

明 細 書

発明の名称：

ピロロピリミジン骨格を有する新規なリン酸エステル化合物又はその薬学的に許容可能な塩

技術分野

[0001] 本発明は、優れた抗腫瘍効果を有するピロロピリミジン骨格を有する新規なリン酸エステル又はその薬学的に許容可能な塩に関するものである。また、本発明は、ピロロピリミジン骨格を有する新規なリン酸エステル又はその薬学的に許容可能な塩と、アルキル化剤及び／又は放射線療法との併用に関するものである。

背景技術

[0002] 細胞の増殖異常を特徴とする腫瘍は、現在もなお効果的な治療法が望まれている難治性疾患である。腫瘍の細胞増殖にも核酸の生合成が必須であり、その生合成に関与する分子の模倣化合物は、腫瘍の核酸代謝を攪乱する核酸代謝拮抗剤として開発が精力的に行われてきた。

[0003] しかし、効力の高い核酸代謝拮抗作用を持つ化合物が見出されても、毒性、又は薬物動態的な観点で問題を有している場合が多く、そのような化合物は臨床的に有用な薬剤になり得ない。そのような問題を克服し本来の効力を最大限引き出す為、このような化合物はプロドラッグに変換されることがある。これにより、化合物が抗腫瘍効果を持つのであれば化合物の薬物動態の改善、及び癌組織への作用選択性が向上することが期待される。しかし、このような期待がなされても、効力の高い核酸代謝拮抗作用を持つ化合物をプロドラッグに変換し、臨床的に有用な薬剤とすることは容易ではない。

[0004] ピロロピリミジン骨格を有する化合物として、4-アミノ-5-ハロゲノ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン骨格を有するデオキシリボヌクレオシド誘導体が報告されている（非特許文献1、2、3、4）。そして、5位にヨウ素を有するデオキシリボヌクレオシド誘導体が報告されている（特

許文献1)。しかし、これらのヌクレオシド誘導体に対応するヌクレオチド誘導体を示唆する記載はない。

[0005] また、4-アミノ-5-ハロゲノ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン骨格を有するデオキシリボヌクレオチド誘導体が報告されている（特許文献2、3）。また、デオキシリボヌクレオチド誘導体の5位にフッ素を有する誘導体が報告されている（特許文献3）。さらに、4-アミノ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン骨格を有するデオキシリボヌクレオチド誘導体が報告されている（特許文献1）。しかし、これらのヌクレオチド誘導体には、対応するヌクレオシド誘導体のプロドラッグを示唆する記載はない。

[0006] さらに、3'位にリン酸エステルを有するリボヌクレオチド誘導体も報告されている（非特許文献5）。しかし、これらのヌクレオチド誘導体には、ピロロ[2, 3-d]ピリミジン骨格の5位にハロゲンを有する化合物の記載はなく、対応するヌクレオシド誘導体のプロドラッグを示唆する記載もない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1: WO 2013/009735

特許文献2: WO 2014/124430

特許文献3: WO 2017/165489

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Liら、Acta Cryst. 2014, E70, o120

非特許文献2: Perlikovaら、ChemMedChem, 2013, 8, 832-846

非特許文献3: Nausら、Bioorg. Med. Chem, 20, 2012, 5202-5214

非特許文献4: Brownら、J Med Chem. 2016 July 28; 59(14): 6860-6877

非特許文献5: Ikeharaら、Chemical & Pharmaceutical

ical Bulletin 1966, 14 (12), 1338-46

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、ピリミジン骨格を有する既存の化合物より優れた安全性を有し、且つ高い抗腫瘍効果を示すピリミジン骨格を有する化合物を提供する。また、本発明は、当該ピリミジン骨格を有する化合物と、アルキル化剤及び／又は放射線療法との併用療法を提供する。

課題を解決するための手段

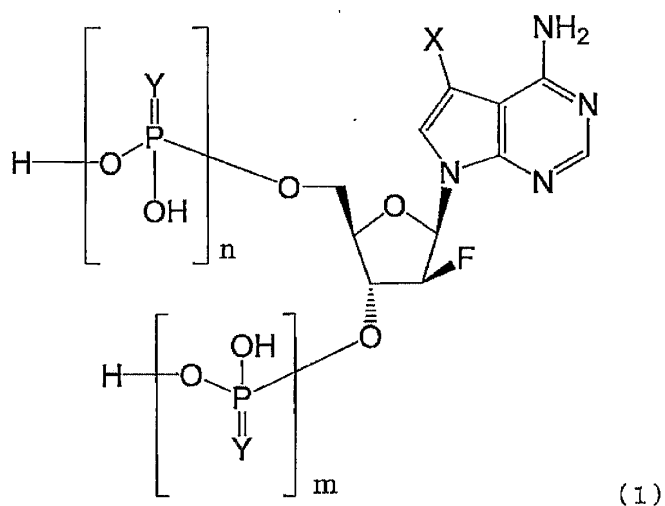
[0010] 本発明者らは、一般式（１）で表されるピロロ〔２，３－ｄ〕ピリミジン骨格を有するデオキシリボヌクレオチド誘導体を見出した。これらの化合物は、５位に特定のハロゲン（Ｙ）を有し、３′位又は５′位にリン酸エステルを有する化合物である。

[0011] すなわち、本発明の一形態は、下記を含む。

[１]

下記一般式（１）

[化１]



[式中、

Xは、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を示し、

Yは、同一又は異なって酸素原子、又は硫黄原子を示し、

mは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

nは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

$m + n = 1$ である。]

で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

[2]

Xは、臭素原子、又はヨウ素原子である、上記[1]に記載の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[3]

Xは、ヨウ素原子である、上記[2]に記載の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[4]

Yは、酸素原子である、上記[3]に記載の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[5]

$m = 0$ であり、 $n = 1$ である、上記[4]に記載の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[6]

Xが臭素原子、又はヨウ素原子であり、Yが酸素原子であり、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である、上記[1]に記載の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[7]

以下の化合物群：

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ[2, 3-d]ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3

ーヒドロキシテトラヒドロフランー2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート;

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート;

(3) O - ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル) O, O-ジヒドロジェン ホスホロチオエート;

(4) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-イル ジヒドロジェン ホスフェート; 及び

(5) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-クロロ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート

から選択される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

[8]

上記[1]～[7]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む抗腫瘍剤。

[9]

上記[1]～[7]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩及び薬学的に許容可能な担体を含有する医薬組成物。

[10]

経口剤又は注射剤として製剤化されたものである、上記[8]に記載の抗腫瘍剤又は上記[9]に記載の医薬組成物。

[1 1]

腫瘍の予防及び／又は治療方法であって、上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを特徴とする方法。

[1 2]

腫瘍の予防及び／又は治療方法であって、それを必要とする対象に、経口剤又は注射剤として製剤化された上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む、方法。

[1 3]

医薬組成物として使用するための上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

[1 4]

腫瘍を予防及び／又は治療するための、上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

[1 5]

経口剤又は注射剤として製剤化されたものである腫瘍の予防及び／又は治療に使用するための上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

[1 6]

抗腫瘍剤の製造のための上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[1 7]

医薬組成物を製造するための上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[1 8]

経口剤又は注射剤として製剤化されたものである抗腫瘍剤を製造するための上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[1 9]

前記腫瘍が、頭頸部癌（口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、唾液腺癌、甲状腺癌等）、消化器癌（食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臓癌、胆道癌（胆嚢・胆管癌等）、膵臓癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌等）等）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫等）、乳癌、生殖器癌（卵巣癌、子宮癌（子宮頸癌、子宮体癌等）等）、泌尿器癌（腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍等）、造血器腫瘍（白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等）、骨・軟部腫瘍、皮膚癌、及び脳腫瘍からなる群から選択される、上記 [8] に記載の抗腫瘍剤、上記 [1 1] 又は [1 2] に記載の腫瘍の予防及び／又は治療方法、上記 [1 3] ～ [1 5] のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、又は上記 [1 6] ～ [1 8] のいずれかに記載の使用。

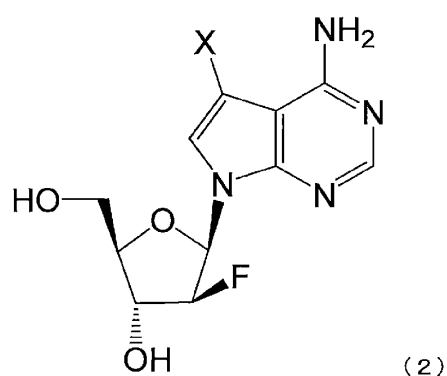
[2 0]

前記腫瘍が、脳腫瘍である、上記 [1 9] に記載の抗腫瘍剤、腫瘍の予防及び／又は治療方法、化合物又はその薬学的に許容可能な塩、又は使用。

[2 1]

下記一般式（2）

[化2]



[式中、

Xは、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を示す。]

で表される化合物又はその薬学的に許容な塩。

[2 2]

上記 [2 1] に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む抗腫瘍剤。

[2 3]

上記 [2 1] に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、薬学的に許容可能な担体とを含有する医薬組成物。

[2 4]

経口剤又は注射剤として製剤化されたものである、上記 [2 2] に記載の抗腫瘍剤又は上記 [2 3] に記載の医薬組成物。

[2 5]

上記 [2 1] に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを特徴とする腫瘍の予防及び／又は治療方法。

[2 6]

腫瘍を予防及び／又は治療するための、上記 [2 1] に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩。

[2 7]

医薬組成物又は抗腫瘍剤の製造のための上記 [2 1] に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[2 8]

前記腫瘍が、頭頸部癌（口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、唾液腺癌、甲状腺癌等）、消化器癌（食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臓癌、胆道癌（胆嚢・胆管癌等）、膵臓癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌等）等）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫等）、乳癌、生殖器癌（卵巣癌、子宮癌（子宮頸癌、子宮体癌等）等）、泌尿器癌（腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍等）、造血器腫瘍（白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等）、骨・軟部腫瘍、皮膚癌、及び脳腫瘍からなる群から選択される、上記 [2 2] に記載の抗腫瘍剤、上記 [2 5] に記載の腫瘍の予防及び／又は治療方法、上

記〔26〕に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、又は上記〔27〕に記載の使用。

〔29〕

前記腫瘍が、脳腫瘍である、上記〔28〕に記載の抗腫瘍剤、腫瘍の予防及び／又は治療方法、化合物又はその薬学的に許容可能な塩、又は使用。

〔30〕

アルキル化剤と併用することを特徴とする、上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩からなる抗腫瘍剤、又は医薬組成物。

〔31〕

アルキル化剤の抗腫瘍効果を増強するための、上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む抗腫瘍効果増強剤。

〔32〕

アルキル化剤の投与を受けた癌患者を治療するための、上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む抗腫瘍剤。

〔33〕

アルキル化剤と併用することを特徴とする、上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む腫瘍の治療方法。

〔34〕

上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を患者に投与することを含む、アルキル化剤の抗腫瘍効果を増強するための方法。

〔35〕

上記〔1〕～〔7〕及び〔21〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩からなる抗腫瘍剤、及びアルキル化剤を投与することを含

む、腫瘍の予防及び／又は治療方法。

[36]

アルキル化剤を併用投与することを特徴とする、腫瘍の治療のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[37]

アルキル化剤を併用投与することを特徴とする、アルキル化剤の抗腫瘍効果増強のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[38]

アルキル化剤の投与を受けた癌患者を治療することを特徴とする、腫瘍の治療のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[39]

アルキル化剤の投与を受けた癌患者を治療することを特徴とする、アルキル化剤の抗腫瘍効果増強のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

[40]

抗腫瘍剤の製造のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍剤は、アルキル化剤と併用投与することを特徴とする、使用。

[41]

アルキル化剤の抗腫瘍効果増強剤の製造のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍効果増強剤は、アルキル化剤と併用投与することを特徴とする、使用。

[42]

抗腫瘍剤の製造のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに

記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍剤は、アルキル化剤の投与を受けた癌患者に、又はアルキル化剤の投与を受けようとする癌患者に対して投与される、使用。

[43]

アルキル化剤の抗腫瘍効果増強剤の製造のための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍効果増強剤は、アルキル化剤の投与を受けた癌患者に、又はアルキル化剤の投与を受けようとする癌患者に対して投与される、使用。

[44]

アルキル化剤がテモゾロミドである、上記[30]若しくは[32]に記載の抗腫瘍剤、上記[31]に記載の抗腫瘍効果増強剤、[33]～[35]に記載の方法、又は[36]～[43]に記載の使用。

[45]

アルキル化剤に加えて、放射線療法と併用することを特徴とする、上記[30]若しくは[32]に記載の抗腫瘍剤、上記[31]に記載の抗腫瘍効果増強剤、[33]～[35]に記載の方法、又は[36]～[43]に記載の使用。

[46]

放射線療法と併用することを特徴とする、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩からなる抗腫瘍剤。

[47]

放射線療法の抗腫瘍効果を増強するための、上記[1]～[7]及び[21]のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む抗腫瘍効果増強剤。

[48]

放射線療法を受けた癌患者を治療するための、上記[1]～[7]及び[

２１］のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む抗腫瘍剤、又は医薬組成物。

〔４９〕

放射線療法と併用することを特徴とする、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩からなる腫瘍の予防及び／又は治療方法。

〔５０〕

上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を患者に投与することを含む、放射線療法の抗腫瘍効果を増強するための方法。

〔５１〕

放射線療法を受けた癌患者に、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩からなる抗腫瘍剤を投与することを含む、腫瘍の予防及び／又は治療方法。

〔５２〕

放射線療法を併用することを特徴とする、腫瘍の治療のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

〔５３〕

放射線療法を併用することを特徴とする、抗腫瘍効果増強のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

〔５４〕

放射線療法を受けた癌患者を治療することを特徴とする、腫瘍の治療のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

〔５５〕

放射線療法を受けた癌患者を治療することを特徴とする、抗腫瘍効果増強

のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用。

〔５６〕

抗腫瘍剤の製造のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍剤は、放射線療法を併用することを特徴とする、使用。

〔５７〕

抗腫瘍効果増強剤の製造のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍効果増強剤は、放射線療法を併用することを特徴とする、使用。

〔５８〕

抗腫瘍剤の製造のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍剤は、放射線療法を受けた癌患者に対して投与される、使用。

〔５９〕

抗腫瘍効果増強剤の製造のための、上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用であって、前記抗腫瘍効果増強剤は、放射線療法を受けた癌患者に対して投与される、使用。

〔６０〕

放射線療法に加えて、アルキル化剤と併用することを特徴とする、上記〔４６〕若しくは〔４８〕に記載の抗腫瘍剤、上記〔４７〕に記載の抗腫瘍効果増強剤、〔４９〕～〔５１〕に記載の方法、又は〔５２〕～〔５９〕に記載の使用。

〔６１〕

アルキル化剤がテモゾロミドである、上記〔６０〕に記載の抗腫瘍剤、抗腫瘍効果増強剤、方法、又は使用。

〔６２〕

上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物と、アルキル化剤とを含む組合せ物。

〔６３〕

上記〔１〕～〔７〕及び〔２１〕のいずれかに記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、アルキル化剤とを含む配合剤。

〔６４〕

放射線療法と併用することを特徴とする、上記〔６２〕に記載の組合せ物、又は上記〔６３〕に記載の配合剤。

〔６５〕

経口剤又は注射剤として製剤化されたものである、上記〔６２〕に記載の組合せ物、又は上記〔６３〕に記載の配合剤。

発明の効果

[0012] ピロロピリミジン骨格を有する新規のリン酸エステル化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、優れた安全性を有し、且つ高い抗腫瘍効果を示す抗腫瘍剤として有用である。また、本発明の新規のリン酸エステル化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、アルキル化剤及び／又は放射線療法と併用した場合に優れた併用効果を示す。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図１は、ヒト脳腫瘍細胞株（U-87MG）を移植したBALB/cAJcl-nu/nuマウスに比較例２及び実施例２の化合物を投与したときの評価最終日におけるIR（縦軸）を示す。

[図2] 図２は、ヒト脳腫瘍細胞株（U-87MG）を移植したBALB/cAJcl-nu/nuマウスへ比較例２及び実施例２の化合物を投与したときの各評価日（横軸）におけるBWC（縦軸）を示す。○はControl群（無処置）、■は比較例２、▲は実施例２の化合物投与群を示す。

[図3] 図３は、ヒト造血器腫瘍細胞株（MV-4-11）を移植したBALB/cAJcl-nu/nuマウスへ比較例２の化合物を投与したときの各評価日（横軸）におけるRTV（縦軸）を示す。○はControl群（無

処置)、■は比較例2の化合物投与群を示す。

[図4]図4は、ヒト造血器腫瘍細胞株(MV-4-11)を移植したBALB/c A J c l - n u / n u マウスへ実施例2の化合物を投与したときの各評価日(横軸)におけるBWC(縦軸)を示す。○はControl群(無処置)、■は比較例2の化合物投与群を示す。

[図5]図5は、ヒト造血器腫瘍細胞株(MV-4-11)を移植したBALB/c A J c l - n u / n u マウスへ実施例2の化合物を投与したときの各評価日(横軸)におけるRTV(縦軸)を示す。○はControl群(無処置)、▲は実施例2の化合物投与群を示す。

[図6]図6は、ヒト造血器腫瘍細胞株(MV-4-11)を移植したBALB/c A J c l - n u / n u マウスへ実施例2の化合物を投与したときの各評価日(横軸)におけるBWC(縦軸)を示す。○はControl群(無処置)、▲は実施例2の化合物投与群を示す。

[図7]図7は、ヒト造血器腫瘍細胞株(MV-4-11)を移植したBALB/c A J c l - n u / n u マウスへ実施例2の化合物、又は比較例2の化合物を投与したときのリンパ球(LYMPH)、単球(MONO)の評価最終日におけるControl群(無処置)に対する変動を示す。

[図8]図8は、ヒト脳腫瘍細胞株(U-87MG)に対して比較例2の化合物と放射線療法とを単剤又は併用で処理した際の細胞生存率を示す。

[図9]図9は、ヒト脳腫瘍細胞株(U-87MG)に対して比較例2の化合物とテモゾロミド(TMZ)とを単剤又は併用で処理した際の細胞生存率を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下に、本発明について詳細に説明するが、本発明がその範囲を以下に説明する実施形態に限定して解釈されることを意図しない。

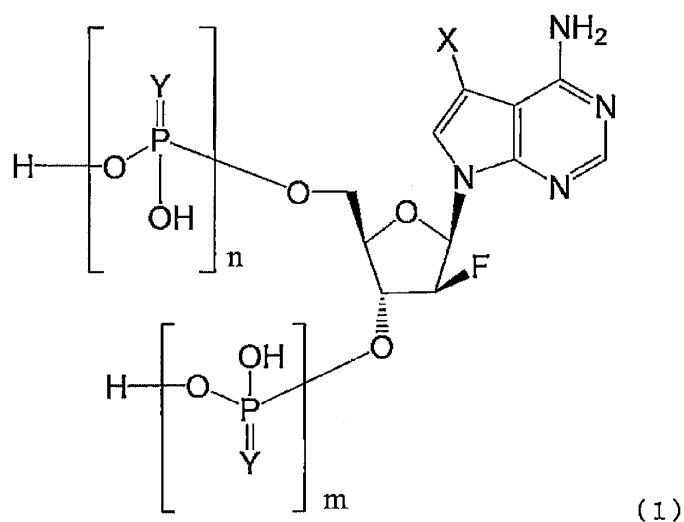
[0015] <用語の定義>

本明細書において用いられる用語は、そうでないことが特に示されない限り、当技術分野において通常用いられる意味を有するものとする。

[0016] <式(1)の化合物>

本発明の一実施形態において、下記式(1)：

[化3]



[式中、

Xは、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を示し、

Yは、同一又は異なって酸素原子、又は硫黄原子を示し、

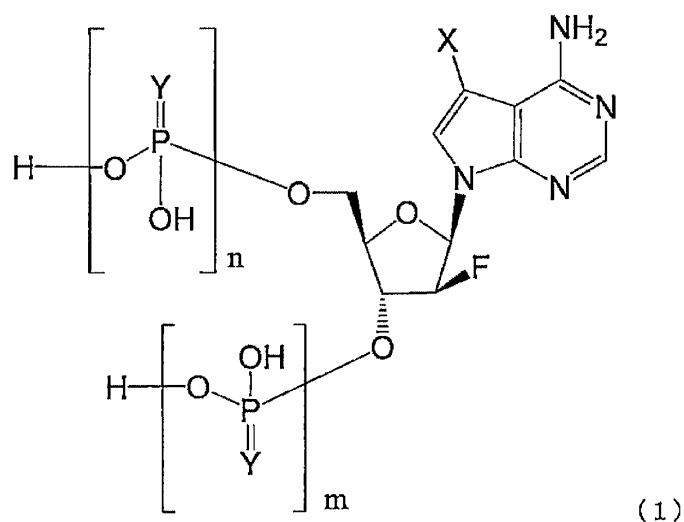
mは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

nは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

m + n = 1である。] で表される本発明の化合物は、ピロロ[2,3-d]ピリミジンの基本骨格とする化合物であり、新規な化合物である。

[0017] 本発明の一実施形態において、下記式(1)：

[化4]



[式中、

Xは、臭素原子、又はヨウ素原子を示し、

Yは、同一又は異なって酸素原子、又は硫黄原子を示し、

mは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

nは、0、又は1のいずれかの整数を示し、

$m + n = 1$ である。]で表される本発明の化合物は、ピロロ[2, 3-d]ピリミジンを基本骨格とする化合物であり、新規な化合物である。

[0018] 本発明の一般式(1)で表される化合物において、Xは、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を示し、好ましくは、Xは臭素原子、又はヨウ素原子を示し、さらに好ましくは、Xはヨウ素原子を示す。

[0019] 本発明の一般式(1)で表される化合物において、Yは、同一又は異なって酸素原子、又は硫黄原子を示す。本発明化合物は、抗腫瘍効果と毒性のバランスの観点から、好ましくは、Yは、酸素原子である。

[0020] 本発明の一般式(1)で表される化合物において、nは、0又は1のいずれかの整数を示す。すなわち、nは、5'位のヒドロキシル基に置換されて

いるリン酸の数を表す。本発明化合物において、好ましくは、 n は1である。本発明化合物は、リン酸置換を有する場合には化合物の水溶性を向上させることができ、経口剤としてだけでなく、注射剤としても使用することができる。

[0021] 本発明の一実施形態では、一般式(1)で表される化合物において、好ましくは、 X が塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子であり、 Y が酸素原子、又は硫黄原子であり、 $m + n = 1$ の化合物である。より好ましくは、 X が塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子であり、 Y が酸素原子であり、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である化合物である。

[0022] 本発明の一実施形態では、一般式(1)で表される化合物において、上記の置換基が挙げられるが、好ましくは、 X が臭素原子、又はヨウ素原子であり、 Y が酸素原子であり、 $m + n = 1$ の化合物である。より好ましくは、 X が臭素原子、又はヨウ素原子であり、 Y が酸素原子であり、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である。

[0023] 本発明の一実施形態では、本発明の一般式(1)で表される化合物において、好ましくは、 X がヨウ素原子であり、 Y が酸素原子、又は硫黄原子であり、 $m + n = 1$ である化合物である。より好ましくは、 X がヨウ素原子であり、 Y が酸素原子であり、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である化合物である。

[0024] さらに、本発明の一実施形態では、本発明の一般式(1)で表される化合物において、好ましくは、 X が臭素原子であり、 Y が酸素原子、又は硫黄原子であり、 $m + n = 1$ である化合物である。より好ましくは、 X が臭素であり、 Y が酸素原子であり、 $m = 0$ であり、 $n = 1$ である化合物である。

[0025] 具体的な本発明の化合物としては、以下の化合物又はその薬学的に許容な塩が例示できるが、これらには限定されない。

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ[2, 3-d]ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(3) O - ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル) O, O-ジヒドロジェン ホスホロチオエート

(4) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-イル ジヒドロジェン ホスフェート

(5) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-クロロ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート

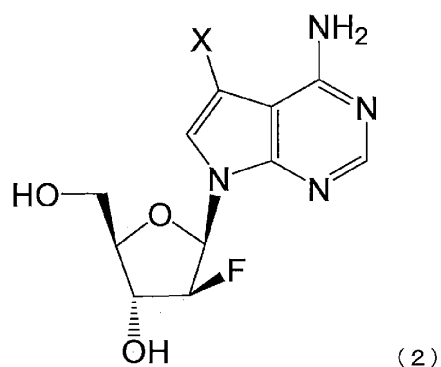
[0026] 本発明の化合物は、これら(1)～(5)の化合物のうち、好ましくは、以下からなる群から選択された化合物、又はその薬学的に許容な塩であってよい。

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ブロモ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート ; 又は

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル) - 4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート

[0027] 本発明の一実施形態において、下記式(2) :

[化5]



[式中、

Xは、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を示す。]

で表される化合物又はその薬学的に許容な塩を提供する。

[0028] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物は、以下からなる群から選択された化合物、又はその薬学的に許容な塩が提供される。

(1) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール、

(2) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール、又は

(3) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール

[0029] <式(1)で表される化合物の製造方法>

次に、本発明に係る化合物の製造法について説明する。

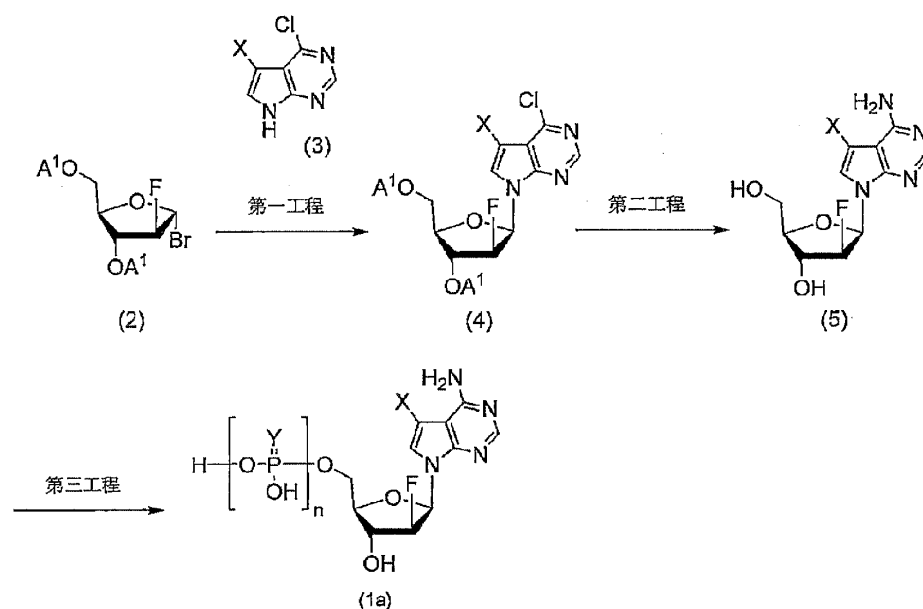
[0030] 本発明の式(1)で表される化合物は、例えば、下記の製造法又は実施例に示す方法等により製造することができる。ただし、本発明の式(1)で表

される化合物の製造法はこれら反応例に限定されるものではない。各工程で得られる生成物は、既知の分離精製手段、例えば濃縮、減圧濃縮、結晶化、溶媒抽出、再沈殿、クロマトグラフィーなどにより単離精製するか又は単離精製することなく、次工程に付すことができる。また、下記の製造法において、記載の有無にかかわらず必要に応じて保護基の導入、又は脱保護を行っても良く、各工程の順序は適宜変更してもよい。

[0031] 各工程で得られる生成物及び原料は、必要に応じて、容易に当該官能基に転化可能な保護基を導入することにより、各工程に効果的な場合、あるいは各工程を入れ替えることも可能になる。ここで用いられる保護基としては、例えば、文献記載の方法〔グリーン (Greene) 及びウッツ (Wuts) 著、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第5版、John Wiley & Sons Inc、2014年〕に記載の保護基等を用いることができ、各工程で用いる反応条件に応じて適宜選択すればよい。当該保護基を導入して反応を行なった後、必要に応じて保護基を除去することにより、所望の化合物を得ることができる。

[0032] 〔製造法1〕一般式(1a) (一般式(1)において、 $m=0$)の化合物の製造法

[化6]



[式中、X、Y、nは前述と同義であり、A¹はアシル基を示す]

[0033] (第一工程)

本工程では塩基存在下、一般式(2)で表される化合物と一般式(3)で表される化合物とを反応させて、一般式(4)で表される化合物を得る。

[0034] 一般式(2)で表される化合物のA¹は、アンモニアにより脱保護され得るものであれば、特に制限はないが、ベンゾイル基、アセチル基等のアシル基が挙げられる。

[0035] 本反応に用いる塩基としては、水酸化ナトリウム、水素化ナトリウム、水酸化リチウム、水素化カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基が挙げられる。本反応に用いる溶媒としては、反応に関与しないものであれば、特に制限無く、例えばアセトニトリル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、N, N-ジメチルアセトアミド、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。反応に際しては必要に応じトリス(2-(2-メトキシエトキシ)エチル)アミン等の有機3級アミンを用いてもよい。この反応において、一般式(2)

で表される化合物 1 モルに対し、一般式 (3) で表される化合物を 0.5 ～ 20 モル量程度、好ましくは 0.7 ～ 5 モル量程度、塩基を 1.0 ～ 40 モル量、好ましくは 1.4 ～ 10 モル量程度、有機 3 級アミンは 0.01 ～ 10 モル量、好ましくは 0.02 ～ 5 モル量程度使用する。反応温度は -30 ～ 100℃、好ましくは -20 ～ 60℃ であり、反応時間は 0.1 ～ 48 時間、好ましくは 1 ～ 24 時間である。

[0036] (第二工程)

本工程では、一般式 (4) で表される化合物とアンモニアとを反応させて、一般式 (5) で表される化合物を製造できる。

[0037] 本反応に用いる溶媒としては、反応に関与しないものであれば、特に制限無く、例えばジオキサン、ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン、N, N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、水等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。この反応において、一般式 (4) で表される化合物 1 モルに対し、アンモニアを 3 ～ 1000 モル量程度、好ましくは 5 ～ 500 モル量程度使用する。反応温度は 0 ～ 200℃、好ましくは 20 ～ 150℃ であり、反応時間は 0.1 ～ 48 時間、好ましくは 1 ～ 24 時間である。

[0038] (第三工程)

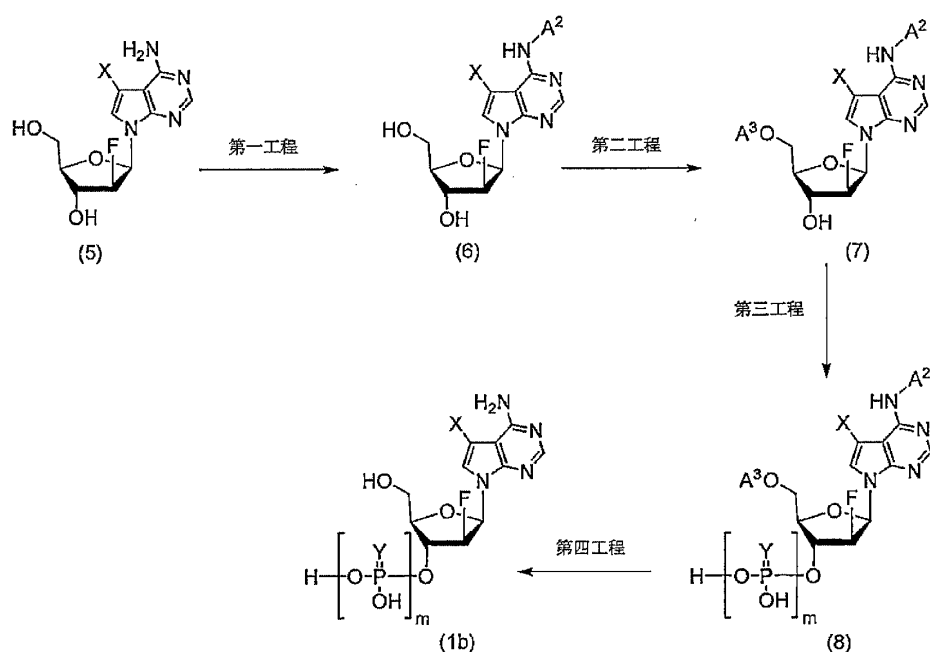
本工程では一般式 (5) で表される化合物とリン酸化試薬を反応させて、選択的に 5' 位のみをリン酸エステル化し、一般式 (1a) で表される化合物を得る。

[0039] 本反応に用いるリン酸エステル化試薬としては、5' 位を選択的にリン酸エステル化できるものであれば特に制限はないが、オキシ塩化リン、チオ塩化リンやオキシ臭化リン等のホスホリルハライド類が挙げられる。反応に際しては、必要に応じ塩基を用いてもよい。塩基としては、例えば、イミダゾール、1-メチルイミダゾール、トリエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、4-(N, N-ジメチルアミノ)ピリジン、ルチジン、コリジン

等の有機アミン類や炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の無機塩基が挙げられる。本反応に用いる溶媒としては、反応に関与しないものであれば、特に制限はなく、例えばリン酸トリメチル、リン酸トリエチル、リン酸トリプロピル、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン、N, N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。この反応において、一般式(5)で表される化合物1モルに対し、前記リン酸エステル化試薬を0.5～20モル量、好ましくは1～10モル量程度、塩基を0.5～20モル量、好ましくは1～10モル量程度使用する。反応温度は-30～100℃、好ましくは-20～60℃であり、反応時間は0.1～100時間、好ましくは1～48時間である。

[0040] [製造法2] 一般式(1b) (一般式(1)において、 $n=0$)の化合物の製造法

[化7]



[式中、X、Y、mは前述と同義であり、 A^2 、 A^3 はアシル基を示す]

[0041] (第一工程)

本工程では一般式(5)で表されるヌクレオシド化合物又はその塩とアミノ基の保護基の導入試薬とを反応させて、選択的にアミノ基のみを保護し、一般式(6)で表される化合物を得る。

[0042] 本反応で選択される保護基としては、塩基性条件下で除去できるものであればあれば特に制限はないが、 A^2-Z (Zはハロゲン等の脱離基を示す。)で表されるベンゾイルクロリド、p-クロロベンゾイルクロリド、アセチルクロリド等のハロゲン化アシルが挙げられる。

[0043] 本反応においてアミノ基を選択的に保護するためには、まず、トリメチルクロロシランを用いてトリメチルシリル化することにより、反応系中においてあらかじめ2つの水酸基を保護しておき、その後同反応系中において A^2-Z をアミノ基に反応させ、次いで更に同反応中においてアンモニアと反応させ、トリメチルシリル基を脱保護することにより、一般式(6)で表される化合物が得られる。本反応に用いる溶媒としては、反応に影響しないものであれば、特に制限がなく、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン、N，N-ジメチルアセトアミド、N，N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。反応に際しては、必要に応じ塩基を用いてもよい。塩基としては、例えば、イミダゾール、1-メチルイミダゾール、トリエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、4-(N，N-ジメチルアミノ)ピリジン、ルチジン、コリジン等の有機アミン類や炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の無機塩基が挙げられ、塩基のみを溶媒として使用しても良い。この反応において、一般式(5)で表せる化合物1モルに対し、トリメチルクロロシランを1～20モル量程度、好ましくは1～10モル

量程度使用し、前記の A^2-Z を 1～20 モル量程度、好ましくは 1～10 モル量程度使用し、塩基を 1～1000 モル量程度、好ましくは 1～500 モル量程度使用し、アンモニアを 1～10000 モル量程度、好ましくは 1～1000 モル量程度使用する。反応温度は $-30\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-10\sim 60^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は 0.1～100 時間、好ましくは 1～48 時間である。

[0044] (第二工程)

本工程では一般式 (6) で表される化合物と保護化試薬を反応させて、選択的に 5' 位の水酸基のみを保護し、一般式 (7) で表される化合物を得る。

[0045] 本反応で選択される保護基としては、塩基性条件下且つ A^2 と同時に除去できるものであればあれば特に制限はないが、保護基の導入試薬としては、 A^3-Z (Z はハロゲン等の脱離基を示す。) で表されるベンゾイルクロリド、 p -クロロベンゾイルクロリド、アセチルクロリド等のハロゲン化アシルが挙げられる。本反応に用いる溶媒としては、反応に影響しないものであれば、特に制限がなく、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン、 N,N -ジメチルアセトアミド、 N,N -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。反応に際しては、必要に応じ塩基を用いてもよい。塩基としては、例えば、イミダゾール、1-メチルイミダゾール、トリエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、 N -メチルモルホリン、ピリジン、4-(N,N -ジメチルアミノ)ピリジン、ルチジン、コリジン等の有機アミン類や炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の無機塩基が挙げられ、塩基のみを溶媒として使用しても良い。この反応において、一般式 (6) で表せる化合物 1 モルに対し、前記の A^3-Z を 1～20 モル量程度、好ましくは 1～10 モル量程度使用し、塩基を 1～1000 モル量程度、好ましくは 1～500 モル量程度使用する。

反応温度は $-30\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-10\sim 60^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は0.1～100時間、好ましくは1～48時間である。

[0046] (第三工程)

本工程では一般式(7)で表される化合物とリン酸化試薬を反応させて、3'位の水酸基をリン酸エステル化し、一般式(8)で表される化合物を得る。

[0047] 本反応に用いるリン酸エステル化試薬としては、オキシ塩化リン、チオ塩化リンやオキシ臭化リン等のホスホリルハライド類が挙げられる。本反応に用いる溶媒としては、反応に影響しないものであれば、特に制限はなく、例えばリン酸トリメチル、リン酸トリエチル、リン酸トリプロピル、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、ベンゼン、トルエン、N,N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。この反応において、一般式(7)で表される化合物1モルに対し、前記リン酸エステル化試薬を0.5～20モル量、好ましくは1～10モル量程度使用する。反応温度は $-30\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-20\sim 60^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は0.1～100時間、好ましくは1～48時間である。

[0048] (第四工程)

本工程では、一般式(8)で表される化合物に脱保護試薬を反応させて、 A^2 と A^3 を脱保護し、一般式(1b)で表される化合物を得る。使用される溶媒としては、反応に関与しないものであれば、特に制限がなく、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル、N,N-ジメチルアセトアミド、水等が挙げられ、それらを単独あるいは混合して用いることができる。使用される脱保護試薬としては、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン等のモノアルキルアミン、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等の無機塩基が

挙げられる。この反応において、一般式（８）で表される化合物１モルに対し、前記脱保護化試薬を１～１０００モル量、好ましくは１～１００モル量程度使用する。反応温度は－３０～１００℃、好ましくは－２０～６０℃であり、反応時間は０．１～１００時間、好ましくは０．２～４８時間である。

[0049] このようにして、一般式（１）で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩のうち、５'位にリン酸エステルを有する一般式（１a）、又は３'位にリン酸エステルを有する一般式（１b）を製造することができる。

[0050] このようにして製造された一般式（１）で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、通常用いられる方法により精製することができる。具体的な精製方法としては、シリカゲルクロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーによる分取、有機層と水層による抽出などが挙げられるが、これらの精製方法に限定されない。

[0051] 本発明化合物は、ピロロピリミジン骨格を有する新規なリン酸エステル化合物又はその薬学的に許容可能な塩であり、新規なヌクレオチド誘導体ともいうことができる。本発明化合物は、リン酸エステルが生体内で除去されることにより、抗腫瘍効果を有する活性ヌクレオシド誘導体に変換されるプロドラッグとして用いることができる。これにより、活性ヌクレオシド誘導体が有していた薬物動態をさらに改善することができ、さらに活性ヌクレオシド誘導体が有する毒性を緩和できるため、本発明化合物は、極めて優れた抗腫瘍剤として用いることができる。

[0052] 本発明化合物による毒性の緩和は、本発明化合物を投与する動物種に関係なく実現される。当該緩和は、例えば、投与された動物種の体重減少の抑制、血液成分減少の抑制などにより確認できる。

[0053] 本発明化合物が、光学異性体、立体異性体、回轉異性体、互変異性体等の異性体を有する場合には、特に明記しない限り、いずれの異性体も混合物も本発明化合物に包含されるものとする。

[0054] 本発明化合物の塩とは、薬学的に許容可能な塩を意味し、塩基付加塩又は

酸付加塩を挙げることができる。

[0055] 本発明化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、アモルファスであっても、結晶であってもよい。また、結晶形が単一であっても多形混合物であっても、本発明化合物又はその薬学的に許容可能な塩に包含される。本発明化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、溶媒和物（例えば、水和物等）であっても、無溶媒和物であってもよく、いずれも本発明化合物又はその薬学的に許容可能な塩に包含される。同位元素（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I など）などで標識された化合物も、本発明化合物又はその薬学的に許容可能な塩に包含される。

[0056] 本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、医薬として用いるにあたっては、必要に応じて薬学的に許容可能な担体を配合し、予防又は治療目的に応じて各種の投与形態を採用可能であり、当該医薬の形態としては、例えば、経口剤、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤等のいずれでもよく、好ましくは、経口剤、又は注射剤が採用され、より好ましくは注射剤が採用される。別の実施形態において、当該医薬の形態としては、より好ましくは経口剤が採用される。

[0057] 本発明化合物における各種の投与形態として、(1)～(5)に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の経口剤、又は注射剤が挙げられる。

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(3) O - ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオ

ロー3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル) O, O-ジ
ヒドロジェン ホスホロチオエート

(4) (2R, 3R, 4S, 5R)-5-(4-アミノ-5-ヨード-
7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)-4-フルオロ-2-
(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-イル ジヒドロジェン ホ
スフェート

(5) (2R, 3R, 4S, 5R)-5-(4-アミノ-5-クロロ-
7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)-4-フルオロ-3-
ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホス
フェート

本発明化合物における各種の投与形態として、好ましくは(1)に記載の
化合物又はその薬学的に許容可能な塩の経口剤、(1)に記載の化合物又は
その薬学的に許容可能な塩の注射剤、(2)に記載の化合物又はその薬学的
に許容可能な塩の経口剤、又は(2)に記載の化合物又はその薬学的に許容
可能な塩の注射剤である。

[0058] これらの投与形態は、各々当業者に既知の製剤方法により製造できる。

[0059] 本明細書で使用する場合、「治療する」又は「治療」は、癌を治癒又は改
善する目的で、又は癌の進行、発生、又は再発を抑制する、又は症状を緩和
する目的で治療することを含む。

[0060] 本明細書で使用される場合、「有効量」は、組織、系、動物又はヒトの生
物学的又は医学的応答を誘発する、薬学的に活性な薬剤の量を指す。それは
研究者、獣医、医師又は他の臨床医によって決められる。本発明の一実施形
態では、「有効量」は、ヒト患者における少なくとも1つの臨床症状を緩和
する医薬活性剤の量を意味する。本発明の一実施形態では、「有効量」は、
「予防的有効量」、すなわち、癌を予防するのに十分な量であってもよい。
本発明の一実施形態では、アルキル化剤と併用投与する場合の「有効量」は
、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩及びアルキル化剤のそれぞ
れの薬剤の薬効と副作用との両方を考慮して、単剤での有効量から適宜減量

しうる。本発明の一実施形態では、放射線療法と併用する場合の「有効量」は、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩及び放射線療法のそれぞれの効果と副作用との両方を考慮して、単剤での有効量から適宜減量しうる。

[0061] 本明細書で使用される場合、「対象」には、哺乳動物及び非哺乳動物の両方の動物、好ましくはヒトが含まれる。本発明の一実施形態では、対象はヒト患者であり、本明細書に開示される癌に関連する臨床症状又は医学的状态の治療が必要であると診断されたヒトであり得る。対象は、既存の癌の治療を必要としている場合があり、又は癌の発生のリスクを予防又は低減するための予防的治療を必要としている場合がある。本明細書で使用される場合、既存の癌の治療又は予防的治療を「必要としている」対象は、医療専門家による必要性の決定、ならびにそのような治療に対する患者の要望の両方を包含する。

[0062] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む抗腫瘍剤が提供される。また、本発明の別の実施形態において、腫瘍の予防及び／又は治療方法であって、それを必要とする対象に、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を投与することを含む方法が提供される。また、本発明のさらに別の実施形態において、抗腫瘍剤を製造するための本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。また、本発明のさらにまた別の実施形態において、腫瘍の予防及び／又は治療に使用するための本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

[0063] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物が提供される。本発明の一実施形態の医薬組成物は、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩、及び薬学的に許容可能な担体を含む。また、本発明の別の実施形態において、医薬組成物を製造するための本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。本発明の別の実施形態において、医薬として使用するための本発明の化合物

又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

[0064] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、アルキル化剤及び／又は放射線療法と併用することができる。

[0065] 本発明の一実施形態において、アルキル化剤と併用投与することを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。本発明の別の実施形態において、抗腫瘍剤を製造するためのアルキル化剤と併用投与することを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。本発明の別の実施形態において、腫瘍の治療するためのアルキル化剤と併用投与することを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

[0066] 本発明において、「アルキル化剤」は、癌に対して体内で活性であり、本発明の化合物とは異なる任意の医薬活性剤（又はその医薬上許容される塩）である。併用するアルキル化剤には、併用するアルキル化剤のプロドラッグ、遊離酸、遊離塩基及び薬学的に許容される塩が含まれる。一般に、任意の適切な追加の抗癌剤は、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩との任意の組み合わせで、単回投与製剤（例えば、固定用量薬物の組み合わせ）又は1つ以上の別々の形で使用され得る。単回投与製剤は、対象への医薬活性剤の同時（別々の医薬活性剤の同時投与）、逐次投与、又は個別投与を可能にするものである。特定の実施形態では、本発明の化合物及び併用するアルキル化剤は、数分間隔で、又は数時間間隔で、又は数日間隔で投与される。一実施形態では、1つ又は複数の追加の抗癌剤が、上記のように医薬製剤に含まれる。

[0067] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物と、アルキル化剤と、を含む組合せ物が提供される。この組合せ物に含まれる、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物と、アルキル化剤は、同時（別々の医薬活性剤の同時投与）、又は逐次投与、又は個別投与することができ、数分間隔で、又は数時間間隔で、又は数日間隔で、又は数週間間隔で、又は数ヶ月間隔で投与され得る。

。

[0068] 本発明において、「アルキル化剤」の例としては、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、サイトホスファン、エストラムスチン、イホスファミド、マンノムスチン、メクロレタミン、塩酸メクロレタミン、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トリスマスチン、クロロエチルアミン、トロホスファミド、及びウラシルマスタード；ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、ストレプトゾトシン、TA-07などのニトロソウレア；アルトレタミン、チオテパ、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスフォラミド、トリエチレンフォスフォラミド、トリメチロロメラミンなどのエチレンイミンとメチルアメラミン；アンバムスチン；ベンダムスチン；ダカルバジン；エトグルシド；イロフルベン；マフォスファミド；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；プロカルバジン；テモゾロミド；トレオスルファン；トリアジコン、ジアンヒドロガラクチトール等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0069] 本発明の好ましい実施形態において、「アルキル化剤」は、クロラムブシル、エストラムスチン、イホスファミド、メルファラン、カルムスチン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、アルトレタミン、ベンダムスチン、ダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド、ジアンヒドロガラクチトールである。本発明の更に好ましい実施形態において、「アルキル化剤」は、エストラムスチン、カルムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン、ベンダムスチン、プロカルバジン、テモゾロミド、ジアンヒドロガラクチトールである。本発明の最も好ましい実施形態において、「アルキル化剤」は、テモゾロミドである。

[0070] 本発明の一実施形態において、これらの「アルキル化剤」は、1種を使用してもよいし、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0071] 本発明の一実施形態において、アルキル化剤と併用投与することに加えて

、さらに放射線療法を併用することができる。

[0072] 本発明の一実施形態において、放射線療法と併用することを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。本発明の別の実施形態において、抗腫瘍剤を製造するための放射線療法と併用することを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩の使用が提供される。本発明の別の実施形態において、腫瘍の治療するための放射線療法と併用されることを特徴とする本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩が提供される。

[0073] 放射線療法を施すための技術は当技術分野で広く用いられており、たとえば「放射線治療計画ガイドライン2016」などに記載されている。これらの技術は、本明細書に記載されている発明において使用することができる。

[0074] 放射線療法は、大きく外部照射療法、内部放射線療法に大別される。外部照射療法は、体外から放射線を照射させて癌を治療することを指し、内部放射線療法は、体内から放射線を照射させて癌を治療することを指す。外部照射療法では、一般的な高エネルギー放射線治療、三次元原体照射、強度変調放射線治療（IMRT）、画像誘導放射線治療（IGRT）、定位放射線治療（SRT）、定位手術的照射（SRIS）などの治療方法又は照射方法が選択される。内部放射線療法では、密封小線源療法、及び非密封放射性同位元素による治療が選択される。これらの放射線療法において、放射線の種類は、電子線、X線、 α （アルファ）線、 β （ベータ）線、 γ （ガンマ）線、陽子線、重粒子線などが、癌腫に応じて選択される。本発明において、上記の放射線治療及び放射線の種類を組み合わせる用いることができ、さらにこれらに限定されるものではない。

[0075] 本発明の一実施形態において、放射線療法と併用することに加えて、さらにアルキル化剤を併用投与することができる。

[0076] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩は、単独で癌の治療に用いることができ、さらに放射線療法と併用することもできる。さらに加えて、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な

塩を単独で癌の治療に用いる場合、又は放射線療法と併用する場合において、アルキル化剤と併用投与することができる。

[0077] 本発明の一実施形態では、アルキル化剤及び／又は放射線療法と組み合わせて使用される式(1)の化合物は、以下からなる群から選択されたものと、その薬学的に許容な塩である。

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

(3) O - ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル) O, O - ジヒドロジェン ホスホロチオエート

(4) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - イル ジヒドロジェン ホスフェート

(5) (2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ジヒドロジェン ホスフェート

[0078] 本発明の一実施形態において、本発明の化合物は、より好ましくは以下からなる群から選択された化合物、又はその薬学的に許容な塩であってよい。

(1) ((2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ

ー7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)ー4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート;又は

(2) ((2R, 3R, 4S, 5R)ー5-(4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)ー4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェート

[0079] 本発明の一実施形態では、アルキル化剤及び/又は放射線療法と組み合わせて使用される式(2)の化合物は、以下からなる群から選択されたものと、その薬学的に許容な塩である。

(1) (2R, 3R, 4S, 5R)ー5-(4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)ー4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-オール、

(2) (2R, 3R, 4S, 5R)ー5-(4-アミノ-5-ブromo-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)ー4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-オール、又は

(3) (2R, 3R, 4S, 5R)ー5-(4-アミノ-5-クロロ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)ー4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-オール

[0080] 本発明の特定の実施形態では、本発明の化合物は、有効量で投与される。

[0081] 一実施形態では、アルキル化剤は、有効量で投与される。

[0082] 特定の実施形態では、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と併用されるアルキル化剤が、治療的有效量で投与される。

[0083] 一実施形態では、本発明の化合物及びアルキル化剤は同時に投与される。

[0084] 一実施形態では、本発明の化合物及びアルキル化剤は別々に投与される。

[0085] 一実施形態では、本発明の化合物及びアルキル化剤は逐次的に投与される。一実施形態では、本発明の化合物は、アルキル化剤の前に投与される。一実施形態では、本発明の化合物は、アルキル化剤の後に投与される。

- [0086] 一実施形態では、本発明の化合物の投与及び放射線療法は同時に実施される。
- [0087] 一実施形態では、本発明の化合物の投与及び放射線療法は逐次的に実施される。一実施形態では、本発明の化合物は、放射線療法の前に投与される。一実施形態では、本発明の化合物は、放射線療法の後に投与される。
- [0088] 一実施形態では、本発明に記載の化合物又はその薬学的に許容可能な塩と、アルキル化剤が、少なくとも1つの医薬的に許容される担体をさらに含む単一の医薬製剤を介して投与される。
- [0089] 薬学的に許容可能な担体としては、製剤素材として慣用の各種有機或いは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、着色剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等として配合される。また、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、甘味剤、安定化剤等の製剤添加物を用いることもできる。
- [0090] 経口用固形製剤を調製する場合は、本発明の化合物に賦形剤、必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。
- [0091] 注射剤を調製する場合は、本発明の化合物にpH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内及び静脈内用注射剤を製造することができる。
- [0092] 上記の各投与単位形態中に配合されるべき本発明の化合物の有効量は、これを適用すべき対象の症状、その剤形等により一定ではないが、一般に投与単位形態あたり、経口剤ではプロドラッグとして、0.05～10000mg、注射剤ではプロドラッグとして、0.01～5000mg、坐剤ではプロドラッグとして、1～10000mgとすることができる。本発明の一実施形態において、投与単位形態中に配合されるべき本発明の化合物の有効量は、好ましくは、投与単位形態あたり、経口剤ではプロドラッグとして、0

、0.05～1000mg、注射剤ではプロドラッグとして、0.01～500mg、坐剤ではプロドラッグとして、1～1000mgである。

[0093] また、上記投与形態を有する薬剤の1日あたりの投与量は、対象の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、本発明の化合物として通常成人（体重50kg）1日あたりプロドラッグとして、0.05～50000mg、好ましくは0.1～10000mgとすることができ、好ましくは、経口剤ではプロドラッグとして、0.05～1000mg、注射剤ではプロドラッグとして、0.01～500mg、坐剤ではプロドラッグとして、1～1000mgである。

[0094] 本発明化合物の適用対象となる腫瘍は、特に制限はされないが、例えば、頭頸部癌（口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、唾液腺癌、甲状腺癌等）、消化器癌（食道癌、胃癌、十二指腸癌、肝臓癌、胆道癌（胆嚢・胆管癌等）、膵臓癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌等）等）、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、中皮腫等）、乳癌、生殖器癌（卵巣癌、子宮癌（子宮頸癌、子宮体癌等）等）、泌尿器癌（腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍等）、造血器腫瘍（白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等）、骨・軟部腫瘍、皮膚癌、脳腫瘍等が挙げられる。

[0095] 本発明の化合物で治療される脳腫瘍は、転移性脳腫瘍及び原発性脳腫瘍を含む。

[0096] 脳腫瘍は、特に制限はないが、例えば、転移性脳腫瘍（例えば、肺癌、乳癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、胆道癌、子宮癌等の脳転移）、毛様細胞性星状細胞腫、びまん性星細胞腫、乏突起膠腫・乏突起星細胞腫、退形成性星細胞腫・退形成性乏突起膠腫、退形成性乏突起星細胞腫、膠芽腫、上衣腫、退形成性上衣腫、神経節膠腫、中枢性神経細胞腫、髓芽腫、胚腫（germinoma）、中枢神経系悪性リンパ腫、髄膜腫、神経鞘腫、GH産生下垂体腺腫、PRL産生下垂体腺腫、ACTH産生下垂体腺腫、非機能性下垂体腺腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫、血管芽腫、類上皮腫等が挙げられる。

[0097] 本発明化合物はプロドラッグとして用いられることから、その活性化化合物

である一般式（１）〔式中、 m 及び n が０であり、他の置換基は上記と同義である〕で表される化合物、又は薬学的に許容可能な塩の適用対象となる癌腫も、上記と同様の腫瘍が挙げられる。

[0098] 本発明の化合物はプロドラッグとして用いられることから、その活性化化合物である、

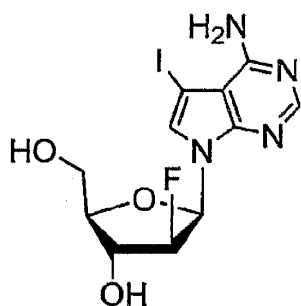
(2 R, 3 R, 4 S, 5 R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7 H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール ; 又は

(2 R, 3 R, 4 S, 5 R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7 H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール ; 又は

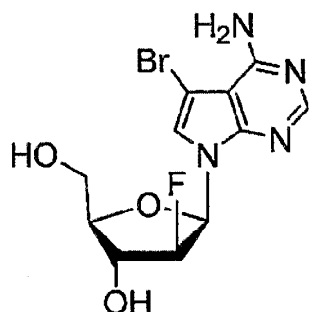
(2 R, 3 R, 4 S, 5 R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 7 H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オール

で表される下記の化合物、又はその薬学的に許容可能な塩の適用対象となる癌腫としても、上記と同様の腫瘍が挙げられる。

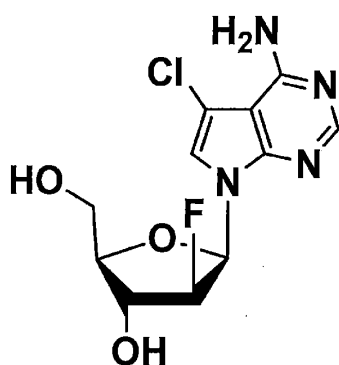
[化8]



[化9]



[化10]



実施例

[0099] 以下に実施例及び試験例を示し、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0100] 実施例で用いた各種試薬は、特に記載の無い限り市販品を使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、及び、塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、昭光サイエンティフィック社製、又は、バイオタージ社製プレパックドカラムを用いた。

[0101] 逆相分取HPLCカラムクロマトグラフィーは下記条件にて実施した。インジェクション量とグラディエントは適宜設定して実施した。

カラム：OSAKA SODA製CAPCELL PAK C18 MG II I, 30×50mm, 5 μ m

UV検出：254nm

カラム流速：40mL/分

移動相：水/アセトニトリル（0.1%ギ酸）

インジェクション量：0.1–1.0mL

グラディエント 水/アセトニトリル 10%→90%（7分）

[0102] NMRスペクトルは、AL400（400MHz；日本電子（JEOL））、Mercury400（400MHz；アジレント・テクノロジー）、AVANCE NEO（400MHz；ブルカー）、AVANCE III HD（500MHz；ブルカー）型スペクトロメータを使用し、重溶媒中にテトラメチルシランを含む場合は内部基準としてテトラメチルシランを用い、それ以外の場合には内部基準としてNMR溶媒を用いて測定し、全 δ 値をppmで示した。

[0103] LCMSスペクトルは、Waters社製SQDを用いて下記2つの条件にて測定し、[M+H]⁺値を示した。

MS検出：ESI positive

UV検出：254及び210nm

カラム流速：0.5mL/分

移動相：水/アセトニトリル（0.1%ギ酸）

インジェクション量：1 μ L

カラム：Acquity BEH、2.1×50mm、1.7 μ m

グラディエント：

測定時間（分） 水/アセトニトリル（0.1%ギ酸）

0	95	5
0.1	95	5
2.1	5	95
3.0	STOP	

[0104] 略号の意味を以下に示す。

s : シングレット

d : ダブルレット

t : トリプレット

q : カルテット

dd : ダブルダブルレット

m : マルチプレット

br : ブロード

brs : ブロードシングレット

DMSO-d₆ : 重ジメチルスルホキシド

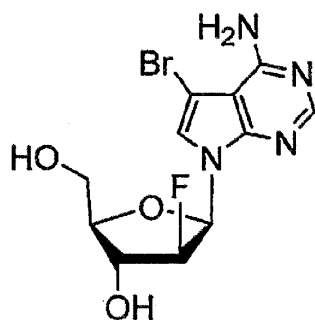
D₂O : 重水

HPMC : ヒドロキシプロピルメチルセルロース

[0105] [比較例 1]

(2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ブロモ - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オールの合成

[化11]



[0106] (工程 1)

5 - ブロモ - 4 - クロロ - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン (2.

2 g) をアセトニトリル (80 mL) に懸濁させ、トリス (2- (2-メトキシエトキシ) エチル) アミン (0.17 mL) とパウダー状の水酸化カリウム (1.1 g) を加え、50℃で5時間加熱撹拌させた。この混合液に、文献 (Bioorg. Med. Chem, 20, 2012, 5202-5214) 記載の方法で得られた ((2R, 3R, 4S, 5R) -3- (ベンゾイロキシ) -5-ブromo-4-フルオロテトラヒドロフラン-2-イル) メチル ベンゾエート (4.5 g) のアセトニトリル (20 mL) 溶液を室温で加え、同温度で1.5時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、LCMS スペクトルにより ((2R, 3R, 4S, 5R) -3- (ベンゾイロキシ) -5- (5-ブromo-4-クロロ-7H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-7-イル) -4-フルオロテトラヒドロフラン-2-イル) メチル ベンゾエートの存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、当該ベンゾエート (5.1 g) を得た。

[0107] (工程2)

本比較例の工程1で得られたベンゾエート (3.0 g) を25%アンモニア水溶液 (16 mL) と1, 4-ジオキサン (16 mL) の混合液に懸濁させ、120℃で5時間撹拌した。この溶液を一部採取して、LCMS スペクトルにより標題化合物の存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、標記化合物 (1.3 g) を得た。

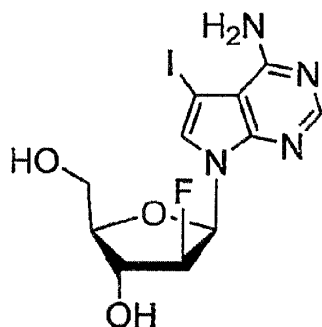
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) δ (ppm): 3.55-3.67 (2 H, m), 3.74-3.78 (1 H, m), 4.29-4.37 (1 H, m), 5.02-5.17 (1 H, m), 5.06 (1 H, t, $J = 5.6$ Hz), 5.87 (1 H, d, $J = 4.8$ Hz), 6.52 (1 H, dd, $J = 4.4, 14$ Hz), 6.83 (2 H, brs), 7.48 (1 H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.09 (1 H, s)

ESI-MS: m/z 347, 349 (MH⁺)

[0108] [比較例2]

(2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピ
ロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロ
キシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オールの合成

[化12]

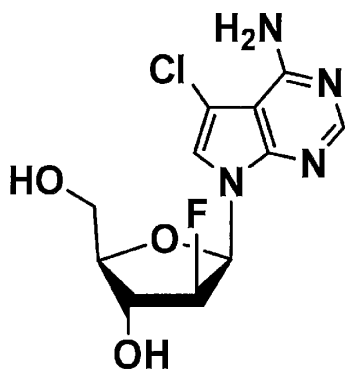


文献 (Bioorg. Med. Chem, 20, 2012, 5202 - 5214) 記載の方法により合成した。

[0109] [比較例3]

(2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - クロロ - 7H - ピ
ロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロ
キシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - オールの合成

[化13]



5-クロロ-4-クロロ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジンから比較例1記載の方法により合成した。

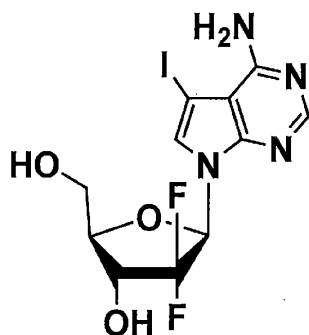
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) : 3.63–3.79 (3 H, m), 4.34–4.39 (1 H, m), 5.09–5.20 (2 H, m), 5.90 (1 H, s), 6.56 (1 H, d, $J = 12$ Hz), 6.93 (2 H, brs), 7.46 (1 H, s), 8.12 (1 H, s)

ESI-MS: m/z 303, 305 (MH $^+$)

[0110] [比較例4]

(2R, 3R, 4S, 5R)–5–(4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)–4、4-ジフルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-オールの合成

[化14]



文献 (ChemMedChem, 8, 2013, 832–846) 記載の方法により合成した。

[0111] [実施例1]

(2R, 3R, 4S, 5R)–5–(4-アミノ-5-ブromo-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)–4-フルオロ-3-ヒドロ

キシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェートの合成

比較例1より得られた(2R, 3R, 4S, 5R)-5-(4-アミノ-5-ブロモ-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)-4-フルオロ-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3-オール(300mg)をリン酸トリエチル(5mL)に溶解させ、氷冷下オキシ塩化リン(0.16mL)を加え、4℃で12時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、LCMSスペクトルにより標題化合物の存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、標記化合物(220mg)を得た。

[0112] [実施例2]

((2R, 3R, 4S, 5R)-5-(4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)-4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル ジヒドロジェン ホスフェートの合成

比較例2に記載の化合物(200mg)をリン酸トリエチル(2.5mL)に溶解させ、氷冷下オキシ塩化リン(0.11mL)を加え、4℃で12時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、LCMSスペクトルにより標題化合物の存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、標記化合物(158mg)を得た。

[0113] [実施例3]

O-(((2R, 3R, 4S, 5R)-5-(4-アミノ-5-ヨード-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-7-イル)-4-フルオロ-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル) O, O-ジヒドロジェン ホスホロチオエートの合成

比較例2に記載の化合物(100mg)をリン酸トリエチル(1mL)に溶解させ、氷冷下2, 6-ジメチルピリジン(0.12mL)とチオ塩化リン(0.077mL)を加え、氷冷下3時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、LCMSスペクトルにより標題化合物の存在を確認した後、通常用

いられる方法により精製し、標記化合物（99 mg）を得た。

[0114] [実施例4]

(2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 3 - イル ジヒドロジェン ホスフェートの合成

(工程1)

比較例2に記載の化合物（200 mg）をピリジン（2.5 mL）に溶解させ、クロロトリメチルシラン（0.32 mL）を加え、室温で2時間撹拌させた。その後反応溶液に塩化ベンゾイル（0.025 mL）を加え、室温で3時間撹拌させた。その後反応液を氷冷し、水（1 mL）と30%アンモニア水溶液（1 mL）を加え、室温で撹拌した。この溶液を一部採取して、LCMSスペクトルによりN - (7 - ((2R, 3S, 4R, 5R) - 3 - フルオロ - 4 - ヒドロキシ - 5 - (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン - 2 - イル) - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 4 - イル) ベンズアミドの存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、当該ベンズアミド（105 mg）を得た。

[0115] (工程2)

本実施例の工程1で得られたベンズアミド（105 mg）をピリジン（2 mL）に溶解させ、塩化ベンゾイル（0.025 mL）を加え、室温で12時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、LCMSスペクトルにより（(2R, 3R, 4S, 5R) - 5 - (4 - ベンズアミド - 5 - ヨード - 7H - ピロロ [2, 3-d] ピリミジン - 7 - イル) - 4 - フルオロ - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メチル ベンゾエートの存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、当該ベンゾエート（105 mg）を得た。

[0116] (工程3)

本実施例の工程2で得られたベンゾエート（105 mg）をリン酸トリエ

チル（１．５ｍＬ）に溶解させ、氷冷下オキシ塩化リン（０．０６５ｍＬ）を加え、室温で３６時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、ＬＣＭＳスペクトルにより（（２Ｒ，３Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－（４－ベンズアミド－５－ヨード－７Ｈ－ピロロ〔２，３－ｄ〕ピリミジン－７－イル）－４－フルオロ－３－（ホスホノオキシ）テトラヒドロフラン－２－イル）メチルベンゾエートの存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、当該ベンゾエート（１００ｍｇ）を得た。

[0117] （工程４）

本実施例の工程３で得られたベンゾエート（１００ｍｇ）を４０％メチルアミン水溶液（３ｍＬ）に溶解させ、室温で２時間撹拌させた。この溶液を一部採取して、ＬＣＭＳスペクトルにより標題化合物の存在を確認した後、通常用いられる方法により精製し、標記化合物（２１ｍｇ）を得た。

[0118] [実施例５]

（（２Ｒ，３Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－５－クロロ－７Ｈ－ピロロ〔２，３－ｄ〕ピリミジン－７－イル）－４－フルオロ－３－ヒドロキシテトラヒドロフラン－２－イル）メチル ジヒドロジェン ホスフェートの合成

比較例３より得られた（２Ｒ，３Ｒ，４Ｓ，５Ｒ）－５－（４－アミノ－５－クロロ－７Ｈ－ピロロ〔２，３－ｄ〕ピリミジン－７－イル）－４－フルオロ－２－（ヒドロキシメチル）テトラヒドロフラン－３－オール（１００ｍｇ）から実施例１と同様の方法により標記化合物（８８ｍｇ）を得た。

[0119] 実施例１～５の化合物の化学構造式及び物性値を以下の表１に示す。

[0120]

[表1]

化合物番号	構造式	¹ H-NMR δ (ppm)	MS
実施例 1		(DMSO-d ₆) 3.94-4.09(3H, m), 4.31-4.38(1H, m), 5.03-5.18(1H, m), 6.00(1H, brs), 6.59(1H, dd, J = 4.4, 16 Hz), 6.90(1H, brs), 7.45(1H, d, J = 2 Hz), 8.12(1H, s)	m/z 427, 429 (MH ⁺)
実施例 2		(DMSO-d ₆) 3.97-4.12(3H, m), 4.35-4.41(1H, m), 5.05-5.20(1H, m), 6.06(1H, brs), 6.59(1H, dd, J = 4.4, 16 Hz), 6.76(1H, brs), 7.48(1H, d, J = 2 Hz), 8.14(1H, s)	m/z 475 (MH ⁺)
実施例 3		(DMSO-d ₆) 3.97-4.18 (3H, m), 4.36-4.43 (1H, m), 5.06-5.21 (1H, m), 6.08 (1H, brs), 6.60 (1H, dd, J = 4.4, 16.3 Hz), 6.77 (2H, brs), 7.51 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.16 (1H, s)	m/z 491 (MH ⁺)
実施例 4		(DMSO-d ₆) 3.58-3.67(2H, m), 3.98-4.05(1H, m), 4.54-4.62(1H, m), 5.12-5.26(1H, m), 6.42(1H, dd, J = 3.2, 20 Hz), 7.47(1H, d, J = 2.4 Hz), 8.09(1H, s)	m/z 475 (MH ⁺)
実施例 5		(DMSO-d ₆) 3.97-4.12 (3H, m), 4.35-4.41 (1H, m), 5.07-5.22 (1H, m), 6.07 (1H, brs), 6.62 (1H, dd, J = 4.4, 16 Hz), 6.96 (2H, brs), 7.41 (1H, d, J = 1.6 Hz), 8.14 (1H, s)	m/z 383, 385 (MH ⁺)

[0121] 上記実施例及び比較例の化合物を、以下の試験法を用いて評価した。

[0122] 〔試験例 1〕 マウスにおけるプロドラッグの確認及び吸収性の評価 1

比較例 1 の化合物、実施例 1 の化合物のトリエチルアミン塩、比較例 2 の化合物、及び実施例 2 の化合物の各投与量は、それぞれ $50 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ 、 $62 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ （フリー体換算で $50 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ ）、 $3 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ 、及び $3.6 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ となるように、0.5%HPMC水溶液で投与液を調製した。なお、実施例 1 の化合物のトリエチルアミン塩は、投与液を調製する際は、1モル当量のトリエチルアミンを添加することで調製した。

[0123] 比較例 3 の化合物、及び実施例 5 の化合物の各投与量は、それぞれ $3 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ 、及び $3.8 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ となるように、0.5%HPMC水溶液で投与液を調製した。

[0124] なお、「 $\text{mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ 」の記載は、例えば「 $50 \text{ mg} / 10 \text{ mL} / \text{kg}$ 」は、マウスの体重 1 kg あたり 50 mg の評価対象化合物を 10 mL の投与液に分散又は溶解させたことを意味し、以降の記載も同様である。

[0125] これらの投与液を、それぞれ経口投与ゾンデを用いて非絶食条件下のマウス（B a l b / c A，雄）に経口投与した。

[0126] 投与 0.5、1、2、4、6 時間後に、イソフルラン麻酔下で、専用の針（アニマルランセット）及びヘパリンコート済みヘマトクリット管を用いて、顔面静脈より採血した。

[0127] 採取した血液は、速やかに遠心分離（ 13000 rpm ，2 分， 4°C ）により血漿を調製し、除タンパク処理を行った後に本化合物の血漿中濃度を LC/MS/MS にて測定した。

[0128] 薬物血中濃度－時間曲線下面積（AUC）の値は、解析ソフト P h o e n i x（登録商標） W i n N o n l i n（登録商標）を用いて算出した。

[0129] 投与後 0～6 時間における AUC（AUC_{0-6hr}）について、比較例 1、2 と実施例 1 のトリエチルアミン体、及び実施例 2 の結果は表 2 に示し、比較例 3 と実施例 5 の結果は表 3 に示す。表 2 及び表 3 中、「比較例 1」、「比較例 2」、及び「比較例 3」はそれぞれ、「比較例 1 の化合物」（B

r 体)、「比較例 2 の化合物」(I 体)、及び「比較例 3 の化合物」(C I 体)を表す。

[0130] [表2]

化合物	用量	AUC 0-6hr ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$)
比較例 1	50mg/kg (0.14mmol/kg)	20.25
実施例 1 の トリエチルアミン塩	62mg/kg (0.12mmol/kg)	活性化合物である比較例 1 として 28.37
比較例 2	3mg/kg (7.6 μmol /kg)	0.21
実施例 2	3.6mg/kg (7.6 μmol /kg)	活性化合物である比較例 2 として 0.34

[0131] [表3]

化合物	用量	AUC 0-6hr ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$)
比較例 3	3mg/kg (9.9 μmol /kg)	2.07
実施例 5	3.8mg/kg (9.9 μmol /kg)	活性化合物である比較例 3 として 2.02

[0132] これより、実施例 1 のリン酸エステルは、活性化合物である比較例 1 (B r 体) のプロドラッグであることが分かった。また、実施例 2 のリン酸エステルは、活性化合物である比較例 2 (I 体) のプロドラッグであることが分かった。さらに、実施例 1 ~ 2 のリン酸エステルは、比較例 1 ~ 2 で示した対応する活性化合物そのものを経口投与するよりも、AUC が増加する傾向にあった。また実施例 5 の化合物は活性化合物である比較例 3 (C I 体) のプロドラッグであることが分かった。

[0133] [試験例 2] マウスにおけるプロドラッグの確認及び吸収性の評価 2

実施例 1 の化合物の 2 ナトリウム塩、実施例 2 の化合物の 2 ナトリウム塩、実施例 3 の化合物の 2 ナトリウム塩、実施例 4 の化合物の 2 ナトリウム塩、実施例 5 の化合物の 2 ナトリウム塩の各投与量は、それぞれ 26 mg / 5 mL / kg、12 mg / 5 mL / kg、12 mg / 5 mL / kg、12 mg

／5 mL／kg、及び11 mg／5 mL／kgとなるように、生理食塩水に溶解し投与液を調製した。なお、実施例1～4の化合物の2ナトリウム塩については、投与液を調製する際に、2モル当量の水酸化ナトリウムを添加することで調製した。

[0134] 非絶食条件下のマウス（B a l b／c A，雄）を専用固定台に固定し、消毒用エタノールにて消毒後、シリンジと注射針を用い、尾静脈部位から投与した。

[0135] 投与0.25、0.5、1、2、4、6時間後に専用の針（アニマルランセット）及びヘパリンコート済みヘマトクリット管を用いて、顔面静脈より採血した。

[0136] 採取した血液は、速やかに遠心分離（13000 rpm，2分，4℃）により血漿を調製し、除タンパク処理を行った後に本化合物の血漿中濃度をLC／MS／MSにて測定した。

[0137] AUCの値は、解析ソフトPhoenix（登録商標）WinNonlin（登録商標）を用いて算出した。

[0138] 実施例1～4の化合物のナトリウム塩の投与後0～6時間におけるAUC（AUC 0－6 hr）の結果を表4に示し、実施例5の化合物のナトリウム塩の投与後0～6時間におけるAUC（AUC 0－6 hr）の結果を表5に示す。表4及び表5中、「比較例1」、「比較例2」、及び「比較例3」はそれぞれ、「比較例1の化合物」（Br体）、「比較例2の化合物」（I体）、及び「比較例3の化合物」（Cl体）を表す。

[0139] [表4]

化合物	用量	AUC 0－6hr ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$)
実施例1の2ナトリウム塩	26mg/kg	活性化合物である比較例1として15.9 実施例1として0.15
実施例2の2ナトリウム塩	12mg/kg	活性化合物である比較例2として6.07 実施例2として0.64
実施例3の2ナトリウム塩	12mg/kg	活性化合物である比較例2として4.28 実施例3として0.18
実施例4の2ナトリウム塩	12mg/kg	活性化合物である比較例2として9.76 実施例4として9.35

[0140] [表5]

化合物	用量	AUC 0-6hr ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$)
実施例5の2ナトリウム塩	11mg/kg	活性化化合物である比較例3として6.29 実施例5として0.08

[0141] これより、実施例1のリン酸エステルは、活性化化合物である比較例1（Br体）のプロドラッグであることが分かった。また、実施例2～4は、活性化化合物である比較例2（I体）のプロドラッグであることが分かった。更に実施例5は、活性化化合物である比較例（CI体）のプロドラッグであることが分かった。

[0142] [試験例3] ヒト腫瘍細胞株における増殖抑制活性の評価1

各種ヒト腫瘍細胞株を培地中に懸濁させ、マルチウェルプレートの各ウェルに播種し、培養した。培養開始翌日に段階希釈した化合物溶液を添加し、更に3日間培養した。細胞数の計測はセルタイターグロ（プロメガ社製）を用いて、プロメガ社の推奨するプロトコールに基づき行った。以下の式より細胞生存率を算出し、50%阻害する化合物の濃度（IC50（ μM ））を求めた。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (T / C) \times 100$$

T：化合物を添加したウェルの発光強度

C：化合物を添加しなかったウェルの発光強度

[0143] 比較例1の化合物（Br体）を用いた場合の結果を表6に示し、比較例2の化合物（I体）を用いた場合の結果を表7に示す。表6及び表7中、「比較例1」及び「比較例2」はそれぞれ、「比較例1の化合物」（Br体）及び「比較例2の化合物」（I体）を表す。

[0144]

[表6]

種類	細胞株	比較例1	種類	細胞株	比較例1
		IC50 (μ M)			IC50 (μ M)
ヒト骨腫瘍	A673	0.13	ヒト肺癌	H2126	0.11
ヒト乳癌	HCC1806	0.13	ヒト肺癌	H2170	0.26
ヒト乳癌	MCF7	0.08	ヒト肺癌	H226	0.13
ヒト脳腫瘍	A172	0.14	ヒト肺癌	H23	0.05
ヒト脳腫瘍	LN229	0.63	ヒト肺癌	H441	0.14
ヒト頭頸部癌	CA9-22	0.08	ヒト肺癌	H460	0.08
ヒト頭頸部癌	DOK	0.11	ヒト肺癌	H526	0.17
ヒト造血器腫瘍	HL60	0.30	ヒト肺癌	H69	0.11
ヒト造血器腫瘍	K562	0.11	ヒト肺癌	Mero82	0.46
ヒト造血器腫瘍	MOLT4	0.06	ヒト肺癌	Mero83	0.35
ヒト造血器腫瘍	MV-4-11	0.03	ヒト肺癌	MES01	0.41
ヒト造血器腫瘍	RPMI8226	0.34	ヒト肺癌	SDM103T2	0.58
ヒト造血器腫瘍	CCRFCEM	0.05	ヒト肺癌	Mero48a	0.16
ヒト造血器腫瘍	BHL-89	0.23	ヒト肺癌	SPC111	0.36
ヒト造血器腫瘍	BC3	0.02	ヒト卵巣癌	A2780	0.05
ヒト造血器腫瘍	BCP1	0.11	ヒト膀胱癌	BXPC3	0.27
ヒト腎癌	786-0	0.22	ヒト膀胱癌	CAPAN2	0.05
ヒト大腸癌	DLD1	0.05	ヒト膀胱癌	CFPAC1	0.11
ヒト大腸癌	HCT116	0.12	ヒト膀胱癌	MIAPACA2	0.07
ヒト大腸癌	HT29	0.11	ヒト前立腺癌	DU145	0.09
ヒト大腸癌	SW48	0.13	ヒト皮膚癌	COLO792	0.89
ヒト大腸癌	SW620	0.23	ヒト胃癌	HS746T	0.25
ヒト肺癌	DMS273	0.40	ヒト胃癌	MKN45	0.21
ヒト肺癌	EBC1	0.06	ヒト胃癌	N87	0.03
ヒト肺癌	H1703	0.02	ヒト胃癌	NUGC3	0.07
ヒト肺癌	H1975	0.07	ヒト膀胱癌	HT1197	0.13
ヒト肺癌	H2081	0.09	ヒト膀胱癌	HT1376	0.06

[0145]

[表7]

種類	細胞株	比較例2
		IC50 (μM)
ヒト脳腫瘍	A172	0.03
ヒト脳腫瘍	LN229	0.02
ヒト造血器腫瘍	MOLT4	0.01
ヒト造血器腫瘍	MV-4-11	0.004
ヒト造血器腫瘍	CCRFCEM	0.04
ヒト大腸癌	DLD1	0.04
ヒト大腸癌	HCT116	0.09
ヒト大腸癌	HT29	0.13
ヒト肺癌	H1703	0.04
ヒト肺癌	H69	0.06
ヒト膀胱癌	CFPAC1	0.05
ヒト膀胱癌	MIAPACA2	0.04
ヒト胃癌	MKN45	0.13

[0146] これより、比較例1及び比較例2に記載の化合物では多種の腫瘍に対して幅広く抗腫瘍作用を有することが分かった。

[0147] [試験例4] ヒト腫瘍細胞株における増殖抑制活性の評価2

各種ヒト腫瘍細胞株を培地中に懸濁させ、マルチウェルプレートの各ウェルに播種し、培養した。培養開始翌日に段階希釈した化合物溶液を添加し、更に3日間培養した。細胞数の計測はセルタイターグロ（プロメガ社製）を用いて、プロメガ社の推奨するプロトコールに基づき行った。以下の式より細胞生存率を算出し、50%阻害する化合物の濃度（IC50（nM））を求めた。

[0148] 細胞生存率（%）＝（T／C）×100

T：化合物を添加したウェルの発光強度

C：化合物を添加しなかったウェルの発光強度

比較例1と比較例2の化合物を用いた場合の結果を表8に示し、比較例3の化合物を用いた場合の結果を表9に示す。表8中、「比較例1」及び「比較例2」はそれぞれ、「比較例1の化合物」（Br体）及び「比較例2の化合物」（I体）を表す。また、表9中、「比較例3」は「比較例3の化合物

」(C I 体)を表す。

[0149] [表8]

種類	細胞株	比較例 1	種類	細胞株	比較例 2
		IC50 (nM)			IC50 (nM)
ヒト肺癌	A549	24	ヒト肺癌	A549	14
ヒト肺癌	H1650	11	ヒト肺癌	H1650	8
ヒト肺癌	H2122	17	ヒト肺癌	H2122	9
ヒト肺癌	H358	69	ヒト肺癌	H358	52
ヒト肺癌	HCC827	228	ヒト肺癌	HCC827	176
ヒト脳腫瘍	A431	32	ヒト脳腫瘍	A431	18
ヒト大腸癌	RKO	31	ヒト乳癌	SK-BR-3	23
ヒト乳癌	SK-BR-3	26			

[0150] [表9]

種類	細胞株	比較例 3 IC50 (nM)
ヒト肺癌	A549	54
ヒト肺癌	H1650	31
ヒト肺癌	H2122	58
ヒト肺癌	H358	273
ヒト肺癌	HCC827	795
ヒト脳腫瘍	A431	124
ヒト大腸癌	RKO	135
ヒト乳癌	SK-BR-3	88

[0151] これより、比較例 1、比較例 2 及び比較例 3 に記載の化合物では多種の腫瘍に対して幅広く抗腫瘍作用を有することが分かった。

[0152] [試験例 5] ヒト腫瘍細胞株における増殖抑制活性の評価 3

各種ヒト腫瘍細胞株を培地中に懸濁させ、マルチウェルプレートの各ウェルに播種し、培養した。培養開始翌日に段階希釈した化合物溶液を添加し、更に 3 日間培養した。細胞数の計測はセルタイターグロ（プロメガ社製）を用いて、プロメガ社の推奨するプロトコールに基づき行った。以下の式より細胞生存率を算出し、50%阻害する化合物の濃度（IC50 (nM)）を求めた。

[0153] 細胞生存率 (%) = (T / C) × 100

T : 化合物を添加したウェルの発光強度

C : 化合物を添加しなかったウェルの発光強度

結果を表10に示す。表10中、「比較例2」及び「比較例4」はそれぞれ、「比較例2の化合物」(I体)及び「比較例4の化合物」(ジフルオロ体)を表す。

[0154] [表10]

種類	細胞株	比較例2 IC50 (nM)	比較例4 IC50 (nM)
ヒト肺癌	A427	98	1136
ヒト肺癌	H520	29	465

[0155] これより、比較例2の化合物は比較例4の化合物に比べてIC50が10倍以上低く、優れた抗腫瘍作用を有することが分かった。

[0156] [試験例6] マウスにおける抗腫瘍効果及び毒性の評価1

ヒト脳腫瘍細胞株(U-87MG)をBALB/c A J c l - n u / n u マウスの右側胸部の皮下に移植した。腫瘍移植後に腫瘍の長径(mm)及び短径(mm)を測定し、腫瘍体積(tumor volume: TV)を算出後、各群の平均TVが均等になるように各群にマウスを割り付け、群分けを実施した日をDay 0とした。

[0157] Day 1より比較例2の化合物(I体)については12mg/kg/dayで連日経口投与し、実施例2の化合物については14.4mg/kg/dayで連日経口投与した。その後は許容出来る程度の体重減少まで投与を継続し評価する事とした。以下の文献も参考に、体重減少が20%以上となる時点まで投与及び評価観察を継続する事とした。LABIO 21, No. 30, OCT. 2007, P27

[0158] 抗腫瘍効果及び毒性の指標として、各群のtumor volume (TV) 及びbody weight (BW) を評価し、下式によりDay 0に対する相対腫瘍体積(relative tumor volume: RTV) を元にした腫瘍増殖の抑制率(Inhibition Rate: IR

）及び体重変化（body weight change : BWC）を求め、Control群（無処置）、実施例2の化合物投与群、比較例2の化合物投与群のIR及びBWCを比較した。

$$TV \text{ (mm}^3\text{)} = (\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$$

$$RTV = (\text{評価日におけるTV}) / (\text{Day 0におけるTV})$$

$$IR \text{ (\%)} = (1 - (\text{評価日における投与群のRTV}) / (\text{評価日におけるControl群のRTV})) \times 100$$

$$BWC \text{ (\%)} = (\text{評価日におけるBW} - \text{Day 0におけるBW}) / (\text{Day 0におけるBW}) \times 100$$

[0159] 比較例2及び実施例2の化合物を投与した群の評価最終日（比較例2の化合物を用いた場合はDay 6、実施例2の化合物を用いた場合はDay 13）のIRを図1に、BWCの経日的推移を図2に示した。

[0160] 以上の評価の結果、実施例2の化合物投与群は、比較例2の化合物投与群に比べて投与継続性が増し、体重への影響も緩やかでありながら、高い抗腫瘍効果が観察された。

[0161] これより、実施例2の化合物は高い抗腫瘍効果を有し、かつ安全性の面でも優れていることが分かった。

[0162] 〔試験例7〕マウスにおける抗腫瘍効果及び毒性の評価2

ヒト造血器腫瘍細胞株（MV-4-11）をBALB/c A J c l - n u / n u マウスの右側胸部の皮下に移植した。腫瘍移植後に腫瘍の長径（mm）及び短径（mm）を測定し、腫瘍体積（tumor volume : TV）を算出後、各群の平均TVが均等になるように各群にマウスを割り付け、群分けを実施した日をDay 0とした。

[0163] Day 1より比較例2の化合物（I体）については12mg/kg/dayで連日経口投与し、実施例2の化合物については20mg/kg/dayで14日間用osmotic pump（注射剤様デバイス）により持続的に投与を行った。その後は許容出来る程度の体重減少まで投与を継続し評価する事とした。以下の文献も参考に、体重減少が20%以上となる時点まで

投与及び評価観察を継続する事とした。LABIO 21, No. 30, OCT. 2007, P27

- [0164] 抗腫瘍効果及び毒性の指標として、各群の tumor volume (TV) 及び body weight (BW) を評価し、下式により Day 0 に対する相対腫瘍体積 (relative tumor volume: RTV) 及び体重変化 (body weight change: BWC) を求めてプロットし、Control 群 (無処置)、実施例 2 投与群、比較例 2 投与群の RTV 及び BWC の経日的推移を比較した。

$$TV (mm^3) = (\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$$

$$RTV = (\text{評価日における } TV) / (\text{Day 0 における } TV)$$

$$BWC (\%) = (\text{評価日における } BW - \text{Day 0 における } BW) / (\text{Day 0 における } BW) \times 100$$

- [0165] 図 3 及び図 4 に、比較例 2 の化合物を投与したときの RTV 及び BWC の経日的推移を示し、図 5 及び図 6 に、実施例 2 の化合物を投与したときの経日的推移を示す。

- [0166] 更なる毒性の指標として、評価最終日 (比較例 2 の化合物を用いた場合は Day 11、実施例 2 の化合物を用いた場合は Day 15) に各群の血球成分の分析 (リンパ球: LYMPH (Lymphocyte)、単球: MONO (Monocyte)) を行い、下式により実施例 2 投与群、比較例 2 投与群の Control 群に対する変動 (T/C, %) を求めた。その結果を図 7 に示す。

$$T/C (\%) = (\text{投与群における血球成分の数} / \text{Control 群における血球成分の数}) \times 100$$

- [0167] 以上の評価の結果、実施例 2 の化合物投与群は、比較例 2 の化合物投与群に比べて投与継続性が増し、体重への影響及び血液毒性も軽微でありながら、腫瘍退縮を認める著明な抗腫瘍効果が観察された。

- [0168] これより、実施例 2 の化合物は高い抗腫瘍効果を有し、かつ安全性の面でも優れていることが分かった。

[0169] 〔試験例 8〕 放射線併用効果の評価

ヒト脳腫瘍細胞株（U-87MG）を培地中に懸濁させ、マルチウェルプレート（96ウェル）の各ウェルに播種し、培養した。同日操作は培養開始翌々日に放射線照射と化合物添加をした。化合物の先添加については培養開始翌日に段階希釈した化合物溶液を添加し、培養開始翌々日に放射線を照射した。放射線の先照射については培養開始翌日に放射線を照射し、培養開始翌々日に段階希釈した化合物溶液を添加した。播種日の 5 日後に 2.5% グルタルアルデヒド水溶液を用いて細胞を固定し、染色液（0.05 w/v% クリスタルバイオレット in 20% メタノール）を用いて染色した。抽出液（0.1 N NaH_2PO_4 : 100% エタノール = 1 : 1）を添加して混和後、540 nm における吸光度を測定することで細胞数を計測した。以下の式より細胞生存率を算出した。統計処理はスチューデントの t 検定を用いて行った。

[0170] 細胞生存率 (%) = $(T / C) \times 100$

T : 放射線照射又は化合物を添加したウェルの吸光度

C : 放射線照射及び化合物を添加しなかったウェルの吸光度

結果を図 8 に示す。

[0171] 以上の評価の結果、何れの併用順序（同日、化合物先行、放射線先行）においても、比較例 2 の化合物と放射線は各々単独での処理に比べ、併用により有意な細胞生存率の低下が観察された。

[0172] これより、比較例 2 の化合物は放射線と抗腫瘍性の併用効果を示す事が分かった。

[0173] 〔試験例 9〕 テモゾロミド（TMZ）併用効果の評価

ヒト脳腫瘍細胞株（U-87MG）を培地中に懸濁させ、マルチウェルプレート（96ウェル）の各ウェルに播種し、培養した。同日操作は培養開始翌々日に両剤の化合物添加をした。化合物の先添加については培養開始翌日に段階希釈した化合物溶液を添加し、培養開始翌々日に段階希釈した TMZ 溶液を添加した。TMZ の先添加については培養開始翌日に段階希釈した TMZ 溶液を添加

し、培養開始翌々日に段階希釈した化合物溶液を添加した。播種日の5日後に25%グルタルアルデヒド水溶液を用いて細胞を固定し、染色液(0.05w/v% クリスタルバイオレット in 20% メタノール)を用いて染色した。抽出液(0.1N NaH_2PO_4 : 100% エタノール = 1 : 1)を添加して混和後、540nmにおける吸光度を測定することで細胞数を計測した。以下の式より細胞生存率を算出した。統計処理はスチューデントのt検定を用いて行った。

[0174] 細胞生存率(%) = $(T/C) \times 100$

T : TMZ又は化合物を添加したウェルの吸光度

C : TMZ及び化合物を添加しなかったウェルの吸光度

結果を図9に示す。

[0175] 以上の評価の結果、何れの併用順序(同日、化合物先行、TMZ先行)においても、比較例2の化合物とTMZは各々単独での処理に比べ、併用により有意な細胞生存率の低下が観察された。

[0176] これより、比較例2の化合物はTMZと抗腫瘍性の併用効果を示す事が分かった。

[0177] 以上の通り、本発明の化合物は、優れた安全性を有し、且つ高い抗腫瘍効果を示す抗腫瘍剤として有用である。また、本発明の化合物は、アルキル化剤及び/又は放射線療法と併用した場合に優れた併用効果を示す。