

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4463550号
(P4463550)

(45) 発行日 平成22年5月19日 (2010.5.19)

(24) 登録日 平成22年2月26日 (2010.2.26)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 C 59/54 (2006.01)

C O 7 C 59/54

A 6 1 K 31/085 (2006.01)

A 6 1 K 31/085

A 6 1 K 31/192 (2006.01)

A 6 1 K 31/192

A 6 1 K 31/216 (2006.01)

A 6 1 K 31/216

A 6 1 K 31/36 (2006.01)

A 6 1 K 31/36

請求項の数 21 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-517002 (P2003-517002)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月18日 (2002.7.18)
 (65) 公表番号 特表2004-536879 (P2004-536879A)
 (43) 公表日 平成16年12月9日 (2004.12.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2002/000474
 (87) 国際公開番号 WO2003/011808
 (87) 国際公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)
 審査請求日 平成17年7月5日 (2005.7.5)
 (31) 優先権主張番号 RM2001A000464
 (32) 優先日 平成13年7月31日 (2001.7.31)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

前置審査

(73) 特許権者 591043248
 シグマータウ・インドゥストリエ・ファル
 マチュウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
 ・アチオニ
 SIGMA-TAU INDUSTRIE
 FARMACEUTICHE RIUN
 ITE SOCIETA PER AZI
 ONI
 イタリア00144ローマ、ピアレ・シャ
 ケスペアレ47番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

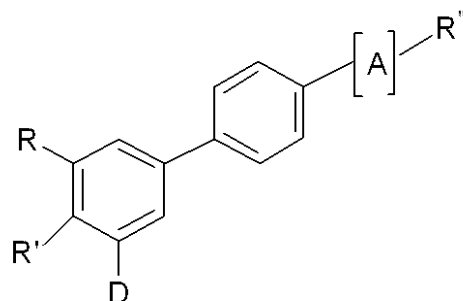
(54) 【発明の名称】 抗血管新生、抗腫瘍性およびアポトーシス促進性の活性を有するレチノイド誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 (I) の化合物：

【化1】



(I)

[式中：R は、アダマンチルを表す；R' は、OR'''、OCOR'''、またはCOR^{I V}を表す；R' - D は、O - (CH₂)_n - Oを表す；ここで n = 1 - 3 である；D は、H、OH、O - アルキル、(CH₂)_n - NH₂、(CH₂)_n - NH - アルキル、または (CH₂)_n - OHを表し、n = 1 - 4 である；

R'' は、 COOH 、または COO - アルキルを表す；

R''' は、 H 、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、 SO_3H 、または D - または L - グリコシルを表す；

R^{IV} は、 H 、 OH 、または OR''' を表す；

$[A]$ は、エポキシ、シクロプロピル、ジハロゲン化シクロプロピル、 R''' により置換されたシクロプロピル、 $[C(R^V, R^{VI}) - C(R^{VII}, R^{VIII})]_n$ 、 $[C(R^X)]_n$ 、または $[C - C]_n$ を表し、 $n = 1$ である；

R^V 、 R^{VI} 、 R^{VII} 、 R^{VIII} は、独立に、 H 、またはアルキルを表す；

R^X は、 H 、 OH 、ハロゲン、アルキル、アリール、 CN 、 NO_2 、または COOR''' を表す]。

10

【請求項 2】

活性成分として請求項 1 の式 (I) の化合物および少なくとも 1 つの医薬上許容される賦形剤および / または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 3】

血管新生の変化に関連する疾患の治療のための請求項 1 の式 (I) の化合物を含む医薬組成物。

【請求項 4】

疾患が、関節炎疾患、腫瘍、転移、糖尿病性網膜症、乾癬、慢性炎症、およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

疾患が糖尿病性網膜症である、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 6】

疾患が乾癬である、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

疾患が慢性炎症性疾患である、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

疾患がアテローム性動脈硬化症である、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

関節炎疾患の治療のための、請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 の式 (I) の化合物を含む抗腫瘍活性を有する医薬組成物。

30

【請求項 11】

抗腫瘍活性が細胞障害性である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

抗腫瘍活性がアポトーシス誘導性である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

抗腫瘍活性が抗血管新生性である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

腫瘍転移の予防および治療のための請求項 1 の式 (I) の化合物を含む医薬組成物。

【請求項 15】

腫瘍が、肉腫、癌腫、癌様体、骨腫瘍、神経内分泌腫瘍、リンパ白血病、骨髄球性白血病、単核球性白血病、巨核球白血病およびホジキン病からなる群から選択される、請求項 10 から 14 のいずれかに記載の医薬組成物。

40

【請求項 16】

腫瘍が急性前骨髄球性白血病である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

請求項 1 の式 (I) の化合物と 1 または複数の既知の抗癌薬を組合せて含む組成物。

【請求項 18】

抗癌薬が、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、代謝拮抗剤、ピンカアルカロイドを含む天然物、エピポドフィロトキシン、抗生物質、酵素、タキサン、細胞分化化合物、

50

イレッサまたはグリベックを含むホスホチロシンキナーゼ阻害剤、T R A I L（腫瘍壊死因子 - 関連アポトーシス - 誘導性リガンド）、D R 4 または D R 5 受容体（T R A I L の部位）のアゴニスト、免疫抗腫瘍療法用化合物、抗腫瘍ワクチン、およびインターフェロン、 からなる群から選択される、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の組成物および 1 または複数の医薬上許容される賦形剤または媒体を含む医薬組成物。

【請求項 20】

腫瘍治療のための、1 または複数の既知の抗癌薬と組合された 1 または複数の請求項 1 の式（I）の化合物を含む医薬組成物。

10

【請求項 21】

腫瘍治療のための、1 または複数の既知の抗癌薬と組合された 1 または複数の請求項 1 の式（I）の化合物を含む医薬組成物であって、請求項 1 の式（I）の化合物が抗癌薬の補助剤として存在することを特徴とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

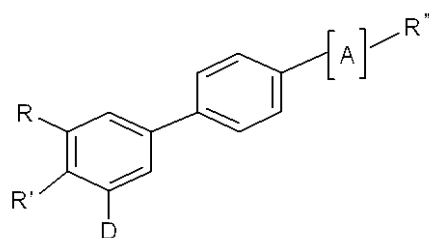
【0001】

本発明は、抗腫瘍性、抗血管新生、アポトーシス促進性、抗炎症性の活性を有する下記一般式（I）で表されるレチノイド誘導体に関する。

【0002】

20

【化 1】



(I)

30

〔式中、R は、アルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、フェニル、置換されたフェニル、アダマンチル（ここで少なくとも 1 つの C H は、C - ハロゲンまたは C - アルキルで置換されていてもよく、C H₂ のうち 1 つは、O、S、C H - ハロゲン、C H - アリール、C H - ヘテロアリール、C H - アリールアルキル、C H - ヘテロアリールアルキル、C H - アミノによって置換されていてもよい）を表す；

R' は、O R^{IV}、O C O R^{IV}、C O R^{IV}を表す；

R' - D は、O - (C H₂)_n - O；（ここで n = 1 - 3）を表す；

D は、H、O H、O - アルキル、(C H₂)_n - N H₂、(C H₂)_n - N H - アルキル、(C H₂)_n - O H（ここで n = 1 - 4）を表す；

R^{IV} は、テトラゾール、S O₃ H、N H S O₃ H、C H O、C O O H、C O O - アルキル、C O N H O H、C O N H - アリール、C O N H - C₆ H₄ O H、C H₂ O R^{IV}；P O₃ H₂；C O - (C H₂)_n - アリール（ここで n = 0 - 4）を表す；

40

R^{IV} は、H、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、S O₃ H、または D - および L - グリコシルを表す；

R^{IV} は、H、O H、O R^{IV}を表す；

[A] は、[C (R^V, R^{V I}) - C (R^{V I I}, R^{V I I I})]_n、[C (R^{I X}) = C (R^X)]_n、[C - C]_n（ここで n = 0 - 3）を表す；

R^V、R^{V I}、R^{V I I}、R^{V I I I} は、H、アルキル、ハロゲン、O H、O R^{IV}、N O₂、N H₂、アリール、- O -、- C H₂ -、C X₂ -（ここで X はハロゲン）、- C H (R^{IV}) - を表す；

50

$R^I X$ 、 R^X は、H、OH、ハロゲン、アルキル、アリール、CN、NO₂、COOR
' ' 'を表す]。

【背景技術】

【0003】

ビタミンAおよびその生物学的に活性な誘導体であるレチナールおよびレチノイン酸は、視覚において重要な役割を果たし、生殖システムに必須であり、胚の成長において形態形成剤として作用し、生物体の成長を基礎とし、広範な細胞タイプの成長および分化を調節する [M.Sporn、A.Roberts、D.Goodman、The Retinoids、Raven Press、New York 1994]。レチノイン酸およびその誘導体の生物学的作用は、2つのファミリーに属する核内受容体との相互作用によって媒介される：その一方はRAR（レチノイン酸受容体）とよばれ、他方はRXR（レチノイドX受容体）とよばれる [P.Chambon、FASEB J.、1996、10、940-54]。それぞれのファミリーは3種類の遺伝子によってコードされる3つのサブタイプ（ α 、 β 、 γ ）に分類される。

10

【0004】

全-トランス-レチノイン酸（ATRA）は、RARおよびRXRに結合するが、9-シスRAはRXRにのみ結合する。

【0005】

天然のものであれ、合成ビタミンAアナログであれ、レチノイドは、細胞増殖、分化およびアポトーシスに大きな影響を与える：これらの特性は、腫瘍疾患、皮膚疾患、および血管新生の変化に関連する疾患の制御において十分に利用されている。

20

【0006】

成人における血管新生は通常は静止状態であるが、例えば創傷の治癒または女性の生殖周期における子宮内膜の再構築においては、正常な機能を果たす。

【0007】

血管新生応答は、血管機能が低減し、組織灌流が不十分な場合に生理的に刺激される。

【0008】

より一般的には、生理条件においては、血管新生は不十分な灌流、または酸素および栄養素の不十分な供給に対する応答において正のフィードバックを構成するといえる。例えばこれは動脈の閉塞、組織集団の成長（例えば筋組織の形成に伴う新血管新生）、および仕事の負荷が増加し、酸素および栄養素の要求が大きくなったような状況において起こる。

30

【0009】

動脈の部分的または完全な閉塞による局所虚血の過程において、灌流を維持するためには側副血管の発達が必要となる。

【0010】

原発性腫瘍の成長は腫瘍組織の良好な血管新生によって促進されることがよく知られている。酸素および栄養素の十分な供給により腫瘍自体の迅速な成長が促進される。

【0011】

血管新生の程度が腫瘍の予後における高度に負の因子であることが証明されている (van Hinsbergh VW、Collen A、Koolwijk P; Ann. Oncol.、10 Suppl.、4:60-3、1999; Buolamwini JK; Curr. Opin. Chem. Biol.、3(4):500-9、1999 Aug.)。

40

【0012】

腫瘍細胞の生物学における基本段階は転移能力の獲得であることも知られている。

【0013】

転移する腫瘍細胞は周囲の構造に対する接着を失い、血管およびリンパ管に侵入し、離れた場所にあるその他の組織にコロニーを形成することができ、そこで腫瘍細胞は自己複製を続けることができる。

【0014】

転移は、癌による死の主要な原因であることから疾患の臨床歴における重要な事象でもある。それは腫瘍部位または隣接領域における脈管組織の存在に密接に関連し、それによ

50

って促進される。

【 0 0 1 5 】

周囲の構造を横切る腫瘍細胞の遊走により、腫瘍細胞が腫瘍内の血管に到達する。この血管は既存のものでも新血管新生によって形成されたものであってもよく、そして血流に到達する (Ray JM.、Stetler-Stevenson WG; Eur. Respir. J.、7(11):2062-72、1994; Stetler-Stevenson WG、Liotta LA、Kleiner DE Jr; FASEB J.、7(15):1434-41、1993 Dec.)。

【 0 0 1 6 】

腫瘍の脈管領域におけるリンパ管と血管の間の連絡の存在により、腫瘍細胞は両方の脈管系に入ることができる。

10

【 0 0 1 7 】

最近の研究により、血管新生と関節炎疾患との直接的相関が示された (Koch AE; Arthritis and Rheumatism 41:951-962、1998)。特に、関節軟骨の新血管新生がパンプス形成および関節炎の進行に重要な役割を果たしていることが示された。正常な軟骨は血管を有さないが、関節炎の患者の関節液は内皮細胞によって産生される血管新生 - 刺激因子を含んでいる (E A S F)。

【 0 0 1 8 】

この因子の存在が血管新生および軟骨の分解に関与している。

【 0 0 1 9 】

その他にも異常な血管新生に関連する疾患がある。

20

【 0 0 2 0 】

糖尿病性網膜症 [Histol Histopathol 1999 Oct; 14(4):1287-94]、乾癬 [Br. J. Dermatol. 1999 Dec; 141(6):1054-60]、慢性炎症およびアテローム性動脈硬化症 [Planta Med. 1998 Dec; 64(8):686-95]において、罹患組織の血管新生が促進因子であることが見出された。

【 0 0 2 1 】

それゆえ血管新生の制御がこれらの疾患の管理および治療のための基本的な要素の1つである。

【 0 0 2 2 】

癌の治療に有用であって、抗血管新生活性を有するレチノイドは既に知られている。

30

【 0 0 2 3 】

最近みいだされたレチノイドに属する化合物である C D 4 3 7 (Cancer Research、2002; 62(8)、2430-6; Blood、2000; 95、2672-82; Leukemia、1999、13、739-49; Cancer Letters、1999、137、217-2)は R A R に対して選択的であり、A T R A - 耐性のものを含む乳癌、メラノーマおよび子宮頸癌細胞系において、受容体結合とは独立の機構により細胞成長を阻害し、アポトーシスを誘導する (国際特許出願 W O 9 7 0 3 6 8 2 号; J. Med. Chem. 1995、38、4993-5006)。C D 4 3 7 および例えばシス - T T N P B 誘導体 (脂環式(ac.) テトラメチル - テトラヒドロ - ナフタレニル - プロベニルベンゾエート)などのその他の誘導体は共に、新規なアポトーシス誘導薬の開発のためのリード化合物として作用する。

40

【 0 0 2 4 】

また、合成によって得られるレチノイドのなかには、例えば、T A C - 1 0 1 [Clin. Cancer Res. 1999、5、2304-10]または R E - 8 0、A M - 5 8 0 あるいは A m - 8 0 などの誘導体 [Eur. J. Pharmacol. 1993、249、113-6]のように、抗血管新生特性を示すものもある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 5 】

最近になされた進展にもかかわらず、腫瘍疾患および異常な血管新生によって特徴付けられる疾患の新規な治療薬の発見に関する医薬研究が、いまだに医薬分野における多くの

50

専門家にとってもっとも有望な分野の一つであると考えられている。

【 0 0 2 6 】

実際、現在まで腫瘍疾患および異常な血管新生によって引き起こされる疾患を阻害または妨害することができる新規化合物に対する要求が強く認識されている。上記のように、これらの疾患には、腫瘍、腫瘍転移、慢性炎症、関節炎疾患、糖尿病性網膜症、乾癬、慢性炎症およびアテローム性動脈硬化症が含まれる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 7 】

このたび驚くべきことに一般式 (I) を有する化合物が抗腫瘍、アポトーシス促進、および抗血管新生活性を有することが見出された。

10

【 0 0 2 8 】

本発明による式 (I) の化合物は以前には記載されていなかった。

【 0 0 2 9 】

それゆえ、一般式 (I) の化合物が本明細書に記載する本発明の目的である。

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、一般式 (I) の化合物およびその医薬分野での使用である。

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、一般式 (I) の化合物およびその調製方法である。

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、活性成分として式 (I) の化合物および少なくとも医薬上許容される賦形剤および / または希釈剤を含む医薬組成物である。

20

【 0 0 3 0 】

本発明のさらなる目的は、血管新生の変化に関連する疾患の治療薬の調製のための式 (I) の化合物の使用に関し、ここで疾患は、関節炎疾患、腫瘍、転移 (metastatisation)、糖尿病性網膜症、乾癬、慢性炎症性疾患、およびアテローム性動脈硬化症を含む群から選択される。

【 0 0 3 1 】

本発明のさらなる目的は、腫瘍の治療薬の調製のための式 (I) の化合物の使用に関し、ここで抗腫瘍活性は細胞障害性の性質、および / またはアポトーシス誘導性の性質、および / または抗血管新生の性質のものである ; ここで腫瘍は、肉腫、癌腫、癌様体、骨腫瘍、神経内分泌腫瘍、リンパ白血病、骨髄球性白血病、単核球性白血病、巨核球白血病、急性前骨髄球性白血病またはホジキン病を含む群から選択される。

30

【 0 0 3 2 】

本発明のさらなる目的は、腫瘍転移の予防および治療に有用な薬物の調製のための式 (I) の化合物の使用に関する。

【 0 0 3 3 】

上記のように、原発性腫瘍の成長は腫瘍組織の良好な血管新生によって促進され、新血管新生の程度は腫瘍の予後における高度に負の因子でありうる。腫瘍部位における酸素および栄養素の十分な供給は、実際、腫瘍自体の迅速な成長を促進する。

【 0 0 3 4 】

腫瘍の治療のために医師に利用可能な抗腫瘍薬を用いても、こういった疾患により多くの患者が死ぬことを防ぐことがいまだに不可能であることがよく知られている。また、ほとんどの腫瘍患者が 1 つの抗癌薬だけでなくいくつかの抗癌薬の組合せによって治療されていることもよく知られている。

40

【 0 0 3 5 】

組合せて抗癌薬を投与する必要性は、様々な代謝レベルにおいて作用させることにより、腫瘍が完全に緩解する場合があります、また、患者の延命および / または治療される患者の生活の質の向上がもたらされる場合があるという事実によって生じる。

【 0 0 3 6 】

今日まで、既知の抗腫瘍化合物と組合せて用いられる新規化合物に対する強い要求がいまだに認識されている。

50

本明細書において記載する本発明の化合物は 1 または複数の抗癌薬と組合せて用いることができる。

【 0 0 3 7 】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、1 または複数の既知の抗癌薬との、1 または複数の式 (I) の化合物との組合せであり、ここで、抗癌薬は、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗チューブリン剤、インターカレート化合物、代謝拮抗剤、ビンカアルカロイドなどの天然物、エピポドフィロトキシン、抗生物質、酵素、タキサン、細胞分化化合物、ホスホチロシンキナーゼ阻害剤 (例えばイレッサ (Iressa) またはグリベック (Glivec))、T R A I L (腫瘍壊死因子 - 関連アポトーシス誘導性リガンド)、D R 4 または D R 5 受容体 (T R A I L の部位) のアゴニスト、免疫抗腫瘍治療用化合物、抗腫瘍性ワクチンまたはインターフェロン、
、
を含む群から選択される。

10

【 0 0 3 8 】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、1 または複数の式 (I) の化合物と 1 または複数の既知の抗癌薬との組合せと、1 または複数の医薬上許容される賦形剤または媒体を含む医薬組成物である。

【 0 0 3 9 】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、腫瘍治療薬の調製のための、1 または複数の既知の抗癌薬と組合せての 1 または複数の式 (I) の化合物の使用である。

【 0 0 4 0 】

本明細書に記載する本発明のさらなる目的は、腫瘍治療薬の調製のための、1 または複数の既知の抗癌薬と組合せての 1 または複数の式 (I) の化合物の使用であって、式 (I) の化合物が抗癌薬の補助剤として存在することによって特徴付けられる使用である。

20

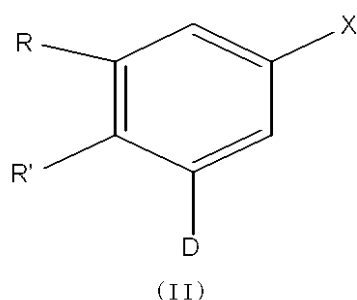
【 0 0 4 1 】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

(一般的合成方法)

式 (I) の化合物は、式 (I I) の化合物

【 化 2 】

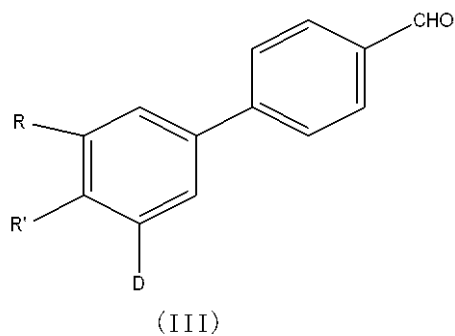


30

[式中、R、R' および D は、式 (I) について記載したものと同一意味であり、X はハロゲンを表す] と、4 - ホルミルボロン酸とを、ミヤムラ・スズキ反応 (Miyaura-Suzuki reaction) (Chem. Rev. 1995、95、2457-83) において反応させて、式 (I I I) のアルデヒドを得ることによって調製した。

40

【化 3】



10

【0042】

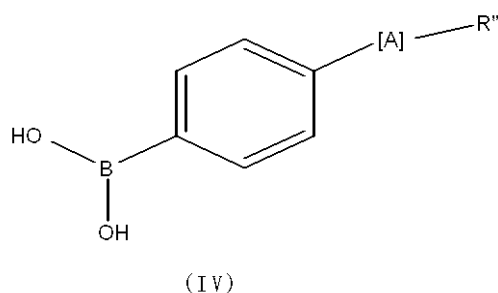
式(III)の化合物[式中、R、R'およびDは前記と同じ意味である]を、文献に記載されている周知の手順にしたがって[例えば、Wittig反応(Org. Reactions、Vol.14)、Wadsworth-Horner-Emmons反応(Org. Reactions、Vol.25)、Knoevenagel反応(Org. Reactions、Vol.15)、Henry反応(Houben-Weyl、Methoden der organischen Chemie、Vol. 10/1、p. 250)、Darzens 反応(Org. Reactions、Vol.5)など]反応させて一般式(I)の化合物[式中、[A]は、 $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ を表し、 $R^V, R^{VI}, R^{VII}, R^{VIII}$ はH、アルキル、ハロゲン、OH、OR''、 NO_2 、 NH_2 、アリール、-O-を表すか、[A]はC-Cを表す]を得る。

20

【0043】

あるいは、一般式(I)の化合物は、一般式(II)の化合物から、一般式(IV)のボロン酸とのミヤムラ・スズキ反応によって(Chem. Rev. 1995. 95、2457-83)調製することができる。

【化 4】



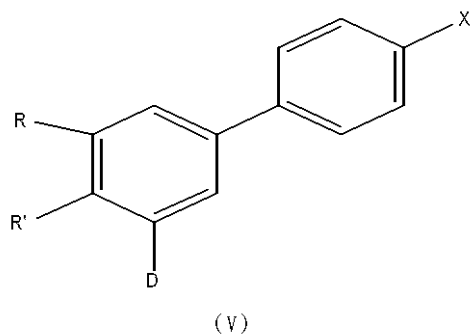
30

[式中、AおよびR''は上記と同じ意味を有する]。

【0044】

あるいは、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ またはC-Cを表す]は一般式(V)の化合物から開始して調製することができる。

【化 5】



40

50

[式中、R、R'およびDは上記と同じ意味であり、Xはハロゲンを表す]、これは既知の方法、例えばHeck (Org. Reactions, Vol.27)に記載の方法による、置換されたアルケンまたはアルキンとの、金属または有機金属触媒の存在下での反応による。

【0045】

あるいは、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ またはC-Cを表す]は一般式(I)の化合物[式中、RおよびDはHであり、R'は上記と同じ意味である]から開始して、アルコール(例えば、アダマンタン-1-オール、1-メチル-1-シクロヘキサノール、tert-ブタノールなど)との、触媒としての硫酸またはその他の酸(例えば、Charpentier et al. (J. Med. Chem. 1995、38、4993-5006に記載のもの)の存在下でのアルキル化反応によって、調製することができる。類似の反応および適当なアルコールを用いて、一般式(I)の化合物[式中、DはH、およびR、R'は上記と同じ意味を有する]から開始して、一般式(I)の化合物を調製することができる。

10

【0046】

一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, H) - C(H, R^{VI})$ であり R^V, R^{VI} が $-CH_2-$ である]は、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ を表す]から、文献公知(例えば、Simmons-Smithに記載の方法および例えばJ. Am. Chem. Soc. 1959、81、4256またはJ. Am. Chem. Soc. 1981、103、5813に記載の類似の方法)のシクロプロパン化反応によって調製することができる。あるいは一般式(I)の化合物[式中、Aは $CH=CH_2$ 、そしてR''はH]から、ジアゾ酢酸エチルとの反応によって調製することができる。一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, H) - C(H, R^{VI})$ を表し、 R^V, R^{VI} は $-O$ を表す]は、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ を表す]から、例えばジオキシランまたはその類縁体との文献公知のエポキシ化反応によってYang and colleagues. in J. Org. Chem.、1995、60、3887-9に記載のようにして調製することができる。

20

【0047】

一般式(I)の化合物[式中、[A]はC-Cを表す]は、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VII}, R^{VIII})$ またはC-Cを表す]から、二重結合または三重結合のための公知の還元反応(例えば、触媒的水素付加)によって調製することができる。

30

【0048】

一般式(I)の化合物[式中、R''はCONHOHを表す]は、一般式(I)の化合物[式中、R''はCOOHを表す]から開始してヒドロキサム酸の合成のための文献公知の方法(例えば、O-ベンジルヒドロキシルアミンおよび縮合剤との反応[De Luca et al. J. Org. Chem.、2001、66、2534]、その後、触媒的水素付加、またはO-トリメチルシリルヒドロキシルアミンとの反応、その後、脱シリル化(desilylation))によって調製できる。

【0049】

一般式(I)の化合物[式中、R''はCONHアリールを表す]は、一般式(I)の化合物[式中、R''はCOOHを表す]からアミド合成の文献公知の方法(例えば、レチノイン酸アミドについてSangmam, et. al. (Synth. Commun.、1998、28、2945-58)によって記載されている)によって調製できる。

40

【0050】

一般式(I)の化合物[式中、R''は CH_2OH を表す]は、一般式(I)の化合物[式中、R''はCOOHを表す]またはそのエステルまたは誘導体から開始して、文献公知のアルコール合成方法(例えば、LiAlH₄による還元)によって調製することができる。

【実施例1】

【0051】

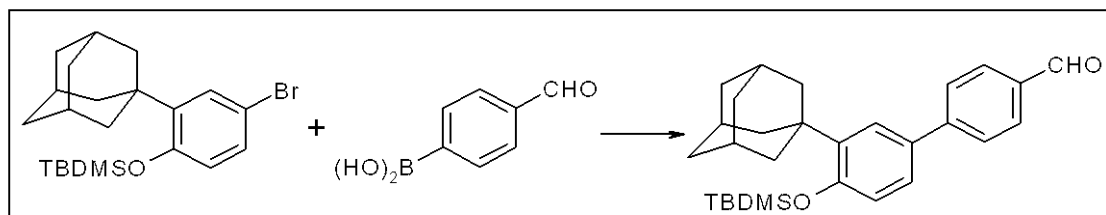
50

4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - t e r t - ブチルジメチル - シリルオキシフェニル) ベンズアルデヒドの調製

表題の化合物を以下に報告する合成図式 1 にしたがって調製した。

【化 6】

合成図式 1



10

【 0 0 5 2 】

1.56 g (3.70 mmol) の 4 - t e r t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - (1 - アダマンチル) - プロモベンゼン [Charpentier et al. J. Med. Chem.、1995、38、4993-5006] を、7.5 ml のトルエンに溶解した。3.7 ml の 2 M Na_2CO_3 水溶液、0.128 g (0.11 mmol) のテトラキス - トリフェニルホスフィン - パラジウム、および 610 mg (4.07 mmol) の 4 - ホルミルベンゼンボロン酸の 1.73 ml のエタノール中の溶液を添加した。このようにして得た溶液を窒素流中で 2 時間還流した。次に溶液を冷却し、酢酸エチルで処理し、 NaCl 飽和溶液で洗浄した。

20

【 0 0 5 3 】

相を分離し、有機相をろ過し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、再びろ過し、溶媒を蒸発させて残渣をシリカゲル (Merck) でのフラッシュクロマトグラフィーにかけた。溶出液としてヘキサン：酢酸エチル 3：1 を用いた。

1.09 g の表題の化合物を得た。

【 0 0 5 4 】

M. p. 158 .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 0.37 (6 H、s、- $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$) ; 1.05 (9 H、s、- t - Bu) ; 1.78 (6 H、s、6 Ad.) ; 2.09 (3 H、s、3 Ad.) ; 2.15 (6 H、s、6 Ad.) ; 6.88 (1 H、d、1 Ar、 $J = 8.54$ Hz) ; 7.35 (1 H、dd、1 Ar、 $J = 2.24$ Hz、 $J = 8.54$ Hz) ; 7.51 (1 H、d、1 Ar、 $J = 2.24$ Hz) ; 7.70 (2 H、d、2 Ar、 $J = 8.14$ Hz) ; 7.90 (2 H、d、2 Ar、 $J = 8.14$ Hz) ; 10.01 (1 H、s、- CHO)

30

【実施例 2】

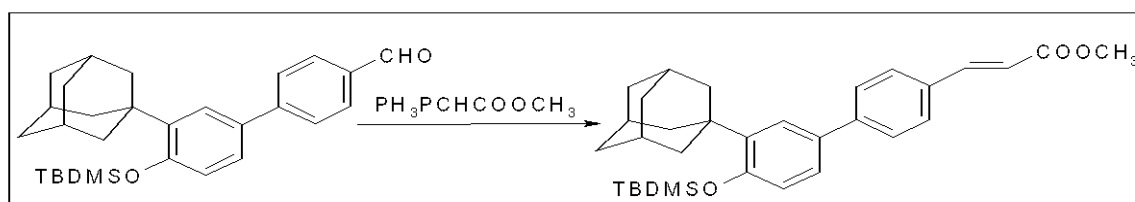
【 0 0 5 5 】

メチル E - 4 (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - t e r t - ブチルジメチルシリルオキシフェニル) シンナメート (cinnamate) の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 2 にしたがって調製した。

【化 7】

合成図式 2



40

【 0 0 5 6 】

386 mg (0.864 mmol) の 4 - (1 - t e r t - ブチルジメチルシリルオキシ

50

シ - 2 - (1 - アダマンチル) フェニル)) - ベンズアルデヒドを 4 . 5 m l のクロロホルムに溶解し、298 mg (0 . 864 mmol) のトリフェニルホスフォアニリデン酢酸メチル (methyltriphenylphosphoranylideneacetate) を添加し、こうして得た溶液を 3 時間還流した。溶液を冷却し、溶媒を蒸発させ、次いでシリカゲル (Merck) でのフラッシュクロマトグラフィーにかけた。溶出液としてヘキサン : CH_2Cl_2 1 : 1 を用いた。350 mg の表題の化合物を得た。

【 0057 】

M . p . 148 .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 0 . 36 (6 H、s、- Si (CH_3)₂) ; 1 . 05 (9 H、s、- t - Bu) ; 1 . 77 (6 H、s、6 Ad .) ; 2 . 08 (3 H、s、3 Ad .) ; 2 . 15 (6 H、s、6 Ad .) ; 3 . 80 (3 H、s、- OCH_3) ; 6 . 44 (1 H、d、- $\text{CH} =$ 、 $J = 16 . 07 \text{ Hz}$) ; 6 . 86 (1 H、d、1 Ar、 $J = 8 . 54 \text{ Hz}$) ; 7 . 30 (1 H、dd、1 Ar、 $J = 2 . 24 \text{ Hz}$ 、 $J = 8 . 54 \text{ Hz}$) ; 7 . 47 (1 H、d、1 Ar、 $J = 2 . 24 \text{ Hz}$) ; 7 . 50 - 7 . 70 (4 H、m、4 Ar) ; 7 . 71 (1 H、d、 $\text{CH} =$ 、 $J = 16 . 07 \text{ Hz}$)

10

【実施例 3】

【 0058 】

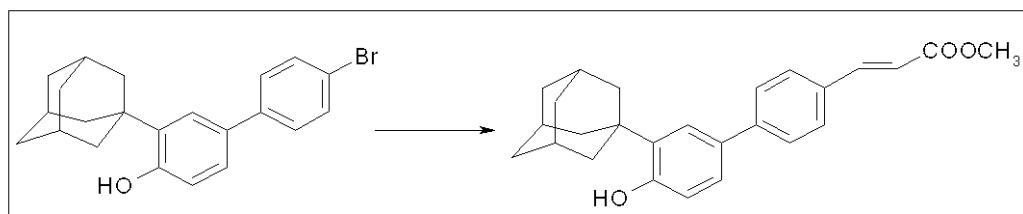
メチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 3 にしたがって調製した。

20

【化 8】

合成スキーム 3



【 0059 】

30

1 . 2 m l のトリエチルアミン中の 1 g (2 . 6 mmol) の 2 - (1 - アダマンチル) - 4 - (4 - ブロモフェニル) フェノール、358 mg (4 . 16 mmol) のアクリル酸メチル、5 . 8 mg (0 . 02 mmol) のパラジウム酢酸塩および 30 mg (0 . 1 mmol) のトリ - (o - トリル) - ホスフィンの混合物を 4 時間還流した。トリエチルアミンを蒸発させ、2 N HCl と酢酸エチルで処理し、有機相を分離し、水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させた。640 mg の生成物を得た。

【 0060 】

M . p . > 240

$^1\text{H - NMR}$ (DMSO-d_6) : 1 . 75 (6 H)、2 . 1 (9 H)、3 . 72 (s、3 H、 OCH_3)、6 . 63 (d、1 H、 $J = 16 \text{ Hz}$)、6 . 85 (dd、1 H、 $J = 8 . 8$ 、1 . 8 Hz)、7 . 3 - 7 . 4 (2 H 芳香族 (arom.))、7 . 55 - 7 . 85 (5 H)、9 . 55 (s、1 H、OH)

40

【実施例 4】

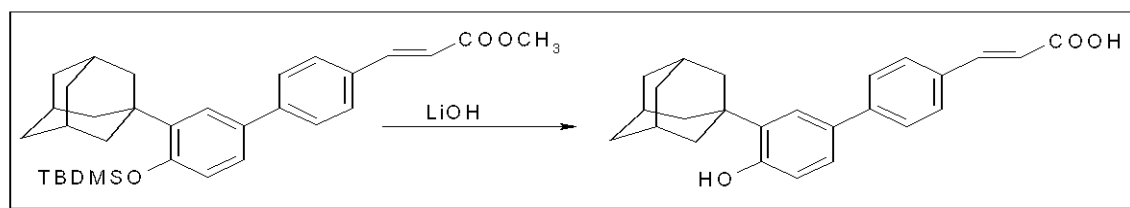
【 0061 】

E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) 桂皮酸 (ST1926) の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 4 にしたがって調製した。

【化 9】

合成スキーム 4



【0062】

42 mg (1 mmol) の $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ を 8.2 ml の THF (テトラヒドロフラン) : H_2O 1 : 1 に溶解し、100 mg (0.2 mmol) のメチル E - 4 (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - tert - ブチルジメチルシリルオキシフェニル) シンナメートを添加し、こうして得た溶液を室温で 3 時間攪拌した。THF を蒸発させ、2 N HCl で酸性にし、酢酸エチルで抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。ろ過および蒸発させ、次いでシリカゲル(Merck)でのフラッシュクロマトグラフィーにかけた。溶出液としてヘキサン : 酢酸エチル 2 : 3、次いで 1 : 1 を用いた。55 mg の生成物を得た。

【0063】

M.p. > 240 . Rf = 0.50 (Merck シリカゲル 60 F₂₅₄、EtOAc)
¹H NMR (DMSO - d₆) : 1.74 (6H, s, 6Ad.) ; 2.04 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 6.51 (1H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 6.85 (1H, d, 1Ar, J = 8.82 Hz) ; 7.30 - 7.40 (2H, m, 2Ar) ; 7.55 - 7.63 (3H, m, 2Ar + CH=) ; 7.70 (2H, d, 2Ar, J = 8.09 Hz) ; 9.54 (1H, s, -OH) ; 12.34 (1H, brs, -COOH)
 MS (m/z) : 374 (M⁺, 100) .

【実施例 5】

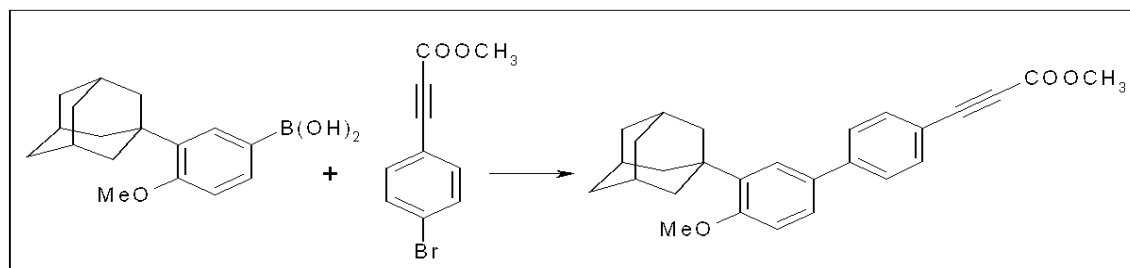
【0064】

メチル 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) プロピオラートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 5 にしたがって調製した。

【化 10】

合成スキーム 5



【0065】

301 mg (1.26 mmol) のメチル 4 - ブロモフェニルプロピオラートを 2.5 ml のトルエンに溶解し、1.34 ml の 2 M Na_2CO_3 水溶液、次いで 43.7 mg の Pd - テトラキストリフェニルホスフィン、そして最後に 398 mg (1.39 mmol) の 3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニルボロン酸を添加し、混合物を 3 時間還流した。粗生成物をエチルエーテルで処理し、有機相を NaCl 飽和溶液で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、蒸発させて乾燥させて 570 mg の粗生成物を得た。シリカゲル(Merck)でのフラッシュクロマトグラフィーにより、15 mg の純粋な生成物を得

た。溶出液として、ヘキサン：酢酸エチル 2：1 を用いた。

【0066】

M . p . 175

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 3.86 (s、3 H、 OCH_3)、3.90 (s、3 H、 OCH_3)、6.96 (d、1 H、 $J = 8.5$)、7.43 (dd、1 H、 $J = 2.2$ 、8.5)、7.47 (d、1 H、 $J = 2.2$)、7.55 - 7.70 (4 H 芳香族)

【実施例 6】

【0067】

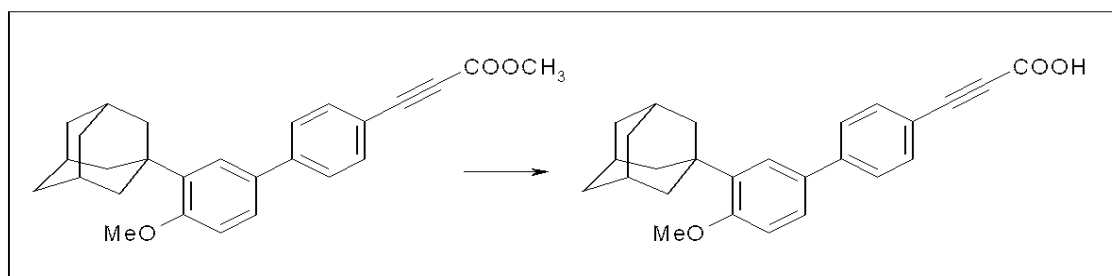
4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) プロピオン酸 (propiolic acid) (ST1879) の調製

10

表題の化合物を以下の合成スキーム 6 にしたがって調製した。

【化 11】

合成スキーム 6



20

【0068】

15 mg (0.0374 mmol) のメチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) プロピオラートをメタノール中の 2.14 ml の 0.7 N NaOH に溶解し、混合物を 1 時間還流した。メタノールを蒸発させ、水で処理し、6 N HCl で酸性にし、エチルエーテルで抽出した。Na₂SO₄ での乾燥および溶媒の蒸発後、残渣をヘキサンで洗浄し、それからろ過後に 10 mg の生成物を得た。

【0069】

M . p . 156 . R f = 0.41 (Merck シリカゲル 60 F₂₅₄、EtOAc / MeOH 2 / 1)

30

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) : 1.70 (s、6 H)、2.10 (s、9 H)、3.85 (s、3 H、 OCH_3)、7.05 (d、1 H、 $J = 8.4$ 、H - 6')、7.40 (d、1 H、 $J = 2$ 、H - H')、7.45 - 7.60 (3 H 芳香族)、7.65 (2 H 芳香族)

【実施例 7】

【0070】

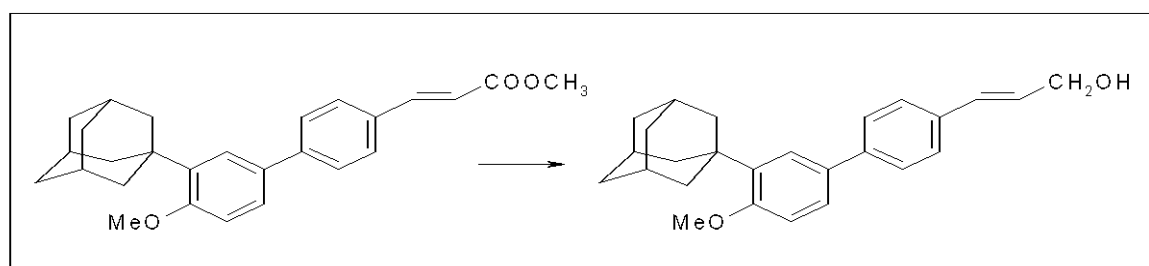
E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) ケイヒアルコールの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 7 にしたがって調製した。

40

【化 1 2】

合成スキーム 7



10

【0071】

テトラヒドロフラン中の $375 \mu\text{l}$ の 1 M LiAlH_4 溶液 (0.365 mmol) を 5 ml の無水テトラヒドロフランに添加した。氷浴中で冷却し、 151 mg (0.375 mmol) のメチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) シンナメート (実施例 19 を参照) を添加し、冷条件下で 1 時間、次いで室温で一晩攪拌した。氷浴中で冷却し、 5 ml の 10% NH_4Cl 水溶液を添加し、テトラヒドロフランを蒸発させ、次いで酢酸エチルで処理した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶媒を蒸発させることにより、 126 mg の粗生成物を得、これを溶出液としてメチレンクロリド：ヘキサン 3：1、次いでヘキサン：酢酸エチル 28：72 を用いたシリカゲル (Merck) でのクロマトグラフィーにかけ、 11 mg の生成物を得た。

20

【0072】

M . p . 148° .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.75 (s, 6 H)、 2.15 (9 H)、 3.90 、s、3 H、 OCH_3)、 4.38 (dd, 2 H、 $J = 6$ 、 1.6)、 6.41 (dt, 1 H、 $J = 6$ 、 1.6 、 $=\text{CHCH}_2\text{OH}$)、 6.67 (dd, 1 H、 $J = 1.6$ 、 1.6 、アリール $\text{CH} =$)、 6.96 (d, 1 H、 $J = 8.3$ 、H - 6')、 7.42 (dd, 1 H、 $J = 2.2$ 、 8.3 、H - 5')、 7.45 (m, 2 H、H - 2 および H - 6)、 7.48 (d, 1 H、 $J = 2.2$ 、H - 3')、 7.55 (m, 2 H、H - 3 および H - 5)
 MS m/z 374 (M^+)

30

【実施例 8】

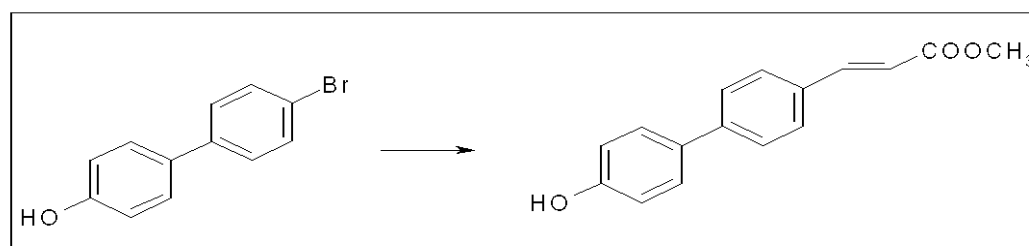
【0073】

メチル E - 4 - (4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 8 にしたがって調製した。

【化 1 3】

合成スキーム 8



40

【0074】

3.7 ml のトリエチルアミン中の 2 g (8.03 mmol) の 4 - (4 - ブロモフェニル) フェノール、 1.1 g (12.8 mmol) のアクリル酸メチル、 18 mg (0.08 mmol) のパラジウム酢酸塩、および 94 mg (0.31 mmol) のトリ - (o - トリル) ホスフィンの混合物を 6 時間還流した。さらに 6 mg のパラジウム酢酸塩および 30 mg のトリ - (o - トリル) ホスフィンを添加し、1 時間加熱し、次いでさらに 3

50

0 m g のパラジウム酢酸塩および 9 4 m g のトリ - (o - トルイル) ホスフィンを添加し、3 . 5 時間加熱した。次いで反応物を 6 M H C l で酸性にし、酢酸エチルを添加し、しばらく攪拌して沈殿を溶解させ、相を分離し、有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させた。粗生成物 (9 3 4 m g) をヘキサン / エチルエーテル中での処理により精製し、ろ過して 1 . 7 g の表題の生成物を得た。

【 0 0 7 5 】

M . p . . 2 3 3 - 2 3 5

^1NMR (CDCl_3) : 3 . 7 0 (s 、 3 H 、 OCH_3) 、 6 . 1 3 (d 、 1 H 、 $\text{CH} =$ 、 $J = 16$) 、 6 . 8 2 (d 、 2 H 、 H - 3 ' および H - 5 ') 、 7 . 4 8 、 d 、 2 H 、 H - 2 ' および H - 6 ') 、 7 . 6 - 7 . 7 5 (5 H)

10

【 実施例 9 】

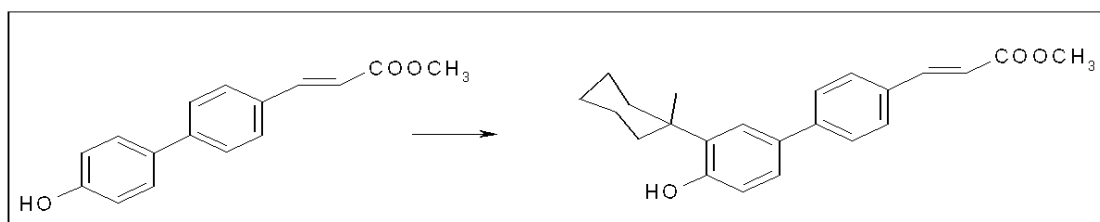
【 0 0 7 6 】

メチル E - 4 - (3 - (1 - メチルシクロヘキシル) - 4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 9 にしたがって調製した。

【 化 1 4 】

合成スキーム 9



20

【 0 0 7 7 】

1 5 0 m g (0 . 6 m m o l) のメチル E - 4 - (4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートおよび 6 8 . 5 m g の 1 - メチル - 1 - シクロヘキサノールを 1 . 2 m l の CH_2Cl_2 に溶解し、0 . 0 3 2 m l の濃 H_2SO_4 で処理し、混合物を 1 日還流した。水を添加し、混合物を炭酸水素ナトリウム飽和溶液で中和した。水相を数回酢酸エチルで抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、ろ過および蒸発させた。その結果得た粗生成物をシリカゲル (Merck) でのフラッシュクロマトグラフィーにかけた。溶出液としてヘキサン : 酢酸エチル 9 : 1 を用いた。2 0 m g の生成物を得た。

30

【 0 0 7 8 】

$^1\text{HNMR}$ (アセトン - d_6) : 1 . 4 3 (3 H 、 s 、 - CH_3) ; 1 . 4 - 1 . 9 (8 H 、 m 、 シクロヘキサン) ; 2 . 3 - 2 . 4 5 (2 H 、 m 、 シクロヘキサン) ; 3 . 8 0 (3 H 、 s 、 - OCH_3) ; 6 . 6 0 (1 H 、 d 、 $\text{CH} =$ 、 $J = 16 . 18 \text{ Hz}$) ; 7 . 0 (1 H 、 d 、 1 A r 、 $J = 8 . 2 \text{ Hz}$) ; 7 . 4 4 (1 H 、 d d 、 1 A r 、 $J = 8 . 2 \text{ Hz}$ 、 2 . 2 H z) ; 7 . 6 5 (1 H 、 d 、 1 A r 、 $J = 2 . 2 \text{ Hz}$) ; 7 . 7 - 7 . 8 5 (5 H 、 m 、 4 A r + $\text{CH} =$) ; 8 . 6 5 (1 H 、 s 、 - OH)

40

【 実施例 1 0 】

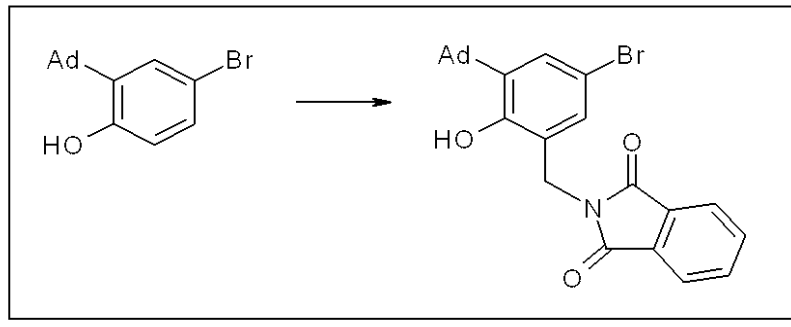
【 0 0 7 9 】

2 - (1 - アダマンチル) - 4 - ブロモ - 6 - N - フタルイミドメチル) フェノールの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 1 0 にしたがって調製した。

【化 15】

合成スキーム 10



10

【0080】

7 ml のジクロロメタン中の 500 mg (1.63 mmol) の 2 - アダマンチル - 4 - プロモフェノールの溶液に、289 mg (1.63 mmol) の N - ヒドロキシメチルフタルイミドおよび 2 滴の濃 H_2SO_4 を添加した。混合物を 3 日間還流し、水で希釈し、ジクロロメタンで抽出した。溶媒の蒸発および溶出液としてヘキサン：酢酸エチルを 80：20 を用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにより、348 mg (46%) の生成物を得た。

20

【0081】

M. p. 253 .

1H NMR (CDCl₃) : 1.78 (6H, s, 6 Ad.) ; 2.09 (3H, s, 3 Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6 Ad.) ; 4.76 (2H, s, -CH₂-) ; 7.28 (1H, d, 1 Ar, J = 2.94 Hz) , 7.45 (1H, d, 1 Ar, J = 2.94 Hz) ; 7.76 (2H, dd, 2 Ar, J = 2.94 Hz, J = 5.52 Hz) ; 7.88 (2H, dd, 2 Ar, J = 2.94 Hz, J = 5.52 Hz) ; 8.13 (1H, s, -OH)

【実施例 11】

【0082】

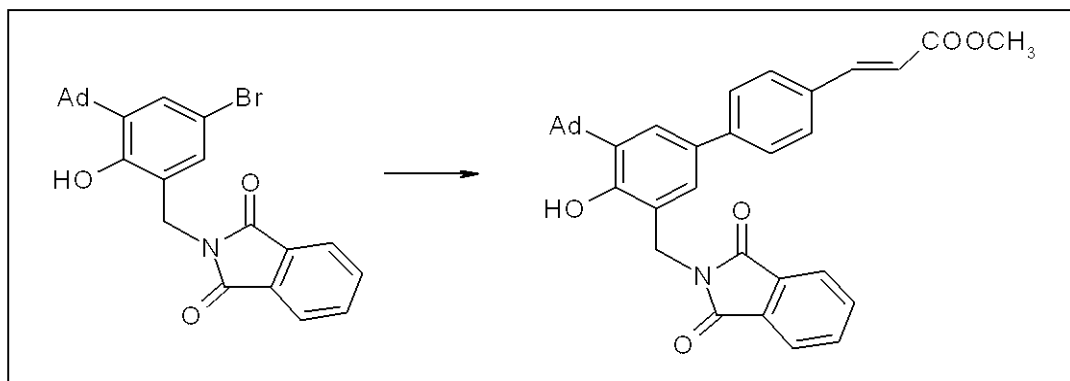
メチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 5 - (N - フタルイミドメチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートの調製

30

表題の化合物を以下の合成スキーム 11 にしたがって調製した。

【化 16】

合成スキーム 11



40

【0083】

100 mg の 2 - (1 - アダマンチル) - 4 - プロモ - 6 - N - フタルイミドメチル)

50

フェノールを 1.6 ml のジオキサンに懸濁し、窒素流下で；59.7 mg のボロ（ビスピナコレート）、63 mg の無水酢酸カリウム、5 mg のジクロロ（ジフェニルホスフィンフェロセン）パラジウムおよび 103 mg のメチル 4 - プロモシンナメートを添加した。これを 2 時間還流し、酢酸エチルに再懸濁し、1 ml の 2 M HCl で酸性にし、有機相を NaCl 飽和溶液で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、ヘキサン：酢酸エチル 65：35 を用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにかけた。32 mg（27%）の生成物を得た。

【0084】

M. p. 216 .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.78 (6H, s, 6Ad.) ; 2.09 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 3.83 (3H, s, -OCH₃) ; 4.90 (2H, s, -CH₂-) ; 6.44 (1H, d, CH=, J = 16.18 Hz) ; 7.45 - 7.90 (11H, m, 10Ar + CH=) ; 8.22 (1H, s, -OH)

MS (m/z) : 547 (M^+ , 100) ; 400 (30) ; 160 (30)

【実施例 12】

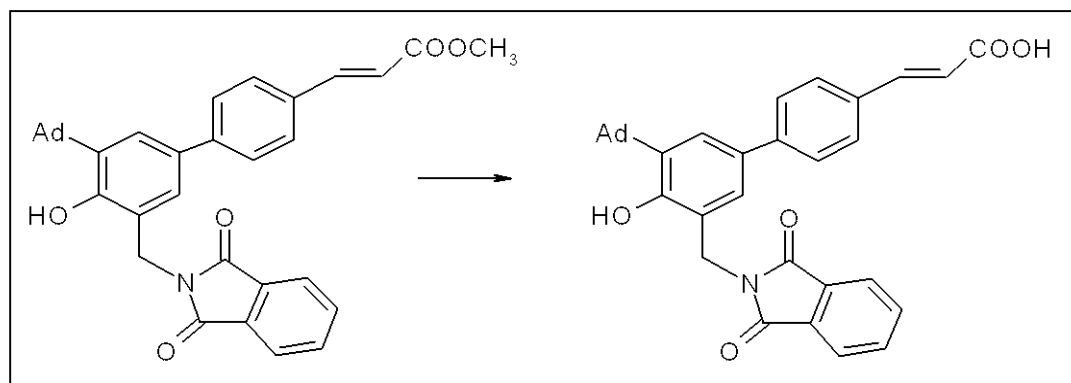
【0085】

E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 5 - (N - フタルイミドメチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) 桂皮酸の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 12 にしたがって調製した。

【化 17】

合成スキーム 12



【0086】

30 mg のメチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 5 - (N - フタルイミドメチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) シンナメートを 1 ml の酢酸と 37% 塩酸の 3：1 混合物に添加し、混合物を 30 時間還流した。酢酸を蒸発させ、水で処理し、固体残渣をろ過して水で洗浄した。24 mg の生成物を得た。

【0087】

M. p. 216

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) : 1.73 (6H, s, 6Ad.) ; 2.04 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 4.81 (2H, s, -CH₂-) ; 6.45 (1H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 7.07 (1H, d, 1Ar, J = 1.84 Hz) ; 7.30 (1H, d, 1Ar, J = 1.84 Hz) ; 7.46 (2H, dd, 2Ar, J = 8.82 Hz, J = 1.84 Hz) ; 7.53 (1H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 7.64 (2H, dd, 2Ar, J = 8.82 Hz, J = 1.84 Hz) ; 7.78 - 7.94 (4H, m, 4Ar) ; 8.60 (1H, s, -OH) ; 12.5 (1H, br s, COOH)

MS (m/z) : 533 (M⁺, 100) ; 386 (40) ; 160 (60) 130 (50)

【実施例 13】

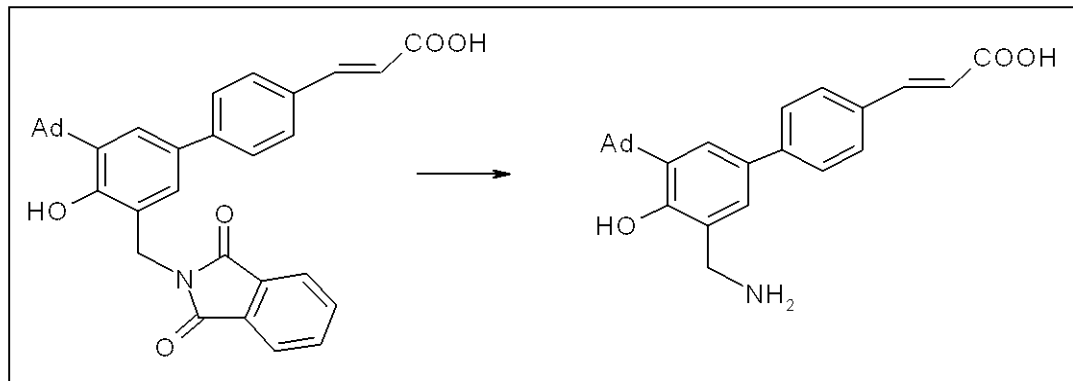
【0088】

E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 5 - (アミノメチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) 桂皮酸の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 13 にしたがって調製した。

【化 18】

合成スキーム 13



【0089】

20 mg の E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 5 - (N - フタルイミドメチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) 桂皮酸を 0.15 ml のメタノールに懸濁し、0.013 ml のヒドラジン水和物を添加し、混合物を 50 で 5 時間加熱した。溶媒を蒸発させ、水に再懸濁し、2 M HCl で酸性にし、沈殿を減圧下でろ過した。粗生成物を乾燥させ、テトラヒドロフランで処理してフタルヒドラジドに溶解し、そしてろ過した。

【0090】

M. p. 195

¹H NMR (DMSO - d₆) : 1.73 (6 H, s, 6 Ad.) ; 2.04 (3 H, s, 3 Ad.) ; 2.12 (6 H, s, 6 Ad.) ; 4.00 (2 H, s, -CH₂-) ; 6.45 (1 H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 7.07 - 8.00 (5 H, m, 5 Ar)

【実施例 14】

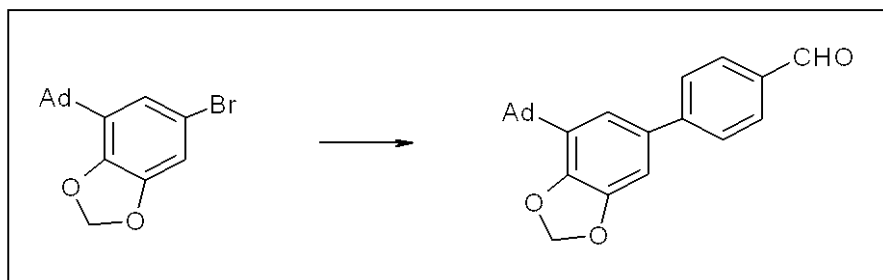
【0091】

4 - (7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ (1 , 3) ジオキソール - 5 - イル) - ベンズアルデヒドの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 14 にしたがって調製した。

【化 19】

合成スキーム 14



10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

0.875 g (2.61 mmol) の 4 - アダマンタン - 1 - イル - 6 - プロモ - ベンゾ (1,3) ジオキソールを 5.2 ml のトルエンおよび 2.6 ml の 2 M Na_2CO_3 水溶液に溶解し、0.090 g (0.08 mmol) のテトラキス - トリフェニルホスフィン - パラジウム、および 1.2 ml のエタノール中の 0.430 g (2.87 mmol) の 4 - ホルミルベンゼンボロン酸の溶液を添加した。これを窒素流下で 7 時間還流した。これを冷却し、酢酸エチルで処理し、 NaCl 飽和溶液で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、ろ過し、溶媒を蒸発させた。溶出液としてヘキサン : 酢酸エチル 9 : 1 を用いたシリカゲル (Merck) でのフラッシュクロマトグラフィーの後、0.66 g の生成物 (70%) を得た。

10

【 0 0 9 3 】

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.80 (6H, s, 6Ad.); 2.09 (3H, s, 3Ad.); 2.12 (6H, s, 6Ad.); 6.02 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 7.01 (1H, d, 1Ar, $J = 1.86\text{ Hz}$); 7.04 (1H, d, 1Ar, $J = 1.86\text{ Hz}$); 7.68 (2H, d, 2Ar, $J = 8.19\text{ Hz}$,); 7.92 (2H, d, 2Ar, $J = 8.19\text{ Hz}$,); 10.02 (1H, s, $-\text{CHO}$)

【実施例 15】

【 0 0 9 4 】

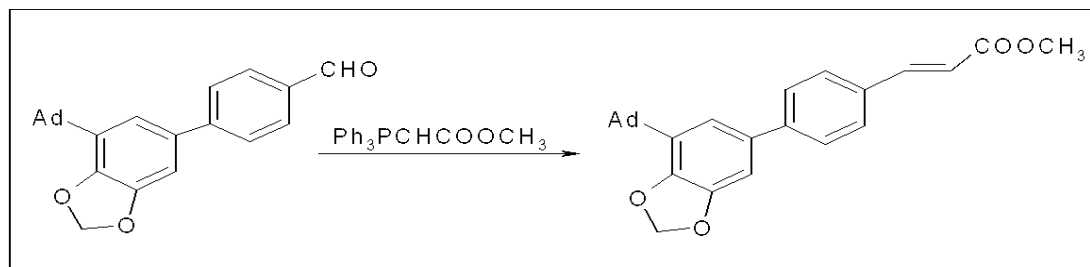
メチル E - 4 - (7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ (1,3) ジオキソール - 5 - イル) - シンナメートの調製

20

表題の化合物を以下の合成スキーム 15 にしたがって調製した。

【化 20】

合成スキーム 15



30

【 0 0 9 5 】

4.5 ml の CHCl_3 中の 300 mg の 4 - (7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ (1,3) ジオキシル - 5 - イル) - ベンズアルデヒドの溶液を、窒素下で 278 mg のトリフェニルホスフォアニリデン酢酸メチルで処理し、5 時間還流し、さらに 3 時間後にイリド (20%) を添加した。この期間の最後に、溶媒を蒸発させ、残渣を溶出液としてヘキサン : ジクロロメタン 45 : 55 を用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにかけた。298 mg の生成物を得た。

【 0 0 9 6 】

40

M. p. 205 .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : 1.72 (6H, s, 6Ad.); 2.06 (3H, s, 3Ad.); 2.12 (6H, s, 6Ad.); 3.80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); 5.97 (2H, s, $-\text{CH}_2-$); 6.44 (1H, d, $-\text{CH}=\text{}$, $J = 16\text{ Hz}$); 6.95 (1H, d, 1Ar, $J = 1.86\text{ Hz}$); 6.98 (1H, d, 1Ar, $J = 1.86\text{ Hz}$); 7.52 - 7.58 (4H, m, 4Ar); 7.71 (1H, d, $-\text{CH}=\text{}$, $J = 16\text{ Hz}$,)

【実施例 16】

【 0 0 9 7 】

E - 4 - (7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ (1,3) ジオキソール - 5 - イル)

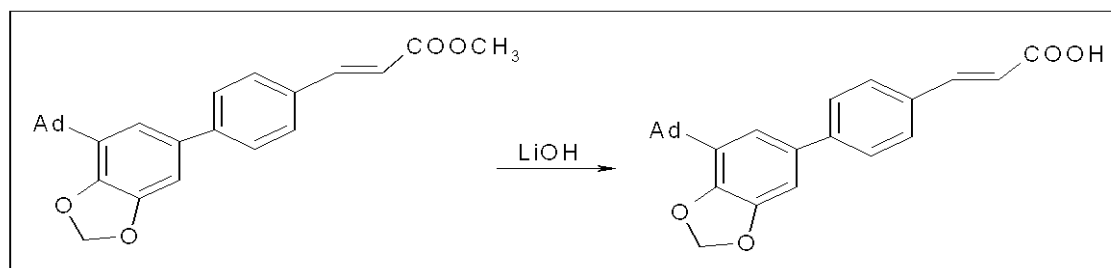
50

- 桂皮酸の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 16 にしたがって調製した。

【化 2 1】

合成スキーム 16



10

【0098】

200 mg (0.48) のメチル E - 4 - (7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ (1 , 3) ジオキソール - 5 - イル) - シンナメートを 25 ml の THF / H₂O 3 : 2 中の LiOH · H₂O の溶液に懸濁し、室温で一晩攪拌した。THF を蒸発させ、カルボキシラート懸濁液をヘキサンで洗浄し、2 N HCl で酸性にし、氷浴中で冷却した。ろ過後、150 mg (78%) の生成物を得た。

【0099】

M . P . > 300 . R f = 0 . 59 (Merck シリカゲル 60 F₂₅₄、EtOAc / ヘキサン 9 / 1)

¹H NMR (DMSO - d₆) : 1 . 72 (6 H、s、6 Ad .) ; 2 . 01 (3 H、s、3 Ad .) ; 2 . 12 (6 H、s、6 Ad .) ; 6 . 01 (2 H、s、- CH₂ -) ; 6 . 52 (1 H、d、- CH =、J = 16 . 18 Hz) ; 6 . 99 (1 H、d、1 Ar、J = 1 . 84 Hz) ; 7 . 14 (1 H、d、1 Ar、J = 1 . 84 Hz) ; 7 . 60 (1 H、d、- CH =、J = 16 . 18 Hz) ; 7 . 62 (2 H、dd、2 Ar、J = 8 . 46 Hz、1 . 84 Hz) ; 7 . 68 (2 H、dd、2 Ar、J = 8 . 46 Hz、1 . 84 Hz)

【実施例 17】

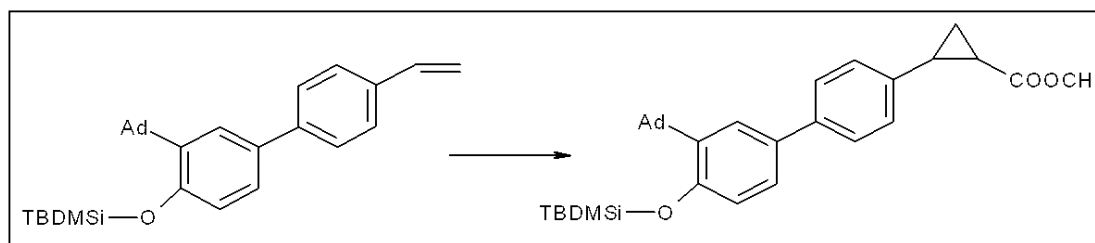
【0100】

メチル 2 - [4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシフェニル)] シクロプロパンカルボキシラートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 17 にしたがって調製した。

【化 2 2】

合成スキーム 17



40

【0101】

0 . 5 mg のテトラ酢酸ロジウム二水和物および 36 μ l のジアゾ酢酸エチルを 2 ml のジクロロメタン中の 150 mg の (3 - アダマンタン - 1 - イル - 4' - ビニルピフェニル - 4 - オキシ) tert - ブチルジメチルシラン (対応するアルデヒドからの Wittig 反応により調製したもの) の溶液に添加した。反応物を室温で 5 日間放置し、合計 5 mg の触媒および 10 μ l のジアゾ酢酸エチルを添加した。触媒をセライトでろ過し、

50

硫酸ナトリウムで乾燥させ、蒸発させ、ヘキサン：酢酸エチルの65：35混合物を用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにかけた。2つのシスとトランスのジアステレオ異性体の43mgの混合物を得た。

【0102】

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) ; 0.45 (6H, s, -Si(CH₃)); 0.95 (3H, t, -CH₃, J = 7 Hz); 1.1 (9H, s, tBu); 1.25 (3H, t, -CH₃, J = 7 Hz); 1.35 - 1.55 (1H, m, 1-CH₂); 1.55 - 1.74 (1H, m, 1-CH₂); 1.79 (6H, s, 6Ad.); 1.95 (1H, m, -CH-COOEt) 2.07 (3H, s, 3Ad.); 2.12 (6H, s, 6Ad.); 2.48 - 2.65 (1H, m, -CH-Ar); 3.85 (2H, q, -OCH₂, J = 7 Hz); 4.18 (2H, q, -OCH₂, J = 7 Hz); 6.82 (1H, dd, 1Ar, J = 1.84 Hz, 8.46 Hz); 7.15 (1H, d, 1Ar, J = 8.46 Hz); 7.25 (2H, dd, 2Ar, J = 8.0 Hz, 1.84 Hz); 7.45 - 7.50 (3H, m, 3Ar)

10

【実施例18】

【0103】

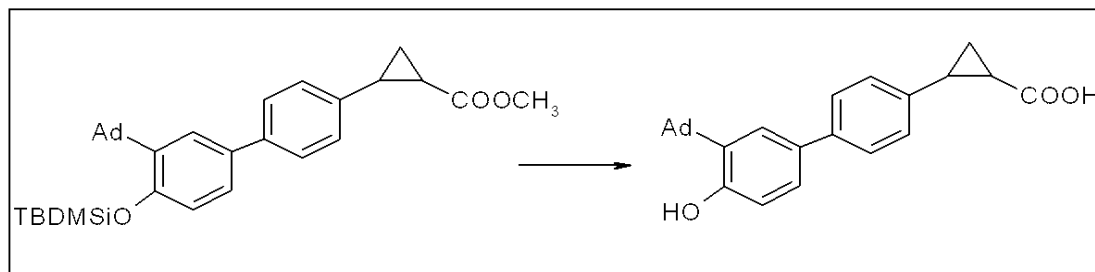
シスおよびトランス2-(4-(3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル)]シクロプロパンカルボン酸の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム18にしたがって調製した。

【化23】

20

合成スキーム18



30

【0104】

微細に粉碎したAl₂O₃ (40%)上の113mgのKFを4.4mlのジメトキシエタン中のメチル2-[4-(3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル)]シクロプロパンカルボキシレート(110mg)の溶液に添加し、室温で2日間攪拌した。その後、溶媒を蒸発させ、粗生成物を水中の12.4mlの50%テトラヒドロフラン中の63mgのLiOH・H₂O溶液に添加した。これを室温で3日間攪拌し、溶媒を蒸発させ、エチルエーテルで抽出し、2M HClで酸性にし、酢酸エチルで抽出した。蒸発後、生成物(58mg)をヘキサン：酢酸エチル40：60を用いたシリカゲルでのクロマトグラフィーにかけた。6mgのトランス-2-4-(3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル)]シクロプロパンカルボン酸(M.p. 190)、10mgのジアステレオ異性体の混合物および20mgのシス-2-[4-(3-(1-アダマンチル)-4-ヒドロキシフェニル)]シクロプロパンカルボン酸(M.p. 204)を得た。

40

【0105】

Rf = 0.23 シス; 0.44 トランス (Merckシリカゲル 60 F₂₅₄, EtOAc / ヘキサン 6 / 4)

$^1\text{H NMR}$ (MeOD) トランス: 1.45 - 1.50 (1H, m, 1-CH₂); 1.60 - 1.65 (1H, m, 1-CH₂); 1.95 - 2.0 (7H, m, -CH-COOEt + 6Ad) 2.2 (3H, s, 3Ad.); 2.35 (6H, s, 6Ad.); 2.50 - 2.58 (1H, m, -CH-Ar); 6.84 (1H, d, 1Ar, J = 8

50

. 46 Hz) ; 7.24 (2H, dd, 2Ar, J = 7.35 Hz, J = 1.84 Hz) ; 7.31 (1H, dd, 1Ar, J = 8.46 Hz, 2.57 Hz) ; 7.42 (1H, d, 1Ar, J = 2.57 Hz) ; 7.52 (2H, dd, 2Ar, J = 7.35 Hz, J = 1.84 Hz)

¹H NMR (MeOD) シス : 1.40 - 1.50 (1H, m, 1-CH₂) ; 1.70 - 1.75 (1H, m, 1-CH₂) ; 1.95 - 2.0 (6H, s, 6Ad) ; 2.10 - 2.15 (4H, m, 3Ad + -CH-COOH) ; 2.30 (6H, s, 6Ad) ; 2.70 - 2.78 (1H, m, -CH-Ar) ; 6.83 (1H, d, 1Ar, J = 8.46 Hz) ; 7.30 (1H, dd, 1Ar, J = 8.46 Hz, 2.57 Hz) ; 7.38 (2H, dd, 2Ar, J = 7.30 Hz, J = 1.84 Hz) ; 7.42 (1H, d, 1Ar, J = 2.57 Hz) ; 7.49 (2H, dd, 2Ar, J = 7.30 Hz, J = 1.84 Hz)

MS (m/z) : 388 (M⁺, 100) ; 135 (50)

【実施例 19】

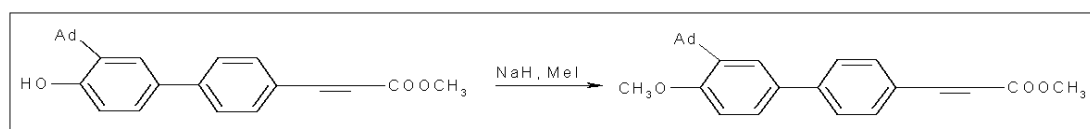
【0106】

メチル E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) シンナメートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 19 にしたがって調製した。

【化 24】

合成スキーム 19



【0107】

3.3 mL の DMF 中の NaH (鉱油中 60%、66 mg、2.74 mmol) の懸濁液に、N₂ 下で、969 mg (2.49 mmol) のメチル E - 4 (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシシンナメートを添加した。混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで 186 μL (2.99 mmol) の CH₃I を滴下した。

【0108】

反応物を室温で一晩放置した ; 80 mL の冷水の添加後、水相を CH₂Cl₂ (4 x 60 mL) で抽出した。有機層を水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、溶媒を蒸発させた。972 mg の生成物を得た (97%)。

【0109】

¹H NMR (CDCl₃) : 1.75 (6H), 2.1 (9H), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.80 (s, 3H, -COOCH₃) ; 6.40 (d, 1H, CH=, J = 16 Hz), 6.90 (d, 1H, 1Ar, J = 8.8 Hz), 7.35 (dd, 1H, 1Ar, J = 8.8, 1.8 Hz) ; 7.42 (d, 1H, 1Ar, J = 1.8 Hz) ; 7.48 - 7.53 (m, 4H, 4Ar) ; 7.65 (d, 1H, CH=, J = 16 Hz)

【実施例 20】

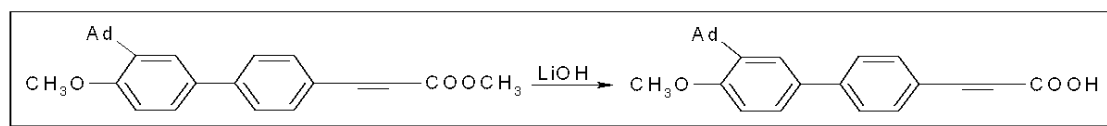
【0110】

E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) 桂皮酸 (ST1898) の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 20 にしたがって調製した。

【化 25】

合成スキーム 20



【0111】

455 mg (10.8 mmol) の LiOH・H₂O を 90 ml の THF : H₂O 1 : 1 に溶解した； 873 mg (2.17 mmol) のメチル E - 4 (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) シンナメートを添加し、こうして得た溶液を室温で 2 日間攪拌した。THF を蒸発させ、2 N HCl で酸性にし、白色沈殿をろ過した。固体を AcOEt および Et₂O で洗浄し、792 mg (94%) の表題の化合物を得た。

10

【0112】

R_f = 0.28 (Merck シリカゲル 60 F₂₅₄、EtOAc / ヘキサン 9 / 1)

¹H NMR (DMSO - d₆) : 1.74 (6H, s, 6 Ad.) ; 2.04 (3H, s, 3 Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6 Ad.) ; 3.75 (3H, s, -OCH₃) ; 6.50 (1H, d, -CH=, J = 16 Hz) ; 6.98 (1H, d, 1 Ar, J = 8.8 Hz) ; 7.40 - 7.70 (7H, m, 6 Ar + CH=) ; 12.3 (1H, br s, -COOH)

20

【0113】

腫瘍細胞系に対する ST1926 の細胞障害性

細胞障害性試験を行なうために、2 つの急性前骨髄球性白血病 (APL) 細胞系を用いた。

1. 細胞系 NB4。これは、染色体転座 t(15; 17) を有し、融合タンパク質 PML / RAR を産生する。この細胞系は医薬用量の ATRA (10⁻⁷ - 10⁻⁶ M) の分化作用に対して極めて感受性である；

2. 細胞系 HL60。これは、ATRA に応答するが、細胞系 NB4 と比べると感受性が低い。この細胞系は上記の染色体転座を有さない。

【0114】

30

これらの細胞系を 10% ウシ胎仔血清 (FCS) および 1% グルタミンを含有する RPMI 1640 中に維持した。

【0115】

固形腫瘍に由来する様々な細胞系も用いた。

1. ヒト前立腺癌 PC3 および DU145。これらの細胞系は、10% FCS、1% ピルビン酸ナトリウムおよび 1% グルタミンを含有する RPMI 1640 培地中に維持した；

2. ヒト大腸腺癌 LoVo。この細胞系は、10% FCS および 1% グルタミンを含有する HAM's F - 12 培地中に維持した。

3. ヒト卵巣癌。例えば、A2780 および A2780 / Dx。これらはそれぞれ薬剤に感受性および耐性である (ドキソルピシン、タキソール、エトポシド、ビンクリスチン) ; IGROV - 1 および IGROV - 1 / Pt。これらはそれぞれ、プラチナ・ベースの化学療法に感受性および耐性である。これらを 10% FCS、1% ピルビン酸ナトリウムおよび 1% グルタミンを含有する RPMI 1640 培地に維持した；

40

4. ヒトメラノーマ MeWo および MeS2.21、グリア芽細胞腫 GBM、非小細胞肺癌 A431、NCI - H460、骨肉腫 SAOS および U2OS を、10% FCS、1% ピルビン酸ナトリウムおよび 1% グルタミンを含有する RPMI 1640 培地中に維持した。

【0116】

細胞障害性試験は、懸濁液中の NB4 または HL - 60 細胞 (10000 / ウェル) を用いて行なった。細胞を 96 ウェルプレートに 250 μl の容量で播き、37 °C で 24 時

50

間インキュベートした。翌日、様々な濃度の被験化合物 S T 1 9 2 6 [(2 E) - 3 - [3 ' - (1 - アダマンチル) - 4 ' - ヒドロキシ [1 , 1 ' - ビフェニル] - 4 - イル] - 2 - プロペノエート / プロペン酸 (propenoate / ic acid)] を添加し、細胞をさらに 2 4 時間、37 で 5 % C O ₂ を含有する加湿雰囲気中でインキュベートした。3 日目に、プレートを 1 0 分間 1 6 0 0 × g で遠心分離して上清をデカントして捨てることによって培地を除去した。2 5 0 μ l の P B S を添加した；次いでプレートを再び 1 6 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離し、上清をデカントして捨てた。2 0 0 μ l / ウェルの、1 0 % F C S を含有する R P M I 1 6 4 0 培地を添加し、プレートを 3 7 でさらに 4 8 時間インキュベートした。5 日目に、プレートを再び 1 6 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離し、プレートを逆さにすることにより培地を除去し、2 0 0 μ l の P B S および 5 0 μ l の冷却した 8 0 % T C A を添加した。プレートを次いで静置して少なくとも 1 時間氷上でインキュベートした。T C A をプレートを逆さにして除去した；プレートを蒸留水に浸漬することにより 3 回洗浄し、まず紙上で乾燥させ、次いで熱気流によって乾燥させた。すべてのウェルに 1 % 酢酸中の 2 0 0 μ l の 0 . 4 % スルホローダミン B を添加した。プレートを室温でさらに 3 0 分間インキュベートした。スルホローダミン B をプレートを逆さにすることによって除き、プレートを 1 % 酢酸中に浸漬することによって 3 回洗浄し、次いでまず吸収紙で、そして熱気流で乾燥させた。2 0 0 μ l の 1 0 m M T r i s 塩基をすべてのウェルに添加し、プレートを少なくとも 2 0 分間振盪した。吸光度を Multiskan 分光光度計を用いて 5 4 0 n m で測定した。

10

【 0 1 1 7 】

20

接着細胞については、用いた手順は同じであったが、3 日目のプレートの洗浄はプレートを逆さにした後、P B S を添加することによって 3 回行ない、1 6 0 0 × g での遠心分離によっては行わなかった。5 日目についても、上清はプレートを逆さにすることによって除去した。

【 0 1 1 8 】

細胞生存度は、S T 1 9 2 6 とともに 2 4 時間インキュベーションし、化合物を除去してから 4 8 時間後に測定した。化合物との 2 4 時間のインキュベーションにより、細胞増殖を濃度依存的に阻害することができた。表 1 は I C 5 0 値 (細胞生存度を 5 0 % 阻害する化合物の濃度) を示す。これは調査したそれぞれの腫瘍細胞系について計算した。S T 1 9 2 6 はヒト前骨髄球性白血病腫瘍細胞系 N B 4 に対して、その他の腫瘍系に対して計算された値と比べておよそ 1 0 倍大きい細胞障害性を示した (I C 5 0 = 0 . 0 2 2 μ M) 。

30

【 0 1 1 9 】

【表 1】

ST1926 の細胞障害性

| 細胞系 | IC50 (μM) |
|------------|-----------|
| 前骨髄球性白血病 | |
| NB4 | 0.02 |
| HL-60 | 0.2 |
| 前立腺癌 | |
| PC3 | 0.21 |
| DU145 | 0.10 |
| 大腸癌 | |
| LoVo | 0.24 |
| 卵巣癌 | |
| A2780 | 0.10 |
| A2780/Dx | 0.20 |
| IGROV-1 | 0.23 |
| IGROV-1/Pt | 0.33 |
| メラノーマ | |
| MeWo | 0.23 |
| MeS 2.21 | 0.23 |
| グリア芽細胞腫 | |
| GBM | 0.18 |
| 肺癌 | |
| A431 | 0.25 |
| NCI-H460 | 0.19 |
| 骨肉腫 | |
| SAOS | 0.25 |
| U2OS | 0.26 |

【0120】

(実施例9)

腫瘍細胞周期に対するST1926の効果の評価

本発明による化合物の細胞周期の様々な時期に対する効果を評価するために、細胞蛍光測定法による細胞周期の分析を行なった。

【0121】

HL60またはNB4細胞を、10%FCSを含有するRPMI1640培地中に150.000細胞/mlの密度でプレートに播き、0.1%DMSOに溶解した0.01から0.1μMの濃度の被験化合物(ST1926)を、最適以下の用量のATRA(NB4については5-10nM、HL60については0.5μM)の存在下または不在下で暗条件で添加し、培地を交換せずに3日間インキュベーターに入れた。

【0122】

処理の3日目に、500.000の細胞をサンプリングし、180×gで5分間遠心分離し、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSで2回洗浄した。細胞(1mlの固定液当たり1×10⁶)を、-20℃に維持したアセトン/メタノール1:4v/vおよびカルシウムおよびマグネシウムを含まない50%のPBSからなる固定混合液中で少なくとも1時間固定した；次いで細胞を遠心分離し、カルシウムおよびマグネシウムを

まないPBSで洗浄し、そして再び遠心分離して洗浄した。細胞沈殿を200 μ lのヨウソ酸プロピジウム(100 μ g/ml)および200 μ lのRNase(150 KU/mg)とともに30分間暗条件下で室温でインキュベートした。

【0123】

サンプルをナイロンフィルター(直径60 - 80 μ m)でろ過し、細胞蛍光測定計FACSscan(Becton Dickinson)で、励起波長488 nm、発光波長620 nmで分析し、これは20000事象/サンプルを捕らえるものであった。細胞周期の時期のパーセンテージの分析は、専用ソフトウェアパッケージ、Modfit v. 2.0 (Becton Dickinson)を用いて行なった。

【0124】

前立腺癌細胞PC3の細胞周期の分析のために、細胞をRPMI培地中500000細胞/mlの密度でプレートに播いた。化合物ST1926での24時間の処理後、細胞を上記のようにして分析した。

【0125】

(実施例9/1)

ヒト前骨髄球性白血病NB4細胞の細胞周期に対するST1926の効果の評価

ST1926による処理(3日間)のNB4の細胞周期に対する効果の分析により、本発明による化合物は0.08および0.1 μ Mの濃度で細胞周期の複製S期における成長停止およびアポトーシスを誘導することが示された。得られた結果を表2に示す。

【0126】

【表2】

NB4の細胞周期に対するST1926の効果

| 処理 | G0/G1 | S | G2+M | アポトーシス |
|---------------------|-------|-------------|------|-------------|
| 対照 | 53.4 | 35.5 | 11.1 | 26.6 |
| ST1926 0.01 μ M | 48.4 | 38.8 | 12.8 | 19.9 |
| ST1926 0.02 μ M | 48.2 | 39.4 | 12.4 | 28.4 |
| ST1926 0.04 μ M | 51.3 | 35.7 | 13.0 | 33.9 |
| ST1926 0.08 μ M | 41.4 | 53.6 | 5.0 | 45.0 |
| ST1926 0.1 μ M | 50.6 | 46.1 | 3.3 | 53.6 |

【0127】

(実施例9/2)

ヒト前骨髄球性白血病HL-60細胞の細胞周期に対するST1926の効果の評価

ST1926による3日間の処理のHL-60細胞の細胞周期に対する効果の分析により、0.5および1 μ Mの濃度において、細胞周期は測定不能であるが、該化合物は強いアポトーシス促進効果を有することが示された。得られた結果を表3において報告する。

【0128】

【表 3】

ヒト 前骨髄球性 白血病 **HL-60** 細胞の細胞周期 に対する **ST1926** の効果

| 処理 | G0/G1 | S | G2+M | アポトーシス |
|-----------------------|-------|------|------|-------------|
| 対照 | 57.9 | 30.9 | 11.2 | 10.5 |
| ST1926 0.0025 μ M | 54.9 | 33.4 | 11.7 | 8 |
| ST1926 0.005 μ M | 53.4 | 34.4 | 12.2 | 14.0 |
| ST1926 0.01 μ M | 52.0 | 35.4 | 12.6 | 12.5 |
| ST1926 0.05 μ M | 45.0 | 42.0 | 13.0 | 13.0 |
| ST1926 0.1 μ M | 39.9 | 46.8 | 13.3 | 27.5 |
| ST1926 0.5 μ M | n.e. | n.e. | n.e. | 82 |
| ST1926 1 μ M | n.e. | n.e. | n.e. | 86.5 |

10

【 0 1 2 9 】

(実施例 9 / 3)

前立腺癌 PC3 細胞の細胞周期 に対する ST1926 の効果

ST1926 での 24 時間の処理の PC3 の細胞周期 に対する効果の分析により、処理の直後に被験化合物が調査した最高濃度 (0 . 4 μ M) においてアポトーシスを誘導することが示された；細胞収集の 24 時間後に細胞は S 期に蓄積したが、0 . 4 μ M 濃度では細胞のアポトーシスが誘導された。得られた結果を表 4 に報告する。

20

【 0 1 3 0 】

【表 4】

ヒト 前立腺癌 PC3 細胞の細胞周期 に対する ST1926 の効果

| 処理 | G0/G1 | S | G2+M | アポトーシス |
|---------------------------------------|-------|-------------|------|-----------|
| 処理 24 時間および 収集 0 時間 | | | | |
| 対照 | 54.8 | 24.6 | 20.6 | 8 |
| ST1926 0.02 μ M | 54.0 | 24.2 | 21.8 | 9 |
| ST1926 0.05 μ M | 55.8 | 23.6 | 20.6 | 11 |
| ST1926 0.1 μ M | 52.0 | 35.4 | 28.0 | 10 |
| ST1926 0.2 μ M | n.v. | n.v. | n.v. | 13.5 |
| ST1926 0.4 μ M | n.v. | n.v. | n.v. | 25 |
| 処理 24 時間および 収集 24 時間 | | | | |
| 対照 | 49.9 | 31.8 | 22.3 | 10.5 |
| ST1926 0.02 μ M | 44.6 | 30.4 | 25.0 | 13 |
| ST1926 0.05 μ M | 44.9 | 29.5 | 25.6 | 15 |
| ST1926 0.1 μ M | 45.8 | 25.8 | 28.4 | 10 |
| ST1926 0.2 μ M | 31.8 | 43.2 | 25.0 | 13 |
| ST1926 0.4 μ M | n.e. | n.e. | n.e. | 26 |

30

40

【 0 1 3 1 】

TRAIL (腫瘍壊死因子 - 関連アポトーシス - 誘導性リガンド) と組合せての ST1926 のインビトロでの細胞障害性活性

50

ナチュラルキラー細胞とともにリンパ球は、TNFサイトカインファミリー（腫瘍壊死因子）のメンバーであるTRAIL生成（腫瘍壊死因子 - 関連アポトーシス - 誘導性リガンド）に必要である。この膜タンパク質は広範な形質転換細胞においてアポトーシスを誘導し、このファミリーの他のメンバーと異なり、インビトロで正常細胞に対して細胞障害性ではないようである。TRAILは、2つのデスドメイン - 含有デス受容体DR4およびDR5と相互作用することによってアポトーシスを誘導する。それゆえ、TRAILは腫瘍選択的、アポトーシス誘導性サイトカインであると考えられ、癌の予防および治療の有望な新規候補化合物である（Neoplasia、6: 535-546、2001）。

【0132】

TRAILと組合せてのST1926の細胞障害性の研究は、M109マウス肺癌およびA2780/Dx多剤耐性ヒト卵巣癌の2種の腫瘍細胞系を用いて行なった。細胞を10% FCS、1% ピルビン酸ナトリウムおよび1% グルタミンを含有するRPMI 1640培地に維持した。

【0133】

細胞を96ウェルプレートに250 μ lの容積で播き、37℃で24時間インキュベートした。翌日、被験化合物ST1926[(2E)-3-[3'-(1-アダマンチル)-4'-ヒドロキシ[1,1'-ビフェニル]-4-イル]-2-プロペノエート/プロペン酸(propenoate/ic acid)]またはTRAILを種々の濃度で添加し、細胞をさらに72時間、37℃で5% CO₂を含有する加湿雰囲気中でインキュベートした。5日目に、上清をプレートを逆さにすることによって除去した。200 μ lのPBSおよび50 μ lの冷却した80% TCAを添加した。次いでプレートを氷上で少なくとも1時間インキュベートした。TCAをプレートを逆さにすることによって除去した；プレートを蒸留水地中に浸漬することによって3回洗浄し、まず紙上で乾燥させ、次いで熱気流で乾燥させた。すべてのウェルに、200 μ lの1% 酢酸中の0.4% スルホローダミンBを添加した。プレートを室温でさらに30分間インキュベートした。スルホローダミンBをプレートを逆さにすることによって除去し、プレートを1% 酢酸に浸漬することによって3回洗浄し、まず吸収紙で、次いで熱気流で乾燥させた。200 μ lの10mM Tris塩基をすべてのウェルに添加し、プレートを少なくとも20分間攪拌した。吸光度をMultiskan分光光度計を用いて540nmで測定した。

【0134】

ST1926とTRAILの間の相互作用は、Drewinko et al. (Cancer Biochem. Bio phys. 1: 187-195、1976)の分析法を用いて測定した。

分析は以下に行なった：

$(SF_a \times SF_b / S_f a + SF_b) / 100$ （ここでSF_aはST1926の生存画分(survival fraction)であり、SF_bはTRAILの生存画分である）。

値は以下の効果を示す：

値 > 1 相乗作用、< 1 拮抗作用、= 1 効果無し。

両方の細胞系において、ST1926はTRAILとの相乗活性を示した（図1および図2）。

【0135】

マウス肺癌モデルM109および3LLにおけるST1926の抗腫瘍活性

マウス肺腺癌Madison109細胞(M109)を腫瘍断片の皮下(s.c.)継代によって維持した。接種日に、細胞懸濁液を20g雄性BALB/cマウスの左後足に 3×10^5 細胞/マウスの密度で筋肉内注射した。3LLマウスLewis肺癌を常套方法によって、C57BL/6Jマウスにおいて 1×10^5 細胞/マウスの筋肉内継代(10-14日毎)によって維持した。抗腫瘍活性の実験のために、腫瘍をドナーマウスから切り出し、機械的脱分離(desegregation)および酵素消化の後に、腫瘍細胞生存度をトリパンブルー色素排除試験によって評価した。次いで、 1×10^5 細胞/100 μ l/マウスを、C57BL/6Jマウスの右後足の筋肉に筋肉内注射した。

【0136】

腫瘍の大きさの測定は、デジタルキャリパー (Vernier Caliper) を用いて塊が測定可能になった日から週に 2 回行なった。腫瘍塊は、mm で表した、2 つの主な寸法 (長さ と 幅) のサイズから、式 (長さ × 幅²) / 2、即ち、mm³ で表した腫瘍体積によって評価した。各実験群について、腫瘍体積の阻害の対照に対するパーセンテージ (TVI%)、即ち (100 - (T/C%)) を算出した。TVI は、ST1926 の最後の投与の 2 日後に評価した。

【0137】

平均生存時間 (MST) も測定し、(MST_T / MST_C) × 100 - 100 として計算される ILS% (寿命の増加) として表される平均寿命の増加を算出した。

【0138】

各群に付いて得られた TVI の値と生存時間の比較を、非対データ用の非パラメトリック Mann-Whitney 検定によって、GraphPad inc. からの InStat ソフトウェアを用いて行なった。

【0139】

ST1926 溶液は使用の直前に調製し、クレモフォア (cremophor) : エタノール 1 : 1 に可溶化し、次いで緩衝食塩水に 1 : 4 に希釈した。動物の処理は 10 ml / kg の容積で行なった。様々な用量の ST1926 の処理スキームは、5 日間連続 (qdx5)、腫瘍細胞の接種の 1 日後から開始し、3 サイクル繰り返した。

【0140】

マウス (各群に付き 8 匹) はまず、薬物投与期間にわたって観察される体重の最終的変動に基いて、物質を正確な量投与するために、そして、処理期間中の体重の最大減少 (BWL% max) を記録するために、各処理の前に体重を量った。

【0141】

結果を以下の表 5 において報告する。ST1926 は、処理プロトコール qdx5x3w によって、10 mg / kg、経口 (p.o.) および 15 mg / kg、腹腔内 (i.p.) の用量で、マウス肺腫瘍 M109 を有する動物の寿命を増加させ、腫瘍塊を阻害することが示された。

【0142】

さらに、ST1926 は 3LL - 腫瘍担持マウスの寿命を 10 mg / kg、経口 (p.o.) の用量で増加させ、腫瘍体積を 65% 減少させた。

【0143】

【表 5】

マウス 肺 M109 腫瘍に対する of ST1926 (qdx5x3w) の抗腫瘍活性

| 処理 | 用量 (mg/kg) | BWL% Max | MST (範囲日) | ILS% | TVI% |
|-------------|---------------|-------------|--------------|------|-------|
| M109 | | | | | |
| 対照 | / | 9 | 22 (13-34) | / | / |
| ST1926 | 10, i.p. | 9 | *28 (25-35) | 27 | 18 |
| ST1926 | 15, i.p. | 10 | **36 (30-42) | 64 | *46 |
| ST1926 | 10, p.o. | 10 | **35 (27-42) | 59 | *49 |
| 3LL | | | | | |
| 対照 | / | 3 | 21 (15-33) | / | / |
| ST1926 | 10, po | 7 | *32 (24-42) | 52 | ***65 |

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. 対照 (Mann-Whitney).

【0144】

ヒト卵巣癌モデル A2780 および A2780 / Dx およびヒト非小細胞肺癌 NCI -

H 4 6 0 における S T 1 9 2 6 の抗腫瘍活性

ヒト卵巣癌細胞 A 2 7 8 0、A 2 7 8 0 / D x および N C I - H 4 6 0 を 1 0 % F C S、2 m M グルタミン、5 0 μ g / m l ゲンタマイシンを含有する R P M I - 1 6 4 0 に、3 7 °C で 5 % C O₂ を含有する加湿雰囲気下で維持した。細胞をトリプシン処理し、完全培地中に回収し、およそ 1 1 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離し、沈殿をハンス 1 9 9 培地に再懸濁した；この操作を 2 回行なった。細胞を 2.0×10^6 / m l の密度でハンス 1 9 9 培地に再懸濁し、0.1 m l (2×10^6 細胞 / マウスに相当) を 6 週齢の雌性 C D 1 n u / n u マウスの右脇腹に皮下注射した。

【 0 1 4 5 】

S T 1 9 2 6 溶液は使用の直前に調製し、クレモフォア：エタノール 1：1 に可溶化し、次いで緩衝食塩水で 1：4 に希釈した。動物の処理は 1 0 m l / k g の容積を投与することで行なった。種々の用量の S T 1 9 2 6 の処理プロトコールは、5 日間連続 (q d x 5)、腫瘍細胞接種の 1 日後から開始して 3 サイクル繰り返した。

【 0 1 4 6 】

腫瘍の大きさの測定は、デジタルキャリパー (Vernier Caliper) を用いて塊が測定可能になった日から週に 2 回行なった。腫瘍塊は、mm で表した、2 つの主な寸法 (長さ と 幅) のサイズから、式 (長さ \times 幅²) / 2、即ち、mm³ で表した腫瘍体積によって評価した。各実験群について、腫瘍体積の阻害の対照に対するパーセンテージ (T V I %)、即ち (1 0 0 - (T / C %)) を算出した。T V I は、S T 1 9 2 6 の最後の投与の 2 日後に評価した。

【 0 1 4 7 】

対照群の腫瘍の重さが 2 g となるまでマウスを測定し、次いで頸部脱臼によってマウスを屠殺した。

【 0 1 4 8 】

各群に付いて得られた T V I の値の比較を、非対データ用の非パラメトリック Mann Whitney 検定によって、GraphPad inc. からの InStat ソフトウェアを用いて行なった。

【 0 1 4 9 】

マウスは、まず、薬物投与経過に渡って観察され得る変化に基いて正確な量の物質を投与するため、そして処理期間中の体重の最大減少 (B W L % m a x) を記録するために、各処理の前に体重を量った。

【 0 1 5 0 】

結果を以下の表 6 において報告する。この場合も S T 1 9 2 6 は、処理プロトコール q d x 5 x 3 w によって、15 から 5 m g / k g、経口 (p.o.) の範囲の用量で、ヒト卵巣腺癌 A 2 7 8 0、多剤耐性 A 2 7 8 0 / D x およびヒト非小細胞肺癌 N C I - H 4 6 0 を有するマウスの腫瘍塊を阻害した。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

【表 6】

ヒト 卵巣癌 A2780, A2780/Dx および 非小細胞肺癌 NCI-H460 に対する
ST1926 (qdx5x3w)の抗腫瘍活性

| 処理 | 用量 (mg/kg) | BWL% Max | 死亡率 | TVI%±SE |
|-----------------|---------------|-------------|-----|---------|
| A2780 | | | | |
| 対照 | / | 0 | 0/8 | / |
| ST1926 | 5, p.o. | 3 | 0/8 | *34±8 |
| ST1926 | 10, p.o. | 5 | 0/8 | *39±5 |
| A2780/Dx | | | | |
| 対照 | / | 0 | 0/8 | / |
| ST1926 | 10, po | 0 | 0/8 | *34±3 |
| ST1926 | 15, po | 6 | 0/8 | *54±9 |
| NCI-H460 | | | | |
| 対照 | / | | | |
| ST1926 | 15, po | 4 | 0/8 | *40±2 |

*P<0.05 vs. 対照.

【 0 1 5 2 】

ST1926は、スケジュール q d x 4 x 3 w により、15 mg / kg、経口(p.o.)
の用量でタキソールと併用しても併用しなくても（スケジュール q 7 d x 3 により 15 mg / kg、腹腔内(i.p.)）NCI-H460 非小細胞肺癌において有効であることが示された（表 7）。

【 0 1 5 3 】

【表 7】

タキソール(q7dx3)有りおよび無しの非小細胞 肺癌 NCI-H460 に対する
ST1926 (qdx4x3w)の抗腫瘍活性

| 処理 | 用量 (mg/kg) | BWL% max | 死亡率 | TVI%±SE |
|----------------|------------------|-------------|-----|---------|
| 対照 | / | 3 | / | / |
| ST1926 | 15, po | 14 | 0/8 | **38±8 |
| タキソール | 15, ip | 4 | 0/8 | 0 |
| 1926+ タキソール | 15, po 15, ip | 16 | 0/8 | **°56±6 |

**P<0.01 vs 対照; °P<0.05 vs ST1926 (Mann-Whitney).

【 0 1 5 4 】

ST1926は、スケジュール q d x 3 x 3 w によって 15 mg / kg、経口(p.o.)の
用量で投与した場合有意な抗腫瘍活性を示した（表 8）。

【 0 1 5 5 】

【表 8】

非小細胞 肺癌 NCI-H460 に対する ST1926 (qdx3x3w) の抗腫瘍活性

| 処理 | 用量 (mg/kg) | BWL% max | 死亡率 | TVI%±SE |
|--------|---------------|-------------|-----|---------|
| 対照 | / | 3 | / | / |
| ST1926 | 15, po | 4 | 0/8 | *52±7 |

*P<0.05 vs 対照 (Mann-Whitney).

10

【 0 1 5 6 】

ウシ副腎微小循環(microcircle) 内皮 (B M E C) 細胞系に対する S T 1 8 7 9 の細胞障害性

以下のようにして新鮮なウシ副腎から以前に調製した内皮細胞系 B M E C を用いた。副腎を屠殺直後に動物から取り出し、実験室に届くまで氷中で保存した。無菌条件 (バイオハザード層流フード (Bio-Hazard laminar flow hood)) 中で、副腎をベータグイン溶液中で 5 分間洗浄し、次いで 2 リットルの無菌 P B S で洗浄した。副腎を次いで無菌使い捨てメスで切断して約 2 mm の断片にし、P B S (副腎あたり 3 0 m l) を含有するポリスチレンファルコン (Falcon) チューブに移した。冷凍遠心機での 4 、 6 0 0 r p m の遠心分離の後、上清をデカントして捨てた。ペレットを等量 (沈殿物の体積に対して) の 0 . 1 2 % コラゲナーゼ A (Boehringer Mannheim) に再懸濁し、3 7 で 2 時間攪拌しながらインキュベートした。その後、まず 2 0 0 メッシュ、次いで 1 0 0 メッシュでのフィルター (Sigma) を通し、上清を 1 5 % D M E M F B S の溶液に添加してコラゲナーゼ A の作用を阻害した。溶液を 1 0 0 0 r p m で室温で遠心分離して、沈殿を 2 0 % F B S 、5 0 μ g / m l のウシ脳抽出物 (B B E) 、5 0 μ g / m l ヘパリン (Sigma) 、0 . 5 % v / v ゲンタマイシン (Sigma) 、1 % v / v L - グルタミンを含有する D M E M 培地に再懸濁し、1 % ゼラチン (ブタゼラチン Sigma) によりゼラチン化したペトリ皿に播いた。集密に達すると、細胞を因子 VIII などの内皮マーカーで特徴付けた。

20

【 0 1 5 7 】

細胞障害性試験は B M E C 細胞を用いて行なった。細胞を 9 6 ウェルプレートに 2 0 0 μ l の容積で播き、2 4 時間 3 7 でインキュベートした。翌日、被験化合物 S T 1 8 7 9 を 2 0 0 μ M から 1 . 5 6 μ M の種々の濃度で添加した。細胞をさらに 3 7 で 2 4 時間 5 % C O ₂ を含有する加湿雰囲気中でインキュベートした。3 日目、培地をプレートを逆さにすることによって捨て、プレートの 3 日目の洗浄は、プレートを逆さにし、3 0 0 μ l の P B S を添加することを 4 回繰り返すことによって行なった。洗浄後、前述のようにゼラチン上に播くために使用する 2 0 0 μ l / ウェルの培地を添加した。5 日目に、培地をプレートを逆さにすることにより捨て、細胞を冷却した 1 5 % T C A 溶液で 1 時間処理した。ウェルをプレートを水に浸漬して逆さにして水を捨てることによって水で 3 回洗浄した。各ウェルに 1 % 酢酸中の 2 0 0 μ l の 0 . 4 % スルホローダミン B を添加した。プレートを室温でさらに 3 0 分間インキュベートした。スルホローダミン B をプレートを逆さにすることによって捨て、プレートを 1 % 酢酸に浸漬することによって 3 回洗浄し、まず吸収紙で、次いで熱気流で乾燥させた。各ウェルに、2 0 0 μ l の 1 0 m M T r i s 塩基を添加し、プレートを少なくとも 2 0 分間振盪しながら放置した。吸光度を Multiskan 分光光度計を用いて 5 4 0 n m で測定した。

30

40

【 0 1 5 8 】

S T 1 8 7 9 との 2 4 時間のインキュベーションによる細胞の生存度を化合物を除去した 4 8 時間後に測定した。化合物との 2 4 時間のインキュベーションにより濃度依存的に細胞増殖を阻害することができた。表 5 は算出した I C ₅₀ 値 (細胞生存度を 5 0 % 阻害する化合物の濃度) を示す。S T 1 8 7 9 は 1 0 5 μ M に対応する弱い細胞障害性、2 5 μ M に対応する非毒性濃度を示した。これを後に S T 1 8 7 9 の内皮細胞遊走に対する効

50

果の研究に用いた（表 9 を参照されたい）。

【 0 1 5 9 】

【表 9】

内皮細胞に対する **ST1879** の細胞障害性

| 細胞系 | IC ₅₀ ±SD (μM) | IC ₀ |
|------|---------------------------|-----------------|
| BMEC | 105±14 | 25 μM |

【 0 1 6 0 】

内皮 BMEC 細胞走化性

ST1879 の内皮細胞走化性に対する効果を評価するために、ボイデンチャンバを用いた。これは 2 つのウェルを有するチャンバからなり、その一方は下部、他方は上部にあり、規定孔サイズ 8 μm のポリカーボネートフィルターによって分離されている。下方のウェルには DMEEM 中の化学遊走因子、1 % FBS を入れ、上方のウェルには 1 % 脂肪酸非含有ブタ血清アルブミンを含有する DMEEM に懸濁したウシ副腎微小循環 (subrenal microcircle) 内皮細胞 (BMEC) を入れた。ST1879 のポリカーボネートフィルターを通る化学遊走因子に向かう細胞遊走の阻害能力を、フィルターの下方に存在する細胞数を計数することによって定量的に評価した。表 8 において報告する遊走のパーセンテージは、式：(処理 - 対照 / 対照) × 100 にしたがって算出した。ST1926 は、50 および 25 μM の濃度で化学遊走刺激因子 FCS に向かう BMEC 細胞の走化性の阻害を示した（表 10）。

【 0 1 6 1 】

【表 10】

ST1879 によって誘導される BMEC 細胞の遊走の阻害

| 細胞系 | % 遊走の阻害 | |
|------|---|---|
| | 50 μM | 25 μM |
| BMEC | 91% (6.1 細胞±2.4 vs 対照中 72.1±7.4 細胞) | 42.7% (41.3 細胞±10.2 vs 対照中 72.1±7.4 細胞) |

【 0 1 6 2 】

マトリゲル上での HUVEC 細胞の分化に対する ST1879 の効果

マトリゲル上での内皮細胞の分化アッセイは、化合物の抗血管新生活性を評価するために一般的に用いられるアッセイである。マトリゲルは腫瘍から再構築された基底膜抽出物であり、主にラミニンおよびコラーゲン IV からなり、この上に内皮細胞が毛細血管と類似した 3 次元構造において組織化する。網状組織強度は 3 以上の管状構造が発する交差点によって規定される「ノード」を顕微鏡で計数することにより測定できるし、あるいは、コンピュータ化された画像システムによって毛細血管構造によって占められた領域のパーセンテージを計算することにより測定できる。

【 0 1 6 3 】

4 でマトリゲル (Becton-Dickinson) を 24 ウェルプレートに入れ、インキュベーター中、37 で 30 分間ゲル化させた。ヒト - 臍帯内皮細胞 HUVEC (Clonetics) を 500 μl の培地に非毒性濃度である 25 μM の ST1879 の存在下または不在下で再懸濁し、マトリゲル上に播いた。5 時間のインキュベーション後、細胞を PBS 中の 4 % パラホルムアルデヒド溶液で固定化した。結果を 3 つの別々の領域の、ノードの数 / 領域を顕微鏡で計数することによって定量し、陽性対照に対するパーセンテージとして表した。

【 0 1 6 4 】

ST1879はマトリゲル上で25 μ Mの濃度で内皮細胞の分化を61%阻害することが示された(表11)。

【0165】

【表11】

ST1879によって誘導される HUVEC 細胞分化の阻害

| 細胞系 | % マトリゲル上の分化の阻害 |
|-------|---|
| HUVEC | ST1879 (25 μ M)= 61% (8.2 ノード vs 対照中 21.2 ノード) |

10

【0166】

ヒト腫瘍細胞系に対するST1879およびST1898の細胞障害性

10%ウシ胎仔血清(FCS)および1%グルタミンを含有するRPMI 1640に維持したヒト急性前骨髄球性白血病細胞系NB4を用いて細胞障害性試験を行なった。

【0167】

さらに2種の固形腫瘍細胞系も用いた：

1. ヒト前立腺癌PC3。この細胞系を10%FCS、1%ピルビン酸ナトリウムおよび1%グルタミンを含有するRPMI 1640培地に維持した。
2. ヒト大腸腺癌LoVo。この細胞系を10%FCSおよび1%グルタミンを含有するHAM's F-12培地に維持した。

20

【0168】

細胞障害性試験は10000のNB4細胞/ウェルを用いて行なった。細胞を96ウェルプレートに250 μ lの容積で播き、37℃で24時間インキュベートした。翌日、被験化合物ST1879を様々な濃度で添加し、細胞をさらに24時間、37℃で5%CO₂を含有する加湿雰囲気中でインキュベートした。3日目、培地をプレートを1600 x gで10分間遠心分離することによって除き、上清をデカントした。250 μ lのPBSを添加した；次いでプレートを再び1600 x gで10分間遠心分離し、上清をデカントして捨てた。200 μ l/ウェルの10%FCSを含有するRPMI 1640培地を添加し、プレートを37℃でさらに48時間インキュベートした。5日目、プレートを再び1600 x gで10分間遠心分離し、培地をプレートを逆さにすることによって除去し、200 μ lのPBSおよび50 μ lの80%冷却TCAを添加した。プレートを次いで氷中で少なくとも1時間インキュベートした。TCAをプレートを逆さにすることによって除去した；プレートを蒸留水に浸漬することによって3回洗浄し、まず紙上で、次いで熱気流で乾燥した。各ウェルに、1%酢酸中の200 μ lの0.4%スルホローダミンBを添加した。プレートを室温でさらに30分間インキュベートした。スルホローダミンBをプレートを逆さにすることによって除去し、プレートを1%酢酸に浸漬することによって3回洗浄し、次いで、まず吸収紙で、次に熱気流で乾燥した。各ウェルに200 μ lの10 mM Tris塩基を添加し、プレートを少なくとも20分間振盪した。吸光度をMultiskan分光光度計を用いて540 nmで測定した。

30

40

【0169】

接着細胞系PC3およびLoVoについて同じ手順を用いたが3日目のプレートの洗浄は、プレートを逆さにすることとPBSの添加によって3回行ない、1600 x gでの遠心分離は行なわなかった。5日目に付いても、上清はプレートを逆さにすることによって除去した。

【0170】

ST1879またはST1898との24時間のインキュベーションによる細胞生存度を化合物の除去の48時間後に測定した。化合物との48時間のインキュベーションは、濃度依存的に細胞増殖を阻害するのに十分であった。表10は試験した腫瘍細胞系についてそれぞれ計算したIC50値(細胞生存度を50%阻害する化合物の濃度)を示す。S

50

T 1 8 7 9 は、L o V o 細胞 (I C 5 0 = 5 . 2 μ M) に対して、前立腺癌系 P C 3 (I C 5 0 = 1 3 . 6 μ M) およびヒト前骨髄球性 N B 4 系 (5 8 . 5 μ M) に対して計算されたものよりも大きな細胞障害性を示した。S T 1 8 9 8 もまた、大腸癌腫 L o V o に対してより活性であることが示された (表 1 2 を参照されたい)。

【 0 1 7 1 】

【 表 1 2 】

ST1879 および ST1898 の細胞障害性

| 被験化合物 | 細胞系 | IC50 \pm SD (μ M) |
|--------|------|--------------------------|
| ST1879 | NB4 | 58.5 \pm 3.2 |
| ST1879 | PC3 | 13.6 \pm 2.1 |
| ST1879 | LoVo | 5.2 \pm 0.9 |
| ST1898 | NB4 | 8.8 \pm 0.6 |
| ST1898 | PC3 | 1.7 \pm 0.2 |
| ST1898 | LoVo | 0.38 \pm 0.02 |

10

【 0 1 7 2 】

S T 1 8 7 9 および S T 1 8 9 8 の N B 4 細胞に対する分化促進効果

20

N B 4 細胞を 1 0 % 胎児血清を含有する R P M I 1 6 4 0 培地に 1 5 0 0 0 0 細胞 / m l の密度でプレートに播いた。細胞を次いで 0 . 4 μ M から 0 . 0 1 μ M の様々な濃度の S T 1 8 7 9 または S T 1 8 9 8 で処理し、3 日間インキュベーターに入れておき培地交換はしなかった。分化促進効果を測定するために、各サンプルから 5 0 0 0 0 0 細胞を収集し、遠心分離し、1 0 % 血清、1 m g / m l ニトロブルーテトラゾリウム (N B T) および 1 0 0 n g の P M A (フォルボールミリスチル酢酸) を含有する 1 m l の R P M I 1 6 4 0 培地に再懸濁した。上記のように再懸濁した細胞を、3 7 $^{\circ}$ C で 6 0 分間インキュベートした。インキュベーションの最後に細胞を遠心分離し、沈殿を 1 m l の 1 0 % T r i t o n x 1 0 0 を含有する P B S に再懸濁した。サンプルを超音波処理して溶解し、次いで分光光度計で 5 4 0 n m の波長の読みを得た。分化した細胞を含有するサンプルは紫がかかった色になり、対照サンプルおよび / または分化した細胞を含まないサンプルは白色のままであるか、弱く着色した。S T 1 8 7 9 または S T 1 8 9 8 の分化促進作用を A C 5 0 (5 0 % の細胞分化を活性化する濃度) について評価した。これを以下に報告する。S T 1 8 9 8 は A C 5 0 値が 1 9 n M であることから判定できるように、良好な分化促進能力を有することが示された (表 1 3 を参照されたい)。

30

【 0 1 7 3 】

【 表 1 3 】

NB4 細胞に対する ST1879 および ST1898 の分化促進効果

| 化合物 | AC50 (nM \pm SD) |
|--------|--------------------|
| ST1879 | 55 \pm 9 |
| ST1898 | 19 \pm 0.8 |

40

【 0 1 7 4 】

ニワトリ絨毛尿膜 (C A M) モデルにおける S T 1 8 7 9 、 S T 1 9 2 6 および S T 1 8 9 8 の血管形成抑制 (Angiostatic) 活性

ニワトリ絨毛尿膜は非常に血管新生化した膜であり、血管が発達の 4 日目において現れ、発達の 8 日目において動脈血管系 (arteriovenal system) が発達し、1 1 日目まで活動的に増殖する。

50

【 0 1 7 5 】

この研究の目的は、基底状態および血管増殖(vasoprolifcation)の誘導物質 b F G F (塩基性線維芽細胞成長因子)の存在下での C A M における血管の発達を調べることである。この研究にはその発達の初期段階のニワトリ胚性卵を用いた。発達の3日目に殻を開ける操作を行い、C A M の血管を目視できるようにした。発達の9日目に約 1 mm^3 の無菌ゼラチン (GELFOAM Pharmacia-Upjohn) の断片を、C A M 表面に導入し、そのうえに b F G F (50 ng / 胚) または問題の化合物を3日間連続して投与することにより処理した。

【 0 1 7 6 】

分子の血管増殖に対する効果の評価は、処理0時の血管と後の時間 (1 2 日目) の血管を比較することによって得た。

10

【 0 1 7 7 】

表 1 4 において結果を報告する。3つの化合物は 0.25 から $0.5\text{ }\mu\text{g / 胚}$ の濃度においてニワトリ絨毛尿膜モデルにおいて血管形成抑制活性を有することが示された (表 1 4)。

【 0 1 7 8 】

【表 1 4 】

ST1879, ST1926, ST1898 の血管形成抑制活性

| 処理 | 濃度($\mu\text{g / 胚}$) | n | 9 日目 (T0) | 12 日目 (72 時間) | Δ 血管 |
|-----------|-------------------------|---|--------------|------------------|--------------------|
| bFGF | 0.05 | 7 | 5 ± 1 | 19 ± 1 | 15 ± 1 |
| bFGF+1879 | 0.05+0.5 | 6 | 4 ± 1 | 8 ± 1 | 4 ± 1 (-73%) |
| bFGF | 0.05 | 6 | 3 ± 1 | 22 ± 1 | 19 ± 1 |
| bFGF+1926 | 0.05+0.25 | 8 | 3 ± 1 | 12 ± 2 | 9 ± 2 (-53%) |
| bFGF | 0.05 | 4 | 3 ± 1 | 28 ± 2 | 24 ± 1 |
| bFGF+1898 | 0.05+0.25 | 6 | 3 ± 1 | 10 ± 1 | 7 ± 1 (-71%) |

20

30

【 0 1 7 9 】

結果は、スポンジ当たりの血管の数の平均 \pm S E である。

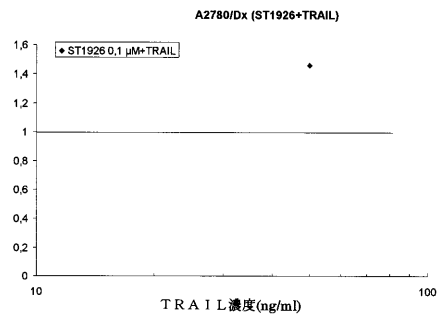
【図面の簡単な説明】

【 0 1 8 0 】

(原文に記載なし)

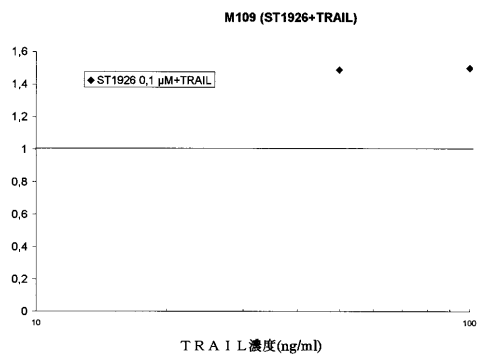
【 図 1 】

Figure 1.



【 図 2 】

Figure 2.



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

| | | |
|---------------------------|-----------------|-------|
| A 6 1 K 31/4035 (2006.01) | A 6 1 K 31/4035 | |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | |
| A 6 1 P 17/06 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 17/06 | |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 | |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 | |
| C 0 7 C 43/23 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |
| C 0 7 C 59/72 (2006.01) | C 0 7 C 43/23 | C |
| C 0 7 C 69/732 (2006.01) | C 0 7 C 59/72 | |
| C 0 7 C 69/734 (2006.01) | C 0 7 C 69/732 | Z |
| C 0 7 C 69/736 (2006.01) | C 0 7 C 69/734 | Z |
| C 0 7 C 229/34 (2006.01) | C 0 7 C 69/736 | |
| C 0 7 D 209/48 (2006.01) | C 0 7 C 229/34 | |
| C 0 7 D 317/54 (2006.01) | C 0 7 D 209/48 | |
| C 0 7 F 7/18 (2006.01) | C 0 7 D 317/54 | |
| | C 0 7 F 7/18 | A |
| | C 0 7 F 7/18 | J |

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 ルチョ・メルリニ

イタリア、イ - 2 0 1 3 3 ミラン、ヴィア・チェロリア 2 番、ディパルティメント・ディ・シエンツェ・アグロアリメンタリ、ユニヴェルシタ・デリ・ストゥディ・ディ・ミラノ

(72)発明者 サブリナ・ダッラヴァッレ

イタリア、イ - 2 0 1 3 3 ミラン、ヴィア・チェロリア 2 番、ディパルティメント・ディ・シエンツェ・アグロアリメンタリ、ユニヴェルシタ・デリ・ストゥディ・ディ・ミラノ

(72)発明者 セルジョ・ペンコ

イタリア、イ - 2 0 1 5 3 ミラン、ヴィア・ミリー・カルラ・ミニョーネ 5 番

(72)発明者 ジュゼッペ・ジャンニーニ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 クラウディオ・ピサノ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

(72)発明者 ロレダナ・ヴェシ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ベル・アチオニ内

審査官 木村 敏康

(56)参考文献 J. Med. Chem. 2003, 46, p909-912

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07C 59/54