

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7215774号  
(P7215774)

(45)発行日 令和5年1月31日(2023.1.31)

(24)登録日 令和5年1月23日(2023.1.23)

(51)国際特許分類

F I

|         |                 |         |       |         |
|---------|-----------------|---------|-------|---------|
| C 0 7 F | 5/04 (2006.01)  | C 0 7 F | 5/04  | C C S P |
| C 0 7 K | 5/02 (2006.01)  | C 0 7 K | 5/02  |         |
| C 0 7 K | 1/06 (2006.01)  | C 0 7 K | 1/06  |         |
| A 6 1 K | 31/69 (2006.01) | A 6 1 K | 31/69 |         |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 |         |

請求項の数 11 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-531165(P2021-531165)  
 (86)(22)出願日 令和1年8月5日(2019.8.5)  
 (65)公表番号 特表2021-534234(P2021-534234  
 A)  
 (43)公表日 令和3年12月9日(2021.12.9)  
 (86)国際出願番号 PCT/CN2019/099305  
 (87)国際公開番号 WO2020/029925  
 (87)国際公開日 令和2年2月13日(2020.2.13)  
 審査請求日 令和3年4月8日(2021.4.8)  
 (31)優先権主張番号 201810902222.0  
 (32)優先日 平成30年8月9日(2018.8.9)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 中国(CN)

(73)特許権者 521061793  
 シヤンドン ハブル キセン バイオロジ  
 カル テクノロジー カンパニー リミテ  
 ッド  
 中華人民共和国 2 5 0 1 0 1 シヤンド  
 ン チーナン ハイ-テック インダスト  
 リアル ディベロプメント ゾーン イン  
 シュ ロード ナンバー 2 7 6 6 ノース  
 ビルディング ナンバー 3 2 7  
 (74)代理人 110000578  
 名古屋国際弁理士法人  
 (72)発明者 シュ ウェンファン  
 中華人民共和国 2 6 1 0 6 1 シヤンド  
 ン ウェイファン ハイ-テック インダ  
 ストリアル ディベロプメント ゾーン  
 最終頁に続く

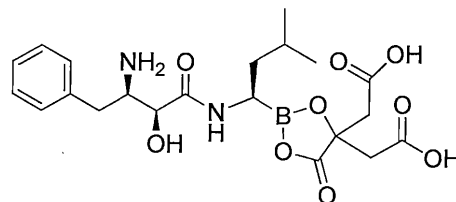
(54)【発明の名称】 多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブおよびその製造方法と使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物。

## 【化1】

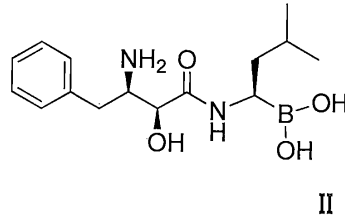


I

## 【請求項2】

下記式IIで表される中間体化合物。

## 【化2】

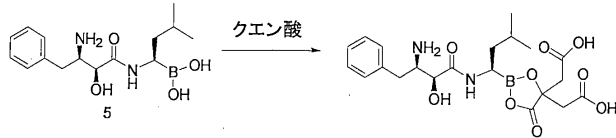


## 【請求項3】

式Iで表される化合物の製造方法であって、

10

## 【化3】

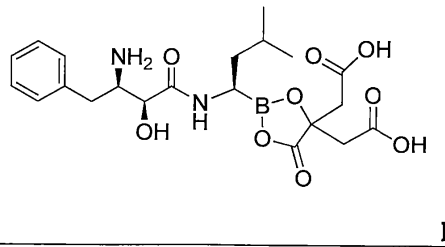


6. クエン酸ベスタゾミブ(式I)

中間体5をクエン酸と作用させて式Iで表される化合物を得る工程を含むことを特徴とし、  
前記式Iで表される化合物は、

## 【化4】

20



である方法。

## 【請求項4】

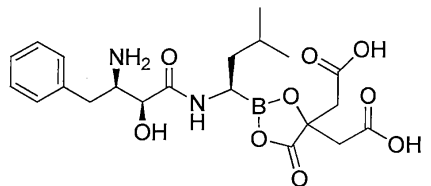
30

式Iで表される化合物の製造方法であって、

(2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸を原料とし、Cbzで1級アミン基を保護して中間体2を得る工程、中間体2を無水DCMにおいてEDCIとHOBtの触媒下で(R)-1-アミノ-3-メチルブチルボロン酸ピナジオールエステルトリフルオロ酢酸塩と反応させて中間体3を得る工程、中間体3にイソブチルボロン酸の作用下で保護基を脱離させて中間体4を得る工程、中間体4をPd/Cおよび水素ガスにおいて脱Cbz保護させて中間体5を生成し、最後にクエン酸と作用させて式Iで表される化合物を得る工程を含むことを特徴とし、  
前記式Iで表される化合物は、

## 【化5】

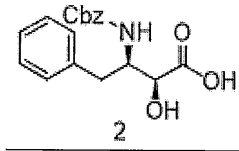
40



であり、前記中間体2は、

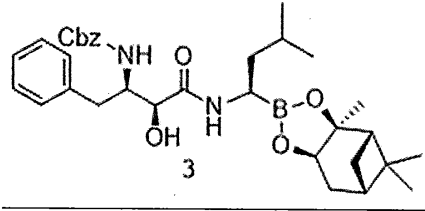
50

## 【化6】



であり、前記中間体3は、

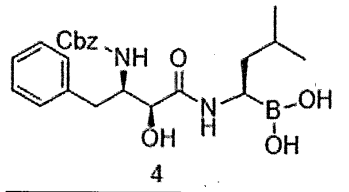
## 【化7】



10

であり、前記中間体4は、

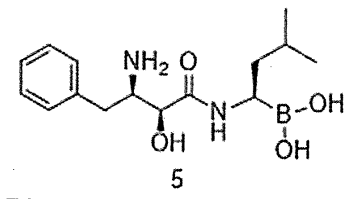
## 【化8】



20

であり、前記中間体5は、

## 【化9】



30

である方法。

## 【請求項5】

多機能標的阻害薬の製造における、請求項1に記載の式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物の使用であって、

前記多機能標的阻害薬はアミノペプチダーゼNにもプロテアソームにも抑制活性を有する使用。

40

## 【請求項6】

腫瘍を予防または治療する薬物の製造における、請求項1に記載の式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物の使用。

## 【請求項7】

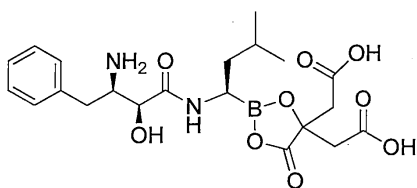
前記腫瘍は、骨髄腫、白血病および固形腫瘍を含むことを特徴とする請求項6に記載の使用。

## 【請求項8】

50

活性成分が式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物であることを特徴とする薬物組成物であって、前記式Iで表される化合物は、

【化10】



I

10

である薬物組成物。

【請求項9】

前記薬物組成物は、さらに、1つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤を含むことを特徴とする請求項8に記載の薬物組成物。

【請求項10】

前記薬物組成物は経口投与製剤または注射製剤であることを特徴とする請求項8または9に記載の薬物組成物。

20

【請求項11】

腫瘍疾患を治療する薬物製剤の製造における請求項8または9に記載の薬物組成物の使用

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、薬物化学の技術分野に関し、具体的に、多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブ (Bestazomib) およびその製造方法と使用に関する。

【0002】

[背景技術]

アミノペプチダーゼN (APN/CD13) は、II型膜貫通亜鉛イオン依存性メタロプロテアーゼで、M1ファミリーのグルジンシン (Gluzincins) サブファミリーに属し、ホモ二量体の糖タンパク質の様態で細胞膜と結合する (Nucleic Acids Res., 1999, 27(1):325-331)。APNは、多くの組織の細胞表面で発現され、たとえば中枢神経系シナプス細胞、滑液線維芽細胞、活性化内皮細胞、肝細胞、腸粘膜上皮細胞、胎盤、骨髄前駆細胞、単核細胞、破骨細胞など、特に腎臓や腸刷子縁細胞に大量に存在する (Haema., 2003, 4(6):453-461)。また、正常細胞と比べ、APNは多くの腫瘍細胞、たとえば多発性骨髄腫、肝臓癌、メラノーマ、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、膵臓腺癌、乳癌、肺癌などの細胞の表面で高発現される。

30

【0003】

近年、世界中で多くの研究室による大量の実験研究により、アミノペプチダーゼN (APN/CD13) はヒ肝臓癌幹細胞の表面のバイオマーカーで、肝臓癌の化学療法の薬剤耐性、再発および転移に密接に関連することが証明され (J Clin Invest 2010, 120, 3326-3339)、APN/CD13は腫瘍微環境における血管新生を仲介することが証明された (PNAS 2007, 104(11):4588-4593; 2012, 109(5):1637-1642)。APN/CD13は、腫瘍微環境において重要な役割を担い、腫瘍組織の微環境におけるあるサイトカインのレベルに影響を与えることにより、腫瘍組織の微小血管の生成を促進して腫瘍の生長を加速させ、また放射線・化学治療による腫瘍組織内における癌細胞の活性酸素種 (ROS) の発生を阻止することによって化学療法の薬剤耐性を生じさせることで、免疫機能の欠失につながる。

40

【0004】

50

ウベニメクス (Ubenimex、Bestatin) は、ストレプトマイセス・オリボレチクリ (Streptomyces olivoreticuli) の培養液から単離されたジペプチド系化合物で、1987年に日本で市販されて免疫増強剤として白血病の治療に使用されている。ウベニメクスは1998年に中国で市販され、商品名は百士欣 (ベスタチン、Bestatin) である。ベスタチンは、明らかな免疫調節機能および顕著な抗腫瘍活性を有する。ベスタチンは、免疫系への影響が主に有効にT・B細胞の機能を増強させ、同時にナチュラルキラー細胞 (NK) の殺傷活性を向上させることに表れている。また、コロニー刺激因子の合成を促進し、骨髄細胞の再生と分化を刺激することにより、生体の免疫機能を調節、増強、興奮および回復させる作用を実現することができる。ベスタチンは、マウスメラノーマ高転移株B16BL6の侵襲を抑制することができ、HUVECの管腔構造の形成を抑制することもできる (Cancer letter, 2004, 216(1):35-42)。マウス移植腫瘍実験において、ベスタチンが腫瘍細胞の転移および腫瘍による血管新生を抑制できることが見出された (Bio. Pharm, Bull., 1996, 19(1):6-10)。ベスタチンは、小分子免疫増強剤として、臨床において従来の化学治療薬と併用して様々な癌、たとえば白血病、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群やほかの固形腫瘍などを治療することが、安全で有効であることが証明されている。しかし、単独の投与では、治療効果が非常に低い (Science, 2000)。

10

## 【0005】

ボルテゾミブ (Bortezomib、MG-341) は、米国ミレニウム社によって研究・開発されたプロテアソーム阻害薬で、2003年にFDAによって市販を許可され、臨床において多発性骨髄腫および再発・難治性マントル細胞リンパ腫の治療に使用されている。ボルテゾミブは、体外において多くの悪性腫瘍細胞に明らかな増殖抑制作用を有し、そして一連の血液系の悪性腫瘍および小細胞肺癌、前立腺癌、膵臓腺癌などの固形腫瘍のいずれにおいても明らかな抗腫瘍効果がある。しかし、低生物学的利用能および安定性のため、ボルテゾミブは注射による投与しかできない。

20

## 【0006】

イクキサゾミブクエン酸エステル (Ixazomib Citrate、MLN9708) は、武田薬品工業株式会社によって研究・開発され、経口投与の高選択性を有するプロテアソーム阻害薬で、2015年11月20日に初めて米国で市販を許可され、過去に第一選択治療を受けた多発性骨髄腫の治療に使用されている。既に市販されていたプロテアソーム阻害薬と比べ、イクキサゾミブは、ボルテゾミブなどの第一世代の阻害薬に薬剤耐性がある多発性骨髄腫患者にも有効で、経口投与のプロテアソーム阻害薬のため、週に1回しか服用する必要がなく、ボルテゾミブよりも低い末梢神経毒性を有するといった利点がある。

30

## 【0007】

既存の悪性腫瘍の治療薬は、機能および標的が単一であるため、悪性腫瘍の化学治療は一般的に併用治療が必要で、特に従来の細胞毒性系化学治療薬と生物免疫アジュバントまたは血管新生を抑制する標的キナーゼ阻害薬系薬物の併用は、既に腫瘍の臨床化学療法的好適なプランになっている。しかし、併用の過程において、腫瘍患者は複数で大量の薬物による治療を受けることが必要で、薬物の相互作用によるリスクがより大きくなり、そして治療コストが上昇する。そのため、多機能型抗癌薬の設計・開発は、近年、薬物化学の新薬設計分野の研究の焦点になっている。

40

## 【0008】

## [発明の概要]

上記既存技術の不足に対し、本発明の目的は、多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブ (Bestazomib Citrate) を提供することである。それはAPN/CD13にも、腫瘍のプロテアソームにも抑制活性を有する。

## 【0009】

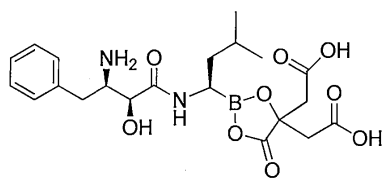
上記目的を実現するために、本発明は以下の技術方案を使用する。

本発明の第一の側面では、式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または三者の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物を提供する。

50

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】



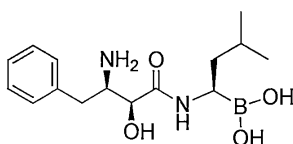
I

【 0 0 1 1 】

本発明の第二の側面では、式Iで表される化合物を製造するための中間体であって、構造が式IIで表されるものを提供する。

【 0 0 1 2 】

【 化 2 】



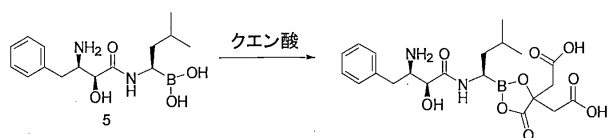
II

【 0 0 1 3 】

本発明の第三の側面では、上記式Iで表される化合物の製造方法であって、

【 0 0 1 4 】

【 化 3 】



6, クエン酸ベスタゾミブ(式I)

【 0 0 1 5 】

中間体5をクエン酸と作用させて式Iで表される化合物を得る工程を含む方法を提供する。もう一つの好適な例において、前記の方法は、

(2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(AHPA)を原料とし、Cbzで1級アミン基を保護して中間体2を得る工程、中間体2を無水DCMにおいてEDCIとHOBtの触媒下で(R)-1-アミノ-3-メチルブチルポロン酸ピナンジオールエステルトリフルオロ酢酸塩と反応させて中間体3を得る工程、中間体3にイソブチルポロン酸の作用下で保護基を脱離させて中間体4を得る工程、中間体4をPd/Cおよび水素ガスにおいて脱Cbz保護させて中間体5を生成し、最後にクエン酸と作用させて式Iで表される化合物を得る工程を含む。

【 0 0 1 6 】

その合成経路は以下の通りである。

【 0 0 1 7 】

10

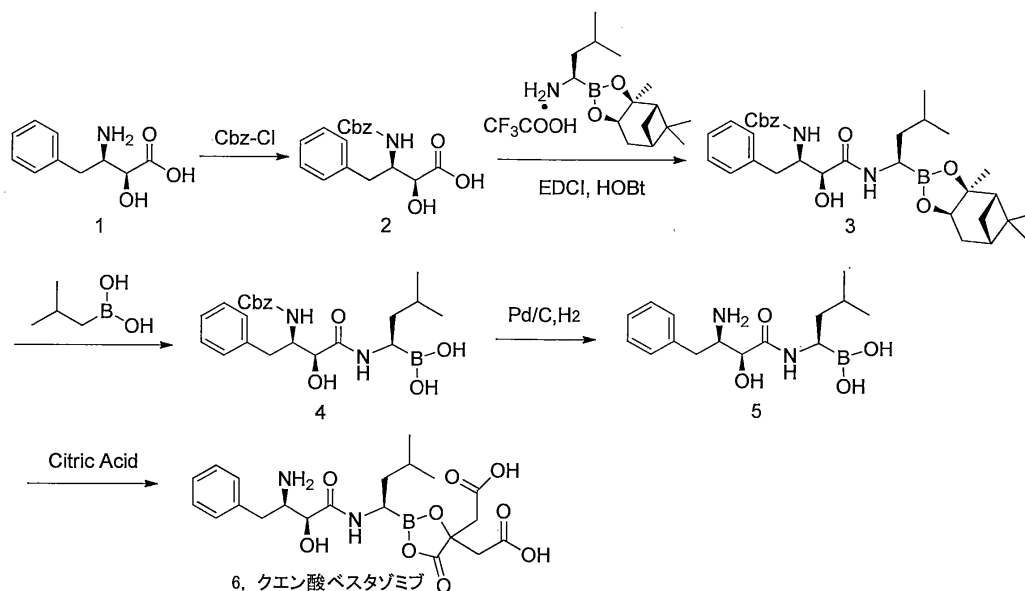
20

30

40

50

## 【化4】



## 【0018】

ここで、Cbz-Clはベンジルオキシカルボニルクロリドで、DCMはジクロロメタンで、EDCIは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩で、HOBTは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールで、Pd/Cはパラジウム炭素である。

20

## 【0019】

本発明の第三の側面では、多機能標的阻害薬の製造における、上記式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または三者の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物の使用を提供する。好ましくは、前記多機能標的阻害薬はアミノペプチダーゼNにもプロテアソームにも抑制活性を有する。

## 【0020】

本発明の第四の側面では、腫瘍を予防または治療する薬物の製造における、上記式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または三者の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物の使用を提供する。

30

## 【0021】

好ましくは、前記腫瘍は、骨髄腫、白血病および固形腫瘍を含む。

本発明の第五の側面では、活性成分が式Iで表される化合物、あるいはその光学異性体、ジアステレオマー、ラセミ体または三者の混合物、あるいはその薬学的に許容される塩、あるいはその溶媒和物である薬物組成物を提供する。

## 【0022】

また、前記薬物組成物は、さらに、1つまたは複数の薬学的に許容される担体または賦形剤を含む。

好ましくは、前記薬物組成物は経口投与製剤または注射製剤である。

40

## 【0023】

腫瘍疾患を治療する薬物製造の製造における上記薬物組成物の使用も本発明の保護範囲内である。好ましくは、前記腫瘍疾患は、骨髄腫、白血病および固形腫瘍を含む。

本発明の第六の側面では、腫瘍疾患を治療する方法であって、腫瘍疾患のリスクに面するか、腫瘍疾患と診断された被験者に治療有効量の式Iで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を投与する工程を含む方法を提供する。

## 【0024】

本明細書で用いられる用語「治療有効量」とは、標的の疾患または病状を治療、改善するか、あるいは検出可能な治療効果が現れるのに必要な治療剤の量である。

本発明の化合物は、幅広い投与量の範囲内で有効である。実際の本発明の式Iで表される

50

化合物の投与量は医者によって関連する状況に基づいて決められる。これらの状況は、被験者の身体状態、投与経路、年齢、体重、薬物に対する個体の反応、症状の重篤度などを含む。

【0025】

治療過程において、上記式Iで表される化合物またはその薬学的に許容される塩は、さらに、少なくとも1つのほかの薬物と併用してもよい。含まれるほかの薬物は原子構成と構造がいずれも式Iの化合物と異なる。

【0026】

本発明の有益な効果は以下の通りである。

(1) 本発明の多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブはAPN/CD13にも腫瘍のプロテアソームにも抑制活性を有し、悪性腫瘍の治療薬の開発に有用である。

10

【0027】

(2) 本発明のクエン酸ベスタゾミブを活性成分として開発される抗癌薬は、多標的で多機能性を有し、ほかの抗腫瘍薬と併用しなくても悪性腫瘍の治療が実現でき、併用の過程における薬物の相互作用によるリスクを避け、そして治療コストを低下させる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、各群の肺結節数である。

【図2】図2は、肝臓癌H22の肺転移を抑制する抑制率の試験結果である。

【図3】図3は、各群の動物体重の変化曲線である。

20

【図4】図4は、各群の肺の器官写真および肺結節である。

【図5】図5は、各群の動物生存期間の変化曲線である。

【図6】図6は、各群の動物の生存日数の比較である。

【図7】図7は、各群の生存期間の変化曲線である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

[具体的な実施形態]

もちろん、以下の詳細な説明はいずれも例示的なもので、本願にさらなる説明を提供するためのものである。別途に明示しない限り、本明細書で用いられるすべての技術・科学用語はいずれも本願が属する技術分野の当業者によって通常理解される意味と同様である。

30

【0030】

本明細書で用いられる用語および定義の意味は以下の通りである。

「薬学的に許容される塩」とは、式Iの化合物の治療効果がありながら、毒性がない塩の形態である。任意の塩基性基（たとえばアミノ基）でカチオン塩になってもよい。本分野で既知のこのような塩の多くは、任意の塩基性基（たとえばアミノ基）に形成したアニオン塩である。これらの塩の多くは本分野で既知のものである。また、相応する酸で塩基性の形態の(1)を処理することによって簡単にアニオン塩を得ることができるが、このような酸は、無機酸、たとえば塩酸、硫酸、硝酸、リン酸など、あるいは有機酸、たとえば酢酸、トリフルオロ酢酸、プロパン酸、グリコール酸、2-ヒドロキシプロパン酸、2-オキシプロパン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、2-ヒドロキシ-1,2,3-トリカルバリル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、4-メチルベンゼンスルホン酸、シクロヘキシルスルフィン酸、2-ヒドロキシ安息香酸、4-アミノ-2-ヒドロキシ安息香酸などを含む。これらの塩は、当業者に熟知のもので、当業者は本分野の知識で提供される任意の塩を製造することができる。また、当業者は溶解度、安定性、製剤の難易度などの要素からある塩を取るが、もう一つの塩を捨てることができる。これらの測定および最適化は当業者の経験の範囲内である。

40

【0031】

背景技術の部分で紹介したように、既存の抗腫瘍薬は、機能および標的が単一で、通常、併用が必要である。しかし、併用は薬物の相互作用によるリスクを増加させ、そして治療コストを上昇させる。これに基づき、本発明は、多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン

50



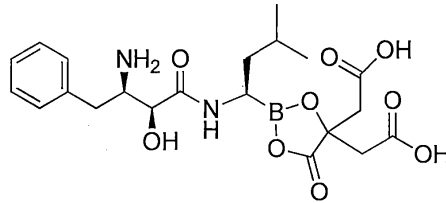
酸ベスタゾミブを提供する。

【0032】

本発明の多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブは、以下のような構造を有する。

【0033】

【化5】



I

【0034】

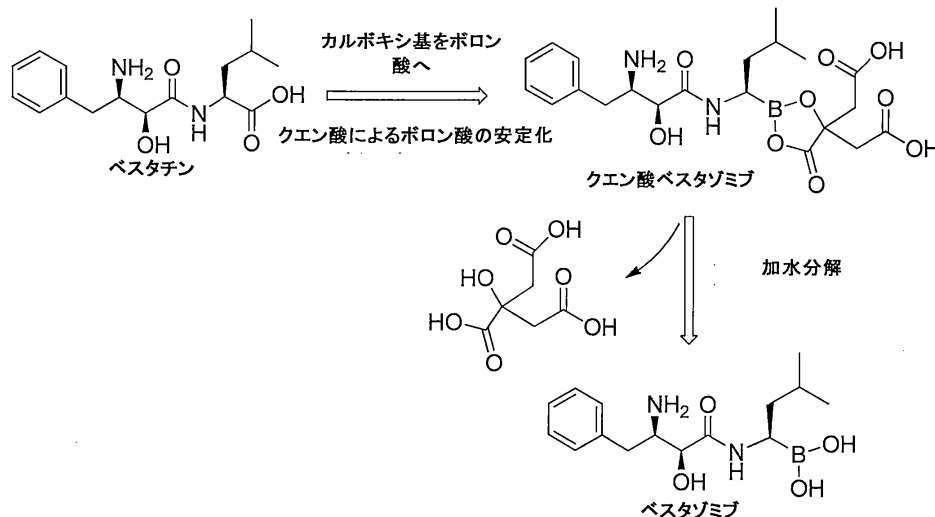
クエン酸ベスタゾミブの化学名は、2,2'-(2-((R)-1-((2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブチルアミノ)-3-メチルブチル)-5-オキソ-1,3,2-ジオキサボロラン-4,4-ジイル)ジ酢酸である。

【0035】

本発明の多機能標的免疫小分子抗癌薬の設計構想は、本発明はベスタチンに基づいて構造設計を行い、まず、ベスタチンの分子構造における遊離カルボキシ基を修飾すると、APN/CD13の抑制活性を維持するが、体外における腫瘍細胞の増殖を抑制する活性が向上せず、そしてプロテアソームにも抑制活性がないことが見出された。化合物の多標的および多機能性を実現するため、本発明では、革新的に、ベスタチンの分子構造におけるカルボキシ部分をボロン酸に変えたところ、腫瘍細胞の増殖に対する抑制活性が顕著に向上したことが見出された。しかし、ベスタチンの分子構造におけるカルボキシ部分をボロン酸に変えると、ボロン酸が三量体構造になりやすく、その安定性が劣り、経口投与の抗癌薬に開発することが困難である。さらにその安定性の問題を解決するため、本発明では、化合物の分子構造にクエン酸を導入することによってボロン酸を安定化させ、化合物の安定性を増強する。上記設計過程により、本発明では、設計して式Iで表される化合物であるクエン酸ベスタゾミブ (Bestazomib Citrate) を得た。この化合物は前駆体分子で、体内において代謝されてクエン酸部分が脱離することで、さらに細胞毒性の殺傷作用を発揮する。

【0036】

【化6】



【0037】

10

20

30

40

50

本発明で設計された化合物であるクエン酸ベスタゾミブは、リード化合物と比べ、多標的性および多機能性を有し、APN/CD13に優れた抑制活性を有するのみならず、腫瘍のプロテアソームにも良い抑制活性がある。細胞試験では、本発明の化合物であるクエン酸ベスタゾミブは多くの腫瘍細胞の増殖にも明らかな抑制活性を有することが示された。

【0038】

リード化合物と比べ、本発明で設計された化合物であるクエン酸ベスタゾミブは、薬物動態学、生物学的利用能、安全性および物理・化学的性質などの面においても大幅に向上し、活性が良く、機能が多く、安定性が良く、多機能標的免疫小分子の抗癌薬への開発に非常に適する。

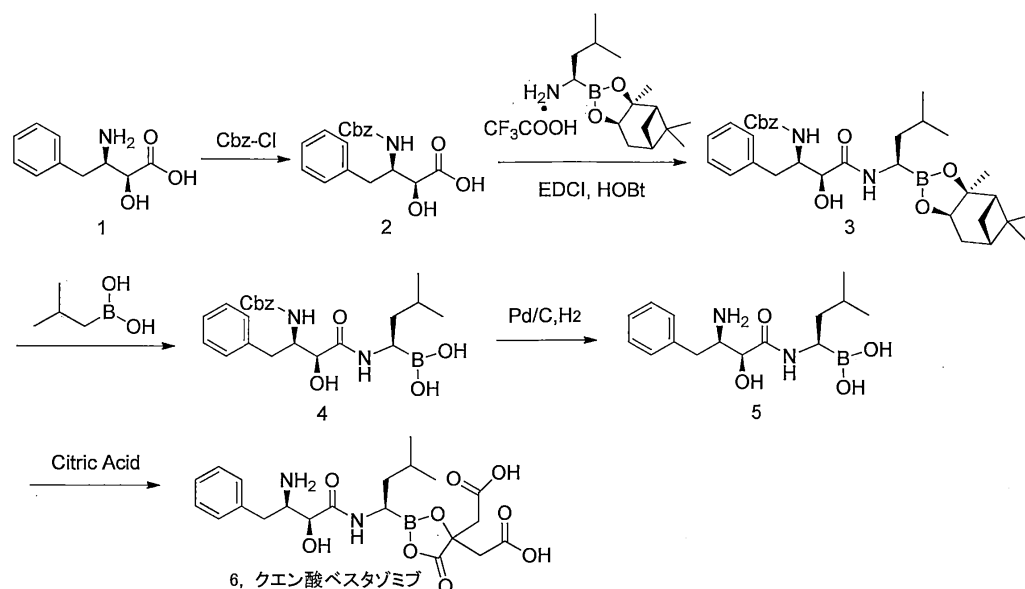
【0039】

本発明の多機能標的免疫小分子抗癌薬のクエン酸ベスタゾミブは、以下のような方法によって製造される。

光学的に単一の(2*S*,3*R*)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(AHPA)を原料とし、Cbzで1級アミン基を保護して中間体2を得る。無水DCMにおいてEDCIとHOBtの触媒下で(R)-1-アミノ-3-メチルブチルボロン酸ピナンジオールエステルトリフルオロ酢酸塩と反応させて中間体3を得る。中間体3にイソブチルボロン酸の作用下で保護基を脱離させて重要中間体4を得る。中間体4をPd/Cおよび水素ガスにおいて脱Cbz保護させて中間体5を生成し、最後にクエン酸と作用させて式Iで表される化合物6(Bestazomib Citrate)を得る。反応式は、以下の通りである。

【0040】

【化7】



【0041】

当業者は、収率を向上させるために上記工程を変更することができるが、本分野の基本知識に基づいて合成の経路を決め、たとえば反応物、溶媒および温度を選択し、様々な通常の保護基で副反応の発生を避けることで、収率を向上させることができる。これらの通常の保護方法は、たとえばT. Greene, *Protecting Groups in Organic Synthesis*を参照する。

【0042】

本発明の化合物を含む薬物組成物

本発明の一部の誘導体は遊離の形態または塩の形態で存在してもよい。当業者には、多くの化合物の種類の薬学的に許容される塩およびその製造方法が既知である。薬学的に許容される塩は、通常は無毒性の塩を含むが、このような化合物塩基と無機酸または有機酸で形成する4級アンモニウム塩を含む。

10

20

30

40

50

## 【0043】

本発明の化合物は水和物または溶媒和物でもよい。当業者には、化合物を水とともに凍結乾燥する場合に形成する水和物または溶液において適切な有機溶媒と濃縮すると溶媒和物が形成する方法が既知である。

## 【0044】

本発明は、治療量の本発明の化合物の薬物と、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および/または賦形剤を含有する薬物組成物を含む。担体は、たとえば食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水、グリセリン、エタノールおよびこれらの結合物を含むが、下記でより詳細に述べる。必要により、当該組成物は、さらに、少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。当該組成物は、液体、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル、徐放製剤または粉末でもよい。当該組成物は、従来のバインダーおよび担体、たとえばトリグリセリドで坐剤にしてもよい。経口投与製剤は、標準担体、たとえば薬品級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロースや炭酸マグネシウムなどを含んでもよい。必要な製剤により、調製は成分の混合、造粒および圧縮または溶解を設計してもよい。もう一つの経路において、当該組成物はナノ顆粒にしてもよい。

10

## 【0045】

使用される薬物担体は固体または液体でもよい。

典型的な固体担体は、乳糖、石膏粉、ショ糖、タルク、ゲル、寒天、ペクチン、アラビアゴム、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などを含む。固体担体は、1つまたは複数の同時に矯味剤、潤滑剤、相溶剤、懸濁剤、フィラー、流動化剤、圧縮助剤、バインダーまたは錠剤-崩壊剤にもなれる物質を含んでもよく、さらにコーティング材料を含んでもよい。粉末において、担体は精細に粉碎された固体で、精細に粉碎された活性成分と混合される。錠剤において、活性成分は必要な圧縮性質を有する担体と適切な比率で混合され、必要な形状と大きさのように圧縮される。粉末および錠剤は好ましくは99%以下の活性成分を含む。適切な固体担体は、たとえば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、乳糖、デキストリン、デンプン、ゲル、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポビドン、低融点ワックスやイオン交換樹脂を含む。

20

## 【0046】

典型的な液体担体は、シロップ、落花生油、オリーブ油、水などを含む。液体担体は、溶液、懸濁液、乳剤、シロップ剤、チンキ剤および密封された組成物の調製に使用される。活性成分は薬学的に許容される液体担体、たとえば、水、有機溶媒、両者の混合物あるいは薬学的に許容される油類または脂肪に溶解または懸濁させてもよい。液体担体は、ほかの適切な薬物添加剤、たとえば、相溶剤、乳化剤、緩衝剤、防腐剤、甘味料、矯味剤、懸濁剤、増稠剤、顔料、粘度調整剤、安定化剤または浸透圧調整剤を含んでもよい。経口投与および胃腸外投与に用いられる液体担体の適切な例は、水（部分的に上記のような添加剤、たとえばセルロース誘導體、好ましくはカルボキシメチルセルロースナトリウム溶液を含む）、アルコール（モノアルコールおよび多価アルコール、たとえばエチレングリコールを含む）およびその誘導體、および油類（たとえば分留ヤシ油や落花生油）を含む。また、胃腸外投与に用いられる担体は油脂、たとえば、オレイン酸エチルやイソプロピルミリスチン酸塩でもよい。無菌の液体担体は胃腸外投与の無菌の液体組成物に用いられる。加圧組成物に用いられる液体担体はハロゲン化炭化水素またはほかの薬学的に許容される駆出剤でもよい。無菌溶液または懸濁液の液体薬物組成物は、たとえば、静脈内、筋肉内、腹膜内または皮下注射に使用することができる。注射の際、単回の注入または少しずつの注入、30分間の静脈内注入でもよい。また、当該化合物は液体または固体組成物の形態で経口投与してもよい。

30

40

## 【0047】

担体または賦形剤は本分野で既知の徐放剤、たとえばグリセリンモノステアレートやグリセリンジステアレートを含んでもよい、またワックス、エチルセルロース、ヒドロキシ

50

プロピルメチルセルロース、イソクロトン酸メチルなどを含んでもよい。製剤が経口投与に用いられる場合、周知のようにPHOSALPG-50 (リン脂質(phospholipid)と1,2-プロピレングリコールが濃縮したもの、A. Nattermann & Cie. GmbH) における0.01% ツイン80がほかの化合物の許容される経口投与製剤の調製に使用され、本発明の各化合物の調製にも適する。

【0048】

本発明の化合物を投与する場合、様々な形態を使用してもよい。固体担体を使用する場合、製剤は錠剤、硬カプセルに入った粉末または丸剤または錠剤または糖衣錠剤でもよい。固体担体の量は大きく変わるが、好ましくは約25mg~約1.0gである。液体担体を使用する場合、製剤はシロップ剤、乳剤、軟カプセル、アンプルまたは小瓶または非水の液体懸濁液における無菌注射溶液または懸濁液でもよい。

10

【0049】

安定した水溶性の剤形を得るために、化合物またはその薬学的に許容される塩を有機酸または無機酸の水曜席、0.3Mコハク酸またはクエン酸溶液に溶解させてもよい。任意に、酸性の誘導体は適切な塩基性溶液に溶解させてもよい。可溶性の形態が得られない場合、化合物を適切な共溶媒またはその組み合わせに溶解させてもよい。このような適切な共溶媒の例は、濃度範囲が全体積の0~60%のエタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール300、ポリソルベート80、グリセリン、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、脂肪族アルコールやヒドロキシ脂肪酸グリセリドなどを含むが、これらに限定されない。

20

【0050】

様々な放出系は既知で、かつ化合物またはほかの各製剤の投与に使用することができるが、これらの製剤は錠剤、カプセル、注射可能な溶液、リポソームにおけるカプセル、マイクロビーズ、マイクロカプセルなどを含む。導入の方法は、皮膚、皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、肺、硬膜外、目および(通常、好ましい)経口投与の経路を含むが、これらに限定されない。化合物は任意の便利な経路またはほかの適切な経路で投与してもよいが、たとえば注入または快速高濃度注入による投与、上皮または粘膜の経路(たとえば、口腔粘膜、直腸や腸粘膜など)を介する吸収あるいは薬物を担持するホルダーによる投与、そしてほかの生物活性剤との併用投与が挙げられる。全身または局所の投与でもよい。

30

【0051】

以下、当業者により明確に本願の技術方案が理解できるように、具体的な実施例とともに本願の技術方案を詳しく説明する。

本発明の実施例で使用された、具体的に説明されていない試験材料は本分野の通常の試験材料で、いずれも市販品として購入することができる。

【0052】

[実施例]

実施例1: (2S,3R)-3-((ベンジルオキシカルボニル)アミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(2)

AHPA(1, 1.95 g, 10.0 mmol)を100 mLのテトラヒドロフランと1mol/L水酸化ナトリウムの混合溶液に溶解させ、氷浴の条件でベンジルオキシカルボニルクロリド(1.88g, 11.0 mmol)を滴下した。室温で6時間反応させた後、蒸発で反応液におけるテトラヒドロフランを除去し、水相を1mol/L塩酸でpH=1になるように調整し、酢酸エチルで3回抽出し、有機相を合併し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発で溶媒を除去して白色の固体2を得た(2.11g, 64%)。

40

【0053】

実施例2: (R)-1-((2S,3R)-3-((ベンジルオキシカルボニル)アミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニルブチルアミノ)-3-メチルブチルポロン酸ピナンジオールエステル(3)

化合物2(3.29 g, 10.0 mmol)を50 mLの無水DCMに溶解させ、氷浴の条件でHOBt(1.49 g, 11 mmol)およびEDCI(2.10 g, 11.0 mmol)を入れ、0.5 h後、(R)-1-アミノ-3

50

-メチルブチルポロン酸ピナンジオールエステルトリフルオロ酢酸塩(4.07 g, 11.0 mmol)、1.5 mLのトリエチルアミンを入れた。氷浴を撤去し、室温で5h反応させた。反応完了後、有機層をそれぞれ水、1Mクエン酸、飽和炭酸水素ナトリウム、飽和塩化ナトリウムで洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し、蒸発で溶媒を除去し、白色の固体3を得た(3.05g, 53%)。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz DMSO-d<sub>6</sub>): 0.82 (s, 3H), 0.88-0.90 (m, 6H), 1.24-1.27 (m, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.40-1.50 (m, 2H), 1.60-1.65 (m, 1H), 1.72 (s, 1H), 1.83 (d, J=14.88 Hz, 1H), 1.89 (s, 1H), 1.99-2.01 (m, 1H), 2.16-2.20 (m, 1H), 2.28-2.32 (m, 1H), 2.99-3.05 (m, 2H), 3.26-3.27 (m, 1H), 4.05-4.07 (m, 1H), 4.17 (s, 1H), 4.29 (d, J=14.88 Hz, 1H), 4.98-5.09 (m, 3H), 5.45 (d, J=8.28 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.17-7.36 (m, 10H). ESI-MS m/z:577.34 (M+H)<sup>+</sup>。

【0054】

実施例3：(R)-1-((2S,3R)-3-((ベンジルオキシカルボニル)アミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニルブチリルアミノ)-3-メチルブチルポロン酸(4)

化合物3(2.88 g, 5.0mmol)を50 mLの無水メタノールとn-ヘキサンの1:1の混合溶媒に溶解させ、そしてそれにイソブチルポロン酸(1.27 g, 12.5 mmol)を入れた。氷浴の条件下で、1 mol/Lの塩酸溶液を入れて室温で攪拌を6h続けた。静置して分液させた後、下層に2 mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を入れ、ジクロロメタンで3回抽出した。水相をさらに1N塩酸でpH=5になるように調整し、DCMで3回抽出し、DCM相を合併し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発で溶媒を除去して白色の固体4を得た(0.77g, 35%)。

【0055】

実施例4：(R)-1-((2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブチリルアミノ)-3-メチルブチルポロン酸(5)

化合物4(1.10 g, 2.5 mmol)を50 mLの無水メタノールに溶解させ、10%パラジウム炭素を0.1g入れ、水素ガスの雰囲気において室温で6h反応させ、ろ過後、蒸発で溶媒を除去して白色の固体5を得た(1.26g, 42%)。

【0056】

実施例5：2,2'-(2-((R)-1-((2S,3R)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニルブチリルアミノ)-3-メチルブチル)-5-オキソ-1,3,2-ジオキサボロラン-4,4-ジイル)ジ酢酸(6)

化合物5(0.62 g, 2.0 mmol)を20 mLの酢酸エチルに溶解させ、65 °Cの油浴においてクエン酸(0.38 g, 2.0 mmol)を入れた。0.5h反応させた後、室温に冷却して続いて2 h攪拌した。蒸発で溶媒を除去して粗製品を得たが、酢酸エチルで再結晶させて白色の固体6を得た(0.36g, 40%)。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz DMSO-d<sub>6</sub>): 0.77-0.87 (m, 6H), 1.18-1.30 (m, 2H), 1.65-1.75 (m, 1H), 2.20-2.36 (m, 1H), 2.56-2.84 (m, 4H), 2.96-3.06 (m, 1H), 3.18 (s, 1H), 3.49-3.71 (m, 1H), 3.86-3.96 (m, 1H), 7.22-7.36 (m, 5H), 7.60-7.97 (m, 3H), 11.93 (s, 2H). ESI-MS m/z:465.20 (M+H)<sup>+</sup>; つまり、目的化合物6 (Bestazomib Cirtate)であった。

【0057】

実施例6：目的化合物の体外におけるアミノペプチダーゼNに対する抑制活性試験

アミノペプチダーゼNはその商品化された基質のL-ロイシル-p-ニトロアニリン (Sigma社から購入)と相互作用すると、405nmに吸収があるp-ニトロアニリンが生成し、そしてp-ニトロアニリンの濃度が酵素活性の大きさと正関連する。405nmにおいて吸収度を測定し、阻害薬群および対照群の吸収度から抑制率を計算し、そしてIC<sub>50</sub>値を算出した。実験結果は表1に示す。

【0058】

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表1:クエン酸ベスタゾミブ、ベスタゾミブおよび陽性対照のベスタチンの体外酵素抑制試験の結果

| 化合物        | IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|
|            | APN                                | 20S プロテアソーム                        |
| クエン酸ベスタゾミブ | 2.14                               | 8.56                               |
| ベスタゾミブ     | 3.87                               | 10.18                              |
| ベスタチン      | 4.86                               | ND <sup>b</sup>                    |
| イキサゾミブ     | 18.23                              | 0.0063                             |

<sup>a</sup>表における数値は3回の試験の平均値で、<sup>b</sup>NDは未検出である。

## 【0059】

上記試験結果では、化合物クエン酸ベスタゾミブが示したAPNに対する抑制活性が陽性対照薬のベスタチンよりも優れたこと示され、結果から、ベスタチンのカルボキシ基をボロン酸で置き換えた後、APNに対する抑制活性が維持し、新規な高効率のアミノペプチダーゼN阻害剤を見つけるリード化合物として有用で、良い開発の将来性があることが明らかになった。

## 【0060】

実施例7：目的化合物の体外における20Sプロテアソームに対する抑制活性試験

20Sプロテアソーム検出キット(Calbiochems, EMD Millipore Co., USA)によって体外プロテアソーム活性試験を行った(Clinical Cancer Research, 2011, 17:5311-5321)。プロテアソームはその基質と相互作用すると、蛍光物質である7-アミノ-4-メチルクマリロン(7-AMC)が生成し、そして7-AMCの濃度がプロテアソーム活性の大きさと正関連する。380/460nmにおいて蛍光強度を測定し、阻害薬群および対照群の吸収度から抑制率を計算し、そしてIC<sub>50</sub>値を算出した。実験結果は表1に示す。

## 【0061】

上記試験結果では、化合物クエン酸ベスタゾミブはプロテアソームに対する抑制活性も示したが、その抑制活性が陽性対照薬のイキサゾミブよりも低かったことが示された。化合物クエン酸ベスタゾミブは二重標的の抑制活性を有することが示された。

## 【0062】

実施例8：目的化合物の体外における細胞増殖に対する抑制活性試験

目的化合物の体外における細胞増殖に対する抑制活性試験はMTT法を使用した。ヒト白血病K562細胞株、ヒト骨髄腫U266細胞株、ヒト肺癌A549細胞、ヒト前立腺癌PC-3細胞株、ヒトリンパ腫U937細胞株およびヒト肝臓癌PLC/PRF/5細胞株、ヒト胚胎腎臓細胞HEK293、ヒト正常肝細胞HL7702を取り、いずれも通常の培養を使用した。実験時、いずれも対数期の細胞を使用した。上記細胞の細胞懸濁液を取って倒立顕微鏡において細胞数を計数し、培地を入れて細胞数が $1 \times 10^5$ /mLになるように調整した。96ウェル細胞培養プレートで細胞接種および薬物実験を行い、周縁のウェルを使用せず(無菌PBSを充填)、ブランク対照群、陰性対照群、陽性対照群および薬物実験群を設け、ここで、ブランク対照群では、細胞培養液のみを150 μL/ウェル入れ、陰性対照群では、細胞懸濁液を100 μL/ウェル接種して細胞培養液を50 μL/ウェル入れ、陽性対照群では、細胞懸濁液を100 μL/ウェル接種して陽性対照薬溶液を50 μL/ウェル入れ、薬物実験群では、細胞懸濁液を100 μL/ウェル接種して被験化合物溶液を50 μL/ウェル入れ、陽性対照群および薬物実験群はそれぞれ5つの異なる薬物最終濃度：0.01、0.1、1、10、100 μmol・L<sup>-1</sup>を設け、各薬物濃度に3つの平行重複ウェルを設けた。薬物添加が終了した後、96ウェル細胞培養プレートを37℃、5% CO<sub>2</sub>および飽和湿度の条件で48h培養し、各ウェルに10 μL

の0.5%のMTT染色液を入れ、続いて4 hインキュベートした後、2500 rpmで30 min遠心し、さらにウェルにおける培地を捨て、各ウェルに100  $\mu$ LのDMSOを入れ、シェーカーにおいて15 min振とうし、ホルマザン結晶が完全に溶解するようにした。マイクロプレートリーダーによって波長570nmにおいて各ウェルのOD値を測定し、細胞生長抑制率は以下の公式で計算された。

【0063】

【数1】

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{対照ウェルの平均OD値} - \text{実験ウェルの平均OD値}}{\text{対照群の平均生存時間}} \times 100\%$$

10

【0064】

【表2】

表2:クエン酸ベスタゾミブおよび陽性対照のベスタチンの腫瘍細胞に対する増殖抑制活性の結果 ( $IC_{50}$ 、 $\mu M^a$ )

| 細胞系       | クエン酸ベスタゾミブ       | ベスタゾミブ           | ベスタチン |
|-----------|------------------|------------------|-------|
| K562      | 12.28 $\pm$ 1.46 | 37.15 $\pm$ 2.28 | >200  |
| U266      | 21.72 $\pm$ 1.87 | 36.55 $\pm$ 2.07 | >200  |
| A549      | 63.58 $\pm$ 5.71 | 98.36 $\pm$ 7.51 | >200  |
| PC-3      | 45.57 $\pm$ 3.16 | 65.74 $\pm$ 5.83 | >200  |
| U937      | 6.42 $\pm$ 0.64  | 15.49 $\pm$ 1.41 | >200  |
| PLC/PRF/5 | 54.70 $\pm$ 4.12 | 79.64 $\pm$ 6.32 | >200  |

20

<sup>a</sup>表における数値は3回の試験の平均値である。

30

【0065】

上記試験データでは、化合物クエン酸ベスタゾミブは上記腫瘍細胞のいずれにもある程度の増殖抑制作用を有し、陽性対照薬のベスタチンと比べ、クエン酸ベスタゾミブはヒトリンパ腫細胞U937、ヒト白血病細胞K562およびヒト骨髄腫細胞U266に対する増殖抑制活性が明らかに増強し、ヒト前立腺癌細胞PC-3、ヒト肺癌細胞A549およびヒト肝臓癌細胞PLC/PRF/5にも明らかな増殖抑制活性を有することが示され、良い開発の将来性がある(表2)。また、クエン酸ベスタゾミブのヒト正常細胞に対する増殖抑制活性を研究したところ、陽性対照薬のイキサゾミブと比べ、クエン酸ベスタゾミブは正常細胞に対する抑制活性がイキサゾミブよりも遥かに低かったことが示され、クエン酸ベスタゾミブは安全性がより高く、治療域がより広いことがわかる(表3)。

40

【0066】

50

【表 3】

表3:クエン酸ベスタゾミブおよび陽性対照のイキサゾミブのヒト正常細胞に対する増殖抑制活性の結果 (IC<sub>50</sub>、μM<sup>a</sup>)

| 細胞系    | クエン酸ベスタゾミブ   | イキサゾミブ     |
|--------|--------------|------------|
| HEK293 | 445.95±19.45 | 17.10±2.27 |
| HL7702 | 370.70±70.85 | 4.04±0.63  |

a表における数値は3回の試験の平均値である。

10

【0067】

実施例9：目的化合物の肝臓癌H22の肺転移の抑制実験

1. マウス移植性腫瘍モデルの構築

良好に生長した肝臓癌H22担持マウスを取り、腹水を取り出し、無菌PBS溶液を入れて濃度が2.5 × 10<sup>7</sup>個/mLになるように希釈し、尾静脈から昆明マウスを200 μL/匹で接種した。体重が高すぎたか、低すぎた昆明マウスを除き、ランダムに分け、投与プランに従って投与を開始した。

【0068】

2. 薬効学試験

H22腫瘍を接種された昆明マウスを、体重を測定した後、ランダムに以下の6群に7匹/群で分けた。(1) 陰性対照：PBS；(2) イキサゾミブ高投与量群：4 mg/kg/4d；(3) イキサゾミブ低投与量群：2 mg/kg/4d；(4)クエン酸ベスタゾミブ低投与量群：2.69 mg/kg/4d；(5)クエン酸ベスタゾミブ中投与量群：3.59 mg/kg/4d；(4)クエン酸ベスタゾミブ高投与量群：4.48 mg/kg/d。クエン酸ベスタゾミブは毎日1回で投与し、5日投与すると2日投与を止め、7日を1サイクルとし、計2サイクルで（投与体積：200 μL/20g/匹/回、投与形態：胃内投与）、陽性対照のイキサゾミブは4日に1回投与し、各サイクルの開始時と終了時に電子天秤でマウスの体重を測定し、平均値を求めた。接種から13日目にマウスを殺処分した。肺癌肺転移抑制率の計算式は、以下の通りである。

20

【0069】

【数2】

ブランク群の肺転移巣数－治療群の肺転移巣数

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{ブランク群の肺転移巣数} - \text{治療群の肺転移巣数}}{\text{ブランク群の肺転移巣数}} \times 100\%$$

30

【0070】

3. 試験結果：

各群の肺結節数を図1に、肝臓癌H22の肺転移を抑制する抑制率の試験結果を図2に、各群の動物体重の変化曲線を図3に、各群の肺の器官写真および肺結節を図4に示す。

40

【0071】

上記試験結果から、クエン酸ベスタゾミブは多機能免疫小分子の抗癌薬として強い体内外の抗腫瘍活性を有し、ある程度の開発・応用の将来性がある。

実施例10：カーボンクリアランステスト

1. 実験原理

単核のマクロファージ系は非常に重要な防御システムで、強い異種粒子の貪食クリアランス能を有する。一定の濃度のカーボン粒子がマウスの尾静脈を経て体内に入った後、血液の流れで肝臓、脾臓などに連れられ、これらの器官のマクロファージがこれらのカーボン粒子をクリアランスすることができる。一定の濃度範囲内で、マクロファージのカーボン粒子に対するクリアランス速度がその投与量と指数関数関係にあり、すなわち、貪食速

50



度が血液におけるカーボン粒子の濃度と正比例する。そのため、マウス血液におけるカーボン粒子濃度の対数値を縦座標に、時間を横座標にプロットすると、その傾きKはマクロファージの貪食速度を表すが、これは校正されていない貪食指数である。実際に、その貪食活性はさらにマウスの肝臓、脾臓の重量に関連し、重量が異なると、K値が異なるため、一般的に、校正された貪食指数で表すが、これは単位重量の組織の貪食活性を反映する。Kおよび $\alpha$ の計算式は、以下の通りである。

【0072】

【数3】

$$K = (\log A_1 - \log A_2) / (t_2 - t_1) \\ \alpha = (k^{1/3} \times \text{体質量}) / (\text{肝臓質量} + \text{脾臓質量})$$

10

【0073】

## 2. 実験の材料と方法

材料：昆明マウス（雌、4-5週齢）、インディアンインク、生理食塩水、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液（0.1% g/v）、UV紫外可視分光光度計。

【0074】

昆明マウスをランダムに分け、2週間投与した。最後の投与から1 hで、各マウスの尾静脈から生理食塩水で5倍希釈されたインディアンインクを0.1 mL/10 g注射し、注入後すぐに計時を開始し、それぞれ2 min (t<sub>1</sub>)、10 min (t<sub>2</sub>)の時点でそれぞれ眼窩静脈叢から正確に20  $\mu$ L採血して2 mLの0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液に入れ、均一に混合した後、0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液を対照群とし、各投与群は実験群で、紫外可視分光光度計によって波長600 nmでそれぞれt<sub>1</sub>とt<sub>2</sub>の2つの時点の吸光度を測定し、A<sub>1</sub>とA<sub>2</sub>とした。以上のK値の計算式によってクリアランス指数を算出した。また、採血終了後、マウスを頸椎脱臼で殺め、それぞれ肝臓、脾臓を摘出して体重を測定した。貪食指数 $\alpha$ を計算した。

20

【0075】

【表4】

表4: クエン酸ベスタゾミブおよび陽性対照のイキサゾミブのマウス体内におけるマクロファージのカーボンクリアランス指数(K)と貪食指数( $\alpha$ )

| 群                     | 投与量 (mg/kg/4d) | カーボンクリアランス指数 (K) <sup>a</sup> | 貪食指数 ( $\alpha$ ) <sup>a</sup> |
|-----------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 対照                    | 0              | 0.057 ± 0.0061                | 19.126 ± 0.685                 |
| イキサゾミブ高投与量 (p.o.)     | 4              | 0.045 ± 0.0092                | 15.423 ± 1.053                 |
| イキサゾミブ低投与量 (p.o.)     | 2              | 0.061 ± 0.0066                | 19.949 ± 0.718                 |
| クエン酸ベスタゾミブ低投与量 (p.o.) | 2.69           | 0.066 ± 0.0077                | 24.842 ± 0.969                 |
| クエン酸ベスタゾミブ中投与量 (p.o.) | 3.59           | 0.076 ± 0.0016                | 21.620 ± 0.154                 |
| クエン酸ベスタゾミブ高投与量 (p.o.) | 4.48           | 0.063 ± 0.0002                | 21.628 ± 0.026                 |

30

<sup>a</sup>示された結果は「平均値 ± 標準偏差」で表示される。

40

【0076】

50

上記テスト結果から、クエン酸ベスタゾミブを投与されたマウスはマクロファージに対する貪食能が陽性対照のイキサゾミブよりも強く、かつある程度の投与量依存性があることが示された。この結果から、クエン酸ベスタゾミブはマウスのマクロファージの貪食能を増強することにより、マウスの生体免疫機能を増強することができることが示された。そのため、クエン酸ベスタゾミブは多機能免疫小分子の抗癌薬として優れた開発・応用の将来性がある。

## 【0077】

実施例11：昆明マウスH22肝腹水モデルの生存期間試験

良好に生長した肝臓癌H22担持マウスを取り、腹水を取り出し、無菌PBS溶液を入れて濃度が $2.5 \times 10^7$ 個/mLになるように希釈し、昆明マウスの腹腔に200  $\mu$ L/匹で接種した。5日後、ランダムに群分けして投与し、接種当日は1日目で、投与時、動物の体重を記録した。ランダムに体重を測定して以下の6群に10匹/群で分けた。(1)陰性対照：PBS；(2)イキサゾミブ高投与量群：4 mg/kg/4d；(3)イキサゾミブ低投与量群：2 mg/kg/4d；(4)クエン酸ベスタゾミブ低投与量群：2.69 mg/kg/4d；(5)クエン酸ベスタゾミブ中投与量群：3.59 mg/kg/4d；(6)クエン酸ベスタゾミブ高投与量群：4.48 mg/kg/d。所定の投与量でマウスに投与し、それぞれ体重を測定して記録した。

10

## 【0078】

Origin7.5ソフトの一元配置分散分析(One-Way ANOVA)機能によって全体差を算出し、t検定でそれぞれ各投与群とブランク群を両者比較し、そして以下の式で各群の薬物の延命率を計算した。

20

## 【0079】

## 【数4】

投与群の平均生存時間－対照群の平均生存時間

$$\text{延命率(\%)} = \frac{\text{投与群の平均生存時間} - \text{対照群の平均生存時間}}{\text{対照群の平均生存時間}} \times 100\%$$

## 【0080】

各群の生存期間の変化曲線を図5に、各群の動物の生存日数の比較を図6に示す。上記試験結果から、陽性薬のイキサゾミブと等モル量の前提で、Bestazomib Citrateクエン酸ベスタゾミブを投与されたマウスの生存時間が陽性薬のイキサゾミブの延長時間よりも優れたことがわかる。クエン酸ベスタゾミブは多機能免疫小分子の抗癌薬として優れた開発・応用の将来性がある。

30

## 【0081】

実施例12：B16F10メラノーマ細胞C57マウス皮下腫瘍の生存期間試験

対数期にあるB16F10メラノーマ細胞を取り、無菌PBS溶液を入れて濃度が $1.5 \times 10^7$ 個/mLになるように希釈し、C57マウスの皮下に150  $\mu$ L/匹で接種した。5日後、ランダムに群分けして投与し、接種当日は1日目で、投与時、動物の体重を記録した。ランダムに体重を測定して以下の5群に分けた。(1)陰性対照：PBS；(2)イキサゾミブ高投与量群：4 mg/kg/4d；(3)クエン酸ベスタゾミブ低投与量群：4 mg/kg/4d；(4)クエン酸ベスタゾミブ中投与量群：6 mg/kg/4d；(5)クエン酸ベスタゾミブ高投与量群：9 mg/kg/4d。所定の投与量でマウスに投与し、それぞれ体重を測定して記録した。マウスの死亡を観察の終点として連続して観察し、各マウスの死亡時間を記録した。各群のマウスの死亡時間を統計した。

40

Origin7.5ソフトの一元配置分散分析(One-Way ANOVA)機能によって全体差を算出し、t検定でそれぞれ各投与群とブランク群を両者比較し、そして以下の式で各群の薬物の延命率を計算した。

## 【0082】

## 【数5】

50

投与群の平均生存時間－対照群の平均生存時間

$$\text{延命率(\%)} = \frac{\text{投与群の平均生存時間} - \text{対照群の平均生存時間}}{\text{対照群の平均生存時間}} \times 100\%$$

【 0 0 8 3 】

各群の生存期間の変化曲線を図7に示す。上記試験結果から、クエン酸ベスタゾミブは顕著にB16F10メラノーママウスの生存期間を延長することができ、陽性薬のイキサゾミブと比べ、クエン酸ベスタゾミブは中、高の2つの投与量におけるマウスの生存時間が陽性薬のイキサゾミブよりも優れたことがわかる。クエン酸ベスタゾミブは多機能免疫小分子の抗癌薬として優れた開発・応用の将来性がある。

10

【 0 0 8 4 】

以上の記載は本願の好適な実施例にすぎなく、本願に対する制限にならず、当業者には、本願の様々な変更と変化が可能である。本願の趣旨と原則の範囲内で行われるいずれの変更、同等代替、改良なども、本願の保護範囲内に含まれる。

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

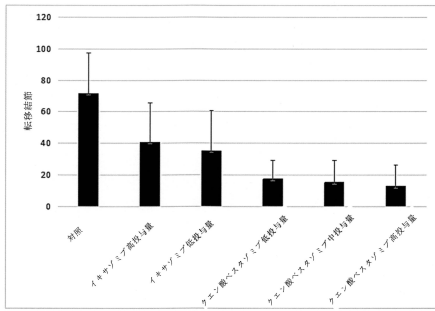


図 1

【図 2】

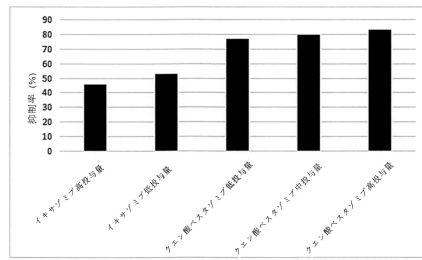


図 2

10

【図 3】

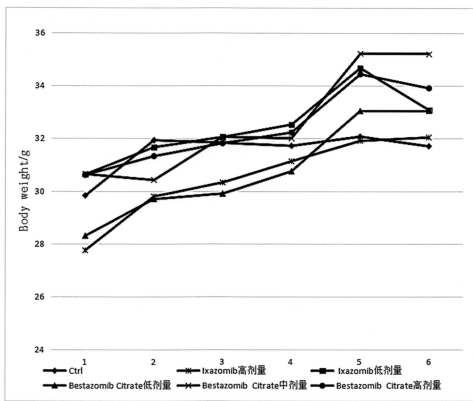


図 3

【図 4】

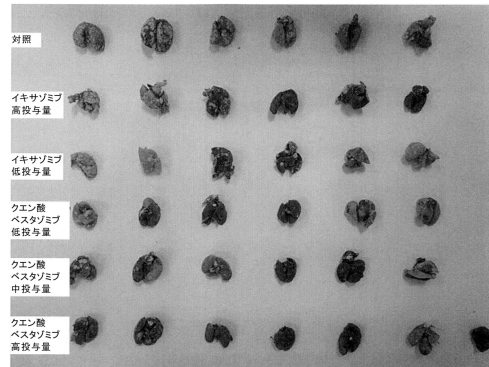


図 4

20

【図 5】

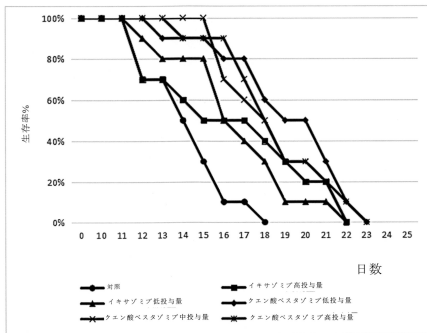


図 5

【図 6】

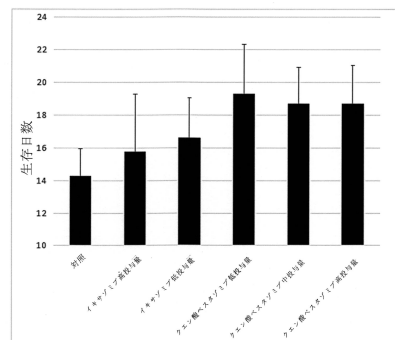


図 6

30

40

50

【 図 7 】

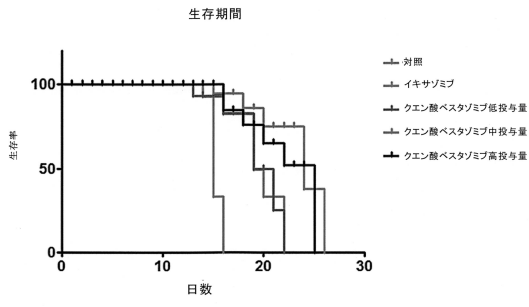


図 7

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/02  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

ハイ - テック セカンド ロード ナンバー 3 6

## (72)発明者

ジャン ジェン

中華人民共和国 2 6 1 0 5 3 シャンドン ウェイファン バアオ トン ウェスト ストリート ナンバー 7 1 6 6

## (72)発明者

ジェン ユーチー

中華人民共和国 2 6 6 0 6 1 シャンドン チンタオ ホン コン イースト ロード ナンバー 2 3

## (72)発明者

シュ シャオボア

中華人民共和国 2 6 1 0 6 1 シャンドン ウェイファン ハイ - テック インダストリアル ディベロプメント ゾーン ハイ - テック セカンド ロード ナンバー 3 6

## (72)発明者

リ シャオヤン

中華人民共和国 2 6 6 0 6 1 シャンドン チンタオ ホン コン イースト ロード ナンバー 2 3

## (72)発明者

タン ルチャオ

中華人民共和国 2 6 1 0 6 1 シャンドン ウェイファン ハイ - テック インダストリアル ディベロプメント ゾーン ハイ - テック セカンド ロード ナンバー 3 6

## (72)発明者

ファン ヨンシュエ

中華人民共和国 2 6 1 0 6 1 シャンドン ウェイファン ハイ - テック インダストリアル ディベロプメント ゾーン ハイ - テック セカンド ロード ナンバー 3 6

## (72)発明者

ウォン シュエジェン

中華人民共和国 2 6 1 0 5 3 シャンドン ウェイファン バアオ トン ウェスト ストリート ナンバー 7 1 6 6

## (72)発明者

ジャン ゼン

中華人民共和国 2 5 0 1 0 1 シャンドン チーナン ハイ - テック インダストリアル ディベロプメント ゾーン インシュ ロード ナンバー 2 7 6 6 ノース ビルディング ナンバー 3 2 7

審査官 柳本 航佑

## (56)参考文献

中国特許出願公開第 1 0 5 6 4 6 2 7 3 ( C N , A )

特表 2 0 1 6 - 5 2 7 2 0 2 ( J P , A )

中国特許出願公開第 1 0 6 9 1 6 1 7 7 ( C N , A )

中国特許出願公開第 1 0 6 4 7 8 7 0 1 ( C N , A )

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 F 5 / 0 0 - 5 / 0 6

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0 - 3 5 / 0 4

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 0 7 K 1 / 0 6

C 0 7 K 5 / 0 2