

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-539385
(P2024-539385A)

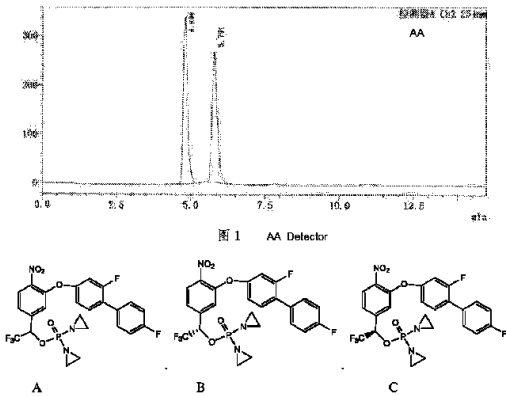
(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 F	9/24 (2006.01)	C 0 7 F	9/24	F C S P	4 B 0 6 3
C 0 7 C	205/38 (2006.01)	C 0 7 C	205/38		4 C 0 8 6
C 0 7 C	201/12 (2006.01)	C 0 7 C	201/12		4 H 0 0 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 5 0
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全123頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-526649(P2024-526649)				
(86)(22)出願日	令和3年11月5日(2021.11.5)				
(85)翻訳文提出日	令和6年6月27日(2024.6.27)				
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/129077				
(87)国際公開番号	WO2023/077452				
(87)国際公開日	令和5年5月11日(2023.5.11)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK ,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,G N,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,B				
	最終頁に続く				
(71)出願人	517319271 アセンタウィッツ ファーマシューティ カルズ リミテッド 中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グァン ドン、シェンジェン、ピンシャン ディ ストリクト、ケンジ ストリート、ジン シャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー1 4、バイオメディカル イノ ヴェイション インダストリアル パーク 、ビルディング1 0、フロア1 0、ルー ム1 0 0 3				
(74)代理人	110000970 弁理士法人 楓国際特許事務所				
(72)発明者	リ アンロン 中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グァン 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 A K R 1 C 3 活性化DNAアルキル化剤、およびその医学的応用

(57)【要約】

以下の構造式（A、B、C）のいずれか1つを有する A K R 1 C 3 活性化DNAアルキル化剤、または医薬的に許容されるその塩、もしくはそのプロドラッグ、もしくはその溶媒和物、もしくはその同位体変異体、およびその抗がん医療用途。

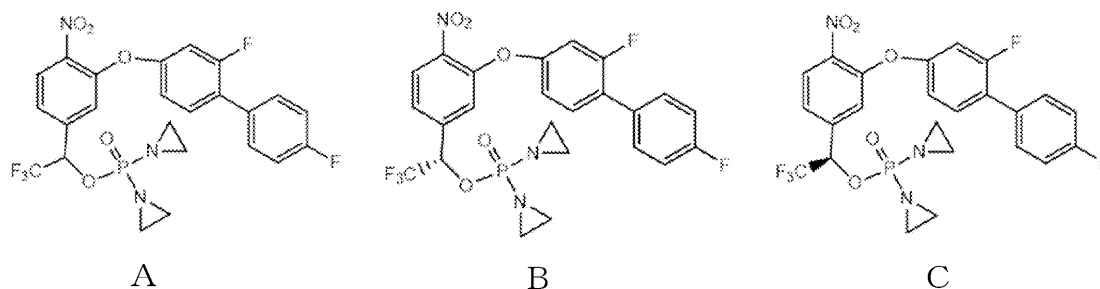


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造式、

【化 1】



10

のいずれか 1 つを有する化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体。

【請求項 2】

前記塩が塩基性塩または酸性塩であり、前記溶媒和物が水和物またはアルコールである、請求項 1 に記載の化合物。

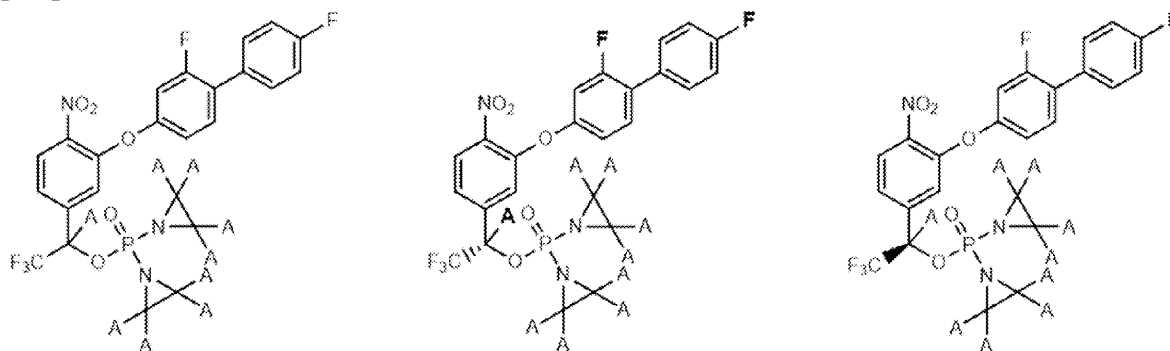
【請求項 3】

前記アルコールがエタノールである、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記同位体変異体が、以下の構造式、

【化 2】



30

を有し、式中、A は、それぞれ独立して H または D であり、9 つの A のうちの少なくとも 1 つは D である、請求項 1 に記載の化合物。

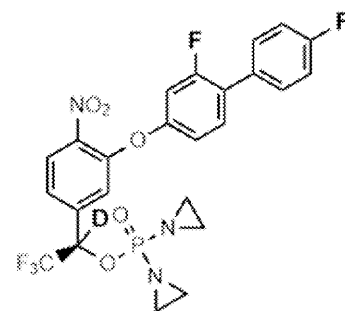
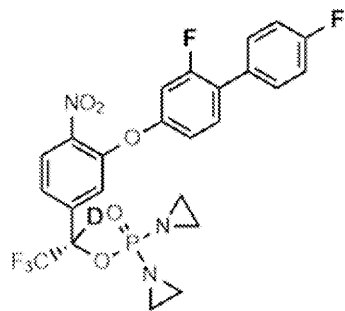
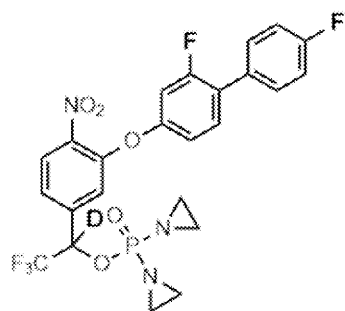
【請求項 5】

前記同位体変異体が、以下の構造、

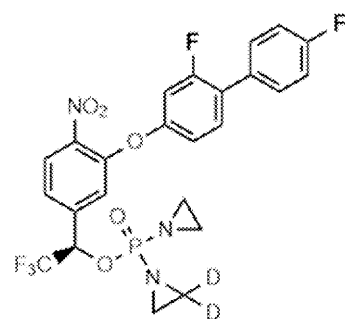
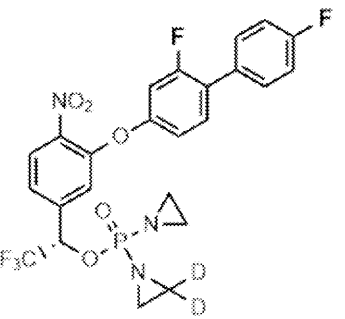
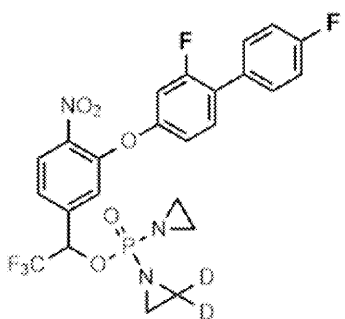
40

50

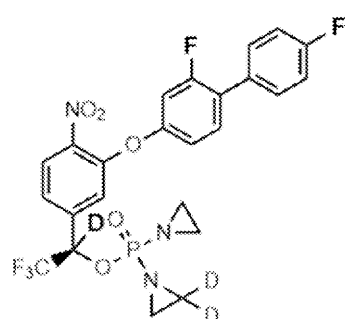
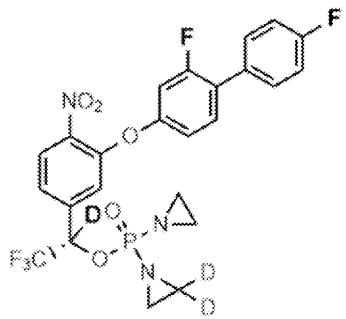
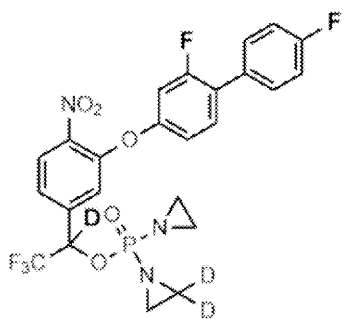
【化 3】



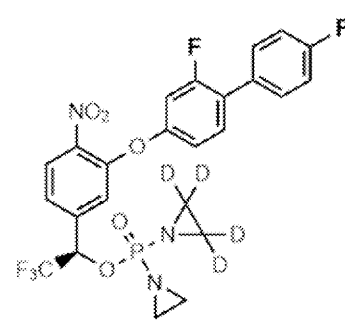
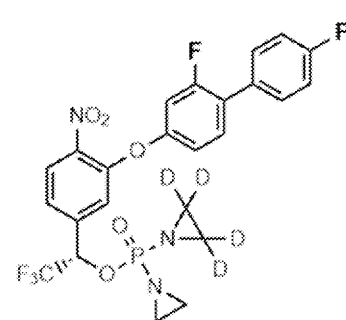
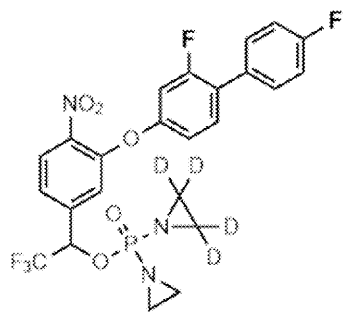
10



20



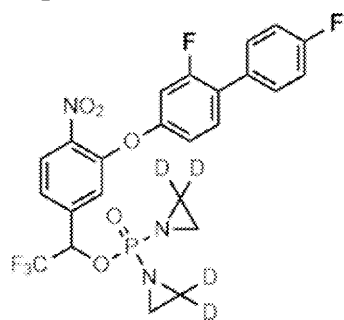
30



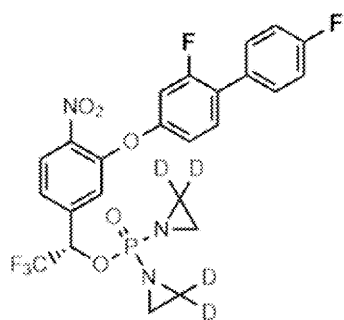
40

50

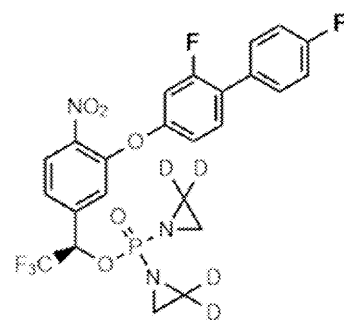
【化 4】



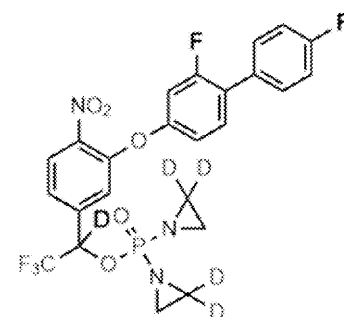
10



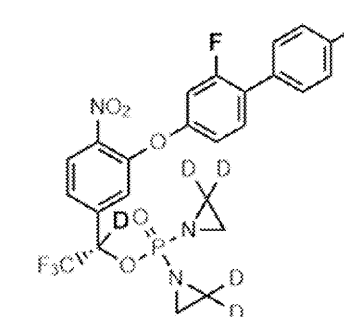
20



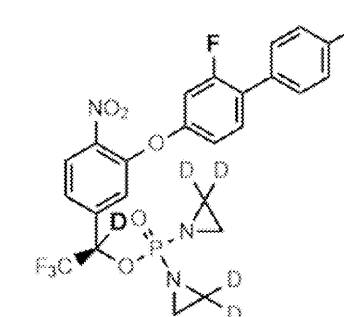
30



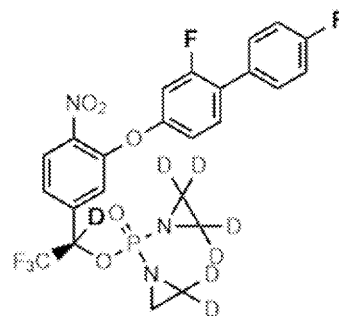
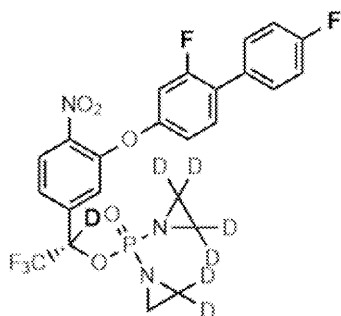
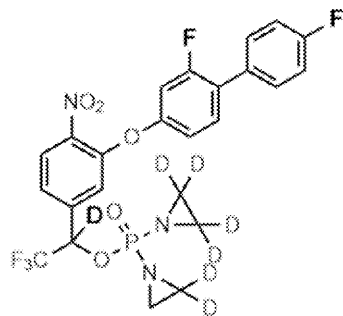
40



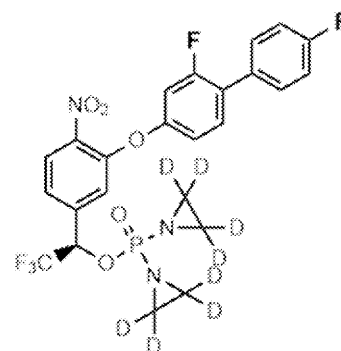
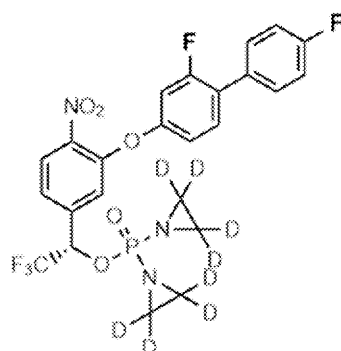
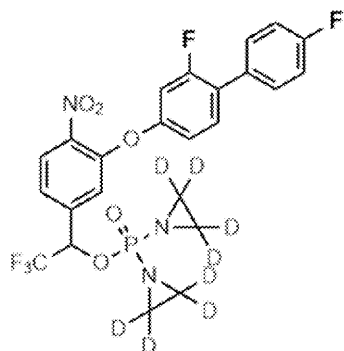
50



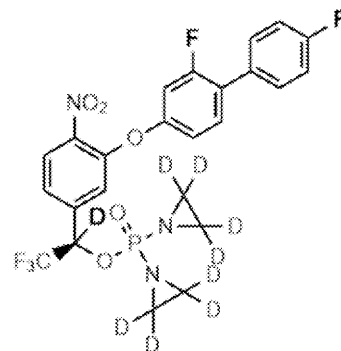
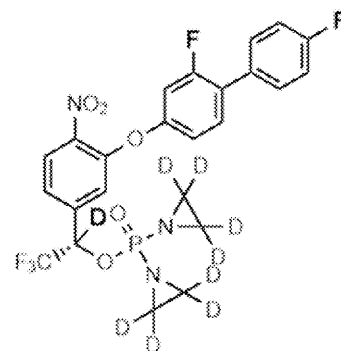
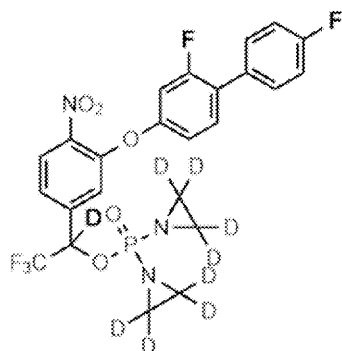
【化 5】



10



20



30

を有する重水素化合物に対応する、請求項 1 または 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を含有する薬物。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の薬物または請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の化合物の使用であって、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療のための、使用。

40

【請求項 8】

前記がんまたは腫瘍が、肺がん、膵臓がん、肝臓がん、または胃がんである、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

前記がんまたは腫瘍が、原発性の脳がん、脳腫瘍、または脳に転移する転移性のがんもしくは腫瘍である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 10】

請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体の使用であって、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療用の薬物の調製にお

50

【請求項 18】

X がどちらも臭素である、請求項 16 に記載の方法。

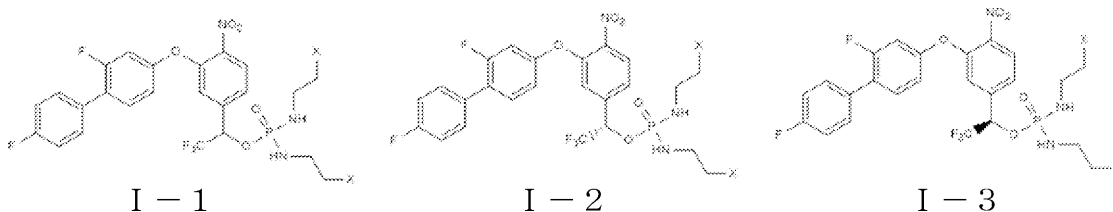
【請求項 19】

前記有機塩基が、N，N－ジイソプロピルエチルアミンまたはトリエチルアミンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

以下の構造のいずれか 1 つを有する化合物であって、

【化 7】



10

式中、X は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素である、化合物。

【請求項 21】

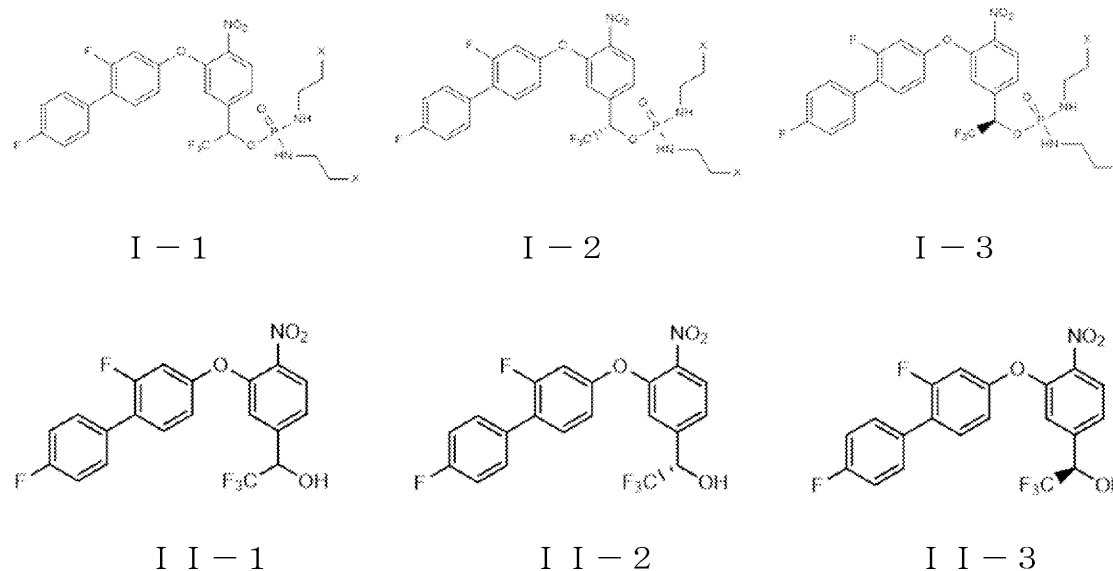
請求項 20 に記載の化合物の使用であって、請求項 1 に記載の化合物を合成するための中間体としての、または、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療用の薬物の調製における、使用。

20

【請求項 22】

以下の構造を有する化合物のいずれか 1 つの調製方法であって、前記調製方法は、化合物 II-1、II-2 または II-3 を出発反応物として、オキシハロゲン化リンとの第 1 反応を行ってそれぞれ中間体を得、次いで、前記中間体とハロエチルアミンまたはヒドロハロゲン化ハロエチルアミンとの第 2 反応を行い、最終的に、対応する化合物 I-1、I-2 または I-3 をそれぞれ得ることを含み、

【化 8】



30

40

式中、化合物 I-1、I-2 または I-3 の 2 つの X は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、

前記オキシハロゲン化リンは、オキシフッ化リン、オキシ塩化リン、オキシ臭化リンおよびオキシヨウ化リンから選択され、好ましくはオキシ塩化リンであり、

前記オキシハロゲン化リンのハロゲン原子、および化合物 I-1、I-2 または I-3 の 2 つの X は、同じでも異なってもよい、調製方法。

50

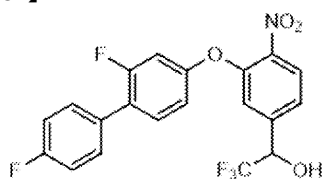
【請求項 2 3】

化合物Ⅰ－１、Ⅰ－２またはⅠ－３のⅩが臭素であり、前記ハロエチルアミンがブロモエチルアミンであり、前記ヒドロハロゲン化ハロエチルアミンがヒドロ臭化ブロモエチルアミンである、請求項 2 2 に記載の方法。

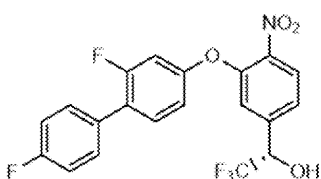
【請求項 2 4】

以下の構造、

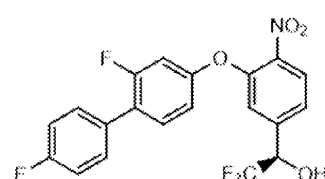
【化 9】



ⅠⅠ－１



ⅠⅠ－２



ⅠⅠ－３

10

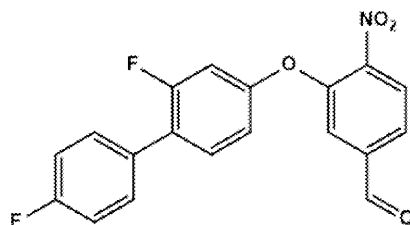
のいずれか 1 つを有する化合物。

【請求項 2 5】

以下の構造を有する化合物のいずれか 1 つの調製方法であって、化合物ⅠⅠⅠ－３を、接触している TMSCF_3 と反応させ、脱保護の後に加水分解してラセミアルコールⅠⅠ－１を得、ラセミアルコールⅠⅠ－１にキラル分割操作を行ってキラルアルコールⅠⅠ－２およびキラルアルコールⅠⅠ－３をそれぞれ得る、調製方法。

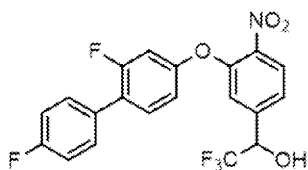
20

【化 1 0】

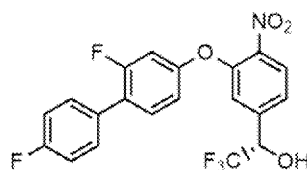


ⅠⅠⅠ－３

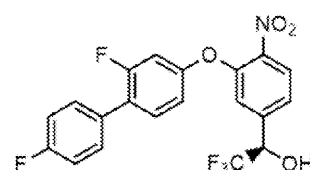
30



ⅠⅠ－１



ⅠⅠ－２



ⅠⅠ－３

【請求項 2 6】

前記脱保護の操作に使用される脱保護試薬がフッ化テトラブチルアンモニウムであり、加水分解操作にフッ化アンモニウム、水性塩化アンモニウム、または塩酸が使用される、請求項 2 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

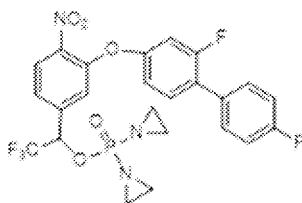
前記キラル分割の方法として、結晶化法および化学分割法が挙げられる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 に記載の化合物

50

【化 1 1】



のラセミ体を分離して、エナンチオマーを得るかまたは前記化合物中のラセミ体のエナンチオマーのどちらかの濃度を過剰に高める方法であって、前記方法は、以下の工程、すなわち、

10

前記ラセミ化合物を光学分割操作にかける工程であって、前記操作は固定相および移動相を含むキラルクロマトグラフィーによって行われ、前記固定相は官能化多糖類を含浸させたシリカゲルを含み、前記移動相はアルコールとさらなる溶媒とを含み、

前記アルコールはエタノールであり、前記さらなる溶媒は *n*-ヘキサンであり、

前記キラルクロマトグラフィーの操作中のクロマトグラフィーカラムの温度が 38℃であり、

前記官能化多糖類はアミローストリス（3，5-ジメチルフェニルカルバマート）である、

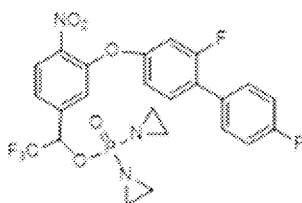
工程を含む、方法。

20

【請求項 29】

請求項 1 に記載の化合物

【化 1 2】



のラセミ体を分離して、エナンチオマーを得るかまたは前記化合物中のラセミ体のエナンチオマーのどちらかの濃度を過剰に高めるための HPLC 法であって、クロマトグラフィーカラムが CHIRALPAK（登録商標）AD、移動相がエタノール、カラム温度が 35℃である、HPLC 法。

30

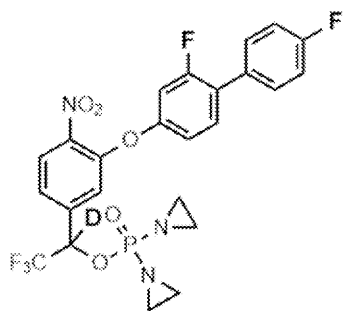
【請求項 30】

以下の構造を有する重水素化合物のいずれか 1 つの調製方法であって、前記調製方法は、化合物 IV-1～IV-21 を閉環反応させて、対応する重水素化合物 V-1～V-15 をそれぞれ得ることを含み、

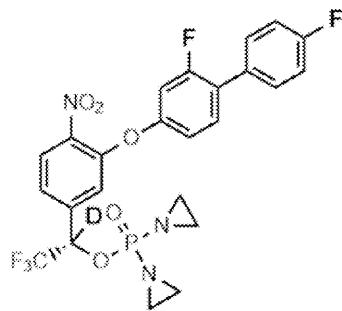
40

50

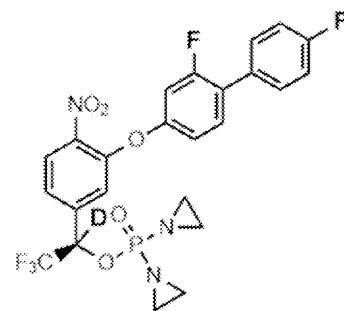
【化 1 3】



V-1

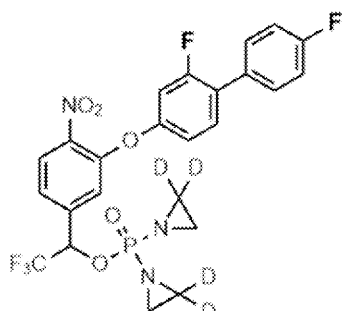


V-2

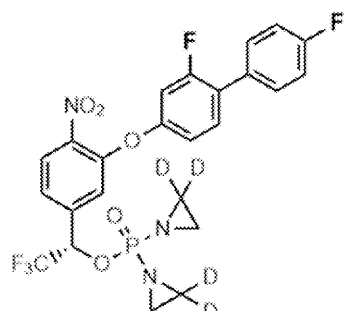


V-3

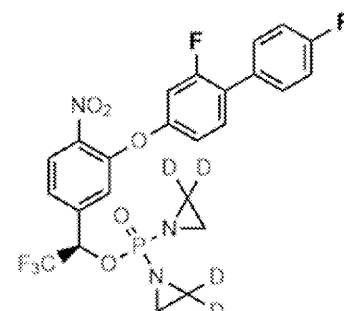
10



V-4

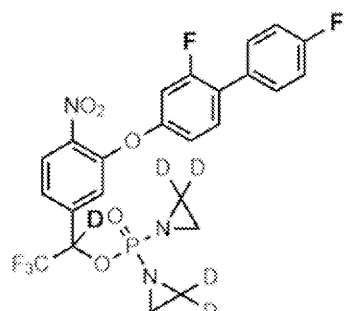


V-5

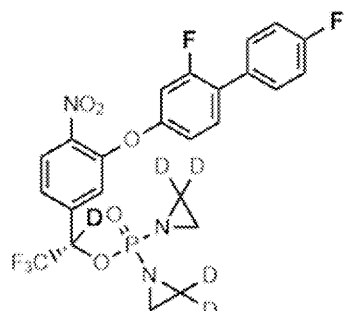


V-6

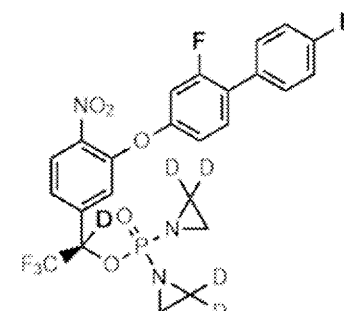
20



V-7



V-8



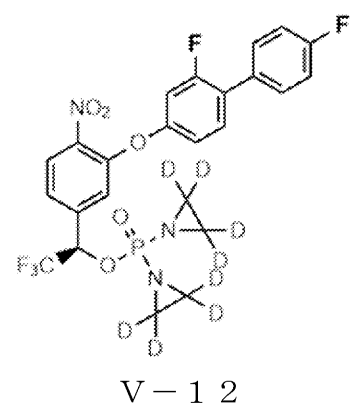
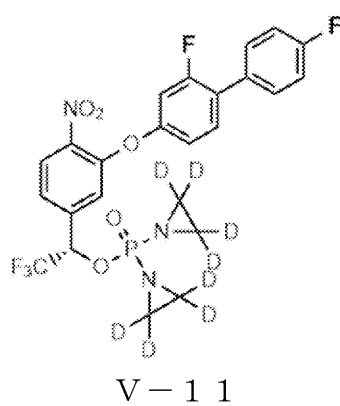
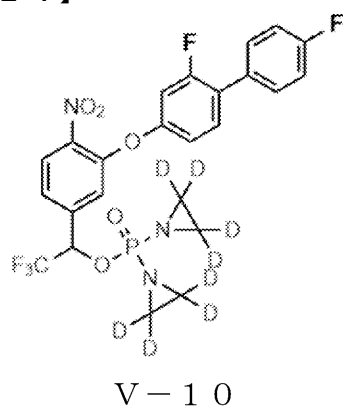
V-9

30

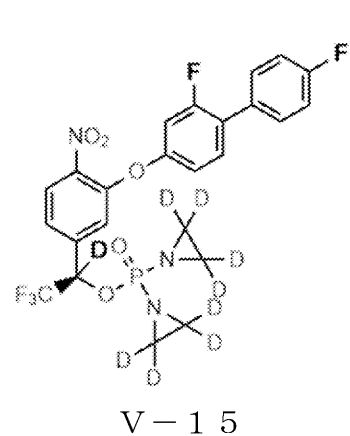
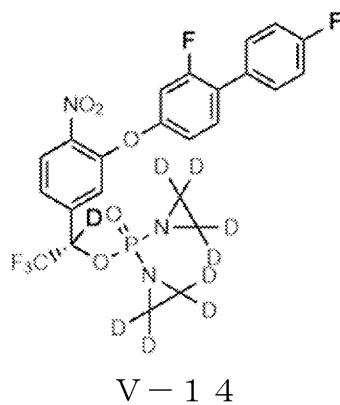
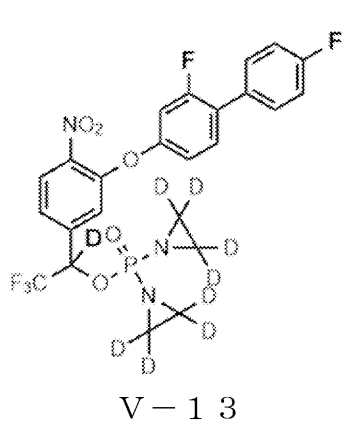
40

50

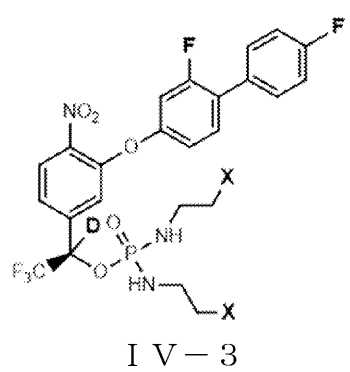
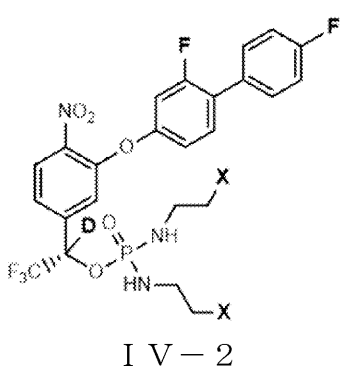
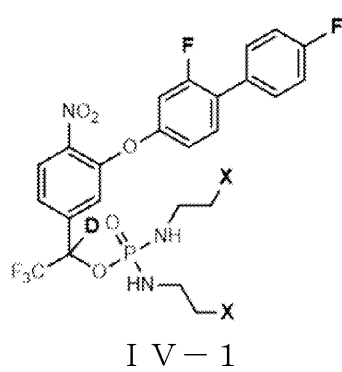
【化 1 4】



10



20

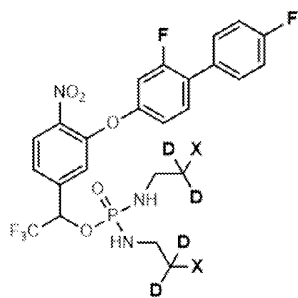


30

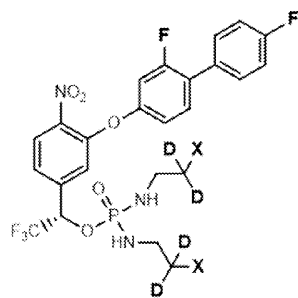
40

50

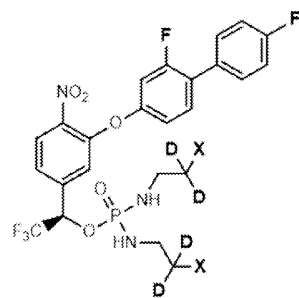
【化 1 5】



I V-4

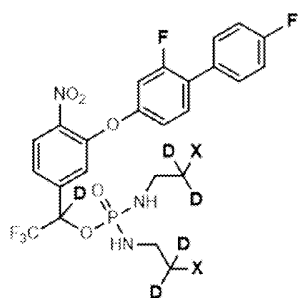


I V-5

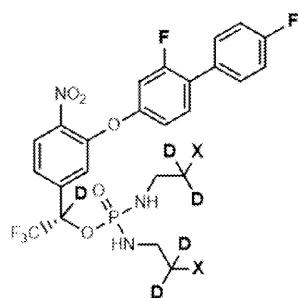


I V-6

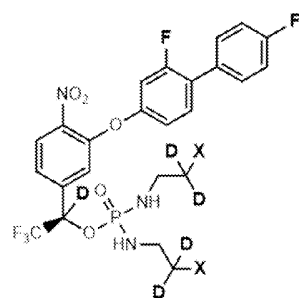
10



I V-7

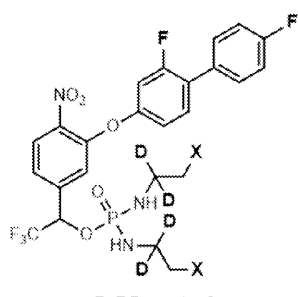


I V-8

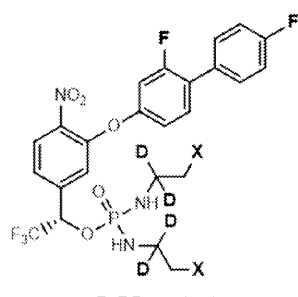


I V-9

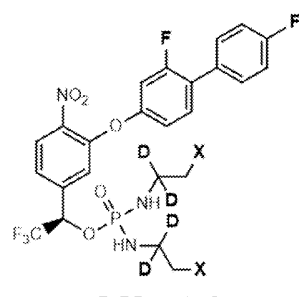
20



I V-10

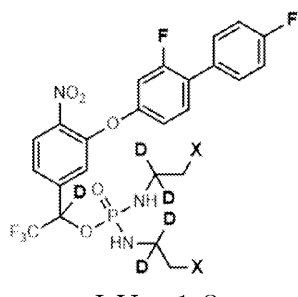


I V-11

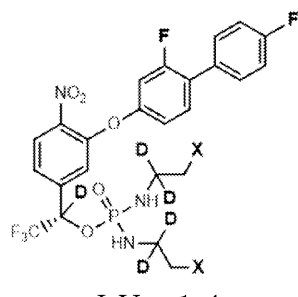


I V-12

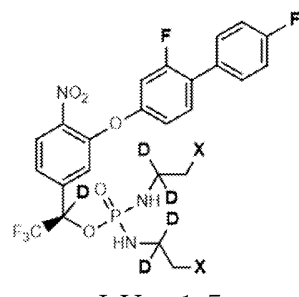
30



I V-13



I V-14

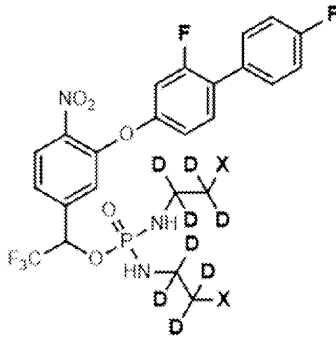


I V-15

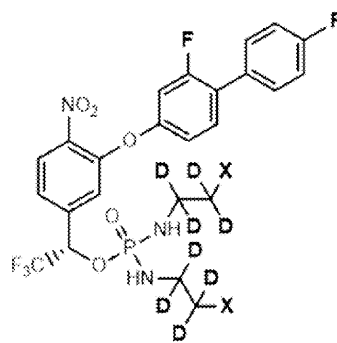
40

50

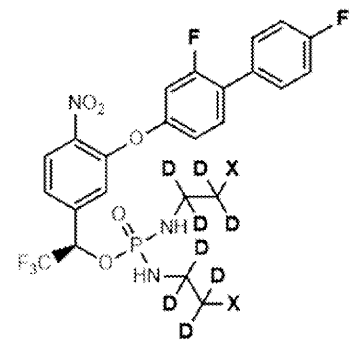
【化 1 6】



I V - 1 6

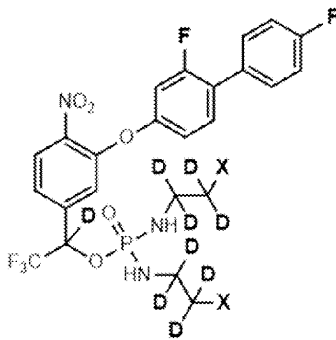


I V - 1 7

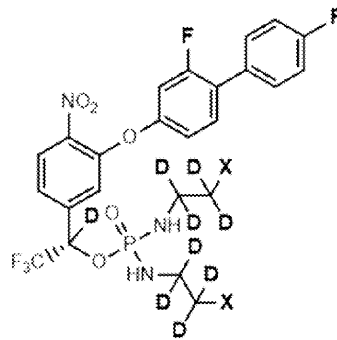


I V - 1 8

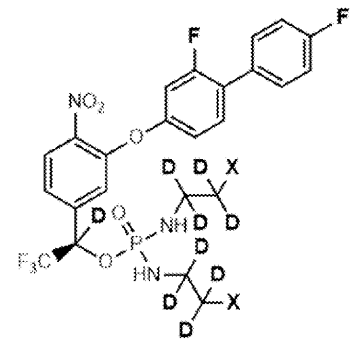
10



I V - 1 9



I V - 2 0



I V - 2 1

20

化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 のいずれか 1 つにおける 2 つの X 原子は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素、好ましくは臭素であり、

前記閉環反応において、有機塩基の添加の有無に関わらず、触媒として酸化銀または硝酸銀を使用する、

調製方法。

【請求項 3 1】

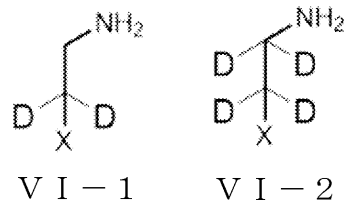
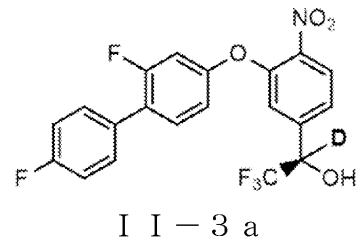
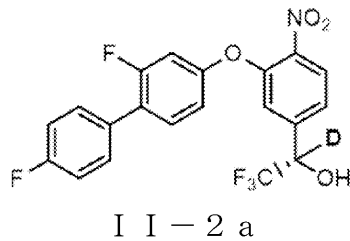
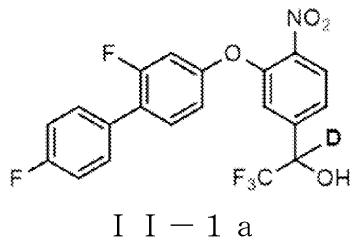
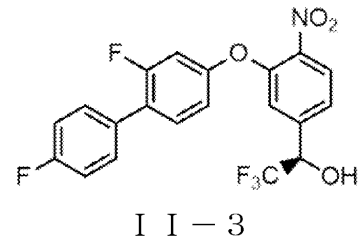
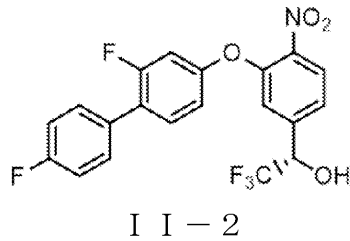
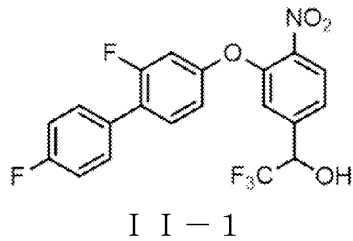
請求項 3 0 に記載の化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 のいずれか 1 つの調製方法であって、前記調製方法は、化合物 I I - 1、I I - 2 もしくは I I - 3 またはその重水素化合物 I I - 1 a、I I - 2 a もしくは I I - 3 a を出発反応物として、オキシハロゲン化リンとの第 1 反応を行ってそれぞれ中間体を得、次いで、前記中間体と、対応する重水素化ハロエチルアミン V I - 1 もしくは V I - 2、または前記重水素化ハロエチルアミン V I - 1 もしくは V I - 2 のヒドロハロゲン化物との第 2 反応を行い、最終的に、対応する化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 を得ることを含み、

30

40

50

【化 1 7】



化合物VI-1またはVI-2のX原子は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、化合物IV-1～IV-21のX原子に対応し、

前記オキシハロゲン化リンは、オキシフッ化リン、オキシ塩化リン、オキシ臭化リンおよびオキシヨウ化リンから選択され、好ましくはオキシ塩化リンであり、

前記オキシハロゲン化リンのハロゲンと、化合物IV-1～IV-21のいずれか1つにおける2つのX原子または化合物VI-1もしくはVI-2のX原子とは、同じであっても異なってもよく、

前記重水素化ハロエチルアミンのヒドロハロゲン化物において、ヒドロハロゲン化物のハロゲンと重水素化ハロエチルアミンのハロゲンとは同じであり、

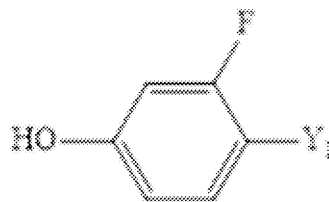
前記ハロエチルアミンはブromoエチルアミンであり、前記ヒドロハロゲン化ハロエチルアミンはヒドロ臭化ブromoエチルアミンであることが好ましい、

調製方法。

【請求項 3 2】

以下の構造を有する化合物のいずれか1つの調製方法であって、前記調製方法は、以下の工程、すなわち、化合物

【化 1 8】



を出発物質として反応させて化合物

10

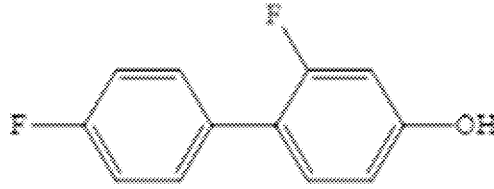
20

30

40

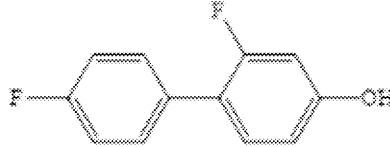
50

【化 1 9】



を得、次いで、前記化合物

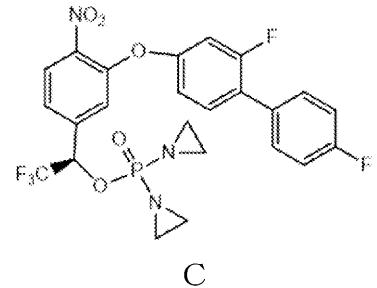
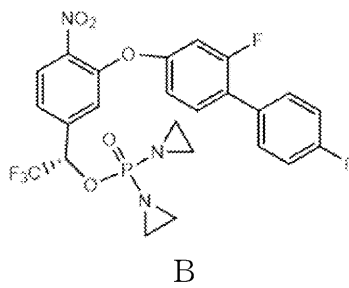
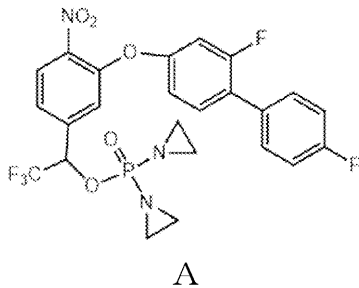
【化 2 0】



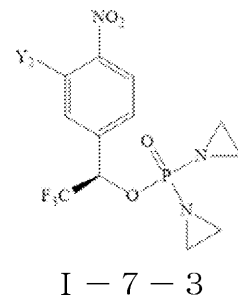
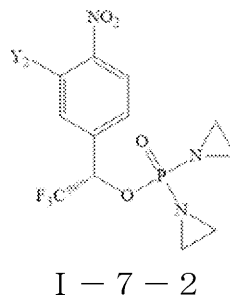
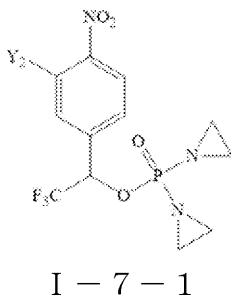
10

を式 I-7-1、I-7-2 または I-7-3 と反応させて、対応する式 A、B または C の化合物をそれぞれ得る工程を含み、

【化 2 1】



20



30

式中、Y₁ および Y₂ はハロゲンまたは OM であり、M は水素、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、またはカルシウムであり、ハロゲンは好ましくは臭素である、調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

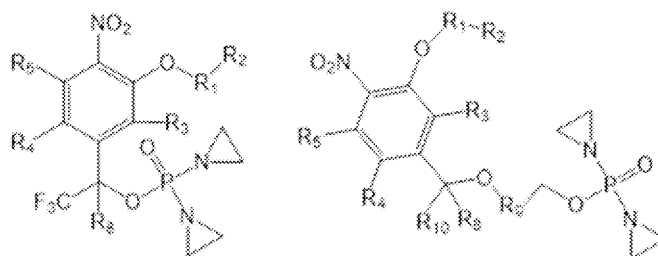
本発明は、小分子薬物研究の分野に属するがん療法のための化合物の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

発明者のデュアン・ジャンーシン (DUAN Jianxi)、リ・アンロン (LI Anrong) らによる特許 PCT/CN2020/089692 (2020年5月12日に出願) には、以下の一般式

【化 2 2】



を有する一連の化合物とその抗がん性用途が開示されている。

10

【0003】

本発明では、AST-3424が好都合に製剤化、貯蔵および輸送することができない油であることの欠点を克服するために、AST-3424および類似構造を有する化合物の分子構造の特定の位置にトリフルオロメチル基を導入することにより、固体（部分的にワックス状）の化合物を得た。トリフルオロメチル基を導入した上記の化合物は、予備的な細胞試験により、やはりAKR1C3活性化DNAアルキル化剤であることが確認されている。

【0004】

さらなる研究で、AST-3424は、P-gpの基質であり、血液脳関門を通過することができないため、脳内の腫瘍に対しては効果がないことが判明した。

20

【0005】

したがって、脳または中枢神経系の他の部分に入ることができるAKR1C3活性化小分子化合物について、さらなる研究開発を行うべきである。

【発明の概要】

【0006】

その後の研究およびスクリーニングにおいて、本発明者らは、PCT/CN2020/089692に開示されている化合物No. 16が、脳または中枢神経系の他の部分に浸透する能力を有し、さらに、脳または中枢神経系の他の部分の腫瘍の治療用の薬物としての発展が見込まれることを見出した。

【0007】

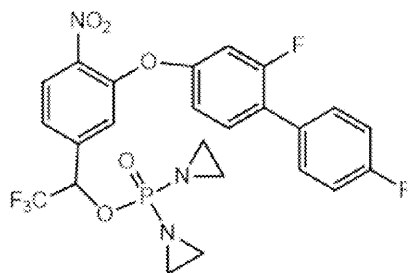
30

本発明は、脳または中枢神経系の他の部分に入ることができるAKR1C3活性化小分子化合物を提供するが、その作用機序は、AKR1C3酵素の作用を介してDNAアルキル化剤を放出することにより、腫瘍細胞を阻害し死滅させるものである。

【0008】

特に、上記の化合物No. 16は、以下の構造式

【化 2 3】



40

を有する。

【0009】

実験により、この化合物は、がん細胞増殖阻害活性が高く、特にAKR1C3酵素が活性化した状況においてがん細胞阻害活性が高いことが示され、かつ、これらの化合物はP-gp（P-糖タンパク質）の基質ではなく、血液脳関門を通過し、脳または中枢神経系の他の部分に入り作用して、その効果を発揮し得ることが示されている。血清および肝ミク

50

ロソームおよび動物モデルにおける実験により、さらに、この化合物は安定性が高く、腫瘍に対するクリアランスおよび阻害効果が良好であることが示された。

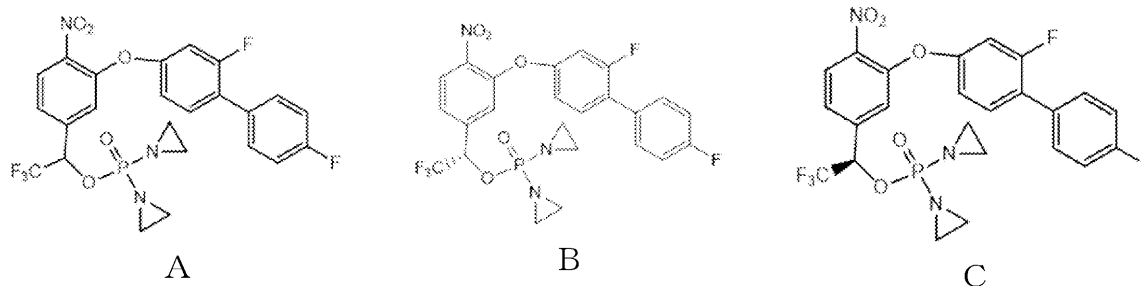
【0010】

以上の知見に基づいて、本発明は、以下の A K R 1 C 3 活性化 D N A アルキル化剤を提供し、これらが、関連する抗がん性および抗腫瘍性の医学的用途を有することを明らかにする。

【0011】

本発明は、以下の構造式 A、B および C、

【化24】



10

のいずれか1つを有する化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を提供する。

【0012】

塩は、塩基性塩または酸性塩であり、溶媒和物は、水和物またはアルコールートである。

【0013】

アルコールートはエタノラートであることが好ましい。

【0014】

本発明は、上記3つの化合物の医薬的に許容される塩を提供し、その塩は、塩基性塩であってもよく、例えば、無機塩基（例えば、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類金属水酸化物など）または有機塩基（例えば、モノエタノールアミン、ジエタノールアミンもしくはトリエタノールアミンなど）で形成された化合物の塩が挙げられる。あるいは、塩は、酸性塩であってもよく、例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、過塩素酸、硫酸もしくはリン酸など）または有機酸（例えば、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、フマル酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸など）で形成された化合物の塩が挙げられる。化合物の許容される塩、溶媒和物などの選択および調製は、当技術分野で周知である。

20

30

【0015】

本明細書中の化合物は、さらに溶媒和物の形態で使用されてもよい。すなわち、本発明は、上記3つの化合物の医薬的に許容される溶媒和物を提供し、溶媒和物は水和物、アルコールートなどであり、アルコールートとしてはエタノラートが挙げられる。

【0016】

「同位体変異体」という用語は、化合物であって、その化合物を構成する1つまたは複数の原子において、非天然の割合の同位体を含有する化合物を指す。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は、1つまたは複数の同位体を非天然の割合で含有し、その同位体としては、（以下に限定されないが）水素（ ^1H ）、重水素（ ^2H ）、トリチウム（ ^3H ）、炭素11（ ^{11}C ）、炭素12（ ^{12}C ）、炭素13（ ^{13}C ）、炭素14（ ^{14}C ）、窒素13（ ^{13}N ）、窒素14（ ^{14}N ）、窒素15（ ^{15}N ）、酸素14（ ^{14}O ）、酸素15（ ^{15}O ）、酸素16（ ^{16}O ）、酸素17（ ^{17}O ）、酸素18（ ^{18}O ）、フッ素17（ ^{17}F ）、フッ素18（ ^{18}F ）、リン31（ ^{31}P ）、リン32（ ^{32}P ）、リン33（ ^{33}P ）、硫黄32（ ^{32}S ）、硫黄33（ ^{33}S ）、硫黄34（ ^{34}S ）、硫黄35（ ^{35}S ）、硫黄36（ ^{36}S ）、塩素35（ ^{35}Cl ）、塩素36（ ^{36}Cl ）、塩素37（ ^{37}Cl ）、臭素79（ ^{79}Br ）、臭素81（ ^{81}Br ）、ヨウ

40

50

素 1 2 3 (^{123}I)、ヨウ素 1 2 5 (^{125}I)、ヨウ素 1 2 7 (^{127}I)、ヨウ素 1 2 9 (^{129}I)、およびヨウ素 1 3 1 (^{131}I) が挙げられる。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は安定した（すなわち、非放射性）形態である。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は、1つまたは複数の同位体を非天然の割合で含有し、その同位体としては、（以下に限定されないが）水素 (^1H)、重水素 (^2H)、炭素 1 2 (^{12}C)、炭素 1 3 (^{13}C)、窒素 1 4 (^{14}N)、窒素 1 5 (^{15}N)、酸素 1 6 (^{16}O)、酸素 1 7 (^{17}O)、酸素 1 8 (^{18}O)、フッ素 1 7 (^{17}F)、リン 3 1 (^{31}P)、硫黄 3 2 (^{32}S)、硫黄 3 3 (^{33}S)、硫黄 3 4 (^{34}S)、硫黄 3 6 (^{36}S)、塩素 3 5 (^{35}Cl)、塩素 3 7 (^{37}Cl)、臭素 7 9 (^{79}Br)、臭素 8 1 (^{81}Br)、およびヨウ素 1 2 7 (^{127}I) が挙げられる。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は不安定な（すなわち、放射性）形態である。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は、1つまたは複数の同位体を非天然の割合で含有し、その同位体としては、（以下に限定されないが）トリチウム (^3H)、炭素 1 1 (^{11}C)、炭素 1 4 (^{14}C)、窒素 1 3 (^{13}N)、酸素 1 4 (^{14}O)、酸素 1 5 (^{15}O)、フッ素 1 8 (^{18}F)、リン 3 2 (^{32}P)、リン 3 3 (^{33}P)、硫黄 3 5 (^{35}S)、塩素 3 6 (^{36}Cl)、ヨウ素 1 2 3 (^{123}I)、ヨウ素 1 2 5 (^{125}I)、ヨウ素 1 2 9 (^{129}I)、およびヨウ素 1 3 1 (^{131}I) が挙げられる。本明細書で提供する化合物において、当業者が実現可能と判断した場合、任意の水素が例えば ^2H （すなわち、D）であってもよく、または任意の炭素が例えば ^{13}C であってもよく、または任意の窒素が例えば ^{15}N であってもよく、任意の酸素が ^{18}O であってもよいことを理解すべきである。いくつかの実施形態では、化合物の「同位体変異体」は、非天然の割合の重水素（D）を含有する。

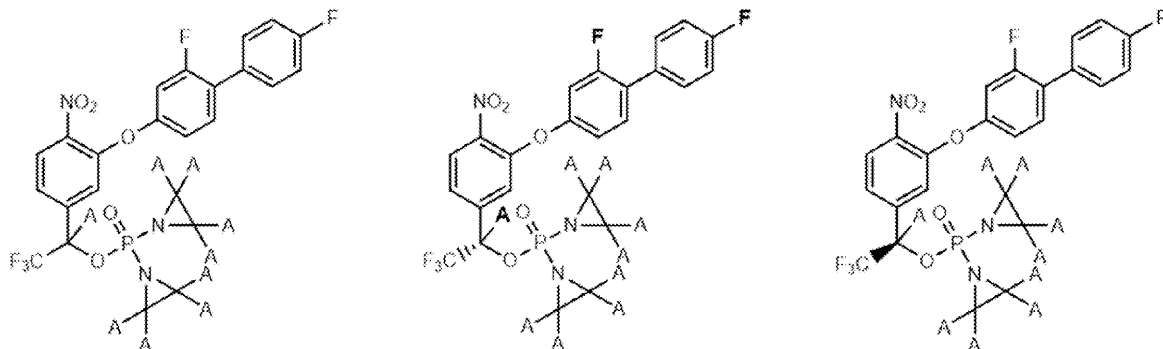
10

20

【0017】

本発明が提供する同位体変異体は、以下の構造、

【化25】



30

から選択される重水素化合物に対応し、

式中、A は、それぞれ独立して H または D であり、9 つの A のうち少なくとも 1 つは D である。

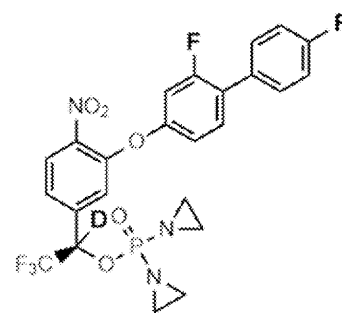
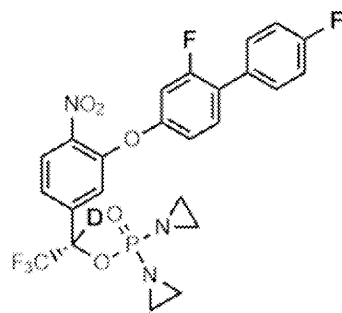
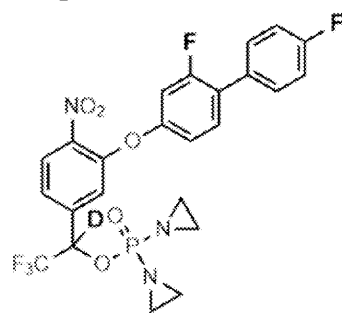
【0018】

前記同位体変異体は、以下の構造、

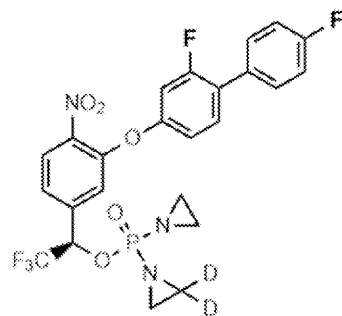
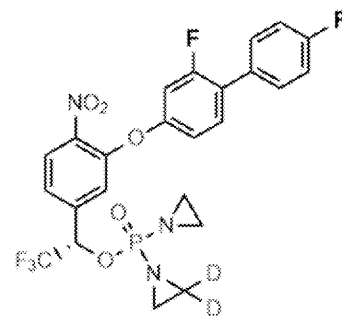
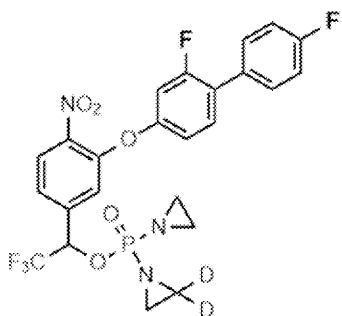
40

50

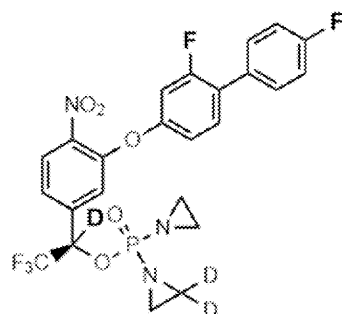
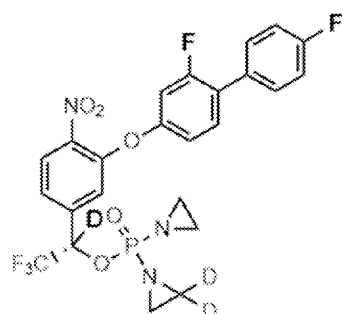
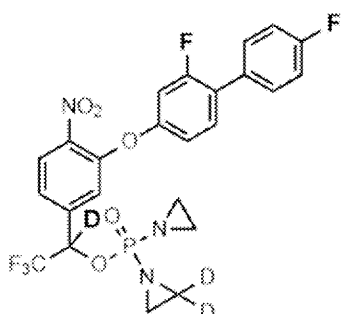
【化 2 6】



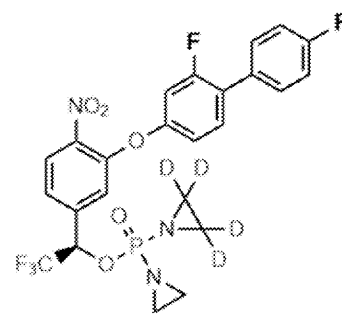
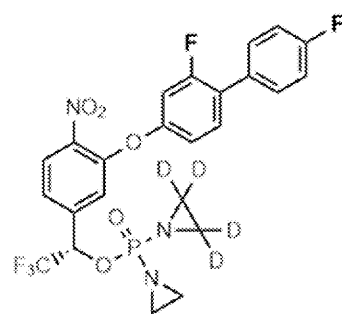
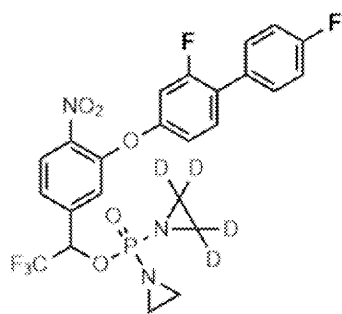
10



20



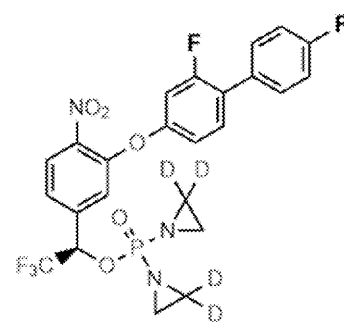
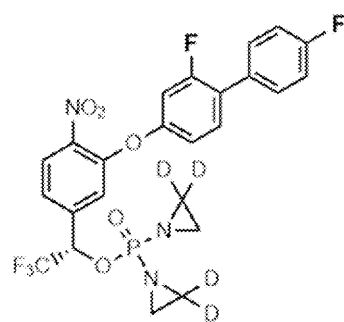
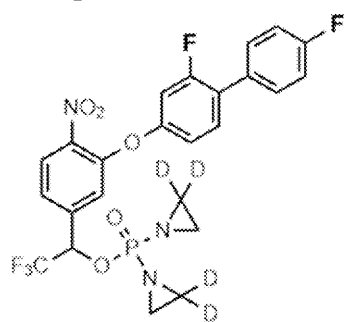
30



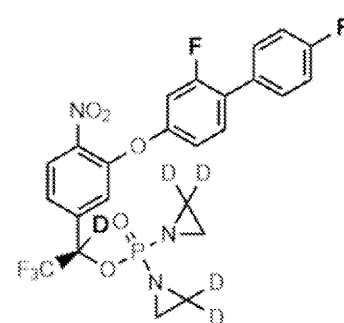
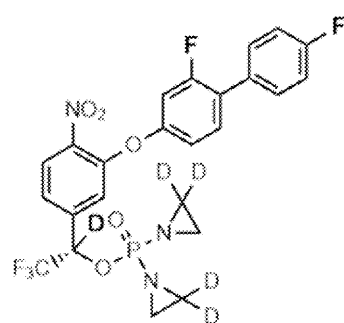
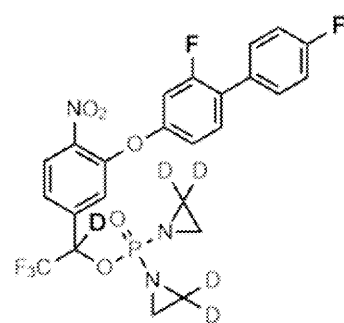
40

50

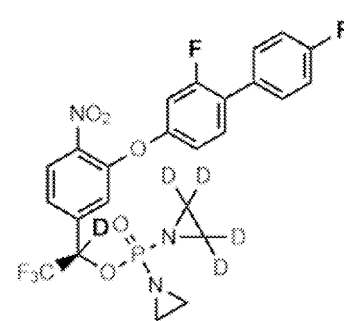
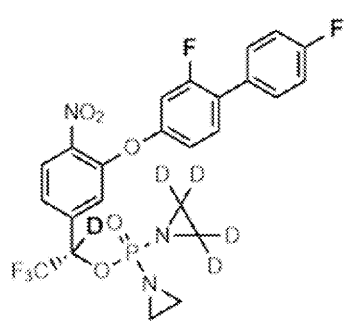
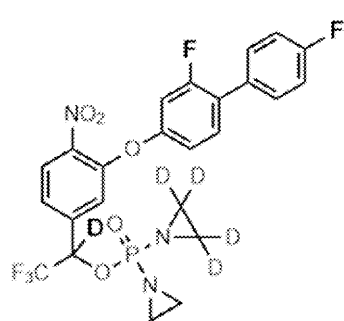
【化 2 7】



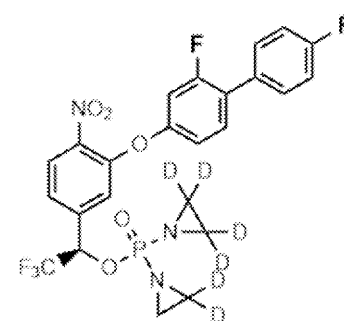
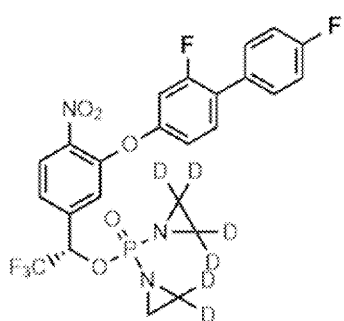
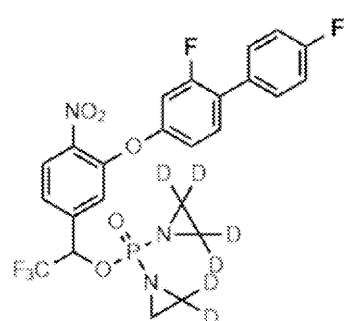
10



20



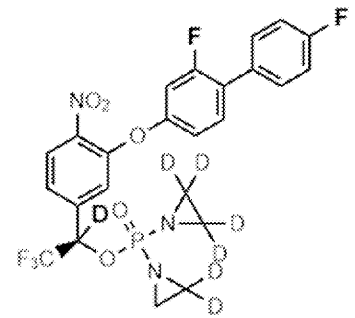
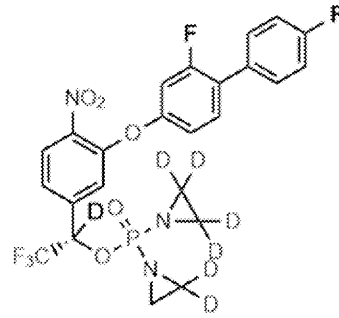
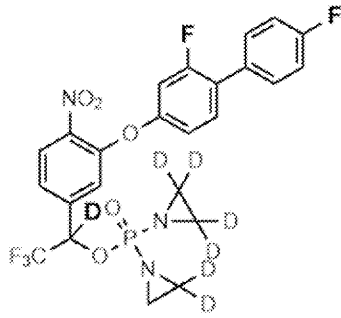
30



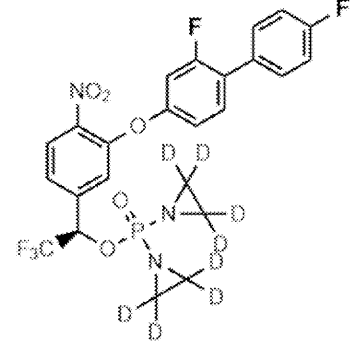
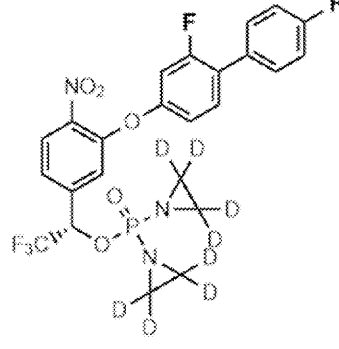
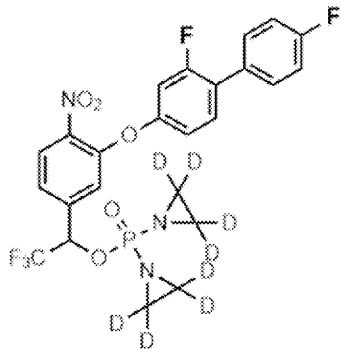
40

50

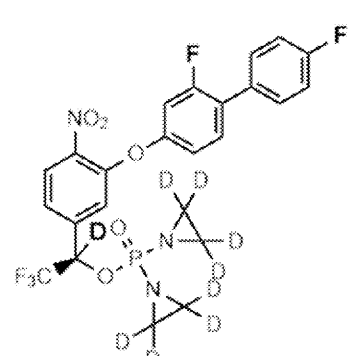
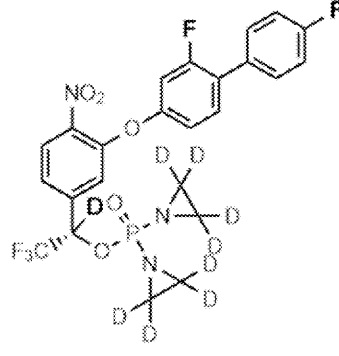
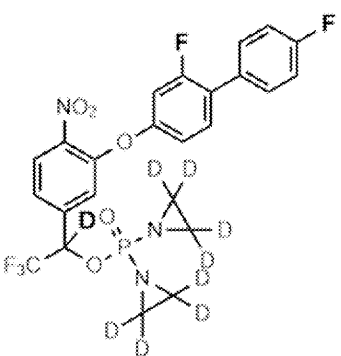
【化 2 8】



10



20



30

を有する重水素化合物に対応することが好ましい。

【0019】

本発明は、上記の構造 A、B または C のいずれか 1 つの化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を含む薬物を提供する。

【0020】

本発明はまた、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療用の上記薬物の使用も提供する。

40

【0021】

治療には、単剤療法および併用療法が含まれる。

【0022】

単剤療法とは単一薬物療法を指す。併用とは複合薬物療法を指す。単一薬物療法とは、治療過程において 1 つの抗がん剤のみを使用することを指す。併用療法とは、治療過程において、2 つ以上の抗がん剤を同時にまたは経時的に使用することを指す。

【0023】

一般的に、併用療法については、疾患の特徴や併用する薬物の種類に応じて、様々な投与薬用量および投与サイクルを検討する必要がある、上記の状況に応じてのみ、その検討から得られた併用療法計画によって、単一薬物療法と比較してより良好な治療効果が達成

50

され得る。

【0024】

単剤療法および併用療法のどちらのレジメンについても、薬物の投与薬用量および投与サイクルは、上記の化合物A、BおよびCならびにそれらの類似体、ならびに他の薬物の薬用量および投与レジメンを参照して、臨床試験を通じて検討する必要がある。

【0025】

さらに、本発明は、上記の構造A、BおよびCのいずれか1つの化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体の使用であって、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療における使用を提供する。

10

【0026】

具体的には、上記のがんまたは腫瘍は、肺がん、膵臓がん、肝臓がん、または胃がんである。

【0027】

具体的には、上記のがんまたは腫瘍は、原発性の脳がん、脳腫瘍、または脳に転移する転移性のがんもしくは腫瘍である。

【0028】

本発明は、上記の構造A、BおよびCのいずれか1つの化合物、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体の使用であって、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療用の薬物の調製における使用を提供する。

20

【0029】

上記のがんまたは腫瘍として挙げられるのは、肺がん、非小細胞肺がん、肝臓がん、膵臓がん、胃がん、骨がん、食道がん、乳がん、前立腺がん、精巣がん、結腸がん、卵巣がん、膀胱がん、子宮頸がん、黒色腫、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞性腺がん、嚢胞性がん、髄質がん、気管支がん、骨細胞がん、上皮がん、胆管細胞がん、絨毛がん、胚性がん腫、精上皮腫、ウィルムス腫瘍、神経膠芽腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫瘍、血球芽細胞腫、声帯神経腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、視神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経線維腫、線維肉腫、線維芽細胞腫、線維腫、線維腺腫、線維軟骨腫、線維嚢腫、線維粘液腫、線維骨腫、線維粘液肉腫、線維乳頭腫、粘液肉腫、粘液嚢腫、粘液軟骨腫、粘液軟骨肉腫、粘液軟骨線維肉腫、粘液腺腫、粘液芽腫、脂肪肉腫、脂肪腫、脂肪腺腫、脂肪芽細胞腫、脂肪軟骨腫、脂肪線維腫、脂肪血管腫、粘液脂肪腫、軟骨肉腫、軟骨腫、軟骨筋腫、脊索種、絨毛腺腫、絨毛上皮腫、絨毛芽腫、骨肉腫、骨芽細胞腫、骨軟骨線維腫、骨軟骨肉腫、骨軟骨腫、骨嚢腫、骨象牙質腫、骨線維腫、骨線維肉腫、血管肉腫、血管腫、血管脂肪腫、血管軟骨腫、血管芽細胞腫、被角血管腫、血管神経膠腫、血管内皮腫、血管線維腫、血管筋腫、血管脂肪腫、血管リンパ管腫、血管脂肪平滑筋腫、血管筋脂肪腫、血管筋神経腫、血管粘液腫、血管細網腫、リンパ管肉腫、リンパ肉芽腫、リンパ管腫、リンパ腫、リンパ性粘液腫、リンパ肉腫、リンパ管線維腫、リンパ細胞腫、リンパ上皮腫、リンパ芽球腫、内皮腫、内皮芽細胞腫、滑膜腫、滑膜肉腫、中皮腫、結合組織腫瘍、ユーイング腫瘍、平滑筋腫、平滑筋肉腫、平滑筋芽腫、平滑筋線維腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、横紋筋粘液腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性疾患性貧血、赤血球増加症、リンパ腫、子宮内膜がん、神経膠腫、結腸直腸がん、甲状腺がん、尿路上皮がん、または多発性骨髄腫である。

30

40

【0030】

がんまたは腫瘍は、原発性の脳がん、脳腫瘍、または脳に転移する転移性のがんもしくは腫瘍であることが好ましい。

【0031】

がんまたは腫瘍は、肺がん、膵臓がん、肝臓がん、または胃がんであることが好ましく、肺がんは非小細胞肺がんであることがより好ましい。

50

【0032】

本発明は、がんまたは腫瘍の治療方法を提供し、その治療方法は以下の工程 a または工程 b を含む。

a. 患者のがんの細胞または組織の A K R 1 C 3 レダクターゼ含有量を定量し、測定した A K R 1 C 3 レダクターゼ含有量が所定の値以上である場合、上記の薬物、または上記の構造 A、B および C のいずれか 1 つを有する化合物、もしくは医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を患者に投与すること。

b. 患者のがんの細胞または組織の A K R 1 C 3 レダクターゼに対応する R N A 発現レベルを定量し、測定した R N A 発現レベルが所定の範囲内にある場合、上記の薬物、または上記の構造 A、B および C のいずれか 1 つを有する化合物、もしくは医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を患者に投与すること。

10

【0033】

A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量は、以下に限定されないが、E L I S A アッセイおよび I H C アッセイなどの方法を用いて定量することができる。

【0034】

市販のヒトのアルド・ケトレダクターゼ 1 C 3 (a l d o - k e t o r e d u c t a s e 1 C 3 : A K R 1 C 3) E L I S A アッセイキットを使用すると、血漿および血液試料などの液体試料は直接検出することができる。その他の試料は、処理した後に検出される。

【0035】

免疫組織化学 (I H C) 法は、固形腫瘍試料の検出に適している。

20

【0036】

研究により、放射線療法の後、頭頸部がん患者の腫瘍組織における A K R 1 C 3 酵素の含有量が増加することが示されている。そのため、患者の腫瘍組織に放射線療法で使用される放射線を照射することにより、A K R 1 C 3 酵素の発現レベルを増加させることが可能である。放射線としては、放射性同位体によって生成される α 線、 β 線および γ 線、ならびに、様々な X 線治療装置または加速器によって生成される X 線、電子線、陽子線およびその他の粒子線が挙げられる。

【0037】

本発明は、A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量を調整する工程を含むがんまたは腫瘍の別の治療方法であって、A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量が所定の値以上に調整される場合に、上記の薬物、または上記の構造 A、B および C のいずれか 1 つを有する化合物、もしくは医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体を患者に投与する、別の治療方法を提供する。

30

【0038】

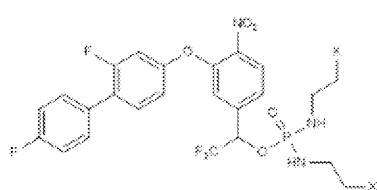
この方法は、主に、患者の A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量が比較的低い状況を対象としており、特定の調整治療／投与のプロセスを経て、患者の A K R 1 C 3 レダクターゼの含有量を適当なレベルに調整することによって行われる。

【0039】

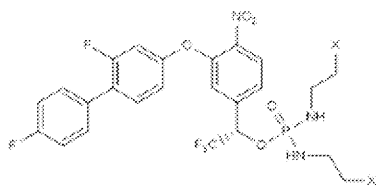
本発明は、以下の構造 I (化合物 A、B または C) の A K R 1 C 3 活性化合物の調製方法であって、化合物 I - 1、I - 2 または I - 3 を閉環反応させて、対応する化合物 A、B または C を得ることを含み、

40

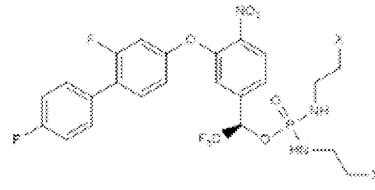
【化 2 9】



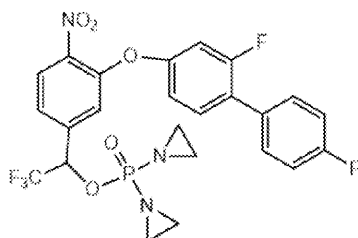
I - 1



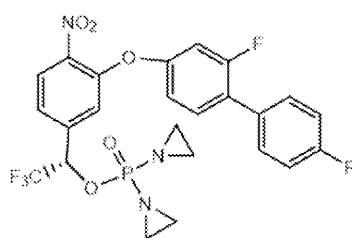
I - 2



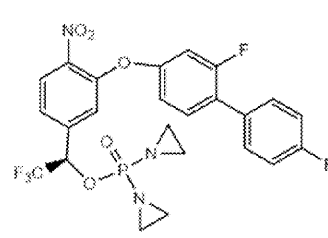
I - 3



A



B



C

式中、Xは、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、好ましくは臭素である、
調製方法を提供する。

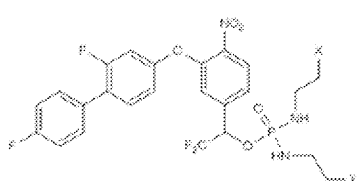
【 0 0 4 0 】

上記の調製方法では、有機塩基の添加の有無に関わらず、閉環反応の触媒として酸化銀または硝酸銀を使用する。有機塩基は、N，N－ジイソプロピルエチルアミンまたはトリエチルアミンであることが好ましい。

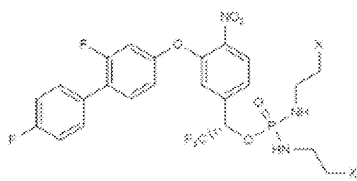
【 0 0 4 1 】

本発明は、以下の構造式のいずれか 1 つを有する化合物であって、

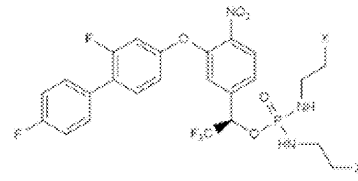
【化 3 0】



I - 1



I - 2



I - 3

式中、Xは、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、好ましくは臭素である、
化合物を提供する。

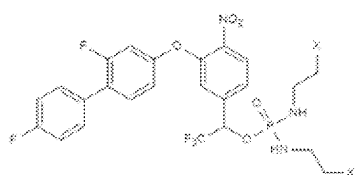
【 0 0 4 2 】

本発明は、上記の構造Ⅰ－１、Ⅰ－２またはⅠ－３の化合物を、上記ＡＫＲ１Ｃ３活性化ＤＮＡアルキル化剤（化合物Ａ、ＢもしくはＣ、または医薬的に許容されるその塩、プロドラッグ、溶媒和物もしくは同位体変異体）を合成するための中間体として使用すること、または、がん患者もしくは腫瘍患者、がんもしくは腫瘍に起因する病状、または細胞増殖性疾患の治療用の薬物の調製において使用することを提供する。

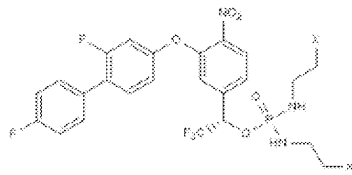
【 0 0 4 3 】

本発明は、以下の構造Ⅰ－１、Ⅰ－２またはⅠ－３を有する化合物の合成方法であって、前記合成方法は、化合物ⅠⅠ－１、ⅠⅠ－２またはⅠⅠ－３を出発反応物として、オキシハロゲン化リンとの第１反応を行ってそれぞれ中間体を得、次いで、前記中間体とハロエチルアミンまたはヒドロハロゲン化ハロエチルアミンとの第２反応を行い、最終的に、対応する化合物Ⅰ－１、Ⅰ－２またはⅠ－３をそれぞれ得ることを含み、

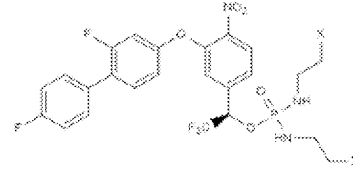
【化 3 1】



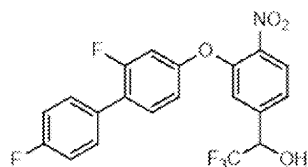
I - 1



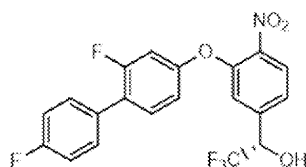
I - 2



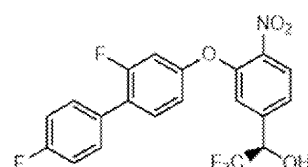
I - 3



I I - 1



I I - 2



I I - 3

10

式中、化合物 I - 1、I - 2 または I - 3 の 2 つの X は、それぞれ独立して、F、Cl、Br または I、好ましくは Br であり、

前記オキシハロゲン化リンは、オキシフッ化リン、オキシ塩化リン、オキシ臭化リンおよびオキシヨウ化リンから選択され、好ましくはオキシ塩化リンであり、

前記オキシハロゲン化リンのハロゲン原子、および化合物 I - 1、I - 2 または I - 3 の 2 つの X は、同じでも異なってもよく、

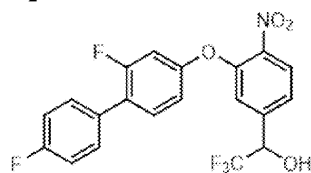
20

前記ハロエチルアミンはブロモエチルアミンであり、前記ヒドロハロゲン化ハロエチルアミンはヒドロ臭化ブロモエチルアミンであることが好ましい、
化合物の合成方法を提供する。

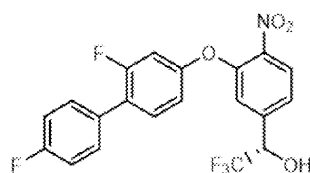
【0044】

本発明は、以下の構造、

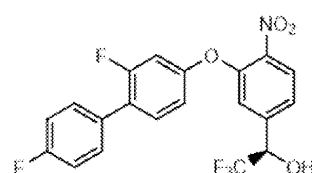
【化 3 2】



I I - 1



I I - 2



I I - 3

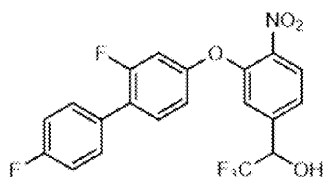
30

のいずれか 1 つを有する化合物を提供する。

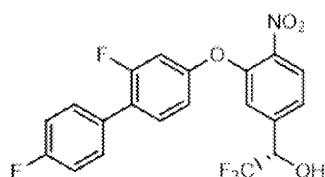
【0045】

本発明は、以下の構造、

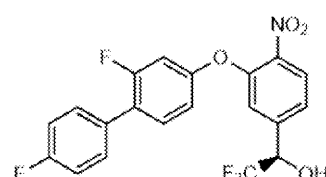
【化 3 3】



I I - 1



I I - 2



I I - 3

40

を有する化合物のいずれか 1 つの合成方法を提供する。

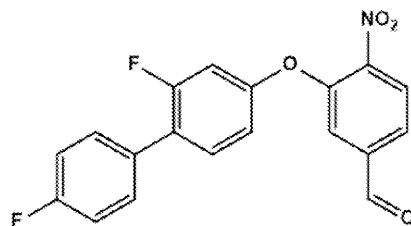
【0046】

化合物 I I I - 3 を、接触している T M S C F₃ と反応させ、脱保護の後に加水分解してラセミアルコール I I - 1 を得、ラセミアルコール I I - 1 にキラル分割操作を行ってキラルアルコール I I - 2 およびキラルアルコール I I - 3 をそれぞれ得る。

50

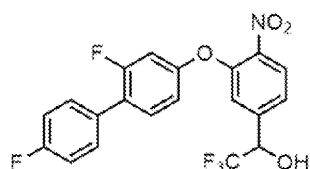
【 0 0 4 7 】

【 化 3 4 】

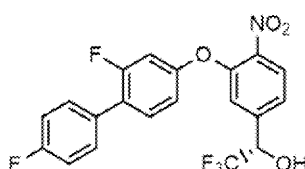


I I I - 3

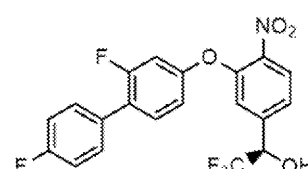
10



I I - 1



I I - 2



I I - 3

【 0 0 4 8 】

TMSCF₃ はトリメチル（トリフルオロメチル）シランであり、脱保護操作に使用される脱保護試薬はフッ化テトラブチルアンモニウム（tetra butyl ammonium fluoride: TBAF）であり、加水分解操作にはフッ化アンモニウム、水性塩化アンモニウムまたは塩酸が使用される。

20

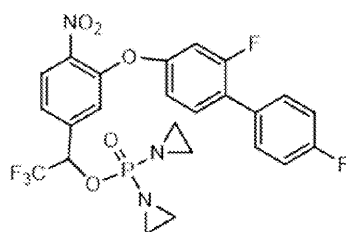
【 0 0 4 9 】

キラル分割の方法としては、結晶化法および化学分割法が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

本発明は、化合物 A のラセミ体を分離して、エナンチオマーを得るかまたは化合物中の化合物のエナンチオマーのどちらかの濃度を過剰に高める方法であって、以下の工程、すなわち、

【 化 3 5 】



A

30

ラセミ化合物を光学分割操作にかける工程であって、前記操作は固定相および移動相を含むキラルクロマトグラフィーによって行われ、固定相は官能化多糖類を含浸させたシリカゲルを含み、移動相はアルコールとさらなる溶媒とを含む、工程を含む方法を提供する。

40

【 0 0 5 1 】

アルコールはエタノールであり、さらなる溶媒は n-ヘキサンであり、キラルクロマトグラフィー操作中のクロマトグラフィーカラムの温度は 38℃であり、官能化多糖類はアミロストリス（3,5-ジメチルフェニルカルバマート）であることが好ましい。

【 0 0 5 2 】

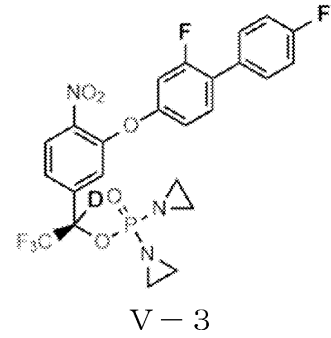
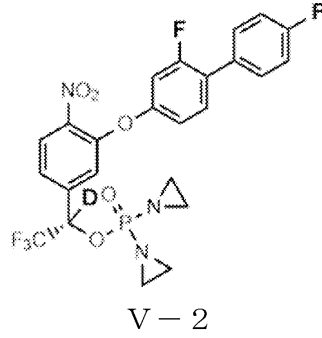
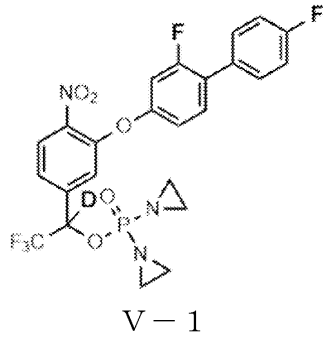
本発明は、化合物 A のラセミ体を分離して、エナンチオマーを得るかまたは化合物中のラセミ体のエナンチオマーのどちらかの濃度を過剰に高めるさらなる HPLC 法であって、前記 HPLC 法で使用するクロマトグラフィーカラムが CHIRALPAK（登録商標）AD、移動相がエタノール、カラム温度が 35℃である、HPLC 法を提供する。

50

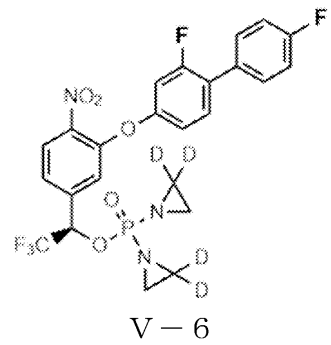
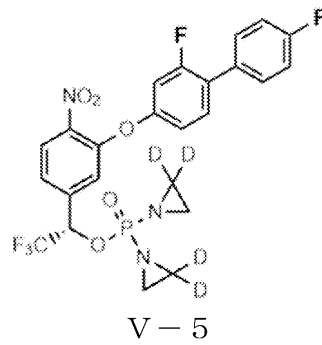
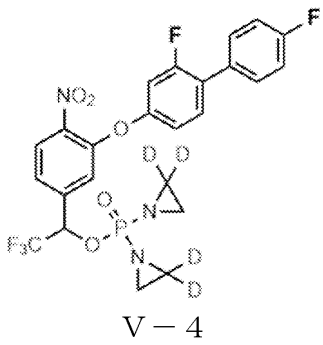
【 0 0 5 3 】

本発明は、以下の構造を有する重水素化合物のいずれか1つの調製方法であって、前記調製方法は、化合物ⅠⅤ－1～ⅠⅤ－21を閉環反応させて、対応する重水素化合物Ⅴ－1～Ⅴ－15をそれぞれ得ることを含み、

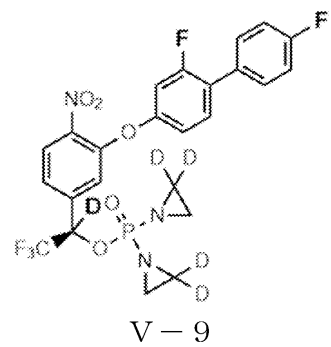
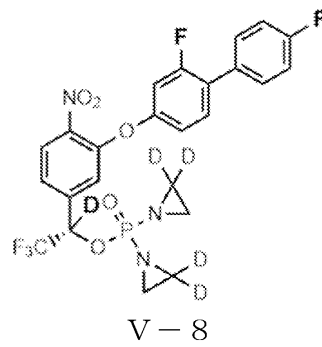
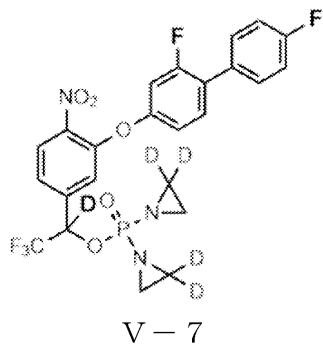
【化36】



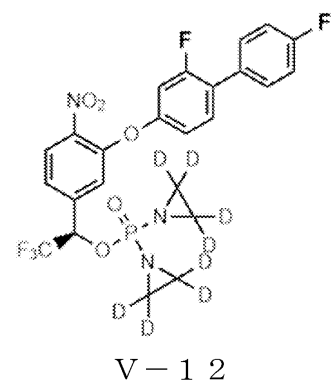
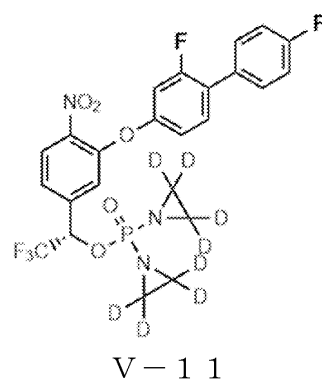
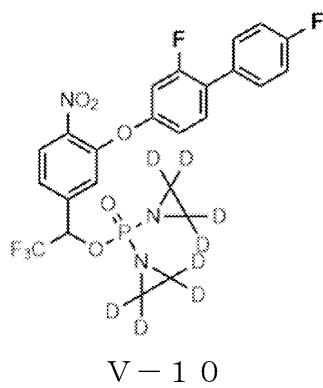
10



20



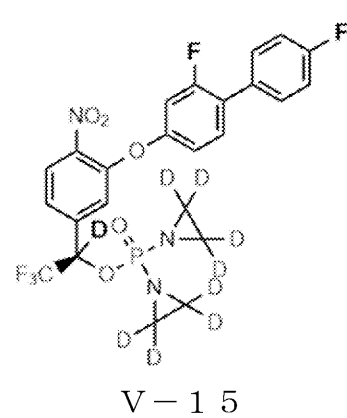
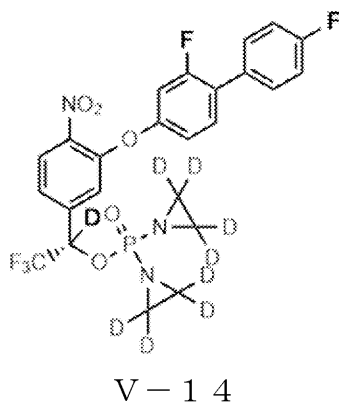
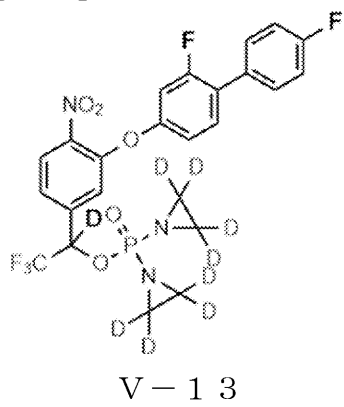
30



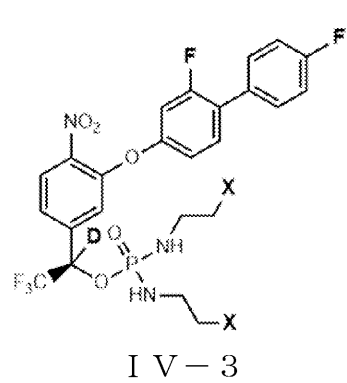
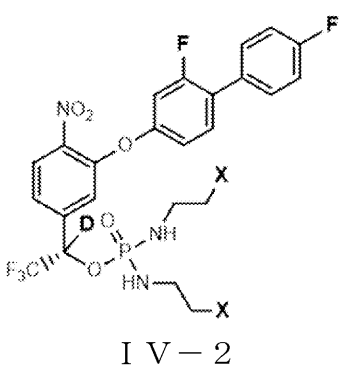
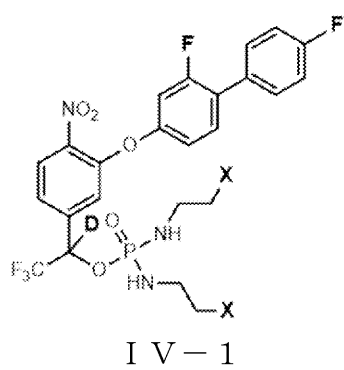
40

50

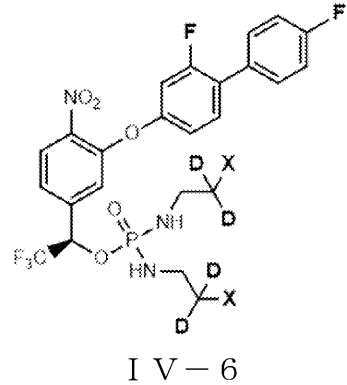
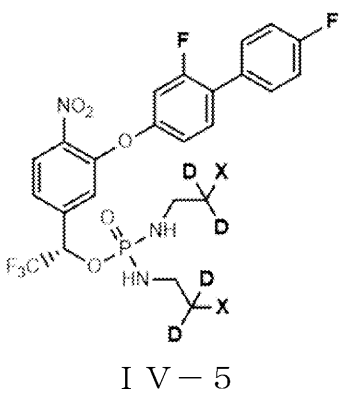
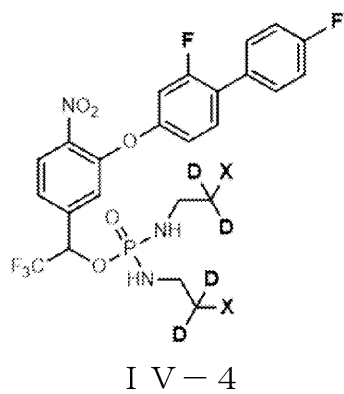
【化 3 7】



10



20

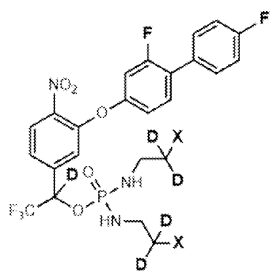


30

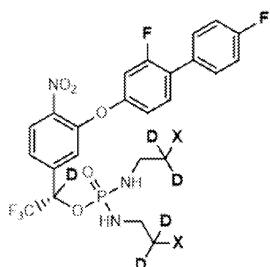
40

50

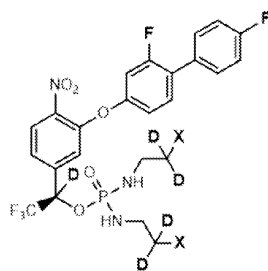
【化 3 8】



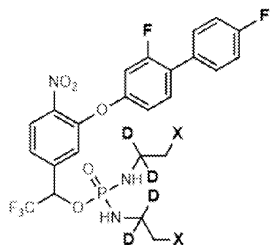
I V-7



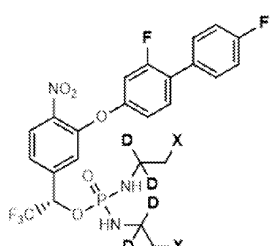
I V-8



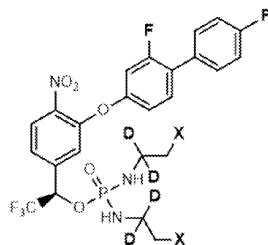
I V-9



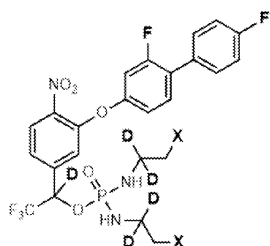
I V-10



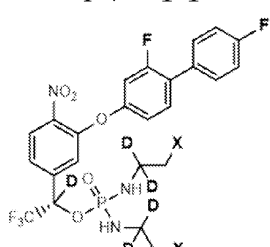
I V-11



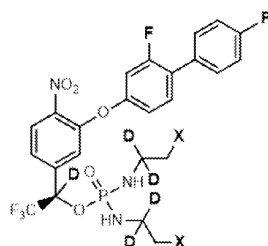
I V-12



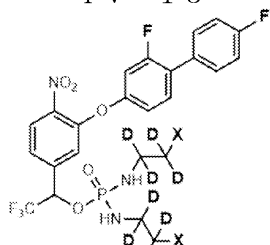
I V-13



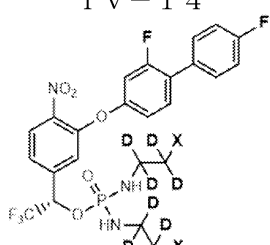
I V-14



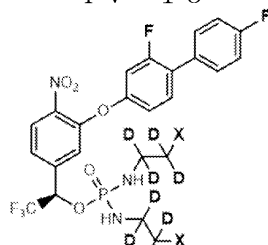
I V-15



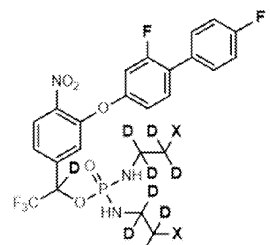
I V-16



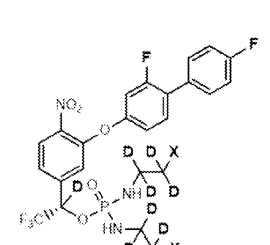
I V-17



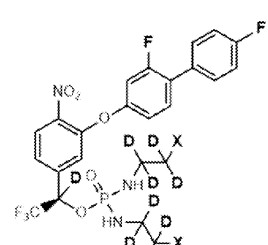
I V-18



I V-19



I V-20



I V-21

10

20

30

40

50

化合物 I V-1 ~ I V-21 のいずれか 1 つにおける 2 つの X 原子は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、好ましくは臭素であり、

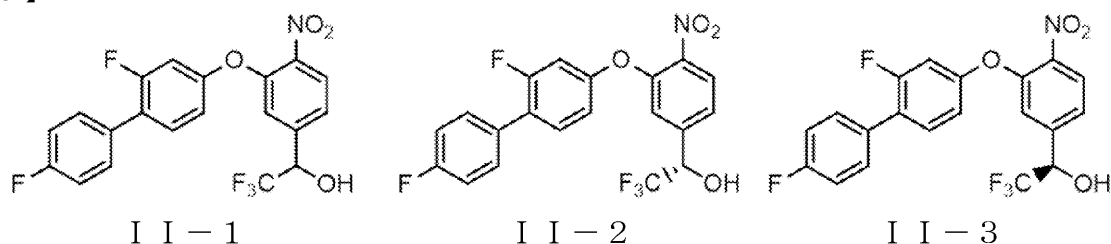
前記閉環反応において、塩基の添加の有無に関わらず、触媒として酸化銀または硝酸銀を使用する、
調製方法を提供する。

【0054】

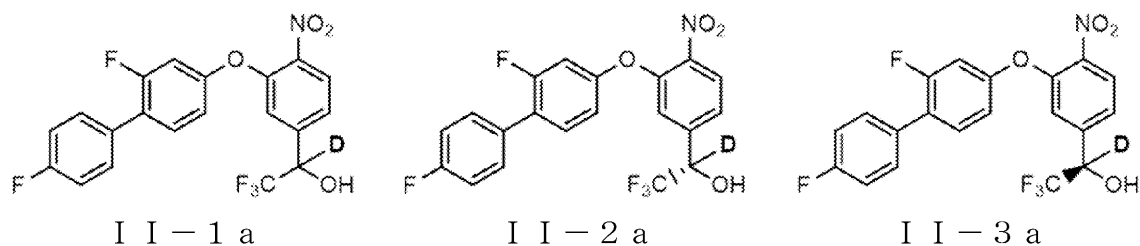
本発明は、上記化合物 I V-1 ~ I V-21 のいずれか 1 つの調製方法であって、前記調製方法は、化合物 I I-1、I I-2 もしくは I I-3 またはその重水素化合物 I I-1 a、I I-2 a もしくは I I-3 a を出発反応物として、オキシハロゲン化リンとの第

1 反応を行ってそれぞれ中間体を得、次いで、前記中間体と、対応する重水素化ハロエチルアミン V I - 1 もしくは V I - 2、または重水素化ハロエチルアミン V I - 1 もしくは V I - 2 のヒドロハロゲン化物との第 2 反応を行い、最終的に、対応する化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 を得ることを含み、

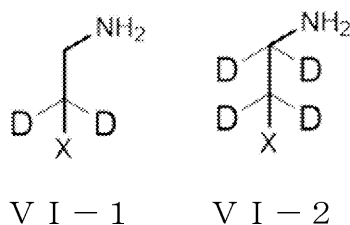
【化 3 9】



10



20



式中、化合物 V I - 1 または V I - 2 の X 原子は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 の X 原子に対応し、

30

前記オキシハロゲン化リンは、オキシフッ化リン、オキシ塩化リン、オキシ臭化リンおよびオキシヨウ化リンから選択され、好ましくはオキシ塩化リンであり、

前記オキシハロゲン化リンのハロゲンと、化合物 I V - 1 ~ I V - 2 1 のいずれか 1 つにおける 2 つの X 原子または化合物 V I - 1 もしくは V I - 2 の X 原子とは、同じであっても異なってもよく、

前記重水素化ハロエチルアミンのヒドロハロゲン化物において、ヒドロハロゲン化物のハロゲンと重水素化ハロエチルアミンのハロゲンとは同じであり、

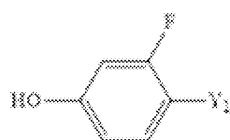
前記ハロエチルアミンはプロモエチルアミンであり、前記ヒドロハロゲン化ハロエチルアミンはヒドロ臭化プロモエチルアミンであることが好ましい、
調製方法を提供する。

40

【0055】

本発明は、以下の構造を有する化合物のいずれか 1 つの調製方法であって、以下の工程、すなわち、出発物質である化合物

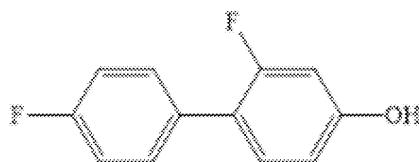
【化 4 0】



を反応させて化合物

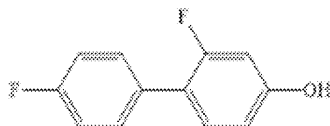
50

【化 4 1】



を得、次いでその化合物

【化 4 2】

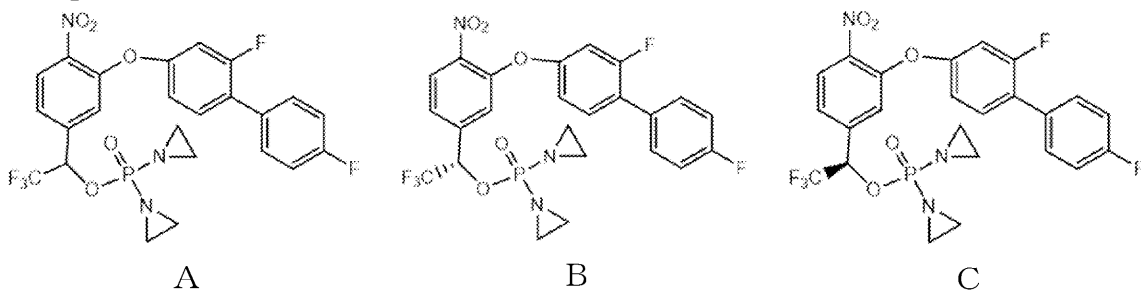


10

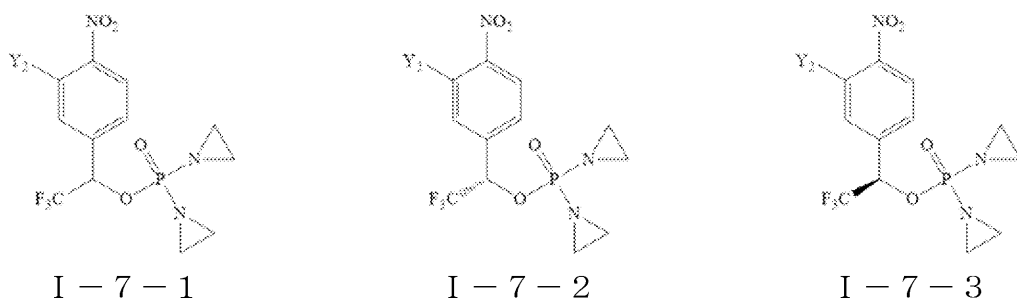
を式 I-7-1、I-7-2 または I-7-3 と反応させて、対応する式 A、B または C の化合物をそれぞれ得る工程を含む、調製方法を提供する。

【0056】

【化 4 3】



20



30

【0057】

具体的には、前記各化合物の構造における Y_1 および Y_2 はハロゲンまたは OM であり、M は水素、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、またはカルシウムであり、ハロゲンは好ましくは臭素である。

【0058】

具体的には、M がマグネシウムまたはカルシウムである場合、前記各化合物の構造における他の基の量は、M が水素、ナトリウム、またはカリウムの場合の 2 倍である。

40

【0059】

本明細書に記載の薬物に関して、調製された薬物は、示した化合物またはその塩もしくは溶媒和物もしくはその同位体変異体を特定の薬用量範囲で含有し、かつ／または、調製された薬物は特定の剤形であり、特定の投与方法を用いて投与される。

【0060】

本明細書に記載の使用に関して、調製された薬物はまた、医薬的に許容される助剤または賦形剤を含有してもよい。医薬は、錠剤、坐剤、分散性錠剤、腸溶錠、チュアブル錠、口内崩壊錠、カプセル、糖コーティング剤、顆粒、乾燥粉末、経口溶液、注射用小針、注射用凍結乾燥粉末、または輸液など、臨床投与用の任意の剤形であり得る。特定の剤形および投与の様式に応じて、医薬中の医薬的に許容される助剤または賦形剤は、1 つまたは

50

複数の以下のもの、すなわち、希釈剤、可溶化剤、崩壊剤、懸濁剤、潤滑剤、接着剤、充填剤、香味剤、甘味料、抗酸化剤、界面活性剤、防腐剤、包装剤および顔料などを含んでもよい。

【0061】

患者は哺乳類であることが好ましく、ヒトであることがより好ましい。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】化合物Aの高速液体クロマトグラフィー分析スペクトルを示す。

【図2】化合物Aの分離後に得られた化合物A-P1の高速液体クロマトグラフィー分析スペクトルを示す。

10

【図3】化合物Aの分離後に得られた化合物A-P2の高速液体クロマトグラフィー分析スペクトルを示す。

【図4】具体的な化合物V-10の $^1\text{H NMR}$ スペクトルを示す。

【図5】正常酸素圧条件下におけるH460細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の様々な濃度での阻害率の曲線を示し、 Log. conc (nM) は、10を底とする nmol/L の濃度値の対数値を表す。

【図6】様々な肝臓がん細胞株に対する化合物A、BおよびCの様々な濃度での阻害率の曲線を示し、 Log. conc (nM) は、10を底とする nmol/L の濃度値の対数値を表す。

【図7】AKR1C3阻害剤AST3021の存在下または非存在下におけるH460がん細胞に対する化合物A、BおよびCの様々な濃度での阻害率の曲線を示し、 Log. conc (nM) は、10を底とする nmol/L の濃度値の対数値を表す。

20

【図8】10株の非小細胞肺癌に対する化合物AのAKR1C3依存性の曲線を示し、FPKMは、RNA-seqにおけるキロベース百万当たりのフラグメント数（Fragments Per Kilobase Million）であり、2を底とする対数として Log_2FPKM を得、 IC_{50} は50%阻害濃度、すなわち細胞生存率が対照試料の細胞生存率の半分になった時に対応する濃度である。

【図9】10株の非小細胞肺癌に対する化合物AST-3424のAKR1C3依存性の曲線を示し、FPKMは、RNA-seqにおけるキロベース百万当たりのフラグメント数であり、2を底とする対数として Log_2FPKM を得、 IC_{50} は50%阻害濃度、すなわち細胞生存率が対照試料の細胞生存率の半分になった時に対応する濃度である。

30

【図10】肝臓がんLI6280 PDXモデルにおける化合物AおよびソラフェニブのAKR1C3依存性の生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図11】胃がんGA6201 PDXモデルにおける化合物A、AST-3424およびイホスファミドの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図12】胃がんGA6201 PDXモデルにおける化合物AおよびAST-3424の生体内薬力学実験における14日目での薬物中止後の様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

40

【図13】胃がんGA6201 PDXモデルにおける化合物A、AST-3424およびイホスファミドの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図14】ヒト由来の非小細胞肺癌NCI-H460皮下異種移植モデルにおける化合物Aおよびカルボプラチンの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図15】ヒト由来の非小細胞肺癌NCI-H460皮下異種移植モデルにおける化合物Aおよびカルボプラチンの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

50

【図 16】ヒト肝臓がん L I 6 6 5 2 皮下異種移植 P D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 17】ヒト肝臓がん L I 6 6 5 2 皮下異種移植 P D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 18】ヒト由来の非小細胞肺がん N C I - H 4 6 0 - L u c 2 頭蓋内接種 C D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数での生物蛍光値変化の曲線を示し、生物蛍光値が高いと腫瘍体積が大きいことを表す。

【図 19】ヒト由来の非小細胞肺がん N C I - H 4 6 0 - L u c 2 頭蓋内接種 C D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

10

【図 20】膵臓がん P A 1 2 2 2 P D X モデルにおける化合物 A およびゲムシタピンの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 21】膵臓がん P A 1 2 2 2 P D X モデルにおける化合物 A およびゲムシタピンの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 22】肺がん L U 2 5 0 5 P D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 23】肺がん L U 2 5 0 5 P D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 24】肝臓がん L 6 6 4 3 P D X モデルにおけるソラフェニブ、化合物 A の 0 . 5 m g / k g 、 1 m g / k g および 2 m g / k g 、ならびに A S T - 3 4 2 4 の様々な濃度での生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

20

【図 25】肝臓がん L 6 6 4 3 P D X モデルにおけるソラフェニブ、ならびに化合物 A の 1 . 2 5 m g / k g 、 2 . 5 m g / k g 、 5 m g / k g および 1 0 m g / k g の生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 26】肝臓がん L 6 6 4 3 P D X モデルにおけるソラフェニブ、ならびに化合物 A の 1 . 2 5 m g / k g 、 2 . 5 m g / k g 、 5 m g / k g および 1 0 m g / k g の生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 27】肝臓がん L I 1 0 0 5 P D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

30

【図 28】肝臓がん L I 1 0 0 5 P D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 29】肝臓がん H e p G 2 C D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 30】肝臓がん H e p G 2 C D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 31】肺がん L U 0 8 8 4 P D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 32】肺がん L U 0 8 8 4 P D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

40

【図 33】肝臓がん L I 6 6 6 4 P D X モデルにおける化合物 A 、 A S T - 3 4 2 4 およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数での腫瘍体積変化の曲線を示す。

【図 34】肝臓がん L I 6 6 6 4 P D X モデルにおける化合物 A 、 A S T - 3 4 2 4 およびソラフェニブの生体内薬力学実験における様々な日数でのマウスの体重変化率の曲線を示す。

【図 35】血漿および脳組織における化合物 A の濃度の対時間曲線を示す。

【図 36】化合物 A の血漿中濃度と脳組織中濃度との比率の対時間曲線を示す。

【図 37】血漿および脳組織における化合物 A S T - 2 8 7 0 の濃度の対時間曲線を示す。

50

【図38】化合物AST-2870の血漿中濃度と脳組織中濃度との比率の対時間曲線を示す。

【図39】NADPHを添加した場合、NADPHを添加しない場合、ならびにAKR1C3阻害剤および対照薬プロゲステロンを添加した場合の、マウス、サル、ラットおよびヒトの肝細胞細胞質ゾル溶液で経時的に反応した後の化合物Aの残存量の曲線を示す。グラフ中、Remainingは代謝残存率を表し、Timeは時間を表し、ASTは化合物Aを表し、Progesteroneはプロゲステロンを表す。

【図40】NADPHを添加した場合、NADPHを添加しない場合、ならびにAKR1C3阻害剤および対照薬プロゲステロンを添加した場合の、マウス、サル、ラットおよびヒトの肝細胞細胞質ゾル溶液で経時的に反応した後の化合物AST-3424の残存量の曲線を示す。グラフ中、Remainingは代謝残存率を表し、Timeは時間を表し、Progesteroneはプロゲステロンを表す。

10

【発明を実施するための形態】

【0063】

本発明を、具体的な実施例を挙げて下記で説明する。これらの実施例は本発明を説明するために使用するにすぎず、本発明の範囲を決して限定するものではないことを、当業者なら理解するであろう。

【0064】

以下の実施例の実験方法は、特に明記しない限り、従来法である。以下の実施例で使用している医薬原料、試薬材料などは、特に明記しない限り、全て市販品である。

20

「プロドラッグ」とは、投与されてから、少なくとも1つの特性に関して生物学的に活性またはより活性な化合物（または薬物）へと代謝されるか、そうでなければ変換される化合物を指す。薬物に対して、プロドラッグは、薬物よりも低活性または不活性になるように化学的に修飾されているが、その化学修飾は、そのプロドラッグが投与された後、代謝プロセスまたは他の生物学的プロセスによって、それに対応する薬物が生成されるような修飾である。プロドラッグは、活性薬物と比較して、代謝安定性または輸送特性が改変され、副作用が少なく、もしくは毒性が低く、または風味が改善されていてもよい。プロドラッグは、それに対応する薬物以外の反応物を使用して合成されてもよい。

【0065】

患者への薬物の「投与」とは、医療専門家による患者への投与であり得、もしくは自己投与であり得る直接投与、および／または薬物を処方する行為であり得る間接投与を指す。例えば、患者に薬物の自己投与を指示し、かつ／または患者に薬物の処方箋を提供する医師は、患者に薬物を投与しているということである。

30

【0066】

「がん」とは、浸潤によって局所的に、転移によって全身に拡大し得るという潜在的に抑制不能な成長を伴う白血病、リンパ腫、がん腫、およびその他の（固形腫瘍を含む）悪性腫瘍を指す。がんの例としては、（以下に限定されないが）副腎、骨、脳、乳房、気管支、結腸および／または直腸、胆嚢、頭頸部、腎臓、喉頭、肝臓、肺、神経組織、脾臓、前立腺、副甲状腺、皮膚、胃および甲状腺のがんが挙げられる。その他のがんの特定の例として挙げられるのは、急性および慢性のリンパ球性および顆粒球性新生物、腺がん、腺腫、基底細胞がん、子宮頸部上皮異形成および上皮内がん、ユーイング肉腫、類表皮がん、巨細胞腫、多形神経膠芽腫、毛様細胞腫瘍、腸管神経節腫、過形成角膜神経腫瘍、脾島細胞がん、カポジ肉腫、平滑筋腫、白血病、リンパ腫、悪性カルチノイド、悪性黒色腫、悪性高カルシウム血症、マルファン体型（marfanoid habitus）腫瘍、髄様上皮がん、転移性皮膚がん、粘膜神経腫、骨髄腫、菌状息肉腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、骨形成およびその他の肉腫、卵巣腫瘍、褐色細胞腫、真性多血症、原発性脳腫瘍、小細胞肺がん、潰瘍性および乳頭状の扁平上皮がん、過形成、精上皮腫、軟部組織肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、腎細胞腫瘍、局所皮膚病変、細網細胞肉腫、ならびにウィルムス腫瘍である。

40

【0067】

50

「患者」と「個体」は互換的に使用され、がんの治療を必要とする哺乳類を指す。通常、患者はヒトである。通常、患者は、がんと診断されたヒトである。特定の実施形態では、「患者」または「個体」とは、薬物および治療法のスクリーニング、特徴付けおよび評価に使用される非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、マウスまたはラットなどの非ヒト哺乳類を指す場合がある。

【0068】

「固形腫瘍」とは、（以下に限定されないが）骨、脳、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、前立腺、皮膚および軟部組織（肉腫）における転移性腫瘍などの固形腫瘍を指す。

【0069】

薬物の「治療有効量」とは、がん患者に投与された場合に、意図された治療効果（例えば、患者のがんの1つまたは複数の臨床病態の軽減、寛解、緩和または消失）を有する薬物の量を指す。治療効果は、必ずしも1回分の用量を投与することによって生じるわけではなく、一連の用量を投与した後にのみ生じ得る。したがって、治療有効量が1回または複数回の投与で投与されてもよい。

10

【0070】

病状または患者の「治療」または「療法」とは、有益または所望の（臨床結果を含む）結果を得るための措置を講じることを指す。本発明の目的に関して、有益または所望の臨床結果としては、（以下に限定されないが）がんの1つまたは複数の症状の軽減もしくは寛解、疾患の範囲の減少、疾患進行の遅延もしくは緩徐化、疾患状態の寛解、緩解、もしくは安定化、またはその他の有益な結果が挙げられる。

20

【0071】

「腫瘍細胞」とは、任意の適当な種（例えば、ネズミ科、イヌ科、ネコ科の動物、ウマ、またはヒトなどの哺乳類）の腫瘍細胞を指す。

【0072】

「治療」または「患者の治療」とは、本発明に関連する患者に、治療有効量の薬物を投与または使用することである。

【0073】

患者への薬物の「投与」または「使用」とは、医療専門家による患者への投与、もしくは自己投与であり得る直接投与、および／または薬物を処方する行為であり得る間接投与を指す。例えば、患者に薬物の自己投与を指示し、かつ／または患者に薬物の処方箋を提供する医師は、患者に薬物を投与しているということである。

30

【0074】

本発明の具体的な実施形態に関する以上の説明は、本発明を限定するものではない。当業者は、本発明に従って種々の改変および変更を行うことができ、本発明の趣旨の範囲内のいかなる改変および変更も、本発明に添付する特許請求の範囲に含まれるものとする。

【0075】

I. 化合物の合成、調製および構造決定

略語の注釈：

40

50

【表 1】

略語	正式名称
THF	テトラヒドロフラン
DCM	ジクロロメタン
EA	酢酸エチル
TEA	トリエチルアミン
MTBE	メチルtert-ブチルエーテル
DMAP	4-ジメチルアミノピリジン
DBAD	ジ-tert-ブチルアゾジカルボキシラート
TFA	トリフルオロ酢酸
EtOH	エタノール
t-BuOH	tert-ブタノール
DMF	N, N-ジメチルホルムアミド
PE	石油エーテル
DMF-DMA	N, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール
TBAF	フッ化テトラブチルアンモニウム
DIPEAまたはDIEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
DIAD	ジイソプロピルアゾジホルマート
t-BuOK	カリウムtert-ブトキシド
MS	質量分析
HPLC	高速液体クロマトグラフ
Calculated	質量分析の理論計算値
found	質量分析の測定値
eq	同等

10

20

【0076】

明記されていないその他の略語または用語は、有機化学または有機合成のハンドブックの定義または指示に従って解釈または運用することができる。

30

【0077】

明記されていない全ての試薬または薬物は、商業的に購入されている。

【0078】

¹H-NMR NMR試験には、明記していない場合は400MHz機器を判定のために使用しており、MS質量分析試験には、LC-MS液体クロマトグラフィー-質量分析機器を定量のために使用している。

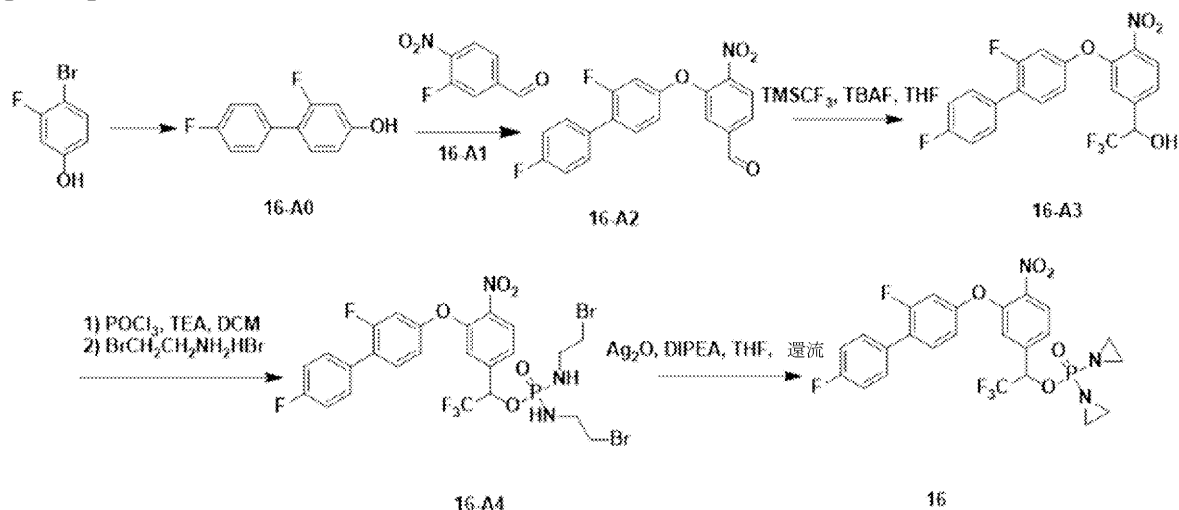
【0079】

1.1 化合物A（すなわち、化合物16）の合成
方法1：

40

50

【化 4 4】



10

化合物Aの合成経路

【0080】

化合物Aの合成法は、特許PCT/CN2020/089692の化合物No. 16の合成法と同じであり、その特許における化合物No. 16の合成法は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

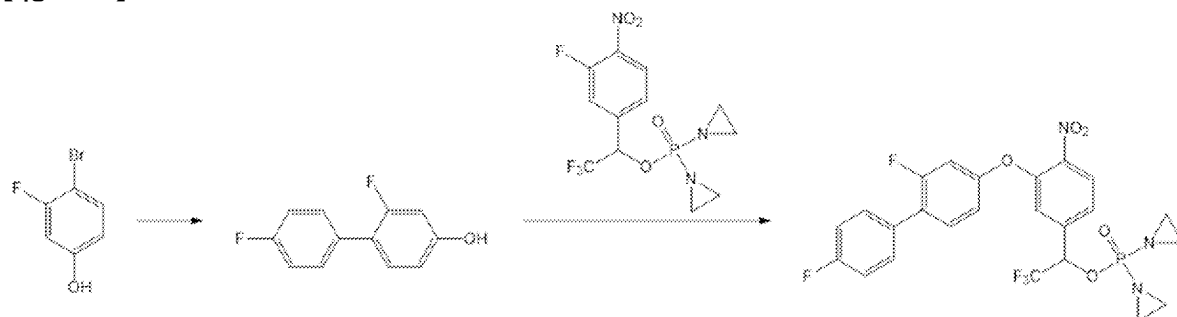
【0081】

方法2:

3-フルオロ-4-ブロモフェノールを出発物質として使用する二段階反応によって、目的化合物Aを得た。

【0082】

【化 4 5】

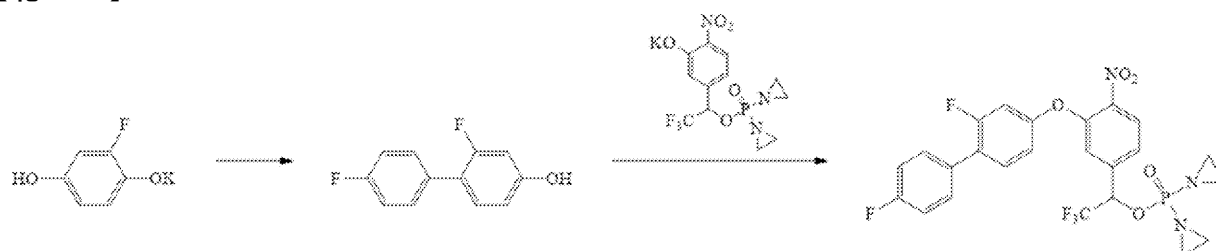


30

【0083】

方法3:

【化 4 6】



40

【0084】

1. 2 化合物Aのキラル分割

純粋形の化合物Aをキラル分析にかけた。

50

【 0 0 8 5 】

H P L Cキラル分析条件は以下のとおりである。

【 0 0 8 6 】

【表 2】

クロマトグラフィー用カラム	CHIRALPAK AD-H(AD00CD-UE022)
カラムサイズ	内径 0.46cm × 長さ 15cm
注入体積	0.2ul
移動相	エタノール=100%
流速	0.5ml/分
検出波長	UV 254nm
カラム温度	35℃

10

【 0 0 8 7 】

試験で得られたH P L Cスペクトルを図 1 に示し、具体的な結果を以下の表に示す。

【 0 0 8 8 】

【表 3】

化合物	分離ピーク	Ret. Time (保持時間)	面積	面積% (面積比率)
A-P1	ピーク1	4.808	3436401	51.036%
A-P2	ピーク2	5.791	3296947	48.964%

20

【 0 0 8 9 】

化合物 A を 4 . 4 8 1 4 g 取り、クロマトグラフィーグレードのエタノールに溶解した。以下のキラル分離調製法およびキラル分離調製条件を用いて、キラル分離調製を実施した。

【 0 0 9 0 】

H P L Cキラル分離調製法：上記のキラルラセミ体（すなわち、化合物 A）を、H P L C調製装置およびキラルカラムを使用したH P L C法により分離し、対応する画分を採取した。溶媒を回転蒸発により除去して、光学異性体の純生成物を得た。

30

【 0 0 9 1 】

H P L Cキラル分離調製条件は以下のとおりである。

【 0 0 9 2 】

【表 4】

分割クロマトグラフィー用カラム	CHIRALPAK AD
カラムサイズ	内径 5.0cm、長さ 25cm、充填剤粒子のサイズ 10 μ m
移動相	エタノール=100%
流速	40ml/分
検出波長	UV 254nm
カラム温度	35℃

40

【 0 0 9 3 】

分離調製後、ピーク 1 に対応する光学異性体の純生成物 2 . 1 4 3 2 g を得、測定されたエナンチオマー過剰 (e n a n t i o m e r i c e x c e s s : e e) 値は 9 9 . 2 % であった。ピーク 2 に対応する光学異性体の純生成物 2 . 0 8 4 0 g を得、測定 e e 値は 9 9 . 5 % であった。

【 0 0 9 4 】

50

キラル分離調製によるピーク 1 に対応する光学異性体およびピーク 2 に対応する光学異性体を、HPLC キラル分析条件を用いてさらに分析し、図 2 および図 3 に示す結果を得た。

【0095】

ピーク 1 に対応する光学異性体の HPLC 分析の結果を以下の表に示す。

【0096】

【表 5】

化合物	分離ピーク	Ret. Time (保持時間)	面積	面積% (面積比率)
A-P1	ピーク1	4.807	5645223	99.639%
A-P2	ピーク2	5.777	20453	0.361%

10

【0097】

ピーク 2 に対応する光学異性体の HPLC 分析の結果を以下の表に示す。

【0098】

【表 6】

化合物	分離ピーク	Ret. Time (保持時間)	面積	面積% (面積比率)
A-P1	ピーク1	4.835	12783	0.216%
A-P2	ピーク2	5.801	5918040	99.784%

20

【0099】

1. 3 化合物 A ならびにその異性体 A-P1 および A-P2 のキラル安定性に関する研究
長期条件および加速条件下での異性体の安定性について研究した。

【0100】

化合物 A ならびに異性体 A-P1 および A-P2 を、 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 、 $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ($60\% \pm 5\% \text{RH}$) および $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ($75\% \pm 5\% \text{RH}$) での特徴および異性体安定性についてそれぞれ調べ、その結果を以下の表に示した。

30

【0101】

40

50

【表 7】

化合物	異性体ピーク	異性体の結果(%)											
		-20±5℃			5℃±3℃			25℃±2℃/60%±5%RH			40℃±2℃/75%±5%RH		
		0か月	3か月	1か月	3か月	6か月	1か月	3か月	6か月	1か月	3か月	6か月	1か月
A	性状	淡黄色 固体	NA	NA	NA	淡黄色 固体	NA	NA	淡黄色 固体	NA	NA	淡黄色 固体	NA
	A-P1	49.8	NA	NA	NA	49.9	NA	NA	49.9	NA	NA	49.9	NA
	A-P2	50.2	NA	NA	NA	50.1	NA	NA	50.1	NA	NA	50.1	NA
A-P1	異性体変換	NA	NA	NA	NA	0.1	NA	NA	0.1	NA	NA	0.1	NA
	性状	淡黄色 固体	淡黄色 固体	淡黄色 固体	淡黄色 固体	/	淡黄色 濃厚液体	淡黄色 濃厚液体	/	淡黄色 濃厚液体	NA	NA	NA
	A-P1	99.92	99.92	99.92	99.92	/	99.92	99.92	/	99.91	NA	NA	NA
A-P2	異性体変換	0.08	0.08	0.08	0.08	/	0.08	0.08	/	0.09	NA	NA	NA
	性状	NA	0.00	0.00	0.00	/	0.00	0.00	/	0.01	NA	NA	NA
	A-P2	99.75	99.74	99.75	99.75	/	99.75	99.75	/	99.74	NA	NA	NA
A-P2	異性体変換	NA	-0.01	0.00	0.00	/	0.00	0.00	/	0.01	NA	NA	NA
	性状	淡黄色 固体	淡黄色 固体	淡黄色 固体	淡黄色 固体	/	淡黄色 濃厚液体	淡黄色 濃厚液体	/	淡黄色 濃厚液体	NA	NA	NA
	A-P2	99.75	99.74	99.75	99.75	/	99.75	99.75	/	99.74	NA	NA	NA

注：1. 表のデータは、元のスペクトルのピーク面積に基づいて、「含有量%＝個々の異性体ピーク面積÷(P1ピーク面積＋P2ピーク面積)×100%」の式に従って計算した。
2. NAは該当なしを意味し、/は試験を行わなかったことを意味する。

【0102】

上記の表のデータから、5℃±3℃、25℃±2℃（60%±5%RH）および40℃±2℃（75%±5%RH）に6か月間置いた後でも、化合物Aの性状およびキラリティーは本質的に変化していないことが実証され、これにより、化合物Aの2つの単一異性体の比率が安定し、化合物Aのキラリティーが安定していることが示された。

【0103】

化合物A-P1およびA-P2を、それぞれ-20℃±5℃、5℃±3℃、25℃±2℃（60%±5%RH）に3か月間、および40℃±2℃（75%±5%RH）に1か月間置いたところ、試料の色およびキラリティーに、本質的に変化はなく、これにより、上

記の条件下では、単一異性体 A-P 1 および A-P は互いに変換することなく、キラリティーが安定していることが示された。

【0104】

1. 4 重水素化合物の調製

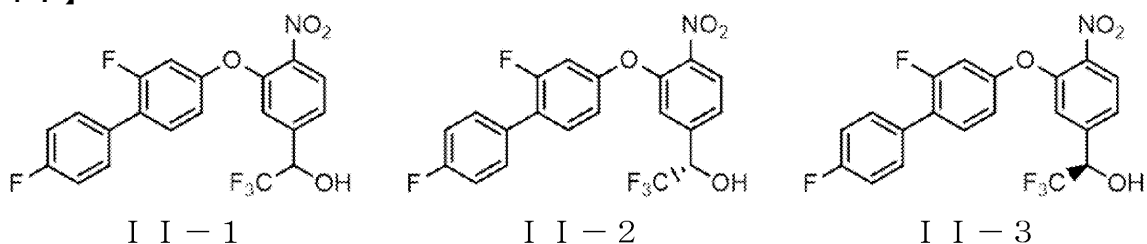
式 I V-1 ~ I V-21 の重水素化合物を、以下の合成経路または工程を用いて調製した。

【0105】

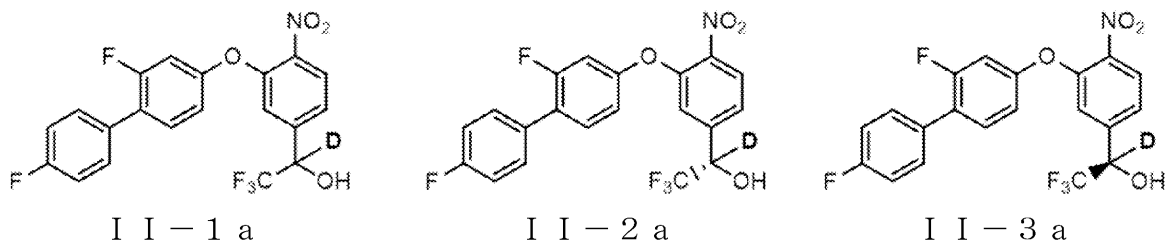
工程 1、すなわち化合物 I V-1 ~ I V-21 の調製であって、前記調製は、化合物 I I-1、I I-2 もしくは I I-3 またはその重水素化合物 I I-1 a、I I-2 a もしくは I I-3 a を出発反応物として、オキシハロゲン化リンとの第 1 反応を行って、それぞれ中間体を得、次いで、前記中間体と、対応する重水素化ハロエチルアミン V I-1 もしくは V I-2、または重水素化ハロエチルアミン V I-1 もしくは V I-2 のヒドロハロゲン化物との第 2 反応を行い、最終的に、対応する化合物 I V-1 ~ I V-21 を得ることを含み、

10

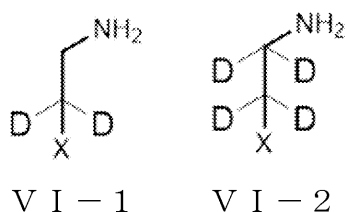
【化 4 7】



20



30



式中、X は、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素であり、

前記重水素化ハロエチルアミンのヒドロハロゲン化物において、ヒドロハロゲン化物のハロゲンと重水素化ハロエチルアミンのハロゲンとは同じであり、

40

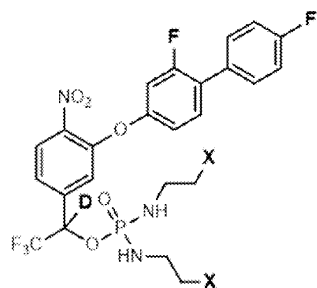
前記ハロエチルアミンはブromoエチルアミンであり、前記ヒドロハロゲン化ハロエチルアミンはヒドロ臭化ブromoエチルアミンであることが好ましい、
化合物 I V-1 ~ I V-21 の調製。

【0106】

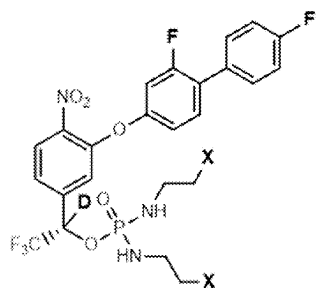
工程 2、すなわち以下の構造のいずれか 1 つを有する重水素化合物 V-1 ~ V-15 の調製方法であって、前記調製方法は、化合物 I V-1 ~ I V-21 を閉環反応させて、対応する重水素化合物 V-1 ~ V-15 をそれぞれ得ることを含み、

50

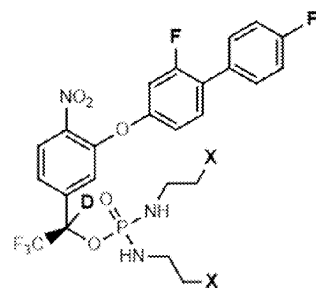
【化 4 8】



IV-1

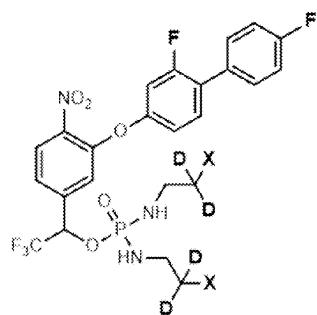


IV-2

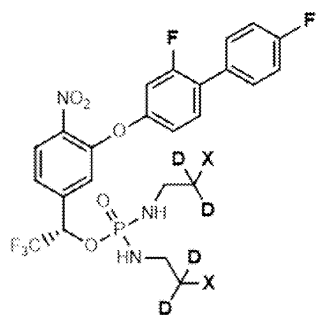


I V-3

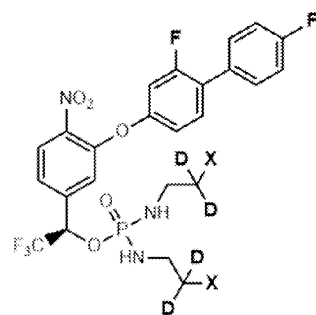
10



I V-4

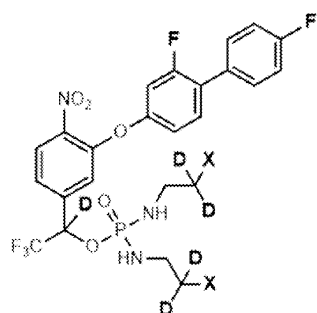


IV-5

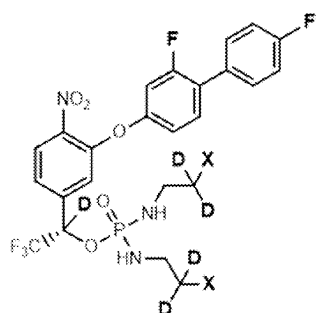


I V-6

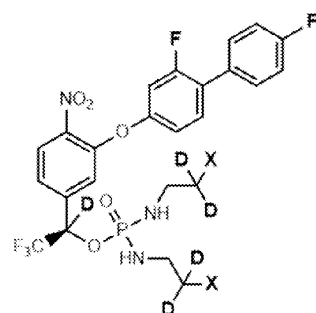
20



I V-7

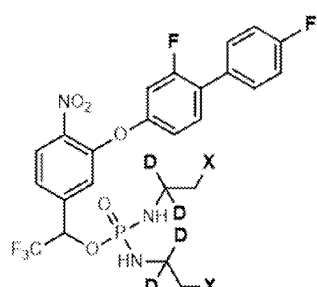


IV-8

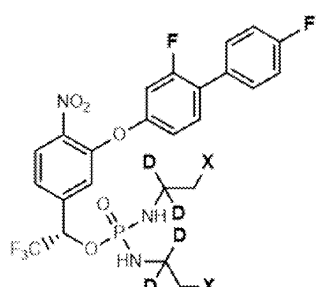


I V-9

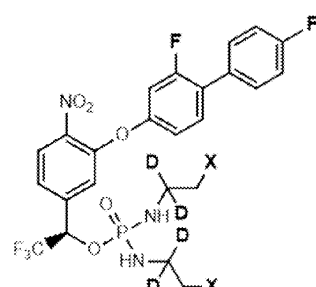
30



IV-10



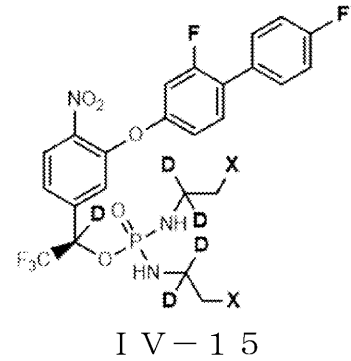
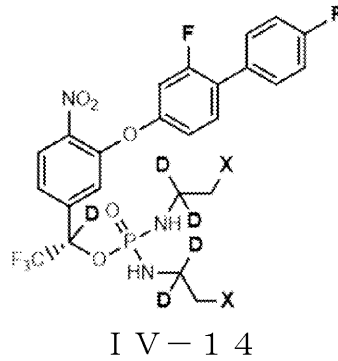
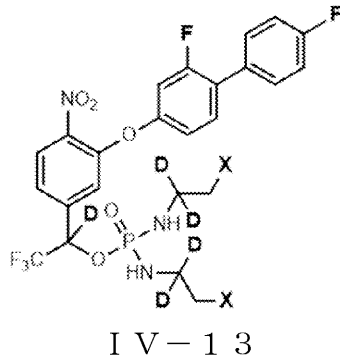
IV-11



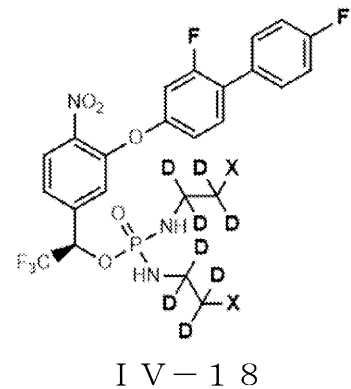
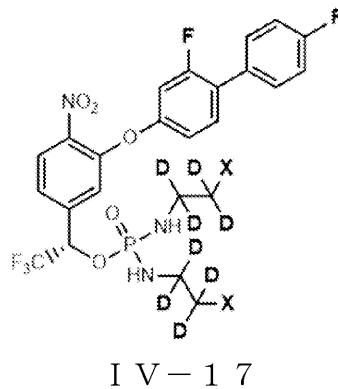
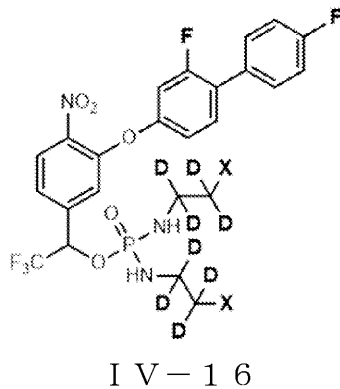
IV-12

40

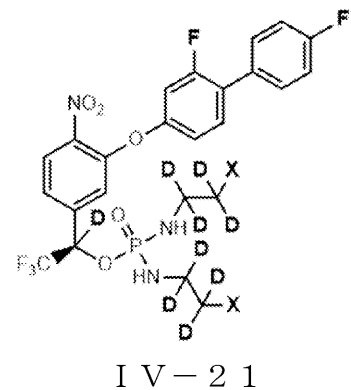
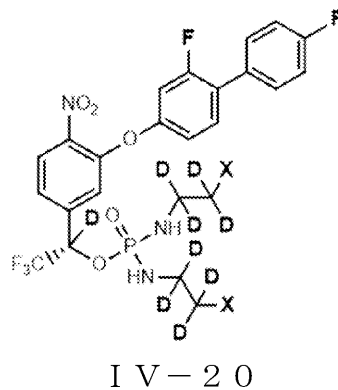
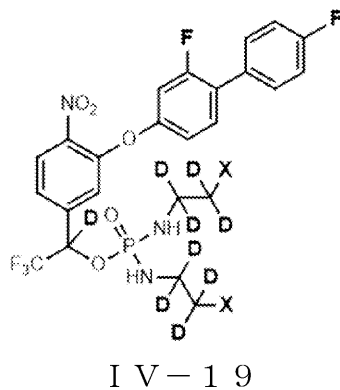
【化 4 9】



10



20



30

式中、Xは、それぞれ独立して、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素、好ましくは臭素であり、

前記閉環反応において、塩基の添加の有無に関わらず、触媒として酸化銀または硝酸銀を使用する、

重水素化合物 V-1 ~ V-15 の調製方法。

【0107】

40

具体的には、上記の項目 1. 1 における化合物 A の合成方法の反応条件および物質比率を参考にして、適当な重水素化中間体または出発物質を選ぶことにより、上記の 15 個の重水素化合物 (V-1 ~ V-15) の合成調製が達成されてもよい。

【0108】

得られた以下の式 V-10 の重水素化合物は淡黄色の固体であり、その $^1\text{H NMR}$ スペクトルを図 4 に示した。分析データは以下のとおりであった。

【0109】

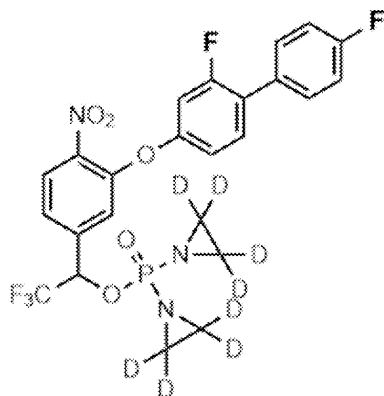
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.60–7.51 (m, 4H), 7.45 (s, 1H), 7.19 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.99–6.96 (m, 2H), 6.10–6.05 (m, 1H

50

）。HPLC（保持時間：9.817分）MS：Calculated MS、563.2、found、564.2（[M+H]⁺）。

【0110】

【化50】



I-4-1

10

【0111】

下記の項目2～7の生体内実験および生体外実験に関わる略語または語彙の意味は、医薬品化学、生化学、生理学、薬理学または医学の教科書にある語彙の意味に従って解釈することができる。

20

【0112】

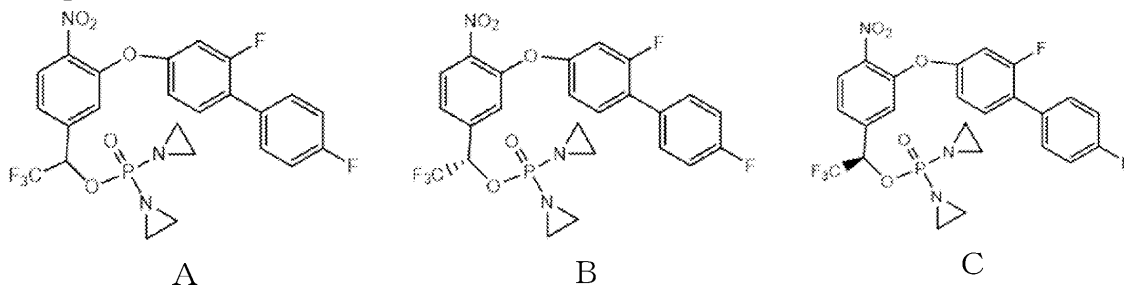
II. がん細胞に対する化合物の阻害アッセイ

2.1 H460がん細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の阻害アッセイ

化合物AST-3424は、過剰発現したアルド・ケトレダクターゼ1C3（aldoketoreductase 1C3：AKR1C3）を標的として出願人ががん治療用に開発したDNAアルキル化医薬品であり（DNAアルキル化剤、PCT出願第PCT/US2016/021581号、国際公開第2016145092号、中国特許出願第201680015078.8号、中国特許公告第107530556号）、現在第I

30

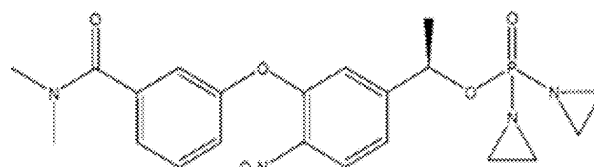
【化51】



A

B

C



AST-3424

40

を有する。

【0113】

生体外でのヒト腫瘍細胞株の細胞毒性に関する定量値IC₅₀を使用して、化合物A、B、CおよびAST-3424のがん細胞増殖阻害性を比較した。

50

【0114】

特に明記されていない限り、 IC_{50} の値は、以下の実験方法によって測定した。

【0115】

(1) 細胞培養

a) 10% FBSおよび1%の二重抗体を有するRPMI-1640培地でH460細胞を培養し、37℃、5% CO_2 に置いた。

【0116】

(2) 細胞プレーティング

a) 細胞を、細胞飽和度が80%～90%になり必要数に達するまで従来法で培養した後、細胞を採取した。

b) 対応する培地で細胞を再懸濁し、数を数え、適当な密度の細胞懸濁液を調合した。

c) その細胞懸濁液を、1ウェル当たり100 μ L、2000細胞／ウェルの細胞密度で、96ウェルプレートに添加した。

d) 37℃、5% CO_2 のインキュベータで、細胞を一晩培養した。

【0117】

(3) 化合物の調製

a) 実験要件に従って化合物を調製した。

b) 0.5% DMSOを添加した細胞を、高表示値用の対照ウェルであるブランク対照ウェルに添加した。

c) 細胞がない培地のみのウェルを、低表示値用の対照ウェルとして使用した。

【0118】

(4) 化合物を用いた細胞の処理

a) 細胞を24時間でプレーティングし、次いで化合物を単独で作用させた。1ウェル当たり99 μ Lの成長培地を補充し、次いで200X化合物1 μ Lを添加し、穏やかに振とうして確実に均一混合させた後、37℃、5% CO_2 のインキュベータに置いた。

b) その細胞プレートを前記インキュベータに72時間置いた。

【0119】

(5) CTG法検出

a) 試験対象の前記細胞プレートを室温で30分間平衡状態に置き、培地100 μ Lを各ウェルから廃棄した。

b) CTG試薬（セルタイター・グロ（Cell Titer Glo）キット）100 μ Lを各ウェルに添加し、プレートを高速発振器に置いて2分間振とうした後、光から離して室温で30分間置いた。

c) 化学発光シグナル値をエンビジョン（Envision）機器で読み取った。

【0120】

(6) データ分析

グラフパッド・プリズム8ソフトウェアを使用して IC_{50} を計算し、以下の非線形フィッティング式を使用して化合物の IC_{50} （半阻害濃度）を得た。

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log } IC_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X：化合物濃度の対数値、Y：阻害率（阻害%）

阻害率（阻害%）=（高表示値用の対照表示値－化合物ウェルの表示値）／（高表示値用の対照表示値－低表示値用の対照表示値）×100。

【0121】

上記の実験方法によって測定した化合物A、B、CおよびAST-3424の IC_{50} 値を、下記表1に示した。

【0122】

10

20

30

40

50

【表 8】
表1:H460がん細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の阻害効果に関するIC₅₀データ

化合物	IC ₅₀ (nmol/L)
A	6.87
B	8.77
C	23.37
AST-3424	0.11

10

【0123】
化合物A、B、CおよびAST-3424の試験から得られたIC₅₀曲線を図5に示した。

【0124】
試験結果から、2つの光学異性体（化合物BおよびC）は、H460に対して、ラセミ体（化合物A）と同様の阻害毒性を有することが示された。3つの化合物A、BおよびC全てのIC₅₀は、AST-3424のIC₅₀よりも高かった。

【0125】
2.2 様々な肝細胞がん（hepatocellular carcinoma:HCC）細胞株SNU354、SNU886、MHCC97H、huH-1に対する化合物A、BおよびCの細胞阻害実験

20

上記と同じ実験方法を用いて、化合物A、BおよびCを、様々な肝細胞がん（HCC）細胞株SNU354、SNU886、MHCC97HおよびhuH-1に対する細胞毒性についてさらに試験し、その結果を下記表2に示した。

【0126】
【表 9】
表2:様々な肝細胞がん細胞(HCC)に対する化合物A、BおよびCの阻害効果に関するIC₅₀データ

細胞株	IC ₅₀ (nM)			比率		
	A	B	C	A/B	A/C	C/B
SNU354	962.3	754	1519	1.28	0.63	2.01
SNU886	628.5	377.8	843.4	1.66	0.75	2.23
MHCC97H	395.8	242.4	563.1	1.63	0.70	2.32
huH-1	305.7	257.8	269.3	1.19	1.14	1.49

30

【0127】
化合物A、BおよびCの試験に対応するIC₅₀曲線を図6に示したが、試験結果から、2つの光学異性体（化合物BおよびC）は、肝細胞がん（HCC）細胞株に対して、ラセミ体（化合物A）と同様の増殖阻害活性を有することが示された。

40

【0128】
III. AKR1C3 活性化依存性細胞増殖阻害活性アッセイ

3.1 AKR1C3 阻害剤の存在下または非存在下におけるH460がん細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の阻害アッセイ

詳細には、指数関数的に成長する細胞を、96ウェルプレートに4×10³細胞／ウェルの密度で接種し、5%CO₂、95%空気および100%相対湿度の条件下、37℃で24時間インキュベートした。次いで、試験した化合物を添加した。前記化合物は、所望の最終試験濃度の200倍の濃度で100%DMSOに溶解した。当該医薬を添加した時に、完全培地を使用して、前記化合物を所望の最終試験濃度の4倍の濃度にさらに希釈した。特定の濃度の化合物のアリコート50μLを、培地150μLを含有するマイクロウ

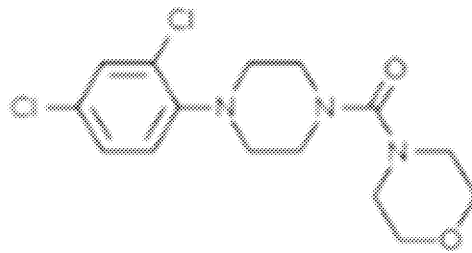
50

エルに添加して、最終医薬濃度を得た。医薬を添加した後、5%CO₂、95%空気および100%相対湿度の条件下、プレートを37℃でさらに2時間インキュベートした。次いで、医薬を洗浄した。新鮮な培地を添加し、5%CO₂、95%空気および100%相対湿度の条件下、プレートを37℃でさらに70時間インキュベートした。インキュベーションが終了した後、アラマブルーを使用して生細胞を分析し、定量化した。50%の成長阻害をもたらす医薬の濃度（IC₅₀）を、コンピュータソフトウェアによって計算した。

【0129】

化合物がヒトAKR1C3（アルド・ケトレダクターゼファミリー1メンバーC3）によって特異的に活性化されることをさらに検証するために、特定のAKR1C3酵素阻害剤AST-3021（濃度3マイクロモル）の存在下または非存在下で、H460がん細胞の増殖に対する化合物のアッセイを実施した。化合物処理の2時間前に、AKR1C3酵素阻害剤AST-3021を添加した化合物の溶液を、細胞培養物に添加した。使用した阻害剤は化合物36、すなわち、FlanaganらによるBioorganic and Medicinal Chemistry（2014年）、962～977頁に記載されている

【化52】



であり、本明細書ではAST-3021またはTH-3021と略す。

【0130】

AKR1C3阻害剤AST-3021の存在下または非存在下におけるH460がん細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の阻害効果に関するIC₅₀データを表3に示し、それに対応するIC₅₀曲線を図7に示した。

【0131】

【表10】

表3: AKR1C3阻害剤の存在下または非存在下におけるH460がん細胞に対する化合物A、B、CおよびAST-3424の阻害効果に関するIC₅₀データ

化合物	IC ₅₀ (nmol/L)		倍率
	AST-3021 の添加なし	AST-3021 の添加あり	
A	5.818	2136	367.13
B	3.727	1913	513.28
C	7.657	3329	434.76
AST-3424	0.3486	44.87	128.71

【0132】

試験結果から、AST-3021の添加の有無に関わらず、3つの化合物A、BおよびC全てのIC₅₀は化合物AST-3424のIC₅₀よりも高かったが、AST-3021によって阻害された3つの化合物A、BおよびCのIC₅₀の倍率はAST-3424の倍率よりもはるかに高いことが示され、これにより、新たに設計された化合物A、BおよびCの生体外活性が、AKR1C3酵素とはるかに密接に関係していることが示された。

【 0 1 3 3 】

3. 2 10 細胞株の非小細胞肺癌に対する化合物 A および A S T - 3 4 2 4 の A K R 1 C 3 依存性アッセイ

10 株の非小細胞肺癌の IC_{50} を定量するための実験方法は、H 4 6 0 がん細胞に関する項目 3. 1 で使用したものと同一であった。また一方で、A K R 1 C 3 酵素に対応する RNA の発現量は、 $Log_2 FPKM$ に基づいて以下の方法で定量され、特許 P C T / C N 2 0 2 1 / 0 7 9 2 9 9 を参考にすることができる。化合物 A および A S T - 3 4 2 4 の $Log_2 FPKM$ および IC_{50} を表に記載し、実験結果を表 4 および表 5 に示した。

【 0 1 3 4 】

【表 1 1】

表4: 化合物Aの $Log_2 FPKM$ および IC_{50} のデータ

非小細胞肺癌細胞株	AKR1C3 の RNA 発現レベル ($Log_2 FPKM$)	化合物 A の IC_{50} (nM)
NCI-H1944	11.06	71.27
NCI-H2228	9.25	12.76
NCIH1755	9.00	570
NCI-H1563	8.61	454.4
NCI-H2110	8.2334	67.77
NCI-H1792	8.07	375.2
CAL12T	3.86	8076
NCIH2106	2.68	6858
NCI-H522	-1.88	14147
NCI-H23	-1.98	11941

【 0 1 3 5 】

【表 1 2】

表5: 化合物AST-3424の $Log_2 FPKM$ および IC_{50} のデータ

NSCLC	AKR1C3 の RNA 発現レベル ($Log_2 FPKM$)	化合物 AST-3424 の IC_{50} (nM)
NCI-H1944	11.06	2.3
NCI-H2228	9.25	0.21
NCIH1755	9	8.2
NCI-H1563	8.61	2.5
NCI-H2110	8.23	1.1
NCI-H1792	8.07	4.5
CAL12T	3.86	29.1
NCIH2106	2.68	>1000
NCI-H23	-1.98	>1000
NCI-H522	-1.88	>1000

【 0 1 3 6 】

図 8 および図 9 に示すように、A K R 1 C 3 酵素に対応する RNA 発現量と IC_{50} との相関分析を実施し、化合物 A および A S T - 3 4 2 4 との関係プロットをそれぞれ得た

。

【0137】

実験結果から、化合物AおよびAST-3424の生体外細胞毒性は、AKR1C3発現と正の相関のあることが示された。AKR1C3の発現が高い細胞株では、化合物AおよびAST-3424のどちらもが強い生体外細胞毒性を示した。AKR1C3の発現が少ない細胞株では、化合物AおよびAST-3424仲介の細胞毒性は非常に低いことが示された。AST-3424 ($R^2 = 0.796$)と比較して、化合物AはAKR1C3の発現レベルとより密接に相関しており ($R^2 = 0.952$)、これにより、化合物Aの活性化がAKR1C3に対してより特異的であることが示された。

【0138】

3.3 肝臓がんLI6280 PDXモデルにおける化合物AおよびソラフェニブのAKR1C3依存性生体内薬力学実験

実験説明：HuPrime（登録商標）モデルLI6280腫瘍ブロックをBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。試験を、試験薬ソラフェニブの30mg/kg群、試験薬化合物Aの4.5mg/kg群、および7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計3群に分け、1群当たりマウス6匹とした。上記のうち、7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン(35)+ヒマシ油85%+グルコース注射剤D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群は、週1回、3週間連続で尾静脈を通して投与し、試験薬化合物A 4.5mg/kg群は、週1回、3週間連続で尾静脈を通して投与し、試験薬ソラフェニブ30mg/kg群は、胃管栄養法により、1日1回、21日間連続で投与した。相対的腫瘍阻害率TGI (%)によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。各群についての具体的な投薬レジメンおよびTGI (%)を表6に示した。

【0139】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表6:HuPrime(登録商標)肝臓がんL16280モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	最初の投与後 17 日目(すなわち、Day 17)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)	2113.82±170.66	20.5±0.73	-	-	-
第 2 群 ソラフェニブ(30mg/kg)	1076.45±230.21	10.18±1.86	50.35	49.65	p<0.001
第 3 群 化合物 A(4.5mg/kg)	2201.20±287.44	20.79±1.15	-1.41%	101.41	0.987

注: 1. データは「平均±標準誤差」、すなわち±Sとして表した。
2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ (T_{RTV} : 治療群の平均RTV; C_{RTV} : ビヒクル対照群の平均RTV; $RTV = V_t/V_o$, V_o は群分けした時の動物の腫瘍体積、 V_t は治療後の動物の腫瘍体積、以下同じ); $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ (T および C は、それぞれ、特定の時点での治療群および対照群の平均の相対腫瘍体積 (relative tumour volume: RTV)、以下同じ)。

【 0 1 4 0 】
様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 7 に示した。
【 0 1 4 1 】

10

20

30

40

【表 1 4】

表7:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目
第1群	103.74	169.79	401.62	775.57	1319.18	2113.82	2641.70	3149.10		
第2群	103.93	168.82	269.83	439.29	731.99	1076.45	1241.19	1504.89	2218.52	2313.01
第3群	103.98	150.33	318.74	683.99	1404.42	2201.20	2739.12	3311.77	3362.07	

【0 1 4 2】
対応する腫瘍体積経時変化の曲線を図 1 0 に示した。

【0 1 4 3】
試験薬ソラフェニブ 3 0 m g ／ k g 治療群は、最初の投与後 1 7 日目に、対照群と比較して統計的有意差のある (p < 0 . 0 0 1) 有意な腫瘍阻害効果、および 5 0 . 3 5 % の相対的腫瘍阻害率 T G I (%) を示した。試験薬化合物 A の 4 . 5 m g ／ k g 治療群は、最初の投与後 1 7 日目では腫瘍阻害効果がなく、対照群と比較して統計的有意差はなく (p = 0 . 9 8 7) 、 - 1 . 4 1 % の相対的腫瘍阻害率 T G I (%) を示した。

【0 1 4 4】

10

20

30

40

50

このモデルにおける A K R 1 C 3 酵素に対応する R N A の発現量は、上記と同じ方法で定量され、 $\text{Log}_2 \text{FPKM}$ に基づいて、 $\text{Log}_2 \text{FPKM} = -0.943$ と計算された。

【0145】

上記の実験データから、肝臓がん L I 6 2 8 0 P D X モデルでは、A K R 1 C 3 に対応する R N A 発現レベルが比較的 low ($\text{Log}_2 \text{FPKM} = -0.943$)、化合物 A の効力はビヒクル対照群とほとんど区別できなかったのに対し、ソラフェニブには A K R 1 C 3 依存性ではないある程度の効力があつたことがわかる。したがって、化合物 A が有意な抗がん活性を発揮するには、A K R 1 C 3 酵素の特異的活性化が必要であり、項目 3.2 の結論と合すると、化合物 A は A K R 1 C 3 酵素によって活性化される抗がんプロドラッグであることが示された。

10

【0146】

I V . P D X および C D X の動物モデルでの実験

4.1 胃がん G A 6 2 0 1 P D X モデルにおける化合物 A、A S T - 3 4 2 4 およびイソシクロホスファミドの生体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデル G A 6 2 0 1 腫瘍ブロックを B A L B / c マウスに皮下接種して、ヒト胃がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。試験を、試験薬イソシクロホスファミドの 60 mg/kg 群、試験薬 A S T - 3 4 2 4 の 5 mg/kg 群、試験薬 A 化合物の 2.5 mg/kg 群および 5 mg/kg 群、ならびに生理食塩液 ($\text{pH } 7.0 \sim 7.6$) ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計 5 群に分け、1 群当たりマウス 5 匹とした。上記のうち、生理食塩液 ($\text{pH } 7.0 \sim 7.6$) ビヒクル対照群は週 1 回、3 週間投与し、4 週間観察した。試験薬 A S T - 3 4 2 4 の 5 mg/kg 、試験薬 A 化合物の 2.5 mg/kg 群および 5 mg/kg 群は、尾静脈注射により週 1 回、2 週間投与し、7 週間観察した。試験薬イソシクロホスファミドの 60 mg/kg 群は、腹腔内注射により週 5 回続けて投与し、7 週間観察した。試験薬イソシクロホスファミドの 60 mg/kg 群は、2 週間にわたって、5 日間連続で腹腔内注射により投与し、次に各週で 2 日間休み、7 週間観察した。相対的腫瘍阻害率 T G I (%) によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。各群についての具体的な投薬レジメンおよび T G I (%) を表 8 に示した。

20

【0147】

30

40

50

【表 15】

表8: 胃がんGA6201モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	全投与の終了後 3 日目(すなわち、Day 38)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 生理食塩液、pH7.0～7.6	905.75±252.4	9.34±2.42	—	—	—
第 2 群 イソシクロホスファミド 60mg/kg	371.02±75.96	3.85±0.63	58.83	41.17	0.857
第 3 群 AST-3424 5mg/kg	12.65±7.91	0.11±0.07	98.79	1.21	0.00000265
第 4 群 化合物 A 5mg/kg	19.97±10.18	0.19±0.08	97.96	2.04	0.0000182
第 5 群 化合物 A 2.5mg/kg	28.69±8.2	0.29±0.08	96.85	3.15	0.000135

注: 1. データは「平均±標準誤差」、すなわち $\bar{x} \pm S$ として表した。

2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ (T_{RTV} : 治療群の平均RTV; C_{RTV} : ビヒクル対照群の平均RTV; $RTV = V_t/V_0$, V_0 は群分けした時の動物の腫瘍体積、 V_t は治療後の動物の腫瘍体積、以下同じ); $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ (T および C は、それぞれ、ある時点での治療群および対照群の平均の相対腫瘍体積(RTV))。

【0148】

上記の投薬レジメンでは、イソシクロホスファミドは、文献 (Jessica D. Sun, Qian Liu, Dharmendra Ahluwalia, Damien J. Ferraro, Yan Wang, Don Jung, Mark D. Matteucci, and Charles P. Hart. Comparison of hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) and ifosfamide in preclinical non-small cell lung cancer models [J]. Cancer Biology & Therapy, 2016, 17 (4): 371-380.) に記載されている最大安全薬用量を含む最良の投薬レジメンに基づいて設計した。

【0149】

様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表9に示した。

【0150】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表9:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0 日	3 日	7 日	10 日	14 日	17 日	21 日	24 日	28 日	31 日	35 日	38 日	42 日	45 日	49 日
第 1 群	94.22	123.26	161.08	182.31	242.26	297.28	398.37	479.52	579.90	648.12	831.15	905.75	1026.01	1130.43	1283.11
第 2 群	94.15	122.22	129.39	175.00	190.74	189.23	217.96	225.66	247.04	265.76	324.51	371.02	403.47	484.83	578.60
第 3 群	94.19	114.98	84.33	77.04	63.59	52.08	45.81	40.55	30.28	23.24	18.55	12.65	13.42	10.82	8.15
第 4 群	94.36	118.42	101.91	97.17	74.20	59.77	46.21	44.03	38.50	35.92	22.70	19.97	5.05	11.14	9.96
第 5 群	94.61	120.19	118.33	118.65	96.08	76.14	71.72	57.94	45.51	43.44	32.04	28.69	23.49	25.00	17.72

10

20

30

40

【 0 1 5 1】

対応する腫瘍体積経時変化の曲線を図 1 1 に示した。

【 0 1 5 2】

実験結果から、少なくとも 4 9 日間は、A S T - 3 4 2 4 の 5 m g / k g 群、ならびに試験薬化合物 A の 2 . 5 m g / k g 群および 5 m g / k g 群は、がん細胞に対して優れた阻害活性があり、それらは全て、従来の D N A アルキル化剤であるイソシクロホスファミドを上回り、化合物 A の相対的腫瘍阻害率 (T G I) は 9 6 % 以上であった。

【 0 1 5 3】

上記の実験では、1 4 日目の投与後に投与を中止し、腫瘍体積を測定し、図 1 2 に示す

50

曲線をプロットした。実験結果から、1ヶ月間治療を中止した後でも、化合物Aのどちらの投与量でも腫瘍阻害効果があり、腫瘍体積は減少し続け、小さいままか測定不可能かのどちらかであることが示された。これにより、化合物Aの良好な治療効果が示され、この効果はAST-3424と同等であった。

【0154】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの効果を検証するために、マウスの体重変化のデータを記録し、マウスの体重変化率を図13示すように計算した。上記の実験動物の体重変化のデータから、化合物Aのどちらの用量の投与群も、生理食塩液対照群、イソシクロホスファミド群、およびAST-3424群と同様であり、実験動物の体重に対する影響はないことが示された。同じ用量の化合物AおよびAST-3424には同等の腫瘍阻害効力があり、毒性作用はなかった。

10

【0155】

4.2 ヒト由来の非小細胞肺癌NCI-H460皮下異種移植モデルにおける化合物Aおよびカルボプラチンの生体内薬力学実験の比較

ヒト肺癌NCI-H460細胞をBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト肺癌の皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬カルボプラチンの100mg/kg群、試験単一薬物化合物Aの5mg/kg群、10mg/kg群および15mg/kg群、ならびに10%エタノール+10%ポリオキシエチレンヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W(pH7.4)ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計5群に分け、1群当たりマウス6匹とした。上記のうち、10%エタノール+10%ポリオキシエチレンヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W(pH7.4)ビヒクル対照群、試験薬化合物Aの5mg/kg群、10mg/kg群および15mg/kg群は、尾静脈注射により週1回、3週間投与し、1週間観察した。試験薬カルボプラチンの100mg/kg群は、腹腔内注射により週1回、3週間投与し、1週間観察した。相対的腫瘍阻害率TGI(%)によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

20

【0156】

NCI-H460 CDXモデルにおける各群の薬力学分析を、腫瘍細胞接種後31日目に行い、その結果を表10に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表11に示した。図14に示すように、対応する腫瘍体積経時変化の曲線をプロットした。

30

【0157】

40

50

表10:ヒト由来肺がんNCI-H460モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	腫瘍細胞接種後 31 日目(すなわち、Day 31、最初の投与後 24 日目)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 10%エタノール+ 10%ポリオキシエチレンヒマシ油+ 80%グルコース注射剤 D5W(pH7.4) QWx3, i.v.	1818.22 ± 235.32	13.24 ± 2.49	–	–	–
第 2 群 カルボプラチン、100mg/kg, QWx3, i.p.	1230.93 ± 258.17	8.58 ± 1.16	35.19	64.81	0.683
第 3 群 化合物 A、5mg/kg, QWx3, i.v.	337.78 ± 54.37	2.45 ± 0.29	81.49	18.51	0.0000233
第 4 群 化合物 A、10mg/kg, QWx3, i.v.	164.13 ± 34.01	1.18 ± 0.27	91.06	8.94	0.00000000000975
第 5 群 化合物 A、15mg/kg, QWx3, i.v.	125.90 ± 25.46	0.92 ± 0.22	93.06	6.94	0.000000000000988

注: 1. データは「平均 ± 標準誤差」、すなわち $\pm S$ として表した。
2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$
3. 第3群対第4群、 $p = 0.168$; 第3群対第5群、 $p = 0.0317$; 第4群対第5群、 $p = 0.998$

【表 1 8】

表11：様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目	35日目
第1群	144.68	226.31	339.60	493.01	774.49	977.77	1370.47	1818.22	2299.37
第2群	145.46	262.15	409.97	529.44	761.56	960.42	1073.28	1230.93	1577.99
第3群	144.35	183.15	198.80	228.87	253.30	310.83	279.31	337.78	452.75
第4群	144.21	164.75	151.95	140.29	138.66	144.36	149.16	164.13	168.68
第5群	145.41	171.22	167.54	161.80	157.66	151.20	134.73	125.90	108.70

10

20

30

40

【0159】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図15に示す曲線としてプロットした。

【0160】

上記の実験データから、31日間連続して観察する間、化合物Aはカルボプラチンよりも良好な腫瘍阻害効果を示し、化合物Aの相対的腫瘍阻害率(TGI%)は、5mg/kg、10mg/kgおよび15mg/kgの3つ投与量で、それぞれ81.49%、91.06%および93.06%に達することが示された。前記3つの投与量の化合物Aには

50

、少なくとも31日間、実験動物の体重への有意な影響はなく、これにより、化合物Aには、毒性副作用なく優れた腫瘍阻害効果のあることが示された。

【0161】

4.3 ヒト肝臓がんL16652皮下異種移植PDXモデルにおける化合物Aおよびソラフェニブの生体内薬力学実験の比較

実験説明：ヒト肝臓がんL16652腫瘍ブロックをBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下異種移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブの30mg/kg（1日1回、21日間連続で投与）群、試験薬化合物Aの1.25mg/kgの単一薬物群（5日間連続で毎日投与し、次に2日間休み、その後さらに2週間休んで合計2回の投薬サイクル）、2.5mg/kgの単一薬物群（5日間連続で毎日投与し、次に2日間休み、その後さらに2週間休んで合計2回の投薬サイクル）、5mg/kgの単一薬物群（5日間連続で毎日投与し、次に2日間休み、その後さらに2週間休んで合計2回の投薬サイクル）、および7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W（pH7.4）対照群の複数群、すなわち合計5群に分け、1群当たりマウス6匹とした。試験薬化合物Aの1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kgの単一薬物群、および7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W（pH7.4）対照群は、腹腔内注射によって投与し、5日間連続で毎日投与し、次に2日間休み、その後さらに2週間休んで合計2回の投薬サイクルを行った。試験薬ソラフェニブの30mg/kg群は、胃管栄養法によって投与し、1日1回、21日間連続で投与した。相対的腫瘍阻害率TGI（%）によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

10

20

【0162】

肝臓がんL16652モデルにおける各群の薬力学分析を投与後31日目に行い、その結果を表12に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表13に示した。図16に示すように、対応する腫瘍体積経時変化の曲線をプロットした。

【0163】

30

40

50

表12:肝臓がんL16652モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	全投与の終了後 3 日目(すなわち、Day 28)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)	1590.50±470.81	14.67±3.14	-	-	-
第 2 群 ソラフェニブ 30mg/kg	315.93±81.35	2.50±0.57	82.96	17.04	0.108
第 3 群 化合物 A 1.25mg/kg	24.72±9.57	0.18±0.07	98.77	1.23	0.00000291
第 4 群 化合物 A 2.5mg/kg	18.28±8.14	0.17±0.10	98.84	1.16	0.000000535
第 5 群 化合物 A 5mg/kg	3.38±3.38	0.02±0.02	99.86	0.14	0.00000000575

注:1. データは「平均±標準誤差」、すなわち±Sとして表した。
2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【表 2 0】

表13:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目
第1群	125.10	219.19	322.75	504.30	740.03	925.35	1284.19	1658.67	1590.50	2112.46
第2群	125.84	146.95	196.51	212.41	217.19	191.72	178.69	209.42	315.93	441.67
第3群	126.30	184.11	194.19	135.63	51.98	28.94	29.42	28.38	24.72	18.12
第4群	126.29	179.46	189.33	145.19	43.64	29.90	21.49	17.91	18.28	5.56
第5群	124.83	174.91	190.90	130.55	34.29	19.84	13.80	12.20	3.38	2.62

【0165】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図17に示す曲線としてプロットした。

【0166】

以上の結果から、前記3つの投与量の化合物Aは、相対腫瘍阻害TGI(%)が98%を超える優れた腫瘍阻害効果を示し、それは、ソラフェニブの腫瘍阻害効果を上回ることが示された。前記3つの投与量の化合物Aには、少なくとも28日間、実験動物の体重への有意な影響はなく、これにより、化合物Aには、毒性副作用なく優れた腫瘍阻害効果の

あることが示された。

【0167】

4.4 ヒト由来の非小細胞肺癌NCI-H460-Luc2頭蓋内接種CDXモデルにおける化合物Aおよびパクリタキセルの生体内薬力学実験の比較

実験説明：ヒト肺癌NCI-H460-Luc2細胞をBALB/cヌードマウスに頭蓋内接種して、ヒト肺癌の頭蓋内移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬パクリタキセルの20mg/kg群、化合物Aの2mg/kg群、4mg/kg群および8mg/kg群、ならびに10%エタノール+10%ポリオキシエチレンヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W(pH7.42)ビヒクル対照群(ビヒクル群)の複数群に分け、1群当たりマウス6匹とした。上記のうち、10%エタノール+10%ポリオキシエチレンヒマシ油+80%グルコース注射剤D5W(pH7.42)ビヒクル対照群、試験薬化合物Aの2mg/kg群、4mg/kg群および8mg/kg群は、尾静脈注射により週1回、3週間投与した。陽性薬パクリタキセルの20mg/kg群は腹腔内注射によって投与し、週1回、3週間投与した。腫瘍の生物蛍光値によって相対的腫瘍阻害率TGI(%)を計算し、効力を評価し、かつ動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

10

【0168】

ヒトNCI-H460-Luc2頭蓋内接種モデルにおける各群の薬力学分析を、投与後11日目の測定生物発光値に基づいて行い、その結果を表14に示した。

【0169】

【表21】

20

表14:ヒト由来NCI-H460-Luc2頭蓋内接種モデルにおける各群の薬力学分析の表

群	生物発光値 ($\times 10^5$ 光子/秒) ^a (11日目)	TGI ^b (%)	T/C ^c (%)	p値 ^d
ビヒクル (n=5)	2576.80 $\pm$ 680.69	--	--	--
パクリタキセル 20mg/kg, i.p. (n=5)	4184.52 $\pm$ 1679.77	-62.45	130.82	0.2278
化合物 A 2mg/kg, i.v. (n=6)	7.62 $\pm$ 2.10	99.80	0.24	0.0089
化合物 A 4mg/kg, i.v. (n=6)	1.62 $\pm$ 0.30	100.03	0.05	0.0087
化合物 A 8mg/kg, i.v. (n=6)	1.78 $\pm$ 0.42	100.03	0.06	0.0087

30

【0170】

40

図18に示すように、各治療群および対照群で測定された生物蛍光値に基づいて、治療日数に対する曲線をプロットした。前記3つの投与量の化合物Aの生物蛍光値は低く、前記投与量のパクリタキセルの生物蛍光値よりも有意に低いことから、化合物Aが血液脳関門を通過し脳に入って、パクリタキセルでは発揮し得ない薬力学的効果である腫瘍阻害効果を発揮し得ることが示された。

【0171】

また、実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図19に示す曲線としてプロットした。図では、2つの対照群のマウスの体重が有意に減少しており、これにより、パクリタキセルは、血液脳関門を通過して脳に入ることができず、

50

腫瘍阻害効果を発揮し得ないことが示された。前記3つの投与量の化合物Aに対応する体重の変化率を観察したところ、マウスの体重にはほとんど変化がなかったことから、化合物Aは、脳に入って腫瘍阻害効果を発揮することができる一方、毒性副作用が事実上みられないことが示され、また、化合物Aは血液脳関門を通過し、腫瘍阻害効果を発揮することも示された。

【0172】

4.5 脾臓がんPA1222 PDXモデルにおける化合物Aおよびゲムシタビンの生体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデルPA1222腫瘍ブロックをBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト脾臓がん皮下移植腫瘍モデルを確立した。試験を、試験薬ゲムシタビンの120mg/kg群、試験薬化合物Aの10mg/kg、および7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W（pH7.4）ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計3群に分け、1群当たりマウス5匹とした。上記のうち、7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W（pH7.4）ビヒクル対照群および試験薬化合物Aの10mg/kg群は、尾静脈注射により週1回、3週間連続で投与した。試験薬ゲムシタビン（Gemcitabine）の120mg/kg群は、週1回、3週間連続で、腹腔内投与した。相対的腫瘍阻害率TGI（%）によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

【0173】

脾臓がんPA1222モデルにおける各群の薬力学分析を投与後28日目に行い、その結果を表15に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表16に示した。

【0174】

10

20

30

40

50

表15:HuPrime(登録商標)腫臓がんPA1222モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	最初の投与後 28 日目(すなわち、Day 28)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射剤 D5W(pH7.4)、 0mg/kg、QWx3、i.v.	395.45 ± 76.89	3.49 ± 0.62	-	-	-
第 2 群 ゲムシタビン、120mg/kg、QWx3、i.p.	166.11 ± 24.40	1.49 ± 0.19	57.17%	42.83%	7.78e-4
第 3 群 化合物 A、10mg/kg、QWx3、i.v.	12.51 ± 5.25	0.10 ± 0.04	97.14%	2.86%	9.14e-7

注: 1. データは「平均±標準誤差」、すなわち±Sとして表した。
2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【表 2 3】

表16:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目
第1群	112.01	139.75	177.43	199.20	249.21	306.79	339.57	362.58	395.45
第2群	111.91	136.17	153.75	157.55	147.44	136.71	138.01	153.69	166.11
第3群	111.50	117.62	113.91	107.17	66.08	42.94	23.22	21.20	12.51

【0176】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図20に示す曲線としてプロットした。

【0177】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図21に示す曲線としてプロットした。

【0178】

モデルはゲムシタビン感受性モデルであった。上記の実験の結果から、投与量10mg

10

20

30

40

／k g の化合物 A には良好な抗腫瘍活性があり、その腫瘍阻害活性は、投与量 1 2 0 m g
／k g のゲムシタビンの腫瘍阻害活性を上回ることが示された。一方、対照群の実験動物
の体重変化との比較において、化合物 A は毒性副作用のない優れた腫瘍阻害効果を示した
。

【 0 1 7 9 】

4 . 6 肺がん L U 2 5 0 5 P D X モデルにおける化合物 A およびパクリタキセルの生
体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデル L U 2 5 0 5 腫瘍ブロックを B A L B /
c ノードマウスに皮下接種して、ヒト肺がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、
試験薬パクリタキセルの 2 0 m g / k g 群、試験薬化合物 A の 1 . 2 5 m g / k g 群、2
. 5 m g / k g 群および 5 m g / k g 群、ならびに 7 . 5 % 無水エタノール + 7 . 5 % ポ
リオキシエチレン（3 5）ヒマシ油 + 8 5 % グルコース注射剤 D 5 W（p H 7 . 4）ビヒ
クル対照群の複数群、すなわち合計 5 群に分け、1 群当たりマウス 5 匹とした。上記のう
ち、試験薬パクリタキセルの 2 0 m g / k g 群は、腹腔内注射により、4 日毎、合計 4 回
の投薬サイクルで投与し、1 3 日間観察した。7 . 5 % 無水エタノール + 7 . 5 % ポリ
オキシエチレン（3 5）ヒマシ油 + 8 5 % グルコース注射剤 D 5 W（p H 7 . 4）ビヒクル
対照群、試験薬化合物 A の 1 . 2 5 m g / k g 群、2 . 5 m g / k g 群および 5 m g / k
g 群は、尾静脈注射により、週 1 回、3 週間連続で投与し、8 日間観察した。相対的腫瘍
阻害率 T G I（%）によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を
評価した。

【 0 1 8 0 】

肺がん L U 2 5 0 5 モデルにおける各群の薬力学分析を投与後 2 8 日目に行い、その結
果を表 1 7 に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 1 8 に示
した。

【 0 1 8 1 】

【表 2 4】

表17:HuPrime(登録商標)肺がんLU2505モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	3 週間の投薬サイクル終了後 8 日目(すなわち、Day 28)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 ビヒクル対照群	1126.00 $\pm$ 354.60	10.68 $\pm$ 3.44	—	—	—
第 2 群 パクリタキセル 20mg/kg	250.47 $\pm$ 157.81	2.29 $\pm$ 1.37	78.60	21.40	0.0322
第 3 群 化合物 A 1.25mg/kg	485.95 $\pm$ 175.25	4.61 $\pm$ 1.57	56.86	43.14	0.7120
第 4 群 化合物 A 2.5mg/kg	102.06 $\pm$ 47.51	1.11 $\pm$ 0.56	89.57	10.43	0.0322
第 5 群 化合物 A 5mg/kg	19.00 $\pm$ 8.08	0.17 $\pm$ 0.07	98.40	1.60	0.00112

【 0 1 8 2 】

【表 2 5】

表18:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	4日目	7日目	11日目	14日目	18日目	21日目	25日目	28日目
第1群	103.58	196.01	291.37	390.10	486.55	670.52	824.93	902.96	1126.00
第2群	103.12	133.63	133.14	132.14	164.42	207.89	238.63	231.63	250.47
第3群	103.28	156.32	231.55	242.12	291.72	383.24	434.92	478.15	485.95
第4群	103.26	149.02	131.34	109.62	116.57	113.09	103.18	92.38	102.06
第5群	103.23	139.41	111.31	62.41	42.40	34.32	30.63	20.52	19.00

【0183】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図22に示す曲線としてプロットした。

【0184】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図23に示す曲線としてプロットした。

【0185】

上記の実験結果から、投与量1.25mg/kg、2.5mg/kgおよび5mg/kg

10

20

30

40

g の化合物 A には、肺がん LU2505 PDX モデルに対して良好な抗腫瘍活性があり、投与量 2.5 mg/kg および 5 mg/kg の化合物 A の抗腫瘍活性は、投与量 20 mg/kg のパクリタキセルの抗腫瘍活性よりも高かった。化合物 A (1.25 mg/kg、2.5 mg/kg および 5 mg/kg) の治療効果は用量依存的であり、化合物 A (5 mg/kg) 治療群では、化合物 A (1.25 mg/kg) 治療群と比較して統計的有意差 ($p = 0.0192$) があり、残りの群の間には、統計的有意差はなかった。一方、対照群の実験動物の体重変化との比較において、化合物 A は毒性副作用のない優れた腫瘍阻害効果を示した。

【0186】

4.7 肝臓がん LI6643 PDX モデルにおける化合物 A、ソラフェニブおよび AST-3424 の生体内薬力学実験の比較

実験説明: HuPrime (登録商標) モデル LI6643 腫瘍ブロックを BALB/c ノードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下グラフト腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブ (Sorafenib) の 30 mg/kg 群、試験薬 AST-3424 の 0.3 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/kg 群、試験薬化合物 A の 0.5 mg/kg、1 mg/kg 群、2 mg/kg 群、ならびに 7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% 生理食塩液 (pH 7.5) ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計 8 群に分け、1 群当たりマウス 6 匹とした。上記のうち、7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% 生理食塩液 (pH 7.5) ビヒクル対照群は、週に 1 回、3 週間連続で尾静脈を通して投与した。試験薬 AST-3424 の 0.3 mg/kg 群および 1 mg/kg 群は、尾静脈注射により、1 日 1 回、5 日間連続で投与し、次に 2 日間休み、次に 2 週間休み、その後 5 日間連続で、続けて投与した。試験薬 AST-3424 の 1.25 mg/kg 群は、尾静脈注射により、週 1 回、2 週間連続で投与し、次に 1 週間休み、その後 2 週間連続で、続けて投与した。化合物 A の 0.5 mg/kg 群、1 mg/kg 群および 2 mg/kg 群は、尾静脈注射により、1 日 1 回、5 日間連続で投与し、次に 2 日間休み、次に 2 週間休み、その後 5 日間連続で、続けて投与した。試験薬ソラフェニブの 30 mg/kg 群は、1 日 1 回、21 日間連続で胃管栄養法によって投与した。相対的腫瘍阻害率 TGI (%) によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

【0187】

肝臓がん LI6643 モデルにおける各群の薬力学分析を投与後 21 日目に行い、その結果を表 19 に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 20 に示した。

【0188】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表19:HuPrime(登録商標)肝臓がんLI6643モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	最初の投与後 21 日目(すなわち、Day 21)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%生理食塩液	605.52±161.19	4.82±1.36	—	—	—
第 2 群 ソラフェニブ (30mg/kg)	214.75±31.53	1.83±0.2	62.12%	37.88%	0.29
第 3 群 AST-3424 (0.3mg/kg)	250.47±44.00	1.92±0.2	60.16%	39.84%	0.403
第 4 群 AST-3424 (1mg/kg)	75.89±21.82	0.66±0.22	86.32%	13.68%	<0.001
第 5 群 AST-3424 (1.25mg/kg)	169.64±41.89	1.36±0.22	71.86%	28.14%	<0.01
第 6 群 化合物 A (0.5mg/kg)	242.85±50.74	1.84±0.25	61.88%	38.12%	0.29
第 7 群 化合物 A (1mg/kg)	174.86±17.43	1.44±0.16	70.09%	29.91%	<0.01
第 8 群 化合物 A (2mg/kg)	116.38±20.17	0.97±0.14	79.81%	20.19%	<0.001

注: 1. データは「平均±標準誤差」として表した。

2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【0189】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表20:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目
第1群	124.93	190.19	249.09	351.57	421.67	493.35	605.52	796.73	996.53
第2群	124.67	170.03	185.13	193.95	189.87	171.25	214.75	238.48	309.08
第3群	124.74	210.50	242.31	227.43	208.00	223.43	250.47	302.15	386.93
第4群	124.32	156.70	144.82	110.44	90.12	97.62	75.89	89.34	98.43
第5群	124.62	205.56	217.23	216.04	187.94	176.52	169.64	174.54	146.31
第6群	124.86	239.56	282.74	266.35	231.35	241.82	242.85	173.56	188.68
第7群	124.32	205.79	246.90	225.40	195.33	191.98	174.86	217.19	231.64
第8群	124.40	182.25	182.74	162.65	137.87	117.10	116.38	122.78	95.87

【0190】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図24に示す曲線としてプロットした。

【0191】

上記の実験結果から、投与量0.5mg/kg、1mg/kgおよび2mg/kgの化合物A、ならびに投与量0.3mg/kg、1mg/kgおよび1.25mg/kgのAST-3424には、ヒトLI6643 PDXモデルに対して同様の陽性の抗腫瘍活性があり、これらの抗腫瘍活性は、投与量20mg/kgのソラフェニブの抗腫瘍活性に匹敵するものであった。

【0192】

4.8 肝臓がん L I 6 6 4 3 P D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデル L I 6 6 4 3 腫瘍ブロックを B A L B / c ノードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブの 20～30 mg / kg 群、化合物 A の 1.25 mg / kg 群、2.5 mg / kg 群、5 mg / kg 群、10 mg / kg 群、および 7.5 % 無水エタノール + 7.5 % ポリオキシメチレン（35）ヒマシ油 + 85 % グルコース注射剤溶液 D 5 W（pH 7.4）ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計 6 群に分け、1 群当たりマウス 5 匹とした。上記のうち、7.5 % 無水エタノール + 7.5 % ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油 + 85 % グルコース注射剤 D 5 W（pH 7.4）ビヒクル対照群、試験薬化合物 A の 1.25 mg / kg 群、2.5 mg / kg 群、5 mg / kg 群は、腹腔内注射によって投与し、5 日間連続で毎日投与し、次に 2 日間休み、その後さらに 2 週間休んで合計 2 回の投薬サイクルを行い、28 日間観察した。試験薬化合物 A の 10 mg / kg 群は、尾静脈注射により投与し、週に 1 回、2 週間連続で投与し、次に 1 週間休んで合計 2 回の投薬サイクルを行い、25 日間観察した。ソラフェニブ 20～30 mg / kg 群は、0 日目から 11 日目の間は胃管栄養法によって投与し、12 日目～20 日目の間は 30 mg / kg 用量を 1 日 1 回、12 日間連続で投与し、マウスの体重減少が有意であったため、用量を 30 mg / kg から 20 mg / kg に調整し、1 日 1 回、9 日間連続で投与し、33 日間観察した。相対的腫瘍阻害率 T G I（%）によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

10

20

【0193】

肝臓がん L I 6 6 4 3 モデルにおける各群の薬力学分析を投与後 35 日目に行い、その結果を表 21 に示した。様々な日数で腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 22 に示した。

【0194】

30

40

50

【表 2 8】

表21:HuPrime(登録商標)肝臓がんL16643モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	全投与の終了後 7 日目(すなわち, Day 35)。				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)	1780.45 $\pm$ 371.56	14.15 $\pm$ 2.84	-	-	-
第 2 群 ソラフェニブ 20 $\sim$ 30mg/kg	392.20 $\pm$ 64.05	3.09 $\pm$ 0.45	78.19%	21.81%	0.174
第 3 群 化合物 A 10mg/kg, QWx2;1 週間休み;QWx2, i.v.	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	100.00%	0.00%	0.00000000138
第 4 群 化合物 A 1.25mg/kg, QDx5;2 日間休み, 2 週間休み;QDx5, i.p.	35.61 $\pm$ 18.63	0.27 $\pm$ 0.14	98.11%	1.89%	0.000000555
第 5 群 化合物 A 2.5mg/kg, QDx5;2 日間休み, 2 週間休み;QDx5, i.p.	56.62 $\pm$ 9.62	0.45 $\pm$ 0.07	96.81%	3.19%	0.0000895
第 6 群 化合物 A 5mg/kg, QDx5;2 日間休み, 2 週間休み;QDx5, i.p.	7.12 $\pm$ 7.12	0.05 $\pm$ 0.05	99.66%	0.34%	0.00000000613

【 0 1 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 29】

表22:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	4日目	7日目	11日目	14日目	18日目	21日目	25日目
第1群	127.06	184.53	321.39	445.25	595.14	856.01	1053.14	1249.58
第2群	126.16	163.51	205.85	235.50	279.42	291.41	287.76	326.85
第3群	126.11	160.85	216.99	94.21	72.94	59.48	25.80	21.28
第4群	126.02	181.97	270.85	264.04	197.40	177.65	102.13	90.41
第5群	125.92	199.12	278.32	191.74	167.14	154.33	100.94	103.28
第6群	126.93	178.97	214.95	132.13	63.74	60.36	40.93	24.91
実験室	28日目	32日目	35日目	39日目	42日目	46日目	49日目	53日目
第1群	1445.52	1574.72	1780.45	2218.93	1938.47	2147.64	/	/
第2群	346.56	385.09	392.20	431.87	451.48	521.44	585.72	622.46
第3群	10.93	7.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
第4群	73.75	49.39	35.61	31.79	25.59	19.34	12.51	9.04
第5群	93.12	74.85	56.62	39.85	27.34	14.83	12.00	12.86
第6群	21.48	8.71	7.12	6.77	5.57	4.27	4.12	3.81

10

【0196】

20

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図25に示す曲線としてプロットした。実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図26に示す曲線としてプロットした。

【0197】

上記の実験結果から、投与量1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kgおよび10mg/kgの化合物Aには、LI6643細胞に対して良好な抗腫瘍活性があり、これらの抗腫瘍活性は全て投与量30mg/kgのソラフェニブよりも高いことが示された。一方、対照群の実験動物の体重変化と比較して、化合物Aは毒性副作用のない優れた腫瘍阻害効果を示した。

30

【0198】

4.9 肝臓がんLI1005 PDXモデルにおける化合物Aおよびソラフェニブの生体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデルLI1005腫瘍ブロックをBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブの30mg/kg群、化合物Aの1.25mg/kg群、2.5mg/kg群、5mg/kg群、10mg/kg群、および7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシメチレン(35)ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W(pH7.4)ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計6群に分け、1群当たりマウス5匹とした。上記のうち、7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W(pH7.4)ビヒクル対照群、試験薬化合物Aの1.25mg/kg群、2.5mg/kg群、5mg/kg群は、腹腔内注射によって投与し、5日間連続で毎日投与し、次に2日間休み、その後さらに2週間休んで合計2回の投薬サイクルを行い、10日間観察した。化合物Aの10mg/kg群は、尾静脈注射により、週1回、2週間連続で投与し、次に1週間休んで合計2回の投薬サイクルを行い、7日間観察した。ソラフェニブ30mg/kg群は、1日1回、21日間連続で胃管栄養法により投与し、15日間観察した。相対的腫瘍阻害率TGI(%)によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

40

【0199】

肝臓がんLI1005モデルにおける各群の薬力学分析を投与後35日目に行い、その

50

結果を表 2 3 に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 2 4 に示した。

【 0 2 0 0 】

【表 3 0】

表23:HuPrime(登録商標)肝臓がんLI1005モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	投与後 35 日目(すなわち、Day 35、2020 年 9 月 29 日)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)	1090.50±293.57	10.09±1.78	-	-	-
第 2 群 ソラフェニブ 30mg/kg	294.09±60.93	2.85±0.49	71.74%	28.26%	5.06E-02
第 3 群 化合物 A 10mg/kg、 QWx2;1 週間休み;QWx2、i.v.	179.97±51.38	1.87±0.54	81.47%	18.53%	9.15E-04
第 4 群 化合物 A 1.25mg/kg、 QDx5;2 日間休み、 2 週間休み;QDx5、i.p.	334.61±61.24	3.28±0.53	67.53%	32.47%	1.20E-01
第 5 群 化合物 A 2.5mg/kg、 QDx5;2 日間休み、2 週間休み;QDx5、i.p.	178.69±65.98	1.60±0.42	84.12%	15.88%	3.21E-04
第 6 群 化合物 A 5mg/kg、QDx5;2 日間休み、 2 週間休み;QDx5、i.p.	85.00±26.32	0.77±0.18	92.38%	7.62%	4.65E-06

注:1. データは「平均±標準誤差」として表した。
2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【 0 2 0 1 】

【表 3 1】

表24:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	3日目	7日目	10日目	14日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目	35日目
第1群	102.76	180.44	290.97	342.24	413.26	516.71	630.34	736.61	923.45	1008.22	1090.50
第2群	102.89	121.64	136.21	136.21	136.89	140.09	142.56	161.17	200.97	227.65	294.09
第3群	102.58	127.72	172.58	138.61	127.60	132.95	151.00	181.36	191.25	186.25	179.97
第4群	102.66	157.94	198.68	188.83	196.25	204.85	228.87	256.49	246.26	282.93	334.61
第5群	103.02	156.63	197.27	156.39	147.34	148.94	173.92	180.83	178.96	182.98	178.69
第6群	103.15	160.80	167.82	120.93	97.35	90.25	106.81	115.29	110.01	102.22	85.00

【0202】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図27に示す曲線としてプロットした。実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図28に示す曲線としてプロットした。

【0203】

実験の結論：用量10mg/kg、2.5mg/kgおよび5mg/kgの化合物Aには、HuPrime（登録商標）肝臓がんLI1005に対して、対照群と比較して統計的有意差のある有意な腫瘍成長阻害効果があり、その効力は、ソラフェニブの効力を上回

っていた。用量 1.25 mg/kg の化合物 A および用量 30 mg/kg のソラフェニブには、HuPrime（登録商標）肝臓がん L I 1005 に対して、腫瘍成長に対する阻害効果があったが、対照群と比較して統計的有意差はなく、ソラフェニブ群と比較して効力に差はなかった。担腫瘍マウスは、試験した用量 10 mg/kg 、 1.25 mg/kg 、 2.5 mg/kg および 5 mg/kg の化合物 A に対する耐性が良好であった。ソラフェニブは、試験した用量 30 mg/kg ではマウスに一定の体重減少が生じ、投薬期間が終了した後に、体重は徐々に正常に戻った。一方、対照群の実験動物の体重変化と比較して、化合物 A は毒性副作用のない優れた腫瘍阻害効果を示した。

【0204】

4.10 肝臓がん Hep G2 C D X モデルにおける化合物 A およびソラフェニブの生体内薬力学実験の比較

実験説明：ヒト肝臓がん Hep G2 細胞を BALB/c ノードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブの 30 mg/kg 群、試験薬化合物 A の 5 mg/kg (QW x 2; 1 週間休み; QW x 2, i. v.)、 10 mg/kg (QW x 2; 1 週間休み; QW x 2, i. v.)、 1.25 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.)、 2.5 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.)、 5 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.) の単一薬物群、および 7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% グルコース注射剤 D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計 7 群に分け、1 群当たりマウス 6 匹とした。上記のうち、7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% グルコース注射剤 D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群、試験薬化合物 A の 1.25 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.)、 2.5 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.) および 5 mg/kg (QD x 5; 2 日間休み、2 週間休み; QD x 5, i. p.) の群を腹腔内注射により投与し、1 日 1 回、5 日間連続で投与し、次に 2 日間休み、2 週間休み、その後 1 日 1 回 5 日間連続で投与し、次に 9 日間観察した。試験薬化合物 A の 5 mg/kg 群 (QW x 2; 1 週間休み; QW x 2, i. v.)、 10 mg/kg 群 (QW x 2; 1 週間休み; QW x 2, i. v.) は、尾静脈注射により投与し、週 1 回、2 週間連続で投与し、次に 1 週間休み、その後週 1 回、2 週間連続で投与し、次に、最終の投与の後、6 日間観察した。試験薬ソラフェニブの 30 mg/kg 群は、1 日 1 回、21 日間連続で胃管栄養法により投与し、次に 14 日間観察した。相対的腫瘍阻害率 TGI (%) によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

【0205】

肝臓がん Hep G2 モデルにおける各群の薬力学分析を、細胞接種後 53 日目に行い、その結果を表 25 に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表 26 に示した。

【0206】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表25: ヒト肝臓がんHepG2モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	腫瘍細胞接種後 53 日目(すなわち、Day 53、最初の投与後 34 日目)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)、 QDx5:2 日間休み、2 週間休み-QDx5、i.p.	2293.53 ± 358.48	11.85 ± 1.76	-	-	-
第 2 群 ソラフェニブ、30mg/kg、QDx21 日間、p.o.	1484.78 ± 304.89	7.82 ± 1.58	34.05	65.95	0.833
第 3 群 化合物 A 5mg/kg、 QWx2:1 週間休み-QWx2、i.v.	136.44 ± 66.47	0.70 ± 0.34	94.08	5.92	0.0000000978
第 4 群 化合物 A、10mg/kg、 QWx2:1 週間休み-QWx2、i.v.	88.20 ± 29.95	0.45 ± 0.15	96.17	3.83	0.00000000582
第 5 群 化合物 A、1.25mg/kg、QDx5:2 日間休み、 2 週間休み-QDx5、i.p.	1066.23 ± 252.18	5.57 ± 1.26	52.97	47.03	0.192
第 6 群 化合物 A、2.5mg/kg、QDx5:2 日間休み、 2 週間休み-QDx5、i.p.	417.76 ± 105.16	2.19 ± 0.52	81.54	18.46	0.000184
第 7 群 化合物 A、5mg/kg、QDx5:2 日間休み、 2 週間休み-QDx5、i.p.	189.84 ± 72.81	0.99 ± 0.38	91.67	8.33	0.0000000381

注: 1. データは「平均±標準誤差」として表した。
2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【表 3 3】

表26:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	19日目	22日目	24日目	27日目	31日目	36日目	39日目	42日目	46日目	49日目	53日目
第1群	192.64	336.01	345.38	430.57	617.10	771.64	969.06	1325.75	1574.22	1939.71	2293.53
第2群	189.76	291.62	311.64	340.46	398.84	491.06	509.41	657.51	816.63	1012.20	1484.78
第3群	191.48	315.19	360.12	390.21	373.82	314.44	283.08	276.88	233.11	145.58	136.44
第4群	191.97	314.32	375.81	427.75	386.68	347.85	312.31	252.78	197.45	142.21	88.20
第5群	189.54	315.41	351.74	383.10	366.64	416.27	586.80	782.39	886.97	975.41	1066.23
第6群	189.31	292.03	360.14	373.23	405.67	392.90	342.04	399.84	417.54	456.60	417.76
第7群	189.64	259.29	280.24	286.22	290.75	293.88	247.49	224.58	215.32	234.89	189.84

【0208】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図29に示す曲線としてプロットした。

【0209】

実験動物の体重変化に対する化合物Aの影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図30に示す曲線としてプロットした。

【0210】

実験の結論：化合物Aの効力は、ソラフェニブの効力を上回っている。HepG2は悪

10

20

30

40

50

液質のモデルであるため、担腫瘍マウスの自然体重減少を特徴とした。用量 $10 \text{ mg} / \text{kg}$ ($\text{QW} \times 2$; 1週間休み; $\text{QW} \times 2$ 、i.v.、第4群) および $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ ($\text{QD} \times 5$; 2日間休み、2週間休み; $\text{QD} \times 5$ 、i.p.、第6群) の化合物Aには、ヒト肝臓がん Hep G2 モデルにおける腫瘍成長に対して、どちらも対照群と比較して統計的有意差のある有意な阻害効果があった。化合物Aは、上述の2つの試験した用量および投与様式では、担腫瘍マウスの重度の体重減少または死亡を引き起こさなかった。用量 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ の試験化合物A単一薬物 ($\text{QW} \times 2$; 1週間休み; $\text{QW} \times 2$ 、i.v.、第3群) には、対照群と比較して統計的有意差のあるヒト肝臓がん Hep G2 モデルの腫瘍成長に対する統計的に有意な阻害効果があり、この群の1匹のマウスは、投薬サイクルの間に死亡した。用量 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ の化合物A ($\text{QD} \times 5$; 2日間休み、2週間休み; $\text{QD} \times 5$ 、i.p.、第7群) には、ヒト肝臓がん Hep G2 モデルの腫瘍成長に対して、対照群と比較して統計的有意差のある有意な阻害効果があり、1匹のマウスは、BWLが20%を超えたため、投薬サイクルの間に安楽死させた。 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ の化合物A群のマウス1匹は、完全に治癒した。さらに、化合物A治療群の $1.25 \text{ mg} / \text{kg}$ ($\text{QD} \times 5$; 2日間休み、2週間休み; $\text{QD} \times 5$ 、i.p.、第5群)、 $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ ($\text{QD} \times 5$; 2日間休み、2週間休み; $\text{QD} \times 5$ 、i.p.、第6群) および $5 \text{ mg} / \text{kg}$ ($\text{QD} \times 5$; 2日間休み、2週間休み; $\text{QD} \times 5$ 、i.p.、第7群) は、用量依存的な用量応答関係を示した。第3、4および7群のそれぞれで1匹のマウスが完全に治癒し、試験した用量 $30 \text{ mg} / \text{kg}$ のソラフェニブは、ヒト肝臓がん Hep G2 モデルに対して、対照群と比較して統計的有意差のない腫瘍成長阻害を示し、試験した用量ではマウスに有意な体重減少が生じた。

10

20

【0211】

4.11 肺がん LU0884 PDXモデルにおける化合物Aおよびパクリタキセルの生体内薬力学実験の比較

実験説明: HuPrime (登録商標) モデル LU0884 腫瘍ブロックを BALB/c ノードマウスに皮下接種して、ヒト肺がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬パクリタキセルの $20 \text{ mg} / \text{kg}$ 群、化合物Aの $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ 群、 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 群および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 群、ならびに 7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% グルコース注射剤 D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計6群に分け、1群当たりマウス6匹とした。上記のうち、7.5% 無水エタノール + 7.5% ポリオキシエチレン (35) ヒマシ油 + 85% グルコース注射剤 D5W (pH 7.4) ビヒクル対照群、化合物Aの $2.5 \text{ mg} / \text{kg}$ 群、 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ 群および $10 \text{ mg} / \text{kg}$ 群は、尾静脈注射により、週1回、3週間連続で投与し、8日間観察した。試験薬パクリタキセルの $20 \text{ mg} / \text{kg}$ 群は、腹腔内注射により、4日に1回、4回連続で投与し、13日間観察した。相対的腫瘍阻害率 TGI (%) によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

30

【0212】

肺がん LU0884 モデルにおける各群の薬力学分析を投与後28日目に行い、その結果を表27に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表28に示した。

40

【0213】

表27:HuPrime(登録商標)肺がんLU0884モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	全投薬サイクルの終了後 8 日目(すなわち、Day 28)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射液 D5W(pH7.4)、 0mg/kg、QWx3、i.v.	664.59±121.31	5.99±0.80	-	-	-
第 2 群 パクリタキセル、20mg/kg、Q4Dx4、i.p.	528.88±147.69	4.72±1.26	21.21%	78.79%	0.957
第 4 群 化合物 A、2.5mg/kg、QWx3、i.v.	360.43±44.42	3.47±0.56	42.15%	57.85%	0.560
第 5 群 化合物 A、5mg/kg、QWx3、i.v.	291.60±103.85	2.61±0.94	56.38%	43.62%	0.252
第 6 群 化合物 A、10mg/kg、QWx3、i.v.	434.80±160.03	3.78±1.19	36.98%	63.02%	0.687

1. データは「平均±標準誤差」として表した。
2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【表 3 5】

表28:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0日目	4日目	7日目	11日目	14日目	18日目	21日目	25日目	28日目
第1群	109.73	180.12	262.62	314.65	366.16	476.97	510.27	599.15	664.59
第2群	110.11	157.57	229.87	250.46	292.52	381.53	402.62	492.50	528.88
第4群	109.86	138.21	177.96	194.38	216.81	261.94	287.79	328.61	360.43
第5群	110.67	173.28	221.81	229.45	236.47	260.75	271.59	289.40	291.60
第6群	109.04	202.09	257.40	283.55	293.14	343.92	359.85	411.01	434.80

【0 2 1 5】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図 3 1 に示す曲線としてプロットした。

【0 2 1 6】

実験動物の体重変化に対する化合物 A の影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図 3 2 に示す曲線としてプロットした。

【0 2 1 7】

実験の結論：試験薬パクリタキセル（2 0 m g ／ k g、第 2 群）は、試験した用量で、

10

20

30

40

50

HuPrime（登録商標）肺がんLU0884に対して、対照群と比較して統計的有意差のない弱い腫瘍阻害効果を示した。化合物Aの2.5mg/kg（第4群）、5mg/kg（第5群）および10mg/kg（第6群）は全て、試験した用量で、HuPrime（登録商標）肺がんLU0884に対して、対照群と比較して統計的有意差のない一定の腫瘍阻害効果を示した。したがって、このモデルでは、試験薬パクリタキセルと化合物Aとの効力に有意差はなかった。担腫瘍マウスは、試験した用量20mg/kgのパクリタキセル（第2群）、ならびに試験した用量2.5mg/kg（第4群）、5mg/kg（第5群）および10mg/kg（第6群）の化合物Aに対して有意な体重減少がなく、耐性が良好であった。

【0218】

4.12 肝臓がんLI6664 PDXモデルにおける化合物A、AST-3424およびソラフェニブの生体内薬力学実験の比較

実験説明：HuPrime（登録商標）モデルLI6664腫瘍ブロックをBALB/cヌードマウスに皮下接種して、ヒト肝臓がんの皮下移植腫瘍モデルを確立した。実験を、試験薬ソラフェニブの30mg/kg群、試験薬AST-3424の0.3mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg群、化合物Aの0.5mg/kg、1.5mg/kg群、4.5mg/kg群、ならびに7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W（pH7.4）ビヒクル対照群の複数群、すなわち合計8群に分け、1群当たりマウス6匹とした。上記のうち、7.5%無水エタノール+7.5%ポリオキシエチレン（35）ヒマシ油+85%グルコース注射剤D5W（pH7.4）ビヒクル対照群は、週に1回、3週間連続で尾静脈を通して投与した。試験薬AST-3424の0.3mg/kg群および1mg/kg群は、尾静脈注射により、1日1回、5日間連続で投与し、次に2日間休み、次に2週間休み、その後5日間連続で、続けて投与した。試験薬AST-3424の1.25mg/kg群は、尾静脈注射により、週1回、2週間連続で投与し、次に1週間休み、その後2週間連続で、続けて投与した。化合物Aの0.5mg/kg群、1.5mg/kg群および4.5mg/kg群は、尾静脈注射により、週1回、3週間連続で投与し、次に1週間休み、その後3週間連続で投与した。試験薬ソラフェニブの30mg/kg群は、1日1回、21日間連続で胃管栄養法によって投与した。相対的腫瘍阻害率TGI（%）によって効力を評価し、動物の体重変化および死亡によって安全性を評価した。

【0219】

肝臓がんLI6664 PDXモデルにおける各群の薬力学分析を投与後28日目に行い、その結果を表29に示した。様々な日数での腫瘍体積のサイズを記録し、その結果を表30に示した。

【0220】

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表29:HuPrime(登録商標)肝臓がんLI6664モデルにおける各群の薬力学分析の表

実験群	初回投与後 28 日目(すなわち、Day 28)				
	腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	相対腫瘍体積 ($\bar{x} \pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 値 (対照群との比較)
第 1 群 7.5%無水エタノール+ 7.5%ポリオキシエチレン(35)ヒマシ油+ 85%グルコース注射剤 D5W(pH7.4)	1506.35±457.93	12.91±2.94	—	—	—
第 2 群 ソラフェニブ (30mg/kg)	1003.42±128.88	9.17±0.47	28.99%	71.01%	1
第 3 群 AST-3424 (0.3mg/kg)	746.71±130.55	6.99±1.31	45.85%	54.15%	0.79
第 4 群 AST-3424 (1mg/kg)	463.09±99.32	4.51±1.21	65.05%	34.95%	0.0329
第 5 群 AST-3424 (1.25mg/kg)	687.95±147.16	6.14±0.94	52.42%	47.58%	0.479
第 6 群 化合物 A (0.5mg/kg)	920.46±215.96	8.51±2.07	34.07%	65.93%	0.855
第 7 群 化合物 A (1.5mg/kg)	466.31±77.63	4.31±0.54	66.57%	33.43%	0.0457
第 8 群 化合物 A	320.72±40.03	2.96±0.27	77.05%	22.95%	0.000856

注: 1. データは「平均±標準誤差」として表した。

2. $T/C\% = T_{RTV}/C_{RTV} \times 100\%$ または $T/C\% = T_{TV}/C_{TV} \times 100\%$ 、 $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$

【 0 2 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

表30:様々な日数での様々な実験群における腫瘍体積のサイズ(mm³)

実験群	0 日目	4 日目	7 日目	11 日目	14 日目	18 日目	21 日目	25 日目
第 1 群	108.31	224.91	303.09	414.35	597.93	762.00	892.78	1214.79
第 2 群	107.93	170.15	197.93	218.34	321.83	391.52	481.85	730.68
第 3 群	108.20	162.32	177.51	208.59	306.95	391.40	499.34	631.08
第 4 群	107.53	131.59	145.23	158.03	233.54	291.97	371.35	438.00
第 5 群	108.46	174.65	210.25	222.97	291.02	361.03	467.94	581.63
第 6 群	108.44	201.76	277.38	301.39	347.30	434.18	518.23	746.19
第 7 群	108.25	127.56	152.00	161.35	206.44	225.71	287.02	398.93
第 8 群	108.26	125.30	142.58	150.82	176.69	180.29	201.42	282.76
実験群	28 日目	32 日目	35 日目	39 日目	42 日目	46 日目	49 日目	/
第 1 群	1506.35	1441.57	1671.99	2081.93	1409.66	649.08	695.40	/
第 2 群	1003.42	1333.07	1595.00	2102.94	2729.04	2892.15	2600.00	/
第 3 群	746.71	958.09	1059.71	1226.51	1094.69	1268.82	1486.77	/
第 4 群	463.09	622.48	748.13	929.60	1226.79	1496.83	1717.60	/
第 5 群	687.95	746.71	871.84	1081.64	1307.36	1675.14	1923.31	/
第 6 群	920.46	1036.44	1258.05	1426.66	1661.81	2037.97	1746.71	/
第 7 群	466.31	543.94	643.84	805.84	1060.20	1179.82	1407.10	/
第 8 群	320.72	339.73	360.45	391.38	417.79	451.01	538.20	/

10

20

【0 2 2 2】

様々な群のマウスの腫瘍体積を様々な日数で測定し、平均値を得、図 3 3 に示す曲線としてプロットした。

【0 2 2 3】

実験動物の体重変化に対する化合物 A の影響を検証するために、上記の実験方法に基づき、実験動物の体重変化を様々な時点で記録し、その体重の増加率を計算し、図 3 4 に示す曲線としてプロットした。

30

【0 2 2 4】

実験の結論：試験薬ソラフェニブの 3 0 m g / k g 治療群には、最初の投与後 2 8 日目で腫瘍阻害効果がなく、相対的腫瘍阻害率 T G I (%) は 2 8 . 9 9 % であった。試験薬 A S T - 3 4 2 4 の 0 . 3 m g / k g (1 日 1 回、5 日間連続で投与し、次に 2 日間休み、次に 2 週間休み、その後 5 日間連続で、続けて投与) 治療群には、最初の投与後 2 8 日目で、対照群と比較して統計的有意差のない (p = 0 . 7 9) 一定の腫瘍阻害効果があり、相対的腫瘍阻害率 T G I (%) は 4 5 . 8 5 % であった。試験薬 A S T - 3 4 2 4 の 1 m g / k g (1 日 1 回、5 日間連続で投与し、次に 2 日間休み、次に 2 週間休み、その後 5 日間連続で、続けて投与) 治療群には、最初の投与後 2 8 日目で、対照群と比較して統計的有意差のある (p = 0 . 0 3 2 9) 有意な腫瘍阻害効果があり、相対的腫瘍阻害率 T G I (%) は 6 5 . 0 5 % であった。試験薬 A S T - 3 4 2 4 の 1 . 2 5 m g / k g (週 1 回、2 週間連続で投与し、次に 1 週間休み、その後 2 週間続けて投与) 治療群は、最初の投与後 2 8 日目 (D a y 2 8) に、対照群と比較して統計的有意差のない (p = 0 . 4 7 9) 一定の腫瘍阻害効果を示し、相対的腫瘍阻害率 T G I (%) は 5 2 . 4 2 % であった。

40

【0 2 2 5】

化合物 A の 0 . 5 m g / k g (週 1 回、3 週間連続で投与し、次に 1 週間休み、その後 3 週間連続で、続けて投与) 治療群は、最初の投与後 2 8 日目に、対照群と比較して統計的有意差のない (p = 0 . 8 5 5) わずかな腫瘍阻害効果を示し、相対的腫瘍阻害率 T G I (%) は 3 4 . 0 7 % であった。化合物 A の 1 . 5 m g / k g および 4 . 5 m g / k g

50

(週1回、3週間連続で投与し、次に1週間休み、その後3週間連続で、続けて投与)の治療群は、最初の投与後28日目に、対照群と比較して統計的有意差のある(p は、それぞれ0.0457および0.000856)有意な腫瘍阻害効果を示し、相対的腫瘍阻害率TGI(%)は、それぞれ66.57%および77.05%であった。化合物Aの腫瘍阻害効果は用量依存的であり、試験薬化合物Aの0.5mg/kg治療群(第6群)と比較した4.5mg/kg治療群(第8群)には、統計的有意差($p=0.0428$)があった。化合物AおよびAST-3424には同様の腫瘍阻害効果があり、どちらもソラフェニブの腫瘍阻害効果を上回っていた。

【0226】

ソラフェニブの30mg/kg治療群では、個々のマウスで体重減少が見られた。治療期間中、AST-3424および化合物Aの治療群では体重減少はなく、それらの群の耐性は良好であった。

【0227】

V. Pgp阻害アッセイおよびBBB血液脳関門アッセイ

P-糖タンパク質(P-glycoprotein: P-GP、多剤耐性タンパク質としても知られる)は、多剤耐性腫瘍細胞の原形質膜で発見された高分子量タンパク質であり、輸送ポンプのような構造を有する。P-GPは、多様な化学療法薬を細胞外に送り出し、細胞内の薬物濃度を低減させる。P-GPは、臨床化学療法における耐性と密接に関係している。

【0228】

中枢神経系(脳など)の腫瘍またはがんの治療のための化学療法薬の役割は、制約を受ける。この制約は、主に血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)によるものであり、これにより化学療法薬の腫瘍系または腫瘍組織への透過性が低くなる。すなわち、化学療法薬は、血液脳関門を通過し脳に入ってがん細胞を死滅させることができない場合がある。

【0229】

小分子(例えば化学療法薬)が血液脳関門を通過するプロセスは、より複雑である。全身の血液循環と脳脊髄液との間に位置する血液脳関門は、特殊な脳微小血管内皮細胞と、それを囲む細胞と血管周囲星状細胞とから、隣接する細胞間のタイトジャンクションを介して形成されており、血管内皮細胞の周りに物理的な障壁を形成するのではなく、ほとんどの分子が通過する際に選択的障壁を形成しなければならない。小さな親水性分子はBBBの膜輸送系を通過することができるが、多くの化学療法薬や巨大分子薬などの大きな親水性分子は、特定のタンパク質によって能動的に輸送されることがない限り、中枢神経系から排除される。さらに重要なのは、脳組織を保護するためのBBBの「薬物排出ポンプ」(例えばP-GP)は、一部の化学療法薬や巨大分子薬を能動的に脳から排除する可能性のあることである。したがって、それでも小分子標的抗腫瘍薬分子などの親水性小分子化学療法薬であれば、血液脳関門を通過して脳に入り、その効果を発揮する可能性がある。しかし、親水性小分子化学療法薬は、P-GPの作用を受けて中枢神経系から排除されるため、機能しない可能性がある。つまり、P-GPの膜貫通構造はエネルギー依存的な「薬物ポンプ」の機能を有し、疎水性の脂溶性薬物(例えば、ビンクリスチン(VCR)、アドリマイシン(Dox)、エトポシド(EP-16))を細胞外に送り出し、細胞内薬物濃度を低下させるため、細胞毒性が低下または完全に失われる可能性がある。

【0230】

上記の理由から、P-GPと化合物との相互作用の実験データを使用して、中枢神経系における腫瘍細胞の増殖阻害活性に対する化合物の有効度を評価する。

【0231】

5.1 MDCKII-MDR1細胞をモデルとし、ベラパミルを阻害剤とした、P-gp基質としての化合物Aの可能性の評価

5.1.1 浸透試験のための細胞の調製

(1) MDCKII-MDR1細胞を細胞培養瓶で培養した。インキュベータの条件は

10

20

30

40

50

、37℃、5%CO₂、相対湿度95%に設定した。細胞成長のコンフルエンスが70～90%に達した時に、細胞をトランスウェルに接種した。

【0232】

(2) 細胞を接種する前に、トランスウェルの上部コンパートメントの全てのウェルに培養培地50μLを添加し、下部の培養プレートに培養培地25mLを添加した。培養プレートは、37℃、5%CO₂下のインキュベータで1時間インキュベートした後、細胞接種に使用してもよい。

【0233】

(3) 細胞をインキュベートした後、細胞懸濁液を吸引し、丸底遠心管に移し、その遠心管を120gで5分間遠心した。

【0234】

(4) 細胞を培養培地に再懸濁した。最終濃度は、 1.56×10^6 細胞/mLであった。この細胞懸濁液を、96ウェルトランスウェルの培養プレートの上部コンパートメントに、1ウェル当たり細胞懸濁液50μLとして移した。最終接種密度は 5.45×10^5 細胞/cm²であった。

【0235】

(5) 接種後48時間で培養培地を交換した。4～8日間培養した後、1日おきに培地を交換した。

【0236】

(6) 培養培地交換のプロセスは以下のようにした。トランスウェルと受容プレートとを分離した。受容プレートの培地を廃棄し、次いでトランスウェルの培地を廃棄した。最後に、各トランスウェルに新鮮な培地75μLを添加し、受容プレートに新鮮な培地25mLを添加した。

【0237】

5.1.2 細胞単層膜の完全性の評価

(1) MDCKII-MDR1細胞は、4～8日間培養した後、完全にコンフルエントになっており、分化を完了しているべきである。その後、MDCKII-MDR1細胞を浸透試験に使用することができる。

【0238】

(2) ミリポアを使用して単層膜の抵抗値を測定し、全てのウェルの抵抗値を記録した。

【0239】

(3) 測定後、トランスウェル培養プレートをインキュベータに戻した。

【0240】

(4) 抵抗値の計算：測定した抵抗値(オーム)×膜の面積(cm²)=経内皮電気抵抗(transendothelial electrical resistance: TEER)値(オーム・cm²)。TEER値が42オーム・cm²未満であれば、そのウェルは浸透試験に使用しない。

【0241】

5.1.3 薬物の浸透試験

(1) MDCKII-MDR1トランスウェル培養プレートをインキュベータから取り出した。細胞単層膜を緩衝溶液で2回洗い流し、37℃で30分間インキュベートした。

【0242】

(2) 化合物がトップエンドからベースエンドに輸送される輸送速度を試験した。試験物質を含有する緩衝溶液75μLを上部コンパートメント(トップエンド)の各ウェルに添加し、緩衝溶液235μLを下部コンパートメント(ベースエンド)の各ウェルに添加した。

【0243】

(3) 化合物がベースエンドからトップエンドに輸送される輸送速度を試験した。緩衝溶液75μLを上部コンパートメント(トップエンド)の各ウェルに添加し、試験物質を

10

20

30

40

50

含有する緩衝溶液 235 μL を下部コンパートメント（ベースエンド）の各ウェルに添加した。

【0244】

（４）試料 50 μL を作業溶液調製プレートから移し、内部標準（100 nM アルプラゾラム、200 nM ラベタロール、200 nM カフェイン、および 2 μM ケトプロフェン）を含有するアセトニトリル 200 μL に添加し、その混合物を 0 分での投薬試料として試験した。

【0245】

（５）P-GP 阻害剤ベラパミルを添加した条件下で試験物質の輸送を試験するには、MDC K I E-MDR 1 トランスウェルのドナーエンドおよびアクセプターエンドの緩衝塩にベラパミルを添加する必要がある、最終濃度を 100 μM とした。

【0246】

（６）上部および下部への輸送物をプールし、次いで 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。

【0247】

（７）インキュベーションが終了した後、トランスウェル培養プレートの上部コンパートメントおよび下部コンパートメントの各ウェルからそれぞれ試料 50 μL を取り出し、新しい試料管に添加した。内部標準（100 nM アルプラゾラム、200 nM ラベタロール、200 nM カフェイン、および 2 μM ケトプロフェン）を含有するアセトニトリル 200 μL を試料管に添加した。その試料管を 10 分間ボルテックスし、3220 g で 30 分間遠心した後、上清 100 μL を取り、同体積の水で希釈して LC-MS/MS 分析を行った。各試料を 3 つの並行インキュベーションに用いた。

【0248】

（８）細胞単層膜を 2 時間インキュベートした後、蛍光イエローを使用した漏出アッセイによりその完全性を評価した。ここで、蛍光イエロー原液は、緩衝溶液で最終濃度の 100 μM に希釈した。トランスウェルの上部コンパートメントの各ウェルに蛍光イエロー溶液 100 μL を添加し、緩衝液 300 μL をトランスウェルの下部コンパートメントの各ウェルに添加した。トランスウェルを 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした後、上部コンパートメントおよび下部コンパートメントの各ウェルから溶液 80 μL をそれぞれ吸い取り、新しい 96 ウェルプレートに移した。マイクロプレートリーダーを使用して、励起波長 480 nm および発光波長 530 nm を用いて蛍光測定を行った。

【0249】

5.1.4 データ分析

イオンクロマトグラフィーの結果によりピーク面積を計算した。化合物の見かけの透過係数（*apparent permeability coefficient*: P_{app} 、単位： $\text{cm}/\text{s} \times 10^{-6}$ ）を、次式により計算した。

【0250】

【数 1】

$$P_{app} = \frac{V_A}{\text{面積} \times \text{時間}} \times \frac{[\text{薬物}]_{\text{アクセプター}}}{[\text{薬物}]_{\text{初期、ドナー}}}$$

式中、「 V_A 」はアクセプターエンドにある溶液の体積を指し（ $A_p \rightarrow B_l$ は 0.235 mL であり、 $B_l \rightarrow A_p$ は 0.075 mL であった）、「面積」はトランスウェル 96 ウェルプレートの膜の面積（0.143 cm^2 ）を指し、「時間」はインキュベーション時間（単位：s）を指し、「 $[\text{薬物}]_{\text{アクセプター}}$ 」は、インキュベーション後のアクセプターエンドの薬物濃度を指し、「 $[\text{薬物}]_{\text{初期、ドナー}}$ 」は、インキュベーション前の投与の初期濃度を指す。

【0251】

排出比率を次式により計算した。

【0252】

10

20

30

40

50

【数 2】

$$\text{排出比率} = \frac{P_{app(B-A)}}{P_{app(A-B)}}$$

式中、「 $P_{app(B-A)}$ 」は、ベースエンドからトップエンドまでの見かけの透過係数を指し、「 $P_{app(A-B)}$ 」はトップエンドからベースエンドまでの見かけの透過係数を指す。

【0253】

回収率を次式により計算した。

【0254】

【数 3】

$$\text{回収 \%} = \frac{[\text{薬物}]_{\text{アクセプター}} \times V_A + [\text{薬物}]_{\text{ドナー}} \times V_D}{[\text{薬物}]_{\text{初期, ドナー}} \times V_D} \times 100$$

式中、「 V_A 」はアクセプターエンドにある溶液の体積（単位：mL）を指し、「 V_D 」はドナーエンドにある溶液の体積（単位：mL）を指し、「 $[\text{薬物}]_{\text{アクセプター}}$ 」は、インキュベーション後のアクセプターエンドの薬物濃度を指し、「 $[\text{薬物}]_{\text{ドナー}}$ 」は、インキュベーション後のドナーエンドの薬物濃度を指し、「 $[\text{薬物}]_{\text{初期, ドナー}}$ 」は、インキュベーション前の投与の初期濃度を指す。

【0255】

細胞単層膜の蛍光値、LY漏出量を次式により計算した。

【0256】

【数 4】

$$\text{LY 漏出率} = \left(\frac{I_{\text{アクセプター}} \times 0.3}{I_{\text{アクセプター}} \times 0.3 + I_{\text{ドナー}} \times 0.1} \right) \times 100$$

式中、「 $I_{\text{アクセプター}}$ 」はアクセプターウェル（0.3 mL）の蛍光強度を指し、「 $I_{\text{ドナー}}$ 」はドナーウェル（0.1 mL）の蛍光強度を指し、%LYで表される。LY < 1.5%は、細胞単層膜が無傷であることを意味する。

【0257】

調製した化合物の一部をそれぞれ試験した後、P-糖タンパク質阻害剤、ベラパミルの存在下または非存在下における様々な化合物の排出比率を得た。実験データを表31に示した。

【0258】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表31:薬物に関する浸透実験データ

化合物	ベラパミル (μ M)	$P_{app}(A-B)$ (10^{-6} , cm/s)	$P_{app}(B-A)$ (10^{-6} , cm/s)	排出比率	回収率(%)	
					AP-BL	BL-AP
メトプロロール	0	27.57	26.51	0.96	96.18	98.46
フラゾシン	0	10.99	31.84	2.90	90.69	78.53
フラゾシン	100	30.36	17.65	0.58	94.19	88.52
イマチニブ	0	1.89	30.49	16.13	79.04	63.40
イマチニブ	100	21.14	19.68	0.93	83.02	87.60
A	0	0.18	0.24	1.36	5.03	4.34
A	100	0.27	0.31	1.12	5.70	12.56
AST-3424	0	1.95	34.51	17.71	79.11	90.60
AST-3424	100	7.50	21.51	2.87	92.56	96.29

【0259】

実験の結論：P-gp阻害剤ベラパミルの存在下および非存在下における化合物Aの $P_{app}(A-B)$ 、 $P_{app}(B-A)$ 、排出比率の3つの主要パラメータは、互いに非常に近かった。したがって、化合物AはP-gpの基質ではなく、その効力は血液脳関門による影響をほとんど受けなかった。

【0260】

対照として、同じくAKR1C3酵素によって活性化されたAST-3424を試験したところ、得られた $P_{app}(A-B)$ 、 $P_{app}(B-A)$ および排出比率の3つの主要パラメータには大きな差があり、これにより、AST-3424はP-gp基質であり、

その効力は血液脳関門による影響を強く受けていることが示された。

【 0 2 6 1 】

5 . 2 血液脳関門アッセイ

5 . 2 . 1 化合物 A の血液脳関門アッセイ

3 匹の C D - 1 マウスに、1 m g / k g の試験化合物 A を各時点で静脈内投与した。投与後 5 分、1 5 分、1 時間、2 時間、4 時間および 8 時間で、血液および脳組織を取った。試料中の試験物質の濃度を L C / M S 法により定量し、その結果を表 3 2 に示した。

【 0 2 6 2 】

【表 3 9 】

表32:CD-1マウスに化合物Aを静脈内投与した後の様々な時点での血液および脳組織中の試験物質の濃度

経路	時間(h)	動物ID	脳 (ng/g)	血漿 (ng/mL)	比率(脳/血漿)	平均値	SD	CV (%)
IV	0.083	1	538.05	459.53	1.17	1.28	0.10	7.51
		2	540.75	400.55	1.35			
		3	549.95	416.19	1.32			
	0.25	4	419.34	371.76	1.13	1.15	0.19	16.87
		5	489.60	362.24	1.35			
		6	371.38	384.54	0.97			
	1	7	180.29	226.51	0.80	0.76	0.06	8.49
		8	188.68	238.84	0.79			
		9	169.85	249.07	0.68			
	2	10	107.09	150.39	0.71	0.67	0.07	10.32
		11	94.27	134.42	0.70			
		12	77.50	131.84	0.59			
	4	13	71.20	96.41	0.74	0.78	0.12	15.87
		14	68.47	74.91	0.91			
		15	42.73	63.17	0.68			
	8	16	23.60	48.84	0.48	0.52	0.10	18.78
		17	21.85	49.05	0.45			
		18	18.85	29.91	0.63			

【 0 2 6 3 】

図 3 5 に示すように、血液および脳組織中の化合物 A の時間に対する濃度に対応する結果を、曲線グラフにした。

【 0 2 6 4 】

図 3 6 に示すように、脳組織および血液中の化合物 A の時間に対する濃度の比率に対応する試験結果を、曲線グラフにした。

【 0 2 6 5 】

表 3 3 および表 3 4 に示すように、上記のアッセイから得られた薬物動態 (P h a r m a c o k i n e t i c : P K) パラメータを、以下に列挙した。

P K パラメータ、薬物動態パラメータ。

T 1 / 2 、半減期。

C l _ o b s 、血漿クリアランス。

C 0 、開始濃度。

A u C l a s t 、投与の開始時間から最終点までの濃度－時間曲線下面積。

A U C l n f 、投与開始から無限大の時間までの濃度－時間曲線下面積。

T m a x 、観測された最大血漿濃度までの時間。

C m a x 、観測された最大血漿濃度までの濃度。

M R T l n f _ o b s 、投与開始から無限大に対する理論的外挿時間までの平均滞留時間を表す。

A U C l n f R a t i o n (脳 / 血漿) 、投与開始から無限大の時間までの血清および脳組織の濃度－時間曲線下面積の比率。

U n i t 、単位。

M e a n 、平均値。

【 0 2 6 6 】

【表 4 0 】

表33:血漿における試験から得られたPKパラメータ

PK パラメータ	単位	平均値
Cl_obs	mL/min/kg	13.85
T1/2	h	3.64
C0	ng/mL	453.48
AUClast	h*ng/mL	979.51
AUCInf	h*ng/mL	1202.97
MRTInf_obs	h	4.37
Vss_obs	L/kg	3.63

【 0 2 6 7 】

【表 4 1】

表34:脳組織における試験から得られたPKパラメータ

PKパラメータ	単位	平均値
T1/2	h	2.80
Tmax	h	0.08
Cmax	ng/g	543.00
AUClast	h*ng/g	785.85
AUCInf	h*ng/g	872.43
MRTInf_obs	h	2.99
AUCInf Ratio (脳／血漿)	-	0.80

10

【0 2 6 8】

上記の実験結果から、化合物 A は、脳組織中で検出することができ、血液脳関門を通過して正常な生理的代謝を行い、腫瘍阻害効果を発揮し得ることが示された。

20

【0 2 6 9】

5. 2. 2 化合物 A S T - 2 8 7 0 の血液脳関門アッセイ

化合物 A S T - 2 8 7 0 は化合物 A S T - 3 4 2 4 のラセミ体であり、A S T - 3 4 2 4 と同様の腫瘍阻害活性がある。

【0 2 7 0】

3 匹の C D - 1 マウスに、1 0 m g / k g の試験化合物 A S T - 2 8 7 0 を、各時点で腹腔内注射により投与した。投与の 5 分、1 5 分、3 0 分、1 時間、1 . 5 時間および 2 時間後に、血液および脳組織を取り、試料中の試験物質の濃度を L C / M S 法により定量した。図 3 7 に示すように、血液および脳組織中の化合物 A S T - 2 8 7 0 の時間に対する濃度に対応する結果を、曲線グラフにした。図 3 8 に示すように、脳組織および血液中の化合物 A S T - 2 8 7 0 の時間に対する濃度の比率に対応する試験結果を、曲線グラフにした。

30

【0 2 7 1】

表 3 5 および表 3 6 に示すように、上記のアッセイから得られた P K (薬物動態) パラメータを、以下に列挙した。

【0 2 7 2】

40

50

【表 4 2】

表35:血漿における試験から得られたAST-2870のPKパラメータ

PK パラメータ	単位	平均値
Cl_obs	mL/min/kg	NC
T1/2	h	0.15
Cmax	ng/mL	4023
AUClast	h*ng/mL	725
AUCInf	h*ng/mL	725
MRTInf_obs	h	NC
Vss_obs	L/kg	NC

10

【0 2 7 3】

【表 4 3】

表36:脳組織における試験から得られたAST-2870のPKパラメータ

20

PKパラメータ	単位	平均値
T1/2	h	0.0747
Tmax	h	0.08
Cmax	ng/g	88.7
AUClast	h*ng/g	16.3
AUCInf	h*ng/g	16.5
MRTInf_obs	h	NC
AUCInf Ratio (脳/血漿)	-	0.0227

30

【0 2 7 4】

実験の結論：項目5.2.1の実験データと組み合わせると、化合物Aの半減期はAST-2870の半減期よりも有意に長かったと結論付けることができる。脳組織中の化合物Aの濃度は、定量を行った8時間以内は血漿中の濃度と同様であり、これによって、この化合物が効率的に血液脳関門に浸透し得ることが示された。一方、脳内で定量されたAST-2870の濃度は血漿中の濃度よりも有意に低く、投与の30分後では、AST-2870の濃度は定量化の下限値よりも低かった。これにより、AST-2870は血液脳関門を通過できないことが示された。

40

【0 2 7 5】

V I . 代謝安定性評価アッセイ

6 . 1 細胞質溶液安定性アッセイ

(I) 溶液調製

1) 試験用化合物A、プロゲステロン陽性対照、およびAST-3021阻害剤の10

50

0 mM 原液を調製し、冷凍庫（ $-10^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ ）で貯蔵した。

【0276】

2) 試験用の 2.5 mM 試料、陽性対照の中間溶液、および阻害剤の 1.5 mM 中間溶液を調製した。

【0277】

3) サル細胞細胞質ゾル溶液 10 mg/mL を調製した。

【0278】

4) 陽性対照 7.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 1.5 mg/mL を調製した。

【0279】

5) 試験用試料 7.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 1.5 mg/mL を調製した。

【0280】

6) 試験用試料 7.5 μM および阻害剤 4.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 1.5 mg/mL を調製した。

【0281】

7) 適当な量の NADPH の粉末を計量し、次いでリン酸カリウム緩衝液に溶解して NADPH 作業溶液 6 mM を調合し、 37°C で予熱した。

【0282】

(II) インキュベーションアッセイ

1) 陰性対照群：様々な時点（0 分および 60 分）で、試験用試料 7.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 30 μL / ウェルを、96 ウェルプレートに分配した。3 つの複製ウェルを並行して調製した。

【0283】

2) 陽性対照群：様々な時点（0、5、15、30、45 および 60 分）で、陽性対照 7.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 30 μL / ウェルを、96 ウェルプレートに分配した。3 つの複製ウェルを並行して調製した。

【0284】

3) 正常反応群：様々な時点（0、5、15、30、45 および 60 分）で、試験用試料 7.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 30 μL / ウェルを、96 ウェルプレートに分配した。3 つの複製ウェルを並行して調製した。

【0285】

4) 阻害反応群：様々な時点（0、5、15、30、45 および 60 分）で、試験用試料 7.5 μM および阻害剤 4.5 μM を含有する肝細胞細胞質ゾル懸濁液 30 μL / ウェルを、96 ウェルプレートに分配した。3 つの複製ウェルを並行して調製した。

【0286】

5) 96 ウェルプレートを 37°C の水浴中で 5 分間インキュベートした。

【0287】

6) 0 分試料：内部標準を含有するアセトニトリル 150 μL / ウェルを添加し、次いで、予熱した NADPH 作業溶液 15 μL / ウェルを正常反応群、阻害反応群および陽性対照群の試料に添加し、予熱したリン酸カリウム緩衝液 15 μL / ウェルを陰性対照群の試料に添加した。

【0288】

7) その他の試料（5、15、30、45 および 60 分）：正常反応群、阻害反応群および陽性対照群については、予熱した NADPH 作業溶液 15 μL / ウェルを添加して反応を開始し、陰性対照群については、予熱したリン酸カリウム緩衝液 15 μL / ウェルを添加した。次いで、反応プレートを 37°C の水浴中でインキュベートし続け、対応する時点（5、15、30、45 および 60 分）で、停止溶液 150 μL / ウェルを添加することにより反応を停止した。最終的なインキュベーション系を下記表 25 に示した。

【0289】

10

20

30

40

50

8) 全ての反応を停止した後、プレートを密封し、600rpmで約10分間よく振とうしてから、分析するまで凍結保存(−10℃〜−30℃)した。

【0290】
【表44】

表37: インキュベーション系のデータ

種	群	基質	基質濃度 (μM)	阻害剤 (AST-3021) (μM)	NADPH (mm)	細胞質ゾル (mg/mL)	インキュベーション 時間
マウス、ラット、 サル、およびヒト	陰性対照	化合物A	5	0	0	1	0分および60分
	正常反応	化合物A	5	0	2	1	0、5、15、30、45 および60分
	阻害反応	化合物A	5	3	2	1	0、5、15、30、45 および60分
	陽性対照	プロゲステロン	5	0	2	1	0、5、15、30、45 および60分

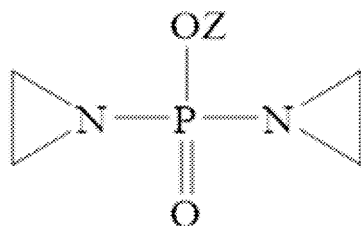
【0291】
(III) 試料分析

試料を4℃、4000rpmで15分間遠心し、上清を取って等体積の超純水と混合し、次いで、化合物A、AST-2660およびプロゲステロンの濃度をLC-MS/MSによって分析した。

【0292】

A S T - 2 6 6 0 は、A K R 1 C 3 酵素によるプロドラッグ化合物 A の代謝の後に放出される DNA アルキル化剤であり、腫瘍細胞を死滅させるのに有効である。A S T - 2 6 6 0 の構造式は次のとおりであり、

【化 5 3】



10

式中、Z は、水素、ナトリウムまたはカリウムであり得る。

【0 2 9 3】

(I V) データ分析

各試料中の分析物の濃度をピーク面積比率（ピーク面積分析物／ピーク面積内部標準）として表し、次いで 0 分時のピーク面積比率を基準として使用してインキュベーションの各時点での残存％を計算し、残存％の $\ln$ 対数値をインキュベーション時間に対して直線的にフィットさせ、半減期を次式に従って計算した。

【0 2 9 4】

残存％、残存％ = $\text{PAR 指定時間} / \text{PAR 0 分の平均} \times 100$ （PAR：ピーク面積比率（Peak Area Ratio））、

20

消失速度定数（ k ） = （－勾配値）、

半減期（ $t_{1/2}$ ）（分） = $0.693 / k$ 。

【0 2 9 5】

このアッセイでは、C D - 1 マウス、S D ラット、カニクイザルおよびヒトの肝細胞細胞質ゾルにおいて、A K R 1 C 3 阻害剤（A S T - 3 0 2 1）の存在下または非存在下で、試験対象化合物（化合物 A および化合物 A S T - 3 4 2 4）の代謝安定性を生体外で調べた。A S T - 3 0 2 1 の存在下または非存在下で、 $5 \mu\text{M}$ の試験対象化合物（化合物 A および化合物 A S T - 3 4 2 4）を、 2mM の N A D P H および $1 \text{mg} / \text{mL}$ の肝細胞細胞質ゾルと 0 ～ 6 0 分間、共インキュベートした。また、N A D P H および A S T - 3 0 2 1 の非存在下で、陰性対照として、 $5 \mu\text{M}$ の試験対象化合物（化合物 A および化合物 A S T - 3 4 2 4）を、 $1 \text{mg} / \text{mL}$ の肝細胞細胞質ゾルと 0、6 0 分間、共インキュベートした。A S T - 3 0 2 1 の非存在下で、陽性対照として、 $5 \mu\text{M}$ のプロゲステロンを 2mM の N A D P H および $1 \text{mg} / \text{mL}$ の肝細胞細胞質ゾルと 0 ～ 6 0 分間、共インキュベートした。次いで、インキュベーション後の試料中の陽性対照プロゲステロン、試験対象化合物（化合物 A および化合物 A S T - 3 4 2 4）ならびに A S T - 2 6 6 0 のパラメータを L C - M S / M S によって定量し、実験データを表 3 8 および表 3 9 に示した。

30

【0 2 9 6】

40

50

表38:様々な種の肝細胞細胞質ゾルにおける化合物Aクリアランスに基づく代謝パラメータ

基質	基質濃度 (μM)	種	群	分析物	平均残存%						代謝パラメータ	
					0分	5分	15分	30分	45分	60分	k	t _{1/2} (分)
化合物 A	5	マウス	陰性対照群	化合物 A	100.00%	NA	NA	NA	NA	83.01%	0.0031	223.40
化合物 A	5	ラット		化合物 A	100.00%	NA	NA	NA	NA	68.42%	0.0063	109.60
化合物 A	5	サル		化合物 A	100.00%	NA	NA	NA	NA	78.57%	0.0040	172.44
化合物 A	5	ヒト		化合物 A	100.00%	NA	NA	NA	NA	38.96%	0.0157	44.12
化合物 A	5	マウス	正常反応群	化合物 A	100.00%	99.18%	109.17%	95.86%	95.38%	88.89%	0.0014	511.07
化合物 A	5		阻害反応群	化合物 A	100.00%	90.76%	87.29%	85.00%	82.33%	74.94%	0.0041	168.42
化合物 A	5	ラット	正常反応群	化合物 A	100.00%	90.07%	90.26%	84.80%	81.99%	71.72%	0.0053	130.84
化合物 A	5		阻害反応群	化合物 A	100.00%	88.10%	86.23%	83.84%	78.06%	63.81%	0.0068	101.55
化合物 A	5	サル	正常反応群	化合物 A	100.00%	98.89%	94.52%	89.81%	83.43%	73.28%	0.0046	151.55
化合物 A	5		阻害反応群	化合物 A	100.00%	96.83%	101.19%	90.97%	88.36%	69.52%	0.0045	155.47
化合物 A	5	ヒト	正常反応群	化合物 A	100.00%	88.27%	79.04%	70.02%	52.35%	43.34%	0.0139	49.88
化合物 A	5		阻害反応群	化合物 A	100.00%	83.74%	78.58%	67.01%	66.39%	53.65%	0.0107	64.94
プロゲステロン	5	マウス	陽性対照群	プロゲステロン	100.00%	89.61%	78.52%	62.61%	44.84%	31.03%	0.0184	37.71
プロゲステロン	5	ラット		プロゲステロン	100.00%	84.80%	69.77%	45.51%	21.61%	4.70%	0.0311	22.28
プロゲステロン	5	サル		プロゲステロン	100.00%	82.47%	59.82%	28.19%	10.01%	3.26%	0.0525	13.20
プロゲステロン	5	ヒト		プロゲステロン	100.00%	80.76%	55.69%	20.59%	7.72%	0.46%	0.0543	12.76

【表 4 6】

表39:様々な種の肝細胞細胞質ゾルにおける代謝物AST-2660の平均ピーク面積比率

基質	基質濃度 (μM)	種	群	分析物	代謝物の平均ピーク面積比率					
					0 分	5 分	15 分	30 分	45 分	60 分
化合物 A	5	マウス	陰性対照群	AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	ラット		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	サル		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	ヒト		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	マウス	正常反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5		阻害反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5	ラット	正常反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5		阻害反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5	サル	正常反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.24E-05	2.71E-05	4.27E-05
化合物 A	5		阻害反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.68E-06
化合物 A	5	ヒト	正常反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	8.73E-06	2.29E-05	6.26E-05	8.33E-05
化合物 A	5		阻害反応群	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

【0298】

化合物 A および AST-3424 をそれぞれ上述の方法で試験し、実験結果データを分析、プロットして図 39 を得た。図 39 は、マウス、サル、ラットおよびヒトの肝細胞細胞質ゾル溶液において、NADPH の添加あり、NADPH の添加なし、AKR1C3 阻害剤および対照薬物プロゲステロンの添加ありで反応させた後の化合物 A の経時的な残存量の曲線を示す。マウス、サル、ラットおよびヒトの肝細胞細胞質ゾル溶液において、NADPH の添加あり、NADPH の添加なし、AKR1C3 阻害剤および対照薬物プロゲステロンの添加ありで反応させた後の AST-3424 の経時的な残存量の曲線を示す図 40 を得た。

【0299】

化合物Aの実験的分析：

1. NADPHの非存在下およびAST-3021の非存在下では、マウス、ラット、サルおよびヒトの肝細胞細胞質ゾルと60分間、共プレインキュベーションした後の化合物Aの平均残存率は、それぞれ83.01%、68.42%、78.57%、および38.96%であった（表38を参照されたい）。これらのデータにより、化合物Aは、非NADPH依存性の代謝経路の対象になっている可能性のあることが示された。代謝物AST-2660は、いずれの試料においても検出されなかった（表39を参照されたい）。

【0300】

2. AST-3021の非存在下では、マウス、ラット、サルおよびヒトの肝細胞細胞質ゾルならびにNADPHと60分間、共プレインキュベーションした後の化合物Aの平均残存率は、それぞれ88.89%、71.72%、73.28%、および43.34%であり（表38を参照されたい）、これらは、それぞれ半減期511.07分、130.84分、151.55分および49.88分に対応した。マウスおよびラットの試料ではAST-2660は検出されず、サルおよびヒトの試料では少量のAST-2660が検出された。

【0301】

3. AKR1C3阻害剤AST-3021の存在下では、マウス、ラット、サルおよびヒトの肝細胞細胞質ゾルにおける化合物A残存率は、それぞれ74.94%、63.81%、69.52%および53.65%であり、これらは、それぞれ半減期140.38分、101.55分、155.47分および64.94分に対応した（表38を参照されたい）。マウス、ラットおよびヒトの試料ではAST-2660は検出されず、1匹のサルの60分試料でのみ検出された。AST-3021は、マウス、ラットおよびサルの肝細胞細胞質ゾルでは化合物Aの代謝を有意に阻害しなかったが、ヒト肝細胞細胞質ゾルでは化合物Aの代謝をわずかに阻害した。AST-3021の存在下で、AST-2660はマウスおよびラットの細胞質ゾルでは検出されなかったが、ほとんどのサルおよびヒトの細胞質ゾル試料では、AST-3021の存在下で、AST-2660の濃度が検出可能なレベルまで低減した。

【0302】

上記の実験により、以下のことが実証された。

【0303】

i. 化合物Aは、AST-3424と同様の代謝機構を有している。すなわち、細胞質で代謝され、NADPHおよびAKR1C3酵素の存在下で代謝されてDNAアルキル化剤AST-2660を放出し、NADPHの非存在下またはAKR1C3酵素の非存在下では、代謝はされるが、代謝されてDNAアルキル化剤AST-2660を放出することはない。

【0304】

ii. ヒトおよびサルの肝細胞細胞質ゾルでは、正常群の化合物Aの代謝安定性はAST-3424よりも良好であり、半減期が長く、がん細胞に作用する場合、がんに対する阻害効果を、AST-3424よりも長く持続して発揮することができた。

【0305】

6.2 肝ミクロソームの安定性実験

1) 2つの個別実験を行った。

1a) NADPHあり：20mg/mLの肝ミクロソームを10μL、および10mMのNADPHを40μL、培養溶液に添加した。ミクロソームおよびNADPHの最終濃度は、それぞれ0.5mg/mLおよび1mMであった。

1b) NADPHなし：20mg/mLの肝ミクロソームを10μL、および超純粋H₂Oを40μL、培養溶液に添加した。ミクロソームの最終濃度は0.5mg/mLであった。

【0306】

2) 最終濃度 $2\text{ }\mu\text{M}$ で $4\text{ }\mu\text{L}$ の $200\text{ }\mu\text{M}$ 試験化合物溶液または対照化合物 (ベラパミル) 溶液を添加することにより反応を開始し、 37°C でインキュベートした。

【0307】

3) 反応溶液からアリコート $50\text{ }\mu\text{L}$ を0分および30分で取った。4倍の体積の冷アセトニトリルおよび4つの内部標準 (internal standard: IS、 100 nM アルブラゾラム、 200 nM カフェイン、 200 nM ラベタロール、および $2\text{ }\mu\text{M}$ ケトプロフェン) を添加することにより、反応を停止した。試料を $3,220\times g$ で40分間遠心した。 $100\text{ }\mu\text{L}$ の上清のアリコートを $100\text{ }\mu\text{L}$ の超純粋 H_2O と混合してから、LC-MS/MS分析に使用した。全ての実験を2度繰り返して行った。試験結果を下記表40に示した。

【0308】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表40:肝ミクロソームの安定性実験における30分後の化合物Aの残存量

化合物	30 分後の残存百分率									
	ヒト		サル		イヌ		ラット		マウス	
	NADPH の添加あり	NADPH の添加なし	NADPH の添加あり	NADPH の添加なし	NADPH の添加あり	NADPH の添加なし	NADPH の添加あり	NADPH の添加なし	NADPH の添加あり	NADPH の添加なし
ベラバミル	15.55	98.27	0.19	92.44	15.73	97.58	1.13	89.24	2.91	93.95
化合物 A	115.25	111.93	82.29	81.30	-	-	92.10	114.62	98.59	104.30
AST-3424	10.65	-	0.03	-	-	-	8.79	-	3.1	-

【0309】

上記の実験結果から、化合物 A は、ヒト、サルおよびマウスの肝ミクロソームでは比較的安定であり、ラットの肝ミクロソームでは比較的不安定であることが示された。化合物 A のデータを A S T - 3 4 2 4 と比較することによって、ヒト、サル、ラットおよびマウスの肝ミクロソームでは、化合物 A の方が A S T - 3 4 2 4 よりも安定であることがわかった。

【0310】

6. 3 血漿安定性試験

1) 血漿調製

凍結した血漿を 37℃ の水浴中で直ちに溶かした。その血漿を 3, 220 g で 10 分間遠心して血栓を除去し、上清を新しい試験管に採取した。血漿の pH を確認し、記録した。注 a. 到着してから融解した回数が 2 回以下の血漿のみを使用し、b. pH 7 ~ pH 8 の範囲の血漿のみを使用した。

【0311】

2) 実験溶液の調製

試験化合物および対照化合物メビノリンの 1 mM の作業溶液を DMSO で調製した。対照化合物プロパン溶液の 1 mM の作業溶液を、アセトニトリルで調製した。作業溶液 4 μL を、プレインキュベートした血漿 796 μL に添加し、最終濃度を 5 μM とした。溶媒の最終濃度は 0.5 % であった。

【0312】

3) 血漿安定性の試験手順

標準添加血漿 50 μL のアリコート新しい試験管に添加し、37℃ の水浴において約 60 rpm で 2 時間インキュベートした。アッセイを 2 度繰り返して行った。2 時間のインキュベーションの最後に、室温で 300 μL の急冷溶液（内部標準液（アセトニトリル、100 nM アルプラゾラム、500 nM ラベタロール、および 2 μM ケトプロフェン）を含有するアセトニトリル）を添加して反応を停止した。室温で、急冷溶液 300 μL を入れた新しい管に標準添加血漿 50 μL を添加することにより、時間 0 の試料を調製した。その管をボルテックスにより、5 分間混合した。プレート内の試料を 3, 220 x g で 30 分間、4℃ で遠心して、タンパク質を沈殿させた。上清 100 μL を新しいプレートに移した。その上清を水 100 μL で希釈し、よく混合し、LC-MS/MS を用いて分析した。

【0313】

様々な種の血漿における 2 時間後の化合物 A の試験結果を、下記表 41 に示した。

【0314】

【表 48】

表 41: 様々な種の血漿における 2 時間後の残存百分率

化合物	種	残存百分率
化合物 A	ヒト	60.06
化合物 A	ラット	33.03
化合物 A	マウス	38.19
化合物 A	サル	79.20

【0315】

上記のアッセイの結果から、化合物 A は、2 時間後にサルおよびヒトの血漿中で 79.20 % および 60.06 % 残っており、その安定性は、ラットおよびマウスの血漿中での安定性を上回っていることが示された。

【0316】

VII. 最大耐量 (maximal tolerance dose: MTD) アッセイ

7.1 化合物 A の MTD アッセイ

化合物 A を静脈内注入により 30 分間で単独投与した後のカニクイザルにおける毒性応答および毒物動態特性を評価した。

【0317】

7.1.1 実験手順:

健康で適度に元気なカニクイザル 8 匹（半数が雄、半数が雌）を性別と体重に応じて無作為に 4 つの群に分け、各群で各性別 1 匹とした。第 1 群をビヒクル対照群、第 2 ~ 4 群

を、それぞれ化合物 A の低用量群 (1 mg / kg)、中用量群 (3 mg / kg) および高用量群 (6 mg / kg) とした。全ての動物に、単独静脈内注入により 30 分間で投与し、14 日間観察し、15 日目に剖検を行なった。

【0318】

全ての動物に、詳細な臨床観察および身体検査を投与前に 1 回行った。適応期間および実験期間の間、ケージサイド観察を、解剖予定日は 1 回であったことを除き、1 日 2 回 (午前 1 回、午後 1 回) 行った。実験期間中、第 1 ~ 4 群の全ての動物に、1 日 1 ~ 2 回、詳細に臨床観察を行なった。計量を、群分けする前に 1 回、D 1 の前 (投与前) に 1 回、D 3 の前に 1 回、D 7 の前に 1 回、D 10 の前に 1 回、D 14 の前に 1 回、および D 15 での解剖前に 1 回、それぞれ行った。D 3 および D 14 を除いて、24 ± 1 時間での食物消費量を 1 日 1 回定量した。温度を、適応期間中、D 1 での投与前、D 1 での投与の 2 ~ 4 時間後、および D 1 での投与の 6 ~ 8 時間後、ならびに D 2 (投与の 24 ± 1 時間後) に、それぞれ測定した。心電図を、適応期間中および投与の 2 ~ 4 時間後に 1 回、それぞれ測定した。血圧を、適応期間中、投与の 2 ~ 4 時間後および D 14 に 1 回、それぞれ測定した。

【0319】

臨床検査のため血液試料を採取する前に、動物は一晩絶食させたが、水は制限しなかった。適応期間である D 4 および D 15 (予定の解剖前) での血液、血液凝固、血清の生化学的分析のために、血液試料 (約 5 mL) を大腿静脈からそれぞれ 1 回採取した。また、尿検査のために 1 日前に尿も採取した。

【0320】

第 1 群の動物からは、投与前および投与の 1 時間後に毒物動態の試料を採取し、第 2 ~ 4 群の動物からは、0 時間 (投与前)、0.5 時間 (投与直後)、0.75 時間、1 時間、1.25 時間、1.5 時間、2 時間、2.5 時間、4.5 時間および 8.5 時間で、毒物動態の試料を採取した。血液試料を約 0.5 mL / 匹 / 時点で大腿静脈から採取し、次いで、ヘパリンナトリウムを含有する抗凝固管に採取後に入れ、湿った氷の上で保存した。採取後 2 時間以内に、6800 g で 6 分間、2 ~ 8 °C で遠心することにより、血漿を分離した。研究機関の生物分析研究所により、確立された LC-MS / MS 法を用いて、血漿試料中の化合物 A の濃度を定量した。C_{max}、T_{max}、AUC (0 - t)、AUC (0 - ∞)、t_{1/2}、V_{ss}、V_z、C_l を、WinNonlin 7.0 の非コンパートメントモデルを使用して計算した。

【0321】

解剖予定日 (D 15) にペントバルビタールナトリウムの静脈内注射により全ての動物を安楽死させ、大腿動脈 / 静脈からのしゃ血により動物の死亡を確認した後、肉眼解剖検査を行った。

【0322】

7.1.2 実験結果：

このアッセイの条件下では、カニクイザルに 0 mg / kg、1 mg / kg、3 mg / kg および 6 mg / kg の化合物 A を単独静脈内注入により投与したところ、全ての動物が解剖予定日まで生存した。化合物 A の 3 mg / kg 群および 6 mg / kg 群の雌では、投与部位にわずかな紅斑が見られた。6 mg / kg 化合物 A 群の雄および雌のどちらでも、軟便が観察された。これらの症状は全て、観察期間中に正常に回復した。化合物 A への曝露は用量比例的であった。化合物 A は、1.34 ~ 2.72 L / 時間 / kg の範囲では中程度から高い全身クリアランスを示し、1.80 ~ 3.64 L / kg の範囲では中程度の分布体積定常状態を示した。要約すると、このアッセイの条件下での化合物 A の MTD (最大耐量) は 6 mg / kg より多かった。

【0323】

7.2 化合物 AST-3424 の MTD アッセイ

AST-3424 注射剤を 30 分間の静脈点滴により単独投与した後のカニクイザルにおける最大耐量を評価した。

【0324】

7.2.1 実験手順：

健康で適度に元気なカニクイザル8匹（半数が雄、半数が雌）を性別と体重に応じて無作為に4つの群に分け、各群で各性別1匹とした。第1群をビヒクル対照群、第2～4群を、それぞれAST-3424（3.75%エタノール／1.25%プロピレングリコールを含有）の低用量群（0.5mg/kg）、中用量群（1.0mg/kg）および高用量群（1.5mg/kg）とした。全ての動物に、単独静脈内注入により30分間で投与し、28日間観察し、29日目に剖検を行なった。

【0325】

試験中、以下のパラメータを評価した。すなわち、臨死および死亡の状態、臨床観察、体重、食物摂取、血液の生化学分析、血液凝固および血清、心電図、体温、肉眼解剖、ならびに組織病理学的顕微鏡検査を評価した。

10

【0326】

7.2.2 実験結果：

AST-3424を用量1.5mg/kgおよび1.0mg/kgで投与した雄のカニクイザルでは、それぞれ8日目および16日目に試験物質関連の死亡が見られた。当該動物が死亡する前に、体が痩せ、かつ便が緩んでいることが観察された。また、1.0mg/kg用量群の雄のカニクイザルは、犠牲になる前に以下の様態、すなわち活動の低下、体の冷たさ、体重減少、電解質障害（Na⁺の減少、K⁺の増加）、CKおよびBUNの増加を示し、かつ以下の様態を示した。すなわち、肉眼解剖によって、当該動物の心膜に黄色がかった滲出液が見られ、結腸の局所粘膜に暗赤色のプラークが見られ、そして肺の左葉に2つの白いプラークが見られ、かつそれらのプラークが硬くなっていることが観察された。顕微鏡観察では、当該動物は、肺および心臓に著しい炎症反応があり、結腸の粘膜および粘膜下組織に出血があり、リンパ球壊死のあることが観察された。雌サルでは、試験用試料に関連した死亡は生じなかった。しかし、1.5mg/kgのAST-3424群の雌サルでは、体重減少、食物摂取量の減少、下痢、および嘔吐が見られた。

20

【0327】

雌サルでは、AST-3424を1.5mg/kgの用量で投与したところ、赤血球（red blood cell：RBC）、ヘモグロビンおよび赤血球の比体積の減少、網状赤血球の百分率の増加など、血液指標の変化が観察された。網状赤血球の百分率の増加は、赤血球の減少に対する再生反応であると考えられた。雄サルにAST-3424を1.0mg/kgの用量で投与したところ、白血球数（好中球の百分率）およびフィブリノーゲンが増加し、リンパ球の百分率が減少した。上記の現象は、心臓や肺などの様々な臓器の炎症に関連していた。また、1.5mg/kg用量群の雌サルでは、14日目に総タンパク質およびアルブミンの減少が見られ、28日目に回復した。

30

【0328】

要約すると、AST-3424注射剤0.5、1.0および1.5mg/kgを単独静脈点滴でカニクイザルに30分間投与したところ、1.0mg/kg以上の用量で雄サルの死亡が観察された。したがって、このアッセイの条件下では、単一用量投与の最大耐量は、雄および雌のカニクイザルで、それぞれ0.5mg/kgおよび1.5mg/kgであった。

40

【0329】

上記の一連のアッセイを通じて、化合物AとAST-3424とを比較すると、以下のことがわかる。

【0330】

（1）化合物Aは固体であり、液体であるAST-3424と比較して、貯蔵および輸送、計量が容易で、製剤作業においてより好都合であるという特性を有している。

【0331】

（2）化合物Aには、AST-3424とそれほど変わらないがん細胞死滅効果があり、AKR1C3酵素の活性化に対する感度および特異性が高い。実際、PDX動物モデル

50

において、どちらも同様の治療効果がある。

【0332】

(3) P-gpの基質であり血液脳関門を通過することができないAST-3424と比較して、新規なAKR1C3活性化化合物Aは、P-gpの基質ではなく、血液脳関門を通過することができる。したがって、新規な化合物Aには、中枢神経系、特に原発性脳腫瘍またはがん、ならびに脳に転移した転移性のがんおよび腫瘍に対して治療効果があり、実施例(NCI-H460-Luc2頭蓋内接種CDXモデル)で提供した脳腫瘍モデルに関する実験データによっても、化合物Aには、脳腫瘍(脳転移)の治療において治療効果のあることが確認され、一方、AST-3424には、同モデルについて治療効果がない。

10

【0333】

(4) 化合物Aは、血漿および脳組織のどちらにおいても、AST-3424より半減期が長い。したがって、新規な化合物Aは、投薬サイクルおよび薬用量などの計画に関してAST-3424よりも優れており、脳組織に一定期間存在することにより、その効力を発揮することができる。

【0334】

(5) 化合物Aの最大耐量(MTD)は、AST-3424の最大耐量(MTD)よりも大きく、これは、化合物Aは投与の薬用量の範囲がより広く、患者による耐容性がより高い可能性のあることを示している。

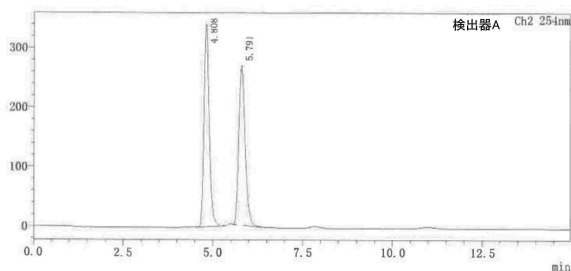
【0335】

(6) 化合物AのR/S異性体である化合物BおよびCは、がん細胞に対し、化合物Aと同等の生体外増殖阻害活性を有する。さらに、化合物A、BおよびCは、AKR1C3酵素の作用によるDNAアルキル化剤の放出機構が同じであり、その機構はR/S構成に依存しない。したがって、化合物Aのように、化合物BおよびCも、血液脳関門を通過し、中枢神経系、特に原発性脳腫瘍またはがん組織、ならびに脳に転移した転移性のがんおよび腫瘍組織に入り、がんの阻害効果を発揮し得ると判断することができる。

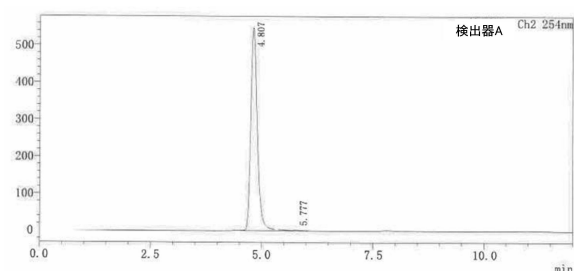
20

【図面】

【図1】



【図2】

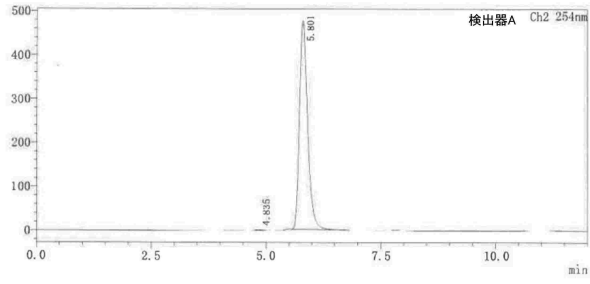


30

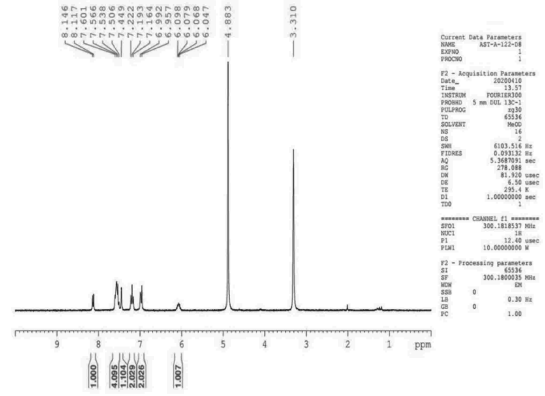
40

50

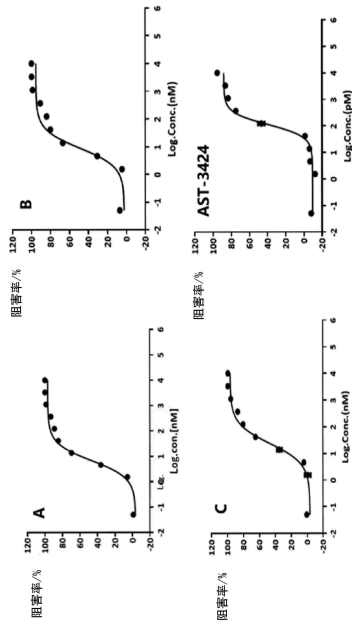
【図 3】



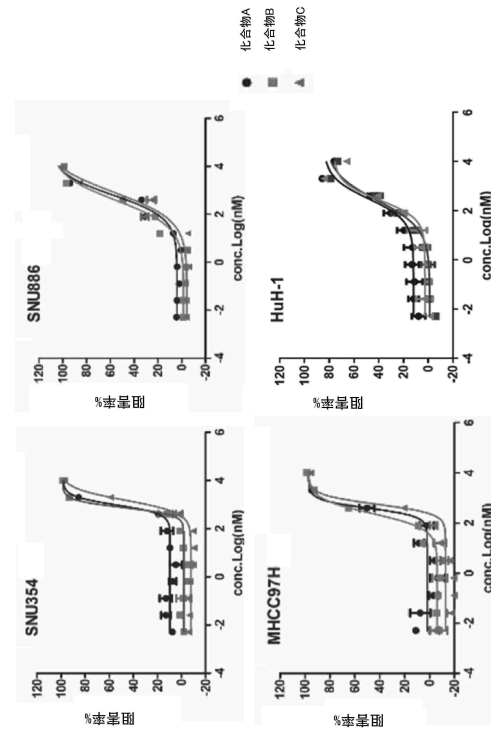
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

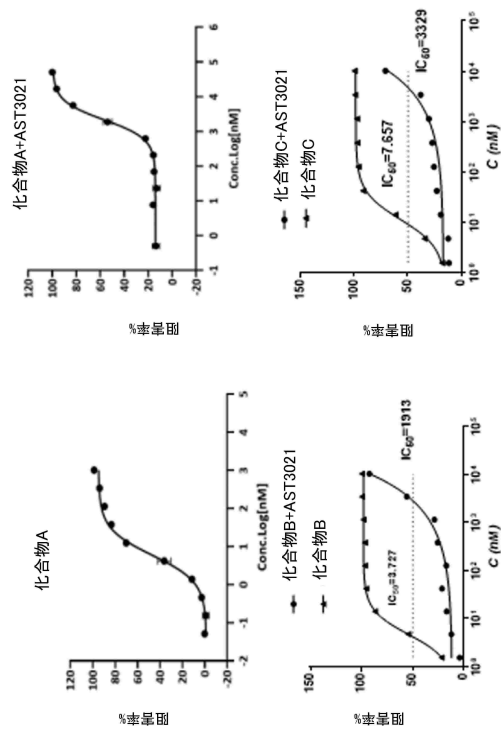
20

30

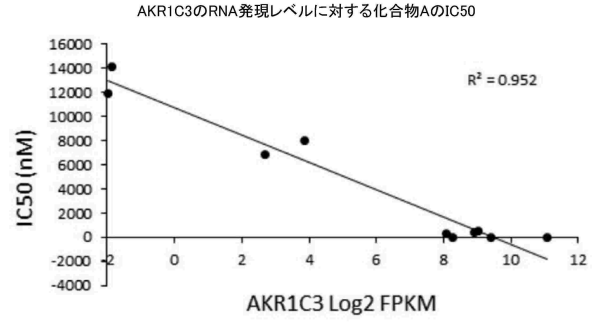
40

50

【図 7】



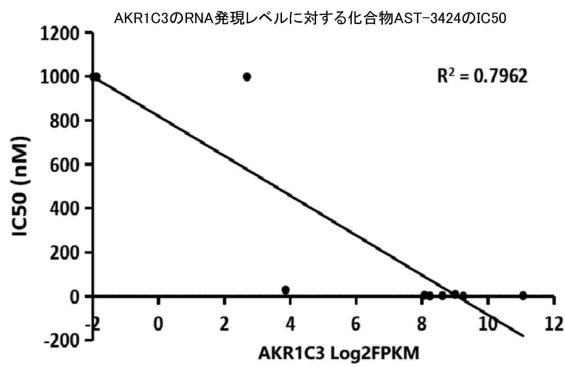
【図 8】



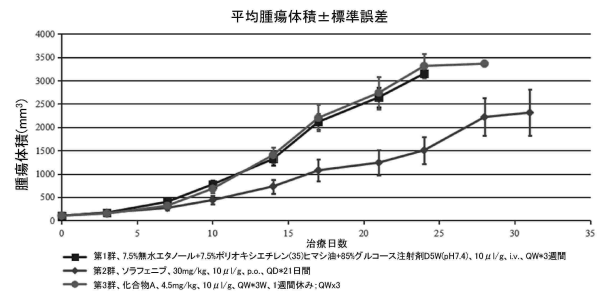
10

20

【図 9】



【図 10】

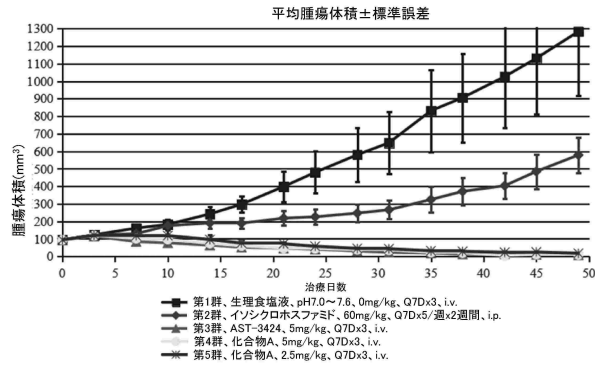


30

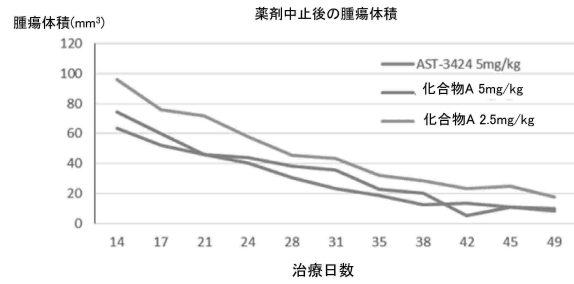
40

50

【図 1 1】

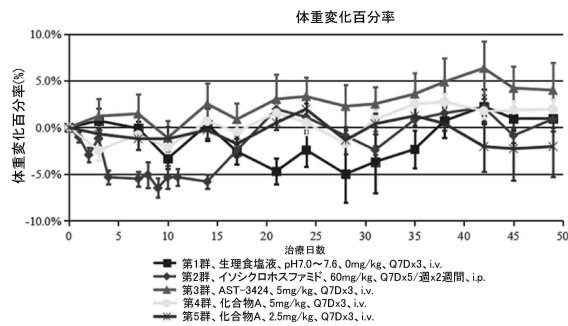


【図 1 2】

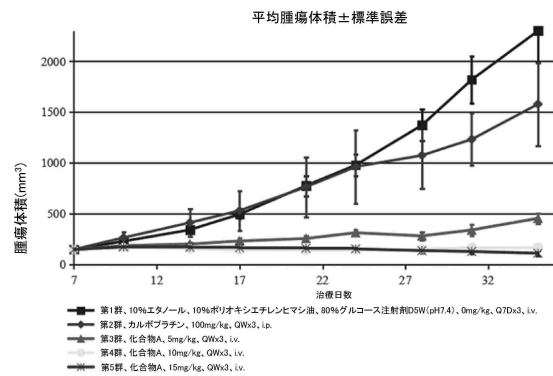


10

【図 1 3】

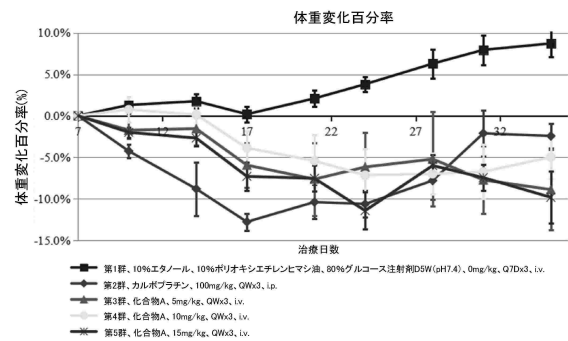


【図 1 4】

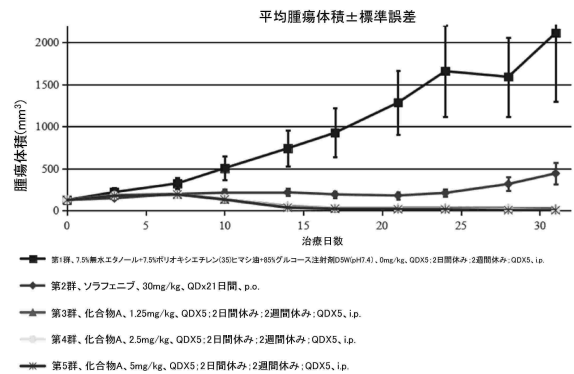


20

【図 1 5】



【図 1 6】

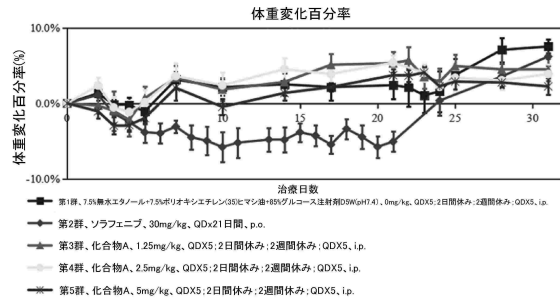


30

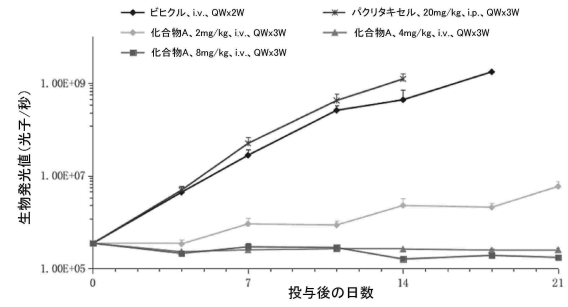
40

50

【図 17】

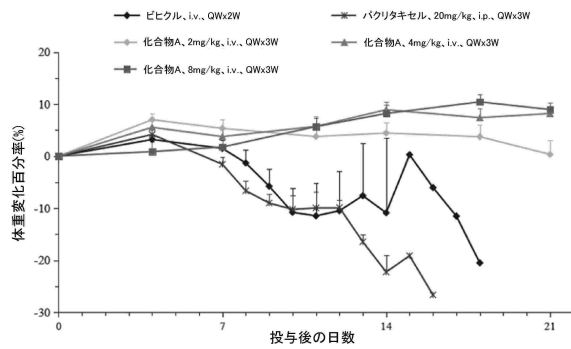


【図 18】

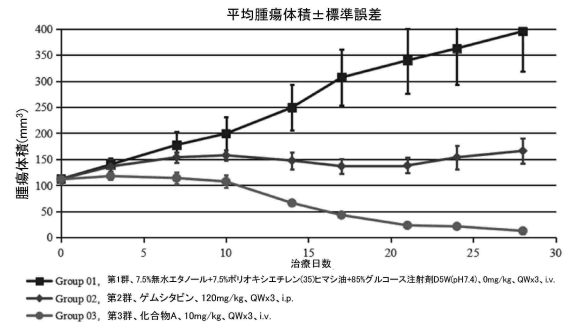


10

【図 19】

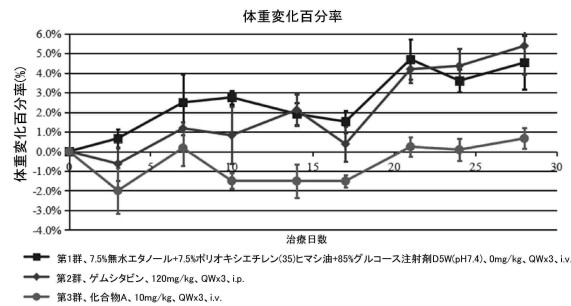


【図 20】

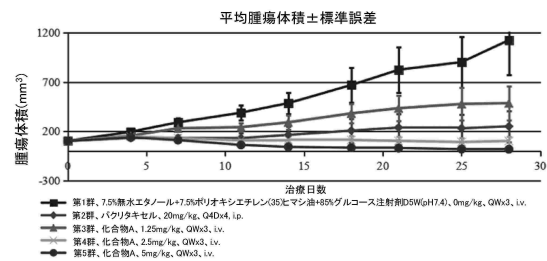


20

【図 21】



【図 22】

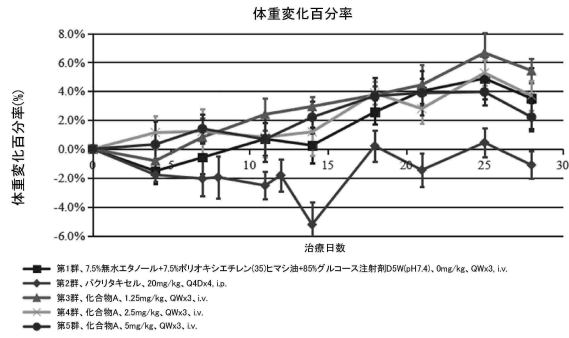


30

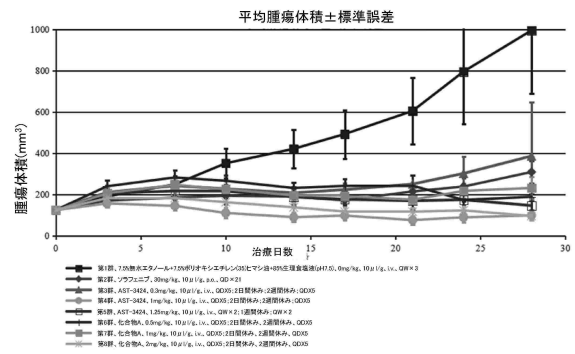
40

50

【図 2 3】

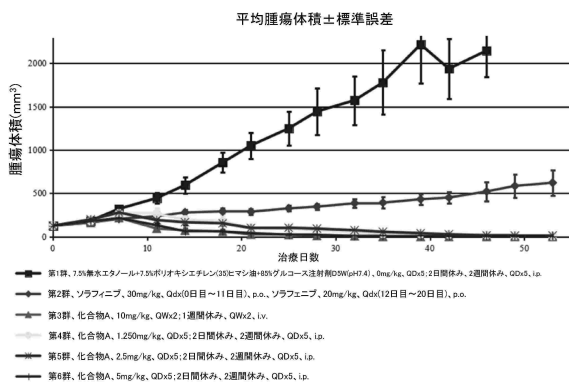


【図 2 4】

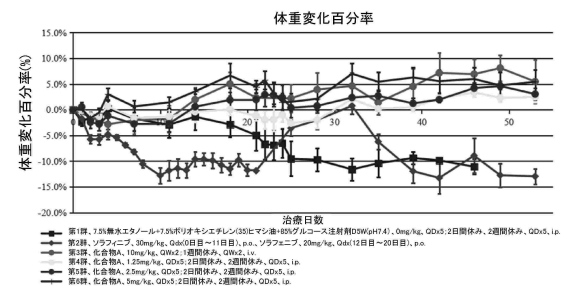


10

【図 2 5】

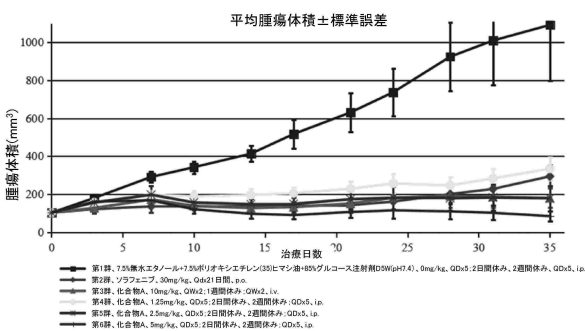


【図 2 6】

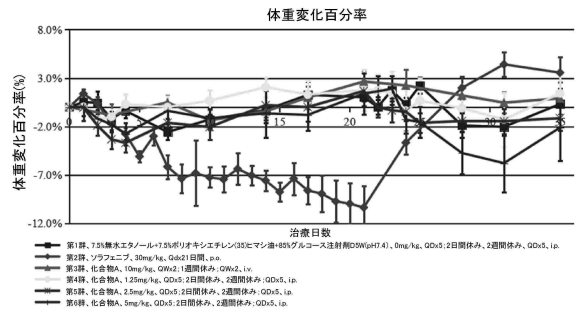


20

【図 2 7】



【図 2 8】

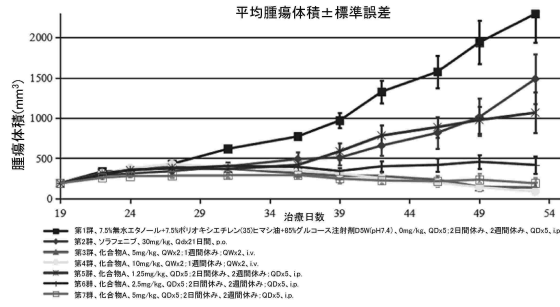


30

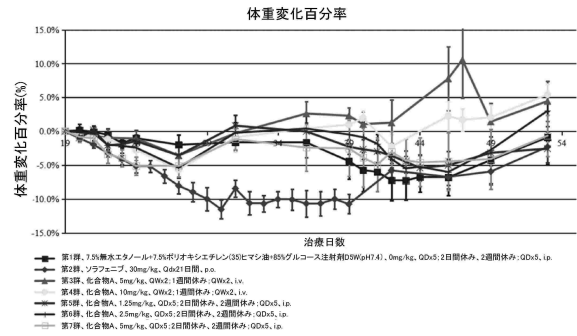
40

50

【図 29】

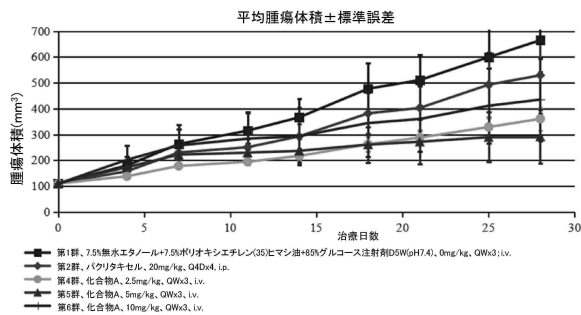


【図 30】

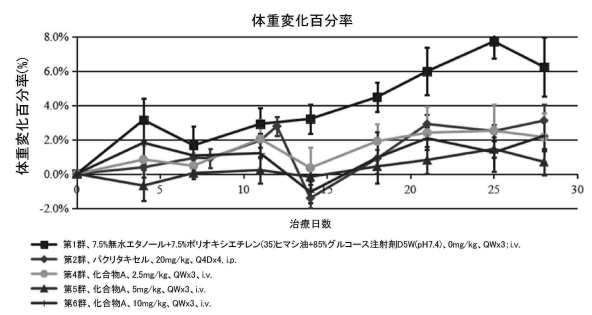


10

【図 31】

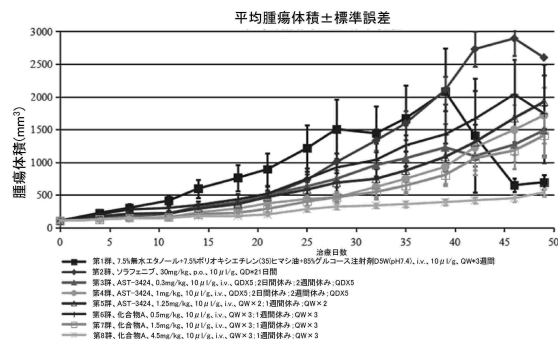


【図 32】

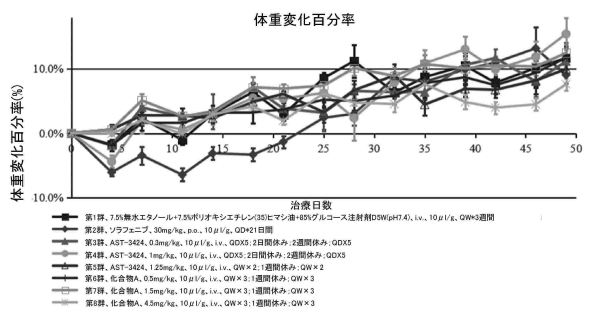


20

【図 33】



【図 34】

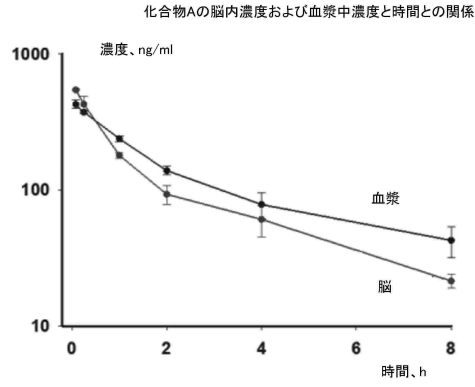


30

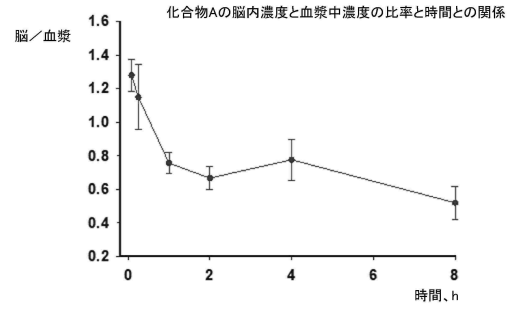
40

50

【図 3 5】

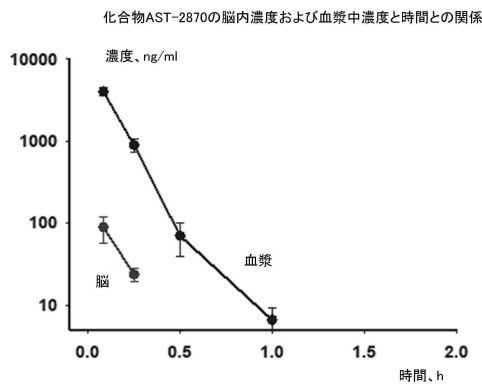


【図 3 6】

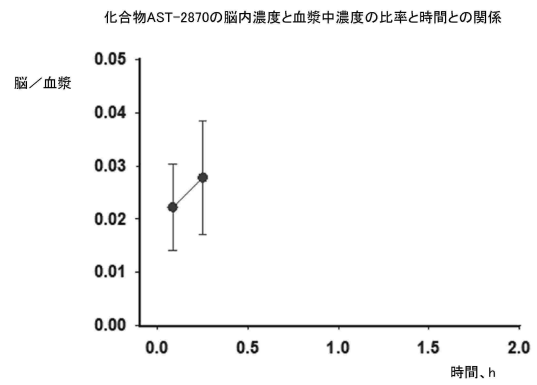


10

【図 3 7】



【図 3 8】



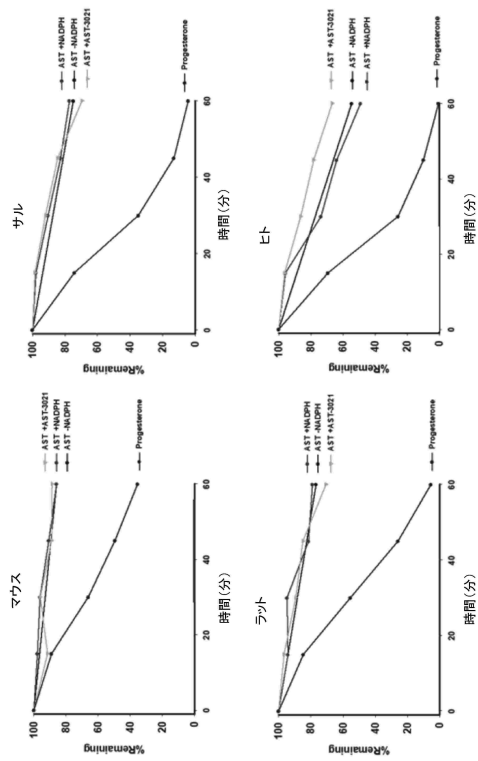
20

30

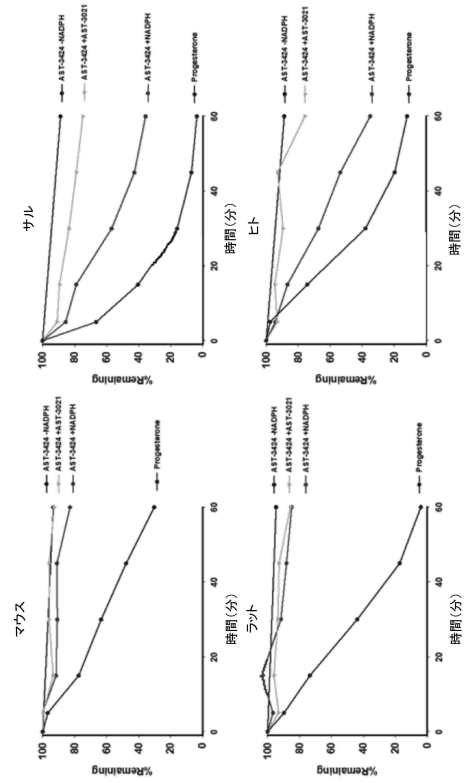
40

50

【図 39】



【図 40】



10

20

30

40

50

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/129077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 9/24(2006.01)i; C07F 9/564(2006.01)i; A61K 31/664(2006.01)i; A61K 31/396(2006.01)i; A61K 31/04(2006.01)i; A61K 31/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, DWPL, VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI: 深圳艾欣达伟, 李安蓉, 段建新, 孟繁英, 齐天阳, 孟腾, 张梦云, 醛基酮还原酶1C3, 醛基酮还原酶1C3, DNA烷化剂, p-糖蛋白, 多药耐药蛋白, 血脑屏障, 同位素变体, 外消旋体, 颅内, 脑癌, 脑肿瘤, 脑转移, 肝癌, 肺癌, 胃癌, 胰腺癌, 直链淀粉-三(3, 5-二甲苯基氨基甲酸酯), Ascentawits, AKR1C3, aldo-keto reductase 1C3, DNA alkylating agent, p-gp, pgp, P-glycoprotein, blood brain barrier, BBB, racemate, brain, cancer, tumour, brain metastasis, AST-2660, AST-3424, TH2870, OBI-3424, TH-3424, CHIRALPAK, TGI, 2553207-65-9, 2553207-92-2, 2553207-66-0, 2553207-61-5, 2553207-58-0

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021083310 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 06 May 2021 (2021-05-06) description, page 1, lines 21-33, page 4, lines 15-16, page 7, line 1 to page 13, line 9, and page 32, line 8 to page 37, line 5	1-13, 16-27, 30-32
X	WO 2020228685 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) description, page 2, line 14, page 5, line 4, and page 7, lines 15-21	1-15
Y	WO 2021083310 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 06 May 2021 (2021-05-06) description, page 1, lines 21-33, page 4, lines 15-16, page 7, line 1 to page 13, line 9, and page 32, line 8 to page 37, line 5	14, 15, 28, 29
Y	WO 2020228685 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) description, page 2, line 14, page 5, line 4, and page 7, lines 15-21	14, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2022

Date of mailing of the international search report

24 June 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/129077

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021120717 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 24 June 2021 (2021-06-24) embodiments 1 and 23	28, 29
A	CN 107530556 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 02 January 2018 (2018-01-02) entire document	1-32
A	CN 108136214 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-32
A	CN 108290911 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 17 July 2018 (2018-07-17) entire document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/129077

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **7-9, 12, 14, 15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 7-9 and 12 relate to a use of the drug according to claim 6 or the compound according to any one of claims 1-5 for the treatment of a cancer patient or tumor patient or a condition induced by cancer or a tumor, or a hyperplasia disease. Claims 14 and 15 relate to a method for the treatment of cancer or a tumor. The use or method relates to a method for the treatment of a disease, and therefore, said claims do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The search report was made on the basis that the title of the subject matter of claims 7-9 and 12 is amended to be "a use of the drug according to claim 6 or the compound according to any one of claims 1-5 for in the preparation of a drug for treating a cancer patient or tumor patient or a condition induced by cancer or a tumor, or a hyperplasia disease" and that the title of the subject matter of claims 14 and 15 is amended to be "a use of the drug according to claim 6 in the preparation of a drug for treating cancer or a tumor".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/129077

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021083310	A1	06 May 2021	CN	114555614	A	27 May 2022
WO	2020228685	A1	19 November 2020	US	2022119429	A1	21 April 2022
				AU	2020275818	A1	25 November 2021
				CA	3140070	A1	19 November 2020
				EP	3971194	A1	23 March 2022
				KR	20220012274	A	03 February 2022
				CN	113853379	A	28 December 2021
WO	2021120717	A1	24 June 2021	TW	202128188	A	01 August 2021
				TW	202135831	A	01 October 2021
				WO	2022052564	A1	17 March 2022
CN	107530556	A	02 January 2018	KR	20190072689	A	25 June 2019
				US	2019225633	A1	25 July 2019
				IL	254377	D0	30 November 2017
				CA	2979251	A1	15 September 2016
				US	2018044360	A1	15 February 2018
				KR	20210095231	A	30 July 2021
				EP	3277380	A1	07 February 2018
				SG	11201707293V	A	30 October 2017
				TW	201706262	A	16 February 2017
				ES	2828026	T3	25 May 2021
				EP	3747508	A1	09 December 2020
				ES	2896960	T3	28 February 2022
				KR	20170128280	A	22 November 2017
				BR	112017019287	A2	02 May 2018
				KR	20190072688	A	25 June 2019
				WO	2016145092	A1	15 September 2016
				AU	2016229136	A1	05 October 2017
				JP	2018513876	A	31 May 2018
				SG	10201913462 X	A	30 March 2020
CN	108136214	A	08 June 2018	JP	2019178172	A	17 October 2019
				US	2021017120	A1	21 January 2021
				KR	20170127463	A	21 November 2017
				SG	10201913709 Q	A	30 March 2020
				WO	2016161342	A2	06 October 2016
				HK	1250959	A1	18 January 2019
				JP	2018511612	A	26 April 2018
				US	2018086693	A1	29 March 2018
				CA	2981494	A1	06 October 2016
				EP	3277381	A2	07 February 2018
				SG	CN 11201707375 U	A	30 October 2017
				IL	254769	D0	31 December 2017
				TW	201706267	A	16 February 2017
				AU	2016244000	A1	12 October 2017
				CN	112142692	A	29 December 2020
				BR	112017021167	A2	03 July 2018
				KR	20190075145	A	28 June 2019
CN	108290911	A	17 July 2018	JP	2018517710	A	05 July 2018
				TW	201726695	A	01 August 2017
				ES	2781398	T3	01 September 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

International application No.

PCT/CN2021/129077

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 3390415 A1	24 October 2018
		IL 256569 D0	28 February 2018
		CA 2990696 A1	26 May 2017
		KR 20170130615 A	28 November 2017
		AU 2016357728 A1	30 November 2017
		WO 2017087428 A1	26 May 2017
		BR 112017025778 A2	14 August 2018
		HK 1250988 A1	18 January 2019

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/129077

A. 主题的分类 C07F 9/24(2006.01)i; C07F 9/564(2006.01)i; A61K 31/664(2006.01)i; A61K 31/396(2006.01)i; A61K 31/04(2006.01)i; A61K 31/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07F; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, DWPI, VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 深圳艾欣达伟, 李安蓉, 段建新, 孟繁英, 齐天阳, 孟腾, 张梦云, 醛基酮还原酶1C3, 醛酮还原酶1C3, DNA烷化剂, p-糖蛋白, 多药耐药蛋白, 血脑屏障, 同位素变体, 外消旋体, 颅内, 脑癌, 脑肿瘤, 脑转移, 肝癌, 肺癌, 胃癌, 胰腺癌, 直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯), Ascentawits, AKR1C3, aldo-keto reductase 1C3, DNA alkylating agent, p-gp, pgp, P-glycoprotein, blood brain barrier, BBB, racemate, brain, cancer, tumour, brain metastasis, AST-2660, AST-3424, TH2870, OBI-3424, TH-3424, CHIRALPAK, TGI, 2553207-65-9, 2553207-92-2, 2553207-66-0, 2553207-61-5, 2553207-58-0		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2021083310 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年5月6日 (2021 - 05 - 06) 说明书第1页第21-33行, 第4页第15-16行, 第7页第1行至第13页第9行, 第32页第8行至第37页第5行	1-13, 16-27, 30-32
X	WO 2020228685 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2020年11月19日 (2020 - 11 - 19) 说明书第2页第14行, 第5页第4行, 第7页第15-21行	1-15
Y	WO 2021083310 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年5月6日 (2021 - 05 - 06) 说明书第1页第21-33行, 第4页第15-16行, 第7页第1行至第13页第9行, 第32页第8行至第37页第5行	14, 15, 28, 29
Y	WO 2020228685 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2020年11月19日 (2020 - 11 - 19) 说明书第2页第14行, 第5页第4行, 第7页第15-21行	14, 15
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2022年6月13日		国际检索报告邮寄日期 2022年6月24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 韩松 电话号码 (86-10)53961906

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际申请号

PCT/CN2021/129077

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	W0 2021120717 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年6月24日 (2021 - 06 - 24) 实施例1和23	28, 29
A	CN 107530556 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年1月2日 (2018 - 01 - 02) 全文	1-32
A	CN 108136214 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年6月8日 (2018 - 06 - 08) 全文	1-32
A	CN 108290911 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年7月17日 (2018 - 07 - 17) 全文	1-32

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2021/129077
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1. ☒	权利要求： 7-9, 12, 14, 15 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] 权利要求7-9, 12涉及权利要求6所述的药物或权利要求1-5任一项所述的化合物用于治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的用途，权利要求14, 15涉及治疗癌症或肿瘤的方法，该用途或方法属于疾病的治疗方法，不符合PCT实施细则第39.1(iv)的规定。本检索报告是基于权利要求7-9, 12的主题名称修改为“权利要求6所述的药物或权利要求1-5任一项所述的化合物用于制备治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物的用途”，权利要求14, 15的主题名称修改为“权利要求6所述的药物在制备治疗癌症或肿瘤的药物用途”作出的。	10
2. ☐	权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：	
3. ☐	权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/129077

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021083310	A1	2021年5月6日	CN	114555614	A	2022年5月27日
WO	2020228685	A1	2020年11月19日	US	2022119429	A1	2022年4月21日
				AU	2020275818	A1	2021年11月25日
				CA	3140070	A1	2020年11月19日
				EP	3971194	A1	2022年3月23日
				KR	20220012274	A	2022年2月3日
				CN	113853379	A	2021年12月28日
WO	2021120717	A1	2021年6月24日	TW	202128188	A	2021年8月1日
				TW	202135831	A	2021年10月1日
				WO	2022052564	A1	2022年3月17日
CN	107530556	A	2018年1月2日	KR	20190072689	A	2019年6月25日
				US	2019225633	A1	2019年7月25日
				IL	254377	D0	2017年11月30日
				CA	2979251	A1	2016年9月15日
				US	2018044360	A1	2018年2月15日
				KR	20210095231	A	2021年7月30日
				EP	3277380	A1	2018年2月7日
				SG	11201707293V	A	2017年10月30日
				TW	201706262	A	2017年2月16日
				ES	2828026	T3	2021年5月25日
				EP	3747508	A1	2020年12月9日
				ES	2896960	T3	2022年2月28日
				KR	20170128280	A	2017年11月22日
				BR	112017019287	A2	2018年5月2日
				KR	20190072688	A	2019年6月25日
				WO	2016145092	A1	2016年9月15日
				AU	2016229136	A1	2017年10月5日
				JP	2018513876	A	2018年5月31日
				SG	10201913462X	A	2020年3月30日
CN	108136214	A	2018年6月8日	JP	2019178172	A	2019年10月17日
				US	2021017120	A1	2021年1月21日
				KR	20170127463	A	2017年11月21日
				SG	10201913709Q	A	2020年3月30日
				WO	2016161342	A2	2016年10月6日
				HK	1250959	A1	2019年1月18日
				JP	2018511612	A	2018年4月26日
				US	2018086693	A1	2018年3月29日
				CA	2981494	A1	2016年10月6日
				EP	3277381	A2	2018年2月7日
				SG	11201707375U	A	2017年10月30日
				IL	254769	D0	2017年12月31日
				TW	201706267	A	2017年2月16日
				AU	2016244000	A1	2017年10月12日
				CN	112142692	A	2020年12月29日
				BR	112017021167	A2	2018年7月3日
				KR	20190075145	A	2019年6月28日
CN	108290911	A	2018年7月17日	JP	2018517710	A	2018年7月5日
				TW	201726695	A	2017年8月1日
				ES	2781398	T3	2020年9月1日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

PCT/CN2021/129077

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K	31/664 (2006.01)	A 6 1 K	31/664	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 3
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/26 (2006.01)	C 1 2 Q	1/26	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	

G,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY, MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU, RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 ドン、シェンジェン、ピンシャン ディストリクト、ケンジ ストリート、ジンシャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー 1 4、バイオメディカル イノベーション インダストリアル パーク、ビルディング 1 0、フロア 1 0、ルーム 1 0 0 3

(72)発明者

デュアン ジャンーシン

中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グアンドン、シェンジェン、ピンシャン ディストリクト、ケンジ ストリート、ジンシャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー 1 4、バイオメディカル イノベーション インダストリアル パーク、ビルディング 1 0、フロア 1 0、ルーム 1 0 0 3

(72)発明者

モン ファンイン

アメリカ合衆国、9 4 1 2 1 カリフォルニア州、サンフランシスコ、4 7 番アヴェニュー 8 3 0

(72)発明者

チ テンヤン

中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グアンドン、シェンジェン、ピンシャン ディストリクト、ケンジ ストリート、ジンシャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー 1 4、バイオメディカル イノベーション インダストリアル パーク、ビルディング 1 0、フロア 1 0、ルーム 1 0 0 3

(72)発明者

モン タン

中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グアンドン、シェンジェン、ピンシャン ディストリクト、ケンジ ストリート、ジンシャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー 1 4、バイオメディカル イノベーション インダストリアル パーク、ビルディング 1 0、フロア 1 0、ルーム 1 0 0 3

(72)発明者

ツァン モンギン

中華人民共和国、5 1 8 1 2 2 グアンドン、シェンジェン、ピンシャン ディストリクト、ケンジ ストリート、ジンシャ コミュニティ、ジンファイ ロード ナンバー 1 4、バイオメディカル イノベーション インダストリアル パーク、ビルディング 1 0、フロア 1 0、ルーム 1 0 0 3

F ターム (参考)

4B063 QA01 QA13 QQ02 QQ08 QQ22 QQ42 QQ52 QR02 QR32 QR35
 QR72 QR77 QS36 QX01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 DA34 MA01 MA04 MA17 MA31 MA35
 MA37 MA41 MA43 MA44 MA52 MA66 NA14 NA15 ZA15 ZA59 ZA66
 ZA68 ZA75 ZB26
 4H006 AA01 AA02 AA03 AB28 AB84
 4H050 AA01 AA03 AB28