

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5548365号
(P5548365)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

(51) Int.Cl.		F I	
CO8G	69/48	(2006.01)	CO8G 69/48
CO8G	69/10	(2006.01)	CO8G 69/10
CO8G	69/42	(2006.01)	CO8G 69/42
A61K	31/787	(2006.01)	A61K 31/787
A61K	47/34	(2006.01)	A61K 47/34

請求項の数 18 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-543080 (P2008-543080)
(86) (22) 出願日	平成19年11月6日 (2007.11.6)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/071532
(87) 国際公開番号	W02008/056654
(87) 国際公開日	平成20年5月15日 (2008.5.15)
審査請求日	平成22年9月16日 (2010.9.16)
(31) 優先権主張番号	特願2006-302686 (P2006-302686)
(32) 優先日	平成18年11月8日 (2006.11.8)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	000004086 日本化薬株式会社 東京都千代田区富士見1丁目11番2号
(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

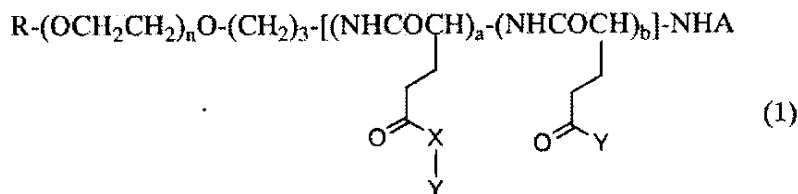
(54) 【発明の名称】 核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)：

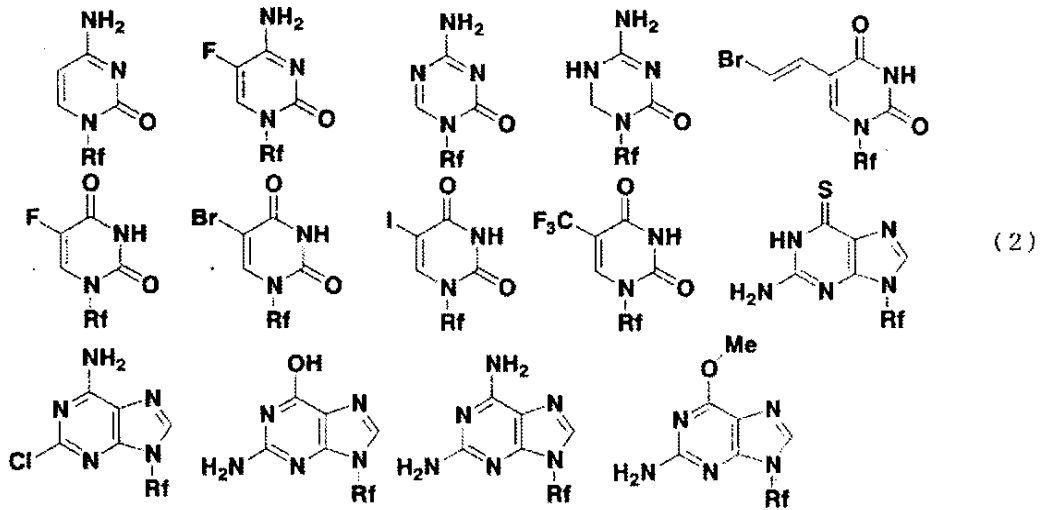
【化1】



[式中、RはC1～C4アルキル基を示し、AはC2～C4アシル基を示し、a+bは平均値で5～100を示し、aはa+bのうち80～100%、bはa+bのうち0～20%を示し、nは平均値で50～1000を示し、Xは疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1～C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基(核酸系代謝拮抗剤残基数はa+bを100%とすると5～80%であり、-N(R1)CONH(R2)の数は0～70%であり、水酸基数は0～70%である)を示し、ポリグルタミン酸の構成単位の結合順は任意である。]で表される化合物であり、

核酸系代謝拮抗剤残基が一般式(2) :

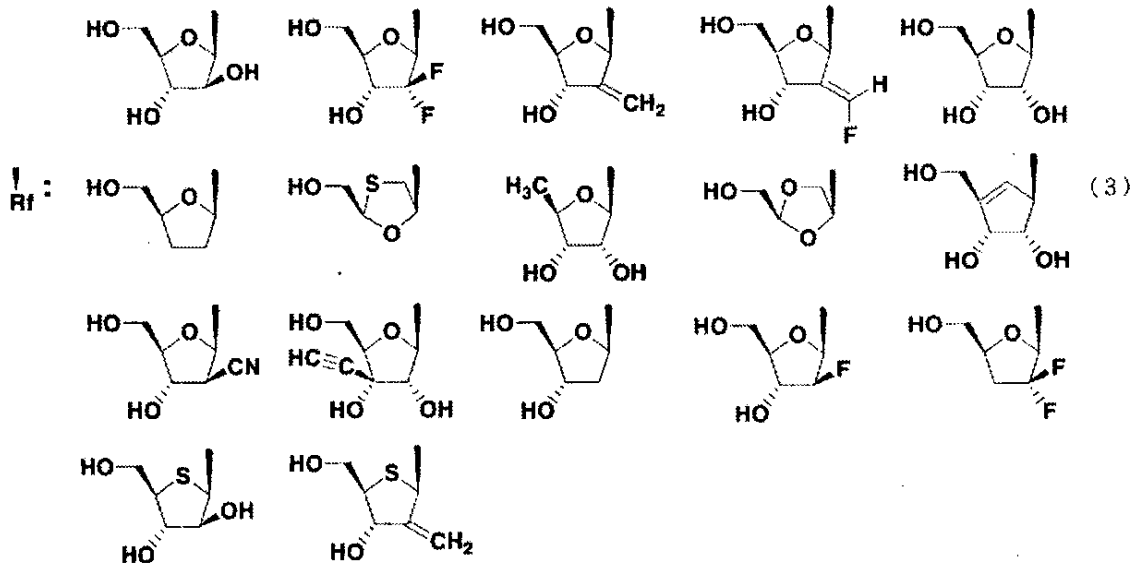
【化2】



10

[式中、-Rfは、式(3) :

【化3】



20

30

の置換基群より選ばれる基を示す]

で表されるいずれかの核酸系代謝拮抗剤の残基である、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

40

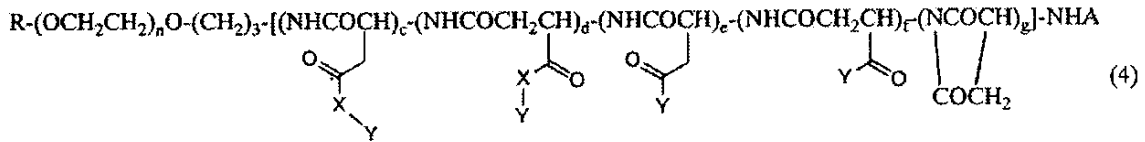
【請求項2】

Rがメチル基、Aがアセチル基であり、a+bが平均値で10~60であり、nが平均値で100~300であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン又はドキシフルリジン残基である請求項1に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

【請求項3】

下記一般式(4) :

【化4】

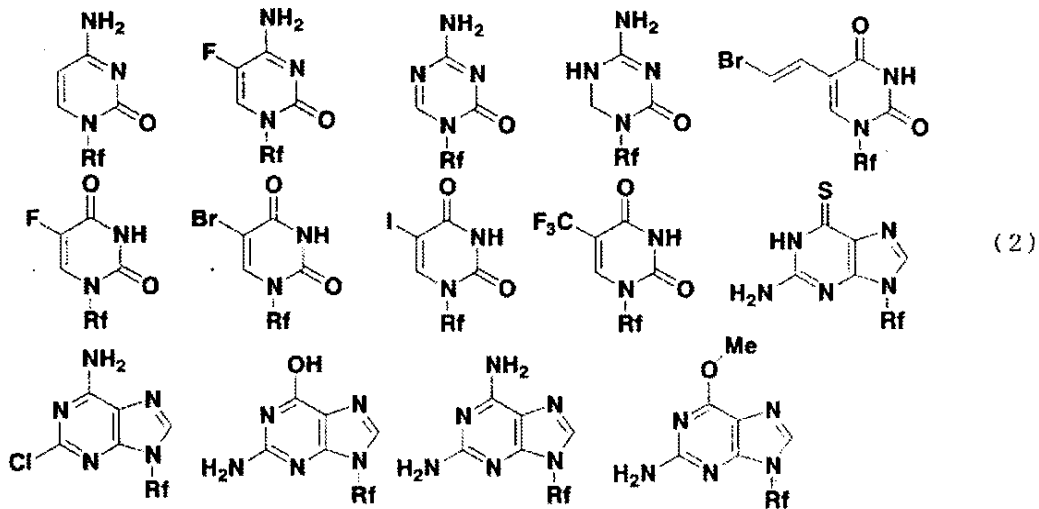


[式中、R、A、n、Xは、請求項1の一般式(1)に同じであり、c+d+e+f+gは平均値で3~200を示し、c+dはc+d+e+f+gのうち85~100%、e+f+gはc+d+e+f+gのうち0~15%を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なっていてもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基(核酸系代謝拮抗剤残基数はc+d+e+f+gを100%とすると5~80%であり、-N(R1)CONH(R2)の数は0~70%であり、水酸基数は0~70%である)を示し、ポリアスパラギン酸の各構成単位の結合順は任意である。]で表される化合物であり、

10

核酸系代謝拮抗剤残基が一般式(2)：

【化5】

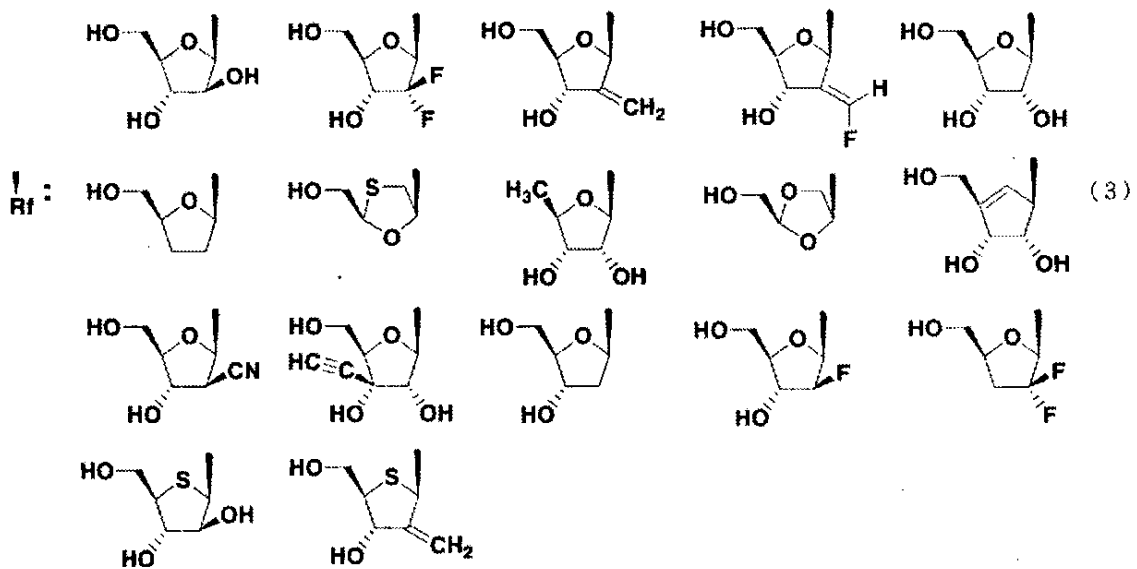


20

30

[式中、-Rfは、式(3)：

【化6】



10

の置換基群より選ばれる基を示す]

で表されるいずれかの核酸系代謝拮抗剤の残基である、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

20

【請求項4】

RがC1～C4アルキル基であり、AがC2～C4アシル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で5～100であり、 $c + d$ が $c + d + e + f + g$ のうち90～100%であり、 $e + f + g$ が $c + d + e + f + g$ のうち0～10%であり、 n が平均値で50～1000である、請求項3に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

【請求項5】

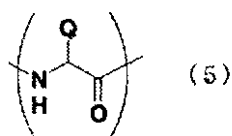
Rがメチル基、Aがアセチル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で10～60、 n が平均値で100～300であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン又はドキシフルリジン残基である請求項4に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

30

【請求項6】

疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基が一般式(5)：

【化7】



(5)

[式中、Qは中性アミノ酸の側鎖を示す]

で表される請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

40

【請求項7】

Qがイソプロピル基又はベンジル基である請求項6に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

【請求項8】

Rがメチル基、Aがアセチル基であり、 $a + b$ が平均値で10～60、 n が平均値で100～300であり、疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基がフェニルアラニン残基であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン残基であり、 $-N(R1)CO NH(R2)$ がイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基である請求項1に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

【請求項9】

50

R がメチル基、A がアセチル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で 10 ~ 60、 n が平均値で 100 ~ 300 であり、疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基がフェニルアラニン残基であり、核酸系代謝拮抗剤がゲムシタピンであり、 $-N(R1)CONH(R2)$ がイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基である請求項 3 に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分として含む抗腫瘍剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分として含む抗ウイルス剤。

10

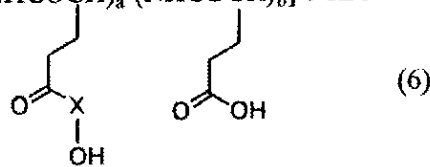
【請求項 12】

ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤を導入することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

【請求項 13】

一般式 (6) :

【化 8】



20

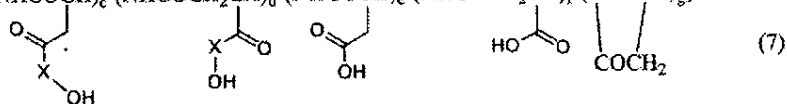
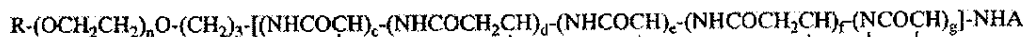
[式中、R、A、 n 、 a 、 b 、X は、請求項 1 の一般式 (1) に同じである] で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体に核酸系代謝拮抗剤を導入する請求項 12 に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

30

【請求項 14】

一般式 (7) :

【化 7】



40

[式中、R、A、 n 、X は、請求項 1 の一般式 (1) に同じであり、 c 、 d 、 e 、 f 、 g は、請求項 3 の一般式 (4) に同じである] で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体に核酸系代謝拮抗剤を導入する請求項 12 に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の一般式 (6) で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の一般式 (7) で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

50

【請求項 17】

R がメチル基、A がアセチル基であり、 $a + b$ が平均値で 10 ~ 60、 n が平均値で 100 ~ 300 である請求項 15 に記載の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

【請求項 18】

R がメチル基、A がアセチル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で 10 ~ 60、 n が平均値で 100 ~ 300 である請求項 16 に記載の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体、その用途及びその製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

悪性腫瘍あるいはウイルス性疾患の治療を目的として種々の核酸系代謝拮抗剤の開発が行なわれ、抗腫瘍剤（抗癌剤）としてはシタラビン（cytarabine）、ゲムシタビン（gemcitabine）、ドキシフルリジン（doxifluridine）、アザシチジン（azacitidine）、デシタビン（decitabine）、ネララビン（nelarabine）等が、抗ウイルス剤としてはザルシタビン（zalcitabine）、ラミブジン（lamivudine）等が臨床で使用されている。

20

【0003】

しかし、これら核酸系代謝拮抗剤は強い *in vitro* 活性を示すにもかかわらず、生体内での代謝・排泄を受けやすいために本来の薬剤が持つ薬効を十分に発揮できなかったり、あるいは高投与量を必要とするものが多い。例えば、ゲムシタビンは *in vitro* ではパクリタキセルやドキシソルピシン等の抗癌剤に匹敵する強い細胞増殖抑制活性を有するのに対し、臨床においては体表面積あたり 1 回 1000 mg/m² の高投与が必要である。これは、2'-デオキシシチジンの代謝酵素であるシチジン脱アミノ化酵素によって塩基の 4 位アミノ基が代謝・失活されることにより、*in vivo* 利用率が低くなるためと考えられている（非特許文献 1 参照）。

【0004】

30

ポリマーに薬剤を結合させることにより、生体内における薬物動態が改善し治療効果の向上がみられることがある。非特許文献 2 には、平均分子量約 30000 のポリグルタミン酸類とシタラビンとを結合させた高分子誘導体が記載されている。しかしながら、薬剤の高分子誘導体には免疫反応により過敏反応を示す場合があり、その様な場合には薬剤として繰返し投与ができない。

【0005】

特許文献 1 にはポリエチレングリコール類にシチジン系誘導体を結合させた高分子誘導体が、非特許文献 3 にはポリエチレングリコール類の両末端にアスパラギン酸を分枝状に置換させそれにシタラビンを結合させた高分子誘導体が記載されている。さらに、特許文献 6 にはポリエチレングリコール鎖の末端にアミノ酸を用い分岐させ、その各分岐がベンジル脱離反応を受けた後に薬剤を放出する構造を持つ高分子誘導体が記載されている。しかし、これらすべての高分子誘導体は、血漿中での加水分解速度が、長くても数 10 時間でそれほど遅くならず、高分子誘導体そのものが、生体内に長時間滞留し、長時間にわたって内包化合物を放出しない。さらに、これら高分子誘導体は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の加水分解速度と血漿中の加水分解速度の差が大きく、加水分解反応が生体内の酵素に大きく依存するため、临床上における治療効果が患者の個体差に大きく影響される可能性がある。

40

【0006】

特許文献 2 にはポリエチレングリコール類とポリアスパラギン酸が縮合したブロック型ポリマーに薬剤を結合した分子がミセルを形成し医薬となることが記載されている。又、

50

特許文献3にはポリエチレングリコール類とポリ酸性アミノ酸とのブロック共重合体の側鎖カルボキシル基に疎水性物質を結合した高分子運搬体となる高分子担体が記載されている。さらに、特許文献4にはポリエチレングリコール類とポリグルタミン酸が縮合したブロック型ポリマーのグルタミン酸側鎖カルボキシル基に抗癌性物質を結合させた高分子が記載されている。しかしながら、これらには結合する薬剤として核酸系代謝拮抗剤に関する記載はない。

【0007】

特許文献5にはポリエチレングリコールとポリカルボン酸との重合体のカルボキシル基と、フェノール性カンプトテシン類のフェノール性水酸基とを、エステル縮合した水溶性高分子誘導体が癌化学療法に適していることが記載されているが、これらはポリエチレングリコールとポリカルボン酸との重合体のカルボキシル基に直接薬剤を結合させており、何らかのリンカーを介して薬剤を結合させていない。また、これらにも結合する薬剤として核酸系代謝拮抗剤に関する記載はない。

10

【0008】

【特許文献1】特表2003-524028号公報

【特許文献2】特許第2694923号公報

【特許文献3】特許第3268913号公報

【特許文献4】特開平5-955号公報

【特許文献5】国際公開番号WO2004/039869号パンフレット

【特許文献6】特表2004-532289号公報

20

【0009】

【非特許文献1】「*キャンサー・サイエンス*」、日本癌学会発行、2004年、第95巻、105-111頁(Cancer Science, Japanese Cancer Association, Vol. 95, p. 105-111 (2004))

【非特許文献2】「*キャンサー・リサーチ*」(米国)、米国癌学会発行、1984年、第44巻、25-30頁(Cancer Research, American Association for Cancer Research, Vol. 44, p. 25-30 (1984))

【非特許文献3】「*ジャーナル オブ コントロールド リリース*」(英国)、エルゼヴィア発行、2002年、第79巻、55-70頁(Journal of Controlled Release, Elsevier, Vol. 79, p. 55-70 (2002))

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、低投与量でより高い効果を有し新規な抗癌剤又は抗ウイルス剤となる核酸系代謝拮抗剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体、特にポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤が結合していることを特徴とする核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を見出した。

40

【0012】

即ち、本発明は次の(1)~(21)に関する。

(1) ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤が結合していることを特徴とする核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(2) 側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリアスパラギン酸またはポリグル

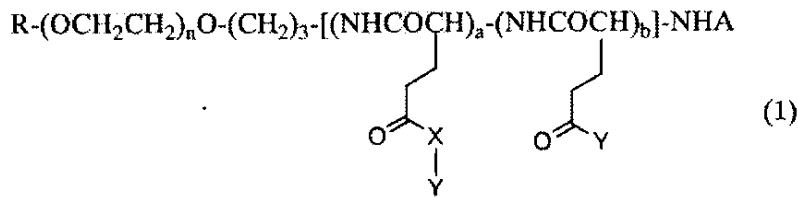
50

タミン酸誘導体である上記(1)記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(3)側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリグルタミン酸誘導体である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体が、下記一般式(1)：

【0013】

【化1】



10

【0014】

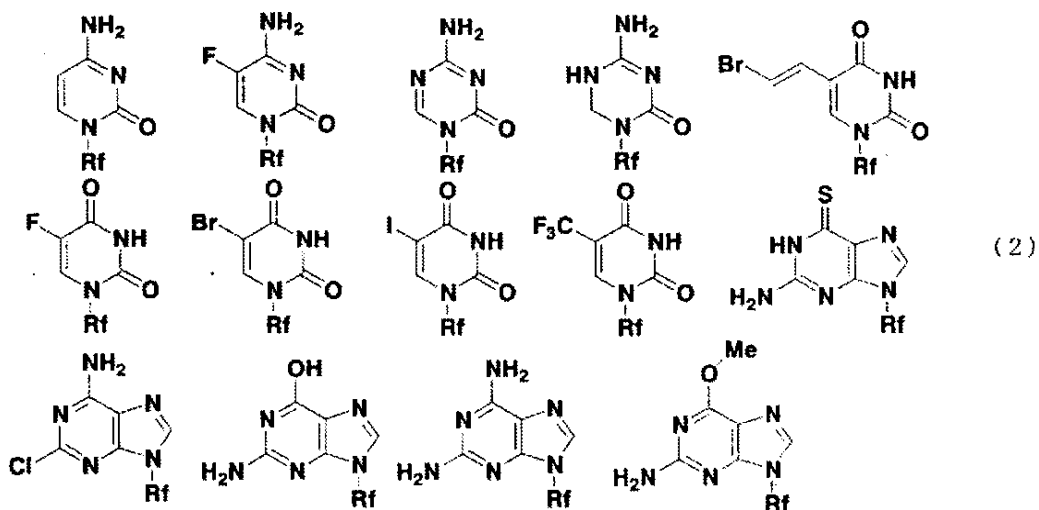
[式中、Rは水素原子又はC1～C6アルキル基を示し、Aは水素原子、C1～C6アシル基又はC1～C6アルコキシカルボニル基を示し、a+bは平均値で3～200を示し、aはa+bのうち75～100%、bはa+bのうち0～25%を示し、nは平均値で5～2000を示し、Xは疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なっていてもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1～C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基(核酸系代謝拮抗剤残基数はa+bを100%とすると5～80%であり、-N(R1)CONH(R2)の数は0～70%であり、水酸基数は0～70%である)を示し、ポリグルタミン酸の構成単位の結合順は任意である。]

20

(4)RがC1～C4アルキル基であり、AがC2～C4アシル基であり、a+bが平均値で5～100であり、aがa+bのうち80～100%であり、bがa+bのうち0～20%であり、nが平均値で50～1000であり、核酸系代謝拮抗剤残基が一般式(2)：

【0015】

【化2】



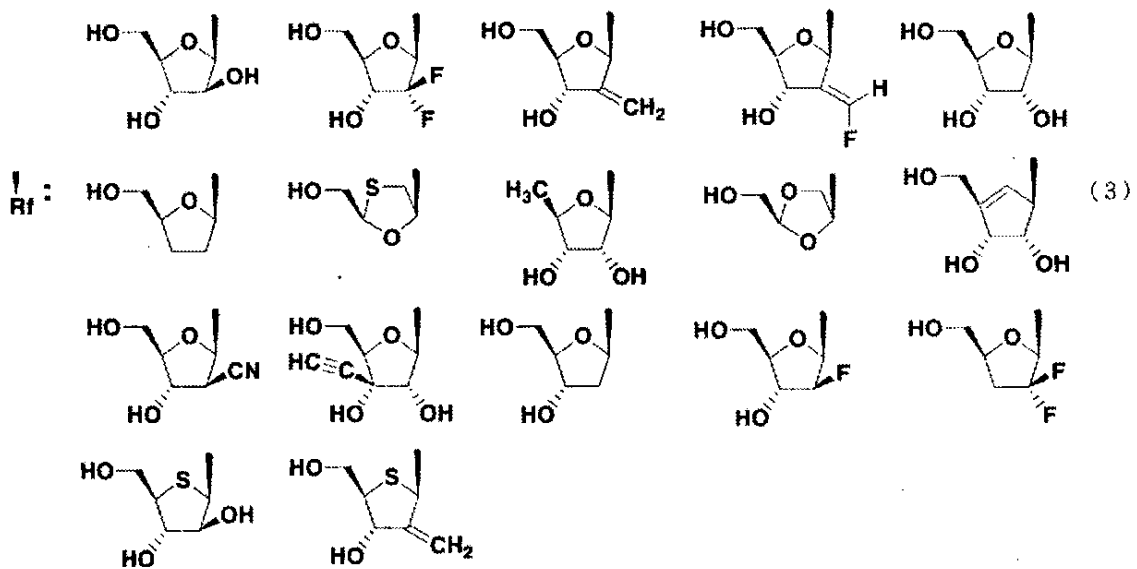
30

40

[式中、-Rfは、式(3)：

【0016】

【化3】



10

【0017】

の置換基群より選ばれる基を示す]

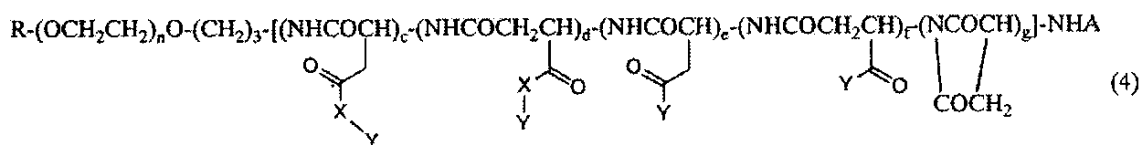
で表されるいずれかの核酸系代謝拮抗剤の残基である上記(3)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(5) Rがメチル基、Aがアセチル基であり、 $a + b$ が平均値で5~100であり、 n が平均値で100~300であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン又はドキシフルリジン残基である上記(4)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(6) 側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリアスパラギン酸誘導体である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体が、下記一般式(4)：

【0018】

【化4】



30

【0019】

[式中、R、A、 n 、Xは一般式(1)に同じであり、 $c + d + e + f + g$ は平均値で3~200を示し、 $c + d$ は $c + d + e + f + g$ のうち85~100%、 $e + f + g$ は $c + d + e + f + g$ のうち0~15%を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なっていてもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基(核酸系代謝拮抗剤残基数は $c + d + e + f + g$ を100%とすると5~80%であり、-N(R1)CONH(R2)の数は0~70%であり、水酸基数は0~70%である)を示し、ポリアスパラギン酸の各構成単位の結合順は任意である。]で表される化合物である上記(1)又は(2)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

40

(7) RがC1~C4アルキル基であり、AがC2~C4アシル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で5~100であり、 $c + d$ が $c + d + e + f + g$ のうち90~100%であり、 $e + f + g$ が $c + d + e + f + g$ のうち0~10%であり、 n が平均値で50~1000であり、核酸系代謝拮抗剤残基が前記一般式(2)で表されるいずれかの核酸系代謝拮抗剤の残基である上記(6)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(8) Rがメチル基、Aがアセチル基であり、 $c + d + e + f + g$ が平均値で10~60

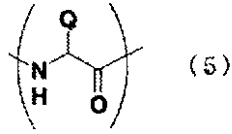
50

、nが平均値で100～300であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン又はドキシフルリジン残基である前記(7)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(9)疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基が一般式(5)：

【0020】

【化5】



10

【0021】

[式中、Qは中性アミノ酸の側鎖を示す]

で表される上記(3)～(8)のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(10)Qがイソプロピル基又はベンジル基である上記(9)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(11)Rがメチル基、Aがアセチル基であり、a+bが平均値で10～60、nが平均値で100～300であり、疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基がフェニルアラニン残基であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン残基であり、-N(R1)CONH(R2)がイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基である上記(3)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

20

(12)Rがメチル基、Aがアセチル基であり、c+d+e+f+gが平均値で10～60、nが平均値で100～300であり、疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基がフェニルアラニン残基であり、核酸系代謝拮抗剤残基がゲムシタピン残基であり、-N(R1)CONH(R2)がイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基である上記(6)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体。

(13)上記(1)～(12)のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分として含む抗腫瘍剤。

(14)上記(1)～(12)のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分として含む抗ウイルス剤。

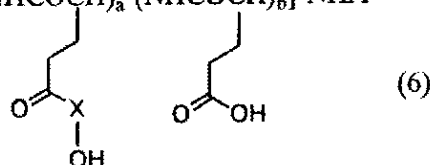
30

(15)ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤を導入することを特徴とする上記(1)～(12)のいずれか一項に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

(16)一般式(6)：

【0022】

【化6】



40

【0023】

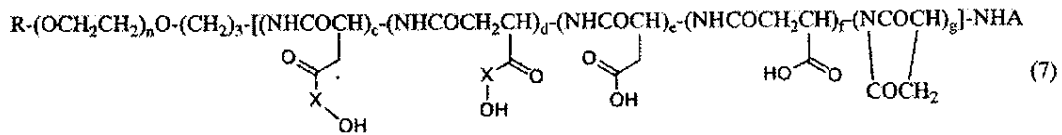
[式中、Rは、A、n、a、b、Xは一般式(1)に同じである]で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体に核酸系代謝拮抗剤を導入する、上記(15)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

(17)一般式(7)：

50

【 0 0 2 4 】

【 化 7 】



【 0 0 2 5 】

[式中、R、A、n、Xは一般式(1)に同じであり、c、d、e、f、gは一般式(4)に同じである] で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体に核酸系代謝拮抗剤を導入する、上記(15)に記載の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の製造法。

10

(18) 上記(16)に記載の一般式(6)で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

(19) 上記(17)に記載の一般式(7)で表される、高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

(20) Rがメチル基、Aがアセチル基であり、a+bが平均値で10~60、nが平均値で100~300である上記(18)に記載の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

20

(21) Rがメチル基、Aがアセチル基であり、c+d+e+f+gが平均値で10~60、nが平均値で100~300である上記(19)に記載の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 6 】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体は、ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤であるヌクレオシド誘導体が結合した構造を有することを特徴とする。この高分子誘導体は、その構造上、水中で親水性の高いポリエチレングリコール類部分を外殻、疎水性リンカーを有する側鎖を内殻とした凝集体を形成すると考えられる。この高分子誘導体は生体内において酵素非依存的に核酸系代謝拮抗剤を徐放することができ、低投与量で治療効果に優れた抗癌剤又は抗ウイルス剤として有用である。酵素非依存的に薬剤徐放性を示すことから、治療効果に対する患者の個体差の影響が少ない誘導体となり得る。又、この高分子誘導体は選択的に患部に集積し、より高い効果で副作用が少ない薬剤となる。更に、この高分子誘導体は、薬剤の親水性の程度に関わらず、薬剤の含有量が高い。これは疎水性リンカーを介して薬剤を導入することに起因している。

30

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 7 】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体は、ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤が結合していることを特徴とする。

40

【 0 0 2 8 】

本発明において、疎水性のリンカーとしては疎水性であればいずれの置換基でもよく、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の薬効発現に支障をきたさない限り特に限定されないが、好ましくは疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

本発明における「核酸系代謝拮抗剤」とは、抗腫瘍活性又は抗ウイルス活性を有し、ヌクレオシド誘導体の構造を有する化合物である。具体的には、核酸塩基部分が上記式(2)から選択されるいずれかであり、それに結合している基(Rf)が上記式(3)から選

50

扱されるいずれかである化合物である。

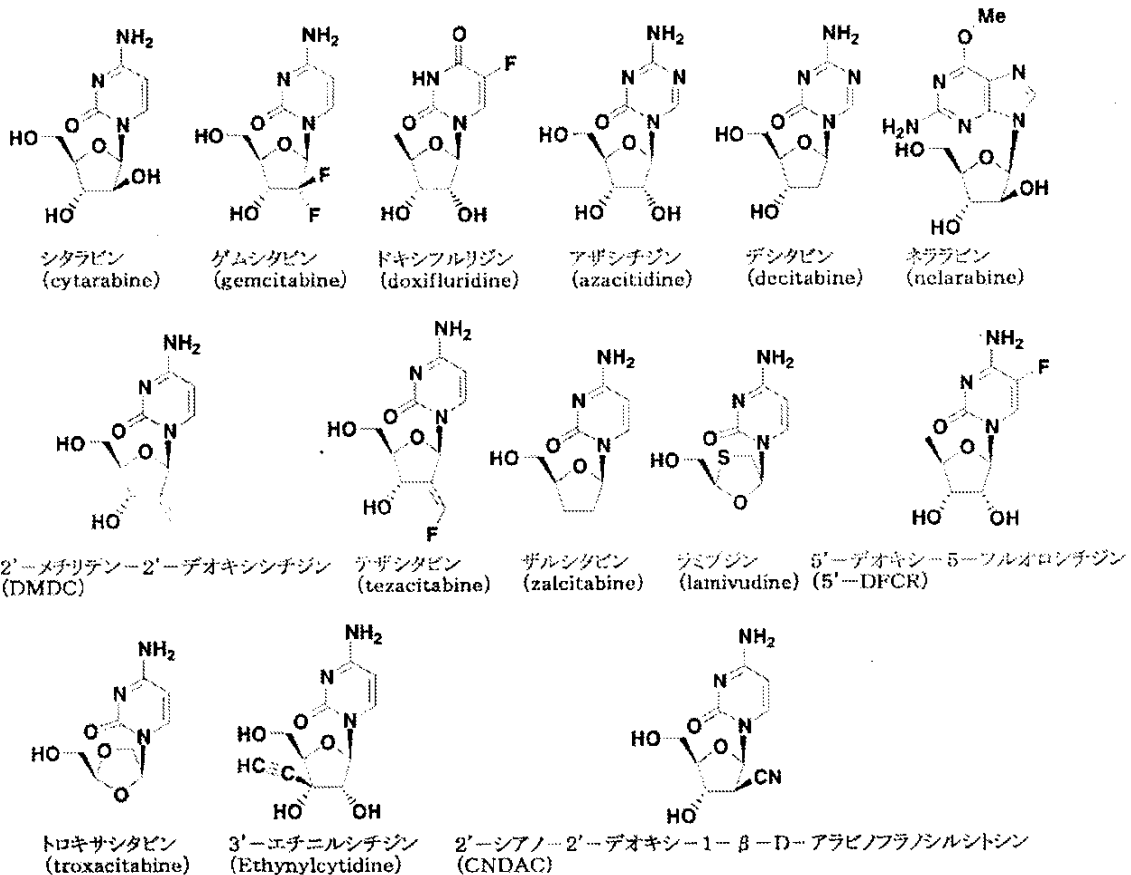
【0030】

更に具体的には、例えば、シタラビン(cytarabine)、ゲムシタビン(gemcitabine)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、アザシチジン(azacitidine)、デシタビン(decitabine)、ネララビン(nelarabine)、2'-メチリデン-2'-デオキシシチジン(DMDC)、テザシタビン(tezacitabine)、ザルシタビン(zalcitabine)、ラミブジン(lamivudine)、5'-デオキシ-5-フルオロシチジン(5'-DFCR)、トロキサシタビン(troxacitabine)、3'-エチニルシチジン(ethynylcytidine)又は2'-シアノ-2'-デオキシ-1-β-D-アラビノフラノシルシトシン(CNDAC)等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0031】

【化8】



20

30

【0032】

本発明において「ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物」における側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分としては、カルボキシル基を有する側鎖がポリマー主鎖から枝分かれしたグラフト型ポリマーやポリカルボン酸ポリマーが縮合したブロック型ポリマー等が挙げられる。

40

【0033】

側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がグラフト型ポリマーである前記の高分子化合物は、例えば、特開平11-279083号公報に記載のポリエチレングリコールとアクリル酸類の縮合物と、アクリル酸類あるいは無水マレイン酸等とを共重合反応に供し、必要に応じて加水分解反応に付すこと等によって得られるポリマー等が挙げられる。

【0034】

側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がブロック型ポリマーである前記の高分子

50

化合物は、末端官能基を有するポリエチレングリコール類と末端に官能基を有するポリカルボン酸を結合した化合物や、特許文献3、4、及び5に記載されている、末端にアミノ基を有するポリエチレングリコール類で重合を開始するアミノ酸活性化物の重合反応によって得られる化合物等が挙げられる。

【0035】

側鎖にカルボキシル基を有するポリマーは、例えば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリリンゴ酸、ポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸等が挙げられ、好ましくはポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸である。

【0036】

本発明における「ポリエチレングリコール類」は、両末端又は片末端が修飾されたポリエチレングリコール誘導体でもよく、その場合、両末端の修飾基は同一でも異なってもよい。末端の修飾基としては、置換基を有していてもよいC1～C6アルキル基が挙げられ、好ましくは置換基を有していてもよいC1～C4アルキル基である。

10

【0037】

本発明において置換基を有していてもよいC1～C6アルキル基におけるC1～C6アルキル基は直鎖、分岐鎖又は環状のC1～C6アルキル基が挙げられ、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、2-メチルブチル基、ネオペンチル基、1-エチルプロピル基、ヘキシル基、4-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、1-メチルペンチル基、3,3-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,1-ジメチルブチル基、1,2-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、シクロプロピル基、シクロペンチル基又はシクロヘキシル基等が挙げられ、好ましくはC1～C4アルキル基であり、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基又はt-ブチル基等であり、特に好ましくはメチル基、エチル基、n-プロピル基又はイソプロピル基である。

20

【0038】

本発明において置換基を有していてもよいC1～C6アルキル基の置換基は特に限定されないが、例えば、アミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、ジエチルアミノ基等が挙げられ、好ましくはアミノ基である。

30

【0039】

本発明においては両末端が修飾されたポリエチレングリコール誘導体が好ましく、具体的には、一方の末端がC1～C6アルキル基で他方の末端がアミノC1～C6アルキル基であるポリエチレングリコール誘導体が挙げられ、一方の末端がC1～C4アルキル基で他方の末端がアミノC1～C4アルキル基であるポリエチレングリコール誘導体が好ましく、特に一方の末端がメチル基で他方の末端がアミノプロピル基であるポリエチレングリコール誘導体が好ましい。

【0040】

本発明における「ポリエチレングリコール類」の重量平均分子量は200～50000程度であり、好ましくは500～100000程度、より好ましくは2000～50000程度である。

40

【0041】

本発明における「ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物」として好ましくはブロック型ポリマーであり、より好ましくはポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシル基を有するポリマーとのブロック共重合体である。

【0042】

本発明においてポリエチレングリコール類と側鎖にカルボキシル基を有するポリマーとのブロック共重合体としては、例えば、アルコキシポリエチレングリコール-ポリアクリル酸、アルコキシポリエチレングリコール-ポリメタクリル酸、メトキシポリエチレング

50

リコール - ポリアスパラギン酸又はアルコキシポリエチレングリコール - ポリグルタミン酸等が挙げられ、好ましくはメトキシポリエチレングリコール - ポリアスパラギン酸またはメトキシポリエチレングリコール - ポリグルタミン酸である。

【 0 0 4 3 】

本発明における「ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物」の1分子あたりの平均カルボキシル基数は、3 ~ 200個程度であり、好ましくは5 ~ 100個程度、より好ましくは10 ~ 60個程度である。

【 0 0 4 4 】

本発明における「ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物」の重量平均分子量は500 ~ 500000程度であり、好ましくは2000 ~ 100000程度であり、より好ましくは3000 ~ 50000程度である。

【 0 0 4 5 】

本発明において、ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して結合している核酸系代謝拮抗剤の結合量としては、1個 ~ カルボキシル基の総数の範囲内であれば特に限定されず、生体内に投与した際に薬効を示す量であればよい。好ましくはポリマー部分の総カルボン酸数の5 ~ 80%、より好ましくは5 ~ 70%である。

【 0 0 4 6 】

上記結合量は、本発明化合物の紫外線吸収スペクトルの強度から求めることができる。又、本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体をアルカリ加水分解することにより遊離する核酸系代謝拮抗剤を、例えば、高速液体クロマトグラフィー等で定量することによっても求めることができる。

【 0 0 4 7 】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体とはポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーを介して核酸系代謝拮抗剤であるヌクレオシド誘導体が結合していることを特徴とし、好ましくは側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸の誘導体である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体である。さらに好ましくは上記一般式(1) [式中、Rは水素原子又はC1 ~ C6アルキル基を示し、Aは水素原子、C1 ~ C6アシル基又はC1 ~ C6アルコキシカルボニル基を示し、a + bは平均値で3 ~ 200を示し、aはa + bのうち75 ~ 100%、bはa + bのうち0 ~ 25%を示し、nは平均値で5 ~ 2000を示し、Xは疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び - N(R1)CONH(R2) (R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1 ~ C6アルキル基) からなる群から2種以上選ばれる基 (核酸系代謝拮抗剤残基数はa + bを100%とすると5 ~ 80%であり、- N(R1)CONH(R2)の数は0 ~ 70%であり、水酸基数は0 ~ 70%である) を示し、ポリグルタミン酸の構成単位の結合順は任意である。] 及び上記一般式(4) [式中、R、A、n、Xは一般式(1)に同じであり、c + d + e + f + gは平均値で3 ~ 200を示し、c + dはc + d + e + f + gのうち85 ~ 100%、e + f + gはc + d + e + f + gのうち0 ~ 15%を示し、Yは核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、及び - N(R1)CONH(R2) (R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1 ~ C6アルキル基) からなる群から2種以上選ばれる基 (核酸系代謝拮抗剤残基数はc + d + e + f + gを100%とすると5 ~ 80%であり、- N(R1)CONH(R2)の数は0 ~ 70%であり、水酸基数は0 ~ 70%である) を示し、ポリアスパラギン酸の各構成単位の結合順は任意である。] で表される化合物である。

【 0 0 4 8 】

又、本発明の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性にリンカーが結合している

高分子誘導体とは、上記一般式(6) [式中、Rは、A、n、a、b、Xは一般式(1)に同じである]及び上記一般式(7) [式中、R、A、n、Xは一般式(1)に同じであり、c、d、e、f、gは一般式(4)に同じである]で表される化合物である。本発明の高分子化合物の側鎖のカルボキシル基に疎水性のリンカーが結合している高分子誘導体に核酸系代謝拮抗剤であるヌクレオシド誘導体を導入することで本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を得ることができる。

【0049】

一般式(1)、一般式(4)、一般式(6)及び一般式(7)中、RにおけるC1~C6アルキル基は上記のアルキル基と同じ意味であり、好ましい基も同様である。

【0050】

一般式(1)、一般式(4)、一般式(6)及び一般式(7)中、AにおけるC1~C6アシル基は、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ピバロイル基又はヘキサノイル基が挙げられ、好ましくはC2~C4アシル基、例えば、アセチル基又はプロピオニル基であり、より好ましくはアセチル基である。

【0051】

一般式(1)、一般式(4)、一般式(6)及び一般式(7)中、AにおけるC1~C6アルコキシカルボニル基は、例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基、n-ブトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、ペントキシカルボニル基、ヘキシルオキシカルボニル基、シクロプロポキシカルボニル基、シクロペンチルオキシカルボニル基又はシクロヘキシルオキシカルボニル基が挙げられ、好ましくはメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基又はtert-ブトキシカルボニル基であり、より好ましくはエトキシカルボニル基又はtert-ブトキシカルボニル基である。

【0052】

一般式(1)、一般式(4)、一般式(6)及び一般式(7)中、nは平均値で5~2000であり、好ましくは50~1000程度であり、より好ましくは100~300程度である。

【0053】

一般式(1)及び一般式(6)中、a+bは平均値で3~200であり、好ましくは5~100程度であり、より好ましくは10~60程度である。

【0054】

一般式(1)及び一般式(6)中、aはa+bのうち75~100%であり、好ましくは80~100%であり、bとしてはa+bのうち0~25%であり、好ましくは0~20%である。

【0055】

一般式(4)及び一般式(7)中、c+d+e+f+gは平均値で3~200であり、好ましくは5~100程度であり、より好ましくは10~60程度である。

【0056】

一般式(4)及び一般式(7)中、c+dはc+d+e+f+gのうち85~100%であり、好ましくは90~100%であり、e+f+gとしてはc+d+e+f+gのうち0~15%であり、好ましくは0~10%である。

【0057】

一般式(1)及び一般式(6)において、aやbの括弧の構成単位が、ランダムに結合していても、ブロックを形成して結合していてもよい。Yも核酸系代謝拮抗剤、水酸基、-N(R1)CONH(R2)がランダムに結合していても、ブロックを形成して結合していてもよい(ただし、核酸系代謝拮抗剤残基数はa+bを100%とすると5~80%であり、-N(R1)CONH(R2)の数は0~70%であり、水酸基数は0~70%である)。一般式(1)中、Yにおける核酸系代謝拮抗剤として特に好ましくは、ゲムシ

10

20

30

40

50

タピンが挙げられる。

【0058】

一般式(4)及び一般式(7)において、c、d、e、f及びgの括弧の構成単位が、ランダムに結合していても、ブロックを形成して結合していてもよい。Yも核酸系代謝拮抗剤、水酸基、 $-N(R1)CONH(R2)$ がランダムに結合していても、ブロックを形成して結合していてもよい(ただし、核酸系代謝拮抗剤残基数は $c+d+e+f+g$ を100%とすると5~80%であり、 $-N(R1)CONH(R2)$ の数は0~70%であり、水酸基数は0~70%である)。一般式(4)中、Yにおける核酸系代謝拮抗剤として特に好ましくは、ゲムシタピンが挙げられる。

【0059】

一般式(1)、一般式(4)、一般式(6)及び一般式(7)中、Xにおける疎水性リンカーとしては種々の置換基が挙げられ、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の薬効発現に支障をきたさない限り特に限定されないが、好ましくは疎水性アミノ酸残基または疎水性アミノ酸誘導体残基、さらに好ましくは前記一般式(5)[式中、Qは中性アミノ酸の側鎖を示す]で表される - アミノ酸または - アミノ酸誘導体で表される基が挙げられる。

【0060】

一般式(5)におけるQにおいて中性アミノ酸の側鎖は、例えば、水素原子、メチル基、イソプロピル基、イソブチル基、s-ブチル基、ベンジル基、ヒドロキシメチル基、1-ヒドロキシエチル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基等の天然型アミノ酸残基又はtert-ブトキシメチル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジルオキシカルボニルメチル基、2-ベンジルオキシカルボニルエチル基等のアミノ酸残基誘導体等が挙げられ、好ましくはイソプロピル基、イソブチル基、s-ブチル基、ベンジル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジルオキシカルボニルメチル基、2-ベンジルオキシカルボニルエチル基等であり、より好ましくはイソプロピル基、ベンジル基、ベンジルオキシメチル基又は2-ベンジルオキシカルボニルエチル基であり、特に好ましくはベンジル基である。

【0061】

一般式(1)及び一般式(4)中、Yにおける $-N(R1)CONH(R2)$ は、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の薬効発現に支障をきたさない限り特に限定されないが、好ましくは $-N(R1)CONH(R2)$ のR1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基で表される基が挙げられる。より好ましくは、シクロヘキシルアミノカルボニルシクロヘキシルアミノ基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基である。

【0062】

なお、 $-N(R1)CONH(R2)$ におけるR1、R2において、3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基のC1~C6アルキル基としては、前記のアルキル基と同じ意味であり、好ましい基も同様である。

【0063】

一般式(1)及び一般式(4)中、ポリマーの総カルボキシル基数に対して、Yが核酸系代謝拮抗剤残基である割合は5~80%、好ましくは5~70%であり、Yが水酸基である割合は0~70%、好ましくは5~60%であり、Yが $-N(R1)CONH(R2)$ である割合は0~70%、好ましくは0~60%である。

【0064】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体において、核酸系代謝拮抗剤等が結合していない側鎖カルボキシル基が存在する場合、当該カルボキシル基は遊離型又はアルカリ類の塩型でもよい。遊離型で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって目的とする塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法により遊離型又は目的とする他の塩に変換することができる。

【0065】

10

20

30

40

50

アルカリ類の塩としては、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩又はトリエチルアンモニウム塩等が挙げられる。

【0066】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体における側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分を構成する構造単位は、光学異性体が存在する場合は光学活性体でもラセミ体でも任意の割合の混合体でもよい。例えば、側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリグルタミン酸誘導体の場合、ポリ-L-グルタミン酸、ポリ-D-グルタミン酸、側鎖が置換されたL-グルタミン酸及び側鎖が置換されたD-グルタミン酸が任意の割合で任意の結合順で結合したポリマーでもよい。

【0067】

さらに、側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分がポリアスパラギン酸誘導体の場合、上記光学異性体だけでなく、一般式(4)及び(7)の括弧で示されるc及びe単位の - アミノ酸型、d及びf単位の - アミノ酸型、g単位の環化体の構造単位もある。これらの 及び - アミノ酸型や環化体の構成単位の結合順は特に限定されず、ブロック型でもランダム型でもよく、全アスパラギン酸数(c+d+e+f+g)に対する - アミノ酸型(c+e)の割合は10~100%であり、好ましくは20~100%である。この割合は、例えばポリアスパラギン酸の保護基の脱保護条件等を選ぶことにより適宜変えることができる。

【0068】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体として特に好ましい化合物としては、例えば、以下の表1に示す化合物が挙げられる。

【0069】

表1において、P h eはフェニルアラニンを表す。又、Yの核酸系代謝拮抗剤残基としては、シタラビン、ゲムシタビン、ドキシフルリジン、アザシチジン、デシタビン、ネララビン、テザシタビン、5'-デオキシ-5-フルオロシチジン、2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジン(DMDC)、3'-エチルシチジン、2'-C-シアノ-2'-デオキシ-1-ベータ-D-アラビノフラノシルシトシン(CNDAC)、トロキサシタビン及び(-)-ベータ-L-ジオキソランシチジンの各残基が挙げられる。

【0070】

10

20

【表 1】

化合物番号	一般式	R	n (平均)	a+b (平均)	c+d+e+f+g (平均)	A	X:疎水性 リンカー	核酸系代謝拮抗剤
1	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	ゲムシタピン
2	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	ドキシフルリジン
3	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	シタラピン
4	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	アザシチジン
5	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	デンシタピン
6	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	ネララピン
7	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	テザシタピン
8	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	5'-デオキシ-5-フルオロシチジン
9	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジン
10	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	3'-エチニルシチジン
11	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	2'-C-シアノ-2'-デオキシ-1-ベータ-D-アラビノフラノシルシチジン
12	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	トロキサシタピン
13	(1)	CH ₃	272	10~40		CH ₃ CO	Phe	(-)-ベータ-L-デオキシソランシチジン
14	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	ゲムシタピン
15	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	ドキシフルリジン
16	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	シタラピン
17	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	アザシチジン
18	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	デンシタピン
19	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	ネララピン
20	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	テザシタピン
21	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	5'-デオキシ-5-フルオロシチジン
22	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	2'-デオキシ-2'-メチリデンシチジン
23	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	3'-エチニルシチジン
24	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	2'-C-シアノ-2'-デオキシ-1-ベータ-D-アラビノフラノシルシチジン
25	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	トロキサシタピン
26	(4)	CH ₃	272		10~45	CH ₃ CO	Phe	(-)-ベータ-L-デオキシソランシチジン

10

20

【0071】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体は、例えば、特許文献3、4及び5記載の方法に準じて製造されたメトキシポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体やメトキシポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体と、カルボキシル基を保護したアミノ酸誘導体とを溶媒中で脱水縮合剤により縮合させた後、脱保護することにより生じる新たなカルボキシル基を有する一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体の当該新たなカルボキシル基と核酸系代謝拮抗剤とを、溶媒中で脱水縮合剤により縮合させることで製造することができるが、特にこの製造法に限定されるわけではない。

30

【0072】

なお、本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体において、核酸系代謝拮抗剤がエステル結合を介して一般式(6)又は一般式(7)で表される高分子誘導体のカルボキシル基と結合している場合と、エステル結合及びアミド結合を介して一般式(6)又は一般式(7)で表される高分子誘導体のカルボキシル基と結合している場合と、アミド結合を介して一般式(6)又は一般式(7)で表される高分子誘導体のカルボキシル基と結合している場合がある。これは、用いる脱水縮合剤によってどの結合様式で入るかが決まるが、本発明においてはいずれの結合様式であってもよい。

40

【0073】

当該製造法において、リンカーとなるカルボキシル基を保護したアミノ酸及びアミノ酸誘導体の脱水縮合反応(アミド化)における溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、例えば、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、塩化メチレン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタン、ジエチレングリコールジメチルエーテル等のエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類、1,3-ジメチルイミダゾリジノン等のウレア類又は前記溶媒の混合溶媒等が挙げられ、好ましくはアミド類又はウレア類であり、より好ましくはジメチルホルムアミド又は1,3-ジメチルイミダゾリジノンである。

【0074】

50

脱水縮合剤としてはアミン類とカルボキシル基の縮合反応が進行する限り特に限定されないが、好ましくはジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、クロロギ酸イソブチル、ピパリン酸クロリド、DMT-MM(4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルホルホリニウムクロリド)、TFFH(テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート)、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)又はBOP(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)である。

【0075】

当該脱水縮合反応の際、反応補助剤を用いてもよく、該反応補助剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ジメチルアミノピリジン又は2,6-ジ-t-ブチル-4-メチルピリジン等が挙げられる。

【0076】

脱水縮合反応の反応温度は通常4~60であり、好ましくは室温~50である。反応時間は2時間~数日であり、好ましくは4~48時間である。

【0077】

上記製造法において、カルボニル基を保護したアミノ酸及びアミノ酸誘導体導入後に行われる保護基の除去方法はそれぞれ用いた保護基に適した方法を用いればよく、公知の方法によって行われる。例えば、ベンジル基は接触還元による加水素分解により除去することができる。保護基の除去により、一般式(6)及び(7)で表される本発明の高分子誘導体を得ることができる。

【0078】

上記製造法において、脱保護により新たに生じたカルボニル基に核酸系代謝拮抗剤を導入する脱水縮合反応における溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、上記のメトキシポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体やメトキシポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体とアミノ酸誘導体との脱水縮合する際に使用できる溶媒と同様な溶媒が使用でき、好ましい溶媒も同様である。

【0079】

脱水縮合剤としては、核酸系代謝拮抗剤とカルボキシル基との縮合反応が進行する限り特に限定されないが、前記のメトキシポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体やメトキシポリエチレングリコール-ポリグルタミン酸ブロック共重合体とアミノ酸誘導体との脱水縮合する際に使用できる脱水縮合剤と同様な脱水縮合剤が使用でき、好ましい脱水縮合剤も同様である。特に好ましくはジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミド等のカルボジイミド系縮合剤及び2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン(EEDQ)等が挙げられる。

【0080】

脱水縮合反応の際、反応補助剤を用いてもよく、該反応補助剤としては、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ジメチルアミノピリジン又は2,6-ジ-t-ブチル-4-メチルピリジン等が挙げられる。

【0081】

脱水縮合反応の反応温度は通常4~60であり、好ましくは15~50である。反応時間は1時間~数日であり、好ましくは4~48時間である。

【0082】

当該反応後、必要に応じて自体公知の分離手段、例えば、減圧濃縮、溶媒抽出、結晶化、透析、クロマトグラフィー等を適宜適用して目的化合物を単離、精製することができる。

【0083】

上記の脱水縮合反応によりYが、核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、-N(R1)CON

10

20

30

40

50

H(R2)(R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基である本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体が得られる。また、Yへ導入される基や、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体における一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体と核酸系代謝拮抗剤との結合様式は、用いる脱水縮合剤などにより次のように変えることができる。

【0084】

例えば、脱水縮合剤としてカルボジイミド系の脱水縮合剤を用いると、Yが、核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基、-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基)からなる群から2種以上選ばれる基である本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体が得られる。核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体における一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体と核酸系代謝拮抗剤との結合様式は、核酸系代謝拮抗剤の水酸基やアミノ基などの官能基の反応性に影響を受け、核酸系代謝拮抗剤の水酸基と反応したエステル結合が主となると考えられる。この場合、核酸系代謝拮抗剤との結合様式は、核酸系代謝拮抗剤のもつ官能基によって複数できる場合があるが、核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の薬効発現に支障をきたさない限り、それらが混合であっても単独であってもよい。

10

【0085】

また、例えば、脱水縮合剤としてEEDQを用いると、Yが、核酸系代謝拮抗剤残基、水酸基である本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体が得られる。当該核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体における一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体と核酸系代謝拮抗剤との結合様式は、EEDQの反応メカニズムより、核酸系代謝拮抗剤のシチジン系代謝拮抗剤のアミノ基と反応したアミド結合が主となると考えられる。

20

【0086】

Yが-N(R1)CONH(R2)(R1、R2は同一でも異なってもよく3級アミノ基で置換されていてもよいC1~C6アルキル基)のみを一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体へ導入する場合、核酸系代謝拮抗剤なしで前記のカルボジイミド系の脱水縮合剤を用いることで導入することができる。

【0087】

なお、ポリエチレングリコール類部分及び側鎖にカルボキシル基を有するポリマー部分からなる高分子化合物に対してリンカーと核酸系代謝拮抗剤が縮合した化合物を別途合成し導入させてもよいが、多官能基を有する活性本体である核酸系代謝拮抗剤の反応及び分解を回避するため、最終工程で核酸系代謝拮抗剤を結合させるのが好ましい。

30

【0088】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体は、水溶液中でポリエチレングリコール類部分を外殻とするミセルを形成していてもよい。ミセルの形成については、ゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)法又は動的光散乱法等により確認することができる。

【0089】

本発明においては、リンカーの疎水性を自由に変えることによって、凝集体となる性質を失うことが無く、様々な親水性薬剤を高い含有量で一般式(6)又は一般式(7)の高分子誘導体に導入することが可能である。

40

【0090】

本発明には前記の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分として含む抗腫瘍剤又は抗ウイルス剤も含まれる。該核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体は、そのまま投与することも、又、医薬上許容できる物質と混合した薬学的組成物として投与することもできる。薬学的組成物の剤型は注射剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、坐剤等いかなるものでもよい。又、これらの製剤は医薬用に用いられる種々の補助剤、即ち、担体やその他の助剤、例えば、安定剤、防腐剤、無痛化剤、乳化剤等の添加剤を含有していてもよい。

【0091】

製剤中における核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の含量は製剤により種々異なるが、通常0.1~100重量%、好ましくは1~98重量%である。

50

【 0 0 9 2 】

核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分とする本発明の抗腫瘍剤の適用は特に限定されないが、例えば、非小細胞肺癌、膵臓癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、A I D S 関連カポジ肉腫等に使用され得る。

【 0 0 9 3 】

核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体を薬効成分とする本発明の抗ウイルス剤の適用は特に限定されないが、例えば、後天性免疫不全症候群 (A I D S)、帯状疱疹、単純ヘルペスウイルス感染症等に使用され、感染予防目的にも使用され得る。

【 0 0 9 4 】

本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の投与方法として、経口、注射、直腸内投与、門脈内投与、臓器の灌流液に混合、患部臓器への局所投与等いずれの投与方法でも可能であるが、好ましくは非経口的投与であり、より好ましくは注射による静脈内投与、動脈内投与又は患部臓器への局所投与である。本発明の核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体の投与量は、病状、投与方法、患者の状態、年齢、体重等により異なるが、通常、核酸系代謝拮抗剤換算で体表面積 1 m^2 あたり $1 \text{ mg} \sim 5000 \text{ mg}$ 、好ましくは $10 \text{ mg} \sim 2000 \text{ mg}$ であり、これを1日1回又は数回に分けて投与してもよい。又、この投与は連日行なうこともできるが、数日から数ヶ月の間をおいて反復投与を行なってもよい。必要に応じて前記以外の投与方法、投与量、投与スケジュールを用いることができる。

10

【 0 0 9 5 】

本発明の高分子誘導体がプロドラッグとして作用する場合も本発明に含まれる。ここで、プロドラッグとは生物学的に活性な親化合物の化学的誘導体であって、投与すると生体内で該親化合物を遊離するものである。

20

【実施例】

【 0 0 9 6 】

以下に、参考例、実施例及び試験例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 9 7 】

参考例 1 分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約 26 のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N - アセチル化物の合成

片末端メトキシ基片末端 3 - アミノプロピル基のポリエチレングリコール (S U N B R I G H T M E P A - 1 2 T、日本油脂株式会社製、平均分子量 12000、9.60 g) をジメチルスルホキシド (200 mL) に溶解し、 - ベンジル - L - グルタメート N - カルボン酸無水物 (B L G - N C A、6.15 g ; ポリエチレングリコールに対して 30 当量) を加え、30 にて一晚攪拌した。イソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1、3.0 L) 攪拌下に反応液を滴下し、更に 1 時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1、500 mL) にて洗浄した。得られた生成物 (14.25 g) を N、N - ジメチルホルムアミド (220 mL) に溶解し、無水酢酸 (4.28 mL) を加えて、30 にて一晚攪拌した。イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1、2.2 L) 攪拌下に滴下し、更に 1 時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1、400 mL) にて洗浄した。得られた生成物 (13.5 g 中 12.0 g) を N、N - ジメチルホルムアミド (195 mL) に溶解し、5 % パラジウム炭素 (55 % 含水、1.20 g) を加えて、水素雰囲気下室温にて一晚攪拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1、2.0 L) 攪拌下に滴下し、更に 1 時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1、300 mL) にて洗浄した。得られた生成物を蒸留水 (500 mL) に溶解し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて液性を pH 11 に調整した。蒸留水を加えて最終液量を 1000 mL とし、塩化ナトリウム (50 g) を加えた。この溶液を吸着樹脂 H P - 20 s s (三菱化学製、250 mL) のカラムに通塔し、5 % 塩化ナトリウム水溶液 (1000 mL) 及び蒸留水 (1000 mL) にて洗浄後、50 % アセトニトリル水溶液 (12

30

40

50

50 mL)にて溶出した。目的物を含む溶出画分を陽イオン交換樹脂Dowex 50W (プロトン型、150 mL)のカラムに通塔、溶出し、更に50%アセトニトリル水(150 mL)にて溶出した。目的物を含む溶出画分を液量が約150 mLになるまで減圧下濃縮した後、凍結乾燥して、標記化合物(8.30 g)を得た。

【0098】

水酸化ナトリウム水溶液を用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の平均重合数(カルボン酸数)は、26.72であった。

【0099】

参考例2 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約17.5のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物の合成

10

参考例1記載の方法に従い、ポリエチレングリコールに対してBLG-NCAを21当量用いることにより、標記化合物を得た。

水酸化ナトリウム水溶液を用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の平均重合数(カルボン酸数)は、17.47であった。

【0100】

参考例3 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約22のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物の合成

参考例1記載の方法に従い、ポリエチレングリコールに対してBLG-NCAを25当量用いることにより、標記化合物を得た。

水酸化ナトリウム水溶液を用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の平均重合数(カルボン酸数)は、22.14であった。

20

【0101】

参考例4 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N-アセチル化物の合成

参考例1記載の方法に従い、ポリエチレングリコールに対してBLG-NCAを30当量用いることにより、標記化合物を得た。

水酸化ナトリウム水溶液を用いた滴定値に基づく本化合物1分子中のグルタミン酸の平均重合数(カルボン酸数)は、25.85であった。

【0102】

実施例1 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物と、L-フェニルアラニンベンジルエステルとのアミド結合体(ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約85%)の合成

30

参考例1で合成した分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸のブロック共重合体 N-アセチル化物(1.28 g)、L-フェニルアラニンベンジルエステルの塩酸塩(966 mg)及びN、N-ジイソプロピルエチルアミン(577 µL)をN、N-ジメチルホルムアミド(30 mL)に溶解し、DMT-MM(1.22 g)を加えて40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒(4:1、300 mL)に滴下した。30分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ取し、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒(4:1)にて洗浄し、標記化合物(1.60 g)を得た。

40

【0103】

本化合物を加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて定量することにより、本化合物のアミド結合しているPhe-OBzl基の結合率を求めたところポリグルタミン酸のカルボキシル基に対して84.5%であった。

【0104】

加水分解の方法

標記化合物(10.58 mg)をメタノール(1.0 mL)に溶解し、0.5 M水酸化ナトリウム水溶液(1.0 mL)を加えて40 にて1時間攪拌した。酢酸にて中和後、

50

蒸留水にて希釈して正確に 10 mL 溶液とした。

【0105】

HPLC の分析条件 (ベンジルアルコールの分析)

カラム: YMC Hydrosphere、4.6 x 250 mm ;

カラム温度: 40 ;

溶離液 A 液: 1% リン酸水溶液、B 液: アセトニトリル ;

グラジエント: B 液 % (時間、分) 0 (0)、0 (5)、80 (25)、80 (35)、stop (35.01) ;

流速: 1 mL / 分 ;

検出器 (検出波長): UV (210 nm)

10

【0106】

実施例 2 分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと平均重合数 26.72 のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N - アセチル化物と、L - フェニルアラニンとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約 85%) の合成

実施例 1 で合成した化合物 (1.60 g) を N、N - ジメチルホルムアミド (30 mL) に溶解し、5% パラジウム炭素 (55% 含水、150 mg) を加えて、水素雰囲気下室温にて一晩攪拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4:1、300 mL) 攪拌下に滴下し、更に 1 時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4:1) にて洗浄した。得られた生成物を 50% アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Dowex 50W (プロトン型、5 mL) を加え、2 時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液を、減圧下 1/2 容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (1.42 g) を得た。

20

【0107】

本化合物を実施例 1 と同様の方法で加水分解後、遊離したベンジルアルコールを実施例 1 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、ベンジルアルコールが検出されないことを確認した。

【0108】

実施例 3 一般式 (1) で R がメチル基、A がアセチル基、n の平均値が 272、a + b の平均値が 26.72、a の平均値が 22.6、b の平均値が 4.1、X がフェニルアラニン残基、Y が水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

30

実施例 2 で合成した化合物 (704 mg) 及び塩酸ゲムシタピン (300 mg) に N、N - ジメチルホルムアミド (15 mL) 及び N、N - ジイソプロピルエチルアミン (174 µL) を加えて 40 にて攪拌した。溶解後、4 - ジメチルアミノピリジン (24.4 mg) 及びジイソプロピルカルボジイミド (313 µL) を加えて 40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4:1、150 mL) に滴下した。30 分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取し、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4:1) にて洗浄した。得られた生成物を 50% アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Dowex 50W (プロトン型、2 mL) を加え、2 時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液を、減圧下 1/2 容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (720 mg) を得た。

40

【0109】

本化合物を加水分解した後、遊離したゲムシタピンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で 10.9% (w/w) であった。又、本発明化合物について HPLC で分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は 0.2% 以下であった。

【0110】

加水分解の方法

50

標記化合物 (1 1 . 7 1 m g) をメタノール (1 . 0 m L) に溶解し、 0 . 5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1 . 0 m L) を加えて 4 0 にて 1 時間攪拌した。酢酸にて中和後、蒸留水にて希釈して正確に 1 0 m L 溶液とした。

【 0 1 1 1 】

H P L C の分析条件 (ゲムシタピンの分析)

カラム : Y M C H y d r o s p h e r e 、 4 . 6 × 2 5 0 m m ;

カラム温度 : 4 0 ;

溶離液 A 液 : 1 % リン酸水溶液、 B 液 : アセトニトリル ;

グラジエント : B 液 % (時間、分) 0 (0) 、 0 (5) 、 8 0 (2 5) 、 8 0 (3 5) 、 s t o p (3 5 . 0 1) ;

流速 : 1 m L / 分 ;

検出器 (検出波長) : U V (2 1 0 n m)

【 0 1 1 2 】

また、本化合物におけるゲムシタピン 1 分子に対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム / 重水 / 重アセトニトリルに溶解したものの ¹ H - N M R (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、 0 . 2 4 であった。

【 0 1 1 3 】

実施例 4 一般式 (1) で R がメチル基、 A がアセチル基、 n の平均値が 2 7 2 、 a + b の平均値が 2 6 . 7 2 、 a の平均値が 2 2 . 6 、 b の平均値が 4 . 1 、 X がフェニルアラニン残基、 Y が水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びドキシフルリジン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

実施例 2 で合成した化合物 (7 0 4 m g) とドキシフルリジン (2 4 6 m g) を N , N - ジメチルホルムアミド (1 5 m L) に加えて 4 0 にて攪拌した。溶解後、 4 - ジメチルアミノピリジン (2 4 . 4 m g) 及びジイソプロピルカルボジイミド (3 1 3 μ L) を加えて 4 0 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1 、 1 5 0 m L) に滴下した。 3 0 分間攪拌後、析出した沈殿物を濾取し、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を 5 0 % アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 D o w e x 5 0 W (プロトン型、 2 m L) を加え、 2 時間室温で振とう後、樹脂を濾去し、樹脂を 5 0 % アセトニトリル水にて洗浄した。得られた濾液を、減圧下 1 / 2 容量まで濃縮後、凍結乾燥して標記化合物 (7 2 0 m g) を得た。

【 0 1 1 4 】

本化合物を加水分解した後、遊離したドキシフルリジンを高速液体クロマトグラフィー (H P L C) にて定量することにより、本化合物のドキシフルリジン含量を求めたところ、ドキシフルリジン換算で 7 . 9 5 % (w / w) であった。又、本発明化合物について H P L C で分析したところ、遊離のドキシフルリジン含量は 0 . 2 % 以下であった。

【 0 1 1 5 】

加水分解の方法

標記化合物 (1 1 . 5 7 m g) をメタノール (1 . 0 m L) に溶解し、 0 . 5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1 . 0 m L) を加えて 4 0 にて 1 時間攪拌した。酢酸にて中和後、蒸留水にて希釈して正確に 1 0 m L 溶液とした。

【 0 1 1 6 】

H P L C の分析条件 (ドキシフルリジンの分析)

カラム : Y M C H y d r o s p h e r e 、 4 . 6 × 2 5 0 m m ;

カラム温度 : 4 0 ;

溶離液 A 液 : 1 % リン酸水溶液、 B 液 : アセトニトリル ;

グラジエント : B 液 % (時間、分) 0 (0) 、 0 (5) 、 8 0 (2 5) 、 8 0 (3 5) 、 s t o p (3 5 . 0 1) ;

流速 : 1 m L / 分 ;

検出器 (検出波長) : U V (2 1 0 n m)

【0117】

また、本化合物におけるドキシフルリジン 1 分子に対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム / 重水 / 重アセトニトリルに溶解したものの $^1\text{H-NMR}$ (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、0.37であった。

【0118】

実施例 5 分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約 36 のポリアスパラギン酸とのブロック共重合体 N - アセチル化物と、L - フェニルアラニンベンジルエステルとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約 96%) の合成

特許文献 3 に記載された方法によって調製したモノメトキシポリエチレングリコール - ポリアスパラギン酸ブロック共重合体 N - アセチル化物 (アスパラギン酸の重合数 35.7; 1.0 g)、L - フェニルアラニンベンジルエステルの塩酸塩 (968 mg) 及び N、N - ジイソプロピルエチルアミン (578 μL) を N、N - ジメチルホルムアミド (15 mL) に溶解し、DMT-MM (1.22 g) を加えて室温にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4:1、200 mL) に滴下した。30 分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取りし、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4:1) にて洗浄し、標記化合物 (1.39 g) を得た。

10

【0119】

本化合物を実施例 1 と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例 1 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のアミド結合している Phe - O - Benzyl 基の結合率を求めたところポリグルタミン酸のカルボキシル基に対して 95.8% であった。

20

【0120】

実施例 6 分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約 36 のポリアスパラギン酸とのブロック共重合体 N - アセチル化物と、L - フェニルアラニンとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約 96%) の合成

実施例 5 で合成した化合物 (1.39 g) を N、N - ジメチルホルムアミド (25 mL) に溶解し、5% パラジウム炭素 (55% 含水、140 mg) を加えて、水素雰囲気下室温にて一晩攪拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4:1、250 mL) 攪拌下に滴下し、更に 1 時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取りし、イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4:1) にて洗浄した。得られた生成物を 50% アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Dowex 50W (プロトン型、5 mL) を加え、2 時間室温で振とうした後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液を、減圧下 1/2 容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (0.99 g) を得た。

30

【0121】

本化合物を実施例 1 と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例 1 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、ベンジルアルコールが検出されないことを確認した。

【0122】

実施例 7 一般式 (4) で R がメチル基、A がアセチル基、n の平均値が 272、c + d + e + f + g の平均値が 35.7、c + d の平均値が 34.2、e + f + g の平均値が 1.5、X がフェニルアラニン残基、Y が水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

40

実施例 6 で合成した化合物 (531 mg) 及び塩酸ゲムシタピン (269 mg) に N、N - ジメチルホルムアミド (10 mL) 及び N、N - ジイソプロピルエチルアミン (156 μL) を加えて 40 にて攪拌した。30 分後、4 - ジメチルアミノピリジン (21.9 mg) 及びジイソプロピルカルボジイミド (281 μL) を加えて 40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4:1、100 mL) に滴下した。30 分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取りし、ジイソプロ

50

ピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を 50 % アセトニトリル水に溶解し、透析膜 (分画分子量 : 12000 ~ 14000) を用いて、蒸留水 (2 L x 3) にて透析した。透析した溶液を凍結乾燥して、凍結乾燥して標記化合物 (491 mg) を得た。

【 0 1 2 3 】

本化合物 (18.46 mg) を実施例 3 と同様の方法で加水分解した後、遊離したゲムシタピンを実施例 3 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で 19.2 % (w / w) であった。又、本発明化合物について HPLC で分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は 0.2 % 以下であった。

10

【 0 1 2 4 】

また、本化合物におけるゲムシタピンに対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム / 重水 / 重アセトニトリルに溶解したものの ¹H - NMR (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、0.23 であった。

【 0 1 2 5 】

実施例 8 一般式 (4) で R がメチル基、A がアセチル基、n の平均値が 272、c + d + e + f + g の平均値が 35.7、c + d の平均値が 34.2、e + f + g の平均値が 1.5、X がフェニルアラニン残基、Y が水酸基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

実施例 6 で合成した化合物 (500 mg) 及び塩酸ゲムシタピン (253 mg) に N, N - ジメチルホルムアミド (10 mL) 及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (147 μL) を加えて 40 にて攪拌した。30 分後、2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン (EEDQ, 261 mg) を加えて 40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1, 100 mL) に滴下した。30 分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取り、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を 50 % アセトニトリル水に溶解し、透析膜 (分画分子量 : 12000 ~ 14000) を用いて、蒸留水 (2 L x 3) にて透析した。透析した溶液を凍結乾燥して、凍結乾燥して標記化合物 (513 mg) を得た。

20

【 0 1 2 6 】

本化合物 (14.93 mg) を実施例 3 と同様の方法で加水分解した後、遊離したゲムシタピンを実施例 3 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で 13.2 % (w / w) であった。又、本発明化合物について HPLC で分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は 0.2 % 以下であった。

30

なお、この反応では縮合剤として 2 - エトキシ - 1 - エトキシカルボニル - 1, 2 - ジヒドロキノリン (EEDQ) が使用されているため、- N (R1) CONH (R2) からなる基は ¹H - NMR で確認されなかった。

【 0 1 2 7 】

実施例 9 分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約 17.5 のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N - アセチル化物と、L - フェニルアラニンベンジルエステルとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約 100 %) の合成

40

参考例 2 で合成した分子量約 12000 のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約 17.5 のポリグルタミン酸のブロック共重合体 N - アセチル化物 (1.80 g)、L - フェニルアラニンベンジルエステルの塩酸塩 (963 mg) 及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (575 μL) を N, N - ジメチルホルムアミド (36 mL) に溶解し、DMT - MM (1.22 g) を加えて 40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1, 400 mL) に滴下した。30 分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ取り、ジイソプロピルエーテル - エタノール混

50

合溶媒（４：１）にて洗浄し、標記化合物（２．４２ｇ）を得た。

【０１２８】

本化合物を実施例１と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例１と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて定量することにより、本化合物のアミド結合している Phe-O-Benz 基の結合率を求めたところポリグルタミン酸のカルボキシル基に対して１００．２％であった。

【０１２９】

実施例１０ 分子量約１２０００のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約１７．５のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N -アセチル化物と、 L -フェニルアラニンとのアミド結合体（ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約１００％）の合成

10

実施例９で合成した化合物（２．４０ｇ）を N 、 N -ジメチルホルムアミド（４８ｍＬ）に溶解し、５％パラジウム炭素（５５％含水、２４０ｍｇ）を加えて、水素雰囲気下室温にて一晚撹拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル-酢酸エチル混合溶媒（４：１、５００ｍＬ）撹拌下に滴下し、更に１時間撹拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル-酢酸エチル混合溶媒（４：１）にて洗浄した。得られた生成物を５０％アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Muromac C 1002 （プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、６ｍＬ）を加え、２時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を５０％アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液を、減圧下１／２容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物（１．９６ｇ）を得た。

【０１３０】

20

本化合物を実施例１と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例１と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて定量することにより、ベンジルアルコールが検出されないことを確認した。

【０１３１】

実施例１１ 一般式（１）で R がメチル基、 A がアセチル基、 n の平均値が２．７２、 $a + b$ の平均値が１．７５、 a の平均値が１．７５、 b の平均値が０、 X がフェニルアラニン残基、 Y が水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

実施例１０で合成した化合物（１．８３ｇ）、塩酸ゲムシタピン（５６９ｍｇ）及び４-ジメチルアミノピリジン（４６．４ｍｇ）に N 、 N -ジメチルホルムアミド（３７ｍＬ）及び N 、 N -ジイソプロピルエチルアミン（３３１ μL ）を加えて４０にて撹拌した。３０分後、ジイソプロピルカルボジイミド（５９５ μL ）を加えて４０にて一晚撹拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒（４：１、５００ｍＬ）に滴下した。３０分間撹拌後、析出した沈殿物をろ取し、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒（４：１）にて洗浄した。得られた生成物を５０％アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Muromac C 1002 （プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、６ｍＬ）を加え、２時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を５０％アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液の約半量を、さらに陰イオン交換樹脂 Muromac A 203 T （ OH 型、ムロマチテクノス株式会社、３ｍＬ）を加え、２時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を５０％アセトニトリル水にて洗浄した。減圧下１／２容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物（０．９３ｇ）を得た。

30

40

【０１３２】

本化合物（１．４８ｍｇ）を実施例３と同様の方法で加水分解した後、遊離したゲムシタピンを実施例３と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で９．２６％（ w/w ）であった。又、本発明化合物についてＨＰＬＣで分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は０．２％以下であった。

【０１３３】

また、本化合物におけるゲムシタピン１分子に対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム／重水／重アセトニトリルに溶解した

50

ものの ^1H -NMR (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、0.45であった。

【0134】

塩酸ゲムシタピンの含量及びゲムシタピンに対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比が得られたことにより、Xのフェニルアラニンが100%導入された ($a + b = a$) と仮定すると、ゲムシタピンに対する水酸基のモル比は1.5と計算できる。

【0135】

実施例12 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約22のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物と、L-フェニルアラニンベンジルエステルとのアミド結合体(ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約100%)の合成

10

参考例3で合成した分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約22のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物(1.30g)、L-フェニルアラニンベンジルエステルの塩酸塩(845mg)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(505 μL)をN,N-ジメチルホルムアミド(26mL)に溶解し、DMT-MM(1.07g)を加えて40 $^\circ\text{C}$ にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒(4:1、300mL)に滴下した。30分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ取し、ジイソプロピルエーテル-エタノール混合溶媒(4:1)にて洗浄し、標記化合物(1.75g)を得た。

【0136】

20

本化合物を実施例1と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例1と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて定量することにより、本化合物のアミド結合しているPhe-Obzl基の結合率を求めたところポリグルタミン酸のカルボキシル基に対して99.9%であった。

【0137】

実施例13 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約22のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物と、L-フェニルアラニンとのアミド結合体(ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約100%)の合成

実施例12で合成した化合物(1.70g)をN,N-ジメチルホルムアミド(34mL)に溶解し、5%パラジウム炭素(55%含水、170mg)を加えて、水素雰囲気下室温にて一晩攪拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル-酢酸エチル混合溶媒(4:1、400mL)攪拌下に滴下し、更に1時間攪拌した。析出した沈殿物をろ取し、イソプロピルエーテル-酢酸エチル混合溶媒(4:1)にて洗浄した。得られた生成物を50%アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂Murmac C1002(プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、6mL)を加え、2時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を50%アセトニトリル水にて洗浄した。得られたろ液を、減圧下1/2容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物(1.42g)を得た。

30

【0138】

本化合物を実施例1と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例1と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて定量することにより、ベンジルアルコールが検出されないことを確認した。

40

【0139】

実施例14 一般式(1)でRがメチル基、Aがアセチル基、nの平均値が272、a+bの平均値が22.1、aの平均値が22.1、bの平均値が0、Xがフェニルアラニン残基、Yが水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

実施例13で合成した化合物(1.40g)、塩酸ゲムシタピン(512mg)及び4-ジメチルアミノピリジン(41.8mg)をN,N-ジメチルホルムアミド(28mL)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(298 μL)を加えて40 $^\circ\text{C}$ にて攪拌した。30分後、ジイソプロピルカルボジイミド(535 μL)を加えて40 $^\circ\text{C}$ にて一晩攪拌

50

した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1、500 mL) に滴下した。30分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取り、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を50%アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Muromac C1002 (プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、6 mL) を加え、2時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を50%アセトニトリル水にて洗浄した。得られたる液の約半量を、さらに陰イオン交換樹脂 Muromac A203T (OH型、ムロマチテクノス株式会社、3 mL) を加え、2時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を50%アセトニトリル水にて洗浄した。減圧下1/2容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (0.77 g) を得た。

【0140】

本化合物 (11.02 mg) を実施例3と同様の方法で加水分解した後、遊離したゲムシタピンを実施例3と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で11.09% (w/w) であった。又、本発明化合物についてHPLCで分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は0.2%以下であった。

【0141】

また、本化合物におけるゲムシタピン1分子に対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム/重水/重アセトニトリルに溶解したものの¹H-NMR (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、0.36であった。

【0142】

塩酸ゲムシタピンの含量及びゲムシタピンに対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比が得られたことにより、Xのフェニルアラニンが100%導入された (a + b = a) と仮定すると、ゲムシタピンに対する水酸基のモル比は1.5と計算できる。

【0143】

実施例15 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸とのブロック共重合体N-アセチル化物と、L-フェニルアラニンベンジルエステルとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約97%) の合成

参考例4で合成した分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸のブロック共重合体 N-アセチル化物 (1.00 g)、L-フェニルアラニンベンジルエステルの塩酸塩 (736 mg) 及びN、N-ジイソプロピルエチルアミン (439 µL) をN、N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶解し、DMT-MM (930 mg) を加えて40 にて一晚攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1、200 mL) に滴下した。30分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ取り、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄し、標記化合物 (1.30 g) を得た。

【0144】

本化合物を実施例1と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例1と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のアミド結合しているPhe-OBzl基の結合率を求めたところポリグルタミン酸のカルボキシル基に対して97.2%であった。

【0145】

実施例16 分子量約12000のモノメトキシポリエチレングリコールと重合数約26のポリグルタミン酸とのブロック共重合体 N-アセチル化物と、L-フェニルアラニンとのアミド結合体 (ポリカルボン酸のカルボキシル基に対して約97%) の合成

実施例15で合成した化合物 (1.30 g) をN、N-ジメチルホルムアミド (25 mL) に溶解し、5%パラジウム炭素 (55%含水、130 mg) を加えて、水素雰囲気下室温にて一晚攪拌した。パラジウム炭素をろ別後、ろ液をイソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1、200 mL) 攪拌下に滴下し、更に1時間攪拌した。析出した沈

10

20

30

40

50

殿物をろ取り、イソプロピルエーテル - 酢酸エチル混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を 50% アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Muromac C1002 (プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、5 mL) を加え、2 時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。得られたる液を、減圧下 1 / 2 容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (1.10 g) を得た。

【0146】

本化合物を実施例 1 と同様の方法で加水分解した後、遊離したベンジルアルコールを実施例 1 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、ベンジルアルコールが検出されないことを確認した。

【0147】

実施例 17 一般式 (1) で R がメチル基、A がアセチル基、n の平均値が 2.72、a + b の平均値が 2.585、a の平均値が 2.513、b の平均値が 0.72、X がフェニルアラニン残基、Y が水酸基、イソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基及びゲムシタピン残基である核酸系代謝拮抗剤の高分子誘導体

実施例 16 で合成した化合物 (995 mg)、塩酸ゲムシタピン (402 mg) 及び 4 - ジメチルアミノピリジン (32.7 mg) に N, N - ジメチルホルムアミド (20 mL) 及び N, N - ジイソプロピルエチルアミン (234 µL) を加えて 40 にて攪拌した。30 分後、ジイソプロピルカルボジイミド (420 µL) を加えて 40 にて一晩攪拌した。反応液を室温まで冷却後、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1、200 mL) に滴下した。30 分間攪拌後、析出した沈殿物をろ取り、ジイソプロピルエーテル - エタノール混合溶媒 (4 : 1) にて洗浄した。得られた生成物を 50% アセトニトリル水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Muromac C1002 (プロトン型、ムロマチテクノス株式会社、4 mL) を加え、2 時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。得られたる液を、さらに陰イオン交換樹脂 Muromac A203T (OH 型、ムロマチテクノス株式会社、4 mL) を加え、2 時間室温で振とう後、樹脂をろ去し、樹脂を 50% アセトニトリル水にて洗浄した。減圧下 1 / 2 容量まで濃縮した後、凍結乾燥して標記化合物 (950 mg) を得た。

【0148】

本化合物 (11.28 mg) を実施例 3 と同様の方法で加水分解した後、遊離したゲムシタピンを実施例 3 と同様な条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量することにより、本化合物のゲムシタピン含量を求めたところ、塩酸ゲムシタピン換算で 12.76% (w/w) であった。又、本発明化合物について HPLC で分析したところ、遊離のゲムシタピン含量は 0.2% 以下であった。

【0149】

また、本化合物におけるゲムシタピンに対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比は重水酸化ナトリウム / 重水 / 重アセトニトリルに溶解したものの ¹H - NMR (水素核磁気共鳴スペクトル) から求められ、0.35 であった。

【0150】

塩酸ゲムシタピンの含量及びゲムシタピンに対するイソプロピルアミノカルボニルイソプロピルアミノ基のモル比が得られたことにより、X のフェニルアラニンが 100% 導入された (a + b = a) と仮定すると、ゲムシタピンに対する水酸基のモル比は 1.4 と計算できる。

【0151】

試験例 1 酵素非存在下における薬剤放出性試験 (1)

実施例 3 の化合物、実施例 4 の化合物、実施例 7 の化合物、実施例 8 の化合物をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) に 1.0 mg/mL となるように溶解し、37 にて定温放置した。放出されたゲムシタピン及びドキシフルリジン量を HPLC にて経時的に測定し、使用した化合物中の全ゲムシタピン及びドキシフルリジン量に対する放出されたゲムシタピン及びドキシフルリジン量の割合を求めた。結果を図 1 に示す。本発明の化合物が酵素非存在下、薬剤を徐放することが示された。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 2 】

試験例 2 酵素非存在下における薬剤放出性試験 (2)

実施例 1 1 の化合物、実施例 1 4 の化合物、実施例 1 7 の化合物をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7 . 4) に 1 . 0 m g / m L となるように溶解し、37 °C にて定温放置した。放出されたゲムシタピン量を H P L C にて経時的に測定し、使用した化合物中の全ゲムシタピン量に対する放出されたゲムシタピン量の割合を求めた。結果を図 2 に示す。本発明の化合物が酵素非存在下、薬剤を徐放することが示された。

【 0 1 5 3 】

試験例 3 マウス血漿中における薬剤放出性

実施例 1 1 の化合物、実施例 1 7 の化合物を、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7 . 4) に溶解後、マウスより採血・調製した血漿を 4 倍量 (v / v) 加えて、37 °C にて定温放置した。50 μ L ずつを経時的に取り、50 % メタノール水 (450 μ L) にて希釈した。メンブランフィルター (孔径 0 . 45 μ m) にて除タンパク処理した後、本発明化合物より放出されたゲムシタピン量を H P L C にて経時的に測定し、本発明化合物中の全ゲムシタピン量に対する、放出されたゲムシタピン量の割合を求めた。結果を図 3 に示す。本発明の化合物が、血漿中でも薬剤を徐放していることから、血漿中の酵素による加水分解反応に依存しない化合物であることが示された。

【 0 1 5 4 】

試験例 2 及び試験例 3 の結果を比較すると、本発明の化合物が、マウス血漿中においては、酵素非存在下の場合よりも、薬剤放出率が高いものの、その差は小さい。これは本発明の化合物が、酵素による加水分解反応に対して感受性が低いために、マウス血漿中においても高分子誘導体として、長時間滞留し、薬剤を放出していると考えられる。

【 0 1 5 5 】

試験例 4 担癌マウスに対する抗腫瘍効果 (1)

マウス皮下で継代しているマウス大腸癌 C o l o n 2 6 腫瘍塊を約 2 ミリメートル角のブロックにし、套管針を用いてマウス皮下に移植した。腫瘍移植後 7 日目に実施例 5 の化合物を 5 % ブドウ糖注射液で、対照薬としての塩酸ゲムシタピンを生理食塩水で溶解し、表 2 に示す投与量で静脈内に単回投与した。投与開始日及び投与開始後 8 日目の腫瘍体積を下記の計算式により算出し、投与開始日に対する投与開始後 8 日目の相対腫瘍体積を求めた。結果を表 2 に示す。

【 0 1 5 6 】

【 数 1 】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \frac{[\text{腫瘍の長径(mm)}] \times [\text{腫瘍の短径(mm)}] \times [\text{腫瘍の短径(mm)}]}{2}$$

【 0 1 5 7 】

10

20

30

【表 2】
表 2

薬剤	投与量 (塩酸ゲムシタピン換算) (mg/kg)	相対腫瘍体積*
無処置	0	10.3 ± 2.9
化合物1	80	0.6 ± 0.7
	40	3.7 ± 1.3
対照薬	200	4.8 ± 1.7
	40	5.3 ± 1.1

10

*薬剤投与開始日の腫瘍体積を1.0としたときの
投与開始後8日目の平均相対腫瘍体積(平均±SD)

【0158】

この結果、本発明の化合物は、対照薬である塩酸ゲムシタピンと比較して低投与量で同等以上の抗腫瘍効果を有することが明らかである。

【0159】

試験例5 担癌マウスに対する抗腫瘍効果(2)

20

マウス皮下で継代しているマウス大腸癌Colon26腫瘍塊を約2ミリメートル角のブロックにし、套管針を用いてマウス皮下に移植した。腫瘍移植後7日目に実施例11の化合物、実施例14の化合物、実施例17の化合物を5%ブドウ糖注射液で、対照薬としての塩酸ゲムシタピンを生理食塩水にて溶解し、表3に示す投与量で静脈内に単回投与した。投与開始日及び投与開始後7日目、26日目の腫瘍体積を前記の計算式により算出し、投与開始日に対する投与開始後7日目、26日目の相対腫瘍体積を求めた。結果を表3に示す。

【0160】

【表 3】

表 3

30

薬剤	投与量 (塩酸ゲムシタピン換算) (mg/kg)	相対腫瘍体積*	相対腫瘍体積**
無処置	0	11.7 ± 1.9	
実施例11の化合物	60	0.2 ± 0.1	0.02 ± 0.01
実施例14の化合物	70	0.5 ± 0.2	0.04 ± 0.02
実施例17の化合物	80	0.7 ± 0.6	0.7 ± 1.4
対照薬	160	1.5 ± 1.5	25.8 ± 36.0

40

*薬剤投与開始日の腫瘍体積を1.0としたときの
投与開始後7日目の平均相対腫瘍体積(平均±SD)

**薬剤投与開始日の腫瘍体積を1.0としたときの
投与開始後26日目の平均相対腫瘍体積(平均±SD)
無処置群は途中で死亡したため測定値なし

【0161】

この結果、本発明の化合物は、対照薬である塩酸ゲムシタピンと比較して低投与量で持続的に強い抗腫瘍効果を有することが明らかである。

【図面の簡単な説明】

50

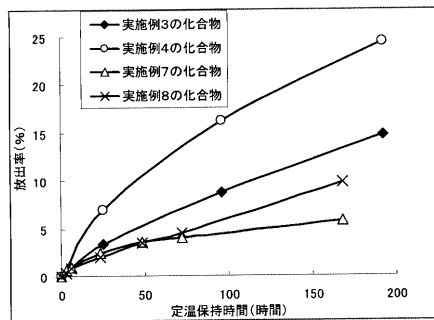
【 0 1 6 2 】

【図 1】酵素非存在下における薬剤放出の経時変化を示す。 は実施例 3 の化合物、 は実施例 4 の化合物、 は実施例 7 の化合物、 × は実施例 8 の化合物をそれぞれ表す。

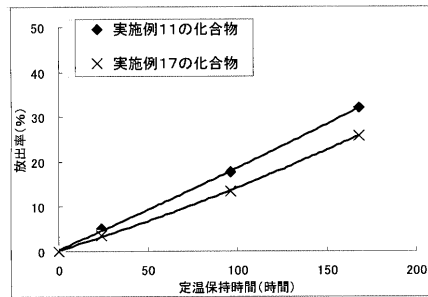
【図 2】酵素非存在下における薬剤放出の経時変化を示す。 は実施例 11 の化合物、 は実施例 14 の化合物、 × は実施例 17 の化合物をそれぞれ表す。

【図 3】マウス血漿中における薬剤放出の経時変化を示す。 は実施例 11 の化合物、 × は実施例 17 の化合物をそれぞれ表す。

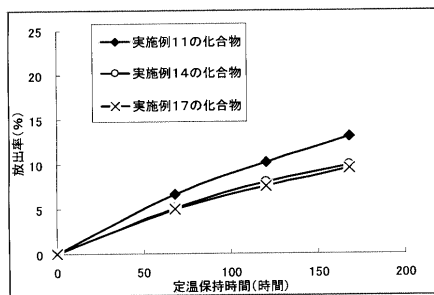
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 47/48 (2006.01) A 6 1 K 47/48
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(72)発明者 山本 啓一郎
東京都北区志茂 3 - 3 1 - 1 2 日本化薬株式会社 医薬研究所内

(72)発明者 高塩 一俊
東京都北区志茂 3 - 3 1 - 1 2 日本化薬株式会社 医薬研究所内

審査官 北澤 健一

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 3 2 2 8 9 (J P , A)
特表 2 0 0 5 - 5 1 9 1 2 2 (J P , A)
特開平 0 2 - 3 0 0 1 3 3 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 2 7 4 4 3 (J P , A)
特開平 0 6 - 2 0 6 8 3 2 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 9 9 0 1 3 (U S , A 1)
特開平 0 8 - 0 4 8 7 6 6 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 0 9 1 4 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 0 8 G 6 9 / 0 0 - 6 9 / 5 0
A 6 1 K 3 1 / 7 8 7
A 6 1 K 4 7 / 3 4
A 6 1 K 4 7 / 4 8
A 6 1 P 3 1 / 1 2
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C A、 R E G I S T R Y (S T N)