

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5676020号
(P5676020)

(45) 発行日 平成27年2月25日(2015.2.25)

(24) 登録日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 0 7 D 233/91	(2006.01)	C O 7 D 233/91	C S P
C 0 7 D 403/06	(2006.01)	C O 7 D 403/06	
C 0 7 H 19/06	(2006.01)	C O 7 H 19/06	
A 6 1 K 31/4168	(2006.01)	A 6 1 K 31/4168	
A 6 1 K 31/513	(2006.01)	A 6 1 K 31/513	

請求項の数 4 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-558712 (P2013-558712)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月13日(2013.2.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/053429
 (87) 国際公開番号 W02013/122112
 (87) 国際公開日 平成25年8月22日(2013.8.22)
 審査請求日 平成26年6月30日(2014.6.30)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-28761 (P2012-28761)
 (32) 優先日 平成24年2月13日(2012.2.13)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 504171134
 国立大学法人 筑波大学
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 長崎 幸夫
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
 大学法人筑波大学内
 (72) 発明者 池田 豊
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
 大学法人筑波大学内
 (72) 発明者 久野 光
 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
 大学法人筑波大学内

最終頁に続く

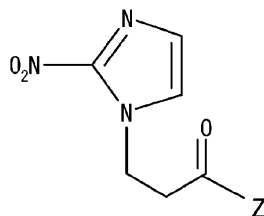
(54) 【発明の名称】 ニトロイミダゾールを用いたプロドラッグ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式(I)で表される化合物またはその製薬学的に許容される塩:

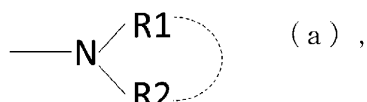
【化1】



(I)

式中、Zは、式(a):

【化2】



(a),

を表し、

式中、R 1 は、アミノ基を持つ治療的活性有機化合物から当該アミノ基を除去した残基であり、

R 2 は水素原子であるか、または、

R 1 と R 2 は隣接する N 原子と一緒に、環状アミノ基を持つ治療的活性有機化合物の残基を表し、

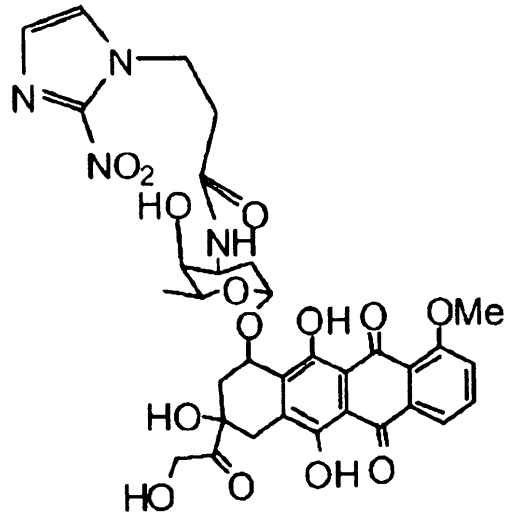
前記治療的活性有機化合物が、ドキシソルピシン、ゲムシタピン及び5 - フルオロウラシルからなる群より選ばれる。

【請求項 2】

下記式で表される、請求項1に記載の化合物。

【化 3】

10

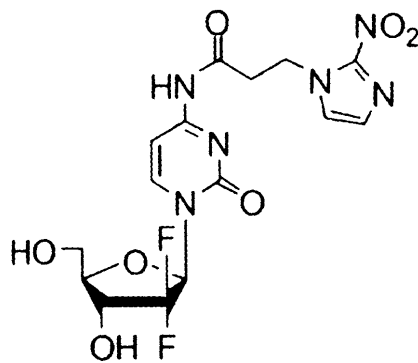


20

【請求項 3】

下記式で表される、請求項1に記載の化合物。

【化 4】



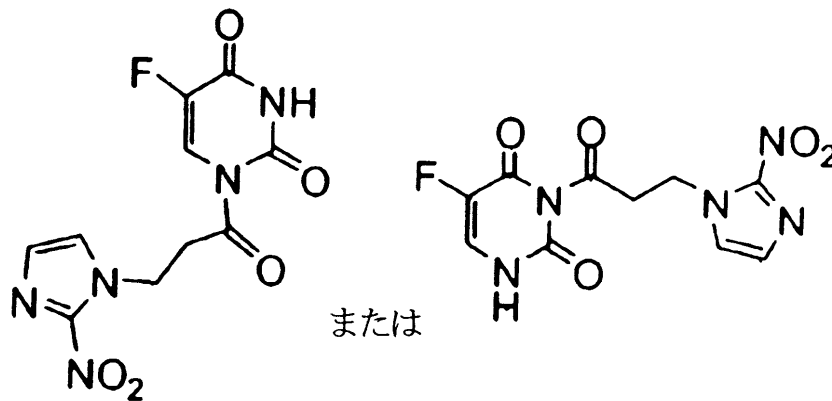
30

【請求項 4】

下記式のいずれかで表される、請求項1に記載の化合物。

40

【化5】



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2-ニトロ-1-イミダゾールプロピオン酸と治療的活性化合物たる薬剤のコンジュゲートに関する。より具体的には、生体の低酸素部位または還元環境下でニトロイミダゾールと薬剤の間の共有結合が開裂し、活性化形態で治療的活性化合物を放出できる当該プロドラッグ、及び当該コンジュゲートを提供するための2-ニトロ-1-イミダゾールプロピオン酸の使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

低酸素部位の腫瘍は浸潤、転移及び耐性癌の原因となっており、癌の根治を妨げる最大の要因であり、これら低酸素環境下にある腫瘍細胞の治療法の開発は切に望まれている。

【0003】

低酸素部位の癌細胞を標的とした医薬品はトリアパザミン (Triapazine)、AQ4N [バノキサントロン・二塩酸 (banoxantrone dihydrochloride)]、PR104 [ジニトロベンズアミド・ナイトロジェンマスタードプロドラッグ (dinitrobenzamide nitrogen mustard prodrug)] 及び TH-302 [N,N'-ビス(2-プロモエチル)ホスホロジアミジックアシッド (1-メチル-2-ニトロ-1H-イミダゾール-5-イル)メチルエステル (N,N'-bis(2-bromoethyl)phosphorodiamidic acid (1-methyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methyl ester)] 等現在数種類の臨床試験が行われているが、現時点で、上市されたとの情報はない。

30

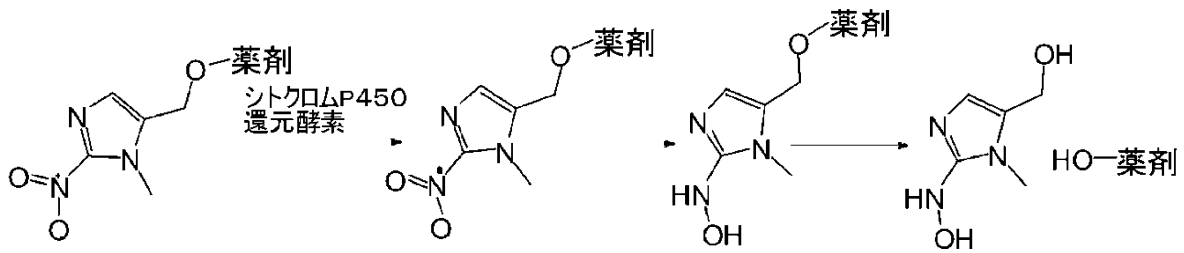
【0004】

このような保護基として作用する、例えば、ジニトロベンズアミドが非特許文献1に開示されており、また、TH-302に関連するニトロイミダゾール類が非特許文献2、特許文献1、特許文献2に開示されている。TH-302は次の反応スキームにより表されるように、保護基-薬剤の結合を開裂し、薬剤を放出する機序を利用するものと理解される。

40

【0005】

【化1】



【0006】

特許文献1及び2のどちらも、薬剤はイミダゾール環を構成する炭素原子にメチレンオキシ基(-CH₂-O-)を介して結合しており、上記の反応スキームと同様の機序によりプロドラッグから薬剤を放出するものと理解される。しかしながらこのシステムでは薬剤の放出効率が薬剤の脱離能に依存しており、放出される薬剤は脱離しやすいフェノール性の水酸基やリン酸を有する化合物等に限定される。

【0007】

特許文献3には、生体還元性基(Hyp:例えば、2-ニトロイミダゾリル)がその1位でリンカー(L:-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-)を介してアントラサイクリン系抗癌剤(Q)のアミノ基に共有結合させた低酸素活性化コンジュゲート(Hyp-L-Q)が記載されている。このコンジュゲートである化合物は、低酸素腫瘍領域で-L-Q部分が結合したままであるが、2-ニトロイミダゾリルのニトロ基ヒドロキシアミンに還元され、こうしてイミダゾリルの4位もしくは5位を介してDNAをアルキル化でき、一方で、Qを構成するアントラサイクリンがDNA塩基間にインターカレートすることで癌細胞を殺すことが示唆されている。しかしながら、当該文献では、リンカーが「-C₃H₆-C(=O)-」である化合物は、リンカーが、例えば、-CH₂(CH₂)_aCH₂-O-CH₂- (ここで、aは0または1の整数である。)である対応する化合物に比べて低酸素下の肺癌細胞に対して著しく低い細胞毒性を示すにすぎないことが明らかにされており、現に、前記化合物は当該特許出願においてクレームの範囲外におかれている。

【0008】

さらに、特許文献4には、例えば、N-メチル-2-ニトロ-1-イミダゾールプロパノイルアミド等のアミド類が放射線増感作用とともに単独で抗悪性腫瘍作用を有することが記載されている。しかし、かようなイミダゾールカルボン酸が他の薬剤とのコンジュゲートまたはプロドラッグを形成するのに使用できることは何ら記載も示唆もされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO2000/64864または特表2002-543059

【特許文献2】WO2004/087075または特表2006-521409

【特許文献3】WO2009/018163 A1

【特許文献4】JP7(1995)-101860 A

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】B. M. Sykes et al., J. Med. Chem. 1999, 42, 345-355

【非特許文献2】J. Duan et al., J. Med. Chem. 2008, 51(8): 2412-2420

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

10

20

30

40

50

本発明者等は、2-ニトロイミダゾールは酸化還元電位が比較的高く生体内の低酸素部位で効率よく還元されるので、ニトロ基がヒドロキシアミン及びアミンに還元され、こうして起こる分子の構造変化を化合物の放出に展開または応用できれば低酸素部位特異的な抗癌剤の開発につながるものと推定した。すなわち通常の酸素濃度では化合物がプロドラッグの形で存在するため活性を有さないが、低酸素部位において構造変化を起こし活性型となるのであれば、抗癌剤の副作用を抑え、低酸素部位において活性を有する医薬品開発が可能となろう。したがって、本発明の目的は、従来技術に比べ、より汎用性があり、腫瘍等の低酸素部位において特異的に分子構造が変化し、効率よく薬剤等の化合物を放出するシステムを提供するにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

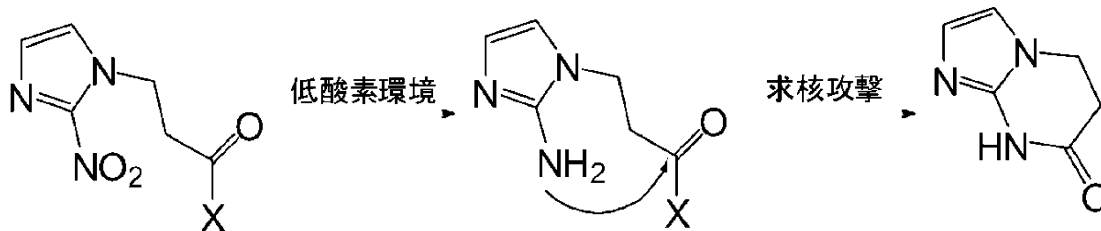
非特許文献1では、2-ニトロイミダゾール骨格の1位と結合した、リンカー： $-CH(-Me)-C(=O)-$ のカルボニル基に薬剤が共有結合した化合物は、ニトロイミダゾール部が還元されても分子内環化反応が起こらず、薬剤が放出されない旨示唆されている。一方、特許文献3では、リンカー部が $-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ で表されるHyp-L-Qは、低酸素下でHypに相当する2-ニトロイミダゾール部は還元されるものの、L-Qの結合は開裂しないことが記載されている。

意外にも、当該カルボニル基を介して形成されたアミド結合、イミド結合またはエステル結合は還元環境下、特に、生体内の低酸素部位において開裂することを本発明者等は見出した。

このような開裂は、理論に拘束されるものではないが、還元環境下でイミダゾール環上のニトロ基がヒドロキシアミンまたはアミノ基に変換され、当該アミノ基が分子内で求核攻撃を行う次の反応スキームに従う分子内環化反応を伴って起こるものと理解できる。

【0013】

【化2】



【0014】

本願発明に従えば、前記アミド結合、イミド結合またはエステル結合が還元環境下で開裂し、その場でそれ自体活性を持つ薬物を放出するので、還元環境下で選択的に放出されることに技術的に意味のある、多種多様な薬物のコンジュゲートまたはプロドラッグとなり得る化合物を提供できる。

したがって、本発明は、広く、2-ニトロ-1-イミダゾールプロピオン酸を、多種多様な薬物、特に、治療的活性有機化合物のプロドラッグを提供するために使用できることを見出したことに基づく。

本発明の一態様としては、一般式(I)

【0015】

一般式(I)で表される化合物またはその製薬学的に許容される塩：

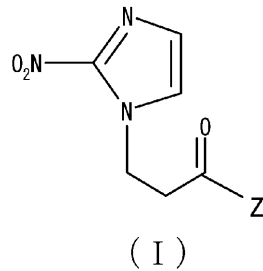
10

20

30

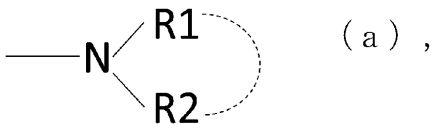
40

【化3】



式中、Zは、式(a)：

【化4】



または、式(b)：

- O - R3 (b)を表し、

式中、R1は、アミノ基を持つ治療的活性有機化合物から当該アミノ基を除去した残基であり、かつ、R2が水素原子であるか、または、

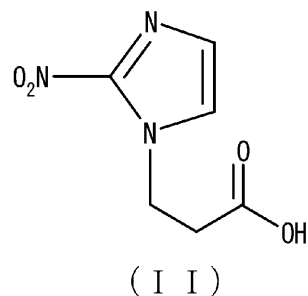
R1とR2が隣接するN原子と一緒にあって、環状アミノ基を持つ治療的活性有機化合物の残基を表す、

R3は、ヒドロキシル基を持つ治療的活性有機化合物から当該ヒドロキシ基を除去した残基である。

【0016】

また、本発明の別の態様としては、式(II)

【化5】



で表される2-ニトロ-1-イミダゾールプロピオン酸を反応体として含む分子中にアミノ基、環状アミノ基またはヒドロキシル基を分子中に持つ治療的活性有機化合物のプロドラッグを製造するための調製物、または

分子中にアミノ基、環状アミノ基またはヒドロキシル基を分子中に持つ治療的活性有機化合物のプロドラッグを製造するための反応体としての式(II)で表される化合物の使用、

についても提供される。

このような一般式(I)の化合物は、2-ニトロ-1-イミダゾールプロピオン酸(以下、Izpと略称することがある。)が治療的活性有機化合物に結合していることにより、当該有機化合物が本来持っている生物活性(例えば、細胞毒性、その他の活性)を低下またはマスクする一方で、還元環境下、特に、哺乳動物の低酸素部位でIzp部分とZに相当する部分が選択的に開裂する。かような開裂によりもたらされる当該有機化合物はそれら本来の活性を低酸素部位またはその周辺で示すようになる。

10

20

30

40

50

したがって、一般式 (I) で表される化合物は、それに含まれる治療的有機化合物を哺乳動物の特定部位で放出できるので、より安全かつ、効果的に使用できる。

【発明の詳細な記述】

【0017】

本明細書で用いるか、または本発明に関して用いる技術用語は、別に定義しないかぎり当該技術分野で一般的に用いられている意味、内容を持つ。

こうして、「プロドラッグ」とは、それ自体当該技術分野で用いられている意味を有し、例えば、生理活性物質または治療的活性有機化合物を化学的に修飾し、生体内で酵素的またはその他の条件下で親化合物を遊離もしくは放出するように設計された化合物を意味する。

10

「コンジュゲート」とは、2種以上の異なる化合物が共有結合して形成された結合体を意味し、プロドラッグを包含する概念として用いている。

「治療的活性有機化合物」は、哺乳動物、特にヒトの疾患、障害、等を治療または予防する活性を持つ有機化合物を意味する。かような疾患、障害としては、腫瘍、特に悪性腫瘍、及び炎症であって、これらの病巣またはその周辺領域が正常な組織または細胞領域に比べて低酸素状態を伴うものを挙げることができる。

「抗腫瘍剤または物質」及び「抗癌剤」は互換可能な用語として使用している。

【0018】

治療的活性有機化合物に包含される抗腫瘍物質には、現在、癌の化学療法に使用されているか、または使用するために試験中である化合物のみならず、毒性または副作用が強いため臨床使用がきらめられた化合物、さらには本発明の目的の沿うのであれば、将来抗癌剤として提供される化合物も包含される。このような抗癌剤には、限定されるものではないが、ドキシソルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、ピラルピシン、アムルピシン、アクラシノマイシン、アントラマイシン、ゾルピシン等のアントラサイクリン系、プレオマイシン、アクチノマイシン等のペプチド系、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン等のキノリンアルカロイド系、ドセタキセル、パクリタキセル等のタキサン系、ビノレルピン (vinorelbine)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン等のピンカアルカロイド系、ゲムシタピン、シタラピン等のデオキシシチジン系、5-フルオロウラシル、カペシタピン、ドキシフルリジン等のピリミジン系、フルダラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン等のプリン環誘導体系、エポチロン等のマクロライド系、メルファラン等のアミノ酸誘導体系、メトトレキサート、ベメトレキセド等の葉酸誘導体系に包含される化合物が挙げられる。

20

30

【0019】

他方、治療的活性有機化合物に包含される抗炎症には、メサラジン等のサリチル酸系非ステロイド抗炎症剤、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム等のオキシカム系非ステロイド系抗炎症薬、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、コルチゾン酢酸エステル、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド等のステロイド系抗炎症薬等が挙げられる。

【0020】

これらの抗腫瘍物質の分子中に存在し、式 (II) の化合物との反応によりアミド結合、イミド結合、またはエステル結合を形成するのに使用できるアミノ基もしくは環状アミノ基またはヒドロキシル基は、例えば、アンシラサイクリン類では、糖部分に存在するアミノ基またはヒドロキシル基を、ペプチド系抗生物質はアミノ基を、キノリンアルカロイド類ではE環のヒドロキシル基を、タキサン類ではタキサン環に結合している水酸基または側鎖のヒドロキシルを、ピンカアルカロイド類ではインドール環上の環状アミノ基を、デオキシシチジン誘導体では、シトシン塩基の環外アミノ基またはリボース環上のヒドロキシルを、ピリミジン系誘導体では、ピリミジン環上の環状アミノ基またはリボース環上のヒドロキシルを、プリン環誘導体ではプリン環の環状アミノ基もしくは環外アミノ基またはリボース環上のヒドロキシル基を、マクロライド系抗生物質ではマクロライド環上のヒドロキシル基を、アミノ酸誘導体では炭素に結合しているアミノ基を、葉酸代謝拮抗

40

50

剤では複素環に結合しているアミノ基を挙げることができる。

【0021】

また、抗炎症剤の分子中に存在し、式(II)の化合物との反応によりアミド結合、イミド結合、またはエステル結合を形成するのに使用できるアミノ基もしくは環状アミノ基またはヒドロキシル基は、例えば、サリチル酸系ではベンゼン環に結合した水酸基もしくはアミノ基を、オキシカム系では環状スルホンアミドに存在する水酸基を、ステロイド系では21位の炭素に結合している水酸基を挙げることができる。

【0022】

したがって、一般式(I)にいう、

アミノ基を持つ治療的活性有機化合物の代表的な化合物としては、ドキシソルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、ピラルピシン、アムルピシン、アクラシノマイシン、アントラマイシン、ゾルピシン、プレオマイシン、アクチノマイシン、ゲムシタピン、シタラピン、メトトレキサート、ペメトレキサド、メルファラン、メサラジンを挙げることができ、

10

環状アミノ基を持つ治療的活性有機化合物の代表的な化合物としては、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリンを挙げることができ、

ヒドロキシル基を持つ治療的活性有機化合物の代表的な化合物としては、ガドセタキセル、パクリタキセル、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、ピラルピシン、アムルピシン、アクラシノマイシン、アントラマイシン、ゾルピシン、プレオマイシン、アクチノマイシン、ゲムシタピン、シタラピン、カペシタピン、ドキシフルリジン、エポチロン、ピロキシカム、メロキシカム、テノキシカム、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、コルチゾン酢酸エステル、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニドを挙げることができる。

20

これらのうち、治療的活性有機化合物の好ましいものとしては、ドキシソルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、ピラルピシン、アムルピシン、アクラシノマイシン、アントラマイシン、ゾルピシン、プレオマイシン、アクチノマイシン、カンプトセシン、トポテカン、イリノテカン、ドセタキセル、パクリタキセル、ビノレルピン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ゲムシタピン、シタラピン、5-フルオロウラシル、カペシタピン、ドキシフルリジン、フルダラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、エポチロン、ピロキシカム、メルファラン、メトトレキサート、ペメトレキサド、メサラジン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾンを挙げることができ、より好ましいものとしては、ドキシソルピシン、イダルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、ピラルピシン、アムルピシン、アクラシノマイシン、アントラマイシン、ゾルピシン、ゲムシタピン、シタラピン、メトトレキサート、ペメトレキサド、メルファラン、メサラジン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、5-フルオロウラシル及び6-メルカプトプリン、プレドニゾロンを挙げることができる。

30

【0023】

一般式(I)の化合物の製薬学的に許容される塩は、当該化合物が上記アミド結合、イミド結合を形成するアミノ基または環状アミノ基以外に塩基性の基を持つ場合には、塩酸、硫酸等の鉱酸、ギ酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸等の有機酸の酸付加塩であることができ、一方、当該化合物がカルボキシル基、水酸基等の酸性基を有する場合は、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、アンモニウム、メチルアミン等の有機アミンの付加塩であることができる。

40

【0024】

本発明に関して、「低酸素部位」には、インビボまたはインビトロのいずれであるかを問わず使用しているが、好ましくは哺乳動物、特にヒトの生体内の、特に、固形癌病巣または固形癌細胞集団等、並びにその周辺領域が包含される。

50

【0025】

分子中にアミノ基、環状アミノ基及び/またはヒドロキシル基を持つ治療的活性有機化合物と式(II)の化合物との反応によりアミド結合、イミド結合またはエステル結合を形成することによる一般式(I)の化合物を製造するには、適当な非活性溶媒中で、当該有機化合物と式(II)の化合物を当該技術分野でそれ自体周知の縮合剤(例えば、カルボジイミド類)の存在下で反応させるか、或は、式(II)の化合物の活性エステル(ハロゲン化物、N-ヒドロキシコハク酸イミドとのエステル等)を一般式(I)の化合物と適当な溶媒中で反応させればよい。当該有機化合物の分子中にアミノ基もしくは環状アミノ基とヒドロキシル基が共存するときには、必要により、当該技術分野で公知の方法により、いずれかの基を保護した後、上記のいずれかの反応を行えばよい。

10

【0026】

一般式(I)で表される化合物またはプロドラッグは、親化合物たる治療的活性有機化合物が投与されているのと同様の剤形で、同様の投与経路から患者に投与できる。限定されるものではないが、製剤は、製薬学的に許容される担体を用いて調製できる。例えば、非経口または筋肉内投与に適する製剤としては、バッファー、張度調節剤、等を含め、必要に応じて、界面活性剤、リポソーム形成剤、高分子ミセル形成剤、等を含む、水性または非水性の溶液または希釈剤に溶解または懸濁させて調製できる。投与量は、親化合物の用量を参考に、必要があれば専門医と相談して決定すればよい。

【図面の簡単な説明】

【0027】

20

【図1】例1の環化反応により生成した化合物4のNMRチャート。

【図2】例4で通常酸素及び低酸素環境下でのナフチルメチルアミンの放出量の比較検討を行った高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の測定結果を示すグラフ。

【図3】例5によるヒト膵臓がん細胞を用いる一般式(I)のモデル化合物からのアミノ基を持つ有機化合物の放出挙動を示すグラフ。

【図4】例7による細胞生存率の評価(低酸素環境応答性ドキシソルピシン)の結果を示すグラフ。

【図5】比較実験例による本発明の化合物と構造類似の公知化合物の細胞毒性についての比較試験の結果を示すグラフ。

【図6】例9による細胞生存率評価(低酸素環境応答性ゲムシタピン)の結果を示すグラフ。

30

【図7】例11による細胞生存率評価(低酸素環境応答性5-フルオロウラシル)の結果を示すグラフ。

【図8】例16による低酸素環境下でのプレドニゾロンプロドラッグからの薬剤の放出挙動を示すグラフ。

【発明の具体的な態様】

【0028】

以下、具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの例に本発明を限定することを意図するものでない。

【0029】

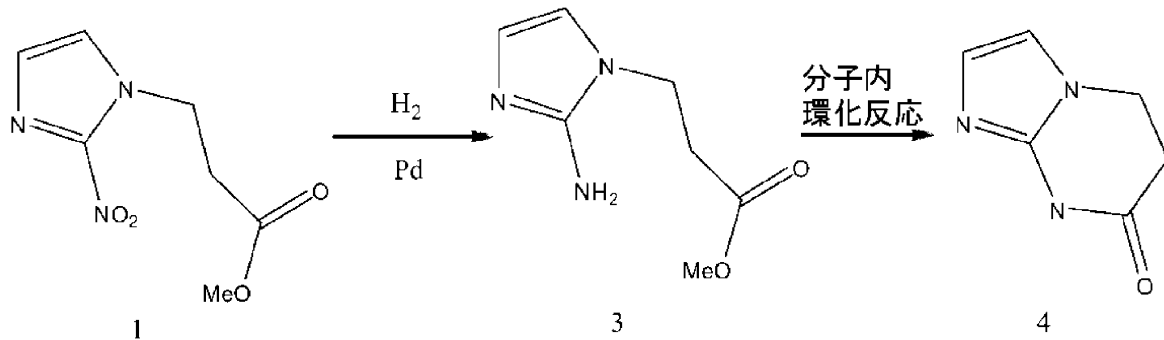
40

例1:メチル 3-(2-ニトロ-1H-イミダゾールイル)プロピオネートの還元

【0030】

【化6】

反応スキーム：



10

【0031】

文献(M. P. Hay et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 381-391)に記載の方法に準じて合成した化合物1の200mgを加えた反応容器にメタノール10mL, Pd/C 150mgを入れ、水素ガスを充填させた。水素ガスを充填させたまま24時間攪拌し、反応後TLC(展開溶媒 酢酸エチル：ヘキサン=1：1)によって反応の進行を確認した。次にセライト濾過によってPd/Cを除去し、最後にエバポレーターを用いてメタノールを除去した。その結果、中間体3が単離されることなく還元反応中の溶液で速やかに環構造を形成して化合物4が生成した。得られた化合物4のNMRチャートを図1に示す。

20

【0032】

このチャートから、化合物(1)を還元することにより環状構造を有する化合物4が生成したことが確認された。すなわち、式(I)で表される化合物の類似体はその分子内環化反応を伴いエステル結合が開裂し、HOMeを放出することがわかる。

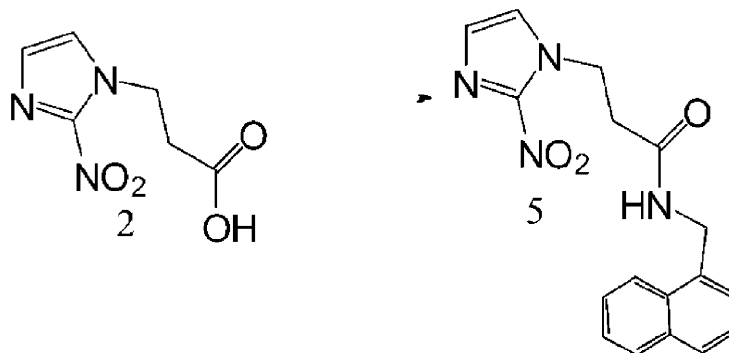
【0033】

例2：N-ナフチルメチル-3-(2-ニトロ-1H-イミダゾールイル)プロピオニルアミドの製造

【0034】

【化7】

反応スキーム：



40

【0035】

文献(M. P. Hay et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 381-391)に記載の方法に準じて合成した化合物2(100mg)を50mLのナスフラスコに加え、スターラーで攪拌しながら反応容器に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(155.6mg), N,N-ジメチル4-アミノピリジン(6.7mg), 塩化メチレン(5.4mL), 1-ナフチルメチルアミン(119.27μL)を入れ、2日間攪拌した。100mLの分液ロートに酢酸エチル20m

50

Lと飽和塩化アンモニウム20 mLを入れ、有機層と水層に分離した。回収した酢酸エチル層に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和NaCl水溶液を加えて分離を行い、有機層を回収した。有機層を無水 Na_2SO_4 で乾燥後、エバポレーターで溶媒を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 酢酸エチル：ヘキサン = 1：1400 mL）で単離精製し、エバポレーターで溶媒を除去し、標題の化合物5を得た。
ESI-MS ($\text{M} + \text{H}^+$) 理論値：325.130，実測値：325.126

【0036】

例3：化合物5の還元

50 mLのナスフラスコに攪拌子と化合物5（10 mg）を加えた。スターラーで攪拌しながら反応容器にメタノール10 mL，Pd/C 50 mgを入れ、水素ガスを充填させた。水素ガスを充填させたまま24時間間攪拌し、反応後TLC（展開溶媒 酢酸エチル：ヘキサン = 1：1）によって反応の進行を確認した。次にセライト濾過によってPd/Cを除去し、最後にエバポレーターによってメタノールを除去した。エレクトロスプレーイオン化質量分析により解析したところ、化合物4の生成を示す結果が得られた。すなわち、分子内環化反応を伴いアミド結合が開裂し、ナフチルメチルアミンを放出することがわかる。

化合物4の分子量理論値：138.067、実測値：138.063

【0037】

例4：化合物5の低酸素下にある培養細胞中でのインキュベーション

この例は、化合物5が低酸素環境下の細胞で還元され、その後の分子内環化反応によりナフチルメチルアミンを放出することを確認するために行った。

【0038】

細胞数が 1×10^4 cell/mLになるように調整し、96wellプレートに播種し、24時間インキュベーターで37 °Cのもと培養した。24時間後、合成した化合物5を細胞中で1 mMになるように添加した。添加した後、通常酸素濃度インキュベーター（20% O_2 ）と低酸素ワークステーション（1% O_2 ）でそれぞれ6時間培養した。その後、培地を回収した、50 μL のTrypsin/EDTAを加えて5分間インキュベーションを行って細胞をはがし、先に回収した培地に加えた。その後、回収サンプルを一晩凍結乾燥し、アセトニトリルを200 μL 加えて超音波洗浄を30分間行った。さらに、遠心分離機（3,000 rpm, 10 min）で死細胞を沈殿させ、上澄みを回収し、アセトニトリルを遠心エバポレーターによって除去した。そのエッペンチューブにメタノール（LC/MS用）を200 μL 加え、フィルター（0.2 μm ）を通してLC/MS測定および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定を行った。この測定を行う事で低酸素環境と正常酸素環境での放出量の差を比較した。HPLCの結果を図2に示す。図より、低酸素環境下で多くのナフチルメチルアミンが放出されていることがわかる。

【0039】

例5：化合物5の低酸素下にある培養細胞中でのインキュベーション

ヒト膵臓がん細胞（MIA PaCa-2、理研セルバンクより入手）を細胞数が 1×10^4 cell/mLになるように調整し、96wellプレートに播種した。24時間後、化合物5を10 μM の濃度で加え、通常酸素濃度インキュベーター（20% O_2 ）と低酸素ワークステーション（0.1% O_2 ）でそれぞれ培養した。時間経過後培地を回収し、更にトリプシンを加え細胞を回収した。回収した細胞を超音波処理により粉碎し、アセトニトリルで化合物を抽出して下記条件によりLC/MSにより解析を行った。

使用カラム：Lachrom Urtra C18（粒子径2 μm ，2 mm \times 50 mm）カラム

測定波長：220 nm

溶離液A：0.1% TFA含有milliQ

溶離液B：アセトニトリル

流速：0.2 mL/min

グラジエント

10

20

30

40

50

95 : 5 (溶離液 A : 溶離液 B) 95 : 5 (5 分) 30 : 70 (15 分)

この測定を行うことで低酸素環境と正常酸素環境での放出量の差を比較した。HPLCの結果を図3に示す。図より、低酸素環境下で多くのナフチルメチルアミンが放出されていることがわかる。

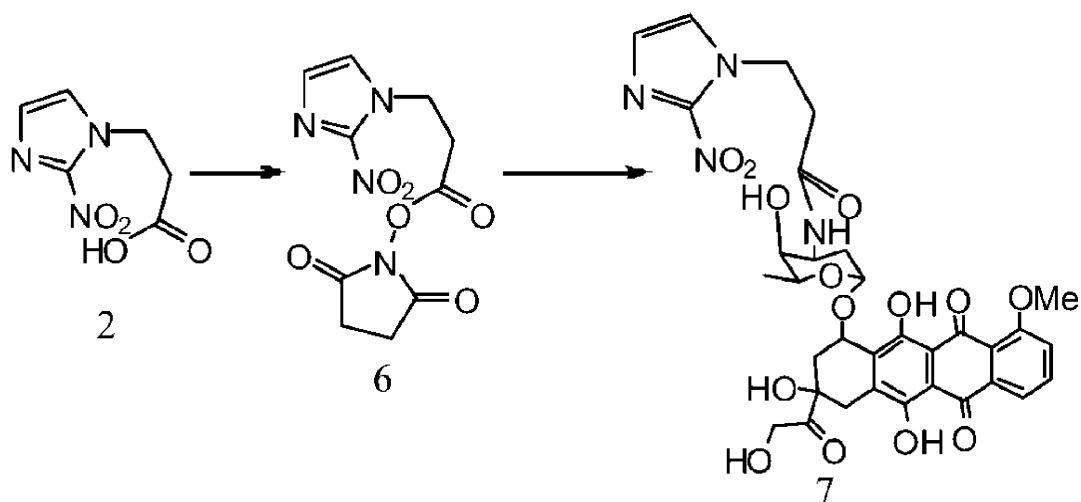
【0040】

例6：ドキシソルピシンのプロドラッグの製造

【0041】

【化8】

反応スキーム：



【0042】

(1) 化合物6の合成

例2と同様に合成した化合物2 (60 mg) に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (80.8 mg) 加え、N-ヒドロキシコハク酸イミド (48 mg) を加えN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) 中、氷冷下で1時間反応させその後室温で3時間反応させた。反応後、氷冷下で酢酸を数滴滴下し30分攪拌した。酢酸エチルと飽和食塩水で分液を行い、有機層をエバポレーションにより濃縮し、2-プロパノールを加えて加熱し不純物を濾別し、濾液を氷冷することにより化合物6を得た (50 mg)。

ESI-MS (M + H⁺) 理論値 : 283.068, 実測値 : 283.079

【0043】

(2) 化合物7の合成

ドキシソルピシン (3 mg) に化合物6 (2.2 mg) をN,N-ジメチルホルムアミド (50 μL) と水 (50 μL) の混合溶媒中で加え、トリエチルアミン (1.4 μL) を加え24時間室温において反応させた。反応後、逆相HPLCカラム (GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20X50 mm、流速 5 mL/min、展開液 : メタノール/水 = 60/40 (0 min) ~ 100/0 (20 min)) により精製した。

ESI-MS (M + Na⁺) 理論値 : 733.1967, 実測値 : 733.2013

こうして、上記反応スキームに記載の化合物7が得られた。

【0044】

例7：細胞生存率の評価 (低酸素環境応答性ドキシソルピシン)

ヒト膀胱がん細胞 (MIA PaCa-2、理研セルバンクより入手) MIA PaCa-2 を 5000 cells/well の濃度で撒きダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で24時間培養した後に化合物7を指定濃度で加え、6時間通常酸素濃度 (20%) 及び低酸素濃度 (0.1%) で培養した。培養後DMEM培地交換を行い、化合物を

10

20

30

40

50

除去し、通常酸素濃度のインキュベーターにおいて48時間培養し、その後WSTアッセイにより細胞の生存率を解析した。結果を図4に示す。

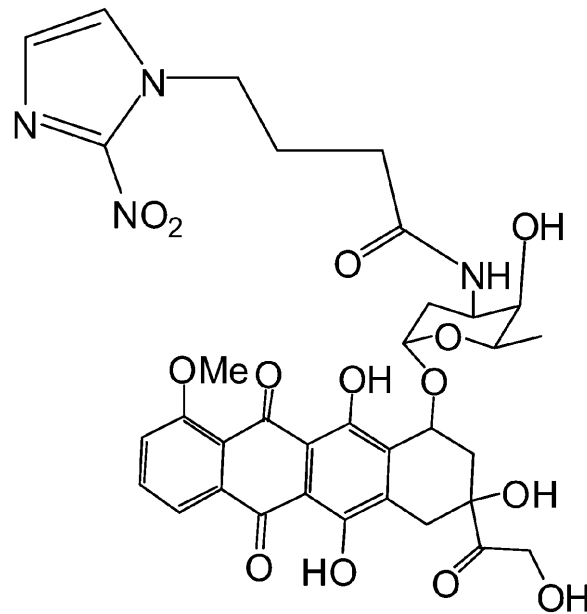
図より、化合物7は、通常酸素濃度下に比べて低酸素濃度下で、ヒト膀胱がん細胞の生存率を有意に低下させることがわかる。

【0045】

比較実験例：本発明の化合物と構造類似の公知化合物の細胞毒性についての比較

WO2009/018163 A1に記載されている下記化合物8を用意し、その化合物と本発明の範囲内の化合物（対応するリンカーが $-CH_2CH_2C(=O)-$ であること以外、ニトロイミダゾール及び薬剤との結合様式は同じ。実施例6の化合物7）について実施例7に記載の方法に従って試験したときの細胞生存率を比較した。結果を図5に示す。

【化9】



8

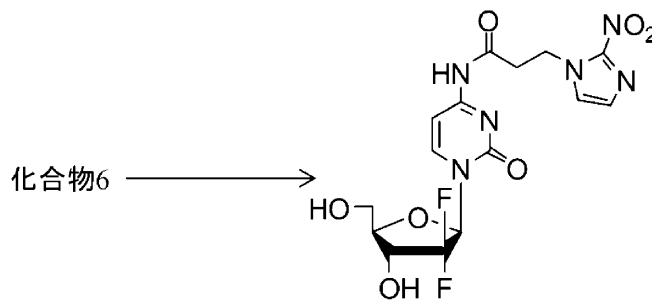
図から、本発明の化合物7は公知化合物8に比べてヒト膀胱がん細胞に対して有意に高い細胞毒性を示すことがわかる。

【0046】

例8：低酸素環境応答性ゲムシタビンプログの合成

【化10】

反応スキーム：



9

ピリジン（1 mL）に溶解させたゲムシタピン（22 mg）にトリメチルクロロシラン（47 μL）を加え0 で2時間撹拌した。その後、アセトニトリル（1 mL）に溶解さ

10

20

30

40

50

せた化合物 6 を加え 45 で 12 時間攪拌した。反応後エタノール (1 mL) を加え 45 で 30 分攪拌し、水 (1 mL) 加え 45 で 30 分攪拌した。エバポレーションにより溶媒を除去し、逆相 HPLC カラム (GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20 X 50 mm、流速 5 mL/min、展開液：アセトニトリル/水 = 20/80 (0 min) ~ 50/50 (30 min)) により精製した。

こうして精製し化合物 9 を得た。収率 20%

E S I - M S [M + H] ⁺ : 理論値 : 431.11、実測値 : 431.20)

【0047】

例 9 : 細胞生存率評価 (低酸素環境応答性ゲムシタピン)

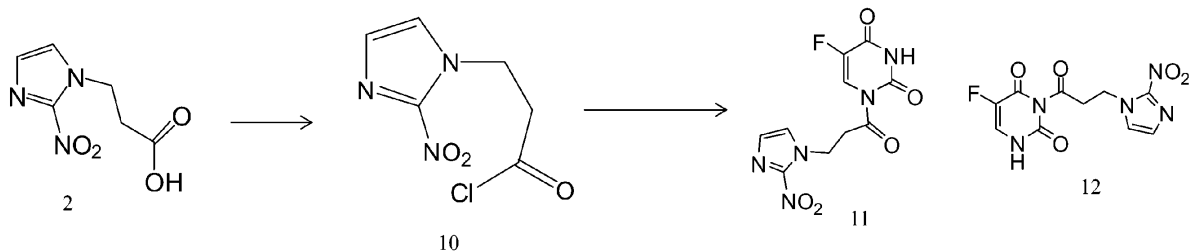
ヒト膵臓がん細胞 (MIA PaCa-2、理研セルバンクより入手) MIA PaCa-2 を 5000 cells/well の濃度で撒き DMEM 培地中で 24 時間培養した後に、化合物 9 を指定濃度で加え、1 時間通常酸素濃度 (20%) 及び低酸素濃度 (0.1%) で培養した。培養後培地交換を行い、化合物 9 を除去し、通常酸素濃度のインキュベーターにおいて 48 時間培養し、その後 WST アッセイにより細胞の生存率を解析した。結果を図 6 に示す。

【0048】

例 10 : 低酸素環境応答性フルオロウラシルプロドラッグの合成

【化 11】

反応スキーム :



塩化メチレン (1 mL) に溶解させた化合物 2 (30 mg) に塩化チオニル (500 μL) を加え 60 で 2 時間反応させた。反応後、エバポレーションにより溶媒を除去した。生成物 (化合物 10) を塩化メチレン (1 mL) に溶解させ、ピリジン (1 mL) に溶解させた 5-FU (21 mg) を加え 0 で 30 分反応させた後、室温で 12 時間反応させた。反応後エバポレーションにより溶媒を除去し、逆相 HPLC カラム (GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20 X 50 mm、流速 5 mL/min、展開液：アセトニトリル/水 = 20/80 (0 min) ~ 50/50 (30 min)) により精製し、化合物 11 及び 12 を混合物として得た。収率 45%

E S I - M S [M - H] ⁻ : 理論値 296.1、実測値 296.1)

【0049】

例 11 : 細胞生存率評価 (低酸素環境応答性 5-フルオロウラシル)

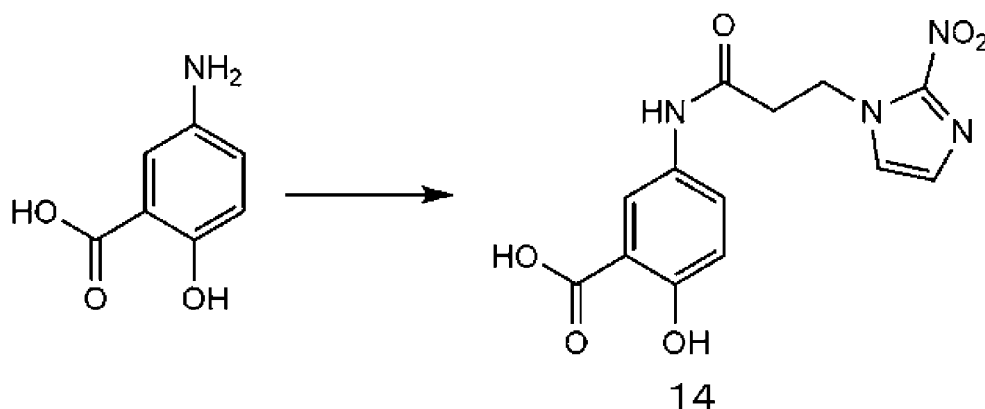
ヒト膵臓がん細胞 (MIA PaCa-2、理研セルバンクより入手) MIA PaCa-2 を 5000 cells/well の濃度で撒き、DMEM 培地中で 24 時間培養した後に、化合物 11 および 12 の混合物を指定濃度で加え、24 時間通常酸素濃度 (20%) 及び低酸素濃度 (0.1%) で培養した。培養後培地交換を行い、化合物を除去し、通常酸素濃度のインキュベーターにおいて 48 時間培養し、その後 WST アッセイにより細胞の生存率を解析した。結果を図 7 に示す。

【0050】

例 12 : 低酸素環境応答性メサラジンプロドラッグの合成

【化12】

反応スキーム：



10

例10と同様に合成した化合物10(0.11mmol)を塩化メチレン(1mL)に溶解させ、ピリジン(1mL)に溶解させたメサラジン(16mg)を加え0℃で30分反応させた後、室温で24時間反応させた。反応後エバポレーションにより溶媒を除去し、逆相HPLCカラム(GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20X50mm、流速 5ml/min、展開液：メタノール/水=20/80(0min)~80/20(30min))により精製し化合物14を得た。収率 35%

ESI-MS[M-H]⁻：理論値319.07、実測値 318.78

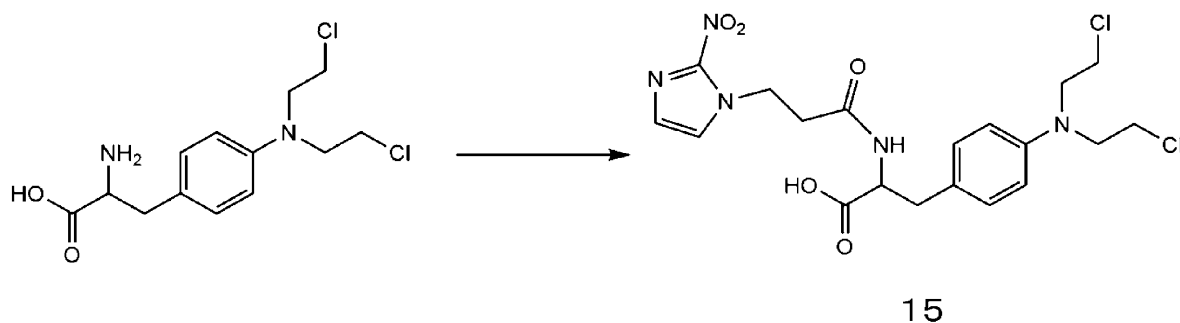
20

【0051】

例13：低酸素環境応答性メルファランプロドラッグの合成

【化13】

反応スキーム：



30

例10と同様に合成した化合物10(0.11mmol)を塩化メチレン(1mL)に溶解させ、ピリジン(1mL)に溶解させたメルファラン(32mg)を加え0℃で30分反応させた後、室温で24時間反応させた。反応後エバポレーションにより溶媒を除去し、逆相HPLCカラム(GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20X50mm、流速 5ml/min、展開液：メタノール/水=20/80(0min)~80/20(30min))により精製し化合物15を得た。収率 38%

ESI-MS[M-H]⁻：理論値470.10、実測値 469.63

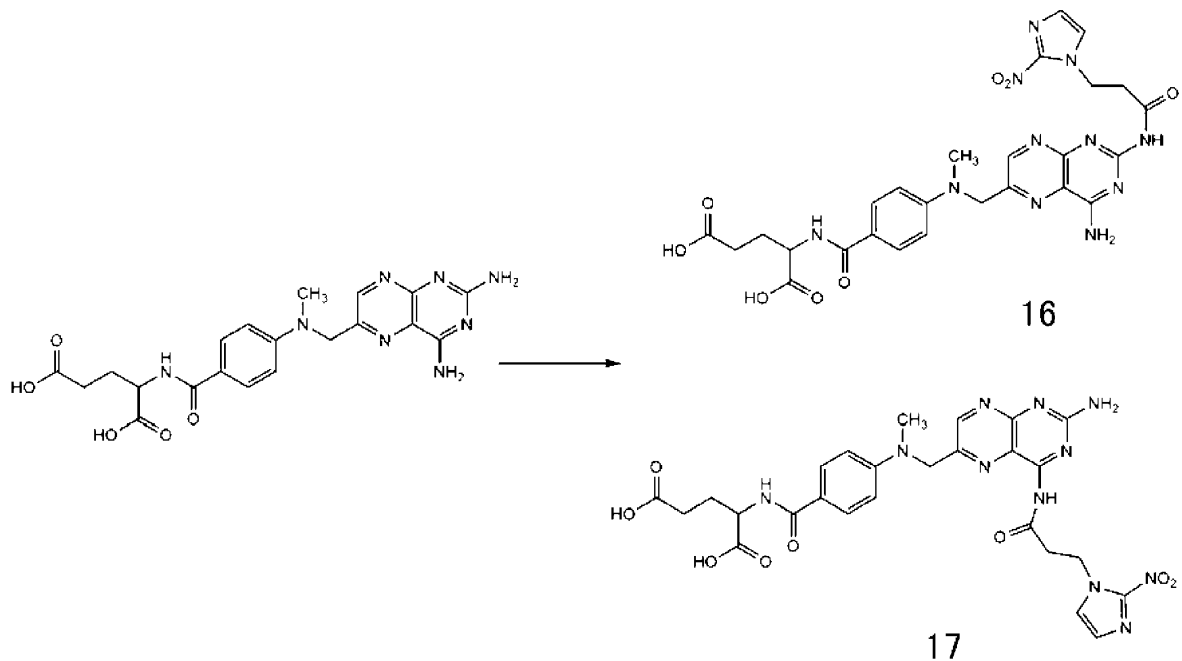
40

【0052】

例14：低酸素環境応答性メトトレキサートプロドラッグの合成

【化14】

反応スキーム：



例10と同様に合成した化合物10(0.11mmol)を塩化メチレン(1mL)に溶解させ、ピリジン(1mL)に溶解させたメトトレキサート(50mg)を加え0で30分反応させた後、室温で24時間反応させた。反応後エバポレーションにより溶媒を除去し、逆相HPLCカラム(GL Sciences Inc. Inertsil ODS-3 20X50mm、流速5ml/min、展開液：メタノール/水=20/80(0min)~80/20(30min))により精製し化合物16および化合物17を混合物で得た。収率51%

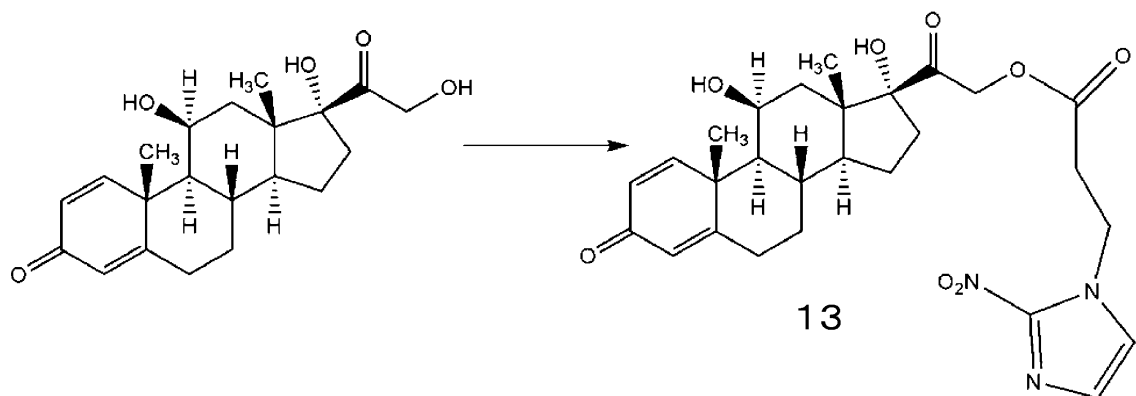
MALDI-TOF MS[M-H]⁻：理論値620.19、実測値620.38

【0053】

例15：低酸素環境応答性プレドニゾロンプロドラッグの合成

【化15】

反応スキーム：



例10と同様に合成した化合物10(0.16mmol)を塩化メチレン(1mL)に溶解させ、ピリジン(1mL)に溶解させたプレドニゾロン(84mg)を加え0で30分反応させた後、室温で24時間反応させた。反応後エバポレーションにより溶媒を除去し、飽和食塩水とクロロホルムにより分液を行い、硫酸ナトリウムで有機層を処理した後にエバポレーターを用いて濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製して化合物13を得た。収率42%

E S I - M S (M + H ⁺) 理論値 : 5 2 8 . 2 3 , 実測値 : 5 2 7 . 9 3
【 0 0 5 4 】

例 1 6 : 低酸素環境下でのプレドニゾロンプロドラッグからの薬剤の放出

ヒト膵臓がん細胞 (M I A P a C a - 2、理研セルバンクより入手) を細胞数が 1×10^4 cell / mL になるように調整し、96wellプレートに播種した。24時間後、化合物13を10 μ Mの濃度で加え、通常酸素濃度インキュベーター (20% O₂) と低酸素ワークステーション (0.1% O₂) でそれぞれ培養した。1時間後培地を回収し、更にトリプシンを加え細胞を回収した。回収した細胞を超音波処理により粉碎し、アセトニトリルで化合物を抽出して下記条件によりLC/MSによりプレドニゾロンの放出量解析を行った。

使用カラム : T S K g e l O D S - 1 0 0 Z (粒子径 3 μ m , 2 mm x 7 5 mm)
カラム

測定波長 : 2 5 0 nm

溶離液 A : 0.1 M 酢酸アンモニウム

溶離液 B : アセトニトリル

流速 : 0.2 mL / min

グラジエント

40 : 60 (溶離液 A : 溶離液 B) ~ 10 : 90 (20分)

この測定を行うことで低酸素環境と正常酸素環境での放出量の差を比較した。HPLCの結果を図8に示す。図より、低酸素環境下で多くのプレドニゾロンが放出されていることがわかる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 5 】

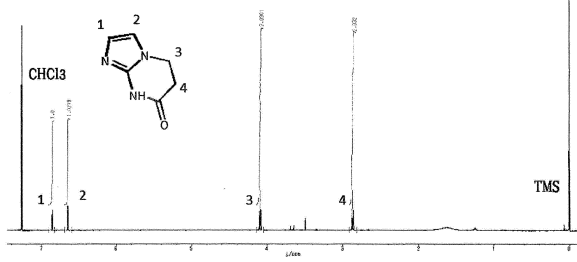
本発明によれば、正常酸素濃度環境下では親化合物の副作用が低減するが、低酸素環境下では親化合物本来の活性を示すプロドラッグが提供できる。したがって、本発明は、例えば、毒性の低減した治療的活性有機化合物を提供する製薬産業で利用できる。

10

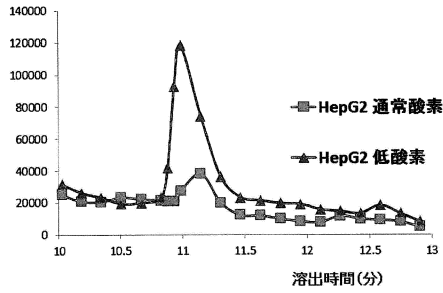
20

30

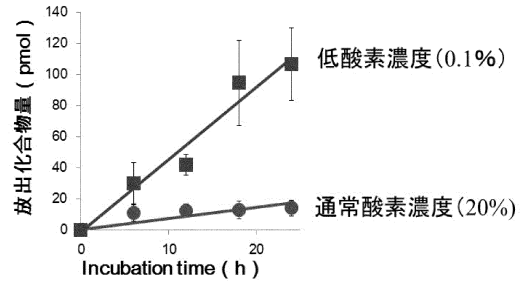
【 図 1 】



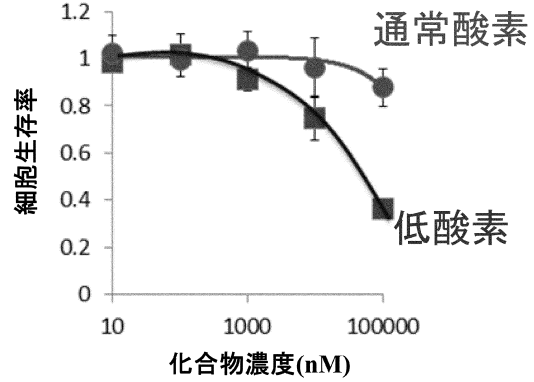
【 図 2 】



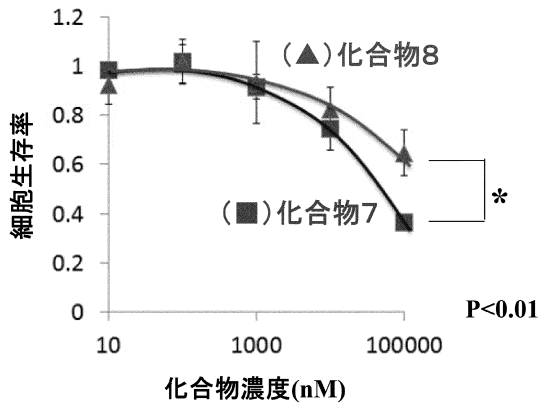
【 図 3 】



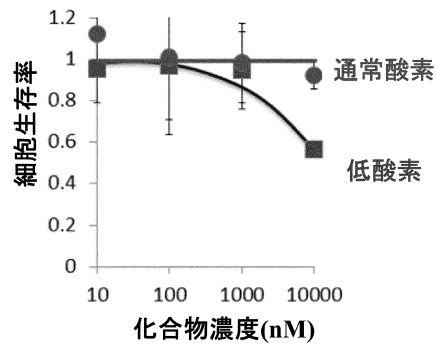
【 図 4 】



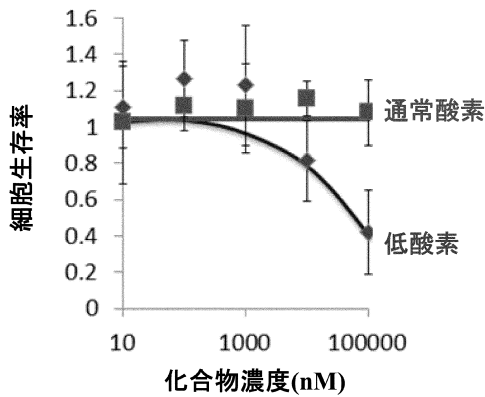
【 図 5 】



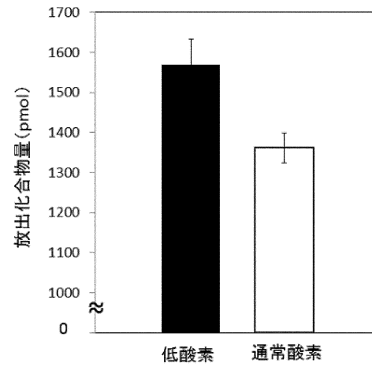
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068
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 2 3

審査官 清水 紀子

- (56)参考文献 国際公開第2009/018163(WO, A1)
 特表2010-508292(JP, A)
 特開2007-230958(JP, A)
 Hay, Michael P. et al., Nitroimidazole-based 'extruded mustards' designed as reductively activated hypoxia-selective cytotox, *Anti-Cancer Drug Design*, 1996年, Vol.11(5), p.383-402
 Hay, Michael P. et al., Hypoxia-selective antitumor agents. 8. Bis(nitroimidazolyl)alkanecarboxamides: a new class of hypox, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1994年, Vol. 37(3), p.381-91
 Li, Zejun et al., Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of three radioiodinated nitroimidazole analogues as tumor, *Nuclear Medicine and Biology*, 2005年, Vol.32(3), p.225-231

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 2 3 3 / 9 1
 C 0 7 D 4 0 3 / 0 6
 C 0 7 H 1 9 / 0 6
 A 6 1 K 3 1 / 4 1 6 8
 A 6 1 K 3 1 / 5 1 3
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 6 8
 A 6 1 K 4 7 / 4 8
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)