

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012年2月2日(02.02.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/014848 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/4433 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C07D 405/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/066866

(22) 国際出願日: 2011年7月25日(25.07.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-167577 2010年7月26日(26.07.2010) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 千葉大学(National University Corporation Chiba University) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 荒井 緑 (ARAI Midori) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 石橋 正己 (ISHIBASHI Masami) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 柳瀬 なつき (YANASE Natsuki) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 小柳 津 和音 (KORYUDZU Kazune) [JP/JP]; 〒

2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 国立大学法人千葉大学 大学院薬学研究院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 井上 春季(INOUE Haruki); 〒1100005 東京都台東区上野3-18-1 大熊ビル502 Tokyo (JP).

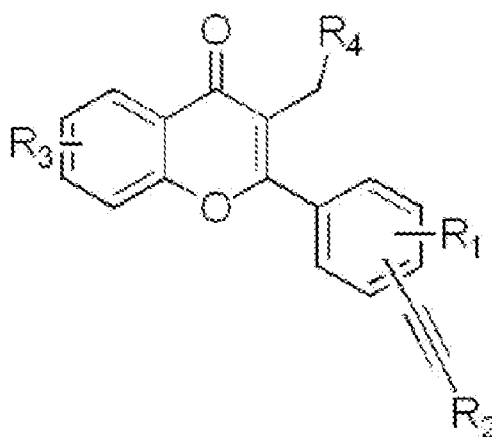
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: FLAVONIOD-DERIVED HES-1 PROMOTER INHIBITOR

(54) 発明の名称: フラボノイド由来Hes1プロモーター阻害剤



(57) Abstract: [Problem] To provide an HES-1 promoter inhibitor which has strong HES-1 promoter inhibitory activity and which is less toxic to neural stem cells. [Solution] An HES-1 promoter inhibitor which comprises a compound represented by the general formula or a derivative thereof.

(57) 要約: 【課題】 Hes1 プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低い Hes1 プロモーター阻害剤を提供する。 【解決手段】 下記一般式に示される化合物又はその誘導体を含む Hes1 プロモーター阻害剤とする。



WO 2012/014848 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：フラボノイド由来Hes1プロモーター阻害剤

技術分野

[0001] 本発明はHes1プロモーター阻害剤に関する。

背景技術

[0002] 神経幹細胞の分化を促進させ、選択的に特定の神経細胞（ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）に導く化合物は、認知症などの重篤な神経疾患や、脳溢血後や脊髄損傷後の神経再生医薬のリードとなる。特に、特定のニューロン（例えばドーパミンニューロンなど）に導くことは重要である。

[0003] 神経幹細胞に作用し、神経再生医薬候補となる有効な化合物は、世界でもほとんど報告例が無い。再生医療の発展がめざましく、幹細胞の活用が非常に期待されている最近の世界状況からも、神経幹細胞に作用する化合物の創製が非常に望まれている。

[0004] ところで、下記非特許文献1には、ドコサヘキサエン酸（DHA）の神経幹細胞の分化促進作用とHes1発現阻害の関連に関する報告がある。また、下記非特許文献2には、神経幹細胞の増殖・維持や種々の神経細胞への分化を調節しているbHLH転写因子群の中で、Hes1プロモーター活性を阻害すると神経幹細胞の分化を促進することに繋がることが開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：M. Katakura, M. Hashimoto, H. M. Shahdat, S. Gamoh, T. Okui, K. Matsuzaki, O. Shido, Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-

loop-helix transcription factors and cell cyclic in neural stem cells, Neuroscience, 2009, 160, 651-660.

非特許文献2：荒井緑，天然物様化合物を軸とした神経幹細胞，癌細胞へのアプローチ，日本薬学会第130年会要旨集1，p. 56

発明の概要

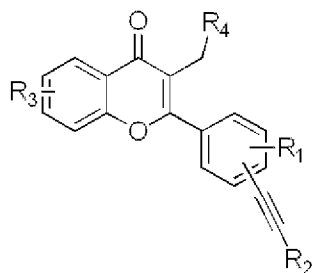
発明が解決しようとする課題

- [0006] しかしながら、上記非特許文献1に記載された化合物は、Hes1プロモーター阻害活性において改善の余地があり、より効果の大きな化合物を探索することは極めて有用である。
- [0007] また、上記非特許文献2に記載された化合物は、マウス神経幹細胞に対してではあるが、神経幹細胞に対し強い毒性を有するといった課題がある。
- [0008] そこで、本発明は、Hes1プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低い神経幹細胞分化促進剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、上記課題について鋭意検討、試行錯誤を行なったところ、Hes1プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低い化合物を発見するに至った。
- [0010] 即ち、上記課題を解決するための第一の観点に係るHes1プロモーター阻害剤は、下記一般式に示される化合物を含む。

[化1]



- [0011] 上記式中R₁、R₃、R₄は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシ

ル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環を表し、 R_2 は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシル基、アルコキシ基、アミノ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環を表す。また R_1 、 R_3 は一つであっても、複数であってもよい。

発明の効果

[0012] 以上、本発明によると、Hes1プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低い神経幹細胞分化促進剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

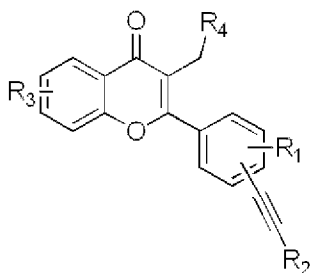
[0013] [図1]実施例の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0014] 以下、本発明を実施するための形態について図面を用いて詳細に説明する。ただし、本発明は多くの異なる形態による実施が可能であって、以下に示す実施形態、実施例の記載にのみ限定されるわけではない。

[0015] 本実施形態に係るHes1プロモーター阻害剤は、下記一般式に示される化合物を含む。

[化2]



[0016] 上記式中 R_1 、 R_3 、 R_4 は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシル基、ヒドロキシル基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエー

テル基、アリール基、又はヘテロ環を表し、 R_2 は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシル基、アルコキシ基、アミノ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環を表す。また R_1 、 R_3 は一つであっても、複数であってもよい。

[0017] なおここで「置換基」とは、アルキル基、ハロゲン、アシル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環をいうがこれに限定されない。

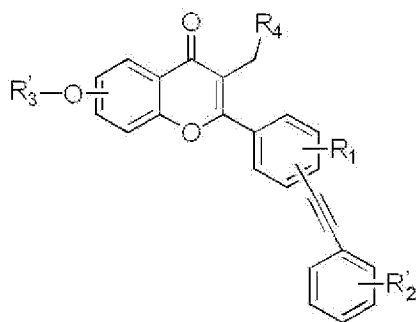
[0018] また、ここで「ヘテロ環」とは、2種以上の元素を含む環式の化合物であって、例えば下記の例で示すようなチオール環、オキソール環、アゾール環又はピリジン環をいう。もちろん、上記のとおり、ヘテロ環は置換基を有していてもよい。

[0019] [化3]



[0020] また、上記一般式に示される化合物は、好ましくは、下記一般式に示される化合物を含む。

[化4]

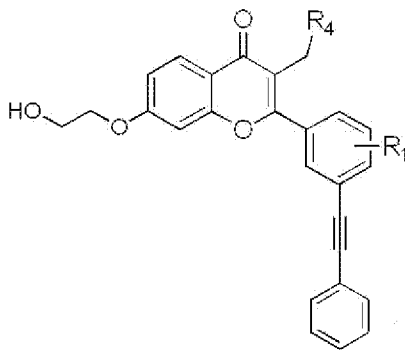


[0021] 上記式中 R_1 、は水素、ハロゲン、又は、置換基を有してよいアルキル基若しくはアルコキシ基を表し、 R'_2 は水素、ハロゲン、又は、置換基を有して

よいアルキル基素若しくはアルコキシ基を表し、 R'_3 は水素、ハロゲン、又は、置換基を有してよいアルキル基素若しくはアルコキシ基を表し、 R_4 は置換基を有してよいヘテロ環を表す。 R_1 は一つであっても、複数であってもよい。

[0022] また、上記一般式に示される化合物は、より好ましくは、下記一般式に示される化合物を含む。

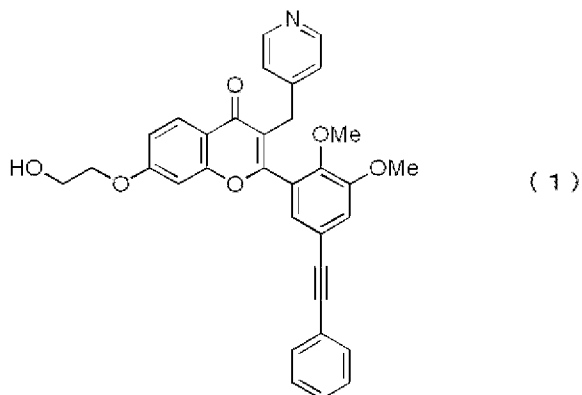
[化5]



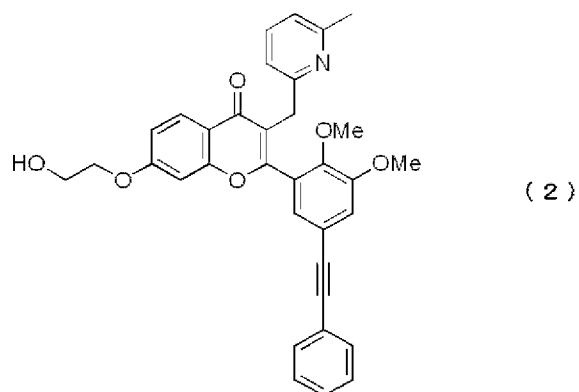
[0023] 上記式中 R_1 は1又は複数のアルコキシ基を表し、 R_4 はアルキル基又はアルコキシル基を有してよいピリジン環を表す。

[0024] なお、上記式に示される化合物は、限定されるわけではないが、より具体的には、下記1乃至4で例示することができる。

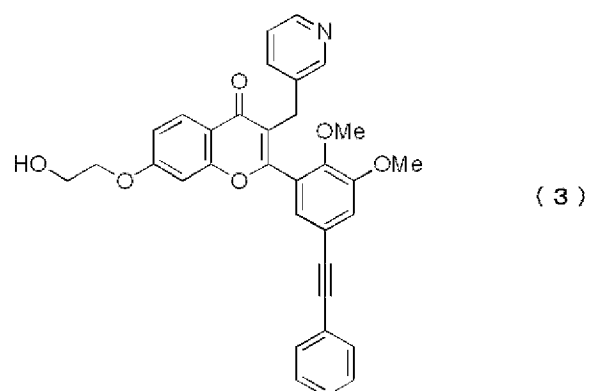
[化6]



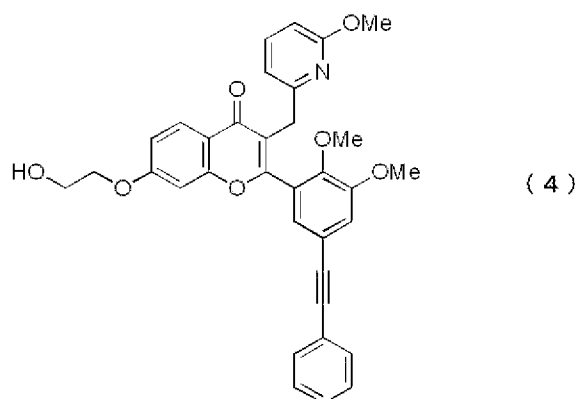
[化7]



[化8]



[化9]



[0025] 本実施形態にかかる化合物は、Hes1プロモーター阻害剤が強い一方、神経幹細胞に対して公知の化合物より毒性がより低いものとなっており、認知症等の神経疾患の治療や予防に有用な薬剤となる。

[0026] 薬剤として用いる場合、上記化合物のほか、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、賦形剤、希釈剤（例えば蒸留水）、pH緩衝材（例えばリン酸

緩衝生理食塩水)、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤等の各種調剤用配合剤成分を含有することができる。

[0027] また本実施形態に係るHes1プロモーター阻害剤は、その使用形態に応じて経口的に又は非経口的に投与することができるが、長期にわたるリハビリ等を考慮すると経口的であることが好ましく、脳溢血や脳梗塞等の発病段階では非経口的であることが好ましい。経口的な投与としては通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁液、油剤、乳化剤等の投与形態を採用することができる。非経口的な投与としては、通常用いられる投与形態、例えば上記の液剤、懸濁液等にしたものを点滴や注射により投与する形態、直接損傷部位に投与する形態等を採用することができる。

[0028] 本実施形態に係るHes1プロモーター阻害剤の投与量は、患者の体重、性別、神経損傷の程度、投与の方法に応じて適宜選択されうるが、例えば非経口な投与であって、損傷部位に直接投与する場合、例えば成人1日、上記化合物を1mg以上100mg以下の範囲内で含む量であることが好ましく、より好ましくは有効成分を1mg以上20mg以下の範囲内で含む量である。なお、注射による投与の場合、非経口な投与であっても、有効成分が上記有効成分の量の10倍程度の範囲内にすることが好ましい。

[0029] 本実施形態に係るHes1プロモーター阻害剤は、得られる限りにおいて限定されるわけではないが、合成によって作製することができる。上記化合物の合成は、例えば、まずヒドロキシアセトフェノン誘導体を出発物質として芳香族アルデヒドと塩基性条件下にてカルコン誘導体を合成し、更にこの化合物にヘテロ環アルデヒドを添加し、さらにPd触媒による菌頭-荻原カップリング、あるいは鈴木-宮浦カップリングにより置換基を導入することで作製することができる。これについては、例えば、Arai, M. A., Sato, M., Sawada, K., Hosoya, T., Ishibashi, M., "Efficient Synthesis of Chromone and Flavonoid Derivatives wi

th Diverse Heterocyclic Units” Chem. Asian J., 2008, 3, 2056–2064.)にある方法を参照することで製造できる。

[0030] 以上、本実施形態によると、Hes1プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低い神経幹細胞分化促進剤を提供することができる。

実施例

[0031] 以下、上記実施形態に係る神経肝細胞分化促進剤について実際に作製を行い、その効果を確認した。以下に説明する。

[0032] (一般式で示される化合物の作製)

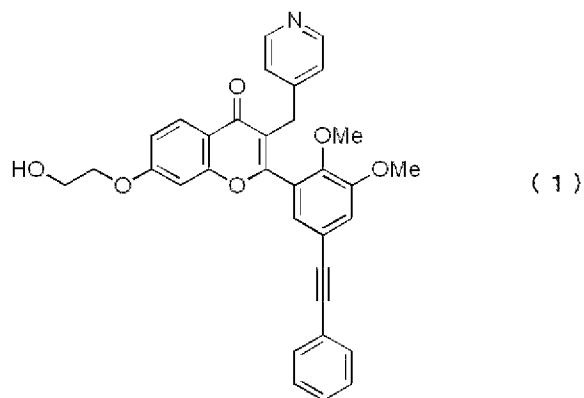
(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenone-4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenoneを担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) (担持の方法は、Arai, M. A., Sato, M., Sawada, K., Hosoya, T., Ishibashi, M., “Efficient Synthesis of Chromone and Flavonoid Derivatives with Diverse Heterocyclic Units” Chem. Asian J., 2008, 3, 2056–2064にある方法に従うことのできる)をKOH (26mg)存在下、EtOH (2ml)中、種々の芳香族アルデヒド (3当量)と40℃で24–50時間攪拌し、対応するカルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ50mgに対し、対応するヘテロ環アルデヒド (20当量)と60℃で72時間攪拌し、対応するフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ20mgに対し、Pd(OAc)₂ (1当量)、トリフェニルホスフィン (2当量)、ピロリジン (30当量)存在下、対応するアセチレン化合物 (20当量)を加え、DMF (1ml)中、60℃で24時間攪拌し、対応する菌頭-萩原カップリングによ

るフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。一方、鈴木－宮浦カップリングでは、ビーズ20mgに対し、*tris* (*dibenzylideneacetone*) *dipalladium* (0) (1当量)、NaOMe (15当量)を加え、THF/H₂O (10/1, 1 ml)中、対応するボラン化合物 (15当量)と反応させ、60℃で48時間攪拌し、対応する鈴木－宮浦カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5%HF・PyのTHF溶媒中、室温、1時間で行い、一般式で示される化合物を得た。

[0033] (化合物(1)の作製)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenoneを担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) KOH (26mg)存在下、EtOH (2ml)中、5-bromo-2,3-dimethoxycarboxyaldehyde (57mg)と40℃で30時間攪拌し、カルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ50mgに対し、4-pyridinecarboxyaldehyde (73μL)と60℃で72時間攪拌し、フラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ20mgに対し、Pd(OAc)₂ (4mg)、トリフェニルホスフィン (8 mg)、ピロリジン (39μL)存在下、phenylacetylene (34μL)を加え、DMF (1ml)中、60℃で24時間攪拌し、対応する菌頭－萩原カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5%HF・PyのTHF溶媒中、室温、1時間で行い、下記式(1)で示される化合物 (4.4mg)を得た。

[化10]



[0034] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.76 (d, $J=8.2\text{ Hz}$, 1H), 7.54–7.52 (m, 3H), 7.46 (dt, $J=7.3, 2.0\text{ Hz}$, 2H), 7.33–7.28 (m, 5H), 7.21 (d, $J=1.9\text{ Hz}$, 1H), 6.85 (dd, $J=8.2, 2.0\text{ Hz}$, 1H), 6.45 (d, $J=2.0\text{ Hz}$, 1H), 4.10 (t, $J=4.1\text{ Hz}$, 2H), 4.00 (br s, 2H), 3.97 (t, $J=4.1\text{ Hz}$, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.64 (s, 3H).

[0035] $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 179.0, 162.8, 159.3, 156.1, 134.9, 134.5, 132.2, 132.1, 132.0, 131.6, 131.4, 131.0, 130.9, 130.4, 130.0, 128.6, 128.5, 128.4, 122.8, 113.3, 107.6, 100.8, 61.1, 55.9, 37.1, 31.9, 29.4, 22.7, 14.1.

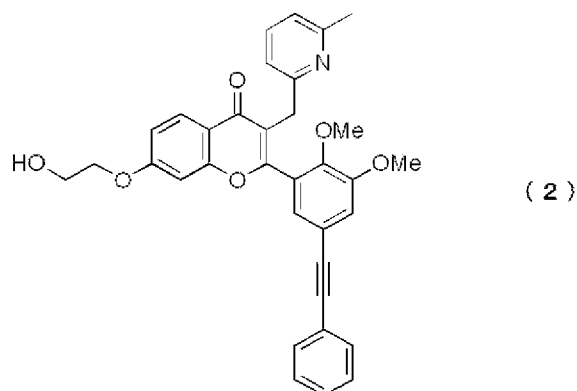
[0036] ESI-HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{NO}_6$ 534.1917, found 534.1962.

[0037] (化合物(2)の作製)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenone を担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) KOH (26mg) 存在下、EtOH (2ml) 中、5-bromo-2,3-d

dimethoxycarbonylaldehyde (57 mg) と 40℃ で 30 時間攪拌し、カルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ 50 mg に対し、6-methyl-2-pyridinecarboxyaldehyde (94 mg) と 60℃ で 72 時間攪拌し、フラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ 20 mg に対し、Pd(OAc)₂ (4 mg)、トリフェニルホスフィン (8 mg)、ピロリジン (39 μL) 存在下、phenylacetylene (34 μL) を加え、DMF (1 ml) 中、60℃ で 24 時間攪拌し、対応する菌頭-萩原カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5% HF・Py の THF 溶媒中、室温、1 時間で行い、下記式 (2) で示される化合物 (5.7 mg) を得た。

[化11]



[0038] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.15 (d, J=8.8 Hz, 1H), 7.48 (dd, J=7.0, 2.2 Hz, 2H), 7.41 (t, J=7.6 Hz, 1H), 7.35-7.33 (m, 4H), 7.18 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.03 (d, J=7.6 Hz, 1H), 6.99 (dd, J=8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, J=7.6 Hz, 1H), 6.85 (d, J=2.4 Hz, 1H), 4.15 (t, J=4.2 Hz, 2H), 4.01 (t, J=4.2 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 2.46 (s, 3H).

[0039] ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 173.8, 163.0,

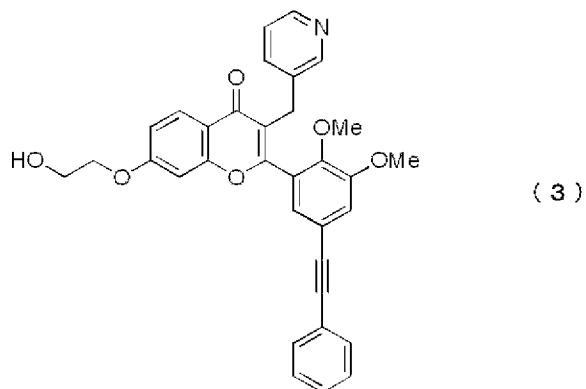
160.8, 158.8, 157.4, 152.5, 149.7, 136.5, 134.7, 131.5, 131.4, 128.4, 127.5, 127.3, 126.4, 121.0, 120.5, 119.6, 119.0, 118.7, 117.4, 117.1, 114.5, 100.7, 69.8, 61.4, 61.0, 56.0, 34.2, 29.7, 24.4, 24.3.

[0040] ESI-HRMS $[M+H]^+$: calcd for $C_{34}H_{30}NO_6$ 548.2073, found 548.2086.

[0041] (化合物(3)の作製)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenone を担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) KOH (26mg) 存在下、EtOH (2ml) 中、5-bromo-2,3-dimethoxycarboxyaldehyde (57mg) と40℃で30時間攪拌し、カルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ50mg に対し、3-pyridinecarboxyaldehyde (73 μ L) と60℃で72時間攪拌し、フラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ20mg に対し、Pd(OAc)₂ (4mg)、トリフェニルホスフィン (8mg)、ピロリジン (39 μ L) 存在下、phenylacetylene (34 μ L) を加え、DMF (1ml) 中、60℃で24時間攪拌し、対応する菌頭-萩原カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5%HF $\cdot$ PyのTHF溶媒中、室温、1時間で行い、下記式(3)で示される化合物(5.0mg)を得た。

[化12]



[0042] $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) : δ 7.76 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.54–7.52 (m, 3H), 7.46 (dt, $J=7.3, 2.0$ Hz, 2H), 7.33–7.28 (m, 5H), 7.21 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 6.85 (dd, $J=8.2, 2.0$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J=4.1$ Hz, 2H), 4.00 (br s, 2H), 3.97 (t, $J=4.1$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.64 (s, 3H).

[0043] $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3) : δ 179.0, 162.8, 159.3, 156.1, 134.9, 134.5, 132.2, 132.1, 132.0, 131.6, 131.4, 131.0, 130.9, 130.4, 130.0, 128.6, 128.5, 128.4, 122.8, 113.3, 107.6, 100.8, 61.1, 55.9, 37.1, 31.9, 29.4, 22.7, 14.1.

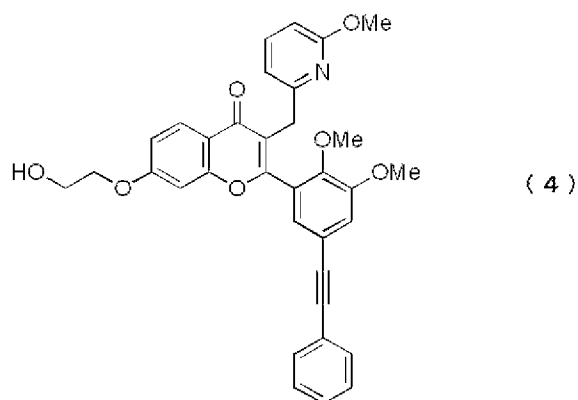
[0044] ESI-HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{NO}_6$ 534.1917, found 534.1962.

[0045] (化合物(4)の作製)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenone を担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) KOH (26mg) 存在下、EtOH (2ml) 中、5-bromo-2,3-d

imethoxycarboxyaldehyde (57 mg) と 40℃ で 30 時間攪拌し、カルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ 50 mg に対し、6-methoxy-2-pyridinecarboxyaldehyde (94 μ L) と 60℃ で 72 時間攪拌し、フラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ 20 mg に対し、Pd(OAc)₂ (4 mg)、トリフェニルホスフィン (8 mg)、ピロリジン (39 μ L) 存在下、phenylacetylene (34 μ L) を加え、DMF (1 mL) 中、60℃ で 24 時間攪拌し、対応する菌頭-萩原カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5% HF・Py の THF 溶媒中、室温、1 時間で行い、下記式 (4) で示される化合物 (4.2 mg) を得た。

[化13]



[0046] ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 8.14 (dd, J=8.3, 2.2 Hz, 1H), 7.95 (d, J=9.0 Hz, 1H), 7.55–7.43 (m, 4H), 7.35–7.28 (m, 4H), 6.86 (d, J=2.1 Hz, 1H), 6.47 (dd, J=9.0, 2.3 Hz, 1H), 6.35 (d, J=2.3 Hz, 1H), 4.20 (t, J=4.4 Hz, 2H), 4.01 (t, J=4.4 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.78 (s, 3H).

[0047] ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ 180.6, 163.5,

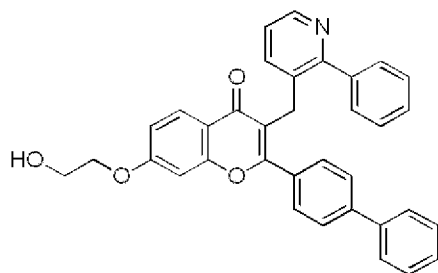
162.4, 157.9, 148.3, 141.3, 134.3, 134.2, 132.2, 132.0, 131.9, 131.4, 131.0, 130.8, 130.4, 129.6, 128.8, 128.6, 128.3, 128.0, 127.8, 126.6, 123.0, 102.3, 69.9, 69.4, 63.4, 60.6, 55.8, 50.1, 29.6, 22.6.

[0048] ESI-HRMS $[M+H]^+$: calcd for $C_{34}H_{30}NO_7$ 564.2022, found 564.2026.

[0049] (化合物(5)の作製: 比較例)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenone を担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g) を KOH (26mg) 存在下、EtOH (2ml) 中、4-bromobenzaldehyde (43mg) と 40℃ で 30 時間攪拌し、対応するカルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ50mg に対し、2-bromo-3-pyridinecarboxyaldehyde (145mg) と 60℃ で 72 時間攪拌し、対応するフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。次に、得られたビーズ20mg に対し、tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) (14mg)、NaOMe (13mg) を加え、THF/H₂O (10/1, 1ml) 中、phenylboronic acid (29mg) と反応させ、60℃ で 48 時間攪拌し、対応する鈴木-宮浦カップリングによるフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5% HF・Py の THF 溶媒中、室温、1 時間で行い、下記式(5)で示される化合物を得た。

[化14]



(5)

[0050] IR (ATR) : 3420, 2926, 1624, 1507, 1488, 1441, 1386, 1249, 1177, 1077, 844, 765, 699 cm^{-1} .

[0051] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 3.68 (s, 2H), 3.96 (t, $J=4.6\text{ Hz}$, 2H), 4.10 (t, $J=4.6\text{ Hz}$, 2H), 6.73 (d, $J=2.2\text{ Hz}$, 1H), 6.91–6.94 (m, 2H), 6.98 (dd, $J=8.9, 2.2\text{ Hz}$, 1H), 7.02 (d, $J=7.5\text{ Hz}$, 2H), 7.11 (d, $J=7.5\text{ Hz}$, 2H), 7.12–7.13 (m, 2H), 7.31–7.40 (m, 6H), 7.53 (t, $J=8.6\text{ Hz}$, 1H), 8.08 (d, $J=8.9\text{ Hz}$, 1H), 8.32–8.34 (m, 1H), 8.68 (dd, $J=8.6, 1.8\text{ Hz}$, 1H).

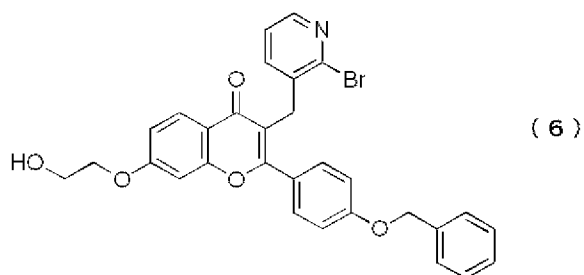
[0052] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3) : δ 173.9, 165.3, 163.0, 157.8, 157.5, 154.5, 146.9, 143.3, 135.8, 132.1, 132.0, 131.9, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 127.2, 127.1, 127.0, 126.9, 126.8, 122.4, 100.7, 100.2, 69.8, 61.0, 29.7.

[0053] (化合物(6)の作製：比較例)

(4-メトキシフェニル)ジイソプロピルシリルプロピルポリスチレンに 4'-hydroxyethoxy-2'-hydroxyacetophenoneを担持させたビーズ100mg (0.78mmol/g)をKOH

(26 mg) 存在下、EtOH (2 ml) 中、4-benzoxymethylbenzaldehyde (50 mg) と 40℃ で 30 時間攪拌し、対応するカルコン誘導体担持ビーズを得た。次に、この得られたビーズ 50 mg に対し、2-bromo-3-pyridinecarboxaldehyde (145 mg) と 60℃ で 72 時間攪拌し、対応するフラボノイド誘導体担持ビーズを得た。ビーズからの切り出しは、5% HF・Py の THF 溶媒中、室温、1 時間で行い、下記式 (6) で示される化合物を得た。

[化15]



[0054] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.22 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.45–7.35 (m, 8H), 7.17 (dd, $J=7.6, 4.7$ Hz, 1H), 7.05–7.01 (m, 3H), 6.93 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.20 (t, $J=4.7$ Hz, 2H), 4.05 (br s, 2H), 3.99 (s, 2H).

[0055] $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 177.4, 163.2, 160.6, 157.8, 147.5, 144.2, 137.3, 136.7, 136.2, 129.8, 128.7, 128.2, 127.5, 127.4, 125.1, 122.9, 116.9, 116.8, 115.0, 114.9, 100.7, 70.1, 69.9, 61.1, 32.0.

[0056] ESI-HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$: calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{24}^{79}\text{BrNO}_5\text{Na}$ 580.0736, found 580.0740.

[0057] (アッセイの準備)

本実施例において、Hes1 発現阻害は、マウス Hes1 プロモーター部

を有するルシフェラーゼレポータージーンを用いるアッセイにて評価した。

[0058] Hes 1 プロモーター部を有するルシフェラーゼレポータージーンを安定発現する細胞 (C3H10T1/2を用いて発明者が作成) を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ($1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$) ずつ 96-well white plate に播種し、18時間培養 (37°C 、 $5\%\text{CO}_2$) した。培地を取り除き、それぞれの濃度に希釈した化合物溶液を作成し、 $50\mu\text{L}$ ずつ加えた。24時間インキュベーションし、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。ルシフェラーゼ活性の測定は、以下のように行った。培地を取り除き、 $50\mu\text{L}$ の $1 \times \text{Glo Lysis Buffer}$ (Promega) を加え、室温にて30分間振とうした。細胞が溶解した後、 $30\mu\text{L}$ の $\text{Bright-Glo}^{\text{TM}}$ Luciferase Assay System (Promega) の luciferin を添加し、Luminoskan Ascent (Thermo) を用いて化学発光量を測定し、Hes 1 promoter 活性を評価した。

[0059] また本実施例では、同時に、細胞毒性試験 (FMCA) も行い、細胞の生存率を調べた。 $1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ の細胞を $50\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ 96-well black plate に播種し、18時間培養 (37°C 、 $5\%\text{CO}_2$) した。ルシフェラーゼ活性用のサンプル添加と同時に、同じ濃度のテストサンプルを加え、24時間作用させた後、fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) の手法を用いて Fluoroskan ascent (Thermo) にてその蛍光量を測定し ($\text{Ex}: 485 \text{ nm}$ 、 $\text{Em}: 538 \text{ nm}$)、細胞生存率を評価した。

[0060] それぞれの活性評価は、サンプルを添加していないコントロールの値を100%とし、テストサンプル群の値の変化を割合で計算し、ルシフェラーゼ活性では Hes 1 プロモーター活性を、FMCA では細胞生存率を算出した。

[0061] そしてこのアッセイを用いて、上記化合物 (1) 乃至 (6) についてその

効果を確認した。この結果を図1に示す。図中、棒グラフはルシフェラーゼ活性を、折れ線グラフは、アッセイ細胞（C3H10T1／2）の生存率を表す。また図中「c o」はコントロールを意味する。

[0062] この結果、化合物のHes1発現阻害作用のIC50は、化合物（1）において21 μ M、化合物（2）において46 μ M、化合物（3）において29 μ M、化合物（4）において25 μ Mであることが確認でき、Hes1発現阻害を確認した。一方、上記化合物（5）については、IC50が>50 μ Mであり、Hes1発現阻害作用が低かった。

[0063] また一方、化合物のマウス神経幹細胞に対する毒性は、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay（Promega）を用い、生存細胞のATP量を指標に比較した。化合物を24時間作用させた後のマウス神経幹細胞の生存率は、化合物濃度20 μ Mにおいて、化合物（1）では77%、化合物（2）では83%、化合物（3）では77%、化合物（4）では88%であり、一方、化合物（6）においては2%であり、化合物濃度50 μ Mにおいても、化合物（1）～（4）において生存率は60%以上であったが、一方、化合物（6）においては0.7%とほぼ死滅した。本実施形態に係る化合物の神経幹細胞の毒性が低いことが確認できた。

[0064] 以上、本実施例により、Hes1プロモーター阻害活性が強い一方、神経幹細胞に対して毒性のより低いHes1プロモーター阻害剤となっていることを確認した。

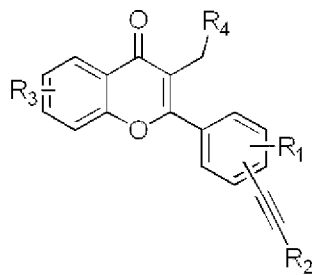
産業上の利用可能性

[0065] 本発明は、Hes1プロモーター阻害剤、神経幹細胞分化促進剤のリード化合物として産業上の利用可能性がある。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

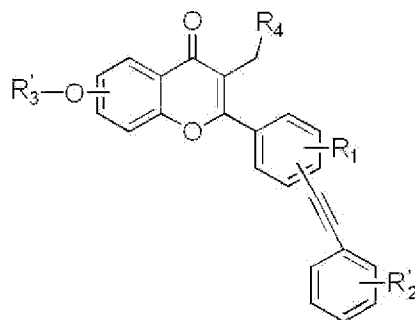
[化1]



上記式中 R_1 、 R_3 、 R_4 は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基、ニトロ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環を表し、 R_2 は置換基を有してよいアルキル基、ハロゲン、アシル基、アルコキシ基、アミノ基、アミド基、シアノ基、リン酸若しくはそのエステル、スルホニル基、チオール、チオエーテル基、アリール基、又はヘテロ環を表す。また R_1 、 R_3 は一つであっても、複数であってもよい。

[請求項2] 下記一般式に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

[化2]

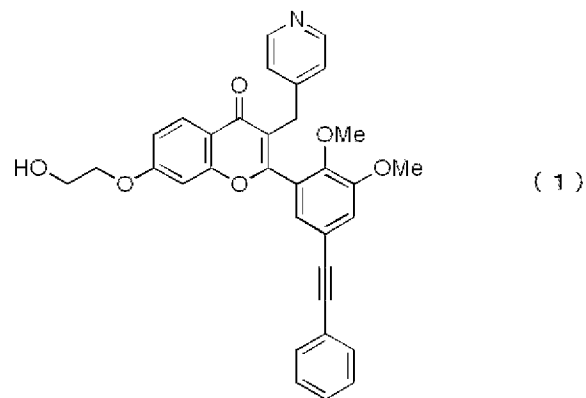


上記式中 R_1 、は水素、ハロゲン、又は、置換基を有してよいアル

キル基若しくはアルコキシ基を表し、 R'_2 は水素、ハロゲン、又は、置換基を有してよいアルキル基素若しくはアルコキシ基を表し、 R'_3 は水素、ハロゲン、又は、置換基を有してよいアルキル基素若しくはアルコキシ基を表し、 R_4 は置換基を有してよいヘテロ環を表す。 R_1 は一つであっても、複数であってもよい。

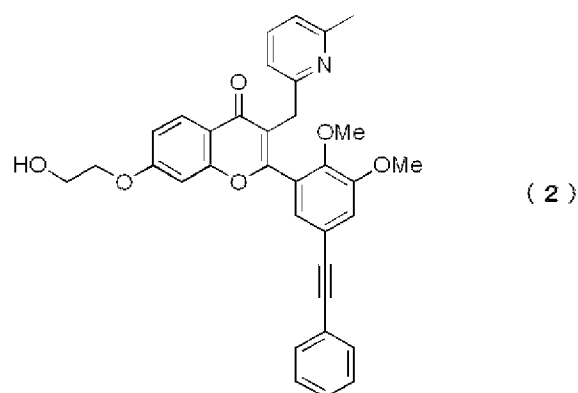
[請求項3] 下記式（１）に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

[化3]



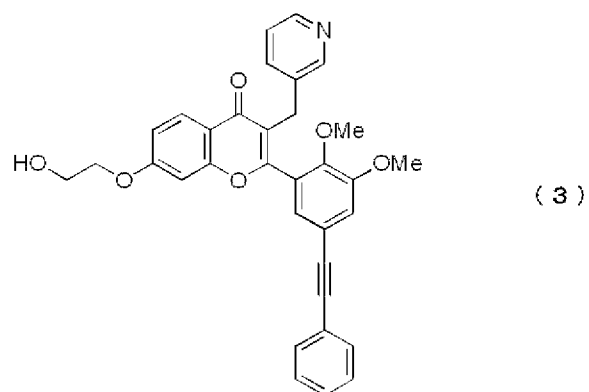
[請求項4] 下記式（２）に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

[化4]



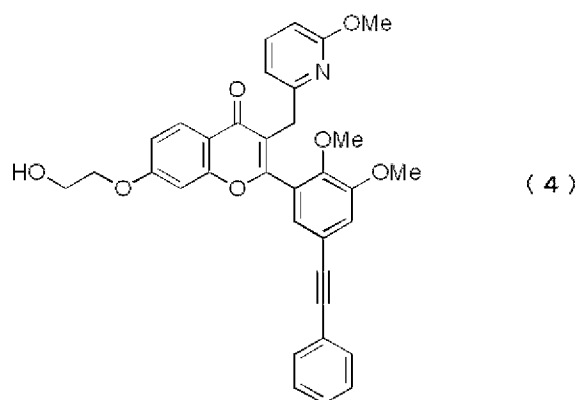
[請求項5] 下記式（３）に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

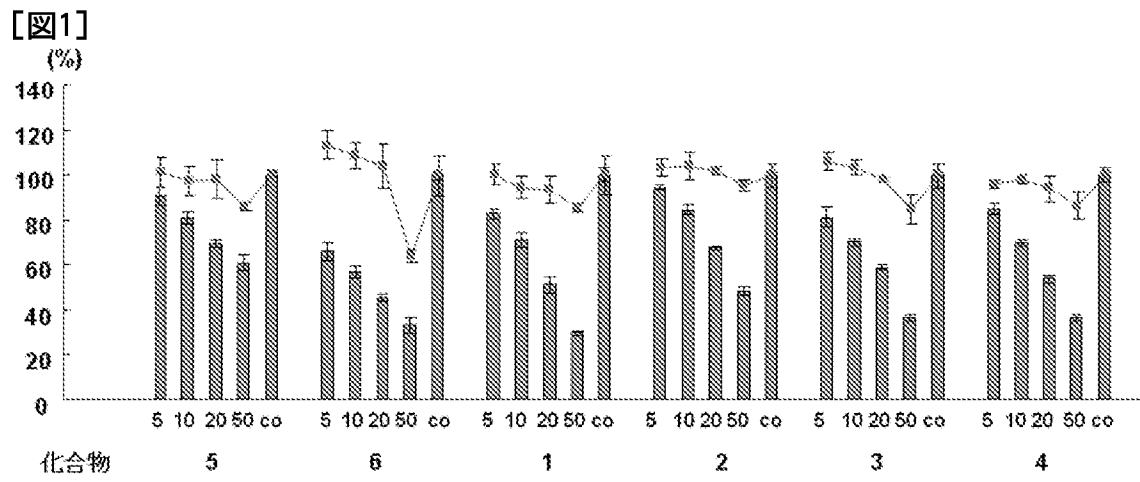
[化5]



[請求項6] 下記式（４）に示される化合物又はその誘導体を含むH e s 1 プロモーター阻害剤。

[化6]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/4433(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C07D405/06(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/4433, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, C07D405/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Midori ARAI, "Tennenbutsu-yo Kagobutsu o Jiku to shita Shinkei Kansaibo, Gan Saibo eno Approach", Abstracts of 130th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan (1), 05 March 2010 (05.03.2010), page 56, cited in the specification of the present application as "non-patent document 2", entire text	1-6
A	ARAI, M. A., et al., "Efficient Synthesis of Chromone and Flavonoid Derivatives with Diverse Heterocyclic Units", CHEMISTRY. ASIAN JOURNAL, 2008, vol.3, pp.2056-2064, entire text	1-6
A	ARAI, M. A., et al., "The first Hes1 dimer inhibitors from natural products", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 2009, vol.19, pp.5778-5781, entire text	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 September, 2011 (06.09.11)

Date of mailing of the international search report
20 September, 2011 (20.09.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/066866

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-057306 A (National University Corporation Chiba University), 19 March 2009 (19.03.2009), (Family: none)	1-6
A	KATAKURA, M., et al., "Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells", NEUROSCIENCE, 2009, vol.160, pp.651-660, cited in the specification of the present application as "non-patent document 1", entire text	1-6
P,A	ARAI, M. A., et al., "Approaches to Neural Stem Cells and Cancer Cells Based on Natural Products", CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 2011.04, vol.59, no.4, pp.417-426, entire text	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/4433(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D405/06(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/4433, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, C07D405/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	荒井緑, "天然物様化合物を軸とした神経幹細胞、癌細胞へのアプローチ", 日本薬学会第130年会要旨集1, 2010.03.05, p.56, 本願明細書で「非特許文献2」として引用, 文献全体	1~6
A	ARAI, M. A., et al., "Efficient Synthesis of Chromone and Flavonoid Derivatives with Diverse Heterocyclic Units", CHEMISTRY. ASIAN JOURNAL, 2008, vol.3, pp.2056-2064, 文献全体	1~6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 0 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

井上 典之

4 P

9 3 6 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	ARAI, M. A., et al., "The first Hes1 dimer inhibitors from natural products", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 2009, vol.19, pp.5778-5781, 文献全体	1～6
A	JP 2009-057306 A (国立大学法人 千葉大学) 2009.03.19, (ファミリーなし), 文献全体	1～6
A	KATAKURA, M., et al., "Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells", NEUROSCIENCE, 2009, vol.160, pp.651-660, 本願明細書で「非特許文献1」として引用, 文献全体	1～6
P, A	ARAI, M. A., et al., "Approaches to Neural Stem Cells and Cancer Cells Based on Natural Products", CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 2011.04, vol.59, no.4, pp.417-426, 文献全体	1～6