

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4931312号
(P4931312)

(45) 発行日 平成24年5月16日(2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int. Cl. F I
C 0 7 J 41/00 (2006.01) C O 7 J 41/00
A 6 1 K 31/566 (2006.01) A 6 1 K 31/566
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 1/02 (2006.01) A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 1/04 (2006.01) A 6 1 P 1/04

請求項の数 8 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-544757 (P2001-544757)
(86) (22) 出願日 平成12年12月7日(2000.12.7)
(65) 公表番号 特表2003-517002 (P2003-517002A)
(43) 公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)
(86) 国際出願番号 PCT/GB2000/004689
(87) 国際公開番号 W02001/044268
(87) 国際公開日 平成13年6月21日(2001.6.21)
審査請求日 平成19年9月13日(2007.9.13)
(31) 優先権主張番号 9929445.6
(32) 優先日 平成11年12月13日(1999.12.13)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)
(31) 優先権主張番号 0004317.4
(32) 優先日 平成12年2月23日(2000.2.23)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500232695
ステリックス リミテッド
イギリス国 エスエル1 3エックスイー
パークシャー, スラウ, パス ロード
1 9 0
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

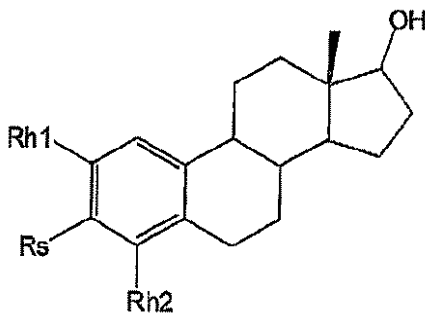
(54) 【発明の名称】 ステロイドスルファターゼのインヒビターとしてのハロゲン化スルファメートー、ホスホネートー、チオホスホネートー、スルホネートー、およびスルホンアミドー化合物

(57) 【特許請求の範囲】

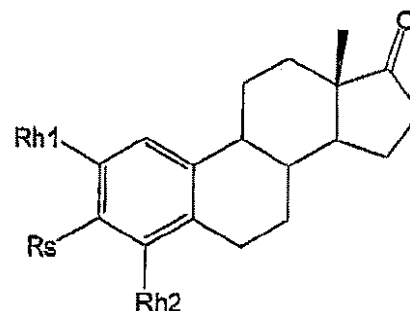
【請求項1】

下式の化合物であって、

【化1】



または



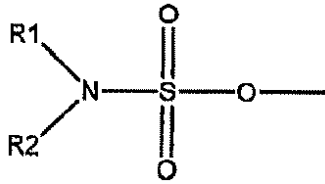
ここで、

R h 1 は、ハロ基であり；

R h 2 は、水素またはハロ基であり；

R s は、下式

【化 2】

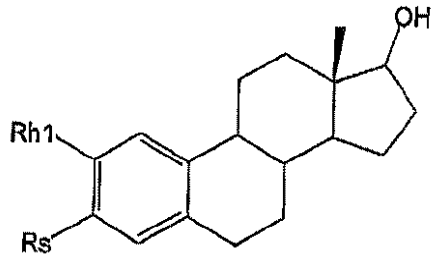


の基であり、R 1 および R 2 は、独立して H およびアルキルから選択される、化合物。

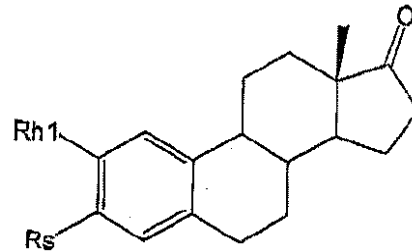
【請求項 2】

下式を有する請求項 1 に記載の化合物であって、

【化 3】

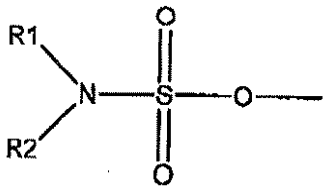


または



ここで、R h 1 は、ハロ基であり、R s は、下式

【化 4】



の基であり、R 1 および R 2 は、独立して H およびアルキルから選択される、化合物。

【請求項 3】

R 1 および R 2 の少なくとも一つが H である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

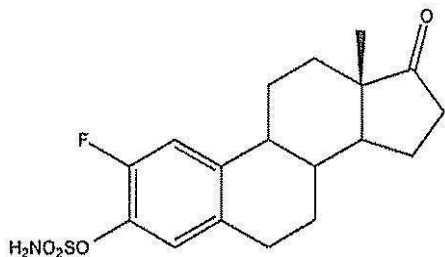
【請求項 4】

R 1 および R 2 の各々が H である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

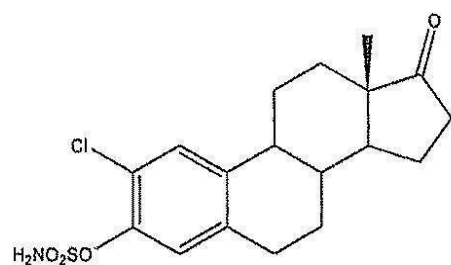
【請求項 5】

前記化合物が以下の式からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【化 4】



【化 5】



10

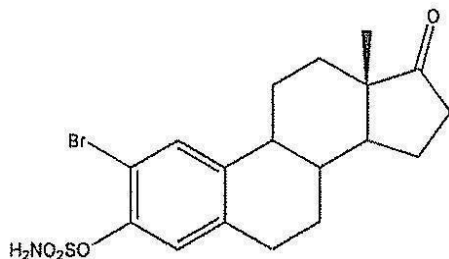
20

30

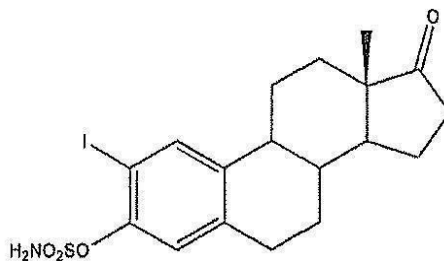
40

50

【化6】



【化7】



10

【請求項6】

薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、賦活剤または補助剤と混合された、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を含む、薬学的組成物。

20

【請求項7】

癌の処置における使用のための医薬の製造における、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項8】

請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物を含む、癌の処置における使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、化合物に関する。

30

【0002】

特に、本発明は、化合物およびこの化合物を含む薬学的組成物に関する。本発明はまた、治療適用におけるこの化合物または組成物の使用に関する。

【0003】

(発明の背景)

証拠は、エストロゲンが内分泌物依存性組織(例えば、乳房および子宮内膜)における腫瘍増殖の促進に与する主要なミトジェンであることを示唆する。血漿エストロゲン濃度は、乳癌を有する女性でも乳癌を有さない女性でも同様であるが、乳房腫瘍のエストロンレベルおよびエストラジオールレベルは、正常乳房組織または正常血液よりも有意に高い。エストロゲンのインサイチュ合成は、腫瘍における高レベルのエストロゲンに対して重大に寄与していると考えられ、従って、エストロゲン生合成のインヒビター、特に特異的インヒビターは、内分泌依存性腫瘍の処置のために潜在的な価値がある。

40

【0004】

過去20年間にわたって、アロマターゼ経路(アンドロゲン前駆体であるアンドロステンジオンを、エストロンに変換する)のインヒビターの開発に多くの興味を持たれてきた。しかし、現在では、エストロンスルファターゼ(E1-S-T-S)経路(すなわち、アロマターゼ経路と反対に、エストロンサルフェートのエストロンへの加水分解(E1SからE1))は、乳房腫瘍におけるエストロゲンの主要な供給源であるという証拠が存在する。この理論は、アロマターゼインヒビター(例えば、アミノグルテチミドおよび4-ヒドロ

50

キシアンドロステンジオン)により処置された乳癌を有する閉経後の女性における血漿エストロゲン濃度の穏やかな減少、またこれらのアロマトーゼインヒビターで処置された患者における血漿E1S濃度が比較的高いままであるという事実により支持される。非結合体化エストロゲンの半減期(20分)と比較してE1Sの血中での長い半減期(10~12時間)、ならびに肝臓、および正常および悪性の乳房組織における高レベルのステロイドスルファターゼ活性もまた、この理論に支持を与える。

【0005】

PCT/GB92/01587は、エストロン依存性腫瘍(特に乳癌)の処置における使用のための、新規なステロイドスルファターゼインヒビターおよびそれらを含む薬学的組成物を教示する。これらのステロイドスルファターゼインヒビターは、N,N-ジメチルエストロン-3-スルファメートのようなスルファメートエステルであり、そして好ましくはエストロン-3-スルファメート(そうでなければ「EMATE」として知られる)である。

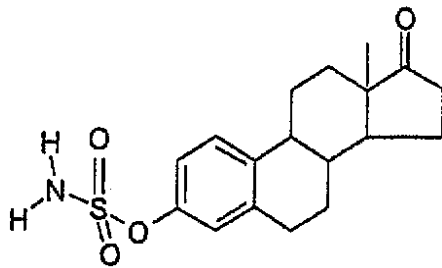
10

【0006】

EMATE(2-メトキシエストロン-3-O-スルファメート)(これは、エストロン-3-O-スルファメートのアナログである)は、以下の構造:

【0007】

【化1】



20

を有する。EMATEが強力なE1-S-T-Sインヒビターであることは公知である。なぜならば、これは、0.1mMでインタクトなMCF-7細胞において99%より高いE1-S-T-S活性の阻害を示すからである。EMATEはまた、E1-S-T-S酵素を、時間依存性かつ濃度依存性の様式で阻害し、このことは、EMATEが活性部位指向性不活性化因子(inactivator)として作用することを示す。EMATEは、元々E1-S-T-Sの阻害のために設計されたが、これはまた、ジヒドロエピアンドロステロンスルファターゼ(DHA-S-T-S)を阻害する。この酵素は、エストロゲン性ステロイドアンドロステンジオールの生合成を調節する際に中枢の役割を有すると考えられる。また、現在では、アンドロステンジオールが乳房腫瘍増殖のプロモーターとして非常に重要でさえあり得ることを示す証拠が存在する。EMATEはまた、インビボでも活性である。なぜならば、経口かまたは皮下のいずれかで投与される場合に、ラット肝臓E1-S-T-S活性(99%)およびDHA-S-T-S活性(99%)のほとんど完全な阻害を生じたからである。さらに、EMATEは、ラットにおいて記憶増強効果を有することが示された。マウスにおける研究は、DHA-S-T-S活性と免疫応答の一部の調節との間の関係を示唆した。これはまたヒトでも起こり得ると考えられる。EMATE中のスルファメート部分のO原子を架橋することは、阻害活性のために重要である。従って、3-O-原子が、エストロン-3-N-スルファメートおよびエストロン-3-S-スルファメートにおけるように、他のヘテロ原子で置換される場合、これらのアナログは、より弱い時間非依存性不活性化因子である。

30

40

【0008】

E1-S-T-Sの阻害について最適な効力はEMATEにおいて達成され得たが、エストロンが、スルファターゼ阻害の間に放出され得ること、およびEMATEおよびそのエスト

50

ラジオール同族体が、エストロゲン様活性を有し得ることは、可能である。

【0009】

Ahmedら (Biochem Biophys Res Commun 1999 Jan 27; 254(3): 811-5) は、STSのステロイドインヒビターおよびステロイドインヒビターの構造 - 活性相関研究について報告する。

【0010】

本発明は、E1-STSの阻害および他の治療的適用に適切な新規な化合物を提供することを目的とする。

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、特定の八口化合物が有効なステロイドスルファターゼインヒビターとして使用され得るという驚くべき発見に基づく。

【0012】

八口化合物は、環系化合物の置換基である少なくとも1個の八口基を含む。この環系化合物は、少なくとも1個の環成分を含む。この環成分は、環内に少なくとも4個の原子を含む。代表的には、これらの4個の原子は、炭素原子である。従って、代表的には、この環成分は、ヒドロカルビル基である。この環系化合物はまた、この環系上のさらなる置換基として、スルファメート基、ホスホネート基、チオホスホネート基、スルホネート基またはスルホンアミド基のうち1種以上を含む。スルファメート基、ホスホネート基、チオホスホネート基、スルホネート基またはスルホンアミド基の少なくとも1種は、環成分上の置換基である。好ましい局面において、八口基は、少なくとも1個のスルファメート基、ホスホネート基、チオホスホネート基、スルホネート基またはスルホンアミド基を有する原子に隣接する原子上の置換基である。

【0013】

本発明の八口化合物は、他の置換基を含み得る。これらの他の置換基は、例えば、本発明の化合物の活性をさらに増加し得、および/または安定性(エキソピボおよび/またはインピボ)を増加し得る。

【0014】

(発明の詳細な局面)

本発明の1局面によれば、図1に提供される式(Ia)の化合物が提供され、ここで: Xは、環内に少なくとも4個の原子を有するヒドロカルビル環であり; Kは、ヒドロカルビル基であり; Rh1は、任意の八口基であり; Rh2は、任意の八口基であり; Rh1およびRh2のうち少なくとも1個が存在し; Rsは、スルファメート基、ホスホネート基、チオホスホネート基、スルホネート基またはスルホンアミド基のうちいずれか1個であり; そしてここで、この化合物は、ステロイドスルファターゼ(STS)活性を阻害し得る。

【0015】

本発明の1局面によれば、(a)式(Ia)を有する1種以上の候補化合物を用いて、ステロイドスルファターゼアッセイを実施する、工程; (b)該候補化合物の1種以上が、STS活性を調節し得るかどうかを決定する、工程; および(c)STS活性を調節し得る候補化合物の1種以上を選択する、工程を含む方法が提供される。

【0016】

本発明の1局面によれば、(a)式(Ia)を有する1種以上の候補化合物を用いて、ステロイドスルファターゼアッセイを実施する、工程; (b)該候補化合物の1種以上が、STS活性を調節し得るかどうかを決定する、工程; および(c)STS活性を阻害し得る候補化合物の1種以上を選択する、工程、を含む方法が提供される。

【0017】

本発明の方法のいずれか1つにおいて、1つ以上の追加の工程が存在し得る。例えば、この方法はまた、(例えば、化学的技術および/または酵素的技術によって)同定された候補化合物を調節する工程、およびSTS阻害効果(この効果はより大きいかまたは異なる

10

20

30

40

50

場合に、見られ得る)について改変された化合物を試験する任意のさらなる工程、を包含する。さらなる例として、この方法はまた、同定された候補化合物の構造を(例えば、結晶学的技術の使用によって)決定し、次いで、(そのSTS阻害作用をさらに増加するために)コンピューターモデリング研究を実施する工程を包含する。従って、本発明はまた、上記の同定された候補化合物についてのデータセット(例えば、結晶学的座標)を有するコンピューターを包含する。本発明はまた、タンパク質結合研究のような分析のためのコンピュータースクリーン上に提供される際に同定された候補化合物を包含する。

【0018】

本発明の1局面によれば、本発明の方法によって同定された化合物が提供される。

【0019】

本発明の1局面によれば、医薬における使用のための本発明に従う化合物が提供される。

【0020】

本発明の1局面によれば、必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、賦活剤または補助剤と混合された、本発明に従う化合物を含む薬学的組成物が提供される。

【0021】

本発明の1局面によれば、STSに関連した状態または疾患の治療における使用のための医薬の製造における本発明に従う化合物の使用が提供される。

【0022】

本発明の1局面によれば、有害STSレベルに関連した状態または疾患の治療における使用のための医薬の製造における本発明に従う化合物の使用が提供される。

【0023】

参照を容易にするために、本発明のこれらの局面およびさらなる局面は、本明細書中において、適切な節の表題下で議論される。しかし、各節下での教示は、必ずしも、各々の特定節に限定されずとは限らない。

【0024】

(好ましい局面)

好ましくは、Yと結合したXは、ステロイド構造を模倣する。

【0025】

好ましくは、Kは、環式基である。

【0026】

好ましくは、Xは、6員環である。

【0027】

好ましくは、X環は、環内に6個の炭素原子を有する。

【0028】

好ましくは、Yと結合したXは、ステロイド環構造である。

【0029】

好ましくは、K基およびX環は、ステロイド環構造またはそれらの置換された誘導体である。

【0030】

好ましくは、Rs基は、X環の3位である。

【0031】

好ましくは、Rsは、スルファメート基である。

【0032】

好ましくは、Rh1は、X環の2位である。

【0033】

好ましくは、Rh2は、X環の4位である。

【0034】

好ましくは、式(Ia)の化合物は、式(Ib)として提供される式を有し、ここで、Rh1、Rh2、Rs、XおよびKの各々は、上記の意味を有し、ここでRh1およびRh2のうちの少なくとも1個が、存在する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

好ましくは、K基およびX環は、一緒になって、全ての置換基を包括し、最大で、約50個の炭素原子、より通常は、約30～40個以下の炭素原子を含む。

【 0 0 3 6 】

幾つかの適用の場合、好ましくは、この化合物は、エストロゲン効果を有しないか、または最小限のエストロゲン効果を有する。

【 0 0 3 7 】

幾つかの適用の場合、好ましくは、この化合物は、エストロゲン効果を有する。

【 0 0 3 8 】

幾つかの適用の場合、好ましくは、この化合物は、可逆性の作用を有する。

10

【 0 0 3 9 】

幾つかの適用の場合、好ましくは、この化合物は、不可逆性の作用を有する。

【 0 0 4 0 】

1実施形態において、本発明の化合物は、胸部癌の処置に有用である。

【 0 0 4 1 】

2つの好ましい化合物は、2-ヨードEMATEおよび2-ブロモEMATEである。

【 0 0 4 2 】

(幾つかの利点)

本発明の1つの重要な利点は、本発明のスルファメート化合物がSTSインヒビターとして作用し得ることである。

20

【 0 0 4 3 】

本発明の化合物の別の利点は、それらがインビボにおいて有効であり得ることである。

【 0 0 4 4 】

本発明の化合物の幾つかは、非エストロゲン性化合物であり得る。本明細書中において、用語「非エストロゲン性」とは、エストロゲン活性を全く示さないか、または実質的に示さないことを意味する。

【 0 0 4 5 】

別の利点は、この化合物の幾つかは、ホルモン活性を表示または誘発する化合物に代謝され得ないことである。

【 0 0 4 6 】

本発明の化合物の幾つかはまた、それらが経口活性であり得るという点で有利である。

30

【 0 0 4 7 】

本発明の化合物の幾つかは、特に、医薬が初期年齢から投与される必要があり得る際、癌(例えば、胸部癌)、および(あるいは)非悪性状態(例えば、自己免疫疾患の防止)の処置に有用であり得る。

【 0 0 4 8 】

従って、本発明の化合物はまた、内分泌依存癌の処置(例えば、自己免疫疾患の処置)以外の治療用途を有すると考えられる。

【 0 0 4 9 】

(ステロイドスルファターゼ)

ステロイドスルファターゼは、時折、ステロイドスルファターゼまたはステリルスルファターゼまたは略して「STS」といわれるが、エストロンスルフェート、デヒドロエピアンドロステロンおよびコレステロールスルフェートのような幾つかの硫酸化ステロイド(sulphated steroid)を加水分解する。STSは、酵素番号EC3.1.6.2が割り当てられる。

40

【 0 0 5 0 】

STSは、クローン化され、そして発現されてきた。例えば、Steinら(J. Biol. Chem. 264:13865-13872(1989))およびYenら(Cell 49:443-454(1987))を参照のこと。

【 0 0 5 1 】

50

S T S は、多くの疾患状態に関連付けられてきた酵素である。

【 0 0 5 2 】

例えば、研究者は、S T S の全欠乏症が魚鱗癬を産生することを発見した。幾つかの研究者によれば、S T S 欠乏症は、日本において非常に流行している。同じ研究者 (S a k u r a ら、J I n h e r i t M e t a b D i s 1 9 9 7 N o v ; 2 0 (6) : 8 0 7 - 1 0) はまた、アレルギー性疾患 (例えば、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、またはアトピー性皮膚炎) が、ステロイドスルファターゼ欠乏症と関連し得ることを報告した。

【 0 0 5 3 】

S T S 活性の全体的欠乏を通して生じる疾患状態に加えて、S T S 活性の増加したレベルはまた、ほとんどの疾患状態をもたらし得る。例として、上記に示されるように、胸部癌増殖および転移における S T S の役割を支持する強力な証拠が存在する。

【 0 0 5 4 】

S T S はまた、他の疾患条件に関連付けられてきた。例えば、L e R o y ら (B e h a v G e n e t 1 9 9 9 M a r ; 2 9 (2) : 1 3 1 - 6) は、ステロイドスルファターゼ濃度とマウスの発作挙動の開始との間に遺伝的な相関性が存在し得ることを決定した。この著者らは、ステロイドの硫酸化が、突然変異誘発による攻撃に関連することが示された遺伝子を含む、複合ネットワークのプライムムーバー (p r i m e m o v e r) であり得ると結論付けた。

【 0 0 5 5 】

(S T S 阻害)

S T S 活性に関連した幾つかの疾患状態は、不活性な硫酸化エストロンの活性な非硫酸化エストロンへの転化によると考えられる。S T S 活性に関連した疾患状態において、S T S 活性を阻害することが所望される。

【 0 0 5 6 】

本明細書中において、用語「阻害する」とは、S T S の有害作用を低減および/または排除および/またはマスクおよび/または防止することを含む。

【 0 0 5 7 】

(S T S インヒビター)

本発明に従って、本発明の化合物は、S T S インヒビターとして作用し得る。

【 0 0 5 8 】

本明細書中において、本発明の化合物に関して、本明細書中で使用される用語「インヒビター」とは、S T S 活性を阻害し得る、例えば、S T S の有害作用を低減および/または排除および/またはマスクおよび/または防止し得る化合物を意味する。S T S インヒビターは、アンタゴニストとして作用し得る。

【 0 0 5 9 】

エストロンスルファターゼ活性を阻害する化合物の能力は、インタクトな M C F - 7 胸部癌細胞または胎盤ミクロソームのいずれかを使用して評価され得る。さらに、動物モデルが使用され得る。適切なアッセイプロトコルについての詳細は、以下の節に提供される。他のアッセイが使用され、S T S 活性、次いで S T S 阻害を決定し得ることに注意すべきである。例えば、引用はまた、W O - A - 9 9 / 5 0 4 5 3 の教示に対して行われ得る。

【 0 0 6 0 】

好ましくは、幾つかの適用の場合、本化合物は、スルファメート基が、スルフェート基によって置換され、スルフェート誘導体を形成する場合、このスルフェート誘導体は、ステロイドスルファターゼ (E . C . 3 . 1 . 6 . 2) 活性 (すなわち、p H 7 . 4 および 3 7 でステロイドスルファターゼ E C 3 . 1 . 6 . 2 でインキュベートした場合) を有する酵素によって加水分解可能であるという特徴によってさらに特徴付けられる。

【 0 0 6 1 】

1 つの好ましい実施形態において、化合物のスルファメート基が、スルフェート基と置き換えられてスルフェート化合物を形成した場合、このスルフェート化合物がステロイドス

10

20

30

40

50

ルファターゼ (E . C . 3 . 1 . 6 . 2) 活性を有する酵素によって加水分解可能であり、pH 7 . 4 および 3 7 でステロイドスルファターゼ E C 3 . 1 . 6 . 2 でインキュベートした場合、200 mM 未満、好ましくは 150 mM 未満、好ましくは 100 mM 未満、好ましくは 75 mM 未満、好ましくは 50 mM 未満の Km 値を生じる。

【 0 0 6 2 】

好ましい実施形態において、本発明の化合物は、ステロイドスルファターゼ (E . C . 3 . 1 . 6 . 2) 活性を有する酵素によって加水分解可能ではない。

【 0 0 6 3 】

幾つかの適用の場合、好ましくは、本発明の化合物は、所望の標的 (例えば、STS) に対して少なくとも約 100 倍の選択性を有し、好ましくは、所望の標的に対して少なくとも約 150 倍の選択性を有し、好ましくは、所望の標的に対して少なくとも約 200 倍の選択性を有し、好ましくは、所望の標的に対して少なくとも約 250 倍の選択性を有し、好ましくは、所望の標的に対して少なくとも約 300 倍の選択性を有し、好ましくは、所望の標的に対して少なくとも約 350 倍の選択性を有する。

10

【 0 0 6 4 】

本発明の化合物は、STS 活性を阻害する能力に加えて、またはその能力の代わりに、他の有利な特性を有し得る。

【 0 0 6 5 】

(K 基)

K 基は、環式構造である必要はない。この点において、K 基は、インビボにおいて環様構造に従う能力を有し得る直鎖構造であり得る。

20

【 0 0 6 6 】

好ましい局面において、K 基は、環式であり、環式基 K を形成する。

【 0 0 6 7 】

環式 K は、必ずしも X 環に縮合される必要はない。この点において、それらは、適切なスペーサー基 (ヒドロカルビル基であり得る) によって隔てられ得る。

【 0 0 6 8 】

好ましい局面において、環式基 K は、X 環に縮合される。

【 0 0 6 9 】

K 基は、多環式基であり得、縮合された多環式である必要はない。

30

【 0 0 7 0 】

従って、好ましい局面において、K 基および環 X は、多環式化合物を構成する。示されるように、本明細書中での用語「多環式」は、縮合環構造および非縮合環構造 (それらの組み合わせを含む) を含む。

【 0 0 7 1 】

環式基 K および X のうちの少なくとも 1 個は、複素環式基 (複素環) または非複素環式基であり得る。

【 0 0 7 2 】

環式基 K および X のうちの少なくとも 1 個は、飽和環構造または不飽和環構造 (例えば、アリール基) であり得る。

40

【 0 0 7 3 】

好ましくは、環式基の少なくとも 1 個は、アリール環である。

【 0 0 7 4 】

この環式基が、多環式である場合、この化合物の環成分の幾つかまたは全ては、一緒に縮合されるか、または 1 個以上の適切なスペーサー基を介して接合され得る。

【 0 0 7 5 】

この多環式化合物は、多くの縮合環を含み得る。この点において、縮合環は、異なるサイズの環 (例えば、3 つの 6 員環 (6, 6, 6)、1 つの 6 員環、1 つの 7 員環および 1 つの 6 員環 (6, 7, 6)、1 つの 6 員環および 2 つの 8 員環 (6, 8, 8) など) の任意の組み合わせを含み得る。

50

【0076】

1局面において、本発明は、多環式化合物が(6, 6, 7)環以外である化合物に関する。さらなる局面において、本発明は、多環式化合物が7員以外を有する特定の環のみを含む化合物に関する。

【0077】

好ましくは、多環式化合物は、全ての置換基を包括し、約50以下の炭素原子、より通常は、約30~40個以下の炭素原子を含む。

【0078】

この多環式化合物は、少なくとも2個の環成分、または少なくとも3個の環成分、または少なくとも4個の環成分を含み得る。

10

【0079】

好ましくは、この多環式化合物は、4個の環成分を含む。

【0080】

好ましい多環式化合物は、ステロイド性環成分、またはその生体-等配電子体(bio-isostere)を有する。

【0081】

(ヒドロカルビル)

本明細書中で使用される場合の用語「ヒドロカルビル基」は、少なくともCおよびHを含む基を意味し、そして必要に応じて1つ以上の他の適切な置換基を含み得る。このような置換基の例としては、ハロ、アルコキシ、ニトロ、アルキル基、環式基などが挙げられ得る。これらの置換基が環式基である可能性に加えて、置換基の組合せが環式基を形成し得る。ヒドロカルビル基が、1つより多くのCを含む場合、これらの炭素は、必ずしも互いに連結される必要はない。例えば、少なくとも2つの炭素は、適切な元素または基を介して連結され得る。したがって、ヒドロカルビル基は、特定のヘテロ原子を含み得る。適切なヘテロ原子は、当業者に明らかであり、これらとしては、例えば、イオウ、窒素および酸素が挙げられる。ヒドロカルビル基の非限定的な例は、アシル基である。

20

【0082】

代表的なヒドロカルビル基は、炭化水素基である。本明細書中で、用語「炭化水素」は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基のいずれか1つを意味し、これらの基は、直鎖、分岐鎖、または環式であり得るか、またはアリール基であり得る。用語炭化水素もまた、必要に応じて置換されているこれらの基を含む。炭化水素が、炭化水素上に置換基(単数または複数)を有する分岐した構造である場合、この置換(単数)は、炭化水素骨格上でも分岐上でもよい;あるいは、これらの置換(複数)は、炭化水素骨格上でも分岐上でもよい

30

(スルファメート基)

1つの実施形態において、環Xは、置換基としてスルファメート基を有する。本明細書中で使用される場合の用語「スルファメート」は、スルファミン酸のエステル、もしくはスルファミン酸のN-置換誘導体のエステル、またはその塩を含む。

【0083】

R_sがスルファメート基である場合、本発明の化合物は、スルファメート化合物と称される。

40

【0084】

代表的には、スルファメート基は、以下の式:

(R₁)(R₂)N-S(O)(O)-O-

を有し、ここで好ましくはR₁およびR₂は、独立して、H、アルキル、シクロアルキル、アルケニルおよびアリール、またはその組合せから選択されるか、または共にアルキレンを表わし、ここで各アルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルは、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を含む。

【0085】

置換される場合、本発明のN-置換化合物は、1つまたは2つの、N-アルキル置換基、

50

N - アルケニル置換基、N - シクロアルキル置換基またはN - アリール置換基を含み得、これらは、好ましくは最大10個の炭素原子を含むか、それぞれ最大10個の炭素原子を含む。R1および/またはR2が、アルキルである場合、好ましい基は、R1およびR2が、1~6個の炭素原子を含む低級アルキル基(すなわち、メチル、エチル、プロピルなど)からそれぞれ独立して選択される基である。R1およびR2は、両方ともメチルであり得る。R1および/またはR2がアリールである場合、代表的なものは、フェニルおよびトリル(PhCH₃; o)である。R1およびR2がシクロアルキルを表わす場合、代表的なものは、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどである。共に連結される場合、R1およびR2は、代表的には4~6個の炭素原子鎖を生じるアルキレン基を表わし、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を介在させ、例えば、5員環複素環(例えば、モルホリノ、ピロリジノまたはピペリジノ)を生じる。

10

【0086】

アルキル置換基、シクロアルキル置換基、アルケニル置換基およびアリール置換基には、目的の化合物のスルファターゼ阻害活性を妨害しない1つ以上の基を置換基として含む基が含まれる。例示的な非妨害置換基としては、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキルおよびアリールが挙げられる。

【0087】

いくつかの実施形態において、スルファメート基は、基X中または基X上の1つ以上の原子に縮合される(または結合される)ことにより環構造を形成し得る。

【0088】

いくつかの実施形態において、1つより多くのスルファメート基が存在し得る。例として、2つのスルファメートが存在し得る(すなわち、ビス-スルファメート化合物)。これらの化合物がステロイド様核を基本とする場合、好ましくは、第2のスルファメート基(またはさらなるスルファメート基の少なくとも1つ)は、ステロイド様核の17位に位置する。これらの基は、同じである必要はない。

20

【0089】

いくつかの好ましい実施形態において、R1およびR2の少なくとも1つはHである。

【0090】

いくつかのさらなる好ましい実施形態において、R1およびR2の各々がHである。

【0091】

(ホスホネート基)

R_sがホスホネート基である場合、本発明の化合物は、ホスホネート化合物と称される。

30

【0092】

代表的には、ホスホネート基は、以下の式：

(R1) - P(O)(OH) - O -

を有し、ここで好ましくは、R1は、H、アルキル、シクロアルキル、アルケニルもしくはアリールまたはそれらの組合せであり、ここでアルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルのそれぞれは、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を含む。

【0093】

置換される場合、本発明のN - 置換化合物は、1つまたは2つの、N - アルキル置換基、N - アルケニル置換基、N - シクロアルキル置換基、またはN - アリール置換基を含み得、好ましくは、最大10個の炭素原子を含むか、それぞれ最大10個の炭素原子を含む。R1がアルキルの場合、R1は、1~6個の炭素原子を含む低級アルキル基(すなわち、メチル、エチル、プロピルなど)であり得る。例として、R1はメチルであり得る。R1がアリールである場合、代表的なものはフェニルおよびトリル(PhCH₃; o)である。R1がシクロアルキルを表わす場合、代表的なものは、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどである。R1は、4~6個の炭素鎖を生じるアルキレン基を含み得、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を介在させて、例えば、5員環複素環(例えば、モルホリノ、ピロリジノ、またはピペリジノ)を生じる。

40

【0094】

50

これらの基には、目的の化合物のスルファターゼ阻害活性を妨害しない1つ以上の基を置換基として含む、アルキル置換基、シクロアルキル置換基、アルケニル置換基およびアリール置換基が含まれる。例示的な非妨害性置換基としては、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキルおよびアリールが挙げられる。

【0095】

いくつかの実施形態において、ホスホネート基は、基X中または基X上の1つ以上の原子と縮合される（または結合する）ことにより環構造を形成し得る。

【0096】

いくつかの実施形態において、1より多くのホスホネート基が存在し得る。例として、2つのホスホネートが存在し得る（すなわち、ビスホスホネート化合物）。これらの化合物がステロイド様核を基本とする場合、好ましくは、第2のホスホネート基（またはさらなるホスホネート基の少なくとも1つ）は、ステロイド様核の17位に位置する。これらの基は、同じである必要はない。

10

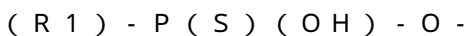
【0097】

（チオホスホネート基）

R_sがチオホスホネート基である場合、本発明の化合物は、チオホスホネート化合物と称される。

【0098】

代表的には、チオホスホネート基は、以下の式：



20

を有し、ここで好ましくは、R₁は、H、アルキル、シクロアルキル、アルケニルもしくはアリールまたはそれらの組合せであり、ここでアルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルのそれぞれは、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を含む。

【0099】

置換される場合、本発明のN-置換化合物は、1つまたは2つのN-アルキル置換基、N-アルケニル置換基、N-シクロアルキル置換基、またはN-アリール置換基を含み得、好ましくは、最大10個の炭素原子を含むか、それぞれ最大10個の炭素原子を含む。R₁がアルキルの場合、R₁は、1~6個の炭素原子を含む低級アルキル基（すなわち、メチル、エチル、プロピルなど）であり得る。例として、R₁はメチルであり得る。R₁がアリールである場合、代表的なものはフェニルおよびトリル（PhCH₃; o）である。R₁がシクロアルキルを表わす場合、代表的なものは、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどである。R₁は、4~6個の炭素鎖を生じるアルキレン基を含み得、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を介在させて、例えば、5員環複素環（例えば、モルホリノ、ピロリジノ、またはピペリジノ）を生じる。

30

【0100】

これらの基には、目的の化合物のスルファターゼ阻害活性を妨害しない1つ以上の基を置換基として含む、アルキル置換基、シクロアルキル置換基、アルケニル置換基およびアリール置換基が含まれる。例示的な非妨害性置換基としては、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキルおよびアリールが挙げられる。

【0101】

いくつかの実施形態において、チオホスホネート基は、基X中または基X上の1つ以上の原子と縮合される（または結合する）ことにより環構造を形成し得る。

40

【0102】

いくつかの実施形態において、1より多くのチオホスホネート基が存在し得る。例として、2つのチオホスホネートが存在し得る（すなわち、ビスチオホスホネート化合物）。これらの化合物がステロイド様核を基本とする場合、好ましくは、第2のチオホスホネート基（またはさらなるチオホスホネート基の少なくとも1つ）は、ステロイド様核の17位に位置する。これらの基は、同じである必要はない。

【0103】

（スルホネート基）

50

R_sがスルホネートである場合、本発明の化合物は、スルホネート化合物と称される。

【0104】

代表的には、スルホネート基は、以下の式：



を有し、ここで好ましくは、R₁は、H、アルキル、シクロアルキル、アルケニルもしくはアリール、またはそれらの組合せであり、ここでアルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルは、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を含む。

【0105】

置換される場合、本発明のN-置換化合物は、1つまたは2つの、N-アルキル置換基、N-アルケニル置換基、N-シクロアルキル置換基またはN-アリール置換基を含み得、
10
これらは、好ましくは最大10個の炭素原子を含むか、それぞれ最大10個の炭素原子を含む。R₁が、アルキルである場合、R₁は、1~6個の炭素原子を含む低級アルキル基（すなわち、メチル、エチル、プロピルなど）であり得る。例として、R₁は、メチルであり得る。R₁がアリールである場合、代表的なものは、フェニルおよびトリル（PhCH₃；o）である。R₁がシクロアルキルを表わす場合、代表的なものは、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどである。R₁は、4~6個の炭素原子の鎖を生じるアルキレン基さえ含み得、必要に応じて1つ以上のヘテロ原子または基を介在させ、例えば、5員環複素環（例えば、モルホリノ、ピロリジノまたはピペリジノ）を生じる。

【0106】

これらの基には、アルキル置換基、シクロアルキル置換基、アルケニル置換基およびアリー
20
ール置換基には、目的の化合物のスルファターゼ阻害活性を妨害しない1つ以上の基を置換基として含む基が含まれる。例示的な非妨害置換基としては、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキルおよびアリールが挙げられる。

【0107】

いくつかの実施形態において、スルホネート基は、基X中または基X上の1つ以上の原子に縮合される（または結合される）ことにより環構造を形成し得る。

【0108】

いくつかの実施形態において、1つより多くのスルホネート基が存在し得る。例として、
30
2つのスルホネートが存在し得る（すなわち、ビス-スルホネート化合物）。これらの化合物がステロイド様核を基本とする場合、好ましくは、第2のスルホネート基（またはさらなるスルホネート基の少なくとも1つ）は、ステロイド様核の17位に位置する。これらの基は、同じである必要はない。

【0109】

（スルホネート/ホスホネート/チオホスホネート/スルファメートの組合せ）

本発明のいくつかの化合物に関して、1つの、本明細書中で規定されるようなスルホネートまたは本明細書中で規定されるようなホスホネートまたは本明細書中で規定されるようなチオホスホネートまたは本明細書中で規定されるようなスルファメート；および別の、本明細書中で規定されるようなスルホネートまたは本明細書中で規定されるようなホスホネートまたは本明細書中で規定されるようなチオホスホネートまたは本明細書中で規定されるようなスルファメートが存在し得る。例としては、本発明の化合物は、1つのスル
40
ファメート基および1つのホスホネート基を含み得る。

【0110】

本発明のこれらの化合物がステロイド様核を基本とする場合、好ましくは他のこれらの基は、ステロイド様核の17位に位置する。

【0111】

（模倣物（mimic））

1つの局面において、XおよびKは、ステロイド様環構造の模倣物であり得る。

【0112】

本明細書中で使用される場合の用語「模倣物」は、同様または異なる構造を有するが同様の機能的効果を有することを意味する。換言すると、基Kおよび環Xは、共に、ステロイ
50

ド環の生体等配電子体 (bio-isostere) またはその活性部分であり得る。

【0113】

好ましい局面において、基 K および環 X は、共に、エストロン環の生体等配電子体、またはその部分であり得る。

【0114】

(ステロイド環構造)

1つの好ましい局面において、X および K は、ステロイド環構造を作製する - すなわち、シクロペンタンフェナントレン骨格、またはその生体の等配電子体である。

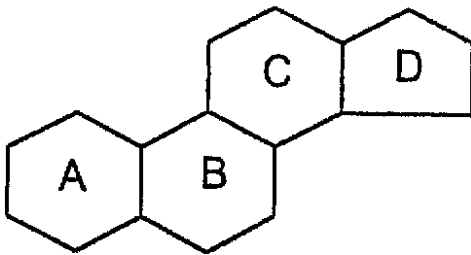
【0115】

当該分野で公知のように、伝統的なステロイド環構造は、一般式：

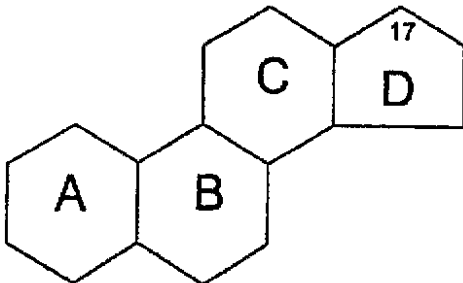
10

【0116】

【化2】



20



30

を有する。

【0117】

上記の式において、環は、慣例的な様式で標識されてきた。

【0118】

生体の等配電子体の例としては、環 A、B、C および D の任意の 1 つ以上が複素環式環である場合および / または環 A、B、C および D の任意の 1 つ以上が置換されている場合および / または環 A、B、C および D の任意の 1 つ以上が修飾されている場合であるが、ここで、スルファメート基の非存在下の生体の等配電子体がステロイド特性を有する。

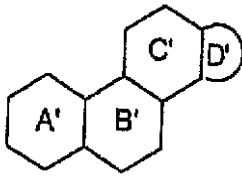
40

【0119】

これに関して、好ましい多環構造の構造は、以下のように示され得る：

【0120】

【化3】



ここで、各環 A'、B'、C'、D' は、独立してヘテロ環式環または非ヘテロ環式環を示す、この環は、独立して置換されていても置換されていなくてもよく、飽和でもよいし、不飽和でもよい。

10

【0121】

例として、環 A'、B'、C'、D' のいずれか 1 つ以上は独立して、適切な基（例えば、アルキル基、アリル基、ヒドロキシ基、ハロ基、ヒドロカルビル基、オキシヒドロカルビル基など）で置換され得る。

【0122】

D' の好ましい例は、五員環または六員環の、少なくとも 1 つの置換基を有する非ヘテロ環式環である。

【0123】

1 つの好ましい実施形態では、環 D' は、エチニル基で置換される。

【0124】

環 A'、B'、C'、D' のいずれか 1 つがヘテロ環式環である場合、C 原子の組み合わせ、および少なくとも 1 つの N 原子、および / または少なくとも 1 つの O 原子を包含することが好ましい。他のヘテロ環式環原子は、環中に存在し得る。

20

【0125】

本発明の化合物の適切な、好ましいステロイド核環 A' - D' の例としては、デヒドロエピアンドロステロンおよびエストロンを含むエストロゲンの環 A - D が挙げられる。

【0126】

本発明の化合物の好ましいステロイド核環 A' - D' は、以下の環 A - D を含む：

エストロンおよび置換エストロン、すなわち：

エストロン

4 - OH - エストロン

6 - OH - エストロン

7 - OH - エストロン

16 - OH - エストロン

16 - OH - エストロン

17 - デオキシエストロン

エストロン

エストラジオールおよび置換エストラジオール、すなわち：

4 - OH - 17 - エストラジオール

6 - OH - 17 - エストラジオール

7 - OH - 17 - エストラジオール

4 - OH - 17 - エストラジオール

6 - OH - 17 - エストラジオール

7 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

17 - エストラジオール

17 - エストラジオール

30

40

50

17 - エチニル - 17 - エストラジオール

17 - エチニル - 17 - エストラジオール

17 - デオキシエストラジオール

エストリオールおよび置換エストリオール、すなわち：

エストリオール

4 - OH - エストリオール

6 - OH - エストリオール

7 - OH - エストリオール

17 - デオキシエストリオール

デヒドロエピアンドロステロンおよび置換デヒドロエピアンドロステロン、すなわち：

デヒドロエピアンドロステロン

6 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

7 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

16 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

16 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

一般に、用語、環系 A' B' C' D' は、種々の非干渉置換基を含み得る。特に、環系 A

' B' C' D' は、1以上のヒドロキシ、アルキル（特に低級（C₁ ~ C₆）アルキル、

例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、

tert-ブチル、n-ペンチル、および他のペンチル異性体、ならびにn-ヘキシルお

よび他のヘキシル異性体）、アルコキシ（特に低級（C₁ ~ C₆）アルコキシ、例えば、

メトキシ、エトキシ、プロポキシなど）、アルキニル（例えば、エチニル）、またはハロ

ゲン（例えば、フルオロ置換基）を含み得る。

【0127】

（非ステロイド構造）

代替的な実施態様では、本発明の化合物は、ステロイド核を含まなくてもよいし、ステロ

イド核に基づかなくてもよい。これに関して、この多環式化合物は、非ステロイド環系（

例えば、ジエチルスチルベステロール、スチルベステロール、クマリン、フラボノイド、

コンプレスタチン（combr estatin）および他の環系）を含み得るかまたはこれ

に基づき得る。本発明中のかまたは本発明の組成物としての使用のための他の適切な非

ステロイド化合物は、米国特許第5567831号において見出され得る。

【0128】

（他の置換基）

本発明の化合物は、Rh1、Rh2およびRs以外の置換基を有する。例としては、これ

らの他の置換は、以下の1つ以上であり得る：1以上のスルファメート基、1以上のホス

ホネート基、1以上のチオホスホネート基、1以上のスルホンアミド基、1以上のハロ基

、1以上のO基、1以上のヒドロキシ基、1以上のアミノ基、1以上の硫酸含有基、1以

上のヒドロカルビル基（例えば、オキシヒドロカルビル基）。

【0129】

（オキシヒドロカルビル）

本明細書で使用される場合、用語「ヒドロカルビル」基は、少なくともC、HおよびOを

含む基を意味し、必要に応じて1つ以上の他の適切な置換基を含み得る。そのような置換

基の例は、ハロ -、アルコキシ -、ニトロ -、アルキル基、環式基などを包含し得る。置換

基が環式基になる可能性に加えて、置換基の組み合わせが環式基を形成し得る。オキシ

ヒドロカルビル基が1つ以上のCを含む場合、それらの炭素は必ずしも互いに結合される

必要はない。例えば、少なくとも2つの炭素が、適切な元素または基を介して結合され得

る。したがって、オキシヒドロカルビル基は、ヘテロ原子を含み得る。適切なヘテロ原子

は、当業者に明白であり、例えば、硫黄および窒素を含む。

【0130】

本発明の1つの実施態様において、オキシヒドロカルビル基はオキシヒドロカーボン基で

ある。

10

20

30

40

50

【0131】

本明細書中において、用語「オキシヒドロカーボン」はアルコキシ基、オキシアルケニル基、オキシアルキニル基（これら基は直鎖、分岐もしくは環状であり得る）またはアリル基を意味する。用語、オキシヒドロカーボンはまたこれらの基を含むが、ここでこれらは必要に応じて置換されている。オキシヒドロカーボンが、その上に置換基を有する分岐構造である場合、置換は炭化水素主鎖上もしくは側鎖上のどちらかにあり得る；あるいは、置換は炭化水素主鎖上および側鎖上にあり得る。

【0132】

代表的には、オキシヒドロカルビル基は、式 $C_{1-6}O$ （例えば、 $C_{1-3}O$ ）で表される。

【0133】

（癌細胞を使用するSTS活性を測定するためのアッセイ（プロトコル1））（MCF-7細胞におけるステロイドスルファターゼ活性の阻害）
ステロイドスルファターゼ活性を、インタクトなMCF-7ヒト乳癌細胞を用いてインピットロにおいて測定した。このホルモン依存性細胞株は、ヒト乳癌細胞の増殖のコントロールを研究するのに広く用いられている。それは、顕著なステロイドスルファターゼ活性（MacIndoeら、*Endocrinology*, 123, 1281-1287 (1988)；PurohitおよびReed、*Int. J. Cancer*, 50, 901-905 (1992)）を有し、合衆国では、American Type Culture Collection (ATCC) から、および英国では、例えば、The Imperial Cancer Research Fundから入手できる。

細胞を、20 mM HEPES、5%ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、非必須アミノ酸ならびに0.075%重炭酸ナトリウムを含有する最小必須培地（MEM）（Flow Laboratories, Irvine, Scotland）で保持する。30複製まで25 cm²組織培養フラスコを、上記の培地を用いておおよそ1 × 10⁵細胞/フラスコで播種した。細胞を、80%コンフルエントまで増殖させ、そして培地を3日ごとに換えた。

【0134】

3組の25 cm²組織培養フラスコにおけるMCF-7細胞の完全な単一層を、Earleの平衡塩溶液（Earle's Balanced Salt Solution）（ICN Flow, High Wycombe, U.K.からのEBSS）で洗浄し、そしてエストロン-3-スルファメート（11濃度：0；1 fM；0.01 pM；0.1 pM；1 pM；0.01 nM；0.1 nM；1 nM；0.01 mM；0.1 mM；1 mM）と一緒に無血清MEM（2.5 ml）中の5 pmol（7 × 10⁵ dpm）[6, 7-³H]エストロン-3-スルフェート（比活性60 mCi/mmolのものをNew England Nuclear, Boston, Mass., U.S.Aから）と共に37において3～4時間インキュベートした。インキュベーションした後、各々のフラスコを、冷却し、培地（1 ml）を、[¹⁴C]エストロン（7 × 10³ dpm）（比活性97 Ci/mmolのものをAmersham International Radiochemical Centre, Amersham, U.K.から）を含有する別々のチューブにピペットで分けた。混合物を、トルエン（5 ml）とともに30秒間よく振った。実験は、90%より多い[¹⁴C]エストロンおよび0.1%より少ない[³H]エストロン-3-スルフェートが、この処理によって水相から取り除かれたことを示した。有機相の一部（2 ml）を取り除き、エバポレートし、そして残渣の³Hおよび¹⁴Cの含有量を、シンチレーションスペクトロメトリーによって決定した。加水分解されたエストロン-3-スルフェートの質量を、得られた³Hのカウント（培地の容量および用いた有機相の容量ならびに加えた[¹⁴C]エストロンの回収容量で修正）および基質の比活性から算出した。実験の各々のバッチ（batch）は、スルファターゼポジティブのヒトの胎盤（ポジティブコントロール）から調製されたマイクロソームのインキュベーション、および細胞なしのフラスコ（基質の酵素によらない見かけの加水分解を評価する

10

20

30

40

50

ため)を包含する。フラスコごとの細胞核の数を、サポニン (Zaponin) とともに細胞単層を処理した後、コールターカウンター (Coulter Counter) を用いて決定した。各々のバッチの1つのフラスコを、細胞膜の状態および生存度をトリパンブルー排除法 (exclusion method) (Phillips, H. J. (1973): Tissue culture and applications, [Kruse, D. F. および Patterson, M. K. 編]; 406 - 408 頁; Academic Press, New York 中) を用いて評価するために用いた。

【0135】

ステロイドスルファターゼ活性の結果を 10^6 細胞に対して計算されるインキュベーション期間 (20 時間) の間に形成された総生成物 (エストロン + エストラジオール) の平均値 ± 1 S. D. として、および統計的な重要性を示す値のためにエストロン - 3 - スルファメートを含むしないインキュベーションにおける減少パーセント (阻害) として表現した。片側スチューデント t - 検定を、結果の統計的重要性を試験するために用いた。

10

【0136】

(胎盤ミクロソームを使用するSTS活性を測定するためのアッセイ (プロトコル2))
(胎盤ミクロソーム中のステロイドスルファターゼ活性の阻害)
通常の妊娠期間由来のスルファターゼポジティブのヒトの胎盤を、徹底的にはさみで細かく切り刻み、そして一旦冷リン酸緩衝液 (pH 7.4, 50 mM) で洗浄し、次いで冷リン酸緩衝液 (5 ml / g の組織) に再懸濁させた。均質化を、氷中での2分冷却時間で間を置いた3回の10秒の破碎を用いて、Ultra-Turraxホモジナイザーで達成した。核および細胞の破片を、30分間2000gで遠心分離 (4) することによって取り除き、そして上清の一部 (2 ml) を -20 で保存した。上清のタンパク質濃度を、Bradford法 (Anal. Biochem., 72, 248 - 254 (1976)) によって決定した。

20

【0137】

インキュベーション (1 ml) を、100 mg / ml のタンパク質濃度、20 mM [6, 7 - 3H] エストロン - 3 - 硫酸塩 (New England Nuclear, Boston, Mass, U. S. A. からの比活性 60 Ci / mmol) の基質濃度および37 で20分のインキュベーション時間を用いて行う。必要ならば、8つの濃度の化合物を利用する: 0 (すなわち、コントロール); 0.05 mM; 0.1 mM; 0.2 mM; 0.4 mM; 0.4 mM; 0.6 mM; 0.8 mM; 1.0 mM。インキュベーション後、各サンプルを冷却し、そして培地 (1 ml) を [14C] エストロン (7×10^3 dpm) (Amersham International Radiochemical Center, Amersham, U. K. からの比活性 97 Ci / mmol) を含む別のチューブにピペティングした。混合物をトルエン (5 ml) で30秒間徹底的に振盪する。実験は、90%より大きい [14C] エストロンおよび0.1%未満の [3H] エストロン - 3 - 硫酸塩は、この処理によって水相から除去されることを示した。有機相の一部 (2 ml) は、除去され、エバポレートされ、そして残留物の3Hおよび14C含量を、シンチレーション分光法によって決定した。加水分解されたエストロン - 3 - 硫酸塩の質量を、(使用された培地および有機相の用量について、および添加された [14C] エストロンの回収について補正された) 得られた3Hカウント数、および基質の比活性から算出する。

30

40

【0138】

(STS活性を決定するための動物アッセイモデル (プロトコル3))
(インビボでのエストロンスルファターゼの阻害)
本発明の化合物は、動物モデルを使用して、特に卵巣除去されたラットで研究され得る。このモデルにおいて、エストロゲン性 (oestrogenic) である化合物は、子宮の増殖を刺激する。

【0139】

化合物 (0.1 ml / Kg / 日で5日間) を、ラットに経口投与し、動物の別の軍は、ピ

50

ヒクル（プロピレングリコール）のみを受ける。研究の終わりに、肝臓組織のサンプルを得て、そしてエストロン硫酸塩活性を、以前記載されるように、基質として3Hエストロン硫酸塩を用いてアッセイした（PCT/GB95/02638を参照）。

【0140】

（エストロゲン性活性を決定するための動物アッセイモデル（プロトコル4））

（インビボエストロゲン性（estrogenicity）の欠失）

本発明の化合物は、動物モデルを用いて、特に卵巣除去されたラットで研究され得る。このモデルにおいて、エストロゲン（oestrogenic）である化合物は、子宮の増殖を刺激する。

【0141】

化合物（0.1ml/Kg/日で5日間）を、ラットに経口投与し、動物の別の軍は、ピヒクル（プロピレングリコール）のみを受ける。研究の終わりに、子宮を得て、そして測量し、結果を子宮の重量/全体重×100として表わした。

【0142】

子宮の増殖に有意な効果を有さない化合物は、エストロゲン性（oestrogenic）ではない。

【0143】

（STS活性を決定するための生物学的アッセイ（プロトコル5））

化合物のエストロゲン硫酸塩活性を阻害する能力はまた、例えば、高スループットのスクリーンにおいて、STS、あるいはその活性なフラグメント、誘導体、ホモログまたは改変体をコードするアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を用いて評価され得る。

【0144】

任意の1以上の適切な標的（例えば、アミノ酸配列および/またはヌクレオチド配列）は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれにおいても、STSを調節し得る因子を同定するために使用され得る。このような試験で利用される標的は、溶液中で遊離し得るか、固体支持体に固定され得るか、細胞表面上に保有され得るか、または細胞内に位置され得る。標的活性の消滅または標的と試験されている因子との間の結合複合体の形成は、測定され得る。

【0145】

本発明のアッセイは、スクリーンされ得、それによって、多くの因子が試験される。1つの局面において、本発明のアッセイ方法は、高スループットスクリーンである。

【0146】

薬物スクリーニングのための技術は、Geysen, 1984年9月13日に発表された欧州特許出願84/03564に記載される方法に基づき得る。要約すると、多くの異なる小ペプチド試験化合物を固体基質（例えば、プラスチックピン）またはいくつかの他の表面上に合成する。ペプチド試験化合物を、適切な標的またはそのフラグメントと反応させ、そして洗浄する。次いで、（例えば、当該分野において周知の方法を適切に適用することによって）結合単位を検出する。精製された標的はまた、薬物スクリーニング技術における使用のためにプレートに直接コートされ得る。あるいは、非中和抗体を使用して、ペプチドを捕捉し、そして固体支持体上に固定し得る。

【0147】

本発明はまた、競合的薬物スクリーニングアッセイの使用を予期し、ここでは、標的に結合可能な中和抗体が、標的への結合のための試験化合物と特異的に競合する。

【0148】

スクリーニングのための別の技術は、キャビテーション質に対して適切な結合親和性を有する因子の高スループットスクリーニング（HTS）を提供し、そしてWO 84/03564に詳細に記載される方法に基づく。

【0149】

本発明のアッセイ方法は、試験化合物の小規模と大規模の両方のスクリーニングにとって、そして質量アッセイにおいて適切であることが予期される。

10

20

30

40

50

【0150】

1つの好ましい局面において、本発明は、STSを選択的に調節する因子を同定する方法に関し、この化合物は、式(1a)を有する。

【0151】

(レポーター)

種々のレポーターが、本発明のアッセイ方法(およびスクリーン)において使用され得、好ましいレポーターは、好都合なことに(例えば、分光法によって)検出可能なマーカーを提供する。例として、レポーター遺伝子は、光吸収特性を変化させる反応物を触媒する酵素をコードし得る。

【0152】

他のプロトコルとしては、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光細胞分析分離装置(FACS)が挙げられる。2つの非干渉のエピトープに対するモノクローナル抗体を使用する2部位のモノクローナルベースのイムノアッセイがさらに使用され得る。これらおよび他のアッセイは、他の場所に、Hampton Rら(1990、Serological Methods、A Laboratory Manual、APS Press、St Paul MN)およびMaddox DEら(1983、J Exp Med 15:8:121-1)に記載される。

【0153】

レポーター分子の例としては、(-ガラクトシダーゼ、インペルターゼ、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、(-グルクロニダーゼ、エキソ-グルカナーゼおよびグルコアミラーゼ)が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、放射標識されるかまたは蛍光タグ標識されたヌクレオチドは、発生器の転写物に取り込まれ得、これは、次いで、オリゴヌクレオチドプローブに結合する場合に、同定される。

【0154】

さらなる実施例によって、多くの会社(例えば、Pharmacia Biotech(Piscataway, NJ)、Promega(Madison, WI)およびUS Biochemical Corp(Cleveland, OH)は、市販のキットおよびアッセイの手順のためのプロトコルを提供する。適切なレポーター分子または標識としては、放射線核種、酵素、蛍光、化学発光、または発色性因子および基質、補因子、インヒビター、磁性粒子などが挙げられる。このような標識の使用を教示する米国特許としては、US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149およびUS-A-4366241が挙げられる。

【0155】

(宿主細胞)

本発明に関して、用語「宿主細胞」は、本発明の因子に対する標的を含み得る任意の細胞を含む。

【0156】

従って、本発明のさらなる実施形態は、本発明の標的であるかまたは本発明の標的を発現するポリヌクレオチドで形質転換されるか、あるいはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。好ましくは、このポリヌクレオチドは、標的であるかまたは標的を発現するポリヌクレオチドの複製および発現のために、ベクター内に運ばれる。細胞は、このベクターと適合可能であるように選択され、そして例えば、原核生物(例えば、細菌)細胞、真菌細胞、酵母細胞、または植物細胞であり得る。

【0157】

グラム陰性細菌E. coliは、異種遺伝子発現のための宿主として広く使用される。しかし、大量の異種タンパク質は、細胞内に蓄積する傾向がある。E. coli細胞内タンパク質バルクからの所望のタンパク質の引き続いての精製は、時々、困難であり得る。

10

20

30

40

50

【0158】

E. coliと対照的に、バチルス属からの細菌は、培養培地へタンパク質を分泌するそれらの能力のため、異種宿主として非常に適切である。宿主として適切な他の細菌は、ストレプトミセス属およびシュードモナス属からの細菌である。

【0159】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの性質、および/または発現されたタンパク質のさらなるプロセシングのための望ましさに依存して、真核生物宿主（例えば、酵母または他の真菌）が好ましくあり得る。通常、酵母細胞は、操作がより容易なので、真菌細胞以上に好ましい。しかし、いくつかのタンパク質は、酵母細胞からは少ししか分泌されないか、またはいくつかの場合は、適切にプロセシングされない（例えば、酵母における過剰グリコシル化（hyperglycosylation）かのいずれかである。これらの場合、異なる真菌宿主生物が選択されるべきである。

10

【0160】

本発明の範囲内の適切な発現宿主の例としては、真菌（例えば、アスペルギルス種（例えば、EP-A-0184438およびEP-A-0284603に記載されるようなもの）ならびにトリコデルマ種）；細菌（例えば、バチルス種（例えば、EP-A-0134048およびEP-A-0253455に記載されるようなもの））；ストレプトミセス種およびシュードモナス種；ならびに酵母（例えば、クリュベロミセス（*Kluyveromyces*）種（例えば、EP-A-0096430およびEP-A-0301670に記載されるようなもの））ならびにサッカロミセス種が挙げられる。例として、代表的な発現宿主は、*Aspergillus niger*、*Aspergillus niger* var. *tubigenis*、*Aspergillus niger* var. *wamori*、*Aspergillus aculeatis*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus oryzae*、*Trichoderma reesei*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Kluyveromyces lactis*および*Saccharomyces cerevisiae*から選択され得る。

20

【0161】

適切な宿主の使用（例えば、酵母宿主細胞、真菌宿主細胞、および植物宿主細胞）は、本発明の組換え発現産物において最適な生物学的活性を与えるのに必要とされ得るように、翻訳後の改変（例えば、ミリストイル化、グリコシル化、切断、脂質化およびチロシン、セリンまたはスレオニンのリン酸化）を提供し得る。

30

【0162】

（生物）

本発明に関して、用語「生物」は、本発明に従う標的および/またはその生物から得られる産物を含み得る任意の生物を含む。生物の例としては、真菌、酵母、または植物が挙げられ得る。

【0163】

本発明に関して、用語「トランスジェニック生物」は、本発明に従う標的および/または得られた産物を含む任意の生物を含む。

40

【0164】

（宿主細胞/宿主生物の形質転換）

最初に示されるように、宿主生物は、原核生物または真核生物であり得る。適切な原核生物宿主の例としては、E. coliおよび*Bacillus subtilis*が挙げられる。原核細胞宿主の形質転換に関する教示は、当該分野においてよく実証されており、例えば、Sambrookら（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press）およびAusubelら、*Current Protocols in Molecular Biology*（1995）、John W

50

iley & Sons, Inc. を参照のこと。原核生物宿主が使用され、次いで、ヌクレオチド配列は、形質転換前に、(例えば、イントロンの除去によって)適切に改変されることが必要とし得る。

【0165】

別の実施形態において、トランスジェニック生物は酵母であり得る。この点に関して、酵母はまた、異種遺伝子発現のためのビヒクルとして広く用いられている。Saccharomyces cerevisiae種は、工業利用に関して長い歴史を持ち、異種遺伝子発現のための使用が挙げられる。Saccharomyces cerevisiaeでの異種遺伝子の発現については、Goodeyら(1987、Yeast Biotechnology、D. R. Berryら編、401~429頁、Allen and Unwin、London)およびKingら(1989、Molecular and Cell Biology of Yeasts、E. F. WaltonおよびG. T. Yarronton編、107~133頁、Blackie、Glasgow)により総説される。

10

【0166】

種々の理由から、Saccharomyces cerevisiaeは、異種遺伝子発現に十分適切である。第1に、ヒトに対して非病原性であり、そして特定の毒素を産生し得ない。第2に、種々の目的のための商業面での開発の後数世紀にわたる、安全な使用に関する長い歴史を持つ。これにより幅広い公衆の承認が得られた。第3に、この生物に向けられた幅広い商業的な使用および研究により、Saccharomyces cerevisiaeの遺伝学および生理学、ならびにラージスケールの発酵の特徴付けについての見識の蓄積が得られた。

20

【0167】

Saccharomyces cerevisiaeにおける異種遺伝子発現および遺伝子産物の分泌の原理についての総説は、E. Hinchcliffe E. Kenny(1993、「Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes」、Yeasts、第5巻、Anthony H. RoseおよびJ. Stuart Harrison編、第2版、Academic Press Ltd.)により与えられる。

【0168】

種々のタイプの酵母ベクターが利用可能であり、組込みベクター(これらを維持するために宿主ゲノムとの組換えを要求するベクター)、および自律的に複製するプラスミドベクターが挙げられる。

30

【0169】

トランスジェニックSaccharomycesを調製するために、酵母で発現するように設計された構築物にヌクレオチド配列を挿入することにより、発現構築物が調製される。異種発現に用いられる種々のタイプの構築物が開発されてきた。ヌクレオチド配列と融合される酵母において、プロモーター活性を含む構築物(通常は、GAL1プロモーターのような酵母起源のプロモーター)が用いられる。通常、酵母起源のシグナル配列(例えば、SUC2シグナルペプチドをコードする配列)が用いられる。酵母においてターミネーター活性は、発現系を終了させる。

40

【0170】

酵母の形質転換に関して、種々の形質転換プロトコルが開発されてきた。例えば、本発明に基づくトランスジェニックSaccharomycesは、Hinnenら(1978、Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75、1929); Beggs、JD(1978、Nature、London、275、104); およびIto、Hら(1983、J. Bacteriology 153、163-168)の教示に従い調製され得る。

【0171】

形質転換された酵母細胞は、種々の選択マーカーを用いて選択される。形質転換に使用さ

50

れるマーカーの中には、LEU2、HIS4、およびTRP1のような多くの栄養要求性マーカー、およびアミノグリコシド抗生物質マーカー（例えば、G418）のような多くの優性抗生物質耐性マーカーがある。

【0172】

別の宿主生物は植物である。遺伝的に改変された植物の構築における基本的な原理は、植物ゲノムに遺伝子情報を挿入し、挿入された遺伝的物質の安定な保持を獲得することである。遺伝子情報を挿入することに関して種々の技術が存在し、主な2つの原理は、遺伝子情報を直接導入することおよびベクター系を用いて遺伝子情報を導入することである。一般的な技術の総説は、Potrykus (Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1991) 42: 205-225) および Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27) の論文に見出され得る。植物の形質転換に関するさらなる教示はEP-A-0449375に見出され得る。

10

【0173】

したがって、本発明はまた、標的となるかまたは標的を発現するヌクレオチド配列を用いて宿主細胞を形質転換する方法を提供する。このヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、コードされるタンパク質の発現に適切な条件下で培養され得る。組換え細胞により産生されるタンパク質は、細胞の表面に提示され得る。所望の場合および当業者に理解されるように、コード配列を含む発現ベクターは、特定の原核生物または真核生物の細胞膜を通じてコード配列が分泌させるようシグナル配列を含んで設計され得る。他の組換え構築物は、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチド領域をコードするヌクレオチド配列にコード配列を連結し得る (Kroll D. J. (1993) DNA Cell Biol. 12: 441-53)。

20

【0174】

(改変体 / 相同体 / 誘導体)

本明細書中で言及される特定のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列に加えて、本発明はまた、これらの改変体、相同体、および誘導体の使用を包含する。本明細書において用語「相同性 (homology)」は、「同一性 (identity)」と同一視され得る。

【0175】

本明細書での関係において、相同な配列は、少なくとも75、85または90%同一（好ましくは少なくとも95または98%同一）であり得るアミノ酸配列を含むと解釈される。相同性はまた、類似性 (similarity)（すなわち、類似の化学的特性 / 機能を有するアミノ酸残基）ともみなされ得るが、本発明の関係において、配列同一性に関して相同性を表現することが好ましい。

30

【0176】

相同性の比較は、目視により、またはより通常には容易に利用可能な配列比較プログラムの補助により行なわれ得る。これらの市販のコンピュータプログラムは2つ以上の間の相同性 (%) を計算し得る。

【0177】

相同性 (%) は、連続した配列全体で計算され得る。すなわち、ある配列が他の配列と並べられ、そしてある配列中のそれぞれのアミノ酸が、一度に1つの残基ずつ、他の配列中の対応するアミノ酸と直接的に比較される。これは、「アンギャップ (ungapped)」アラインメントと呼ばれる。代表的に、このようなアンギャップアラインメントは、比較的少ない残基数にわたる場合のみに実施される。

40

【0178】

これは非常に単純で一貫した方法であるが、例えば、別の同一性の対の配列において、1つの挿入または欠失が、次のアミノ酸残基のアラインメントを出される原因になり、したがって潜在的に、全体のアラインメントが実施された場合、大きな相同性 (%) の減少を引き起こすことが考慮されない。したがって、たいていの配列比較方法は、過度に全体的

50

な相同性のスコアを悪くすることなく可能性のある挿入および欠失を考慮に入れた最適なアラインメントを生じるよう設計される。このことは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入し、局所的な相同性を最大限に活用する試みをすることにより達成される。

【0179】

しかし、これらのより複雑な方法は、アラインメントで起こるそれぞれのギャップに「ギャップペナルティー (gap penalties)」を割り当て、その結果、同じ数の同一アミノ酸に関して、可能な限り少ないギャップを有する配列アラインメント (これにより、2つの比較される配列間のより高い関連性が反映される) が、多くのギャップを有するアラインメントよりも高いスコアを達成する。「アフラインギャップコスト (Affine gap costs)」は代表的に、ギャップの存在およびギャップ中の引き続く残基それぞれに対するより小さいペナルティーの存在について比較的高いコストを要求するよう用いられる。これは、最も共通して用いられるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティーは、当然より少ないギャップを有する最適化されたアラインメントを生じる。たいていのアラインメントプログラムは、ギャップペナルティーが変更されることを可能にする。しかし、このような配列比較のためのソフトウェアを用いる場合、デフォルト値を用いることが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ (以下を参照のこと) を用いる場合、アミノ酸配列に対するデフォルトギャップペナルティーは、ギャップに対して -12 であり、そしてそれぞれの伸長に対して -4 である。

【0180】

したがって、最大相同性 (%) の計算には、ギャップペナルティーを考慮に入れた最適アラインメントの生成が第1に必要とされる。このようなアラインメントを実施するのに適切なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージである (University of Wisconsin, USA; Devereuxら、1984、Nucleic Acids Research 12:387)。配列比較を実行し得る、それ以外のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ (Ausubelら、1999同書、18章を参照のこと)、FASTA (Atschulら、1990、J. Mol. Biol.、403-410) および比較ツールの中のGENEWORKSパッケージソフトが挙げられるがこれらに限定されない。BLASTおよびFASTAはオフラインおよびオンライン調査に利用可能である (Ausubelら、1999同書、7-58~7-60頁を参照のこと)。しかしGCG Bestfitプログラムを用いることが好ましい。

【0181】

さらなる有用な参考文献が、FEMS Microbiol Lett 1999 May 15:174(2):247-50 (そして公開された誤記が、FEMS Microbiol Lett 1999 Aug 1:177(1):187-8で明らかにされている) に見出される。

【0182】

最終的な相同性 (%) は、同一性に関して測定されるが、アラインメントのプロセス自体は、代表的にオールオアナッシングの対の比較に依存されない。その代わりに、測定される類似性スコアマトリクスが、化学的な類似性または進化の面での距離に基づくそれぞれの対の比較にスコアを割り当てるのに一般的に用いられる。このような共通して用いられるマトリクスの例は、BLOSUM62マトリクス (BLASTパッケージソフトのプログラムのデフォルトマトリクス) である。GCG Wisconsinプログラムは、一般的に公開されているデフォルト値かまたは提供される場合は自前のシンボル比較テーブルのいずれかを用いる (さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照のこと)。GCGパッケージについては公開されているデフォルト値を使用することが好ましい。他のソフトウェアの場合は、BLOSUM62のようなデフォルトマトリクスを用いることが好ましい。

【0183】

いったんソフトウェアが最適なアラインメントを生じた場合、相同性(%)、好ましくは配列同一性(%)が計算されることが可能である。このソフトウェアは代表的に、これを配列比較の一部として行い、そして実数の結果を生じる。

【0184】

配列はまたは、アミノ酸残基の欠失、挿入または置換を有し、これは静的な変化を生じ、そして機能的に等価な物質を生じる。物質の二次的な結合活性が保持される限り、意図的なアミノ酸置換は、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性における類似性に基づいてなされ得る。例えば、陰性に荷電したアミノ酸としてアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；陽性に荷電したアミノ酸としてリジンおよびアルギニンが挙げられ；そして類似の親水性値を有する荷電していない極性の先端基を持つアミノ酸として、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、フェニルアラニン、およびチロシンが挙げられる。

10

【0185】

保存性置換が、例えば、以下の表に従ってなされ得る。2番目のカラムの同じブロックのアミノ酸、そして好ましくは3番目のカラムの同じ列のアミノ酸は、互いに置換され得る。

【0186】

【表1】

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性—非荷電	C S T M
		N Q
極性—荷電	D E	
	K R	
芳香族		H F W Y

20

(発現ベクター)

標的として使用されるヌクレオチド配列または標的を発現するヌクレオチド配列は、組換え複製可能ベクターに組み込まれ得る。ベクターを用いて、適合可能な宿主細胞内で、および/または宿主細胞からヌクレオチド配列を複製し、発現し得る。発現は、プロモーター/エンハンサーおよび他の発現調節シグナルを含む制御配列を用いて制御され得る。原核生物プロモーターおよび真核生物細胞中で機能するプロモーターが用いられ得る。組織特異的または刺激特異的なプロモーターが用いられ得る。上記の2つ以上の異なるプロモーター由来の配列エレメントを含むキメラプロモーターもまた用いられ得る。

30

【0187】

ヌクレオチド配列の発現により宿主の組換え細胞によって産生されるタンパク質は、用いられる配列および/またはベクターに依存して分泌され得るか、または細胞内に含有され得る。コード配列は、特定の原核生物または真核生物の細胞膜を通じて物質コード配列が分泌されるようシグナル配列を含んで設計され得る。

40

【0188】

(融合タンパク質)

標的アミノ酸配列は、例えば、抽出および精製を補助するために融合タンパク質として産生され得る。融合タンパク質のパートナーの例として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6×His、GAL4(DNA結合および/または転写活性化ドメイン)および(-ガラクトシダーゼが挙げられる。融合タンパク質配列の除去を可能にするために、融合タンパク質のパートナーと目的のタンパク質との間にタンパク質分解性切断部位を含むこともまた、便宜的であり得る。好ましくは融合タンパク質は、標的の活性を妨害しない。

【0189】

50

融合タンパク質は、本発明の物質に融合された抗原または抗原決定基を含み得る。この実施形態において、融合タンパク質は、免疫系の汎用の刺激を提供する意味でアジュバンドとして作用し得る物質を含む、天然に存在しない融合タンパク質であり得る。抗原または抗原決定基は、物質のアミノ末端かまたはカルボキシ末端のいずれかに取り付けられ得る。

【0190】

本発明の別の実施形態において、アミノ酸配列は、融合タンパク質をコードする異種配列に連結され得る。例えば、この物質の活性に影響を与え得る薬剤に対するペプチドライブラリーのスクリーニングに関して、市販の抗体により認識される異種エピトープを発現するキメラ物質をコードすることは有用であり得る。

10

【0191】

(治療)

本発明の化合物は、治療剤として、すなわち治療適用に使用され得る。

【0192】

用語「治療」は、治癒効果、緩和効果、および予防効果を含む。

【0193】

治療は、ヒトまたは動物に対してであり得、好ましくは雌性動物である。

【0194】

(薬学的組成物)

1つの局面において、本発明は、薬学的組成物を提供し、この薬学的組成物は、本発明に従う化合物、必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤または賦形剤(これらの組み合わせを含む)を含む。

20

【0195】

薬学的組成物は、ヒトの医薬および獣医の医薬におけるヒト用法または動物用法のためであり得、代表的には、任意の1つ以上の薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、または賦形剤を含む。治療用途のための受容可能なキャリアまたは希釈剤は、薬学分野で周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 編、1985)に記載される。薬学的キャリア、賦形剤または希釈剤の選択は、意図される投与経路および標準的な薬学的な実施に関して、選択され得る。薬学的組成物は、キャリア、賦形剤、もしくは希釈剤としてかまたはこれらに加えて、任意の適切な結合剤、潤滑剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤を含み得る。

30

【0196】

保存剤、安定剤、色素さらに香味剤が、この薬学的組成物中に提供され得る。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤および懸濁剤がまた、使用され得る。

【0197】

異なる送達系に依存した異なる組成物/処方物の要求が存在し得る。例として、本発明の薬学的組成物は、処方されて、ミニポンプを用いてかまたは粘膜経路によって(例えば、吸入のための経鼻スプレーもしくはエアゾルまたは摂取可能溶液として)送達され得るか、または組成物が送達(例えば、静脈内経路によるか、筋内経路によるか、または皮下経路による)のために注射可能な形態で処方される非経口送達される。

40

【0198】

薬剤が胃腸粘膜を介して粘膜送達される場合、この薬剤は、胃腸管を通した通過の間に安定なままであり得るべきであり;例えば、この薬剤は、タンパク質分解性の分解に対して耐性であり、酸性pHにおいて安定であり、そして胆汁の浄化効果に対して耐性であるべきである。

【0199】

適切な場合、薬学的組成物は、坐剤またはペッサリーの形態で吸入によって、ローション、溶液、クリーム、軟膏もしくは粉剤の形態で局所的に、皮膚パッチの使用によって、デ

50

ンブンもしくはラクトースのような賦形剤を含む錠剤の形態で経口的に、または単独もしくは賦形剤との混合のいずれかでのカプセルもしくは卵で、または香味剤もしくは着色剤を含むエリキシル、溶液または懸濁剤の形態で投与され得るか、あるいは、これらは、非経口的に、例えば、静脈内的、筋内的または皮下的に注射され得る。非経口投与に関して、この組成物は、滅菌水溶液の形態で最良に使用され得、この滅菌水溶液は、他の物質、例えば、血液とのこの溶液の等張性を作るための十分な塩または単糖を含み得る。頬側投与または舌下投与に関して、この組成物は、従来様式で処方され得る錠剤またはトローチ剤の形態で投与され得る。

【0200】

(組合わせ医薬)

本発明の化合物は、1つ以上の他の活性な薬剤(例えば、1つ以上の他の薬学的に活性な薬剤)と組合わせて使用され得る。

【0201】

例として、本発明の化合物は、他のSTSインヒビターおよび/または他のインヒビター、例えば、アロマトーゼインヒビター(例えば、4ヒドロキシアンドロステジオン(4-OHA))および/またはステロイド(例えば、天然に存在するステルニューロステロイド(sterneurosteroid)デヒドロエピアンドロステロンサルフェート(DHEAS)およびプレグネロンサルフェート(PS)および/または他の構造的に類似した有機化合物)と組合わせて使用され得る。

【0202】

さらに、または代替的に、本発明の化合物は、生物学的応答の修飾因子と組合わせて使用され得る。

【0203】

用語、生物学的応答の修飾因子(「BRM」)としては、サイトカイン、免疫調節因子、増殖因子、造血調節因子、コロニー刺激因子、走化性因子、溶血因子および血栓溶解因子、細胞表面レセプター、リガンド、白血球接着分子、モノクローナル抗体、予防ワクチンおよび治療ワクチン、ホルモン、細胞外マトリックス成分、フィブロネクチンなどが挙げられる。いくつかの適応において、好ましくは、生物学的応答の修飾因子は、サイトカインである。サイトカインの例としては、以下:インターロイキン(IL)(例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-19);腫瘍壊死因子(TNF)(例えば、TNF-);インターフェロン、インターフェロンおよびインターフェロン;TGF-が挙げられる。いくつかの適応において、好ましくは、サイトカインは、腫瘍壊死因子(TNF)である。いくつかの適応においてTNFは、任意の型のTNF、例えば、TNF-、TNF-(これらの誘導体または混合物を含む)であり得る。より好ましくは、サイトカインは、TNF-である。TNFに関する教示は、当該分野で見出され得る(例えば、WO-A-98/08870およびWO-A-98/13348)。

【0204】

(投与)

代表的に、医師は、個々の被験体に対して最も適切である実際の投薬量を決定し、そしてこの投薬量は、特定の患者の年齢、体重および応答によって変化する。より低い投薬量が、平均の場合の典型である。当然、より高いまたはより低い投薬量範囲が正当である個々の例があり得る。

【0205】

本発明の組成物は、直接注射によって投与され得る。この組成物は、非経口投与、粘膜投与、筋内投与、静脈内投与、皮下投与、眼球内投与、または経皮投与のために処方され得る。必要性に依存して、薬剤は、0.01~30mg/kg体重の用量(例えば、0.1~10mg/kg体重、より好ましくは0.1~1mg/kg体重の用量)で投与され得る。

10

20

30

40

50

【0206】

さらなる例として、本発明の薬剤は、一日あたり1～4回、好ましくは1日あたり1回または2回のレジメンに従って投与され得る。任意の特定の患者に対する特定の用量レベルおよび投薬頻度は、変動し得、そして種々の因子（使用される特定の化合物の活性、この化合物の代謝安定性および作用の長さ、年齢、体重、全身の健康、性別、食事、投与形式および時間、排出速度、薬物の組み合わせ、特定の状態の重篤度、および治療を受ける宿主を含む）に依存する。

【0207】

代表的な送達様式（上記に示される）は別として、用語「投与」はまた、脂質媒介トランスフェクション、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、カチオン性フェイシャル両親媒性物（CFA）およびこれらの組み合わせのような技術による送達を含む。この

10

【0208】

ような送達機構のための経路としては、粘膜経路、鼻経路、口腔経路、非経口経路、胃腸経路、局所経路、または舌下経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【0209】

用語「投与された」は、粘膜経路（例えば、吸入のための経鼻スプレーもしくはエアロゾルまたは摂取可能な溶液として）；送達が可能となる形態による非経口経路（例えば、静脈経路、筋内経路または皮下経路）による送達が可能となるが、これらに限定されない。

従って、薬学的投与に関して、本発明のSTSインヒビターは、従来の薬学的処方技術ならびに薬学的キャリア、アジュバント、賦形剤、希釈剤などを用いて任意の適切な様式で、通常非経口投与のために、処方され得る。おおよその有効用量の割合は、1～1000 mg/日、例えば、10～900 mg/日またはさらに100～800 mg/日の範囲であり得、問題の化合物の個々の活性に依存し、そしてこれは、平均体重（70 Kg）の患者に対してである。好ましくそしてより活性である化合物に関する、より有用な投薬量の割合は、200～800 mg/日、より好ましくは200～500 mg/日、最も好ましくは200～250 mg/日の範囲である。これらは、単一投薬レジメンで提供され得、余剰の投薬レジメンおよび/または複数の投薬レジメンが、数日間にわたって続く。経口投与に関して、これらは、単一用量あたり100～500 mgの化合物を含む錠剤、カプセル、溶液または懸濁液で処方され得る。あるいは、および好ましくは、この化合物は、適切な非経口的に投与可能なキャリア中に、非経口投与のために処方され、そして200～800 mg、好ましくは200～500 mg、より好ましくは200～250 mgの範囲の単一日投薬量の割合を提供する。しかし、このような有効日用量は、活性成分の本来の活性、患者の体重に依存して変動し、このような変動は、当該分野および医師の判断の範囲内である。

20

30

【0210】

（細胞周期）

本発明の化合物は、細胞周期障害の処置方法において有用であり得る。

【0211】

「Molecular Cell Biology」第3版、Lodishら、177-181頁に考察されるように、異なる真核生物細胞は、非常に異なる速度で増殖し、そして分裂し得る。例えば、酵母細胞は、120分毎に分裂し、そしてウニおよび昆虫の胚細胞における受精卵の最初の分裂は、1530分しかかからない。なぜなら、1つの大きな既存細胞が、再分されるからである。しかし、最も成長している植物細胞および動物細胞は、数が2倍になるのに10～20時間かかり、そしていくらかの複製物はよりゆっくりとして速度である。成体の多くの細胞（例えば、神経細胞および横紋筋細胞）は、すこしも分裂せず；創傷治癒を補助する線維芽細胞のような他の細胞は、要求に応じて増殖するが、さもなければ休止している。

40

【0212】

さらに、分裂する全ての真核生物細胞は、2つの娘細胞に均等に遺伝物質を提供する用意がなければならない。真核生物におけるDNA合成は、細胞分裂周期中、常には生じない

50

が、細胞分裂前の一部に制限される。

【0213】

真核生物DNA合成と細胞分裂との間の関連性は、哺乳動物細胞（これらは全て増殖および分裂し得た）の培養において徹底的に分析されている。細菌と対照的に、真核生物細胞は、DNA合成においてその時間の一部のみを費やし、そして細胞分裂（有糸分裂）の前の時間に完了することが見出された。従って、時間のギャップが、DNA合成後および細胞分裂前に生じ；別のギャップが、分裂後および次の回のDNA合成前に生じることが見出された。この分析は、真核生物細胞周期が、M（有糸分裂）期、G₁期（最初のギャップ）、S期（DNA合成）期、G₂期（第2のギャップ）からなり、そしてMに戻るという結論を導いた。有糸分裂間の期（G₁、S、およびG₂）は、集合的に間期として知られる。

10

【0214】

組織中の多くの非分裂細胞（例えば、全ての休止線維芽細胞）は、有糸分裂後およびDNA合成のちょうど前に周期を停止し；このような「休止」細胞は、細胞周期から外され（*exite*）そしてG₀状態にあるといわれる。

【0215】

細胞が細胞周期の3つの間期のうちの1つにある場合、この細胞の相対的なDNA含量を測定する蛍光活性化細胞分類器（FACS）を使用することによって、この細胞を同定することは可能であり；G₁（DNA合成前）にある細胞は、規定された量xのDNAを有し；S（DNA複製）の間、細胞はxと2xとの間を有し；そしてG₂（またはM）にある場合、細胞は、2xのDNAを有する。

20

【0216】

動物細胞における有糸分裂および細胞質分裂の段階は、以下の通りである。

【0217】

（（a）間期） 間期のG₂期は、有糸分裂開始の直前である。染色体DNAは、S期間に複製され、そしてタンパク質に結合されるが、染色体はまだ、明確な構造として観察されない。核小体が、光学顕微鏡の下で可視的な唯一の核下部構造である。二倍体細胞では、DNA複製前に、各型の2つの形態学的な染色体が存在し、そしてこの細胞は、2nであると言われる。G₂では、DNA複製後、細胞は4nである。4コピーの各染色体DNAが存在する。これらの姉妹染色体はまだ、互いから分離されていないので、これらは姉妹染色分体と呼ばれる。

30

【0218】

（（b）前期の初期） 中心小体（各々が、新たに形成された娘中心小体を有する）は、細胞の対極への移動を開始させる；染色体は、長い糸として観察され得る。核膜が、小胞へと脱凝集し始める。

【0219】

（（c）前期の中期および後期） 染色体凝縮が完了する；各々の可視的な染色体構造は、それらの動原体において互いに保持された2つの染色分体からなる。各染色分体は、2つの新たに複製された娘DNA分子のうちの一つを含む。微小管紡錘体は、中心小体に隣接した領域から放射状に伸び始め、これらは、それらの極により近づくように移動する。いくつかの紡錘体線維は、極から極へ達する；大半は、染色分体に移動し、そして動原体で付着する。

40

【0220】

（（d）中期） 染色体は、細胞の赤道の方へと移動し、ここでそれらは、赤道面に整列されるようになる。この姉妹染色分体は、まだ分離されない。

【0221】

（（e）後期） 2つの姉妹染色分体が、個々の染色体に分離する。各々は、それらが移動した1つの極への紡錘体線維に結合された動原体を含む。従って、各染色体の1コピーが、各娘細胞に与えられる。同時に、細胞は、極-極紡錘体と同じように、伸長する。細胞質分裂は、分割溝が形成され始めるにつれて開始される。

50

【 0 2 2 2 】

((f) 終期) 新しい膜が、娘核の周囲に形成される ; 染色体は解かれ、そして明確性がより低くなり、核小体が再び可視的になり、そして核膜が、各娘核の周囲に形成される。細胞質分裂が、ほぼ完了し、そして紡錘体は、微小管および他の線維が解重合するにつれて消滅する。有糸分裂全体を通して、各極の「娘」中心小体は、それが全長になるまで伸長する。終期に、元々の中心小体の各々の複製が完了し、そして新しい娘中心小体が、次の間期の間に生成される。

【 0 2 2 3 】

((g) 間期) 細胞質分裂の完了時に、細胞は、細胞周期の G_1 期に入り、そして再度、この周期を進行する。

10

【 0 2 2 4 】

細胞周期運動が、極めて重要な細胞プロセスであることが理解される。正常な細胞周期運動からの逸脱が、多くの医学的障害を生じさせ得る。増加したおよび / または無制限の細胞周期運動が、癌を生じ得る。細胞周期運動の減少は、変性状態を生じ得る。本発明の化合物を使用することによって、このような障害および状態を処置するための手段が提供され得る。

【 0 2 2 5 】

従って、本発明の化合物は、癌 (ホルモン依存性およびホルモン非依存性の癌を含む) のような細胞周期運動障害の処置における使用に適切であり得る。

【 0 2 2 6 】

さらに、本発明の化合物は、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、肉腫、黒色腫、前立腺癌、膵臓癌などのような癌、および他の固形腫瘍の処置に適切であり得る。

20

【 0 2 2 7 】

いくつかの適用について、細胞周期運動は、阻害されるか、および / または妨げられるか、および / または阻止され、好ましくはここで、細胞周期運動は、妨げられるか、および / または阻止される。1つの局面では、細胞周期運動は、 G_2 / M 期において、阻害され得るか、および / または妨げられ得るか、および / または阻止され得る。1つの局面では、細胞周期運動は、不可逆的に、阻害され得るか、および / または妨げられ得るか、および / または阻止され得、好ましくは、細胞周期運動は、不可逆的に、妨げられるか、および / または阻止される。

30

【 0 2 2 8 】

用語「不可逆的に、防止されるか、および / または阻害されるか、および / または阻止される」とは、本発明の化合物の適用後に、この化合物を除去した際に、この化合物の効果 (すなわち、細胞周期運動の防止、および / または阻害、および / または阻止) がなお観察可能であることを意味する。より詳細には、用語「不可逆的に、防止されるか、および / または阻害されるか、および / または阻止される」とは、本明細書中に提供される細胞周期運動アッセイプロトコルに従ってアッセイされた場合に、目的の化合物で処理された細胞が、コントロール細胞よりも、プロトコル I のステージ 2 の後に、より低い増殖を示すことを意味する。このプロトコルの詳細を、以下に示す。

【 0 2 2 9 】

従って、本発明は、以下の化合物を提供する : 細胞周期運動を妨げ、および / または阻害し、および / または阻止することによって、インビトロにおいて、エストロゲンレセプターポジティブ ($ER+$) および ER ネガティブ ($ER-$) 乳癌細胞の増殖阻害を引き起こす ; および / またはインタクトな動物 (すなわち、卵巣摘出されていない) において、ニトロソ - メチル尿素 (NMU) 誘導性乳房腫瘍の後退を引き起こし、および / または癌細胞における細胞周期運動を妨げ、および / または阻害し、および / または阻止し ; および / または細胞周期運動を妨げ、および / または阻害し、および / または阻止することによってインビボで作用し、および / または細胞周期運動アゴニストとして作用する、化合物。

40

【 0 2 3 0 】

50

(細胞周期運動アッセイ(プロトコル6))

(手順)

(ステージ1)

MCF-7乳癌細胞を、10⁵細胞/ウェルの密度で、マルチウェル培養プレートに播種する。細胞を付着させ、そしてそれらの細胞を以下のように処理した場合に約30%コンフルエントとなるまで増殖させた。

【0231】

(コントロール-未処理)

(目的の化合物(Compound of Interest; COI) 20 μM)

細胞を、COIを含む増殖培地中において6日間増殖させる(培地/COIの交換は、3日毎)。この期間の終了時に、細胞数を、Coulter細胞計数器を使用して計数した。

10

【0232】

(ステージ2)

6日間のCOIでの細胞処理後、細胞を、10⁴細胞/ウェルの密度で再播種する。いかなるさらなる処理も付加しない。細胞を、増殖培地の存在下でさらに6日間増殖させ続ける。この期間の終了時に、再度、細胞数を計数する。

【0233】

(癌)

示されたように、本発明の化合物は、細胞周期運動障害の処置において有用であり得る。特定の細胞周期運動障害が、癌である。

20

【0234】

癌は、依然として大半の西洋諸国における死亡率の主因である。これまでに開発された療法は、ホルモン依存性腫瘍の増殖を阻害するためにホルモンの作用または合成をブロックすることを含んだ。しかし、より攻撃的な化学療法が、ホルモン非依存性腫瘍の処置のために現在では使用されている。

【0235】

従って、化学療法に付随する、いくらかまたはすべての副作用を欠くが、ホルモン依存性および/またはホルモン非依存性の腫瘍を抗癌処置する医薬の開発は、治療上の主たる進歩を示す。

30

【0236】

エストロゲンは、その合成後に、多くのヒドロキシル化および結合体化反応を受けることが公知である。近年まで、このような反応は、代謝プロセスの部分であり、このプロセスが究極的に、エストロゲンを水溶性にさせ、そして身体からのそれらの除去を増強させると考えられていた。現在では、いくつかのヒドロキシ代謝産物(例えば、2-ヒドロキシおよび16-ヒドロキシ)および結合体(例えば、硫酸エストロン、E1S)が、エストロゲンが体内で有する複雑な作用のいくつかを決定するにおいて重要であることが明らかである。

【0237】

研究者らは、乳癌の危険性を改変する状態に関連した2-および16-ヒドロキシル化エストロゲンの形成を研究してきた。現在では、2-ヒドロキシラーゼ活性を増加させる因子が、癌の危険性の減少と関連するが、16-ヒドロキシル化を増加させる因子は、乳癌の危険性を増強し得るという証拠が存在する。エストロゲン代謝産物の生物学的役割に関するさらなる関心は、2-メトキシエストラジオールが、抗有糸分裂特性を有する内因性代謝産物であるという増大する多数の証拠によって刺激された。2-MeOE2は、カテコールエストロゲンメチルトランスフェラーゼ(全身にわたって広範に分布している酵素)によって2-ヒドロキシエストラジオール(2-OHE2)から形成される。

40

【0238】

研究者らは、インビボにおいて、2-MeOE2が、Meth A肉腫、B16黒色腫、またはMDA-MB-435エストロゲンレセプターネガティブ(ER-)乳癌細胞の皮

50

下注射から生じる腫瘍の増殖を阻害することを示してきた。これはまた、内皮細胞の増殖および移動、ならびにインビトロでの新脈管形成を阻害する。2-MeOE2がインビボで腫瘍増殖を阻害する能力は、腫瘍細胞増殖の直接的な阻害ではなく、腫瘍誘導性の新脈管形成を阻害するその能力に起因し得ることが示唆された。

【0239】

2-MeOE2が、その強力な抗マイトジェン作用および抗脈管形成作用を発揮する機構は、依然として解明されていない。高濃度で、それらが微小管重合化を阻害し得、そしてチューブリンに結合するコルヒチンの弱いインヒビターとして作用するという証拠が存在する。しかし、近年、有糸分裂をブロックする濃度で、細胞中のチューブリン糸状構造が、解重合されるのではなく、タキソール処置後に見出される形態と同一の形態を有することが見出された。従って、タキソール（乳癌および卵巣乳癌（ovarian breast cancer）の治療に使用される薬物）と同様に、2-MeOE2が、微小管の動力学を安定化させることによって作用する可能性がある。

10

【0240】

新たな癌治療としての2-MeOE2の同定は、重要な進歩を表すが、経口的に投与されたエストロゲンのバイオアベイラビリティは貧弱である。さらに、これらは、それらがまず肝臓を通過する間に、広範な代謝を受け得る。乳癌治療のためのステロイド性スルファターゼインヒビターを開発するための研究プログラムの一部として、エストロン-3-O-スルファメート（EMATE）が、強力で活性な部位特異的インヒビターとして同定された。予想外に、EMATEは、強力なエストロゲン特性を有することが証明された。ラットにおけるその経口的子宮作用性活性は、エストラジオールの活性よりも100倍高い。その増強されたエストロゲン性（oestrogenicity）は、その肝臓通過の間の不活性化から防御し、かつその延長した期間のその緩徐な放出のためのレザーバとして作用する赤血球（rbc's）によるその吸着から生じると考えられる。多くのA-環改変アナログ（2-メトキシエストロン-3-O-スルファメートを含む）が、合成され、そして試験された。この化合物は、ステロイド性スルファターゼインヒビターとしてEMATEとして等価であったが、これは、エストロゲン性を欠く。

20

【0241】

本発明者らは、本発明の化合物が、癌、そして特に乳癌の処置のための手段を提供すると考える。

30

【0242】

さらに、または代替的に、本発明の化合物は、癌（白血病を含む）および固形腫瘍（例えば、乳房、子宮内膜、前立腺、卵巣および膵臓の腫瘍）の増殖のブロックにおいて有用であり得る。

【0243】

（エストロゲンに関する治療）

本発明者らは、本発明の化合物のいくつかは、身体（特に、雌性における）においてエストロゲンレベルを制御するにおいて有用であり得ると考える。従って、この化合物のいくつかは、受胎能制御手段（例えば、経口避妊錠剤、丸剤、溶液、またはロゼンジ）を提供するとして有用であり得る。あるいは、この化合物は、インプラントまたはパッチとしての形態であり得る。

40

【0244】

従って、本発明の化合物は、エストロゲンに関連したホルモン状態を処置するにおいて有用であり得る。

【0245】

さらに、または代替的に、本発明の化合物は、エストロゲンに関連したホルモン状態以外に、ホルモン状態を処置するにおいて有用であり得る。従って、本発明の化合物はまた、ホルモン活性に影響を及ぼし得、そしてまた、免疫応答に影響を及ぼし得る。

【0246】

（神経変性性疾患）

50

本発明の化合物のいくつかは、神経変性性疾患、および類似の状態の処置に有用であり得ると考えられる。

【0247】

例えば、STSインヒビターは、健忘、頭部傷害、アルツハイマー病、癩癩性痴呆、初老期痴呆、外傷後痴呆、老人性痴呆、血管性痴呆、および脳卒中後痴呆のような病態に罹患した患者、またはさもなければ記憶強化が望ましい個体の記憶機能を強化するのに有用であり得る。

【0248】

(TH1)

本発明者らは、本発明の化合物のいくつかがTH1の意味において有用であり得ると考えている。

10

【0249】

例えば、マクロファージまたは他の抗原提示細胞内のSTSインヒビターの存在は、感作されたT細胞がTH1(高IL-2、IFN 低IL-4)応答を増大する能力を減少させ得る。従って、他のステロイド(例えば、グルココルチコイド)の正常な調節性の影響は優勢である。

【0250】

(炎症性状態)

本発明者らは、本発明の化合物のいくつかは、以下のいずれか1つ以上と関連する状態のような、炎症性状態を処置するのに有用であり得ると考えている：自己免疫(例えば、慢性関節リウマチ、I型糖尿病およびII型糖尿病、全身エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、甲状腺炎、血管炎、潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む)、皮膚障害(例えば、乾癬および接触性皮膚炎)；移植片対宿主病；湿疹；喘息および移植後の器官拒絶。

20

【0251】

例えば、STSインヒビターは、免疫応答および/または炎症性反応に対するDHEAまたは関連のステロイドの正常な生理学的効果を妨げ得る。

【0252】

本発明の化合物は、内因性グルココルチコイド様効果を救済するための医薬の製造において有用であり得る。

30

【0253】

(他の治療)

本発明の化合物/組成物が他の重要な医学的意味を有し得ることがまた理解される。

【0254】

例えば、本発明の化合物または組成物は、WO-A-99/52890に列挙される障害の処置において有用であり得る(すなわち)：

さらに(あるいは)本発明の化合物または組成物は、WO-A-98/05635に列挙される障害の処置において有用であり得る。参照を容易にするために、そのリストの一部をここに挙げる：癌、炎症または炎症性疾患、皮膚科障害、熱、心血管効果、出血、凝固および急性期反応、悪液質、拒食症、急性感染、HIV感染、ショック状態、宿主対移植片反応、自己免疫疾患、再還流傷害、髄膜炎、片頭痛、およびアスピリン依存性抗血栓症；腫瘍増殖、侵入および伝播、新脈管形成、転移、悪性、腹水および悪性胸水；脳虚血、虚血性心疾患、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨粗しょう症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、発作、血管炎、クローン病および潰瘍性大腸炎；歯周炎、歯肉炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水疱症；角膜潰瘍、網膜症および外科創傷治癒；鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー；再狭窄、うっ血性心不全、子宮内膜症、アテローム性動脈硬化症または内膜硬化症。

40

【0255】

さらに(あるいは)、本発明の化合物または組成物は、WO-A-98/07859に列挙される障害の処置に有用であり得る。参照を容易にするために、そのリストの一部をこ

50

ここに挙げる：サイトカインおよび細胞増殖／分化活性；免疫抑制または免疫刺激活性（例えば、免疫欠損（ヒト免疫不全ウイルスでの感染を含む）；リンパ球増殖の調節を処置するため；癌および多くの自己免疫疾患を処置するため、および移植拒絶または腫瘍免疫誘導を防ぐため）；造血の調節、例えば、骨髄またはリンパ球疾患の処置；骨、軟骨、腱、靭帯および神経組織の成長を促進する（例えば、創傷治癒のため）やけど、潰瘍および歯周疾患ならびに神経変性の処置；卵胞刺激ホルモンの阻害または活性化化合物（受精の調節）；走化性活性／ケモキネシス活性（例えば、傷害または感染の部位に特異的な細胞型を動員するため）；止血剤および血栓溶解剤活性（例えば、血友病および発作を処置するため）；抗炎症性活性（例えば、敗血症性ショックまたはクローン病を処置するため）；抗菌薬として；例えば、代謝または挙動の調節因子；鎮痛薬として；特定の欠損性傷害を処置する；例えば乾癬の処置において（ヒトまたは獣医の医薬において）。

10

【 0 2 5 6 】

さらに（あるいは）、本発明の組成物は、WO - A - 9 8 / 0 9 9 8 5 に列挙される障害の処置において有用であり得る。参照を容易にするために、その列挙の一部をここに挙げる：マクロファージ阻害性活性および／またはT細胞阻害性活性、それによる抗炎症性活性；抗免疫活性；すなわち、細胞免疫および／または体液性免疫応答に対する阻害性効果（炎症に関連しない応答を含む）；細胞外マトリックス成分およびフィブロネクチンを固定するマクロファージおよびT細胞の能力、ならびにT細胞におけるアップレギュレートされたfasレセプター発現を阻害する；以下を阻害する：望ましくない免疫反応および炎症（慢性関節炎を含む関節炎、過敏症に関連する炎症、アレルギー性反応、喘息、全身エリテマトーデス、コラーゲン疾患および他の自己免疫病を含む）、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化性心疾患、再還流傷害、心停止、心筋梗塞、血管炎症性障害、呼吸抑制症候群または他の心肺疾患、消化性潰瘍に関連する炎症、潰瘍性大腸炎および他の胃腸管の疾患、肝線維症、肝硬変または他の肝疾患、甲状腺炎または他の分泌腺疾患、糸球体腎炎または他の腎疾患および泌尿器疾患、耳炎または他の耳鼻咽喉科疾患、皮膚炎または他の皮膚疾患、歯周病または他の歯の疾患、精巣炎または精巣上体炎、不妊症、精巣外傷もしくは他の免疫関連精巣疾患、胎盤機能不全、胎盤不全、習慣流産、子癇、子癇前症および他の免疫および／もしくは炎症関連婦人科疾患、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ブドウ膜網膜炎、視神経炎、眼内性炎症、例えば、網膜炎もしくは類囊胞黄斑水腫、交感性眼炎、強膜炎、色素性網膜炎、変性眼底疾患の免疫性および炎症性要素、眼性外傷の炎症性要素、感染により引き起こされる眼性炎症、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血視神経障害、過度の瘢痕形成、例えば、緑内障手術後の、眼内インプラントに対する免疫および／もしくは炎症反応、ならびに他の免疫および炎症関連眼疾患、自己免疫疾患または状態または障害に関連した炎症（ここで、中枢神経系（CNS）または任意の他の器官において、免疫および／もしくは炎症の抑制が有益である）、パーキンソン病、パーキンソン病の処置からの合併症および／もしくは副作用、AIDS関連痴呆複合HIV関連脳障害、ドヴィック病、シドナム舞踏病、アルツハイマー病およびCNSの他の変性疾患、状態、もしくは障害、発作の炎症性要素、ポリオ後症候群（post-polio syndrome）、精神医学的な障害の免疫性および炎症性要素、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギヤン-バレー症候群、シドナム舞踏病、重症筋無力症、偽脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮外側索硬化、CNS圧迫もしくはCNS外傷もしくはCNSの感染の炎症性要素、筋萎縮およびジストロフィーの炎症性要素、ならびに中枢神経系および末梢神経系の免疫および炎症関連疾患、状態もしくは障害、外傷後炎症、敗血症性ショック、感染性疾患、手術の炎症性合併症もしくは副作用、骨髄移植もしくは他の移植合併症および／もしくは副作用、遺伝子治療の炎症性および／もしくは免疫合併症ならびに副作用（例えば、ウイルス担体による感染に起因する）またはAIDSに関連した炎症、体液性および／もしくは細胞性免疫応答の抑制または阻害、単球もしくはリンパ球の量を減少することによる単球もしくは白血球増殖性疾患（例えば、白血病）の処置または緩和、天然または人工の細胞、組織、および器官（例えば

20

30

40

50

、角膜、骨髄、器官、レンズ、ペースメーカー、天然もしくは人工の皮膚組織)の移植の場合の移植片拒絶の予防および/もしくは処置のため。

【0257】

(化合物の調製)

本発明の化合物は、適切なアルコールと適切な塩化物との反応によって調製され得る。例えば、本発明のスルファメート化合物は、適切なアルコールと、式 $R_1R_2NSO_2Cl$ の適切なスルファモイル (sulfamoyl) 塩化物との反応によって調製され得る。

【0258】

この反応を実行するための代表的な条件は以下の通りである。

【0259】

水素化ナトリウムおよびスルファモイルクロライド (sulfamoyl chloride) を、0 で、アルコール含有無水ジメチルホルムアミドの攪拌溶液に添加する。引き続き、この反応物を室温まで暖め、その後攪拌をさらに24時間続ける。この反応混合物を重炭酸ナトリウムの冷飽和溶液に注ぎ、そして得られた水相をジクロロメタンで抽出する。合わせた有機抽出物を無水 $MgSO_4$ で乾燥した。ろ過、その後の減圧下での溶媒エバポレーション、およびトルエンでの同時エバポレートによって、粗残滓を得て、これをさらにフラッシュクロマトグラフィーによって精製する。

【0260】

好ましくは、フルファモイルクロライドとの反応前に、適切な場合、アルコールを誘導する。必要な場合、アルコール中の官能基を公知の様式で保護し得、そしてこの保護基は、反応の最後に取り除く。

【0261】

好ましくは、スルファメート化合物は、Pageら (1990 Tetrahedron 46:2059~2068) の技術に従って調製される。

【0262】

ホスホネート化合物は、Pageら (1990 Tetrahedron 46:2059~2068) および PCT/GB92/01586 の技術を適切に組み合わせることによって調製され得る。

【0263】

スルホネート化合物は、Pageら (1990 Tetrahedron 46:2059~2068) および PCT/GB92/01586 の技術を適切に適合させることによって調製され得る。

【0264】

チオホスホネート化合物は、Pageら (1990 Tetrahedron 46:2059~2068) および PCT/GB91/00270 の技術を適切に適合させることによって調製され得る。

【0265】

(要旨)

要するに、本発明は、ステロイドスルファターゼインヒビターとして用いるための新規な化合物およびそれを含む薬学的組成物を提供する。

【0266】

(実施例)

本発明はここで、添付する図面を参照して単に一例として記載される。

【0267】

図2に示される一般的合成スキームに従って、本発明による以下の化合物 (図4、7、11および12を参照のこと) を調製した。詳細には、Pageらにより記載されているように、化合物1、2、3、5、6、8および9 (図2のスキームを参照のこと) を調製した (Tetrahedron 1990; 46; 2059~2068)。

【0268】

次いで、上記のプロトコルに従って、化合物を試験した。この結果 (図、5、6、8、9

10

20

30

40

50

、10、13および14を参照のこと)は、それらがSTSインヒビターとして働き得ることを示した。

【0269】

各化合物4、7、10および13のIC₅₀を、また誘導した。これらの値を以下に示す。

【0270】

【表2】

化合物		IC ₅₀
4	2-ブromoEMATE	1.65 nM
7	2-odEMATE	6.1 nM
10	2-クロロEMATE	0.8 nM
13	2-フルオロEMATE	5.6 nM

10

(エストロンアセテート (1))

エストロン(10g、36.82mmol)、無水酢酸(17.5ml)、およびピリジン(75ml)の混合物を還流下で2時間加熱した。冷却した反応混合物を減圧(真空)下で濃縮し、次いで水浴でクエンチした。形成された沈殿物をろ過除去し、水で洗浄し、乾燥し、そしてエタノール水(95%)から再結晶化して、白色結晶として1を得た(11.2g、97%); mp 115~118; TLC(クロロホルム/アセトン, 8:1):

20

【0271】

【数1】

R_f 0.83; v_{max}

(KBr) 1770, 1720 (C=O) cm⁻¹; δ_H(400 MHz, CDCl₃) 0.91 (3H, s, C-18-CH₃), 1.42-2.19 (11H, m), 2.29 (3H, s, CH₃CO), 2.38-2.54 (2H, m), 2.9 (2H, t, J = 4.43 Hz, C-6-CH₂), 6.81 (1H, d, J_{C-2-H, C-4-H} = 2.14 Hz, C-4-H), 6.86 (1H, dd, J_{C-4-H, C-2-H} = 2.44 Hz, J_{C-1-H, C-2-H} = 8.54 Hz, C-2-H) および 7.28 (1H, d, J_{C-2-H, C-1-H} = 8.24 Hz, C-1-H); MS m/z (FAB+) 466.2 [10, (M+H+NBA)⁺], 313.2 [65, (M+H)⁺], 270.2 [100, (M+H-CH₃CO)⁺]; MS m/z (FAB-) 269.2 [100, (M-CH₃CO)⁻]. 実験値 C, 76.9; H, 7.83 C₂₀H₂₄O₃ 理論値 C, 76.89; H, 7.74%.

30

(2-ブromoエストロンアセテート (2))

1(2.0g、6.402mmol)を含有するトリフルオロ酢酸(TFA, 50ml)溶液に対して、トリフルオロ酢酸タリウム(6.958g、12.80mmol)を添加し、そして得られた混合物を窒素下0で24時間攪拌した。40未満での減圧下でのTFAの除去の際、得られた結晶エストロン-タリウム(III)複合体を、1,2-ジクロロエタンで2回洗浄した。次いで、1,4-ジオキサン(30ml)および臭化銅(8.58g、38.41mmol)をこの洗浄した複合体に添加し、そして得られた今後物を還流下で3時間加熱した。溶媒のエバポレーション後、次に水(100ml)をこの洗浄複合体に添加した。この溶媒のエバポレーション後、水(100ml)を得られた残滓に添加し、そして粗生成物をジクロロメタン(3x150ml)中に抽出した。この合わせられた有機抽出物を水で洗浄し、乾燥(MgSO₄)し、濾過してエバポレートした。得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(エチルアセテート/ヘキサン、1

40

50

: 4) によって分画し、そして得られた淡白色の固体 (2.05 g) を、メタノールからの再結晶化によってさらに精製し、無色結晶として2を得た (1.79 g, 72%); mp 229 ~ 231; TLC (クロロホルム/アセトン, 8:1 およびエチルアセテート/ヘキサン, 4:1);

【0272】

【数2】

R_s 0.89 および 0.62 (メタノール);

vmax (KBr) 1770, 1730 (C=O) cm⁻¹; δ_H (400 MHz, CDCl₃) 0.91 (3H, s, C-18-CH₃), 1.25-2.3 (12H, m), 2.34 (3H, s, CH₃CO), 2.5 (1H, m), 2.86 (2H, t, J = 4.58 Hz, C-6-CH₂), 6.85 (1H, s, C-4-H) and 7.49 (1H, s, C-1-H); MS m/z (FAB+) 545.2 [90, (M+H+NBA)⁺], 391.2 [100, (M)⁺], 348.1 [90, (M-CH₃CO)⁺], 330.1 (10); Acc. MS (FAB+) 391.08559 C₂₀H₂₄BrO₃ 理論値 391.09088. 実測値 C, 61.2; H, 5.89; C₂₀H₂₃BrO₃ 理論値 C, 61.39; H, 5.92%.

10

(2-プロモエストロン(3))

3 (1.5 g, 3.832 mmol)、炭酸カリウム (2.65 g、19.17 mmol) を含有するメタノール (70 ml) の混合物を還流下で3時間加熱した。溶媒のエバポレーションの際、水 (50 ml) を得られた残滓に添加し、そして組成生成物をジクロロメタン (3 × 100 ml) で抽出した。この合わせられた有機抽出物を水で洗浄し、乾燥 (MgSO₄) し、濾過してエバポレートして、黄色固体 (1.3 g) を得た。この固体を、エチルアセテート/石油エーテル (60 ~ 80) (3:2) からの再結晶化によって精製して、淡黄色結晶として3を得た (1.23 g, 93%) mp 190 ~ 193; TLC (クロロホルム/アセトン, 8:1 および 4:1):

20

【0273】

【数3】

R_s

0.51 および 0.64 (メタノール); vmax (KBr) 1710 (C=O) cm⁻¹; δ_H (400 MHz, CDCl₃) 0.87 (3H, s, CH₃), 1.4-2.52 (13H, m), 2.84 (2H, m, C-6-CH₂), 5.32 (1H, br s, 以下と交換: D₂O, OH), 6.73 (1H, s, C-4-H) および 7.52 (1H, s, C-1-H); δ_C (400 MHz, CDCl₃) 13.81 (q, C-18), 21.56 (t), 25.89 (t), 26.26 (t), 29.9 (t), 31.54 (t), 31.91 (t), 38.04 (d), 43.6 (d), 47.93 (s, C13), 50.38 (d), 114.94 (d, C-4), 135.04 (d, C-1), 128.84 (s), 130.92 (s), 139.02 (s), 152.7 (s, C-3) and 220 (s, C-17-C=O); MS m/z (FAB+) 502.1 [20, (M+NBA)⁺], 349.1 [100, (M)⁺], 271.0 (20); MS m/z (FAB-) 502.2 [40, (M+NBA)⁻], 348.1 [100, (M-H)⁻]; Acc. MS (FAB+) 348.07532 C₁₈H₂₁BrO₂ 理論値 348.07249. 実測値 C, 60.72; H, 5.94. C₁₈H₂₁BrO₂ 理論値 C, 61.9; H, 6.06%.

30

40

(2-プロモエストロン3-O-スルファメート (sulphamate) (4))

スルファモイレーション (sulphamoylation) の際、3 (500 mg, 1.431 mmol) により粗生成物 (620 mg) を得て、これをフラッシュクロマトグラフィー (クロロホルム/アセテート, 8:1) によって分画した。得られたベージュ色残滓 (510 mg) をアセトン/ヘキサン (1:2) からの再結晶化によってさらに精製し、ベージュ色結晶として3を得た (405 mg, 66%) mp > 155 (dec.); TLC (クロロホルム/アセトン, 8:1 および 4:1):

【0274】

50

【数4】

R_s 0.43 および 0.61 (メチル) ; v_{max} (KBr) 3500, 3300 (NH₂), 1730 (C=O), 1390 (SO₂N) cm⁻¹; δ_H(400 MHz, acetone-d₆) 0.92 (3H, s, CH₃), 1.41-2.49 (13H, m), 2.86 (2H, m, C-6-H₂), 7.27 (1H, s, C-4-H), 7.32 (2H, br s, 以下と交換: D₂O, OSO₂NH₂) および 7.55 (1H, s, C-1-H); MS m/z (FAB+) 428.1 [100, (M)⁺], 349.2 [40, (M+H-SO₂NH₂)⁺]; MS m/z (FAB-) 580.2 [M-H+NBA], 428.1 [100, (M)⁻], 349.1 [30, (M+H-SO₂NH₂)⁻]; Acc. MS (FAB+) 428.04299 C₁₈H₂₃BrNO₄S 理論値 428.05311. 実測値, C, 49.1; H, 5.18; N, 3.60; C₁₈H₂₂BrNO₄S 理論値: C, 50.47; H, 5.18; N, 3.27%.

10

(2-インドエステロンアセテート(5))

これを、ヨウ化銅(18.29g, 96.03mmol)を用いることを除いて、2の調製と同じ様式で1(5.0g, 16.01mmol)から調製した。得られた粗生成物を、エチルアセテート/ヘキサン(1:4)を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、そして得られた黄色固体(6.25g)をメタノールから再結晶化によってさらに精製し、淡黄色結晶として5を得た(5.89g, 84%); mp 170~172 (結晶は>145で褐色に変化した); TLC(クロロホルム/アセトン, 8:1およびエチルアセテート, 4:1):

【0275】

20

【数5】

R_s 0.8 および 0.67 (メチル) ; v_{max} (KBr) 1770, 1730 (C=O), δ_H(400 MHz, CDCl₃) 0.92 (3H, s, C-18-CH₃), 1.4-2.31 (12H, m), 2.34 (3H, s, CH₃CO), 2.5 (1H, m), 2.87 (2H, t, J = 4.27 Hz, C-6-CH₂), 6.82 (1H, s, C-4-H) および 7.69 (1H, s, C-1-H); MS m/z (FAB+) 592.1 [20, (M+H+NBA)⁺], 439.1 [80, (M+H)⁺], 396.1 [100, (M+H-CH₃CO)⁺], 270.2 (40); Acc. MS (FAB+) 439.07667 C₂₀H₂₄IO₃ 理論値 439.07702. 実測値 C, 54.2; H, 5.3 C₂₀H₂₃IO₃ 理論値 C, 54.81; H, 5.29%.

30

(2-ヨードエストロン(6))

このプロモアナログ3の調製と同じ様式でこれを5(4.0g, 9.126mmol)から調製した。得られた黄色粗生成物をメタノールから再結晶化して淡黄色結晶として6を得た(3.29g, 91%); mp 207~209 (結晶は>169で褐色に変化した); TLC(クロロホルム/アセトン, 8:1):

【0276】

【数6】

R_f 0.75; ν_{max} (KBr) 3400 (OH), 1730 (C=O) cm⁻¹; δ_H (270 MHz, CDCl₃) 0.91 (3H, s, C-18-CH₃), 1.4-2.56 (13H, m), 2.83 (2H, m, C-6-CH₂), 5.24 (1H, s, 以下交換: D₂O, C-3-OH), 6.74 (1H, s, C-4-H) および 7.52 (1H, s, C-1-H); δ_C (400 MHz, CDCl₃) 13.82 (q, C-18), 21.57 (t), 25.89 (t), 26.26 (t), 29.98 (t), 31.57 (t), 31.81 (t), 39.0 (d), 43.9 (d), 48.3 (s, C13), 50.38 (d), 116.54 (d, C-4), 138.14 (d, C-1), 129.64 (s), 131.92 (s), 138.02 (s), 153.6 (s, C-3) and 220 (s, C-17, C=O); MS *m/z* (FAB+) 550.1 [20, (M+H+NBA)⁺], 396.1 [100, (M)⁺], 271.2 (40); MS *m/z* (FAB-) 549.2 [20, (M+NBA)⁻], 395.1 [100, (M-H)⁻]; Acc. MS (FAB+) 397.0651 C₁₈H₂₂O₂ 理論値 397.06646. 実験値 C, 53.7; H, 5.34 C₁₈H₂₂O₂ 理論値 C, 54.56; H, 5.34%.

10

(2 - ヨードエステロン 3 - O - スルファメート (7))

スルファモイレーション (sulphamoylation) の際、6 (500 mg , 1 . 262 mmol) により粗生成物を得て、これをフラッシュクロマトグラフィー (クロロホルム / アセテート、8 : 1) によって分画した。得られたベージュ色残渣 (450 mg) をアセトン / ヘキサン (1 : 2) からの再結晶化によってさらに精製し、ベージュ色結晶として7を得た (342 mg、57%) mp > 145 (dec.) ; TLC (クロロホルム / アセトン、8 : 1 および 4 : 1) :

20

【 0 2 7 7 】

【 数 7 】

R_f 0.61 および 0.73 (4 本 4 本) ; ν_{max} (KBr) 3500, 3200 (NH₂), 1720 (C=O), 1390 (SO₂) cm⁻¹; δ_H (400 MHz, acetone-d₆) 0.92 (3H, s, CH₃), 1.4-2.53 (13H, m), 2.83 (2H, m, C-6-H₂), 7.25 (1H, s, C-4-H), 7.32 (2H, br s, 以下交換: D₂O, OSO₂NH₂) および 7.76 (1H, s, C-1-H); MS *m/z* (FAB+) 629.1 [40, (M+H+NBA)⁺], 476.1 [100, (M+H)⁺], 396.1 [40, (M+H-SO₂NH₂)⁺]; MS *m/z* (FAB-) 628.1 [35, (M+NBA)⁻], 474.1 [100, (M-H)⁻], 395.1 [20, (M-SO₂NH₂)⁻]; Acc. MS (FAB+) 476.03874 C₁₈H₂₃INO₄S 理論値 476.03926. 実験値 C, 45.8; H, 4.74; N, 2.85; C₁₈H₂₃INO₄S 理論値 C, 45.48; H, 4.66; N, 2.95%.

30

この表題の化合物 (図 7 に図示される) は、「 2 - ヨード E M A T E (2 - I o d o E M A T E) 」と呼ばれる。この化合物の結果を表 8 および 9 に示す。

【 0 2 7 8 】

(2 - クロロエステロンアセテート (8))

これを、ヨウ化銅 (475 mg , 4 . 798 mmol) を用いることを除いて、2の調製と同じ様式で1 (500 mg , 1 . 603 mmol) から調製した。得られた粗生成物を、エチルアセテート / ヘキサン (1 : 4) を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、そして得られた淡黄色固体 (526 mg) をメタノールから再結晶化によってさらに精製し、白色結晶として8を得た (436 mg , 78%) ; mp 195 ~ 197 ; TLC (クロロホルム / アセトン、8 : 1 およびエチルアセテート、4 : 1) :

40

【 0 2 7 9 】

【 数 8 】

R_fs 0.78 及び 0.67 (それぞれ) ; v_{max}

(KBr) 1770, 1730 (C=O), δ_H (400 MHz, CDCl₃) 0.90 (3H, s, C-18-CH₃), 1.38-2.29 (12H, m), 2.33 (3H, s, CH₃CO), 2.5 (1H, m), 2.87 (2H, m, C-6-CH₂), 6.85 (1H, s, C-4-H) 及び 7.34 (1H, s, C-1-H).

(2-クロロエストロン(9))

これを、その臭素アナログ3の調製と同じ様式で8(400 mg、1.15 mmol)から調製した。得られた淡黄色の粗生成物をメタノールから再結晶して、白色結晶として9(320 mg、90%)を得た；

【0280】

【数9】

mp 221-223 °C; TLC

(クロロホルム/アセトン 8:1): R_f 0.70; v_{max} (KBr) 3400 (OH), 1730 (C=O) cm⁻¹; δ_H (270 MHz, CDCl₃) 0.91 (3H, s, C-18-CH₃), 1.4-2.54 (13H, m), 2.84 (2H, m, C-6-CH₂), 5.27 (1H, s, D₂Oで置換, C-3-OH), 6.71 (1H, s, C-4-H) 及び 7.31 (1H, s, C-1-H).

10

20

(2-クロロエストロン3-O-スルファメート(10))

スルファモイル化の際、6(200 mg、655 μmol)を、フラッシュクロマトグラフィ(クロロホルム/アセトン、8:1)により分画した粗生成物として得た。得られたベージュ色の残渣(190 mg)を、アセトン/ヘキサン(1:2)から再結晶することによりさらに精製して、白色結晶として10(170 mg、68%)を得た；

【0281】

【数10】

mp > 163 °C (dec.); TLC (クロロホルム/アセトン、

8:1 及び 4:1): R_fs 0.63 及び 0.74 (それぞれ) ; v_{max} (KBr) 3500, 3200 (NH₂), 1720 (C=O), 1390 (SO₂) cm⁻¹; δ_H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-d₆; 10:1) 0.93 (3H, s, CH₃), 1.4-2.51 (13H, m), 2.86 (2H, m, C-6-H₂), 7.01 (2H, br s, D₂Oで置換, OSO₂NH₂), 7.25 (1H, s, C-4-H) 及び 7.35 (1H, s, C-1-H).

30

(2-フルオロエストロンアセテート(11))

1, 1, 2-トリクロロエタン(24 ml)中のエストロン(1.50 g、5.55 mmol)およびN-フルオロピリジニウムトリフレート(2.74 g、11.0 mmol)を、窒素下で24時間還流した。溶媒を減圧下で除去し、そして残渣を水に注ぎ、そしてジクロロメタン(3×100 ml)で抽出し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、そしてエバポレートして、褐色の粗油状物を得た。この油状物を、ピリジン(10.5 ml)に溶解し、そして無水酢酸(2.62 ml)を用いて還流下で2時間処理した。溶媒をエバポレートし、そして残渣を冷水に注いだ。この溶液をジクロロメタン(3×100 ml)で抽出し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、そしてエバポレートして、粗固体を得た。溶出液として、石油エーテル(b.p. 60~80 °C): 酢酸エチル(9:1~7:3)を用いるフラッシュカラムクロマトグラフィによる精製により、エバポレーション後に粗混合物(0.85 g)を得た。石油エーテル(b.p. 60~80 °C): 無水エタノール(2:8)からの再結晶により、第1の生成物(first crop)として、2-フ

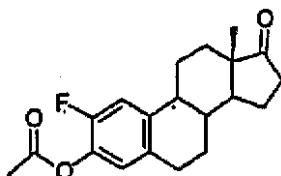
40

50

ルオロエステロンアセテート 11 ((純度 75 ~ 80 %、¹H - NMR により評価) (215 mg、収率 12 %) 無色結晶) を有意に得た。

【 0 2 8 2 】

【 数 1 1 】



10

参考文献: P. C. Bulman Page, F. Hussain, J.L. Maggs, P. Morgan and B. Kevin Park, *Tetrahedron*, 46, 2059-2068, 1990. を参照

$C_{20}H_{23}FO_3$

MW 330.39

Mp °C 83-88 (litt. 88-90)

¹H NMR 270 MHz (CDCl₃): 0.91 (s, 3H, C-18-CH₃), 1.38-1.75 (m, 6H), 1.90-2.45 (m, 6H), 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.46-2.57 (m, 1H), 2.80-2.95 (m, 2H, C-6-H), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, C-4-H), 7.07 (d, 1H, *J* = 13.2 Hz, C-1-H).

20

M/S *m/z* (+ve FAB, rel. int.): 331.1 (59, M⁺+1), 288.1 (100), 270.1 (22).

HRMS (+ve FAB) *m/z* (計算値(C₂₀H₂₃FO₃)(M⁺+1) 331.170948, 実測値 331.170464.

(2 - フルオロエステロン (1 2))

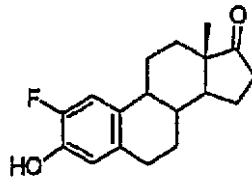
2 - フルオロエステロンアセテート (1 1) (185 mg、0.56 mmol) を、メタノール (5 ml) に溶解し、そして K₂CO₃ (387 mg、5 当量) と共に、還流下で 3 時間加熱することにより脱アセチル化した。溶媒のエバポレーションの後、水 (25 ml) を添加し、そして生成物をジクロロメタン (3 × 20 ml) により抽出した。抽出物を、MgSO₄ により乾燥し、減圧下で乾燥した。石油エーテル (b . p . 60 ~ 80) : 無水エタノール (2 : 8) からの再結晶により、無色結晶 (m . p . 220 ~ 227) として、2 - フルオロエステロン (121 mg、¹H - NMR により評価した純度、75 %) を得た。HPLC 分離 (溶媒 MeOH : H₂O = 60 : 40、流速 20 ml / 分、Column Waters Rapidialpak C18 100 × 25 mm、検出 254 および 270 nm) によるさらなる精製は、溶媒のエバポレーションの後に、白色固体として 2 - フルオロエステロン 12 (72 mg、収率 45 %) を得た。

30

【 0 2 8 3 】

【 数 1 2 】

参考文献 P.C. Bulman Page *et al.*, *Tetrahedron*, 46, 2059-2068, 1990. を参照



$C_{18}H_{21}FO_2$

MW 288.36

Mp °C 220-223 [Litt. 220-222 (石油エーテル-無水エタノール)]

1H NMR 400 MHz (CDCl₃): 0.78 (s, 3H, C-18-CH₃), 1.37-1.79 (m, 6H), 1.91-2.40 (m, 6H), 2.46-2.56 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 2H, C-6-H), 5.02 (d, 1H exch. D₂O, $J = 3.9$ Hz, -OH), 6.72 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz, C-4-H), 6.98 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, C-1-H).

^{19}F NMR 376 MHz (CDCl₃): -144.50 (t, 1F, $J = 9.2$ Hz).

HPLC 水: 溶出液 MeOH:H₂O = 60:40, 流速 2 ml/min, Column Waters Radialpak C18 8 x 100 mm, 検出 270 nm, 2-フルオロエストロン RT = 11.69 min 96.85%, 不純物 RT = 9.69 min, 3.15%.

M/S m/z (+ve FAB, rel. int.): 289.0 [100, (M⁺+1)], 149.0 (33), 120.0 (35).

M/S m/z (-ve FAB, rel. int.): 287.1.0 [100, (M⁻-1)], 200.0 (25), 140.0 (25), 123.0 (43).

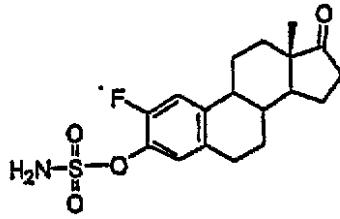
HRMS (+ve FAB) m/z 計算値 ($C_{18}H_{21}FO_2$), M⁺ 288.152558 実測値 288.151993.

(2-フルオロエストロン-3-O-スルファメート(13))

無水DMF (7 ml) 中の2-フルオロエストロン12 (65 mg、0.23 mmol) の攪拌溶液に、窒素雰囲気下で、室温にて、DMBP (139 mg、0.68 mmol) を加え、次いでトルエン (1.61 ml、1.13 mmol) 中の塩化スルファモイル (0.68 M) の溶液をシリンジを介して加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌した。水 (50 ml) および酢酸エチル (60 ml) を加え、そして分離の際、有機層を鹼水 (3 x 50 ml) で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにより乾燥し、濾過し、そして減圧下でエバポレートした。得られた組成物を、溶媒として、クロロホルム: アセトン = 8:1 を用いるフラッシュクロマトグラフィー (カラム径 = 2.5 cm、h = 20 cm) により精製して、白色固体として、2-フルオロエストロン-3-O-スルファメート13 (47 mg、収率57%) を得た。

【0284】

【数13】



C₁₈H₂₂NO₄FS

MW 367.44

Mp 189-193°C

10

¹H NMR 400 MHz (CDCl₃): 0.91 (s, 3H, C-18-CH₃), 1.36-1.70 (m, 6H), 1.92-2.36 (m, 6H), 2.46-2.57 (m, 1H), 2.80-2.95 (m, 2H, C-6-H), 5.03 (s, 2H, -NH₂), 7.11 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, C-4-H), 7.13 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz, C-1-H).

¹⁹F NMR 376 MHz (CDCl₃): -113.24 (dd, 1F, *J* = 15.5 Hz, *J* = 9.7 Hz)

M/S *m/z* (+ve FAB, rel. int.): 367.0 (100, M⁺), 350.0 (30), 288.1 (49), 258.0 (32), 243.1 (38), 178 (34), 133.0 (30), 97.0 (35).

20

M/S *m/z* (-ve FAB, rel. int.): 366.0 [100, (M-H)⁻], 77.9 (21).

HRMS (+ve FAB) *m/z* C₁₈H₂₂NO₄SM⁺ の計算値 367.125358、実測値 367.126663。

Rf 0.32 (CHCl₃:アセトン = 8:1)、SM Rf 0.58。

【0285】

(胎盤マイクロソームにおけるハロ - EMATE によるエストロンスルファターゼ活性の阻害)

(スルファターゼ) - 陽性ヒト胎盤を胎盤マイクロソームの供給源として使用した。組織をホモジナイズし、そして核および細胞破片を、2000 × g で30分間の遠心分離によって除去した。胎盤マイクロソームを、生じた上清を100,000 × g で1時間遠心分離することによって得た。

30

【0286】

阻害研究のために、胎盤マイクロソーム (125 μg/ml) を、インヒビター (1 pm ~ 1.0 μM) の不在下または存在下で、³Hエストロンスルフェート (E1S、非標識 E1S を用いて 20 μM に調整した 2 × 10⁵ dpm) とともに 60 分間インキュベートした。[4-¹⁴C E1] (7 × 10³ dpm) を添加して手順上の損失を補正し、そして遊離ステロイドおよび硫酸化ステロイドを、トルエンを使用する溶媒分配によって分離した。この溶媒の一部を取り出し、そして ³H および ¹⁴C の含量を、液体シンチレーション分光法によって決定した。

40

【0287】

得られたデータを、図 13 に示す。

【0288】

さらなるデータを、以下の表に示す。

【0289】

【表 3】

化合物	MCF-7細胞におけるプレートアッセイ 10 μ Mでの阻害%
2-Cl-Emate	35
2-Br-Emate	33
2-I-Emate	25

10

(T47D細胞増殖に対するハロ - EMATEの効果(プレートアッセイ)) T47Dレセプター陽性乳癌細胞を96ウェル細胞培養プレートに播種し、そして約70%コンフルエントになるまで増殖させた。細胞を、ビヒクル(コントロール、培地中のテトラヒドロフラン)またはハロ - EMATE(1 μ Mもしくは10 μ M)のいずれかで処理し、そしてさらに24時間培養した。この期間の最後に、細胞数に対する薬物の効果を、マイクロタイタープレートアッセイ(Cell Titre 96細胞増殖アッセイ、Promega)を使用して決定した。このアッセイにおいて、培養期間の最後の非処理細胞による基質の変換を100%に設定した。

【0290】

得られたデータを図14に示す。

20

【0291】

さらなるデータを、以下の表に示す。

【0292】

【表4】

化合物	T47D細胞の細胞アッセイ		
	1 μ Mでの阻害%	20 μ Mでの阻害%	形態
2-F-Emate	<1	30	+
2-Cl-Emate	1	7.5	+
2-Br-Emate	-	-	+
2-I-Emate	-	-	+

30

+ は、細胞形態に対する効果を有する。

【0293】

上記明細書中に言及されるすべての刊行物および特許は、本明細書中において参考として援用される。

【0294】

40

本発明の種々の改変および変化が、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者に明らかである。本発明は、特定の好ましい実施形態に関して記載されているが、特許請求される発明は、このような特定の実施形態に不当に限定されるべきでないことが、理解されるべきである。実際、化学分野、生物学分野または関連分野における当業者に明らかである、本発明を実行するための記載された様式の種々の改変が、上記の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。

【0295】

本発明はここで、添付する図面を参照して単に一例として記載される。

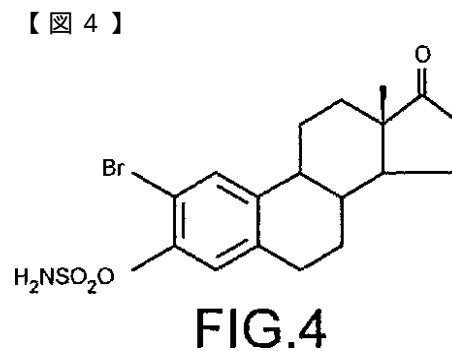
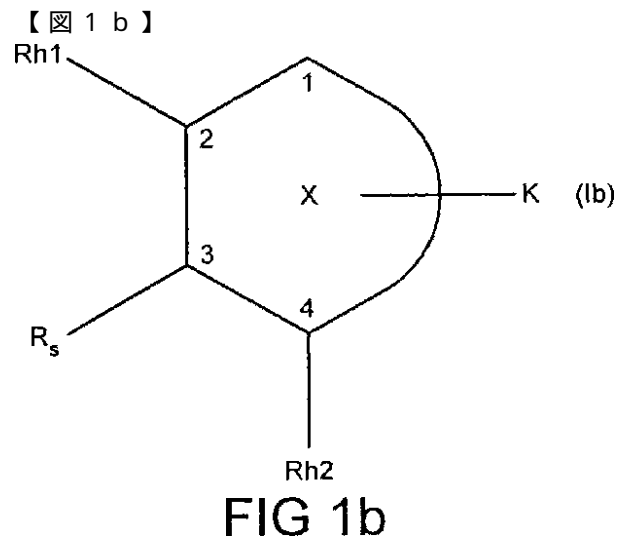
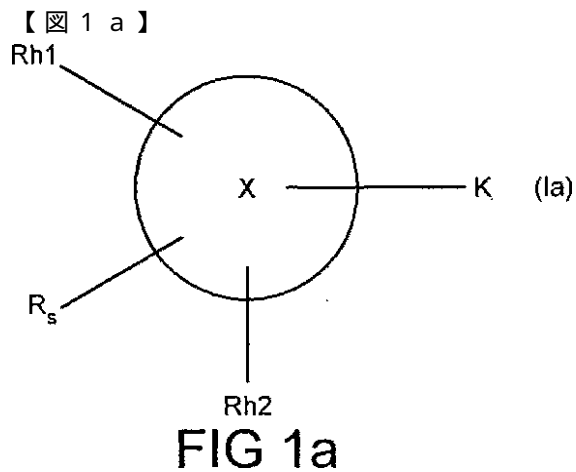
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、一般式を示す。

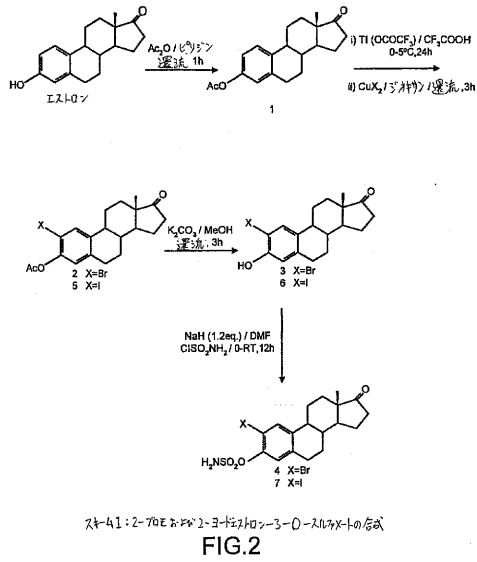
50

- 【図2】 図2は、一般的な反応スキームを示す。
 【図3】 図3は、一般的反応スキームを示す。
 【図4】 図4は、化合物の式を示す。
 【図5】 図5は、データの表を示す。
 【図6】 図6は、グラフを示す。
 【図7】 図7は、化合物の式を示す。
 【図8】 図8は、データの表を示す。
 【図9】 図9は、グラフを示す。
 【図10】 図10は、グラフを示す。
 【図11】 図11は、化合物の式を示す。
 【図12】 図12は、化合物の式を示す。
 【図13】 図13は、グラフを示す。
 【図14】 図14は、グラフを示す。

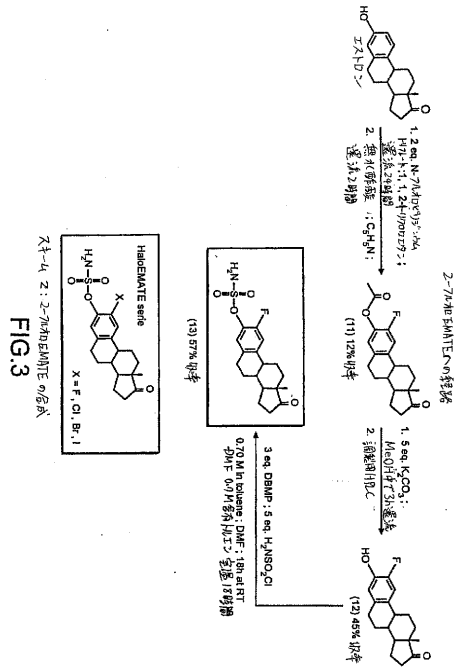
10



【 図 2 】



【 図 3 】

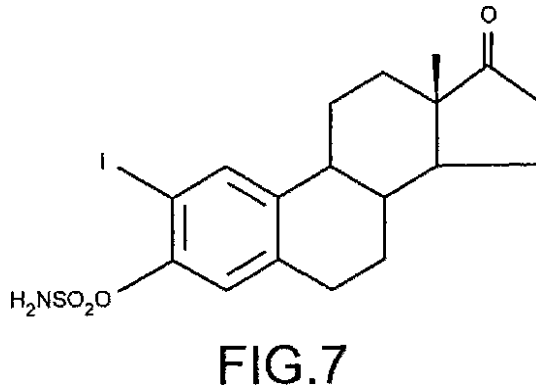


【 図 5 】

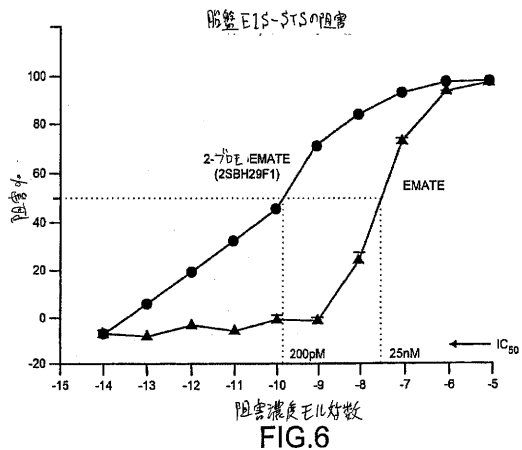
阻害 平均値	SD % 阻害	処理
99.6	0.1	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 10μM
98.8	0.1	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 1μM
94.5	0.2	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 0.1μM
85.1	0.1	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 10nM
72.1	0.2	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 1nM
46.1	0.3	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 0.1nM
32.2	0.5	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 10pM
19.7	1.2	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 1pM
6.1	1.2	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 0.1pM
-6.7	0.7	2SBH29F1 (2-70E EMATE) 10M
98.8	0.1	EMATE 10μM
95.1	0.1	EMATE 1μM
74.4	1.1	EMATE 0.1μM
24.3	3.5	EMATE 10nM
-0.9	1.2	EMATE 1nM

FIG.5

【 図 7 】



【 図 6 】

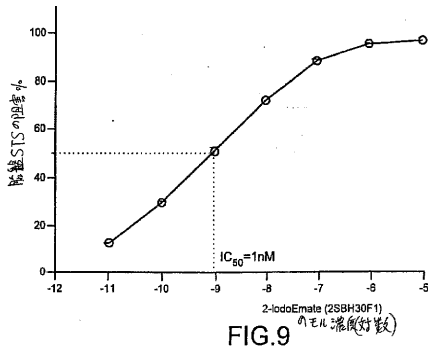


【 図 8 】

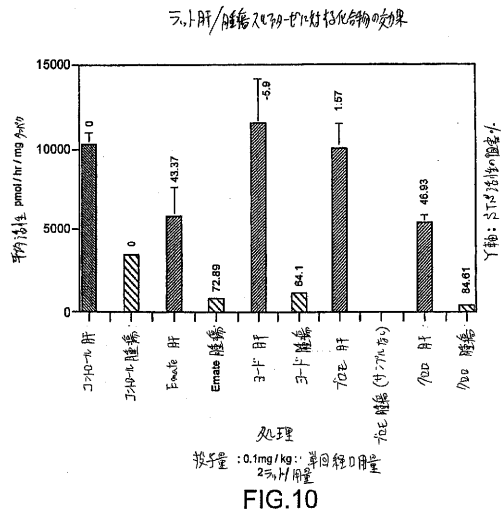
阻害平均	阻害SD	2-30E Estradiol 濃度
98.8	0.1	10μM 2SBH30F1
97.3	0.1	1μM 2SBH30F1
89.8	0.6	0.1μM 2SBH30F1
72.9	0	10nM 2SBH30F1
51.1	1.7	1nM 2SBH30F1
30.1	0.6	0.1nM 2SBH30F1
13.1	0.5	10pM 2SBH30F1

FIG.8

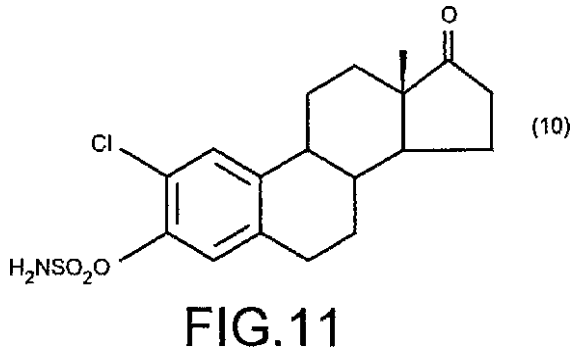
【 図 9 】



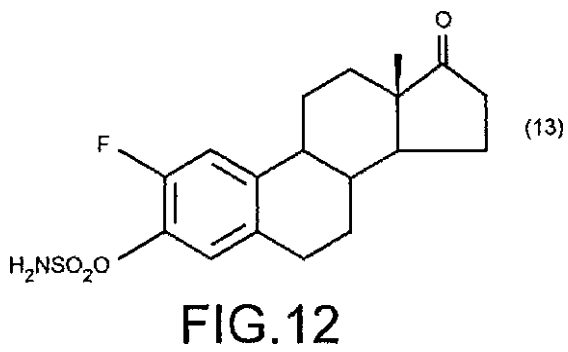
【 図 10 】



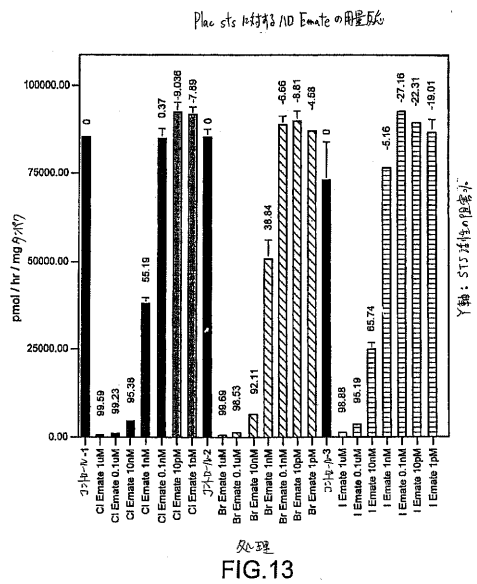
【 図 1 1 】



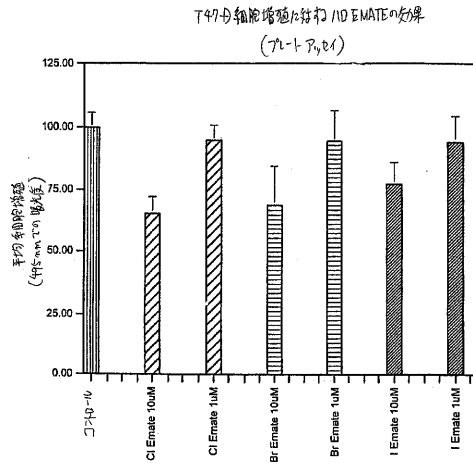
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 14 】



処理 : (24hrs)
FIG.14

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	5/44	(2006.01)	A 6 1 P	5/44	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
			A 6 1 P	43/00	1 1 1

(31)優先権主張番号 0018040.6

(32)優先日 平成12年7月21日(2000.7.21)

(33)優先権主張国 英国(GB)

(72)発明者 リード, マイケル ジョン

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード, ザ オックスフォード サイエ
ンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー, マグダレン センター, ステリックス
リミテッド

(72)発明者 ボッター, バリー ビクター ロイド

イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード, ザ オックスフォード サイエ
ンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー, マグダレン センター, ステリックス

リミテッド

- (72)発明者 ヘジャツ, ハテム
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード, ザ オックスフォード サイエ
ンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー, マグダレン センター, ステリックス
リミテッド
- (72)発明者 プロヒット, アツル
イギリス国 オーエックス4 4ジーエイ オックスフォード, ザ オックスフォード サイエ
ンス パーク, ロバート ロビンソン アベニュー, マグダレン センター, ステリックス
リミテッド

審査官 早乙女 智美

- (56)参考文献 国際公開第98/042729 (WO, A1)
米国特許第06583130 (US, B1)
国際公開第98/024802 (WO, A1)
特表平07-501515 (JP, A)
特表平07-501514 (JP, A)
国際公開第99/027936 (WO, A1)
米国特許第04496555 (US, A)
PUROHIT A, MOLECULAR BIOLOGY, 英国, ELSEVIER SCIENCE LTD., 1998年, V64N5, P269-275
WOO, L. W. L., Heteroatom-Substituted Analogues of the Active-Site Directed Inhibitor
Estra-1,3,5(10)-Trien-17-One-3-Sulphamate Inhibit Estrone Sulphatase by a Different Me
chanism, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1996年, 57(1/2), p
. 79-88
HOWARTH, N. M., Phosphonates and thiophosphonates as sulfate surrogates: Synthesis of
estrone 3-methylthiophosphonate, a point inhibitor of estrone sulfatase, Bioorganic &
Medicinal Chemistry Letters, 1993年, 3(2), p. 313-318
PUROHIT, A., Inhibition of Steroid Sulphatase Activity by Steroidal Methylthiophosphon
ates: Potential Therapeutic Agents in Breast Cancer, Journal of Steroid Biochemistry a
nd Molecular Biology, 1994年, 48(5/6), p. 523-527
TOWNSLEY J D, ENDOCRINOLOGY, 米国, 1973年 7月 1日, V93N1, P172-181
HORWITZ, JEROME P., J.MED.CHEM., 1986年, V29N5, P692-698

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07J 41/00
A61K 31/566
A61P 1/00-43/00
C12Q 1/34
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)