

(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2009-513710
(P2009-513710A)

(43) 公表日 平成21年4月2日(2009.4.2)

| | | |
|-------------------------------------|-------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C07D 498/22 (2006.01) | C07D 498/22 C S P | 4 C 0 7 2 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A61K 39/395 C | 4 C 0 8 5 |
| A61K 31/422 (2006.01) | A61K 39/395 L | 4 C 0 8 6 |
| A61P 43/00 (2006.01) | A61K 31/422 | |
| A61P 35/00 (2006.01) | A61P 43/00 1 O 5 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2008-538978 (P2008-538978)
 (86) (22) 出願日 平成18年10月31日 (2006.10.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年6月27日 (2008.6.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/042565
 (87) 国際公開番号 W02007/053650
 (87) 国際公開日 平成19年5月10日 (2007.5.10)
 (31) 優先権主張番号 11/264,502
 (32) 優先日 平成17年10月31日 (2005.10.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/814,651
 (32) 優先日 平成18年6月16日 (2006.6.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503049667
 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,
 オースティン, ウエスト 7ティーエイチ
 ストリート 201
 (74) 代理人 100080816
 弁理士 加藤 朝道
 (74) 代理人 100098648
 弁理士 内田 潔人

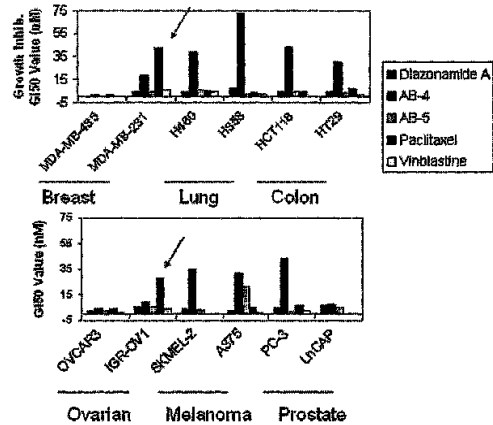
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジアゾンアミドA類似体

(57) 【要約】

特定のジアゾンアミドA類似体ならびにその塩およびコンジュゲートは増殖性疾患の治療に効果的である。

【選択図】 図1

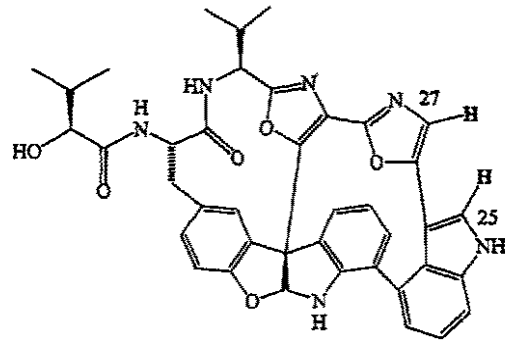


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式

【化 1】



(I)

10

の化合物またはその製薬上許容される塩またはコンジュゲート。

【請求項 2】

製薬上許容される塩の形態である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

式 I の化合物がターゲティング剤に結合されている、請求項 1 に記載のコンジュゲート

20

【請求項 4】

請求項 1 に記載の化合物を有効成分として含み、製薬上許容される賦形剤をさらに含む、医薬組成物。

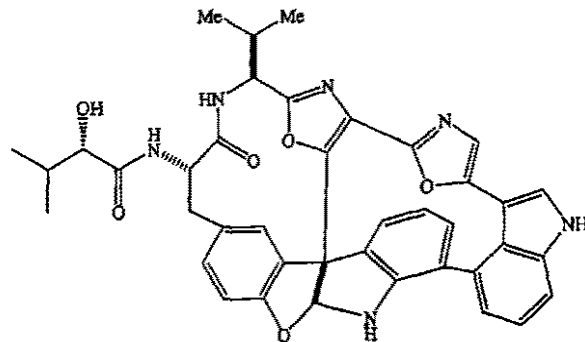
【請求項 5】

増殖性疾患を治療する方法であって、このような治療を必要とする対象に有効量の請求項 1 に記載の化合物またはその製薬上許容される組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 6】

式：

【化 2】

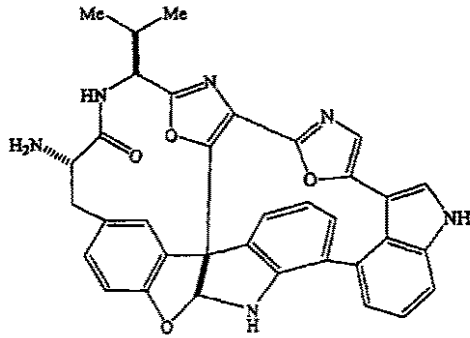


30

の化合物を合成するための方法であって、式：

40

【化 3】



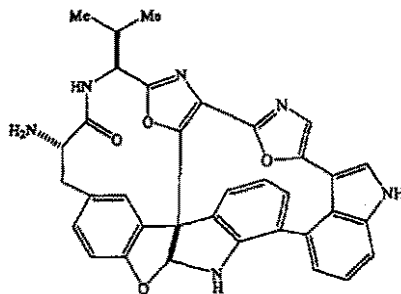
10

の化合物または少なくとも1つの環窒素上に水素の代わりに保護基を有するその保護形態を、(S)-2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸の活性化エステルまたは2-ヒドロキシル基上に保護基を有するその保護形態で処理した後に、そのアミン基またはヒドロキシル基上に存在している保護基を除去することを含む、方法。

【請求項 7】

(S)-2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸の活性化エステルが(S)-2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルであり、これが式：

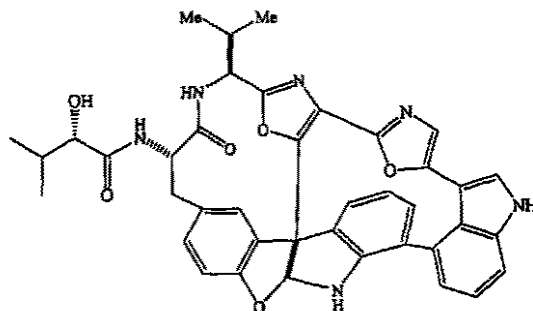
【化 4】



20

の化合物で処理され、式：

【化 5】



30

の生成物が得られる、請求項 6 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、優れた抗腫瘍活性を有するジアゾンアミド A の類似体に関する。この化合物の合成経路も開示される。

【背景技術】

【0002】

ジアゾンアミド A は海洋生物ジアゾナ・アングラータ(Diazona angulata)から初めて単離された紡錘体阻害剤である。この化合物およびその類似体を合成するための多くの試みがなされてきた。PCT公報 WO 03 / 106438 には推定合成経路が記載されている

50

が、この公報に示されているジアゾンアミド A の構造は適切でない。米国特許第 7,022,720 ('720)号にはジアゾンアミド A の構造が正しく開示され、触媒的ヘックエンドサイクリゼーション(catalytic Heck endocyclization)、立体制御縮環ピナコール転位(stereo-controlled ring-contracting pinacol rearrangement)、および分子内光誘起電子移動によるインドールアリアル化の併用によるそのいくつかの類似体の合成が記載されている。いくつかの類似体の一般構造が示されている。この特許の優先権を主張する後続出願が 2005 年 10 月 31 日に出願され、第 2006/0089397 号として公開され、これには本明細書で請求される類似体化合物 J の構造が含まれている。この '720 号特許には、驚くべき強力な抗有糸分裂活性を有する本発明の化合物は明示されていない。

10

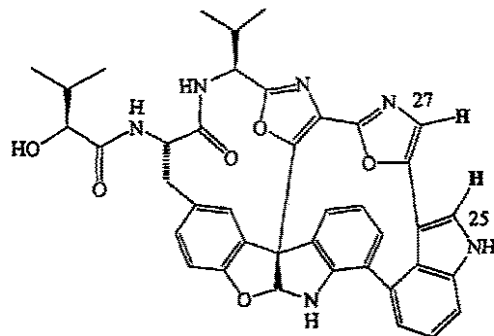
【発明の開示】

【0003】

本発明は式

【0004】

【化 1】



20

の化合物(化合物 J)およびその製薬上許容される塩に関する。本発明はまた、この化合物および/またはその塩を含有する医薬組成物、安定化剤またはターゲティング剤に結合されたこの化合物の修飾形態、ならびにこれらの化合物および処方物を用いて増殖性疾患、特にタキソール(Taxol)(商標)耐性癌を治療する方法に関する。

【0005】

別の態様において、本発明は、化合物 J およびその塩を合成するための方法に関する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

化合物 J は、以下の例で示されるように、ある種の癌、特にタキソール(Taxol)(商標)に耐性のある癌に対して強力な抗有糸分裂活性を有することが示されている。化合物 J はその遊離塩基形態で供給することもできるし、あるいは製薬上許容される塩として、または図示されている形態と対応する塩の混合物として供給することもできる。好適な塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヒドロスルフェート(hydrosulfates)などの無機酸の塩、または酢酸塩、ギ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸付加塩などが挙げられる。

【0007】

さらに、化合物 J はターゲティング剤などの部分(moieties)と結合させてもよい。このようなターゲティング剤としては、抗体またはその免疫活性フラグメント、例えば、腫瘍抗原に対する、または腫瘍関連の受容体もしくはインテグリンに対する単鎖抗体形態、およびこれらの部分(moieties)に対するペプチドミメティクスなどがある。さらに、化合物 J は薬物動態を変化させるため、ポリエチレングリコールなどの賦形剤と結合させてもよい。

40

【0008】

本発明において有用な処方物としては、引用することにより本明細書に繰込み記載される Remington's Pharmaceutical Sciences, 最新版, Mack Publishing Co., Easton, PA に示されているものなどの標準的な処方物がある。このような処方物としては、経口投与、徐放、局所投与、非経口投与、または担当する医師もしくは獣医師により決定される他の

50

いずれかの好適な経路向けにデザインされたものが含まれる。このように投与は全身投与であっても局所投与であってもよい。好適なビヒクルまたは賦形剤としては、リポソーム、ミセル、ナノ粒子、ポリマーマトリックス、バッファーおよび医師に知られている全範囲の処方物が含まれる。

【0009】

化合物Jは増殖性疾患、特に、乳房、卵巣、肺、結腸、前立腺、黒色腫、結腸、膵臓、神経膠腫、癌腫(carcinoma)などに関連する腫瘍および悪性疾患の治療において特に有用である。

【0010】

また、化合物Jおよび/またはその塩および/またはそのコンジュゲートを含むこれらの処方物は、付加的抗腫瘍薬などの他の薬剤、または栄養もしくは健康全般を補助する化合物などの他の緩和化合物と併用してもよい。

10

【0011】

化合物Jは、遊離型のアミノ前駆体をS - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル - 2 - ヒドロキシ - 3 - メチルプタノエートで処理することにより簡便に合成される。これによりこの遊離アミンは3 - メチル - 2 - ヒドロキシブチレートへ変換する。

【0012】

当業者ならば、このカップリング反応は、単に例に過ぎないが、N - ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、ペルフルオロフェニルエステル、N - ヒドロキシフタルイミドエステル、カルボン酸とカルボジイミドとの反応により生じた活性化エステル、およびアミンをアクリル化してアミド結合を形成させるために便宜に用いられる他の活性化エステルといった2 - ヒドロキシ3 - メチルプタノエートなどの他の活性化エステルによって達成することもできることが分かるであろう。よって、本発明は、活性化2 - ヒドロキシ - 3 - メチルプタノエート誘導体（所望により2 - ヒドロキシルの部位で保護されていてもよい）と上記のアミンを結合させることにより化合物Jを製造する方法を提供する。このアミンもまた所望により保護形態であってもよく、すなわち、このアミンはそのインドール窒素とインドリン窒素の一方または両方上に保護基を有し得る。ヒドロキシルに用いるのに好適な保護基としては、アシル基、シリル基、ピランアセタールなどが挙げられる。このアミン化合物の環窒素原子に用いるのに好適な保護基は、ヒドロキシプタノエートにより活性化されたエステルとの反応を意図していないが、カルバメートまたはトリフルオロアセテートなどのアシル基ならびにシリル基が挙げられる。好適な保護基ならびにそれらを付加および除去する方法は当技術分野では周知であり、例えば、T. H. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 第2版に記載されている。

20

30

【0013】

下記の実施例は例として示されるものであり、本発明を限定するものではない。実施例1 ~ 16は化合物Jの合成を記載している。実施例17 ~ 20はその生物活性を記載している。

【実施例】

【0014】

実施例1

40

7 - プロモインドール

2 - プロモニトロベンゼン (1 . 1 0 k g , 5 . 4 5 m o l) を室温でテトラヒドロフラン (1 0 L) に溶解させた。この溶液を - 7 8 に維持した槽内で攪拌しながら冷却した。内部温度が - 4 0 に達した際に、臭化ビニルマグネシウム (1 6 . 3 L , 1 6 . 3 m o l) を、添加中、内部温度が - 4 0 に維持されるような速度で添加した。添加が完了したところで、反応物を槽から取り出し、45分かけて - 3 0 までゆっくり温めた。時々冷却する必要があった。この - 3 0 の反応溶液を軽く冷却した (~ 1 0) 飽和 N H ₄ C l 水溶液 (1 0 L) を急速に加えてクエンチ (quench) した。若干の発泡が見られた。(塩化アンモニウム溶液への逆クエンチも上手くいった。)これによりゲル形態の不溶マグネシウム塩をいくらか含む二相混合物が得られた。この混合物を30分間攪拌する

50

と、分離した。水層についてテトラヒドロフラン(10 L)を用いて逆抽出を行った。合した有機層を減圧下、槽温35で蒸発させ、得られた暗色油を塩化メチレン(5 L)に取り、 Na_2SO_4 で乾燥させた。この混合物を濾過し、濃縮した。得られた材料をクロマトグラフィーに付し、2%酢酸エチル-ヘキサンで溶出し、7-プロモインドール(5.57 g, 収率52%)を灰白色固体として得た。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 提示構造と一致。

【0015】

実施例 2

2-アセトアミド-3-(7-プロモ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸

攪拌子、窒素雰囲気、熱電対および冷却器を備えた5 Lの三口丸底フラスコに、実施例1の標題化合物(252.1 g, 1.29 mol)、次いで酢酸(1.5 L)および無水酢酸(760 mL, 8.04 mol)を加えた。20分間攪拌した後、L-セリン(266.9 g, 2.53 mol)を入れた。この混合物を4時間攪拌した後、40まで加熱した。大部分の固体が溶けた後、この反応物を90まで加熱し、その後110まで急速進行させた。次に、この反応物を80まで冷却し、この温度で攪拌し、反応をHPLCによりモニタリングした。5時間後、クロマトグラムに7-プロモインドールが存在しないことを判断して反応が完了した。除熱し、反応物を一晩室温で攪拌し続けた。

【0016】

メタノール(450 mL)を加え、反応物を -50 で真空濃縮し、粘稠な黒いタールとした。この残渣にメタノール(3 L)を加え、激しく振盪した後、残渣の大部分が溶液に移行し、後に微細な沈殿が残った。この混合物に H_2SO_4 (52.5 mL)を加え、この反応物を還流下で一晩攪拌した。この反応物を室温まで冷却し、テトラヒドロフラン(3 L)で希釈した。この溶液を、飽和 NaHCO_3 水溶液(4 L)の入った12 L分液漏斗に入れた。この混合物についてメチルト-ブチルエーテル(3×4 L)を用いて抽出を行った。有機層を合わせ、ブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた後、真空濃縮し、褐色固体と褐色油の混合物を得た。この粗生成物に塩化メチレン(500 mL)を加えたところ、白色固体がいくらか溶けずに残った。これらの結晶を濾過し、 ~ 10 gの生成物を得た。この濾液に種結晶を加えたところ、30分後に褐色固体が沈殿した。この新たな混合物を濾過し、さらなる種結晶を加えて第三の沈殿生成物を得、この第三の混合物も濾過した。種結晶を加えてもさらなる生成物は得られなかった。この濾液を真空濃縮して褐色泡沫を得、これを塩化メチレン(600 mL)に再溶解した。この溶液にメチルト-ブチルエーテル(MTBE)(1,250 mL)をゆっくり加えると、褐色固体が沈殿した。この混合物を濾過し、濾液を他の不純サンプルに加えた後、塩化メチレン-ヘキサンで溶出するカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分はあまり純粋でなかった(範囲50%~75%)、全てMTBEを用いて再結晶させ、標題化合物を得た(139 g, 収率33%, 純度75%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 提示構造と一致。

【0017】

実施例 3

2-アミノ-3-(7-プロモ-1H-インドール-3-イル)プロパン酸メチル塩酸塩

メタノール(3.4 L)中、実施例2の標題化合物(342 g, 1.05 mol)の攪拌混合物に H_2SO_4 (340 mL)をゆっくり加えた。得られた暗褐色混合物を16時間加熱還流し、この時点でHPLC分析は反応の完了を示した。反応物を室温まで冷却し、水(4.8 L)、重炭酸ナトリウム(342 g)および塩化メチレン(4.8 L)の攪拌混合物中でゆっくりクエンチした。1.5時間攪拌を続けた。層に分け、水層について塩化メチレン(3.0 L)を用いて2回逆抽出を行った。合わせた抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して黒いタールを得た。この材料を塩化メチレン(3.0 L)に溶解させた。ジエチルエーテル中1Nの HCl (1.1 L)を外冷却しながらゆっくり加えた。この懸濁液を氷浴温度まで冷却し、濾過した。これらの固体を塩化メチレン(500 mL)で2回、ヘキサン(500 mL)で3回洗浄した。これらの固体を一定質量となる

10

20

30

40

50

まで32の真空炉で乾燥させ、標題化合物を得た(267.4g, 収率76%)。¹H NMR (CDCl₃): 提示構造と一致。

【0018】

実施例4

2 - ((S) - 2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - メチルブタンアミド) - 3 - (7 - プロモ - 1H - インドール - 3 - イル) プロパン酸メチル

実施例3の標題化合物(256.6g, 770mmol)、TBTU(296.4g, 1.2当量)およびCbz-L-パリン(212.7g, 1.1当量)をジメチルホルムアミド(DMF, 無水, 2,700mL)に溶解させ、30分間0まで冷却した。ジイソプロピルエチルアミン(DIEA, 268mL)をゆっくり加え、この溶液を室温まで温めた。攪拌を4時間続け、この時点でHPLCは反応の完了を示した。この反応物を酢酸エチル(11L)および水(7.5L)で希釈した。この混合物を1時間攪拌し、分離させた。有機層を水(7.5L)で1回、ブライン(7.5L)で2回、飽和NaHCO₃(7.5L)で2回洗浄した。この材料を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮して褐色黒色固体を得た。この材料を塩化メチレン(7.5L)に取り、同質の別ロットの材料22.2gおよびシリカゲル(400g)と合わせた。この粗化合物をシリカ上に保持するために溶媒を除去した。この材料を半分に分け、各半分を、6in x 4ftシリカ重力カラムのクロマトグラフィーに付した。各々、塩化メチレン(20L)、次いで5%アセトン含有塩化メチレン(20L)、次いで8%アセトン含有塩化メチレン(30L)で溶出し、標題化合物を得た(383g, 収率89%)。¹H NMR (CDCl₃): 提示構造と一致。

10

20

【0019】

実施例5

2 - ((S) - 1 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 2 - メチルプロピル) - 5 - (7 - プロモ - 1H - インドール - 3 - イル) オキサゾール - 4 - カルボン酸メチル

テトラヒドロフラン(15L)に溶解させた実施例4の標題化合物(361.4g, 681mmol)の攪拌溶液にジクロロジシアノキノン(340.8g, 1,500mmol)を加え、6時間加熱還流し、この時点でHPLCは反応の完了を示した。この反応物をその容量が1/4になるまで濃縮し、酢酸エチル(12L)で希釈した。得られた黒い溶液を飽和NaHCO₃水溶液(5.5L)で3回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、濃縮し、標題化合物を黒色固体として得た(392g, 収率100%)。¹H NMR (CDCl₃): 提示構造と一致。

30

【0020】

実施例6

2 - ((S) - 1 - アミノ - 2 - メチルプロピル) - 5 - (7 - プロモ - 1H - インドール - 3 - イル) オキサゾール - 4 - カルボン酸メチル塩酸塩

酢酸(1.33L)中33%のHBrに実施例5の標題化合物(403.4g, 766mmol)を加え、1時間20分激しく攪拌した。この混合物を外部冷却し、激しく振盪しながら、ゆっくり注意深くMTBE(12L)に加えた。この混合物を1時間0で攪拌し、N₂下で濾過した。これらの吸湿性固体をMTBE(1L)で洗浄し、一定質量となるまで真空炉で乾燥させ、標題化合物(277.5g, 76.5%)を微細な褐色固体として得た。¹H NMR (CDCl₃): 提示構造と一致。

40

【0021】

実施例7

2 - ((S) - 1 - ((S) - 2 - (ベンジルオキシカルボニルアミノ) - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロパンアミド) - 2 - メチルプロピル) - 5 - (7 - プロモ - 1H - インドール - 3 - イル) オキサゾール - 4 - カルボン酸メチル

0で攪拌したジイソプロピルエチルアミン(225mL, 1,290mmol)に、ジメチルホルムアミド(無水, 2.77L)中、実施例6の標題化合物(277.5g, 586.5mmol)、Cbz-L-チロシン(194.2g, 615.9mmol)お

50

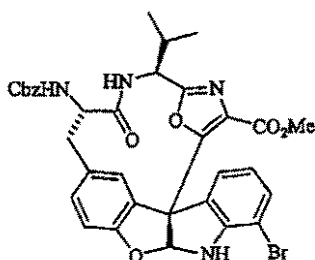
よび T B T U (2 0 7 . 2 g , 1 . 1 当量) の溶液を加えた。この反応物を室温まで温め、16時間攪拌し、この時点で H P L C は反応の完了を示した。この反応溶液を飽和 N a H C O ₃ 水溶液 (1 2 . 0 L) にゆっくり注ぎ、30分間攪拌した。沈殿を濾過し、濾過ケーキを水で十分洗浄した。得られた褐色材料を一定質量となるまで 4 0 の真空炉で乾燥させ、標題化合物 (4 3 5 g) を得た。この標題化合物をさらに再結晶により精製した。標題化合物を 7 0 のイソプロパノール (9 . 0 L) に溶解させた。不溶材料を濾去し、濾液を、ヘキサン (9 . 0 L) をゆっくり加えながら加熱した。この懸濁液を室温まで冷却し、この時点で氷浴を適用した。冷却されたところで、この混合物を氷浴温度で 3 0 分間攪拌し、濾過した。固体をヘキサンで洗浄し、4 0 の真空炉で一定質量となるまで乾燥させ、純粋な標題化合物を得た (2 6 4 g , 6 1 % 収率) 。 ¹ H N M R (C D C l ₃) : 提示構造と一致。

【 0 0 2 2 】

実施例 8

【 0 0 2 3 】

【 化 2 】



実施例 7 の標題化合物 (4 5 . 0 g , 6 5 m m o l) をテトラヒドロフラン (3 2 5 m L) に溶解させ、- 2 0 の、2, 2, 2 - トリフルオロエタノール (1 3 . 0 L) 中、P h I (O A c) ₂ (2 0 g , 6 2 m m o l) および L i O A c (1 2 . 7 g , 1 9 6 m m o l) の溶液に手早く加えた。この溶液を - 2 0 で 2 5 分間攪拌し、この時点で固体 N a H C O ₃ (1 1 7 . 5 g) を加えた。冷浴を外し、さらに 3 0 分間攪拌を続けた。この混合物を 1 0 で濾過し、濾液を濃縮した。残渣 9 4 . 6 g を C H C l ₃ - テトラヒドロフラン (3 : 1 , 3 0 0 m L) に取り、10分間音波処理した。沈殿した不要のジアステレオマーを濾去し、濾液を濃縮し、標題化合物を得た。上記の操作を計 3 回行い、合わせて計 2 2 3 . 6 g の粗標題化合物を得た。この粗標題化合物をまず、100% 酢酸エチルで溶出するシリカプラグ濾過により精製した。これにより 1 7 9 . 9 g の材料が得られ、これを複数のカラムクロマトグラフィーによりさらに精製した。第一のカラムは 6 : 1 塩化メチレン - テトラヒドロフランを用いて溶出した。これにより 7 1 . 1 g の材料が得られ、これを 6 : 1 塩化メチレン - テトラヒドロフラン (2 0 0 m L) に取り、一晩冷蔵した。沈殿した不要なジアステレオマーを濾去し、濾液を濃縮し、6 6 . 6 g の化合物を得た。この材料をさらに 2 回、1 5 : 1 塩化メチレン - テトラヒドロフランで溶出するクロマトグラフィーに付し、2 回 (2 つの画分) で標題化合物を得た (1 6 . 8 g および 9 . 3 g) 。 ¹ H N M R (D M S O d - 6) : 提示構造と一致。質量スペクトル (E S I) m / z : 6 8 7 (M + 1) 。

【 0 0 2 4 】

実施例 9

【 0 0 2 5 】

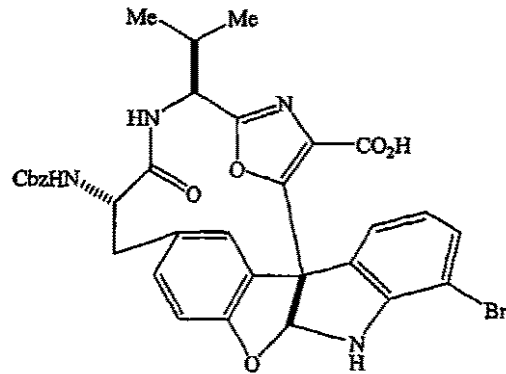
10

20

30

40

【化3】



10

実施例8で合成した化合物(102 mg, 0.148 mmol)の入ったフラスコにメタノール(3.6 mL)を加えた。この溶液を氷水浴で15分間冷却した。LiOHの保存水溶液(35.4 mg / 0.6 mL, 1.48 mmol)を0で滴下した。この混合物を室温まで温め(全ての沈殿物を溶解させ)、4時間攪拌した。LCMSで確認したところ、残っていた出発材料は1%未満であった。この反応混合物に約10 gの氷を加え、温度を0まで下げた。HCl水溶液(1 N, 1.6 mL)を0で滴下し、反応混合物のpHを2~3の間に調整した。酢酸エチル(2 x 20 mL)を用い、目的の酸を抽出した。合わせた有機層を水(10 mL)、ブライン(10 mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。この溶液を濃縮して100 mgの標題化合物を得、これをそれ以上精製せずに次の工程で用いた。¹H NMR(DMSO-d-6): 提示構造と一致。

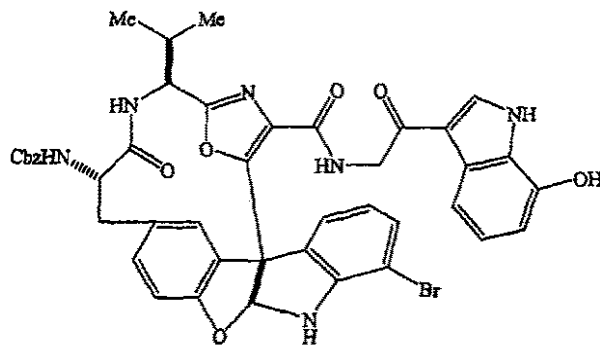
20

【0026】

実施例10

【0027】

【化4】



30

実施例9で合成した化合物(100 mg)の入った乾燥フラスコに2-アミノ-1-(7-ヒドロキシ-1H-インドール-3-イル)エタノン塩酸塩(50.3 mg, 0.222 mmol)および無水DMF(0.5 mL)を加えた。トリエチルアミン(31 μl, 0.222 mmol)をN₂下、室温で加えた。この溶液に室温で、予め作製したDHOBtの黄色溶液(8.45 mg, 0.0518 mmol)、無水DMF(2.0 mL)中、EDC·HCl(42.6 mg, 0.222 mmol)およびトリエチルアミン(31 μl, 0.222 mmol)を加えた。この混合物をN₂下、41~42で6時間攪拌した。この反応混合物を酢酸エチル(30 mL)で希釈した後、水(10 mL)、10% NaHSO₄(10 mL)水溶液、水(2 x 10 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)、水(2 x 10 mL)およびブライン(10 mL)で洗浄した。この溶液をNa₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、標題化合物(130 mg)を得た。¹H NMR(DMSO-d-6): 提示構造と一致。

40

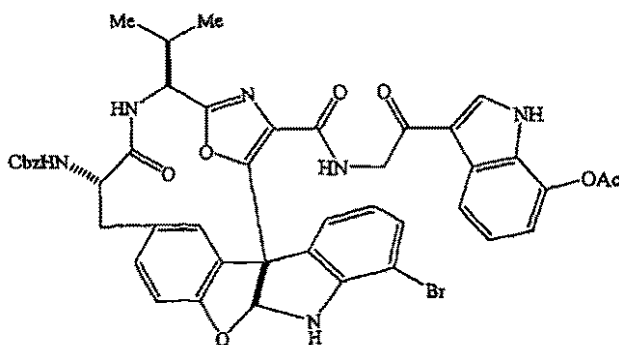
【0028】

実施例11

50

【 0 0 2 9 】

【 化 5 】



10

実施例 10 で合成した化合物の入った乾燥フラスコに無水テトラヒドロフラン (0.9 mL) および CH_2Cl_2 (2.7 mL) を加えた。得られた溶液を氷水浴で 15 分間冷却した。無水酢酸 (42 μl , 0.444 mmol) およびピリジン (18 μl , 0.222 mmol) を 0 で加えた。その後、この混合物を室温まで温め、 N_2 下で 3.5 時間攪拌した。反応を LCMS でモニタリングした。この反応溶液を酢酸エチル (30 mL) で希釈した後、水 (10 mL) およびブライン (10 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。濃縮後、136 mg の粗生成物を得た。酢酸エチル / CH_2Cl_2 , 30 / 70 ~ 35 / 65 で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより標題化合物 (80 mg, 最後の三工程全体で収率 61%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO d-6) : 提示構造と一致。

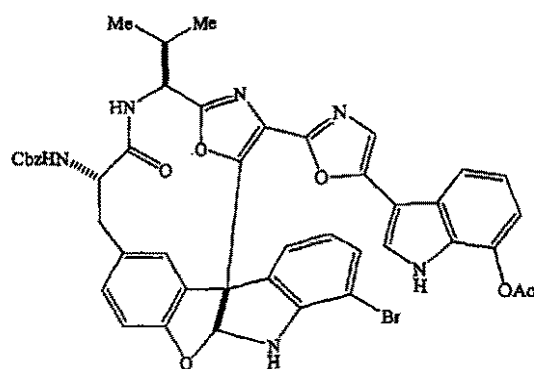
20

【 0 0 3 0 】

実施例 12

【 0 0 3 1 】

【 化 6 】



30

攪拌子を備えた乾燥フラスコにトリフェニルホスフィン (474 mg, 1.81 mmol) およびヘキサクロロエタン (428 mg, 1.81 mmol) を加えた。無水 CH_2Cl_2 (18.5 mL) を加え、得られた溶液を N_2 下、氷水浴で十分冷却した。この溶液にトリエチルアミン (351 μl , 2.52 mmol) をゆっくり加えた後、0 で 10 分間攪拌した。実施例 11 で合成した化合物 (160 mg, 0.180 mmol) を含む無水 CH_2Cl_2 (9.5 mL) の溶液を滴下し、温度を 0 ~ 2 に維持した。添加後、この反応混合物を 0 で 10 分間攪拌した (総時間は 15 分未満でなければならない)。水 (34 μL) を加えて反応をクエンチした。全溶媒を減圧下、15 で蒸発させた。酢酸エチル (5 mL) を加えて酸化トリフェニルホスフィンを沈殿させた。濾過後、濾液を再び濃縮し、上記の手順を 2 回繰り返す、余分な酸化トリフェニルホスフィンを除去した。濾液を濃縮した後、酢酸エチル - トルエン (60 : 40) で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、標題化合物 (110 mg, 収率 70%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO d-6) : 提示構造と一致。

40

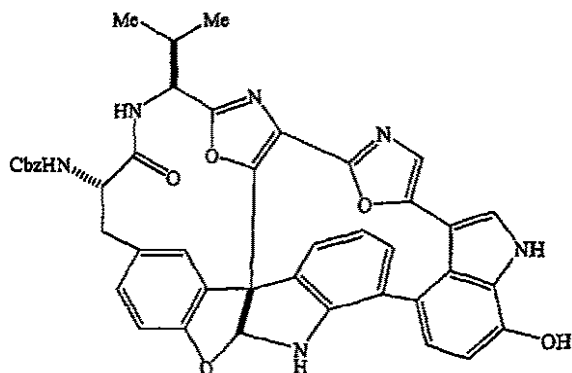
【 0 0 3 2 】

50

実施例 13

【0033】

【化7】



10

石英試験管に実施例12で合成した化合物を含むアセトニトリル(10.0 mg / 4 mL)の溶液を加えた後、N₂で30分間スパージした。LiOH含有H₂O(0.596 mg / 0.60 mL)の、脱気した保存溶液を滴下した。この反応溶液は暗黄色となり、N₂で30分間脱気した。この石英試験管を300 nm電球で光照射がなされるフォトリアクター内に置いた。この反応溶液に45分間光を照射し、N₂でスパージした。この反応を12回繰り返した。合わせた反応混合物を酢酸エチル(200 mL)で希釈した後、飽和NH₄Cl(50 mL)、H₂O(50 mL)、ブライン(50 mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、標題化合物を得た。

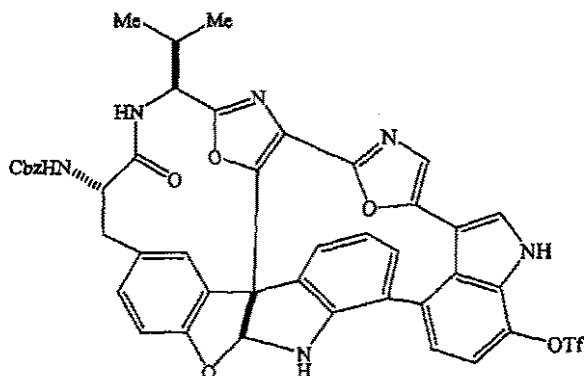
20

【0034】

実施例 14

【0035】

【化8】



30

実施例13で合成した化合物(0.150 mmol)の入った乾燥フラスコに乾燥K₂CO₃(61 mg)および無水DMF(4 mL)を加えた。この反応混合物に室温で4-ニトロフェニルトリフルオロメタンスルホネートを含む無水DMF(61 mg / 1.3 mL)の溶液を加えた。得られた黄褐色溶液をN₂下、室温で1時間攪拌した。次に、この混合物を酢酸エチル(100 mL)で希釈した後、飽和NH₄Cl水溶液(2 x 20 mL)、H₂O(5 x 20 mL)、ブライン(2 x 20 mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。濃縮後、生成物を酢酸エチル-CH₂Cl₂(30:70)で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、標題化合物を得た(50 mg, 最後の二工程全体で収率38%)。¹H NMR(DMSO-d-6): 提示構造と一致。

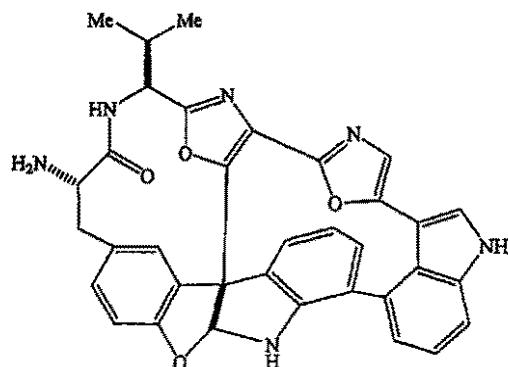
40

【0036】

実施例 15

【0037】

【化 9】



10

実施例 14 で合成した化合物 (50 mg, 0.057 mmol) の入ったフラスコに MeOH (5 mL) およびトリエチルアミン (29 μ L, 0.205 mmol) を加え、N₂ でバージした。次に、Pd(OH)₂/C (95 mg) を N₂ 下で加えた。水素ガスを充填した風船をすぐに付け、フラスコを 4 回水素でバージした。反応を 3 時間進行させた。この混合物をセライトパッドで濾過し、残渣を MeOH (2 \times 10 mL) で洗浄した。濾液を濃縮し、酢酸エチル (50 mL) で希釈した。溶液を H₂O (3 \times 10 mL) およびブライン (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた。濃縮後、標題化合物を得 (33 mg)、それ以上精製せずに次の工程で用いた。

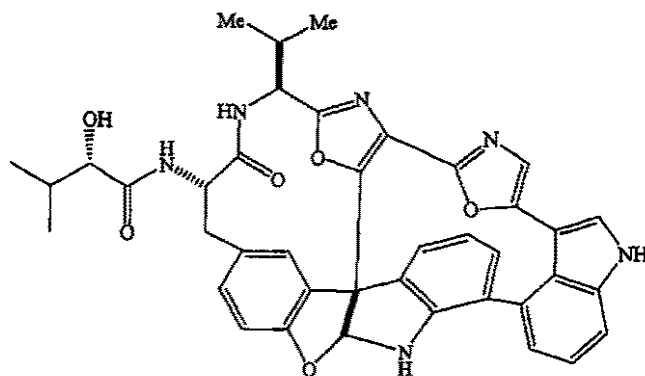
20

【0038】

実施例 16

【0039】

【化 10】



30

上記で示した式 (1) の化合物 J を合成するため、実施例 15 で合成した化合物 (2 mg, 0.0469 mmol) の入った乾燥フラスコに無水テトラヒドロフラン (1.1 mL) を加えた。この反応混合物に室温で、無水テトラヒドロフラン (0.3 mL) 中、(S)-2,5-ジオキソピロリジン-1-イル2-ヒドロキシ-3-メチルブタノエート (11.1 mg, 0.0516 mmol) 溶液を加えた。この反応混合物を N₂ 下、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を CH₂Cl₂ (50 mL) で希釈した後、飽和 NaHCO₃ (2 \times 5 mL)、H₂O (5 mL) およびブライン (5 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させた。濃縮後、最終生成物を MeOH-CH₂Cl₂ (3:9) で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、標題化合物を得た (19 mg, 収率 58%)。質量スペクトル (ESI) m/z: 697.2 (M+1)。¹H NMR (DMF-d-6): 提示構造と一致。

40

【0040】

実施例 17

化合物 J による種々の細胞系統の阻害

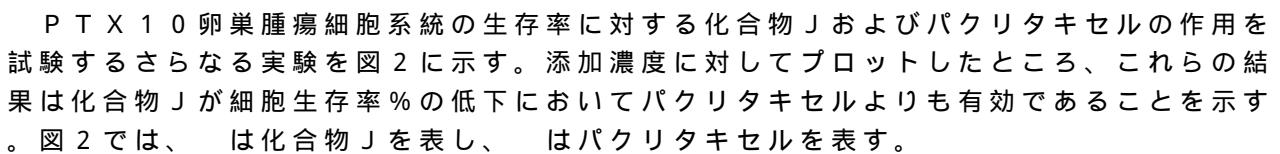
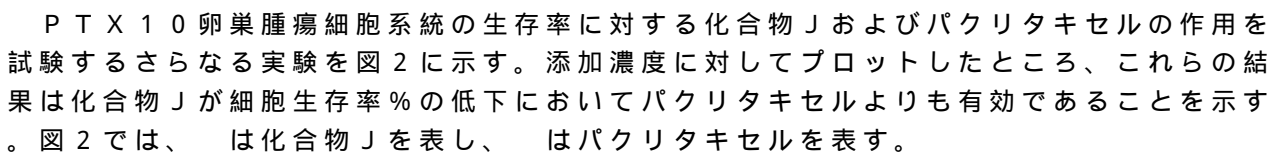
肺癌、結腸癌、卵巣癌および前立腺癌ならびに黒色腫を呈するいくつかの腫瘍細胞系統をジアゾンアミド A、化合物 J のヒドロキシル化形態、化合物 J、パクリタキセルおよび

50

ピンブラスチンの存在下、標準的な増殖条件下でアッセイした。図1で、これらの結果を、増殖を2分の1に低下させる濃度 (GI_{50}) としてグラフ化した。図1に示されている四角の中で、AB-4は化合物Jのヒドロキシル化形態であり、AB-5は化合物Jである。示されているように、供試薬剤は全て乳癌細胞系統MDA-MB-435で極めて低い GI_{50} 濃度を示したが、MDA-MB-231に関してはジアゾンアミドA、化合物Jおよびピンブラスチンのほうが残りの薬剤よりも有効性が高かった。肺および結腸では、化合物Jのヒドロキシル化形態は残りの薬剤よりも有効性が低かった。供試薬剤は全て卵巣細胞系統OVCAR3で極めて低い(一桁のnM) GI_{50} を有していたが、卵巣細胞系統IGR-OV1およびSKMEL-2に対してはパクリタキセルが残りの4つの薬剤より有意に有効性が低かった。黒色腫では、化合物Jおよびそのヒドロキシル化形態は残りの薬剤よりも有効性が低かったが、前立腺細胞系統PC-3およびLnCAPでは、全ての薬剤が十分働いた。(化合物Jのヒドロキシル化形態はPC-3に対しては有効性が低かった。)

10

【0041】

PTX10 卵巣腫瘍細胞系統の生存率に対する化合物Jおよびパクリタキセルの作用を試験するさらなる実験を図2に示す。添加濃度に対してプロットしたところ、これらの結果は化合物Jが細胞生存率%の低下においてパクリタキセルよりも有効であることを示す。図2では、は化合物Jを表し、はパクリタキセルを表す。

【0042】

実施例18

20

薬物動態学

化合物Jを、MDA-MB-435乳癌細胞から増殖させた異種移植片腫瘍を含むマウスに静注した。化合物Jの腫瘍濃度を時間の関数として評価した。結果を表3に示す。要約すれば、この化合物の最終半減期は297.6分であり、曲線下面積は3010224分 \cdot ng/mlであり、分布容積は2.91/kgである。

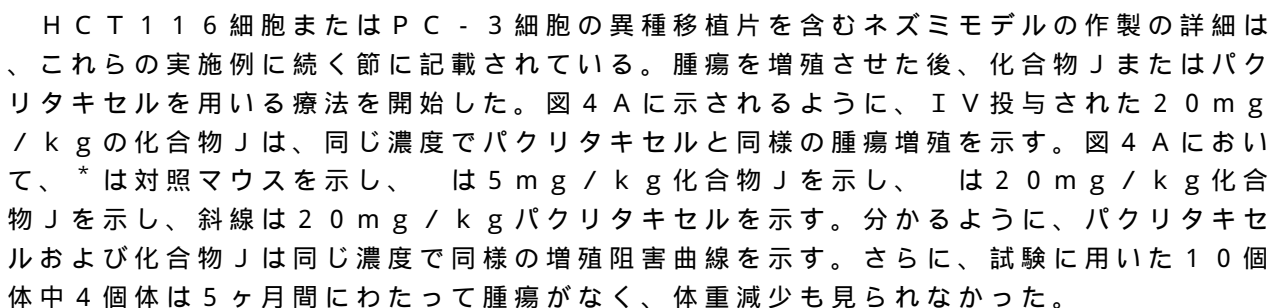
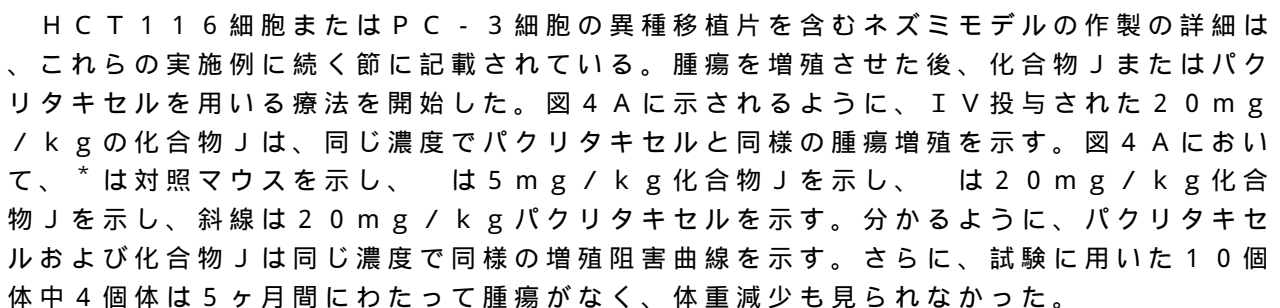
【0043】

実施例19in vivo活性

図4Aおよび4Bに示されるように、化合物JはHCT116異種移植片およびPC-3異種移植片の増殖阻害においてパクリタキセルに匹敵する。

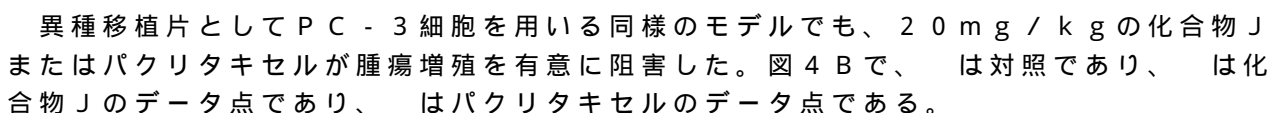
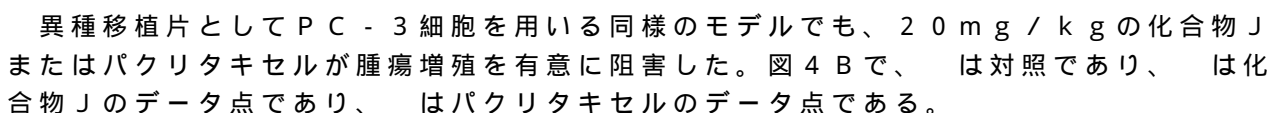
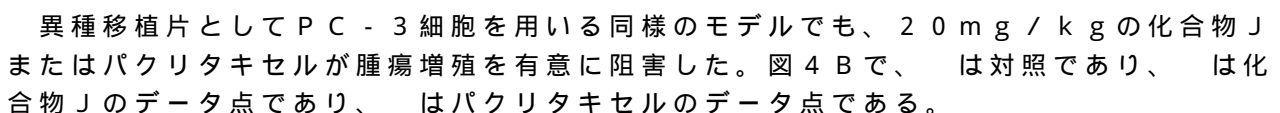
30

【0044】

HCT116細胞またはPC-3細胞の異種移植片を含むネズミモデルの作製の詳細は、これらの実施例に続く節に記載されている。腫瘍を増殖させた後、化合物Jまたはパクリタキセルを用いる療法を開始した。図4Aに示されるように、IV投与された20mg/kgの化合物Jは、同じ濃度でパクリタキセルと同様の腫瘍増殖を示す。図4Aにおいて、*は対照マウスを示し、は5mg/kg化合物Jを示し、は20mg/kg化合物Jを示し、斜線は20mg/kgパクリタキセルを示す。分かるように、パクリタキセルおよび化合物Jは同じ濃度で同様の増殖阻害曲線を示す。さらに、試験に用いた10個体中4個体は5ヶ月間にわたって腫瘍がなく、体重減少も見られなかった。

40

【0045】

異種移植片としてPC-3細胞を用いる同様のモデルでも、20mg/kgの化合物Jまたはパクリタキセルが腫瘍増殖を有意に阻害した。図4Bで、は対照であり、は化合物Jのデータ点であり、はパクリタキセルのデータ点である。

【0046】

実施例20好中球増殖および細胞総数に対する作用

図5に示されるように、パクリタキセルは骨髄および末梢血において5mg/kgおよび20mg/kgの用量で好中球総数の減少を生じたが、化合物Jはこの濃度でこれらの細胞総数に作用しなかった。

【0047】

50

腫瘍に対する作用を評価することに加え、骨髄および血液中の好中球に対するパクリタキセルおよび化合物 J の作用も得た。図 5 A に示されるように、パクリタキセルは 20 mg / kg で骨髄の好中球総数を有意に減少させたが、これに匹敵する用量の化合物 J には作用はなかった。これらのデータは一大腿での GR 1 + 細胞の数として示される。

【 0 0 4 8 】

図 5 B でも同様に、末梢血の好中球総数は 5 mg / kg および 20 mg / kg 双方のパクリタキセルにより著しく低下したが、同量の化合物 J によっては有意な作用はなかった。これらのデータを ANC (細胞 / ml) として表に示す。

【 0 0 4 9 】

パクリタキセルと比較した場合の化合物 J の、異種移植片における増殖阻害に関して得られたデータを以下に示す。

【 0 0 5 0 】

【表 1】

化合物 J の有効性データのまとめ

| 腫瘍 | 化合物 | 送達経路 | 最大 T/C% ^a | Log ₁₀ 腫瘍細胞死滅数 ^b | 腫瘍不含数 (日数) |
|-----------------|---------------------|------|----------------------|----------------------------------------|------------|
| HCT 116 (結腸) | 化合物 J (20mg/kg) | IV | 0.2 | 1.8 | 2/5(234+) |
| | 化合物 J (5mg/kg) | IV | 26.5 | 0.54 | 0/5 |
| | 化合物 J (5mg/kg) | IP | 41.9 | 0.37 | 0/5 |
| | パクリタキセル (20mg/kg) | IV | 0.2 | 3.2 | 1/5(243+) |
| PC3 (前立腺) | 化合物 J (20mg/kg) | IV | 0.3 | 3.4 | 2/5(157+) |
| | パクリタキセル (20mg/kg) | IV | 0 | 3.4 | 4/5(157+) |
| MDA-MB-435 (乳房) | 化合物 J (20mg/kg) | IP | 8.8 | 0.6 | 0/6 |
| | ビンブラスチン (0.7mg/kg) | IP | 14.1 | 0.6 | 0/6 |
| MDA-MB-436 (乳房) | 化合物 J (20mg/kg) | IP | 3.1 | 1.0 | 0/6 |
| | ビンブラスチン (0.7mg/kg) | IP | 41.1 | 0.2 | 0/6 |
| HCT 116 (結腸) | 化合物 J (20mg/kg) | IP | 9.3 | 1.0 | 0/5 |
| | ビンブラスチン (0.45mg/kg) | IP | 56.0 | 0.2 | 0/5 |

最大 T / C % = 処理腫瘍重中間値 / 対照腫瘍重中間値

Log₁₀ 腫瘍細胞死滅数 = [(T - C) × 0 . 3 0 1] / T d

T = 処理群の 300 mg に達するまでの日数

C = 対照群の 300 mg に達するまでの日数

T d = 腫瘍倍加時間

【 0 0 5 1 】

実施例 19 および 20 のプロトコールの詳細は次の通りである。

必要な材料：

・ PC3 前立腺 (prostrate) 腫瘍細胞および HCT 116 結腸腫瘍細胞 (NCI の腫瘍貯蔵所 Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD) から入手)

・ 完全 RPMI 培地

RPMI (カタログ番号 11875 - 085, Invitrogen)

10% 熱不活化 (30' 56) ウシ胎児血清 (カタログ番号 100 - 106, Gemini

10

20

30

40

50

Bio-Products)

2 m M L - グルタミン (カタログ番号 2 5 0 3 0 - 0 8 1 , Invitrogen)

0 . 1 m M M E M 非必須アミノ酸溶液 (カタログ番号 1 1 1 4 0 - 0 5 0 , Invitrogen)

1 0 U / m l ペニシリン / 1 0 μ g / m l ストレプトマイシン (カタログ番号 1 5 1 4 0 - 1 2 2 , Invitrogen)

1 m M ビルビン酸ナトリウム (カタログ番号 1 1 3 6 0 - 0 7 0)

・トリプシン - E D T A (カタログ番号 2 5 3 0 0 - 0 5 4 , Invitrogen)

・Ca²⁺ / Mg²⁺ 不含リン酸緩衝生理食塩水、5%デキストロース水溶液

・細胞培養皿 1 5 0 m m × 2 5 m m (カタログ番号 4 3 0 5 9 9 , Corning, Inc.)

・1 0 m l および 2 5 m l ピペット、標準的なピペット補助品、p 2 0 0 および p 1 0 0 ピペットチップおよび標準的なピペットマン

・無胸腺 N C r - n u / n u ヌードマウス、6 ~ 1 2 週齢、両性 (系統コード : 0 1 B 7 4 , NCI Frederick Animal Production Program - 供給者としては Charles River Labs および Taconic Farms がある)。既存の試験にはおよそ 7 週齢の雌マウスを用いた。

・標準的な 1 c c ツベルクリンシリンジ、3 0 G 1 / 2 および 2 5 G 5 / 8 ニードル (Becton Dickinson)

・ファルコン 5 m l 試験管 (カタログ番号 3 5 2 0 5 4)

・5 0 m l および 1 5 m l ディスポーザブルプラスチックコニカルチューブ (Falcon または同等の業者)

・トリパンブルー溶液 (0 . 4 %) (カタログ番号 T 8 1 5 4 , Sigma)

・ハウザー (Hausser) 位相差血球計 (カタログ番号 0 2 - 6 7 1 - 5 4 , Fisher)

・アイスバケット

・マウス体重測定のための秤 (0 . 2 g まで正確なもの)

・ノギス (Vernier calipers)

・既知の病原体を含まない動物施設 (ヌードマウスは可能な限り通常のマウスから隔離して飼育しなければならない。すなわち、部屋または個々の通気を備えたマイクロアイソレーターケージで隔離する。動物のハウジング、敷きわら、水は全て使用前にオートクレーブ処理しなければならない。標準的な照射処理済みのマウス餌を使用しなければならない。動物のケージの入れ替えは層流式フード内で行わなければならない。マウスを取扱う研究者は適宜、使い捨てのガウン、ボンネット、ブーツ、グローブ、マスク、を着用してなければならない。)

・A B - 5 (化合物 J) 化合物

・エチルアルコール、2 0 0 プルーフ (Aaper, MFD 041205)

・クレマホル (Cremaphor) (カタログ番号 C 5 1 3 5 , Sigma)

・パクリタキセル (カタログ番号 A N P 0 0 1 0 , Polymed Therapeutics)

手順 :

1) 3 7 の湯浴中で P C 3 または H C T 1 1 6 細胞 (必要に応じて) を急速解凍する。内容物を 9 m l の完全 R P M I 培地に移す。5 分間 1 2 0 0 r p m (2 4 0 X g) で回転沈降させる。培地を廃棄し、ペレットを 8 m l の完全 R P M I 培地に再懸濁させる。5 % C O 2、3 7 加湿インキュベーター内、1 0 0 m m × 2 5 m m 細胞培養皿で平板培養する。

2) 5 ~ 1 0 日間増殖させ、必要に応じ 3 ~ 4 日おきに 1 : 8 ~ 1 : 1 0 分割し (培地を吸引し、3 ~ 5 m l の P B S で洗浄し、1 m l のトリプシン - E D T A を加え、3 ~ 5 分間 3 7 でインキュベートし、所望の容量まで培地を加え、複数のプレートに移す)、細胞を対数増殖期に入らせる。

3) 細胞がよく増殖している際に、1 5 0 m m × 2 5 m m 皿への拡張を始める。本発明者らは 1 5 0 m m 皿に 2 0 m l の培地を用い、分割に 2 m l のトリプシンを用いる。ほぼ密集状態では、2 × 1 0⁷ 細胞 / 1 5 0 m m 皿であろう。

4) 動物を腫瘍細胞注射の 1 週間前に動物施設に馴化させることができるよう、n u / n

10

20

30

40

50

u マウスの到着時に先立って計画を立てる。この期間に、動物施設での標準的実践に従ってイヤータグやマークを付ける。

5) 試験中のマウス総数に対して十分量の細胞が採れると予測された際に PC3 または HCT116 細胞を採取する (マウス総数 = 7 匹 / 群 × 群総数 - 示唆群 : ビヒクル対照、パクリタキセル陽性対照、AB-5 + 異種移植片の獲得率の変動を考慮するための追加マウス 5 匹まで、すなわち 26 匹)。細胞 1 千万個 / マウスを注射するように計画し、注射過程で容量当たりの細胞の損失を考慮する。すなわち 30 匹に注射する場合、少なくとも 35 回の注射に十分な細胞、すなわち 35×1000 万細胞 = 3.5×10^8 細胞を採取するようにする。既存の HCT116 試験では、マウス当たり 7.5×10^6 細胞を注射した。各群 5 匹のマウスを AB-5 処理に用い、各群 4 匹のマウスを対照処理およびパクリタキセル処理に用いた。既存の PC3 試験では、 10^7 細胞を注射した。各群 6 匹のマウスを対照処理に用い、各群 5 匹のマウス AB-5 処理およびパクリタキセル処理に用いた。AB-5 のアペラビリティは限定されるため、さらに小さな群サイズが必要であった。

10

6) 上記の工程 2 および 3 の分割の場合と同様に細胞を採取する。これによれば一度に 10 プレートだけを採取するのが有用であるが、1 回の試験に多数のプレートを処理する必要がある場合は採取した細胞を氷上に置く。最初にトリプシンを希釈し、細胞を採取するために用いた培地に加え、さらなる培地で 1 ~ 2 回プレートを洗浄する。10 プレートからの細胞と洗液を合わせてちょうど 50 ml コニカル 1 本となる。工程は全て無菌技術を用いて行うべきであり、細胞および遠心分離物は手順の間低温で維持すべきである。

20

7) 細胞を全て採取したところで、5 分間 1200 rpm (240 X g) で回転沈降させる。ペレットを 5 ~ 10 ml のプレーン (血清フリーおよび添加剤フリー) RPMI に再懸濁させる。ペレットをプールした後、プールした細胞集団を計数に適当な濃度に希釈して計数する。標準的な血球計で $50 \mu\text{l} + 50 \mu\text{l}$ トリバンブルーを計数する。先のように細胞を回転沈降させ、血清フリー洗浄をさらに 2 回繰り返して、血清を完全に除去する。計数や洗浄のためには 50 ml のコニカル管何本かに細胞を分割するのが有用であるが、最後の回転には、1 本の試験管に必ずプールしなす。

8) ペレット自体の容量を考慮して細胞ペレットを血清フリー培地に $4 \times 10^7 / \text{ml}$ で再懸濁させる。ピペット操作または穏やかなボルテックス攪拌が適用できる。

9) 氷上にある細胞を動物施設に持って行く。この時、マウスはケージ中ですでに注射の準備ができていなければならない。

30

10) $0.8 \sim 0.9 \text{ ml}$ の細胞を 1 cc のツベルクリンシリンジに吸い取る。25 G のニードルを付け、注射用としてシリンジ内に 0.7 ml の細胞が残るように注意深く気泡を消す。残りの細胞は氷上に置く。

11) 左手でマウスを押さえ、マウスが動けないが呼吸はできるように尾と頭の後ろの皮膚を強く保持する。注射する皮膚をアルコールワイプで拭き、皮膚のたるみの部分をつまみ上げる。ニードルを傾斜させつつ、細胞の入ったシリンジおよびニードルをマウスの皮膚直下に静かに挿入し、 0.2 ml の細胞 (1×10^7 細胞) をゆっくり注射する。注射領域は皮下で隆起領域を形成しなければならない。マウスをケージに戻す。

12) 注射 3 日後、ノギスで腫瘍の大きさを測定 (長さおよび幅を測定) し始め、体積を $(L \times W^2) / 2$ として計算する。マウス重量も測定する。一般に、マウス重量は、予測される 1 日の変動を避けるために毎日同じ時 (1 ~ 2 時間以内) に測定しなければならない。腫瘍体積が増えていることを確認するため、腫瘍体積は 2 ~ 3 日間隔で少なくともさらに 1 回測定する。腫瘍体積が $150 \sim 250 \text{ mm}^3$ の間になったら治療を開始することができる。最初に注射してから 5 ~ 10 日以内にこの時点に到達しなければならない。腫瘍がこの範囲から著しく外れるマウスは用いない。既存の PC3 試験では腫瘍を注射してから 5 日後に、既存の HCT116 試験では腫瘍を注射してから 8 日後に治療を開始する。

40

13) 治療初日の前に、パクリタキセルおよび AB-5 / 化合物 J 化合物を個用量のアリコートに小分けする。最初の腫瘍増殖期間中に測定した重量に基づき、治療の初日にマウ

50

スの重量を評価することができなければならない。試験管毎に、処理群のマウス数に + 1 . 5 ~ 2 倍の用量に十分な化合物を小分けする。パクリタキセルおよび化合物 J は双方とも 2 0 m g / k g で与える。化合物の損失を最小限とし、正確さを最大限とするため、本発明者らは 2 0 ~ 3 0 m g の化合物を秤量し、エタノールに溶かす。次に、所望の化合物量のアリコートを開々の試験管にピペットで移し、真空乾燥させる。アリコートをテフロン（登録商標）管またはガラス管で - 2 0 にて乾燥保存する。

1 4) 治療初日に、各群の平均腫瘍体積が一定となるようにマウスを無作為に群に分ける。雄を用いる場合、争うために雄 n u / n u マウスを新しい n u / n u マウスとグループ分け直すのは望ましくないので複数のケージを使用する必要がある場合がある。

1 5) 1 : 1 クレマホール : エタノールの保存溶液を調製する。まず、2 0 μ l / 回 (d o s e) のクレマホール : エタノールに、必要に応じて激しくボルテックス攪拌するか音波処理を行いながら溶解させることで注射用の化合物 J およびパクリタキセルを調製する。クレマホール : エタノールの終濃度が 1 0 % となるように 5 % デキストロースで希釈する（すなわち、一用量（回）当たり 5 % デキストロース 1 8 0 μ l を加える）。ボルテックスにかけて混合する。溶液はやや粘稠となる。パクリタキセルは溶液中に留めるためにやや高濃度（最終 2 0 % まで）の賦形剤を必要とする場合がある。既存の H C T 1 1 6 および P C 3 試験では、パクリタキセル処方には 2 0 % 、 A B - 5 処方には 1 0 % の賦形剤を用いた。

1 6) 1 5 0 W の熱ランプを用いて尾を温める。本発明者らは尾だけを温めることを選択したが、動物施設により使用される標準的技術が優れている。マウスをテールペイナー (T a i l v e i n e r) に置く。静脈をアルコールワイプで拭き、5 秒かけて 0 . 2 m l をゆっくり注射する。

1 7) 1 日おきに 6 回の投与を行わなければならない (q 2 d X 6) 。既存の H C T 1 1 6 および P C 3 試験では、月水金で 2 週間投与を行った (q 2 - 3 d X 6) 。

1 8) 動物を秤量し、各投与で用量を再計算しなければならない。

1 9) 腫瘍注射後数か月間、3 ~ 4 日おきに腫瘍体積と重量を測定しなければならない。対照マウスは 3 0 ~ 4 0 日以内に最長径で 2 0 m m に達するべきである（本発明者らの施設で屠殺の必要な時点）。パクリタキセルおよび化合物 J は双方とも 4 0 ~ 8 0 % のマウスに治癒をとまう有意な退縮を生じるはずである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 2 】

【図 1】図 1 は、ジアゾンアミド A、化合物 J のヒドロキシル化型、パクリタキセルおよびピンブラスチンと比較した場合の化合物 J の種々の癌細胞システムの増殖を阻害する能力を示す。

【図 2】図 2 は、化合物 J およびパクリタキセルで、P T X 1 0 卵巣癌細胞システムに関し、薬剤濃度に対して生存率をプロットしたものを示す。

【図 3】図 3 は、化合物 J の薬物動態を示すグラフである。

【図 4】図 4 A および B は、H C T 1 1 6 および P C - 3 細胞の異種移植片に対する、パクリタキセルと比較した場合の化合物 J の作用を示す。

【図 5】図 5 A および B は、化合物 J が i n v i v o において好中球増殖または細胞総数に対して作用しないことを示す。

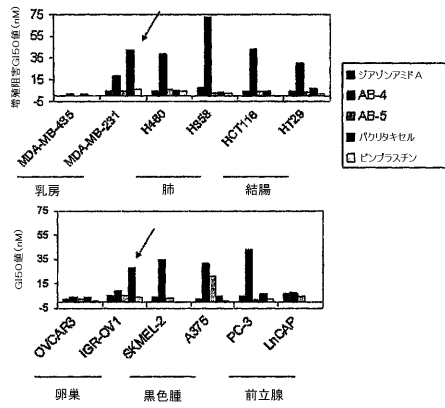
10

20

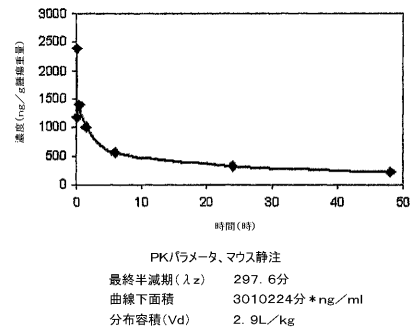
30

40

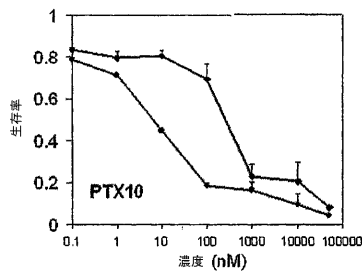
【 図 1 】



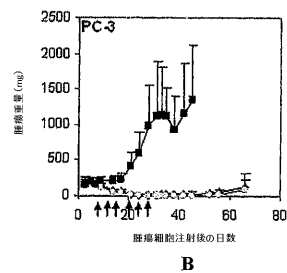
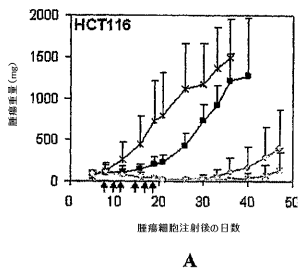
【 図 3 】



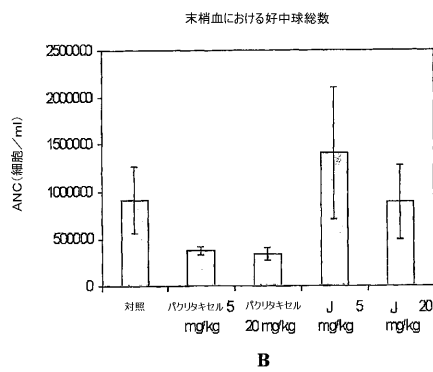
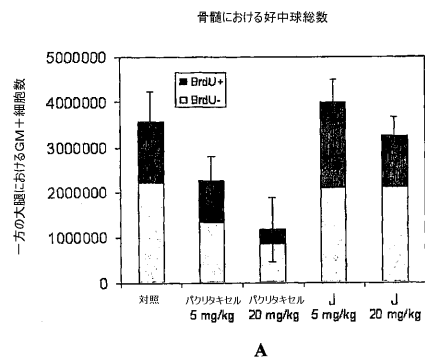
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 06/42565 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): A61K 31/42; A61N 43/76; C07D 291/00 (2007.01) USPC: 514/375 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) USPC: 514/375 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Google: Keywords: diazonamide and proliferative diseases Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2003/0100589 A1 (HARRAN, et al) 29 May 2003 (29.05.2003), para [0016]-[0026], [0122], [0140], [0066], [0123], [0064], [0110], [0091], [0107] | 1-7 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * 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 08 April 2007 (08.04.2007) | | Date of mailing of the international search report 25 SEP 2007 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | | Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

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 35/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ハラン、パトリック

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0、ダラス、ハリー ハインズ プールバード 5 3 2 3、
ザ ユニバーシティ オブ テキサス サウスウェスタン メディカル センター アット ダラ
ス、デパートメント オブ バイオケミストリー

(72) 発明者 ウィリアムズ、ノエル

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0、ダラス、ハリー ハインズ プールバード 5 3 2 3、
ザ ユニバーシティ オブ テキサス サウスウェスタン メディカル センター アット ダラ
ス、デパートメント オブ バイオケミストリー

(72) 発明者 バーゲット、アンソニー

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0、ダラス、ハリー ハインズ プールバード 5 3 2 3、
ザ ユニバーシティ オブ テキサス サウスウェスタン メディカル センター アット ダラ
ス、デパートメント オブ バイオケミストリー

F ターム(参考) 4C072 AA04 AA06 BB04 CC05 CC13 EE09 FF16 GG01 GG08 UU01
4C085 AA26 BB01 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 CB22 GA16 GA17 MA01 MA04 NA14
ZB21 ZB26