

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-507116

(P2019-507116A)

(43) 公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 C 39/17 (2006.01)	C 0 7 C 39/17	4 C 2 0 6
C 0 7 C 39/15 (2006.01)	C 0 7 C 39/15	4 H 0 0 6
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	
A 6 1 K 31/122 (2006.01)	A 6 1 K 31/122	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-536179 (P2018-536179)	(71) 出願人	500033634
(86) (22) 出願日	平成29年1月6日 (2017.1.6)		ザ・ボード・オブ・トラステーズ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・イリノイ
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月3日 (2018.9.3)		THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/012586		アメリカ合衆国60612イリノイ州シカゴ、ウエスト・ポルク・ストリート1853番、スウィート446
(87) 国際公開番号	W02017/120507		
(87) 国際公開日	平成29年7月13日 (2017.7.13)		
(31) 優先権主張番号	62/275, 416	(71) 出願人	518239710
(32) 優先日	平成28年1月6日 (2016.1.6)		ザ ユニヴァーシティ オブ テキサス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		サウスウェスタン メディカル センター
			アメリカ合衆国 テキサス州 75235
			ダラス ハリー ハイムズ プールバード 5323

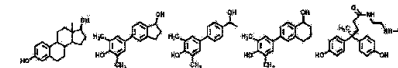
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロゲン受容体を活性化する新規化合物ならびにその組成物および使用方法

(57) 【要約】

本明細書中に示される式の化合物を提供する。上記化合物には、組織選択的活性を有する経路優先エストロゲン誘導体(PaPE)が含まれ得る。また、上記化合物を含む医薬組成物だけでなく、上記化合物を投与することを含む疾患または状態を治療する方法も提供する。上記疾患または状態には、閉経後症状、心血管疾患、脳卒中、血管疾患、骨疾患、代謝性疾患、関節炎、骨粗鬆症、肥満、血管運動性症状/のぼせ、認知低下、乳癌を含む癌が含まれ得る。

【選択図】図1



Property	E2	PaPE-1	PaPE-2	PaPE-3	PaPE-4
Molecular Formula	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₁₇ H ₁₈ O ₂	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₄
MW	272.4	264.3	242.1	268.4	370.5
cLogP	3.78	3.64	3.53	4.20	1.54
Volume	268 Å ³	244 Å ³	238 Å ³	281 Å ³	351 Å ³
Polar Surface Area	40.5 Å ²	40.5 Å ²	40.5 Å ²	40.5 Å ²	98.7 Å ²
ERα K _i [RBA]	0.2 nM [100]	10 μM [0.002]	10 μM [0.002]	10 μM [0.002]	20 μM [0.001]
ERβ K _i [RBA]	0.5 nM [100]	25 μM [0.002]	13 μM [0.004]	17 μM [0.003]	17 μM [0.003]

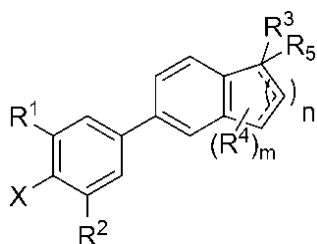
FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(i)の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩：

【化 1】



(i)

10

(式中、

nは、0～4の整数であり；

mは、0～4の整数であり；

Xは、H、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルコキシであり；

R₁およびR₂は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、-S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；

R₃は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；

20

R₄は、各々独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；

R₅は、H、C₁₋₄アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；

---は、二重結合であってもよい。

【請求項 2】

C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシが、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよびC₁₋₄アルコキシの1つ以上で置換されている、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

R₃がヒドロキシルである、請求項 1 または 2 記載の化合物。

【請求項 4】

R₁およびR₂の少なくとも1つがC₁₋₄アルキルである、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の化合物。

30

【請求項 5】

R₁およびR₂の両方がC₁₋₄アルキルである、請求項 4 記載の化合物。

【請求項 6】

R₁およびR₂の少なくとも一方がメチルである、請求項 4 記載の化合物。

【請求項 7】

R₁およびR₂の両方がメチルである、請求項 6 記載の化合物。

【請求項 8】

C₁₋₄アルキルが置換されている、請求項 1～7 のいずれか 1 項記載の化合物。

40

【請求項 9】

置換基がヒドロキシである、請求項 8 記載の化合物。

【請求項 10】

R₁およびR₂が、独立して、H、メチル、エチル、クロロ、-CH₂OHおよび-CH₂OMeから選択される、請求項 1～9 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 11】

R₃が、H、OH、オキソ、クロロ、シアノまたはメトキシから選択される、請求項 1～10 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 12】

R₄が、フルオロ、クロロ、ブロモ、メトキシ、ヒドロキシまたはオキソから選択される

50

、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 13】

R_5 が H である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 14】

R_5 が -CCH である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 15】

m が 0 である、請求項 1 ~ 11、13 または 14 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 16】

n が 1 である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項記載の化合物。

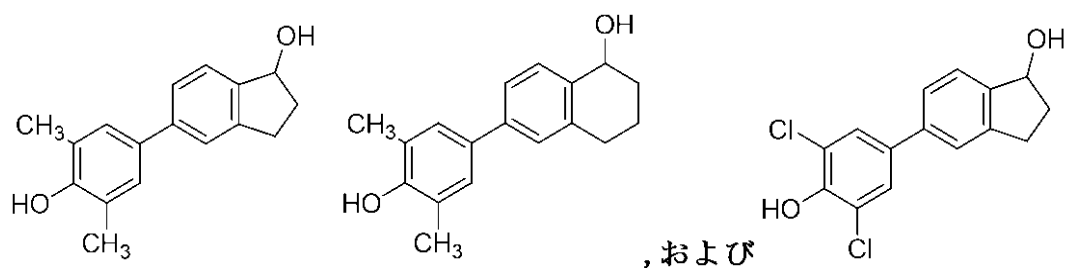
【請求項 17】

n が 2 である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 18】

下記からなる群から選択される、請求項 1、3 ~ 7、10、11、13、15 ~ 17 のいずれか 1 項記載の化合物：

【化 2】



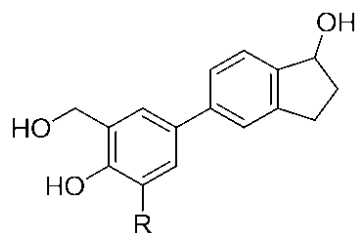
10

20

【請求項 19】

式(ii)の請求項 1 記載の化合物ならびにその立体異性体および塩

【化 3】



(ii)

30

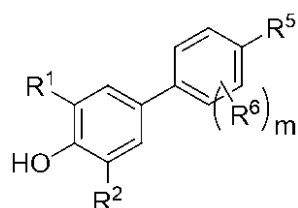
(式中、

R は、H またはメチルである)。

【請求項 20】

式(iii)に従う化合物ならびにその立体異性体および塩

【化 4】



(iii)

40

(式中、

m は、0 ~ 3 の整数であり；

R_1 および R_2 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、 $-S-C_{1-4}$ アルキルまたはハロであり；

50

R₅ は、H、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルキルであり；

R₆ は、各々独立して、H、ヒドロキシ、ハロまたはC₁₋₄アルキルである)。

【請求項 2 1】

C₁₋₄アルキルが、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよびC₁₋₄アルコキシの1つ以上で置換されている、請求項 2 0 記載の化合物。

【請求項 2 2】

R₁およびR₂の少なくとも一方がC₁₋₄アルキルである、請求項20または21記載の化合物。

【請求項 2 3】

R₁およびR₂の両方がC₁₋₄アルキルである、請求項 2 2 記載の化合物。

【請求項 2 4】

R₁およびR₂の少なくとも一方がメチルである、請求項 2 2 記載の化合物。

【請求項 2 5】

R₁およびR₂の両方がメチルである、請求項 2 2 記載の化合物。

【請求項 2 6】

C₁₋₄アルキルが置換されている、請求項 2 0 ~ 2 5 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 2 7】

置換基がヒドロキシである、請求項 2 6 記載の化合物。

【請求項 2 8】

R₅がヒドロキシである、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 2 9】

R₅がC₁₋₄アルキルである、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 3 0】

R₅が置換されたC₁₋₄アルキルである、請求項 2 9 記載の化合物。

【請求項 3 1】

R₅が-CH(OH)(CH₃)である、請求項30記載の化合物。

【請求項 3 2】

R₆がC₁₋₄アルキルである、請求項 2 0 ~ 3 1 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 3 3】

R₆が置換されたC₁₋₄アルキルである、請求項32記載の化合物。

【請求項 3 4】

R₆が-CH₂OHである、請求項33記載の化合物。

【請求項 3 5】

mが1である、請求項 1 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 3 6】

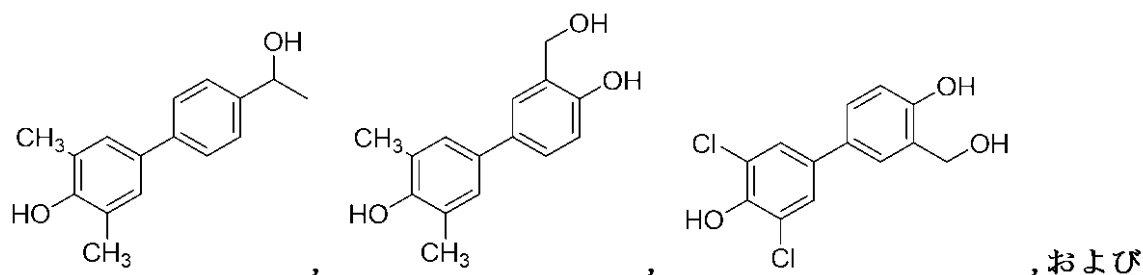
下記からなる群から選択される請求項 2 0 ~ 3 5 のいずれか 1 項記載の化合物：

10

20

30

【化 5】

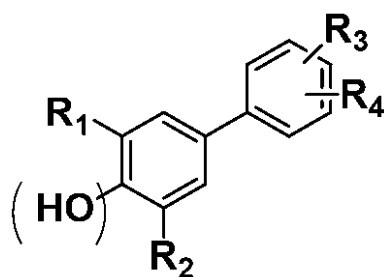


10

【請求項 3 7】

式(iv)を有する化合物：

【化 6】



(iv)

20

(式中、

R_1 および R_2 は、H、 C_{1-4} アルキル基、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アルキルオキシアルキル、シクロアルキルオキシアルキル、アルキルチオ、アルキルチオアルキル、シクロアルキルチオアルキル、 $R'R''N$ -アルキル(R' および R'' は独立してアルキル、アルキルカルボニルまたは環状アルキルである)から選択され、括弧は、ヒドロキシルの有無を表し、

30

R_3 および R_4 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ- C_{1-4} アルキル、シアノ、シアノアルキル、ニトロ、ニトロアルキル、 $-C(O)-$ アリール、 $-C(O)H$ 、アルキルアルデヒド、カルボキシルおよびカルボキシアルキルから選択されるか、または

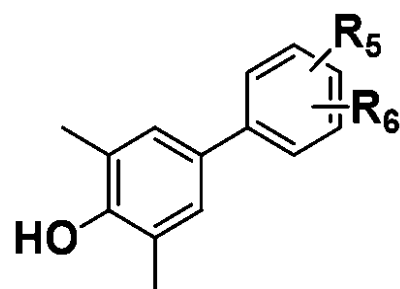
R_3 および R_4 は、4~8員原子の環を形成し、前記環はシアノまたはヒドロキシで置換されている)。

【請求項 3 8】

式(v)の請求項 3 7 記載の化合物：

40

【化 7】



50

(v)

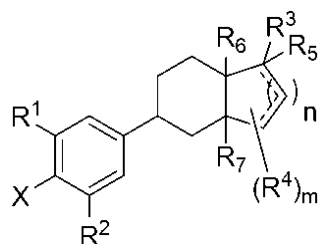
(式中、

R_5 および R_6 は、独立して、ヒドロキシル、シアノ、ヒドロキシアルキル、シアノアルキル、ハロゲン化ヒドロキシアルキルおよびハロゲン化シアノアルキルである)。

【請求項 39】

式(vi)に従う化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩；

【化 8】



10

(vi)

(式中、

n は、0～4の整数であり；

m は、0～4の整数であり；

X は、H、ヒドロキシまたは C_{1-4} アルコキシであり；

R_1 および R_2 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、 $-S-C_{1-4}$ アルキルまたはハロであり；

20

R_3 は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシであり；

各 R_4 は、独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシであり；

R_5 は、H、アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；

R_6 および R_7 は、独立して、 C_{1-4} アルキルおよびHから選択され；

---は、二重結合であってよい)。

【請求項 40】

C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシが、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよび C_{1-4} アルコキシの1つ以上で置換されている、請求項 39 記載の化合物。

30

【請求項 41】

R_3 がヒドロキシルである、請求項 39 または 40 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 42】

R_1 および R_2 の少なくとも一方が C_{1-4} アルキルである、請求項 39～41 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 43】

R_1 および R_2 の両方が C_{1-4} アルキルである、請求項 42 記載の化合物。

【請求項 44】

R_1 および R_2 の少なくとも一方がメチルである、請求項 42 記載の化合物。

40

【請求項 45】

R_1 および R_2 の両方がメチルである、請求項 44 記載の化合物。

【請求項 46】

C_{1-4} アルキルが置換されている、請求項 39～45 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 47】

置換基がヒドロキシである、請求項 46 記載の化合物。

【請求項 48】

R_1 および R_2 が、独立して、H、メチル、エチル、クロロ、 $-CH_2OH$ および $-CH_2OMe$ から選択される、請求項 39～47 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 49】

50

R_3 が、H、OH、オキソ、クロロ、シアノまたはメトキシから選択される、請求項39～48のいずれか1項記載の化合物。

【請求項50】

R_4 が、フルオロ、クロロ、ブロモ、メトキシ、ヒドロキシまたはオキソから選択される、請求項39～49のいずれか1項記載の化合物。

【請求項51】

R_5 がHである、請求項39～50のいずれか1項記載の化合物。

【請求項52】

R_5 が-CCHである、請求項39～50のいずれか1項記載の化合物。

【請求項53】

m が0である、請求項39～49、51または52のいずれか1項記載の化合物。

【請求項54】

n が1である、請求項39～53のいずれか1項記載の化合物。

【請求項55】

n が2である、請求項39～54のいずれか1項記載の化合物。

【請求項56】

R_6 がメチルである、請求項39～55のいずれか1項記載の化合物。

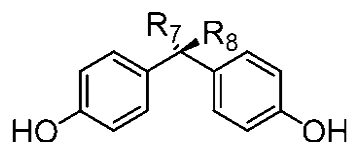
【請求項57】

R_7 がHである、請求項39～56のいずれか1項記載の化合物。

【請求項58】

式(vii)に従う化合物ならびにその立体異性体および塩；

【化9】



(vii)

(式中、

R_7 および R_8 は、独立して、H、 C_{1-5} アルキル、アミノ、ヒドロキシル、シアノ、アミド、環状 C_{3-8} アルキルまたはヘテロシクリルである)。

【請求項59】

R_7 および R_8 が、 C_{1-4} アルキルアミノカルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルアミノ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルアミノ- C_{1-4} アルキル-アミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルオキシ- C_{1-4} アルキルアミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルチオ- C_{1-4} アルキルアミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルキルチオ- C_{1-4} アルキルから選択される、請求項58記載の化合物。

【請求項60】

R_7 がメチルである、請求項58または59記載の化合物。

【請求項61】

R_8 が、置換された C_{1-4} アルキルである、請求項58～60のいずれか1項記載の化合物

【請求項62】

R_8 が、-C(O)-R、-C(O)NR_{N1}R_{N2}、-C(O)OR、-NR_{N1}C(O)Rまたは-OC(O)R(ここで、R_{N1}、R_{N2}およびRは、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキルから選択される)で置換されている、請求項61記載の化合物。

【請求項63】

R_{N1}、R_{N2}またはRの少なくとも1つが、-(CH₂)_n-R₁₀(ここで、nは2～5の整数であり、R₁₀が-C(O)-R、-C(O)NR_{N1}R_{N2}、-C(O)OR、-NR_{N1}C(O)Rまたは-OC(O)Rであり、R_{N1}、R_{N2}およびRは、独立して、H、アリール、シクロアルキル、またはOHまたはアミノで置換されているもよい C_{1-4} アルキルから選択される)である、請求項62記載の化合物。

10

20

30

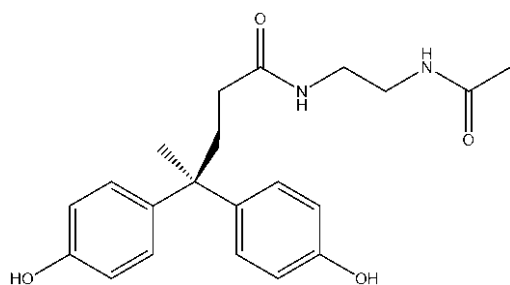
40

50

【請求項 6 4】

下記の化合物である、請求項 5 8 ～ 6 3 のいずれか 1 項記載の化合物

【化 1 0】

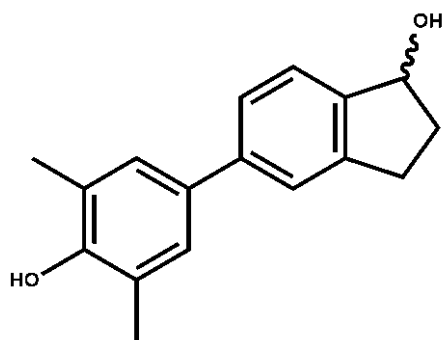


10

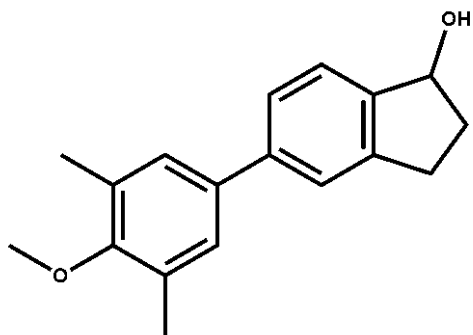
【請求項 6 5】

下記からなる群から選択される化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩

【化 1 1】

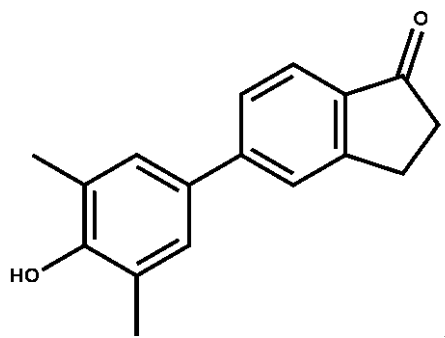


,

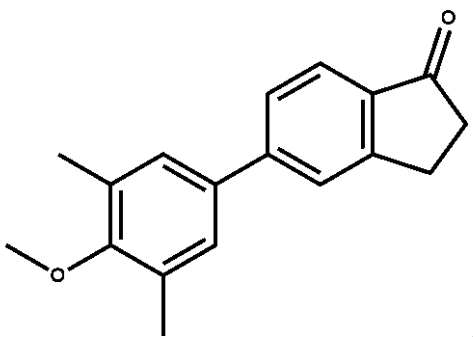


,

10

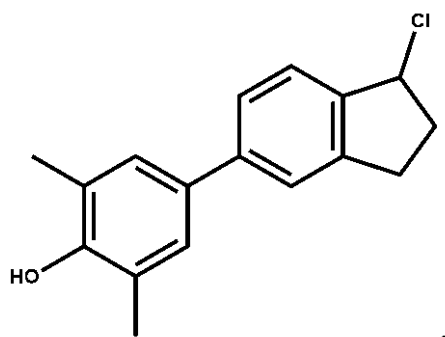


,

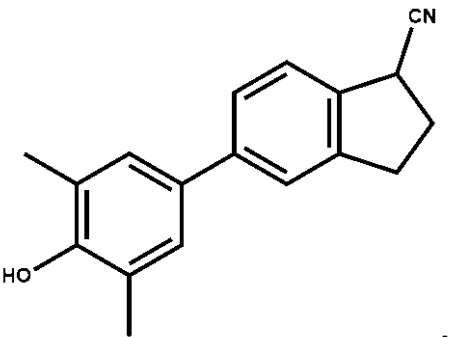


,

20

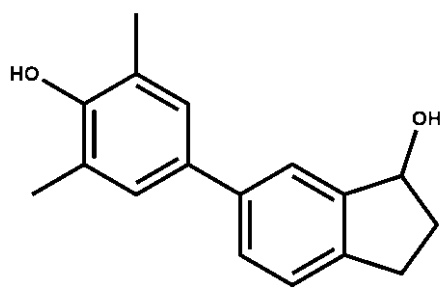


,

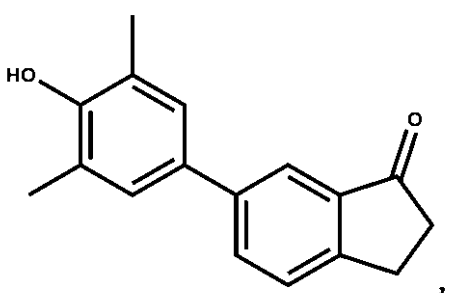


,

30

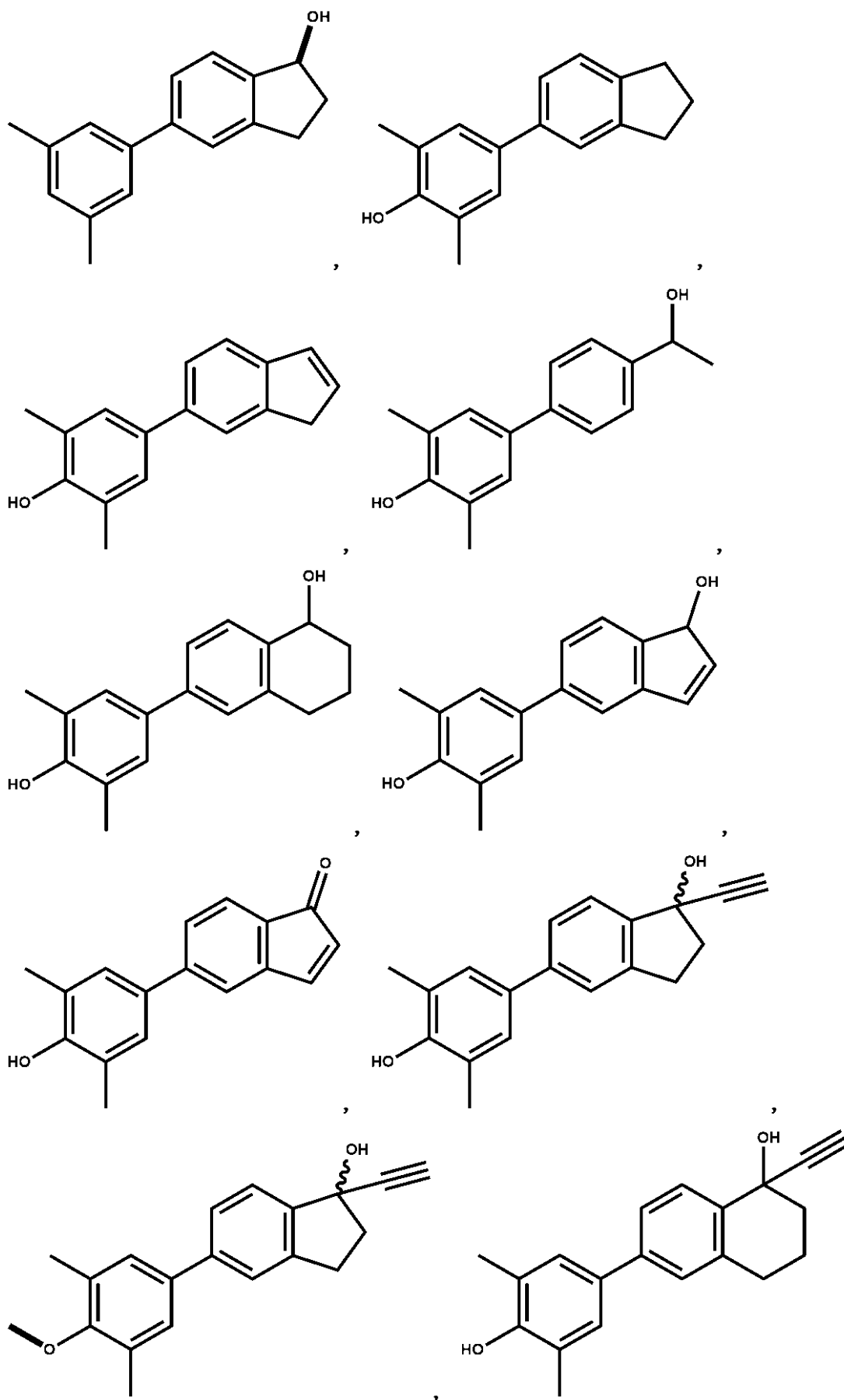


,

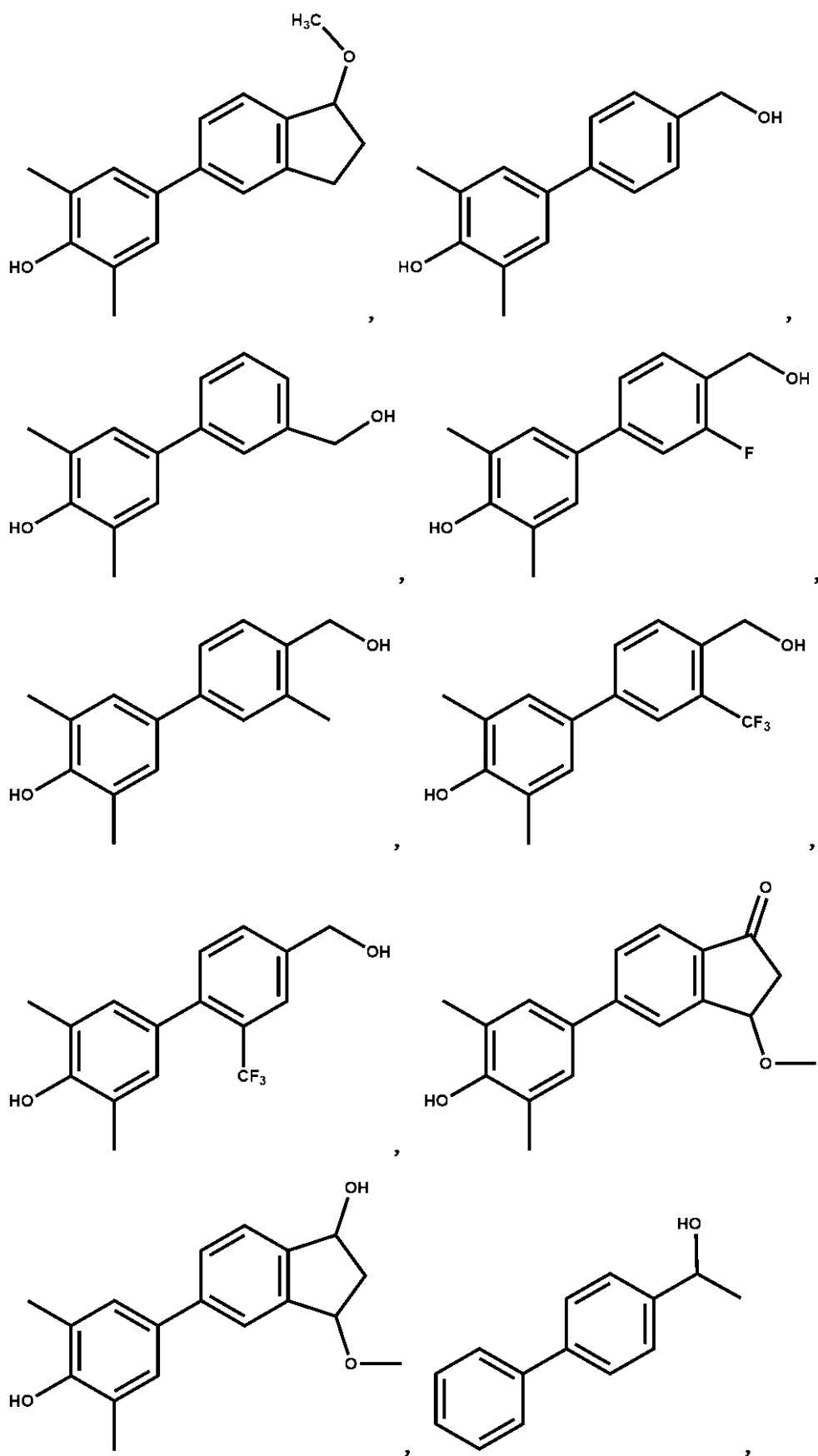


,

【化 1 2】



【化 1 3】



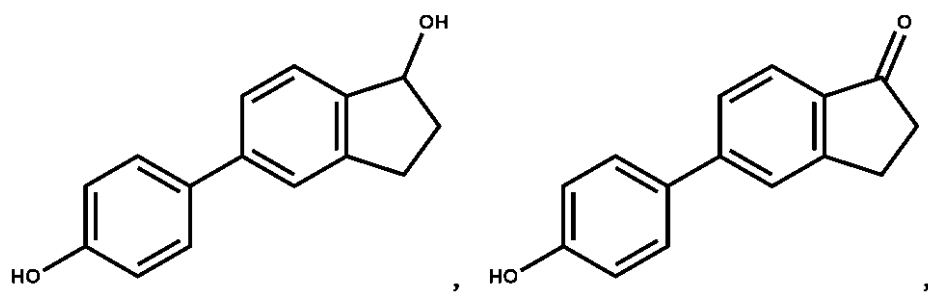
10

20

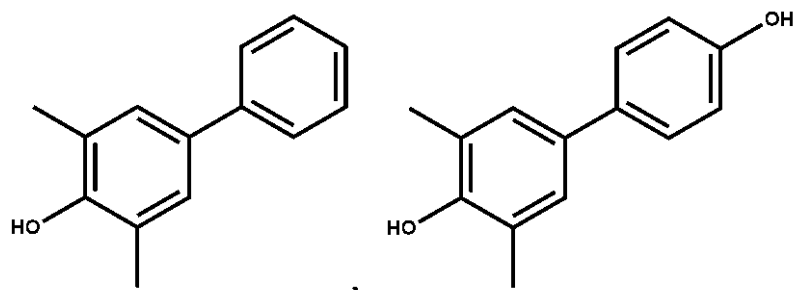
30

40

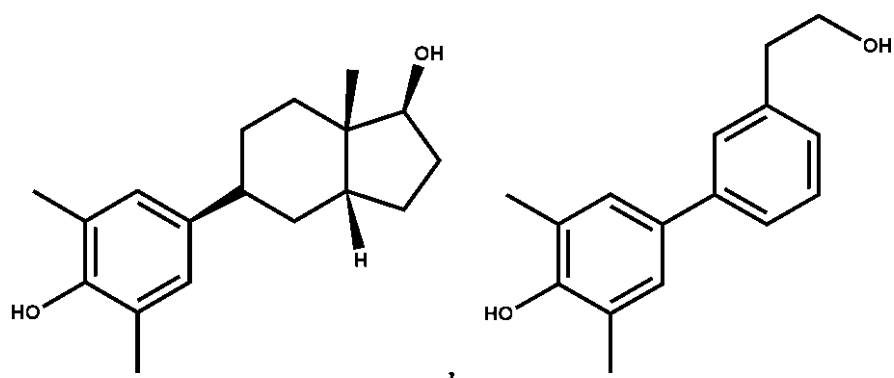
【化 1 4】



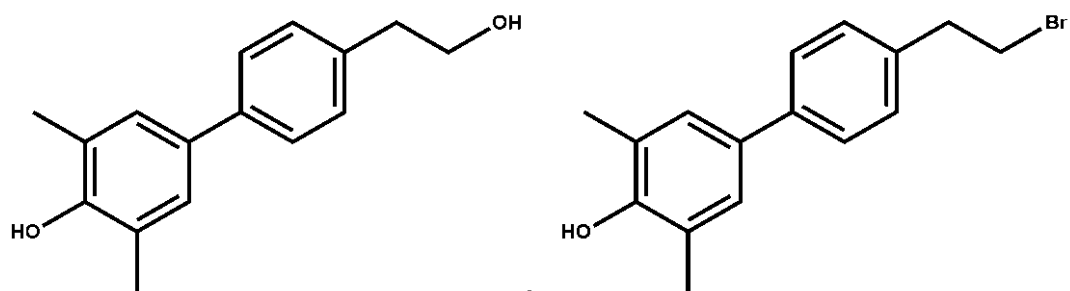
10



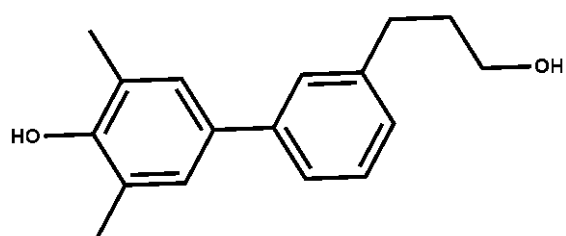
20



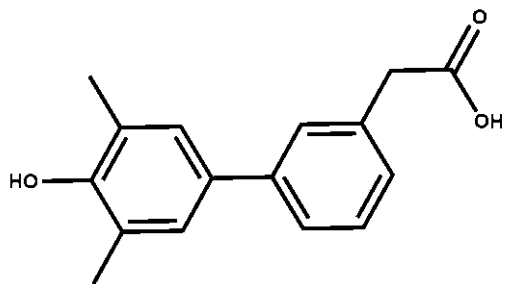
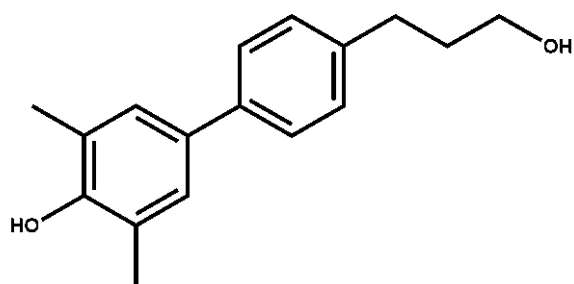
30



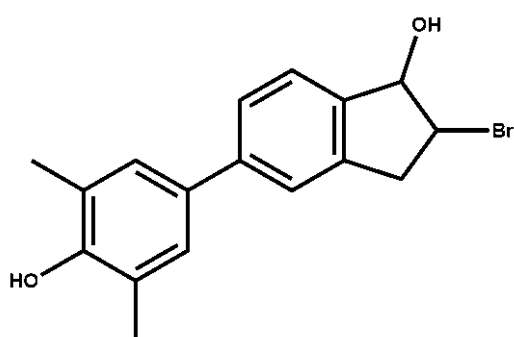
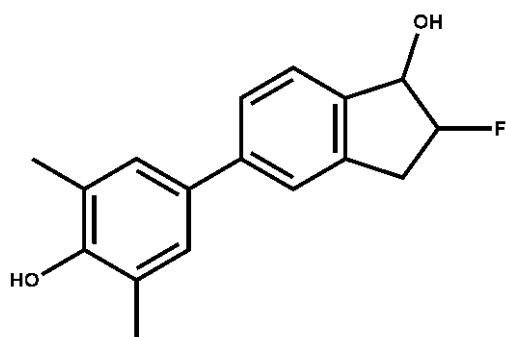
40



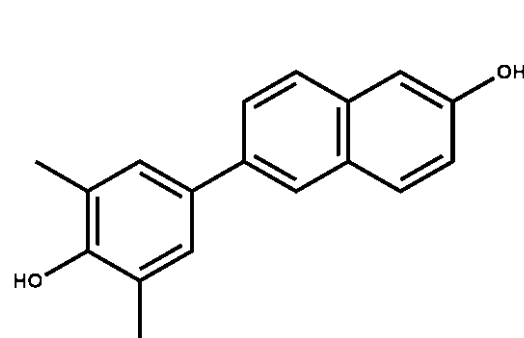
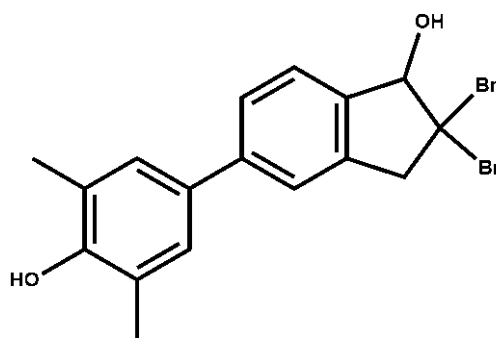
【化 1 5】



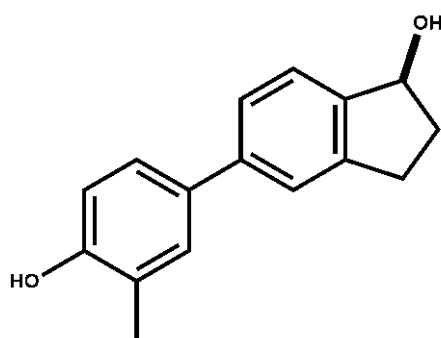
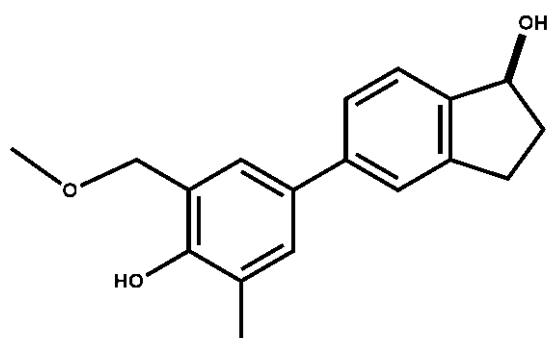
10



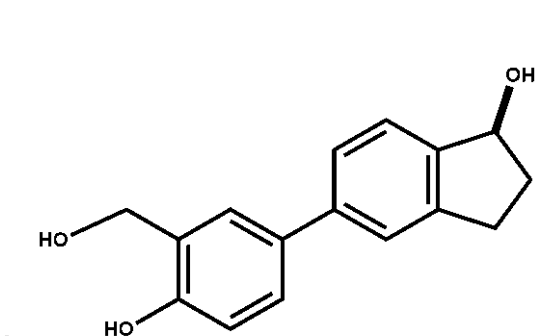
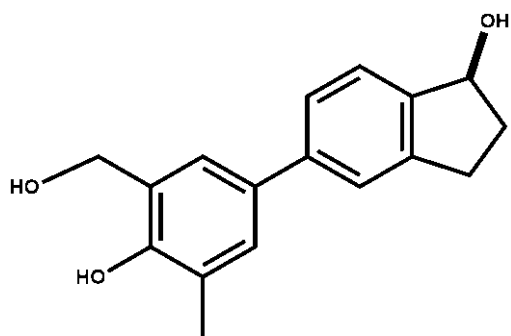
20



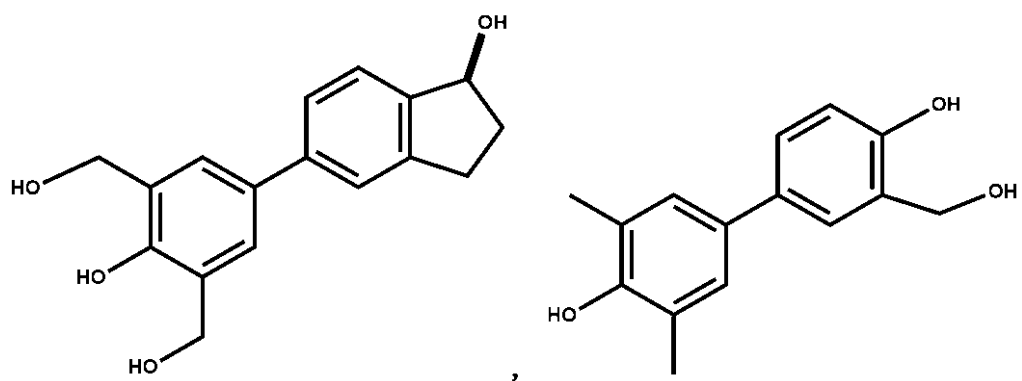
30



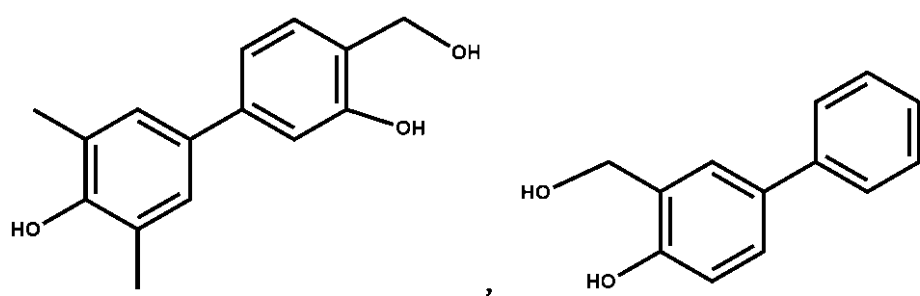
40



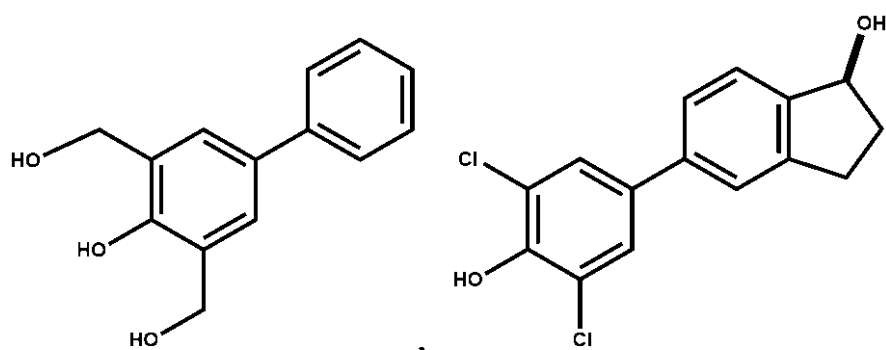
【化 1 6】



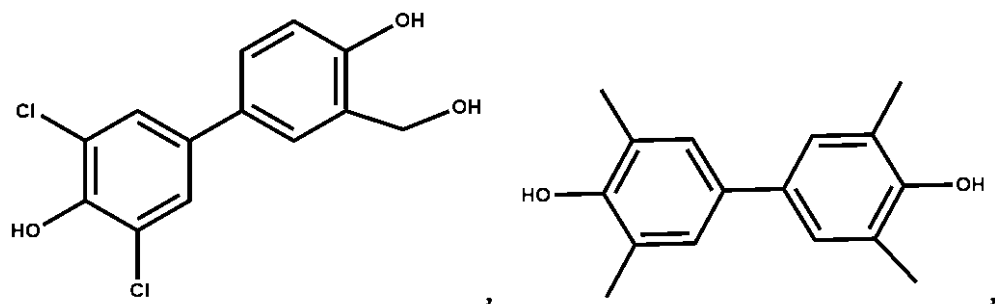
10



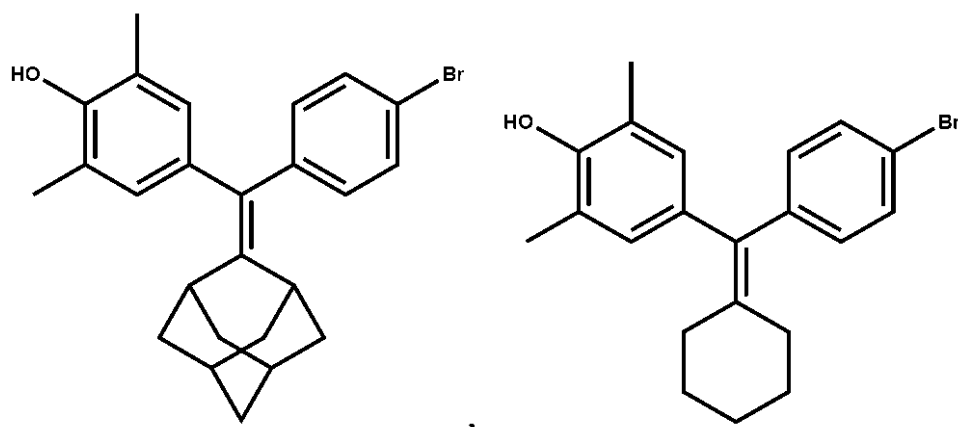
20



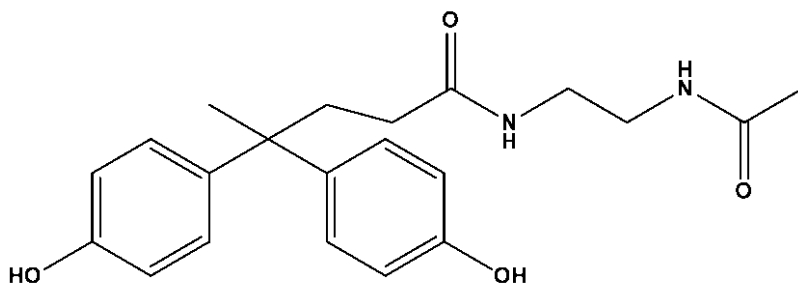
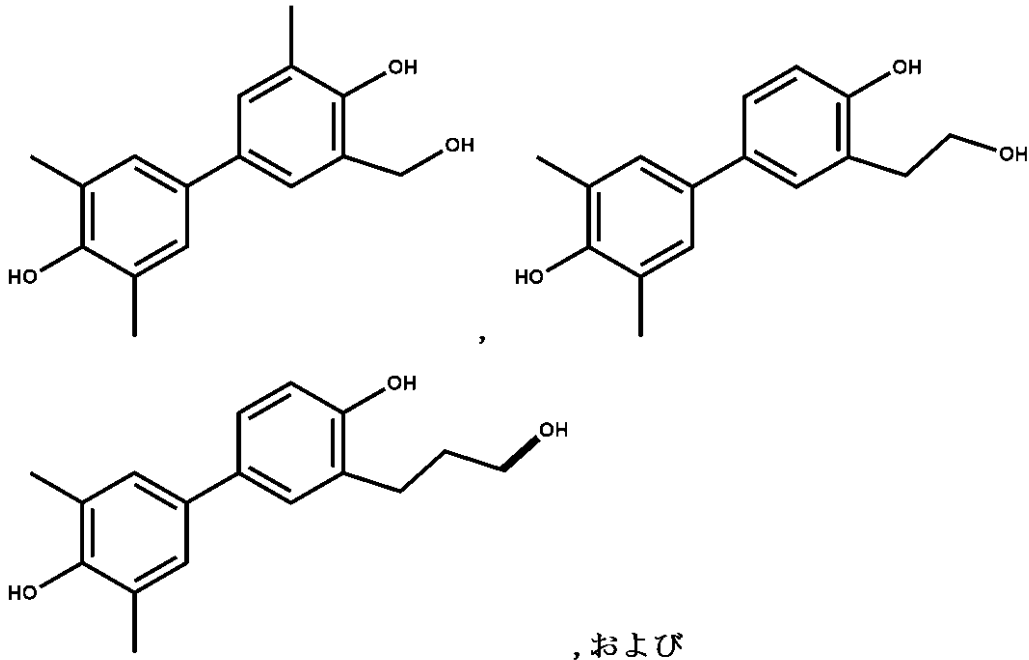
30



40



【化 1 7】

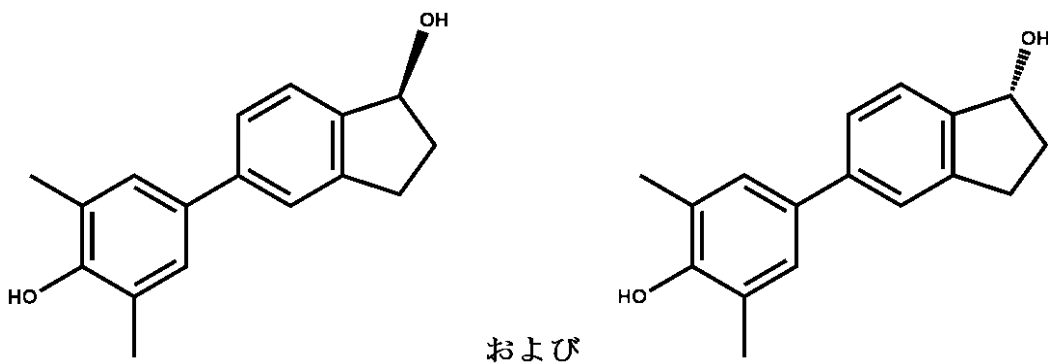


【請求項 6 6】

下記からなる群から選択される、請求項 6 5 記載の化合物およびその医薬的に許容される塩：

30

【化 1 8】



【請求項 6 7】

請求項 1 ~ 6 6 のいずれか 1 項記載の化合物および医薬的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 6 8】

対象における疾患または状態を治療する方法であって、請求項 1 ~ 6 7 のいずれか 1 項記載の化合物または組成物の治療的有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 6 9】

疾患または状態が、エストロゲン受容体の核外開始経路によって影響されている、請求項 6 8 記載の方法。

50

【請求項 70】

疾患または状態が、閉経後症状、心血管疾患、脳卒中、血管疾患、骨疾患、代謝性疾患、関節炎、骨粗鬆症、肥満、血管運動性症状/のぼせ、認知低下、および癌から選択される、請求項 68 または 69 記載の方法。

【請求項 71】

疾患が脳卒中である、請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 72】

疾患が代謝性疾患である、請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 73】

癌が乳癌である、請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 74】

疾患が肥満関連乳癌である、請求項 73 記載の方法。

【請求項 75】

疾患がエストロゲン応答性乳癌である、請求項 73 記載の方法。

【請求項 76】

疾患が血管疾患である、請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 77】

疾患が骨粗鬆症である、請求項 68 ~ 70 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 78】

対象がヒトである、請求項 68 ~ 77 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 79】

請求項 1 ~ 67 のいずれか 1 項記載の化合物または組成物および使用説明書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、その全内容が本明細書に援用されている、2016年1月6日に出願された米国仮出願第62/275,416号に対する優先権を主張する。

【0002】

30

連邦支援の研究または開発に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって授与されたAT006288、DK015556、およびHL087564、および米国農務省によって授与されたILLU-698-909による政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

背景

エストロゲンは多くの必須の生理学的過程を調節し、生殖系の内外の多くの成人標的組織の機能維持に必要である。しかしながら、エストロゲンは乳癌や子宮癌を促進する上で有害な行動を起こす可能性がある。多様な標的組織における望ましい活性と望ましくない活性とのこのバランスは、骨の健康、血管運動の症状からの寛解、および乳房または子宮の刺激なしに代謝と血管の保護を与えるような更年期ホルモン置換の最小限のリスクによる正味の利益を提供する組織選択的エストロゲンの開発にとって興味深い機会を与える。

40

2つの異なるシグナル伝達経路を利用することによって、エストロゲンがエストロゲン受容体(ER)を介して作用することが現在認識されており、2つの異なるシグナル伝達経路は、ERがクロマチン結合リガンド調節転写因子として機能する直接核開始(「ゲノム」性)経路と核外からのER作用によって開始されるキナーゼカスケードを含む核外開始(「非ゲノム」性)経路である。核外ER作用によるエストロゲンの作用による特異的キナーゼの活性化は、一般に迅速かつしばしば一時的であり、その開始は、ER-ホルモン複合体によるトリガーシグナルの入力のみを必要とし、核外開始ERシグナル伝達経路を介してキナーゼ

50

カスケードと細胞活性を開始させるようである。対照的に、直接核ERシグナル伝達経路を介した遺伝子の活性化は、熱ショックタンパク質の解離、コレギュレータータンパク質の動員、クロマチンへのER結合の刺激、クロマチン構造の改変およびヒストンを修飾し、RNA pol IIを活性化して遺伝子転写を開始するのに充分である、ERホルモン複合体のより持続性の作用を必要とするようである。強力な核ER活性を有するERリガンドはより動力学的に安定な受容体-補因子複合体を形成し、活性化補助因子結合はリガンドの解離速度を数桁遅らせることがある(Gee, Mol Endocrinol 13, 1912-1923, 1999)。したがって、核内より核外ERシグナル伝達に優先的なERリガンドは、特定のエストロゲンの構造を、それらの本質的な化学的特徴、フェノールおよびしばしば第二級アルコール、ならびにそれらの全体的な組成および形状を維持するように再設計することによって得られるであろうが、それらの高親和性ER結合をかなり減少させることになることが可能であると思われる。

10

好都合な薬理学的プロファイルを有するエストロゲンは、骨の健康、血管運動症状の軽減、および代謝および血管の保護のような更年期女性の望ましい活性を支持するが、乳房および子宮に対する刺激活性は欠如している。

【発明の概要】

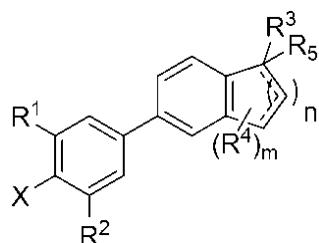
【0004】

概要

一態様において、本開示は、式(i)の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化1】

20



(i)

(式中、

nは、0～4の整数であり；

mは、0～4の整数であり；

Xは、H、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルコキシであり；

R₁およびR₂は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、-S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；

R₃は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；

R₄は、各々独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；

R₅は、H、C₁₋₄アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；

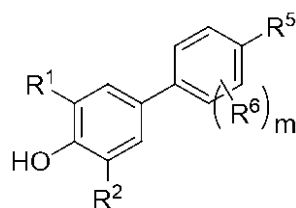
---は、二重結合であってもよい)。

40

【0005】

別の態様において、本開示は、式(iii)に従う化合物ならびにその立体異性体および塩を提供する：

【化2】



50

(iii)

(式中、

mは、0～3の整数であり；

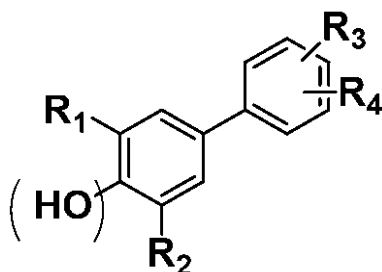
R₁およびR₂は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、-S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；R₅は、H、ヒドロキシ、またはC₁₋₄アルキルであり；R₆は、各々独立して、H、ヒドロキシ、ハロまたはC₁₋₄アルキルである)。

【0006】

別の態様において、本開示は、式(iv)を有する化合物を提供する：

【化3】

10



(iv)

(式中、

20

R₁およびR₂は、H、C₁₋₄アルキル基、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アルキルオキシアルキル、シクロアルキルオキシアルキル、アルキルチオ、アルキルチオアルキル、シクロアルキルチオアルキル、R'R''N-アルキル(R'およびR''は、独立して、アルキル、アルキルカルボニルまたは環状アルキルである)から選択され、括弧はヒドロキシルの有無を表し；

R₃およびR₄は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、ヒドロキシ-C₁₋₄アルキル、シアノ、シアノアルキル、ニトロ、ニトロアルキル、-C(O)-アリール、-C(O)H、アルキルアルデヒド、カルボキシルおよびカルボキシアルキルから選択されるか；または

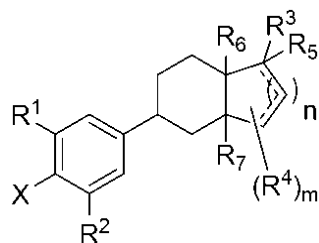
R₃およびR₄は、4～8員原子の環を形成する(上記環はシアノまたはヒドロキシで置換されている)。

30

【0007】

別の態様において、本開示は、式(vi)に従う化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化4】



(vi)

(式中、

nは、0～4の整数であり；

mは、0～4の整数であり；

Xは、H、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルコキシであり；R₁およびR₂は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、-S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；R₃は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；

50

R_4 は、各々独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシであり；

R_5 は、H、アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；

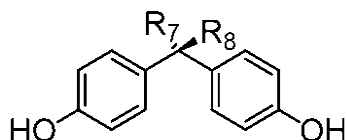
R_6 および R_7 は、独立して、 C_{1-4} アルキルおよびHから選択され；

---は、二重結合であってもよい)。

【0008】

別の態様において、本開示は、式(vii)に従う化合物ならびにその立体異性体および塩を提供する：

【化5】



(vii)

10

(式中、

R_7 および R_8 は、独立して、H、 C_{1-5} アルキル、アミノ、ヒドロキシル、シアノ、アミド、環状 C_{3-8} アルキルまたはヘテロシクリルである)。

【0009】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載の化合物および医薬的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

20

別の態様において、本開示は、本明細書に記載の化合物および組成物を使用する方法を提供する。

上述のもの以外の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明を考慮すると、より容易に明らかになるであろう。そのような詳細な説明は、以下の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】E2および4つのPaPEの構造ならびに分子特性および結合特性。MWは分子量であり、cLogPは計算されたオクタノール-水分配係数の \log_{10} であり、体積は分子体積であり、極性表面積は化合物の極性の尺度であり、すべてChemBioDraw Ultra(ver.13.0.0.3015)を使用して得られる。相対結合親和性(RBA)値は、競合放射測定結合アッセイによって定量された(Carlson et.al. Biochemistry 36, 14897-14905, 1997)。E2は、両方のERで100に設定されている。 K_i 値は $K_i = K_d(E2の場合) \times (100/RBA)$ (E2の K_d は0.2nM(ER)および0.5nM(ER)である)として算出した。値は、変動係数が< 0.3の平均3~4回の測定値の平均である。

30

【図2】ER のリガンド結合ポケット中のPaPE-1およびE2を比較するコンピュータモデル。結晶構造(1GWR)に基づくER +E2のモデルは、銀/灰色で示されるE2およびらせん状の要素と、スレートブルーのポケット体積の輪郭を有する。PaPE-1のモデルは、E2からPaPE-1へのリガンド構造の漸進的な変換によってER +E2構造から生成され、リガンドおよびリガンド結合ドメインの漸進的最小化と組みあわされている。得られたPaPE-1リガンドと水素結合残基の位置はオレンジ色で示されている。詳細については、以下の方法を参照されたい。

40

【図3】PaPE-1およびE2による遺伝子発現、細胞増殖および経路シグナル伝達調節の比較。(A)MCF-7細胞において、PaPE-1はE2と比較して直接核開始(ゲノム性)遺伝子(PgR)より核外開始(非ゲノム性)遺伝子(LRRC54)を優先的に活性化する。細胞を対照ビヒクル(0.1%エタノール)、10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間処理し、遺伝子発現をqPCRによってモニタした。(B)MCF-7細胞を1 μ M ICI182,780(ICI)で1時間前処理し、次いでICIの存在下または非存在下で、Veh(0.1%EtOH)、10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間処理した。RNAを単離し、示された遺伝子についてqPCR解析に供した。(C)MCF-7細胞を播種し、24時間後、この細胞をsiCtrl、siER またはsiGPR30(30nM)で72時間トランスフェクションした。次いで、細胞を、Veh(0.1%EtOH)、10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間処理した。RNAを単離し、q

50

PCR解析に供した。(D)MCF-7細胞を、Veh、10nM E2または示された濃度のPaPE-1で6日間処理し、WSTアッセイによって増殖をモニタした。(E)MCF-7細胞において、PaPE-1はmTORおよびMAPKシグナル伝達を選択的に活性化した。細胞を対照ビヒクル(V)で処理するか、指示された濃度のE2またはPaPE-1で15分間(上部パネル)および45分間(下部パネル)処理し、ウェスタンブロットを行って、活性化シグナル伝達タンパク質およびER のS118リン酸化を評価した。総ER をモニタし、総ERK2をローディングコントロールとして使用した。(F)PaPE-1は、ER とRaptorとの間の相互作用を誘導する。MCF-7細胞を10nM E2または1 μ M PaPE-1で15分間処理した。細胞を架橋し、ER およびRaptor抗体と共に一晚インキュベートし、PLAを行った。信号強度の定量化は、右側のパネルに示されている。二元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

10

【図4】PaPE-1およびE2は、MCF-7細胞における共通のおよび別個の遺伝子群を調節する。(A)細胞を10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間および24時間処理した。RNAを単離し、RNA-Seqを行った。調節された遺伝子は、 $P < 0.05$ および発現倍数変化 > 2 を有するものと考えられる。(B)PaPE-1媒介遺伝子発現変化は、mTORおよびMAPK経路阻害剤に感受性である。MCF-7細胞における、E2およびPaPE-1による遺伝子調節に対するmTORおよびMAPK阻害剤の効果。細胞を1 μ M PP242または1 μ M AZD6244で1時間前処理し、次いでインヒビターの存在下または非存在下で10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間処理した。RNAを単離し、RNA-Seqを行った。 $(P < 0.05$ 、倍数変化 $> 2)$ 。(C)PaPE-1は、ER またはERK2のクロマチンへの動員を誘導せず、RNA Pol IIの動員を刺激する。MCF-7細胞を10nM E2または1 μ M PaPE-1で45分間処理した。示されたタンパク質についてChIP-Seqを実施した。E2またはPaPE-1の存在下でのシストロームのUCSCゲノムトラックが示される(右パネル)。

20

【図5】E2とは異なり、PaPE-1は子宮または胸腺質量を変化させず、乳腺管分岐を誘導しないが、E2と同様に、乳腺の脂肪細胞面積を減少させる。(A)PaPE-1は子宮または胸腺の質量に影響しない。C57BL/6マウスを卵巣摘出し、次いでE2(5 μ g/日)またはビヒクル(V、Veh)の皮下注射を毎日与えたか、4日間PaPE-1ペレット(5 μ g/日および300 μ g/日)を埋め込んだ。子宮および胸腺の質量をモニタした。(B)PaPE-1は、乳腺の伸長をごくわずかしが刺激しないが、乳腺の脂肪細胞(脂肪細胞の大きさ)を大きく減少させる。C57BL/6マウスを卵巣摘出し、次いでE2(5 μ g/日)またはPaPE-1(5 μ g/日および300 μ g/日)のペレットを3週間埋め込んだ。乳腺のホルマウント染色およびHおよびE染色が示されている。(C)乳腺脂肪細胞面積は、HおよびE画像から計算した。二元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

30

【図6】PaPE-1は、E2と同様に、卵巣摘出後の体重増加を低下させ、脂肪蓄積および血中トリグリセリドレベルを低下させる。(A)PaPE-1は、卵巣摘出後の体重を正常化するのに有効である。C57BL/6マウスを卵巣摘出し、3週間後にE2(5 μ g/日)またはPaPE-1(300 μ g/日)を含むペレットまたはVeh対照を3週間埋め込んだ($n = 8$ /群)。動物は通常の食餌で飼育した。二元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、処置をビヒクル(Veh.)と比較。(B)Aからの各マウスの摂食量を毎週モニタした。(C)Aの各マウスの体組成を、3週の終わりにEchoMRIを使用してモニタした。一元配置ANOVA、Newman-Keuls post-test、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。(D)生殖腺周囲脂肪組織(AT)のHおよびE染色。(E)3週間の対照ビヒクルまたはリガン

40

ド曝露後にモニタされた種々の脂肪デポの質量。(F)Veh、E2またはPaPE-1処置の3週間の終了時に動物の血液中のトリグリセリドを測定した($n = 6$ /群)。処置の3週間後の肝臓の(G)HおよびE染色(上部2パネル)およびオイルレッドO染色(下部パネル)。(H)3週間の肝臓におけるSREBP1cおよびFASNの遺伝子発現解析(上のパネル)($n = 12$ /群)、および2週間にわたるE2およびPaPE-1処置マウスの肝臓におけるFASNおよびACACA発現の時間経過。二元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

【図7】インビボでの組織におけるPaPE-1およびE2による遺伝子調節およびシグナル伝達経路活性化。(A)C57BL/6マウスを卵巣摘出し、3週間後にE2(5 μ g/日)、PaPE-1(300 μ g/日)を含むコレステロールペレットまたはビヒクル(Veh、コレステロール単独)を3週間埋め

50

込んだ。肝臓、骨格筋、生殖腺周囲の脂肪、膵臓および子宮を回収した。示された遺伝子についてRNAを単離し、qPCRを行った。(B)PaPE-1は、肝臓および骨格筋におけるmTORシグナル伝達を活性化する(p-S6の増加によってモニタされる)。卵巢摘出C57BL/6マウスに5 μ gのE2または300 μ gのPaPE-1を2時間注射した。示された組織を採取し、p-S6およびp-p42/44 MAPKのウェスタンブロット解析に供した。 -アクチンおよび総ERK2をローディングコントロールとして使用した。

【図8】PaPE-1は、E2と同様に、損傷後の血管内皮の修復を誘発し、これは抗エストロゲンICIによって阻止される。(A)抗エストロゲンICI 182,780(ICI)の非存在下または存在下における、PaPE-1またはE2で処置したOVXマウスの内皮層を傷付けた損傷後の頸動脈再内皮化。*、 $p < 0.05$ 対基底対照。(B)PaPE-1はこれらの実験において子宮質量に影響を与えないが、E2は子宮質量を増加させ、これはICIによって阻止される。(C)抗エストロゲンICI 182,780の存在下および非存在下でのE2およびPaPE-1によるeNOS刺激。BAECをリガンドで15分間処理し、eNOS活性をモニタした。*、 $p < 0.05$ 対対照。

【図9】MCF-7細胞、ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)細胞およびマウスにおけるPaPE-2、PaPE-3、およびPaPE-4の活性の評価。(A)核外で開始されたLRRRC54遺伝子発現対直接核PgR遺伝子発現の選択的刺激。MCF-7細胞処理は、RNA回収およびqPCR解析の前に、対照ビヒクル(Veh)、10nM E2、または1 μ Mの示されたPaPEを用いて4時間行った。(B)種々の濃度のE2またはPaPEで6日間処理した後のMCF-7細胞の増殖。(C)MCF-7細胞の15分間の処理後の種々の濃度のE2、PaPE-1またはPaPE-4による種々の細胞シグナル伝達経路活性化の刺激。ER のレベルも表示されている。(D)PaPE-2またはPaPE-3による細胞シグナル伝達経路活性化の時間経過を15,45および90分でモニタした。ER のレベルが示され、総ERK2がローディングコントロールとして使用される。(E)10nMのリガンド単独または1 μ M ICI 182,780による同時処置を伴うBAECの15分間の処置中のNOS活性の刺激。(F)PaPEおよびE2は、C57BL/6マウスの卵巢摘出後の体重増加を減少させる。動物を卵巢摘出し、3週間後に動物にE2(5 μ g/日)、PAPE(300 μ g/日)のペレット、またはビヒクルを与え、体重を次の3週間にわたってモニタした。比較のために、無傷の非卵巢摘出マウス群を含めた。二元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、すべての処置をビヒクル(Veh.)と比較する。(G)摂食量を時間とともにモニタした。(H)E2(5 μ g/日)またはPaPE-1、-2、-3および-4(300 μ g/日)のペレットの卵巢摘出C57BL/6マウスの3週間後における子宮質量増加の評価。一元配置ANOVA、Newman-Keuls post-test、* $p < 0.05$ 、* $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。(I)パネルFに示されるマウスの3週間の処置期間の終わりに、EchoMRIにより脂肪量、除脂肪体量および水分量を測定した。一元配置ANOVA、Newman-Keuls post-test、無傷およびすべての処置をビヒクル(Veh.)と比較した * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

【図10】リガンドおよびリガンド解離速度を用いたエストロゲン受容体および活性化補助因子結合および相互作用アッセイ。(A)³H-E2競合結合アッセイによって決定されたER (上)およびER (下)に対するPaPE-1、トランス-ヒドロキシタモキシフェン(OH-Tam)およびE2の結合親和性の比較。(B)E2-ER またはPaPE-1-ER 複合体へのコレギュレーターSRC3の結合。(C)OH-TamまたはPaPE-1による、10nM E2-ER 複合体からのSRC3の置換。(D)対照ビヒクル、10nM E2または1 μ M PaPE-1で1時間細胞を処理した後のMCF-7細胞におけるER およびSRC3の相互作用を調べる共免疫沈降アッセイ。リガンド処理後、細胞溶解物をSRC3または対照IgGに対する抗体で免疫沈降させ、免疫沈降物をSDS PAGEゲル上で分離し、抗ER 抗体を使用してER についてプロットした。(E)ER リガンド結合ドメインからのPaPE-1およびE2(F)の解離の時間経過。ER LBD(2nM)を100nM E2または5 μ M PaPE-1で氷上に1時間平衡化させた。5 で保持した試料をゼロ時間点について蛍光偏光によってアッセイし、次いで過剰のE2をPaPE-1サンプルに添加、または過剰のOH-TamをE2サンプルに添加し、解離を異方性の変化として時間の経過とともに追跡した。詳細は、下記の方法を参照のこと。

【図11】E2およびPaPE-1を用いた近接性ライゲーションアッセイ(PLA)。PLAを使用して、ER とmTOR；またはER とPRAS40；またはER とpMAPKとの相互作用に対する対照ビヒ

クル、10nM E2または1 μ M PaPE-1の効果を比較した。MCF-7細胞をリガンドで15分間処理し、次いでPLAを行った。PLAのシグナル強度の定量化は右側のパネルに示されている。一元配置ANOVA、Bonferroni posttest、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

【図12】注射またはペレット埋め込み後のPaPE-1の血中濃度の解析のための薬物動態(PK)試験。(A)100 μ g PaPE-1の皮下注射後のオベックスマウスの血液中のPaPE-1レベルの測定を、24時間までの指示された時間に行った。(B)300 μ g/日のPaPE-1を含有するペレットの埋め込み後3週間にわたるオベックスマウスの血液中のPaPE-1レベルの測定。

【図13】PaPE-1の効果にはER が必要である。(A)野生型(WT)またはER ノックアウト(ERKO)C57BL/6マウスを卵巣摘出し、3週間後にE2(5 μ g/日)またはPaPE-1(300 μ g/日)を含有するペレットを3週間埋め込んだ。動物は通常の固形飼料で飼育していた。体重の変化をモニタした。(B)ビヒクル(Veh)またはリガンド処理の3週間後の(A)からの動物の子宮質量。(B)ビヒクル(Veh)またはリガンド処理の3週間後の(A)からの動物の子宮質量。(C)3週間のリガンド曝露後の(A)からの動物の血液中のトリグリセリドレベル。(D)Veh、E2およびPaPE-1で3週間処置したWTまたはERKOマウスの肝臓におけるFASNおよびSREBP1cの遺伝子発現解析、t検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図14】PaPE-1と同じである化合物2は、非ゲノム性遺伝子LRR54をE2よりも1.9倍高いレベルに活性化した。LRR54 mRNA発現とは対照的に、化合物2によるPgR mRNAの誘導レベルはビヒクル(Veh.)レベルとほとんど変わらない。従って、化合物2は非ゲノム性シグナル伝達経路に対して良好な選択的活性を有する。化合物5のように、フェノールのOHがメチル基でブロックされている場合、この非ゲノム性活性の著しい喪失がある。脂肪族アルコールがケトン(化合物6)に酸化されると、非ゲノム性活性も失われる。脂肪族アルコール(化合物8)の代わりに塩素を用いると、非ゲノム性遺伝子(LRR54)が刺激されるが、化合物2よりも少ない程度であり(E2と比較してわずか50%)、シアノ類似体(化合物9)は、非ゲノム性活性を示さない。位置異性体(化合物10)は非常に良好な選択的非ゲノム性活性を有するが、ケトン類似体(化合物11)は不活性である。化合物12,13及び14はヒドロキシル基が欠失しており、最初の2つはある程度の非ゲノム性活性を有するが、3つ全てがゲノム性遺伝子PgRを強く刺激する。

【図15】図14に示される活性は、赤色の曲線がゲノム性活性(PgR遺伝子の刺激)を表し、青色の曲線が非ゲノム性活性(LRR54遺伝子の刺激)を表す、レーダーまたはスタープロットとしてここに示されている。選択的非ゲノム性活性は、青色の曲線上の点が赤色の曲線上の点を超えて伸びるときに明らかである。このことから、この図の化合物のうち、化合物2(PaPE-1)は、非常に低いゲノム性活性と共に最も大きな非ゲノム性活性を有することは明らかである。

【図16】PaPE-1(化合物2)および種々の化合物によるLRR54 mRNA(非ゲノム性遺伝子)およびPgR mRNA(ゲノム性遺伝子)の倍数変化。

【図17】レーダーグラフで実証されたLRR54 mRNA(非ゲノム性)およびPgR mRNA(ゲノム性)遺伝子の発現に対するPaPE-1(化合物2)および種々の近い類似体の効果。本明細書に示すように、テトラロン(化合物16、PaPE-3とも呼ばれる)およびその開環系(化合物15、PaPE-2とも呼ばれる)は、非ゲノム性遺伝子に対していくらかの選択性を有するが、化合物2のそれよりも少ない。インデン-1-オール系(化合物17)は、LRR54およびPgR活性の両方を失う。インデン-1-オン系(化合物18)は、非ゲノム性遺伝子およびゲノム性遺伝子の両方の発現を増加させる。17-エチニルエストラジオール模倣化合物(化合物19~21)はいずれの遺伝子に対しても活性を有しない。アルコールOHがメチル基(化合物22)によってブロックされると、ゲノム性および非ゲノム性の両遺伝子発現の刺激が失われる。

【図18】ラセミ体であるPaPE-1(化合物2)および化合物2(PaPE-1)のS-エナンチオマー(化合物3)およびR-エナンチオマー(化合物2)によるLRR54 mRNA(非ゲノム性遺伝子)およびPgR mRNA(ゲノム性遺伝子)の倍数変化。上記ラセミ体およびS-エナンチオマーは同等の活性を有し；上記R-エナンチオマーは非ゲノム性遺伝子活性がより少ない。

【図19】種々の追加のベンジル化合物および構造的に修飾されたPaPE誘導体によるLRR54

10

20

30

40

50

54 mRNA(非ゲノム性遺伝子)およびPgR mRNA(ゲノム性遺伝子)の倍数変化。

【図20】図19からのデータのスタープロット。ベンジルアルコール型化合物(化合物23~28)のうち、化合物24,26および27はエストラジオール(E2)と同様のレベルの非遺伝子発現を示したが、ゲノム性遺伝子(PgR)発現はビヒクルレベルよりもわずかに高かった。化合物2(PaPE-1)は、最も優勢な非ゲノム性遺伝子刺激を示した。興味深いことに、化合物29はE2と同様のレベルのLRRC54を発現したが、ビヒクル(Veh.)の活性化能を超えてはPgRを活性化しなかった。ケトン(化合物29)の還元により誘導された化合物30は、その親化合物29よりも高いレベルにゲノム性および非ゲノム性遺伝子発現両方を上昇させた。

【図21】PaPE-1(化合物2)の構造の一部を欠いている様々のビフェニル型類似体によって誘導されたLRRC54およびPgR mRNAレベルの倍数変化。

【図22】図21のデータのスタープロット。このシリーズから、化合物2(図14および15参照)のフェノール性OHに隣接するベンジルOHおよび2つのメチル基の両方がゲノム性遺伝子発現を抑制し、LRRC54遺伝子活性を刺激するのに重要であることがわかる。メチル基およびOHが除去されると(化合物31)、両方の活性が失われる。化合物2および6からメチル基のみが除去された場合、これらの誘導体(化合物32~33)は、E2のレベルに近いレベルでPgR遺伝子発現を刺激するが、化合物2(PaPE-1)と同様(化合物32)のまたは化合物2(PaPE-1)よりもいくぶん少ない(化合物33)LRRC54遺伝子誘導を維持する。2つのメチル基およびフェノール性OHの重要な役割に加えて、脂肪族アルコールを有するアルキル基の除去またはフェノールによる置換(化合物34~35)は、LRRC54およびPgR遺伝子の両方の発現を刺激する活性の喪失(化合物34)または主にLRRC54遺伝子発現の喪失(化合物35)を引き起こす。

【図23】エストラジオール(E2)の種々の改変型、化合物36~43によって誘導されたLRRC54およびPgR mRNA遺伝子発現の倍数変化。

【図24】図23のデータのスタープロット。化合物38の改変を除く全ての改変は、ゲノム性遺伝子PgRに対して強い活性を有する。化合物2(PaPR-1)の活性と同様の非ゲノム性遺伝子(LRRC54)活性化は、化合物39および41で維持され、36および37ではより程度に維持される。

【図25】化合物40はフェムトモル濃度でLRRC54遺伝子発現を選択的に刺激し、ナノモル~マイクロモル濃度での発現は低下する；ゲノム性遺伝子発現(PgR)は、より高濃度でのみ増加し、標的遺伝子発現を制御する非ゲノム性(高感受性)およびゲノム性(低感受性)シグナル伝達の効力分離が明らかにされる。

【図26】ジメチルフェノール機能を維持しながらのアルキル鎖改変の効果を調べるための、種々の追加のビフェニル化合物(44~49)によって誘導されるLRRC54およびPgR mRNA遺伝子発現の倍数変化。

【図27】図26のデータのスタープロット。この系列から、p-およびm-フェネチルアルコール(化合物44~45)およびp-フェネチルプロミド(化合物46)化合物は、E2よりも良好にLRRC54を優先的に刺激する。m-および/またはp-フェニルプロピルアルコール基(化合物47~48)は、ゲノム性PgR遺伝子の発現をよく刺激するが、化合物47は非ゲノム性LRRC54の良好な刺激も示す。m-フェニル酢酸類似体(化合物49)は、ビヒクルのように挙動する。

【図28】追加のインダン誘導体(化合物50~58)によって誘導されるLRRC54およびPgR mRNA遺伝子発現の倍数変化。

【図29】図28からのデータのスタープロット。化合物2(PaPE-1)の2位を置換した -フルオロ(化合物50)および -プロモ(化合物51)は、E2のレベルに近く非ゲノム性LRRC54およびゲノム性PgR遺伝子発現両方を刺激する。ジプロモ置換化合物(化合物52)およびメトキシ置換化合物54も(ある程度まで)両方の遺伝子の発現をほとんど示さない。2-ナフトール化合物(化合物53)は、エストラジオール(E2)と同等の遺伝子発現パターンを有する。1つのメチル基が欠失すると(化合物55)、PgR遺伝子はE2の場合より2倍に刺激される。アリールメチルへの極性OH基の付加(化合物56~58)は、非ゲノム性LRRC54遺伝子の発現を増加させ、化合物56および57はかなりの非ゲノム性遺伝子選択性を示す。

【図30】追加のビフェニルおよびシクロフェニル模倣化合物(59~70)によって誘導されたLRRC54およびPgR mRNA遺伝子発現の倍数変化。

10

20

30

40

50

【図3 1】図30のデータのスタープロット。*o,o'*-ジメチルフェノール(化合物59および60)または*o,o'*-ジクロロフェノール(化合物64)を有するフェノールベンジルアルコールは、E2と比較して非ゲノム性LRR54遺伝子の選択的発現を示すが、その発現レベルは化合物2よりも低い。PaPE-1のジクロロ類似体(化合物63)は非ゲノム性遺伝子LRR54を選択的に刺激するが、その活性は化合物2の1/2未満である。4-ヒドロキシ-3-ヒドロキシメチル-ビフェニル(化合物61)は、ビヒクル(Veh.)よりも少し良好にLRR54を刺激し、PgRを全く刺激しない。4,4'-ジヒドロキシ-3,3',5,5'-テトラメチルビフェニル(化合物65)は、LRR54遺伝子発現を大きく抑制し、PgR遺伝子発現はビヒクル(Veh.)と同等である。2つのシクロフェニルタイプの化合物(化合物66~67)は、PgR遺伝子を選択的に刺激する。化合物59のフェノールに対して(化合物68におけるように)オルト位の追加のメチル基は、親化合物59の作用と比較してLRR54遺伝子発現を抑制する。化合物44および47におけるフェノール基に加えて(化合物69および70におけるように)さらなるフェノール基の追加は、化合物44および47のそれらと比較して非ゲノム性LRR54遺伝子応答を改善しない。

10

【図3 2】化合物2、ヒドロキシタモキシフェン(HO-TAM)およびラロキシフェン(RAL)化合物の比較。ラロキシフェンは、非ゲノム性LRR54およびゲノム性PgR遺伝子の発現を阻止する。HO-TAMは、PgR遺伝子のわずかな刺激を示すが、非ゲノム性のLRR54遺伝子の刺激は示さない。

【図3 3】図32からのデータのスタープロット。ラロキシフェン(RAL)もヒドロキシタモキシフェン(TOT)も、非ゲノム性遺伝子LRR54の選択的活性化を示さない。

【図3 4】閉経後肥満女性における、腫瘍に関連する危険因子および病原力の特性評価。(A)GC-MSを使用して測定した基準(BMI> 25の肥満または過体重、閉経後2~3年)に適合する中年の健康調査からの63人の肥満または過体重対37人の非肥満閉経後女性からの100の血清サンプルの全代謝物プロファイリングのヒートマップ。BMIについて、赤は高い値を示し、緑は低い値を示す。(B)Aと同じサンプルのOLINKバイオマーカープロファイリング。BMIについて、赤色はより高い値を示し、緑色はより低い値を示す。(C)細胞増殖アッセイは、ER⁻(+)およびER⁻(-)乳癌細胞株の両方で実施した。35人の肥満個体および35人の非肥満個体からの血清を使用して、WST1アッセイによる解析の前に7日間細胞を処理した。3つの技術的複製物が使用された。肥満個体対非肥満個体の血清が乳癌細胞株増殖に統計学的に有意な差を生じさせるかどうかを評価するために、対応のないt検定を用いた。*、 $p < 0.05$ 。平均±SEMをプロットした。(D)細胞遊走は、35人の肥満個体および35人の非肥満個体の血清サンプルでBT474細胞を24時間処理した後、1フィールドあたりの細胞数を測定することにより試験した。MCF-7細胞において、35人の肥満個体からの血清によってpS6K活性が増加し、35人の非肥満個体由来の血清によっては活性化されなかったことにより、mTOR経路が活性化されたことが見いだされた。すべてのアッセイは、96ウェルプレートで3つ組で実施した。肥満個体対非肥満個体の血清が乳癌細胞株運動性およびmTOR経路活性化において統計的に有意な差を生じたかどうかを評価するために、対応のないt検定を使用した。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。平均±SEMをプロットした。(E)細胞表現型指標とバイオマーカーの相関解析(ピアソン相関係数)。 p 値< 0.05でMCF-7増殖と相関するバイオマーカーが選択される。対応のあるt検定とボンフェローニの補正を使用して、統計学的有意差を同定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。F)Eからのバイオマーカーの相関解析(p 値)。

20

30

40

【図3 5】肥満の閉経後女性の細胞増殖に関連する因子の同定。(A)細胞増殖とBMI、エストラジオール、テストステロンおよびプロゲステロンの関連性解析。ピアソン相関係数(上のパネル)および p 値(下のパネル)を各比較について示した。(B)増殖とBMI、エストラジオールと増殖、BMIとエストラジオールとの間の詳細な関連解析を示した。(C)代謝産物の相対濃度を測定し、増殖指標で分類した血清サンプルから示した。対応のあるt検定とボンフェローニの補正を使用して、統計学的有意差を同定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【図3 6】細胞増殖に対する刺激効果についてFFAのスクリーニング。(A)図1の同じ試料の遊離脂肪酸プロファイリングのヒートマップ。GC-MSを用いて測定した。BMIおよび増殖

50

について、赤はより高い値を示し、緑はより低い値を示す。(B)MetaboanalystにおけるPartial Least Squares - Discriminant Analysis(PLS-DA)を用いた高および低増殖指標に関連する重要な特徴。(C)中年の健康調査-体重減少サンプルの代謝学的解析。以下の基準を満たした中年の健康調査の21人の閉経後女性の初期および最終来院血清サンプルを分析した：最初の来院時のBMI> 25および最後の来院時のBMI< 25。最初の来院サンプル(個体が肥満または太りすぎていた場合)は赤い太い線で示されている。(D)Komen Tissue Bank感受性試料の代謝学的解析。血清サンプルは、後に乳癌の診断を受けたが献血時には癌がない23人の感受性閉経後女性、および乳癌の診断が報告されていないので癌がない女性23人(年齢、BMI、レースマッチドコントロール)(E)図36AおよびBから同定された個々のFFAの存在下でのMCF-7細胞の細胞増殖。2つの濃度(1nMおよび100nM)の遊離脂肪酸で細胞を処理した後、細胞増殖を調べた。FFAミックスは、この実験で試験したすべての単一の遊離脂肪酸を含有する。脂質ミックス(コレステロールと脂肪酸の混合物)はSigmaから購入した。6つの複製物を各アッセイで使用し、実験を2回繰り返した。対応のないt検定を使用して、種々の遊離脂肪酸(FFA)処理がMCF-7細胞増殖の統計的に有意な刺激をもたらすかどうかを評価した。* $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$ 、*** $p < 0.0001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。

10

【図37】PaPE-1はMCF-7細胞における増殖および経路の活性化を抑制し、マウスの卵巣切除によって増加したオレイン酸(OA)レベルを正常化する。(A)MCF-7細胞増殖と中年の健康調査からの血清中のOAレベルの相関。(B)MCF-7細胞におけるOAによって誘導されるmTOR経路活性化。細胞を100nMオレイン酸で0、15、45、および90分間処理した。AKT、ERK1/ERK2、S6、および4EBP1のリン酸化および総タンパク質レベルをウェスタンブロット解析によって調べた。実験を2回繰り返し、代表的なプロットを示した。(C)PaPE-1によるOA誘導mTOR経路活性化の阻害。MCF-7細胞において、オレイン酸はmTORC経路を刺激し、PaPE-1は活性化を抑制した。MCF-7細胞を対照ビヒクルおよび100nMオレイン酸で、PaPE-1と共にまたはPaPE-1無しで45分間処理した。4EBP1、P70S6K、およびS6のリン酸化および総タンパク質レベルをウェスタンブロット解析によって調べた。実験を2回繰り返し、代表的なプロットを示す。(D)PaPE-1有りおよび無しの場合のMCF-7細胞増殖に対するOA効果。細胞増殖に対するOAの用量応答を、WST1アッセイの前に6日間単独で、またはPaPE-1(1 μ M)と組合せて試験した。実験は6つの技術的複製物を含み、2回繰り返した。MCF-7細胞増殖に対するOA用量および阻害剤(CtrlおよびPaPE-1)処理の寄与を評価するために、二元配置分散解析(ANOVA)モデルを適合させた。主効果が $p = 0.05$ で統計学的に有意であった場合、ボンフェローニ補正とのペアワイズt検定を用いて、処理が統計的に異なるかどうかを同定した。*** $p < 0.0001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。(E)ER およびmTOR標的化剤によるOA誘発MCF-7細胞増殖の阻害。細胞増殖は、100nMオレイン酸によって刺激され、1 μ M 4-OH-Tamoxifen(4-OH-Tam)、1 μ M Fulvestrant(Fulv)、mTOR阻害剤、1 μ M RAD001、および1 μ M PaPE-1を添加することによって抑制された。上記細胞増殖実験において、指定された化合物を添加した全増殖培地中でMCF-7細胞を処理した。処理は6日間行い、450でのODをWST1アッセイによって測定した。データは、平均の標準誤差を有する6回反復の平均から表される。実験を2回繰り返す。MCF-7細胞増殖に対するリガンド(VehまたはOA)および阻害剤(Ctrl、4-OH-Tam、Fulv、RAD001およびPaPE-1)処理の寄与を評価するために、二元配置分散解析(ANOVA)モデルを適合させた。主効果が $p = 0.05$ で統計学的に有意であった場合、ボンフェローニ補正とのペアワイズt検定を用いて、処理が統計的に異なるかどうかを同定した。*** $p < 0.0001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。(F)4-OH-Tam、FulvおよびPaPE-1による血清誘導MCF-7細胞増殖の阻害。MCF-7細胞をVeh、1 μ M 4-OH-Tam、1 μ M Fulvおよび1 μ M PaPE-1で6日間処理した後、63人の肥満個体(左)の血清および標準的な細胞培養物(右)においてWST-1アッセイを行った。標準的な細胞培養培地について、各血清サンプルについて3つの技術的複製物があり、各処理については14の複製物が存在する。一元配置分散解析(ANOVA)モデルを、血清または標準的な細胞培地誘導MCF-7細胞増殖に対するリガンドの寄与を評価するために適合させた。主効果が $p = 0.05$ で統計学的に有意であった場合、ボンフェローニ補正とのペアワイズt検定を用いて、処理が統計的に異なるかどうかを同定した。*** $p < 0.0001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。

20

30

40

50

かを同定した。**** $p < 0.0001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。(G) 卵巣摘出後のPaPE-1によるOAレベルの回復。3つの異なるマウスモデルを試験した：正常食餌(処理群につきN = 2マウス、実験を2回繰り返した)の野生型C57BLマウス、高脂肪食餌を与えた野生型C57BLマウス(処理群当たりN=5の動物)およびob/obマウス(処理群当たりN=4の動物)に投与した。マウスを6週齢で卵巣摘出し、VehまたはPaPE-1を含むAlzet徐放ミニポンプを6週間皮下に埋め込んだ。血清中のOA濃度は、GC-MSを使用して測定した。対応のないt検定を使用して、PaPE-1がVeh処理動物と比較して血清中の相対OA濃度を減少させることができるかどうかを評価した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。平均 \pm SEMをプロットした。

【図38】遺伝子調節に対するOAおよびPaPE-1の効果によって誘導される遺伝子の同定。(A) OAおよびOA+PaPE1によって誘導された遺伝子発現変化のRNA-Seq解析。有意な変更発現を有する遺伝子のヒートマップ。MCF-7細胞を、1 μ MのPaPE-1の存在下および非存在下、24時間、Vehまたは10nM OAで処理した。RNAを単離し、各処理群からの2つの試料を用いてRNA-Seqを実施した。差次的に調節された遺伝子を、 $p < 0.05$ および発現倍数変化 > 2 で決定した。(B) OAによって調節され、PaPE-1によって逆転されたA.由来のクラスター。PaPE-1によって調節される高脂肪遺伝子として同定されたクラスター1(C1)および2(C2)の平均遺伝子発現レベル。C1において、発現がOAで刺激されることが見いだされたがOA + PaPE-1処理では見いだされなかった425の遺伝子がある。C2では、OAで発現が抑制されることが見いだされたがOA + PaPE-1処理で回復した遺伝子が646個存在する。(C) ベン図解析。OA単独またはPaPE-1と組合せた、アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションされた遺伝子のベン図。(D) OA調節遺伝子の例。関与する遺伝子の上位機能の一部が提示されている。

【図39】OAによって誘導されるER クロマチン結合部位およびER シストロームにおけるこれらの変化を逆転させる際のPaPE-1の効果。(A) PaPE-1、OAおよびOA+PaPE-1の存在下でのER のクロマチンへの動員。MCF-7細胞を、1 μ M PaPE-1を含むかまたは含まずに、45分間、Vehおよび100nM OAで処理した。ER -DNA複合体を、ER 抗体を用いてプルダウンした。3つの生物学的複製物をプールし、配列決定した。seqMINERソフトウェアを使用して、Veh(0.1% EtOH)、PaPE-1(1 μ M)、OA(100nM)およびOA(100nM)+ PaPE-1(1 μ M)の処理におけるER 結合部位のクラスタリングを行った。(B) ChIP-qPCRを使用したPgR、CISHおよびSREBP1Cの調節領域におけるER 結合に対するOAおよびPaPE-1の効果の検証。MCF-7細胞を、1 μ MのPaPE-1を含むかまたは含まずに、45分間、Vehおよび100nM OAで処理した。ER -DNA複合体を、ER 抗体を使用してプルダウンした。PgR(chr1: 100,904,522-100,905,458)、CISH(chr3: 50,642,336-50,643,191)およびSREBP1(chr17: 17,743,329-17,743,912)部位へのER の動員をQ-PCRによって定量した。実験は3回繰り返し、毎回少なくとも2つ組で行った。平均 \pm SEMをプロットした。MCF-7細胞増殖に対するリガンド(VehまたはOA)および阻害剤(Ctrl、PaPE-1)処理の寄与を評価するために、一元配置分散解析(ANOVA)モデルを適合させた。主効果が $= 0.05$ で統計学的に有意であった場合、ボンフェローニ補正とのペアワイズt検定を用いて、治療が統計的に異なるかどうかを同定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。平均 \pm SEMをプロットした。(C) ER 占有率がOA処理により増加した結合部位(Bでは*印のクラスター)。ER 結合部位は、特徴的なパターンの4つのクラスター：C1、C2、C3およびC4に分かれた。(D) 転写因子(TF)結合部位のエンリッチメントは、C1、C2、C3およびC4のクラスターについて、Cistrome/GalaxyのSeqposツールを用いて同定した。(E) 様々なTFの転写活性。45経路CignalFinderアッセイを使用して、指示されたルシフェラーゼ構築物でMCF-7細胞を24時間トランスフェクションした。ルシフェラーゼアッセイによる測定の前に、細胞を1 μ M PaPE-1を含むかまたは含まずに、Vehおよび100nM OAで24時間処理した。実験は技術的な複製物で2回繰り返した。代表的な実験からの転写活性のヒートマップを、Treeview Javaを使用してプロットする。(F) 図39DおよびEからの選択された因子の転写活性の例。TF活性、TFモチーフおよび統計は、PPAR、LXR、RXRおよびEGR1について詳細に示されている。Cignal PPAR、LXR α 、RXRおよびEGR1レポーターアッセイを使用して、指示されたルシフェラーゼ構築物を用いてMCF-7細胞を二重に24時間トランスフェクションした。実験を3回繰り返した。ルシフェラーゼアッセイによる測定の前に

10

20

30

40

50

、細胞を、PaPE-1を含むかまたは含まずに、Veh、1 μ M PaPE-1および100 μ MOAで24時間処理した。対応のないt検定を使用して、MCF-7細胞における転写因子活性に対する処理(OA)および阻害剤(PaPE-1)の影響を評価した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。平均 \pm SEMをプロットした。

【図40】PaPE-1は、OAの影響を受ける代謝経路を正常化する。(A)Seahorseエネルギー表現型キットを用いた細胞代謝表現型アッセイ。Veh、OAおよびOA+PaPE-1で24時間処理した細胞について、基底レベル(左)および解糖またはミトコンドリア活性の阻害時の代謝ストレス下で(右)エネルギー表現型を試験した。各実験は3つの技術的複製物で2回繰り返した。代表的な実験の結果を示す。(B)糖分解はOA処理細胞で刺激されたが、PaPE-1を添加することによって正常化した。図40Cと同じ処理をした細胞を、糖分解ストレスアッセイを使用して測定し、ECARレベルを異なる時点で示した。各実験は3つの技術的複製物で2回繰り返した。代表的な実験の結果を示す。(C)ミトコンドリアのエネルギー産生を、Mitostressキットを用いて別々に測定した。細胞を上記と同じ方法で処理した。各実験は3回の技術的反復で2回繰り返した。代表的な実験の結果を示す。(D)MCF-7細胞の代謝解析。MCF-7細胞を、1 μ M PaPE-1有り又は無しで、100nM OAを使用して処理し、24時間後に冷メタノール中に回収した。各複製物をプールし、代謝産物全体の解析に供した。実験を2回繰り返した。実験の1つの代謝産物の代表的な結果は、クラスター3を使用してクラスター化し、Treeview Javaを使用して視覚化した。(E)CytoscapeのMetscapeプラグインによって同定された特定の代謝経路。糖分解、ペントースリン酸経路、脂肪酸生合成、TCAサイクル、尿素サイクルおよびアミノ酸代謝について、影響を受けた基質のレベルおよび経路におけるそれらの位置が示される。

10

20

【図41】マウスの脳卒中モデル

【図42】3日目および7日目のMRIによるCNS損傷の重症度は、対照と比較して低下した。

【図43】対照と比較して、エストラジオール、特にPaPE-1により、3日目および7日目でのMRIに対するCNS損傷の重症度が低下した。

【図44】エストラジオール、特にPaPE-1によるCNS損傷の減弱は、損傷に対する同側のCNSへの白血球動員の減少に関連する。

【図45】エストラジオール、特にPaPE-1によるCNS損傷の減弱は、損傷の同側のCNSへの白血球動員の減少に関連する。

【図46】エストラジオール、特にPaPE-1によるCNS損傷の減弱は、損傷の同側のCNSへの白血球動員の減少に関連する。

30

【図47】エストラジオールとPaPE-1により、ローターロッド試験で評価したように脳卒中後の機能が改善された。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、様々な変更および代替形態が可能であるが、それらの例示的な実施形態は、図面の例として示され、本明細書において詳細に記載される。しかしながら、例示的な実施形態の説明は、本発明を開示された特定の形態に限定することを意図するものではなく、むしろ、上記の実施形態および下記の請求項によって定義されるような本発明の精神および範囲内に入るすべての修正、均等物および代替を包含することを意図するものであると理解すべきである。したがって、本発明の範囲を解釈するために上記の実施形態および以下の特許請求の範囲を参照すべきである。

40

特許またはアプリケーションファイルは、カラーで実行される少なくとも1つの図面を含む。この特許または特許出願の刊行物とカラー図面の写しは、請求および必要な手数料の支払いを受けて庁が提供する。

【0012】

詳細な説明

以下に添付の図面を参照して本発明の組成物をより詳細に説明するが、本発明のすべての実施形態ではないが、いくつかの実施形態が示される。実際、本発明は、多くの異なる形態で具体化されてもよく、本明細書に記載された実施形態に限定されるものと解釈され

50

るべきではない；むしろ、これらの実施形態は、本開示が適用可能な法的要件を満たすように提供される。

同様に、本明細書に記載された組成物の多くの変更および他の実施形態は、前述の説明および関連する図面に示された教示の利益を有する本発明に関連する当業者には思い浮かぶであろう。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に限定されるものではなく、変更および他の実施形態が添付の特許請求の範囲に含まれるものとすることが理解されるべきである。本明細書では特定の用語を使用しているが、それらは一般的かつ説明的な意味でのみ使用され、限定のためではない。

本明細書に列挙された任意の数値(例えば、範囲)は、下限値から上限値までのすべての値を含むこと、すなわち、列挙された最低値と最高値との間のすべての可能な数値の組合せがこの出願に明示的に記載されているとみなされることが特に理解される。例えば、濃度範囲が1%~50%と記載されている場合、2%~40%、10%~30%、または1%~3%などの値がこの明細書に明示的に列挙されることが意図される。これらは、具体的に意図されているものの例にすぎない。

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似または等価な任意の方法および材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、好ましい方法および材料が本明細書に記載される。

【0013】

概要

本開示には、特許請求される式の化合物が含まれる。上記化合物は、直接核開始経路よりも核外開始シグナル伝達経路を活性化するのに充分であり得るERとの相互作用を有することができる。ある実施形態では、その化合物は、標準エストロゲンエストラジールの約50,000倍、または約25,000倍、約10,000倍、または約5,000倍、または約1,000倍少ないERに対する親和性を有する。上記化合物は、直接核開始経路よりもエストロゲン受容体作用の核外開始経路に対して、より高い活性または効力を有する経路選択性エストロゲン(Pathway Preferential Estrogens)(PaPE)を含み得る。核外で開始される経路を活性化するための上記化合物の選択性は、ヒトの健康に有益であり得る細胞およびインビボ生物学的効果の好ましいパターンをもたらし得る。上記化合物は、生殖組織、乳房組織、または乳癌細胞の刺激を最小限にするか、またはまったく生じさせない、遺伝子調節パターンおよび細胞および生物学的プロセスを誘発し得る。理論に縛られることを望むものではないが、これらの組織の刺激は、通常、エストロゲンの核開始作用に主として起因すると考えられている；したがって、上記化合物は、標準エストロゲンエストラジールによって行われる刺激と比較して、限られた活性しか有さない。ある実施形態では、上記化合物は、標準エストロゲンエストラジールによって行われる刺激と比較して、生殖組織、乳房組織または乳癌細胞に対して約20%未満の刺激、または標準エストロゲンエストラジールによって行われる刺激と比較して、約15%未満、または約10%未満、または約5%未満、または約2%未満、または約1%未満、または約0.5%未満、または約0.1%未満の刺激しか生じないであろう。対照的に、上記化合物は、代謝組織(脂肪、肝臓)および脈管構造に対して活性の好ましいパターンを有し、卵巣切除後の体重増加および脂肪蓄積を減少させ、内皮損傷の修復を加速する。これらの組織の刺激は、エストロゲンの核外開始作用に大きく起因すると考えられる。したがって、これらの組織における応答において、上記化合物は、標準的エストロゲン、エストラジールと同じまたはそれ以上の有益な健康影響を有し得るか、エストラジールの約50%の有益性を有し得る。この設計されたりガンド構造変化プロセスは、閉経後ホルモン置換に有益であることが示されるであろう組織選択的/非核経路選択的エストロゲンを得るために、ER作用の核外開始経路対核開始経路の利用におけるバランスを支配する新規アプローチを表している。

【0014】

本明細書に記載の上記化合物は、新規な組織選択的エストロゲンを表し得る。ある実施形態では、上記化合物は、これらの組織におけるER作用にとって重要なシグナル伝達経

路の選択的活性化によって代謝および血管組織において良好な作用を提供し得るが、子宮の成長を増大させるかまたは乳房組織の増殖を刺激する生殖組織においてこれらの経路を活性化させることができない。理論に縛られることを望むものではないが、上記化合物の組織選択的作用は、ゲノム性経路を介するよりも非ゲノム性経路を介するそれらの活性のより大きな保持に起因すると考えられる。

ERに対するPaPE-1および他のPaPEの親和性はE2の親和性よりも約50,000倍低い、非ゲノム性効果はE2よりも約100倍過剰のPaPEを使用して刺激され、これは、非ゲノム性シグナル伝達経路が、ゲノム性経路よりも受容体に対するリガンドの親和性に対する依存性が低い可能性があることを示唆する所見である。また、E2の後にパターンニングされたPaPE-1、-2、および-3はすべてE2と同様の物理的特性(親油性、極性表面積、体積など)を有するが、PaPE-4はE2および他のPaPEよりもかなり大きく、より極性であるが、PPE-4は他の3つのPaPEと非常によく似た生物学的活性を有しており、PaPE様化合物のクラスがかなり広い範囲の物理的および構造的性質をカバーできることを示唆している。

【0015】

定義

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、定義を含む本文書が支配する。好ましい方法および材料は下に記載されているが、本明細書において記載されているものと同様のまたは等価な方法および材料が本発明の実施または試験において使用することができる。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が援用されている。本明細書に開示された材料、方法および実施例は、例示的なものに過ぎず、限定することを意図するものではない。

本明細書で使用する「含む(comprise)」、「含める(include)」、「有している」、「有する」、「することができる」、「含有する」という用語およびそれらの変形は、付加的な行為または構造の可能性を排除しない非限定型の移行句、用語、または言葉であることを意味する。単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈上他に明確に指示されていない限り、複数の言及が含まれる。本開示は、また、明示的に示されているか否かにかかわらず、本明細書に提示された実施形態または要素を「含む」、「からなる」、および「から本質的になる」他の実施形態を企図する。

【0016】

量に関連して使用する「約」という修飾語は、記載された値を含み、文脈によって指示される意味を有する(例えば、少なくとも特定の量の測定に関連する誤差の程度を含める)。また、「約」という修飾語は2つの端点の絶対値によって定義される範囲を開示するものとして考慮されるべきである。例えば、「約2~約4」という表現は、範囲「2~4」も開示する。「約」という用語は、示された数のプラスまたはマイナス10%を意味することがある。例えば、「約10%」は9%~11%の範囲を示し、「約1」は0.9~1.1を意味してもよい。「約」の他の意味は、四捨五入などの文脈から明らかであり、したがって、例えば「約1」は0.5~1.4を意味することになる。

特定の官能基および化学用語の定義は、以下でより詳細に記載される。この開示のために、元素の周期律表、CAS版、Handbook of Chemistry and Physics、第75版、内部カバーに従って化学元素を同定し、特定の官能基は一般にその中に記載されているように定義される。さらに、有機化学の一般的原理、ならびに特定の官能部分および反応性は、Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987に記載されている;これらの各々の全内容は、本明細書に援用されている。

【0017】

本明細書で使用する「アルコキシ」という用語は、酸素原子を介して親分子部分に付加

した本明細書で定義のアルキル基を意味する。アルコキシの代表例には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ及びtert-ブトキシが含まれるが、これらに限定されない。

本明細書で使用する「アルキル」という用語は、1~10個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の飽和炭化水素鎖を意味する。「低級アルキル」または「C₁-C₆アルキル」という用語は、1~6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の炭化水素を意味する。「C₁-C₃-アルキル」という用語は、1~3個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の炭化水素を意味する。アルキルの代表的な例には、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、iso-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニルおよびn-デシルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】

本明細書で使用する「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合および1~10個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖炭化水素鎖を意味する。

本明細書で使用される「アルコシアルキル」という用語は、本明細書で定義されるアルキル基を介して親分子部分に付加した、本明細書で定義されるアルコキシ基を意味する。

本明細書で使用する「アルコシフルオロアルキル」という用語は、本明細書で定義されるフルオロアルキル基を介して親分子部分に付加した、本明細書で定義されるアルコキシ基を意味する。

本明細書で使用する「アルキレン」という用語は、1~10個の炭素原子、例えば2~5個の炭素原子の直鎖または分枝鎖炭化水素から誘導される二価の基を意味する。アルキレンの代表例には、-CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, および-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-が含まれるが、これらに限定されない。

本明細書で使用する「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素結合が二重結合である、1~10個の炭素原子の直鎖または分枝鎖の炭化水素から誘導される二価の基を意味する。

本明細書で使用する「アルキルアミノ」という用語は、本明細書で定義されるような少なくとも1つのアルキル基が、親分子部分に本明細書で定義されるようなアミノ基を介して付加されていることを意味する。

本明細書で使用する「アミド」という用語は、Rが水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アルケニルまたはヘテロアルキルであり得る-C(O)NR-または-NRC(O)-を意味する。

【0019】

本明細書で使用する「アミノアルキル」という用語は、本明細書で定義されるような少なくとも1個のアミノ基が本明細書で定義されるようなアルキレン基を介して親分子部分に付加されていることを意味する。

本明細書で使用される「アミノ」という用語は、-NR_xR_y (R_xおよびR_yは、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アルケニルまたはヘテロアルキルであり得る)を意味する。アミノが2つの他の部分を一緒に付加するアミノアルキル基または任意の他の部分の場合、アミノは-NR_x- (R_xは水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アルケニルまたはヘテロアルキルでもよい)でもよい。

本明細書で使用する「アリール」という用語は、フェニル基または二環式縮合環系を意味する。二環式縮合環系は、親分子部分に付加され、本明細書で定義されるようなシクロアルキル基、フェニル基、本明細書で定義されるようなヘテロアリール基、または本明細書で定義されるような複素環に縮合したフェニル基によって例示される。アリールの代表例には、インドリル、ナフチル、フェニル、キノリニルおよびテトラヒドロキノリニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

本明細書で使用する「シアノアルキル」という用語は、少なくとも1つの-CN基を意味し、本明細書で定義されるアルキレン基を介して親分子部分に付加される。

本明細書で使用する「シアノフルオロアルキル」という用語は、少なくとも1つの-CN基を意味し、本明細書で定義されるフルオロアルキル基を介して親分子部分に付加される。

本明細書で使用する「シクロアルコキシ」という用語は、酸素原子を介して親分子部分に付加される本明細書で定義のシクロアルキル基を意味する。

本明細書で使用する「シクロアルキル」という用語は、3～10個の炭素原子、0個のヘテロ原子および0個の二重結合を含有する炭素環系を意味する。シクロアルキルの代表例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニルおよびシクロデシルが挙げられるが、これらに限定されない。また、「シクロアルキル」にはシクロアルキル基が親分子部分に付加され、本明細書で定義されるアリール基(例えば、フェニル基)、本明細書で定義されるヘテロアリール基、または定義される複素環に縮合している炭素環系が含まれる。このようなシクロアルキル基の代表的な例には、2,3-ジヒドロ-1H-インデニル(例えば、2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-イルおよび2,3-ジヒドロ-1H-インデン-2-イル)、6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[b]ピリジニル(例えば、6,7-ジヒドロ-5H-シクロペンタ[b]ピリジン-6-イル)、および5,6,7,8-テトラヒドロキノリニル(例えば、5,6,7,8-テトラヒドロキノリン-5-イル)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0021】

本明細書で使用する「シクロアルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含み、好ましくは環あたり5～10個の炭素原子を有する非芳香族単環式または多環式環系を意味する。例示的な単環シクロアルケニル環としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルまたはシクロヘプテニルが挙げられる。

本明細書で使用する「フルオロアルキル」という用語は1、2、3、4、5、6、7または8個の水素原子がフッ素と置き換えられている、本明細書で定義されるアルキル基を意味する。フルオロアルキルの代表例としては、2-フルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、トリフロロメチル、ジフルオロメチル、ペンタフルオロエチルおよびトリフルオロプロピル(例えば3,3,3-トリフルオロプロピル)が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書で使用する「フルオロアルキル」という用語は、1,2,3,4,5,6,7または8個の水素原子がフッ素で置き換えられている、本明細書で定義されるアルキル基を意味する。フルオロアルキルの代表例には、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシおよび2,2,2-トリフルオロエトキシが挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書で使用する「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、Cl、Br、IまたはFを意味する。

【0022】

本明細書で使用する「ハロアルキル」という用語は、1,2,3,4,5,6,7または8個の水素原子がハロゲンで置き換えられている、本明細書で定義されるアルキル基を意味する。

本明細書で使用する「ハロアルコキシ」という用語は、本明細書で定義されるような少なくとも1つのハロアルキル基が、酸素原子を介して親分子部分に結合していることを意味する。

本明細書で使用する「ハロシクロアルキル」という用語は、1個以上の水素原子がハロゲンで置き換えられている、本明細書で定義されるシクロアルキル基を意味する。

本明細書で使用する「ヘテロアルキル」という用語は、1個以上の炭素原子がS、O、PおよびNから選択されるヘテロ原子によって置換された、本明細書で定義されるアルキル基を意味する。ヘテロアルキルの代表例には、アルキルエーテル、第二級および第三級アルキルアミン、アミドおよびアルキルスルフィドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0023】

本明細書で使用する「ヘテロアリール」という用語は、芳香族単環式環または芳香族二環式環系を意味する。芳香族単環式環は、N、OおよびS(例えば、O、S、およびNから独立

して選択される1,2,3または4個のヘテロ原子)からなる群から独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含む5または6員環である。5員芳香族単環式環は2個の二重結合を有し、6員芳香族単環式環は3個の二重結合を有する。二環式ヘテロアリール基は、親分子部分に付加され、本明細書で定義される単環シクロアルキル基、本明細書で定義される単環アリール基、本明細書で定義される単環ヘテロアリール基、本明細書で定義される複素環に縮合された単環ヘテロアリール環によって例示される。ヘテロアリールの代表例には、インドリル、ピリジニル(ピリジン-2-イル、ピリジン-3-イル、ピリジン-4-イルを含める)、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピラゾリル、ピロリル、ベンゾピラゾリル、1,2,3-チアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾキサゾリル、ベンゾキサジアゾリル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、フラニル、オキサゾリル、イソキサゾリル、プリニル、イソインドリル、キノキサリニル、インダゾリル、キナゾリニル、1,2,4-トリアジニル、1,3,5-トリアジニル、イソキノリニル、キノリニル、6,7-ジヒドロ-1,3-ベンゾチアゾリル、イミダゾ[1,2-a]ピリジニル、ナフチリジニル、ピリドイミダゾリル、チアゾロ[5,4-b]ピリジン-2-イル、チアゾロ[5,4-d]ピリミジン-2-イルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0024】

本明細書で使用する「複素環」または「複素環式」という用語は、単環式複素環、二環式複素環または三環式複素環を意味する。単環式複素環は、0、NおよびSからなる群から独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を含む3員、4員、5員、6員、7員または8員環である。3員または4員環は、0または1つの二重結合、および0、NおよびSからなる群から選択される1つのヘテロ原子を含有する。5員環は、0または1つの二重結合および0、N、およびSからなる群から選択される1、2または3個のヘテロ原子を含有する。6員環は、0、1または2つの二重結合および0、N、およびSからなる群から選択される1、2または3個のヘテロ原子を含有する。7員環および8員環は、0、1、2または3つの二重結合および0、N、およびSからなる群から選択される1、2または3個のヘテロ原子を含有する。単環式複素環の代表例には、アゼチジニル、アゼパニル、アジリジニル、ジアゼパニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジオキサソラニル、1,3-ジチオラニル、1,3-ジチアニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、イソチアゾリニル、イソチアゾリジニル、イソキサゾリニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、2-オキソ-3-ピペリジニル、2-オキソアゼパン-3-イル、オキサジアゾリニル、オキサジアゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキセタニル、オキセパニル、オキソカニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピラニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、ピロリニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロチエル、チアジアゾリニル、チアジアゾリジニル、1,2-チアジナニル、1,3-チアジナニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、チオモルホリニル、1,1-ジオキシドチオモルホリニル(チオモルホリンスルホン)、チオピラニルおよびトリチアニルが挙げられるが、これらに限定されない。二環式複素環は、フェニル基に縮合した単環式複素環、または単環シクロアルキルに縮合した単環式複素環、または単環シクロアルケニルに縮合した単環式複素環、または単環式複素環に縮合した単環式複素環、またはスピロ複素環式基、または環の2つの非隣接原子が1,2,3または4個の炭素原子のアルキレン架橋または2、3または4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されている架橋単環式複素環系である。二環式複素環の代表例には、ベンゾピラニル、ベンゾチオピラニル、クロマニル、2,3-ジヒドロベンゾピラニル、2,3-ジヒドロベンゾチエニル、2,3-ジヒドロイソキノリン、2-アザスピロ[3.3]ヘプタン-2-イル、2-オキサ-6-アザスピロ[3.3]ヘプタン-6-イル、アザビシクロ[2.2.1]ヘプチル(2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプテ-2-イルを含める)、アザビシクロ[3.1.0]ヘキサニル(3-アザスピロ[3.1.0]ヘキサン-3-イルを含める)、2,3-ジヒドロ-1H-インドリル、イソインドリニル、オクタヒドロシクロペンタ[c]ピロリル、オクタヒドロピロロピリジニルおよびテトラヒドロイソキノリニルが挙げられるが、これらに限定されない。三環式複素環は、フェニル基に縮合した二

20

30

40

50

環式複素環、または単環シクロアルキルに縮合した二環式複素環、または単環シクロアルケニルに縮合した二環式複素環、または単環式複素環に縮合した二環式複素環、二環式環の2つの隣接していない原子が1、2、3または4個の炭素原子のアルキレン架橋、または2、3または4個の炭素原子のアルケニレン架橋によって連結されている二環式複素環によって例示される。三環式複素環の例としては、オクタヒドロ-2,5-エボキシペンタレン、ヘキサヒドロ-2H-2,5-メタノシクロペンタ[b]フラン、ヘキサヒドロ-1H-1,4-メタノシクロペンタ[c]フラン、アザ-アダマンタン(1-アザトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン)、およびオキサ-アダマンタン(2-オキサトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン)が挙げられるが、これらに限定されない。単環式、二環式および三環式複素環は、環内に含まれる任意の炭素原子または窒素原子を介して親分子部分に結合され、非置換または置換されていてもよい。

10

【0025】

本明細書で使用する「ヒドロキシル」または「ヒドロキシ」という用語は、-OH基を意味する。

本明細書で使用される「ヒドロキシアルキル」という用語は、少なくとも1つの-OH基を意味し、本明細書で定義されるアルキレン基を介して親分子部分に付加される。

本明細書で使用される「ヒドロキシフルオロアルキル」という用語は、少なくとも1つの-OH基を意味し、本明細書で定義されるフルオロアルキル基を介して親分子部分に付加される。

いくつかの例では、ヒドロカルビル置換基(例えば、アルキルまたはシクロアルキル)中の炭素原子の数は、接頭辞「C_x-C_y-」によって示され、xは最小であり、yは置換基中の炭素原子の最大数を意味する。したがって、例えば、「C₁-C₃-アルキル」は、1~3個の炭素原子を含むアルキル置換基を意味する。

20

本明細書で使用される「スルホンアミド」という用語は、-S(O)₂NR^dまたは-NR^dS(O)-を意味し、R^dは水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アルケニルまたはヘテロアルキルであり得る。

「置換基」という用語は、その基の任意の原子におけるアリール基、ヘテロアリール基、フェニル基またはピリジニル基上の「置換」基を意味する。任意の原子を置換することができる。

【0026】

「置換された」という用語は、1つ以上の非水素置換基でさらに置換されていてもよい基を意味する。置換基には、ハロゲン、= O(オキシ)、= S(チオキシ)、シアノ、ニトロ、フルオロアルキル、アルコキシフルオロアルキル、フルオロアルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヘテロアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、アリールアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキレン、アリールオキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、アリールアミノ、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スルフィニル、-COOH、ケトン、アミド、カルバメートおよびアシルが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、基が「置換されていてもよい」(例えばアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、ヘテロアルキル基、複素環基またはR基のような他の基)として記載される場合には、ハロゲン、= O(オキシ)、= S(チオキシ)、シアノ、ニトロ、フルオロアルキル、アルコキシフルオロアルキル、フルオロアルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、ヘテロアルキル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、アリールアルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルキレン、アリールオキシ、フェノキシ、ベンジロキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、アミノアルキル、アリールアミノ、スルホニルアミノ、スルフィニルアミノ、スルホニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、スル

30

40

50

フィニル、-COOH、ケトン、アミド、カルバメートおよびアシルから独立して選択される0、1、2、3、4または5個の置換基を有してもよい。

【0027】

用語

【化6】

“ --- ”

は、単結合

【化7】

(—)

10

または二重結合

【化8】

(=)

を示す。

【0028】

本明細書に記載されている化合物では、原子および置換基の許容される原子価に従って、その基および置換基を選択することができ、その結果、選択および置換により安定な化合物、例えば、転位、環化、脱離などによって自発的に変換を受けない化合物が得られる。

20

本明細書の数値範囲の列挙では、同じ程度の精度でその間に介在する各数字が明示的に考慮される。例えば、6~9の範囲では、6と9に加えて7と8の数値が考慮され、6.0~7.0の範囲では6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9および7.0の数値が明示的に考慮される。

【0029】

当該技術において使用される慣例に従って、基：

【化9】

—{

30

は部分または置換基がコアまたは骨格構造に結合する点である結合を表すために本明細書の構造式で使用される。

【0030】

本明細書で使用される化合物、製剤、組成物、成分、塩などに対する「許容される」または「医薬的に許容される」という用語は、治療される対象の全般的な健康に永続的な有害な効果を持たないことを意味する。

本明細書で使用する「有効量」または「治療有効量」という用語は、治療される疾患または状態の1つまたは複数の症状をある程度緩和するであろう十分な量の投与される薬剤または化合物を意味する。その結果は、疾患の徴候、症状、または原因の減少および/または軽減、または生物系の任意の他の所望の改変であり得る。例えば、治療的使用のための「有効量」は、疾患症状の臨床的に有意な減少を提供するために必要とされる本明細書に開示される化合物を含む組成物の量である。個々の症例における適切な「有効」量は、用量漸増研究などの技術を使用して決定することができる。

40

「対象」または「患者」という用語は、哺乳動物および非哺乳動物を包含する。哺乳動物の例には、哺乳動物クラスの任意のメンバー：ヒト、非ヒト霊長類(例えば、チンパンジー)、および他の類人猿およびサル種；ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの家畜；ウサギ、イヌ、およびネコなどの家畜；ラット、マウスおよびモルモットなどのげっ歯類を含める実験動物などが挙げられるが、これらに限定されない。非哺乳動物の例としては、鳥類、魚類などが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供される方法および組成物の一実施形態において、哺乳動物はヒトである。

50

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される「治療する」、「治療すること」または「治療」という用語には、疾患または状態の症状を緩和、軽減または緩和すること、追加の症状を予防すること、症状の根本的な代謝原因を改善または予防すること、疾患または状態を阻止すること、例えば、疾患または状態を抑えること、疾患または状態を軽減すること、疾患または状態の退行を引き起こすこと、疾患または状態によって引き起こされる状態を緩和すること、または疾患または状態の症状を予防的におよび/または治療的に停止することが含まれる。本明細書で使用される「予防する」、「予防すること」などは、適切な対照対象と比較した。

したがって、「予防すること」とは、疾患または障害の進行の遅延、停止または逆転、または本明細書に記載の化合物のうちの少なくとも1つを含む医薬組成物の適用または投与を含む適用を意味し、対象は疾患の疾患または症状を有し、その目的は疾患または疾患の症状を治療、治癒、緩和、軽減、改変、回復、寛解、改善または作用することである。「治療すること」と「防止すること」との共通部分があることができるにもかかわらず、「予防する」ことは、「治療すること」の間に観察されるよりも劇的(すなわち、あまり微妙でない)な疾患または障害の減少であることを意図している。同様に、「治療すること」は、疾患または障害を有する個体において生じ得る一方で、「予防すること」は、疾患または障害の顕性徴候および症状に単に感受性があるかまたはまだ阻止していない個体において生じ得る。

10

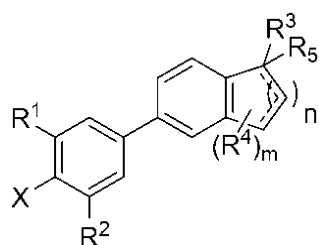
【 0 0 3 2 】

20

化合物

本開示の一態様は、下記式の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【 化 1 0 】



(i)

30

(式中、

n は、0～4の整数であり；

m は、0～4の整数であり；

X は、H、ヒドロキシまたは C_{1-4} アルコキシであり；

R_1 および R_2 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、 $-S-C_{1-4}$ アルキルまたはハロであり；

R_3 は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシであり；

40

R_4 は、各々独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシであり；

R_5 は、H、 C_{1-4} アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；

---は、二重結合であってもよい)。

【 0 0 3 3 】

ある実施形態において、 R_3 は、H、OH、オキソ、クロロ、シアノまたはメトキシである。適切には、 R_3 はヒドロキシルである。

ある実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは C_{1-4} アルキルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 は両方とも C_{1-4} アルキルである。実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つはメチルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 の両方はメチル

50

である。ある実施形態において、 R_1 および R_2 は、独立して、H、メチル、エチル、クロロ、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ および $-\text{CH}_2\text{OMe}$ から選択される。

ある実施形態において、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシは、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよび C_{1-4} アルコキシの1つ以上で置換されていてもよい。適切には、置換基はヒドロキシである。

ある実施形態において、 R_4 は、フルオロ、クロロ、プロモ、メトキシ、ヒドロキシまたはオキソから選択される。

ある実施形態において、 R_5 はHである。ある実施形態において、 R_5 は $-\text{CCH}$ である。

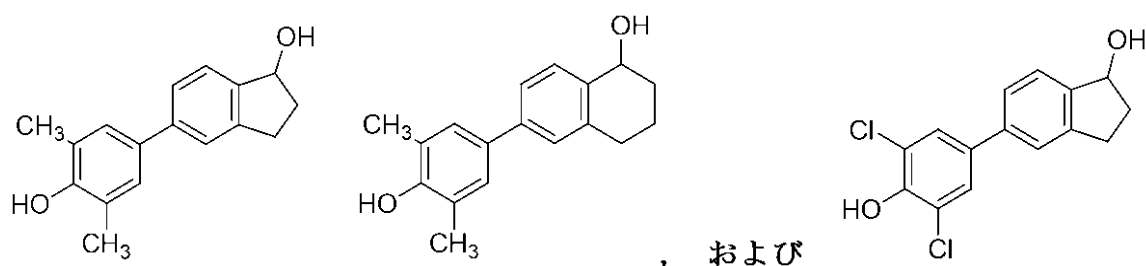
ある実施形態において、 m は0である。ある実施形態において、 n は1である。実施形態において、 n は2である。

上記において同定された好ましい置換基の組合せおよび置換は、明示的に考慮される。

【0034】

一態様において、本開示は、下記からなる群から選択される化合物を提供する：

【化11】



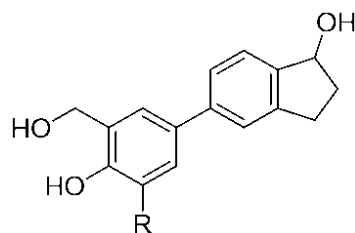
10

20

【0035】

一態様において、本開示は、下記式の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化12】



(ii)

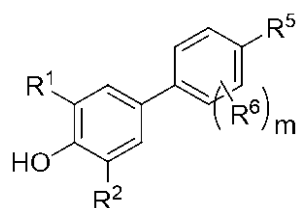
(式中、

R は、Hまたはメチルである)。

【0036】

別の態様において、本開示は、下記式の化合物およびその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化13】



(iii)

(式中、

m は、0~3の整数であり；

R_1 および R_2 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、アミノ、-

30

40

50

S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；

R₅はH、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルキルであり；

R₆は、各々独立して、H、ヒドロキシ、ハロまたはC₁₋₄アルキルである)。

【0037】

ある実施形態において、上記C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシは、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよびC₁₋₄アルコキシの1つ以上で置換されている。適切には、その置換基はヒドロキシである。

ある実施形態において、R₁およびR₂の少なくとも1つはC₁₋₄アルキルである。ある実施形態において、R₁およびR₂は両方ともC₁₋₄アルキルである。実施形態において、R₁およびR₂の少なくとも1つはメチルである。実施形態において、R₁およびR₂の両方はメチルである。ある実施形態において、R₁およびR₂の少なくとも1つはハロゲンであり、好ましくは塩素である。

ある実施形態において、R₅はヒドロキシである。ある実施形態において、R₅はC₁₋₄アルキルである。適切には、R₅は置換C₁₋₄アルキルである。ある実施形態において、R₅は、-C(H)(OH)(CH₃)である。

ある実施形態において、R₆はC₁₋₄アルキルである。好適には、R₆は置換C₁₋₄アルキルである。ある実施形態において、R₆は-CH₂OHである。

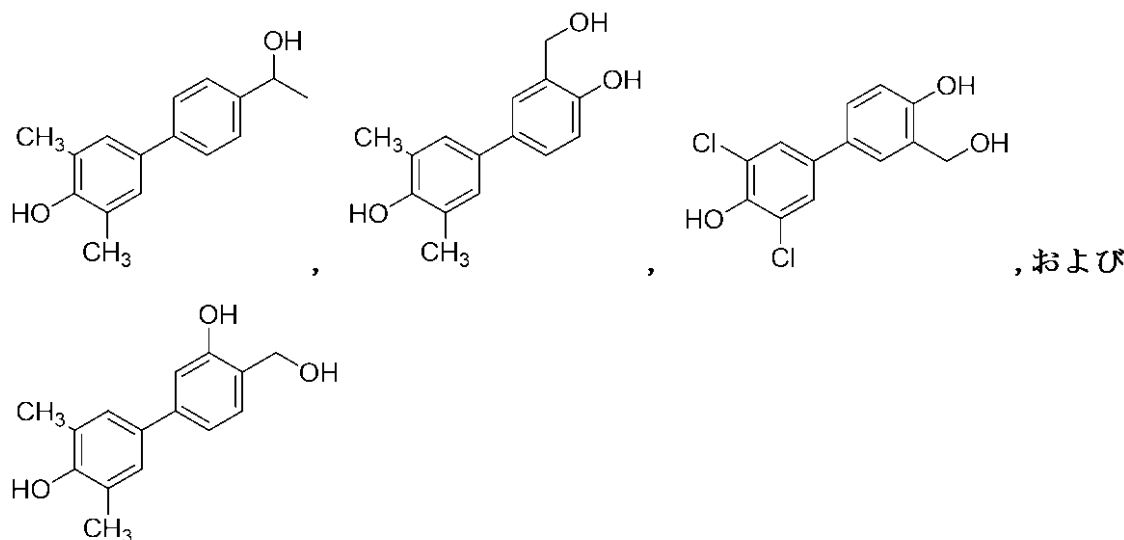
ある実施形態において、mは1である。

上記で特定される好ましい置換基の組合せおよび置換は、明示的に考慮される。

【0038】

一態様において、本開示は、下記からなる群から選択される化合物を提供する：

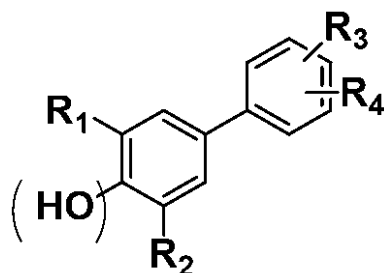
【化14】



【0039】

別の態様において、本開示は、下記式を有する化合物を提供する：

【化15】



(iv)

(式中、

10

20

30

40

50

R_1 および R_2 は、H、 C_{1-4} アルキル基、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アルキルオキシアルキル、シクロアルキルオキシアルキル、アルキルチオ、アルキルチオアルキル、シクロアルキルチオアルキル、 $R'R''N$ -アルキル(R' および R'' は独立してアルキル、アルキルカルボニルまたは環状アルキルである)から選択され、括弧は、ヒドロキシルの有無を表し、

R_3 および R_4 は、独立して、H、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、ヒドロキシ- C_{1-4} アルキル、シアノ、シアノアルキル、ニトロ、ニトロアルキル、 $-C(O)$ -アリール、 $-C(O)H$ 、アルキルアルデヒド、カルボキシルおよびカルボキシアルキルから選択されるか、または

R_3 および R_4 は、4員~8員原子の環を形成し、その環はシアノまたはヒドロキシで置換されている)。

10

【0040】

ある実施形態において、 C_{1-4} アルキルまたは C_{1-4} アルコキシは、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよび C_{1-4} アルコキシの1つ以上で置換されている。適切には、その置換基はヒドロキシである。

ある実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つは C_{1-4} アルキルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 は両方とも C_{1-4} アルキルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つはメチルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 の両方はメチルである。ある実施形態において、 R_1 および R_2 の少なくとも1つはハロゲンであり、好ましくは塩素である。

ある実施形態において、 R_3 はヒドロキシである。ある実施形態において、 R_3 は C_{1-4} アルキルである。好適には、 R_3 は置換 C_{1-4} アルキルである。ある実施形態において、 R_3 は $-CH(OH)(CH_3)$ である。

20

ある実施形態において、 R_4 は C_{1-4} アルキルである。好適には、 R_4 は置換 C_{1-4} アルキルである。実施形態において、 R_4 は $-CH_2OH$ である。

ある実施形態において、 R_3 および R_4 は、5員または6員環を形成する。

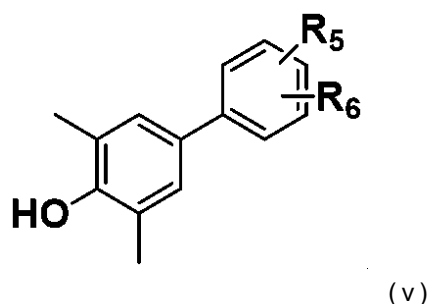
上記で特定された好ましい置換基の組合せおよび置換は、明示的に考慮される。

【0041】

一態様において、本開示は、下記式を有する化合物を提供する：

【化16】

30



(式中、

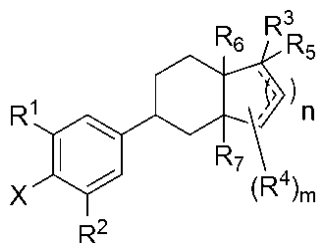
R_5 および R_6 は、独立して、ヒドロキシル、シアノ、ヒドロキシルアルキル、シアノアルキル、ハロゲン化ヒドロキシルアルキル、およびハロゲン化シアノアルキルから選択される)。

40

【0042】

別の態様において、本開示は、下記式の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化 1 7】



(vi)

(式中、

nは、0～4の整数であり；

mは、0～4の整数であり；

Xは、H、ヒドロキシまたはC₁₋₄アルコキシであり；R₁およびR₂は、独立して、H、ヒドロキシ、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アミノ、-S-C₁₋₄アルキルまたはハロであり；R₃は、H、ヒドロキシ、オキソ、シアノ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；R₄は、各々独立して、水素、ヒドロキシ、オキソ、ハロ、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシであり；R₅は、H、アルキニルであるか、または二重結合が存在する場合には存在せず；R₆およびR₇は、独立して、C₁₋₄アルキルおよびHから選択され；

---は、二重結合であってもよい)。

10

20

【0043】

ある実施形態において、R₃は、H、OH、オキソ、クロロ、シアノまたはメトキシである。適切には、R₃はヒドロキシルである。

ある実施形態において、R₁およびR₂の少なくとも1つはC₁₋₄アルキルである。ある実施形態において、R₁およびR₂は両方ともC₁₋₄アルキルである。実施形態において、R₁およびR₂の少なくとも1つはメチルである。実施形態において、R₁およびR₂の両方はメチルである。実施形態において、R₁およびR₂は、独立して、H、メチル、エチル、クロロ、-CH₂OHおよび-CH₂OMeから選択される。

30

ある実施形態において、C₁₋₄アルキルまたはC₁₋₄アルコキシは、ハロ、シアノ、アミノ、ヒドロキシおよびC₁₋₄アルコキシの1つ以上で任意に置換されていてもよい。適切には、その置換基はヒドロキシである。

ある実施形態において、R₄は、フルオロ、クロロ、ブロモ、メトキシ、ヒドロキシまたはオキソから選択される。

ある実施形態において、R₅は、Hである。ある実施形態において、R₅は、-CCHである。

ある実施形態において、R₆はメチルである。ある実施形態において、R₇はHである。

ある実施形態において、mは0である。ある実施形態において、nは1である。ある実施形態において、nは2である。

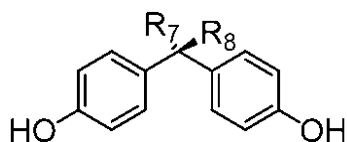
上記で特定された好ましい置換基の組合せおよび置換は、明示的に考慮される。

40

【0044】

別の態様において、本開示は、下記式の化合物ならびにその立体異性体および医薬的に許容される塩を提供する：

【化 1 8】



(vi)

(式中、

50

R_7 および R_8 は、独立して、H、 C_{1-5} アルキル、アミノ、ヒドロキシル、シアノ、アミド、環状 C_{3-8} アルキル、およびヘテロシクリルである)。

【0045】

実施形態において、 R_7 および R_8 は、 C_{1-4} アルキルアミノカルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルアミノ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルアミノ- C_{1-4} アルキル-アミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルオキシ- C_{1-4} アルキルアミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルキルチオ- C_{1-4} アルキルアミノ-カルボキシ- C_{1-4} アルキル、または C_{1-4} アルキルチオ- C_{1-4} アルキルから選択される。

実施形態において、 R_7 はメチルである。

実施形態において、 R_8 は置換 C_{1-5} アルキルである。適切には、 R_8 は、 $-C(O)-R$ 、 $-C(O)NR_{N1}R_{N2}$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-NR_{N1}C(O)R$ または $-OC(O)R$ で置換され、 R_{N1} 、 R_{N2} および R は、独立して、Hまたは C_{1-4} アルキルから選択されている。実施形態において、 R_{N1} 、 R_{N2} または R の少なくとも1つは $-(CH_2)_n-R_{10}$ であり、 n は2~5の整数であり、 R_{10} は $-C(O)-R$ 、 $-C(O)NR_{N1}R_{N2}$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-NR_{N1}C(O)R$ または $-OC(O)R$ であり、 R_{N1} 、 R_{N2} および R は、独立して、H、アリール、シクロアルキル、またはOHまたはアミノで置換されていてもよい C_{1-4} アルキルから選択される。

10

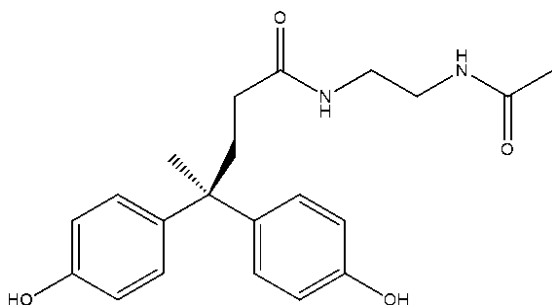
上記で特定された好ましい置換基の組合せおよび置換が明示的に考慮される。

【0046】

一態様において、本開示は、下記式を有する化合物を提供する：

【化19】

20

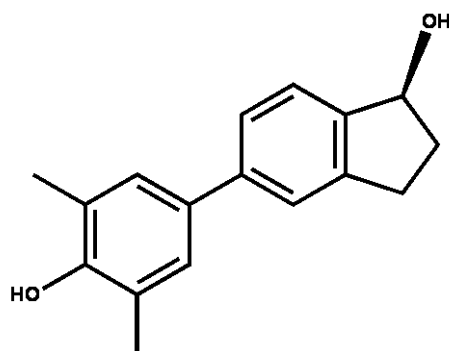
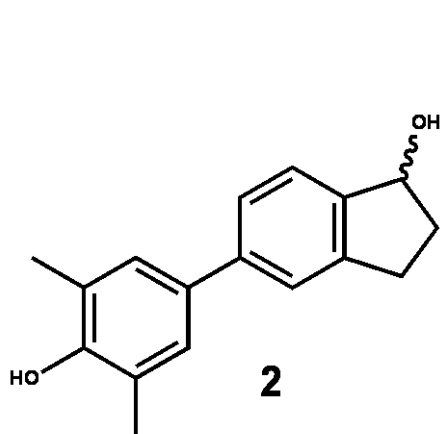


【0047】

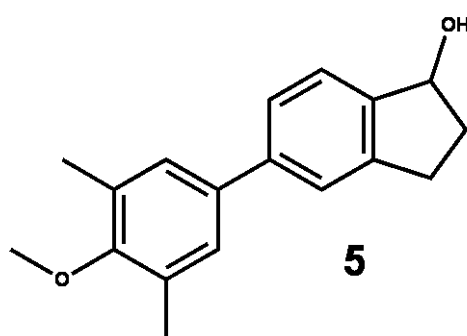
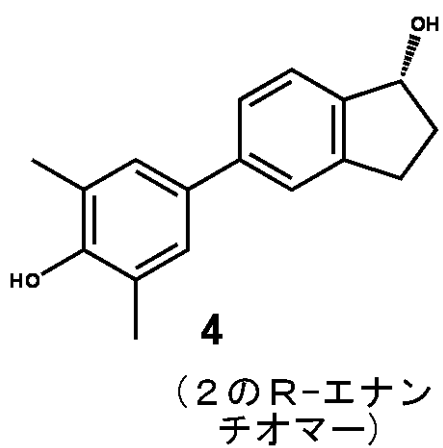
別の態様において、本開示は、下記からなる群から選択される化合物を提供する：

30

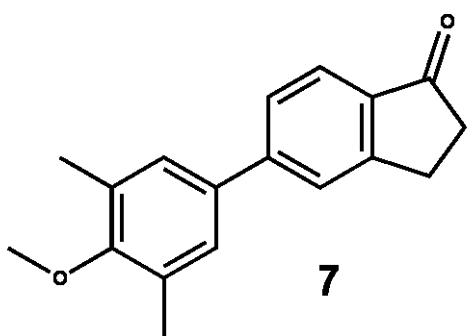
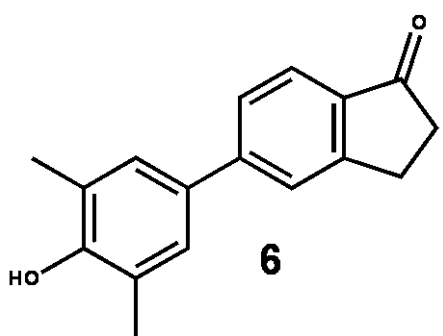
【化 20】



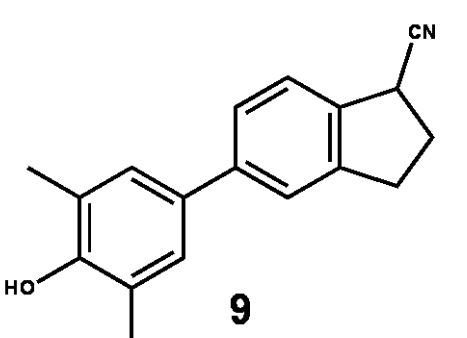
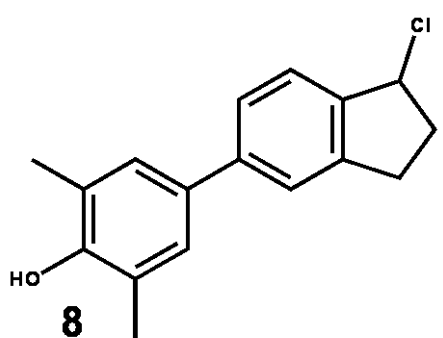
10



20

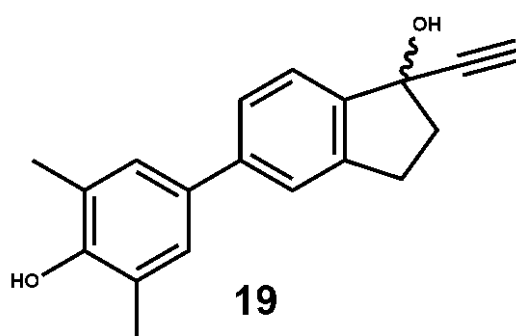
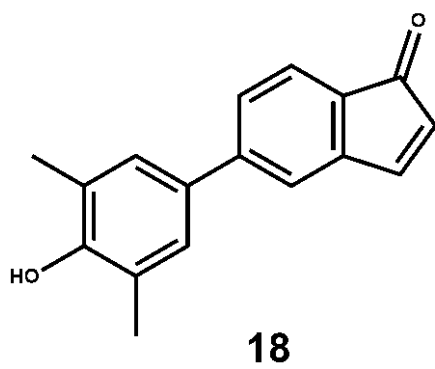
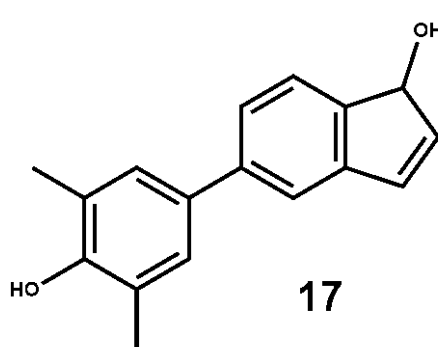
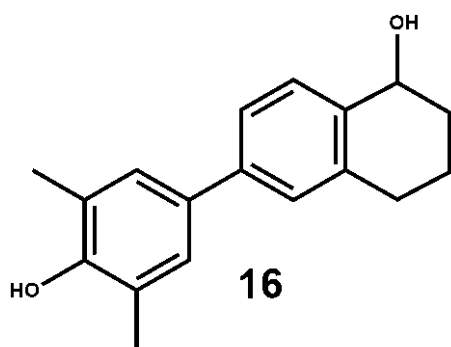
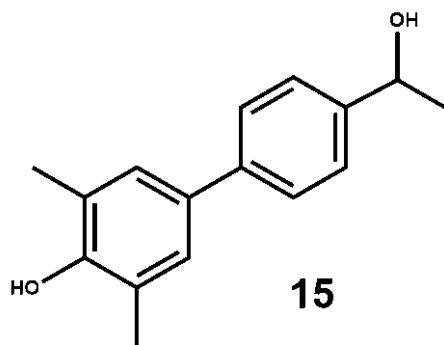
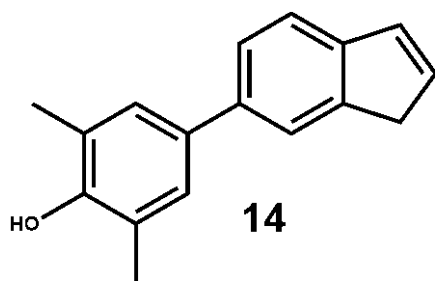
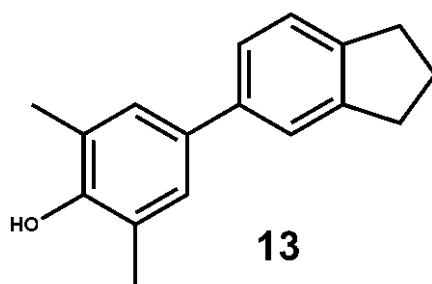
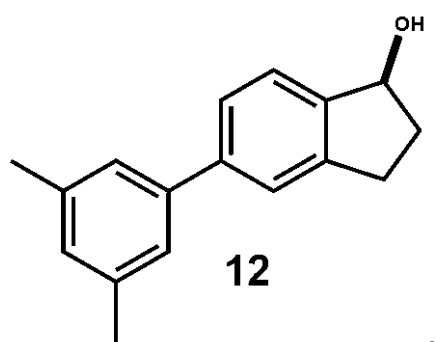
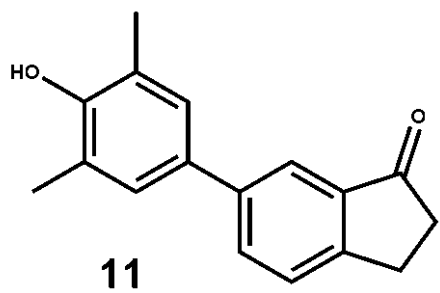
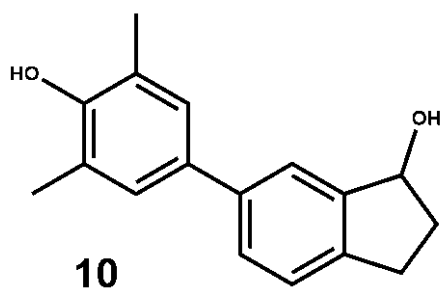


30



40

【化 2 1】



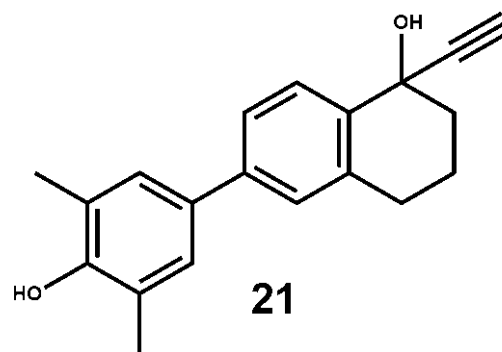
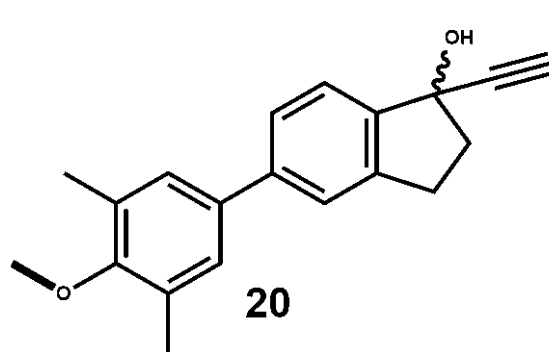
10

20

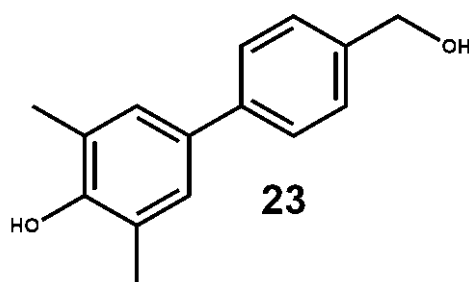
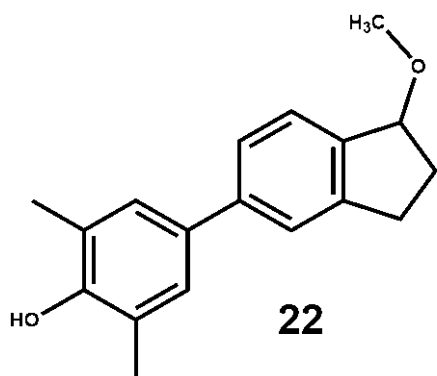
30

40

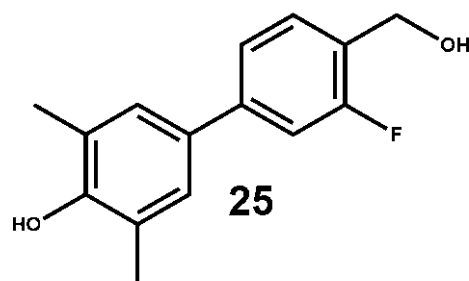
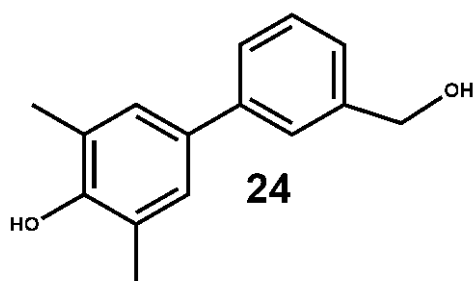
【化 2 2】



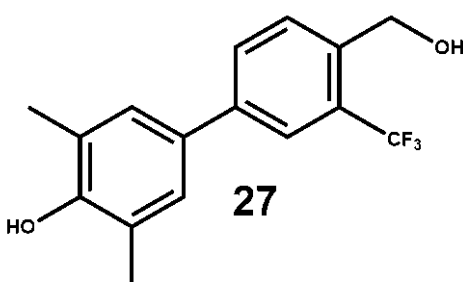
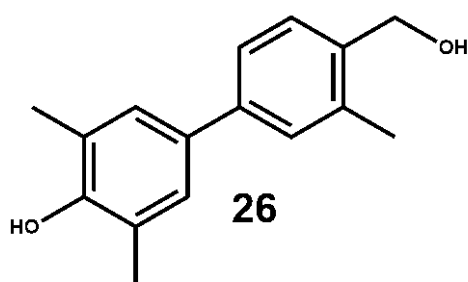
10



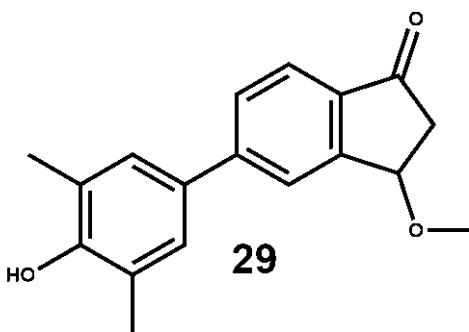
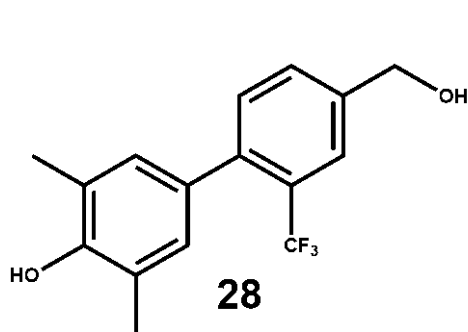
20



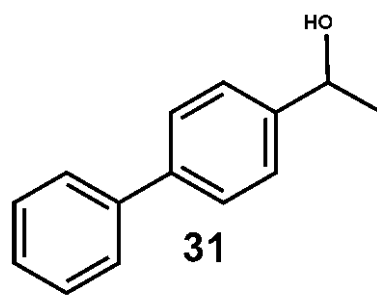
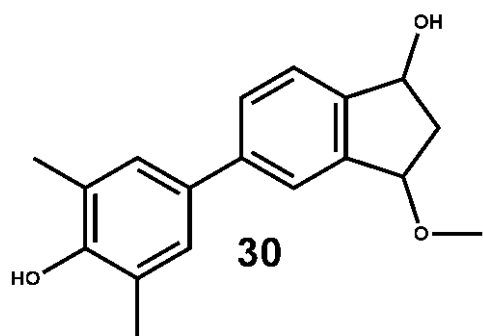
30



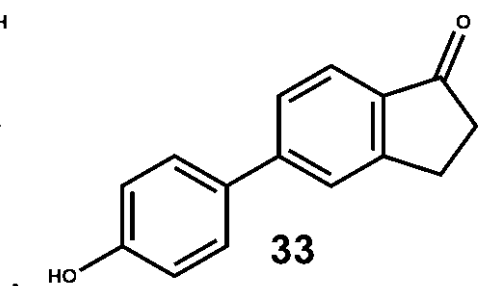
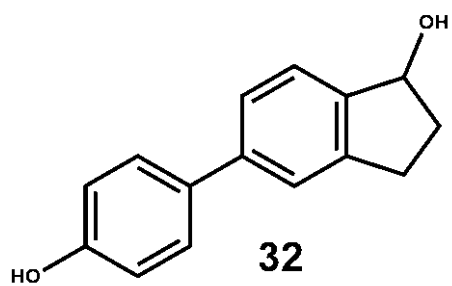
40



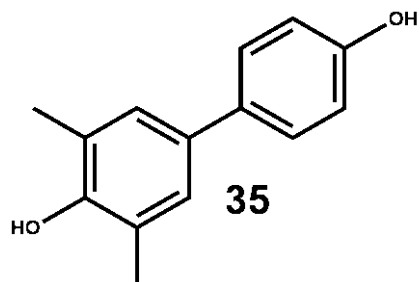
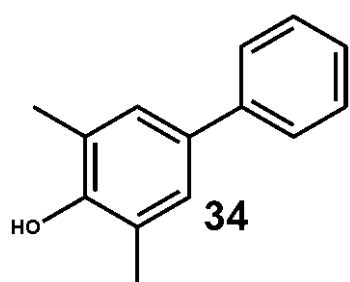
【化 2 3】



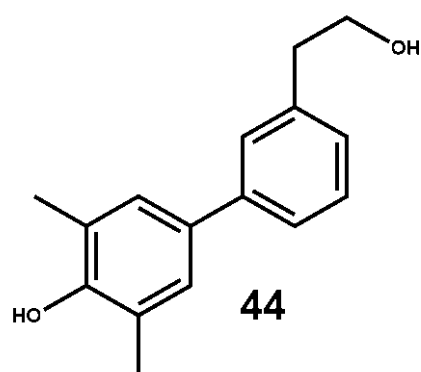
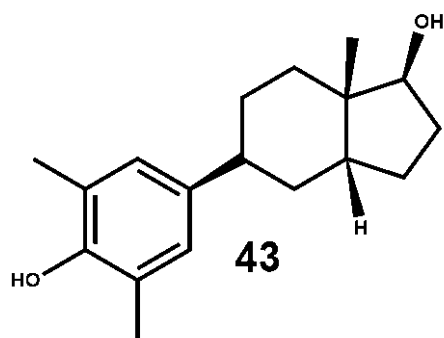
10



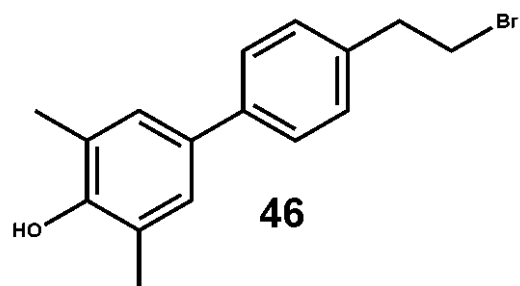
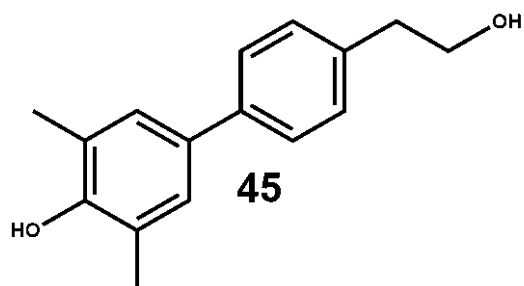
20



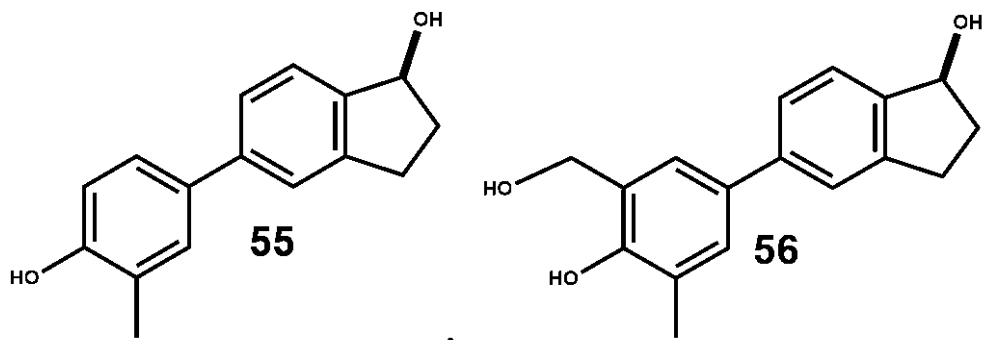
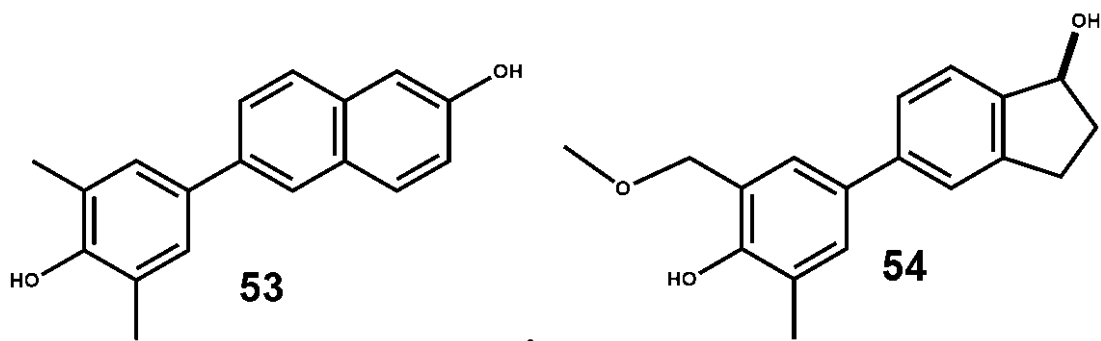
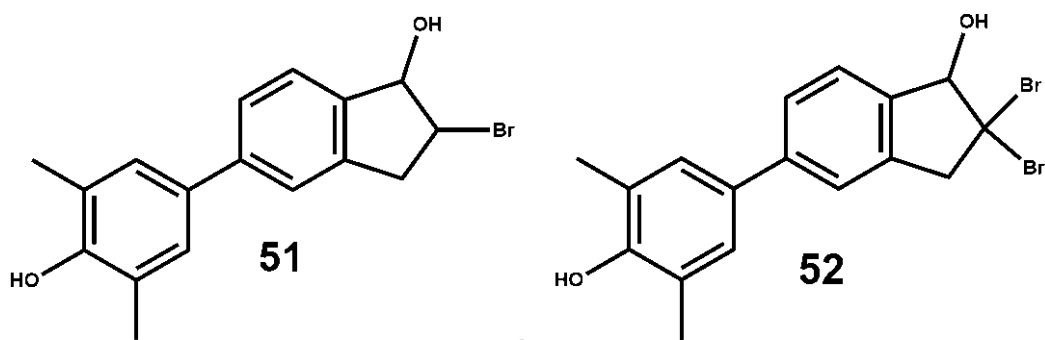
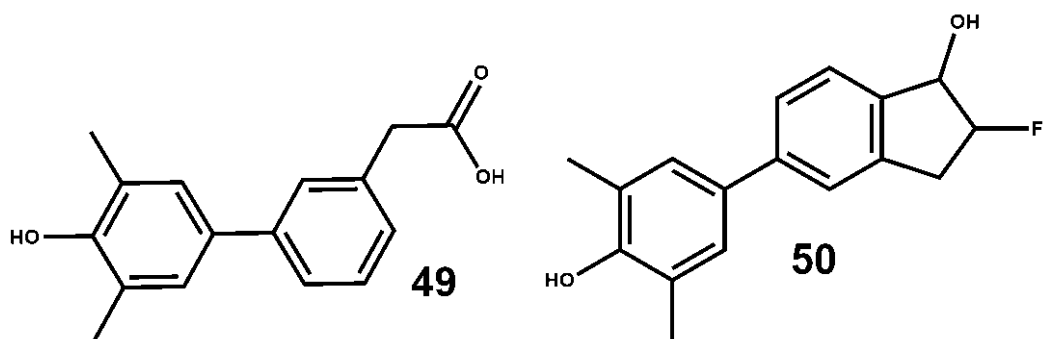
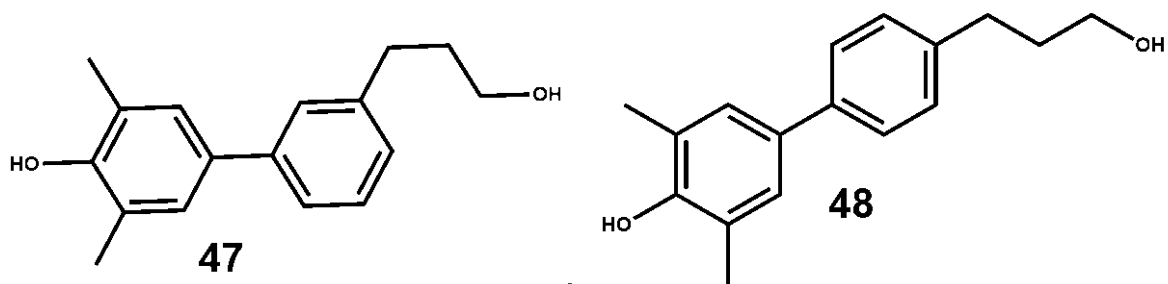
30



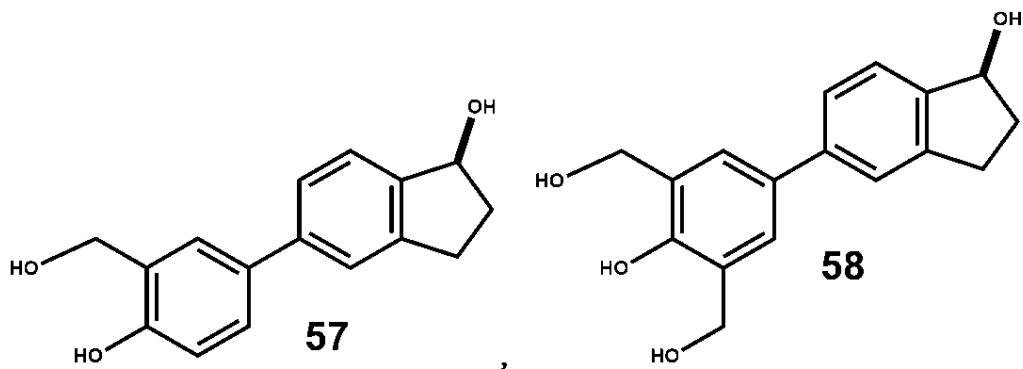
40



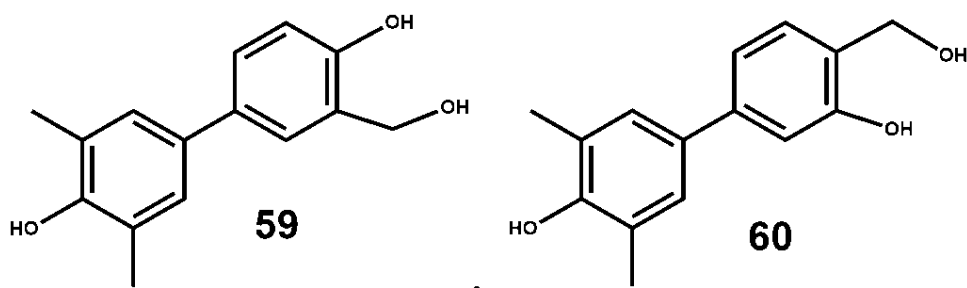
【化 2 4】



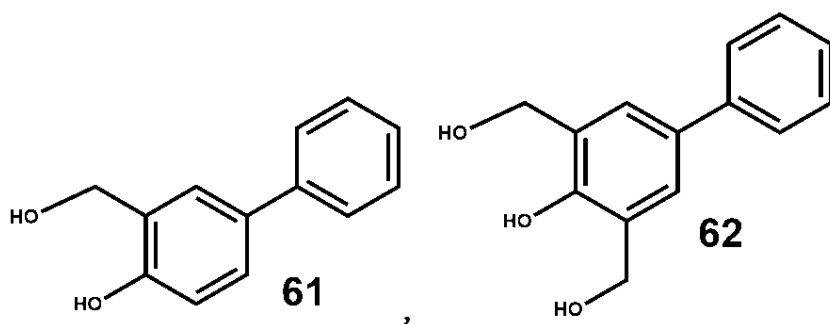
【化 2 5】



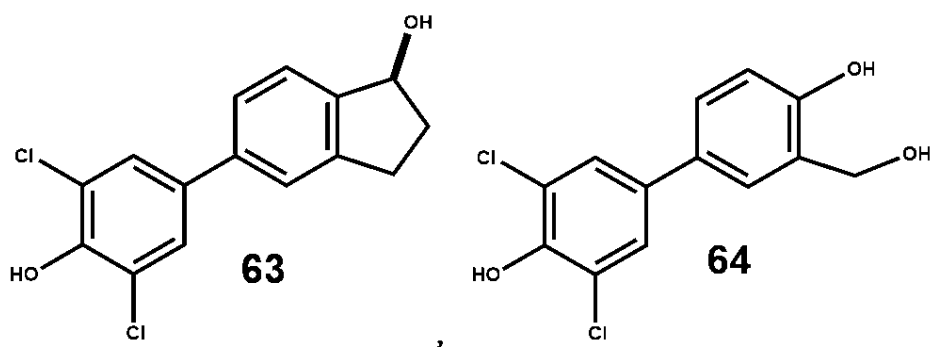
10



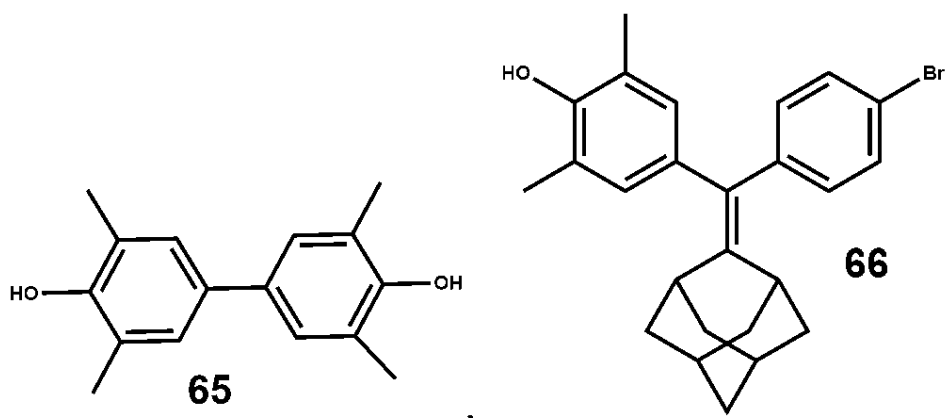
20



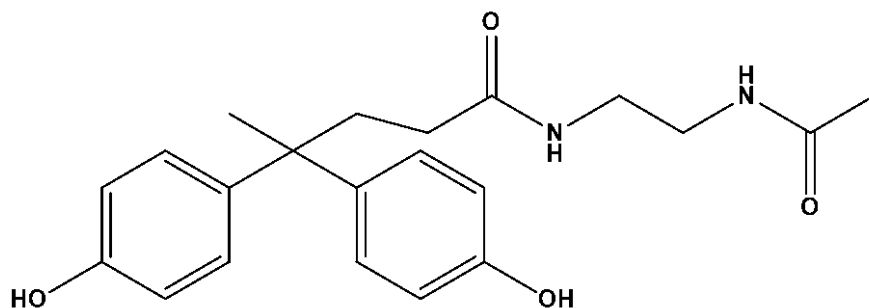
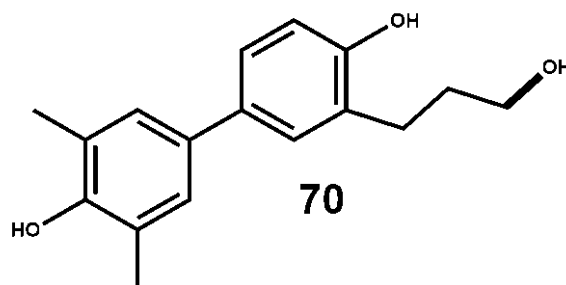
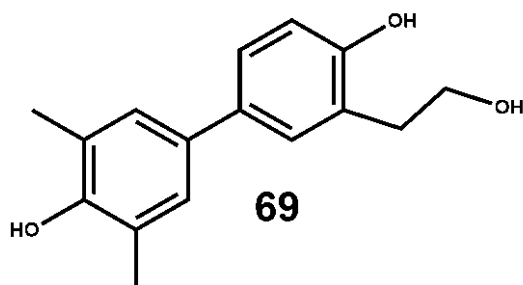
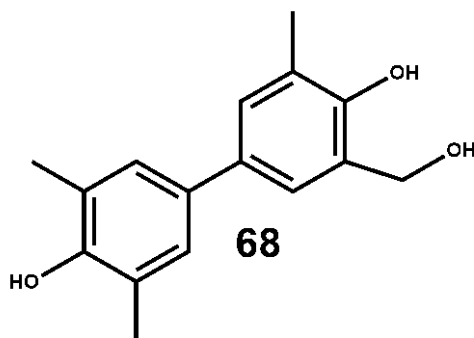
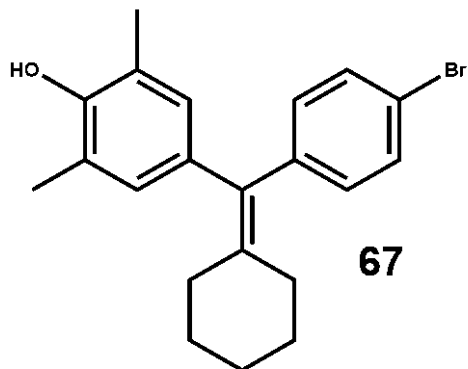
30



40



【化 2 6】



【0048】

本明細書に示される化合物は、1つ以上の立体中心を有することができ、各中心は、RまたはS立体配置で存在し得る。本明細書に示される化合物には、すべてのジアステレオマー、エナンチオマーおよびエピマー形態ならびにそれらの適切な混合物が含まれる。個々の立体異性体は、所望であれば、例えば、キラルクロマトグラフィーカラムによる立体異性体の分離のような当該技術において公知の方法によって得ることができる。

本開示の化合物の式において、可変または未定義の置換位置および立体化学は、「太字のくさび形結合」または「破線のくさび形結合」の代わりに「環系を通る線」、「くねくねした結合」または「直線結合」のような一般的な化学構造描写規則を使用して示され、慣例によると指定平面（「太字のくさび形結合」）から出てくるか、または指示された平面から離れる置換基（「破線のくさび形結合」）を示している。

本開示に従う化合物では、基およびその置換基は、原子および置換基の許容される原子価に従って選択することができ、その結果、選択および置換は、安定した化合物をもたらす、例えば、転位、環化、脱離などによって自発的に変換を受けない。

本開示に従う化合物には、1つ以上の同位体的濃縮原子の存在のみが異なる化合物が含まれる。例えば、化合物は、重水素またはトリチウムによる水素の置換、または¹³C-または¹⁴C-濃縮炭素による炭素の置換を除いて、本発明の構造を有し得る。

【0049】

本開示に従う化合物は、塩、例えば、医薬的に許容される塩の形態であり得る。「医薬的に許容される塩」という用語には、化合物に見られる特定の置換基に応じて、比較的非毒性の酸または塩基で調製される活性化合物の塩が含まれる。本発明の化合物の適切な医薬的に許容される塩には、例えば、本発明に従う化合物の溶液を、塩酸、硫酸、メタンス

ルホン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酢酸、安息香酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸、炭酸またはリン酸のような医薬的に許容される酸の溶液と混合することによって形成され得る酸付加塩が含まれる。さらに、本発明の化合物が酸性部分を有する場合、その適切な医薬的に許容される塩としては、アルカリ金属塩、例えばナトリウムまたはカリウム塩、アルカリ土類金属塩、例えばカルシウムまたはマグネシウム塩；および適切な有機リガンド、例えば第四級アンモニウム塩と形成される塩が挙げられる。

中性形態の化合物は、塩を塩基または酸と接触させ、親化合物を従来の方法で単離することによって再生することができる。化合物の親形態は、極性溶媒への溶解性のような特定の物理的性質において種々の塩形態とは異なるが、そうでなければ塩は本開示のための化合物の親形態と同等である。

【0050】

様々な医薬的に許容される塩は、当技術分野において周知であり、Berge S, et al., 「Pharmaceutical salts」, J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977)やHaynes D, et al., 「Occurrence of pharmaceutically acceptable anions and cations in the Cambridge Structural Database」, J. Pharm. Sci. 94:2111-2120 (2005)に開示されているもののような本化合物と使用されていてもよく、この各々は、その全体で示されているかのように本明細書に援用されている。例えば、FDA認可の商業的に市場に出された塩のリストとしては、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、酒石酸塩、臭化物、エデト酸カルシウム、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クエン酸塩、二塩酸塩、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセブテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨウ化物、イソチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、臭化メチル、硝酸メチル、硫酸メチル、ムチン酸塩、ナブシル酸塩、ミトラート、パモ酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクレートおよびトリエチオジドが挙げられる。

塩形態に加えて、本発明は、また、プロドラッグ形態である本開示に従う化合物を提供することができる。上記化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学変化を受けて化合物を提供する化合物である。プロドラッグは、生体外環境において化学的または生化学的方法によって本発明の化合物に変換することができる。例えば、プロドラッグは、適切な酵素または化学試薬を用いて経皮パッチリザーバーに入れたときに本発明の化合物にゆっくりと変換することができる。

【0051】

本開示に従う化合物は、例えば、本明細書に記載の立体異性体の鏡像異性的に濃縮された異性体であり得る。本明細書で使用されるエナンチオマーは、分子構造が互いに対して鏡像関係を有する一対の化合物のいずれかを意味する。例えば、化合物は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%のエナンチオマー過剰率を有することができる。

本開示に従う化合物の調製物は、選択された立体中心に対応する、選択された立体化学、例えばRまたはSを有する上記化合物の異性体を濃縮することができる。例えば、上記化合物は、選択された立体中心の選択された立体化学を少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%有する化合物に対応する純度を有し得る。化合物は、例えば、選択された立体中心で選択された立体化学、例えばRまたはSを有する1つまたは複数の構造が濃縮された本明細書に開示された化合物の調製物を含めることができる。

いくつかの実施形態において、本開示に従う化合物の調製物は、上記化合物のジアステレオマーである異性体(対象異性体)について濃縮されてもよい。本明細書で使用するジアステレオマーは、同じ化合物の別の立体異性体の鏡像ではない2つ以上のキラル中心を有

10

20

30

40

50

する化合物の立体異性体を意味する。例えば、上記化合物は、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の選択されたジアステレオマーを有する化合物に対応する純度を有することができる。

【0052】

化合物中の所定の立体中心における立体配置の特定の指示がなされていない場合、立体配置のいずれか1つまたは立体配置の混合物が意図される。

化合物は、立体特異的合成または分割によって、ラセミ形態または個々のエナンチオマーまたはジアステレオマーとして調製することができる。上記化合物は、例えば、光学活性塩基との塩形成による立体異性体対の形成、その後の分別結晶化および遊離酸の再生などの標準的な技術によって、それらの成分のエナンチオマーまたはジアステレオマーに分割することができる。上記化合物は、立体異性体エステルまたはアミドの形成、続いてのクロマトグラフィー分離およびキラル補助剤の除去によっても分解することができる。あるいは、キラルHPLCカラムを使用して上記化合物を分割することができる。また、エナンチオマーはリパーゼ酵素を使用した対応するエステルのラセミ体の速度論的分割から得ることができる。

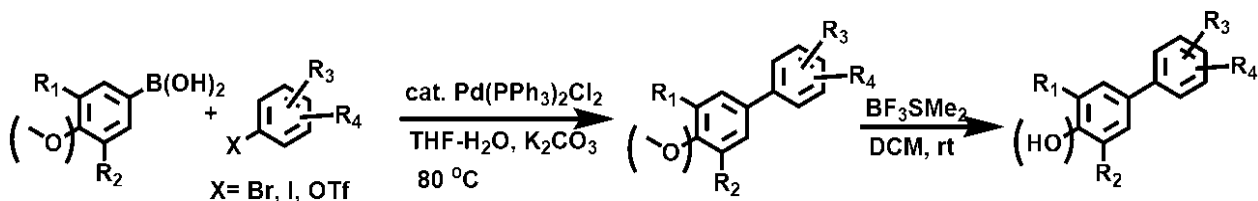
また、本開示に従う化合物は選択的な生物学的特性を高めるために適切な官能基を付加することによって変性することもできる。そのような変性には、当技術において公知であり、所定の生物学的系(例えば、血液、リンパ系、中枢神経系)への生物学的浸透を増加させ、経口利用可能性を高め、注射による投与を可能にする溶解性を高め、代謝を変えかつ/または排泄率を変化させるものが含まれる。これらの変性の例には、ポリエチレングリコールによるエステル化、ピバレートまたは脂肪酸置換基による誘導体化、カルバメートへの変換、芳香族環のヒドロキシル化、および芳香族環におけるヘテロ原子置換が含まれるが、これらに限定されない。

【0053】

化合物の合成

これらの化合物の多くを合成するための一般的経路を下記に示す：

【化27】



本明細書中の式の化合物を合成する方法は、当業者には明らかであろう。上記化合物の合成に有用な合成化学変換および保護基方法(保護および脱保護)は、当該技術において公知であり、例えば、R.Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W.Greene and P.G.M.Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d.Ed., John Wiley and Sons (1991); L.Fieser and M.Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); L.Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)、およびそれ以降の刊行物に記載されている。

【0054】

化合物の評価

化合物は、受容体リガンド結合動態および平衡解析、コレギュレーター結合アッセイ、核外開始経路に対して核開始経路を介したエストロゲンの選択的作用に関連する受容体および他のタンパク質の細胞内分布免疫組織化学および近接ライゲーションアッセイ；特定の遺伝子のレギュレーションおよび全トランスクリプトーム(RNAシーケンシング、RNA-seq)解析、受容体、キナーゼ、およびクロマチン免疫沈降(ChIP)およびChIP配列決定法を使用するRNAポリメラーゼクロマチン結合調査、ならびに細胞増殖アッセイおよびエストロゲン受容体のリガンドが標的細胞内で働く経路をさらに規定するシグナル形質導入経路解

析を含める細胞活性調査；子宮質量評価および生殖組織に対して刺激性であるかまたは刺激性でなく、ヒト乳癌および子宮癌を開始または促進しないであろう化合物を予測することができる乳房組織発生アッセイを含めるインビボアッセイ；動物体重および器官質量調査、およびヒトにおける代謝異常または代謝症候群の防止または発生に関係するであろう異なる食餌制限による動物に対する血中および組織脂質ならびにメタボミクス解析；核および非核エストロゲン受容体作用によって調節されるエストロゲン応答性遺伝子を含む内皮細胞機能の動物におけるアッセイ、内皮修復アッセイおよびヒトにおける血管疾患および代謝性疾患に対する活性を予測する正常および高脂肪食餌による野生型および変異動物におけるアテロームおよび新生内膜発生の抑制が含まれる血管健康のアッセイを含む多くの方法およびアッセイを使用して解析することができる。化合物の効果は、ヒトにおける糖尿病に関連する種々の食事の下での野生型および突然変異動物における代謝健康およびグルコース利用についてアッセイすることができる。化合物は、脳卒中、または心不全もしくは心臓発作のヒト疾患のモデルである強制虚血の条件下で、生体外心臓またはインビボ脳への損傷の抑制についてアッセイすることができる。化合物は、ヒトにおける骨粗鬆症または骨減少症への影響を予測するマウスまたはラットモデルにおいて、エストロゲン条件が低いため、骨密度、強度および構造の保護についてアッセイすることができる。これらの方法のいくつかは、実施例に記載されている。

10

【0055】

使用方法

別の態様において、対象において疾患または状態を治療する方法であって、本明細書の請求項のいずれかに記載の少なくとも1つの化合物の医薬的に有効な量を投与することを含む、上記方法が提供される。

20

別の態様において、対象における疾患または状態を改善する方法であって、本明細書の請求項のいずれかに記載の少なくとも1つの化合物の医薬的に有効な量を投与することを含む、上記方法が提供される。

別の態様において、対象における疾患または状態の進行を予防または遅延させる方法であって、本明細書の請求項のいずれかに記載の少なくとも1つの化合物の医薬的に有効な量を投与することを含む、上記方法が提供される。

ある実施形態において、上記疾患または状態は、エストロゲン受容体の核外開始経路によって影響されている。

30

上記疾患または状態は、例えば、閉経後症状、心血管疾患、脳卒中、血管疾患、骨疾患、代謝性疾患、糖尿病、関節炎、骨粗鬆症、肥満、認知低下、血管運動/ほてりおよび癌から選択される。

実施形態において、上記疾患は脳卒中である。実施形態において、上記疾患は代謝性疾患である。実施形態において、上記疾患は糖尿病である。実施形態において、上記疾患は、乳癌などの癌である。実施形態において、上記乳癌は、エストロゲン応答性乳癌または肥満関連乳癌である。実施形態において、上記疾患は血管疾患である。実施形態において、上記疾患は骨粗鬆症である。

【0056】

組成物および投与経路

40

また、本開示は、本開示に従う化合物および医薬的に許容される賦形剤を含む上記医薬組成物を提供する。

本開示の医薬組成物は、非限定例として、経口、経皮、皮下、静脈内、筋肉内および鼻腔内を含める様々な経路によって投与することができる。意図する送達経路に応じて、上記医薬組成物は、好ましくは、注射用組成物または経口組成物として、または経皮投与のための軟膏剤として、ローション剤としてまたはパッチ剤として製剤化される。

経口投与のための上記組成物は、バルク液体溶液または懸濁液、またはバルク粉末の形態を取ることができる。しかしながら、より一般的には、上記組成物は、正確な投与を容易にするための単位剤形で提供される。本明細書で使用される「単位剤形」は、適切な医薬的賦形剤と関連して、各々の単位が所望の治療効果を生じるように計算された所定量の

50

活性物質を含有する、ヒト対象および他の哺乳動物のための単位用量として適切な物理的に別個の単位を意味する。典型的な単位剤形には、液体組成物の予め充填された予め測定されたアンプルまたはシリンジまたは固体組成物の場合は丸剤、錠剤、カプセル剤などが含まれる。そのような組成物において、併用治療は、通常、少量成分(約0.1質量%～約50質量%、好ましくは約1質量%～約40質量%)であり、残りは所望の投与形態を形成するのに役立つ様々な賦形剤または担体および加工助剤である。

【0057】

経口投与に適した液体形態には、緩衝剤、懸濁剤や分配剤、着色剤、香味剤などを有する適切な水性または非水性賦形剤が含まれ得る。固体形態には、例えば、下記の成分のいずれか、または同様の性質の化合物が含まれ得る：ミクロクリスタリンセルロース、トラガントガムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースのような賦形剤、アルギン酸、Primogelまたはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤；スクロースまたはサッカリンのような甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバーのような香味剤。

注射用組成物は、典型的には、注射用滅菌生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水または当該技術において公知の他の注射用担体に基づく。前と同様に、そのような組成物の活性化化合物は、典型的には、少量成分であり、しばしば約0.05質量%～10質量%であり、残りは注射用担体などである。

経皮組成物は、典型的には、活性成分を、一般的には、約0.01質量%～約20質量%、好ましくは約0.1質量%～約20質量%、好ましくは約0.1質量%～約10質量%、より好ましくは約0.5質量%～約15質量%の範囲の量で含有する局所用軟膏またはクリームとして処方される。軟膏として処方される場合、活性成分は、典型的には、パラフィン系または水混和性の軟膏基剤のいずれかと組み合わせられる。あるいは、活性成分は、例えば水中油型クリーム基剤を用いてクリーム中に処方することができる。そのような経皮製剤は、当該技術において周知であり、一般に、有効成分または製剤の皮膚浸透または安定性を高めるための追加の成分を含める。このような既知の経皮製剤および成分はすべて、本発明の範囲内に包含される。

【0058】

上記医薬組成物は、経皮デバイスによって投与することもできる。したがって、経皮投与は、リザーバーまたは多孔質膜タイプのパッチ、または固体マトリックスの種類のパッチを使用して達成することができる。

経口投与用、注射用または局所投与用の組成物のための上記の成分は、単に代表的なものである。他の材料および加工技術などは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985, Mack Publishing Company, Easton, PennsylvaniaのPart 8に記載されている。

また、上記医薬組成物は、徐放性形態または徐放性薬剤送達系で投与することもできる。代表的な徐放性材料の説明は、上記のRemington's Pharmaceutical Sciencesに見ることができる。

一態様において、開示された化合物または他の薬剤が有用性を有する疾患または状態のリスクの治療、予防、制御、改善または低減において、開示された化合物を1つ以上の他の薬剤と組合せて使用することができ、ここで、上記薬剤の組合せは、いずれかの薬剤単独よりも安全であるかまたはより有効である。そのような他の薬剤は、そのために一般に使用される経路および量で、本開示の化合物と同時にまたは順次投与されることができる。本開示の化合物が1つ以上の他の薬剤と同時に使用される場合、そのような他の薬剤および開示された化合物を含有する単位投与形態の医薬組成物が好ましい。しかしながら、併用治療は、開示された化合物および1つ以上の他の薬剤が異なる重複スケジュールで投与される治療も含め得る。1つ以上の他の活性成分と組合せて使用する場合、開示される化合物および他の活性成分は、それぞれが単独で使用される場合よりも低い用量で使用され得ることも企図される。

したがって、上記医薬組成物には、本開示の化合物に加えて、1つ以上の他の活性成分を含有するものが含まれる。

【0059】

上記の組合せには、1つの他の活性化合物だけでなく2つ以上の他の活性化合物との開示化合物の組合せが含まれる。同様に、開示化合物は、開示化合物が有用である疾患または状態のリスクの予防、治療、制御、改善または低減において使用される他の薬剤と組合せて使用することができる。このような他の薬剤は、本開示の化合物と同時にまたは順次、そのために一般的に使用される経路および量で投与することができる。本開示の化合物が1つ以上の他の薬剤と同時に使用される場合、開示化合物に加えてこのような他の薬剤を含む医薬組成物が好ましい。したがって、上記医薬組成物には、本開示の化合物に加えて、1つ以上の他の活性成分も含むものが含まれる。

10

開示化合物と第2の有効成分との質量比は変更することができ、各成分の有効用量に依存する。一般に、それぞれの有効量が使用される。したがって、例えば、本開示の化合物が別の薬剤と組合せられる場合、開示化合物と他の薬剤との質量比は、一般に、約1000:1 ~ 約1:1000、好ましくは約200:1 ~ 約1:200の範囲である。本開示の化合物と他の活性成分との組合せは、一般に、上記の範囲内であるが、いずれの場合も、各有効成分の有効量を使用すべきである。

このような組合せにおいて、開示化合物および他の活性薬剤は、別々にまたは一緒に投与され得る。さらに、1つの要素の投与は、他の薬剤の投与の前、同時、またはその後にすることができる。

20

したがって、開示された化合物は、単独で、または開示化合物の効力、安全性、利便性を増加させるか、または望ましくない副作用または毒性を低減する受容体または酵素に影響を与える対象徴候または他の薬剤において有益であることが知られている他の薬剤と組合せて使用することができる。対象化合物および他の薬剤は、同時治療または固定された組合せのいずれかで同時投与することができる。

【0060】

下記の製剤例は、本発明にしたがって調製することができる代表的な医薬組成物を例示する。しかしながら、本発明は、下記の医薬組成物に限定されるものではない。

製剤1 - 錠剤：医薬組成物は、乾燥粉末として乾燥ゼラチン結合剤と約1:2の質量比で混合することができる。少量のステアリン酸マグネシウムは滑沢剤として添加される。この混合物を錠剤プレス機で240 ~ 270mgの錠剤(1錠剤当たり80 ~ 90mgの活性化合物)に形成する。

30

製剤2 - カプセル剤：医薬組成物は、乾燥粉末としてデンプン希釈剤と約1:1の質量比で混合することができる。この混合物を250mgカプセルに充填する(カプセル当たり125mgの活性化合物)。

製剤3 - 液体：医薬組成物(125mg)は、スクロース(1.75g)およびキサンタンガム(4mg)と混合してもよく、得られた混合物を混和し、No.10メッシュU.S.ふるいに通し、水中のミクロクリスタリンセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウム(11:89、50mg)の予め製造した溶液と混合する。安息香酸ナトリウム(10mg)、香味剤および着色剤を水で希釈し、攪拌しながら加える。次いで、十分な水を添加して総量5mLを生成してもよい。

40

製剤4 - 錠剤：医薬組成物は、乾燥粉末として乾燥ゼラチン結合剤と約1:2の質量比で混合してもよい。少量のステアリン酸マグネシウムが滑沢剤として添加される。この混合物を錠剤プレス機で450 ~ 900mgの錠剤(活性化合物150 ~ 300mg)に形成する。

製剤5 - 注射剤：医薬組成物は、緩衝化滅菌生理食塩水注射用水性媒体中に約5mg/mLの濃度に溶解または懸濁させることができる。

製剤6 - 局所用：約75 でステアリルアルコール(250g)および白色ワセリン(250g)を溶解し、次いで水(約370g)に溶解した医薬組成物(50g)、メチルパラベン(0.25g)、プロピルパラベン 0.15g)、ラウリル硫酸ナトリウム(10g)およびプロピレングリコール(120g)の混合物を加えることができ、得られた混合物を凝固するまで攪拌する。

50

下記の非限定実施例は、いくつかの態様および実施形態を純粹に例示することを意図し、本開示に従って実施された特定の実験を示すものである。

【0061】

実施例

材料および方法

細胞培養およびsiRNA処理

MCF-7細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)から得られ、それにより推奨されているように増殖させた。受容体発現はqPCRおよびウエスタンブロッティングによって確認し、エストラジオール(E2)に対する遺伝子発現および増殖応答を定期的にモニタした。E2およびPaPE処理による実験については、使用前に少なくとも5日間、フェノールレッドを含まない組織培養培地中で細胞を維持した。ER ノックダウン実験は、Dharmaconからの4つのsiRNAのSMARTプールを利用し、30 nM siCtrlまたはsiER またはsiGPR30で72時間、記載されたように実施した(Madak-Erdogan et al., Mol Endocrinol 22, 2116-2127, 2008参照)。これにより、対応するmRNAおよびタンパク質のノックダウンが80%を超えた。初代ウシ大動脈内皮細胞を、Chambliss, J Clin Invest 120, 2319-2330, 2010に記載されているように回収し、維持し、使用した。

10

【0062】

動物およびリガンド処理

研究は、C57BL/6バックグラウンドの野生型およびER ノックアウトマウスを使用した。動物を含むすべての実験は、イリノイ大学アーバナシャンペーン校とテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターの承認を受けたプロトコルを用いて、動物の使用とケアのための国立衛生研究所標準に従って行われた。野生型C57BL/6マウスは、Jackson Laboratories/National Cancer Instituteから購入した。ER および野生型同腹仔の完全切除を有するER ノックアウトマウスを、Taconicから入手し、以前にDupont et al., Development, 127, 4277-4291, 2000およびHewitt et al. FASEB J., 24, 4660-4667, 2010に記載されたように使用した。

20

インビボでの代謝パラメータおよび遺伝子発現の研究において、総質量20mgとなるようにコレステロールと混合した化合物を含有するペレットを皮下移植することにより、卵巣摘出レシピエントマウスにリガンドを投与した。研究中は動物を単収容した。3週間の研究では、エストラジオール(E2、Sigma-Aldrich)の投与量(0.125mg/ペレット)を以前の知見に基づいて選択した。頸動脈再内皮化実験では、記載されているように(Chambliss, J Clin Invest 120, 2319-2330, 2010)、化合物を4週間(Model 2006)Alzetミニポンプによって6 µg/日の用量で送達した。卵巣切除術後毎週総体重および食物摂取量をモニタした。EchoMRI-700 Body Composition Analyzer(Echo Medical Systems、テキサス州ヒューストン)を使用して、3週間の終わりに、体脂肪および除脂肪体重の組成をモニタし、生きている動物の縦断的体組成を定量することができた。

30

【0063】

ウエスタンブロット法およびChIPアッセイ

ウエスタンブロット解析は、ER (HC-20、Santa Cruz) ; ERK2(D-2、Santa Cruz) ; およびpS6、pS6K、pmTOR、pRAPTOR、pR1CTOR、pMAPK(細胞シグナル伝達)に対する特異抗体を使用した。共免疫沈降アッセイでは、SRC3(Santa Cruz、C-20)およびER (Santa Cruz、F10)に対する抗体を使用した。

40

ChIPアッセイは、記載されているように行った(Madak-Erdogan et al. Mol Syst Biol 9, 676 2013およびMadak-Erdogan et al., Mol Cell Biol 31, 226-236, 2011)。使用した抗体は、ER (HC20)、ERK2(Santa Cruz, D2 and C14)、およびpSer5 RNA Pol II(Santa Cruz, sc-47701)に対するものであった。ChIP DNAをQIAGEN PCR精製キットを用いて単離し、ChIP-seq解析および定量的リアルタイムPCR(qPCR)に使用した。記載されているように、qPCRを使用して、調査された領域への動員を計算した。

50

【0064】

ChIP-seq解析とクラスタリング

ゲノムワイドChIP-seqについては、ChIP DNAをIllumina Solexa ChIP-seqサンプル処理法に従ってライブラリーに調製し、Illumina HiSeq 2000を使用してシングルリード配列決定を行った。生成した配列をBowtie2によってヒトゲノム(hg18)上に一義的にマッピングした。Madak-Erdogan, Mol Syst Biol 9, 676, 2013に記載されているように、 6.0×10^{-7} のp値カットオフおよび0.01のFDRで豊富なピーク領域(デフォルト設定)を同定するために、MACS(ChIP-Seqのモデルベース解析)を使用した。

クラスタ、すなわち同様の組成特徴を有する座位の群を生成するために、両方向で500bpのウィンドウを用いてseqMINER密度アレイ法を使用した。各クラスタのBEDファイルは、Galaxy Cistrome統合解析ツール(Venn diagram, conservation, CEAS)でさらに解析するために使用された。

10

【0065】

RNA-Seq転写プロファイリング

遺伝子発現解析については、各リガンド処理について3つの生物学的複製物からTrizol試薬を使用して総RNAを抽出し、RNAeasyキット(QIAGEN)を使用してさらに清浄化した。時間経過研究については、MCF-7細胞を、4時間および24時間、Veh(0.1% EtOH)、10nM E2または1 μ M PaPEで処理した。阻害剤研究については、MCF-7細胞をCtrl(0.1% DMSO)、1 μ M PP242または1 μ M AZD6244で30分間前処理し、次いで阻害剤の存在下または非存在下、Veh、10nM E2または1 μ M PaPE-1で4時間処理した。試料の品質および複製の再現性が確認されたら、各群からの2つの試料を配列決定に付した。ライブラリー構築にはヌクレアーゼを含まない水中で100ng/ μ Lの濃度のRNAを使用した。cDNAライブラリーは、mRNA-TruSeqキット(Illumina, Inc.)を用いて調製した。要約すると、ポリA含有mRNAを総RNAから精製し、RNAを断片化し、断片化RNAから二本鎖cDNAを生成し、アダプターを末端に連結した。

20

HiSeq 2000からのペアエンド読取りデータを処理し、一連のステップを介して解析した。Casava 1.8.2を用いて、各レーン内のサンプルのベースコーリングおよび脱多重化を行った。FASTQトリマー(バージョン1.0.0)を使用してFASTQファイルをトリミングした。ophat2(バージョン0.5)を用いて、RefSeqゲノムレファレンスアノテーションと組み合わせて、対になったRNA-Seq読み取りをUCSCゲノムブラウザのヒト(Homo sapiens)レファレンスゲノムのバージョンhg19にマッピングした。BAMファイルからの遺伝子発現値(生の読み取りカウント)は、StrandNGS(バージョン2.1)定量ツールを使用して計算した。部分的な読み取りが考慮され、新規の遺伝子およびエキソンの検出の選択肢が選択された。新規なエキソンおよび遺伝子を見つけるためのデフォルトパラメーターが特定された。デフォルト値を使用するDESeq正規化アルゴリズムが選択された。差次的に発現された遺伝子は、ビヒクル対照と比較して、各処理の各遺伝子についてのBenjaminiおよびHochbergの多重検定補正による倍数変化およびp値によって決定された。倍数変化 > 2 およびp値 < 0.05 を有する遺伝子は、統計学的に有意であり、差別的に発現されたと考えられた。すべてのRNA-Seqデータセットは、GEO受託番号GSE73663の下でNCBIに寄託されている。

30

【0066】

モチーフとGOカテゴリ解析

過度に提示されたGO生物学的プロセスは、ウェブベースのDAVID Bioinformatics Resourcesデータベース、ClueGOおよびウェブベースGREATソフトウェアによって決定された。モチーフ濃縮解析は、Seqposを使用して行った。

40

【0067】

免疫組織化学(IHC)

ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色、および全体のマウント染色を、パラフィン包埋組織切片上で行った。画像は、フィジソフトウェアの3つの無作為に選択されたフィールドからの平均細胞サイズをモニターすることによって定量化した(<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>)。

【0068】

免疫蛍光顕微鏡検査、細胞における近接ライゲーションアッセイおよびデータ解析

50

ビヒクル(0.1%EtOH)、10nM E2または1 μ MPaPE-1で15分間処理した細胞をPBSで洗浄し、ガラスカバースリップ上に固定し、ER (F10、Santa Cruz)に対する抗体、pSer5 RNA Pol II(Santa Cruz、47701)、またはRAPTOR(Cell Signaling)とインキュベートした。翌日、ZhaoZhao et.al., Endocrinology, 154, 1349-1360, 2013に記載されているように、Duolink In Situキット(Olink Bioscience)を使用して、製造業者の説明書にしたがって近接ライゲーションアッセイ(PLA)を行った。簡単に説明すると、一次抗体と一晩のインキュベーションの後、2つのPLAプローブを用いて37℃で1時間ハイブリダイゼーションし、次いで15分間ライゲーションし、37℃で90分間増幅した。カバースリップを各スライドに取り付け、画像取得および解析を行った。サンプルは、Zeiss LSM 700または710レーザー走査共焦点顕微鏡で63 \times /1.4オイルDIC M27対物レンズを使用して画像化した。画像は、PLAシグナルについて488本のAr(10mW)レーザー線を使用した逐次方法で得られた。励振シグナルの表面にじみを防止するために順次走査モードを使用してDAPIおよびPLAシグナルの個々のチャンネルが得られた。レーザー出力、ゲインおよびオフセットはサンプルにわたって一定に保たれ、2/4フレームの平均を有する512 \times 512または1024 \times 1024ピクセルの高解像度フォーマットでスキャンされた。画像のさらなる定量化はFijiソフトウェアを使用した(<http://fiji.se/wiki/index.php/Fiji>)。簡単に説明すると、画像は各チャンネルのセグメント化のために8ビットに変換され、画像はピクセルサイズ100のローリングボール法を使用してバックグラウンド減算され、DAPIチャンネルを使用してセグメント化された。

【0069】

細胞増殖アッセイ

96ウェルプレートに1000細胞/ウェルで細胞を播種した。2日目に、示された濃度で、細胞をVeh、E2またはPaPEで処理し、Madak-Erdogan, Mol Syst Biol 9, 676, 2013に記載されているようにWST-1試薬(Roche)を使用して増殖を評価した。

【0070】

eNOS活性化

以前に報告された方法(Chambliss et.al., J Clin Invest 120, 2319-2330, 2010)を使用して、¹⁴C-L-シトルリンへの¹⁴C-L-アルギニンの15分間にわたる変換を測定することにより、インタクトな初代内皮細胞においてeNOS活性化を評価した。細胞をビヒクル(基底活性を生じる)、E2、またはPaPE単独で、または抗エストロゲンICI 182,780で示した濃度において処理した。

【0071】

頸動脈再内皮化

損傷後72時間のエバンスブルー染料の取り込みを評価することにより、マウスの血管周囲電気損傷後に頸動脈再内皮化を研究した。このモデルにおける損傷後の内皮脱落および回復は、ウィルブランド因子の免疫組織化学によって確認されている。8~9週齢の卵巢摘出の時点で、雌のマウスに、6 μ g/日のE2またはPaPE-1を送達するように調製した腹腔内浸透圧ミニポンプを入れた。頸動脈露出は21日後に行った。選択された研究では、追加の処置にはビヒクルまたはICI 182,680(360 μ g/マウス)の頸動脈損傷の3日前および損傷の日の皮下注射投与が含まれる。研究の終わりに、子宮も採取し、重さを測定した。

【0072】

薬物動態解析

短期間の研究として、卵巢摘出C57BL/6マウスに、100 μ l DMSO中100 μ g PaPE-1を皮下注射した。3匹のマウスを各時点で犠牲にし、400 μ lの血液を腹部大動脈から得た。サンプルを2000gで10分間遠心分離し、血清を回収した。各サンプルの50 μ l部分を解析のためにイリノイ大学のメタボロミクスセンターに提出した。長期間の研究として、卵巢摘出C57BL/6マウスに、8mg PaPE-1および12mgコレステロールで製造したペレットを皮下に埋め込んだ。血液サンプル(30 μ l)を、処置の第3週まで毎週尾を切って集めた。サンプルを2000gで10分間遠心分離し、血清を回収した。血清(10 μ l)を40 μ lのPBSと混合し、解析のためにメタボロミクスセンターに提出した。解析のために、5500QTrapとAgilent 1200 HPLCとを使用した液体クロマトグラフィー - 質量解析法で分析する前に、各試料にPaPE-1(3重

水素原子で標識した)の質量標準を添加した。

【0073】

リガンド解離アッセイ

ER においてC530に結合したフルオレセインの蛍光偏光特性または異方性特性は、結合したリガンドの性質に感受性である。これらの差異を利用して、1つのリガンドの解離および第2のリガンドの会合を検出することができ、リガンド交換の速度は最初に結合したリガンドの解離速度によって制限される。PaPE-1はERに結合したときにE2よりも約20%低い異方性値を与え、OH-TamはERに結合したときにE2よりも80%低い異方性値を与える。したがって、各リガンド対(PaPE-1/E2またはE2/OH-Tam)は異方性の明確な変化をもたらし、最初に結合したリガンドの解離速度をモニタするために使用できる。

C530に1つの活性システインを有するように突然変異したER - リガンド結合ドメイン(LBD)を5-ヨードアセトアミドフルオレセインで部位特異的に標識し、次いでt/g緩衝液(50 mMトリス、10%グリセロール、pH8)とキャリアタンパク質として添加した0.01Mメルカプトエタノールおよび0.03mg/mlのオポアルブミンに希釈して2nMのERを得た。ホモFRETを最小化するために、5倍過剰(10nM)の非標識ER - LBD(10 μ M)を添加し、フルオレセイン標識および非標識ER二量体を室温において暗所で1時間交換し、それにより本質的にただ1つのモノマーがフルオレセイン標識された二量体を生成した。次いで、ERを100nM E2または100nM/RBAのPaPE-1と結合させた；PaPE-1のRBAは0.002%であり；したがって、100nM/RBA = 50 μ MのPaPEを使用した。これらのサンプルを室温において暗所で2.5時間リガンド結合を完了させた。

異方性は、一定の波長条件下でSpex fluorolog IIキュベットベースの蛍光計で測定した。励起は488nmに設定し、マジック角条件下に520nmで発光させ、3から5時点を0時間にした。PaPE-1の解離を開始させるために、300nMのE2をPaPE-1サンプルに加え、解離の時間経過に続いて異方性が変化した。グリセロールの粘度変化のために、室温と5 との間にタンパク質異方性の変化がある；したがって、タンパク質およびキュベットチャンバを5 に予冷するように注意した。

E2の解離を測定するために、300nM E2を、フルオレセイン標識および非標識アポ-ER二量体の予め交換した試料に加え、上記のように2.5時間結合させた。キュベットおよびチャンバを5 に冷却し、ゼロ時点を取った後、5 μ M OH-Tamを添加することによってE2解離を開始し、異方性の変化を時間とともに追跡した。両方の解離実験のデータを、Prism 4 を使用した線形回帰によって指数関数的減衰関数に適合させた。

【0074】

ER とPaPE-1またはE2との複合体のコンピューターモデリング

ER + E2結晶構造(PDBコード：1GWR)から出発して、MOE(MOE：分子操作環境、ケミカルコンピューティンググループ)の構造調製ルーチンを使用して欠けているループ、側鎖、明示的な水素原子を補填した。カスタムボリューム視覚化コードを使用して、ER + E2構造の結合体積を生成し、図2Bにおいてスレートブルーで示されており；赤い点は構造的な水である。PaPE-1の結合のモデルは、リガンド結合ドメインの漸進的最小化と合わせて、E2の構造からPaPE-1リガンド構造の漸進的生成によって構築された：原子はまずB環を開くためにE2から除去され、C環を芳香族環に変換するが、A環上の2つのオルトメチル基はまだ付加しない。この段階でリガンドの酸素原子と全タンパク質原子の位置を固定し、0.1kcal/(mol・オングストローム)を終了勾配カットオフとしてMMFF94x力場を使用してエネルギー最小化を行い、PaPE-1リガンドコアの低いエネルギーコンフォメーションを得た。その後、すべての原子を固定せず、水素結合側鎖との相互作用を最適化するためにタンパク質主鎖を束縛しながらエネルギー最小化をさらに行った。2つのA環オルトメチル基を付加した後、束縛された骨格原子を用いて別のエネルギー最小化を行い、次いで、最終的な無束縛エネルギー最小化をすべて同じ勾配のカットオフに対して行った。得られたリガンドおよび水素結合残基の位置は、図2Bに黄色で示されている。

【0075】

統計解析

インビボ動物代謝研究からのデータを、異なるリガンド効果を比較するための一元配置ANOVAまたはGraphPad Prism 6を使用するBonferroni post hoc試験後の時間依存的変化を比較するための二元配置ANOVAのいずれかを用いて解析した。遺伝子発現研究からのデータは、t検定を使用して解析した。

【0076】

一般的な合成手順

NMR測定：¹H NMRスペクトルをVarian vxr500MHz、u500またはu400MHz分光計で記録し、化学シフトを7.26ppmの残留溶媒ピーククロロホルム(CDC₃)および3.31ppmのメタノール(CD₃OD)を基準とする 値[ppm]で示す。カップリング定数Jは、ヘルツで報告されている。材料および溶媒は、商業的供給源から入手可能な最高級のものであり、さらに精製することなく使用した。分子量は、Waters Quattro ultima ESIまたはWaters 70-VSE EI/CI/FD/FI質量分析計を使用して定量した。

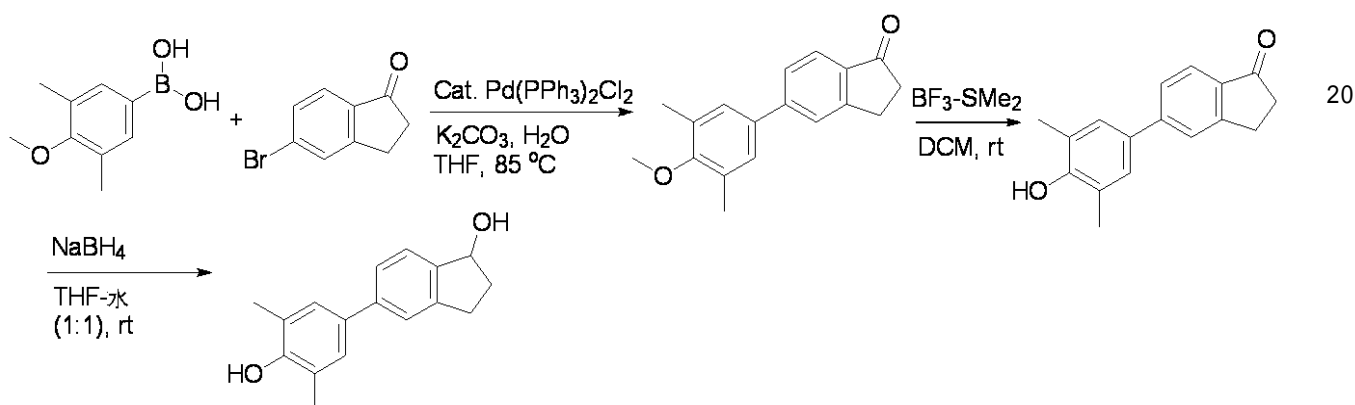
10

【実施例1】

【0077】

実施例1. 5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(2)の合成

【化28】



20

THF(10mL)中の3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)、5-ブromo-1-インダノン(211mg、1.00mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロライド(35mg、0.05 mmol)、炭酸カリウム(307mg、2.22mmol)および脱イオン(DI)水(39mg、2.22mmol)の混合物をアルゴン雰囲気下、85 °Cで4時間~8時間混合した。TLC分析で出発物質が消失した後、酢酸エチル(20mL)を反応混合物に加えた。DI水(20mL)を反応混合物に添加すると、不溶性固体が沈殿した。懸濁した固体を濾過により集め、酢酸エチル濾液を蒸発させた後にさらに固体を集めた。合せた固形物を酢酸エチルから再結晶して、5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(223mg、84%)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.82 (s, 6H), 2.75 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.20 (t, 2H, J = 6.0 Hz), 3.79 (s, 3H), 7.31 (s, 2H), 7.58 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.65 (s, 1H), 7.80 (d, 1H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.55, 26.12, 36.78, 60.07, 122.06, 124.21, 125.06, 126.81, 128.21, 131.74, 135.88, 147.72, 156.10, 157.70, 206.92.

30

40

【0078】

DCM(10mL)中の5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(266mg、1.00mmol)の溶液に三フッ化ホウ素メチルスルフィド錯体(1.04g、0.08mmol)を添加し、室温で6時間攪拌した後、溶媒を蒸発させ、水を加え、濾過して、5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オンをわずかに暗白色の固形物(240mg、95%)として得た。脱メチル化の際に、この生成物は、254nmのUV光に暴露されたとき、TLC上に青色の蛍光スポットとして現れる。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.31 (s, 6H), 2.72 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.17 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 7.26 (s, 2H), 7.55 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.62 (s, 1H), 7.76 (d, 1H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃)

50

3) 16.49, 26.11, 36.77, 122.09, 124.22, 124.56, 126.52, 127.91, 128.87, 135.27, 148.19, 153.50, 156.39.

THF-水混合物(200mg、0.79mmol)中の5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オンの溶液に、NaBH₄(50mg、1.31mmol)を室温に加え、混合物をシリカゲルTLC分析で出発物質が消失するまで攪拌した。NaBH₄で還元すると、254nmのシリカゲルTLCで青色蛍光が消失した。n-ヘキサン中35%酢酸エチルを使用して短いシリカゲルパッドを通過させた後、化合物2(189mg)を収率94%で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃+メタノール-d₄) 1.95-2.05 (m, 1H), 2.31 (s, 6H), 2.48-2.58 (m, 1H), 2.84-2.92 (m, 1H), 3.02-3.16 (m, 1H), 4.66 (s, 1H, フェノールOH), 5.29 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 7.20 (s, 2H), 7.39-7.46 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.30, 30.06, 36.40, 76.48, 123.47, 123.50, 124.57, 125.83, 127.69, 133.61, 141.83, 143.50, 144.17, 152.07; ESI (m/z) 255.3 (M⁺+1, 25%), 237.2 (M⁺+1-H₂O, 85%)

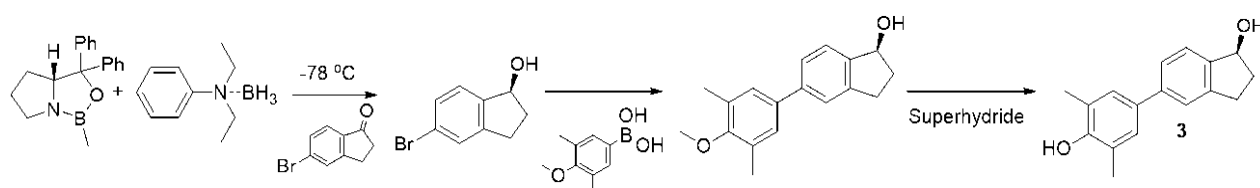
10

【実施例2】

【0079】

実施例2. S-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(3:S-2)の合成

【化29】



20

【0080】

S-5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール. 文献(SH Lee et al, J. Org. Chem.2011, 76, 10011~10019)に従って、触媒(R)-(+)-2-メチル-CBS-オキシアザボロリジンおよび2当量ジエチルアニリンボランを使用して5-プロモ-1-インダノンの不斉還元から得られた98% ee(S)-5-プロモ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(100mg、0.47mmol)および3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(101mg、0.56mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロライド(18mg、0.028mmol)、炭酸カリウム(155mg、1.12mmol)およびTHF(10mL)中のDI水(40mg、2.22mmol)の混合物をアルゴン雰囲気下、80℃で4時間~8時間、シリカゲルTLC分析で出発アルコールスポットが消失するまで攪拌した。反応混合物の温度を冷却した後、水(20mL)を加え、続いて酢酸エチル(10mL×3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を濃縮してからカラムクロマトグラフィー用シリカゲルに装填した。n-ヘキサン中20%酢酸エチルで溶離して、表題化合物をオフホワイトの固形物(110mg、0.41mmol、87%)として得た。分光データは、実施例4に記載した化合物5のデータと同一であった。

30

【0081】

S-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(S-2). THF(10mL)中のS-5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(134mg、0.5mmol)の溶液に、THF(4mL、4.0mmol)中1M super-hydride溶液を室温で加えた。この溶液を24時間還流し、温度を冷却した後、水(10mL)を氷浴で冷却しながら滴下した。この溶液を酢酸エチル(10mL×3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、カラムクロマトグラフィー用シリカゲルに装填した。n-ヘキサン中35%酢酸エチルで溶離して、オフホワイトの固形物としてS-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(81mg、0.32mmol、64%)を得た。エナンチオマー過剰率は、超臨界相クロマトグラフィー(SFC)によって98% eeであることが確認された。分光データは、化合物2のものと同一であった。(超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)カラム条件: 15% MeOH/CO₂、1mL/分、ダイセルキラルバックADカラム(25cm×4.6mm)、保持時間: 10.94分)

40

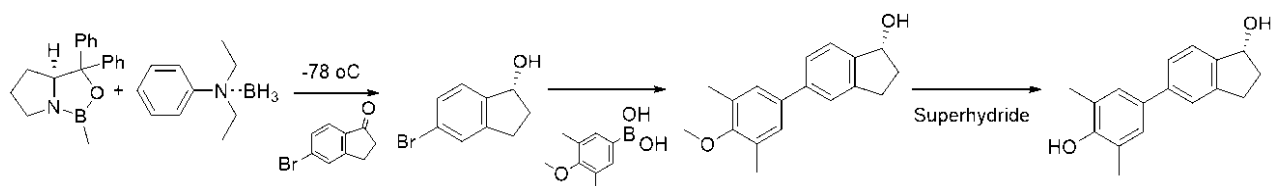
【実施例3】

50

【 0 0 8 2 】

実施例3. R-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(4 : R-2)の合成

【 化 3 0 】



触媒としての(S)-(+)-2-メチル-CBS-オキシアザボロリジンの使用を除いて同様の手順に従い、98% ee(R)-5-ブromo-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール前駆体を得た。(超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)カラム条件：15%MeOH/CO₂、1mL/分、Daicel Chiralpak ADカラム(25cm x 4.6mm)、保持時間：15.18分)

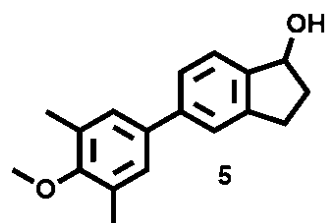
10

【 実施例 4 】

【 0 0 8 3 】

実施例4. 5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(5)

【 化 3 1 】



20

実施例1の化合物7(55mg、0.21mmol)を、混合溶媒(MeOH-THF = 1 : 1、v/v、5mL)中のNaBH₄(15mg、0.39mmol)で処理した。SiO₂ TLCで出発物質が消失したら、溶媒を蒸発濃縮し、EtOAc : n-ヘキサン(1 : 1、v/v)を用いてシリカゲルパッドに通して、化合物5(48mg)をオフホワイトの固形物として回収した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + メタノール-d₄) 1.97-2.04 (m, 1H), 2.35 (s, 6H), 2.51-2.57 (m, 1H), 2.84-2.90 (m, 1H), 3.08-3.14 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 5.85 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 5.30 (s, 1H, フェノールOH), 7.23 (s, 2H), 7.12 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.43 (s, 1H), 7.45 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.50, 30.07, 36.42, 60.03, 76.46, 123.73, 124.59, 126.07, 127.91, 131.33, 137.10, 141.69, 143.91, 144.17, 156.76.

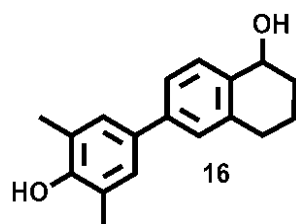
30

【 実施例 5 】

【 0 0 8 4 】

実施例5. 6-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン-1-オール(16)

【 化 3 2 】



40

実施例1に記載の方法に従って、3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)および6-ブromo-1-テトラロン(225mg、1.00mmol)を用いて化合物16を合成した。収率は化合物2の収率に匹敵した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.78-1.85 (m, 1H), 1.91-1.97 (m, 1H), 1.98-2.05 (m, 1H), 2.31 (s, 6H), 2.75-2.82 (m, 1H), 2.85-2.92 (m, 1H), 3.02-3.16 (m, 1H), 4.83 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 7.20 (s, 2H), 7.27 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.38 (dd, 1H, J, J = 1.5, 8.5 Hz), 7.47 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ¹³C NMR

50

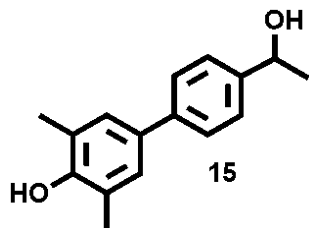
(126 MHz, CDCl_3) 16.30, 19.09, 29.68, 32.63, 68.24, 123.50, , 124.95, 126.58, 127.53, 129.25, 133.24, 137.31, 137.60, 140.66, 152.09.

【実施例 6】

【0085】

実施例6. 4'-(1-ヒドロキシエチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(15)

【化33】



10

化合物15を、実施例1に記載の方法に従って、3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.1mmol)および4-プロモ-アセトフェノン(199mg、1.00mmol)によって合成した。収率は化合物2の収率に匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.53 (d, 3H, $J = 5.0$ Hz), 2.31 (s, 3H), 4.94 (q, 1H, $J = 5.0$ Hz), 4.83 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.22 (s, 2H), 7.24 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.41 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.31, 25.34, 70.49, 123.54, , 125.98, 126.49, 127.06, 127.37, 127.54, 133.19, 140.61, 152.09, 144.19, 152.09.

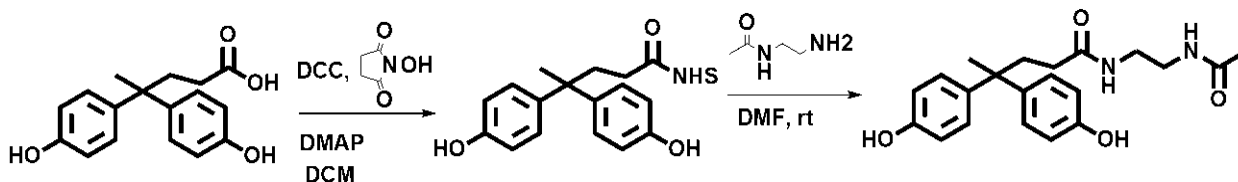
20

【実施例 7】

【0086】

実施例7. ジフェノール酸NHEtNHAc(71)

【化34】



30

【0087】

ジフェノール酸NHSエステル. DMF(1mL)中のジフェノール酸(285mg、1.00mmol)の溶液に、N-ヒドロキシコハク酸(121mg、1.05mmol)、触媒量のDMAPおよびDCC(217mg、1.05mmol)を加えた。1時間撹拌した後、EtOAc(10mL)を加えて尿素を沈殿させ、これを濾過により除去した。濾液を水(2mL×4)、 NaHCO_3 飽和液で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、蒸発させてNHSエステルを得、これをさらに精製することなく使用した。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 1.49 (s, 3H), 2.26-34 (m, 2H), 2.34-2.43 (m, 2H), 2.75 (s, 4H), 6.66 (d, 4H, $J = 8.0$ Hz), 6.94 (d, 4H, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 25.72, 27.39, 30.19, 36.49.44.53, 115.14, 128.32, 139.81, 154.86, 169.27, 169.57.ESI (m/z) 384.3 ($\text{M}^+ + 1$)

【0088】

ジフェノール酸-NHEtNHAc(71). 室温でDMF(500 μL)中のNHSエステル(38mg、0.1mmol)とモノアセチル化エチレンジアミン(35mg、0.35mmol)との反応。反応混合物を室温で30分間超音波処理(Branson sonicator Model 2210)した後、脱イオン水(10mL)を添加し、EtOAc(5mL×3)で抽出し、再度水(5mL×3)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濃縮して1mm SiO_2 分取薄層クロマトグラフィーにかけた。DCM中5%MeOHで展開した R_f 0.25バンドを分取TLCから掻き取った後、 SiO_2 チャンクを焼結ガラスフィルターに入れ、DCM中の20%MeOHを用いて表題化合物を抽出して、28mgの表題化合物を得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 1.48 (s, 3H), 1.85-1.94 (m, 5H), 2.28 (q, 2H, $J = 5$ Hz), 3.12-3.22 (m, 4H), 6.66 (d, 4H, $J = 8.0$ Hz), 6.96 (d, 4H, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 18.11, 26.61, 31.86, 36.35, 41.57, 43.42, 48.58, 118.81, 132.

50

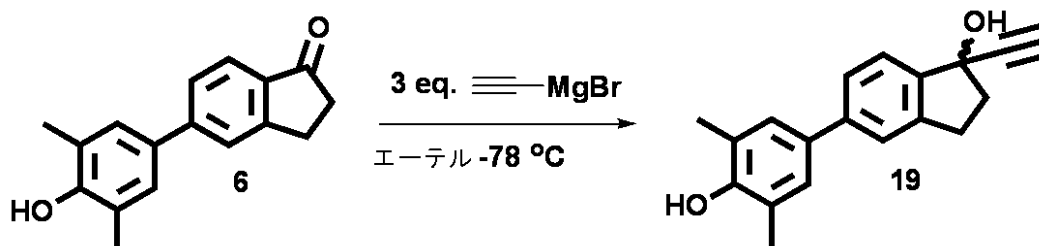
36, 144.36, 158.61, 176.42, 179.65; ESI (m/z) 371.2 (M⁺+1)

【実施例 8】

【0089】

実施例8. 1-エチニル-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(19)

【化35】



10

-78 で2時間、THF(10mL)中化合物6(80mg、0.32mmol)と臭化エチニルマグネシウム(1.2 mL x 2、0.5M THF)との反応により、化合物19を合成した。反応温度が室温に上昇した後、反応混合物に水を注意深く滴下し、0.1N HCl溶液を加えて反応溶液を酸性化した。反応混合物をEtOAc(5mL x 3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、濃縮して1mm SiO₂分取TLC上にかけた。分取TLCをn-ヘキサン中の20%EtOAcで展開し、R_f 0.3のバンドを掻き取り、化合物19(26mg)を抽出した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.32 (s, 6H), 2.48-2.52 (m, 1H), 2.60-2.64 (m, 1H), 2.66 (s, 1H, OH), 2.92-3.01 (m, 1H), 3.17-3.22 (m, 1H), 4.74 (s, 1H, フェノールOH), 7.20 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.57 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.30, 29.80, 43.53, 73.20, 76.19, 86.13, 123.46, 123.56, 126.32, 127.75, 128.00, 133.43, 142.71, 143.75, 143.88, 152.22.

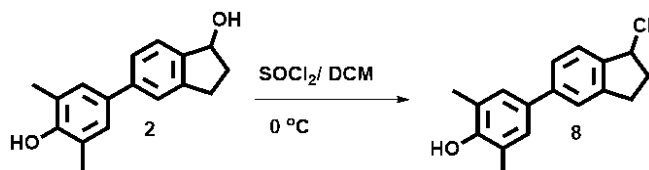
20

【実施例 9】

【0090】

実施例9. 4-(1-クロロ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル)-2,6-ジメチルフェノール(8)

【化36】



30

化合物2(25mg、0.1mmol)をDCM(1mL)中のSOCl₂(40mg、0.34mmol)で0 において2時間処理することによって化合物8を合成した。5%NaHCO₃で洗浄し、溶媒を蒸発させて化合物8(24mg)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 2.09-2.13 (m, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.42-2.56 (m, 1H), 2.86-2.94 (m, 1H), 3.09-3.18 (m, 1H), 4.62 (s, 1H, フェノールOH), 6.20 (dd, 1H, J = 3.0 Hz, 3.0 Hz), 7.18 (s, 2H), 7.37 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.41 (s, 1H), 7.42 (d, 1H, J = 8.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 16.29, 30.05, 32.72, 78.39, 123.26, 123.48, 125.83, 127.66, 127.77, 133.47, 139.54, 142.43, 145.32, 152.14.

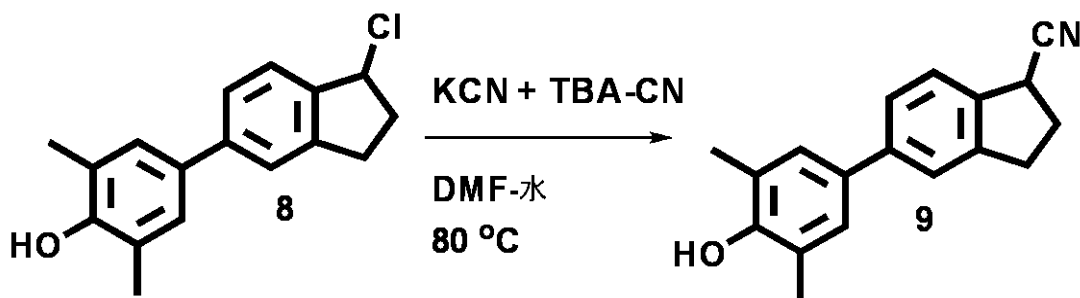
40

【実施例 10】

【0091】

実施例10. 5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-カルボニトリル(9)

【化 3 7】



10

化合物8(14mg、0.51mmol)を、55 で4時間、DMF(1mL)におけるシアン化カリウム(50mg、1.56mmol)およびTBA-CN(100mg)で処理した。反応混合物を水(10mL)に注ぎ、EtOAc(5mL × 3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、真空下で濃縮して0.2mmSiO₂ TLCプレート(20cm × 20cm)にかけた。TLCプレートをn-ヘキサン溶媒中15%EtOAcで展開し、R_f 0.5バンドを掻き取り、抽出して化合物9(5mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.32 (s, 6H), 2.42-2.47 (m, 1H), 2.60-2.65 (m, 1H), 3.00-3.04 (m, 1H), 3.12-3.17 (m, 1H), 4.14 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 4.66 (s, 1H, フェノールOH), 7.20 (s, 2H), 7.43-7.47 (m, 3H).

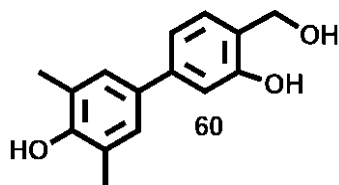
【実施例 1 1】

【 0 0 9 2】

20

実施例11. 4-(ヒドロキシメチル)-3',5'-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-3,4'-ジオール(60)

【化 3 8】



3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.1mmol)および4-プロモ-2-メトキシベンズアルデヒド(215mg、1.00mmol)を使用して、実施例1で使用した方法に従って化合物60を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.31 (s, 6H), 4.70 (s, 1H, フェノールOH), 4.91 (s, 2H), 7.04 (dd, 1H, J = 1.5 Hz, 8.5 Hz), 7.07 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.09 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.22 (s, 2H), 7.27 (s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.28, 64.88, 115.03, 118.65, 123.00, 123.52, 127.48, 132.81, 142.93, 152.26, 156.56.

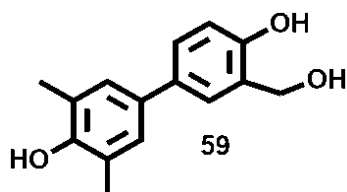
30

【実施例 1 2】

【 0 0 9 3】

実施例12. 3'-(ヒドロキシメチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール(59)

【化 3 9】



40

3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)および5-プロモ-2-メトキシベンズアルデヒド(215mg、1.00 mmol)を使用して、化合物2を合成するために、実施例1で使用した方法に従って化合物59を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.31 (s, 6H), 4.70 (s, 1H, フェノールOH), 4.93 (s, 2H), 6.94 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.15 (s, 2H), 7.21 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.39 (dd, 1H, J

50

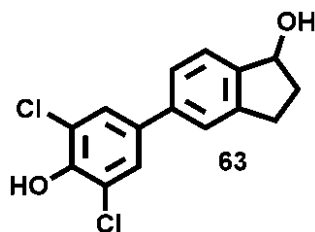
, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 8.5 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.29, 65.16, 117.08, 123.51, 124.91, 126.33, 127.17, 127.96, 133.09, 133.55, 151.66, 155.31.

【実施例 13】

【0094】

実施例13. 5-(3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(63)

【化40】



10

化合物63を、3,5-ジクロロ-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)および5-ブromo-1-インダノン(211mg、1.00ミリモル)を使用して実施例1で使用した方法に従って合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.01-2.05 (m, 1H), 2.52-2.59 (m, 1H), 2.85-2.91 (m, 1H), 3.09-3.15 (m, 1H), 5.30 (t, 1H, $J = 5.5 \text{ Hz}$), 5.94 (s, 1H, フェノールOH), 7.37 (d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$), 7.38 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$), 7.48 (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 30.04, 36.38, 76.35, 121.65, 123.46, 124.96, 125.76, 127.11, 135.29, 139.04, 144.59, 144.89, 147.31.

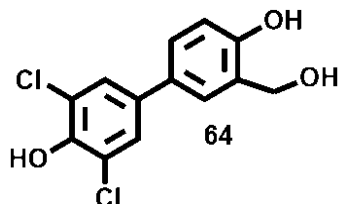
20

【実施例 14】

【0095】

実施例14. 3,5-ジクロロ-3'-(ヒドロキシメチル)-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール(64)

【化41】



30

化合物2を合成する実施例1で使用した方法に従って、3,5-ジクロロ-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)、5-ブromo-2-メトキシベンズアルデヒド(215mg、1.00ミリモル)によって化合物64を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{メタノール-}d_4$) 4.75 (s, 2H), 7.04 (dd, 1H, $J, J = 1.5 \text{ Hz}, 8.5 \text{ Hz}$), 6.83 (d, 1H, $J = 8.5 \text{ Hz}$), 7.19 (d, 1H, $J = 2.0 \text{ Hz}$), 7.24 (dd, 1H, $J, J = 2.0, 8.5 \text{ Hz}$), 7.35 (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{メタノール-}d_4$) 63.16, , 116.48, 122.02, 126.48, 126.56, 127.18, 130.36, 134.47, 139.95, 147.33, 155.80.

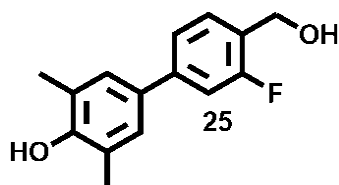
40

【実施例 15】

【0096】

実施例15. 3'-フルオロ-4'-(ヒドロキシメチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(25)

【化42】



3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)および4-ブromo-2-フル

50

オロベンズアルデヒド(203mg、1.00mmol)を使用して、化合物2を合成する実施例1で使用した方法に従って化合物25を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 2.32 (s, 6H), 4.79 (s, 2H), 4.81 (s, 1H, フェノールOH), 7.21 (s, 2H), 7.24 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz), 7.33 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.43 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3 + メタノール- d_4) 16.29, 59.60 (d, $J_{\text{CF}} = 3.9$ Hz), 113.61 (d, $J_{\text{CF}} = 22.4$ Hz), 122.56 (d, $J_{\text{CF}} = 2.8$ Hz), 123.76, 125.80 (d, $J_{\text{CF}} = 14.5$ Hz), 127.46, 129.85 (d, $J_{\text{CF}} = 4.9$ Hz), 131.90, 143.16 (d, $J_{\text{CF}} = 7.8$ Hz), 152.60, 161.82 (d, $J_{\text{CF}} = 245.9$ Hz).

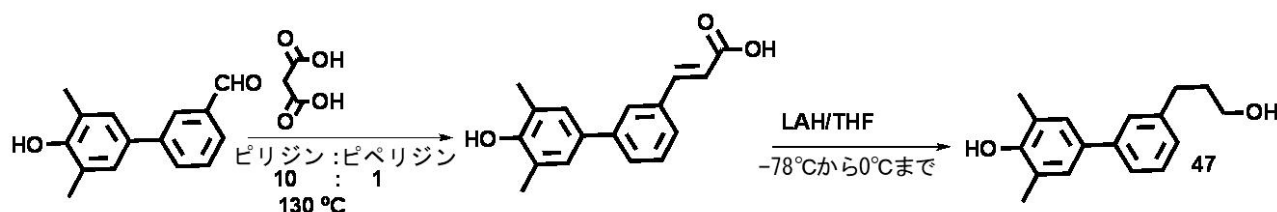
【実施例 16】

【0097】

10

実施例16. 3'-(3-ヒドロキシプロピル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(47)

【化43】



4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボアルデヒド(40mg、0.18mmol)およびマロン酸(19mg、0.18mmol)、11 μL のピリジンとピペリジンの混合物(10 : 1、v/v)を130 で3時間加熱した。反応混合物を1mL EtOAcで希釈し、1mm SiO_2 分取TLCプレート(20cm \times 20cm)にかけ、n-ヘキサン溶媒中40%EtOAcで展開した。Rf 0.45バンドを掻き取って、焼結ガラスフィルターおよびDCM中の20%MeOHを使用して抽出後、(E)-3-(4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-イル)アクリル酸(35mg)を得た。続いて、添加のために-78、次いで反応のために0 の温度でTHF(1mL)中のLAH(8.5mg、0.22mmol)で上記酸(20mg、0.07mmol)を還元し、ロッシェル塩で典型的な後処理をし、n-ヘキサン中45%EtOAcで分離して、化合物47(18mg)を得た。

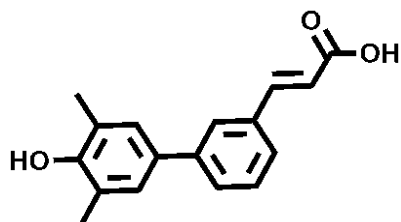
20

【0098】

(E)-3-(4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-イル)アクリル酸

【化44】

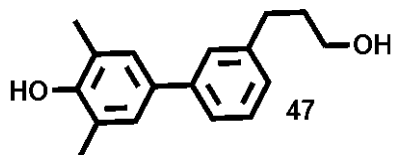
30



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 +メタノール- d_4) 2.28 (s, 6H), 6.45 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz), 7.17 (s, 2H), 7.37 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.41 (d, 1H, $J = 7.5$), 7.51 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 +メタノール- d_4) 16.41, 118.14, 124.12, 126.39, 126.71, 127.47, 129.01, 129.37, 132.39, 134.79, 142.06, 146.26, 152.62, 169.96.

40

【化45】



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.94 (六重線, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.31 (s, 6H), 2.76 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.70 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.21 (s, 2H), 7.31 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.36 (d, 1H, $J = 8.0$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3)

50

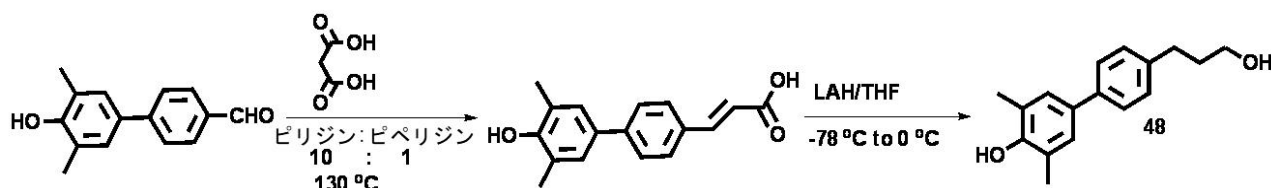
16.33, 32.41, 34.51, 62.55, 123.62, 124.59, 126.85, 127.15, 127.59, 128.92, 133.55, 141.47, 142.35, 152.13.

【実施例 17】

【0099】

実施例17. 4'-(3-ヒドロキシプロピル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(48)

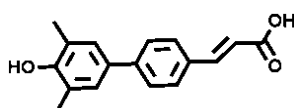
【化46】



10

化合物47を製造する同じ方法を使用して、ピリジンおよびピペリジン(10:1、v/v)混合物中の4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-カルボアルデヒド(40mg、0.18mmol)およびマロン酸(21mg、0.2mmol)から化合物48(13mg)を調製し、続いてTHF(1ml)中のLAHを使用して還元した。

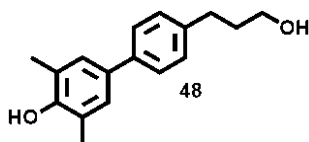
【化47】



20

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 +メタノール- d_4) 2.23 (s, 6H), 6.36 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz), 7.23 (s, 2H), 7.50 (s, 4H), 7.64 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz).

【化48】



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.94 (六重線, 2H, $J = 6.5$ Hz), 2.30 (s, 6H), 2.75 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.72 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.22 (s, 2H), 7.25 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.47 (d, 2H, $J = 8.0$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.28, 31.90, 34.46, 62.57, 123.49, 126.73, 126.80, 126.97, 127.46, 128.95, 139.01, 140.29, 151.92.

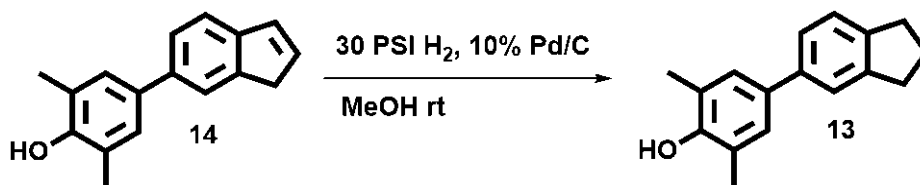
30

【実施例 18】

【0100】

実施例18. 4-(2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル)-2,6-ジメチルフェノール(13)

【化49】



40

化合物14(24mg、0.1mmol)を、触媒量の10% Pd/Cを含有するMeOH(2mL)に溶解し、パーシューカーにおける30PSI H_2 の下に室温で1時間振盪した。焼結ガラスフィルターを通して濾過し、蒸発させて、化合物13(21mg)を得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.109 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.31 (s, 6H), 2.92 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.96 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.62 (s, 1H, フェノールOH), 7.20 (s, 2H), 7.25 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.29, 25.79, 32.76, 33.13, 123.05, 123.25, 123.36, 127.61, 142.83, 144.98, 151.74, 154.50.

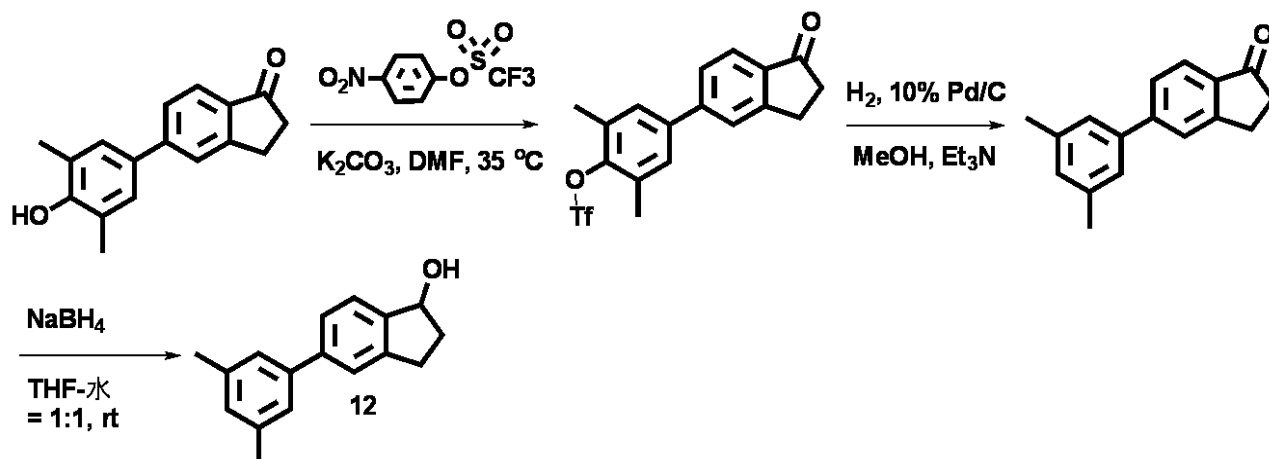
【実施例 19】

【0101】

実施例19. 5-(3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(12)

50

【化 5 0】

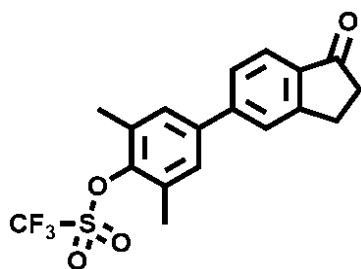


10

【 0 1 0 2】

5-(4-トリフルオロメタンスルホニルオキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン

【化 5 1】



20

化合物6(50mg、1.98mmol)をDMF(1mL)中の K_2CO_3 (27.6mg、0.2mmol)上で、55℃で2時間、p-ニトロフェニルトリフルオロメタンスルホネート(58mg、2.14mmol)を添加した。反応溶液を水(10mL)に注ぎ、EtOAc(10mL×3)で抽出し、 $NaHCO_3$ 飽和水溶液で洗浄し、濃縮してカラムクロマトグラフィー用シリカゲルに装填した。n-ヘキサン溶媒中の30%EtOAcで溶離して、5-(4-トリフルオロメタンスルホニルオキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(40mg)を無色固体として得た。(R_f = 0.4)¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

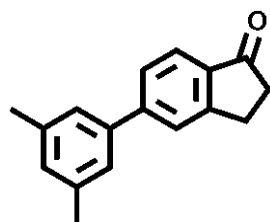
30

2.46 (s, 6H), 2.78 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.22 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 7.36 (s, 2H), 7.56 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.65 (s, 1H), 7.83 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) 17.56, 26.19, 36.83, 118.85 (q, J_{CF} = 320.6), 124.56, 125.56, 127.13, 132.42, 136.33, 141.27, 146.65, 147.20, 156.59, 208.24; ¹⁹F NMR (470 MHz, $CDCl_3$) -73.78.

【 0 1 0 3】

5-(3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン

【化 5 2】



40

トリフラート化合物(25mg、0.07mmol)をMeOHに溶解した。Et₃N(20 μL)および触媒量の10%Pd/Cを添加し、水素(30PSI)を適用した。パーリアクタを使用して1時間振盪した後、反応混合物を焼結ガラスフィルターに通してPd/Cを除去し、真空下で蒸発させて、5-(3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(15mg)を得た。この残渣をさら

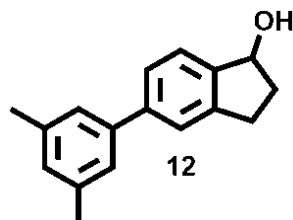
50

に精製することなく使用した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.40 (s, 6H), 2.74 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz), 3.19 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz), 7.06 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.59 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.66 (s, 1H), 7.81 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 21.64, 26.11, 36.77, 124.19, 125.34, 125.63, 127.04, 130.21, 136.08, 138.76, 140.43, 148.23, 156.05, 206.91.

【0104】

5-(3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(12)

【化53】



10

続いて、5-(3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(15mg、0.06mmol)をTHF-水(1:1、v/v、1mL)中 NaBH_4 (5mg、0.13mmol)で処理し、続いてEtOAc(5mL×3)で抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥し、シリカゲルパッドを通過させて、溶媒蒸発後に12mgの12を無色の固形物として得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.97-2.05 (m, 1H), 2.39 (s, 6H), 2.51-2.58 (m, 1H), 2.85-2.91 (m, 1H), 3.09-3.15 (m, 1H), 5.30 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.01 (s, 1H), 7.21 (s, 2H), 7.47 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 21.66, 30.07, 36.43, 76.49, 123.95, 124.60, 125.44, 126.29, 129.13, 138.48, 141.57, 142.18, 144.17, 144.16.

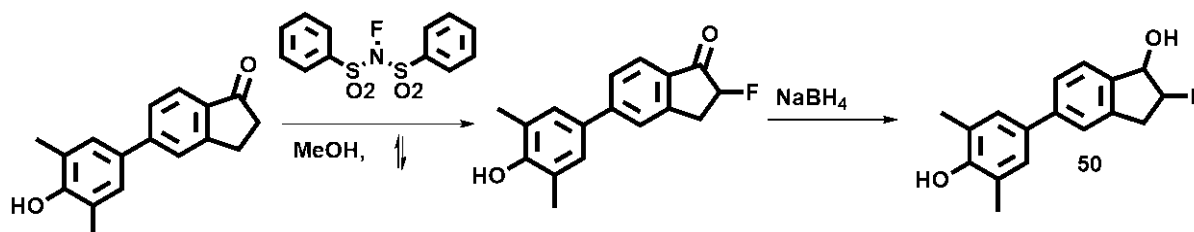
20

【実施例20】

【0105】

実施例20. 2-フルオロ-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(50)

【化54】



30

化合物6(40mg、0.16mmol)をMeOH中のAccufluor(55mg、1.74mmol)で還流温度において4時間処理した。出発物質が SiO_2 TLC分析(n-ヘキサン中10%EtOAc)で消失したら、反応溶液の温度を室温に冷却し、 NaBH_4 (10mg、0.26mmol)を反応混合物に添加した。この混合物を蒸発させて、カラムクロマトグラフィー用のシリカゲルに装填した。n-ヘキサン中20%EtOAcで溶出して50を無色固体(28mg)として得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 +メタノール- d_4) 2.23 (s, 6H), 3.02-3.22 (m, 2H), 5.07 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}}$, $J_{\text{H-F}} = 4.2, 17.9$ Hz), 5.24 (ABXF, 1H, J , J , $J = 2.0, 4.4, 53.9$ Hz), 7.12 (s, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.40 (s, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.44, 36.77 (d, $J = 22.2$ Hz), 75.86, 95.06 (d, $J = 182.5$ Hz), 123.56, 124.39, 124.79, 126.27, 127.43, 132.91, 139.11, 139.70, 152.56.

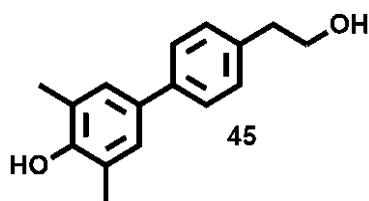
40

【実施例21】

【0106】

実施例21. 4'-(2-ヒドロキシエチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(45)

【化 5 5】



3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.1mmol)および3-プロモ-フェネチルアルコール(201mg、1.00mmol)を使用して、実施例1に記載の方法にしたがって化合物45を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.31 (s, 6 H), 2.90 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.90 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.21 (s, 2H), 7.27 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.49 (d, 2H, $J = 8.0$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.33, 39.01, 63.94, 123.57, 127.16, 127.48, 129.57, 133.26, 136.87, 139.63, 152.04.

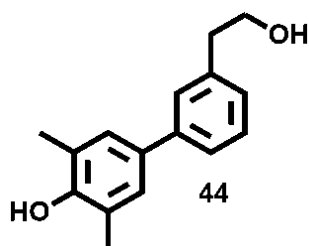
10

【実施例 2 2】

【0 1 0 7】

実施例22. 3'-(2-ヒドロキシエチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4-オール(44)

【化 5 6】



20

3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.1mmol)および4-プロモ-フェネチルアルコール(201mg、1.00mmol)を使用して、実施例1に記載の方法にしたがって化合物44を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.32 (s, 6 H), 2.93 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 3.91 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 4.82 (s, 1H, フェノールOH), 7.16 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.22 (s, 2H), 7.35 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.41 (d, 2H, $J = 8.0$); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.33, 39.53, 63.99, 123.61, 125.22, 127.43, 127.62, 127.74, 129.15, 133.38, 138.99, 141.70, 152.18.

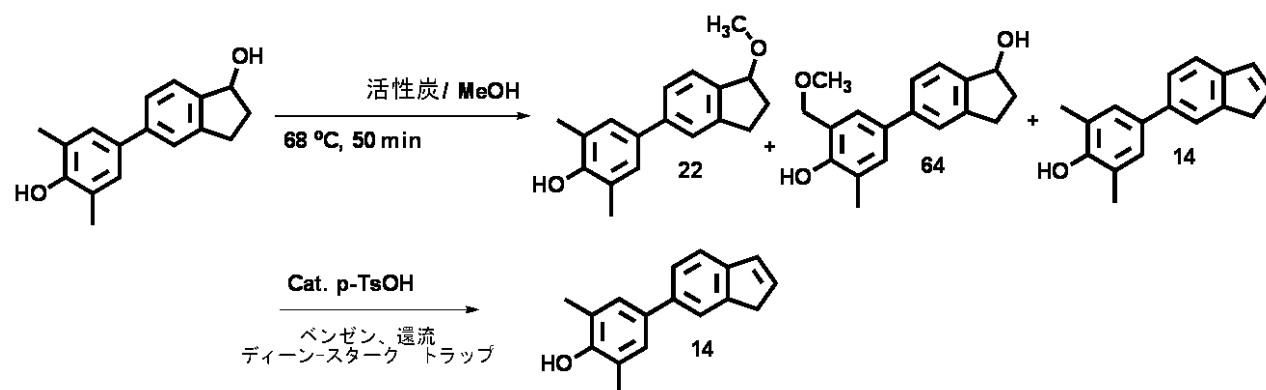
30

【実施例 2 3】

【0 1 0 8】

実施例23. 4-(1-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル)-2,6-ジメチルフェノール(22)、5-(4-ヒドロキシ-3-メチル-5-メトキシメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(64)および4-(1H-インデン-6-イル)-2,6-ジメチルフェノール(14)。

【化 5 7】



40

化合物2(400mg)を、沸騰温度で頻繁に加熱することにより活性炭(Norit、4g)をMeOH中で50分間処理し、続いて濾過し、濾液を蒸発させて、2、22、64および14の混合物を得た

50

。【0109】

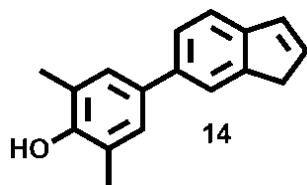
4-(1-メトキシ-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-5-イル)-2,6-ジメチルフェノール(22)。この混合物からn-ヘキサン中の25%EtOAcの溶出液を用いたSiO₂カラムクロマトグラフィーにより化合物22(80mg)を得た(rf = 0.8)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.17-2.23 (m, 1H), 2.34 (s, 6H), 2.38-2.47 (m, 1H), 2.88-2.94 (m, 1H), 3.15-3.21 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 4.91 (ABq, 1H, J = 4.0, 6.5 Hz), 5.03 (s, 1H, フェノールOH), 7.25 (s, 2H), 7.43 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.47 (s, 1H), 7.48 (d, 1H, J = 7.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.37, 30.48, 32.32, 56.23, 84.64, 123.49, 123.76, 125.39, 125.49, 127.67, 133.68, 140.95, 141.93, 144.94, 152.14.

10

5-(5-メトキシメチル-4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(64)。HPLCカラムクロマトグラフィー(Supelcoセミプレップシリカカラム、粒径10 μm、L x I.D. 25cm x 10mm、n-ヘキサン中5% IPA、4ml/分、保持時間: 11.79分)を使用して、化合物64(10mg)を集めた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.97-2.03 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.52-2.60 (m, 1H), 2.84-2.91 (m, 1H), 3.05-3.14 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 4.73 (s, 2H, ベンジルCH₂), 5.29 (q, 1H, J = 5.5 Hz), 7.09 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.41 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.45 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.66 (s, 1H, フェノールOH)。

20

【0110】
4-(1H-インデン-6-イル)-2,6-ジメチルフェノール(14)
【化58】



活性炭の処理から得られた混合物から、混合溶媒(ヘキサン中25%EtOAc、Rf = 0.9)を使用するクロマトグラフィーにより、化合物14(15mg)を単離した。ベンゼン中の化合物2(35mg、0.14mmol)、触媒量のp-トルエンスルホン酸一水和物を、ディーン・スタークトラップを備えたシステムで4時間還流した。NaHCO₃飽和水溶液で洗浄した後、溶媒を蒸発させて化合物14(28mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.33 (s, 6H), 3.47 (s, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 6.57 (dt, 1H, J = 1.9, 5.5 Hz), 6.92 (d, 1H, J = 5.5 Hz), 7.26 (s, 2H), 7.43 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.47 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.67 (s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.34, 39.38, 121.19, 122.52, 123.51, 125.30, 127.66, 132.04, 134.17, 134.40, 137.99, 143.64, 144.57, 151.80.

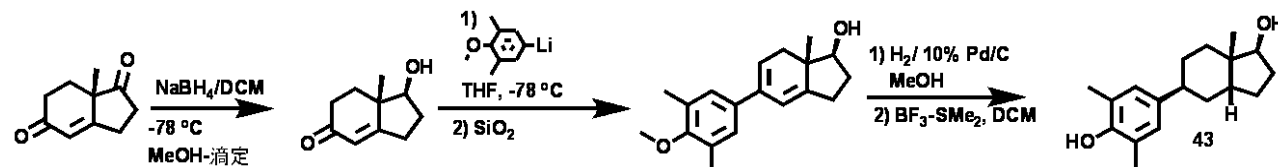
30

【実施例24】

【0111】

実施例24。(1S, 3aR, 5S, 7aS)-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-オール(43)

【化59】



40

【0112】

(1S, 7aS)-1-ヒドロキシ-7a-メチル-1,2,3,6,7,7a-ヘキサヒドロ-5H-インデン-5-オン。この化合物は、(S)-7a-メチル-2,3,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン-1,5(6H)-ジオン(0.4g、2.43mmol)とNaBH₄(23.0mg、0.62mmol)との反応によってMeOHを-78 で滴定することにより、文献(E.J.Schweiger et al, Tetrahedron letters, Vol.38, No.35, pp.6127-6130

50

, 1997)にしたがって調製した。

【 0 1 1 3 】

(1S,7aS)-5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-7a-メチル-2,3,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン-1-オール、2,6-ジメチル-4-プロモ-アニソール(777mg、3.6mmol)の溶液に、n-BuLi(n-ヘキサン中1.6M、2.25mL)を-78 で滴下した。この混合物を1時間撹拌した後、THF(5mL)中の(1S,7aS)-1-ヒドロキシ-7a-メチル-1,2,3,6,7,7a-ヘキサヒドロ-5H-インデン-5-オン(150mg、0.90ミリモル)溶液をカニューレ針によって-78 で滴下した。反応混合物を室温で4時間以上撹拌し、続いて水(20mL)を添加し、酢酸エチル(10mL×3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥させ、真空下で濃縮してカラムクロマトグラフィーのSiO₂上に装填した。n-ヘキサン中の20%酢酸エチルで溶離して、(1S,7aS)-5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-7a-メチル-2,3,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン-1-オール(130mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.02 (s, 3H), 1.48-1.55 (m, 1H), 2.02-2.08 (m, 1H), 2.31 (s, 6H), 2.41-2.48 (m, 1H), 2.58-2.68 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.08 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 5.42 (s, 1H), 6.54 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.16 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 15.05, 16.50, 25.85, 34.27, 38.50, 44.92, 59.97, 82.21, 119.41, 119.59, 126.00, 130.81, 136.90, 137.81, 146.80, 156.72.

10

【 0 1 1 4 】

(1S,3aR,5S,7aS)-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-7a-メチルオクタヒドロ-1H-インデン-1-オール。パーシェーカー中の水素(30PSI)を、触媒量の10%Pd/Cを含有する(1S,7aS)-5-(4-メトキシ-3,5-ジメチルフェニル)-7a-メチル-2,3,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン-1-オール(110mg、0.39mmol)のメタノール溶液に室温で2時間加えた。この系を窒素でパージしてから、セライトパッドを通過させてPd/Cを除去して、表題化合物(102mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 0.92 (s, 3H), 1.07-1.03 (m, 1H), 1.05-1.75 (m, 7H), 1.83-1.85 (m, 1H), 2.09-2.15 (m, 1H), 2.28 (s, 6H), 2.36-2.44 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.78 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 6.87 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 10.69, 16.41, 25.70, 30.12, 30.71, 33.73, 37.18, 42.76, 44.52, 45.62, 59.92, 82.05, 127.42, 130.67, 142.79, 155.21.

20

MeOH溶媒を蒸発させ、乾燥させた後、残渣をDCM(10mL)に再溶解し、三フッ化ホウ素メチルスルフィド(350mg、2.7mmol)を室温で添加し、反応物を6時間連続して撹拌した後、0でMeOHを滴下し、続いて酢酸エチル(10mL×3)で抽出し、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を真空下で蒸発させて、表題化合物(81mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 0.87 (s, 3H), 0.91-0.94 (m, 1H), 1.00-1.05 (m, 1H), 1.38-1.78 (m, 8H), 1.95-1.97 (m, 1H), 2.03-2.09 (m, 1H), 2.23 (s, 6H), 2.35-2.42 (m, 1H), 3.74 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 6.85 (s, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 10.69, 16.25, 25.72, 30.32, 30.74, 33.90, 37.23, 42.77, 44.38, 45.69, 82.09, 123.04, 127.23, 139.27, 150.53.

30

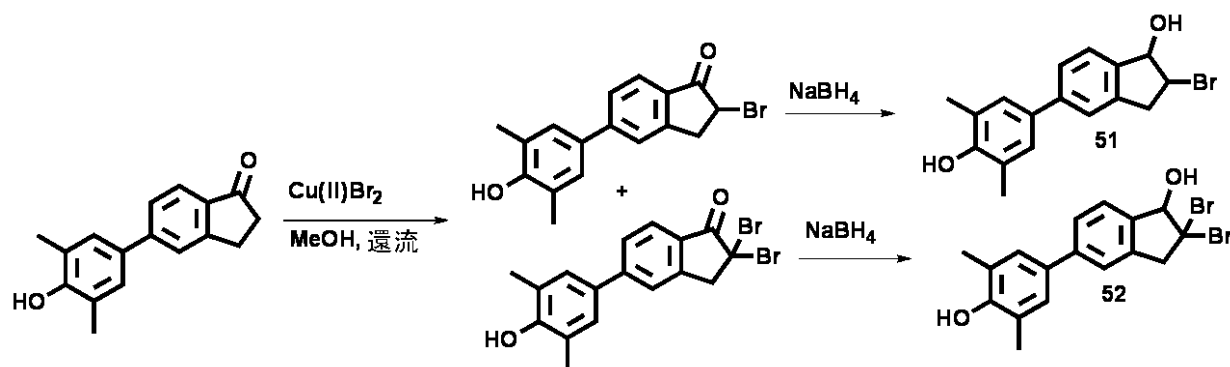
【 実施例 2 5 】

【 0 1 1 5 】

実施例25. 2-プロモ-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(51)および2,2-ジプロモ-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(52)

40

【化 6 0】



10

MeOH中臭化銅(II)(110mg、0.49mmol)および5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(40mg、0.16mmol)の混合物を、SiO₂ TLC分析(n-ヘキサン中20%EtOAc)で出発物質が消失するまで還流した。反応混合物を真空下で濃縮し、EtOAcに再溶解してシリカゲルカラムに装填した。n-ヘキサン中の25%EtOAcによる第1および第2画分により、それぞれ2-ブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(45mg)および2,2-ジブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(62mg)を得、続いてTHF-水(1:1)中のNaBH₄で処理して、それぞれ51(39mg)(R_f = 0.45)および52(56mg)(R_f = 0.38)を同様に得た。

20

【0116】

2,2-ジブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.33 (s, 6H), 4.11 (s, 2H), 4.93 (s, 1H, フェノールOH), 7.28 (s, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.66 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.94 (d, 1H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.32, 52.70, 57.62, 123.62, 124.06, 127.10, 127.15, 128.01, 128.07, 131.52, 148.05, 150.32, 153.65, 192.57.

【0117】

2-ブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.34 (s, 6H), 3.45 (ABq, 1H, J, J = 18.0 Hz, 3.0 Hz), 3.87 (ABq, 1H, J, J = 18.0 Hz, 7.5 Hz), 4.70 (ABq, 1H, J, J = 7.5, 3.5 Hz), 7.29 (s, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.87 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.32, 38.30, 44.79, 124.01, 124.20, 125.62, 127.41, 128.03, 131.82, 131.88, 149.34, 152.10, 153.45.

30

【0118】

2,2-ジブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(52). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.32 (s, 6H), 3.95 (d, 1H, J = 16.5 Hz), 4.10 (d, 1H, J = 16.5 Hz), 4.70 (s, 1H, フェノールOH), 5.20 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.21 (s, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.46 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 7.50 (d, 1H, J = 7.50 Hz).

【0119】

2-ブromo-5-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(51). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.35 (s, 6H), 3.39-3.52 (m, 2H), 4.69 (s, 1H, フェノールOH), 4.94-4.96 (m, 1H), 5.01-5.04 (m, 1H), 7.23 (s, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.48 (s, 2H).

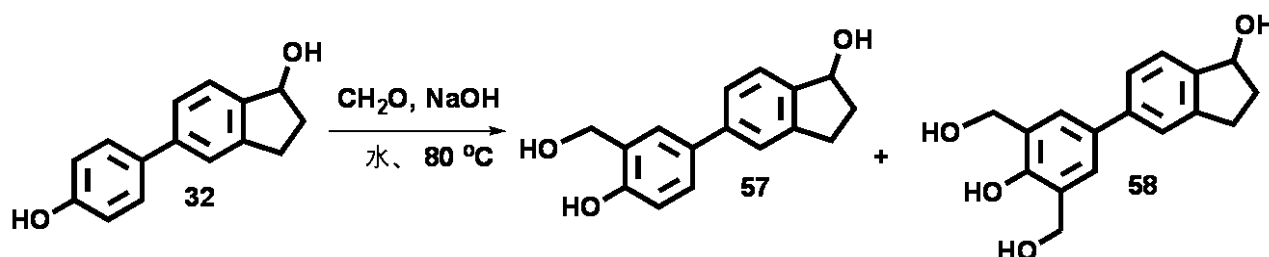
40

【実施例 26】

【0120】

実施例26. 5-(4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)フェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(57)および5-(4-ヒドロキシ-3,5-(ジヒドロキシメチル)フェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(58)

【化 6 1】



化合物32(30mg、0.13mmol)をDI水(1mL)に懸濁させた。ホルムアルデヒド溶液35質量%(105 μ l)およびNaOH(20mg、0.5mmol)を懸濁液に添加した。この溶液を85 $^{\circ}$ Cで8時間連続的に攪拌した。1N HClを滴定してpHを \sim 5.5に調整した。溶液をEtOAc(5mL \times 3)で抽出した。有機層をNa₂SO₄で乾燥させ、真空中で濃縮し、SiO₂プレップTLC(0.1mm)に装填した。Rf0.55および0.45バンドを掻き取り、これらのバンドをそれぞれ抽出すると、化合物57(12mg)および58(18mg)がそれぞれ得られた。

10

【0 1 2 1】

5-(4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)フェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(57). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD) 1.93-2.01 (m, 1H), 2.42-2.50 (m, 1H), 2.78-2.84 (m, 1H), 3.02-3.08 (m, 1H), 4.79 (s, 2H, ベンジルCH₂), 5.22 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 6.87 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.26 (s, 1H), 7.27-7.40 (m, 4H).

20

5-(4-ヒドロキシ-3,5-(ジヒドロキシメチル)フェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(58). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD) 1.84-1.95 (m, 1H), 2.36-2.2.42 (m, 1H), 2.72-2.79 (m, 1H), 2.98-3.02 (m, 1H), 4.72 (s, 4H, ベンジルCH₂), 5.17 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 7.22 (s, 2H), 7.30 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.31 (s, 1H), 7.33 (d, 1H, J = 8.0 Hz).

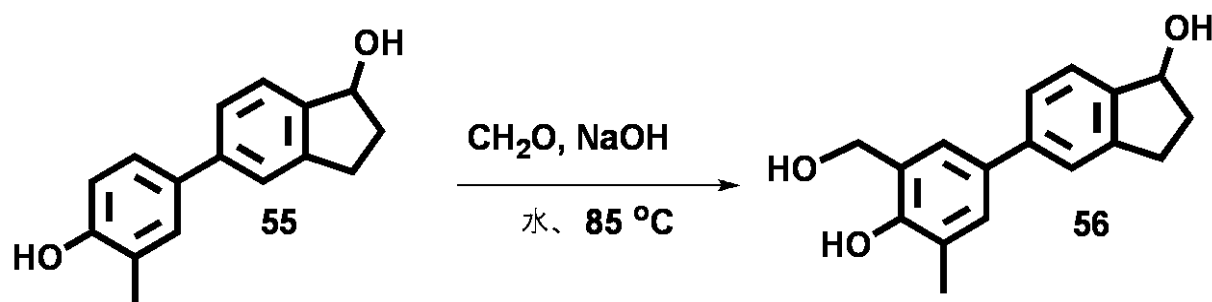
【実施例 2 7】

【0 1 2 2】

実施例27. 5-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(55)および5-(4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)-5-メチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(56)

30

【化 6 2】



40

化合物57および58の合成について記載したように、化合物55(24mg、0.1mmol)、ホルムアルデヒド質量%溶液(80 μ l)、およびNaOH(30mg)を85 $^{\circ}$ Cの脱イオン水中で反応させることによって化合物56(18mg)を調製した。

実施例1に記載の方法にしたがって、3-メチル-4-メトキシフェニルボロン酸(199mg、1.20mmol)および5-ブromo-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オン(211mg、1.00mmol)を使用して、化合物55を合成した。収率は化合物2のものに匹敵した。

【0 1 2 3】

5-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(55). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.96-2.04 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.52-2.59 (m, 1H), 2.83-2.92 (m, 1H), 3.04-3.08 (m, 1H), 4.92 (s, 1H, フェノールOH), 5.24 (t, 1H, J = 5.5

50

Hz), 6.82 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.32 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.35 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.43 (d, 1H, J = 8.5 Hz).

【 0 1 2 4 】

5-(4-ヒドロキシ-3-(ヒドロキシメチル)-5-メチルフェニル)-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-1-オール(56). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - CD_3OD) 1.91-1.97 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.43-2.49 (m, 1H), 2.75-2.84 (m, 1H), 3.02-3.08 (m, 1H), 4.82 (s, 2H, ベンジル CH_2), 5.21 (t, 1H, J = 5.5 Hz), 7.05(s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.34 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.36 (s, 1H), 7.38 (d, 1H, J = 8.5 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 15.99, 30.00, 64.44, 76.00, 123.21, 124.14, 124.59, 124.87, 125.57, 125.84, 129.29, 132.81, 141.48, 143.51, 144.15, 154.21.

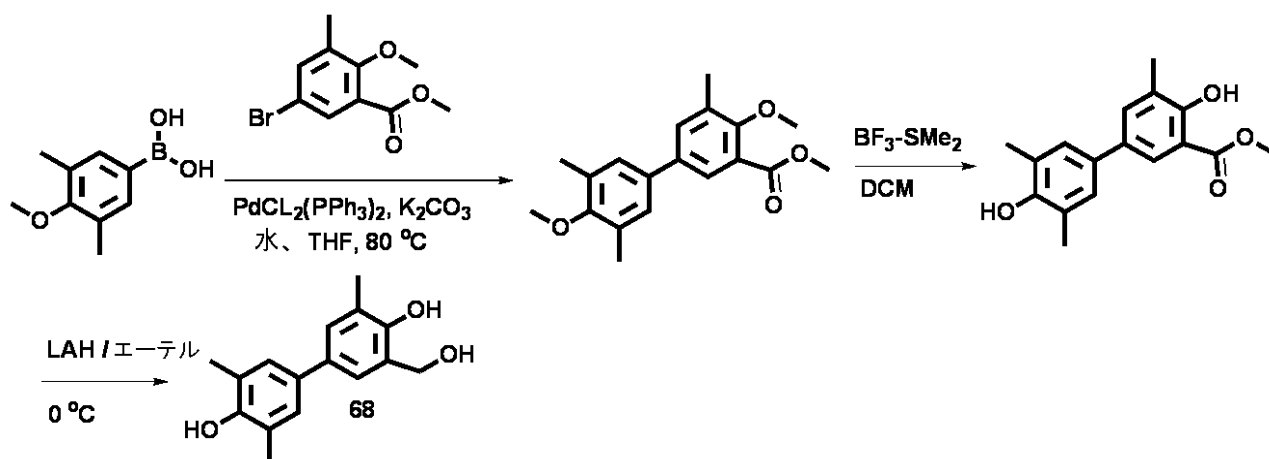
10

【 実施例 2 8 】

【 0 1 2 5 】

実施例28. 3-(ヒドロキシメチル)-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール; 3-(ヒドロキシメチル)-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール

【 化 6 3 】



20

【 0 1 2 6 】

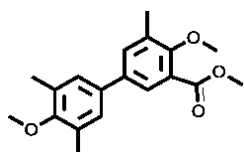
3-(ヒドロキシメチル)-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール(68). メチル4,4'-ジヒドロキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(60mg、0.21mmol)とLAH(16mg、0.42mmol)との反応から乾燥ジエチルエーテル(5mL)中0 で、次いで室温で2時間、化合物68が得られ、続いて10%NaOH水溶液で急冷し、pHを5.5に調整し、EtOAc(5mL x 3)で抽出し、 Na_2SO_4 で蒸発させて化合物68(12mg)を得る。68: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.32 (s, 6H), 2.34 (s, 3H), 4.93 (s, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.16 (s, 2H), 7.29 (s, 1H).

30

【 0 1 2 7 】

メチル4,4'-ジメトキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート

【 化 6 4 】



40

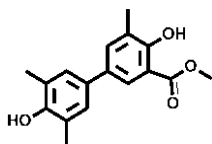
実施例1の方法に記載の反応から、3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)および4-ブromo-フェネチルアルコール(259mg、1.00mmol)によってメチル4,4'-ジメトキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(295mg)を得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 2.38 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.24 (s, 2H), 7.54 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.84 (d, 1H, J = 1.5 Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 16.49, 52.49, 60.05, 61.84, 124.84, 127.64, 127.74, 131.45, 133.19, 133.76, 135.62, 136.62, 156.89, 157.70, 167.23.

50

【 0 1 2 8 】

メチル4,4'-ジヒドロキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート

【 化 6 5 】



実施例 1 に記載されているように、メチル4,4'-ジメトキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(157mg、0.05mmol)とBF₃-SMe₂(600mg、4.6mmol)とのDCMM中の室温での反応からメチル4,4'-ヒドロキシ-3',5,5'-トリメチル-[1,1'-ビフェニル]-3-カルボキシレート(125mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 2.36 (s, 6H), 2.38 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.65 (brs, 1H), 7.18 (s, 2H), 7.53 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 7.83 (d, 1H, J = 1.5 Hz); [¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.13, 16.30, 52.56, 111.93, 123.56, 125.29, 127.12, 129.99, 132.59, 135.32, 151.79, 159.21, 171.34.]

10

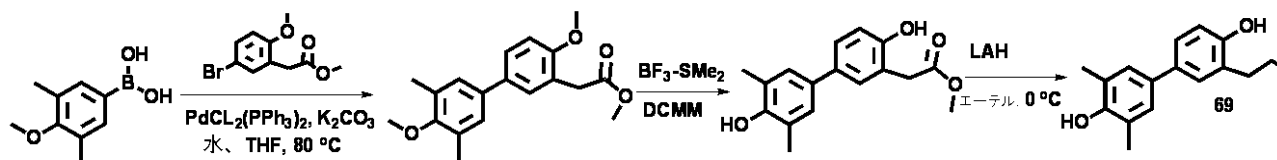
【 実施例 2 9 】

【 0 1 2 9 】

実施例29. 3'-(2-ヒドロキシエチル)-3,5-ジメチル-[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジオール(69)

【 化 6 6 】

20



化合物68の合成について記載したように、化合物69は、3,5-ジメチル-4-メトキシフェニルボロン酸(200mg、1.11mmol)およびメチル2-(5-プロモ-2-メトキシフェニル)アセテート(259mg、1.00mmol)によるスズキカップリング反応から調製し、フェノール上のメチル基をBF₃-SMe₂で脱保護し、次いでカルボン酸メチル(65mg、0.23mmol)をLAHでアルコールに還元して化合物69(43mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD) 2.30 (s, 6H), 2.96 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 4.03 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 6.95 (d, 1H, J = 10.5 Hz), 7.16 (s, 2H), 7.24 (d, 1H, J = 2.5 Hz), 7.32 (dd, 1H, J = 10.5 Hz, 2.5 Hz).

30

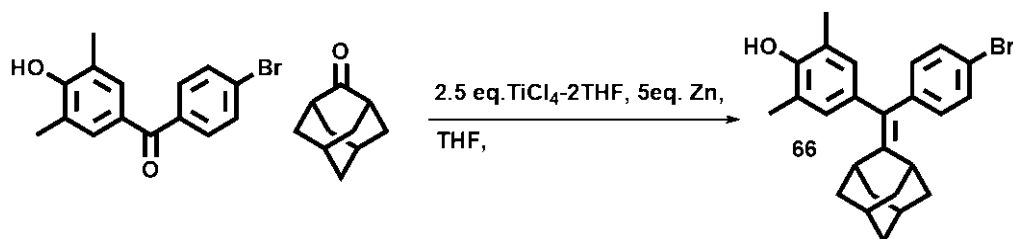
【 実施例 3 0 】

【 0 1 3 0 】

実施例30. 4-(((1r, 3r)-アダマンタン-2-イリデン)(4-プロモフェニル)メチル)-2,6-ジメチルフェノール

【 化 6 7 】

40



THF(50ml)中の塩化チタン(IV)THF錯体(1.0g、3.0mmol)および亜鉛粉末(290mg、6.15mmol)の混合物を1.5時間還流し、室温まで冷却した。この混合物に、室温で(4-プロモフェニル)(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)メタノン(308mg、1.01mmol)と2-アダマンタノ

50

ン(150mg、1.00mmol)の混合溶液を加えた。この混合物を熱い油浴下で4時間還流した後、EtOAc(100ml)と10%K₂CO₃水溶液(200ml)の混合物に注ぎ、水溶液の色が白色に変わるまで撹拌した。有機層を分離し、EtOAc(50mL×2)で洗浄し、先に集めた有機溶液に合わせ、続いてNa₂SO₄で乾燥させ、真空下で濃縮し、Combiflash(Teledyne Co., LTD)によるクロマトグラフィーで処理した。n-ヘキサンおよびEtOAc(n-ヘキサン:EtOAc、30分かけて100:0~90:10)による勾配溶出により、表題化合物(280mg)をオフホワイトの固体として得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.87 (brs, 10H), 2.00 (s, 2H), 2.20, (s, 6H), 2.71 (s, 1H), 2.81(s, 1H), 4.65 (brs, 1H, フェノールOH), 6.72 (s, 2H), 7.01 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.38 (d, 2H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.27, 28.39, 34.68, 37.36, 39.80, 119.94, 122.74, 129.49, 129.92, 131.25, 131.46, 134.68, 142.56, 146.91.150.93.

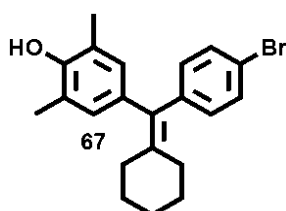
10

【実施例 3 1】

【0 1 3 1】

実施例31. 4-(4-ブロモフェニル)(シクロヘキシリデン)メチル)-2,6-ジメチルフェノール

【化 6 8】



20

上記のようにTHF(50mL)中の(4-ブロモフェニル)(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)メタノン(308mg、1.01mmol)、シクロヘキサノン(98mg、1.00mmol)、塩化チタン(IV)THF錯体(1.0g、3.0mmol)および亜鉛粉末(290mg、6.15mmol)の反応から表題化合物(235mg)を得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) 1.60 (brs, 6H), 2.20, (s, 6H), 2.24 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 4.59 (brs, 1H, フェノールOH), 6.70 (s, 2H), 6.99 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.39 (d, 2H, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) 16.20, 27.01, 28.86, 32.64, 32.75, 120.02, 122.63, 130.20, 131.18, 131.71, 133.32, 134.78, 139.42, 142.68, 150.91.

30

【実施例 3 2】

【0 1 3 2】

実施例32: 経路選択的エストロゲン、PaPE-1、はエストロゲン受容体結合および活性化補助因子相互作用を阻害した

E2およびPaPE-1(図1)の相対結合親和性(RBA)値は、精製全長ヒトER およびER を使用する競合放射測定結合分析によって得た(Carlson et.al., Biochemistry 36, 14897-14905, 1997)。E2のRBAは100と定義され、E2と比較して、PaPE-1はER およびER に対して50,000倍弱く結合する。E2のナノモル未満のK_D値(図10A)と比較して、同等のK_D値は、PaPE-1についてER およびER に対してそれぞれ10 μMおよび25 μMである。したがって、両方のERに対するPaPE-1のER結合親和性は、E2の物理的および機能的なグループ属性を可能な限り保存しながら低下している。

40

時間分解フェルスター共鳴エネルギー移動(tr-FRET)アッセイを使用して、ステロイド受容体活性化補助因子3(SRC3)のER への結合をモニタした。(Jeyakumar et.al. J Biol Chem, 286, 12971-12982, 2011, Jeyakumar et.al., Anal Biochem 386, 73-78, 2009). 活性化補助因子滴定アッセイ(図10B)では、SRC3はE2とのER 複合体に高親和性で結合したが、PaPE-1とのER 複合体への結合は示さなかった。しかしながら、注目すべきことに、アンタゴニストであるトランスヒドロキシタモキシフェン(OH-Tam)は、E2によって促進されるER-SRC3相互作用を逆転させた; また、PaPE-1はER-SRC3相互作用を逆転させたが、より低いER 結合親和性に見合った、はるかに高い濃度でのみ逆転した(図10C)。MCF-7細胞からの複合体の共免疫沈降によってもER とSRC3とのE2誘発相互作用が観察されたが、

50

PaPE-1に曝露した後のER およびSRC3では共免疫沈降複合体は観察されなかった(図10D)。

【実施例 3 3】

【0 1 3 3】

実施例33: PaPE-1はエストロゲン調節遺伝子のサブセットを調節しキナーゼを活性化しますが、乳癌細胞増殖を刺激しない

PaPE-1は、LRRRC54刺激によって示されるように、非ゲノム性遺伝子を活性化することにおいて選択的であったが、本質的には直接的ER遺伝子標的PgRに対して活性がなかった(図3A)。PaPE-1によるLRRRC54遺伝子発現の活性化は、抗エストロゲン(フルベストラント)ICI 182,780(図3B)およびER のノックダウン(図3C)による処理によって阻止された。対照的に、GPR30のノックダウンは遺伝子刺激に対して何ら影響を及ぼさなかった(図3C)。また、PaPE-1はMCF-7細胞の増殖を刺激しなかったが、E2は増殖を強力に刺激した(図3D)。

MCF-7細胞における主要なシグナル伝達経路の活性化をモニタすると、mTORC1活性化に関連するpP70S6Kおよびp4EBP1の増加、mTORC2活性化に関連するpSGK1の増加、およびpMAPKの増加によって見られるように、PaPE-1がmTORおよびMAPKシグナル伝達の活性化において非常に効率的であることが観察された(図3E)。また、pAKTおよびpSREBP1の上昇はE2と比較してPaPE-1において、より顕著であった。しかしながら、PaPE-1は、E2で観察され、ER の分裂促進活性に関連するER の検出可能なSer118リン酸化を誘導しなかった(図3E)。

mTOR経路は、環境の栄養状態を感知し、細胞内の代謝機能を調節する主要なシグナル伝達系である。mTORキナーゼは、2つの異なる複合体、mTORC1およびmTORC2として存在し、それぞれRAPTORおよびRICTOR足場折り畳みタンパク質の存在によって区別される。mTORC1は主に細胞代謝を調節するが、mTORC2は主に細胞骨格および細胞増殖の調節に関与すると考えられている。PaPE-1によるmTOR活性化をさらに特性評価するために、MCF-7細胞における近接ライゲーションアッセイ(PLA)を実施し、ER がE2よりもPaPE-1の存在下でRAPTORとより大きく相互作用することを見出した。AktおよびmTORシグナル伝達において重要な、ER とmTOR、またはER および40kDaのプロリンに富むAkt基質(PRAS40)との相互作用は検出されず、ER がRaptorとの直接相互作用を介してmTOR経路を調節したことを示唆した(図11)。

【実施例 3 4】

【0 1 3 4】

実施例34: PaPE-1はmTORおよびMAPK活性依存性様式で代謝関連遺伝子を調節するが、ER のクロマチンへの動員を引き起こさない

RNA-Seq解析を行って、発現レベルがPaPE-1および/またはE2によって変化した遺伝子を比較した。MCF-7細胞を、10nMのE2または1 μM PaPE-1で4時間および24時間処理し、これらの2つの時点で各化合物によって調節される遺伝子を比較した(図4A)。両方の時点で、E2はPaPEより多くの遺伝子を調節し、E2による遺伝子調節の大きさはPaPEによる遺伝子調節の大きさよりも一般に高かった。4時間で、E2は約1500個の遺伝子を制御したが、PaPE-1はわずか500個の遺伝子の発現を調節した(図4A上のVennダイアグラム)。24時間で、約3000個の遺伝子がE2によって調節されたが、PaPE-1は2200個の遺伝子を調節した(図4A下のVennダイアグラム)。4時間および24時間の両方において、PaPE-1によって調節される遺伝子の3/4はE2の標的でもあった。特に、24時間の時点でE2のみが有糸分裂遺伝子をアップレギュレーションし、アポトーシス遺伝子をダウンレギュレーションし、PaPE-1がMCF-7細胞増殖を刺激しなかったという観察と一致した。

【0 1 3 5】

経路選択的阻害因子を使用して、PaPEおよびE2媒介遺伝子調節に対するmTOR経路またはMAPK経路活性化の効果を評価した。mTOR経路阻害因子PP242はPaPE調節遺伝子の60%の調節を阻止したが、E2調節遺伝子の40%のみがこの阻害因子の影響を受けた。同様に、MAPK阻害因子AZD6244は、PaPE-1調節遺伝子のほぼ50%を遮断したが、E2調節遺伝子の23%のみが同じ阻害因子により遮断された(図4B)。エンリッチメント遺伝子オントロジー (gene

10

20

30

40

50

ontology) (GO) 機能を調べることにより、これらの阻害因子は、細胞遊走、免疫、細胞周期および血管新生関連遺伝子のE2調節を阻止することが明らかになり、一方、ヌクレオチド代謝、炎症反応、ncRNAプロセッシング、アミノ酸輸送および糖タンパク質代謝に関連する遺伝子のPaPE-1調節を阻止した。

PaPE-1媒介転写事象におけるER、ERK2および活性RNA Pol II動員の役割を調べるために、ChIP-Seq解析を行った。ChIP-Seq (図4C) により、ERは細胞のE2処理時にクロマチンに動員され、一方ERはPaPE-1の存在下でクロマチンに動員されなかったことが明らかにされた。PaPE-1はERK2の近位プロモーター領域への動員を引き起こし、一方、E2はERと共にエンハンサー領域へのERK2の動員を引き起こした。異なるRNA Pol II動員部位がPaPE-1で観察され、PaPE-1が標的遺伝子のエンハンサー領域へのERまたはERK2動員に影響を及ぼさずにRNA Pol IIの動員を介して転写事象を誘導することがさらに示唆された。図4Cの右にVeh、E2およびPaPE-1による細胞処理後のER、ERK2およびpSer5 RNAポリメラーゼII結合のこれらの異なるパターンがTFF1/pS2遺伝子およびLRR54/TSKU遺伝子について示されている。

【0136】

PaPE-1のインビボ生物学的活性は、卵巢摘出雌マウスにおいて特性評価した。E2について知られているように、PaPE-1は、皮下注射の後に迅速に消失した($t_{1/2}$ 約1時間、図12A)；したがって、インビボ研究のためのより長期の曝露を提供するために、ALZETミニポンプによる投与またはPaPE-1を含有するベレットによる投与が使用され、両方とも皮下に埋め込まれた(図12B)。

PaPE-1は、ERおよびmTORシグナル伝達の組織特異的モジュレーターであり、非生殖(代謝および血管)組織における選択的エストロゲン様活性を有する。子宮、胸腺および乳腺の増殖に対するPaPE-1のE2様作用の欠如に対して、体重、肝臓、脂肪組織および脈管構造においてPaPE-1のE2様作用が見られた。8週齢のマウスを卵巢摘出し、2週間後、対照Veh、E2またはPaPE-1で3週間処置した。E2は子宮の成長を高めるのに非常に有効であったが、PaPE-1は子宮質量に対して刺激効果を示さなかった(図5A)。周知のように、E2は顕著な胸腺の退縮を誘導するが、PaPE-1は高用量でさえ胸腺の大きさに影響を及ぼさなかった(図5A)。同様に、PaPE-1は、ビヒクル対照マウスと比較して乳腺管形態を変化させなかったが、E2は顕著な管成長(伸長および分枝)を誘発した(図5B)。しかしながら、興味深いことに、E2およびPaPE-1の両方は、卵巢摘出後にマウスに発生する乳腺脂肪過多症を低下させた。これは、E2またはPaPE-1処置後の脂肪細胞面積の減少と関連していた(図5C)。

【0137】

PaPE-1およびE2の効果は、肝臓および脂肪組織における体重および代謝効果に見られた。マウスの体重は、よく知られているように、卵巢摘出後に増加し、この体重増加は、PaPE-1および3週間のモニタされたE2によって抑制された(図6A)。体重は、E2-およびPaPE-1処置マウス対ビヒクル対照処置動物(Bonferroni post-testを用いた二元配置ANOVA、E2 $p < 0.05$; PaPE-1 $p < 0.01$)で統計的に低く、PaPE-1およびE2群は互いに統計的に異ならなかった。PaPE-1で観察された体重増加の低下は、摂食量の変化によるものではなかった(図6B)。E2の既知の食欲抑制効果のため、E2処置動物では食物摂取の早期低下があった；しかしながら、これはPaPE-1処置動物では観察されず、このことが体重および脂肪デポにおける変化が異なることの決定要因ではないことを示唆した(図6B)。

PaPE-1の主要な影響は、EchoMRI測定で観察されたように、動物の脂肪蓄積にあった。E2とPaPE-1はともに脂肪量を大幅に減少させたが、E2のみにより総除脂肪体重と水分量が増加し、これらはPaPE-1の影響を受けず、PaPE-1は動物の除脂肪体重よりも全体的な脂肪蓄積を変化させることによって働いたことを示した(図6C)。生殖腺周囲の脂肪組織のH&EおよびOil Red O染色(図6D)は、この組織に対するPaPE-1およびE2の両方の類似した著しいエストロゲン作用を強調した。PaPE-1およびE2は、検査された全脂肪デポの質量を減少させた(図6E)。生殖腺周囲、腎周囲および皮下の脂肪組織は両方のリガンドによって減少したが、試験された用量ではE2により大幅に減少した。腸間膜脂肪組織は、両方のリガンドによって同様に減少し、また、両方のリガンドも血中のトリグリセリドレベルを減少

させた(図6F)。

【0138】

肝臓の組織学的変化をモニタすると、非常に劇的な肝臓表現型が観察された。OVXによるエストロゲンの除去は、脂質小滴の蓄積を増加させ、E2またはPaPE-1は、肝臓切片のオイルレッドO染色で観察されるように、肝細胞脂質含量を減少させた(図6G)。脂肪酸合成経路の変化は、肝脂肪症、FASNおよびSREBP-1cの2つのバイオマーカーをモニタすることによって確認され、これらの遺伝子の発現レベルは、E2またはPaPE-1処置の3週間後に減少したことが分かった(図6H)。SREBP-1転写標的、FASN、およびアセチル-CoAのマロニル-CoAへのカルボキシル化を触媒する(脂肪酸合成における律速段階)酵素アセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACACA)をコードする遺伝子の発現は、PaPE-1またはE2処置の24時間で低下し、2週間モニタして低値を維持した(図6H)。

10

PaPE-1対E2による遺伝子発現およびシグナル伝達経路の活性化をインビボで複数の組織で研究した。PaPE-1は、遺伝子発現およびシグナル伝達経路活性化パターンにおける組織特異的分子変化を誘導することが見出された。長期研究において動物から採取された様々な組織におけるこれらの変化を特性評価するために、肝臓、骨格筋、生殖腺周囲の脂肪、膵臓、および子宮において変化することが文献に報告されている遺伝子の発現の解析を行った。PaPE-1およびE2は、代謝組織、すなわち肝臓および骨格筋において非常に類似したプロファイルを生成した；全く対照的に、E2のみが子宮において遺伝子発現変化を誘導した(図7A)、非生殖組織におけるPaPE-1の選択的刺激作用と一致した。

20

【0139】

より機構的な洞察を得るために、E2およびPaPE-1によって活性化されたシグナル伝達経路は、種々の組織においてプロファイリングした(図7B)。E2とPaPE-1とは生殖組織(子宮および乳腺)において対照的な効果を有し、E2のみが刺激性であったのに対し、E2およびPaPE-1は非生殖組織において同様の経路効果を有した。さらに、肝臓および骨格筋のような代謝組織において、E2およびPaPE-1の両方は、S6リン酸化によって観察されるように、mTORシグナル伝達を誘導するのに非常に有効であった。

ER α ノックアウトマウスにおいてPaPE-1活性は失われる。野生型およびER α ノックアウトマウス(ERKO)において、E2およびPaPE-1の生理学的プロセスおよび遺伝子発現に対する選択された数の効果を比較した(図13)。OVXマウスをE2またはPaPE-1で3週間処置し、図13Aに示すように、卵巣摘出後の体重増加を減少させるE2またはPaPE-1の能力は、ERKOマウスにおいて失われた。子宮の成長のE2刺激は、予想通り、ERKOマウスでは観察されず(図13B)、E2またはPaPE-1後の血中トリグリセリドの減少もなかった(図13C)。図13Dは、ER α が、ERKOマウスにおいて観察されなかった野生型マウスの肝臓に見られるFASNおよびSREBP1c遺伝子に対するPaPE-1またはE2の抑制効果のメディエータであることを示す。

30

【0140】

E2およびPaPE-1の血管効果を研究した。エストロゲンは、雌マウスの血管周囲電気損傷後の頸動脈再内皮化のインビボ研究によって例示されるように、血管細胞に対して潜在的に有益な作用を有する。卵巣摘出後、マウスをビヒクル、E2またはPaPE-1で18日間処置し、その時点でE2およびPaPE-1処置マウスにビヒクルまたは抗エストロゲンICI 182,780の単回用量を投与した。3日後、頸動脈露出を行い、E2またはPaPE-1を継続しつつマウスに2回目のビヒクルまたはICIを投与し、露出72時間後にエバンスブルー染料を全身投与して露出の残存面積を評価した。図8A上のパネルは、頸動脈の内膜表面によるエバンスブルー染料の取り込みを示す。E2およびPaPE-1は、残存露出の最小限の面積によって示されるように、同様の顕著な内皮修復を引き起こし、E2およびPaPE-1によって誘発された応答は、抗エストロゲンICI 182,780(ICI、フルベストラント)によって完全に防止された。種々の処置群のまとめのデータを下の図8Aに示す。同じ動物において、E2によって大きく上昇した子宮質量はPaPE-1によって影響を受けず、予想通り、抗エストロゲンICIはE2による子宮刺激を阻止した(図8B)。

40

内皮への直接的効果を評価するために、培養中の無傷の初代ウシ内皮細胞による ^{14}C -L-アルギニンの ^{14}C -L-シトルリンへの変換を測定することによって、内皮NOシンターゼ(eNO

50

S) 活性化を評価した。eNOSは以前に観察されたようにE2によって活性化され(Chambliss、J Clin Invest 120,2319-2330、2010)、PaPE-1に対して匹敵する応答があった；E2およびPaPE-1の両方の効果は、ICIによって完全に弱められた(図8C)。

【実施例 3 5】

【0 1 4 1】

実施例35：追加のPaPEの特性評価

ER非ゲノム性シグナル伝達を優先的に活性化する化合物をさらに例示するために、PaPE-2およびPaPE-3からの結果を示す。この2つのリガンドはステロイドリガンドであるエストラジオールの変化した形態である点でPaPE-1に構造的に関連するが、もともとエストラジオールD環であった構造において変動を有する。すなわちPaPE-2では環が開裂しており、PaPE-3では環が拡大(図1)している。さらにPaPEの構造を多様化するために、追加のリガンド、PaPE-4も研究した；このPaPEは、非ステロイド性エストロゲン、ビスフェノールA(BPA)に由来し、BPAのコアビスフェノール構造を維持するが、メチル基の1つを極性ビスアミド置換基で置換することによって減少したER結合親和性を有するように改変されている。PaPE-2、-3および-4のER結合および物理的特性を図1に示す。

これらのPaPEの全ては、インビトロおよびインビボで同様の生物学的活性を示した。それらはすべて、両方の遺伝子の発現を非常によく刺激したE2と比較して、ゲノム性遺伝子刺激に対して優先的な非ゲノム性遺伝子刺激を引き起こした(LRRC54> PgR)(図9A)。E2とは対照的に、これらのPaPEのいずれも、試験した広い濃度範囲にわたってMCF-7細胞の増殖を刺激しなかった(図9B)。すべてのPaPEは、これらの細胞におけるpMAPK、pP70S6およびpSREBP1、およびpAKTによってモニタされるように、MAPK、mTORおよびAKTシグナル伝達経路の活性化を増加させた(図9Cおよび9D)。内皮細胞では、PaPE-1で見られたように(図8C)、E2と同様にPaPE-2、-3および-4もNOS活性を増加させ(図9E)、NOS刺激は抗エストロゲン、ICIで完全に阻止された。インビボで、4種のPaPEおよびE2は、卵巣切除後、摂食量を変化させずに(図9G)体重増加を低下させた(図9F)。4種のPaPEは子宮質量の増加を誘発しなかったが、これとは対照的に、E2により子宮質量は著しく増加した(図9H)。4種のPaPEによる体重の減少は、EchoMRIによってモニタされるように、体脂肪量の変化にほとんど起因し、除脂肪体重または水分量の変化はほとんどまたはまったくなかった。E2は脂肪量をより顕著に減少させ、除脂肪体重および水分量を増加させた(図9I)。これらの差異の影響は、E2処置動物の体重がPaPE処置動物の体重と一致したという事実を説明することができる。

【実施例 3 6】

【0 1 4 2】

実施例36：シグナル伝達経路と結合するERリガンド結合ダイナミクスの研究

E2と比較した、ERのリガンド結合ポケットにおけるPaPE-1の適合性の構造的詳細を示すコンピューターモデルを図2に示す。ヘリックス3および6は結合ポケットのA環末端を拘束し、E2(銀/灰色)はGLU353およびARG394の両方に水素結合を形成し、GLUおよびARGを架橋する結晶水(赤い点)によってさらに安定化する。対照的に、PaPE-1のオルト-メチル基(黄色)は、H3およびH6との立体障害を導入し、リガンドの配置に有意な変化を誘導する。PaPE-1のA環OHはGLU353への水素結合を維持し、結晶水は依然としてGLUとARGとの間を架橋するが、ARG394への直接リガンド接触は破壊されている(ER構造は黄色である)。ポケットのD環末端には、HIS524の位置決めにも微妙なシフトがある。全体的に、PaPE-1リガンドの体積が減少し、芳香族C環模倣物による平面性が増加することによって、ポケットの中央領域全体でのファンデルワールス接触がより少なくなるようである。ER-E2複合体に関するこれらの変化の全ては、PaPE-1の結合親和性が非常に低いことと一致する。それにもかかわらず、リガンド結合ポケットの全体的な形状は、PaPE-1の結合によって大きな変化はなく、PaPE-1はなお(短寿命ではあるが)ERと構造的に適格である複合体を形成できることが示唆される。

PaPE-1およびE2の解離速度をERについて測定した(図10EおよびF)。それらは、ほぼ2000倍異なる。ER-E2複合体の半減期は約30時間であるのに対して、PaPE-1複合体の半減期

は1分未満である。

【実施例 37】

【0143】

実施例37. PaPEによる非ゲノム性遺伝子の活性化.

LRRC54遺伝子をPgR遺伝子より高いレベルに選択的に活性化させる化合物は、核外開始経路、すなわち非ゲノム性経路の活性化に優先的であると考えられる。それぞれの場合において、この選択性は、2つの遺伝子の刺激における倍数変化を示すヒストグラムからだけでなく星またはレーダープロット (LRRC54の活性化が青色の曲線上の点としてプロットされ、PgRの活性化が赤い曲線上の点としてプロットされる) から明らかである (図14~33)。

このヒストグラムにおいて、非ゲノム性遺伝子(LRRC54)の活性化倍数が、ゲノム性遺伝子(PgR)の活性化と比較してエストラジオール(E2)による活性化に対して高い場合に、その化合物は非ゲノム性遺伝子の活性化に対する経路選択を示す。星またはレーダープロットでは、非ゲノム性遺伝子の選択的な活性化は、青色の曲線上の点が、赤色の曲線上の点よりもプロットの中心からさらに遠くに広がっている場合に明らかである。

非ゲノム性経路の活性化のための選択の明確な証拠を示す化合物の例は以下の通りである: 化合物2、3、4; 15、16、18; 24、26、29~30; 32; 41; 44-47; 56-58; 59~60; 63-64。適切な濃度(ピコモル濃度)で、化合物40は、非ゲノム性経路の選択性も示す(図25)。

非ゲノム性経路の活性化をほとんどまたは全く示さない化合物の例は、化合物5~14; 17、19~22; 23、25、27-28、31~35、36~40、42~43; 48~49; 50~55; 61、62、65~67。

選択された化合物についてのER およびER RBA値のリスト。RBA(相対結合親和性)値は、100のRBA値を有するエストラジオールのそれに対する結合親和性の尺度である。

【0144】

【表 1】

Compound	ER α	ER β	Compound	ER α	ER β	Compound	ER α	ER β
2	0.001 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	21	0.019 \pm 0.004	0.012 \pm 0.002	40	0.302 \pm 0.04	0.058 \pm 0.01
8	0.001 \pm 0	0.006 \pm 0.001	23	0.002 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	41	0.004 \pm 0.001	0.002 \pm 0
9	0.003 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	24	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0	42	0.004 \pm 0	0.002 \pm 0.001
10	0.008 \pm 0.002	<0.001	25	0.003 \pm 0	0.009 \pm 0	43	<0.001	0.001
12	0.001 \pm 0	0.002 \pm 0.001	26	<0.001	0.002 \pm 0.001	44	0.001	0.001
15	0.002 \pm 0.001	0.005 \pm 0.003	27	0.003 \pm 0.001	0.003 \pm 0	45	0.001	0.002
16	0.002 \pm 0.001	0.004 \pm 0.003	28	0.008 \pm 0.002	0.013 \pm 0.002	55	0.002	0.004
17	0.003 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	30	0.002 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	56	<0.001	<0.001
19	0.004 \pm 0.001	<0.001	32	0.005 \pm 0.001	0.190 \pm 0.04	60	<0.001	~0.001
20	<0.001	<0.001	35	0.011 \pm 0.003	0.755 \pm 0.20	63	0.005	0.006

Compound: 化合物

【実施例 38】

【0145】

実施例38. 乳癌細胞に対するPaPe-1の効果.

肥満の閉経後女性における乳がん細胞の増殖と攻撃性を促進する要因の特定

肥満に関連する血清からの因子を同定するために、「中年の健康調査」と命名された最初の研究から合計100の試料(37人の非肥満、63人の肥満者)が使用された。ボルチモア市

と周辺のいくつかの郡を含むボルチモア首都圏の住民である女性から血清を採取した。BMI > 25を、過体重および肥満として分類するためのカットオフとして使用した。対象はすべて閉経後2~3年の女性であった。これらの100サンプルの炎症、CVDおよび腫瘍学パネルについて、全代謝産物プロファイリングおよびOLINKバイオマーカープロファイリングを実施した(図34AおよびB)。これらの解析は、対象のBMIに基づいて、血清代謝産物組成およびタンパク質組成がある程度階層化していることを示した。この研究の乳癌発症の追跡調査は利用できなかったため、各個体からの血清を使用してER (+)MCF-7およびT47D細胞およびER (-)MDA-MB-231細胞における増殖指標を導き出した(図34C)。ER (+)細胞は肥満個体からの血清で処理された場合に細胞増殖が増加したが、ER (-)細胞ではそうではなかった。インビトロ細胞増殖指標と血清ドナーのBMIとの間には統計的に有意な線形相関があったが、エストラジオール、テストステロンまたはプロゲステロンレベルでは相関しなかった(図35AおよびB)。MCF-7細胞におけるBT474細胞およびmTOR経路活性化のために、乳癌の攻撃性を測定するための代用物として運動性指標を使用した(図34D)。最初のサンプルセットは癌のない女性のものであるため、いくつかのよく知られている癌血清バイオマーカーのレベルは乳癌転帰を予測すると同定されたバイオマーカーの能力を検証するために測定される。例えば、健常者と比較して、乳癌患者の血液中には、より低いグリセロール、フェニルアラニン、グルタミン酸およびイソロイシンレベルが見出された。より高い増殖指標に関連する血清試料は、低い増殖指標に関連する試料と比較して、これらの代謝産物のレベルが低かった(図35C)。したがって、細胞増殖、運動性、およびmTOR経路活性化の評価は、乳癌の予後に関して有益であり、乳癌の攻撃性の増加に関連するバイオマーカーを同定するために使用された。

10

20

次に、相関解析を、血清代謝産物レベルとバイオマーカーレベルとER (+)細胞からの細胞増殖指標との間で行った。ヒートマップを使用して、MCF-7増殖と $p < 0.05$ で相関する代謝産物およびタンパク質バイオマーカーの相関係数を視覚化した。この解析は、オレイン酸/9-オクタデセン酸(OA)およびパルミチン酸(ヘキサデカン酸)、レプチン(LEP)、サイトカインCCL3およびIL-20が含まれるいくつかの遊離脂肪酸(FFA)がMCF-7およびT47D細胞増殖と正の相関があることを示した(図34EおよびF)。

【0146】

ER (+)乳癌細胞の血清誘発増殖はFFAと関連する

ER (+)細胞増殖を増加させる可能性がある特定のFFAを同定するために、同じ血清試料を遊離脂肪酸についてプロファイリングし(図36Aおよび2B)、乳癌細胞におけるより高い増殖を引き起こした試料が、解析した全てのFFAについて高いレベルを有することが確認された。さらに、中年の健康調査のサンプルのサブセットで代謝産物のプロファイリングを実施した。このサンプルには、研究の開始時に肥満であり、後に体重を減らし、研究の最後まで非肥満であった21人の閉経後女性のサンプルが含まれていた。これらの個体から初期試料(階層ツリーの中に濃い赤色の線で標識された)および最終血清試料(階層ツリーにおいて黒色で標識された)をプロファイリングし、減量後のFFAレベルの低下を観察した(図36C)。最後に、癌がなく、後に乳癌の診断を受けたときに血液を寄贈した閉経後女性のサンプルが含まれていたKomen Tissue Bankから得られたサンプルセットを使用した。年齢、BMIおよび人種合致対照サンプルからの血清サンプルもまた使用した。この解析は、乳癌を発症した肥満の閉経後女性は、健常対照と比較して血清中の高レベルのFFAを有することを示した(図36D)。各FFAのER (+)MCF-7細胞株の増殖に影響を及ぼす能力を試験することにより、フォローアップスクリーニングを行った(図36E)。不飽和脂肪酸、特にOAがMCF-7細胞における細胞増殖を増加させるには非常に効率的であることが分かった。対照的に、他のFFAは、細胞増殖を誘導するにはOAほど有効ではなかった(図36E)。

30

40

【0147】

OAはER およびmTORシグナル伝達を活性化することによって乳癌細胞増殖を増加させる

血清中のFFA混合物において細胞増殖を誘導することができる活性成分としてOAを検証するために、インビトロ増殖アッセイを実施した。このアッセイにより、高レベルのOAが乳癌細胞におけるより高い増殖指標と著しく関係していることが明らかになった(図37A)

50

。肥満個体由来の血清もまたmTOR経路活性化を増加させることが見出されたので(図34C)、OAを使用して時間経過実験を行い、OA処理がmTOR経路の下流標的Akt、S6および4EBP1の強力な活性化を引き起こすことが見出された(図37B)。ERK1/ERK2もまた活性化されたが、この活性化はより早期で、かつ一過性であった(図37B)。次に、PaPE-1を使用し、OAがER-mTORシグナル伝達を介して機能するかどうかを調べるために、PaPE-1がER-mTORシグナル伝達クロストークを調節することを示した。PaPE-1での細胞の処理は、OA誘導mTOR経路活性化(図37C)およびOA誘導細胞増殖(図37D)を減少させた。OA誘導細胞増殖がERおよびmTOR経路を介したものであることをさらに確認するために、4-OH-タモキシフェン(R-OH-Tam)、ERアンタゴニストであるフルベストラント(Fulv)、およびmTOR経路阻害剤であるRAD001、の存在下でOA処理を行った。試験した薬剤の全てがOA誘導細胞増殖を阻止した(図37E)。肥満個体由来血清もERおよびmTOR経路を介してMCF-7細胞の増殖を誘導することを確かめるために、4-OH-Tam、FulvおよびPaPE-1の存在下で細胞増殖アッセイを行った。注目すべきことに、PaPE-1は、MCF-7細胞の血清誘導性増殖を阻害するのに最も有効な薬剤であった(図37F左パネル)。しかしながら、正常な細胞培養条件下では、4-OH-TamおよびFulvがより良好な薬剤であり(図37Fの右パネル)、これは肥満個体由来血清による処理がMCF-7細胞をPaPE-1の増殖阻害効果に対してより感受性にすることを示唆する。最後に、高レベルのOAが食餌とは独立であるが、肥満状態のみに関連することを確実にするために、正常または高脂肪食である野生型マウスおよび正常食餌によるレプチン欠損(ob/ob)マウスの両方を卵巣摘出し、6週間にわたってVehまたはPaPE-1を送達したAlzetミニポンプを皮下に埋め込んだ。PaPE-1処置は、食物摂取量を変更することなく、卵巣切除誘発性体重増加を低下させた。卵巣摘出に伴うエストロゲンレベルの低下は、卵巣摘出動物の血清中のOAレベルの上昇を、無傷の動物と比較して引き起こす(図37G、左パネル)。3つのモデルすべてにおいて、PaPE-1による治療は、OAの血清レベルを低下させ、乳癌細胞におけるER-mTORシグナル伝達による直接作用に加えて、PaPE-1がOAの血清レベルを全身的に低下させることによって肥満に伴う乳癌を予防し得ることを示唆する(図37G)。

【0148】

OAは乳癌細胞における遺伝子発現変化を誘導し、PaPE-1によって阻止される

OA誘導ERおよびmTOR経路調節に関連する遺伝子発現変化を明らかにするために、ビヒクル(Ctrl)、100nM OAまたは1 μ M PaPE-1の存在下の100nM OAでMCF-7細胞を処理した(図38A)。OAは約350個の遺伝子をアップレギュレーションし、これらのアップレギュレーションされた遺伝子の80%の活性化はPaPE-1によって阻止された。他方、約500個の遺伝子がOAによってダウンレギュレーションされ、PaPE-1はこれらの遺伝子の約60%の発現を回復することができた(図38BおよびC)。GOターム(Term)解析により、OAが、細胞増殖、エネルギー貯蔵代謝プロセス、上皮細胞遊走および血管新生に関連する遺伝子をアップレギュレーションすることが示された。他方、OA処理は、グルコースおよび脂肪酸代謝に関連する遺伝子ならびに上皮細胞増殖の阻害剤をダウンレギュレーションした(図38 4D)。

【0149】

FFA処置はERのクロマチンへの動員を誘導する

OA処置によって誘導された遺伝子発現変化のいずれかがクロマチンへの直接的なER動員を介して生じたかどうかを試験するために、ChIP-Seq実験を実施したところ、ERがOA処理により新規クロマチン部位に動員され、この動員のほとんどがPaPE-1処理によって阻止されることが示された(図39A)。PgRの古典的ER結合部位を含む種々の部位へのER動員のパターンが確認された(図39B)。OAの存在下でのER動員のクロマチンへの動員の性質を理解するために、OA処理に際してERによって占有される結合部位を研究した(図39AおよびC)。C1、C2、C3およびC4と命名された4つの主要なクラスターがあった(図39C)。これらの結合事象の大部分は、OA処理により発現が増加した遺伝子と関連していた。次いで、転写因子結合モチーフエンリッチメント解析をCistrome/GalaxyのSeqposツールを使用して実施した。興味深いことに、C2を除いたクラスターのいずれも、EREのエンリッチメントがなかったため、これらの部位へのERの動員の可能性のある係留様式が示唆された(図39D)。次に、これらの因子のいくつかの転写活性を、Signal finderアッセイと呼ばれ

るルシフェラーゼベースのシステムを使用して解析した(図39E)。OAへの曝露は、PPAR、LXRおよびRXRの転写活性を増加させ、ER が遺伝子発現を調節するためにこれらの核受容体を動員し、パートナーとなり、代謝過程および乳癌細胞の生存に必須である変化をもたらすことを示唆する(図39EおよびF)。

【0150】

OA処理は乳癌細胞において代謝リプログラミングを引き起こす

遺伝子発現、ER ChIP-Seqおよび転写因子活性アッセイは、OA曝露時のMCF-7細胞における代謝経路の変化の可能性を指摘した。したがって、細胞代謝表現型アッセイを実施した。それによりOAの存在下では、細胞は活発な表現型を採用し、好気的および糖分解性代謝能を増加させることにより代謝ストレスによく対処することが明らかになった(図40A)。細胞はより糖分解性であり(図40B)、そのミトコンドリア代謝は増加し(図40C)、PaPE-1処理によってOA誘発性解糖系および好気性呼吸が逆転した。次に、細胞表現型実験(図40D)からの所見と一致し、ペントース経路(図40E)およびプロリンを含む特定のアミノ酸(図40E)の代謝産物の増加を有するMCF-7細胞で平行メタボロミクス実験を行った。OAは、リンゴ酸およびフマル酸を除くTCAサイクル代謝産物の多くをダウンレギュレーションし、細胞質ゾルからのリンゴ酸分路の増加を示唆したが(図40E)、これは特定のアミノ酸レベルの増加およびミトコンドリア活性の増加と一致する。最後に、脂肪酸生合成経路は、リノール酸合成まで全体的にダウンレギュレーションされ、高レベルの細胞外OAに起因する負のフィードバックループを示唆した(図40E)。全体として、これらの解析は、OA処理が乳癌細胞の有意な代謝再プログラミングを引き起こし、これはPaPE-1処理によって逆転され得ることを示唆している。

【実施例39】

【0151】

実施例39. マウスにおける脳卒中損傷の重症度および予後に対するPaPE-1の効果

雌の8週齢のC57BL/6マウスを卵巣摘出した。次いで、2週間のウォッシュアウト期間の後、ビヒクル、エストラジオールまたはPaPE-1(無作為化、 $n = 9 \sim 10$ /群)を含有する皮下ペレットインプラントを埋め込んだ。1週間後、マウスは30分間中大脳動脈閉塞され、続いて90分間の再灌流期間によって、脳虚血再灌流傷害を受けた。1つのコホートは、45分の一過性中大脳動脈閉塞(tMCAo)の前にローターロッドトレーニングを受け、tMCAo後2週間を通してMRIおよびローターロッドを評価した。脾臓白血球亜集団および子宮質量を定量した。別のコホートに45分間のtMCAoを施して、脳、脾臓および血液中の白血球亜集団を脳卒中の3日後に定量した。脳卒中3日後および7日後にMRIを実施し、脳卒中後13日間にわたりローターロッド試験を行った(図41)。

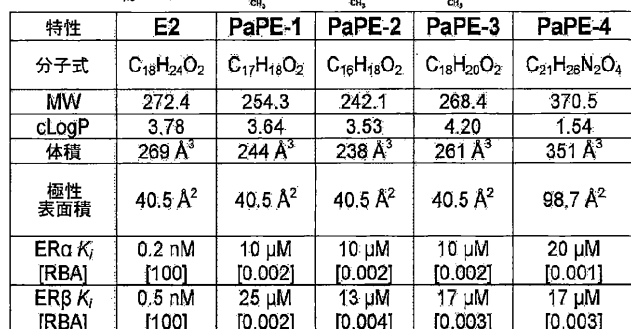
マウスは、tMCAo後2日目でベースラインから53%のローターロッド能力低下を経験した。PaPE-1はベースラインの85% ($p = 0.005$) および82% ($p = 0.001$) までそれぞれtMCAo後6日目および13日目で機能回復を改善したが、エストラジオール処置は脳卒中後の13日目 ($p = 0.005$) にのみ機能を改善した。ビヒクルと比較して、PaPE-1およびエストラジオールの両方が、tMCAo後3日目および7日目に梗塞体積を有意に減少させた。さらに、PaPE-1およびエストラジオール処置により、脳卒中3日後に脳内に浸潤した白血球数はそれぞれ93% ($p = 0.002$) および63% ($p = 0.019$) 減少した。しかしながら、ビヒクルと比較して、エストラジオールは子宮湿潤質量の増加を引き起こしたが、PaPE-1は効果がなかった。

【0152】

E2およびPaPE-1処置では、3日目および7日目でのMRIに対するCNS損傷の重症度は、対照処置と比較して減少した(図42および43)。また、損傷に関連する腫脹の程度は脳卒中3日目のE2およびPaPE-1により減弱した(図42および43)。E2およびPaPE-1によるCNS損傷の減弱は、損傷に対する同側のCNSに対する白血球動員の減少と関連していた(図44~46)。E2およびPaPE-1は、さらに、ローターロッド試験で評価した脳卒中後の機能の改善をもたらした(図47)。

PaPE-1累積所見は、PaPE-1による非核エストロゲン受容体活性化が、マウスにおける脳卒中の損傷からの保護および有害なPaPE-1後遺症から保護することを示している。

【 圖 1 】



【 圖 2 】

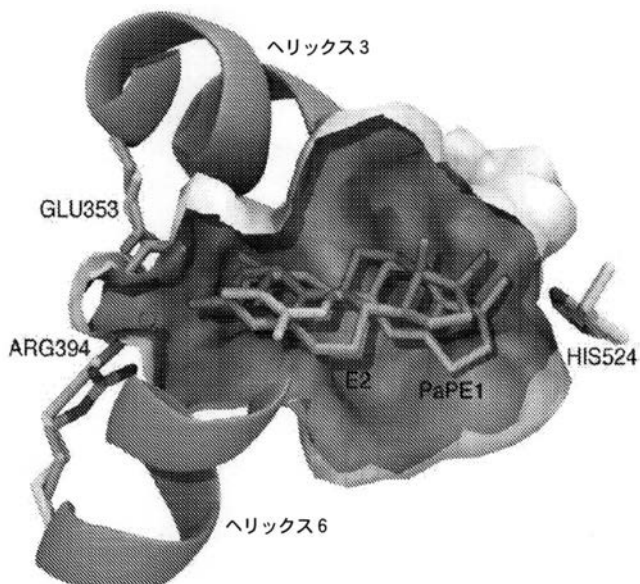


FIG. 2

【 図 3 】

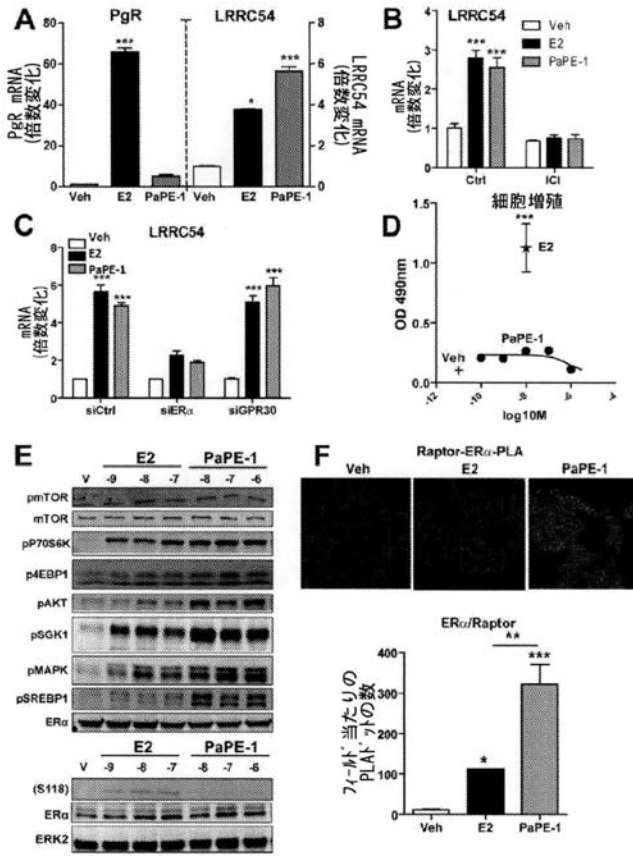


FIG. 3

【 図 4 】

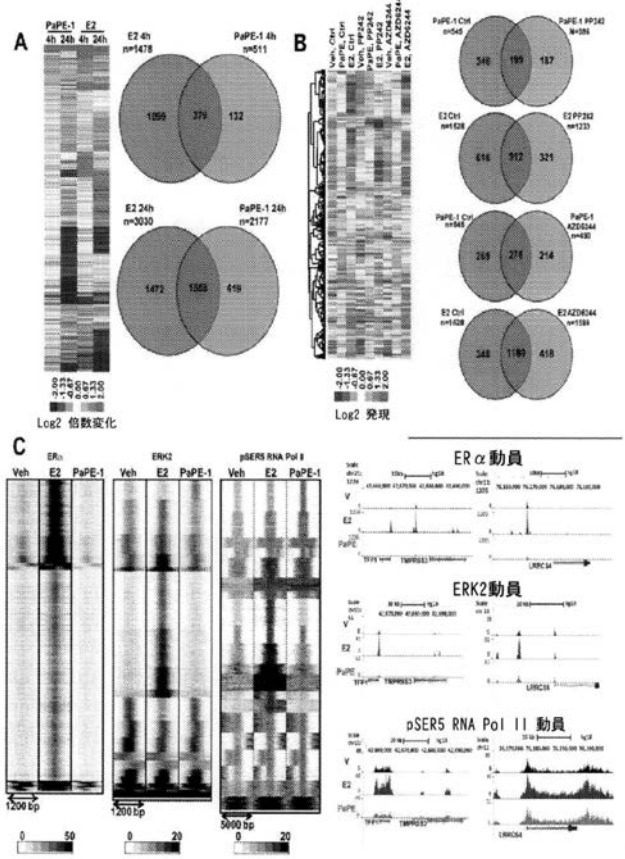


FIG. 4

【 図 5 】

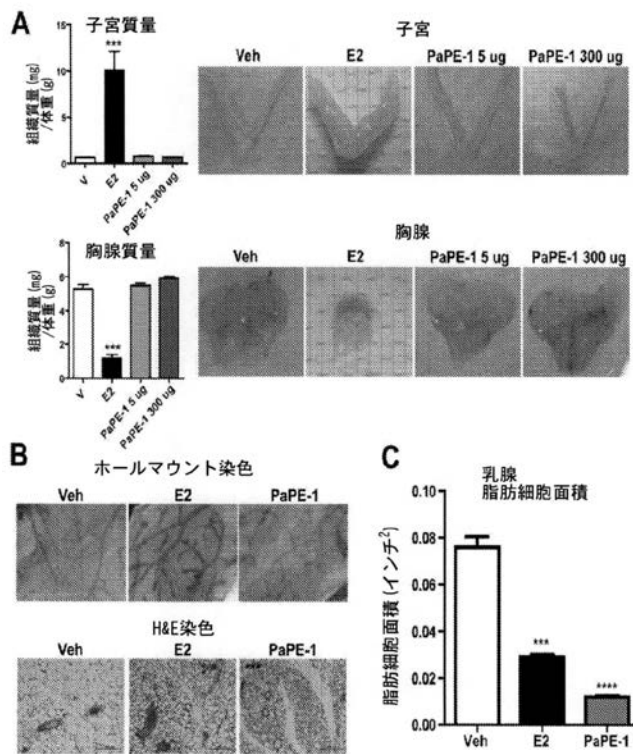


FIG. 5

【 図 6 】

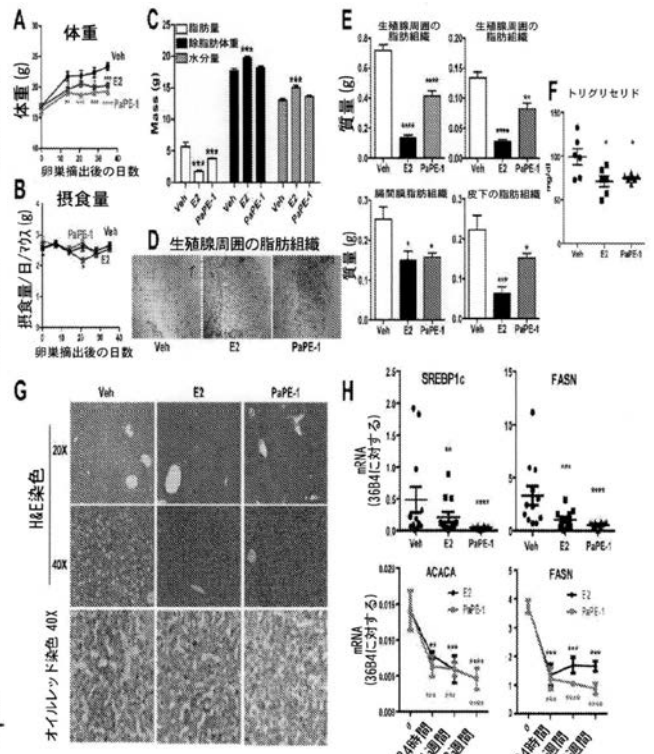


FIG. 6

【図 7】

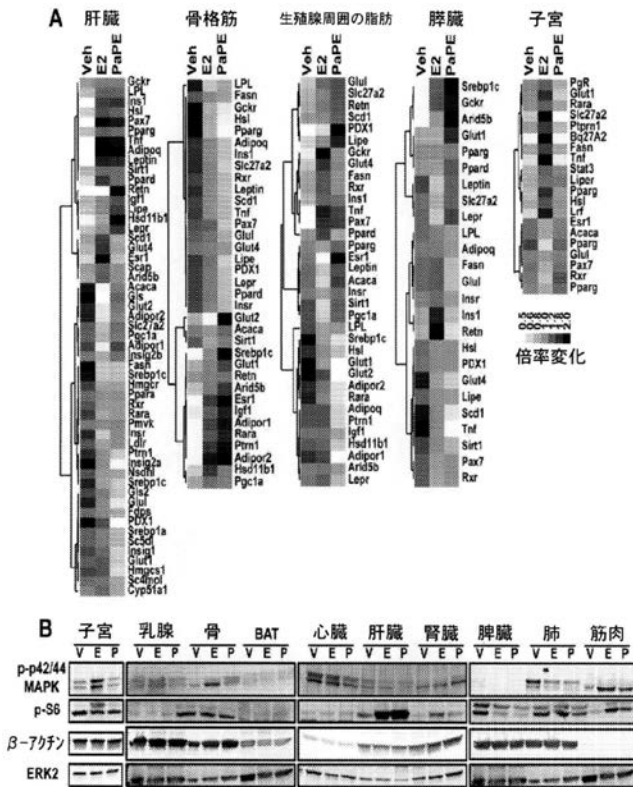


FIG. 7

【図 8】

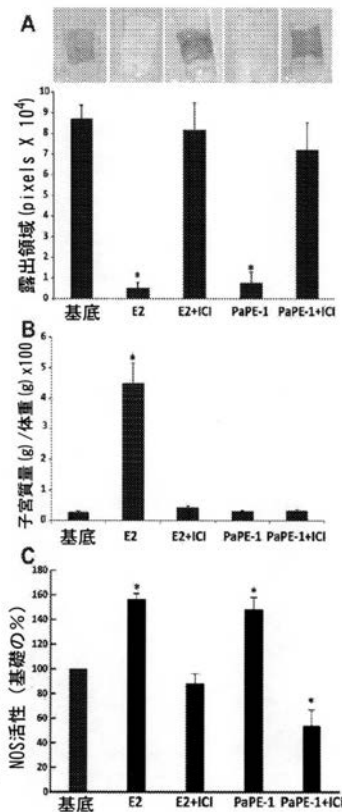


FIG. 8

【図 9】

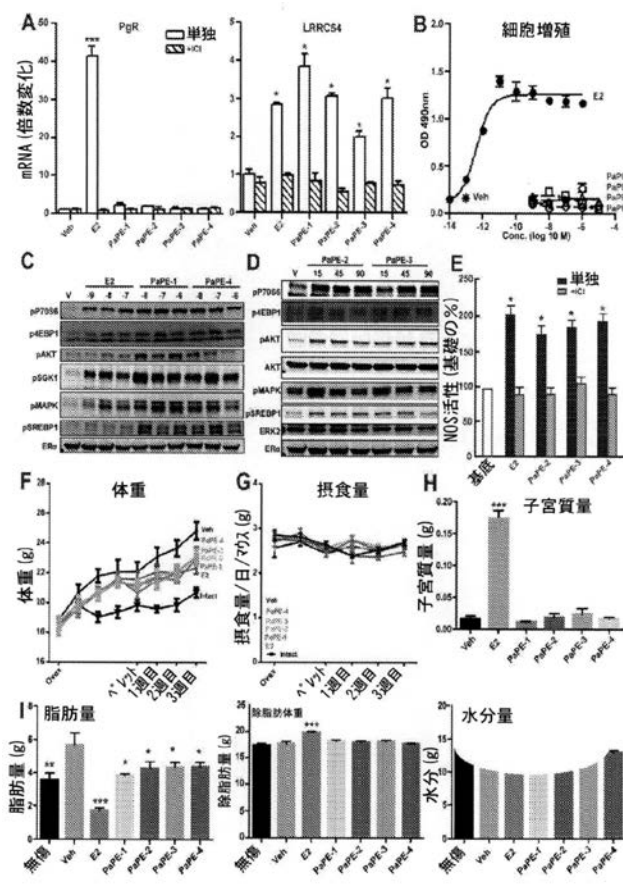


FIG. 9

【図 10】

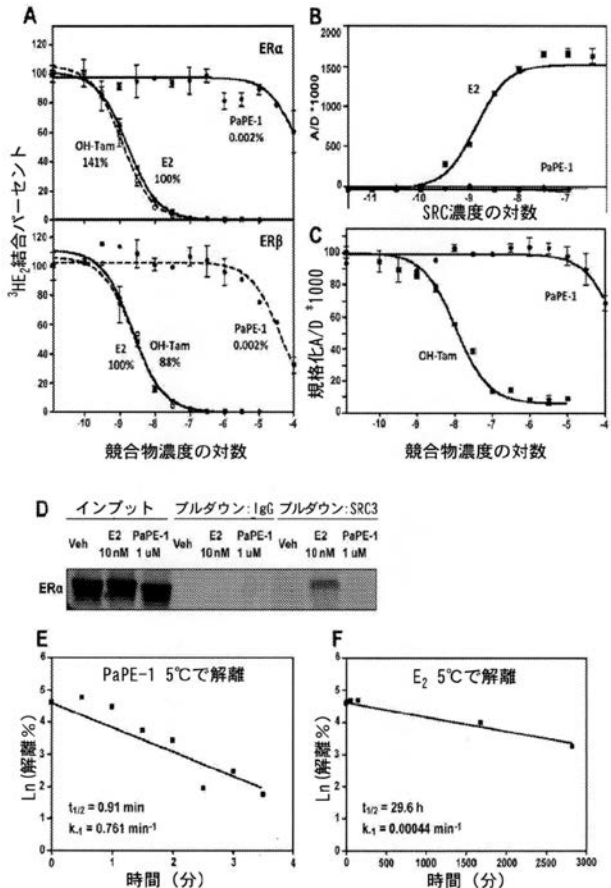


FIG. 10

【図 1 1】

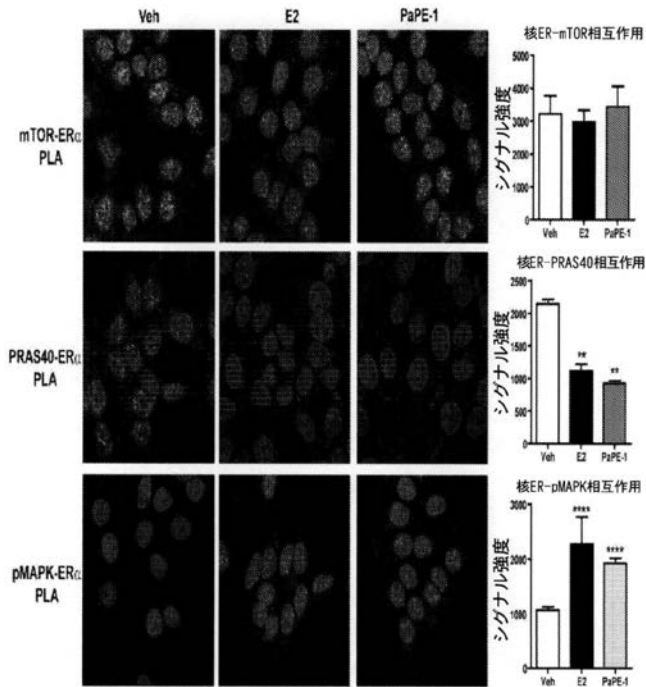


FIG. 11

【図 1 2】

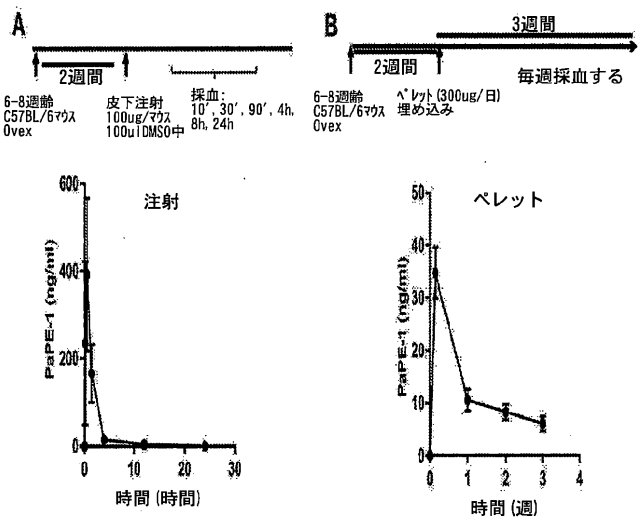


FIG. 12

【図 1 3】

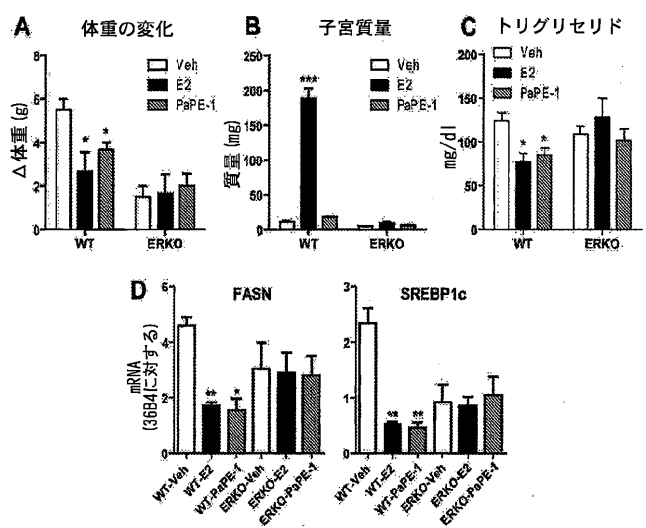


FIG. 13

【図 1 4】

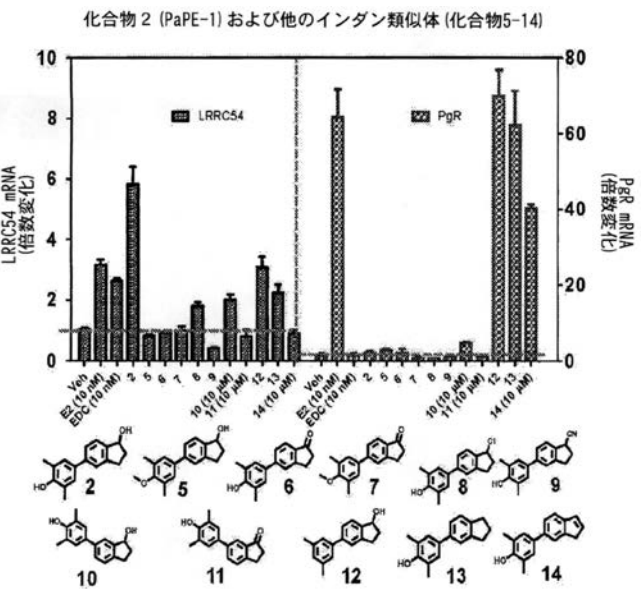


FIG. 14

【図 15】

化合物 2 (PaPE-1) および他のインダン類似体 (化合物5-14)

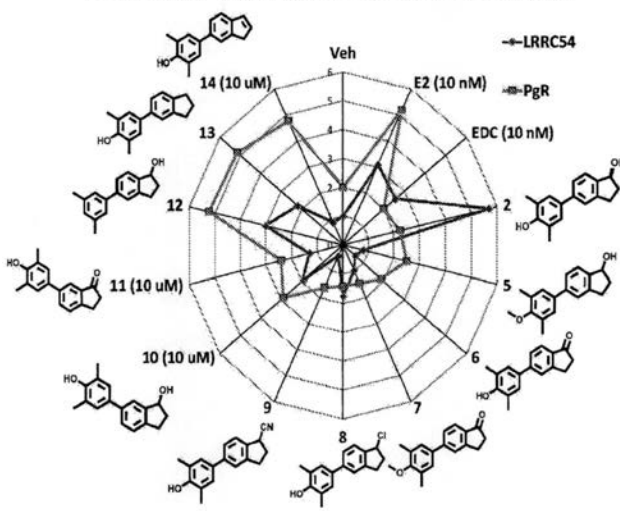


FIG. 15

【図 16】

化合物 2 (PaPE1)、化合物15 (PaPE2)、化合物16 (PaPE3)、および他の関連化合物 (17-22)

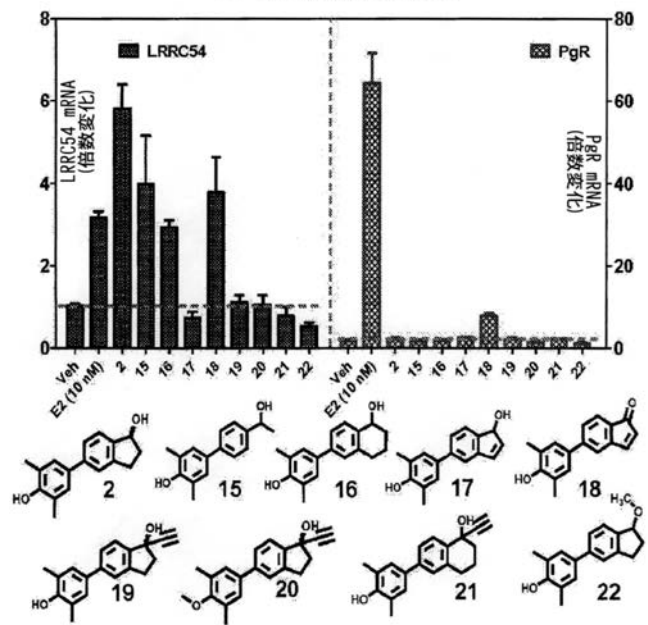


FIG. 16

【図 17】

化合物 2 (PaPE1)、化合物15 (PaPE2)、化合物16 (PaPE3)、および他の関連化合物 (17-22)

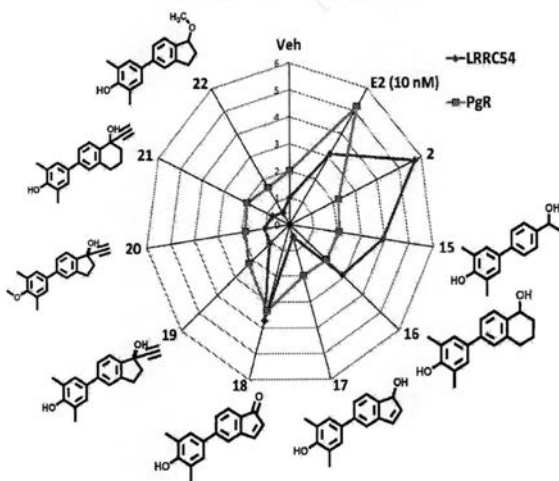


FIG. 17

【図 18】

化合物2 (ラセミ体, PaPE1)、PaPE1 (化合物3) のS-エナンチオマーおよびPaPE1 (化合物4) のR-エナンチオマー

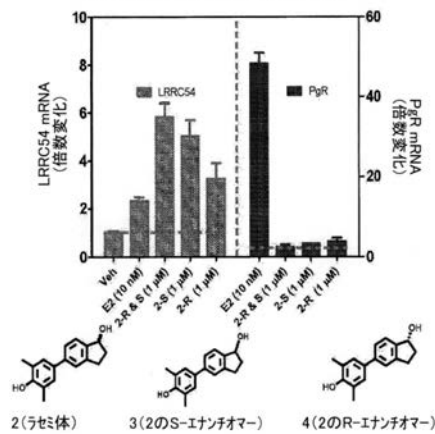


FIG. 18

【図 19】

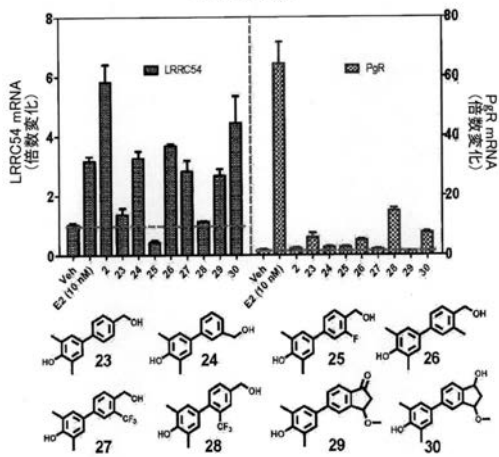
化合物2 (PaPE-1) ならびに関連ベンジルおよび他の類似体
(化合物23-30)

FIG. 19

【図 20】

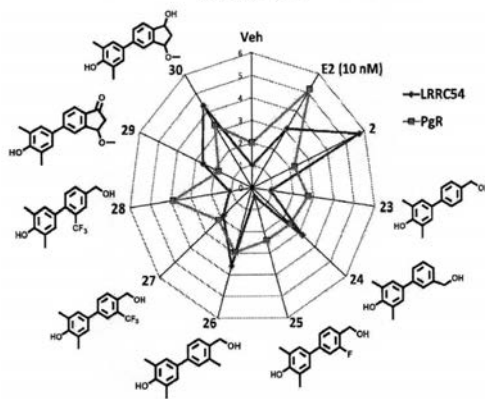
化合物2 (PaPE-1) ならびに関連ベンジルおよび他の類似体
(化合物23-30)

FIG. 20

【図 21】

化合物2 (PaPE-1) および関連ビフェニル類似体 (化合物31-35)

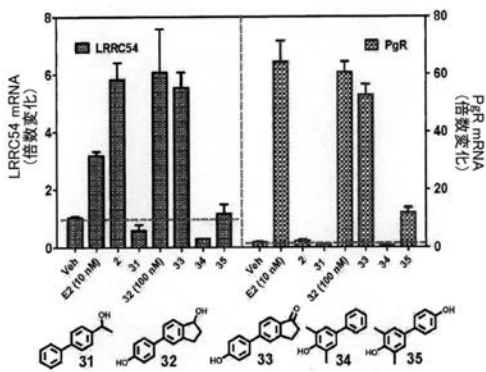


FIG. 21

【図 22】

化合物2 (PaPE-1) および関連ビフェニル類似体 (化合物31-35)

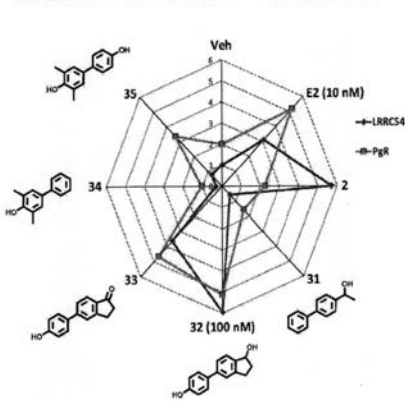


FIG. 22

【図 2 3】

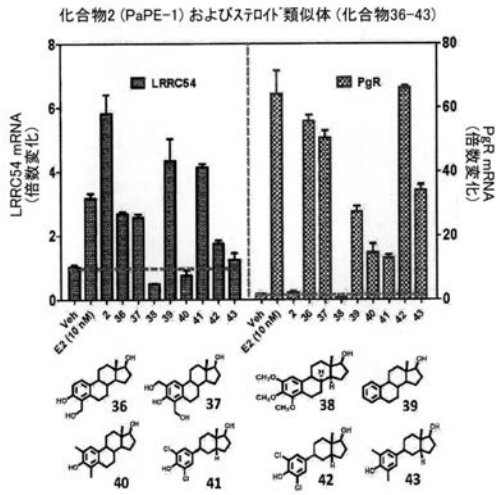


FIG. 23

【図 2 4】

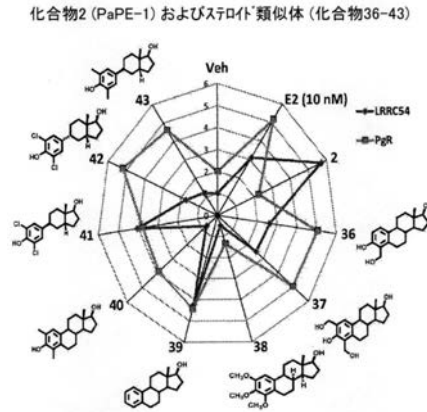


FIG. 24

【図 2 5】

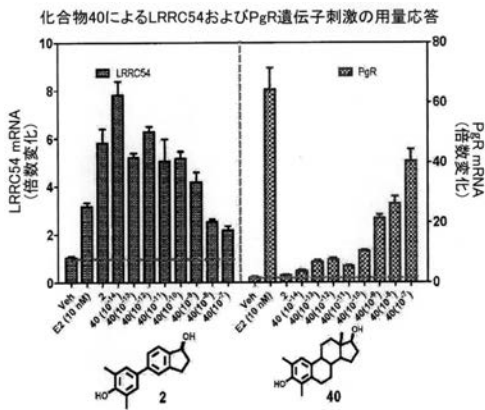


Fig. 25

【図 2 6】

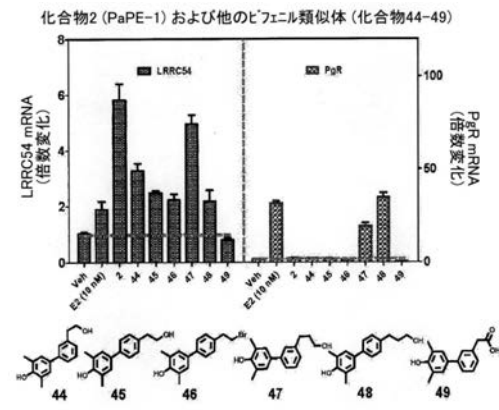


Fig. 26

【 図 2 7 】

化合物2 (PaPE-1) および他のビフェニル類似体 (化合物44-49)

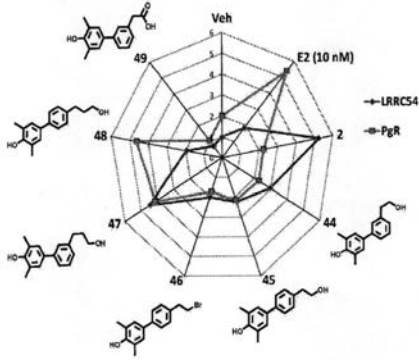


Fig. 27

【 図 2 8 】

化合物2 (PaPE-1) ならびに種々の関連インダンおよびビフェニル類似体 (化合物50-58)

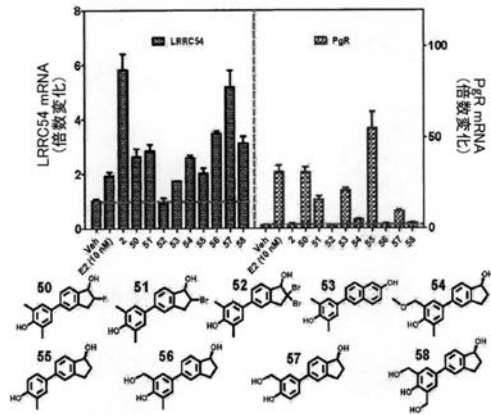


Fig. 28

【 図 2 9 】

化合物2 (PaPE-1) ならびに種々の関連インダンおよびビフェニル類似体 (化合物50-58)

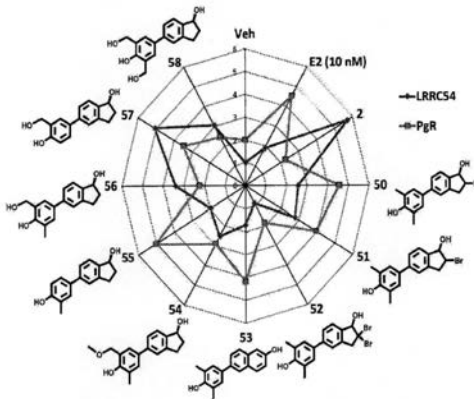


Fig. 29

【 図 3 0 】

化合物2 (PaPE-1) ならびに関連ビフェニル類似体 (化合物59-65, 68-70) およびシクロフェニル類似体 (化合物66および67)

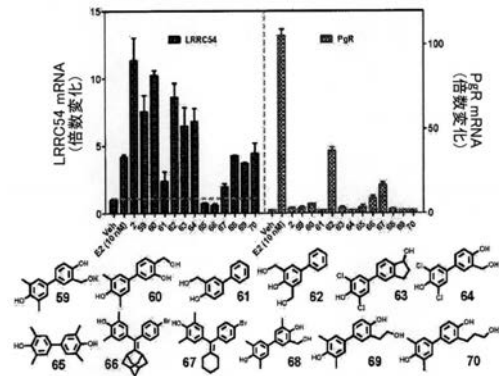


Fig. 30

【図 3 1】

化合物2 (PaPE-1) ならびに関連フェニル類似体 (化合物59-65, 68-70) およびシクロフェニル類似体 (化合物66および67)

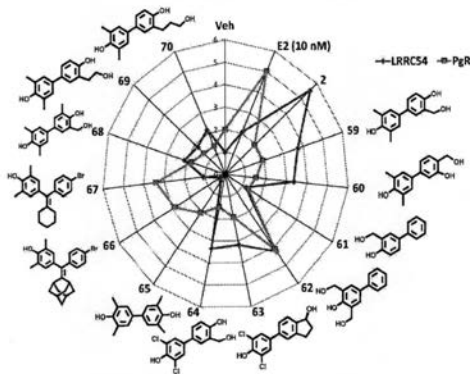


Fig. 31

【図 3 2】

化合物2 (PaPE-1) ならびに選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERMs) ヒドロキシタモキシフェン (HO-TAM) およびタモキシフェン (RAL)

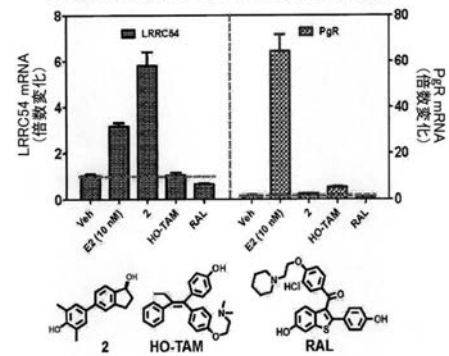


FIG. 32

【図 3 3】

化合物2 (PaPE-1) ならびに選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERMs) ヒドロキシタモキシフェン (HO-TAM) およびタモキシフェン (RAL)

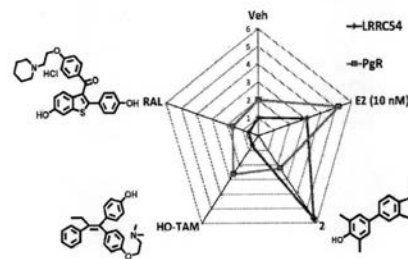


FIG. 33

【図 3 4】

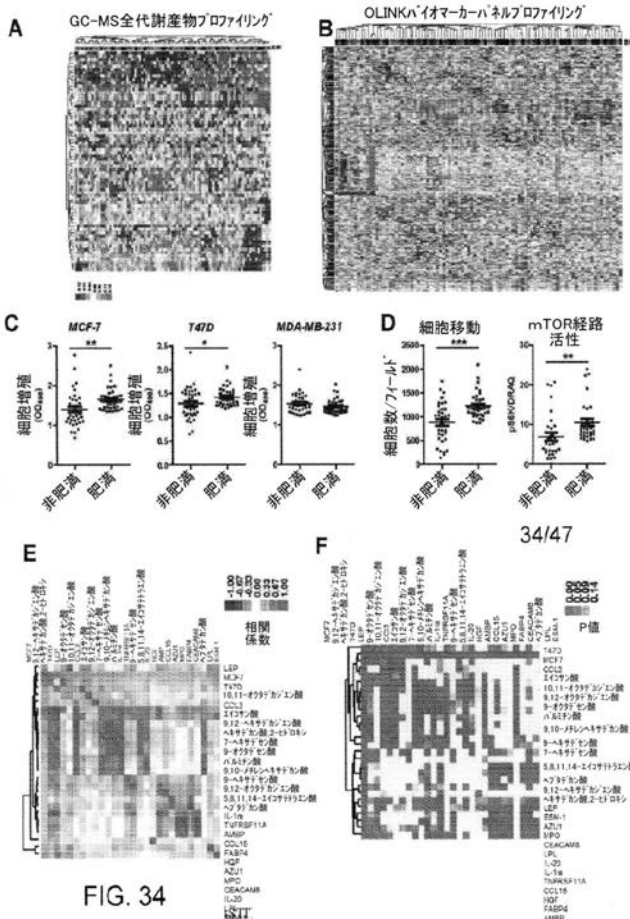


FIG. 34

【図 3 5】

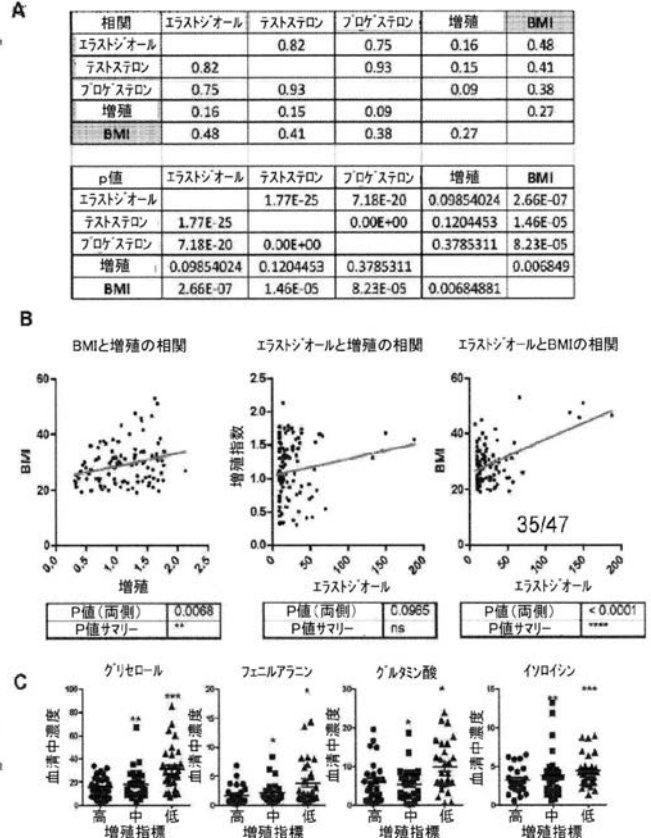
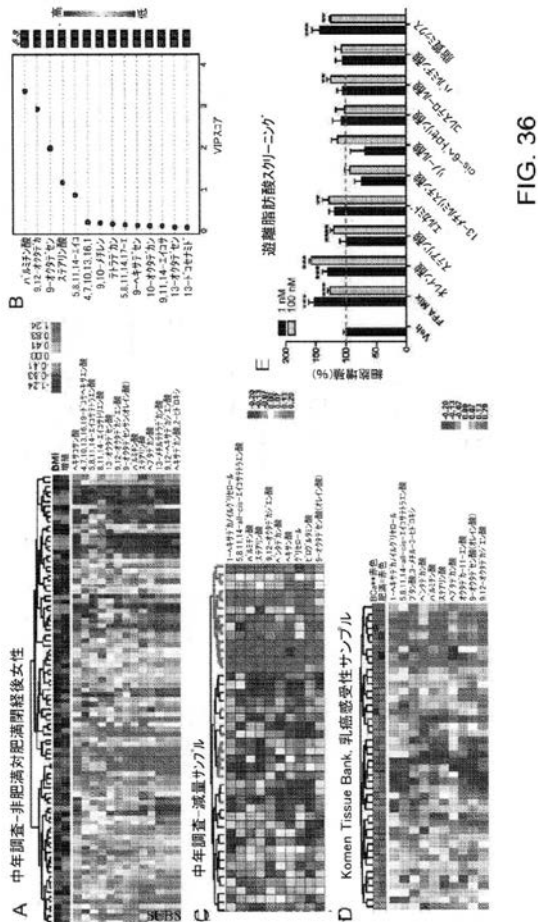


FIG. 35

【図 36】



【図 37】

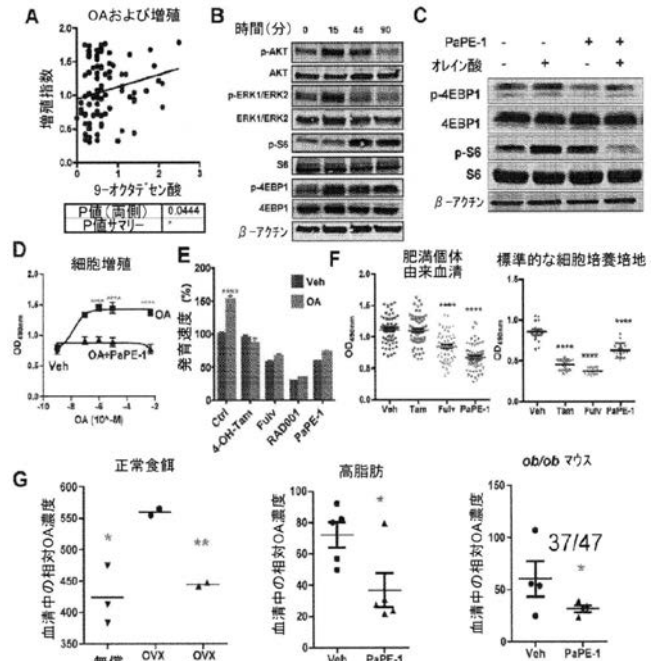
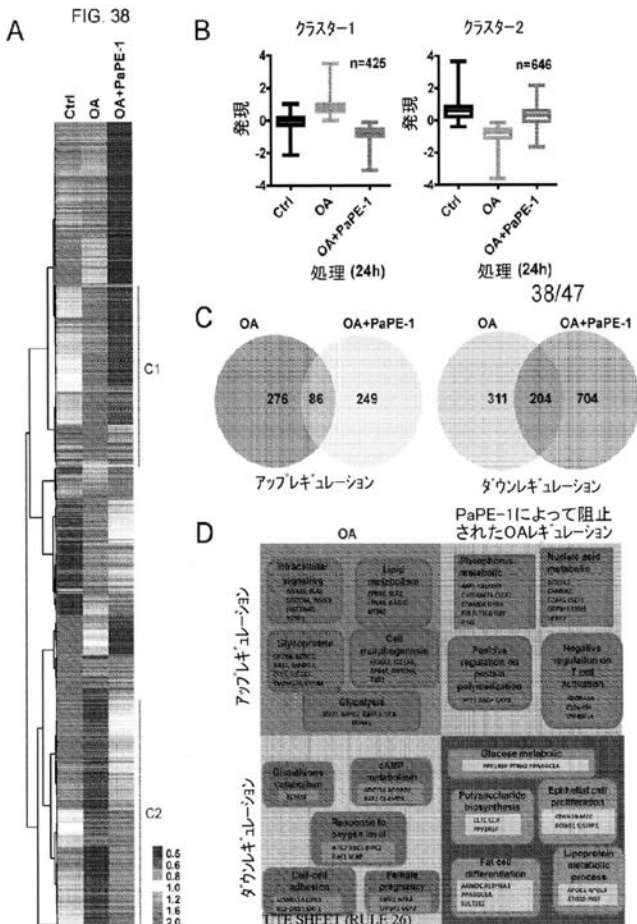


FIG. 37

【図 38】



【図 39】

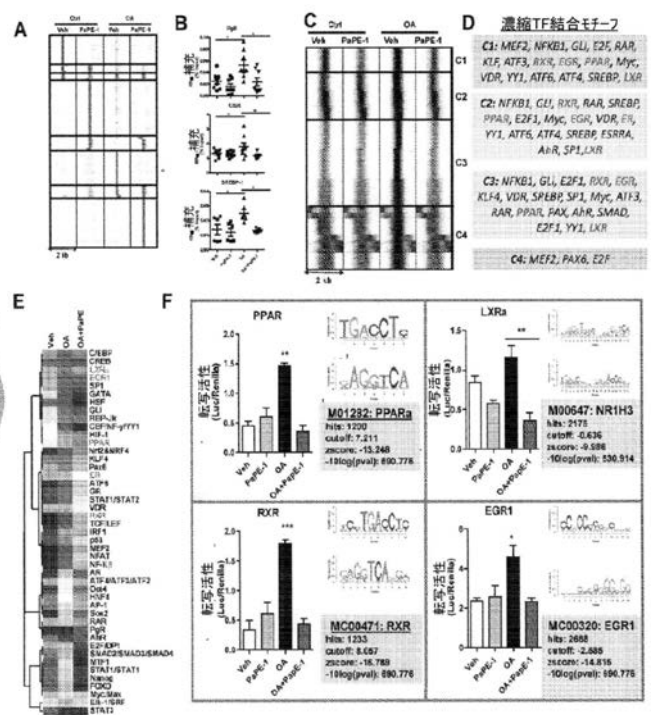


FIG. 39

【 図 4 0 】

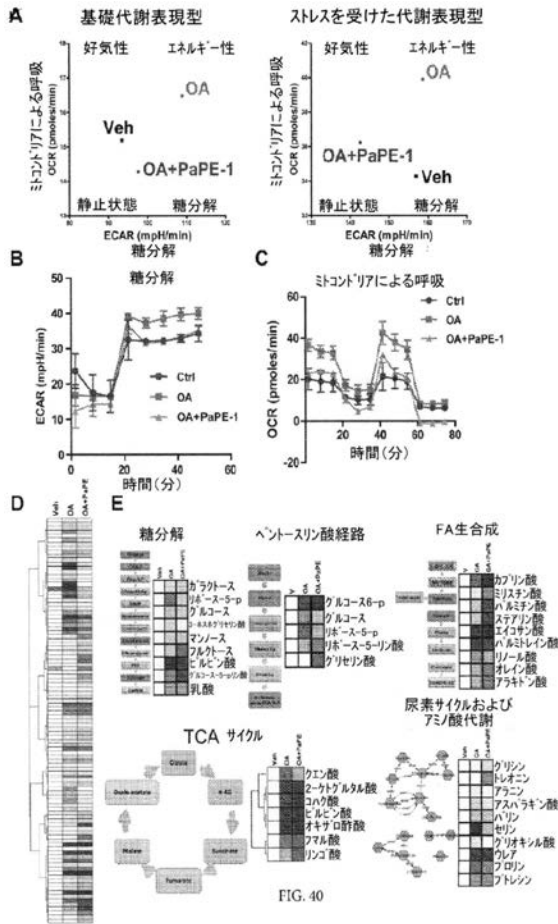


FIG. 42

【 図 4 2 】

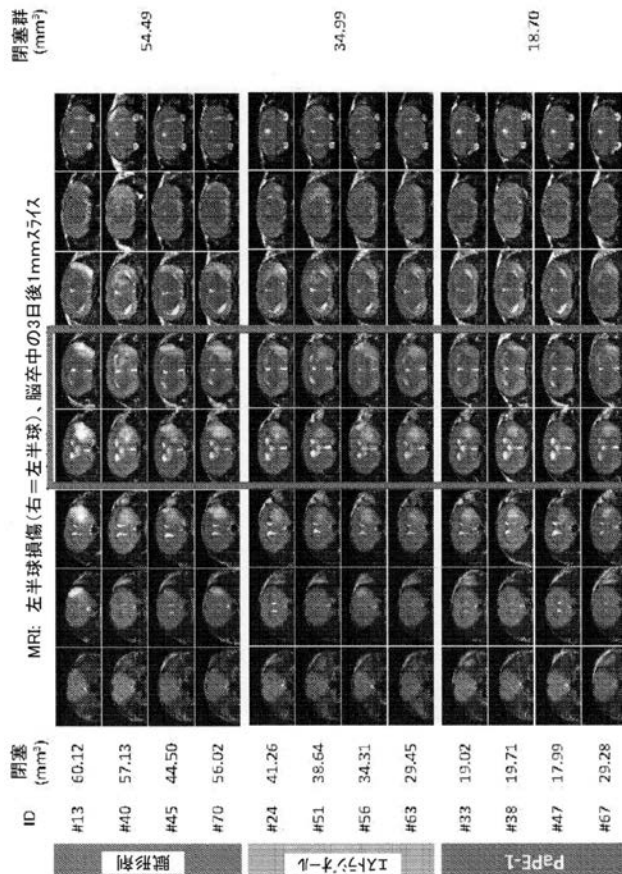


FIG. 42

【 図 4 1 】

非核ER活性化および脳卒中

賦形剤, E2またはPaPe-1で処置した卵巣摘出雌マウスは脳虚血再灌流障害の中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルを受け、14日間の回復期間で結果を評価した。

【 図 4 3 】

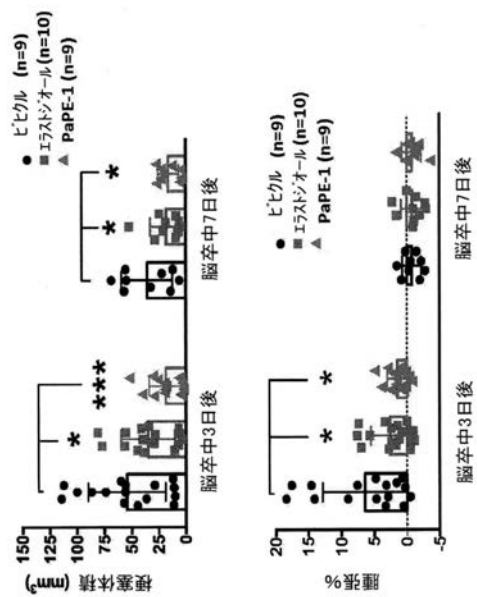
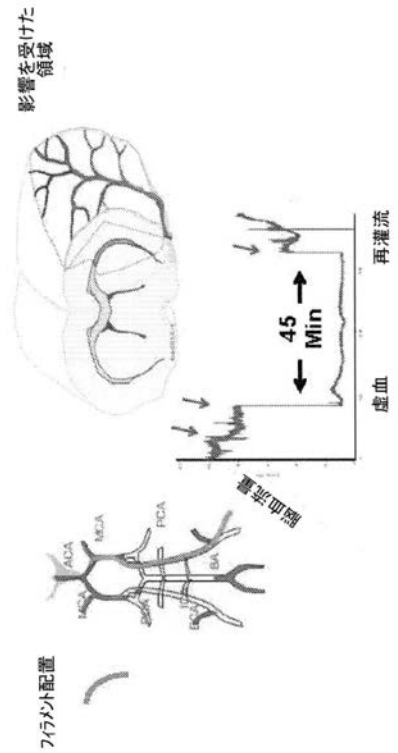


FIG. 43

FIG. 41



【図 4 4】

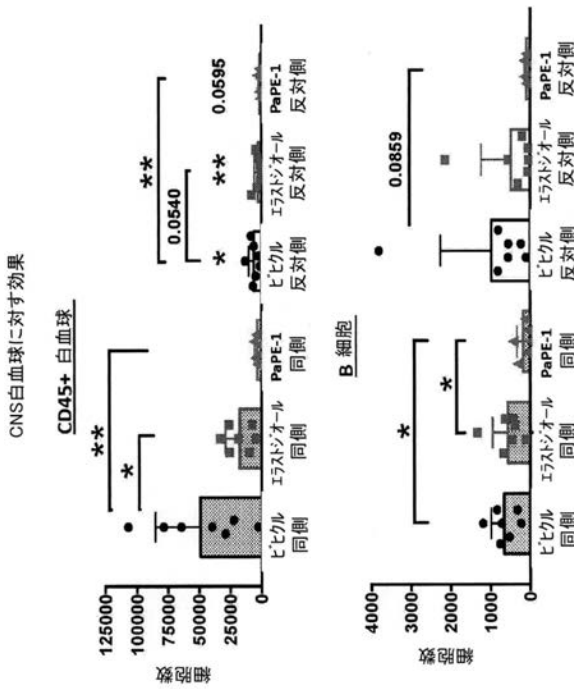


FIG. 44

【図 4 5】

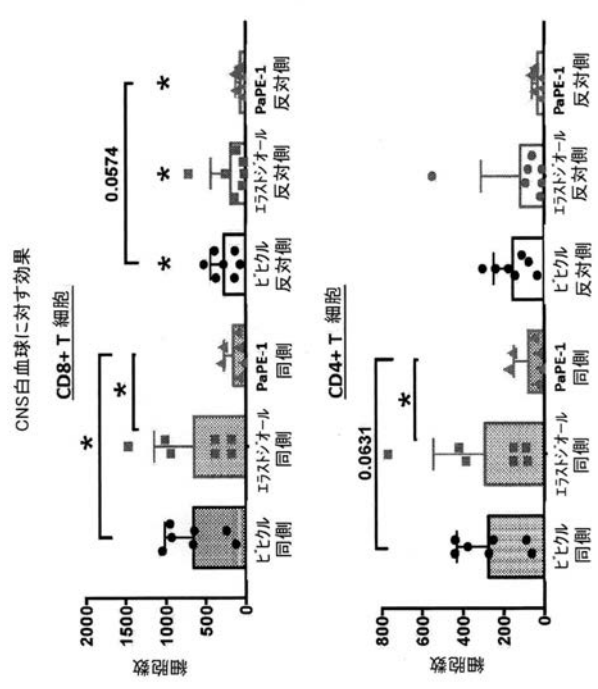


FIG. 45

【図 4 6】

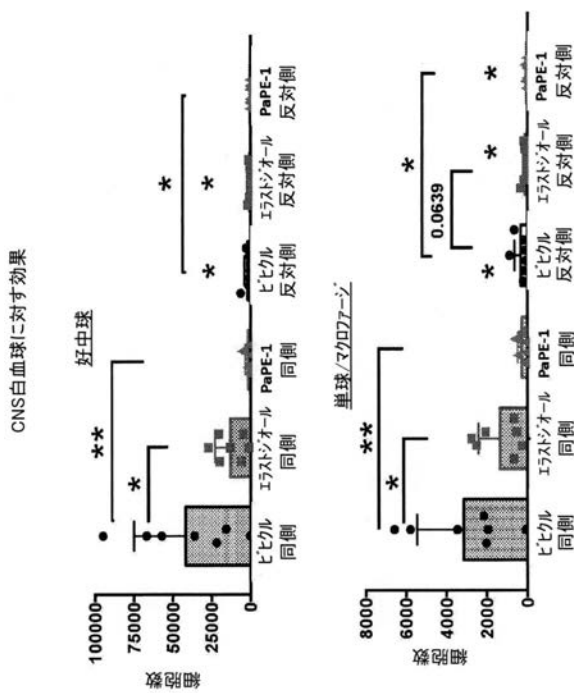


FIG. 46

【図 4 7】

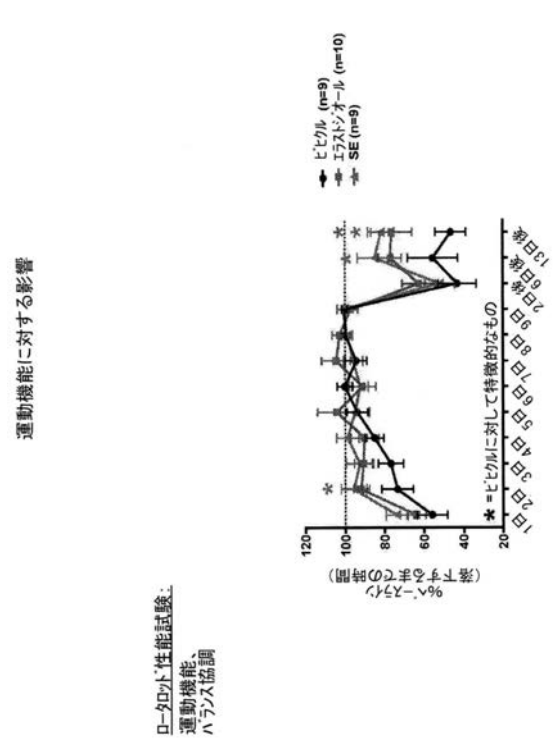


FIG. 47

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/012586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61P 35/00; A61K 31/00; C07K 14/705; G01N 33/574 (2017.01)

CPC - G01N 33/57415; C07K 14/721; C07K 16/26; C12Q 1/6886; G01N 2500/10 (2017.02)

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)

See Search History document

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

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PUBCHEM: Substance Record for SID 230773243. 12 February 2015. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/230773243#section=Top >. entire document	1
A	PUBCHEM: Substance Record for SID 89960275. 22 March 2010. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/89960275#section=Top >. entire document	1
A	PUBCHEM: Substance Record for SID 223685320. 06 January 2015. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/223685320#section=Top >. entire document	1
A	PUBCHEM: Substance Record for SID 131321332. 12 December 2011. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/131321332#section=Top >. entire document	1
A	PUBCHEM: Substance Record for SID 143533528. 29 August 2012. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/143533528#section=Top >. entire document	1
A	PUBCHEM: Substance Record for SID 227716744. 12 February 2015. [retrieved on 05.04.2017]. Retrieved from the Internet. <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/227716744 >. entire document	1

☐ 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

"I" 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 April 2017

Date of mailing of the international search report

19 APR 2017

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Coppenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/012586

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-18, 26-36, 42-57, 61-64, 67-79
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See Extra Sheet

Claim 1 has been analyzed subject to the restriction that claim reads on a compound of formula (I) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein n is 0; m is 0; X is H; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R4 is absent; R5 is H; and the dashed bond is a single bond.

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

1

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/012586

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-3, 19, 37, 38, 65, and 66 are drawn to compounds of formula (i) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof and compounds having the formula (iv) and stereoisomers and salts thereof.

Group II+: claims 20-25 and 65 are drawn to compounds according to formula (iii) and stereoisomers and salts thereof.

Group III+: claims 39-41 and 65 are drawn to compounds of formula (vi) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Group IV+: claims 58-60 and 65 are drawn to compounds of formula (vii) and stereoisomers and salts thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to a compound of formula (i) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein n is 0; m is 0; X is H; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R4 is absent; R5 is H; and the dashed bond is a single bond. It is believed that claim 1 reads on this first named invention and thus this claim will be searched without fee to the extent that it read on the above embodiment.

The first invention of Group II+ is restricted to a compound according to formula (iii): and stereoisomers and salts thereof; wherein m is 0; R1 and R2 are independently H; R5 is H; and R6 is absent.

The first invention of Group III+ is restricted to a compound according to formula (vi) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof; wherein n is 0; m is 0; X is H; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R4 is absent; R5 is H; R6 and R7 are independently C1 alkyl; and the dashed bond is a single bond.

The first invention of Group IV+ is restricted to a compound according to formula (vii) and stereoisomers and salts thereof; wherein R7 and R8 are independently H.

Applicant is invited to elect additional formula(e) for each additional compound to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected formula(e) requires the selection of a single definition for each compound variable. An exemplary election would be a compound of formula (i) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein n is 1; m is 0; X is H; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R4 is absent; R5 is H; and the dashed bond is a single bond. Additional formula(e) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ through IV+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I+, compounds of formula (i) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof and compounds having the formula (iv) and stereoisomers and salts thereof, are not present in Groups II+, III+, and IV+; the special technical features of Group II+, compounds according to formula (iii) and stereoisomers and salts thereof, are not present in Groups I+, III+, and IV+; the special technical features of Group III+, compounds according to formula (vi) and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof, are not present in Groups I+, II+, and IV+; and the special technical features of Group IV+, compounds according to formula (vii) and stereoisomers and salts thereof, are not present in Groups I+, II+, and III+.

The Groups I+ through IV+ formulae do not share a significant structural element requiring the selection of alternatives for the compound variables R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, X, m, and n.

The Groups I+ through IV+ share the technical features of a compound of formula (i); and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof; a compound according to formula (iii); and stereoisomers and salts thereof; a compound having the formula (iv); a compound according to formula (vi); and stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof; a compound according to formula (vii) and stereoisomers and salts thereof; and a compound selected from the groups consisting of structures shown in claim 65 of the instant invention. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, Substance Record for SID 227716744 to PubChem teaches a compound of formula (i); wherein n is 1; m is 0; X is hydroxyl; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R5 is H; and the dashed bond is a single bond (Pg. 3;...see shown structure...).

Additionally, Substance Record for SID 143533528 to PubChem teaches a compound according to formula (iii); wherein m is 2; R1 and R2 are each independently C1 alkyl; R5 is hydroxyl; each R6 is C1 alkyl (Pg. 3;...see shown structure...); and the seventh structure from the bottom of claim 65 of the instant invention (Pg. 3;...see shown structure...).

Additionally, Substance Record for SID 223685320 to PubChem teaches a compound of formula (iv); wherein R1 and R2 are independently H; R3 and R4 are independently H (Pg. 3;...see shown structure...).

Additionally, Substance Record for SID 89960275 to PubChem teaches a compound of formula (vi); wherein n is 1; m is 0; X is hydroxyl; R1 and R2 are independently H; R3 is H; R4 is absent; R5 is H; R6 is C1 alkyl; R7 is H; and dashed bond is a single bond (Pg. 3;...see shown structure...).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/012586

Additionally, Substance Record for SID 131321332 to PubChem teaches a compound of formula (viii); wherein R6 and R7 are independently H (Pg. 3;...see shown structure...).

The inventions listed in Groups I+ through IV+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/075 (2006.01)		A 6 1 K 31/075	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)		A 6 1 P 3/00	
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 3/04 (2006.01)		A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 5/24 (2006.01)		A 6 1 P 5/24	
A 6 1 K 31/277 (2006.01)		A 6 1 K 31/277	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

- (71)出願人 319000894
 カッツェンエレンボーゲン ジョン
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1 アーバナ ウェスト ペンシルベニア アベニュー
 7 0 4
- (71)出願人 319000908
 カッツェンエレンボーゲン ベニータ
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1 アーバナ ウェスト ペンシルベニア アベニュー
 7 0 4
- (71)出願人 319000919
 キム ソンフン
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 2 シャンペーン サウスフォード トレース ドライヴ
 4 4 0 6
- (71)出願人 319000920
 マダク - エルドガン ゼイネブ
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 2 シャンペーン モレーン コート 1
- (71)出願人 319000931
 シャウル フィリップ
 アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 0 8 2 リチャードソン チューリップ ドライヴ 2 6 0 6
- (74)代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
- (74)代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
- (74)代理人 100103610
 弁理士 吉 田 和彦
- (74)代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
- (74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治
(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100111501
弁理士 滝澤 敏雄
(72)発明者 カッツェンエレンボーゲン ジョン
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1 アーバナ ウェスト ペンシルベニア アベニュー
7 0 4
(72)発明者 カッツェンエレンボーゲン ベニータ
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 0 1 アーバナ ウェスト ペンシルベニア アベニュー
7 0 4
(72)発明者 キム ソンフン
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 2 シャンペーン サウスフォード トレース ドライヴ
4 4 0 6
(72)発明者 マダク - エルドガン ゼイネブ
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 1 8 2 2 シャンペーン モレーン コート 1
(72)発明者 シャウル フィリップ
アメリカ合衆国 テキサス州 7 5 0 8 2 リチャードソン チューリップ ドライヴ 2 6 0 6
F ターム(参考) 4C206 AA01 AA02 AA03 CA17 CA18 CA20 CA25 CB24 GA23 HA11
MA01 MA04 NA14 ZA15 ZA36 ZA70 ZA96 ZA97 ZB11 ZB26
ZC11 ZC21
4H006 AA01 AA03 AB20 FC56 FE11 FE13