

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509845

(P2004-509845A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07C 233/36	C O 7 C 233/36	4 C O 2 3
A61K 31/16	A 6 1 K 31/16	4 C O 3 1
A61K 31/165	A 6 1 K 31/165	4 C O 3 6
A61K 31/166	A 6 1 K 31/166	4 C O 3 7
A61K 31/17	A 6 1 K 31/17	4 C O 5 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 158 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-500833 (P2002-500833)	(71) 出願人	500023990
(86) (22) 出願日	平成13年5月31日 (2001.5.31)		メディクエスト セラピューティックス
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月2日 (2002.12.2)		インク
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/017795		アメリカ合衆国 ワシントン 98103
(87) 国際公開番号	W02001/092218		, シアトル, ストーン ウェイ ノー
(87) 国際公開日	平成13年12月6日 (2001.12.6)		ス 4010, スイート 220
(31) 優先権主張番号	09/584, 175	(74) 代理人	100086586
(32) 優先日	平成12年5月31日 (2000.5.31)		弁理士 安富 康男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ニコラス・エム・ジェイ・ヴァーミュリン
			アメリカ合衆国 ワシントン州 9807
			2, ウッドインヴィル, 196 アヴェニ
			ュー エヌイー 19334

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療剤及び診断剤としての新規ポリアミン類似体

(57) 【要約】

ポリアミン輸送の阻害剤化合物である新規「ビスポリアミン」を開示する。これらの化合物はポリアミン輸送又はポリアミン結合タンパク質を阻害するのが望ましい病気、例えば、ガン又は血管形成術後の損傷等の、治療を行なうための有用な薬剤である。この化合物は、診断・研究用分析及び治療の両面で望ましい活性を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分子のポリアミン結合部位に結合する、及び/又は、ポリアミンの輸送を阻害するポリアミンの類似体若しくは誘導体であって、前記類似体又は誘導体がビスポリアミンであることを特徴とするポリアミンの類似体又は誘導体。

【請求項 2】

前記ビスポリアミンが N^1 -置換ポリアミンである N^1 -置換のプトレッシン、スペルミジン又はスペルミンを少なくとも 1 つ有することを特徴とする請求項 1 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 3】

前記 N^1 -置換体がアミド結合を有することを特徴とする請求項 2 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 4】

前記 N^1 -置換体がスルホンアミド結合を有することを特徴とする請求項 2 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 5】

前記 N^1 -置換体がアミンを有することを特徴とする請求項 2 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 6】

前記 N^1 -置換体が更にリンカー部位を有することを特徴とする請求項 3 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 7】

前記 N^1 -置換体が更にアミノアルキル基を有することを特徴とする請求項 3 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 8】

前記 N^1 -置換体が更にアミノ酸頭基 (head group) 又はその誘導基を有することを特徴とする請求項 3 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 9】

前記アミノ酸頭基が保護された、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸であることを特徴とする請求項 8 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 10】

前記類似体又は誘導体が図 16 に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 に記載のポリアミンの類似体又は誘導体。

【請求項 11】

前記類似体又は誘導体が図 17 に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 1 に記載のポリアミンの類似体又は誘導体。

【請求項 12】

前記 N^1 -置換ポリアミンが図 9 h に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 4 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 13】

前記 N^1 -置換ポリアミンが図 9 a ~ 9 c に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 3 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 14】

前記 N^1 -置換ポリアミンが図 9 d ~ 9 g に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 8 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 15】

前記 N^1 -置換ポリアミンが図 9 a ~ 9 f に示す化合物から選ばれたものであることを特徴とする請求項 11 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 16】

前記類似体又は誘導体がターゲット分子の求核部位と共有結合を形成することができる活

10

20

30

40

50

性部位を更に有することを特徴とする請求項 1 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 17】

前記ターゲット分子がタンパク質又は核酸であることを特徴とする請求項 16 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 18】

前記ターゲット分子が細胞受容体等の細胞表面の分子であることを特徴とする請求項 16 に記載の類似体又は誘導体。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリアミンの類似体又は誘導体、及び、医薬的に許容できる賦形剤からなることを特徴とする、ポリアミンの輸送を阻害することが望ましい病気又は健康状態を治療するのに有用な組成物。 10

【請求項 20】

請求項 19 に記載の組成物及びポリアミン合成阻害剤を有することを特徴とする、ポリアミンの輸送及び合成を阻害することが望ましい病気又は健康状態を治療するのに有用な組成物。

【請求項 21】

前記ポリアミン合成阻害剤がジフルオロメチルオルニチン (DFMO) であることを特徴とする請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

請求項 20 に記載の組成物であって、前記組成物とともに、前記病気又は健康状態を治療するのに有用であるとして知られている添加剤を 1 種又はそれ以上更に含むことを特徴とする組成物。 20

【請求項 23】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリアミンの類似体又は誘導体の効果的な量を患者へ投与することからなることを特徴とする、望ましくない細胞増殖に関わる患者に対する、及び / 又は、ポリアミンの輸送を阻害することにより治療できる病気又は健康状態を治療する方法。

【請求項 24】

前記望ましくない細胞増殖が、免疫系細胞の増殖、血管新生内皮細胞の増殖、腫瘍細胞の増殖又は望ましくない脈管形成に関与していることを特徴とする請求項 23 に記載の方法 30

【請求項 25】

前記病気又は健康状態がガン又は血管形成術後の損傷であることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリアミンの類似体又は誘導体の、及び、ポリアミン合成阻害剤の効果的な量を患者へ投与することからなることを特徴とする、望ましくない細胞増殖に関わる患者に対する、及び / 又は、ポリアミンの輸送及び合成を阻害することにより治療できる病気又は健康状態を治療する方法。

【請求項 27】

前記ポリアミン合成阻害剤がジフルオロメチルオルニチン (DFMO) であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。 40

【請求項 28】

前記病気又は健康状態を治療するのに有用であるとして知られている添加剤を 1 種又はそれ以上更に含むことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記投与が経口、非経口、局所、経皮、腔内、鼻腔内、気管支内、頭蓋内、眼内、耳内若しくは直腸に行われる、又は、注射によるものであることを特徴とする請求項 23 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記注射による投与が静脈内、皮下、筋内、頭蓋内又は腹膜内にされることを特徴とする請求項 29 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

化学及び生化学に属する本発明は、薬理学及び農学の用途に、並びに、選択されたポリアミン結合標的の生化学検査及び精製におけるプローブとして用いられる新規のポリアミン輸送(PAT)阻害剤の合成及び使用に関する。薬としてこれらの化合物は望ましくない細胞増殖、初期のガンのような疾患を処置するために、単独又はポリアミン合成阻害剤のような他の剤との併用により用いられる。

10

【0002】

本発明はまた、結合ライブラリーの一部としての上記新規ポリアミン化合物の合成及び使用にも関する。上記ライブラリーは、PATを阻害する、及び/又は、細胞のポリアミン輸送体(PATr)に結合する組成物を発見するために用いられる。上記ライブラリーを用いて発見されたライブラリー又は化合物のうちの様々なものが、薬、農薬及びプローブとして有用である。

【0003】

背景技術

細胞プロセスの中でポリアミン、プトレッシン、スペルミジン、及び、スペルミンが果たす細胞活性に関する極めて多くの長年の調査により、生命の中でそれらの果たす役割は非常に大きいことが明らかになっている(Cohen, S. S., 「ポリアミン便覧」、1998, Oxford University Press, New York)。生理的pHにおけるポリカチオンとして、全てのアニオン性細胞成分とポリアミンは密接に結合し、且つ、全てのアニオン性細胞成分の生物活性を強く変化させる。特異的で、且つ、強力な相互作用は、DNA及びRNA、並びに、それらに関連する染色タンパク質に関係している(Tabor, H. ら、「1,4-ジアミノブタン(プトレッシン)、スペルミジン、及び、スペルミン」、Ann Rev. Biochem. 1976, 45, 285-306; Matthews, H. R. 「ポリアミン、クロマチンの構造と転写」、BioEssays, 1993, 15, 561-566)。スペルミンは、活性酸素類による障害からDNAを保護するフリーラジカルスカベンジャーとして直接機能することが示されている(Ha, H. C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 11140-11145)。マルチカチオン性のポリアミンと微小管との特異的な相互作用が、最近明らかにされた(Wolff, J. 「オリゴカチオンによる微小管の集合の促進：荷電した基の間の協同性」、Biochemistry, 1998, 37, 10722-10729; Webb, H. K. ら、J. Med. Chem. 1999, 印刷中)。アセチルコリンエステラーゼ等の膜境界酵素のアロステリック制御が明らかにされている(Kossorotow, A. ら、「膜境界性アセチルコリンエステラーゼに対するポリアミンの制御効果」、Biochem. J. 1974, 144, 21-27)。ポリアミンは、多くの神経伝達物質受容体及びイオンチャネルに直接影響を与える(Carter, C. 「ポリアミンの神経薬理学」、1994, Academic Press, San Diego, CA; Williams, K. 「ポリアミンとイオンチャネルとの相互作用」、Biochem. J., 1997, 325, 289-297)。NMDA受容体錯体に対してもポリアミン特異的結合部位があることが立証されている(Ransom, R. W. ら、「 $[^3\text{H}]$ MK-801のN-メチル-D-アスパラギン酸塩受容体-イオンチャネル錯体への結合に対する、L-グルタミン酸塩、グリシン及びポリアミンによる協同調節(Cooperative modulation of $[^3\text{H}]$ MK-801 Binding to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Ion Channel Complex by L-Glutamate, Glycine, and Polyamines.)」、J. Neurochem. 1988, 51, 830-836; Williams, K. ら、「ミニレビュー： 40

20

30

40

50

ポリアミンによるNMDA受容体の調節」、Life Sci. 1991, 48, 469 - 498)。

【0004】

正常発達及び新生物発達の両方に関与する多くの刺激は、ポリアミン生合成経路を活性化
する。数多くの専門分野にわたる研究により、ポリアミンの細胞内濃度は、生合成、異化
及び輸送における多くの段階において高度に制御されていることが明らかになっている。
ポリアミンの分子の量を厳しく制御するために細胞がこのように複雑な機構を持つという
ことから、非常に狭い濃度領域のみが許容されることがわかる。ポリアミン生合成におけ
る律速酵素であるオルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)は、前駆体オルニチンからの
ブトレッシンの産生を触媒する。生物学的な半減期が非常に短いこの酵素は、公知の哺乳
類の最も誘導性の酵素の1つである(Russell, D.ら、「発達の早い組織における
アミンの合成：ラットの再生肝臓、ヒヨコの胚及び多様な腫瘍におけるオルニチンデカル
ボキシラーゼ活性」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 1420 - 1427)。細胞の増殖に関与する多くの生物学的刺激がこの酵素を誘導
することが明らかになっており、ODCの誘導により目立った増殖効果が得られる(Al
honen-Hongisto, L.ら、「エールリッヒ腹水ガン細胞における、腫瘍形
成性、細胞表面の糖タンパク質の変化及びオルニチンデカルボキシラーゼの遺伝子パター
ン」、Biochem. J. 1985, 229, 711 - 715)。ODCの活性の増大
は腫瘍の発達に関与している(Janne, J.ら、「早い発達におけるポリアミンと腫
瘍」、Biochem. Biophys. Acta 1978, 473, 241 - 493
; Scalabrino, G.ら、「哺乳類の腫瘍におけるポリアミン Part I.
」、Adv. Cancer Res. 1981, 35, 151 - 268; Scalabr
ino, G.ら、「哺乳類の腫瘍におけるポリアミン Part II.」、Adv. C
ancer Res. 1982, 36, 1 - 102)。ODC活性のフィードバック阻害
は、ODC抗酵素タンパク質によって媒介される。ポリアミン濃度の上昇に続いて起こる
、ODC抗酵素mRNAリーディングフレームのポリアミンに刺激された+1フレームシ
フトにより、このODC阻害タンパク質が増加する(Hayashi, S.ら、「オルニ
チンデカルボキシラーゼ抗酵素：新規種の制御タンパク質」、TIBS, 1996, 21
, 27 - 30; Matsufuji, S.ら、EMBO Journal, 1996, 15,
1360 - 1370)。ODC抗酵素タンパク質は、高い親和性によりODCに結合
して不活性錯体を形成し、その後ATPに依存する形での26Sプロテオソームによる分
解をみるために不活性錯体を標識する(Heller, J.S.ら、Proc. Natl
. Acad. Sci. USA. 1976, 73, 1858 - 1862; Murakami
, Y.ら、「オルニチンデカルボキシラーゼはユビキチン化されることなく26Sプロテ
オソームによって分解される」、Nature, 1992, 360, 597 - 599)。
ODC抗酵素はまた、細胞のポリアミンの取り込み系を抑制する(Suzuki, T.ら
、「抗酵素は、オルニチンデカルボキシラーゼ過産生細胞におけるポリアミンの異常な蓄
積及び毒性を防ぐ」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91
, 8930 - 8934)。

【0005】

ポリアミンの異化経路は、過剰量のポリアミンによる細胞に対しての毒性効果を防ぐため
に重要である(Seiler, N.「ポリアミンのアセチル化の機能」、Can. J. P
hysiol. Pharmacol. 1987, 65, 2024 - 2035; Seile
r, N.「ポリアミンオキシダーゼ、性質と機能」、Progress in Brai
n Res. 1995, 106, 333 - 344)。この経路は、多様なポリアミンを相
互転換し、毒性を表す量に達する前に過剰量のポリアミンを排出するために細胞によって
利用される。この経路によってそれ以上の炭素前駆体をポリアミンプールに導入すること
はない。

【0006】

哺乳類の細胞へのポリアミンの輸送は、エネルギー及び温度に依存し、飽和できるもので

あり、担体によって媒介され、実質的な濃度勾配に影響を及ぼす (Seiler, N.ら、「哺乳類の細胞におけるポリアミンの輸送」、*Int. J. Biochem.* 1990, 22, 211-218; Khan, N. A.; Quemener, V.ら、「ポリアミン輸送経路の特徴付け」、*Neuropharmacology of Polyamines* (Carter, C., 編集), 1994, Academic, San Diego, pp. 37-60)。数多くの実験により、ポリアミン濃度の恒常性はこの輸送経路によって仲介されていることが証明されている。輸送活性の増加は、増殖の刺激に応じて起こるポリアミン要求性の変化を反映している。ヒト繊維芽細胞が血清や表皮性増殖因子により細胞の増殖を刺激すると、これに続くブトレッシンの取り込みが18~100倍増加する (DiPasquale, A.ら、「表皮性増殖因子は、培養ヒト繊維芽細胞においてブトレッシンの輸送及びオルニチンデカルボキシラーゼ活性を刺激する」、*Exp. Cell Res.* 1978, 116, 317-323; Pohjanpelto, P. 「ブトレッシンの輸送は、増殖を開始したヒト繊維芽細胞において顕著に増大する」、*J. Cell Biol.* 1976, 68, 512-520)。腫瘍ではブトレッシンの取り込み速度が増大していることが明らかになっている (Volkow, N.ら、「脳腫瘍におけるプローブとしての標識ブトレッシン」、*Science*, 1983, 221, 673-675; Moulinoux, J.-P.ら、「腫瘍学における循環ポリアミンの生物学的な重要性」、*Cell. Mol. Biol.* 1991, 37, 773-783)。十分に研究の進んだ機構に基づくODCの阻害剤である - ジフルオロメチルオルニチン (DFMO) により培養の際に細胞においてポリアミンの生合成が阻害され、これにより細胞内のブトレッシン及びスベルミジンが実質的に涸渇し、その結果細胞の増殖が阻害される。外因性のポリアミンを含んだ培養液を補充すると、この涸渇が原因となって輸送活性が数倍上昇する (Bogle, R. G.ら、「内皮におけるポリアミンの取り込み (Endothelial polyamine uptake): L-アルギニンの欠乏又はポリアミンの涸渇による選択的な刺激」、*Am. J. Physiol.* 1994, 266, C776-C783; Alhonen-Hongisto, L.ら、「細胞内のブトレッシンの欠乏は天然ポリアミン及びメチルグリオキサールビス (グアニルヒドラゾン) の取り込みを誘導する」、*Biochem. J.* 1980, 192, 941-945)。この後細胞の増殖速度は本来の速度に戻る。

10

20

30

40

50

【0007】

実証された複数の実験系により、ポリアミン輸送機構を妨げることによってODC阻害効果を増大させることができることが裏付けられる。ポリアミンと同じ輸送系によって取り込まれる非常に細胞毒性の強いAdoMetDC阻害剤であるメチルグリコキサールビス (グアニルヒドラゾン) (MGBG) に対する抵抗性によって選択された後、変異L1210白血病細胞系のポリアミン輸送活性は大幅に減少していることが明らかにされた。上記細胞を接種したマウスは、親の細胞系 (半生存時間が22%増加) を接種したマウスに比べて、DFMO処理 (半生存時間が87%増加; 40匹中13匹が治癒した) に対してずっと顕著に反応する。次を参照; Persson, L.ら、「ポリアミンの取り込みが不十分な変異L1210白血病細胞を持つマウスに対する、d, l - 2 - ジフルオロメチルオルニチンの治療効果」、*Cancer Res.* 1988, 48, 4807-4811。細胞外のポリアミンの重要な供給源は、胃腸系内の微生物叢により生産される (Sarhan, S.ら、「腫瘍成長のためのポリアミン供給源としての胃腸系」、*Anticancer Res.* 1989, 9, 215-224)。このポリアミン供給源が細胞叢の除染により除去されると、ルイス肺ガン細胞又はL1210異種移植片を予防する、DFMOの適度な増殖阻害効果が著しく強化される (Hessels, J.ら、「食餌中のポリアミン及びアルギニンの制限及びブトレッシンの胃腸系における合成は、L1210を保有するマウスにおけるa - ジフルオロメチルオルニチンの細胞増殖阻害効果を強化する」、*Int. Symp. Polyamines in Biochemical and Clinical Research, Sorrento (Italy)*, 1988, Abstr. P105)。ポリアミンの供給源としては食餌によるものもある (Bar

docz, S.ら、「食品におけるポリアミン；成長及び健康のための関わり」、*J. Biochem. Nutr.* 1993, 4, 66-71)。DFMO処理したヌードマウスにポリアミンを含まない餌を与えると、DFMO処理のみを行ったマウスと比較して、MCF-7ヒト乳ガン異種移植片におけるブトレシンの量が顕著に減少する(Leveque, J.ら、「胃腸系のポリアミン供給源の潤滑は、*in vivo*におけるMCF-7ヒト乳ガン細胞において、DFMOにより誘導されるポリアミンの潤滑を高める」、*Anticancer Res.* 1998, 18, 2663-2668)。その他の動物モデルにおいても、ポリアミンが完全に欠乏すると、DFMOの増殖阻害効果が高まる(Moulinoux, J. P.ら、「ポリアミンの欠乏による、ヌードマウスにおけるU-251ヒト膠芽腫細胞の増殖の阻害」、*Anticancer Res.* 1991, 11, 175-180; Quemener, V.ら、「ポリアミンの欠乏は化学療法の抗腫瘍効果を高める」、*Anticancer Res.* 1992, 12, 1447-1454; Chamailard, L.ら、「ポリアミンの欠乏は腫瘍に誘導された免疫抑制の発達を防ぐ」、*Br. J. Cancer* 1997, 76, 365-370)。

【0008】

ポリアミン輸送体(PATr)

発達の早い形質転換されたガン細胞のせいでポリアミンの需要は増えているが、合成速度が増えてもほんの一部しか需要を満たさない。ポリアミンの必要性がこのように増えていることを活用して、合成阻害剤が探索された。また、ポリアミンの濃度が低下するとクロマチン構造の異常が起こり、結果として細胞死又は増殖の阻害を導くこととなる(Quemener, V.ら、*Anticancer Res.* 14: 443-448, 1994; Porter, C. W.ら、*Cancer Res.* 53: 581-586, 1993)。ポリアミン合成阻害剤は臨床において期待された結果が最初は出なかったが、これは特異的活性輸送系によるポリアミンの輸送がそれを補うために増加するためである、ということがますます明らかになってきた(Seiler, N.ら、*Int. J. Biochem.* 22: 211-218, 1990; Seiler, N.ら、*J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 843-861, 1996)。オルニチンデカルボキシラーゼである -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)の自殺基質阻害剤、又は、S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼであるメチルグリオキサールビス(グアニルヒドラゾン)(MGBG)の阻害剤を用いた細胞培養において有望な結果が観察されたが、ヒトの臨床試験に移行することはなかった(Schechter, P. J.ら、「ポリアミンの代謝の阻害における、新規治療法の生物学的重要性と基礎(Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies)」、McCann, P. P.ら、編集; 1987, pp 345-364)。ポリアミンプールへの炭素の運搬には合成又は輸送の2つの方法しかないので、これら両方を同時に阻害することが抗ガン治療に役立つアプローチとなると本発明者らは考えている。

【0009】

この化学療法のアプローチの有効性を確認するため、PATが欠乏した移植ハツカネズミL1210白血病細胞を用いて検討した。野生型L1210ガン細胞(完全な状態のPATを持つ)を移植したマウスは、DFMOで処理した場合でも、12日後に死亡した。一方、PATが欠乏したL1210細胞を移植したDFMOマウスは、60日より長く生きた(Ask, A.ら、*Cancer Lett.* 66: 29-34, 1992)。Ask, A.らはまた、野生型L1210細胞を保有するマウスを(1)DFMO、(2)低ポリアミン食又は(3)抗生物質(消化管の叢によるポリアミンの産生を減少させる)を併用して処理すると、DFMOのみで処理する場合と比較して長く生存することも示した。

【0010】

ガン細胞内のPATを増やせば細胞死が促進される。J. L. Holeyら(*Cancer Res.* 52: 4190-4195, 1992)は、クロラムブチル-スベルミジ

ン抱合体の細胞毒性はクロラムブチル単独と比較して225倍増加していることを明らかにした。一連のニトロイミダゾール-ポリアミン抱合体類も同様に効果的であった(Holley, J. L.ら、Biochem. Pharmacol. 43:763-769, 1992)。この他、マラリアの多剤耐性株を感染させたマウスは、クロロキノリン-ブトレッシン抱合体で治療することにより治癒することが示された(Singh, S.ら、J. Biol. Chem. 272:13506-13511, 1997)。このように細胞毒性を持つ化合物の効果はポリアミンと抱合することによって向上した。これらの効果は、PATのシステムを利用してガン細胞に上記化合物を運搬したからであったかもしれない。

【0011】

ポリアミン輸送タンパク質の遺伝子は、大腸菌、最近では酵母からクローニングされた(Kashiwagi, K.ら、J. Biol. Chem. 1990, 265, 20893-20897; Tomitori, H.ら、「酵母におけるポリアミン輸送タンパク質の遺伝子の同定」、J. Biol. Chem. 1999, 274, 3265-3267)。哺乳類における輸送体の遺伝子の同定が待たれる。大腸菌由来の輸送体が結晶化され、そのX線構造が決定された(Sugiyama, S.ら、「大腸菌におけるポリアミン輸送系の主たる受容体であるPotDの結晶構造」、J. Biol. Chem. 1996, 271, 9519-9525)。この構造はスペルミジン結合タンパク質として決定されたもののうちの1種を示しており、このようなタンパク質はわずか2、3種であるがその数は増加している。この構造は原核生物において決定されたので、哺乳類の輸送阻害剤の設計に用いるには限りがあると考えられた。それにも関わらずこの構造の分析を通して、いくつかの洞察が得られ、また利用された。カルボン酸塩残基が存在することは予想されたが、これに加えて、スペルミジンのプロトン化アミノ基と塩橋を形成する位置にある残基、多数の芳香族残基、特にトリプトファン残基は、基質中のメチレン基との疎水的相互作用を強化することが分かった。更に、H₂O分子はスペルミジン基質の1つの末端に位置し、この位置においてイオン性の残基とより強い相互作用を示した。

【0012】

複数の研究者が細胞への³H-スペルミジンの取り込みを阻害するポリアミン類似体の能力を研究した。Bergeronらは、スペルミジン又はスペルミンの類似体の末端窒素原子を異なるアルキル基で置換することの影響について研究した(Bergeron, R. J.ら、「ポリアミン類似体の抗増殖特性：構造-活性の研究」、J. Med. Chem. 1994, 37, 3464-3476)。アルキル基が大きくなると、放射標識されたスペルミジンの取り込みを防ぐ能力が小さくなることを示した。彼らは後に、窒素原子間のメチレン数が増加すると³Hスペルミジンの取り込みに対する受容能が小さくなると結論づけた(Bergeron, R. J.ら、「スペルミジン抗腫瘍薬とスペルミン抗腫瘍薬の構造-活性関係の比較」、J. Med. Chem. 1997, 40, 1475-1494)。ポリアミン輸送機構はポリアミンの認識及び輸送においてはカチオン性センター(cationic center)は3つしか必要でないという彼らの結論は、本発明において非常に重要である(Porter, C. W.ら、Cancer Res. 1984, 44, 126-128)。L1210細胞への³Hスペルミジンの取り込みを阻害するポリアミン類似体の能力の文献の例を2つのグループがCOMFA法及びQSAR法により調べた(Li, Y.ら、「比較分子場の分析に基づいて予想される、L1210細胞におけるポリアミン輸送阻害剤の構造-機能の関係のモデル」、Cancer Res. 1997, 57, 234-239; Xia, C. Q.ら、「L1210細胞におけるポリアミン輸送阻害剤のQSAR分析」、J. Drug Target. 1998, 6, 65-77)。

【0013】

ポリアミン輸送(PAT)の分析

PATの測定のための処理量の多い分析で公知のものはない。放射化学的分析は生化学的に輸送を分析する際に用いられ、酵母及び多様な哺乳類の細胞におけるPATの研究にも

10

20

30

40

50

用いられている (Kakinuma, Y.ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 216: 985-992, 1995; Seiler, N.ら、Int. J. Biochem. Cell Biol. 28: 843-861, 1996)。例えば次を参照: Huber, M.ら、Cancer Res. 55: 934-943, 1995。

【0014】

放射検査分析においてはプトレッシン、スペルミジン又はスペルミン等のポリアミンを放射標識したものをを用いるが、シグナルが弱いため接着細胞や非接着細胞が多く必要となる。スペルミンについては、細胞とプラスチックに非特異的に吸着するため特別な注意が必要となる。細胞を試料化合物及び放射標識したポリアミンと混合して分析を始める。細胞はその種類によって1~60分間インキュベートする。媒質を除去してプレートを4まで冷却し、分析を終了する。この後細胞は冷却した媒質で3回洗浄し、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムに溶解し、溶液中の放射能をシンチレーションカウンターで検査する。この分析方法は、標識として用いる放射性同位元素のシグナルが弱く、放射能を用いた方法固有の取り扱いが要求されるため、処理量の多い方法にスケールアップすることが難しい。

10

【0015】

クモ及びスズメバチ等の節足動物の毒において多くのポリアミンアミド天然物が最近になって発見された。上記アシルポリアミン類似体は、昆虫の神経と筋肉の接合部と特異的に強く相互作用することが明らかとなった (Moya, E.ら、「節足動物のポリアミンアミド毒素の合成及び神経薬理的性質」、ポリアミンの神経薬理学 (Neuropharmacology of Polyamines) (Carter, C.ら、編集)、1994, Academic, San Diego, pp. 167-184)。上記毒素のこの能力により、捕食昆虫は餌となる生物を麻痺させて殺すことができる。上記天然物の大部分は、芳香族アミノ酸の構造類似体とアミドで結合しているポリアミン部位 (多くは構造的に異なったポリアミン類似体) に共通の分子的特徴を持つ。甲殻類の神経筋シナプス又は哺乳類のグルタミン酸塩受容体のどちらかとの相互作用を最大にするための試みより単純な合成類似体が調べられた (Asami, T.ら、「アシルポリアミンの作用は、甲殻類の筋グルタミン酸塩受容体に対するジョロウグモの毒素 (JSTX) の作用と似ている」、Biomedical Res. 1989, 10, 185-189; Raditsch, M.ら、「ポリアミンクモ毒素及び哺乳類のN-メチル-D-アスパラギン酸塩受容体。アルジオトキシン₆₃₆ (argiotoxin₆₃₆) の、チャネルのブロック及びチャネルへの結合の構造の基礎」、Eur. J. Biochem. 1996, 240, 416-426; Tsubokawa, H.ら、「虚血後の海馬のCA1ニューロンにおける、グルタミン酸塩によって活性化された電流に対するクモ毒素及びその類似体の効果」、J. Neurophys. 1995, 74, 218-225)。

20

30

【0016】

上記の文書の引用は、前述の記述のいずれかが従来の技術にぴったり合っていることを認める、ということを用意したものではない。日付に関する全ての記述やこれらの書類の内容に関する表現は出願人が利用できる情報に基づいており、日付やこれらの書類の内容の正確さに関していかなる承認も構成しているものではない。

40

【0017】

発明の要約

本発明は、多様なポリアミン類似体及び誘導体、並びに、薬として、農薬として若しくは環境上有用な薬品としてのその用途に関する。本発明は、膜 (及び水溶性) タンパク質、特にPATrへの上記化合物の結合 (及びポリアミン結合) についての鍵となる、上記化合物に含まれる部位及び構造を決定するものである。

【0018】

本発明の組成物は、1つ又はそれ以上の位置が置換されているポリアミン誘導体を含む。一置換ポリアミンは末端窒素が置換されていることが好ましいが、内部の窒素原子及び/又は内部の炭素原子が代わりに若しくは更に置換されていてもよい。

50

【0019】

好ましい実施形態としては、抗ガン化学療法として薬学的に有用な、高度に特異的なPAT阻害剤がある。これらには、互いに結合した2つの直鎖状のポリアミンを含むポリアミン誘導体が含まれる。上記2つのポリアミンは、同一であっても異なってもよく、内部の炭素原子及び/又は内部の窒素原子が置換されていてもよい。好ましくは、それぞれのポリアミンの一方の末端位置が結合に用いられていることである。また、もう一方の末端位置も置換されていてもよい。

【0020】

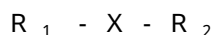
好ましい置換基は、結合親和性を増大させるか、そうでなければPATr、酵素若しくはDNA等のポリアミン結合分子へのその化合物の結合の不可逆性を高める構造である。更にそのような他の置換基としてはアジリジン基や他のさまざまな脂肪族多環構造、芳香族多環構造、脂肪族-芳香族が組み合わさった多環構造、又は、ヘテロ環多環構造等がある。アジリジンのようにPATr及び他のポリアミン結合分子に不可逆的に結合する反応性の部位もまた本発明の範囲に含まれる。求核剤と反応して共有結合を形成する反応性の基の例としては、クロロ-、プロモ-及びヨードアセトアミド、硫化スルホニル、エステル、ナイトロジェンマスタード等が含まれる。このような反応性の部位は、診断及び研究において親和標識に用いられ、PAT又はポリアミンの合成を阻害する薬剤の中の部位として薬理的活性の促進に寄与する。上記反応性の部位は、アジド基又はベンゾフェノン基のような反応性光親和性の部位であってもよい。光親和性標識の化学薬品は当技術分野において十分公知である(Flemming, S. A., Tetrahedron 51: 12479-12520, 1995)。ガン治療のための光反応性化合物もまた、当技術分野において公知である。

10

20

【0021】

より具体的には、本発明のポリアミン類似体又は誘導体は分子のポリアミン結合部位に結合し、及び/又は、ポリアミンの輸送を阻害し、次の構造：



(式中、 R_1 及び R_2 はそれぞれポリアミン、その類似体又はその誘導体、及び、 X は、2つのポリアミンに結合するリンカー部位)

を有する。

【0022】

ポリアミン類似体又は誘導体は、一方の末端に反応性の基を有することが好ましく、分析や生化学的研究におけるプローブとして用いられてもよい。

30

【0023】

更にポリアミン類似体又は誘導体(レポーター基を有する又は有しない)のポリアミン部分にあってもよい置換基としては、結合親和性を高めるか、そうでなければPATr、酵素若しくはDNAのようなポリアミン結合分子へのその化合物の結合の不可逆性を高める構造がある。そのような置換基としてはアジリジン基や他のさまざまな脂肪族多環構造、芳香族多環構造又はヘテロ環多環構造等が含まれる。

【0024】

アジリジン基のように、PATr又は他のポリアミン結合分子に不可逆的に結合できる反応性の部位についても検討した。求核剤と反応して共有結合を形成する反応性の基の例としては、クロロ-、プロモ-及びヨードアセトアミド、硫化スルホニル、エステル、ナイトロジェンマスタード等が含まれる。このような反応性部位は、診断及び研究において親和標識に用いられ、PAT又はポリアミンの合成を阻害する薬剤の成分として薬理的活性の促進に寄与する。上記反応性の基は、アジド基又はベンゾフェノン基のような反応性光親和性基であってもよい。光親和性標識における化学試薬は十分公知である(Flemming, S. A., Tetrahedron 51: 12479-12520, 1995)。更にガン治療のための光反応性化合物もまた、当技術分野において知られている。

40

【0025】

本発明のポリアミン類似体又は誘導体は、様々な方法で分類することができる。ポリアミ

50

ン類似体又は誘導体の1種としてはビスポリアミンが挙げられ、同一若しくは異なった2つのポリアミンが結合したポリアミン類似体又は誘導体と考えることができる。ポリアミン基はそれぞれ、直鎖状で、2つの末端がアミノ基であることが好ましい実施形態である。このようなポリアミンとしては、例えば天然ポリアミン：プトレッシン、スペルミジン及びスペルミンが含まれる。上記各ポリアミンの一方の末端アミノ基は、2つの個々のポリアミン間の結合に用いられることができる。もう一方の末端アミノ基は、アミノ基として残るか更に誘導されてもよい。

【0026】

結合してビスポリアミンとなるポリアミンの例としては、 N^1 -ダンシルスペルミン（モノダンシルスペルミン又はMDS(1)ともいう）、 N^1 -ダンシルスペルミジン（モノダンシルスペルミジン又はMDSdともいう）、 N^1 -[(N^6 -ダンシル)-6-アミノカプロイル]スペルミン(DACS(4)という)、 N^1 -[(N^6 -ダンシル)-6-アミノカプロイル]スペルミジン(DACSd)、 N^1 -[(N^6 -5-(4-クロロベンズアミドメチル)チオフェン-2-スルホニル)-6-アミノカプロイル]スペルミン(5)又は N^1 -[(N^6 -(2-ジベンゾフランスルホニル)-6-アミノカプロイル)スペルミン(6)が含まれる。

10

【0027】

結合してビスポリアミンとなるポリアミンとしては更に、 N^1 -アシルアミノ酸-スペルミン抱合体が含まれる。これらにはスペルミンの天然又は非天然アミノ酸アミドが含まれ、それら自身非常に効果的なポリアミン輸送阻害剤である。このようなポリアミンの例としては、L-Lys-スペルミン(化合物1202)、L-Val-スペルミン(化合物1157)及びL-Orn-スペルミン(化合物1224)が含まれる。

20

【0028】

結合してビスポリアミンとなるポリアミンとしては更に、 N^1 -一置換体等のアシルポリアミンがある。一置換ポリアミンはアミド、スルホアミド、 N^1 -一置換アミン等に更に分類できる。アミドの中では、リンカーを持たないもの、リンカー、アミノアルキル基及びアミノ酸頭基(head group)を持つものに更に分類することができる。上記アミノ酸頭基は、保護されているもの、天然-アミノ酸、非天然-アミノ酸及びアミノ酸誘導体に更に分類することができる。

【0029】

一旦ポリアミンの輸送を望ましいレベルで阻害するポリアミン類似体が同定されれば、同一の又は異なる種類の他のポリアミン類似体と構造及び機能を比較することで更に容易に最適化することができ、その結果有用性を改善させることができる。そのような改善の例としては、限定されるものではないが、阻害活性の向上、代謝安定性の向上、特異性の強化、取り扱い及び投与の容易化、結合親和性、細胞ポリアミンプールへの取り込み防止及び副作用の低減が含まれる。

30

【0030】

本発明はまた、上記の組成物及び医薬的に許容できる賦形剤からなり、ポリアミンの輸送を阻害することが望ましい病気又は健康状態を治療するのに有用な医薬組成物に関するものでもある。上記医薬組成物は、ポリアミンの合成阻害剤；好ましくはDFMOを更に含んでいてもよい。他には、上記医薬組成物、及び、上記病気又は健康状態を治療するのに有用であるとして公知の1つ又はそれ以上の添加剤等の組み合わせもある。

40

【0031】

本発明はまた、上記の医薬組成物の効果的な量を患者へ投与することからなり、望ましくない細胞増殖に関わり、かつ/又は、ポリアミンの輸送を阻害することにより治療できる患者を治療する方法を提供するものでもある。上記望ましくない細胞増殖は、免疫系細胞の増殖、血管新生内皮細胞の増殖、腫瘍細胞の増殖又は望ましくない脈管形成に参与していてもよい。上記のように治療されることが好ましい病気としては、ガン又は血管形成術後の損傷が含まれる。

【0032】

50

このように、本発明の類似体及び誘導体は、単独又は他の薬品との組み合わせで、ガン及び脈管形成若しくは損傷後の細胞増殖等の望ましくない細胞増殖に関わる他の病気の治療に用いることができる。上記治療は、P A T、デオキシハイプシルシターゼ (d e o x y h y p u s y l s y n t h a s e) 若しくは細胞増殖を阻害することによって、又は、アポトーシスを誘導することによって行われることが好ましい。このように上記治療は、細胞増殖抑制性の、及び/又は、細胞毒性の機構によって行われる。本発明の類似体及び誘導体は、個々に又は他の薬品との組み合わせ若しくは他の剤を含まない組み合わせで、高血圧、骨粗鬆症、アルツハイマー病、虚血、自己免疫疾患、精神病、鬱病、脳卒中、心血管疾患、又は、微生物、寄生虫、若しくは、菌類等の植物病原体による感染の治療に用いることができる。本発明の類似体及び誘導体による阻害の影響を受けやすい細胞プロセスとしては、単独又は他の剤との組み合わせで、複製、転写又は翻訳のような核酸 (D N A 又は R N A) に関するものが含まれる。本発明の類似体及び誘導体は、抗下痢剤、抗蠕動剤、抗痙攣剤、抗ウイルス剤及び抗乾癬剤及び殺虫剤として効果的であってもよい。

10

【0033】

本発明は更に一部が、上記類似体及び誘導体の細胞内への輸送についての迅速で効果的な分析に関するものでもある。本発明は、上記類似体及び誘導体の構造 - 活性の関係 (S A R s) のデータベースを作成することにより、P A T r 等の膜タンパク質又は可溶性タンパク質へのポリアミンの結合の鍵となる要素を明らかにするものである。上記情報により、本発明において新規ポリアミン類似体及び誘導体の輸送能力及び活性に関して予想することができる。

20

【0034】

本発明のポリアミン類似体及び誘導体は、分析や生化学におけるプローブとして用いることができる。分析の方法としては、検出可能な標識 (「レポーター」) としての役割を果たす部分、好ましくはフルオロフォア、最も好ましくはダンシル基、又は、それ以外の E L I S A 法等の様々な手段で検出できる置換体を有するポリアミン類似体及び誘導体を用いることが好ましい。また、分析の方法としては、固体の担体に固定された類似体及び誘導体を用いることが好ましい。

【0035】

本発明はまた、一連の診断用の組成物において有用なポリアミン類似体に関するものでもある。このような化合物の合成方法についても記載している。

30

【0036】

S A R s データベースに関する詳細、分析のプローブとしてのポリアミン類似体の使用及び診断用組成物については P C T / U S 9 8 / 1 4 8 9 6 に記載されている。

【0037】

本発明は更に、P A T r (P A T r) 等の膜タンパク質又は可溶性タンパク質へのポリアミンの結合の鍵となる要素を明らかにするものである。

【0038】

詳細な説明

本発明者らは、治療に用いる新規化合物を設計し、かつ、効率がよく処理量の多い分析における、P A T 及びポリアミン結合を測定するプローブとしてこのような化合物を用いる試験を考案した。本発明者らは上記新規方法を用いて、競合的に及び非競合的に取り込みを阻害する、P A T r に対する親和性の高い化合物をスクリーニングし発見した。上記化合物は数々の病気、特にガンに対する薬品として有用である。上記化合物はまた、例えば、D F M O (オルニチンデカルボキシラーゼを阻害する) 等のポリアミン合成阻害剤や他の薬剤との組み合わせで、新薬の成分としても用いることができる。本発明の化合物は、ポリアミンが上記に述べたように作用しているその他の病気又は健康状態においても有用であり、農業的用途及び環境的用途も有している。

40

【0039】

本発明者らは、個々のポリアミンからのビスポリアミンの形成が、P A T の阻害剤として又は P A T の分析及び薬剤のスクリーニングにおけるプローブとして有利な性質を与えるこ

50

とを見出した。このような化学修飾は、効果的な結合を破壊するものではなく、また実際、誘導したポリアミンの P A T r への親和性を高めてもよい。これ故、このような化合物は、ポリアミンの取り込みの阻害剤を発見するのに有用である。

【0040】

定義

ここに用いられているように、「ポリアミン」という語句は、プトレッシン、スペルミジン又はスペルミンを含み、また、窒素原子を2～約10個有してよい、より長い直鎖ポリアミン及び分岐ポリアミン等を含む。この定義には、C原子又は末端若しくは内部のN原子に結合された複数の官能基のいずれかを持つ基本的なポリアミン鎖を含む、ポリアミン類似体又は誘導體も含まれる。ポリアミン誘導體は、ポリアミンコアと誘導する官能基との間に末端リンカー又はスペーサー基を含んでよい。

10

【0041】

「頭基 (head group)」は、ポリアミンに直接結合した部分、又は、ポリアミンに結合したリンカーに付着した部分として定義される。「頭基」には、脂肪族基又はアロアルキル基 (aralkyl groups) が含まれるが、芳香族基又はヘテロ環基が好ましい。このように、頭基は「レポーター」としての役割も果たす蛍光部位であってよい。

【0042】

「阻害剤」である部分又は基は、ポリアミンを誘導する化学基であり、(1)天然ポリアミンの親和性よりも高い親和性をもって誘導體を P A T r に結合させる及び/又は(2)それ以外の方法で細胞へのポリアミン(又は本発明のプロープ)の取り込み若しくは亜細胞性の P A T r の調製をブロックするものである。本発明者らは本発明において、MDA-MB-231ヒト乳ガン細胞等において効果的に P A T を阻害する化合物を開示している。様々なタイプのこのような阻害剤が多数合成された；本発明において多様な合成スキームを開示している。

20

【0043】

「レポーター部位」は、(直接、又は、例えば酵素で増強して)プロープを検出可能にしてこのプロープが結合している P A T r の活性を分析できるようにする、プロープの一部をなす化学部分である。レポーターは、それ自身が検出可能なシグナルを放射するか、又は、検出可能なパートナー、若しくは、レポーターと結合か反応して検出可能となるレポーター特異的なパートナーに対して親和性があるために検出することができる。実施の形態としては、類似体及び相互作用/結合しているどんな分子をも複合体の混合物から除去できる固体の担体に上記ポリアミン類似体が固定されていることが好ましい。

30

【0044】

本発明において開示されている多様な阻害剤化合物は、計数スキーム(1～166及びそれ以上の値を用いる)及び識別名番号スキーム(4桁の化合物番号のみ、又は、識別名「ORI」若しくは「Ori」との組み合わせで用いる)等の数値による多様な記号表示で同定されている。どの同定スキームを用いるかに関わらず、関与する化合物の実際の分子構造を表してその化合物に制限を加える識別名はほとんどいない。

【0045】

構造 - 活性の関係 (SARs) の概観

P A T 阻害剤は、輸送体の天然基質であるスペルミジンを改変することによって開発された。本発明者らは、3-アミドプロピル基をスペルミジンのジアミノブチル部分に導入すると、図1に示すような明らかに性能のよい輸送阻害剤を産生できることを見出した。アミド置換基又はスルホンアミド置換基としては中程度の大きさの芳香族基が最適であることが分かったので、輸送阻害剤でもあり輸送分析におけるレポーター分子でもある N¹-ダンシルスペルミン (MDS) を発明するに至った。MDSは、スペルミジン及び N¹-アセチルスペルミンに比べて細胞に対する結合親和性が高い。細胞増殖の阻害及び P A T は、MDSの芳香族「頭」基とポリアミンコアとの間に6-炭素原子リンカーを導入した結果顕著に亢進した。この新規分子 N¹-[(N⁶-ダンシル)-6-アミノカプロイル

40

50

] スペルミン (又は D A C S (4)) は、公知の最も効果的な P A T 阻害剤の 1 つである。生物学的システムとの相互作用において、D A C S は上記の望ましい性質を多く示す。本発明者らは、D A C S 及びその他の関係する類似体について幅広く研究した。

【 0 0 4 6 】

図 2 に示すように、リード化合物としての D A C S (4) の周辺の S A R s を幅広く調べた (特に、化合物 7 3 ~ 9 8)。上記に述べたように、D A C S の複数の領域それぞれを変化させ、輸送体の結合に対する効果を測定した。芳香族「頭」基を変えることによる影響を、遠位のアミノ末端に種々の芳香族及び非芳香族の N - スルホンアミドを有する活性化 4 - ニトロフェニルエステルを種々多数合成することによって調べた。それ以外の「無頭 (h e a d l e s s) 」類似体の類も合成して、疎水性芳香族群が重要であるかどうかを調べた。要するに本発明者らは、効率的に P A T を阻害する化合物を多数設計して合成したのである。本発明に述べるように、多様な置換基を有するモノ、ジ及び多置換ポリアミンは全て薬としての使用を意図したものである。

10

【 0 0 4 7 】

N¹ - 置換ポリアミン類似体は、米国特許出願 0 9 / 3 4 1 , 4 0 0、及び、スペルミンとの典型的な反応を本発明で使用するポリアミンコアの限定を伴わない例としてしばしば記載している米国特許出願 0 9 / 3 9 6 , 5 2 3 といった関連出願に記載されているように調製することができる。ビスポリアミンを調製する際の一保護ポリアミン中間体としては、テトラヒドロフランにおけるジ - t e r t - ブチル二炭酸塩を用いる B l a g b r o u g h ら (T e t r a h e d r o n L e t t . 3 5 : 2 0 5 7 - 2 0 6 0 , 1 9 9 4) の方法によって生成されたアミノ末端^t B o c 誘導体が好ましく用いられた。

20

【 0 0 4 8 】

リードポリアミン類似体化合物は、ビスポリアミンを産生するための類似体を産生する目的で更に改変することができる。例えば、アミド、スルホンアミド又は尿素置換基の周辺の構造を調べた後、ポリアミンコアと頭基の間に 6 つの炭素原子からなる直鎖脂肪族リンカーを導入することにより P A T r への結合が 1 0 倍増加するということが分かった (図 1 参照)。生物学的ターゲットへの親和性が高まったので、更に改変するためのリード化合物としてこの化合物 D A C S (4) を選択した。このリード化合物を更に誘導する方法は関連出願である米国特許出願 0 9 / 3 4 1 , 4 0 0 及び米国特許出願 0 9 / 3 9 6 , 5 2 3 に記載されている。

30

【 0 0 4 9 】

対象とするターゲット (例えばタンパク質) への結合の選択性を実現する成果の多いアプローチとしては、結合分子の高次構造的又は立体化学的に決定された類似体を合成することが有益で一般的であった。可能性のある回転異性体又は高次構造の数を大幅に減らすことにより、所望の部位への結合を増大させることができる分子を選ぶことができる。上記分子はもはや完全な「高次構造的な空間」を必要としないため、ターゲットと相互作用するエネルギーは何倍も増加する。

【 0 0 5 0 】

他にも、ポリアミン類似体に関わる選択性の問題を、高次構造が限定された類似体を合成することによって解決しようとする試みがなされた。G a n e m はスペルミンのブチル部分を 2 - ブテン及び 2 - ブチンジアミノ誘導体で置き換えた (G a n e m , B . , J . O r g . C h e m . 1 9 8 7 , 5 2 , 5 0 4 4 - 5 0 4 6)。R a j e e v , K . G . ら、J . O r g . C h e m . 1 9 9 7 , 6 2 , 5 1 6 9 - 5 1 7 3 は、立体化学的に決定され、高次構造が限定されたピロリジン環をスペルミンバックボーン (図 1 0 ; 1 1 5 , x = 1) に組み入れた。B r a n d , G . ら、T e t r a h e d r o n L e t t . 1 9 9 4 , 3 5 , 8 6 0 9 - 8 6 1 2 はスペルミジン及びスペルミンの環状ポリアミン類似体を合成した。例えば、図 1 0 (1 1 3 , x = 3 , 4 及び 5) を参照。本発明者らはこの研究の範囲を広げて、これ以外の図 1 0 に示す類似体を作成した。上記類似体は様々な公知の方法により合成される。x = 1 である類似体は、G a n e m , B . , A c c . C h e m . R e s . , 1 9 8 2 , 1 5 , 2 9 0 に記載されているように、スペルミン又は N , N ' - ピ

40

50

ス(3-アミノプロピル)-1, 3-プロパンジアミンをホルムアルデヒドと反応させることにより作成する。上記一級アミンは、類似体 111 及び 113 の N-tBoc 誘導体として保護する。その後酸脱保護 (Acid deprotection) により所望の産物が得られる。x = 1 である誘導体 112 もまた、Ganem の方法によって合成した。

【0051】

x = 2 ~ 4 である類似体 111 及び 113 (図 10) は、還元的アルキル化により作成した。エタノール中で、N¹, N^{1,4}-ビス(tBoc)スペルミンをジアルデヒド、OH C(CH₂)_{x-2}CHO 及び NaBH₄ と反応させた。化合物 112 及び 114 は、適切な N¹, N⁴-ビス保護スペルミン誘導体の場合と同様の手法で作成した。

10

【0052】

立体配置が決定された、内部が環状の構造 (図 10, 115) は、対応するアルコールから産生した中間体であるアルデヒドを用いて合成する。この保護されたアルコールは、Swern 条件により酸化 (Swern 酸化) してアルデヒドとすることができる。ホルミルメチレントリフェニルホスホランとの Wittig 反応によってアルデヒドを炭素鎖を伸張し、続いて還元 (過還元されたアルコールは、塩化クロム酸ピリジニウムを用いて再度酸化してアルデヒドとすることができる) 及び還元的アミノ化/環化を行って、x = 2 である類似体を作る完全な配列が完成した。3-プロモプロピルトリフェニルホスホニウムプロマイドとの Wittig 反応、脱保護及び分子内のアルキル化的環化により、x = 3 である類似体を作成できる。どちらの立体異性体も L-又は D-オルニチンでスタートして作成することができる。グアニジニウム基を有するポリアミンは、Iwanowicz, E. J. ら、Synthetic Comm. 23 1443-1445, 1993 の方法により合成する。

20

【0053】

ブレッシン、スペルミジン及びスペルミン等の天然ポリアミンは、多様な「頭」及び「リンカー」基にポリアミンをカップリングさせることにより本発明の組成物に組み込む。同様に用いることができるその他の天然ポリアミンとしては以下のものが挙げられる：N¹-アセチルスペルミン、N¹-アセチルスペルミジン、N⁸-アセチルスペルミジン、N¹-グアニジノスペルミン、カダベリン、アミノプロピルカダベリン、ホモスペルミジン、カルジン (caldine) (ノルスペルミジン)、7-ヒドロキシスペルミジン、サーミン (thermine) (ノルスペルミン)、サーモスペルミン (thermospermine)、カナバルミン (canavalmine)、アミノプロピルホモスペルミジン、N, N'-ビス(3-アミノプロピル)カダベリン、アミノペンチルノルスペルミジン、N⁴-アミノプロピルノルスペルミジン、N⁴-アミノプロピルスペルミジン、カルドペンタミン (caldopentamine)、ホモカルドペンタミン (homocaldopentamine)、N⁴-ビス(アミノプロピル)ノルスペルミジン、サーモペンタミン (thermopentamine)、N⁴-ビス(アミノプロピル)スペルミジン、カルドヘキサミン (caldohexamine)、ホモサーモヘキサミン (homothermo-hexamine) 及びホモカルドヘキサミン (homocaldohexamine)。

30

40

【0054】

in vivo における一置換ポリアミン類似体の代謝安定性は、これらの化合物を改変して酵素分解に抵抗させることによって増大する。例えば、末端一級アミン基をアルキル基で置換すると、酸化的代謝をされないの代謝安定性が増大する。本発明はまた、2級アミノ基をアルキル化した化合物も含む。アミド窒素を N-アルキル化することによりタンパク質分解の速度が遅くなる。

【0055】

アミド結合が代謝において分解されるのを防ぐ方法としては、更にチオアミド誘導体を作る方法もある。本発明のビスポリアミン中で用いる前に化合物 1202L-Lys-スペルミン抱合体に加えた上記の変更を図 11a に示す。上記変更を組み合わせることもまた

50

、本発明の一部に含まれる。

【0056】

上記変更は、数々の合成経路を用いることによって行うことができる。位の炭素原子を2級窒素に置換したり窒素をアシル化したりすることによっても、ポリアミンオキシダーゼによって分解される速度が遅くなる。このような化学的改変を行うことによって、これらの化合物の持つ潜在的な薬理的副作用を最小にすることができる。

【0057】

また、メチル基をスペルミンの末端アミノ基の位に導入することができる(Lakane, J. R.ら、J. Med. Chem. 35: 724-734, 1992)。1, 12-ジメチルスペルミン類似体121は、正常な代謝的分解に非常に強い抵抗性を示した。この化合物は、ビスポリアミンの一部と容易にカップリングする。

10

【0058】

置換基としてアセチル基(47)、N-エチル基(35)及び-ジメチル基(66)を有する4のポリアミン類似体を合成し、(MDA-MB-231細胞のPATrに対する)K_iはそれぞれ2100、41、18nMであることが示された。検出できるよう標識したポリアミン誘導体は、放射標識した¹⁴C-スペルミン又はそれ以外の放射標識したポリアミンを開始物質として用いることにより合成できる。

【0059】

内部の炭素がアルキル化されている多様なポリアミン類似体を合成することもできる。5-カルボキシスペルミン、テトラtBoc-5-カルボキシスペルミン及びその酸クロライドは、Huber, H.ら、J. Biol. Chem. 271: 27556-27563, 1994の方法によって合成する。このように合成した酸クロライドをその後様々な求核性の試薬と反応させ、続いてtBoc基を除去すると、カルボキシル基で置換されたポリアミン類似体を得られる。上記類似体はその後、リンカー及び/又は頭基を与える試薬とカップリングさせる。またこのカルボキシル中間体を還元することによって、多くの類似体の合成において用いられる中間体とすることができる。このような類似体は、アルキル化剤(例えば、内部がアジリジンであるスペルミン誘導体)として、又は、ポリアミン生合成、利用及び分解に関与する酵素(例えば、スペルミンシンターゼ、デオキシヒプシンシンターゼ、ポリアミンオキシダーゼ)の、酵素によって活性化された不可逆的阻害剤として本発明の関心のあるところである。置換された炭素原子に作用するものであれば

20

30

【0060】

ポリアミン誘導体は多数市販されており、これらを更に誘導することにより本発明のポリアミン誘導体を容易に作ることができる。

【0061】

好ましいビスポリアミン

好ましいビスポリアミン化合物としては、図2及び図9a~9jに示すポリアミンの類似体、並びに、それらの誘導体を結合させることによって、抗ガン、抗ウィルス、抗微生物又は抗真菌の化学療法として薬学的な用途を持つものを作るものが挙げられる。そのような化合物としては、図16及び17に示したものと並びにその誘導体であることが特に好ましい。

40

【0062】

本発明の他のビスポリアミン類似体及び誘導体の構造及び機能と比較し、他の類似体の特定の構造的な要素を上記化合物に組み入れて最適化することによって、所望の活性を持つビスポリアミンを更に誘導し最適化することができる。上記構造的な要素は、限定されるものではないが、阻害活性、代謝安定性、特異性、取り扱い性及び投与性、結合親和性、細胞ポリアミンプールへの取り込み防止及び副作用の低減等の機能を向上させるという期待に基づいて選択されるであろう。

【0063】

50

上記構造的な要素を導入して改変した化合物は、本発明で決定されるビスポリアミンの類似体及び誘導体の構造の範囲内のものを含んでいればどんな構造でもよい。言い換えると、上記改変した化合物は、1つ又はそれ以上の原子若しくは官能基を更に有したり、及び/又は、1つ又はそれ以上の原子若しくは官能基を最適化した後で除去したりした結果、本発明で決定されたビスポリアミンの類似体及び誘導体の範囲内の化合物又はこの範囲を超えた化合物のどちらかとなる。

【0064】

好ましい活性を持つ化合物を複数回最適化することによって、ビスポリアミン類似体を更に改良できるようにすることができる。

【0065】

生合成と輸送の両経路の細胞内ポリアミンを涸渇させるという複合療法におけるODC阻害剤の作用と同じ作用を持つ化合物であればどんな化合物でも複数のところから必要とされるため、本発明の複数のビスポリアミンの類似体及び誘導体の設計が進められた。このような化合物は、ポリアミン(プトレッシン、スペルミジン及びスペルミン)の細胞外の取り込みの阻害剤として優れていて、一方それら自身は輸送体の基質又は細胞のポリアミン量を維持するための基質ではないことが要求される。もし上記化合物が輸送体の基質であり、天然ポリアミンとして機能(又はポリアミンに代謝)できたとしたら、上記化合物は細胞のポリアミン量を涸渇させるという目的を達することができなかつたであろう。

【0066】

アミノ酸基以外にも更に -C(=O)NH-、-S(=O)₂NH-、-NH C(=O)-、-HNS(=O)₂-、-HNC(=O)NH-、-HNC(=S)NH-、-O-C(=O)NH-、-O-、-S-、-CH₂-又は-NH-等のカプラーが「頭」基とリンカー部位とを結合しているポリアミンに、頭基が結合しているポリアミンは、本発明のビスポリアミン類似体及び誘導体に含まれる。

【0067】

頭基 (head groups)

1. 概要

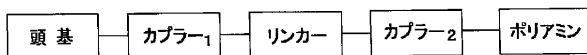
上述のように、本発明のビスポリアミンは、末端アミノ基を媒介として結合されたポリアミン誘導体から形成されている。ビスポリアミンの一部を形成することができるポリアミン誘導体の一例としては、頭基で誘導したポリアミンリード化合物が挙げられる。

【0068】

以下に示したリード化合物の一般構造は、頭基、リンカー及びポリアミンの関係を示している。

【0069】

【式1】



【0070】

この中で、カプラー₁は、-C(=O)NH-、-S(=O)₂NH-、-NH C(=O)-、-HNS(=O)₂-、-HNC(=O)NH-、-HNC(=S)NH-、O-C(=O)NH-、-O-、-S-、-CH₂-又は-NH-であり、カプラー₂は、-C(=O)NH-、-S(=O)₂NH-、-HNC(=O)NH-、-HNC(=S)NH-又は-NH-である。様々なカップリングを用いることによって「頭」基とリンカー部分を結合することができる。上記頭基へ置換できる基としての「頭」基の種類を更に以下に開示する。

【0071】

リンカーについて記載する前に、ポリアミンとリンカーのカップリングについて以下に述べる。その次に、頭基の定義について述べる。

【0072】

頭基として好ましい構造は多岐に涉っているが、アミンに共有結合できる有機基はほとん

10

20

30

40

50

どその候補となる可能性がある。下の表に、用いられる頭基について記載するが、何らこれにより限定されるものではない。さらに本発明のポリアミン類似体に用いるのに適した頭基の例としては、D h a i n a u tら(1996)「多剤耐性の修飾因子としての新しいプリン及びプリン類似体」J. Med. Chem. 39: 4099-4108のコラム表1の「R2」が挙げられる。ここに全てを述べたものとして、その全体は本明細書に組み込まれる。頭基の環状構造上の一置換基及び多置換基も含まれる。

【0073】

【表1】

頭基の置換基表

ハロゲン	シクロヘキシル基	エトキシ基	プロピルエステル基
メチル基	シクロヘプチル基	プロポキシ基	イソプロピルエステル基
エチル基	シクロオクチル基	チオ基	シアノ基
プロピル基	シクロノニル基	メチルチオ基	イソシアナート基
イソプロピル基	シクロデシル基	エチルチオ基	トリフルオロメチル基
ブチル基	ヘキシル基	プロピルチオ基	トリクロロメチル基
イソブチル基	2-ヘキシル基	ブチルチオ基	トリプロモメチル基
tert-ブチル基	3-ヘキシル基	イソプロピルチオ基	アジド基
ペンチル基	アリル基	ニトロ基	アセトキシ基
2-ペンチル基	ビニル基	アミノ基	カルボキサミド基
3-ペンチル基	アセチレニック基	アセトアミド基	N-メチルカルボキサミド基
ネオペンチル基	プロパルギリック基	ホルムアミド基	N,N-ジメチルカルボキサミド基
シクロペンチル基	ホモプロパルギリック基	カルボキシル基	N-エチルカルボキサミド基
シクロプロピル基	ヒドロキシル基	メチルエステル基	N,N-ジエチルカルボキサミド基
シクロブチル基	メトキシ基	エチルエステル基	

10

20

【0074】

2. 芳香族基

芳香族基としては、フェニル基、ナフチル基、1-, 2-又は3-ピフェニル基、インデニル基、アセナフチレニル基、アントラセニル基、フェナンスレニル基、フェナレニル基、トリフェニレニル基、ピレニル基及びジフェニルメチレニル基等が挙げられる。

【0075】

3. ヘテロ環基

ヘテロ環基としては、ピロリジニル基、ピペリジニル基、ピペラジニル基、モルホリニル基、ピフェニル基、フラニル基、ピロリル基、1, 2-ジアゾイル基、イミダゾイル基、1H, 1, 2, 3-トリアゾイル基、1H-1, 2, 3, 4-テトラゾイル基、チアゾイル基、オキサゾイル基、1, 3, 4-チアジアゾイル基、ピリジニル基、ピリミジニル基、1, 2-ジアジニル基、1, 4-ジアジニル基、1, 3, 5-トリジニル基、ジベンゾフラニル基、アクリジニル基、2, 1, 3-ベンゾチアジアゾール基、イソキノリニル基、キノリニル基、ベンズフラニル基、イソベンゾフラニル基、1, 3-ベンゾジアジニル基、フェナジニル基、フェノキサジニル基、フェノチアジニル基、ピラン、クロメニル基、キサントニル基、インドリジニル基、イソインドリル基、インドリル基、プリニル基、フタラジニル基、ナフチリジニル基、キノキサリニル基、キナゾリニル基、シノリニル基、プテリシニル基、カルバゾイル基、 β -カルボリニル基、フェナンスリジニル基、アクリジニル基、ペリミジニル基、フェナントロリニル基、イソチアゾイル基、フラザニル基、インドリニル基、イソインドリニル基、キヌクリジニル基 (quinuclidinyl) 及びピオチニル基等が挙げられる。

30

40

【0076】

4. 脂肪族基

この分類には、リンカーに付着している直鎖、分岐及び環状の炭化水素等がある。このような基としては、炭素数2~10のアルカン; 1~3の不飽和結合を有する炭素数3~10のアルケン; 1~3の不飽和結合を有する炭素数3~10のアルキン; 炭素数3~10の分岐アルカン、アルケン及びアルキン; 炭素数3~8のシクロアルキル基、アダマンチ

50

ル基、カンフォリル基及びコレステリル基等の多環脂肪族炭化水素並びにステロイド状の環構造等が挙げられる。

【0077】

5. a. 種々のDNAインターカレーター

ポリアミンにインターカレーターをカップリングすることによって、ターゲットである核酸に対する親和性がかなり高い薬剤を得ることができる。この使用に適合するインターカレート剤としては、アクリジン、9-アミノアクリジン、プロフラビン、アクチノマイシンD、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ノガラマイシン、メノガリル、エリプチシン、BD-40、アムサクリン、アコダゾール、2-フェニルキノリン、カルボキサミド、クリスナトール、ニトラクリン、ピラゾロアクリジン、ミトノアフィド、アメタントロン、ミトキサントロン、オキサンスラゾール、ビスアントレン、エキノマイシンが挙げられる。DNAインターカレート剤のレビューについては、Baguley, B. C., *Anti-Cancer Drug Design*, 1991, 6, 1-35を参照のこと。

10

【0078】

5. b. 種々の生化学的抱合

薬剤の選択性は、特定の細胞又は細胞上の酵素/受容体をターゲットにすることによって得られる。以下の生化学薬品は、ポリアミンにカップリングさせて選択性を持つ医薬品を製造できるものである：ステロイド、プロスタグランジン、ホスホリピド；NADH、アセチルCoA、AdoMet、フラビン、トリプトファントリプトフィルキノン(TTQ)等の分子を含むヌクレオチド等の酵素補助因子。

20

【0079】

頭基としては、種々の大きさの、ポリエチレングリコール(PEG)に抱合させたポリアミン又はO-メチル化PEG(略称MePEG)重合体が更に挙げられる。

【0080】

6. 多環頭基

頭基には、単一のアルキル置換基から、多環及び多環-単環置換基まで含まれる。この構造の変形体は、米国特許出願09/341,400の図15に模式的に示されている。

【0081】

リンカー基

1. 概要

ビスポリアミン化合物に用いられるポリアミン類似体のリンカー部分は、一方の端にアミノ基、もう一方の端に酸性基を有する一般構造で表すことができる。リンカーの基の1種として、尿素結合を介してポリアミンに結合し、また、アミド、尿素又はスルホンアミド結合を介して頭基に結合している、ジアミノ基がある。頭基はこの他、エーテル、チオエーテル及びC-C結合等によってもカップリングできる。上記の模式構造(「頭基：1. 概要」の標題を付した段落)は、頭基をポリアミンと結合させていて、かつ、長さが望ましく、立体的、高次構造的性質及び疎水性が望ましく組み合わせられているリンカー部位を示している。また、組み合わせることができるカップリングも示している。どのカップリングも、もう一方の位置において米国特許出願09/341,400の図3に示される3つの方法のいずれとも併用することができ、様々な望ましい性質が得られる。

30

40

【0082】

リンカー基は下記に示すような数々の変形によって反映される様々な性質を持つことができる。リンカー構造を変更すると、疎水性、親水性、頭基とポリアミン部分との距離、頭基とポリアミン部分の立体配置、高次構造的な性質、溶解性及び電子的性質等のポリアミン類似体全体の性質に影響が出る。

【0083】

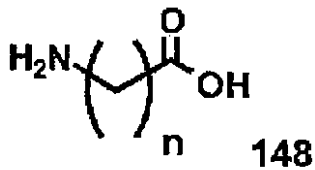
2. 脂肪族直鎖リンカー

頭基とポリアミン間の距離の違いによる影響を調べるため、一連のリンカーを合成した。この一連のリンカーの最も単純なものは、下に化合物148として示す、様々な長さの炭素鎖を持つ直鎖脂肪族リンカーによって表される。

50

【 0 0 8 4 】

【 化 1 】



n = 1 to 12

【 0 0 8 5 】

10

本発明者らは、リンカーの長さがPATの阻害活性と細胞増殖阻害活性に劇的な影響を与えることを見出した。C₆リンカーには、芳香族頭基の存在下では低いK_i値が最適である。しかし頭基が無い場合は、増殖又は輸送阻害活性に著しい違いはなかった。このように、「無頭」化合物のK_i値は約25 nMであるが、細胞増殖(乳ガン細胞系)阻害効果は、細胞が実際に輸送される能力がおそらくは最も大きな原因となって、更に低くなる。前立腺ガン細胞系は、上記「無頭」阻害剤によってより強く阻害される。C₃-無頭化合物は、細胞増殖に対して劇的な効果を示した。

【 0 0 8 6 】

20

種々のポリアミンと頭基を用いて開始する、この一連の化合物の合成経路は、米国特許出願09/341,400の図9に描かれているDACS(4)合成スキームに示されている。アミノ基をN^tBoc基で保護し、p-ニトロフェニルエステルを形成することによってカルボン酸を活性化する。その後N^tBoc基の酸の保護を外し、アミノ基を所望の頭基の酸又はスルホンアミドクロライドと反応させることができる。精製後、選択したポリアミンを用いてメタノール中で直接反応させ、所望の産物を得る。精製は(1) MeOH : 0.5N HCl = 2 : 9の溶液を用いた逆相シリカゲルクロマトグラフィー、又は、(2) 0 ~ 2N NH₄OHの直線勾配を用いたBioRex 70樹脂(NH₄型)によるカチオン交換クロマトグラフィーのどちらの方法によっても行うことができる。

【 0 0 8 7 】

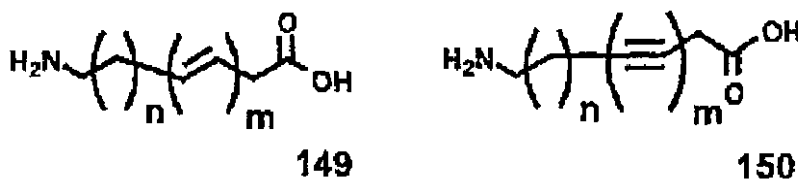
30

3. 不飽和直鎖脂肪族リンカー

下に示すように、アルケン誘導体の幾何異性体と共に、不飽和度の異なる不飽和体(アルケン及びアルキン)をリンカー部位に導入することができる(149及び150)。これらの変形形態によって、最終産物は高次構造的に制限される。

【 0 0 8 8 】

【 化 2 】

**E and Z isomers**

40

【 0 0 8 9 】

式中 n = 0 ~ 7、及び、m = 1 ~ 4

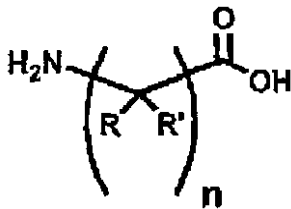
【 0 0 9 0 】

4. 炭素置換型及び環状脂肪族リンカー

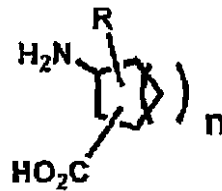
分岐及び環状飽和脂肪族リンカー基により、所望のポリアミン類似体は高次構造的に制限される。以下の化合物151と152はこの分類の構造を示している。

【 0 0 9 1 】

【 化 3 】



151



152

【0092】

式中 $n = 1 \sim 10$ 、 R 及び R' は独立して変更でき、 H 又は CH_3 (CH_2) $_m$ であってもよい。また、 $m = 1 \sim 10$ 。

【0093】

5. キラル炭素置換型アミノ酸リンカー

多数の市販されているキラルアミノ酸のいずれかを用いることによって、様々な構造をポリアミン類似体に迅速に組み込むことができる。いくつかの N - t -Boc 保護アミノ酸及び N - t -Boc 保護アミノ酸 p -ニトロフェニルエステル等のキラルアミノ酸中間体も多く市販されている。図 12 (153) はこの方法で作成した種々の誘導体を図示する。これらのアミノ酸-ポリアミン抱合体は、アミノ酸部位に可変性キラリティーを持っている。このアミノ酸はまた、他の N -置換型「頭基」への「リンカー」としても用いることができる。

20

【0094】

更に、当技術分野において公知の多くの α -アミノ酸類似体もまた、ポリアミン付加物を形成するために用いることができる。これらは、米国特許出願 09/341,400 の図 8 及び図 9 に記載の合成手順によって大変容易に本発明に取り入れることができる。いくつかの重要な例としては、 t -ブチルグリシン、オルニチン、 β -アミノイソ酪酸、2-アミノ酪酸、 γ -アミノスベリン酸、4-クロロフェニルアラニン、シトルリン、 β -シクロヘキシルアラニン、3,4-デヒドロプロリン、3,5-ジヨードチロシン、ホモシトルリン、ホモセリン、ヒドロキシプロリン、 β -ヒドロキシバリン、4-ニトロフェニルアラニン、ノルロイシン、ノルバリン、フェニルグリシン、ピログルタミン、 β -(2-チエニル)アラニン等が挙げられる。また、重要な α -アミノ酸のいくつかは、上述の

30

【0095】

天然 L -アミノ酸 ($L = S$) 又は D -アミノ酸 ($D = R$) のどちらの立体異性体も本発明に用いることができる。各異性体は単独で用いることができるため、類似体の構造多様性は著しく向上する。

【0096】

6. 「無頭」リンカー

所望の生物学的性質は頭基の存在によって必ずしも左右されるわけではない。このため、頭基を持たないポリアミンとリンカーを含むいわゆる「無頭 (headless)」誘導体を多数合成し、分析した。これらの誘導体は、 N - t -Boc アミノ酸の活性エステル (p -ニトロフェニル又は N -ヒドロキシルスクシンイミド) を意図するポリアミンと反応させることによって作る。この結果得られた N - t -Boc 保護誘導体を、BioReX 70 (NH_4 型) 樹脂を用いた、0~2N NH_4OH の直線勾配によるカチオン交換クロマトグラフィーによって精製する。その後、酸処理によって t -Boc 基を開裂させることができる。 t -Boc 及び酸の保護を外した誘導体の両方の生物学的活性を分析することが可能である。他の誘導体と合わせて、上述の全てのアミノ酸を合成した。

40

【0097】

反応性、不可逆性ポリアミン輸送阻害剤

A. アルキル化試薬

50

1. アジリジン

フルオロフォア及びそれ以外のバルキーな末端基で置換したポリアミンは、固有の特性として P A T r に強く結合することが分かった。これにより、診断や研究用ツールとしての用途他に、P A T を阻害することが望ましい病気や健康状態に用いられる治療薬としても有用であることが示唆された。このように D N A 等の他のポリアミンターゲット固有の親和力を持つことにより、治療上の有用性が更に広がることとなる。同様に、このような変性ポリアミンを含むビスポリアミンも、同じ活性を示すと予想される。

【0098】

実施形態としては、ポリアミンコアがアジリジニル基で置換されていることが好ましい。アジリジニル基で置換されたポリアミンは、ターゲット結合錯体（受容体、輸送体、酵素及び核酸）中の求核性基と反応する。更に、他の反応性の部位と結合させてポリアミンとするためにも使用できる。これらの一 - 及び二 - 置換型ポリアミン類似体は、(a) P A T r (b) ポリアミン合成及び (c) 核酸を基質として用いる反応を阻害するため、薬剤として有用である。

10

【0099】

もう一つの実施形態としては、アジリジン以外の反応性の基を、既に頭基とリンカーを置換したポリアミンに導入する。この反応性の基によって、P A T r 等のポリアミン結合ターゲット分子上の適切な求核性部位に、標識したポリアミンを共有結合させることができる。この種の化合物は、受容体、酵素及び核酸を共有結合により標識するために用いられる。このように変性ポリアミンは、診断分析において有用な親和標識、及び、ポリアミン結合ターゲットを単離するためのツールとして用いられる。また、このような化合物を薬剤として用いれば、P A T や D N A - ポリアミンの相互作用をブロックすることによって改善する病気又は健康状態を治療することができるであろう。このような化合物は、結合が相対的に不可逆性であるため、当技術分野において公知の化合物に比べて投与量や回数を減らして用いることができる。

20

【0100】

二置換のポリアミンは、適切なアミン保護基をポリアミンに用いることによって合成する。スペルミンを段階的に機能化させるための試薬は公知である (B e r g e r o n , R . J . ら、J . O r g . C h e m . 53 : 3108 - 3111 (1988) ; B y k , G . ら、T e t r a h e d r o n L e t t . 38 : 3219 - 3222 (1997)) 。 B e r g e r o n ら (上述) は、4つの独立したアミン保護基：ベンジル基、t - ブトキシカルボニル基、トリフルオロアセチル基、及び、2, 2, 2 - トリクロロ - t - ブトキシカルボニル基の使用について記載した。各々の保護基を選択的に除去することを可能にする状態についてもまた、記載している。これらの反応条件では、スペルミンの各窒素を独立に且つ選択的に誘導することが可能である。このように本発明は、一官能スペルミンの4つの窒素のうちいずれか1つをリンカー / 頭基で誘導すること、及び、1つ以上の官能性窒素を用いてポリアミン類似体を合成することを含むものである。

30

【0101】

アジリジン基をスペルミン (L i ら、J . M e d . C h e m . , 39 : 339 - 341 (1996)) 及び、スペルミジン誘導体 (Y u a n ら、P r o c . A m . A s s o c . C a n c e r R e s . , 34 : 380 (1993)) に導入する方法が利用できる。

40

【0102】

2. その他の反応性の基

その他、アジリジン基の代わりに付加でき、求核剤と反応して共有結合を形成するのに用いることができる部位としては、クロロ - 、ブロモ - 及びヨードアセトアミド、スルホニルフロリド、エステル、ナイトロジェンマスタード等が挙げられる。

【0103】

化学的に反応性の2 - ハロアセトアミド基は、適当な2 - ハロ酢酸ハライドと反応させることによって、どのようなポリアミン類似体へも容易に導入することができる。その他の化学的に反応性の基を、以下に記載する。

50

【0104】

B. 光化学的に活性化した試薬

光化学的に活性化した官能基を、生物学的活性を持つ分子に用いることは、十分に公知である (Fleming, S. A., Tetrahedron 51: 12479-12520, 1995)。ポリアミンの分野においては、Felschowらが、アジド安息香酸部位をスペルミンに付着させ、その結果得られた付加物と細胞表面のタンパク質との相互作用を調べた (Felschow, DMら、Biochem. J. 328, 889-895, 1997; Felschow, DMら、J. Biol. Chem. 270: 28705-28711, 1995)。これらの光プローブはPATrに対するスペルミジンの値に対して見かけの K_i 値が $1\mu\text{M}$ であったので、記載されている光標識タンパク質はポリアミン結合タンパク質の混合物であったということになる。本発明における最も効果の高いPAT阻害剤の1つであるDACSは K_i 値が 10nM 未満であり、このことはFelschowらによって報告された化合物よりも100倍も高い親和性を持つことを示している。それゆえ、この分子に光活性化できる基を導入すればPATrタンパク質を単離できる見込みが大きい。

10

【0105】

1. アジド

塩化ダンシルのジメチルアミノ基をアジドで置換することによって、光化学的に反応性の化学基を作成する。1-アジド-5-ナフタレンスルホニルクロライドの調製については既に記載されており (Muramoto, K., Agric. Biol. Chem., 1984, 48(11), 2695-2699)、Molecular Probes社 (Eugene, Oregon) から市販されている。この化合物はDACSの合成スキームに容易に組み込むことができ、塩化ダンシルへ置き換えれば良い。

20

【0106】

このアジド誘導体によって、PATrタンパク質を単離して特徴付けすることができるであろう。また、不可逆性で光活性化できる薬剤分子としてこのアジド誘導体を利用できるであろう。

【0107】

2. ジアジリジン

頭基のジアジリジン基を置換することにより、上述と同様の目的を多数達成することができるであろう。

30

【0108】

3. ジアゾ基

光活性化できる頭基を持つポリアミン類似体を、光活性化できる3-ジアゾピルビン酸基を脂肪族アミンへ導入するための試薬であるp-ニトロフェニル3-ジアゾピルベートを用いて作る。この試薬は、Molecular Probes社から購入することができる。所望の誘導体は、この試薬と遊離アミノ、p-ニトロフェニル活性化リンカー前駆体とを反応させ、リンカー/頭基中間体を精製し、ポリアミンと反応させることによって作る。

40

【0109】

分析用及び診断用としての使用

本発明のビスポリアミン類似体及び誘導体は、リポーター頭基の使用及びポリアミン輸送分析についても記載しているPCT/US98/14896に記載されているように、可溶性タンパク質等の他の薬理的ターゲットを分析するためのリポーター分子及びプローブとしても使用できる。

【0110】

ポリアミン輸送阻害剤の分析

上述の様々な合成経路により作成したビスポリアミンのスクリーニングにより、ポリアミンの輸送を効果的に阻害する化合物を複数見出した。「R」値は、DFMO又は他のポリアミン合成阻害剤の存在下での IC_{50} に対する、DFMO又は他のポリアミン合成阻害

50

剤の非存在下での IC_{50} の比率として計算した。「R」値が1であるということは、ポリアミン輸送阻害剤が、ポリアミン合成阻害剤の存在下で変化を示さないことを表し、輸送阻害剤が輸送を阻害できないか、又は、輸送体に対して特異的でないことを示唆している。

【0111】

予測した通り、ポリアミン合成阻害剤が存在すると、本発明のビスポリアミン輸送阻害剤を単独で使用した場合の細胞増殖の阻害が高まる。阻害が大幅に高まるということは、輸送阻害剤が他の細胞成分と有意に反応していないことを示唆しているので、ポリアミン輸送体の特異的で良好な輸送阻害剤であることを示している。本発明の輸送阻害剤としては「R」値が約2より大きいもの好ましく、約5、10、50、100、200、300及び400よりも大きいものがより好ましい。最も好ましくは「R」値が約500、1000、又は、10,000よりも大きいものである。高い「R」値は、輸送阻害剤も、ポリアミン合成阻害剤単独でも、結果として増殖を阻害できない状態を表すので、この2つを併用すると相乗効果があると考えられるが、これは、特異的な合成阻害剤と併用する輸送阻害剤の特異性によって変化する。このような効果は、阻害活性の大きさ及び特異性の程度が個々の輸送阻害剤に対してそれぞれ異なるので、前もって予測することはできない。

10

【0112】

本発明の「R」値はまた、ポリアミン合成阻害剤の存在下又は非存在下での本発明のポリアミン輸送阻害剤の IC_{50} 値との関連においても考察することができる。このように考察することにより、活性成分としての輸送阻害剤の持つ潜在的な有用性に関して有用な情報を得ることができる。ポリアミン合成阻害剤の存在下での IC_{50} 値に対する「R」値は、再試験されることが好ましい。というのは、阻害活性にとっては高濃度であることが必須であるため、もしその IC_{50} 値が高すぎると輸送阻害剤が活性剤として利用できる見込みがないためである。「R」値が非常に高いとしても、この高濃度が必要であることは必ずしも否定されるものではないと考えられる。このように本発明の阻害剤としては、ポリアミン合成阻害剤と併用した場合に、 IC_{50} 値が約100 μ M程度のものが好ましい。より好ましくは、ポリアミン合成阻害剤の存在下での IC_{50} 値がそれぞれ約75、50及び25 μ M未満のものである。最も好ましくは、ポリアミン合成阻害剤の存在下での IC_{50} 値が約10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01 μ M未満の化合物である。

20

30

【0113】

速度論的測定と生物学的分析により、本発明者らは、PATの阻害と増殖と間に高い相関関係があることを見出した。

【0114】

医薬組成物及び治療学的組成物

本発明のビスポリアミン類似体及び誘導體、並びに、その医薬的に許容できる塩は、医薬組成物に配合することができる。塩基性の基を含んでいて本発明の化合物の医薬的に許容できる酸添加塩は、当技術分野において公知の方法により、塩基性アミンの存在下で、強力又は適度に強力で毒性を持たない有機若しくは非有機酸を用いて作る。本発明に含まれる酸添加塩の例としてはマレイン酸塩、フマル酸塩、乳酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩及び硝酸塩である。

40

【0115】

上述のように、本発明の化合物は、数々のあらゆる病気や健康状態（最も注目すべきはガン）の治療において開発されてきた特性を有している。本発明の組成物は、本質的に活性でも良く、又は、*in vivo*で活性な形態に変化する「プロドラッグ」でも良い。

【0116】

本発明の化合物、及び、その医薬的に許容できる塩はカプセルや浸透オブラート剤、錠剤、又は、注射用調剤等の便利な投薬形状に取り入れても良い。固体又は液体の医薬的に許容できる担体を使用しても良い。徐放性又は遅延性としてデザインされた医薬組成物をさ

50

らに配合しても良い。

【0117】

好ましくは、本発明の化合物は、例えば注射投与等によって系統的に投与するのが良い。本発明の化合物が使用される場合、注射はあらゆる公知のルートによるものでも良いが、好ましくは静脈注射、皮下注射、筋肉内注射、頭蓋骨内注射又は腹膜内注射である。注射可能薬剤は従来形態で調剤され、溶液若しくは懸濁液、注射の前に液体中で溶液や懸濁液にするのに好適な固体状、又は、乳剤のいずれでも良い。

【0118】

固体の担体としては、でんぷん、ラクトース、硫酸カルシウム二水和物、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、ステアリン酸マグネシウム及びステアリン酸が含まれる。液体の担体としては、シロップ、ピーナツ油、オリーブ油、生理食塩水、水、ブドウ糖及びグリセロール等が含まれる。同様に、担体や希釈剤にはモノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル等の放出を遅らせるいずれかの物質を単独又はワックスと共に含有しても良い。液体の担体を用いる場合、調剤はシロップ、エリキシル、乳液、軟質ゼラチンカプセル、液体含有カプセル、アンプル等の無菌の注射可能な液体（例えば溶液等）、又は、水溶性若しくは非水溶性の液体懸濁液等の形態で良い。そのような医薬組成物の一覧は、例えば、レミントン製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (Gennaro 第18版、1990)）等で見ることができる。

【0119】

医薬調剤は、以下の製薬化学の従来技術、つまり、例えば適宜、混合、粒化及び圧縮、並びに、錠剤として必要な成分の混合、充填及び溶解等の工程を含む従来技術によって製造することができる。それによって、局所投与、経皮投与、腔内投与、鼻腔内投与、気管支内投与、頭蓋骨内投与、眼内投与、耳内投与及び直腸投与等の経口又は非経口投与に望ましい生成物が得られる。医薬組成物は更に湿化剤又は乳化剤、pH緩衝剤等の少量の無毒性助剤を含んでいても良い。

【0120】

投与経路は系統的である方が好ましいが、医薬組成物は局所投与若しくは経皮投与（例えば軟膏、クリーム又はジェルとして）、経口投与、直腸投与（例えば坐薬として）、非経口投与（注射投与又は連続点滴投与）、腔内投与、鼻腔内投与、気管支内投与、頭蓋骨内投与又は眼内投与でも良い。

【0121】

局所投与の場合、膏薬又は軟膏等の局所用賦形剤に取り入れることもできる。活性成分の担体は、噴射可能なものでも噴射ができないものでもどちらでも良い。噴射ができないものとしては、局所投与固有の担体からなり、且つ、好ましくは水よりも大きな動的粘性を有する半固体又は固体形状をとり得る。好適な配合としては、特に限定される訳ではないが、溶液、懸濁液、乳液、クリーム、軟膏、粉末、塗布剤、膏薬等がある。所望であれば、これらは助剤（例えば、防腐剤、安定剤、湿化剤、緩衝剤、又は、浸透圧に影響を与える塩等）と共に滅菌又は混合しても良い。噴射ができない局所投与用調剤のための好ましい賦形剤としては、軟膏基剤（例えばポリエチレングリコール-1000（PEG-1000）等）、HEBクリーム等の従来クリーム、ジェル、及び、石油ゼリー等である。

【0122】

更に局所投与に好適なものとしては、上記の化合物が、好ましくは固体又は液体の不活性担体物質と併用して、中身をしばり出せるプラスチック容器に、又は、加圧した揮発性の標準の高圧ガスとの混合物として詰められている噴射可能なエアゾール調剤である。エアゾール調剤は本発明の上記の化合物に加えて、溶媒、緩衝剤、界面活性剤、香料、及び/又は、酸化防止剤を含んでも良い。

【0123】

好ましい局所投与として、特にヒトに対しては、ターゲットとする領域（例えば皮膚表面

10

20

30

40

50

、粘膜、眼等)に対して有効量の化合物を投与することが好ましい。この有効量は、治療面積、症状の重さ、及び、使用する局所投与薬剤用賦形剤の性質にもよるが、一般的には一回の塗布当たり約0.001mgから約1gの範囲である。

【0124】

本発明の組成物は、病気や望ましくない健康状態を治療するのに使われる一以上の添加化合物と併用して得られる。ガンを治療するために、ポリアミン類似体及び誘導体は、ピンブラスチン等の有糸分裂阻害剤、シクロホスファミド等のアルキル化剤、メトトレキサート、プリトレキシム、若しくは、トリメトレキサート(trimetrexate)等の葉酸阻害剤、5-フルオロウラシル及びシトシンアラビノシド等の坑代謝剤、アドリアマイシン及びブレオマイシン等のインターカレーション抗生物質、アスパラギナーゼ等の酵素又は酵素阻害剤、エトポシド等のトポイソメラーゼ阻害剤、又は、インターフェロン等の生体反応変成剤等の坑腫瘍剤と組み合わせて得られる。実際、本発明で開示されているポリアミン類似体及び誘導体と併用される公知のガン治療剤のいずれかを含む医薬組成物は、本発明の範囲内にある。本発明の化合物は、DFMOなどのポリアミン合成阻害剤と併用して投与することが最も好ましい。

10

【0125】

本発明の医薬組成物は、抗バクテリア薬、抗真菌薬、抗寄生虫薬、抗ウィルス薬、抗コクシウム剤等を含む抗感染薬等の一以上の他の薬剤を含んでも良い。

【0126】

本発明の化合物の一回の服用量は具体的には約1ng/kg体重から約10g/kg体重の間である。一回の服用量は好ましくは約0.01mg/kg体重から約1g/kg体重であり、最も好ましいのは約0.1mg/kg体重から約100mg/kg体重である。局所投与の場合は、服用量は化合物濃度がおよそ0.01~20%の範囲であり、好ましくは1~5%であることが提案される。一日あたりの全服用量は、経口投与で1~500mgの範囲であることが好ましい。しかしながら、上記の範囲は個人の治療の摂生が大きい時には変わり得る値として提案するものであり、推奨する値からの考慮できるずれは予想され、よって当業者により決まり通りに行なうことができる。

20

【0127】

病気や望ましくない健康状態を治療するための化合物の有効量又は有効服用量は、特定の病気や望ましくない健康状態に対して、容認されている*in vitro*の系や*in vivo*の動物モデルを使って決定することができる。ガンの場合には、多くの従来から容認されているモデルが知られており、ヒトの腫瘍の幅広のスペクトルが代表的である。上記化合物は培養中の腫瘍細胞増殖の阻害について、ヒト又はヒト以外の動物を起源とする数多くの腫瘍細胞系のいずれかを用いて標準の検定法でテストすることができる。動物モデル等を含むこれらのアプローチの多くは、ゲラン(Gerlan), R.I.ら、「動物の腫瘍及び他の生物系に対する化学的薬品並びに天然生成物をスクリーニングするためのプロトコル("Protocols for Screening Chemical Agent and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems")」第三版、Canc. Chemother. Reports, Part 3, 3:1-112に詳しく述べられている。

30

40

【0128】

合成方法

パラレルライブラリー合成及びコンビナトリアルアプローチ等の、本発明のビスポリアミンを調製するためにポリアミン類似体及び誘導体の製造するのに必要な合成方法は、PCT/US98/14896に記載されている。

【0129】

さらに、本発明は、ポリアミンが容易に製造できる合成方法を提供する(図3A及び図3B及び下記の実施例参照)。手短かに言えば、この方法は、結合してポリアミンを形成する出発基質として、^tBoc基で保護したポリアミン誘導体を使用する。次に、これらのポ

50

リアミン生成物はイオン交換クロマトグラフィーにて生成される。生成物の溶離液は回収して、必要な場合には行う次の脱保護を行うことができる。

【0130】

【実施例】

ここまで本発明の概要を述べてきたが、本発明を更に理解し易くするために、以下に例示による実施例を記載する。なお特に断りのない限り、本発明がこれにより限定されるものではない。

【0131】

実施例 1

輸送におけるポリアミン類似体のスクリーニングと増殖分析

いくつかの強力な P A T 輸送阻害剤の P A T に対する効果と、M D A 細胞の増殖を図 2 (3 - 9 8) に要約する。比率「R」は、O D C 阻害剤と混合したポリアミン類似体の I C₅₀ に対する、ポリアミン単独の I C₅₀ を示す。この「R」値は、ポリアミン類似体と O D C 阻害剤間の「相乗作用 (s y n e r g i s m) 」の相互水準を示す。この増殖分析条件下において、O D C 阻害剤単独では阻害効果は見られなかった。

【0132】

実施例 2

K_i の定量と構造活性の関連性

本発明のビスポリアミン類似体と誘導體は、培養組織中で、M D A 中へのスペルミジンの摂取の阻害能力を評価することができる。女郎グモ毒 J S T x - 3 は C a l b i o c h e m から購入することができる。また、1 - ナフチルアセチルスペルミンは R B I から購入が可能である。デオキシスペルグアリンは、P a u l G l a d s t o n e 氏からの寄贈による。ビスポリアミン類似体の K_i 値は図 1 6 の方法で測定した。その結果を共に図 1 6 に示す。

【0133】

実施例 3

D F M O とスペルミジンを用いた M D A 細胞に対する I C₅₀

O D C 阻害剤 D F M O と共に、スペルミジン 1 μ M を加えた条件下で、アミノ酸 / スペルミンアミドの能力を強調する細胞分析を開発した。細胞はポリアミンの生合成が阻害されている時でも、培養媒体に加えたスペルミジンを利用できるので、D F M O 単独ではこの分析で増殖阻害は見られない。分析した全ての類似体や誘導體による、外因的に加えられたスペルミジンのこのような摂取阻害により、結果的にポリアミンが涸渇して、増殖阻害が観察できるようになる。

いくつかの脱保護ビスポリアミンを用いた結果を図 1 6 に示す。

【0134】

実施例 4

ビスポリアミンの合成

ビスポリアミンを合成する基質は、2 段階を経て作成することができる。リンカー部分の合成と、一保護ポリアミンの合成である。

【0135】

典型的なリンカーは、相当する酸クロライドを、4 - ニトロフェノールを用いて、パラニトロフェニル活性エステルに転化させることによって、調製される。図 4 を参照のこと。このような活性エステルの例を図 1 8 に示す。これらはエタノール / C H₂ C l₂ (1 0 ~ 3 0 % エタノール) 中で再結晶化することによって精製し、高減圧下で乾燥させる。

【0136】

ポリアミンは、従来技術で公知の方法によって、保護することができる。例えば、ジ - t e r t - ブチルジカーボネート (1 当量又は “ e q ”) を、スペルミンのジオキサン / 水溶液に N a O H (1 当量) と共に 1 時間半かけてゆっくりと加えることによって、スペルミン (3 当量) は一保護になる。図 5 を参照のこと。2 4 時間攪拌した後、溶媒を蒸発させて、得られた化合物を B i o - R e x カチオン交換カラム (4 5 × 2 . 5 c m) を用い

10

20

30

40

50

て精製する。

【0137】

ビスポリアミンは、図3Aに示されている反応スキームにあるように、パラニトロフェニル活性化エステルを保護スベルミンと反応させて、合成することができる。

【0138】

例えば、2.2当量の N^1-t Boc-スベルミンの10mLメタノール溶液が入ったフラスコに、DMF 5mLとMeOH 10mLの混合液中に溶解した1当量の4-ニトロフェニルエステルを滴下し、3時間又は一晩かけて攪拌した。

【0139】

次に、1当量の4-ニトロフェニルエステルを固体に加え、さらに3時間攪拌してもよい。溶媒を蒸発させ、DMFを高減圧下で除去した。得られた粗生成物をそのまま一度水中で溶解させ、Bio-Rexカチオン交換カラム(45×2.5cm)を用いて精製した。

【0140】

必要であれば、ビスポリアミンの溶解性が良いことから、50%MeOH/水溶液を溶媒として用いてもよい。得られた化合物を、0~1N又は2Nの勾配範囲の NH_4OH を用いて溶離した。適量の留分を取っておき、溶媒を蒸発させてビスポリマーを得た。

【0141】

その後、 N^1-t Boc-スベルミンを、図18に示すスクシニル($n=2$)で結合したジスベルミン等の8つのパラニトロフェニルエステルにカップリングした。これらの化合物のうち6つを、Bio-Rexカチオン交換クロマトグラフィーを用いて精製した。得られる粗生成物は、薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析すると、一般的に2つのスポットからなる混合物である。両方のスポットは N^1-t Boc-スベルミンより上方に移動し、一方は一般的に溶媒前端に移動し、もう一方は N^1-t Boc-スベルミンより幾分上方に移動する。しかしこれは、パラニトロフェニルエステルと共に変化する。

一般的に、このスポットは n の値が増加するにつれて、上方に移動する。 $n=10$ の場合(ドデカンジオイル誘導体)では、2つの斑点は溶媒前端近くに、互いにかかなり近接して移動する。より高い n の値を持つ化合物の精製は、一般に0~1又は1.5N NH_4OH 勾配を用いて溶離する。

しかし、1つの例外は、TLC上の4つの反応生成物からなるスクシニル誘導体である。この誘導体は水の代わりに50%MeOH/水溶液を溶媒として用いることにより、うまく精製することができた。

【0142】

N^1-t Bocの保護基を除去するために、5mLの3M HClを上記の反応条件に加え、その後1時間攪拌してもよい。

【0143】

t -boc保護ビスポリアミンの 1H 及び ^{13}C NMRスペクトルを、 1H のみ測定したORI1268を除き、測定した。同様に、脱保護した最終生成物ORI1236、1288、1289、1290の 1H 及び ^{13}C NMRスペクトルを得た。また、ORI1288及びORI1290の質量分析も完了した。

【0144】

実施例5

ビスポリアミンによるポリアミンの輸送阻害

分析を行った大部分のスベルミン二量体は、輸送阻害において、75nMより低い、大変良好な K_i 値を示した。ORI1236は K_i 値22nMを示した、最も強力な阻害剤であった。この値は、ORI1090の K_i 値と同等である(MDA細胞に対しては、10~22nM)。ORI1275のみが、100nM以上の K_i 値を示した($K_i=219$ nM)。得られた結果は、概して増殖阻害分析に反映された。全ての化合物は、IC₅₀が10μM以下のDFMOとの相乗作用が認められた。最も強力な成長抑制剤はORI1

288で、続いてORI1286、1236、1289、1290、1275、1299の順であった。

【0145】

学説と違い、短い結合を持つスベルミン二量体は、長い連鎖を持つ類似体よりもわずかに効力が高いようである。この類似体間では、よりはっきりとした活性の違いはなかったので、輸送体のポリアミン結合部位の脂肪族リンカーの長さに、かなりの程度の公差があるものと推測される。このことはまた、1202と1090等のPTI阻害剤のリンカーの長さに、いくらかの公差があるという発見を裏づけるものである。これらのビスポリアミン分子は、1202や1090等の輸送体と同様の方法で、相互に作用する可能性がある。

10

【0146】

DFMOと組み合わせたORI1236は、対照実験として行ったORI1202/DFMOよりも低い最大の増殖阻害力を持つことが認められた。このことは、ORI1236が部分的にポリアミンの涸渇を抑える作用を持つ可能性を示唆した。続いて、ORI1236は部分的にDFMOの涸渇を抑えることが分かった。ORI1287以外の分析したほとんど全ての他のビスポリアミン化合物は、対照実験として行ったORI1202/DFMOよりも低い最大の増殖阻害力を示した。ORI1236と1290は、再び分析を行い、ORI1290のみが、涸渇抑制作用を示した。

【0147】

以前に具体的に組み込まれたかどうかに関わらず、ここに引用した全ての参照は、これにより全体が参照として組み込まれる。

20

ここまで本発明を十分に記載してきたが、同様の実験が幅広い当量のパラメーター、濃度、条件の範囲内で、本発明の意図と範囲から離れることなく、また過度の実験をすることなく行われることは、当業者に高く評価されるであろう。

【0148】

発明の具体的な実施形態との関連において本発明を記載してきたが、更なる改良が可能であることが理解されるであろう。本願は、概して本発明の原則に従いながら、本発明のあらゆるバリエーション、使用又は適合を包含することを意図するものであり、また本開示が属する従来技術内の公知あるいは習慣的な実用に入り、かつ請求の範囲に従ってこれまでに記載された本質的な特徴に適用できるような本発明から始まる第一歩を含んでいる。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はスベルミジン、MDS及びDACSの間の構造及び活性の関係(SAR)を示す。 K_i 値は、PAT阻害分析で得た阻害定数である。

【図2】図2/1は細胞増殖における効果を試験した3から11の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数)は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図3】図2/2は細胞増殖における効果を試験した12から21の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数)は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

40

【図4】図2/3は細胞増殖における効果を試験した22から31の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数)は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図5】図2/4は細胞増殖における効果を試験した32から41の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増

50

殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図6】図2/5は細胞増殖における効果を試験した42から51の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図7】図2/6は細胞増殖における効果を試験した52から61の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図8】図2/7は細胞増殖における効果を試験した62から71の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図9】図2/8は細胞増殖における効果を試験した72から81の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図10】図2/9は細胞増殖における効果を試験した82から91の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図11】図2/10は細胞増殖における効果を試験した92から98の多くの化学構造を表で示したものである。増殖阻害活性の指標であるRは、試料化合物の存在下での細胞の増殖の、DFMOを加えた化合物の存在下での増殖に対する割合である。 K_i (阻害定数) は、細胞培養におけるPATの、化合物による阻害を反映している。これらの生物学的効果は、SAR分析の基準を提供するものである。

【図12】図3Aは本発明のビスポリアミンの調製の典型的な合成経路を示す。この合成スキームにおいて、スペルミン誘導体を4-ニトロフェニルエステルと結合することによって、2つの N^1-t Boc-スペルミンポリアミンを含むビスポリアミンが生産される。この反応の粗生成物は、メタノール(MeOH)及びジメチルホルムアミド(DMF)溶媒を蒸発及び/又は高真空により除去した後、陽イオン交換カラムを用いたもののようなカラムクロマトグラフィーによる精製のために、水又は50%のMeOH/水のどちらかに溶解することができる。溶出は0Nから1N又は2Nにわたる勾配を持つ NH_4OH で行った。

【図13】図3Bは図3Aと同じくビスポリアミンの調製の典型的な合成経路を示すが、更に先の、 N^1-t Boc保護基を3M HClで除去する工程を伴う。

【図14】図4はp-ニトロフェニル基によって活性化されたエステルの、相当する酸塩化物からの転化による調製の典型的な合成経路を示す。図5は、ジ-tert-ブチルジカーボネートで処理することによるスペルミンにおける末端アミン基の保護の典型的な反応を示す。

【図15】図6は、結合してビスポリアミンを形成してよい本発明の好ましいポリアミン類似体を示す。

【図16】図7は、脂肪族又は芳香族の二酸鎖により結合されたスペルミンのビス-アミ

10

20

30

40

50

【図42】図9hは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図43】図9hは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図44】図9hは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図45】図9hは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図46】図9hは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図47】図9iは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図48】図9jは、本発明のビスポリアミンを形成するのに用いてよい数々の N^1 -置換ポリアミンを分類した表を含む。

【図49】図10は、立体配置的に限定されたポリアミン類似体の4種 (111 - 114) を示し、本発明のビスポリアミンの調製に用いてよい、立体化学的に定義され、内部が環状のポリアミン類似体 (116) を一番下に示す。

【図50】図11は、本発明のビスポリアミンの調製に用いてよい、1202L-Lys-スペルミン化合物及びこの化合物の変形形態を示す。

【図51】図12は、アミノ酸部位のキラリティーが異なる、アミノ酸-ポリアミン抱合体の一覧を示す。これらのアミノ酸は本発明のビスポリアミンの形成に用いてもよい。

【図52】図13及び14は、本発明のビスポリアミンの調製に用いてよい、ピオチン修飾ポリアミンである N^1 -[(N^6 - (ピオチニル) - 6 - アミノカプロイル)]スペルミン及び N^1 - (ピオチニル) スペルミンの合成を示す。

【図53】図15、パネルA及びBは、改変したポリアミンにおいて「固定ハンドル」と「レポーターハンドル」の結合を作成することが可能な部位を示す概略図である。これらの改変されたポリアミンは、本発明においてビスポリアミンを産生するのに用いられてよい。

【図54】図16は、本発明において好ましい、保護が外されたビスポリアミンの表である。

【図55】図16は、本発明において好ましい、保護が外されたビスポリアミンの表である。

【図56】図17は、本発明において好ましい、保護されたビスポリアミンの表である。

【図57】図17は、本発明において好ましい、保護されたビスポリアミンの表である。

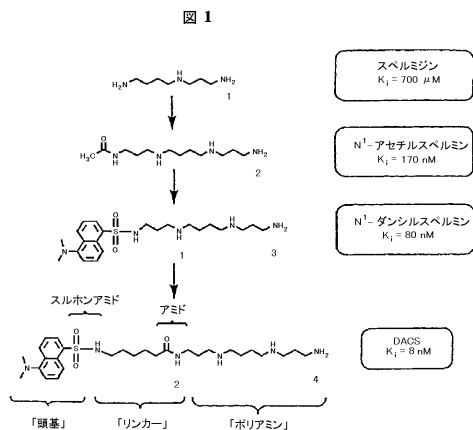
【図58】図18は、ビスポリアミンの調製に適した活性化エステルを示す。

10

20

30

【 図 1 】



【 図 2 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
3		0.080	20	1
4		0.010	400	9, 13
5		0.010	210	13
6		0.005	220	13
7		0.10	3.6	3
8		0.110	3.7	2
9		0.440	2.7	4
10		0.050	>10	15
11		0.190	2.4	15

a ポリアミンの取り込みの阻害: Ki はラインウィーバー-バーク二重逆数プロットから決定した
b 腫瘍細胞増殖の阻害: RはIC50(化合物単独)のIC50(化合物+DFMO)に対する割合
c 実施例(合成を示す)の番号を指す
d アドルフィケミカル社より購入

図 2/1

【 図 3 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
12		0.150	4.3	15
13		0.058	>47	15
14		0.037	14	17
15		0.091	2.2	2
16		0.08	2.1	15
17		0.43	>31	15
18		0.083	40	17
19		0.24	>10	15
20		0.23	1.0	17
21		0.084	1.0	17

図 2/2

【 図 4 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
22		0.066	11	15
23		0.250	6.2	2
24		0.23	10	15
25		0.067	8.6	15
26		0.180	15	15
27		0.650	9.9	15
28		0.054	9.3	15
29		0.076	>46	15
30		0.120	>10	15
31		0.083	>12	12

図 2/3

【 図 5 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
32		0.093	2.1	17
33		0.17	1.4	15
34		0.120	1.0	15
35		0.041	33	13
36		0.61	>2	17
37		0.150	2.4	17
38		0.140	1.0	17
39		0.500	1	17
40		0.086	18	17
41		0.200	1.0	17

図 2/4

【 図 6 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
42		0.110	1.1	14
43		0.033	76	17
44		0.073	39	13
45		0.052	3.0	13
46		0.082	63	13
47		2.1	6.8	13
48		0.079	>49	13
49		0.067	3.2	15
50		0.12	1.0	17
51		0.083	1.5	15

図 2/5

【 図 7 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
52		0.094	5.3	15
53		0.18	1.0	15
54		0.19	2.0	15
55		0.075	>1.1	4
56		0.190		d
57		0.017	170	15
58		0.030	189	13
59		>1		13
60		>1		13
61		0.200	1.0	13

図 2/6

【 図 8 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
62			>2.0	13
63		0.050	>1	13
64		0.046		13
65		0.012		13
66		0.018	27	13
67		0.07	1.0	13
68		0.110	>4.4	13
69		0.22	1	15
70		0.033	>12.2	13
71		0.160	>1.5	13

図 2/7

【 図 9 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
72		0.031	>100	13
73		0.094	>1	13
74		0.200	1.0	13
75		0.130	>1	13
76		0.040	1.0	13
77		0.093	1	13
78		0.156		13
79		0.047	1	13
80		0.258		13
81		0.0096	153	13

図 2/8

【 図 10 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
82		0.097	>54	13
83		0.183		13
84		0.036	>5.2	13
85		0.048	>6.5	13
86		0.091		13
87		0.034	>1	13
88		0.014	>40	13
89		0.020	>1	13
90		0.077		13
91		0.037	1	13

図 2/9

【 図 11 】

#	構造	Ki (M) ^a	R ^b	方法 ^c
92		0.300	1	13
93		0.061	1	13
94		0.042	1	13
95		0.030	1	13
96		0.034	1	13
97		0.027	1	13
98		0.180	12	d

図 2/10

【 図 12 】

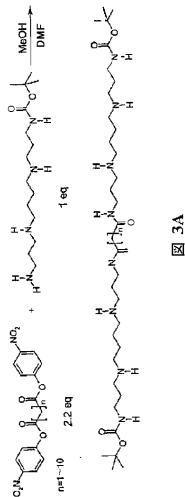
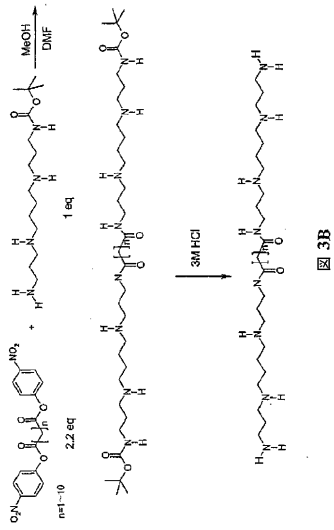
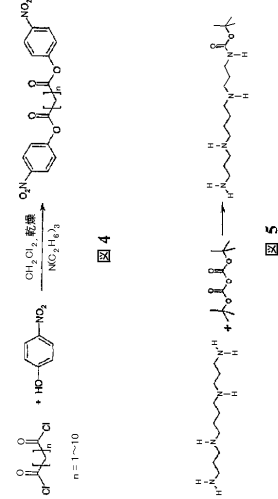


図 3A

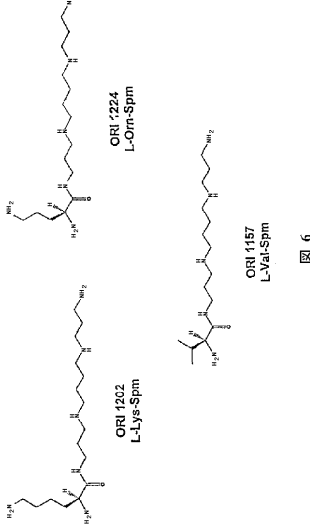
【 図 1 3 】



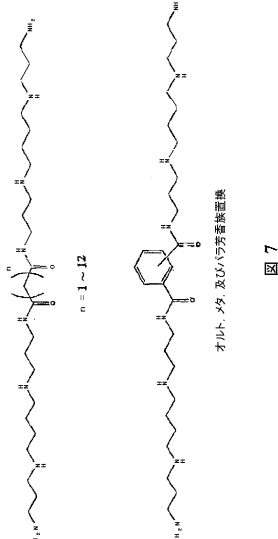
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 17 】

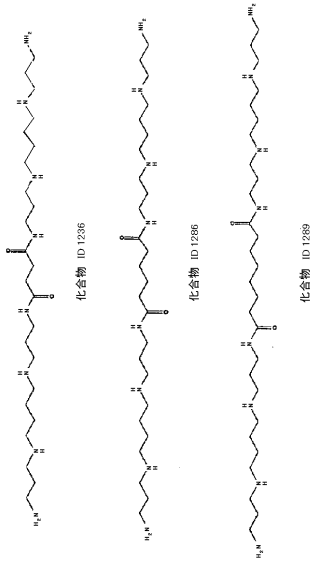


図 8

【 図 18 】

ID	NI 一置換ホルミルアミン、リソカール、構造	輸送>細胞系	Ki	輸送阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
1032	307.5248	MDA	0.19	MDA	3.58	>300
1033	421.9748	MDA	0.083	MDA		>300
1036	616.5189	MDA	0.28	MDA		50
1037	472.6331	MDA	0.084	MDA		100
1038	407.3474	MDA	>10	MDA		>300
1039	502.4818	MDA	>10	MDA		30
1043	407.6335	MDA	0.344*	MDA	22.3	200
1053	394.6648	MDA	0.4	MDA		280
1072	565.0762	mda	>1			

図 9A

【 図 19 】

ID	NI 一置換ホルミルアミン、リソカール、構造	輸送>細胞系	Ki	輸送阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
1073	305.4540	MDA	>10	mda	150	>300
1076	425.6911	MDA	0.116*	mda	28.1	150
1077	501.1143	MDA	0.098*	mda	2.48	56
1078	447.604	MDA	0.037	mda		19
		MDA	0.19*	pc-3		16.4
		MDA		ccc-2		24.4
		MDA		cem		6.9
1078	425.6323	MDA	0.084*	pc-3		63
1080	346.6202	MDA	0.056*	mda	7.4	76
		MDA		mda		100
1081	442.6593	MDA	0.030	mda		26
		MDA	0.297*	mda		26
		MDA		pc-3		5.5
		MDA		ccc-2		23.0
		MDA		cem		1.7
1104	457.4048	MDA	0.12*	mda		18
		MDA		pc-3		20.2
		MDA		ccc-2		30.2
		MDA		cem		4.5

図 9A (続き)

【 図 20 】

ID	NI 一置換ホルミルアミン、リソカール、構造	輸送>細胞系	Ki	輸送阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
1163	302.4538	MDA	0.083	mda		>100
1166	230.36	MDA		mda		>100
1167	235.3843	MDA		HI57		>100
1168	412.62	MDA	0.252	mda		>100
1206	300.47	MDA		ccc-3	>300	>300
1210	362.37	MDA		ccc-3	20.1	>300
1211	341.41	MDA				
1213	326.4629	MDA				
1214	325.46	MDA				
1215	284.45	MDA				
1216	313.49	MDA				

図 9A (続き)

【 2 1 】

図 9A (続き)

ID	N1-置換ピロリジン-2-アミド-リンカーなし 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1217	307.441		輸送>細胞系				
1218	307.4424						
1235	354.5792		MDA	1.14			>300
1240	378.6682				mda		>300
1249	470.6594				pc-3		>300
1251	392.5063		MDA	>1			
1347	472.6795		MDA				

【 2 3 】

図 9B (続き)

ID	N1-置換ピロリジン-2-アミド-リンカーあり 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1059	546.822		MDA	5.0*	mda		70
1060	439.8164		MDA	0.039	mda	>300	>300
1051	576.8513		MDA	0.00895	mda	43	380
			MDA	0.0942	mda	3.81	580
			MDA	41.2 nM	mda		
			MDA	57.8 nM	mda		
1063	650.7686		MDA	89*	mda		18
1064	510.7013		MDA	> 30	mda	>100	>100
1065	632.9597		MDA	0.78	mda	>30	>30
1066	650.9722		MDA	19.2*	mda		27
			MDA	pc-3	caat-2	8.7	>30
			MDA	cent	mda	2.9	>30
1007	482.0588		MDA	0.070*	mda	>30	>30
1008	500.7467		MDA	0.43	mda	>30	>30
1009	459.831		mda	>1			
			MDA	0.74			

【 2 2 】

図 9B

ID	N1-置換ピロリジン-2-アミド-リンカーあり 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1002	542.7972		MDA-MB-231	0.24*	MDA-MB-231	2.2	>100
			A172	0.016*			
			PC-3	0.0339*			
			MCF-7	0.012			
			MDA	0.0152*			
			CaCo	0.0078*			
			mda	0.0246-0.13	MDA-MB-231	2.0	>100
			mda	0.0062-0.03	mda	0.93	460
			MDA	4.6 nM	mda	2.0	380
			mda		mda		72
7009	472.6795		MDA	0.104	mda	<3	25
			A172	0.12			
1022	370.5463		MDA	0.230	MDA	9.4	79
			MDA		MDA	0.26	>300
1040	407.5974				mda		>100
1055	398.5718		MDA		mda		8.9
1056	398.5807		MDA	0.11*	MDA		150

【 2 4 】

図 9B (続き)

ID	N1-置換ピロリジン-2-アミド-リンカーあり 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1083	407.5974		mda	81.3	mda		>300
1085	373.5065		mda	2.2			
1088	481.8		mda	0.0147	mda	3.900	300
1089	520.2897		MDA	0.00997			
			PC-3	0.070*			
			MDA	3.07134			
			MCF-7	0.0242			
			CaCo	0.022*			
			MDA	13.3-15.7 nM	mda	1.54	>300
			MDA	0.0218 Pre-			
			MDA	0.0273			
			HT-29	0.0812			
			Drd45	0.018			
1091	630.6945		mda	>30			
1096	584.8446		MDA	0.094*	mda	25.5	190
			MDA	0.0397			
			MDA	0.117			
1097	465.6378		MDA	0.0817	mda	5.24	1200
			mda		mda	5.62	1300
1098	590.8346		MDA	2.1	mda	286	>1000

【 25 】

図 9B (続き)

ID	NI 一置換アミノアミン、リンカーあり	分子重	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DEMC (C50)
1100	構造	545.75	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C</chem>	MDA	0.0165*	mda	0.589
				MDA	0.02485		
				PC-3	0.0164		
				MDA	0.0167		
				MDA-7	0.0168		
				Ca62o	0.05663		
1101	構造	513.7292	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0793	pc-3	3.0
				MDA	0.162	mda	6.77
1107	構造	314.5196	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.19		
1111	構造	957.7199	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0167	mda	1.44
1113	構造	694.3402	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.073	pc-3	1.43
1114	構造	659.0029	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		mda	1.59
1115	構造	487.7012	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		pc-3	3.15
				MDA		mda	>300
1118	構造	487.7012	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		pc-3	>300
				MDA		mda	>300
1119	構造	493.0849	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0688*	pc-3	3.15
				MDA		mda	5.1
1120	構造	415.6245	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0897*	mda	11.3

【 26 】

図 9B (続き)

ID	NI 一置換アミノアミン、リンカーあり	分子重	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DEMC (C50)
1121	構造	343.6604	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.248		
				MDA	0.397		
1123	構造	657.2438	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.072	MDA	6.70
				MDA	0.0138	PC-3	2.85
				MDA	0.0296		5.30
1124	構造	576.0513	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0778	mda	13.2
1129	構造	529.7916	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0468	mda	98.2
				MDA	0.17	pc-3	71.3
1136	構造	425.6833	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.167*	pc-3	29.2
1138	構造	477.7998	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0449*	mda	98.6
				MDA	0.0344	pc-3	9.23
1149	構造	357.6703	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.135*	mda	>100
1152	構造	550.8377	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0089	pc-3	99
1166	構造	614.2716	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.086	mda	>100
				MDA	0.00855	mda	1.55
1180	構造	388.6891	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0564*	pc-3	2.59
				MDA		mda	46.9
1161	構造	357.5438	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	> 0.3	pc-3	>300
				MDA	> 1	mda	>300

【 27 】

図 9B (続き)

ID	NI 一置換アミノアミン、リンカーあり	分子重	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DEMC (C50)
1165	構造	607.2209	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0143	mda	<3
				MDA	0.3	pc-3	1.68
1174	構造	459.86	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		mda	>300
1175	構造	573.5402	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.061	pc-3	>300
1179	構造	369.6565	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	> 1.0M	mda	>300
1180	構造	430.6694	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0255	mda	>300
1203	構造	344.3832	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		pc-3	>300
1209	構造	369.62	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	>1	mda	62
1233	構造	367.2084	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0365*	pc-3	72
				MDA	0.0185*	mda	1.6
1234	構造	506.7109	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0555	mda	0.86
1238	構造	384.5732	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	> 1	pc-3	0.67
1239	構造	392.6333	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA		mda	2.85
				MDA		pc-3	209
				MDA		mda	1.95
				MDA		pc-3	173

【 28 】

図 9B (続き)

ID	NI 一置換アミノアミン、リンカーあり	分子重	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DEMC (C50)
1241	構造	615.2626	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0262		
1243	構造	428.6449	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			
1244	構造	353.5183	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.48		
1245	構造	313.4495	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			
1254	構造	555.666	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	0.0577		
1281	構造	352.6333	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA	> 1		
1298	構造	418.5665	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			
1305	構造	346.5361	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			
1315	構造	477.4338	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			
1340	構造	644.3043	<chem>C1=CC=C(C=C1)N(C)C(=O)O</chem>	MDA			

【 29 】

図 9C

ID	分子重 1091	301.4791	構造	輸送>細胞系	Ki	常規阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO (C50)
	1091	301.4791		MDA	0.075	mda	>100
	1094	315.5082		MDA	0.117	mda	>300
				MDA	0.142	mda	>1000
				MDA	0.028	mda	>300
	1110	244.3832		MDA	0.162	MDA	
	1121	343.6504		MDA	0.190	MDA	>300
				MDA	0.04	MDA	>300
	1122	343.6504		MDA	0.5	PC-3	>300
	1128	301.4791		MDA	0.248		
				MDA	0.337	mda	>100
				MDA	> 10		
	1150	287.452		MDA	0.043*	mda	>100
	1177	273.4249		MDA	0.0768*	mda	>300
				PC-3	0.0638	pc-3	<3
				DRHG	0.147	MDA	>100
						PC-3	2.05
	1197	301.4791		MDA	0.38	MDA	>300
						PC-3	>500
						PC-3	469

【 30 】

図 9C (続き)

ID	分子重 1168	301.4791	構造	輸送>細胞系	Ki	常規阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO (C50)
	1168	301.4791		MDA	0.424	MDA	>300
						PC-3	>300
						PC-3	286

【 31 】

図 9D

ID	分子重 1117	350.5101	構造	輸送>細胞系	Ki	常規阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO (C50)
	1117	350.5101		MDA	0.232*	mda	>100
	1118	488.679				pc-3	22.64
						mda	50.4
	1127	459.6626				mda	>100
	1147	481.7281		MDA	0.038*	mda	>100
	1151	416.6565		MDA	> 1		
	1152	430.6565		mda	0.155		
	1165	401.6974		MDA	0.268		
	1196	399.6816		MDA	0.183		
	1182	433.6514		MDA	0.0813		
				MDA	0.083		
	1170	621.7051		MDA	> 1	mda	>300

【 32 】

図 9D (続き)

ID	分子重 1172	555.7973	構造	輸送>細胞系	Ki	常規阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO (C50)
	1172	555.7973		MDA	37.1	pc-3	>300
						mda	20
	1176	373.5432		MDA	0.0418	mda	>300
				MDA	0.0418	mda	>300
	1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3	14.0
				MDA	0.0418	mda	>300
	1176	373.5432		MDA	0.0418	mda	>300
				MDA	0.0418	mda	>300
	1176	373.5432		MDA	0.0418	mda	>300
				MDA	0.0418	mda	>300
	1188	493.6866		MDA	0.465	pc-3	>300
				MDA		MDA	52
						PC-3	100
	1193	415.6245		MDA	0.266	PC-3	>300
						MDA	68.2
	1185	401.6974		MDA	0.271	PC-3	91.9
						MDA	37.9
						PC-3	70.9

【 37 】

図 9E (続き)

MF-1 置換リジン/アミド、天然α-アミノ酸誘導体	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
分子番号 1207 303.4574		MDA	0.13	mda	6.6	>300
分子番号 1228 315.6062		MDA	0.124	pc-3 mda	62 9.1	>300 >300
分子番号 1230 316.5062		MDA	0.0333	pc-3 mda	4.0 >300	>300 >300
分子番号 1237 374.6181		MDA	0.113	pc-3 mda	6.2 >300	>300 >300
分子番号 1260 395.5343		MDA	0.089	pc-3 mda	>300 6.80	>300 >100
				pc-3	3.04	>100

【 38 】

図 9F

MF-1 置換リジン/アミド、非天然α-アミノ酸誘導体	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
分子番号 1188 313.4488		MDA	>1 μM	MDA		320
分子番号 1194 315.5062		MDA	10.6 0.0727	PC-3 MDA	5.32	214 >300
分子番号 1196 301.4791		MDA		PC-3 MDA	7.51 16.19	>300 >300
分子番号 1220 287.462		MDA		PC-3 MDA	1.82 9.03	>300 >300
分子番号 1224 316.4838		MDA	0.16 0.0432	PC-3 pc-3	8.01 2.4	>300 >300
分子番号 1227 355.5715		MDA	0.0515 0.241	mda mda	4.37 7.8	>300 >50
分子番号 1309 368.5607				pc-3	0.95	>30

【 39 】

図 9G

MF-1 置換リジン/アミド、アミノ酸誘導体	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
分子番号 1304 415.6337				mda	36	>300
分子番号 1310 610.7725				pc-3 mda	15.0 4.2	244.8
分子番号 1355 145.205				pc-3 mda	1.7	>10000

【 40 】

図 9H

MF-1 置換リジン/アミド、非天然α-アミノ酸誘導体	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO	IC50
分子番号 1001 435.6365		MDA	0.39	MDA	20	600
分子番号 1003 421.6094		A172 MDA	0.08 1	A172 MDA	100 μM	>300
分子番号 1005 318.3975		A172	23	A172		28 μM
分子番号 1006 448.6164		mda	1.46	MDA A172		40 μM 20
分子番号 1007 302.4388		A172	60	MDA mda		60 >300
分子番号 1008 416.6308		MDA	>10	MDA		>300
分子番号 1010 442.6282		MDA	0.110	MDA	1.7	20
		A172	0.082	MDA	1.05	1.0

【 4 1 】

ID	NT-1直鎖ポリマリン・スルホニルアミド 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1011	435.6385		MDA	0.008*	MDA	8.0	50
1012	421.6094		MDA	>10	MDA	<3.0	50 150
1013	435.6385		MDA	3.5	MDA	13.4	50
1014	421.6094		AT12 MDA	1.34 >10	MDA		100
1015	489.6981		MDA	2.9	MDA		15
1016	475.6981		MDA	1.6	pc-3 caco-2 cam		>30 18.2 >30
1017	382.6876		MDA	>10	MDA		13
			MDA	0.87	MDA	14.2	50
			AT12	24			

図 9H (続き)

【 4 2 】

ID	NT-1直鎖ポリマリン・スルホニルアミド 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1018	475.6981		mda	>30	MDA		120
1019	382.6876		MDA	0.2*	MDA	7.5	50
1020	379.6281		AT12 MDA	0.37 >30	MDA	4.4	50 110
1023	486.6505		MDA	0.001	MDA		22
1024	407.6623		AT12 MDA	0.75 5.4	MDA		50
1025	365.501		MDA	4.3	MDA		>300
1026	364.6135		MDA	2.7	MDA		50
1027	322.4322		MDA	>10	MDA		>300
1028	421.6094		MDA	11.4	MDA		50

図 9H (続き)

【 4 3 】

ID	NT-1直鎖ポリマリン・スルホニルアミド 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1029	379.6281		MDA	3.4	MDA		>300
1030	459.0254		MDA	0.03	MDA	125	>250
1031	393.4552		MDA	0.43	MDA	<10	>500
1034	444.5505		MDA	0.24	MDA	<3	50
1036	430.5735		MDA	0.84	mda MDA	8.7	50
1041	432.5893		MDA	0.698	MDA	0.6	12
					pc-3		6.2
					caco-2		16.1
					cam		0.79
					mda		53.0
					pc-3		12.4
					pc-3		6.1
					MDA		160
1044	616.129		MDA	0.156*	MDA	3	180
			MDA	0.0532	mda	<3.0	180
			MDA	0.130			13
1045	425.6192		MDA	0.229	MDA	13	180
			MDA	0.164	mda	7.3	140
			MDA	0.32			

図 9H (続き)

【 4 4 】

ID	NT-1直鎖ポリマリン・スルホニルアミド 分子量	構造	輸送>細胞系	Ki	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMC	IC50
1046	472.6879		MDA	0.44	mda	0.92	55
			MDA	0.0377	pc-3		34.8
			MDA	0.375	caco-2		>30
1047	468.0844		MDA	0.421	mda	7.3	170
1048	400.5893		MDA	0.177	mda	26.7	>300
1049	423.0024		MDA	>3	mda		>300
1050	454.0872		MDA	0.109	MDA	2.26	140
1051	481.634		MDA	0.0537	mda	6.5	>500
1052	342.3071		MDA	0.076	mda	30	>300
1054	446.5422		MDA	0.16*	MDA	<10	50
			MDA	0.025	MDA	7.89	20
			MDA	0.0929	mda		19.8
			MDA		pc-3		27.1
			MDA		caco-2		2.6
			MDA		cam		100
1057	434.7334		MDA	0.17	mda		

図 9H (続き)

【 45 】

図 9H (続き)

NI-置換ポリアミン、その単 ID	分子重 NI-置換アミン 構造	輸送>細胞系	KI	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO IC50
1059	481.7503 	MDA	0.17*	mda	IC50 9
1070	567.7877 	MDA	> 10	pc-3 caco-2 carn	5.9 14.8 0.71
1074	437.505 	MDA	> 30	mda pc-3 caco-2 carn MDA	13 >30 >30 >30 >30
1076	433.6206 	MDA	> 100		
1082	412.6429 	MDA	> 3	mda	140
1088	278.3753 	mda	5.4*		
1103	488.6241 	MDA	0.057	mda	3.5
1105	557.6804 	MDA	0.053	mda	58
1108	356.6342 	MDA	0.054	mda	160
1108	322.5167 	MDA	0.19	mda	150
1130	294.4525 	MDA	0.22	mda	>300

【 46 】

図 9H (続き)

NI-置換ポリアミン、その単 ID	分子重 NI-置換アミン 構造	輸送>細胞系	KI	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO IC50
1330	316.5329 	MDA		mda	IC50

【 47 】

図 9I

NI-置換ポリアミン、その単 ID	分子重 NI-置換アミン 構造	輸送>細胞系	KI	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO IC50
1004	372.4712 				
1390	316.5374 	MDA A172	2.2 3	MDA	5

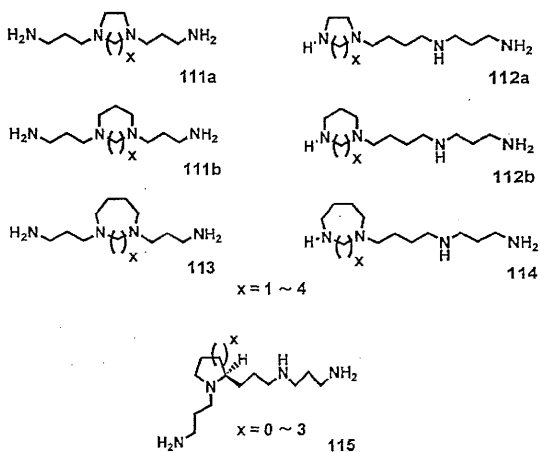
【 48 】

図 9J

NI-置換ポリアミン、その単 ID	分子重 NI-置換アミン 構造	輸送>細胞系	KI	増殖阻害>細胞系	Half Effect Drug DFMO IC50
1021 (urea)	421.5503 	MDA	0.44	MDA	35
1042 (urea)	569.7762 	A172 MDA	24*	MDA	14.8
1071	641.0464 	MDA			
1108 (urea)	593.8118 	MDA	0.0674	pc-3	>100
1295 (thiourea)	587.735 	MDA MDA	0.090 >3	mda	>100

【 図 4 9 】

図 10



【 図 5 0 】

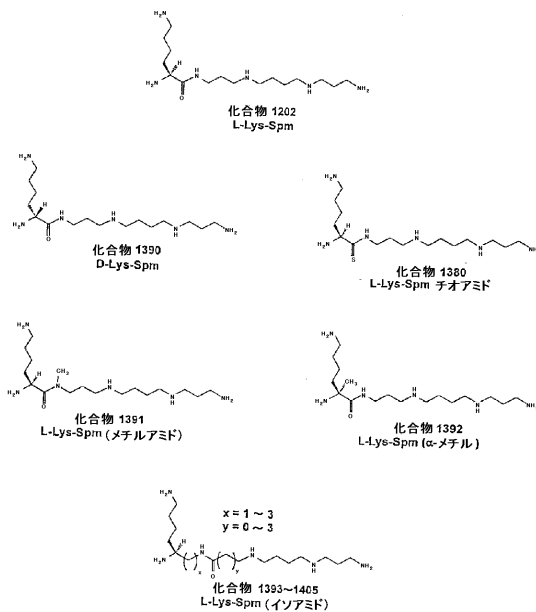
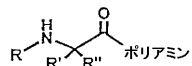


図 11

【 図 5 1 】



立体化学：L は S, D は R

R'	R'	R'	R'
-H	Gly	HS-	Cys
-CH ₃	Ala	-S-	Met
	Val	H ₂ N-	Asn
	Leu	H ₂ N-	Gln
	Ile	HO-	Asp
	Phe	HO-	Glu
	Tyr	H ₂ N-	Lys
	Trp	H ₂ N-	Orn
HO-	Ser	H ₂ N-	Arg
	Thr		His
			Pro

図 12

【 図 5 2 】

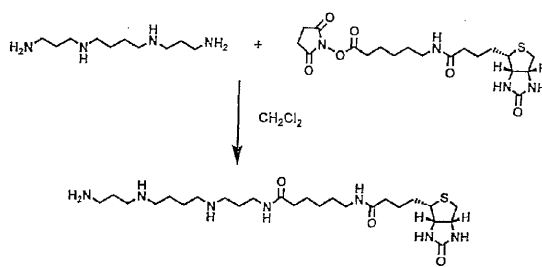


図 13

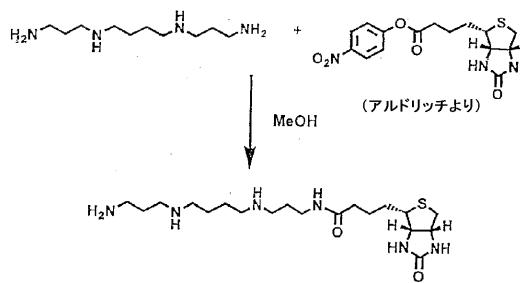
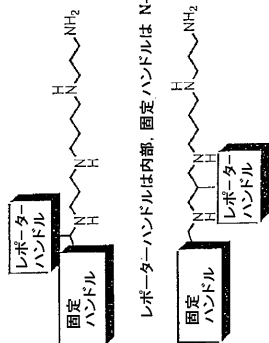


図 14

【 図 5 3 】

A. レポーター及び固定ハンドルはいずれもN¹-末端にある



B. レポーターハンドルは内部、固定ハンドルはN-末端にある



C. 固定及びレポーターのハンドルはいずれも各々N¹及びN¹²末端にある

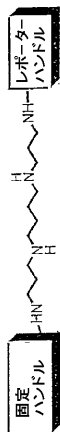


図 15

【 図 5 4 】

ID	分子量	構造	輸送>精路系	Ki	特異阻害>精路系	Half Effect Drug DFMO IC50
1092	655.95		MDA	0.079	nda	>800
1236	486.704		MDA	0.026	nda	>300
1261	620.9735		MDA	0.052	pc-3	>350
1275	528.8317		MDA	0.402		
1285	514.5045		MDA	0.219		
1287	570.9129		MDA	0.0555		
				0.0865		

図 16

【 図 5 5 】

ビスポリアミン誘導体: 脱保護

ID	分子量	構造
1288	500.7775	
1289	542.8587	
1290	556.8858	
1299	598.9671	

図 16 (続き)

【 図 5 6 】

ビスポリアミン誘導体: 保護

ID	分子量	構造
1262	686.987	
1263	757.1225	
1264	771.1495	
1265	729.0683	
1267	701.0141	
1268	799.2037	
1269	743.0954	

図 17

【 図 5 7 】

ビスポリアミン誘導体:保護

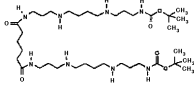
ID 分子量 構造
1285 715.0412

図 17 (続き)

【 図 5 8 】

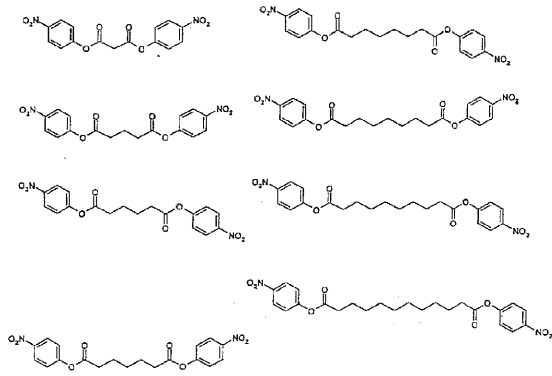


図 18

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2001 (06.12.2001)

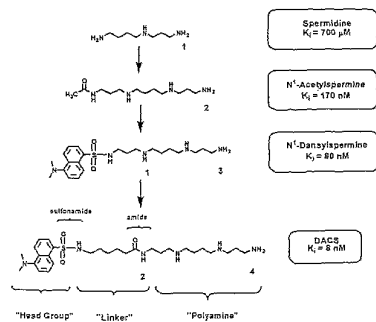
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/92218 A2

- (51) International Patent Classification: C07C 311/00
- (74) Agents: LAU, Kawai et al.; Morrison & Foerster LLP, Suite 500, 3811 Valley Centre Drive, San Diego, CA 92130-2332 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/17795
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 31 May 2001 (31.05.2001)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/584,175 31 May 2000 (31.05.2000) US
- (71) Applicant: ORIDIGM CORPORATION [US/US], Suite 200, 4010 Stone Way North, Seattle, WA 98103 (US).
- (72) Inventors: VERMEULIN, Nicolaas, M., J.; 19334 - 196th Avenue NE, Woodinville, WA 98072 (US). O'DAY, Christine, L.; 4404-B 216th Street S.W., Mountlake Terrace, WA 98043 (US). WEBB, Heather, K.; 5705 Seaview Avenue, NW, Seattle, WA 98107 (US). BURNS, Mark, R.; 226 Northwest 184th Street, Shoreline, WA 98177 (US). BERGSTROM, Donald, E.; 3416 Hamilton Street, West Lafayette, IN 47906 (US).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NOVEL POLYAMINE ANALOGUES AS THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC AGENTS



(57) Abstract: Novel "bispolyamine" inhibitor compounds of polyamine transport are disclosed. These compounds are useful pharmaceutical agents for treating diseases where it is desired to inhibit polyamine transport or other polyamine binding proteins, for example cancer and post-angioplasty injury. These compounds display desirable activities both for diagnostic and research assays and therapy.



WO 01/92218 A2

WO 01/92218

PCT/US01/17795

**NOVEL POLYAMINE ANALOGUES AS THERAPEUTIC AND
DIAGNOSTIC AGENTS****FIELD OF THE INVENTION**

The invention in the field of chemistry and biochemistry relates to the synthesis and use of novel polyamine transport (PAT) inhibitor compounds with pharmacological or agricultural uses and as probes for biochemical assays or for purification of selected polyamine binding targets. As drugs, these compounds are used to treat disorders of undesired cell proliferation, primarily cancer, alone or combined with other agents such as polyamine synthesis inhibitors.

The invention also relates to the synthesis and use of such novel polyamine compounds as part of combinatorial libraries. These libraries are used to discover compositions that inhibit PAT and/or that bind to a cellular polyamine transporter (PATr). Various members of these libraries or compounds discovered through use of the libraries have utility as drugs, agricultural chemicals, and as probes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Decades of research on the myriad of biological activities that the polyamines, putrescine, spermidine and spermine play in cellular processes have shown the profound role they play in life (Cohen, S.S., "A Guide to the Polyamines" 1998, Oxford University Press, New York). As polycations at physiological pH, they bind tightly to and strongly modulate the biological activities of all of the anionic cellular components. Specific and strong interactions have been associated with DNA and RNA together with their associated chromatin proteins (Tabor, H. et al. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Ann Rev. Biochem.* 1976, 45, 285-306; Matthews, H.R. Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays*, 1993, 15, 561-566). Spermine has been shown to function directly as a free radical scavenger that protects DNA from insults by reactive oxygen species (Ha, H.C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 11140-11145). Specific interactions of multicationic polyamines with microtubules has been recently

WO 01/92218

PCT/US01/17795

shown (Wolff, J. Promotion of Microtubule Assembly by Oligocations: Cooperativity between Charged Groups. *Biochemistry*, 1998, 37, 10722-10729; Webb, H.K. et al., *J. Med. Chem.* 1999, in press). Allosteric regulation of membrane-bound enzymes including acetylcholinesterase has been shown (Kossorotow, A. et al. Regulatory effects of polyamines on membrane-bound acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1974, 144, 21-27). Polyamines have a direct influence on many neurotransmitter receptors and ion channels (Carter, C. The Neuropharmacology of Polyamines, 1994, Academic Press, San Diego, CA; Williams, K. Interaction of polyamines with ion channels, *Biochem. J.*, 1997, 325, 289-297). Specific polyamine binding sites have also been demonstrated for the NMDA receptor complex (Ransom, R.W. et al. Cooperative modulation of [³H]MK-801 Binding to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Ion Channel Complex by L-Glutamate, Glycine, and Polyamines. *J. Neurochem.* 1988, 51, 830-836; Williams, K. et al. Minireview: Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.* 1991, 48, 469-498).

Many stimuli involved in both normal and neoplastic growth activate the polyamine biosynthetic pathway. A great number of multidisciplinary studies have shown that the intracellular concentrations of the polyamines is highly regulated at many steps in their biosynthesis, catabolism and transport. The fact that cells contain such complex apparatus for the tight control of the levels of these molecules shows that only a very narrow concentration range is tolerated. Ornithine decarboxylase (ODC), the rate-limiting enzyme in polyamine biosynthesis, catalyzes the production of putrescine from its precursor ornithine. This enzyme, with a very short biological half-life, is one of the most inducible mammalian enzymes known (Russell, D. et al. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 1968, 60, 1420-1427). Many biological stimuli involved in cellular growth have been shown to induce this enzyme and a distinct growth advantage is gained by induction of ODC (Alhonen-Hongisto, L. et al. Tumorigenicity, cell-surface glycoprotein changes and ornithine decarboxylase gene pattern in Ehrlich ascites-carcinoma cells. *Biochem. J.* 1985, 229, 711-715). An increase in the activity of ODC has been associated with tumor growth (Jänne, J. et al. Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 473, 241-493; Scalabrino, G. et al. Polyamines in mammalian tumors. Part I. *Adv. Cancer Res.* 1981, 35, 151-268; Scalabrino, G. et al.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Polyamines in mammalian tumors. Part II. *Adv. Cancer Res.* **1982**, *36*, 1-102). Feedback inhibition of ODC activity is mediated by ODC-antizyme protein. Following elevation of polyamine concentrations, a polyamine-stimulated +1 frameshift of the ODC-antizyme mRNA reading frame causes elevation of this ODC-inhibiting protein (Hayashi, S. et al. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *TIBS*, **1996**, *21*, 27-30; Matsufuji, S. et al. *EMBO Journal*, **1996**, *15*, 1360-1370). The ODC-antizyme protein binds to ODC with high affinity to form an inactive complex that is then tagged for degradation in an ATP-dependent fashion by the 26S proteasome (Heller, J.S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1976**, *73*, 1858-1862; Murakami, Y. et al. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, **1992**, *360*, 597-599). ODC-antizyme also represses the polyamine uptake system of cells (Suzuki, T. et al. Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 8930-8934).

The polyamine catabolism pathway is important to prevent the toxic effects of excess polyamines on cells (Seiler, N. Functions of polyamine acetylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1987**, *65*, 2024-2035; Seiler, N. Polyamine oxidase, properties and functions. *Progress in Brain Res.* **1995**, *106*, 333-344). This pathway is used by the cell to interconvert the various polyamines and to eliminate excess polyamines before they reach toxic levels. This pathway introduces no additional carbon precursors into the polyamine pool.

Polyamine transport into mammalian cells is energy and temperature dependent, saturable, carrier mediated and operates against a substantial concentration gradient (Seiler, N. et al. Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biochem.* **1990**, *22*, 211-218; Khan, N.A.; Quemener, V. et al. Characterization of polyamine transport pathways, in *Neuropharmacology of Polyamines* (Carter, C., ed.), **1994**, Academic, San Diego, pp. 37-60). Ample experimental proof exists that polyamine concentration homeostasis is mediated via this transport system. Changes in the requirements for polyamines in response to growth stimulation is reflected by increases in the transport activity. Stimulation of human fibroblasts to cell proliferation by serum or epidermal growth factor was followed by an 18-100 fold increase in the uptake of putrescine (DiPasquale, A. et al. Epidermal growth factor stimulates putrescine transport and ornithine decarboxylase activity in

WO 01/92218

PCT/US01/17795

cultures human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **1978**, *116*, 317-323; Pohjanpelto, P. Putrescine transport is greatly increased in human fibroblasts initiated to proliferate. *J. Cell Biol.* **1976**, *68*, 512-520). Tumors have been shown to have an increased rate of putrescine uptake (Volkow, N. et al. Labeled putrescine as a probe in brain tumors. *Science*, **1983**, *221*, 673-675; Moulinoux, J-P. et al. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell. Mol. Biol.* **1991**, *37*, 773-783). Inhibition of polyamine biosynthesis in cells in culture by α -difluoromethylornithine (DFMO), a well-studied mechanism-based inhibitor of ODC, causes a substantial depletion of intracellular putrescine and spermidine with resultant cell growth inhibition. Upon supplementing the culture media with exogenous polyamines this depletion causes transport activity to rise several-fold (Bogle, R.G. et al. Endothelial polyamine uptake: selective stimulation by L-arginine deprivation or polyamine depletion. *Am. J. Physiol.* **1994**, *266*, C776-C783; Alhonen-Hongisto, L. et al. Intracellular putrescine deprivation induces uptake of the natural polyamines and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochem. J.* **1980**, *192*, 941-945). The cells then returned to their original rate of growth.

Several experimental lines of evidence support the conclusion that increased effectiveness of ODC inhibition can be obtained by interfering with the polyamine transport apparatus. A mutant L1210 leukemia cell line was shown to have greatly reduced polyamine transport activity following selection for resistance to methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MGBG), an extremely cytotoxic AdoMetDC inhibitor that is taken up by the same transport system as the polyamines. Mice inoculated with these cells had a much greater response to DFMO treatment (87% increase in median survival time; 13 of 40 mice cured) than mice inoculated with the parental cell line (22% increase in median survival time). See Persson, I. et al. Curative effect of d,l-2-difluoromethylornithine on mice bearing mutant L1210 leukemia cells deficient in polyamine uptake. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4807-4811. A significant source of extracellular polyamines is produced by the microbial flora in the gastrointestinal tract (Sarhan, S. et al. The gastrointestinal tract as polyamine source for tumor growth. *Anticancer Res.* **1989**, *9*, 215-224). When this source of polyamines is removed by decontamination of this flora, DFMO's previous moderate growth inhibitory effects on Lewis lung carcinoma cells or L1210 xenografts is markedly potentiated (Hessels, J. et al. Limitation of dietary polyamines and arginine and the

WO 01/92218

PCT/US01/17795

gastrointestinal synthesis of putrescine potentiates the cytostatic effect of α -difluoromethylornithine in L1210 bearing mice. *Int. Symp. Polyamines in Biochemical and Clinical Research*, Sorrento (Italy), 1988, Abstr. P105). An additional source of polyamines is from dietary sources (Bardocz, S. et al. Polyamines in food; implications for growth and health. *J. Biochem Nutr.* 1993, 4, 66-71). By feeding a polyamine-free diet to DFMO-treated nude mice the MCF-7 human breast cancer xenografts contained greatly reduced levels of putrescine in comparison to DFMO treatment alone (Levêque, J. et al. The gastrointestinal polyamine source depletion enhances DFMO induced polyamine depletion in MCF-7 human breast cancer cells in vivo. *Anticancer Res.* 1998, 18, 2663-2668). In additional animal models, complete polyamine deprivation also enhanced DFMO's growth inhibitory effectiveness (Moulinoux, J.P. et al. Inhibition of growth of the U-251 human glioblastoma in nude mice by polyamine deprivation. *Anticancer Res.* 1991, 11, 175-180; Quemener, V. et al. Polyamine deprivation enhances antitumoral efficacy of chemotherapy. *Anticancer Res.* 1992, 12, 1447-1454; Chamailard, L. et al. Polyamine deprivation prevents the development of tumour-induced immune suppression. *Br. J. Cancer* 1997, 76, 365-370).

The Polyamine Transporter (PATr)

The increased demand for polyamines by rapidly growing, transformed cancer cells is only partially met by an increased rate of synthesis. To exploit this increased need for polyamines, synthesis inhibitors have been sought. Additionally, lowering polyamine concentrations can result in aberrations in chromatin structure leading to cell death or inhibition of proliferation (Quemener, V. et al., *Anticancer Res.* 14:443-448, 1994; Porter, C. W. et al., *Cancer Res.* 53:581-586, 1993). It has become increasingly apparent that the initial disappointing results observed in the clinic with polyamine synthesis inhibitors arises from compensatory increases in transport of polyamines by a specific active transport system (Seiler, N. et al., *Int. J. Biochem.* 22:211-218, 1990; Seiler, N. et al., *J. Biochem. Cell. Biol.* 28:843-861, 1996). The promising results observed in cell culture with a suicide substrate inhibitor of ornithine decarboxylase, α -difluoromethylornithine (DFMO), or with an inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase, methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MGBG) did not transfer to human clinical trials (Schechter, P.J. et al., In *Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies*; McCann,

WO 01/92218

PCT/US01/17795

P.P. et al., eds; 1987, pp 345-364). Since the only two avenues for carbon transfer into polyamine pools are synthesis or transport, simultaneous inhibition of both of these pathways is considered by the present inventors to be a promising anti-cancer therapeutic approach.

A study confirming the validity of this chemotherapeutic approach used transplanted murine L1210 leukemia cells that were deficient in PAT. Mice transplanted with the wild-type L1210 cancer cells (with intact PAT) died after 12 days, even when treated with DFMO. In contrast, DFMO mice transplanted with PAT-deficient L1210 cells lived longer than 60 days (Ask, A. et al., *Cancer Lett.* 66:29-34, 1992). These authors also showed that treatment of mice harboring wild-type L1210 cells with a combination of (1) DFMO (2) a low polyamine diet and (3) antibiotics (which decrease polyamine production by gut flora) resulted in prolonged survival compared to treatment with DFMO alone.

Augmented PAT into cancer cells promotes cell killing. J.L. Holley et al. (*Cancer Res.* 52:4190-4195, 1992) showed up to a 225-fold increase in cytotoxicity of a chlorambucil-spermidine conjugate compared to chlorambucil alone. A series of nitroimidazole-polyamine conjugates were also effective (Holley, J.L. et al., *Biochem. Pharmacol.* 43:763-769, 1992). Others showed that mice infected with a multi-drug resistant strain of malaria were cured by treatment with a chloroquine-putrescine conjugate (Singh, S. et al., *J. Biol. Chem.* 272:13506-13511, 1997). Thus, the effectiveness of cytotoxic compounds could be enhanced by their conjugation with polyamines. These effects may have been due to the exploitation of the PAT system to deliver these compounds into cancer cells.

The gene for the polyamine transport protein has been cloned from *Escherichia coli* and recently from yeast (Kashiwagi, K. et al. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 20893-20897; Tomitori, H. et al. Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 3265-3267). The genes for the mammalian transporter await identification. The transporter from *E. coli* has been crystallized and its X-ray structure has been determined (Sugiyama, S. et al. Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 9519-9525). This structure represents one of only a few but growing number determined for spermidine-binding proteins. Since this structure was determined on a prokaryotic species its use in the

WO 01/92218

PCT/US01/17795

design of mammalian transport inhibitors was deemed to be of limited value. Despite this, several insights were obtained and used through analysis of this structure. In addition to the expected presence of carboxylate residues positioned to form salt bridges with the protonated amino groups of spermidine, numerous aromatic residues, especially tryptophan residues appeared to strengthen hydrophobic interactions with the methylene groups of the substrate. Additionally, a H₂O molecule was positioned at one end of spermidine substrate, providing stronger interactions with the ionic residues in this position.

Several researchers have studied the ability of polyamine analogs to inhibit the uptake of ³H-spermidine into cells. Bergeron and coworkers studied the effect of addition of different alkyl group substitution on the terminal nitrogen atoms of spermidine or spermine analogs (Bergeron, R.J. et al. Antiproliferative properties of polyamine analogues: a structure-activity study. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 3464-3476). They showed larger alkyl groups diminished the ability to prevent uptake of radiolabeled spermidine. They later concluded that increases in the number of methylenes between the nitrogen atoms decreased the ability to compete for ³H spermidine uptake (Bergeron, R.J. et al. A comparison of structure-activity relationships between spermidine and spermine antineoplastics. *J. Med. Chem.* 1997, 40, 1475-1494). Of greater importance to the present work was their conclusion that the polyamine transport apparatus requires only three cationic centers for polyamine recognition and transport (Porter, C.W. et al. *J. Cancer Res.* 1984, 44, 126-128). Two groups analyzed literature examples of the polyamine analogs ability to inhibit ³H spermidine uptake into L1210 cells by CoMFA and QSAR methods (Li, Y. et al. Comparative Molecular field analysis-based predictive model of structure-function relationships of polyamine transport inhibitors in L1210 cells. *Cancer Res.* 1997, 57, 234-239; Xia, C.Q. et al. QSAR analysis of polyamine transport inhibitors in L1210 cells. *J. Drug Target.* 1998, 6, 65-77).

Polyamine Transport (PAT) Assays

There is no known high-throughput assay for measuring PAT. A radiochemical assay is used for biochemical analysis of transport and has been used to study PAT in yeast and a variety of mammalian cells (Kakinuma, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216:985-992, 1995; Seiler, N. et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:843-861, 1996). See, for example Huber, M. et al. *Cancer Res.* 55:934-943, 1995.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The radiometric assay uses radiolabeled polyamines such as putrescine, spermidine or spermine, but, due to the low signal, large numbers of adherent or non-adherent cells are required. Additional care is required with spermine due to its non-specific adsorption to cells and plastics. Cells are mixed with the test compounds and the radiolabeled polyamine to initiate the assay. The cells are incubated for 1-60 minutes, depending on cell type. The assay is terminated by removal of the medium and cooling the plates to 4°C. The cells are then washed with cold medium three times, dissolved in 0.1% sodium dodecyl sulfate and the radioactivity in solution is then determined by scintillation counting. This assay is difficult to scale up to a high throughput procedure due to the low signal from the radiolabel and the handling requirements inherent in procedures with radioactivity.

A great number of polyamine amide natural products have been recently been discovered in the venom of arthropods such as spiders and wasps. These acylpolyamine analogs have been shown to have specific and strong interactions with the neuromuscular junctions of insects (Moya, E. et al. Syntheses and neuropharmacological properties of arthropod polyamine amide toxins. *Neuropharmacology of Polyamines* (Carter, C., ed.), 1994, Academic, San Diego, pp. 167-184). With this capability these toxins give the insect predators the ability to paralyze or kill their prey. Most of these natural products have the common molecular features of a polyamine moiety (many with structurally diverse polyamine analogs) connected through an amide with an aromatic amino acid structural analog. Simpler synthetic analogs have been sought that attempt to maximize interactions with either crustacean neuromuscular synapses or mammalian glutamate receptors (Asami, T. et al. Acylpolyamines mimic the action of Joro spider toxin (JSTX) on crustacean muscle glutamate receptors. *Biomedical Res.* 1989, 10, 185-189; Raditsch, M. et al. Polyamine spider toxins and mammalian *N*-methyl-D-aspartate receptors. Structural basis for channel blocking and binding of argiotoxin₂₃₆. *Eur. J. Biochem.* 1996, 240, 416-426; Tsubokawa, H. et al. Effects of a spider toxin and its analogue on glutamate-activated currents in the hippocampal CA1 Neuron after ischemia. *J. Neurophys.* 1995, 74, 218-225).

Citation of the above documents is not intended as an admission that any of the foregoing is pertinent prior art. All statements as to the date or representation as to the contents of these documents is based on the information available to the applicant and does

WO 01/92218

PCT/US01/17795

not constitute any admission as to the correctness of the dates or contents of these documents.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to various polyamine analogues and derivatives and their use as drugs, as agricultural or as environmentally useful agents. The invention defines sites and structures within these compounds that are key to their binding (and polyamine binding) to membrane (and soluble) proteins, particularly the PATr.

The compositions of the present invention include polyamine derivatives substituted at one or more positions. Monosubstituted polyamines are preferably substituted at a terminal nitrogen, but may be alternatively or additionally substituted at internal nitrogen and/or internal carbon atoms.

A preferred embodiment is a highly specific PAT inhibitor with pharmaceutical utility as an anti-cancer chemotherapeutic. These include polyamine derivatives comprised of two linear polyamines linked to each other. The two polyamines may be identical or different and may be substituted at an internal carbon and/or nitrogen atom. Preferably, one terminal position of each polyamine is used in the linkage. The other terminal position may also be substituted.

Preferred substituents are structures that increase binding affinity or otherwise enhance the irreversibility of binding of the compound to a polyamine binding molecule, such as the PATr, an enzyme or DNA. Such additional substituents include the aziridine group and various other aliphatic, aromatic, mixed aliphatic-aromatic, or heterocyclic multi-ring structures. Reactive moieties which, like aziridine, bind irreversibly to a PATr or another polyamine binding molecule, are also within the scope of this invention. Examples of reactive groups that react with nucleophiles to form covalent bonds include chloro-, bromo- and iodoacetamides, sulfonylfluorides, esters, nitrogen mustards, etc. Such reactive moieties are used for affinity labeling in a diagnostic or research context, and subserves pharmacological activity as sites within a drug that inhibit PAT or polyamine synthesis. The reactive group can be a reactive photoaffinity group such as an azido or benzophenone group. Chemical agents for photoaffinity labeling are well-known in the art (Flemming, S.A., *Tetrahedron* 51:12479-12520, 1995). Photoreactive compounds for cancer treatment are also known in the art.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

More specifically, a polyamine analogue or derivative of the invention includes one that binds to a polyamine-binding site of a molecule and/or inhibits polyamine transport, and has the formula



wherein

R₁ and R₂ are each a polyamine, or analogue or derivative thereof; and
X is a linker moiety connecting the two polyamines.

Polyamine analogues or derivatives, preferably having a reactive group at one end, may also be employed as assay or biochemical probes.

Additional substituents which may be present on the polyamine portion of analogues or derivatives (with or without a reporter group), are structures which increase binding affinity, or otherwise enhance the irreversibility of binding of the compound to a polyamine binding molecule, such as a PATr, an enzyme or DNA. Such additional substituents include the aziridine group and various other aliphatic, aromatic or heterocyclic multi-ring structures.

A reactive moiety, which, like aziridine, can bind irreversibly to a PATr or another polyamine binding molecule is also contemplated. Examples of groups which react with nucleophiles to form covalent bonds include chloro-, bromo- and iodoacetamides, sulfonylfluorides, esters, nitrogen mustards, etc. Such reactive moieties are used for affinity labeling in a diagnostic or research context, and subserve pharmacological activity as parts of drugs that inhibit PAT or polyamine synthesis. The reactive group can also be a reactive photoaffinity group such as an azido- and benzophenone group. Chemical reagents in photoaffinity labeling are well-known (Flemming, S.A., *Tetrahedron* 51:12479-12520, 1995). Moreover, photoreactive compounds for cancer treatment are known in the art.

The polyamine analogues and derivatives of the invention may be categorized in a variety of ways. One category of polyamine analogues and derivatives is the bispolyamines, which may be viewed as analogues or derivatives containing two linked polyamines, which may be identical or different. In preferred embodiments, the individual polyamine groups are linear and have two terminal amino groups. Examples of such polyamines include the naturally occurring polyamines: putrescine, spermidine, and

WO 01/92218

PCT/US01/17795

spermine. One terminal amino group in each of such polyamines may be used in the linkage between the two individual polyamines. The remaining terminal amino group may be left as an amine group or further derivatized.

Examples of polyamines for linkage into bispolyamines include N¹-dansylspermine (also termed monodansylspermine or MDS **1**), N¹-dansylspermidine (also termed monodansylspermidine or MDSd, N¹-[(N⁶-dansyl)-6-aminocaproyl]spermine (termed DACs, **4**), N¹-[(N⁶-dansyl)-6-aminocaproyl]spermidine (DACSD), N¹-[(N⁶-5-(4-chlorobenzamidomethyl)thiophene-2-sulfonyl)-6-aminocaproyl]spermine **5** or N¹-[(N⁶-(2-dibenzofuransulfonyl)-6-aminocaproyl]spermine **6**.

Additional polyamines for linkage into bispolyamines include N¹-acyl aminoacid-spermine conjugates. These include natural and non-natural amino acid amides of spermine which are by themselves very effective polyamine transport inhibitors. Examples of such polyamines include L-Lys-spermine (compound 1202), L-Val-spermine (compound 1157) and L-Orn-spermine (compound 1224).

More polyamines for linkage into bispolyamines are acyl polyamines, such as N¹-monosubstituted. Monosubstituted polyamines can be further classified into categories such as amides, sulfonamides, N¹-monosubstituted amines and other. Among the amides, further classification into those without linkers, those with linkers, amino alkyls, and amino acid head groups is possible. The amino acid head groups can be further categorized as those that are protected, natural α -amino acids, non-natural α -amino acids, and amino acid derivatives.

Once a polyamine analogue which inhibits polyamine transport at a desirable level has been identified, it can readily be further optimized by structural and functional comparisons with other polyamine analogues in the same or different categories to improve its utility. Examples of such improvements include, but are not limited to, increased inhibitory activity, enhanced metabolic stability, enhanced specificity, ease of handling and administration, binding affinity, non-incorporation into cellular polyamine pools, and decreases in side effects.

The present invention is also directed to a pharmaceutical composition useful for treating a disease or condition in which the inhibition of polyamine transport is desirable, comprising a composition as described above and a pharmaceutically acceptable excipient.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The pharmaceutical composition may further include an inhibitor of polyamine synthesis; preferably DFMO. Other combinations include the above pharmaceutical composition and one or more additional agents known to be useful for treating said disease or condition

This invention also provides a method for treating a disease or a condition in a subject associated with undesired cell proliferation and/or which is treatable by inhibition of polyamine transport, comprising administering to said subject an effective amount of a pharmaceutical composition as described above. The undesired cell proliferation may be associated with proliferation of cells of the immune system, cell of the vascular neointima, tumor cells or with undesired angiogenesis. Preferred diseases to be treated as above include cancer or post-angioplasty injury.

Thus the analogues and derivatives of the invention, alone or in combination with other agents, may be used for the treatment of cancer and other diseases of unwanted cellular proliferation, including angiogenesis and post-injury cell growth. Preferably, such treatments act by inhibiting PAT, deoxyhypusyl synthase, or cell growth or by the induction of apoptosis. As such, they may act by cytostatic and/or cytotoxic mechanisms. The analogues and derivatives of the invention, individually or in combinations with or without other agents, may also be used to treat hypertension, osteoporosis, Alzheimer's disease, ischemia, autoimmune diseases, psychosis, depression, strokes, cardiovascular disease, infection with microorganisms or parasites, plant pathogens including fungi. Cellular processes susceptible to inhibition by the analogues and derivatives of the invention, alone or in combination with other agents, include those involving nucleic acids (DNA or RNA), such as replication, transcription or translation. The analogues and derivatives of the invention may also be efficacious as anti-diarrheal, anti-peristaltic, anti-spasmodic, anti-viral, anti-psoratic and insecticidal agents.

The invention is also directed in part to rapid and efficient testing of many such analogues and derivatives for their transport into cells. By creating a database of structure-activity-relationships (SARs) of such analogues and derivatives, the invention identifies elements that are key for polyamine binding to membrane proteins such as PATr or soluble proteins. With such information, the invention permits predictions as to the transportability and activity of novel polyamine analogues and derivatives.

The polyamine analogues and derivatives of the invention may also be employed as assay or biochemical probes. A preferred assay method employs a polyamine analogue or

WO 01/92218

PCT/US01/17795

derivative with a moiety that serves as a detectable label (a "reporter"), preferably a fluorophore, most preferably the dansyl group, or another substituent that can be detected through a variety of means, including by ELISA. A preferred assay method employs an analogue or derivative immobilized to a solid support.

The present invention is also directed to a series of polyamine analogues useful in diagnostic compositions. Methods for the synthesis of such compounds are also described.

Details concerning SARs databases, the use of polyamine analogues as assay probes, and diagnostic compositions are set forth in PCT/US98/14896.

The invention further identifies elements that are key for polyamine binding to membrane proteins such as the PATr (PATr), and to soluble proteins.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the structure and activity relationships (SAR) between spermidine, MDS and DACS. K_i values are the inhibitory constants obtained in a PAT inhibition assay.

Figure 2 is a tabular representation of a large number of chemical structures 3-98 that were tested for their effects on cell growth. R_i , an index of growth inhibitory activity, is the ratio of the growth of cells in the presence of the test compound to the growth in the presence of the compound plus DFMO. The K_i (inhibition constant) reflects a compound's inhibition of PAT in cell culture. These biological effects provide a basis for SAR analysis.

Figure 3A shows a representative synthetic route for the preparation of bispolyamines of the invention. In this synthetic scheme, a bispolyamine containing two N^1 -Boc-spermine polyamines is produced by linking the spermine derivatives with 4-nitrophenyl ester. The crude product from this reaction, after removal of the methanol (MeOH) and dimethyl formamide (DMF) solvents by evaporation and/or high vacuum, can be dissolved in either water or 50% MeOH/water for purification by column chromatography such as with a cation exchange column. Elution was with a gradient ranging from 0 to 1 or 2N NH_4OH .

Figure 3B shows the same representative synthetic route as Figure 3A but with a further step of removing the N^1 -Boc protecting group with 3M HCl.

Figure 4 shows representative synthetic routes for the preparation of p-nitrophenyl activated esters by conversion from the corresponding acid chlorides.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Figure 5 shows a representative reaction for the protection of a terminal amine group in spermine by treatment with di-tert-butylidicarbonate.

Figure 6 shows preferred polyamine analogs of the invention that may be linked to form a bispolyamine.

Figure 7 shows the general structure of bis-amide dimers of spermine linked by an aliphatic or aromatic di-acid chain.

Figure 8 shows preferred linked bis-amide dimers of spermine.

Figures 9a to 9j contain tables classifying a large number of N¹-monosubstituted polyamines which may be used to form bispolyamines of the invention.

Figure 10 shows four classes (**111-114**) of conformationally restricted polyamine analogues, and at the bottom, a stereochemically defined, internally cyclic polyamine analogues (**116**) that may be used in the preparation of the bispolyamines of the invention.

Figure 11 shows compound 1202 L-Lys-spermine and variations of that compound, which may be used in preparing bispolyamines of the invention.

Figure 12 lists amino acid-polyamine conjugates where the amino acid moiety may vary in chirality. These amino acids may also be used to form bispolyamines of the invention.

Figures 13 and 14 show the synthesis of biotin modified polyamines N¹-[(N⁶-(biotinyl)-6-aminocaproyl)]spermine and N¹-(biotinyl)spermine, which may be used in preparing the bispolyamines of the invention.

Figure 15, panels A and B, is a schematic illustration showing the possible sites for modifying a polyamine to create an "immobilization handle" and a "reporter handle" combination. These modified polyamines may be used in the present invention to produce bis-polyamines.

Figure 16 is a table of preferred deprotected bispolyamines of the invention.

Figure 17 is a table of preferred protected bispolyamines of the invention.

Figure 18 shows some activated esters suitable for preparation of bispolyamines.

DETAILED DESCRIPTION

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The present inventors have designed novel compounds for therapeutic uses and have devised tests using such compounds as probes for measuring PAT and polyamine binding in an efficient, high throughput assay. Using the novel methods, they have screened for and discovered compounds with high affinity for the PATr that inhibit uptake, both competitively and non-competitively. Such compounds are useful as drugs in a number of diseases, particularly cancer. They can also be used as a component of novel drug combinations with, for example, a polyamine synthesis inhibitor such as DFMO (which inhibits ornithine decarboxylase) or with other agents. The compounds of the present invention are also useful in other diseases or conditions in which polyamines play a role as described above, and have agricultural and environmental uses.

The inventors found that formation of a bispolyamine from individual polyamines give it advantageous properties as an inhibitor of PAT or as a probe in an assay of PAT and for drug screening. Such chemical modification does not destroy the effective binding and, in fact, may enhance the affinity of the derivatized polyamine for the PATr. Hence, these compounds are useful for discovery of inhibitors of polyamine uptake.

Definitions

As used herein, the term "polyamine" includes putrescine, spermine or spermidine, as well as longer linear polyamines, branched polyamines, and the like, which may have between 2 and about 10 nitrogens. Also included in this definition are polyamine derivatives or analogues comprising a basic polyamine chain with any of a number of functional groups bound to a C atom or a terminal or internal N atom. A polyamine derivative may include a terminal linker or spacer group between the polyamine core and a derivatizing function.

A "head group" is defined as a moiety bonded either directly to the polyamine or attached to a linker that is bonded to the polyamine. It is preferably an aromatic or heterocyclic group, although aliphatic groups or aroalkyl groups are included. Thus, a head group may be a fluorescent moiety, which also serves as a "reporter."

An "inhibitor" moiety or group is a chemical group derivatizing a polyamine that (1) causes the derivative to bind to the PATr with higher affinity than does a native polyamine and/or (2) by other means blocks the uptake of a polyamine (or a probe of this invention) into a cell or a subcellular PATr preparation. The inventors disclose herein

WO 01/92218

PCT/US01/17795

compounds that efficiently inhibit PAT in MDA-MB-231 human breast carcinoma cell and other cells. A number of different types of such inhibitors have been synthesized; various of the synthetic schemes are disclosed herein.

A "reporter moiety" is a chemical moiety forming part of a probe which renders the probe detectable (either directly or, for example, through enzymatic enhancement) and hence permits the determination of the activity of the PATr to which the probe binds. A reporter is detectable either because it itself emits a detectable signal, or by virtue of its affinity for a reporter-specific partner which is detectable or becomes so by binding to, or otherwise reacting with, the reporter. In a preferred embodiment the polyamine analogue is immobilized to a solid support which enables removal of the analogue and any interacting/binding molecules from a complex mixture.

The various inhibitor compounds disclosed herein are identified by various numerical designations, including a counting scheme (using values from 1 to 166 and above) and an identifier number scheme (using four digit compound numbers alone or in combination with an "ORP" or "Ori" identifier). Irrespective of what identifying scheme is used, the identifier merely represents the actual molecular structure of the compound involved and imposes no limitation on said compound.

Overview of Structure-Activity Relationships (SARs)

The PAT inhibitors were developed by modification of the natural substrate of the transporter, spermidine. The present inventors discovered that introduction of a 3-amidopropyl group to the diaminobutyl part of spermidine produced a significantly better transport inhibitor as shown in Figure 1. The optimal amido or sulfonamide substituent was found to be a medium sized aromatic group, leading to the invention of N¹-dansylspermine (MDS) as both a transport inhibitor and a transport assay reporter molecule. MDS has increased binding affinity to cells compared to spermidine and N¹-acetylspermine. Significantly enhanced inhibition of cell growth and PAT resulted from the introduction of a 6-carbon atom linker between the aromatic "head" group of MDS and the polyamine core. This new molecule, N¹-[(N⁶-dansyl)-6-aminocaproyl]spermine (or DACS) **4**, is one of the most potent PAT inhibitors known. In its interaction with biological systems, DACS shows many of the desired properties set forth above. The present inventors have studied DACS and other related analogues extensively.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The SARs around DACS **4** as a lead compound have been explored extensively as shown in Figure 2 (in particular, compounds **73-98**). As discussed above, changes were made in each of several regions of DACS, and effects on transporter binding were measured. The impact of changing the aromatic "head" group was explored by synthesizing a number of different activated 4-nitrophenyl esters with different aromatic and non-aromatic N-sulfonamides at the distal amino end. Another series of "headless" analogues were synthesized to explore the importance of the hydrophobic aromatic grouping. In sum, the present inventors have designed and synthesized a large number of compounds that efficiently inhibit PAT. As described herein, all mono, di and multi-substituted polyamines with the various substituents are intended for use as drugs.

N¹-substituted polyamine analogues may be prepared as described in related applications U.S. 09/341,400 and 09/396,523, which often presents representative reactions with spermine as a non-limiting example of a polyamine core for use in the present invention. The preferred mono-protected polyamine intermediates for use in preparing bispolyamines were the amino terminal tBoc derivatives produced according to Blagbrough *et al.*, (*Tetrahedron Lett.* 35:2057-2060, 1994), using di-*tert*-butyldicarbonate in tetrahydrofuran.

Lead polyamine analogue compounds may be further modified to produce analogues for the production of bispolyamines. For example, following structural explorations around the amide, sulfonamide or urea substituent, it was determined that introduction of a six carbon, straight chain aliphatic linker between the polyamine core and the head group led to a 10-fold increase in binding to the PATr (see Figure 1). Given the high affinity this compound, DACS **4**, to its biological target, it was selected as a lead compound for further modification. Methods for the further derivatization of this lead compound is described in related applications U.S. 09/341,400 and 09/396,523.

A fruitful general approach to realize selectivity of binding to a target (*e.g.*, protein) of interest has been to synthesize conformationally or stereochemically defined analogues of a binding molecule. By significantly reducing the number of possible rotomers or conformations a molecule can adopt, one can attain increased binding to the desired site. Since the molecule no longer has to search the entire "conformational space," its energy of interaction with the target increases many times.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Others have tried to solve the selectivity problem with polyamine analogues by synthesizing conformationally restricted analogues. Ganem replaced the butyl portion of spermine with 2-butene and 2-butyne diamino derivatives (Ganem, B., *J. Org. Chem.* 1987, 52, 5044-5046). Rajeev, K.G. *et al.*, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 5169-5173, incorporated a stereochemically defined, conformationally restrained pyrrolidine ring into the spermine backbone (Fig. 10; **115**, x=1) Brand, G. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 8609-8612, synthesized cyclopolyamine analogues of spermidine and spermine. See, for example Figure 10 (**113**, x= 3, 4, and 5). The present inventors extended this work by producing the other analogues shown in Figure 10. These analogues are synthesized using variations of known methods. The analogues where x = 1 are produced by reacting spermine or N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine with formaldehyde as described by Ganem, B., *Acc. Chem. Res.*, 1982, 15, 290). The primary amines are protected as N-tBoc derivatives for the analogues **111** and **113**. Acid deprotection then gives the desired products. The derivative **112**, where x = 1, was also synthesized Ganem.

Analogues **111** and **113** (Figure 10), where x = 2 to 4, were produced by reductive alkylation. N¹, N¹⁴-Bis(tBoc)spermine was reacted with the dialdehyde, OHC(CH₂)_x-CHO and NaBH₄ in EtOH. Compounds **112** and **114** were made by the same procedure on a suitable N¹,N¹⁴-bisprotected spermine derivative.

Stereochemically defined, internally cyclic structures (Figure 10, **115**) are synthesized using an intermediate aldehyde produced from the corresponding alcohol. This protected alcohol can be oxidized to the aldehyde using Swern conditions. Aldehyde extension by the Wittig reaction with formylmethylene triphenylphosphorane, followed by reduction (overreduced alcohol can be reoxidized to the aldehyde using pyridinium chlorochromate) and reductive amination/cyclization completed the sequence to make the analogues where x = 2. By Wittig reaction with 3-bromopropyl triphenylphosphonium bromide, deprotection and intramolecular alkylative cyclization, the analogue where x = 3 can be produced. Either stereoisomer can be produced by starting with L- or D-ornithine. Polyamines containing a guanidinium group are synthesized according to Iwanowicz, E.J. *et al.*, *Synthetic Comm.* 23 1443-1445, 1993.

The natural polyamines, including putrescine, spermidine and spermine, are incorporated into the compositions of this invention by coupling them to various "head"

WO 01/92218

PCT/US01/17795

and "linker" groups. Other naturally occurring polyamines that can be employed similarly include: N¹-acetylspermine, N¹-acetylspermidine, N⁸-acetylspermidine, N¹-guanidinosperrmine, cadaverine, aminopropylcadaverine, homospermidine, caldine (norspermidine), 7-hydroxyspermidine, thermine (norspermine), thermospermine, canavamine, aminopropylhomospermidine, N, N¹-bis(3-aminopropyl)cadaverine, aminopentylhomospermidine, N⁴-aminopropylhomospermidine, N¹-aminopropylspermidine, caldopentamine, homocaldopentamine, N⁴-bis(aminopropyl)norspermidine, thermopentamine, N¹-bis(aminopropyl)spermidine, caldoxamine, hornothermohexamine and homocaldohexamine.

The metabolic stability *in vivo* of monosubstituted polyamine analogues is increased by modifying these compounds to resist enzymatic degradation. For example, substitution of the terminal primary amine group with an alkyl group would achieve this by preventing oxidative metabolism. This invention also includes compounds with alkylated secondary amino groups. N-alkylation of the amide nitrogens slows down proteolytic degradation.

An additional method to prevent metabolic degradation of amide bonds is to produce the thioamide derivative. Figure 11a shows these changes implemented into compound 1202 L-Lys-spermine conjugates before its use in the bispolyamines of the invention. Combinations of these changes are also encompassed as part of the present invention.

The foregoing changes can be achieved by a number of synthetic routes. Substitution of carbon atoms α to secondary nitrogens and acylation of nitrogens can also slow degradation by polyamine oxidase. Such chemical modifications may minimize potential pharmacological side effects of these compounds.

Alternatively, methyl groups can be introduced α to the terminal amino groups of spermine (Lakanen, J. R. *et al.*, *J. Med. Chem.* 35:724-734, 1992). The 1,12-dimethylspermine analogue **121** was very resistant to normal metabolic degradation. This compound is easily coupled as part of a bispolyamine.

Polyamine analogues of **4** with acetyl (**47**), N-ethyl (**35**) and α -dimethyl (**66**) substitution have been synthesized and shown to have K_i's (for the MDA-MB-231 cell PATr) of 2100, 41, 18 nM, respectively.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Detectably labeled polyamine derivatives can be synthesized using radiolabeled ^{14}C -spermine or other radiolabeled polyamine as starting material.

Various polyamine analogues alkylated at internal carbons can also be synthesized. 5-carboxyspermine, tetra tBoc-5-carboxyspermine and its acid chloride are synthesized according Huber, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:27556-27563, 1994. The resulting acid chloride can then be reacted with various nucleophilic reagents to produce carboxy-substituted polyamine analogues following removal of the tBoc group. These analogues can then be coupled to the reagents that donate the linker and/or head group. Alternatively, the carboxy intermediate can be reduced to an intermediate that is used to synthesize numerous analogues. Such analogues are of interest in the present invention as alkylating agents (*e.g.*, internal aziridine spermine derivatives) or as enzyme-activated irreversible inhibitors of enzymes involved in polyamine biosynthesis, utilization and degradation (*e.g.*, spermine synthase, deoxyhypusine synthase, polyamine oxidase). Any enzyme that acts on the substituted carbon atom will generate a highly reactive intermediate that can alkylate the enzyme's active site residues.

Many polyamine derivatives are available commercially, and these can easily be derivatized further to make the polyamine analogues of the present invention.

Preferred bispolyamines

Preferred bispolyamine compounds include those produced by linking polyamine analogs as presented in Figures 2 and 9a to 9j as well as derivatives thereof with pharmaceutical utility as an anti-cancer, anti-viral, anti-microbial, or anti-fungal chemotherapeutic. Particularly preferred compounds include those presented in Figures 16 and 17 as well as derivatives thereof.

The further derivatization or optimization of bispolyamine compounds having a desirable activity may be achieved by structural and functional comparisons with other bispolyamine analogues and derivatives of the invention to incorporate particular structural elements of other analogues into the compound being optimized. The structural elements will be selected based on the expectation of improving functionalities such as, but not limited to, inhibitory activity, metabolic stability, specificity, handling and administration,

WO 01/92218

PCT/US01/17795

binding affinity, non-incorporation into cellular polyamine pools, and decreases in side effects.

The resultant compounds modified by the introduction of such structural elements may be of any structure, including those within the limits of the bispolyamine analogues and derivative structures defined herein. Stated differently, the resultant compounds may have one or more additional atoms or functional groups and/or removal of one or more atoms or functional groups after optimization, resulting in a compound either within or beyond the limits of the bispolyamine analogues and derivative structures defined herein.

Multiple iterations of optimizing compounds with preferred activity may be conducted to further improve the bispolyamine analogue.

The design of some bispolyamine analogues and derivatives of the invention was driven by several requirements of any compound that would act in concert with an ODC inhibitor in a combination therapy to deplete cellular polyamines through both the biosynthetic and transport pathways. Such compounds need to be good inhibitors extracellular uptake of polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) while not being themselves substrates for the transporter or for maintenance of cellular polyamine levels. If such were substrates of the transporter and could function as the natural polyamines (or be metabolized to polyamines), the compounds would defeat their purpose of depleting cellular polyamine levels.

In addition to the use of amino acid groups, the bispolyamine analogues and derivatives of the invention may comprise a polyamine with a head group linked to a polyamine where coupler such as $-C(=O)NH-$, $-S(=O)_2NH-$, $-NHC(=O)-$, $-HNS(=O)_2-$, $-HNC(=O)NH-$, $-HNC(=S)NH-$, $O-C(=O)NH-$, $-O-$, $-S-$, $-CH_2-$ or $-NH-$ is used to combine the "head" group and the linker moiety.

Head Groups

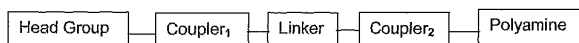
1. General Description

As stated above, bispolyamines of the invention are composed of polyamine derivatives that are linked together via terminal amino groups. One example of polyamine derivatives that may be made part of a bispolyamine are polyamine lead compounds derivatized with a head group.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The general construction of the lead compounds shown below indicates the connections between the head group, linker and polyamine:



where coupler₁ is -C(=O)NH-, -S(=O)₂NH-, -NHC(=O)-, -HNS(=O)₂-, -HNC(=O)NH-, -HNC(=S)NH-, O-C(=O)NH-, -O-, -S-, -CH₂- or -NH-; and

coupler₂ is -C(=O)NH-, -S(=O)₂NH-, -HNC(=O)NH-, -HNC(=S)NH- or -NH-

A number of coupling chemistries can be used to combine the "head" group and the linker moiety. Types of "head" groups are disclosed below as are additional groups that can be substituted onto these head groups.

The coupling between the polyamine and linker will be described below before description of the linkers. What follows is the definition of the head groups.

The structural diversity of preferred head groups is very large, and most organic groups that can be covalently attached to an amine are potential candidates. The following table provides guidance regarding the intended head groups but is by no means intended to be limiting. Additional examples of head groups suitable for use in the polyamine analogues of the invention include those in column "R2" of Table 1 in Dhainaut et al. (1996) "New purines and purine analogs as modulators of multidrug resistance." *J. Med. Chem.* 39:4099-4108, which is incorporated herein in its entirety as if fully set forth. Mono and multi-substitutions on the ring structures of the head groups are also intended.

LIST OF HEAD GROUP SUBSTITUENTS

halogen	cyclohexyl	ethoxyl	propyl ester
methyl	cycloheptyl	propoxyl	isopropyl ester
ethyl	cyclooctyl	thio	cyano
propyl	cyclononyl	methylthio	isocyanato
isopropyl	cyclodecyl	ethylthio	trifluoromethyl
butyl	hexyl	propylthio	trichloromethyl
isobutyl	2-hexyl	butylthio	tribromomethyl
tert-butyl	3-hexyl	isopropylthio	azido
pentyl	allyl	nitro	Acetoxy
2-pentyl	vinyl	amino	Carboxamide
3-pentyl	acetylenic	acetamide	N-methylcarboxamide
neopentyl	propargylic	formamide	N,N-dimethylcarboxamide
cyclopentyl	homopropargylic	carboxylic	N-ethylcarboxamide
cyclopropyl	hydroxyl	methyl ester	N,N-diethylcarboxamide
cyclobutyl	methoxyl	ethyl ester	

2. Aromatic Groups

Aromatic groups include phenyl naphthyl, 1-, 2-, or 3-biphenyl, indenyl, acenaphthylenyl, anthracenyl, phenanthrenyl, phenalenyl, triphenylenyl pyrenyl, diphenylmethylenyl, *etc.*

3. Heterocyclic Groups

Heterocyclic groups include pyrrolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, morpholinyl, biphenyl, furanyl, pyrrolyl, 1,2-diazolyl, imidazolyl, 1H,1,2,3-triazolyl, 1H-1,2,3,4-tetrazolyl, thiazolyl, oxazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, pyridinyl, pyrimidyl, 1,2-diazinyl, 1,4-diazinyl, 1,3,5-triazinyl, dibenzofuranyl, acridinyl, 2,1,3-benzothiadiazole, isoquinolinyl, quinolinyl, benzofuranyl, isobenzofuranyl, 1,3-benzodiazinyl, phenazinyl, phenoxazinyl, phenothiazinyl, pyran, chromenyl, xanthenyl, indoliziny, isoindolyl, indolyl, purinyl, phthalazinyl, naphthyridinyl, quinoxalinyl, quinazoliny, cinnolinyl, ptericinyl, carbazolyl, β -carbolinyl, phenanthridinyl, acridinyl, perimidinyl, phenanthrolinyl, isothiazolyl, furazanyl, indoliny, isoindoliny, quinuclidinyl, and biotinyl.

4. Aliphatic Groups

This class includes straight-chain, branched and cyclic hydrocarbons attached to the linker. The group includes C₂₋₁₀ alkanes; C₃₋₁₀ alkenes containing 1 to 3 unsaturations; C₃₋₁₀ alkynes containing 1 to 3 unsaturations; branched C₃₋₁₀ alkanes, alkenes and alkynes; polycyclic aliphatic hydrocarbons and steroid-like ring systems that include C₃₋₈ cycloalkyl, adamantyl, camphoryl, cholesteryl, *etc.*

5. Miscellaneous-

a. DNA intercalators:

Coupling an intercalator to the polyamine will yield an agent with much higher affinity for nucleic acid targets. Examples of intercalating agents amenable to this use are acridine, 9-aminoacridine, proflavine, actinomycin D, daunorubicin, doxorubicin, nogalamycin, menogaril, ellipticine, BD-40, amsacrine, acodazole, 2-pheylquinoline carboxamide, crisanol, nitracrine, pyrazoloacridine, mitonofide, ametantrone, mitoxantrone, oxanthrazole, bisantrene, echinomycin. For a review of DNA intercalating agents see Baguley, B.C., *Anti-Cancer Drug Design* 1991, 6, 1-35.

b. Biochemical conjugates

Drug selectivity is achieved by targeting specific cells or enzymes/receptors on cells. The following biochemicals are candidates for coupling to polyamines for producing a selective pharmaceutical agent: steroids, prostaglandins, phospholipids; enzyme cofactors including nucleotide containing molecules such as NADH, AcetylCoA, AdoMet, flavin, tryptophantryptophyl quinone (TTQ), *etc.*

An additional series of head groups comprises polyamines conjugated to polyethylene glycol (PEG) or O-methylated PEG (abbreviated MeOPEG) polymers of various sizes.

6. Multiple Ring Head Groups

Head groups can vary from simple alkyl substitutions to multi-ring and multi-single-ring substitutions. Some of the structural variations are schematically represented in Figure 15 of U.S. Patent Application 09/341,400.

Linker Group

1. General Description

The linker portion of polyamine analogues for use in bispolyamine compounds can be represented by a general structure with an amino group at one end and an acid group on the other. One group of linkers contains diamino groups that are bonded via a urea linkage to the polyamine and via an amide, urea or sulfonamide linkage to the head group. The head group can also be bonded through other couplings such as ether, thioether and C-C bonds. The schematic structure shown above (in the section labeled "Head Groups, 1. General Description) shows the function of the linker moiety connecting the head group to the polyamine and possessing a desired length and combination of steric, conformational and hydrophobic properties. Also shown are the possible combination of coupling methods. Each coupling method can be used in combination with any of the three methods in Figure 3 of U.S. Patent application 09/341,400 at the other position to result in a wide array of desired properties.

The linker group can have a range of properties that are reflected by the number of variations discussed below. Changes in the linker structure will be affect the properties of the whole polyamine analogue such as hydrophobicity, hydrophilicity, distance between

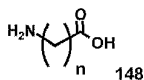
WO 01/92218

PCT/US01/17795

head and polyamine portions, steric arrangement of head and polyamine portions, conformational properties, solubility and electronic properties.

2. Aliphatic Straight Chain Linkers

A series of linkers was been synthesized to test the effect of different distances between head group and polyamine. This series is most simply represented by the straight-chain aliphatic linkers having various carbon chain lengths shown below as compound 148.



$n = 1$ to 12

The present inventors discovered that linker length had dramatic effects on the PAT inhibitory activity and the cell growth inhibitory activity. A low K_i is optimal for C_6 linkers in the presence of an aromatic head group. However, in the absence of a head group, differences in growth or transport inhibitory activities have not been dramatic. Thus, "headless" compounds have K_i s in the order of about 25 nM but have more attenuated inhibitory effects cell growth (breast cancer cell line) most likely due to their ability to actually be transported. A prostate cancer cell line is more powerfully inhibited by these "headless" inhibitors. The C_3 -headless compound had dramatic effects on cell growth.

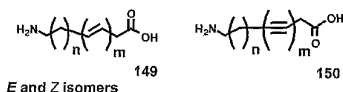
The synthetic route to this series of compounds, starting with various polyamines and head groups, is represented by the DACS 4 synthetic scheme depicted in Figure 9 of U.S. Patent Application 09/341,400). The amino group is protected by the N-Boc group, and the carboxylic acid is then activated by forming the p-nitrophenyl ester. After acid deprotection of the N-Boc group, the amino group can be reacted with an acid or sulfonamide chloride of the desired head group. After purification, direct reaction with the polyamine of choice in methanol gives the desired product. This can be purified by either (1) reverse-phase silica gel chromatography using 2:9 MeOH/0.5 N HCl or (2) cation-exchange chromatography over BioRex 70 resin (NH_4 form) using a linear gradient of from 0 to 2N NH_4OH .

WO 01/92218

PCT/US01/17795

3. Unsaturated straight-chain aliphatic linkers

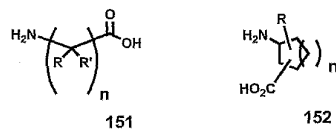
Varying degrees of unsaturation (alkene and alkyne) together with the geometric isomers of the alkene derivatives can be introduced into the linker moiety as depicted below (149 and 150). These variations allow introduction of conformational restraint into the final product.



where $n=0$ to 7 and $m=1$ to 4

4. Carbon-substituted and cyclic aliphatic linkers

Branched chain and cyclic saturated aliphatic linker groups impose conformational restraint on the desired polyamine analogue. Compounds 151 and 152 below illustrates this class of structure.



where $n=1-10$; R and R' vary independently and can be H or $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m$, and where $m=1$ to 10.

5. Chiral carbon-substituted amino acid linkers

Great structural diversity can be incorporated quickly into the polyamine analogues by using any of the large number of chiral amino acids that are available commercially. Many of the chiral amino acid intermediates are also available commercially, including some N-Boc protected amino acids and some N-Boc protected amino acid p-nitrophenyl esters. Figure 12 (153) illustrates a variety of derivatives that have been produced by this method. These amino acid-polyamine conjugates contain variable chirality in the amino acid moiety. The amino acids can also be used as "linkers" to other N-substituted "head groups".

An additional thousand α -amino acid analogues known in the art can be used to form polyamine adducts. These are very easily incorporated into the present invention

WO 01/92218

PCT/US01/17795

through synthetic sequences described in Figures 8 and 9 of U.S. Patent Application 09/341,400. Several key examples are; t-butylglycine, ornithine, α -aminoisobutyric acid, 2-aminobutyric acid, α -aminosuberic acid, 4-chlorophenylalanine, citrulline, β -cyclohexylalanine, 3, 4-dehydroproline, 3, 5-diiodotyrosine, homocitrulline, homoserine, hydroxyproline, β -hydroxvaline, 4-nitrophenylalanine, norleucine, norvaline, phenylglycine, pyroglutamine, β -(2-thienyl)alanine, *etc.* Several important β -amino acids are easily incorporated into the present invention through the chemistry discussed above. A key example is β -alanine, *etc.*

Both stereoisomers of the natural L-amino acids (L=S) or D-amino acids (D=R) can be used in this invention. Because each isomer can be used individually, the structural diversity of the analogues is markedly enhanced.

6. "Headless" linkers

The desired biological properties do not always depend upon the presence of a head group. Hence, a large series of so-called "headless" derivatives, containing a polyamine and linker without a head group were synthesized and tested. These derivatives are made by reacting the active ester (p-nitrophenyl or N-hydroxylsuccinimide) of the N-Boc amino acid with the polyamine of interest. The resulting N-Boc protected derivatives are then purified by cation-exchange chromatography over BioRex 70 (NH₄ form) resin using a linear gradient from 0 to 2N NH₄OH. The Boc group can then be cleaved by acid treatment. Both the tBoc and acid deprotected derivatives can be tested for biological activity. The full series of amino acids discussed above, together with other derivatives have been synthesized.

Reactive, Irreversible Polyamine Transport Inhibitors

A. Alkylating Reagents-

1. Aziridines

Polyamines substituted with fluorophores and other bulky end group were found to have the intrinsic property of high avidity binding to the PATr. This suggested that, in addition to utility as a diagnostic or research tool, they are useful as therapeutic agents for treating diseases or conditions wherein it is desirable to inhibit PAT. Their intrinsic affinity for other polyamine targets such as DNA broadens even further the scope of their

WO 01/92218

PCT/US01/17795

therapeutic utility. Correspondingly, bispolyamines containing such modified polyamines are expected to display the same activities.

In a preferred embodiment the polyamine core is substituted with the aziridiny group. Aziridiny-substituted polyamines react with nucleophilic groups in target binding complexes (receptors, transporters, enzymes and nucleic acids). In addition they can be exploited to bind other reactive moieties to polyamines. These mono- and di-substituted polyamine analogues are useful as drugs because of their inhibition of (a) the PATr, (b) polyamine synthesis and (c) reactions that use nucleic acids as substrates.

In another embodiment, a reactive group other than aziridine is introduced into a polyamine already substituted with a head group and a linker. This reactive group allows the labeled polyamine to bind covalently to an appropriate nucleophilic site on a polyamine-binding target molecule such as the PATr. Compounds of this type are used to covalently label receptors, enzymes or nucleic acids; thus, the modified polyamine serves as an affinity label that is useful in diagnostic assays and as a tool to isolate a polyamine binding target. Again, such compounds used as drugs will treat diseases or conditions which are ameliorated by blocking PAT or DNA-polyamine interactions. By virtue of the relative irreversibility of their binding, such compounds can be used at lower doses or at decreased frequency compared to compounds known in the art.

Disubstituted polyamines are synthesized by using the appropriate amine protecting groups on the polyamines. Reagents for the stepwise functionalization of spermine are known (Bergeron, R.J. *et al.*, *J. Org. Chem.* 53: 3108-3111 (1988); Byk, G. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 38: 3219-3222 (1997)). Bergeron *et al.* (*supra*) described the use of four independent amine-protecting groups: benzyl, t-butoxycarbonyl, trifluoroacetyl, and 2,2,2-trichloro-t-butoxycarbonyl. Conditions that allow the selective removal of each protecting group were also described. These reaction conditions allow independent and selective derivatization of each nitrogen of spermine. Thus this invention includes derivatization of monofunctionalized spermine with a linker/head group on any one of the four nitrogens and the synthesis of polyamine analogues with more than one functionalized nitrogen.

Methods to introduce an aziridine group into spermine (Li *et al.*, *J. Med. Chem.*, 39:339-341 (1996) and into derivatives of spermidine (Yuan *et al.*, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 34: 380 (1993) are available.

2. Other Reactive Groups

Other useful moieties that can be added instead of the aziridine group and that react with nucleophiles to form covalent bonds include chloro-, bromo- and iodoacetamides, sulfonylfluorides, esters, nitrogen mustards, *etc.*

The chemically reactive 2-haloacetamide group can easily be introduced into any of the polyamine analogues by reaction with the appropriate 2-haloacetic acid halide. Other chemically reactive groups are described below.

B. Photochemically Activated Reagents

The use of photochemically activated functionalities on biologically active molecules is a well known (Fleming, S.A., *Tetrahedron* 51:12479-12520, 1995). In the polyamine field, Felschow *et al.* attached an azidobenzoic acid moiety to spermine and examined the interaction of the resulting adduct with cell surface proteins (Felschow, DM *et al. Biochem. J.* 328, 889-895, 1997; Felschow, DM *et al., J. Biol. Chem.* 270:28705-28711, 1995). Since their photoprobe had an apparent K_i of 1 μ M versus spermidine for the PATr, the photolabeled proteins described were a mixture of polyamine binding proteins. One of the most potent PAT inhibitors of the present invention, DACS, has a K_i of <10 nM, which indicates an affinity 100 times higher than the compound reported by Felschow *et al.* Therefore introduction of a photoactivatable group to this molecule holds great promise in the isolation of the PATr protein(s).

1. Azide

Substitution of the dimethylamino group in dansyl chloride by azide produces a photochemically reactive chemical group. The preparation of 1-azido-5-naphthalene sulfonyl chloride has been described (Muramoto, K., *Agric. Biol. Chem.*, 1984, 48 (11), 2695-2699), and it is also available commercially from Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon). Introduction of this compound into the synthetic scheme for DACS is straightforward and merely requires substitution for dansyl chloride.

This azido derivative, would enable isolation and characterization of the PATr protein(s), and would also find use as an irreversible, photoactivatable drug molecule.

2. Diaziridines

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Substitution of a diaziridine group on the head group would accomplish many of the same goals as noted above.

3. Diazo Groups

Polyamine analogues with photoactivatable head groups are made using p-nitrophenyl 3-diazopyruvate, a reagent for introduction of a photoactivatable 3-diazopyruvate group to an aliphatic amine. This agent is also available from Molecular Probes, Inc. The desired derivative is made by reacting this reagent with the free amino, p-nitrophenyl activated linker precursor, purifying the linker/head group intermediate, and reacting it with the polyamine.

Analytical and Diagnostic Uses

The bispolyamine analogues and derivatives of the invention may also be used as reporter molecules and probes to assay other pharmacological targets, including soluble proteins, as described in PCT/US98/14896, which also describes the use of reporter head groups and polyamine transport assays.

TESTING INHIBITORS OF POLYAMINE TRANSPORT

Through screening bispolyamine compounds made by the various synthetic routes described above, several compounds were found to effectively inhibit polyamine transport. "R" values were calculated as the ratio of the IC_{50} in the absence of DFMO, or other polyamine synthesis inhibitor, over the IC_{50} in the presence of DFMO, or other polyamine synthesis inhibitor. An "R" value of 1 reflects a polyamine transport inhibitor that shows no change in the presence of a polyamine synthesis inhibitor, suggesting that the transport inhibitor fails to inhibit the transporter or is not specific for the transporter.

As expected, the presence of a polyamine synthesis inhibitor enhances the inhibition of cell growth by the bispolyamine transport inhibitors of the invention when used alone. A large enhancement reflects a good transport inhibitor that is specific for the polyamine transporter because it suggests that the transport inhibitor does not interact significantly with other cellular components. Preferred transport inhibitors of the invention will have "R" values of above about 2, but more preferably above about each of the following: 5, 10,

WO 01/92218

PCT/US01/17795

50, 100, 200, 300, and 400. Most preferred are compounds with "R" values of above about 500, above about 1000, or above about 10,000. Since significant "R" values may reflect conditions where neither the transport inhibitor nor the polyamine synthesis inhibitor alone are able to result in growth inhibition, the combination of the two may be considered to result in a synergistic effect, which varies according to the specificity of the transport inhibitor in combination with the specific synthesis inhibitor used. Such effects are not readily predictable in advance because the magnitude of inhibitory activity and degree of specificity are individual to each transport inhibitor.

The "R" values of the invention may also be considered in relation to the IC_{50} values of this invention's polyamine transport inhibitors in the presence or absence of a polyamine synthesis inhibitor. Such a consideration provides useful information regarding the potential usefulness of the transport inhibitor as an active ingredient. Preferred is a review of the "R" value versus the IC_{50} value in the presence of a polyamine synthesis inhibitor. This is useful because if that IC_{50} value is too high, the transport inhibitor is unlikely to be a viable active agent because of the necessary high concentrations needed for inhibitory activity. This requirement for a high concentration would not necessarily be negated even by very high "R" values. Thus inhibitors of the invention are preferably those that exhibit a IC_{50} value of about 100 μ M or less when used in combination with a polyamine synthesis inhibitor. More preferable are inhibitors that exhibit IC_{50} values, in the presence of a polyamine synthesis inhibitor, of less than about each of the following: 75, 50, and 25 μ M. Most preferred are compounds that exhibit IC_{50} values, in the presence of a polyamine synthesis inhibitor, of less than about 10, less than about 5, less than about 1, less than about 0.5, less than about 0.1, less than about 0.05, and less than about 0.01 μ M.

Using both a kinetic measure and a biological assay, the present inventors observed high correlation between the inhibition of PAT and growth.

PHARMACEUTICAL AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS

The bispolyamine analogues and derivatives of the invention, as well as the pharmaceutically acceptable salts thereof, may be formulated into pharmaceutical compositions. Pharmaceutically acceptable acid addition salts of the compounds of the invention which contain basic groups are formed where appropriate with strong or

WO 01/92218

PCT/US01/17795

moderately strong, non-toxic, organic or inorganic acids in the presence of the basic amine by methods known in the art. Exemplary of the acid addition salts that are included in this invention are maleate, fumarate, lactate, oxalate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzenesulfonate, tartrate, citrate, hydrochloride, hydrobromide, sulfate, phosphate and nitrate salts.

As stated above, the compounds of the invention possess the ability to inhibit PAT or polyamine synthesis, properties that are exploited in the treatment of any of a number of diseases or conditions, most notably cancer. A composition of this invention may be active *per se*, or may act as a "pro-drug" that is converted *in vivo* to active form.

The compounds of the invention, as well as the pharmaceutically acceptable salts thereof, may be incorporated into convenient dosage forms, such as capsules, impregnated wafers, tablets or injectable preparations. Solid or liquid pharmaceutically acceptable carriers may be employed. Pharmaceutical compositions designed for timed or delayed release may also be formulated.

Preferably, the compounds of the invention are administered systemically, *e.g.*, by injection. When used, injection may be by any known route, preferably intravenous, subcutaneous, intramuscular, intracranial or intraperitoneal. Injectables can be prepared in conventional forms, either as solutions or suspensions, solid forms suitable for solution or suspension in liquid prior to injection, or as emulsions.

Solid carriers include starch, lactose, calcium sulfate dihydrate, terra alba, sucrose, talc, gelatin, agar, pectin, acacia, magnesium stearate and stearic acid. Liquid carriers include syrup, peanut oil, olive oil, saline, water, dextrose, glycerol and the like. Similarly, the carrier or diluent may include any prolonged release material, such as glyceryl monostearate or glyceryl distearate, alone or with a wax. When a liquid carrier is used, the preparation may be in the form of a syrup, elixir, emulsion, soft gelatin capsule, liquid containing capsule, sterile injectable liquid (*e.g.*, a solution), such as an ampoule, or an aqueous or nonaqueous liquid suspension. A summary of such pharmaceutical compositions may be found, for example, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (Gennaro 18th ed. 1990).

WO 01/92218

PCT/US01/17795

The pharmaceutical preparations are made following conventional techniques of pharmaceutical chemistry involving such steps as mixing, granulating and compressing, when necessary for tablet forms, or mixing, filling and dissolving the ingredients, as appropriate, to give the desired products for oral or parenteral, including, topical, transdermal, intravaginal, intranasal, intrabronchial, intracranial, intraocular, intraaural and rectal administration. The pharmaceutical compositions may also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents and so forth.

Although the preferred routes of administration are systemic, the pharmaceutical composition may be administered topically or transdermally, e.g., as an ointment, cream or gel; orally; rectally; e.g., as a suppository, parenterally, by injection or continuously by infusion; intravaginally; intranasally; intrabronchially; intracranially intra-aurally; or intraocularly.

For topical application, the compound may be incorporated into topically applied vehicles such as a salve or ointment. The carrier for the active ingredient may be either in sprayable or nonsprayable form. Non-sprayable forms can be semi-solid or solid forms comprising a carrier indigenous to topical application and having a dynamic viscosity preferably greater than that of water. Suitable formulations include, but are not limited to, solution, suspensions, emulsions, creams, ointments, powders, liniments, salves, and the like. If desired, these may be sterilized or mixed with auxiliary agents, e.g., preservatives, stabilizers, wetting agents, buffers, or salts for influencing osmotic pressure and the like. Preferred vehicles for non-sprayable topical preparations include ointment bases, e.g., polyethylene glycol-1000 (PEG-1000); conventional creams such as HEB cream; gels; as well as petroleum jelly and the like.

Also suitable for topical application are sprayable aerosol preparations wherein the compound, preferably in combination with a solid or liquid inert carrier material, is packaged in a squeeze bottle or in admixture with a pressurized volatile, normally gaseous propellant. The aerosol preparations can contain solvents, buffers, surfactants, perfumes, and/or antioxidants in addition to the compounds of the invention.

For the preferred topical applications, especially for humans, it is preferred to administer an effective amount of the compound to a target area, e.g., skin surface, mucous

WO 01/92218

PCT/US01/17795

membrane, eyes, etc. This amount will generally range from about 0.001 mg to about 1 g per application, depending upon the area to be treated, the severity of the symptoms, and the nature of the topical vehicle employed.

The compositions of the invention be given in combination with one or more additional compounds that are used to treat the disease or condition. For treating cancer, the polyamine analogues and derivatives are given in combination with anti-tumor agents, such as mitotic inhibitors, e.g., vinblastine; alkylating agents, e.g., cyclophosphamide; folate inhibitors, e.g., methotrexate, prirerixim or trimetrexate; antimetabolites, e.g., 5-fluorouracil and cytosine arabinoside; intercalating antibiotics, e.g., adriamycin and bleomycin; enzymes or enzyme inhibitors, e.g., asparaginase; topoisomerase inhibitors, e.g., etoposide; or biological response modifiers, e.g., interferon. In fact, pharmaceutical compositions comprising any known cancer therapeutic in combination with the polyamine analogues and derivatives disclosed herein are within the scope of this invention. Most preferably, the present compounds are administered in combination with a polyamine synthesis inhibitor such as DFMO.

The pharmaceutical compositions of the invention may also comprise one or more other medicaments such as anti-infectives including antibacterial, anti-fungal, anti-parasitic, anti-viral, and anti-coccidial agents.

Typical single dosages of the compounds of this invention are between about 1 ng and about 10 g/kg body weight. The dose is preferably between about 0.01 mg and about 1g/kg body wt. and, most preferably, between about 0.1 mg and about 100 mg/kg body wt. For topical administration, dosages in the range of about 0.01-20% concentration of the compound, preferably 1-5%, are suggested. A total daily dosage in the range of about 1-500 mg is preferred for oral administration. The foregoing ranges are, however, suggestive, as the number of variables in regard to an individual treatment regime is large, and considerable excursions from these recommended values are expected and may be routinely made by those skilled in the art.

Effective amounts or doses of the compound for treating a disease or condition can be determined using recognized *in vitro* systems or *in vivo* animal models for the particular disease or condition. In the case of cancer, many art-recognized models are known and are representative of a broad spectrum of human tumors. The compounds may be tested for

WO 01/92218

PCT/US01/17795

inhibition of tumor cell growth in culture using standard assays with any of a multitude of tumor cell lines of human or nonhuman animal origin. Many of these approaches, including animal models, are described in detail in Geran, R.I. *et al.*, "Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems (Third Edition)", *Canc. Chemother. Reports*, Part 3, 3:1-112.

Synthetic Methods

The synthetic methods necessary to produce the polyamine analogues and derivatives for the preparation of bispolyamines of the invention, including parallel library synthesis and combinatorial approaches, have been described in PCT/US98/14896.

Additionally, this invention provides synthetic methods whereby bispolyamines may be readily produced (see Figures 3A and 3B as well as examples below). Briefly, the method uses ^tBoc protected polyamine derivatives as starting substrates that are linked to form bispolyamines. These bispolyamine products are then purified by ion exchange chromatography. Elution of the products permits recovery and availability for optional subsequent deprotection.

Having now generally described the invention, the same will be more readily understood through reference to the following examples which are provided by way of illustration, and are not intended to be limiting of the present invention, unless specified.

EXAMPLE I

Screening of Polyamine Analogues in Transport and Growth Assays

The effect of a number of potential PAT transport inhibitors on PAT and growth of MDA cells is summarized in Figure 2 (3-98). The ratio "R" is the IC₅₀ for polyamine alone relative to the IC₅₀ for the polyamine analogue combined with an ODC inhibitor. This value of "R", indicates the relative level of "synergism" between the polyamine analogue and ODC inhibitor. Under the growth assay conditions, the ODC inhibitor alone shows no inhibition.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

EXAMPLE IIK_i determinations and structure activity relationships

The bispolyamine analogues and derivatives of the invention may be evaluated for their ability to inhibit the uptake of spermidine into MDA cells in culture. Joro spider toxin JSTx-3 is available from Calbiochem; 1-Naphthylacetylspermine is available from RBI. Deoxyspergualin was a generous gift from Paul Gladstone. K_s were measured for the bispolyamine analogues in Figure 16 and the results are shown therein.

EXAMPLE IIIIC₅₀ against MDA cells with DFMO and spermidine

A cellular assay was developed to highlight the ability of the amino acid/spermine amides to work in concert with the ODC inhibitor DFMO in the presence of added 1 μM spermidine. In this assay, no growth inhibition is observed with DFMO alone because the cells are able to utilize the spermidine added to the culture media even when polyamine biosynthesis is inhibited. Thus inhibition of uptake of the exogenously added spermidine by any of the tested analogues or derivatives results in observable growth inhibition due to polyamine depletion.

Results with some deprotected bispolyamines are shown in Figure 16.

EXAMPLE IVSynthesis of bispolyamines

The substrates for synthesizing bispolyamines may be prepared by a two part process: synthesis of a linker moiety and synthesis of monoprotected polyamines.

Exemplary linkers are prepared by converting the corresponding acid chlorides to p-nitrophenyl activated esters using 4-nitrophenol. See Figure 4. Examples of such activated esters are shown in Figure 18. These are purified by recrystallization in EtOH/CH₂Cl₂ (10-30% EtOH) and dried under high vacuum.

Polyamines may be protected by methods well known in the art. For example, spermine (3 equivalents or "eq") is monoprotected with di-tert-butylidicarbonate (1 eq) which is slowly added over a 1.5 hour time frame to a solution of spermine in

WO 01/92218

PCT/US01/17795

dioxane/water with NaOH (1 eq). See Figure 5. After stirring for 24 hours, the solvent is evaporated and the compound purified over a Bio-Rex cation exchange column (45x 2.5 cm).

Synthesis of bispolyamines may be by the reaction scheme shown in Figure 3A, where p-nitrophenyl activated esters are reacted with protected spermines.

For example, to a flask of 2.2 equivalents of N¹-¹Boc-spermine in 10 mL methanol, 1 equivalent of 4-nitrophenyl ester dissolved in 5 mL DMF and 10 mL of MeOH was added drop by drop with stirring for three hours or overnight.

A second equivalent of the 4-nitrophenyl ester may be added as a solid and allow to stir for an additional 3 hours. The solvent was evaporated and the DMF removed under high vacuum. The crude product was originally redissolved in water and purified over a Bio-Rex cation exchange column (45 x 2.5 cm).

Optionally, 50% MeOH/water may be used as the solvent for improved solubility of the bispolyamine. The compounds were eluted with a gradient ranging from 0 through 1 - 2 N NH₄OH. The appropriate fractions were pooled and the solvent evaporated to produce the bispolymer.

N¹-¹Boc-spermine has been coupled to the eight paranitrophenyl esters shown in Figure 18, including the succinyl (n = 2) linked dispermine. I have purified six of these compounds using Bio-Rex cation exchange chromatography. The crude product is generally a mixture consisting of two spots when analyzed on thin layer chromatography (TLC). Both spots migrate higher than N¹-¹Boc-spermine with one generally migrating close to the solvent front and the other migrating somewhat higher than N¹-¹Boc-spermine but this varies with the p-nitrophenyl ester.

In general, this spot migrates higher as n increases in value. In the case where n = 10 (dodecanedioyl derivative) the two spots migrate very close to each other near the solvent front. The purification of compounds with greater n values are generally eluted with a 0 to 1 or 1.5 N NH₄OH gradient.

One exception, however, is the succinyl derivative which consists of four reaction products on TLC. This derivative was successfully purified using 50% MeOH/water instead of water as solvent.

For removal of the N¹-¹Boc protecting group, 5 mL of 3M HCl may be added to the above reaction conditions followed by stirring for one hour.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

¹H and ¹³C NMR spectra for the t-boc protected bispolyamines have been completed except for ORI 1268 where only a ¹H was completed. Likewise, ¹H and ¹³C NMR spectra have also been obtained for the deprotected final products ORI 1236, 1288, 1289, 1290. Mass spec analysis has been completed for ORI 1288 and ORI 1290.

EXAMPLE V

Polyamine transport inhibition by bispolyamines

Most of the spermine dimers that have been tested provided very good K_i for transport inhibition with values under 75 nM. ORI 1236 was the most potent inhibitor with a K_i of 22 nM. This value is comparable with the K_i for ORI 1090 (between 10-22 nM for MDA cells). Only ORI 1275 had a K_i that was above 100 nM ($K_i = 219$ nM). The results were generally mirrored in the growth inhibition assay. All of the compounds were synergistic with DFMO with IC_{50} s of 10 μ M or less. The most potent growth inhibitor was ORI 1288 followed by ORI 1286 > 1236 > 1289 > 1290 > 1275 > 1299.

Without being bound by theory, it appears that shorter linked spermine dimers are slightly more potent than the longer chained analogs. Because there was not a more dramatic difference in activity between the analogs, it is suggested that there is a fairly large degree of tolerance for the length of the aliphatic linker in a transporter's polyamine binding site. This also supports the finding that there is some leeway in linker length of PTI inhibitors such as 1202 and 1090. These bispolyamine molecules may interact in similar fashion with respect to the transporter as ORI 1202 and ORI 1090.

It was observed that ORI 1236 in combination with DFMO gave a maximum growth inhibition that was less than the ORI 1202/DFMO control. This suggested that ORI 1236 may partially rescue from polyamine depletion. Subsequently, ORI 1236 was found to partially rescue from DFMO. Almost all other bispolyamine compounds tested except for ORI 1287 gave a maximum growth inhibition that was less than the ORI 1202/DFMO control. ORI 1236 and 1290 have been re-tested and only ORI 1290 displayed rescue

All references cited herein are hereby incorporated by reference in their entireties, whether previously specifically incorporated or not.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

Having now fully described this invention, it will be appreciated by those skilled in the art that the same can be performed within a wide range of equivalent parameters, concentrations, and conditions without departing from the spirit and scope of the invention and without undue experimentation.

While this invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications. This application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be applied to the essential features herein before set forth as follows in the scope of the appended claims.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A polyamine analogue or derivative that binds to a polyamine-binding site of a molecule and/or inhibits polyamine transport, which analogue or derivative is a bispolyamine.
2. An analogue or derivative according to claim 1 wherein said bispolyamine comprises at least one N¹-monosubstituted polyamine that is an N¹-monosubstituted putrescine, spermidine, or spermine.
3. An analogue or derivative according to claim 2 wherein said N¹-monosubstitution comprises an amide linkage.
4. An analogue or derivative according to claim 2 wherein said N¹-monosubstitution comprises a sulfonamide linkage.
5. An analogue or derivative according to claim 2 wherein said N¹-monosubstitution comprises an amine.
6. An analogue or derivative according to claim 3 wherein said N¹-monosubstitution further comprises a linker moiety.
7. An analogue or derivative according to claim 3 wherein said N¹-monosubstitution further comprises an amino alkyl moiety.
8. An analogue or derivative according to claim 3 wherein said N¹-monosubstitution further comprises an amino acid head group or derivative thereof.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

9. An analogue or derivative according to claim 8 wherein said amino acid head group is protected, a naturally occurring amino acid, or a non-naturally occurring amino acid.

10. A polyamine analogue or derivative according to claim 1 wherein said analogue or derivative is selected from the compounds listed in Figure 16.

11. A polyamine analogue or derivative according to claim 1 wherein said analogue or derivative is selected from the compounds listed in Figure 17.

12. An analogue or derivative according to claim 4 wherein said N¹-monosubstituted polyamine is selected from the compounds listed in Figure 9h.

13. An analogue or derivative according to claim 3 wherein said N¹-monosubstituted polyamine is selected from the compounds listed in Figures 9a-9c.

14. An analogue or derivative according to claim 8 wherein said N¹-monosubstituted polyamine is selected from the compounds listed in Figures 9d-9g.

15. An analogue or derivative according to claim 11 wherein said N¹-monosubstituted polyamine is selected from the compounds listed in Figures 9a-9f.

16. An analogue or derivative according to claim 1 wherein said analogue or derivative further comprises a reactive moiety that is capable of forming covalent bonds with a nucleophilic site on a target molecule.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

17. An analogue or derivative according to claim 16, wherein said target molecule is a protein or a nucleic acid.

18. An analogue or derivative according to claim 16, wherein said target molecule is a cellular receptor or other cell surface molecule.

19. A composition useful for treating a disease or condition in which the inhibition of polyamine transport is desirable, comprising

a polyamine analogue or derivative according to any one of the preceding claims and

a pharmaceutically acceptable excipient.

20. A composition useful for treating a disease or condition in which the inhibition of polyamine transport and synthesis is desirable, comprising the composition of claim 19 and an inhibitor of polyamine synthesis.

21. A composition according to claim 20 wherein said inhibitor of polyamine synthesis is difluoromethylornithine (DFMO).

22. A composition according to claim 20, further comprising, in combination with said composition, one or more additional agents known to be useful for treating said disease or condition

23. A method for treating a disease or a condition in a subject associated with undesired cell proliferation and/or which is treatable by inhibition of polyamine transport, comprising administering to said subject an effective amount of a polyamine analogue or derivative of any one of claims 1-18.

WO 01/92218

PCT/US01/17795

24. A method according to claim 23 wherein said undesired cell proliferation is associated with proliferation of cells of the immune system, cell of the vascular neointima, tumor cells or with undesired angiogenesis.

25. A method according to claim 23 wherein said disease or condition is cancer or post-angioplasty injury.

26. A method for treating a disease or a condition in a subject associated with undesired cell proliferation and/or which is treatable by inhibition of polyamine transport and synthesis, comprising administering to said subject an effective amount of a polyamine analogue or derivative according to any one of claims 1-18, and an inhibitor of polyamine synthesis.

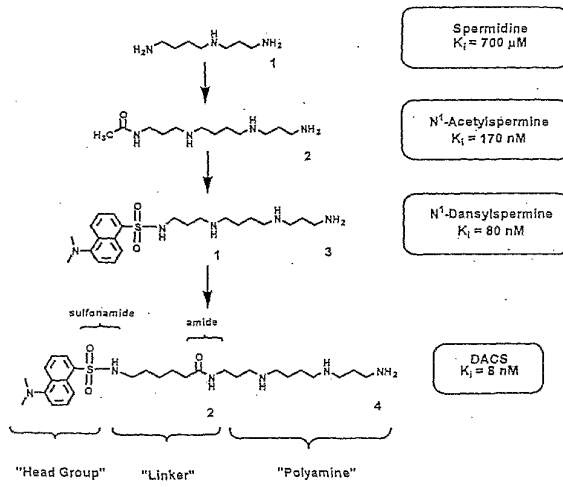
27. A method according to claim 26 wherein said inhibitor of polyamine synthesis is difluoromethylornithine (DFMO).

28. A method according to claim 26, further comprising one or more additional agents known to be useful for treating said disease or condition.

29. A method according to any of claims 23-28 wherein said administering is performed orally, parenterally, topically, transdermally, intravaginally, intranasally, intrabronchially, intracranially, intraocularly, intraaurally, or rectally, or by injection.

30. A method according to claim 29 wherein said administering by injection is intravenous, subcutaneous, intramuscular, intracranial, or intraperitoneal.

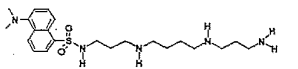
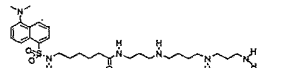
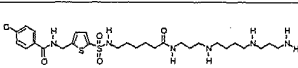
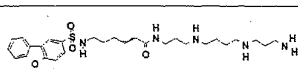
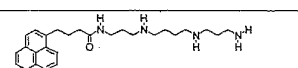
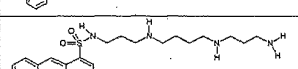
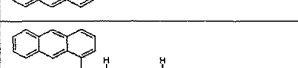
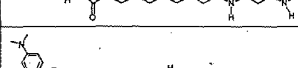
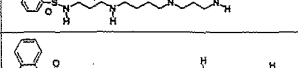
Fig. 1



WO 01/92218

2/58

PCT/US01/17795

#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
3		0.080	20	I
4		0.010	400	IX, XIII
5		0.010	210	XIII
6		0.005	220	XIII
7		0.10	3.6	III
8		0.110	3.7	II
9		0.440	2.7	IV
10		0.050	>10	XV
11		0.190	2.4	XV

a Inhibition of polyamine uptake: Ki determined from Lineweaver-Burke double reciprocal plots
b Inhibition of Tumor Cell Growth: R is ratio of IC50 (compound alone) to IC50 (compound + DFMO)
c Numbers refer to Examples (describing synthesis)
d Purchased from Aldrich Chemical Company

Fig. 2/1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

3/58

PCT/US01/17795

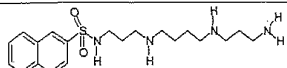
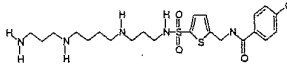
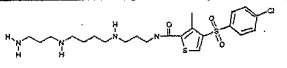
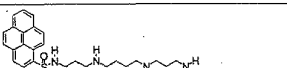
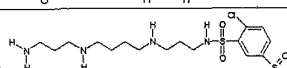
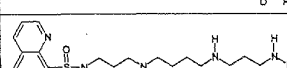
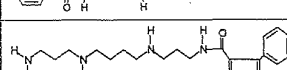
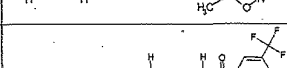
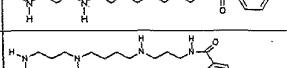
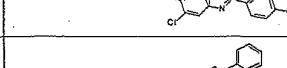
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
12		0.150	4.3	XV
13		0.058	>47	XV
14		0.037	14	XVII
15		0.091	2.2	II
16		0.08	2.1	XV
17		0.43	>31	XV
18		0.083	40	XVII
19		0.24	>10	XV
20		0.28	1.0	XVII
21		0.084	1.0	XVII

Fig. 2/2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

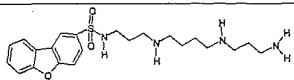
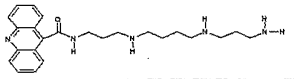
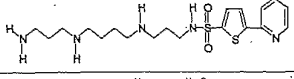
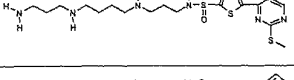
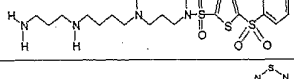
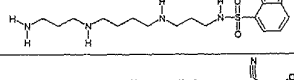
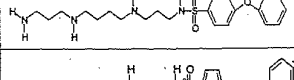
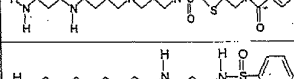
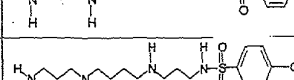
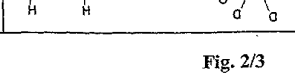
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
22		0.066	11	XV
23		0.250	6.2	II
24		0.23	10	XV
25		0.067	8.6	XV
26		0.180	15	XV
27		0.650	9.9	XV
28		0.054	9.3	XV
29		0.076	>46	XV
30		0.120	>10	XV
31		0.083	>12	XII

Fig. 2/3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

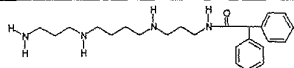
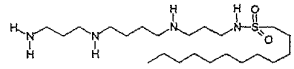
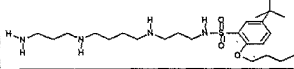
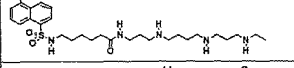
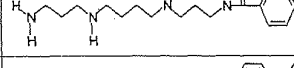
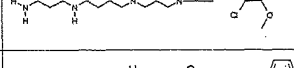
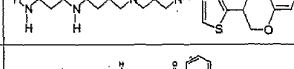
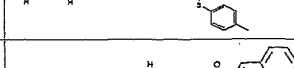
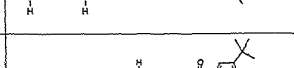
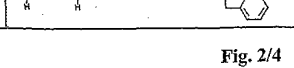
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
32		0.093	2.1	XVII
33		0.17	1.4	XV
34		0.120	1.0	XV
35		0.041	33	XIII
36		0.61	>2	XVII
37		0.150	2.4	XVII
38		0.140	1.0	XVII
39		0.500	1	XVII
40		0.086	18	XVII
41		0.200	1.0	XVII

Fig. 2/4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

6/58

PCT/US01/17795

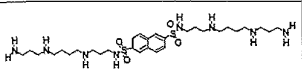
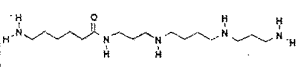
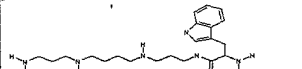
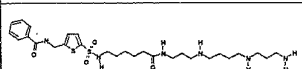
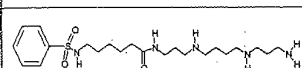
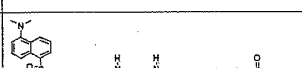
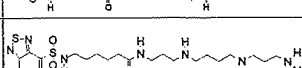
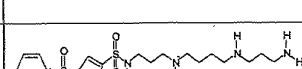
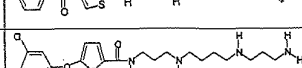
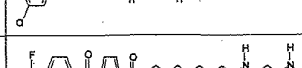
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
42		0.110	1.1	XIV
43		0.033	76	XVII
44		0.073	39	XIII
45		0.052	3.0	XIII
46		0.082	63	XIII
47		2.1	6.8	XIII
48		0.079	>49	XIII
49		0.067	3.2	XV
50		0.12	1.0	XVII
51		0.083	1.5	XV

Fig. 2/5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

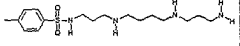
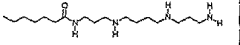
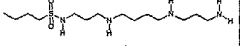
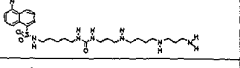

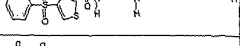
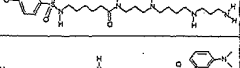
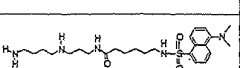
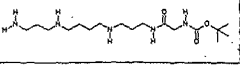

#	Structure	K _i (M) ^a	R ^b	Method ^c
52		0.094	5.3	XV
53		0.18	1.0	XV
54		0.19	2.0	XV
55		0.079	>1.1	IV
56		0.190		d
57		0.017	170	XV
58		0.050	189	XIII
59			>1	XIII
60			>1	XIII
61		0.200	1.0	XIII

Fig. 2/6

WO 01/92218

8/58

PCT/US01/17795

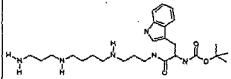
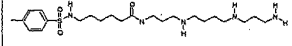
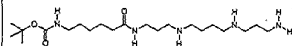
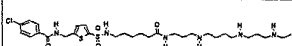
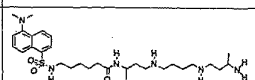
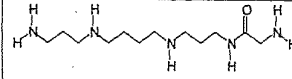
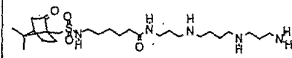
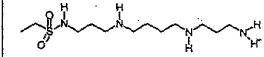
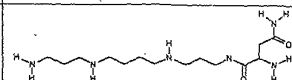
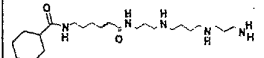
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
62			>2.0	XIII
63		0.050	>1	XIII
64		0.046		XIII
65		0.012		XIII
66		0.018	27	XIII
67		0.07	1.0	XIII
68		0.110	>4.4	XIII
69		0.22	1	XV
70		0.033	>12.2	XIII
71		0.160	>1.5	XIII

Fig. 2/7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

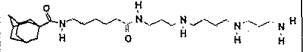
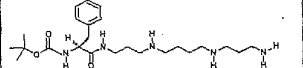
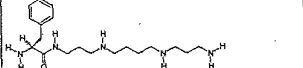
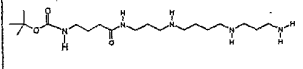
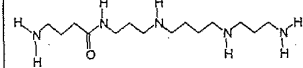
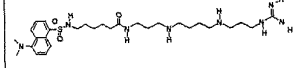
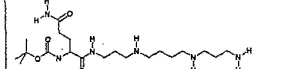
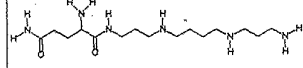
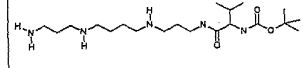
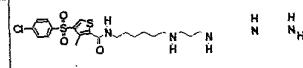
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
72		0.031	>100	XIII
73		0.094	>1	XIII
74		0.200	1.0	XIII
75		0.130	>1	XIII
76		0.040	1.0	XIII
77		0.093	1	XIII
78		0.156		XIII
79		0.047	1	XIII
80		0.258		XIII
81		0.0096	153	XIII

Fig. 2/8

#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
82		0.097	>54	XIII
83		0.183		XIII
84		0.036	>3.2	XIII
85		0.048	>6.5	XIII
86		0.091		XIII
87		0.034	>1	XIII
88		0.014	>40	XIII
89		0.020	>1	XIII
90		0.077		XIII
91		0.037	1	XIII

Fig. 2/9

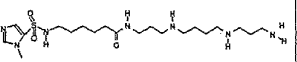
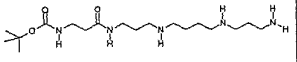
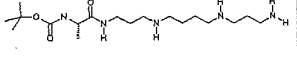
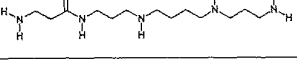
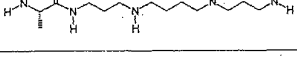
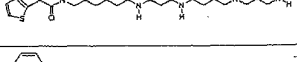
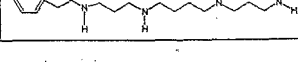
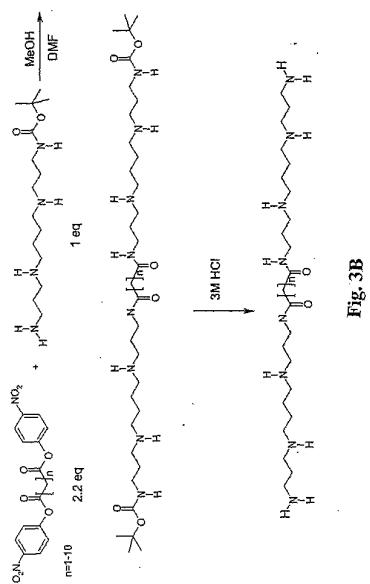
#	Structure	Ki (M) ^a	R ^b	Method ^c
92		0.300	1	XIII
93		0.061	1	XIII
94		0.042	1	XIII
95		0.050	1	XIII
96		0.034	1	XIII
97		0.027	1	XIII
98		0.180	12	d

Fig. 2/10



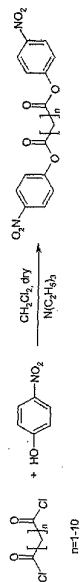


Fig. 4

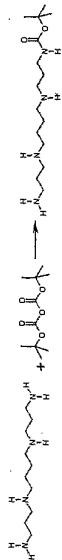


Fig. 5

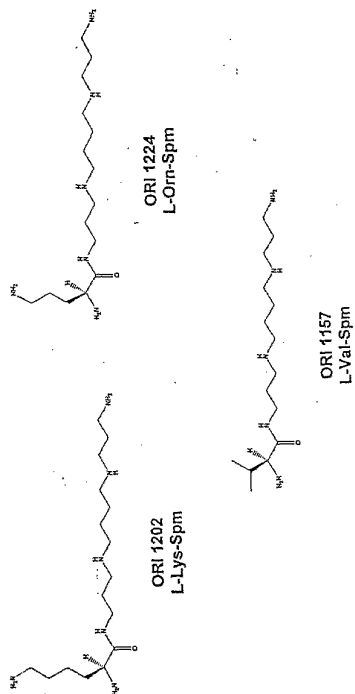


Fig. 6

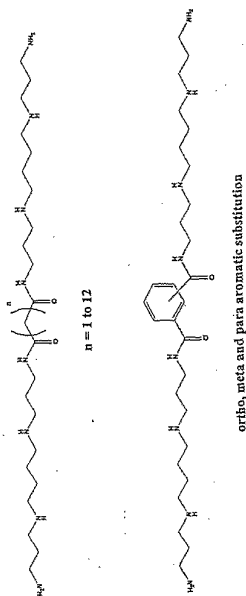


Fig. 7

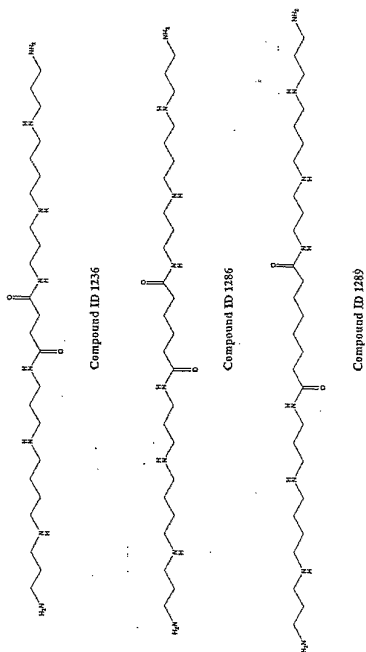


Fig. 8

Fig. 9A

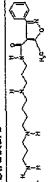






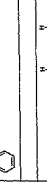

N1-monosubstituted polyamines: amides, no linker ID	Mol weight Structure	Transport-Cell Line	Ki	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1032	387.5295 	MDA	0.19	MDA	3.86	>300
1033	421.9745 	MDA	0.063	MDA		>300
1035	516.5189 	MDA	1.0	MDA		50
1037	472.6331 	MDA	0.28	MDA		100
1038	407.9474 	MDA	0.084	MDA		>300
1039	502.4918 	MDA	>10	MDA		30
1043	407.5635 	MDA	>10	MDA		200
1053	394.5648 	MDA	0.344*	MDA	22.3	260
1072	595.8762 	mda	0.4	MDA		
			0.54			
			>1			

Fig. 9A (cont'd)




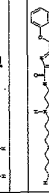
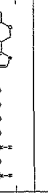
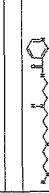

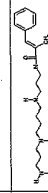
1073	306.4549		MDA	> 10	mda	150	>300
1076	426.8911		MDA	0.61	mda	28.1	150
1077	501.1143		MDA	0.116*	mda		
			MDA	0.165*	mda	2.46	56
			MDA	0.11*	mda		
1078	447.604		MDA	0.037	mda		19
			MDA	0.19*	mda		
					pc-3		19.4
					caeo-2		24.4
					cem		6.9
1079	429.6323		MDA	0.594*	pc-3		83
1080	346.5202		MDA	0.062*	mda	7.4	78
			MDA	0.085	mda		190
1081	442.6531		MDA	0.297*	mda		26
					pc-3		5.5
					caeo-2		23.0
					cem		1.7
1104	457.4043		MDA	0.12	mda		18
					pc-3		20.2
					caeo-2		96.2
					cem		4.5

Fig. 9A (cont'd)


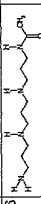

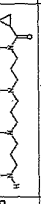
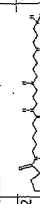

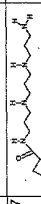

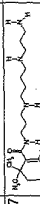
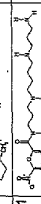
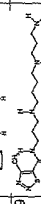
			MDA	0.083			
1163	302.4638						>100
1166	230.36				mda		>100
1167	256.3943				H157 mda		>100
1169	412.62		MDA	0.0252	h157 mda	>300	>100 >300
1208	308.47				pc-3	20.1	>300
1210	352.57						
1211	341.41						
1213	328.4829						
1214	325.46						
1215	284.46						
1216	313.49						

Fig. 9A (cont'd)


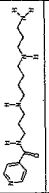
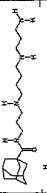
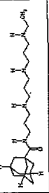

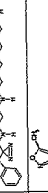

1217	307.44							
1218	307.4424							
1235	364.5792		MDA	1,14				>300
1240	378.6062				mda			>300
1249	470.5594				pc-3			>300
1251	392.5053		MDA	> 1				
1347	472.6795		MDA					

Fig. 9B

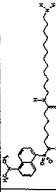





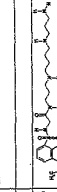

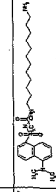
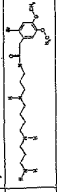
ID	mol weight	Structure	NT-1-mono-substituted polyamines: amides, with linker	Transport-Cell Line	Ki	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1002	546.7972		MDA-MB-231	MDA-MB-231	0.24*	MDA-MB-231	2.2	>100
			A172	A172	0.16*			
			PC-3	PC-3	0.0339*			
			MCF-7	MCF-7	0.012			
			MDA	MDA	0.0152*			
			CaCo	CaCo	0.0078*			
			mda	mda	0.0245-0.13	MDA-MB-231	2.0	>100
			MDA	MDA	0.0052-0.03	mda	0.63	450
					5.6 nM	mda	2.0	390
						mda-7		72
						pcasnc		
1008	472.6795		MDA	MDA	0.104	MDA	<3	25
			A172	A172	0.12			
1022	370.5425		MDA	MDA	0.230	MDA	9.4	79
						MDA	8.26	>300
1040	401.5974					mda		>100
1055	398.5718			MDA		mda		6.9
1056	396.5807			MDA	0.11*	MDA		150

WO 01/92218

23/58

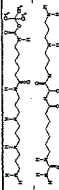
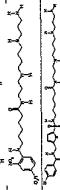
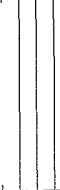



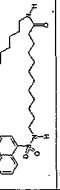
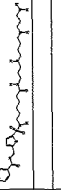
PCT/US01/17795

Fig. 9B (cont'd)

1059	546.822		MDA	6.5*	mda		70
1060	439.8164		MDA	0.089	mda	>300	>300
1061	578.8513		MDA	0.00695	mda	<3	360
			MDA	0.0942			
			MDA	41.2 nM	mda	9.81	560
			MDA	57.8 nM	mda		
1063	560.7666		MDA	88*	mda		18
1064	510.7013		MDA	> 30	mda	>100	>100
1065	632.9597		MDA	0.76	mda	>30	>30
1066	650.9723		MDA	19.2*	mda		27
					pc-3		8.7
					caso-2		>30
					com		2.9
1067	492.6888		MDA	0.070*	mda	>30	>30
1068	506.7567		MDA	0.43	mda	>30	>30
1068	459.431		mda	>1			
			MDA	0.74			

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 9B (cont'd)

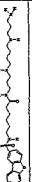





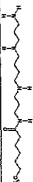
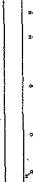

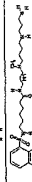
1083	401.5974		mda	81.3	mda	>100
1085	373.5025		mda	2.2	mda	>300
1086	481.8		mda	0.0147	mda	300
1090	625.2897		MDA	0.00987		
			PC-3	0.070*		
			MDA	0.01324		
			MCF-7	0.0252		
			CaCo	0.013*		
			MDA	0.023*		
			MDA	13.3 - 15.7 nM	mda	1.54
			MDA	0.0216 Pte-		
			MDA	0.0273		
			HT-29	0.0812		
			Du145	0.016		
1093	630.9845		mda	>30		
1088	594.8446		MDA	0.094*	mda	190
			MDA	0.0997		
1097	455.6678		MDA	0.117	mda	1200
			MDA	0.0817		
1088	590.8348		MDA	2.1	mda	1200
			MDA		mda	>1000

WO 01/92218

25/58

PCT/US01/17795

Fig. 9B (cont'd)

1100	545.75		MDA	0.0195*	mda	0.588	180
			MDA	0.00485			
			PC-3	0.0164			
			MDA	0.0105*			
			MCF-7	0.0196			
			CaCo	0.00663			
1101	513.7292		MDA	0.0793	pc-3	3.0	>300
			MDA		mda	6.17	>300
1107	314.5186		MDA	0.182	mda		63
1111	565.7189		MDA	0.19			
1113	564.8402		MDA	0.0167	mda	1.44	380
1114	559.0029		MDA	0.073	pc-3	1.43	320
1115	491.7012		MDA		mda	1.59	>300
1116	491.7012				pc-3		>300
					mda	315	>300
					pc-3		>300
1119	469.6949		MDA	0.0568*	mda	315	>300
					pc-3	5.1	>10
1120	415.6245		MDA	0.0667*	mda	11.5	>10

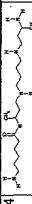
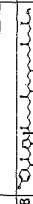

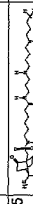
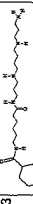

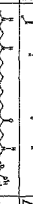
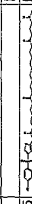



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

26/58

PCT/US01/17795

Fig. 9B (cont'd)

1122	343.5604		MDA	0.248			
			MDA	0.397			
1123	657.3438		MDA	0.012	MDA	5.20	255
			MDA	0.0136	PC-3	1.23	530
			PC-3	0.038			
			Dur145	0.0995			
1124	576.8513		MDA	0.0178	mda	13.2	>300
			MDA	0.0466			
1129	629.7915		MDA	0.17*	mda	66.2	>300
			MDA	0.167*	pc-3	71.3	>300
1135	425.6633		MDA	0.167*	pc-3	28.2	>300
			MDA	0.0446*	mda	66.5	>100
1136	477.7998		MDA	0.0446*	mda	9.68	>1000
			MDA	0.0344	pc-3	9.23	>1000
1149	387.5703		MDA	0.136*	mda	>100	>100
1152	560.8377		MDA	0.0903	pc-3		99
			MDA	0.085	mda		>100
1156	614.275		MDA	0.09955	mda	1.55	>300
			MDA	0.0564*	pc-3	2.56	>300
1160	393.5961		MDA	0.0564*	mda	45.8	>300
			MDA	> 0.3	pc-3		64
1161	357.5438		MDA	> 0.3	mda	>300	>300
			MDA	> 1	pc-3	>300	>300

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 9B (cont'd)

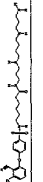
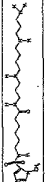
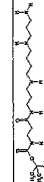

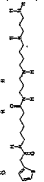
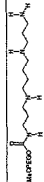
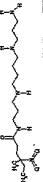


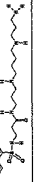

1166	607.2209		MDA	0.0143	mda	<3	199
1174	459.66		MDA	0.3	pc-3 mda	<3 >300	188 >300
1175	373.6432		MDA	0.061	pc-3 mda	>300 >300	>300 >300
1179	369.655		MDA	> 1 μM	pc-3 mda	>300 >300	>300 >300
1180	439.6664		MDA	0.0265	mda	>300	>300
1203	244.3832				pc-3	>300	>300
1209	359.52		MDA	>1	mda	62	277
1233	587.2084		MDA	0.0355*	pc-3 mda	72 1.9	227 >300
1234	506.7169		MDA	0.0185* 0.0565	pc-3 mda	0.55 1.5	>300 >300
1238	364.5792		MDA	> 1	pc-3 mda	0.87	>300 235
1239	382.6333				pc-3 mda		208 195
					pc-3		173

Fig. 9B (cont'd)



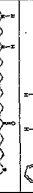

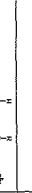



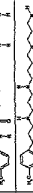

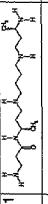
1241	615.2626		MDA	0.0282				
1243	428.6448							
1244	358.5189		MDA	0.48				
1245	313.4495							
1254	505.666		MDA	0.0577				
1281	392.6333		MDA	> 1				
1298	413.6665							
1305	348.5361							
1315	477.4338							
1340	644.3043							

Figure 9C

N1-mono-substituted polyamines: amides, amino alkyl	mol weight	Structure	Transport-Cell Line	Ki	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1091	301.4791		MDA	0.075	mda		>100
1094	315.5062		MDA	0.117	mda	18	>300
			MDA	0.040	mda	51.5	>1000
			MDA	0.028 -	mda	54	>300
1110	244.3832		MDA	0.043	MDA		
			MDA	0.162			
			MDA	0.190			
1121	343.5604		MDA	0.64	MDA	>300	>300
			MDA	0.5	PC-3		
1122	343.5604		MDA	0.248			>300
			MDA	0.397			
1126	301.4791		MDA	> 10	mda		>100
			MDA	0.043*	mda		>100
1150	287.452		MDA	0.0756*	mda	>300	>300
1177	273.4249		PC-3	0.0636	PC-3	<3	>300
			Drd46	0.147	MDA	>100	>100
					PC-3	2.86	>100
1197	301.4791		MDA	0.39	MDA		>300
					PC-3	>300	460

Fig. 9C (cont'd)

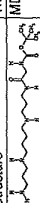
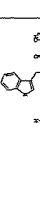

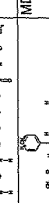



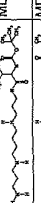
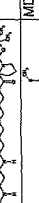

1188	301.4781		MDA	0.424	MDA	>300	>300
					PC-3	299	>300

WO 01/92218

31/58

PCT/US01/17795

Fig. 9D

ID	N1-mono-substituted polyamines: amides, protected amino acid head group mol weight	Structure	Transport-Cell Line	Ki	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1117	369.5161		MDA	0.232*	mda		>100
1118	488.679				pc-3	22.84	>300
1127	458.6526				mda	50.4	>100
1147	481.7281		MDA	0.098*	mda	>100	>100
1151	416.6665		MDA	> 1			
1153	430.5955		mda	0.156			
1155	401.5974		MDA	0.258			
1158	399.5815		MDA	0.183			
1162	433.6614		MDA	0.0913			
1170	621.7061		MDA	0.083	mda	>300	>300

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 9D (cont'd)

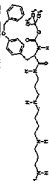

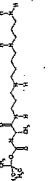
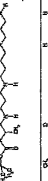
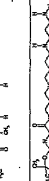
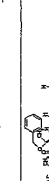

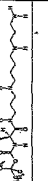


1172	565.7673		MDA	37.1	pc-3 mda	>300	>300
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	>300	20
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	14.0	>300
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	14.0	>300
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	14.0	>300
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	14.0	>300
1176	373.5432		MDA	0.0418	pc-3 mda	14.0	>300
1189	483.6666		MDA	0.465	pc-3 MDA	14.0	>300
1189	416.6245		MDA	0.265	pc-3 MDA	100	>300
1189	401.5974		MDA	0.271	pc-3 MDA	89.2	>300
					pc-3	91.9	>300
					pc-3	37.9	>300
					pc-3	70.9	>300

Fig. 9D (cont'd)

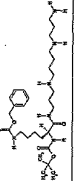
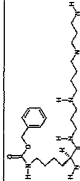

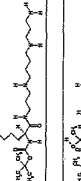
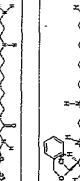
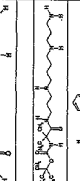

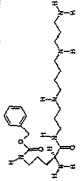
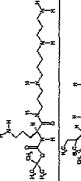
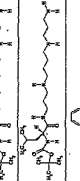
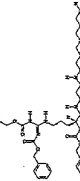
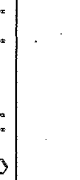
1199	564.775		MDA	0.060*	MDA	15.5	>300
1200	464.6567		MDA	0.039	PC-3 MDA	9.20 29.8	>300 >300
1201	430.6392		MDA	0.191	MDA PC-3 PC-3 MDA	41.3 7.87 6.51 36.9	>300 >300 >300 >300
1205	403.5697				PC-3 mda	16.9 100	430 >300
1206	393.5773		MDA	0.1084	PC-3 mda	>300 19	>300 >300
1219	387.5703				pc-3	67	>300
1221	550.7479						

Fig. 9D (cont'd)

1222	460.6236								
1223	416.6121								
1228	415.6245								
1231	415.6245								
1258	760.9417								

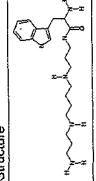
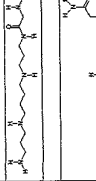
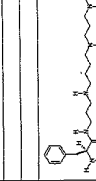
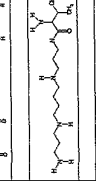


ID	N1-mono-substituted polyamines: mol weight	Structure	amides, natural	alpha-amino acid	head group	Transport-Cell Line	IC ₅₀	Half Effect Drug DFMO	Growth Inhibition-Cell Line	IC ₅₀
1095	388.5607		MDA		MDA	0.073		5.3	mda	>300
					MDA	0.011		8.44	mda	560
					MDA	0.07		14.05	pc-3	>1000
1125	259.3978		MDA		MDA	0.07		30.0	mda	>100
1131	316.4601		MDA		MDA	0.1036*		57.0	pc-3	>300
					MDA	0.0325				
								81.97	mda	>1000
								113	mda	>300
								57	pc-3	>300
1148	349.5237		MDA		MDA	0.214*			mda	>100
1154	330.4772		MDA		MDA	0.047		>300	mda	>300
1157	301.4791		MDA		MDA	0.160*		>300	pc-3	>300
					MDA	0.0392		5.58	mda	>300
					PC-3	0.149		14.35	pc-3	>300
					Dut145	0.109		26.42	MDA	>300
					MDA	0.0514		3.86	PC-3	>300
					Dut145	0.0467		5.28	pc-3	>300

Fig. 9E

Fig. 9E (cont'd)



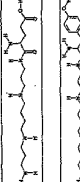
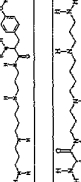
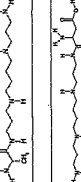

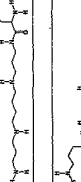
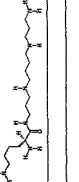

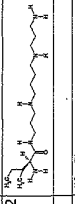
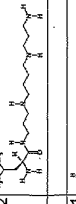
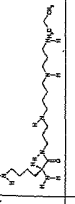
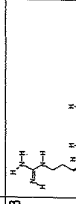
1169	299.4632		MDA	0.0255	mda	92.8	>300
			MDA	0.0499	pc-3	16.5	>100
			MDA	21.5 - 50	mda	>100	81
1164	333.5431		MDA	0.0335	mda	12.1	>100
			MDA	0.0765	pc-3	>300	>300
1171	331.462		MDA	0.0765	MDA	300	>300
			MDA	0.13	PC-3	185	>300
1173	365.5231		MDA	0.0768	MDA	94.6	>300
			MDA	0.0526*	PC-3	42.7	>300
1178	273.4249		MDA	0.0526*	mda	>300	>300
			MDA	0.167	pc-3	>300	>300
1186	317.4349		MDA	0.167	MDA	300	>300
			MDA	0.38	PC-3	213	>300
1187	289.4243		MDA	0.0463	MDA	25.5	>300
			MDA	0.0295	PC-3	20.8	>300
1202	330.5209		MDA	0.0295	MDA	4.75	>300
			PC3	0.748	PC-3	5.30	>300
			MDA	0.147	pc-3	1.7	
			MDA	0.032*			
			MDA	0.05			
			HT-29	0.185			

Fig. 9E (cont'd)

1207	303.4514		MDA	0.13	mda	6.5	>300
1228	315.5062		MDA	0.124	pc-3 mda	62 9.1	>300 >300
1230	315.5062		MDA	0.0323	pc-3 mda	4.0 >300	>300 >300
1237	374.6181		MDA	0.113	pc-3 mda	6.2 >300	>300 >300
1260	368.5343		MDA	0.099	pc-3 mda	>300 6.80	>300 >100
					pc3	3.04	>100

WO 01/92218

38/58

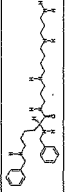
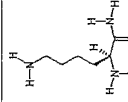
PCT/US01/17795

Fig. 9F

ID	Mol weight	Structure	N1-mono-substituted polyamines: amides, non-natural alpha-amino acid head group		Growth Inhibition > Cell Line	Half Effect Drug DFMO
			Transport > Cell Line	Ki > 1 uM		
1188	313.4466		MDA	> 1 uM	MDA	320
1194	315.5062		MDA	10.6	PC-3	214
			MDA	0.0727*	MDA	>300
1196	301.4791		MDA	0.0463	PC-3	7.51
					MDA	16.19
1220	287.462		MDA	0.16	PC-3	1.82
					MDA	9.03
1224	316.4936		MDA	0.0432	PC-3	8.01
					MDA	8.0
1227	355.5715		MDA	0.0515	PC-3	2.4
					MDA	3.0
1309	388.5607		MDA	0.241	MDA	4.37
					MDA	7.8
					pc-3	0.95

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 9C

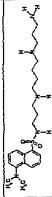
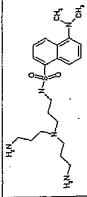
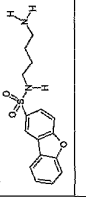
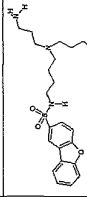
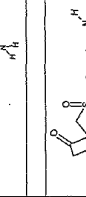
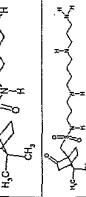
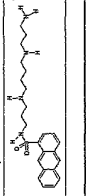
ID	N1-mono-substituted polyamines: amides, amino acid derivative head group mol weight	Structure	Transport>Cell Line	K _i	Growth Inhibition>Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1310	510.7726				pc-3 mda	15.0 4.2	244.8
1355	145.206				pc-3 mda	1.7	>10000

WO 01/92218

40/58

PCT/US01/17795

Fig. 9H

N1-monosubstituted polyamines: sulfonamides ID	mol weight Structure	Transport-Cell Line	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1001	435.6365 	MDA	MDA	20	600
1003	421.6094 	A172 MDA	A172 MDA	100uM	>300
1005	318.3975 	A172	A172		28 uM
1006	446.6164 	mda	MDA A172		40 uM 20
1007	302.4389 	A172	MDA mda		50 >300
1008	416.6308 	MDA	MDA		>300
1010	442.6282 	MDA	MDA	1.7	20
		A172	MDA	1.05	18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

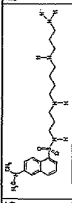

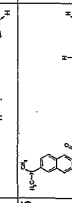
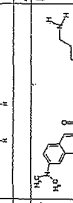
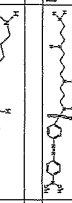

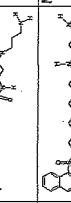
1011	435.6365		MDA	0.066*	MDA	6.0	60
1012	421.6094		MDA	>10	MDA	<3.0	50
1013	435.6365		MDA	3.5	MDA	13.4	50
1014	421.6094		A172	1.34	MDA		100
1015	489.6881		MDA	2.9	MDA		15
			A172	1.6	pc-3		>30
					caco-2		18.2
					cen		>30
1016	475.661		MDA	>10	MDA		13
1017	392.5676		MDA	.187	MDA	14.2	50
			A172	.24			

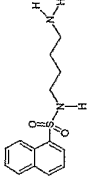
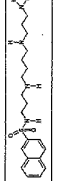
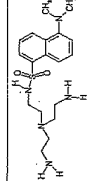
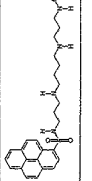
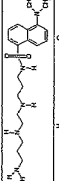
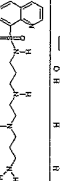

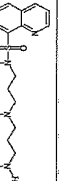

Fig. 9H (cont'd)

WO 01/92218

42/58

PCT/US01/17795

Fig. 9H (cont'd)

1018	278.3758		mda	>30	MDA		120
1019	392.5676		MDA	0.2*	MDA	7.5	50
1020	379.5281		A172 MDA	0.37 >30	MDA MDA	4.4	50 110
1023	466.6505		MDA	.091	MDA		22
1024	407.6823		A172 MDA	.075 5.4	MDA		50
1025	365.501		MDA	4.3	MDA		>300
1026	364.5135		MDA	2.7	MDA		50
1027	322.4322		MDA	>10	MDA		>300
1028	421.6094		MDA	11.4	MDA		50


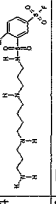

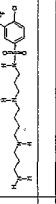
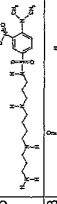
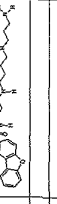

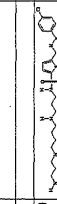
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

43/58

PCT/US01/17795

Fig. 9H (cont'd)

1029	379.6281		MDA	3.4	MDA		>300
1030	459.0064		MDA	0.08	MDA	125	>260
1031	393.5552		MDA	0.43	MDA	<10	>300
1034	444.8605		MDA	0.24	MDA	<3	50
1036	430.5735		MDA	0.84	mda MDA	8.7	50 >300
1041	432.5683		MDA	0.066	MDA	.95	12
					pc-3		6.2
					ceco-2		16.1
					cem		0.79
					mda	12.6	53.0
					pc-3		12.4
					mda		46.1
					pc-3		6.5
1044	516.129		MDA	0.166*	MDA	3	180
			MDA	0.0682	mda	<3.0	190
			MDA	0.130			
			MDA	0.13			
1045	425.6192		MDA	0.228	MDA	13	180
			MDA	0.164	mda	7.3	140
			MDA	0.32			


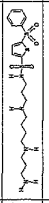
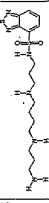

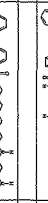
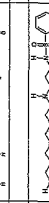


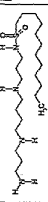
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

44/58

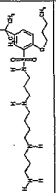
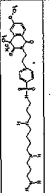

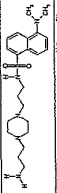
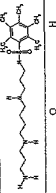
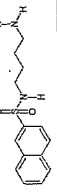
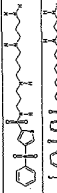

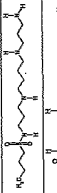


PCT/US01/17795

Fig. 9H (cont'd)

1048	472.6979		MDA	0.44	mda	6.92	58
			MDA	0.0677	pc-3		34.8
			MDA		caco-2		>50
1047	488.6944		MDA	0.375	cem	7.3	8.9
			MDA		mda		170
1048	400.5686		MDA	0.177	mda	26.7	>500
			MDA	0.421	mda		
1049	423.0024		MDA	> 3	mda		>300
1050	494.0602		MDA	0.108	MDA	2.26	140
			MDA	0.0537	mda	6.5	>300
1051	481.694		MDA	0.28	mda		
			MDA	0.076	mda	30	>300
1052	342.5071		MDA	0.16*	mda		
1054	445.8422		MDA	0.025	MDA	<3.0	50
			MDA	0.0629	mda	7.69	20
			MDA		pc-3		19.8
			MDA		caco-2		27.1
			MDA		cem		2.6
1057	434.7334		MDA	0.17	mda		100

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 9H (cont'd)

1058	484.7503		MDA	0.17*	mda	6
					pc-3	5.9
					caco-2	14.8
					cem	0.71
1070	587.7877		MDA	> 10		
					mda	13
					pc-3	>30
					caco-2	>30
					cem	>30
1074	437.506		MDA	> 30	MDA	
1075	433.6206		MDA	> 100		
1082	412.6426		MDA	> 3	mda	140
1088	278.3768		mda	5.4*		
1103	488.6544		MDA	0.067	mda	58
1105	567.6804		MDA	0.083	mda	44
1106	366.5342		MDA	0.094	mda	160
1108	322.5167		MDA	0.19	mda	150
1130	294.4625		MDA	0.22	mda	>300

WO 01/92218

48/58

PCT/US01/17795

Fig. 9J

N1-mono-substituted polyamines: Other ID	Final weight Structure	Transport-Cell Line	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug DFMO	IC50
1021 (urea)		MDA	MDA	8.2	35
1042 (urea)		A172	MDA	14.8	100
1071		MDA	MDA		
1109 (urea)		MDA	MDA	30	>100
1295 (thiourea)		MDA	MDA	95	>100

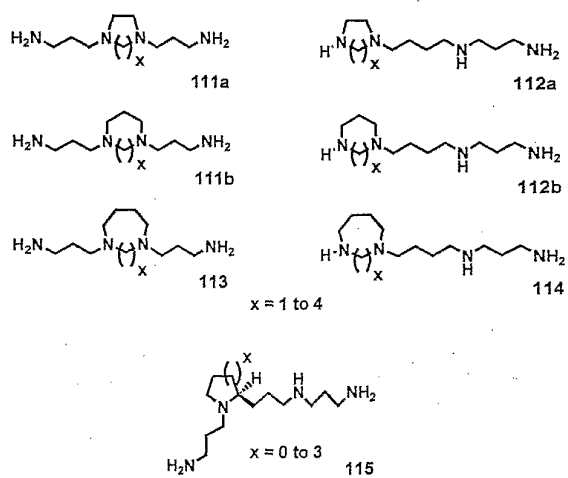
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/92218

49/58

PCT/US01/17795

Fig. 10

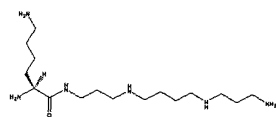


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

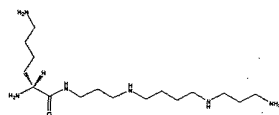
WO 01/92218

50/58

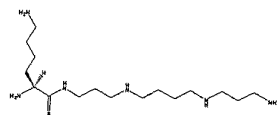
PCT/US01/17795



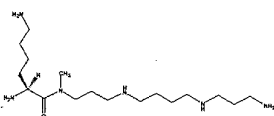
Compound 1202
L-Lys-Spm



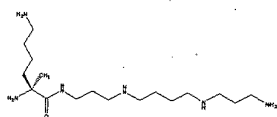
Compound 1390
D-Lys-Spm



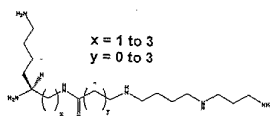
Compound 1380
L-Lys-Spm Thioamide



Compound 1391
L-Lys-Spm (methanamide)



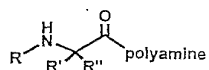
Compound 1392
L-Lys-Spm (α -methyl)



x = 1 to 3
y = 0 to 3

Compound 1393 - 1405
L-Lys-Spm (isoamide)

Fig. 11



stereochemistry:
L is S, D is R

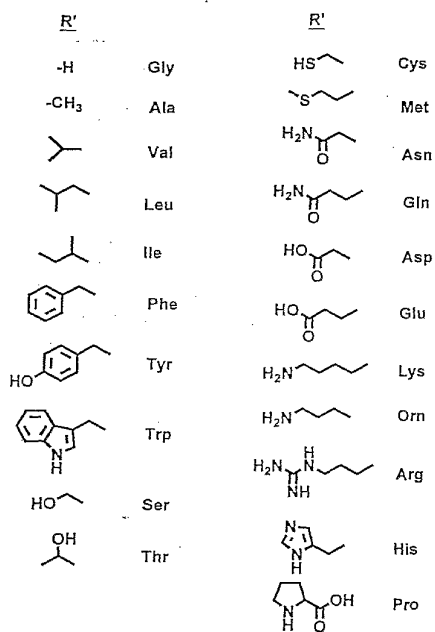


Fig. 12

WO 01/92218

52/58

PCT/US01/17795

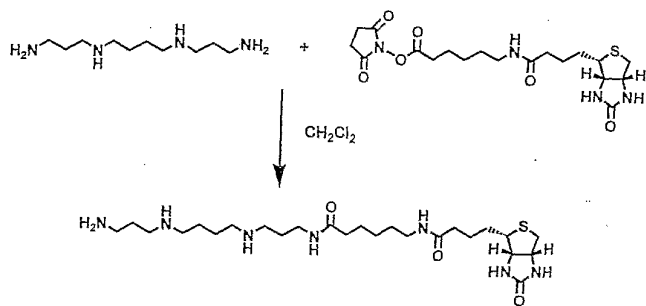


Fig. 13

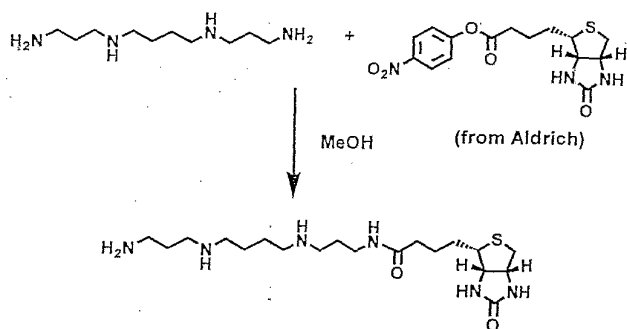
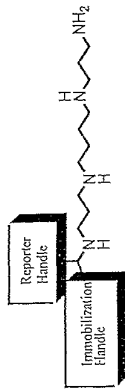
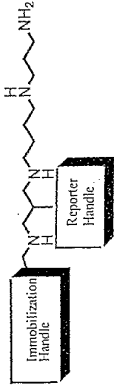


Fig. 14

A. Reporter and Immobilization handles are both N¹-terminal



B. Reporter Handle is internal and Immobilization handle is N-terminal.



C. Immobilization and Reporter handles are both N¹ and N¹² terminal, respectively

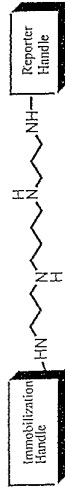


Fig. 15

Bispyramine derivatives: deprotected

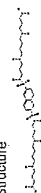


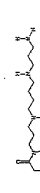
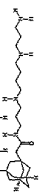


ID	mol weight	Structure	Transport-Cell Line	Ki	Growth Inhibition-Cell Line	Half Effect Drug	DFMO	IC50
1092	656.96		MDA	0.079	mda	279		>300
1236	486.7504		MDA	0.0288	mda	6.0		>300
1261	620.9735		MDA	0.0152	pc-3	1.8		>300
1275	528.8317		MDA	0.402				
1275	528.8317		MDA	0.219				
1286	514.8046		MDA	0.0595				
1287	570.9129		MDA	0.0686				

Fig. 16

WO 01/92218

55/58

PCT/US01/17795

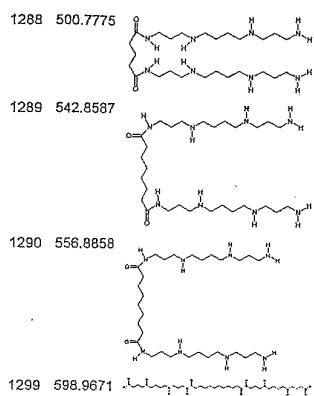


Fig. 16 (cont'd)

Bispolyamine derivatives: protected

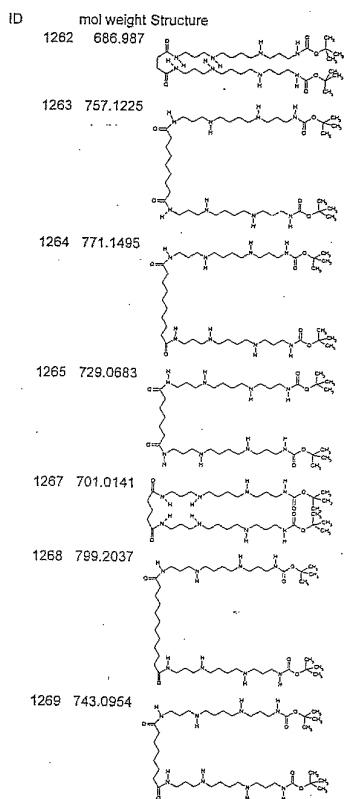


Fig. 17

1285 715.0412

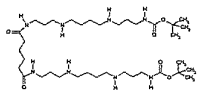


Fig. 17 (cont'd)

WO 01/92218

58/58

PCT/US01/17795

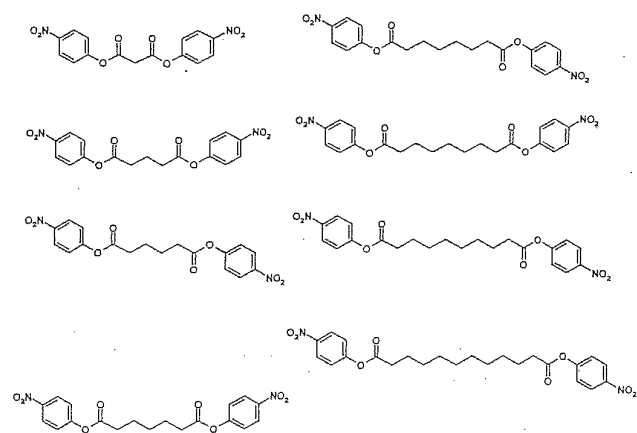


Fig. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/092218 A3

- (51) International Patent Classification: C07C 311/18, 233/36, 233/37, 271/10, 311/41, 311/11, C07D 307/77, 333/34, 409/04, A61K 31/165, 31/18, 31/33
- (74) Agents: LAU, Kawai et al.; Morrison & Foerster LLP, Suite 500, 3811 Valley Centre Drive, San Diego, CA 92130-2352 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/17795
- (22) International Filing Date: 31 May 2001 (31.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/584,175 31 May 2000 (31.05.2000) US
- (71) Applicant: ORIDIGM CORPORATION [US/US]; Suite 200, 4010 Stone Way North, Seattle, WA 98103 (US).
- (72) Inventors: VERMEULIN, Nicolaas, M., J.; 19334 - 196th Avenue NE, Woodinville, WA 98072 (US); O'DAY, Christine, L.; 4404-B 216th Street S.W., Mountlake Terrace, WA 98043 (US); WEBB, Heather, K.; 5705 Seaview Avenue, NW, Seattle, WA 98107 (US); BURNS, Mark, R.; 226 Northwest 184th Street, Shoreline, WA 98177 (US); BERGSTROM, Donald, E.; 3416 Hamilton Street, West Lafayette, IN 47906 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 27 March 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/092218 A3

(54) Title: POLYAMINE ANALOGUES AS THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC AGENTS

(57) Abstract: Novel "bispolyamine" inhibitor compounds of polyamine transport are disclosed. These compounds are useful pharmaceutical agents for treating diseases where it is desired to inhibit polyamine transport or other polyamine binding proteins, for example cancer and post-angioplasty injury. These compounds display desirable activities both for diagnostic and research assays and therapy.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17795
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07C31/18 C07C233/36 C07C233/37 C07C271/10 C07C311/41 C07C311/11 C07D307/77 C07D333/34 C07D409/04 A61K31/165 A61K31/18 A61K31/33 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07C C07D A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 03823 A (ORIDIGM CORP) 28 January 1999 (1999-01-28) page 20, line 29 - page 21, line 11; page 43, line 25 - page 46, line 27; page 58, line 21 - page 62, line 14; example VIII; figure 2, compound 42 & PCT/US98/14896 cited in the application ---	1,10, 16-30
X	WO 99 54283 A (UNIVERSITE LAVAL ET AL) 28 October 1999 (1999-10-28) page 7, line 14 - page 8, line 2; claims 1-12, 15-18, 21-43 ---	1,19,20, 23,26,27
X	G. J. ATWELL ET AL: J. MED. CHEM., vol. 29, no. 1, 1986, pages 69-74, XP000891842 the whole document --- -/--	1-3,6, 23-25
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. ** document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 December 2002		03/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 6018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2240, Tx. 91 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Van Amsterdam, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17795
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	G. SOSNOVSKY ET AL: Z. NATURFORSCH., B: CHEM. SCI., vol. 49, no. 11, 1994, pages 1580-1585, XP001040443 pages 1580-1581, introduction; page 1581, scheme 2, compounds 10-11, 13-14; page 1582, scheme 4, compounds 20-21	1-3,23
X	C. O. XIA ET AL: J. DRUG TARGETING, vol. 6, no. 1, 1998, pages 65-77, XP001040438 page 71, compounds 31, 39, 41, 34, 38, 40, 44; page 73, compounds 60, 61	1,2,23
X	M. K.-H. DOLL ET AL: HELV. CHIM. ACTA, vol. 79, no. 2, 1996, pages 541-547, XP001040442 page 543, scheme 2, compounds 8-12	1-3
P,X	EP 1 085 011 A (ORIDIGM CORP) 21 March 2001 (2001-03-21) page 10, lines 6-26; page 16, lines 47-49; page 23, line 54 - page 25, line 15; example VII; figure 2/5, compound 42; figures 44b-c	1-4,6, 10,19-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/17795**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23-30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim 1 relates to bispolyamine compounds defined by reference to a desirable property, namely the ability of these compounds to bind to a polyamine-binding site of a molecule and/or to inhibit polyamine transport. The claim cover all bispolyamine compounds having this property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a limited number of such bispolyamine compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the bispolyamine compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been guided those parts of the application which do appear to be sufficiently clear. The search has mainly related to bispolyamine compounds consisting of two, optionally N-monosubstituted, polyamine moieties selected from putrescine, spermidine and spermine (cf. claim 2), linked together via a linking group derived from a dicarboxylic or disulfonic acid (cf. figures 16-17).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/17795

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9903823	A	28-01-1999	AU 8496898 A	10-02-1999
			EP 1001927 A2	24-05-2000
			JP 2001510181 T	31-07-2001
			WO 9903823 A2	28-01-1999
			US 6172261 B1	09-01-2001
WO 9954283	A	28-10-1999	WO 9954283 A1	28-10-1999
			AU 7131698 A	08-11-1999
			CA 2304557 A1	28-10-1999
			EP 1003715 A1	31-05-2000
EP 1085011	A	21-03-2001	AU 5942100 A	22-03-2001
			EP 1085011 A1	21-03-2001
			JP 2001172244 A	26-06-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/18	A 6 1 K 31/18	4 C 0 5 6
A 6 1 K 31/185	A 6 1 K 31/185	4 C 0 6 3
A 6 1 K 31/197	A 6 1 K 31/197	4 C 0 6 9
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/27	A 6 1 K 31/27	4 C 2 0 4
A 6 1 K 31/277	A 6 1 K 31/277	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/341	A 6 1 K 31/341	4 H 0 0 6
A 6 1 K 31/381	A 6 1 K 31/381	
A 6 1 K 31/401	A 6 1 K 31/401	
A 6 1 K 31/405	A 6 1 K 31/405	
A 6 1 K 31/415	A 6 1 K 31/415	
A 6 1 K 31/42	A 6 1 K 31/42	
A 6 1 K 31/427	A 6 1 K 31/427	
A 6 1 K 31/433	A 6 1 K 31/433	
A 6 1 K 31/44	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 K 31/4436	A 6 1 K 31/4436	
A 6 1 K 31/47	A 6 1 K 31/47	
A 6 1 K 31/473	A 6 1 K 31/473	
A 6 1 K 31/506	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 P 1/12	A 6 1 P 1/12	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 C 233/40	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 C 233/63	C 0 7 C 233/40	
C 0 7 C 233/78	C 0 7 C 233/63	
C 0 7 C 235/50	C 0 7 C 233/78	
C 0 7 C 237/10	C 0 7 C 235/50	
C 0 7 C 271/22	C 0 7 C 237/10	
C 0 7 C 275/40	C 0 7 C 271/22	
C 0 7 C 311/05	C 0 7 C 275/40	
C 0 7 C 311/14	C 0 7 C 311/05	
C 0 7 C 311/18	C 0 7 C 311/14	
C 0 7 C 311/29	C 0 7 C 311/18	
C 0 7 C 311/44	C 0 7 C 311/29	

C 0 7 C 323/60	C 0 7 C 311/44	
C 0 7 D 207/16	C 0 7 C 323/60	
C 0 7 D 209/20	C 0 7 D 207/16	
C 0 7 D 213/82	C 0 7 D 209/20	
C 0 7 D 215/36	C 0 7 D 213/82	
C 0 7 D 215/52	C 0 7 D 215/36	
C 0 7 D 219/04	C 0 7 D 215/52	
C 0 7 D 233/90	C 0 7 D 219/04	
C 0 7 D 261/18	C 0 7 D 233/90	A
C 0 7 D 285/14	C 0 7 D 261/18	
C 0 7 D 307/68	C 0 7 D 285/14	
C 0 7 D 333/24	C 0 7 D 307/68	
C 0 7 D 333/34	C 0 7 D 333/24	
C 0 7 D 333/38	C 0 7 D 333/34	
C 0 7 D 409/04	C 0 7 D 333/38	
C 0 7 D 409/12	C 0 7 D 409/04	
C 0 7 D 417/04	C 0 7 D 409/12	
	C 0 7 D 417/04	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 クリスティーヌ・エル・オデイ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98043, マウントレイク テラス, 216 ストリート エ
 スダブリュー 4404 - ビー

(72)発明者 ヘザー・ケイ・ウェブ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98107, シアトル, エヌダブリュー, シーヴュー アヴェニ
 ュー 5705

(72)発明者 マーク・アール・バーンズ
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98177, ショアライン, ノースウェスト 184 ストリ
 ート 226

(72)発明者 ドナルド・イー・バーグストローム
 アメリカ合衆国 インディアナ州 47906, ウェスト ラファイエット, ハミルトン ストリ
 ート 3416

Fターム(参考) 4C023 HA03

4C031 HA07

4C036 AD04 AD14 AD27 AD30

4C037 MA02

4C055 AA01 BA02 BA47 BB04 CA02 CA58 CB10 DA01

4C056 AA01 AB01 AC01 AD01 AE03 AF04 FA04 FB17 FC01

4C063 AA01 BB01 BB08 CC82 CC92 DD12 DD29 DD62 EE01

4C069 AA16 AA17 BD06

4C086 AA01 AA02 AA03 BA03 BA05 BB02 BC07 BC14 BC17 BC27

BC28 BC29 BC36 BC38 BC42 BC67 BC82 BC85 GA02 GA04

GA07 GA08 GA10 MA01 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28

MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14

ZA06 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA36 ZA40 ZA42 ZA73 ZA89

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004509845A5	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2002500833	申请日	2001-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	麦迪凯斯特治疗学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	媒体探秘治疗油墨		
[标]发明人	ニコラスエムジェイヴァーミュリン クリスティーヌエルオデイ ヘザーケイウェブ マークアールバーンズ ドナルドイーバークストローム		
发明人	ニコラス・エム・ジェイ・ヴァーミュリン クリスティーヌ・エル・オデイ ヘザー・ケイ・ウェブ マーク・アール・バーンズ ドナルド・イーバークストローム		
IPC分类号	C07D233/90 A61K31/16 A61K31/165 A61K31/166 A61K31/17 A61K31/18 A61K31/185 A61K31/197 A61K31/198 A61K31/27 A61K31/277 A61K31/341 A61K31/381 A61K31/401 A61K31/405 A61K31/415 A61K31/42 A61K31/427 A61K31/433 A61K31/44 A61K31/4436 A61K31/47 A61K31/473 A61K31/506 A61K47/48 A61P1/12 A61P9/10 A61P9/12 A61P17/06 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07C211 /13 C07C211/52 C07C211/54 C07C233/36 C07C233/39 C07C233/40 C07C233/62 C07C233/63 C07C233/78 C07C235/20 C07C235/34 C07C235/50 C07C235/74 C07C237/10 C07C237/20 C07C237 /22 C07C237/42 C07C239/16 C07C271/20 C07C271/22 C07C275/28 C07C275/40 C07C279/14 C07C311/05 C07C311/06 C07C311/10 C07C311/14 C07C311/18 C07C311/19 C07C311/24 C07C311 /29 C07C311/41 C07C311/42 C07C311/44 C07C323/60 C07C327/42 C07D207/16 C07D209/20 C07D209/22 C07D213/81 C07D213/82 C07D215/36 C07D215/52 C07D219/04 C07D231/14 C07D233 /84 C07D261/18 C07D285/14 C07D285/22 C07D307/68 C07D307/91 C07D333/24 C07D333/34 C07D333/38 C07D401/04 C07D409/04 C07D409/12 C07D417/04 C07F9/645 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/50 A61P1/12 A61P9/10 A61P9/12 A61P17/06 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07C211 /13 C07C211/52 C07C211/54 C07C233/36 C07C233/39 C07C233/40 C07C233/62 C07C233/78 C07C235/20 C07C235/34 C07C235/50 C07C235/74 C07C237/10 C07C237/20 C07C237/22 C07C237 /42 C07C239/16 C07C271/20 C07C271/22 C07C275/28 C07C275/40 C07C279/14 C07C311/05 C07C311/06 C07C311/10 C07C311/18 C07C311/19 C07C311/24 C07C311/29 C07C311/41 C07C311 /42 C07C323/60 C07C327/42 C07C2601/02 C07C2601/14 C07C2601/16 C07C2602/42 C07C2603/24 C07C2603/26 C07C2603/40 C07C2603/42 C07C2603/50 C07C2603/74 C07D207/16 C07D209/20 C07D209/22 C07D213/81 C07D213/82 C07D215/36 C07D215/52 C07D219/04 C07D231/14 C07D233 /84 C07D261/18 C07D285/14 C07D285/22 C07D307/68 C07D307/91 C07D333/24 C07D333/34 C07D333/38 C07D401/04 C07D409/04 C07D409/12 C07D417/04 C07F9/645 G01N33/5308		
FI分类号	C07C233/36 A61K31/16 A61K31/165 A61K31/166 A61K31/17 A61K31/18 A61K31/185 A61K31/197 A61K31/198 A61K31/27 A61K31/277 A61K31/341 A61K31/381 A61K31/401 A61K31/405 A61K31/415 A61K31/42 A61K31/427 A61K31/433 A61K31/44 A61K31/4436 A61K31/47 A61K31/473 A61K31/506 A61P1/12 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P9/12 A61P17/06 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/08 A61P25 /18 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111 C07C233/40 C07C233/63 C07C233/78 C07C235/50 C07C237/10 C07C271/22 C07C275/40 C07C311		

/05 C07C311/14 C07C311/18 C07C311/29 C07C311/44 C07C323/60 C07D207/16 C07D209/20
C07D213/82 C07D215/36 C07D215/52 C07D219/04 C07D233/90.A C07D261/18 C07D285/14
C07D307/68 C07D333/24 C07D333/34 C07D333/38 C07D409/04 C07D409/12 C07D417/04

F-TERM分类号 4C023/HA03 4C031/HA07 4C036/AD04 4C036/AD14 4C036/AD27 4C036/AD30 4C037/MA02 4C055
/AA01 4C055/BA02 4C055/BA47 4C055/BB04 4C055/CA02 4C055/CA58 4C055/CB10 4C055/DA01
4C056/AA01 4C056/AB01 4C056/AC01 4C056/AD01 4C056/AE03 4C056/AF04 4C056/FA04 4C056
/FB17 4C056/FC01 4C063/AA01 4C063/BB01 4C063/BB08 4C063/CC82 4C063/CC92 4C063/DD12
4C063/DD29 4C063/DD62 4C063/EE01 4C069/AA16 4C069/AA17 4C069/BD06 4C086/AA01 4C086
/AA02 4C086/AA03 4C086/BA03 4C086/BA05 4C086/BB02 4C086/BC07 4C086/BC14 4C086/BC17
4C086/BC27 4C086/BC28 4C086/BC29 4C086/BC36 4C086/BC38 4C086/BC42 4C086/BC67 4C086
/BC82 4C086/BC85 4C086/GA02 4C086/GA04 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/GA10 4C086/MA01
4C086/MA04 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA31 4C086
/MA35 4C086/MA37 4C086/MA43 4C086/MA52 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA66
4C086/NA14 4C086/ZA06 4C086/ZA12 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086
/ZA40 4C086/ZA42 4C086/ZA73 4C086/ZA89 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB13 4C086/ZB26
4C086/ZB32 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZC41 4C204/BB01 4C204/CB03 4C204
/DB26 4C204/EB02 4C204/FB01 4C204/GB01 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/AA03 4C206/GA02
4C206/GA06 4C206/GA07 4C206/GA08 4C206/GA09 4C206/GA13 4C206/GA19 4C206/HA14 4C206
/HA22 4C206/HA30 4C206/JA13 4C206/JA14 4C206/JA24 4C206/KA01 4C206/KA03 4C206/KA04
4C206/KA05 4C206/KA08 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/MA13 4C206/MA14 4C206/MA33 4C206
/MA37 4C206/MA42 4C206/MA43 4C206/MA48 4C206/MA51 4C206/MA55 4C206/MA57 4C206/MA63
4C206/MA72 4C206/MA79 4C206/MA80 4C206/MA83 4C206/MA86 4C206/NA14 4C206/ZA06 4C206
/ZA12 4C206/ZA15 4C206/ZA16 4C206/ZA18 4C206/ZA36 4C206/ZA40 4C206/ZA42 4C206/ZA73
4C206/ZA89 4C206/ZA97 4C206/ZB07 4C206/ZB13 4C206/ZB26 4C206/ZB32 4C206/ZB33 4C206
/ZB35 4C206/ZB37 4C206/ZC41 4H006/AA01 4H006/AB28 4H006/BJ50 4H006/BM30 4H006/BM72
4H006/BP30 4H006/BU32 4H006/BV22 4H006/BV62 4H006/BV72 4H006/RA06 4H006/TA04

优先权 09/584175 2000-05-31 US

其他公开文献 JP2004509845A

摘要(译)

公开了多胺转运的新型“双多胺”抑制剂化合物。这些化合物是有用的药剂，用于治疗希望抑制多胺转运或其它多胺结合蛋白的疾病，例如癌症和血管成形术后的损伤。这些化合物对于诊断和研究测定和治疗都显示出所需的活性。