

(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 1

<b>C07C 59/54</b>	<b>(2006.01)</b>	C07C 59/54
<b>A61K 31/085</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/085
<b>A61K 31/192</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/192
<b>A61K 31/216</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 31/216
<b>A61K 31/36</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 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) 國際出願番号	PCT/IT2002/000474
(87) 國際公開番号	W02003/011808
(87) 國際公開日	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 マチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル ・アチオニ S I G M A - T A U I N D U S T R I E F A R M A C E U T I C H E R I U N I T E S O C I E T A P E R A Z I O N I イタリアOO144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

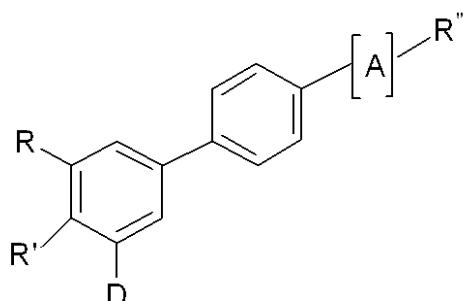
(54) 【発明の名称】抗血管新生、抗腫瘍性およびアポトーシス促進性の活性を有するレチノイド誘導体

## (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<sup>I V</sup>を表す；R'-Dは、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Oを表す；ここでn=1-3である；Dは、H、OH、O-アルキル、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-アルキル、または(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OHを表し、n=1-4である；

10

20

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<sub>3</sub>H、またはまたはD-またはL-グリコシルを表す；  
 R <sup>I</sup> <sub>V</sub>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<sup>V</sup>, R<sup>V</sup><sub>I</sub>) - C(R<sup>V</sup><sub>I</sub><sub>I</sub>, R<sup>V</sup><sub>I</sub><sub>I</sub><sub>I</sub>)]<sub>n</sub>、[C(R<sup>I</sup>X) = C(R<sup>X</sup>)]<sub>n</sub>、または[C C]<sub>n</sub>を表し、n = 1である；  
 R<sup>V</sup>、R<sup>V</sup><sub>I</sub>、R<sup>V</sup><sub>I</sub><sub>I</sub>、R<sup>V</sup><sub>I</sub><sub>I</sub><sub>I</sub>は、独立に、H、またはアルキルを表す；  
 R<sup>I</sup>X、R<sup>X</sup>は、H、OH、ハロゲン、アルキル、アリール、CN、NO<sub>2</sub>、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。

30

## 【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。

## 【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。

40

## 【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、单核球性白血病、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。

## 【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、ビ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、TRAIL（腫瘍壞死因子 - 関連アポトーシス - 誘導性リガンド）、DR4またはDR5受容体（TRAIL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】**

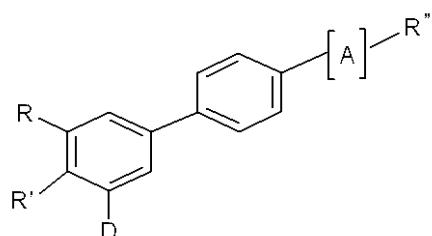
**【技術分野】**

**【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。 20

**【0002】**

**【化1】**



(I)

[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CH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、CH<sub>2</sub>のうち1つは、O、S、CH-ハロゲン、CH-アリール、CH-ヘテロアリール、CH-アリールアルキル、CH-ヘテロアリールアルキル、CH-アミノによって置換されていてもよい）を表す；

R'は、OR'''、OCOR'''、COR<sup>I</sup>Vを表す；

R'-Dは、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O；（ここでn=1-3）を表す；

Dは、H、OH、O-アルキル、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-アルキル、(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH（ここでn=1-4）を表す；

R''は、テトラゾール、SO<sub>3</sub>H、NHSO<sub>3</sub>H、CHO、COOH、COO-アルキル、CONHOH、CONH-アリール、CONH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH、CH<sub>2</sub>OR'''；PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>；CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-アリール（ここでn=0-4）を表す； 40

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<sub>3</sub>H、またはD-およびL-グリコシルを表す；

R<sup>I</sup>Vは、H、OH、OR'''を表す；

[A]は、[C(R<sup>V</sup>, R<sup>V</sup>I) - C(R<sup>V</sup>I I, R<sup>V</sup>I I I)]<sub>n</sub>、[C(R<sup>I</sup>X) = C(R<sup>X</sup>)]<sub>n</sub>、[C C]<sub>n</sub>（ここでn=0-3）を表す；

R<sup>V</sup>、R<sup>V</sup>I、R<sup>V</sup>I I、R<sup>V</sup>I I Iは、H、アルキル、ハロゲン、OH、OR'''、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、アリール、-O-、-CH<sub>2</sub>-、CX<sub>2</sub>-（ここでXはハロゲン）、-CH(R''')-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、NO<sub>2</sub>、COOR等を表す]。

【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。

【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。

【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、組織灌流が不充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、血管新生は不充分な灌流、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つたような状況において起こる。

【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; Baumwini JK; Curr. Opin., Chem., Biol., 3(4):500-9, 1999 Aug.)。

【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有る。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

10

20

30

40

50

って促進される。

【0015】

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.)。

【0016】

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

【0017】

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ヌ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產生される血管新生 - 刺激因子を含んでいる (EASF)。

【0018】

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。

【0019】

その他にも異常な血管新生に関連する疾患がある。

20

【0020】

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。

【0021】

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。

【0022】

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

【0023】

最近みいだされたレチノイドに属する化合物である CD437 (Cancer Research、2002; 62(8)、2430-6; Blood、2000; 95、2672-82; Leukemia、1999、13、739-49; Cancer Letters、1999、137、217-2) は RAR に対して選択的であり、ATRA - 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 WO 9703682 号; J.Med.Chem. 1995、38、4993-5006)。CD437 および例えシス - TTNPB 誘導体 (脂環式(ac.) テトラメチル - テトラヒドロ - ナフタレン - プロペニルベンゾエート) など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

【0024】

また、合成によって得られるレチノイドの中には、例えば、TAC-101 [Clin.Cancer Res. 1999、5,2304-10] または RE-80、AM-580 あるいは Am-80 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】

【0025】

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。

**【0026】**

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】**

**【0027】**

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

**【0028】**

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。

**【0029】**

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

**【0030】**

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(metastatation)、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。

**【0031】**

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

**【0032】**

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。

**【0033】**

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。

**【0034】**

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

**【0035】**

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。

**【0036】**

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、 トボ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、 ピ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 ( 例えればイレッサ (Iressa) またはグリベック (Glivec) )、 TRAIL ( 腫瘍壞死因子 - 関連アポトーシス誘導性リガンド )、 DR4 または DR5 受容体 ( TRAIL 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、 肿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、 肿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

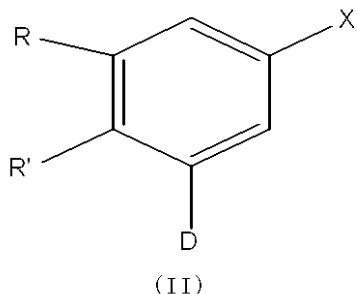
**【 0 0 4 1 】**

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)

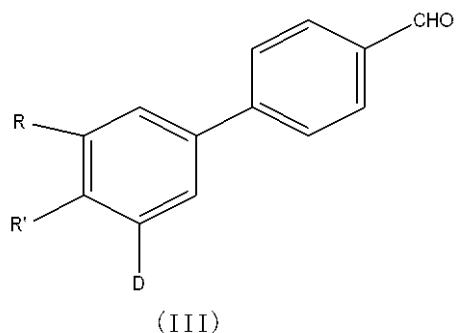
式 (I) の化合物は、 式 (II) の化合物

**【 化 2 】**



[ 式中、 R、 R' および D は、 式 (I) について記載したものと同じ意味であり、 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 (III) のアルデヒドを得ることによって調製した。 40

## 【化3】



10

## 【0042】

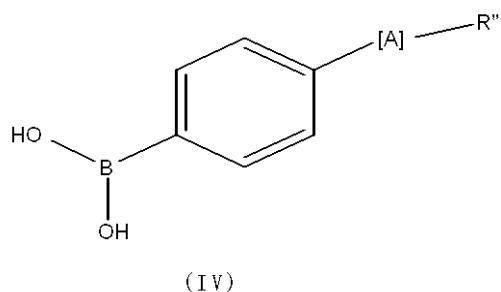
式(IICI)の化合物[式中、R、R'およびDは前記と同じ意味である]を、文献に記載されている周知の手順にしたがって[例えば、Wittig反応(Org. Reactions, Vol.14)、Wadsworth-Horner-Emmons反応(Org. Reactions, Vol.25)、Knoevenagel反応(Org. Reactions, Vol.15)、Henry反応(Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Vol. 10/1, p. 250)、Darzens反応(Org. Reactions, Vol.5)など]反応させて一般式(I)の化合物[式中、[A]は、C(R<sup>V</sup>, R<sup>V</sup>I) = C(R<sup>V</sup>II, R<sup>V</sup>III)を表し、R<sup>V</sup>, R<sup>V</sup>I, R<sup>V</sup>II, R<sup>V</sup>IIIはH、アルキル、ハロゲン、OH、OR'''、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、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】



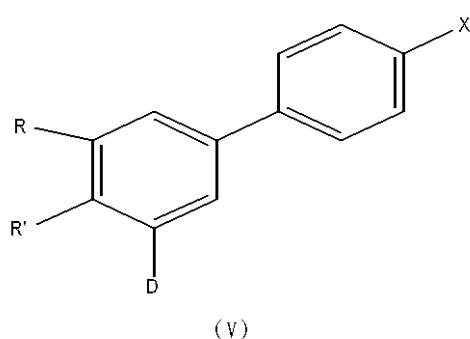
30

[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<sup>V</sup>, R<sup>V</sup>I) = C(R<sup>V</sup>II, R<sup>V</sup>III)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 $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VI}I)$ ,  $R^{VI}I$ ]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 $C(R^V, H) - C(H, R^{VI}I)$ であり $R^V, R^{VI}I$ が $-CH_2-$ である]は、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VI}I, R^{VI}I)$ 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 $C(R^V, H) - C(H, R^{VI}I)$ を表し、 $R^V, R^{VI}I$ は-Oを表す]は、一般式(I)の化合物[式中、[A]は $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VI}I, R^{VI}I)$ 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 $C(R^V, R^{VI}) = C(R^{VI}I, R^{VI}I)$ 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リ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リルアミンとの反応、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、LiAlH<sub>4</sub>による還元)によって調製することができる。

#### 【実施例1】

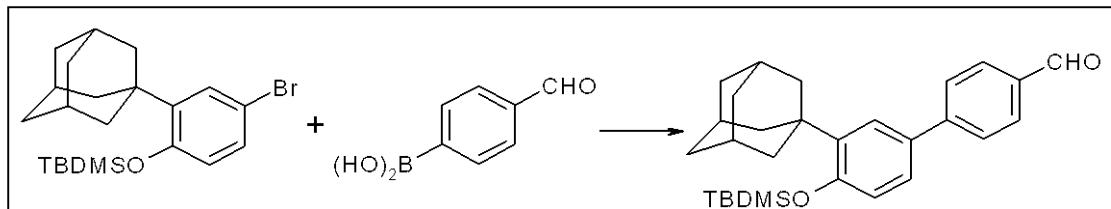
#### 【0051】

4 - ( 3 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - t e r t - プチルジメチル - 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

**【0052】**

1 . 5 6 g ( 3 . 7 0 m m o l ) の 4 - t e r t - プチルジメチルシリルオキシ - 3 - ( 1 - アダマンチル ) - ブロモベンゼン [ Charpentier et al. J. Med. Chem.、 1995、 38 、 4993-5006 ] を、 7 . 5 m l のトルエンに溶解した。 3 . 7 m l の 2 M N a \_ 2 C O \_ 3 水溶液、 0 . 1 2 8 g ( 0 . 1 1 m m o l ) 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 6 1 0 m g ( 4 . 0 7 m m o l ) の 4 - ホルミルベンゼンボロン酸の 1 . 7 3 m l 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、 N a C l 飽和溶液で洗浄した。

20

**【0053】**

相を分離し、有機相をろ過し、 N a \_ 2 S O \_ 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 . 0 9 g の表題の化合物を得た。

**【0054】**

M . p . 1 5 8 .

<sup>1</sup> H N M R ( C D C l \_ 3 ) : 0 . 3 7 ( 6 H、 s、 - S i ( C H \_ 3 ) \_ 2 ) ; 1 . 0 5 ( 9 H、 s、 - t - B u ) ; 1 . 7 8 ( 6 H、 s、 6 A d . ) ; 2 . 0 9 ( 3 H、 s、 3 A d . ) ; 2 . 1 5 ( 6 H、 s、 6 A d . ) ; 6 . 8 8 ( 1 H、 d、 1 A r、 J = 8 . 5 4 H z ) ; 7 . 3 5 ( 1 H、 d d、 1 A r、 J = 2 . 2 4 H z、 J = 8 . 5 4 H z ) ; 7 . 5 1 ( 1 H、 d、 1 A r、 J = 2 . 2 4 H z ) ; 7 . 7 0 ( 2 H、 d、 2 A r、 J = 8 . 1 4 H z ) ; 7 . 9 0 ( 2 H、 d、 2 A r、 J = 8 . 1 4 H z ) ; 1 0 . 0 1 ( 1 H、 s、 - C H O )

30

**【実施例 2】**

**【0055】**

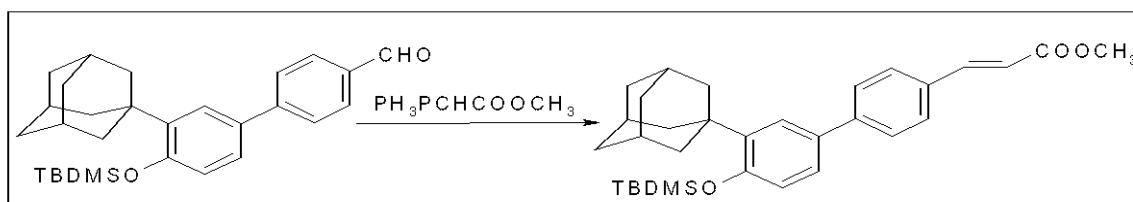
メチル E - 4 - ( 3 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - t e r t - プチルジメチルシリルオキシフェニル ) シンナメート (cinnamate) の調製

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】**

40

合成図式 2



**【0056】**

3 8 6 m g ( 0 . 8 6 4 m m o l ) の 4 - ( 1 - t e r t - プチルジメチルシリルオキ

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 : C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> 1 : 1 を用いた。350 mg の表題の化合物を得た。

## 【0057】

M . p . 148 .

<sup>1</sup> H N M R ( C D C l<sub>3</sub> ) : 0 . 36 ( 6 H, s, - S i ( C H<sub>3</sub> )<sub>2</sub> ) ; 1 . 05 ( 9 H, s, - t - B u ) ; 1 . 77 ( 6 H, s, 6 A d . ) ; 2 . 08 ( 3 H, s, 3 A d . ) ; 2 . 15 ( 6 H, s, 6 A d . ) ; 3 . 80 ( 3 H, s, - O C H<sub>3</sub> ) ; 6 . 44 ( 1 H, d, - C H =, J = 16 . 07 Hz ) ; 6 . 86 ( 1 H, d, 1 A r, J = 8 . 54 Hz ) ; 7 . 30 ( 1 H, d d, 1 A r, J = 2 . 24 Hz, J = 8 . 54 Hz ) ; 7 . 47 ( 1 H, d, 1 A r, J = 2 . 24 Hz ) ; 7 . 50 - 7 . 70 ( 4 H, m, 4 A r ) ; 7 . 71 ( 1 H, d, C H =, J = 16 . 07 Hz )

## 【実施例3】

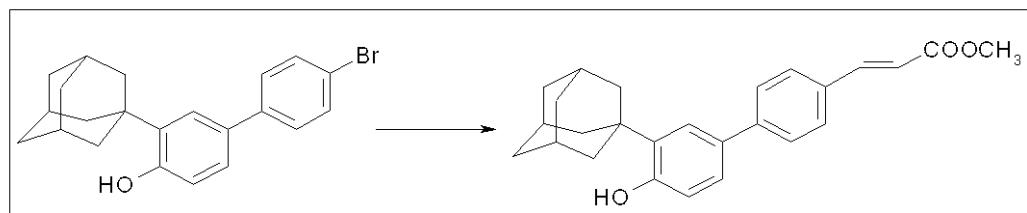
## 【0058】

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。

## 【化8】

合成スキーム 3



## 【0059】

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 H C l と酢酸エチルで処理し、有機相を分離し、水で洗浄し、N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> 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 . &gt; 240

<sup>1</sup> H - N M R ( D M S O - d<sub>6</sub> ) : 1 . 75 ( 6 H ) , 2 . 1 ( 9 H ) , 3 . 72 ( s , 3 H , O C H<sub>3</sub> ) , 6 . 63 ( d , 1 H , J = 16 Hz ) , 6 . 85 ( d d , 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 , O H )

## 【実施例4】

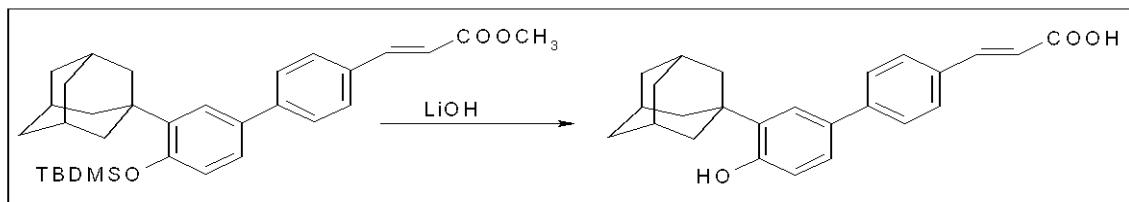
## 【0061】

E - 4 - ( 3 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - ヒドロキシフェニル ) 桂皮酸 ( S T 1926 ) 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 LiOH · H<sub>2</sub>O を 8.2 ml の THF (テトラヒドロフラン) : H<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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。

10

## 【0063】

M.p. > 240 . Rf = 0.50 (Merckシリカゲル 60 F<sub>254</sub>、EtOAc)  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 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<sup>+</sup>, 100).

20

## 【実施例5】

## 【0064】

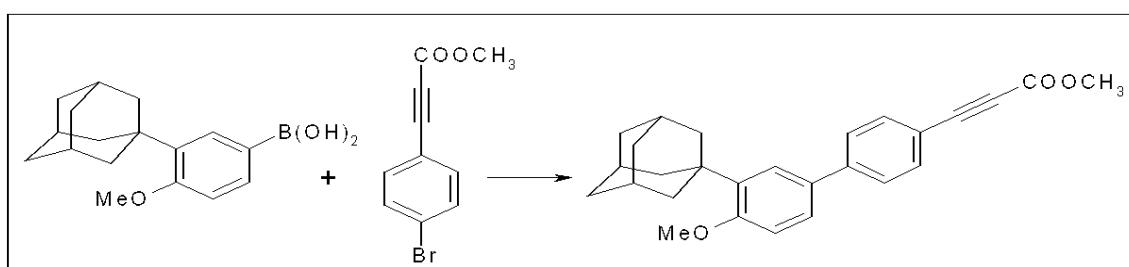
メチル 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) プロピオラートの調製

30

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



40

## 【0065】

301 mg (1.26 mmol) のメチル 4 - プ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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液、次いで 43.7 mg の Pd - テトラキストリフェニルホスфин、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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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

50

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

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)、3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)、6.96 (d, 1H, J = 8.5)、7.43 (dd, 1H, J = 2.2, 8.5)、7.47 (d, 1H, J = 2.2)、7.55 - 7.70 (4H 芳香族.)

**【実施例6】**

**【0067】**

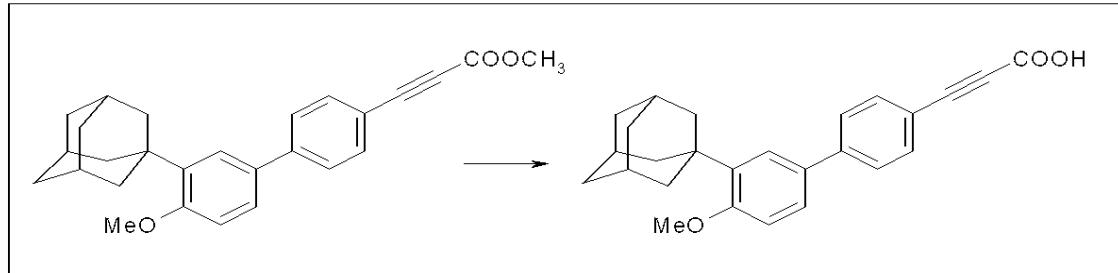
4-(3-(1-アダマンチル)-4-メトキシフェニル)プロピオン酸 (propionic acid) (ST1879) の調製

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】**

15mg (0.0374mmol) 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 2.14ml の 0.7N 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、6N HCl で酸性にし、エチルエーテルで抽出した。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 10mg の生成物を得た。

**【0069】**

M.p. 156. Rf = 0.41 (Merckシリカゲル 60F<sub>254</sub>、EtOAc / MeOH 2/1)

30

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.70 (s, 6H)、2.10 (s, 9H)、3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)、7.05 (d, 1H, J = 8.4, H - 6')、7.40 (d, 1H, J = 2, H - H')、7.45 - 7.60 (3H 芳香族.)、7.65 (2H 芳香族.)

**【実施例7】**

**【0070】**

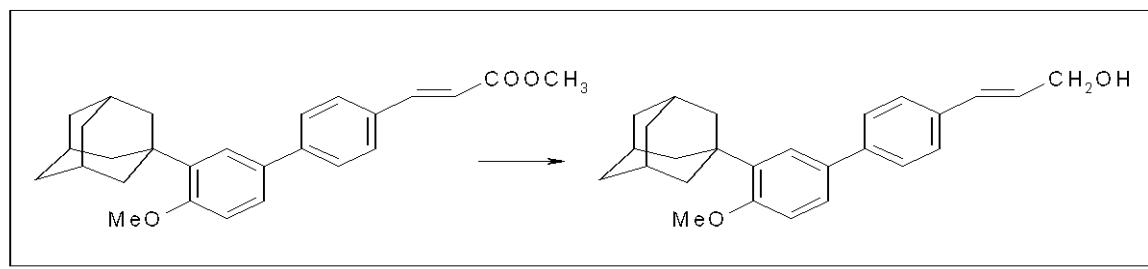
E - 4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - メトキシフェニル) ケイヒアルコールの調製

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12】

合成スキーム7



10

## 【0071】

テトラヒドロフラン中の375 μlの1M LiAlH<sub>4</sub>溶液(0.365 mmol)を5mlの無水テトラヒドロフランに添加した。氷浴中で冷却し、151mg(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、5mlの10% NH<sub>4</sub>Cl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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させた。溶媒を蒸発させることにより、126mg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、11mgの生成物を得た。

20

## 【0072】

M.p. 148.

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.75(s, 6H)、2.15(9H)、3.90、s、3H、OCH<sub>3</sub>)、4.38(dd, 2H, J = 6, 1.6)、6.41(d, t, 1H, J = 6, 1.6, =CHCH<sub>2</sub>OH)、6.67(dd, 1H, J = 1.6, 1.6, アリールCH=)、6.96(d, 1H, J = 8.3, H-6')、7.42(dd, 1H, J = 2.2, 8.3, H-5')、7.45(m, 2H, H-2およびH-6)、7.48(d, 1H, J = 2.2, H-3')、7.55(m, 2H, H-3およびH-5)

MS m/z 374 (M<sup>+</sup>)

30

## 【実施例8】

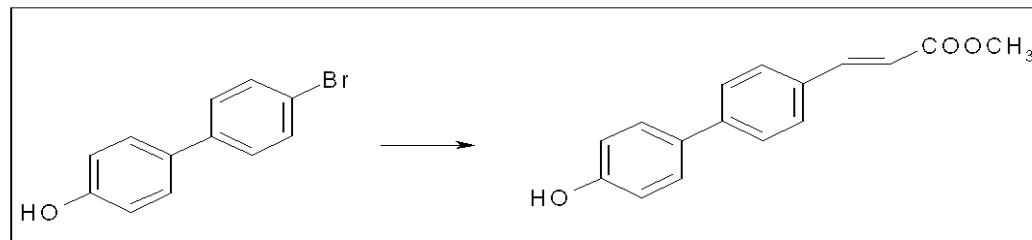
## 【0073】

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13】

合成スキーム8



40

## 【0074】

3.7mlのトリエチルアミン中の2g(8.03mmol)の4-(4-ブロモフェニル)フェノール、1.1g(12.8mmol)のアクリル酸メチル、18mg(0.08mmol)のパラジウム酢酸塩、および94mg(0.31mmol)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6mgのパラジウム酢酸塩および30mg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 mg のパラジウム酢酸塩および 94 mg 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 HCl 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させ、溶媒を蒸発させた。粗生成物 ( 934 mg ) 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。

## 【0075】

M.p. 233 - 235

<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub> ) : 3.70 ( s, 3H, OCH<sub>3</sub> ), 6.13 ( d, 1H, CH =, J = 16 ), 6.82 ( d, 2H, H - 3' および H - 5' ), 7.48, d, 2H, H - 2' および H - 6' ), 7.6 - 7.75 ( 5H )

10

## 【実施例 9】

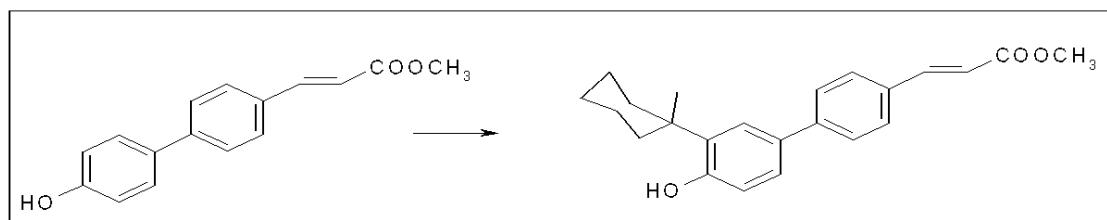
## 【0076】

メチル E - 4 - ( 3 - ( 1 - メチルシクロヘキシリ ) - 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14】

合成スキーム 9



20

## 【0077】

150 mg ( 0.6 mmol ) 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 68.5 mg の 1 - メチル - 1 - シクロヘキサノールを 1.2 mL の CH<sub>2</sub>C<sub>l</sub><sub>2</sub> に溶解し、0.032 mL の濃 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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。20 mg の生成物を得た。

30

## 【0078】

<sup>1</sup>H NMR ( アセトン - d<sub>6</sub> ) : 1.43 ( 3H, s, -CH<sub>3</sub> ); 1.4 - 1.9 ( 8H, m, シクロヘキサン ); 2.3 - 2.45 ( 2H, m, シクロヘキサン ); 3.80 ( 3H, s, -OCH<sub>3</sub> ); 6.60 ( 1H, d, CH =, J = 16.18 Hz ); 7.0 ( 1H, d, 1Ar, J = 8.2 Hz ); 7.44 ( 1H, dd, 1Ar, J = 8.2 Hz, 2.2 Hz ); 7.65 ( 1H, d, 1Ar, J = 2.2 Hz ); 7.7 - 7.85 ( 5H, m, 4Ar + CH = ); 8.65 ( 1H, s, -OH )

40

## 【実施例 10】

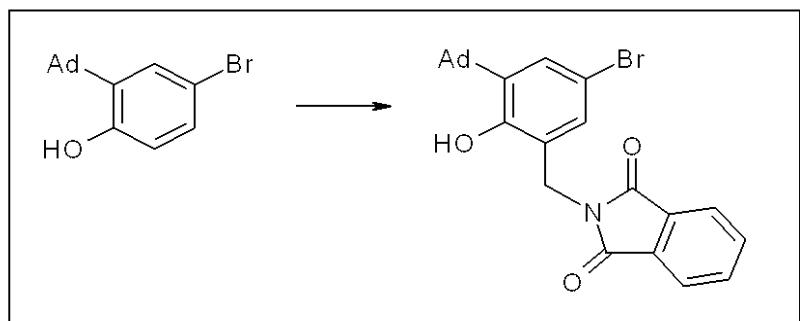
## 【0079】

2 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - プロモ - 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 10 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 - ブ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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 .

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 1.78 (6H, s, 6Ad.) ; 2.09 (3H, s, 3Ad.9) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 4.76 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-) ; 7.28 (1H, d, 1Ar, J = 2.94 Hz) ; 7.45 (1H, d, 1Ar, J = 2.94 Hz) ; 7.76 (2H, dd, 2Ar, J = 2.94 Hz, J = 5.52 Hz) ; 7.88 (2H, dd, 2Ar, J = 2.94 Hz, J = 5.52 Hz) ; 8.13 (1H, s, -OH)

## 【実施例11】

## 【0082】

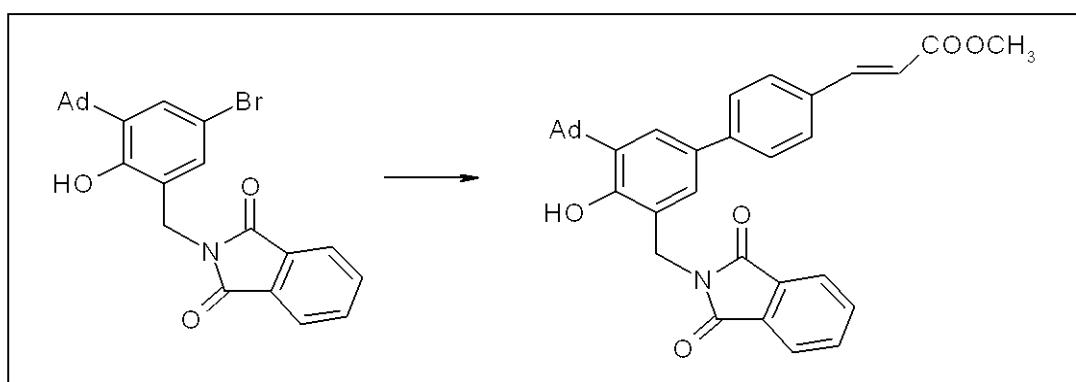
30

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

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 - ブロモ - 6 - N - フタルイミドメチル)

50

フェノールを1.6m1のジオキサンに懸濁し、窒素流下で；59.7mgのボロ(ビスピナコレート)、63mgの無水酢酸カリウム、5mg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103mgのメチル4-ブ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、1m1の2M HClで酸性にし、有機相をNaCl飽和溶液で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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。32mg(27%)の生成物を得た。

## 【0084】

M.p. 216.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 1.78 (6H, s, 6Ad.) ; 2.09 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 3.83 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) ; 4.90 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-) ; 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<sup>+</sup>, 100) ; 400 (30) ; 160 (30)

## 【実施例12】

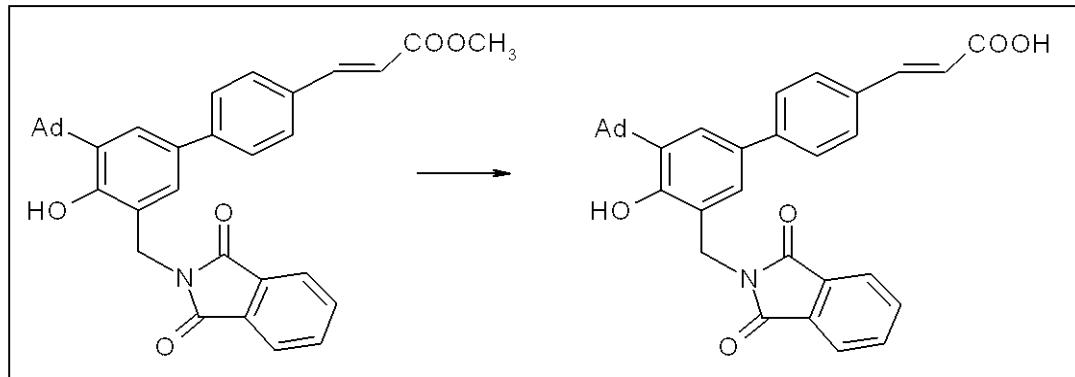
## 【0085】

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】

30mg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1m1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。24mgの生成物を得た。

## 【0087】

M.p. 216

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.73 (6H, s, 6Ad.) ; 2.04 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 4.81 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-) ; 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, brs, COOH)

10

20

30

40

50

M S ( m / z ) : 533 ( M<sup>+</sup>、100) ; 386 ( 40 ) ; 160 ( 60 ) 130 ( 50 )

【実施例 13】

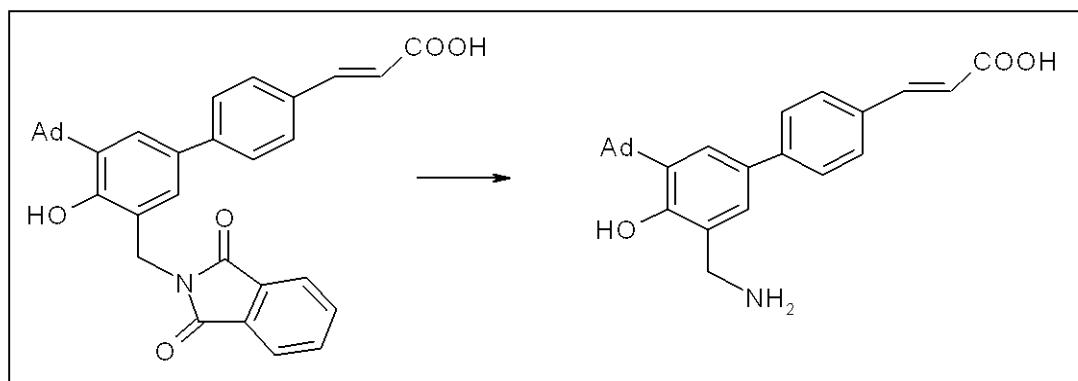
【0088】

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



10

20

【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 度で 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リルヒドラジドに溶解し、そしてろ過した。

【0090】

M.p. 195

30

<sup>1</sup>H NMR ( DMSO - d<sub>6</sub> ) : 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, - CH<sub>2</sub> - ) ; 6.45 ( 1 H, d, - CH =, J = 16.18 Hz ) ; 7.07 - 8.00 ( 5 H, m, 5 Ar. )

【実施例 14】

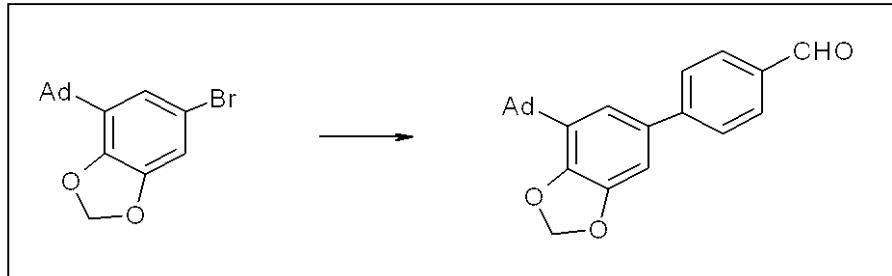
【0091】

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



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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 ]

<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub> ) : 1.80 ( 6 H, s, 6 Ad. ) ; 2.09 ( 3 H, s, 3 Ad. ) ; 2.12 ( 6 H, s, 6 Ad. ) ; 6.02 ( 2 H, s, -CH<sub>2</sub>- ) ; 7.01 ( 1 H, d, 1 Ar, J = 1.86 Hz ) ; 7.04 ( 1 H, d, 1 Ar, J = 1.86 Hz ) ; 7.68 ( 2 H, d, 2 Ar, J = 8.19 Hz, ) ; 7.92 ( 2 H, d, 2 Ar, J = 8.19 Hz, ) ; 10.02 ( 1 H, s, -CHO )

### 【实施例 15】

[ 0 0 9 4 ]

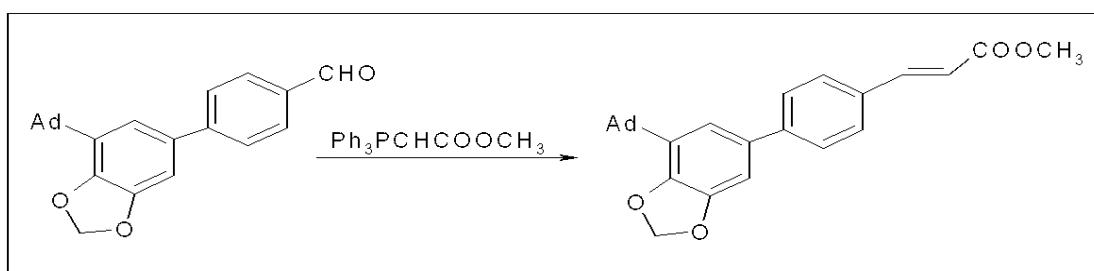
メチルE-4-(7-アダマンタン-1-イル-ベンゾ(1,3)ジオキソール-5-イル)-シンナメートの調製

20

表題の化合物を以下の合成スキーム 1.5 にしたがって調製した。

【化 20】

会成るき二八五



30

[ 0 0 9 5 ]

4.5 ml の  $\text{CHCl}_3$  中の 300 mg の 4-(7-アダマンタン-1-イル-ベンゾ(1,3)ジオキシリル-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 . 2 0 5 .

<sup>1</sup> H NMR ( CDCl<sub>3</sub> ) : 1.72 ( 6 H, s, 6 Ad. ) ; 2.06 ( 3 H, s, 3 Ad. ) ; 2.12 ( 6 H, s, 6 Ad. ) ; 3.80 ( 3 H, s, -OCH<sub>3</sub> ) ; 5.97 ( 2 H, s, -CH<sub>2</sub>- ) ; 6.44 ( 1 H, d, -CH=, J = 16 Hz ) ; 6.95 ( 1 H, d, 1 Ar, J = 1.86 Hz ) ; 6.98 ( 1 H, d, 1 Ar, J = 1.86 Hz ) ; 7.52 - 7.58 ( 4 H, m, 4 Ar ) ; 7.71 ( 1 H, d, -CH=, J = 16 Hz, )

### 【案例 1-6】

( 0 0 9 7 )

E - 4 - C7 - アダマンタン - 1 - イル - ベンゾ(1,3)ジオキソニル - 5 - イル)

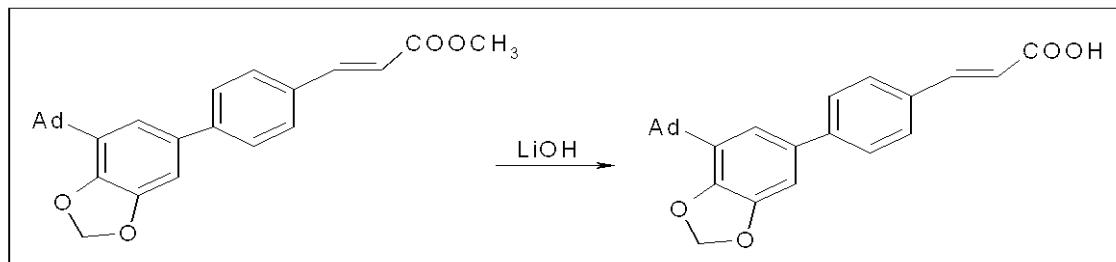
50

- 桂皮酸の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 1 6 にしたがって調製した。

【化 2 1】

合成スキーム 1 6



【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 / H<sub>2</sub>O 3 : 2 中の LiOH · H<sub>2</sub>O 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 . Rf = 0.59 (Merckシリカゲル 60 F<sub>254</sub>、EtOAc / ヘキサン 9/1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.72 (6H, s, 6Ad.) ; 2.01 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 6.01 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-) ; 6.52 (1H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 6.99 (1H, d, 1Ar, J = 1.84 Hz) ; 7.14 (1H, d, 1Ar, J = 1.84 Hz) ; 7.60 (1H, d, -CH=, J = 16.18 Hz) ; 7.62 (2H, dd, 2Ar, J = 8.46 Hz, 1.84 Hz) ; 7.68 (2H, dd, 2Ar, J = 8.46 Hz, 1.84 Hz)

【実施例 17】

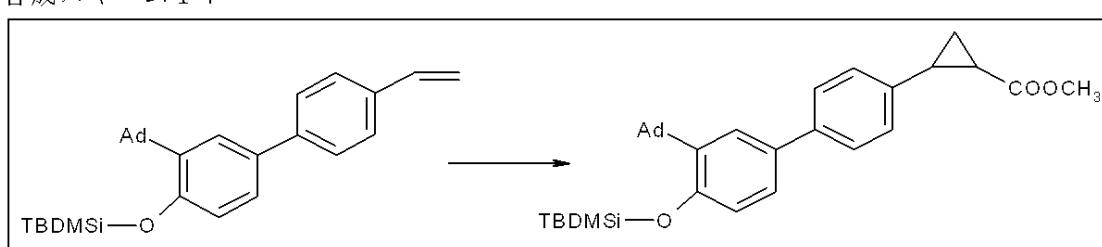
【0100】

メチル 2 - [4 - (3 - (1 - アダマンチル) - 4 - ヒドロキシフェニル) ] シクロブ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 1 7 にしたがって調製した。

【化 2 2】

合成スキーム 1 7



【0101】

0.5 mg のテトラ酢酸ジウム二水和物および 36 μl 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' - ビニルビフェニル - 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 μl 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、

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】**

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) ; 0.45 (6H, s, -Si(CH<sub>3</sub>) ; 0.95 (3H, t, -CH<sub>3</sub>, J = 7Hz) ; 1.1 (9H, s, tBu) ; 1.25 (3H, t, -CH<sub>3</sub>, J = 7Hz) ; 1.35 - 1.55 (1H, m, 1-CH<sub>2</sub>) ; 1.55 - 1.74 (1H, m, 1-CH<sub>2</sub>) ; 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, -OCH<sub>2</sub>, J = 7Hz) ; 4.18 (2H, q, -OCH<sub>2</sub>, J = 7Hz) ; 6.82 (1H, dd, 1Ar, J = 1.84Hz, 8.46Hz) ; 7.15 (1H, d, 1Ar, J = 8.46Hz) ; 7.25 (2H, dd, 2Ar, J = 8.0Hz, 1.84Hz) ; 7.45 - 7.50 (3H, m, 3Ar) 10

**【実施例18】**

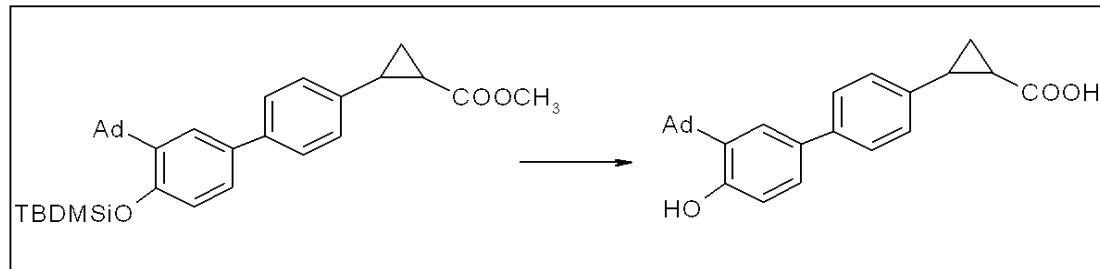
**【0103】**

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】**

合成スキーム18



20

**【0104】**

微細に粉碎したAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(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ラート(110mg)の溶液に添加し、室温で2日間攪拌した。ろ過後、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·H<sub>2</sub>O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60F<sub>254</sub>、EtOAc/ヘキサン6/4)

<sup>1</sup>H NMR (MeOD) トランス: 1.45 - 1.50 (1H, m, 1-CH<sub>2</sub>) ; 1.60 - 1.65 (1H, m, 1-CH<sub>2</sub>) ; 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 = 8.46Hz) 50

. 4 . 6 H z ) ; 7 . 2 4 ( 2 H、d d、2 A r、J = 7 . 3 5 H z、J = 1 . 8 4 H z ) ; 7 . 3 1 ( 1 H、d d、1 A r、J = 8 . 4 6 H z、2 . 5 7 H z ) ; 7 . 4 2 ( 1 H、d、1 A r、J = 2 . 5 7 H z ) ; 7 . 5 2 ( 2 H、d d、2 A r、J = 7 . 3 5 H z、J = 1 . 8 4 H z )

<sup>1</sup>H N M R ( M e O D ) シス：1 . 4 0 - 1 . 5 0 ( 1 H、m、1 - C H<sub>2</sub> ) ; 1 . 7 0 - 1 . 7 5 ( 1 H、m、1 - C H<sub>2</sub> ) ; 1 . 9 5 - 2 . 0 ( 6 H、s、6 A d ) ; 2 . 1 0 - 2 . 1 5 ( 4 H、m、3 A d + - C H - C O O H ) ; 2 . 3 0 ( 6 H、s、6 A d ) ; 2 . 7 0 - 2 . 7 8 ( 1 H、m、- C H - A r ) ; 6 . 8 3 ( 1 H、d、1 A r、J = 8 . 4 6 H z ) ; 7 . 3 0 ( 1 H、d d、1 A r、J = 8 . 4 6 H z、2 . 5 7 H z ) ; 7 . 3 8 ( 2 H、d d、2 A r、J = 7 . 3 0 H z、J = 1 . 8 4 H z ) ; 7 . 4 2 ( 1 H、d、1 A r、J = 2 . 5 7 H z ) ; 7 . 4 9 ( 2 H、d d、2 A r、J = 7 . 3 0 H z、J = 1 . 8 4 H z )

M S ( m / z ) : 3 8 8 ( M<sup>+</sup>、1 0 0 ) ; 1 3 5 ( 5 0 )

### 【実施例 1 9】

#### 【0 1 0 6】

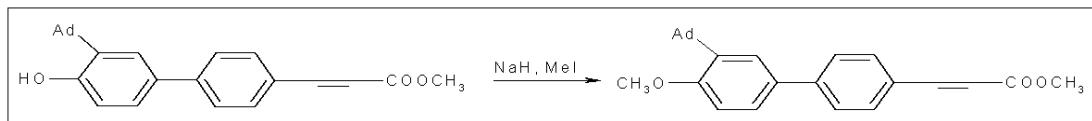
メチル E - 4 - ( 3 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - メトキシフェニル ) シンナメートの調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 1 9 にしたがって調製した。

### 【化 2 4】

#### 合成スキーム 1 9

20



#### 【0 1 0 7】

3 . 3 m L の D M F 中の N a H ( 鉛油中 6 0 %、6 6 m g、2 . 7 4 m m o l ) の懸濁液に、N<sub>2</sub> 下で、9 6 9 m g ( 2 . 4 9 m m o l ) 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 1 8 6 μ L ( 2 . 9 9 m m o l ) の C H<sub>3</sub> I を滴下した。

30

#### 【0 1 0 8】

反応物を室温で一晩放置した；8 0 m l の冷水の添加後、水相を C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> ( 4 × 6 0 m l ) で抽出した。有機層を水で洗浄し、N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> で乾燥させ、溶媒を蒸発させた。9 7 2 m g の生成物を得た ( 9 7 % ) 。

#### 【0 1 0 9】

<sup>1</sup>H N M R ( C D C l<sub>3</sub> ) : 1 . 7 5 ( 6 H )、2 . 1 ( 9 H )、3 . 7 5 ( s、3 H、O C H<sub>3</sub> )、3 . 8 0 ( s、3 H、- C O O C H<sub>3</sub> ) ; 6 . 4 0 ( d、1 H、C H =、J = 1 6 H z )、6 . 9 0 ( d、1 H、1 A r、J = 8 . 8 H z )、7 . 3 5 ( d d、1 H、1 A r、J = 8 . 8、1 . 8 H z ) ; 7 . 4 2 ( d、1 H、1 A r、J = 1 . 8 H z ) ; 7 - 4 8 - 7 . 5 3 ( m、4 H、4 A r ) ; 7 . 6 5 ( d、1 H、C H =、J = 1 6 H z )

40

### 【実施例 2 0】

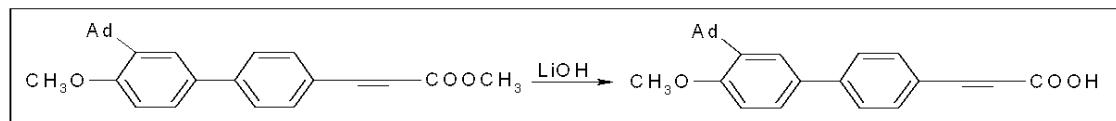
#### 【0 1 1 0】

E - 4 - ( 3 - ( 1 - アダマンチル ) - 4 - メトキシフェニル ) 桂皮酸 ( S T 1 8 9 8 ) の調製

表題の化合物を以下の合成スキーム 2 0 にしたがって調製した。

## 【化25】

合成スキーム20



## 【0111】

455mg (10.8mmol) の LiOH・H<sub>2</sub>O を 90ml の THF : H<sub>2</sub>O 1 : 1 に溶解した； 873mg (2.17mmol) 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、2N HCl で酸性にし、白色沈殿をろ過した。固体を AcOEt および Et<sub>2</sub>O で洗浄し、792mg (94%) の表題の化合物を得た。

10

## 【0112】

Rf = 0.28 (Merckシリカゲル 60 F<sub>254</sub>、EtOAc / ヘキサン 9 / 1)  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.74 (6H, s, 6Ad.) ; 2.04 (3H, s, 3Ad.) ; 2.12 (6H, s, 6Ad.) ; 3.75 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) ; 6.50 (1H, d, -CH=, J = 16Hz) ; 6.98 (1H, d, 1Ar, J = 8.8Hz) ; 7.40 - 7.70 (7H, m, 6Ar + CH=) ; 12.3 (1H, brs, -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<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> 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（ドキソルビシン、タキソール、エトポシド、ピンクリスチン）；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℃ 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 24 時間、 37 度 5 % C O<sub>2</sub> を含有する加湿霧囲気中でインキュベートした。3日目に、プレートを 10 分間 1600 × 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。250 μl の P B S を添加した；次いでプレートを再び 1600 × g で 10 分間遠心分離し、上清をデカントして捨てた。200 μl / ウェルの、 10 % F C S を含有する R P M I 1640 培地を添加し、プレートを 37 度さらに 48 時間インキュベートした。5日目に、プレートを再び 1600 × g で 10 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、200 μl の P B S および 50 μl の冷却した 80 % 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 200 μl 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。200 μl の 10 mM 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。

【 0117 】

10

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、1600 × 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。

【 0118 】

20

細胞生存度は、S T 1 9 2 6 とともに 24 時間インキュベーションし、化合物を除去してから 48 時間後に測定した。化合物との 24 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 50 % 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、他の腫瘍系に対して計算された値と比べておよそ 10 倍大きい細胞障害性を示した ( I C 5 0 = 0 . 0 2 2 μ M )。

30

【 0119 】

【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/m<sup>2</sup>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1×10<sup>6</sup>)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含

10

20

30

40

50

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 μl のヨウソ酸プロピジウム (100 μg / ml) および 200 μl 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。

【 0 1 2 3 】

サンプルをナイロンフィルター ( 直径 60 - 80 μm ) でろ過し、細胞蛍光測定計 F A C S c a n ( 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。

【 0 1 2 4 】

前立腺癌細胞 P C 3 の細胞周期の分析のために、細胞を R P M I 培地中 500000 細胞 / ml の密度でプレートに播いた。化合物 S T 1 9 2 6 での 24 時間の処理後、細胞を上記のようにして分析した。

【 0 1 2 5 】

( 実施例 9 / 1 )

ヒト前骨髄球性白血病 N B 4 細胞の細胞周期に対する S T 1 9 2 6 の効果の評価

S T 1 9 2 6 による処理 (3 日間) の N B 4 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 μM 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。

【 0 1 2 6 】

【 表 2 】

**NB4 の細胞周期に対する ST1926 の効果**

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

10

20

30

【 0 1 2 7 】

( 実施例 9 / 2 )

ヒト前骨髄球性白血病 H L - 60 細胞の細胞周期に対する S T 1 9 2 6 の効果の評価

S T 1 9 2 6 による 3 日間の処理の H L - 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 μM 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。

【 0 1 2 8 】

40

【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 μM	54.9	33.4	11.7	8
ST1926 0.005 μM	53.4	34.4	12.2	14.0
ST1926 0.01 μM	52.0	35.4	12.6	12.5
ST1926 0.05 μM	45.0	42.0	13.0	13.0
ST1926 0.1 μM	39.9	46.8	13.3	27.5
ST1926 0.5 μM	n.e.	n.e.	n.e.	<b>82</b>
ST1926 1 μM	n.e.	n.e.	n.e.	<b>86.5</b>

10

## 【0129】

(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 μM) 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 μM 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

## 【0130】

【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 μM	54.0	24.2	21.8	9
ST1926 0.05 μM	55.8	23.6	20.6	11
ST1926 0.1 μM	52.0	35.4	28.0	10
ST1926 0.2 μM	n.v.	n.v.	n.v.	13.5
ST1926 0.4 μM	n.v.	n.v.	n.v.	<b>25</b>
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 μM	44.6	30.4	25.0	13
ST1926 0.05 μM	44.9	29.5	25.6	15
ST1926 0.1 μM	45.8	25.8	28.4	10
ST1926 0.2 μM	31.8	<b>43.2</b>	25.0	13
ST1926 0.4 μM	n.e.	n.e.	n.e.	<b>26</b>

30

## 【0131】

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) と組合せての ST1926 のインビトロでの細胞障害性活性

40

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つのデスマイン-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は腫瘍選択性的、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/D×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RPMI1640培地に維持した。

## 【0133】

細胞を96ウェルプレートに250μl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%CO<sub>2</sub>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。200μlのPBSおよび50μl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、200μl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。200μl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. Biophys. 1: 187-195, 1976)の分析法を用いて測定した。

分析は以下のようになつた：

(SFa × SFb / SFa + SFb) / 100 (ここでSFaはST1926の生存画分(survival fraction)であり、SFb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<sup>5</sup>細胞/マウスの密度で筋肉内注射した。3LLマウスルイス肺癌を常套方法によって、C57BL/6Jマウスにおいて1×10<sup>5</sup>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<sup>5</sup>細胞/100μl/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】

10

20

30

40

50

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<sup>2</sup>）/ 2、即ち、mm<sup>3</sup>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<sub>T</sub> / MST<sub>C</sub>) × 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】

各群について得られた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10ml/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（q d × 5）、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q d × 5 × 3wによって、10mg/kg、経口（p.o.）および15mg/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10mg/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ST1926 (qdx5x3w)の抗腫瘍活性

処理	用量 (mg/kg)	BWL% Max	MST (範囲日)	ILS%	TVI%
<b>M109</b>					
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
<b>3LL</b>					
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/D×およびヒト非小細胞肺癌NCI-

10

20

30

40

50

#### 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  $\mu$  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 度 5 % C O<sub>2</sub> 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、沈殿をハンクス 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 × 1 0<sup>6</sup> / m l の密度でハンクス 1 9 9 培地に再懸濁し、 0 . 1 m l ( 2 × 1 0<sup>6</sup> 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 × 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、 m m 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<sup>2</sup> ) / 2 、即ち、 m m<sup>3</sup> 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 】

各群について得られた 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 % max ) 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 × 5 × 3 w によって、 1 5 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
<b>A2780</b>				
対照	/	0	0/8	/
ST1926	5, p.o.	3	0/8	*34±8
ST1926	10, p.o.	5	0/8	*39±5
<b>A2780/Dx</b>				
対照	/	0	0/8	/
ST1926	10, po	0	0/8	*34±3
ST1926	15, po	6	0/8	*54±9
<b>NCI-H460</b>				
対照	/			
ST1926	15, po	4	0/8	*40±2

\*P<0.05 vs. 対照.

## 【0152】

ST1926は、スケジュール q d × 4 × 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 × 3 により 15 mg / kg、腹腔内(i.p.)) NCI - H 4 6 0 非小細胞肺癌において有効であることが示された(表7)。

## 【0153】

## 【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).

## 【0154】

ST1926は、スケジュール q d × 3 × 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)。

## 【0155】

10

20

30

40

## 【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&lt;0.05 vs 対照 (Mann-Whitney).

10

## 【0156】

ウシ副腎微小循環(microcircle) 内皮(BMEC)細胞系に対するST1879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BMEC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、副腎をベータダイン溶液中で5分間洗浄し、次いで2リットルの無菌PBS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2mmの断片にし、PBS(副腎あたり30ml)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、600rpmでの遠心分離の後、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0.12%コラゲナーゼA(Boehringer Mannheim)に再懸濁し、37で2時間攪拌しながらインキュベートした。その後、まず200メッシュ、次いで100メッシュでのフィルター(Sigma)ろ過に續いて、上清を15%DMEM/FBS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1000rpmで室温で遠心分離して、沈殿を20%FBS、50μg/mlのウシ脳抽出物(BBE)、50μg/mlヘパリン(Sigma)、0.5%v/vゲンタマイシン(Sigma)、1%v/vL-グルタミンを含有するDMEM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

## 【0157】

細胞障害性試験はBMEC細胞を用いて行なった。細胞を96ウェルプレートに200μlの容積で播き、24時間37でインキュベートした。翌日、被験化合物ST1879を200μMから1.56μMの種々の濃度で添加した。細胞をさらに37で24時間5%CO<sub>2</sub>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、300μlのPBS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200μl/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15%TCA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によって水で3回洗浄した。各ウェルに1%酢酸中の200μl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、200μlの10mMTris塩基を添加し、プレートを少なくとも20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540nmで測定した。

30

## 【0158】

ST1879との24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48時間後に測定した。化合物との24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IC50値(細胞生存度を50%阻害する化合物の濃度)を示す。ST1879は105μMに対応する弱い細胞障害性、25μMに対応する非毒性濃度を示した。これを後にST1879の内皮細胞遊走に対する効

40

50

果の研究に用いた（表9を参照されたい）。

【0159】

【表9】

**内皮細胞に対するST1879の細胞障害性**

細胞系	IC <sub>50</sub> ±SD (μM)	IC <sub>0</sub>
BMEC	105±14	25 μM

【0160】

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D MEM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D MEM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）。

【0161】

【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%	42.7%
	(6.1 細胞±2.4 vs 対照中 72.1±7.4 細胞)	(41.3 細胞±10.2 vs 対照中 72.1±7.4 細胞)

10

20

30

40

【0162】

マトリゲル上でのH U V E C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以上の管状構造が出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。

【0163】

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H U V E C(Clontech)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。

【0164】

50

S T 1 8 7 9 はマトリゲル上で 2 5  $\mu$ M の濃度で内皮細胞の分化を 6 1 % 阻害することが示された（表 1 1）。

【 0 1 6 5 】

【 表 1 1 】

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 $\mu$ M)= 61% (8.2 ノード vs 対照中 21.2 ノード)

10

【 0 1 6 6 】

ヒト腫瘍細胞系に対する S T 1 8 7 9 および S T 1 8 9 8 の細胞障害性

1 0 % ウシ胎仔血清 ( F C S ) および 1 % グルタミンを含有する R P M I 1 6 4 0 に維持したヒト急性前骨髄球性白血病細胞系 N B 4 を用いて細胞障害性試験を行なった。

【 0 1 6 7 】

さらに 2 種の固形腫瘍細胞系も用いた：

- 1 . ヒト前立腺癌 P C 3 。この細胞系を 1 0 % F C S 、 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 R P M I 1 6 4 0 培地に維持した。
- 2 . ヒト大腸腺癌 L o V o 。この細胞系を 1 0 % F C S および 1 % グルタミンを含有する H A M ' s F - 1 2 培地に維持した。

20

【 0 1 6 8 】

細胞障害性試験は 1 0 0 0 0 の N B 4 細胞 / ウェルを用いて行なった。細胞を 9 6 ウェルプレートに 2 5 0  $\mu$ l の容積で播き、 3 7 ℃ で 2 4 時間インキュベートした。翌日、被験化合物 S T 1 8 7 9 を様々な濃度で添加し、細胞をさらに 2 4 時間、 3 7 ℃ で 5 % C O <sub>2</sub> 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 1 6 0 0 × g で 1 0 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。 2 5 0  $\mu$ 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  $\mu$ 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、プレートを再び 1 6 0 0 × g で 1 0 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、 2 0 0  $\mu$ l の P B S および 5 0  $\mu$ l の 8 0 % 冷却 T C A 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。 T C A 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 2 0 0  $\mu$ 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 2 0 0  $\mu$ l の 1 0 mM T r i s 塩基を添加し、プレートを少なくとも 2 0 分間振盪した。吸光度を Multiskan 分光光度計を用いて 5 4 0 nm で測定した。

30

【 0 1 6 9 】

接着細胞系 P C 3 および L o V o 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 P B S の添加によって 3 回行ない、 1 6 0 0 × 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。

【 0 1 7 0 】

S T 1 8 7 9 または S T 1 8 9 8 との 2 4 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 4 8 時間後に測定した。化合物との 4 8 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 1 0 は試験した腫瘍細胞系についてそれぞれ計算した 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。 S

40

50

T1879は、LoVo細胞 (IC<sub>50</sub> = 5.2 μM) に対して、前立腺癌系PC3 (IC<sub>50</sub> = 13.6 μM) およびヒト前骨髄球性NB4系 (58.5 μM) 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。ST1898もまた、大腸癌腫LoVoに対してより活性であることが示された（表12を参照されたい）。

【0171】

【表12】

### **ST1879 および ST1898 の細胞障害性**

被験化合物	細胞系	IC <sub>50</sub> ±SD (μM)
ST1879	NB4	58.5±3.2
ST1879	PC3	13.6±2.1
ST1879	LoVo	5.2±0.9
ST1898	NB4	8.8±0.6
ST1898	PC3	1.7±0.2
ST1898	LoVo	0.38±0.02

10

【0172】

### **ST1879 および ST1898 の NB4 細胞に対する分化促進効果**

20

NB4細胞を10%胎児血清を含有するRPMI1640培地に150000細胞/m<sup>2</sup>の密度でプレートに播いた。細胞を次いで0.4 μMから0.01 μMの様々な濃度のST1879またはST1898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50000細胞を収集し、遠心分離し、10%血清、1mg/mlニトロブルーテトラゾリウム(NBT)および100ngのPMA(フォルボールミリストチル酢酸)を含有する1mlのRPMI1640培地に再懸濁した。上記のように再懸濁した細胞を、37℃で60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1mlの10% Triton X-100を含有するPBS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540nm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。ST1879またはST1898の分化促進作用をAC50(50%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。ST1898はAC50値が19nM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13を参照されたい）。

30

【0173】

【表13】

### **NB4 細胞に対する ST1879 および ST1898 の分化促進効果**

化合物	AC50 (nM±SD)
ST1879	55±9
ST1898	19±0.8

40

【0174】

ニワトリ緘毛尿膜(CAM)モデルにおけるST1879、ST1926およびST1898の血管形成抑制(Angiostatic)活性

ニワトリ緘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、11日目まで活動的に増殖する。

50

## 【0175】

この研究の目的は、基底状態および血管増殖(vasoproliferation)の誘導物質 bFGF(塩基性線維芽細胞成長因子)の存在下でのCAM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、CAMの血管を目視できるようにした。発達の9日目に約1mm<sup>3</sup>の無菌ゼラチン(GELFOAM Pharmacia-Upjohn)の断片を、CAM表面に導入し、そのうえにbFGF(50ng/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。

## 【0176】

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(12日目)の血管を比較することによって得た。

10

## 【0177】

表14において結果を報告する。3つの化合物は0.25から0.5μg/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14)。

## 【0178】

## 【表14】

ST1879, ST1926, ST1898 の血管形成抑制活性

処理	濃度(μg/胚)	n	9日目 (T0)	12日目 (72時間)	△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

## 【0179】

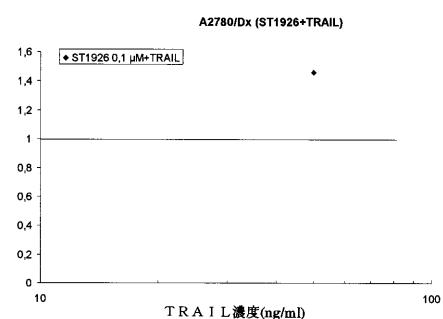
結果は、スponジ当たりの血管の数の平均±SEである。

## 【図面の簡単な説明】

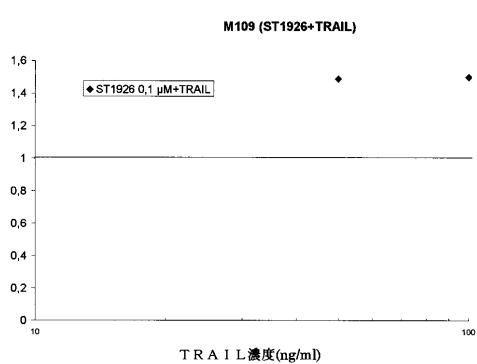
## 【0180】

(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

			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 9/10 101
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 43/00 105
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-20133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、ウニヴェルシタ・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-20133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、ウニヴェルシタ・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-20153ミラン、ヴィア・ミリー・カルラ・ミニヨーネ5番

(72)発明者 ジュゼッペ・ジャンニーニ

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30, 400、シグマ-タウ・インドウストリエ・ファルマチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 クラウディオ・ピサノ

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30, 400、シグマ-タウ・インドウストリエ・ファルマチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 ロレダナ・ヴェシ

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30, 400、シグマ-タウ・インドウストリエ・ファルマチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・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., DB名)

C07C 59/54