

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6501946号  
(P6501946)

(45) 発行日 平成31年4月17日 (2019. 4. 17)

(24) 登録日 平成31年3月29日 (2019. 3. 29)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 515/22 (2006. 01)

C O 7 D 515/22 C S P

A 6 1 K 31/4995 (2006. 01)

A 6 1 K 31/4995

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

A 6 1 P 35/00

請求項の数 16 外国語出願 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2018-86736 (P2018-86736)  
 (22) 出願日 平成30年4月27日 (2018. 4. 27)  
 (65) 公開番号 特開2018-188431 (P2018-188431A)  
 (43) 公開日 平成30年11月29日 (2018. 11. 29)  
 審査請求日 平成30年11月9日 (2018. 11. 9)  
 (31) 優先権主張番号 17382228. 9  
 (32) 優先日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 17382497. 0  
 (32) 優先日 平成29年7月26日 (2017. 7. 26)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 505404208  
 ファルマ、マール、ソシエダード、アノニ  
 マ  
 PHARMA MRS, S. A.  
 スペイン・E-28770・マドリッド・  
 コルメナール・ヴィエホ・アヴェニューダ・  
 デ・ロス・レジェス・1・ポリゴノ・イン  
 ダストリアル・ラ・ミナ  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

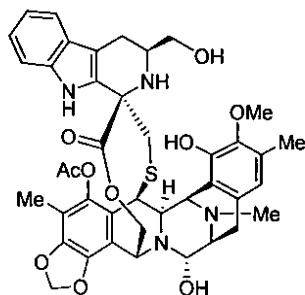
(54) 【発明の名称】 抗腫瘍化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式Iの化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

【化 1】



式 I

【請求項 2】

前記塩が、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、エチレンジアミン、エタノールアミン、N,N-ジアルキレンエタノールアミン、トリエタノールアミン及び塩基性アミノ

酸から選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項4】

請求項3に記載の医薬組成物を含む剤形。

【請求項5】

請求項1又は2に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、請求項3に記載の組成物、又は請求項4に記載の剤形を含む医薬。

【請求項6】

がんの治療用の、請求項5に記載の医薬。

【請求項7】

前記がんが、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん、胃がん並びに大腸がんから選択される、請求項6に記載の医薬。

【請求項8】

前記がんが、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、乳がん、膵臓がん、並びに大腸がんから選択される、請求項7に記載の医薬。

【請求項9】

がんの治療用の医薬の製造における、請求項1又は2に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、請求項3に記載の組成物、又は、請求項4に記載の剤形の使用。

【請求項10】

前記がんが非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん、胃がん並びに大腸がんから選択される、請求項9に記載の使用。

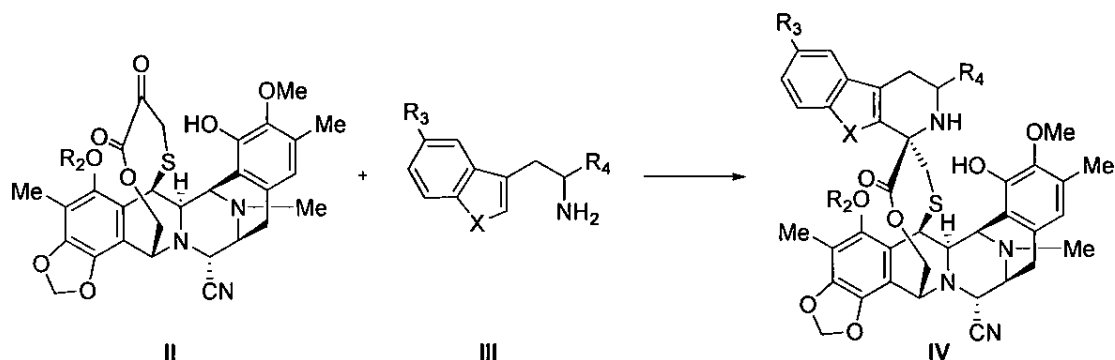
【請求項11】

前記がんが、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、乳がん、膵臓がん、並びに大腸がんから選択される、請求項10に記載の使用。

【請求項12】

請求項1に記載の式Iの化合物又はその薬学的に許容可能な塩を得る方法であって、式IIIの化合物を式IIIの化合物と反応させて、式IVの化合物を生成する工程

【化2】



[式中、

Xは-NH-であり、

R<sub>2</sub>はアセチルであり、

R<sub>3</sub>は水素であり、

R<sub>4</sub>は-CH<sub>2</sub>OHである]

を含む方法。

【請求項13】

式IVの化合物中のシアノ基をヒドロキシ基で置き換えて式Iの化合物を生成する更なる工程を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

治療有効量の請求項1又は2に記載の化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、キット。

【請求項15】

がんの治療における前記化合物の使用説明書を更に含む、請求項14に記載のキット。

【請求項16】

前記がんが、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん、胃がん並びに大腸がんから選択される、請求項15に記載のキット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エクテイナシジン、特にエクテイナシジン736(ET-736)の合成類似体、それを含む医薬組成物、その製造方法、及び抗腫瘍薬としてのその使用に関する。

【背景技術】

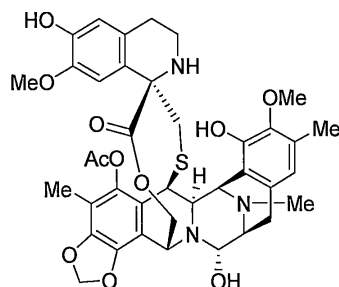
【0002】

エクテイナシジンは、ホヤの*Ecteinascidia turbinata*から単離される極めて強力な抗腫瘍薬である。これらの化合物のうちの1種である次式のET-743は、

20

【0003】

【化1】



30

【0004】

トラベクテジンという国際一般名称(INN)で抗がん剤として、アントラサイクリン及びイホスファミドによる治療不成功後の進行性及び転移性軟組織肉腫(STS)の患者、又はかかる薬剤の投与が適さない患者の治療、及びベグ化リポソームドキソルビシンと併用した再発プラチナ製剤感受性卵巣がんの治療に用いられている。

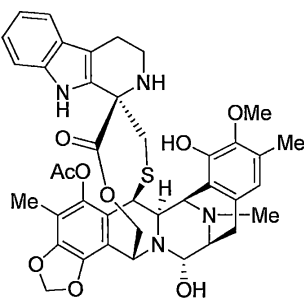
【0005】

エクテイナシジン736(ET-736)は、Rinehartによって初めて発見され、天然の供給源から単離されるエクテイナシジン化合物にごく普通に見られるテトラヒドロイソキノリン単位の代わりであるテトラヒドロ- -カルボリン単位を特徴とする。例えば、Sakai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, vol. 89, 11456-11460を参照されたい。

40

【0006】

## 【化2】



ET-736

10

## 【0007】

米国特許第5,149,804号は、カリブ海産原索動物 *Ecteinascidia turbinata* から単離されたエクティナシジン736(ET-736)とその構造を記載している。ET-736は、インビボにおいて、極低濃度でP388リンパ腫、B16黒色腫及びルイス肺癌からマウスを保護する。

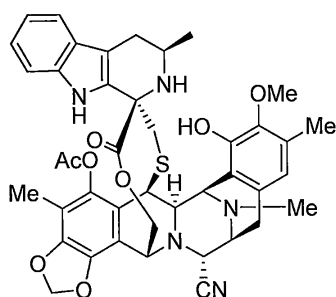
## 【0008】

W003014127は、ET-736の数種の合成類似体及び腫瘍細胞に対するその細胞傷害活性を記載している。W003014127は、一群のがん細胞系に対する細胞傷害活性と合わせて化合物A~Dを記載している。

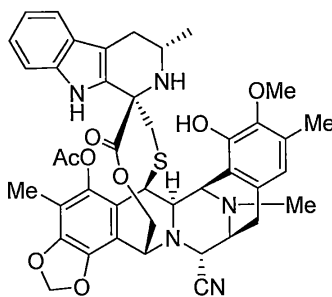
## 【0009】

20

## 【化3】

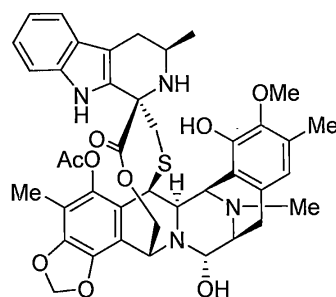


A

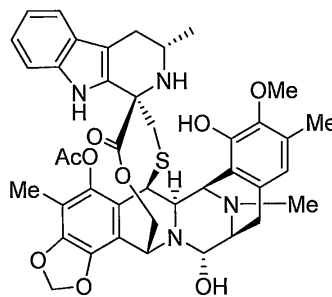


B

30



C



D

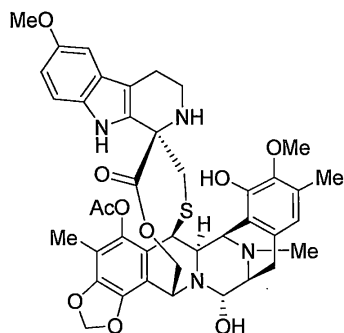
40

## 【0010】

この特許出願で記載されている別の化合物PM01183は、現在、がん治療の臨床試験中である。PM01183は、次の化学構造を有する。

## 【0011】

## 【化 4】



10

## 【 0 0 1 2 】

PM01183は、固形及び非固形腫瘍細胞系に対する非常に強力なインビトロ活性、並びに乳がん、腎臓がん及び卵巣がん等、マウスにおけるいくつかの異種移植ヒト腫瘍細胞系における顕著なインビボ活性を実証した。PM01183は、DNA副溝中のグアニンの共有結合修飾により抗がん作用を発揮し、最終的に、がん細胞のDNA二本鎖切断、S期停止及びアポトーシスを起こす。

## 【 0 0 1 3 】

化学療法への臨床応用で肯定的な結果が得られたにもかかわらず、腫瘍に対する活性、選択性の最適な特徴、全身性毒性の軽減及び/又は改善された薬物動態特性を有する新規化合物を特定するために、エクテイナシジン化合物の分野における探索がまだ続いている。

20

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【 0 0 1 4 】

【特許文献 1】米国特許第5,149,804号

【特許文献 2】W003014127

【特許文献 3】W001/87895

## 【非特許文献】

## 【 0 0 1 5 】

【非特許文献 1】Sakai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, vol. 89, 11456-11460

30

【非特許文献 2】E.W.Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences

【非特許文献 3】Skehan et al. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112

【非特許文献 4】Mosmann et al. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63

【非特許文献 5】The American National Standards Institute and Society for Laboratory Automation and Screening(ANSI SLAS 1-2004 (R2012) 10/12/2011)

【非特許文献 6】Boyd MR and Paul KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91-104

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

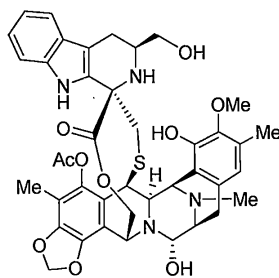
40

## 【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の態様では、式 I の化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくはエステルを提供する。

## 【 0 0 1 7 】

## 【化 5】



I.

10

## 【0018】

本発明の更なる態様では、本発明に従う化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物を提供する。

## 【0019】

本発明のなおも更なる態様では、本発明に従う医薬組成物を含む剤形を提供する。

## 【0020】

本発明のなおも更なる態様では、医薬としての使用のための本発明に従う化合物、医薬組成物又は剤形を提供する。

20

## 【0021】

本発明のなおも更なる態様では、がんの治療における使用のための、本発明に従う化合物、医薬組成物又は剤形を提供する。

## 【0022】

本発明のなおも更なる態様では、がんの治療用の医薬の製造のための、本発明に従う化合物、医薬組成物又は剤形の使用を提供する。

## 【0023】

本発明のなおも更なる態様では、がんを予防又は治療する方法であって、治療を必要とする患者、とりわけヒトに、有効量の本発明に従う化合物を投与する工程、有効量の本発明に従う医薬組成物を投与する工程、又は有効量の本発明に従う剤形を投与する工程を含む、方法を提供する。

30

## 【0024】

本発明のなおも更なる態様では、がんの治療のための、又は好ましくはがんの治療用の医薬の調製における、本発明に従う化合物の使用を提供する。

## 【0025】

本発明のなおも更なる態様では、治療有効量の本発明に従う化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、キットを提供する。キットは、がんの治療における使用のためのものである。

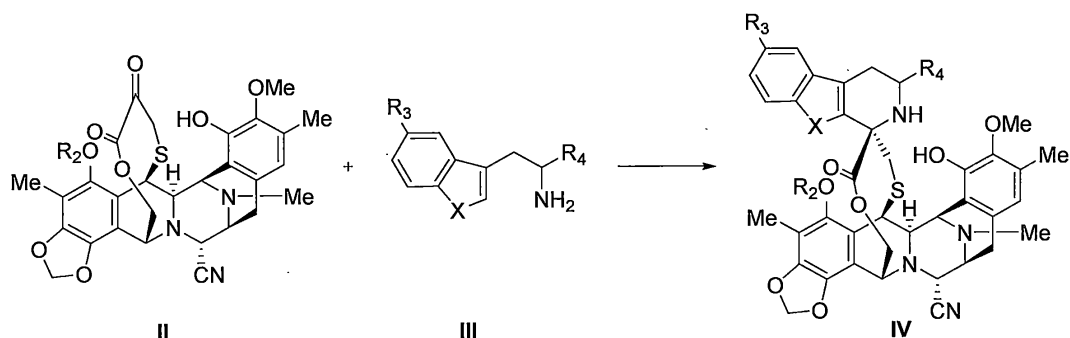
## 【0026】

本発明のなおも更なる態様では、式Iの化合物又は薬学的に許容可能なその塩若しくはエステルを得る方法であって、式IIの化合物を式IIIの化合物と反応させて式IVの化合物を生成する工程

40

## 【0027】

## 【化 6】



10

## 【 0 0 2 8 】

[ 式中、

Xは-NH-であり、

R<sub>2</sub>はアセチルであり、R<sub>3</sub>は水素であり、R<sub>4</sub>は-CH<sub>2</sub>OHである]

を含む方法を提供する。

## 【 0 0 2 9 】

本方法は、式IVの化合物中のシアノ基をヒドロキシ基で置き換えて式Iの化合物を生成する更なる工程を含むことができる。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 3 0 】

【図 1】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるHT1080腫瘍の腫瘍総直径評価のグラフである。

【図 2】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるMDA-MB-231腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 3】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH460腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 4】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH526腫瘍の腫瘍体積の評価のグラフである。

30

【図 5】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH82腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 6】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるA2780腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 7】プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるHGC-27腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 8】プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおけるPC-3腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

【図 9】プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおけるDU-145腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

40

【図 10】プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおける22Rv1腫瘍の腫瘍体積評価のグラフである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 3 1 】

以下は、本発明の全態様に該当する。

## 【 0 0 3 2 】

用語「薬学的に許容可能な塩」及び「エステル」は、患者への投与時、本明細書の説明の通りに化合物を(直接又は間接に)提供することができるどのような薬学的に許容可能な塩又はエステルをも指す。しかし、非薬学的に許容可能な塩も、薬学的に許容可能な塩の

50

調製に有用になり得るので、本発明の範囲内である、と理解される。塩の調製は、当技術分野で既知の方法によって実施可能である。

【0033】

例えば、ここで提供する化合物の薬学的に許容可能な塩は、塩基部分又は酸部分を含有する親化合物から、従来の化学的方法によって合成される。概ね、かかる塩は、例えば、水中又は有機溶媒中又は両方の混合液中で化学量論量の適切な塩基又は酸とこれらの化合物の遊離酸又は塩基を反応させることによって調製される。概ね、エーテル、酢酸エチル、エタノール、2-プロパノール又はアセトニトリルのような非水性溶媒が好ましい。前記酸付加塩の例は、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の鉱酸付加塩、及び、例えば酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸、メタンスルホン酸塩及びp-トルエンスルホン酸塩等の有機酸付加塩を含む。アルカリ付加塩の例は、無機塩、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム及びアンモニウム塩、及び、有機アルカリ塩、例えばエチレンジアミン、エタノールアミン、N,N-ジアルキルエタノールアミン、トリエタノールアミン及び塩基性アミノ酸塩を含む。

10

【0034】

本発明の化合物は、遊離化合物として、又は、溶媒和物(例、水和物)として結晶又は非晶質形態であることができ、全形態が本発明の範囲内であることを意図する。溶媒和方法は、当技術分野で一般に周知である。

【0035】

20

不特定の立体化学を有する不斉炭素を囲む立体異性が可能であり、そのため、かかる事例では、不斉炭素は(R)又は(S)の立体配置を有することができる。分子中に存在する他の不斉炭素と連動したかかる不斉炭素の特定の立体配置によって生じる全ジアステレオマー及びその混合物は、本発明の範囲内と見なされる。二重結合を囲む立体異性(幾何異性)も可能で、そのため、一部の事例では、分子は、(E)-異性体又は(Z)-異性体として存在することができる。分子が数個の二重結合を含有する場合、各二重結合は、独自の立体異性を有することとなり、該分子の他の二重結合の立体異性と同一又は異なることができる。更に、本明細書で言及する化合物は、アトロプ異性体として存在することができる。本明細書で言及する化合物のジアステレオ異性体、幾何異性体及びアトロプ異性体及びそれらの混合物を含めた単一立体異性体は、本発明の範囲内であると考えられる。

30

【0036】

更に、本明細書で言及する化合物は、同位体標識体で存在することができる。本明細書で言及する化合物のすべての薬学的に許容可能な塩、エステル及び同位体標識体及びそれらの混合物は、本発明の範囲内である。

【0037】

より簡潔な説明を提供するため、本明細書に示される数量の表現の一部は、用語「約」により制限されない。用語「約」を明示的に使用するか否かにかかわらず、本明細書で示すすべての数量は、実際の特定値を指すことを意図するものである、と理解し、かかる特定値の実験条件及び/又は測定条件のために、等量及び概算値を含めて、当分野の通常の技術に基づいて推論するのが妥当な特定値の概算を指すことも意味する。

40

【0038】

上記の化合物の重要な特徴は、その生物学的活性、特に、その細胞傷害活性である。この点で、本発明者らは、驚くべきことに、実施例3、5及び6に示すように、本発明の化合物が増強された抗腫瘍活性を示すことを見出した。

【0039】

本発明の更なる実施形態では、本発明に従う化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物を提供する。投与形態の例は、経口、局所、非経口、舌下、直腸、膺、眼内及び鼻内を含むが、それらに制限されない。非経口投与は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射又は点滴技術を含む。好ましくは、前記組成物は、非経口的に投与する。本発明の医薬組成物は、該組成物の動物、好ましくはヒトへの投与時、本発明に従う化合物を

50



生体内利用可能にするように配合できる。組成物は、1種又は複数の剤形の形態をとることができ、例えば、錠剤は、単一の用量単位であることができ、本発明に従う化合物の容器は、液体又はエアロゾルの形態で本化合物を含有することができ、単一又は多数の用量単位を保持することができる。

#### 【0040】

薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を微粒子化し、それによって、前記組成物が、例えば錠剤又は散剤の形態になることができる。担体は液体になることができ、それによって、組成物は、例えば、経口シロップ又は注射液になる。更に、担体は、気体又は液体であってよく、それによって、例えば、吸入投与に有用なエアロゾル組成物を提供する。吸入剤形に粉末も使用することができる。用語「担体」は、希釈剤、アジュバント又は添加剤を指し、これと共に、本発明に従う化合物を投与する。かかる医薬担体は、水、石油、動物、植物、合成由来のものを含めた油、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等の液体であってもよい。担体は、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイドシリカ、尿素、二糖等であってもよい。更に、助剤、安定化剤、増稠剤、滑沢剤、着色剤を使用できる。ある実施形態では、本発明に従う化合物及び組成物、並びに薬学的に許容可能な担体は、動物に投与する場合、無菌である。本発明に従う化合物を静脈内投与する場合、水が好ましい担体である。食塩水及び水性デキストロース及びグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射溶液に用いることができる。適切な医薬担体は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等の添加剤も含む。本組成物は、好みで、少量の湿潤剤又は乳化剤、又は、pH緩衝化剤も含むことができる。

#### 【0041】

経口投与を意図する場合、本組成物は、好ましくは、固体又は液体の形態であり、半固体、半液体、懸濁液及びゲルの形態は、固体が液体として本明細書で考慮されている形態内に含まれる。

#### 【0042】

経口投与用の固体組成物としては、本組成物は、散剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル剤、チューインガム剤、ウェハー剤等の形態に製剤化することができる。かかる固体組成物は、典型的には、1種又は複数の不活性希釈剤を含有する。更に、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース又はゼラチン等の結合剤、デンプン、ラクトース又はデキストリン等の添加剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、コーンスターチ等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤、スクロース又はサッカリン等の甘味料、ペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジ香料等の香料、及び着色剤のうちの1種又は複数が存在してもよい。

#### 【0043】

本組成物がカプセル剤(例、ゼラチンカプセル剤)の形態の場合、上記タイプの材料に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン又は脂肪油等の液体担体を含有することができる。

#### 【0044】

本組成物は、液剤、例えばエリキシル剤、シロップ剤、溶液剤、エマルジョン剤又は懸濁剤の形態であってもよい。液剤は、経口投与又は注射での送達に有用となり得る。経口投与を意図する場合、組成物は、甘味料、防腐剤、染料/着色剤及び香り増強剤のうちの1種又は複数を含むことができる。注射による投与のための組成物では、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定化剤、等張化剤のうちの1種又は複数も含むことができる。

#### 【0045】

好ましい投与経路は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、脳内、心室内、髄腔内、腔内、経皮を含むが、それらに制限されない非経口投与である。好ましい

10

20

30

40

50

投与方式は、医師の自由裁量に任されており、一部では、病態の部位(がん部位等)に左右される。更に好ましい実施形態では、本発明に従う化合物は、静脈内投与する。24時間までの点滴時間の使用が好ましく、更に好ましくは1~12時間で、1~6時間が最も好ましい。病院に一晚滞在することなく治療を実施する短い点滴時間が、特に望ましい。しかし、必要ならば、注入が12~24時間又はそれ以上にもなる場合がある。点滴は、例えば1~4週間の適切な間隔で実施するのがよい。

#### 【0046】

本発明の液体組成物は、それらが溶液、懸濁液であれ、或いは、他の同様の形態であれ、以下のもののうちの1種又は複数を含むことができ、それらは、注射用水、食塩水、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム等の滅菌希釈剤、合成モノ又はジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン又は他の溶媒等の不揮発性油、ベンジルアルコール又はメチルパラベン等の抗細菌薬、塩化ナトリウム又はデキストロース等の等張性の調整剤である。非経口組成物は、アンプル、使い捨てシリンジ又はガラス製、プラスチック製又は他の材料製の頻回投与バイアルに封入することができる。生理食塩水は好ましくはアジュバントである。

10

#### 【0047】

特定の障害又は病態の治療に有効な本発明に従う化合物の量は、前記の障害又は病態の性質に依存し、標準的臨床技術で決定することができる。更に、インビトロ又はインビボアッセイを任意に用いて、最適な用量範囲を特定するのに役立てることができる。組成物に用いる正確な用量は、投与経路、及び、疾患又は障害の重症度にも左右され、医師の判断及び各患者の状況に従って決定する必要がある。

20

#### 【0048】

本組成物は、有効量の本発明の化合物を含み、それによって、適切な投与量が得られる。本化合物の正確な投与量は、特定の配合、適用方式、特定の部位、治療対象の宿主と疾患、例えばがん、更に、そうであれば、どんなタイプの腫瘍かに従って異なってくる。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排泄率、宿主の状態、併用薬物、反応感受性及び疾患の重症度のような他の要因を考慮する必要がある。投与は、連続して、或いは、定期的に最大耐用量の範囲内で実施することができる。

#### 【0049】

典型的には、量は、少なくとも本発明の化合物の約0.01%であり、組成物の少なくとも80重量%であってもよい。経口投与を意図する場合、この量は、組成物の約0.1重量%~約80重量%の範囲まで変動させることができる。好ましい経口組成物は、組成物の約4重量%~約50重量%の本発明の化合物を含むことができる。

30

#### 【0050】

好ましい本発明の組成物は、非経口用量単位が約0.01~約10重量%の本発明の化合物を含有するように調製する。更に好ましい非経口用量単位は、約0.5~約5重量%の本発明の化合物を含有する。

#### 【0051】

静脈内投与に対して、本組成物は、約0.1mg/kg~約250mg/kg動物体重、好ましくは約0.1mg/kg~約20mg/kg動物体重、更に好ましくは約1mg/kg~約10mg/kg動物体重の用量に適している。

40

#### 【0052】

本発明の化合物は、いずれかの便利な経路、例えば点滴又は単回全量注射、上皮又は粘膜皮膚内壁からの吸収によって投与できる。

#### 【0053】

特定の実施形態では、本発明の化合物を、又は組成物を治療が必要な区域に局所的に投与するのが望ましい場合がある。ある実施形態では、がん、腫瘍又は新生物組織又は前新生物組織の部位(又は元部位)での直接注射による投与が可能である。

#### 【0054】

肺内投与は、例えばインヘラー又はネブライザー及びエアロゾル化剤との配合物の使用

50

により、又は、フルオロカーボン又は合成肺界面活性剤中の灌流によっても行うことができる。特定の実施形態では、本発明の化合物は、従来の結合剤及びトリグリセリド等の担体との坐剤として配合することができる。

【0055】

本組成物は、溶液剤、懸濁剤、エマルジョン剤、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、液体含有カプセル剤、散剤、徐放製剤、坐剤、エマルジョン剤、エアロゾル剤、スプレー剤、懸濁剤の形態、又は他の使用に適した形態をとることができる。適切な医薬担体の他の例は、E.W.MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciencesに説明されている。

【0056】

医薬組成物は、製薬技術上周知の方法を使って調製することができる。例えば、注射による投与を意図した組成物は、本発明の化合物を水又はリン酸緩衝食塩水等の他の生理的に適切な希釈剤を合わせ、溶液を形成することによって調製できる。均質溶液又は懸濁液の形成の促進に界面活性剤を添加することができる。

【0057】

本発明に従う好ましい組成物は、

- ・ 本発明の化合物及び二糖を含む医薬組成物を含む。特に好ましい二糖は、ラクトース、トレハロース、スクロース、マルトース、イソマルトース、セロピオース、イソサッカロース、イソトレハロース、ツラノース、メリピオース、ゲンチオピオース、及び、それらの混合物から選択される。

- ・ 更に、前記の好ましい組成物は、本発明の化合物及び二糖を含む凍結乾燥医薬組成物を含む。特に好ましい二糖は、ラクトース、トレハロース、スクロース、マルトース、イソマルトース、セロピオース、イソサッカロース、イソトレハロース、ツラノース、メリピオース、ゲンチオピオース及び、それらの混合物から選択される。

【0058】

本発明の実施形態の、二糖に対する活性物質の比率は、二糖の溶解度に従って決定され、配合物が凍結乾燥の場合は、二糖の凍結乾燥能にも従って決定される。この活性物質：二糖比(w/w)は、一部の実施形態では約1:10、他の実施形態では約1:20、なおも他の実施形態では約1:50であってもよいと予測される。他の実施形態は、約1:5～約1:500の範囲のかかる比を有し、なおも更なる実施形態は、約1:10～約1:500の範囲のかかる比を有すると予測される。

【0059】

本発明の化合物を含む組成物は、凍結乾燥することができる。本発明の化合物を含む組成物は、通常、かかる化合物の特定量を含むバイアルで提示される。

【0060】

本発明者らは、本発明の化合物及び本発明の組成物が、がんの治療に特に有効であることを認めた。

【0061】

よって、前述のように、本発明は、治療を必要とする患者、特にがんを発症したヒトを治療する方法であって、発症者に、治療有効量の本発明に従う化合物又は組成物を投与する工程を含む、方法を提供する。本発明は、医薬としての使用のための化合物又は組成物を提供する。本発明は、がん、更に好ましくは非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん(colon cancer、大腸がん)、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん並びに胃がんから選択されるがんの治療における使用のための化合物又は組成物を提供する。

【0062】

よって、本発明に従う化合物及び組成物は、腫瘍細胞又はがん細胞の増加即ち増殖の抑制に、或いは、動物のがんの治療に有用である。

【0063】

本発明に従う化合物及び組成物は、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん並びに胃がん等のがんの治療で

10

20

30

40

50

優れた活性を示す。最も好ましいがんは、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、乳がん、膵臓がん並びに大腸がんから選択される。

【0064】

本出願において、「がん」は、腫瘍、新生物、及び、原因として悪性組織又は細胞を有するいずれの他の悪性疾患をも含むことを意味する。

【0065】

用語「治療する」は、本明細書で使用する場合、別段の指示がない限り、かかる用語が該当する疾患又は病態、又はかかる障害又は病態の1種又は複数の症状の進行の好転、減弱、緩和又は抑制を意味する。用語「治療」は、本明細書で使用する場合、別段の指示がない限り、「治療する」についての直上の定義通り、治療の行為を指す。

10

【0066】

本発明に従う化合物及び組成物は、がんの治療として手術も受けた動物に投与することができる。本発明のある実施形態では、追加の治療方法は放射線療法である。

【0067】

本発明の具体的な実施形態では、本発明に従う化合物又は組成物は、放射線療法と同時に投与する。別の具体的な実施形態では、放射線療法は、本発明の化合物又は組成物の投与の前又は後に、好ましくは、本発明の化合物又は組成物の投与の少なくとも1時間、3時間、5時間、12時間、1日、1週間、1ヶ月、更に好ましくは、数ヶ月(例、3ヶ月まで)前又は後に実施する。

20

【0068】

治療対象のがんのタイプに応じて、いずれの放射線療法プロトコルも使用できる。例えば、X線照射を実施できるが、それに制限されるものではない。特に、高エネルギー超高電圧(1MeVよりも高いエネルギーの照射)を深部腫瘍に使用でき、電子ビーム及び慣用電圧X線照射を皮膚がんを使用できる。ラジウム、コバルト及び他の元素の放射性同位元素等のガンマ線放出同位元素も投与できる。

【0069】

本発明の更なる実施形態では、治療有効量の本発明に従う化合物及び薬学的に許容可能な担体を含む、キットを提供する。

【0070】

ある実施形態では、この実施形態に従うキットは、がん、更に好ましくは非小細胞肺癌及び小細胞肺癌を含む肺癌、結腸がん、乳がん、膵臓がん、肉腫、卵巣がん、前立腺がん並びに胃がんから選択されるがんの治療における使用のためのものである。

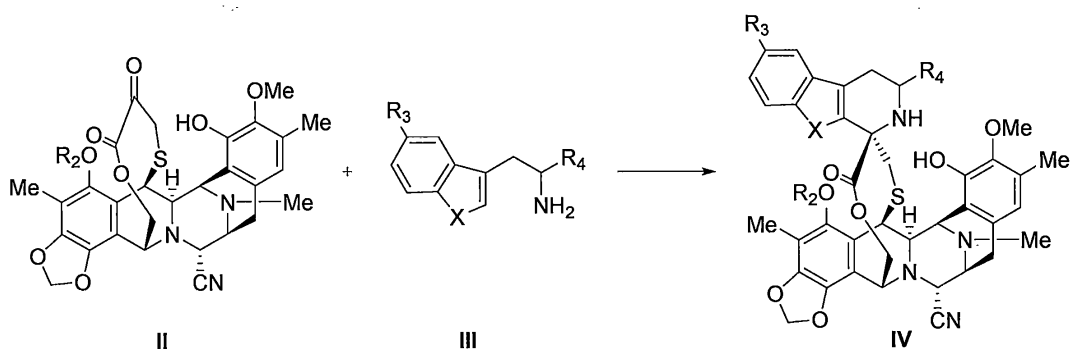
30

【0071】

本発明の更なる実施形態では、式Iの化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくはエステルを得る方法であって、式IIの化合物を式IIIの化合物と反応させて、式IVの化合物を生成する工程

【0072】

【化7】



40

【0073】

[式中、

50

Xは-NH-であり、  
 $R_2$ はアセチルであり、  
 $R_3$ は水素であり、  
 $R_4$ は-CH<sub>2</sub>OHである]  
 を含む方法を提供する。

【0074】

更に好ましい実施形態では、本方法は、更に、式IVの化合物中のシアノ基をヒドロキシ基で置き換えて式Iの化合物を生成する工程を含む。

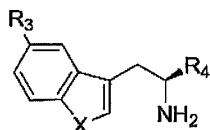
【0075】

本発明に従う好ましい方法は、

・ 式IIIの化合物が式IIIaの化合物である

【0076】

【化8】



IIIa

【0077】

[式中、  
 Xは-NH-であり、  
 $R_3$ は水素であり、  
 $R_4$ は-CH<sub>2</sub>OHである]  
 方法を含む。

【実施例】

【0078】

WO01/87895の実施例20の説明の通りに化合物1を調製した。

【0079】

WO03/014127号(化合物44)の説明の通りに参照化合物Cを調製した。

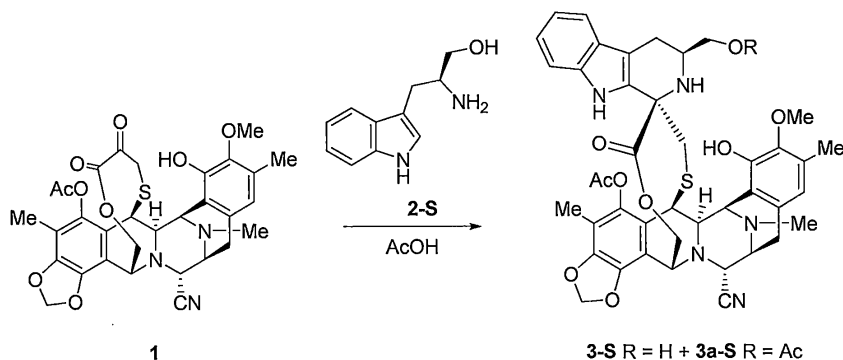
【0080】

(実施例1)

A)

【0081】

【化9】



【0082】

酢酸(20mL、0.04M)中の1(0.5g、0.80mmol)の溶液に、L-トリプトファン(2-S)(533mg、3.0mmol、Sigma Aldrich社)を添加した。反応混合液を23℃で16時間攪拌した後、酢酸を蒸発させた。NaHCO<sub>3</sub>の水性飽和溶液を添加し、混合液をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を合

10

20

30

40

50

わせ、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン:EtOAc 1:1)により化合物3-S(616mg、97%)及び3a-S(12mg、2%)を得た。

【 0 0 8 3 】

【 数 1 】

### 3-S

R<sub>f</sub> = 0.50 (ヘキサン:EtOAc, 1:1).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.71 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.13 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.03 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.26 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 6.04 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.14 (dd, *J* = 11.7, 1.2 Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.36-4.24 (m, 2H), 4.21 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.52 (s, 1H), 3.50-3.47 (m, 1H), 3.45 (dq, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 3.01-2.78 (m, 5H), 2.62 (dd, *J* = 15.3, 4.7 Hz, 1H), 2.41 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.37-2.31 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

ESI-MS *m/z*: 794.2 (M+H)<sup>+</sup>.

10

### 3a-S

R<sub>f</sub> = 0.70 (ヘキサン:EtOAc, 1:1).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.83 (s, 1H), 7.38 (dt, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.25 (dt, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 7.11 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.24 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 6.03 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 5.13 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.36-4.22 (m, 3H), 4.17-4.09 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 10.5, 8.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.51-3.41 (m, 2H), 3.04-2.92 (m, 3H), 2.72 (dd, *J* = 15.1, 4.0 Hz, 1H), 2.54-2.41 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.35-2.30 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.21-2.16 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.2, 170.7, 168.6, 147.5, 145.8, 143.0, 141.1, 140.4, 135.6, 130.1, 129.5, 126.7, 122.2, 121.2, 120.9, 119.4, 118.4, 118.2, 118.2, 113.6, 113.5, 110.9, 110.0, 109.1, 102.1, 91.4, 67.2, 63.4, 61.3, 60.4, 59.7, 59.1, 54.8, 54.6, 47.7, 42.0, 41.6, 31.6, 24.0, 22.6, 21.0, 15.9, 14.2, 9.7.

ESI-MS *m/z*: 836.2 (M+H)<sup>+</sup>.

30

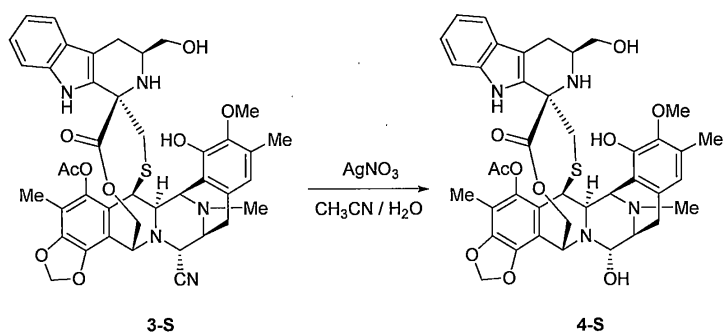
【 0 0 8 4 】

B)

【 0 0 8 5 】

40

## 【化 10】



10

## 【0086】

CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O(1.39:1, 51mL、0.015M)中の3-S(616mg、0.77mmol)の溶液に、AgNO<sub>3</sub>(3.40g、23.3mmol)を添加した。23 で3時間後、反応混合液を、NaClとNaHCO<sub>3</sub>の飽和水溶液の1:1混合液で反応停止させ、15分間攪拌し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、5分間攪拌した後、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を合わせて、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過した後、真空下で濃縮した。得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 99:1~85:15)で精製し、4-Sを得た(471mg、78%)。

## 【0087】

## 【数 2】

20

R<sub>f</sub>= 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH, 9:1).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.71 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.12 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.03 (ddd, *J* = 8.0, 7.1, 1.0 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.23 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.25 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.92 (s, 1H), 4.52 (br s, 3H), 4.22 (dd, *J* = 11.4, 2.2 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.54 (br s, 2H), 3.35 (t, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.26 (s, 1H), 3.01-2.93 (m, 3H), 2.88 (br s, 3H), 2.63 (dd, *J* = 15.2, 4.8 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.36-2.31 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.9, 168.6, 147.5, 145.4, 142.9, 141.2, 140.7, 135.5, 130.4, 126.8, 122.3, 122.0, 121.3, 119.4, 118.4, 115.2, 112.8, 111.0, 110.0, 109.6, 101.8, 81.9, 76.8, 65.2, 62.8, 62.5, 60.4, 58.1, 57.9, 55.9, 55.1, 53.4, 51.6, 41.8, 41.3, 39.6, 24.1, 23.8, 20.5, 15.8, 9.7.

30

ESI-MS *m/z*: 767.3 (M-H<sub>2</sub>O+H)<sup>+</sup>.

(+)-HR-ESI-TOF-MS *m/z* 767.2788 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> (C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S の計算値: 767.2745).

## 【0088】

(実施例2)

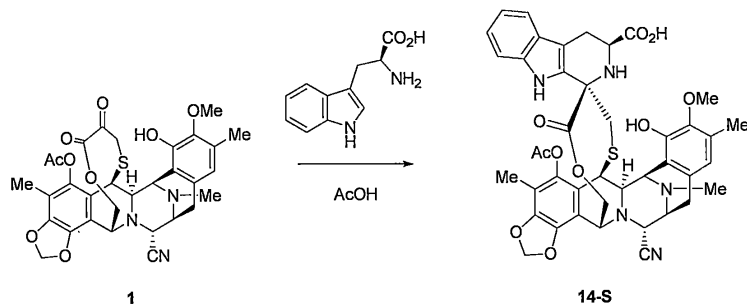
40

参照化合物14-S及び15-Sの合成

A)

## 【0089】

## 【化 1 1】



10

## 【 0 0 9 0 】

酢酸 (1mL、0.08M) 中の1 (50mg、0.08mmol) の溶液に、L-トリプトファン (50mg、0.24mmol) を添加した。反応混合液を50℃で17時間攪拌した後、酢酸を蒸発させた。NaHCO<sub>3</sub>の水性飽和溶液を添加し、混合液をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を合わせて、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過した後、真空下で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 99:1 ~ 80:20) により化合物14-S (58mg、90%) を得た。

## 【 0 0 9 1 】

## 【数 3】

R<sub>f</sub> = 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH, 10:1).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.77 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.04 (td, *J* = 7.5, 7.1, 1.0 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.24 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.03 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.35 (dd, *J* = 11.7, 2.1 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 5.2, 1.6 Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.52-3.41 (m, 4H), 3.07-2.88 (m, 2H), 2.91-2.80 (m, 2H), 2.42-2.21 (m, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.04 (s, 3H).

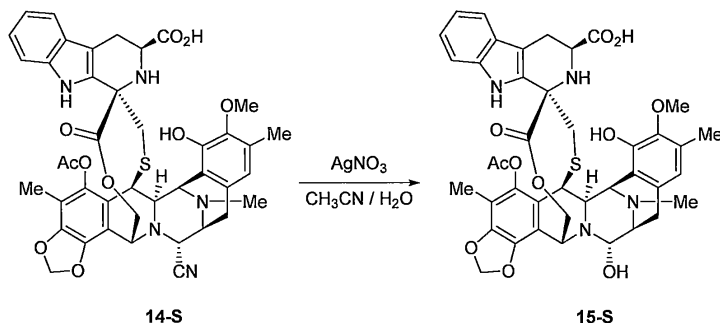
ESI-MS *m/z*: 808.6 (M+H)<sup>+</sup>.

20

30

## 【 0 0 9 2 】

## 【化 1 2】



40

## 【 0 0 9 3 】

CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (2:1、4.5mL、0.015M) 中の化合物14-S (52mg、0.066mmol) の溶液に、AgNO<sub>3</sub> (164mg、1.45mmol) を添加した。23℃で20時間放置後、NaCl 及び NaHCO<sub>3</sub> 飽和水性溶液の1:1混合液を添加し、15分間攪拌し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、30分間攪拌し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出した。有機層を合わせ、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過後、真空下で濃縮した。得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 99:1 ~ 70:30) により精製し、15-S (18mg、35%) を得た。

## 【 0 0 9 4 】

50



## 【数 4】

$R_f = 0.15$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ , 9:1).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.76 (s, 1H), 7.40 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.14 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.04 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.23 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 6.01 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 5.28 (d,  $J = 12.7$  Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.28 (dd,  $J = 11.4, 2.0$  Hz, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.58 (s, 1H), 3.52-3.47 (m, 2H), 3.28 (s, 1H), 3.03 (dd,  $J = 15.8, 5.2$  Hz, 1H), 2.91-2.82 (m, 3H), 2.44 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.35-2.31 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.7, 171.2, 168.7, 147.5, 145.7, 142.8, 141.2, 140.8, 135.6, 129.8, 126.3, 122.8, 121.5, 121.2, 119.9, 118.6, 117.7, 115.0, 111.1, 101.9, 81.5, 66.8, 62.9, 60.4, 57.9, 55.8, 55.1, 52.3, 42.3, 41.3, 38.3, 31.9, 29.4, 28.9, 24.5, 24.0, 23.8, 22.7, 20.5, 16.0, 9.7.

ESI-MS  $m/z$ : 781.6 ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$ ) $^+$ .

(+)-HR-ESI-TOF-MS  $m/z$ : 781.2610 [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$ ] $^+$  ( $\text{C}_{41}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$  の計算値: 781.2538).

10

20

## 【0095】

(実施例3)

抗腫瘍活性検出のためのインビトロバイオアッセイ

このアッセイの目的は、被験サンプルのインビトロでの細胞分裂抑制(腫瘍細胞増殖の遅延又は停止能)又は細胞傷害活性(腫瘍細胞殺傷能)を評価することである。

## 【0096】

## 【表 1】

細胞系

名称	ATCC 番号	種	組織	特徴
A549	CCL-185	ヒト	肺	肺癌(NSCLC)
HT29	HTB-38	ヒト	結腸	大腸腺癌
MDA-MB-231	HTB-26	ヒト	乳房	乳腺癌
PSN1	CRM-CRL-3211	ヒト	膵臓	膵臓腺癌
PC-3	CRL-1435	ヒト	前立腺	前立腺腺癌
22Rv1	CRL-2505	ヒト	前立腺	前立腺癌

30

40

## 【0097】

SBR及びMTT比色アッセイを使った細胞傷害活性の評価

スルホローダミンB(SRB)反応を使った比色アッセイを採用し、細胞の増殖及び生存率の定量を提供した(Skehan et al. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112に記載の技術に従った)。3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)から紫色のホルマザンへの還元に基づく別の比色アッセイも使用して抗増殖活性を評価した(Mosmann et al. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63の説明の技術に従った)。

50

## 【 0 0 9 8 】

これらのアッセイ方式は、The American National Standards Institute and the Society for Laboratory Automation and Screening(ANSI SLAS 1-2004 (R2012) 10/12/2011)の基準に従って96ウェル細胞培養マイクロプレートを用いる。この試験で使用する全細胞系は、The American Type Culture Collection (ATCC)から入手し、様々な種類のヒトのがんに由来するものであった。

## 【 0 0 9 9 】

A549、HT29、MDA-MB-231及びPSN1細胞をDulbecco改変イーグル培地(DMEM)中に維持し、一方、PC-3及び22Rv1は、Roswell Park Memorial Institute培地(RPMI)中に維持した。全細胞系に10%ウシ胎仔血清(FBS)、2mM L-グルタミン、100U/mLペニシリン及び100U/mLストレプトマイシンを、37℃、5%CO<sub>2</sub>及び98%湿度下で補充した。実験用に、トリプシン処理を使って、サブコンフルエント培養物から細胞を採取し、新鮮培地に再懸濁し、その後、カウンティングとプレーティングを行った。

## 【 0 1 0 0 】

A549、HT29、MDA-MB-231及びPSN1細胞を、150 µLのアリコート中に細胞5000個/ウェルで、96ウェルマイクロタイターに接種し、薬物無添加培地中で18時間(一晚)プレート表面に付着させた。その後、各細胞系に1枚の対照(未処理)プレートを用意し(下記の通り)、ゼロ時参照値用に使用した。次に、10種の2/5段階希釈(10 µg/mLから0.003 µg/mLへの範囲の濃度)と3回繰返し培養物(DMSO中1%最終濃度)を使って、培養物プレートを被験化合物(完全培養培地+4%DMSO中4X原液のアリコート50 µL)で処理した。72時間の処理後、SRB方法を使って抗腫瘍効果を測定した。手短に言うと、細胞をPBSで2回洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液中、室温で15分間固定し、PBSで2回すすぎ、室温下、0.4%SRB溶液で30分間染色した。次に、細胞を1%酢酸溶液で数回すすぎ、室温で風乾した。その後、SRBを10mMトリズマ塩基溶液で抽出し、自動分光測光プレートリーダーにより490nmで吸光度を測定した。

## 【 0 1 0 1 】

細胞系に応じてウェル1個当たり細胞5,000~15,000個の範囲のアッセイでの最終細胞密度に達するのに適切な数のPC-3及び22Rv1細胞を96-ウェルプレートに接種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>及び98%湿度下で培養培地に24時間放置した。次に、培養培地中の化合物又はDMSOを添加し、1%(v/v)DMSO中0.1 µg/mLから10種の段階2/5希釈を網羅する範囲で最終容量200 µL、及び、対象化合物濃度を達成した。この時点で、1%(v/v)DMSOで処理した1組の「ゼロ時対照プレート」セットを下記の通りにMTTで処理した。残りのプレートは、前述の環境条件下で72時間インキュベートした。その後、培養培地中1mg/mL MTT溶液50 µLをウェルに添加し、37℃で6~8時間インキュベートし、ホルマザン結晶を生成した。次に、培養培地を除去し、純正DMSO100 µLを各ウェルに添加し、ホルマザン生成物を溶解し、着色溶液とし、最終的に、その540nmの吸光度をPolarStar Omegaマイクロプレートマルチラベルリーダー(BMG Labtech社、Ortenberg、独)で測定した。

## 【 0 1 0 2 】

NCIアルゴリズム(Boyd MR and Pauli KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91-104)を適用して細胞増殖及び生存率への作用を推定した。3回繰返し培養で得られた数値を、非線形回帰分析による4-パラメーターロジスティック曲線に非線形回帰で当てはめた。3種類の参照パラメーターを、かかる当てはめによって得られた曲線の自動内挿によって算出した(前述のNCIアルゴリズムに従う)。即ち、GI<sub>50</sub>=対照培養物と比較した場合に50%細胞増殖抑制を生じる化合物濃度、TGI=対照培養物と比較した場合の総細胞増殖抑制(細胞分裂抑制作用)、及び、LC<sub>50</sub>=正味の50%細胞殺傷(細胞傷害作用)を生じる化合物濃度である。

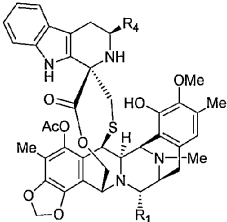
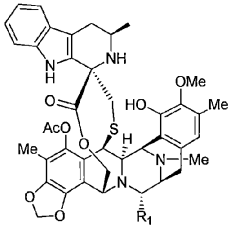
## 【 0 1 0 3 】

Table 1(表2)は、本発明の化合物の生物学的活性に関するデータを参照化合物の生物学的活性と合わせて示す。Table 2(表3)は、カルボン酸基を有する類似体と比較した生物学的活性に関するデータを示す。化合物C及び15-Sは、本発明の一部ではない。

## 【 0 1 0 4 】

【表 2】

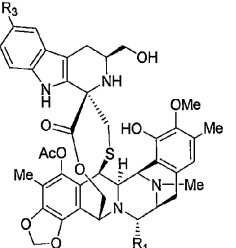
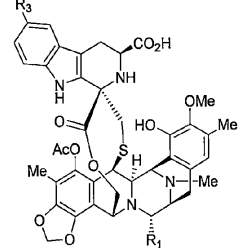
Table 1. 生物学的活性(モル)

化合物							参照化合物				
<div></div> <div>4-S R<sub>1</sub> = OH, R<sub>4</sub> = -CH<sub>2</sub>OH</div>							<div></div> <div>C R<sub>1</sub> = OH</div>				
	A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1	PC-3	22Rv1	A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1	
GI <sub>50</sub>	1.27E-09	1.27E-09	1.22E-09	1.78E-09	8.08E-10	3.58E-10	2.73E-08	2.08E-08	2.60E-08	3.64E-08	
TGI	4-S	1.40E-09	1.40E-09	2.55E-09	2.29E-09		C	6.63E-08	2.34E-08	5.46E-08	4.42E-08
LC <sub>50</sub>	>1.27E-07	>1.27E-07	6.50E-09	3.44E-09			>1.30E-07	>1.30E-07	>1.30E-07	6.50E-08	

【 0 1 0 5 】

【表 3】

Table 2. 生物学的活性(モル)

化合物					参照化合物					
										
4-S R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = H					15-S R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = H					
		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1
GI <sub>50</sub>	4-S	1.27E-09	1.27E-09	1.22E-09	1.78E-09	15-S	>1.25E-06	3.00E-07	1.63E-07	2.38E-07
TGI		1.40E-09	1.40E-09	2.55E-09	2.29E-09		>1.25E-06	5.13E-07	2.13E-07	4.63E-07
LC <sub>50</sub>		>1.27E-07	>1.27E-07	6.50E-09	3.44E-09		>1.25E-06	9.14E-07	2.75E-07	8.39E-07

【 0 1 0 6 】

本発明の化合物は、参照化合物と比較すると、インビトロで高い効力を有することが認められている。これは、本発明に従う化合物が、がん細胞に対して高い細胞傷害性を発揮

し、がんの治療に有用であることを実証するものである。

【 0 1 0 7 】

(実施例4)

MTD及びMTMDの定量

全実験に雌CD-1又は胸腺欠損ヌード-Fox1 nu/nuマウス(Envigo社)を用いた。動物(N=10匹/ケージ)を21～23 及び湿度40～60%、12時間明暗周期下で、個別換気ケージ内(Sealsafe Plus(登録商標) Techniplast S.P.A.社)に収容した。マウスには、放射線照射げっ歯類用標準食(Tecklad 2914C)と滅菌水を自由に摂取させた。動物を個別にタトゥーで識別する前に、5日間順化した。動物プロトコルは、the regional Institutional Animal Care and Use Committeesにより、再審査され、承認された。

10

【 0 1 0 8 】

マウスを実験群に無作為に割付け、MTD(最大耐量)決定用に1回、又は、MTMD(最大頻回投与耐量)決定試験用に3週間連続で週1回投与として、静脈内投与した。動物に白色配合物か各種濃度の実験配合物に溶解した化合物を投与した。投与量は、常に、10mL/kgであった。いったん投与すると、投与後14日まで、全身毒性の臨床徴候、体重変化及び死亡率について動物をモニターした。

【 0 1 0 9 】

MTDの結果をTable 3(表4)に要約する。

【 0 1 1 0 】

【表 4】

20

Table 3

化合物	経路/スケジュール	投与量(mg/Kg)	MTD (mg/kg)
4-S	iv / SD	0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 5.00	1.0
化合物 C		0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 4.00, 5.00	3.0

30

【 0 1 1 1 】

MTMDの結果をTable 4(表5)に要約する。

【 0 1 1 2 】

【表 5】

Table 4

化合物	経路/スケジュール	投与量(mg/Kg)	MTMD (mg/kg)
4-S	iv / Q7dx3	0.00, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25	1.25
化合物 C		0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0	3.0
iv、静脈内 Q7dx3、週1回投与による3回累積量			

40

【 0 1 1 3 】

50

(実施例5～6)

インビボ異種移植

雌胸腺欠損nu/nuマウス(Harlan Laboratories Models, S.L社 バルセロナ、スペイン又はEnvigo社 スペイン)を全実験に用いた。動物を21～23 及び湿度40～60%、12時間明暗周期下で、個別換気ケージ内(Sealsafe Plus(登録商標) Techniplast S.P.A.社)に1ケージ10匹を収容した。マウスには、放射線照射げっ歯類用標準食(Tecklad 2914C)と滅菌水を自由に摂取させた。腫瘍細胞懸濁液で腫瘍を移植する前に、少なくとも5日間動物を順化した。

【0114】

【表6】

10

細胞系

名称	ATCC 番号	*ECCC 番号	種	組織	特徴
HT1080	CCL-121	-	ヒト	結合組織	線維肉腫
MDA-MB-231	HTB-26	-	ヒト	乳房	乳腺癌
H460	HTB-177	-	ヒト	肺、胸水	NSCLC
A2780	-	93112519	ヒト	卵巣	卵巣癌
HGC27	-	94042256	ヒト	胃	胃癌
H526	CRL-5811	-	ヒト	肺	SCLC
H82	HTB-175	-	ヒト	肺	SCLC
PC3	CLR-1435	-	ヒト	前立腺、転移部位から誘導、骨	前立腺腺癌
DU145	HTB-81	-	ヒト	前立腺、転移部位から誘導、脳	前立腺癌
22Rv1	CRL-2505	-	ヒト	前立腺	前立腺癌

20

30

\* 欧州細胞培養コレクション(European Collection of Cell Cultures)

40

【0115】

HT1080細胞は、イーグル最小必須培地(MEME)(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37 下、インビトロで維持した。各動物は、4～6週齢で、抗生物質無添加の無血清培地に懸濁した10×10<sup>6</sup>個のHT1080細胞を26G注射針及び1ccシリンジを使った筋肉内注射により腓腹筋に同所移植した。

【0116】

MDA-MB-231細胞は、Dulbecco改変イーグル培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37 下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各動物は、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した7.5×10<sup>6</sup>個の

50

MDA-MB-231細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 1 7 】

H460細胞は、Dulbecco改変イーグル培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞をコンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各動物に、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した5×10<sup>6</sup>個のH460細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 1 8 】

A2780細胞は、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各動物に、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した10×10<sup>6</sup>個のA2780細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 1 9 】

HGC27細胞は、IscoveのDulbecco改変培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各動物には、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した5×10<sup>6</sup>個のHGC-27細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 2 0 】

H526細胞は、RPMI-1640培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。H526細胞を懸濁液として増殖させ、細胞密度の増加につれて、2～3日毎に新鮮培地を添加して維持した。毎週、培養物を懸濁液の遠心分離により再樹立させ、その後、新鮮培地に細胞1×10<sup>5</sup>個/mLの濃度で再懸濁した。各動物に、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した5×10<sup>6</sup>個のH526細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 2 1 】

H82細胞は、RPMI-1640培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。H82細胞を懸濁液として増殖させ、細胞密度の増加につれて、2～3日毎に新鮮培地を追加して維持した。毎週、培養物を懸濁液の遠心分離により再樹立させ、その後、新鮮培地に細胞1×10<sup>5</sup>個/mLの濃度で再懸濁した。動物に、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した5×10<sup>6</sup>個のH82細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 2 2 】

PC3細胞は、RPMI-1640培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各雌無胸腺マウスに、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)Matrix(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した3×10<sup>6</sup>個のPC3細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 2 3 】

DU-145細胞は、RPMI-1640培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各雄無胸腺マウスに、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)Matrix(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した5×10<sup>6</sup>個のDU-145細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹)に皮下移植した。

【 0 1 2 4 】

22Rv1細胞は、RPMI-1640培地(Sigma-Aldrich社)中、5%CO<sub>2</sub>、37℃下、インビトロで維持した。培養細胞を、コンフルエンスに達した時点で、3～5日毎に継代培養した。各雄無胸

10

20

30

40

50

腺マウスに、4～6週齢で、50%Matrigel(登録商標)Matrix(Corning Incorporated Life Sciences社)と50%無血清及び無抗生物質培地から成る溶液0.05mL中に懸濁した $5 \times 10^6$ 個の22Rv1細胞を(26G注射針及び1ccシリンジを使って右脇腹に)皮下移植した。

#### 【0125】

体重増加、全身性毒性の臨床徴候、並びに注射部位の局所損傷の証拠をモニタリングして、治療忍容性を評価した。

#### 【0126】

HT1080細胞系による異種移植試験において、以下のことを行った。

- 総直径(腫瘍+脚部)の測定値をデジタルカリパー(Fowler Sylvac社、S235PAT)を使って決定した。この総直径と動物の体重を、治療初日(ゼロ日目)から週2～3回測定した。
- 総直径が約7.0～8.0mmの長さ達した時点で、NewLab Oncologyソフトウェア(バージョン2.25.06.00)を使って、体重及び腫瘍測定値に基づいて、マウスを治療群と対照群に無作為に割付けた(N=8～10匹/群)。
- 抗腫瘍効果の評価に、対照群の総直径(腫瘍+脚部)中央値に対する治療群の総直径(腫瘍+脚部)中央値の比較を使用した。
- 総脚部直径が約18mmに達した時、動物を安楽死させた。

#### 【0127】

他の細胞系による異種移植試験において、以下のことを行った。

- 方程式 $(a \cdot b^2)/2$ を使って腫瘍体積を算出し、この場合、aの長さ(最長直径)、bの幅(最短直径)をデジタルカリパー(Fowler Sylvac社、S235PAT)を使ってmmで測定した。腫瘍の寸法と体重を、治療初日から週に2～3回記録した。
- 腫瘍が約150～250mm<sup>3</sup>に達した時点で、NewLab Oncologyソフトウェア(バージョン2.25.06.00)を使用し、体重と腫瘍測定値に基づいて、担腫瘍マウス(N=8～10匹/群)を治療群に無作為に割付けた。
- 抗腫瘍効果の評価に、治療群と対照群の腫瘍体積中央値の比較を使用した。
- 腫瘍が約2000mm<sup>3</sup>に達した及び/又は重症壊死が見られた時、動物を安楽死させた。

#### 【0128】

致死率>20%及び/又は20%の正味の体重減少を生じた治療は、有害と見なした。

#### 【0129】

表及び図は、完全実験群、即ち初回動物数、n=8～10を保った群から得られたデータを要約する。しかし、いったん腫瘍長さ>18mm又は腫瘍サイズ>2000mm<sup>3</sup>となり最初の動物を屠殺すると、その実験群は不完全と見なす。そのため、屠殺日以後、また、その後に得られたデータは、提示しない(即ち、表、図に示さない)。

#### 【0130】

(実施例5)

数種の異種移植モデルにおける4-Sの作用を決定するインビボ試験

4-S及び化合物Cは、凍結乾燥品のフリーズドライバイアルの形態で提供された。点滴用に、各バイアルを点滴用水に溶解し、濃度0.5mg/mLとした。投与する配合物濃度まで注射用5%デキストロース溶液で更に希釈を行った。4-Sと化合物Cの投与量は、それぞれ、1.25mg/kgと3.0mg/kgであった。

#### 【0131】

プラセボは、100mgスクロース+リン酸二水素カリウム6.8mg+リン酸適量pH3.8～4.5を含有する凍結乾燥ケーキの形態で提供され、これを点滴用水に溶解した。

#### 【0132】

これらの実験で、4-S及び化合物C並びにプラセボを、可能な場合はいつでも、0、7、14日目の週1回、3週間連続で静脈内投与した。

#### 【0133】

(実施例5a)

ヒト線維肉腫異種移植において4-Sの作用を決定するインビボ試験

この試験の目的は、ヒト肉腫の異種移植モデルを使った化合物Cの抗腫瘍活性と化合物4

10

20

30

40

50

-Sの抗腫瘍活性を比較することであった。

【 0 1 3 4 】

この試験で使用した腫瘍モデルは、HT1080細胞系であった。

【 0 1 3 5 】

Table 5(表7)では、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるHT1080腫瘍の総直径(腫瘍+脚部)評価を報告する。これらの結果を図1にも示す。

【 0 1 3 6 】

【表 7】

**Table 5**

日数	総直径(腫瘍+脚部)(mm)		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	7.5	7.5	7.5
2.0	9.4	8.8	7.7
5.0	11.4	9.0	8.3
7.0	12.1	9.6	8.8
9.0	13.2	10.2	8.4
12.0	14.5	10.2	8.4
14.0	15.2	11.2	9.6
16.0	15.9	12.4	10.0
19.0	18.0	13.3	10.4
21.0		15.2	12.1
23.0		18.0	12.7
27.0			13.5
30.0			15.6
33.0			18.0

【 0 1 3 7 】

(実施例5b)

ヒト乳腺異種移植において4-Sの作用を決定するインビボ試験

この試験の目的は、ヒト乳がんの異種移植モデルを使って4-Sの抗腫瘍活性を化合物Cの抗腫瘍活性と比較することであった。

【 0 1 3 8 】

この試験で使用した腫瘍モデルは、MDA-MB-231細胞系であった。

【 0 1 3 9 】

Table 6(表8)では、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるMDA-MB-231腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図2にも示す。

【 0 1 4 0 】



## 【表 8】

Table 6

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	149.4	149.4	150.6
2.0	240.0	217.1	197.3
5.0	325.1	281.3	250.9
7.0	407.8	338.6	265.0
9.0	514.8	385.1	272.5
12.0	648.1	400.4	270.6
14.0	799.0	436.9	281.3
16.0	1002.5	585.7	293.6
19.0	1233.9	774.7	322.1
21.0	1539.1	965.9	324.4
23.0	2006.5	1215.2	326.6
26.0	2027.7	1503.2	398.8
28.0		1785.3	501.8
30.0		2037.1	654.8
33.0			856.7
35.0			1147.1
37.0			1635.9

10

20

30

## 【0141】

(実施例5c)

ヒト肺腫瘍異種移植において4-Sの作用を決定するインビボ試験

この試験の目的は、ヒト肺がんの3種の異なる異種移植モデルを使って4-Sの抗腫瘍活性を化合物Cの抗腫瘍活性と比較することであった。これらのモデルは、非小細胞肺がん(H-460細胞系)と小細胞肺がん(H526及びH82細胞系)に対応する。

40

## 【0142】

Table 7(表9)では、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH460腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図3にも示す。

## 【0143】

## 【表 9】

Table 7

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	187.4	186.1	185.9
2.0	577.5	395.4	310.9
5.0	1352.0	665.9	634.6
7.0	1642.9	929.5	959.1
9.0	2025.0	1063.7	1064.9
12.0		1436.5	1421.0
14.0		2025.0	1845.5
16.0		2025.0	2025.0

10

20

## 【 0 1 4 4 】

Table 8(表10)は、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH526腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図4にも示す。

## 【 0 1 4 5 】

【表 10】

Table 8

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	217.2	217.9	211.8
2.0	410.7	262.4	279.0
4.0	778.5	108.3	98.8
7.0	1083.2	129.8	56.7
9.0	1371.0	85.9	62.5
11.0	1782.0	52.3	32.0
14.0	2025.0	54.1	18.0
16.0		47.3	32.0
21.0		4.0	4.0
28.0		4.0	4.0
35.0		4.0	4.0
42.0		62.5	4.0
49.0		53.5	4.0

10

20

【0146】

Table 9(表11)では、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるH82腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図5にも示す。

30

【0147】

## 【表 1 1】

Table 9

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	171.6	170.5	168.3
2.0	439.4	265.3	215.2
5.0	1024.7	488.7	253.6
7.0	1422.0	760.0	341.4
9.0	1923.8	899.5	349.4
12.0	2025.0	1038.5	436.4
14.0		1213.4	516.0
16.0		1256.4	521.8
19.0		1741.5	560.9
21.0		1878.8	627.7
23.0		2057.0	690.9
26.0			953.4
28.0			847.1
30.0			1067.5
33.0			1200.6
35.0			1257.7
37.0			1497.7
41.0			2014.2

## 【0 1 4 8】

(実施例5d)

ヒト卵巣腫瘍異種移植において4-Sの作用を決定するインビボ試験

この試験の目的は、ヒト卵巣がんの異種移植モデルを使って4-Sの抗腫瘍活性を化合物Cの抗腫瘍活性と比較することであった。

## 【0 1 4 9】

この試験で使用した腫瘍モデルは、A2780であった。

## 【0 1 5 0】

Table 10(表12)では、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるA2780腫瘍の体積の評価を報告する。これらの結果を図6にも示す。

## 【0 1 5 1】

## 【表 1 2】

Table 10

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	169.5	169.6	168.3
2.0	317.5	206.3	150.6
5.0	758.9	372.7	175.9
7.0	1351.9	607.6	317.7
9.0	1675.8	696.2	281.9
12.0	2025.0	855.6	372.1
14.0		1293.9	709.2
16.0		1683.5	870.9
19.0		2137.5	1235.4
21.0			1453.3
23.0			1666.0
26.0			2025.0

10

20

## 【0 1 5 2】

(実施例5e)

ヒト胃腫瘍異種移植において4-Sの作用を決定するインビボ試験

30

この試験の目的は、ヒト胃がんの異種移植モデルを使って4-Sの抗腫瘍活性を化合物Cの抗腫瘍活性と比較することであった。

## 【0 1 5 3】

この試験で使用した腫瘍モデルは、HGC27であった。

## 【0 1 5 4】

Table 11(表13)は、プラセボ、化合物C及び4-Sで処置したマウスにおけるHGC27腫瘍の腫瘍体積増加を報告する。これらの結果を図7にも示す。

## 【0 1 5 5】

## 【表 13】

Table 11

日数	腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
	対照	化合物 C	4-S
0.0	200.7	195.0	194.8
2.0	429.0	391.0	358.6
5.0	835.5	578.6	515.3
7.0	1256.5	708.2	589.2
9.0	1602.2	937.7	779.4
12.0	2040.7	1169.5	980.8
14.0		1496.8	1153.3
16.0		1690.6	1346.2
19.0		2004.0	1643.4
21.0			2004.7

## 【0156】

## (実施例6)

ヒト前立腺異種移植における4-Sの作用を決定するインビボ試験

この試験の目的は、ヒト前立腺がんの3種の異なる異種移植モデルを使って4-Sの抗腫瘍活性を比較することであった。これらのモデルは、PC-3、DU-145及び22Rv1細胞系に対応する。

## 【0157】

化合物4-Sは、凍結乾燥品のフリーズドライバイアルの形態で提供された。各バイアルを注射用滅菌水に溶解し、0.5mg/mLの濃度とした。注射用5%デキストロース溶液で投与配合物濃度まで更に希釈を行った。4-Sの投与量は、試験に応じて変動し、それぞれ、腫瘍モデルがPC-3の場合は、1.25mg/Kg、腫瘍モデルがDU-145の場合は、1.00mg/Kg、腫瘍モデルが22Rv1の場合は、0.75mg/Kgであった。

## 【0158】

プラセボは、100mgスクロース+リン酸二水素カリウム6.8mg+リン酸適量、pH3.8~4.5を含有する凍結乾燥ケーキの形態で提供され、点滴用水に溶解した。

## 【0159】

これらの実験では、4-S並びにプラセボは、可能な場合はいつでも、週1回、3週連続で、0、7及び14日目に静脈内投与した。

## 【0160】

Table 12(表14)は、プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおけるPC-3腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図8にも示す。

## 【0161】

## 【表 1 4】

Table 12

腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
日数	対照	4-S
0	140.5	141.3
2	178.6	130.7
4	233.1	147.6
7	284.6	157.7
9	331.7	200.9
11	433.7	192.8
14	500.4	210.8
16	570.8	255.5
18	680.3	261.1
21	850.1	282.4
23	928.5	382.2
25	915.7	451.6
28	1187.5	611.1
30	1270.1	762.3
32	1327.1	821.6
35	1373.6	1045.6

10

20

## 【0 1 6 2】

Table 13(表15)は、プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおけるDU-145腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図9にも示す。

30

## 【0 1 6 3】

【表 1 5】

Table 13

腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
日数	対照	4-S
0	127.4	126.2
3	180.9	102.4
5	248.8	119.5
7	320.4	149.5
10	384.6	216.8
12	441.0	181.4
14	519.6	237.7
17	601.0	204.4
19	660.8	210.9
24	740.7	300.0
26	798.6	378.4
28		587.0
31		650.3

10

20

【0 1 6 4】

Table 14(表16)は、プラセボ及び4-Sで処置したマウスにおける22Rv1腫瘍の腫瘍体積中央値の評価を報告する。これらの結果を図10にも示す。

【0 1 6 5】



【表 16】

Table 14

腫瘍体積中央値(mm <sup>3</sup> )		
日数	対照	4-S
0	174.6	173.6
3	307.2	70.3
5	511.5	63.1
7	739.1	76.7
10	955.2	49.1
12	1286.1	59.8
14	1385.8	74.9
17	1791.1	55.1
19	2025.0	64.9
24		138.4
26		186.9
28		242.0
31		392.5
33		561.8
35		799.3
38		1107.0
40		1426.4
42		1685.5
45		2025.0

10

20

30

【図 1】

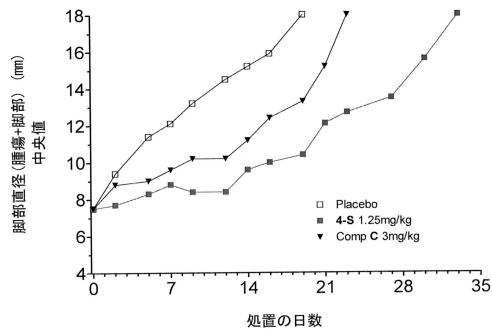


Figure 1

【図 3】

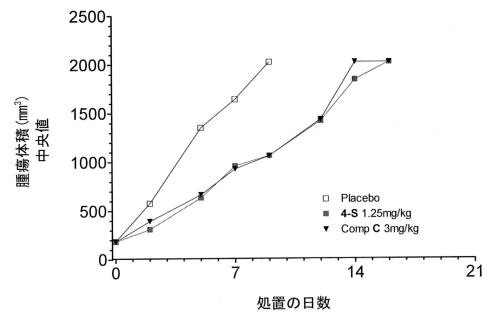


Figure 3

【図 2】

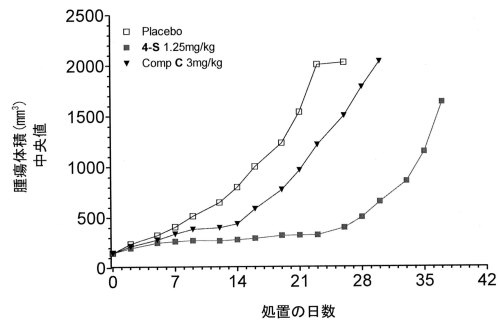


Figure 2

【図 4】

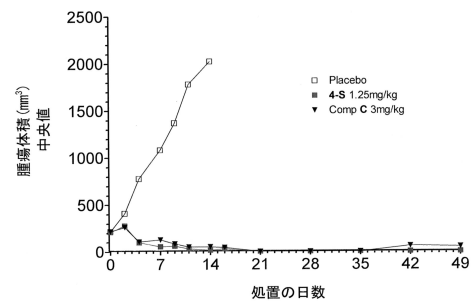


Figure 4

【図 5】

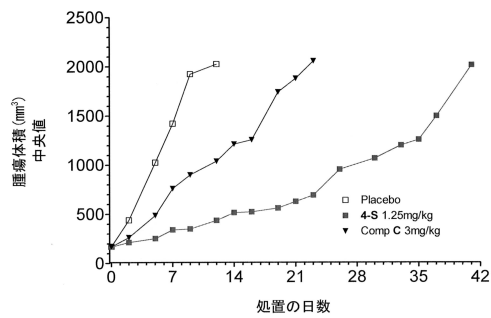


Figure 5

【図 7】

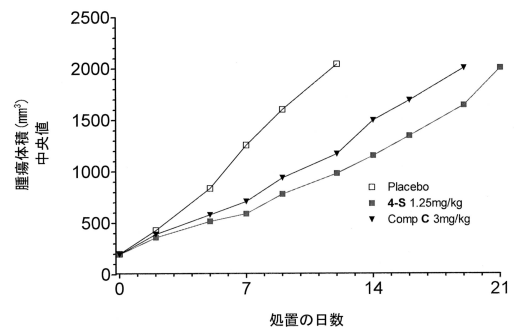


Figure 7

【図 6】

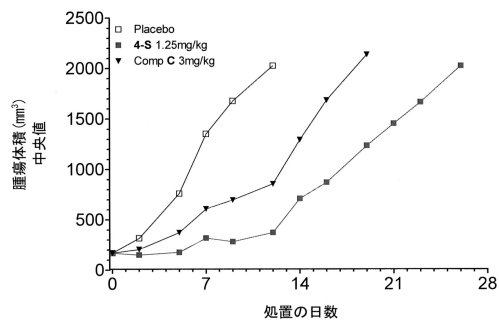


Figure 6

【図 8】

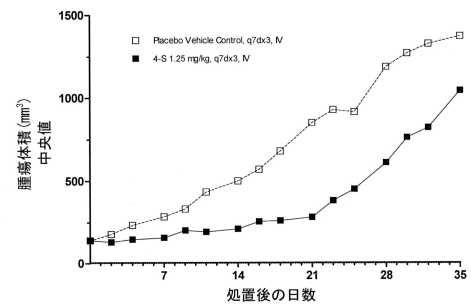


Figure 8

## 【図 9】

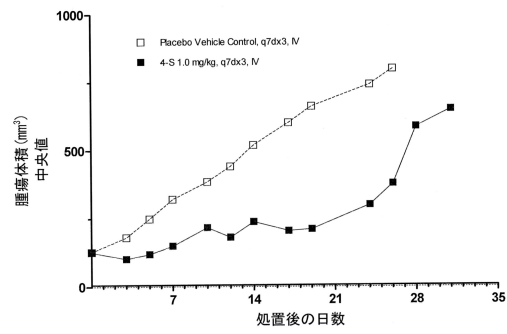


Figure 9

## 【図 10】

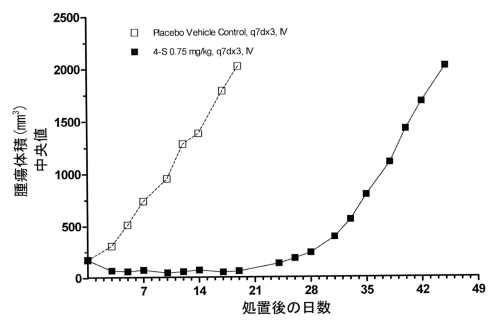


Figure 10

---

フロントページの続き

- (72)発明者 マリア・デル・カルメン・ケヴァス・マルシャンテ  
スペイン・28770・コルメナル・ピエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レジエス・1・ポリゴノ  
・インダストリアル・ラ・ミナ・ファルマ・マール・ソシエダード・アノニマ
- (72)発明者 アンドレス・フランセスク・ソリョーソ  
スペイン・28770・コルメナル・ピエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レジエス・1・ポリゴノ  
・インダストリアル・ラ・ミナ・ファルマ・マール・ソシエダード・アノニマ
- (72)発明者 バレンティン・マルティネス・バラサ  
スペイン・28770・コルメナル・ピエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レジエス・1・ポリゴノ  
・インダストリアル・ラ・ミナ・ファルマ・マール・ソシエダード・アノニマ

審査官 三上 晶子

- (56)参考文献 国際公開第03/014127(WO, A1)  
国際公開第2011/147828(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07D 515/22  
A61K 31/4995  
A61P 35/00  
CAplus/REGISTRY(STN)