

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4805917号
(P4805917)

(45) 発行日 平成23年11月2日 (2011. 11. 2)

(24) 登録日 平成23年8月19日 (2011. 8. 19)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 7/64 (2006. 01)

C O 7 K 7/64 Z N A

C O 7 D 491/22 (2006. 01)

C O 7 D 491/22

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 31/4745 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4745

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 15 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-512734 (P2007-512734)
 (86) (22) 出願日 平成17年5月4日 (2005. 5. 4)
 (65) 公表番号 特表2008-504235 (P2008-504235A)
 (43) 公表日 平成20年2月14日 (2008. 2. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2005/000260
 (87) 国際公開番号 W02005/111063
 (87) 国際公開日 平成17年11月24日 (2005. 11. 24)
 審査請求日 平成20年5月7日 (2008. 5. 7)
 (31) 優先権主張番号 RM2004A000240
 (32) 優先日 平成16年5月13日 (2004. 5. 13)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(73) 特許権者 591043248
 シグマータウ・インドゥストリエ・ファル
 マチュウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
 ・アチオニ
 SIGMA-TAU INDUSTRIE
 FARMACEUTICHE RIUN
 ITE SOCIETA PER AZI
 ONI
 イタリア00144ローマ、ピアレ・シャ
 ケスペアレ47番

最終頁に続く

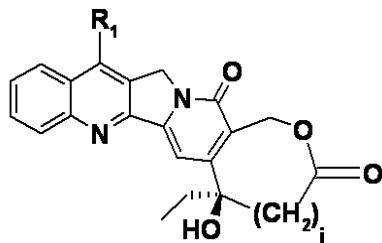
(54) 【発明の名称】 細胞分裂阻害剤として7位にて環状ペプチドと接合したカンプトテシン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)の化合物、そのラセミ混合物、その単一エナンチオマー、その単一ジアステレオ
 アイソマー、その形態EまたはZ、その混合物、またはその医薬上許容される塩：

【化 1】



(1)

[式中：

i は、0 または 1；

R₁ は、基 -CH=N-(O)_m-R₂-Z-X-Y；

ここで、m は、0 または 1；

R₂ は以下からなる群から選択される：直鎖状または分枝状 C₁-C₇ アルキレン、直鎖状
 または分枝状 C₂-C₇ アルケニレン、下記式：-(CH₂)_{m1}-NR₈-(CH₂)_{n1}-NR₉-(CH₂-CH₂-CH₂-N
 R₉)_{p1}-H のポリアミノアルキル基、ここで、m₁ および n₁ は、同一であっても異なっていて

もよく、2～6の整数であり、 p_1 は0～3の整数である；

R_8 および R_9 は、同一であっても異なってもよく、以下からなる群から選択される：H、直鎖状または分枝状 C_1 - C_6 アルキル、Boc、Cbz；6-D-ガラクトシル、または6-D-グルコシルから選択される単糖類；上記の基はそれぞれ以下からなる群から選択される1以上の基によって置換されていてもよい：CN、 NO_2 、 NH_2 、OH、SH、COOH、COO-(アルキル)(C_1 - C_5)、CONH-(アルキル)(C_1 - C_5)、 SO_3H 、 SO_3 -(アルキル)(C_1 - C_5)、ここでアルキル基は直鎖状または分枝状；ハロゲン原子；

Zは、非存在、または-NH-、-CO-、-O-から選択される；

Xは、非存在、または以下からなる群から選択される：-COCHR₃NH-、-COCHR₆(CH₂)_{n₂}R₄-、
-R₄-CH₂(OCH₂CH₂)_{n₃}OCH₂R₄-、-R₄(Q)R₄-、-R₅[Arg-NH(CH₂)_{n₁}CO]_{n₄}R₅-、-R₅-[N-グアニ
ジノプロピル-Gly]_{n₃}R₅-、-CON[CH₂]_{n₄}NHR₇]CH₂-、ここで n_1 は2～6の整数、 n_2 は0～5の整
数、 n_3 は0～50の整数、 n_4 は2～7の整数；

R_3 は、Hまたは-COOH、-CONH₂、-NH₂または-OHによって置換されていてもよい直鎖状ま
たは分枝状 C_1 - C_4 アルキル； C_6 - C_{14} アリール；

R_4 は、以下からなる群から選択される：-NH-、-CO-、-CONH-、-NHCO-；

R_5 は、非存在または -R₄(Q)R₄-；

R_6 は、水素原子、または、-NH₂；

R_7 は、水素原子または直鎖状または分枝状 (C_1 - C_4) アルキル；

Qは以下からなる群から選択される：直鎖状または分枝状 C_1 - C_6 アルキレン；直鎖状
または分枝状 C_3 - C_{10} シクロアルキレン；直鎖状または分枝状 C_2 - C_6 アルケニレン；直
鎖状または分枝状 C_3 - C_{10} シクロ-アルケニレン； C_6 - C_{14} アリーレン；アリーレン (C_6 -
 C_{14})-アルキレン；(C_1 - C_6) アルキレン (C_1 - C_6)-アリーレン (C_6 - C_{14})；O、N、Sからな
る群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含む芳香族または非芳香族ヘテロサイ
クリル(C_3 - C_{14})；

Yは、

式c(Arg-Gly-Asp-AA₁-AA₂)、

ここで：

cは、環状を意味する；

AA₁は、以下からなる群から選択される：(D)-Phe、(D)-Trp、(D)-Tyr、(D)-2-ナフチル
Ala、(D)-4-terブチル-Phe、(D)-4,4'-ビフェニル-Ala、(D)-4-CF₃-Phe、(D)-4-アセチル
アミン-Phe；

AA₂は、以下からなる群から選択される：NW-CH[(CH₂)_{n₇}-CO]-CO、NW-CH[(CH₂)_{n₅}-NH]-C
O、NW-[4-(CH₂)_{n₅}-CO]-Phe、NW-[4-(CH₂)_{n₅}-NH]-Phe、[NW]-Gly、NW-Val、4-カルボキシ
ベンジル、4-アミノメチルベンジル、ここでWは、H、直鎖状または分枝状 C_1 - C_6 アルキ
ル、-(CH₂)_{n₅}-COOHから選択され、ここで n_7 および n_5 は0～5の整数]。

【請求項2】

mが1である、請求項1の化合物。

【請求項3】

X = -R₄CH₂(OCH₂CH₂)_{n₃}OCH₂R₄-である、請求項2の化合物。

【請求項4】

下記式を有する請求項2の化合物、そのラセミ混合物、その単一エナンチオマー、その
単一ジアステレオアイソマー、その形態EまたはZ、その混合物、またはその医薬上許容さ
れる塩。

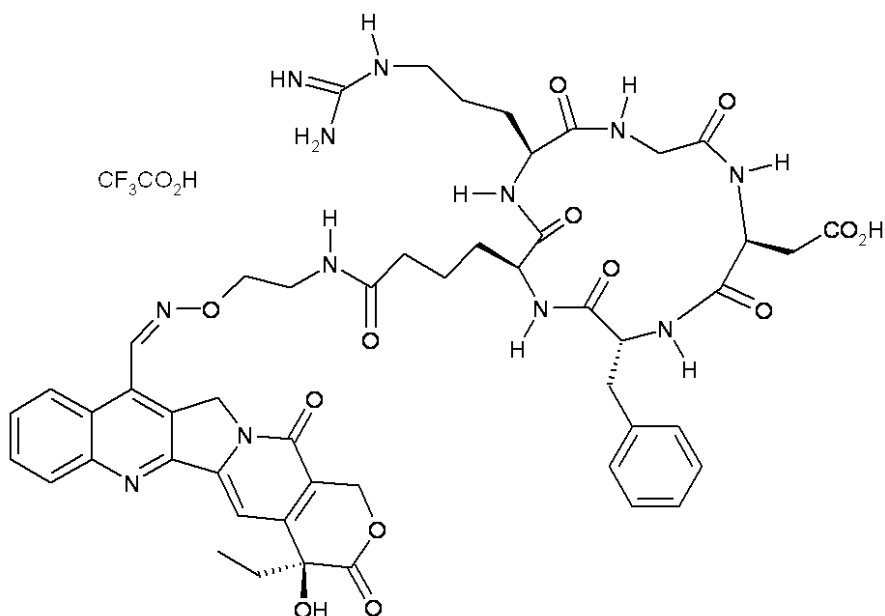
10

20

30

40

【化 2】



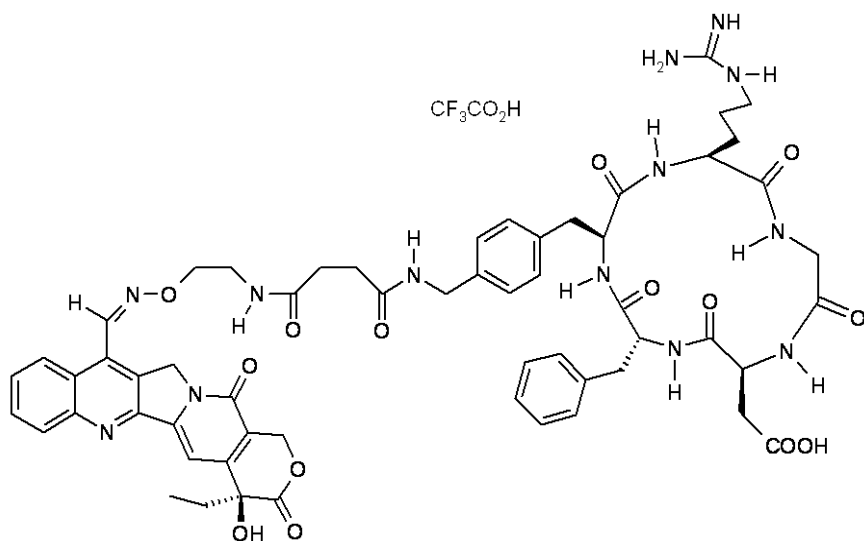
10

【請求項 5】

下記式を有する請求項 2 の化合物、そのラセミ混合物、その単一エナンチオマー、その単一ジアステレオアイソマー、その形態 E または Z、その混合物、またはその医薬上許容される塩。

20

【化 3】



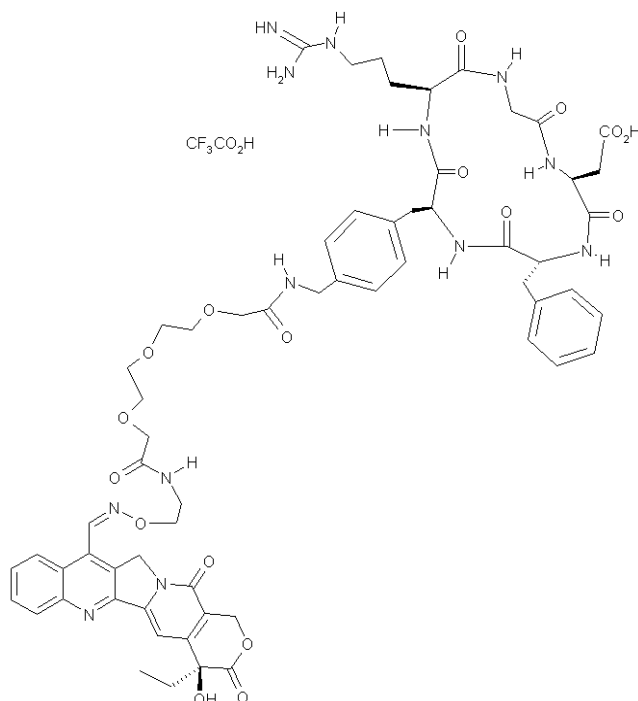
30

【請求項 6】

下記式を有する請求項 3 の化合物、そのラセミ混合物、その単一エナンチオマー、その単一ジアステレオアイソマー、その形態 E または Z、その混合物、またはその医薬上許容される塩。

40

【化 4】

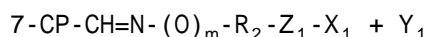


10

20

【請求項 7】

以下のように行われる請求項1-6のいずれかの化合物の調製方法:



ここで、7-CPは、7-置換カンプトテシンの多環構造を表し、 Z_1 、 X_1 および Y_1 はそれぞれ最終的に適宜に官能化および/または保護される請求項 1の式Iで定義した基Z、XおよびYを表す。

【請求項 8】

活性成分として請求項1-6のいずれかの少なくとも1つの化合物を、少なくとも1つの医薬上許容される賦形剤および/または媒体と混合して含む医薬組成物。

【請求項 9】

医薬の調製のための請求項 8の医薬組成物。

30

【請求項 10】

トポイソメラーゼ 1 阻害活性を有する、請求項8または9の医薬組成物。

【請求項 11】

抗癌活性を有する請求項 10の医薬組成物。

【請求項 12】

非小細胞肺癌、小細胞肺癌、結腸直腸腫瘍、前立腺癌、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、消化器癌、肝臓癌、カポジ肉腫、腎臓癌、肉腫、骨肉腫、精巣癌、乳癌、脾臓癌、黒色腫、膀胱癌または頭頸部癌の治療のための、請求項 11の医薬組成物。

【請求項 13】

転移形態の予防または治療のための、請求項 11の医薬組成物。

40

【請求項 14】

抗寄生虫活性を有する、請求項 10の医薬組成物。

【請求項 15】

抗ウイルス活性を有する、請求項 10の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、RGD 配列を含むシクロペプチドおよびカンプトテシン誘導体からなる、細胞

50

毒性活性を有する化合物、その調製方法、その医薬としての使用およびそれを含む組成物に関する。

【0002】

特に、本発明に記載する化合物は、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ に対する高親和性と、マイクロモル濃度でのヒト細胞株に対する選択的細胞毒性活性との両方を備えている。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

化学療法用抗癌薬は、治療濃度域が非常に制限された薬剤である。実際、それらの細胞毒性活性は非選択的であるため、それらはそれらが接触した体の細胞のすべてに無差別に損傷を与え得る。

【0004】

現在、薬剤の活性を健康な周囲組織の細胞には損傷を与えずに発揮させ、あるいは少なくとも可能な限り損傷を制限する、選択的に腫瘍細胞に向かわせる細胞毒性薬の問題が存在している。

【0005】

文献によると、選択的シクロペプチドの使用により（その参照化合物はシクロペプチド c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)とされている）(JACS 1997、119、1328-35; 国際特許出願 WO 97/06791)、あるいはモノクローナル抗体の使用により(Cell、1994、79、1157-64)、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ をブロックすることにより、血管新生が抑止され、腫瘍増殖が低減されることが報告されている。さらに、抗転移作用も観察されている(J. Clin. Invest.、1995、96、1815)。Brooks et al.(Science、1994、264、569-71)は、腫瘍脈管構造の内皮細胞および腫瘍細胞自体が、正常組織の静止状態の細胞と比較してインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を優先的に発現することを報告している。臨床開発の発展段階にある化合物のなかで、本発明者らは、c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-MeVal)、またはEMD121974またはシレンギチド(cilengitide)に言及する。

【0006】

Ruoslatiおよびその同僚ら(Current Opinion in Oncology、1998、10、560-5)は、腫瘍内皮に結合するRGD アナログは、細胞毒性薬であるドキソルビシンと一度接合すると、ドキソルビシンのみよりもより有効かつ低毒性の化合物を形成することを示した。かかる著者らは、結合が遊離のペプチド自体によりアンタゴナイズされるため、合理的疑いの余地無く、その効果はRGDとの接合に起因することを示した (Arap、Pasqualini and Ruoslati、Science、1998、279、377-380)。後に、同著者らはアポトーシス促進性ペプチド配列のRGD アナログへの化学的結合についての別の実験を行い、その新規化合物が血管新生内皮細胞に対して選択的に毒性であり、マウスにおいて抗癌活性を有することを示した (Ruoslati、Nature Medicine、1999、5、1032-8)。

【0007】

Marcus et al.は国際特許出願 WO 01/17563において、1以上のアミノ酸からなるスーパーサーによって、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ の非ペプチド性阻害剤アンタゴニストに接合したカンプトテシンなどの細胞毒性薬についての特異的抗癌活性について記載している。

【0008】

Aoki et al.は、Cancer Gene Therapy、2001、8、783-787において、RGD 配列に接合したヒスチジル化(histidylated)オリゴリシンの特異的抗癌活性について記載しており、マウスにおける腫瘍に対するホーミング(homing)効果を明らかにした。

【0009】

インテグリンにより媒介される細胞表面での結合の概念は遺伝子輸送に関して提案されている (Hart、et al.、J. Biol. Chem.、1994、269、12468-12474)。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

このたび、任意に好適なスペーサーによって、RGD 配列を含むシクロペプチド誘導体に接合した7-イミノメチルまたは7-オキシメチル カンプトテシン誘導体が、強い選択的な抗癌活性を有しており、腫瘍の治療のための医薬の調製に有利なことに使用できることが見いだされた。

【0011】

腫瘍細胞に対する選択的細胞毒性活性のため、本発明による化合物により、副作用が少ないか、あるいは重篤ではない医薬が提供される。

【課題を解決するための手段】

【0012】

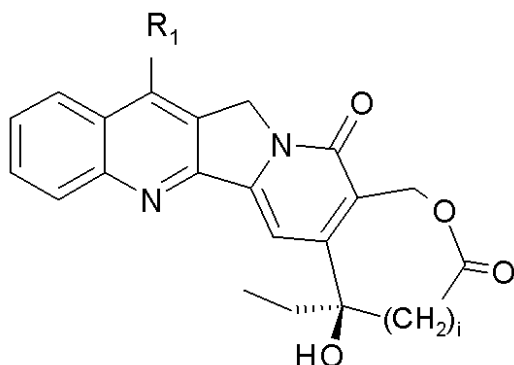
発明の説明

本発明の目的は、RGD配列を含むシクロペプチド誘導体に接合したカンプトテシン誘導体である。その結果得られる分子は、元のカンプトテシンの細胞毒性と、非接合シクロペプチドについて観察されるものと匹敵する親和性を有するインテグリン結合特性の、両方を変化させずに保持している。この組合せの結果は、 v_3 および v_5 型のインテグリンを大量に発現する細胞における細胞毒性薬の集中に有利である(ホーミング(homing))。この細胞毒性薬は酵素または加水分解作用を介して接合形態および/または遊離形態においてその細胞内活性を発揮する。

【0013】

本発明の目的は式(I)の化合物、そのN₁-オキシド、ラセミ混合物、その単一エナンチオマー、その単一ジアステレオアイソマー、EおよびZ形態、それらの混合物、医薬上許容される塩である：

【化1】



(I)

[式中:]

iは、0または1;

R₁は、基 -CH=N-(O)_m-R₂-Z-X-Y;

ここで、mは、0または1;

R₂は、以下からなる群から選択される： 直鎖状または分枝状 C₁-C₇ アルキレン、直鎖状または分枝状 C₂-C₇ アルケニレン、C₃-C₁₀ シクロアルキレン、C₃-C₁₀ シクロアルケニレン、C₆-C₁₄ アリーレン、アリーレン (C₆-C₁₄)-アルキレン (C₁-C₆)、アルキレン (C₁-C₆)-アリーレン (C₆-C₁₄)、O、N、Sからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含む芳香族または非芳香族複素環 (C₃-C₁₄)、ヘテロシクロアルキレン (O、N、Sからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むC₃-C₁₀)-アルキレン (C₁-C₆)、アルキレン (C₁-C₆)-ヘテロシクロアルキレン (O、N、Sからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含むC₃-C₁₀)；式-(CH₂)_{m1}-NR₈-(CH₂)_{n1}-NR₉-(CH₂-CH₂-CH₂-NR₉)_{p1}-Hのポリアミノアルキル基、ここで、m₁およびn₁は、同一であっても異なってもよく、0~6の整数である；

R₈およびR₉は、同一であっても異なってもよく、以下からなる群から選択される：

H、直鎖状または分枝状 C_1-C_6 アルキル、Boc、Cbz；単糖類、例えば、6-D-ガラクトシル、または6-D-グルコシル；上記基はそれぞれ以下からなる群から選択される1以上の基によって置換されていてもよい：CN、 NO_2 、 NH_2 、OH、SH、COOH、 $COO-(アルキル)(C_1-C_5)$ 、 $CONH-(アルキル)(C_1-C_5)$ 、 SO_3H 、 $SO_3-(アルキル)(C_1-C_5)$ 、ここでアルキル基は直鎖状または分枝状；ハロゲン原子；

Zは、非存在、または-NH-、-CO-、-O-から選択される；

X は、非存在、または以下からなる群から選択される：-COCHR₃NH-、-COCHR₆(CH₂)_{n₂}R₄-、-R₄-CH₂(OCH₂CH₂)_{n₃}OCH₂R₄-、-R₄(Q)R₄-、-R₅[Arg-NH(CH₂)_{n₁}CO]_{n₄}R₅-、-R₅-[N-グアニジノプロピル-Gly]_{n₃}R₅-、-CON[CH₂]_{n₄}NHR₇CH₂-、ここで、n₁は、2~6の整数、n₂は、0~5の整数、n₃は、0~50の整数、n₄は、2~7の整数；

R₃は、Hまたは-COOH、-CONH₂、-NH₂または-OHによって置換されていてもよい直鎖状または分枝状 C_1-C_4 アルキル； C_6-C_{14} アリール；

R₄は、以下からなる群から選択される：-NH-、-CO-、-CONH-、-NHCO-；

R₅は、非存在または-R₄(Q)R₄-；

R₆は、水素原子または、-NH₂；

R₇は、水素原子または直鎖状または分枝状 (C_1-C_4) アルキル；

Q は以下からなる群から選択される：直鎖状または分枝状 C_1-C_6 アルキレン；直鎖状または分枝状 C_3-C_{10} シクロアルキレン；直鎖状または分枝状 C_2-C_6 アルケニレン；直鎖状または分枝状 C_3-C_{10} シクロ-アルケニレン； C_6-C_{14} アリーレン；アリーレン (C_6-C_{14})-アルキレン；(C_1-C_6), アルキレン (C_1-C_6)-アリーレン (C_6-C_{14})；O、N、Sからなる群から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を含む芳香族または非芳香族ヘテロサイクリル (C_3-C_{14})；

Yは、式 c(Arg-Gly-Asp-AA₁-AA₂)、ここで：

cは環状を意味する；

AA₁ は、以下からなる群から選択される：(D)-Phe、(D)-Trp、(D)-Tyr、(D)-2-ナフチルAla、(D)-4-terブチル-Phe、(D)-4,4'-ビフェニル-Ala、(D)-4-CF₃-Phe、(D)-4-アセチルアミノ-Phe；

AA₂ は、以下からなる群から選択される：NW-CH[(CH₂)_{n₇}-CO]-CO、NW-CH[(CH₂)_{n₅}-NH]-CO、NW-[4-(CH₂)_{n₅}-CO]-Phe、NW-[4-(CH₂)_{n₅}-NH]-Phe、[NW]-Gly、NW-Val、ここでWはH、直鎖状または分枝状 C_1-C_6 アルキル、-(CH₂)_{n₅}-COOHから選択され、ここでn₇は0~5の整数、4-カルボキシベンジル、4-アミノメチルベンジル]。

【0014】

本発明はまた、上記式(I)の化合物の調製方法を提供する。

【0015】

本発明は、医薬、特にトポイソメラーゼI阻害剤として有用な医薬のための活性成分としての上記一般式(I)の化合物の使用を含む。トポイソメラーゼI阻害に起因する治療用途のなかでも、本発明者らは腫瘍および寄生虫またはウイルス感染に言及する。

【0016】

特定の薬理学的特性があるため、式(I)の化合物はまた、腫瘍およびその転移形態の治療用医薬の調製に有用である。

【0017】

本発明はまた、少なくとも1つの 医薬上許容される媒体および/または賦形剤と混合して、活性成分として式(I)の化合物を含む医薬組成物も含む。

【0018】

本発明による化合物は、7位にて官能化された、カンプトテシン分子と、Arg-Gly-Asp配列を含むシクロペプチドとの縮合の結果得られる。この構造的組合せは、 v_3 および v_5 型のインテグリンを高発現する細胞に細胞毒性薬 (カンプトテシン)を集中させやすいという利点を有する。細胞毒性薬はその活性を、酵素または加水分解作用を介して接合形態および/または 遊離形態において発揮する。

【0019】

10

20

30

40

50

上記式(1)に示される様々な官能基および残基の定義、ならびに医薬上許容される塩の定義は、化学分野の当業者の周知技術の範囲内であり、特定の定義は必要ではない。しかしながら、かかる基への言及は、例えば本出願人名義で出願した国際特許出願WO 00/53607(抗腫瘍活性を有するカンプトテシン誘導体)、WO 03/101995(修飾ラクトン環を有するカンプトテシン; $i=1$)およびWO 03/101996(カンプトテシンの20位におけるエステル)などの技術および特許文献においてみることが出来る。

【0020】

好ましい化合物の第一の群は、 $m = 1$ である式(1)の化合物からなる。

【0021】

この第一の群において、 R_2 は好ましくはアルキレンであり、より好ましくはメチレンまたはエチレンであり、 X は非存在である。

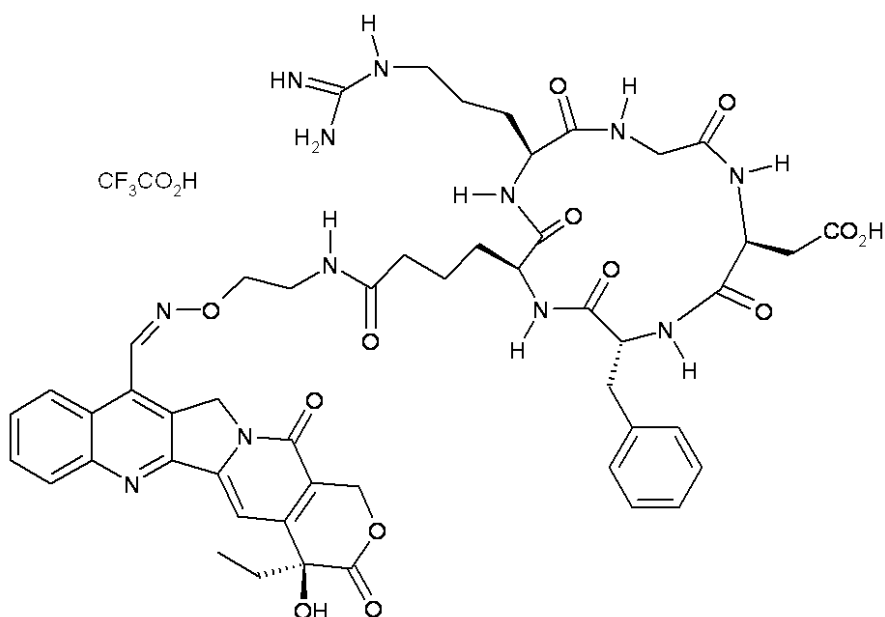
【0022】

好ましい化合物の別の群は、 $X = R_4CH_2(OCH_2CH_2)_{n3}OCH_2R_4$ である式(1)の化合物からなる。

【0023】

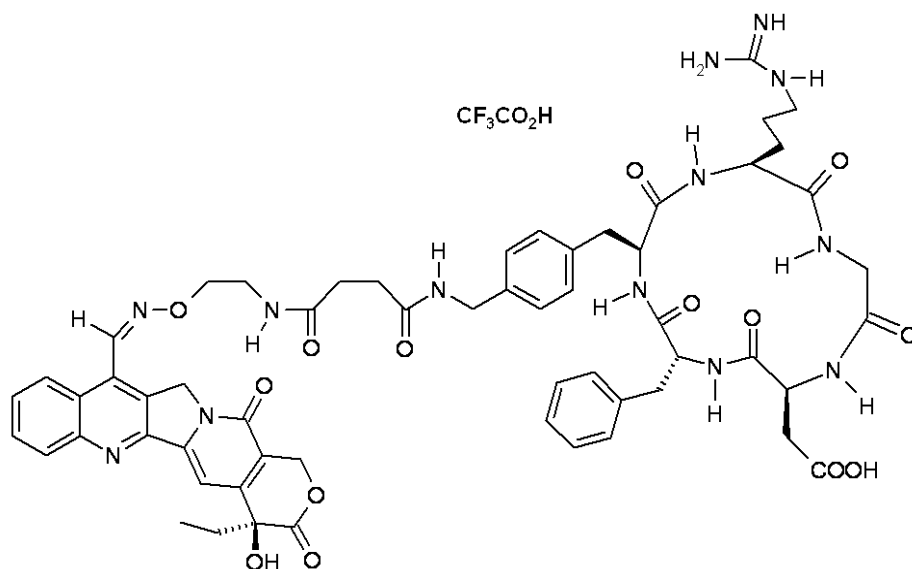
本発明によるもっとも好ましい化合物は以下のものである：

【化2】



以下、ST2686と称する；

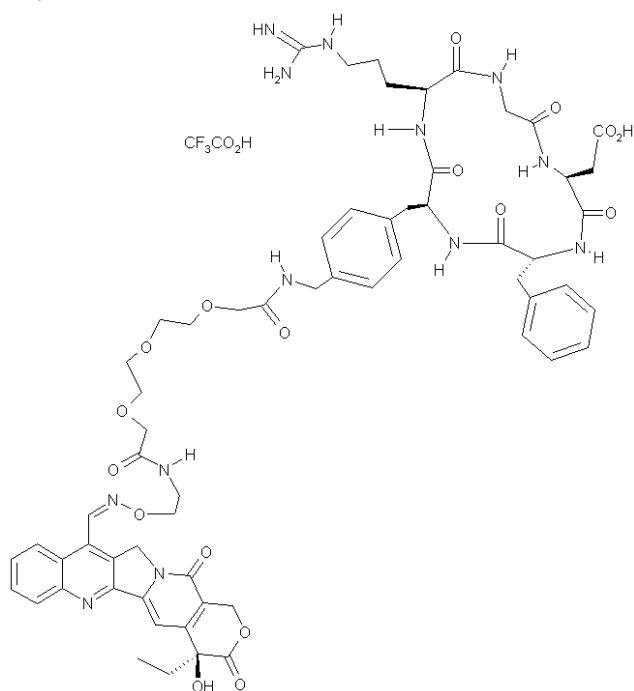
【化 3】



10

以下、ST2724と称する；

【化 4】



20

30

以下、ST2742と称する。

【 0 0 2 4】

40

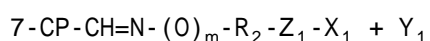
式(1)の化合物は、本発明による好ましい化合物について以下に記載され、例証されている方法によって調製することが出来る。この方法は本発明のさらなる目的を構成する。

【 0 0 2 5】

基本的に、本発明の目的である式(1)の化合物は、その五環系構造を簡略して本明細書においては略語CPによって示す、7位にて好適に官能化されたカンプトテシンと、シクロペプチド誘導体 Y_1 との、縮合によって調製することが出来る。

【 0 0 2 6】

縮合反応は以下のスキームによって行うことが出来る：



ここで、7-CPは7-置換カンプトテシンの多環構造を表し、 Z_1 、 X_1 および Y_1 はそれぞれ、

50

式Iの接合化合物が得られるように、最終的に適当に官能化および/または保護されている、式Iにおいて定義した基Z、XおよびYを表す。

【0027】

7-CP 誘導体は公知のアプローチ、例えば、EP1044977、またはJ. Med. Chem. 2001、44、3264-3274、S.Dallavalle et alに記載のアプローチを用いて得られ、縮合反応は常套方法、例えば、Journal of Controlled Release 2003、91、61-73; S.S. Dharap et al.; Journal of Medicinal Chem. 2003、46、190-3、R.Bhattに記載の方法を用いて実施できる。

【0028】

シクロペプチド Y_1 は実施例1~6に記載のように常套のペプチド合成技術にしたがって調製することが出来る。

10

【0029】

所望のシクロペプチドが得られると、それは保護形態において縮合反応に用いられ、保護基は最終化合物が得られた後に除去する。脱保護は、公知方法、例えば、純粋なトリフルオロ酢酸の使用による酸性条件または塩素化有機溶媒の存在下で行われる。

【0030】

カンプトテシン誘導体 $7\text{-CP-CH=N-(O)}_m\text{-R}_2\text{-Z}_1\text{-X}_1$ は、当業者にとって技術常識である方法を用いて得られる。

【0031】

重要な中間体はアミノ(アルコキシ)-イミノメチル-カンプトテシンであり、その調製方法はWO 03/101995および WO 03/101996に記載されており、上記特許EP 1 044 977に記載の反応と類似の反応により7-ホルミルカンプトテシンから出発する

20

【0032】

7-ホルミルカンプトテシンは公知の化合物であり、その調製は特許出願 WO 00/53607およびそれに引用される文献に記載されており、特に、 N_1 -オキシドの調製も記載されている。

【0033】

Dallavalle S., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001、11(3): 291-4; Dallavalle S., et al., J.Med.Chem., 2000、43(21): 3963-9も参照されたい。

【0034】

$Y(-\text{COOH})$ 化合物は新規であり、特に式(I)の化合物の調製のための中間体として、本発明のさらなる目的を構成する。

30

【0035】

本発明に記載される化合物は、トポイソメラーゼI阻害剤であり、それゆえ医薬、特に該トポイソメラーゼの阻害により恩恵を受ける疾患の治療用医薬として有用である。特に、本発明による化合物は抗増殖活性を示し、それゆえその治療特性のために使用され、そして医薬組成物における製剤のために好適なものとする物理化学的特性を有する。

【0036】

医薬組成物は、例えば、有意な治療効果をもたらす量の少なくとも1つの式(I)の化合物を活性成分として含む。本発明による組成物は完全に常套のものであり、医薬業界において慣行である方法を用いて得られる。選択した投与経路に応じて、組成物は経口、非経口または静脈内投与に好適な固体または液体形態であろう。本発明による組成物は、活性成分とともに、少なくとも1つの医薬上許容される媒体または賦形剤を含む。特に有用なものは、製剤補助剤、例えば、可溶化剤、分散剤、懸濁剤または乳化剤であり得る。

40

【0037】

式(I)の化合物は、例えば抗癌薬または抗寄生虫または抗ウイルス活性を有するその他の薬物といったその他の活性成分と組み合わせて、別々の形態および単一用量形態のいずれにおいても用いることが出来る。

【0038】

本発明による化合物は例えば以下において、抗癌活性を有する医薬として有用である：

50

非小細胞癌(non-microcytoma)および小細胞肺癌、または結腸直腸癌または 前立腺癌、神経膠芽腫および神経芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、消化器癌、肝臓癌、カポジ肉腫、腎臓癌、肉腫および骨肉腫、精巣癌、乳癌、膵臓癌、黒色腫、膀胱癌および頭頸部癌。本発明による化合物により得られる利益の1つは、分子のカンプトテシン部分に固有の抗トポイソメラーゼ活性と、分子のシクロペプチド部分によって提供されるインテグリン阻害活性の組合せである。その結果、本発明による化合物により可能な組合せ作用は、腫瘍学分野における当業者に有益であると認識される。実際、Arg-Gly-Asp 配列を含むシクロペプチド部分は、分子をインテグリンを発現する腫瘍に向かわせるだけでなく、いったん標的に到達すると、分子の細胞毒性部分のインターナリゼーションからインテグリン阻害活性に及ぶ多様な機能を発揮することが出来、その結果、特に腫瘍血管新生の阻害に関する利益がもたらされる。シクロペプチド部分も、いったんカンプトテシン部分と離れると、腫瘍部位から離れた部位にて作用を発揮することが出来、それゆえ本発明による化合物は、転移形態の予防または治療において有用である。

10

【0039】

本発明の目的である医薬はまた、寄生虫疾患の治療においても有用であり得る。

【0040】

以下の実施例により本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0041】

使用した略語は以下の通りである：

20

Aad (アミノアジピン酸)；

Amb (アミノメチルベンジル)；

Amp (アミノメチルフェニルアラニン)；

Boc (ter-ブトキシカルボニル)；

CSA (カンファースルホン酸)；

CTH (触媒的移動水素化)；

DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド)；

DCM (ジクロロメタン)；

DIEA (ジイソプロピルエチルアミン)；

DMF (ジメチルホルムアミド)；

30

Fmoc (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)；

HOBT (ヒドロキシベンゾトリアゾール)；

NMP (N-メチル-ピロリドン)；

Pht (フタロイル)；

Pmc (ペンタメチルクロマン-6-スルホニル)；

ST1968 (2-アミノエトキシイミノメチル-カンプトテシン)

TBTU(テトラフルオロボラート-0-ベンゾトリアゾール-1-イル-テトラメチルウロニウム)；

TFA (トリフルオロ酢酸)。

【0042】

実施例 1

40

c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp) (保護された ST2581) の合成

1.587 mmolの Fmoc-Gly-Res (Res = Sasrin 樹脂(登録商標)、Bachem)を30 分間撹拌しながら75 mlの DMFに懸濁し、その後 18 mlの ピペリジンを添加しさらに30 分間撹拌を続けた。ろ過し、DMFで洗浄した樹脂を、50 mlの NMP (N-メチル-ピロリドン)に15 分間懸濁した。その後 Fmoc-Arg(Pmc)-OH、HOBT、TBTU および DIEAを添加した(各3.174 mmol)；2 時間の撹拌の後、懸濁液をろ過し、DMFで洗浄した。ピペリジンによる脱保護の後、連続してそれぞれ上記のように行う次のアミノ酸とのカップリングを繰り返した。即ち：Fmoc-Amp(Cbz)-OH、Fmoc-D-Phe-OH、および Fmoc-Asp(OtBu)-OH。Fmoc-N-末端の最後の脱保護の後、直鎖状ペプチドをDCM中の45 mlの 1% TFAを用いて樹脂から遊離させた。これをおよそ1 lのCH₃CNに溶解し、4.761 mmolの HOBT および TBTU および 10 mlの

50

DIEAを添加した；溶液を30 分間攪拌しながら維持し、溶媒を蒸発させて少容量とし、生成物の沈降を水を用いて完了した。ろ過した粗生成物を27 mlの MeOH および DMFの1:1混合物に溶解した；5 mmolのアンモニウムホルミエート および 0.55 gの10% Pd/Cを添加し、室温で30 分間攪拌しながら放置した。懸濁液をセライトでろ過し、乾燥させた。残渣を分取 RP-HPLC (カラム: Alltima (登録商標) C-18、Alltech; 移動相水中50% CH₃CN + 0.1% TFA; 保持時間 (Rt) = 9.13 分間)により精製した。483 mgの白色粉末を得た。

【 0 0 4 3 】

¹H-NMR (DMSO-d₆) 8.3、8.07、8.04、7.90、7.80、7.33、7.15、7.07、4.62、4.50、4.35、4.12、4.01、3.15、3.03、2.96-2.65、2.58、2.48、2.32、2.02、1.75、1.50、1.35、1.23

10

【 0 0 4 4 】

分子量 (Maldi-Tof): 973

【 0 0 4 5 】

実施例 2

c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Aad) (保護された ST2650) の合成

0.69 mmolの Fmoc-Gly-Resを実施例 1に記載のようにして処理し、ただしこの場合、第3および第4 アミノ酸をジペプチド Fmoc-D-Phe-Aad(OBzl)-OH の形態で添加した。CTHによる脱保護、および粗生成物の分取 RP-HPLC (移動相: 水中 66% CH₃CN + 0.1% TFA; Rt = 17.29 分間)による精製の後、187 mgの 純粋なペプチドを得た。

【 0 0 4 6 】

20

¹H-NMR (DMSO-d₆) 7.23、4.58、4.20-3.90、3.28、3.05、2.99、2.85、2.74-2.35、2.15、2.05、1.85-1.25.

【 0 0 4 7 】

分子量 (Maldi-Tof): 940

【 0 0 4 8 】

実施例 3

c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Me-Amp) (保護された ST2700) の合成

還流している無水トルエン中のFmoc-Phe(4-Pht-N-CH₂)-COOHの懸濁液に、2 当量のCSA および20 当量のパラホルムアルデヒドを添加し、15 分の間隔で4 部に分けた。混合物を放置して冷却し、120 mlの トルエンで希釈し、5% NaHCO₃ および水で洗浄した。溶媒の蒸発後、残渣を15 mlの CHCl₃ + 15 mlの TFA + 700 μlの Et₃SiHに溶解した；混合物を暗所で42 時間放置して攪拌した。溶媒の蒸発後、残渣をシリカゲルでのろ過により精製した。総収率: 90%

30

【 0 0 4 9 】

直鎖状ペプチドを実施例 1に記載のように固相で合成し、上記のように調製した第3 アミノ酸としてのFmoc-N-Me-Phe-(4-Pht-N-CH₂)-COOHを挿入した。この場合は樹脂でのN-Fmoc-末端の脱保護をDMF中の溶液中の30% ジイソプロピルアミン (300 当量) を用いて行った(フタルイミドが存在したため)。閉環後、500 mgのペプチドを10 mlの熱い無水 EtOHに溶解し、それに、エタノール中の0.9 mlのNH₂-NH₂ · H₂O 1 M溶液を添加した。還流しながら2 時間加熱した後、溶媒を蒸発させ、残渣を10 mlの DCM + 10 mlの Na₂CO₃ 溶液で激しく攪拌しながら処理した。粗最終生成物を有機相から回収し、蒸発後、分取 RP-HPLC (移動相: 水中52%CH₃CN + 0.1% TFA; Rt = 10 分間)により精製した。

40

【 0 0 5 0 】

¹H-NMR (CDCl₃) 8.29-7.66、7.38-7.07、4.95-4.77、4.09、3.41、3.05-2.81、2.51、2.05、1.74、1.40、1.26

【 0 0 5 1 】

分子量 (Maldi-Tof): 987

【 0 0 5 2 】

実施例 4

c[Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp(CO-(CH₂)₂-COOH)] (保護された ST2649) の合成

50

120 mgのシクロペプチド c[Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp]・TFA (実施例 1に記載のように調製)を3.6 mlの DCM-DMFの2:1混合物に、化学量論の TEA および 無水コハク酸とともに溶解した。1 時間後、反応混合物を30 mlの DCMで希釈し、水で洗浄した。有機相を、乾燥させ濃縮し、100 mgの 純粋な生成物の残渣を得た。

【 0 0 5 3 】

分析 RP-HPLC: カラム: Purosphere STAR (登録商標)、Merck; 移動相: 水中 45% CH₃CN + 0.1% TFA; Rt = 13.17 分間

【 0 0 5 4 】

¹H-NMR(DMSO-d₆) 8.20-7.75、7.19-7.02、4.58、4.45、4.36、4.30、4.20、4.05、3.00、2.97-2.57、1.83、1.62、1.32

10

【 0 0 5 5 】

分子量 (Maldi-Tof): 1073

【 0 0 5 6 】

実施例 5

c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Amb-Gly) (保護された ST2701) の合成

6 mlの THF中の1.22 mmolの Boc-一保護 p-キシリレンジアミンの溶液に、1.83 mmolの TEAを添加し、2 mlの THF中の1.22 mmolの ベンジル ブロモアセートの溶液を滴下した。混合物を撈拌しながら一晩放置し、その後、溶媒を蒸発させ、残渣をフラッシュカラム (CHCl₃-EtOAc、9:1)で精製した。0.69 mmolの N-(4-Boc-NH-CH₂-ベンジル)-グリシン ベンジルエステルを得た。

20

【 0 0 5 7 】

250 mgの Fmoc-D-Phe-OHを27 mlの DCMに溶解し、40 μlの ジホスゲン および 230 μlの sym-コリジンを添加した; 15 分後、190 mgの先に調製したエステルを添加し、3 mlの DCMに溶解した。3 時間後、80 μlの N-Me-ピペラジンを反応混合物に添加し、10 分間撈拌し、その後混合物を10 mlの DCMで希釈し、抽出を水、HCl 0.5N、水、5% NaHCO₃ および 水により行った。溶媒の蒸発後、残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (DCM-EtOAc、9:1)により精製した。収率: 80%

【 0 0 5 8 】

こうして得た6 mlの MeOHに溶解した100 mgの生成物に、76 μlの AcOH および 42 mgの HCOONH₄を添加し、混合物を0 に冷却し、50 mgの 10% Pd/Cを添加した。30 分後、反応混合物をセライトでろ過した。ろ液を乾燥させ、フラッシュカラム (CHCl₃-MeOH 9:1)で精製した。収率: 90%

30

【 0 0 5 9 】

こうして得た190 mgの生成物を1.2 mlの TFAに溶解し、乾燥させた (Bocの脱保護); 残渣を9 mlの 10% Na₂CO₃ + 6 mlの ジオキサンに再溶解し、0 に冷却し、3 mlの ジオキサンで希釈した120 μlの ベンジルオキシカルボニルクロリド溶液を滴下した。室温で1 時間撈拌後、減圧下で蒸発を行い、少容量とし、その後混合物を水で希釈し、pHをHClにより1に下げ、抽出をEtOAcにより行った。溶媒の蒸発後、残渣をシリカゲルでのろ過により精製し、CHCl₃-MeOH (8:2)で洗浄した。純粋なジペプチド収率: 82%

【 0 0 6 0 】

0.69 mmolの Fmoc-Gly-Resを実施例 1に記載のように処理し、Argの後、先に調製したジペプチド Fmoc-D-Phe-N(4-Cbz-NH-CH₂-ベンジル)-GIを順に添加した。CTHによるCbzの脱保護の後、粗生成物 c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-N-Amp-Gly) を分取 RP-HPLC (移動相: 水中50% CH₃CN + 0.1% TFA; Rt = 10.5 分間)により精製した。

40

【 0 0 6 1 】

¹H-NMR (DMSO-d₆) 8.29-7.66、7.44-6.90、5.15、4.72-4.18、4.20、4.05-3.32、3.15、3.06、2.70、2.51、2.49、2.01、1.80-1.35、1.49、1.35、1.23

【 0 0 6 2 】

分子量 (Maldi-Tof): 973

【 0 0 6 3 】

50

実施例 6c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp(CO-CH₂-(OCH₂CH₂)_n-O-CH₂-COOH)) の合成

4 ml の 3:1 DCM-DMF 混合物中の 200 mg の c(Arg(Pmc)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Amp)・TFA (実施例 1 に記載のように得た) の溶液に、実質的に過剰のグリコールジ酸を添加した。DIEA (3 当量) および DCC (2 当量) を同溶液に添加した。混合物を一晩撹拌しながら放置し、その後 DCM で希釈し、水で洗浄した。

【0064】

粗生成物を有機相の蒸発により回収し、フラッシュクロマトグラフィー (移動相: CHCl₃-MeOH 7:3 + 1% AcOH) により精製した; 生成物を含むフラクションをプールし、水で洗浄し、脱水し、乾燥させ、157 mg の純粋な生成物の残渣を得た。

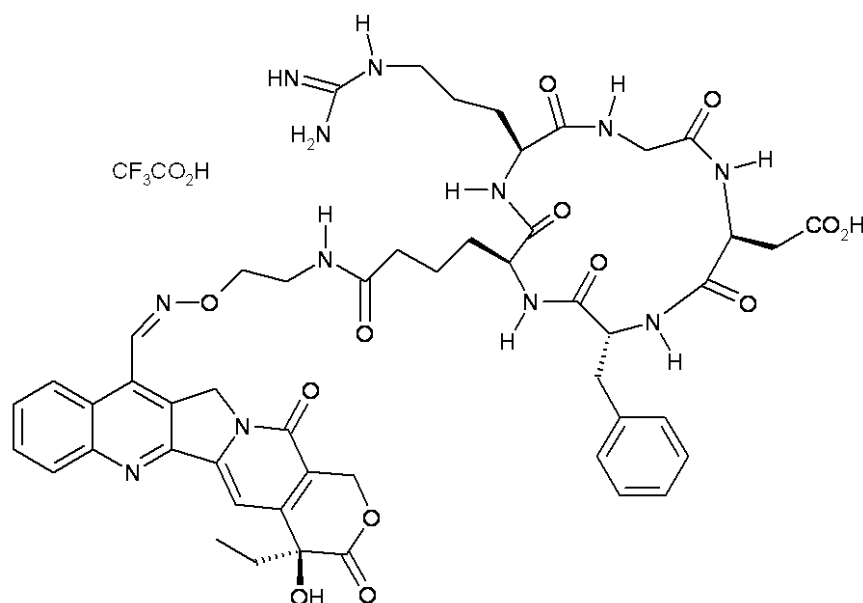
【0065】

分析 RP-HPLC: (カラム: Purosphere STAR (登録商標)、Merck; 移動相: 水中 50% CH₃CN 50% + 0.1% TFA; R_t = 10.96)

¹H-NMR (DMSO-d₆) 8.35-7.92、7.20-7.00、4.65、4.50、3.94、3.60-3.45、3.00-2.60、2.55、2.45、2.30、2.00、1.70、1.50、1.30、1.20.

【0066】

分子量 (Maldi-Tof): 様々な分子量の様々な使用したグリコール類に対応

【0067】接合誘導体の合成実施例 7ST2686 の合成【化 5】【0068】ST1968 と保護された ST2650 との縮合

15 mg (0.016 mmol) の保護された ST2650 を 1 ml の 無水 DMF に溶解し、溶液を 0 にした; 3.6 mg (0.027 mmol) の HOBt および 4 mg (0.019 mmol) の EDC を添加し、混合物を 0 で 30 分間放置して反応させた。

【0069】

6 mg の 2-アミノエトキシイミノメチルカンプトテシン (0.0131 mmol) および 8 μl の DIEA (0.046 mmol) を次いで添加し、混合物を室温でおよそ 60 時間放置して反応させた。反応は TLC によりモニターした (CH₂Cl₂:CH₃OH = 9:1)。

【0070】

反応混合物を H₂O (およそ 10 ml) で希釈し、CH₂Cl₂ で 3 回抽出を行った; 有機相を塩水

10

20

30

40

50

で洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、ろ過して乾燥させた。40 mgの粗生成物を得た。

【0071】

クロマトグラフィー：溶出液 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 94:6$ 92:8。11 mgの生成物を得た。

【0072】

収率 = 61%

【0073】

保護基の遊離

9 mgの保護生成物を4 mlの $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CF}_3\text{COOH} 1:1$ 溶液に溶解し、室温で24時間放置して反応させた。

【0074】

反応はTLCによりモニターした ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 94:6$)。

【0075】

反応溶液を乾燥させ、固体を得、それを Et_2O で3回洗浄し、遊離反応の副生成物を除いた。

【0076】

5 mgの生成物をトリフルオロアセートの形態にて得た。

【0077】

収率 = 66%

【0078】

分析データ：

$R_f = 0.24$ 、 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 7:3$ 中 (TLC RP)

【0079】

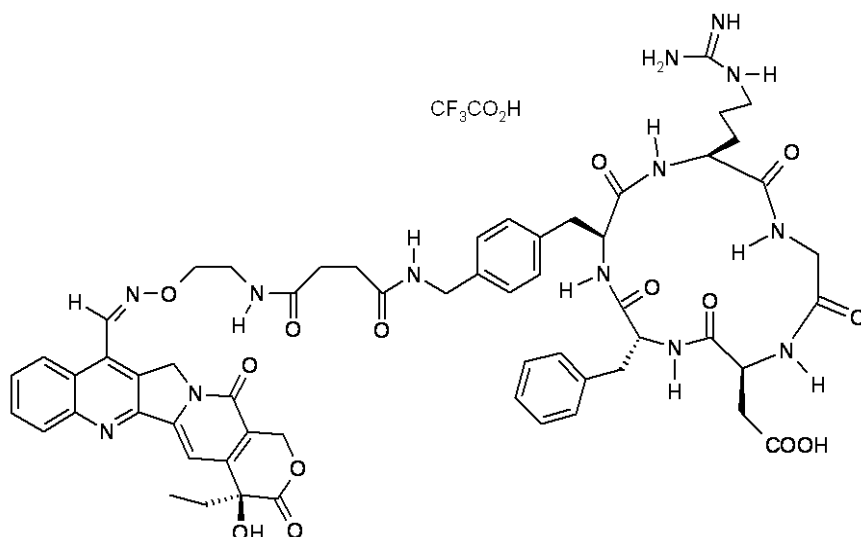
HPLC 分析：カラム：Dynamax (登録商標) RP C_{18} 、サンプルはメタノールに溶解；流速：1ml/分；溶出混合液：アセトニトリル：水 (0.1% TFA) = 55:45；グラジエント：10分～55% 水 (TFA 0.1%)：45% アセトニトリル、10分～10% 水 (TFA 0.1%)、10分、10% 水 (TFA 0.1%)、5分～開始条件。 = 360 nm 8.323 (25.8%)；10.969 (74.2%)、 = 254 nm 8.325 (29.4%)；10.975 (70.6%)

【0080】

実施例 8

ST2724の合成

【化6】



ST1968と保護されたST2649との縮合

25 mg (0.023 mmol)の保護されたST2649を2 mlの無水DMFに溶解し、溶液を0にし、その後5 mg (0.039 mmol)のHOBtおよび5 mg (0.027 mmol)のEDCを添加し、混合物を0

10

20

30

40

50

で30分間放置して反応させた。

【 0 0 8 1 】

8 mgの ST1968 (0.019 mmol)および12 μ lの DIEA (0.070 mmol) を添加し、混合物を室温でおよそ39 時間放置して反応させた。反応 はTLCによりモニターした ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ H = 9:1 開始を確認)。

【 0 0 8 2 】

DMF を蒸発させ、混合物を H_2O (およそ 10 ml)で希釈し、 CH_2Cl_2 で3回抽出を行った。有機相を塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、ろ過して乾燥させた。29 mgの 粗生成物を得た。

【 0 0 8 3 】

クロマトグラフィー：溶出液 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ = 94:6 9:1. 22 mgの 7位にて結合した $\text{CH}=\text{NO}$ 基の 2 つのsinおよびanti異性体からなる生成物 (lom184)。

【 0 0 8 4 】

収率 = 78 %

HPLC-MS 分析：カラム：対称 C_{18} (3.5 μm , 4.6 x 75 mm); 移動相：アセトニトリル (TFA 0.1%): 水 (TFA 0.1%) = 55:45; グラジエント：10 分、55% 水 (TFA 0.1%): 45% アセトニトリル、10 分~10% 水 (TFA 0.1%)、10分、10% 水 (TFA 0.1%)、5分~ 開始条件。
= 254 nm: t_r = 5.20 (42%); t_r = 5.97 (52%)

【 0 0 8 5 】

MS: (ESI) m/z = 1492 、 $[\text{MH}]^+$ に対応

【 0 0 8 6 】

保護基の除去

22 mgの 保護されたST2724を4 mlの $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CF}_3\text{COOH}$ 1:1 溶液に溶解し、室温で26 時間放置して反応させた。反応 はTLCによりモニターした (溶出液: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ = 95:5 開始を確認; $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ = 3:7、生成物)。

【 0 0 8 7 】

保護されたST2724の消失を $t = 0$ 、 $t = 2$ 時間、 $t = 26$ 時間にて以下のグラジエント条件にて得たサンプルを注入するHPLCによりモニターした：10 分、55% 水 (TFA 0.1%): 45 % CH_3CN 、10 分~10% 水 (TFA 0.1%)、10分、10% 水 (TFA 0.1%)、5分~ 開始条件; T_r 保護されたST2724 = 17.3; 18.1

【 0 0 8 8 】

カラム：Alltima RP C_{18} (150 mm、DI 4.6 mm、5 μ)。サンプルは溶出混合液に溶解

【 0 0 8 9 】

反応溶液を乾燥させ、3回洗浄した; 得られた固体を3回 Et_2O で洗浄した。

【 0 0 9 0 】

10 mgの トリフルオロアセテート 生成物を得た。

【 0 0 9 1 】

収率 = 53%

R_f = 0.52 、 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ = 7:3中 (TLC RP)

【 0 0 9 2 】

融点: 分解温度 (dec. T) > 160

【 0 0 9 3 】

HPLC 分析：カラム：Alltima RP C_{18} (150 mm、DI 4.6 mm、5 μ)、 サンプルは溶出混合液に溶解; 移動相：アセトニトリル (0.1% TFA): 水 (TFA 0.1%) = 35:65; 流速 = 1 ml/分、アイソクラティック 分析、 = 254 nm 3.204 (15.0%); 3.982 (79.1%)、 = 360 nm 3.204 (12.8%); 3.984 (83.9%)

【 0 0 9 4 】

実施例 9

ST2742の合成

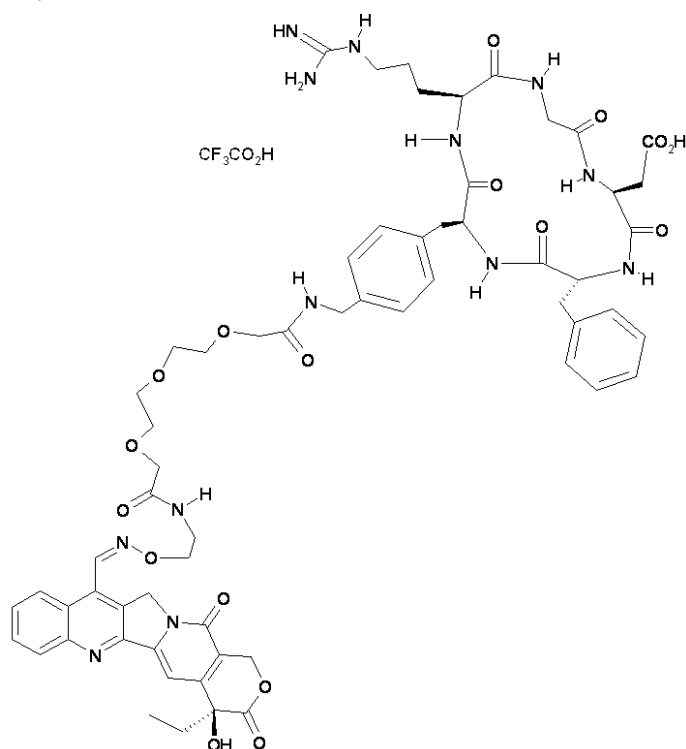
10

20

30

40

【化 7】



10

20

ST1968と保護されたST2661との縮合

110 mg (0.093 mmol)の保護されたST2661を4 mlの 無水 DMFに溶解し、溶液を0 にし、その後 21 mg (0.158 mmol)のHOBtおよび22 mg (0.112 mmol)の EDC を添加し、混合物を0 で30分間放置して反応させた。

【 0 0 9 5 】

33 mgの ST1578 (0.077 mmol)、47 μ lの DIEA (0.270 mmol) を添加し、混合物を室温で24時間放置して反応させた。反応 はTLCによりモニターした (CH₂Cl₂:CH₃OH = 9:1 開始を確認)

30

【 0 0 9 6 】

処理(processing): DMF を蒸発させ、混合物をH₂O (およそ 15 ml)で希釈し、CH₂Cl₂で3回抽出を行った。有機相を塩水で処理し、Na₂SO₄で脱水し、ろ過して乾燥させた。166 mgの 粗生成物を得た。

【 0 0 9 7 】

クロマトグラフィー: 溶出液 CH₂Cl₂:CH₃OH = 95:5 8:2. 63 mgの 生成物 (保護されたST2742)を得た。収率 = 52%

【 0 0 9 8 】

HPLC 分析: カラム: Alltima RP C₁₈ (150 mm、DI 4.6 mm、5 μ), サンプルは溶出混合液に溶解; 移動相: アセトニトリル (TFA 0.1%): 水 (TFA 0.1%) = 35:65; 流速 = 1 ml/分; グラジエント: 10 分~55% 水 (TFA 0.1%): 45% アセトニトリル、10分~10% 水 (TFA 0.1%)、10分、10% 水 (TFA 0.1%)、5分~開始条件、 = 254 nm 15.17 (12.7%); 15.88 (80.2%)、 = 360 nm 15.17 (17.5%); 15.88 (79.0%)

40

【 0 0 9 9 】

保護基の除去

30 mgの 保護されたST2742を4 mlのCH₂Cl₂:CF₃COOH 1:1 溶液に溶解し、室温で25 時間放置して反応させた。保護生成物の消失は、上記分析条件にてt = 0、t = 1 時間、t = 2 時間およびt = 24時間にて得たサンプルを注入するHPLCによりモニターした。

【 0 1 0 0 】

50

7位にて結合するCH=NO 基の2つのsinおよびanti異性体からなる19 mgの生成物を得た。

【0101】

収率 = 73%; m.p. 160 (dec); MS (MALDI) m/z: 1272, 4

【0102】

$R_f = 0.44$, $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 7:3$ 中(TLC RP-18)

【0103】

HPLC 分析: カラム: Alltima RP C_{18} (150 mm、DI 4.6 mm、5 μ)、サンプルは溶出混合液に溶解; 移動相: アセトニトリル (TFA 0.1%): 水 (TFA 0.1%) = 35:65; 流速 = 1 ml/分; グラジエント: 85% 水 (TFA 0.1%): 15% アセトニトリル、20' ~ 10% 水 (TFA 0.1%)、10'、10% 水 (TFA 0.1%)、5' ~ 開始条件

【0104】

= 254 nm 9.65 (28.4%); 10.24 (62.4%)

【0105】

実施例 10

生物学的結果

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 受容体への結合

精製した $\alpha_v\beta_3$ 受容体 (Chemicon、カタログ番号CC1020)をバッファー (20 mM Tris、pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2)に希釈して濃度0.5 $\mu\text{g/ml}$ とした。100 μl のアリコットを96-ウェルプレートに添加し、一晚+4 でインキュベートした。プレートを1回バッファー (50 mM Tris、pH 7.4、100 mM NaCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2 、1% ウシ血清アルブミン)で洗浄し、次いでさらに2 時間室温でインキュベートした。プレートを同じバッファーで2 回洗浄し、3 時間 室温で放射性リガンド [^{125}I]エキスタチン0.05 nM(Amersham Pharmacia Biotech)とともに競合リガンドの存在下でインキュベートした。インキュベーションの最後に、ウェルを洗浄し、放射能をガンマカウンター (Packard)を用いて測定した。リガンドの非特異的結合は過剰の非放射性エキスタチン(1 μM)の存在下で測定した。

【0106】

インテグリン $\alpha_v\beta_5$ 受容体への結合

精製した $\alpha_v\beta_5$ 受容体 (Chemicon、カタログ番号CC1020)をバッファー (20 mM Tris、pH 7.4、150 mM NaCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2)に希釈して濃度1 $\mu\text{g/ml}$ とした。100 μl のアリコットを96-ウェルプレートに添加し、一晚+4 でインキュベートした。プレートを1回バッファー (50 mM Tris、pH 7.4、100 mM NaCl、2 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2 、1% ウシ血清アルブミン)で洗浄し、次いでさらに2 時間 室温でインキュベートした。プレートを同じバッファーで2 回洗浄し、3 時間室温で放射性リガンド [^{125}I]エキスタチン0.15 nM (Amersham Pharmacia Biotech)とともに競合リガンドの存在下でインキュベートした。インキュベーションの最後に、ウェルを洗浄し、放射能をガンマカウンター (Packard)を用いて測定した。非特異的リガンド結合は過剰の非放射性エキスタチン(1 μM)の存在下で測定した。

【0107】

IC₅₀ パラメーターの評価

ピトロネクチン受容体に対する生成物の親和性を、IC₅₀ 値 \pm SD、即ち、特異的放射性リガンド-受容体結合の50%を阻害することが出来る濃度として表した。IC₅₀ パラメーターは「ALLFIT」ソフトウェアを用いて算出した。

【0108】

結果

接合体ST2686はIC₅₀ 値として算出した結合が低かったため、ST2724およびST2742と比較してインテグリン受容体に対する親和性をもっとも興味深かった(表 1参照)。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 受容体について放射性リガンドと競合するST2686の能力は遊離RGD ペプチドST2650により示されるよりも高く、 $\alpha_v\beta_5$ 受容体に対するST2650の能力に匹敵していた

(表 2)。ST2724もまた、遊離ペプチド ST2649と比較してインテグリン受容体に対する強い親和性を示したが(表 2)、ST2742は、両方のインテグリン受容体に対する強力な親和性ではあるが、RGD 遊離ペプチド ST2661と比較して弱い親和性を示した。

【 0 1 0 9 】

その他のRGD ペプチド(ST2581、ST2700、ST2701)もまた、インテグリン受容体に対する強力な相互作用を示した (表 2)。

【 0 1 1 0 】

表 1

カンプトテシン-RGD 接合体のビトロネクチン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ 受容体に対する親和性

10

【表 1】

化合物	$\alpha_v\beta_3$ IC ₅₀ ± SD (nM)	$\alpha_v\beta_5$
ST2686	0.59±0.01	0.37±0.01
ST2724	7.27±0.06	8.39±0.07
ST2742	12.5±2.1	6.5±0.03

表 2

RGD ペプチドのビトロネクチン $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ 受容体に対する親和性

20

【表 2】

化合物	$\alpha_v\beta_3$ C ₅₀ ± SD (nM)	$\alpha_v\beta_5$
ST2650	28.6±0.7	0.17±0.01
ST2649	37.6±0.9	5.1±0.07
ST2661	4.0±0.1	0.35±0.09
ST2581	1.7±0.1	3.4±0.1
ST2700	7.2±0.07	0.9±0.005
ST2701	36.7±0.7	2.9±0.1

30

【 0 1 1 1 】

様々な腫瘍細胞株に対する接合体の細胞毒性

化合物の生存細胞に対する効果を評価するために、スルホローダミン B試験を用いた。PC3 ヒト前立腺癌、A498 ヒト腎臓癌、A2780 ヒト 卵巣癌細胞を用いた。A2780、およびPC3 腫瘍細胞は10% 胎児ウシ血清 (GIBCO)を含むRPMI 1640で培養し、A498 腫瘍細胞は10% 胎児ウシ血清 (GIBCO)を含むEMEMで培養した。

【 0 1 1 2 】

腫瘍細胞を96-ウェル組織培養プレート(Corning)におよそ 10% 集密にて播種し、少なくとも 24時間付着させ、回復させた。8種類の濃度の被験薬物の効果を分析してそのIC₅₀ 値 (細胞生存を50%阻害する濃度))を算出した。プレートを72時間37 °Cでインキュベートした。処理の最後に、プレートを上清の除去とPBS の添加を3回行うことによって洗浄した。200 μlのPBSと50 μlの冷80%TCA を添加した。プレートを氷上で少なくとも 1時間インキュベートした。TCAを除去し、プレートを蒸留水に3回浸漬させて洗浄し、紙で40 °Cで5分間乾燥させた。次いで1% 酢酸中の200 μlの 0.4%スルホローダミン Bを添加した。プレートを室温でさらに30分間インキュベートした。スルホローダミン Bを除去し、プレートを1% 酢酸に3回浸漬させて洗浄し、紙で40 °Cで5分間乾燥させた。次いで200 μlのTris 10 mM を添加し、プレートを攪拌下に 20分間維持した。生存細胞をMultiskan 蛍光光度計で540 nmの吸光度として測定した。死滅した細胞の量を対照培養と比較してのスルホローダミン B結合のパーセンテージ低下として算出した。IC₅₀ 値は「ALLFIT」プログラムを用いて算出した。

40

50

【 0 1 1 3 】

報告するように、接合体はA2780 卵巢腫瘍細胞に対して IC_{50} 値が $0.16 \sim 0.4 \mu M$ であり、もっとも強力な細胞毒性活性を示した。A498 腫瘍細胞に対しては、ST2742は IC_{50} 値 $0.74 \mu M$ 、次いでST2686および ST2724 (それぞれ $IC_{50}=3.2$ および $4.3 \mu M$) (表 3)の順に活性が高かった。

【 0 1 1 4 】

表 3

PC3 前立腺癌、A498 腎臓癌、A2780 卵巢癌細胞に対する接合体の細胞毒性

【表 3】

化合物	PC3 $IC_{50} \pm SD, \mu M$	A498	A2780
ST2686	15 ± 1.5	3.2 ± 0.4	0.4 ± 0.03
ST2724	4.7 ± 0.4	4.3 ± 0.1	0.16 ± 0.001
ST2742	27 ± 3.9	0.7 ± 0.1	0.18 ± 0.01

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12

(73)特許権者 591030835

ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI
 イタリア共和国, ミラノ, ヴィア ヴェネジアン 1 番地

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 アルマ・ダル・ボッツォ

イタリア、イ - 2 0 1 3 3 ミラノ、ヴィア・ジ・コロポ 8 1 番、ISTITUTO・ディ・リチェ
 ルケ・キミケ・エ・ピオキミケ・“ジ・ロンツォーニ” 内

(72)発明者 セルジョ・ペンコ

イタリア、イ - 2 0 1 5 3 ミラノ、ヴィア・ミリー・カルラ・ミニョーネ 5 番

(72)発明者 ルーチョ・メルリーニ

イタリア、イ - 2 0 1 2 2 ミラノ、ヴィア・クリヴェッリ 1 4 番

(72)発明者 ジュゼッペ・ジャンニーニ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ボンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
 - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 マリア・オルネッラ・ティンティ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ボンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
 - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 クラウディオ・ピサーノ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ローマ、ボメツィア、ヴィア・ボンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0
 、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ
 内

(72)発明者 フランコ・ツニーノ

イタリア、イ - 2 0 1 3 3 ミラノ、ヴィア・ヴェネツィアン 1 番、ISTITUTO・ナツィオナー
 レ・ベル・ロ・ストゥディオ・エ・ラ・クラ・デイ・トゥモリ内

(72)発明者 ドメニコ・アッロアッティ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ボンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
 - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 ロレダナ・ヴェシ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ボンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ
 - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 サブリナ・ダッラヴァッレ

イタリア、イ - 2 0 0 5 9 ヴィメルカーテ、ヴィア・モンテ・ネロ 9 番

(72)発明者 ミン・ホン・ニ

イタリア、イ - 2 0 1 3 3 ミラノ、ヴィア・ジ・コロombo 8 1 番、イステイトウト・ディ・リチェ
ルケ・キミケ・エ・ピオキミケ・“ジ・ロンツォーニ”内

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 9 6 3 6 7 (WO , A 1)
国際公開第 0 2 / 0 2 9 0 7 2 (WO , A 1)
特表 2 0 0 3 - 5 0 8 4 9 7 (JP , A)
特開平 0 5 - 2 2 2 0 4 8 (JP , A)
特表平 1 0 - 5 0 6 3 7 5 (JP , A)
特表 2 0 0 1 - 5 1 1 8 0 7 (JP , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07K 1/00-19/00

C07D 491/00-491/22

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed