、細胞毒素またはその低酸素活性化プロドラッグに使用するための、本発明の第一の態様による化合物を提供する。

30

## 【0080】

一実施形態では、化合物は、細胞毒素またはその低酸素活性化プロドラッグとしてin vivoで使用するためのものである。

## 【0081】

「その低酸素活性化プロドラッグ」は、化合物が低酸素条件下にあるか、低酸素条件に曝露された後、優先的に細胞毒性となる(すなわち、低酸素条件下にあるか、低酸素条件に曝露された後に優先的に高い細胞毒性を示す)ことを包含するものとする。例えば、式V、VI、IXおよびXの化合物などの本発明のN-オキシド化合物は、正常酸素濃度条件下では比較的無細胞毒性であるが、低酸素条件下では容易に還元されて式III、IV、VIIおよびVIIIなどの細胞毒性化合物を生じる。

40

## 【0082】

この文脈において、「低酸素」は、電極法によって直接測定したときの酸素化レベルが4%以下(または23mmHg)であると考えられ得る。例えば、酸素化のレベルは3.0%、2.5%、2%、1.5%、1%または0.5もしくは0.1%未満であり得る。

## 【0083】

当業者には、低酸素に誘発される化合物の細胞毒性作用の活性化をin vitroまたはin vivoのいずれかで判定し得ることが理解されよう。

## 【0084】

例えば、細胞毒性を直接電極法によって測定される様々な酸素化レベルにおいてin

50

v i t r o で判定し得る。

【 0 0 8 5 】

あるいは、組織の酸素化のレベルを例えれば、酵素検出アッセイ調べた組織切片を用いて、または遺伝子発現解析によって、間接的に測定し得る。

【 0 0 8 6 】

i n v i v o で低酸素に誘発された細胞毒性の確認には、システムおよび O x y L i t e システムの両方を用いて、生きている組織の酸素化レベルを判定し得る（例えば、W en l a , 2 0 0 8 , R a d i a l R e s . 1 6 9 : 6 7 - 7 5 を参照されたい）。

【 0 0 8 7 】

ほかにも、血流分析および灌流分析の結果から所与の組織における低酸素の存在を推測し得る。血流量を変化させるまたは血管形成を阻害する薬剤を適用しても、第一原理的に罹患組織における酸素化を減少させることが予想される。

【 0 0 8 8 】

本発明は特に、哺乳動物（中でも注目すべきはヒト）の癌の治療に使用するための本発明の第一の態様による化合物を提供する。

【 0 0 8 9 】

例えば、化合物は膀胱癌、乳癌、骨癌（原発性および続発性、例えば骨肉腫およびユーリング肉腫など）、脳癌（多形神経膠芽腫および星状細胞腫を含む）、子宮頸癌、絨毛癌、結腸および直腸癌、子宮内膜癌、眼癌、胆嚢癌、胃癌、妊娠性腫瘍、頭頸部癌、腎臓（腎細胞）癌、喉頭癌、白血病（A L L 、 A M L 、 C L L 、 C M L および毛様細胞性白血病など）、肝臓癌、肺癌、リンパ腫（ホドキンリンパ腫（H o d k i n ' s l y m p h o m a ）および非ホドキンリンパ腫（n o n - H o d k i n ' s l y m p h o m a ）など）、黒色腫、中皮腫、口腔癌、骨髄腫、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、食道癌、卵巣癌、腋臓癌、陰茎癌、前立腺癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、腔癌、外陰癌ならびに子宮癌からなる群より選択される癌の治療に使用するためのものであり得る。

【 0 0 9 0 】

一実施形態では、化合物は、様々な形態の肉腫および癌腫などの固形腫瘍の治療に使用するためのものである。

【 0 0 9 1 】

本発明の化合物は、本来少なくとも部分的に低酸素である（例えば、酸素レベル中央値が3%未満、例えば2.5%、2%、1.5%、1%または0.5%未満である）腫瘍の治療に特に有用であり得る。このような腫瘍の例には腋臓癌および前立腺癌があり、ともに通常、低い酸素レベルおよび悪性進行の傾向を示す。

【 0 0 9 2 】

本発明のプロドラッグ化合物の細胞毒性が低酸素により活性化されることによって、細胞毒性を腫瘍細胞に標的化し、健常細胞への損傷のリスクを低減することが可能になる。

【 0 0 9 3 】

低酸素が特定の癌の悪性進行の促進に何らかの役割を果たしている可能性があると考えられている（例えば、R u d o l f s s o n およびB e r g h , 2 0 0 9 , E x p . O p i n . T h e r . T a r . 1 3 : 2 1 9 - 2 2 5 を参照されたい）。腫瘍の低酸素の領域内で優先的に細胞毒性効果を発揮することによって、本発明の化合物は、他の方法では、例えば放射線療法または従来の化学療法剤による治療に対して耐性を示す癌細胞を標的とし得る。このような耐性細胞を根絶することによって、転移を減少させ得る。

【 0 0 9 4 】

したがって、一実施形態では、化合物は、転移（癌の病因から、または治療の結果として生じ得る）の治療または予防に使用するためのものである。当業者

【 0 0 9 5 】

当業者には、本発明の化合物を単独で、または他の癌治療（放射線療法、例えば放射性同位元素および外照射、ならびに化学療法剤など；以下を参照されたい）と組み合わせて使用し得ることが理解されよう。

10

20

30

40

50

## 【0096】

一実施形態では、化合物は単独療法（すなわち、他の癌治療を一切実施しない）として使用するためのものである。しかし、癌患者にはほかにも、異なるタイプの有益な薬剤（例えば鎮痛剤、鎮静剤、抗うつ剤、抗生物質など）を投与し得ることが理解されよう。

## 【0097】

しかし、本発明の化合物は、別法として、1つまたは複数の追加の癌治療と組み合わせて使用するためのものであり得る。例えば、化合物を1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の追加の癌治療と組み合わせて使用し得る。

## 【0098】

「組み合わせて」は、同じ治療過程で1つまたは複数の追加の癌治療を受けている対象に化合物を投与することを包含するものとする。したがって、この用語には、化合物を1つまたは複数の追加の癌治療と同時に投与すること（ボーラス投与または注入として）のみならず、一時的にこれらの癌治療とは別々に投与することも含まれる。例えば、患者の腫瘍医が化合物の前、化合物と一緒に、または化合物の後に実施される1つまたは複数の追加の癌治療を含むと定めた治療スケジュール／サイクル内で、例えば、10週間、9週間、8週間、7週間、6週間、5週間、4週間、3週間、2週間、10日、1週間、5日、4日、3日、2日、1日、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、3時間、2時間、1時間、45分、30分、20分、10分または5分以内に化合物を投与し得る。各治療サイクルを数回、通常、最大6サイクル繰り返し得るが、癌の性状および治療に対するその応答に応じて、サイクルがこの数値を上回る、または下回る場合があり得る。

10

## 【0099】

当業者には、1つまたは複数の追加の癌治療が化学療法剤または放射線療法であり得ることが理解されよう。

## 【0100】

しかし、一実施形態では、1つまたは複数の追加の癌治療は1つまたは複数の化学療法および／または放射線療法を含むか、これよりなるものである。

## 【0101】

本発明のプロドラッグ化合物の細胞毒性が低酸素により活性化されることを考慮すると、*in vivo*で腫瘍の酸素化レベルを低下させる（少なくとも一時的に）ことが可能な1つまたは複数の化学療法剤および／または放射線療法との併用療法の一部としてこれを投与するのが有利である。例えば、1つまたは複数の化学療法剤および／または放射線療法は、腫瘍の酸素濃度の中央値を3%未満、例えば、2.5%、2%、1.5%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%または0.1%未満に低下させることができるものであり得る。

30

## 【0102】

当業者には、多数の様々な手段によって、例えば、確立された腫瘍血管系の破壊、血管新生（新たな血管の形成）の阻止および／または血管収縮によって腫瘍の酸素化レベルの低下を達成し得ることが理解されよう。

## 【0103】

適切な癌治療法は抗アンドロゲン剤（ステロイド性および非ステロイド性）、血管破壊剤、抗血管新生剤、抗VEGFR剤、IL-8阻害剤、NO合成酵素阻害剤、血管収縮剤、血管拡張剤および放射線療法からなる群より選択され得る。

40

## 【0104】

「ステロイド性抗アンドロゲン剤」は酢酸シプロテロンを包含するものとする。

## 【0105】

「抗血管新生剤」は以下のものを包含するものとする：

(a) ベバシズマブ、アキシチニブ、パゾパニブおよびラニビズマブなどの抗VEGF抗体または抗体フラグメント、ペガブタニブナトリウム、トリプトファニル-tRNA合成酵素、AdPEDF、EYLEA、AG-013958、JSM6427、TG100801、ATG3、ラパマイシン、エンドスタチン；

50

( b ) 細胞内のシグナル伝達を遮断する薬物、例えばラパチニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ、パゾパニブおよびAZ2171など；

( c ) テトラヒドロカンナビノール(THC)およびカンナビジオール；

( d ) ロシグリタゾン、ピオグリタゾンおよびトログリタゾンなどのチアゾリジンジオン  
( e ) エルロチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ラパチニブ  
；ならびに

( f ) 細胞間のシグナルに影響を及ぼす薬物、例えばサリドマイドおよびレナリドマイドなど。

【0106】

「血管破壊剤」は、小分子(タキサン、タキソール、パクリタキセルコンプレタスタチン、CA4P、Oxi4503、アウロスタチン、ドロスタチン、コルチン、アザコルヒチノールazacolchicinol、ZD6126I、MMP活性化コルヒチン、ICT2588、DMXAA、TZT1027およびAVE8062など)および生物学的製剤(ADEPT、GDEPTおよび腫瘍血管系を標的とする抗体薬物コンジュゲート)を包含するものとする。10

【0107】

「IL8阻害剤」はレペルタキシンを包含するものとする。

【0108】

「NO合成酵素阻害剤」はN<sup>G</sup>-メチル-L-アルギニン塩酸塩(546C88；1-NMMA)、NG-ニトロ-L-アルギニン(L-NNa)、L-ニトロアルギニンメチルエステル(L-NAMe)、LG-ニトロ-L-アルギニン(L-NO-Arg)および7-ニトロ-インダゾール(7-NI)を包含するものとする。20

【0109】

「血管収縮剤」は、アルファ1アドレナリン受容体アゴニスト(例えば、メトキサミン、フェニレフリン、オキシメタゾリン、テトラヒドララジン、キシロメタゾリン)、アルファ2アドレナリン受容体アゴニスト(例えば、クロニジン、グアナベンズ、グアンファシン、-メチルドバ)およびパソプレッシン類似体(例えば、アルギニンパソプレッシンおよびトリグリシルリジンパソプレッシン)を包含するものとする。

【0110】

「血管拡張(血管盗血)剤」はアルファ-アドレナリン受容体アンタゴニスト(アルファ遮断剤)、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断剤ARB)、ベータ2-アドレナリン受容体アゴニスト(-2-アゴニスト)、カルシウムチャネル遮断剤(CCB)、中枢性交感神経遮断剤、直接作用型血管拡張剤、エンドセリン受容体アンタゴニスト、神経節遮断剤、ニトロ系拡張剤(nitrodilator)、ホスホジエステラーゼ阻害剤、カリウムチャネル開口薬およびレニン阻害剤を包含するものとする。30

【0111】

「放射線療法」は、従来の外照射放射線療法(2DXRT)、定位放射線手術(SRS)、体幹部定位放射線療法(SBRT)およびプロトン療法などの粒子線療法；SAVI(商標)、MammoSite(商標)、Contura(商標)、Proxcelan(商標)、TheraSeed(商標)およびI-Seed(商標)などの近接照射療法；メタヨードベンジルグアニジン(MIBG)、ヨウ素-131、ホルモン結合ルテチウム-177およびイットリウム-90(ペプチド受容体放射性核種療法)などの放射性同位元素療法を包含するものとする。40

【0112】

好ましい一実施形態では、1つまたは複数の癌治療法は非ステロイド性抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、フィナステリド、デュタステリド、ベキストステリド、イゾンステリド、ツロステリド、エプリステリドおよびアビラテロンなどである。

【0113】

したがって、一実施形態では、本発明の第一の態様による化合物を癌の治療、例えば、転移の予防または減少にピカルタミドと組み合わせて使用する。

【0114】

したがって、一実施形態では、本発明の第一の態様による化合物を癌化学療法剤および／または放射線療法および／または患者が呼吸する空気を減少または増加させる方法、例えばカルボゲン（ニコチンアミドを加えるものまたは加えないもの）と組み合わせて使用する。

【0115】

関連する本発明の第六の態様は、癌治療のための薬剤の調製における本発明の第一の態様の化合物の使用を提供する。

10

【0116】

本発明の第六の態様の好ましい実施形態は、本発明の第五の態様に関連して上に記載されるものである。

【0117】

本発明の第七の態様は、治療有効量の本発明の第一の態様の化合物を患者に投与することを含む、患者の癌を治療する方法を提供する。

【0118】

一実施形態では、患者は哺乳動物（例えば、ヒト）である。

【0119】

本発明の第七の態様の好ましい実施形態は、本発明の第五の態様に関連して上に記載されるものである。

20

【0120】

本発明の第八の態様は、細胞の酸素化レベルのマーカーとしての本発明の第一の態様の化合物の使用を提供する。具体的には、このような化合物を *in vitro* または *in vivo* のいずれかで細胞低酸素マーカーとして使用し得る。

【0121】

一実施形態では、細胞は哺乳動物（例えば、ヒト）のものである。

【0122】

N-オキシド型の本発明の化合物（式VおよびVIの化合物など）を低酸素細胞に曝露すると、この細胞が対応するアミン型（式IIIおよびIVのものなど）に還元され、既知の手段によってこれを容易に検出することができる。

30

【0123】

還元化合物（式IIIおよびIVの化合物など）の存在を用いて、低酸素細胞を *in vitro* または *in vivo* で検出することができる。還元化合物（1つまたは複数）によって本来の蛍光特性が保持され、還元化合物（1つまたは複数）が細胞内に存在し続けることは、低酸素条件に曝露されていたか、曝露され続けている細胞の識別、定量化および位置特定に有利である。

【0124】

例えば、低酸素の細胞マーカーとして作用する場合、特に限定されないが質量分析法、赤外線分光測定法、比色定量法、ラマン分光法、核磁気共鳴法または陽電子放射断層撮影法を含めた化学組成物または物理的特性を確認する方法（1つまたは複数）を用いて、還元化合物（式IIIおよびIVの化合物など）を検出し得る。アフィニティーキャプチャ法では、還元化合物のDNAまたは合成ポリヌクレオチド配列との高親和性結合能を利用する。

40

【0125】

還元化合物（1つまたは複数）の光学的特性を用いて生物試料中の化合物を検出してよく、このようなものとしては、特に限定されないが、還元化合物の本来の蛍光特性を用いるフローサイトメトリーおよび顕微鏡法が挙げられる。還元化合物を検出する第二の方法としては、特に限定されないが、還元化合物がアクセプターまたはドナーのいずれかとして共鳴エネルギー転移反応に関与する、他の分子のレポーター化合物との結合が挙げら

50

れる。還元化合物を検出するその他の第二の方法としては、特に限定されないが、分子検出のための抗体ベースの方法を用いる方法が挙げられる。

**【0126】**

一実施形態では、本発明の化合物を用いて低酸素腫瘍細胞を *in vivo* で特定し、次いで、これを *in situ* で可視化するか、外科的に切除する。

**【0127】**

さらなる実施形態では、本発明の第一の態様の化合物を非重水素化型の本発明の第一の態様の化合物と組み合わせて、細胞低酸素マーカーとして使用する。

**【0128】**

この文脈における「組み合わせて」は、化合物を同時にまたは逐次的に（例えば、24時間、12時間、6時間、4時間、3時間、2時間、1時間、30分、30分、10分またはこれ以下以内に）細胞に適用（例えば、患者に投与）し得ることを包含する。  
10

**【0129】**

したがって、好ましい実施形態では、式IXまたはXの化合物を米国特許第5,132,327号に開示される化合物（例えば、AQ4N）と組み合わせて、細胞低酸素マーカーとして（*in vivo* または *in vitro* で）使用する。

**【0130】**

関連する本発明の第九の態様は、本発明の第一の態様による化合物を含む、細胞の酸素化レベルの検出に使用するための部分のキットを提供する。

**【0131】**

任意選択で、キットは非重水素化型の本発明の第一の態様による化合物（米国特許第5,132,327号に開示される化合物、例えばAQ4Nなど）をさらに含む。  
20

**【0132】**

好ましくは、化合物（1つまたは複数）を無菌、無発熱物質の形態で提供する。

**【0133】**

本発明のキットは1つまたは複数の試薬、対照試料および／または指示書をさらに含み得ることが理解されよう。

**【0134】**

これより以下の図面を参照しながら、本発明の特定の態様を具体的に示す好ましい非限定的な例を記載する。  
30

**【図面の簡単な説明】**

**【0135】**

【図1】代謝産物AQ4NおよびOCT1001は正常酸素化条件下でほぼ同じ細胞周期停止作用を有し、選択的重水素化が内因性の生物活性を変化させないことを示す図である。実施例Bを参照されたい。

【図2】AQ4NおよびOCT1002のほぼ同じ低酸素活性化細胞毒性を示す図である。実施例Bを参照されたい。

【図3】AQ4NおよびOCT1002の生物活性が低酸素の程度に依存することを例示する図である。実施例Bを参照されたい。

【図4】AQ4NおよびOCT1002による低酸素依存性の増殖阻害が細胞周期のほぼ同じ機序から生じ、低酸素の程度に依存することを示す図である。実施例Bを参照されたい。  
40

【図5A】酸素条件下におけるAQ4NとOCT1002に共通する機能性p53(DoHH2)および変異体p53(SU-DHL-4)ヒトB細胞リンパ腫に対する生物活性を例示する図である。実施例Bを参照されたい。

【図5B】酸素条件下におけるAQ4NとOCT1002に共通する機能性p53(DoHH2)および変異体p53(SU-DHL-4)ヒトB細胞リンパ腫に対する生物活性を例示する図である。実施例Bを参照されたい。

【図6】低酸素下でのOCT1001赤外蛍光発色団の細胞内蓄積がOCT1002プロドラッグ投与量および酸素化レベルに応答性であることを示す図である。実施例Bを参照  
50

されたい。

【図7】重水素化は代謝産物（AQ4またはOCT1001）が細胞内に蓄積する内因性の能力に影響を及ぼさないことを示す図である。実施例Bを参照されたい。

【図8】変換されたプロドラッグOCT1001の蓄積が増殖停止と相関することを示す図である。実施例Bを参照されたい。

【図9A】低酸素条件下でOCT1002に曝露した後の細胞内蛍光およびプロドラッグ重水素化が細胞内蓄積を減少させるが、代謝産物の残留は増大させることを実証する図である。実施例Bを参照されたい。

【図9B】低酸素条件下でOCT1002に曝露した後の細胞内蛍光およびプロドラッグ重水素化が細胞内蓄積を減少させるが、代謝産物の残留は増大させることを実証する図である。実施例Bを参照されたい。  
10

【図10】異種移植片として増殖した22Rv1前立腺腫瘍の酸素化に対するビカルタミドの効果を示す図である。実施例Cを参照されたい。

【図11】22Rv1腫瘍異種移植片の血管に対するビカルタミドの効果を示す図である。実施例Cを参照されたい。

【図12】マウスの22Rv1異種移植片に対するビカルタミド単回投与またはAQ4N単回投与またはOCT1002単回投与の効果を示す図である。実施例Cを参照されたい。

【図13】ビカルタミドで連日処置したマウスの22Rv1異種移植片に対するAQ4N単回投与またはOCT1002単回投与の複合効果を示す図である。実施例Cを参照されたい。  
20

【図14】ビカルタミド処置 / 未処置マウスのLNCaP異種移植片に対するOCT1002の効果を示す図である。実施例Cを参照されたい。

【図15】OCT1002がin vitroの低酸素LNCaP腫瘍細胞内で還元されることを示す図である。実施例Cを参照されたい。

【図16】OCT1002がLNCaP腫瘍の肺への転移拡散を低減することを示す図である。実施例Cを参照されたい。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0136】

実施例A：アルキルアミノアルキルアミノアントラキノンおよびそのN-オキシドの合成  
30

(a) 1,4-ジフルオロ-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンの調製

##### 【化8】



4,7-ジフルオロイソベンゾフラン-1,3-ジオン（8.50 g、46.2 mmol）、ヒドロキノン（5.64 g、51.3 mmol）、三塩化アルミニウム（36.9 g、277 mmol）およびスルホラン（10 mL）の化合物を165℃で16時間攪拌した。約150まで混合物が粘稠性の赤色のシロップにならないため、反応物は効率的に溶解した。突然の発熱およびHClガス発生の危険性を最小限に抑えるため、反応物を一部ずつ攪拌し、氷浴中で冷却し、混合が十分になるまで再び攪拌した。そのとき初めて混合物を加熱した。  
40

##### 【0137】

混合物を氷中に注加し、2M HCl（50 mL）を加えた。混合物を攪拌した後、ろ過し、得られたスラリーを2M HClでさらに洗浄した。固体を2M HClでさらに  
50

3回、再スラリー化して、生成物のアルミニウム含有量を減らした。最終的なスラリーをエーテルで2回洗浄し、一定重量になるまで丸底フラスコ中、60℃で乾燥させて、1,4-ジフルオロ-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン(9.82g、35.6mmol、収率77%)を得た。

## 【0138】

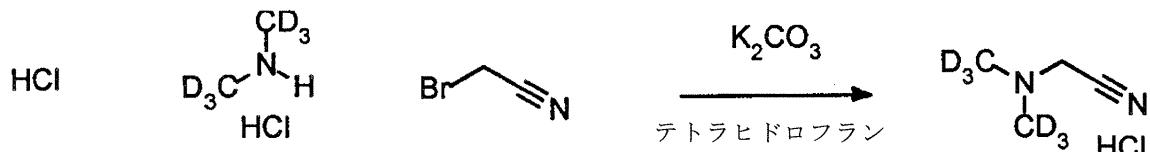
<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)に不純物は認められず、所望の物質と一致していた。

## 【0139】

(b) 1,4-ビス-[{[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ)エチル]アミノ}-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンの調製

## 【化9】

10



丸底フラスコ中の重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミン塩酸塩(18.4g、210mmol)と2-ブロモアセトニトリル(14.63ml、210mmol)の無水THF(250mL)懸濁液を激しく攪拌しながら-10℃に冷却し、一部ずつ炭酸カリウム(58.1g、420mmol)で処理した。塩基を加えた後、反応物を還流冷却器および風船型フラスコに入れ、2時間にわたって緩やかに5℃に温めた。TLC(1:1のEt<sub>2</sub>O/c<sub>1</sub>/イソ-ヘキサン)により生成物の存在が示された。混合物を室温で週末の間攪拌した。

20

## 【0140】

残渣をDCM(250mL)で希釈してろ過し、多量のDCMで洗浄した。母液をN<sub>2</sub>で1時間脱気した後、ロータリーエバポレーターで体積を半減させた。次いで、塩化水素の4Mジオキサン溶液(52.5ml、210mmol)を加えて白色固体を沈殿させ、混合物を10分間静置した後、DCMで洗浄しながらろ過して、重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアセトニトリル(21.73g、172mmol、収率82%)を得た。

## 【0141】

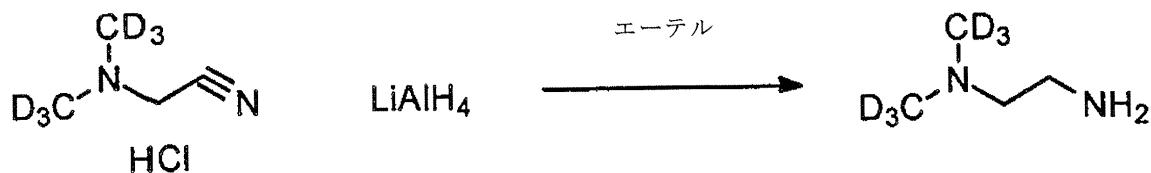
30

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): 4.47(2H, s)は所望の物質と一致していた。

## 【0142】

(c) 重水素化-d<sub>6</sub>-N,N-ジメチルエチレンジアミンの調製

## 【化10】



40

0℃で攪拌している重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアセトニトリル(21.72g、172mmol)のEt<sub>2</sub>O(200mL)懸濁液に水素化アルミニウムリチウムの1Mエーテル溶液(515ml、515mmol)を滴下漏斗で1.5時間にわたって滴加した。滴加後、冷却浴を取り外した。さらに1.5時間経過した後、硫酸ナトリウム十水和物(LiAlH<sub>4</sub>に対して0.5当量、80g)を1.5時間にわたって慎重に加え(反応を遅らせて)、1.5(18以下)で反応を停止させた。混合物を1時間、攪拌しながら放置した後、エーテルで洗浄しながらろ過した。ろ液を暗所で一晩保管した。ロータリーエバポレーターで真空をかけずに約40℃でエーテルを除去して、重水素化-d<sub>6</sub>-N,N-

50

-ジメチルエチレンジアミン(15.89g、16.0mmol、収率93%に不純物は認められず、所望の物質と一致していたが、約0.25当量のエーテルが含まれていた)。

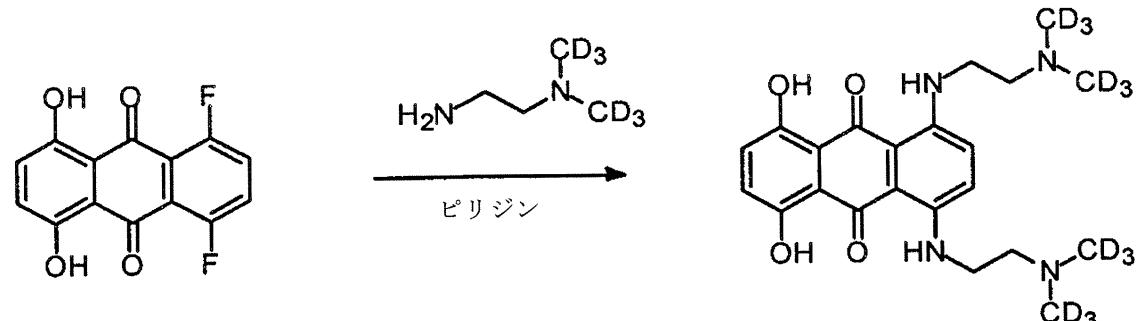
**【0143】**

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.76 (2H, t), 2.33 (2H, t)。

**【0144】**

(d) 1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシ-アントラセン-9,10-ジオン(「OCT1001」)の調製

**【化11】**



10

1,4-ジフルオロ-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン(4.9g、17.74mmol)のピリジン(35mL)溶液を一定な流れの重水素化-d<sub>6</sub>-N,N-ジメチルエチレンジアミン、(16.57mL、14.2mmol)で処理した。混合物を40℃に温め、窒素流下で24時間、攪拌した。反応物を除熱し、氷浴中で冷却した。冷却した水酸化アンモニウム(30%、30mL)とブライン(30mL)の混合物を加え、得られた混合物を氷浴中、2時間攪拌した。2時間後、混合物を10%水酸化アンモニウム溶液(130mL)で洗浄しながらろ過した。固体を30分間空気乾燥させた後、風袋重量を測定したフラスコに移し、60℃、真空下で一定重量になるまで(約2時間)乾燥させた。

**【0145】**

バルク原料をDCMに負荷し(脱脂綿プラグを通す)、6%、次いで10%のMeOH(1%NH<sub>3</sub>を含有)/DCMで溶離するフラッシュクロマトグラフィー(Biotage、120g)により精製して、1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン(2.01g、4.73mmol、収率26.7%)を得た。

**【0146】**

生成物をLCMS(m/z 425.3(M+H)<sup>+</sup>(ES<sup>+</sup>)により分析した; 0.90分および1.03分において423.2(M-H)-(ES)-(カラム上の生成物スマア)、100%。

**【0147】**

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)に不純物は認められず、所望の物質<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 13.51 (2H, s), 10.40 (2H, br t), 7.17 (2H, s), 7.11 (2H, s), 3.47 (4H, q), 2.66 (4H, t)と一致していた。

**【0148】**

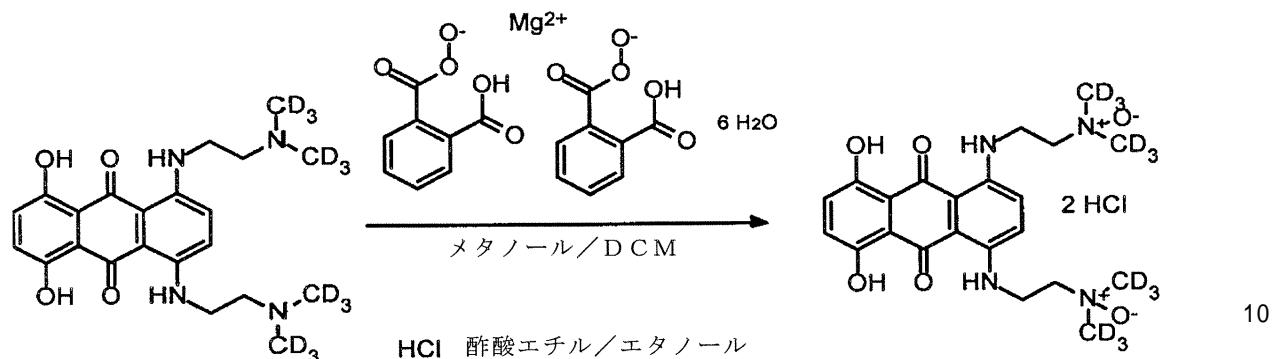
(e) 1,4-ビス-[2-(重水素化-d<sub>6</sub>-ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン(「OCT1002」)の調製

20

30

40

## 【化12】



-11に冷却した攪拌している281-041(1.90g、4.48mmol)、AQ4のメタノール(8mL)/DCM(30mL)溶液にモノペルオキシフタル酸マグネシウム、MMP4(3.10g、6.27mmol)を含有するメタノール(8mL)懸濁液を滴加した。添加完了後、反応溶液を0℃に温め、暗所で一晩攪拌した(この間、室温に温めた)。予め冷却したEtOAc(30mL)およびEtOH(6mL)を反応混合物に0℃で加えた。この混合物を30分間攪拌した後、塩化水素の4Mジオキサン溶液(4.48mL、17.90mmol)を約-10~-15℃で滴加した。次いで、得られたスラリーを10分間攪拌した後、EtOH/水(9:1、100mL)、MeOH/EtOAc(1:1、100mL)およびEtOAc(60mL)で洗浄しながら過し、真空下(ロータリーエバポレーターで)、40℃で2時間(一定重量)乾燥させて、1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン(2.15g、3.99mmol、収率89%)を濃青色の粉末として得た。

## 【0149】

生成物をLCMS(標準的な4分の方法、agilent)、3.07分においてm/z 458.2(M+H)<sup>+</sup>(ES<sup>+</sup>)、254nmにおける純度98.3%により分析した。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O) : 6.73(2H, br s), 6.43(2H, br s), 3.76(4H, br s), 3.58(4H, br s)。

## 【0150】

<sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O)は所望の物質と一致していた。

## 【0151】

実施例B: 1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオンおよびその活性代謝物のin vitro特性

(a)代謝産物AQ4とOCT1001は正常酸素化条件下でほぼ同じ細胞周期停止作用を有し、このことは、選択的重水素化が内因性の生物活性を変化させなかったことを示している。

・従来の付着細胞のための方法を用いてA549ヒト肺癌細胞を培養し、37℃、空気中の二酸化炭素5%の標準的な細胞培養条件下、0、1、3または10nMの薬剤に4日間曝露した。回収した細胞を透過処理し、DNA蛍光色素の臭化工チジウムで染色し、従来のフローサイトメトリーにより細胞周期分布を明らかにした。

・図1(フローサイトメトリー)は、外因性代謝産物の1,4-ビス-[2-(ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン('AQ4')および1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチルアミノ)エチル]アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン('OCT1001')に曝露した細胞の3~10nMにおけるDNA含有量分布のG2ピークの増大(細胞周期停止を示す)がほぼ同じであることを示している。

## 【0152】

(b)低酸素により増大するAQ4NおよびOCT1002の細胞毒性はほぼ同じであ

10

20

30

40

50

る

・空気中または1%酸素条件下、ヒトT細胞白血病細胞（Jurkat）を様々な濃度のAQ4NまたはOCT1002の存在下で従来の懸濁培養の方法を用いて4日間培養した。従来のコールターカウンター粒子計数法を用いて相対細胞数を求めた。

・図2は、被験化合物が細胞増殖の阻害に低酸素条件を必要とするこことを示している。したがって、1,4-ビス-[2-(ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン（「AQ4N」）および1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチル-アミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシ-アントラセン-9,10-ジオン（「OCT1002」）はともに、低酸素条件下（1%酸素）で顕著な細胞分裂阻害活性を示す。10

・対照については、低酸素症により直接作用型DNAトポイソメラーゼ阻害剤（VP-16）の細胞分裂阻害活性は変化せず、ほぼ同じレベルの細胞分裂阻害活性の延長がもたらされることを示している。

#### 【0153】

(c) AQ4NおよびOCT1002の生物活性が低酸素の程度に依存することの例示  
・従来の付着細胞のための方法を用いてA549ヒト肺癌細胞を培養し、37、空気中の二酸化炭素5%（酸素正常）の標準的な細胞培養条件下または低酸素（1%および3%）条件下、様々な濃度のAQ4NおよびOCT1002剤に4日間曝露した。

・データを曝露期間の開始時および終了時における細胞剥離および細胞密度のコールターカウンター粒子計数によって求めた相対的な細胞集団倍加数としてプロットする。20

・図3は、被験化合物、すなわち1,4-ビス-[2-(ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシ-アントラセン-9,10-ジオン（「AQ4N」）および1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチル-アミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン（「OCT1002」）では、増殖阻害が低酸素の程度および薬物濃度に依存し、2種類の薬剤がほぼ同じ応答を示すことを示している。

#### 【0154】

(d) AQ4NおよびOCT1002による低酸素増感

・この実験にはA549ヒト肺癌細胞を使用し、培養条件は上の(c)に記載される通りのものであった。30

・上の(a)に記載される通りに細胞周期分析を実施した。

・図4は、被験化合物、すなわち1,4-ビス-[2-(ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシ-アントラセン-9,10-ジオン（「AQ4N」）および1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチル-アミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシ-アントラセン-9,10-ジオン（「OCT1002」）が生物活性薬物量の範囲内でほぼ同じ細胞周期停止（フローサイトメトリーによって求められる）をもたらすことを示している。

・後期細胞周期停止の程度は酸素化レベルが減少するにつれて増大する。

#### 【0155】

(e) 低酸素条件下におけるAQ4NとOCT1002に共通するp53機能性および変異体p53ヒトB細胞リンパ腫細胞系に対する生物活性の例示

・ヒトB細胞リンパ腫細胞を空気中、1%酸素化条件または3%酸素化条件で、従来の懸濁培養の方法を用いて、様々な濃度のAQ4NまたはOCT1002の存在下で4日間培養した。従来のコールターカウンター粒子計数法を用いて相対細胞数を求めた。

・図5(A)は、被験化合物が21%（丸）、3%（三角）または1%（四角）O<sub>2</sub>下で4日間、懸濁液中で培養しプロドラッグに曝露したDoHH2ヒトB細胞リンパ腫細胞（bcl2過剰発現；p53wt）に対して、低酸素条件下で同程度にかつ選択的に細胞毒性であることを示している。したがって、1,4-ビス-[2-(ジメチルアミノ-N-オキシド)エチル]アミノ)-5,8-ジ-ヒドロキシアントラセン-9,10-ジオン（「AQ4N」）および1,4-ビス-[2-(重水素化-d6-ジメチル-アミノ-

- N - オキシド)エチル]アミノ) - 5 , 8 - ジ - ヒドロキシ - アントラセン - 9 , 10 - ジオン(「OCT1002」)はともに、低酸素(1%酸素)条件下で顕著な細胞分裂阻害活性を示し、増殖阻害は低酸素の程度に感受性である。

・同様に、図5(B)は、プロドラッグAQ4NおよびOCT1002が21%(丸)、3%(三角)または1%(四角) $\text{O}_2$ 下で4日間、懸濁液中で培養しプロドラッグに曝露したSU-DHL-4ヒトB細胞リンパ腫細胞(bcl2過剰発現; p53変異体)に対して、低酸素条件下で同程度に選択的に細胞毒性であることを示している。同様に、増殖阻害は低酸素の程度に感受性である。

### 【0156】

(f)負荷した $\text{pO}_2$ レベルと最終産物生成の程度との間の相互関係  
10  
・OCT1002およびAQ4Nは、生物学的に関連する範囲の低酸素において、負荷した $\text{pO}_2$ レベルと最終産物生成の程度との間の相互関係を示し、酸素正常下で変換が低レベルか検出不可能なレベルである(また、AQ4NまたはOCT1002が検出不可能なレベルであることは、代謝産物が主要な残留するアントラキノン形態であることを示している)。

・AQ4Nに比べて、重水素化変異型のOCT1002は、長時間にわたる曝露条件下で瀕死細胞内での全体的な還元/蓄積能の低下(HPLC分析)を示し、このことは、ヒト肺癌細胞系における「不必要的標的化」の減少を示している。この場合、プロドラッグの不必要的標的化は、細胞周期停止が起こったときでもプロドラッグの変換が継続し得るために細胞不活化に必要とされるよりも過剰に細胞毒性型を生成することを指す。過剰な生成の結果、最初の標的細胞から放出されたときに変換型の有害作用が増大する。最初に低酸素条件に曝されていない周辺組織に対するこの望ましくないバイスタンダー効果は、非標的正常細胞および腫瘍細胞を含むことになる。正常細胞に対する損傷が望ましくないのは明らかである。バイスタンダー効果により非標的腫瘍細胞が適量下で曝露されると、組み合わせて送達される他の薬剤(1つまたは複数)に対する応答が低下するか、薬物耐性の発現に選択的な条件が発生し得る。

・表1は、ヒトA549細胞を様々な程度の低酸素および濃度下でAQ4NおよびOCT1002に曝露した後の代謝産物生成のHPLC分析の比較(データは2つの測定から得られたもの)を示し、ここでは21%が正常な酸素化条件下であると見なされている。

・データは、示される条件に曝露し洗浄した後にプロドラッグまたはその代謝産物の存在をアッセイした細胞において、OCT1001の生成がAQ4と比較して一貫して減少していることを示している。データはほかにも、低酸素に供した細胞中に存在する分子型が代謝産物であって、親プロドラッグではないことを示している。

### 【0157】

#### 【表1】

プロドラッグ (OCT1001 または AQ4)の投与量	加湿酸素化条件	細胞 $10^5$ 個当たりに生成した代謝産物のpmole数 <sup>a</sup>	相対的なプロドラッグから代謝産物への還元
---------------------------------------	---------	---	----------------------

nM×日数	%	pO <sub>2</sub> mmHg	AQ4	OCT1001	AQ4の範囲	OCT1001の範囲	OCT1001/AQ4
30	1%	7.1	9.25	5.64	1.46	1.20	0.61
30	3%	21.4	0.78	0.49	0.05	0.06	0.62
30	21%	142.2	<0.10	0.10	0.03	0.02	1.02
100	1%	7.1	>42.95	16.17	6.59	8.16	<0.38
100	3%	21.4	5.58	1.93	1.13	0.16	0.35
100	21%	142.2	0.23	0.11	0.08	0.03	0.50

10

20

30

40

50

<sup>a</sup> いずれの試料においても A Q 4 N または O C T 1 0 0 2 が検出されないことは、受けた代謝によってプロドラッグ形態がすべて枯渇したか、用いる方法によってこのような形態が細胞内に容易に保持されないことを示している。

#### 【 0 1 5 8 】

( g ) 低酸素下での O C T 1 0 0 1 遠赤外蛍光発色団の細胞内蓄積は、O C T 1 0 0 2 プロドラッグ投与量および酸素化レベルに応答する

- 付着 A 5 4 9 細胞を従来の方法によって培養し、空気中、1 % 酸素化レベルまたは 3 % 酸素化レベルで 0 、 3 0 または 1 0 0 n M の O C T 1 0 0 2 に 4 日間曝露した。従来のフローサイトメトリーおよび波長 6 3 3 n m の励起を用いて、剥離細胞を遠赤外蛍光強度について分析した (  $1 \times 1 0 ^ 4$  個の細胞を分析した ) 。

10

- 図 6 は、平均蛍光強度がプロドラッグ投与量の一次関数として増大し、酸素化レベルに依存することを示している。これは、細胞集団において優勢な p O<sub>2</sub> レベルを分析するための簡便で蛍光定量的な単一生細胞の分析方法を提供するものである。

#### 【 0 1 5 9 】

( h ) 重水素化は活性代謝物 ( O C T 1 0 0 1 ) の内因性の蓄積能に影響を及ぼさない

- この実験には、上の ( g ) に記載される通りに A 5 4 9 ヒト肺癌細胞を使用した。
- 酸素正常条件下では、細胞内に O C T 1 0 0 1 および A Q 4 のほぼ同じレベルの蓄積が観察された ( 図 7 を参照されたい ) 。したがって、酸素正常下で A Q 4 または O C T 1 0 0 1 に曝露した細胞の蛍光の集団分布を重ね合わせたヒストグラムは、ほぼ同じ細胞蓄積能を示している。

20

#### 【 0 1 6 0 】

( i ) 変換されたプロドラッグ O C T 1 0 0 1 の蓄積は増殖停止 ( 瀕死細胞の増大 ) と相關する

- この実験には、光側方散乱 ( 波長 4 8 8 n m ) を蛍光強度 ( 波長 6 9 5 n m 超 ) に対して収集したことを除いて、上の ( g ) に記載される通りに A 5 4 9 ヒト肺癌細胞を使用した。

- 図 8 は、2 1 % 、 3 % および 1 % 酸素下で 0 、 3 0 および 1 0 0 n M の O C T 1 0 0 2 に 4 日間にわたって曝露した細胞について収集されたフローサイトメトリーデータを示している。

- 全データポイントのプロットから、光側方散乱パラメータの増大 ( 増殖停止による細胞の大きさおよび複雑性の増大を反映している ) が蛍光強度の増大 ( O C T 1 0 0 1 の共蓄積を示している ) と相關することがわかる。

30

#### 【 0 1 6 1 】

( j ) 低酸素条件下で O C T 1 0 0 2 に曝露した後の細胞内蛍光およびプロドラッグ重水素化が細胞内蓄積を減少させるが、代謝産物の残留は増大させることの実証

- 従来の方法を用いて A 5 4 9 細胞を培養し、チャンバースライドのガラス基質に付着させ、低酸素下で O C T 1 0 0 2 に曝露した。生細胞の蛍光造影には、赤色線レーザー励起を用いた従来の共焦点蛍光顕微鏡を使用した。

- 図 9 a は、細胞に検出された遠赤外蛍光が細胞質蓄積の領域の証拠から細胞内にある ( 対照培養物にはバックグラウンド蛍光は検出されない ) ことを示している。データは、単一細胞レベルにおいて重水素化プロドラッグが単一細胞の低酸素を感知することを裏付けるものである。

40

- 低酸素下における O C T 1 0 0 2 から O C T 1 0 0 1 への変換による細胞内蛍光が確認されたことを考慮して、さらに A 5 4 9 ヒト肺癌細胞を使用して、上の ( g ) に記載される通りにフローサイトメトリーを用いて代謝産物の差次の蓄積または滞留を評価した。 1 % 酸素下で A Q 4 N または O C T 1 0 0 2 に曝露した後、細胞を分析のために剥離するか、剥離およびフローサイトメトリーによる分析の前に洗浄して無薬物培地で 2 4 時間インキュベートし正常酸素化条件下に置いた。

- 図 9 b のフローサイトメトリーのデータは、低酸素下の A 5 4 9 では、A 5 4 9 細胞をプロドラッグの O C T 1 0 0 1 および A Q 4 に曝露した後に細胞内蓄積が減少したこと (

50

4日間の曝露後)に加えて、代謝産物AQ4に起因する蛍光に比べて代謝産物OCT1001に起因する細胞内蛍光の損失が減少したこと(曝露後24時間の回復後)を示している。したがって、重水素化が、低酸素により変換された形態のOCT1002のin situ細胞内区画の負荷/滞留を変化させる。

### 【0162】

#### 結論

以上の試験は、本発明の例示的な重水素化化合物(N-オキシドプロドラッグのOCT1002およびその活性代謝物のOCT1001)のin vitro特性を明らかにするものである。

(a) 様々な腫瘍細胞型に増殖停止を誘発する低酸素におけるプロドラッグ還元後の主要な生物活性の証拠；  
10

(b) 還元薬物(OCT1001)の同程度に効果的な毒性に対して、酸素正常状態におけるOCT1002の細胞に対する毒性は有意に低い。

(c) 生物学的に関連する低酸素の範囲におけるpO<sub>2</sub>レベルと最終生成物生成との間の相互関係；

(d) 細胞内蛍光が、低酸素環境を検知および報告する代謝産物のsituation生成を報告する能力；

(e) 物理化学的方法によってプロドラッグの変換および代謝を追跡するのに使用し得る、部位特異的重水素化によって得られる明確な分子的/原子的痕跡；ならびに

(f) プロドラッグの重水素化により、低酸素下で還元型の蓄積が減少するが、外部薬物を除去し再酸素化すると還元型の残留/滞留が増加する。瀕死細胞で明らかにされたこの特性は、重水素化型の不必要的標的化の低減および低酸素感知用途に便利なシグナル残留の両方を裏付けるものである。  
20

### 【0163】

#### 実施例C-OCT1002の腫瘍増殖および転移に対するin vivoでの効果

本発明のプロドラッグ化合物の細胞毒性が低酸素により活性化されることを考慮すると、in vivoで腫瘍の酸素化レベルを低下させる(少なくとも一時的に)ことが可能な1つまたは複数の化学療法剤および/または放射線療法との併用療法の一部としてこれを投与するのが有利であり得る。ビカルタミド(Casodex、Cosudex、Calutide、Kalumidとして市販されている)は、前立腺癌の初期段階の治療のための単独療法として使用される場合を含め、前立腺癌の治療に使用される経口非ステロイド性抗アンドロゲン剤である。22Rv1はヒト前立腺癌上皮細胞系である(Sramkoski RM, Pretlow TG 2nd, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999 Jul-Aug; 35(7): 403-9)。この細胞系は前立腺特異抗原(PSA)を発現する。ジヒドロキシテストステロンによって増殖がわずかに刺激され、可溶化液はウエスタンプロット解析によりアンドロゲン受容体抗体に免疫反応性を示す。  
30

### 【0164】

#### (i) 異種移植片として増殖した22Rv1前立腺腫瘍の酸素化に対するビカルタミドの効果

- 100~150mm<sup>3</sup>の22Rv1前立腺腫瘍を有する雄SCIDマウス(8週齢超)を溶媒(トウモロコシ油中0.1%のDMSO)またはビカルタミド(溶媒中、2mg/(kg・日))の強制経口投与により28日間、連日処置した。

- 治療開始前(第0日)、Oxyline酸素電極プローブを用いてpO<sub>2</sub>(mmHg)を測定し、これを示される日に繰り返した。

### 【0165】

【表2】

処置	処置日	平均pO <sub>2</sub> ±SD (mmHg)	有意性 (溶媒に対して)	有意性 (第0日に対して)
溶媒単独	0	15.277±11.254		
	7	14.74±4.290		
	14	3.165±3.275		
	21	2.660±1.889		
	28	3.546±1.563		
ビカルタミド (2mg/(kg・日))	0	15.277±11.254	ns	
	7	1.996±1.989	<0.05	<0.05
	14	0.486±0.107	ns	<0.05
	21	1.291±0.291	ns	<0.05
	28	11.905±0.861	<0.01	ns

表3には平均pO<sub>2</sub>値±SDが示されている。このほか、対照および第0日の値と比較したビカルタミド群の統計学的比較が示されている；ns=有意性なし。

## 【0166】

- 22Rv1細胞はSCIDマウスの背部で固形腫瘍として増殖する。
- 溶媒およびビカルタミド(2mg/(kg・日))処置マウスにおける腫瘍酸素化を28日間にわたって測定した(上の表3を参照されたい)。
- ビカルタミドは約15.3mmHg(2%酸素)から第7日には2.0mmHg(0.3%酸素)、第14日には0.5mmHg(0.1%酸素)まで腫瘍酸素化の低下を引き起こした(図10に示される通り)。この低下が約2週間持続した後、第21日および第28日(酸素化の開始レベルとの間に有意差が認められなくなるとき)以降のどこかの時点でほぼ正常な状態に回復する。
- より速く増殖する溶媒処置対照は、第7日まで酸素レベルの有意な低下を示さなかった。しかし、翌週(腫瘍の大きさに関連すると思われる)、酸素レベル中央値が約3mmHg(0.4%酸素)まで低下し、確かに回復を示している。

## 【0167】

## 結論

22Rv1固形腫瘍モデルには低酸素がみられる。ビカルタミドの添加により、腫瘍によって示される酸素レベルのパターンが変化する。低酸素が22Rv1モデルおよびこのようなモデルの単独療法(±ビカルタミド)に対する応答;ならびに併用療法におけるOCT1002の潜在的役割に関連することは明らかである。

## 【0168】

## (i) 22Rv1腫瘍異種移植片の血管に対するビカルタミドの効果

- 雄SCIDマウス(8週齢超)の背中にウインドウチャンバーを用いて背部の皮膚のひだを確保した。22Rv1腫瘍断片を移植し、処置開始前の7日間、血管化させた。
- 溶媒(トウモロコシ油中0.1%のDMSO)またはビカルタミド(溶媒中、2mg/kg)の強制経口投与によりマウスを連日処置した。
- 共焦点顕微鏡による撮像の直前、麻酔したマウスにFITC標識デキストランを静脈内注射した。
- 画像はそれぞれ、処置群当たり最小5個体の代表的なものである。
- SCIDマウス背部のウインドウチャンバー/背部皮弁で22Rv1腫瘍が増殖した。処置開始前に(A)溶媒および(E)ビカルタミド前処置群、次いで処置後第7日、第14日および第21日に(B~D)溶媒単独および(F~H)ビカルタミドについて腫瘍断片を撮像した(倍率10倍)(図11を参照されたい)。
- 7日以内では、腫瘍断片は実験期間の第0日として示される広範囲にわたる小血管の発達を示した(図11を参照されたい)。

- ・溶媒処置した腫瘍では、第14日までに血管密度がわずかな変化を示し、第21日までに小血管の数が減少した。
- ・ビカルタミド処置した腫瘍では、第7日および第14日に小血管の消失が見られ、第21日までにいくぶん回復した。これは酸素電極のデータ、すなわち、酸素化の低下およびその後の回復と一致する。

### 【0169】

#### 結論

- ・溶媒は少なくとも7日間は血管に何ら効果を示さない。第14日までに血管のわずかな剪定が見られ、第21日までにこれが明白に見られるようになる。この血管消失はビカルタミド処置した腫瘍に見られる（第7日および14日；Mingら, 2007）ものほど劇的なものではないが、この急速に増殖する溶媒処置腫瘍にこの時点でみられる血管虚脱および壊死に起因すると思われる。酸素レベルの低下はいくぶん早く、すなわち、第7日から第14日の間のどこかの時点でみられる（図10を参照されたい）。
- ・ビカルタミド処置した22Rv1腫瘍では、早期の腫瘍血管系の顕著な消失がみられる（第7日まで）。このデータは、ビカルタミドが抗血管作用を介して腫瘍酸素化の著しい低下を引き起こす証拠をもたらすものであり、これは直接的なものであるか、あるいは腫瘍細胞による血管新生促進因子の産生が阻害されたことに起因する可能性が考えられる。
- ・第21日までには小血管は回復しており、このことは、図10にみられる酸素化レベルの増大と一致している。

### 【0170】

#### (iii) マウスの22Rv1異種移植片に対するビカルタミド単独またはAQ4N単回投与またはOCT1002単回投与の効果。

- ・ $100 \sim 150 \text{ mm}^3$  の22Rv1異種移植腫瘍を有する雄SCIDマウス（8週齢超）を28日間処置した。処置には溶媒（トウモロコシ油中0.1%のDMSO）またはビカルタミド（溶媒中、2mg/（kg・日））を含め、ともに強制経口投与により連日投与した。あるいは、実験期間の第7日目、AQ4NまたはOCT1002（無菌PBS中、50mg/kg）を単回投与として腹腔内投与した。
- ・1日置きにキャリパーを用いて腫瘍体積を測定した。
- ・処置（1つまたは複数）の腫瘍体積に対する時間依存的効果を判定するためのデータ解析を実施した。腫瘍体積は第6日（すなわち、プロドラッグ追加前）に対して正規化した。時系列回帰分析を実施した。
- ・全体的な腫瘍増殖およびパターンを図12（AおよびB）と比較できるよう、腫瘍増殖を第6日に対して正規化する。
- ・22Rv1腫瘍は、in vitroでビカルタミドに対して感受性でないにもかかわらず、わずかであるが有意な増殖速度の低下を示す。増殖遅延の古典的な横断比較は、溶媒で処置したマウスが処置開始時の体積の4倍に達するのに $14.0 \pm 0.3$ 日必要であることを示していた。ビカルタミド処置（2mg/（kg・日））ではこれが $18.5 \pm 0.8$ 日に増加し、したがって、これは4.5日の増殖遅延であった。
- ・グラフの回帰適合は、ビカルタミド単独で処置した22Rv1腫瘍が、ビカルタミドに連日曝露し続けたにもかかわらず増殖の遅延を示し（第10日～20日の間）、腫瘍が第24日まで全体的な指數関数的増殖パターン（ $R^2 = 0.9915$ ）を示すことを示している。
- ・第7日に単回投与（50mg/kg）として投与したAQ4Nの追加では、ビカルタミド単独処置のものと比較して異なる増殖パターンが観察され、回帰適合が非線形性の多項増殖パターン（ $R^2 = 0.9948$ ）を示した。
- ・第7日に単回投与（50mg/kg）として投与したOCT1002の追加では、この単回投与で処置した腫瘍が多項（ $\times^2$ ）増殖速度パターンを維持することができ、これは非線形パターンでもあった（ $R^2 = 0.9978$ ）。
- ・OCT1002処置腫瘍は実験の残りの期間（第22日以降）にわたって、ビカルタミ

10

20

30

40

50

ド单独およびAQ4N单独で処置した腫瘍に比べて全体的な増殖速度の低下を示した。全期間にわたる累積増殖（累積曲線下面積）がこの差を示している（図12B）。

### 【0171】

(i v) ビカルタミドで連日処置したマウスの22Rv1異種移植片に対するAQ4N単回投与またはOCT1002単回投与の複合効果

- ・100～150mm<sup>3</sup>の22Rv1異種移植腫瘍を有する雄SCIDマウス（8週齢超）を28日間処置した。溶媒（トウモロコシ油中0.1%のDMSO）およびビカルタミド（溶媒中、2mg/（kg・日））処置を強制経口投与により連日実施した。
- ・第7日、AQ4NまたはOCT1002（無菌PBS中、50mg/kg）を単回投与として腹腔内投与した。

- ・1日置きにキャリパーを用いて腫瘍体積を測定した。
- ・腫瘍量が800mm<sup>3</sup>に達した後にマウスを間引いた。
- ・全体的な腫瘍増殖およびパターンを図13（AおよびB）と比較できるよう、腫瘍増殖を第6日に対して正規化する。

・ビカルタミド単独処置（2mg/（kg・日））は上述の通りであり、第24日まで全体的な指指数関数的増殖パターン（ $R^2 = 0.9915$ ）を示す。

・ビカルタミド処置を第7日に投与するAQ4N単回投与（50mg/kg）と組み合わせたところ、ビカルタミド単独処置のものと比較して変化した増殖パターンが観察され、回帰適合が非線形的な多項増殖パターン（ $R^2 = 0.9982$ ）を示し、第20日以降においてビカルタミド単独との増殖の相違が明らかであった。

・ビカルタミド処置を第7日に投与するOCT1002単回投与（50mg/kg）と組み合わせたところ、異なる増殖パターンが観察され、回帰適合が線形性の腫瘍増殖応答（ $R^2 = 0.9955$ ）を示し、第14日以降においてビカルタミド単独との増殖の相違が明らかであった。

### 【0172】

#### 結論

- ・併用療法は2つの極めて重要な特徴を示している。

(i) 第一の特徴は、OCT1002の方がAQ4Nよりも早くビカルタミド処置腫瘍に対して効果的な腫瘍増殖阻害を示すことであり；

(ii) 第二の特徴は持続的な腫瘍増殖阻害（線形性の応答の維持によって示される）を示すものであり、これは持続的なOCT1002および腫瘍増殖阻害を反映している。

・その結果、低酸素状態／低い酸素レベルに達した時点でOCT1002を投与すると、早く持続的な効果が得られた。OCT1002とビカルタミドとの組合せは、AQ4Nとビカルタミドとの組合せと比較して腫瘍増殖を阻害する効果が高かった。

### 【0173】

(v) ビカルタミド処置／未処置マウスのLNCaP異種移植片に対するOCT1002の効果

・100～150mm<sup>3</sup>のLNCaP異種移植腫瘍を有する雄SCIDマウス（8週齢超）を28日間処置した。

・溶媒（トウモロコシ油中0.1%のDMSO）およびビカルタミド（溶媒中、2mg/（kg・日））処置を強制経口投与により連日実施した。第7日、OCT1002（無菌PBS中、50mg/kg）を単回投与として腹腔内投与した。

・1日置きにキャリパーを用いて腫瘍体積を測定した。

・増殖曲線は、ビカルタミド処置群および溶媒処置群の5個体以上の平均値；ビカルタミド+OCT1002群（第14日までn=5；その後、n=3）およびvehicle+OCT1002（第13日までn=5；n=1）±s.e.である。

・下の表6は、処置サイズの2倍に達するまでの時間について計算した増殖遅延を示している。

・ビカルタミドは、LNCaP腫瘍増殖に溶媒と比較して5.1日の遅延を引き起す。

・OCT1002（第7日に50mg/kgの単回投与）を溶媒（連日投与）と併用して

10

20

30

40

50

投与したところ、腫瘍増殖に対して認識できる効果は認められなかった（下の表6）。

・ビカルタミド（28日間連日）は最初、第12日～14日まで腫瘍増殖の速度を低下させる。その後、腫瘍増殖が回復し、腫瘍は第28日までに溶媒処置腫瘍と同じ大きさになる（下の表6）。

・OCT1002の単回投与で処置した腫瘍は、ビカルタミドと併用した場合に増殖速度が低下し、これには第14日から実験終了時の第28日まで常に、対照との間に有意差が認められた（図15）。

#### 【0174】

##### 結論

・第7日のOCT1002投与にはLNCaP腫瘍増殖に対する有意な効果は認められなかった。このことは、酸素化がより良好な腫瘍（すなわち、ビカルタミド処置腫瘍と比較して）ではOCT1002の毒性が低く、この酸素化がより良好な細胞の割合が溶媒処置対照腫瘍の増殖への寄与において優勢であることを示している。10

・OCT1002の単回投与とビカルタミドの併用により、ビカルタミド処置群に観察される増殖速度の増大が阻止された。OCT1002は、ビカルタミド単独では遅延の後に回復がみられる第12日以降において腫瘍増殖の阻止に極めて効果的である。

・ビカルタミドによる連日処置期間におけるLNCaP腫瘍増殖速度の最初の低下および第14日以降の回復は、腫瘍の酸素化および血管の低下およびその後の回復と一致している（Mingら, 2012, 上記）。

#### 【0175】

##### 【表3】

表6

処置	開始時体積の2倍になるまでの時間(日)	増殖遅延(日)
溶媒単独	11.2±1.88	
ビカルタミド	16.2±1.94	5±3.82
OCT1002単独	13±0.89	1.8±2.77
OCT1002+ビカルタミド	25.5±3.22	14.3±5.1

#### 【0176】

(v i) OCT1002プロドラッグはin vivoの低酸素LNCaP腫瘍細胞内で代謝産物に変換される

##### 方法

・雄SCIDマウスの背部に背部皮弁（ウインドウチャンバー）を付着させ、1mm<sup>3</sup>のLNCaP-Luc腫瘍断片を挿入し、7日間血管化させた。

・次いで、マウスを溶媒（トウモロコシ油中0.1%のDMSO）またはビカルタミド（2mg/（kg・日））のいずれかで21日間、経口的に処置した。

・（a）溶媒または（b）ビカルタミド導入の7日後、マウスにOCT1002（50mg/kg）を腹腔内投与した。

・OCT1002注射の2時間後、マウスにFITC-デキストランを静脈内注射した。40

・共焦点レーザー走査顕微鏡法を用いて画像を取り込み、腫瘍の血管（緑）およびOCT1001（青）のパターンを示した（倍率10倍とデジタルズーム3倍）（ピクセル解像度）。

・このほか、第0日（すなわち、腫瘍断片移植の7日後）、14日および21日に画像を取得した。

・第0日、14日および21日にFITC-デキストランのみを投与した。（c）第0日、7日、14日および21日の画像の全パネル。

・対照マウスを溶媒（トウモロコシ油中0.1%のDMSO）で21日間、経口的に処置し、全体を通して血管化を維持させた。第7日までに腫瘍断片が血管化された（実験第0日を図15Cの緑で示す）。

10

20

30

40

50

- ・第7日に溶媒 + OCT 1002で処置したマウスでは、変換化合物 OCT 1001(青)は血管化が乏しい少数の領域に見られる(図15A)。
- ・ビカルタミド(溶媒中、2mg/(kg・日))で処置したマウスでは、第7日に血管化の減少が見られた。第7日、OCT 1002(50mg/kg)の単回投与の腹腔内注射の2時間後、大量の変換化合物(OCT 1001；青)が腫瘍断片全体にわたって見られる(図15B)。
- ・ビカルタミド(溶媒中、2mg/(kg・日))で処置したマウスでは、第7日および14日に血管化の減少が見られ、これは21日までに回復した(Mingら, 2012, 上記)。
- ・第14日および21日に腫瘍を再検査した。10
- ・第14日ではOCT 1001(青)が依然として腫瘍に局在しているが、第21日までには化合物の量が大幅に減少していた(図15C)。

**【0177】****結論**

- ・腹腔内投与したOCT 1002は、マウス背部の皮膚のひだに局在する腫瘍断片全体に広く分布していた。
- ・血管系が大幅に減少したとき(すなわち、第7日および14日のビカルタミド処置まで)でも、分布が広範囲にわたっていた。
- ・OCT 1001は主として、酸素レベルが低い場所(すなわち、血管化が乏しい領域)に見られたが、対照にも小さい領域が見られた(程度は少ないにせよ、未処置腫瘍に低酸素が起こり得ることを示している)。20
- ・ビカルタミド処置の第14日でもOCT 1001の広範にわたる局在が依然として観察され、化合物が少なくとも7日間存在し続けることを示している。
- ・第21日までに腫瘍血管がある程度回復を示し、OCT 1001レベルが低下しているが、依然としてバックグラウンドを上回っている。
- ・還元産物、OCT 1001が7日間よりも長く残留したことは、変換化合物の半減期が長いことを示している。
- ・しかし、OCT 1001シグナルが第21日までに大幅に減少していることから、その半減期はAQ4よりも短いと考えられる。
- ・これはOCT 1001の細胞結合特性がAQ4とは異なることに起因していると考えられ、周辺の低酸素末梢組織に少量の還元化合物が残留することによって引き起こされ得る全身毒性の累積がAQ4よりも少ないと想定される可能性がある。7日間超存在し続ける低酸素腫瘍断片全体に大量にみられることから、これが代謝的主要部位(すなわち、腫瘍内の低酸素細胞)におけるOCT 1002/OCT 1001の主要な効果に影響を及ぼすとは考えられない。30

**【0178】****(viii) OCT 1002はLNCaP腫瘍の肺への転移拡散を低減する**

- ・100~150mm<sup>3</sup>のLNCaP-luc異種移植腫瘍を有する雄SCIDマウス(8週齢超)を28日間処置した(ルシフェラーゼ発現細胞は親LNCaP細胞とほぼ同じ特徴を有する; Mingら, 2012, 上記)。40
- ・溶媒(トウモロコシ油中0.1%のDMSO)およびビカルタミド(溶媒中、2mg/(kg・日))処置を強制経口投与により連日実施した。
- ・第7日、OCT 1002(無菌PBS中、50mg/kg)を単回投与として腹腔内投与した。
- ・処置第28日、造影15分前にD-ルシフェリンの溶液(PBS中、150mg/kg)をマウスにi.p.注射した。
- ・次いでマウスを屠殺し、IVISイメージングシステム(Xenogen, USA)を用いた生物発光の検出に様々な組織を摘出した。
- ・5分間撮像し、領域の周囲に目的とする範囲を描き、全光束を光子/秒(ph/s)で測定することによって、生物発光を定量化した。50

・様々な組織を摘出したが、肺および腫瘍のみ測定可能な生物発光を示した。肺における生物発光の平均  $\pm$  s.eを図16に示す；ビカルタミドおよび溶媒処置群（n=10）；ビカルタミド+OCT1002群（n=3）ならびに溶媒+OCT1002（n=1）。

\*ビカルタミド対ビカルタミド+OCT1002（p=0.024）。溶媒で処置したマウスに肺への転移拡散が少しみられた。第7日に単回投与したOCT1002は、この拡散に対して何ら効果を示さなかった。

・ビカルタミドは転移拡散の程度を増大させるように思えたが、その結果は有意性には達しなかった。

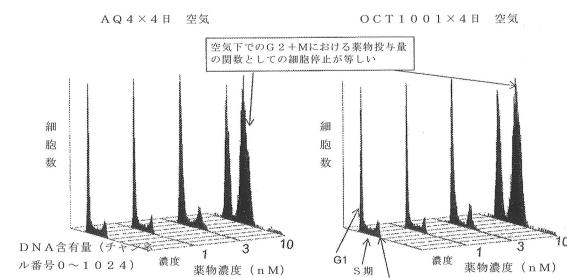
・OCT1002とビカルタミドの併用は、OCT1002がビカルタミドによって引き起こされる肺への転移拡散を有意に減少させることを示した（P=0.024）。 10

### 【0179】

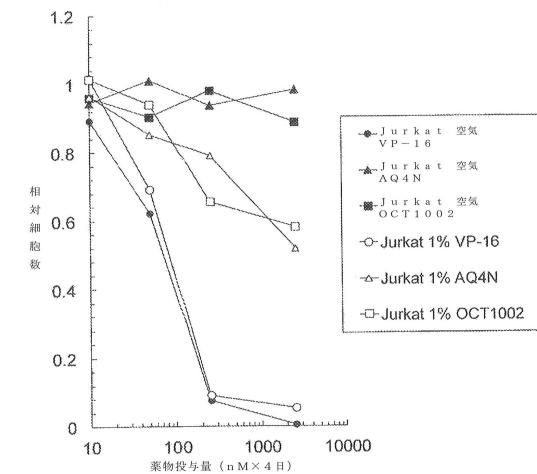
#### 結論

・第7日に単回投与として投与したOCT1002により、ビカルタミド処置によって引き起こされる肺への転移拡散を有意に減少させることができた。

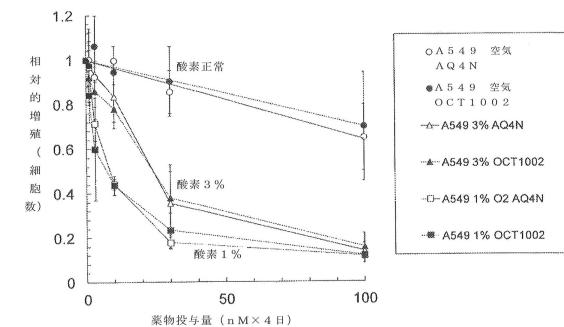
【図1】



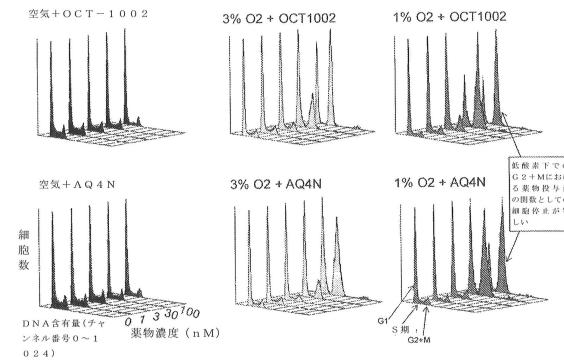
【図2】



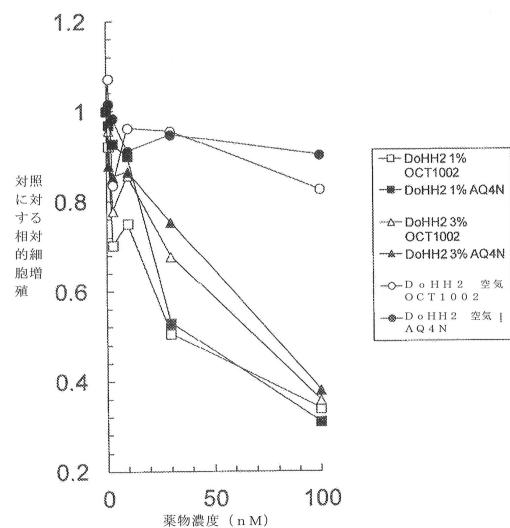
【図3】



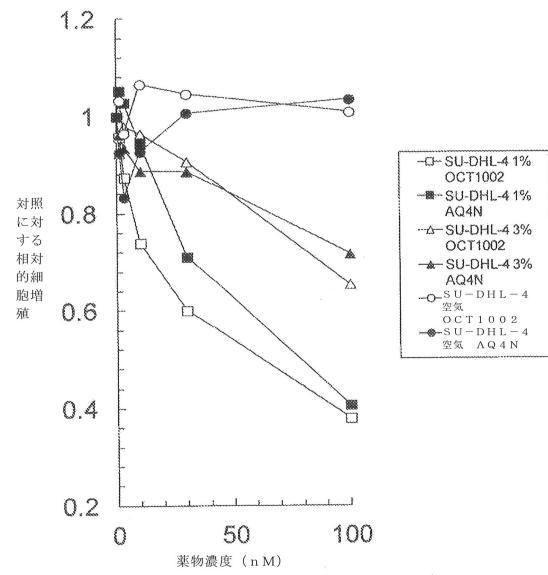
【図4】



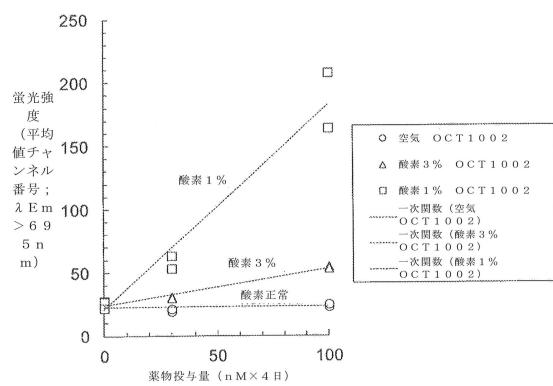
【図 5 A】



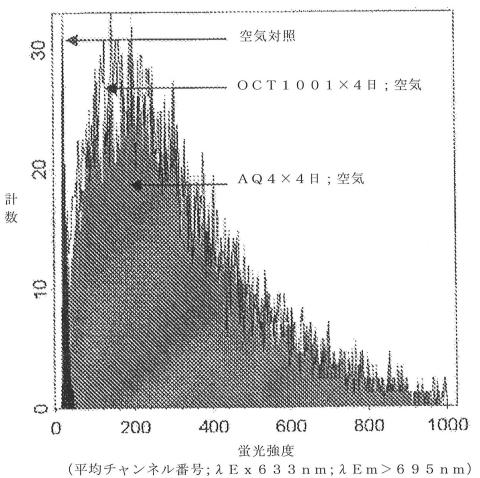
【図 5 B】



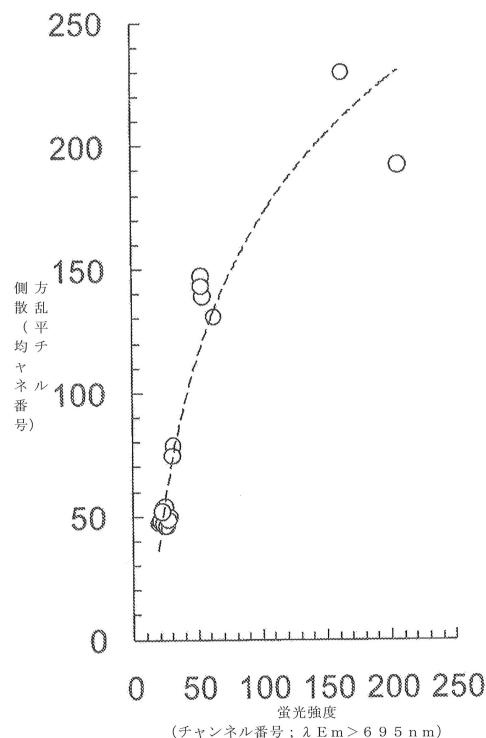
【図 6】



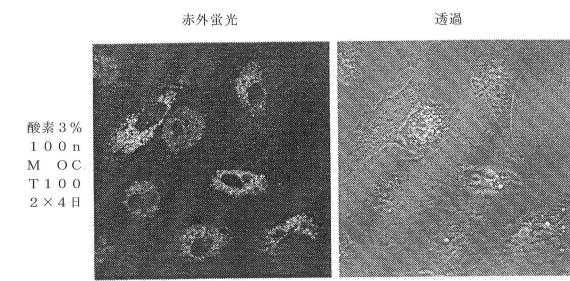
【図 7】



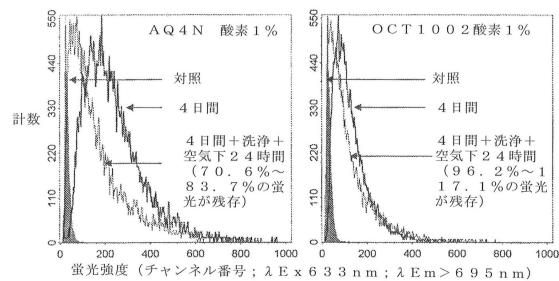
【図 8】



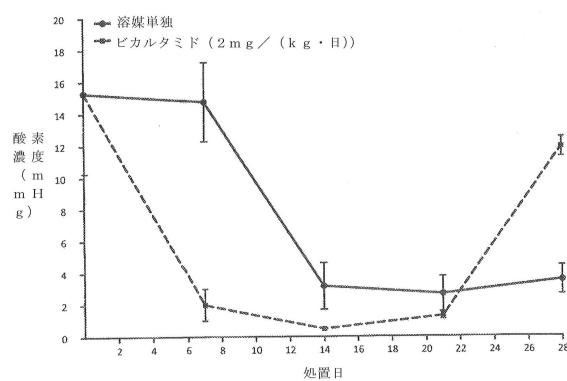
【図 9 A】



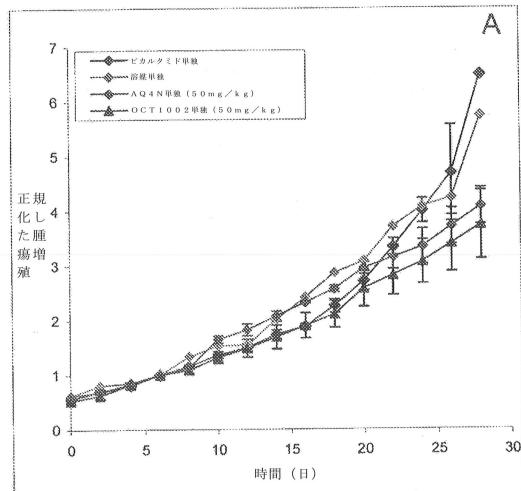
【図 9 B】



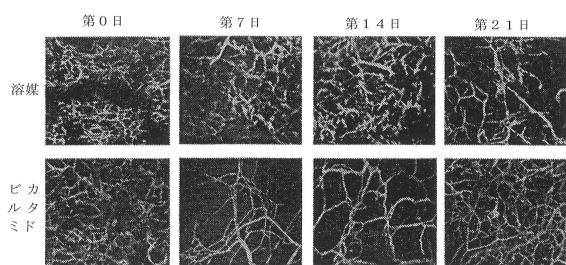
【図 10】



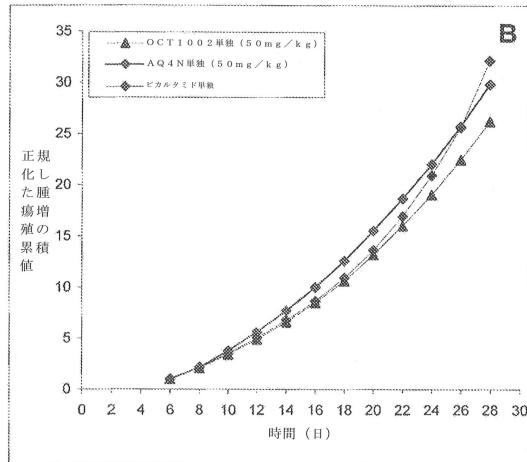
【図 12 A】



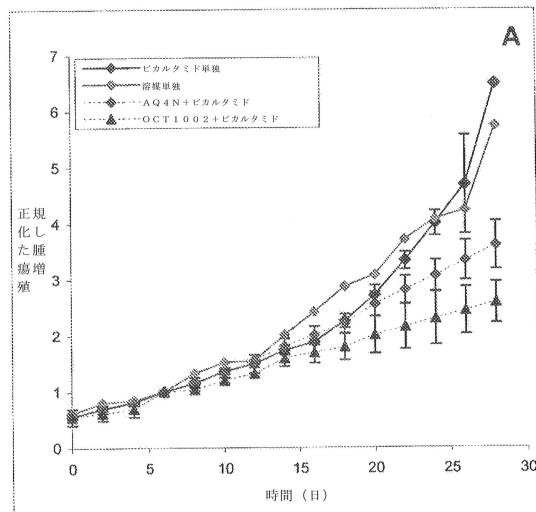
【図 11】



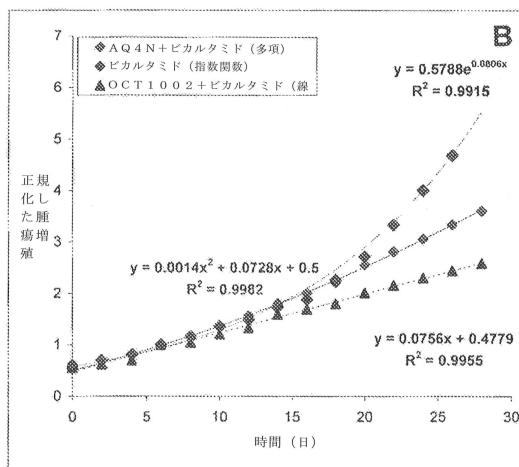
【図 1 2 B】



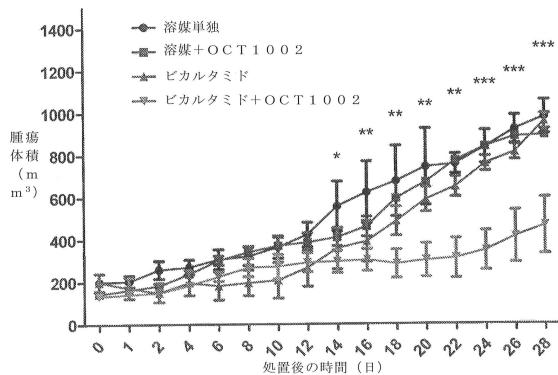
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

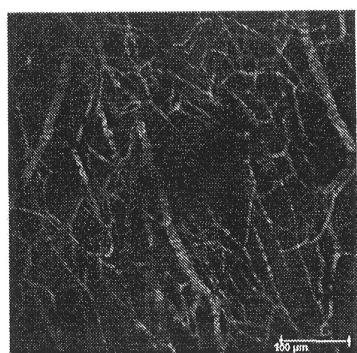


【図 1 4】



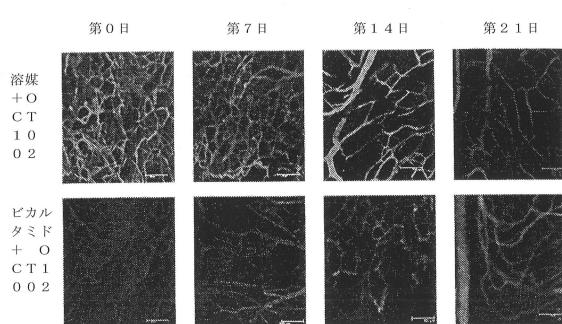
【図 15 - 1】

(A) 溶媒+OCT1002 (第7日)

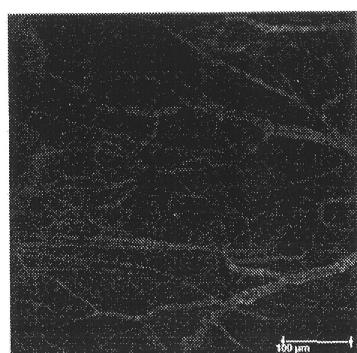


【図 15 - 2】

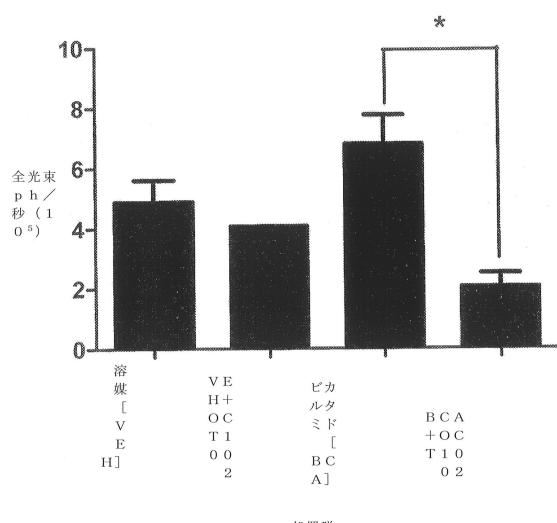
(C)



(B) ビカルタミド+OCT1002 (第7日)



【図 16】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 5/28 (2006.01)	A 6 1 P 5/28
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 11/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/04
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 0 7 B 59/00 (2006.01)	C 0 7 B 59/00

(72)発明者 スミス , ポール

イギリス国 , エルイー 12 9 エヌピー , レスター・シャー , シェップシェッド , 56 エー チャーチウッド ロード

(72)発明者 マッケオン , ステファニー

イギリス国 , エルイー 12 9 エヌピー , レスター・シャー , シェップシェッド , 56 エー チャーチウッド ロード

(72)発明者 パターソン , ローレンス

イギリス国 , エルイー 12 9 エヌピー , レスター・シャー , シェップシェッド , 56 エー チャーチウッド ロード

(72)発明者 エリントン , レイチェル ジーン

イギリス国 , エルイー 12 9 エヌピー , レスター・シャー , シェップシェッド , 56 エー チャーチウッド ロード

審査官 山本 昌広

(56)参考文献 特表平4 - 502166 (JP , A)

特表2006 - 501140 (JP , A)

米国特許第4197249 (US , A)

国際公開第2006 / 096458 (WO , A2)

国際公開第2011 / 124927 (WO , A1)

国際公開第2006 / 031719 (WO , A2)

米国特許出願公開第2009 / 0156807 (US , A1)

Analytical Chemistry , 1988年 , Vol.60 , No.19 , p.2090-2095

DATABASE REGISTRY (STN) RN 1189974-82-0, [online] , 2009年10月25日 , [Retrieved on 2017.06.21]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 C 2 2 1 / 0 0 - 2 2 5 / 3 6  
C 0 7 C 2 9 1 / 0 0 - 2 9 1 / 1 4  
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0  
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0  
C 0 7 B 5 9 / 0 0