

(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2004-532289

(P2004-532289A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C08G 85/00</b>	C08G 85/00	4C076
<b>A61K 47/48</b>	A61K 47/48	4C086
<b>A61P 35/00</b>	A61P 35/00	4C206
<b>A61P 43/00</b>	A61P 43/00 123	4J005
<b>C08G 65/333</b>	C08G 65/333	4J031
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-565549 (P2002-565549)  
 (86) (22) 出願日 平成14年2月19日 (2002.2.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月18日 (2003.8.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/004781  
 (87) 国際公開番号 W02002/065988  
 (87) 国際公開日 平成14年8月29日 (2002.8.29)  
 (31) 優先権主張番号 60/270,009  
 (32) 優先日 平成13年2月20日 (2001.2.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

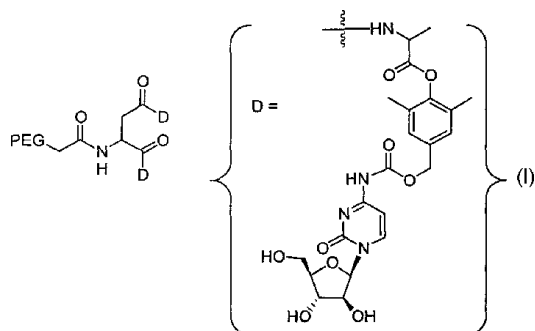
(71) 出願人 596124151  
 エンゾン ファーマシューティカルズ、インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 08807 ニュージャージー州、ブリッジウォーター、ルート 202/206 685  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 末端分枝高分子リンカーおよびそれを含む高分子複合体

## (57) 【要約】

多数のローディングが可能な末端分枝高分子プロドラッグプラットフォームを開示する。本発明の好ましい態様では、プロドラッグプラットフォームは活性物質を保持している各分枝がベンジル脱離反応を受けた後に多数の親化合物を放出する。プロドラッグの製造方法および哺乳類の治療におけるその使用方法もまた開示する。1つの好ましい態様では、式(I)などの高分子複合体を提供する。



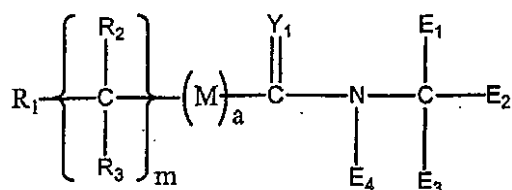
## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式：

## 【化 1】

(I)

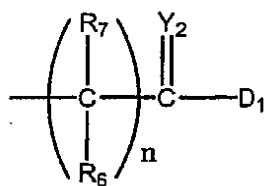


10

{式中、

 $R_1$ は高分子残基であり； $Y_1$ はO、Sまたは $NR_4$ であり； $M$ はO、Sまたは $NR_5$ であり； $E_1$ は

## 【化 2】

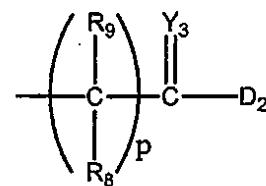


20

であり；

 $E_{2-4}$ は独立に、H、 $E_1$ または

## 【化 3】



30

であり；

(a)は0または1であり；

(m)は0または正の整数であり；

(n)および(p)は独立に、0または正の整数であり；

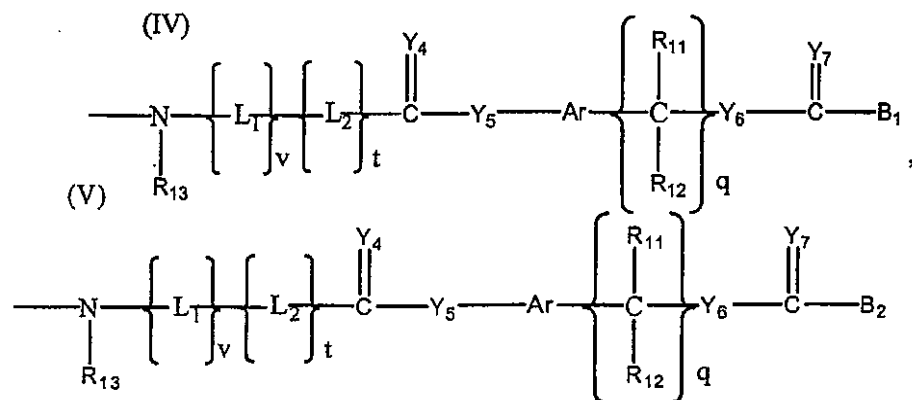
 $Y_{2-3}$ は独立に、O、Sまたは $NR_{10}$ であり；

$R_{2-10}$ は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

 $D_1$ および $D_2$ は独立に、OH、

40

## 【化 4】



10

(式中、

(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数であり；

(q)は0または正の整数であり；

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は独立に選択された二官能性リンカーであり；Y<sub>4-7</sub>は独立に、O、SおよびNR<sub>14</sub>からなる群から選択され；

R<sub>11-14</sub>は独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-6</sub>置換アルキル、C<sub>3-8</sub>置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、置換C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、フェノキシおよびC<sub>1-6</sub>ヘテ

20

ロアルコキシからなる群から選択され；  
Arは式(1)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；

B<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>は独立に、脱離基、OH、ヒドロキシル基含有成分またはアミン基含有成分の残基からなる群から選択される)

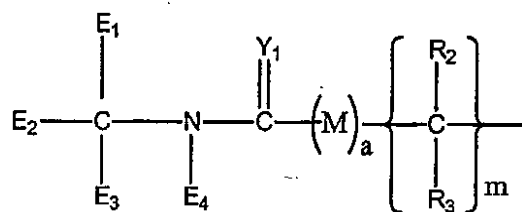
または末端分枝基である}

で表される化合物。

## 【請求項 2】

R<sub>1</sub>が水素、NH<sub>2</sub>、OH、CO<sub>2</sub>H、C<sub>1-6</sub>基および

## 【化 5】



30

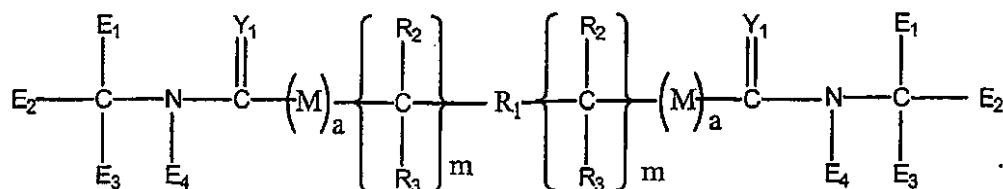
からなる群から選択されるキャッピング基Aをさらに含んでなる、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項 3】

40

式：

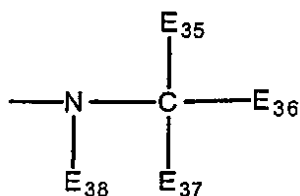
## 【化 6】



50

【請求項 4】

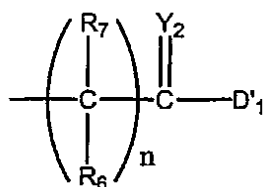
【化 7】



10

$E_{35}$  は

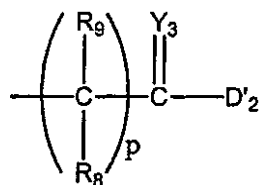
【化 8】



20

$E_{3.6-3.8}$  は独立に、 $H$ 、 $E_{3.5}$  または

【化 9】

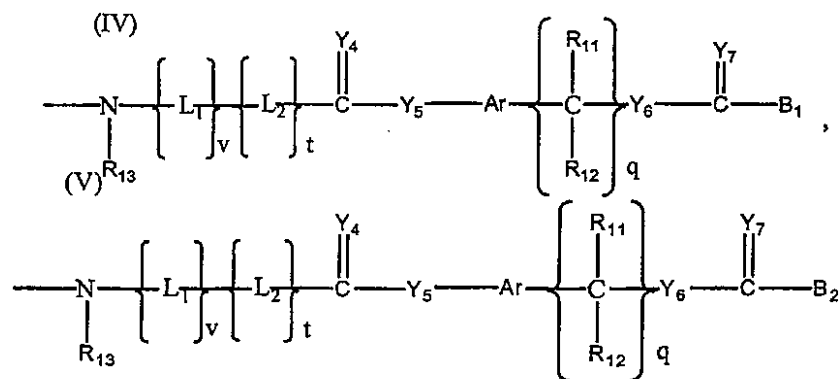


30

R<sub>6-10</sub>は独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-6</sub>置換アルキル、C<sub>3-8</sub>置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、置換C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、フェノキシおよびC<sub>1-6</sub>ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

$D'_1$  および  $D'_2$  は独立に、OH、

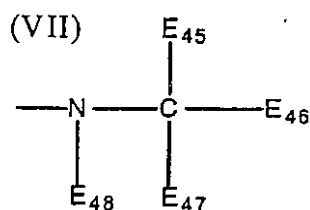
## 【化 1 0】



10

または

## 【化 1 1】



20

{式中、

(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数であり；

(q)は0または正の整数であり；

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は独立に選択された二官能性リンカーであり；Y<sub>4-7</sub>は独立に、0、SおよびNR<sub>14</sub>からなる群から選択され；

R<sub>11-14</sub>は独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-6</sub>置換アルキル、C<sub>3-8</sub>置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、置換C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、フェノキシおよびC<sub>1-6</sub>ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

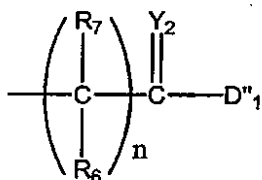
30

Arは式(I)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；

B<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>は独立に、脱離基、OH、ヒドロキシル基含有成分またはアミン基含有成分の残基からなる群から選択され；

E<sub>45</sub>は

## 【化 1 2】

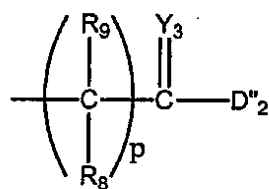


40

であり；

E<sub>46-48</sub>は独立に、H、E<sub>45</sub>または

【化 1 3】

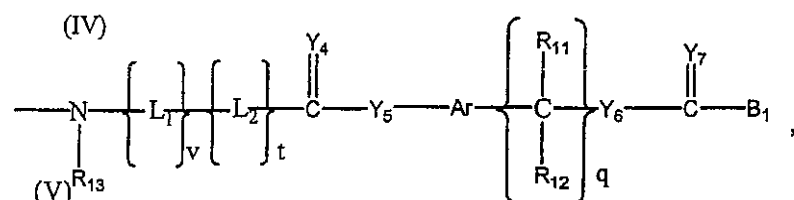


(式中、

$D''_1$  および  $D''_2$  は独立に、OH、

10

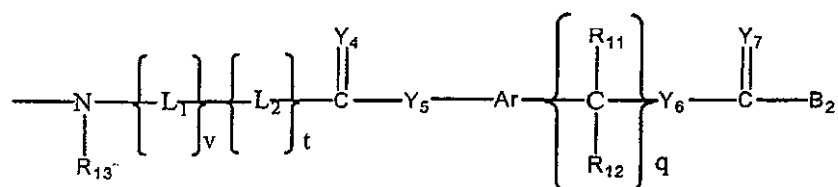
## 【化 1 4】



または

## 【化 1 5】

20



である)

である }

である。

30

で表される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

$Y_1$  が 0 である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 6】

R<sub>1</sub>がポリアルキレンオキシド残基を含んでなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項 7】

R<sub>1</sub> がポリエチレングリコール残基を含んでなる、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

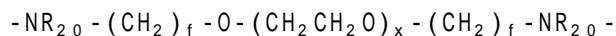
R<sub>1</sub>がポリエチレングリコール残基を含んでなる、請求項3に記載の化合物。

【請求項 9】

40

 $R_1$  が
$$-C(=Y_8)-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A,$$
$$-C(=Y_8)-Y_9-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A,$$
$$-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A,$$
$$-(CR_{2,1}R_{2,2})_e-O-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A,$$
$$-\text{NR}_{20}-(\text{CH}_2)_f-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-\text{A},$$
$$-C(=Y_8)-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-C(=Y_8)-,$$
$$-C(=Y_8)-Y_9-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-Y_9-C(=Y_8)-,$$
$$-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-NR_{20}-C(=Y_8)-,$$
$$-(\text{CR}_{2,1}\text{R}_{2,2})_e-\text{O}-(\text{CH}_2)_f-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-(\text{CH}_2)_f-\text{O}-(\text{CR}_{2,1}\text{R}_{2,2})_e-$$
、および

50



(式中、

$Y_8$ および $Y_9$ は独立に、O、Sまたは $NR_{20}$ であり；

$x$ は重合度であり；

$R_{20}$ 、 $R_{21}$ および $R_{22}$ は独立に、H、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

$e$ および $f$ は独立に、0、1、または2であり；かつ

Aはキャッピング基である)

からなる群から選択される、請求項6に記載の化合物。

10

【請求項10】

$R_1$ が $-O-(CH_2CH_2O)_x$ を含んでなり、かつ $x$ は重量平均分子量が少なくとも約20,000であるような正の整数である、請求項9に記載の化合物。

【請求項11】

$R_1$ の重量平均分子量が約20,000～約100,000である、請求項3に記載の化合物。

【請求項12】

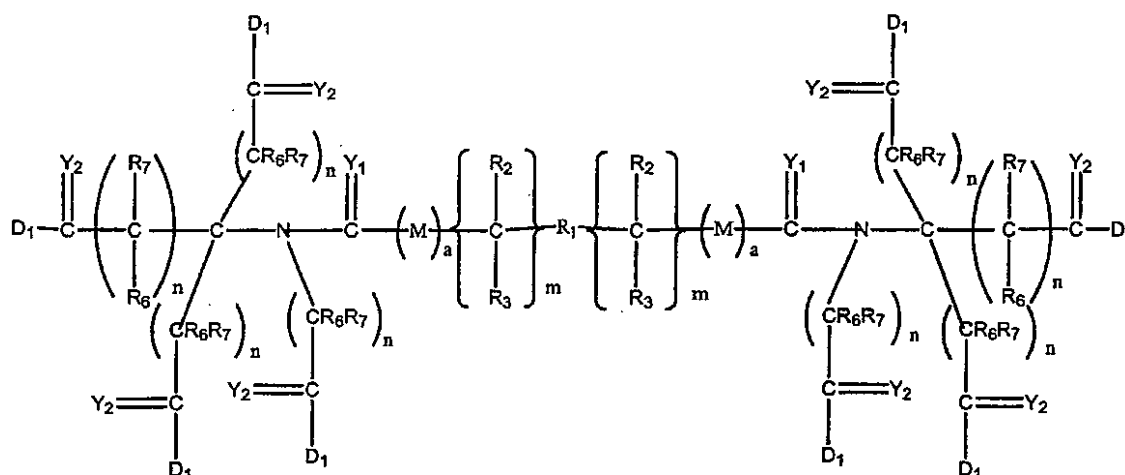
$R_1$ の重量平均分子量が約25,000～約60,000である、請求項3に記載の化合物。

【請求項13】

式

20

【化16】



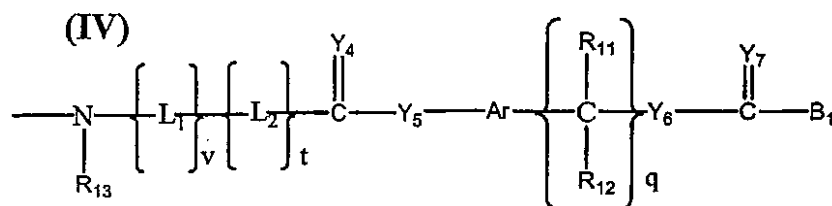
30

で表される、請求項3に記載の化合物。

【請求項14】

$D_1$ が

【化17】



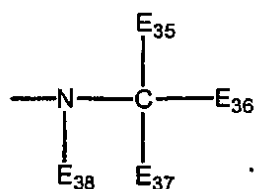
40

である、請求項13に記載の化合物。

【請求項15】

$D_1$ が

## 【化 1 8】



である、請求項 13 に記載の化合物。

## 【請求項 16】

10

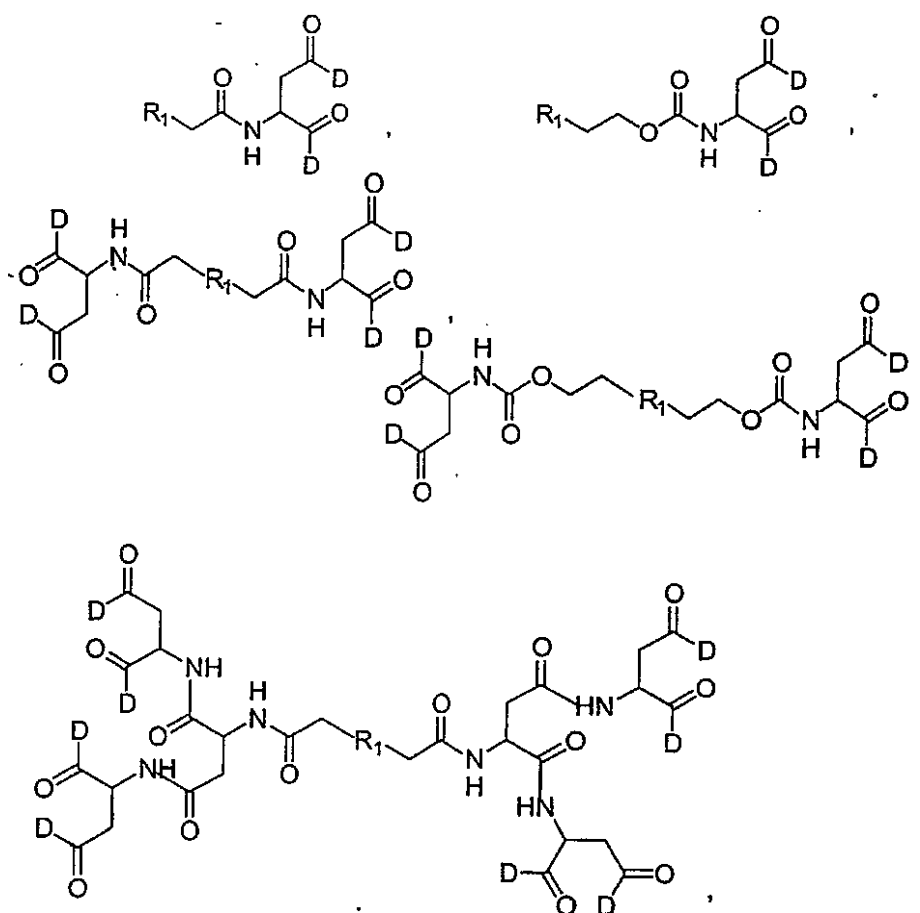
$L_1$  が  $(CH_2CH_2O)_2$  である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 17】

$L_2$  が  $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2C(O)NHCH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH_2C(O)NHCH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_2NH-$  および  $-CH_2C(O)NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)-$  からなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 18】

## 【化 1 9】

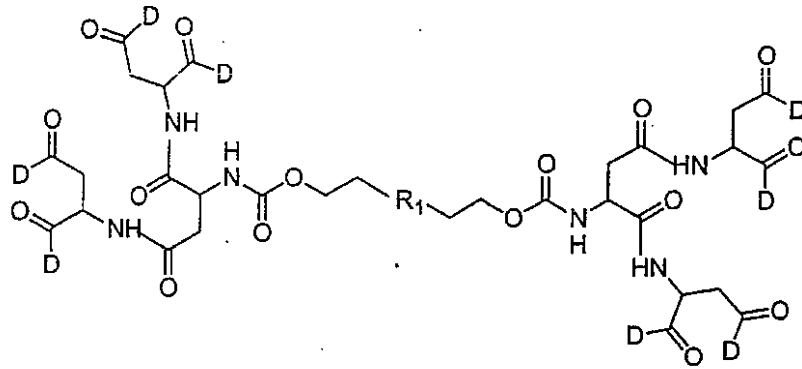


20

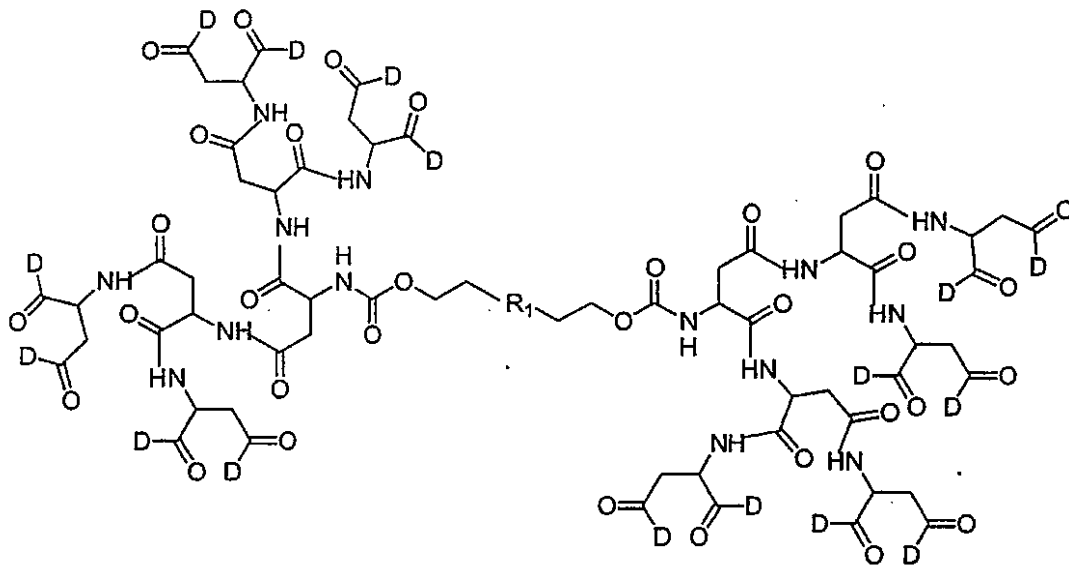
30

40





10

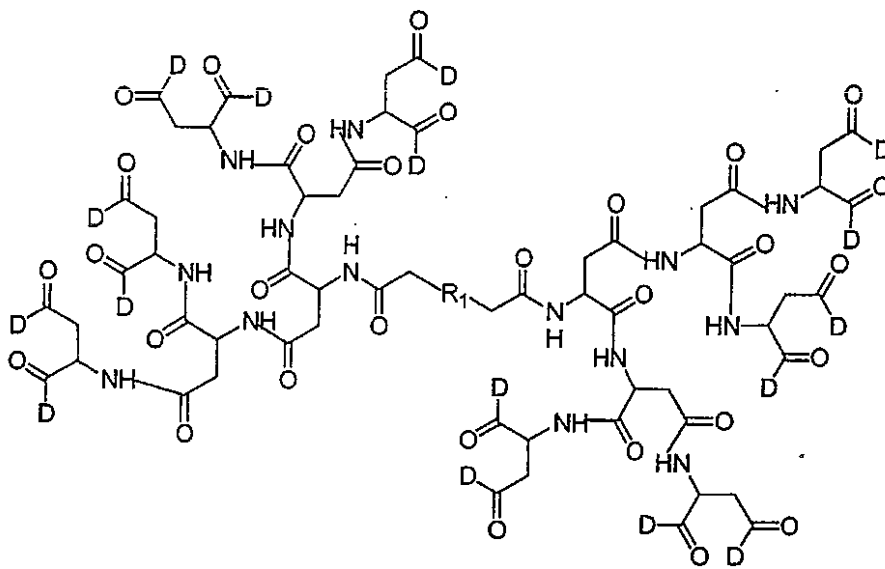


20

および

30

【化 20】



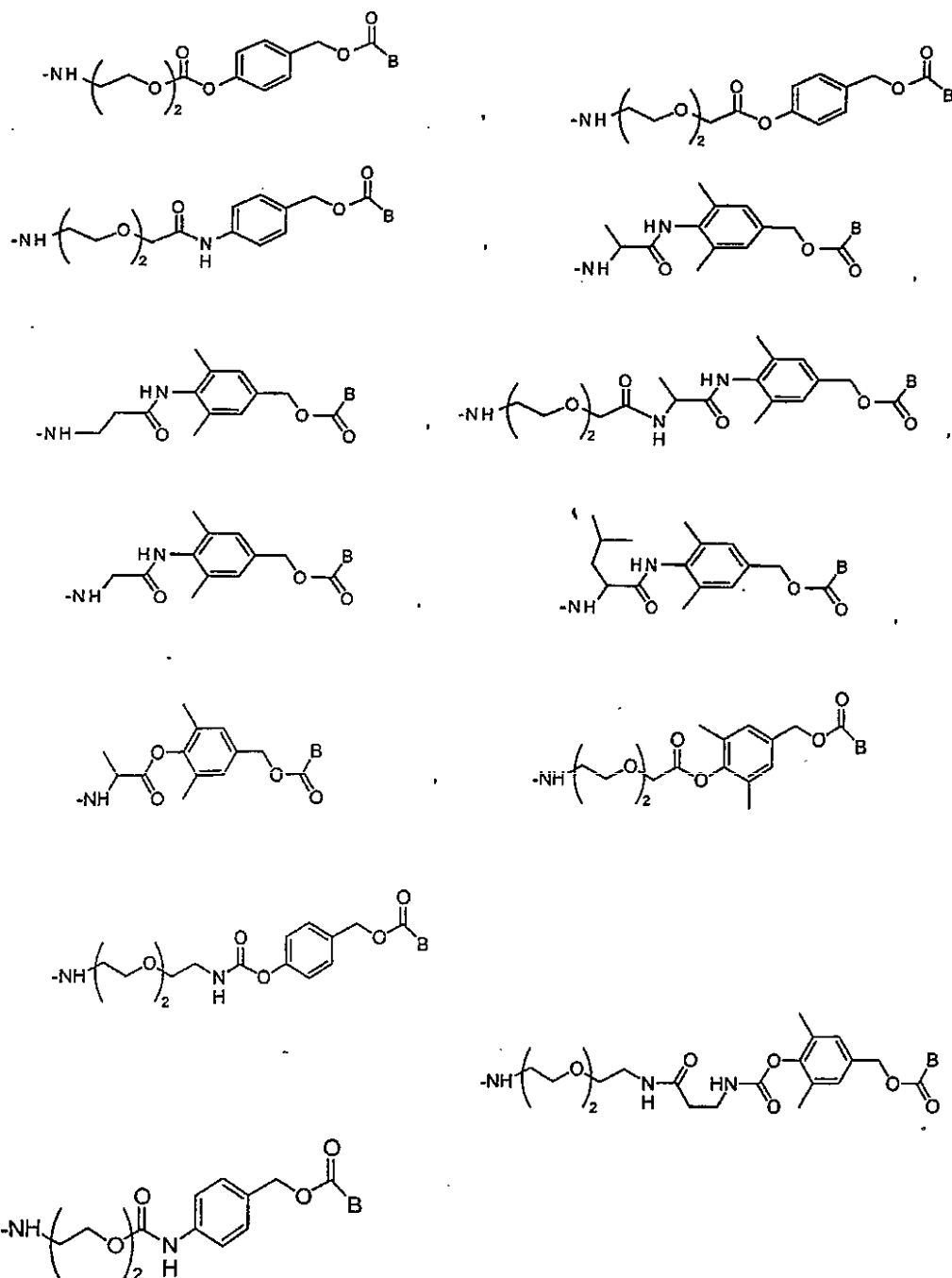
40

{式中、

R<sub>1</sub>はPEG残基であり、かつDは

50

## 【化 2 1】



10

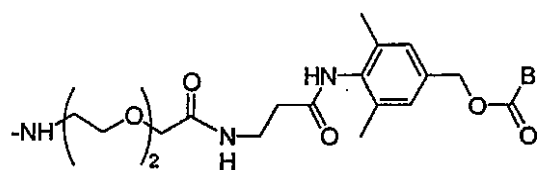
20

30

40

および

## 【化 2 2】



(式中、

Bはアミンまたはヒドロキシル基含有薬物の残基である)

からなる群から選択される}

からなる群から選択される、請求項1に記載の化合物。

## 【請求項19】

50

Bがダウノルビシン、ドキソルビシン；p-アミノアニリンマスタード、メルファラン、Ara-C(シトシンアラビノシド)、ロイシン-Ara-C、およびゲムシタピンからなる群のメンバーの残基である、請求項18に記載の化合物。

【請求項20】

治療が必要な哺乳類に、有効量の請求項1に記載の化合物(式中、D<sub>1</sub>は生物学上活性な成分の残基である)を投与することを含んでなる、治療方法。

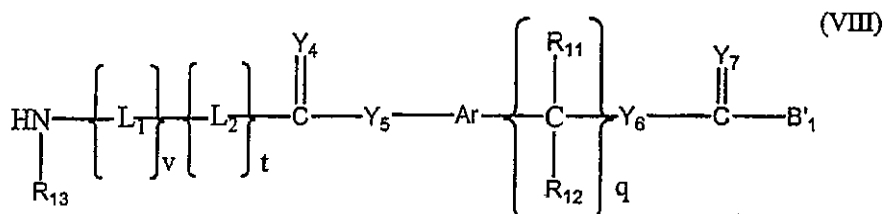
【請求項21】

治療が必要な哺乳類に有効量の請求項18に記載の化合物を投与することを含んでなる、治療方法。

【請求項22】

高分子複合体の製造方法であって、  
式(VIII):

【化23】



10

20

(式中、

(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数であり；

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は独立に選択された二官能性リンカーであり；

Y<sub>4-7</sub>は独立に、0、SおよびNR<sub>14</sub>からなる群から選択され；

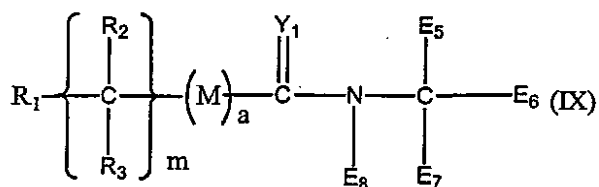
R<sub>11-14</sub>は独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-6</sub>置換アルキル、C<sub>3-8</sub>置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、置換C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、フェノキシおよびC<sub>1-6</sub>ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

Arは式(I)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；かつ

B'<sub>1</sub>はヒドロキシルまたはアミン基含有成分の残基である)

で表される化合物と、式(IX):

【化24】



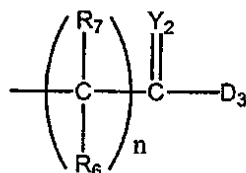
30

40

{式中、

E<sub>5</sub>は

【化25】

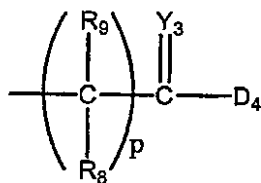


50

であり；

$E_{6-8}$ は独立に、H、 $E_5$ または

【化 2 6】



10

(式中、

$D_3$ および $D_4$ は独立に、OH、保護されていないアミンまたはヒドロキシルと反応しうる脱離基、または末端分枝基であり；

$R_1$ は高分子残基であり；

$Y_1$ はO、Sまたは $NR_4$ であり、

MはO、Sまたは $NR_5$ であり；

(n)および(p)は独立に、0または正の整数であり；

$Y_{2-3}$ は独立に、O、Sまたは $NR_{10}$ であり；かつ

$R_{2-10}$ は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択される)

20

である}

で表される化合物とを、高分子複合体を生成させるのに十分な条件下で反応させることを含んでなる、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物活性材料の長時間作用性複合体の作製に有用である新しいタイプの末端活性化高分子材料に関する。特に、本発明は治療的ペイロードの高い高分子系複合体およびその製造方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

長年にわたり、生物学上有効な材料を哺乳類に投与するいくつかの方法が提案されてきた。多くの薬剤が水溶性塩として入手可能であり、比較的容易に医薬製剤に配合することができる。所望の薬剤が液体に不溶性である場合、またはin vivoで急速に分解される場合には問題が起こる。特に、アルカロイドは難溶である場合が多い。

【0003】

薬剤を可溶性にする1つの方法がそれらを可溶性プロドラッグの一部として含める方法である。プロドラッグは投与した際にin vivoにおいて最終的に親化合物を遊離する生物学上活性な親化合物の化学誘導体を含む。プロドラッグは当業者によるin vivoにおける薬剤作用の発現および/または持続時間の改変を可能とし、体内での薬物の輸送、分配または溶解性を改変しうるものである。さらに、プロドラッグ製剤は毒性を減弱することも多く、あるいはまた医薬製剤を投与する場合に遭遇する問題を克服もする。プロドラッグの典型例としては、有機リン酸塩またはアルコールもしくはチオアルコールのエステルが挙げられる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., A. Osol, Ed. (1980)を参照。なお、その開示は参照により本明細書に組み入れる。

40

【0004】

プロドラッグは親化合物または活性化合物の生物学上不活性または実質的に不活性な形態

50

である場合が多い。活性薬物の放出速度、すなわち、加水分解速度はいくつかの要因によって、特に、親薬物と改変剤とをつなぐ結合タイプにより影響を受ける。親化合物の十分な量の加水分解が起こる前に腎臓または細網内皮系などにより排出されるプロドラッグを製造することがないよう留意しなければならない。

【0005】

高分子をプロドラッグ系の一部として組み込むことで薬物の循環寿命が長くなることが示されている。しかしながら、約10,000ダルトン未満の1種のみまたは2種の高分子各々とアルカロイド化合物などの特定の生物学上活性な物質とを複合体化した場合、特に、幾分耐加水分解性の結合が使用されている場合には、得られた複合体がin vivoで迅速に排出されることが分かっている。実際、かかる複合体は体から極めて迅速に排出されるため、加水分解が起こりやすいエステル結合が使用されている場合でさえも、治療効果に十分な親分子がin vivoにおいて再生されない。

10

【0006】

カンプトテシンおよび生物学上活性な関連類似体は水溶性に乏しいことが多く、PEGプロドラッグ技術によって恩恵を得る物質の例である。当技術分野でのこれまでのいくつかの研究の概要を以下に示す。

【0007】

Ohya, ら, J. Bioactive and Compatible Polymers Vol. 10 Jan., 1995, 51-66では、エステルをはじめとする種々の結合を介した置換基の結合により作製されるドキソルビシン-PEG複合体を開示している。しかしながら、使用したPEGの分子量はせいぜい約5,000である。そのため、複合体は十分な結合の加水分解の前に実質的に排出されることから、in vivoにおける恩恵の実現は十分なものではない。

20

【0008】

米国特許第4,943,579号では、水溶性プロドラッグとして塩形態の特定の単純な20(S)-カンプトテシンアミノ酸エステルを開示している。しかし、参考文献ではアルカロイドを比較的高分子量の高分子に結合させてプロドラッグを作製するための結合の一部としてアミノ酸を使用することについては開示されていない。表2で示された579人の患者に関するデータから明らかなように、加水分解は急速である。そのため、生理学的pHでは注入後に不溶性基剤が迅速に生じ、タンパク質と結合し、治療効果が達成される前に体から迅速に排出される。関連した取り組みは水溶性カンプトテシンナトリウム塩の開発に向けられた。

30

【0009】

残念なことに、カンプトテシンの水溶性ナトリウム塩には依然として臨床応用に対する高い有害性が残されていた(Gottlieb ら, 1970 Cancer Chemother, Rep. 54, 461; Moertel ら, 1972 上記, 56, 95; Gottlieb ら, 1972 上記, 56, 103)。

【0010】

本願出願人によるPCT公報W096/23794では、1当量のヒドロキシル基含有薬物を高分子の各末端に結合したビス-複合体について記載している。このような進展があったものの高分子のペイロードをさらに高める技術が求められている。

【0011】

このように、カンプトテシンおよび関連類似体などの治療成分からなるプロドラッグを作製するさらなる技術を提供する必要性がなお存在している。本発明ではこの必要性に取り組むものである。

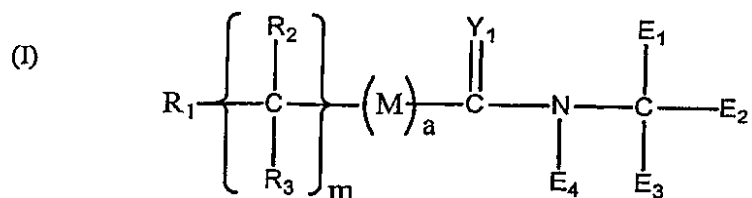
40

【発明の開示】

【0012】

本発明の1つの態様では、式(1):

【化1】



(式中、

$R_1$  は高分子残基であり；

$Y_1$  は0、Sまたは $NR_4$ であり；

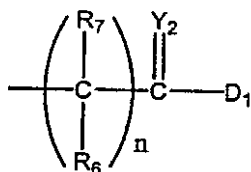
$M$  は0、Sまたは $NR_5$ であり；

$(m)$  は0または正の整数、好ましくは1または2であり；

$(a)$  は0または1であり；

$E_1$  は

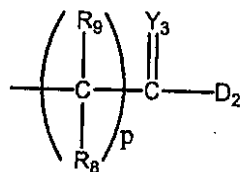
【化2】



であり；

$E_{2-4}$  は独立に、H、 $E_1$  または

【化3】



であり；

$(n)$  および  $(p)$  は独立に、0または正の整数であり；

$Y_{2-3}$  は独立に、0、Sまたは $NR_{10}$ であり；

$R_{2-10}$  は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

$D_1$  および  $D_2$  は独立に、OH、

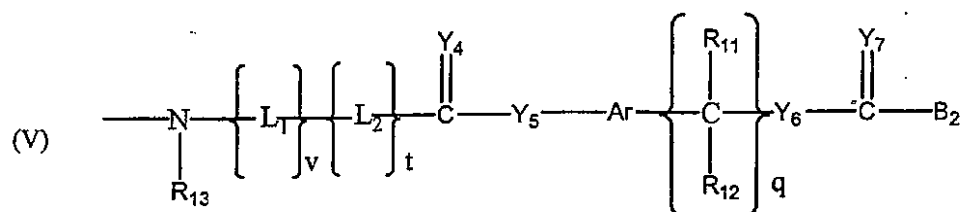
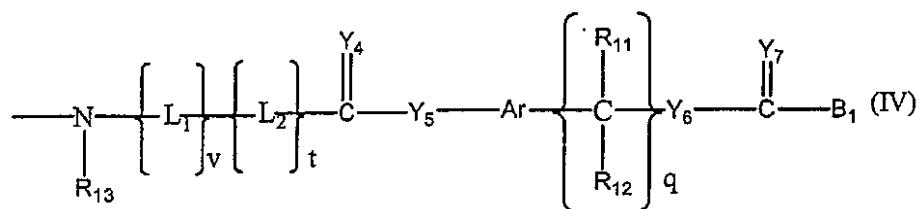
【化4】

10

20

30

40



10

または以下に示すさらなる末端分枝基である)  
で表される化合物が提供される。

【0013】

式(IV)および(V)中、

変数(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数、好ましくは約1であり；

(q)は0または正の整数、好ましくは1であり；

20

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は独立に選択された二官能性リンカーであり；

Y<sub>4-7</sub>は独立に、O、SおよびNR<sub>14</sub>からなる群から選択され；

R<sub>11-14</sub>は独立に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-6</sub>置換アルキル、C<sub>3-8</sub>置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、置換C<sub>1-6</sub>ヘテロアルキル、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、フェノキシおよびC<sub>1-6</sub>ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

Arは式(I)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；かつ

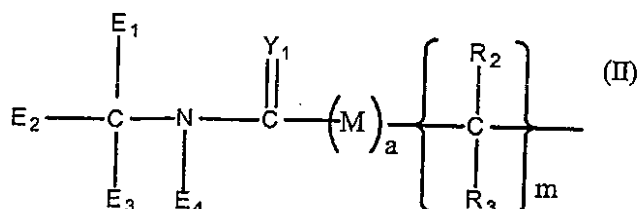
B<sub>1</sub>およびB<sub>2</sub>は独立に、脱離基、OH、ヒドロキシル基含有成分またはアミン基含有成分の残基からなる群から選択される。

30

【0014】

本発明の1つの特に好ましい態様では、高分子残基の末端部が次の式(II)：

【化5】



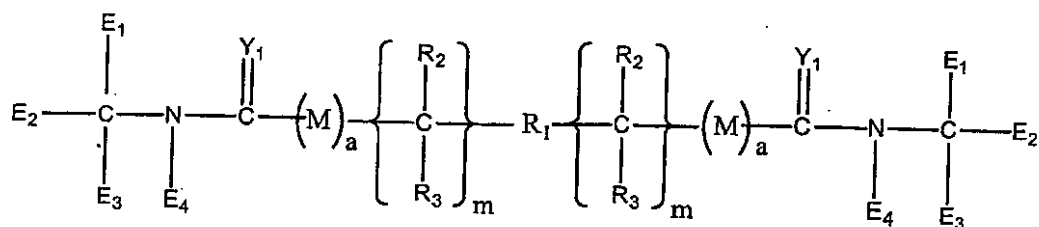
40

(式中、

全ての置換基および変数はこれまでに定義したとおりである)

で表される成分でさらに置換またはキャッピングされている。よって、二官能性化合物は、本明細書においてB<sub>1</sub>またはB<sub>2</sub>とよばれる、2、4またはそれ以上の当量の生物学上活性な薬剤、薬物、またはタンパク質が送達されうるように高分子残基(R<sub>1</sub>)が および 両方の末端結合基を含有する場合に形成される。かかる二官能性高分子輸送形態の例は次の式(I II)：

【化6】



(III)

(式中、  
全ての置換基および変数は上記のとおりである)  
のように示される。

10

## 【0015】

本発明の目的における「残基」とは、生物学上活性な化合物がプロドラッグ担体部分を結合するための置換反応を受けた後にも残存する生物学上活性な化合物の部分を意味するものとする。

## 【0016】

本発明の目的における「アルキル」とは、直鎖、分枝鎖、置換（例えば、ハロ-、アルコキシ-、およびニトロ-）、 $C_{1-12}$ アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキルまたは置換シクロアルキルなどを包含するものとする。

20

## 【0017】

本発明の目的における「置換」とは、官能基または化合物に含まれる1個以上の原子に1個以上の異なる原子を付加するまたはそれと置き換えることを包含するものとする。

## 【0018】

本発明の目的において、「置換アルキル」とは、カルボキシアリル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアリルおよびメルカプトアルキルを包含し；「置換シクロアルキル」とは、4-クロロシクロヘキシルなどの基を包含し；「アリール」とは、ナフチルなどの基を包含し；「置換アリール」とは、3-プロモ-フェニルなどの基を包含し；「アラリル」とは、トルイルなどの基を包含し；「ヘテロアルキル」とは、エチルチオフェンなどの基を包含し；「置換ヘテロアルキル」とは、3-メトキシ-チオフェンなどの基を包含し；「アルコキシ」とは、メトキシなどの基を包含し；および「フェノキシ」とは、3-ニトロフェノキシなどの基を包含する。ハロ-はフルオロ、クロロ、ヨードおよびプロモを包含するものとする。

30

## 【0019】

本発明の目的における「十分な量」とは、当業者によって理解される治療効果を達成する量を意味するものである。

## 【0020】

本発明の化合物の最も重要な利点の1つはプロドラッグの高分子単位当たりのペイロードがこれまでの技術よりも高いことである。一般的には、高分子がまず加水分解によりベンジル脱離(BE)系プロドラッグ中間体を放出し、次いで得られた中間体または「第2のプロドラッグ」成分が1,4-または1,6-アリール（例えばベンジル）脱離反応を受けて、例えば、生物学上活性な化合物またはさらなるプロドラッグを含んでなる組成物(composition)のいずれかである成分を再生することが好ましい。よって、本発明の高ペイロード高分子複合体は最大4つまでまたはそれ以上の数の薬物分子を含有しうる独自の送達系である。

40

## 【0021】

本明細書において記載する化合物および複合体の製造および使用方法も提供される。

## 【0022】

## 発明の詳細な説明

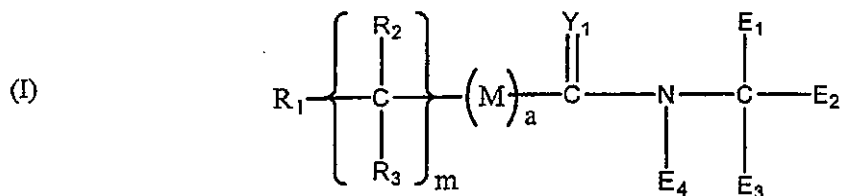
## A. 式 (I)

本発明の1つの好ましい実施形態では、式：

50



## 【化 7】



{式中、

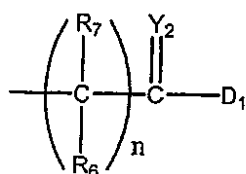
$R_1$  は高分子残基であり；

$Y_1$  はO、Sまたは $NR_4$ であり；

$M$  はO、Sまたは $NR_5$ であり；

$E_1$  は

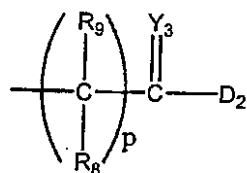
## 【化 8】



であり；

$E_{2-4}$  は独立に、H、 $E_1$ または

## 【化 9】



であり；

(a)は0または1であり；

(m)は0または正の整数であり；

(n)および(p)は独立に、0または正の整数であり；

$Y_{2-3}$  は独立に、O、Sまたは $NR_{10}$ であり；

$R_{2-10}$  は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

$D_1$ および $D_2$ は独立に、OH、

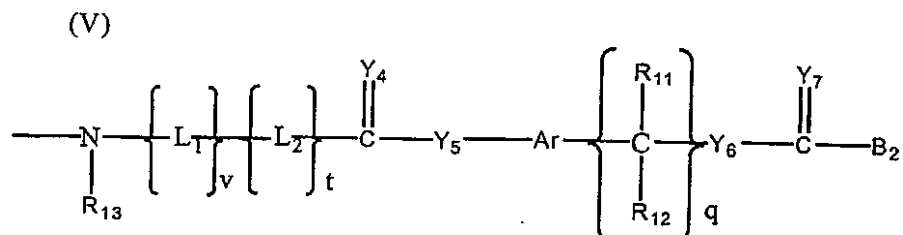
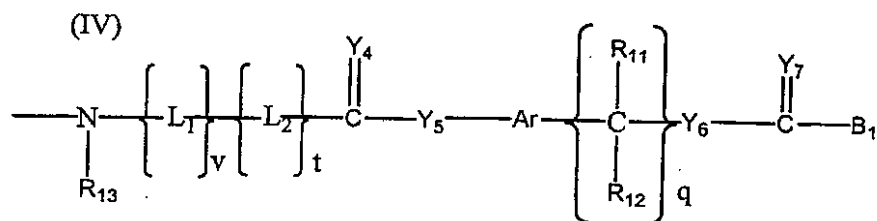
## 【化 10】

10

20

30

40



10

(式中、

(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数、好ましくは約1であり；

(q)は0または正の整数、好ましくは1であり；

 $L_1$ および $L_2$ は独立に選択された二官能性リンカーであり； $Y_{4-7}$ は独立に、0、Sおよび $NR_{14}$ からなる群から選択され；

$R_{11-14}$ は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

Arは式(I)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；

$B_1$ および $B_2$ は独立に、脱離基、OH、ヒドロキシル基含有成分またはアミン基含有成分の残基からなる群から選択される)

である}

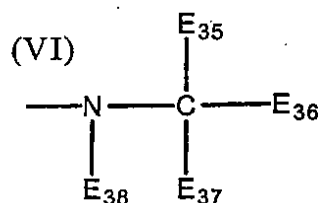
で表される化合物が提供される。

【0023】

30

もう1つの好ましい実施形態では、 $D_1$ および $D_2$ は独立に、式(VI)

【化11】



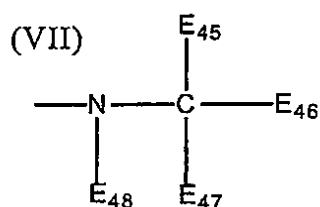
(式中、

40

$E_{35-38}$ は定義内で $D_1$ および $D_2$ が以下で定義する $D'_1$ および $D'_2$ に変わることを除き、上記の $E_{1-4}$ の定義と同じ基から選択される)

で表される選択された末端分枝基である。この実施形態では、 $D'_1$ および $D'_2$ が独立に、OH、式(IV)または(V)で表される成分、または

【化12】



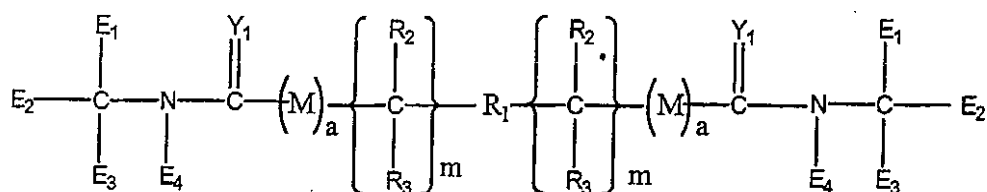
(式中、

E<sub>4.5-4.8</sub> は定義内でD<sub>1</sub>およびD<sub>2</sub>がD<sup>"</sup><sub>1</sub>およびD<sup>"</sup><sub>2</sub>に変わり、かつD<sup>"</sup><sub>1</sub>およびD<sup>"</sup><sub>2</sub>が独立に、OH、式(IV)または式(V)であることを除き、E<sub>1-4</sub>の定義と同じ基から選択される)で表される成分でありうる。上記のことからわかるように、末端分枝がその最大限に二官能性高分子R<sub>1</sub>を受け入れるとすると、最大16当量の薬物が高分子プラットフォームにロード(load)できる。

【 0 0 2 4 】

ビス-置換高分子残基が望まれるこの実施形態の態様では、本発明のいくつかの好ましい高分子輸送系が次の式

【化 1 3】



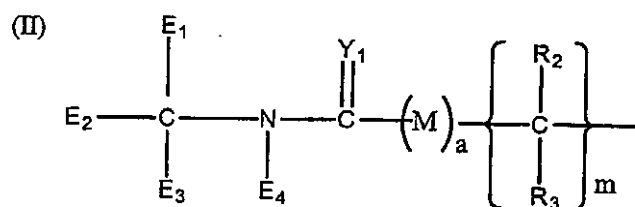
(式中、

全ての置換基および変数はこれまでに記載したとおりである)のよう示される。

【 0 0 2 5 】

本発明のマルチ・ローディング (multi-loading) 高分子輸送系は主として本明細書において  $R_1$  とよばれる高分子残基に基づくものである。所望により、 $R_1$  がキャッピング基 A を含有していてもよい。高分子キャッピング基 A としては、例えば、水素、 $CO_2H$ 、 $C_{1-6}$  アルキル基、およびビス系を形成する以下に示す式 (II) の化合物などの成分が挙げられる：

【化 1 4】



(式中、

全ての置換基および変数はこれまでに記載したとおりである)。上記の多数の末端分枝がビス系においても等しく適用されることが分かるであろう。

【 0 0 2 6 】

本発明の式が含んでなるその他の置換基および変数に関しては、以下のものが好ましい：  
Y<sub>1-4</sub>およびY<sub>7</sub>は各々、酸素であり；

$R_{2-14}$  は各々、好ましくは水素または低級アルキル、例えば、 $C_{1-6}$  であり；

(m) は 1 または 2 であり ;

(n)および(p)は各々、0または1～4の整数のいずれかであり；

(v)は0または1であり；

(t)は1であり；

$L_1$ は $-(CH_2CH_2O)_2-$ であり；かつ

$L_2$ は $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2C(O)NHCH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 、 $-CH_2C(O)NHCH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_2NH-$ または $-CH_2C(O)NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)-$ の1つである。

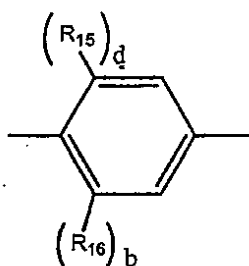
【0027】

#### B. Ar成分の説明

式(1)に関して、Arは式(1)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であると考えられる。重要な特徴はAr成分が本質的に芳香性であることである。一般に、芳香族であるには、環分子面の上下にある「雲」内で電子が共有される必要がある。さらに、電子数はヒュッケル則 $(4n+2)$ に従うものでなければならない。当業者ならば、無数の成分がその成分の芳香族必要条件を満たし、それゆえ本発明における使用に好適であることが分かるであろう。いくつかの特に好ましい芳香族基には：

10

【化15】



20

(式中、

$R_{15-16}$ は独立に、 $R_2$ の定義と同じ基から選択され、(b)および(d)は独立に、0または1である)

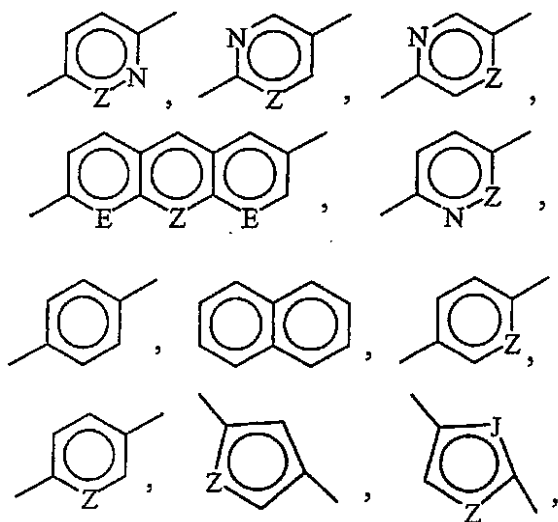
が含まれる。

【0028】

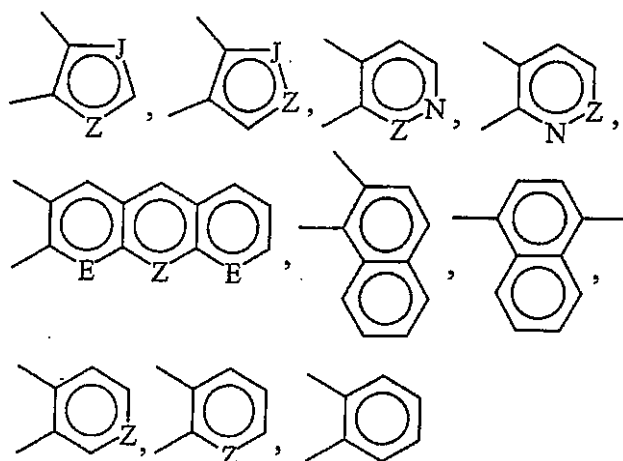
その他の好ましい芳香族炭化水素基としては、限定するものではないが：

30

【化16】



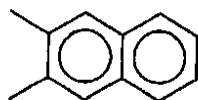
40



10

および

【化 17】



20

が挙げられる。これらの芳香族基において、JはO、SまたはN-R<sub>17</sub>であり；EおよびZは独立に、C-R<sub>18</sub>またはN-R<sub>19</sub>であり；かつR<sub>17-19</sub>は、式(1)におけるR<sub>2</sub>の定義と同じ基から独立に選択される（例えば、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル等）。ベンゾおよびジベンゾ系のほか、5および6員環を有する異性体もまた包含され、それらの関連同族体もまた包含される。また当業者ならば、ヒュッケル則に従いさえすれば、所望により、芳香環がO、S、NR<sub>17</sub>などのヘテロ原子で置き換えられてもよいことが分かるであろう。さらに、所望により、芳香族または複素環式構造が当技術分野で一般的に理解されているハロゲンおよび/または側鎖で置き換えられてもよい。また、本発明のAr成分に好適な全ての構造はY<sub>5</sub>およびC(R<sub>11</sub>)(R<sub>12</sub>)基を同一平面のパラ位またはオルト位に存在させることが可能である。

30

【0029】

#### C. プロドラッグの加水分解による薬物生成

本発明のプロドラッグ化合物は、血漿中の加水分解 $t_{1/2}$ が排出 $t_{1/2}$ よりも短くなるように設計される。

【0030】

治療を受けている哺乳類の血漿中における本発明の化合物に含まれる結合の加水分解 $t_{1/2}$ は、排出前に、十分な量の親化合物（すなわち、アミノまたはヒドロキシル基含有生物活性化合物）を放出させるのに十分短い加水分解 $t_{1/2}$ である。本発明のいくつかの好ましい化合物の血漿中における加水分解の $t_{1/2}$ は約5分～約12時間の範囲である。好ましくは、組成物の血漿加水分解 $t_{1/2}$ が約0.5～約8時間の範囲、さらに最も好ましくは約1～約6時間の範囲である。

40

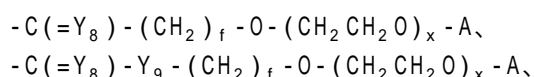
【0031】

#### D. 実質的に非抗原性である高分子

上記のように、R<sub>1</sub>はポリアルキレンオキシド(PAO)またはポリエチレングリコール(PEG)などの好ましくは実質的に非抗原性である水溶性高分子残基である。本発明の好ましい態様では、R<sub>1</sub>は本明細書においてAとよばれる、二官能性またはビス-高分子系を形成しうる上記のキャッピング基をさらに含む。

【0032】

例として、本発明の組成物のPEG残基部分は、限定されるものではないが、次の：



50

$-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ 、  
 $-(CR_{21}R_{22})_e-O-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ 、  
 $-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ 、  
 $-C(=Y_8)-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-C(=Y_8)-$ 、  
 $-C(=Y_8)-Y_9-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-Y_9-C(=Y_8)-$ 、  
 $-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-NR_{20}-C(=Y_8)-$ 、  
 $-(CR_{21}R_{22})_e-O-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-O-(CR_{21}R_{22})_e-$ 、および  
 $-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-NR_{20}-$   
 (式中、

$Y_8$ および $Y_9$ は独立に、O、Sまたは $NR_{20}$ であり；

10

$x$ は重合度であり；

$R_{20}$ 、 $R_{21}$ および $R_{22}$ は独立に、H、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

$e$ および $f$ は独立に、0、1、または2であり；かつ

Aはキャッピング基である）

から選択されうる。

#### 【0033】

高分子の重合度( $x$ )は約10～約2,300でありうる。これは高分子鎖の繰り返し単位数を示すものであり、高分子の分子量に依存している。(A)部分は本明細書において記載するキャッピング基、すなわち、高分子の末端に見られる基であり、いくつかの態様では、H、 $NH_2$ 、OH、 $CO_2H$ 、 $C_{1-6}$ アルキルまたは当業者によって理解されているその他のPEG末端活性化基のいずれかから選択されうる。

20

#### 【0034】

また、ポリプロピレングリコール、本願出願人による米国特許第5,643,575号で記載されたものなどの分枝PEG誘導体、Shearwater Polymers, Inc. カタログ "Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998"で記載されたものなどの「星型PEG」および分岐したPEGも有用である。なお、上記の各々の開示は参照により本明細書に組み入れる。要すれば、過度の試験を行うことなく、二官能性結合基との結合のために水溶性高分子を官能化しうるこ

30

#### 【0035】

さらに実施形態では、 $R_1$ は所望により、1種以上のデキストラン、ポリビニルアルコール、炭水化物系高分子、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリアルキレンオキシドおよび/またはそのコポリマーから選択されてもよい。本願出願人による米国特許第6,153,655号も参照されたい。なお、その内容は参照により本明細書に組み入れる。

#### 【0036】

本発明の多くの態様では、複数置換高分子複合体が望まれる場合にはビス-活性化ポリエチレングリコールが好ましい。また、一置換高分子が望まれる場合にはポリエチレングリコール(PEG)、モノメチル基を末端にもつポリエチレングリコール(mPEG)などのモノ活性化 $C_{1-4}$ アルキル基を末端にもつポリアルキレンオキシド(PAO)が好ましい。

40

#### 【0037】

所望の加水分解可能な結合を提供するためには、モノまたはジPEGアミンおよびモノまたはジPEGジオールのほか、PEG酸またはPEG二酸などの一または二酸活性化高分子も使用できる。好適なPAO酸はまずmPEG-OHをエチルエステルに変換し、その後、鹼化することにより合成できる。Gehrhardt, H., ら, Polymer Bulletin 18: 487 (1987)およびVeronese, F. M., ら, J. Controlled Release 10: 145 (1989)も参照されたい。また、PAO酸はmPEG-OHをt-ブチルエステルに変換し、その後、酸開裂することにより合成できる。例えば、本願出願人による米国特許第5,605,976号を参照されたい。なお、上記の各々の開示は参照により本明細書に組み入れる。

50

## 【0038】

PA0およびPEGは平均分子量の点で実質的に異なりうるが、本発明のほとんどの態様においてプロドラッグの高分子部分の重量平均分子量は少なくとも約20,000である。好ましくは、 $R_1$ の重量平均分子量は約20,000～約100,000、さらにより好ましくは約25,000～約60,000である。プロドラッグに含有させるのに選択される高分子の平均分子量は、リンカーの加水分解前に、プロドラッグの十分な循環を提供するのに十分なものでなければならない。

## 【0039】

本明細書において包含される高分子物質は、好ましくは室温で水溶性である。限定されるものではないが、かかる高分子としては、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレンオキシドホモポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、およびそのコポリマー、ならびにブロックコポリマーの水溶性が維持される場合にはそのブロックコポリマーが挙げられる。

10

## 【0040】

PEGなどのPA0について本明細書において記載したように同様の活性化が行われるなら、デキストラン、ポリビニルアルコール、炭水化物系高分子、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド(HPMA)、およびそのコポリマーなどのような有効に非抗原性な材料をPA0系高分子の代わりとして使用できる。当業者ならば、上記のリストは例示にすぎず、本明細書において記載する性質を有する全ての高分子材料が包含されることが分かるであろう。本発明の目的では、「有効に非抗原性」および「実質的に非抗原性」とは、当技術分野において実質的に毒性がなく、かつ哺乳類において感知できる免疫応答を誘導しないと認識される全ての高分子材料を包含するものと理解される。

20

## 【0041】

ポリプロピレングリコール酸など上記のもの以外のポリアルキレンオキシド誘導体、ならびにその他の二官能性結合基もまた包含されることが上記の説明から明らかであろう。

## 【0042】

## E. プロドラッグ候補

## 1. ヒドロキシル基含有化合物の残基

## a. カンプトテシンおよび関連トポイソメラーゼI阻害剤

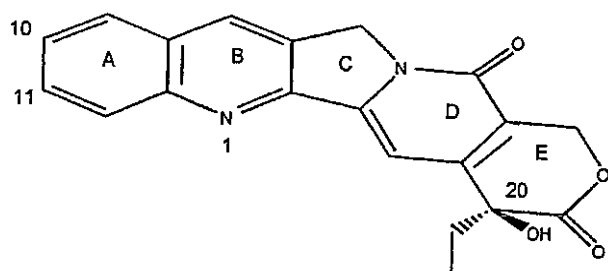
カンプトテシンは中国で自生するカンプトテカ・アクミナタ(*Camptotheca accuminata*)の樹木およびインドで自生するクサミズキ(*Nothapodytes foetida*)の樹木で産生される水に不溶性の細胞傷害性アルカロイドである。カンプトテシンおよび関連化合物ならびに類似体は有望な抗癌または抗腫瘍剤であることも知られており、さらにこれらの活性が*in vitro*および*in vivo*において発揮されることも分かっている。また、カンプトテシンおよび関連化合物は本発明のプロドラッグへの変換候補でもある。

30

## 【0043】

カンプトテシンおよび特定関連類似体は共通した構造：

## 【化18】



40

を有している。

## 【0044】

この主要構造から、いくつかの公知な類似体が製造されてきた。例えば、A環はOHで10お

50

よび11位のいずれかまたはその両方を置換しうる。また、A環は直鎖または分枝鎖 $C_{1-30}$ アルキルまたは $C_{1-17}$ アルコキシ(所望により、ヘテロ原子、すなわち、OまたはSで環と結合していてもよい)で9位も置換しうる。B環は直鎖もしくは分枝鎖 $C_{1-30}$ アルキルもしくは置換アルキル、 $C_{5-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-30}$ アルコキシ、フェニルアルキルなど、アルキルカルバメート、アルキルカルバジド、フェニルヒドラジン誘導体、アミノ、アミノアルキル、アラルキルなどで7位を置換しうる。C、DおよびE環でもその他の置換が可能である。例えば、米国特許第5,004,758号; 第4,943,579号; 第Re 32,518号を参照されたい。その内容は参照により本明細書に組み入れる。かかる誘導体は過度な試験を行わなくとも、公知の合成方法を用いて作製できる。本発明における使用に好ましいカンプトテシン誘導体としては、20-OHまたは本明細書において記載する活性化型高分子輸送系と直接反応しうるまたは後にPEGなどの高分子と結合する結合部分中間体、例えば、イミノ二酢酸などと反応しうるもう1つのOH基を含むものが挙げられる。本明細書において記載したカンプトテシン類似体は例示を目的とするものであって、これに限定されない。

10

#### 【0045】

#### b. タキサン系化合物およびパクリタキセル誘導体

本発明のプロドラッグ組成物に含まれる化合物種の1つがタキサン系化合物である。本発明の目的では、「タキサン」とは、タキサン系テルペンに入る全ての化合物を包含するものである。よって、タキソール(パクリタキセル)、3'-置換 tert-ブトキシ-カルボニル-アミン誘導体(タキソテール)など、ならびに標準有機技術を用いて容易に合成されるまたはSt. Louis, MissouriのSigma Chemicalなどの民間供給会社から入手可能であるその他の類似体は本発明の範囲である。これらの誘導体は有効な抗癌剤であることが分かっている。多くの研究により、これらの薬剤が数種類の悪性腫瘍に対する活性を有することが示されている。現在まで、それらの使用には、特に、それらの供給が不足しており、水溶性が乏しく、さらに過敏症を引き起こす傾向があることから厳しい制限があった。本願出願人による米国特許第5,622,986号および第5,547,981号で開示された7-アリール-カルバメートおよび7-カルバザートをはじめとするその他のタキサン系化合物もまた本発明のプロドラッグに含めうることは理解すべきである。なお、上記米国特許の内容は参照により本明細書に組み入れる。パクリタキセルは好ましいタキサンである。

20

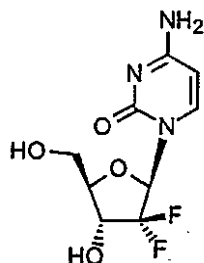
#### 【0046】

#### c. さらなる生物活性成分

上記分子のほか多くの化合物を用いて本発明のプロドラッグ製剤が製造できる。例えば、ビス-PEG複合体などの生物学上活性な化合物が、  
ゲムシタピン:

30

#### 【化19】



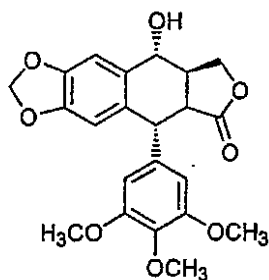
40

または

ポドフィロトキシン:

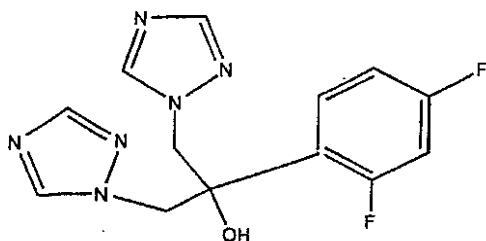
#### 【化20】





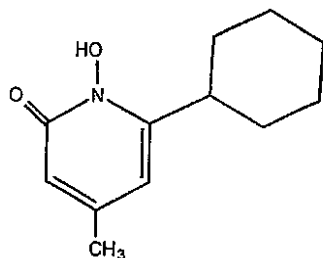
または  
フルコナゾールなどのトリアゾール系抗真菌薬：  
【化 2 1】

10



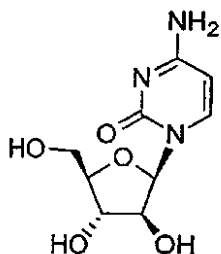
20

または  
シクロピロックス：  
【化 2 2】



30

または  
Ara-C：  
【化 2 3】



40

または既知のそれらの誘導体（例えば、Ieu-Ara-CなどのN<sup>4</sup>アミノ酸誘導体）から誘導された。

【0047】

本発明の高分子系プロドラッグは特にかかる水不溶性化合物を送達するのに十分に好適なものであるが、プロドラッグ形態用を選択される親化合物が実質的に水不溶性である必要はない。その他の有用な親化合物としては、例えば、生物学上活性な特定の低分子量タンパク質、酵素およびペプチドグリカンをはじめとするペプチド、ならびにその他の抗腫瘍剤； フォルスコリンなどの心血管作動薬； コンブレタスタチン、 ビンブラスチン、 ドキソ

50

ルピシン、メイタンシンなどの抗新生物薬；バンコマイシン、エリスロマイシンなどの抗感染薬；ナイスタチン、アムホテリシンB、トリアゾール、パピュロキャンディン、ニューモキャンディン、エキノキャンディン、ポリオキシン、ニッコーマイシン、プラジミシン、ペナノミシンなどの抗真菌薬（"Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development" Annu. Rev. Microbiol. 1994, 48: 471-97(その内容は参照により本明細書に組み入れる)を参照されたい）；抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系活性化剤、鎮痛剤、排卵誘発剤または避妊薬、抗炎症薬、ステロイド系薬剤、抗尿酸血症薬、心血管作動剤、血管拡張薬、血管収縮薬などが挙げられる。

#### 【0048】

上記のものは本発明のプロドラッグに好適である生物学上活性な成分の例示である。特記していないが、好適なエステル形成基、すなわち、ヒドロキシル基を有する生物学上活性な材料もまた本発明の範囲とされるものと理解すべきである。また、本発明のプロドラッグ複合体が、1当量の薬物および高分子だけでなく *in vivo* において生物活性に影響を及ぼさない成分を含有する少量の化合物も含有してよいことも理解すべきである。例えば、いくつかの例では、二酸と1個の結合ポイントを有する薬物分子とを反応させても、その反応条件では高分子当たり2当量の薬物を有するプロドラッグが定量的な量で生成されないということが分かっている。カルボジイミドを使用する場合にはアシル尿素などの反応副生成物が生じる場合がある。

#### 【0049】

### 2. アミン基含有化合物の残基

本発明のいくつかの態様では、 $B_1$  または  $B_2$  はアミン基含有化合物の残基である。限定されるものではないが、かかる好適な化合物としては、有機化合物、酵素、タンパク質、ポリペプチドなどの残基が挙げられる。有機化合物としては、限定されるものではないが、ダウノルピシン、ドキソルピシン；p-アミノアニリンマスタード、メルファラン、Ara-C(シトシンアラビノシド)などをはじめとするアントラサイクリン系化合物、および関連代謝拮抗性化合物、例えば、ゲムシタピン、などの成分が挙げられる。あるいは、Bはアミン基含有心血管作動剤、抗新生物薬、抗感染薬、ナイスタチンおよびアムホテリシンBなどの抗真菌薬、抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系活性化剤、鎮痛薬、排卵誘発剤、避妊薬、抗炎症薬、ステロイド系薬剤、抗尿酸血症薬、血管拡張薬、血管収縮薬などの残基でありうる。

#### 【0050】

本発明の好ましい態様では、アミノ基含有化合物は、動物、例えば、ヒトをはじめとする哺乳類のかかる治療が望まれる症状の治療における医薬上のまたは診断上の使用に好適な、生物学上活性な化合物である。上記のものは例示を意図するものであり、改変しうる化合物を限定するものではない。当業者ならば、その他のかかる化合物も過度な試験を行うことなく同様に改変しうるということが分かるであろう。特に示していないが、好適なアミノ基を有する生物学上活性な材料もまた本発明の範囲とされるものと理解すべきである。

#### 【0051】

本発明において含有させるのに好適なアミノ基含有分子のタイプについての唯一の条件は、担体部分と反応しかつそれと結合しうる利用可能な少なくとも1つの(第1または第2)アミン基含有位置が存在することと、プロドラッグ系が親化合物を放出して、親化合物を再生利用した後に生物活性の実質的な喪失がないことである。

#### 【0052】

本発明のプロドラッグ組成物への含有に好適な親化合物は、それ自体が結合型組成物からの加水分解による放出後は活性ではないが、さらなる化学工程/反応を受けた後に活性となる物質/化合物であってよいことに注目されたい。例えば、ダブルプロドラッグ輸送系によって血流に送達される抗癌剤は、癌または腫瘍細胞に浸透するまで不活性な状態にあり、そこで癌または腫瘍細胞化学、例えば、その細胞に特異的な酵素反応により活性化されると考えられる。

#### 【0053】

### 3. 脱離基

B<sub>1</sub>またはB<sub>2</sub>が脱離基である態様では、好適な脱離基としては、限定されるものではないが、N-ヒドロキシベンゾトリアゾリル、ハロゲン、N-ヒドロキシフタルイミジル、p-ニトロフェノキシ、イミダゾリル、N-ヒドロキシスクシンイミジル；チアゾリジンチオンなどの基を挙げることができ、あるいは当業者には理解されるその他の好適な脱離基が挙げられる。本明細書において使用し記載する合成反応は過度の試験を行わなくとも当業者ならば分かるであろう。

#### 【0054】

例えば、式(I)のアシル化中間体をクロロ蟻酸4-ニトロフェニル、ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)、カルボニルジイミダゾール、チアゾリジンチオンなどの反応物質と反応させて所望の活性化誘導体を得ることができる。

10

#### 【0055】

p-ヒドロキシベンジルアルコールまたはp-アミノベンジルアルコール、およびo-ヒドロキシベンジルアルコールまたはo-アミノベンジルアルコールのフェノールまたはアニリン部分の選択的アシル化は、例えば、チアゾリジンチオン活性化高分子、スクシンイミジルカーボネート活性化高分子、カルボン酸活性化高分子、ブロックアミノ酸誘導体を用いて行うことができる。適切に実施されれば「活性化」型PEGプロドラッグ(またはブロックプロドラッグ)はアミンまたはヒドロキシル基含有化合物との複合体化が可能である。

#### 【0056】

### F. 高分子プロドラッグ輸送系の合成

20

典型的な高分子プロドラッグの合成を実施例で記載するが、一般に、プロドラッグ輸送系を製造する1つの好ましい方法では、最初に高分子残基を分枝基に結合させる。別途、生物学上活性な成分または薬物、例えば、薬物-OHまたは薬物-NH<sub>2</sub>(式IのB<sub>1</sub>またはB<sub>2</sub>)をBE成分に結合させる。このBE成分は、高分子との結合ポイントで二官能性スペーサーを含んでもよい。次に、末端分枝を有する高分子残基と薬物-BE成分とを最終生成物を生成するのに十分な条件下で反応させる。

#### 【0057】

二官能性スペーサーを含有するBE-薬物成分と高分子部分との結合は、好ましくはカップリング剤の存在下で行われる。限定されるものではないが、好適なカップリング剤としては、例えば、Sigma-Aldrich Chemicalなどの民間供給会社から入手可能である、または公知の方法により合成される1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、好適なジアルキルカルボジイミド、ハロゲン化2-ハロ-1-アルキル-ピリジニウム、(Mukaiyama試薬)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(EDC)、プロパンホスホン酸環状無水物(PPACA)およびジクロロリン酸フェニルなどが挙げられる。

30

#### 【0058】

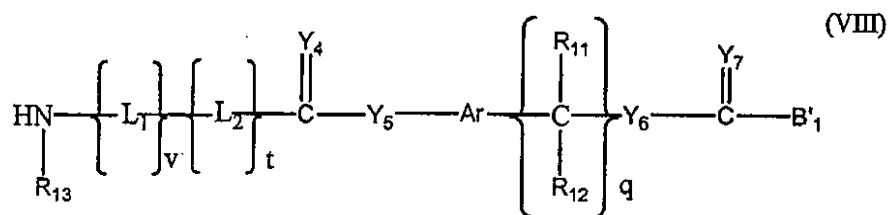
好ましくは、置換基を塩化メチレン、クロロホルム、DMFまたはその混合物などの不活性溶媒中で反応させる。この反応は、好ましくは生成した全ての酸を中和するためにジメチルアミノピリジン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、トリエチルアミンなどの塩基の存在下、0 ~ 約22 (室温)の温度で行われる。

#### 【0059】

より詳細には、高分子輸送系を製造する1つの方法は式(VIII)：

40

#### 【化24】



(式中、

50

(v)および(t)は独立に、0または約6までの正の整数、好ましくは約1であり；

$L_1$ および $L_2$ は独立に選択された二官能性リンカーであり；

$Y_{4-7}$ は独立に、0、Sおよび $NR_{14}$ からなる群から選択され；

$R_{11-14}$ は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択され；

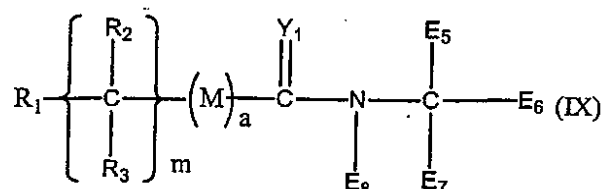
Arは式(I)に含まれる場合に多置換芳香族炭化水素または多置換複素環基を形成する成分であり；かつ

$B'_1$ はヒドロキシルまたはアミン基含有成分の残基である)

10

で表される化合物と式(IX)：

【化25】

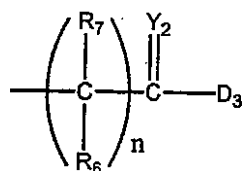


{式中、

$E_5$ は

20

【化26】

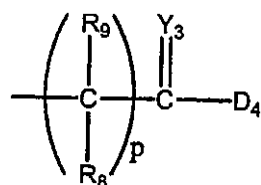


であり；

$E_{6-8}$ は独立に、H、 $E_5$ または

30

【化27】



(式中、

$D_3$ および $D_4$ は独立に、OH、保護されていないアミンまたはヒドロキシルと反応しうる脱離基、または末端分枝基である)

40

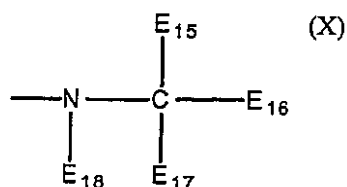
である}

で表される化合物とを反応させることを含む。

【0060】

この方法のさらなる態様では、 $D_3$ および $D_4$ は独立に、式(X)

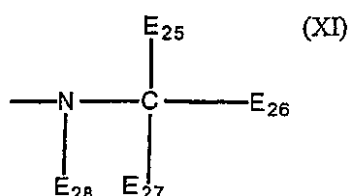
【化28】



{式中、

$E_{15-18}$ は、 $D_3$ および $D_4$ が $D'_3$ および $D'_4$ に変わることを除き、 $E_{5-8}$ の定義と同じ基から選択され、この場合、 $D'_3$ および $D'_4$ は独立に、OH、式(IV)または(V)で表される成分、または【化29】

10



(式中、

$E_{25-28}$ は $D_3$ および $D_4$ が $D''_3$ および $D''_4$ に変わり、かつ $D''_3$ および $D''_4$ が独立に、OH、または保護されていないアミンもしくはヒドロキシルと反応しうる脱離基と定義されることを除き、 $E_{5-8}$ の定義と同じ基から選択される)

20

である}

で表される成分でありうる。

【0061】

かかる合成方法により、最大16当量のカルボン酸または活性化カルボン酸を、例えば、結合させることが可能である。本明細書における好ましい構造で示されるように、末端分枝多酸を有するPEG残基が本発明の好ましい態様である。

【0062】

式(IX)に話をもどすと、

30

$R_1$ は高分子残基であり；

$Y_1$ はO、Sまたは $NR_4$ であり；

MはO、Sまたは $NR_5$ であり；

(n)および(p)は独立に、0または正の整数であり；

$Y_{2-3}$ は独立に、O、Sまたは $NR_{10}$ であり；かつ

$R_{2-10}$ は独立に、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分枝鎖アルキル、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-6}$ 置換アルキル、 $C_{3-8}$ 置換シクロアルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、置換 $C_{1-6}$ ヘテロアルキル、 $C_{1-6}$ アルコキシ、フェノキシおよび $C_{1-6}$ ヘテロアルコキシからなる群から選択される。

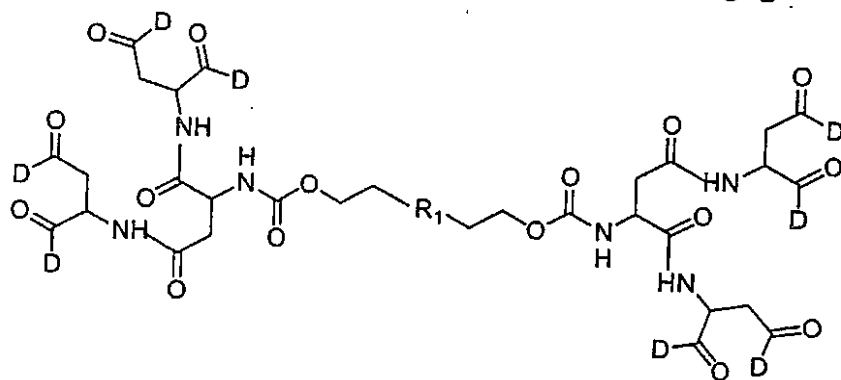
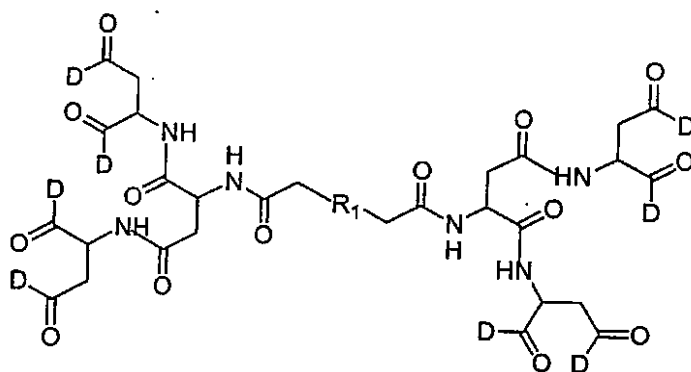
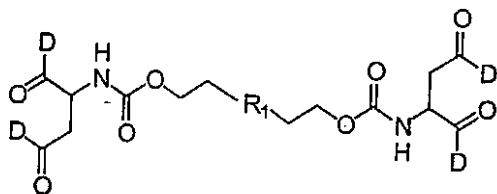
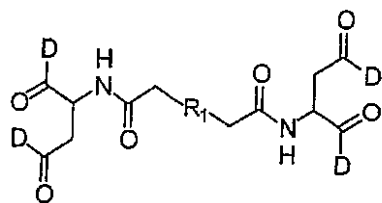
【0063】

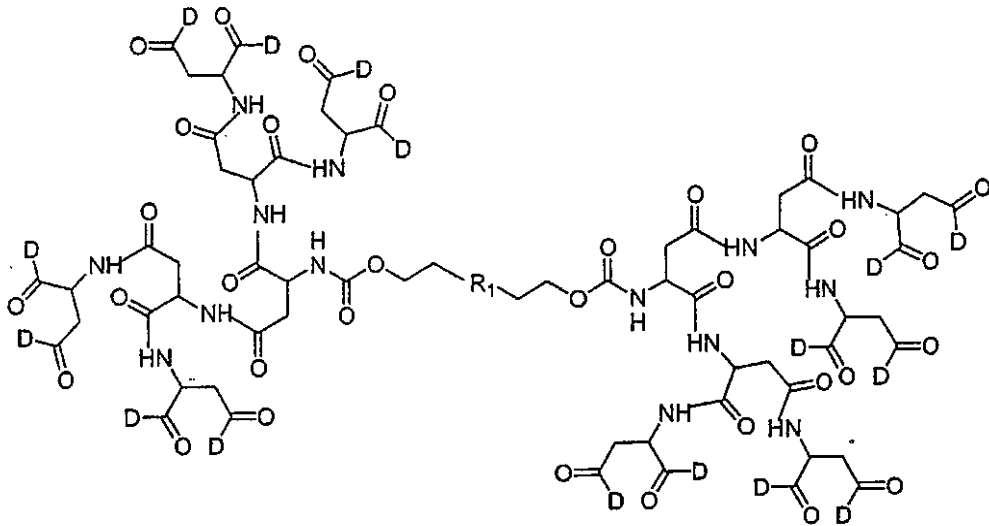
40

選択された合成方法にかかわらず、本明細書において記載する合成方法によって得られる好ましい化合物としては、

【化30】



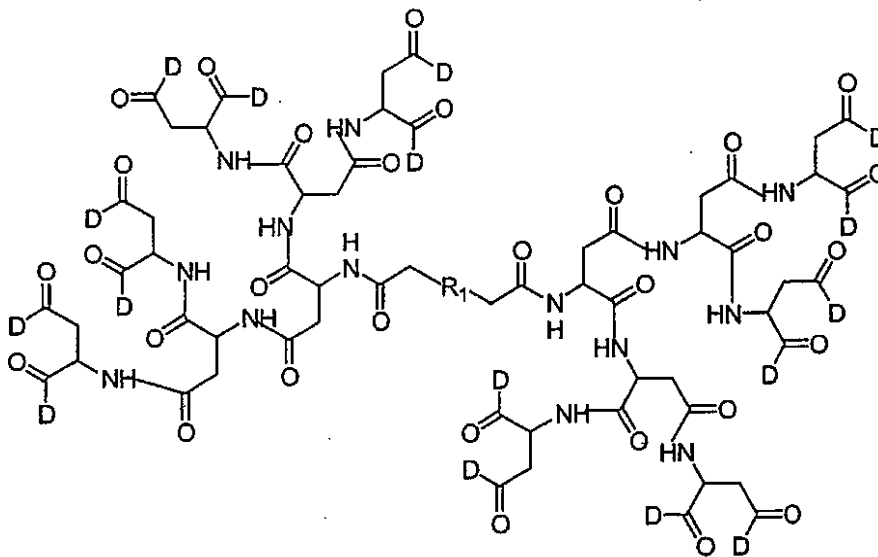




10

および

【化 3 1】



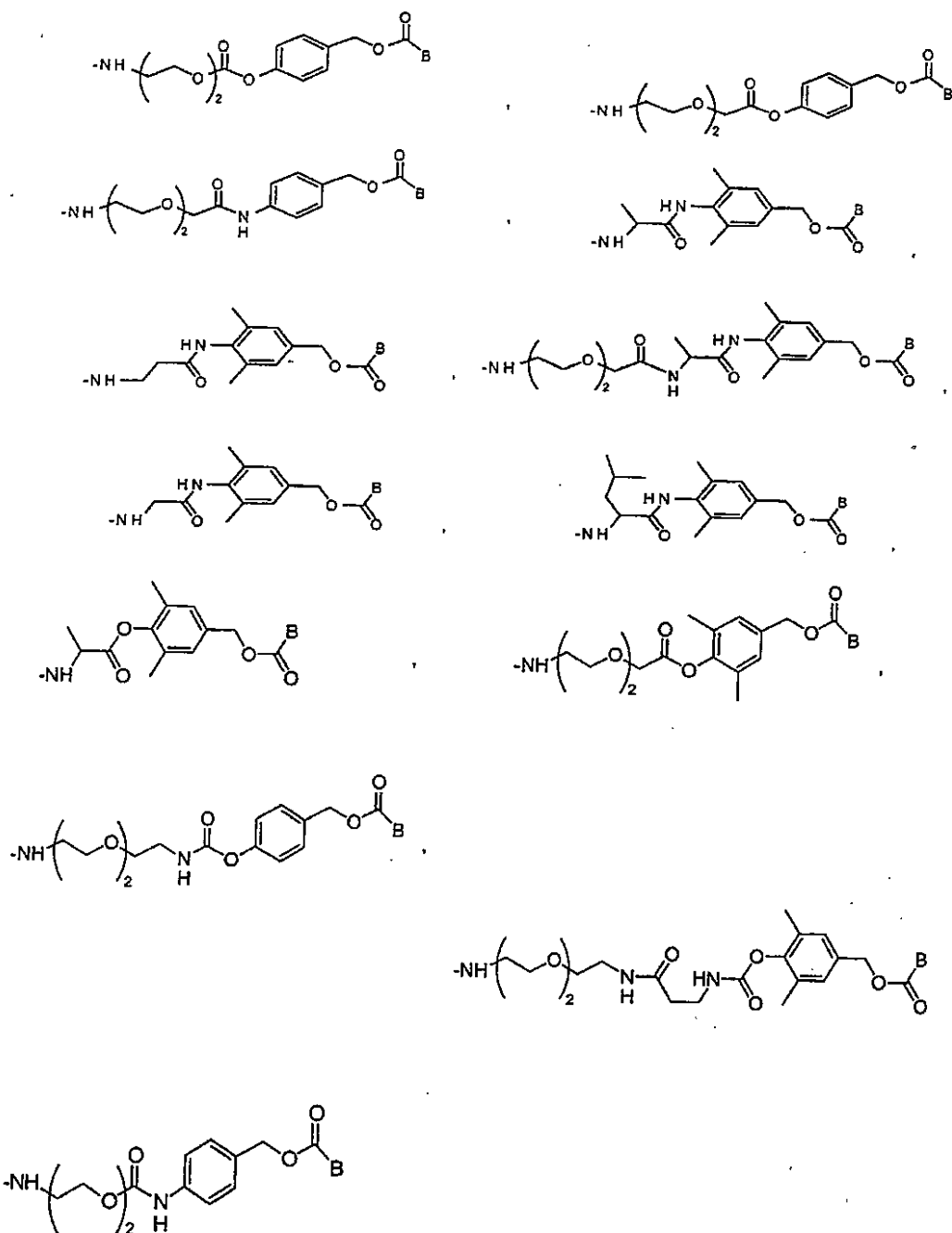
20

30

{ 式中、

$R_1$  は PAO または PEG などの高分子残基であり、かつ D は OH、式 (IV) または (V) である。好ましくは、D は

【化 3 2】



10

20

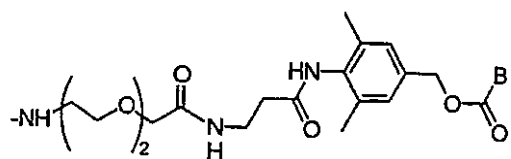
30

40

50

および

【化 3 3】



(式中、

Bはアミンまたはヒドロキシル基含有薬物の残基である)

である}

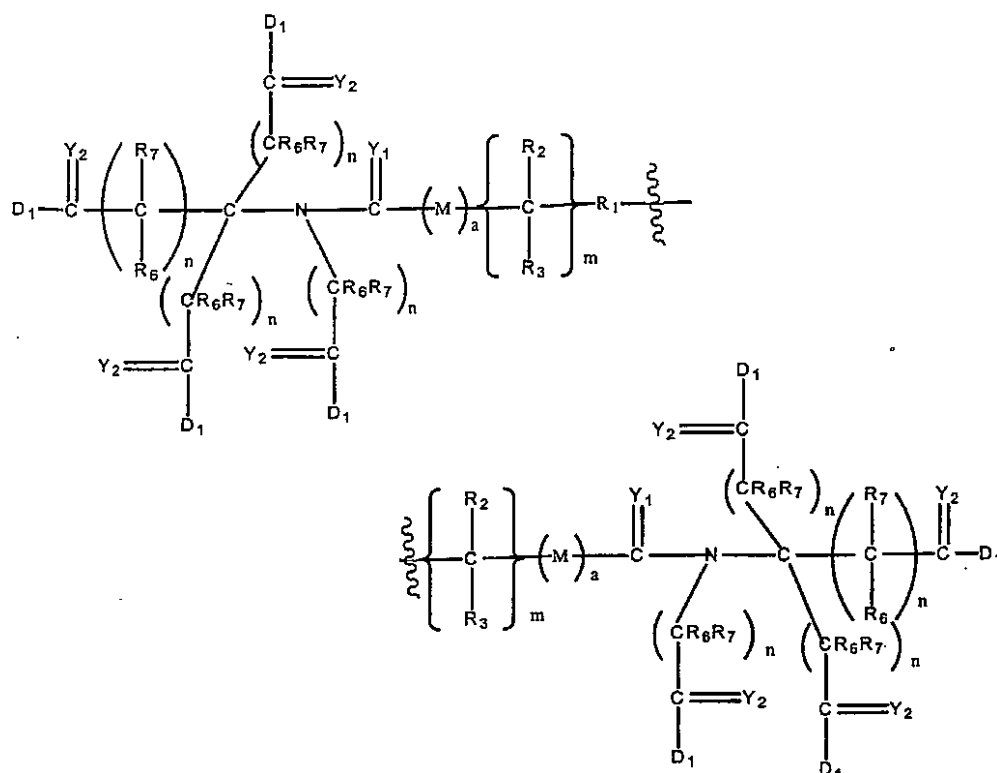
が挙げられる。

【 0 0 6 4】



本発明のもう1つの好ましい態様では、本発明の化合物は式(XII)：

【化34】



10

20

(式中、  
全ての置換基および変数はこれまでに定義したとおりである)  
で表される。

【0065】

#### G. *in vivo*診断学

本発明のさらなる態様は、所望により、診断または造影目的に選択される診断タグを上記の輸送エンハンサーに付けて作製してもよい本発明の複合体を提供する。そのため、好適なタグは、好適な成分、例えば、アミノ酸残基を、当技術分野の標準放射性同位元素、放射線不透過性標識、磁気共鳴標識、またはその他、磁気共鳴映像法に好適なその他の非放射性同位元素標識、蛍光標識、外科処置中の腫瘍組織のイメージングを可能にする可視色を呈する標識および/または紫外線、赤外線または電気化学的刺激下で蛍光発光可能な標識などに結合させることにより作製される。所望により、診断タグを複合体化される治療成分に組み込みおよび/または結合させて、動物またはヒト患者内での治療用生物活性材料の分布のモニタリングを可能にすることができる。

30

【0066】

本発明のなおさらなる態様では、本発明のタグ付き複合体が当技術分野で公知な方法により、例えば、放射性同位元素標識をはじめとする好適な標識を用いて容易に作製される。一例として、これらには*in vivo*において腫瘍細胞に選択的に取り込まれる放射免疫シンチグラフ用薬剤を製造するための<sup>131</sup>ヨウ素、<sup>125</sup>ヨウ素、<sup>99m</sup>テクネチウムおよび/または<sup>111</sup>インジウムが挙げられる。例えば、一例として、参照により本明細書に組み入れる米国特許第5,328,679号；同第5,888,474号；同第5,997,844号；および同第5,997,845号により示されたものをはじめとする、ペプチドをTc-99mに結合させる当技術分野で公知な方法が多数ある。

40

【0067】

一般には、患者の腫瘍組織の解剖学的位置決定では、腫瘍を有することが予測される患者または動物に複合体タグを投与する。標識化免疫グロブリンを腫瘍部位に位置付けるのに

50

十分な時間が経過した後、標識により発生するシグナルを、例えば、X線ラジオグラフィ、コンピュータ体軸横断X線断層撮影、MRIにより、発光性タグの機器検出により、ガンマカメラなどのフォトスキャン装置、または選択されたタグの性質に好適なその他の方法もしくは装置により視覚的に検出する。

【0068】

次いで、検出されたシグナルを画像または腫瘍部位の解剖学のおよび/もしくは生理学的判定に変換する。この画像により *in vivo* における腫瘍の位置付けが可能になり、好適な治療計画の立案ができる。タグ付き成分自体が治療薬である実施形態では、検出されたシグナルによって治療中の解剖学的位置決定が明らかであり、診断的および治療的インターベンションを追跡するための基準が提供される。

10

【0069】

#### H. 治療方法

本発明のもう1つの態様により、哺乳類における種々の病状に向けた治療方法が提供される。これらの方法は、かかる病状の治療に必要な哺乳類に、有効量の、本明細書において記載するように製造したマルチ・ローディッド (multi-loaded) Ara-C-PEG複合体などのプロドラッグを投与することを含む。該組成物は特に、新生物性疾患を治療する、全身腫瘍組織量を減少させる、新生物転移を予防する、および哺乳類における腫瘍/新生物増殖の再発を予防するのに有用である。

【0070】

投与するプロドラッグ量はその中に含まれる親分子に応じたものとなる。一般に、治療方法に使用するプロドラッグ量は哺乳類において所望の治療効果を効果的に達成する量である。必然的に、種々のプロドラッグ化合物の投与量は親化合物、*in vivo*加水分解速度、高分子の分子量などによっても多少変わるが、一般には、タキサン系プロドラッグはタキサン成分の量を基に1日当たり約5～約500mg/m<sup>2</sup>の範囲の量で投与される。また、カンプトテシンプロドラッグも1日当たり約5～約500mg/m<sup>2</sup>の範囲の量で投与される。上記の範囲設定は例示であり、臨床経験および治療適用に基づき、選択されたプロドラッグの最適投与量が当業者により決定されるであろう。実際の投与量については必要以上の試験を行うことなく、当業者には明らかであろう。

20

【0071】

哺乳類へ投与するために本発明のプロドラッグを1種以上の好適な医薬組成物に含めることができる。医薬組成物は当技術分野で十分に公知な方法に従って製造される液剤、懸濁剤、錠剤、カプセル剤などの形態であってよい。また、当業者が要すれば、かかる組成物の投与は経口および/または非経口経路によるものであってよいと考えられる。組成物の溶液および/または懸濁液は、例えば、当技術分野で公知な方法、例えば、静脈内、筋肉内、皮下注射などによる組成物の注入または浸潤用の担体ビヒクルとして使用しうる。

30

【0072】

また、かかる投与は体内スペースもしくは体腔への注入、ならびに吸入および/または経鼻経路によるものであってよい。しかしながら、本発明の好ましい態様では、プロドラッグはその必要のある哺乳類に非経口投与される。

【実施例】

40

【0073】

#### I. 実施例

次の実施例は本発明をさらに理解するためのものであり、本発明の有効な範囲を何ら制限するものではない。実施例で列挙される下線を施した太字体の数字は図面で示されるものと対応している。二官能性PEG誘導体( および 置換)を使用すること、および図面では末端基の鏡像を考えた場合、実際に形成される化合物の1つの側面しか示されていないことも理解すべきである。

【0074】

#### 概説

反応は全て乾燥窒素またはアルゴン雰囲気下で行った。市販の試薬はさらなる精製を行わ

50

ずに使用した。全てのPEG化合物は使用前に真空下または共沸蒸留(トルエン)により乾燥させた。<sup>1</sup>Hスペクトルは特に断りのない限り、溶媒としてジウテリオクロホルムを用いてJEOL FT NMR システム JNM GSX-270またはVarian MercuryVX-300装置で測定した。<sup>13</sup>C NMRスペクトルはJNM GSX-270では67.80MHzでまたはVarian MercuryVX-300では75.46MHzで測定した。化学シフト( )はテトラメチルシラン(TMS)から低磁場へ向かう百万分の一(ppm)単位で表され、結合定数(J値)はヘルツ(Hz)で示される。in vivo薬物処理前の注入用に全てのPEG複合体化合物を滅菌生理食塩水(0.9%)に溶解し(～15mg/mL)、それらをara-C等価物として投与した(絶対量のara-Cを投与)。

【0075】

#### HPLC法

C8逆相カラム(Beckman, ultrasphere)を用い、移動相としてメタノール-水の80:20混合物(v/v)を用いる定組成条件下でHPLC分析を行った。ピーク溶出は紫外吸光検出器を用いて254nmでモニターした。遊離PEGの存在を検出し、さらにPEG化生成物の存在も確認するため、蒸発光散乱検出器(ELSD)、PL-EMD 950型(Polymer Laboratories)を使用した。ELSDおよびUV分析では、全ての最終PEG化生成物には非改変薬物が含まれず、HPLCによる純度は95%であった。

【0076】

#### PEG誘導体中のAra-C含量の分析

PEG誘導体中のara-C含量を測定するため、ara-Cのアシル化により吸光度が変化することからN<sup>4</sup>-アセチルシチジンを標準として使用した。H<sub>2</sub>O中のN<sup>4</sup>-アセチルシチジンのUV吸光度を0.01 μmol/mL～0.05 μmol/mLの範囲にわたる6種の異なる濃度で257nmにおいて測定した。濃度に対する吸光度の検量線でのN<sup>4</sup>-アセチルシチジンの吸光係数の計算値は36.4であった(1mg/mLの257nmにおけるO.D.、光路長1.0cm)。PEG化ara-C誘導体をおよその濃度0.015 μmol/mL(分子量40kDaを基にして)にH<sub>2</sub>Oに溶解し、これら化合物のUV吸光度を257nmで測定した。この値と、さらに上記で得た吸光係数を用いて、サンプル中のara-C濃度を調べた。この値をサンプル濃度で割ってサンプル中のara-Cの割合(%)を求めた。

【0077】

#### PEG誘導体中のメルファラン含量の分析

PEG誘導体中のメルファラン含量を測定するため、メルファランを標準として使用した。DMF-H<sub>2</sub>O(9:1, v/v)中のメルファランのUV吸光度を0.02 μmol/mL～0.06 μmol/mLの範囲にわたる5種の異なる濃度で264nmにおいて測定した。濃度に対する吸光度の検量線でのメルファランの吸光係数の計算値は54.6であった(1mg/mLの264nmにおけるO.D.、光路長1.0cm)。PEG化メルファラン誘導体をおよその濃度0.013 μmol/mL(分子量40kDaを基にして)でDMF-H<sub>2</sub>O(9:1, v/v)に溶解し、これら化合物のUV吸光度を264nmで測定した。この値と、さらに上記で得た吸光係数を用いて、サンプル中のメルファラン濃度を調べた。この値をサンプル濃度で割ってサンプル中のメルファランの割合(%)を求めた。

【0078】

#### 略語

DCM(ジクロロメタン)、DIEA(N,N-ジイソプロピルエチルアミン)、DMAP(4-(ジメチルアミノ)ピリジン)、DSC(N,N-ジスクシンイミジルカーボネート)、EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)、HOBT(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、IPA(2-プロパノール)、NMM(N-メチルモルホリン)、TBDMS-Ci(tert-ブチルジメチルシリルクロリド)、TEA(トリエチルアミン)、TFA(トリフルオロ酢酸)。

【0079】

[実施例1] 4-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシメチル)-2,6-ジメチル-フェノール(2)

DCM(5mL)中のトリエチルアミン(5mL, 35.87mmol)の溶液をDCM(10mL)中の4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルベンジルアルコール(1, 1.0g, 6.58mmol)およびTBDMS-Cl(1.61g, 10.7mmol)の溶液に0 で1時間にわたってゆっくり加えた。この最終溶液を室温に温め、室温で一晩攪拌した。溶媒を真空除去した。残渣をDCMに溶解し、水で4回洗浄し、1.5g(86%)の2を得た

10

20

30

40

50

:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  0.00 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.11 (s, 6H, 2 x Ar- $\text{CH}_3$ ), 4.50 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 6.82 (s, 2H, 2 x Ar-CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.25, 15.91, 18.48, 26.01, 64.91, 122.84, 126.93, 132.85, 151.15.

【0080】

[実施例2] 2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピオン酸 4-(tert-ブチル-ジメチルシラニルオキシメチル)-2,6-ジメチル-フェニルエステル(3)

DCM(50mL)中のBoc-Ala-OH(1.279g, 6.77mmol)、2(1.2g, 4.511mmol)、EDC-HCl(1.299g, 6.77mmol)、およびDMAP(825.6mg, 6.77mmol)の混合物を0 で攪拌した後、室温に一晩温めた。この溶液を0.5N HCl(25mL x 4)で洗浄し、無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、溶媒を真空除去し、1.95g(99%)の3を得た:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  0.00 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.36 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.50 (d, 3H,  $J = 0.81$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.07 (s, 6H, 2 x Ar- $\text{CH}_3$ ), 4.51 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.56 (s, 1H, Ar- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.91 (s, 2H, 2 x Ar-CH);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  -3.55, 16.34, 18.39, 18.53, 25.92, 28.26, 49.34, 64.43, 77.46, 126.28, 129.68, 138.97, 146.57, 155.17, 171.43.

10

【0081】

[実施例3] 2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピオン酸 4-ヒドロキシメチル-2,6-ジメチル-フェニルエステル(4)

化合物3(1.9g, 4.35mmol)を酢酸(25mL)、THF(8mL)、および水(8mL)に溶解し、この溶液を室温で1時間攪拌した。溶媒を真空除去し、残渣をDCM(100mL)に溶解し、0.5% $\text{NaHCO}_3$ (50mL)および水(50mL)で洗浄した。有機層を無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、溶媒を真空除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、0.85g(55%)の4を得た:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1.46 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.58 (d, 3H,  $J = 0.81$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.13 (s, 6H, 2 x Ar- $\text{CH}_3$ ), 4.51 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.56 (s, 1H, Ar- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.03 (s, 2H, 2 x Ar-CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (67.80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.17, 18.31, 28.18, 49.30, 64.39, 79.98, 127.12, 129.99, 138.68, 146.95, 155.14, 171.38.

20

【0082】

[実施例4] 2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピオン酸 4-(2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルオキシ-カルボニルオキシメチル)-2,6-ジメチル-フェニルエステル(5)

無水クロロホルム(20mL)中の4(730mg, 2.26mmol)、DSC(752.1mg, 2.94mmol)、およびピロリジン(232.1mg, 2.94mmol)の混合物を25~30 で一晩攪拌した。この反応混合物を0.5N HCl(15mL)で洗浄し、有機層を無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させた。溶媒を真空除去し、5を固体として得た(899.5mg, 86%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  16.32, 18.45, 25.45, 28.28, 49.35, 72.25, 77.21, 80.10, 128.99, 129.02, 130.94, 130.91, 148.45, 151.04, 155.14, 168.57.

30

【0083】

[実施例5] 2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-プロピオン酸 4-[1-(3,4-ジヒドロキシ-5-ヒドロキシメチルテトラヒドロ-フラン-2-イル)-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-ピリミジン-4-イルカルバモイルオキシメチル]-2,6ジメチル-フェニルエステル(7)

無水DMF(40mL)中の5(760mg, 1.64mmol)、ara-C(6, 996mg, 4.1mmol)およびDIEA(634.3mg, 4.92mmol)の混合物を40 で一晩攪拌した。この反応混合物を真空濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。純粋生成物(7)の収量は200mg(21%)であった:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.45, 17.61, 28.61, 50.41, 62.38, 67.74, 75.98, 77.75, 80.49, 86.77, 88.96, 95.68, 129.41, 131.48, 134.29, 147.18, 148.96, 154.14, 157.29, 157.43, 164.27, 172.98.

40

【0084】

[実施例6] 2-アミノ-プロピオン酸 4-[1-(3,4-ジヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロ-フラン-2-イル)-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-ピリミジン-4-イルカルバモイルオキシメチル]-2,6-ジメチル-フェニルエステル(8)TFA塩

化合物7(200mg, 0.34mmol)をDCM(4mL)およびTFA(2mL)中、室温で2時間攪拌し、溶媒を真空除去した。残渣をDCM-エーテルで再結晶化させ、200mg(100%)の8を得た:  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  16.28, 16.44, 49.86, 62.74, 67.97, 76.53, 78.08, 87.47, 89.47, 95.76, 129

50

.96, 131.70, 135.76, 148.00, 148.89, 154.58, 164.68, 169.62。

【0085】

[ 実施例7 ] 化合物10

EDC-HCl(131.1mg, 0.68mmol)を無水DCM(25mL)およびDMF(15mL)中のPEGアスパラギン酸(9, 分子量40,000, 1.73g, 0.043mmol)、8(210mg, 0.43mmol)、NMM(137.9mg, 1.37mmol)、およびHOBt(69.1mg, 0.51mmol)の混合物に0 で加えた。この混合物を0 で30分間攪拌した後、室温に一晩温めた。溶媒を除去し、残渣をIPAで2回再結晶化させ、1.4g(82%)の10を得た。UVアッセイで測定した生成物中に存在するara-C量は2.26重量%であった：<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O) 14.51, 18.19, 18.68, 33.67, 45.20, 52.46, 62.92, 63.44, 72-11-72.19 (PE G), 74.32, 77.64, 78.36, 87.15, 89.17, 95.46, 131.04, 133.19, 135.97, 148.93, 15 0.04, 155.76, 158.71, 165.46, 173.25, 174.46, 187.43。

【0086】

[ 実施例8 ] 4-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシメチル)-フェノール(12)

DMF(50mL)中の4-ヒドロキシメチルフェノール(11, 9.3g, 75mmol)の溶液に無水窒素ガスを10分間スパージした後、TBDMS-Cl(12.44g, 82mmol)を加えた。この反応混合物を0 に冷却した後、DMF(25mL)中のTEA(30.36g, 300mmol)の溶液をゆっくり加えた。反応液を室温で一晩攪拌し、真空濃縮した。残渣を水(100mL)とDCM(200mL)とで2回分液した。有機層を合し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた後、溶媒を真空除去し、12(16.3g, 91%)を得た：<sup>13</sup>C NMR -5.344 (2 x Si-CH<sub>3</sub>), 18.285 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.850 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 64.840 (Ar-CH<sub>2</sub>O), 115.221 (ArC<sup>2</sup>), 127.842 (Ar-C<sup>3</sup>), 132.962 (Ar-C<sup>4</sup>), 155.248 (Ar-C<sup>1</sup>)。 20

【0087】

[ 実施例9 ] 化合物14

ピリジン(983mg, 12.43mmol)をCHCl<sub>3</sub>(140mL)中の12(2.7g, 11.3mmol)およびDSC(3.18g, 12.43mmol)の懸濁液に加え、混合物を一晩還流した。室温に冷却した後、13(3.398g, 13.7mmol)をこの溶液に加え、反応混合物を室温で一晩攪拌した。この混合物を0.1N HCl(3 x 100mL)およびブライン(100mL)で洗浄した。有機層を無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、溶媒を真空除去した。残渣をヘキサン(100mL)に溶解した後、不溶性不純物を濾過した。ヘキサン濾液を濃縮し、生成物14(5.1g, 88%)を得た：<sup>13</sup>C NMR -5.469 (2 x Si-CH<sub>3</sub>), 18.235 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.790 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.263 (O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.230 (CH<sub>2</sub>NH), 40.917 (CH<sub>2</sub>NH), 64.392 (Ar-CH<sub>2</sub>O), 69.892 (CH<sub>2</sub>O), 70.192 (CH<sub>2</sub>O), 70.253 (CH<sub>2</sub>O), 79.305 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 121.371 (Ar-C<sup>2</sup>), 126.943 (Ar-C<sup>3</sup>), 138.482 (Ar-C<sup>4</sup>), 149.960 (OC(=O)NH), 154.936 (OC(=O)NH), 156.096 (Ar-C<sup>1</sup>)。 30

【0088】

[ 実施例10 ] 化合物15

化合物14(5g, 9.76mmol)をアセトニトリル(30mL)および水(30mL)に溶解した後、HOAc(90mL)を加えた。この反応混合物を室温で1.5時間攪拌した後、溶媒を除去した。残渣をDCM(300mL)に溶解し、水(3 x 300mL)で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。溶媒を真空除去し、15(4.1g, 80%)を得た：<sup>13</sup>C NMR 28.233 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.184 (CH<sub>2</sub>NH), 40.871 (CH<sub>2</sub>NH), 64.484 (Ar-CH<sub>2</sub>O), 69.811-70.191 (4 x CH<sub>2</sub>O), 79.228 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 121.661 (Ar-C<sup>2</sup>), 127.950 (Ar-C<sup>3</sup>), 138.177 (Ar-C<sup>4</sup>), 150.418 (OC(=O)NH), 154.875 (OC(=O)NH), 156.1 40 11 (Ar-C<sup>1</sup>)。

【0089】

[ 実施例11 ] 化合物16

DCM(80mL)中の化合物15(800mg, 2.01mmol)およびDSC(726mg, 2.8mmol)の溶液を0 に冷却した後、ピリジン(224mg, 2.8mmol)を加えた。この溶液を0~5 で一晩攪拌した後、溶媒を真空除去した。残渣をDCM(40mL)に溶解し、水(2 x 20mL)で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、溶媒を真空除去し、16(0.88g, 88%)を得た：<sup>13</sup>C NMR 24.852 (NHS's 2 x C(=O)CH<sub>2</sub>), 27.834 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.777 (CH<sub>2</sub>NH), 40.443 (CH<sub>2</sub>NH), 69.230-69.640 (4 x CH<sub>2</sub>O), 71.624 (Ar-CH<sub>2</sub>O), 78.690 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 121.583 (Ar-C<sup>2</sup>), 129.468 (Ar-C<sup>3</sup>), 137.110 (Ar-C<sup>4</sup>), 148.092 (OC(=O)O), 151.203 および 154.134 (OC(=O)NH), 155.772 (OC(=O)NH) 50

, 168.752 ( $\text{Ar}-\text{C}^1$ ), 172.809 ( $\text{NHS}'\text{s } 2 \times \text{C}(=\text{O})\text{CH}_2$ ).

【0090】

[実施例12] 化合物17

化合物16を実施例6~8と同じ条件に付し、19を得た。

【0091】

[実施例13] 化合物22

PEGジオール(20, 55g, 1.38mmol)を2時間トルエンと共沸させた後、回転蒸発により200mLの溶媒を除去した。この溶液を $\sim 30^\circ\text{C}$ に冷却し、トリホスゲン(0.544g, 1.83mmol)を固体として加え、続いて、無水ピリジン(0.434g, 5.49mmol)を加えた。反応混合物を $50^\circ\text{C}$ で1時間攪拌した。N-ヒドロキシフタルイミド(21, 1.12g, 6.88mmol)および無水ピリジン(0.54g, 6.88mmol)をクロロ蟻酸混合物に加え、反応物を $50^\circ\text{C}$ でさらに2時間、次に、室温で12時間攪拌した。この反応混合物を濾紙で濾過し、溶媒を真空除去した。生成物をDCM-エチルエーテル(1100mL, 8:2, v/v)で再結晶化させ、生成物を得た(50.9g, 92%):  $^{13}\text{C}$  NMR 123.62, 128.10, 134.55, 152.00, 160.00.

【0092】

[実施例14] PEG-cmc-Asp-O-t-Bu(24)

化合物22(分子量40,000, 20g, 0.459mmol)およびアスパラギン酸ジ-t-ブチルエステル・HCl(23, 1.0g, 3.55mmol)を無水DCMに溶解した後、DMAP(0.433g, 3.55mmol)を加えた。この溶液を一晚還流した後、エチルエーテル(1L)を加えて沈殿させた。濾過により固体を単離し、IPA(1L)で2回再結晶化させた。濾過ケーキをIPA(200mL)およびエーテル(200mL)で洗浄し、 $45^\circ\text{C}$ で真空乾燥させた後に15.6g(78%)の生成物を得た:  $^{13}\text{C}$  NMR 27.837 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.991 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37.752 ( $\text{CHCH}_2\text{CO}_2$ ), 50.800 (NHCH), 64.212 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 81.333 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.007 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.924 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 169.674 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 169.969 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

【0093】

[実施例15] PEG-cmc-Asp-OH(25)

化合物24(15g, 0.375mmol)をDCM(150mL)に溶解した後、TFA(75mL)を加えた。この溶液を室温で2時間攪拌し、ヘキサン(500mL)を加えて固体を沈殿させた。この固体をヘキサントリチュレートしてTFAを除去した後、冷却したDCM-エーテルで再結晶化させた。再結晶化させた固体をDCM(150mL)に再溶解し、水(150mL)で洗浄した。有機層を分離し、無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、真空濃縮し、エーテルで沈殿させ、12.4g(83%)の生成物を得た:  $^{13}\text{C}$  NMR 36.441 ( $\text{CHCH}_2\text{CO}_2$ ), 50.177 (NHCH), 64.390 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 81.333 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.007 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.172 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 171.944 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 172.211 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

【0094】

[実施例16] メルファランMeエステル(27)

メルファラン(26, 1.00g, 3.28mmol)を2,2-ジメトキシプロパン(65.59mL, 533.49mmol)に懸濁した。この懸濁液にHCl水溶液(36%, 3.28mL)および無水メタノール(4mL)を加えた。混合物を、溶液がわずかに褐変し始めるまで激しく攪拌しながら穏やかに加温還流した。次いで、混合物を室温で18時間攪拌した。反応混合物を真空濃縮し、残渣から粗生成物をエーテルで沈殿させた。固体を濾過し、エーテルで洗浄し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 9:1$ , v/v)により精製し、所望の生成物を得た(0.47g, 45%):  $^{13}\text{C}$  NMR 39.751, 40.340, 51.912, 53.435, 55.803, 112.124, 126.076, 130.620, 145.033, 175.754.

【0095】

[実施例17] 化合物28

窒素下、無水クロロホルム(30mL)中の16(1.91g, 3.55mmol)、27(1.7g, 5.33mmol)、およびDMAP(0.519g, 4.25mmol)の混合物を室温で一晩攪拌した後、真空濃縮した。残渣をDCM(100mL)に再溶解し、1N HCl(50mL)で3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー( $\text{EtOAc}:\text{ヘキサン} = 8:2$ , v/v)により精

製し、所望の生成物を得た(0.8301g, 32%):  $^{13}\text{C}$  NMR 28.173, 36.571, 40.076, 40.680, 51.838, 52.956, 54.381, 54.933, 65.707, 68.390, 69.212, 69.610, 76.056, 76.480, 76.891, 78.547, 111.060, 120.575, 123.285, 128.087, 128.318, 129.333, 131.002, 132.029, 143.856, 149.544, 149.801, 153.127, 154.193, 154.565, 170.539.

【0096】

[ 実施例18 ] 化合物29

TFA(2.5mL)をDCM(5mL)中の28(0.8306g, 1.12mmol)の溶液にゆっくりと加えた。この反応液を室温で1.5時間攪拌した後、真空濃縮した。残渣をDCM-エーテルで再結晶化させ、所望の生成物を得た(0.0838g, 13%):  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ) 37.218, 39.814, 40.715, 41.196, 52.521, 53.625, 55.091, 66.349, 66.635, 69.998, 70.107, 111.768, 121.357, 123.995, 128.781, 130.062, 132.927, 144.615, 150.218, 154.381, 154.988, 171.411. 10

【0097】

[ 実施例19 ] 化合物30

氷浴中0 でEDC(0.048g, 0.253mmol)およびDMAP(0.077g, 0.632mmol)を無水DCM(20mL)および無水DMF(5mL)中のPEG-cmc-Asp-COOH(25, 1.26g, 0.032mmol)および29(0.191g, 0.253mmol)の混合物に加えた。窒素下、反応混合物を室温で一晩攪拌した後、真空濃縮した。残渣をDCM-エーテル、さらにIPAで再結晶化させ、所望の生成物を得た(0.874g, 64.2%)。UVアッセイで測定した生成物中のメルファラン量は2.4重量%であった:  $^{13}\text{C}$  NMR 36.385, 38.995, 40.090, 40.606, 51.809, 52.949, 54.506, 61.039, 62.451, 65.683, 68.300-72.780 (PEG), 111.372, 120.942, 123.754, 128.474, 129.733, 132.185, 144.332, 150.106, 153.868, 154.768, 160.141, 171.165. 20

【0098】

[ 実施例20 ] 化合物32

窒素下、無水DCM(20mL)中の31(2.0g, 5.78mmol, 1当量)、2(3.1g, 11.56mmol, 2当量)、およびDMAP(1.76g, 14.45mmol, 2.5当量)の溶液を4時間還流した後、室温に冷却した。この溶液をDCM(100mL)で希釈し、水(50mL)で3回洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(DCM中5~25%MeOH, v/v)により精製し、所望の生成物を得た(2.50g, 87%):  $^{13}\text{C}$  NMR -5.421, 15.994, 18.324, 25.850, 28.282, 40.251, 64.392, 67.413, 68.641, 70.331, 79.304, 126.409, 129.878, 139.171, 147.209, 153.200, 156.041. 30

【0099】

[ 実施例21 ] 化合物33

化合物32(2.5g, 5.027mmol)をアセトニトリル(8mL)および水(8mL)に溶解した後、HOAc(23mL)を加えた。この反応混合物を室温で1.5時間攪拌した後、溶媒を除去した。残渣をDCM(50mL)に溶解し、0.5%重炭酸ナトリウム(3×25mL)、次に、水(25mL)で洗浄した。有機層を無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、溶媒を真空除去し、33(1.556g, 80.8%)を得た:  $^{13}\text{C}$  NMR 15.828, 28.206, 40.187, 53.320, 64.417, 67.489, 68.513, 70.241, 79.278, 82.760, 113.173, 127.279, 130.159, 138.915, 147.580, 153.020, 156.067. 40

【0100】

[ 実施例22 ] 化合物34

ピリジン(0.427mL, 5.277mmol)を無水クロロホルム(31.12mL)中の化合物33(1.556g, 4.059mmol)およびDSC(1.352g, 5.277mmol)の溶液に加えた。この溶液を室温で一晩攪拌した後、溶媒を真空除去した。反応混合物をクロロホルムで50mLに希釈し、0.5N HClで3回洗浄し、無水 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、溶媒を真空除去し、34(1.722g, 81%)を得た:  $^{13}\text{C}$  NMR 15.857, 25.256, 28.210, 40.143, 67.568, 68.507, 70.270, 72.099, 79.249, 129.130, 130.959, 131.094, 148.918, 151.654, 152.845, 156.034, 168.773. 40

【0101】

[ 実施例23 ] 化合物35

窒素下、無水クロロホルム(40mL)中の34(1.37g, 2.61mmol)、27(1.249g, 3.91mmol)、お 50

よびDMAP(0.382g, 3.13mmol)の混合物を室温で一晩攪拌した後、真空濃縮した。残渣をDCM(100mL)に再溶解し、1N HCl(50mL)で3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、濃縮し、所望の生成物を得た(1.85g, 97%):  $^{13}\text{C}$  NMR 15.981, 28.321, 36.820, 39.943, 40.315, 52.244, 53.192, 53.358, 54.804, 66.325, 67.541, 68.539, 70.293, 79.266, 111.983, 112.329, 124.310, 128.610, 130.338, 130.479, 131.081, 133.961, 145.084, 148.028, 152.828, 155.542, 155.875, 172.041。

## 【0102】

## [実施例24] 化合物36

TFA(4.6mL)をDCM(10mL)中の35(1.85g, 2.536mmol)の溶液にゆっくりと加えた。この反応液を室温で1.5時間攪拌した後、真空濃縮した。残渣をDCM-エーテルで再結晶化させ、所望の生成物を得た(1.335g, 71%):  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ) 15.905, 36.846, 39.431, 40.379, 52.321, 53.396, 54.932, 66.273, 66.670, 67.374, 68.936, 112.021, 124.386, 128.585, 130.364, 130.505, 134.204, 145.161, 148.003, 152.995, 155.644, 172.259。

10

## 【0103】

## [実施例25] 化合物37

氷浴中0 でEDC(0.345g, 1.79mmol)およびDMAP(0.77g, 6.29mmol)を無水DCM(100mL)および無水DMF(25mL)中のPEG-cmc-Asp-COOH(25, 7.25g, 0.179mmol)および36(1.34g, 1.79mmol)の混合物に加えた。窒素下、反応混合物を室温で一晩攪拌し、真空濃縮した。残渣をDCM-エーテル、さらにIPAで再結晶化させ、所望の生成物を得た(5.10g, 66.3%)。UVアッセイで測定した生成物中のメルファラン量は2.85重量%であった:  $^{13}\text{C}$  NMR 5.498, 36.214, 38.855, 39.894, 51.706, 52.815, 54.444, 60.947, 62.394, 63.756-73.461 (PEG), 111.438, 123.937, 128.080, 129.892, 133.572, 144.583, 147.462, 152.209, 155.116, 160.467, 170.411, 171.535。

20

## 【0104】

## [実施例26] 化合物10のin vitroおよびin vivoデータ

この実施例では、in vivoおよびin vitroデータを示し、非改変Ara-Cと比較している。

## 【0105】

in vivo

胸腺欠損ヌードマウスにドナーマウスから採取したLX-1の4~5mm<sup>3</sup>組織片を皮下移植した。腫瘍トリカール部位を週2回観察し、触診できるものを週1回測定した。各マウスの腫瘍体積を測径器での二次元測定により調べ、式: 腫瘍体積 = (長さ × 幅<sup>2</sup>)/2により算出した。腫瘍が平均体積90mm<sup>3</sup>に達したときにマウスを非改変Ara-CおよびPEG-Ara-C(化合物10)からなるそれらの試験群に分けた。腫瘍サイズ分布が均等になるようマウスを分類し、4~6マウス/群に群分けし、永久識別のため耳にパンチ穴を開けた。薬物を毎分約0.5mLの速度で尾部静脈から静脈投与した、q3d × 4(1、4、7および10日目)。化合物は、20mg/kgの等モルベース(絶対量の活性成分)で、またそれら各々のMTD(Ara-C、100mg/kg/投与量(毒性); 10, 40mg/kg/投与量(容量))に近い値でも与えた。マウス重量および腫瘍サイズは試験開始時と、第4週まで週2回測定した。薬物の有効性は処置したマウスと処置していない対照マウス(ビヒクルなし)との腫瘍増殖の比較により確認した。比較基準として5種類の指標を用いた: (a)28日目における平均腫瘍体積; (b)各腫瘍体積の原体積からの平均変化率; (c)対照群の腫瘍体積中央値が約800~1100mm<sup>3</sup>に達したとき(対数増殖期)に測定した腫瘍体積の相対率(%T/C); (d)21日目における(~2000mm<sup>3</sup>)腫瘍体積の相対率(%T/C)および(e)各群の腫瘍寛解(28日目の腫瘍体積が1日目と比べて小さくなっている)数。

30

40

## 【0106】

結果

化合物10はわずか20%の活性親化合物量で非改変Ara-Cとほぼ同等の抗腫瘍活性を示した。

## 【表1】



化合物	$t_{1/2}$ (h) <sup>a</sup> ラット血漿	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup> P388/O	LX-1 %T/C <sup>b</sup>
Ara-C	-	10	74.0 (100mg/kg)
化合物 10	14	448	68.2 (20mg/kg)

<sup>a</sup> 全ての試験は2連、37℃で行い、 $t_{1/2}$ はPEG誘導体の消失により測定した。測定値の標準偏差 = ±10%。 10

<sup>b</sup> 平均ベースライン腫瘍体積は1000mm<sup>3</sup>であった。

【0107】

#### in vitroバイオアッセイ

P388/O(マウスリンパ系腫瘍, Southern Research Institute)細胞系を使用して一連のin vitroバイオアッセイを行い、非改変Ara-Cおよび化合物10のIC<sub>50</sub>を調べた。P388/O細胞をRPMI 1640培地(Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland)+10%FBS(Hyclone Inc., Logan UT)で増殖させた。バイオアッセイは抗生物質およびファンギゾンを含有するそれら各々の培地で行った。

【0108】

Ara-CをDMSOに溶解し、培地で好適な濃度に希釈した。PEG-Ara-Cを水に溶解し、培地で好適な濃度に希釈した。 20

【0109】

アッセイを96ウェルマイクロタイター細胞培養プレートで2連で行った。

【0110】

化合物の2倍連続希釈をマイクロタイタープレートで行った。0.1%トリプシン/ベルセンを加えて37℃でインキュベートすることにより細胞を分離した。10%FBSを含有する各細胞系に好適な培地を加えてトリプシンを不活性化した。マイクロタイタープレートの各ウェルに10,000個の細胞を加えた。3日後、代謝性標識色素、Alamar Blueを製造業者のプロトコールに従って添加し、細胞増殖を測定した。試験化合物および参照化合物のIC<sub>50</sub>値は上記に表で示している。 30

【0111】

本発明の好ましい実施形態であると現在考えられるものを記載してきたが、当業者ならば本発明の精神を逸脱しない限り、変形および改変をなしうることが分かるであろう。本発明の真の範囲にあるかかる変形および改変の全てを請求することを意図するものである。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】図1は、実施例1～7で記載する本発明の化合物を製造する方法の概略図である。

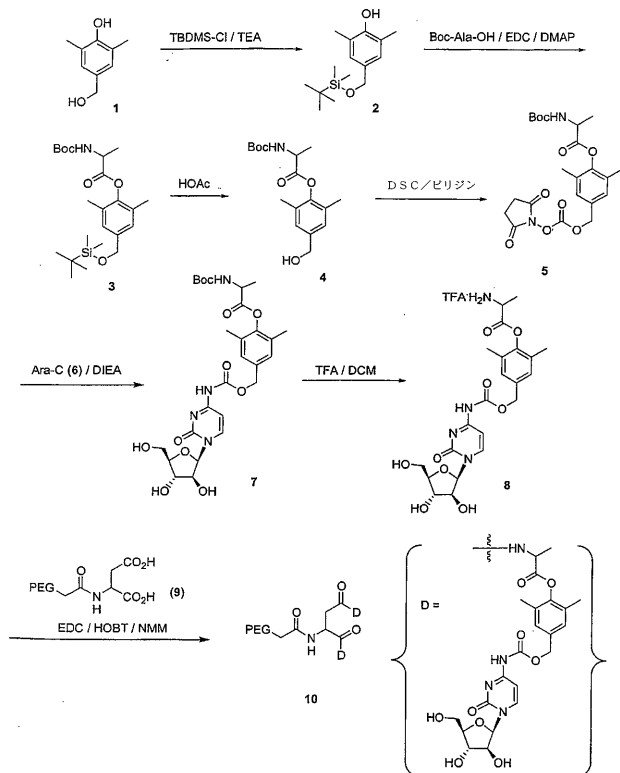
【図2】図2は、実施例8～12で記載する本発明の化合物を製造する方法の概略図である。 40

【図3】図3は、実施例13～15で記載する本発明の化合物を製造する方法の概略図である。

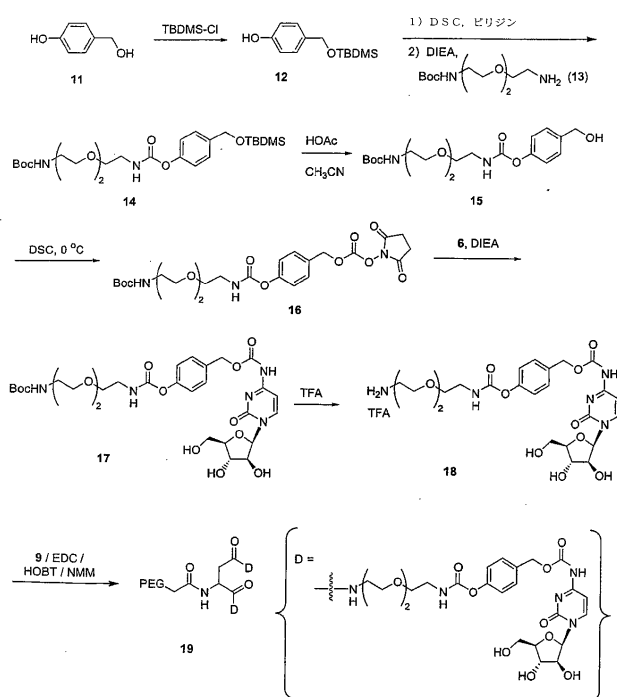
【図4】図4は、実施例16～19で記載する本発明の化合物を製造する方法の概略図である。

【図5】図5は、実施例20～25で記載する本発明の化合物を製造する方法の概略図である。

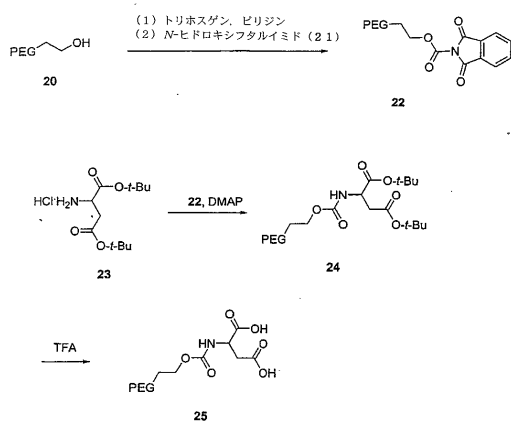
【図 1】



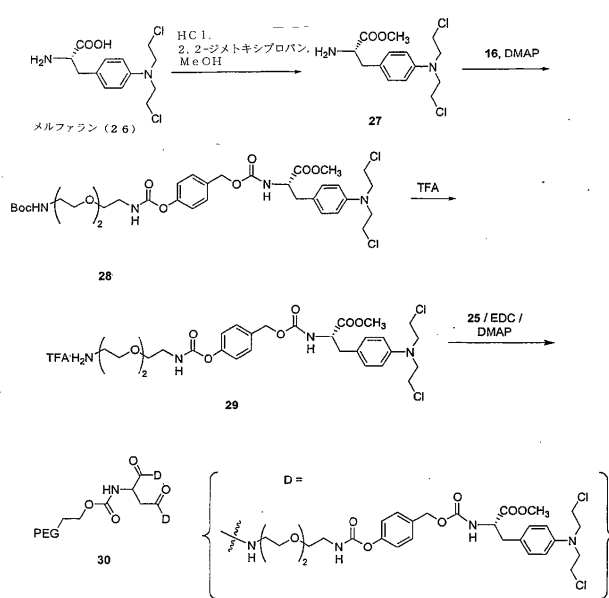
【図 2】



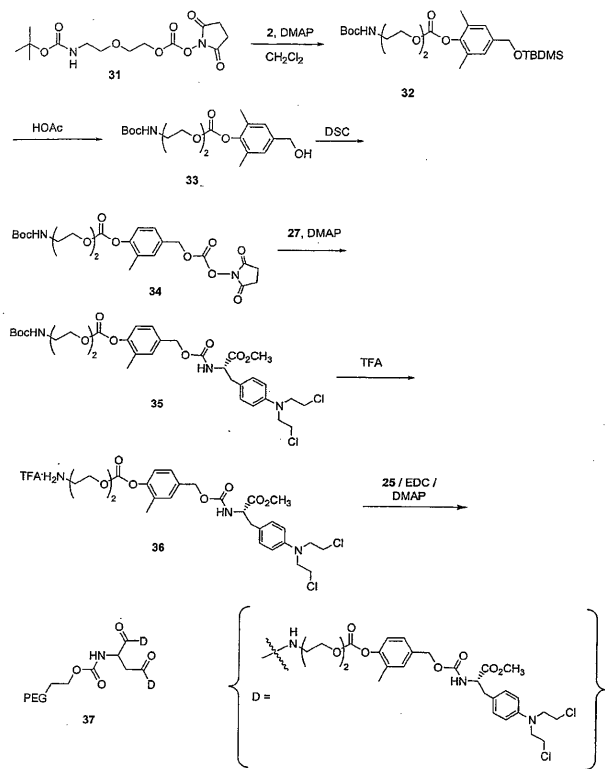
【図 3】



【図 4】



## 【 図 5 】



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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau

(43) International Publication Date  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/065988 A2

(51) International Patent Classification: A61K

(21) International Application Number: PCT/US02/04781

(22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 60/270,009 20 February 2001 (20.02.2001) US

(71) Applicant: ENZON, INC. [US/US]; 20 Kingsbridge Road, Piscataway, NJ 08854 (US).

(72) Inventors: CHOE, Yun, Hwang; 9 Greenbriar Road, Green Brook, NJ 08812 (US); GREENWALD, Richard, B.; 113 Hickory Road, Somerset, NJ 08873 (US).

(74) Agent: MERCANTI, Michael, N.; Roberts & Mercanti, L.L.P., EDC II, 105 Lock Street, Suite 203, Newark, NJ 07103 (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, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

*[Continued on next page]*

(54) Title: TERMINALLY-BRANCHED POLYMERIC LINKERS AND POLYMERIC CONJUGATES CONTAINING THE SAME

(57) Abstract: Terminally-branched polymeric prodrug platforms capable of high degrees of loading are disclosed. In preferred aspects of the invention, the prodrug platform releases multiple parent compounds after each branch holding the active agent undergoes a benzyl elimination reaction. Methods of preparing the prodrugs and using the same in the treatment of mammals are also disclosed. In one preferred aspect, polymeric conjugates such as (I) are provided.

WO 02/065988 A2

---

**WO 02/065988 A2****Published:**

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

*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 02/065988

PCT/US02/04781

TERMINALLY-BRANCHED POLYMERIC LINKERS AND  
POLYMERIC CONJUGATES CONTAINING THE SAME

TECHNICAL FIELD

5 The present invention relates to new types of terminally-activated polymeric materials which are useful in forming long-acting conjugates of bioactive materials. In particular, the invention relates to polymeric-based conjugates having increased therapeutic payloads and methods of preparing the same.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Over the years, several methods of administering biologically-effective materials to mammals have been proposed. Many medicinal agents are available as water-soluble salts and can be included in pharmaceutical formulations relatively easily. Problems arise when the desired medicinal agent is either insoluble in aqueous fluids or is rapidly degraded in vivo. Alkaloids are often especially difficult to solubilize.

15 One way to solubilize medicinal agents is to include them as part of a soluble prodrug. Prodrugs include chemical derivatives of a biologically-active parent compound which, upon administration, eventually liberate the parent compound in vivo. Prodrugs allow the artisan to modify the onset and/or duration of action of an agent in vivo and can modify the transportation, distribution or solubility of a drug in the body. Furthermore, prodrug formulations often reduce the toxicity and/or otherwise overcome difficulties  
20 encountered when administering pharmaceutical preparations. Typical examples of prodrugs include organic phosphates or esters of alcohols or thioalcohols. See Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., A. Osol, Ed. (1980), the disclosure of which is incorporated by reference herein.

25 Prodrugs are often biologically inert or substantially inactive forms of the parent or active compound. The rate of release of the active drug, i.e. the rate of hydrolysis, is

WO 02/065988

PCT/US02/04781

influenced by several factors but especially by the type of bond joining the parent drug to the modifier. Care must be taken to avoid preparing prodrugs which are eliminated through the kidney or reticular endothelial system, etc. before a sufficient amount of hydrolysis of the parent compound occurs.

5 Incorporating a polymer as part of a prodrug system has been suggested to increase the circulating life of a drug. However, it has been determined that when only one or two polymers of less than about 10,000 daltons each are conjugated to certain biologically active substances such as alkaloid compounds, the resulting conjugates are rapidly eliminated in vivo, especially if a somewhat hydrolysis-resistant linkage is used. 10 In fact, such conjugates are so rapidly cleared from the body that even if a hydrolysis-prone ester linkage is used, not enough of the parent molecule is regenerated in vivo to be therapeutic.

Camptothecin and related biologically active analogs are often poorly water soluble and are examples of substances which would benefit from PEG prodrug technology. A brief overview of some previous work in the field is presented below.

15 Ohya, et al., J. Bioactive and Compatible Polymers Vol. 10 Jan., 1995, 51-66, disclose doxorubicin-PEG conjugates which are prepared by linking the two substituents via various linkages including esters. The molecular weight of the PEG used, however, is only about 5,000 at most. Thus, the in vivo benefits are not fully realized because the 20 conjugates are substantially excreted prior to sufficient linkage hydrolysis.

U.S. Patent No. 4,943,579 discloses certain simple 20(S)-camptothecin amino acid esters in their salt forms as water soluble prodrugs. The reference does not, however, disclose using an amino acid as part of a linkage which would attach the alkaloid to a relatively high molecular weight polymer in order to form a prodrug. As evidenced by the 25 data provided in Table 2 of the '579 patent, hydrolysis is rapid. Consequently, at physiologic pH, the insoluble base is rapidly generated after injection, binds to proteins and is quickly eliminated from the body before a therapeutic effect can be achieved. A related effort was directed to developing a water-soluble camptothecin sodium salt. Unfortunately, the water-soluble sodium salt of camptothecin remained too toxic for 30 clinical application (Gottlieb et al., 1970 Cancer Chemother. Rep. 54, 461; Moertel et al., 1972 ibid. 56, 95; Gottlieb et al., 1972 ibid. 56, 103).

WO 02/065988

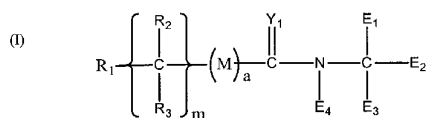
PCT/US02/04781

Commonly-assigned PCT publication WO96/23794 describes bis-conjugates in which one equivalent of the hydroxyl-containing drug is attached to each terminal of the polymer. In spite of this advance, techniques which would further increase the payload of the polymer have been sought.

Thus, there continues to be a need to provide additional technologies for forming prodrugs of therapeutic moieties such as camptothecin and related analogs. The present invention addresses this need.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect of the invention, compounds of Formula (I) are provided:



wherein:

$R_1$  is a polymeric residue;

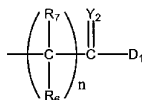
$Y_1$  is O, S or  $NR_4$ ;

$M$  is O, S or  $NR_5$ ;

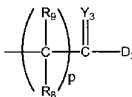
$(m)$  is zero or a positive integer, preferably 1 or 2;

$(a)$  is zero or one;

$E_1$  is



$E_{2,4}$  are independently H,  $E_1$  or



$(n)$  and  $(p)$  are independently 0 or a positive integer;

$Y_{2,3}$  are independently O, S or  $NR_{10}$ ;

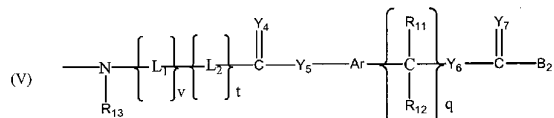
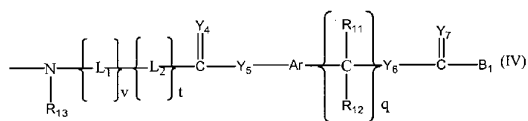
$R_{2-10}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,

$C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  hetero-



WO 02/065988

PCT/US02/04781

alkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> are independently OH,

5 or additional terminal branching groups described below.

Within formulae (IV) and (V), the variables (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6, and preferably about 1;

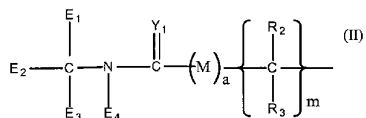
(q) is zero or a positive integer, preferably one;

L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> are independently selected bifunctional linkers;10 Y<sub>4,7</sub> are independently selected from the group consisting of O, S and NR<sub>14</sub>;R<sub>11-14</sub> are independently selected from the group consisting of hydrogen,C<sub>1-6</sub> alkyls, C<sub>3-12</sub> branched alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls,C<sub>3-8</sub> substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substitutedC<sub>1-6</sub> heteroalkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

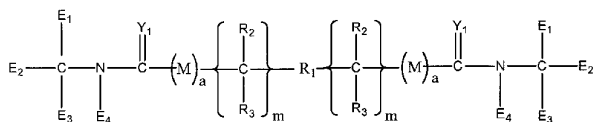
15 Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group; and

B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> are independently selected from the group consisting of leaving groups, OH, residues of hydroxyl-containing moieties or amine-containing moieties.

20 In one particularly preferred aspect of the invention, the polymeric residue is also substituted or capped on the distal portion with a moiety of formula (II) below:



5 where all variables are as previously defined. Bifunctional compounds are thus formed when the polymeric residue ( $R_1$ ) includes both an alpha and an omega terminal linking group so that two, four or more equivalents of a biologically active agent, drug or protein, designated herein as  $B_1$  or  $B_2$  can be delivered. An example of such a bifunctional polymer transport form is illustrated below as formula (III):



10 (III)

wherein all variables are as described above.

For purposes of the present invention, the term "residue" shall be understood to mean that portion of a biologically active compound which remains after the biologically active compound has undergone a substitution reaction in which the prodrug carrier portion has been attached.

For purposes of the present invention, the term "alkyl" shall be understood to include straight, branched, substituted, e.g. halo-, alkoxy-, and nitro-, C<sub>1-12</sub> alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls or substituted cycloalkyls, etc.

For purposes of the present invention, the term “substituted” shall be understood to include adding or replacing one or more atoms contained within a functional group or compound with one or more different atoms.

For purposes of the present invention, substituted alkyls include carboxyalkyls, aminoalkyls, dialkylaminos, hydroxyalkyls and mercaptoalkyls; substituted cycloalkyls include moieties such as 4-chlorocyclohexyl; aryls include moieties such as naphthyl; substituted aryls include moieties such as 3-bromo-phenyl; aralkyls include moieties such

WO 02/065988

PCT/US02/04781

as tolyl; heteroalkyls include moieties such as ethylthiophene; substituted heteroalkyls include moieties such as 3-methoxy-thiophene; alkoxy includes moieties such as methoxy; and phenoxy includes moieties such as 3-nitrophenoxy. Halo- shall be understood to include fluoro, chloro, iodo and bromo.

The term "sufficient amounts" for purposes of the present invention shall mean an amount which achieves a therapeutic effect as such effect is understood by those of ordinary skill in the art.

One of the chief advantages of the compounds of the present invention is that the prodrugs have a higher payload per unit of polymer than previous techniques. It is generally preferred that the polymeric first releases the benzyl elimination (BE) based prodrug intermediate by hydrolysis and then the resultant intermediate or "second prodrug" moiety undergoes a 1,4- or 1,6-aryl (e.g., benzyl) elimination reaction to regenerate, for example, a moiety which is either a biologically active compound or a composition comprising a further prodrug. The high payload polymeric conjugates of the present invention are thus unique delivery systems which can contain up to four or a greater number of molecules of a drug.

Methods of making and using the compounds and conjugates described herein are also provided.

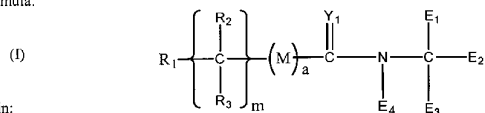
#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

Figures 1 -5 schematically illustrate methods of forming compounds of the present invention which are described in the Examples.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

##### **A. FORMULA (I)**

In one preferred embodiment of the invention, there are provided compounds of the formula:



wherein:

$R_1$  is a polymeric residue;

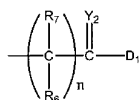
WO 02/065988

PCT/US02/04781

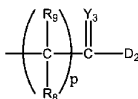
$Y_1$  is O, S or  $NR_4$ ;

M is O, S or  $NR_5$ ;

$E_1$  is



$E_{2,4}$  are independently H,  $E_1$  or



(a) is zero or one;

(m) is zero or a positive integer;

(n) and (p) are independently 0 or a positive integer;

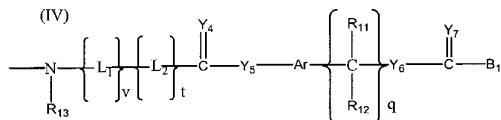
$Y_{2,3}$  are independently O, S or  $NR_{10}$ ;

$R_{2,10}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,

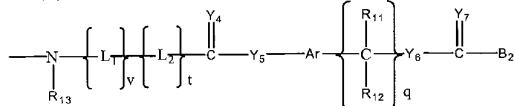
$C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy;

$D_1$  and  $D_2$  are independently OH.

(IV)



(V)



wherein (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6, and preferably about 1;

(q) is zero or a positive integer, preferably one;

WO 02/065988

PCT/US02/04781

$L_1$  and  $L_2$  are independently selected bifunctional linkers;

$Y_{4,7}$  are independently selected from the group consisting of O, S and  $NR_{14}$ ;

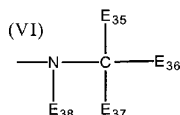
$R_{11-14}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,

$C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-6}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy;

Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group;

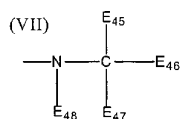
$B_1$  and  $B_2$  are independently selected from the group consisting of leaving groups,  $OH$ , residues of hydroxyl-containing moieties or amine-containing moieties.

In another preferred embodiment,  $D_1$  and  $D_2$  are independently selected terminal branching groups of formula (VI)



wherein  $E_{35-38}$  are selected from the same group which defines  $E_{1-4}$  above, except that within the definition,  $D_1$  and  $D_2$  are changed to  $D'_1$  and  $D'_2$  which are defined below.

Within this embodiment,  $D'_1$  and  $D'_2$  can be independently  $OH$ , a moiety of formula (IV) or (V), or



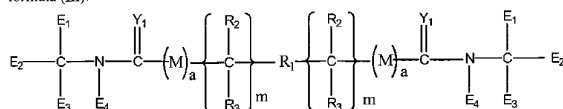
wherein  $E_{45-48}$  are selected from the same group which defines  $E_{1-4}$ , except that within the definition  $D_1$  and  $D_2$  are changed to  $D''_1$  and  $D''_2$  and  $D''_3$ , and  $D''_3$  are independently  $OH$ , formula (IV) or formula (V). As can be appreciated from the above, when the terminal branching is taken to its fullest extent with a bifunctional polymer  $R_{11}$ , up to sixteen (16) equivalents of drug can be loaded onto the polymeric platform.

In those aspects of this embodiment where bis-substituted polymeric residues are desired, some preferred polymeric transport systems of the invention are shown below as

WO 02/065988

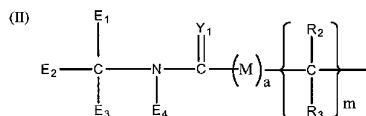
PCT/US02/04781

formula (III):



wherein all variables are as previously described.

The multi-loading polymer transport system of the present invention is based in large part on the polymeric residue designated herein as R<sub>1</sub>. Optionally, R<sub>1</sub> includes a capping group A. The polymer capping group A includes, for example, moieties such as hydrogen, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub> alkyl moieties, and compounds of formula (II) shown below, which forms a bis-system:



wherein all variables are as previously described. It will be understood and appreciated that the multiple terminal branching described above applies equally in the bis-systems as well.

With regard to the other variables which comprise the formulae of the present invention, the following are preferred:

Y<sub>1,4</sub> and Y<sub>7</sub> are each oxygen;

R<sub>2,4</sub> are each preferably hydrogen or lower alkyl, e.g. C<sub>1-6</sub>;

(m) is 1 or 2;

(n) and (p) are each either zero or an integer from 1-4;

(v) is zero or 1;

(t) is 1;

L<sub>1</sub> is -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-7</sub>; and

L<sub>2</sub> is one of -CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>C(O)NHCH(CH<sub>3</sub>)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH- or -CH<sub>2</sub>C(O)NHCH(CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)-

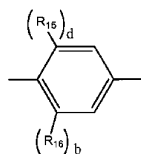
WO 02/065988

PCT/US02/04781

**B. DESCRIPTION OF THE Ar MOIETY**

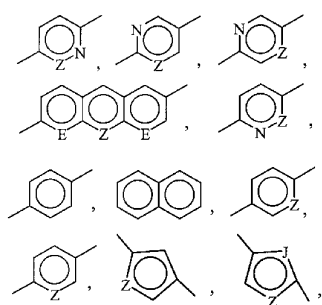
Referring to Formula (I), it can be seen that the Ar is a moiety, which when included in Formula (I), forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-

substituted heterocyclic group. A key feature is that the Ar moiety is aromatic in nature. Generally, to be aromatic, the  $\pi$  electrons must be shared within a "cloud" both above and below the plane of a cyclic molecule. Furthermore, the number of  $\pi$  electrons must satisfy the Hückle rule ( $4n+2$ ). Those of ordinary skill will realize that a myriad of moieties will satisfy the aromatic requirement of the moiety and thus are suitable for use herein. Some particularly preferred aromatic groups include:



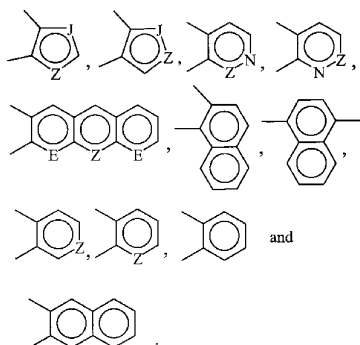
where  $R_{15,16}$  are individually selected from the same group which defines  $R_2$  and (b) and (d) are independently zero or one.

Other preferred aromatic hydrocarbon moieties include, without limitation:



WO 02/065988

PCT/US02/04781



In the above-listed aromatic moieties, J is O, S, or N-R<sub>17</sub>, E and Z are independently C-R<sub>18</sub> or N-R<sub>19</sub>, and R<sub>17,19</sub> are independently selected from the same group as that which defines R<sub>2</sub> in Formula (I) e.g., hydrogen, C<sub>1-8</sub> alkyls, etc. Isomers of the five and six-membered rings are also contemplated as well as benzo- and dibenzo- systems and their related congeners are also contemplated. It will also be appreciated by the artisan of ordinary skill that the aromatic rings can optionally be substituted with hetero-atoms such as O, S, NR<sub>17</sub>, etc. so long as Hückel's rule is obeyed. Furthermore, the aromatic or heterocyclic structures may optionally be substituted with halogen(s) and/or side chains as those terms are commonly understood in the art. However, all structures suitable for Ar moieties of the present invention are capable of allowing the Y<sub>5</sub> and C(R<sub>11</sub>)(R<sub>12</sub>) moieties to be in a *para* or an *ortho* arrangement with the same plane.

#### C. DRUG GENERATION VIA HYDROLYSIS OF THE PRODRUG

The prodrug compounds of the present invention are designed so that the t<sub>1/2</sub> of hydrolysis is < t<sub>1/2</sub> elimination in plasma.

The linkages included in the compounds have hydrolysis rates in the plasma of the mammal being treated which is short enough to allow sufficient amounts of the parent compounds, i.e. the amino- or hydroxyl-containing bioactive compound, to be released prior to elimination. Some preferred compounds of the present invention have a t<sub>1/2</sub> for



WO 02/065988

PCT/US02/04781

hydrolysis in plasma ranging from about 5 minutes to about 12 hours. Preferably, the compositions have a plasma  $t_{1/2}$  hydrolysis ranging from about 0.5 to about 8 hours and most preferably from about 1 to about 6 hours.

#### D. SUBSTANTIALLY NON-ANTIGENIC POLYMERS

As stated above,  $R_1$  is a water soluble polymeric residue which is preferably substantially non-antigenic such as a polyalkylene oxide (PAO) or polyethylene glycol (PEG). In preferred aspects of the invention,  $R_1$  further includes the previously mentioned capping group, designated herein as A, which allows a bifunctional or bis-polymer system to be formed.

As an example, the PEG residue portion of the inventive compositions can be selected from the following non-limiting list:

$-C(=Y_8)-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ ,  
 $-C(=Y_8)-Y_9-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ ,  
 $-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ ,  
 $-(CR_{21}R_{22})_e-O-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ ,  
 $-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-A$ ,  
 $-C(=Y_8)-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-C(=Y_8)-$ ,  
 $-C(=Y_8)-Y_9-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-Y_9-C(=Y_8)-$ ,  
 $-C(=Y_8)-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-NR_{20}-C(=Y_8)-$ ,  
 $-(CR_{21}R_{22})_e-O-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-O-(CR_{21}R_{22})_e-$ , and  
 $-NR_{20}-(CH_2)_f-O-(CH_2CH_2O)_x-(CH_2)_f-NR_{20}-$

wherein:

$Y_8$  and  $Y_9$  are independently O, S or  $NR_{20}$ ;

x is the degree of polymerization;

$R_{20}$ ,  $R_{21}$ , and  $R_{22}$  are independently selected from among H,  $C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy;

e and f are independently zero, one or two; and

A is a capping group.

The degree of polymerization for the polymer (x) can be from about 10 to about

WO 02/065988

PCT/US02/04781

2,300. This represents the number of repeating units in the polymer chain and is dependent on the molecular weight of the polymer. The (A) moiety is a capping group as defined herein, i.e. a group which is found on the terminal of the polymer and, in some aspects, can be selected from any of H, NH<sub>2</sub>, OH, CO<sub>2</sub>H, C<sub>1-6</sub> alkyls or other PEG terminal activating groups, as such groups are understood by those of ordinary skill.

Also useful are polypropylene glycols, branched PEG derivatives such as those described in commonly-assigned U.S. Patent No. 5,643,575, "star-PEG's" and multi-armed PEG's such as those described in Shearwater Polymers, Inc. catalog "Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998". The disclosure of each of the foregoing is incorporated herein by reference. It will be understood that the water-soluble polymer can be functionalized for attachment to the bifunctional linkage groups if required without undue experimentation.

In a further embodiment R<sub>1</sub> is optionally selected from among one or more of dextran, polyvinyl alcohols, carbohydrate-based polymers, hydroxypropylmethacrylamide, polyalkylene oxides, and/or copolymers thereof. See also commonly-assigned U.S. Patent No. 6,153,655, the contents of which are incorporated herein by reference.

In many aspects of the present invention, bis-activated polyethylene glycols are preferred when di- or more substituted polymer conjugates are desired. Alternatively, polyethylene glycols (PEG's), mono-activated, C<sub>1-4</sub> alkyl-terminated polyalkylene oxides (PAO's) such as mono-methyl-terminated polyethylene glycols (mPEG's) are preferred when mono-substituted polymers are desired.

In order to provide the desired hydrolyzable linkage, mono- or di-acid activated polymers such as PEG acids or PEG diacids can be used as well as mono- or di-PEG amines and mono- or di-PEG diols. Suitable PAO acids can be synthesized by first converting mPEG-OH to an ethyl ester followed by saponification. See also Gehrhardt, H., et al. Polymer Bulletin 18: 487 (1987) and Veronese, F.M., et al., J. Controlled Release 10: 145 (1989). Alternatively, the PAO-acid can be synthesized by converting mPEG-OH into a *t*-butyl ester followed by acid cleavage. See, for example, commonly assigned U.S. Patent No. 5,605,976. The disclosures of each of the foregoing are incorporated by reference herein.

Although PAO's and PEG's can vary substantially in average molecular weight, the polymer portion of the prodrug is at least about 20,000 weight average in most aspects

WO 02/065988

PCT/US02/04781

of the invention. Preferably, R<sub>1</sub> has a weight average molecular weight of from about 20,000 to about 100,000 and more preferably from about 25,000 to about 60,000. The average molecular weight of the polymer selected for inclusion in the prodrug must be sufficient so as to provide sufficient circulation of the prodrug before hydrolysis of the linker.

The polymeric substances included herein are preferably water-soluble at room temperature. A non-limiting list of such polymers include polyalkylene oxide homopolymers such as polyethylene glycol (PEG) or polypropylene glycols, polyoxyethylenated polyols, copolymers thereof and block copolymers thereof, provided that the water solubility of the block copolymers is maintained.

As an alternative to PAO-based polymers, effectively non-antigenic materials such as dextran, polyvinyl alcohols, carbohydrate-based polymers, hydroxypropylmethacrylamide (HPMA), and copolymers thereof etc. and the like can be used if the same type of activation is employed as described herein for PAO's such as PEG. Those of ordinary skill in the art will realize that the foregoing list is merely illustrative and that all polymeric materials having the qualities described herein are contemplated. For purposes of the present invention, "effectively non-antigenic" and "substantially non-antigenic" shall be understood to include all polymeric materials understood in the art as being substantially non-toxic and not eliciting an appreciable immune response in mammals.

It will be clear from the foregoing that other polyalkylene oxide derivatives of the foregoing, such as the polypropylene glycol acids, etc., as well as other bi-functional linking groups are also contemplated.

#### E. PRODRUG CANDIDATES

##### 1. Residues of Hydroxyl-containing Compounds

###### a. Camptothecin and Related Topoisomerase I Inhibitors

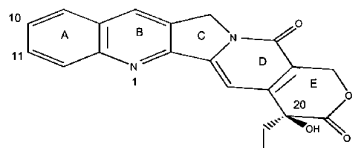
Camptothecin is a water-insoluble cytotoxic alkaloid produced by *Camptotheca accuminata* trees indigenous to China and *nothapodytes foetida* trees indigenous to India. Camptothecin and related compounds and analogs are also known to be potential anticancer or antitumor agents and have been shown to exhibit these activities *in vitro* and *in vivo*. Camptothecin and related compounds are also candidates for conversion to the

WO 02/065988

PCT/US02/04781

prodrugs of the present invention.

Camptothecin and certain related analogues share the structure:



From this core structure, several known analogs have been prepared. For example, the A ring in either or both of the 10- and 11-positions can be substituted with an OH. The A ring can also be substituted in the 9-position with a straight or branched C<sub>1-30</sub> alkyl or C<sub>1-17</sub> alkoxy, optionally linked to the ring by a heteroatom i.e., O or S. The B ring can be substituted in the 7-position with a straight or branched C<sub>1-30</sub> alkyl or substituted alkyl-, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl, C<sub>1-30</sub> alkoxy, phenyl alkyl, etc., alkyl carbamate, alkyl carbazides, phenyl hydrazine derivatives, amino-, aminoalkyl-, aralkyl, etc. Other substitutions are possible in the C, D and E rings. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,004,758; 4,943,579; Re 32,518, the contents of which are incorporated herein by reference. Such derivatives can be made using known synthetic techniques without undue experimentation. Preferred camptothecin derivatives for use herein include those which include a 20-OH or another OH moiety which is capable of reacting directly with activated forms of the polymer transport systems described herein or to the linking moiety intermediates, e.g. iminodiacetic acid, etc., which are then attached to a polymer such as PEG. Reference to camptothecin analogs herein has been made for purposes of illustration and not limitation.

#### b. Taxanes and Paclitaxel Derivatives

One class of compounds included in the prodrug compositions of the present invention is taxanes. For purposes of the present invention, the term "taxane" includes all compounds within the taxane family of terpenes. Thus, taxol (paclitaxel), 3'-substituted tert-butoxy-carbonyl-amine derivatives (taxoteres) and the like as well as other analogs which are readily synthesized using standard organic techniques or are available from commercial sources such as Sigma Chemical of St. Louis, Missouri are within the scope

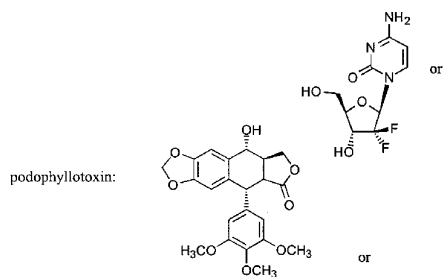
WO 02/065988

PCT/US02/04781

of the present invention. These derivatives have been found to be effective anti-cancer agents. Numerous studies indicate that the agents have activity against several malignancies. To date, their use has been severely limited by, among other things, their short supply, poor water solubility and a tendency to cause hypersensitivity. It is to be understood that other taxanes including the 7-aryl-carbamates and 7-carbazates disclosed in commonly assigned U.S. Patent Nos. 5,622,986 and 5,547,981 can also be included in the prodrugs of the present invention. The contents of the foregoing U.S. patents are incorporated herein by reference. Paclitaxel is a preferred taxane.

c. Additional Biologically-Active Moieties

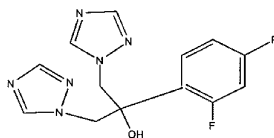
In addition to the foregoing molecules, the prodrug formulations of the present invention can be prepared using many other compounds. For example, biologically-active compounds such as bis-PEG conjugates derived from compounds such as gemcitabine:



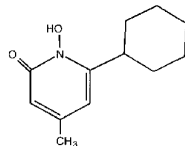
WO 02/065988

PCT/US02/04781

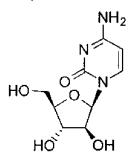
triazole-based antifungal agents such as fluconazole:



or ciclopirox:



or Ara-C:



or known derivatives thereof, including N<sup>6</sup> amino acid derivatives such as leu-Ara-C.

The parent compounds selected for prodrug forms need not be substantially water-insoluble, although the polymer-based prodrugs of the present invention are especially well suited for delivering such water-insoluble compounds. Other useful parent compounds include, for example, certain low molecular weight biologically active proteins, enzymes and peptides, including peptido glycans, as well as other anti-tumor agents; cardiovascular agents such as forskolin; anti-neoplastics such as combretastatin, vinblastine, doxorubicin, maytansine, etc.; anti-infectives such as vancomycin, erythromycin, etc.; anti-fungals such as nystatin, amphotericin B, triazoles, papulocandins, pneumocandins, echinocandins, polyoxins, nikkomycins, pradimicins, benanomicins, etc. see, "Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development" Ann. Rev. Microbiol. 1994, 48:471-97, the contents of which are incorporated herein by reference; anti-anxiety agents, gastrointestinal agents, central nervous system-activating

WO 02/065988

PCT/US02/04781

agents, analgesics, fertility or contraceptive agents, anti-inflammatory agents, steroidal agents, anti-urecemic agents, cardiovascular agents, vasodilating agents, vasoconstricting agents and the like.

The foregoing is illustrative of the biologically active moieties which are suitable for the prodrugs of the present invention. It is to be understood that those biologically active materials not specifically mentioned but having suitable ester-forming groups, i.e. hydroxyl moieties, are also intended and are within the scope of the present invention. It is also to be understood that the prodrug conjugates of the present invention may also include minor amounts of compounds containing not only one equivalent of drug and polymer but also a moiety which does not effect bioactivity *in vivo*. For example, it has been found that in some instances, in spite of reacting diacids with drug molecules having a single linkage point, the reaction conditions do not provide quantitative amounts of prodrugs with two equivalents of drug per polymer. By-products of the reactants can sometimes be formed such as acyl ureas if carbodiimides are used.

## 2. Residues of Amine-containing Compounds

In some aspects of the invention, B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> is a residue of an amine-containing compound, a non-limiting list of such suitable compounds include residues of organic compounds, enzymes, proteins, polypeptides, etc. Organic compounds include, without limitation, moieties such as anthracycline compounds including daunorubicin, doxorubicin; *p*-aminoaniline mustard, melphalan, Ara-C (cytosine arabinoside) and related anti-metabolite compounds, e.g., gemcitabine, etc. Alternatively, B can be a residue of an amine-containing cardiovascular agent, anti-neoplastic, anti-infective, anti-fungal such as nystatin and amphotericin B, anti-anxiety agent, gastrointestinal agent, central nervous system-activating agent, analgesic, fertility agent, contraceptive agent, anti-inflammatory agent, steroidal agent, anti-urecemic agent, vasodilating agent, vasoconstricting agent, etc.

In a preferred aspect of the invention, the amino-containing compound is a biologically active compound that is suitable for medicinal or diagnostic use in the treatment of animals, e.g., mammals, including humans, for conditions for which such treatment is desired. The foregoing list is meant to be illustrative and not limiting for the compounds which can be modified. Those of ordinary skill will realize that other such compounds can be similarly modified without undue experimentation. It is to be

WO 02/065988

PCT/US02/04781

understood that those biologically active materials not specifically mentioned but having suitable amino-groups are also intended and are within the scope of the present invention.

The only limitations on the types of amino-containing molecules suitable for inclusion herein is that there is available at least one (primary or secondary) amine-containing position which can react and link with a carrier portion and that there is not substantial loss of bioactivity after the prodrug system releases and regenerates the parent compound.

It is noted that parent compounds suitable for incorporation into the prodrug compositions of the invention, may themselves be substances/compounds which are not active after hydrolytic release from the linked composition, but which will become active after undergoing a further chemical process/reaction. For example, an anticancer drug that is delivered to the bloodstream by the double prodrug transport system, may remain inactive until entering a cancer or tumor cell, whereupon it is activated by the cancer or tumor cell chemistry, e.g., by an enzymatic reaction unique to that cell.

### 3. Leaving Groups

In those aspects where B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> is a leaving group, suitable leaving groups include, without limitations, moieties such as N-hydroxybenzotriazolyl, halogen, N-hydroxyphthalimidyl, p-nitrophenoxy, imidazolyl, N-hydroxysuccinimidyl, thiazolidinyl thione, or other good leaving groups as will be apparent to those of ordinary skill. The synthesis reactions used and described herein will be understood by those of ordinary skill without undue experimentation.

For example, an acylated intermediate of formula (I) can be reacted with a reactant such as 4-nitrophenyl chloroformate, disuccinimidyl carbonate (DSC), carbonyldiimidazole, thiazolidine thione, etc. to provide the desired activated derivative.

The selective acylation of the phenolic or anilinic portion of the p-hydroxybenzyl alcohol or the p-aminobenzyl alcohol and the o-hydroxybenzyl alcohol or the o-amino-benzyl alcohol can be carried out with, for example, thiazolidine thione activated polymers, succinimidyl carbonate activated polymers, carboxylic acid activated polymers, blocked amino acid derivatives. Once in place, the "activated" form of the PEG prodrug (or blocked prodrug) is ready for conjugation with an amine- or hydroxyl-containing compound.



WO 02/065988

PCT/US02/04781

**F. SYNTHESIS OF THE POLYMERIC PRODRUG TRANSPORT SYSTEM**

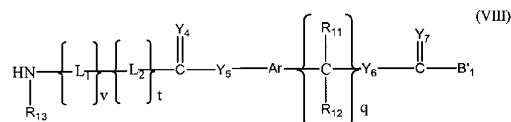
Synthesis of representative polymer prodrugs is set forth in the Examples.

Generally, however, in one preferred method of preparing the prodrug transport systems, the polymer residue is first attached to the branching groups. Separately, the biologically active moiety or drug, e.g. Drug-OH or Drug-NH<sub>2</sub> (B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> of formula I) is attached to the BE component which may also include a bifunctional spacer thereon at point of attachment to the polymer. Next, the polymeric residue containing the terminal branches is reacted with the drug-BE portion under conditions sufficient to form the final product.

Attachment of the bifunctional spacer containing the BE- Drug component to the polymer portion is preferably carried out in the presence of a coupling agent. A non-limiting list of suitable coupling agents include 1,3-diisopropylcarbodiimide (DIPC), any suitable dialkyl carbodiimides, 2-halo-1-alkyl-pyridinium halides, (Mukaiyama reagents), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide (EDC), propane phosphonic acid cyclic anhydride (PPACA) and phenyl dichlorophosphates, etc. which are available, for example from commercial sources such as Sigma-Aldrich Chemical, or synthesized using known techniques.

Preferably the substituents are reacted in an inert solvent such as methylene chloride, chloroform, DMF or mixtures thereof. The reaction also preferably is conducted in the presence of a base, such as dimethylaminopyridine, diisopropylethylamine, pyridine, triethylamine, etc. to neutralize any acids generated and at a temperature from 0°C up to about 22°C (room temperature).

More particularly, one method of preparing a polymeric transport system includes reacting a compound of the formula (VIII):



wherein (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6, and preferably about 1;

L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> are independently selected bifunctional linkers;

Y<sub>4,7</sub> are independently selected from the group consisting of O, S and NR<sub>14</sub>;

WO 02/065988

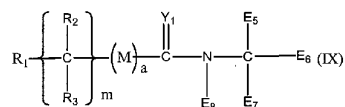
PCT/US02/04781

$R_{11-14}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,  $C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy;

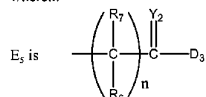
Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group; and

$B'_1$  is a residue of a hydroxyl- or an amine-containing moiety;

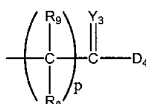
with a compound of the formula (IX):



wherein

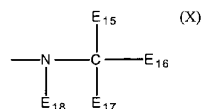


$E_{6-8}$  are independently H,  $E_5$  or



wherein  $D_3$  and  $D_4$  are independently OH, a leaving group which is capable of reacting with an unprotected amine or hydroxyl or a terminal branching group.

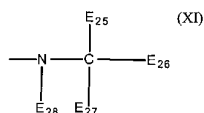
In further aspects of the method,  $D_3$  and  $D_4$  are independently selected terminal branching groups of the formula (X):



where  $E_{15-18}$  are selected from the same group which defines  $E_{5-8}$ , except that  $D_3$  and  $D_4$  are changed to  $D'_3$  and  $D'_4$ , where  $D'_3$  and  $D'_4$  are independently OH, a moiety of formula (IV) or (V), or

WO 02/065988

PCT/US02/04781

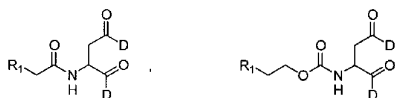


wherein  $E_{25,28}$  are selected from the same group which defines  $E_{2,3}$ , except that  $D_3$  and  $D_4$  are changed to  $D''_3$  and  $D''_4$  which are defined as being independently OH or a leaving group which is capable of reacting with an unprotected amine or hydroxyl.

5 Such synthetic techniques allow up to sixteen (16) equivalents of carboxylic acid or activated carboxylic acid, for example, to be attached. As shown in the preferred structures herein, PEG residues with terminally branched multi-acids are preferred aspects of the invention.

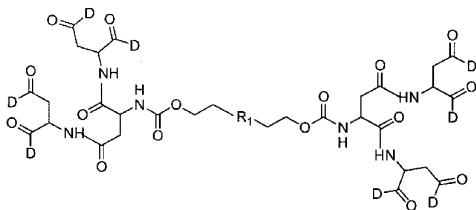
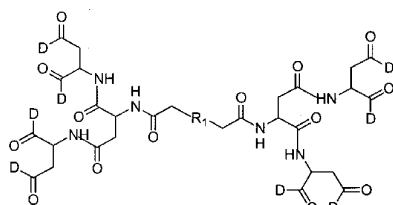
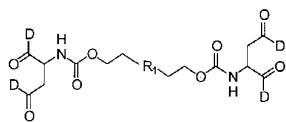
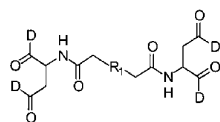
Returning to formula (IX),  $R_1$  is a polymeric residue;  $Y_1$  is O, S or  $NR_4$ ; M is O, S or  $NR_5$ ; (n) and (p) are independently 0 or a positive integer;  $Y_{2,3}$  are independently O, S or  $NR_{10}$ ; and  $R_{2,10}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen, 10  $C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3-12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy.

15 Regardless of the synthesis selected, some of the preferred compounds which result from the synthesis techniques described herein include:



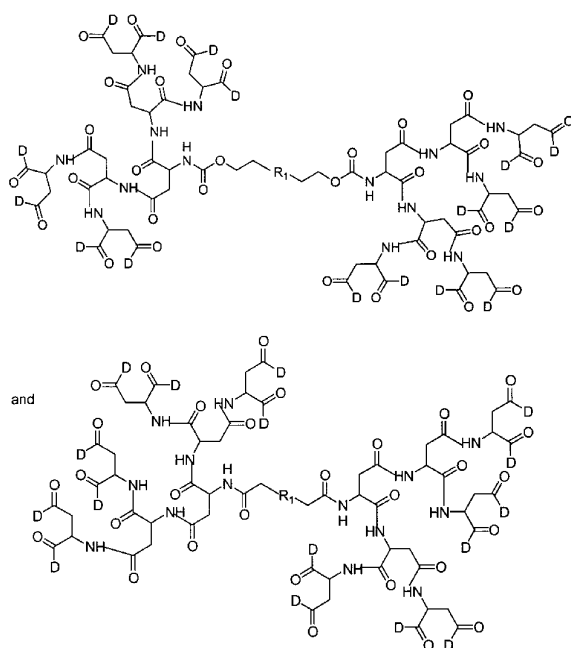
WO 02/065988

PCT/US02/04781



WO 02/065988

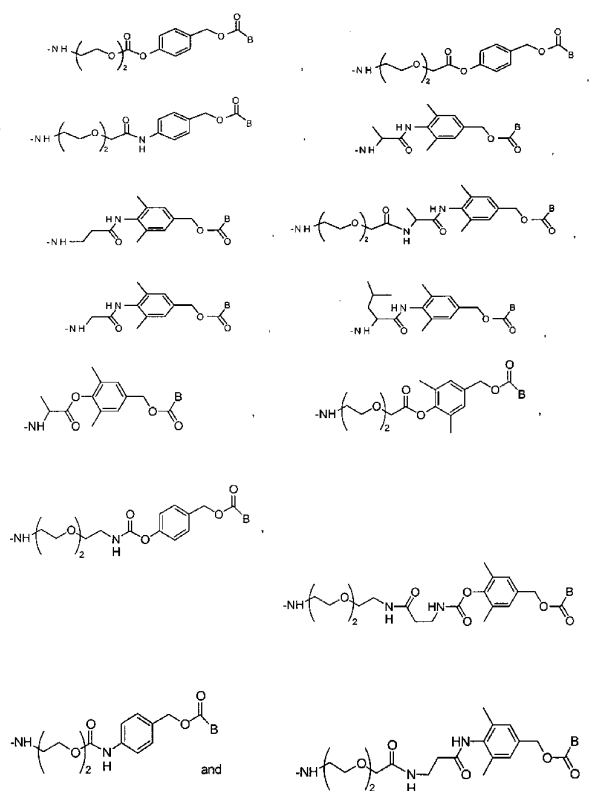
PCT/US02/04781



wherein R<sub>1</sub> is a polymer residue such as a PAO or PEG residue and D is OH, formula (IV)  
or (V). Preferably, D is

WO 02/065988

PCT/US02/04781

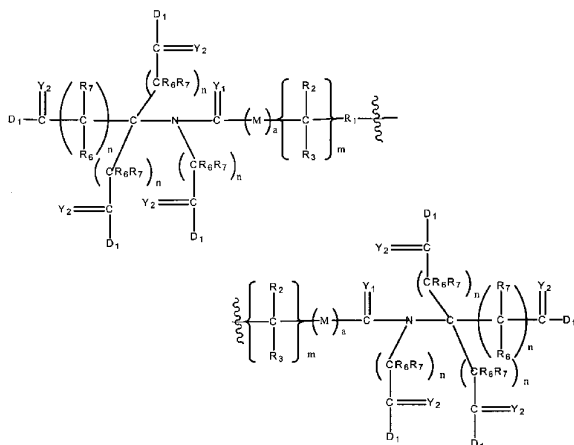


where B is a residue of an amine or a hydroxyl- containing drug.

WO 02/065988

PCT/US02/04781

In another preferred aspect of the invention, the compounds of the present invention are of formula (XII):



wherein all variables are as previously defined above.

5

#### G. *IN VIVO* DIAGNOSTICS

A further aspect of the invention provides the conjugates of the invention optionally prepared with a diagnostic tag linked to the transport enhancer described above, wherein the tag is selected for diagnostic or imaging purposes. Thus, a suitable tag is prepared by linking any suitable moiety, e.g., an amino acid residue, to any art-standard emitting isotope, radio-opaque label, magnetic resonance label, or other non-radioactive isotopic labels suitable for magnetic resonance imaging, fluorescence-type labels, labels exhibiting visible colors and/or capable of fluorescing under ultraviolet, infrared or electrochemical stimulation, to allow for imaging tumor tissue during surgical procedures, and so forth. Optionally, the diagnostic tag is incorporated into and/or linked to a

10

WO 02/065988

PCT/US02/04781

conjugated therapeutic moiety, allowing for monitoring of the distribution of a therapeutic biologically active material within an animal or human patient.

In a still further aspect of the invention, the inventive tagged conjugates are readily prepared, by art-known methods, with any suitable label, including, e.g., radioisotope labels. Simply by way of example, these include <sup>131</sup>Iodine, <sup>125</sup>Iodine, <sup>99m</sup>Tcnetium and/or <sup>111</sup>Indium to produce radioimmunoscintigraphic agents for selective uptake into tumor cells, *in vivo*. For instance, there are a number of art-known methods of linking peptide to Tc-99m, including, simply by way of example, those shown by U.S. Patent Nos. 5,328,679; 5,888,474; 5,997,844; and 5,997,845, incorporated by reference herein.

Broadly, for anatomical localization of tumor tissue in a patient, the conjugate tag is administered to a patient or animal suspected of having a tumor. After sufficient time to allow the labeled immunoglobulin to localize at the tumor site(s), the signal generated by the label is detected, for instance, visually, by X-ray radiography, computerized transaxial tomography, MRI, by instrumental detection of a luminescent tag, by a photo scanning device such as a gamma camera, or any other method or instrument appropriate for the nature of the selected tag.

The detected signal is then converted to an image or anatomical and/or physiological determination of the tumor site. The image makes it possible to locate the tumor *in vivo* and to devise an appropriate therapeutic strategy. In those embodiments where the tagged moiety is itself a therapeutic agent, the detected signal provides evidence of anatomical localization during treatment, providing a baseline for follow-up diagnostic and therapeutic interventions.

#### **H. METHODS OF TREATMENT**

Another aspect of the present invention provides methods of treatment for various medical conditions in mammals. The methods include administering to the mammal in need of such treatment, an effective amount of a prodrug, such as a multi-loaded Ara-C-PEG conjugates, which has been prepared as described herein. The compositions are useful for, among other things, treating neoplastic disease, reducing tumor burden, preventing metastasis of neoplasms and preventing recurrences of tumor/neoplastic growths in mammals.



WO 02/065988

PCT/US02/04781

The amount of the prodrug administered will depend upon the parent molecule included therein. Generally, the amount of prodrug used in the treatment methods is that amount which effectively achieves the desired therapeutic result in mammals. Naturally, the dosages of the various prodrug compounds will vary somewhat depending upon the parent compound, rate of in vivo hydrolysis, molecular weight of the polymer, etc. In general, however, prodrug taxanes are administered in amounts ranging from about 5 to about 500 mg/m<sup>2</sup> per day, based on the amount of the taxane moiety. Camptothecin prodrugs are also administered in amounts ranging from about 5 to about 500 mg/m<sup>2</sup> per day. The range set forth above is illustrative and those skilled in the art will determine the optimal dosing of the prodrug selected based on clinical experience and the treatment indication. Actual dosages will be apparent to the artisan without undue experimentation.

The prodrugs of the present invention can be included in one or more suitable pharmaceutical compositions for administration to mammals. The pharmaceutical compositions may be in the form of a solution, suspension, tablet, capsule or the like, prepared according to methods well known in the art. It is also contemplated that administration of such compositions may be by the oral and/or parenteral routes depending upon the needs of the artisan. A solution and/or suspension of the composition may be utilized, for example, as a carrier vehicle for injection or infiltration of the composition by any art known methods, e.g., by intravenous, intramuscular, subdermal injection and the like.

Such administration may also be by infusion into a body space or cavity, as well as by inhalation and/or intranasal routes. In preferred aspects of the invention, however, the prodrugs are parenterally administered to mammals in need thereof.

#### I. EXAMPLES

The following examples serve to provide further appreciation of the invention but are not meant in any way to restrict the effective scope of the invention. The underlined and bold-faced numbers recited in the Examples correspond to those shown in the figures. It is also to be understood that the bifunctional PEG derivatives (alpha and omega substituted) are used and that the figures show only one side of the compounds actually formed in light of the mirror images of the terminal groups.

**General.** All reactions were run under an atmosphere of dry nitrogen or argon. Commer-

cial reagents were used without further purification. All PEG compounds were dried under vacuum or by azeotropic distillation (toluene) prior to use. <sup>1</sup>H spectra were obtained with a JEOL FT NMR System JNM GSX-270 or Varian MercuryVX-300 instrument using deuteriochloroform as solvent unless specified. <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained at

67.80 MHz on the JNM GSX-270 or 75.46 MHz on the Varian MercuryVX-300. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS) and coupling constants (*J* values) are given in hertz (Hz). All PEG conjugated compounds were dissolved (~15 mg/mL) in sterile saline (0.9%) for injection prior to *in vivo* drug treatments and were given as their ara-C equivalents (absolute amt. of ara-C given).

**HPLC Method.** Analytical HPLC's were performed using a C8 reversed phase column (Beckman, ultrasphere) under isocratic conditions with an 80:20 mixture (v/v) of methanol-water as mobile phase. Peak elutions were monitored at 254 nm using a UV detector. To detect the presence of any free PEG and also to confirm the presence of PEGylated product, an evaporative light scattering detector (ELSD), Model PL-EMD 950 (Polymer Laboratories), was employed. Based on ELSD and UV analysis, all the final PEGylated products were free of native drug and were ≥ 95% pure by HPLC.

**Analysis of Ara-C Content in PEG Derivatives.** For the determination of the ara-C content in PEG derivatives, *N*<sup>6</sup>-acetylcytidine was used as the basis because of the absorbance change due to the acylation of ara-C. The UV absorbance of *N*<sup>6</sup>-acetylcytidine in H<sub>2</sub>O was determined at 257 nm for six different concentrations ranging from 0.01 μmol/mL to 0.05 μmol/mL. From the standard plot of absorbance vs. concentration, the absorption coefficient, *ε*, of *N*<sup>6</sup>-acetylcytidine was calculated to be 36.4 (O.D. at 257 nm for 1 mg/mL with 1.0 cm light path). PEGylated ara-C derivatives were dissolved in H<sub>2</sub>O at an approximate concentration of 0.015 μmol/mL (based on a MW of 40 kDa) and the UV absorbance of these compounds at 257 nm was determined. Using this value and employing the absorption coefficient, *ε*, obtained from the above, the concentration of ara-C in the sample was determined. Dividing this value by the sample concentration provided the percentage of ara-C in the sample.

**Analysis of Melphalan Content in PEG Derivatives.** For the determination of the melphalan content in PEG derivatives, melphalan was used as a standard. The UV absorbance of melphalan in DMF-H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) was determined at 264 nm for 5 different

WO 02/065988

PCT/US02/04781

concentrations ranging from 0.02  $\mu\text{mol/mL}$  to 0.06  $\mu\text{mol/mL}$ . From the standard plot of absorbance vs. concentration, the absorption coefficient,  $\epsilon$ , of melphalan was calculated to be 54.6 (O.D. at 264 nm for 1 mg/mL with 1.0 cm light path). PEGylated melphalan derivatives were dissolved in DMF- $\text{H}_2\text{O}$  (9:1, v/v) at an approximate concentration of 0.013  $\mu\text{mol/mL}$  (based on a MW of 40 kDa) and the UV absorbance of these compounds at 264 nm was determined. Using this value and employing the absorption coefficient,  $\epsilon$ , obtained from the above, the concentration of melphalan in the sample was determined. Dividing this value by the sample concentration provided the percentage of melphalan in the sample.

**Abbreviations.** DCM (dichloromethane), DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine), DMAP (4-(dimethylamino)pyridine), DSC (*N,N*-disuccinimidyl carbonate), EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), HOBT (1-hydroxybenzotriazole), IPA (2-propanol), NMM (*N*-methylmorpholine), TBDMS-Cl (*tert*-butyldimethylsilyl chloride), TEA (triethylamine), TFA (trifluoroacetic acid).

#### Example 1.

**4-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl)-2,6-dimethyl-phenol (2).** A solution of triethylamine (5 mL, 35.87 mmol) in DCM (5 mL) was slowly added over 1 hour to a solution of 4-hydroxy-3,5-dimethylbenzyl alcohol (1, 1.0 g, 6.58 mmol) and TBDMS-Cl (1.61 g, 10.7 mmol) in DCM (10 mL) at 0 °C. The final solution was allowed to warm to room temperature and stirred overnight at room temperature. The solvent was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM and washed with water four times to give 1.5 g (86%) of 2:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  0.00 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.11 (s, 6H,  $2 \times \text{Ar-CH}_3$ ), 4.50 (s, 3H,  $\text{Ar-CH}_2\text{OH}$ ), 6.82 (s, 2H,  $2 \times \text{Ar-CH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (67.80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.25, 15.91, 18.48, 26.01, 64.91, 122.84, 126.93, 132.85, 151.15.

#### Example 2.

**2-*tert*-Butoxycarbonylamino-propionic acid 4-(*tert*-butyl-dimethylsilyloxymethyl)-2,6-dimethyl-phenyl ester (3).** A mixture of Boc-Ala-OH (1.279 g, 6.77 mmol), 2 (1.2 g, 4.511 mmol), EDC·HCl (1.299 g, 6.77 mmol), and DMAP (825.6 mg, 6.77 mmol) in DCM (50 mL) was stirred at 0 °C and then allowed to warm to room temperature overnight. The solution was washed with 0.5N HCl (25 mL  $\times$  4), dried over anhyd  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent removed *in vacuo* to give 1.95 g (99%) of 3:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  0.00 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.36 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.50 (d, 3H,  $J =$

WO 02/065988

PCT/US02/04781

0.81 Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.07 (s, 6H,  $2 \times \text{Ar-CH}_3$ ), 4.51 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.56 (s, 1H,  $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 6.91 (s, 2H,  $2 \times \text{Ar-CH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  -3.55, 16.34, 18.39, 18.53, 25.92, 28.26, 49.34, 64.43, 77.46, 126.28, 129.68, 138.97, 146.57, 155.17, 171.43.

**Example 3.**

**2-tert-Butoxycarbonylamino-propionic acid 4-hydroxymethyl-2,6-dimethyl-phenyl ester (4).** Compound 3 (1.9 g, 4.35 mmol) was dissolved in acetic acid (25 mL), THF (8 mL), and water (8 mL) and the solution was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in DCM (100 mL), washed with 0.5%  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) and water (50 mL). The organic layer was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and the solvent removed *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography to give 0.85 g (55%) of 4:  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1.46 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.58 (d, 3H,  $J = 0.81$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.13 (s, 6H,  $2 \times \text{Ar-CH}_3$ ), 4.51 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.56 (s, 1H,  $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 7.03 (s, 2H,  $2 \times \text{Ar-CH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (67.80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.17, 18.31, 28.18, 49.30, 64.39, 79.98, 127.12, 129.99, 138.68, 146.95, 155.14, 171.38.

**Example 4.**

**2-tert-Butoxycarbonylamino-propionic acid 4-(2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yloxy-carbonyloxymethyl)-2,6-dimethyl-phenyl ester (5).** A mixture of 4 (730 mg, 2.26 mmol), DSC (752.1 mg, 2.94 mmol), and pyridine (232.1 mg, 2.94 mmol) in anhydrous chloroform (20 mL) was stirred at 25-30 °C overnight. The reaction mixture was washed with 0.5N HCl (15 mL) and the organic layer dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed *in vacuo* to give 5 as a solid (899.5 mg, 86%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  16.32, 18.45, 25.45, 28.28, 49.35, 72.25, 77.21, 80.10, 128.99, 129.02, 130.94, 130.91, 148.45, 151.04, 155.14, 168.57.

**Example 5.**

**2-tert-Butoxycarbonylamino-propionic acid 4-[1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-pyrimidin-4-ylcarbonyloxymethyl]-2,6-dimethyl-phenyl ester (7).** A mixture of 5 (760 mg, 1.64 mmol), ara-C (6, 996 mg, 4.1 mmol) and DIEA (634.3 mg, 4.92 mmol) in anhydrous DMF (40 mL) was stirred overnight at 40 °C. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and purified by silica gel column chromatography. The yield of pure product (7) was 200 mg (21%):  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ )  $\delta$  16.45, 17.61, 28.61, 50.41, 62.38, 67.74, 75.98, 77.75, 80.49, 86.77, 88.96, 95.68, 129.41, 131.48, 134.29, 147.18, 148.96, 154.14, 157.29, 157.43, 164.27,

WO 02/065988

PCT/US02/04781

172.98.

**Example 6.**

**2-Amino-propionic acid 4-[1-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydro-pyrimidin-4-ylcarbamoyloxymethyl]-2,6-dimethyl-phenyl ester (8) TFA salt.** Compound 7 (200 mg, 0.34 mmol) was stirred in DCM (4 mL) and TFA (2 mL) for 2 h at room temperature and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was recrystallized from DCM-ether to give 200 mg (100%) of 8: <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 16.28, 16.44, 49.86, 62.74, 67.97, 76.53, 78.08, 87.47, 89.47, 95.76, 129.96, 131.70, 135.76, 148.00, 148.89, 154.58, 164.68, 169.62.

**Example 7.**

**Compound 10.** EDC·HCl (131.1 mg, 0.68 mmol) was added to a mixture of PEG-aspartic acid (9, mw. 40,000, 1.73 g, 0.043 mmol), 8 (210 mg, 0.43 mmol), NMM (137.9 mg, 1.37 mmol), and HOBt (69.1 mg, 0.51 mmol) in anhydrous DCM (25 mL) and DMF (15 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min and then allowed to warm to room temperature overnight. The solvent was removed and the residue was recrystallized twice from IPA to yield 1.4 g (82%) of 10. The amount of ara-C present in the product measured by UV assay was 2.26 wt%. <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O) δ 14.51, 18.19, 18.68, 33.67, 45.20, 52.46, 62.92, 63.44, 72.11-72.19 (PEG), 74.32, 77.64, 78.36, 87.15, 89.17, 95.46, 131.04, 133.19, 135.97, 148.93, 150.04, 155.76, 158.71, 165.46, 173.25, 174.46, 187.43.

**Example 8.**

**4-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-phenol (12).** A solution of 4-hydroxymethyl phenol (11, 9.3 g, 75 mmol) in DMF (50 mL) was sparged with anhydrous nitrogen gas for 10 min, followed by addition of TBDMS-Cl (12.44 g, 82 mmol). The reaction mixture was cooled to 0 °C and then a solution of TEA (30.36 g, 300 mmol) in DMF (25 mL) was added slowly. The reaction solution was stirred overnight at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was partitioned twice between water (100 mL) and DCM (200 mL). The organic layers were combined and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> followed by removal of the solvent *in vacuo* to give 12 (16.3 g, 91%): <sup>13</sup>C NMR δ -5.344 (2 × Si-CH<sub>3</sub>), 18.285 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.850 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 64.840 (Ar-CH<sub>2</sub>O), 115.221 (Ar-C<sup>5</sup>), 127.842 (Ar-C<sup>6</sup>), 132.962 (Ar-C<sup>6</sup>), 155.248 (Ar-C<sup>5</sup>).

**Example 9.**

**Compound 14.** Pyridine (983 mg, 12.43 mmol) was added to a suspension of 12 (2.7 g,

WO 02/065988

PCT/US02/04781

11.3 mmol) and DSC (3.18 g, 12.43 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (140 mL) and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, **13** (3.398 g, 13.7 mmol) was added to the solution and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was washed with 0.1N HCl ( $3 \times 100$  mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and the solvent removed *in vacuo*. The residue was dissolved in hexane (100 mL) followed by filtration of insoluble impurities. The hexane filtrate was concentrated to give product **14** (5.1 g, 88%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  -5.469 ( $2 \times \text{Si-CH}_3$ ), 18.235 ( $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.790 ( $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.263 ( $\text{O-C}(\text{CH}_3)_2$ ), 40.230 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 40.917 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 64.392 ( $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 69.892 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.192 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.253 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 79.305 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 121.371 ( $\text{Ar-C}^2$ ), 126.943 ( $\text{Ar-C}^3$ ), 138.482 ( $\text{Ar-C}^4$ ), 149.960 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 154.936 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 156.096 ( $\text{Ar-C}^1$ ).

**Example 10.**

**Compound 15.** Compound **14** (5 g, 9.76 mmol) was dissolved in acetonitrile (30 mL) and water (30 mL) followed by the addition of HOAc (90 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h followed by the removal of the solvent. The residue was dissolved in DCM (300 mL), washed with water ( $3 \times 300$  mL) and dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed *in vacuo* to give **15** (4.1 g, 80%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  28.233 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 40.184 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 40.871 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 64.484 ( $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 69.811-70.191 ( $4 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 79.228 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 121.661 ( $\text{Ar-C}^2$ ), 127.950 ( $\text{Ar-C}^3$ ), 138.177 ( $\text{Ar-C}^4$ ), 150.418 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 154.875 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 156.111 ( $\text{Ar-C}^1$ ).

**Example 11.**

**Compound 16.** A solution of compound **15** (800 mg, 2.01 mmol) and DSC (726 mg, 2.8 mmol) in DCM (80 mL) was cooled to 0 °C followed by the addition of pyridine (224 mg, 2.8 mmol). The solution was stirred overnight at 0-5 °C followed by the removal of solvent *in vacuo*. The residue was dissolved in DCM (40 mL), washed with water ( $2 \times 20$  mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$  and the solvent removed *in vacuo* to give **16** (0.88 g, 88%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  24.852 ( $\text{NHS's } 2 \times \text{C(=O)CH}_2$ ), 27.834 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 39.777 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 40.443 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 69.230-69.640 ( $4 \times \text{CH}_2\text{O}$ ), 71.624 ( $\text{Ar-CH}_2\text{O}$ ), 78.690 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 121.583 ( $\text{Ar-C}^2$ ), 129.468 ( $\text{Ar-C}^3$ ), 137.110 ( $\text{Ar-C}^4$ ), 148.092 ( $\text{OC(=O)O}$ ), 151.203 & 154.134 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 155.772 ( $\text{OC(=O)NH}$ ), 168.752 ( $\text{Ar-C}^1$ ), 172.809 ( $\text{NHS's } 2 \times \text{C(=O)CH}_2$ ).

WO 02/065988

PCT/US02/04781

**Example 12.**

**Compound 17.** Compound 16 is subjected to similar conditions as shown in Example 6-8 to give 19.

**Example 13.**

**Compound 22.** PEG diol (20, 55 g, 1.38 mmol) was azeotroped in toluene over a 2 h period followed by the removal of 200 mL of solvent by rotary evaporation. The solution was cooled to ~30 °C and triphosgene (0.544 g, 1.83 mmol) was added as a solid followed by the addition of anhydrous pyridine (0.434 g, 5.49 mmol). The reaction mixture stirred at 50 °C for 1 h. *N*-hydroxyphthalimide (21, 1.12 g, 6.88 mmol) and anhydrous pyridine (0.54 g, 6.88 mmol) were added to the chloroformate mixture and the reaction stirred for a further 2 h at 50 °C and then for 12 h at room temperature. The reaction mixture was filtered through filter paper and the solvent removed *in vacuo*. The product was recrystallized from DCM-ethyl ether (1100 mL, 8:2, v/v) to give the product (50.9 g, 92%): <sup>13</sup>C NMR δ 123.62, 128.10, 134.55, 152.00, 160.00.

**Example 14.**

**PEG-cmc-Asp-O-*t*-Bu (24).** Compound 22 (mw. 40,000, 20 g, 0.459 mmol) and aspartic acid di *t*-butyl ester·HCl (23, 1.0 g, 3.55 mmol) were dissolved in anhydrous DCM, followed by the addition of DMAP (0.433 g, 3.55 mmol). The solution was refluxed overnight followed by precipitation by addition of ethyl ether (1 L). The solid was isolated by filtration and recrystallized from IPA (1 L) twice. The filter cake was washed with IPA (200 mL) and ether (200 mL) to give 15.6 g (78%) of product after drying at 45 °C *in vacuo*: <sup>13</sup>C NMR δ 27.837 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.991 (CHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.752 (CHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>), 50.800 (NHCH), 64.212 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC(=O)NH), 81.333 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 82.007 (CHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.924 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OC(=O)NH), 169.674 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 169.969 (CHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Example 15.**

**PEG-cmc-Asp-OH (25).** Compound 24 (15 g, 0.375 mmol) was dissolved in DCM (150 mL) followed by addition TFA (75 mL). The solution was stirred at room temperature for 2 h and hexane (500 mL) was added to precipitate the solid. The solid was triturated with hexane to remove TFA followed by recrystallization from chilled DCM-ether. The recrystallized solid was redissolved in DCM (150 mL) and washed with water (150 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, concentrated *in vacuo*,

WO 02/065988

PCT/US02/04781

and precipitated with ether to give 12.4 g (83%) of product:  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  36.441 ( $\text{CHCH}_2\text{CO}_2$ ), 50.177 (NHCH), 64.390 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 81.333 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.007 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 156.172 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})\text{NH}$ ), 171.944 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 172.211 ( $\text{CHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**Example 16.**

**Melphalan Me ester (27).** Melphalan (**26**, 1.00 g, 3.28 mmol) was suspended in 2,2-dimethoxypropane (65.59 mL, 533.49 mmol). To the suspension was added aqueous HCl (36 %, 3.28 mL) and absolute methanol (4 mL). The mixture was warmed to mild reflux with vigorous stirring until the solution started to turn slightly brown. The mixture then was stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* and the crude product precipitated from the residue with ether. The solid was filtered, washed with ether, and purified by silica gel column chromatography ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 9:1, v/v) to yield the desired product (0.47 g, 45%):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  39.751, 40.340, 51.912, 53.435, 55.803, 112.124, 126.076, 130.620, 145.033, 175.754.

**Example 17.**

**Compound 28.** A mixture of **16** (1.91 g, 3.55 mmol), **27** (1.7 g, 5.33 mmol), and DMAP (0.519 g, 4.25 mmol) in anhydrous chloroform (30 mL) was stirred at room temperature overnight under nitrogen and then concentrated *in vacuo*. The residue was redissolved in DCM (100 mL), and washed three times with 1N HCl (50 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (EtOAc:Hexane = 8:2, v/v) to yield the desired product (0.8301 g, 32 %):  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  28.173, 36.571, 40.076, 40.680, 51.838, 52.956, 54.381, 54.933, 65.707, 68.390, 69.212, 69.610, 76.056, 76.480, 76.891, 78.547, 111.060, 120.575, 123.285, 128.087, 128.318, 129.333, 131.002, 132.029, 143.856, 149.544, 149.801, 153.127, 154.193, 154.565, 170.539.

**Example 18.**

**Compound 29.** TFA (2.5 mL) was slowly added to a solution of **28** (0.8306 g, 1.12 mmol) in DCM (5 mL). The reaction solution was stirred at room temperature for 1.5 hours, followed by concentration *in vacuo*. The residue was recrystallized with DCM-ether to yield the desired product (0.0838 g, 13 %):  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  +  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  37.218, 39.814, 40.715, 41.196, 52.521, 53.625, 55.091, 66.349, 66.635, 69.998, 70.107, 111.768, 121.357, 123.995, 128.781, 130.062, 132.927, 144.615, 150.218, 154.381,



WO 02/065988

PCT/US02/04781

154.988, 171.411.

**Example 19.**

**Compound 30.** EDC (0.048 g, 0.253 mmol) and DMAP (0.077 g, 0.632 mmol) were added to a mixture of PEG-cmc-Asp-COOH (**25**, 1.26 g, 0.032 mmol) and **29** (0.191 g, 0.253 mmol) in anhydrous DCM (20 mL) and anhydrous DMF (5 mL) at 0 °C in an ice bath. Reaction mixture was stirred at room temperature overnight under nitrogen and then concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from DCM-ether and from IPA to yield the desired product (0.874 g, 64.2 %). The amount of melphalan in the product measured by UV assay was 2.4% wt/wt: <sup>13</sup>C NMR δ 36.385, 38.995, 40.090, 40.606, 51.809, 52.949, 54.506, 61.039, 62.451, 65.683, 68.300-72.780 (PEG), 111.372, 120.942, 123.754, 128.474, 129.733, 132.185, 144.332, 150.106, 153.868, 154.768, 160.141, 171.165.

**Example 20.**

**Compound 32.** A solution of **31** (2.0 g, 5.78 mmol, 1 eq), **2** (3.1 g, 11.56 mmol, 2 eq), and DMAP (1.76 g, 14.45 mmol, 2.5 eq) in anhydrous DCM (20 mL) was refluxed under nitrogen for 4 hours and then cooled to room temperature. The solution was diluted with DCM (100 mL) and washed three times with water (50 mL). The organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate, concentrated, and purified by silica gel column chromatography (5-25 % MeOH in DCM, v/v) to yield the desired product (2.50 g, 87 %): <sup>13</sup>C NMR δ -5.421, 15.994, 18.324, 25.850, 28.282, 40.251, 64.392, 67.413, 68.641, 70.331, 79.304, 126.409, 129.878, 139.171, 147.209, 153.200, 156.041.

**Example 21.**

**Compound 33.** Compound **32** (2.5 g, 5.027 mmol) was dissolved in acetonitrile (8 mL) and water (8 mL) followed by addition of HOAc (23 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h, followed by the removal of the solvent. The residue was dissolved in DCM (50 mL), washed with 0.5% sodium bicarbonate (3 × 25 mL) and then with water (25 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed *in vacuo* to give **33** (1.556 g, 80.8%): <sup>13</sup>C NMR δ 15.828, 28.206, 40.187, 53.320, 64.417, 67.489, 68.513, 70.241, 79.278, 82.760, 113.173, 127.279, 130.159, 138.915, 147.580, 153.020, 156.067.

**Example 22.**

**Compound 34.** Pyridine (0.427 mL, 5.277 mmol) was added to a solution of compound

WO 02/065988

PCT/US02/04781

33 (1.556 g, 4.059 mmol) and DSC (1.352 g, 5.277 mmol) in anhydrous chloroform (31.12 mL). The solution stirred overnight at room temperature, followed by the removal of solvent *in vacuo*. The reaction mixture was diluted to 50 mL with chloroform, washed with 0.5N HCl three times, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and the solvent removed *in vacuo* to give **34** (1.722 g, 81%): <sup>13</sup>C NMR δ 15.857, 25.256, 28.210, 40.143, 67.568, 68.507, 70.270, 72.099, 79.249, 129.130, 130.959, 131.094, 148.918, 151.654, 152.845, 156.034, 168.773.

**Example 23.**

**Compound 35.** A mixture of **34** (1.37 g, 2.61 mmol), **27** (1.249 g, 3.91 mmol), and DMAP (0.382 g, 3.13 mmol) in anhydrous chloroform (40 mL) was stirred at room temperature overnight under nitrogen and then concentrated *in vacuo*. The residue was redissolved in DCM (100 mL), and washed three times with 1N HCl (50 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and concentrated to yield the desired product (1.85 g, 97%): <sup>13</sup>C NMR δ 15.981, 28.321, 36.820, 39.943, 40.315, 52.244, 53.192, 53.358, 54.804, 66.325, 67.541, 68.539, 70.293, 79.266, 111.983, 112.329, 124.310, 128.610, 130.338, 130.479, 131.081, 133.961, 145.084, 148.028, 152.828, 155.542, 155.875, 172.041.

**Example 24.**

**Compound 36.** TFA (4.6 mL) was slowly added to a solution of **35** (1.85 g, 2.536 mmol) in DCM (10 mL). The reaction solution was stirred at room temperature for 1.5 hours, followed by concentration *in vacuo*. The residue was recrystallized with DCM-ether to yield the desired product (1.335 g, 71 %): <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD) δ 15.905, 36.846, 39.431, 40.379, 52.321, 53.396, 54.932, 66.273, 66.670, 67.374, 68.936, 112.021, 124.386, 128.585, 130.364, 130.505, 134.204, 145.161, 148.003, 152.995, 155.644, 172.259.

**Example 25.**

**Compound 37.** EDC (0.345 g, 1.79 mmol) and DMAP (0.77 g, 6.29 mmol) were added to a mixture of PEG-cmc-Asp-COOH (**25**, 7.25 g, 0.179 mmol) and **36** (1.34 g, 1.79 mmol) in anhydrous DCM (100 mL) and anhydrous DMF (25 mL) at 0 °C in an ice bath. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight under nitrogen and concentrated *in vacuo*. The residue was recrystallized from DCM-ether and from IPA to yield the desired product (5.10 g, 66.3%). The amount of melphalan in the product

WO 02/065988

PCT/US02/04781

measured by UV assay was 2.85 % wt/wt:  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  5.498, 36.214, 38.855, 39.894, 51.706, 52.815, 54.444, 60.947, 62.394, 63.756-73.461 (PEG), 111.438, 123.937, 128.080, 129.892, 133.572, 144.583, 147.462, 152.209, 155.116, 160.467, 170.411, 171.535.

**Example 26****In vitro and in vivo data for compound 10.**

In this Example, in vivo and in vitro data are presented and compared to unmodified Ara-C.

**In Vivo**

Athymic nude mice were implanted subcutaneous with a 4-5 mm<sup>3</sup> tissue fragment of LX-1 collected from donor mice. The tumor trocar site was observed twice weekly and measured once palpable. The tumor volume for each mouse was determined by measuring two dimensions with calipers and calculated using the formula: tumor volume = (length x width<sup>2</sup>)/2. When tumors reached the average volume of 90 mm<sup>3</sup>, the mice were divided into their experimental groups which consisted of unmodified Ara-C and PEG-Ara-C (**Compound 10**). The mice were sorted to evenly distribute tumor size, grouped into 4 to 6 mice/group, and ear punched for permanent identification. Drugs were administered intravenously q3d x 4 (Day 1, 4, 7 and 10) via the tail vein at an approximate rate of 0.5 mL per minute. Compounds were given both at an equal molar basis (absolute amount of active) of 20 mg/kg and at close their respective MTD (Ara-C, 100 mg/kg/dose (toxicity); 10, 40 mg/kg/dose (volume). Mouse weight and tumor size were measured at the beginning of study and twice weekly through week 4. Drug effectiveness was determined by comparing tumor growth in treated versus untreated (no vehicle) control mice. Five types of endpoints were used as the basis for comparison: (a) mean tumor volumes at Day 28; (b) mean percent change in individual tumor volumes from initial; (c) percent difference in tumor volume (%T/C), measured when the control group's median tumor volume reached approximately 800 - 1100 mm<sup>3</sup> (exponential growth phase); (d) percent difference in tumor volume (%T/C) at Day 21 (~2000 mm<sup>3</sup>) and (e) the number of tumor regression (smaller tumor volume on Day 28 compared to Day 1) per group.

**Results**

Compound 10 demonstrated about equivalent antitumor activity with native Ara-C at only

WO 02/065988

PCT/US02/04781

20% of the active parent compound's dose.

Compound	% (h) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	LX-1
	Rat Plasma	P388/O	%T/C <sup>b</sup>
Ara-C	-	10	74.0 (100 mg / kg)
Compound 10	14	448	68.2 (20 mg / kg)

5       <sup>a</sup> All experiments were done at 37 °C in duplicate and t<sub>1/2</sub> was measured by the disappearance of PEG derivatives. Standard deviation of measurements = ±10 %.

<sup>b</sup> Mean baseline tumor volume was 1000 mm<sup>3</sup>.

#### IN VITRO BIOASSAY

10       A series of in vitro assays were conducted to determine the IC<sub>50</sub> for unmodified Ara-C and compound 10 using the P388/O (murine lymphoid neoplasm, Southern Research Institute) cell line. The P388/O cells were grown in RPMI 1640 medium (Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland) + 10% FBS (Hyclone Inc., Logan UT). Bioassays were performed in their respective media containing antibiotics and fungizone.

15       Ara-C was dissolved in DMSO and diluted to the appropriate concentration in culture media. The PEG-Ara-C was dissolved in water and diluted to the appropriate concentrations in culture media.

20       The assays were performed in duplicate in 96-well microtiter cell culture plates. Two fold serial dilution of the compounds were done in the microtiter plates. Cells were detached by incubating with 0.1% Trypsin/Versene at 37°. Trypsin was inactivated by adding the appropriate media for each cell line containing 10% FBS. To each well of the microtiter plates, 10,000 cells were added. After three days, cell growth was measured by addition of a metabolic indicator dye, Alamar Blue, according to the manufacturer's protocol. The IC<sub>50</sub> value for the test compound and reference compound are provided above in the Table.

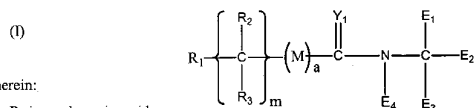
25       While there have been described what are presently believed to be the preferred embodiments of the invention, those skilled in the art will realize that changes and modifications may be made without departing from the spirit of the invention. It is intended to claim all such changes and modifications as fall within the true scope of the invention.

WO 02/065988

PCT/US02/04781

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A compound comprising the formula:



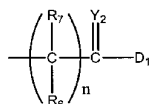
wherein:

R<sub>1</sub> is a polymeric residue;

Y<sub>1</sub> is O, S or NR<sub>4</sub>;

M is O, S or NR<sub>5</sub>;

E<sub>1</sub> is



E<sub>2-4</sub> are independently H, E<sub>1</sub> or

(a) is zero or one;

(m) is zero or a positive integer;

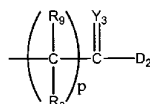
(n) and (p) are independently 0 or a positive integer;

Y<sub>2-3</sub> are independently O, S or NR<sub>10</sub>;

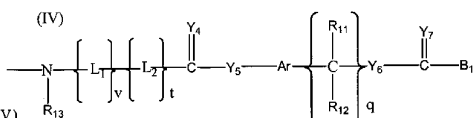
R<sub>2-10</sub> are independently selected from the group consisting of hydrogen,

C<sub>1-6</sub> alkyls, C<sub>3-12</sub> branched alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls, C<sub>3-8</sub> substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substituted C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

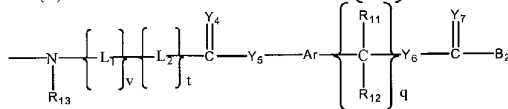
D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> are independently OH,



(IV)



(V)



WO 02/065988

PCT/US02/04781

or a terminal branching group;

wherein (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6;

(q) is zero or a positive integer;

$L_1$  and  $L_2$  are independently selected bifunctional linkers;

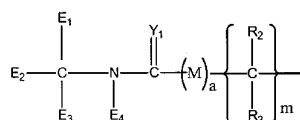
$Y_{2,7}$  are independently selected from the group consisting of O, S and  $NR_{14}$ ;

$R_{1,1-4}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,  $C_{1-6}$  alkyls,  $C_{3,12}$  branched alkyls,  $C_{3-8}$  cycloalkyls,  $C_{1-6}$  substituted alkyls,  $C_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $C_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $C_{1-6}$  heteroalkyls,  $C_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $C_{1-6}$  heteroalkoxy;

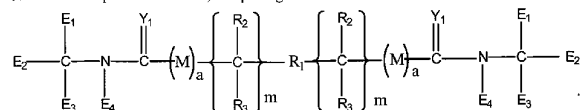
Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group;

$B_1$  and  $B_2$  are independently selected from the group consisting of leaving groups, OH, residues of hydroxyl-containing moieties or amine-containing moieties.

2. The compound of claim 1, wherein  $R_1$  further comprises a capping group A, selected from the group consisting of hydrogen,  $NH_2$ , OH,  $CO_2H$ ,  $C_{1-6}$  moieties and



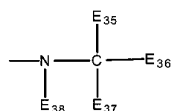
3. A compound of claim 2, comprising the formula:



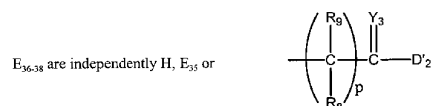
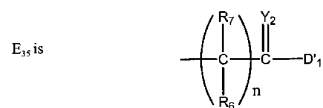
WO 02/065988

PCT/US02/04781

4. The compound of claim 1, wherein said terminal branching group comprises the formula:



wherein

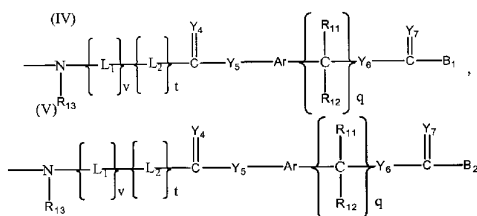


(n) and (p) are independently 0 or a positive integer;

Y<sub>2,3</sub> are independently O, S or NR<sub>10</sub>;

R<sub>6-10</sub> are independently selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyls, C<sub>3-12</sub> branched alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls, C<sub>3-8</sub> substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substituted C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

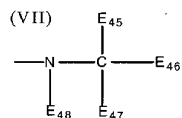
D'<sub>1</sub> and D'<sub>2</sub> are independently OH,



WO 02/065988

PCT/US02/04781

or



wherein (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6;

(q) is zero or a positive integer;

L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> are independently selected bifunctional linkers;

Y<sub>4,7</sub> are independently selected from the group consisting of O, S and NR<sub>14</sub>;

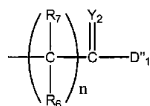
R<sub>11,14</sub> are independently selected from the group consisting of hydrogen,

C<sub>1-6</sub> alkyls, C<sub>3,12</sub> branched alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls, C<sub>3-8</sub> substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substituted C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

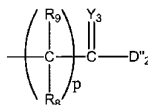
Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group;

B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> are independently selected from the group consisting of leaving groups, OH, residues of hydroxyl-containing moieties or amine-containing moieties;

E<sub>45</sub> is



E<sub>46-48</sub> are independently H, E<sub>45</sub>, or



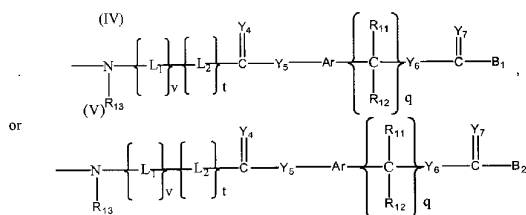
wherein

D''<sub>1</sub> and D''<sub>2</sub> are independently OH,



WO 02/065988

PCT/US02/04781



5. The compound of claim 3, Y<sub>1</sub> is O.
6. The compound of claim 1, wherein R<sub>1</sub> comprises a polyalkylene oxide residue.
7. The compound of claim 6, wherein R<sub>1</sub> comprises a polyethylene glycol residue.
8. The compound of claim 3, wherein R<sub>1</sub> comprises a polyethylene glycol residue.
9. The compound of claim 6, wherein R<sub>1</sub> is selected from the group consisting of

$\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---A}$ ,  $\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---Y}_9\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---A}$ ,  
 $\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---NR}_{20}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---A}$ ,  $\text{---(CR}_{21}\text{R}_{22})_e\text{O---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---A}$ ,  
 $\text{---NR}_{20}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---A}$ ,  $\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{C(=Y}_8\text{)}\text{---}$ ,  
 $\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---Y}_9\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{Y}_9\text{C(=Y}_8\text{)}\text{---}$ ,  
 $\text{---C(=Y}_8\text{)}\text{---NR}_{20}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{NR}_{20}\text{C(=Y}_8\text{)}\text{---}$ ,  
 $\text{---(CR}_{21}\text{R}_{22})_e\text{O---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CR}_{21}\text{R}_{22})_e\text{---}$ , and  
 $\text{---NR}_{20}\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{O---(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_x\text{---(CH}_2\text{)}_f\text{NR}_{20}\text{---}$

wherein:

Y<sub>8</sub> and Y<sub>9</sub> are independently O, S or NR<sub>20</sub>;

x is the degree of polymerization;

R<sub>20</sub>, R<sub>21</sub>, and R<sub>22</sub> are independently selected from among H, C<sub>1-6</sub> alkyls,

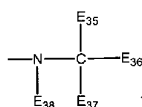
C<sub>3-12</sub> branched alkyls, C<sub>3-4</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls, C<sub>3-4</sub> substituted cycloalkyls,

aryl, substituted aryl, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substituted C<sub>1-6</sub> heteroalkyls,

C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

e and f are independently zero, one or two; and

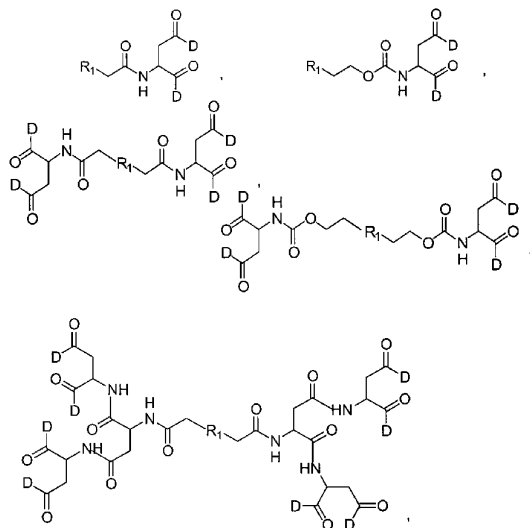
A is a capping group.



WO 02/065988

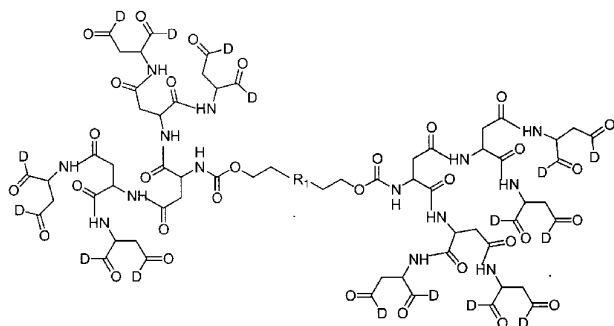
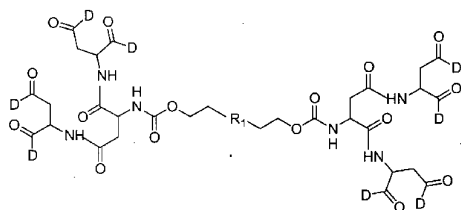
PCT/US02/04781

16. The compound of claim 1, wherein  $L_1$  is  $(CH_2CH_2O)_2$ .
17. The compound of claim 1, wherein  $L_2$  is selected from the group consisting of  $-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)-$ ,  $-CH_2C(O)NHCH(CH_3)-$ ,  $-(CH_2)_2-$ ,  $-CH_2C(O)NHCH_2-$ ,  $-(CH_2)_2NH-$ ,  $-(CH_2)_2NH-C(O)(CH_2)_2NH-$  and  $-CH_2C(O)NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)-$ .
18. A compound of claim 1, selected from the group consisting of:



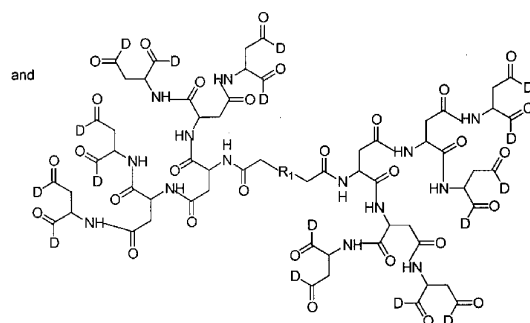
WO 02/065988

PCT/US02/04781

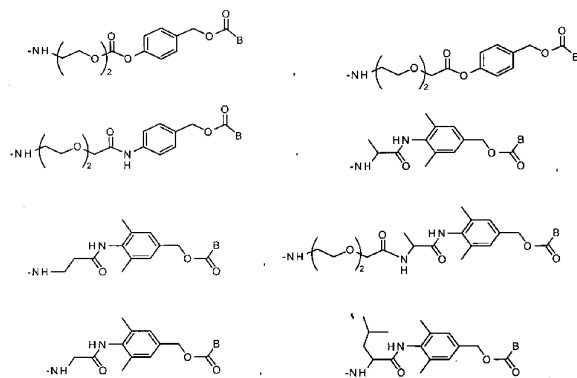


WO 02/065988

PCT/US02/04781

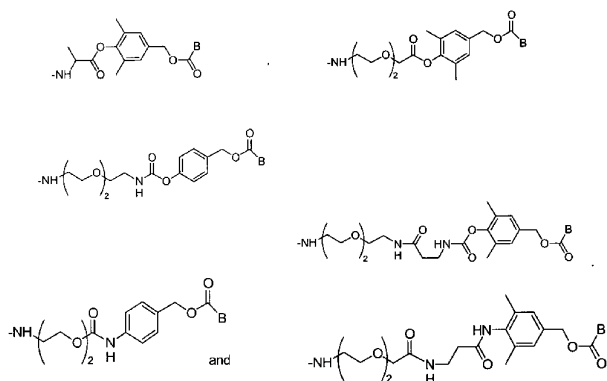


wherein R<sub>1</sub> is a PEG residue and D is selected from the group comprising:



WO 02/065988

PCT/US02/04781



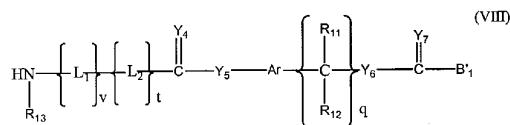
where B is a residue of an amine or a hydroxyl-containing drug.

19. A compound of claim 18, wherein B is a residue of a member of the group consisting of: daunorubicin, doxorubicin; *p*-aminoaniline mustard, melphalan, Ara-C (cytosine arabinoside), leucine-Ara-C, and gemcitabine
20. A method of treatment, comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a compound of claim 1, wherein D<sub>1</sub> is a residue of a biologically active moiety.
21. A method of treatment, comprising administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a compound of claim 18.

WO 02/065988

PCT/US02/04781

22. A method of preparing a polymer conjugate, comprising:  
reacting a compound of the formula (VIII):



wherein (v) and (t) are independently 0 or a positive integer up to about 6;

$\text{L}_1$  and  $\text{L}_2$  are independently selected bifunctional linkers;

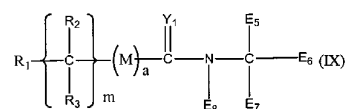
$\text{Y}_{4,7}$  are independently selected from the group consisting of O, S and  $\text{NR}_{14}$ ;

$\text{R}_{11-14}$  are independently selected from the group consisting of hydrogen,  $\text{C}_{1-6}$  alkyls,  $\text{C}_{3-12}$  branched alkyls,  $\text{C}_{3-6}$  cycloalkyls,  $\text{C}_{1-6}$  substituted alkyls,  $\text{C}_{3-8}$  substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls,  $\text{C}_{1-6}$  heteroalkyls, substituted  $\text{C}_{1-6}$  heteroalkyls,  $\text{C}_{1-6}$  alkoxy, phenoxy and  $\text{C}_{1-6}$  heteroalkoxy;

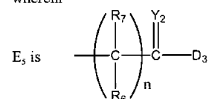
Ar is a moiety which when included in Formula (I) forms a multi-substituted aromatic hydrocarbon or a multi-substituted heterocyclic group; and

$\text{B}'_1$  is a residue of a hydroxyl- or an amine-containing moiety;

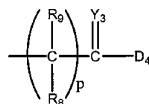
with a compound of the formula (IX):



wherein



$\text{E}_{5,8}$  are independently H,  $\text{E}_3$  or



WO 02/065988

PCT/US02/04781

wherein

D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> are independently OH, a leaving group which is capable of reacting with an unprotected amine or hydroxyl or a terminal branching group;

R<sub>1</sub> is a polymeric residue;

Y<sub>1</sub> is O, S or NR<sub>4</sub>;

M is O, S or NR<sub>5</sub>;

(n) and (p) are independently 0 or a positive integer;

Y<sub>2-3</sub> are independently O, S or NR<sub>10</sub>; and

R<sub>2-10</sub> are independently selected from the group consisting of hydrogen, C<sub>1-6</sub> alkyls, C<sub>3-12</sub> branched alkyls, C<sub>3-8</sub> cycloalkyls, C<sub>1-6</sub> substituted alkyls, C<sub>3-8</sub> substituted cycloalkyls, aryls, substituted aryls, aralkyls, C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, substituted C<sub>1-6</sub> heteroalkyls, C<sub>1-6</sub> alkoxy, phenoxy and C<sub>1-6</sub> heteroalkoxy;

under conditions sufficient to cause a polymeric conjugate to be formed.

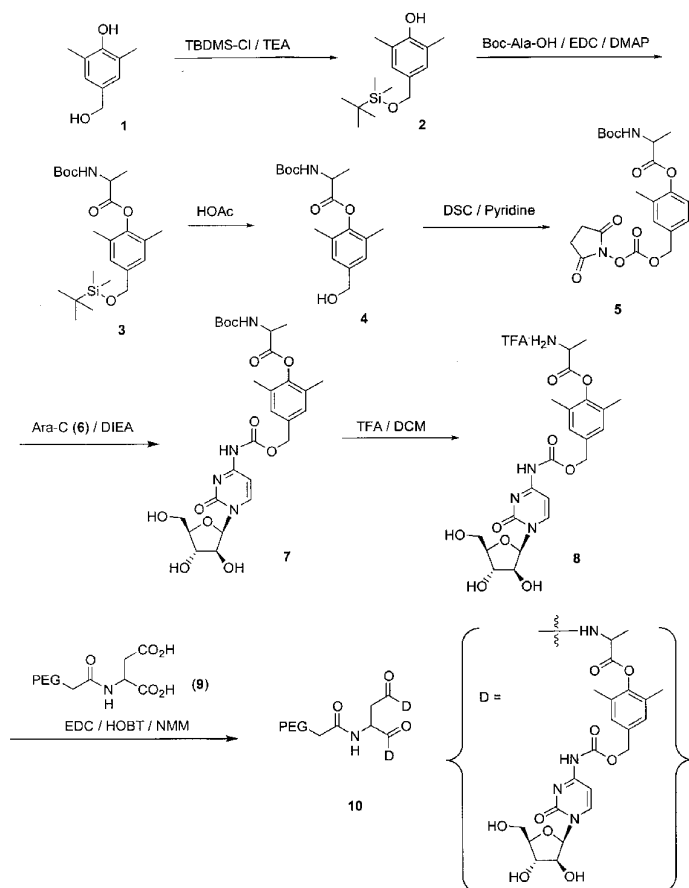


WO 02/065988

1/5

PCT/US02/04781

Figure 1

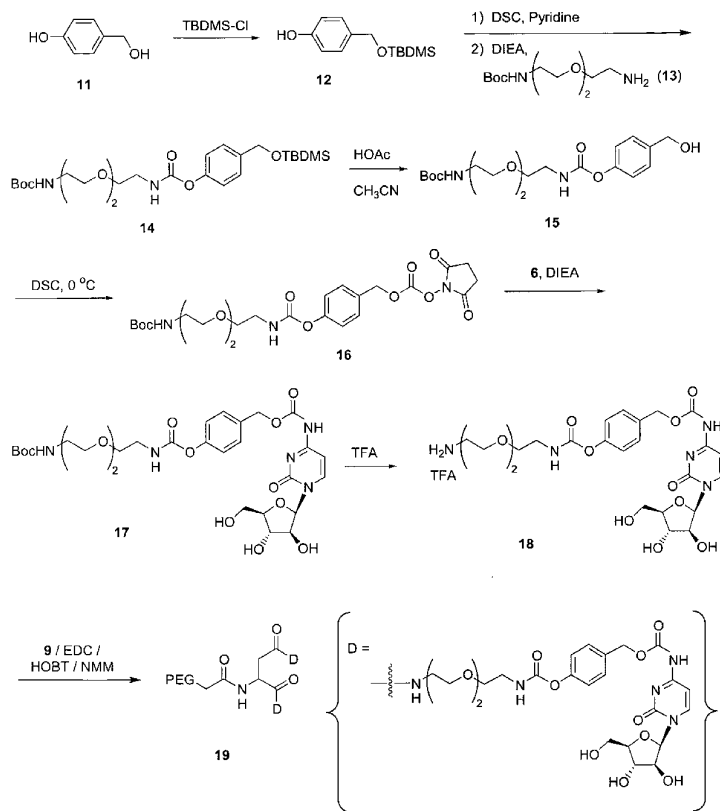


WO 02/065988

2/5

PCT/US02/04781

Figure 2

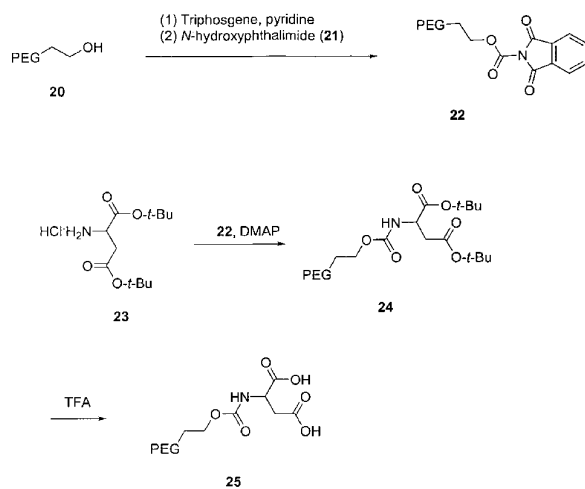


WO 02/065988

3/5

PCT/US02/04781

Figure 3



Melphalan (**26**)

$\xrightarrow[\text{MeOH}]{\text{HCl, 2,2-dimethoxypropane}}$

**27**

$\xrightarrow{16, \text{ DMAP}}$

**28**

$\xrightarrow{\text{TFA}}$

**29**

$\xrightarrow{25 / \text{ EDC } / \text{ DMAP}}$

**30**

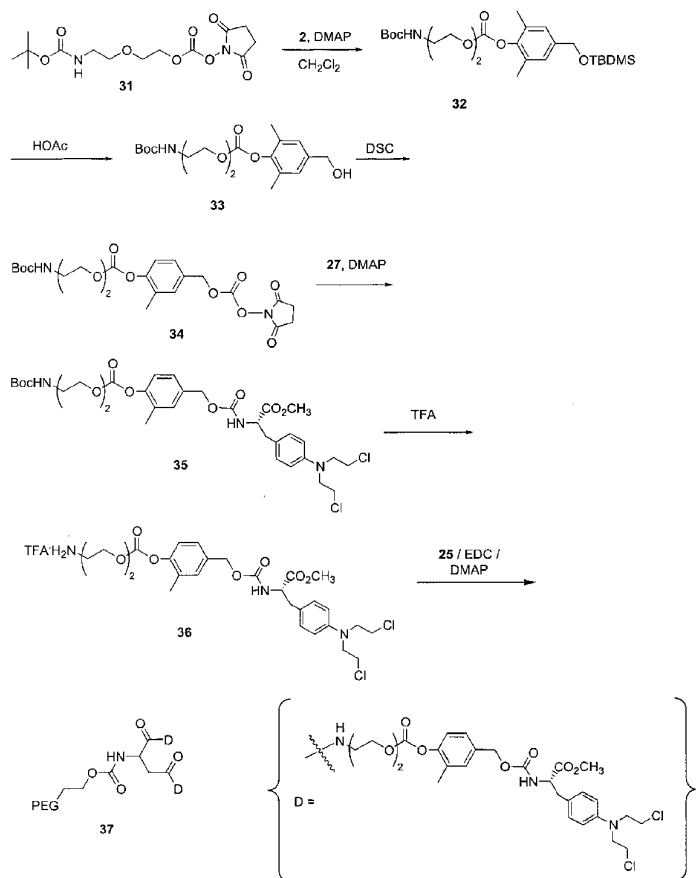
D =

WO 02/065988

5/5

PCT/US02/04781

Figure 5



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/065988 A3**(51) International Patent Classification: C07D 491/22,  
317/70, 305/14, A61K 31/335

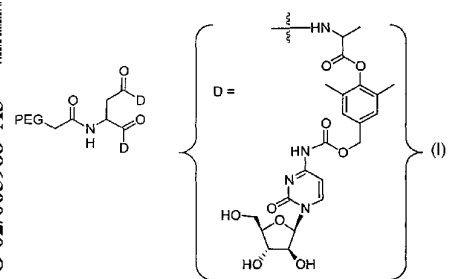
(21) International Application Number: PCT/US02/04781

(22) International Filing Date: 19 February 2002 (19.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/270,009 20 February 2001 (20.02.2001) US

(71) Applicant: ENZON, INC. [US/US]; 20 Kingsbridge  
Road, Piscataway, NJ 08854 (US).(81) Designated States (*national*): AF, AG, AI, 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, GI,  
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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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  
(BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).Published:  
— with international search report(72) Inventors: CHOE, Yun, Hwang; 9 Greenbrier Road,  
Green Brook, NJ 08812 (US); GREENWALD, Richard,  
B.; 113 Hickory Road, Somerset, NJ 08873 (US).(88) Date of publication of the international search report:  
10 April 2003(74) Agent: MERCANTI, Michael, N.; Roberts & Mercanti,  
L.L.P., LDC II, 105 Lock Street, Suite 203, Newark, NJ  
07103 (US).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: TERMINALLY-BRANCHED POLYMERIC LINKERS AND POLYMERIC CONJUGATES CONTAINING THE  
SAME

(57) Abstract: Terminally-branched polymeric prodrug platforms capable of high degrees of loading are disclosed. In preferred aspects of the invention, the prodrug platform releases multiple parent compounds after each branch holding the active agent undergoes a benzyl elimination reaction. Methods of preparing the prodrugs and using the same in the treatment of mammals are also disclosed. In one preferred aspect, polymeric conjugates such as (I) are provided.

WO 02/065988 A3

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/04781
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07D 491/22, 317/70, 305/14; A61K 31/335 US CL : 514/772.3, 283,506; 560/147, 155 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/772.3, 283,506; 560/147, 155 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96/23794 A1 (ENZO, INC.) 08 August 1996, (08.08.1996), see entire document.	1-22
Y	US 6,135,655 A (MARTINEZ et al) 28 November 2000 (28.11.2000), see entire document.	1-17
Y	WO 93/24476 A1 (CLOVER CONSOLIDATED LIMITED) 09 December 1993 (09.12.1993), see entire document.	1-22
Y	US 5,606,047 A (COUTTS) 25 February 1997, (25.02.1997), see entire document.	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 October 2002 (01.10.2002)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 2002
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Howard V. Owens Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/04781

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
WEST  
STN



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
// A 6 1 K 31/136	A 6 1 K 31/136	
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/7068	A 6 1 K 31/7068	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チョウ, ユン, ファン

アメリカ合衆国 0 8 8 1 2 ニュージャージー州, グリーン ブルック, グリーンプライアー  
ロード 9

(72)発明者 グリーンウォルド, リチャード, ビー.

アメリカ合衆国 0 8 8 7 3 ニュージャージー州, サマーセット, ヒッコリー ロード 1 1 3

F ターム(参考) 4C076 CC27 CC42 EE59 FF31 FF67

4C086 AA01 AA02 AA03 EA10 EA17 FA06 MA01 NA15 ZB26

4C206 AA01 AA02 AA03 FA31 FA53 MA01 NA15 ZB26

4J005 AA04 BD05 BD06

4J031 BA06 BA11 BA15 BA29 BB01 BB02 BD03 CA06 CD12 CD25