

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6609634号  
(P6609634)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.

F 1

C07H 15/252	(2006.01)	C07H 15/252
C07F 9/38	(2006.01)	C07F 9/38
C07C 337/06	(2006.01)	C07C 337/06
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00
A61P 19/08	(2006.01)	A61P 19/08

E

請求項の数 14 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-546026 (P2017-546026)  
 (86) (22) 出願日 平成27年11月20日 (2015.11.20)  
 (65) 公表番号 特表2017-535615 (P2017-535615A)  
 (43) 公表日 平成29年11月30日 (2017.11.30)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2015/077279  
 (87) 國際公開番号 WO2016/079327  
 (87) 國際公開日 平成28年5月26日 (2016.5.26)  
 審査請求日 平成30年11月20日 (2018.11.20)  
 (31) 優先権主張番号 1461253  
 (32) 優先日 平成26年11月20日 (2014.11.20)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 フランス (FR)

(73) 特許権者 517177165  
 アトランテラ  
 A T L A N T H E R A  
 フランス共和国、44800 サン テル  
 ブラン、リュ アロナ 3  
 3, Rue Aronnax, 448  
 00 Saint-Herblain F  
 RANCE  
 (74) 代理人 110000785  
 誠真IP特許業務法人  
 (72) 発明者 エゴロフ、マキシム  
 フランス共和国、44340 ブゲネ、  
 シュマン デ カントン 25

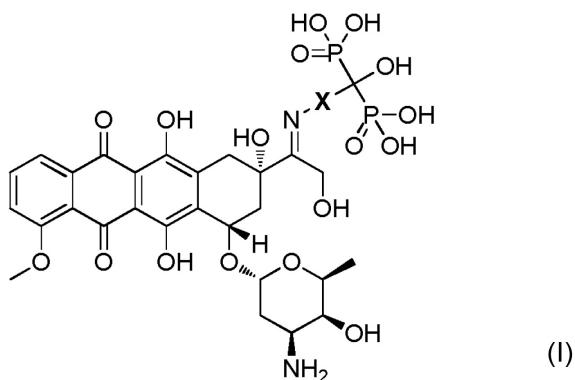
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ドキソルビシンの水溶性ヒドロキシビスホスホン酸誘導体

## (57) 【特許請求の範囲】

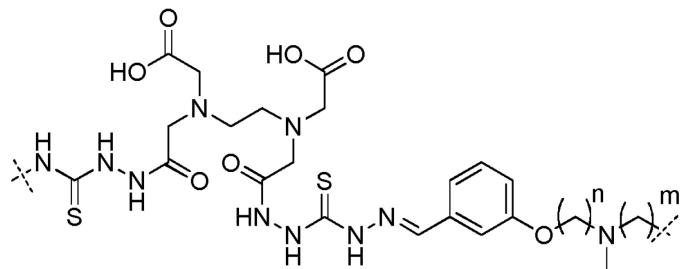
## 【請求項 1】

以下の一般式(I)またはその薬学的に許容できる塩の化合物であって、  
 【化1】



式中、Xが、  
 (1)

【化2】

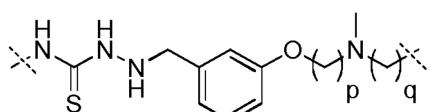


(ここで、nおよびmがそれぞれ、独立して、1～6の整数を表す)と、

10

(2)

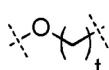
【化3】



(ここで、pおよびqがそれぞれ、独立して、1～6の整数を表す)と、

(3)

【化4】



20

(ここで、tが、1～6の整数を表す)と

から選択される二価基を表し、これらの官能基は、それらの末端窒素または酸素原子を介して式(I)の前記化合物のイミン官能基に、および、それらの末端炭素原子を介して式(I)の前記化合物のヒドロキシビスホスホン酸官能基に結合される化合物。

【請求項2】

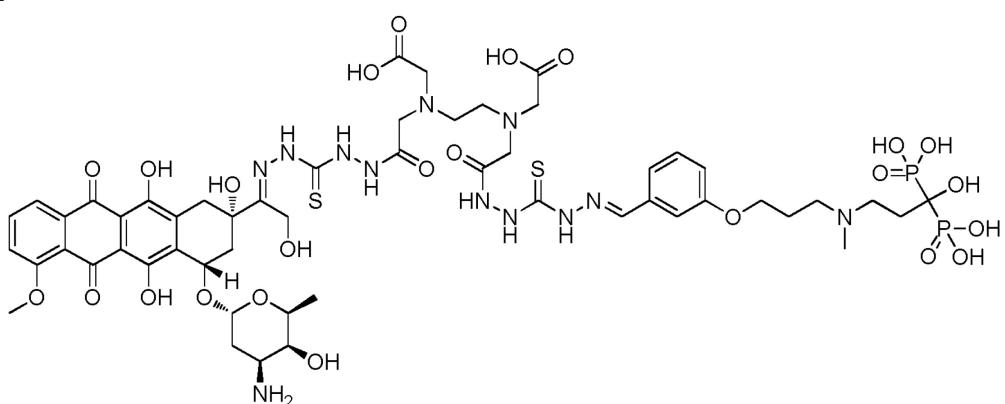
n、m、p、qおよびtがそれぞれ、独立して、1～4の整数を表すことを特徴とする、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

前記化合物が、以下の化合物

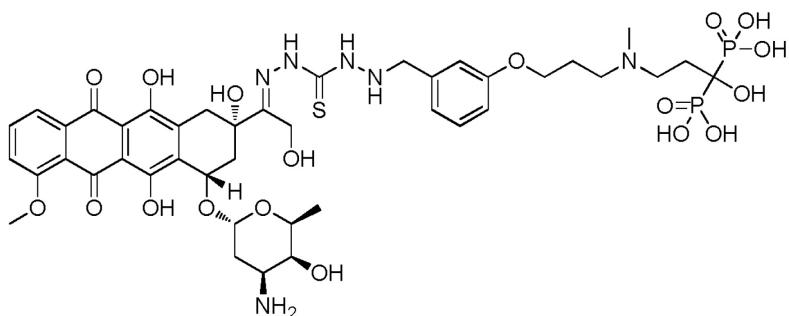
30

【化5】



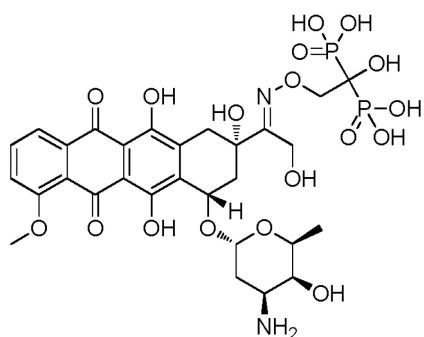
40

## 【化6】



10

## 【化7】



20

およびその薬学的に許容できる塩から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項4】

医薬品として使用するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項5】

骨腫瘍の治療に使用するための、請求項1～3のいずれか一項に記載の化合物。

## 【請求項6】

前記骨腫瘍が、骨肉腫、軟骨肉腫、巨細胞腫またはユーイング肉腫のような原発性骨腫瘍と、骨転移と、多発性骨髄腫とから選択されることを特徴とする、請求項5に記載の化合物。

30

## 【請求項7】

請求項1～3のいずれか一項に記載の式(I)の少なくとも1つの化合物と、少なくとも1つの薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物。

## 【請求項8】

医薬品として使用するための、請求項7に記載の組成物。

## 【請求項9】

骨腫瘍の治療に使用するための、請求項7に記載の組成物。

## 【請求項10】

前記骨腫瘍が、骨肉腫、軟骨肉腫、巨細胞腫またはユーイング肉腫のような原発性骨腫瘍と、骨転移と、多発性骨髄腫とから選択されることを特徴とする、請求項9に記載の組成物。

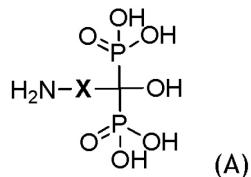
40

## 【請求項11】

請求項1～3のいずれか一項に記載の化合物を調製するための方法であって、

(a) ドキソルビシンまたはその塩を、以下の式(A)

## 【化8】



50

(式中、Xが、請求項1に定義されるとおりである)の化合物またはその塩と反応させて、式(I)の化合物を得るステップと、

(b)任意に、前のステップ(a)で得られた式(I)の前記化合物を塩化して、その薬学的に許容できる塩を得るステップとを含む方法。

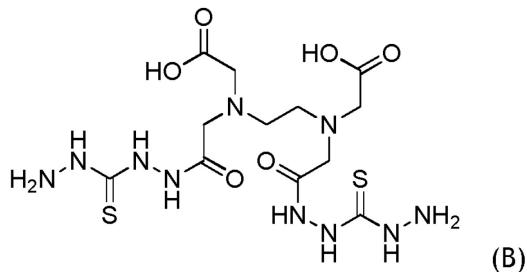
**【請求項12】**

Xが官能基(1)を表す、請求項1~3のいずれか一項に記載の化合物を調製するための方法であって、

(i)以下の式(B)

**【化9】**

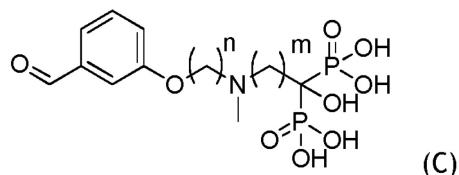
10



の化合物またはその塩と、以下の式(C)

**【化10】**

20



(式中、nおよびmが、請求項1に定義されるとおりである)の化合物またはその塩と、ドキソルビシンまたはその塩とのカップリング反応のステップ、であって、

前記カップリング反応が、式(B)の前記化合物またはその塩と、式(C)の前記化合物またはその塩と、ドキソルビシンまたはその塩との存在下で、1工程で、あるいは式(B)の前記化合物またはその塩を、ドキソルビシンまたはその塩とまずカップリングしてから、式(C)の前記化合物またはその塩との前記カップリングを行うことによるか、または式(B)の前記化合物またはその塩を、式(C)の前記化合物またはその塩とまずカップリングしてから、ドキソルビシンまたはその塩との前記カップリングを行うことによる2工程で行い、Xが官能基(1)を表す、式(I)の化合物を得るステップと、

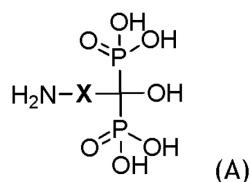
(ii)任意に、前のステップ(i)で得られた式(I)の前記化合物を塩化して、その薬学的に許容できる塩を得るステップとを含む方法。

**【請求項13】**

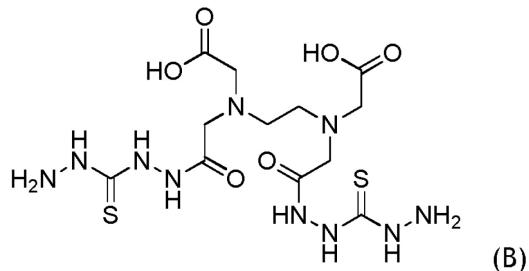
以下の式(A)または(B)

**【化11】**

40



【化12】



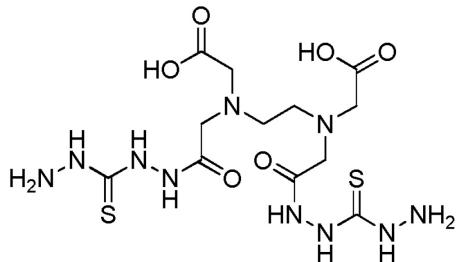
(式中、Xが、請求項1に定義されるとおりである)若しくはその塩の化合物。

10

【請求項14】

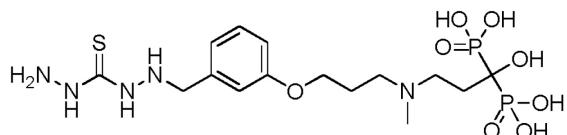
前記化合物が、以下の化合物

【化13】

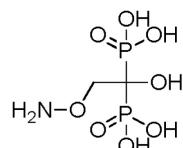


20

【化14】



【化15】



30

およびその塩から選択されることを特徴とする、請求項13に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、骨腫瘍の治療における、特に、医薬品としての使用のための、骨組織を標的とするドキソルビシンの水溶性ヒドロキシビスホスホン酸誘導体と；それを合成するための方法と；このような誘導体を含む医薬組成物とに関する。

【背景技術】

【0002】

骨組織は、ヒドロキシアパタイト結晶、細胞外基質および特殊化した細胞（骨芽細胞および破骨細胞）から構成される常に再構築される結合組織である。骨付加（bone apposition）および骨吸収の現象の間の均衡の乱れは、腫瘍に由来し得る（骨肉腫のような原発性腫瘍または骨転移のような二次性腫瘍による）溶骨性または骨凝縮性病変を引き起こす。骨肉腫は、骨膜付加（periosteal apposition）、皮質の破壊および軟組織の浸潤を伴う非常に侵攻性の高い骨腫瘍である。骨肉腫は、一般に、若年層（年齢中央値18歳）で発症し、小児癌の5%を占める。これらの腫瘍は、骨溶解と腫瘍増殖との間の悪循環を確立する特殊性を有する。これらの腫瘍の現在の治療は、術前化学療法、続いて腫瘍の外科的切除、次に術後化学療法からなり、5年患者生存率は60～70%であるが、肺転移が検出された場合、わずか30%である。これらの比

40

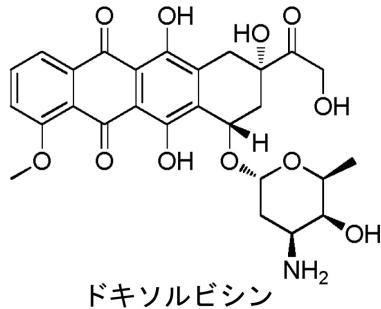
50

較的低い生存率に直面して、骨肉腫の新規な治療法の開発が必要なようである。

### 【0003】

ヒドロキシビスホスホン( H B P )酸誘導体は、骨組織に対するそれらの非常に高い親和性および骨吸収を阻害するそれらの特性で知られている分子である( M o r i c e a u et al . , Curr Pharm Des . 2010 , 16 ( 27 ) , 2981 )。ドキソルビシンは、骨腫瘍の治療に使用される必需品の1つである。しかしながら、ドキソルビシンの毒性は、その使用を大きく制限する。H B Pと化学的に結合するドキソルビシンへの関心には、2つの側面がある。ベクター化( v e c t o r i z a t i o n )により、血中濃度を低下させながら( ひいてはその毒性を低下させながら )、骨部位におけるドキソルビシンの抗腫瘍活性を標的とすること( ひいてはより効果的に腫瘍を治療すること )が可能になるはずである。同時に、H B Pベクター( v e c t o r )は、その再吸収阻害効果によって腫瘍骨溶解の治療を改善し得る。  
10

### 【化1】



10

20

### 【0004】

国際公開第2012/130911号には、イミン結合を介して、H B P官能基を有するベクター上で、ドキソルビシンを含む活性成分とベクターを化学的に組み合わせるこの手法が特に記載されている。しかしながら、H B Pベクターに結合されたドキソルビシン部分(修飾されているか否かにかかわらず)を含む国際公開第2012/130911号に記載される生成物は、有機添加剤(例えば、T w e e n (登録商標)、P E G、グリセリン、グルコース)または無機添加剤(例えば、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム)を用いても、水に、および有機溶媒(例えば、エタノールまたはジメチルスルホキシド)に不溶性(またはその修飾形態で非常に難溶性)であることが分かっており、それにより、この生成物を医薬品として使用するのが難しい。  
30

### 【発明の概要】

### 【発明が解決しようとする課題】

### 【0005】

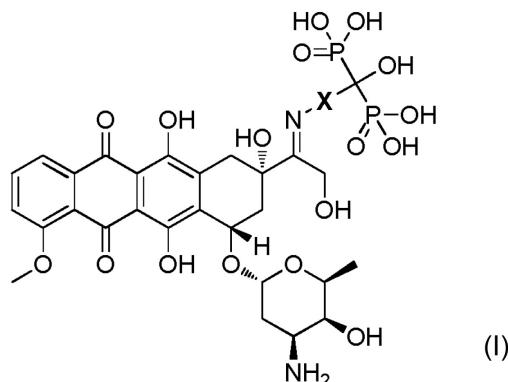
したがって、医薬品として使用することを可能にするために水溶性であり得るH B Pベクターに結合される新規なドキソルビシン誘導体を開発することが必要とされている。

### 【課題を解決するための手段】

### 【0006】

したがって、本発明は、以下の一般式( I )またはその薬学的に許容できる塩のドキソルビシンのヒドロキシビスホスホン酸誘導体であって、  
40

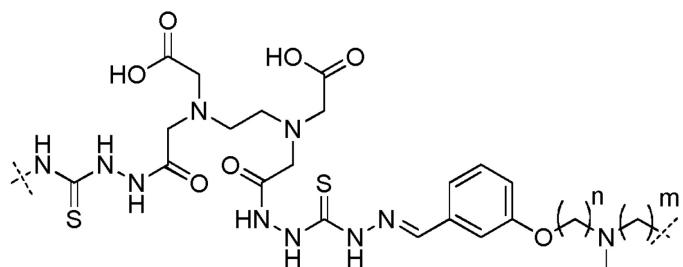
【化2】



式中、Xが、

(1)

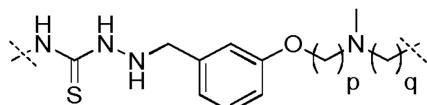
【化3】



(ここで、nおよびmがそれぞれ、独立して、1～6、特に、1～4の整数を表す)と、

(2)

【化4】

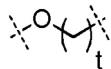


30

(ここで、pおよびqがそれぞれ、独立して、1～6、特に、1～4の整数を表す)と、

(3)

【化5】



(ここで、tが、1～6、特に、1～4の整数を表す)と

から選択される二価基を表し、これらの官能基は、それらの末端窒素または酸素原子を介して式(I)の化合物のイミン官能基に、および、それらの末端炭素原子を介して式(I)の化合物のヒドロキシビスホスホン酸官能基に結合されるドキソルビシンのヒドロキシビスホスホン酸誘導体に関する。

40

【0007】

ここで、本発明に係る式(I)の化合物は、骨組織を標的とするヒドロキシビスホスホン酸ベクターによってドキソルビシン(抗腫瘍薬)のベクター化を可能にする。ドキソルビシンが結合される方法およびベクターの性質は、特に、それらの臨床用途を容易にするために化合物の水への高い溶解度を確保するように適合される。

【0008】

本発明において、「薬学的に許容できる」とは、一般に安全で、非毒性で、生物学的にも他の形でも望ましくないことはなく、動物ならびにヒトの医薬品用途に許容できる医薬組成物の調製に有用であることを意味する。

50

## 【0009】

化合物の「薬学的に許容できる塩」とは、親化合物の所望の薬理学的活性を有する、本明細書において定義される薬学的に許容できる塩を意味する。

## 【0010】

薬学的に許容できる塩としては、特に、以下のものが挙げられる。

(1) 塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などのような薬学的に許容できる無機酸とともに形成されるか；または酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヒドロキシナフトエ酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムコン酸、2-ナフタレンスルホン酸、プロピオン酸、サリチル酸、コハク酸、ジベンゾイル-L-酒石酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸、トリメチル酢酸、トリフルオロ酢酸などのような薬学的に許容できる有機酸とともに形成される薬学的に許容できる酸付加塩、および

(2) 親化合物中に存在する酸プロトトンが、金属イオン、例えばアルカリ金属イオン(例えば、Na、K、Li若しくはCs)、アルカリ土類金属イオン(例えば、Ca、Mg)またはアルミニウムイオンで置換される場合；あるいはジエタノールアミン、エタノールアミン、N-メチルグルカミン、トリエタノールアミン、トロメタミンなどのような薬学的に許容できる有機塩基と；または水酸化アルミニウム、水酸化カルシウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウムなどのような薬学的に許容できる無機塩基と配位される場合に形成される薬学的に許容できる塩基付加塩。

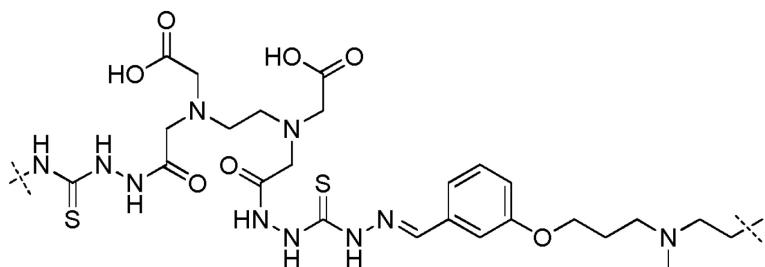
## 【0011】

ここで、n、m、p、qおよびtがそれぞれ、独立して、1、2、3、4、5または6に等しい整数、特に、1、2、3または4に等しい整数を表す。

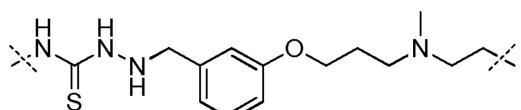
## 【0012】

本発明の特定の実施形態によれば、n=3、m=2、p=3、q=2およびt=1である。ここで、有利には、Xが、

## 【化6】

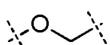


## 【化7】



及び

## 【化8】



から選択される官能基を表し、これらの基は、それらの末端窒素または酸素原子を介して式(I)の化合物のイミン官能基に、および、それらの末端炭素原子を介して式(I)の化合物のヒドロキシビスホスホン酸官能基に結合される。

## 【0013】

本発明の特定の実施形態によれば、式(I)の化合物は、以下の実験項に記載される化合物(II)、(III)、(IV)およびその薬学的に許容できる塩から選択される。

10

20

30

40

50

## 【0014】

本発明は、特に骨組織を標的とする医薬品として使用するための、上記の式(I)またはその薬学的に許容できる塩の化合物にも関する。

## 【0015】

本発明は、より特定的には骨組織を標的とする医薬組成物を製造するための、上記の式(I)またはその薬学的に許容できる塩の化合物の使用にも関する。

## 【0016】

特に、本発明に係る式(I)の化合物は、骨腫瘍を治療するのに使用され得る。

## 【0017】

本発明は、骨腫瘍を治療するための方法であって、それを必要とする人に、有効量の上記の式(I)またはその薬学的に許容できる塩の化合物を投与する工程を含む方法にも関する。 10

## 【0018】

骨腫瘍は、特に、骨肉腫、軟骨肉腫、巨細胞腫またはユーイング肉腫のような原発性骨腫瘍；骨転移；または多発性骨髄腫であり得る。

## 【0019】

本発明は、上記の式(I)またはその薬学的に許容できる塩の少なくとも1つの化合物と、少なくとも1つの薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物にも関する。

## 【0020】

この組成物は、特に、非経口経路（例えば、皮下、静脈内、皮内または筋肉内）によって、すなわち、好ましくは、注射用溶液の形態で、およびヒトを含む哺乳動物に向けて、その投与を可能にするように製剤化され得る。 20

## 【0021】

注射される溶液は、薬学的に許容できる分散剤および/または湿潤剤を含有する、水性懸濁液、等張食塩水溶液または滅菌注射用溶液の形態であり得る。

## 【0022】

投与計画は、治療および該当する疾患に応じて変化する。活性成分としての本発明の化合物は、特に、1日当たり0.01mg～5000mgの用量で使用され、1日1回単回投与されるか、または1日を通して数回投与で、例えば等しい用量で1日に2回投与され得る。これらの範囲を超える用量を使用することが必要であることがあり、このことは、当業者に明らかであろう。 30

## 【0023】

本発明は、目的として、特に上に定義される骨腫瘍の治療に使用するための、上に定義される医薬組成物も有する。

## 【0024】

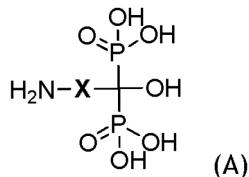
本発明は、本発明に係る式(I)の化合物を調製するための方法にも関する。

## 【0025】

第1の方法は、

(a) ドキソルビシンまたはその塩を、以下の式(A)

## 【化9】



（式中、Xが、上に定義されるとおりである）の化合物またはその塩と反応させて、本発明に係る式(I)の化合物を得るステップと、

(b) 任意に、前のステップ(a)で得られた式(I)の前記化合物を塩化して、その薬学的に許容できる塩を得るステップと  
を含む。 40

10

20

30

40

50

## 【0026】

&lt;ステップ(a)&gt;

ドキソルビシンは、特に、その塩酸塩の形態で使用され得る。

## 【0027】

式(A)の化合物は、以下の実験項に記載されるとおりに調製され得る。

## 【0028】

ドキソルビシンまたはその塩と、式(A)の化合物またはその塩との間のカップリングは、テトラヒドロフラン(THF)、メタノール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、水およびそれらの混合物から選択される溶媒中で、特に、水/THF混合物中で行われ得る。このカップリングは、0~80の温度、特に、室温で行われ得る。

10

## 【0029】

「室温」とは、本発明の文脈において、15~40、好ましくは、20~30、特に、約25の温度を意味する。

## 【0030】

&lt;ステップ(b)&gt;

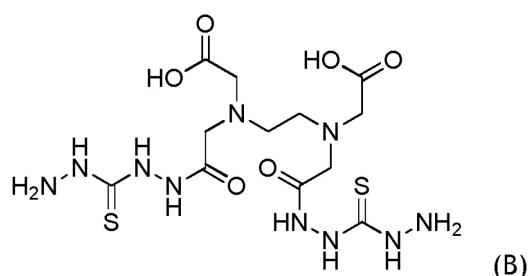
式(I)の化合物の塩化(salification)は、式(I)の化合物と、薬学的に許容できる酸または塩基との反応によって行われ得る。

## 【0031】

Xが官能基(1)を表す、式(I)の化合物を調製するための第2の方法は、

(i)以下の式(B)

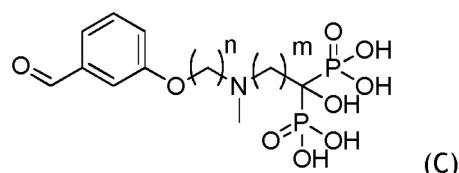
## 【化10】



の化合物またはその塩と、以下の式(C)

30

## 【化11】



(式中、nおよびmが、上に定義されるとおりである)の化合物またはその塩と、ドキソルビシンまたはその塩とのカップリング反応のステップであって、

カップリング反応が、式(B)の化合物またはその塩と、式(C)の化合物またはその塩と、ドキソルビシンまたはその塩との存在下で、1工程で、あるいは式(B)の化合物またはその塩を、ドキソルビシンまたはその塩とまずカップリングしてから、式(C)の化合物またはその塩とのカップリングを行うことによるか、または式(B)の化合物またはその塩を、式(C)の化合物またはその塩とまずカップリングしてから、ドキソルビシンまたはその塩との前記カップリングを行うことによる2工程で行い、Xが官能基(1)を表す、本発明に係る式(I)の化合物を得るステップと、

40

(ii)任意に、前のステップ(i)で得られた式(I)の化合物を塩化して、その薬学的に許容できる塩を得るステップと  
を含む。

## 【0032】

&lt;ステップ(i)&gt;

50

ドキソルビシンは、特に、その塩酸塩の形態で使用され得る。

**【0033】**

式(B)の化合物は、チオカルボヒドラジド(化合物2)と、エチレンジアミン四酢酸二無水物(化合物1)との反応によって、以下の実験項に記載されるとおりに調製され得る。

**【0034】**

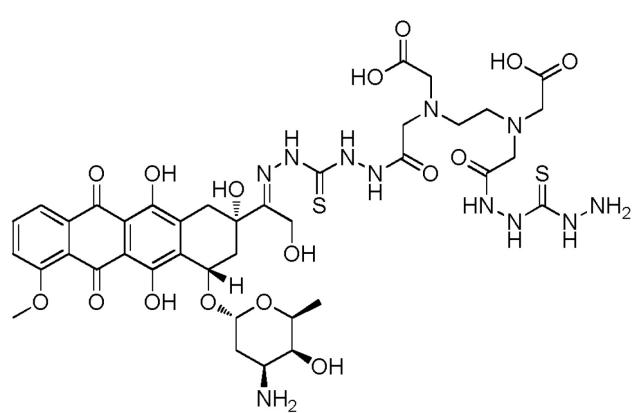
式(C)の化合物は、国際公開第2012/130911号に記載されているように調製され得る。式(C)の化合物は、特に、二ナトリウム塩の形態で使用され得る。

**【0035】**

第1の変形例によれば、式(B)および(C)の化合物およびドキソルビシンまたはその塩は、全て一緒に反応されて、Xが官能基(1)を表す、本発明に係る式(I)の化合物が得られる(1工程カップリング反応)。  
10

**【0036】**

第2の変形例(2工程カップリング反応)によれば、式(B)の化合物またはその塩は、第1のステップにおいて、ドキソルビシンまたはその塩と反応されて、以下の式(D)  
【化12】

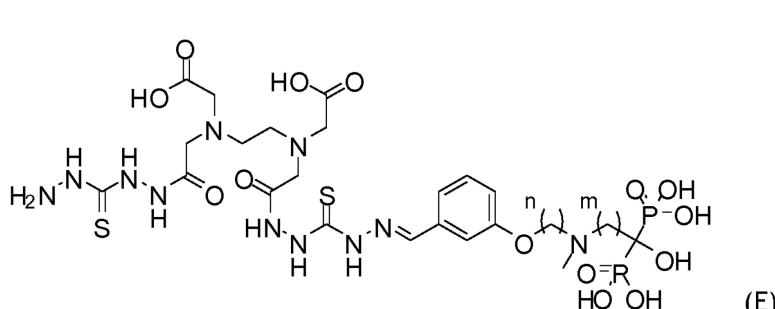


(D)

の中間化合物が得られる。次に、式(D)のこの化合物は、第2のステップにおいて、式(C)の化合物またはその塩と反応されて、Xが官能基(1)を表す、本発明に係る式(I)の化合物が得られる。

**【0037】**

第3の変形例(2工程カップリング反応)によれば、式(B)の化合物またはその塩は、第1のステップにおいて、式(C)の化合物またはその塩と反応されて、以下の式(E)  
【化13】



(E)

(式中、nおよびmが、上に定義されるとおりである)の中間化合物が得られる。次に、式(E)のこの化合物は、第2のステップにおいて、ドキソルビシンまたはその塩と反応されて、Xが官能基(1)を表す、本発明に係る式(I)の化合物が得られる。

**【0038】**

3つの変形例における上記のカップリング反応は、特に、トリフルオロ酢酸の存在下で、酸性媒体中で行われ得る。テトラヒドロフラン、メタノール、ジメチルスルホキシド、水およびそれらの混合物から選択される溶媒、特に、THF / 水混合物が使用され得る。  
50

このカップリングは、室温で行われ得る。

**【0039】**

「室温」とは、本発明の文脈において、15～40、好ましくは、20～30、特に、約25の温度を意味する。

**【0040】**

<ステップ(iii)>

式(I)の化合物の塩化は、式(I)の化合物と、薬学的に許容できる酸または塩基との反応によって行われ得る。

**【0041】**

上記の方法の1つによって得られる化合物は、例えば抽出、溶媒蒸発または沈殿およびろ過のような、当業者に周知の方法によって、反応媒体から分離され得る。 10

**【0042】**

さらに、化合物は、化合物が結晶質である場合には再結晶化または沈殿、カラムクロマトグラフィー(例えば、シリカゲルにおける、シリカは、特に、C18またはC8カラム上などで疎水性にさせるように、任意に修飾される)または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)のような、当業者に周知の技術によって、必要に応じて精製され得る。

**【0043】**

本発明は、目的として、上に定義される式(A)または(B)若しくは上に定義される薬学的に許容できる塩のようなその塩の化合物も有する。

**【0044】**

この化合物は、特に、以下の実験項に記載される化合物4、7、13および上に定義される薬学的に許容できる塩のようなその塩から選択され得る。 20

**【0045】**

このような化合物は、特に、上に定義される式(I)の化合物を調製するための、合成中間体として有用である。

**【0046】**

本発明は、以下の非限定的な実施例によって例示される。

**【図面の簡単な説明】**

**【0047】**

【図1】対照(CT)、化合物(II)、化合物(III)、ドキソルビシン、ベクター5、およびドキソルビシン+ベクター5群のマウスで発生されるHO5腫瘍の平均腫瘍容積( $\text{mm}^3$ )の経時的な変化を表す。 30

【図2】各対照(CT)、化合物(II)および化合物(III)群の10匹のマウスの腫瘍のある足の27日目のX線写真を表す。

**【発明を実施するための形態】**

**【実施例】**

**【0048】**

使用される略語:

DMSO: ジメチルスルホキシド

DPBS: ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

ES: エレクトロスプレー

HPLC: 高速液体クロマトグラフィー

MS: 質量分析計

y1d: 収率

NMR: 核磁気共鳴

sat: 飽和

RT: 室温

TFA: トリフルオロ酢酸

THF: テトラヒドロフラン

40

50

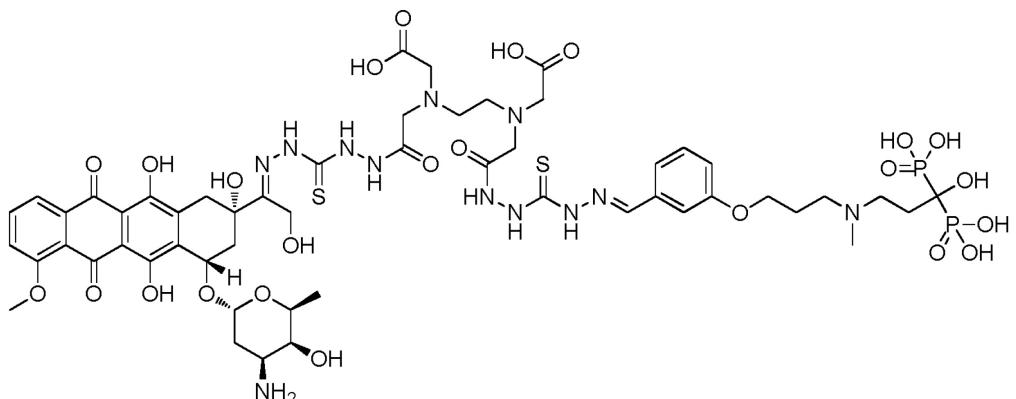
TRIS : 2 - アミノ - 2 - ( ヒドロキシメチル ) プロパン - 1 , 3 - ジオール

【0049】

( 1 . 本発明に係る化合物の合成 )

< 化合物 ( II ) > :

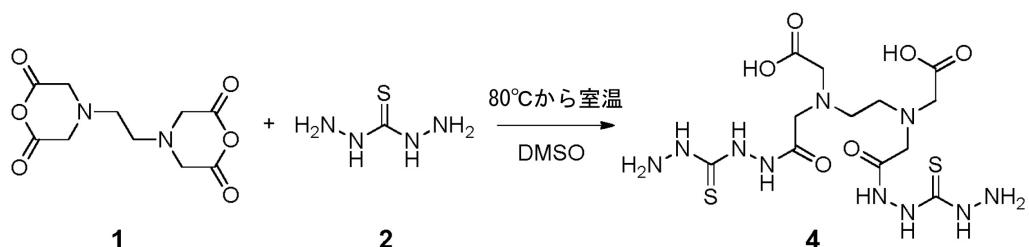
【化14】



10

< ステップ 1 > :

【化15】



20

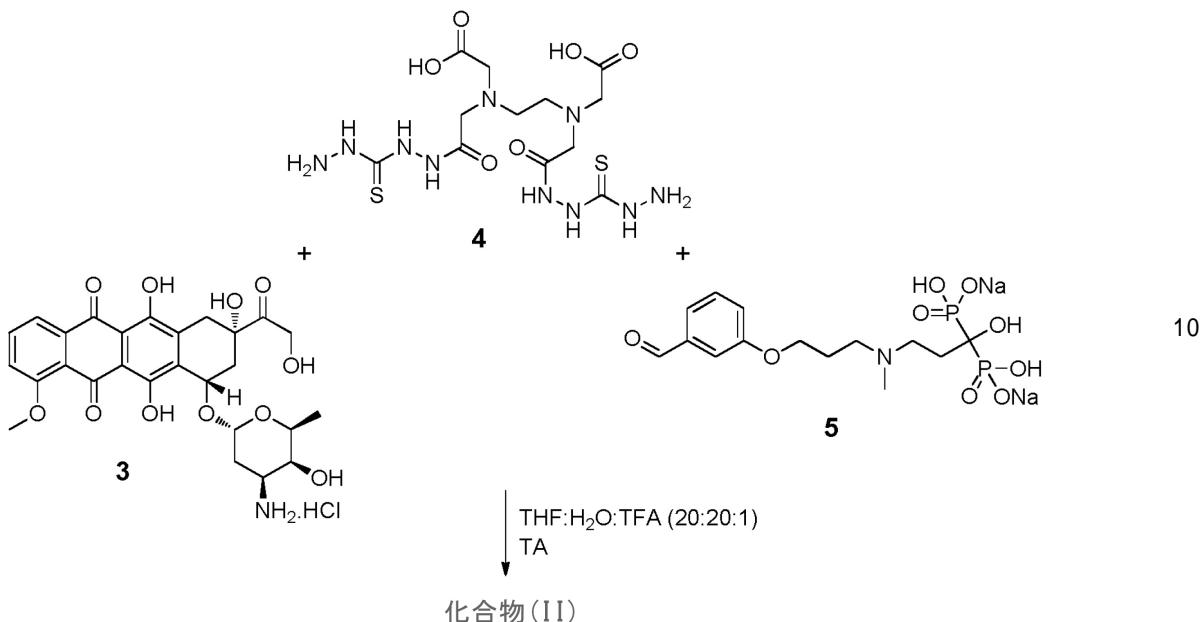
化合物 1 ( 3 g 、 11.7 mmol ) を、 80 で、 DMSO ( 15 ml ) 中で可溶化し、 次に、 80 で DMSO ( 30 ml ) 中の化合物 2 ( 5 g 、 47.2 mmol ) の溶液に加える。得られた透明の溶液を、 室温で 3 時間攪拌する。反応混合物を、 メタノール ( 120 ml ) と水 ( 120 ml ) との混合物で希釈する。得られた透明の溶液に、 メタノール ( 600 ml ) を攪拌しながら加えた後、 ジエチルエーテル ( 150 ml ) を加え、 攪拌を室温で 5 分間続ける。得られた沈殿物をろ過し、 メタノールで洗浄し、 次に、 15 分間にわたって室温で、 150 ml の水中で完全に可溶化する。得られた溶液に、 メタノール ( 600 ml ) を加えた後、 ジエチルエーテル ( 150 ml ) を加え、 攪拌を室温で 5 分間続ける。得られた沈殿物をろ過し、 メタノール、 続いてジエチルエーテルで洗浄し、 次に、 室温で、 減圧下で乾燥させる。化合物 4 ( 3.2 g 、 収率 = 58% ) が得られる。<sup>1</sup>H NMRスペクトル ( D<sub>2</sub>O 、 400 MHz ) 、 ppm : 3.87 ( 2 H, s ) 、 3.70 ( 2 H, s ) 、 3.24 ( 2 H, s ) 。

30

【0050】

< ステップ 2 > :

## 【化16】



化合物5の合成は、国際公開第2012/130911号に記載されている。アルゴン下で、24mlのTHF/H<sub>2</sub>O/TFA(20:20:1)混合物中の化合物4(10  
60mg、2.26mmol)の溶液を、24mlのTHF/H<sub>2</sub>O/TFA(20:2  
0:1)混合物中の化合物3(918mg、1.58mmol)および5(1028mg  
、2.26mmol)の溶液に一度に加える。得られた暗赤色の溶液を、光から保護しながら室温で16時間攪拌する。次に、Et<sub>2</sub>O/MeOH(5:1)混合物(360ml  
)を、攪拌を維持しながらこの溶液に加え、得られた赤色の沈殿物懸濁液を室温で5分間攪拌する。沈殿物をろ過し、Et<sub>2</sub>Oで洗浄し、次に、減圧下で乾燥させる。得られた赤色の粉末を、10mlの飽和NaHCO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O(1:1)混合物中で可溶化し、得られた溶液を、C18カラム中に導入し、次に、[600mlの3%のMeOH/H<sub>2</sub>O+  
2mlの20%のNH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O]から[600mlの50%のMeOH/H<sub>2</sub>O+2ml  
の20%のNH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O]の勾配で溶離する。約450mlの溶離剤から出発して、  
約150mlの溶離剤中で最終生成物が残る。最終生成物を含有する画分を、約10ml  
の溶液が残るまで減圧下で蒸発させ、次に、それを、MeOH(40ml)、続いてEt<sub>2</sub>  
O(200ml)で希釈する。得られた混合物を、赤色の沈殿物が形成されるまで攪拌し、それを室温で5分間攪拌し、次に、ろ過し、Et<sub>2</sub>Oで洗浄し、室温で、減圧下で乾燥させる。化合物(II)(526mg、収率=23%)が得られる。

20  
30  
30

## 【0051】

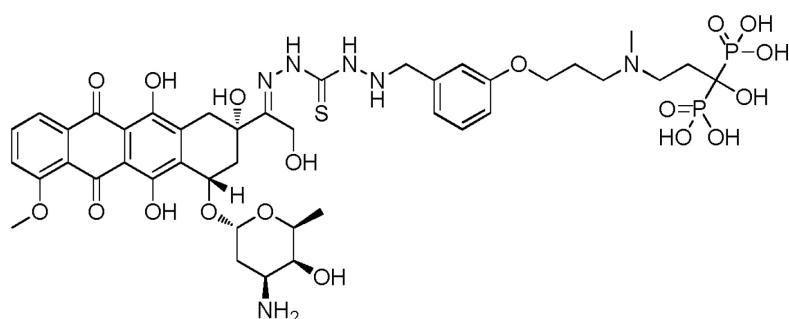
<sup>1</sup>H NMRスペクトル(1%のTFA-D/DMSO-D<sub>6</sub>、400MHz)、ppm: 14.07(1H, s)、13.36(1H, s)、11.97(1H, s)、1  
1.24(1H, s)、10.53(1H, s)、10.48(1H, s)、10.30(1H, s)、9.80(1H, s)、8.05(1H, s)、7.95(2H, s)、  
7.84(2H, m)、7.68(1H, dd)、7.46(1H, s)、7.40(1H, d)、7.33(1H, t)、7.02(1H, d)、5.30(1H, s)、4.  
99(1H, s)、4.61(1H, t)、4.5-3.7(12H, m)、3.6-2.85(14H, m)、3.01(1H, d)、2.81(3H, s)、2.27(4H,  
m)、2.13(2H, m)、1.85(1H, t)、1.65(1H, d)、1.18(3H, d)。<sup>31</sup>P NMRスペクトル(1%のTFA-D/DMSO-D<sub>6</sub>、16  
2MHz)、ppm: 18.23。質量スペクトル(ES-)(m/z): [M-H]  
1386。HPLC分析による純度(C18、H<sub>2</sub>O/EDTA/NH<sub>3</sub>-MeCN): 97%。

40

## 【0052】

&lt;化合物(I I I)&gt;:

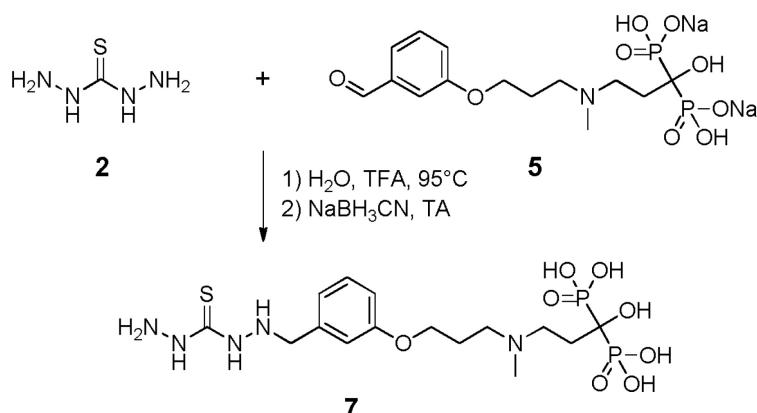
【化17】



10

&lt;ステップ1&gt;:

【化18】



20

攪拌しながら、化合物5(1g、2.2mmol)を、95で水(40ml)中の化合物2(1g、9.4mmol)の溶液に加える。得られた透明の溶液に、TFA(0.8ml)を加え、混合物を同じ温度で30分間攪拌する。次に、混合物を室温に置き、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ (0.6g、9.5mmol)を加え、次に、攪拌を室温で24時間続ける。反応混合物を、[600mlの3%のMeOH/H<sub>2</sub>O]から[600mlの50%のMeOH/H<sub>2</sub>O]の勾配で溶離されるC18カラムに導入する。過剰な化合物2が、約150mlの溶離剤の後に溶離され、最終生成物7が、約200mlの溶離剤の体積中で、約400mlの溶離剤の後に溶離される。画分を、約10mlの溶液が残るまで減圧下で蒸発させ、次に、それを、攪拌によって、MeOH(200ml)、続いてEt<sub>2</sub>O(300ml)で希釈する。得られた沈殿物をろ過し、Et<sub>2</sub>Oで洗浄し、室温で、減圧下で乾燥させる。化合物7(780mg、収率=71%)が得られる。

30

【0053】

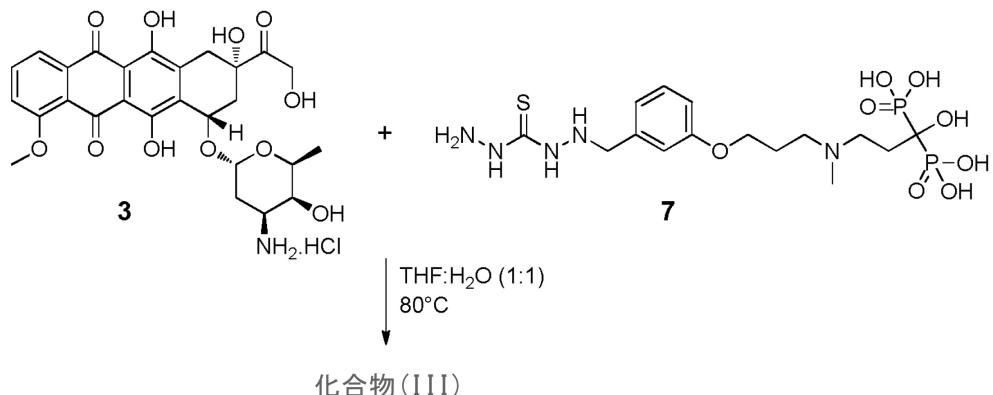
<sup>1</sup>H NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O、400MHz)、ppm: 7.26(1H, t)、6.97(2H, m)、6.89(1H, dd)、4.10(2H, t)、3.89(2H, s)、3.60-3.10(4H, s)、2.82(3H, s)、2.31(2H, m)、2.19(2H, m)。<sup>31</sup>P NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O、162MHz)、ppm: 16.87。質量スペクトル(ES-) (m/z) : [M-H] 500。

40

【0054】

&lt;ステップ2&gt;:

## 【化19】



化合物7 (250 mg、0.5 mmol)と3 (290 mg、0.5 mmol)との混合物を、80で、6 mlのTHF / H<sub>2</sub>O (1:1)混合物中で可溶化し、この温度で3分間攪拌し、次に、減圧下で蒸発乾固させる。得られた乾燥された混合物を、80で5分間にわたって減圧下に置き、栓付きの丸底フラスコを、冷水で室温に急冷する。得られた固体を、飽和NaHCO<sub>3</sub> (4 ml)と、水 (4 ml)と、THF (8 ml)との混合物中で、30~40で攪拌しながら可溶化する。得られた非常に濃い透明の溶液を水 (50 ml)で希釈し、C18カラムに導入する。カラムを、600 mlの3%のMeOH / H<sub>2</sub>Oから600 mlのMeOHの勾配で溶離する。化合物(III)が、約200 mlの溶離剤の体積中で、約400 mlの溶離剤の後に溶離される。画分を、約10 mlの溶液が残るまで減圧下で蒸発させ、それを、攪拌によって、MeOH (100 ml)、続いてEt<sub>2</sub>O (300 ml)で希釈する。形成された赤色の沈殿物をろ過し、Et<sub>2</sub>Oで洗浄し、室温で、減圧下で乾燥させる。化合物(III) (160 mg、収率 = 32%)が得られる。

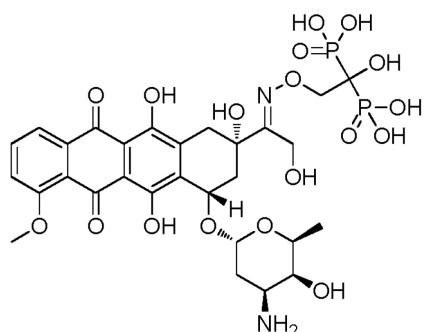
## 【0055】

<sup>1</sup>H NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O / THF - D8 = 3/1、400 MHz)、ppm : 8.03 (2H, m)、7.81 (1H, d)、7.40 (1H, t)、7.21 (1H, s)、7.07 (1H, d)、5.40 (1H, s)、5.17 (1H, t)、4.42 - 3.99 (11H, m)、3.80 - 3.35 (6H, m)、3.14 - 3.95 (4H, m)、2.73 - 2.35 (7H, m)、2.22 (1H, t)、2.02 (1H, m)、1.47 (1H, m)、1.44 (3H, d)。<sup>31</sup>P NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O / THF - D8 = 3/1、162 MHz)、ppm: 14.62。質量スペクトル(ES-) (m/z) : [M - H] 1025。HPLC分析による純度(C18、H<sub>2</sub>O / EDTA / NH<sub>3</sub> - MeCN) : 98%。

## 【0056】

<化合物(IV)> :

## 【化20】



<ステップ1> :

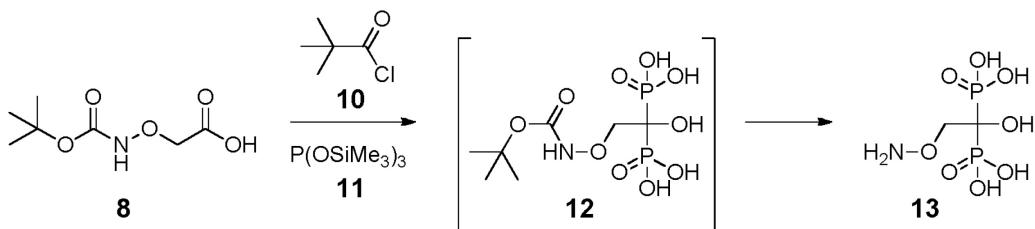
10

20

30

40

【化 2 1】



T H F ( 2 m l ) 中の市販の製品 8 ( 3 0 0 m g 、 1 . 5 7 m m o l ) の透明の溶液に、トリエチルアミン ( 2 1 8  $\mu$  l 、 1 . 5 7 m m o l ) を加え、均一混合物を 0 度に冷却する。この温度で、T H F ( 6 0 0  $\mu$  l ) 中の製品 1 0 ( 1 9 0 m g 、 1 . 5 7 m m o l ) の溶液を、徐々に加え、反応混合物を 0 度で 1 5 分間攪拌する。アルゴン下で透明の溶液を収集するために、沈殿物を迅速にろ過する。この溶液に、化合物 1 1 ( 1 . 4 g 、 4 . 7 1 m m o l ) を加え、得られた透明の混合物を室温で 1 時間攪拌する。メタノール ( 3 m l ) を加え、1 0 分間攪拌した後、混合物を、3 6 度で、減圧下で濃縮乾固する。得られた残渣に、T F A ( 2 m l ) を加え、形成された白色の沈殿物を室温で 1 時間攪拌し、次に、揮発性物質を、3 6 度で、蒸発乾固させる。得られた油を、メタノール、続いてエーテルで処理し、形成された白色の沈殿物をろ過し、エーテルで洗浄し、乾燥させる。化合物 1 3 が得られる ( 2 0 5 m g 、 収率 = 5 5 % ) 。

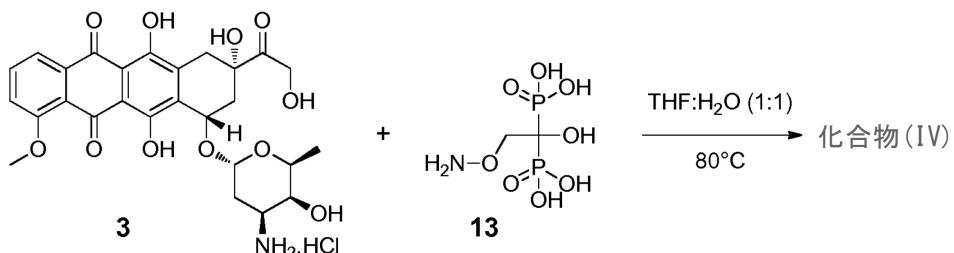
[ 0 0 5 7 ]

<sup>1</sup>H NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O、400MHz)、ppm:4.49(2H, t)。<sup>31</sup>P NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O、162MHz)、ppm:14.18。

[ 0 0 5 8 ]

## ＜ステップ2＞：

【化 2 2】



アルゴン下で、3 ml の THF / H<sub>2</sub>O / TFA (20 : 20 : 1) 混合物中の化合物 3 (270 mg, 0.46 mmol) および 13 (100 mg, 0.42 mmol) の溶液を、光から保護しながら、室温で 16 時間攪拌する。20 ml の飽和 NaHCO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O (1 : 1) 混合物を加え、得られた溶液を、C18 カラム中に導入し、次に、[600 ml の 3% の MeOH / H<sub>2</sub>O + 2 ml の 20% の NH<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>O] から [600 ml の 50% の MeOH / H<sub>2</sub>O + 2 ml の 20% の NH<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>O] の勾配で溶離する。約 210 ml の溶離剤から出発して、約 150 ml の溶離剤中で最終生成物が残る。最終生成物を含有する画分を、約 5 ml の溶液が残るまで減圧下で蒸発させ、次に、それを、メタノール (40 ml)、次にジエチルエーテル (200 ml) で希釈する。得られた混合物を、赤色の沈殿物が形成されるまで攪拌し、それを室温で 5 分間攪拌し、次に、ろ過し、ジエチルエーテルで洗浄し、室温で、減圧下で乾燥させる。化合物 (IV) (160 mg、収率 = 47%) が得られる。

【 0 0 5 9 】

<sup>1</sup>H NMRスペクトル(D<sub>2</sub>O、400MHz)、ppm: 7.66(1H, t)、7.38(2H, m)、5.48(1H, s)、4.84(1H, s)、4.62(2H, m)、4.40(2H, s)、4.29(1H, m)、3.90(3H, s)、3.87(1H, s)、3.73(1H, t)、2.90(1H, d)、2.57(1H, d)、2.35(1H, d)、2.15-1.92(3H, m)、1.33(3H, d)。

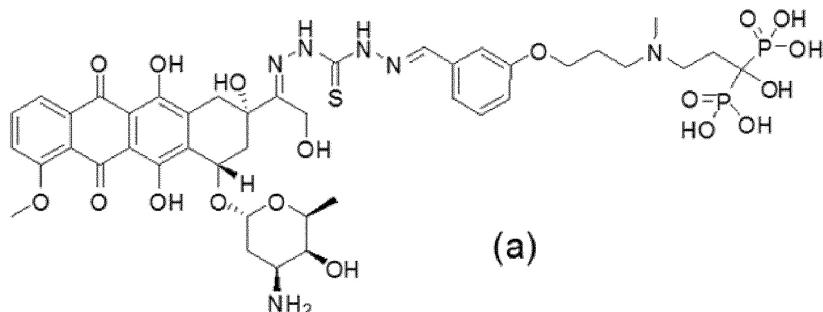
<sup>3</sup> <sup>1</sup> P NMR スペクトル (D<sub>2</sub>O、162 MHz)、ppm: 15.19 (1P, d), 15.08 (1P, d)。質量スペクトル (ES+) (m/z) : [M - H]<sup>-</sup> 807。HPLC 分析による純度 (C18、H<sub>2</sub>O / EDTA / NH<sub>3</sub> - MeCN) : 99%。

### 【0060】

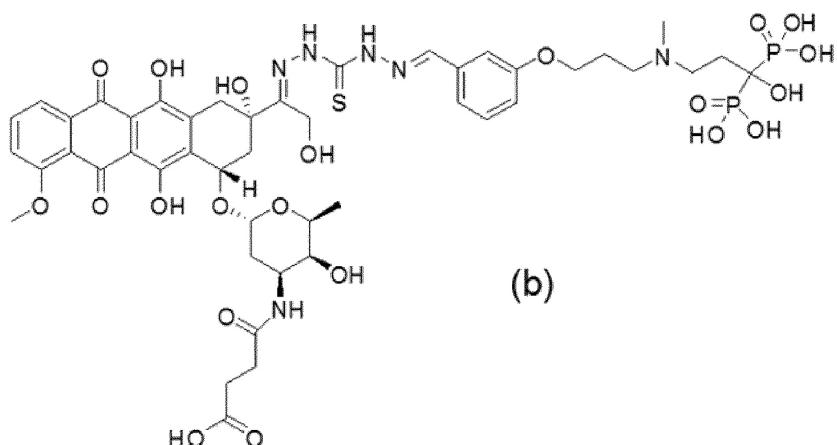
(2. 生成物 (a) および (b) と比較した化合物 (II)、(III) および (IV) の溶解度)

国際公開第2012/130911号には、修飾されたドキソルビシン部分とHBP型ベクターとの間のカップリングから誘導される以下の誘導体 (b) が記載されている。この化合物 (b) は、水に不溶性であり、TRIS が追加された水に難溶性であり、それにより、このような化合物を使用するのが難しい。国際公開第2012/130911号にあるのと同じHBPベクターを用いることによって、ドキソルビシンとこのベクター 5 とのカップリングから誘導される生成物 (a) も、水、有機添加剤 (Tween (登録商標)、PEG、グリセリン、グルコース、TRIS) または無機添加剤 (炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム) を含む水、および有機溶媒 (エタノール若しくはジメチルスルホキシドまたは水とそれらとの混合物) に不溶性であり、それにより、この生成物を使用するのが難しい。

### 【化23】



### 【化24】



### 【0061】

本発明に係る生成物 (II)、(III) および (IV) の溶解度が、分子 (a) および (b) の溶解度と比べて大幅に改善され (以下の表を参照)、このことは、医薬品としてのこのような化合物の使用を容易にする。

### 【0062】

【表1】

	(II)	(III)	(IV)	(a)	(b)
DPBS または水	約 255mM	約 160mM	約 315mM	不溶性	不溶性
水中の TRIS の 2mg/ml の溶液	試験せず			不溶性	約 1mM

10

## 【0063】

(3. 生物学的試験)

&lt;材料および方法&gt;:

本発明に係る化合物(II)および(III)の抗腫瘍活性を、免疫抑制マウスへのヒト腫瘍株HO-S(ヒト骨肉腫、ATCC)の前脛骨(paratibial)注入によって誘発される溶骨性骨肉腫の同所性異種移植マウスモデルにおいて評価した。本発明に係る分子の活性を、単独でまたは組み合わせてそれらを構成する2つの主要サブユニット(ドキソルビシンおよびベクター5)の活性と比較した。群当たり10匹の動物における治療を、腫瘍誘発の翌日に開始し、5週間にわたって週に1~2回腹腔内に投与した。腫瘍容積を、ノギスを用いて週に2回測定し、X線写真評価を、週に1回行った。 $\text{mm}^3$ で表される腫瘍容積を、以下の式:  $V = (L \times l^2) / 2$  ( $\text{mm}$ で表されるLおよびlはそれぞれ、腫瘍の長い方の長さおよび短い方の長さに対応する)にしたがって計算する。

20

## 【0064】

ここで、以下の治療群を、10匹のマウスに対してそれぞれ試験した。

## 【0065】

【表2】

群		腹腔内に投与される治療 (注入量: 10mL/kg)
1	対照(溶媒: DPBS)	2回/週
2	化合物(II) (DPBS 中の 2.5mM)	25μmol/kg – 2回/週
3	化合物(III) (DPBS 中の 2.5mM)	25μmol/kg – 2回/週
4	ドキソルビシン (0.9% の NaCl 水溶液中の 0.37mM)	3.7μmol/kg – 1回/週
5	ベクター5 (DPBS 中の 2.5mM)	25μmol/kg – 2回/週
6	ドキソルビシン (0.9% の NaCl 水溶液中の 0.37mM)	3.7μmol/kg – 1回/週
	ベクター5 (DPBS 中の 2.5mM)	25μmol/kg – 2回/週

30

40

## 【0066】

&lt;結果&gt;:

(毒性) 12mg/kg (20μmol/kg) の用量で投与されると、ドキソルビシンは、動物の非常に早い体重減少(10%を超える体重減少では、2週間の治療後の動

50

物の安楽死が求められる)および心臓毒性の原因となる。モル当量の用量で使用される化合物(ⅠⅠ)、(ⅠⅢ)および(ⅠⅤ)は、毒性のこれらの兆候を誘発しない。より効果的に腫瘍を治療するために、二官能性分子を、抗癌剤単独より高い用量で使用することもできる(典型的なドキソルビシン治療用量は、2 mg / kg (3.7 μmol / kg)であることが分かっている)。ここで、使用可能な最大用量を決定するための試験は、化合物(ⅠⅠ)、(ⅠⅢ)および(ⅠⅤ)が、ドキソルビシン単独より13倍多い用量で静脈内または腹腔内に使用された場合、マウスの同様の体重減少を示した。

#### 【0067】

(抗腫瘍特性)(図1および2を参照) 化合物(ⅠⅠ)および(ⅠⅢ)は、対照群、およびベクター5および/またはドキソルビシンで治療された群と比べて、測定される骨外性腫瘍のサイズを著しく減少させる。しかしながら、様々な群の腫瘍容積の比較は、27日まで可能である。この日の後、対照、ドキソルビシンおよびベクター5群の動物は、過度に大きい腫瘍容積のため、安楽死させる必要があった。さらに、32日目に、ドキソルビシン+ベクター5群の全ての動物が、容積が1500 mm<sup>3</sup>を超える腫瘍を有する一方、化合物(ⅠⅠ)群からのわずか1匹のマウスが、この閾値を超える。

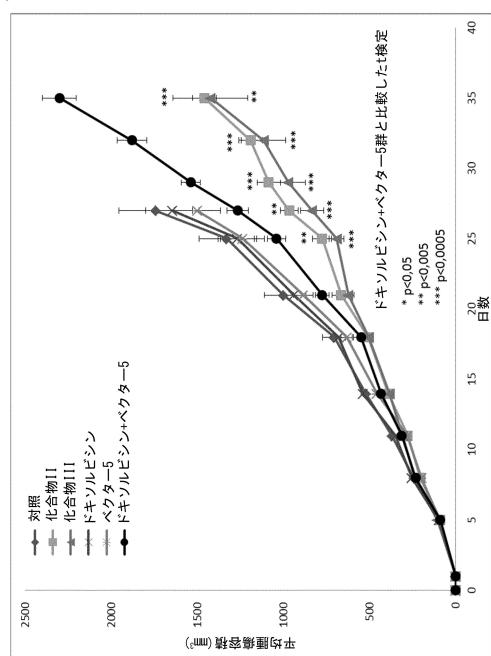
10

#### 【0068】

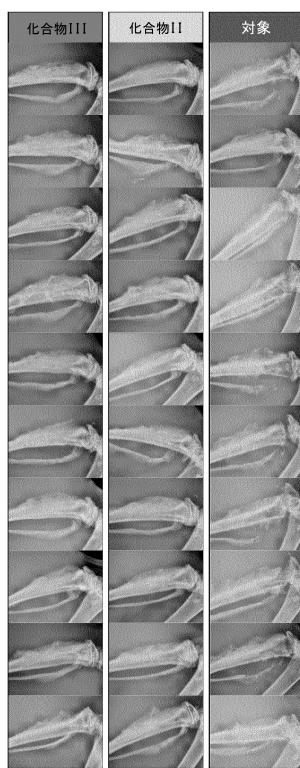
(腫瘍成長に関連する骨病変の予防) 化合物(ⅠⅠ)および(ⅠⅢ)は、対照、ドキソルビシン、ベクター5、およびドキソルビシン+ベクター5群と比較して、骨幹端骨折、皮質の完全性の変化、および新たな異所性骨形成を減少させる。27日目に、対照群の動物の90%が、腫瘍成長の生じる場所である脛骨骨幹端の骨折を有するが、これらの骨折は、化合物(ⅠⅠ)および(ⅠⅢ)で治療されたマウスのいずれにも検出されない。ドキソルビシン群で観察される病変は、対照群のものと同等である(皮質表面および骨幹端骨折における著しい骨溶解)。ベクター5(ベクター5、およびドキソルビシン+ベクター5群)は、骨幹端骨折を部分的に減少させるが、残念ながら、大きい溶骨性病変が、皮質表面において観察された。一方、本発明に係る化合物は、この骨肉腫モデルにおいて、腫瘍成長に関連する骨溶解を著しく防ぐ。

20

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 61 K 31/704 (2006.01) A 61 K 31/704  
A 61 K 47/54 (2017.01) A 61 K 47/54

(72)発明者 ゲジョン、ジャン - イヴ  
フランス共和国、44590 デルヴァル、リュ ジョルジュ サンド 15  
(72)発明者 ル ポ、ロナン  
フランス共和国、44100 ナント、リュ ジョルジュ クロード 11  
(72)発明者 ダヴィド、エマニュエル  
フランス共和国、44710 ポール サン ペール、ラ シャリ 3

審査官 山本 吾一

(56)参考文献 特表2014-514288 (JP, A)  
特表平6-506451 (JP, A)  
特表2011-508757 (JP, A)  
国際公開第2009/083613 (WO, A1)  
国際公開第1996/40156 (WO, A1)  
ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, 2009年, vol. 43, no. 24, pp. 9208 - 9215  
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2002年, vol. 45, no. 7, pp. 1466 - 1476  
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2012年, vol. 55, no. 17, pp. 7502 - 7515

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 H  
C 07 C  
C 07 F  
Caplus / REGISTRY (STN)