

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265384号  
(P5265384)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.

F 1

C07D 491/22	(2006.01)	C07D 491/22
C07D 519/00	(2006.01)	C07D 519/00
A61K 31/4745	(2006.01)	A61K 31/4745
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00
A61P 35/02	(2006.01)	A61P 35/02

請求項の数 25 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-554430 (P2008-554430)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月9日 (2007.2.9)  
 (65) 公表番号 特表2009-526076 (P2009-526076A)  
 (43) 公表日 平成21年7月16日 (2009.7.16)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/003808  
 (87) 國際公開番号 WO2007/092646  
 (87) 國際公開日 平成19年8月16日 (2007.8.16)  
 審査請求日 平成22年2月5日 (2010.2.5)  
 (31) 優先権主張番号 60/772,464  
 (32) 優先日 平成18年2月9日 (2006.2.9)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/804,391  
 (32) 優先日 平成18年6月9日 (2006.6.9)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 505354899  
 エンゾン ファーマスティカルズ イン  
 コーポレイテッド  
 E N Z O N P H A R M A C E U T I C A  
 L S, I N C.  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O  
 8807 ブリッジウォーター ルート  
 202/206 685  
 (74) 代理人 100073184  
 弁理士 柳田 征史  
 (74) 代理人 100090468  
 弁理士 佐久間 剛

最終頁に続く

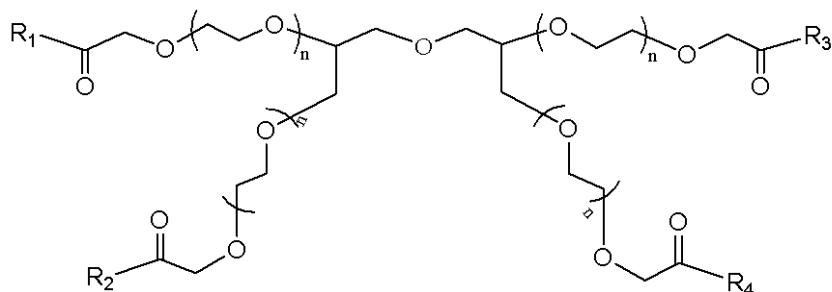
(54) 【発明の名称】乳癌、結腸直腸癌、肺臓癌、卵巣癌及び肺癌の治療のための7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンのマルチアーム・ポリマー複合体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

下記式(I)の化合物:

## 【化1】



10

ここで、

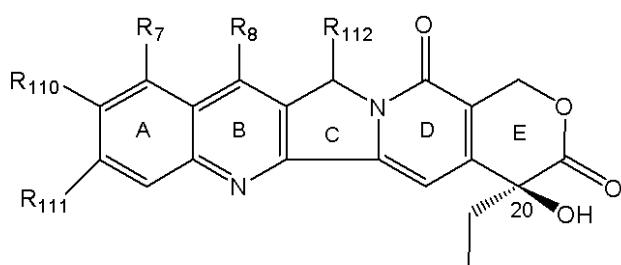
R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、独立して、OHまたは(L)<sub>m</sub>-Dであり、  
 Lは、アミノ酸、あるいは2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、-アラニン、-アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2

20

- アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスマシン、2,2-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオニ酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスマシン、アロイソロイシン、N-メチルグリシン、サルコシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリジン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン及びオルニチンからなる群より選択されるアミノ酸誘導体の残基よりなる群から選択される二官能性のリンカーであり、

Dは、カンプトセシン、または下記式(I)を有するカンプトセシン類似体であり、

【化2】



10

ここで、

R<sub>7</sub>は、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、水素、ハロゲン、F、Cl、Br、I、COOH、OH、O-C<sub>1-8</sub>アルキル、SH、S-C<sub>1-3</sub>アルキル、CN、CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、CH<sub>2</sub>-NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、CHO及びC<sub>1-3</sub>アルキルからなる群より選択され、

R<sub>8</sub>は、H、C<sub>1-8</sub>アルキル及びCH<sub>2</sub>NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>からなる群より選択され、

ここで、

R<sub>9</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルからなる群より選択され、

R<sub>10</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びCOR<sub>11</sub>からなる群より選択され、

ここで、

R<sub>11</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルからなる群より選択されるか、あるいは、

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、及びB環の窒素が、O、SまたはNR<sub>12</sub>を含む、飽和3~7員の複素環を形成し、

ここで、

R<sub>12</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、アリール、ならびにC<sub>1-6</sub>アルキル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、C<sub>1-6</sub>アルキルアミノ、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、C<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル及びCOR<sub>13</sub>からなる群より選択される1つ以上の基で置換されたアリール、からなる群より選択され、ここでR<sub>13</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、アリール、ならびに、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルのうちの1つ以上の基で置換

20

30

40

50

されたアリール、からなる群より選択され、

$R_{110}$ 及び $R_{111}$ は、それぞれ独立して、水素、ハロ、アシル、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アジド、アミド、ヒドラジン、アミノ、置換アミノ、ヒドロキシカルボニル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルアミノ、カルバモイルオキシ、アリールスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、-C( $R_{117}$ )=N-(O)<sub>j</sub>- $R_{118}$ （ここで、 $R_{117}$ は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、またはアリールであり、jは0または1であり、 $R_{118}$ は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、または複素環である）、 $R_{119}C(O)O-$ （ここで、 $R_{119}$ は、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、複素環、置換複素環、または $R_{120}-O-(CH_2)_k-$ （ここで、kは1～10の整数であり、 $R_{120}$ は、アルキル、フェニル、置換フェニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、複素環、または置換複素環である）である）からなる群より選択されるか、または

$R_7$ が $R_{110}$ と一緒に、または $R_{110}$ が $R_{111}$ と一緒に、置換または非置換のメチレンジオキシ、エチレンジオキシ、またはエチレンオキシを形成し、

$R_{112}$ はHまたはOR'であり、ここで、R'は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、ハロアルキル、またはヒドロキシアルキルであり、

mは1であり、

前記Lは、前記アミノ酸またはアミノ酸誘導体のアミンおよびカルボン酸部分がそれ、該化合物のポリマー部分のカルボキシル基、および前記カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の20-ヒドロキシル基と結合を形成して、Dとポリマー部分との間を連結しており、

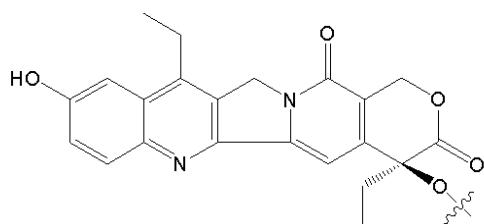
nは、正の整数であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ のすべてがOHではないことを条件とする。

【請求項2】

前記カンプトセシン類似体が、

【化3】



であることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項3】

Lが、グリシン、アラニン、メチオニンまたはサルコシン残基であることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項4】

Lがグリシン残基であることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項5】

nが28～341であり、それによって該化合物のポリマー部分の総分子量が5,000～60,000の範囲になることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項6】

nが114～227であり、それによって該化合物のポリマー部分の総分子量が20,000～40,000の範囲になることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項7】

nが227であり、それによって該化合物のポリマー部分の総分子量が40,000に

10

20

30

40

50

なることを特徴とする請求項 1 記載の化合物。

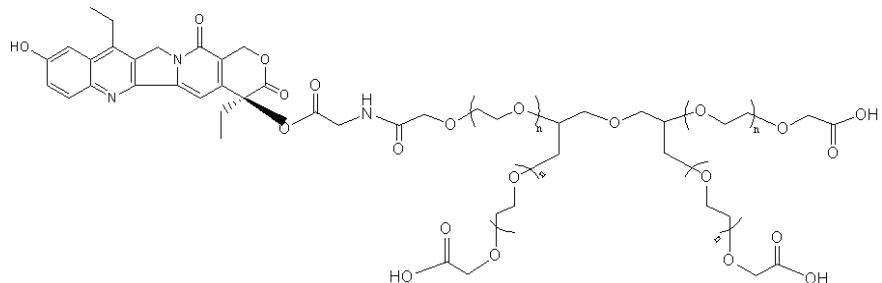
【請求項 8】

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  が、 $(L)_m - D$  であることを特徴とする請求項 1 記載の化合物。

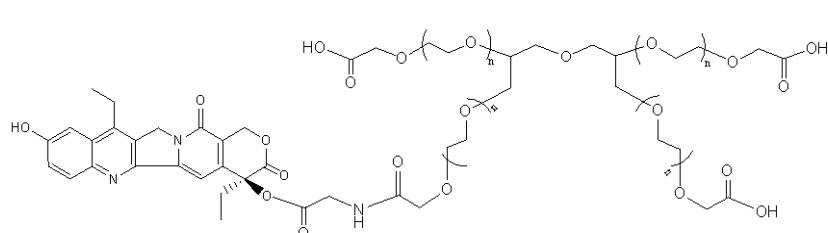
【請求項 9】

下記の化合物よりなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の化合物。

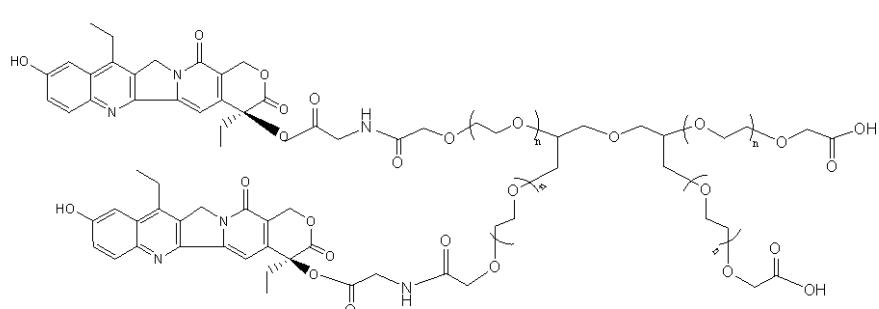
【化 4】



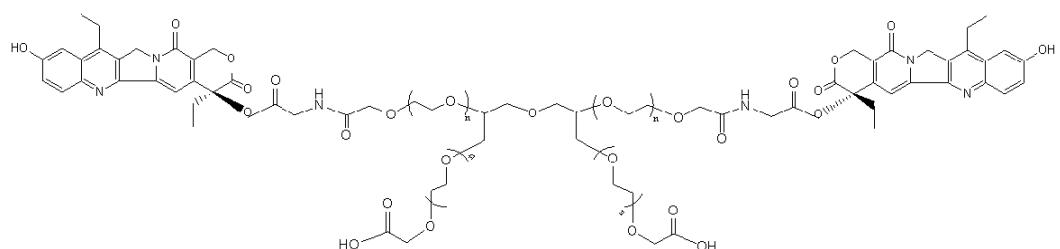
【化 5】



【化 6】



【化 7】



10

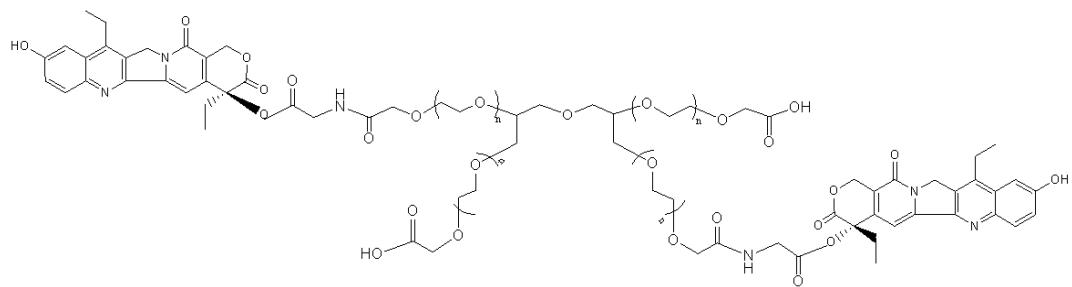
20

30

40

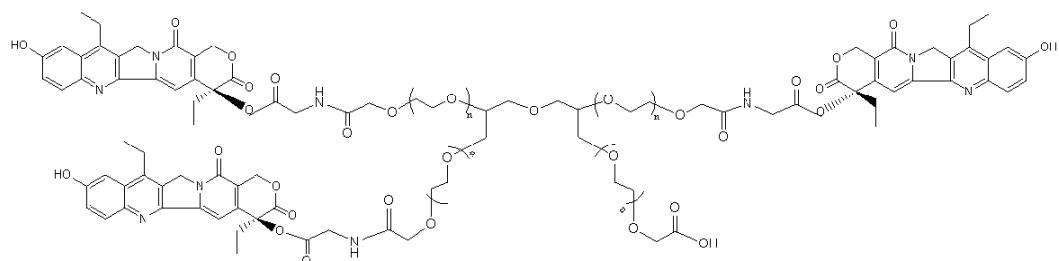
50

## 【化 8】



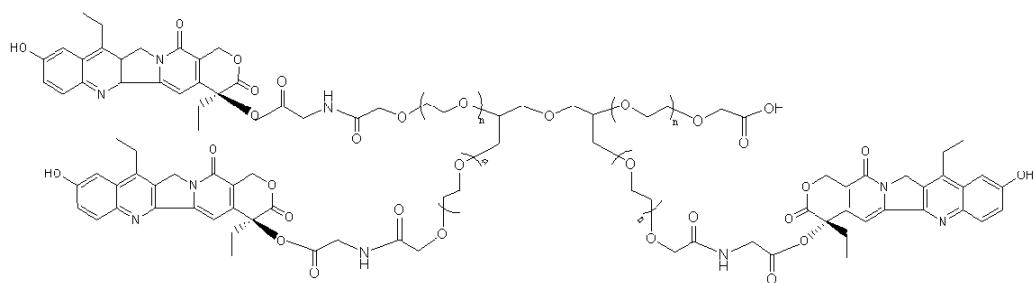
10

## 【化 9】



20

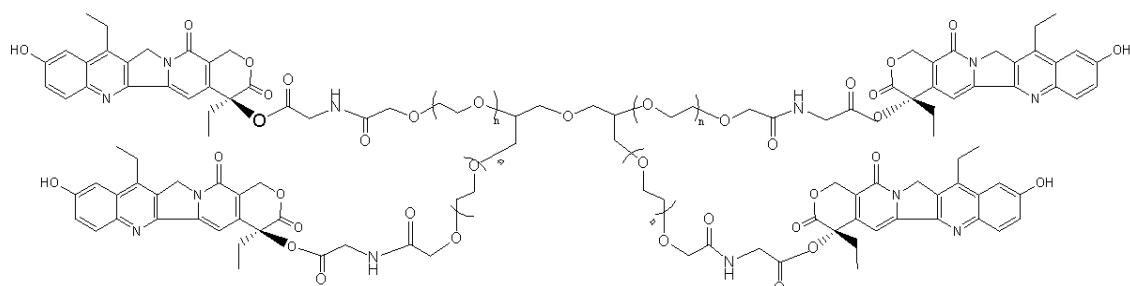
## 【化 10】



30

、および

## 【化 11】

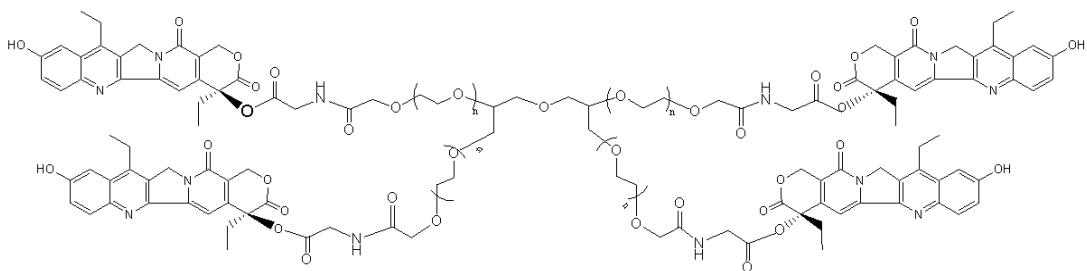


40

## 【請求項 10】

下記式で表されることを特徴とする請求項 1 記載の化合物。

## 【化12】



10

## 【請求項11】

薬剤として使用するための請求項1記載の化合物。

## 【請求項12】

Dが、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン残基であることを特徴とする請求項11記載の化合物。

## 【請求項13】

癌を治療するための薬剤の調製における、有効量の請求項1記載の化合物の使用。

## 【請求項14】

前記癌が、充実性腫瘍、リンパ腫、肺癌、小細胞肺癌、急性リンパ性白血病（ALL）  
、乳癌、結腸直腸癌、膵臓癌、膠芽腫、卵巣癌、および胃癌からなる群より選択されることを特徴とする請求項13記載の使用。

20

## 【請求項15】

前記癌が転移性であることを特徴とする請求項13記載の使用。

## 【請求項16】

前記化合物が、該化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの重量で表して、1mg/kg/週～100mg/kg/週の量で投与されることを特徴とする、請求項13記載の使用。

## 【請求項17】

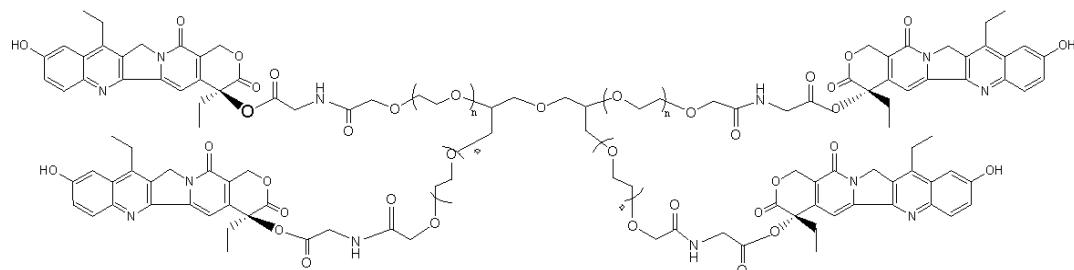
前記化合物が、該化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの重量で表して、2mg/kg/週～60mg/kg/週の量で投与されることを特徴とする請求項13記載の使用。

30

## 【請求項18】

前記癌が乳癌であり、かつ前記化合物が下記式により表されることを特徴とする、請求項13記載の使用。

## 【化13】



40

## 【請求項19】

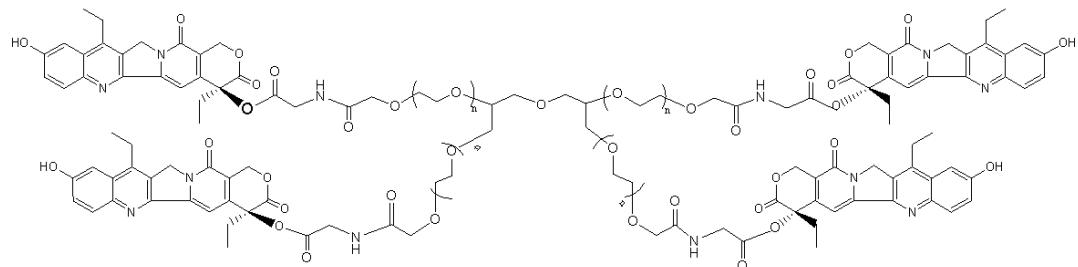
前記化合物が、該化合物中に含まれる7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの重量で表して、5～20mg/kg/用量で投与されることを特徴とする、請求項18記載の使用。

50

## 【請求項 20】

前記癌が結腸直腸癌であり、かつ前記化合物が下記式により表されることを特徴とする、請求項 13 記載の使用。

## 【化 14】



10

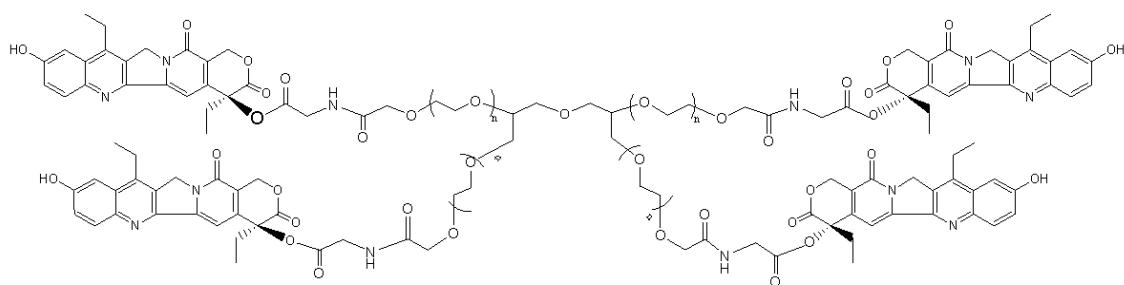
## 【請求項 21】

前記化合物が、該化合物中に含まれる 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンの重量で表して、10 ~ 30 mg / kg / 用量で投与されることを特徴とする、請求項 20 記載の使用。

## 【請求項 22】

前記癌が膵臓癌であり、かつ前記化合物が下記式により表されることを特徴とする、請求項 13 記載の使用。

## 【化 15】



20

30

## 【請求項 23】

前記化合物が、該化合物中に含まれる 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンの重量で表して、10 ~ 30 mg / kg / 用量で投与されることを特徴とする、請求項 22 記載の使用。

## 【請求項 24】

マルチアーム高分子プロドラッグの調製方法であって、

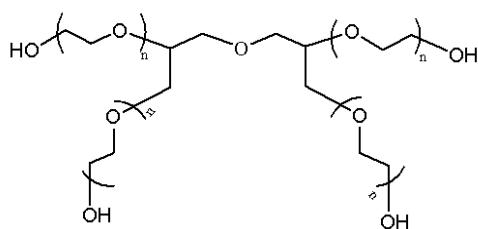
( a ) 利用可能な 20 - ヒドロキシル基を有する 1 当量のカンプトセシンまたはカンプトセシン類似体と、利用可能なカルボン酸基を有する 1 当量以上の二官能性リンカーとを提供し、

( b ) 利用可能なアミン基を有するカンプトセシン - 二官能性リンカー中間体を形成するのに有効な条件下で、前記 2 つの反応物質を反応させ、

( c ) 活性部位当たり 1 当量以上の得られた中間体と、1 当量の下記式

40

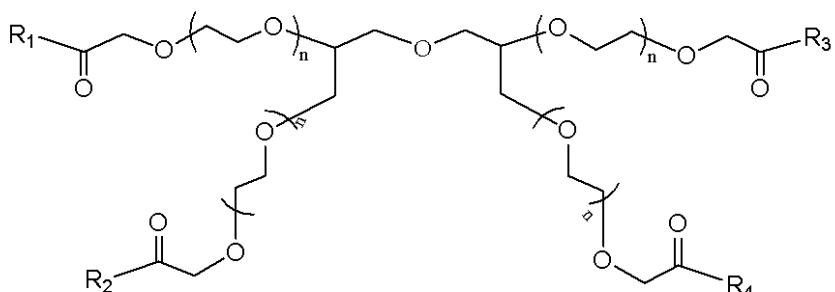
## 【化16】



10

で表される活性化ポリマーを、下記構造式を有するマルチアーム高分子プロドラッグを形成するのに有効な条件下で反応させる、各工程を有してなる方法：

## 【化17】



20

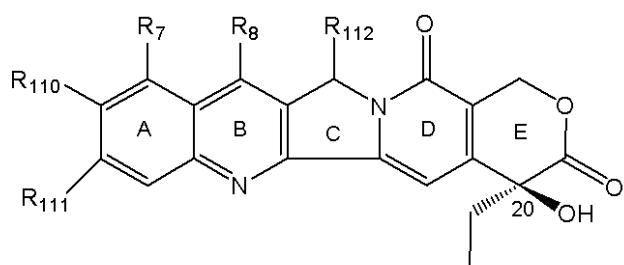
ここで、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、独立して $OH$ または $(L)_m-D$ であり、

$L$ は、アミノ酸、あるいは2-アミノジピニン酸、3-アミノジピニン酸、-アラニン、-アミノプロピオニン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスマシン、2,2-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオニン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスマシン、アロイソロイシン、N-メチルグリシン、サルコシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリジン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン及びオルニチンからなる群より選択されるアミノ酸誘導体の残基よりなる群から選択される二官能性のリンカーであり、

$D$ は、カンプトセシン、または下記式(I)を有するカンプトセシン類似体であり、

## 【化18】



40

ここで、

$R_7$ は、 $NO_2$ 、 $NH_2$ 、 $N_3$ 、水素、ハロゲン、F、Cl、Br、I、 $COOH$ 、 $OH$ 、 $O-C_{1-8}$ アルキル、 $SH$ 、 $S-C_{1-3}$ アルキル、CN、 $CH_2NH_2$ 、 $NH-C_{1-3}$ アルキ

50

ル、 $\text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C}_{1-3}$ アルキル、 $\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $\text{O} -$ 、 $\text{NH} -$ 及び $\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $\text{O} -$ 、 $\text{NH} -$ 及び $\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $\text{O} -$ 、 $\text{NH} -$ 及び $\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $\text{O} -$ 、 $\text{NH} -$ 及び $\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $\text{O} -$ 、 $\text{NH} -$ 及び $\text{S} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{アルキル})_2$ 、 $\text{CHO}$ 及び $\text{C}_{1-3}\text{アルキル}$ からなる群より選択され、

$\text{R}_8$ は、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-8}$ アルキル及び $\text{CH}_2\text{N R}_9\text{R}_{10}$ からなる群より選択され、

ここで、

$\text{R}_9$ は、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{2-6}$ アルケニル、ヒドロキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、及び $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキルからなる群より選択され、

$\text{R}_{10}$ は、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{2-6}$ アルケニル、ヒドロキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、及び $\text{C O R}_{11}$ からなる群より選択され、

ここで、

$\text{R}_{11}$ は、水素、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ペルハロ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{3-7}$ シクロアルキル- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{2-6}$ アルケニル、ヒドロキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ、及び $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキルからなる群より選択されるか、あるいは、

$\text{R}_9$ 、 $\text{R}_{10}$ 、及びB環の窒素が、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$ または $\text{N R}_{12}$ を含む、飽和3~7員の複素環を形成し、

ここで、

$\text{R}_{12}$ は、水素、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ペルハロ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、アリール、ならびに $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルアミノ、ペルハロ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ヒドロキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル及び $\text{C O R}_{13}$ からなる群より選択される1つ以上の基で置換されたアリール、からなる群より選択され、ここで $\text{R}_{13}$ は、水素、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ペルハロ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ、アリール、ならびに、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ペルハロ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、ヒドロキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキル、及び $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ- $\text{C}_{1-6}$ アルキルのうちの1つ以上の基で置換されたアリール、からなる群より選択され、

$\text{R}_{110}$ 及び $\text{R}_{111}$ は、それぞれ独立して、水素、ハロ、アシル、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アジド、アミド、ヒドラジン、アミノ、置換アミノ、ヒドロキシカルボニル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルアミノ、カルバモイルオキシ、アリールスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、- $\text{C}(\text{R}_{117}) = \text{N} - (\text{O})_j - \text{R}_{118}$ （ここで、 $\text{R}_{117}$ は、 $\text{H}$ 、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、またはアリールであり、 $j$ は0または1であり、 $\text{R}_{118}$ は、 $\text{H}$ 、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、または複素環である）、 $\text{R}_{119}\text{C}(\text{O})\text{O} -$ （ここで、 $\text{R}_{119}$ は、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、複素環、置換複素環、または $\text{R}_{120} - \text{O} - (\text{CH}_2)_k -$ （ここで、 $k$ は1~10の整数であり、 $\text{R}_{120}$ は、アルキル、フェニル、置換フェニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、複素環、または置換複素環である）である）からなる群より選択されるか、または

$\text{R}_7$ が $\text{R}_{110}$ と一緒に、または $\text{R}_{110}$ が $\text{R}_{111}$ と一緒に、置換または非置換のメチレンジオキシ、エチレンジオキシ、またはエチレンオキシを形成し、

$\text{R}_{112}$ は $\text{H}$ または $\text{O R}'$ であり、ここで、 $\text{R}'$ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、ハロアルキル、またはヒドロキシアルキルであり、

$m$ は1であり、

前記Lは、前記アミノ酸またはアミノ酸誘導体のアミンおよびカルボン酸部分がそれぞれ、マルチアーム高分子プロドラッグのポリマー部分のカルボキシル基、および前記カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の20-ヒドロキシル基と結合を形成して、Dと

10

20

30

40

50

ポリマー部分との間を連結しており、

n は、正の整数であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  のすべてが  $OH$  ではないことを条件とする。

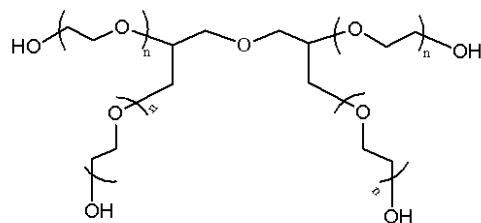
**【請求項 25】**

マルチアーム高分子プロドラッグの調製方法であって、

(a) 利用可能な 20 - ヒドロキシル基を有する 1 当量のカンプトセシンまたはカンプトセシン類似体を、利用可能なカルボン酸基を有する 1 当量以上の二官能性リンカーと、利用可能なアミン基を有するカンプトセシン - 二官能性リンカー中間体を形成するのに有効な条件下で反応させ、

(b) 活性部位当たり 1 当量以上の、工程 (a) から得られた中間体を、1 当量の下記式

**【化 19】**

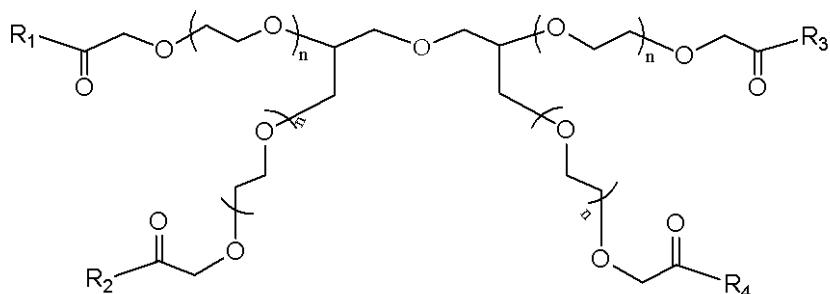


10

20

で表される活性化ポリマーと、下記構造式を有するマルチアーム高分子プロドラッグを形成するのに有効な条件下で反応させる、各工程を有してなる方法：

**【化 20】**



30

ここで、

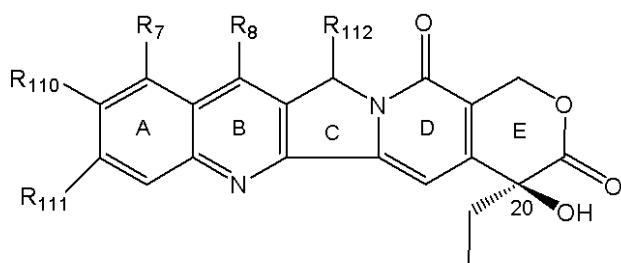
$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は、独立して  $OH$  または  $(L)_m - D$  であり、

$L$  は、アミノ酸、あるいは 2 - アミノアジピン酸、3 - アミノアジピン酸、 - アラニン、 - アミノプロピオン酸、2 - アミノ酪酸、4 - アミノ酪酸、ピペリジン酸、6 - アミノカプロン酸、2 - アミノヘプタン酸、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノイソ酪酸、2 - アミノピメリン酸、2, 4 - ジアミノ酪酸、デスマシン、2, 2 - ジアミノピメリン酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、N - エチルグリシン、N - エチルアスパラギン、3 - ヒドロキシプロリン、4 - ヒドロキシプロリン、イソデスマシン、アロイソロイシン、N - メチルグリシン、サルコシン、N - メチルイソロイシン、6 - N - メチルリジン、N - メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン及びオルニチンからなる群より選択されるアミノ酸誘導体の残基よりなる群から選択される二官能性のリンカーであり、

$D$  は、カンプトセシン、または下記式 (II) を有するカンプトセシン類似体であり、

40

## 【化21】



10

ここで、

R<sub>7</sub>は、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、水素、ハロゲン、F、Cl、Br、I、COOH、OH、O-C<sub>1-8</sub>アルキル、SH、S-C<sub>1-3</sub>アルキル、CN、CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、CH<sub>2</sub>-NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>1-3</sub>アルキルからなる群より選択され、

20

R<sub>8</sub>は、H、C<sub>1-8</sub>アルキル及びCH<sub>2</sub>NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>からなる群より選択され、

ここで、

R<sub>9</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルからなる群より選択され、

R<sub>10</sub>は、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びCOR<sub>11</sub>からなる群より選択され、

ここで、

R<sub>11</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルからなる群より選択されるか、あるいは、

30

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、及びB環の窒素が、O、SまたはNR<sub>12</sub>を含む飽和3~7員の複素環を形成し、

ここで、

R<sub>12</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、アリール、ならびにC<sub>1-6</sub>アルキル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、C<sub>1-6</sub>アルキルアミノ、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、C<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル及びCOR<sub>13</sub>からなる群より選択される1つ以上の基で置換されたアリール、からなる群より選択され、ここでR<sub>13</sub>は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、アリール、ならびに、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ-C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ-C<sub>1-6</sub>アルキル、及びC<sub>1-6</sub>アルコキシ-C<sub>1-6</sub>アルキルのうちの1つ以上の基で置換されたアリール、からなる群より選択され、

40

R<sub>110</sub>及びR<sub>111</sub>は、それぞれ独立して、水素、ハロ、アシル、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アジド、アミド、ヒドラジン、アミノ、置換アミノ、ヒドロキシカルボニル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルアミノ、カルバモイルオキシ、アリールスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、-C(R<sub>117</sub>)=N-(O)<sub>j</sub>-R<sub>118</sub>（ここで、R<sub>117</sub>は、H、アルキル、アルケニル、シク

50

ロアルキル、またはアリールであり、 $j$  は 0 または 1 であり、 $R_{118}$  は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、または複素環である)、 $R_{119}C(O)O$  - (ここで、 $R_{119}$  は、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、複素環、置換複素環、または $R_{120}-O-$  ( $CH_2$ ) $_k$  - (ここで、 $k$  は 1 ~ 10 の整数であり、 $R_{120}$  は、アルキル、フェニル、置換フェニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、複素環、または置換複素環である) である) からなる群より選択されるか、または

$R_7$  が  $R_{110}$  と一緒に、または  $R_{110}$  が  $R_{111}$  と一緒に、置換または非置換のメチレンジオキシ、エチレンジオキシ、またはエチレンオキシを形成し、

$R_{112}$  は H または OR' であり、ここで、 $R'$  は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、ハロアルキル、またはヒドロキシアルキルであり、

$m$  は 1 であり、

前記 L は、前記アミノ酸またはアミノ酸誘導体のアミンおよびカルボン酸部分がそれぞれ、マルチアーム高分子プロドラッグのポリマー部分のカルボキシル基、および前記カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の 20 - ヒドロキシル基と結合を形成して、D とポリマー部分との間を連結しており、

$n$  は、正の整数であり、

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  のすべてが OH ではないことを条件とする。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【関連出願の説明】

20

#### 【0001】

本願は、参照することにより各内容が本願に援用される、2006年2月9日出願の米国仮特許出願第 60/772,464 号、2006年6月9日の出願の同第 60/804,391 号、2006年9月15日出願の同第 60/844,938 号、2006年11月6日の出願の同第 60/864,516 号の各号の優先権の利益を主張するものである。

#### 【技術分野】

#### 【0002】

本発明は、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンのマルチアーム高分子プロドラッグに関する。具体的には、本発明は、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンの 4 - アームポリエチレングリコール複合体及びその使用に関する。

30

#### 【背景技術】

#### 【0003】

長年にわたり、生物学的に有効な物質を哺乳動物に投与する方法が、いくつか提案されている。所望の薬剤が液体に不溶性の場合、問題が生じる。アルカロイドは、特に、可溶化が困難であることが多い。

#### 【0004】

カンプトセシンは、中国に自生しているカンレンボク (Camptotheca acuminata) の樹木、及びインドに自生しているクサミズキ (Nothapodytes foetida) の樹木から産生される、水不溶性の細胞毒性アルカロイドである。カンプトセシン及び関連する類似体は、抗がん剤として有望であることが知られており、インビトロ及びインビボでの治療活性が実証されている。

40

#### 【0005】

カンプトセシン及び類似体は、DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤として知られている。例えば、カンプトセシン類似体の 1 つに、DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤としても知られ、かつ、抗癌活性も示す、イリノテカン (CPT-11、カンプトサー (Camptosar (登録商標))) がある。7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンは、CPT-11 の活性代謝産物である。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

50

## 【0006】

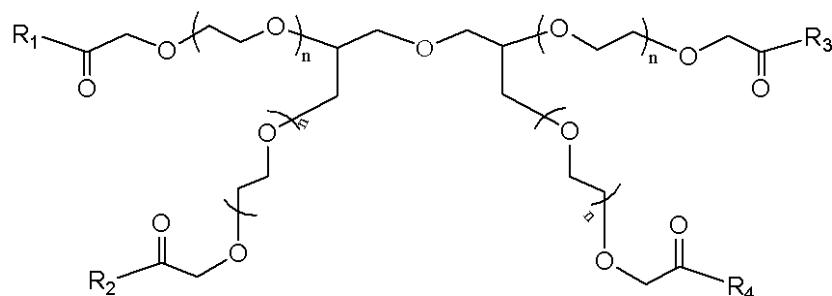
上記の問題を克服し、PEG化を通じて薬物送達の技術を向上させることを目的とした、マルチアーム化PEGを直接使用して適切なリンカーを通じて薬物分子に共役させる、新規の方法を提供する。この方法では、PEGに、面倒な分岐鎖部分を取り入れる必要がない。さらには、薬物分子は互いに、比較的離れている。したがって、PEGに対する共役効率は著しく向上する。PEG複合体の溶解性もまた、末端を分岐させた手法よりも改善される。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明の1つの態様では、構造式(I)の化合物が提供される：

## 【化1】



10

20

## 【0008】

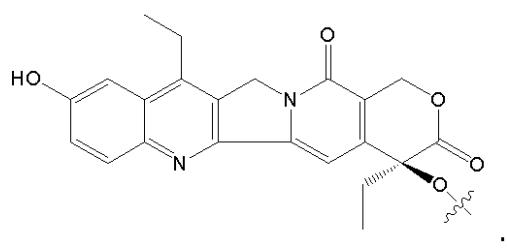
ここで、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は、独立して、OHまたは(L)<sub>m</sub>-Dであり、

Lは、2官能性のリンカーであり、

Dは、例えば、

## 【化2】



30

## 【0009】

で表される、カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の残基であり、

mは0または正の整数であり、

nは正の整数であり、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は、すべてがOHではないことを条件とする。

## 【0010】

本発明のこの態様では、カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体は、20-OH基自体が4-アームポリマーと複合体を形成するように、ポリマーと反応する。

## 【0011】

本発明の1つの好ましい態様では、Lはアミノ酸残基である。本発明のある好ましい態様では、nは約28～約341であり、約227であることが好ましい。

## 【0012】

複合体の製造方法、ならびに、本発明の化合物を使用する治療法についても、提供する

40

50

。

【 0 0 1 3 】

以下の説明及び図面から、利点が明らかになるであろう。

【 0 0 1 4 】

本発明において、「残基」という用語は、当然ながら、化合物の一部を意味するものと理解されたい。その言葉の指すものとは、すなわち、別の化合物と置換反応させた後も残存する、カンプトセシン類似体である7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンやアミノ酸などである。

【 0 0 1 5 】

本発明において、「ポリマー含有残基」または「P E G残基」という用語は、当然ながら、それぞれ、カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体含有化合物と反応させた後も残存する、ポリマーまたはP E Gの一部を意味するものと理解されたい。

10

【 0 0 1 6 】

本発明において、当然ながら、「アルキル」という用語には、直鎖、分岐鎖、置換が含まれるものとして理解されたい。この場合の置換は、例えばハロ、アルコキシ、ニトロ、C<sub>1-12</sub>などであるが、C<sub>1-4</sub>アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、または置換シクロアルキルなどが好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明において、当然ながら、「置換（された）」という用語には、官能基または化合物中に含まれる1以上の原子に1以上の異なる原子を加えるか、1以上の原子を1以上の異なる原子と置き換えること、が含まれるものと理解されたい。

20

【 0 0 1 8 】

本発明において、置換アルキルとしては、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキル及びメルカプトアルキルが挙げられ、置換アルケニルとしては、カルボキシアルケニル、アミノアルケニル、ジアルケニルアミノ、ヒドロキシアルケニル及びメルカプトアルケニルが挙げられ、置換アルキニルとしては、カルボキシアルキニル、アミノアルキニル、ジアルキニルアミノ、ヒドロキシアルキニル及びメルカプトアルキニルが挙げられ、置換シクロアルキルとしては、4-クロロシクロヘキシリなどの部分が挙げられ、アリールとしては、ナフチルなどの部分が挙げられ、置換アリールとしては、3-ブロモフェニルなどの部分が挙げられ、アラルキルとしてはトリルなどの部分が挙げられ、ヘテロアルキルとしてはエチルチオフェンなどの部分が挙げられ、置換ヘテロアルキルとしては3-メトキシ-チオフェンなどの部分が挙げられ、アルコキシとしてはメトキシなどの部分が挙げられ、フェノキシとしては、3-ニトロフェノキシなどの部分が挙げられる。当然ながら、ハロにはフルオロ、クロロ、ヨード及びブロモが含まれるものと理解されたい。

30

【 0 0 1 9 】

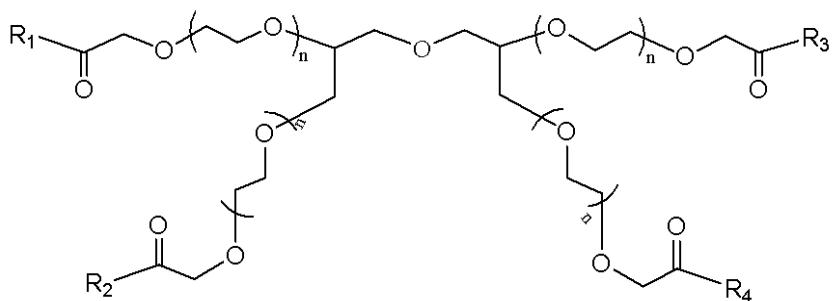
本発明において、「有効量」及び「十分な量」という用語は、当然ながら、所望の効果または治療効果を実現する量を意味し、このような効果は当業者には明らかであろう。

【 0 0 2 0 】

本発明の1つの実施の形態では、構造式（I）：

40

## 【化3】



10

## 【0021】

の化合物が提供され、

ここで、

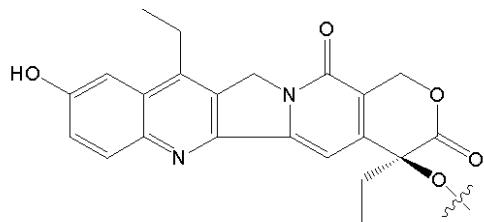
R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は、独立して OH または (L)<sub>m</sub>-D であり、

L は二官能性のリンカーであり、

D は、例えば、

## 【化4】

20



## 【0022】

30

で表される、カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体残基であり、

m は 0 または正の整数であり、約 1 ~ 約 10 が好ましく、1 がさらに好ましく、

n は正の整数であり、約 28 ~ 約 341 が好ましく、約 227 がさらに好ましく、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> のすべてが OH ではないことを条件とする。

## 【0023】

A. カンプトセシン及び関連するカンプトセシン類似体

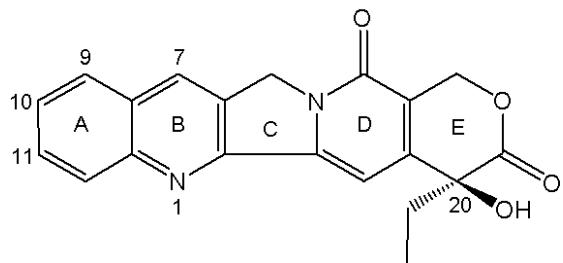
カンプトセシンは、中国に自生しているカンレンボクの樹木、及びインドに自生しているクサミズキの樹木から産生される、水不溶性の細胞毒性アルカロイドである。カンプトセシンならびに関連する化合物及び類似体はまた、抗がん剤または抗腫瘍剤として有望であることが知られており、実験動物でのインビトロ及びインビボにおいて、これらの活性を発現することが示されている。

40

## 【0024】

カンプトセシン及び特定の関連類似体は下記の構造：

## 【化5】



10

## 【0025】

を共有している。

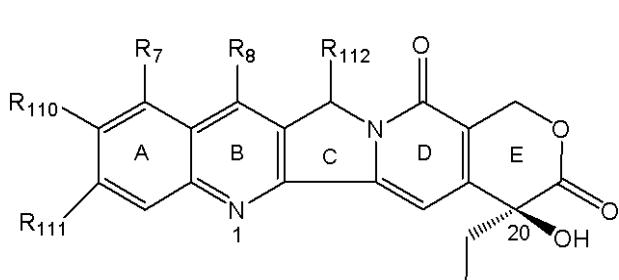
## 【0026】

このコア構造から、いくつかの既知の類似体が調製されている。例えば、A環の10位及び11位のいずれかまたは両方がOHで置換されうる。A環は、随意的に、ヘテロ原子、すなわち-Oまたは-Nによって環に連結された、直鎖または分岐鎖のC<sub>1-30</sub>アルキルまたはC<sub>1-17</sub>アルコキシで置換することができる。B環の7位を、直鎖または分岐鎖C<sub>1-30</sub>アルキル(C<sub>2</sub>アルキルが好ましい)、C<sub>5-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-30</sub>アルコキシ、フェニルアルキルなど、アルキルカーバメート、アルキルカルバジド、フェニルヒドラジン誘導体などで置換することができる。C、D及びE環における他の置換も可能である。例えば、参照することによりその内容を本願に援用する、米国特許第5,004,758号、同第4,943,579号、米国再発行特許第32,518号の各明細書を参照のこと。熟練した技術者が認識するように、10-ヒドロキシカンプトセシン、11-ヒドロキシカンプトセシン、及び10,11-ジヒドロキシカンプトセシン類似体は、カンレンボク及びその近縁種において、微量成分の1種として天然に存在する。これらの化合物に対するさらなる置換、すなわち、7-アルキル-、7-置換アルキル-、7-アミノ-、7-アミノアルキル-、7-アラルキル-、9-アルキル-、9-アラルキル-カンプトセシンなどの誘導体を、不必要的実験をすることなく、既知の合成手法を用いて作ることができる。一部のカンレンボクのアルカロイド(camptotheca alkaloids)は、以下に示す構造

20

## 【化6】

(II)



30

## 【0027】

を有する。

## 【0028】

上記構造において、R<sub>7</sub>は、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、水素、ハロゲン(F、Cl、Br、I)、COOH、OH、O-C<sub>1-8</sub>アルキル、SH、S-C<sub>1-3</sub>アルキル、CN、CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、CH<sub>2</sub>-NH-C<sub>1-3</sub>アルキル、N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>N(C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH-及びS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、

40

50

NH- 及び S - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH- 及び S - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH- 及び S - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、O-、NH- 及び S - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、O-、NH- 及び S - CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N (C<sub>1-3</sub>アルキル)<sub>2</sub>、CHO または C<sub>1-3</sub>アルキルのうちの 1 つである。

### 【0029】

上記構造 (II) における R<sub>8</sub> は、H または C<sub>1-8</sub>アルキル (好ましくは C<sub>2</sub>アルキル) または CH<sub>2</sub>NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub> であって差し支えなく、ここで、

(a) R<sub>9</sub> 及び R<sub>10</sub> は、独立して、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ - C<sub>1-6</sub>アルキルであるか、あるいは、

(b) R<sub>9</sub> は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ - C<sub>1-6</sub>アルキルであって差し支えなく、R<sub>10</sub> は、-COR<sub>11</sub> であって差し支えなく、ここで R<sub>11</sub> は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル、C<sub>3-7</sub>シクロアルキル - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>2-6</sub>アルケニル、ヒドロキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、C<sub>1-6</sub>アルコキシ - C<sub>1-6</sub>アルキルであるか、または

(c) R<sub>9</sub> 及び R<sub>10</sub> は、それらに付加する窒素原子と一緒に、O、S または NR<sub>12</sub> 基を含んでいてもよい飽和 3 ~ 7 員の複素環を形成し、ここで R<sub>12</sub> は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ - C<sub>1-6</sub>アルキル、アリール、あるいは、C<sub>1-6</sub>アルキル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、C<sub>1-6</sub>アルキルアミノ、ペルハロ - C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、C<sub>1-6</sub>アルコキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル及び -COR<sub>13</sub> からなる群より選択される 1 またはそれ以上の基で置換されたアリールであって、ここで、R<sub>13</sub> は、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ - C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、アリール、及び、C<sub>1-6</sub>アルキル、ペルハロ - C<sub>1-6</sub>アルキル、ヒドロキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル、または C<sub>1-6</sub>アルコキシ - C<sub>1-6</sub>アルキル基の 1 つ以上の基で置換されたアリール、であり、

R<sub>110</sub> ~ R<sub>111</sub> は、それぞれ独立して、水素、ハロ、アシル、アルキル (例えば、C<sub>1-6</sub>アルキル)、置換アルキル、アルコキシ (例えば、C<sub>1-6</sub>アルコキシ)、置換アルコキシ、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、アジド、アミド、ヒドラジン、アミノ、置換アミノ (例えば、モノアルキルアミノ及びジアルキルアミノ)、ヒドロキシカルボニル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルキルカルボニルアミノ、カルバモイルオキシ、アリールスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、-C(R<sub>117</sub>) = N - (O)<sub>j</sub> - R<sub>118</sub>、ここで、R<sub>117</sub> は H、アルキル、アルケニル、シクロアルキルまたはアリールであり、j は 0 または 1 であり、R<sub>118</sub> は、H、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、または複素環である、及び R<sub>119</sub>C(O)O-、ここで、R<sub>119</sub> は、ハロゲン、アミノ、置換アミノ、複素環、置換複素環、または R<sub>120</sub> - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub> - であって、ここで k は 1 ~ 10 の整数であり、R<sub>120</sub> は、アルキル、フェニル、置換フェニル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、複素環、または置換複素環である、からなる群より選択されるか、あるいは、

R<sub>7</sub> が R<sub>110</sub> と一緒に、または R<sub>110</sub> が R<sub>111</sub> と一緒に、置換または非置換のメチレンジオキシ、エチレンジオキシ、またはエチレンオキシを形成し、

R<sub>112</sub> は、H または OR' であり、ここで、R' はアルキル、アルケニル、シクロアルキル、ハロアルキル、またはヒドロキシアルキルである。

### 【0030】

好ましいアリール基は、フェニル及びナフチルである。R<sub>9</sub> と R<sub>10</sub> が、それらに付加する窒素原子と一緒に環を形成する場合の適切な複素環としては、アジリジン、アゼチジン、ピロリジン、ピペリジン、ヘキサメチレンイミン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、イソオキサゾリジン、ピペラジン、N - メチルピペラジン、テトラヒドロアゼピン、N - メチル - テトラヒドロアゼピン、チアゾリジンなどが挙げられる。共役後に残存するカンプトセシン類似体は、非共役化合物残基と称される。

## 【0031】

説明を簡略化するためであって、限定するわけではないが、好ましい、例示する化合物としてのカンプトセシン類似体として、本説明は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンについて言及する。請求の範囲に記載される発明は、類似体が、ポリマーへの付加点として20-OH基などのOH基を有する限り、これらの誘導体及び類似体のすべてを包含する。カンプトセシン及びカンプトセシン類似体は、ラセミ体混合物または光学的に純粋な異性体であって構わない。20(S)カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体などの、実質的に純粋な活性体をマルチアーム高分子プロドラッグに用いることが好ましい。

## 【0032】

10

## B. 二官能性リンカー

本発明のある好ましい態様では、Lはアミノ酸残基である。既知の天然に存在するL-アミノ酸のいずれかから選択されるアミノ酸としては、いくつかの例を挙げるとすれば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、及び/またはこれらの組合せが挙げられる。別の態様では、Lはペプチド残基であってもよい。ペプチドは、例えば、約2~約10アミノ酸残基の長さであって差し支えない。

## 【0033】

20

天然アミノ酸の誘導体及び類似体もまた、疎水性または非疎水性の、当技術分野で知られたさまざまな非天然アミノ酸(DまたはL体)と同様に、本発明の範囲内にあることが意図されている。単に例を挙げると、アミノ酸類似体及び誘導体としては、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、-アラニン、-アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ酪酸、2-アミノビメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスモシン、2,2-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、N-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロイソロイシン、N-メチルグリシンまたはサルコシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリジン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン及び他のものなど、枚挙にいとまがないが、それらは、参照することにより本願に援用される、米国特許商標庁審査ガイドライン63 Fed. Reg. 29620, 29622に記載されている。一部の好ましいL基としては、グリシン、アラニン、メチオニンまたはサルコシン残基が挙げられる。本発明の化合物としては、リンカー基(L)としてのグリシン残基がさらに好ましい。

30

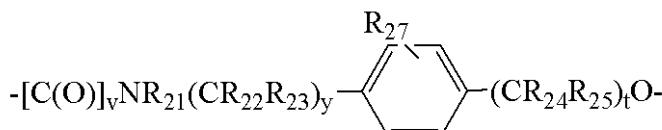
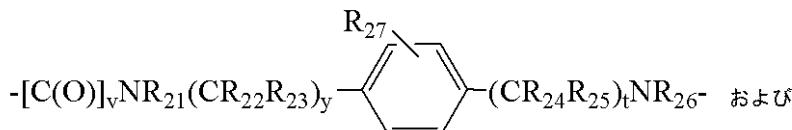
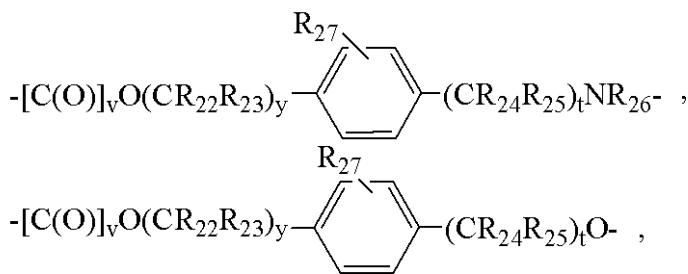
## 【0034】

本発明の別の態様では、カンプトセシン類似体とポリマーの間に付加した後のLは、

- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>O)<sub>t</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>O)<sub>t</sub>(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>y</sub>O-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>O)<sub>t</sub>(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>y</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>O-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>(CR<sub>24</sub>CR<sub>25</sub>O)<sub>y</sub>NR<sub>26</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>O(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>NR<sub>26</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>O(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>O-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>NR<sub>26</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>t</sub>(CR<sub>24</sub>CR<sub>25</sub>O)<sub>y</sub>-、
- [C(O)]<sub>v</sub>NR<sub>21</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>O)<sub>t</sub>(CR<sub>24</sub>CR<sub>25</sub>)<sub>y</sub>NR<sub>26</sub>-、

40

## 【化7】



## 【0035】

から選択され、ここで、

$\text{R}_{21} \sim \text{R}_{26}$  は、独立して、水素、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ アルケニル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ アルキニル、 $\text{C}_{3\sim 19}$ 分岐鎖アルキル、 $\text{C}_{3\sim 8}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ 置換アルキル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ 置換アルケニル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ 置換アルキニル、 $\text{C}_{3\sim 8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ、 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルコキシからなる群より選択され、

$\text{R}_{27}$  は、水素、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ アルケニル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ アルキニル、 $\text{C}_{3\sim 19}$ 分岐鎖アルキル、 $\text{C}_{3\sim 8}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ 置換アルキル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ 置換アルケニル、 $\text{C}_{2\sim 6}$ 置換アルキニル、 $\text{C}_{3\sim 8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルキル、置換 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルキル、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルコキシ、フェノキシ、 $\text{C}_{1\sim 6}$ ヘテロアルコキシ、 $\text{NO}_2$ 、ハロアルキル及びハロゲンからなる群より選択され、

$t$  及び  $y$  は、独立して、約 1 ~ 約 4 の正の整数から選択され、

$v$  は 0 または 1 である。

## 【0036】

本発明の一部の好ましい態様では、化合物には二官能性リンカーの 1 単位が含まれ、したがって  $m$  は 1 である。

## 【0037】

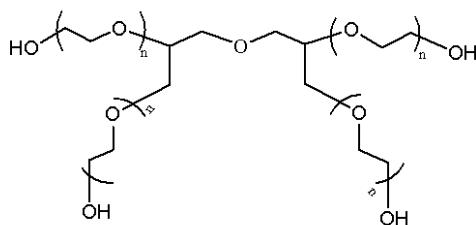
さらなるリンカーについては、参照することによりその内容が本願に援用される、Greenwaldら (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1998, 6:551-562) の表 1 に示されている。

## 【0038】

## C. マルチアーム・ポリマー

マルチアーム PEG は、参照することによりその開示を援用する、NOF 社の Drug Delivery System catalog, Ver. 8, April 2006 に記載されている。ある特に好ましいマルチアーム PEG は、以下の構造式：

## 【化8】



10

## 【0039】

を有し、

ここで、 $n$  は正の整数である。

## 【0040】

本発明のある好ましい実施の形態では、ポリマーの重合度 (n) は約 28 ~ 約 341 であり、約 5,000 ~ 60,000 の総分子量を有するポリマーを提供し、重合度約 114 ~ 約 227、総分子量 20,000 ~ 40,000 を有するポリマーを提供することが好ましい。これは、ポリマー鎖における繰り返し単位の数を表しており、ポリマーの分子量によって決まる。本発明のある特に好ましい実施の形態では、 $n$  は約 227 である。

20

## 【0041】

## D. プロドラッグの合成

一般に、本発明のプロドラッグは、1 当量以上の活性化マルチアーム・ポリマーを、例えば活性部位当たり 1 当量以上のカンプトセシン - アミノ酸複合体と、該複合体がポリマーのカルボン酸と反応し、結合を形成するためのアミノ基を効率的に生じさせるのに十分な条件下で、反応させることによって調製される。

## 【0042】

さらに具体的には、本方法は、

1) 利用可能な 20 - ヒドロキシル基を含む、1 当量のカンプトセシンまたはカンプトセシン類似体と、利用可能なカルボン酸基を含む 1 当量以上の二官能性リンカーとを提供し、

30

2) その 2 つの反応物質を反応させて、1, (3 - ジメチルアミノプロピル) 3 - エチルカルボジイミド (EDC) (または 1, 3 - ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC) )、任意の適切なジアルキルカルボジイミド、向山試薬 (例えば 2 - ハロ - 1 - アルキル - ピリジニウムハライド)、またはプロパンホスホン酸環状無水物 (PPACA) など) 等のカップリング剤及び DMAP などの適切な塩基の存在下、DCM (または DMF、クロロホルム、トルエン、またはこれらの混合物) などの不活性溶媒中でカンプトセシン - 二官能性リンカー中間体を形成し、

3) アミン基を有している、活性部位当たり 1 当量以上 (実施例では 2 当量) の得られた中間体と、PEG - 酸などの 1 当量の活性化ポリマーを、DCM (または DMF、クロロホルム、トルエン、またはこれらの混合物) などの不活性溶媒中で、1, (3 - ジメチルアミノプロピル) 3 - エチルカルボジイミド (EDC)、PPAC (または 1, 3 - ジイソプロピルカルボジイミド (DIPC) )、任意の適切なジアルキルカルボジイミド、向山試薬 (例えば 2 - ハロ - 1 - アルキル - ピリジニウムハライド)、またはプロパンホスホン酸環状無水物 (PPACA) など) 等のカップリング剤、及び、例えばシグマ・ケミカル社などの商業的供給源から入手可能であるか、あるいは公知の技術を利用して合成された、DMAP などの適切な塩基の存在下、0 ~ 22 までの温度で反応させる、各工程を有していてよい。

40

## 【0043】

ある好ましい態様では、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンの 10 - ヒドロ

50

キシリル基は、工程 1 ) の前に保護される。

【 0 0 4 4 】

7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン中間体自体が良好な溶解性を有し、能率的かつ効果的に、高純度の形態で精製可能なことから、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンにおける 10 - ヒドロキシリル基のようなカンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の OH 基を保護するためには、芳香族の保護基が好ましい。例えば、T B D P S C 1 、T B D M S C 1 及び T M S C 1 などのシリル含有保護基を、カンプトセシンまたはカンプトセシン類似体の 10 - ヒドロキシリル基の保護に使用することができる。

【 0 0 4 5 】

活性化ポリマー、すなわち、1 - 4 末端カルボン酸基を含むポリマーは、例えば、N O F サンプライト (登録商標) 型、または末端 OH 基を有する他の分岐鎖ポリマーを、当業者に周知の標準的な技法を用いて、対応するカルボン酸誘導体に転換することによって、調製することができる。例えば、本明細書の実施例 1 ~ 2 、及び、参照することにより本願に援用される、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第 5,605,976 号明細書を参考のこと。

【 0 0 4 6 】

第 1 及び第 2 カップリング剤は、同一でも、異なっていてもよい。

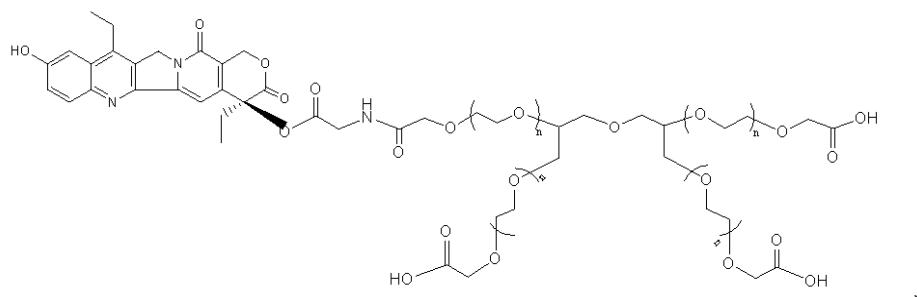
【 0 0 4 7 】

好ましい二官能性リンカー基の例としては、グリシン、アラニン、メチオニン、サルコシンなどが挙げられ、合成については実施例に示す。別の特異的合成に関しては、実施例に提供する。

【 0 0 4 8 】

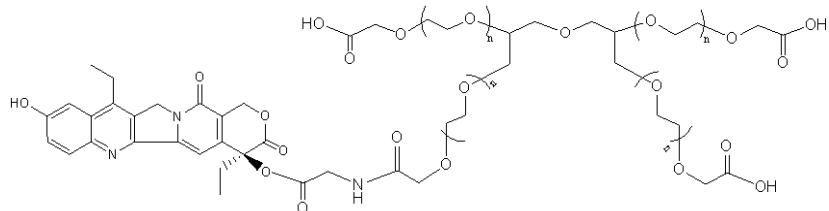
例えば、本発明の化合物としては、

【 化 9 】



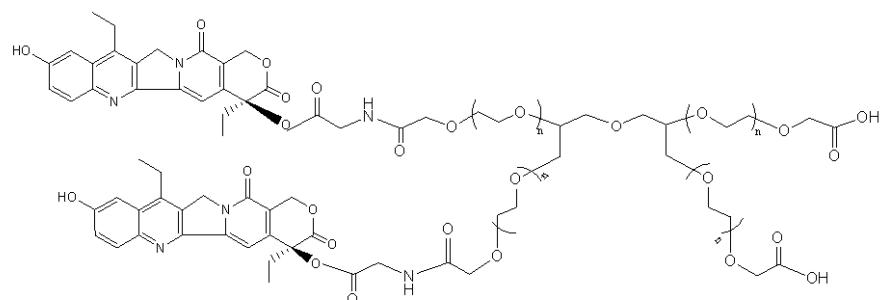
30

【 化 10 】



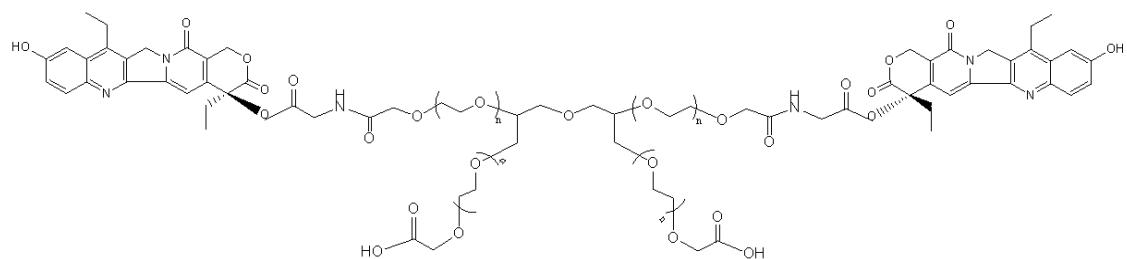
40

## 【化 1 1】



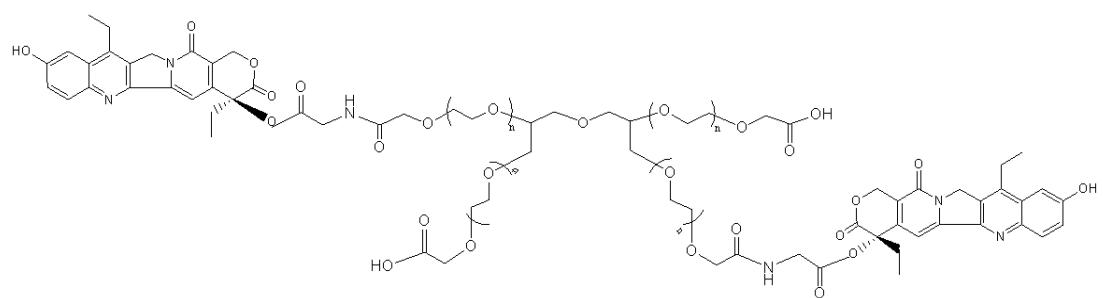
10

## 【化 1 2】



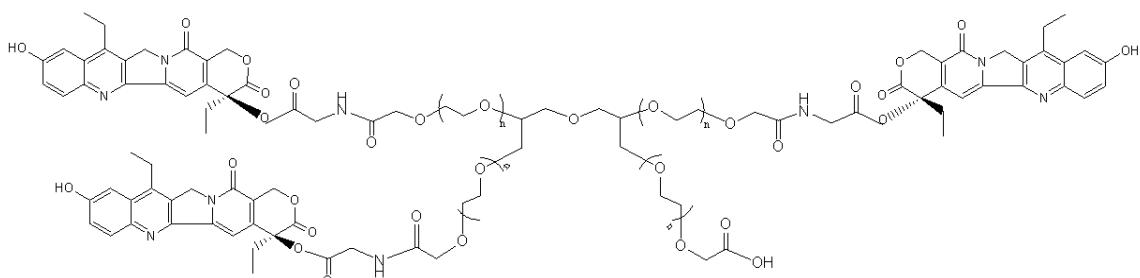
20

## 【化 1 3】



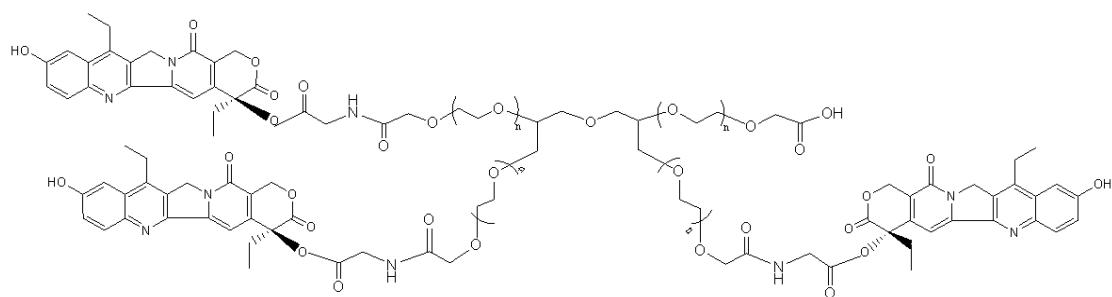
30

## 【化 1 4】



40

【化15】

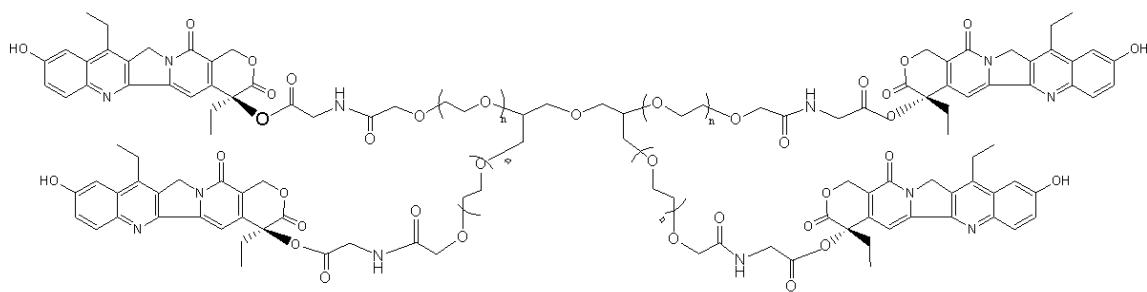


10

【0049】

及び

【化16】



20

【0050】

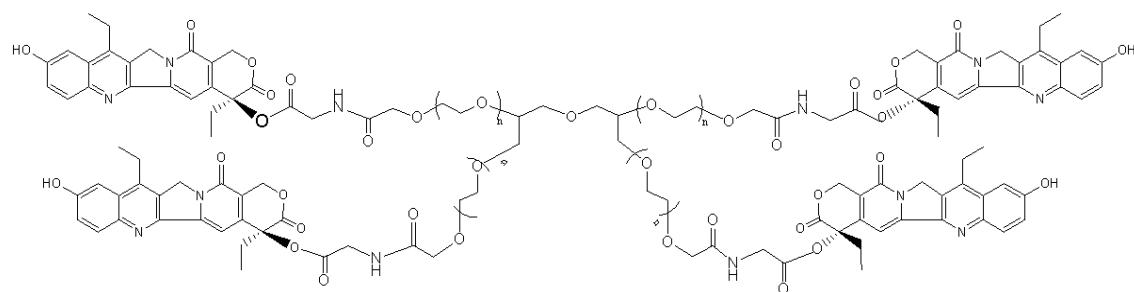
が挙げられる。

【0051】

1つの特に好ましい化合物は、

【化17】

30



【0052】

40

であり、

ここで、ポリマーの4つのアームすべてが、グリシンを介して、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンと共に役している。本発明のこの態様に従って調製された化合物のHPLC分析は、平均して4つの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン分子が、1つのPEG分子に共役していることを示す(4重量%)。

【0053】

E. 組成物 / 製剤

本発明のポリマー複合体を含む医薬組成物は、例えば、さまざまな周知の混合、溶解、顆粒化、粉末化(levigating)、乳化、カプセル化、封入化、または凍結乾燥化する方法など、当技術分野で周知の方法によって製造されて差し支えない。活性化合物を薬剤的に使

50

用可能な製剤に加工する工程を容易にする、補助剤及び賦形剤を含む1種類以上の生理的に許容できる担体と共に、組成物を製剤化してもよい。適切な製剤は、選択する投与経路に応じて決まる。本発明の多くの態様では、非経口の経路が好ましい。

【0054】

注射用としては、限定はしないが、静脈、筋肉及び皮下注射が挙げられ、本発明の化合物を水溶液で製剤化して差し支えなく、緩衝生理食塩水などの生理的に適合する緩衝液、または限定はしないがピロリドンまたはジメチルスルホキシドなどを含む極性溶媒で製剤化することが好ましい。

【0055】

化合物は、また、例えば、ボーラス注入または持続注入などによる、非経口的投与のための製剤であってもよい。注射用の製剤は、例えばアンプル剤または多数回投与型の容器など、単位投与量剤形(unit dosage form)で存在して差し支えない。有用な組成物としては、限定はしないが、懸濁液、溶液または、油性または水性媒体中のエマルションが挙げられ、懸濁化剤、安定化剤及び/または分散剤などの添加剤を含めてよい。非経口的投与用の医薬組成物としては、限定はしないが、活性化合物の塩(好ましい)などの水溶性の形態の水溶液が挙げられる。さらには、活性化合物の懸濁液を脂肪親和性の媒体で調製してもよい。適切な脂肪親和性の媒体としては、ゴマ油などの脂肪油、オレイン酸エチル及びトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームなどの物質が挙げられる。水性懸濁注射液は、カルボキシルメチル・セルロース・ナトリウム、ソルビトール、またはデキストランなど、懸濁液の粘度を増大させる物質を含んでいてもよい。随意的に、適切な安定化剤及び/または、化合物の溶解性を向上させる薬剤を懸濁液に含めて、高濃度の溶液を調製できるようにしてもよい。あるいは、活性成分は、使用前に、滅菌された、発熱物質を含まない(pyrogen-free)水などの適切な媒体で構成するための粉末の形態であって差し支えない。

【0056】

活性化合物を、当技術分野で周知の薬剤的に許容できる担体と組み合わせることにより、化合物を経口投与用に製剤化してもよい。これらの担体は、本発明の化合物を、錠剤、丸薬、トローチ剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、ペースト、スラリー、溶液、懸濁液、患者が飲用水で希釈するための濃縮液及び高濃度懸濁液、患者の食事で希釈するためのプレミックスなど、患者の経口摂取用として製剤化することができる。固体の賦形剤を使用し、随意的に、得られた混合物を粉末化し、必要に応じて他の適切な補助剤を加えた後、顆粒の混合物を処理して、錠剤または糖衣錠の中心部を得ることにより、経口用の医薬品を調製することができる。有用な賦形剤としては、特に、乳糖、しょ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤、例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン及びジャガイモデンプンなどのセルロース調製物、及びゼラチン、トラガカント、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、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム、及び/またはポリビニルピロリドン(PVP)などの他の物質が挙げられる。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸などの崩壊剤も加えて構わない。アルギン酸ナトリウムなどの塩もまた使用して差し支えない。

【0057】

吸入による投与には、加圧型のパックまたは噴霧器及び適切な推進体を用いたエアゾール噴霧の形態で、本発明の化合物を便利に送達させることができる。

【0058】

本化合物は、例えばカカオ脂または他のグリセリドなどの慣用的な座薬基剤を使用する、坐剤または保持浣腸(retention enema)などの直腸用組成物として製剤してもよい。

【0059】

上述の製剤に加えて、化合物はまた、徐放性製剤として製剤して差し支えない。このような長時間作用型の製剤は、移植(例えば、皮下または筋肉内に)または筋肉注射によって投与されて構わない。この発明の化合物は、適切なポリマーまたは疎水性物質(例えば

10

20

30

40

50

、薬剤的に許容できる油とのエマルション中)と共に、イオン交換樹脂と共に、または、限定はしないが難溶性の塩などの難溶性誘導体として、投与経路用に製剤されて差し支えない。

【0060】

リポソーム及びエマルションなど、他の送達システムもまた使用することができる。

【0061】

さらには、化合物は、治療薬を含む固体の疎水性ポリマーの半透性の基剤などの持続放出性の製剤を使用して送達されてもよい。さまざまな持続放出性の物質が確立されており、当業者には周知である。持続放出性のカプセルは、それらの化学的性質に応じて、数週間から100日を越えるまで、化合物を放出して差し支えない。特定の化合物の化学的性質及び生物学的安定性に応じて、さらなる安定化の方法を用いてもよい。

10

【0062】

F. 投薬量

治療に有効な量とは、カンプトセシンまたは関連する類似体、すなわち7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン感受性の状態を予防、軽減、または改善するのに効果的な化合物の量のことをいう。治療に有効な量の決定は、特に、本明細書の開示を考慮すれば、十分に、当業者が対応できる範囲内にある。

【0063】

本発明の方法に使用する任意の化合物のための治療に有効な量は、最初にインビトロ試験から推定することができる。次に、動物モデルに使用するための投薬量を製剤化して、有効な投薬量を含む血中濃度幅を達成することができる。次いで、このような情報を用いて、患者に有用な投薬量をさらに正確に決定することができる。

20

【0064】

当技術分野で周知の方法を使用して、細胞培養または実験動物における標準的な医薬的手段によって、本明細書に記載の化合物の毒性及び治療効果を決定することができる。当然ながら、投薬量は、投与形態及び投与経路に応じて変化しうる。患者の状態を考慮して、内科医がそれぞれ、的確な剤形、投与経路及び投薬量を選択して差し支えない。しかしながら、一般的には、本発明の化合物の全身送達のための、目下の好ましい投薬量の範囲は、約1～約100mg/kg/週であり、約2～約60mg/kg/週が好ましい。

【0065】

30

組成物は、1日1回投与して差し支えなく、または、複数週の治療プロトコルの一環として与えることが可能な複数回投与に分けて投与してもよい。正確な投薬量は、当業者に認識されるように、症状の段階及び重症度、ポリマー-プロドラッグ組成物に対する腫瘍の感受性、及び、治療される患者の個々の特性に応じて決まるであろう。

【0066】

G. 治療方法

上記を考慮して、化学式(I)で表される本発明の化合物を、それを必要としている患者に有効量で投与することを含む、哺乳動物を治療する方法も提供する。ここでDは生物活性部分、すなわちカンプトセシン類似体である。本発明のある好ましい態様では、Dは7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン残基である。

40

【0067】

本発明の別の態様は、哺乳動物におけるさまざまな病状の治療方法を提供する。本組成物は、とりわけ、哺乳動物における、腫瘍性疾患の治療、全身腫瘍組織量の低減、腫瘍の転移の抑制及び腫瘍の(tumor/neoplastic)増殖の再発予防に有用である。別の態様では、治療される癌は、充実性腫瘍、リンパ腫、小細胞肺癌、急性リンパ性白血病(ALL)、膵臓癌、膠芽腫、卵巣癌、胃癌などのうちの1つ以上でありうる。

【0068】

例えば、プロドラッグとして使用する、組成物の投与量は、そこに含まれる親分子によって決まるであろう。一般に、治療方法に用いられるプロドラッグの量とは、哺乳動物において所望の治療結果を効果的に達成する量である。当然、さまざまなプロドラッグ化合

50

物の投薬量は、親分子、インビポでの加水分解速度、ポリマーの分子量などによって、多少、変化するであろう。一般に、カンプトセシンのポリマーエステル誘導体及び関連する組成物は、約1～約100mg/kg/週の量で投与され、約2～約60mg/kg/週が好ましい。上に定義された範囲は例示であり、当業者は臨床経験及び治療適応に基づいて、選択したプロドラッグの最適量を決定するであろう。

【0069】

本発明の別の態様では、治療方法は、本明細書に記載の化合物を、それを必要としている、トポイソメラーゼの干渉によって治療可能な病状を患っている、哺乳動物または患者に、有効量で投与することが含まれる。

【実施例】

10

【0070】

以下の実施例は、本発明がさらに正しく認識されるためのものであり、いかなる方法によっても本発明の効力範囲を制限することは意味していない。実施例中に挙げられる下線及び太字の数字は、図1～5に対応している。

【0071】

一般的手法。すべての反応は、乾燥窒素またはアルゴン雰囲気下で行なわれた。市販の試薬は、さらに精製することなく使用した。すべてのPEG化合物を、使用前に、真空下またはトルエンから共沸蒸留することによって乾燥させた。<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、特別の定めのない限り、Varian Mercury 300 NMRスペクトロメーター、ならびに、溶媒として重クロロホルム及びメタノールを使用し、75.46Hzで取得した。化学シフト( )は、テトラメチルシラン(TMS)から低磁場側の100万分の1(ppm)単位で報告された。

20

【0072】

HPLC法。反応混合物ならびに中間体及び最終生成物の純度は、ベックマン・コルターのSystem Gold(商標登録)HPLC機器でモニタした。1mL/分の流量の0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)中の10-90%アセトニトリル勾配を用いて、多波長UV検出器と共に、ZOBAX 300SB C8逆相カラム(150×4.6mm)またはフェノメネックスジュピター(Phenomenex Jupiter)(登録商標)300A C18逆相カラム(150×4.6mm)を用いた。

【0073】

30

実施例1.<sup>40k</sup>4アーム-PEG-t-ブチルエステル(化合物2)：

<sup>40k</sup>4アーム-PEG-OH(12.5g、1当量)を220mLのトルエンと共に共沸蒸留し、35mLのトルエン/水を除去した。溶液を30まで冷却し、t-ブタノール中の1.0Mカリウム-t-ブトキシド(3.75mL、3当量×4=12当量)を加えた。混合物を30で30分間攪拌し、次に、ブロモ酢酸t-ブチル(0.975g、4当量×4=16当量)を加えた。反応を30で1時間保持した後、25度まで冷却した。150mLのエーテルをゆっくり加えて生成物を沈殿させた。得られた懸濁液を17まで冷却し、17で0.5時間置いた。粗生成物を濾過し、湿ったケーキをエーテルで2回洗浄した(2×125mL)。単離された湿ったケーキを50mLのDCMに溶解し、生成物を350mLのエーテルで沈殿させ、濾過した。湿ったケーキをエーテルで2回洗浄した(2×125mL)。生成物を40で真空乾燥させた(収率=98%、12.25g)。<sup>13</sup>C NMR(75.4MHz, CDCl<sub>3</sub>)：27.71, 68.48-70.71(PEG), 80.94, 168.97。

40

【0074】

実施例2.<sup>40k</sup>4アーム-PEG酸(化合物3)：

<sup>40k</sup>4アーム-PEG-t-ブチルエステル(化合物2、12g)を120mLのDCMに溶解し、60mLのTFAを加えた。混合物を室温で3時間攪拌し、次に、溶媒を35で真空除去した。得られた油状残渣を37.5mLのDCMに溶解させた。粗生成物を375mLのエーテルで沈殿させた。湿ったケーキを30mLの0.5%NaHCO<sub>3</sub>に溶解させた。生成物をDCMで2回抽出した(2×150mL)。合わせた有機層を2

50

.5 g の MgSO<sub>4</sub> で乾燥させた。溶媒を室温で真空除去した。得られた残渣を 37.5 ml の DCM に溶解し、生成物を 300 ml のエーテルで沈殿させ、濾過した。湿ったケイキをエーテルで 2 回洗浄した (2 × 125 ml)。生成物を 40 ml で真空乾燥させた (収率 = 90 %、10.75 g)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 67.93 - 71.6 (PEG), 170.83。

#### 【0075】

実施例 3 . T B D P S - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) (化合物 5) :

100 ml の無水 DCM 中の 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン (化合物 4、2.0 g、5.10 mmol、1 当量) の懸濁液に Et<sub>3</sub>N (4.3 ml、30.58 mmol、6 当量) 及び T B D P S C 1 (7.8 ml、30.58 mmol、6 当量) を加えた。反応混合物を一晩加熱還流した後、0.2 N の HCl 溶液 (2 × 50 ml)、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (100 ml)、及び塩水 (100 ml) で洗浄した。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、真空下で蒸発濃縮させた。残渣を無水 DCM に溶解し、ヘキサンを加えて沈殿させた。DCM / ヘキサンで沈殿を繰り返し、過剰の T B D P S C 1 を除去した。固体物を濾過し、真空乾燥させて、2.09 g の生成物を得た (収率 65 %)。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (3H, t, J = 7.6 Hz), 1.01 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.17 (9H, s), 1.83-1.92 (2H, m), 2.64 (2H, q, 6.9 Hz), 3.89 (1H, s, OH), 5.11 (2H, s), 5.27 (1H, d, J = 16.1 Hz), 5.72 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.07 (2H, d, J = 2.63 Hz), 7.36-7.49 (7H, m), 7.58 (1H, s), 7.75-7.79 (4H, m), 8.05 (1H, d, J = 9.4 Hz)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.82, 13.28, 19.52, 22.86, 26.48, 31.52, 49.23, 66.25, 72.69, 97.25, 110.09, 117.57, 125.67, 126.57, 127.65, 127.81, 130.02, 131.69, 131.97, 135.26, 143.51, 145.05, 147.12, 149.55, 149.92, 154.73, 157.43, 173.72。

#### 【0076】

実施例 4 . T B D P S - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Gly - Boc (化合物 6) :

100 ml の無水 DCM 中の T B D P S - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) (化合物 5、3.78 g、5.99 mmol、1 当量) 及び Boc - Gly - OH (1.57 g、8.99 mmol、1.5 当量) の 0 ml の溶液に、EDC (1.72 g、8.99 mmol、1.5 当量) 及び DMAP (329 mg、2.69 mmol、0.45 当量) を加えた。反応混合物を 0 ml で、出発物質が HPLC で完全に消えるまで攪拌した (およそ 1 時間 45 分)。有機層を 0.5 % NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (2 × 50 ml)、水 (1 × 50 ml)、0.1 N の HCl 溶液 (2 × 50 ml)、及び塩水 (1 × 50 ml) で洗浄し、MgSO<sub>4</sub> で乾燥させた。濾過及び真空下で蒸発濃縮後、4.94 g の粗生成物を得た (定量的収率)。粗固体物をさらに精製することなく、次の反応に使用した。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (3H, t, J = 7.6 Hz), 0.96 (3H, t, J = 7.5 Hz), 1.18 (9H, s), 1.40 (9H, s), 2.07-2.29 (3H, m), 2.64 (2H, q, 7.5 Hz), 4.01-4.22 (2H, m), 5.00 (1H, br s), 5.01 (2H, s), 5.37 (1H, d, J = 17.0 Hz), 5.66 (1H, d, J = 17.0 Hz), 7.08 (1H, d, J = 2.34 Hz), 7.16 (1H, s), 7.37-7.50 (7H, m), 7.77 (4H, d, J = 7.6 Hz), 8.05 (1H, d, J = 9.4 Hz)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.52, 13.30, 19.50, 22.86, 26.45, 28.21, 31.64, 42.28, 49.14, 67.00, 76.65, 79.96, 95.31, 110.13, 118.98, 125.75, 126.45, 127.68, 127.81, 130.03, 131.54, 131.92, 135.25, 143.65, 144.91, 145.19, 147.08, 149.27, 154.75, 155.14, 157.10, 166.98, 169.17。

#### 【0077】

実施例 5 . T B D P S - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Gly - HCl (化合物 7) :

5 ml の無水ジオキサン中の T B D P S - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Gly - Boc (化合物 6、1 g、1.27 mmol) に

ジオキサン中の 4 M HCl 溶液 5 mL を加えた。反応混合物を室温で、出発物質が HPLC で完全に消えるまで攪拌した(1時間)。反応混合物に 50 mL のエチルエーテルを加え、得られた固体物を濾過した。固体物を 50 mL の DCM に溶かし、塩水で洗浄した(飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液を加えて pH を 2.5 に合わせた)。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、真空下で蒸発濃縮した。残渣を 5 mL の DCM に溶かし、50 mL のエチルエーテルを加えて沈殿させた。濾過により、770 mg (収率 84%) の最終生成物を得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0.84 (3H, t, J = 7.6 Hz), 1.05 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.16 (9H, s), 2.15-2.30 (3H, m), 2.59 (2H, q, J = 7.6 Hz), 4.16 (1H, d, J = 17.9 Hz), 4.26 (1H, d, J = 17.9 Hz), 5.13 (2H, s), 5.46 (1H, d, J = 17.0 Hz), 5.60 (1H, d, J = 17.0 Hz), 7.11 (1H, d, J = 2.34 Hz), 7.30 (1H, s), 7.40-7.51 (6H, m), 7.56 (1H, dd, J = 2.34, 9.4 Hz), 7.77 (4H, dd, J = 7.6, 1.6 Hz), 7.98 (1H, d, J = 9.1 Hz)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8.09, 13.72, 20.26, 23.61, 26.94, 31.83, 41.01, 50.71, 67.62, 79.51, 97.03, 111.65, 119.69, 127.13, 128.97, 128.99, 129.11, 131.43, 131.96, 133.00, 133.03, 136.51, 145.62, 145.81, 147.24, 148.29, 150.58, 156.27, 158.68, 167.81, 168.34。 10

#### 【0078】

実施例 6. <sup>40k</sup>4 アーム - PEG - Gly - (20) - (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン) - (10) - TB DPS (化合物 8) :

14 mL の無水 DCM 中の <sup>40k</sup>4 アーム - PEGCOOH (化合物 3、1.4 g、0.036 mmol、1 当量) の溶液に TB DPS - (10) - (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Gly · HCl (化合物 7、207 mg、0.29 mmol、活性部位当たり 2.0 当量)、DMAP (175 mg、1.44 mmol、1.0 当量) 及び PPAC (0.85 mL の EtOAc 中の 50% 溶液、1.44 mmol、1.0 当量) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した後、真空蒸発させた。得られた残渣を DCM に溶かし、生成物をエーテルで沈殿させて濾過した。残渣を DMF / IPA で再結晶化し、生成物 (1.25 g) を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.45, 13.20, 19.39, 22.73, 26.42, 31.67, 40.21, 49.01, 66.83, 95.16, 110.02, 118.83, 125.58, 126.40, 127.53, 127.73, 129.96, 131.49, 131.76, 131.82, 135.12, 143.51, 144.78, 145.13, 146.95, 149.21, 154.61, 156.92, 166.70, 168.46, 170.30。 20

#### 【0079】

実施例 7. <sup>40k</sup>4 アーム - PEG - Gly - (20) - (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン) (化合物 9) :

化合物 <sup>40k</sup>4 アーム - PEG - Gly - (20) - (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン) - (10) - TB DPS (化合物 8、1.25 g) に、THF 及び 0.05 M の HCl 溶液の 1:1 混合液 (12.5 mL) 中の TBAF (122 mg、0.46 mmol、4 当量) 溶液を加えた。反応混合物を室温で 4 時間攪拌した後、DCM で 2 回抽出した。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、真空下で蒸発濃縮した。残渣を 7 mL の DMF に溶かし、37 mL の IPA で沈殿させた。固体物を濾過し、IPA で洗浄した。DMF / IPA で沈殿を繰り返した。最後に、残渣を 2.5 mL の DCM に溶かし、2.5 mL のエーテルを加えて沈殿させた。固体物を濾過し、40 の真空オーブンで一晩乾燥させた (860 mg)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.48, 13.52, 22.91, 31.67, 40.22, 49.12, 66.95, 94.82, 105.03, 118.68, 122.54, 126.37, 128.20, 131.36, 142.92, 144.20, 144.98, 147.25, 148.29, 156.44, 156.98, 166.82, 168.49, 170.39。この NMR データには、PEG - COOH の痕跡がなく、このことは、すべての COOH が反応したことを示唆している。蛍光検出によって測定された結合数 (loading) は、ポリマーの 4 本の分岐鎖のそれぞれに 7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンがすべて満たされた状態と一致する、3.9 であると判明した。この実験のさらに大規模での反復実施においても、同一の結果を得た。 40

#### 【0080】

実施例 8. Boc - (10) - (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン) (化合 50

物 1 0 ) :

250 ml の無水 DCM 中の 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン (化合物 4、2.45 g、1 当量) の懸濁液に、N<sub>2</sub>下、室温で、二炭酸ジ- t - ブチル(Di-tert-butyl dicarbonate) (1.764 g、1.3 当量) 及び無水ビリジン (15.2 ml、30 当量) を加えた。懸濁液を室温で一晩攪拌した。濁った溶液を、セライト (10 g) を通して濾過し、濾液を 0.5 N の HCl で 3 回 (3 × 150 ml)、及び NaHCO<sub>3</sub> 飽和溶液 (1 × 150 ml) で洗浄した。溶液を MgSO<sub>4</sub> (1.25 g) で乾燥させた。溶媒を 30 で真空除去した。生成物を 40 で真空乾燥した (収率 = 82%、2.525 g)。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.53, 157.38, 151.60, 151.28, 150.02, 149.70, 147.00, 146.50, 145.15, 131.83, 127.19, 127.13, 124.98, 118.53, 113.88, 98.06, 84.26, 72.80, 66.18, 49.33, 31.62, 27.73, 23.17, 13.98, 7.90。 10

【 0 0 8 1 】

実施例 9 . Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Ala - Bsmoc (化合物 11) :

無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) 中の Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) (化合物 10、0.85 g、1.71 mmol) 及び Bsmoc - Ala (0.68 g、2.3 mmol) の溶液に、0 で、EDC (0.51 g、2.67 mmol) 及び DMAP (0.065 g、0.53 mmol) を加えた。混合物を N<sub>2</sub>下、0 で 45 分間攪拌した後、室温まで温めた。反応の完了を HPLC で確認し、反応混合物を 1% NaHCO<sub>3</sub> (2 × 50 ml)、水 (50 ml) 及び 0.1 N の HCl (2 × 50 ml) で洗浄した。有機相を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過した。溶媒を減圧除去した。得られた固体物を 40 以下で一晩真空乾燥し、収率 95% で 1.28 g の生成物を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 171.16, 166.83, 157.16, 154.78, 151.59, 151.33, 149.82, 147.17, 146.68, 145.35, 145.15, 139.08, 136.88, 133.60, 131.83, 130.45, 130.40, 130.33, 127.40, 127.08, 125.32, 125.14, 121.38, 120.01, 114.17, 95.90, 84.38, 77.19, 76.64, 67.10, 56.66, 53.45, 49.96, 49.34, 31.7, 27.76, 17.94, 14.02, 7.53。ESI-MS, 786.20 [M + H]<sup>+</sup>。 20

【 0 0 8 2 】

実施例 10 . Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Ala (化合物 12) :

無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) 中の Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Ala - Bsmoc (化合物 11、4.2 g、5.35 mmol) 及び 4 - ピペリジノピペリジン (1.17 g、6.96 mmol) の溶液を室温で 5 時間、攪拌した。次にこの混合物を 0.1 N の HCl (2 × 40 ml) で洗浄後、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。この溶液を濾過し、溶媒を減圧蒸留によって除去し、HPLC による純度 93%、2.8 g の生成物を得た。この生成物をさらに、エーテル (3 × 20 ml) によって倍散(trituration)した後、酢酸エチル (4 × 20 ml) によって倍散して精製し、純度 97%、1.52 g (2.70 mmol) を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 168.39, 166.63, 156.98, 151.20, 151.15, 149.69, 146.67, 146.56, 145.37, 144.53, 131.66, 127.13, 124.99, 119.80, 113.82, 96.15, 84.21, 77.67, 67.16, 49.48, 49.06, 31.56, 27.74, 23.14, 15.98, 13.98, 7.57。 40

【 0 0 8 3 】

実施例 11 . <sup>40k</sup> 4 アーム - PEG - Ala - (20) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (10) - Boc (化合物 13) :

無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) に、Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Ala (化合物 12、1.50 g、2.5 mmol) 及び 4 アーム PEG - COOH (化合物 3、10.01 g、1.0 mmol) を室温で加えた。溶液を 0 まで冷却した後、EDC (0.29 g、1.5 mmol) 及び DMAP (0.30 g、2.5 mmol) を加えた。混合液を N<sub>2</sub>下、0 で 1 時間攪拌した。その後、室温に一晩保った。溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣を 40 ml の DCM に溶かし、50

エーテル (300 ml) で粗生成物を沈殿させた。濾過によって得られた湿った固体物を、DMF / IPA (60 / 240 ml) の混合液に 65 で溶解させた。溶液を 2 ~ 3 時間のうちに室温まで冷却し、生成物を沈殿させた。次に、固体物を濾過し、エーテルで洗浄した (2 × 200 ml)。湿ったケーキを 40 以下で一晩真空乾燥し、8.5 g の生成物を得た。

【0084】

実施例 12. <sup>40k</sup>4 アーム - PEG - Ala - (20) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) (化合物 14) :

無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 30% TFA 溶液 (130 ml) に、<sup>40k</sup>4 アーム - PEG - Ala - (20) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (10) - Boc (化合物 13、7.98 g) を室温で加えた。混合物を、3 時間、または出発物質の消失が HPLC で確認されるまで、攪拌した。溶媒を 35 、真空下で、可能な限り除去した。残渣を 50 ml の DCM に溶かし、エーテル (350 ml) で粗生成物を沈殿させ、濾過した。湿った固体物を DMF / IPA (50 / 200 ml) の混合液に 65 で溶解させた。溶液を 2 ~ 3 時間のうちに室温まで冷却し、生成物を沈殿させた。次に、固体物を濾過し、エーテルで洗浄した (2 × 200 ml)。湿ったケーキを 40 以下で一晩真空乾燥し、6.7 g の生成物を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.75, 169.30, 166.65, 157.00, 156.31, 148.36, 147.19, 145.03, 144.29, 143.00, 131.49, 128.26, 126.42, 122.47, 118.79, 105.10, 94.57, 78.08, 77.81, 77.20, 71.15, 70.88, 70.71, 70.33, 70.28, 70.06, 69.93, 69.57, 66.90, 49.14, 47.14, 31.53, 22.95, 17.78, 13.52, 7.46。 10

【0085】

実施例 13. Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Met - Bsmoc (化合物 15) :

無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) 中の Boc - (10) - 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン (化合物 10、2.73 g、5.53 mmol) 及び Bsmoc - Met (3.19 g、8.59 mmol) の溶液に、EDC (1.64 g、0.59 mmol) 及び DMAP (0.21 g、1.72 mmol) を 0 で加えた。混合液を N<sub>2</sub> 下、0 で 45 分間、攪拌した後、室温まで温めた。反応の完了を HPLC で確認し、反応混合物を 1% NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 ml) 、水 (100 ml) 及び 0.1 N の HCl (2 × 100 ml) で洗浄した。有機相を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過した。溶媒を減圧除去した。得られた固体物を 40 以下で一晩真空乾燥し、収率 88%、4.2 g の生成物を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.3, 166.8, 157.1, 155.2, 151.4, 151.2, 149.7, 147.0, 146.6, 145.3, 145.1, 138.9, 136.6, 133.5, 131.7, 130.5, 130.3, 130.2, 127.3, 127.0, 125.3, 125.1, 121.2, 119.8, 114.1, 96.1, 84.3, 76.7, 67.0, 56.7, 53.5, 53.4, 49.3, 31.6, 31.0, 29.7, 27.7, 23.1, 15.4, 13.9, 7.4; ESI-MS, 846.24 [M + H]<sup>+</sup>。 30

【0086】

実施例 14. Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Met - NH<sub>2</sub> · HCl (化合物 16) :

無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) 中の Boc - (10) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (20) - Met - Bsmoc (化合物 15、4.1 g、4.85 mmol) 及び 4 - ピペリジノピペリジン (1.06 g、6.31 mmol) の溶液を、室温で 5 時間、攪拌した。次に、この混合液を 0.1 N の HCl (2 × 40 ml) で洗浄した後、有機層を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。この溶液を濾過後、溶媒を減圧蒸留によって除去し、HPLC による純度 97% で 2.8 g の生成物を得た。この生成物をさらに、エーテル (3 × 20 ml) によって倍散した後、酢酸エチル (4 × 20 ml) によって倍散して精製し、純度 97% で 1.54 g を得た。<sup>13</sup>C NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 167.2, 166.5, 156.9, 151.12, 150.9, 149.8, 146.3, 145.9, 145.8, 144.9, 131.3, 127.2, 127.0, 125.1, 119.6, 113.8, 96.7, 84.3, 78.2, 67.0, 60.4, 52.2, 49.4, 31.4, 29.6 40

, 29.1, 27.7, 23.2, 15.1, 13.9, 7.7。

【0087】

実施例15.  $^{40k}$ 4アーム-P E G-M e t-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)-(10)-B o c(化合物17)：

無水C H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>(80m l)溶液に、B o c-(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)-(20)-M e t(化合物16、1.48g、2.25mm o l)及び4アーム-P E G-COOH(化合物3、9.0g、0.9mm o l)を室温で加えた。溶液を0まで冷却した後、E D C(0.26g、1.35mm o l)及びD M A P(0.27g、2.25mm o l)を加えた。混合液をN<sub>2</sub>下、0で1時間、攪拌した。その後、室温で一晩保持した。反応混合物を70m lのC H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>で希釈し、30m lの0.1N H C l/1M N a C l水溶液で抽出した。有機層をM g S O<sub>4</sub>で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。残渣を40m lのC H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>に溶かし、エーテル(300m l)で粗生成物を沈殿させた。濾過によって得られた湿った固体物を65で270m lのD M F/I P Aに溶解した。溶液を2~3時間のうちに室温まで冷却し、生成物を沈殿させた。次に、固体物を濾過し、エーテルで洗浄した(2×400m l)。D M F/I P A中の上記結晶化の手順を繰り返した。湿ったケーキを40で一晩、真空乾燥し、7.0gの生成物を得た。<sup>13</sup>C N M R(75.4 MHz, C D C l<sub>3</sub>)：169.8, 169.6, 166.5, 156.9, 151.2, 151.1, 149.9, 147.0, 146.6, 145.0, 131.7, 127.1, 126.8, 124.9, 119.7, 113.8, 95.5, 84.1, 70.1, 69.9, 66.9, 50.7, 49.2, 31.5, 31.2, 29.6, 27.6, 23.1, 15.3, 13.9, 7.5。 10

【0088】

実施例16.  $^{40k}$ 4アーム-P E G-M e t-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)(化合物18)：

無水C H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>(100m l)の30%T F A溶液に、硫化ジメチル(2.5m l)及び4アーム-P E G-M e t-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)-(10)-B o c(化合物17、6.0g)を室温で加えた。混合物を、3時間、または出発物質の消失がH P L Cで確認されるまで、攪拌した。溶媒を35、真空下で、可能な限り除去した。残渣を50m lのC H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub>に溶かし、エーテル(350m l)で粗生成物を沈殿させ、濾過した。湿った固体物をD M F/I P A(60/300m l)の混合液に65で溶解させた。溶液を2~3時間のうちに室温まで冷却し、生成物を沈殿させた。次に、固体物を濾過し、エーテルで洗浄した(2×200m l)。湿ったケーキを40以下で一晩真空乾燥し、5.1gの生成物を得た。<sup>13</sup>C N M R(75.4 MHz, C D C l<sub>3</sub>)：169.7, 166.6, 157.0, 156.3, 148.4, 147.3, 145.0, 144.4, 142.9, 131.5, 128.3, 126.4, 122.5, 118.7, 105.2, 94.7, 78.1, 67.0, 50.7, 49.2, 31.6, 31.3, 29.7, 23.0, 15.3, 13.5, 7.5；7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシンのP E Gに対する割合：2.1重量%。 20

【0089】

実施例17. B o c-(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)-(20)-S a r-B o c(化合物19)：

75m lのD C M中のB o c-(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン)(化合物10、750mg、1.52mm o l)の溶液に、B o c-S a r-O H(432mg、2.287mm o l)を加え、0まで冷却した。D M A P(432mg、2.287mm o l)及びE D C(837mg、0.686mm o l)を加え、反応混合物を0~室温にて1.5時間、攪拌した。次に反応混合物を0.5%N a H C O<sub>3</sub>(2×75m l)、水(2×75m l)、最後に0.1NのH C l(1×75m l)で洗浄した。ジクロロメタン層を無水M g S O<sub>4</sub>で乾燥させ、溶媒を真空蒸発させ、乾燥した。収量=0.900mg(89%)。構造をN M Rにて確認した。 40

【0090】

実施例18. 7-エチル-10-ヒドロキシカシカントセシン-(20)-S a r-T F A(化合物20)：

Boc-(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(20)-Sar-Boc(化合物19、900mg、1.357mmol)を、4mlのTFA及び16mlのDCMの溶液に加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を30でトルエンと共に蒸発させた。残渣を10mlのCHCl<sub>3</sub>に溶かし、エチルエーテルで沈殿させた。生成物を濾過し、乾燥させた。収量700mg(1.055mmol、78%)。<sup>13</sup>C NMR(67.8MHz, CDCl<sub>3</sub>): 168.26, 167.07, 158.84, 158.71, 148.82, 147.94, 147.22, 146.34, 144.04, 131.18, 130.08, 128.97, 124.46, 119.78, 106.02, 97.23, 79.84, 79.34, 66.87, 50.84, 49.86, 31.81, 23.94, 15.47, 13.84, 8.08。

## 【0091】

実施例19. TBDMSC(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(20)-Sar·HCl(化合物21):

無水DMF(30ml)中の7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン-(20)-Sar·TFA(化合物20、2.17g、3.75mmol、1当量)の溶液を200mlの無水DCMで希釈した。Et<sub>3</sub>N(2.4ml、17.40mmol、4.5当量)を加えた後、TBDMSC(2.04g、13.53mmol、3.5当量)を加えた。HPLCが出発物質の消失を示すまで(およそ1時間)、反応混合物を室温で攪拌した。有機層を0.5%NaHCO<sub>3</sub>で2回、水で1回、塩水で飽和させた0.1N HCl溶液で2回洗浄した後、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。濾過し、溶媒を真空蒸発させた後、得られた油をDCMに溶解させた。エーテルを加えて得た固体物を、細または中程度のブフナー漏斗を使用して濾過した(2.00g、収率87%)。固体物のHPLCは、純度96%を示した。<sup>1</sup>H NMR及び<sup>13</sup>C NMRによって構造を確認した。<sup>1</sup>H NMR(300MHz, CD<sub>3</sub>OD): 0.23(6H, s), 0.96(9H, s), 0.98(3H, t, J = 7.3 Hz), 1.30(3H, t, J = 7.6 Hz), 2.13-2.18(2H, m), 2.67(3H, s), 3.11(2H, q, J = 7.6 Hz), 4.10(1H, d, J = 17.6 Hz), 4.22(1H, d, J = 17.6 Hz), 5.23(2H, s), 5.40(1H, d, J = 16.7 Hz), 5.55(1H, d, J = 16.7 Hz), 7.32(1H, s), 7.38-7.43(2H, m), 8.00(1H, d, J = 9.1 Hz)。<sup>13</sup>C NMR(75.4MHz, CD<sub>3</sub>OD): -4.14, 8.01, 14.10, 19.30, 23.98, 26.16, 31.78, 33.52, 49.46, 50.95, 67.66, 79.80, 97.41, 111.96, 119.99, 127.75, 129.28, 129.67, 131.57, 145.24, 146.86, 147.16, 148.02, 150.34, 156.69, 158.72, 167.02, 168.27。

## 【0092】

実施例20. <sup>40k</sup>4アーム-PEG-Sar-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(10)-TBDMSC(化合物22):

150mlの無水DCM中の<sup>40k</sup>4アーム-PEG-COOH(化合物3、10g、0.25mmol、1当量)の溶液に、20mlの無水DMF中のTBDMSC(10)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(10)-Sar·HCl(化合物21、1.53g、2.5mmol、2.5当量)の溶液を加え、混合液を0まで冷却した。この溶液にEDC(767mg、4mmol、4当量)及びDMAP(367mg、3mmol、3当量)を加え、反応混合物を室温までゆっくりと温め、室温で一晩攪拌した。次に、反応混合物を真空蒸発させ、残渣を最小量のDCMに溶解させた。エーテルを加えて、固体物を形成させ、これを真空下で濾過した。残渣を30mlの無水CH<sub>3</sub>CNに溶かし、600mlのIPAを加えて沈殿させた。固体物を濾過し、IPA及びエーテルで洗浄し、生成物(9.5g)を得た。NMRで構造を確認した。

## 【0093】

実施例21. <sup>40k</sup>4アーム-PEG-Sar-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(化合物23):

方法A. <sup>40k</sup>4アーム-PEG-Sar-(20)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)-(10)-TBDMSC(化合物22)を、H<sub>2</sub>O中のTFA 50%混合液(200ml)に溶解させた。反応混合物を室温で10時間攪拌した後、100mlのH<sub>2</sub>Oで希釈し、DCM(2×300ml)で抽出した。合わせた有機相をH<sub>2</sub>O(2×100ml)で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、真空蒸発させた。残渣を100ml

10

20

30

40

50

1 の無水 D M F に溶かし、ヒートガン(heat gun)で徐々に温め、4 0 0 m l の D M F をゆっくり加えて沈殿させた。固体物を濾過し、I P A 中の 2 0 % D M F 及びエーテルで洗浄した。固体物を D C M に溶かし、エーテルで沈殿させた(6.8 g)。構造を N M R で確認した。

【0094】

方法 B . <sup>40k</sup> 4 アーム - P E G - S a r - (20) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) - (10) - T B D M S (1 g) を、10 m l の 1 N H C l 溶液に溶解させた。反応混合物を室温で1時間攪拌し(H P L C で確認)、その後、D C M (2 × 4 0 m l) で抽出した。有機層を M g S O <sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、真空蒸発させた。得られた鮮黄色の残渣を 1 0 m l の D M F に溶かし(ヒートガンで若干温めた)、次に、4 0 m l の I P A を加えた。得られた固体物を濾過し、4 0 で一晩、真空オーブンにて乾燥させた。構造を N M R で確認した。 10

【0095】

生物学データ

実施例 22. 毒性データ

ヌードマウスを使用して、7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシンと共に4アーム P E G の最大耐用量(M T D)を試験した。マウスは、死亡率及び病気の徵候について14日間モニタされ、体重の減少が治療前体重の > 2 0 % の時点で屠殺した。 20

【0096】

表1は各化合物の単回投与及び複数回投与の両方における最大耐用量を示す。複数回投与での各投与は、マウスに1日おきに10日間与えられ、その後の4日間を含め、全部で14日間、マウスを観察した。 20

【表1】

表1. ヌードマウスにおけるMTDデータ

化合物	投与量 (mg/kg)	生存数/総数	コメント
化合物9 単回投与	25	5/5	
	30	5/5	
	35	4/5	体重の減少が > 20% に達したため、 安楽死させたマウス
化合物9 複数回投与*	10	5/5	
	15	3/5	体重の減少が > 20% に達したため、 安楽死させたマウス
	20	0/5	体重の減少が > 20% に達したため、 安楽死させたマウス

30

30

40

【0097】

単回投与の場合の <sup>40k</sup> 4 アーム - P E G - G l y - (20) - (7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン) (化合物9) の M T D は、3 0 m g / k g であり、複数回投与の場合は 1 0 m g / k g (q 2 d × 5) であることが判明した。 40

【0098】

実施例 23. インビトロにおけるデータ

表2において、細胞毒性(I C <sub>50</sub>の結果を、各化合物について μ M で示す)は、インビトロにおける、各化合物の抗腫瘍作用の指標を提供する。この試験を、4 アーム P E G 化された 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトセシン複合体の P E G 化の効果の測定に用

50

いた。PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン及びCPT-11のインビトロにおける細胞毒性を、MTS試験を用いて測定した。細胞を、37度で72時間、薬剤で培養した。培養の後、MTS染料を加え、着色した生成物(ホルマザン)の形成を490nmで測定した。

【0099】

4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)及びCPT-11のIC<sub>50</sub>値は、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)が、試験した腫瘍細胞のすべてにおいて、CPT-11よりもはるかに高いインビトロにおける抑制効果を有することを示唆している。さらには、4-アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)が、HT29腫瘍細胞を除いて、天然の7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンよりも著しく高いインビトロにおける抑制効果を有することを示唆している。

【0100】

PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体は、カンプトサーに比べて、約10~600倍の効能があった。PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体は、COLO205、HT-29及びOVCA-8の各細胞株において、Pegamotecan(カンプトセシンのPEG化プロドラッグ)に比べて、約8~16倍感受性であった。

【表2】

表2. IC<sub>50</sub>(μM)データ

癌の種類	細胞株	7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン	化合物9	CPT-11
結腸直腸癌	Colo 205	0.2 ± 0.2	1.0 ± 0.6	11 ± 1.4
	HT29	0.1 ± 0.04	0.5 ± 0.3	27 ± 8.6
肺癌	A549	1.0 ± 0.1	2.7 ± 0.4	67 ± 17
膵臓癌	PANC-1	0.56 ± 0.38	0.67 ± 0.14	34 ± 16
	MIA PaCa-2	0.18	0.09	67 ± 46
	ASPC-1	0.64 ± 0.13	1.6 ± 1.1	33 ± 1.0
	BxPC-3	0.54 ± 0.58	0.24 ± 0.04	44 ± 44
卵巣癌	OVCAR-3	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.2	20 ± 7.1
	OV90	0.1 ± 0.02	0.6 ± 0.7	18 ± 4.8
	OVCAR-8	0.03 ± 0.01	0.5 ± 0.1	9.0 ± 1.3
	A2780	0.02 ± 0.01	0.2 ± 0.2	8.0 ± 3.5
	SK-OV-3	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.01	52 ± 8.5

4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)(化合物9)のIC<sub>50</sub>は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンと同等として表される。

示されている値は、平均値±SD(n=3)であり、SDが示されていない値は、2回の反復の平均値である。

【0101】

さまざまなアミノ酸を含むPEG-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体は、表3にまとめた癌細胞株群に対し、インビトロにおける細胞毒性効果がある。すべてのPEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン複合体は、インビトロにおいて、小分子プロドラッグであるCPT-11及びPegamotecanの活性を上回る、抗腫瘍活性効果を示した。

10

20

30

40

## 【表3】

表3. さまざまなPEG-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体の  
IC<sub>50</sub>(μM)データ

化合物	結腸直腸癌		卵巣癌	肺癌
	Colo 205	HT29	OVCAR-3	A549
化合物12 (Ala)	0.03	0.16	0.14	4.4
化合物23 (Sar)	0.04	0.27	0.17	11
化合物18 (Met)	0.03	0.14	0.13	1.6
7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン	0.08	0.08	ND	ND
CPT-11	20	56	41	13

10

20

30

## 【0102】

実施例24. インビボにおけるデータ：乳房腫瘍異種移植マウスにおける単回投与の有効性

ヌードマウスで増殖したヒトの皮下乳癌(MX-1)に対する4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体(化合物9)の有効性を次のように測定した。少なくとも1週間の順応期間の後、供与マウスから、ヌードマウスの左側腹部(left auxiliary flank region)の単一の皮下部位に腫瘍小片を移植することにより、腫瘍を生着させた。腫瘍移植部位を週に2回観察し、1回は触診した。各マウスの腫瘍容積を、測定器で二次元測定し、公式：腫瘍容積 = (長さ × 幅<sup>2</sup>)を利用して計算することによって、決定した。腫瘍が、約100mm<sup>3</sup>の平均量に達した時点で、マウスを、非治療対照群、本明細書の実施例7に従って調製した4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)群、ここに参照することにより本願に援用されるConoverら(Anti-Cancer Drug Design, 1999, 14:499-506)の記載に従って調製したPEG-Ala-CPT群、及びCPT-11群からなる実験群に割付した。薬剤は、20mg/kgマウス体重の単回投与として、尾静脈を介した静脈注射によって投与された。複合体の用量は、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンに相当する量のことを指す。試験開始時及び単回投与後31日目に、マウスの体重及び腫瘍の大きさを測定した。

## 【0103】

表4は、20mg/kgマウス体重の静脈注射による単回投与後31日目の、MX-1乳房腫瘍を異種移植されたマウスにおける腫瘍の縮小の測定結果を示している。腫瘍の全体的な成長を平均腫瘍容積(TV)として算出した。治療群の対照群に対する比(T/C)も算出した。腫瘍の回帰の割合は、インビボにおける各化合物の活性を示唆している。4アームPEG-G1y-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン複合体は、マウスの生存率100%、及び治癒率100%の顕著な抗腫瘍活性を示した。CPT-11群及び生理食塩水対照群では、抑制は見られず、生存率0%であったことを示した。すべてのデータを表4にまとめる。

40

【表4】

表4. MX-1乳房腫瘍の異種移植マウスモデルにおける  
単回投与の有効性の比較

化合物	平均 TV ± SD (mm <sup>3</sup> )	中央値 TV (mm <sup>3</sup> )	F/I (%)	TV ± SD における変化 (%)	TGI (%)	回帰 (%)	治癒 (%)	生存 (%)	T/C (%)
Control	1136 ± 686	785	1259	1399 ± 658	0	0	0	0	---
化合物9	7 ± 9	3	7	-94 ± 10	99	100	100	100	0.3
PEG-Ala-CPT	43 ± 41	40	42	-40 ± 93	96	50	33	100	5
CPT-11	845 ± 50	845	843	1424 ± 432	26	0	0	0	108

## 【0104】

結果は、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)が、乳癌の治療において、PEG-Ala-CPTまたはCPT-11と比較して、有意に効果があることを示している。

## 【0105】

MX-1乳房腫瘍モデルでは、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)での治療により、腫瘍の増殖がほぼ100%抑制され、すべての動物が完全に治癒した。等価の投与量でのCPT-11の治療では、26%の腫瘍増殖抑制を生じた。

## 【0106】

実施例25. インビボにおけるデータ：乳房腫瘍異種移植マウスにおける複数回投与の有効性

ヌードマウスにおけるヒトの乳癌(MX-1)の増殖に対する、一連の4アームPEG-アミノ酸(誘導体)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体の有効性を測定した。マウスを、本明細書の記載に従ってそれぞれ調製した、4アームPEG-Ala-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)、4アームPEG-Met-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)、4アームPEG-Sar-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)、CPT-11または生理食塩水対照の各群に割り付けた。マウスに、6日間連続して、5mg/kg/日を投与した(2日毎[q × 2d] × 6回)。マウス体重及び腫瘍の大きさを初回投与後及びその後の投与31日目までモニタした。

## 【0107】

表5は、5mg/kg/日を6日間(q 2d × 6)静脈注射後、31日目に、MX-1乳房腫瘍細胞を異種移植されたマウスにおける腫瘍の縮小の測定結果を示している。4アームPEG-アミノ酸(誘導体)-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体のすべてにおいて、マウスの生存率100%、回帰100%という顕著な抗腫瘍活性を示した。CPT-11群及び生理食塩水対照群では、生存率0%であり、抑制されなかったことを示した。すべてのデータを表5にまとめる。

10

20

30

40

【表5】

表5. MX-1乳房腫瘍の異種移植マウスモデルにおける複数回投与の有効性の比較

化合物	平均 TV $\pm$ SD (mm <sup>3</sup> )	中央値 TV (mm <sup>3</sup> )	F/I (%)	TV $\pm$ SD における変化 (%)	TGI (%)	回帰 (%)	治癒 (%)	生存 (%)	T/C (%)
Control	1136 $\pm$ 686	785	1259	1399 $\pm$ 658	0	0	0	0	---
化合物12 (Ala)	10 $\pm$ 11	9.6	10	-91 $\pm$ 11	99	100	67	100	1.2
化合物9 (Gly)	12 $\pm$ 18	6.6	14	-91 $\pm$ 10	99	100	100	100	0.8
化合物18 (Met)	8 $\pm$ 9	5.6	7.8	-94 $\pm$ 7	99	100	100	100	0.7
化合物23 (Sar)	12 $\pm$ 10	14.6	13	-87 $\pm$ 12	99	100	100	100	1.9
CPT-11	632 $\pm$ 698	340	594	423 $\pm$ 243	44	0	0	0	43

## 【0108】

データは、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの4アームPEG-アミノ酸誘導体が、乳癌の治療において、CPT-11と比較して著しく効果があることを示している。

## 【0109】

実施例26. 小大の乳房腫瘍を異種移植されたマウスのインビボにおける有効性

小(約100mm<sup>3</sup>)または大(約450mm<sup>3</sup>)のヒト乳房腫瘍MX-1を生着させたヌードマウスにおいて、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の抗腫瘍効果を、評価した。単回投与及び複数回投与の投与計画の両方について、マウスにおける抗腫瘍治療活性を測定した。小さい乳房腫瘍を異種移植されたマウスでは、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の単回投与(20mg/kg)での治療で、TGIが100%に至った。4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の複数回投与(20mg/kg、q2d×5)での治療の結果もまた、TGI 100%に至った。CPT-11の単回投与(20mg/kg)では、腫瘍の増殖は抑制されず、CPT-11の複数回投与(20mg/kg、q2d×5)では、31日目の時点でTGI 44%の結果となった。

## 【0110】

大きい乳房腫瘍を移植されたマウスでは、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の最大耐用量(MTD)の単回投与(30mg/kg)での治療の結果は、TGI 96%に至った。6匹のマウスのうち4匹が、54日目の時点で治癒した。CPT-11の最大耐用量(MTD)の単回投与(80mg/kg)での治療では、13日目にTGI 70%の結果となった。全身腫瘍組織量が過剰になったため、20日目には、すべての動物を屠殺した。MTD投与(10mg/kg、q2d×5)での4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の複数回投与でも、TGIは96%に至り、6匹のマウスのうち5匹が54日目の時点で治癒した。CPT-11では、MTD(40mg/kg q2d×5)での複数回投与で、13日の時点でも~95%のTGIに至った。しかしながら、~5週間後、6匹のマウスのうちの4匹で腫瘍が再増殖した。CPT-11では、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)と等価の投与量(10mg/kg、q2d×5)を与えた場合、治療が中断されるまでは有効なTGIを有したが、その後、腫瘍が再増殖した。結果を図6A及び6Cに記載する。MTDを与えた場合に、4アームPEG-Gly

10

20

30

40

50

- (7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)またはCPT-11のいずれかでの治療では、図6B及び6Dに示すように、治療の継続期間中に動物の体重が顕著に減少しなかったことから、抗腫瘍効果は、一般的な毒性効果に起因しているのではない。

【0111】

単回投与または複数回投与の注射をしたMX-1乳房腫瘍モデルでは、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)は、小(100mm<sup>3</sup>)及び大(450mm<sup>3</sup>)の大きさで生着させた腫瘍における腫瘍増殖を、効果的に抑制した。MX-1乳房腫瘍を異種移植されたマウスにおいて、約75mm<sup>3</sup>～約450mm<sup>3</sup>の大きさの腫瘍の治療に成功した。

【0112】

実施例27. インビボにおけるデータ：結腸直腸腫瘍を異種移植されたマウスにおける単回投与の有効性

この実施例では、30mg/kgの4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)またはCPT-11を単回投与で静脈注射した後、4、8、11、15、18、及び22日目に、HT-29結腸直腸腫瘍細胞を異種移植したマウスの腫瘍の縮小を測定した。CPT-11は、80mg/kgの量でも投与した。結果を図7に記載する。4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体は、顕著な抗腫瘍活性を示した。生理食塩水による対照群では、抑制は見られず、生存率0%であった。結果は、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)が、結腸直腸癌の治療において、CPT-11と比較して著しく効果があることを示している。

【0113】

実施例28. インビボにおけるデータ：結腸直腸腫瘍を異種移植されたマウスにおける複数回投与の有効性

10mg/kg/用量の4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)またはCPT-11を5日間静脈注射した後、4、8、11、15、18、及び22日目に、HT-29結腸直腸腫瘍細胞を異種移植したマウスの腫瘍の縮小を測定した。CPT-11は、40mg/kg/用量を5日間の投与も行った。結果を図8に記載する。複数回投与でも、同様の結果が観察された。さらには、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の複数回投与では、CPT-11と比較して、顕著な治療効果を示した。結果は、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の複数回投与が、結腸直腸癌の治療において、CPT-11と比較して著しく効果があることを示している。MX-1腫瘍を異種移植されたマウスに見られたように、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)またはCPT-11での治療では、治療期間中にマウスの体重は顕著には減少しなかった。

【0114】

実施例29. インビボにおけるデータ：臍臓腫瘍を異種移植されたマウスにおける単回投与の有効性

この実施例では、30mg/kgの4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)またはCPT-11を単回投与で静脈注射した後、4、8、11、15、18、及び22日目に、MiaPaca-2臍臓腫瘍細胞を異種移植したマウスの腫瘍の縮小を測定した。CPT-11は、80mg/kgの量でも投与した。結果を図9に記載する。4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体は、顕著な抗腫瘍活性を示した。生理食塩水による対照群及びCPT-11群では、抑制は見られなかった。結果は、4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)が、臍臓癌の治療において、CPT-11と比較して著しく効果があることを示している。4アームPEG-G1y-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の単回投与での治療では、71%のTGIの結果となったのに対し、CPT-11の単回投与の注射での治療では、TGIは0%であった。

10

20

30

40

50

## 【0115】

実施例30. インビボにおけるデータ：膵臓腫瘍を異種移植されたマウスにおける複数回投与の有効性

10 mg / kg / 用量の 4 アーム P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) または C P T - 1 1 を 5 日間静脈注射した後、 4 、 8 、 1 1 、 1 5 、 1 8 、 及び 2 2 日目に、 M i a P a C a - 2 膵臓腫瘍細胞を異種移植したマウスの腫瘍の縮小を測定した。結果を図 1 0 に記載する。 4 アーム P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) の複数回投与では、 C P T - 1 1 と比較して、顕著な治療効果を示した。結果は、 4 アーム P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) の複数回投与が、膵臓癌の治療において、 C P T - 1 1 と比較して著しく効果があることを示している。 4 アーム P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) の複数回投与での治療では、 9 5 % の T G I の結果となったのに対し、 C P T - 1 1 では、 T G I は 3 4 % であった。 10

## 【0116】

実施例31. インビトロでの代謝

P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) 複合体のインビトロにおける代謝を、ラット肝細胞で観察した。 P E G - G l y - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) をラット肝細胞と共に、 3 7 、 pH 7 . 5 で 2 時間培養した。図 1 1 に示すように、 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン及び 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン - グルクロニド ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン - G ) が主要な代謝産物として確認され、これは、インビボにおける 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシンの既知の代謝経路と一致している。 20

## 【0117】

実施例32. P E G 複合体の特性

表 6 に、 4 種類の P E G - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) 複合体の生理食塩水における溶解度を示す。 4 種類の P E G - ( 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン ) 複合体のすべてにおいて、 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシンで最大 4 mg / ml に相当する、良好な溶解性を示した。ヒト血漿中では、 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシンは、 2 2 ~ 5 2 分の倍加時間で P E G 複合体から着実に放出され、その放出は、次の実施例 3 3 に記載するように、 pH 及び濃度依存性のように見えた。 30

## 【表 6 】

表6. PEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン複合体の性質

化合物	生理食塩水における溶解度 (mg/ml) <sup>a</sup>	ヒト血漿における $t_{1/2}$ (分) <sup>b</sup>	血漿における倍加時間 (分) <sup>c</sup>		
			ヒト	マウス	ラット
化合物 9 (Gly)	180	12.3	31.4	49.5	570
化合物 12 (Ala)	121	12.5	51.9	45.8	753
化合物 23 (Ser)	ND	19.0	28.8	43.4	481
化合物 18 (Met)	142	26.8	22.2	41.9	1920

<sup>a</sup> 7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンは生理食塩水には不溶性である。

<sup>b</sup> PEG複合体の半減期。

<sup>c</sup> 7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの複合体からの形成速度。

## 【0118】

P E G - 7 - エチル - 1 0 - ヒドロキシカンプトセシン複合体は、生理食塩水及び他の水性溶媒中で、室温で最大 2 4 時間まで、良好な安定性を示す。

## 【0119】

10

20

30

40

50

### 実施例 3 3 . 安定性における濃度及び pH の影響

先の研究に基づいて、20-OH位のアシル化によって、活性化された閉環構造中に、ラクトン環を保護する。UV系のHPLC法を用いて、ラット及びヒト血漿における水溶液中の安定性及び加水分解の特性をモニタした。4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体を、各試料と共に、室温で5分間、培養した。

#### 【 0 1 2 0 】

緩衝液中のPEG-7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン複合体の安定性は、pHに依存した。図12は、さまざまな試料における4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の安定性を示している。図13は、PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)からの7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの放出速度がpHの上昇に従って増大することを示している。

#### 【 0 1 2 1 】

### 実施例 3 4 . 薬物動態学

腫瘍を有しないBalb/Cマウスに、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体を20mg/kgの単回投与によって注射した。さまざまな時点において、マウスを屠殺し、HPLCで、原形のままの複合体及び放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンについて、血漿を分析した。非コンパートメント解析(WinNonlin)を用いて、薬物動態学的分析を行った。詳細を表7に記す。

#### 【表7】

10

20

30

表7. 薬物動態データ

パラメーター	化合物9	化合物9から放出された 7-エチル-10- ヒドロキシカンプトセシン
AUC (h* $\mu$ g/ml)	124,000	98.3
末端のt <sub>1/2</sub> (時間)	19.3	14.2
C <sub>max</sub> ( $\mu$ g/ml)	20,500	13.2
CL(ml/時間/kg)	5.3	202
V <sub>ss</sub> (ml/kg)	131	3094

#### 【 0 1 2 2 】

図14に示すように、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンのPEG化は、循環半減期の長期化及び天然薬である7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンへの高濃度の曝露を生じる。4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体の腸肝循環が見られた。マウスにおけるPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の薬物動態プロファイルは、最初の2時間の間に急速な血漿の分布相を示し、その後、複合体の18~22時間の最終排泄相の半減期、及びそれに付随する7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの18~26時間の最終排泄相の半減期を示す、二相性であった。

#### 【 0 1 2 3 】

さらに、ラットにおいて、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の薬物動態プロファイルを調査した。ラットでは、3、10及び30mg/kg(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン相当)の投与量を用いた。ラットにおける薬物動態プロファイルはマウスのものと一致した。

40

50

## 【0124】

ラットでは、PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)は、12~18時間の消失半減期を伴う、循環からの二相性のクリアランスを示した。4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンは、21~22時間の明白な消失半減期を有していた。最大血漿濃度( $C_{max}$ )及び濃度曲線下面積(AUC)は、ラットでは、用量依存性の形で増大した。マウスまたはラットでは、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)複合体から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの明白な半減期は、CPT-11から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの明白な半減期として報告されたよりも著しく長く、また、4アームPEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの曝露は、CPT-11から放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの曝露として報告されたよりも著しく大きい。親化合物のクリアランスは、ラットにおいて、0.35ml / 時間 / kg であった。親化合物の定常状態での推定される分配量(Vss)は、5.49ml / kg であった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンのクリアランスは、ラットにおいて、131ml / 時間 / kg であった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの推定Vssは、ラットにおいて、2384ml / kg であった。放出された7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシンの腸肝循環が、マウス及びラットの両方において観察された。

10

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0125】

【図1】4-アームポリエチレングリコール酸を調製する反応スキームを図式的に示す。

【図2】実施例3~7に記載した、4アーム-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の調製の反応スキームを図式的に示す。

【図3】実施例8~12に記載した、4アーム-PEG-Ala-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の調製の反応スキームを図式的に示す。

【図4】実施例13~16に記載した、4アーム-PEG-Met-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の調製の反応スキームを図式的に示す。

30

【図5】実施例17~21に記載した、4アーム-PEG-Sar-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の調製の反応スキームを図式的に示す。

【図6】実施例26に記載した、大きいMX-1乳房腫瘍を異種移植されたマウスにおける、単回投与及び複数回投与の有効性を示す。

【図7】実施例27に記載した、HT-29結腸直腸腫瘍を異種移植されたマウスにおける、単回投与の有効性を示す。

【図8】実施例28に記載した、HT-29結腸直腸腫瘍を異種移植されたマウスにおける、複数回投与の有効性を示す。

【図9】実施例29に記載した、MiaPaca-2膵臓腫瘍を異種移植されたマウスにおける、単回投与の有効性を示す。

40

【図10】実施例30に記載した、MiaPaca-2膵臓腫瘍を異種移植されたマウスにおける、複数回投与の有効性を示す。

【図11】実施例31に記載した、4アーム-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)のインピトロ代謝を示す。

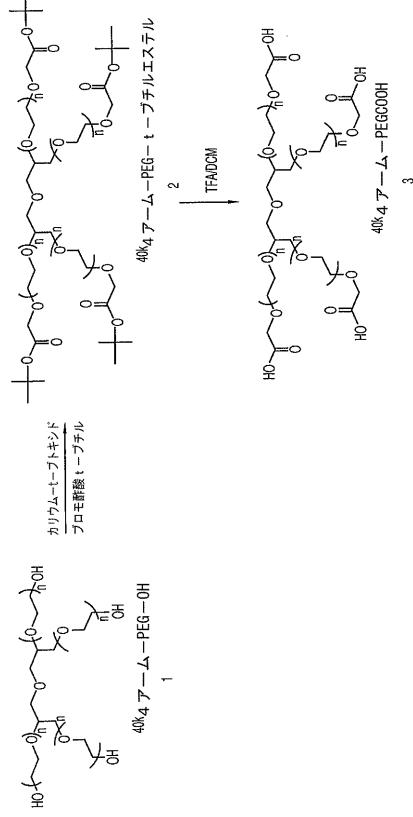
【図12】実施例33に記載した、4アーム-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の安定性を示す。

【図13】実施例33に記載した、4アーム-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の安定性におけるpHの影響を示す。

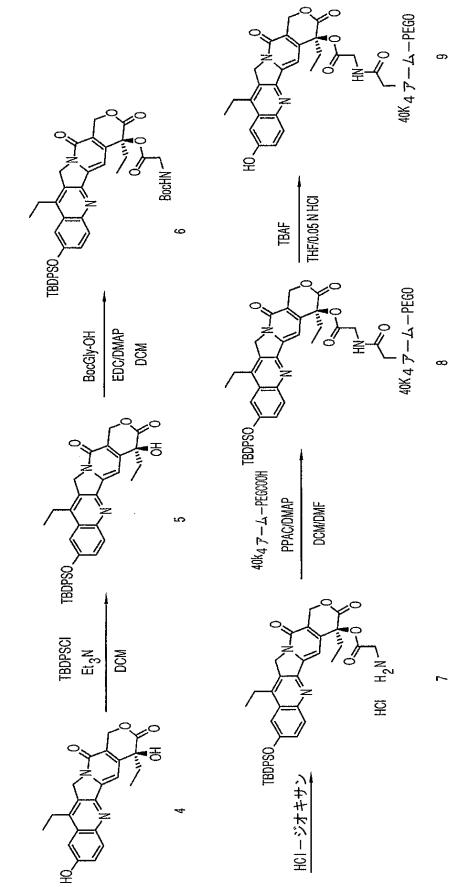
【図14】実施例34に記載した、4アーム-PEG-Gly-(7-エチル-10-ヒドロキシカンプトセシン)の薬物動態プロファイルを示す。

50

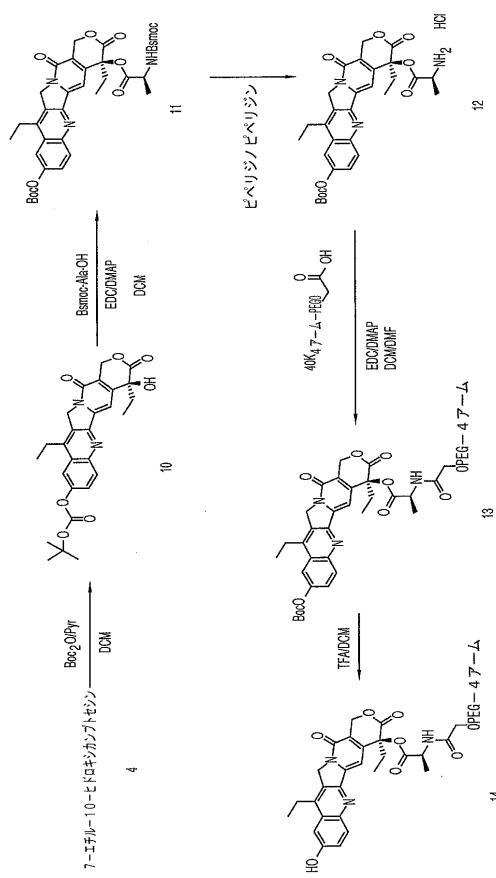
【図1】



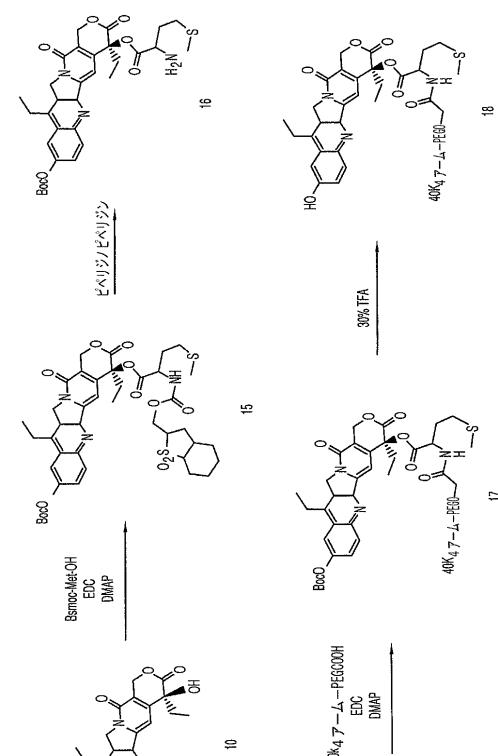
【図2】



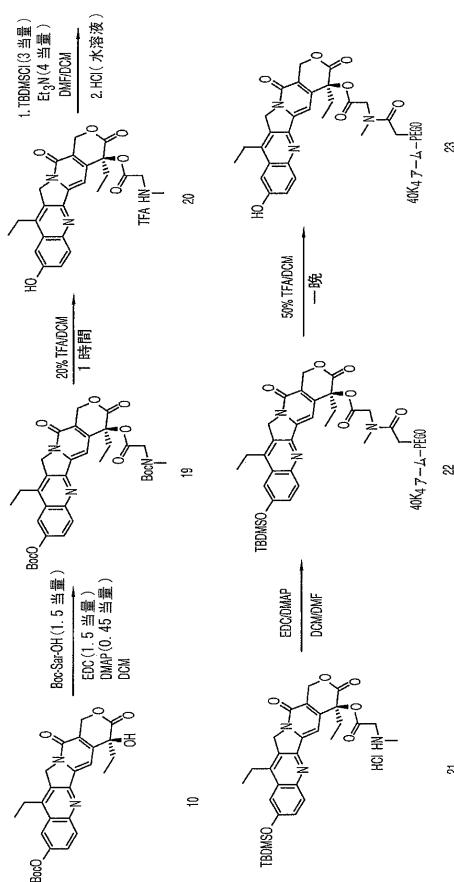
【図3】



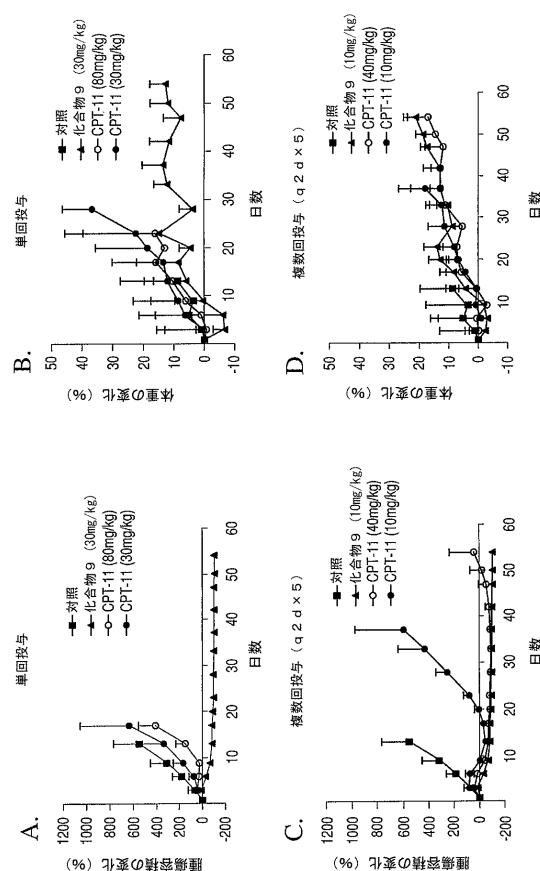
【図4】



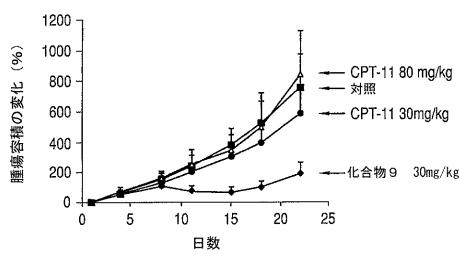
【図5】



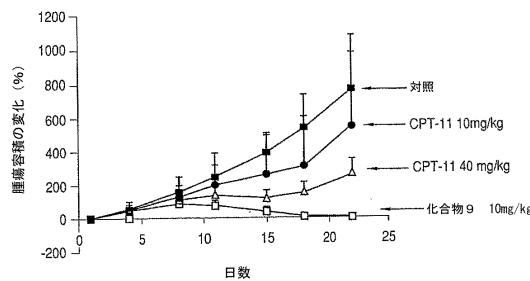
【図6】



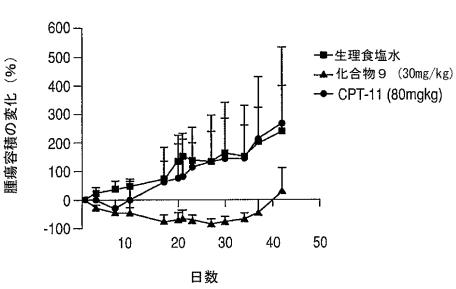
【図7】



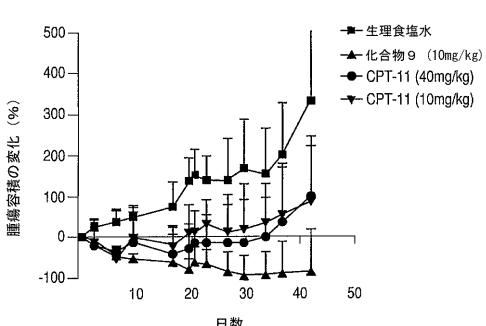
【図8】



【図9】



【図10】



【図 1 1 】

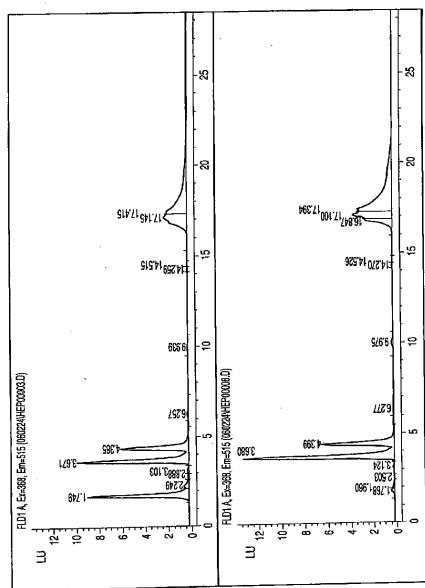
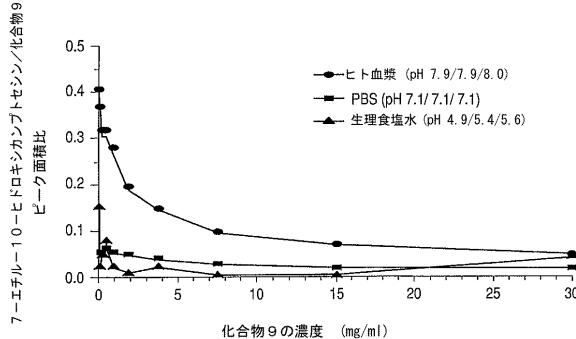
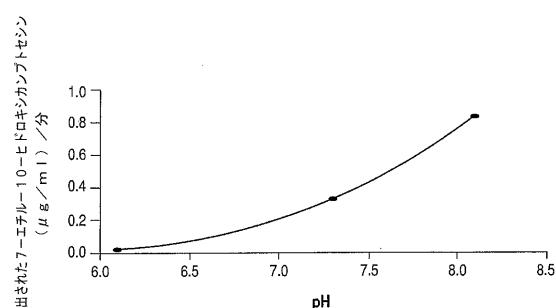


FIG. 11

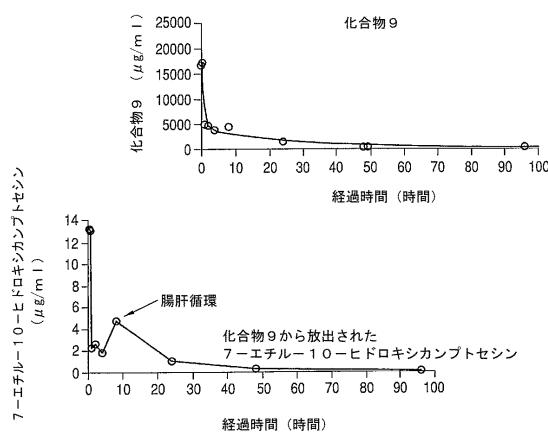
【 図 1 2 】



【习题 13】



【図14】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
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 43/00 123

(31)優先権主張番号 60/844,938  
 (32)優先日 平成18年9月15日(2006.9.15)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/864,516  
 (32)優先日 平成18年11月6日(2006.11.6)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ザオ, ホン  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08820 エディソン ベラ ヴィスタ コート 34  
 (72)発明者 ルビオ, マリア ベレン  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08873 サマーセット ウエストレイク コート 3  
 8  
 (72)発明者 サプラ, プジャ  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08820 エディソン マンマウス アヴェニュー 1  
 9  
 (72)発明者 ウ, デチュン  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08807 ブリッジウォーター フランシス ドライヴ  
 6

審査官 早川 裕之

(56)参考文献 国際公開第2005/028539 (WO, A1)  
 国際公開第2004/089925 (WO, A1)  
 国際公開第2004/108729 (WO, A1)  
 国際公開第2005/068424 (WO, A1)  
 国際公開第2005/111064 (WO, A1)  
 国際公開第2005/080330 (WO, A1)  
 国際公開第98/008505 (WO, A1)  
 米国特許出願公開第2004/0204461 (US, A1)  
 米国特許出願公開第2004/0224950 (US, A1)  
 米国特許出願公開第2004/0142917 (US, A1)  
 独国特許出願公開第10307787 (DE, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 07 D 491/22  
 C 07 D 519/00  
 A 61 K 31/4745  
 A 61 P 35/00~04  
 A 61 P 43/00  
 C A p l u s ( S T N )  
 R E G I S T R Y ( S T N )