

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4675028号  
(P4675028)

(45) 発行日 平成23年4月20日(2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年2月4日(2011.2.4)

(51) Int. Cl.	F I
C07C 235/34 (2006.01)	C O 7 C 235/34
C07C 237/20 (2006.01)	C O 7 C 237/20
A61K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704
A61K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068
A61K 31/77 (2006.01)	A 6 1 K 31/77

請求項の数 24 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-586924 (P2002-586924)	(73) 特許権者	596124151
(86) (22) 出願日	平成14年5月8日(2002.5.8)		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
(65) 公表番号	特表2005-500997 (P2005-500997A)		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
(43) 公表日	平成17年1月13日(2005.1.13)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014398		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02002/089789	(74) 代理人	100118773
(87) 国際公開日	平成14年11月14日(2002.11.14)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成17年4月27日(2005.4.27)	(74) 代理人	100122389
(31) 優先権主張番号	09/852, 335		弁理士 新井 栄一
(32) 優先日	平成13年5月9日(2001.5.9)	(74) 代理人	100111741
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 夏夫
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリメチルロック型テトラパルテートプロドラッグ

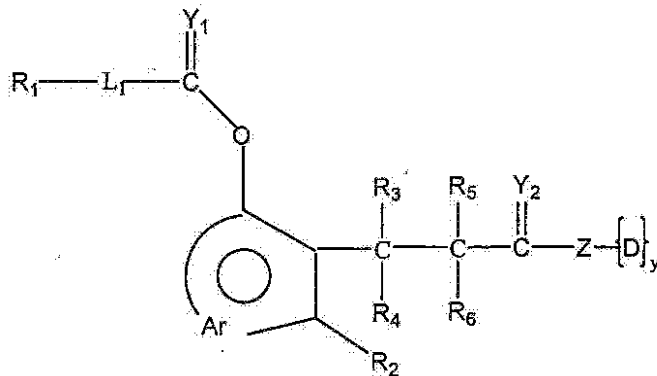
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1】

(I)



[式中、

R<sub>1</sub> は、非抗原性で水溶性のポリマー残基であり、

L<sub>1</sub> は、二官能連結基であり、

Y<sub>1</sub>およびY<sub>2</sub> は、独立して、O、S、またはNR<sub>7</sub>であり、

$R_{2-7}$ は、独立して、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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は、細胞中に送達すべき化合物の残基であり、

Zは、ロイシンであり、

Arは、式(1)に含まれる場合、多置換芳香族炭化水素基を形成する基であり、

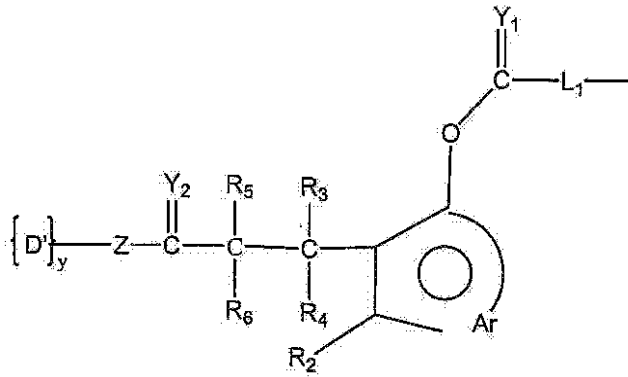
(y)は、1である]

で表される化合物。

【請求項 2】

$R_1$ が、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $NH_2$ 、 $COOH$ 、および

【化 2】



[式中、D'は、細胞中に送達すべき化合物の残基である]

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

【請求項 3】

各D基が、独立して、生物活性物質の残基である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

各D基が、独立して、抗癌剤、抗癌剤プロドラッグ、検出タグ、およびそれらの組み合わせの残基である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

抗癌剤または抗癌剤プロドラッグが、アントラサイクリン系化合物またはトポイソメラーゼ I 阻害物質を含む、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

抗癌剤または抗癌剤プロドラッグが、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、シトシンアラビノシド、ゲムシタピン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 7】

$Y_1$ および $Y_2$ が両方ともOである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 8】

$R_1$ がポリアルキレンオキシド残基を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 9】

ポリアルキレンオキシド残基がポリエチレングリコールを含む、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】

ポリマー残基が、約2,000～約100,000ダルトンの数平均分子量を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 11】

ポリマー残基が、約20,000～約40,000ダルトンの数平均分子量を有する、請求項 1 に記載の化合物。

10

20

30

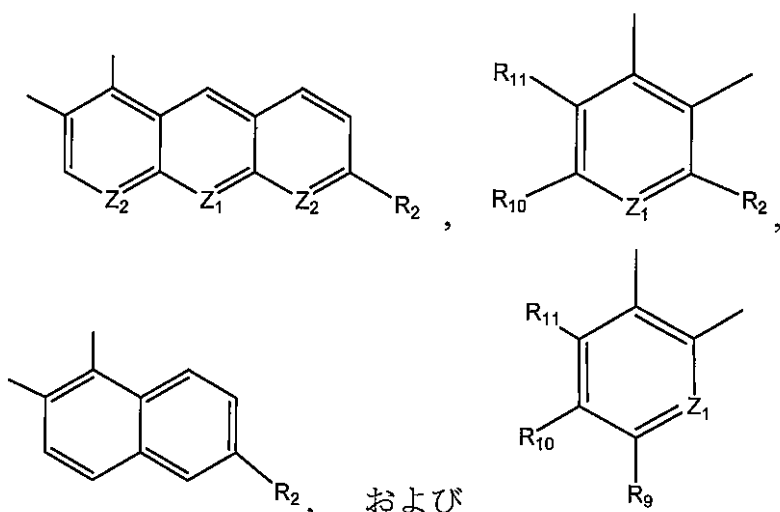
40

50

## 【請求項 1 2】

Arが、

## 【化 3】



10

[式中、

$R_2$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ および $R_{11}$ は、独立して、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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、

20

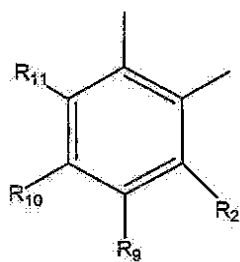
$Z_1$ および $Z_2$ は、独立して、 $CR_{23}$ である(ここで $R_{23}$ は $R_2$ を定義する群と同じ群から選択されるか、またはシアノ、ニトロ、カルボキシル、アシル、置換アシルもしくはカルボキシアルキルである)

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 1 3】

Arが、

## 【化 4】



30

[式中、

$R_2$ は、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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；

40

$R_9$ 、 $R_{10}$ および $R_{11}$ は、独立して、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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]

である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 1 4】

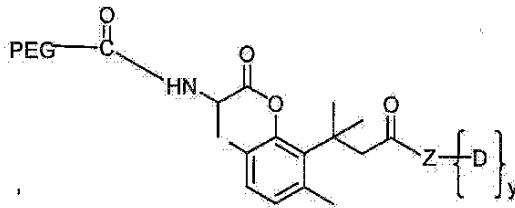
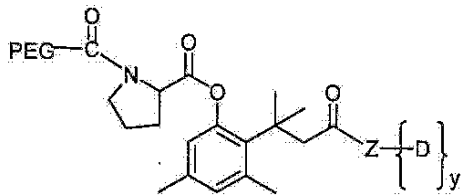
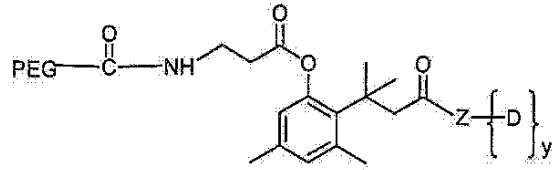
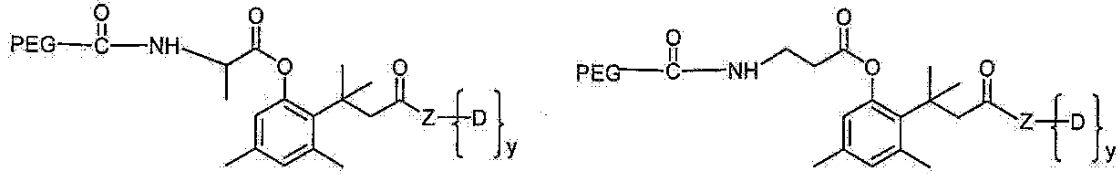
$R_2$ が $CH_3$ である、請求項 1 3 に記載の化合物。

50

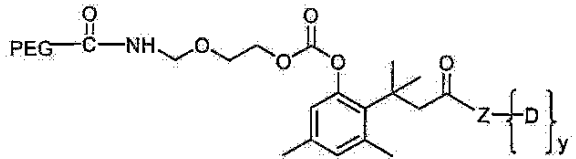
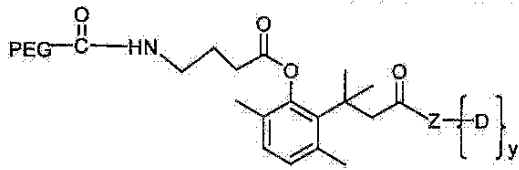
## 【請求項 15】

下記化合物：

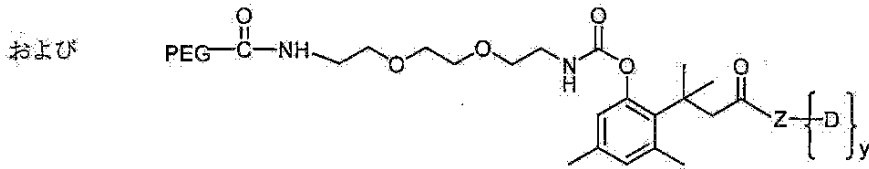
## 【化 5】



10



20



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 16】

PEGが、約20,000～約40,000ダルトンの数平均分子量を有するポリエチレングリコール残基である、請求項 15 に記載の化合物。

30

## 【請求項 17】

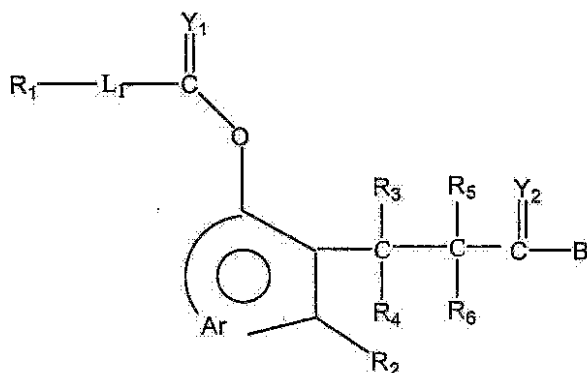
Dが細胞内に送達すべき化合物の残基である請求項 1 に記載の化合物の製薬上または診断上有効な量と、細胞に送達すべき化合物の投与が必要な動物に *in vivo* で投与するのに許容し得る担体とを含む組成物。

## 【請求項 18】

式II：

## 【化 6】

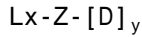
(II)



40

で表される化合物と、式III：

50



[ここで、

式IIについてBは脱離基であり、

式IIIについてLxは求核性試薬であり、

Zは[D]<sub>y</sub>に共有結合されており、ここでZはロイシンであり、

R<sub>1</sub>は非抗原性で水溶性のポリマー残基であり、

L<sub>1</sub>は二官能連結基であり、

Y<sub>1</sub>およびY<sub>2</sub>は独立してO、SまたはNR<sub>7</sub>であり、

R<sub>2-7</sub>は、独立して、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分岐アルキル、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は、細胞に送達すべき化合物の残基であり、

Arは、式(I)に含まれる場合、多置換芳香族炭化水素基を形成する基であり、

(y)は1である]

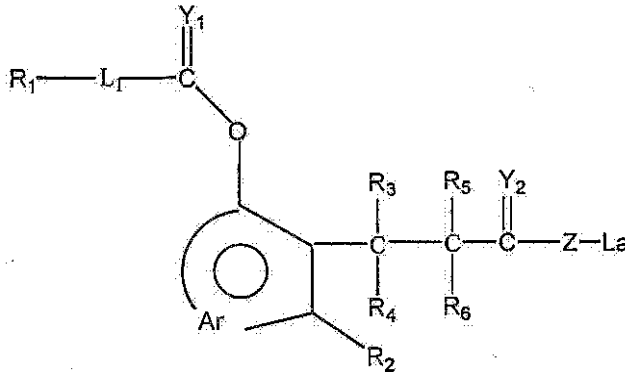
で表される化合物とを反応させることを含む、テトラパルテートプロドラッグを製造する方法。

【請求項19】

式IV:

【化7】

(IV)



[ここで、

R<sub>1</sub>は非抗原性で水溶性のポリマー残基であり、

L<sub>1</sub>は二官能連結基であり、

Y<sub>1</sub>およびY<sub>2</sub>は、独立して、O、SまたはNR<sub>7</sub>であり、

R<sub>2-7</sub>は、独立して、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-12</sub>分岐アルキル、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、

Zは、ロイシンであり、

Arは、式(I)に含まれる場合、多置換芳香族炭化水素基を形成する基であり、

式IVについてはLaは脱離基である]

で表される化合物と、少なくとも1種の生物活性物質とを反応させることを含む、テトラパルテートプロドラッグの製造方法。

【請求項20】

哺乳動物の疾患または障害を治療するための医薬の製造における、請求項1～16のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項21】

生物活性物質Dを、それによる治療を必要とする細胞に送達するための組成物であって

10

20

30

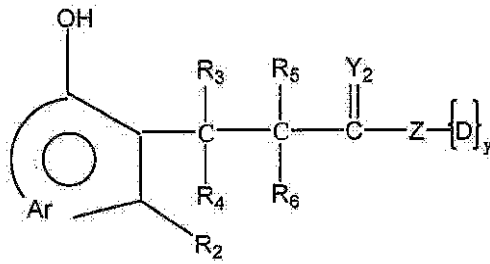
40

50

、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の化合物を含んでなり、式 I の化合物が *in vivo* で細胞外にて加水分解されて、式 (I-i) :

【化 8】

I-(i)

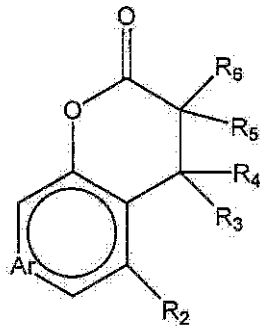


10

で表される化合物が生じ、その後、式 (I-i) で表される化合物が自然に式 (I-ii) :

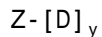
【化 9】

I-(ii)



20

で表される化合物および式 I-(iii) :



で表される化合物に加水分解され、 $Z-[D]_y$  が細胞膜を横切って細胞内で加水分解されて D が放出されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 2】

$R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が独立して  $C_{1-6}$  アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

$R_3$  および  $R_4$  が両方とも  $CH_3$  である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

$R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  がすべて  $CH_3$  である、請求項 1 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、テトラパルテート(tetrapartate)プロドラッグに関する。本発明は、特に、例えば、細胞の取込み促進成分に連結された抗腫瘍剤などを送達する複数パートポリマーコンジュゲートに関する。

40

【背景技術】

【0002】

長年にわたって、生物学的に有効な物質を哺乳動物に投与するいくつかの方法が提案されてきた。例えば、医薬などをはじめとする多くの生物学的に有効な物質は、水溶性塩として利用することが可能であり、比較的容易に医薬製剤中に含有させることが可能である。所望の生物学的に有効な物質が水溶液に不溶である場合か、或いは *in vivo* で急速に分解される場合に問題が生じる。例えば、アルカロイドは、特に溶液に難溶である場合が多い。

【0003】

50

生物学的に有効な物質を可溶化する一つの方法は、可溶性プロドラッグの一部としてそれらを含ませることである。従って、プロドラッグとしては生物活性物質または親化合物の化学的誘導体が挙げられ、投与すると最終的に *in vivo* で親化合物を放出する。プロドラッグによって、当業者は *in vivo* で薬剤作用の開始および/または持続時間の改変が可能となり、体内での薬物の輸送、分布または溶解度を改変することが可能であり得る。さらに、プロドラッグ製剤によって、毒性を低減させ、および/または医薬製剤を投与する際に直面する困難を克服することができる場合が多い。

#### 【0004】

プロドラッグの典型的な例には、有機リン酸エステル、或いはアルコールまた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) を参照のこと（その開示内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

#### 【0005】

プロドラッグは、定義上、親化合物または活性化合物のほとんど不活性な一形態である。通常、プロドラッグの加水分解速度(これに限定されない)による活性薬物の放出速度は、いくつかの因子の影響、特に、活性薬物を修飾基に結び付ける結合のタイプの影響を受ける。十分な量の親化合物が放出される前に、腎臓系または網状内皮系などを介して排出されるプロドラッグを調製しないように注意しなければならない。プロドラッグ系の一部としてポリマーを組み込んで、薬物の循環半減期を拡大することが可能である。しかしながら、例えば、アルカロイドなどのいくつかの場合において、約10,000ダルトン未満の1種または2種のポリマーだけをコンジュゲートさせると、特に、幾分加水分解耐性の結合を用いた場合、得られたコンジュゲートは、*in vivo* ですぐに排出されることが測定されている。実際、上記のコンジュゲートは、体内から非常に急速に排出されるので、加水分解されやすいエステル結合を用いたとしても、十分な親分子が *in vivo* で再生されない。このことは、加水分解耐性の結合を用いる場合でさえ、タンパク質、酵素などの成分とは関係がない場合が多い。上記の場合、それぞれ約2~5 kDaの分子量を有する多種のポリマー鎖を用いることで、分子量および循環半減期がさらに高められる。

#### 【0006】

これらの問題に取り組んでいる一例は、例えば、上記特許出願および特許、例えば米国特許出願第09/137,430号および米国特許第5,965,119号に記載されている。これらは、様々な生物学的に有効な物質のポリマーコンジュゲートを含有する二重プロドラッグ、つまりトリパルテート(tripartate)、および上記のコンジュゲートを形成する方法を教示する。投与した後適切な時間内に、例えばトリメチルロック脱離反応によって、十分な量の「第二の」、より一層反応性の高いプロドラッグ化合物を生成する速度にて *in vivo* で加水分解するように二重プロドラッグの結合を選択することで、多種の低分子量の薬物、薬剤などの薬物動態の制御の改善がもたらされる。しかしながら、さらなる可能性、特に、合理的に設計したプロドラッグコンジュゲートによる、対象の組織または細胞への診断薬剤および/または治療薬剤の選択的ターゲティングについての可能性は残っている。

#### 【0007】

特に、プロドラッグについての所望の標的組織の1つは、腫瘍組織である。腫瘍が、一般的に、透過性の亢進および滞留の効果(「EPR(enhanced permeability and retention)効果」)を特徴とする異常血管透過性を呈することは良く知られている。このEPR効果によって、有利に、生物学的に有効な物質が、巨大分子、例えばタンパク質(酵素および/または抗体、およびそれらの誘導体またはフラグメントなど)の形態で、腫瘍細胞間質組織腔に容易に入れるようになる(例えば、Maedaらによる評論記事「2000, J. of Controlled Release」 65: 271-284 (参照により本明細書に組み入れられている)を参照のこと)。腫瘍に加えて、ある種の他の組織も、炎症などの状態下で、同一のEPR効果を呈することが可能である。

#### 【0008】

要するに、EPR効果の働きに関するいかなる理論や仮説に縛られることなく、EPR効果に

10

20

30

40

50

よって、巨大分子または巨大分子物質(ポリマーベースの送達系を含めて)が浸透するようになると考えられている。このことにより、腫瘍組織腔(例えば、腫瘍間質腔)へのポリマー-コンジュゲートのかなり選択性のある送達をもたらされる。しかしながら、その後、同一のEPR効果によって、放出されたプロドラッグおよび/または任意の新たに放出された比較的分子量の生物学的に有効な物質が、ターゲット組織の細胞外組織腔からすばやく拡散するようになると考えられる。周囲細胞が十分な速度で放出された活性剤を吸収できないならば、該活性剤は、放出部位から離れて、血流またはリンパ流中に拡散すると考えられる。

【発明の開示】

【0009】

10

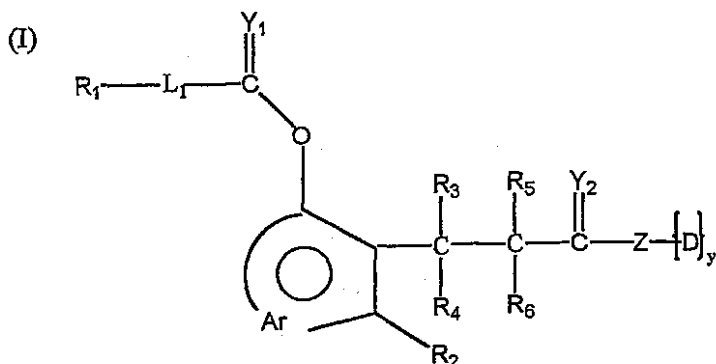
従って、多段階のプロドラッグ概念によって利益を得て、かつ、放出された生物学的に有効な物質の、EPR効果を呈する腫瘍細胞および/または対象の他の組織の細胞中へのより迅速な取込みまたは輸送を可能にすることによって、EPR効果を補整または制御するプロドラッグを作製するさらなる技術を提供する必要性が継続している。

【0010】

発明の概要

本発明の一態様では、式 I :

【化1】



20

【0011】

30

[式中、

$R_1$  は、一価または二価の、例えば約2,000 ~ 約100,000ダルトンの数平均分子量を有するポリマー残基であり、

$L_1$  は、二官能連結基であり、

$Y_1$  および  $Y_2$  は、独立して、O、S、または  $NR_7$  であり、

$R_{2-7}$  は、独立して、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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、多置換芳香族炭化水素または多置換複素環式基を形成する基であり、

40

Dは、細胞中に送達すべき化合物の残基または脱離基であり、

(y)は、1以上の正の整数であり、

Zは、標的細胞に能動輸送される基、疎水性基、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される]

で表される化合物を提供する。

【0012】

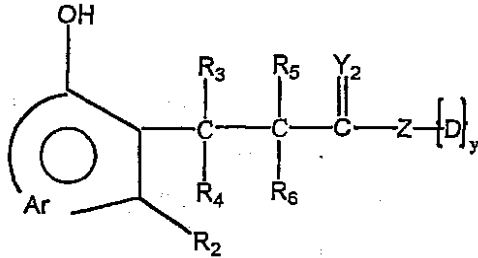
本発明のテトラパルテートプロドラッグを製造および使用方法も提供する。本発明の使用方法は、動物において疾患または障害を治療する方法を含み、そして有効量の式Iで表される化合物を含む製薬上許容し得る組成物を該化合物の投与を必要とする動物に投

50



与することを含む。1つの特定の方法は、本明細書においてDと示した生物活性物質を送達することを含む。本発明の方法は、式Iの化合物を、治療を必要とする細胞を有する動物に投与することを含み、ここで式Iの化合物はin vivoで細胞外にて加水分解されて、ポリマー残基(R<sub>1</sub>およびリンカー)の加水分解後、式(I-i)：

【化2】

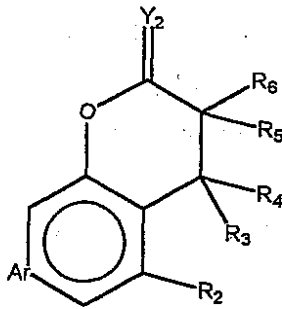


10

【0013】

で表される化合物が得られ、その後、式(I-i)で表される化合物が自然に式(I-ii)：

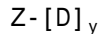
【化3】



20

【0014】

で表される化合物および式I-(iii)：



で表される化合物に加水分解され、次いでZ-[D]<sub>y</sub>が細胞膜を横切って細胞内で加水分解されてDが放出される。

30

【0015】

発明の詳細な説明

#### A. 概要

本発明は、例えば、腫瘍細胞などの特定の標的細胞に生物活性物質を送達するための三重プロドラッグ組成物(以下「テトラパルテート」プロドラッグという)を提供し、また、テトラパルテートプロドラッグの合成法および使用法も提供する。本発明のテトラパルテートプロドラッグ組成物には、ポリマー部分と、トリメチルロック部分と、エンハンサーと、生物活性物質との間の別個の加水分解性または開裂性結合が含まれる。生物活性物質は、例えば、生物活性のある求核性試薬から誘導された成分、つまり、天然の薬物もしくは未修飾の薬物、または診断タグである。上記の結合は、ポリマー輸送部分が放出された後、適切な時期に、生物活性親化合物を十分な量生じる速度で加水分解するように設計されたエステル結合および/またはアミド結合が好ましい。本発明の目的にとって「十分な量」という用語は、治療効果がある量を意味する。

40

【0016】

本発明は、概して、ポリマーベースのプロドラッグコンジュゲート(例えば、上記で論じたような二重プロドラッグ組成物)への組み込みに適切である生物活性物質自体が、結合していた組成物から加水分解によって放出された後には不活性であるが、さらなる化学プロセス/化学反応を受けた後に活性となりうる物質/化合物でありうるとする原理に基づくので、本発明は、三重作用性プロドラッグを提供する。本発明のコンジュゲートは本質

50

的に4つの部分で提供されるので、本明細書では上記の三重作用のプロドラッグを「テトラパルテート(tetrapartate)」プロドラッグと称する。

【0017】

本発明のテトラパルテートプロドラッグに関して、上記の二重プロドラッグ輸送系によって血流に移送される治療薬剤または診断薬剤は、対象の標的細胞に入り込むか或いは能動輸送されるまで本質的に不活性を保ち、標的細胞内に入るか能動輸送されると、細胞内の化学物質によって(例えば、組織または細胞に存在する酵素または酵素系によって)活性化されうる。

【0018】

特に、ある種の追加の基を、上記の二重プロドラッグコンジュゲートの一部分として生物活性物質に結合させると、多くのこのような生物活性物質の有効性が、このような追加の基を持たない類似のプロドラッグで観察される有効性と比較して著しく増加することが今や発見された。本発明のテトラパルテートプロドラッグコンジュゲートは、例えば、ある種の生物活性物質(例えば、特に低分子量の治療薬剤および診断薬剤)の送達および活性において、例えば治療および/または診断活性について、有効性の増大をもたらすものと考えられる。ポリマーベースのコンジュゲートがin vivoで加水分解するように調製された本発明のテトラパルテートプロドラッグは、細胞外液中で生物活性物質を放出するようにコンジュゲートを切断するが、一方で生物活性物質は前記の追加の基に結合したままである。生物活性物質は、非限定であるが、低分子量の治療薬剤および/または診断薬剤であるのが好ましい。以下に例証する通り、好適な一実施形態において、これらは低分子量の抗腫瘍剤であり、治療する組織は、腫瘍組織である。

【0019】

本発明がいかに機能するかに関し、いかなる理論または仮説にも拘束されるものではないが、輸送エンハンサーとして選択された追加の基に依存して、生物活性物質の腫瘍細胞への輸送速度は、例えばEPR効果を呈する組織の細胞外組織腔に生物活性物質を保護された形態および/または輸送増大形態で送達することによるものであると考えられる。記述の便宜上、本明細書では、上述した「追加の基」を「輸送エンハンサー」と記載する。

【0020】

しかしながら、上記の便宜上に記載した用語の提供にあたり、標的細胞への生物活性物質の輸送を専ら高める追加の基だけに本発明の範囲を限定するものではない。なぜなら、本発明のテトラパルテートプロドラッグが有利である一因には、細胞外の加水分解酵素活性からZ-[D]<sub>y</sub>を保護するといった追加のまたは代替のメカニズムにもありうると考えられるからである。

【0021】

またさらに任意選択において、輸送エンハンサーは、細胞膜の輸送系についての公知基質の中から選択される。単に例を挙げると、細胞が、ある種の栄養分および内分泌因子などを能動輸送することは公知であり、そのような栄養分またはその類似体を用いることにより標的細胞中への生物学的に有効な物質の能動輸送が容易に高められる。上記の栄養分の例には、アミノ酸残基、ペプチド(例えば、約2~約10残基またはそれ以上のサイズ範囲の短鎖ペプチド)、単糖および脂肪酸、内分泌因子などが挙げられる。

【0022】

望ましいアミノ酸残基には、公知の天然L-アミノ酸全てが含まれる。例えば、以下に提供する例では、輸送エンハンサーとしてのL-イソロイシンを例証する。驚くことに、Dアミノ酸も、輸送エンハンサーとして有用であることが発見された。例えば、D-アラニンとL-アラニンの両方、その他の類似のアミノ酸の光学異性体は、同一の活性を示す。天然アミノ酸の誘導体および類似体、さらに当技術分野では公知である種々の非天然型アミノ酸(DまたはL)、疎水性または非疎水性アミノ酸も、本発明の範囲内であると考えられる。単なる例として、アミノ酸類似体および誘導体には、2-アミノアジピン酸、3-アミノアジピン酸、ベータ-アラニン、ベータ-アミノプロピオン酸、2-アミノ酪酸、4-アミノ酪酸、ピペリジン酸、6-アミノカプロン酸、2-アミノヘプタン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノイソ

10

20

30

40

50

酪酸、2-アミノピメリン酸、2,4-ジアミノ酪酸、デスモシン、2,2-ジアミノピメリン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、n-エチルグリシン、N-エチルアスパラギン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、イソデスモシン、アロ-イソロイシン、N-メチルグリシン、サルコシン、N-メチルイソロイシン、6-N-メチルリシン、N-メチルバリン、ノルバリン、ノルロイシン、オルニチン、その他（多すぎて列挙できないが、それらは、63 Fed. Reg., 29620, 29622に列挙されており、参照により本明細書に組み入れられている）がある。

#### 【0023】

短鎖ペプチドは、例えば、上述の通り、アミノ酸残基が2～約10の範囲、またはそれ以上のペプチドである。本発明の本実施形態において、上記ペプチド輸送エンハンサーは、疎水性である必要はないと考えられているが、結合した低分子量の薬剤の取込みを高めるため、および/または低分子量の薬剤が通常の血流において早期に加水分解するのを回避するために他の様式で機能すると考えられている。例えば、ペプチド輸送エンハンサー、および他の同程度の分子量範囲を有する輸送エンハンサーは、血漿性の加水分解酵素による生物活性剤からの切断を立体的に妨害するものと考えられるが、その後、標的細胞内で様々なペプチドおよび/またはカテプシンなどのプロテアーゼによって切断される。

10

#### 【0024】

輸送エンハンサーは疎水性基であるのが好ましい。疎水性がいかに有効性に貢献しているかに関していかなる理論または仮説に縛られるものではないが、疎水性基は、細胞外組織腔(例えば、血漿)内に存在する加水分解酵素等の攻撃を抑制することによって、生物活性剤からの輸送エンハンサーの細胞外切断を抑制すると考えられている。ゆえに、好適な輸送エンハンサーには、例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンなどの疎水性アミノ酸、および上記のような非天然生成の誘導体やそれらの類似体が含まれる。

20

#### 【0025】

さらなる任意選択において、輸送エンハンサーは、疎水性の有機基である。単に例を挙げると、有機基は、 $C_{6-18}$ またはそれ以上のアルキル、アリール、または置換ヘテロアリールまたは非置換ヘテロアリールである。有機基輸送エンハンサーは、例えば、 $-C(=S)$ 、 $-C(=O)$ および/または $-C(=NR_8)$ (ここで $R_8$ は $R_2$ を定義する群と同一の群、例えば水素、 $C_{1-6}$ アルキル等から選択される)をはじめとする有機官能基を網羅し含むものである。

30

#### 【0026】

本発明の本質を理解するために、いくつかの定義および説明を以下に提供する。用語「テトラパルテート」は、プロドラッグコンジュゲートを意味し、特に、上記で論じた通りの二重プロドラッグの特徴と、生物活性化合物の残基とポリマー基の間に位置する輸送エンハンサーとしての追加の基とを組み込んだコンジュゲートを意味し、4部構造を形成しており、生物活性剤がコンジュゲートの第4部分である。この構造によって、生物活性化合物の残基は、標的細胞への輸送と放出が実質的に最適化される。ゆえに、「テトラパルテート」の4番目の要素は、生物活性化合物の残基そのものである。さらに、検出タグを組み込んだ診断用のテトラパルテートコンジュゲートも考えられ、本明細書で本発明のコンジュゲートに関する用語「テトラパルテートプロドラッグ」または単に「プロドラッグ」の使用には、指定または区別しない限り、概して、タグ付けされた薬剤を含むコンジュゲート、ならびに診断試薬を製造する方法および送達する方法も含まれる。

40

#### 【0027】

特に明記しない限り、本発明の意図する用語「生物活性物質」、「生物活性化合物」および/または「生物活性剤」などは区別なく用いられる。これらの用語は、例えば、薬物または医薬品、および/または診断薬剤または診断試薬(検出標識またはマーカなど)を意味する。本明細書における用語「薬物」、「薬剤」、「医薬」および「活性剤」は、特に明記しない限り、特に動物にin vivo投与した場合に有用な活性を有する化合物、および/またはその前駆体を意味する。

#### 【0028】

50

前述の通り、生物活性は、例えば医療目的および/または診断目的のために、動物またはヒトにおいて有用であるような物質または化合物などの任意の特性である。生物活性は細胞内腔で現れるのが好ましい。つまり、非限定であるが、薬物または診断薬剤が、対象の1種以上の標的細胞の細胞質および/または核に送達/放出されたら有用であるのが好ましい。

【0029】

本発明の目的上、単数または複数の使用は、言及する項目または対象の数量を限定する意味ではない。従って、特に明記しない限り、細胞、ポリマー、または薬物に関して単数を用いる場合は、1個の細胞だけを取り扱うのではなく、1個の分子だけを調製もしくは利用するのではなく、および/または1つの薬物だけを利用するのではなく、複数を用いる場合は、単数の関連する項目への適用を除外するものではない。さらにこの点に関し、本発明の目的上、用語「細胞」「細胞型」「標的細胞」などは、特に明記しない限り区別なく用いられ、単数および複数細胞の両方を意味するが、治療する動物または患者の正常なまたは病的な組織(単数)、組織(複数)もしくはその他の系または構成成分に組織化される細胞である。

10

【0030】

本発明の目的上、用語「残基」は、例えば利用可能なヒドロキシル基またはアミノ基の修飾によってプロドラッグキャリアー部分が結合して、各々エステルまたはアミド基を形成する反応が行われた後に残存する生物活性化合物の一部を意味するものと解釈されるべきである。

20

【0031】

本発明の目的上、用語「アルキル」には、例えば、直鎖状、分岐状、置換された $C_{1-12}$ アルキル(アルコキシ、 $C_{3-8}$ シクロアルキルまたは置換シクロアルキルなどを含む)が含まれると解釈するべきである。

【0032】

本発明の目的上、「置換された」という用語は、官能基または化合物に1個以上の原子を付加すること、または官能基または化合物に含まれる1個以上の原子を1個以上の異なる原子で置換することと解釈されるべきである。

【0033】

本発明の目的上、置換されたアルキルとしては、カルボキシアルキル、アミノアルキル、ジアルキルアミノ、ヒドロキシアルキルおよびメルカプトアルキルが挙げられ、置換されたシクロアルキルとしては、4-クロロシクロヘキシルなどの基が挙げられ、アリールとしては、ナフチル等の基が挙げられ、置換されたアリールとしては3-プロモ-フェニルなどの基が挙げられ、アラルキルとしては、トルイルなどの基が挙げられ、ヘテロアルキルとしては、エチルチオフェンなどの基が挙げられ、置換されたヘテロアルキルとしては、3-メトキシ-チオフェンなどの基が挙げられ、アルコキシとしては、メトキシなどの基が挙げられ、フェノキシとしては、3-ニトロフェノキシなどの基が挙げられる。ハロ-は、フルオロ、クロロ、ヨードおよびプロモを含むものと解釈されるべきである。

30

【0034】

本発明の目的上、「十分な量」という用語は、治療上の効果を達成する量を意味するものと解釈されるべきであり、そのような効果は当業者によって理解されるとおりである。

40

【0035】

本発明のプロドラッグに、共有に係る特許出願第09/137,430号および米国特許第5,965,119号によって教示された二重プロドラッグが含まれる場合、ポリマー部分が加水分解によって最初に放出された後、結果として生じる「第二プロドラッグ」成分が、トリメチルロック脱離反応を経て、例えば、さらなるプロドラッグを含有する成分を再生するのが通常好ましい。その後、放出された成分が、拡散および/または標的細胞内に輸送され、組み込まれたプロドラッグの残りの実質的な部分が、さらに細胞内酵素によって切断または加水分解されて、生物活性化合物を放出する。

【0036】

50

さらに、用語「癌」または「腫瘍」は、抑制されない異常な細胞増殖を呈する細胞を特徴とする無数の疾患を網羅する臨床上記述的な用語である。用語「腫瘍」は、組織に適用する場合、一般的に、任意の異常な組織成長、つまり過度の異常な細胞増殖を意味する。用語「癌」は、悪性腫瘍またはそれから起こる疾患状態を記述するのに一般に用いる比較的古い用語である。場合によっては、当技術分野では、新生物としての異常な成長、および悪性の新生物としての悪性の異常な成長を意味する。上記の一般的な臨床用語は、本明細書において細胞、組織、および/または疾患または障害とみなされる1種以上の状態に関連して使われる場合、特に指定しない限り、区別なく使用され、同義語であることを意図する。

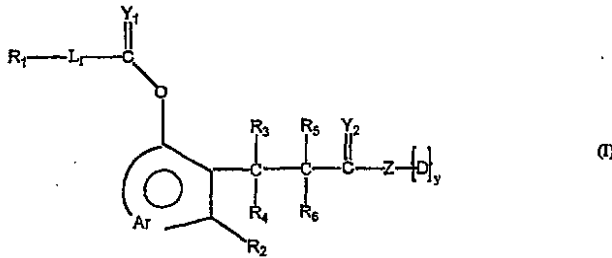
【0037】

10

B. 式(1)

本発明の好ましい1実施形態においては、式：

【化4】



20

【0038】

[式中、

$R_1$ は、一価または二価の、例えば約2,000～約100,000ダルトンの数平均分子量を有するポリマー残基であり、

$L_1$ は、二官能連結基であり、

$Y_1$ および $Y_2$ は、独立して、O、S、または $NR_7$ であり、

$R_{2-7}$ は、独立して、水素、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-12}$ 分岐アルキル、 $C_{3-8}$ 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、

30

Arは、式(1)に含まれる場合、多置換芳香族炭化水素または多置換複素環式基を形成する基であり、

Dは、概して、脱離基である基、または細胞中に送達すべき化合物の残基である]で表される化合物が提供される。より特定すると、Dは生物活性物質の残基またはHであり、(y)は1以上の正の整数である。好ましくは、(y)は1～約5の範囲である。(y)が1より大きい場合、各D基は独立して選択される。

【0039】

Dは、抗炎症剤、解毒剤、抗癌剤、およびこれらのまたはその他の状態を診断するための診断薬といった、治療が必要な動物の標的細胞に送達することが望ましい生物活性物質でありうる。

40

【0040】

好ましくは、Dは抗癌剤、抗癌剤プロドラッグ、検出タグおよびそれらの組み合わせである。テトラパルテートプロドラッグに連結できる抗癌剤または好適なタグはどれでもよい。これらには、いくつか挙げるとすると、アントラキノン化合物、トポイソメラーゼI阻害物質、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、p-アミノアニリンが挙げられるが、これらは単なる例示である。

【0041】

Dが脱離基である場合、Dは、例えば、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

50

イミジル、チアゾリジニルチオンおよび/またはその他の当技術分野で認識されている脱離基でありうる。

【0042】

当業者は、各Dを独立に選択でき、そのため目的の標的細胞に送達するためのZには5種またはそれ以上の異なるタイプの基が連結されうるということを知識するだろう。好ましくは、Dは、治療剤または薬剤であるが、Dは場合によっては診断剤であってもよい。

【0043】

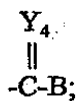
単なる例示である、特定のさらなる付随的な実施形態においては、yは2であり、Zは2価であり、Dは2個の基(双方とも、同一の細胞型または目的の組織型に送達するための治療剤および診断タグを含む)であってよい。さらに、そのような複数のD基は、好ましくは単一の細胞型を標的とした複数の異なる治療剤を含み、一緒に送達および放出されると、その異なる薬剤が相乗的に作用して所望の治療効果が達成される。一つの好ましい随意の実施形態では、Dは、1種以上の抗癌剤および/または抗癌剤プロドラッグ、またはその残基である。

10

【0044】

特定のさらなる実施形態では、Dは、H、または

【化5】



20

【0045】

[式中、BはH、脱離基、アミノ含有成分の残基、またはヒドロキシル含有成分の残基であり、Y<sub>4</sub>は、Y<sub>1</sub>を定義する群と同一の群から選択される]であり、

Zは、[D]<sub>y</sub>に共有結合しており、標的細胞に能動輸送される基、疎水性基またはそれらの組み合わせである。場合によって、Zは、1価、多価、またはより好ましくは2価であり、(y)は1または2である。Z自体は、場合によっては、アミノ酸残基、糖残基、脂肪酸残基、ペプチド残基、C<sub>6-18</sub>アルキル、置換アリール、ヘテロアリール、-C(=O)、-C(=S)および-C(=NR<sub>12</sub>)(ここでR<sub>12</sub>はR<sub>2</sub>を定義する同一の群から選択される)および/またはそれらの組み合わせから選択される。

30

【0046】

Zが少なくとも1種のアミノ酸残基を含む場合、アミノ酸は、例えば、いくつか挙げるとすると、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、セリン、スレオニン、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン、および/またはその組み合わせがある。Zがペプチドを含む場合、ペプチドサイズは約2~約10個のアミノ酸残基の範囲である。1つの好ましい実施形態では、ペプチドは、Gly-Phe-Leu-GlyまたはGly-Phe-Leuである。

【0047】

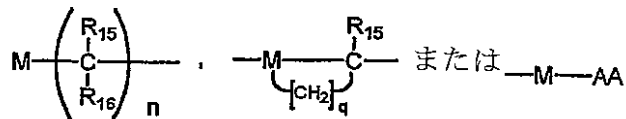
さらなる実施形態では、Zは輸送エンハンサーおよび/またはDに共有結合された保護基であり、ここで、Zは、細胞へのZ-[D]<sub>y</sub>の細胞内送達を、Zを持たないDの細胞内送達よりも増強または向上するように選択される。

40

【0048】

式(1)で定義されているとおり、L1は二官能リンカーである。特に、L<sub>1</sub>は、プラットフォームの環化またはトリメチルロック部へのポリマー残基の結合を促進する基である。2つの特に好ましいタイプの二官能リンカーを下記に示す：

## 【化6】



## 【0049】

[式中、

MはXまたはQであり、ここで、

Xは電子求引性基であり、

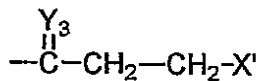
QはC(=Y<sub>2</sub>)から3～6原子の位置に自由電子対を有する基である]。

10

## 【0050】

AAは、好ましくは式：

## 【化7】



## 【0051】

[式中、X'はO、SまたはNR<sub>17</sub>であり、

(n)は0または正の整数、好ましくは1または2であり、

(q)は3または4であり、

R<sub>15</sub>、R<sub>16</sub>およびR<sub>17</sub>は、独立して、R<sub>2</sub>を定義する群から選択される。]

で表されるアミノ酸残基である。具体的な二官能リンカーを下記の実施例および好ましい化合物に示す。

20

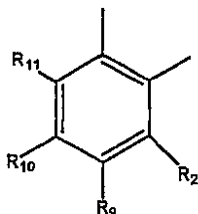
## 【0052】

## C. Ar基の説明

式(1)に関して説明すると、Arは、式(1)に含まれる場合、多置換芳香族炭化水素基または多置換複素環式基を形成する基であると解釈しうる。主要な特徴は、Ar基が本質的に芳香族であることである。一般的に、芳香族であるためには、環状分子平面の上下両方の「電子雲」内に、電子を共有しなければならない。さらに、電子の数は、ヒュッケル則(Huckle rule)(4n+2)を満たさなければならない。当業者は、芳香族性の要件を満たし、本明細書での使用に適切である基が非常に多くあることを理解するだろう。特に好ましい芳香族基は、下記式：

30

## 【化8】



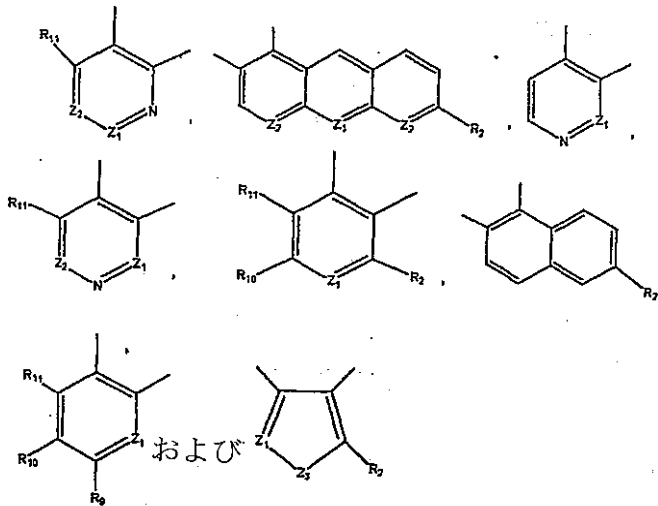
40

## 【0053】

[式中、R<sub>2</sub>は上記の定義のとおりであり、R<sub>9-11</sub>はR<sub>2</sub>を定義する群と同一の群から選択される]

で表される。別の芳香族基としては、

## 【化9】



10

## 【0054】

[式中、 $Z_1$ および $Z_2$ は、独立して、 $CR_{23}$ または $NR_{24}$ であり、 $Z_3$ は、 $O$ 、 $S$ または $NR_{25}$ (ここで、 $R_{23-25}$ は、 $R_2$ を定義する群と同一の群から選択されるか、またはシアノ、ニトロ、カルボキシル、アシル、置換アシルまたはカルボキシアルキルである)である。5員環および6員環の異性体も意図され、そしてベンゾおよびジベンゾ系ならびにその関連同族体も意図される。当業者には、ヒュッケル則に従う限り、芳香環が場合によって $O$ 、 $S$ 、 $NR_{14}$ などのヘテロ原子で置換されていてもよいことを理解するであろう。

20

## 【0055】

さらに、芳香環式構造または複素環式構造は、場合によってハロゲンおよび/または側鎖(それらの用語は当業者に一般に理解されるとおりである)で置換されていてもよい。しかしながら、本発明のAr基に適した構造はすべて同一平面でオルト配置を可能にし得る。

## 【0056】

## D. プロドラッグの加水分解による薬物の生成

本発明のプロドラッグ化合物は、加水分解の半減期 $t_{1/2}$ が血漿での排出(elimination)の半減期( $t_{1/2}$ )よりも小さくなるように設計される。治療される哺乳動物の血漿中における化合物に含まれる結合の加水分解速度は、親化合物を含む単プロドラッグ(つまり、 $Z-\{D\}_y$ )を排出前に十分量放出させるのに十分短い時間である。本発明の好適な化合物の中には、血漿中での加水分解に対する $t_{1/2}$ が約5分~約12時間の範囲である化合物もある。好ましくは、組成物は約0.5~約8時間の範囲の血漿加水分解 $t_{1/2}$ を有し、最も好ましいのは、約1~約6時間である。

30

## 【0057】

コンジュゲートの二重プロドラッグ部分の加水分解が、通常エステラーゼ活性またはpH中和化(moderated)活性または環化反応によってin vivoで生じると、ポリマー残基が切断され、生じた第2プロドラッグ部が残る。

40

## 【0058】

本発明のテトラパルテートコンジュゲートまたはプロドラッグがいかに作用するかについて理論または仮説に束縛されるものではないが、本明細書においてZと呼ぶ取込みエンハンサーに連結された生物学的に有効な物質が標的細胞に入ると、様々な細胞内ペプチダーゼおよび/またはプロテアーゼ(例えばカテプシンなど)が酵素加水分解により輸送エンハンサー部を切断し、標的細胞内に生物学的に有効な物質を放出するものと考えられる。

## 【0059】

(式Iの)テトラパルテートプロドラッグの分解によってin vivoにて制御可能な速度で $R_1-L_1$ 部の加水分解が開始され、式I(i)で表される生成物が生じる(上記参照)。残った化合

50



物、例えばI(i)は、水(細胞外)の存在下で実質的にただちにトリメチルロック型加水分解を受けて、大部分は細胞外組織腔内にZ-[D]<sub>y</sub>としてI(ii)からエンハンサー-プロドラッグ部I(iii)を放出する。

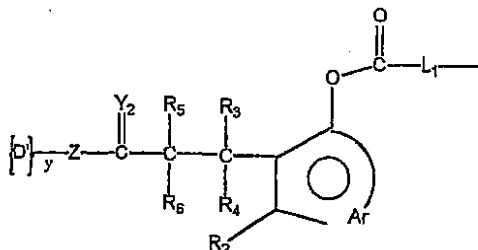
【0060】

E. 実質的に非抗原性のポリマー

本発明の「テトラパルテートプロドラッグ」組成物は、水溶性ポリマーR<sub>1</sub>を含む。場合によっては、R<sub>1</sub>には、キャッピング基Aが含まれる。キャッピング基Aには、例えば、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル基、カルボキシルアルキル、ジアルキルアシル尿素アルキル、および/または以下の式(V)で表される化合物(ビス系を形成する)：

【化10】

(V)

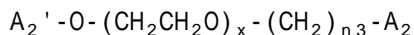


【0061】

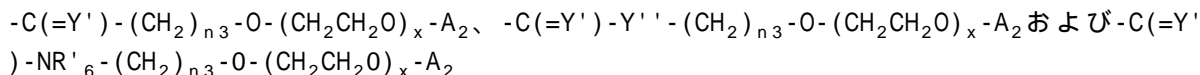
[式中、D'は、Dと同じであるか、もしくはDによって定義される群の別のメンバーであり、残りの可変記号は、式(I)に関して上記に示す通りである]が含まれる。

【0062】

上記のように、R<sub>1</sub>は好ましくは実質上非抗原性であるポリマー残基である。本発明の好ましい態様においては、R<sub>1</sub>は、ビス系を形成し得る上記のキャッピング基Aをさらに含む。そのようなポリマーの好適な例としては、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレンオキシドが挙げられる。PEGおよびその誘導体は一般式



[式中、(x)は、重合度(つまり、約10~約2,300)またはポリマー鎖中の繰り返し単位の数を表し、ポリマーの分子量によって決まり、(n3)は、0または正の整数であり、(A<sub>2</sub>)は、本明細書に定義する通りのキャッピング基(つまり、アミノ、カルボキシ、ハロ、C<sub>1-6</sub>アルキル、またはその他の活性化基)であり、(A'<sub>2</sub>)は(A<sub>2</sub>)と同じであるか、もしくは別の(A<sub>2</sub>)基である]で表される。ポリプロピレングリコール、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,643,575号明細書に記載されたもののような分岐PEG誘導体、「star-PEG's」およびShearwater Polymers, Inc. カタログ「ポリエチレングリコールの誘導体(Polyethylene Glycol Derivatives)」(1997-1998年)に記載されたような多分岐PEGもまた有用である。各々の開示内容は参照により本明細書に組み入れられる。水溶性ポリマーは、ここでは、Mを介して結合部位に結合するように官能化され得ると理解されるだろう。例として、本発明のプロドラッグのPEG部分は、限定するものではないが、以下の化合物：



[式中、Y'およびY''は独立してOまたはSであり、A<sub>2</sub>、(n3)、および(x)は、上記に定義した通りであり、R'<sub>6</sub>はR<sub>6</sub>を定義する群と同一の群から選択される]のうちの一つであり得る。

【0063】

本発明の多くの態様では、二以上置換されたポリマーコンジュゲートが望ましい場合、ビス活性化ポリエチレングリコールが好ましい。あるいは、一置換ポリマーが望ましい場合、ポリエチレングリコール(PEG)、モノ活性化C<sub>1-4</sub>アルキル末端を有するPAO(モノメチル末端を有するポリエチレングリコール(mPEG))が好ましい。

【0064】

所望の加水分解可能な結合部を提供するために、モノまたはジ-PEGアミンおよびモノま

10

20

30

40

50

たはジ-PEGジオールだけでなく、PEG酸またはPEG二酸などの一酸または二酸活性化ポリマーも用いることができる。最初にmPEG-OHをエチルエステルに変換した後、鹸化して、適切なPAO酸を合成することが可能である。Gehrhardt, H.ら、「Polymer Bulletin」18:487(1987年)、およびVeronese, F. M.ら、「J. Controlled Release」10; 145(1989年)を参照のこと。場合によっては、mPEG-OHをt-ブチルエステルに変換した後、酸によって切断して、PAO酸を合成することも可能である。例えば、本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,605,976号明細書を参照のこと。前述の各々の開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている。

#### 【0065】

PAOおよびPEGの数平均分子量は、かなりの範囲に及びうるが、約2,000～約100,000ダルトンの範囲のポリマーを通常、本発明の目的のために選択する。約5,000～約50,000の分子量が好ましく、20,000～約40,000が特に好ましい。プロドラッグに包含されるように選択されるポリマーの数平均分子量は、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であることが必要とされる。化学療法剤および有機成分に関する一部の態様において、上記に規定した範囲内で、少なくとも20,000の分子量範囲を有するポリマーが好ましい。

#### 【0066】

本明細書に包含される高分子物質は、室温で水溶性であるのが好ましい。上記ポリマーとしては、限定するものではないが、ポリアルキレンオキシドホモポリマー、例えば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、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらの共重合体およびそれらのブロック共重合体(但し、ブロック共重合体の水溶性が保持されるという条件で)が挙げられる。

#### 【0067】

PEGのようなPAO系について本明細書に記載したように同じタイプの活性化を採用するならば、PAO系ポリマーに代わるものとして、デキストラン、ポリビニルアルコール、炭水化物系ポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド(HPMA)、およびそれらの共重合体などの実質上非抗原性の材料を用いることも可能である。当業者ならば、前述のリストは、単なる具体例にすぎず、本明細書に記載する特性を有する全ての高分子材料が考慮に入れられることを理解するだろう。本発明の意図するところの「実質上(実質的に)非抗原性」は、実質上非毒性であり、哺乳類に感知できるほどの免疫応答を誘導しないとして、当技術分野で理解される全ての高分子材料を含むことが理解されるだろう。

#### 【0068】

ポリプロピレングリコール酸などの前述のその他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連結基もまた意図されることが前述の記載から明らかであろう。

#### 【0069】

### F. プロドラッグ候補

#### 1. 生物活性物質の残基

概して、本明細書に包含される適切な生物学的に有効な物質のタイプにおける唯一の制約は、取込みエンハンサー基に共有結合するのに利用可能な少なくとも1つの部位があることである。簡単に例を挙げると、上記の部位とは、例えばアミド結合を形成することによって、キャリアー部位と反応して結合することが可能である(第一級または第二級の)アミン含有部位または官能基のことでありうる。取込みエンハンサー基に共有結合するその他の部位には、例えばエステル結合を形成するヒドロキシル官能基がある。勿論、当業者は、対象の生物学的に有効な物質と取込みエンハンサーとの間の選択された結合が、コンジュゲートの二重プロドラッグ部が、輸送エンハンサーと結合状態の親化合物を放出した後、殆ど生物活性を喪失しないような結合であることを理解するだろう。

#### 【0070】

コンジュゲート後、親化合物の残った部分を非コンジュゲート化合物の残基と称する。

#### 【0071】

#### 2. ヒドロキシル含有化合物の残基

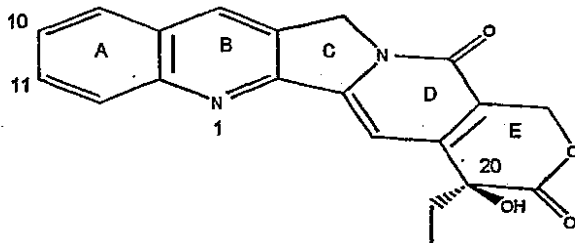
a. カンプトテシンおよび関連のトポイソメラーゼI阻害物質

カンプトテシンは、中国に自生するカンレンボク (*Camptotheca acuminata*) 樹木およびインドに自生するクサミズキ (*nothapodytes foetida*) 樹木から生成される、水に不溶性細胞障害性のアルカロイドである。カンプトテシンおよび関連化合物、および類似体も、潜在的な抗癌剤または抗腫瘍剤であることは公知であり、*in vitro* および *in vivo* で上記の活性を呈することが明らかにされている。カンプトテシンおよび関連の化合物も、本発明のテトラバルテートプロドラッグへ変換するための候補物質でもある。

【0072】

カンプトテシンと特定の関連する類似体は、構造式

【化11】



【0073】

を共有する。

【0074】

このコア構造から、数種の既知の類似体が調製されている。例えば、10-位と11-位のどちらか一方、或いは両方において、A環をOHで置換することが可能である。A環の9-位は、場合によってヘテロ原子(つまり-Oまたは-S)によって結合されていてもよい、直鎖または分岐のC<sub>1-30</sub>アルキルまたはC<sub>1-17</sub>アルコキシで置換されていてもよい。B環の7-位は、直鎖または分岐のC<sub>1-30</sub>アルキルまたは置換アルキル、C<sub>5-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-30</sub>アルコキシ、フェニルアルキルなど、カルバミン酸アルキル、アルキルカルバジド、フェニルヒドラジンの誘導体、アミノ-、アミノアルキル-、アラルキルなどで置換することが可能である。その他の置換は、C、D、およびE環で可能である。例えば、米国特許第5,004,758号、4,943,579号、米国再発行特許第32,518号明細書を参照のこと(その内容を、参照して本明細書に組み入れる)。過度の実験をすることなく、公知の合成技法を用いて、上記の誘導体を合成することが可能である。本明細書に用いる好適なカンプトテシン誘導体には、20-OHを含む化合物もしくは本明細書に記載するポリマー輸送系の活性化状態と直接に反応しうる別のOH基を含む化合物、または結合基中間体(例えば、イミノ二酢酸など)に結合した後に、PEGなどのポリマーに結合する化合物が挙げられる。本明細書のカンプトテシン類似体についての言及は、例示する目的のためであって、限定するものではない。

【0075】

b. タキサン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有される化合物の1クラスは、タキサンである。本発明の目的上、用語「タキサン」には、テルペンのタキサン類に含まれる全ての化合物が含まれる。従って、タキソール(パクリタキセル)、3'-置換のt-ブトキシカルボニルアミン誘導体(タキソテール)など、並びに標準の有機技法を用いて容易に合成されるその他の類似品、または、Sigma Chemical (St. Louis, Missouri) などの市販業者から入手可能であるその他の類似品は、本発明の範囲内である。上記の誘導体は、効果的な抗癌剤であると見出されている。多数の研究により、上記薬剤は、数種の悪性腫瘍に対して活性を有することを示している。これまで、それらの使用は、とりわけ供給不足、水溶性の低さ、および過敏症を引き起こす傾向があることによって厳しい制約を受けていた。本発明の譲受人に譲渡された米国特許第5,622,986号明細書および同5,547,981号に開示の7-アリアルカルバメートおよび7-カルバゼート(carbazate)を含む他のタキサンを本発明のプロドラッグに含ませることも可能であると理解される。前述の米国特許明細書の内容は、参照して、本明細書に組み込んでいる。パクリタキセルは、好適なタキサンである。

10

20

30

40

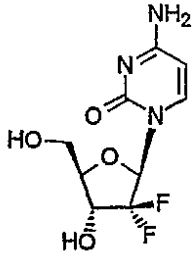
50

## 【 0 0 7 6 】

## c. さらなる生物活性成分

前述の分子に加えて、本発明のプロドラッグ製剤は、多くのその他の化合物を用いて調製することができる。例えば、ゲムシタピン：

## 【化 1 2】

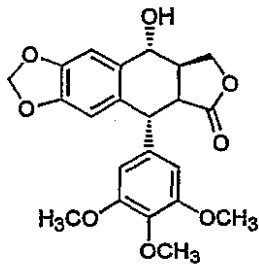


10

## 【 0 0 7 7 】

もしくはポドフィロトキシン：

## 【化 1 3】

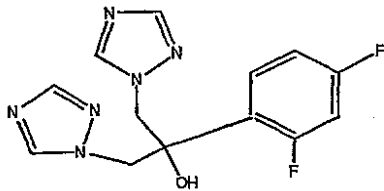


20

## 【 0 0 7 8 】

もしくはフルコナゾール：

## 【化 1 4】

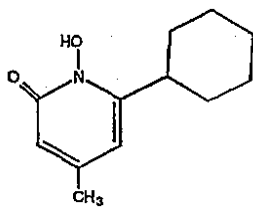


30

## 【 0 0 7 9 】

などのトリアゾール系抗真菌薬、もしくはシクロピロクス：

## 【化 1 5】

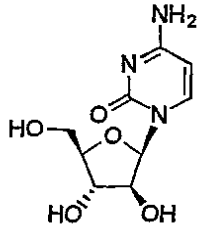


40

## 【 0 0 8 0 】

もしくはAra-C：

## 【化16】



## 【0081】

のようなビスPEG-コンジュゲートなどの生物活性化合物が挙げられる。

10

## 【0082】

プロドラッグ形態に選択される親化合物は、実質的に水に不溶である必要はないが、本発明のポリマーベースのプロドラッグは、水に不溶性化合物を送達するのに特によく適している。他の有用な親化合物としては、例えば、ある種の低分子量の生物活性タンパク質、酵素およびペプチド(ペプチドグリカンを含む)、さらにその他の抗腫瘍剤、心血管薬(ホルスコリンなど)、抗悪性腫瘍薬(コンプレタスタチン、ピンブラスチン、ドキシソルピシン、メイタンシンなど)、抗感染薬(バンコマイシン、エリスロマイシンなどの)、抗真菌剤(ニスタチン、アンホテラシンB、トリアゾール、パプロカンジン、ニューモカンジン、エチノカンジン、ポリオキシシン、ニッコマイシン、プラジミシン、ペナノミシンなど; 「Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development」 Annu. Rev. Microbiology, 1994, 48:471-97を参照のこと、この内容は参照により本明細書に組み入れられる)、抗不安剤、胃腸剤、中枢神経系活性化剤、鎮痛剤、排卵誘発剤または避妊剤、抗炎症剤、ステロイド剤、抗尿毒症剤、心血管剤、血管拡張剤、血管収縮剤などが挙げられる。

20

## 【0083】

上記は、本発明のプロドラッグに適した生物活性成分の例示である。特に挙げられていないが、適当なエステル形成基、すなわちヒドロキシル基を有する生物活性物質も意図され、本発明の範囲に含まれる。本発明のプロドラッグコンジュゲートは、1当量の薬物およびポリマーだけでなく、*in vivo*で生物活性をもたらさない成分をも有する少量の化合物も含み得ることは理解されよう。例えば、いくつかの場合においては、二酸を、1つの連結点を有する薬物分子と反応させたにもかかわらず、その反応条件ではポリマー当たり2当量の薬物を有する、定量的な量のプロドラッグが得られないということが分かった。カルボジイミドを使用した場合、アシル尿素のような反応物の副生物が時々形成され得る。

30

## 【0084】

## 3. アミン含有化合物の残基

本発明の一部の態様において、Dはアミン含有化合物の残基であり、そのような好適な化合物としては、限定するものではないが、有機化合物、酵素、タンパク質、ポリペプチド等の残基が挙げられる。有機化合物には、限定するものではないが、アントラサイクリン系化合物(ダウノルピシン、ドキシソルピシンなど)、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)、および関連する代謝拮抗化合物(例えば、ゲムシタピンなど)の成分がある。

40

## 【0085】

あるいは、Dは、アミン含有心血管薬、抗悪性腫瘍薬、抗感染薬、抗真菌剤(ニスタチンおよびアンホテラシンB)、抗不安剤、胃腸剤、中枢神経系活性化剤、鎮痛剤、排卵誘発剤または避妊剤、抗炎症剤、ステロイド剤、抗尿毒症剤、心血管剤、血管拡張剤、血管収縮剤などの残基であり得る。

## 【0086】

本発明の好ましい態様においては、アミノ含有化合物は、動物、例えば哺乳動物(ヒトを含む)の治療における、そのような治療が望まれる症状のための医薬用途または診断用途に適した生物活性化合物である。上記したものは、例示であり、修飾できる化合物を限

50

定するものではない。当業者は、その他のそのような化合物を過度の実験を行わずに同様に修飾することができるということを認識するだろう。特に挙げていないが適当なアミノ基を有する生物活性物質も意図され、本発明の範囲に含まれることは理解されよう。

【0087】

本発明に包含させるのに適したアミノ含有分子の種類における唯一の制約は、キャリアー部分と反応し、連結することができる少なくとも1個の(1級または2級)アミン含有位が利用可能であり、かつプロドラッグ系が親化合物を放出再生した後に、生物活性の実質的な損失がないということである。

【0088】

本発明のプロドラッグ組成物に組み込むのに適した親化合物は、結合組成物から加水分解により放出された後にそれ自体活性を示さないが、さらなる化学処理/反応を受けた後に活性になる物質/化合物であってもよい。例えば、二重プロドラッグ輸送システムによって血流に送達される抗癌剤は、癌または腫瘍細胞内に入るまでは不活性のままであるが、癌または腫瘍細胞での化学反応、例えば当該細胞に特有の酵素反応によって活性化される。

【0089】

#### 4. 脱離基

Dが脱離基である態様においては、好適な脱離基としては、限定するものではないが、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などの基、チアゾリジニルチオン、または当業者には明白であるその他の良好な脱離基が挙げられる。当業者ならば、過度の実験をすることなく、本明細書で使用および記載の合成反応を理解するだろう。

【0090】

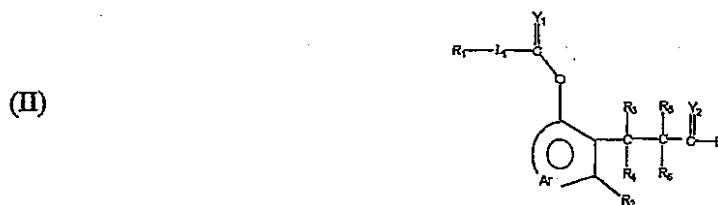
例えば、アシル化された化合物(I)の中間体を、4-ニトロフェニルクロロホルメート、ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)、カルボニルジイミダゾール、チアゾリジンチオンなどの反応物と反応させて、所望の活性誘導体を得ることができる。p-ヒドロキシベンジルアルコールまたはp-アミノベンジルアルコール、およびo-ヒドロキシベンジルアルコールまたはo-アミノベンジルアルコールの選択的アシル化は、例えば、チアゾリジンチオン活性化ポリマー、スクシンイミジルカーボネート活性化ポリマー、カルボン酸活性化ポリマー、ブロックされたアミノ酸の誘導体を用いて実施することが可能である。

【0091】

#### G. 高分子プロドラッグ輸送系の合成

一実施形態においては、本発明の方法には式(II)：

【化17】



【0092】

で表される化合物と、式(III)：



で表される化合物とを反応させることを含む。

【0093】

ここで、式(II)に関してBは脱離基であり、Dが脱離基である場合について上記で定義したとおりである。

【0094】

式(III)に関して、Lxは脱離基であり、Dが脱離基である場合について上記で定義したと

10

20

30

40

50

おりである。

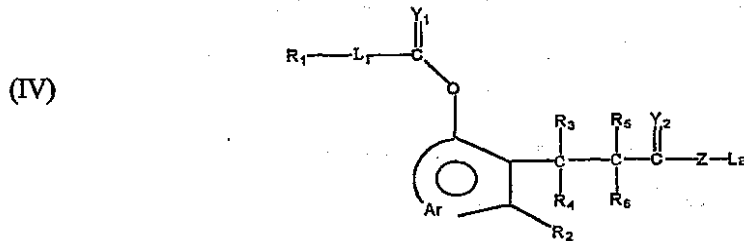
【0095】

Ar、 $R_{1-6}$ 、 $L_1$ 、 $Y_{1-2}$ 、Z、 $[D]_y$ および整数は上記で定義したとおりである。(II)と(III)の反応は、好ましくは、溶媒および塩基の存在下で行われる。溶媒は、例えば、クロロホルム、塩化メチレン、トルエン、ジメチルホルムアミドおよび/またはそれらの組み合わせである。ジメチルホルムアミドが一般に好ましい。塩基は、例えば、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、トリエチルアミンおよび/またはそれらの組み合わせである。

【0096】

本発明のテトラパルテートプロドラッグを調製するさらに別の方法は、式(IV)：

【化18】



【0097】

で表される化合物と、生物活性物質とを反応させることによって行われる。ここで、 $La$ はDが脱離基である場合について上記で定義したような脱離基である。

【0098】

Ar、 $R_{1-6}$ 、 $L_1$ 、 $Y_{1-2}$ 、Z、 $[D]_y$ および整数は上記で定義したとおりである。

【0099】

式IVのさらなる化合物は、Greenwald, et al, "Drug Delivery Systems Based on Trime thyl Lock Lactonization: Poly (ethylene glycol) Prodrugs of Amino-Containing Com pounds," J. Med. Chem., 2000, Vol. 43, Num. 3, pp. 475-487に記載の手順にしたがっ て合成される。この開示内容は参照によりここに組み入れる。

【0100】

場合によって、(IV)と生物活性物質との反応は、カップリング剤、例えば1,3-ジイソプロピルカルボジイミド、ジアルキルカルボジイミド、2-ハロ-1-アルキル-ピリジニウムハロゲン化物、1-(3-ジメチルアミノ-プロピル)-3-エチルカルボジイミド、1-プロパンホスホン酸環状酸無水物、フェニルジクロロホスフェート、および/またはそれらの組み合わせの存在下で行われる。(IV)と生物活性物質との間の反応は、例えば上記の合成法について記載したように、溶媒および塩基の存在下で行われる。

【0101】

選択した合成法に関係なく、本明細書に記載した合成技法によって得られた好適化合物のいくつかを図3～6に示す。

【0102】

## 2. 高分子ハイブリッド

本発明の別の態様においては、本明細書に記載する高分子テトラパルテートプロドラッグ輸送系のハイブリッドタイプを提供する。特に、ハイブリッド系には、上記の可逆的な二重プロドラッグ系だけでなく、さらに永続型の結合をベースとした第二ポリマー輸送系も含まれる。このハイブリッドは、少なくとも2通りの方法で調製することが可能である。例えば、ベンジル脱離型のプロドラッグを最初に合成した後に、チアゾリジニルチオンまたはスクシンイミジルカーボネート活性化PEGなどの当技術分野で認知のいずれかの活性化ポリマーを用いてポリエチレングリコール化(PEG化)することが可能である。場合によっては、最初に、さらに永続的なコンジュゲート反応を行い、得られたコンジュゲートを用いて、本明細書に記載するテトラパルテートコンジュゲートの二重プロドラッグ部を

10

20

30

40

50

形成することが可能である。ハイブリッド系は、複数のアミノ基がポリマー輸送形態の結合に利用できる、タンパク質、酵素などにさらに良好に適すると理解されるだろう。本発明の目的上、「活性ポリマー」には、酵素、タンパク質などで見出されるような -アミノ基、 -アミノ基、ヒスチジン窒素、カルボキシル基、メルカプト基などのうち1種以上と反応可能な1個以上の末端基、並びに合成により調製された有機化合物に見出されるかかる基を含有するポリマーが含まれると理解されるだろう。以下に記載の活性化基を用いて、上記の活性化された輸送形態を形成することが可能であるともさらに理解されるだろう。

#### 【0103】

活性化末端基は、本発明の二重プロドラッグ輸送系を合成する前または後のどちらからに、ポリマーと、生物活性物質（すなわちタンパク質、酵素など）とのコンジュゲートを容易にする任意の基である。例えば、米国特許第4,179,337号明細書を参照のこと（その開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている）。上記の活性化基は：

1. 以下a) ~ f) などのアミノ基と反応させることが可能である官能基、

a) p-ニトロフェニル、またはスクシンイミジルなどのカーボネート（例えば、米国特許第5,122,614号明細書を参照のこと、その開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている）、

b) カルボニルイミダゾール、

c) アズラクトン（例えば、米国特許第5,321,095号明細書参照のこと、その開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている）、

d) 環状イミドチオン（例えば、米国特許第5,349,001号明細書を参照のこと、その開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている）、

e) イソシアナートまたはイソチオシアナート、または

f) N-ヒドロキシ-スクシンイミジルまたはN-ヒドロキシベンゾトリアゾリルなどの活性エステル；

II. 以下a) ~ b) などのカルボン酸基および反応性カルボニル基と反応させることが可能である官能基

a) 一級アミン、または

b) ヒドラジンおよびヒドラジド官能基（例、アシルヒドラジド、カルバゼート、セミカルバメート、チオカルバゼートなど）；

III. メルカプトまたはメルカプト基（フェニルグリオキサルなど）と反応させることが可能な官能基（例えば、米国特許第5,093,531号明細書を参照のこと、その開示内容は、参照により本明細書に組み入れられている）；

IV. (カルボン)酸などのヒドロキシル基と反応させることが可能な官能基、或いは、求電子中心と反応させることが可能な他の求核性試薬；から選択される基でありうる。例えば、限定するものではないが、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、チオール基、活性メチレンなどが挙げられる。

#### 【0104】

活性化成分には、ポリマーに隣接して位置するスペーサー部分も含まれうる。スペーサー部分は、18個までの炭素原子を有するヘテロアルキル、アルコキシ、アルキルでもよく、或いは追加のポリマー鎖であってもよい。スペーサー部分は、標準の合成技法を用いて付加することができる。

#### 【0105】

### H. 治療方法

本発明の別の態様は、概して、治療または診断薬剤などの生物活性物質を、そのような生物活性が望まれる細胞に送達する方法を提供する。本発明のテトラパルテートプロドラッグを用いると、動物の体に見出される広範囲の様々な細胞に生物活性物質が容易く送達されるが、特定の適用例が好適である。例えば、本発明のテトラパルテートプロドラッグは、上記で論じたEPR効果を呈する組織に存在する細胞内に薬物および/または診断薬剤などの生物活性物質を送達する際に特に有用である。EPR効果を呈する多種の組織型は、炎

10

20

30

40

50



症、様々な種類の中毒反応、並びに固形腫瘍を被っている組織を含めて、様々な疾患および障害で現れる。

【0106】

従って、適用範囲の広い方法には、生きている組織と、本発明のテトラパルテートプロドラッグとの接触が含まれる。組織がEPR効果を呈するのが好ましく、その結果、ポリマー結合コンジュゲートが上記組織に入るのが好ましい。勿論、当業者ならば、薬剤が一旦標的細胞内に送達され活性化されると、その後、該細胞によって薬剤が放出されて、他の組織腔に生物活性をもたらすことが可能であることを理解するだろう。

【0107】

簡潔な例として、例えば炎症を起こし、その結果EPR効果を生じている疾患過程中、適切な状況下で肝臓または膵臓の外分泌細胞に送達される本発明の非活性のプロドラッグは、標的細胞の細胞質内で活性化され、次いで活性化された薬物または診断薬剤は、治療および/または診断目的のため、胃腸(「G.I.」)管液腔内に分泌されうる。ゆえに、本例において、適切な薬剤(例えば抗癌剤または抗ウイルス剤)を目標を定めて送達することによって、G.I.管のある種の疾患または障害の治療および/または診断が容易になる。他の器官および/または組織系に対しても、類似の治療方法および類似の生物活性物質送達方法をすぐにでも企図できる。

【0108】

好適な一実施形態において、組織は、腫瘍または癌組織であり、本発明のテトラパルテートプロドラッグは、上記の状態の治療および/または診断に適切な薬剤を含んでなる。ゆえに、テトラパルテートプロドラッグ組成物は、とりわけ、親化合物(例えば、哺乳類における、腫瘍性疾患の治療、腫瘍量の減少、腫瘍または新生物の転移抑制、および腫瘍再発防止/腫瘍増殖防止に適切な化合物を含む)で治療される疾患と同様の疾患の治療に有用である。治療を受ける動物は、哺乳類が好ましく、ヒト患者がさらに好ましい。本発明のプロドラッグを獣医学で使用する場合は、通常、哺乳類種に用いるが、一般的に獣医学実践および畜産学分野の範囲内で、例えば、非常に貴重な、哺乳類以外の外来種の動物を含めた他の種に、該プロドラッグを進んで用いることができるとさらに考える。

【0109】

プロドラッグおよび/または診断用のテトラパルテートタグの投与量は、プロドラッグに含まれる親分子の量によって決まりうる。一般的に、治療方法に用いるテトラパルテートプロドラッグの量は、哺乳類において所望の治療または診断結果を効果的に達成する量である。種々のプロドラッグ化合物の適用量が、親化合物、in vivoでの加水分解速度、ポリマーの分子量などで幾分変わりうるのは当然である。一般的に、テトラパルテートプロドラッグの高分子誘導体は、天然薬物に基づいて1日あたり約5~約500mg/m<sup>2</sup>の範囲の量で投与する。上記に示す範囲は例示的なものであり、当業者は、臨床上の経験と治療の適応に基づいて、選択したプロドラッグに至適な適用量を決定するであろう。当業者ならば、過度の実験を行うことなく、実際の投与量は明白であろう。

【0110】

本発明のプロドラッグを含有する組成物は、それを必要とする動物への投与のため1種以上の適切な医薬組成物に含有されうる。医薬組成物は、溶液、懸濁剤、錠剤、カプセルなどの形態で、当技術分野で公知の方法に基づいて調製可能である。当業者の必要に応じて、経口および/または非経口経路によって、上記組成物を投与してもよいと考える。組成物の溶液および/または懸濁液を、例えば、当技術分野では公知である任意の方法(例えば、静脈内、筋内、皮下注射など)によって組成物を注入又は浸潤させるための担体ビヒクルとして利用してもよい。

【0111】

体腔または腔内への注入によって、さらに吸入および/または鼻腔内経路によって、上記の投与を行ってもよい。しかしながら、本発明の好適な態様において、プロドラッグは、プロドラッグを必要とする哺乳類に非経口経路で投与される。

【0112】

10

20

30

40

50

本発明に係る新規な治療法または投与方法には、プロドラッグの多段階切断がさらに含まれ、その結果、標的細胞内に薬物またはタグなどの生物活性物質が放出される。

【0113】

#### I. *in vivo*での診断

本発明のさらなる態様は、任意に診断タグを上記の輸送エンハンサーに結合することで調製された本発明のコンジュゲートを提供し、ここでこのタグは診断またはイメージング目的のために選択される。従って、任意の適切な基(例えば、アミノ酸残基)を、任意の当技術分野で標準である放射性同位体、放射線不透過性ラベル、磁気共鳴ラベル、または磁気共鳴画像に適切なその他の非放射性同位体ラベル、蛍光タイプのラベル、可視色を呈するラベルおよび/または紫外線、赤外線、または電気化学的な刺激下で蛍光を放ちうるラベルに結合させることによって適切なタグを調製して、外科的処置中および処置後に、腫瘍組織の画像化することができる。場合によっては、コンジュゲートされた治療効果のある成分に診断タグを組み入れるおよび/または結合させ、動物またはヒト患者の体内で治療目的の生物活性物質の分布をモニターすることができる。

【0114】

本発明のさらなる態様において、本発明のタグ付けしたコンジュゲートは、当技術分野で公知の方法に従い、いずれかの適切なラベル(例えば、放射性同位体ラベルなど)を用いて容易に調製される。簡潔に例を挙げると、これらには、*in vivo*における腫瘍細胞への選択的取込みのための放射免疫シンチグラフィ造影剤を生成する<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>インジウムがある。例えば、ペプチドをTc-99mに結合させる当技術分野で公知の方法は非常に多く、簡潔な例として、米国特許第5,328,679号明細書、同5,888,474号、同5,997,844号、および同5,997,845号で、示される例が挙げられる(これらは参照により本明細書に組み入れらる)。

【0115】

概して、患者の腫瘍組織の解剖学的位置確認のため、コンジュゲートタグを、腫瘍を有すると疑われる患者または動物に投与する。ラベルした免疫グロブリンが腫瘍部位に局在化するのに十分な時間が経過した後に、例えば、目視で、X線撮影法、コンピュータ断層撮影、MRI、機器分析によるルミネッセンス標識の検出、ガンマカメラなどのフォトスキナー装置による方法、またはその他の選択した標識の性質に適した方法または機器を用いて、ラベルにより生じるシグナルを検知する。次いで検出したシグナルを画像に変換するか、或いは解剖学および/または生理学的に腫瘍部位を確認する。画像によって、*in vivo*で腫瘍の位置を突き止め、適切な治療方針を考案できる。タグ付けした成分自体が治療薬剤である上記の実施形態において、検出したシグナルは、治療中に、解剖学的位置確認の証拠を提供するものであり、追跡診断および治療介入のためのベースラインを提供する。

【実施例】

【0116】

#### J. 実施例

下記の実施例は、本発明のさらなる理解を得るのに役立つが、本発明の有効な範囲を何ら限定するものではない。実施例で引用された下線を付した番号および太字の番号は、図1および2に示した番号に対応している。

【0117】

#### 一般原則：

反応はすべて乾燥窒素またはアルゴン雰囲気で行った。市販の試薬をさらに精製することなく使用した。すべてのPEG化合物を、使用前に、真空乾燥するか、共沸蒸留(トルエン)により乾燥した。<sup>1</sup>Hスペクトルは、特に指定しない限り溶媒としてジユウテリオク口口ホルムを用いてVarian FT NMR装置により測定した。<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、Varian Mercury VX-300にて75.45MHzで測定した。化学シフト( $\delta$ )はテトラメチルシラン(TMS)を基準として百万分率(ppm)で報告した。結合定数(J値)はヘルツ(Hz)で示した。PEGがコンジュゲートした化合物はすべて*in vivo*での薬物治療前に注射用の無菌生理食塩水(0.9%)に

10

20

30

40

50

溶解し(約15mg/mL)、そのDOX当量として示した(所与のDOX絶対量)。

【0118】

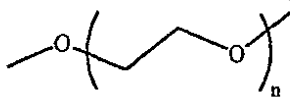
略号

DCM(ジクロロメタン)、DMAP(4-(ジメチルアミノ)ピリジン)、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)、TFA(トリフルオロ酢酸)およびALA-CMPT(20-S-アラニン-カンプトテシン)。

【0119】

すべての化合物を下記の実施例によって製造し、図1~2に示されているように、「PEG」は式：

【化19】



【0120】

[式中、nは重合度を示す]

であることに留意されたい。その他の当業者に既知の変更が上記に示したように容易に使用される。

【0121】

さらに、下記の実施例で用いたPEGの分子量は約40kDaであった。下記の実施例は本発明のさらなる理解を得るのに役立つが、いずれにせよ本発明の有効な範囲を限定することを意味するものではない。

【0122】

実施例1a

化合物3を図1によって示されたようにして製造した。

【0123】

40kDaのPEG-TML3-ロイシン-ドキシソルピシン3 : 40kDaのPEG-TML3-酸1(2.0g、0.049mmol)を40mLの無水DMFに溶かした溶液に、ロイシン-ドキシソルピシン2(87mg、0.132mmol)およびDMAP(97mg、0.79mmol)を加え、その混合物を氷浴中で0 に20分間冷却した。次いでEDC(76mg、0.396mmol)を加え、反応混合物を徐々に室温まで温めて一晩攪拌した。エチルエーテル(約100ml)を反応混合物に加えてPEG誘導体を沈殿させ、濾過により固体を得た。固体をIPAから2回再結晶し(それぞれ60mL)、純粋な生成物3(1.91g、93%)を得た。

【0124】

構造を<sup>13</sup>C NMR(67.8MHz、CDCl<sub>3</sub>)で確認した。ピーク：d 213.58, 186.72, 186.34, 171.90, 171.42, 170.90, 160.72, 155.96, 155.41, 145.48, 136.68, 135.48, 135.16, 133.59, 131.14, 128.32, 127.88, 126.49, 120.51, 119.47, 118.22, 111.16, 108.67, 100.58, 69.0-72.5 (PEG), 68.49, 67.10, 65.16, 56.35, 52.16, 48.70, 47.72, 47.10, 45.58, 39.89, 39.61, 35.32, 33.63, 32.07, 31.20, 28.90, 25.27, 24.28, 22.72, 21.02, 18.84, 16.63, 16.27。

【0125】

実施例1b

ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.102g、0.196mmol)を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

【0126】

実施例2a

化合物5 40kDa PEG-TML1-ロイシン-ドキシソルピシンを、図2に示したようにして調製した。40kDa PEG-TML1-酸4(1.0 g、0.025 mmol)を10mLの無水塩化メチレンに溶かした溶液に、ロイシン-ドキシソルピシン2(64mg、0.098mmol)、4-メチルモルホリン(NMM 0.396mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(HOBT、15mg、0.098mmol)およびEDC(35mg、0.196mmol)を加えた。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。混濁するまで反応溶液にエチ

10

20

30

40

50

ルエーテルを加えて、混合物を30分間フリーザー内で冷却し、ろ過し、IPAによる再結晶化によって精製することで生成物5(0.93g、90%)を得た。

【0127】

構造を $^{13}\text{C}$  NMR(67.8MHz、 $\text{CDCl}_3$ )で確認した。ピーク：d 213.53, 186.62, 186.24, 172.08, 171.87, 171.72, 170.88, 160.64, 155.89, 155.31, 149.48, 138.54, 135.99, 135.43, 135.06, 133.56, 133.38, 133.33, 132.49, 122.08, 120.41, 119.40, 118.18, 111.06, 110.87, 100.44, 69.0-72.5 (PEG), 68.91, 67.75, 67.04, 65.10, 56.30, 52.11, 48.67, 48.05, 45.26, 39.71, 39.65, 39.35, 35.27, 33.53, 32.03, 31.71, 28.80, 25.30, 23.70, 22.72, 20.89, 19.77, 16.59, 15.92。

【0128】

10

#### 実施例2b

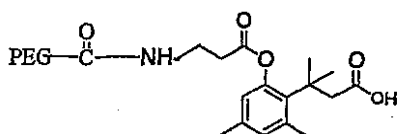
ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.052g、0.100mmol)を使用した以外は実施例2aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

【0129】

#### 実施例3a

本実施例において、PEG-TML3酸(1)の代わりに下記に示した化合物7、TML1

【化20】



20

【0130】

を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返した。

【0131】

#### 実施例3b

ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.120g、0.196mmol)を使用した以外は実施例3aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

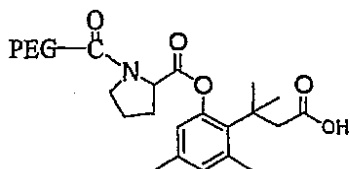
【0132】

#### 実施例4a

30

本実施例において、PEG-TML3酸(1)の代わりに下記に示した化合物8、TML1

【化21】



【0133】

を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返した。

40

【0134】

#### 実施例4b

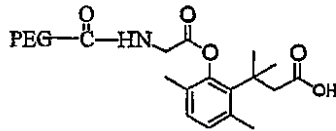
ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.120g、0.196mmol)を使用した以外は実施例4aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

【0135】

#### 実施例5a

本実施例において、PEG-TML3酸(1)の代わりに下記に示した化合物9、TML3

## 【化22】



## 【0136】

を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返した。

## 【0137】

## 実施例5b

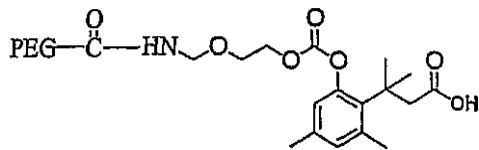
ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.120g、0.196mmol)を使用した以外は実施例5aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

## 【0138】

## 実施例6a

本実施例において、TML3(1)の代わりに下記に示した化合物10、TML4

## 【化23】



## 【0139】

を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返した。

## 【0140】

## 実施例6b

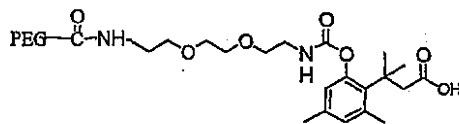
ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.120g、0.196mmol)を使用した以外は実施例6aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

## 【0141】

## 実施例7a

本実施例において、PEG-TML3酸(1)の代わりに下記に示した化合物11、TML5

## 【化24】



## 【0142】

を使用した以外は実施例1aの手順を繰り返した。

## 【0143】

## 実施例7b

ロイシン-ドキシソルピシンの代わりに20-S-アラニン-カンプトテシン・TFA塩6(0.120g、0.196mmol)を使用した以外は実施例7aの手順を繰り返して、最終生成物を得た。

## 【0144】

## 実施例8

## ドキシソルピシン関連テトラパルテートプロドラッグの有効性の確認

少なくとも1週間順化した後、各ヌードマウスの左腋窩隣接領域にある皮下部位1箇所、 $1 \times 10^6$  (100  $\mu$ l)の採取したMX-1乳癌細胞を注入することによって、腫瘍を定着させた。腫瘍注入部位を、週2回観察し、1回触診して評価した。カリパスで2寸法を測定し、式:腫瘍体積=(長さ $\times$ 幅<sup>2</sup>)/2を用いて計算して、各マウスの腫瘍体積を測定した。腫瘍が平均体積およそ65mm<sup>3</sup>に達した場合、マウスを、賦形剤(0.6%NaCl中に20 mMナトリウムPO<sub>4</sub>)

10

20

30

40

50

の対照群、Leu-ドキソルピシン、実施例1aの化合物3、実施例2aの化合物5からなる実験群に分けた。腫瘍サイズが均一なるようにマウスを分類して、1ケージ当たり6匹のマウスになるようにグループ分けし、一生消えない識別をするためにイヤープンチをした。1週間に1度の割合で3週間、尾の静脈から薬物を静脈注射で投薬した(Qd7 x 3)。マウスの体重および腫瘍のサイズを、試験開始時と、週に2回、5週間にわたって測定した。

【0145】

治療終了の1週間後に、腫瘍の全体的な成長を平均腫瘍体積として計算した。対照群の腫瘍サイズのメジアンが、およそ800~1100mm<sup>3</sup>に達した場合と、治療後1週間にもう一度、対照に対する治療の百分率(T/C)の値も計算した。T/C値(%)は、抗腫瘍の有効性に関する非定量的指標である。

【0146】

データを以下の表1に示す。

【表1】

ヌードマウス<sup>a</sup>におけるヒト乳癌<sup>a</sup>(MX-1)に対するPEG-leu-ドキソルピシン類似体の有効性の比較

化合物	投与(mg/kg) q7dx3, iv	腫瘍体積 (平均±sem) 25~28日	変化(%) (平均±sem) 25~28日	1000mm <sup>3</sup> でのT/C (%) <sup>b</sup>
対照	0	3431±291	6603±1200	-
Leu-Dox	30	860±163	1373±487	56.5
化合物3	30	3227±1003	3890±1046	93.8
化合物5	30	1217±351	2194±684	54.2

【0147】

=平均ベースライン腫瘍体積は65mm<sup>3</sup>であった。

【0148】

=対照群の腫瘍体積のメジアンがおよそ1000 mm<sup>3</sup>に達した場合に、治療群および対照群の腫瘍体積のメジアンを測定して、比較した。1000 mm<sup>3</sup>でT/C<42%を、米国国立がん研究所(NCI)の薬物評価部門(Drug Evaluation Branch)による、有意な抗腫瘍活性とみなした。

【0149】

従って、表1で示されるデータからわかるように、leu-ドキソルピシンのPEGコンジュゲート形態は、非コンジュゲートの親化合物よりも効果がある。さらに、ポリマーの結合は親化合物の有効性に重大な影響を及ぼさないことが示されている。

【0150】

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たが、当業者は、本発明の精神から逸脱することなく変更および改変がなされ得ることを理解するだろう。本発明の真の範囲に含まれるような変更および改変はすべて本発明の請求の範囲に入ることを意図するものである。

【図面の簡単な説明】

【0151】

【図1】本発明の化合物の製造方法を概略的に示す図である。

【図2】本発明の化合物の製造方法を概略的に示す図である。

【図3】本発明にしたがって製造された化合物を示す図である。

【図4】本発明にしたがって製造された化合物を示す図である。

【図5】本発明にしたがって製造された化合物を示す図である。

【図6】本発明にしたがって製造された化合物を示す図である。

【配列表】

10

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> Greenwald, Richard B.  
Zhao, Hong

<120> TRIMETHYL LOCK BASED TETRAPARTATE PRODRUGS

<130> 213.1078CIP2PCT

<140> Not yet available

<141> 2002-05-08

<150> US 09/852,335

<151> 2001-05-09

10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide linker

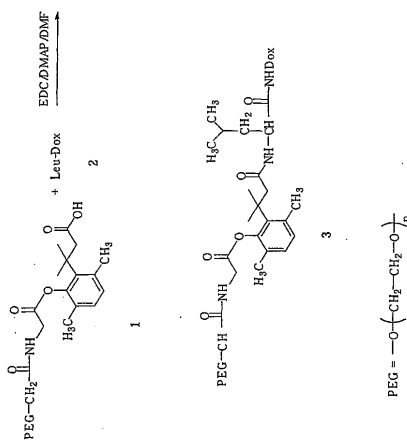
<400> 1

20

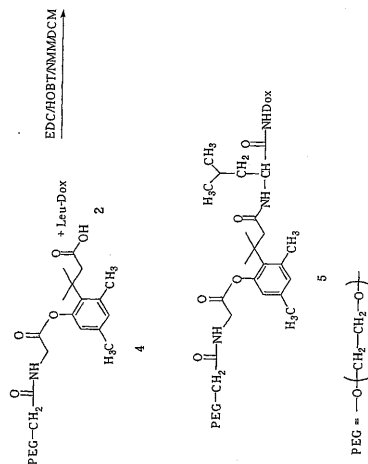
Gly Phe Leu Gly

1

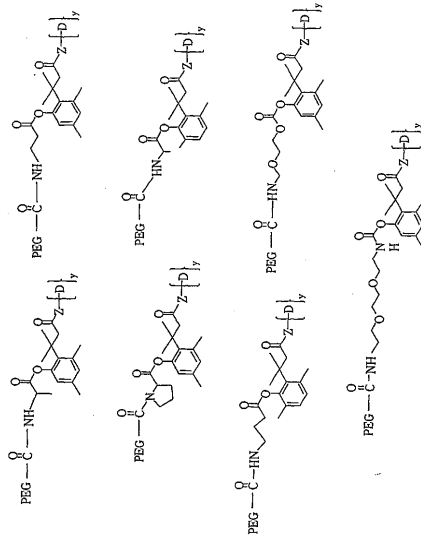
【 図 1 】



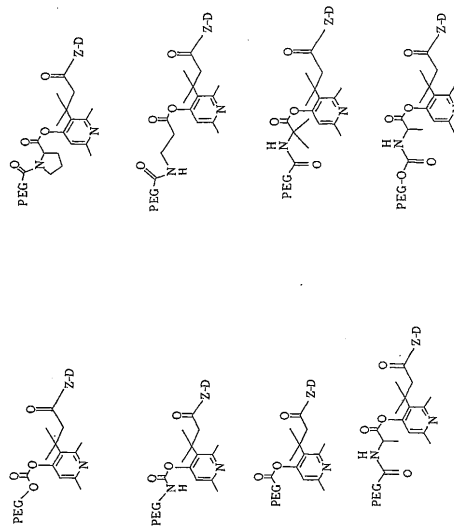
【 図 2 】



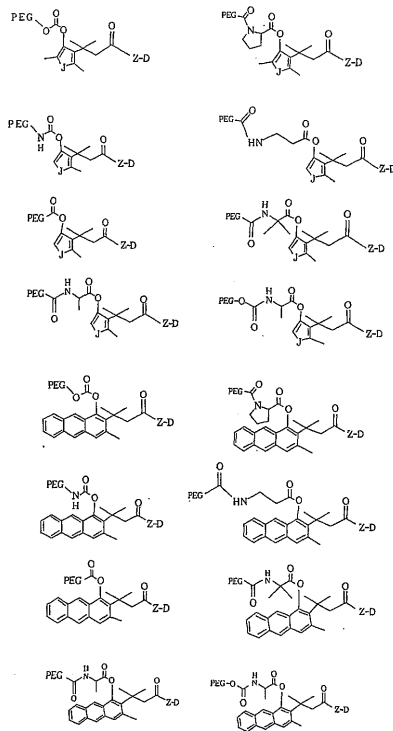
【 図 3 】



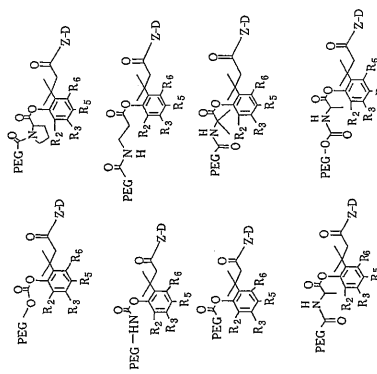
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 7/00	(2006.01)	C 0 7 K 7/00	

(72)発明者 グリーンワールド, 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

(72)発明者 ザオ, ホン  
 アメリカ合衆国 0 8 8 2 0 ニュージャージー州, エディソン, ヴィスコ ドライブ 6

審査官 安田 周史

(56)参考文献 国際公開第99/033483(WO, A1)  
 国際公開第99/030727(WO, A1)  
 特表平11-508275(JP, A)  
 J. Med. Chem., 2000年, Vol.43, No.3, p.475-487

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C07C 235/34  
 C07C 237/20  
 CA/REGISTRY(STN)