

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6000122号
(P6000122)

(45) 発行日 平成28年9月28日 (2016. 9. 28)

(24) 登録日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)

(51) Int. Cl.

F 1

C O 7 F 9/655 (2006. 01)

C O 7 F 9/655

A 6 1 K 31/661 (2006. 01)

A 6 1 K 31/661

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 13 (全 40 頁)

(21) 出願番号 特願2012-510027 (P2012-510027)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月7日 (2010. 5. 7)
 (65) 公表番号 特表2012-526148 (P2012-526148A)
 (43) 公表日 平成24年10月25日 (2012. 10. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/034117
 (87) 国際公開番号 W02010/129918
 (87) 国際公開日 平成22年11月11日 (2010. 11. 11)
 審査請求日 平成25年4月18日 (2013. 4. 18)
 審判番号 不服2015-7238 (P2015-7238/J1)
 審判請求日 平成27年4月17日 (2015. 4. 17)
 (31) 優先権主張番号 61/176, 249
 (32) 優先日 平成21年5月7日 (2009. 5. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 305023366
 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
 オブ ミネソタ
 アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-
 2020 ミネアポリス, オーク スト
 リートーエス・イー 200, マクナマ
 ラ アラムナイ センター 600
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

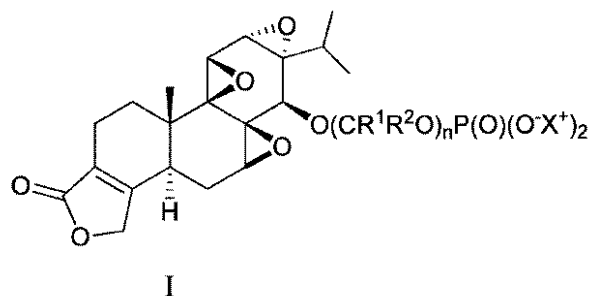
(54) 【発明の名称】 トリプトリド製品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1 4】



10

(式中 :

R¹ は H、またはメチルであり ; そして R² は H であり ;

n は 1 であり ; そして

各 X⁺ は薬学的に許容可能な有機陽イオンまたは無機陽イオンである)

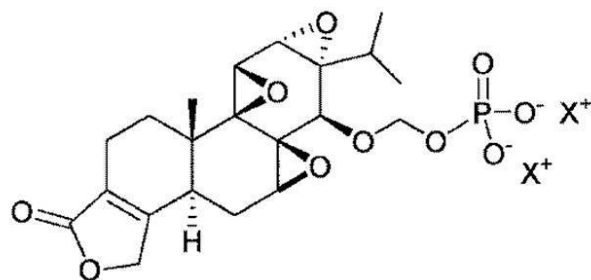
の塩。

20

【請求項 2】

式 I a

【化 1 5】



Ia

10

(式中、 X^+ は薬学的に許容可能な有機陽イオンまたは無機陽イオンである)
である、請求項 1 に記載の塩。

【請求項 3】

R^1 が、メチルである、請求項 1 に記載の塩。

【請求項 4】

R^1 が、H である、請求項 1 に記載の塩。

20

【請求項 5】

各 X^+ が、 Li^+ 、 Na^+ または K^+ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の塩。

【請求項 6】

各 X^+ が、式 HY^+ を有し、ここで Y はアンモニア、トリエチルアミン、トロメタミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、グルカミン、N - メチルグルカミン、グリシン、リシン、オルニチン、アルギニン、エタノールアミン、またはコリンである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の塩。

【請求項 7】

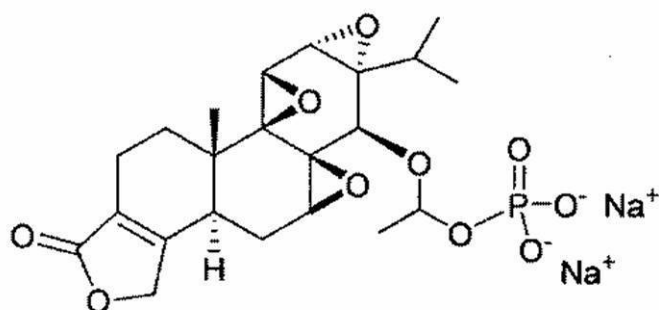
各 X^+ が、 Na^+ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の塩。

30

【請求項 8】

14 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩、または

【化 1 6】



40

である、塩。

【請求項 9】

14 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩である、塩。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の塩を、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせて含む、医薬品組成物。

【請求項 11】

50

医学的療法に使用するための組成物であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の塩を含む組成物。

【請求項 1 2】

がんの予防的処置または治療的処置における使用のための組成物であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の塩を含む組成物。

【請求項 1 3】

H S P 7 0 を発現するがんにおけるがん細胞増殖の予防的阻害または治療的阻害における使用のための組成物であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の塩を含む組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

膵臓がんは、特に活動的および壊滅的な疾患であり、5 年生存率は 5 % 未満である。現在患者の生存期間を有効に延長し得る有効な薬物治療は利用可能でない。2006 年において、35,000 例を超える新規膵臓がん症例が報告され、ほとんど同数がその疾患のために死亡した。膵臓および他のがんを処置するための療法に対する患者の反応を妨げることに於いて、アポトーシスに対する抵抗性が、重要な因子として調査された。

【0002】

トリプトリドは、植物 *Tripterygium wilfordii* から得られる天然に存在する化合物である。トリプトリドは、自己免疫疾患、移植片拒絶（免疫抑制）の処置において有用であることが公知であり、そして抗がんおよび抗受精効果だけでなく他の生物学的効果も有する（非特許文献 1）。トリプトリドは、異種移植腫瘍に対して強力な抗腫瘍効果を有する（例えば、非特許文献 2）。トリプトリドは、がんの増殖および転移に係する複数の細胞標的を有する抗アポトーシス薬剤である。トリプトリドは、NF- κ B 活性化を阻害し、bcl-2 切断を誘導し、生存遺伝子 p21^{WAF1/CIP1} の誘導をブロックし（非特許文献 3）、そして熱ショック転写因子 1（HSF1）の機能を阻害して、それによって内因性の Hsp70 遺伝子発現を抑制する（非特許文献 4）。トリプトリドはまた、強力な腫瘍新脈管形成阻害剤としても機能する（非特許文献 5）。

20

【0003】

生きた細胞には、がん細胞を含む有害な状況に対して保護するいくつかのメカニズムが存在する。熱ショックタンパク質（HSP）と呼ばれるタンパク質のファミリーの合成は、そのような保護メカニズムの 1 つである。主な HSP は、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、およびより小さい HSP を含む。HSP は、ほとんどの細胞内区画に存在し得、HSP70 は主にサイトゾルに位置する。

30

【0004】

HSP70 発現の調節不全は、がんを含む多くの疾患に関連することが公知である。HSP70 は、様々な起源の悪性腫瘍において豊富に発現しており（例えば：非特許文献 6）、それが腫瘍細胞を処置に対して抵抗性にし、そして患者によくない予後をもたらす（非特許文献 7）。熱ショックタンパク質 70（Hsp70）は、正常細胞と比較して、膵臓がん細胞においてアップレギュレートされ、そして過剰発現していることが公知である。さらに、HSP70 は、がん細胞のアポトーシスを阻害してがん細胞に対する保護的效果を有する。膵臓がん細胞における HSP70 の阻害は、これらの細胞のアポトーシス細胞死を増加させることが示された（例えば、非特許文献 8 を参照のこと）。トリプトリドは、マウスにおいて膵臓腫瘍の増殖および転移を阻害することが示された。トリプトリドは、電離放射線と組み合わせて使用した場合に、膵臓がん処置におけるその治療効果が増強されることも示された（非特許文献 9 および非特許文献 10）。トリプトリドに関連する抗がん効果は、正常膵臓細胞と比較して膵臓がん細胞によって有意な量で発現されるタンパク質 HSP70 のレベルを抑制した結果として起こると考えられる。従って、トリプトリド処置は、膵臓がんを含む、HSP70 を過剰発現するがんの可能性のある処置に関

40

50

して、医学分野において興味深い。例えば非特許文献 11 を参照のこと。

【0005】

しかし、トリプトリドの投与に関連する一定の不都合が存在し、そしてこれらの問題に取り組むための異なる解決策を探索した。天然のトリプトリドに関連する 1 つの問題は、それが水溶液中で不溶性であることである。天然のトリプトリドに関連する別の問題は、低い生物学的利用能および毒性の副作用である。改善された溶解性および抑制された毒性を有するトリプトリド、トリプトリド誘導体および特定のプロドラッグが公知である。例えば、Dai ら、特許文献 1 は、増加した溶解性および抑制された毒性を有するトリプトリドプロドラッグを記載する。

【0006】

ホスホノオキシメチル (phosphonomethyl) 部分はそれ自体、特定の医薬化合物のプロドラッグ化合物を形成する目的のために、当該分野で公知である。例えば、非特許文献 12 は、水溶性を改善するための特定の化合物の N - ホスホノオキシメチルプロドラッグの調製を記載する。

【0007】

それにも関わらず、プロドラッグは、実際に有用であるために、多くの性質を有していなければならない。例えば、望ましいプロドラッグは、処方および投与のために安定であるべきである。さらに、一旦投与され、そしてレシピエントのシステムに存在したら、そのプロドラッグはうまく活性化されなければならない。さらに、プロドラッグおよび活性化化合物はどちらも、血漿および組織ホモジネートのような生物学的流体と適合性でなければならない。最終的に、プロドラッグの形態で最初に送達された活性化化合物は、その望ましい治療的または薬学的効果を有さなければならない。これらおよび他の因子は、特定の型の化合物と、同時に達成する、または全体としてバランスを取ることが困難であり得る。トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ化合物の関係において、がん細胞増殖の顕著な阻害と組み合わせて、改善された水溶性、経口剤形の有効な生物学的利用能、トリプトリドのより速いインビボ放出、および比較的抑制されたまたはより低い毒性を達成することは困難であった。例えば、非特許文献 13 を参照のこと。

【0008】

トリプトリドのコハク酸プロドラッグ形態が公知であるが、一定の不都合と関連していた。例えば非特許文献 14 を参照のこと。トリプトリドのコハク酸プロドラッグの不完全なおよび変動する変換が観察された。

【0009】

従って、医学および薬学分野において、膀胱がんのような、活動的固形腫瘍がんを含むがんを処置するための、改善された治療薬のニーズが存在する。さらにそのような治療薬の改善された送達または改善された薬物動態学的パラメーターまたは抑制された毒性のニーズも存在する。改善された溶解性を有する、または活性化化合物トリプトリドのより速い放出を有する、または活性化化合物トリプトリドのより治療的に有効な放出を有するトリプトリドのプロドラッグ形態、または改善された生物学的利用能を有するトリプトリドのプロドラッグ形態に対するニーズも存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献 1】米国特許第 6,548,537 号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Qui および Kao、2003、Drugs R. D. 4、1-18

【非特許文献 2】Yang ら、Mol. Cancer Ther. 2003、2、65-72

【非特許文献 3】Wang ら、Journal of Molecular Medicine、2006、84、405-415

10

20

30

40

50

【非特許文献4】Westerheideら、2006、Journal of Biological Chemistry、281、9616 - 9622

【非特許文献5】Heら、2010、Int. Journal of Cancer、126、266 - 278

【非特許文献6】Hantschelら、2000、Cell Stress Chaperones、5、438 - 442

【非特許文献7】Fuquaら、1994、Breast Cancer Res. Treatment 32、67 - 71

【非特許文献8】Aghdassiら、Cancer Research、67(2)p 616 - 625 (2007)

【非特許文献9】Wangら、Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2006、47、抄録#4720

【非特許文献10】Wangら、Clin. Cancer Res. 2007、13、4891 - 4899

【非特許文献11】Phillipsら、Cancer Research、67(19)、9407 - 16頁(2007)

【非特許文献12】Kriseら、J. Med. Chem. 42、3094 - 3100頁(1999)

【非特許文献13】Chassaingら、Highly Water-Soluble Prodrugs of Anthelmintic Benzimidazole Carbamates: Synthesis, Pharmacodynamics and Pharmacokinetics、J. Med. Chem. 51(5)、1111 - 1114頁(2008)

【非特許文献14】Harrousseauら、Haematologica 2008、93(s1)、14 Abstract0038およびKitzenら、European Journal of Cancer 2009、45、1764 - 1772

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

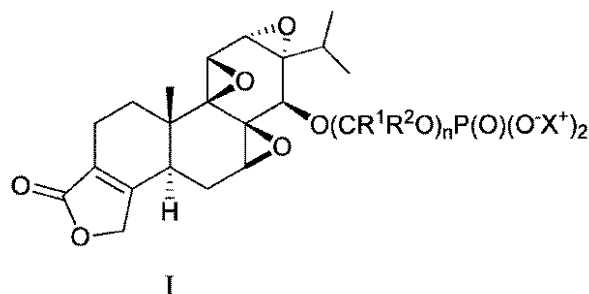
【0012】

本発明は、例えば、以下を提供する：

(項目1)

式I：

【化14】



(式中：

各 R^1 は独立に H、($C_1 \sim C_6$) アルキル、アリール ($C_1 \sim C_6$) アルキル -、($C_3 \sim C_6$) シクロアルキルまたはアリールであり；そして各 R^2 は独立に H、($C_1 \sim C_6$) アルキル、アリール ($C_1 \sim C_6$) アルキル -、($C_3 \sim C_6$) シクロアルキルまたはアリールであり；または R^1 および R^2 はそれらが結合する原子と一緒になって ($C_3 \sim C_7$) シクロアルキルを形成し；ここで R^1 または R^2 のあらゆるアルキルまたはシクロアルキルは、八口、($C_1 \sim C_6$) アルコキシおよび NR^aR^b から選択される、1

つ以上の基で必要に応じて置換され得、そしてここで R^1 または R^2 のあらゆるアリールは八口、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシ、 $NR^a R^b$ 、ニトロおよびシアノから選択される、1つ以上の基で必要に応じて置換され得；

R^a および R^b はそれぞれ独立に、H、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキル、 $(C_3 \sim C_6)$ シクロアルキルおよびアリールから選択され；または R^a および R^b は、それらが結合する窒素と一緒にあってピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノ、アゼチジノ、モルホリノ、またはチオモルホリノを形成し；

n は 1、2、または 3 であり；そして

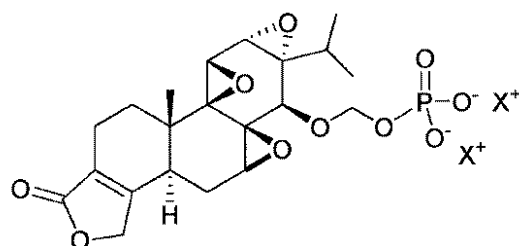
各 X は H である）

の化合物またはその塩。

(項目 2)

式 I a

【化 15】



Ia

(式中、 X^+ は薬学的に許容可能な有機陽イオンまたは無機陽イオンである) の化合物である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 3)

R^1 が、H、または $(C_1 \sim C_6)$ アルキルである、項目 1 に記載の化合物。

(項目 4)

R^1 が、H である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 5)

R^1 が、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルである、項目 1 に記載の化合物。

(項目 6)

R^1 が、メチルまたはエチルである、項目 1 に記載の化合物。

(項目 7)

R^2 が、H、または $(C_1 \sim C_6)$ アルキルである、項目 1 または項目 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 8)

R^2 が、H である、項目 1 または項目 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 9)

各 X^+ が、H である、項目 1 または項目 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 10)

各 X^+ が、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、バリウム、亜鉛、またはアルミニウムである、項目 1 または項目 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 11)

各 X^+ が、式 HY^+ を有し、ここで Y はアンモニア、トリエチルアミン、トロメタミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、グルカミン、N-メチルグルカミン、グリシン、リシン、オルニチン、アルギニン、エタノールアミン、またはコリンである、項目 1 または項目 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 12)

X⁺ が、Li⁺、K⁺、またはNa⁺ から選択される、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 13)

各 X⁺ が、Na⁺ である、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 14)

14 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリドナトリウム塩、14 - O - ホスホノオキシエチルトリプトリドナトリウム塩、または 14 - O - ホスホノオキシプロピルトリプトリドナトリウム塩である、化合物

(項目 15)

14 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリドナトリウム塩である、化合物。

10

(項目 16)

項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせて含む、医薬品組成物。

(項目 17)

医学的療法に使用するための、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

(項目 18)

哺乳動物においてがんを処置するための方法であって、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を、該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

20

(項目 19)

前記がんが、膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん (gastric cancer)、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん (stomach cancer)、子宮頸がん、またはリンパ腫腫瘍から選択される、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記がんが、膵臓がんまたは神経芽細胞腫である、項目 18 に記載の方法。

(項目 21)

がんの予防的処置または治療的処置における使用のための、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

30

(項目 22)

がんの処置のための薬物の製造のための、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の使用。

(項目 23)

前記がんが、膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん (gastric cancer)、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん (stomach cancer)、子宮頸がん、またはリンパ腫腫瘍から選択される、項目 21 または 22 に記載の使用。

40

(項目 24)

前記がんが、膵臓がんまたは神経芽細胞腫である、項目 21 または 22 に記載の使用。

(項目 25)

哺乳動物において、HSP70 を発現するがんにおけるがん細胞増殖を阻害するための方法であって、阻害有効量の項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

(項目 26)

前記 HSP70 を発現するがんが、膵臓がん、乳がん、結腸がん、胃がん (gastric cancer)、肝臓がん、神経芽細胞腫または神経膠芽腫である、項目 25 に記載の方法。

50

(項目 2 7)

前記 H S P 7 0 を発現するがんが、神経芽細胞腫または膵臓がんである、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 8)

H S P 7 0 を発現するがんにおけるがん細胞増殖の予防的阻害または治療的阻害における使用のための、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩。

(項目 2 9)

H S P 7 0 を発現するがんにおけるがん細胞増殖を阻害するための薬物の製造のための、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩の使用。

10

(項目 3 0)

前記 H S P 7 0 を発現するがんが、膵臓がん、乳がん、結腸がん、胃がん (g a s t r i c c a n c e r)、肝臓がん、神経芽細胞腫、または神経膠芽腫である、項目 2 8 または 2 9 に記載の使用。

(項目 3 1)

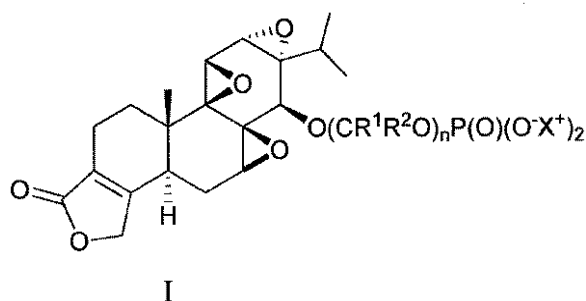
前記 H S P 7 0 を発現するがんが、神経芽細胞腫または膵臓がんである、項目 2 8 または 2 9 に記載の使用。

よって、本発明は、式 I の化合物である本発明の化合物を提供する：

【 0 0 1 3 】

20

【 化 1 】



30

ここで：

各 R¹ は独立に H、(C₁ ~ C₆) アルキル、アリール (C₁ ~ C₆) アルキル -、(C₃ ~ C₆) シクロアルキルまたはアリールである；および各 R² は独立に H、(C₁ ~ C₆) アルキル、アリール (C₁ ~ C₆) アルキル -、(C₃ ~ C₆) シクロアルキルまたはアリールである；または R¹ および R² はそれらが結合する原子と一緒になって (C₃ ~ C₇) シクロアルキルを形成する；ここで R¹ または R² のあらゆるアルキルまたはシクロアルキルは、必要に応じて、ハロ、(C₁ ~ C₆) アルコキシおよび N R^a R^b から選択される、1 つ以上の (例えば 1、2、3、4、または 5) 基で置換され得る、そしてここで R¹ または R² のあらゆるアリールは必要に応じて、ハロ、(C₁ ~ C₆) アルキル、(C₁ ~ C₆) アルコキシ、N R^a R^b、ニトロおよびシアノから選択される、1

40

つ以上の (例えば 1、2、3、4、または 5) 基で置換され得る；
R^a および R^b はそれぞれ独立に、H、(C₁ ~ C₆) アルキル、(C₃ ~ C₆) シクロアルキルおよびアリールから選択される；または R^a および R^b は、それらが結合する窒素と一緒になってピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノ、アゼチジノ、モルホリノ、またはチオモルホリノを形成する；

n は 1、2、または 3 である；そして

各 X は H である；

またはその塩である。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を、薬学的に許容可能

50

なキャリアと組み合わせて含む医薬品組成物を提供する。

【0015】

本発明はまた、医学的療法に使用するための、式Iの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0016】

本発明はまた、式Iの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩を哺乳動物（例えばヒト）へ投与する工程を含む、哺乳動物（例えばヒト）においてがん（例えば膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん（gastric cancer）、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん（stomach cancer）、子宮頸がん、またはリンパ腫腫瘍）を処置するための方法を提供する。

10

【0017】

本発明はまた、がん（例えば膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん（gastric cancer）、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん（stomach cancer）、子宮頸がん、またはリンパ腫腫瘍）の予防的または治療的処置において使用するための、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0018】

20

本発明はまた、哺乳動物（例えばヒト）におけるがん（例えば膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん（gastric cancer）、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん（stomach cancer）、子宮頸がん、またはリンパ腫腫瘍）の処置のための薬物を製造するために、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を使用することを提供する。

【0019】

本発明はまた、阻害効果のある量の式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を哺乳動物（例えばヒト）に投与する工程を含む、哺乳動物（例えばヒト）において、HSP70を発現するがん（例えば膵臓がん、神経芽細胞腫、乳がん、結腸がん、胃がん、肝臓がん、または神経膠芽腫）においてがん細胞の増殖を阻害するための方法を提供する。

30

【0020】

本発明はまた、HSP70を発現するがん（例えば膵臓がん、神経芽細胞腫、乳がん、結腸がん、胃がん、肝臓がん、または神経膠芽腫）におけるがん細胞増殖の予防的または治療的阻害において使用するための、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を提供する。

【0021】

本発明はまた、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を、哺乳動物（例えばヒト）において、HSP70を発現するがん（例えば膵臓がん、神経芽細胞腫、乳がん、結腸がん、胃がん、肝臓がん、または神経膠芽腫）におけるがん細胞増殖を阻害するための薬物を製造するために使用することを提供する。

40

【0022】

本発明はまた、式Iの化合物またはその塩、例えばスキーム1-2で記載されたものを調製するために有用な、本明細書中で開示される新規プロセスおよび新規中間体を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、化合物1を調製するための化学反応ダイアグラムを示す。

【図2】図2は、化合物1に誘導体化されるトリプトリドおよび続く酵素的切断 - トリプトリドを放出するための化合物1の化学的分解を示す化学反応ダイアグラムを示す。

50

【図3】図3は、トリプトリドプロドラッグ（化合物1）のトリプトリドへのインビトロにおける酵素的変換を示す。

【図4】図4は、48時間におけるインビトロでのMiaPaca-2細胞生存能に対する、トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）の効果の比較を示す。

【図5】図5は、24時間および48時間におけるインビトロでのPanc-1細胞生存能に対する、トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）の効果の比較を示す。

【図6】図6は、24時間および48時間におけるインビトロでのS2VP10細胞生存能に対する、トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）の効果の比較を示す。

10

【図7】図7は、*in situ*での5枚の写真およびエキソピボにおける1枚の腫瘍の写真によって、コントロール群のマウスにおける腫瘍増殖を示す。

【図8】図8は、*in situ*での3枚の写真およびエキソピボにおける1枚の腫瘍の写真によって、トリプトリド群のマウスにおける腫瘍増殖を示す。

【図9】図9は、*in situ*での4枚の写真およびエキソピボにおける1枚の腫瘍の写真によって、トリプトリドプロドラッグ（化合物1）群のマウスにおける腫瘍増殖を示す。

【図10】図10は、コントロール群、トリプトリド群、およびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）の腫瘍サイズの比較を示す、インピボ実験由来のエキソピボ腫瘍コレクションの写真である。

20

【図11】図11は、インピボ実験由来の、コントロール群、トリプトリド群、およびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）群のマウスの腫瘍の腫瘍重量（g）の比較を示す。

【図12】図12は、インピボ実験由来の、コントロール群、トリプトリド群、およびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）群のマウスの腫瘍の腫瘍体積（ cm^3 ）の比較を示す。

【図13】図13は、化合物1で処置されたマウスおよびコントロールマウスの生存分析を示す。

【図14】図14は、化合物1で処置されたマウスおよびコントロールマウスの生存分析を示す。

【図15】図15は、化合物1、トリプトリドおよびビークルで処置されたマウスの腫瘍量（tumor burden）（体積および重量）を示す。

30

【図16】図16は、化合物1およびビークルで処置されたマウスの腫瘍量（体積および重量）を示す。

【図17】図17は、化合物1およびビークルで処置されたマウスの腫瘍量（体積および重量）を示す。

【図18】図18は、化合物およびビークルで処置されたマウスの腫瘍量（tumor volume）を示す。

【図19】図19は、トリプトリド存在下における細胞生存能（神経芽細胞腫N2aおよびSKNSH）を示す。

【図20】図20は、トリプトリド存在下におけるカスパーゼ3の活性を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

本明細書中で使用される用語「（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ）アルキル」は、直鎖または分岐した基である、1から6個の炭素原子を有するアルキル基を指す。この用語は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソ-プロピル、*n*-ブチル、*t*-ブチル、イソブチル、*n*-ペンチル、ネオペンチル、および*n*-ヘキシル等のような基によって例示される。

【0025】

本明細書中で使用される用語「（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ）アルコキシ」は、基（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ）アルキルO-を指し、ここで（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ ）アルキルは、本明細書中で定義される通りである

50

。この用語は、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソ-ブトキシ、sec-ブトキシ、ペントキシ、3-ペントキシ、またはヘキシルオキシ等のような基によって例示される。

【0026】

本明細書中で使用される用語「(C₃~C₇)シクロアルキル」は、3から7個の炭素原子を含む、飽和または部分的に不飽和の環状炭化水素環系を指す。この用語は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘキセン、またはシクロヘプタン等のような基によって例示される。

【0027】

本明細書中で使用される用語「アリール」は、フェニル基(radical)、または約9から10個の炭素環原子を有し、その少なくとも1つの環が芳香族である、オルト縮合二環状炭素環基を指す。この用語は、フェニル、インダニル、インデニル、ナフチル、1,2-ジヒドロナフチルおよび1,2,3,4-テトラヒドロナフチルのような基によって例示される。

10

【0028】

本明細書中で使用される用語「アリール(C₁~C₆)アルキル-」は、アリール-(C₁~C₆)アルキル-という基を指し、ここで(C₁~C₆)アルキルおよびアリールは、本明細書中で定義される通りである。この用語は、ベンジルおよびフェネチル等のような基によって例示される。

【0029】

20

本明細書中で使用される用語「含む」は、引用された要素、または構造または機能におけるその同等物、プラス引用されていないあらゆる他の要素(複数可)を意味する。「有する」および「含む」という用語も、文脈が他を示唆しなければ、制限無しと解釈される。「約」、「一般的に」、「実質的に」等のような用語は、それが絶対的なものではないが、先行技術において書かれていないように、用語または値を修飾すると解釈される。そのような用語は、状況によって定義され、そしてそれらが修飾する用語は、当業者によって理解される。これは、値を測定するために使用する所定の技術に関して予測される実験誤差、技術誤差、および装置の誤差の程度を少なくとも含む。

【0030】

例えば、生きた哺乳動物への投与したときに、インビボにおいてがん細胞の増殖を抑制または阻害するために十分な量を意味するために、「治療的に有効な量」および「薬学的に有効な量」という語句が本明細書中で使用される。その語句は、所定の投与経路に関して、確立された薬物動態学的方法および技術によって測定された場合に、意図される生理学的効果を生じるために必要であり、そして所定の活性成分と関連することが決定された量を指すことを意味する。

30

【0031】

本発明の活性化合物および組成物の量に関連して使用される「阻害有効量」という語句は、例えば標準的な細胞培養アッセイ技術を用いて示されるような、示された抗腫瘍性質を指すように意味する。

【0032】

40

本明細書中で使用される「プロドラッグ」という用語は、生物学的に活性になる前に、さらなる代謝(肝臓を含むがそれに限らない)を必要とする医薬品化合物を指すように意味する。

【0033】

キラル中心を有する本発明の化合物が存在し、そして光学活性およびラセミ形態で単離し得ることが、当業者によって認識される。いくつかの化合物は、多型を示し得る。本発明が、本明細書中で記載される有用な性質を有する、本発明の化合物のあらゆるラセミ形態、光学活性形態、多型形態、または立体異性形態、またはその混合物を包含することが理解され、例えば再結晶技術によるラセミ形態の分割によって、光学活性な出発材料からの合成によって、キラル合成によって、またはキラル固定相を用いたクロマトグラフィー

50

分離によって、どのように光学活性形態を調製するかは当該分野で周知である。

【0034】

式Iの化合物の塩が、式Iの化合物を単離または精製するための中間体として有用であり得る。さらに、薬学的に許容可能な酸または塩基の塩として式Iの化合物を投与することが適当であり得る。薬学的に許容可能な塩の例は、有機酸付加塩および無機塩である。

【0035】

「有機陽イオンまたは無機陽イオン」または「陽イオン性有機塩または無機塩」という用語は、当該分野で周知であり、そして化合物のO部分とイオン結合を形成し得、そして本発明の目的のためにプロドラッグの望ましい性質に著しく有害な影響を及ぼさない陽イオン性部分を含む、有機陽イオンまたは無機陽イオン（例えば金属塩またはアミン塩）を含む。「薬学的に許容可能な有機陽イオンまたは無機陽イオン」または「薬学的に許容可能な陽イオン性有機塩または無機塩」という用語は、哺乳動物における使用のために薬学的に許容可能であり、そして当該分野で周知である「有機陽イオンまたは無機陽イオン」を含む。

【0036】

有機陽イオンまたは無機陽イオンは、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、バリウム、亜鉛、アルミニウムおよびアミン陽イオンを含むがこれに限らない。アミン陽イオンは、アンモニア、トリエチルアミン、トロメタミン（TRIS）、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、グルカミン、N-メチルグルカミン、グリシン、リシン、オルニチン、アルギニン、エタノールアミン、コリン等に由来する陽イオンを含むがこれに限らない。1つの実施態様において、そのアミン陽イオンは、 X^+ が式YH⁺である陽イオンであり、ここでYはアンモニア、トリエチルアミン、トロメタミン（TRIS）、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、グルカミン、N-メチルグルカミン、グリシン、リシン、オルニチン、アルギニン、エタノールアミン、コリン等である。

【0037】

1つの実施態様において、使用し得る適当な陽イオン性有機塩または無機塩は、化合物のO部分とイオン結合を形成し得、そして本発明の目的のためのプロドラッグの望ましい性質、例えば溶解性の増加、安定性、および活性化化合物形態の迅速な加水分解放出に著しく有害な影響を与えない陽イオン性部分を含む。好ましくは、XはLi⁺、K⁺、またはNa⁺から選択される。より好ましくは、XはNa⁺であり、従って二ナトリウム塩を形成する。

【0038】

薬学的に許容可能な塩はまた、生理学的に許容可能な陰イオンを形成する酸と形成される塩、例えば、トシラート、メタンスルホン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩、コハク酸塩、安息香酸塩、アスコルビン酸塩、 α -ケトグルタル酸塩、および β -グリセロリン酸塩を含み得る。塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、重炭酸塩、および炭酸塩を含む、適当な無機塩も形成し得る。薬学的に許容可能な塩を含む塩を、当該分野で周知である標準的な手順を用いて、例えばアミンのような塩基性化合物を、生理学的に許容可能な陰イオンを生じる適当な酸と十分に反応させることによって、得ることができる。

【0039】

本発明は、式Iの化合物の遊離酸（例えば-O P（O）（OH）₂）、単塩（例えば-O P（O）（OH）（O⁻X⁺））および二塩（例えば-O P（O）O⁻X⁺）₂）のどれも含む。その酸および塩を、クロマトグラフィー、続く凍結乾燥または再結晶のような、当該分野で周知の様々な技術によって精製し得る。

【0040】

X⁺が有機陽イオンまたは無機陽イオンである、式Iの化合物を、1つ以上の異なる有機陽イオンまたは無機陽イオンを含む式Iの化合物に変換し得ることが、当業者によって認識される。そのような変換を、イオン交換樹脂、イオン交換クロマトグラフィー、および選択的結晶化を含むがこれに限らない、様々な周知の技術および材料を用いて達成し得

る。

【 0 0 4 1 】

R^1 の特定の値は H または ($C_1 \sim C_6$) アルキルである。

【 0 0 4 2 】

R^1 の別の特定の値は H である。

【 0 0 4 3 】

R^1 の別の特定の値は ($C_1 \sim C_6$) アルキルである。

【 0 0 4 4 】

R^1 の別の特定の値はメチルまたはエチルである。

【 0 0 4 5 】

R^2 の特定の値は H または ($C_1 \sim C_6$) アルキルである。

【 0 0 4 6 】

R^2 の別の特定の値は H である。

【 0 0 4 7 】

X^+ の特定の値は H である。

【 0 0 4 8 】

X^+ の別の特定の値はリチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、バリウム、亜鉛またはアルミニウムである。

【 0 0 4 9 】

式 I の化合物の別の特定の群は、 X^+ が式 HY^+ である化合物であり、ここで Y はアンモニア、トリエチルアミン、トロメタミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミン、グルカミン、N - メチルグルカミン、グリシン、リシン、オルニチン、アルギニン、エタノールアミン、またはコリンである。

【 0 0 5 0 】

X^+ の別の特定の値は Li^+ 、 K^+ 、または Na^+ である。

【 0 0 5 1 】

X^+ の別の特定の値は Na^+ である。

【 0 0 5 2 】

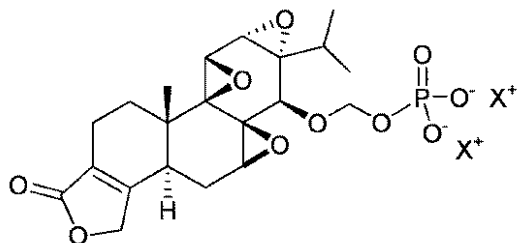
式 I の特定の化合物は、4 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩、14 - O - ホスホノオキシエチルトリプトリド二ナトリウム塩、または 14 - O - ホスホノオキシプロピルトリプトリド二ナトリウム塩、またはその塩である。

【 0 0 5 3 】

式 I の化合物の特定の群は、式 I a の化合物である：

【 0 0 5 4 】

【 化 2 】



Ia

ここで X^+ は薬学的に許容可能な有機陽イオンまたは無機陽イオンである。

【 0 0 5 5 】

別の式 I の化合物の特定の群は、式 I a の化合物である：

【 0 0 5 6 】

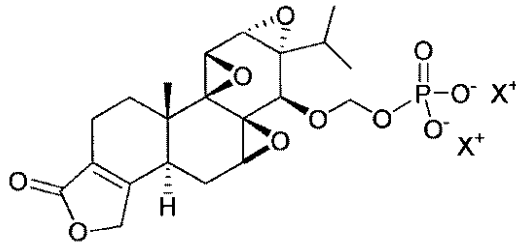
10

20

30

40

【化 3】



Ia

10

ここで X^+ は薬学的に許容可能な陽イオン性有機塩または無機塩である。

【0057】

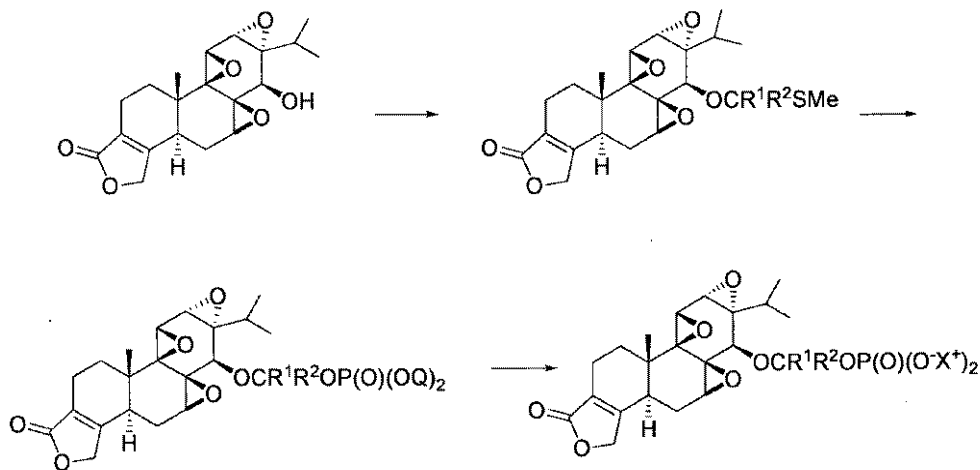
式 I の化合物および式 I の化合物を調製するために有用な中間体を調製するために使用し得るプロセスを、スキーム 1 およびスキーム 2 に示す。

【0058】

スキーム 1

【0059】

【化 4】



20

30

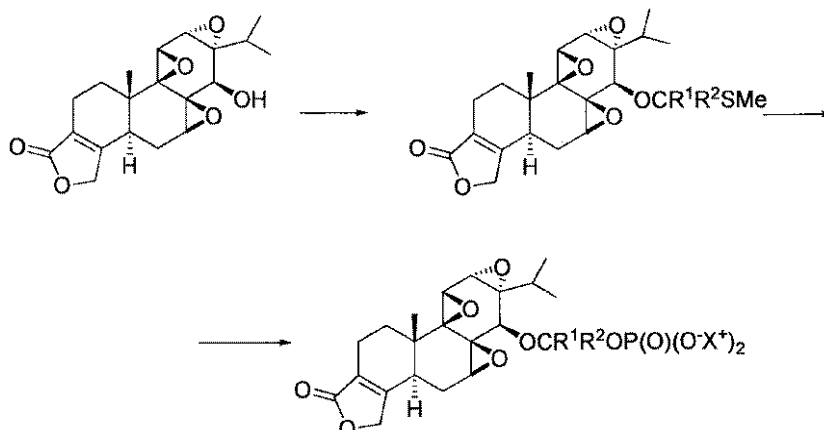
ここで Q はベンジルまたは *tert*-ブチルのような保護基である。

【0060】

スキーム 2

【0061】

【化 5】



40

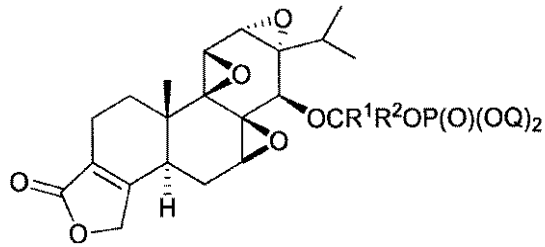
式 I の化合物を、式 I A の化合物から 1 つ以上の保護基を除去して、式 I の対応する化

50

化合物を提供することによって調製し得る：

【 0 0 6 2 】

【 化 6 】



10

Qは保護基である（例えばベンジルまたは *tert*-ブチル）

I A

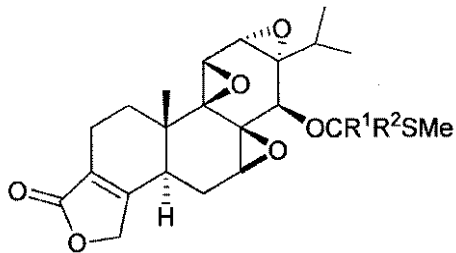
従って、式 I A の中間体は、式 I の化合物を調製するために有用である。

【 0 0 6 3 】

式 I の化合物をまた、式 I B の化合物から - S M e 基を - O P (O) (O ⁻ X ⁺) ₂ 基に変換して、式 I の対応する化合物を提供することによって調製し得る：

【 0 0 6 4 】

【 化 7 】



20

I B

従って、式 I B の中間体は、式 I の化合物を調製するために有用である。

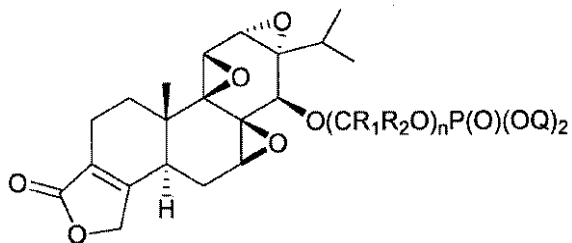
【 0 0 6 5 】

式 I の化合物をまた、式 I C の化合物から 1 つ以上の保護基を除去して、式 I の対応する化合物を提供することによって調製し得る：

30

【 0 0 6 6 】

【 化 8 】



40

Qは保護基である（例えばベンジルまたは *tert*-ブチル）

I C

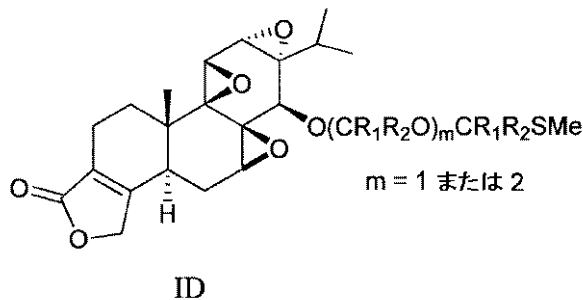
従って、式 I C の中間体は、式 I の化合物を調製するために有用である。

【 0 0 6 7 】

式 I の化合物をまた、式 I D の化合物から - S M e 基を - O P (O) (O ⁻ X ⁺) ₂ 基に変換して、式 I の対応する化合物を提供することによって調製し得る：

【 0 0 6 8 】

【化 9】



10

従って、式 I D の中間体は、式 I の化合物を調製するために有用である。

【0069】

よって、本発明は、以下のための方法を提供する：

a) 1つ以上の保護基を有する、式 I A の対応する化合物を脱保護して、式 I の化合物を提供する工程を含む、式 I の化合物を調製するための方法。

【0070】

b) 式 I B の化合物から - S M e 基を - O P (O) (O ⁻ X ⁺) ₂ 基へ変換して、式 I の化合物を提供する工程を含む、式 I の化合物を調製するための方法。

【0071】

c) 1つ以上の保護基を有する、式 I C の対応する化合物を脱保護して、式 I の化合物を提供する工程を含む、式 I の化合物を調製するための方法。

20

【0072】

d) 式 I D の化合物から - S M e 基を - O P (O) (O ⁻ X ⁺) ₂ 基へ変換して、式 I の化合物を提供する工程を含む、式 I の化合物を調製するための方法。

【0073】

e) 式 I の対応する化合物を酸（例えば有機酸または無機酸）または塩基（例えばアルカリ塩基またはアルカリ性塩基）で処理して、式 I の化合物の塩を提供する工程を含む、式 I の化合物の塩を調製するための方法。

【0074】

f) 1つ以上の X ⁺ が陽イオン性有機塩または無機塩である式 I の化合物を、1つ以上の X ⁺ が異なる陽イオン性有機塩または無機塩である式 I の化合物に変換するための方法。

30

【0075】

本発明の化合物を、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせることによって、医薬品組成物にも処方し得る。医薬品組成物を、薬学分野の当業者に容易に入手可能な、周知の化合物および技術によって調製し得る。本発明の目的のために、その薬学的に許容可能なキャリアは、あらゆる従来の、および容易に入手可能な生物学的に適合性の、または不活性な物質であり得、それは活性医薬品成分と化学的に適合性であり、そして処方または送達の際に、その意図される治療的効果を著しく減弱しない。薬学的に許容可能な塩を、当該分野で周知の標準的な手順および技術を用いて調製し得る。

40

【0076】

本発明の化合物の固体形態は、ナノ粒子であり得、そして従ってナノ粒子として処方し得る。よって、本発明は、式 I の化合物のナノ粒子、および式 I の化合物のナノ粒子を含む組成物を提供する。

【0077】

本発明のトリプトリドプロドラッグ化合物を、様々な賦形剤処方物を用いて処方し得、および下記で記載するような様々な剤形に調製し得る。本発明の化合物に関連する化学的性質および特質はまた、本発明の化合物の経口固体剤形の調製を可能にし得る。

【0078】

本発明の化合物を、医薬品組成物として処方し、そして望ましい特定の投与経路または

50

システムに適当な様々な形態でレシipientに投与し得る。投与経路は、経口経路、非経口経路、静脈内経路（ポンプ注入による静脈内経路を含む）、筋肉内経路、点眼薬を含む局所経路、皮下経路および粘膜経路を含み得るがこれに限らない。本発明の化合物を、不活性な希釈剤または吸収可能な食用キャリアのような、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせ、全身に、例えば経口で投与し得る。従って、活性成分として本発明の化合物を含む医薬品組成物を、様々な剤形で調製し得る。例えば、その組成物を、ハードまたはソフトカプセル（例えばゼラチンまたは植物由来のカプセル材料）に封入し得る。その組成物を、経口摂取または経粘膜錠剤形態、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハ、坐剤等に圧縮し得る。活性成分の量は、特定の望ましい薬学的に有効な投与量によって変動し得る。

10

【0079】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等は、錠剤圧縮技術のために使用し得る、結合剤（トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチンのような）；リン酸ニカルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等のような崩壊剤；滑沢剤（ステアリン酸マグネシウムのような）のようなさらなる成分、例えばショ糖、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテムのような甘味料；およびペパーミント、ウインターグリーン、チェリー等のような香料を含み得る。本発明の組成物中に含まれ得るさらなる成分は、マンニトール、尿素、デキストラン、およびラクトース非還元糖である。

【0080】

20

剤形がカプセルである場合、それはポリエチレングリコール、植物油等を含む液体キャリアを含み得る。特定の剤形で使用し得る他の材料は、ゼラチン、ワックス、セラック、糖等を含む。シロップまたはエリキシル形態は、甘味料としてショ糖、フルクトース、保存剤としてメチルパラベンおよびプロピルパラベン、色素および着色剤、および香料を含み得る。

【0081】

注入または注射によって静脈内または腹腔内に投与される場合、活性成分およびその塩の溶液を、例えば必要に応じて無毒性の界面活性剤を含む、水または食塩水中で調製し得る。分散物を、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、およびその混合物中で、および油中で調製し得る。保存条件は、保存剤を含むことも必要とし得る。

30

【0082】

注射または注入に適当な医薬品剤形は、滅菌水溶液または分散物、または必要に応じてリポソームに封入された、滅菌注射または注入溶液または分散物を即時調製するのに適した活性成分を含む滅菌粉末を含み得る。全ての場合において、最終的な剤形は、滅菌の、流体であって、製造および保存の条件下で安定でなければならない。その液体キャリアまたはビークルは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、植物油、無毒性グリセリルエステル、およびその適当な混合物を含む、溶媒または液体分散媒であり得る。例えばリポソームの形成によって、分散物の場合には必要な粒子サイズを維持することによって、または界面活性剤の使用によって、適当な流動性を維持し得る。微生物の活動の予防を、様々な抗菌薬および抗真菌薬、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって引き起こし得る。多くの場合において、等張剤、例えば糖、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射組成物の延長した吸収を、組成物における吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によって引き起こし得る。

40

【0083】

滅菌注射溶液を、活性化合物を必要な量で、必要に応じて上記で列挙した様々な他の成分と共に適当な溶媒に組込み、続いてろ過滅菌することによって調製する。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、それは先に滅菌ろ過した溶液に存在する活性成分プラスあらゆるさらなる望ま

50

しい成分の粉末を産生する。

【0084】

よって、本発明は、本発明の化合物の滅菌調製物を含む。本発明はまた、本発明の化合物の非滅菌調製物を含む。

【0085】

注射または注入医薬品剤形は、即時処方のために調製された本発明の活性化合物を含む、滅菌水溶液または滅菌分散物または滅菌粉末を含み得る。液体キャリアは、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポチエチレングリコール）等を含む、溶媒または液体分散媒を含み得る。微生物の（*antimicrobial*）活動を阻害または予防するために、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等のような、様々な薬剤を加え得る。

10

【0086】

本発明の化合物および組成物を、単回投与としてまたは複数回投与の間隔で投与し得る。投与量、剤形、投与経路、および特定の処方成分は、望ましい血漿濃度および関与する薬物動態に対応して変動し得る。本発明の重要な局面は、本発明の特定の化合物が、本発明の化合物の構造および置換基の位置に関連する特徴および性質のために、改善されたおよび有効な経口剤形投与経路を与え得ることである。

【0087】

局所投与に関して、一般的に本発明の化合物を、固体または液体であり得る、皮膚科学的に許容可能なキャリアと組み合わせて、組成物または処方物として皮膚に投与することが望ましい。

20

【0088】

有用な固体キャリアは、タルク、粘土、微晶性セルロース、シリカ、アルミナ等のような、細かく分割された固体を含む。有用な液体キャリアは、水、アルコールまたはグリコールまたは水 - アルコール / グリコール混合物を含み、ここで本化合物は、必要に応じて無毒性の界面活性剤の補助によって、有効なレベルで溶解または分散し得る。芳香剤およびさらなる抗菌薬剤のような補助剤を、所定の使用のために性質を最適化するために加え得る。得られた液体組成物を、吸収剤のパッドから適用し得る、包帯および他の包帯材に浸透させるために使用し得る、またはポンプ型またはエアロゾル噴霧器を用いて、冒された領域にスプレーし得る。

30

【0089】

使用者の皮膚に直接適用するための、塗布できるペースト、ゲル、軟膏、石鹸等を形成するために、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪アルコール、修飾セルロースまたは修飾鉱物物質のような増粘剤も、液体キャリアと共に採用し得る。

【0090】

式 I の化合物を皮膚に送達するために使用し得る、有用な皮膚科学的組成物の例は、当該分野で公知である；例えば、*Jacquet*ら（米国特許第 4,608,392 号）、*Geria*（米国特許第 4,992,478 号）、*Smith*ら（米国特許第 4,559,157 号）および *Wortzman*（米国特許第 4,820,508 号）を参照のこと。

40

【0091】

式 I の化合物の有用な投与量を、そのインビトロ活性、および動物モデルにおけるインビボ活性を比較することによって決定し得る。マウスおよび他の動物における有効投与量をヒトへ外挿する方法は、当該分野で公知である；例えば、米国特許第 4,938,949 号を参照のこと。

【0092】

処置において使用するために必要な、化合物またはその活性な塩または誘導体の量は、選択した特定の塩によってだけではなく、投与経路、処置する状態の性質、および患者の年齢および状況によっても変動し、そして最終的には主治医または臨床医の判断である。

【0093】

50

しかし、一般的に、適当な用量は、約 $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日から約 $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日の範囲である（例えば、約 $6 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日から約 $96 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日または約 $6 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日から約 $48 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日、または約 $6 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日から約 $24 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日、または約 $12 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日から約 $24 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重 / 日）。

【0094】

その化合物を、慣習的に、例えば、約 $80 \mu\text{g}$ から約 $8000 \mu\text{g}$ 、慣習的に約 $480 \mu\text{g}$ から約 $7680 \mu\text{g}$ 、慣習的に約 $480 \mu\text{g}$ から約 $3840 \mu\text{g}$ 、および慣習的に約 $960 \mu\text{g}$ から約 $1920 \mu\text{g}$ を含む単位剤形に処方する。1つの実施態様において、本発明は、そのような単位剤形に処方された、本発明の化合物を含む組成物を提供する。

10

【0095】

望ましい用量を、慣習的に単回用量で、または適当な間隔で投与される分割した用量として、例えば1日あたり2用量、3用量、4用量、またはより多いサブ用量（sub-dose）として与えてもよい。そのサブ用量自体を、吸入器からの複数回の吸入、または眼への複数滴の適用によるなど、多くの不連続なゆるく間隔をあけた投与に、さらに分割し得る。

【0096】

本発明の化合物をまた、他の治療薬、例えば、がん（例えば、膵臓がん、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、白血病、急性および慢性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、甲状腺癌、骨肉腫、乳がん、前立腺がん、食道がん、膀胱がん、胃癌、尿路上皮がん、多形神経膠芽腫、結腸がん、子宮頸がん、線維肉腫、扁平上皮癌、多発性骨髄腫、胆管がん、非小細胞肺がん）、炎症性疾患、リウマチ性疾患、自己免疫疾患、多発性嚢胞腎疾患、腎炎、移植片の生存（腎臓、心臓）、肺低血圧、肺の炎症、肺線維症、神経保護、脳虚血 / 再灌流傷害、パーキンソニズム、および角膜潰瘍の処置に有用な他の薬剤と組み合わせて、がん細胞に対する放射線増感剤として投与し得る。そのような薬剤の例は、5 - フルオロウラシル、T R A I L（T N F 関連アポトーシス誘導リガンド）、D R - 4 / 5 活性化抗体、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン（ドキソルビシン）、オンコピン（ピンクリスチン）、パクリタキセル、ドセタキセル（doxetaxel）、シスプラチン、カルボプラチン、C P T - 11、ボルテゾミブ（bortezomib）およびプレドニゾン - プレドニゾロンを含む。よって、1つの実施態様において、本発明はまた、式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩、少なくとも1つの他の治療薬、および薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアを含む組成物を提供する。本発明はまた、式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩、少なくとも1つの他の治療薬、包装材料、および式 I の化合物またはその薬学的に許容可能な塩および他の治療薬（単数または複数）を動物（例えば哺乳動物）に投与してがん（例えば、膵臓がん、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、白血病、急性および慢性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、甲状腺癌、骨肉腫、乳がん、前立腺がん、食道がん、膀胱がん、胃癌、尿路上皮がん、多形神経膠芽腫、結腸がん、子宮頸がん、線維肉腫、扁平上皮癌、多発性骨髄腫、胆管がん、非小細胞肺がん）、炎症性疾患、リウマチ性疾患、自己免疫疾患、多発性嚢胞腎疾患、腎炎、移植片の生存（腎臓、心臓）、肺低血圧、肺の炎症、肺線維症、神経保護、脳虚血 / 再灌流傷害、パーキンソニズム、角膜潰瘍または大腸炎を処置するための指示を含むキットを提供する。別の実施態様において、本発明はまた、式 I の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩、少なくとも1つの他の治療薬、包装材料、および式 I の化合物またはその薬学的に許容可能な塩および他の治療薬（単数または複数）を動物（例えば哺乳動物）に投与して、がん細胞を増感する、ステントをコーティングする（薬剤の溶出）、脊髄を修復するための、または動物において雄および雌の避妊として使用するための指示を含むキットを提供する。以下の文書は、他の治療薬と組み合わせたトリプトリドと関連する（1. Chen, Y. W. ら、Anticancer Drugs、2010、21（5）、502 - 13. 2. Xu B. ら、Cancer Lett. 2010、291（2）、200 - 208. 3. Borja - Cacho, D. ら、J. Gastrointes

20

30

40

50

t. Surg. 2010、14(2)、252-60. Westfall S. D. ら、Chemotherapy、2008、54(1)、67-76. 4. Tang X. Y. ら、Postgrad. Med. J. 2007、83(979)、338-43. 5. Panichakul T. ら、Anticancer Res. 2006、26(1A)、259-65. 6. Pediatr. Blood Cancer、2008、51(6):754-97. Matsui ら、Oncogene、2008、27、4603-4614. 7. Chang ら、The Journal of Biological Chemistry、2001、276、2221-2227. 8. Westfall ら、Chemotherapy、2008、54(1)、67-76. 9. Carter ら、Blood、2008、111巻、7号、3742-3750頁. 10. Borja-Cacho ら、J. Gastrointest. Surg. 2010、14、252-260. 11. Tang ら、Postgraduate Medical Journal 2007、83、338-343. 12. Cen ら、Anti-cancer Drugs、2010、21(5)、502-513. 13. Kapoor、Int. J. Mol. Med. 2008、22(4)、489-96. 14. Fidler ら、Molecular Cancer Therapeutics、2003、2、855)。

【0097】

本発明の重要な局面は、他のトリプトリドプロドラッグ形態と比較して、本発明の化合物が、薬物動態学的性質、物理的性質および治療的利点の望ましい組み合わせを可能にすることである。本発明のトリプトリドプロドラッグ化合物は、化学的安定性、増強された溶解性、およびプロドラッグ形態からの活性トリプトリドの迅速な代謝放出を含む、望ましい特性の組み合わせを示す。まとめると、これらの性質は、改善された治療的抗がん効果を提供する。そのような効果は、細胞内のHSP70によって与えられる保護効果およびアポトーシスおよび処置への抵抗性を阻害することによる、膵臓がん細胞の有効な阻害を含む。

【0098】

実施例1のトリプトリドプロドラッグの代謝的および酵素的切断の化学的経路を、図2に示す。出発の天然化合物(非プロドラッグ形態)トリプトリドは、低い水溶性の特徴を有する。実施例1の調製された化合物は、高いレベルの溶解性を示す。酵素的切断および代謝を受けた場合、実施例1の化合物は、最終的に活性な形態のトリプトリド化合物を放出する。

【0099】

本発明の化合物および組成物を、活性成分として上記で記載した化合物の薬学的に有効な量を投与する工程を含む、固形腫瘍がんを処置する必要がある哺乳動物において、固形腫瘍がんを処置するための方法として採用し得る。処置の方法の文脈において使用される場合、「哺乳動物」という用語は、ヒトを含む。

【0100】

本発明の化合物および組成物は、HSP70を発現するがんのインビトロおよびインビボにおけるがん細胞増殖を阻害するために有効であり得る。HSP70を発現するがんの例は、膵臓がん、乳がん、肺がん、神経がん、白血病、神経芽細胞腫、結腸がん、胃がん、肝臓がん、および神経膠芽腫を含む。

【0101】

よって、1つの実施態様において、本発明は、式Iの化合物の投与による、熱ショックタンパク質HSP70の過剰発現を示すがん細胞の細胞集団の阻害を含む。Mia-Paca、Panc-1およびS2VP10細胞のような、HSP70を発現する膵臓がん細胞に対する有効な細胞阻害効果が、本発明にとって特に重要である。よって、別の実施態様において、本発明は、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩を、哺乳動物(例えばヒト)に投与する工程を含む、哺乳動物(例えばヒト)において、S2がん(例えばS2VP10またはS2013がん)を処置する方法を提供する。

【0102】

10

20

30

40

50

本明細書中の実施例において示されたように、インビトロおよび生きた哺乳動物のシステムの両方において、酵素アルカリホスファターゼは、実施例1の化合物を、活性なトリプトリド形態に変換する。実施例1の化合物の酵素加水分解半減期 ($t_{1/2}$) は、比較的速い変換速度、および従って、該化合物の活性治療形態のより速い放出を示す。

【0103】

トリプトリドを、炎症性疾患のような様々な疾患を処置するために使用する。トリプトリドはまた、様々な疾患を処置するための治療薬として関係付けられてきた。これらの疾患は、がん（例えば膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん (gastric cancer)、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん (stomach cancer)、子宮頸がん、リンパ腫腫瘍）、自己免疫疾患、移植片拒絶、多発性嚢胞腎疾患、炎症性疾患、喘息、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、および腎炎を含む。トリプトリドはまた、ステントのコーティング（薬剤の溶出）、脊髄の修復、大腸炎、および雄および雌動物における避妊において議論された。よって、本発明は、がん（例えば膵臓がん、胆管癌、神経芽細胞腫、結腸がん、乳がん、骨髄腫、胃がん (gastric cancer)、肝臓がん、神経膠芽腫、卵巣がん、結腸直腸がん、非ホジキンリンパ腫、肺がん、前立腺がん、小細胞肺がん、大細胞肺がん、腎臓がん、食道がん、胃がん (stomach cancer)、子宮頸がん、リンパ腫）、自己免疫疾患、移植片拒絶、多発性嚢胞腎疾患、炎症性疾患、喘息、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、および腎炎を含む疾患を処置するために、式Iの化合物を使用し得る。

【0104】

以下の文書は、トリプトリドおよびがんに向けられる (1. AML: Carterら、Blood、2008、111(7)、3742-3750. 2. 未分化甲状腺癌: Mol Pharmacol、2009、75(4)、812-9. 3. 膀胱がん: Yangら、Mol. Cancer Ther.、2003、2(1)、65-72. 4. B16黒色腫: Yangら、Mol. Cancer Ther.、2003、2(1)、65-72. 5. 乳がん: Liangら、Cancer Letters、270(2)、2008、337-341. Liuら、Phytomedicine、2009、16(11)、1006-1013. 6. 子宮頸がん: Wangら、J. Mol. Med.、2006、84(5)、405-15. 7. 胆管がん: Tengchaisriら、Cancer Letters、1998、133(2)、169-175. 8. CML: Louら、Leukemia and Lymphoma、2004、45、373-376. 9. 結腸: Tangら、Postgraduate Medical Journal、2007、83、338-343. 10. 食道がん: Boultrら、B. J. Cancer、2008、89、1985-92. 11. 線維肉腫: Kiviharjuら、Clinical Cancer Research、2002、8、2666-2674. 12. Miyataら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、2005、336(4)、1081-6. 13. 胃がん: Jiang、Oncogene、2001、20(55)、8009-18. 14. Yangら、Mol. Cancer Ther.、2003、2(1)、65-72. 15. 多形神経膠芽腫: Linら、J. Int. Med. Res.、2007、35(4)、490-6. 16. Kapoor、Int. J. Mol. Med.、2008、22(4)、489-96. 17. ヒト前立腺上皮細胞: Kiviharjuら、2002、Clinical Cancer Research、8、2666-2674. 18. AMLを含む白血病: Carterら、Blood、2006、108(2)、630-7. 19. 多発性骨髄腫: Yinjunら、Leuk. Res.、2005、29(1)、99-105. 20. 神経芽細胞腫: Antonoffら、Surgery、2009、146(2)、282-90. 21. 非ホジキンリンパ腫

10

20

30

40

50

: Zhangら、Acta Pharmacologica Sinica、2006、27、1438-1446. 22. 非小細胞肺癌: Changら、The Journal of Biological Chemistry、276、2221-2227. 23. 骨肉腫: Wangら、Pediatr. Blood Cancer、2008、51(6)、754-9. 24. 卵巣がん: Westfallら、Chemotherapy、2008、54(1)、67-76. 25. 膵臓がん: Wangら、J. Mol. Med. 2006、84(5)、405-15. Zhouら、World J. Gastroenterol. 2008、14(10)、1504-1509. Wangら、Clinical Cancer Research 2007、13、4891. Phillips、Salujaら、Cancer Res. 2007.、扁平上皮癌: Miyataら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005、336(4)、1081-6. 26. 甲状腺癌: Zhuら、Oncol Rep. 2009、22(6)、1397-401. 27. 子宮頸癌: Miyataら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005、336(4)、1081-6. 28. 尿路上皮がん: Matsuiら、Oncogene、(2008) 27、4603-4614).

10

【0105】

以下の文書は、トリプトリドおよびがん以外の疾患に向けられる(1. 複数の疾患: D Quira、Drug R&D、2003、4、1-16. 2. 臓器移植: Chen、Leukemia and Lymphoma、2001、42、253-256. 3. 腎臓移植: Zhangら、Journal of Ethnopharmacology、2009、125(1)、141-46. 4. 移植片の生存(皮膚): Yangら、Int. J. Immunopharmac. 1992、14、963-969. 5. 移植片対宿主病: Chenら、Transplantation、2000、70、1442-1447. 6. 炎症性疾患および自己免疫疾患: P. E. Lipskyら、Seminars in Arthritis and Rheumatism、1997、5、713-723. 7. 自己免疫脳脊髄炎: Kizelsztejnら、Journal of Neuroimmunology、2009、217、28-37. 8. 脳虚血/再灌流傷害: Weiら、Neural Regeneration Research、2007. 9. 大腸炎: Weiら、Clin. Immunol. 2008、129、211-218. 10. 雄および雌における避妊: Hikimら、Journal of Andrology、2000、21、431-437. Huynhら、Journal of Andrology、2000、21、689-699. Wangら、Asian Journal of Andrology、1999、1、121-125. Lueら、Journal of Andrology、1998、19、479-486. 11. 角膜潰瘍: Luら、Investigative Ophthalmology and Visual Science、2006、47、3796-3800. 12. 肺の炎症: Krishnaら、2001、Am. J. Pathol. 2001、158(3)、997-1004. 13. 腎炎: Taoら、Arthritis Rheum. 2008、58(6)、1774-83. 14. パーキンソニズムおよび神経保護: Zhouら、Neurobiology of Disease、2005、18、441-449. 15. 多発性嚢胞腎疾患(PKD): Leuenrothら、PNAS、2007、104、4389-4394. 16. 脊髄修復: Suら、Glia 2010、58、901-915. 17. ステンツのコーティング: Q. Luo 2005、特許出願20050043788).

20

30

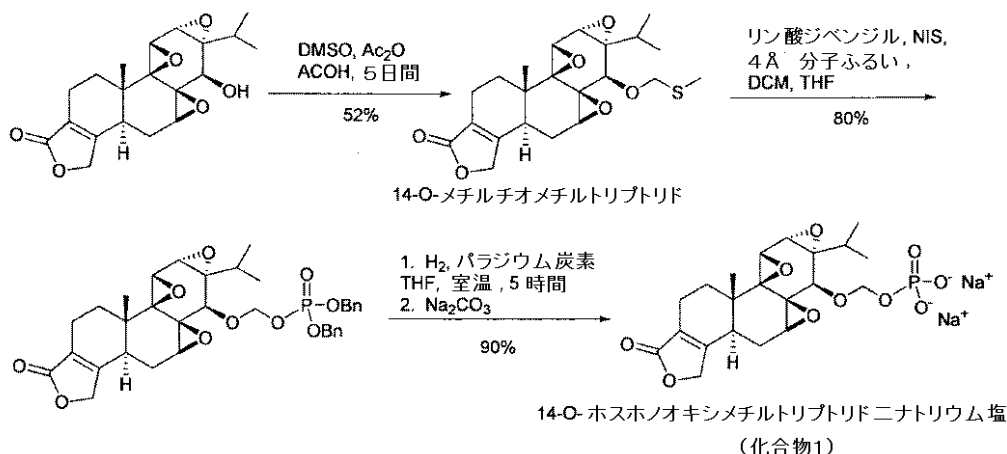
40

【実施例】**【0106】**

本発明を、以下の制限しない実施例によって説明する。

【0107】

【化10】



10

実施例1：14-O-ホスホノオキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩（化合物1）の合成

テトラヒドロフラン（5 mL）中の14-O-ホスホノオキシメチルトリプトリドジベンジルエステル（50 mg、0.08 mmol）の溶液に、パラジウム炭素（10%、10 mg）を加えた。その混合物を、室温で水素（1気圧）下において、3時間撹拌した。CELTITETMを通したる過によって触媒を除去し、そしてろ液を炭酸ナトリウム水物の溶液（3 mLの水に8.9 mg、0.076 mmol）で処理した。テトラヒドロフランを減圧化で蒸発させ、そして残った水溶液を、エーテルで抽出した（3 × 3 mL）。水層を蒸発させて乾燥し、そして得られた固体を真空下で一晩乾燥させ、エーテルで洗浄し、そして再び真空下で乾燥させて、14-O-ホスホノオキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩（35 mg、収率90%）を白色粉末として得た。

20

【0108】

【数1】

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 0.81 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.00 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.03 (s, 3H), 1.35 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 2.00 (dd, 1H, *J*₁ = 14.7 and *J*₂ = 13.4 Hz), 2.08-2.61 (m, 4H), 2.85 (m, 1H), 3.63 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 3.81 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 3.86 (s, 1H), 4.12 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 4.92 (m, 2H), 5.07 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 12.9, 16.0, 16.3, 16.5, 22.3, 25.5, 28.9, 35.2, 39.8, 55.4, 56.1, 61.0, 61.5, 65.1, 65.5, 71.9, 77.6, 91.7, 123.8, 164.2, 177.3 ppm

30

; (C₂₁H₂₆O₁₀P) に関して計算されたHRMSはm/z [M+1]⁺ 469.1264を必要とし、m/z 469.1267を見出した。

【0109】

14-O-ホスホノオキシメチルトリプトリドジベンジルエステルの調製

工程1:

酢酸（5 mL、87.5 mmol）中のトリプトリド（100 mg、0.29 mmol）、およびDMSO（1.5 mL、21.4 mmol）中の無水酢酸（1 mL、10.5 mmol）の溶液を調製し、そして室温で5日間撹拌して、14-O-メチルチオメチルトリプトリド中間体を産生した。次いでその反応混合物を水（100 mL）に注ぎ、そして分割して加えた固体NaHCO₃で中和した。その混合物を酢酸エチルで抽出し（50 mL × 3）、そして合わせた有機抽出物を、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して産物を油として提供した。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（3:2ヘキサン/酢酸エチル）は、52%（60 mg）の14-O-メチルチオメチルトリプトリドを、白色の泡として提供した。

40

【0110】

50

【数 2】

 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.82

(d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.00 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.09 (s, 3H), 1.20 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.93 (dd, 1H, $J_1 = 14.7$ and $J_2 = 13.4$ Hz), 2.19 (s, 3H), 2.10-2.42 (m, 4H), 2.68 (m, 1H), 3.24 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 3.51 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.67 (s, 1H), 3.79 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 4.68 (m, 2H), 4.93 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz), 5.07 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 13.6, 14.8, 16.8, 17.0, 17.1, 23.4, 26.3, 29.5, 35.8, 40.4, 54.5, 55.0, 58.0, 61.5, 63.9, 64.4, 69.9, 75.8, 76.7, 125.5, 160.2, 173.2 ppm

10

; ($\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{SNa}$) に関して計算された HRMS は m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^{+} 443.1505$ を必要とし、 m/z 443.1507 を見出した。

【0111】

工程 2:

N_2 雰囲気下の、乾燥塩化メチレン (2 mL) 中の 14 - O - メチルチオメチルトリプトリド (50 mg、0.12 mmol) の溶液を、粉末活性炭 4 分子ふるい (50 mg) と合わせ、続いてテトラヒドロフラン (2 mL) 中のリン酸ジベンジル (40 mg、0.14 mmol) および N - ヨードスクシンイミド (32 mg、0.14 mmol) の混合物を加えた。その反応混合物を、室温で 5 時間攪拌し、ろ過し、そして塩化メチレン (20 mL) で希釈した。得られた溶液を、チオ硫酸ナトリウムの溶液 (2 mL、1 M 溶液)、炭酸水素ナトリウムの飽和溶液、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、そして真空中で濃縮した。油性の残留物を、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (1:2 ヘキサン/酢酸エチル) によって精製して、14 - O - ホスホノオキシメチルトリプトリドジベンジルエステル (62 mg、収率 80%) を、白色の泡として得た。

20

【0112】

【数 3】

 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.72 (d, 3H, $J = 6.8$

Hz), 0.89 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.05 (s, 3H), 1.27 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.82 (dd, 1H, $J_1 = 14.7$ and $J_2 = 13.4$ Hz), 2.03-2.35 (m, 4H), 2.64 (m, 1H), 3.14 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 3.46 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.65 (s, 1H), 3.76 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 4.65 (m, 2H), 5.02 (m, 4H), 5.27 (m, 1H), 5.47 (m, 1H), 7.34 (m, 10H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 13.6, 16.8, 17.0, 23.3, 26.2, 29.62, 29.67, 35.7, 40.3, 54.7, 55.2, 59.3, 61.1, 63.6, 64.0, 69.36, 69.39, 69.42, 69.45, 69.9, 78.2, 92.9, 93.0, 125.5, 127.9, 128.0, 128.6, 135.5, 135.6, 160.1, 173.2 ppm

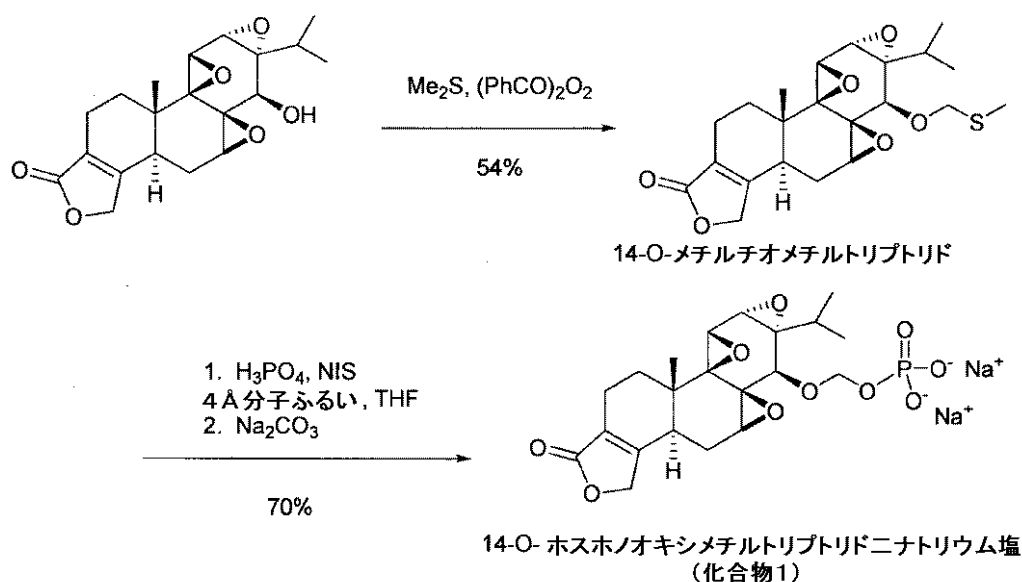
30

; ($\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{O}_{10}\text{PNa}$) に関して計算された HRMS は m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^{+} 673.2179$ を必要とし、 m/z 673.2176 を見出した。

【0113】

40

【化 1 1】



10

実施例 2 : 14 - O - ホスホノキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩 (化合物 1) の合成

20

0 で THF (10 mL) 中に 14 - O - メチルチオメチルトリプトリド (50 mg、0.12 mmol)、リン酸 (82 mg、0.84 mmol)、および分子ふるい (4、0.45 g) を含む溶液に、N - ヨードスクシンイミド (41 mg、0.18 mmol) を加え、そしてその混合物を、室温で 1 時間撹拌した。その反応混合物を、Celite を通してろ過し、そして固体を THF で洗浄した。ろ液を、無色になるまで 1 M の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で処理し、そしてそのろ液を炭酸ナトリウムの溶液 (3 mL の水中 13 mg、0.12 mmol) で処理した。そのろ液を減圧下で蒸発させ、そして残った水溶液をエーテルで抽出した (3 × 3 mL)。水層を蒸発させて乾燥し、そして得られた残留物を水中 0 - 100 % のメタノールの勾配で溶出するクロマトグラフィー (C18) によって精製し、14 - O - ホスホノキシメチルトリプトリド二ナトリウム塩 (43 mg、収率 70 %) を無色の粉末として得た。

30

【0114】

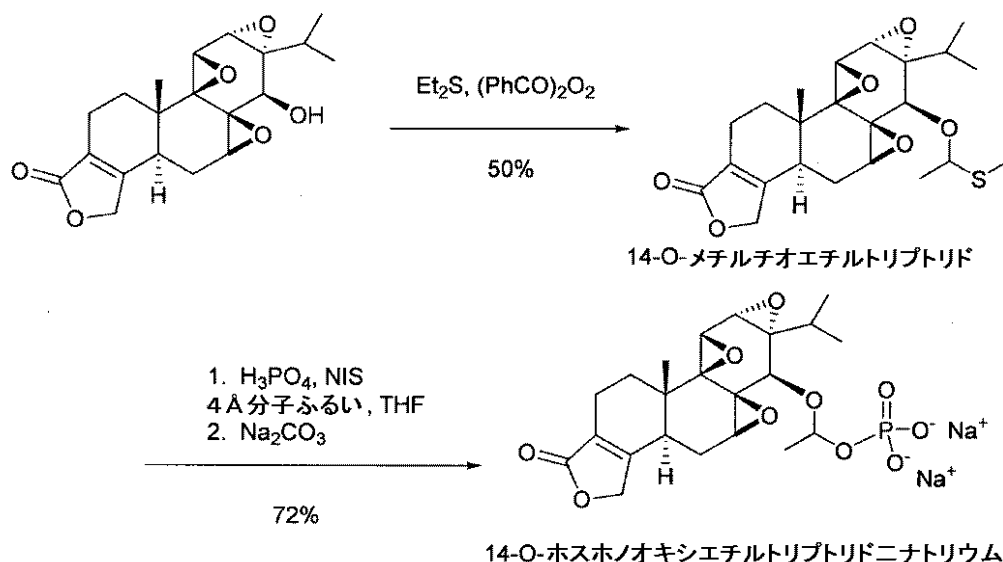
14 - O - メチルチオメチルトリプトリドの調製

0 でアセトニトリル (10 mL) 中のトリプトリド (100 mg、0.28 mmol) および硫化メチル (0.16 mL、2.24 mmol) の溶液に、過酸化ベンゾイル (0.27 g、1.12 mmol) を、等しく 4 つに分割して 20 分かけて加え、そして次いでその混合物を 0 で 1 時間、そしてその後室温で 1 時間撹拌した。その混合物を酢酸エチルで希釈し、そして 10 % Na_2CO_3 および次いでブラインで洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、ろ過し、そして蒸発させた。残留物をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (1 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル) によって精製し、14 - O - メチルチオメチルトリプトリド (63 mg、収率 54 %) を無色の粉末として提供した。

40

【0115】

【化 1 2】



10

実施例 3 : 14 - O - ホスホノオキシエチルトリプトリド二ナトリウム塩の合成

0 で THF (10 mL) 中に 14 - O - メチルチオエチルトリプトリド (52 mg、0.12 mmol)、リン酸 (82 mg、0.84 mmol)、および分子ふるい (4、0.45 g) を含む溶液に、N - ヨードスクシンイミド (41 mg、0.18 mmol) を加え、そしてその混合物を室温で 1 時間撹拌した。その反応混合物を、Celite を通してろ過し、そしてその固体を THF で洗浄した。ろ液を、それが無色になるまで 1 M の Na₂S₂O₃ で処理し、そしてそのろ液を、炭酸ナトリウム溶液 (3 mL の水中 13 mg、0.12 mmol) で処理した。そのろ液を減圧下で蒸発させ、そして残った水溶液をエーテルで抽出した (3 × 3 mL)。水層を蒸発させて乾燥し、そして得られた残留物を、水中 0 - 100 % のメタノールの勾配で溶出するクロマトグラフィー (C18) によって精製して、14 - O - ホスホノオキシエチルトリプトリド二ナトリウム塩 (46 mg、収率 72 %) を、無色の粉末として得た。

20

【 0 1 1 6】

30

【数 4】

¹H NMR

(400 MHz, D₂O) δ 0.68 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.70 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.03 (s, 3H), 1.21 (m, 1H), 1.57 (d, 3H, *J* = 5.3 Hz), 1.58 (m, 1H), 1.94 (dd, 1H, *J*₁ = 14.7 and *J*₂ = 13.4 Hz), 2.08-2.61 (m, 4H), 2.62 (m, 1H), 3.27 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 3.45 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 3.72 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 3.79 (s, 1H), 4.63 (m, 2H), 6.43 (q, 1H, *J* = 5.3 Hz) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 13.5, 16.9, 17.0, 17.1, 21.4, 23.5, 26.8, 29.5, 35.9, 40.3, 54.0, 55.1, 59.4, 61.2, 63.6, 64.2, 69.8, 75.8, 76.5, 91.6, 125.6, 164.2, 177.2 ppm

40

; (C₂₂H₂₈O₁₀P) に関して計算された HRMS は、*m/z* [M + 1]⁺ 483.1137 を必要とし、*m/z* 483.1134 を見出した。

【 0 1 1 7】

14 - O - メチルチオエチルトリプトリドの調製

0 でアセトニトリル (10 mL) 中のトリプトリド (100 mg、0.28 mmol) および硫化エチル (0.24 mL、2.24 mmol) の溶液に、過酸化ベンゾイル (0.27 g、1.12 mmol) を、等しく 4 つに分割して 20 分かけて加え、そして次いで混合物を 0 で 1 時間、そして次いで室温で 1 時間撹拌した。その混合物を酢酸エチルで希釈し、そして 10 % Na₂CO₃ および次いでブラインで洗浄した。有機相を Mg

50

SO₄で乾燥し、ろ過し、そして蒸発させた。残留物をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー（1：1ヘキサン/酢酸エチル）によって精製し、14-O-メチルチオエトリプトリド（60mg、収率50%）を無色の粉末として得た。

【0118】

【数5】

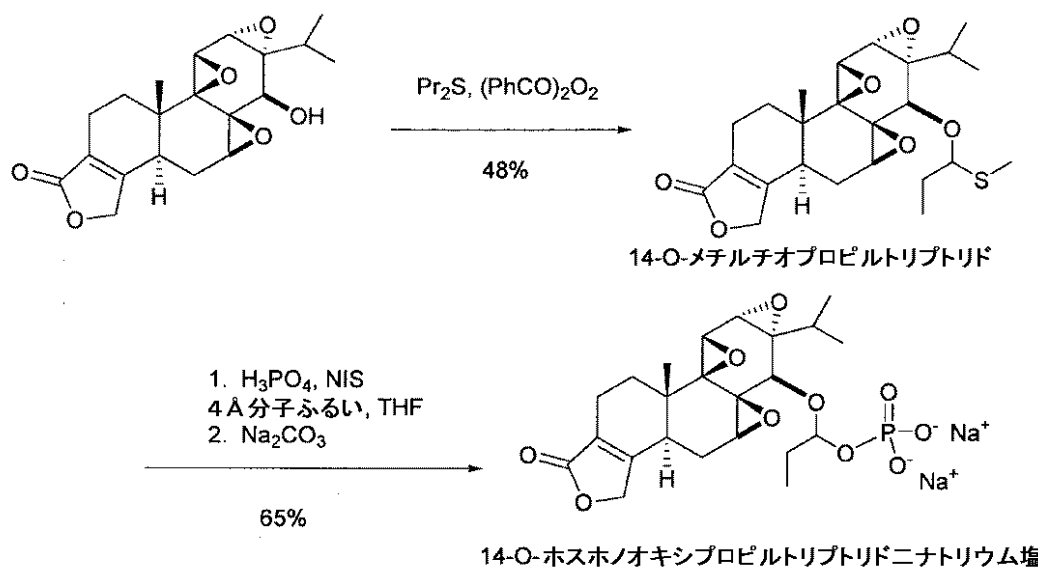
¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ 0.68 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.70 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.04 (s, 3H), 1.20 (m, 1H), 1.57 (d, 3H, *J* = 5.3 Hz), 1.59 (m, 1H), 1.88 (dd, 1H, *J*₁ = 14.7 and *J*₂ = 13.4 Hz), 2.19 (s, 3H), 2.06-2.27 (m, 4H), 2.62 (m, 1H), 3.24 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz), 3.42 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 3.70 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 3.73 (s, 1H), 4.61 (m, 2H), 5.02 (q, 1H, *J* = 5.3 Hz) ppm; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 13.6, 14.8, 16.9, 17.0, 17.1, 21.0, 23.5, 26.4, 29.6, 35.8, 40.5, 54.0, 55.2, 59.4, 61.3, 63.7, 64.2, 69.9, 75.8, 76.7, 125.6, 160.2, 173.2 ppm

; (C₂₃H₃₀O₆SNa) に関して計算されたHRMSは、*m/z* [M + Na]⁺ 457.1763を必要とし、*m/z* 457.1765を見出した。

【0119】

【化13】



実施例4：14-O-ホスホノオキシプロピルトリプトリド二ナトリウム塩の合成

0でTHF（10mL）中に14-O-メチルチオプロピルトリプトリド（54mg、0.12mmol）、リン酸（82mg、0.84mmol）、および分子ふるい（4、0.45g）を含む溶液に、N-ヨードスクシンイミド（41mg、0.18mmol）を加え、そしてその混合物を室温で1時間撹拌した。その反応混合物を、Celiteを通してろ過し、そしてその固体をTHFで洗浄した。ろ液を、それが無色になるまで1MのNa₂S₂O₃で処理し、そしてそのろ液を、炭酸ナトリウム溶液（3mLの水に13mg、0.12mmol）で処理した。そのろ液を減圧下で蒸発させ、そして残った水溶液をエーテルで抽出した（3×3mL）。水層を蒸発させて乾燥し、そして得られた残留物を、水中0-100%のメタノールの勾配で溶出するクロマトグラフィー（C18）によって精製して、14-O-ホスホノオキシプロピルトリプトリド二ナトリウム塩（43mg、収率65%）を、無色の粉末として得た。

【0120】

【数 6】

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 0.66 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.68 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.99 (t, 3H, $J = 5.3$ Hz), 1.03 (s, 3H), 1.20 (m, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.90 (dd, 1H, $J_1 = 14.7$ and $J_2 = 13.4$ Hz), 2.04-2.66 (m, 4H), 2.65 (m, 3H), 3.27 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 3.49 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.71 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.78 (s, 1H), 4.69 (m, 2H), 6.31 (q, 1H, $J = 5.3$ Hz) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 7.55, 13.5, 16.2, 16.9, 17.2, 20.8, 23.2, 26.1, 28.4, 34.7, 38.5, 54.1, 55.0, 59.0, 61.3, 62.5, 63.9, 68.5, 75.4, 76.4, 91.9, 125.7, 160.1, 174.5 ppm

10

; ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_{10}\text{P}$) に関して計算された H R M S は、 m/z [$\text{M} + 1$] $^{+} 497.1294$ を必要とし、 m/z 497.1292 を見出した。

【0121】

14 - O - メチルチオプロピルトリプトリドの調製

0 でアセトニトリル (10 mL) 中のトリプトリド (100 mg 、 0.28 mmol) および硫化プロピル (0.32 mL 、 2.24 mmol) の溶液に、過酸化ベンゾイル (0.27 g 、 1.12 mmol) を、等しく4つに分割して20分かけて加え、そしてその混合物を0 で1時間、そして次いで室温で1時間撹拌した。その混合物を酢酸エチルで希釈し、そして10% Na_2CO_3 および次いでブラインで洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、ろ過し、そして蒸発させた。残留物をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (1 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル) によって精製し、14 - O - メチルチオプロピルトリプトリド (60 mg 、 収率 48%) を無色の粉末として得た。

20

【0122】

【数 7】

^1H NMR (400 MHz,

CDCl_3) δ 0.65 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.67 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.99 (t, 3H, $J = 5.3$ Hz), 1.01 (s, 3H), 1.20 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.88 (dd, 1H, $J_1 = 14.7$ and $J_2 = 13.4$ Hz), 2.18 (s, 3H), 2.01-2.26 (m, 4H), 2.62 (m, 3H), 3.24 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 3.42 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.70 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 3.73 (s, 1H), 4.61 (m, 2H), 5.03 (q, 1H, $J = 5.3$ Hz) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 7.68, 13.5, 14.6, 16.2, 17.0, 17.2, 21.4, 23.2, 26.1, 28.9, 34.7, 39.5, 54.1, 55.6, 59.0, 61.3, 63.5, 64.0, 69.5, 75.1, 76.4, 125.1, 160.9, 173.5 ppm

30

; ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{SNa}$) に関して計算された H R M S は、 m/z [$\text{M} + \text{Na}$] $^{+} 471.1920$ を必要とし、 m/z 471.1918 を見出した。

【0123】

実施例 5 : 式 I の化合物の化学的性質

本発明の化合物の化学的性質を評価した。化合物の水溶性および化学的安定性を測定した。pH を 7.4 に調整した、実施例 1 の化合物の溶液を用いて、室温における溶解性を 61.4 mg / mL と決定した。本発明の化合物の安定性を、室温で、Tris 緩衝液 (pH 7.4) およびホウ酸塩緩衝液 (pH 7.4) 溶液中で評価した。1ヶ月後、実施例 1 の化合物の分解は観察されなかった。その結果を以下の表にまとめる。

40

表 1 式 I の化合物の物理化学的 (physicochemical) 性質

【0124】

【表 1】

化合物	溶解性 (mg/mL) Tris 緩衝液、 室温	化学的 安定性 (t _{1/2}) Tris 緩衝液、 室温	化学的 安定性 (t _{1/2}) 、 ホウ酸塩緩衝液、 室温	酵素的 加水分解 (t _{1/2}) 、 アルカリ ホスファターゼ、37 °C
実施例 1/2 の化合物	61.4	*	*	2分
実施例 3 の化合物	>50	*	*	9分
実施例 4 の化合物	>50	*	*	17分

* 1 ヶ月後、分解は観察されなかった。

【0125】

実施例 6：化合物 1 のインビトロ酵素的変換

化合物 1 を、酵素アルカリホスファターゼの作用によって活性なトリプトリド形態に変換する。本発明のトリプトリドプロドラッグ化合物の生物変換を研究するためのインビトロ実験を行った。インビトロ生物変換を、グリシン緩衝液 (pH 9.8) 中で、アルカリホスファターゼ (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri)) から入手可能な、ウシ腸管粘膜由来、VII-S 型) を用いてシミュレートした。

【0126】

アルカリホスファターゼは、主に肝臓 (アイソザイム ALP-1) および骨 (アイソザイム ALP-2) において見出される酵素のグループであり、少量が小腸の裏打ち細胞 (cellular lining) (アイソザイム ALP-3)、胎盤、および腎臓によって産生される。アルカリホスファターゼは、リンを分離させてアルカリ性の pH を生じる。アルカリホスファターゼに加えて他の酵素も、インビボでの加水分解に同様に寄与し得る。

【0127】

図 3 から、トリプトリドプロドラッグ形態の量の減少が、放出された活性形態のトリプトリドの量の比例した増加と一致していることを見る事ができる。さらに、その変換が比較的短時間に起こり、大部分の変換が最初の 10 分間に起こったことが観察された。

【0128】

残留濃度対インキュベーション時間を適合させる (fitting) ことによって、一次分解定数を計算した。化合物 1 の分解半減期 (t_{1/2}) を、2 分と決定した。

【0129】

実施例 7：比較インビトロ細胞生存能研究

トリプトリド、トリプトリドのプロドラッグ (化合物 1)、およびコントロール (トリプトリドまたはそのプロドラッグ形態無し) を用いて、比較インビトロ細胞生存能を評価するための実験を行った。細胞生存能を、Dojindo Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Rockville, Maryland から入手可能) を用いて決定した。膵臓がん細胞を、ウェルあたり 2 × 10³ 細胞で、96 穴プレートに播種し、そして一晩接着させた。次いでその細胞を、様々な濃度の本発明のプロドラッグトリプトリド (化合物 1) および天然トリプトリドで、24 時間および 48 時間処理した。テトラゾリウム基質 (10 μl) を、プレートの各ウェルに加えた。プレートを、37 °C で 1 時間インキュベートし、その後 460 nm における吸光度を測定した。各実験を 3 組で行い、そして独立に 3 回繰り返した。

【0130】

膵臓がん細胞の生存能に対する化合物 1 およびトリプトリドの効果を、50 から 200 nmol/L の範囲の濃度でプロドラッグトリプトリドを含む培地中で、24 時間および 48 時間インキュベーションした後に観察した。データを集め、そして図 4 (48 時間における Mia-Paca の細胞生存能)、図 5 (24 および 48 時間における Panc-

10

20

30

40

50

1の細胞生存能)、および図6(24および48時間におけるS2VP10の細胞生存能)のチャートに変換した。

【0131】

上記のデータおよび図のそれぞれから見出し得るように、トリプトリドプロドラッグおよびアルカリホスファターゼおよび天然形態トリプトリドの存在は、インビトロにおける脾臓細胞生存能を、時間および用量依存的な方式で有意に抑制した。

【0132】

実施例8: マウスにおける化合物1の比較インビボ研究

胸腺欠損nu/nu系統の30匹のヌードマウスを、National Cancer Institute (NCI) (Rockville, Maryland) から得て、
そしてRAR施設で維持した。そのマウスを、ケタミン75~200mg/kgおよびキシラジン4~8mg/kgを用いて、RAR施設の推奨に従って麻酔した。腹壁の左側に、3mmの小さい切開を行い、そして脾臓を露出させそして接近するために十分遠くへ脾臓を鉗子で引き出した。MiaPaca-2細胞培地を調製し、そしてマウスへ送達するまで氷上で維持した。マウスのそれぞれに、MATRIGELTM (Becton-Dickinson Corporation, Franklin Lakes, New Jersey から入手可能) に懸濁した100万個のMiaPaca-2細胞を、Hamiltonシリンジを用いて、脾臓の尾部(脾臓との解剖学的な結合によって同定する)に注射した。細胞の送達後に、MATRIGELTMを定着させるために、シリンジをさらに5-10秒間固定した。脾臓を腹腔に戻し、そして連続的な方式でvicryl縫合糸によって腹壁を閉鎖した。皮膚を並置し、そして創傷クリップを用いて閉鎖した。次いでマウスを、ケージへ戻す前に、完全に回復するまで加温したパッドに移した。呼吸抑制を予防するために、術後痛の薬剤(ブプレノルフィン0.1mg/kg)を、麻酔から完全に回復した後すぐに腹腔内に投与し、そして次いで12時間ごとに2日間投与した。創傷クリップを、手術から7日後にマウスから除去した。

【0133】

次いでマウスを、各群が10匹のマウスである3群に無作為化した。その群は以下のようであった: コントロール群、トリプトリド群、およびトリプトリドプロドラッグ(化合物1)群。コントロール群は、ビークルDMSOを腹腔内に注射したマウスから成っていた。トリプトリド群の被験動物には、DMSOに溶解し、そしてリン酸緩衝化生理食塩水で100μlの体積に希釈したトリプトリド0.2mg/kgを注射し、その腹腔内注射は60日間にわたって毎日であった。化合物1の被験動物は、100μlの体積に希釈した、リン酸緩衝化生理食塩水に溶解した0.28mg/kgの化合物を、60日間毎日注射した。

【0134】

マウスを、60日の処置の終了にあたって、麻酔下で安楽死させた。サンプルを採取し(血液、肺、脾臓、肝臓、腎臓、および腫瘍組織)、そして腫瘍体積および重量を測定し、そして異なる群の間で比較した。局所の(loco-regional)増殖およびがん増殖を観察した。

【0135】

図7(コントロール群の写真)、図8(トリプトリド群の写真)、および図9(実施例1のトリプトリドプロドラッグ群の写真)は、インビボ実験のマウスの各群由来の、最終的な腫瘍の増殖を示す写真の集合である。図10は、各群由来のマウスから取り、そして各群に対応する列にならべた、切除した腫瘍の集合の写真である。

【0136】

未処置コントロール群から切除した腫瘍は、他の2群から切除したものよりも、60日目においてかなり大きく、このことは、脾臓腫瘍細胞の連続した活動的増殖を示した。対照的に、実施例1の化合物群は、未処置コントロール群と比較して、かなりの脾臓腫瘍増殖阻害を示し、そして天然形態のトリプトリドと比較して、実質的に有効な腫瘍細胞阻害を示した。3つの群それぞれの間の腫瘍重量および腫瘍体積の比較を示す、図11および

図12を参照すると、コントロール群の腫瘍は、トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）群の腫瘍データと比較して、重量（g）および体積（ cm^3 ）のどちらに關してもかなり大きかった。

【0137】

従って、インビボにおいて生きた哺乳動物に投与した場合、本発明のトリプトリドプロドラッグ化合物は、腫瘍の増殖を有効に阻害し得、そして阻害効果は天然の非プロドラッグ形態のトリプトリドに匹敵する。上記のデータおよび図から見出し得るように、天然トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ（化合物1）で60日間処置したマウスにおける膵臓がんの腫瘍増殖は、未処置のコントロール群と比較して、有意な腫瘍体積の抑制を示した。さらに、トリプトリドおよびトリプトリドプロドラッグ群両方の被験動物において、体重に明らかに有意な影響がなく、そして被験動物において明らかな毒性の徴候がなかったことは重要であった。従って、本発明の化合物は、腫瘍の阻害を提供し得、そして、がん細胞の増殖、そして特に膵臓がん細胞の増殖を阻害し得る。さらに、本発明の化合物はまた、生きた哺乳動物において、低毒性の副作用で、膵臓がんを阻害するための有効な処置の基礎を提供し得る。

【0138】

実施例9：化合物1は膵臓がんの同所性マウスモデルにおいて腫瘍の退縮を誘導した（60日間投与試験）

MIA PaCa-2細胞（ 1×10^6 ）を、マトリゲルに懸濁し、そして4-6週齢のメスヌードマウスの膵臓の尾部に注射した。細胞移植の10日後、マウスに、示した濃度の化合物1（0.1、0.15、0.3、0.6、または0.9 mg/kg）または0.2 mg/kgのトリプトリドを毎日60日間腹腔内注射した。コントロールマウスに、生理食塩水を1日2回注射した。60日後に処置を停止し、そして屠殺する前にさらに28日間マウスを観察した。もしあるなら、腫瘍サンプルをこれらのマウスから採取し、そして腫瘍重量および体積を測定した。もし腫瘍量（tumor burden）がUniversity of Minnesota動物飼育ガイドラインを超えるなら、より早い時点でマウスを屠殺し、そしてその腫瘍を採取した。図13は、ピークルに対して化合物1およびトリプトリドで処置したマウスの増強した生存を示す。図14は、ピークルに対して化合物1で処置したマウスの増強した生存を示す。図15は、コントロールマウスに対して、化合物1で処置したマウスの、腫瘍体積または腫瘍重量によって測定された、腫瘍量の減少を示す。

【0139】

実施例10：化合物1は膵臓がんの同所性マウスモデルにおいて腫瘍の退縮を誘導した（21日間投与試験）

1×10^6 細胞の高度に転移性の膵臓がん細胞系統であるS2013を、マトリゲルに懸濁し、そして4-6週齢のメスヌードマウスの膵臓の尾部に注射した。細胞移植の7日後、マウスに0.42 mg/kgの化合物1を21日間腹腔内注射した。処置を21日後に停止し、そしてマウスを屠殺した。もしあるなら、腫瘍サンプルをこれらのマウスから採取し、そして腫瘍重量および体積を測定した。もし腫瘍量がUniversity of Minnesota動物飼育ガイドラインを超えるなら、マウスを屠殺し、そしてより早い時点でその腫瘍を採取した。コントロールマウスに生理食塩水を毎日注射した。図16は、コントロールマウスに対して、化合物1で処置したマウスの、腫瘍体積または腫瘍重量によって測定された、腫瘍量の減少を示す。

【0140】

実施例11：化合物1は、胆管がんの皮下マウスモデルにおいて腫瘍の退縮を誘導した。

【0141】

SkChA-1細胞（ 5×10^5 ）を、マトリゲルに懸濁し、そして4-6週齢のメスヌードマウスの左側腹部に皮下注射した。細胞移植の7日後、マウスに0.3 mg/kgの化合物1を1日2回25日間腹腔内注射した。この時点で処置を停止し、そしてマウス

を屠殺した。もしあるなら、腫瘍サンプルをこれらのマウスから採取し、そして腫瘍重量および体積を測定した。もし腫瘍量がUniversity of Minnesota動物飼育ガイドラインを超えるなら、マウスを屠殺し、そしてより早い時点でその腫瘍を採取した。コントロールマウスに生理食塩水を1日2回注射した。図17は、コントロールマウスに対して、化合物1で処置したマウスの、腫瘍体積または腫瘍重量によって測定された、腫瘍量の減少を示す。

【0142】

実施例12：トリプトリドは、神経芽細胞腫の同所性マウスモデルにおいて腫瘍の退縮を誘導した。

【0143】

神経芽細胞腫N2細胞(1×10^6)を、マトリゲルに懸濁し、そして4～6週齢のA/J免疫応答性マウスの左後腹膜部に注射した。細胞移植の3日後、マウスに0.4 mg/kgのトリプトリドを21日間腹腔内注射した。この時点で処置を停止し、そしてマウスを屠殺した。もしあるなら、腫瘍サンプルをこれらのマウスから採取し、そして腫瘍重量および体積を測定した。もし腫瘍量がUniversity of Minnesota動物飼育ガイドラインを超えるなら、マウスを屠殺し、そしてより早い時点でその腫瘍を採取した。コントロールマウスにDMSOを21日間注射した。図18は、腫瘍体積および腫瘍重量(tumor mass)によって測定された、コントロールマウスに対するトリプトリドで処置したマウスにおける腫瘍量の減少を示す。

【0144】

実施例13：トリプトリドは、神経芽細胞腫細胞において細胞死およびカスパーゼ(caspase)-3の活性化を誘導した。

【0145】

神経芽細胞腫N2aおよびSKNSH細胞を、トリプトリドで処理し、N2aにおいて用量および時間依存的な細胞殺滅を引き起こし、24時間で62.5 nMのトリプトリドによって50%超の細胞が殺滅され、そして48時間で250 nMのトリプトリドによって約85%の細胞が殺滅された(図19)。トリプトリドはアポトーシス経路によって神経芽細胞腫の細胞死を引き起こすという仮説を確認するために、アポトーシスのマーカーとしてカスパーゼ-3活性を測定した。両方の細胞系統において、より高いトリプトリドの用量およびより長い処置期間でカスパーゼ活性が増加した。トリプトリド処置は、カスパーゼ-3活性レベルの用量依存的および時間依存的な増加と関連していた(図20)。これらの結果は、トリプトリドによる細胞死は、アポトーシスの誘導によって起こることを示唆する。

【0146】

実施例14：以下は、ヒトにおける治療的または予防的使用のための、式Iの化合物(「化合物X」)を含む、代表的な医薬品剤形を示す。

【0147】

10

20

30

【表 2 - 1】

(i) 錠剤 1		mg/錠
化合物	X=	0.5
ラクトース		77.5
ポビドン		15.0
クロスカルメロースナトリウム		12.0
微晶性セルロース		92.5
ステアリン酸マグネシウム		<u>3.0</u>
		185

(ii) 錠剤 2		mg/錠
化合物	X=	1.0
微晶性セルロース		410.0
デンプン		50.0
デンプングリコール酸ナトリウム		15.0
ステアリン酸マグネシウム		<u>5.0</u>
		481

10

【 0 1 4 8 】

【表 2 - 2】

<u>iii) カプセル</u>	<u>mg/カプセル</u>
化合物 X=	2.0
コロイド性二酸化ケイ素	1.5
ラクトース	465.5
α 化デンプン	120.0
ステアリン酸マグネシウム	3.0
	468

<u>(iv) 注射 1 (1 mg/ml)</u>	<u>mg/ml</u>
化合物 X=	0.5
第二リン酸ナトリウム	12.0
第一リン酸ナトリウム	0.7
塩化ナトリウム	4.5
1.0 N 水酸化ナトリウム溶液 (8.2-9.0にpH調整)	適量
注射用水	1 mL まで適量

10

<u>(v) 注射 1 (1 mg/ml)</u>	<u>mg/ml</u>
化合物 X=	1
第二リン酸ナトリウム	12.0
第一リン酸ナトリウム	0.7
塩化ナトリウム	4.5
1.0 N 水酸化ナトリウム溶液 (8.2-9.0にpH調整)	適量
注射用水	1 mL まで適量

20

<u>(vi) 注射 2 (10 mg/ml)</u>	<u>mg/ml</u>
化合物 X=	2
第一リン酸ナトリウム	0.3
第二リン酸ナトリウム	1.1
ポリエチレングリコール400	200.0
0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 (8.2-9.0にpH調整)	適量
注射用水	1 mL まで適量

30

上記の処方物を、薬学分野で周知の従来の手順によって得ることができる。

【 0 1 4 9 】

全ての出版物、特許、および特許文書は、個々に参考文献に組み込まれたかのように、本明細書中で参考文献に組み込まれる。本発明は、様々な特定のおよび好ましい実施態様および技術に関して記載された。しかし、本発明の意図および範囲内にとどまりながら、多くの変更および修飾をし得ることが理解されなければならない。

40

【図 1】

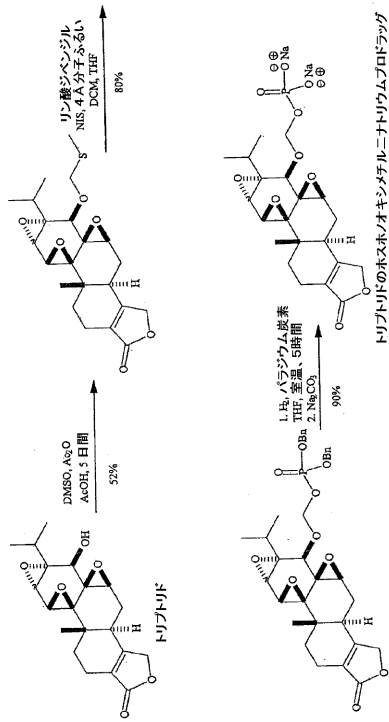
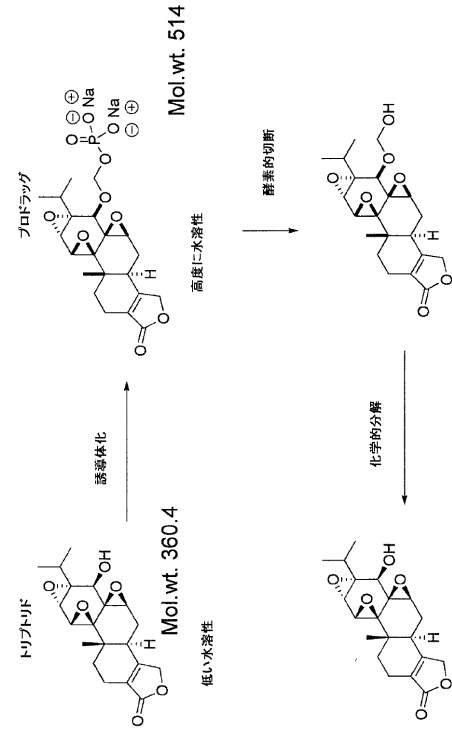


FIG. 1

【図 2】

トリプトリドプロドラッグ (化合物 1) の代謝
および酵素切断



【図 3】

トリプトリドプロドラッグ (化合物 1) のトリプトリドへのインビトロ変換

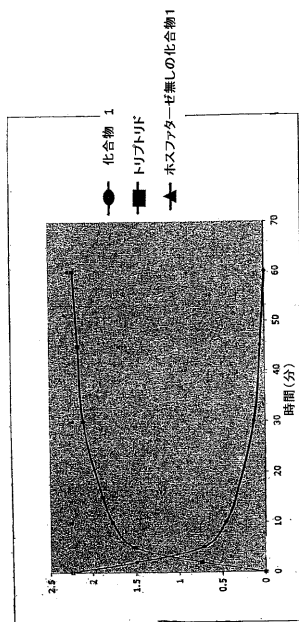


FIG. 3

【図 4】

48時間の曝露後の生存能に対する効果

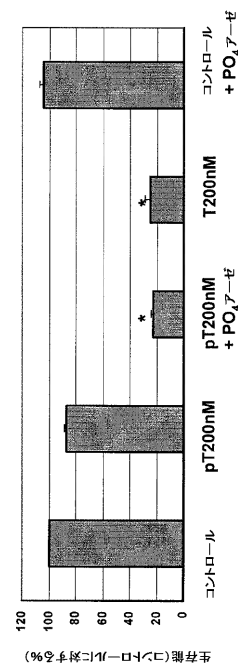


FIG. 4

【図 5】

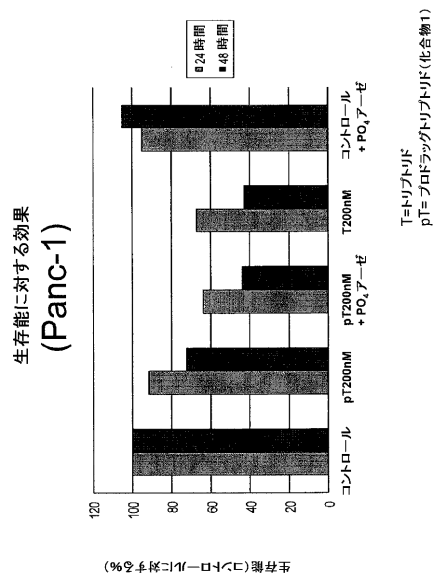


FIG. 5

【図 6】

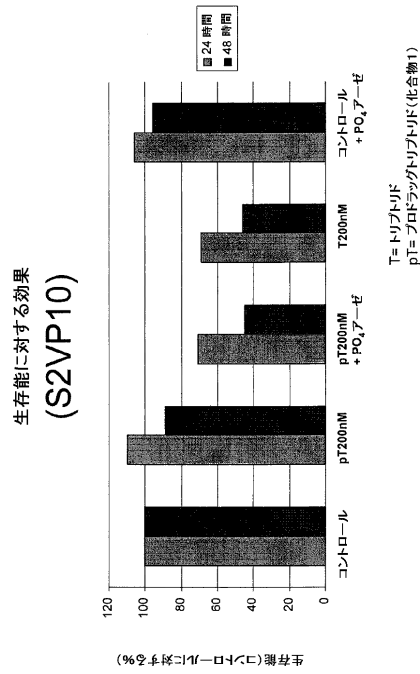


FIG. 6

【図 11】

腫瘍重量を比較するインビボ実験

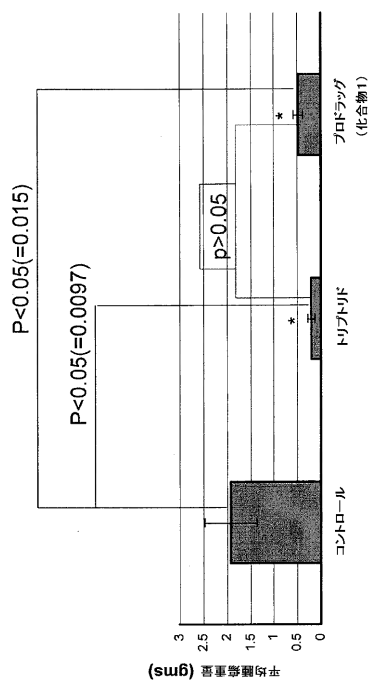


FIG. 11

【図 12】

腫瘍体積を比較するインビボ実験

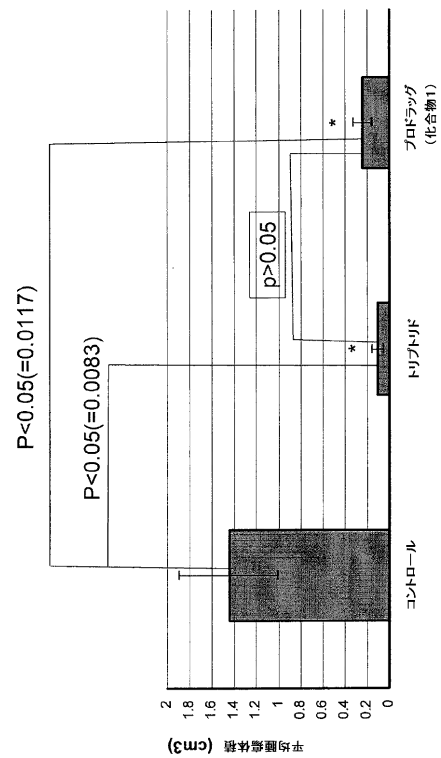
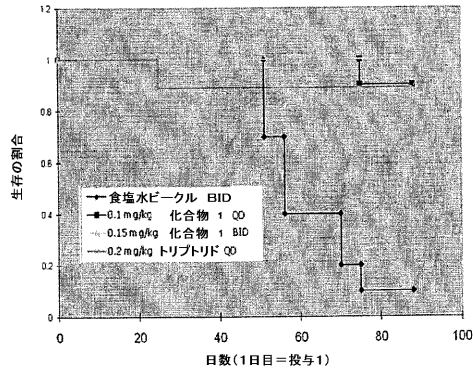


FIG. 12

【図 13】

Figure 13. 化合物1で処置された マウスまたはコントロールマウスの生存分析



ビークル BID: 全ての死亡は腫瘍量による

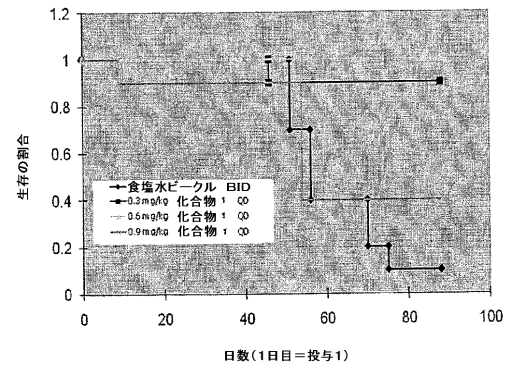
0.1mg/kg 化合物1 QD: 腫瘍量による1例の死亡が観察された

0.15mg/kg 化合物1 BID: 死亡無し

0.2mg/kg 化合物1 QD: 腫瘍量または薬剤の効果とは関係ない、傷害による1例の死亡

【図 14】

Figure 14. 化合物1で処置された マウスまたはコントロールマウスの生存分析



ビークル BID: 全ての死亡は腫瘍量による

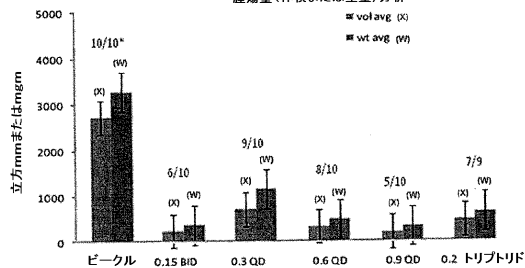
0.3mg/kg 化合物1 QD: 腫瘍量と関係ない、傷害による1例の死亡

0.6mg/kg 化合物1 QD: 死亡無し

0.9mg/kg 化合物1 QD: 試験6日目の注射において1例の死亡、原因不明。
残りの死亡は薬剤の効果による。

【図 15】

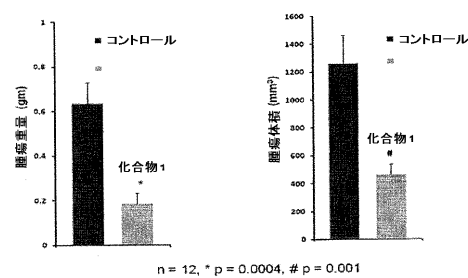
Figure 15. 化合物1で処置された マウスまたはコントロールマウスの腫瘍量(体積または重量)分析



* 腫瘍を有するマウスの数/群内のマウスの数

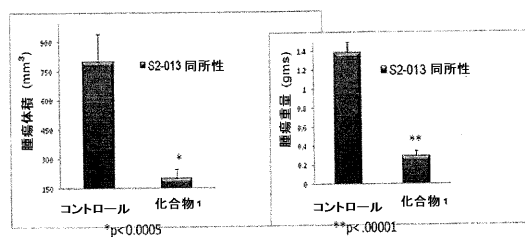
【図 17】

Figure 17. 化合物1で処置された マウスまたはコントロールマウスの腫瘍量(体積または重量)分析



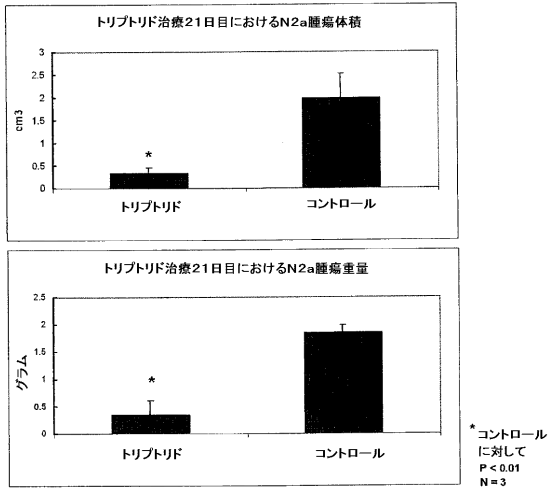
【図 16】

Figure 16. 化合物1で処置された マウスまたはコントロールマウスの腫瘍量(体積または重量)分析



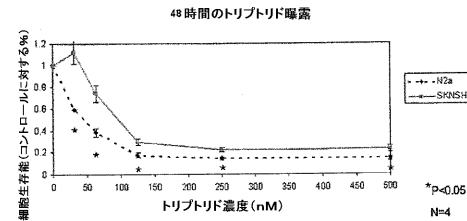
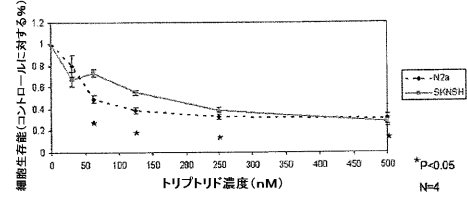
【図 18】

Figure 18. 化合物1で処置されたマウスまたはコントロールマウスの腫瘍量(体積または重量)分析



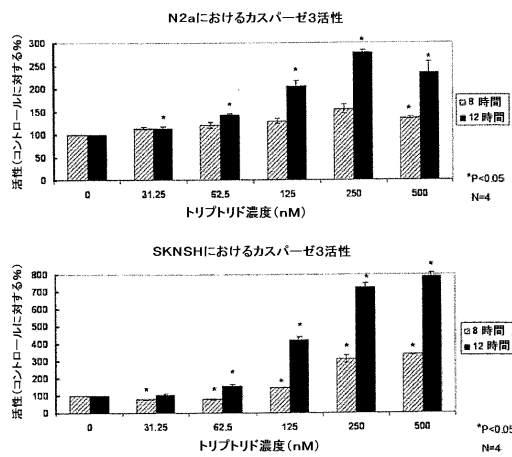
【図 19】

図19はトリプトリド存在下における細胞生存能を示す(神経芽細胞腫N2aおよびSKNSH) 24時間のトリプトリド曝露



【図 20】

図20はトリプトリド存在下におけるカスパーゼ3活性を示す



【図 7】



FIG. 7

【図 8】

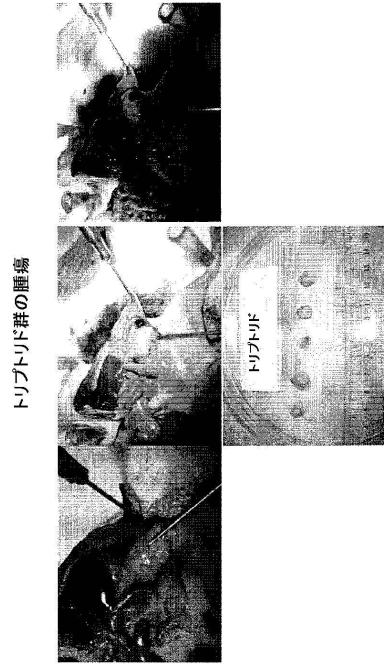


FIG. 8

【図 9】

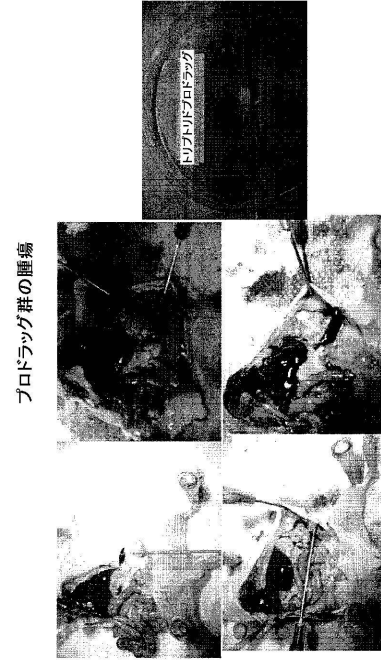


FIG. 9

【図 10】

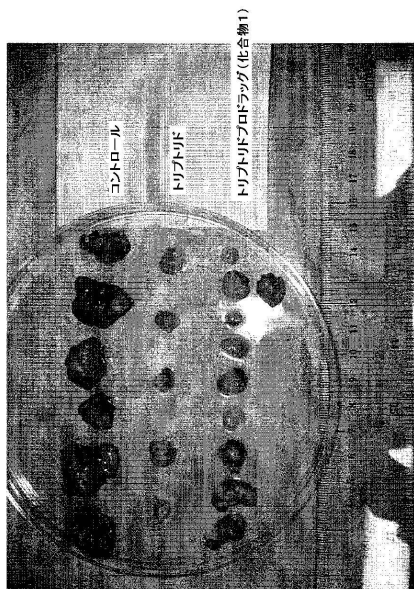


FIG. 10

フロントページの続き

- (72)発明者 ゲオルグ, イングリッド グンダ
アメリカ合衆国 ミネソタ 55114-8658, セント ポール, ウェストゲート ドラ
イブ 1000, スイート 160
- (72)発明者 パティル, サティシュ ブラカシュ
アメリカ合衆国 ミネソタ 55114-8658, セント ポール, ウェストゲート ドラ
イブ 1000, スイート 160
- (72)発明者 サルジャ, アショク ケー.
アメリカ合衆国 ミネソタ 55114-8658, セント ポール, ウェストゲート ドラ
イブ 1000, スイート 160
- (72)発明者 チュー, ロイト
アメリカ合衆国 ミネソタ 55114-8658, セント ポール, ウェストゲート ドラ
イブ 1000, スイート 160
- (72)発明者 ビッカーズ, セルウィン エム.
アメリカ合衆国 ミネソタ 55114-8658, セント ポール, ウェストゲート ドラ
イブ 1000, スイート 160

合議体

審判長 中田 とし子

審判官 富永 保

審判官 齊藤 真由美

- (56)参考文献 特表2006-503831(JP,A)
特表2005-528442(JP,A)
特表2004-517882(JP,A)
特表2002-522443(JP,A)
特表2005-514431(JP,A)
国際公開第2008/014602(WO,A1)
国際公開第2009/016269(WO,A1)
国際公開第2007/025031(WO,A2)
PHILLIPS, P. A. et al., Triptolide Induces Pan
creatic Cancer Cell Death via Inhibition of
Heat Shock Protein 70, Cancer Research, 2007
年, Vol. 67, No. 19, p. 9407-9416

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C Aplus(STN)、REGISTRY(STN)