

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-517045

(P2004-517045A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 J 63/00

C 0 7 J 63/00

4 C 0 8 6

A 6 1 K 31/565

A 6 1 K 31/565

4 C 0 9 1

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/00

4 H 0 0 6

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 1/02

4 H 0 3 9

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 11/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-521491 (P2002-521491)

(86) (22) 出願日 平成13年8月15日 (2001.8.15)

(85) 翻訳文提出日 平成15年2月17日 (2003.2.17)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/025581

(87) 国際公開番号 W02002/016395

(87) 国際公開日 平成14年2月28日 (2002.2.28)

(31) 優先権主張番号 60/226, 536

(32) 優先日 平成12年8月16日 (2000.8.16)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503063593

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
ザ ユニバーシティ オブ イリノイ
アメリカ合衆国 61801 イリノイ
アーバナ サウス ライト ストリート
506 アドミニストレーション ビルデ
ィング 352

(71) 出願人 503063560

アドバンスト ライフ サイエンシーズ
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 60439 イリノイ
レモント サウス ニュー アベニュー
12305

(74) 代理人 100065868

弁理士 角田 嘉宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌およびHIVの治療用ベツリン酸誘導体のプロドラッグ

(57) 【要約】

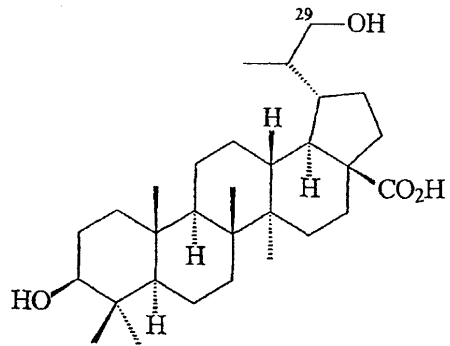
植物由来の化合物および誘導体のプロドラッグを使用して、腫瘍成長を予防または阻害する、より詳細には、悪性腫瘍を治療する組成物および方法を開示する。本方法では、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体を含む組成物を、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体が i n v i v o で腫瘍部位に放出するプロドラッグ形態で投与する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

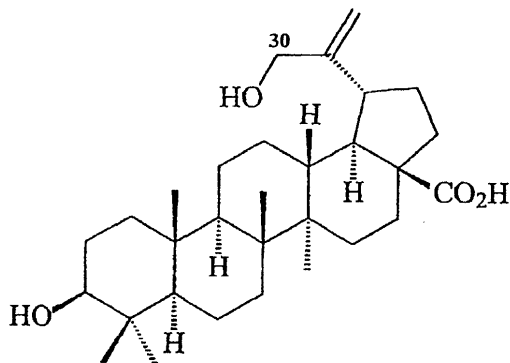
(a) 式：

【化 1】



10

または、



20

を有する化合物の治療有効量および

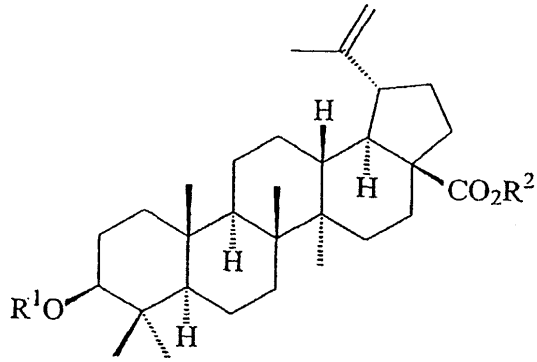
(b) 任意選択的なキャリアを含む、腫瘍成長治療用化合物。

【請求項 2】

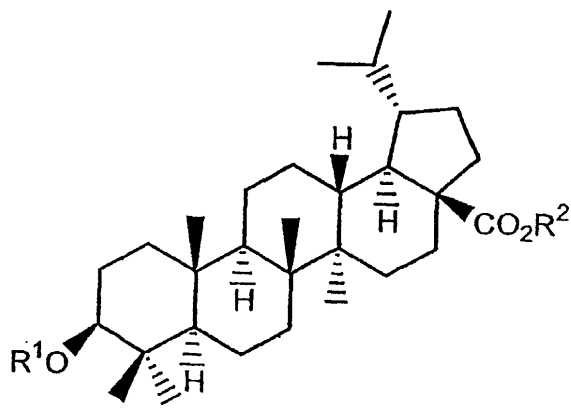
(a)

30

【化 2】

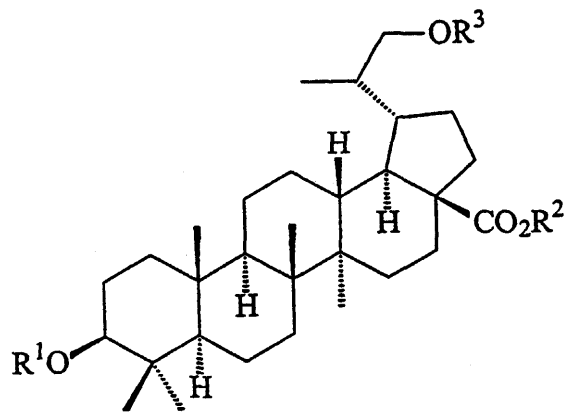


10



20

【化 3】

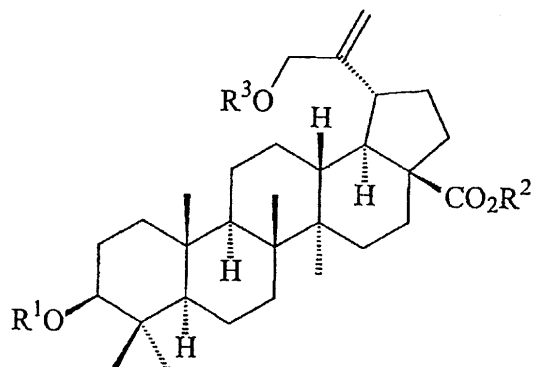


30

および

40

【化 4】



10

(式中、 R^1 および R^3 は、独立して、水素、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim 3 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $COCH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $CO(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_nC_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCO_2C_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCCO_2C_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、および SO_3H からなる群から選択され、 R^2 は、水素、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}NR^4R^5$ 、 $CH_2OCCO_2C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、 SO_3H 、 $CH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、および $(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_nC_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ からなる群から選択され、 R^4 および R^5 は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、およびアリールからなる群から選択されるか、 R^4 および R^5 が共に 5 ~ 7 員環を形成することができ、

20

n は 1 ~ 10 である) からなる群から選択される、ベツリン酸またはその誘導体およびその薬学的に許容可能な塩のプロドラッグ、および

(b) 任意選択的なキャリアを含む、腫瘍成長治療用組成物。

【請求項 3】

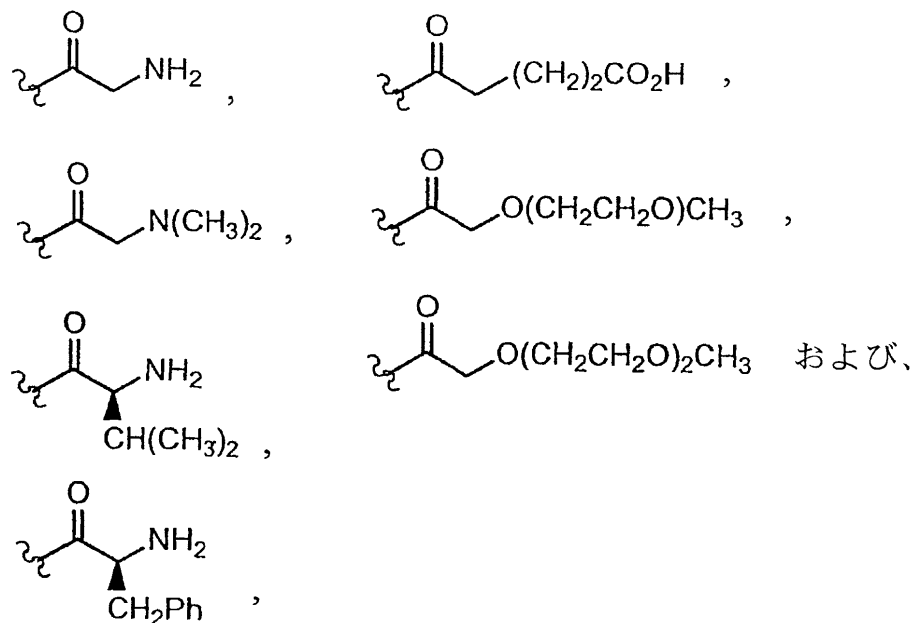
少なくとも 1 つの R^1 、 R^2 、および R^3 は水素であり、少なくとも 1 つの R^1 、 R^2 、および R^3 は水素と異なる、請求項 2 に記載の組成物。

30

【請求項 4】

R^1 、 R^2 、および R^3 は、

【化 5】



10

(式中、Phは C_6H_5 である)からなる群から選択される、請求項2に記載の組成物。

20

【請求項5】

少なくとも1つの R^1 、 R^2 、および R^3 は $\text{PO}(\text{OH})_2$ であり、残りの R^1 、 R^2 、および R^3 は水素である、請求項2に記載の組成物。

【請求項6】

少なくとも1つの R^1 、 R^2 、および R^3 は $\text{CH}_2\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ である、請求項2に記載の組成物。

【請求項7】

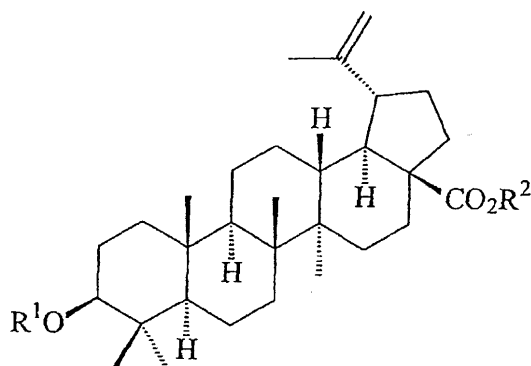
少なくとも1つの R^1 、 R^2 、および R^3 は SO_3H であり、残りの R^1 、 R^2 、および R^3 は水素である、請求項2に記載の組成物。

【請求項8】

構造：

30

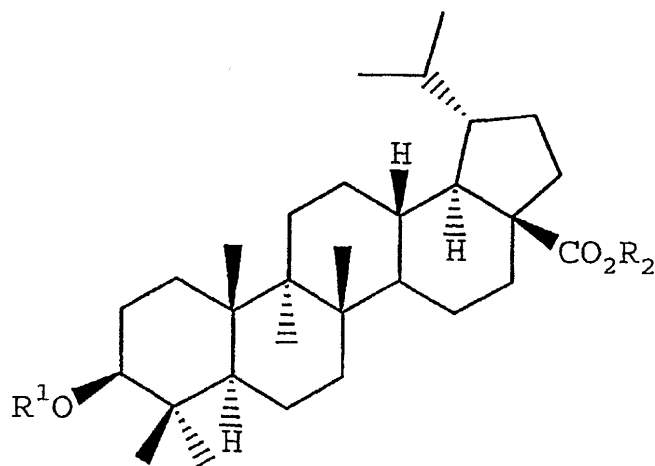
【化 6】



40

または、

【化 7】



(式中、 R^1 は、水素、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim 3 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $COCH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $CO(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_n$ 、 $C_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCO_2C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCCO_2C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、および SO_3H からなる群から選択され、

R² は、水素、C₁ ~ C₆ アルキル、CH₂ C₆ H₅、C₁ ~ C₆ アルキル NR⁴ R⁵、CH₂ OCOC₁ ~ C₆ アルキル、PO(OH)₂、SO₃ H、CH(C₆ H₅) NR⁴ R⁵、(C₁ ~ C₆ アルキル) CO₂ R⁴、および (C₁ ~ C₆ アルキル) O(CH₂ C₆ H₅)_n C₁ ~ C₃ アルキルからなる群から選択され、

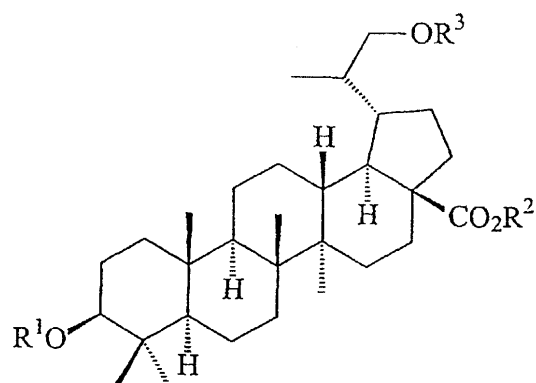
R⁴ および R⁵ は、独立して、水素、C₁ ~ C₆ アルキル、CO (C₁ ~ C₆ アルキル)、およびアリアルからなる群から選択されるか、R⁴ および R⁵ が共に 5 ~ 7 員環を形成することができ、

n は 1 ~ 10 である（但し、少なくとも 1 つの R^1 および R^2 が H と異なる））を有する化合物およびその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 9】

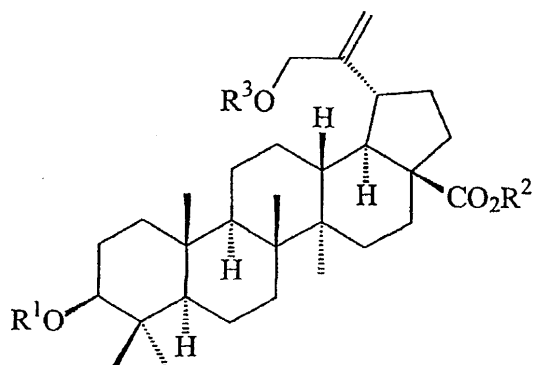
構造：

【化 8】



または、

【化 9】



10

(式中、 R^1 および R^3 は、独立して、水素、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim 3 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $COCH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_nC_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCO_2C_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCOC_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、および SO_3H からなる群から選択され、 R^2 は、水素、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}NR^4R^5$ 、 $CH_2OCOC_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、 SO_3H 、 $CH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、および $(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_nC_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ からなる群から選択され、 R^4 および R^5 は、独立して、水素、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、およびアリールからなる群から選択されるか、 R^4 および R^5 が共に 5 ~ 7 員環を形成することができ、

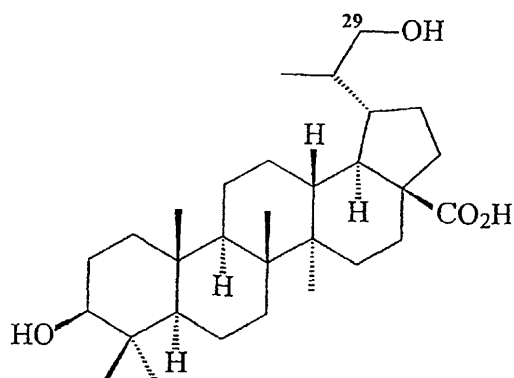
20

n は 1 ~ 10 である) を有する化合物およびその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 10】

前記化合物が、構造：

【化 10】

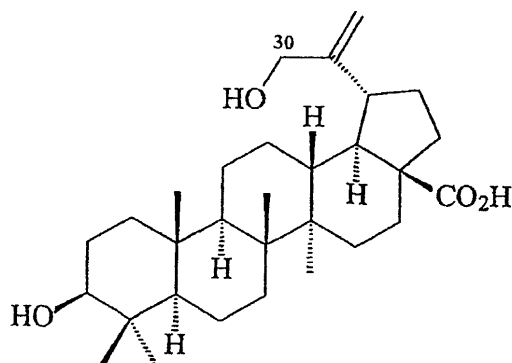


30

または、

40

【化 1 1】



10

を有する、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 1 1】

本明細書中に記載の化合物であって、化合物 2、3、4 a ~ 4 j、5 a ~ 5 g、6 a ~ 6 g、7、8、9、10 a、10 b、11 a ~ 11 g、12 a ~ 12 g、13、14 a ~ 14 c、15 a ~ 15 c、22、23、26、27 a ~ 27 i、28 a ~ 28 i として示される化合物、ならびにその塩。

【請求項 1 2】

治療有効量の請求項 1 1 に記載の化合物を必要とする個体に投与する工程を含む、ベツリ 20
ン酸またはベツリン酸誘導体に感受性を示す癌の治療法。

【請求項 13】

前記癌が、黒色腫、扁平上皮腫瘍、乳がん、大腸癌、肉腫、ヒト口腔表皮癌、ホルモン依存性乳癌、前立腺癌、肺癌、神経膠腫、黒色腫、および神経芽腫からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

治療有効量のベツリン酸のプロドラッグまたはベツリン酸誘導体のプロドラッグを必要とする個体に投与する工程を含む、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体に感受性を示す癌の治療法。

【請求項 15】

前記癌が、黒色腫、扁平上皮腫瘍、乳がん、大腸癌、肉腫、ヒト口腔表皮癌、ホルモン依存性乳癌、前立腺癌、肺癌、神経膠腫、黒色腫、および神経芽腫からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プロドラッグを、局所的、静脈内、または腹腔内投与する、請求項 14 に記載の方法

【請求項 17】

治療有効量の請求項 11 に記載の化合物を必要とする個体に投与する工程を含む、HIV の治療法。

【請求項 18】

治療有効量のベツリン酸のプロドラッグまたはベツリン酸誘導体のプロドラッグを必要とする個体に投与する工程を含む、HIVの治療法。

【請求項 19】

前記プロドラッグを、局所的、静脈内、または腹腔内投与する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 11 に記載の化合物および薬学的に許容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 2 1】

治療有効量の請求項 11 に記載の化合物およびキャリアを含む組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体に感受性を示す癌の治療法。

50

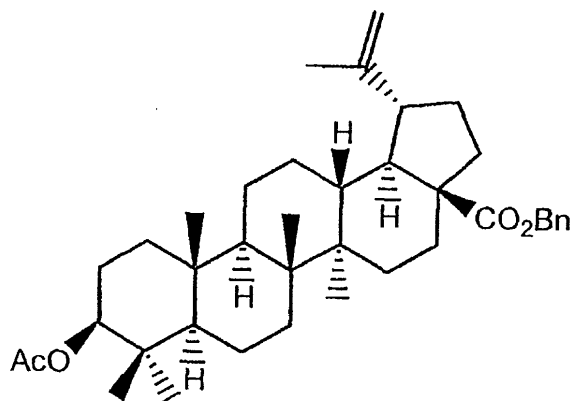
【請求項 2 2】

治療有効量の請求項 1 1 に記載の化合物およびキャリアを含む組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、H I V の治療法。

【請求項 2 3】

(a) 構造 :

【化 1 2】



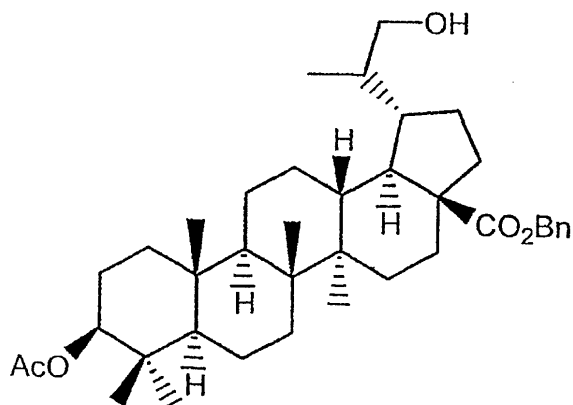
10

を有する保護ベツリン酸を BH_3 - ジメチルスルフィドでヒドロホウ素化する工程と、

(b) 塩基性条件下で工程 (a) の反応生成物を酸化して構造 :

20

【化 1 3】



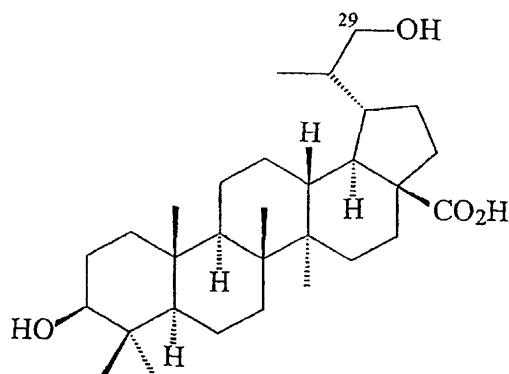
30

を有する C - 2 9 アルコールを得る工程と、

(c) 工程 (b) の生成物の C - 3 アセート基を加水分解する工程と、

(d) 工程 (c) の生成物の C - 2 8 ベンジルエステル基を触媒下で水素化分解する工程とを含む、構造 :

【化 1 4】



40

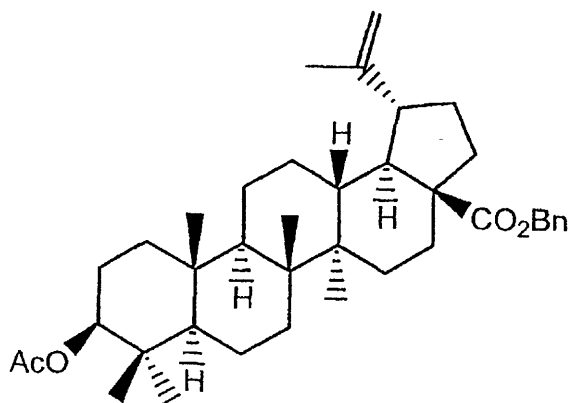
を有する化合物の調製法。

50

【請求項 24】

(a) 二酸化セレン触媒および t - ブチルヒドロペルオキシドを使用して、構造：

【化 15】



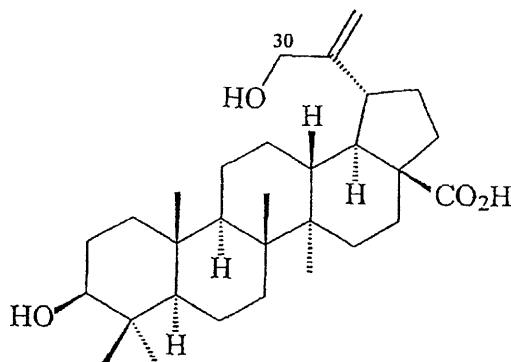
10

を有する化合物を酸化する工程と、

(b) 工程 (a) の生成物の C - 3 アセテート基を加水分解する工程と、

(c) 工程 (b) の生成物の C - 28 ベンジルエステル基を触媒下で水素化分解する工程とを含む、構造：

【化 16】



20

30

を有する化合物の調製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2000年8月18日に提出された米国特許仮出願第60/226,536号の利益を主張する。

(発明の分野)

本発明は、植物由来の化合物およびその誘導体、特にベツリン酸およびベツリン酸誘導体のプロドラッグを使用した、腫瘍の阻害、より詳細には黒色腫などの悪性腫瘍の治療のための組成物および方法に関する。

40

(発明の背景)

過去40年間で、黒色腫の発症率は任意の他の癌型よりも急速に増加している。現在、白人アメリカ90人あたり1人が悪性黒色腫を発症していると推定されている。手術が十分に有効なほど早期に黒色腫と診断される割合が増加し、90%を超える十年生存率を達成している一方で、約7000人の転移性黒色腫個体が米国で毎年死亡している。

【0002】

手術摘出に適応しない転移性黒色腫を罹患した患者の治療選択肢は限られている。5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼニル)-1-H-イミダゾール-4-カルボキシアミド (ダカルバジン、DTIC) は、全体的応答率が24%である、黒色腫の最も有効な化学

50

療法単剤である。しかし、D T I Cに対する応答は、一般に持続性が非常に低い。他の合成および組換え薬（N, N' - ビス（2 - クロロエチル） - N - ニトロソ尿素（カルムスチン、B C N U）、シスプラチン、タモキシフェン、インターフェロン（I N F - ））、およびインターロイキン2（I L - 2）を含む）との併用療法は、いくつかの試験では応答率がより高い（例えば、30 ~ 50 %）が、持続的で完全な応答率は稀であり、毒性が増大する。連続化学療法もまた有望であるが、現在の転移性黒色腫罹患個体の治療選択肢では不満足である。

【0003】

天然産物由来の種々の薬物（アドリアマイシン（ドキソルピシン）、ブレオマイシン、エトポシド、およびビンクリスチン、ならびにこれらの誘導体など）が、単剤または併用療法のいずれかとしての黒色腫に対する有効性について試験されている。しかし、合成および組換え化合物と同様に、これらの化合物は応答率が低く、完全な応答は一過性で、毒性が高い。

10

【0004】

それにもかかわらず、公知且つ現在使用されている癌化学療法薬によって示されるように、植物由来天然産物が有効な薬物の供給源として立証されている。このような2つの有用な天然産物の薬物は、パクリタキセル（タキソール）およびカンプトテシンである。セイヨウイチイ Taxus brevifolia Nutt.（イチイ科）の樹皮由来のパクリタキセルが不応性または残留卵巣癌の治療に使用されている。より最近では、臨床試験により、転移性黒色腫治療におけるパクリタキセルの可能な役割が調査されている。単剤として、タキソールは、シスプラチンおよびI L - 2に匹敵する活性を示す。タキソールは固有の作用様式によって機能し、チューブリンの重合を促進する。したがって、タキソールによって媒介される抗腫瘍応答は、その抗有糸分裂活性による。

20

【0005】

第2の卓越した薬物であるカンプトテシンは、中国産の Camptheca acuminata Decaisne（Nyssaceae）の樹皮から単離された。カンプトテシンはまた、新規の作用機構（すなわち、トポイソメラーゼIの阻害）によって機能する。種々の腫瘍に対する水溶性カンプトテシンプロドラッグアナログであるイリノチカン（C P T - 11）の第I I相臨床試験は日本で完了しており、応答率は0 %（リンパ腫）~ 50 %（小細胞肺癌）の範囲であった。トポテカン（別の水溶性カンプトテシンアナログ）は、現在米国で第I I相試験が行われている。

30

【0006】

さらに、研究により、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体が黒色腫に加えて他の癌細胞型（神経芽腫など）を阻害することができることが示された。例えば、Das Guptaらに付与された米国特許第5, 658, 947号は、ベツリン酸はヒト黒色腫の選択的制御または治療に有用であることを開示し、Pezzutoらに付与された米国特許第5, 962, 527号は、黒色腫細胞に対するベツリン酸誘導体の選択的活性を開示している。

【0007】

しかし、癌治療におけるベツリン酸またはベツリン酸誘導体使用に関する不都合は、これらの活性薬の処方および種々の癌治療に適切な投薬形態の獲得で遭遇する問題である。本出願は、不都合の克服および種々の投薬形態への処方が容易であり、且つ in vivo でベツリン酸またはその誘導体が放出される有用なベツリン酸およびその誘導体のプロドラッグの獲得に関する。

40

（発明の要旨）

本発明は、腫瘍成長の予防または阻害のための方法および組成物に関する。活性化合物は、ベツリン酸またはその誘導体を in vivo で生成するベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグである。ベツリン酸は、Ziziphus mauritiana の樹皮から抽出物を調製する工程およびベツリン酸を単離する工程とを含む方法によって得られる天然産物である。あるいは、ベツリンを、抽出物から単離することができ、その

50

後ベツリン酸を一連の合成工程によってベツリンから調製する。

【0008】

ベツリン酸を、ヒト癌細胞株の被験体パネルにおいてヒト黒色腫に対する選択的細胞傷害プロフィールを媒介する工程と、モニターとして培養ヒト黒色腫細胞(MEL-2)を使用した生物活性プロフィールに基づくバイオアッセイ特異的分別を行う工程と、活性化合物としてベツリン酸を得る工程によって抽出物から単離することができる。得られたベツリン酸を使用して腫瘍成長を予防または阻害するか、誘導体に変換して腫瘍成長を予防または阻害することができる。

【0009】

ベツリン酸の物理化学的性質(例えば、高い融点ならびに親水性および疎水性溶媒における限られた溶解性)により、ベツリン酸含有薬理学的処方物の作製は困難である。本発明は、処方が容易であり、内因性酵素により *in vivo* でベツリン酸または誘導体を放出することができる形態のベツリン酸またはベツリン酸誘導体の獲得に関する。

10

【0010】

したがって、本発明の重要な態様は、処方が容易な形態の天然産物由来化合物またはその誘導体を使用した、腫瘍成長の予防または阻害、特に悪性腫瘍成長の予防または阻害のための方法および組成物を提供することである。

【0011】

本発明の別の態様は、治療有効量のベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグの必要とする個体への投与によって、個体におけるベツリン酸およびベツリン酸誘導体の生物学的利用能を改良することである。

20

【0012】

本発明の別の態様は、ベツリン酸またはその誘導体に感受性を示す癌治療と一致した様式(例えば、黒色腫の予防、阻害、もしくは治療のための局所調製物、または他の癌形態のための静脈内もしくは腹腔内調製物)でベツリン酸またはその誘導体を必要とする個体に投与する、癌細胞の成長および拡大を予防するためのベツリン酸またはその誘導体のプロドラッグを利用した治療法を提供することである。

【0013】

本発明のさらに別の態様は、天然産物由来の化合物(例えば、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグ)による合成抗癌薬に関する高い哺乳動物毒性の問題を克服することである。

30

【0014】

本発明のさらに別の態様は、天然に存在する産物またはその誘導体での種々の癌形態を治療するための組成物および方法を提供することである。特に、本発明は、黒色腫、神経芽腫、乳癌、肺癌、線維肉腫、大腸癌、口腔表皮癌、類表皮癌、前立腺癌、ホルモン依存性乳癌、および神経膠腫に関連する悪性腫瘍成長の阻害に関する。

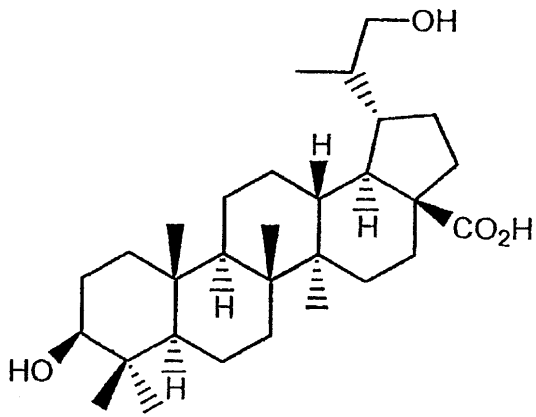
【0015】

特に、本発明の態様は、

【0016】

【化17】

40

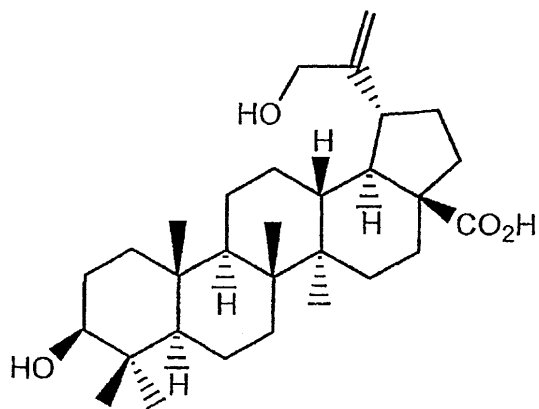


10

および、

【 0 0 1 7 】

【 化 1 8 】



20

【 0 0 1 8 】

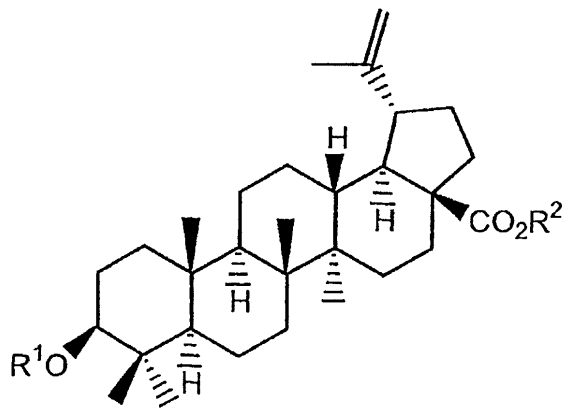
および (b) 選択可能なキャリアを含む、腫瘍成長治療用組成物を提供することである。 30

【 0 0 1 9 】

本発明の別の態様は、

【 0 0 2 0 】

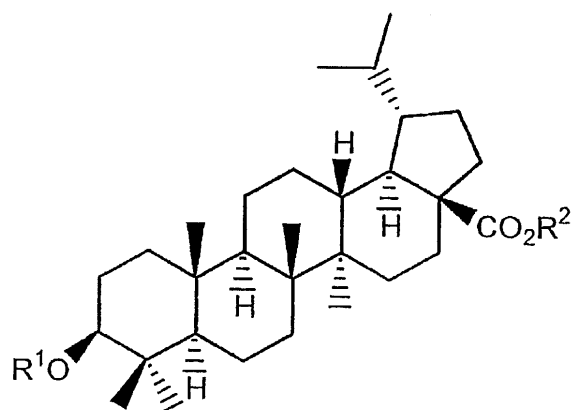
【 化 1 9 】



40

【 0 0 2 1 】

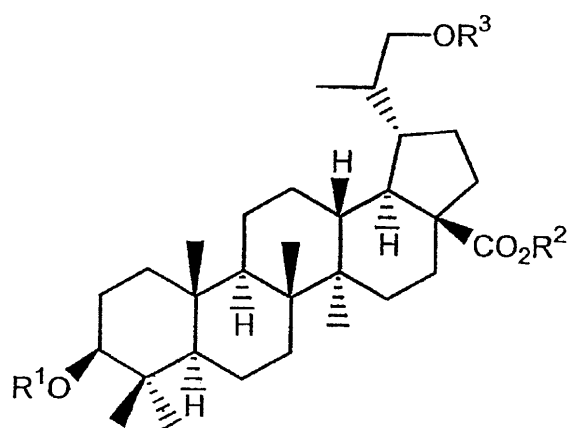
【 化 2 0 】



10

【 0 0 2 2 】

【 化 2 1 】



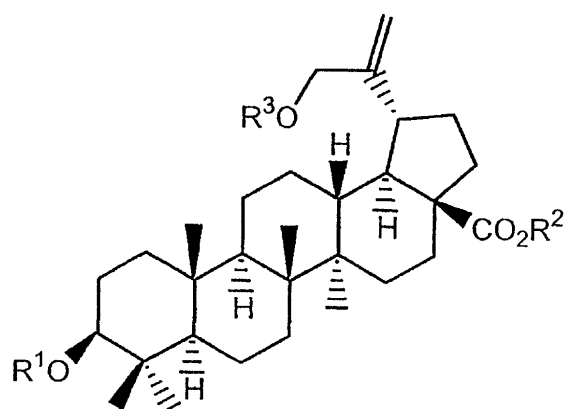
20

および、

【 0 0 2 3 】

【 化 2 2 】

30



40

【 0 0 2 4 】

(式中、 R^1 および R^3 は、独立して、水素、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim 3 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $COCH(C_6H_5)NR^4R^5$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})CO_2R^4$ 、 $CO(C_1 \sim 6 \text{ アルキル})O(CH_2CH_2O)_nC_1 \sim 3 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCO_2C_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2OCC_1 \sim 6 \text{ アルキル}$ 、 $PO(OH)_2$ 、および SO_3H からなる群から選択され、 R^2 は、水素、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $C_1 \sim C_6 \text{ アルキル}NR^4R^5$ 、

50

$\text{CH}_2\text{OCOC}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{PO}(\text{OH})_2$ 、 SO_3H 、 $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NR}^4$
 R^5 、 $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ アルキル})\text{CO}_2\text{R}^4$ 、および $(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ アルキル})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_1 \sim 3$ アルキルからなる群から選択され、
 R^4 および R^5 は、独立して、水素、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $\text{CO}(\text{C}_1 \sim \text{C}_6 \text{ アルキル})$ 、
 およびアリールからなる群から選択されるか、 R^4 および R^5 が共に 5 ~ 7 員環を形成
 することができ、

n は 1 ~ 10 である) ならびにその薬学的に許容可能な塩および (b) 選択可能なキャリアを含む、腫瘍成長治療用組成物を提供することである。

【0025】

本発明の別の態様は、治療有効量のベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグを必要とする個体に投与する工程を含む、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体に感受性を示す癌の治療法を提供することである。特に、癌は、黒色腫、扁平上皮腫瘍、乳がん、大腸癌、肉腫、ヒト口腔表皮癌、ホルモン依存性乳癌、前立腺癌、肺癌、神経膠腫、黒色腫、および神経芽腫からなる群から選択される。

10

【0026】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の本発明の説明から明らかであり、これらの態様は本発明の精神および範囲のいずれも制限することを意図せず、本発明の好ましい実施形態の例示としてのみ提供する。

(好ましい実施形態の詳細な説明)

ベツリン酸 (3 - ヒドロキシ - ラップ - 20 (29) - エン - 28 - オン酸) は、いくつかの高等植物属から単離される天然 5 員環トリテルペン生成物である。ベツリン酸は、ヒト黒色腫に対する顕著な選択的抗腫瘍活性 (E. Pishara, Nature Medicine, 1, 1046 ~ 1051, 1995) および抗 HIV 活性 (T. Fujiohara, J. Nat. Prod., 57, 243 ~ 247, 1994) が証明されている。

20

【0027】

Ziziphus mauritiana Lam. (Rhamnaceae) の樹皮のバイオアッセイ特異的分別により、培養ヒト黒色腫細胞に対して細胞傷害性を示す活性化化合物としてベツリン酸が単離された。ベツリン酸は、in vitro および in vivo でのその特有の細胞障害プロファイルによりヒト黒色腫に対する優れた抗腫瘍化合物であることが見出されている。ベツリン酸は、アポトーシス誘導による黒色腫に対する強力な選択的抗腫瘍活性を示した。

30

【0028】

ベツリン酸はまた、試験した他の癌細胞株に対する活性を有することが認められた。ベツリン酸の細胞傷害性および正常な細胞に対する無毒性は好ましい治療指数を提供する。細胞傷害性が高い細胞株は、A431 (扁平上皮細胞)、BC-1 (乳癌細胞)、ZR-75-1 (ホルモン依存性ヒト乳癌細胞)、神経芽腫細胞、COL-2 (大腸癌細胞)、HT-1080 (肉腫細胞)、KB (ヒト口腔表皮癌細胞)、LNCaP (前立腺癌細胞)、LU-1 (肺癌細胞)、U373 (神経膠腫細胞)、および MEL-1、-2、-3、および -4 (黒色腫細胞) であった。

40

【0029】

シラカバ (Betula alba) の樹皮は、ベツリン (約 25 % まで)、lup-20 (29) - エン - 3, 28 - ジオール、およびベツリン酸 (0.025 %) を含むが、広範なバイオアッセイの実施に十分な量のベツリン酸を単離することは困難である。簡単な合成アプローチによってベツリンから一定量のベツリン酸を得ることができると見出された。

【0030】

表 1 に示すように、MEL-2 細胞の in vitro 成長がベツリン酸によって阻害された (すなわち、 ED_{50} 値が約 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$)。この特定の試験では、他の試験癌細胞株はいずれもベツリン酸に影響を受けなかった (すなわち、 ED_{50} 値が約 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$)。

50

1 を超える)。ベツリン酸によって媒介された細胞障害応答は、M E L - 2 細胞株に排他的に制限されない。M E L - 1、M E L - 3、および M E L - 4 と呼ばれるさらなるヒト黒色腫細胞株を使用して用量 - 反応試験を行い、それぞれ 1 . 1、3 . 3、および 4 . 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の E D₅₀ 値を示した。

【 0 0 3 1 】

表 1 にさらに示すように、他の公知の抗腫瘍薬（パクリタキセル、カンプトテシン、エリブチシン、ホモハリントニン、ミトラマイシン A、ポドピロトキシシン、ビンブラスチン、およびビンクリスチンなど）が比較的強力な非選択的な細胞障害活性を示し、細胞型選択性は区別できなかった。

【 0 0 3 2 】

以下の表 1 では、抽出ベツリン酸および他の純粋な化合物を、以下の培養ヒト細胞株に対する細胞傷害性について試験した：A 4 3 1（扁平上皮細胞）、B C - 1（乳癌細胞）、C O L - 2（大腸癌細胞）、H T - 1 0 8 0（肉腫細胞）、K B（ヒト口腔表皮癌細胞）、L N C a P（前立腺癌細胞）、L U - 1（肺癌細胞）、M E L - 2（黒色腫細胞）、U 3 7 3（神経膠腫細胞）、および Z R - 7 5 - 1（乳癌細胞）。

【 0 0 3 3 】

【 表 1 】

表 1

Ziziphus mauritiana から得た粗酢酸エチル抽出物、ベツリン酸、
他の抗腫瘍薬の細胞傷害活性プロファイル

ED₅₀ (μg/ml)

化合物	A431	BC-1	COL-2	HT-1080	KB	LNCap	LU-1	MEL-2	U373	ZR 75-1
Ziziphus mauritiana 粗抽出物	>20	>20	>20	9.5	>20	>20	5.2	3.7	>20	15.8
ベツリン酸	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	2.0	>20	>20
タキソール	0.00	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.06	0.008	0.02
カンプトチシン	0.00	0.07	0.005	0.01	0.00	0.006	0.00	0.02	0.000	0.001
エリプチシン	0.5	0.2	0.3	1.8	0.04	0.8	0.02	0.9	1.6	0.9
ホモハリントニン	0.02	0.03	0.1	0.01	0.00	0.03	0.03	0.04	0.2	0.06
ミトラマイシン A	0.09	0.3	0.06	1.5	0.09	0.05	0.2	1.2	0.04	0.2
ポドフィロトキシシン	0.03	0.03	0.005	0.00	0.08	0.04	0.00	0.003	0.004	0.4
ビンブラスチン	0.05	0.06	0.01	0.02	0.04	0.1	0.02	0.01	1.1	0.3
ビンクリスチン	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.1	0.05	0.02	0.06	0.4

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

表 1 のデータを得るために使用した試験方法 (すなわち、方法 A) を使用した場合、ヒト

黒色腫細胞に対してベツリン酸応答性細胞障害活性が最も高かった。表 1 にまとめたデータに基づいて、ベツリン酸を使用した *in vivo* 研究を行った。表 2 に示すように、他の試験（すなわち、方法 B および C）を使用して癌細胞株に対する細胞傷害性についてベツリン酸を試験した場合、他のヒト癌細胞型（例えば、乳癌、肉腫、肺癌、大腸癌、扁平上皮癌、前立腺癌、および神経膠腫）に対しても明らかな活性が認められた。しかし、ヒト黒色腫細胞に対して最も高い活性が認められた。ベツリン酸はまた、ヒト神経芽腫細胞株に対して優れた細胞障害活性を示した。

【0035】

表 1 でまとめたデータによって確認したように、ベツリン酸は、培養 KB 細胞に関して非細胞傷害性であると報告した。粗抽出物および精製化合物の細胞傷害性を、多数の培養ヒト癌細胞株で同定した。表 1 は、方法 A を使用して評価した種々の癌細胞型を示す。適切な培地および標準的条件下で細胞を培養した。対数成長を維持するために、細胞傷害性アッセイの 24 時間前に培地を交換した。アッセイ当日、細胞をトリプシン処理によって回収し、計数し、培地で希釈し、DMSO 中に溶解した試験化合物を含む 96 ウェルプレートに添加した。DMSO の最終濃度は、0.05% であった。

10

【0036】

表 2 は、組織培養培地（方法 B）または 5% ウシ血清アルブミン水溶液（方法 C）中に溶解した試験サンプルを使用したベツリン酸の細胞傷害性を示す試験データをまとめている。方法 B および C は、黒色腫、特に乳癌、線維肉腫、肺癌、大腸癌、表皮癌、ホルモン依存性乳癌、および神経膠腫に加えて癌細胞株に対するベツリン酸の細胞傷害性を例示する。

20

【0037】

それぞれ方法 A ~ C において、プレートを 3 日間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を固定し、スルホローダミン B (SRB) 色素で染色した。結合色素を Tris 塩基で遊離させ、OD₅₁₅ (515 nm での光学密度) を、ELISA リーダーで測定した。ベツリン酸処理細胞の成長を OD₅₁₅ 値によって同定し、成長を方法 A ~ C の処理コントロール細胞の OD₅₁₅ 値と比較した。用量反応試験を行って ED₅₀ 値を得た。本明細書中で使用される、用語「OD₅₁₅」は 515 nm での光学密度と定義し、用語「ED₅₀」は、50% の細胞数を減少させるために必要な化合物の濃度と定義する。

30

【0038】

【表 2】

表 2

ED ₅₀ (μ g/ml)												
ベツリン酸	BC1	HT	Lu1	Mel1	Mel2	Mel4	Col2	KB	A431	LNCaP	ZA-75-1	U373
方法 A	>20	>20	>20	1.1	1.9	4.8	17.2	19.2	>20	>20	>20	>20
方法 B	11.2	11.3	7.7	0.9	0.9	1.6	13.3	>20	12.1	19.3	6.4	12.1
方法 C	12.6	10.0	NT	NT	1.6	NT	NT	16.6	>20	16.6	6.9	18.7

10%DMSO (方法 A)、組織培養培地 (方法 B)、または 5%ウシ血清アルブミン水溶液 (方法 C) に溶解したサンプル ; BC1、ヒト乳癌 ; HT、ヒト腺維に肉腫 ; Lu1、ヒト肺癌 ; Mel1、Mel2、Mel4、ヒト黒色腫 ; Col2、ヒト大腸癌 ; KB、ヒト口腔表皮癌 ; A431、ヒト表皮癌 ; LNCaP、ヒト前立腺癌 ; ZA-75-1、ホルモン依存性ヒト乳癌 ; U373、ヒト神経膠腫 ; NT、試験せず。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

したがって、本発明は、腫瘍成長の予防または阻害のための方法および組成物に関する。

最高の活性化合物は、ベツリン酸またはその誘導体のプロドラッグから *in vivo* で生成されるベツリン酸またはベツリン酸誘導体である。*Ziziphus mauritiana* の樹皮由来の抽出物を調製する工程と、ベツリン酸を単離する工程とを含む方法によってベツリン酸を単離することができる。あるいは、ベツリンを抽出物から単離して、ベツリン酸合成の前駆体として使用することができる。次いで、ベツリン酸を、任意選択的にベツリン酸誘導体に変換し、ベツリン酸またはその誘導体をプロドラッグに変換する。

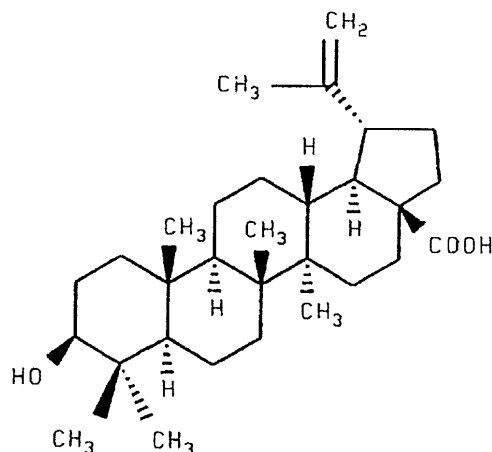
【0040】

ベツリン酸は、構造式(1)：

【0041】

10

【化23】



20

(1)

【0042】

を有する。ベツリン酸は、植物界に広範に存在し、いくつかの生物活性が報告されている。

【0043】

30

ベツリン酸を、風乾粉碎樹皮(450g)の *Z. mauritiana* サンプルの80%メタノール水溶液での抽出によって得た。次いで、抽出物のメタノール水溶液を、ヘキサンおよび酢酸エチルで連続的に分配して、ヘキサン、酢酸エチル、および抽出物水溶液を得た。これらの抽出物のうち、酢酸エチル抽出物(13.5g)は、培養黒色腫細胞株(MEL-2)に対して細胞障害活性を示した(ED_{50} は $3.7 \mu g/ml$)。酢酸エチル抽出物を、溶出液としてヘキサン-酢酸エチル(4:1~1:4)を使用したシリカゲルカラムでのクロマトグラフィーに供して、10個の画分を得た。画分3および4を合わせ、さらなる分画に供して薄層クロマトグラフィーによって主要な1つのスポット(R_f 0.67; $CHCl_3$:MeOH(クロロホルム:メタノール)(10:1))を示す活性画分(画分16)を得て、メタノールからの結晶化の反復後に72mgの透明ニードルを得た(乾燥植物材料からの全収率:0.016% w/w)。

40

【0044】

単離活性化合物であるベツリン酸(MEL-2についての ED_{50} は $2.0 \mu g/ml$)は、高分解能質量スペクトル分析によって同定したところ、分子式は $C_{30}H_{48}O_3$ であり、融点範囲は $292 \sim 293$ であった(分解)。文献によるベツリン酸の融点範囲は、 $290 \sim 293$ である。公知のベツリン酸サンプルの混合融点範囲は、添加しなかった。化合物の旋光度は、 $+7.3^\circ$ ($c=1.2$; ピリジン) ($lit. +7.5^\circ$)と測定された。単離化合物のベツリン酸との同一性を上記の物理的性質ならびに単離化合物の 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、および質量スペクトルデータと文献で報告された公知のベツリン酸サンプルの物理データおよびスペクトルとの比較によって確認した。

50

【0045】

ベツリン酸誘導体のプロドラッグを、本発明の組成物および方法で使用することもできる。ベツリン酸の構造試験により、ベツリン酸がいくつかの官能基を導入することができるいくつかの位置（すなわち、C - 3 位、C - 20 位、C - 28 位、C - 29 位、および C - 30 位）を有することが明らかである。例えば、Pezzutoら、米国特許第 5,962,527 号（本明細書中で参考として引用される）を参照のこと。さらに、所望ならば、導入した官能基を修飾することができる。これら 5 つの位置での一連の反応によって、多数のベツリン酸誘導体が調製され、これらを一連のヒト腫瘍細胞株、特にヒト黒色腫細胞株に対する生体有効性について評価した。

【0046】

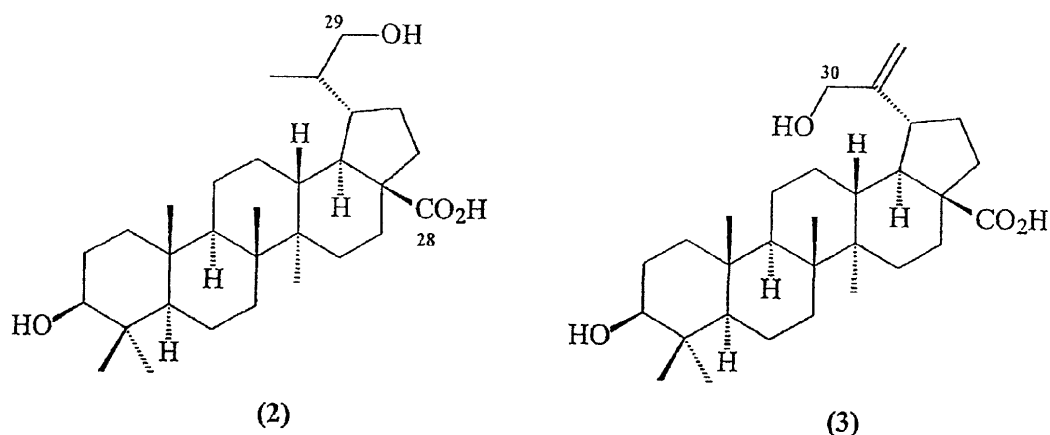
プロドラッグアプローチ（薬物を処方および / または投与に適切な形態に誘導体化し、薬物として *in vivo* で放出する）を首尾よく使用して、薬物の物理化学的性質を一過性に（例えば、生態可逆的に）変化させた（H. Bundgaard 編、「プロドラッグデザイン」、Elsevier、Amsterdam、1985；R. B. Silverman、「薬物デザインおよび薬物作用の有機化学」、Academic Press、San Diego、第 8 章、1992；K. M. Hillgren ら、Med. Res. Rev.、15、83、1995 を参照のこと）。

【0047】

一般に、以下の 2 つの戦略ーを使用して、薬物化合物の水溶性を増加させることができる：イオン性基またはイオン化可能な基の導入および（b）プロドラッグの融点が低下するような様式での誘導体化（G. L. Amidon、「薬物可溶化テクニック」、Yalkowsky ら編、Marcel Dekker、New York、183 ~ 221、1981 を参照のこと）。ベツリン酸の 3 - OH およびカルボン酸基（C - 28）は共にこのような修飾のための潜在的な位置である。さらに、C - 29 位（2）または C - 30 位（3）のいずれかの水酸基により、類似の修飾が可能である。

【0048】

【化 24】

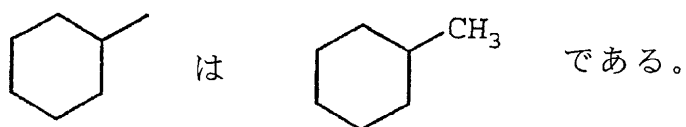


【0049】

置換基を欠く結合については、本明細書中の構造では、置換基はメチル、例えば、

【0050】

【化 25】



【0051】

環上の炭素原子に結合する置換基が示されていない場合、炭素原子は適切な数の水素原子

10

20

30

40

50

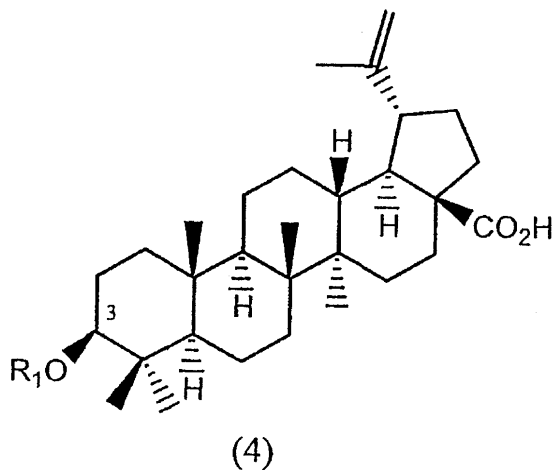
を含むと理解される。

【 0 0 5 2 】

イオン性またはイオン化可能部分の間で、ヘミスクシネート、ジアルキルアミノアセテート、およびアミノ酸エステルは、水酸基含有薬物の水溶性の増大のために一般に使用されるエステルである。したがって、化合物 4 a ~ 4 g、5 a ~ 5 g、および 6 a ~ 6 g を合成することができる。エステルの化学的および/または酵素による加水分解の感受性は広範に変化し、陰イオンおよび陽イオン部分の両方を含む本発明の化合物は、種々の内因性加水分解酵素（エステラーゼなど）の適切な基質であり、親薬物（すなわち、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体）を生体可逆的に送達させると予想される。

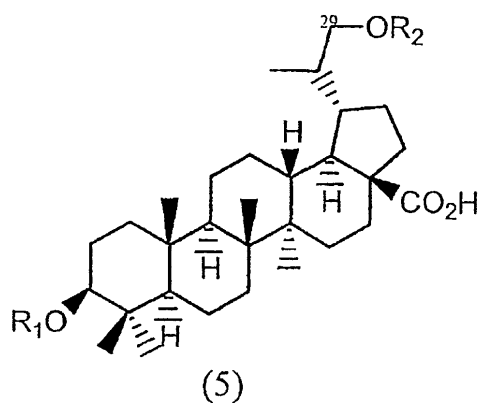
【 0 0 5 3 】

【 化 2 6 】



【 0 0 5 4 】

【 化 2 7 】



【 0 0 5 5 】

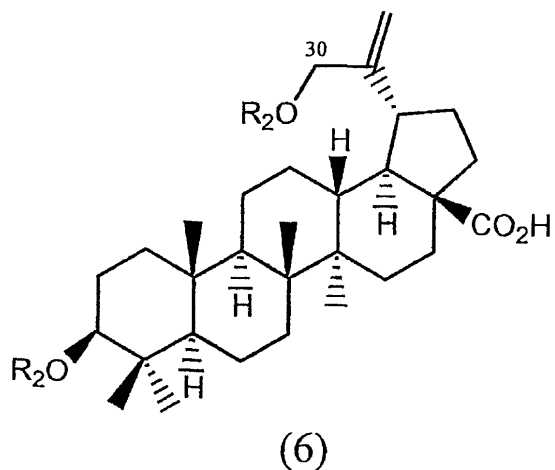
【 化 2 8 】

10

20

30

40



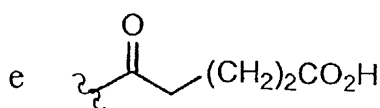
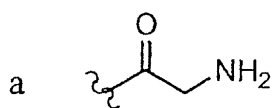
10

【 0 0 5 6 】

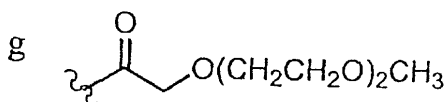
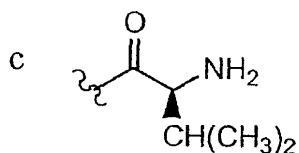
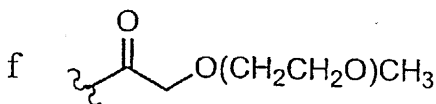
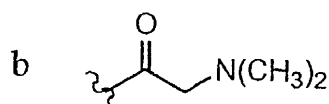
(式中、 R_1 および R_2 は、独立して、

【 0 0 5 7 】

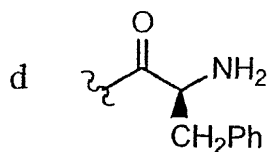
【 化 2 9 】



20



30



【 0 0 5 8 】

からなる群から選択される)。

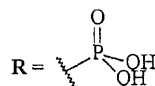
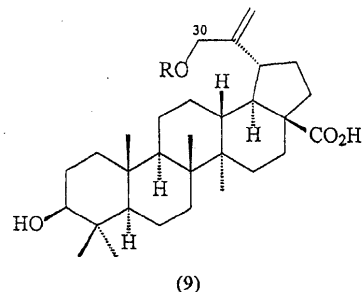
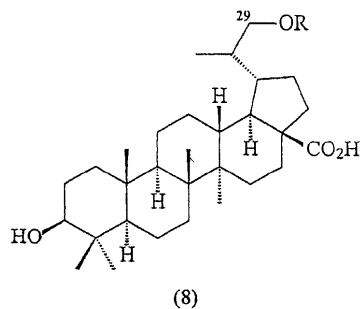
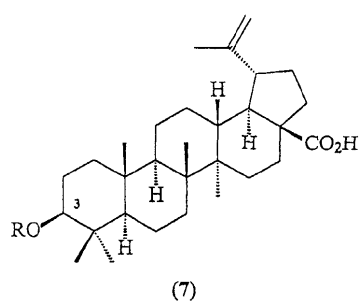
【 0 0 5 9 】

リン酸プロドラッグを使用して、親薬物の治療上の利点を損ね得る薬物送達問題を克服することもできる(例えば、M. G. Nicolaouら、J. Org. Chem., 61、8636、1996を参照のこと)。アルカリホスファターゼの存在下で、種々の組織(肝臓、腎臓、細管、および小腸の上皮など)中に広範に分布する酵素(例えば、リン酸モノエステル)が加水分解されて親水酸基含有薬物および無機リン酸塩を放出することができる。リン酸塩プロドラッグ7~9を、内因性アルカリホスファターゼの基質となるようにデザインする。

40

【 0 0 6 0 】

【 化 3 0 】



10

【 0 0 6 1 】

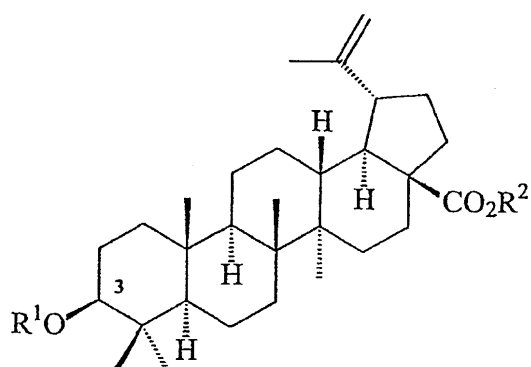
化合物 10a ~ 10b、11a ~ 11g、および 12a ~ 12g は、ピバリロキシメチル誘導体である。プロドラッグのこの（アシルオキシ）アルキルクラスは、親カルボン酸およびアルコールの生物学的利用能の改良に関して有用であると証明されている（N. Bodorら、Int. J. Pharm.、7、63、1980およびN. Bodorら、J. Org. Chem.、48、5280、1983を参照のこと）。例えば、17 - エストラジオールの 3 - ピバリロキシメチルエーテルは、親 17 - エストラジオールの融点を実質的に低下させた。ピバリロキシメチルプロドラッグは、吸収後に非特異的エステラーゼによって対応するヒドロキシメチル誘導体に加水分解され、その後自発的にベツリン酸（またはベツリン酸誘導体）およびホルムアルデヒドに分解されると理論付けられるが、本明細書中では信頼されない。

20

【 0 0 6 2 】

30

【 化 3 1 】



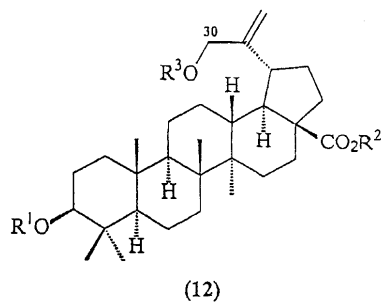
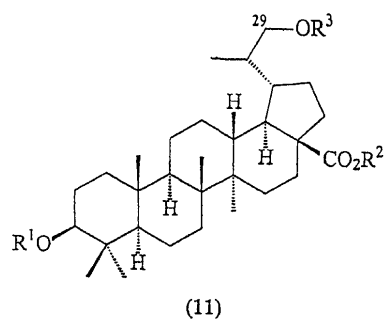
a. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = H$

b. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$

40

【 0 0 6 3 】

【 化 3 2 】



- a. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = H$, $R^3 = H$
 b. $R^1 = H$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^3 = H$
 c. $R^1 = H$, $R^2 = H$, $R^3 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$
 d. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^3 = H$
 e. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = H$, $R^3 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$
 f. $R^1 = H$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^3 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$
 g. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$,
 $R^3 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$

10

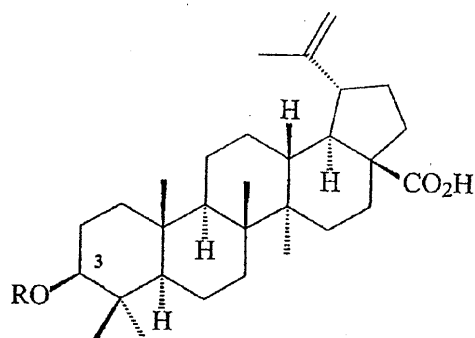
【 0 0 6 4 】

本発明の別のクラスのプロドラッグは、ベツリン酸 (1 3) およびベツリン酸誘導体 (1 4 a ~ c 、 1 5 a ~ c) の硫酸塩である。硫酸塩部分により化合物の親水性が増大する一方で、内因性非特異的スルファターゼによりベツリン酸またはベツリン酸誘導体および無機硫酸塩が i n v i v o で放出される。

20

【 0 0 6 5 】

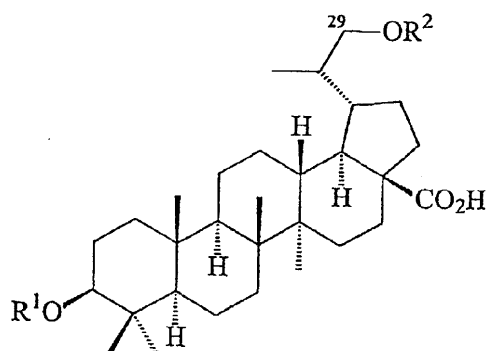
【 化 3 3 】



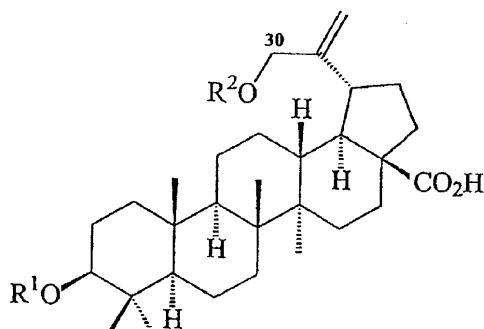
(13)

R = SO₃H

10



(14)



(15)

20

a. R¹ = SO₃H, R² = Hb. R¹ = H, R² = SO₃Hc. R¹ = SO₃H, R² = SO₃H

【 0 0 6 6 】

ベツリン酸の合成

ベツリン酸が高等植物のいくつかの属から単離されているにもかかわらず、ベツリン酸の存在量は非常に少なく、使用可能な量の単離は冗漫な作業である (T. Fujiokaら、J. Nat. Prod.、57、243~7、1994; S. Siddiquiら、J. Nat. Prod.、57、243~7、1994; F. Robinsonら、Phytochemistry、9、907~9、1970を参照のこと)。しかし、以前に注目されていたように、ベツリン 16 は約 25 重量%までの濃度でシラカバから容易に利用可能であり、家具製造などの過程において毎年数百トンの樹皮が廃棄されている。

30

【 0 0 6 7 】

ベツリンからベツリン酸生成のための 2 つの合成法が報告されている。第 1 の方法は、全部で収率 71% の 3 つの工程を含み、第 2 の方法は、全部で収率 55% の 5 工程のプロセスである (D. S. H. L. Kimら、Synth. Commun.、27、1607~1612、1997を参照のこと)。第 1 の方法では実験室でより高い全収率が得られるが、副産物として望ましくない 3 異性体が形成されるので拡大中の生成は困難である。第 2 の方法は、低収率であるにもかかわらず、望ましくない 3 異性体を生成せず、優先的に保護および脱保護手順を含むので、ベツリン酸合成に好ましい。

40

【 0 0 6 8 】

したがって、文献の方法に従ってベツリン 16 を Betula alba の樹皮から単離して、以下のスキーム 1 に示すようにベツリン酸に変換することができる。簡単に述べれば、工程 i) でベツリンの第 1 の水酸基をテトラヒドロピラン (THP) エーテル 17 として選択的に保護し、その後工程 ii) で第 2 の水酸基をアセチル化して化合物 18 を得

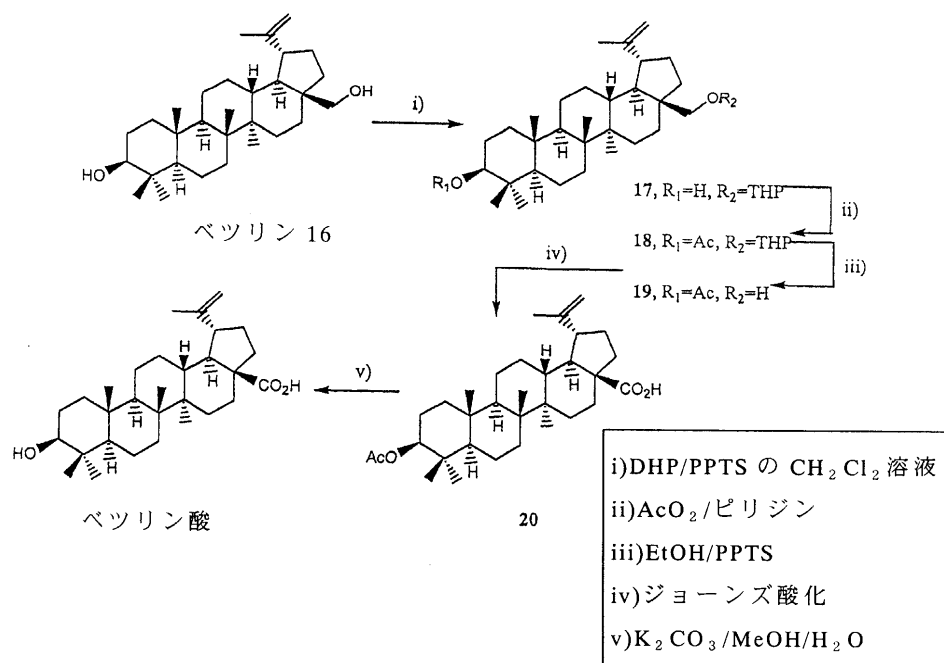
50

る。工程 i i i) で化合物 18 中の T H P 基を選択的に除去後、工程 i v) で得られた第一級アルコール 19 をジョーンズ酸化条件下 ($\text{CrO}_3 / \text{H}_2\text{SO}_4 / \text{アセトン} / 0$) で酸化してカルボン酸 20 を得る。工程 v) で最終的に穏やかな塩基性条件下でアセチル基を除去して、ベツリン酸を得る。

【 0 0 6 9 】

【 化 3 4 】

スキーム 1



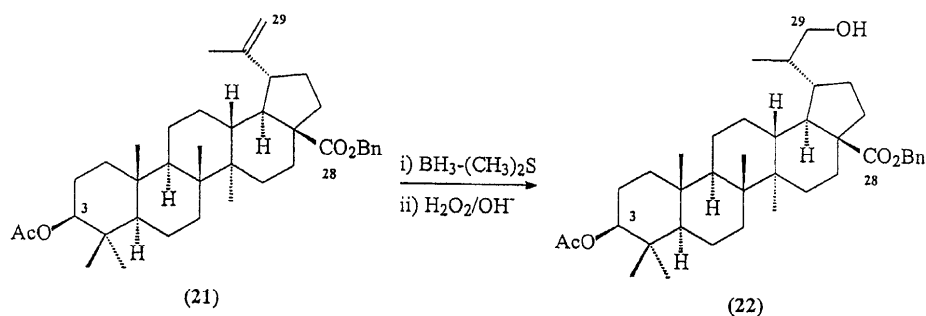
【 0 0 7 0 】

C - 29 および C - 30 ベツリン酸アルコールの合成

ベツリン酸誘導体 2 および 3 の合成を、それぞれヒドロホウ素化およびアリル酸化によって行う。C - 29 アルコールを、共通の中間体 20 から合成し、ベンジルエステル (21) としてカルボン酸をさらに保護する。(21) の BH_3 - ジメチルスルフィドのヒドロホウ素化、その後の塩基性条件下での酸化により C - 29 アルコール (22) が得られ、次いで、C - 3 アルコールまたは C - 28 カルボン酸に妨害されずに選択的に官能化する。C - 3 酢酸塩の加水分解および C - 28 ベンジルエステルの触媒水素化分解により、非保護 C - 29 アルコールを得る。

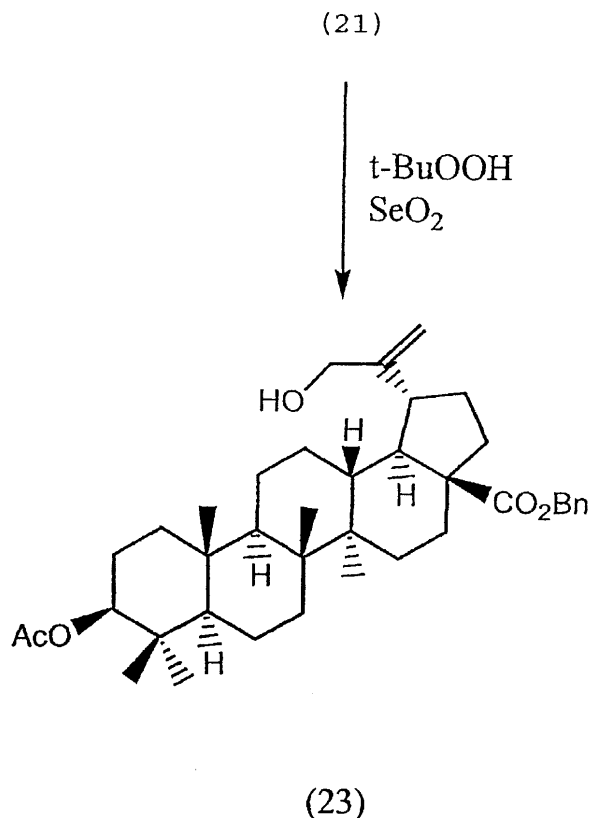
【 0 0 7 1 】

【 化 3 5 】



【 0 0 7 2 】

【化 3 6】



10

20

【0073】

保護ベツリン酸(21)の反応および酸化セレン触媒およびt-ブチルヒドロペルオキシダーゼでの酸化によって、C-30アリアルアルコール(3)の合成を行った。保護C-30アリアルアルコール(23)を、所望のようにさらに操作し、C-3酢酸塩およびC-28ベンジルエステルを炭酸カリウムを使用した加水分解によって除去することができる。

【0074】

プロドラッグ2a~gを合成するために、ベツリン酸中のカルボン酸基を保護する。種々の保護基を使用することができる。本発明のプロドラッグ中のエステル基は不安定なので、非常に穏やかな条件下で除去可能な保護基を使用する。ベンジル基は、中世条件下での水素化分解によって容易に切断されるので、1つの好ましい保護剤はベンジル基である。ベツリン酸中の20(29)-エン二重結合を水素化分解中に飽和することができる。しかし、t-BuMe₂SiHおよびPd(OAc)₂の使用によって二重結合の存在下でベンジル基を切断することができる(M. Sakaitganiら、Tetrahedron Lett.、27、3753、1986を参照のこと)。したがって、ベツリン酸26のベンジルエステルを、酢酸塩20から調製する。炭酸カリウム(K₂CO₃)の存在下でのアセトン中での酢酸塩20の臭化ベンジルとの反応により、二重エステル21が得られ、これを上記のようにK₂CO₃のメタノール(MeOH)溶液を使用して脱アセチル化して、前駆体26を得る(スキーム2)。

30

40

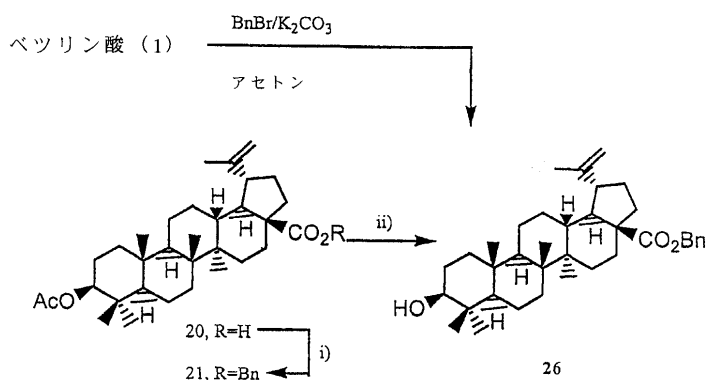
【0075】

あるいは、K₂CO₃の存在下でのアセトン中での臭化ベンジルを使用したベツリン酸の直接的1工程ベンジル化により、許容される収率で前駆体26を得た(スキーム2)。

【0076】

【化 3 7】

スキーム 2



i) BnBr/K₂CO₃/アセトン 2) K₂CO₃/MeOH/H₂O

10

【0077】

ベツリン酸エステルプロドラッグの合成

化合物(4)、(5)、および(6a~d)は、変換法に従って合成したアミノ酸エステルである。したがって、テトラヒドロフラン(THF)の還流においてカルボニルイミダゾール(CDI)またはジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)によって活性化した場合、ベンジルエステル26は、N,N-ジメチルグリシンまたはCbz保護アミノ酸(グリシン、L-ロイシン、およびL-フェニルアラニンなど)とそれぞれ反応する(スキーム3)。Cbzは、カルボキシベンゾイルの略語である。形成されたエステル27a~dをPd(OAc)₂の存在下でt-ブチルジメチルシラン(t-BuMe₂SiH)で処理して、ベンジルおよびCbz保護基を除去して化合物(4a~d)を得る。同一のスキームを使用して、(27a~f)を介してそれぞれ化合物(4e)、(4f)、(5a~f)、および(6a~f)を合成することができる。全ての使用カルボン酸は、市販されている。

20

【0078】

あるいは、遊離酸アナログ(4)を、ベツリン酸から直接合成することができる(スキーム3)。Boc-Gly-OHを、室温で2時間CDIで活性化し、ベツリン酸を一晩還流して、収率97%で(4i)を得た。Bocは、t-ブチルカルボキシの略語である。トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン(TFA/DCM)でのBoc基の脱保護により、ベツリン酸環系が再整列された。いくつかの方法を行った後、4M HClのジオキサン溶液はベツリン酸環系を攻撃することなくBoc基を切断することを見出した。

30

【0079】

類似の方法により、合成スキーム3にしたがって生成物(4f)および(4j)を合成した。

【0080】

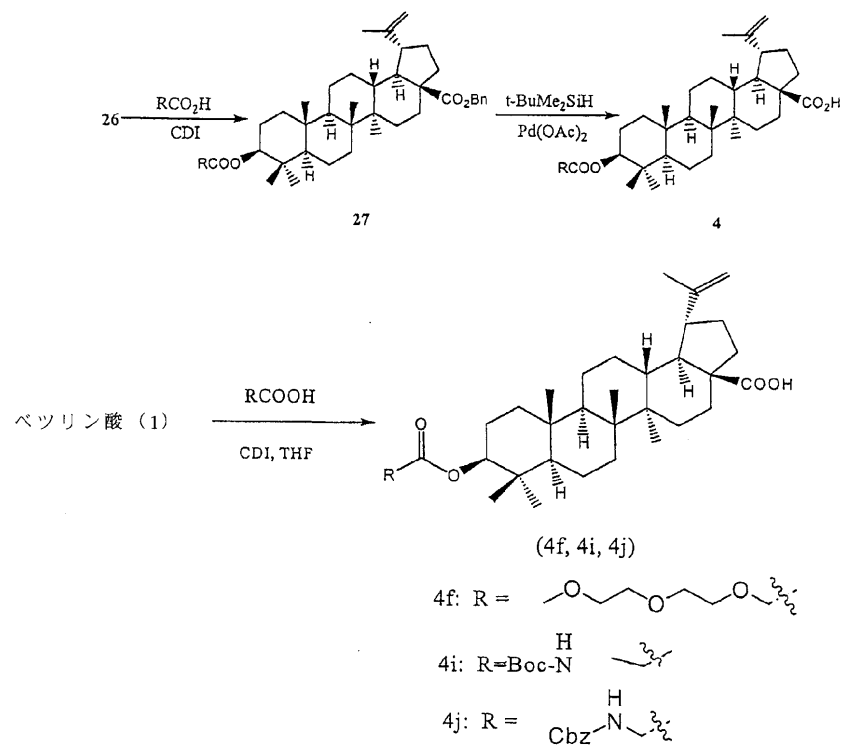
ヘミコハク酸誘導体(4g)を、文献の方法(L. Collaら、J. Med. Chem.、26、602、1983)にしたがって、トリエチルアミンのDMF溶液の存在下でのベンジルエステル26の無水コハク酸との反応によって調製し、その後脱ベンジル化した(スキーム4)。このスキームを使用して、誘導体(5g)および(6g)も調製する。

40

【0081】

【化38】

スキーム 3

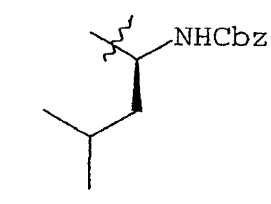
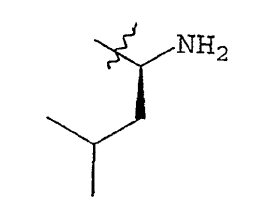
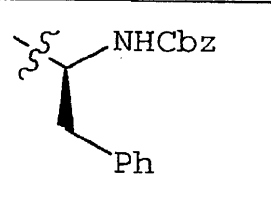
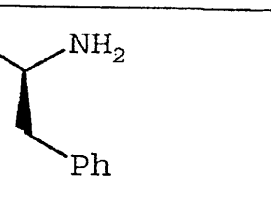
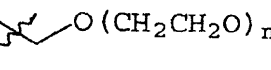
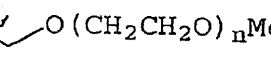


10

20

【 0 0 8 2 】

【 化 3 9 】

27中のR	4中のR
CH_2NHCbz (27a)	CH_2NH_2 (4a)
CH_2NMe_2 (27b)	CH_2NMe_2 (4b)
	
(27c)	(4c)
	
(27d)	(4d)
	
(n=1,2) (27 e,f)	(n=1,2) (4 e,f)

C b z = カルボキシベンゾイル

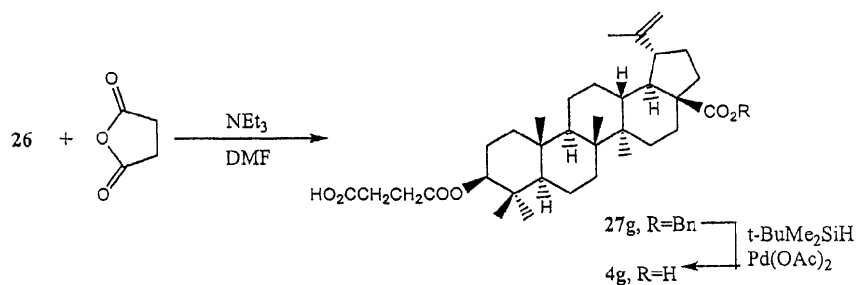
M e = メチル

P h = フェニル

【 0 0 8 3 】

【 化 4 0 】

スキーム 4



【 0 0 8 4 】

リン酸塩プロドラッグ (7 ~ 9) の合成

市販のテトラベンジルピロホスフェート (T B P P) は、適切なリン酸化剤である。したがって、ベンジルエステル 26 のブチルリチウムの T H F 溶液および T B P P での処理により、水中での処理後にリン酸ジエステル (7) を得ることができる (スキーム 5)。P d (O A c)₂ の存在下での t - B u M e₂ S i H での処理によって脱ベンジル化を行っ

10

20

30

40

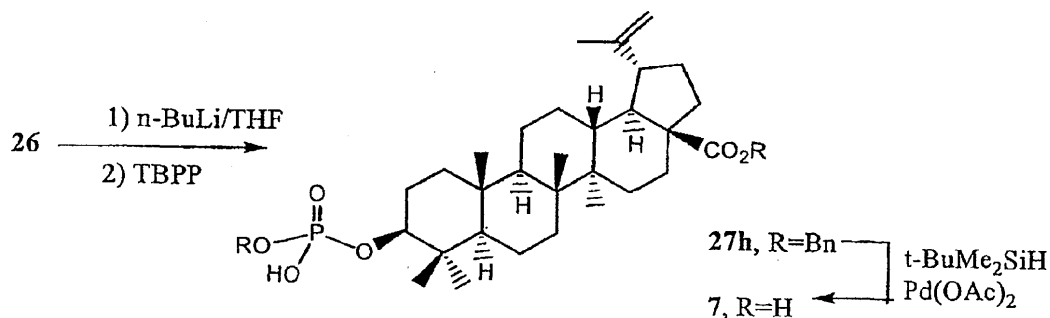
50

てリンを含むカルボン酸(7)を得る。この経路を誘導体(8)および(9)にも使用する。

【0085】

【化41】

スキーム5



10

【0086】

アシルオキシアルキル誘導体化プロドラッグの合成(10~12)

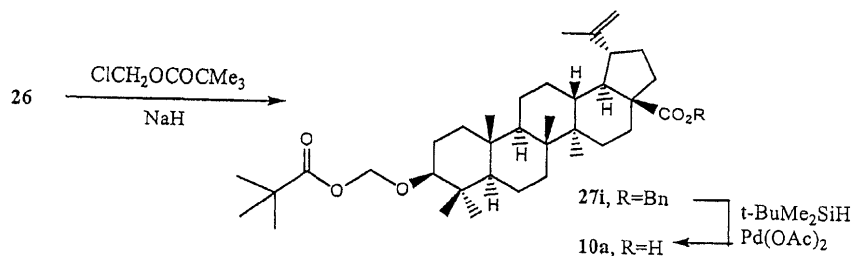
ピバリン酸クロロメチルは市販されており、他のクロロメチルエステルを公開された文献の方法によって調製することができる(Euratoら、Acta Chem. Scand.、20、1276、1966を参照のこと)。ベンジルエステル26のナトリウム塩またはリチウム塩のピバリン酸クロロメチルとの反応により、ピバロイルオキシメチル誘導体27iが得られる(スキーム6)。27iのt-BuMe₂SiHおよびPd(OAc)₂での脱ベンジル化により、対応するモノピバロイルオキシメチル化合物10aが得られる。ベツリン酸の二ナトリウム塩のピバリン酸クロロメチルでの処理により、ビス-ピバロイルオキシメチル化合物10bが得られる(スキーム6)。クロロメチルエステルは十分な反応性を示し得ないので、NaIでの処理により対応するヨウ素アナログに変換することができることが文献で報告されている。

20

【0087】

【化42】

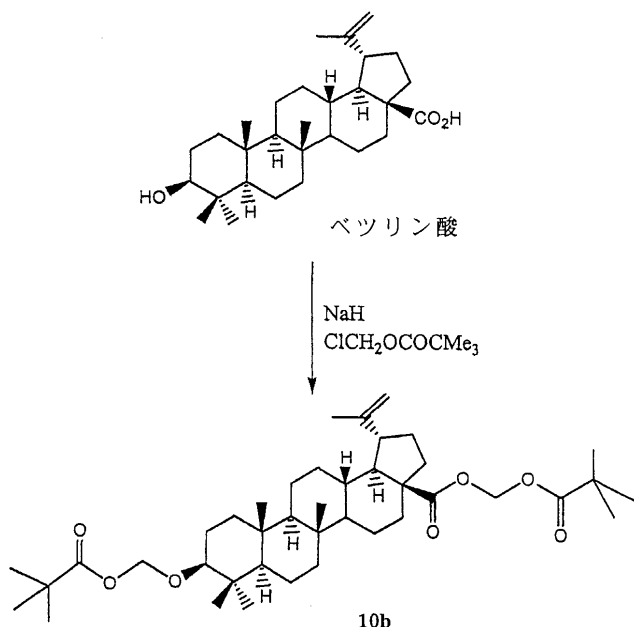
スキーム6



40

【0088】

【化43】



10

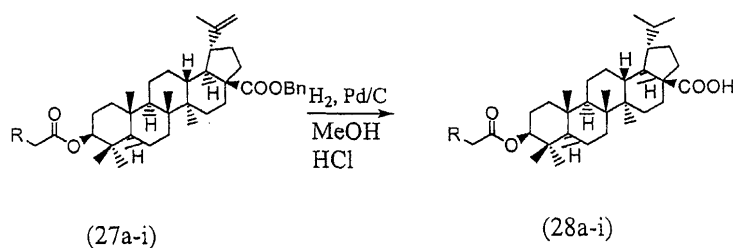
【 0 0 8 9 】

ベンジルエステル (2 7 a) ~ (2 7 i) の水素化分解により、対応する 2 0 (2 9) 飽 20
和ベツリン酸 (2 8 a) ~ (2 7 i) が得られた (スキーム 7) 。

【 0 0 9 0 】

【 化 4 4 】

スキーム 7



30

【 0 0 9 1 】

合成手順において以下の略語を使用する：K₂CO₃ (炭酸カリウム)、MgSO₄ (硫酸マグネシウム)、EtOAc (酢酸エチル)、THF (テトラヒドロフラン)、NaH (水素化ナトリウム)、HCl (塩酸)、および Et₂O (ジエチルエーテル)。

ベンジル保護ベツリン酸 (2 6) の合成

ベツリン酸 (9 , 7 6 g 、 2 1 . 4 1 m m o l) および K₂CO₃ (4 . 3 7 g 、 3 1 . 6 2 m m o l) のアセトン (5 0 0 m l) 溶液を、2 0 分間攪拌した。次いで、臭化ベン 40
ジル (6 . 4 m l 、 5 3 . 8 1 m m o l) を添加し、得られた混合物を室温で一晩攪拌した。さらなる臭化ベンジル (4 . 0 m l 、 3 3 . 6 3 m m o l) を添加し、混合物を室温でさらに 2 4 時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残渣に水を添加し、酢酸エチルで抽出した。EtOAc 抽出物をブラインで洗浄し、MgSO₄ 無水物で乾燥させた。溶媒の除去後、粗生成物を溶出液として 1 0 % EtOAc / ヘキサンを使用したシリカカラムで精製して、白色個体として 7 . 5 5 g (収率 6 4 %) の生成物を得た。¹H NMR (CDCl₃) : 0 . 6 ~ 1 . 7 (m , 3 8 H) 、 1 . 8 ~ 1 . 9 (m , 2 H) 、 2 . 1 ~ 2 . 3 5 (m , 2 H) 、 2 . 9 5 ~ 3 . 0 5 (m , 1 H) 、 3 . 1 ~ 3 . 2 (m , 1 H) 、 4 . 5 9 (d 、 J = 2 H z , 1 H) 、 4 . 7 2 (d , J = 2 H z , 1 H) 、 5 . 1 2 (m , 2 50

H)、7.3~7.4(m, 5H)、MS(APCI⁺): 547.2(M+1)、529.2(M-H₂O)。FT-IR(cm⁻¹): 3553、2940、2866、1692、1451。

Cbz-Gly エステル誘導体(27a)の合成

Cbz-Gly-OH(209mg、1mmol)のTHF(10ml)溶液に、CDI(162mg、1mmol)を添加した。混合物を室温で30分間攪拌し、ベツリン酸ベンジルエステル(26)(238mg、0.44mmol)を添加した。得られた混合物を、1日間還流した。反応混合物を水で希釈し、EtOAcで3回抽出した。有機相をブラインで洗浄し、MgSO₄で乾燥させた。溶媒の除去後、残渣を溶出液としてEtOAc/ヘキサンを使用したシリカゲルのカラムクロマトグラフィーによって精製して、130mgのCbz-Gly-ベツリン酸エステル誘導体(27a)を得た。収率: 41%。融点: 55~57。¹H NMR(CDCl₃): 0.6~1.7(m, 38H)、1.8~2.0(m, 2H)、2.1~2.35(m, 2H)、2.95~3.1(m, 1H)、3.95(d, J=5.4Hz, 2H)、4.55(m, 1H)、4.59(s, 1H)、4.72(s, 1H)、5.12(m, 4H)、5.3(br, 1H)、7.3~7.4(m, 10H)。MS(ESI⁺): 755.6(M+NH₄)。FT-IR(cm⁻¹): 3425、2943、2869、1722、1453。C₄₇H₆₃N₁O₆の計算値: C、76.49; H、8.60; N、1.90; 実測値: C、75.38; H、8.76; N、1.83。

Cbz-Phe エステル誘導体(27d)の合成

化合物(27d)を、化合物(27a)の調製と類似の方法により、Cbz-Phe-OHのベツリン酸ベンジルエステル(26)との反応によって合成した。収率: 15%。融点: 67~71。¹H NMR(CDCl₃): 0.70~1.71(m, 38H)、1.80~1.95(m, 2H)、2.1~2.3(m, 2H)、2.95~3.15(m, 3H)、4.4~4.5(m, 1H)、4.6~4.65(m, 1H)、4.59(d, J=2Hz, 1H)、4.72(d, J=2Hz, 1H)、5.12(m, 4H)、5.22(d, J=8Hz, 1H)、7.1~7.4(m, 15H)。MS(ESI⁺): 845.6(M+NH₄)、828.5(M+1)。FT-IR(cm⁻¹): 3431、2944、2868、1722、1497。C₅₄H₆₉N₁O₆の計算値: C、78.32; H、8.40; N、1.69; 実測値: C、78.01; H、8.52; N、1.61。

Cbz-Leu エステル誘導体(27c)の合成

化合物27cを、化合物(27a)の調製と類似の方法により、Cbz-Leu-OHのベツリン酸ベンジルエステル(26)との反応によって合成した。収率: 6%。融点: 64~69。¹H NMR(CDCl₃): 0.7~1.8(m, 47H)、1.8~2.0(m, 2H)、2.1~2.3(m, 2H)、2.95~3.1(m, 1H)、4.3~4.4(m, 1H)、4.45~4.55(m, 1H)、4.59(d, J=2Hz, 1H)、4.72(d, J=2Hz, 1H)、5.08~5.20(m, 4H)、7.3~7.4(m, 10H)。MS(APCI⁺): 812.4(M+NH₄)、794.7(M+1)。FT-IR(cm⁻¹): 3355、2946、2868、1722、1453。C₅₁H₇₁N₁O₆の計算値: C、77.14; H、9.01; N、1.76; 実測値: C、77.36; H、9.11; N、1.69。

2-(2-メトキシエトキシ)酢酸エステル誘導体(27e)の合成

化合物(27e)を、化合物(27a)の調製と類似の方法により、2-(2-メトキシエトキシ)酢酸のベツリン酸ベンジルエステル(26)との反応によって合成した。収率: 38%。¹H NMR(CDCl₃): 0.75~1.7(m, 38H)、1.85~1.95(m, 2H)、2.1~2.3(m, 2H)、2.95~3.10(m, 1H)、3.38(s, 3H)、3.58(m, 2H)、3.72(m, 2H)、4.13(s, 2H)、4.5~4.6(m, 1H)、4.59(s, 1H)、4.72(s, 1H)、5.12(m, 2H)、7.3~7.4(m, 5H)。MS(ESI⁺): 680.

6 (M + NH₄)。FT-IR (cm⁻¹) : 2945、2867、1754、1715、1453。C₄₂H₆₂O₆ の計算値 : C、76.09 ; H、9.43 ; 実測値 : C、76.28 ; H、9.47。

2-[2-(2-メトキシエトキシ)エトキシ]酢酸エステル誘導体(27f)の合成
化合物(27a)を、化合物(27a)の調製と類似の方法により、2-[2-(2-メトキシエトキシ)エトキシ]酢酸のベツリン酸ベンジルエステル(26)との反応によって合成した。収率 : 52%。¹H NMR (CDCl₃) : 0.75~1.7 (m, 38H)、1.85~1.95 (m, 2H)、2.05~2.3 (m, 2H)、2.95~3.10 (m, 1H)、3.38 (s, 3H)、3.57 (m, 2H)、3.6~3.75 (m, 6H)、4.13 (s, 2H)、4.5~4.6 (m, 1H)、4.59 (d, J = 2 Hz, 1H)、4.72 (d, J = 2 Hz, 1H)、5.12 (m, 2H)、7.3~7.4 (m, 5H)。MS (APCI⁺) : 724.3 (M + NH₄)。FT-IR (cm⁻¹) : 2942、2869、1724、1454。C₄₄H₆₆O₆ の計算値 : C、74.75 ; H、9.41 ; 実測値 : C、73.72 ; H、9.34。

ピバロイルオキシメチルエーテル誘導体(27i)の合成
ベツリン酸ベンジルエステル(26)(526mg、0.96mmol)のTHF(10ml)溶液に、NaH(60%、66mg、1.6mmol)を添加した。混合物を室温で一晩混合し、その後、ピバリン酸クロロメチル(635mg、0.96mmol)を添加した。反応混合物を、室温で一晩攪拌した。次いで、反応混合物を、水で希釈し、酢酸エチルで3回抽出した。有機相をブラインで洗浄し、MgSO₄で乾燥させた。溶媒の除去後、残渣を、溶出液としてEtOAc/ヘキサンを使用したシリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによって精製して、102mgの所望の生成物(27i)を得た。収率16%。融点 : 122~128。°¹H NMR (CDCl₃) : 0.7~1.7 (m, 47H)、1.85~1.95 (m, 2H)、2.1~2.3 (m, 2H)、2.95~3.15 (m, 2H)、4.59 (d, J = 2 Hz, 1H)、4.72 (d, J = 2 Hz, 1H)、5.12 (m, 2H)、5.27 (d, J = 6 Hz, 1H)、5.35 (d, J = 6 Hz, 1H)、7.3~7.4 (m, 5H)。MS (ESI⁺) : 678.7 (M + NH₄)。FT-IR (cm⁻¹) : 2947、2866、1746、1714、1480。C₄₃H₆₄O₅ の計算値 : C、78.14 ; H、9.76 ; 実測値 : C、78.46 ; H、10.49。

Boc-Gly エステル誘導体(4i)の合成
Boc-Gly-OH(525mg、3mmol)のTHF(5ml)溶液に、CDI(486mg、3mmol)を添加した。混合物を室温で2時間混合し、その後、ベツリン酸(684mg、1.5mmol)を添加した。反応混合物を、一晩還流した。溶媒の除去後、残渣をジクロロメタンに溶解し、水およびブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させた。溶媒の除去後、残渣を、溶出液としてEtOAc/ヘキサンを使用したシリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによって精製して、900mgのBoc-Gly-ベツリン酸誘導体(4i)を得た。収率97%。融点 : 135~136。°¹H NMR (DMSO-d₆) : 0.75~1.7 (m, 47H)、1.75~1.9 (m, 2H)、2.05~2.3 (m, 2H)、2.9~3.0 (m, 1H)、3.63 (d, J = 6 Hz, 2H)、4.4 (m, 1H)、4.56 (d, J = 2 Hz, 1H)、4.69 (d, J = 2 Hz, 1H)、7.18 (t, J = 6 Hz, 1H)、12.05 (s, 1H)。MS (ESI⁻) : 612.4 (M - 1)。FT-IR (cm⁻¹) : 2943、2869、1702。C₃₇H₅₉N₁O₆ の計算値 : C、72.39 ; H、9.69 ; N、2.28 ; 実測値 : C、72.13 ; H、10.07 ; N、2.20。

Cbz-Gly エステル誘導体(4j)の合成
化合物(4j)を、化合物(IIIb)の調製と類似の方法により、Cbz-Gly-OHのベツリン酸との反応によって合成した。収率7%。融点 : 82~88。°¹H NMR (CDCl₃) : 0.75~1.7 (m, 38H)、1.95~2.05 (m, 2H)、2.1~2.3 (m, 2H)、2.95~3.05 (m, 1H)、3.97 (d, J

= 6 Hz, 2H)、4.5 ~ 4.6 (m, 1H)、4.60 (s, 1H)、4.75 (s, 1H)、5.12 (s, 2H)、5.25 (m, 1H)、7.3 ~ 7.4 (m, 5H)。MS (APCI⁺): 646.9 (M + NH₄)。FT-IR (cm⁻¹): 2943、2869、1708。C₄₀H₅₇N₁O₆の計算値: C、74.15; H、8.87; N, 2.16; 実測値: C、71.57; H、8.67; N, 2.22。

2-[2-(2-メトキシエトキシ)エトキシ]酢酸エステル誘導体(4f)の合成

化合物(4f)を、化合物(IIIb)の調製と類似の方法により、2-[2-(2-メトキシエトキシ)エトキシ]酢酸のベツリン酸との反応によって合成した。収率: 52%。¹H NMR (CDCl₃): 0.8 ~ 1.7 (m, 38H)、1.9 ~ 2.0 (m, 2H)、2.1 ~ 2.3 (m, 2H)、2.95 ~ 3.05 (m, 1H)、3.38 (s, 3H)、3.57 (m, 2H)、3.6 ~ 3.75 (m, 6H)、4.13 (s, 2H)、4.5 ~ 4.6 (m, 1H)、4.61 (d, J = 2 Hz, 1H)、4.74 (d, J = 2 Hz, 1H)。MS (APCI⁺): 615.8 (M - 1)。FT-IR (cm⁻¹): 2937、2869、1729、1694。C₃₇H₆₀O₆の計算値: C、72.04; H、9.80; 実測値: C、71.98; H、9.90。

10

Gly エステル誘導体(4a)の合成

化合物(4a)(61mg、0.1mmol)を4M HClジオキサン溶液に溶解し、室温で10分間撹拌した。反応混合物を、トルエン(3ml)で希釈した。真空下での溶媒の除去後、残渣をEt₂OHで洗浄して、白色固体として25mgの所望の生成物を得た。収率: 45%。融点: 275 (dec)。¹H NMR (DMSO-d₆): 0.8 ~ 1.7 (m, 38H)、1.75 ~ 1.9 (m, 2H)、2.1 ~ 2.3 (m, 2H)、2.9 ~ 3.0 (m, 1H)、3.8 ~ 3.9 (m, 2H)、4.5 ~ 4.6 (m, 1H)、4.56 (s, 1H)、4.69 (s, 1H)、8.30 (br, 3H)。MS (APCI⁺): 514.6 (M + 1)。FT-IR (cm⁻¹): 2941、2869、1740。C₃₂H₅₂ClNO₄の計算値: C、69.85; H、9.53; N、2.55; 実測値: C、66.31; H、9.38; N、2.68。

20

Gly エステル飽和誘導体(28a)の合成

化合物(27a)(180mg、0.28mmol)を、EtOAc(5ml)に溶解し、メタノール(10ml)で希釈し、1滴のHCl溶液(6N)を添加した。反応混合物を、室温で4時間50psiの水素圧にて触媒として50mgの10%パラジウム-活性炭で水素化した。触媒をろ過により除去した。溶媒の除去後、残渣をEt₂Oで洗浄して、白色固体として110mgの所望の生成物を得た。収率: 72%。融点: 285 (dec)。¹H NMR (DMSO-d₆): 0.8 ~ 1.7 (m, 38H)、1.75 ~ 1.9 (m, 2H)、2.1 ~ 2.3 (m, 2H)、2.9 ~ 3.0 (m, 1H)、3.8 ~ 3.9 (m, 2H)、4.5 ~ 4.6 (m, 1H)、4.56 (s, 1H)、4.69 (s, 1H)、8.30 (br, 3H)。MS (ESI⁺): 516.1 (M + 1)。FT-IR (cm⁻¹): 2947、2868、1740。C₃₂H₅₄ClNO₄の計算値: C、69.60; H、9.86; N、2.54; 実測値: C、65.76; H、9.62; N、2.63。

30

抗黒色腫活性アッセイ

癌細胞に対するベツリン酸およびベツリン酸誘導体のプロドラッグの相対的効果を、各プロドラッグが癌細胞活性を予め定義した範囲で阻害する濃度を同定し、結果を比較することによって確立することができる。典型的には、好ましい同定は、生化学アッセイにおいて50%の活性を阻害する濃度(すなわち、50%阻害濃度または「IC₅₀」)である。当該分野で公知の従来技術を使用して、IC₅₀を同定することができる。一般に、一定範囲の濃度の研究化合物の存在下での所与の細胞株の活性の測定によって、IC₅₀を同定することができる。次いで、細胞株活性の実験値を、使用した化合物濃度に対してプロットする。50%細胞株活性(いかなるインヒビターの非存在下での活性と比較する)を示すインヒビターの濃度を、IC₅₀値として得る。

40

【0092】

50

ベツリン酸およびベツリン酸誘導体のプロドラッグの IC_{50} 値を、典型的には $0.01 \sim 100 \mu g / mL$ の濃度範囲を使用して濃度 - 応答曲線から同定した。当該分野で周知の方法によって IC_{50} を同定することができる。試験法の例を以下に示す。

【0093】

試験化合物の細胞傷害潜在性を、以前に K. L i k h i t w i t a y a w u i d ら, J. Nat. Prod., 56, 1468 ~ 1478, 1993 に記載のように、種々の細胞株を使用して同定した。簡単に述べれば、種々の濃度の試験化合物（例えば、 $10 L$ の 10% DMSO に溶解した $0.1 \sim 100 \mu g / mL$ ）を、 96 ウェルプレートに移し、 $190 L$ アリコートの細胞懸濁液（例えば、 5×10^4 細胞 / mL ）を、各ウェルに添加した。次いで、プレートを $37^\circ C$ で 72 時間インキュベートし（湿度 100% 、空气中 5% の CO_2 ）、 $100 L$ の冷 20% トリクロロ酢酸水溶液を各ウェル中の成長培地に添加して、細胞を固定した。培養物を $4^\circ C$ で 30 分間インキュベートし、洗浄し、風乾し、スルホローダミン B 溶液で染色し、 1% 酢酸で洗浄した。最後に、 $200 L$ の $10 mM$ T r i s 塩基を各ウェルに添加し、E L I S A プレートリーダーを使用して $515 nm$ で光学密度を同定した。それぞれの場合、いくつかのウェルへの同数の細胞の添加および $37^\circ C$ で 30 分のインキュベーション、および上記のような処理によって、 0 日目コントロールを行った。 0 日目コントロールを使用して得た光学密度値を引き、コントロール（溶媒処理）培地と比較して細胞生存率を計算した。結果を、 IC_{50} 値（すなわち、細胞数を 50% 減少させるために必要な試験化合物の濃度）として示した。

【0094】

誘導体化ベツリン酸プロドラッグを、黒色腫（M e l 2）に対して試験し、i n v i t r o 結果を以下の表にまとめる。

【0095】

【表 3】

化合物	$IC_{50}(\mu g/mL)$	
	Mel 2(10% DMSO) ^a	Mel 2(Media) ^b
27a	> 20	> 20
27d	> 20	> 20
27c	> 20	> 20
27e	> 20	> 20
27f	> 20	> 20
4a	> 20	9.6
4i	5.0	4.0
4j	3.0	1.9
4f	3.3	2.7
28a	1.6	2.8

^a 試験物質を 10% DMSO に溶解した。

^b 試験物質を培地に溶解した。

【0096】

ベツリン酸が悪性黒色腫に対する抗腫瘍薬として i n v i v o で作用する能力を試験するために、ヒト黒色腫細胞（M E L - 2）を皮下注射した無胸腺（ヌード）マウスを使用して一連の研究を行った。最初の研究は、非確立腫瘍に対するベツリン酸活性を調査した。ベツリン酸処理を腫瘍細胞注射から 1 日後（すなわち、 24 時間後）に開始した。 50 、 250 、および $500 mg / kg$ （ミリグラム / キログラム）体重の用量では、ベツリン酸は、コントロールに対する各用量について 0.001 の p 値で腫瘍成長の有効な阻害

を示した。

【0097】

特に、データは、4週齢の無胸腺マウスの右側腹部に 3.0×10^8 UISO MEL-2細胞を皮下注射した実験に由来していた。UISO MRL-2は、ヒト強膜液由来の転移性黒色腫に由来する細胞株である。腫瘍細胞注射の翌日に薬物治療を開始し、4日毎に全部で6回投与を継続した。4匹のコントロールマウスに0.5mlのPVPコントロール溶液を腹腔内(IP)で投与し、治療動物(群あたり4匹)に、50、250、または500mg/kg/用量のIPベツリン酸/PVPの脱イオン水溶液を投与した。ベツリン酸を、PVPと共沈して溶解性および生物学的利用能が増大した。研究を通して、一日おきにマウスを秤量し、マイクロメーターで腫瘍を測定した。コントロールマウスにおける平均腫瘍体積が約 1 cm^3 となった場合、33日目に全動物を屠殺して剖検した。

10

【0098】

最も低用量と比較して最も高用量のベツリン酸でより高い腫瘍成長阻害が認められた($p = 0.04$)。体重減少または他の急性毒性形態において毒性を示すので、毒性はベツリン酸治療に関係なかった。体重減少は認められなかった。

【0099】

次に、確立された黒色腫に対してベツリン酸の*in vivo*試験を行った。この研究では、13日目まで治療を行わず、このときまでに全てのマウスに触知可能な腫瘍塊が存在していた。これらの条件下で、ベツリン酸は首尾よく腫瘍生物を阻止した($p = 0.0001$)。さらに、腫瘍成長は、処理終了から14日後でさえもコントロール(非治療)群の腫瘍成長と類似していなかった。

20

【0100】

特に、4週齢の無胸腺マウスの右側腹部に 5×10^8 個のMEL-2細胞を皮下注射した。各5匹のマウスから構成される4つの治療群について研究を行った。1つの群では、マウスに250mg/kg/用量のベツリン酸/PVPを腫瘍細胞注射の翌日から開始して3日毎に全部で6回IP投与した。コントロール群には、0.5mlの生理食塩水をIP投与した。DTIC治療群には、4mg/kg/用量のDTICを3日毎に研究の13~28日目にIP投与した。ベツリン酸治療群には、250mg/kg/用量のベツリン酸/PVPを13~27日目に3日毎にIP投与した。腫瘍負荷量が増大したために、36日目にコントロールおよびDTIC治療マウスを屠殺して剖検した。41日目に残りのマウスを屠殺して剖検した。

30

【0101】

ベツリン酸の有効性もまた転移性黒色腫治療に臨床的に利用可能なDTICと比較した。毒性によって制限されるDTICの用量を、ヒト患者と同一の投与量になるように選択した。ベツリン酸治療群における腫瘍成長は、DTIC治療動物で認められる成長よりも有意に小さい($p = 0.0001$)。コントロールと比較して、DTICは、有意であるがあまり顕著ではない腫瘍成長の減少が認められる(p 値は0.01)。本研究の第4群を、第1の研究に類似のスケジュールで処理した。先に示したように、これらの条件下では、ベツリン酸は腫瘍発達を有意に阻害し($p = 0.0001$)、治療終了から3週間まで腫瘍成長の減少を延長させた。

40

【0102】

ベツリン酸は、MEL-1細胞に対する活性も示した。特に、4週齢の無胸腺マウスの右側腹部に 5.0×10^8 個のUISO MEL-1細胞を皮下注射した。腫瘍細胞注射の翌日から薬物治療を開始し、4日毎に全部で6回継続した。4匹のコントロール動物に0.5mlの性衿食塩水を腹腔内(IP)投与し、治療動物(群あたり4匹)に、5、50、または250mg/kg/用量のベツリン酸/PVPの ddH_2O 溶液をIP投与した。研究を通して、3日毎マウスを秤量し、マイクロメーターで腫瘍を測定した。コントロールマウスにおける平均腫瘍体積が約 0.5 cm^3 である場合、41日目に治療動物を屠殺して剖検した。次いで、コントロールマウスに50mg/kgの用量を41日目から開始して4日毎に6回投与し、71日目に屠殺して剖検した。

50

【0103】

MEL-1細胞に関する結果は、MEL-2細胞に関する結果と類似していた。したがって、ベツリン酸は、MEL-1およびMEL-2細胞のいずれにも活性である。ベツリン酸および誘導体の黒色腫に対する in vivo 活性および他の癌形態に対する in vivo 活性に関するさらなる情報については、Pezzutoら、米国特許第5,962,527号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

【0104】

固有の in vitro 細胞傷害プロフィール、有意な in vivo 活性、および作用様式を考慮して、ベツリン酸は、ヒト黒色腫治療用の例外的に魅力的な化合物である。ベツリン酸はまた、500mg/kgのベツリン酸用量を反復投与した結果、急性の毒性徴候または体重の減少を起こすことがないことによって証明されるように、比較的毒性が低い。ベツリン酸は、ヒポクラテスクリーンにおいて200および400mg/kgの用量で不活性であることが以前に認められていた。

10

【0105】

特に、ベツリン酸誘導体を合成し、生物学的に評価して、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体が in vitro でヒト黒色腫細胞株に対する選択的抗腫瘍活性を有することが示された。親構造のベツリン酸およびベツリン酸誘導体の修飾により、容易に処方して固体に投与することができ、ベツリン酸またはベツリン酸誘導体を放出し、悪性腫瘍成長、特にヒト黒色腫を予防または阻害するために使用することができる多数のプロドラッグが得られることが示された。ベツリン酸およびベツリン酸誘導体の抗腫瘍活性は、これらの化合物が黒色腫に対して高い活性を示すが、この化合物はまた水溶性が低いので、治療上重要である。しかし、ベツリン酸および誘導体の水溶性の低さは、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体の適切なプロドラッグの提供によって克服することができる。

20

【0106】

上記の合成スキームは、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体の修飾により、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体を in vivo で放出することができるプロドラッグを得ることができることを示す。したがって、プロドラッグは、黒色腫および他の癌に対する強力な抗腫瘍薬として使用することができる。プロドラッグの調製により、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体の低水溶性が克服される。

【0107】

したがって、ベツリン酸およびベツリン酸誘導体のプロドラッグは種々の癌（例えば、黒色腫、扁平上皮腫瘍、乳がん、大腸癌、肉腫、ヒト口腔表皮癌、前立腺癌、肺癌、神経膠腫、または神経芽腫）の治療に有用であることが予想される。したがって、本発明は、ヒトを含む哺乳動物の癌の治療または予防用薬物の製造のためのベツリン酸およびベツリン酸誘導体のプロドラッグまたはこのような構成要素を含む薬学的組成物の使用に関する。

30

【0108】

用語「治療」には、治療された病態または症状の進行または重症度の予防、低減、停止、または逆転が含まれる。したがって、用語「治療」には、必要に応じて、治療および/または予防投与の両方が含まれる。

【0109】

「ベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグ」を、そのままの化合物として、またはこのような構成要素を含む薬学的組成物として投与することができることも理解される。

40

【0110】

さらなる態様では、本発明は、治療有効量のベツリン酸またはベツリン酸誘導体のプロドラッグを身体に投与する工程を含む、ヒトまたは非ヒト動物の身体における癌の治療法を提供する。

【0111】

本発明のプロドラッグを、任意の適切な経路（例えば、経口、口内、吸入、舌下、直腸、膣、経尿道、鼻腔内、局所、経皮（すなわち、経皮）、非経口（静脈内、筋肉内、皮下、

50

および歯冠内を含む)投与)で投与することができる。非経口投与をニードルおよびシリンジを使用するか高圧技術(P O W D E R J E C T (登録商標))を使用して行うことができる。

【0112】

本発明での使用に適切な化合物および薬学的組成物には、その意図する目的の達成のために有効な量でプロドラッグが投与されるものが含まれる。より詳細には、「治療有効量」は、治療を受ける被験体の治療もしくは発症の予防または既存の症状の緩和に有効な量を意味する。有効量の決定は、特に本明細書中の詳細な開示を考慮して十分に当業者の範囲内である。

【0113】

「治療有効量」は、所望の効果が達成されるプロドラッグの量をいう。プロドラッグの毒性および治療有効性を、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順(例えば、LD₅₀(集団の50%が死亡する用量)およびED₅₀(数段の50%に治療上有効な用量)の同定)によって同定することができる。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、LD₅₀とED₅₀との間の比で示される。治療指数の高い化合物が好ましい。得られたデータを、ヒト用の投薬量範囲での処方に使用することができる。このような化合物の投薬量は、好ましくは毒性がほとんどないか全く無いED₅₀を含む循環濃度範囲内である。投薬量は、使用する投薬形態および使用する投与経路に依存してこの範囲内で変化し得る。

10

【0114】

正確な処方、投与経路、および投薬量を、治療を受ける特定の疾患および患者の健康状態を考慮して各医師が選択することができる。投薬量および間隔をそれぞれ調整して治療効果の維持に十分な活性部分の血漿レベルを得ることができる。

20

【0115】

プロドラッグの投与量は、治療を受ける患者、患者の体重、疾患の重症度、投与様式、および処方する医師の判断に依存する。

【0116】

特に、上記で同定した病態および傷害の治療または予防治療におけるヒトへの投与のために、本発明のプロドラッグの投薬量は、一般に、平均的な成人患者(70kg)では毎日約0.5~約1000mgである。したがって、典型的な成人患者用の個別の錠剤またはカプセルは、単回投与または複数回投与、1日に1回または数回投与するために、適切な薬学的に許容可能な賦形剤またはキャリア中に0.2~500mgのプロドラッグを含む。静脈内、口内、または舌下投与のための投薬量は、典型的には、必要に応じて1回の投与あたり0.1~500mgである。実際には、各患者に最適な実際の投与計画を医師が決定し、この投薬量は特定の患者の年齢、体重、および応答によって変化する。上記の投薬量は平均的な症例の例示であるが、より高いまたは低い投薬量が有利である場合があり、これは本発明の範囲内である。

30

【0117】

ヒトについて本発明のプロドラッグを単独で投与することができるが、一般に、意図する投与経路および標準的な薬学上の業務に関して選択された薬学的キャリアとの混合物で投与される。したがって、本発明で使用する薬学的組成物を、プロドラッグの薬学的に使用することができる調製物への処理を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容可能なキャリアを使用した従来の様式で処方することができる。

40

【0118】

これらの薬学的組成物を、従来の様式(例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣丸作製、微粒子化、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥プロセス)で製造することができる。適切な処方、選択した投与経路に依存する。治療有効量の本発明のプロドラッグを経口投与する場合、典型的には、組成物は、錠剤、カプセル、粉末、溶液、またはエリキシルの形態である。錠剤形態で投与する場合、組成物は、さらにゼラチンまたはアジュバントなどの固体キャリアを含むことができる。錠剤、カプセル、および粉末は、約5~約

50

95%の本発明のプロドラッグ、好ましくは約25～約90%の本発明のプロドラッグを含む。液体形態で投与する場合、水、石油、または動物油または植物油などの液体キャリアを添加することができる。組成物の液体形態は、さらに、生理食塩水、デキストロースもしくはは他の糖類溶液、またはグリコールを含むことができる。液体形態で投与する場合、組成物は約0.5～約90重量%の本発明のプロドラッグ、好ましくは約1～約50重量%の本発明のプロドラッグを含むことができる。

【0119】

治療有効量の本発明のプロドラッグを、静脈内、皮膚、または皮下注射によって投与する場合、組成物は、無発熱物質の非経口で許容可能な水溶液の形態である。pH、等張性、安定性などを十分に考慮したこのような非経口で許容可能な溶液の調製は、当業者の範囲内である。静脈内、皮膚、皮下注射に好ましい組成物は、典型的には、本発明の化合物に加えて、等張性賦形剤を含む。

10

【0120】

経口投与のために、本発明のプロドラッグと当該分野で周知の薬学的に許容可能なキャリアとの組み合わせによって化合物を容易に処方することができる。このようなキャリアは、治療を受ける患者による経口注入のために、本発明の化合物を錠剤、丸薬、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することができる。経口用薬学的調製物を、式(I)の化合物への固体賦形剤の添加、任意選択的に得られた混合物の粉碎、および所望ならば適切な補助薬の添加後の顆粒混合物の処理による錠剤および糖衣丸コアの獲得によって得ることができる。適切な賦形剤には、例えば、充填薬およびセルロース調製物が含まれる。所望ならば、崩壊薬を添加することができる。

20

【0121】

吸入投与のために、本発明の化合物は、適切な噴射剤を使用する加圧パックまたは噴霧器からのエアゾールスプレイの形態で都合よく送達される。加圧エアゾールの場合、投薬単位を、一定量を送達させるバルブの設置によって同定することができる。例えば、化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤の粉末混合物を含む吸入器または注入器用のゼラチンなどのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

【0122】

注射（例えば、ボラス注射または継続的注入）による非経口投与のためのプロドラッグを処方することができる。注射用処方物は、単位投薬形態（例えば、防腐剤を含むアンプルまたは複数回投与コンテナ）で存在することができる。この組成物は、懸濁液、溶液、油性または水性賦形剤中の乳濁液などの形態をとることができ、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの処方剤を含み得る。

30

【0123】

非経口投与用の薬学的処方物には、水溶性形態のプロドラッグ水溶液が含まれる。さらに、プロドラッグの懸濁液を、適切な油性注射用懸濁液として調製することができる。適切な真油性溶液または賦形剤には、脂肪油または合成脂肪酸エステルが含まれる。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質を含み得る。任意選択的に、懸濁液はまた、適切な安定剤または化合物の溶解性を増大させて高濃縮溶液をつくることが可能な薬剤を含み得る。あるいは、本発明の組成物は、適切な賦形剤（例えば、滅菌無発熱物質水）で使用前に構築するための粉末形態であり得る。

40

【0124】

本発明のプロドラッグを、従来の坐剤用基剤を含む直腸組成物（坐剤または浣腸など）に処方することもできる。先に記載の処方物に加えて、蓄積調製物として処方することができる。このような長期作用処方物を、移植（例えば、皮下または筋肉内）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、適切な重合または疎水性材料（例えば、許容可能な油中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂を使用して、または溶解性の低い誘導体（例えば、溶解性の低い塩）として処方することができる。

【0125】

特に、本発明のプロドラッグを、デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤を含む錠剤の

50

形態、単独または賦形剤との混合物のいずれかを含むカプセルもしくは小卵、または香料または着色料を含むエリキシルまたは懸濁液の形態で、経口、口内、または舌下投与することができる。このような液体調製物を、懸濁剤などの薬学的に許容可能な添加物を使用して調製することができる。プロドラッグを、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、皮下、または歯冠内）で注射することができる。非経口投与のために、プロドラッグを、溶液を血液と等張にするために他の物質（例えば、塩またはマンニトールまたはグルコースなどの単糖類）を含み得る滅菌水溶液の形態で使用する事が最良である。

【 0 1 2 6 】

獣医学的使用のために、本発明のプロドラッグまたはその無毒の塩を、通常の獣医学上の業務にしたがって適切に許容可能な処方物として投与する。獣医師は、特定の動物に最適な投与計画および投与経路を容易に決定することができる。

10

【 0 1 2 7 】

したがって、さらなる態様では、本発明は、薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアと共に本発明のプロドラッグを含む薬学的組成物を提供する。本発明は、さらに、本発明のプロドラッグと薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアと混合する工程を含む、薬学的組成物の調製法を提供する。

【 0 1 2 8 】

特定の実施形態では、本発明には、薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアと共に本発明のプロドラッグを含む、ヒトを含む哺乳動物における癌の治療または予防的治療用の薬学的組成物が含まれる。

20

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16395 A1

- (51) International Patent Classification: C07J 63/00, A61K 31/56, A61P 35/00, 31/18
- (21) International Application Number: PCT/US01/25581
- (22) International Filing Date: 15 August 2001 (15.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/226,536 18 August 2000 (18.08.2000) US
- (71) Applicants: **THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS** [US/US], 352 Administration Building, 506 South Wright Street, Urbana, IL 61801 (US). **ADVANCED LIFE SCIENCES INC.** [US/US], 12305 South New Avenue, Lemont, IL 60439 (US).
- (72) Inventors: **PEZZUTO, John, M.**, 846 Bonnie Brue Place, River Forest, IL 60305 (US). **KOSMEDER, Jerome, W., II**, 215B Washington Boulevard, #2, Oak Park, IL 60302 (US). **XU, Ze-Qi**, 6609 Chick Evans Lane, Woodridge, IL 60517 (US). **ZHOU, Nian, En**, 2204 Mercer Court, Naperville, IL 60565 (US).
- (74) Agent: **NAPOLI, James, J.**, Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/16395 A1

(54) Title: PRODRUGS OF BETULINIC ACID DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CANCER AND HIV

(57) Abstract: A composition and method of preventing or inhibiting tumor growth and, more particularly, of treating a malignant tumor, using prodrugs of plant-derived compounds and derivatives is disclosed. In the method, a composition containing betulnic acid or a betulnic acid derivative is administered in a prodrug form to release betulnic acid or a betulnic acid derivative *in vivo* at the tumor site.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

PRODRUGS OF BETULINIC ACID DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CANCER AND HIV

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims the benefit of
5 U.S. provisional patent application No. 60/226,536,
filed August 18, 2000.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to compositions and methods of inhibiting tumors and, more
10 particularly, of treating a malignant tumor, like a
melanoma, using plant-derived compounds and derivatives thereof, and in particular, prodrugs of betulinic acid and betulinic acid derivatives.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Over the past four decades the incidence
of melanoma has been increasing at a higher rate
than any other type of cancer. It is now theorized
that one in ninety American Caucasians will develop
malignant melanoma in their lifetime. While an in-
20 creasing proportion of melanomas are diagnosed
sufficiently early to respond to surgical treatment
and achieve a greater than 90% ten-year survival
rate, it is estimated that nearly 7,000 individuals
suffering from metastatic melanoma will die in the
25 United States each year.

For patients afflicted with a metastatic
melanoma not amenable to surgical extirpation,
treatment options are limited. 5-(3,3-Dimethyl-1-
triazenyl)-1-H-imidazole-4-carboxamide (dacarbazine,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 2 -

DTIC) is the most efficacious single chemotherapeutic agent for melanoma having an overall response rate of 24%. But the duration of response to DTIC is generally quite poor. Combination therapy with other synthetic and recombinant agents, including N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea (carmustine, BCNU), cisplatin, tamoxifen, interferon-alpha (INF- α), and interleukin-2 (IL-2), has a higher response rate (e.g., 30-50%) in some trials, but a durable complete response rate is uncommon and toxicity is increased. Sequential chemotherapy also has promise, but current treatment options for individuals suffering from metastatic melanoma are unsatisfactory.

Various drugs derived from natural products, such as adriamycin (doxorubicin), bleomycin, etoposide, and vincristine, and their derivatives, have been tested for efficacy against melanoma either as single agents or in combination therapy. However, similar to the synthetic and recombinant compounds, these compounds exhibit low response rates, transient complete responses, and high toxicities.

Nonetheless, as demonstrated by known and presently used cancer chemotherapeutic agents, plant-derived natural products are a proven source of effective drugs. Two such useful natural product drugs are paclitaxel (taxol) and camptothecin. Paclitaxel, originally derived from the bark of the Pacific yew tree *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), currently is used for the treatment of refractory or residual ovarian cancer. More recently, clinical trials have investigated the possible role of paclitaxel in the treatment of metastatic melanoma.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 3 -

As a single agent, taxol displays activity comparable to cisplatin and IL-2. Taxol functions by a unique mode of action, and promotes the polymerization of tubulin. Thus, the antitumor response mediated by taxol is due to its antimitotic activity.

The second drug of prominence, camptothecin, was isolated from the stem bark of a Chinese tree, *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae). Camptothecin also functions by a novel mechanism of action, i.e., the inhibition of topoisomerase I. Phase II trials of a water-soluble camptothecin pro-drug analog, irinotecan (CPT-11), have been completed in Japan against a variety of tumors with response rates ranging from 0% (lymphoma) to 50% (small cell lung). Topotecan, another water-soluble camptothecin analog, currently is undergoing Phase II clinical trials in the United States.

In addition, studies have shown that betulinic acid, and betulinic acid derivatives, can inhibit other types of cancer cells, such as neuroblastoma, in addition to melanoma. For example, Das Gupta et al. U.S. Patent No. 5,658,947 discloses that betulinic acid is useful for the selective control or treatment of human melanoma, and Pezzuto et al. U.S. Patent No. 5,962,527 discloses the selective activity of derivatives of betulinic acid against melanoma cells.

However, a disadvantage associated with the use of betulinic acid or a betulinic acid derivative in the treatment of a cancer is the problem encountered in formulating these active drugs and in providing suitable dosage forms for the treatment of various cancers. The present application is directed

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 4 -

ted to overcoming this disadvantage and providing
useful prodrugs of betulinic acid and derivatives
thereof that are easy to formulate into a variety of
dosage forms and that release betulinic acid or the
5 derivative thereof *in vivo*.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a
method and composition for preventing or inhibiting
tumor growth. The active compound is a prodrug of
10 betulinic acid or a betulinic acid derivative which
generates betulinic acid or a derivative thereof *in*
vivo. Betulinic acid is a natural product obtained
by a method comprising the steps of preparing an
extract from the stem bark of *Ziziphus mauritiana*
15 and isolating the betulinic acid. Alternatively,
betulin can be isolated from the extract, and betu-
linic acid then is prepared from betulin by a series
of synthetic steps.

Betulinic acid can be isolated from the
20 extract by mediating a selective cytotoxic profile
against human melanoma in a subject panel of human
cancer cell lines, conducting a bioassay-directed
fractionation based on the profile of biological
activity using cultured human melanoma cells (MEL-2)
25 as the monitor, and obtaining betulinic acid there-
from as the active compound. The resulting betulin-
ic acid can be used to prevent or inhibit tumor
growth, or can be converted to a derivative to pre-
vent or inhibit tumor growth.

30 The physiochemical properties of betulinic
acid, e.g., a high melting point and limited solu-
bility in hydrophilic and hydrophobic solvents, make

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 5 -

it difficult to produce betulinic acid-containing pharmacological formulations. The present invention is directed to providing betulinic acid or a betulinic acid derivative in a form that is easy to
5 formulate and wherein endogenous enzymes can release the active betulinic acid or derivative *in vivo*.

Therefore, an important aspect of the present invention is to provide a method and composition for preventing or inhibiting tumor growth and, particularly, for preventing or inhibiting the
10 growth of a malignant tumor using a natural product-derived compound, or a derivative thereof, in an easy-to-formulate form.

Another aspect of the present invention is to improve the bioavailability of betulinic acid and betulinic acid derivatives in an individual by administering a therapeutically effective amount of a prodrug of betulinic acid or betulinic acid derivative to an individual in need thereof.
15

Another aspect of the present invention is to provide a treatment method utilizing a prodrug of betulinic acid or derivative thereof to prevent the growth or spread of cancer cells, wherein betulinic acid or a derivative thereof is administered to an
20 individual in need thereof in a manner consistent with the treatment of a cancer sensitive to betulinic acid or a derivative thereof, e.g., in a topical preparation for the prevention, inhibition, or treatment of melanoma, or intravenously or intraperitoneally for other forms of cancer.
25 30

Yet another aspect of the present invention is to overcome the problem of high mammalian toxicity associated with synthetic anticancer agents by using a natural product-derived compound, e.g., a

WO 02/16395

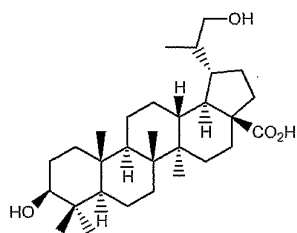
PCT/US01/25581

- 6 -

prodrug of betulinic acid or a betulinic acid derivative.

Yet another aspect of the present invention is to provide a composition and method of treating various forms of cancer with a naturally occurring product, or a derivative thereof. In particular, the present invention is directed to inhibiting malignant tumor growth associated with melanoma, neuroblastoma, breast cancer, lung cancer, fibrosarcoma, colon cancer, oral epidermoid carcinoma, epidermoid carcinoma, prostate cancer, hormone-dependent breast cancer, and glioma.

In particular, an aspect of the present invention is to provide a composition for treating tumor growth comprising:

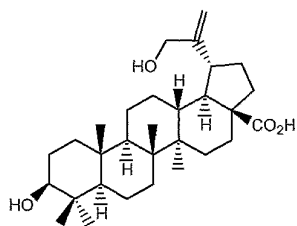


or

WO 02/16395

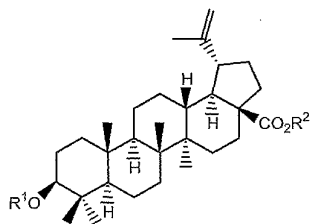
PCT/US01/25581

- 7 -



and (b) an optional carrier.

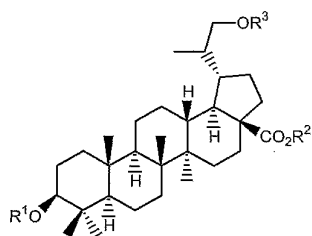
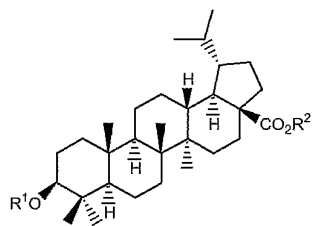
Another aspect of the present invention is
to provide a composition for treating tumor growth
5 comprising;



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 8 -

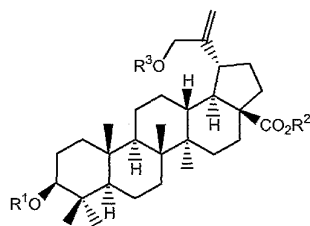


, and

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 9 -



- wherein R^1 and R^3 , independently, are selected from the group consisting of hydrogen, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{NR}^4\text{R}^5$, $\text{CO}(\text{C}_{1-3}\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, $\text{COCH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NR}^4\text{R}^5$, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})$, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, $\text{CO}(\text{C}_{1-6}\text{alkyl})\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{OCO}_2\text{C}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{OCOC}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{PO}(\text{OH})_2$, and SO_3H ,
- R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkylNR}^4\text{R}^5$, $\text{CH}_2\text{OCOC}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{PO}(\text{OH})_2$, SO_3H , $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NR}^4\text{R}^5$, $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, and $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$,
- R^4 and R^5 , independently, are selected from the group consisting of hydrogen, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl}$, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})$, and aryl, or R^4 and R^5 can be taken together to form a 5 to 7 membered ring,
- and n is 1 to 10;
- and pharmaceutically acceptable salts thereof,
- and (b) an optional carrier.
- Yet another aspect of the present invention is to provide a method of treating cancer sensitive to betulinic acid or a derivative thereof comprising administering to an individual in need

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 10 -

thereof a therapeutically effective amount of a pro-drug of betulinic acid or a derivative of betulinic acid. In particular, wherein the cancer is selected from the group consisting of a melanoma, a squamous tumor, a breast cancer, a colon cancer, a sarcoma, a human oral epidermal carcinoma, a hormone-dependent breast cancer, a prostate cancer, a lung cancer, a glioma, a melanoma, and a neuroblastoma.

These and other aspects of the present invention will become apparent from the following description of the invention, which are intended to limit neither the spirit nor scope of the invention but are only offered as illustrations of the preferred embodiments of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Betulinic acid, 3 β -hydroxy-lup-20(29)-ene-28-oic acid, is a natural, pentacyclic triterpene product isolated from several genus of higher plants. Betulinic acid has demonstrated remarkable selective antitumor activity against human melanoma (E. Pisha et al., *Nature Medicine*, 1, pp. 1046-1051 (1995)) and anti-HIV activity (T. Fujioka et al., *J. Nat. Prod.*, 57, pp. 243-247 (1994)).

Through a bioassay-directed fractionation of the stem bark of *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), betulinic acid was isolated as an active compound that showed a cytotoxicity against cultured human melanoma cells. Betulinic acid was found to be an excellent antitumor compound against human melanoma due to its unique *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity profile. Betulinic acid showed a

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 11 -

strong selective antitumor activity against melanoma by induction of apoptosis.

Betulinic acid also was found to have activity against the other cancer cell lines that were tested. The cytotoxicity of betulinic acid, and its lack of toxicity toward normal cells, afford a favorable therapeutic index. The cell lines evaluated for cytotoxicity were A431 (squamous), BC-1 (breast), ZR-75-1 (hormone-dependent human breast cancers), neuroblastoma, COL-2 (colon), HT-1080 (sarcoma), KB (human oral epidermoid carcinoma), LNCaP (prostate), LU-1 (lung), U373 (glioma), and MEL-1, -2, -3, and -4 (melanoma).

The bark of white birch, *Betula alba*, contains betulin (up to about 25%), lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol, and betulinic acid (0.025%), but it is difficult to isolate a sufficient quantity of betulinic acid to perform an extensive bioassay. It has been found that a quantity of betulinic acid could be provided from betulin through a simple synthetic approach.

As shown in Table 1, *in vitro* growth of MEL-2 cells was inhibited by betulinic acid, i.e., an ED₅₀ value of about 2 μ g/ml. In this particular test, none of the other cancer cell lines tested was affected by betulinic acid (i.e., ED₅₀ values of greater than 20 μ g/ml). The cytotoxic response mediated by betulinic acid is not exclusively limited to the MEL-2 melanoma cell line. Dose-response studies performed with additional human melanoma cell lines, designated MEL-1, MEL-3 and MEL-4, demonstrated ED₅₀ values of 1.1, 3.3 and 4.8 μ g/ml, respectively.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 12 -

As further illustrated in Table 1, other known antitumor agents, such as paclitaxel, camptothecin, ellipticine, homoharringtonine, mithramycin A, podophyllotoxin, vinblastine, and vincristine, demonstrated relatively intense, nonselective cytotoxic activity with no discernible cell-type selectivity.

In the following Table 1, the extracted betulinic acid and the other pure compounds were tested for cytotoxicity against the following cultured human cell lines: A431 (squamous cells), BC-1 (breast), COL-2 (colon), HT-1080 (sarcoma), KB (human oral epidermoid carcinoma), LNCaP (prostate), LU-1 (lung), MEL-2 (melanoma), U373 (glioma) and ZR-75-1 (breast).

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 13 -

TABLE 1										
Cytotoxic Activity Profile of the Crude Ethyl Acetate Extract Obtained from <i>Ziziphus mauritiana</i> , Betulinic acid, Other Antineoplastic Agents										
Compound	A431	BC-1	COL-2	ED ₅₀ (μg/ml)						
				HT-1080	KB	LNcap	LU-1	MEL-2	U373	2R 75-1
<i>Ziziphus mauritiana</i> crude extract	>20	>20	>20	9.5	>20	>20	5.2	3.7	>20	15.8
Betulinic acid	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	2.0	>20	>20
Taxol	0.00	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.00	0.06	0.008	0.02
Camptothecin	0.00	0.07	0.005	0.01	0.00	0.006	0.00	0.02	0.000	0.001
Ellipticine	0.5	0.2	0.3	1.8	0.04	0.8	0.02	0.9	1.6	0.9
Homoharringtonine	0.02	0.03	0.1	0.01	0.00	0.03	0.03	0.04	0.2	0.06
Mithramycin A	0.09	0.3	0.06	1.5	0.09	0.05	0.2	1.2	0.04	0.2
Podophyllotoxin	0.03	0.03	0.005	0.00	0.08	0.04	0.00	0.003	0.004	0.4
Vinblastine	0.05	0.06	0.01	0.02	0.04	0.1	0.02	0.01	1.1	0.3
Vincristine	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.1	0.05	0.02	0.06	0.4

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 14 -

When using the test method used to develop the data in Table 1 (i.e., Method A), the greatest cytotoxic activity in response to betulinic acid was observed against human melanoma cells. Based on the data summarized in Table 1, *in vivo* studies using betulinic acid were performed. As set forth in Table 2, when betulinic acid was tested for cytotoxicity against cancer cell lines using other tests (i.e., Methods B and C), appreciable activity also was observed against other human cancer cell types (e.g., breast, sarcoma, lung, colon, squamous cell, prostate, and glioma). However, the greatest activity was observed against human melanoma cells. Betulinic acid also showed excellent cytotoxic activity against human neuroblastoma cell lines.

As confirmed by the data summarized in Table 1, betulinic acid has been reported as noncytotoxic with respect to cultured KB cells. Cytotoxicity of the crude extracts and purified compounds was determined in a number of cultured human cancer cell lines. Table 1 sets forth the various types of cancer cells evaluated using Method A. The cells were cultured in appropriate media and under standard conditions. To maintain logarithmic growth, the media were changed 24 hours prior to cytotoxic assays. On the day of the assay, the cells were harvested by trypsinization, counted, diluted in media, and added to 96-well plates containing test compounds dissolved in DMSO. The final DMSO concentration was 0.05%.

Table 2 summarizes test data showing the cytotoxicity of betulinic acid using test samples dissolved in tissue culture media (Method B) or 5% aqueous bovine serum albumin (Method C). Methods B and C illustrate the cytotoxicity of betulinic acid

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 15 -

against cancer cell lines in addition to melanoma, particularly breast cancer, fibrosarcoma, lung cancer, colon cancer, epidermoid carcinoma, hormone-dependent breast cancer, and glioma.

5 In each of Methods A-C, the plates were incubated for three days. Following the incubation period, the cells were fixed and stained with sulforhodamine B (SRB) dye. The bound dye was liberated with Tris base, and the OD_{515} (optical density at 515 nm) was measured on an ELISA reader. The
10 growth of the betulinic acid-treated cells was determined by the OD_{515} values, and the growth was compared to the OD_{515} values of treated control cells of Methods A-C. Dose response studies were performed to generate ED_{50} values. As used herein, the
15 term OD_{515} is defined as optical density at 515 nM, and the term ED_{50} is defined as the concentration of a compound required to reduce cell number by 50%.

Table 2												
Betulinic Acid	BCL	NT	Lu1	Me11	Me12	Me14	ED ₅₀ (ug/ml)					
							Col2	KB	A431	LNcap	ZA-75-1	U373
Method A	>20	>20	>20	1.1	1.9	4.8	17.2	19.2	>20	>20	>20	>20
Method B	11.2	11.3	7.7	0.9	0.9	1.6	13.3	>20	12.1	19.3	6.4	12.1
Method C	12.6	10.0	NT	NT	1.6	NT	NT	16.6	>20	16.6	6.9	18.7

Sample dissolved in 10% DMSO (Method A), tissue culture media (Method B), or 5% aqueous bovine serum albumin (Method C). Cell lines: BCL, human breast cancer; NT, human fibrosarcoma; Lu1, human lung cancer; Me11, Me12, Me14, human melanoma; Col2, human colon cancer; KB, epidermoid carcinoma; A431, epidermoid carcinoma; LNcap, human prostate cancer; ZA-75-1, hormone-dependent human breast cancer; U373, human glioma; NT, not tested.

WO 02/16395

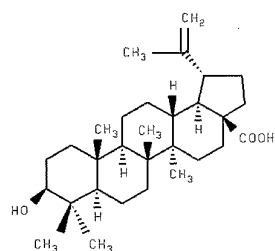
PCT/US01/25581

- 17 -

The present invention, therefore, is directed to a method and composition for preventing or inhibiting tumor growth. The ultimate active compound is betulinic acid or a derivative of betulinic acid, which is generated *in vivo* from a pro-drug of betulinic acid or derivative thereof. Betulinic acid can be isolated by a method comprising the steps of preparing an extract from the stem bark of *Ziziphus mauritiana* and isolating the betulinic acid. Alternatively, betulin can be isolated from the extract and used as a precursor for the synthesis of betulinic acid. The betulinic acid then is optionally converted to a betulinic acid derivative, followed by conversion of betulinic acid or derivative thereof to a prodrug.

Betulinic acid has the structural formula

(1):



(1)

Betulinic acid is fairly widespread in the plant kingdom, and some biological activities have been reported.

- 18 -

Betulinic acid was obtained by extracting a sample of air-dried, milled stem bark (450 g) of *Z. mauritiana* with 80% aqueous methanol. The aqueous methanol extract then was partitioned successively with hexane and ethyl acetate to provide hexane, ethyl acetate, and aqueous extracts. Among these extracts, the ethyl acetate (13.5 g) extract showed cytotoxic activity against a cultured melanoma cell line (MEL-2) with an ED_{50} of 3.7 $\mu\text{g/ml}$. The ethyl acetate extract was chromatographed on a silica gel column using hexane-ethyl acetate (4:1 to 1:4) as eluent to give 10 fractions. Fractions 3 and 4 were combined and subjected to further fractionation to afford an active fraction (fraction 16) showing a major single spot by thin-layer chromatography (R_f 0.67: CHCl_3 :MeOH (chloroform:methanol) (10:1)), which yielded 72 mg of colorless needles after repeated crystallization from methanol (overall yield from dried plant material: 0.016% w/w).

The isolated active compound, betulinic acid (ED_{50} of 2.0 $\mu\text{g/ml}$ for MEL-2), has a molecular formula of $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, as determined by high-resolution mass spectral analysis, a melting point range of 292-293°C (decomposition). The literature melting point range for betulinic acid is 290-293°C. A mixed melting point range with a known sample of betulinic acid was not depressed. The optical rotation of the compound was measured as +7.3° ($c=1.2$; pyridine) (lit. +7.5°). The identity of the isolated compound as betulinic acid was confirmed by comparing the above physical properties, as well as $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and mass spectral data of the isolated compound, with physical data and spectra of a known sample of betulinic acid as reported in the literature.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 19 -

Prodrugs of betulinic acid derivatives also can be used in the composition and method of the present invention. An examination of the structure of betulinic acid reveals that betulinic acid contains several positions, i.e., the C-3, C-20, C-28, C-29, and C-30 positions, where functional groups can be introduced. For example, see Pezzuto et al. U.S. Patent No. 5,962,527, incorporated herein by reference. In addition, the introduced functional groups, if desired, then can be modified. Through a series of reactions at these five positions, a large number of betulinic acid derivatives were prepared and evaluated for bioefficacy against a series of human tumor cell lines, especially against human melanoma cell lines.

It is well established that a prodrug approach, wherein a drug is derivatized into a form suitable for formulation and/or administration, and then is released as the drug *in vivo*, has been successfully employed to transiently (e.g., bioreversibly) alter the physicochemical properties of the drug (see, H. Bundgaard, Ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier, Amsterdam, (1985); R.B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, San Diego, chapter 8, (1992); K.M. Hillgren et al., *Med. Res. Rev.*, 15, 83 (1995)).

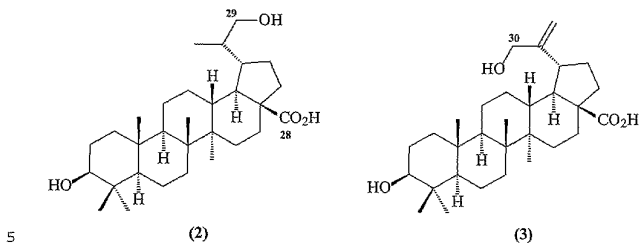
Generally, two strategies can be used to increase aqueous solubility of a drug compound: (a) introduction of an ionic or ionizable group and (b) derivatization in such a manner that the prodrug has a decreased melting point (see G.L. Amidon, *Techniques of Solubilization of Drugs*, Yalkowsky et al., Ed., Marcel Dekker, New York, pp. 183-221, (1981)). Both the 3-OH and the carboxylic acid group (C-28)

WO 02/16395

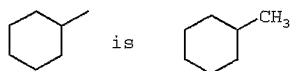
PCT/US01/25581

- 20 -

of betulinic acid are potential positions for such modifications. In addition, introduction of a hydroxy group at either the C-29 (2) or C-30 (3) position allows for similar modifications.



In the structures herein, for a bond lacking a substituent, the substituent is methyl, for example,



- 10 When no substituent is indicated as attached to a carbon atom on a ring, it is understood that the carbon atom contains the appropriate number of hydrogen atoms.

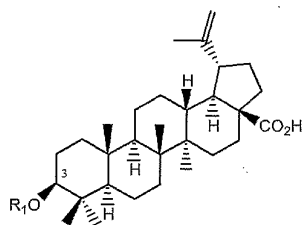
- 15 Among the ionic or ionizable promoieties, a hemisuccinate, a dialkylaminoacetate, and an amino acid ester are commonly used esters for increasing

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 21 -

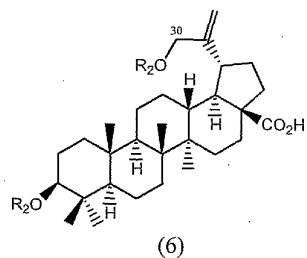
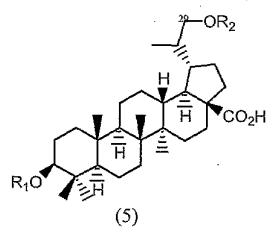
aqueous solubility of a hydroxy group-containing drug. Therefore, compounds 4a-4g, 5a-5g, and 6a-6g can be synthesized. Because the susceptibility of esters to undergo chemical and/or enzymatic hydrolysis varies widely, the present compounds, including both anionic and cationic moieties, are expected to be suitable substrates for a variety of endogenous hydrolytic enzymes, such as esterases, and to deliver the parent drug, i.e., betulinic acid or a betulinic acid derivative, bioreversibly.



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 22 -

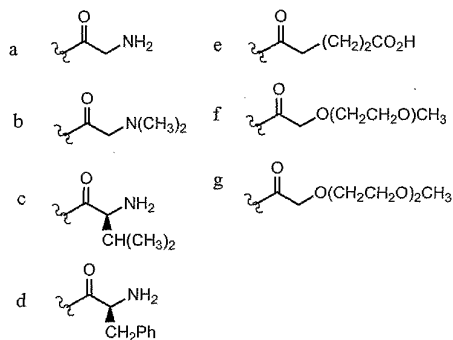


wherein R_1 and R_2 , independently, are selected from the group consisting of:

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 23 -

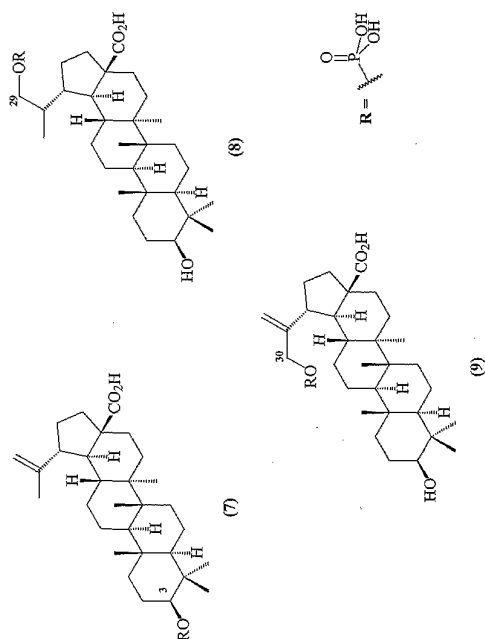


Phosphate prodrugs also can be used to overcome drug delivery problems that can compromise the therapeutic benefits of the parent drug (see, M.G. Nicolaou et al., *J. Org. Chem.*, 61, 8636, (1996), for example). In the presence of alkaline phosphatase, an enzyme widely distributed in a variety of tissues such as the liver, kidney tubules, and intestinal epithelium, for example, phosphomonoesters can undergo hydrolysis to release the parent hydroxy-containing drug and an inorganic phosphate. The phosphate prodrugs 7-9 are designed to be a substrate for the endogenous alkaline phosphatases.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 24 -

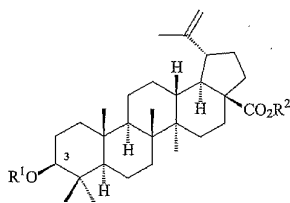


WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 25 -

Compounds 10a-10b, 11a-11g, and 12a-12g are pivalyloxymethyl derivatives. This (acyloxy)-alkyl class of prodrugs have proven useful with respect to improving the biological availability of a parent carboxylic acid, as well as alcohols (see, N. Bodor et al., *Int. J. Pharm.*, 7, 63 (1980); and N. Bodor et al., *J. Org. Chem.*, 48, 5280 (1983)). For example, the 3-pivalyloxymethyl ether of 17 β -estradiol substantially reduced the melting point of the parent 17 β -estradiol. It is theorized, but not relied upon herein, that a pivalyloxymethyl prodrug, after absorption, is hydrolyzed enzymatically by nonspecific esterases to the corresponding hydroxymethyl derivative, which subsequently decomposes spontaneously to betulinic acid (or betulinic acid derivative) and formaldehyde.



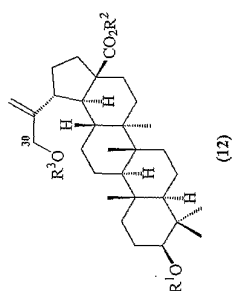
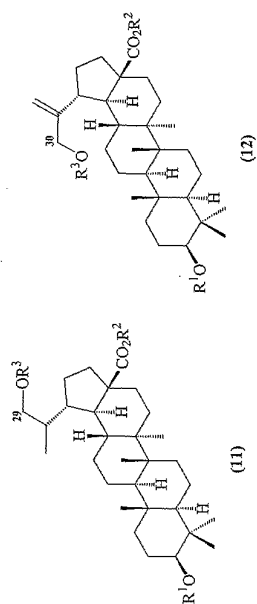
(10)

- a. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = H$
 b. $R^1 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$, $R^2 = (CH_3)_3CCO_2CH_2$

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 26 -



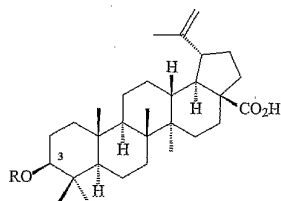
- a. $R^1 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^2 = H$, $R^3 = H$
 b. $R^1 = H$, $R^2 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^3 = H$
 c. $R^1 = H$, $R^2 = H$, $R^3 = (CH_2)_5CO_2CH_2$
 d. $R^1 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^2 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^3 = H$
 e. $R^1 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^2 = H$, $R^3 = (CH_2)_5CO_2CH_2$
 f. $R^1 = H$, $R^2 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^3 = (CH_2)_5CO_2CH_2$
 g. $R^1 = (CH_2)_5CO_2CH_2$, $R^2 = (CH_2)_5CO_2CH_2$,
 $R^3 = (CH_2)_5CO_2CH_2$

WO 02/16395

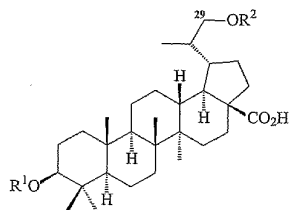
PCT/US01/25581

- 27 -

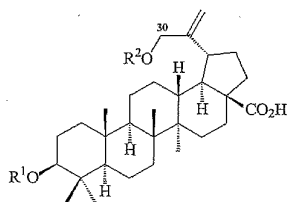
Another class of prodrugs of the present invention is sulfates of betulinic acid (13) and betulinic acid derivatives (14a-c, 15a-c). The sulfate moiety increases the hydrophilicity of the compounds, while endogenous nonspecific sulfatases release betulinic acid or a betulinic acid derivative and an inorganic sulfate *in vivo*.



(13)

R = SO₃H

(14)



(15)

- a. R¹ = SO₃H, R² = H
- b. R¹ = H, R² = SO₃H
- c. R¹ = SO₃H, R² = SO₃H

- 28 -

Synthesis of Betulinic Acid

Even though betulinic acid has been isolated from several genus of higher plants, the abundance of betulinic acid is sufficiently low such that it is tedious to isolate in a useable quantity (see, T. Fujioka et al., *J. Nat. Prod.*, 57, 243-7 (1994); S. Siddiqui et al., *J. Nat. Prod.*, 57, 243-7 (1994); and F. Robinson et al., *Phytochemistry*, 9, 907-9 (1970)). However, as noted previously, betulin 16, is readily available from the bark of white birch, in concentrations up to about 25% by weight, and hundreds of tons of the bark are discarded each year in processes such as furniture manufacture.

Two synthetic methods for the production of betulinic acid from betulin have been reported. One method involves three steps with an overall 71% yield, and the second method is a five-step process affording an overall 55% yield (see D.S.H.L. Kim et al., *Synth. Commun.*, 27, 1607-1612 (1997)). The first method produced a higher overall yield in the laboratory, but the product is difficult to purify during scale up because the undesirable 3 α -isomer was formed as a by-product. The second method, although providing a lower yield, does not produce the undesired 3 α -isomer, and involves predominantly protecting and deprotecting procedures, and thus is preferred for the synthesis of betulinic acid.

Therefore, betulin 16 can be isolated from the bark of *Betula alba*, following a literature method, and converted to betulinic acid as shown in following Scheme 1. Briefly, the primary hydroxy group of betulin is selectively protected as a tetrahydropyran (THP) ether 17 in step i), then the secondary hydroxy group is acetylated to provide

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 29 -

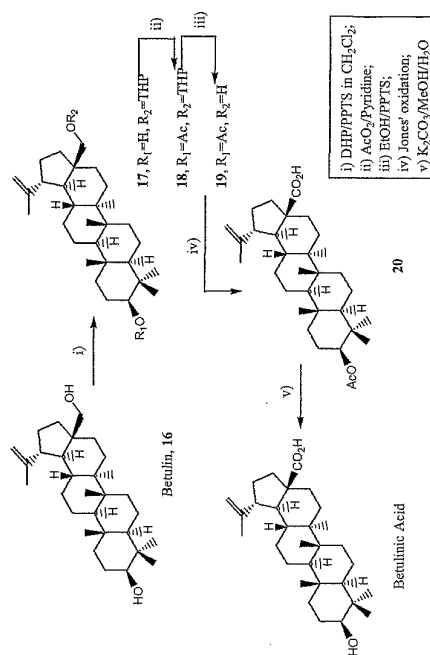
compound 18 in step ii). After the THP group in compound 18 is selectively removed in step iii), the resulting primary alcohol 19 is oxidized under Jones oxidation conditions ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{acetone}/0^\circ\text{C}$) in step
5 iv) to provide carboxylic acid 20. The acetyl group finally is removed under mild basic conditions in step v) to yield betulinic acid.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 30 -

Scheme 1



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 31 -

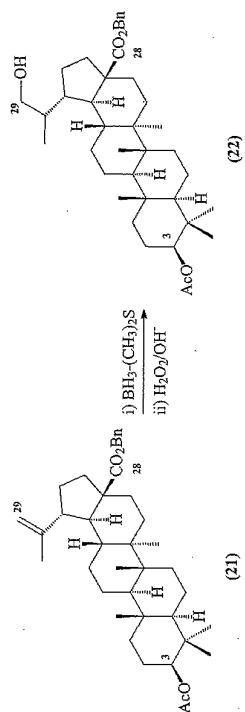
Synthesis of C-29 and C-30 Betulinic Acid Alcohols

The synthesis of betulinic acid derivatives 2 and 3 is accomplished by hydroboration and allylic oxidation, respectively. The C-29 alcohol is synthesized from the common intermediate 20, with additional protection of the carboxylic acid as the benzyl ester (21). Hydroboration of (21) with BH_3 -dimethyl sulfide, followed by oxidation under basic conditions yields the C-29 alcohol (22), which then is selectively functionalized without interference of the C-3 alcohol or C-28 carboxylic acid. Hydrolysis of the C-3 acetate followed by catalytic hydrogenolysis of the C-28 benzyl ester yields the unprotected C-29 alcohol.

WO 02/16395

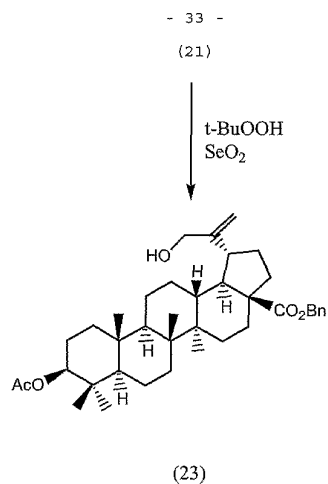
PCT/US01/25581

- 32 -



WO 02/16395

PCT/US01/25581



Synthesis of the C-30 allylic alcohol (3) is achieved by reaction of the protected betulinic acid (21), followed by oxidation with catalytic selenium dioxide and t-butyl hydroperoxide. The protected C-30 allylic alcohol (23) can be further manipulated as desired, and the C-3 acetate and C-28 benzyl ester can be removed by hydrolysis with potassium carbonate.

To synthesize prodrugs 2a-g, the carboxylic acid group in betulinic acid is protected. A variety of protecting groups can be employed. Because the ester group in the present prodrugs may be labile, a protecting group capable of being removed under very mild conditions is used. One preferred protecting agent is a benzyl group because a benzyl

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 34 -

group is readily cleaved by hydrogenolysis under neutral conditions. The 20(29)-ene double bond in betulinic acid can be saturated during hydrogenolysis. However, the benzyl group can be cleaved in the presence of a double bond by using $t\text{-BuMe}_2\text{SiH}$ and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (see, M. Sakaitgani et al., *Tetrahedron Lett.*, 27, 3753 (1986)). Therefore, the benzyl ester of betulinic acid 26 is prepared from the acetate 20. Reaction of acetate 20 with benzyl bromide in the presence of potassium carbonate (K_2CO_3) in acetone yields the double ester 21, which is deacetylated using K_2CO_3 in methanol (MeOH) as described above, providing precursor 26 (Scheme 2).

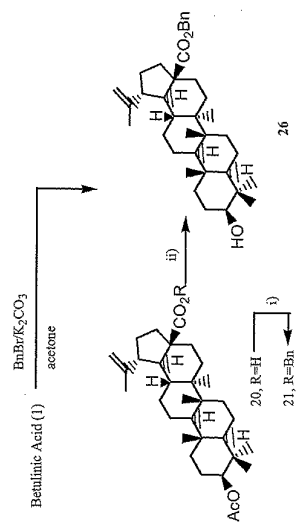
Alternatively, a direct, one-step benzylation of betulinic acid using benzyl bromide in the presence of K_2CO_3 in acetone yielded precursor 26 in an acceptable yield (Scheme 2).

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 35 -

Scheme 2



1) $\text{BnBr}/\text{K}_2\text{CO}_3/\text{acetone}$; 2) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 36 -

Synthesis of Betulinic Acid Ester Prodrugs

Compounds (4), (5), and (6a-d) are amino acid esters synthesized according to the conventional methods. Thus, when activated by carbonyldiimidazole (CDI) or dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in refluxing tetrahydrofuran (THF), benzyl ester 26 reacts with N,N-dimethylglycine, or Cbz-protected amino acids, such as glycine, L-leucine and L-phenylalanine, respectively (Scheme 3). Cbz is an abbreviation for carboxybenzoyl. The formed esters 27a-d are treated with t-butyldimethylsilane (t-BuMe₂SiH) in the presence of Pd(OAc)₂, to cleave the benzyl as well as Cbz-protecting groups, resulting in the formation of compounds (4a-d). The same scheme can be used to synthesize compounds (4e), (4f), (5a-f), and (6a-f) via (27a-f), respectively. All the carboxylic acids employed are commercially available.

Alternatively, free acid analogues (4) can be synthesized directly from betulinic acid (Scheme 3). Boc-Gly-OH was activated with CDI at room temperature for 2 hours, then refluxed with betulinic acid overnight to provide (4i) in 97% yield. Boc is an abbreviation for t-butylcarboxy. Deprotection of the Boc group with trifluoroacetic acid/dichloromethane (TFA/DCM) resulted in rearrangement of the betulinic acid ring system. After trying several methods, it was found that 4M HCl in dioxane cleaves the Boc group without attacking the betulinic acid ring system.

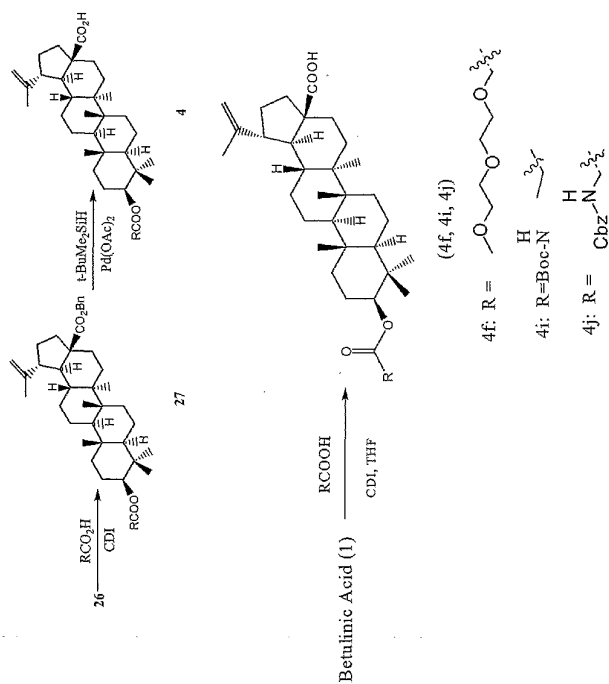
By a similar method, products (4f) and (4j) were synthesized according to synthetic scheme 3.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 37 -

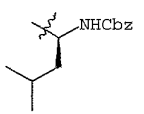
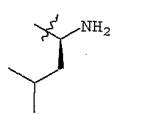
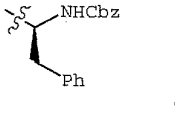
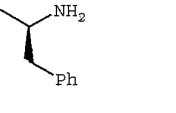
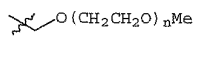
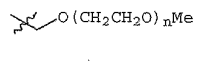
The hemisuccinate derivative (4g) was prepared according to a literature method (L. Colla et al., *J. Med. Chem.*, 26, 602 (1983)) by reacting benzyl ester 26 with succinic anhydride in the presence of triethylamine in DMF, followed by de-benzylation (Scheme 4). This scheme also is used to prepare derivatives (5g) and (6g).



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 39 -

R in 27	R in 4
CH ₂ NHCbz (27a)	CH ₂ NH ₂ (4a)
CH ₂ NMe ₂ (27b)	CH ₂ NMe ₂ (4b)
 (27c)	 (4c)
 (27d)	 (4d)
 (n=1,2) (27 e, f)	 (n=1,2) (4 e, f)

Cbz = carboxybenzoyl

Me = methyl

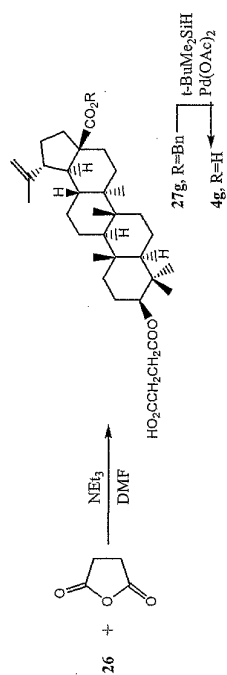
Ph = phenyl

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 40 -

Scheme 4



WO 02/16395

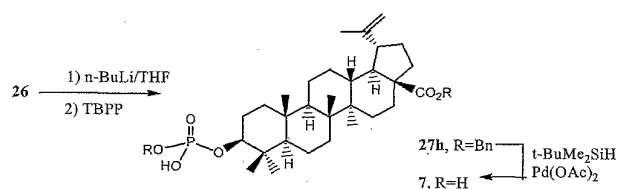
PCT/US01/25581

- 41 -

Synthesis of Phosphate Prodrugs (7-9)

The commercially available tetrabenzylpyrophosphate (TBPP) is a suitable phosphorylating agent. Thus, treatment of benzyl ester 26 with butyllithium in THF, followed by TBPP, can afford phosphate diester (7) after aqueous workup (Scheme 5). Debenzylation is achieved by treatment with *t*-BuMe₂SiH in the presence of Pd(OAc)₂, providing phosphoric carboxylic acid (7). This route is also used for derivatives (8) and (9).

Scheme 5

Synthesis of Acyloxyalkyl Derivatized Prodrugs (10-12)

Chloromethyl pivalate is commercially available, and other chloromethyl esters can be prepared by published literature methods (see, Eurato et al., *Acta Chem. Scand.*, 20, 1276 (1966)). Reaction of the sodium or lithium salt of benzyl ester 26 with chloromethyl pivalate provides pivaloyloxy-methyl derivative 27i (Scheme 6). Debenzylation of 27i with *t*-BuMe₂SiH and Pd(OAc)₂ produces the corre-

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 42 -

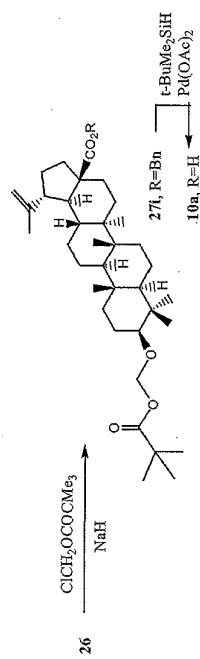
sponding monopivaloyloxymethyl compound 10a. Treatment of the disodium salt of betulinic acid with chloromethyl pivalate furnishes the bis-pivaloyloxymethyl compound 10b (Scheme 6). The literature re-
5 ports that chloromethyl esters may not be sufficiently reactive, and, accordingly, can be converted to the corresponding iodo analogues by treatment with NaI.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 43 -

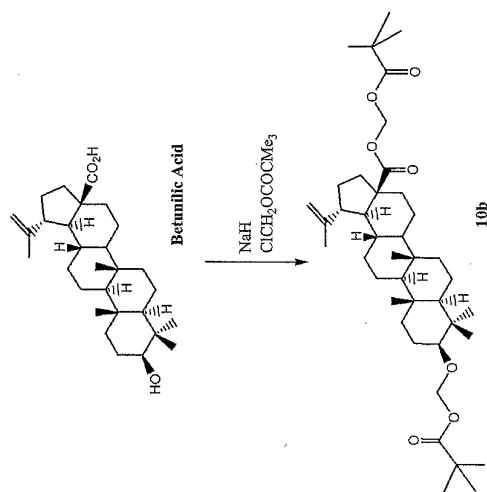
Scheme 6



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 44 -



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 45 -

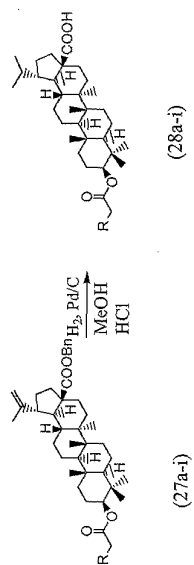
Hydrogenolysis of benzylesters (27a)-(27i)
yielded the corresponding 20(29)-saturated betulinic
acid (28a)-(27i) (Scheme 7).

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 46 -

Scheme 7



WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 47 -

The following abbreviations are used in the synthetic procedures: K₂CO₃ (potassium carbonate), MgSO₄ (magnesium sulfate), EtOAc (ethyl acetate), THF (tetrahydrofuran), NaH (sodium hydride), HCl (hydrochloric acid), and Et₂O (diethyl ether).

Synthesis of benzyl-protected betulinic acid (26)

Betulinic acid (9.76 g, 21.41 mmole) and K₂CO₃ (4.37 g, 31.62 mmole) in acetone (500 ml) was stirred for 20 minutes. Then, benzyl bromide (6.4 ml, 53.81 mmole) was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Additional benzyl bromide (4.0 ml, 33.63 mmole) was added, and the mixture was stirred for an additional 24 hours at room temperature. The solvent was evaporated, water was added to the residue, then extracted with ethyl acetate. The EtOAc extracts were washed with brine, and dried over anhydrous MgSO₄. After removal of solvent, the crude product was purified by silica column using 10% EtOAc/hexane as an eluent to give 7.55 g (64% yield) of product as white solid. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.6-1.7 (m, 38H), 1.8-1.9 (m, 2H), 2.1-2.35 (m, 2H), 2.95-3.05 (m, 1H), 3.1-3.2 (m, 1H), 4.59 (d, J=2 Hz, 1H), 4.72 (d, J=2 Hz, 1H), 5.12 (m, 2H), 7.3-7.4 (m, 5H). MS (APCI⁺): 547.2 (M+1), 529.2 (M-H₂O). FT-IR (cm⁻¹): 3553, 2940, 2866, 1692, 1451.

Synthesis of Cbz-Gly ester derivative (27a)

To a solution of Cbz-Gly-OH (209 mg, 1 mmol) in THF (10 ml) was added CDI (162 mg, 1 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 30 minutes, then betulinic acid benzyl ester (26) (238

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 48 -

mg, 0.44 mmol) was added. The resulting mixture was refluxed for one day. The reaction mixture then was diluted with water and extracted three times with EtOAc. The organic layer was washed with brine, and
5 dried over MgSO_4 . After removal of solvent, the residue was purified by a column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane as an eluent to give 130 mg of Cbz-Gly- betulinic acid ester derivative (27a). Yield: 41%. m.p.: 55-57°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ :
10 0.6-1.7 (m, 38H), 1.8-2.0 (m, 2H), 2.1-2.35 (m, 2H), 2.95-3.1 (m, 1H), 3.95 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 4.55 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 5.12 (m, 4H), 5.3 (br, 1H), 7.3-7.4 (m, 10H). MS (ESI $^+$): 755.6 ($\text{M}+\text{NH}_4$). FT-IR (cm^{-1}): 3425, 2943, 2869, 1722,
15 1453. Anal. Calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_1\text{O}_6$: C, 76.49; H, 8.60; N, 1.90; Found: C, 75.38; H, 8.76; N, 1.83.

Synthesis of Cbz-Phe ester derivative (27d)

Compound (27d) was synthesized by reacting Cbz-Phe-OH with the betulinic acid benzyl ester (26)
20 by a similar method as described to prepare compound (27a). Yield: 15%. m.p. 67-71°C. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.70-1.71 (m, 38 H), 1.80-1.95 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.95-3.15 (m, 3H), 4.4-4.5 (m, 1H), 4.6-4.65 (m, 1H), 4.59 (d, $J=2$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J=2$ Hz, 1H),
25 5.12 (m, 4H), 5.22 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.1-7.4 (m, 15H). MS (ESI $^+$): 845.6 ($\text{M}+\text{NH}_4$), 828.5 ($\text{M}+1$). FT-IR (cm^{-1}): 3431, 2944, 2868, 1722, 1497. Anal. Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{69}\text{N}_1\text{O}_6$: C, 78.32; H, 8.40; N, 1.69; Found: C, 78.01; H, 8.52; N, 1.61.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 49 -

Synthesis of Cbz-Leu ester derivative (27c)

Compound 27c was synthesized by reacting Cbz-Leu-OH with the betulinic acid benzyl ester (26) by a similar method as described to prepare compound (27a). Yield: 6%. m.p. 64-69°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.7-1.8 (m, 47H), 1.8-2.0 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.95-3.1 (m, 1H), 4.3-4.4 (m, 1H), 4.45-4.55 (m, 1H), 4.59 (d, J=2 Hz, 1H), 4.72 (d, J=2 Hz, 1H), 5.08-5.20 (m, 4H), 7.3-7.4 (m, 10H). MS (APCI⁺): 812.4 (M+NH₄⁺), 794.7 (M+1). FT-IR (cm⁻¹): 3355, 2946, 2868, 1722, 1453. Anal. Calcd for C₅₁H₇₁N₁O₆: C, 77.14; H, 9.01; N, 1.76; Found: C, 77.36; H, 9.11; N, 1.69.

Synthesis of 2-(2-Methoxyethoxy)acetic acid ester derivative (27e)

Compound (27e) was synthesized by reacting 2-(2-methoxyethoxy)acetic acid with the betulinic acid benzyl ester (26) by a similar method as described to prepare compound (27a). Yield: 38%. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.75-1.7 (m, 38H), 1.85-1.95 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.95-3.10 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.58 (m, 2H), 3.72 (m, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.5-4.6 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 5.12 (m, 2H), 7.3-7.4 (m, 5H). MS (ESI⁺): 680.6 (M+NH₄⁺). FT-IR (cm⁻¹): 2945, 2867, 1754, 1715, 1453. Anal. Calcd for C₄₂H₆₂O₆: C, 76.09; H, 9.43; Found: C, 76.28; H, 9.47.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 50 -

**Synthesis of 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetic
acid ester derivative (27f)**

Compound (27f) was synthesized by reacting
2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]acetic acid with the
5 betulinic acid benzyl ester (26) by a similar method
as described to prepare compound (27a). Yield: 52%.
¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.75-1.7 (m, 38H), 1.85-1.95 (m, 2H),
2.05-2.3 (m, 2H), 2.95-3.10 (m, 1H), 3.38 (s, 3H),
3.57 (m, 2H), 3.6-3.75 (m, 6H), 4.13 (s, 2H), 4.5-
10 4.6 (m, 1H), 4.59 (d, J=2 Hz, 1H), 4.72 (d, J=2 Hz,
1H), 5.12 (m, 2H), 7.3-7.4 (m, 5H). MS (APCI):
724.3 (M+NH₄). FT-IR (cm⁻¹): 2942, 2869, 1724,
1454. Anal. Calcd for C₄₄H₆₆O₆: C, 74.75; H, 9.41;
Found: C, 73.72; H, 9.34.

**15 Synthesis of pivaloxyoxymethyl
ether derivative (27i)**

To a solution of betulinic acid benzyl
ester (26) (526 mg, 0.96 mmol) in THF (10 ml) was
added NaH (60%, 66 mg, 1.6 mmol). The mixture was
20 stirred at room temperature for 1 hour, then chloro-
methyl pivalate (635 mg, 0.96 mmol) was added. The
resulting mixture was stirred at room temperature
overnight. The reaction mixture then was diluted
with water, and extracted three times with ethyl
25 acetate. The organic layer was washed with brine,
and dried over MgSO₄. After removal of solvent, the
residue was purified by column chromatography on
silica gel with EtOAc/hexane as an eluent to give
102 mg of the desired product (27i). Yield: 16%.
30 m.p.: 122-128°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.7-1.7 (m, 47H),
1.85-1.95 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.95-3.15 (m,
2H), 4.59 (d, J=2 Hz, 1H), 4.72 (d, J=2 Hz, 1H),
5.12 (m, 2H), 5.27 (d, J=6 Hz, 1H), 5.35 (d, J=6 Hz,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 51 -

1H), 7.3-7.4 (m, 5H). MS (ESI⁺): 678.7 (M+NH₄).
FT-IR (cm⁻¹): 2947, 2866, 1746, 1714, 1480. Anal.
Calcd for C₄₃H₆₄O₅: C, 78.14; H, 9.76; Found: C,
78.46; H, 10.49.

5 Synthesis of Boc-Gly ester derivative (4i)

To a solution of Boc-Gly-OH (525 mg, 3 mmol) in THF (5 ml) was added CDI (486 mg, 3 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours, then betulinic acid (684 mg, 1.5 mmol) was added. The resulting mixture was refluxed overnight. After removal of solvent, the residue was dissolved in dichloromethane, washed with water, followed by brine, and dried over Na₂SO₄. After removal of solvent, the residue was purified by a column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane as an eluent to give 900 mg of Boc-Gly- betulinic acid derivative (4i). Yield: 97%. m.p.: 135-136°C. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0.75-1.7 (m, 47H), 1.75-1.9 (m, 2H), 2.05-2.3 (m, 2H), 2.9-3.0 (m, 1H), 3.63 (d, J=6 Hz, 2H), 4.4 (m, 1H), 4.56 (d, J=2 Hz, 1H), 4.69 (d, J=2 Hz, 1H), 7.18 (t, J=6 Hz, 1H), 12.05 (s, 1H). MS (ESI⁺): 612.4 (M-1). FT-IR (cm⁻¹): 2943, 2869, 1702. Anal. Calcd for C₅₇H₉₉N₁O₆: C, 72.39; H, 9.69; N, 2.28; Found: C, 72.13; H, 10.07; N, 2.20.

Synthesis of Cbz-Gly ester derivative (4j)

Compound (4j) was synthesized by reacting Cbz-Gly-OH with the betulinic acid by a similar method as described to prepare compound (IIIb). Yield: 7%. m.p.: 82-88°C. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.75-1.7 (m, 38H), 1.95-2.05 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.95-

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 52 -

3.05 (m, 1H), 3.97 (d, J=6 Hz, 2H), 4.5-4.6 (m, 1H),
4.60 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.25 (m,
1H), 7.3-7.4 (m, 5H). MS (APCI): 646.9 (M+NH₄).
FT-IR (cm⁻¹): 2943, 2869, 1708. Anal. Calcd for
5 C₄₀H₅₇N₁O₆: C, 74.15; H, 8.87; N, 2.16; Found: C,
71.57; H, 8.67; N, 2.22.

Synthesis of 2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]acetic
acid ester derivative (4f)

Compound (4f) was synthesized by reacting
10 2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy] acetic acid with the
betulinic acid by a similar method as described to
prepare compound (IIIb). Yield:52%. ¹H NMR (CDCl₃)
δ: 0.8-1.7 (m, 38H), 1.9-2.0 (m 2H), 2.1-2.3 (m,
2H), 2.95-3.05 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.57 (m, 2H),
15 3.6-3.75 (m, 6H), 4.13 (s, 2H), 4.5-4.6 (m, 1H),
4.61 (d, J=2 Hz, 1H), 4.74 (d, J=2 Hz, 1H). MS
(APCI): 615.8 (M-1). FT-IR (cm⁻¹): 2937, 2869,
1729, 1694. Anal. Calcd for C₃₇H₆₀O₆: C, 72.04; H,
9.80; Found: C, 71.98; H, 9.90.

20 Synthesis of Gly ester derivative (4a)

Compound (4a) (61 mg, 0.1 mmol) was dis-
solved in 4M HCl dioxane solution and stirred at
room temperature for 10 min. The reaction mixture
was diluted with toluene (3 ml). After removal of
25 solvent under vacuum, the residue was washed with
Et₂O to afford 25 mg of the desired product as a
white solid. Yield:45%. m.p.:275°C (dec). ¹H NMR
(DMSO-d₆) δ: 0.8-1.7 (m, 38H), 1.75-1.9 (m 2H),
2.1-2.3 (m, 2H), 2.9-3.0 (m, 1H), 3.8-3.9 (m, 2H),
30 4.5-4.6 (m, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 8.30
(br, 3H). MS (APCI): 514.6 (M+1). FT-IR (cm⁻¹):
2941, 2869, 1740. Anal. Calcd for C₃₂H₅₂ClNO₄: C,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 53 -

69.85; H, 9.53; N, 2.55; Found: C, 66.31; H, 9.38; N, 2.68.

Synthesis of Gly ester saturated derivative (28a)

Compound (27a) (180 mg, 0.28 mmol) was dissolved in EtOAc (5 ml), diluted with methanol (10 ml), and one drop of HCl solution (6N) was added. The reaction mixture was hydrogenated with 50 mg of 10% palladium on activated carbon as a catalyst at 50 psi hydrogen pressure at room temperature for 4 hrs. The catalyst was removed by filtration. After removal of solvent, the residue was washed with Et₂O to afford 110 mg of the desired product as a white solid. Yield: 72%. m.p.: 285°C (dec). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0.8-1.7 (m, 38H), 1.75-1.9 (m, 2H), 2.1-2.3 (m, 2H), 2.9-3.0 (m, 1H), 3.8-3.9 (m, 2H), 4.5-4.6 (m, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 8.30 (br, 3H). MS (ESI⁺): 516.1 (M+1). FT-IR (cm⁻¹): 2947, 2868, 1740. Anal. Calcd for C₃₂H₅₄ClNO₄: C, 69.60; H, 9.86; N, 2.54; Found: C, 65.76; H, 9.62; N, 2.63.

Antimelanoma Activity Assays

The relative efficacies of the prodrugs of betulinic acid and betulinic acid derivatives versus cancer cells can be established by determining the concentrations at which each prodrug inhibits the cancer cell activity to a predefined extent and then comparing the results. Typically, the preferred determination is the concentration that inhibits 50% of the activity in a biochemical assay, i.e., the 50% inhibitory concentration or "IC₅₀." IC₅₀ determinations can be accomplished using conventional techniques known in the art. In general, an IC₅₀ can

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 54 -

be determined by measuring the activity of a given cell line in the presence of a range of concentrations of the compound under study. The experimentally obtained values of cell line activity then are plotted against the compound concentrations used. The concentration of the inhibitor that shows 50% cell line activity (as compared to the activity in the absence of any inhibitor) is taken as the IC_{50} value.

10 The IC_{50} values for the prodrugs of betulinic acid and betulinic acid derivatives were determined from concentration-response curves typically using concentrations ranging from 0.01 to 100 μ g/mL. The IC_{50} determinations can be accomplished
15 by well-known methods in the art. An exemplary test method is as follows:

The cytotoxic potential of test compounds was determined with various cell lines as described previously in K. Likhitwitayawuid et al., *J. Nat. Prod.*, 56, pages 1468-1478 (1993). Briefly, various concentrations of test compounds (e.g., 0.1 to 100 μ g/mL, dissolved in 10 L of 10% DMSO) were transferred to 96 well plates, and 190 L aliquots of cell suspensions (e.g., 5×10^4 cells/mL) were added to each
25 well. The plates then were incubated for 72 hours at 37°C (100% humidity with a 5% CO_2 atmosphere in air), and 100 L of cold 20% aqueous trichloroacetic acid was added to the growth medium in each well to fix the cells. The cultures were incubated at 4°C
30 for 30 minutes, washed, air dried, stained with sulforhodamine B solution, and washed with 1% acetic acid. Finally, 200 L of 10 mM Tris base was added to each well and the optical densities were determined at 515 nm utilizing an ELISA plate reader. In
35 each case, a zero day control was performed by

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 55 -

adding an equivalent number of cells to several wells and incubating at 37°C for 30 minutes, and processing as described above. Optical density values obtained with the zero day control were subtracted, and cell survival, relative to control (solvent-treated) cultures, was calculated. Results were expressed as IC₅₀ values (i.e., concentration of test compound required to reduce cell number by 50%).

The derivatized betulinic acid prodrugs were tested against melanoma (Mel 2), and the *in vitro* results are summarized in the following table.

Compound	IC ₅₀ (µg/mL)	
	Mel 2 (10% DMSO) ^a	Mel 2 (Media) ^b
27a	>20	>20
27d	>20	>20
27c	>20	>20
27e	>20	>20
27f	>20	>20
4a	>20	9.6
4i	5.0	4.0
4j	3.0	1.9
4f	3.3	2.7
28a	1.6	2.8

^a The test articles were dissolved in 10% DMSO.

^b The test articles were dissolved in media.

To test the *in vivo* ability of betulinic acid to serve as an antineoplastic agent against malignant melanoma, a series of studies was performed with athymic (nude) mice injected subcutaneously with human melanoma cells (MEL-2). The ini-

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 56 -

tial study investigated the activity of betulinic acid against unestablished tumors. Treatment with betulinic acid began on day 1, i.e., 24 hours, following tumor cell injection. At doses of 50, 250, and 500 mg/kg (milligram per kilogram) body weight, betulinic acid demonstrated effective inhibition of tumor growth with p values of 0.001 for each dose versus a control.

In particular, the data was derived from experiments wherein four week old athymic mice were injected subcutaneously in the right flank with 3.0×10^5 UIISO MEL-2 cells. UIISO MEL-2 is a cell line derived from metastatic melanoma from human pleural fluid. Drug treatment was initiated on the day following tumor cell injection and continued every fourth day for a total of six doses. Four control animals received 0.5 ml intraperitoneal (IP) of PVP control solution, while treated animals (4 per group) received 50, 250 or 500 mg/kg/dose IP betulinic acid/PVP in deionized H₂O. Betulinic acid was coprecipitated with PVP to increase solubility and bioavailability. The mice were weighed, and the tumors measured with a micrometer every other day throughout the study. All animals were sacrificed and autopsied on day 33, when the mean tumor volume in the control animals was approximately one cm³.

There was greater inhibition of tumor growth at the highest dose of betulinic acid versus the lowest dose ($p = 0.04$). Toxicity was not associated with the betulinic acid treatment because toxicity is indicated by loss of body weight or other forms of acute toxicity. No weight loss was observed.

Next, in vivo testing of betulinic acid was performed on established melanomas. In this

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 57 -

study, treatment was withheld until day 13, by which time a palpable tumor mass was present in all mice. Under these conditions betulinic acid successfully abrogated tumor growth ($p = 0.0001$). Furthermore, tumor growth did not parallel that of the control (untreated) group even 14 days after the termination of treatment.

In particular, four-week-old athymic mice were injected with 5×10^8 MEL-2 cells subcutaneously in the right flank. Four treatment groups of five mice each were studied. In one group, the mice received 250 mg/kg/dose of IP betulinic acid/PVP every third day for six total doses initiated the day following tumor cell injection. The control group received 0.5 ml IP saline. A DTIC treatment group received 4 mg/kg/dose IP DTIC every third day from day 13 to day 28 of the study. The betulinic acid treatment group received 250 mg/kg/dose IP betulinic acid/PVP every third day from day 13 to day 27. The control and DTIC-treated mice were sacrificed and autopsied on day 36 due to their large tumor burden. The remaining mice were sacrificed and autopsied on day 41.

The efficacy of betulinic acid also was compared to DTIC, which is clinically available for the treatment of metastatic melanoma. The dose of DTIC, which is limited by toxicity, was selected to be equivalent to that administered to human patients. Tumor growth in the betulinic acid-treated group was significantly less than that observed in the DTIC-treated animals ($p=0.0001$). Compared to controls, DTIC produced a significant, but less pronounced, reduction in tumor growth, with a p value of 0.01. A fourth group in this study was treated with a schedule similar to that in the

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 58 -

initial study. Under these conditions, betulinic acid, as demonstrated before, significantly inhibited tumor development ($p=0.0001$) and caused a prolonged reduction in tumor growth of up to three weeks following treatment termination.

Betulinic acid also showed activity against MEL-1 cells. In particular, four-week-old athymic mice were injected subcutaneously in the right flank with 5.0×10^8 UIISO MEL-1 cells. Drug treatment was initiated on the day following tumor cell injection and continued every fourth day for a total of six doses. Four control animals received 0.5 ml intraperitoneal (IP) saline, while treated animals (4 per group) received 5, 50 or 250 mg/kg/-dose IP betulinic acid/PVP in dd H₂O. The mice were weighed, and tumors were measured with a micrometer every third day throughout the study. Treated animals were sacrificed and autopsied on day 41, when the mean tumor volume in the control mice was approximately 0.5 cm³. The control mice then received six doses of 50 mg/kg every fourth day beginning day 41 and were sacrificed and autopsied on day 71.

The results with respect to MEL-1 cells were similar to the results with respect to MEL-2 cells. Betulinic acid therefore is active both against MEL-1 and MEL-2 cells. See, Pezzuto et al. U.S. Patent No. 5,962,527, incorporated herein by reference, for additional information with respect to the *in vivo* activity of betulinic acid and derivatives against melanoma, and for *in vivo* activity against other forms of cancer.

Taking into account a unique *in vitro* cytotoxicity profile, a significant *in vivo* activity, and mode of action, betulinic acid is an ex-

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 59 -

ceptionally attractive compound for treating human melanoma. Betulinic acid also is relatively innocuous toxicitywise, as evidenced by repeatedly administering 500 mg/kg doses of betulinic acid without causing acute signs of toxicity or a decrease in body weight. Betulinic acid was previously found to be inactive in a Hippocratic screen at 200 and 400 mg/kg doses.

In particular, betulinic acid derivatives have been synthesized and evaluated biologically to illustrate that betulinic acid and betulinic acid derivatives possess selective antitumor activity against human melanoma cells lines *in vitro*. It has been demonstrated that modifying the parent structure of betulinic acid and betulinic acid derivatives provide numerous prodrugs that can be easily formulated and administered to an individual, which release betulinic acid or a betulinic acid derivative and used to prevent or inhibit malignant tumor growth, especially with respect to human melanoma. The antitumor activity of betulinic acid and betulinic acid derivatives is important therapeutically because these compounds exhibit a high activity against melanomas, but the compounds also possess a low water solubility. The low water solubility of betulinic acid and derivatives, however, can be overcome by providing an appropriate prodrug of betulinic acid or a betulinic acid derivative.

The above synthetic schemes show that modifying the betulinic acid and betulinic acid derivatives can provide prodrugs capable of releasing betulinic acid or a betulinic acid derivative *in vivo*. The prodrugs, therefore, can be used as potent antitumor drugs against melanoma and other cancers. The preparation of a prodrug overcomes the

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 60 -

low solubility of betulinic acid and betulinic acid derivatives in water.

It is envisioned, therefore, that prodrugs of betulinic acid and betulinic acid derivatives are useful in the treatment of various cancers, for example, melanoma, a squamous tumor, a breast cancer, a colon cancer, a sarcoma, a human oral epidermoid carcinoma, a prostate cancer, a lung cancer, a glioma, or a neuroblastoma. Thus, the present invention concerns the use of prodrugs of betulinic acid and betulinic acid derivatives, or a pharmaceutical composition containing such an entity, for the manufacture of a medicament for the curative or prophylactic treatment of a cancer in a mammal, including humans.

The term "treatment" includes preventing, lowering, stopping, or reversing the progression or severity of the condition or symptoms being treated. As such, the term "treatment" includes both medical therapeutic and/or prophylactic administration, as appropriate.

It also is understood that "a prodrug of betulinic acid or a betulinic acid derivative" can be administered as the neat compound, or as a pharmaceutical composition containing such an entity.

In a further aspect, the present invention provides a method of treating a cancer in a human or nonhuman animal body which comprises administering to said body a therapeutically effective amount of a prodrug of betulinic acid or a betulinic acid derivative.

The prodrugs of the invention can be administered by any suitable route, for example by oral, buccal, inhalation, sublingual, rectal, vaginal, transurethral, nasal, topical, percutaneous,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 61 -

i.e., transdermal, or parenteral (including intravenous, intramuscular, subcutaneous, and intracoronary) administration. Parenteral administration can be accomplished using a needle and syringe, or
5 using a high pressure technique, like POWDERJECT™.

Compounds and pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include those wherein the prodrug is administered in an effective amount to achieve its intended purpose.
10 More specifically, a "therapeutically effective amount" means an amount effective to treat or to prevent development of, or to alleviate the existing symptoms of, the subject being treated. Determination of the effective amounts is well within the
15 capability of those skilled in the art, especially in light of the detailed disclosure provided herein.

A "therapeutically effective dose" refers to that amount of the prodrug that results in achieving the desired effect. Toxicity and therapeutic efficacy of the prodrugs can be determined by
20 standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population) and the ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50%
25 of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index, which is expressed as the ratio between LD_{50} and ED_{50} . Compounds which exhibit high therapeutic indices are preferred. The data obtained can be used in formulating a dosage range for use in humans. The dosage of such compounds preferably lies within a range
30 of circulating concentrations that include the ED_{50} with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed, and the route of administration utilized.
35

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 62 -

The exact formulation, route of administration, and dosage can be chosen by the individual physician in view of the particular disease being treated and the patient's condition. Dosage amount and interval can be adjusted individually to provide plasma levels of the active moiety which are sufficient to maintain the therapeutic effects.

The amount of prodrug administered is dependent on the subject being treated, on the subject's weight, the severity of the affliction, the manner of administration, and the judgment of the prescribing physician.

Specifically, for administration to a human in the curative or prophylactic treatment of the conditions and disorders identified above, dosage of the prodrugs of the present invention generally are about 0.5 to about 1000 mg daily for an average adult patient (70 kg). Thus, for a typical adult patient, individual tablets or capsules contain 0.2 to 500 mg of prodrug, in a suitable pharmaceutically acceptable vehicle or carrier, for administration in single or multiple doses, once or several times per day. Dosages for intravenous, buccal, or sublingual administration typically are 0.1 to 500 mg per single dose as required. In practice, the physician determines the actual dosing regimen which is most suitable for an individual patient, and the dosage varies with the age, weight, and response of the particular patient. The above dosages are exemplary of the average case, but there can be individual instances in which higher or lower dosages are merited, and such are within the scope of this invention.

For human use, a prodrug of the present invention can be administered alone, but generally

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 63 -

is administered in admixture with a pharmaceutical carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. Pharmaceutical compositions for use in accordance with the present invention thus can be formulated in a conventional manner using one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries that facilitate processing of the prodrugs into preparations which can be used pharmaceutically.

These pharmaceutical compositions can be manufactured in a conventional manner, e.g., by conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. When a therapeutically effective amount of a prodrug of the present invention is administered orally, the composition typically is in the form of a tablet, capsule, powder, solution, or elixir. When administered in tablet form, the composition can additionally contain a solid carrier, such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain about 5 to about 95% prodrug of the present invention, and preferably from about 25 to about 90% compound of the present invention. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, or oils of animal or plant origin can be added. The liquid form of the composition can further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solutions, or glycols. When administered in liquid form, the composition contains about 0.5 to about 90% by weight of a prodrug of the present

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 64 -

invention, and preferably about 1 to about 50% of a compound of the present invention.

When a therapeutically effective amount of a prodrug of the present invention is administered by intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection, the composition is in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection typically contains, in addition to a compound of the present invention, an isotonic vehicle.

For oral administration, the compounds can be formulated readily by combining a prodrug of the present invention with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the present compounds to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a patient to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by adding a compound of formula (I) with a solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients include, for example, fillers and cellulose preparations. If desired, disintegrating agents can be added.

For administration by inhalation, compounds of the present invention are conveniently delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant. In the case of a

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 65 -

pressurized aerosol, the dosage unit can be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin, for use in an inhaler or insufflator can be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

The prodrugs can be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection can be presented in unit dosage form, e.g., in ampules or in multidose containers, with an added preservative. The compositions can take such forms as suspensions, solutions, or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formula- tory agents such as suspending, stabilizing, and/or dispersing agents.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the prodrugs in water-soluble form. Additionally, suspensions of the prodrugs can be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils or synthetic fatty acid esters. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility of the compounds and allow for the preparation of highly concentrated solutions. Alternatively, a present composition can be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

Prodrugs of the present invention also can be formulated in rectal compositions, such as suppositories or retention enemas, e.g., containing

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 66 -

conventional suppository bases. In addition to the formulations described previously, the prodrugs also can be formulated as a depot preparation. Such long-acting formulations can be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. Thus, for example, the compounds can be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example, as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

In particular, a prodrug of the present invention can be administered orally, buccally, or sublingually in the form of tablets containing excipients, such as starch or lactose, or in capsules or ovules, either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs or suspensions containing flavoring or coloring agents. Such liquid preparations can be prepared with pharmaceutically acceptable additives, such as suspending agents. A prodrug also can be injected parenterally, for example, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, or intracoronarily. For parenteral administration, the prodrug is best used in the form of a sterile aqueous solution which can contain other substances, for example, salts, or monosaccharides, such as mannitol or glucose, to make the solution isotonic with blood.

For veterinary use, a prodrug of the present invention or a nontoxic salt thereof, is administered as a suitably acceptable formulation in accordance with normal veterinary practice. The veterinarian can readily determine the dosing regimen and route of administration that is most appropriate for a particular animal.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 67 -

Thus, the invention provides in a further aspect a pharmaceutical composition comprising a prodrug of the present invention, together with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier

5 therefor. There is further provided by the present invention a process of preparing a pharmaceutical composition comprising mixing a prodrug of the present invention, together with a pharmaceutically acceptable diluent or carrier therefor.

10 In a particular embodiment, the invention includes a pharmaceutical composition for the curative or prophylactic treatment of a cancer in a mammal, including humans, comprising prodrug of the present invention, together with a pharmaceutically
15 acceptable diluent or carrier.

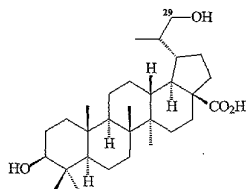
WO 02/16395

PCT/US01/25581

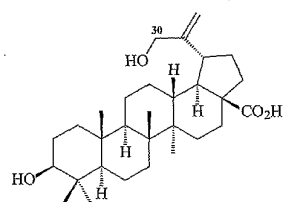
- 68 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition for treating a tumor growth comprising: (a) therapeutically effective amount of a compound having a formula



or



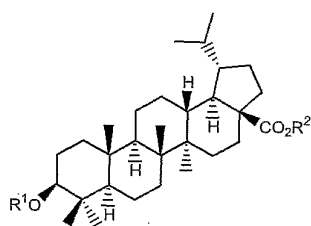
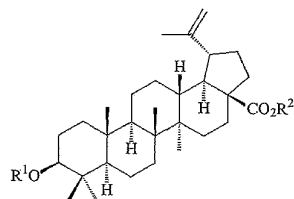
and (b) an optional carrier.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 69 -

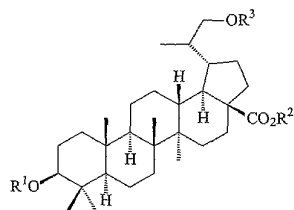
2. A composition for treating a tumor growth comprising: (a) a prodrug of betulinic acid or a derivative thereof, selected from the group consisting of



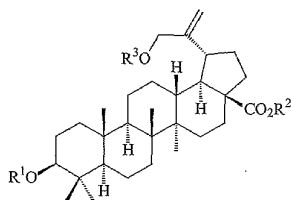
WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 70 -



, and



wherein R^1 and R^3 , independently, are selected from the group consisting of hydrogen, $CO(C_1-C_6\text{alkyl})NR^4R^5$, $CO(C_{1-3}\text{alkyl})CO_2R^4$, $COCH(C_6H_5)NR^4R^5$, $CO(C_1-C_6\text{alkyl})$, $CO(C_1-C_6\text{alkyl})CO_2R^4$, $CO(C_{1-6}\text{alkyl})O-(CH_2CH_2O)_nC_{1-3}\text{alkyl}$, $CH_2OCO_2C_{1-6}\text{alkyl}$, $CH_2OCOC_{1-6}\text{alkyl}$, $PO(OH)_2$, and SO_3H ,

R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, $C_1-C_6\text{alkyl}$, $CH_2C_6H_5$, $C_1-C_6\text{alkyl}NR^4R^5$, $CH_2OCOC_{1-6}\text{alkyl}$, $PO(OH)_2$, SO_3H , $CH(C_6H_5)NR^4R^5$, $(C_1-C_6\text{alkyl})CO_2R^4$, and $(C_1-C_6\text{alkyl})O(CH_2CH_2O)_nC_{1-3}\text{alkyl}$,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 71 -

R⁴ and R⁵, independently, are selected from the group consisting of hydrogen, C₁-C₆alkyl, CO(C₁-C₆alkyl), and aryl, or R⁴ and R⁵ can be taken together to form a 5 to 7 membered ring,

and n is 1 to 10;

and pharmaceutically acceptable salts

thereof,

and (b) an optional carrier.

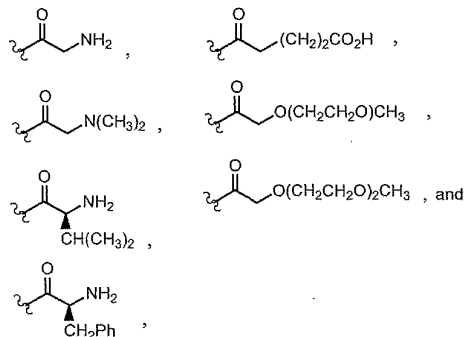
WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 72 -

3. The composition of claim 2 wherein at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is hydrogen, and at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is different from hydrogen.

4. The composition of claim 2 wherein R^1 , R^2 , and R^3 are selected from the group consisting of



wherein Ph is C_6H_5 .

5. The composition of claim 2 wherein at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is PO(OH)_2 and the remaining R^1 , R^2 , and R^3 are hydrogen.

6. The composition of claim 2 wherein at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is $\text{CH}_2\text{OCOC(CH}_3)_3$.

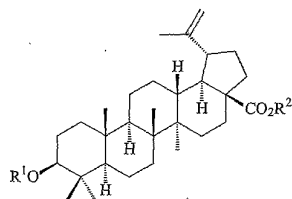
7. The composition of claim 2 wherein at least one of R^1 , R^2 , and R^3 is SO_3H and the remaining R^1 , R^2 , and R^3 are hydrogen.

WO 02/16395

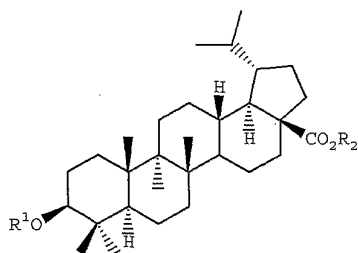
PCT/US01/25581

- 73 -

8. A compound having a structure:



or



wherein R¹ is selected from the group consisting of hydrogen, CO(C₁-C₆alkyl)NR⁴R⁵, CO(C₁₋₃-alkyl)CO₂R⁴, COCH(C₆H₅)NR⁴R⁵, CO(C₁-C₆alkyl), CO(C₁-C₆alkyl)CO₂R⁴, CO(C₁₋₆alkyl)O(CH₂CH₂O)_nC₁₋₃alkyl, CH₂OCO₂C₁₋₆alkyl, CH₂OCOC₁₋₆alkyl, PO(OH)₂, and SO₃H,

R² is selected from the group consisting of hydrogen, C₁-C₆alkyl, CH₂C₆H₅, C₁-C₆alkylNR⁴R⁵, CH₂OCOC₁-

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 74 -

C₆alkyl, PO(OH)₂, SO₃H, CH(C₆H₅)NR⁴R⁵, (C₁-C₆alkyl)CO₂R⁴,
and (C₁-C₆alkyl)O(CH₂CH₂O)_nC₁₋₃alkyl,

R⁴ and R⁵, independently, are selected from
the group consisting of hydrogen, C₁-C₆alkyl, CO(C₁-
C₆alkyl), and aryl, or R⁴ and R⁵ can be taken together
to form a 5 to 7 membered ring,

and n is 1 to 10;

with proviso that at least one of R¹ and R²
is different from H;

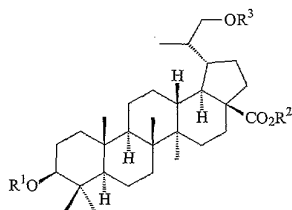
and pharmaceutically acceptable salts
thereof.

WO 02/16395

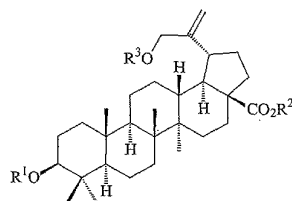
PCT/US01/25581

- 75 -

9. A compound having a structure:



or



wherein R^1 and R^3 , independently, are selected from the group consisting of hydrogen, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{NR}^4\text{R}^5$, $\text{CO}(\text{C}_{1-3}\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, $\text{COCH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NR}^4\text{R}^5$, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})$, $\text{CO}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, $\text{CO}(\text{C}_{1-6}\text{alkyl})\text{-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{OCO}_2\text{C}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{OCOC}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{PO}(\text{OH})_2$, and SO_3H ,

R^2 is selected from the group consisting of hydrogen, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl}$, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkylNR}^4\text{R}^5$, $\text{CH}_2\text{OCOC}_{1-6}\text{alkyl}$, $\text{PO}(\text{OH})_2$, SO_3H , $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NR}^4\text{R}^5$, $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{CO}_2\text{R}^4$, and $(\text{C}_1\text{-C}_6\text{alkyl})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_{1-3}\text{alkyl}$,

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 76 -

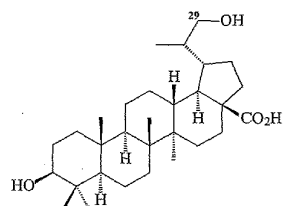
R⁴ and R⁵, independently, are selected from the group consisting of hydrogen, C₁-C₆alkyl, CO(C₁-C₆alkyl), and aryl, or R⁴ and R⁵ can be taken together to form a 5 to 7 membered ring,
and n is 1 to 10;
and pharmaceutically acceptable salts thereof.

WO 02/16395

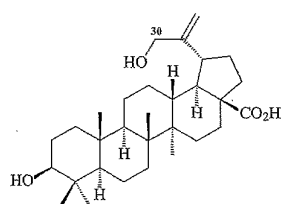
PCT/US01/25581

- 77 -

10. A compound of claim 9 wherein the compound has the structure:



or



11. A compound as described herein, and identified as compound 2, 3, 4a through 4j, 5a through 5g, 6a through 6g, 7, 8, 9, 10a, 10b, 11a through 11g, 12a through 12g, 13, 14a through 14c, 15a through 15c, 22, 23, 26, 27a through 27i, 28a through 28i, and salts thereof.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 78 -

12. A method of treating a cancer sensitive to betulinic acid or a betulinic acid derivative comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of claim 11.

13. The method of claim 12 wherein the cancer is selected from the group consisting of a melanoma, a squamous tumor, a breast cancer, a colon cancer, a sarcoma, a human oral epidermal carcinoma, a hormone-dependent breast cancer, a prostate cancer, a lung cancer, a glioma, a melanoma, and a neuroblastoma.

14. A method of treating a cancer sensitive to betulinic acid or a betulinic acid derivative comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a prodrug of betulinic acid or a prodrug of a betulinic acid derivative.

15. The method of claim 14 wherein the cancer is selected from the group consisting of a melanoma, a squamous tumor, a breast cancer, a colon cancer, a sarcoma, a human oral epidermal carcinoma, a hormone-dependent breast cancer, a prostate cancer, a lung cancer, a glioma, a melanoma, and a neuroblastoma.

16. The method of claim 14 wherein the prodrug is administered topically, intravenously, or intraperitoneally.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 79 -

17. A method of treating HIV comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of claim 11.

18. A method of treating HIV comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a prodrug of betulinic acid or a prodrug of a betulinic acid derivative.

19. The method of claim 18 wherein the prodrug is administered topically, intravenously, or intraperitoneally.

20. A pharmaceutical composition comprising a compound of claim 11 and a pharmaceutically acceptable carrier.

21. A method of treating a cancer sensitive to betulinic acid or a betulinic acid derivative comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a composition comprising a compound of claim 11 and a carrier.

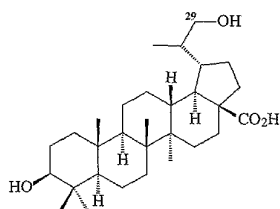
22. A method of treating HIV comprising administering to an individual in need thereof a therapeutically effective amount of a composition comprising a compound of claim 11 and a carrier.

WO 02/16395

PCT/US01/25581

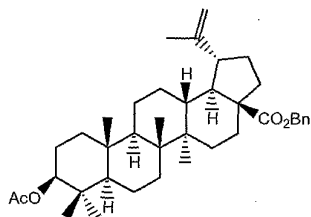
- 80 -

23. A process of preparing a compound having a structure



comprising the steps of:

(a) hydroborating a protected betulinic acid having a structure



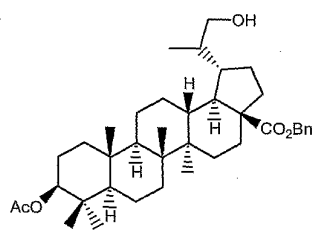
with BH_3 -dimethyl sulfide;

(b) oxidizing the reaction product of step (a) under basic conditions to yield a C-29 alcohol having a structure

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 81 -



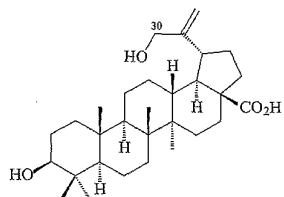
(c) hydrolyzing the C-3 acetate group of the product of step (b);
then (d) a catalytic hydrogenolysis of the C-28 benzyl ester group of the product of step (c).

WO 02/16395

PCT/US01/25581

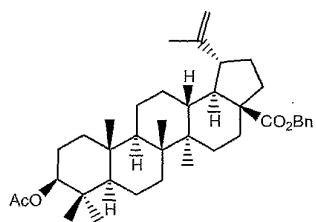
- 82 -

24. A process of preparing a compound having a structure



comprising the steps of:

(a) oxidizing a compound having a structure



using catalytic selenium dioxide and t-butyl hydroperoxide;

WO 02/16395

PCT/US01/25581

- 83 -

(b) hydrolyzing a C-3 acetate group of the product of step (a);

and (c) a catalytic hydrogenolysis of the C-28 benzyl ester group of the product of step (b).

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/25581
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07J63/00 A61K31/56 A61P35/00 A61P31/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07J A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJIOKA T ET AL: "ANTI-AIDS AGENTS, 11. BETULINIC ACID AND PLATANIC ACID AS ANTI-HIV PRINCIPLES FROM SYZIGIUM CLAVIFLORUM, AND THE ANTI-HIV ACTIVITY OF STRUCTURALLY RELATED TRITERPENOIDS" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, XX, XX, vol. 57, no. 2, 1 February 1994 (1994-02-01), pages 243-247, XP000612854 ISSN: 0163-3864 page 244; examples 9,10 page 245; table 1 -- -/-	1-11, 17-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 December 2001		Date of mailing of the international search report 21/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Watchorn, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.
F.01/US 01/25581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN, I-CHEN ET AL: "Anti- AIDS Agents. 34. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Betulin Derivatives as Anti- HIV Agents" J. MED. CHEM. (1998), 41(23), 4648-4657 , XP002184894 page 4649, column 1, paragraph 1; examples 2-5 page 4650; examples 26-29	1-11, 17-22
X	YASUKAWA K ET AL: "SOME LUPANE-TYPE TRITERPENES INHIBIT TUMOR PROMOTION BY 12-O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE IN TWO-STAGE CARCINOGENESIS IN MOUSE SKIN" PHYTOMEDICINE, GUSTAV FISCHER VERLAG, STUTTGART, DE, vol. 4, 1995, pages 309-313, XP000610925 ISSN: 0944-7113 page 311; table 1	1-16
Y	WD 93 10142 A (RHONE-POULENC RORER SA) 27 May 1993 (1993-05-27) page 91, line 22-29; examples 9,11,12	12-16
X	WD 94 26725 A (RHONE-POULENC RORER SA; DEREU NORBERT (FR); EVERS MICHEL (BE); POU) 24 November 1994 (1994-11-24) page 46, line 19-28; example 3	1-11, 17-22
Y		9
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; MACIAS, FRANCISCO A. ET AL: "Natural products as allelochemicals".5. Bioactive steroids and triterpenes from <i>Mellilotus messanensis</i> and their allelopathic potential" retrieved from STN Database accession no. 127:231877 XP002184898 abstract & J. CHEM. ECOL. (1997), 23(7), 1781-1803	9,10

Form PCT/IB545/10 (continuation of second sheet) (July 1989)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/25581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PRADHAN, BHIM PRASAD ET AL: "Oxidation of triterpenoids: Part XVII. Oxidation of isopropenyl double bond of lupane skeleton with m-chloroperbenzoic acid in a molar proportion" retrieved from STN Database accession no. 123:9720 XP002184899 abstract & INDIAN J. CHEM., SECT. B: ORG. CHEM. INCL. MED. CHEM. (1995), 34B(6), 540-42 ,</p>	9
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; DINA, B. ET AL: "Reactions on naturally occurring triterpene: part 1" retrieved from STN Database accession no. 123:169934 XP002184900 abstract & INDIAN J. CHEM., SECT. B: ORG. CHEM. INCL. MED. CHEM. (1995), 34B(7), 624-8 ,</p>	9
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PATRA, AMARENDRA ET AL: "Studies on triterpenoids: treatment of 3-acetylbetulinic acid with m-chloroperbenzoic acid and sulfuric acid" retrieved from STN Database accession no. 111:78441 XP002184901 abstract & INDIAN J. CHEM., SECT. B (1988), 27B(2), 170-2 ,</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No.
PCT/US 01/25581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; TANAKA, REIKO ET AL: "Bioactive Steroids from the Whole Herb of Euphorbia chamaesyce" retrieved from STN Database accession no. 132:134799 XP002184902 abstract & J. NAT. PROD. (2000), 63(1), 99-103 ,	1-11, 17-22
Y	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KUO, YAO-HAU ET AL: "Cytotoxic constituents from the fruit of Diospyros ferrea" retrieved from STN Database accession no. 128:274929 XP002184903 abstract & CHIN. PHARM. J. (TAIPEI) (1997), 49(4), 207-216 ,	1-11, 17-22
Y	EVERS, MICHEL ET AL: "Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action" J. MED. CHEM. (1996), 39(5), 1056-68 , XP002184895 page 1061; example 17B; table 1	1-11, 17-22
X	MAYAUX J-F ET AL: "TRITERPENE DERIVATIVES THAT BLOCK ENTRY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 INTO CELLS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 91, no. 9, 1 April 1994 (1994-04-01), pages 3564-3568, XP000612123 ISSN: 0027-8424 page 3565; figure 1 page 3566; figure 2	1-11, 17-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 01/25581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; FANG, SHENG DING ET AL: "The chemistry of toxic principles from <i>Maytenus nemerosa</i> " retrieved from STN Database accession no. 101:51677 XP002184904 abstract & PHYTOCHEMISTRY (1984), 23(3), 631-3 , -----	1-16
X	MACIAS F A ET AL: "Bioactive polar triterpenoids from <i>melilotus messanensis</i> " PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 49, no. 3, October 1998 (1998-10) , pages 709-717, XP004290188 ISSN: 0031-9422 page 712; example 1 -----	9,10
X	EP 0 943 620 A (DABUR RESEARCH FOUNDATION) 22 September 1999 (1999-09-22) page 9-10; example 15 -----	1-16
X	HASHIMOTO F ET AL: "Anti-AIDS Agents. XXVII. Synthesis and Anti-HIV Activity of Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 5, no. 12, 1997, pages 2133-2143, XP002102686 ISSN: 0968-0896 page 2134; figure 1; examples 2-7,10-15,17,19,20,22,23 page 2136; table 1 page 2137; tables 2,3 page 2138; table 4 -----	1-11, 17-22
X	MA, CHAOMEI ET AL: "Inhibitory effects of constituents from <i>Cynomorium songaricum</i> and related triterpene derivatives on HIV-1 protease" CHEM. PHARM. BULL. (1999), 47(2), 141-145 , XP002184896 page 143; examples 37-41; table 2 ----- -/-	1-8,11, 17-22

Form PCT/ISA(210) (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/25581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM D S H L ET AL: "Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 8, no. 13, 7 July 1998 (1998-07-07), pages 1707-1712, XP004137114 ISSN: 0960-894X page 1711; table 1	1-16
X	NODA Y ET AL: "Enhanced Cytotoxicity of Some Triterpenes toward Leukemia L1210 Cells Cultured in Low pH Media: Possibility of a New Mode of Cell Killing" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN, PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, TOKYO, JP, vol. 45, no. 10, 1997, pages 1665-1670, XP002082673 ISSN: 0009-2363 page 1667; table 1	1-16
X	KITAJIMA, JUNICHI ET AL: "Two new triterpenoid sulfates from the leaves of Schefflera octophylla" CHEM. PHARM. BULL. (1990), 38(3), 714-16, XP002184897 page 714, chart 1, compounds 4 and 5	2,3,7,8, 11
X	KASHIWADA ET AL: "Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives as Potent Anti-HIV Agents" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL, vol. 39, no. 5, 1996, pages 1016-1017, XP002078035 page 1016, column 2; examples 2-5,7-10 page 1017; table 1	1-11, 17-22
P,X	WO 00 59492 A (FARISS MARC ;SMITH J DOYLE (US); UNIV WASHINGTON (US); UNIV VIRGIN) 12 October 2000 (2000-10-12) page 3 page 4, paragraph 3 page 6, paragraph 3 page 7, paragraph 1 example 7	1-16

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 01 /25581

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 8,14-16,18-19 (in part)

Claim 14 and 15, 16 dependent thereon, specify the use of a "betulinic acid derivative" or its "prodrug" in the treatment of cancer. Claim 18 and claim 19 dependent thereon claim the use of the same compounds in the treatment of HIV.

These claims relate to the use of an extremely large number of possible compounds in the above medical methods, that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Furthermore, the above term "betulinic acid derivative" does not have any well recognised meaning in this technical area and as such the scope of the above claims is unclear to an extent that it is not possible to conduct a meaningful search thereon.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely the above mentioned uses of the compounds as defined in composition claims 1-7 and compound claims 8-11.

It should further be noted, that with regard to the search on the compounds of claim 8, the initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claim(s) may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claim(s) is impossible. Consequently, the search has been restricted to the preferred compounds specified in claim 11 and embraced by the scope of claim 8. In any case claim 11 in as far as it specifies compounds falling within the scope of claim 8 still lacks novelty.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 In — International Application No
 PCT/US 01/25581

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310142	A	27-05-1993	FR 2683531 A1	14-05-1993
			CA 2121692 A1	27-05-1993
			EP 0542622 A1	19-05-1993
			EP 0613483 A1	07-09-1994
			FI 942181 A	11-05-1994
			WO 9310142 A1	27-05-1993
			HU 66959 A2	30-01-1995
			JP 7501068 T	02-02-1995
			MX 9206503 A1	01-05-1993
			NO 941666 A	05-05-1994
			US 5468888 A	21-11-1995
WO 9426725	A	24-11-1994	FR 2705097 A1	18-11-1994
			AU 6724494 A	12-12-1994
			CA 2162703 A1	24-11-1994
			EP 0698016 A1	28-02-1996
			WO 9426725 A1	24-11-1994
			JP 8509969 T	22-10-1996
			ZA 9403202 A	16-01-1995
EP 0943620	A	22-09-1999	EP 0943620 A2	22-09-1999
			US 6228850 B1	08-05-2001
			US 6214814 B1	10-04-2001
WO 0059492	A	12-10-2000	AU 4331700 A	23-10-2000
			WO 0059492 A2	12-10-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
// C 0 7 B 53/00	C 0 7 B 53/00	G
C 0 7 B 61/00	C 0 7 B 61/00	3 0 0

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

(74)代理人 100106242
弁理士 古川 安航

(74)代理人 100110951
弁理士 西谷 俊男

(74)代理人 100114834
弁理士 幅 慶司

(74)代理人 100122264
弁理士 内山 泉

(74)代理人 100125645
弁理士 是枝 洋介

(72)発明者 ベズト, ジョン エム.
アメリカ合衆国 6 0 3 0 5 イリノイ リバー フォレスト ボニー プラエ プレイス 8 4
6

(72)発明者 コスメダー, ジェロメ ダブリュ. セカンド
アメリカ合衆国 6 0 3 0 2 イリノイ オーク パーク #2 ワシントン ボーレバード 2
1 5 B

(72)発明者 ク, ゼ-クイ
アメリカ合衆国 6 0 5 1 7 イリノイ ウッドリッジ チック エバンス レーン 6 6 0 9

(72)発明者 ゴウ, ニアン エン
アメリカ合衆国 6 0 5 6 5 イリノイ ナパービル マーサー コート 2 2 0 4

F ターム(参考) 4C086 AA02 DA08 MA02 MA05 MA56 MA65 NA15 ZA01 ZA59 ZA66
ZA67 ZA81 ZA89 ZA94 ZB26
4C091 AA03 BB01 CC01 DD01 EE01 FF02 FF06 GG01 HH04 JJ03
KK01 LL04 LL06 MM04 NN01 PA01 QQ05 QQ15 RR09 RR10
4H006 AA02 AC41 AC80 AC81 BJ30 BN10 BS20
4H039 CA65 CE40