

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-500315

(P2017-500315A)

(43) 公表日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 F 15/00 (2006. 01)	C 0 7 F 15/00	C S P F 4 C 0 8 4
A 6 1 K 33/24 (2006. 01)	A 6 1 K 33/24	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 5 0
A 6 1 K 31/616 (2006. 01)	A 6 1 K 31/616	
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-539133 (P2016-539133)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月12日 (2014. 12. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年6月13日 (2016. 6. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/069997
 (87) 国際公開番号 W02015/089389
 (87) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015. 6. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/915, 110
 (32) 優先日 平成25年12月12日 (2013. 12. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/976, 559
 (32) 優先日 平成26年4月8日 (2014. 4. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500564035
 ザ ユニヴァーシティ オブ ジョージア
 リサーチファウンデーション, インク
 .
 アメリカ合衆国 30602-7411
 ジョージア州 アテネ ボイド グラデュ
 エート スタディーズ リサーチ センタ
 ー (番地なし)
 (74) 代理人 100086771
 弁理士 西島 孝喜
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シスプラチン及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤の放出のためのプロドラッグ

(57) 【要約】

P t (I V) プロドラッグは、1 種以上のコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤を含む。P t (I V) の P t (I I) への還元は、シスプラチン及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤をもたらすことができる。コンセプトの実証のために、シスプラチン及びアスピリンを生み出すことができる P t (I V) プロドラッグ、プラチン-A が合成された。プラチン-A は、優れた抗癌性及び抗炎症性を示したが、それらは、シスプラチンの遊離製剤とアスピリンの組み合わせよりも良好であった。

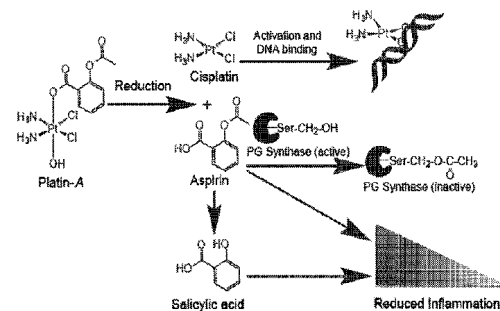


FIG. 5

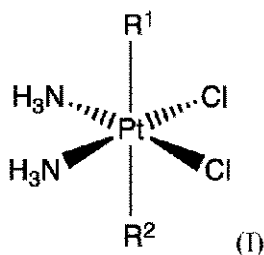
【選択図】 図5

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造を有する Pt (IV) 化合物：

【化 1】



10

(式中、

R^1 は、 $-(L^1)_m-(R^3)_n$ であり；

R^2 は、OH又は $-(L^2)_x-(R^4)_y$ であり；

R^3 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤であり；

R^4 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤又は標的化部分であり、ここで、 R^4 がコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤である場合、 R^3 と R^4 は同じ又は異なっており；

L^1 は、リンカーであり；

20

L^2 は、リンカーであり、 L^1 と L^2 は、両方存在する場合、同じ又は異なっており；

m 及び x は、独立に、0又は1であり；且つ

n 及び y は、独立に、1以上の整数である）。

【請求項 2】

$m = 0$ であり、且つ $n = 1$ である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

$x = 0$ であり、且つ $y = 1$ である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

$m = 1$ であり、且つ n が 1 から 4 の整数である、請求項 1 又は 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

30

$x = 1$ であり、且つ y が 1 から 4 の整数である、請求項 1、2、及び 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

R^4 が、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

R^4 が、コンジュゲートされたアスピリンである、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

R^1 が、コンジュゲートされた非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 9】

R^1 が、COX-1 のコンジュゲートされた阻害剤、COX-2 のコンジュゲートされた阻害剤、又は COX-1 及び COX-2 のコンジュゲートされた阻害剤である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】

R^1 が、コンジュゲートされたアスピリンである、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

R^1 H がサリチル酸である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の化合物。

50

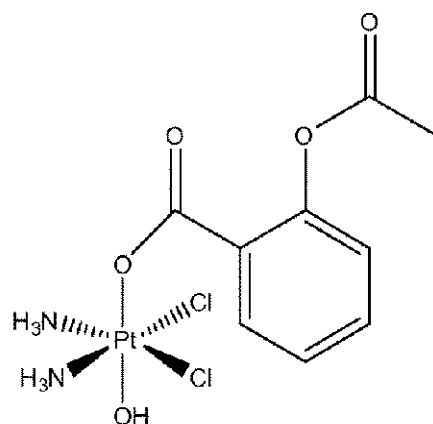
【請求項 12】

Pt(IV)のPt(II)への還元が、シスプラチン、 R^1H 、及び R^2H を生み出す、請求項1～11のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 13】

前記式Iによる化合物が下記である、請求項1に記載の化合物

【化2】



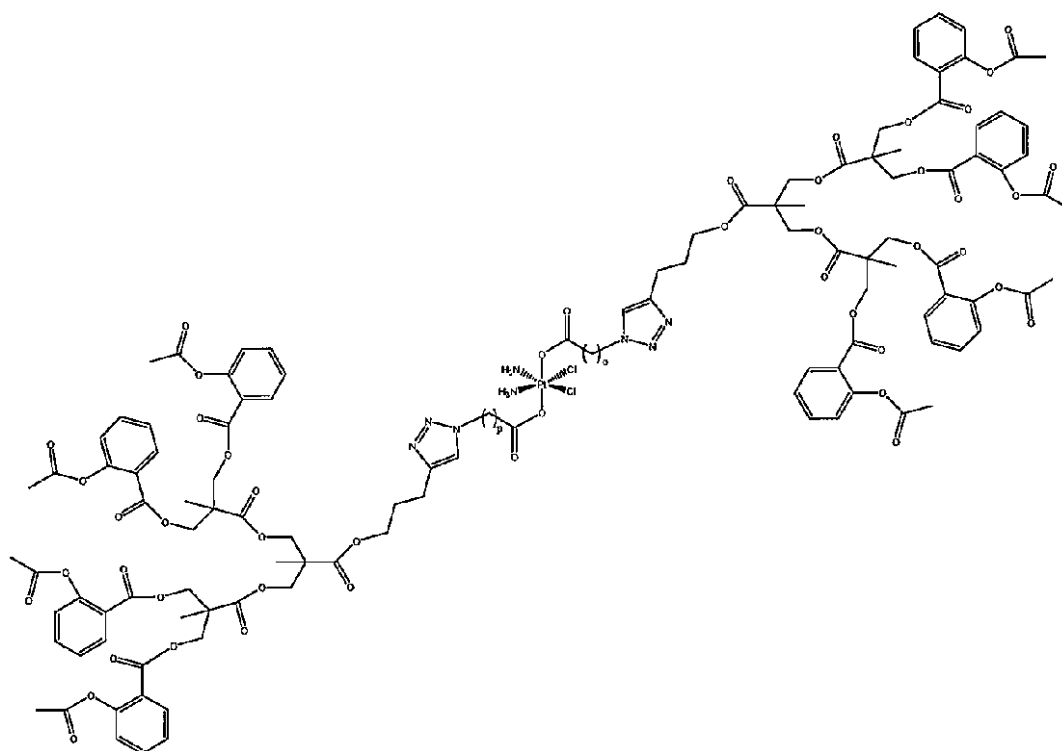
10

20

【請求項 14】

前記式Iによる化合物が下記である、請求項1に記載の化合物：

【化3】



30

40

(式中、o及びpは、それぞれ独立に、3から7である)。

50

【請求項 15】

o = 5 であり、且つ p = 5 である、請求項 14 に記載の化合物。

【請求項 16】

その必要のある患者における癌を治療するための、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 17】

前記癌が高度炎症と関連している、請求項 16 に記載の化合物の使用。

【請求項 18】

前記癌が前立腺癌である、請求項 16 又は 17 に記載の化合物の使用。

【請求項 19】

その必要のある患者における炎症性疾患を治療するための、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 20】

その必要のある患者における癌又は炎症性疾患を治療するための医薬品の製造における、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

【請求項 21】

請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の化合物を対象に投与することを含む方法。

【請求項 22】

癌又は炎症性疾患のリスクがある、又はそれを患っている患者を治療する方法であって、有効量の請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の化合物を前記患者に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援の声明

本発明は、合衆国政府の国防総省により与えられた、認可番号 W 8 1 X W H - 1 2 - 1 - 0 4 0 6 の政府支援によりなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

関連出願

本願は、本明細書に示される開示と矛盾しない程度にその全体が引用により本明細書に組み込まれる、2013 年 12 月 12 日に出願された米国仮特許出願第 61/915,110 号の利益を主張する。

【0003】

分野

本開示は、対象への投与の後でシスプラチン及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤を放出するように構成されたプロドラッグ；及びそれに関連する癌を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景及び序論

慢性炎症は、ヒト癌のおよそ 20% において重要な役割を果たしている。前立腺癌 (PCa) は、米国の男性において最も頻繁に診断される癌であり、癌の死の 2 番目の原因である。PCa を有する患者は、必然的に、ホルモン非依存性の疾患に進行する。アンドロゲン遮断の存在下で進行する PCa は、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) と定義される。複雑な免疫媒介性のプロセス及び炎症が、去勢状況における PCa 進行に決定的な役割を果たし、癌関連の炎症は、機能上、転移の形成に重要な役割を果たす。

【0005】

シス・ジアンミンジクロロ白金 (II) 又はシスプラチンは、現在、種々の固形腫瘍を治療するのに利用可能な最も有効な抗癌剤の 1 つである。アポトーシス死に対する抵抗性は、進行性 PCa の独特な特徴であり、ホルモン不応性疾患のシスプラチン系の治療戦略がうまくいかない原因の 1 つである。

10

20

30

40

50

【0006】

非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）は、癌化学予防におけるその明示的な可能性のため、P C a の化学治療手法に付け加える魅力的なものになり得る。NSAIDの主な標的は、プロスタグランジン（PG）の形成における律速工程を触媒するシクロオキシゲナーゼ（COX）アイソフォーム、COX-1及びCOX-2である。PGは、アラキドン酸から誘導される脂質分子の群であり、炎症反応を発生させる重要な役割を果たす。誘導性アイソフォームCOX-2及びその産物、特にPGE2は、炎症反応、アポトーシスの阻害、及び抵抗性の誘導に関与している。上昇したレベルのPGE及びCOX-2 mRNAは、ヒトP C a 試料の83%において過剰発現されている。

【0007】

10

シスプラチンの使用は、腎毒性及び聴覚毒性などのその副作用のために限定されている。腎毒性は、食塩水補給を利用して低減できる。しかし、シスプラチン聴覚毒性に対する保護的な治療手法は全くない。アセチルサリチル酸とCOXのSer-530残基との間のエステル交換によりCOX-1及びCOX-2を不可逆的に阻害することが知られているアセチルサリチル酸すなわちアスピリンは、聴覚、バランス、及び腎臓に関連するシスプラチンが誘発する副作用の重症度を減少させる能力も有する。アスピリン及びその代謝物サリチル酸は、いくつかの抗炎症性サイトカインを誘導して、炎症を減少させる。シスプラチンとアスピリンとの組み合わせは、高悪性度P C a を管理する魅力的な戦略になり得る。

【0008】

20

シスプラチンとアスピリン混合物との組み合わせの有益な効果がある程度研究された。しかし、薬物組み合わせを試験する際には多くの難題が存在する。遊離の薬物製剤を投与する際の主要な障害には、2種の薬物の比率の選択、正しい薬物比率の決定的な送達、検討している標的への曝露、並びに個別の薬物動態及び生体内分布パラメーターがある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示は、とりわけ、Pt(IV)のPt(II)への還元と同時にPt(II)シスプラチン及び1種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤を生み出すPt(IV)プロドラッグを記載する。薬物組み合わせを含む単一のプロドラッグは、先に議論された難題のいくつかを潜在的に克服できる。

30

【0010】

本明細書に記載される種々の実施形態において、Pt(IV)プロドラッグを使用して、とりわけ、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の抗炎症性により、シスプラチンにより起こる腎毒性を改善できる。本明細書に記載される試験において、プラチン-A（Platin-A）は、Ptの還元と同時にシスプラチン及びアスピリンを生成できるPt(IV)プロドラッグであり、優れた抗癌性及び抗炎症性を示した。プラチン-Aで得られた結果は、遊離のシスプラチン及びアスピリンの製剤の組み合わせよりも良好であった。

【0011】

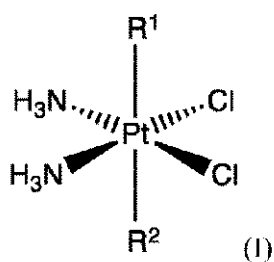
40

本明細書に記載されるPt(IV)プロドラッグは、直接Pt(IV)に結合又はリンカーを介してPt(IV)に結合した1種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤を含み得る。クリックケミストリーなどの容易に利用できる化学的技法を利用して、1種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤がリンカーを介してPt(IV)に結合している、本明細書に記載されるPt(IV)プロドラッグを合成できる。

【0012】

本明細書に記載される種々の実施形態において、プロドラッグになり得る化合物は、以下の構造を有する：

【化 1】



10

(式中

R^1 は、 $-(L^1)_m-(R^3)_n$ であり；

R^2 は、OH又は $-(L^2)_x-(R^4)_y$ であり；

R^3 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤であり；

R^4 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤又は標的化部分であり、ここで、 R^4 がコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤である場合、 R^3 と R^4 は同じ又は異なっており；

L^1 は、リンカーであり；

L^2 は、リンカーであり、ここで、 L^1 と L^2 は、両方とも存在する場合、同じ又は異なっており；

20

m 及び x は、独立に、0又は1であり；且つ

n 及び y は、独立に、1以上の整数である）。

【0013】

いくつかの実施形態において、 $m=0$ である場合、 $n=1$ であり、 $x=0$ である場合、 $y=1$ である。

【0014】

いくつかの実施形態において、式 I の n 及び y は、1 から 4 の整数など、1 から 8 の整数である。リンカー、 L^1 及び L^2 は、使用される場合、式 I の化合物に存在する R^3 及び R^4 の部分の数を制御するように選択できる。すなわち、リンカー、 L^1 及び L^2 は、 n 及び y の値を決めることができる。種々の実施形態において、式 I の R^4 は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤である。

30

【0015】

式 I による化合物の Pt (IV) が Pt (II) へ還元されると、シスプラチン、 R^1H 、及び R^2H が生じる。 $m=0$ 且つ $n=1$ である場合、 R^1H は R^3H であり、 R^3H はシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤である。 $x=0$ 且つ $y=1$ である場合、 R^2H は R^4H であり、 R^4H は、水、COX 阻害剤、還元された細胞標的化部分などである。種々の実施形態において、 R^4H は COX 阻害剤である。

【0016】

いくつかの実施形態において、 R^3H と R^4H の一方又は両方はアスピリンである。

【0017】

40

式 I による化合物は、その必要のある対象における前立腺癌などの癌の治療に使用できる。式 I による化合物は、別法として又は追加的に、その必要のある対象における炎症性疾患の治療に使用できる。

【0018】

本明細書に示される種々の実施形態の 1 つ以上の、シスプラチン及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤を含む以前の併用療法より優る利点は、添付される図面と共に読まれれば以下の詳細な説明に基づいて当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図 1】図 1 は、本明細書に記載される実施形態による化合物を合成する反応スキームの

50

実施形態を表す概略図である。

【図2】図2：DMSO-d₆中の「プラチン-A」の¹H及び¹³C NMR。

【図3】図3：DMSO-d₆中のプラチン-Aの¹⁹⁵Pt NMRスペクトル。

【図4】図4：「プラチン-A」の陽イオンESI-HRMSスペクトル及び同位体ピークパターン分析。

【図5】図5は、本明細書に記載される実施形態による化合物、プラチン-Aの構造、及びその作用機序の実施形態を表す概略図である。

【図6】図6：2つの異なるpH値の1：4ジメチホルムアミド（dimethylformamide）（DMF）－リン酸緩衝液－0.1M KCl中の「プラチン-A」のサイクリックボルタモグラム。上のグラフは、pH7.4でスキャン速度を変えた「プラチン-A」のサイクリックボルタモグラムを示す。下のグラフは、pH6.4でスキャン速度を変えた「プラチン-A」のサイクリックボルタモグラムを示す。

【図7】図7：アスコルビン酸ナトリウムの存在下でのプラチン-Aと5'-GMPとの反応により得られたPt-GG付加物のMALDI-TOF MSクロマトグラム。示された同位体のピークパターンは、Pt-GG付加物中のPt種の存在を確認する。

【図8】図8：プラチン-Aとアスコルビン酸ナトリウムの反応生成物のHPLC分析。比較のために、純粋なアスピリン及びサリチル酸を使用した。利用した波長：280nm。

【図9】図9：（A）PCa細胞株中のプラチン-Aの代表的な細胞傷害性プロファイル並びにシスプラチン及びシスプラチンとアスピリンの等モルの混合物の活性との比較。（B）PC3細胞のアネキシンV-FITC/PI染色によるプラチン-Aのアポトーシス誘導性。4つの別個の表現型：生細胞（左下の四半分）；早期のアポトーシスにある細胞（右下の四半分）；末期のアポトーシス又は壊死にある細胞（右上の四半分）；細胞破片（左上の四半分）。

【図10】図10：第2日のPC3細胞（1×10⁶細胞/mL）を、アポトーシス及び壊死の陽性対照としてエトポシド（100μM、12時間）及びH₂O₂（1mM、45分）により処理し、アネキシンV-FITC/PI染色により分析した。4つの別個の表現型：生細胞（左下の四半分）；早期のアポトーシスにある細胞（右下の四半分）；末期のアポトーシス又は壊死にある細胞（右上の四半分）；細胞破片（左上の四半分）。

【図11】図11：EIAを利用する、プラチン-AがヒッジCOX-1及びCOX-2を阻害する能力。

【図12】図12：酵素免疫アッセイ（EIA）を利用する、異なる濃度でのプラチン-AのCOX阻害性及びアスピリンとの比較。

【図13】図13：PC3細胞中のCOX-2発現の免疫蛍光法分析。（A）PC3細胞中のCOX-2発現並びにアスピリン（1μM）、及び等モル比のシスプラチンとアスピリン（それぞれ1μM）、及びプラチン-A（1μM）の作用、（B）TNF-αによる処理時のPC3細胞中のCOX-2レベルに対する作用並びにアスピリン（1μM）、及び等モル比のシスプラチンとアスピリン（それぞれ1μM）、及びプラチン-A（1μM）のTNF-α刺激細胞に対する作用。細胞はDAPI染色で青に染色された。COX-2は、一次ウサギポリクローナル抗体で標識され、その後に二次AlexaFluor 488ヤギ抗ウサギ抗体で標識された。スケールバーは全て25μmである。

【図14】図14：アスピリン（1μM）、等モル比のシスプラチンとアスピリン（それぞれ1μM）、及びプラチン-A（1μM）によるPC3細胞中のCOX-2阻害の定量化（左）。TNF-αによる処理（右）及びその後のアスピリン（1μM）、等モル比のシスプラチンとアスピリン（それぞれ1μM）、及びプラチン-A（1μM）による処理後のCOX-2の発現レベル（右）。COX-2は、一次ウサギポリクローナル抗体により標識され、その後に二次AlexaFluor（登録商標）488ヤギ抗ウサギ抗体により標識された。データは、発光波長488nm及び励起波長519nmで、プレートリーダーで記録された。統計分析は、Tukeyポストホック検定（post hoc test）と共に一元配置分散分析を利用して実施された。

10

20

30

40

50

【図 15】図 15：プラチン-A の抗炎症。(A) RAW 264.7 マクロファージは LPS により処理されて、炎症が誘導され、シスプラチン、アスピリン、シスプラチンとアスピリンの等モル混合物、及びプラチン-A の、IL-6、TNF- α 、及び IL-10 のレベルに対する作用が、ELISA を利用して試験された。(B) RAW 264.7 マクロファージは、シスプラチン、アスピリン、シスプラチンとアスピリンの等モル混合物、及びプラチン-A により処理され、それに続いて LPS が加えられ、IL-6、TNF- α 、及び IL-10 のレベルに対する被験物品の予防作用が、ELISA を利用して試験された。統計分析は、Tukey 事後検定と共に一元配置分散分析を利用して実施された。

10

【図 16】図 16：プラチン-A (10 μ M)、シスプラチン (10 μ M)、アスピリン (10 μ M)、及びシスプラチン (10 μ M) + アスピリン (10 μ M) の、インキュベーション時間 24 時間の LPS 活性化 RAW 264.7 マクロファージに対する細胞傷害性。

20

【図 17】図 17：腫瘍微小環境におけるプラチン-A の作用機序。

【発明を実施するための形態】

【0020】

概略図は、必ずしも一定の比率でない。図に使用される同様な数は、同様な成分、工程などを指す。しかし、所与の図中の成分に言及するための数の使用が、同じ数で表示される別な図中のその成分を限定するものではないことが理解されるだろう。さらに、複数の成分に言及するための異なる数の使用は、異なる数が付いた成分が同じにも類似にもなり得ないことを示すものではない。

【0021】

詳細な説明

以下の詳細な説明において、本明細書の一部を形成し、実例として装置、システム、及び方法のいくつかの具体的な実施形態が示されている添付図面が参照される。他の実施形態が企図され、本開示の範囲又は趣旨から逸脱せずになされ得ることが理解されよう。したがって、以下の詳細な説明は、限定的な意味にとられるべきではない。

【0022】

本開示は、とりわけ、Pt (IV) の Pt (II) への還元と同時に Pt (II) シスプラチン及び 1 種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤をもたらす Pt (IV) プロドラッグを説明する。本明細書に記載される Pt (IV) プロドラッグは、Pt (IV) に直接結合又はリンカーを介して Pt (IV) に結合した 1 種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤を含み得る。クリックケミストリーなどの容易に利用可能な化学技法を利用して、1 種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤がリンカーを介して Pt (IV) に結合している、本明細書に記載される Pt (IV) プロドラッグを合成できる。

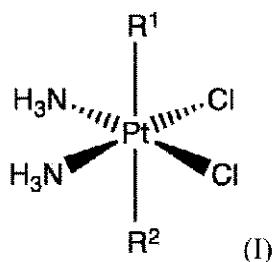
30

【0023】

本明細書に記載される種々の実施形態において、プロドラッグであり得る化合物は以下の構造を有する：

【化 2】

40



(式中

R^1 は、 $-(L^1)_m-(R^3)_n$ であり；

50

R^2 は、OH又は $-(L^2)_x-(R^4)_y$ であり；

R^3 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤であり；

R^4 は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤又は標的化部分であり、ここで、 R^4 がコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤である場合、 R^3 と R^4 は同じ又は異なっており；

L^1 は、リンカーであり；

L^2 は、リンカーであり、ここで、 L^1 と L^2 は同じ又は異なっており；

m 及び x は、独立に、0又は1であり；且つ

n 及び y は、独立に、1以上の整数である）。

【0024】

いくつかの実施形態において、 $m=0$ である場合、 $n=1$ であり、 $x=0$ である場合、 $y=1$ である。

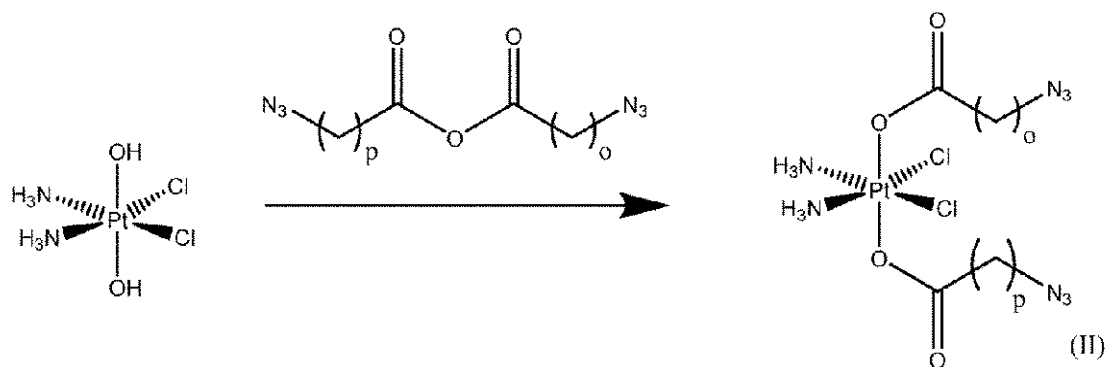
【0025】

いくつかの実施形態において、式Iの n 及び y は、1から4の整数など、1から8の整数である。リンカー、 L^1 及び L^2 は、使用される場合、式Iの化合物に存在する R^3 及び R^4 の部分の数を制御するように選択できる。すなわち、リンカー、 L^1 及び L^2 は、 n 及び y の値を決定できる。

【0026】

クリックケミストリーを利用して、リンカー、又は1種以上のシクロオキシゲナーゼ阻害剤、標的化部分などが結びつけられているリンカーを、Pt(IV)化合物にコンジュゲートできる。好適なクリックケミストリー技法の例には、銅触媒を用いるアジドアルキン環化付加反応(CuAAC)、歪みが促進するアルキン環化付加反応(SPAAC)などがある。アジド官能基は、例えば、以下に示される通りPt(IV)化合物をアジド無水物と反応させることにより、 c, c, t [PtCl₂(NH₃)₂(OH)₂]などのPt(IV)化合物に容易に付加できる：

【化3】



式中、 o 及び p は、独立に、3から7、又は例えば5など、0から10である。いくつかの実施形態において、 o と p は同じである。いくつかの実施形態において、アジド無水物は、6-アジドヘキサン酸無水物である。いくつかの実施形態において、アジド無水物の濃度を制限することにより、又はヒドロキシル基の1つをブロックすることにより、アジド部分が1つだけ、生じるPt化合物に付加される。任意の好適な溶媒を使用できる。好適な溶媒の例には、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)などがある。 c, c, t [PtCl₂(NH₃)₂(OH)₂]は、シスジアンミン白金(II)ジクロリド(シスプラチン)を過酸化水素と反応させることなど、任意の好適な方法で合成できる。

【0027】

次いで、上述の式IIによる化合物など、アジド官能化Pt(IV)化合物を、アルキ

ン含有リンカーと反応させることができるが、これは、任意選択で1種以上のコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤、標的化部分などを含み得る。アルキン含有リンカーが、例えば、1種以上のコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤又は標的化部分を含んでいない場合、リンカーをアジド官能化Pt (IV) 化合物と反応させた後で、そのような部分をリンカーにコンジュゲートできる。

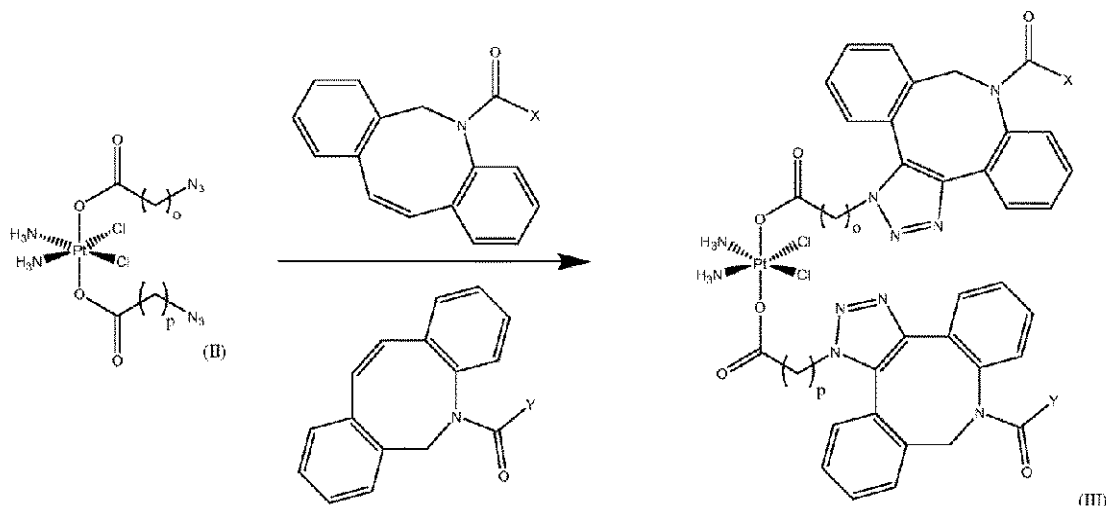
【0028】

上記で示された通り、CuAAC、SPAAC、又はあらゆる他の好適な形態のクリックケミストリーを利用できる。シクロオキシゲナーゼ阻害剤、標的化部分などを含み得るか、又は含むように修飾され得るSPAACアルキン含有化合物の例は、例えば、「アルキン及びアルキンを1, 3-双極子官能化合物と反応させる方法 (ALKYNES AND METHODS OF REACTING ALKYNES WITH 1, 3-DIPOLE-FUNCTIONAL COMPOUNDS)」という名称の米国特許第8, 133, 515号、及び「歪みにより促進されるPT (IV) スキャホールドに対するアジドアルキン環化付加反応：シスプラチンプロドラッグを官能化する万能な生体直交型手法 (STRAIN PROMOTED AZIDE ALKYNE CYCLOADDITION REACTION ON PT (IV) SCAFFOLD: A VERSATILE BIOORTHOGONAL APPROACH TO FUNCTIONALIZE CISPLATIN PRODRUGS)」という名称の2014年3月4日出願の米国仮特許出願第61/947, 703号に記載されており、これらの特許及び特許出願は、それらが本開示と矛盾しない程度に、そのそれぞれの全体として引用により本明細書にそれぞれ組み込まれている。

【0029】

説明のために、官能化アザジベンゾシクロオクチン (ADIBO) 誘導体と、式IIによるアジド官能化Pt (IV) 化合物とのSPAAC反応は下記に示される。

【化4】



式中、o及びpは、式IIによる化合物に関して先に定義された通りであり、Xは、R³、又はーリンカーーR³、又はR³若しくはーリンカーーR³がコンジュゲートできる官能基であり、Yは、R⁴、又はーリンカーーR⁴、又はR³若しくはーリンカーーR³がコンジュゲートできる官能基である。R³及びR⁴は、式Iによる化合物に関して先に定義された通りである。X及びYのリンカーは、存在する場合、独立に、R³又はR⁴が結合できるような好適なリンカーでもよい。いくつかの実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカーを含む。切断可能なリンカーは、例えば、シクロオキシゲナーゼ阻害剤（例えば、R³又はR⁴、R⁴がシクロオキシゲナーゼ阻害剤である場合）の制御可能な放出を与えることができる。あらゆる好適な切断可能なリンカーが利用できる。好適な切断可能なリンカーの例には、米国特許第8, 133, 515号の図12に表されているもの、例え

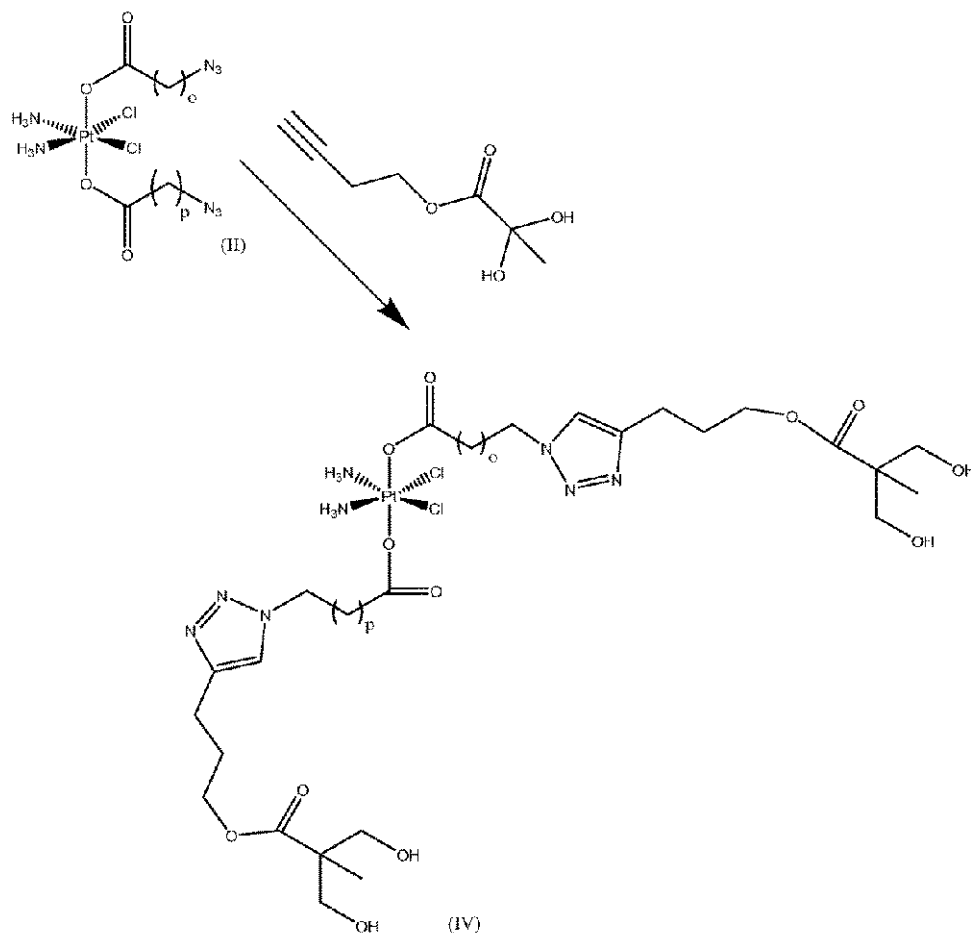
ば、ジスルフィドリンカー、オキシムリンカー、ヒドラジンリンカー、ジアゾリンカー、カルボニルオキシエチルスルホンリンカー、アミノ酸リンカー、フェニルアセトアミドリンカーなどがある。リンカーは、式 I による化合物が投与される対象の標的位置で予測される環境において、場合に応じて、 R^3 又は R^4 の放出を促進するように選択できる。いくつかの実施形態において、シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、式 I による化合物の実施形態が癌を有する対象に投与されると、細胞／腫瘍環境中で、エステラーゼによる、又は酸塩基触媒による反応により放出されるだろう。癌細胞は、細胞エステラーゼの上方制御を特徴とすることが多く、その腫瘍微小環境は酸性になる。したがって、エステラーゼによる、又は酸塩基触媒によるシクロオキシゲナーゼの放出は、腫瘍の微小環境又は腫瘍細胞内部で選択的に放出され得る。したがって、シクロオキシゲナーゼの早過ぎる放出を最小限にできる。

10

【0030】

さらに説明のため、式 I I によるアジド官能化 Pt (IV) 化合物と、2つ以上の R^3 、 R^4 、—リンカー— R^3 、又は—リンカー— R^4 部分（例えば、上述の通り）がコンジュゲートできるリンカーとして作用できるアルキン含有化合物との CuAAC クリックケミストリーは以下に示される。

【化5】



20

30

40

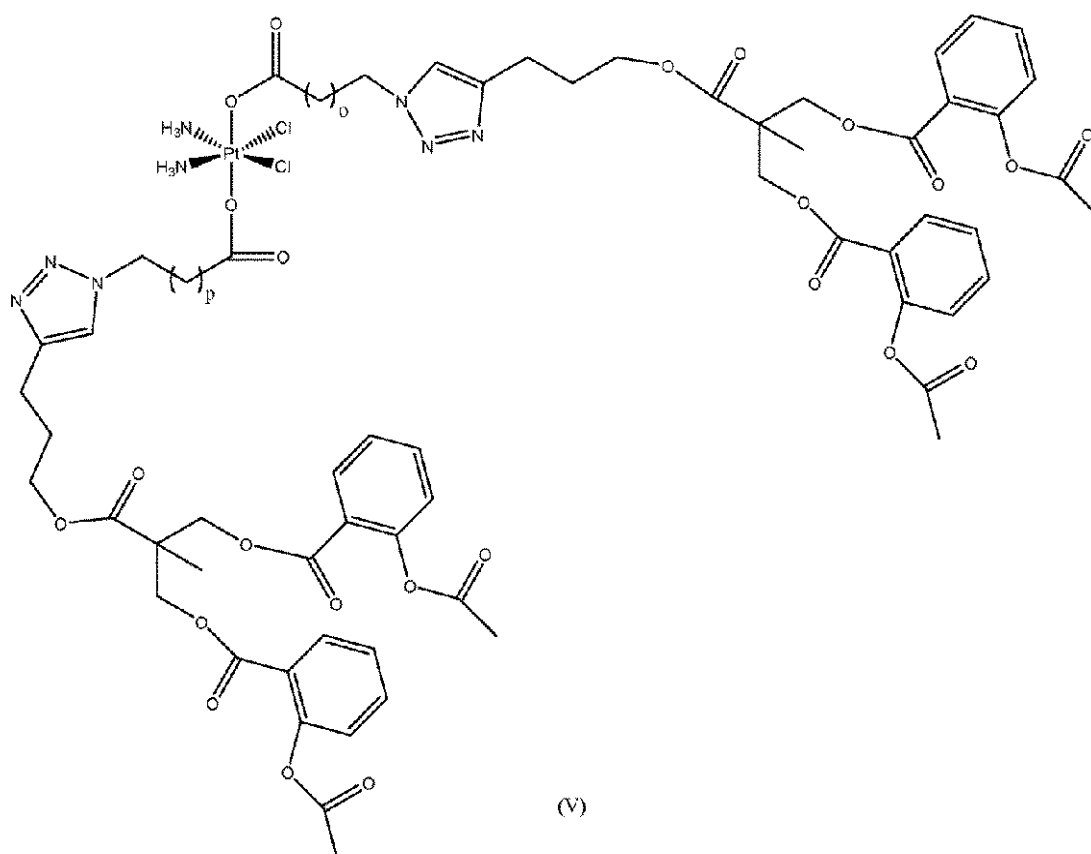
式中、 e 及び p は、式 I I による化合物に関して先に定義された通りである。反応は、CuI などの銅触媒の存在下で起こり得る。 R^3 、 R^4 、—リンカー— R^3 、又は—リンカー— R^4 部分は、式 I V による化合物のヒドロキシル基の酸素に、縮合反応など任意の好適な方法でコンジュゲートできる。いくつかの実施形態において、 R^3 、 R^4 、—リンカー— R^3 、又は—リンカー— R^4 部分は、CuAAC 反応の前にアルキン官能化リンカーにコンジュゲートされるが、それにより、生じる化合物に、異なる R^3 、 R^4 、—リンカー— R^3 、又は—リンカー— R^4 部分を組み込むことができる。

50

【 0 0 3 1 】

例示のために、本明細書に提示される教示による 4 つのアスピリン部分を含む P t (I V) 化合物が以下に示される。

【 化 6 】



10

20

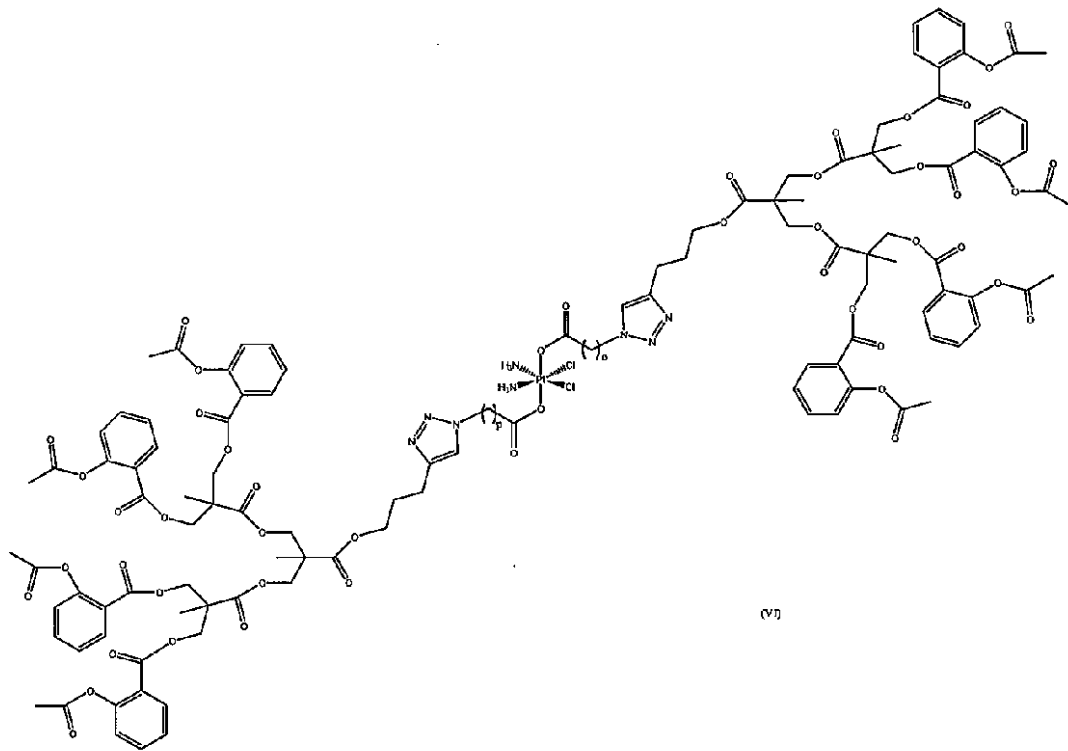
式中、o 及び p は、式 I I による化合物に関して先に定義された通りである。

30

【 0 0 3 2 】

例示のために、本明細書に提示される教示による 8 つのアスピリン部分を含む P t (I V) 化合物が以下に示される。

【化 7】



10

20

式中、o 及び p は、式 I I による化合物に関して先に定義された通りである。

【0033】

式 V I による化合物の合成のための反応スキームが図 1 に描かれているが、「プラチン-A z」は、o が 5 であり p が 5 である式 I I による化合物であり、「Pt (I V) - ボウタイ (Bow Tie)」は、o が 5 であり p が 5 である式 V I による化合物である。

30

【0034】

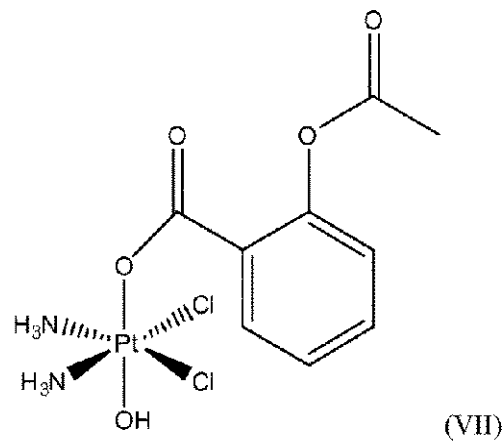
アスピリンは、癌を有する対象に投与されると、細胞／腫瘍環境中で、エステラーゼによる、又は酸塩基触媒による反応により式 V 及び V I による化合物から放出されるはずである。癌細胞は、細胞エステラーゼの上方制御を特徴とすることが多く、その腫瘍微小環境は酸性になる。したがって、エステラーゼによる、又は酸塩基触媒によるシクロオキシゲナーゼの放出は、腫瘍の微小環境又は腫瘍細胞内部で、選択的に放出され得る。したがって、シクロオキシゲナーゼの早過ぎる放出を最小限にできる。さらに、発明者らは、式 V 又は V I による化合物の場合、2 又は 4 つのアスピリンを有する dendron 全体が、Pt (I V) 種が Pt (I I) 形態に転化する間に、最初に Pt (I V) 種から離れるだろうと仮定した。この dendron は、炎症を起こした腫瘍組織環境中で、時間空間的にゆっくりとアスピリンを放出して、癌に関連する炎症を低減できる。

40

【0035】

種々の実施形態において、式 I による化合物は、 R^1 が R^3 であり、それがコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるように、m が 0 であり n が 1 である化合物である。説明のために、 R^1 がコンジュゲートされたアスピリンであり R^2 が OH である式 I による化合物が以下に示される：

【化 8】



。

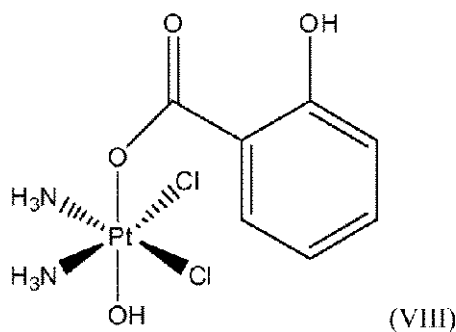
式 (VII) による化合物は、本明細書において「プラチン-A」と呼ばれることがある。プラチン-Aを合成する反応の実施形態は、以下により詳細に説明される。簡単に述べると、プラチン-Aは、c, c, t- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2(\text{OH})_2]$ をアスピリン無水物と反応させて合成された。1つのアスピリンをシスプラチンプラットフォームに得るために、希釈された反応媒体が使用された。プラチン-Aは、いくつかの分光学的技法及び分析技法により特性化された(図2~4)。

20

【0036】

さらに説明するため、 R^1 がコンジュゲートされたサリチル酸であり R^2 がOHである式Iによる化合物が以下に示される：

【化 9】



。

【0037】

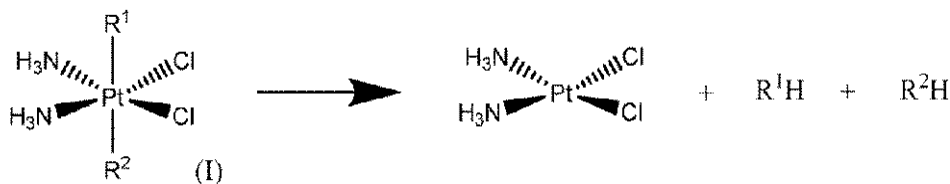
上述の具体的な化合物及び反応スキームが、式Iによる幅広い化合物が種々の反応スキームに従って製造され得ることを示す目的で提示され、限定の目的で提示されていないことが理解されるだろう。

40

【0038】

式Iの $\text{Pt}(\text{IV})$ の $\text{Pt}(\text{II})$ への還元から生じる R^1H 、 R^2H 、及びシスプラチンを示す全般的なスキームは以下に与えられる。

【化 10】



【0039】

R¹がR³であり、それがコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤である場合、Ptの還元は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤R³Hの放出をもたらす。R¹が、上述の通り、リンカー、L¹を含む場合（例えば、mが1である）、いくつかの場合において、1つ以上のR³部分が放出されてから（例えば、切断可能なリンカーの切断、加水分解などにより）、Ptが還元され、R¹の残りの部分が放出され得る。同様に、R²がOH又はR⁴である場合、Ptの還元は水又はR⁴Hの放出をもたらすが、これは、上記で議論された通り、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、標的化部分などであり得る。R²が、上述の通り、リンカー、L²を含む場合（例えば、xが1である）、いくつかの場合、1つ以上のR⁴部分が放出されてから（例えば、切断可能なリンカーの切断、加水分解などにより）、Ptが還元され、R²の残りの部分が放出され得る。

【0040】

式 I による化合物のR³、及び任意選択でR⁴は、どのような好適なコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤でもよい。いくつかの実施形態において、シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）である。好適なNSAIDsの例には、アスピリン、サリチル酸塩（例えば、ナトリウム、マグネシウム、コリン）、セレコキシブ、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸ナトリウム、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカム、ロフェコキシブ、サルサレート、スリンダク、トルメチンナトリウム、バルデコキシブなどがある。いくつかの実施形態において、式 I による化合物は、薬学的に活性な形態で放出可能な、以下のコンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤の1つ以上を含む：アスピリン（アセチルサリチル酸）；サリチル酸；スリンダクスルホン（（Z）-5-フルオロ-2-メチル-1 [p-（メチルスルホニル）ベンジリデン] インデン-3-酢酸）；スリンダクスルフィド（（Z）-5-フルオロ-2-メチル-1- [p-（メチルチオ）ベンジリデン] インデン-3-酢酸）；SC-560（5-（4-クロロフェニル）-1-（4-メトキシフェニル）-3-トリフルオロメチルピラゾール）；レスベラトロール（トランス-3, 4, 5-トリヒドロキシスチルベン）；プテロスチルベンスクシナート、（（E）-4-（4-（3, 5-ジメトキシスチリル）フェノキシ）-4-オキソブタン酸）；メロキシカム（4-（（2-メチル-3-（（5-メチルチアゾール-2-イル）カルバモイル）-1, 1-ジオキシド-2H-ベンゾ [e] [1, 2] チアジン-4-イル）オキシ）-4-オキソブタン酸）；インドメタシンエステル、4-メトキシフェニル-（1-（p-クロロベンゾイル）-5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-酢酸、4-メトキシフェニルエステル；インドメタシン1-（p-クロロベンゾイル）-5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-酢酸；イブプロフェン；フルルビプロフェン（±）-2-フルオロ-α-メチル [1, 1'-ビフェニル] -4-酢酸）；ジクロフェナクナトリウム（2- [（2, 6-ジクロロフェニル）アミノ] ベンゼン酢酸、ナトリウム）；ジクロフェナク、4'-ヒドロキシ-（2- [（（2', 6'-ジクロロ-4'-ヒドロキシ）フェニル）アミノ] ベンゼン酢酸）、及びCOX-2阻害剤 I（メチル [5-メチルスルホニル-1-（4-クロロベンジル）-1H-2-インドリル] カルボキシレート）。

【0041】

上記で議論された通り、式 I による化合物の R^4 は、コンジュゲートされた標的化部分であり得る。任意の好適な標的化部分が、本明細書に提示される教示に従って使用できる。本明細書では、「標的化部分」は、分子が対象に投与されるときに、標的化部分を欠く化合物に比べて、検討している組織、細胞などの中又はその近くで化合物の濃度を増加させる部分である。標的化部分は、例えば、癌標的化部分でも、ミトコンドリア標的化部分でもよい。標的化部分は、コンジュゲートされたシクロオキシゲナーゼ阻害剤に関して先に記載されたのに類似して、式 I による化合物の P_t にコンジュゲートされていても、式 I による化合物の P_t にコンジュゲートされたリンカーにコンジュゲートされていてもよい。標的化部分は、例えば、2014 年 4 月 8 日に出願された「ミトコンドリア標的化シスプラチンプロドラッグ (MITOCHONDRIA-TARGETING CISPLATIN PRODRUG)」という名称の米国仮特許出願第 61/976,559 号に記載のものと類似の方法で結びつけることができ、その出願は、本明細書に提示される開示と矛盾しない程度に引用により本明細書に組み込まれる。

10

【0042】

あらゆる好適な癌標的化部分を、本明細書に記載されるナノ粒子に結び付けることができる。癌標的化部分の例には、癌細胞に選択的であるか、又は過剰発現され、上方制御され、若しくは非癌細胞に見られない量で別な状態で存在する細胞表面抗原又はマーカーに結合する部分がある。

【0043】

あらゆる好適なミトコンドリア標的化部分を使用できる。式 I による化合物に組み込むことができるミトコンドリア標的化部分の例は、例えば、「アポトーシス標的化ナノ粒子 (APOPTOSIS-TARGETING NANOPARTICLES)」という名称で 2013 年 3 月 7 日に公開された国際公開第 2013/033513 A1 号パンフレットに記載されている。一実施形態において、ミトコンドリア標的化部分は、ミトコンドリアマトリックス中でナノ粒子の蓄積を促進する部分である。

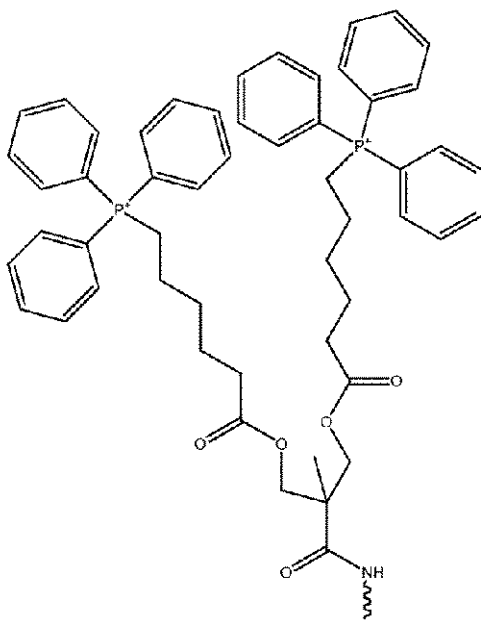
20

【0044】

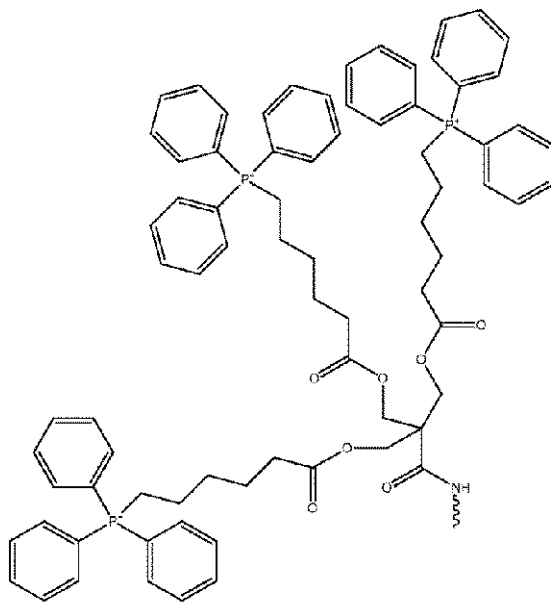
ミトコンドリアマトリックス内でナノ粒子の蓄積を促進するあらゆる好適な部分を利用できる。内部ミトコンドリア膜をまたいでかなりの負の電気化学ポテンシャルが維持されているため、非局在化された親油性カチオンが、疎水性膜を越えてミトコンドリアマトリックス中に蓄積するのに効果的である。トリフェニルホスホニウム (phosphonium) (TPP) 含有部分を使用して、ミトコンドリアマトリックス中で化合物の濃度を高めることができる。あらゆる好適な TPP 含有化合物を、ミトコンドリアマトリックス標的化部分として使用できる。TPP 系部分の代表例は、式 IX、式 X、又は式 XI で以下に示される構造を有し得る：

30

【化 1 1】

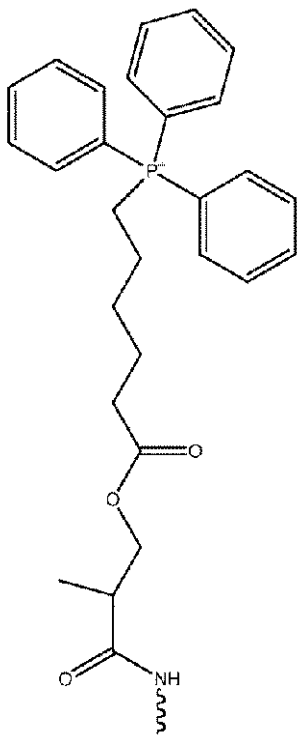


(IX);



(X); または

【化 1 2】



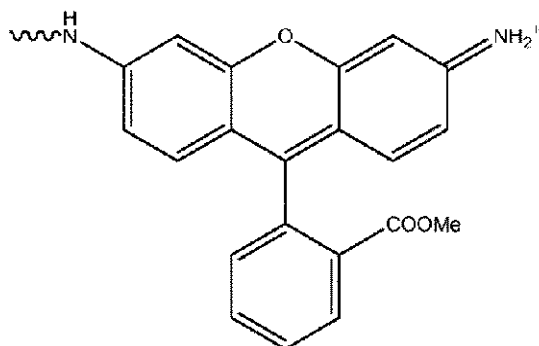
(XI)

式中、アミン（図示されている）は、式 I による化合物の P t（I V）にコンジュゲートされたリンカーにコンジュゲートされていてよい。もちろん、コンジュゲーションは、式 I X、X、又は X I による化合物の他の基によっても達成することができる。

【0045】

いくつかの実施形態において、ミトコンドリアマトリックスを標的化する非局在化親油性カチオンは、以下に描かれる式 X I I を有するローダミン 1 2 3 などのローダミンカチオンである：

【化 1 3】



(XII)

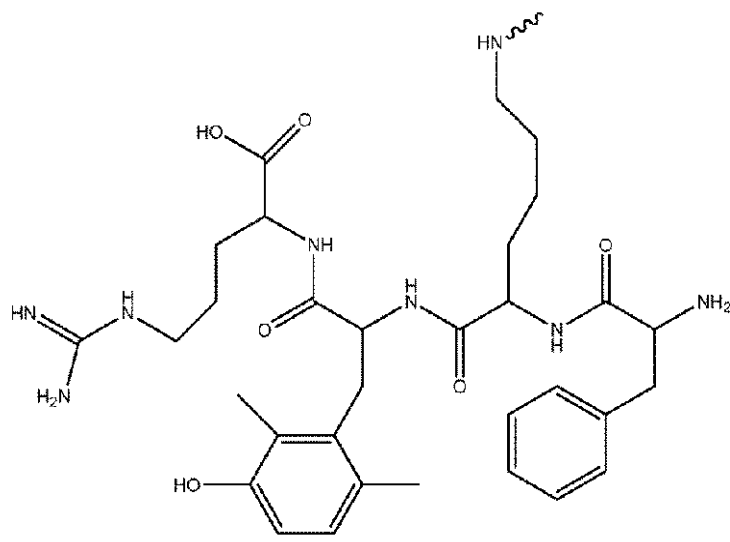
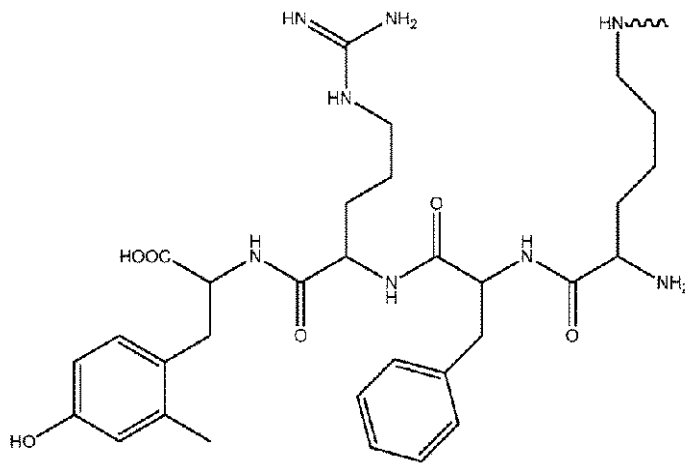
式中、二級アミン（図示されている）は、式 I による化合物の P t（I V）にコンジュゲートされたリンカーにコンジュゲートされていてよい。もちろん、コンジュゲーションは、式 X I I による化合物の別な基によっても達成できる。

【0046】

もちろん、非カチオン性化合物は、ミトコンドリアマトリックスを標的化し、その中に蓄積するように作用し得る。例として、S z e t o - S h i l l e r ペプチドは、ミトコンドリアマトリックス中のナノ粒子を標的化し、蓄積するように作用し得る。あらゆる好

適な Szett o-Shiller ペプチドを、ミトコンドリアマトリックス標的化部分として使用できる。好適な Szett o-Shiller ペプチドの非限定的な例には、以下に描かれるそれぞれ式 X I I I 及び式 X I V を有する S S - 0 2 及び S S - 3 1 がある：

【化 1 4】



式中、二級アミン（図示されている）は、式 I による化合物の P t (I V) にコンジュゲートされたリンカーにコンジュゲートされていてよい。もちろん、コンジュゲーションは、式 X I I 又は X I V による化合物の他の基によっても達成できる。

【0047】

式 I による化合物は、あらゆる好適な目的に使用できる。いくつかの実施形態において、式 I による化合物は、癌、増殖性疾患、又は炎症性疾患を有する、患っている、又はそのリスクがある対象を治療するために使用される。

【0048】

「癌を有する対象を治療すること」は、下記の 1 つ以上を部分的又は実質的に達成することを含む：癌の成長又は広がりを停止させること、癌の程度を減少させること（例えば、腫瘍のサイズを減少させること、又は罹患部位の数を減少させること）、癌の成長速度を抑制すること、及び癌に関連する臨床症状又は指標（組織又は血清成分など）を改良若しくは改善すること。

【0049】

有効量の式 I による化合物を対象に投与して、炎症性疾患を治療できる。治療可能な炎症性疾患には、局所炎症反応と全身性炎症反応の一方又は両方を特徴とする疾患、例えば

、消化管及び関連組織を含む疾病（虫垂炎、消化性潰瘍、胃潰瘍、及び十二指腸潰瘍、腹膜炎、憩室炎、潰瘍性大腸炎、偽膜性大腸炎、急性大腸炎、及び虚血性大腸炎、炎症性腸疾患、憩室炎、喉頭蓋炎、アカラシア、胆管炎、小児脂肪便症、胆嚢炎、肝炎、クローン病、腸炎、及びウィップル病など）；全身性又は局所の炎症性疾患及び病態（喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、免疫複合体病、臓器虚血、再灌流傷害、臓器壊死、花粉症、敗血症、敗血症、エンドトキシンショック、カヘキシー、超高熱、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症、及びサルコイドーシスなど）；尿生殖器系（*u r o g e n i t a l s y s t e m*）及び関連組織を含む疾病（敗血性流産、副睾丸炎、陰炎、前立腺炎、及び尿道炎など）；呼吸器系及び関連組織を含む疾病（気管支炎、肺気腫、鼻炎、嚢胞性線維症、成人呼吸窮迫症候群、肺臓炎、超微視的珪質火山塵肺疾患（*p n e u m o u l t r a m i c r o s c o p i c s i l i c o v o l c a n o c o n i o s i s*）、肺肺炎（*a l v e a l i t i s*）、細気管支炎、咽頭炎、肋膜炎、及び副鼻腔炎など）；種々のウイルス（インフルエンザ、呼吸器多核体ウイルス、HIV、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、及びヘルペスなど）、細菌（播種性菌血症（*d i s s e m i n a t e d b a c t e r e m i a*）、デング熱など）、真菌（カンジダ症など）、並びに原生動物及び多細胞寄生生物（マラリア、フィラリア症、アメーバ症、及び胞虫嚢腫など）による感染から生じる疾病；皮膚の皮膚科疾病及び病態（熱傷、皮膚炎、皮膚筋炎、日焼け、蕁麻疹疣贅、及び丘疹など）；心血管系及び関連組織を含む疾病（血管炎（*v a s u l i t i s*）、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アテローム性動脈硬化、血栓性静脈炎、心膜炎、心筋炎、心筋虚血、鬱血性心不全、結節性多発動脈炎、及びリウマチ熱など）；中枢神経系又は末梢神経系及び関連組織を含む疾病（アルツハイマー病、髄膜炎、脳炎、多発性硬化症、脳梗塞、脳塞栓症、ギランバレー（*G u i l l a m e - B a r r e*）症候群、神経炎、神経痛、脊髄損傷、麻痺、及びブドウ膜炎など）；骨、関節、筋肉、及び結合組織の疾病（種々の関節炎及び関節痛、骨髓炎、筋膜炎、ページェット病、痛風、歯周病、関節リウマチ、及び滑膜炎など）；他の自己免疫及び炎症性疾患（重症筋無力症、甲状腺炎（*t h y r o i d i t i s*）、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、ベーチェット症候群、同種異系移植片拒絶、移植片対宿主病、I型糖尿病、強直性脊椎炎、ベルギー病、I型糖尿病を含む糖尿病、強直性脊椎炎、ベルギー病、及びラター（*R e t i e r ' s*）症候群など）；院内（*n o s i c o m a l*）感染；並びに種々の癌、腫瘍、及び増殖性疾患（ホジキン病など）がある。

【0050】

あらゆる好適な種類の癌は、有効量の式Iによる化合物を、その必要のある対象に投与することにより治療され得る。有効量の式Iによる化合物をその必要のある対象に投与することにより治療又は予防可能な癌には、ヒトの肉腫及び癌腫、例えば、繊維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、大腸癌、肛門癌、食道癌、胃癌、肝細胞癌、膀胱癌、子宮内膜癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、心房粘液腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌腫、甲状腺及び副甲状腺の新生物、乳頭状癌腫、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌腫、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌腫、上皮癌、グリオーマ、下垂体新生物、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、神経鞘腫、乏突起膠腫、髄膜腫、脊髄腫瘍、メラノーマ、神経芽細胞腫、褐色細胞腫、1～3型内分泌腺腫症、網膜芽細胞腫；白血病、例えば、急性リンパ球性白血病及び急性骨髄球性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、及び赤白血病）；慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病及び慢性リンパ球性白血病）；及び真性多血病、リンパ腫（ホジキン病及び非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム（*W a l d e n s t r o b m ' s*）マクログロブリン血症、及び重鎖病があるが、これらに限定されない。式Iによる化合物は、前立腺癌を有する対象の治療に特に効果的になり得ると考えられる。いくつかの実施形態において、有効量の式Iによる化合物が対象に投

与されて、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）が治療される。

【0051】

有効量の式 I による化合物は対象に投与されて、非癌増殖性疾患が治療され得る。非癌増殖性疾患には、平滑筋細胞増殖、全身性強皮症、肝硬変、成人呼吸窮迫症候群、特発性心筋症、紅斑性狼蒼、網膜症、例えば、糖尿病性網膜症又は他の網膜症、心臓過形成、良性前立腺肥大症及び卵巣嚢腫などの生殖系関連疾患、肺線維症、子宮内膜症、線維腫症、過誤腫（hamatomas）、リンパ管腫症、サルコイドーシス、類腱腫などがある。

【0052】

「有効量」は、化合物が対象に投与される場合に有益な臨床成績が達成される化合物の量である。例えば、式 I による化合物が癌を有する対象に投与される場合、「有益な臨床成績」には、腫瘍質量の減少、転移の減少、癌に関連する症状の重症度の減少、又は治療のない場合と比べた対象の寿命の増加がある。

【0053】

対象に投与される化合物の精密な量は、疾病又は病態の種類及び重症度、並びに対象の特性、例えば、全般的な健康状態、年齢、性別、体重、及び薬物に対する耐容性などに依存する。それは、癌の程度、重症度、及び種類にも依存し得る。当業者は、これらの因子及び他の因子によって適切な用量を決定できるだろう。開示される化合物の有効量は、1日あたり約 1 mg/mm^2 から 1日あたり約 10 グラム/mm^2 の範囲になり得る。癌の治療のための別な抗癌剤と共投与される場合、第二の抗癌剤の「有効量」は、利用される薬物の種類によるだろう。好適な用量は認可された抗癌剤に関して公知であり、対象の病態、治療されている癌の種類、及び利用されている式 I による化合物によって、当業者により調整できる。

【0054】

種々の実施形態において、式 I による化合物、又はその互変異性体、薬学的に許容できる塩、溶媒和物、若しくはクラスレートは、医薬組成物に含めることができる。医薬組成物は、化合物及び薬学的に許容できる担体又は希釈剤を含み得る。

【0055】

好適な薬学的に許容できる担体は、好ましくは、式 I による化合物の生物学的活性を阻害しない不活性な成分を含み得る。薬学的に許容できる担体は、好ましくは（preferably）生体適合性、すなわち非毒性、非炎症性、非免疫原性であり、対象への投与時に他の望ましくない反応が全くない。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa に記載の技法など、標準的な医薬製剤技法を利用できる。投与すべき化合物の製剤は、選択される投与経路により変わるだろう（例えば、液剤、乳剤、カプセル剤）。非経口投与用の好適な医薬担体には、例えば、滅菌水、生理食塩水、静菌食塩水（約 $0.9\% \text{ mg/ml}$ ベンジルアルコールを含む食塩水）、リン酸緩衝食塩水、ハンス溶液、乳酸リンゲル液などがある。組成物をカプセル化する方法（硬質ゼラチン又はシクロデキストリンのコーティング中など）は当技術分野に公知である（Baker, et al., "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986）。

【0056】

式 I による化合物は、任意の好適な経路により、例えば、カプセル剤、懸濁剤、錠剤中で経口的にも、非経口投与によっても投与できる。非経口投与は、例えば、筋肉内、静脈内、皮下、又は腹腔内注射による全身投与を含み得る。本発明の化合物は、治療すべき癌の種類によって、経口的にも（例えば、飲食）、局所的にも、吸入によっても（例えば、気管支内、鼻腔内、経口吸入、又は点鼻剤）、直腸内にも投与できる。

【0057】

いまや多くの新たな薬物が、癌を有する患者の治療に、腫瘍専門医が使用するのに利用可能である。複数の抗癌薬が組み合わせられて患者に投与される場合、同じ薬物が個別且つ

10

20

30

40

50

連続的に投与される場合よりも、腫瘍が治療に対して反応性があることが多い。この手法の利点の1つは、腫瘍細胞が、複数の作用機構を有する薬剤により同時に攻撃されるため、抗癌剤が相乗的に作用することが多いことである。そのため、これらの薬剤を組み合わせることで投与することにより、より急速な腫瘍サイズの低下の達成が可能なが多い。併用化学療法別の利点は、腫瘍を完全に根絶する可能性が高く、患者の治療に利用されている抗癌剤に対する耐性が生じにくいことである。

【0058】

いくつかの実施形態において、式Iによる化合物はナノ粒子中に組み込まれる。式Iによる化合物を組み込むことができるナノ粒子の例には、例えば、「アポトーシス標的化ナノ粒子 (Apoptosis-Targeting Nanoparticles)」という名称の公開されたPCT特許出願第2013/033513号パンフレット；「薬剤のミトコンドリア輸送のためのナノ粒子 (Nanoparticles for Mitochondrial Trafficking of Agents)」という名称の公開されたPCT特許出願第2013/123298号パンフレット；「機能性樹状細胞の生成 (Generation of Functional Dendritic Cells)」という名称の公開されたPCT特許出願第2014/124425号パンフレット；及び「併用治療ナノ粒子 (Combination Therapeutic Nanoparticles)」という名称の公開されたPCT特許出願第2014/169007号パンフレットに記載されるナノ粒子があり、公開された特許出願のそれぞれは、本明細書に提示される開示と矛盾しない程度に、それぞれの全体として引用により本明細書に組み込まれる。ナノ粒子は、1種以上の式Iによる化合物に加えて、1種以上の抗癌剤又は抗増殖剤を含み得る。ナノ粒子は、上述の標的化部分などの、1種以上の標的化部分を組み込むことができる。

【0059】

シスプラチン及びアスピリンをそれぞれの生物学的作用のために放出する能力を有するPt(IV)プロドラッグ、プラチン-A (式VIIによる化合物)を表す概略図を、図5に示す。

【0060】

プラチン-A及び他の式Iによる化合物は、非癌細胞の微小環境よりも酸性になる傾向がある癌細胞の微小環境中で還元されると考えられる。7.35から7.45という血液の狭いpH範囲をミミックすることにより、pH7.4でのプラチン-Aの還元電位が標準水素電極(NHE)に対して-536mVであることが見出された(図6)。調節不全のpHは、ほとんどの癌の適応性を示す特徴である。正常な細胞では、細胞内pH(pHi)は約7.2であり、約7.4の細胞外pH(pHe)より低い。癌細胞では、pHiは7.4より高く、pHeは7.1より低い。プラチン-Aの還元性を、癌の低下した細胞外pHeをミミックするpH6.4で試験した。6.4のpH値で、42mVの正のシフトが観察され(図6)、癌微小環境中の低下したpHeが、プラチン-Aの還元によるシスプラチン及びアスピリンの放出を促進するだろうことが示された。

【0061】

シスプラチンの際立った抗癌活性は、DNA損傷につながるグアニン塩基のN7位に結合するその固有の能力による。プラチン-Aのシスプラチンへの細胞内還元及び発生したシスプラチンのDNAによる活性をミミックするために、プラチン-Aが、DNAの短縮型としての2'-デオキシグアノシン5'-モノホスフェートナトリウム塩水和物(5'-GMP)の存在下でアスコルビン酸ナトリウムにより還元され、生成物は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-飛行時間(TOF)-質量分析法(MS)により分析された。プラチン-A還元と、それに続く5'-GMPとの反応は、PtII-5'-GMP-ビス付加体[Pt(NH3)2(5'-GMP-N7)2](m/z=922、図7)の形成を示した。5'-GMPとの結合試験は、プラチン-Aの還元と同時に放出されるシスプラチンが、核DNAと効率よく相互作用するだろうということの有力な証拠を与えた。もう1つの薬物、アスピリンのプラチン-Aからの放出はHPLCに

より分析された（図 8）。還元反応から得た H P L C クロマトグラム及びアスピリン及びサリチル酸の純粋な試料のクロマトグラムとのトレースの比較により、プラチン-A が、還元時に最初にアスピリンを生み出すことが示された。時間がたつにつれ、量が増えつつあるアスピリンの主代謝物、サリチル酸の形成が検出された（図 8）。この観察は、それぞれ C O X 阻害活性及び抗炎症活性のための、プラチン-A からの元の形態のアスピリン部分の放出又はその最終代謝物形態の放出を支持した。

【 0 0 6 2 】

C O X - 2 の高発現が種々の癌に見られるが、P C a 細胞株並びに組織では矛盾した結果が存在する。そのため、発明者らは、アンドロゲン応答性 L N C a P 並びに悪性度が異なるアンドロゲン不応性 (a n d r o g e n u n r e s p o n s i v e) P C 3 細胞と D U 1 4 5 P C a 細胞に対する、プラチン-A の抗増殖性を試験した。プラチン-A は、P C 3 細胞中で、シスプラチン単独及びシスプラチンとアスピリンの等モル混合物に匹敵する I C 5 0 値を示した（図 9、以下の表 1）。同様な傾向が、プラチン-A 及びシスプラチンで、D U 1 4 5 及び L N C a P 細胞で観察された（図 9、表 1）。プラチン-A は、D U 1 4 5 において、シスプラチンとアスピリンの等モル混合物よりわずかに高い I C 5 0 値を示した。しかし、L N C a P 細胞において、プラチン-A 活性はシスプラチンとアスピリンの等モル混合物より良好であった。一般に、P t (I V) 化合物は、その活性 P t (I I) 形態に比べて細胞傷害性が低い。シスプラチンに匹敵するプラチン-A、P t (I V) プロドラッグの細胞傷害性は、P C a 細胞中でのその独特な抗増殖効力を示した。癌細胞増殖のプラチン-A 依存性の障害がアポトーシスと関連するかどうかを評価するために、A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 アネキシン V / ヨウ化プロピジウム (P I) 染色試験が P C 3 細胞で実施され、データが、蛍光支援細胞選別により分析された。2 日に P C 3 細胞 (1 × 1 0 6 細胞 / m L) が、アスピリン (2 5 μ M)、シスプラチン (2 5 μ M)、シスプラチンとアスピリンの等モル混合物 (2 5 μ M)、及びプラチン-A (2 5 μ M) と共に 6 時間インキュベートされた。さらに、エトポシド (1 0 0 μ M、1 2 時間) 処理細胞及び H 2 O 2 (1 m M、4 5 分) 処理細胞を、それぞれ、アポトーシス及び壊死の陽性対照として使用した（図 1 0）。高レベルのアポトーシスがプラチン-A により誘導された。プラチン-A のアポトーシス誘導性は、シスプラチン及びシスプラチンとアスピリンの等モル混合物に非常に類似していた。アスピリン単独は、これらの条件下で健康な P C 3 集団に何も変化を示さなかった（図 9 B）。

【 0 0 6 3 】

【表 1】

表 1. 異なる P C a 細胞におけるシスプラチン、シスプラチンとアスピリンの等モル混合物、及びプラチン-A の I C ₅₀ 値の比較			
I C ₅₀ (μ M)	プラチン-A	シスプラチン	シスプラチン+アスピリン
PC3	15 ± 5	14 ± 4	14 ± 6
DU145	8 ± 3	5 ± 2	4 ± 1
LNCaP	12 ± 1	15 ± 1	18 ± 1

【 0 0 6 4 】

プラチン-A のインビトロ C O X 阻害性が、酵素免疫アッセイ (E I A) を利用して試験された。アスピリンが陽性対照として使用された（図 1 1、図 1 2）。プラチン-A は、濃度非依存的に、アスピリンにより示されたものと非常に類似した、C O X - 1 と C O X - 2 の両方の阻害を示した。アスピリンは、サリチル酸よりも、C O X - 1 又は C O X - 2 の阻害剤として強力であることが知られている。プラチン-A の同等な C O X - 1 及び C O X - 2 阻害性は、アスコルビン酸ナトリウムによるプラチン-A 還元の発明者らの H P L C 分析により支持される通り、プラチン-A の還元が最初にアスピリンを放出することを示した。これらの際立ったプラチン-A の C O X 阻害性は、腫瘍関連炎症の減少に

おけるその能力を示した。

【0065】

多くの癌が、COX-2のレベル上昇を示すが、COX-2のPCaへの寄与及び炎症性サイトカインによるその制御には議論の余地がある。基礎的なCOX-2レベルはPC3細胞において非常に低く、3種の試験物品全ての存在下で効果は全く観察されなかった(図13A、図14)。したがって、発明者らは、COX-2プロモーター中の核内因子-κB(NF-κB)結合モチーフによるその強力なCOX-2遺伝子発現誘導性のために、COX-2誘導性サイトカイン腫瘍壊死因子-α(TNF-α)に応答したCOX-2レベルの増大を調査した(図13B、図14)。TNF-α(20ng/mL)による2時間のPC3細胞の処理と、それに続くプラチン-A(1μM)、シスプラチンとアスピリン(1μM)、及びアスピリン(1μM)による2時間の処理時のCOX-2発現パターンの調査を試験した。増加したCOX-2発現が、TNF-αに刺激されたPC3細胞に観察され、そのレベルは、プラチン-Aによる処理時に低下した(図13B、図14)。シスプラチンとアスピリンの等モル混合物は、これらの活性化細胞に対して、顕著さの低い効果を示し、アスピリンにより示される阻害のレベルは、プラチン-Aにより観察されるものに類似していた(図13、図14)。プラチン-Aによる細胞COX-2の著しい阻害は、腫瘍関連炎症を減少させるその独特な能力をさらに支持した。

10

【0066】

慢性炎症は、PCaを含むヒト癌の進行に重要になり得る。炎症性サイトカイン、TNF-α及びインターロイキン(IL)-6は、癌の増殖、生存、転移、及び免疫監視機構からの逃避にとって重要になり得る。癌細胞上のトール様受容体(TLR)の活性化による慢性炎症は、免疫系の抗腫瘍機能を損ない、発育及び生存を可能にする腫瘍微小環境を作り出す。サイトカインTNF-α及びIL-6は、炎症誘導性発癌の主要な調節物質、NF-κBの強力な活性化物質である。TNF-αの分泌増大は、シスプラチン腎毒性を媒介する。抗炎症性サイトカイン、IL-10は、シスプラチンにより誘導される急性腎損傷における炎症性及び細胞傷害性経路を阻害する。腫瘍随伴マクロファージ(TAM)からのTLR媒介性の炎症性サイトカイン産生は、腫瘍進行、転移、及び癌細胞転移に主要な役割を果たす。したがって、発明者らは、癌の炎症性環境をミミックするために、TLR4の外因性リガンドであるリポ多糖(LPS)により活性化されたRAW 264.7マクロファージに対するプラチン-Aの作用を調査した。最初に、発明者らは、LPSにより刺激されたRAW 264.7マクロファージ中の炎症性サイトカイン、IL-6、TNF-α、及び抗炎症IL-10産生に対するプラチン-A、シスプラチン、シスプラチンとアスピリンの組み合わせ、及びアスピリンの作用を評価した。LPSによるRAW細胞の刺激は、対照条件下で生じたものに比べて、IL-6とTNF-αの産生を著しく増加させた(図15A)。発明者らの実験条件下で、LPSによる刺激時にRAWマクロファージからのIL-10の分泌を、発明者らは全く観察しなかった。次いで、発明者らは、プラチン-Aが、LPSにより誘導された炎症性サイトカインIL-6、TNF-αの産生を減少させるかどうか、及び抗炎症IL-10の誘導の可能性を、酵素結合免疫吸着法(ELISA)を利用して試験した。LPSにより活性化されたマクロファージの10μMのプラチン-Aによる12時間の処理は、IL-6及びTNF-αのレベルを著しく低下させた。同条件下でのシスプラチンは、これらのサイトカインのレベルに対して全く作用を示さなかった(図15A)。サイトカインレベルの低下が、単にプラチン-Aの細胞傷害性によるものである可能性を除外するために、細胞生存率を評価した。プラチン-A(10μM)は、24時間インキュベートされた場合に、細胞生存率に影響しなかった(図16)。IL-10は、種々の炎症性サイトカインの産生及び活性を阻害でき、これらの制御性マクロファージは、多くの炎症性サイトカインを産生する能力を保持している事実にもかかわらず、炎症の強力な阻害因子である。プラチン-Aの存在下でのLPSにより活性化されたマクロファージによるIL-10の分泌は、その独特な抗炎症を示した。

20

30

40

【0067】

50

発明者らは、LPS刺激前のマクロファージに対するプラチン-Aの前処理の効果を評価した。図15Bに示されるように、LPSによるRAWマクロファージの刺激は、12時間後に、細胞条件培地中のIL-6及びTNF- α のレベルを著しく増加させた。プラチン-Aによるこれらのマクロファージの前処理は、10 μ Mの低濃度で、LPSにより誘発されたIL-6とTNF- α の産生を著しく阻害した。プラチン-AとLPSによる前処理の組み合わせは、IL-10のレベルを上昇させた(図15B)。これらの結果を合わせると、プラチン-Aが炎症反応を削減するのに効率的であることが示された。シスプラチン、アスピリン、及びシスプラチンとアスピリン組み合わせの等モル混合物によるマクロファージの前処理は、LPS刺激に対して予防作用を全く示さなかった。

【0068】

発明者らのデータに基づいて、発明者らは、可能性のあるプラチン-Aの作用機序を図17に描写した。プラチン-Aは、酸性で還元性の腫瘍微小環境中で還元されて、活性薬物シスプラチン及びアスピリンを放出すると予測される。活性形態のPt(II)は、種々の技法により示される通り、核DNAに作用する。アスピリンはCOX酵素を阻害し、その代謝物サリチル酸と共に、ELISA実験により示される通り、TAM中の炎症反応のレベルを制御する。プラチン-Aは、抗癌性、COXの阻害、及び効率的な抗炎症プロファイルを示す独特な能力を示した。

【0069】

まとめると、独特な化学抗炎症分子(chemo-anti-inflammatory molecule)、プラチン-A、シスプラチンとアスピリンのプロドラッグが合成され、特性化された。プラチン-Aの好ましい還元パターンが観察されて、生物活性のあるPt(II)形態が放出され、それに伴ってアスピリンが遊離した。プラチン-Aは、PCa細胞においてシスプラチンに匹敵する細胞傷害性プロファイルを示し、独特なアポトーシス誘導効力を示した。アスピリン分子を有するその特徴的な処方により、プラチン-Aは、シスプラチンに関連する腎毒性及び聴覚毒性を減少させる能力と共に、抗炎症効果を示した。TNF- α をCOX-2誘導因子として使用して、発明者らは、PC3細胞中のCOX-2レベルを増加させることができ、細胞内COX-2を阻害するプラチン-Aの独特な能力を観察した。プラチン-Aは、LPSに誘導された炎症を起こしたマクロファージ中で効率的な抗炎症性を示した。これらの結果は、慢性炎症を特徴とする癌の潜在的な候補としてのプラチン-Aのさらなる開発を促す。この研究は、アスピリンなどのシクロオキシゲナーゼ阻害剤又はNSAIDを、単一のプロドラッグの形態でシスプラチン治療レジメンに独自に組み合わせ、効率を増加させ、聴覚毒性などの化学療法の副作用を減少させる機会を強調した。

【0070】

本明細書で使用される全科学技術用語は、特記されない限り、当技術分野で通常使用される意味を有する。本明細書で与えられる定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を助けるためのものであり、本開示の範囲を限定しないものとする。

【0071】

本明細書及び添付される特許請求の範囲で使用される通り、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、内容によりそうでないと明らかに示されない限り、複数の指示対象を有する実施形態を包含する。本明細書及び添付される特許請求の範囲で使用される通り、用語「又は(or)」は、内容によりそうでないと明らかに示されない限り、「及び/又は」を含むその意味で一般的に使用される。特定の場所における「及び/又は」の使用は、他の場所における「又は」の使用が「及び/又は」を意味し得ないことを意味するものではない。

【0072】

本明細書では、「有する(have)」、「有する(having)」、「含む(include)」、「含んでいる(including)」、「含む(comprise)」、「含んでいる(comprising)」などは、その開放式の意味で使用され、一般的に「含むが、それに限定されない」を意味する。「から基本的になる(consis

10

20

30

40

50

ting essentially of)」、「からなる (consisting of)」などが、「含んでいる (comprising)」などに包含されることが理解されるだろう。

【0073】

本明細書では、「疾病」は、正常な機能を損なう生物又はその1つ以上の部分の状態を意味する。本明細書では、疾病という用語は、疾病、疾患、病態、機能不全などを包含する。

【0074】

本明細書では、「治療する」などは、疾病の1つ以上の症状を治癒し、予防し、又は改善することを意味する。

【0075】

本明細書では、「結合する (bind)」、「結合した (bound)」、「コンジュゲートされた (conjugated)」などは、化学物質が、共有結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス (van der Waals) 力などの任意の好適な種類の結合により連結していることを意味する。「結合する」、「結合した」などは、本明細書において、「結び付けられる (attach)」、「結び付けられた (attached)」などと互換的に使用される。好ましくは、「コンジュゲートされた」は、本明細書において共有結合を指すように使用される。

【0076】

本明細書に記載される化合物は、1つ以上のキラル中心及び／又は二重結合を含むことがあり、そのため、二重結合異性体（すなわち幾何異性体）、エナンチオマー、又はジアステレオマーなどの立体異性体として存在し得る。本開示の目的のため、式Iによる化合物を含む、本明細書に描かれている化学構造は、対応する化合物のエナンチオマー、ジアステレオマー、及び幾何異性体の全て、すなわち、立体化学的に純粋な形態（例えば、幾何的に純粋、エナンチオマー的に純粋、又はジアステレオマー的に純粋）と異性体混合物（例えば、エナンチオマー的な、ジアステレオマー的な、及び幾何学的な異性体混合物）の両方を包含する。いくつかの場合において、1つのエナンチオマー、ジアステレオマー、又は幾何異性体は、他の異性体に比べて、優れた活性、又は改善された毒性若しくは反応速度プロファイルを有するだろう。それらの場合において、本発明の化合物のそのようなエナンチオマー、ジアステレオマー、及び幾何異性体が好ましい。

【0077】

開示される化合物が構造により命名されるか、又は描かれる場合、化合物又はその薬学的に許容できる塩の溶媒和物（例えば、水和物）も含まれることが理解されよう。「溶媒和物」は、溶媒分子が結晶化の間に結晶格子中に組み込まれた結晶形を指す。溶媒和物は、水又は、非水性溶媒、例えば、エタノール、イソプロパノール、DMSO、酢酸、エタノールアミン、及びEtOAcなどを含み得る。水が、結晶格子中に組み込まれた溶媒分子である溶媒和物は、典型的には、「水和物」と呼ばれる。水和物は、非共有結合の分子間力により結合した化学量論量又は非化学量論量の水を含む。

【0078】

開示される化合物が構造により命名されるか、又は描かれる場合、溶媒和物を含む化合物が、結晶形、非結晶形、又はその混合物として存在し得ることが理解できよう。化合物又は溶媒和物は、多形も示し得る（すなわち、異なる結晶形で存在する能力）。これらの異なる結晶形は、典型的には、「多形体」として知られている。構造により命名されるか、又は描かれている場合、開示される化合物及び溶媒和物（例えば、水和物）がその全多形体も含むことが理解されよう。本明細書では、用語「多形体」は、化合物又はその錯体の固体の結晶形を意味する。同じ化合物の異なる多形体は、異なる物理的、化学的、及び／又は分光学的な性質を示し得る。異なる物理的性質には、安定性（例えば、熱又は光に対する）、圧縮性及び密度（製剤及び製品製造において重要）、及び溶解速度（バイオアベイラビリティに影響し得る）があるが、これらに限定されない。安定性の差は、化学的反応性の変化からも（例えば、剤形がある多形体で構成されている場合に、別な多形体で

10

20

30

40

50

構成されている場合よりも迅速に変色するような示差酸化)、機械的特性からも(例えば、速度論的に有利な多形体が熱力学的により安定な多形体に転化するにつれて、錠剤が貯蔵時に崩壊する)、両方からも(例えば、ある多形体の錠剤が、高湿度でより分解しやすい)生じ得る。多形体の異なる物理的性質は、その加工に影響し得る。例えば、ある多形体は、溶媒和物をより形成しやすいことがあり、又は、例えば、その粒子の形状又はサイズ分布により、別な多形体よりも濾過又は洗浄して不純物を除くことが困難であり得る。さらに、ある多形体は、特定の条件下で、別な多形体に自然に転化することがある。

【0079】

開示される化合物がその構造により命名されるか、又は描かれる場合、化合物、又はその薬学的に許容できる塩、溶媒和物、若しくは多形体のクラスレート(「包摂化合物」)も包含されることが理解できよう。本明細書では、用語「クラスレート」は、ゲスト分子(例えば、溶媒又は水)を捕捉している空間(例えば、チャンネル)を含む結晶格子の形態にある本発明の化合物又はその塩を意味する。

【実施例】

【0080】

実験セクション

材料及び装置。化学薬品は全て、特記されない限り、さらに精製せずに受け取り使用した。シスプラチンは、Strem Chemicals, Inc. から購入した。アスピリン、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、過酸化水素溶液(30重量%水溶液)、(3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)は、Sigma-Aldrichから購入した。インターロイキン(IL)-6、IL-10、及び腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)サイトカインは、BD OptEIAマウス酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを使用して試験した。超純粋リポ多糖(LPS)は、Invivogen, CA, USAから購入した。Alexa Fluor(登録商標)488アネキシンV/死細胞アポトーシスキットは、Invitrogenから購入した。COX(ヒッジ)阻害剤スクリーニングアッセイキット(Cayman Chemical アイテム番号560101)は、Cayman chemical company Ann Arbor, Michigan, USAから調達した。COX-2の一次ウサギポリクローナル抗体はAbcamから調達し、Alexa Fluor(登録商標)488ヤギ抗ウサギ二次抗体は、Invitrogenから購入した。ヒトTNF- α はR&D systemsから調達した。 K_2PtCl_4 、2'-デオキシグアノシン5'-モノホスフェートナトリウム塩水和物(5'-GMP)、及びアスコルビン酸ナトリウムは、Sigma Aldrichから購入した。電気化学のためのKClは、Sigma Aldrichから購入した。

【0081】

蒸留水は、0.22 μ mフィルターを含むMillipore Milli-Q Bioce1水精製システム(18.2 M Ω)に通して精製した。1H及び13Cスペクトルは400 MHz Varian NMR分光計で記録し、¹⁹⁵Pt NMRスペクトルは、 K_2PtCl_4 を外部標準として使用して500 MHz Varian NMR分光計で記録した。プレートリーダー分析を、Bio-Tek Synergy HTマイクロプレートリーダーで実施した。フローサイトメトリー試験を、FACS Diva v6を使用するデジタル取得を備えたBD LSRIIフローサイトメーターで実施した。共焦点像は、ニコンA1共焦点顕微鏡で記録した。エレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)及び高分解能質量分析法(HRMS)-ESIは、それぞれPerkin Elmer SCIEX API 1 plus及びThermo scientific ORBITRAP ELITE装置で記録した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-飛行時間(TOF)-質量分析法(MS)は、Bruker Autoflex(TOF)質量分析計で実施した。電気化学測定は、25℃で、CH Instruments, Inc. (Austin, TX)の分析システムモデルCHI 920cポテンショスタットで行った。FTIRスペクトルは、圧縮されたKBr錠剤とし

て調製された試料を使用して、OMNISCソフトウェアを備えたThermo-Nicolet 6700分光光度計で集めた。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析は、多波長UV-可視光検出器及び蛍光検出器を備えたAgilent 1200シリーズ装置で実施した。細胞は、Invitrogen life technologyから調達したCountess（登録商標）Automated Cell Counterを使用して計数した。

【0082】

細胞株及び細胞培養。ヒト前立腺癌細胞株LNCaP、PC3、及びDU145並びにRAW 264.7マクロファージは、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から調達した。DU145細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補ったイーグル最小必須培地（EMEM）中で、37℃で、5%CO₂中で成長させた。LNCaP、PC3、及びRAW 264.7細胞は、10%FBS及び1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補ったロズウェルパーク記念研究所（RPMI）1640培地中で成長させた。細胞は、3から4日ごとに継代し、継代数20に達すると凍結ストックから再開した。

10

【0083】

2-アセトキシ安息香酸無水物（アスピリン無水物）の合成：2-アセトキシ安息香酸（5.0g、28mmol）の30mLのCH₂Cl₂中の懸濁液を調製し、DCC（2.9g、13.9mmol）の10mLのCH₂Cl₂中の溶液を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。副生成物、ジシクロヘキシル尿素（DCU）をガラスフィルター中に濾去し、少量のCH₂Cl₂で洗浄した。溶媒を蒸発させ、生じた残渣を酢酸エチルに溶解させた。生じた懸濁液をガラスフィルターに通して濾過して残留DCUを除いた。濾液を蒸発させると無水物を透明な濃い油として与えたが、-20℃で保存すると凝固した。収量4.6g、定量的。¹H NMR（CDCl₃, 400MHz）：δ ppm, 8.08（d, 2H, J=7.9Hz）, 7.70（t, 2H, J=7.8Hz）, 7.40（t, 2H, J=7.7Hz）, 7.19（d, 2H, J=8.1Hz）, 2.31（s, 6H）。¹³C NMR（CDCl₃, 100MHz）：δ 169.42, 159.29, 151.83, 135.54, 132.24, 126.29, 124.42, 121.69, 20.89。IR（KBr）ν max（cm⁻¹）：3570（w）, 3491（w）, 3445（w）, 3332（br）, 3205（w）, 3100（s, C-H）, 2932（s, C-H）, 2855（w）, 2409（w）, 2032（w）, 1789（br, C=O）, 1728（br, C=O）, 1603（s, C=C）, 1581（s）, 1484（s, δ as CH₃）, 1451（s）, 1369（s, δ s CH₃）, 916（s）, 506（s）。HRMS m/z, C₁₈H₁₄NaO₇の計算値：（M+Na）+365.0637。実測値365.0638。融点：80-85℃。

20

30

【0084】

c, c, t-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]の合成：過酸化水素（30重量%、60mL）を、シスプラチン（1.0g、3.33mmol）を含む丸底フラスコに滴加した。反応混合物を75℃に5時間加熱した。山吹色の溶液を、暗所で一晩、室温に保ち、生成物の結晶化を可能にした。黄色の結晶を濾過により分離し、冷水で洗浄し、乾燥させると1gの化合物を得た。収率90%。IR（KBr）ν max（cm⁻¹）：3803（w）, 3515（w）, 3458（br, OH）, 3269（w）, 1582（s）, 1442（s）, 1378（s）, 1074（m, Pt-OH）, 860（br）, 542 [br, Pt-N(O)]。HRMS m/z C₁₂H₉N₂O₂Ptの計算値：（M+H）+333.9689。実測値333.9683。融点：295-300℃。

40

【0085】

プラチン-Aの合成。c, c, t-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]（100mg、0.30mmol）とアスピリン無水物（102.5mg、0.30mmol）の60mLのジメチルスルホキシド（DMSO）中の混合物を室温で24時間攪拌し、それに続いて65℃で12時間攪拌すると、透明な黄色の溶液を得た。反応混合物を15℃に冷却し、

50

複数のジエチルエーテル洗液と共に濃縮することによりDMSOを除去した。粗生成物をアセトニトリルに懸濁させ、ジエチルエーテルで沈殿させた。このプロセスを、最終生成物が完全にアセトニトリルに可溶になるまで、繰り返した。最後に、プラチン-Aのアセトニトリル溶液をジエチルエーテルにより沈殿させることにより、黄色を帯びた白色の固体として生成物を単離した。収率17% (25 mg)。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) (図S3): δ ppm, 7.82 (d, 1H, J=7.7 Hz), 7.47 (t, 1H, J=7.6 Hz), 7.27 (t, 1H, J=7.5 Hz), 7.06 (t, 1H, J=8.1 Hz), 6.00 (m, 6H), 2.29 (s, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) (図S3): δ ppm, 169.6, 149.7, 132.3, 132.0, 128.6, 125.6, 123.9, 21.8。¹⁹⁵Pt NMR (DMSO-d₆, 107.6 MHz) (図S4): δ ppm 1020.4。HRMS m/z C₉H₁₅Cl₂N₂O₅Ptの計算値: (M+H+) 496.0000。実測値495.9990 (図S5)。IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3485 (br), 3226 (br), 1738 (s, C=O), 1605 (s, C=C), 1567 (m, C=C), 1482 (m, δ as CH₃), 1450 (m), 1339 (br, δ s CH₃), 1226 (m), 1198 (s, Pt-OH), 1018 (w), 758 (m), 580 [m, Pt-N(O)]。融点: 110-115°C。

【0086】

プラチン-Aの代替合成: c, c, t-[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂] (142 mg、0.42 mmol)とアスピリン無水物 (537 mg、1.57 mmol)のジメチルホルムアミド (DMF) (60 mL)中の混合物を、65°Cで48時間攪拌すると、透明な黄色の溶液を得た。注意: アスピリン無水物を、少量ずつ、すなわち、0時間で175 mg、12時間で144 mg、及び20時間で218 mg加えた。DMFをロータリーエバポレーションにより除去した。粗生成物をアセトニトリルに再懸濁させ、ジエチルエーテルにより沈殿させた。このプロセスを、最終生成物が完全にアセトニトリルに可溶になるまで、繰り返した。最後に、プラチン-Aのアセトニトリル溶液をジエチルエーテルにより沈殿させることにより、生成物を、黄色を帯びた白色の固体として単離した。収率27% (56 mg)。

【0087】

サイクリックボルタンメトリー。電気化学的測定を、25°Cで、CH Instruments, Inc. (Austin, TX)の分析システムモデルCHI 920cポテンショスタットで実施した。ガラス状炭素作用電極、白金ワイヤー補助電極、及びAg/AgCl (3M KCl)参照電極を含む従来の3電極構成を、電気化学的測定に使用した。電気化学的データは、接続電位に関して補正しなかった。KClを、支持電解質として使用した。プラチン-A (2 mM)溶液を、0.1 mM KClと共に、pH 6.4及び7.4の20% DMF-リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)中に調製し、ボルタモグラムを異なるスキャン速度で記録した (図6)。

【0088】

Pt-GG測定: プラチン-A (1.485 mg、0.003 mM)を、アセトニトリル-水 (1:2、3 mL)に溶かし、2'-デオキシグアノシン5'-モノホスフェートナトリウム塩水和物 (5'-GMP) (5.20 mg、0.015 mM)、及びアスコルビン酸ナトリウム (2.64 mg、0.015 mM)を加え、この混合物を37°Cで240時間インキュベートした。こげ茶色の溶液を凍結乾燥した。生じた残渣を水に溶かし、MALDI-TOF-MSにより分析した (図7)。

【0089】

逆相高速液体クロマトグラフィー (Chromatography) (RPHPLC)によるプラチン-Aからのアスピリン放出: 還元性雰囲気下でプラチン-Aがアスピリンを放出する能力を、RP-HPLCにより試験した。プラチン-A (2.97 mg、2 mM)の還元を、アセトニトリル-水 (1:2、3 mL)中のアスコルビン酸ナトリウム (5.28 mg、10 mM)を使用して実施し、還元生成物をHPLCにより調べた。アスピ

リン (2 mM) 及びサリチル酸 (2 mM) を、クロマトグラム中のアスピリン及びサリチル酸ピークと照合する対照として使用した。各溶液 5 μ L を、Zorbax C18 カラム及び pH 7.0 の 60 : 40 アセトニトリル (1% トリフルオロ酢酸) : 酢酸アンモニウム緩衝液を移動相として使用して注入した。これらの実験に使用した波長は 280 nm であった (図 8)。

【0090】

(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド又は MTT アッセイ及びデータ分析。シスプラチン、アスピリン、シスプラチン+アスピリン、及びプラチン-A の細胞傷害性挙動を、PC3、DU145、LNCaP、及び RAW 264.7 細胞に対して、MTT アッセイを利用して評価した。細胞 (PC3、及び DU145 細胞では 2000 細胞/ウェル; LNCaP 及び RAW 264.7 では 10000 細胞/ウェル) を、96-ウェルプレートで 100 μ L の所望の培地に播種し、24 時間インキュベートした。細胞を、種々の濃度で異なるコンストラクトにより処理し、RAW 264.7 マクロファージ以外、37°C で 72 時間インキュベートした。マクロファージには 24 時間のインキュベーション時間を利用した。次いで、細胞を 20 μ L の MTT (PBS 中 5 mg/mL) で 5 時間処理した。培地を除去し、細胞を 100 μ L の DMSO で溶解させ、Bio-Tek Synergy HT マイクロプレートリーダーを利用して、紫色のホルマザンの吸光度を 550 nm で記録した。各ウェルを三連で実施した。細胞傷害性を、曝露されていない対照に対する平均増加パーセンテージ $\pm$ SD で表した。対照値を、0% 細胞傷害性又は 100% 細胞生存率と設定した。細胞傷害性データ (適切な場合) を S 字状曲線にフィッティングし、3 パラメーターロジスティックモデルを使用して IC₅₀ を計算したが、これは、処理されていない対照に比べて 50% 阻害を起こす化学療法剤の濃度である。平均 IC₅₀ は、実験条件下で細胞成長を 50% 低下させる薬剤の濃度であり、再現性があり統計的に有意な少なくとも 4 つの独立した測定値の平均である。IC₅₀ 値は、 $\pm$ 9.5% 信頼区間で報告した。この分析は、GraphPad Prism (San Diego, U. S. A) により実施した。

【0091】

アネキシン V アッセイによるアポトーシス検出。PC3 細胞を、6 ウェルプレートの各ウェルで、1 $\times$ 10⁶ 細胞/mL の密度で播種し、一晚成長させた。培地を変え、細胞を、25 μ M シスプラチン、25 μ M アスピリン、シスプラチン (25 μ M) とアスピリン (25 μ M) の混合物、及び 25 μ M のプラチン-A により 37°C で 8 時間処理した。陽性対照として、アポトーシスのためのエトポシド (100 μ M、インキュベーション時間 : 12 時間) 及び壊死のための H₂O₂ (1 mM、インキュベーション時間 : 45 分) を使用した。細胞をトリプシン処理し、繰り返し洗浄し、1,800 毎分回転数 (RPM) で 3 分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞密度を測定し、細胞を、1 $\times$ アネキシン V 結合緩衝液中で 1 $\times$ 10⁶ 細胞/mL に再懸濁させ、アッセイあたり 100 μ L を有するのに十分な体積を調製した。100 μ L の細胞懸濁液に、5 μ L の Alexa Fluor (登録商標) 488 アネキシン V 及び 1 μ L の 100 μ g/mL ヨウ化プロピジウム (PI) 希釈標準溶液を加え、15 分間室温でインキュベートした。インキュベーション期間の後、400 μ L の 1 $\times$ アネキシン V 結合緩衝液を各試料に加え、試料を氷上に保ったまま試料を穏やかに混合し、試料を直ちにフローサイトメーターで分析した。

【0092】

インビトロ COX 阻害アッセイ。Cayman Chemicals (カタログ番号 560101) の酵素免疫アッセイ (EIA) キットを使用して、プラチン-A がヒツジ COX-1 及び COX-2 を阻害する能力を評価した。COX 阻害アッセイは、製造業者のプロトコルの通りに実施した。ストック溶液は全て、製造業者の説明に従って調製した。この阻害アッセイは、2 段階のプロセス : COX 反応及び EIA を利用して実施した。COX 反応は、以下の試料の調製を含んでいた。

(i) バックグラウンド試料 : COX-1 及び COX-2 を、20 μ L の各酵素をエッペンドルフチューブに移し、チューブを沸騰水中に 3 分間配置することにより不活性化した

。不活性化の後に、 $970\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液、 $10\ \mu\text{L}$ のヘム、及び $10\ \mu\text{L}$ の不活性COX-1又は不活性COX-2を試験管に加えた。

(ii) COX-1又はCOX-2 100%初期活性試料： $950\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液、 $10\ \mu\text{L}$ のヘム、 $10\ \mu\text{L}$ のCOX-1又はCOX-2、及び $20\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液を各試験管に加えた。

(iii) COX-1又はCOX-2阻害剤試料： $950\ \mu\text{L}$ の反応緩衝液、 $10\ \mu\text{L}$ のヘム、 $10\ \mu\text{L}$ のCOX-1又はCOX-2、及び $20\ \mu\text{L}$ の異なる濃度（COX-1では、 0.25 、 0.5 、 0.75 、 1 、及び $1.5\ \text{mM}$ ；COX-2では、 0.75 、 1 、 1.25 、 1.5 、及び $2\ \text{mM}$ ）の検討中のCOX-1及びCOX-2阻害剤、アスピリン及びプラチン-Aを、各試験管に加えた。

10

【0093】

全試料を、 37°C の水浴中で5分間インキュベートした。 $10\ \mu\text{L}$ のアラキドン酸を全試料に加えることにより反応を開始させた。これらの試料をボルテックスにかけ、 37°C の水浴中でさらに2分間インキュベートした。 $50\ \mu\text{L}$ の $1\ \text{M}\ \text{HCl}$ を各試験管に加えて、酵素触媒作用を止めた。試験管を水浴から取り出し、 $100\ \mu\text{L}$ の飽和塩化第一スズ溶液を各試験管に加え、この混合物をボルテックスにかけた。これらの試料を室温で5分間インキュベートした。バックグラウンド試料を1：100倍に希釈し、COX 100%初期活性試料及びCOX阻害剤試料を1：2000倍に希釈した。

【0094】

EIAのために、 $100\ \mu\text{L}$ のEIA緩衝液を非特異的結合ウェルに加え、 $50\ \mu\text{L}$ のEIA緩衝液を最大結合ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のPGスクリーニングスタンダードを各標準ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のバックグラウンド試料をバックグラウンド試料ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のCOX 100%初期活性試料を特異的ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のCOX阻害剤試料、アスピリン及びプラチン-A試料を、特異的ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のPGスクリーニングアセチルコリンエステラーゼ（ACHE）トレーサーを、全活性及びブランクウェルを除き全ウェルに加えた。 $50\ \mu\text{L}$ のPGスクリーニングEIA抗血清を、全活性、非特異的結合、及びブランクウェルを除き全ウェルに加えた。EIAプレートをプラスチックフィルムで覆い、オービタルシェーカー上で、室温で18時間インキュベートした。ウェルを空にし、洗浄緩衝液で5回すすいだ。エルマン試薬（ $200\ \mu\text{L}$ ）を各ウェルに加え、それに続いて、 $5\ \mu\text{L}$ のトレーサーを全活性ウェルに加えた。EIAプレートを再びプラスチックフィルムで覆い、次いで、オービタルシェーカー上で、暗所で、室温で1時間インキュベートした。プレートリーダーを使用し、 $410\ \text{nm}$ の波長で吸光度を記録した。

20

30

【0095】

PC3細胞中のヒト腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）を使用するCOX-2の誘導及びプラチン-AによるCOX-2阻害の免疫蛍光法分析。PC3細胞を、 1×10^6 細胞/mLの濃度でガラスカバーガラスに播種し、一晚成長させた。次いで、細胞を血清除去培地中で24時間成長させた。次いで、ヒトTNF- α （ $20\ \text{ng/mL}$ ）を細胞に加え、2時間インキュベートした。プラチン-A（ $1\ \mu\text{M}$ ）、アスピリン（ $1\ \mu\text{M}$ ）、及び等モル比のシスプラチンとアスピリン（それぞれ $1\ \mu\text{M}$ ）を細胞に加え、さらに2時間インキュベートした。次いで、細胞を4%パラホルムアルデヒド溶液により、30分間室温で固定化した。次いで、細胞を、1%Triton X-100により、15分間室温で透過処理した。細胞を、ブロッキング緩衝液（ $1\times\ \text{PBS}$ 、 0.1% ヤギ血清、 0.075% グリシン）により1時間室温でブロッキングした。COX-2用の一次ウサギポリクローナル抗体（ブロッキング緩衝液中 $2.5\ \mu\text{g/mL}$ ）を加え、インキュベーションを 4°C で12時間実施した。カバースリップを、水で3回、PBSで3回洗浄した。次いで、細胞を二次AlexaFluor488ヤギ抗ウサギ抗体と共に 37°C で1時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液で5回洗浄した後、細胞を、封入剤（ $\text{pH}\ 8.0$ の $20\ \text{mM}$ トリス、 0.5% の没食子酸n-プロピル、及び 70% グリセロール）と共に顕微鏡スライドに載せた。DAPI及びFITCフィルターを使用して、 $500\ \text{ms}$ の露

40

50

光で画像を集めた。相対蛍光単位 (RFU) も、プレートリーダーにより、488 nm の励起波長及び 519 nm の発光波長で分析した。

【0096】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるプラチン-A の抗炎症性。RAW 264.7 細胞を、10,000 細胞/mL の濃度で、96 プレートに播種し、一晚成長させた。予防的な抗炎症処理のために、プラチン-A (10 μ M)、アスピリン (10 μ M)、シスプラチン (10 μ M)、及び等モル比のシスプラチンとアスピリン (それぞれ 10 μ M) を、RAW 細胞と共に 6 時間インキュベートした。リポ多糖 (LPS) (100 ng/mL) を加え、細胞をさらに 12 時間インキュベートした。治療的な抗炎症処理のため、LPS (100 ng/mL) を RAW 細胞に加え、6 時間インキュベートした。次いで、プラチン-A (10 μ M)、アスピリン (10 μ M)、シスプラチン (10 μ M)、及び等モル比のシスプラチンとアスピリン (それぞれ 10 μ M) を細胞に加え、12 時間インキュベートした。ELISA を、サイトカインインターロイキン (IL) -6、IL-10、及び TNF- α に対して、上清に実施した。簡単に言うと、抗体を被覆したプレートを、PBS 中 10% FBS により 1 時間室温でブロックし、それに続いて 3 回洗浄した。RAW 細胞上清を、プレート上で、2 時間室温でインキュベートした。この後に、直ちに洗浄し、サイトカイン-ビオチンコンジュゲート及びストレプトアビジン希釈標準溶液と共に連続的にインキュベートした。最後に、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを含む基質試薬 (100 μ L) を各ウェルに加え、15 分間インキュベートし、50 μ L の H₂SO₄ (0.1 M) を加えて反応を止めた。BioTek Synergy HT well プレートリーダーを利用して、吸光度を 450 nm で記録した。

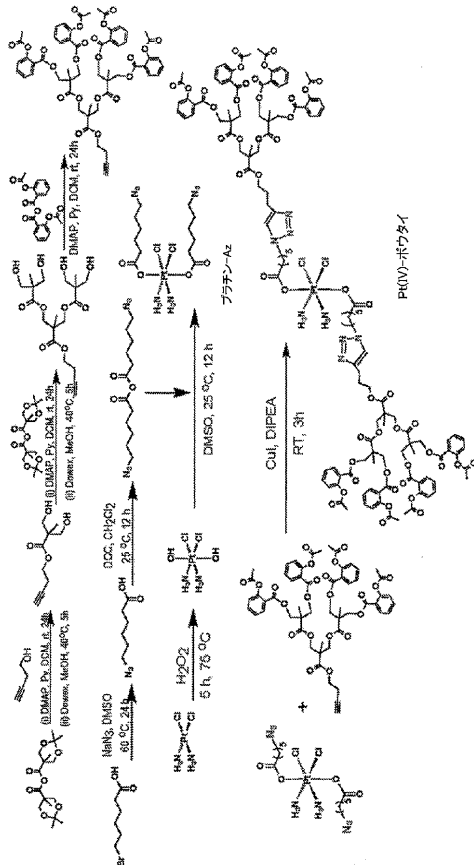
【0097】

ボウタイ化合物の合成。プラチン-Az (0.072 g、0.117 mmol) と Ac-[G2]-(Asp)₄ (0.503 g、0.470 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.030 g、0.235 mmol) との 10 mL ジメチホルムアミド (DMF) 中の混合物を、不活性ガスのバージ下で、1 時間室温で攪拌した。CuI (0.022 g、0.117 mmol) を、この反応混合物に加え、攪拌を 3 時間継続した。ロタバック (rotavac) を使用して溶媒を除去した。粗生成物をアセトニトリルに懸濁させ、ジエチルエーテルにより沈殿させた。最後に、アセトニトリル溶液をジエチルエーテルにより沈殿させることにより、黄色を帯びた白色の固体として生成物を単離した。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ ppm, 7.85 (d, 8H), 7.66 (t, 8H), 7.34 (t, 8H), 7.22 (d, 8H), 6.53 (m, 6H), 4.38 (s, 12H), 4.16 (m, 20H), 2.20 (s, 24H), 1.78 (m, 10H), 1.45 (m, 4H), 1.23 (m, 18H), 1.308 (m, 18H)。ESI-MS m/z C₁₂₂H₁₃₃Cl₂N₈O₄₈Pt の計算値: (M-H)⁻ 2742.7。実測値 2742.4。

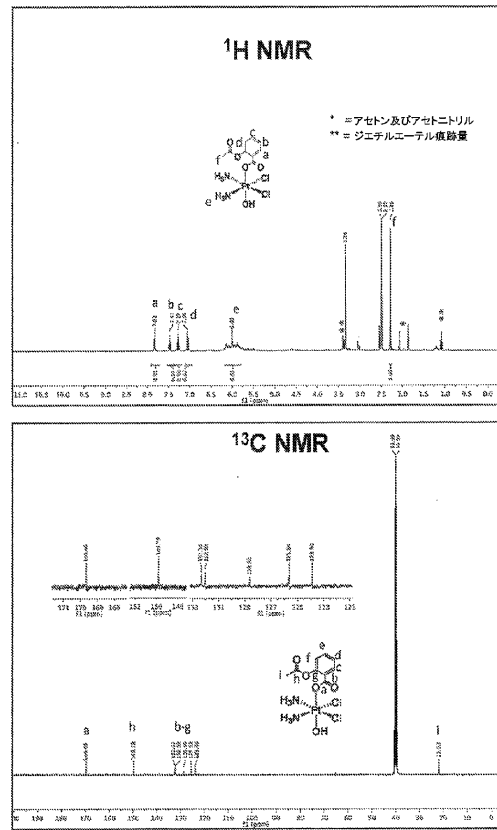
【0098】

このように、シスプラチン及びシクロオキシゲナーゼ阻害剤の放出のためのプロドラッグの実施形態が開示される。当業者は、本明細書に記載されるナノ粒子及び方法が、開示されたもの以外の実施形態により実施可能であることを認識するだろう。開示される実施形態は、限定のためでなく説明のために提示されている。

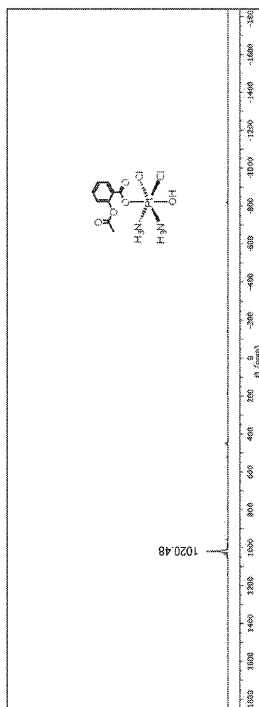
【図 1】



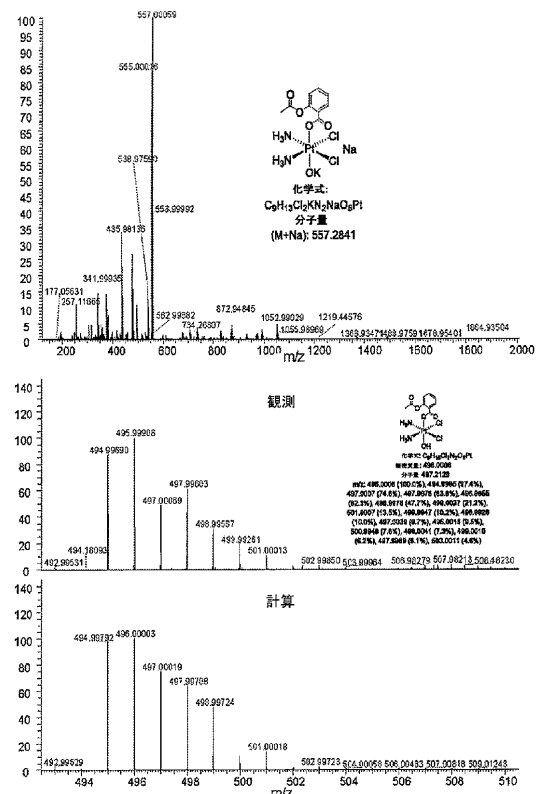
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【图 6】

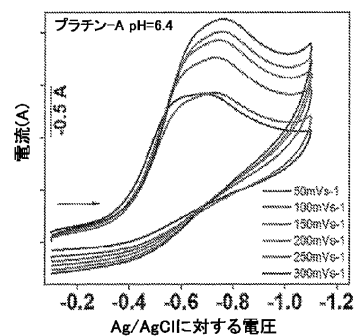


图 6

【图 8】

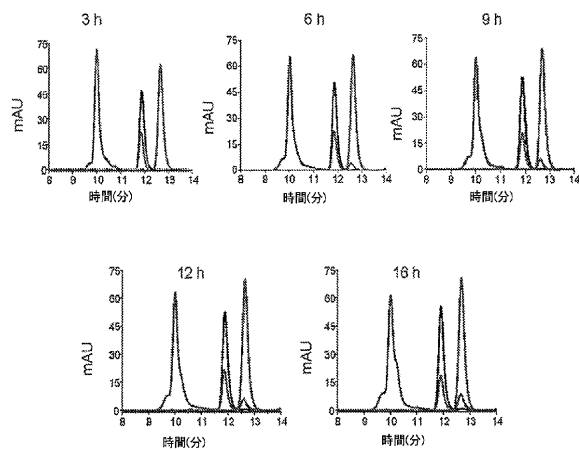
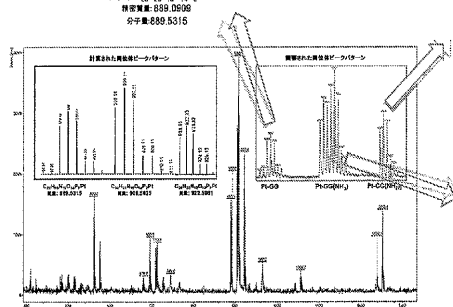
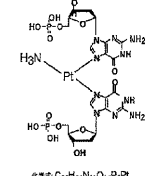


图 8

图7

【図 9】

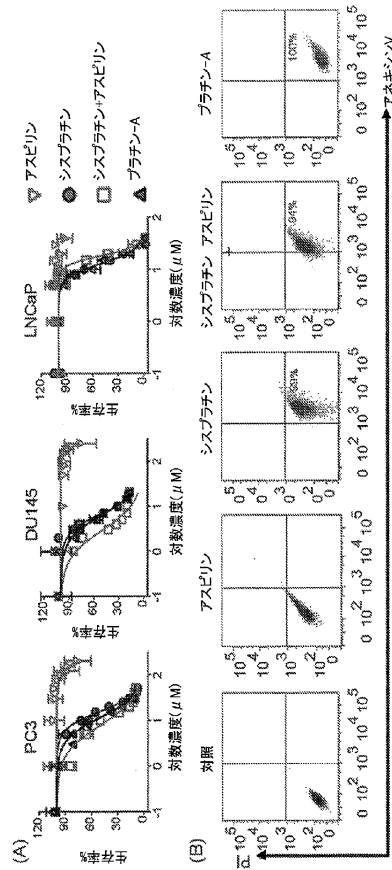


図 9

【図 10】

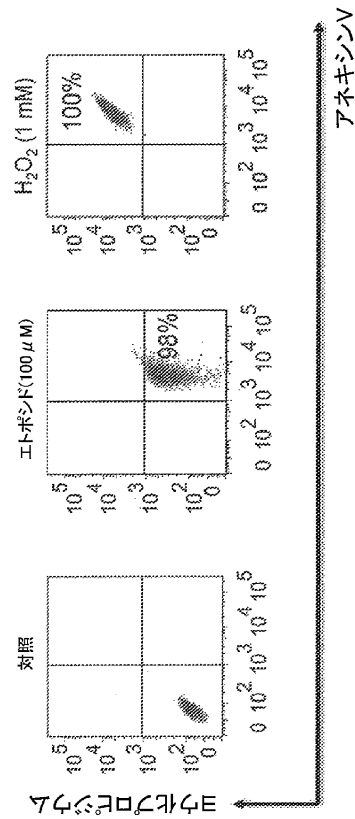


図 10

【図 11】

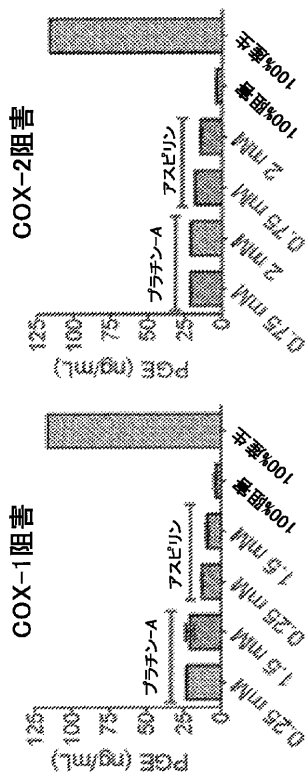


図 11

【図 12】

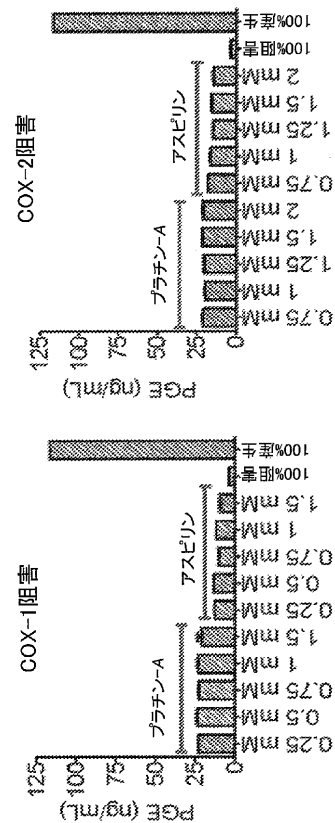


図 12

【図14】

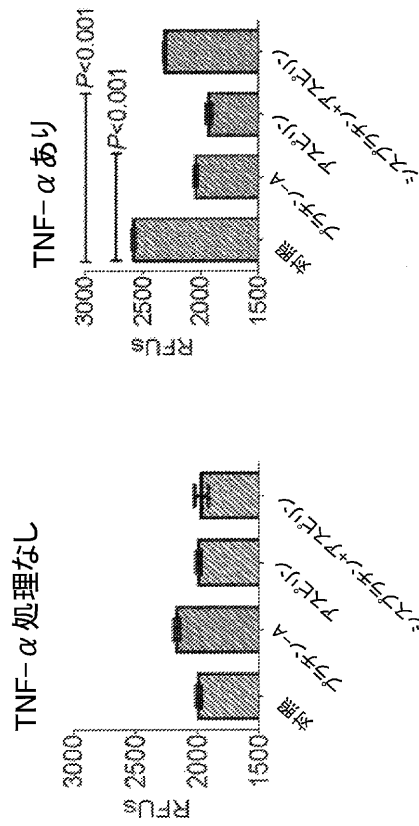


図14

【図15】

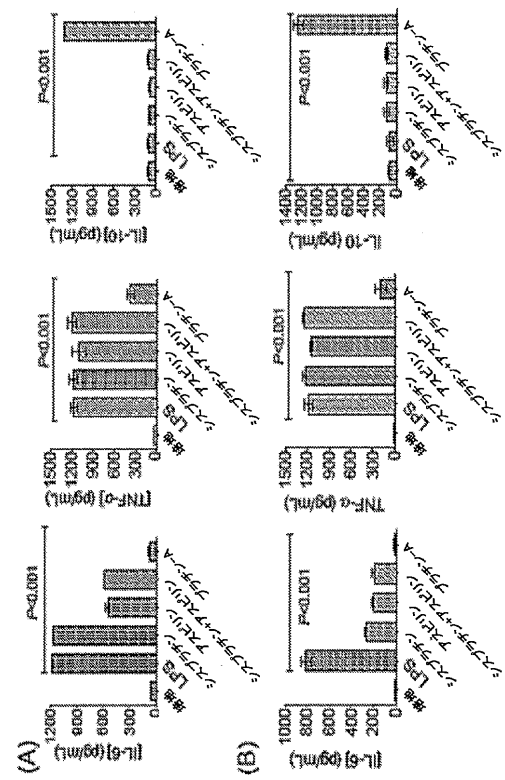


図15

【図16】

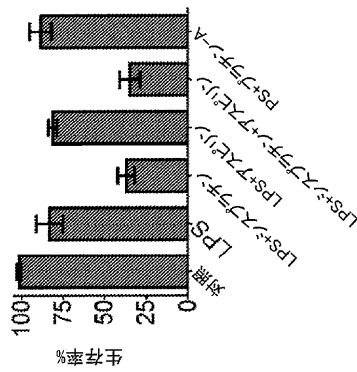


図16

【図17】

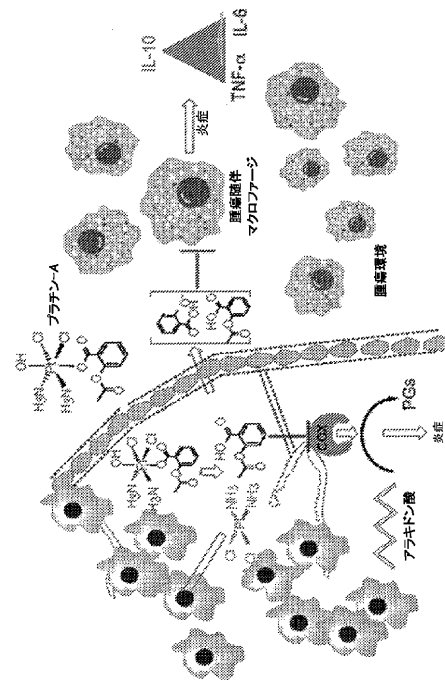


図17

【図 13】

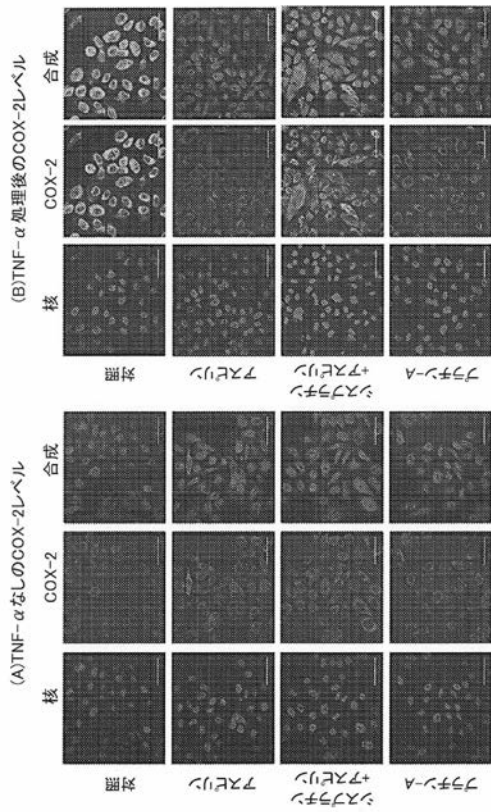


図13

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/069997
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07F 15/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 31/282(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 31/00(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 15/00; A61K 47/48; A61K 31/282; A61P 35/00; A61P 31/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: cisplatin, cyclooxygenase inhibitor, Pt, prodrug, anti cancer, aspirin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SABINE H. VAN RIJT et al., 'Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs' Drug Discovery Today, Vol.14, pp.1089-1097 (2009) See introduction; Figures 3 and 4; and page 1095, left column, lines 25 - 57.	1-3,13-15
A	WANG YUELING et al., 'Effect of aspirin alone or combined with cisplatin on human cervical carcinoma HeLa cells' Journal of Medical Colleges of PLA, Vol.25, pp.11-18 (2010) See abstract; Table 2; and figures 3 and 4.	1-3,13-15
A	ALOIS KOZUBIK et al., 'Novel anticancer platinum(UV) complexes with adamantylamine: their efficiency and innovative chemotherapy strategies modifying lipid metabolism' Metal-Based Drugs, Vol.2008, article ID 417897, 15 pages (2008) See abstract; Figure 1; and Table 1.	1-3,13-15
☐ 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 16 March 2015 (16.03.2015)		Date of mailing of the international search report 17 March 2015 (17.03.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. ++82 42 472 7140		Authorized officer LEE YOUNJOO Telephone No. +82-42-481-3477 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/069997

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.: 21 and 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 21 and 22 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy, as well as prevention method, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☒ Claims Nos.: 17
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:
Claim 17 is unclear under PCT Article 6, because it refers to any one of multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 4-12, 16 and 18-22
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/069997

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01) A 6 1 P 29/00

(81)指定国 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,AT,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,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 ダール シャンタ

アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 6 0 6 アセンズ ティモシー ロード 1 5 0 0 ユニ
ット 2 9

(72)発明者 パサク ラケシュ

アメリカ合衆国 オハイオ州 4 3 2 0 2 コロンバス スティンチクーム ドライヴ 5 1 9
アパートメント 5

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA02 NA15 ZB112 ZB262 ZC752

4C086 AA01 AA02 AA03 DA17 HA12 MA02 MA04 NA15 ZB11 ZB26
ZC75

4H050 AA01 AA03 AB28 WB13 WB14 WB17 WB21