

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5847085号
(P5847085)

(45) 発行日 平成28年1月20日(2016.1.20)

(24) 登録日 平成27年12月4日(2015.12.4)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 31/426	(2006.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
A 61 P 3/10	(2006.01)
C 07 D 277/34	(2006.01)
A 61 K 31/426	31/426
A 61 P 43/00	43/00
A 61 P 35/00	35/00
A 61 P 3/10	3/10
C 07 D 277/34	277/34

請求項の数 7 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2012-533376 (P2012-533376)
(86) (22) 出願日	平成22年10月11日(2010.10.11)
(65) 公表番号	特表2013-507397 (P2013-507397A)
(43) 公表日	平成25年3月4日(2013.3.4)
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/052151
(87) 國際公開番号	W02011/044548
(87) 國際公開日	平成23年4月14日(2011.4.14)
審査請求日	平成25年9月27日(2013.9.27)
(31) 優先権主張番号	61/304,881
(32) 優先日	平成22年2月16日(2010.2.16)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/250,045
(32) 優先日	平成21年10月9日(2009.10.9)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	511247415 ザ オハイオ ステート ユニバーシティ ー リサーチ ファウンデーション アメリカ合衆国 オハイオ 43212, コロンバス, キニアード ロード 12 16
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

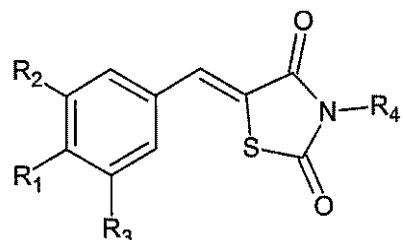
(54) 【発明の名称】チアゾリジンジオンエネルギー制限模倣剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において解糖を阻害するための医薬組成物であって、該組成物は、式 I :

【化 5 2】



10

の化合物を含み、式中、

R₁ はヒドロキシルであり、R₂ は、トリフルオロメチルであり、R₃ は、ヒドロキシルであり、R₄ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択されるかまたは、R₁ は水素であり、R₂ および R₃ は、ハロ部分であり、R₄ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択され、

20

ここで、シクロアルキルは、C₁ - C₄ アルキル基を介して主構造に結合される、環構造を形成するアルキル基または環状アルキル基を指す、医薬組成物。

【請求項 2】

(Z) - 3 - (2 - エチル - ブチル) - 5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオンを含む、被験体において解糖を阻害するための医薬組成物。

【請求項 3】

R₁ はヒドロキシルであり、R₂ は、トリフルオロメチルであり、R₃ は、ヒドロキシルであり、R₄ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。 10

【請求項 4】

(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (2 - エチル - ブチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (2 - エチル - ペンチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (4 - イソプロピル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - (4 - tert - ブチル - ベンジル) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (4 - tert - ブチル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - シクロヘキシリメチル - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - ベンジル - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - シクロヘプチルメチル - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、および(Z) - 5 - (3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - イソブチル - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオンからなる群より選択される化合物を含む、被験体において解糖を阻害するための医薬組成物。 20

【請求項 5】

R₁ は水素であり、R₂ およびR₃ はハロ部分であり、R₄ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - (2 - エチル - ブチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - (2 - エチル - ペンチル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - (4 - イソブロピル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - (4 - tert - ブチル - ベンジル) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - (2 - トリフルオロメチル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - シクロヘキシリメチル - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - ベンジル - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、(Z) - 3 - シクロヘプチルメチル - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン、および(Z) - 5 - (3, 5 - ジブロモ - ベンジリデン) - 3 - イソブチル - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオンからなる群より選択される化合物を含む、被験体において解糖を阻害するための医薬組成物。 40

【請求項 7】

10

20

30

40

50

前記被験体は癌を有するリスクが高いかまたは癌を有すると診断された、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2009年10月9日に出願された米国仮特許出願第61/250,045号および2010年2月16日に出願された米国仮特許出願第61/304,881号（これらの両方は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

10

【0002】

政府の資金提供

本発明は、助成金第CA112250号の下、National Institutes of Healthによる政府の支援によって少なくとも部分的に支援された。政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0003】

ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、トログリタゾン、シグリタゾンを含むチアゾリジンジオン類（TZD）は、核転写因子ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）のための選択性リガンドである。これらTZDは、グルコースホメオスタシス、脂肪酸の代謝、および脂肪細胞中のトリアシルグリセロール貯蔵に関与するインスリン感受性遺伝子の転写活性化を通して脂肪組織の機能の多くの面を調節することによって、インスリン感受性を向上させる。さらに、TZD介在PPAR活性化は、脂肪細胞に与えるインスリンのゲノム効果を模倣することによって前駆脂肪細胞の分化を促進し、またアジポネクチン、IL-6およびTNFのような炎症性サイトカイン、ならびに脂肪細胞およびマクロファージ中の内分泌調節剤のホストの発現を調整することが示されている。これらの有益な効果によって、TZDは、インスリン抵抗を減らしました血糖コントロールを支援することによって2型糖尿病のための新しいタイプの経口療法を提供する。

20

【0004】

脂肪細胞のように、多くのヒト癌細胞株は高レベルのPPAR発現を示すことが報告されている。これら腫瘍細胞を高用量（50 μM）のTZD、特にトログリタゾンおよびシグリタゾンにインビトロで露出させると、細胞サイクルの阻止、アポトーシスおよび/または再分化に至り、PPARシグナル伝達とTZDの抗腫瘍活性との間の推定の関連が示唆された。Grommelsら、Lancet Oncol. 5, p. 419-429 (2004)。さらに、トログリタゾンのインビトロでの抗癌効果が、脂肪肉腫または前立腺癌の患者を含む少数の臨床症例において実証された。Demetrilら、Proc Natl Acad Sci USA. 96, p. 3951-3956 (1999)およびHisatakeら、Cancer Res. 60, p. 5494-5498 (2000)。蓄積した証拠により、トログリタゾンおよびシグリタゾンは、癌細胞の細胞サイクルの進行および存続を支配する多様なシグナル経路を標的にすることによって、PPAR非依存の抗腫瘍効果の媒介となることが示される。Weiら、Cancer Lett. 276, p. 119-124 (2009)。

30

40

【0005】

同定された様々な「的外れ」のメカニズムの中で、カテニン、サイクリンD1、Sp1、アンドロゲン受容体（AR）、および表皮性成長因子受容体（EGFR）を含む広範囲の細胞サイクルおよびアポトーシス調節タンパク質の、プロテアソーム分解または転写抑制による、発現に与えるTZDの効果は特に顕著である。この効果は、カテニン、サイクリンD1、およびSp1などの標的タンパク質のトランスデューション繰り返し体含有タンパク質（-TrCP）介在プロテアソーム分解を、このE3ユビキチンリガーゼの発現量を上げることによって、活性化させるTZDの能力に起因するという証拠が研究

50

者によって得られている。Weiら、Mol Pharmacol. 72, p. 725 - 733 (2007) およびWeiら、J Biol Chem. 283, p. 26759 - 26770 (2008)。サイクリンD1およびSp1のTZD誘発-TrCP介在タンパク質分解の根底にあるメカニズムを調査する過程で、-TrCP依存の分解もまたグルコース欠乏条件下で生じることが観測された。

【0006】

癌細胞とは異なり、非悪性細胞はこれらPPPAR非依存の抗腫瘍効果に耐性があり、これが新規の抗腫瘍剤の開発への足場としてのTZDの可能性を際立たせている。この前提は、それぞれの親化合物であるトログリタゾンおよびシグリタゾンより高い多様な抗腫瘍効能を示す2つのPPPAR不活性誘導体、STG28およびOSU-CG12、に対して当てはまることが実証された。Huangら、J. Med. Chem. 49, p. 4684 - 4689 (2006) およびYangら、J. Med. Chem. 51, p. 2100 - 2107 (2008)。

10

【0007】

チアゾリジンジオンに対する別の可能な標的としては、アデノシンーリン酸活性化プロテインキナーゼ(AMPK)がある。細胞および全身体両レベルでのエネルギーホメオスタシスおよびインスリン感受性の調節におけるAMPKの機能的な役割が知られている。運動、細胞ストレス、およびアジポカインなどの刺激に応答して、この細胞燃料感知酵素は、栄養素摂取およびエネルギー代謝を制御する多数の下流シグナル経路を介して、グルコースおよび脂肪酸摂取、脂肪酸の酸化、およびミトコンドリア発生の刺激、ならびにグリコーゲン合成の阻害を含む、一連の代謝変化を誘発してエネルギー消費の均衡を保つ。もっと最近では、蓄積された証拠により、AMPKと癌細胞の成長および存続との間の関連が、結節硬化症錯体2、すなわちラバマイシンの標的の哺乳類相同体(mTOR)を阻害することによってタンパク質合成を負に調節する腫瘍抑制因子を活性化するその能力に照らして、示唆されている。Inokuraら、Cell, 115, 577 - 590 (2003)。機構的な見地からは、AMPKは、成長因子シグナル伝達をmTORの負調節を介して細胞代謝と統合させる。加えて、AMPKは、マクロファージ中の炎症性サイトカイン、特にインターロイキン(IL)-6の産出を阻害することにより、炎症応答を抑制すると報告されている。Lihnlar、Mol Cell Endocrinol. 292, 36 - 41 (2008)。合わせて、これらの知見により、AMPKは2型糖尿病、代謝症候群、および癌の処置のための治療上適切な標的を表すことが示唆される。

20

【0008】

癌細胞は、それらの微環境で細胞代謝を好気的解糖に移行させ、いわゆるワールブルク効果を提供することによって、成長上の利点を得る。Samudioら、Cancer Res. 69, p. 2163 - 2166 (2009)。ワールブルク効果とは、ほとんどの癌細胞は大抵、ほとんどの正常な細胞のようにミトコンドリア中のピルビン酸塩の酸化によってではなく、シトルル中の乳酸発酵を伴う解糖によってエネルギーを产生するという所見である。これは、酸素が豊富な場合でも起きる。ワールブルク効果は、癌中のミトコンドリアへの損傷の結果、腫瘍内の低酸素環境への適応、または癌遺伝子がミトコンドリアをこれらが細胞のアボトシスプログラムに関与しているという理由でシャットダウンする結果であり得る。

30

【0009】

従って、好気的解糖を標的にして悪性対正常細胞の分化感受性を解糖阻害へと活用することは、癌治療にとって有用な方法である。好気的解糖を標的にすることはまた、糖尿病の処置または寿命増加などの他の目的のためにも使用することができる。癌療法のための好気的解糖の使用例としては、様々な自然発生のまたは化学的に誘導された腫瘍動物モデルにおける発癌を抑制する場合の食事カロリー制限のインビボにおける有効性がある。非特許文献1Jiangら、Cancer Res. 68, p. 5492 - 5499 (2008)；非特許文献2Hurstingら、Annu Rev Med. 54, p. 131 - 152 (2003)；非特許文献3Thompsonら、Mammary Gland

40

50

d Biol Neoplasia、8、p. 133 - 142 (2003) ; および非特許文献4 Berriganら、Carcinogenesis、23、p. 817 - 822 (2002) 参照。

【0010】

レスペラトロル (Baurら、Nat Rev Drug Discov. 5、p. 493 - 506 (2006) および Cucciollaら、Cell Cycle、6、p. 2495 - 2510 (2007)) または 2 - デオキシグルコース (Zhuら、Cancer Res. 65、p. 7023 (2005)) などの様々な化合物を用いた発癌抑制についての情報もまた利用可能である。エネルギー制限模倣剤、2 - デオキシグルコースおよびレスペラトロルは、それぞれグルコース代謝および摂取を阻害することによってエネルギー制限の有益な効果を模倣するこれらの能力により幅広い注目を集めている。しかし、これらの薬剤を治療に適用することは、これらのインビトロにおける効能が比較的弱いことにより制限されてきた。新規のエネルギー制限模倣剤、特に、高い効能を示す模倣剤が、癌、代謝障害、または他の異常解糖を伴う症状の処置に使用するために依然として必要である。10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Jiangら、Cancer Res. (2008) 68、p. 5492 - 549920

【非特許文献2】Hurstingら、Annu Rev Med. (2003) 54、p. 131 - 152

【非特許文献3】Thompsonら、Mammary Gland Biol Neoplasia、(2003) 8、p. 133 - 142

【非特許文献4】Berriganら、Carcinogenesis、(2002) 23、p. 817 - 822

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、チアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することを包含する、被験体において解糖を阻害する方法を提供する。チアゾリジンジオン誘導体は、解糖を阻害するこれらの能力の結果として、グルコース飢餓により得られるものに類似したエネルギー制限の形態を表す、新規のクラスのエネルギー制限模倣剤を表す。チアゾリジンジオン誘導体を用いて被験体において解糖を阻害する方法は、腫瘍の解糖代謝を阻害することで被験体での癌の処置または防止を行うために使用することができ、また癌と診断されていない被験体を含む被験体の寿命を延ばすために使用することができる。本方法に有用なチアゾリジンジオン誘導体はさらに、本明細書にて提供される式I、II、III、およびIVによって定義される。30

【0013】

本発明はまた、有効量のチアゾリジンジオン誘導体を提供することによってアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼを活性化する方法を提供する。さらに、AMPKの活性化はIL-6 発現の阻害に至るため、本発明はまた、チアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することによって被験体においてIL-6 発現を阻害する方法を提供する。AMPKを活性化するためのおよびIL-6 発現を阻害するための適切なチアゾリジンジオン誘導体としては、式I、III、およびIVの特定の実施形態によって定義されるものが含まれる。40

【0014】

本発明は以下の図面を参照することにより、より容易に理解され得る。

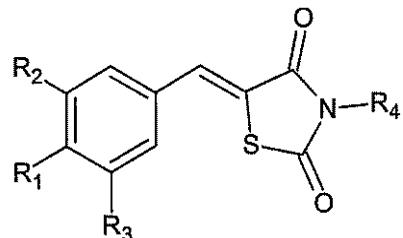
例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

50

被験体において解糖を阻害する方法であって、該方法は、式 I :

【化 5 2】



I

10

の化合物を含む医薬組成物を該被験体に投与することを包含し、式中、

R₁ は水素またはヒドロキシルであり、

R₂ および R₃ は、水素、ヒドロキシル、ハロ、アミノ、メチル、メトキシ、エチル、エトキシ、ニトロ、アミノスルホニル、トリフルオロメチルスルホニル、およびハロアルキル部分から選択され、

R₄ は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択される、方法。

(項目 2)

R₁ はヒドロキシルである、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

20

R₂ はトリフルオロメチルである、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

R₃ は水素である、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記化合物は、(Z)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-チアゾリジン-2-4-ジオンまたは(Z)-3-(2-エチル-ブチル)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオンである、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

R₃ はヒドロキシルである、項目 3 に記載の方法。

30

(項目 7)

前記化合物は、(Z)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(2-エチル-ブチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(2-エチル-ペンチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(4-イソプロピル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(4-tert-ブチル-ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(4-イソプロピル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(4-tert-ブチル-ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(2-トリフルオロメチル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(2-トリフルオロメチル-ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(シクロヘキシルメチル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(シクロヘキシルメチル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(シクロヘキシルメチル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(ベンジル)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、および(Z)-5-(3,4-ジヒドロキシ-5-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-イソブチル-チアゾリジン-2-4-ジオンからなる群より選択される、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

50

R₁ は水素であり、R₂ および R₃ はハロ部分である、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

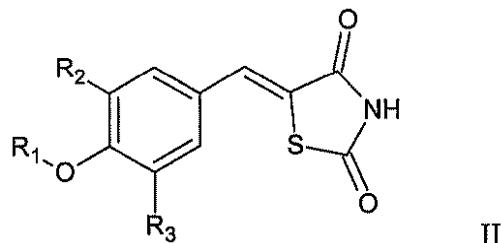
前記化合物は、(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(1-メチル-シクロヘキシリメチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(2-エチル-ブチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(2-エチル-ベンチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(4-イソブロビル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-(4-tert-ブチル-ベンジル)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(2-トリフルオロメチル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-シクロヘキシリメチル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-ベンジル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、(Z)-3-シクロヘプチルメチル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン、および(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-イソブチル-チアゾリジン-2-4-ジオンからなる群より選択される、項目 8 に記載の方法。
10

(項目 10)

前記被験体は癌を有するリスクが高いかまたは癌を有すると診断された、項目 1 に記載の方法。
20

(項目 11)

被験体において解糖を阻害するための方法であって、該方法は、式 II :
【化 53】



30

の化合物を含む医薬組成物を該被験体に投与することを包含し、式中、

R₁ は、アリール、アルキル、ヘテロアリール、シクロアルキル、およびヘテロシクロアルキル基から選択され、

R₂ は、水素、ハロ、およびニトロ部分、ならびにアルキル、アルコキシ、およびハロアルキル基から選択され、

R₃ は、水素およびハロ部分ならびにアルキル、アルコキシ、およびハロアルキル基から選択される、

方法。

(項目 12)

R₁ は

40

【化 5 4】



10

から選択される、項目 1 1 に記載の方法。

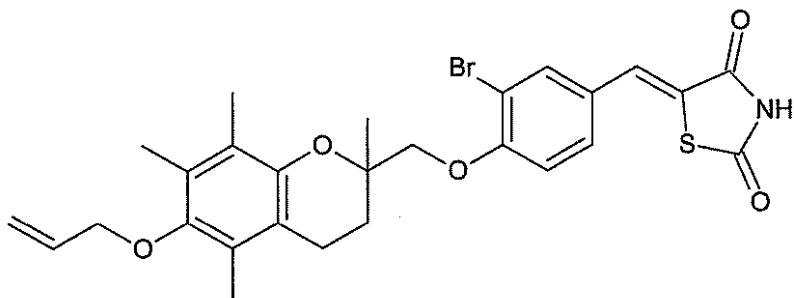
(項目 1 3)

R₂ は、水素、ブロモ、クロロ、メチル、メトキシ、エトキシ、およびニトロから選択され、R₃ は、水素、メチル、メトキシ、およびブロモから選択される、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記化合物は、構造：

【化 5 5】



20

30

を有する、項目 1 1 に記載の方法。

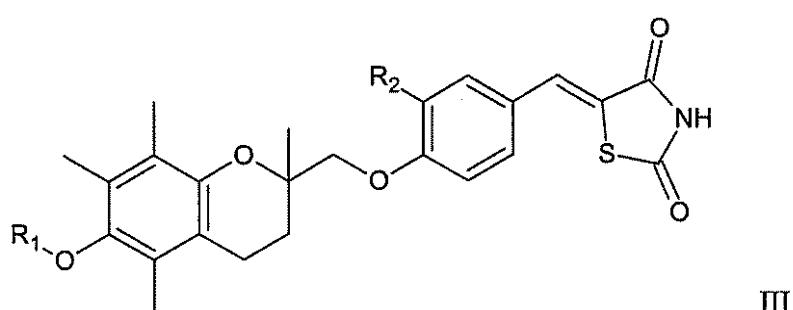
(項目 1 5)

前記被験体は癌を有するリスクが高いかまたは癌を有すると診断された、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

被験体において解糖を阻害する方法であって、該方法は、式 III：

【化 5 6】



40

の化合物を含む医薬組成物を該被験体に投与することを包含し、式中、R₁ は低級アルキル基であり、R₂ はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される、

50

方法。

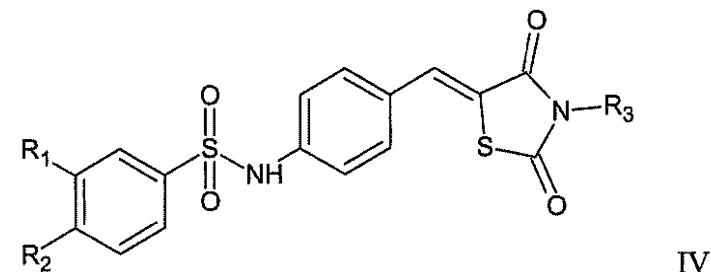
(項目 17)

前記化合物は、5-[3-ブロモ-4-(6-エトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[4-(6-ブトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-3-メトキシ-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、および4-{2-[2-ブロモ-4-(2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル)-フェノキシメチル]-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-6-イルオキシ}-ブチロニトリルからなる群より選択される、項目16に記載の方法。

(項目 18)

被験体において解糖を阻害する方法であって、該方法は、式IV：

【化57】



10

20

の化合物を含む医薬組成物を該被験体に投与することを包含し、式中、

R₁は水素、メチル、またはトリフルオロメチル部分であり、R₂はメトキシまたはニトロ部分であり、そしてR₃はアルキルまたはシクロアルキル基である、

方法。

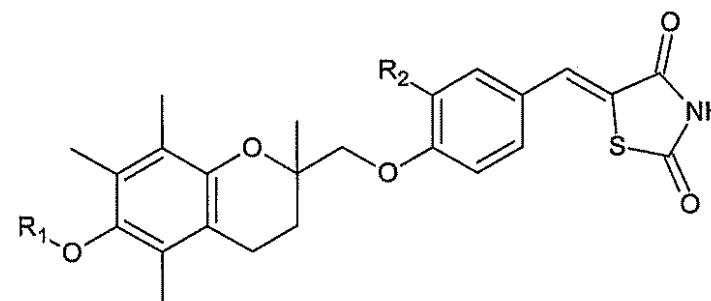
(項目 19)

前記化合物は、4-メトキシ-N-{4-[3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル]-フェニル}-ベンゼンスルホンアミド、N-{4-[3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル]-フェニル}-4-ニトロ-3-トリフルオロメチル-ベンゼンスルホンアミド、およびN-{4-[3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル]-フェニル}-4-ニトロ-ベンゼンスルホンアミドからなる群より選択される、項目18に記載の方法。

(項目 20)

式III：

【化58】



30

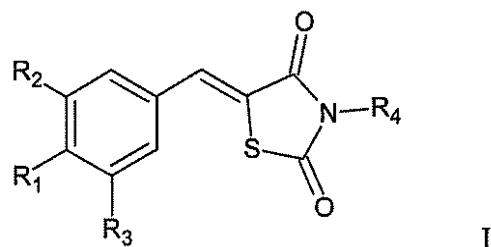
40

の化合物であって、式中、R₁は低級アルキル基であり、R₂はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される、式IIIの化合物；

式I：

50

【化 5 9】

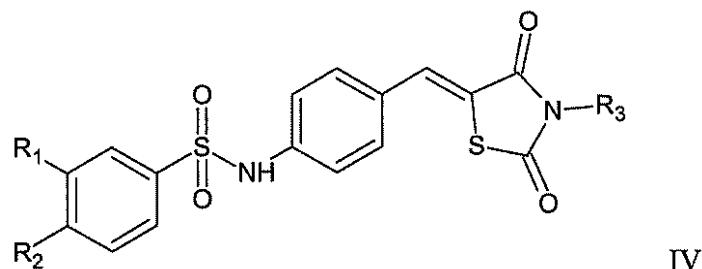


の化合物であって、式中、R₁はヒドロキシルであり、R₂はトリフルオロメチルであり、R₃は水素であり、そしてR₄はアルキルまたはシクロアルキル基である、式Iの化合物；および

10

式IV：

【化 6 0】



20

の化合物であって、式中、R₁は水素、メチル、またはトリフルオロメチル部分であり、R₂はメトキシまたはニトロ部分であり、そしてR₃はアルキルまたはシクロアルキル基である、式IVの化合物

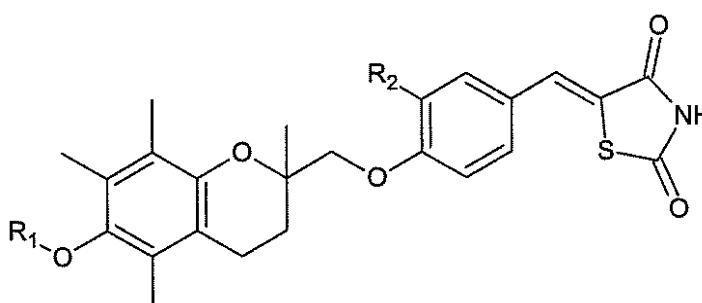
からなる群より選択される有効量のチアゾリジンジオン誘導体を提供することによって、アデノシンーリン酸活性化プロテインキナーゼを活性化する方法。

(項目 2 1)

前記チアゾリジンジオン誘導体は、式III：

30

【化 6 1】



40

の化合物であり、式中、R₁は低級アルキル基であり、R₂はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される、

項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

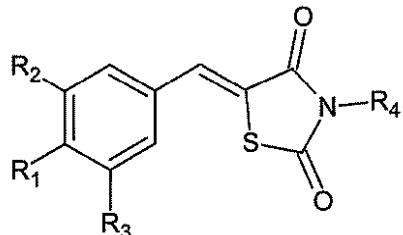
前記化合物は、5-[3-ブロモ-4-(6-エトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[4-(6-ブトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-3-メトキシ-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、および4-[2-[2-ブロモ-4-(2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル)-フェ

50

ノキシメチル] - 2 , 5 , 7 , 8 - テトラメチル - クロマン - 6 - イルオキシ} - プチロニトリルからなる群より選択される、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記チアゾリジンジオン誘導体は、式 I :
【化 6 2】



I

10

の化合物であり、式中、R₁ はヒドロキシルであり、R₂ はトリフルオロメチルであり、R₃ は水素であり、そして R₄ はアルキルまたはシクロアルキル基である、
項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 4)

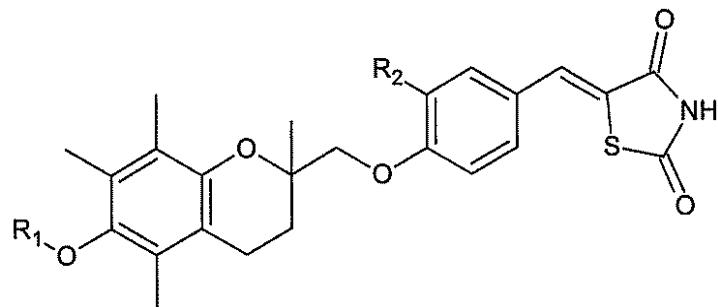
前記化合物は、5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンおよび5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - プロピル - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンからなる群より選択される、項目 2 3 に記載の方法。

20

(項目 2 5)

前記チアゾリジンジオン誘導体は、式 III

【化 6 3】



III

30

の化合物であり、式中、R₁ は低級アルキル基であり、R₂ はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される、

項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 6)

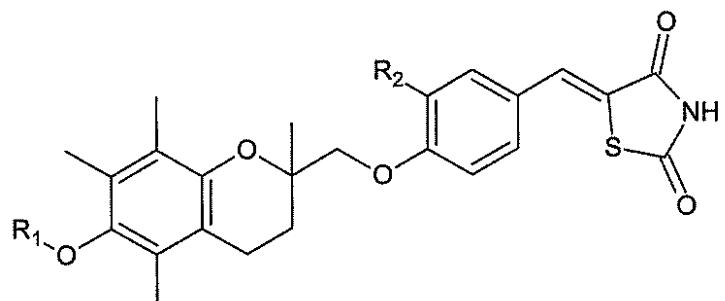
前記化合物は、4 - メトキシ - N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - ベンゼンスルホンアミド、N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデン - メチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - ベンゼンスルホンアミド、およびN - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - ベンゼンスルホンアミドからなる群より選択される、項目 2 5 に記載の方法。

40

(項目 2 7)

被験体において IL - 6 発現を阻害する方法であって、該方法は、
式 III :

【化64】



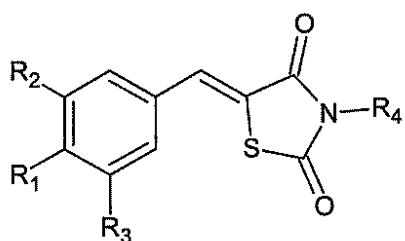
III

10

の化合物であって、式中、R₁は低級アルキル基であり、R₂はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される、式Ⅲの化合物；

式Ⅲ：

【化65】



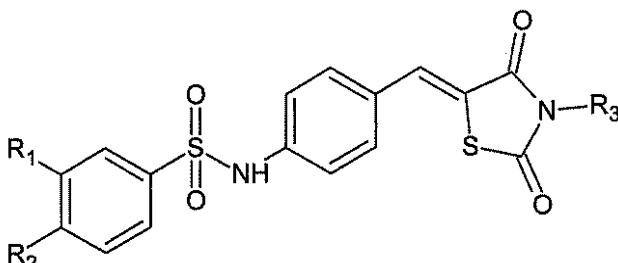
I

20

の化合物であって、式中、R₁はヒドロキシルであり、R₂はトリフルオロメチルであり、R₃は水素であり、およびR₄はアルキルまたはシクロアルキル基である、式Ⅳの化合物；および

式Ⅴ：

【化66】



IV

30

の化合物であって、式中、R₁は水素、メチル、またはトリフルオロメチル部分であり、R₂はメトキシまたはニトロ部分であり、およびR₃はアルキルまたはシクロアルキル基である、式Ⅴの化合物

40

からなる群より選択されるチアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を該被験体に投与することを包含する、方法。

(項目28)

前記化合物は、5-[3-ブロモ-4-(6-エトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、5-[4-(6-ブトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-3-メトキシ-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン、および4-{2-[2-ブロモ-4-(2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル)-フェノキシメチル]-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-6-イルオキシ}-ブチロニトリルからなる群より選択される、項目27に記載の方法。

50

(項目 29)

前記化合物は、5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンおよび5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - プロピル - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオンからなる群より選択される、項目 27 に記載の方法。

(項目 30)

前記化合物は、4 - メトキシ - N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - ベンゼンスルホンアミド、N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデン - メチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - ベンゼンスルホンアミド、およびN - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - ベンゼンスルホンアミドからなる群より選択される、項目 27 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、エネルギー制限模倣剤として作用する能力を持つチアゾリジンジオン類(TZD)に影響される様々な因子を示す概略図を提供する。

【図2】図2は、多数のチアゾリジンジオン化合物のライブラリを作成する固相法を示す概略図および表を提供する。図の上部分は推定合成スキームを示し、図の下部分はライブラリを構成する化合物に存在するR₁およびR₂の置換基を示す。

【図3】図3は、TZDのPPPAR非依存抗増殖効果を示すグラフおよび免疫プロットを提供する。セクションA)は、非悪性前立腺上皮細胞(PrEC)に対してのLNCaP前立腺癌細胞およびMCF-7乳癌細胞を10%FBS補足培地に72時間放置したときの生存度に与える、2つのエネルギー制限模倣剤、レスベラトロール(Resv)および2-デオキシグルコース(2-DG)に比べてのトログリタゾン(TG)、シグリタゾン(CG)、STG28(STG)、およびOSU-CG12(CG12)の用量依存効果を示す。MTTデータは、平均値±95%信頼区間(エラーバー)(n=6)として表されている。セクションB)は、PrECにおいての-TrcP、Sp1、およびアンドロゲン受容体(AR)の発現量に与える、OSU-CG12の効果の欠如を示すもので、OSU-CG12の抗増殖活性に対する非悪性PrECの耐性を実証している。これらウェスタンプロットは3つの独立した実験を代表するものであり、すべてが類似の結果を示している。

【図4】図4は、TZDが自食を誘発するという証拠を提供する。左側パネルは、LC3-Iから、自食のマーカーであるLC3-IIへの変換に与える、5 μMのOSU-CG12の時間依存効果を提供するが、このマーカーは自食阻害剤3-MA(1mM)によってブロックされ得る。LNCaP細胞を、GFP-LC3プラスミドにより一時的にトランسفクトし、続いて5 μMのOSU-CG12に単独または3-MAの存在下で所定時間にわたって露出させた。GFPの免疫プロットを行って、LC3-IIの形成を検出した。右側パネルは、GFP-LC3蛍光発光のパターンに与える、5 μMのOSU-CG12単独のまたは1mMの3-メチルアデニン(3-MA)の存在下での効果についての顕微分析からの画像を提供する。CG12群で明らかな斑点パターンは、それが蓄積して自食胞となっていることを示している。6ウェルプレートで培養されたGFP-LC3発現LNCaP細胞に36時間異なる薬物処理を施し、次に蛍光顕微鏡検査によって検査した。これら免疫プロットおよび顕微鏡によるデータは3つの実験を代表するものであり、すべてが類似の結果を示している。

【図5】図5は、エネルギー制限およびTZDが-TrcP介在タンパク質分解を助長する能力を共有していることを示す免疫プロットを提供する。LNCaPおよびMCF-7細胞を、図のように、トログリタゾン(TG)、STG28、シグリタゾン(CG)、

10

20

30

40

50

O S U - C G 1 2 (C G 1 2) 、 2 つのエネルギー制限模倣剤である 2 - デオキシグルコース (2 - D G) およびレスベラトロール、ならびに無グルコース培地 (グルコース飢餓) に露出して、 - T r C P 介在タンパク質分解の化合物における効果をウェスタンプロット法により評価した。これらの終点は、 - T r C P 、 - T r C P 基質、および S p 1 標的遺伝子産物の発現、ならびに - T r C P 基質の認知の助長に関するキナーゼのリン酸化の状態とした。免疫プロットは 3 つの独立した実験を代表するものである。

【図 6】図 6 は、 T Z D が、 L N C a P 細胞内のエネルギー制限に関連した細胞応答を引き出す 2 - デオキシグルコース (2 - D G) およびグルコース飢餓の能力を共有していることを示す免疫プロットを提供する。セクション A) は、エネルギー制限関連 (S i r t 1 発現、 p 5 3 脱アセチル化、 A M P 活性化プロテインキナーゼ (A M P K) リン酸化、および小胞体 (E R) ストレス指標 G R P 7 8 の発現) ならびに - T r C P 依存タンパク質分解関連 (- T r C P 、 S p 1 、およびサイクリン D 1 の発現量) の様々なマーカーに与える、 1 0 m M の 2 - D G およびグルコース飢餓に比べての 1 0 μ M の O S U - C G 1 2 (C G 1 2) の時間依存効果のウェスタンプロット分析を示す。セクション B) は、 A におけるように C G 1 2 および 2 - D G で処置された L N C a P 細胞での R T - P C R による S i r t 1 、 G R P 7 8 、 - T r C P 、 S p 1 、およびサイクリン D 1 の m R N A 発現量の平行分析を示す。セクション C) は、 L N C a P 細胞での E R ストレスおよび A M P K / m T O R / p 7 0 S 6 K シグナル伝達に与える、 2 - D G 、レスベラトロール、およびグルコース飢餓に対しての様々な用量での T Z D の効果のウェスタンプロット分析を示す。 E R ストレスの指標には、 I R E 1 、 E R ストレスセンサ、 G R P 7 8 および G A D D 1 5 3 の発現量が含まれた。免疫プロットおよび P C R の結果は 3 つの独立した実験を代表するものである。

【図 7】図 7 は、 T Z D が、グルコース摂取をブロックすることによってエネルギー代謝を標的にすることを示すグラフおよび免疫プロットを提供する。セクション A) は、 [³ H] - 2 - デオキシグルコース ([³ H] - 2 D G) 摂取に与える、 O S U - C G 1 2 (C G 1 2 、左側パネル) およびレスベラトロール (中央パネル) の用量および時間依存効果を示す。データは、平均値 ± 9 5 % 信頼区間 (エラーバー) (n = 3) として表されている。右側パネルは O S U - C G 1 2 およびレスベラトロールの球棒構造を示す。セクション B) は、 L N C a P 細胞での解糖速度 (左側パネル) ならびに N A D H (中央パネル) および乳酸塩 (右側パネル) の細胞内濃度に与える、 1 0 m M の 2 - D G に比べての 1 0 μ M の O S U - C G 1 2 の時間依存効果を示す。データは、平均値 ± 9 5 % 信頼区間 (エラーバー) (n = 3) として表されている。セクション C) は、補足グルコースが、 L N C a P 細胞での O S U - C G 1 2 の抗増殖活性に対する用量依存防御を提供することを実証している。表示した濃度のグルコースの存在下で培養した細胞の生存度を、 7 2 時間の薬物処置の後 M T T アッセイによって決定した。データは、平均値 ± 9 5 % 信頼区間 (エラーバー) (n = 6) として表されている。セクション D) では、左側パネルは、補足グルコース (2 0 m g / m l) が、 2 4 時間にわたる L N C a P 細胞での O S U - C G 1 2 による S i r t 1 の一時的な誘発およびその結果としての p 5 3 の脱アセチル化を覆したことを見ている。D) の右側パネルは、補足グルコースが、 P A R P 開裂、 A M P K 活性化、および異なる用量の O S U - C G 1 2 で処置された L N C a P 細胞での G R P 7 8 、 G A D D 1 5 3 、および - T r C P の発現の誘発を実証している。これら免疫プロット結果は 3 つの独立した実験を代表するものである。

【図 8】図 8 は、 - T r C P 発現がエネルギー制限模倣剤の抗増殖効果にとって重要であり、また - T r C P タンパク質の S i r t 1 介在安定化によって上方調節されることを示すグラフおよび免疫プロットを提供する。セクション A) は、 O S U - C G 1 2 (C G 1 2 、左側パネル) および 2 - デオキシグルコース (2 - D G 、左側パネル) による L N C a P 細胞生存度の用量依存阻害に与える、 - T r C P のワイルドタイプ (W T) または優性ネガティブ (F) 形態の異所性発現の効果を示す。細胞生存度は、 M T T アッセイによって決定した。データは、平均値 ± 9 5 % 信頼区間 (エラーバー) (n = 6) として表されている。 p C M V は空ベクターによりトランスクレクトされた細胞である。セ

10

20

30

40

50

クションB)は、LNCaP細胞でのPARP開裂を助長するOSU-CG12(5 μM)および2-DG(5 mM)の能力に与える、WT(WT--TrCP-Myc)および優性ネガティブ(F--TrCP-Myc)--TrCPの異所性発現の効果を示す。セクションC)は、Sirt1上方調節により、OSU-CG12処置されたLNCaP細胞での--TrCP発現量が高まるこことを示す。左側パネルでは、血球凝集素タグ化Sirt1(HA-Sirt1)の異所性発現により、--TrCP発現が用量依存で上昇し、これに対応して標的タンパク質サイクリンD1およびSp1の発現が減少した。右側パネルでは、Sirt1の優性ネガティブ阻害により、OSU-CG12介在--TrCP誘発およびPARP開裂がブロックされた。セクションD)は、Sirt1によりタンパク質安定化を介して--TrCP発現が増加したという証拠を提供する。左側パネルでは、Sirt1脱アセチル化活性が、OSU-CG12による--TrCPタンパク質の安定化にとって不可欠である。ニコチンアミドまたはスプリトマイシンによるSirt1脱アセチル化活性の薬理学的阻害により、--TrCPタンパク質安定性を向上させるOSU-CG12の能力が覆された。LNCaP細胞を12時間、5 μMのOSU-CG12により、単独でまたは50 mMのニコチンアミドもしくは200 μMのスプリトマイシンの存在下で前処理し、続いて、さらに12または24時間、100 μg/mLのシクロヘキシミドにより処置した。右側パネルでは、RT-PCR分析により、上述のように処置されたLNCaP細胞での--TrCP mRNAレベルが変わらないままであることが分かった。すべての免疫プロットおよびPCRの結果は3つの独立した実験を代表するものである。

【図9】図9は、AMPKの優性ネガティブまたは薬理学的阻害はOSU-CG12介在自食をブロックしたが、アポトーシスまたはERストレスには効果がなかったことを示す免疫プロットを提供する。左側パネルでは、p-mTOR、p-p70S6K、--TrCP、およびGADD153の発現量、GFP-LC3の変換、ならびにGFP-LC3発現LNCaP細胞でのPARP開裂を調整するOSU-CG12(5 μM)の能力に与える、AMPKのK45Rキナーゼデッド型優性ネガティブ(DN)形態に対してのワイルドタイプ(WT)形態の異所性発現の効果を示す。右側パネルでは、AMPKの薬理学的阻害剤である化合物Cの効果の平行分析である。

【図10】図10は、TSC2のshRNA介在ノックダウンにより細胞がOSU-CG12誘発自食から防御されたことを示す免疫プロットおよび顕微鏡画像を提供する。左側パネルでは、OSU-CG12処置細胞でのTSC2およびp-AMPK発現のウェスタンプロット分析により、TSC2のshRNA介在ノックダウンの有効性の確認を示す。右側パネルでは、スクランブル化またはTSC2 shRNAによりトランスフェクトされたGFP-LC3発現LNCaP細胞をDMSOまたは5 μMのOSU-CG12に36時間露出させ、次に蛍光顕微鏡検査によって検査してGFP-LC3蛍光発光のパターンを評価した。

【図11】図11は、OSU-CG12が、AMPK/TSC2/mTOR/p70S6Kシグナル経路を標的にすることによって自食を誘発することを示すグラフおよび免疫プロットを提供する。セクションA)は、AMPKの優性ネガティブ阻害によりLNCaP細胞がOSU-CG12介在抗増殖効果から部分的に防御されたことを示す。データは、平均値±95%信頼区間(エラーバー)(n=6)として表されている。セクションB)は、GADD153(DDIT3)のsiRNA介在ノックダウンが、PARP開裂、--TrCP誘発、AMPK活性化のいずれにも影響を与えたかったことを示す。すべての免疫プロットおよび蛍光顕微鏡検査のデータは3つの独立した実験を代表するものである。

【図12】図12において、セクション(A)は、先導AMPK活性剤を同定するための、ベンジリデン-チアゾリジンジオン系の集中化合物ライブラリの2段スクリーニングの概略表示を提供する。セクション(B)は、シリーズA-C化合物の一般的な合成手順を提供する。反応条件:シリーズA:a、K₂CO₃/R1-Br; b、LAH、THF;c、(CF₃SO₂)₂O、ピリジン、CH₂Cl₂; d、K₂CO₃、DMF; e、A

c O H、ピペリジン、エタノール／還流。シリーズB：a、AcOH、ピペリジン、エタノール／還流；b、K₂CO₃、DMF。シリーズC：a、K₂CO₃、DMF；b、ピペリジン、CH₂Cl₂；c、LAH、ドライTHF、O₂；d、MnO₂、CH₂Cl₂、還流；d、ピペリジン、EtOH、還流；e、AcOH、ピペリジン、エタノール／還流。

【図13】図13は、チアゾリジンジオン系の集中化合物ライブラリにおける化合物1～60の化学構造を提供する。

【図14】図14において、セクション(A)は、mTORおよびIL-6/IL-6受容体介在のシグナル経路の負の調節剤としてのAMPKの役割の概略表示を提供する。セクション(B)は、6時間の処置後、10%のFBS含有培地において、LPS処理されたTHP-1細胞でのAMPK、p70S6K、およびStat3のリン酸化に与える、各10μMでのシグリタゾンおよび62の効果のウェスタンプロット分析を提供する。(C)左側パネルは、6時間の処置後、10%のFBS含有培地において、THP-1マクロファージでのLPS刺激IL-6の産生に与える、表示した濃度のシグリタゾン(CG)および62の阻害効果のELISA分析である。カラムは平均；バーはSD(N=3)。右側パネルは、MTTアッセイ(N=6)によるTHP-1細胞の生存度に与える対応する効果である。

【図15】図15において、セクション(A)は、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、LPS処理のみ(L)および非処置(対照)のTHP-1マクロファージにおける場合に対しての、LPS処理されたTHP-1細胞でのAMPK、p70S6K、およびStat3のリン酸化に与える、各10μMでのシグリタゾン(CG)に比べての化合物1～60の効果のウェスタンプロット分析を提供する。セクション(B)の上側パネルは、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、THP-1マクロファージでのLPS刺激IL-6の産生に与える、各10μMでのシグリタゾン(CG)に比べての化合物1～60の阻害効果のELISA分析を提供する。カラムは平均；バーはSD(N=3)。下側パネルは、MTTアッセイ(N=6)によるTHP-1細胞の生存度に与える対応する効果を示す。

【図16】図16において、セクション(A)は、分化されたTHP-1細胞でのPPAR活性化に与える、各10μMでのシグリタゾン(CG)に比べての化合物8、12、31、44、49、53および54の効果を示す。THP-1細胞を、PPRE-x3-TK-Lucレポーターベクターにより一時的にトランスフェクトし、次に10%FBS補足 RPMI 1640培地で48時間、個々の薬剤またはDMSOビヒクリに露出させた。カラムは平均；バーはSD(N=6)。セクション(B)の上側パネルは、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、THP-1マクロファージでのLPS刺激IL-6の産生に与える、各1μMでのシグリタゾン(CG)に比べての化合物8、12、21、31、44、49、53および54の阻害効果のELISA分析を提供する。カラムは平均；バーはSD(N=3)。下側パネルは、MTTアッセイ(N=6)によるTHP-1細胞の生存度に与える対応する効果を示す。

【図17】図17において、セクション(A)は、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、THP-1マクロファージでのLPS刺激IL-6の産生に与える、化合物53の用量依存効果のELISA分析を提供する。カラムは平均；バーはSD(N=3)。セクション(B)は、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、LPS処理されたTHP-1マクロファージでのmRNAレベルのIL-6に与える、化合物53の用量依存抑制効果のRT-PCR分析の結果を示す。カラムは平均；バーはSD(N=3)。セクション(C)は、6時間の処置後、10%のFBS含有培地における、LPS処理されたTHP-1マクロファージでのAMPKおよびp70S6Kのリン酸化レベルに与える、0.5mMのAICARに対しての化合物53の用量依存効果のウェスタンプロット分析を示す。

【図18】図18において、セクション(A)は、優性ネガティブ(DN)AMPKプラ

10

20

30

40

50

スミドまたはpCMV空ベクターにより一時的にトランスフェクトされたTHP-1マクロファージでのAMPKの発現量のウェスタンプロット分析を提供する。セクション(B)は、10μMの化合物53と共同処置されたまたはされていないTHP-1マクロファージでのLPS刺激IL-6産生に与える、DN-AMPKの異所性発現の防御効果を示す。カラムは平均；バーはSD(N=3)。セクション(C)は、10%のFBS含有培地における、C-26腺癌細胞でのAMPKおよびp70S6Kのリン酸化レベルに与える、化合物53の用量依存および時間依存効果のウェスタンプロット分析を示す。セクション(D)は、PT1およびA-769662に対しての化合物53の表面静電位および構造を示す。

【図19】図19は、様々な癌細胞株における化合物53および54の細胞生存度を示すグラフを提供する。10

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、チアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することを包含する、被験体でのエネルギー代謝を制限する方法を提供する。特に、本発明は、式I、式II、式III、または式IVによるチアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することを包含する、被験体において解糖を阻害する方法を提供する。本発明は、エネルギー代謝を制限するためにこれまで使用されていない多数のチアゾリジンジオン誘導体であって、これらの多くは従来のエネルギー制限模倣剤より高い効能を示す誘導体を提供する。20

【0017】

別の局面では、本発明は、有効量のチアゾリジンジオン誘導体を送達することによって、アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ(AMPK)を活性化させる方法を提供する。特に、本発明は、式I、式III、または式IVによる有効量のチアゾリジンジオン誘導体を提供することによって、AMPKを活性化させる方法を提供する。AMPKの活性化によりIL-6が阻害されるため、これらチアゾリジンジオン誘導体はまた、式I、II、またはIVによるチアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することにより、被験体においてIL-6発現を阻害する方法においても使用され得る。

【0018】

定義

本明細書にて示される用語は、実施形態の説明のためのみのものであって、本発明を全体として限定するものとして解釈されるべきではない。本発明の説明および添付の請求の範囲において使用されるものとして、単数形「a」、「a n」および「t h e」は、これらの前後の文脈によって禁忌とされない限り、それらの複数形を含む。30

【0019】

本明細書で用いられる用語「有機基」は、脂肪族基、環状基、または脂肪族基と環状基との組み合わせ(例えば、アルカリルおよびアラルキル基)として分類される炭化水素基を意味するために用いられる。本発明の文脈では、本発明のチアゾリジンジオン類のための適切な有機基は、チアゾリジンジオン類のエネルギー制限活性を妨害しないものである。本発明の文脈では、用語「脂肪族基」は、飽和または不飽和で線状または分枝状の炭化水素基を意味する。この用語は、例えばアルキル、アルケニル、およびアルキニル基を包含するために用いられる。40

【0020】

本明細書で用いられる用語「アルキル」、「アルケニル」、および接頭語「al k」は、直鎖基および側鎖基を含む。特に指定しない限り、これらの基は1~20個の炭素原子を含有し、アルケニル基は2~20個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、これらの基は、合計多くて10個の炭素原子、多くて8個の炭素原子、多くて6個の炭素原子、または多くて4個の炭素原子を有する。4個以下の炭素原子を含むアルキル基はまた低級アルキル基とも称され得る。アルキル基はまた、これらが含む炭素原子の数によって参照され得る(すなわち、C₁~C₄アルキル基は、1~4個の炭素原子を含むアルキ50

ル基である)。

【0021】

本明細書で用いられるシクロアルキルは、環構造を形成するアルキル基(すなわち、アルキル、アルケニル、またはアルキニル基)を指す。環状基は、単環式または多環式であり得、好ましくは3~10個の環状炭素原子を有し得る。シクロアルキル基は、4個以下の炭素原子を含むアルキル基を介して主構造に結合することができる。環状基の例としては、シクロプロピル、シクロプロピルメチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、アダマンチル、ならびに置換および非置換のボルニル、ノルボルニル、およびノルボルネニルが挙げられる。

【0022】

特に指定しない限り、「アルキレン」および「アルケニレン」は、上記に定義した「アルキル」および「アルケニル」基の二価の形態である。用語「アルキレニル」および「アルケニレニル」は、それぞれ「アルキレン」および「アルケニレン」が置換されるときに用いられる。例えば、アリールアルキレニル基は、アリール基が結合するアルキレン部分を備えている。

【0023】

用語「ハロアルキル」は、ペルフルオロ化基を含む、1個以上のハロゲン原子によって置換される基を含む。これはまた、接頭語「ハロ」を含む他の基にも当てはまる。適切なハロアルキルの例としては、クロロメチル、トリフルオロメチルなどがある。ハロ部分としては、塩素、臭素、フッ素、およびヨウ素を含む。

10

【0024】

本明細書で用いられる用語「アリール」は、カルボシクリック芳香族環または環系を含む。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、ビフェニル、フルオレニルおよびインデニルが挙げられる。アリール基は置換されても非置換でもよい。

20

【0025】

特に指定しない限り、用語「ヘテロ原子」とは原子O、S、またはNのことである。用語「ヘテロアリール」は、少なくとも1つの環ヘテロ原子(例えば、O、S、N)を含有する芳香族環または環系を含む。いくつかの実施形態では、用語「ヘテロアリール」は、2~12個の炭素原子を含有する環または環系、1~3個の環、1~4個のヘテロ原子、およびヘテロ原子としてO、S、および/またはNを含む。適切なヘテロアリール基としては、フリル、チエニル、ピリジル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、イソインドリル、トリアゾリル、ピロリル、テトラゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、カルバゾリル、ベンゾキサゾリル、ピリミジニル、ベンズイミダゾリル、キノキサリニル、ベンゾチアゾリル、ナフチリジニル、イソキサゾリル、イソチアゾリル、ブリニル、キナゾリニル、ピラジニル、1-オキシドピリジル、ピリダジニル、トリアジニル、テトラジニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリルなどが含まれる。

30

【0026】

用語「アリーレン」および「ヘテロアリーレン」は、上記に定義された「アリール」および「ヘテロアリール」基の二価の形態である。用語「アリーレニル」および「ヘテロアリーレニル」は、それぞれ「アリーレン」および「ヘテロアリーレン」が置換されるときに用いられる。例えば、アルキルアリーレニル基は、アルキル基が結合するアリーレン部分を備えている。

40

【0027】

本明細書で説明するいかなる式またはスキームにおいても、ある基が一度より多く現れる場合、各基(または置換基)は、明示されているかどうかにかかわらず、独立して選択される。例えば、式-C(O)-NR₂において各R基は独立して選択される。

【0028】

本出願全体を通して用いられるある特定の用語の検討および再引用を簡単にする手段として、用語「基」および「部分」は、置換を考慮にいれているかまたは置換される可能性

50

のある化学的な種と、そのように置換を考慮にいれていないかまたは置換される可能性のない化学的な種との間を区別するために使用される。従って、用語「基」がある化学的な置換基について説明するために用いられるときは、その説明された化学物質は、非置換基、およびカルボニル基または他の従来の置換基と同様に、鎖に、例えば、非過酸化O、N、S、S i、またはF原子を有する基を含む。用語「部分」がある化学的な化合物または置換基を説明するために用いられるときは、非置換の化学物質のみが含まれるものとされる。例えば、「アルキル基」という語句は、メチル、エチル、プロピル、*t e r t -*ブチルなどの純粋な開鎖飽和炭化水素アルキル置換基だけでなく、ヒドロキシ、アルコキシ、アルキルスルホニル、ハロゲン原子、シアノ、ニトロ、アミノ、カルボキシルなどの当該分野では公知のさらなる置換基を有するアルキル置換基をも含むものとされる。従って、「アルキル基」は、エーテル基、ハロアルキル類、ニトロアルキル類、カルボキシアルキル類、シアノアルキル類などを含む。一方、「アルキル部分」という語句は、メチル、エチル、プロピル、*t e r t -*ブチルなどの純粋な開鎖飽和炭化水素アルキル置換基の包含に限定される。10

【0029】

本発明は、本明細書で述べる化合物を、異性体（例えば、ジアステレオマーおよびエナンチオマー）、互変体類、塩類、溶媒和物、多形体、プロドラッグ類などを含む薬学的に許容可能ないかなる形態においても含む。特に、化合物が光学活性である場合、本発明は特に、その化合物のエナンチオマーのそれぞれをエナンチオマーのラセミ混合物と共に含む。用語「化合物」は、明示されているかどうかにかかわらず（「塩」が明示されている場合もあるが）、このような形態のいずれかまたはすべてを含むことは理解されたい。20

【0030】

本明細書で用いられる用語チアゾリジンジオン誘導体は、本明細書において提供される式によって記載されるように、本発明のチアゾリジンジオン化合物の簡略形であり、当業者によりチアゾリジンジオンとして特徴付けられ得るすべての可能な化合物を包含するようには意図されない。

【0031】

本明細書で用いられる「処置する」、「処置すること」、および「処置」などは、少なくとも1つの症状の緩和または抑制、疾患の進行の遅延、疾患の発症の防止または遅延などを通しての状態の改善を含む、癌などの状態または疾患に罹るリスクがあるかまたは罹っている被験体に恩恵をもたらすあらゆる作用のことをいう。被験体は、発癌物質への露出により危険に晒されるとか、解糖を含む障害などに遺伝子的に罹りやすいなどの場合がある。30

【0032】

本明細書で用いられる「薬学的に許容可能な」とは、化合物または組成物が、疾患の重症度および処置の必要性に照らして過度に有害な副作用はなく、本明細書にて述べる方法にとって、被験体への投与に適切であることを意味する。

【0033】

用語「治療上有効な」および「薬理学的に有効な」とは、他の治療に典型的に関連する有害な副作用などの副作用を避ける一方で疾患の重症度を下げるという目標を実現する各薬剤の量を限定するよう意図される。治療上有効な量は、1以上の用量で投与され得る。一方で、有効量とは、検出可能な量のAMPKの活性化など、有意の化学効果を提供するのに十分な量である。40

【0034】

チアゾリジンジオン誘導体を用いたエネルギー代謝の制限

本発明は、本発明の1つ以上のチアゾリジンジオン誘導体を被験体に投与することによって被験体でのエネルギー代謝を制限する方法を提供する。特に、本発明は、1つ以上のチアゾリジンジオン誘導体を含む医薬組成物を被験体に投与することによって被験体において解糖を阻害する方法を提供する。

【0035】

本明細書にて定義する被験体とは、動物、好ましくは家畜（例えば、雌牛、馬、豚）または愛玩動物（例えば、犬、猫）などの哺乳類である。より好ましくは、被験体は人間である。被験体はまた、エネルギー制限を必要とする被験体であり得る。エネルギー制限を必要とする被験体とは、エネルギー制限によって生じる様々な生化学的な効果によりエネルギー制限から利益を得る被験体である。例えば、代謝ストレスを減らす必要がある被験体は、エネルギー制限を必要とする被験体であり得る。エネルギー制限によって生じる他の効果については本明細書に述べる。エネルギー制限を必要とする被験体はまた、癌になるリスクが高いかまたは罹っていると診断された被験体、癌を有すると診断されていない被験体、糖尿病の被験体、代謝障害の被験体、または長寿および／または代謝レベルの低下を望む被験体であり得る。

10

【0036】

エネルギー代謝の制限とは、例えば、制約カロリー摂取（すなわち、カロリー制限）などの食事エネルギー制限によってもたらすことができる効果をいう。食事エネルギー制限の結果、グルコース利用可能性が減り、結果としてグルコース代謝および解糖が減少する。解糖とは、1分子のグルコースが2分子のピルビン酸塩に分解され2個のATP分子という純益を与える一連の代謝プロセスである。正常の細胞では、解糖は細胞エネルギー產生という最初の工程を提供し、ミトコンドリア中で実行されグルコース分子毎に実質的により多くの量のATPを生成するトリカルボン酸サイクルへの前駆体である。

【0037】

エネルギー代謝の制限はまた、エネルギー制限模倣剤と呼ばれる適切な化合物を投与することによって模倣することができる。例えば、2-デオキシグルコースは、ヘキソキナーゼによってリン酸化され、これが次に、累積してさらなるグルコース代謝を妨げるリン酸化状態に閉じ込められる結果として、エネルギー代謝を制限することができる。本発明者によって実行され本明細書に述べる実験により、本発明のチアゾリジンジオン誘導体は、サイレントインフォメーションレギュレータ1(Sirt1)遺伝子誘発、AMPK活性化、および小胞体ストレスなどの飢餓関連の細胞応答を引き出すことができる事が実証される。チアゾリジンジオン誘導体は飢餓関連の細胞応答を引き出すことができるため、また本明細書にて述べる他の理由により、チアゾリジンジオン誘導体は有効なエネルギー制限模倣剤(ERM)である。

20

【0038】

解糖の阻害の結果、エネルギー代謝が制限される。解糖はグルコースをピルビン酸塩に変換する代謝経路であり、この結果、高エネルギー化合物、ATPおよびNADHが放出される。正常レベルの解糖のいかなる量の減少も、本明細書にて述べる本発明に関してはエネルギー代謝の制限を表す。しかし、本発明の異なる実施形態によって阻害レベルは変動し得る。例えば、チアゾリジンジオン誘導体を投与することにより、解糖は10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは完全な阻害、またはこの数値範囲内の他のいかなる有意の阻害レベルとなり得る。実現される阻害レベルは、用いられるチアゾリジンジオン誘導体の用量により変動し得、よって用量依存的である。高レベルの解糖阻害を実現可能な一方で、もっと穏当なレベル、すなわち50%以下の阻害が、高レベルの解糖阻害の潜在的な毒性を避けるため、一般的により臨床上有用であることは留意されたい。

30

【0039】

解糖の阻害は、当業者には公知の様々な異なる化合物および効果を用いて測定することができる一方で、解糖の減少を測定するのに通例用いられるマーカーの例としては、細胞によるグルコース摂取速度の減少、NADHおよび乳酸塩の形成の減少、および自食の増加があり、この自食の増加は、自食胞の形成の対応する増加によって同定することができる。本発明のチアゾリジンジオン誘導体のこれらのおよび他の効果を図1に概略的に示す。

40

【0040】

本発明のチアゾリジンジオン誘導体は、グルコースホメオスタシスを破壊し、この結果

50

、一時的な S i r t 1 誘発、 A M P K 活性化、および E R ストレスを含む特徴的な細胞応答が生じる。これら応答のそれぞれが、 T Z D の抗腫瘍効果の媒介となる役目を果たす。本発明者のデータにより、 S i r t 1 誘発と - T r C P タンパク質蓄積との間の機構的な関連が示され、これが一連のアポトーシス調節タンパク質のプロテアソーム分解および転写抑制を通してアポトーシスに達する。 A M P K 活性化は、 A M P K - T S C 2 - m T O R - p 7 0 S 6 K 経路を介して自食という結果となる。 E R ストレス信号は、 G R P 7 8 、 G A D D 1 5 3 および I R E 1 などのセンサタンパク質の上方調節を引き起こし、これもまたアポトーシス誘発で役割を果たす。

【 0 0 4 1 】

被験体での解糖の阻害により、1つ以上の有益な効果を得ることができる。例えば、被験体での解糖の阻害により癌を処置する方法を提供することができる。解糖の阻害はまた、癌を有すると診断されていない被験体を含む、被験体において寿命を延ばす（すなわち、寿命延長効果を提供する）ために使用することができる。解糖の阻害はまた、インスリンレベルの低下、代謝障害の処置、または自食の刺激など当業者には公知のいかなる他の効果を提供するためにも実行することができる。

【 0 0 4 2 】

様々なチアゾリジンジオン誘導体の癌成長を阻害する能力を下の表 I に示す。化合物に対して、 3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾル - 2 - イル) - 2 , 5 - 臭化ジフェニルテトラゾリウム (M T T) アッセイによる測定で、 L N C a P 前立腺癌細胞の生存度を下げるこれらの能力を試験した。試験した化合物は、 2 - D G またはレスベラトロールなどの公知のエネルギー制約模倣剤より著しく高い活性（すなわち、より低い I C ₅₀ ）を示した。癌細胞増殖阻害のための多くのチアゾリジンジオン誘導体の I C ₅₀ 値は低 μ M 範囲内であり、これらはそれ自体レスベラトロールおよび 2 - デオキシグルコースより少なくとも 1 ~ 3 衍は高い効き目であった。

【 0 0 4 3 】

【表 1 】

表1 チアゾリジンジオン誘導体の抗腫瘍効能

	R基およびLNCaP細胞生存能力阻害における各IC ₅₀ (μM)					
	12					
	5.6	3.7	4.2	4.0	4.5	4.5

本明細書に示すように、悪性細胞は、正常な細胞に対して著しく高い解糖活性、つまりワールブルグ効果と呼ばれる効果を示す。この効果をもたらすとして、ミトコンドリア欠損、癌組織内の低酸素環境への順応、発癌シグナル、およびいくつかの代謝酵素の異常発現を含む幾つかのメカニズムが示唆されている。ミトコンドリアの呼吸機構を用いて A T P を生成する癌細胞の能力が低下するため、癌細胞は、成長を続けるための十分な A T P 生成を維持するため自らの解糖活性を増大させるよう強いられる。この代謝順応により、癌細胞は解糖経路に依存することになり、その阻害による被害を受けやすくなる。さらに、この代謝交替は癌細胞ではほとんど偏在しているため、解糖経路を標的にすることは、広範囲の異なるタイプの癌を処置する有用な方法を表す。抗癌処置のための解糖阻害の使用についてのさらなる検討については、 P e l i c a n o ら、 O n c o g e n e 、 2 5 、 p . 4 6 3 3 - 4 6 4 6 (2 0 0 6) を参照されたい。

【 0 0 4 4 】

解糖が阻害されると、正常細胞内の無傷のミトコンドリアにより、これら細胞が脂肪酸およびアミノ酸などの代替のエネルギー源を使用して、呼吸を通じての A T P 產生のためのトリカルボン酸サイクルへと通じる代謝中間体を产生することが可能になる。この結果、正常なミトコンドリアを持つ細胞は、癌細胞に対して、解糖を阻害する薬剤に対して感度が低く、治療選択性をもたらす。よって、本発明は、癌細胞内での解糖を選択的に阻害するチアゾリジンジオン誘導体の能力の結果としてチアゾリジンジオン誘導体を用いた癌を処置する方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

癌の処置の有効性は、チアゾリジンジオン誘導体の投与に応答した被験体での腫瘍負荷の低下または腫瘍成長の減少を評価することによって測定され得る。腫瘍負荷の低下は、質量の直接の減少によって表されてもよく、または腫瘍成長の遅延によって測定されてもよく、これは、対照腫瘍がある特定の体積まで成長する平均時間を、処置された腫瘍が同じ体積まで成長するのに要する時間から引くことによって計算される。

【 0 0 4 6 】

チアゾリジンジオン誘導体は、癌の処置および防止の両方を行うために用いることができる。本明細書において、用語「防止」は、臨床的に明らかな望ましくない細胞増殖の開始を完全に防ぐこと、またはリスクを持つ個体での望ましくない急速な細胞増殖の臨床前に明らかな段階の開始を防ぐことのいずれかを含む。この定義はまた、悪性細胞の転移の防止または悪性細胞の進行の阻止もしくは反転も包含するものと意図される。これは、前癌状態および癌を発症させるリスクが高い個体の予防処置を含む。高いリスクとは、被験体が癌を発症する平均より上のリスクを表し、これは、例えば、家系または癌を発症する素因を引き起こす遺伝子の検出を通して決定することができる。

10

【 0 0 4 7 】

癌細胞は、細胞の相対的に無制限の成長を結果としてもたらす遺伝子の損傷を含む。癌細胞に存在する遺伝子の損傷は、癌細胞株のその後の世代において遺伝形質として維持される。本発明の方法によって処置される癌は、当業者には公知のまたは本明細書で述べる癌の形態のいずれであってもよい。固形腫瘍として現れる癌、およびそうではなく白血病で典型的にみられるように非固形腫瘍を形成する癌の両方が処置され得る。すべてのタイプの癌において好気性解糖の増加が優勢であることに基づいて、本発明は、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、およびリンパ腫を含む様々な異なるタイプの癌に罹る被験体を処置する方法を提供する。

20

【 0 0 4 8 】

本発明者は、チアゾリジンジオン誘導体を、様々な異なるタイプの癌細胞の成長を阻害するために使用し得ることを実証している。例えば、前立腺癌、乳癌、白血病、非小細胞肺癌、結腸癌、C N S 癌、黒色腫、卵巣癌、および腎臓癌細胞の成長の阻害に対するチアゾリジンジオン誘導体の有効性を実証する実験を実行した。これらの実験は本明細書にて後述の実施例 2 で述べる。

30

【 0 0 4 9 】

チアゾリジンジオン誘導体による解糖の阻害はまた、2型糖尿病または代謝症候群の処置に使用することができる。本明細書にて定義する代謝症候群は、心臓病または糖尿病を発症するリスクの増大を招き得る障害の組み合わせであり、2型糖尿病または空腹時血糖障害でみられるような空腹時高血糖、耐糖能障害、またはインスリン耐性；高血圧；主に胴回りの脂肪沈着を伴う中心性肥満；H D L コレステロールの低下；およびトリグリセリドの上昇から選択される複数の症状を特徴とする。チアゾリジンジオン誘導体は、医薬組成物における治療上有効な量のチアゾリジンジオン誘導体を、これを必要とする被験体に送達することによって、2型糖尿病または代謝症候群を処置または防止するために使用することができる。チアゾリジンジオン誘導体は、本明細書に述べるように、解糖に及ぼすこれらの影響の結果として、およびA M P K に与える影響の結果として有効である。A M P K 系は、真核細胞における細胞エネルギー状態のセンサとして作用することが知られており、代謝制御およびインスリンシグナル伝達に重要な影響を及ぼす。T o w l e r ら、C i r c R e s 、1 0 0 、3 2 8 - 3 4 1 (2 0 0 7)。

40

【 0 0 5 0 】

チアゾリジンジオン誘導体を投与することによって被験体にエネルギー代謝制限を提供する別の潜在的な利点としては、処置される被験体の寿命を延ばし、これにより寿命延長効果を提供することができることである。実験用ラットおよびマウスでの再現可能な寿命延長の研究により、エネルギー制限が寿命を有意に増加させ、また加齢に関連した疾患の発病を遅らせ得ることが実証された。類似の効果は様々な無脊椎種で見られ、また靈長類

50

についての最近の研究は、エネルギー制限により齶歯類で観察されたものに匹敵する生理学的な効果が生じることを示している。エネルギー制約模倣剤の寿命に与える効果を評価するために研究もまた実行されている。Ingramら、Ann NY Acad Sci. 1019、p. 412-23 (2004) 参照。

【0051】

酸化的ストレスの減少、炎症の制御、および高分子の糖化に対する防御を含むエネルギー制約模倣剤の寿命延長効果に対して幾つかのメカニズムが提案されている。特に、解糖の阻害により自食が刺激され、この結果、有意量の反応性酸素種を放出する細胞小器官を取り除くことができることが分かった。さらに、エネルギー制約の寿命延長効果は、エネルギー利用率が低い期間、有機体のエネルギーを再生ではなく生き残りの方に向け直す進化的に保存されたストレス応答であり得ると仮定されている。10

【0052】

寿命延長効果とは、非処置の被験体に比べて、治療上有効な用量のエネルギー制約模倣剤で処置された被験体の平均寿命を増大させる効果である。寿命延長効果もまた癌などの疾患を診断された被験体において実現することができる一方で、寿命延長効果は、疾患の除去に依存しないため、健康な被験体で得ることができる。寿命延長効果は、酸化的ストレスまたは炎症などの慢性的な問題を防ぐ結果として見られるため、被験体は、有意な寿命延長効果を得るために長期間にわたって処置を行わなければならない。マウスにみられる結果に基づけば、寿命延長効果は寿命の10%、20%、30%、または40%の増大を提供し得る。Mattson、M.P.、Annu. Rev. Nutr. 25: p. 237-60 (2005)。20

【0053】

寿命延長効果は、健康であると診断された被験体または疾患もしくは障害を有すると診断されていない被験体において提供することができる。例えば、寿命延長効果は、癌ではないと診断された被験体または癌であると診断されていない被験体において提供することができる。癌であると診断する方法は当業者には周知である。

【0054】

数多くのチアゾリジンジオン誘導体の活性を調査する努力の一部として、本発明者は、インハウスのチアゾリジンジオン系の集中化合物ライブラリのスクリーニングを行って、アデノシンーリン酸活性化プロテインキナーゼ (AMPK) のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) 非依存の活性化およびインターロイキン (IL)-6 産生の抑制の媒介となる能力を有する化合物を同定した。ラバマイシンの標的のAMPKおよび哺乳類の相同物の活性化状態 (すなわち、それぞれAMPKおよびp70リボソームタンパク質S6キナーゼのリン酸化)、およびリポ多糖体 (LPS) 刺激THP-1ヒトマクロファージでのIL-6 / IL-6受容体シグナル伝達 (すなわち、それぞれIL-6 産生ならびに転写3リン酸化のシグナルトランスデューサおよび活性剤) に関する細胞系のアッセイを用いて、この化合物ライブラリをスクリーニングし、様々な活性チアゾリジンジオン誘導体の同定に至った。ここで、化合物53 (N-[4-[3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデン-メチル]-フェニル]-4-ニトロ-3-トリフルオロ-メチル-ベンゼンスルホニアミド) が先導薬剤であると同定された。本明細書の実施例に記載の証拠により、IL-6 産生の抑制はAMPK活性化に起因したものであることが分かる。チアゾリジンジオン誘導体介在のAMPK活性化はまた、C-26結腸腺癌細胞でも実証されたため、この効果が細胞株特異的ではないことを示す。AMPKは、2型糖尿病、メタリックシンドローム、および癌の処置のための治療上関連する標的を表し、チアゾリジンジオン誘導体のエネルギー制約模倣剤としての使用がさらに支持される。3040

【0055】

従って、本発明のさらなる局面は、有効量のチアゾリジンジオン誘導体を提供することによってアデノシンーリン酸活性化プロテインキナーゼを活性化する方法を提供する。加えて、本発明の別の局面は、AMPK活性剤として有効であると本明細書で述べるチアゾ50

リジンジオン誘導体の1つを含む医薬組成物を被験体に投与することによって、被験体においてIL-6発現を阻害する方法を提供する。

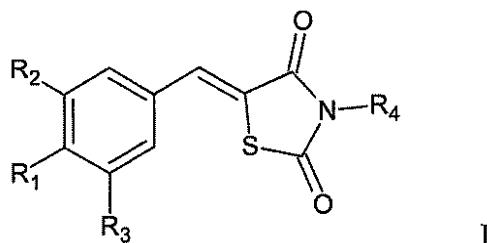
【0056】

チアゾリジンジオン誘導体

本発明のチアゾリジンジオン誘導体は、式I、II、III、およびIVの化合物を含む。例えば、チアゾリジンジオン誘導体は式I

【0057】

【化1】



式中、R₁は水素またはヒドロキシル；R₂およびR₃は、水素、ヒドロキシル、ハロ、アミノ、メチル、メトキシ、エチル、エトキシ、ニトロ、アミノスルホニル、トリフルオロメチルスルホニル(trifluoromethanesulfonyl)、およびハロアルキル部分から選択され；R₄は、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、およびアリール基から選択される。本発明の特定の実施形態では、R₁はヒドロキシルである。さらなる実施形態ではR₂はトリフルオロメチルであり、一方なおさらなる実施形態ではR₃は水素である。

を有する化合物であり得る。

【0058】

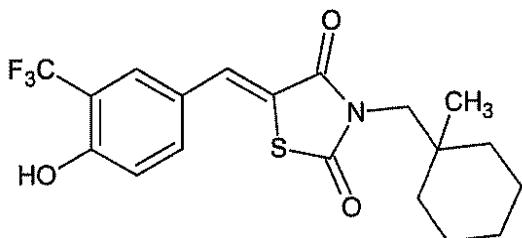
さらなる実施形態では、式Iのチアゾリジンジオン誘導体は以下に示す化合物のいずれでもあり得る。例えば、チアゾリジンジオン誘導体は以下の化合物のいずれであってもよい。

【0059】

(Z)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(1-メチル-シクロヘキシルメチル)-チアゾリジン-2-4-ジオン(OSU-CG12)

【0060】

【化2】



(Z)-3-(2-エチル-ブチル)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン(OSU-CG5)

【0061】

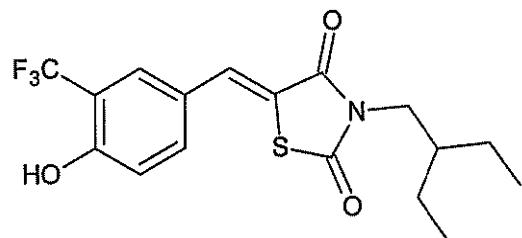
10

20

30

40

【化3】

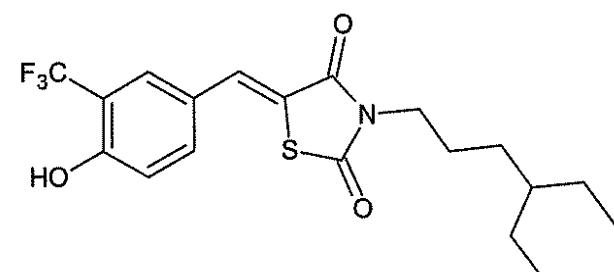


(Z)-3-(2-エチル-ペンチル)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

10

【0062】

【化4】

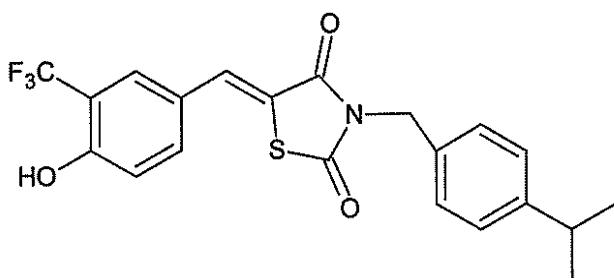


20

(Z)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(4-イソプロピル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0063】

【化5】

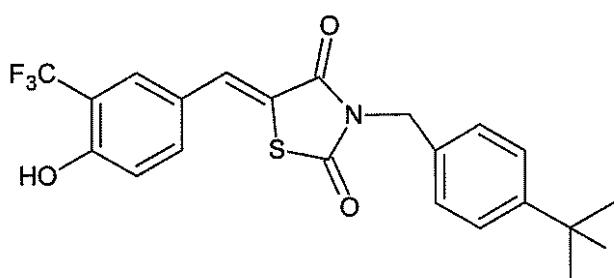


30

(Z)-3-(4-tert-butylbenzyl)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0064】

【化6】

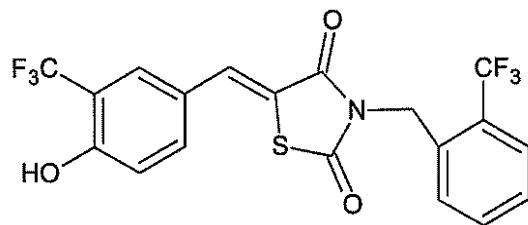


40

(Z)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-(4-トリフルオロメチル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0065】

【化7】

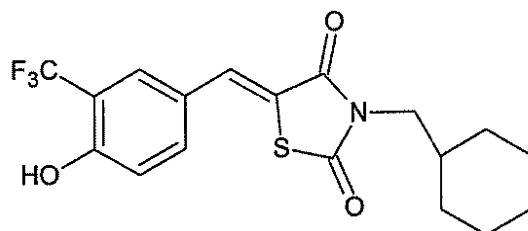


(Z)-3-シクロヘキシリメチル-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

10

【0066】

【化8】

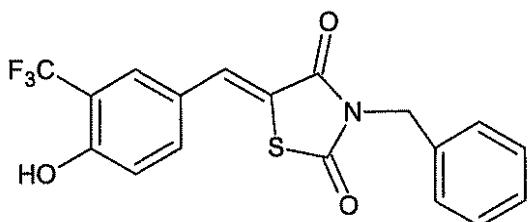


(Z)-3-ベンジル-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

20

【0067】

【化9】

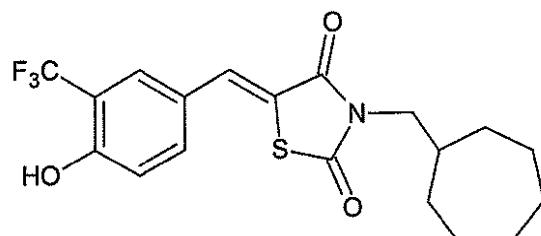


30

(Z)-3-シクロヘプチルメチル-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0068】

【化10】

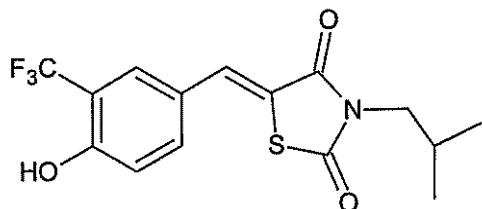


40

(Z)-5-(4-ヒドロキシ-3-トリフルオロメチル-ベンジリデン)-3-イソブチル-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0069】

【化11】



本発明の他の実施形態では、式Iのチアゾリジンジオン誘導体は、R₁がヒドロキシル、R₂がトリフルオロメチル、およびR₃がヒドロキシルであるように定義される。式IのR₄を変えることにより、以下に示すチアゾリジンジオン誘導体が提供される。

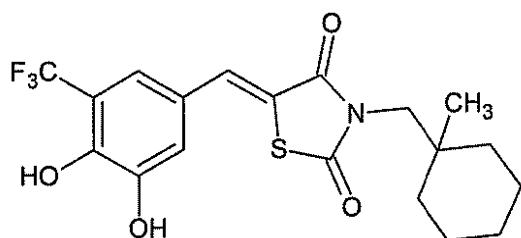
10

【0070】

(Z)-5-((3,4-dihydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl)methylidene)-3-(1-methylcyclohexyl)-2-methyl-4-thia-1,3-dioxolan-5-one

【0071】

【化12】

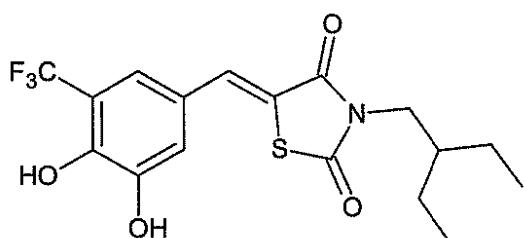


20

(Z)-5-((3,4-dihydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl)methylidene)-3-(2-ethylbutyl)-2-methyl-4-thia-1,3-dioxolan-5-one

【0072】

【化13】

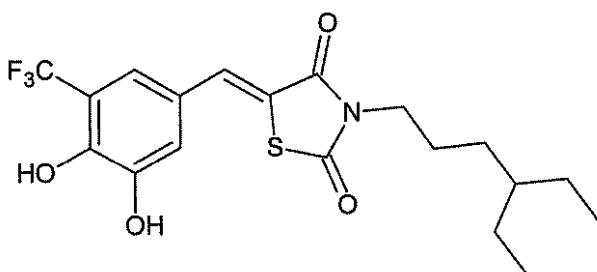


30

(Z)-5-((3,4-dihydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl)methylidene)-3-(2-ethylpentyl)-2-methyl-4-thia-1,3-dioxolan-5-one

【0073】

【化14】

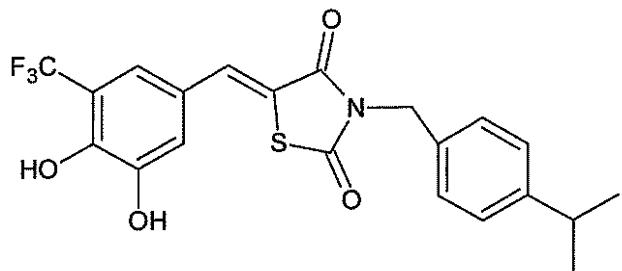


40

(Z)-5-((3,4-dihydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl)methylidene)-3-(4-isopropylbenzyl)-2-methyl-4-thia-1,3-dioxolan-5-one

【0074】

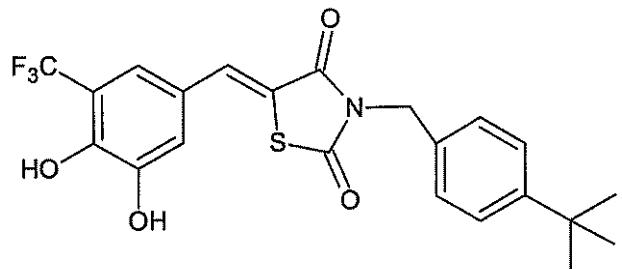
【化15】



(Z) - 3 - (4 - tert - ブチル - ベンジル) - 5 - (3 , 4 - ジヒドロキシ - 5
- トリフルオロメチル - ベンジリデン) - トリアゾリジン - 2 - 4 - ジオン 10

【0075】

【化16】

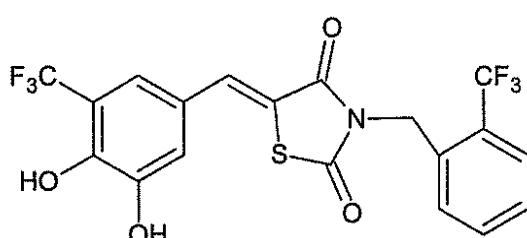


20

(Z) - 5 - (3 , 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3
- (2 - トリフルオロメチル - ベンジル) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン

【0076】

【化17】

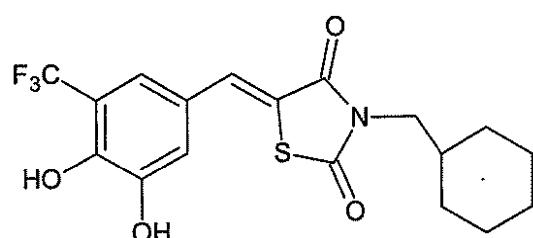


30

(Z) - 3 - シクロヘキシリメチル - 5 - (3 , 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロ
メチル - ベンジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン

【0077】

【化18】

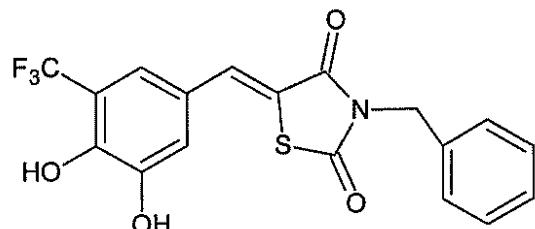


40

(Z) - 3 - ベンジル - 5 - (3 , 4 - ジヒドロキシ - 5 - トリフルオロメチル - ベン
ジリデン) - チアゾリジン - 2 - 4 - ジオン

【0078】

【化19】

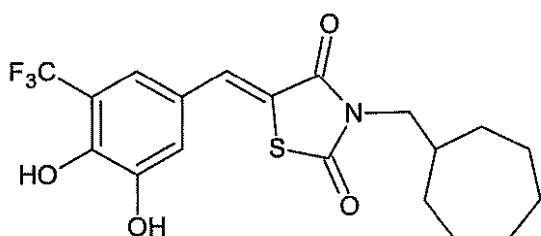


(Z)-3-(3,4-dihydroxy-5-(3,4,5-trifluorophenoxy)-5-phenylmethylthio)-2-(3,4,5-trifluorophenoxy)-2-aziridin-2-ium ion

10

【0079】

【化20】

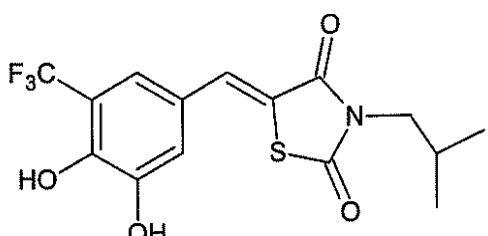


(Z)-5-(3,4-dihydroxy-5-(3,4,5-trifluorophenoxy)-5-phenylmethylthio)-3-isopropyl-2-aziridin-2-ium ion

20

【0080】

【化21】



30

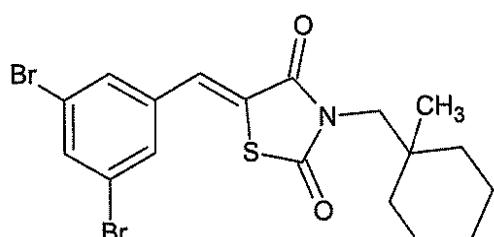
本発明の他の実施形態では、式Iのチアゾリジンジオン誘導体は、R₁が水素ならびにR₂およびR₃がハロ部分であるように定義される。さらなる実施形態では、R₂およびR₃は共にブロモ部分である。この実施形態に対して、式IのR₄を変えることにより、以下に示すチアゾリジンジオン誘導体が提供される。

【0081】

(Z)-5-(3,5-dibromo-5-phenylmethylthio)-3-(1-methylcyclohexyl)-2-aziridin-2-ium ion

【0082】

【化22】

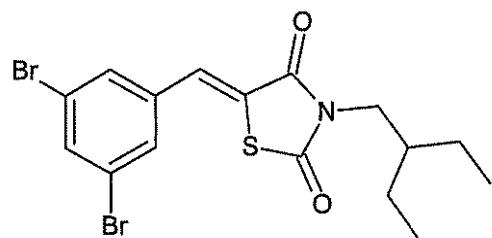


40

(Z)-5-(3,5-dibromo-5-phenylmethylthio)-3-(2-ethylbutyl)-2-aziridin-2-ium ion

【0083】

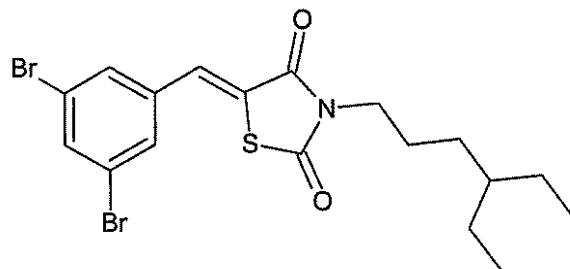
【化23】



(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(2-エチル-ペンチル)-
チアゾリジン-2-4-ジオン 10

【0084】

【化24】

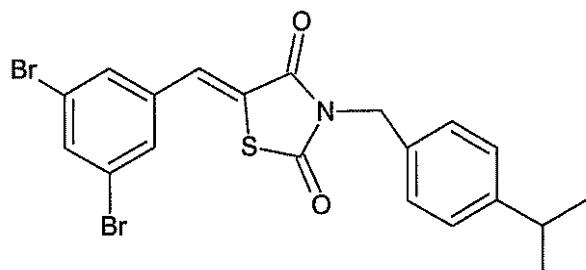


20

(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(4-イソプロピル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0085】

【化25】

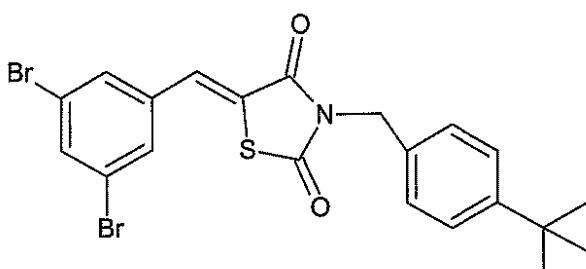


30

(Z)-3-(4-tert-butylbenzyl)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0086】

【化26】

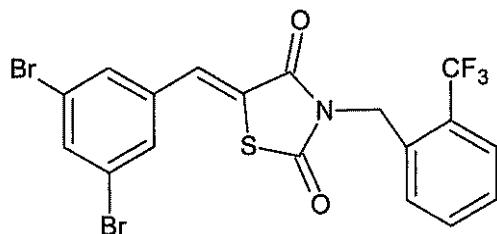


40

(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-(2-トリフルオロメチル-ベンジル)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0087】

【化27】

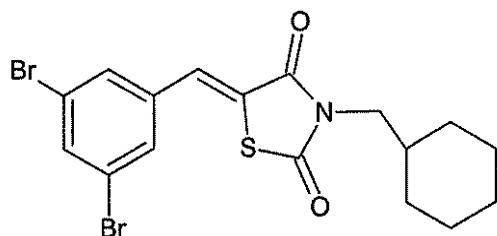


(Z)-3-シクロヘキシリメチル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

10

【0088】

【化28】

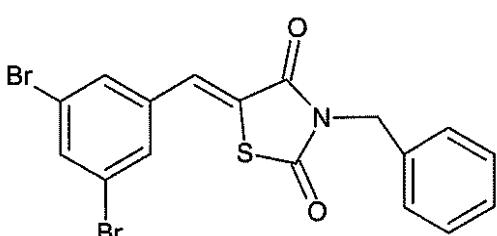


(Z)-3-ベンジル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

20

【0089】

【化29】

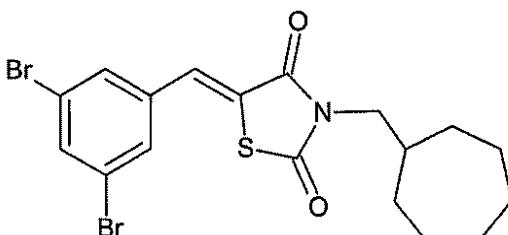


30

(Z)-3-シクロヘプチルメチル-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0090】

【化30】

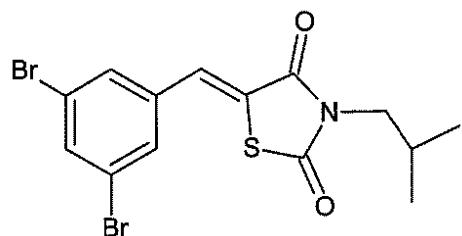


40

(Z)-5-(3,5-ジブロモ-ベンジリデン)-3-イソブチル-チアゾリジン-2-4-ジオン

【0091】

【化31】

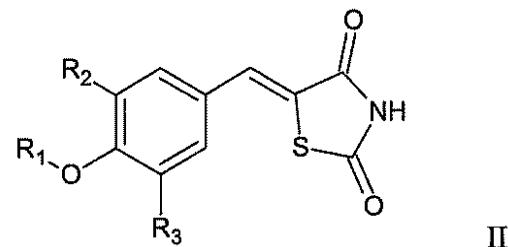


本発明の別の局面では、チアゾリジンジオン誘導体は、式Ⅱ

【0092】

10

【化32】



式中、R₁は、アリール、アルキル、ヘテロアリール、シクロアルキル、およびヘテロシクロアルキル基から選択され；R₂は、水素、ハロ、およびニトロ部分、ならびにアルキル、アルコキシ、およびハロアルキル基から選択され；R₃は、水素およびハロ部分ならびにアルキル、アルコキシ、およびハロアルキル基から選択される、
を有する化合物であり得る。

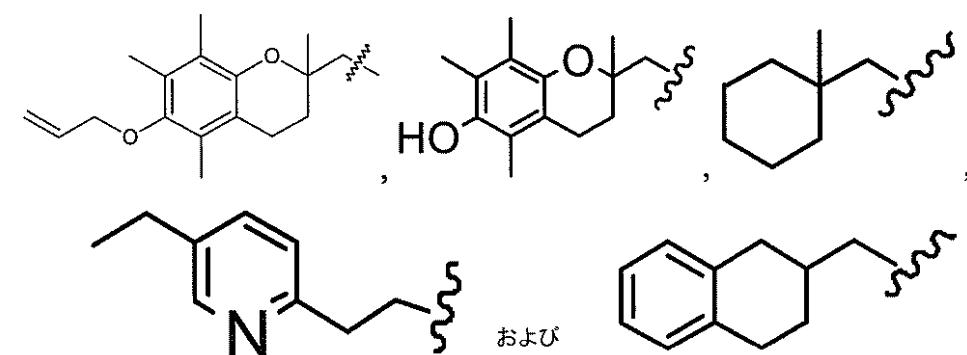
20

【0093】

式Ⅱのチアゾリジンジオン誘導体はまた、いくつかの実施形態では、以下から選択されるR₁を有し得る。

【0094】

【化33】



30

追加の実施形態では、式Ⅱのチアゾリジンジオン誘導体は、R₂が水素、プロモ、クロロ、メチル、メトキシ、エトキシ、およびニトロから選択され；R₃が水素、メチル、メトキシ、およびプロモから選択されるように定義される。

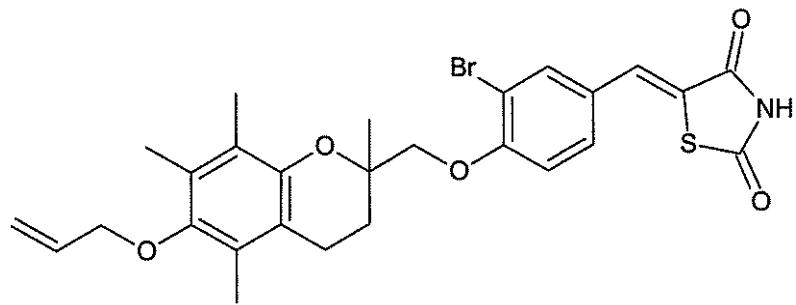
40

【0095】

チアゾリジンジオン誘導体はまた、以下の構造を有する化合物STG28であり得る。

【0096】

【化34】

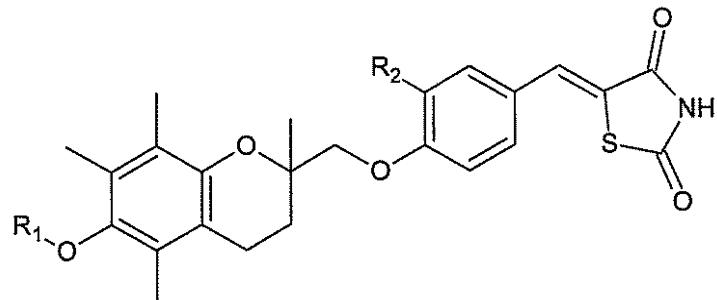


10

本発明のさらなる実施形態では、チアゾリジンジオン誘導体は式I-III

【0097】

【化35】



20

III

式中、R₁は低級アルキル基であり、R₂はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される。

を有する化合物であり得る。

【0098】

式I-IIIによる化合物の例としては、5-[3-ブロモ-4-(6-エトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-ベンジリデン]-チアゾリジン-2-4-ジオン、5-[4-(6-ブトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-3-メトキシ-ベンジリデン]-チアゾリジン-2-4-ジオン、および4-{2-[2-ブロモ-4-(2,4-ジオキソ-チアゾリジン-5-イリデンメチル)-フェノキシメチル]-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-6-イルオキシ}-ブチロニトリルからなる群より選択され得る。

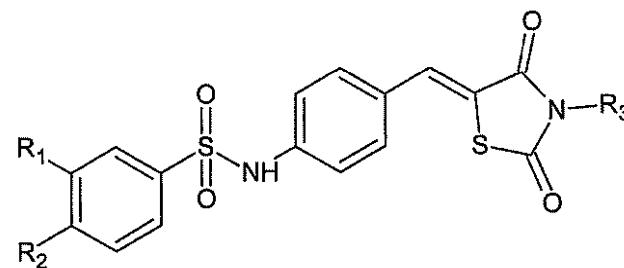
30

【0099】

本発明のさらなる実施形態では、チアゾリジンジオン誘導体は式IV

【0100】

【化36】



40

IV

式中、R₁は、水素、メチル、またはトリフルオロメチル部分であり、R₂は、メトキシまたはニトロ部分であり、R₃は、アルキルまたはシクロアルキル基である、を有する化合物であり得る。

【0101】

式IVによる化合物の例としては、4-メトキシ-N-{4-[3-(1-メチル-シ

50

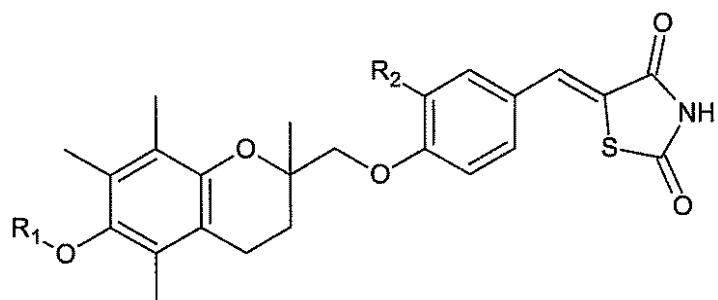
クロヘキシリルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル} - ベンゼンスルホンアミド、N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデン - メチル] - フェニル} - 4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - ベンゼンスルホンアミド、およびN - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル} - 4 - ニトロ - ベンゼンスルホンアミドからなる群より選択され得る。

【0102】

本発明の多数のチアゾリジンジオン誘導体は、AMPKを活性化する能力を示す。特に、式I、III、およびIVの化合物は、AMPKを活性化可能であることが示されている。これら化合物は、エネルギー制限模倣剤として有用な化合物を説明するのに用いられたのと同じ全体式の多くを有する一方で、これらの式の化合物に対する置換基は異なってもよい。従って、チアゾリジンジオン誘導体は、式III

【0103】

【化37】



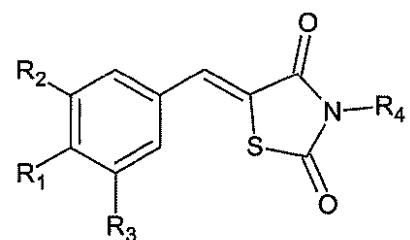
III

式中、R₁は低級アルキル基であり、R₂はハロ、メチル、メトキシ、エチル部分から選択される。

による化合物；式I

【0104】

【化38】



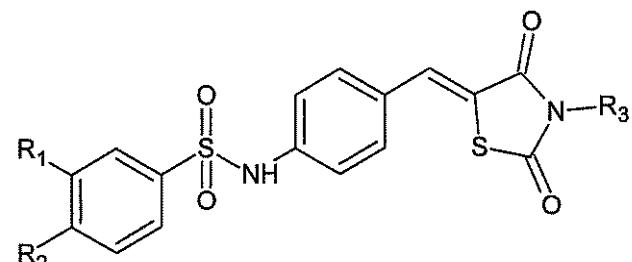
I

式中、R₁はヒドロキシル；R₂はトリフルオロメチル；R₃は水素；R₄はアルキルまたはシクロアルキル基である。

の化合物；および式IV

【0105】

【化39】



IV

式中、R₁は水素、メチル、またはトリフルオロメチル部分；R₂はメトキシまたはニト

50

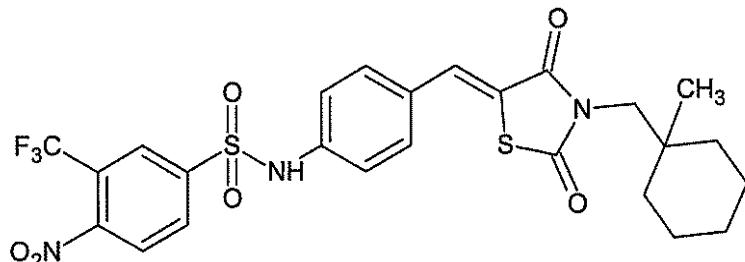
口部分、R₃はアルキルまたはシクロアルキル基である、の化合物であり得る。

【0106】

A M P Kを活性化するための特に好適な化合物は、化合物53であり、これは以下の構造を有する。

【0107】

【化40】



10

チアゾリジンジオン誘導体の同定

本発明のさらなる局面は、被験体でのエネルギー代謝を制限するために使用され得るチアゾリジンジオン誘導体を同定する方法を含む。試験に適している潜在的な薬剤を本明細書では「候補薬剤」と呼ぶ。様々な異なるアッセイを用いてエネルギー代謝を制限する薬剤の能力を同定することができる。例えば、グルコース摂取、解糖速度、またはNADHおよび乳酸塩の産生を減らす化合物の能力を測定することができる。あるいは、またはこれに加えて、Sirt1誘発、AMPK活性化、ERストレス、または-TrcP介在タンパク質分解などのグルコース飢餓様の応答を引き出す化合物の能力を測定することができる。これらの分析を実行する手順は当業者には公知であり、多くが本明細書に示す実施例1に記載されている。候補薬剤の供給源としては、例えば、図2に示すような化合物ライプラリまたは天然源が挙げられる。

20

【0108】

候補薬剤はまた動物モデルにおいて試験され得る。例えば、エネルギー制限の結果として癌を阻害するチアゾリジンジオン誘導体の能力は、C4-2異種移植片腫瘍モデルにおいて評価することができる。動物モデル（例えば、マウス）での様々な癌の研究は、ヒト癌の研究の一般的には認められた慣行である。しかし、候補薬剤はまた、寿命延長効果のために動物モデルにて評価することもできる。例えば、体温および血漿インスリンレベルは共にエネルギー制限効果の指標であり、言うまでもなく動物モデルの寿命を測定することができる。典型的には、候補薬剤で処置された対照動物と処置を受けていない対照の同腹子との間で結果を比較する。

30

【0109】

例えば、C4-2前立腺癌異種移植片腫瘍を、等量の無血清培地およびマトリゲル（2×10⁶細胞数 / 0.1 ml / マウス）中に懸濁させたC4-2細胞の皮下注射によって、去勢雄NCr無胸腺ヌードマウス（生後5～7週間）に定着させることができる。腫瘍の体積が約100 mm³に達すると、マウスをランダムに実験群（10匹/群）に割り当てる。経口投与用にチアゾリジンジオン誘導体を調製し、研究期間中一日一回、それぞれの最大耐量の100%、50%、25%、および10%を強制投与する。対照として、レスベラトロールを一日一回100 mg / kg投与することができる。重量および腫瘍サイズを毎週測定する。対照腫瘍が1000 mm³に達すると、マウスを犠牲にして、組織をバイオマーカー評価のために採取する。グルコース摂取をブロックするチアゾリジンジオン誘導体の能力はまた、ポジトロン断層法により、[¹⁸F]-フルオロデオキシグルコース摂取を用いて試験マウスにおいて評価することができる。

40

【0110】

免疫組織化学およびウェスタンプロット法を用いて、表IIに示すような試験動物でのチアゾリジンジオン活性のインビボにおける腫瘍内バイオマーカーを特徴付けることがで

50

きる。これらバイオマーカーは3つのカテゴリー、すなわち - TrCPシグナル伝達(一時的なSirt1誘発のための代理マーカーとして)、AMPK活性化、およびERストレス応答に分類することができる。腫瘍血管形成のマーカーもまた、エネルギー制限により調整され得るため、検査することができる。

【0111】

【表2】

表II 腫瘍内バイオマーカー

増殖指標	PCNA(増殖細胞核抗原)、Ki67
アポトーシス指標	アポトーシス細胞の同定にはApoptagインサイチュ検出キットを用い得る。これは末端デオキシヌクレオチジルトランスクレラーゼ(TdT)介在TUNEL手順を用いる。
AR機能	AR、PSA、およびヒトカリクレイン-2
β-TrCP シグナル伝達	β-TrCP、βカテニン、サイクリンD1、Sp1、および他のSp1標的タンパク質
AMPK 活性化	AMPK、mTOR、p70S6K、およびAktのリン酸化
ERストレス	GADD153、GRP78、およびIRE1α
血管形成	微細血管の密度(CD31および因子VIII関連抗原); VEGF

チアゾリジンジオン誘導体の調剤および投与

本発明は、医薬組成物中の1つ以上のチアゾリジンジオン誘導体を投与する方法を提供する。医薬組成物の例としては、経口、静脈内、筋肉内、皮下、もしくは腹腔内投与、または当業者には公知の任意の他経路のための医薬組成物が挙げられ、一般に薬学的に許容可能なキャリアと共に調剤されるチアゾリジンジオン誘導体を提供することを含む。

【0112】

本明細書で述べる化合物を経口投与のために調製する場合、医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル、懸濁液、または液体の形態であり得る。医薬組成物は好ましくは、特定量の活性成分を含有する投薬量単位の形態で作製される。このような投薬量単位の例としては、ラクトース、マンニトール、トウモロコシ澱粉またはジャガイモ澱粉などの従来の添加物；結晶セルロース、セルロース誘導体、アカシア、トウモロコシ澱粉、またはゼラチンなどの結合剤；トウモロコシ澱粉、ジャガイモ澱粉、またはカルボキシルメチルセルロースナトリウムなどの分解剤；およびタルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑剤を含む、カプセル、錠剤、粉末、顆粒、または懸濁液がある。活性成分はまた、例えば、生理食塩水、ブドウ糖、または水が適切なキャリアとして使用され得る組成物として注射により投与され得る。

【0113】

静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内投与のためには、化合物は、好ましくは受容体の血液と等張である滅菌水溶液と組み合わされ得る。このような調剤物は、固体活性成分を、塩化ナトリウム、グリシンなどの生理学的に相溶性の物質を含有し、かつ生理学的条件と適合する緩衝pHを有する水に溶解させて水溶液を生成し、この溶液を滅菌することによって調製され得る。調剤物は、封印アンプルまたはバイアルなどの単一用量または多用量容器内に存在してもよい。

【0114】

非経口投与にとって適切な調剤物は、好ましくは等張にされる活性化合物の滅菌水溶液調製物を含むのが都合がよい。注射用の調製物はまた、化合物を、植物油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコールなどの非水性溶媒中で化合物を懸濁または乳化することによって調剤され得る。

【0115】

投薬の形態および量は、公知の処置または予防レジメン(regimens)を参照することによって容易に確立することができる。投与される治療的に活性の化合物の量、

10

20

30

40

50

および疾患状態を本発明の化合物および／または組成物により処置するための投薬レジメンは、被験体の年齢、体重、性別、および病状、疾患の重症度、投与の経路および頻度、ならびに用いる特定の化合物、望ましくない増殖細胞の位置、また処置される個体の薬物動態特性を含む様々な要因に依存するので、広く変動し得る。化合物が全身的にではなく局所的に、また処置のためではなく予防のために投与される場合、投薬量は一般に低くなり得る。このような処置は、必要なだけの頻度で、また処置を行う医師が必要と判断した期間、投与され得る。当業者であれば、投薬レジメンまたは投与されるべき阻害剤の治療上有効な量は個体毎に最適化する必要があることは理解されよう。医薬組成物は活性成分を約0.1～2000mgの範囲で、好ましくは約0.5～500mgの範囲で、最も好ましくは約1～200mgの範囲で含有し得る。日用量約0.01～100mg/kg体重、好ましくは約0.1～約50mg/kg体重が適切であり得る。日用量は1日1～4回で投与することができる。

【0116】

例えば、チアゾリジンジオン誘導体に対する最大耐量(MTD)は、腫瘍のない無胸腺ヌードマウスにおいて決定することができる。薬剤を、0.5%のメチルセルロース(w/v)および0.1%のTween 80(v/v)を含有する滅菌水での懸濁液として調製し、マウス(7匹/群)に、一日一回、0、25、50、100および200mg/kgの用量で14日間、強制経口投与する。1週間に2度測定する体重、および一般的な健康および挙動の毎日の直接の観察が、薬物耐性の第1の指標となる。MTDは、14日の処置期間にわたって10%以下の体重減少をもたらす最大用量と定義される。

【0117】

チアゾリジンジオン誘導体はまた薬学的に許容可能な塩として提供され得る。用語「薬学的に許容可能な」とは、アルカリ金属塩を形成するためにおよび遊離酸または遊離塩基の付加塩を形成するために一般に用いられる塩を意味する。この塩の性質は、これが薬学的に許容可能であれば重要ではない。式I、II、III、およびIVの化合物の適切な薬学的に許容可能な酸付加塩は、無機酸からまたは有機酸から調製され得る。このような無機酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸、およびリン酸がある。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、芳香脂肪族、複素環式、カルボキシル基、およびスルホン基クラスの有機酸から選択され得、これらの例としては、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン(glucoronic)酸、マレイン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、メシリ酸、サリチル酸、p-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、アンボン酸、パモン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、バントテン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシリノスルホン酸、ステアリン酸、アルゲン酸、-ヒドロキシ酪酸、ガラクトタル酸、およびガラクトロン酸が挙げられる。本明細書で述べる化合物の適切な薬学的に許容可能な塩基付加塩としては、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、および亜鉛からなる金属塩が挙げられる。あるいは、N,N'-ベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン(N-メチルグルカミン)およびプロカインからなる有機塩を用いて、本明細書で述べる化合物の塩基付加塩を形成してもよい。これらの塩のすべてが、本明細書で述べる対応する化合物から、例えば適切な酸または塩基を該化合物と反応させることによって、従来の手段により調製され得る。

【0118】

チアゾリジンジオン誘導体の調製

本発明の化合物は、化学的技術において、特に本明細書に含まれる記述に照らして周知のプロセスに類似のプロセスを含む合成経路によって合成され得る。出発材料は一般にAldrich Chemicals(Milwaukee, Wisconsin、米国)などの市販源から入手可能であり、または当業者には周知の方法を用いて容易に調製され

10

20

30

40

50

る(例えば、Louis F. FieserおよびMary Fieser、Reagents for Organic Synthesis, v. 1 - 19, Wiley, New York (1967 - 1999版)および当業者には公知の類似のテキストに一般的に記載された方法によって調製される)。様々なチアゾリジンジオン誘導体の調製は、本発明者によって先に出願された特許出願に記載されている。共にChenらによる米国特許第7,566,787号および米国特許出願第12/389,759号を参照されたい。これらの開示は全体が本明細書において参考により援用されている。多数の具体的なチアゾリジンジオン誘導体の調製を本明細書の実施例において説明する。

【0119】

多数のチアゾリジンジオン誘導体はまた、図2に示すように、固相コンビナトリアル化学を用いて調製することができる。図2に示すように、フェノール環(R_1)および末端疎水性部分(R_2)の置換基を変えることによって、集中化合物ライブラリを作成することができる。

【0120】

図2の合成スキームで示すように、置換ベンズアルデヒド(i)の-OH官能基により、ファーマコフォアが求核置換反応を介してメリフィールド樹脂に繋がって共役(ii)を形成し、続いてチアゾリジンジオン環を添加して共役(iii)を生じさせることができる。異なる疎水性付属物(R_2OH)を、ミツノブ反応(iv)を介してチアゾリジンジオン環に導入することができ、これにより樹脂からの脱カップリングで高収率および高純度の最終生成物(v)が提供される。このコンビナトリアル合成は24ウェルのフォーマットにて行われるため、各サイクルは約10日で多mg量の24の誘導体を生成する。同図に示す誘導体に基づいて、全272の誘導体($8R_1 \times 34R_2$)を合成することができる。追加のチアゾリジンジオン誘導体の調製は図12および図13に示す。

【0121】

本発明を以下の実施例によって示す。特定の実施例、材料、量、および手順は、本明細書に示す本発明の範囲および精神に従って広範囲に解釈されることは理解されよう。

【実施例】

【0122】

実施例1：癌細胞におけるエネルギー制限に与えるチアゾリジンジオン化合物の効果
本実施例では、本発明者は、トログリタゾン、シグリタゾン、STG28、およびOSU-CG12が、LNCaP前立腺癌およびMCF-7乳癌細胞におけるエネルギー制限に特有の特徴的な細胞応答を引き出すことができたことを示す。これらのエネルギー制限関連の変化としては、解糖速度ならびにNADHおよび乳酸塩の産生の減少、サイレントインフォメーションレギュレータ1(Sirt1)遺伝子発現の一時的な誘発、および細胞内細胞燃料センサAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の活性化および小胞体(ER)ストレスを含み、これらの間の相互作用の結果、自食およびアポトーシスとなる。この知見の意味することは多岐にわたる。第1に、これにより、強力なエネルギー制限模倣剤としてのOSU-CG12の同定によって実証されるように、強力なエネルギー制限模倣剤を開発する足場としてTZDを使用する分子基礎が提供される。OSU-CG12は、飢餓関連の細胞応答の媒介となり、またレスベラトロールより1桁高い(IC₅₀、5μM対60~110μM)癌細胞の成長を抑制するのに効力を示す。第2に、機構的な見地からは、本研究は、細胞サイクルおよびアポトーシス調節タンパク質のトランスデューシング繰り返し体含有タンパク質(-TrCP)依存プロテアソーム分解が、一時的なSirt1転写活性化という下流細胞事象を表しているという第1の証拠を提供する。

-TrCPシグナル伝達の活性化は、アポトーシス誘発に与える、グルコース飢餓およびエネルギー制限模倣剤の効果の根底にある。

【0123】

方法

細胞培養および試薬

LNCaPホルモン応答前立腺癌細胞およびMCF-7ER陽性乳癌細胞を、Ame

10

20

30

40

50

rican Type Culture Collection (Manassas、VA) から得て、それぞれ 10 % のウシ胎仔血清 (FBS) 補足 RPMI 1640 培地および F12 / DMEM 培地により維持した。非悪性前立腺上皮細胞 (PrEC) を前立腺上皮成長培地 (PrEGM) (Lonza Inc、Walkersville、MD) にて維持した。すべての細胞を、5 % の CO₂ を含む加湿インキュベータで 37 °C で培養した。トログリタゾンおよびシグリタゾンならびにそれらの PPAR 不活性誘導体 STG 28 および OSU-CG12 を公表された手順に従って合成した。Yangら、J. Med. Chem. 51、p. 2100 - 2107 (2008) および Zhuら、Cancer Res. 65、p. 7023 - 7030 (2005)。無グルコースの RPMI 1640 培地を Invitrogen (Carlsbad、CA) から購入した。2-DG、レスベラトロール、3-メチルアデニン (3-MA)、ニコチンアミドおよびスプリトマイシンを Sigma-Aldrich (St. Louis、MO) から購入した。AMPK 阻害剤化合物 C およびシクロヘキシミドを Calbiochem (San Diego、CA) から得た。これらの薬剤を、最終 DMSO 濃度 0.1 % の培地に添加した。様々なタンパク質に対する抗体を以下の供給源から得た。マウスモノクローナル抗体：カテン、サイクリンD1、Wee1、p53 および GFP、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz、CA)；TrCP, Invitrogen；アクチン、MP Biomedicals (Irvine、CA)。ラビット抗体：Myc、PARP、NF B/p105、AR、ER、p-Ser9-GSK3、GSK3、p-Ser473-Akt、Akt、p-Thr202/Tyr204-ERK、ERK、p-Thr180/Tyr182-p38、p38、p-Ser176/180-I B キナーゼ (IKK)、IKK、p-Thr172-AMPK、AMPK、GRP78、Sirt1、ACK382-p53、IRE1、pSer2448-mTOR、mTOR、p-Thr389-p70S6K、p70S6K および TSC2、Cell Signaling Technology (Beverly、MA)；EGFR、Sp1 および GADD153、Santa Cruz。ヒト DDI T3 SMART pool siRNA は Dharmacon (Lafayette、CO) から得た。フラグタグ化 Sirt1 (ワイルドタイプ [WT] および H363Y 優性ネガティブ)、HA タグ化 Sirt1、Myc タグ化 AMPK (WT および K45R キナーゼデッド) および TSC2 shRNA 血漿を Addgene (Cambridge、MA) から購入した。WT および F- TrCP-Myc 血漿を記述のように調製した (Weiら、Mol Pharmacol. 76、p. 47 - 57 (2009))。GFP-LC3 血漿は親切にも同僚から提供された (Kabeyayaら、LC3、EMBO J. 19、p. 5720 - 5728 (2000))。

【0124】

RNA 单離および半定量 PCR 分析

全 RNA を、RNasey ミニキット (Qiagen、Valencia、CA) を用いて、薬物処置した LNCaP 細胞から单離し、次に Omniscript RT Kit (Qiagen) を用いて製造業者の指示書に従って cDNA に逆転写した。PCR 生成物を、1 % のアガロースゲルにて電気泳動で分離して、臭化工チジウム染色によって視覚化した。

【0125】

一時的トランスフェクション、免疫プロットおよび蛍光顕微鏡分析

Amixa Nucleofector システム (Amixa Biosystems、Cologne、ドイツ) の Nucleofector キット R を用いて電気泳動によってトランスフェクションを行った。LNCaP 細胞を以下の血漿または siRNA、すなわち、WT - および H363Y - フラグ-Sirt1 (DN-Sirt1)、WT - および K45R - Myc - AMPK (DN-AMPK)、GFP-LC3、TSC2 shRNA、ならびに DDI T3 siRNA (GADD153) によりトランスフェクトした。様々な標的タンパク質に対する免疫プロットを、既述のように、M-PER 溶解緩衝液

剤 (Pierce、Rockfold、IL) により採取した細胞溶解物において行った (Weiら、Mol Pharmacol. 76、p. 47-57 (2009))。蛍光顕微鏡分析に対しては、GFP-LC3 発現血漿により、またはスクランブル化もしくは TSC2 shRNA によりトランスフェクトされた LNCaP 細胞を 36 時間、指示されたように処置した。細胞を室温で 20 分間、3.7% のホルムアルデヒドにより固定した後、検査前に 4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) 含有固定培地 (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を用いて核対比染色を行った。ニコン顕微鏡 (Eclipse TE300) を用いて画像を観察した。

【0126】

10

解糖速度の決定

[5-³H] グルコース (GE Healthcare、Piscataway、NJ) の ³H₂O への変換を公表手順 (Ashcroftら、Biochem J. 126、p. 525-532 (1972)) に従って測定することによって、解糖速度を決定した。簡単に述べると、LNCaP 細胞を 6 ウェルプレート (4 × 10⁵ 細胞数 / ウェル) で播種して、次いで 24 時間後に様々な間隔で 10 mM の 2-DG または 10 μM の OSU-CG12 により処置した。PBS で洗浄後、細胞をトリプシン処理し、1 mM の非放射性グルコースおよび 5 μCi / mL の [5-³H] グルコースを含有する 500 μL の Krebs 緩衝液 [25 mM の NaHCO₃、115 mM の NaCl、2 mM の KCl、2 mM の CaCl₂、1 mM の MgCl₂ および 0.25% の BSA (pH 7.4)] において 37 度 1 時間、再懸濁させた。各処置群からのアリコートを、1 mL の H₂O を含有するシンチレーションバイアルに直立に配置された開管内で 0.2 N の HCl に添加した。バイアルを密封して、グルコース消費によって生成された H₂O を室温で最小限 24 時間、管外の H₂O で均衡化させた。管内に保持された ³H の量、ならびに蒸発および凝縮によって周囲の H₂O へと拡散した量を、シンチレーションカウンタ LS 6500 (Beckman) を用いて個別に決定した。以下の等式：利用したグルコース (pmol) = 形成された [³H] 水 (d.p.m) / [5-³H] グルコース (d.p.m / pmol) を用いた [5-³H] グルコースから H₂O への変換速度の計算のために、[5-³H] グルコースのみおよび ³H₂O のみの標準を各実験に含めた。

20

【0127】

30

グルコース摂取アッセイ

6 ウェルプレート (4 × 10⁵ 細胞数 / ウェル) での LNCaP 細胞を、異なる濃度のレスベラトロールまたは OSU-CG12 に露出し、次に Krebs-Ringer リン酸塩緩衝液 (128 mM の NaCl、4.7 mM の KCl、2.5 mM の MgSO₄、5 mM の Na₂HPO₄ および 1% の BSA) により 37 度 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄した後、1 μCi / mL の [³H]-2-DG (Perkin Elmer、Waltham、MA) および 100 mM の非放射性 2-DG を含有する 1 mL の PBS の添加によってグルコース摂取を開始した。5 分後、PBS による広範囲な洗浄によってグルコース摂取を終了させ、細胞を 0.1% の SDS 緩衝液にて可溶化した。シンチレーションカウンタ LS 6500 (Beckman) を用いて放射能を測定するためにアリコートを取り出した。

40

【0128】

NADH アッセイおよび乳酸塩アッセイ

NADH および乳酸塩の細胞内レベルの決定を、それぞれ EnzyChrom NAD⁺ / NADH アッセイキットおよび EnzyChrom L-Lactate アッセイキットを用いて行った (BioAssay Systems、Hayward、CA)。簡単に述べると、LNCaP 細胞を、24 ウェルプレートにて 2 × 10⁵ 細胞数 / ウェルの密度で 24 時間培養し、次いで 10 mM の 2-DG または 10 μM の OSU-CG12 を様々な時間間隔で処置した。細胞をトリプシン処理して収集した後、NADH および乳酸塩の細胞内レベルを製造業者の指示書に従って決定した。

50

【0129】

細胞生存度アッセイ

細胞生存度を、3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-臭化ジフェニルテトラゾリウム(MTT)アッセイを用いて決定した。LNCaPおよびMCF-7細胞を96ウェルプレート(5000細胞数/ウェル)にて播種し、10%のFBSで補足されたそれぞれの培地で24時間インキュベートした。次に細胞を様々な濃度のOSU-CG12、STG28、CG、TG、レスペラトロール、および2-DGにより72時間処置した。次に薬物含有培地を1×MTT(RPMI1640で0.5mg/mL)に置き換える、次いで37℃で2時間インキュベーションした。培地を取り除いた後、減少したMTT染料を200μL/ウェルのDMSOにて可溶化し、吸光度を570nmで測定した。
10
補足グルコースの効果の評価のため、細胞をOSU-CG12により、0.5、2、10、または20mg/mLのグルコースの存在下で72時間処置し、その後MTTを添加した。
-TrCP過剰発現実験では、WT-またはF--TrCP-Myc血漿によりトランスフェクトされた細胞を様々な濃度のOSU-CG12に72時間露出させ、その後MTTを添加した。

【0130】

流量サイトメトリ解析

WT-またはF--TrCPによりトランスフェクトされたLNCaP細胞を6ウェルプレート(4×10^5 細胞数/ウェル)にて播種し、24時間培養し、次にDMSO、5mMの2-DGまたは5μMのOSU-CG12により48時間処置した。PBSによる広範囲な洗浄後、細胞を冷寒80%エタノール中に4℃で一晩固定し、次にヨウ化プロピジウム(100ユニット/mLのRNAase Aを含有するPBS中に50μg/mL)により染色した。細胞サイクル相分布を、FlowScort流量サイトメータを用いて決定して、ModFitLT V3.0プログラムによって分析した。
20

【0131】

統計分析

各実験を3部で行った。すべての実験を少なくとも2回異なる場合に行った。必要な場合は、データは平均値±95%信頼区間として提示される。

【0132】

結果

TZDは癌細胞での自食を誘発する能力を示す。本発明者は、TZDおよびグルコース除去が、-TrCP介在プロテアソーム分解を誘発する能力を共有し、これによりTZDをエネルギー制限模倣剤として用いることができるることを実証した。文献では、腫瘍エネルギー代謝を選択的に標的とすることにより、多くの低分子薬剤が癌細胞増殖を抑制すると報告されており、これらの薬剤の中でも、2-DGおよびレスペラトロールが特に注目に値する。しかし、これらの薬剤は一般に抗増殖効能が低く、これが治療への適応を制限する要因となる。例えば、LNCaP前立腺癌およびMCF-7乳癌細胞の生存度を阻害する場合の2-DGに対するIC₅₀値は、それぞれ5.5mMおよび4.2mMであり、レスペラトロールの場合はそれぞれ110μMおよび60μMであった(図3A)。これに対して、トログリタゾン(70μMおよび70μM)ならびにシグリタゾン(70μMおよび42μM)の抗増殖効能はレスペラトロールのそれに匹敵する一方で、それらのPPAR不活性の最適な誘導体、STG28(12μMおよび11μM)ならびにOSU-CG12(5.7μMおよび5.0μM)はそれぞれレスペラトロールおよび2-DGより1~3桁高い効能を示した。等しく重要なことに、2-DGおよびレスペラトロールと同様に、これらTZDは、正常な前立腺上皮細胞(PrEC)に対して低い細胞毒性を示した。この悪性細胞と非悪性細胞との間の異なる抗増殖効果は、高い濃度のOSU-CG12を48時間処置した後、-TrCP、Sp1、およびARの発現レベルが変化しなかつたことによって証明されるように、TZDにはPrECでの-TrCP介在プロテアソーム分解を誘発する能力が無いことに起因するかもしれない(図3B)。
40

【0133】

自食とは、健康な細胞と同様に癌細胞でのエネルギー制限への特徴的な細胞応答を表す (Singleetaryら、Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 17、p. 1596 - 1610 (2008))。2-DG (DiPaolaら、Prostate. 68 p. 1743 - 1752 (2008)) およびレスベラトロール (Kueckら、Gynecol Oncol. 107 p. 450 - 457 (2007)) は、抗増殖効果を引き起こすのに必要とされる各濃度に合わせてそれぞれ 5 ~ 25 mM および 50 ~ 100 μM の用量範囲で癌細胞に自食を誘発すると報告されている。従って、本発明者は、オートファーゴソーム形成のための不可欠の工程である、微小管関連のタンパク質 1 軽鎖 3 (LC3) - II の LC3 - I からの変換の媒介となる TZD の能力を調べた。LNCaP 細胞を GFP - LC3 発現ベクターにより一時的にトランスフェクトして、公知の自食阻害剤である 1 mM の 3 - メチルアデニン (3-MA) と共にまたはこれを用いず、5 μM の OSU - CG12 による処置を行った。抗 GFP 抗体によるウェスタンプロットにより、薬物処理した細胞では LC3 - II の時間依存蓄積が判明するが、これは 3-MA によってブロックされ得る (図 4、左側パネル)。さらに、蛍光顕微鏡検査により、OSU - CG12 が蛍光の断続蛍光パターンを誘発し、これは GFP - LC3 が蓄積して自食胞となっていることを示す (右側パネル)。この場合も、この GFP - LC3 蛍光の断続パターンは 3-MA 共同処置によって防止された。類似の結果はまた、MCF - 7 細胞の場合 (データ図示せず) と同様に他の TZD でも得られた。これらのデータは、TZD がエネルギー制限によって誘発されるものに匹敵する癌細胞における応答を引き出すという主張に対するさらなる支持を提供する。

【0134】

- TrCP 介在プロテアソーム分解は、エネルギー制限が引き出したシグナル伝達事象を表す。サイクリン D1 および Sp1 の - TrCP 依存タンパク質分解は、TZD による処置の後だけではなく、グルコース除去に応答して起こるという本発明者の先の知見に基づき、この - TrCP 介在プロテアソーム分解はエネルギー代謝を乱す TZD の能力の結果であると仮説を立てた。この仮説に取り組むために、本発明者は、 - TrCP 介在タンパク質分解をエネルギー制限が引き出したシグナル伝達事象として確立しようと努めた。このため、グルコース飢餓の効果を、LNCaP および MCF - 7 細胞での - TrCP 依存タンパク質分解に関係する一連のシグナル伝達タンパク質の発現レベルにおいて、2つの公知のエネルギー制限模倣剤、2-DG およびレスベラトロール、ならびに 4 つの異なる TZD (トログリタゾン、シグリタゾン、およびそれらの PPAR 不活性類似物、STG28 および OSU - CG12) を用いて評価した。これらのタンパク質としては、 - TrCP、 - TrCP 基質 Sp1、 - カテニン、サイクリン D1、Wee1、NF - B / p105、ならびに Sp1 標的遺伝子産物 AR、ER、および EGR を含めた。図 5 に示すように、 - TrCP 発現を上方調節し、 - TrCP 基質および Sp1 標的タンパク質の発現を抑制する TZD の能力は、グルコース飢餓および 2 つのエネルギー制限模倣剤によって共有された。これらの効果を誘発した相対的な効能が、これら薬剤による成長阻害に対して観察されたものに匹敵するものであったのは注目に値する。

【0135】

さらに、標的タンパク質の DSG モチーフ内のセリン残基のリン酸化が、 - TrCP による認知にとっての前提条件であるため、GSK3 (- カテニンおよび Sp1)、ERK (Sp1)、IKK (サイクリン D1)、Akt、および p38 を含む - TrCP 基質のリン酸化に潜在的に関与する一連のキナーゼの活性化状態に与える、グルコース飢餓、2-DG、およびレスベラトロールに比べての TZD の効果を比較した。 - TrCP 助長タンパク質分解を促進する TZD およびエネルギー制限の共有能力と一致して、LNCaP 細胞のこれら薬剤のいずれかまたは無グルコース培地への露出により、これらキナーゼのリン酸化レベルが同様に変化した (図 5)。具体的には、Akt のリン酸化の低下は、GSK3、ERK、p38、および IKK のリン酸化の低下を伴った。これらシグナル伝達バイオマーカーの発現 / リン酸化に与える類似の効果はまた、5 μM の O

10

20

30

40

50

S U - C G 1 2、5 m M の 2 - D G またはグルコース飢餓により処置された M C F - 7 細胞においても示された。合わせて、これら相関データは、- T r C P 介在タンパク質分解はエネルギー制限の下流シグナル伝達事象を表すことを示唆する。

【 0 1 3 6 】

T Z D は、S i r t 1 発現の誘発、A M P K 活性化、およびE R ストレス応答によるエネルギー制限を模倣する。T Z D が、エネルギー代謝を乱すことによって癌細胞内に- T r C P 介在プロテアソーム分解を誘発するという仮説をさらに評価するために、エネルギー制限に対する 3 つの十分に立証された特徴的な細胞応答、S i r t 1 遺伝子発現 (C o h e n ら、S c i e n c e 3 0 5、p . 3 9 0 - 3 9 2 (2 0 0 4)) 、A M P K 活性化 (J i a n g ら、C a n c e r R e s . 6 8、p . 5 4 9 2 - 5 4 9 9 (2 0 0 8)) 、およびE R ストレス (L i n ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 8 1、p . 9 8 8 - 9 9 2 (1 9 8 4)) を引き出す T Z D の能力を調べた。これらのエネルギー制限応答、すなわち、S i r t 1 発現の誘発およびその結果生じる p 5 3 の脱アセチル化、A M P K のリン酸化、およびグルコース調節タンパク質 (G R P) 7 8 の発現、ならびにE R ストレス応答タンパク質のそれぞれの代表であるバイオマーカーの時間経過による変化を、ウェスタンプロットおよび / またはR T - P C R により、1 0 μ M の O S U - C G 1 2 により処置した L N C a P 細胞において、1 0 m M の 2 - D G およびグルコース飢餓と比較して、評価した。

【 0 1 3 7 】

図 6 A に示すように、O S U - C G 1 2 は、これら細胞応答の媒介となる点で 2 - D G およびグルコース飢餓に対して高い類似性を示した。例えば、O S U - C G 1 2 、2 - D G 、またはグルコース飢餓に L N C a P 細胞を 1 0 分間露出させることで、S i r t 1 発現およびA M P K リン酸化が即座に着実に増加し、続いて約 1 時間の後処置で G R P 7 8 の発現レベルが上昇した。これに対して、- T r C P の発現レベルの増大およびその結果の S p 1 およびサイクリン D 1 の分解は、これらシグネチャーカー細胞応答より 1 0 時間より長く遅れ、- T r C P 上方調節がこれらエネルギー制限誘発経路の少なくとも 1 つの下流事象を表すことが示唆される。これら知見に関して 2 つの重要な特徴が注目に値する。第 1 に、S i r t 1 遺伝子発現の転写活性は、O S U - C G 1 2 に対する 1 時間から 2 - D G およびグルコース除去に対する 4 時間までの範囲の短期間の一時的なものであり、これは S i r t 1 デアセチラーゼ基質である p 5 3 のアセチル化レベルの変化に匹敵した。第 2 に、R T - P C R 分析により、T Z D 処置および 2 - D G 処置細胞の両方の S i r t 1 および G R P 7 8 の発現レベルの増加は m R N A レベルの変化を通して媒介され、一方薬物処置は - T r C P の m R N A の存在度には効果を与えなかったため、- T r C P の場合はタンパク質レベルでの調節に起因した (図 6 B) 。

【 0 1 3 8 】

T Z D によるエネルギー制限の標的化に対する追加の証拠として、E R ストレスおよびA M P K シグナル伝達に与える T Z D およびエネルギー制限の平行効果において明らかである。トログリタゾン、S T G 2 8 、シグリタゾン、およびO S U - C G 1 2 による L N C a P 細胞の処置により、E R ストレスが誘発され、これは、2 つの E R ストレス応答タンパク質、G R P 7 8 、成長停止および損傷誘発遺伝子 (G A D D) 1 5 3 、ならびに G R P 7 8 および G A D D 1 5 3 発現を上方調節することが示されている、1 を必要とする E R 関連トランスデューサイノシトール (I R E 1) の発現レベルの用量依存上方調節によって明らかであった (図 6 C) 。さらに、A M P K シグナル伝達を活性化する T Z D の能力は、共にタンパク質合成の調節を介して細胞成長および増殖の主要なエフェクターである、ラパマイシン (m T O R) および p 7 0 S 6 K の哺乳類標的の同時脱リン酸化によって立証された (H a y ら、G e n e s D e v . 1 8 、p . 1 9 2 6 - 1 9 4 5 (2 0 0 4) および M a r t i n ら、C u r r O p i n C e l l B i o l . 1 7 、p . 1 5 8 - 1 6 6 (2 0 0 5)) 。この E R ストレスおよびA M P K シグナル伝達活性化のマーカーの調整は、2 - D G 、レスベラトロールおよびグルコース飢餓により処置された細胞で観察されるものに匹敵した。

10

20

30

40

50

【0139】

O S U - C G 1 2 は、グルコース摂取をブロックすることによってエネルギー代謝を標的にする。上述の知見により、T Z D は、エネルギー制限への細胞応答に特有の細胞シグナル経路を誘発することが示される。これらの知見に従って、T Z D がグルコースの細胞摂取をブロックすることによってエネルギー制限を模倣することを示す、いくつかの証拠が得られた。第1に、[³H] - 2 - D G の L N C a P 細胞への輸送に与える、公知のグルコース摂取阻害剤 (Kueckら、Gynecol Oncol. 107, p. 450 - 457 (2007)) であるレスベラトロールに対しての O S U - C G 1 2 の効果を評価した。図示するように、5 および 10 μM での O S U - C G 1 2 ならびに 50 および 100 μM でのレスベラトロールは、用量依存で (すべての時点で P < 0.05) グルコース摂取を著しく阻害することができた (図 7 A)。構造的な見地からは、O S U - C G 1 2 およびレスベラトロールは、特に親水性官能基の空間配置に対して、ある程度の類似性を示し、これがグルコース摂取を阻害する場合の共通の作用モードの基底をなすと思われる。第2に、O S U - C G 1 2 (10 μM) は、2 - D G (10 mM) の場合と類似した様式で解糖速度の時間依存抑制、N A D H 產生、および L N C a P 細胞での乳酸塩形成の媒介となつた (図 7 B)。いずれかの薬剤で 24 時間処置すると、グルコース消費および細胞内 N A D H および乳酸塩レベルが 50 % ~ 70 % 減少した。第3に、高レベルの補足グルコースにより、細胞を O S U - C G 1 2 の抗増殖効果から防御することができた。L N C a P 細胞の O S U - C G 1 2 に対する感受性に与えるグルコースの効果を調べるために、異なる量のグルコースをグルコース欠乏培地に加えて、最終濃度を 0.5 mg / ml ~ 20 mg / ml の範囲とした。2 mg / ml に対して、未修飾の 10 % F B S 含有 R P M I 1640 培地でのグルコース含有量、10 および 20 mg / ml グルコースは、O S U - C G 1 2 誘発細胞死に対して著しい防御を示し (すべての時点で P < 0.05)、一方 0.5 mg / ml の場合は、L N C a P 細胞は薬物効果に対する感受性がより大きくなつた (図 7 C)。この防御効果はさらに、O S U - C G 1 2 誘発 P A R P 開裂、および S i r t 1、- T r C P 、 G R P 7 8 、および G A D D 1 5 3 の発現レベルの増加ならびに A M P K の活性化を含むエネルギー制限関連細胞応答を抑制する、10 および / または 20 mg / ml での補足グルコースの能力によって確認された (図 7 D)。

【0140】

- T r C P の優性ネガティブ阻害は、O S U - C G 1 2 および 2 - D G 誘発アポトーシスから細胞を防御した。上述の知見により、- T r C P 発現およびその結果生じる基質のタンパク質分解の上方調節は、エネルギー制限への主要な細胞応答を表すことが示唆される。- T r C P は一連の細胞サイクルおよびアポトーシス調節タンパク質の分解を助長するため、本発明者は、- T r C P はエネルギー制限模倣剤の抗増殖効果の媒介となるのに重要な役目を果たし得ると仮説を立てた。この仮定を立証するために、O S U - C G 1 2 および 2 - D G 誘発成長阻害に与える、F ボックスモチーフの欠如により優性ネガティブ突然変異体として作用する、F ボックス削除 - T r C P (F - - T r C P) に対してのワイルドタイプ (W T) - T r C P の異質発現の効果を調べた。p C M V 対照に対して、- T r C P 強制発現により、L N C a P 細胞生存度に対する O S U - C G 1 2 および 2 - D G の抑制活性が向上し、一方 F - - T r C P による - T r C P 機能の優性ネガティブ阻害により、両薬剤の成長阻害効果に対して細胞が防御された (図 8 A)。ウェスタンプロット分析により、これらの効果が、P A R P 開裂およびサブ G 1 個体数の増加ならびにサイクリン D 1 および S p 1 を含む - T r C P 基質のプロテアーソーム分解によって実証されるように、異質 W T - T r C P および F - - T r C P が O S U - C G 1 2 および 2 - D G 誘発アポトーシスをそれぞれ促進および抑制する能力に関連したことが示される (図 8 B)。

【0141】

- T r C P タンパク質発現の増加は S i r t 1 上方調節の結果である。- T r C P タンパク質発現の上方調節とエネルギー制限関連の細胞応答、すなわち S i r t 1 上方調節、A M P K 活性化、および E R ストレスの誘発との間の一時的な関係に照らして (図 6

)、本発明者は、 β -TrCP 発現の増加はこれら特徴的な応答の 1 つの結果であり得るという仮説を立てた。この仮説を試験するために、発明者は、 β -TrCP 発現を上方調節する OSU-CG12 の能力に与える、Sirt1、AMPK、および GADD153 の機能および / または発現を阻害する効果を調べた。

【0142】

得られたデータは、Sirt1 の優性ネガティブ形態 (H363Y Sirt1) の強制発現が、 β -TrCP 発現、およびアポトーシスのためのバイオマーカーである PARP 開裂の誘発に与える OSU-CG12 の効果を覆したことを示している (図 8C、右側パネル)。この機構的な関連はさらに、WT-Sirt1 の異質発現により、 β -TrCP レベルの上昇が、その標的タンパク質サイクリン D1 および Sp1 の発現の減少と共に、用量依存の様式でもたらされたという知見によって立証された (図 8C、左側パネル)。さらに、共に Sirt1 デアセチラーゼ活性の薬理学的阻害剤であるニコチンアミドおよびスプリトマイシンを用いて、OSU-CG12 処置 LNCaP 細胞での β -TrCP 発現の Sirt1 誘発上方調節が、デアセチラーゼ依存メカニズムを介して β -TrCP タンパク質の安定性を向上させるその能力に起因するという証拠が得られた。第 1 に、タンパク質の安定性を評価するためにシクロヘキシミドを用いて、ビヒクル前処理された細胞において、 β -TrCP は 12 時間より少ない半減期を示した (図 8D、左側パネル)。これに対して、5 μM での OSU-CG12 は、 β -TrCP タンパク質のレベルがシクロヘキシミドの存在下でも 24 時間まで変化しなかったため、 β -TrCP の安定性を増大させた。しかし、 β -TrCP に与える OSU-CG12 のこの安定化効果は、細胞をニコチンアミドまたはスプリトマイシンにより共同処置すると覆された。第 2 に、RT-PCR 分析により、 β -TrCP の mRNA レベルは、OSU-CG12 単独でのまたはいずれかの Sirt1 阻害剤の存在下での処置後、変化しないことが確認された (図 8D、右側パネル)。加えて、Sirt1 活性の薬理学的阻害により、LNCaP 細胞を、F- β -TrCP (データ示さず) による優性ネガティブ阻害の場合に類似する様式で、OSU-CG12 誘発細胞死から防御することができた。合わせて、これらの知見により、Sirt1 発現での一時的な TZD またはエネルギー制限誘発の上方調節と、その結果得られる、向上したタンパク質安定化を通しての β -TrCP 発現の上昇との間の偶然の関係が示唆される。

【0143】

これに対して、OSU-CG12 誘発 AMPK 活性化の優性ネガティブおよび薬理学的阻害は、 β -TrCP タンパク質発現の上方調節に影響を与えなかった (図 9)。同様に、GADD163 発現の siRNA 介在サイレンシングは、OSU-CG12 誘発 β -TrCP タンパク質発現に影響を与えたなかった (図 11B)。これらのデータにより、AMPK および ERストレスの活性化は、 β -TrCP 発現の TZD またはエネルギー制限誘発の上方調節の媒介とならないことが示される。

【0144】

自食細胞死は、エネルギー制限模倣剤の抗増殖効果において役割を果たす。

【0145】

上述の知見は、2-DG および OSU-CG12 誘発アポトーシスにおける Sirt1 - β -TrCP 経路の重要な役割を示している。引き続き本発明者は、エネルギー制限模倣剤の抗腫瘍効果における AMPK および ERストレスシグナル伝達の潜在的な役割を評価した。エネルギー制限は、ラバマイシン (mTOR) 経路の AMPK 結節硬化錯体 (TSC) 1/2 哺乳類標的を介する自食を誘発することが報告されている (Single et al. 2008)。従って、AMPK 機能をブロックすることで、LNCaP 細胞が、エネルギー制限模倣剤に応答して自食を経験するのを防ぐはずである。図 9 に示すように、下流標的 mTOR および p70S6K のリン酸化レベルが変わることによって証明される、OSU-CG12 誘発 AMPK 活性化の優性ネガティブ (左側パネル) または薬理学的阻害は、GFP タグ化 LC3-I の、オートファーゴソーム

10

20

30

40

50

形成の指標である L C 3 - I I への変換を防止した。さらに、OSU - CG 1 2 処置 LN C a P 細胞では - Tr C P または G ADD 1 5 3 の発現レベルへの効果は観測されなかつたため、この自食の阻害は、 - Tr C P および E R ストレスへの薬物誘発変化とは無関係であった。

【 0 1 4 6 】

この知見に従って、OSU - OG 1 2 介在自食に与える T S C 2 ノックダウンの効果を蛍光顕微鏡検査により評価した。T S C 2 s h R N A による L N C a P 細胞の安定したトランسفェクションにより、A M P K を活性化する OSU - CG 1 2 の能力に影響を及ぼすことなく、T S C 2 発現の完全な抑制がもたらされた(図 1 0 、左側パネル)。A M P K 活性化の阻害に類似して、T S C 2 発現のサイレンシングにより、OSU - CG 1 2 による G F P - L C 3 ポジティブ斑点の形成が防止され(図 1 0 、右側パネル)、OSU - CG 1 2 誘発自食における A M P K / T S C 1 / 2 経路の中心的な役割が確認された。自食は、治療に応えて癌細胞ホメオスタシスを管理することにおいてはアポトーシスに匹敵することが認められるが、それを促進または阻害することにより薬物誘発細胞死を調整する場合のその機能は、細胞状態によって変動する(Tsuchiharaら、Cancer Lett. 278、p. 130 - 138 (2009))。

【 0 1 4 7 】

エネルギー制限誘発細胞死における自食の役割を評価するために、OSU - CG 1 2 介在アポトーシスおよび細胞生存度の抑制に与える、優性ネガティブ A M P K の異質発現により自食を阻害する効果を調べた。P A R P 開裂によって示されるように、A M P K 自食経路の阻害によっては細胞を OSU - CG 1 2 誘発アポトーシスから防御することはできなかつた(図 9)が、M T T データは、自食をブロックすることによって、p C M V 対照に対して OSU - CG 1 2 誘発細胞死が実質的に減った(すべてのデータポイントにおいて p < 0 . 0 1)ことを示し(図 1 1 A)、これはまた 2 - D G およびレスベラトロール処置細胞(データ示さず)においても確認された。これに対して、G ADD 1 5 3 の s i R N A 介在サイレンシングによる E R ストレスシグナル伝達の阻害は、OSU - CG 1 2 処置 L N C a P 細胞における P A R P 開裂に影響を与える(図 1 1 B)、また L N C a P 細胞の OSU - CG 1 2 の抗増殖活性に対する感受性にも影響を与えるなかつた(データ示さず)。合わせて、これら知見により、S i r t 1 - - Tr C P 経路に加えて、A M P K 活性化誘発自食が、癌細胞におけるエネルギー制限模倣剤の抗増殖効果の媒介に重要な役割を果たすことが明らかである。

【 0 1 4 8 】

考察

癌細胞は、細胞エネルギー代謝を好気性解糖に移行させることにより腫瘍微環境において成長上の利点を得る、いわゆるワールブルク効果が長い間認められてきた。Gateen byら、Nat. Rev. Cancer. 4、p. 891 - 899 (2004) ; Kim ら、Cancer Res. 66、p. 8927 - 8930 (2006) ; および Samudio ら、Cancer Res. 69、p. 2163 - 2166 (2009)。この悪性関連の解糖移行が、ポシトロン断層法で [¹⁸ F] - フルオロデオキシグルコース摂取をトレースすることによって癌の分子画像化の基礎を構成する。より最近では、様々な自然のまたは化学誘発の腫瘍動物モデルでの発癌を抑制する場合の、食物カロリー制限(Hursting ら、Annu Rev Med. 54、p. 131 - 152 (2003))、レスベラトロール(Cucciolla ら、Cell Cycle. 6、p. 2495 - 2510 (2007))、および 2 - D G (Zhu ら、Cancer Res. 65、p. 7023 - 7030 (2005))のインビボでの有効性によって示されるよう、解糖阻害への悪性細胞対正常細胞の感受性の違いを利用することによって、癌治療のために好気性解糖を標的にする(Chen ら、J Bioenerg Biomembr. 39、p. 267 - 274 (2007))ことに関心が高まっている。慢性エネルギー制限は、一般的な個体数による化学的予防方策として実現するのは難しいので、2 - D G およびレスベラトロールが、それぞれグルコース代謝および摂取を阻害することによりエネルギ

10

20

30

40

50

一制限の有益な効果を模倣するこれらの能力のために、幅広い注目を集めている。しかし、レスベラトロールおよび2-DGは、グルコース代謝をブロックする場合のインビトロにおける効能が比較的弱く、IC₅₀値はそれぞれ少なくとも50μMおよび4mMであり、このためこれらの治療への適用は限られている。

【0149】

実験により、TZDは、レスベラトロールおよび2-DGの場合に類似する様式でエネルギー制限に特有の特徴的な細胞応答を引き出すこれらの能力を考慮すれば、新規のクラスのエネルギー制限模倣剤を表すことが実証されている。これらエネルギー制限関連応答としては、最後には自食およびアポトーシスとなる、Sir t 1遺伝子発現の一時的な誘発および細胞内燃料センサAMPKおよびERストレスの活性化を含んだ(図11B)。しかし、これらの応答は、培養培地に補足グルコースが存在することによって覆され得る。さらに、TZD、2-DG、レスベラトロール、およびグルコース除去すべてが、Akt、GSK3、MAPキナーゼ、およびIKKを含む、検査したシグナル伝達キナーゼのリン酸化状態を調整する能力を共有した。これはさらにエネルギー制限模倣剤としてのTZDの提案した活性をさらに支持する

レスベラトロールと同様、OSU-CG12は、解糖速度の低下ならびにNADHおよび乳酸塩の産生の減少によって明らかにされるように、グルコース摂取をブロックすることによりエネルギー制限の効果を模倣した。この薬物誘発代謝障害が、癌細胞において一時的なSir t 1遺伝子発現、AMPK活性化、およびERストレスを含む上述の飢餓関連細胞応答の誘発のシグナルとなった。機構的な見地からは、これら細胞応答のそれぞれが、個別の下流シグナル経路の媒介となり、これらの間の相互作用の結果、OSU-CG12の抗増殖効果となる。例えば、データにより、OSU-CG12誘発AMPK活性化は、TSC1/2-mTOR-p70S6K経路を介して自食へと至る一方、ERストレスの場合は、哺乳類細胞でのERストレス応答の重要なメディエータであるIRE1の上方調節を介してERシャペロンGRP78およびGADD153の転写活性化をシグナル伝達した。

【0150】

以前の研究は、AMPK活性化およびERストレスをカロリー制限中の選択的癌細胞殺滅のための標的として意味付けている(Saitoら、Cancer Res. 69、p. 4225-4234(2009))。しかし、細胞死応答を調節する場合のNAD⁺依存ヒストンデアセチラーゼであるSir t 1の役割は、腫瘍促進剤または腫瘍抑制剤としての従来の役割に照らして十分には定義されていない(Dengら、Int J Bio 1 Sci, 5、p. 147-152(2009))。Sir t 1は、p53、網膜芽細胞腫タンパク質、NF-B、いくつかのフォークヘッドファミリー転写因子(FOXO)、MyoD、DNA修復タンパク質Ku70、転写コアクチベータPCG-1およびp300を含む、脱アセチル化を介する幅広い範囲の非ヒストンシグナル伝達タンパク質の機能と共に、後成変化を調節する能力を示す。Sir t 1は、NF-B/RelAの脱アセチル活性化を通して細胞死または細胞サイクル阻止を向上させると示されている(Yeungら、EMBO J. 23、p. 2369-2380(2004))一方で、これはまたp53、FOXOおよびKu70などの腫瘍抑制およびDNA損傷修復に関与するいくつかの標的タンパク質を不活性化する。

【0151】

本発明者の研究により、Sir t 1の発現が、たとえ非常に短い期間であっても、-TrCP助長プロテアソーム分解の活性化を通して癌細胞でのエネルギー制限模倣剤によるアポトーシスの誘発の効果の媒介に重要な役割を果たすという第1の証拠が提供される。この機構的な関連は、OSU-CG12または2-DG誘発アポトーシス死をブロックする-TrCPまたはSir t 1の優性ネガティブおよび/または薬理学的阻害の能力によって実証された。-TrCP発現のSir t 1介在上方調節は、タンパク質安定化を通して実現され、タンパク質安定化のためには、Sir t 1のデアセチラーゼ活性が重要であったことは注目に値する。-TrCPタンパク質のこの安定化は、プロテアソ-

ム介在タンパク質分解のために - TrCP を標的にする特定の E3 リガーゼの発現 / 活性を抑制する Sirt1 の能力に起因すると考えられる。この潜在的なメカニズムは現在調査中である。加えて、AMPK は、細胞内 NAD⁺ レベルを上げることによって Sirt1 活性を向上させると報告されているが、本データは、AMPK の遺伝的阻害および薬理学的阻害のいずれも、TZD 処置癌細胞での - TrCP 発現に効果を与えたかったことを示し、AMPK 活性化は - TrCP タンパク質安定性を上方調節するのに主要な役割を果たさなかったことを示唆した。

【 0152 】

実質的な証拠は癌における自食の重要性を示しているが、細胞の薬物誘発細胞死を高めるかまたはこれを防御することによりその治療上の応答を調整する役割は不明瞭のままである。その機能は、異なる死シグナル経路に応答して、および / または異なる腫瘍形成段階で変動すると考えられる。エネルギー制限模倣剤の場合には、提供されたデータは、自食とアポトーシスとの間の相互作用はこれらの抗増殖活動の媒介となるのに重要な役割を果たすと示唆している。10

【 0153 】

終わりに、本明細書に提供された知見は 3 つの点で注目に値する。第 1 に、エネルギー制限を標的にする場合のトログリタゾンおよびシグリタゾンの新規の機能により、幅広い範囲のシグナル伝達標的に与えるこれらの PPAR 非依存効果を説明する機構的な基礎が提供される。第 2 に、本発明者は、 - TrCP 助長プロテアソーム分解の Sirt1 介在上方調節は、エネルギー制限が引き出したシグナル伝達事象であり、エネルギー制限模倣剤の抗腫瘍効果にとって重要であることを初めて示した。第 3 に、証拠により、TZD は、グルコース飢餓関連細胞応答を引き出すことによって、抗腫瘍効果の媒介となることが示されている。この知見により、これら TZD を潜在的なエネルギー制限模倣剤を開発するための足場として用いる分子基礎が提供される。OSU-CG12 は、レスベラトロールおよび 2-DG に対して飢餓状細胞応答を引き出すのにそれぞれ 1 枝および 3 枝高い効能を示す。化学療法薬剤としての OSU-CG12 の翻訳値はその経口生体利用効率、および急性毒性を招くことなく腫瘍異種移植成長を抑制する場合の有効性によって強調される。20

【 0154 】

実施例 2 : NCI 60 細胞株スクリーニング分析による癌細胞成長を抑制するチアゾリジンジオン誘導体 OSU-CG5 および OSU-CG12 の能力30

米国国立癌研究所は、様々な異なる癌に対する OSU-CG5 および OSU-CG12 の抗癌活性を、様々な異なる細胞株を用いて評価するため実験を行った。NCI 60 スクリーニング方法の検討に関しては、Shoemaker, R. H. Nature Reviews, 6 : p. 813 - 823 (2006) を参照。より詳しくは、OSU-CG5 および OSU-CG12 を試験して、これらの前立腺癌、乳癌、白血病、非小細胞肺癌、結腸癌、CNS 癌、黒色腫、卵巣癌、および腎臓癌細胞株の成長を阻害する能力を調べた。様々な異なる細胞株を使用して、各タイプの癌の阻害を評価した。例えば、CCFR-CEM、HL-60、K-562、MOLT-4、RPMI-8226、および SR 細胞株を用いて、白血病に与える OSU-A9M の効果を評価した。これらの実験からのデータにより、OSU-CG5 および OSU-CG12 は共に、様々な異なるタイプの癌細胞において著しい抗腫瘍効能を示したことが実証された。40

【 0155 】

NCI 60 スクリーニング方法は以下の技法を用いて実行された。癌スクリーニングパネルのヒト腫瘍細胞株を、5 % のウシ胎仔血清および 2 mM の L-グルタミンを含有する RPMI 1640 培地にて成長させた。次に細胞を、個別の細胞株の倍加時間に依存して、5,000 ~ 40,000 細胞数 / ウェルの範囲のプレート密度で 100 μL 中に 96 ウェルマイクロタイヤープレートへと播種した。細胞播種後、マイクロタイヤープレートを 37 °C 、5 % の CO₂ 、95 % の空気および 100 % の相対湿度で 24 時間インキュベートし、その後チアゾリジンジオン誘導体を添加する。50

【0156】

24時間後、各細胞株の2つのプレートをTCAによりインサイチュで固定して、薬物添加(Tz)時での各細胞株に対する細胞個体数の測定を表すこととした。次にチアゾリジンジオン誘導体を、所望最終最大試験濃度の400倍の濃度でジメチルスルホキシド中で可溶化させ、使用に先立ち冷凍保存した。薬物添加時には、冷凍濃縮物のアリコートを解凍して、50μg/mlのゲンタマイシンを含有する完全培地により所望最終最大試験濃度の2倍に希釈した。さらに4個の10倍または1/210gの連続希釈液を作製し、合計5種の薬物濃度プラス対照を提供した。これら異なる薬物希釈液の100μlのアリコートを、100μlの培地を既に含有する適切なマイクロタイーウェルに添加し、必要な最終薬物濃度とする。

10

【0157】

薬物添加に続いて、プレートを37、5%のCO₂、95%の空気および100%の相対湿度でさらに48時間インキュベートした。接着細胞に対しては、冷TCAを添加することによってアッセイを終了させた。細胞を、50μlの冷50%(w/v)TCA(最終濃度10%TCA)を静かに添加することによってインサイチュで固定して、4で60分間インキュベートした。上清を除去し、プレートを水道水で5回洗浄し、空気乾燥させた。1%の酢酸中に0.4%(w/v)のスルホローダミンB(SRB)溶液(100μl)を各ウェルに添加して、プレートを室温で10分間インキュベートする。染色後、1%の酢酸で5回洗浄することによって非結合の染料を取り除き、プレートを空気乾燥させる。続いて結合した染料を10mMのトリズマ塩基で可溶化し、自動プレート読取り装置上で波長515nmで吸光度を読み取った。懸濁細胞に対しては、50μlの80%TCA(最終濃度16%TCA)を静かに添加することによってウェルの底の沈殿した細胞を固定することでアッセイを終える以外は技法は同じである。7つの吸光度測定[時間ゼロ(Tz)、対照成長(C)および5つの濃度レベル(Ti)での薬物の存在下における試験成長]を用いて、成長百分率を各薬物濃度レベルで計算する。成長阻害百分率は次のように計算される。

20

【0158】

濃度Ti-Tzの場合 [(Ti - Tz) / (C - Tz)] × 100

濃度Ti < Tzの場合 [(Ti - Tz) / Tz] × 100。

【0159】

30

各実験薬剤に対して3つの用量応答パラメータを計算した。[(Ti - Tz) / (C - Tz)] × 100 = 50から、50%の成長阻害(GI50)が計算され、これは、薬物インキュベーション期間での対照細胞における純タンパク質増加(SRB染色で測定)において50%の減少をもたらす薬物濃度である。全成長阻害(TGI)をもたらす薬物濃度は、Ti = Tzから計算した。処置後の細胞の純損失を示すLC50(薬物処置の終了時の測定タンパク質が開始時のそれに比べて50%の減少をもたらす薬物濃度)は、[(Ti - Tz) / Tz] × 100 = -50から計算される。活性のレベルに達した場合はこれら3つのパラメータのそれぞれに対して値を計算した。しかし、効果が達していない場合または超えている場合は、そのパラメータに対する値は、試験された最大または最小濃度より大きいまたは小さいとして表される。

40

【0160】

実施例3：新規のアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ活性剤の開発

AMPKのPPAR非依存活性化の媒介となるチアゾリジンジオンファミリーのPPARアゴニストに固有の能力に照らして、本発明者は、これらの薬剤は、これら2つの薬理学的活性を切り離すことによって強力なAMPK活性剤を開発するために薬理学的に利用され得ると仮説を立てた。インハウスのチアゾリジンジオン系の集中化合物ライブラリの2段スクリーニングを行って、低μM濃度で、AMPKを活性化しましたヒトTHP-1マクロファージ中のPPARとは独立してIL-6産生を阻害する能力を示す新規の薬剤を同定した。

【0161】

50

チアゾリジンジオン類の PPAR 活性をなくすために、本発明者は、トログリタゾンならびにシグリタゾン 61 (2TG) および 62 (2CG) の不飽和誘導体を、60 個の化合物 (1 ~ 60 ; 図 13) よりなる集中化合物ライブラリを開発するための足場として用いた。AMPK および mTOR の活性状態 [すなわち、AMPK および p70 リボソームタンパク質 S6 キナーゼ (p70S6K) それぞれのリン酸化レベル] 、ならびにリボ多糖 (LPS) 刺激 THP - 1 マクロファージでの IL - 6 / IL - 6 受容体シグナル伝達 [すなわち、それぞれ IL - 6 産生ならびに転写 3 (Stat3) リン酸化のシグナルトランスデューサおよび活性剤] に関する細胞系のアッセイを用いて、ウェスタンプロットおよび酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) を介してこの化合物ライブラリをスクリーニングした (図 14A)。10 μ M での個々の化合物の第 1 段のスクリーニングは 8 つの活性薬剤 (8、12、21、31、42、49、53、および 54) をカバーし、これらは 3 つの構造シリーズに類別された (図 12A)。IL - 6 の LPS 刺激産生をブロックする 1 μ M でのこれら薬剤の能力をさらに調べることで、化合物 53 を最適薬剤と同定した。シリーズ A ~ C 化合物の合成のための一般的な手順を図 12B に示す。

【 0162 】

方法

細胞および細胞培養。THP - 1 单核細胞を American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入し、10 % のウシ胎仔血清 (FBS) 、0.25 % のグルコース、0.01 % のピルビン酸ナトリウム、50 μ M の 2 - メルカプトエタノール、および 0.1 ml / ml のペニシリン / ストレプトマイシン / L - グルタミンで補足された L - グルタミン含有 RPMI 1640 により維持した。THP - 1 单核細胞のマクロファージへの分化を、上述の RPMI 1640 培地で 24 時間 PMA (50 nM) に露出させることによって実行した。結腸 26 (C - 26) 腺癌細胞を Ohio State University の研究者から提供を受けた。C - 26 細胞を、5 % の FBS および 1 % のペニシリン / ストレプトマイシンで補足された RPMI 1640 培地で維持した。すべての細胞タイプを 5 % の CO₂ を含む加湿インキュベータで 37 °C で培養した。

【 0163 】

ELISA。10 ng / ml の LPS に応答した分化 THP - 1 マクロファージによる IL - 6 の放出を、IL - 6 ELISA キット (Cayman Chemical Co. ; Ann Arbor, MI) を用いて、製造業者の指示書に従って 3 部で分析した。LPS 刺激 IL - 6 放出に与える各テスト化合物の効果を阻害百分率で表し、以下の式を用いて計算した。阻害百分率 = 100 % × { 1 - [(サンプルの O.D. - 対照の O.D.) / (LPS の O.D. - 対照の O.D.)] } % 。

【 0164 】

ウェスタンプロット。THP - 1 細胞を、冷 PBS 緩衝液で洗浄後 SDS サンプル緩衝液に溶解させ、次に 95 °C で 20 分間加熱した。新たに添加した 1 % のホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Calbiochem) を含有する M - PER 哺乳類タンパク質抽出試薬 (Pierce, Rockford, IL) を用いてタンパク質抽出物を調製した。溶解物を 13000 g で 10 分間遠心分離した後、上清を収集し、各サンプルのタンパク質濃度をタンパク質アッセイ (Bio - Rad) によって決定した。次にタンパク質抽出物を 2 × SDS サンプル緩衝液に懸濁させ、10 % の SDS - ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動により分離し、半乾燥転移細胞を用いてニトロセルロース膜に転移させた。トランスプロットされた膜を、0.1 % の Tween - 20 (TBST) を含有するトリス緩衝化生理食塩水で 2 度洗浄した。5 % の脱脂牛乳を含有する TBST で 1 時間ブロックした後、膜を一次抗体 : p172Thr - AMPK, AMPK, p70S6Tyr - STAT3 および STAT3 (Cell Signaling Technology ; Beverly, MA) ; p389Thr - p70S6K および p70S6K (Santa Cruz Biotechnology ; Santa Cruz, CA) により、それぞれ 1 : 1,000 の希釈で 1 % の TBST - 脱脂牛乳にて 4 °C で一晩中イン

キュベートした。一次抗体によるインキュベーション後、膜をTBS Tにより3回、合計30分間洗浄し、次にセイヨウワサビペルオキシダーゼ共役ヤギ抗マウスIgG（希釈1:2500）により室温で1時間インキュベーションした。TBS Tによる合計30分間の3回の十分な洗浄後、免疫プロットを強化化学発光により可視化した。

【0165】

一時的トランスフェクション。K45Rキナーゼデッド型優性ネガティブAMPKプラスミド（Addgene、Cambridge、MA）または空ベクターによるTHP-1細胞のトランスフェクションを、Amaxa Nucleofector System（Amaxa Biosystem、Cologne、ドイツ）のHuman Monocyte Nucleofector Kitを用いて電気穿孔により、Schnoorら、J Immunol Methods、344、109-115（2009）に従って行った。
10

【0166】

PPAR活性化の分析。チミジンキナーゼ促進剤-ルシフェラーゼ構造物に先行するPPAR応答要素の3つの複製を含むPPRE-x3-TK-Lucレポーターベクターを用いてPPAR活性化の検出を行った。分化THP-1マクロファージを、24ウェルプレートに 1×10^5 細胞数/ウェルの密度で配置し、次にPPRE-x3-TK-Lucレポータープラスミドによるスクレオフェクションにより一時的にトランスフェクトし、次にLPSの存在下で48時間、 $10 \mu M$ のシグリタゾンまたはこの誘導体に3部で露出させた。細胞をパッシブ溶解緩衝液（Promega）により溶解させ、溶解物のアリコート（ $50 \mu L$ ）を、96ウェルプレートに移し、 $100 \mu L$ のルシフェラーゼ基質（Promega）と混合した。ルシフェラーゼ活性を、WinGlowソフトウェアパッケージと共に、MicroLumat Plus LB96V照度計（Berthold Technologies、Oak Ridge、TN）を用いて決定した。
20

【0167】

全RNA単離およびIL-6発現のRT-PCR分析。全RNAを薬物またはビヒクリ処置THP-1マクロファージからTRIzol（Invitrogen；Carlsbad、CA）により抽出し、次にOmniScript RT Kit（Qiagen、Valencia、CA）を用いてcDNAへ逆転写した。適切なIL-6：正方向および逆方向；ならびにアクチン：正方向および逆方向プライマ-を用いた。PCR生成物を1%のアガロースゲル上で電気泳動により分離し、臭化エチジウム染色により可視化した。
30

【0168】

分子モデル実験。化合物53、A-769662、およびPTIの分子構造に、先ずSpartan'08（Wavefunction, Inc.、Irvine、CA）で入手可能なMerck Molecular Force Fieldプログラムを用いて1000ステップのMonte Carloシミュレーションを行った。次にシミュレーションによって達した最小コンフォメーションを、Gaussian03（Gaussian, Inc.、Wallingford、CT）によりB3LYP/6-31G*の密度関数理論レベルで十分に最適化した。十分に最適化した構造のすべてを通常のモード分析により確認した。負の周波数は見つからなかった。Gaussian03を用いることによるHartree-Fock/6-31G*機能理論の下での電位ポピュレーション分析によって各最適構造に対して静電位および密度の計算を行った。各化合物に対する静電位マップを、Molecular Operation Environment 2008（Chemical Computing Group、Montreal、カナダ）によって作成し、静電位を電子密度上にマッピングして示す。
40

【0169】

結果

チアゾリジンジオン類が潜在的なAMPK活性剤を開発するように構造的に最適化され得るという概念の実証。
50

【0170】

本発明者は、初代マクロファージの多くの固有の特徴を模倣する細胞株モデルであるホルボール12-ミリスチン酸12-アセテート(PMA)分化THP-1細胞を用いて、AMPK活性化およびLPS誘発mTOR活性化に与えるチアゾリジンジオン誘導体の効果、および培地へのIL-6分泌を調べた。加えて、p70S6KおよびStat3のリン酸化を、薬物処置細胞においてそれぞれmTORおよびIL-6受容体シグナル経路の活性化状態に対するマーカーとしてモニタリングした(図14A)。AMPKを活性化するには高用量のシグリタゾン(100μM)が必要であったという最近の報告(Wangら、Cancer Res. 68、4640-4648(2008))と一致して、データは、10μMでのシグリタゾンは、6時間の処置後のLPS処理対照に比べてp-AMPKまたはp-p70S6Kのレベルに明らかな効果を与えなかったことを示している(図14B)。これに対して、同じ濃度のそのPPAR不活性の相当物62は、p-AMPKのレベルの上昇、これに伴うp70S6Kリン酸化の平行する減少に効果的であった。それにもかかわらず、シグリタゾンは、LPS刺激IL-6産生の阻害で62より数倍高い効能を示し(図14C)、シグリタゾンの抗IL-6活性が主にPPAR依存メカニズムに起因することが示唆される。このIL-6産生の減少は、いずれの薬剤も調べた用量範囲内でTHP-1細胞の生存度を阻害しなかったため、薬物誘発細胞死によるものではなかった。さらに、LPS活性IL-6受容体シグナル伝達を抑制する10μMでのシグリタゾンおよび62の能力は、対照に対してStat3リン酸化が減少したことにより明らかであった(図13B)。

10

20

【0171】

IL-6産生の抑制に高い効能を持つ有効なAMPK活性剤を同定するための、インハウスのベンジリデン-チアゾリジンジオン系の集中化合物ライプラリのスクリーニング。

【0172】

上記の知見に基づいて、61および62を、多様な構造を有する60個の誘導体よりなる集中化合物ライプラリを生成するための足場として用いた。ここで62はスクリーニングプロセスの間、対照(化合物33)として隠れて埋め込まれた(図13)。これらの化合物およびシグリタゾン、それぞれ10μMを、AMPKを活性化する能力およびLPS刺激THP-1細胞でのIL-6産生を阻害する能力に対して評価した(図15)。先に述べた知見と一致して、10μMの62は、p70S6KおよびStat3のリン酸化の阻害に関連して、AMPK活性化においておよびIL-6分泌に対して控えめな活性を示し、一方シグリタゾンは、AMPKリン酸化状態に影響を及ぼすことなくIL-6産生の阻害に有効であった。調べた他の化合物のうちで、8個の誘導体(8、12、21、31、44、49、53、54)は、これらのマーカーすべての全体的な評価において62に対して実質的に高い効能を示した(図15; IL-6産生の阻害が80%より高いもののみを選択した)。この場合も、これら薬剤のいずれもTHP-1細胞の生存度の顕著な抑制を引き出さず(図15B、下側パネル)、IL-6産生の阻害は細胞死によるものではなかったことを示す。ライプラリの中の薬剤のいくつかはAMPK活性化に活性を示したが、IL-6産生の抑制(例えば、化合物4および5)に与える効果はなく、またはその逆(例えば、化合物9、19、51、52、55および59)も同じであり、それらの作用モードには別のメカニズムが関与していることが示唆される。

30

40

【0173】

IL-6産生の薬物誘発阻害がPPARと無関係であることを実証するために、PPARを転写活性化する、シグリタゾンに対してのこれら8つの薬剤の能力を、PPAR応答要素(PPRE)ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いることによって調べた。レポーター構造体(PPRE-x3-TK-Luc)により一時的にトランスクレプトされたTHP-1細胞では、シグリタゾンは10μMで、ルシフェラーゼ活性を著しく増大させた($P < 0.001$)(図16A)。これに対して、調べた8つの薬剤のいずれもPPAR活性化において明らかな活性を示さなかった。

【0174】

50

化合物53は、AMPK活性化およびIL-6抑制において先導薬剤を表す。

【0175】

IL-6放出をブロックする場合の、シグリタゾンに比べてこれら候補薬剤活性をさらに $1\mu M$ で評価した。図示するように、化合物53は、シグリタゾンの場合を超えて、最も高い効能を示し、これに54および49が続いた(図16B、上側パネル)。これら3つはすべて、置換基の違いはあるが多くは共通の構造上のモチーフを有する。この場合も、これら薬剤のいずれもTHP-1細胞生存度に顕著な効果を与えていないため、IL-6産生のこの阻害は細胞死によるものではなかった(下側パネル)。

【0176】

化合物53は、約 $1\mu M$ のIC₅₀で、用量依存の様式でLPS刺激IL-6産生を阻害し(図17A)、細胞内IL-6mRNA発現(図17B)ならびにAMPKおよびp70S6Kのリン酸化レベルに与えるその効果に匹敵する(図17C)。さらに、AMPKを活性化する場合の化合物53の効能は、AICARの場合より約2桁高い(図17C)。

10

【0177】

AMPK活性化と抗IL-6活性との間の機構的な関連を確立するために、K45Rキナーゼデッド突然変異体(図18A)の異質発現を介するAMPKの優性ネガティブ(DN)阻害の効果を調べた。pCMV対照に対して、DN-AMPK突然変異体による分化THP-1細胞の一時的なトランスフェクションにより、LPS誘発IL-6産生を著しく向上させ、化合物53($10\mu M$)の阻害効果を覆した(図18B)。この知見は、AMPK活性化は、LPS刺激IL-6産生を抑制する化合物53の能力にとって不可欠であることを示唆する。

20

【0178】

AMPKおよびp70S6Kのリン酸化に与える化合物53の効果を、癌力ヘキシー研究に一般に使用される細胞モデルであるC-26結腸腺癌細胞においてさらに評価した。THP-1細胞で観察されたものと同様、化合物53は、用量および時間依存の様式で、p-AMPKレベルの確固とした上昇、およびこれに平行するp-p70S6Kの減少の媒介となった(図18C)。このAMPK活性化が薬物処置のほとんど直後に生じたのは注目に値する。合わせてこれらの知見により、この薬物効果が細胞株特異的な事象ではないことが確認された。

30

【0179】

化合物53および54ではまた、様々な異なる癌細胞株の成長を阻害するそれらの能力について試験をおこなった。用いられた癌細胞株はPC-3、LNCaP、MCF-7、およびMDA-MB-231であった。24時間、48時間、および72時間での阻害の量を図19に示す。

【0180】

考察

最近の証拠により、AMPKは、成長因子シグナル伝達を、mTORの負の調節を通して細胞代謝と統合させることによって、代謝チェックポイントとして働くことが示唆される。Carling, D, Trends Biochem Sci, 29, 18-24 (2004)。この機能的な役割により、癌に対するインスリン抵抗からエネルギー代謝の調節にいたる異なる疾患でのAMPK活性化を標的とする治療法が強調される。例えば、最近の研究では、AICARが、コレステロールおよび脂肪酸合成を阻害することによって、EGFR活性神経膠芽腫細胞の成長を抑制するのに効果的であったことが示されている。Guoら、Proc Natl Acad Sci USA, 106, 12932-12937 (2009)。

40

【0181】

従って、本実施例は、新規のAMPK活性剤を開発するためにチアゾリジンジオン類の薬理学的活用を目的とした。AMPKは細胞エネルギー状態の高度に保護されたセンサであるが、その機能的な役割は細胞状況および細胞タイプ特異的な様式で変動する。ここで

50

は、分化T H P - 1マクロファージを細胞プラットホームとして用いて、I L - 6などの炎症性サイトカインの産生を抑制することによってマクロファージの抗炎症表現型を促進する場合の、m T O R の負の調節剤としてのA M P K の中心的な役割に照らして、薬物スクリーニングを行った。インハウスのチアゾリジンジオン系の集中化合物ライブラリをスクリーニングすることによって、この細胞系アッセイにより、化合物53は、A M P K を活性化しT H P - 1細胞でのL P S 誘発I L - 6 分泌を阻害する場合に低μM効能を持つ先導薬剤として同定された。さらに、このL P S 刺激I L - 6 產生の薬物誘発抑制がA M P K 活性化に起因することが示されたが、これはシグリタゾンのP P A R 依存機構とは対照をなす。それにもかかわらず、調べた多数の薬剤は、A M P K 活性化では不活性であったが、I L - 6 產生に著しい効果を示した（化合物9、19、51、52、55および59）。機構的な見地からは、これら2つの薬理学的活性の分離は、これら薬理学的薬剤の間での作用モードの多様性を示唆する。この仮定は、明白なメカニズムを通してI L - 6 產生を調整する多数の小分子薬剤の能力によって明らかにされる。例えば、フラボノイドの1つであるルテオリンは、J un N末端キナーゼ（J N K ）活性剤タンパク質（A P ）- 1 経路を阻害することによって、L P S 誘発I L - 6 產生を減少させ（J angら、P roc Natl Acad Sci U S A 、105、7534 - 7539 (2008)）、一方I L - 6 発現のクロロキン介在の阻害は、m R N A 安定性およびm R N A レベルの低下に関連した。J angら、R heumatology (Oxford) 、45、703 - 710 (2006)。加えて、ビスフォスフォネートゾレドロン酸もまた、基礎となる機構は不明であるが、前立腺癌細胞でのI L - 6 遺伝子発現を下方調節すると報告された。A s b a g hら、I nt Braz J Urol 、34、355 - 363 (2008)。これに対して、J N K およびT o l l 様受容体4シグナル経路の活性化を通してのパクリタキセルおよびまだ確認されていない機構を通しての多キナーゼ阻害剤スニチニブを含む、多くの治療薬剤がI L - 6 発現の上方調節と関連している。このため、このA M P K 非依存誘発の機構を理解することが、I L - 6 產生の調節に光明を投ずることになろう。

【0182】

最近、A M P K の2つの直接の小分子活性剤、A - 7 6 9 6 6 2 およびP T 1 、が発見され、それぞれが独自の活性化モードを示す。C o o l ら、C ell Metab 、3、403 - 416 (2006)。証拠により、A - 7 6 9 6 6 2 のA M P K サブユニットへのアロステリック結合が、T hr - 172での脱リン酸化を阻害するA M P K のコンフオーメーションを安定させ、一方P T 1 は、自己阻害ドメインの近くの サブユニットに結合することによりA M P K 自己阻害を無効にすることが示唆される。P angら、J Biol Chem 、283、16051 - 16060 (2008)。タンパク質 - リガンド認知のモードは不明のままであるが、P T 1 のA M P K 1 の分子ドッキングにより、結合は主に静電相互作用に起因することが示唆される。化合物53は、A - 7 6 9 6 6 2 およびP T 1 と同様、多くの電子が豊富な部分を含むので、これらの化合物の静電位を比較するため分子モデリング分析を実行した（図18D）。図示するように、化合物53の静電位マップは、P T 1 のそれにある程度類似し、A - 7 6 9 6 6 2 にはもっと低い程度で類似した。この知見により、化合物53は、P T 1 またはA - 7 6 9 6 6 2 の場合に類似したアロステリックな結合メカニズムを通してA M P K 活性化の媒介となるであろうことが示唆され、これが本調査の現在の焦点を構成する。

【0183】

A M P K は代謝症候群および癌の処置のための治療上の関連標的を表すため（L u o ら、T rends Pharmacol Sci 、26、69 - 76 (2005)；Z hangら、C ell Metab 、9、407 - 416 (2009)）、この燃料感知酵素に対する新規の薬理学的活性剤の開発への興味が増大している。しかし、特に肝臓および骨格筋における、A M P K の持続性薬理学的活性化の潜在的な副作用に関して問題が残っている。この課題にもかかわらず、アイソザイム特異的な活性剤および/または組織選択的送達を設計することへの準備として、異なる組織でのA M P K アイソザイムの機能的役

割を理解することは、緊急の課題である。

【0184】

結論

AMPK活性化およびIL-6産生の阻害における化合物53の高い効能に照らして、化合物53は、細胞および動物モデルでの異なる疾患の治療的介入におけるこれら2つのシグナル伝達エフェクターを調整する効果を調査するための有用な薬剤として働く。加えて、AMPK活性化でのその機構の特徴付けにより、AMPKの機能調節に光明が投じられ、これはさらなるAMPK活性剤の同定に至る可能性がある。

【0185】

実施例4：アデノシンーリン酸活性化タンパク質活性剤の調製

10

化学試薬および有機溶剤は特に言及のない限りSigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。核磁気共鳴スペクトル(¹H NMR)をBruker DPX300モデル分光計で測定した。化学シフト(δ)は、TMSピークに対して百万分の一(ppm)の単位で報告した。電気スプレーイオン化質量分析を、Micromass Q-Tof II高解像度電気スプレー質量分析計で行った。試験するすべての化合物の純度は化学分析により95%より高く、これはAtlantic Microlab, Inc. (Norcross, GA)により行われ、計算値の0.4%以内であると報告された。フラッシュカラムクロマトグラフィーをシリカゲル(230~400メッシュ)を用いて行った。8つの先導候補の構造は3つのシリーズ、すなわち、A(8、12、および21)、B(31および44)、ならびにC(49、53、および54)に分類することができた(図12A)。シリーズA~C化合物の合成のための一般的な手順を図12Bに示す。シリーズAおよびBの化合物は、既に報告した手順を少し修正したものに従って合成した。Huangら、J Med Chem, 49, 4684-4689 (2006); Yangら、J Med Chem, 51, 2100-2107 (2008)。シリーズC活性化合物(49、53、および54)の合成は、例として化合物53の合成によって示す。

20

【0186】

5-[3-ブロモ-4-(6-エトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン(8)

【0187】

【化41】

30

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.51(s, 3H), 1.92-2.03(m, 1H), 2.05-2.23 (m, 10H), 2.58-2.72 (m, 2H), 3.74 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.14 (q, J = 9.3 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.65 (s, 1H).

C₂₆H₂₈BrNO₅S (M + Na)⁺のHRMS正確な質量、568.0769 amu; (M + Na)⁺の観察質量、568.0786 amu。分析、計算値C 57.14、H 5.16、O 14.64; 実測値C 57.23、H 5.26、O 14.66。

40

【0188】

5-[4-(6-ブトキシ-2,5,7,8-テトラメチル-クロマン-2-イルメトキシ)-3-メトキシ-ベンジリデン]-チアゾリジン-2,4-ジオン(12)

【0189】

【化42】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.52-1.66 (m, 2H), 1.73-1.85 (m, 2H), 1.89-1.99 (m, 1H), 2.02-2.23 (m, 10H), 2.60-2.69 (m, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 4.04 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.12 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.96-7.10 (m, 3H), 7.80 (s, 1H), 8.58 (br, 1H).

C₂₉H₃₅NO₆S (M + Na) + のHRMS正確な質量、548.2083amu; (M + Na) + の観察質量、548.2095amu。分析、計算値C66.26、H6.71、O18.26; 実測値C66.32、H6.80、O18.29。

10

【0190】

4 - {2 - [2 - プロモ - 4 - (2,4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル) - フエノキシメチル] - 2,5,7,8 - テトラメチル - クロマン - 6 - イルオキシ} - ブチロニトリル(21)

【0191】

【化43】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ 1.49 (s, 3H), 1.94-2.23 (m, 13H), 2.58-2.74 (m, 4H), 3.76 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.00-4.16 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 2.1, 8.7 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 8.36 (br, 1H).

C₂₈H₂₉BrN₂O₅S (M + Na) + のHRMS正確な質量、607.0878amu; (M + Na) + の観察質量、607.0882amu。分析、計算値C57.44、H4.99、O13.66; 実測値C57.54、H5.04、O13.72。

20

【0192】

5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - チアゾリジン - 2,4 - ジオン(31)

【0193】

【化44】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 0.95 (s, 3H), 1.46-1.56 (m, 10H), 3.64 (s, 2H), 6.08-6.38 (br, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.83 (s, 1H).

30

C₁₉H₂₀F₃NO₃S (M + Na) + のHRMS正確な質量、422.1014amu; 実測値：422.1012amu。分析、計算値C57.13、H5.05、O12.02; 実測値C57.38、H5.04、O12.16。

【0194】

5 - (4 - ヒドロキシ - 3 - トリフルオロメチル - ベンジリデン) - 3 - プロピル - チアゾリジン - 2,4 - ジオン(44)

40

【0195】

【化45】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 0.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H), 1.60-1.78 (m, 2H), 3.74 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.19 (br, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.83 (s, 1H).

C₁₄H₁₂F₃NO₃S (M + Na) + のHRMS正確な質量、331.3112amu; 実測値：331.3124amu。分析、計算値C50.75、H3.65、O14

50

. 4 9 ; 実測値 C 5 0 . 8 4 、 H 3 . 6 8 、 O 1 4 . 5 4 。

【 0 1 9 6 】

N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデン - メチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - ベンゼンスルホンアミド (5 3)

ステップ a . トリフルオロメタンスルホン酸 1 - メチル - シクロヘキシリメチルエステル (i) を上述のように 1 - メチルシクロヘキサンカルボン酸から調製した。 Y a n g r a 、 J M e d C h e m 、 5 1 、 2 1 0 0 - 2 1 0 7 (2 0 0 8) 。 i (0 . 5 m m o l) 、 2 , 4 - チアゾリジンジオン (0 . 6 m m o l) および K₂CO₃ (0 . 7 m m o l) の混合物を D M F (3 m L) に溶解し、 4 時間攪拌しつつ 8 0 まで加熱し、水に注ぎ、エチルアセテート (1 0 m L) で 3 回抽出し、濃縮した。残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、 3 - (1 - メチル - シクロヘキシリメチル) - チアゾリジン - 2 , 4 - ジオン (i i) を 5 0 % の収率で得た。 10

【 0 1 9 7 】

ステップ b . 乾燥塩化メチレン (1 0 0 m L) 中のメチル 4 - アミノベンゾエート (1 . 5 1 g 、 1 0 m m o l) およびピリジン (0 . 9 7 m L) の混合物に、乾燥塩化メチレン (2 0 m L) 中の 4 - ニトロ - 3 - 塩化トリフルオロメチルベンゼンスルホニル (2 . 8 9 g 、 1 0 m m o l) をゆっくりと添加し、 1 N の H C l 、水、 1 0 % の N a₂C O₃ 水溶液、および塩水によりタンデムに洗浄した。有機層を乾燥させ、濾過し、濃縮した。残留物をクロマトグラフィー (E t O A c - ヘキサン、 1 : 5) により精製して、 4 - (4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - フェニル - スルファモイル) - 安息香酸メチルエステル (i i i) を無色結晶として 8 6 % の収率で得た。 20

【 0 1 9 8 】

【 化 4 6 】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.79 (s, 3H), 7.25 (d, J = 5.58 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 6.72 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 8.64 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H).

ステップ c . 化合物 (i i i) (3 . 2 6 g 、 8 . 0 6 m m o l) の乾燥 T H F 溶液 (5 0 m L) に、 L A H パレット (0 . 4 6 g 、 1 2 . 1 0 m m o l) を 0 で添加した。得られる反応混合物を 4 時間攪拌し、水 (5 m L) の添加で急冷し、濃縮し、酢酸エチル (5 0 m L) で希釈し、 1 N の H C l 、水、 1 0 % の N a₂C O₃ 水溶液、および塩水によりタンデムに洗浄した。有機層を乾燥させ、濾過し、濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル - ヘキサン、 3 : 7) により精製して、 4 - ヒドロキシメチル - N - (4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - フェニル) - ベンゼンスルホンアミド (i v) を淡黄色固体として 7 1 % の収率で得た。 30

【 0 1 9 9 】

【 化 4 7 】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.06 (br, 1H), 4.75 (s, 2H), 6.96 (br, 1H), 7.59 (d, J = 10.17 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 8.19 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H). 40

ステップ d . クロロホルム (1 0 0 m L) 中の化合物 i v (2 . 0 0 g 、 5 . 3 1 m m o l) および M n O₂ (2 . 3 4 g 、 2 6 . 5 7 m m o l) の反応混合物を一晩還流させ、濃縮し、酢酸エチルで希釈し、濾過し、濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル - ヘキサン、 1 : 7) により精製して、 N - (4 - ホルミル - フェニル) - 4 - ニトロ - 3 - トリフルオロメチル - ベンゼンスルホンアミド (v) を淡黄色固体 50

として 88 % の収率で得た。

【0200】

【化48】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (d, *J* = 6.76 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 6.72 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.43 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.64 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H).

ステップ e . エチルアルコール (50 mL) 中の化合物 i i (0.73 g, 3.21 mmol)、化合物 v i (1.25 g, 3.21 mmol)、および触媒量のピペリジンの反応混合物を一晩還流させ、濃縮し、酢酸エチル (50 mL) で希釈し、酢酸で中和し、水および塩水で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル - ヘキサン、1 : 7) により精製して、化合物 53 を黄色固体として 72 % の収率で得た。

【0201】

【化49】

¹H NMR (300 MHz, *d*-DMSO) δ 0.80 (s, 3H), 1.20-1.43 (m, 10H), 3.47 (s, 2H), 7.24 (d, *J* = 7.65 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.28 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 11.12 (br, 1H).

C₂₅H₂₄F₃N₃O₆S₂ (M⁺Na)⁺ の HRMS 正確な質量、606.0956 amu; 実測値: 606.0974 amu。分析、計算値 C 51.45, H 4.15, O 16.45; 実測値 C 51.72, H 4.20, O 16.54。

【0202】

4 - メトキシ - N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - ベンゼンスルホンアミド (49)

【0203】

【化50】

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/MeOD-D⁴) 0.96 (s, 3H), 1.22-1.62 (m, 10H), 3.66 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 7.02 (d, *J* = 8.7Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.7Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.1Hz, 2H), 7.87(d, *J* = 8.1Hz, 2H), 7.88 (s, 1H).

C₂₆H₂₈N₂O₅S₂ (M⁺Na)⁺ の HRMS 正確な質量、535.1337 amu; 実測値: 535.1352 amu。分析、計算値 C 60.92, H 5.51, O 15.60; 実測値 C 60.72, H 5.60, O 15.54。

【0204】

N - { 4 - [3 - (1 - メチル - シクロヘキシルメチル) - 2 , 4 - ジオキソ - チアゾリジン - 5 - イリデンメチル] - フェニル } - 4 - ニトロ - ベンゼンスルホンアミド (54)

【0205】

【化51】

¹H NMR (300 MHz, *d*-DMSO), δ 0.82 (s, 3H), 1.21-1.45 (m, 10H), 3.51 (s, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.55 Hz, 2H), 7.51(d, *J* = 8.55 Hz, 2H), 7.78 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 9.00 Hz, 2H), 8.36 (d, *J* = 8.97 Hz, 2H), 11.12 (br, 1H).

C₂₄H₂₅N₃O₆S₂ (M⁺Na)⁺ の HRMS 正確な質量、538.1083 amu

u ; 実測値 : 538.1092 amu。分析、計算値 C 55.91, H 4.89, O 18.62 ; 実測値 C 55.98, H 4.98, O 18.76。

【0206】

本明細書で引用したすべての特許、特許出願、および刊行物の完全な開示、ならびに電子的に利用可能な資料は、参考により援用されている。上述の詳細な説明および実施例は理解を明瞭にするためにのみ提示されている。このことから不必要的制約はないことは理解されよう。特に、様々な理論を提供して、チアゾリジンジオニン誘導体が有効となる可能なメカニズムについて述べているが、チアゾリジンジオニン誘導体は用いられる特定のメカニズムには関係なく有効であり、従って本発明者は本明細書で述べた理論に拘束されない。当業者にとって自明の変形例も請求の範囲によって規定される本発明の範囲に含まれ得るため、本発明は、図示および記述した通りの細部に制約されない。

10

【図1】

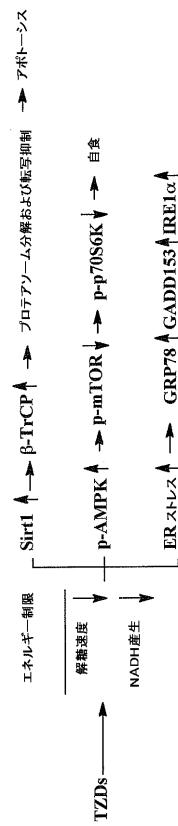


Figure 1

【図2】

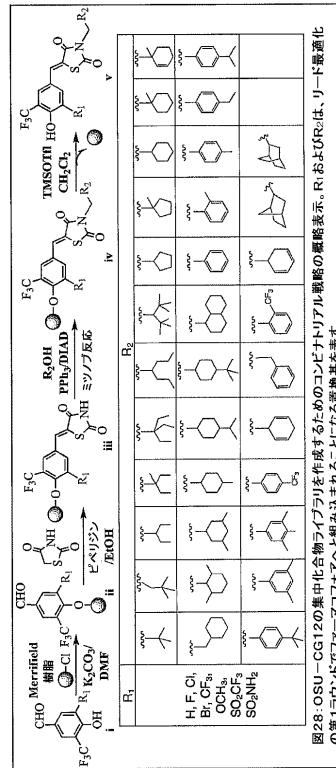


Figure 2

【図3】

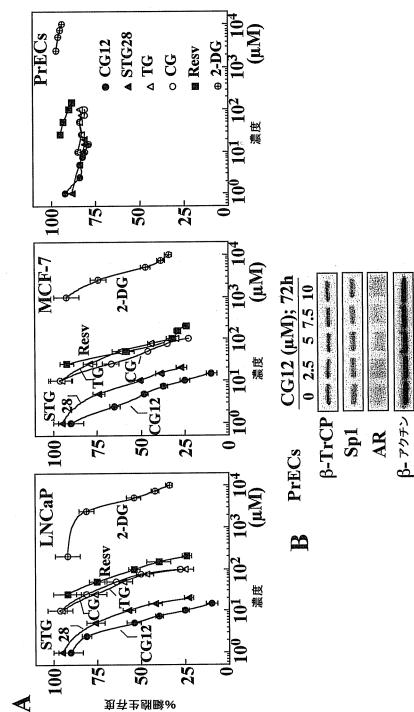


Figure 3

【図12】

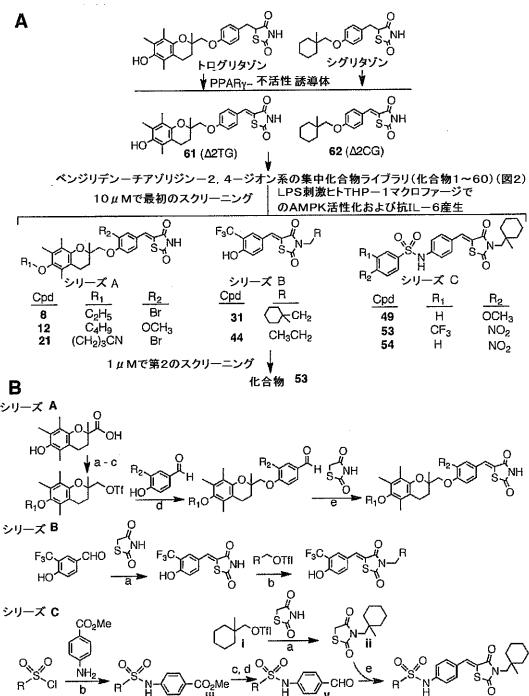


Figure 12

【図13】

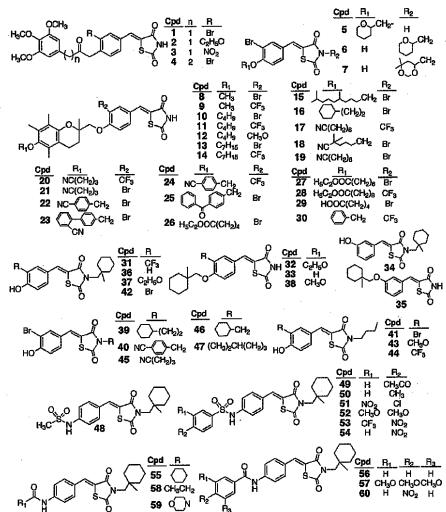


Figure 13

【図16】

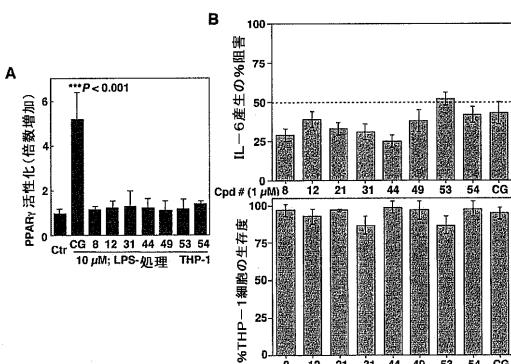


Figure 16

【図19】

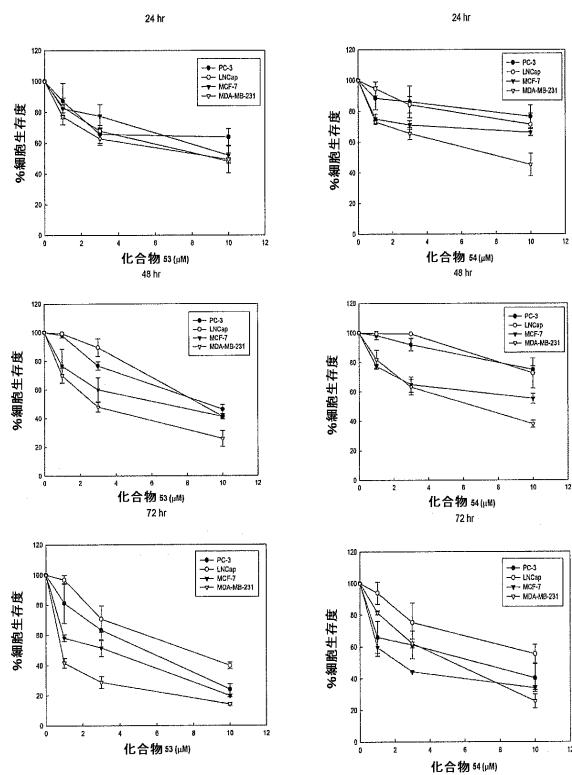


Figure 19

【図4】

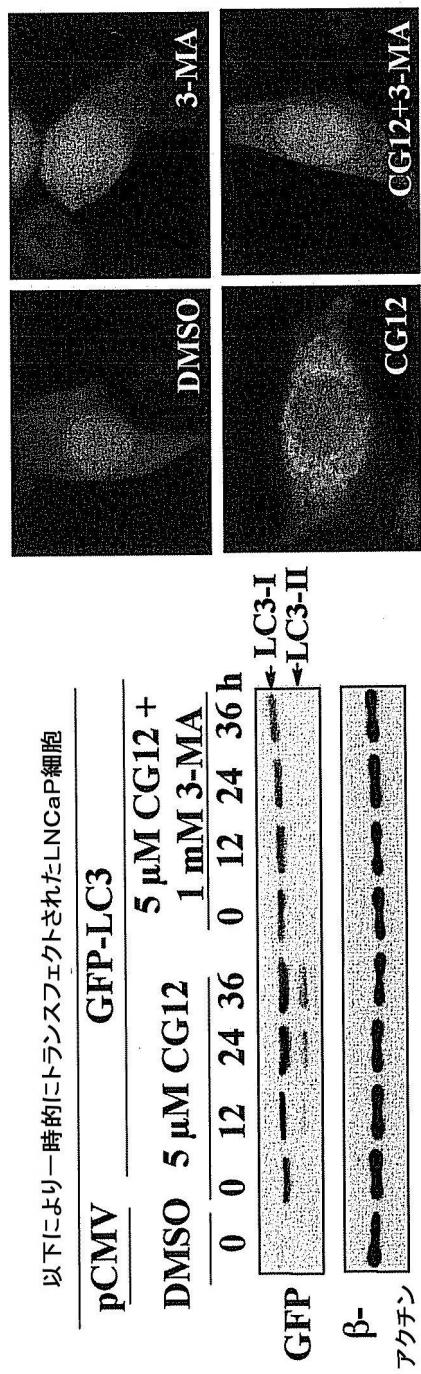


Figure 4

【図5】

* ER α

Figure 5

【図 6】

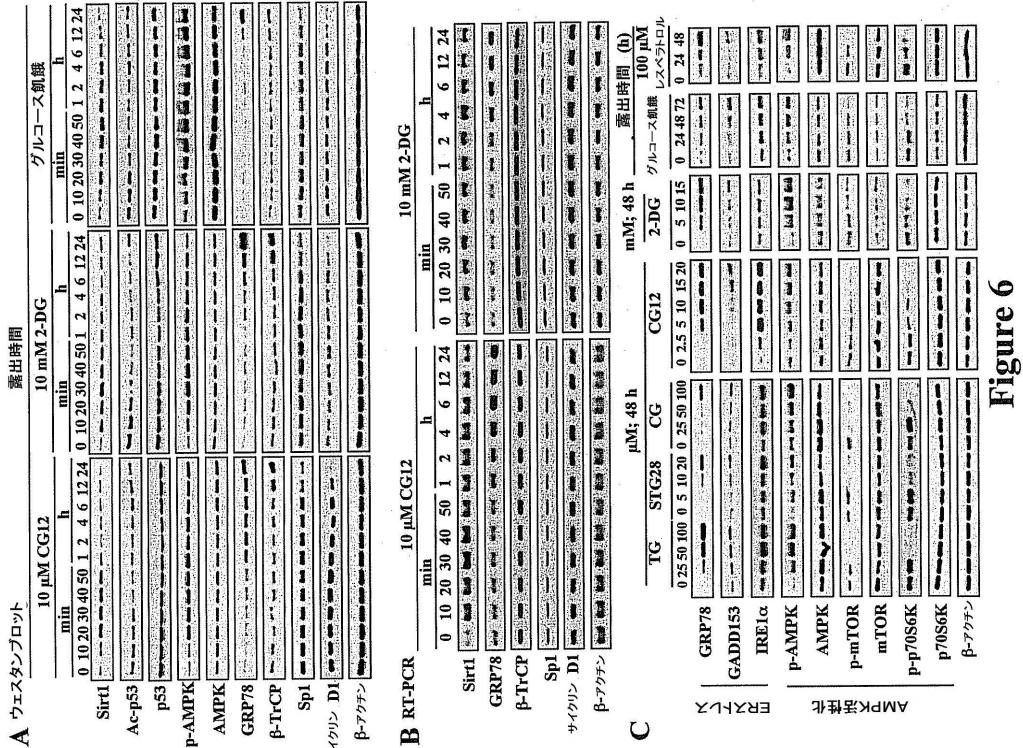


Figure 6

【図 7】

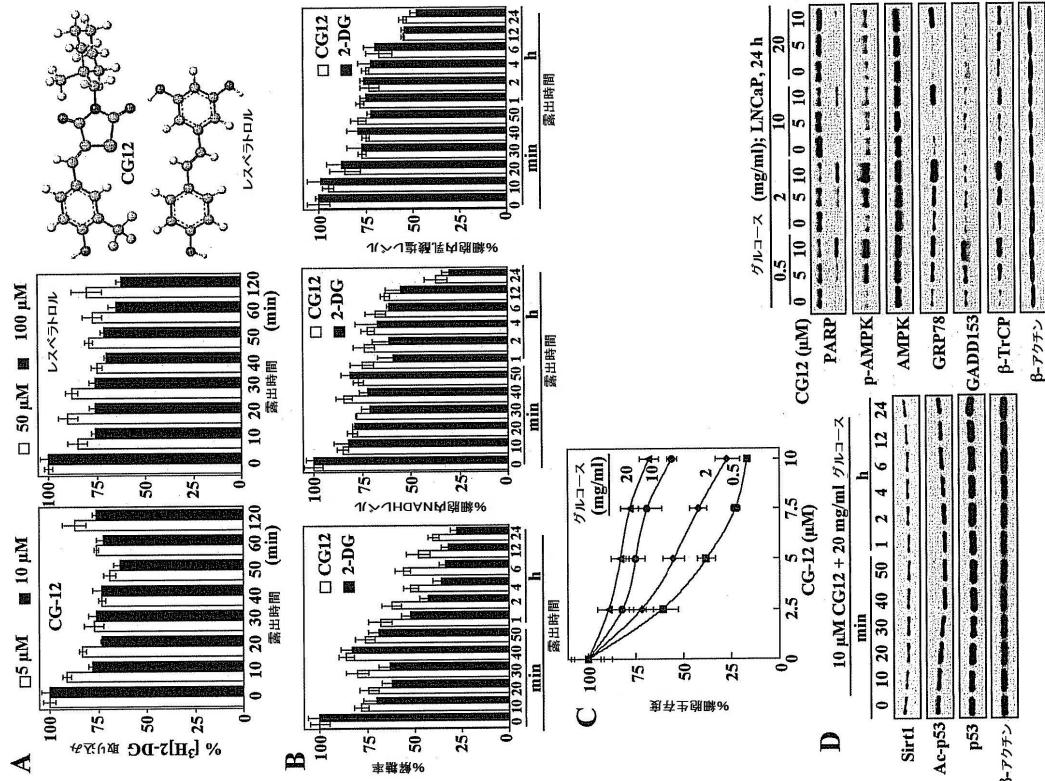


Figure 7

【図8】

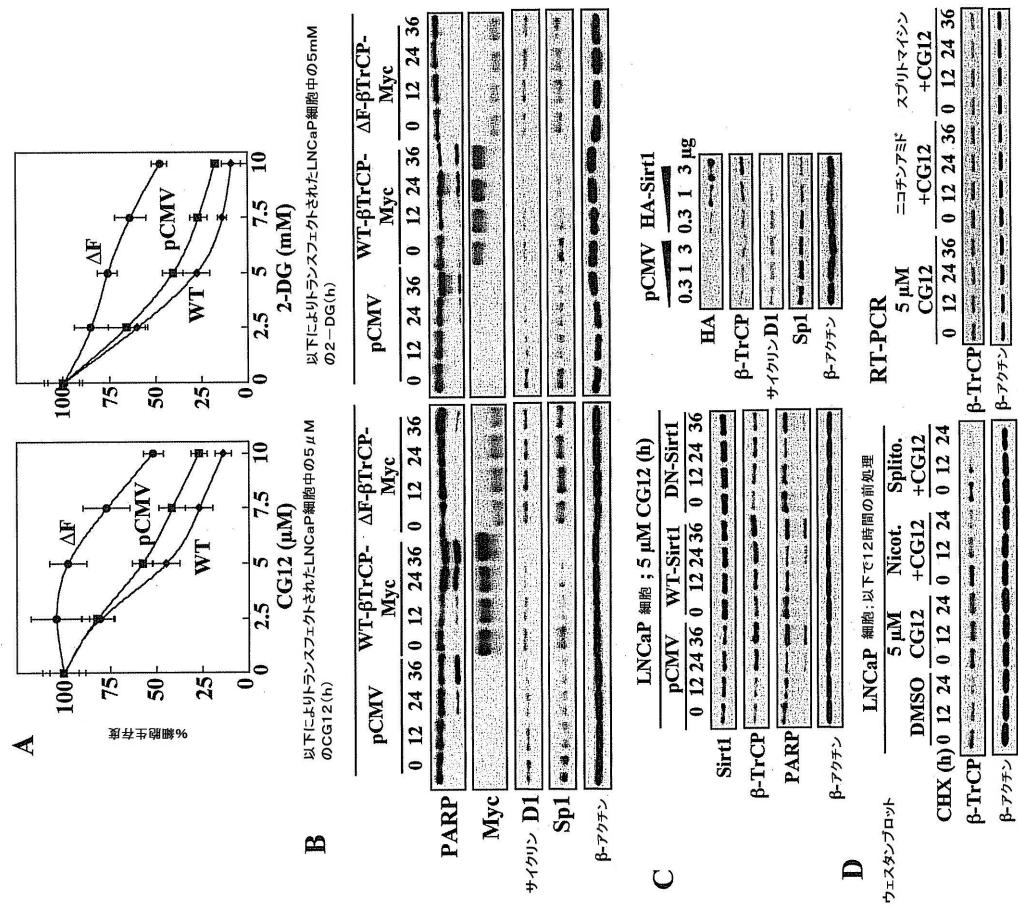


Figure 8

【図9】

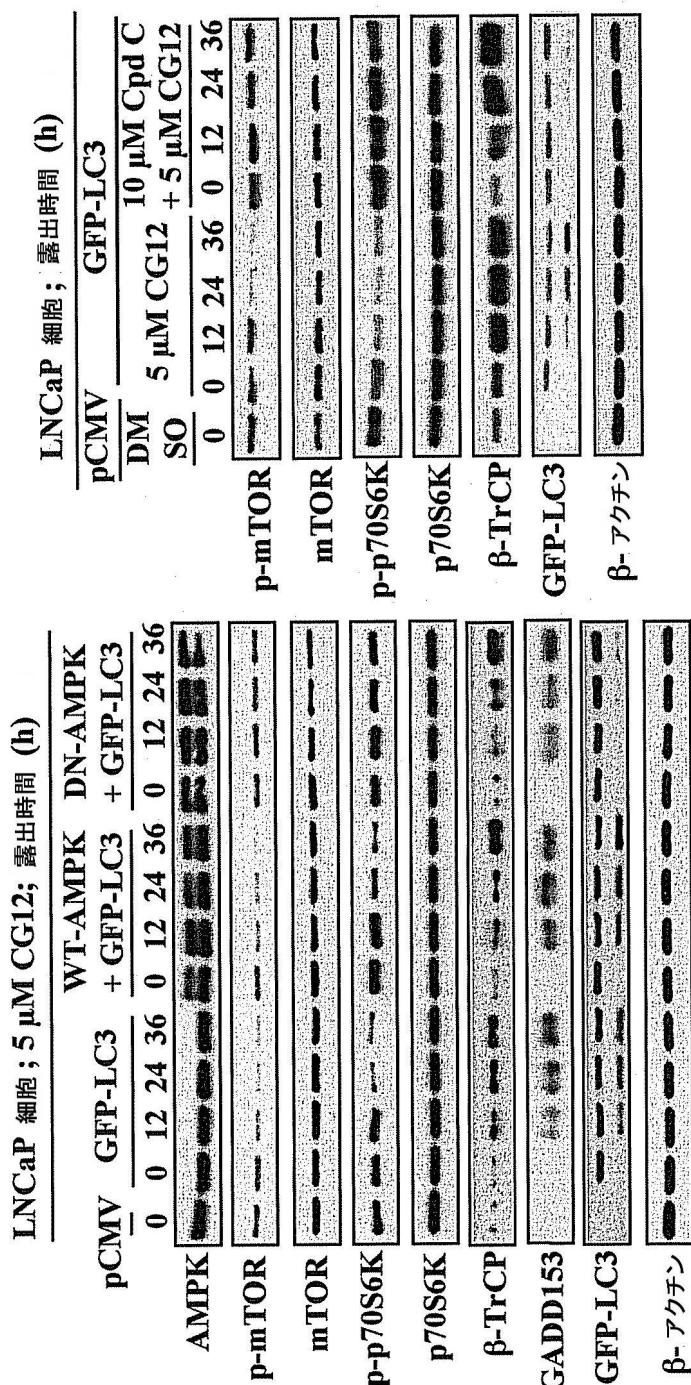


Figure 9

【図 10】

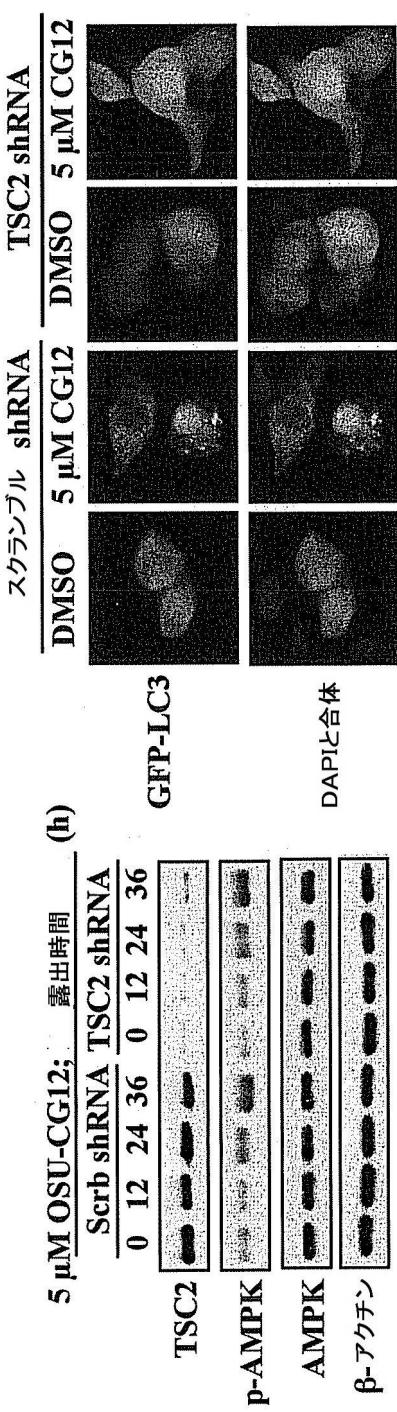


Figure 10

【図 11】

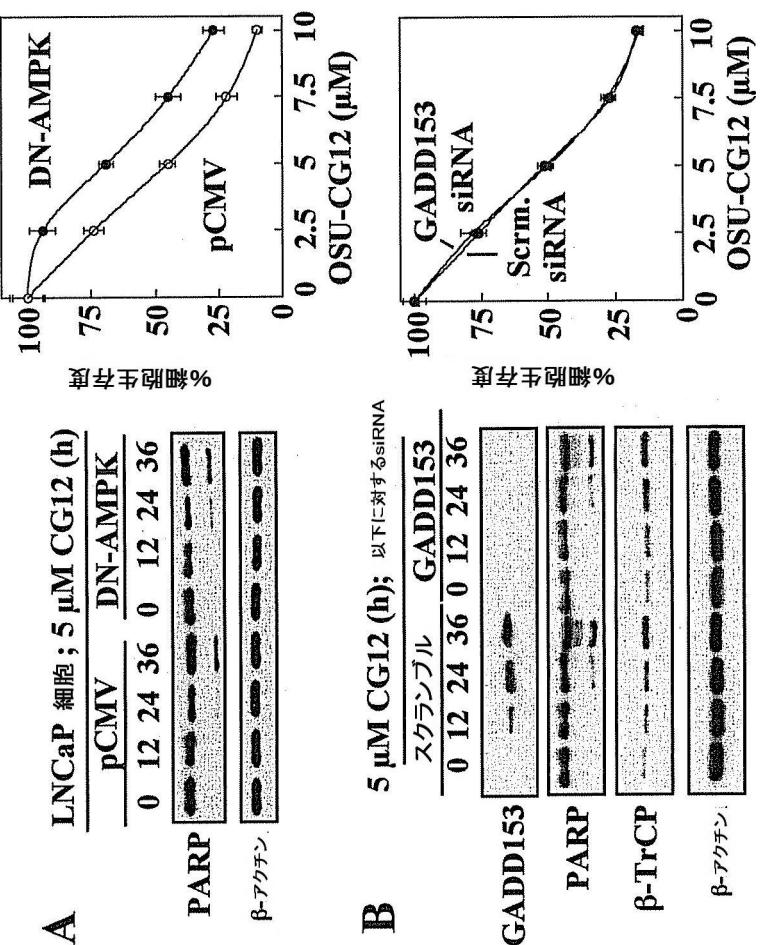


Figure 11

【図14】

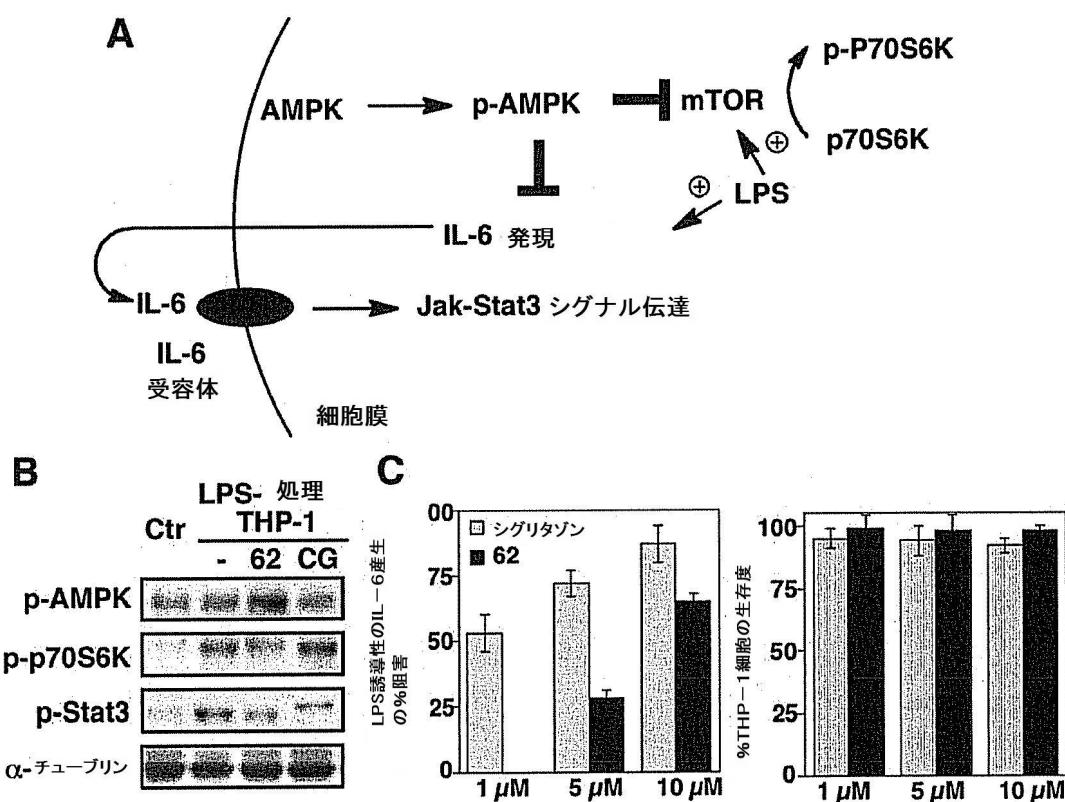


Figure 14

【図15】

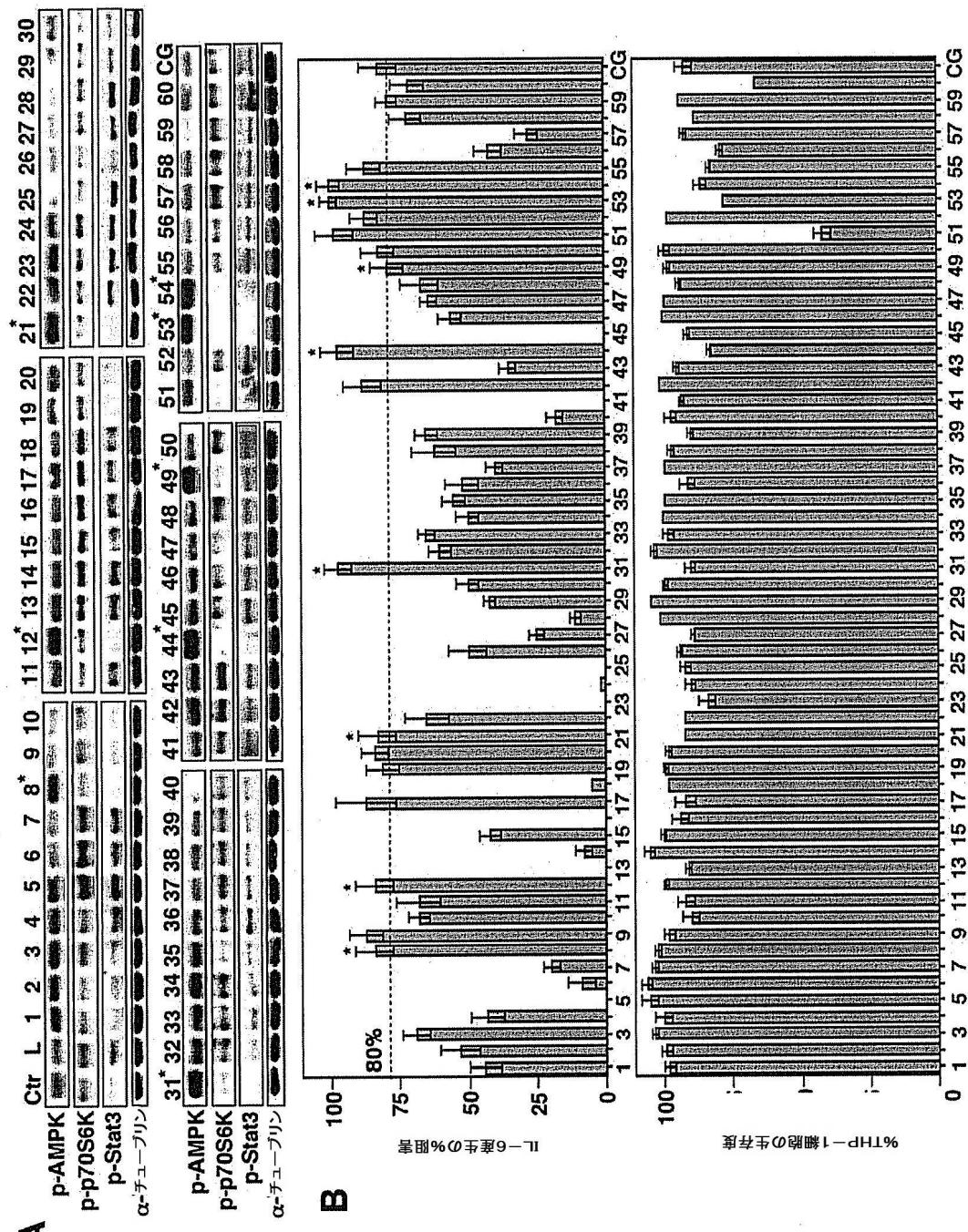


Figure 15

【図17】

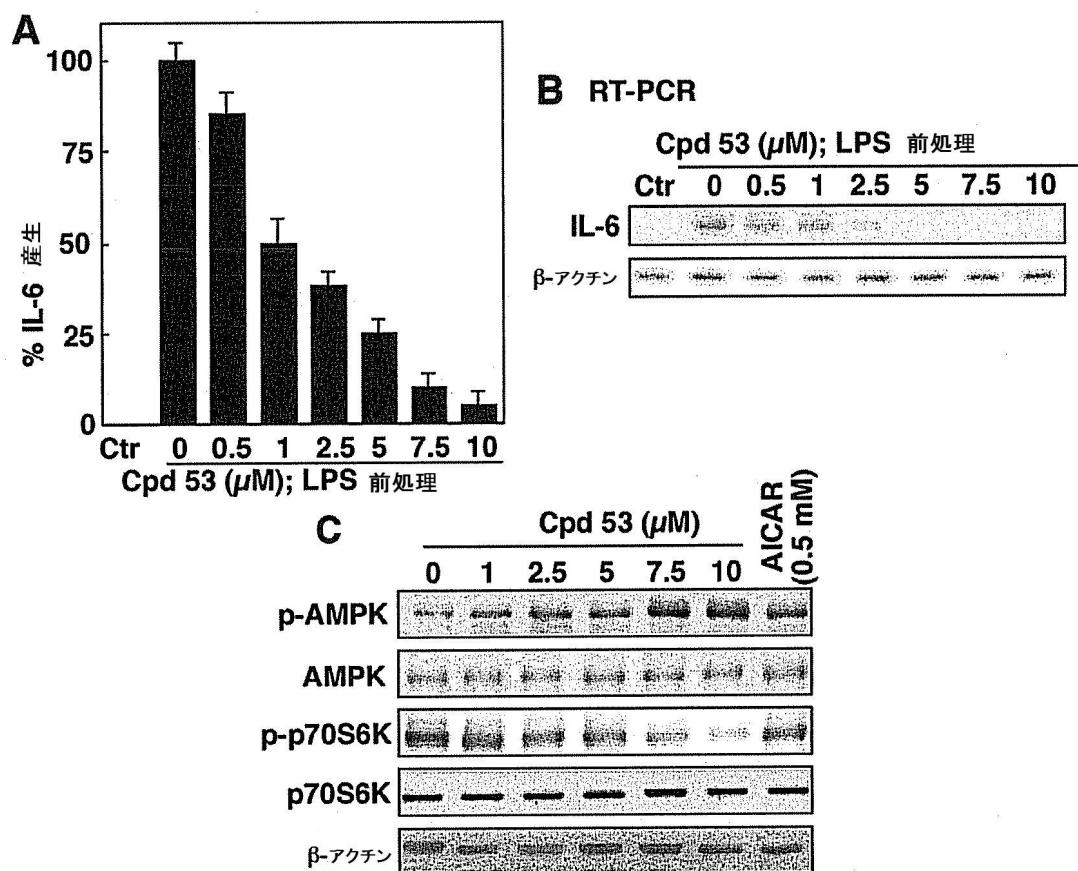


Figure 17

【図18】

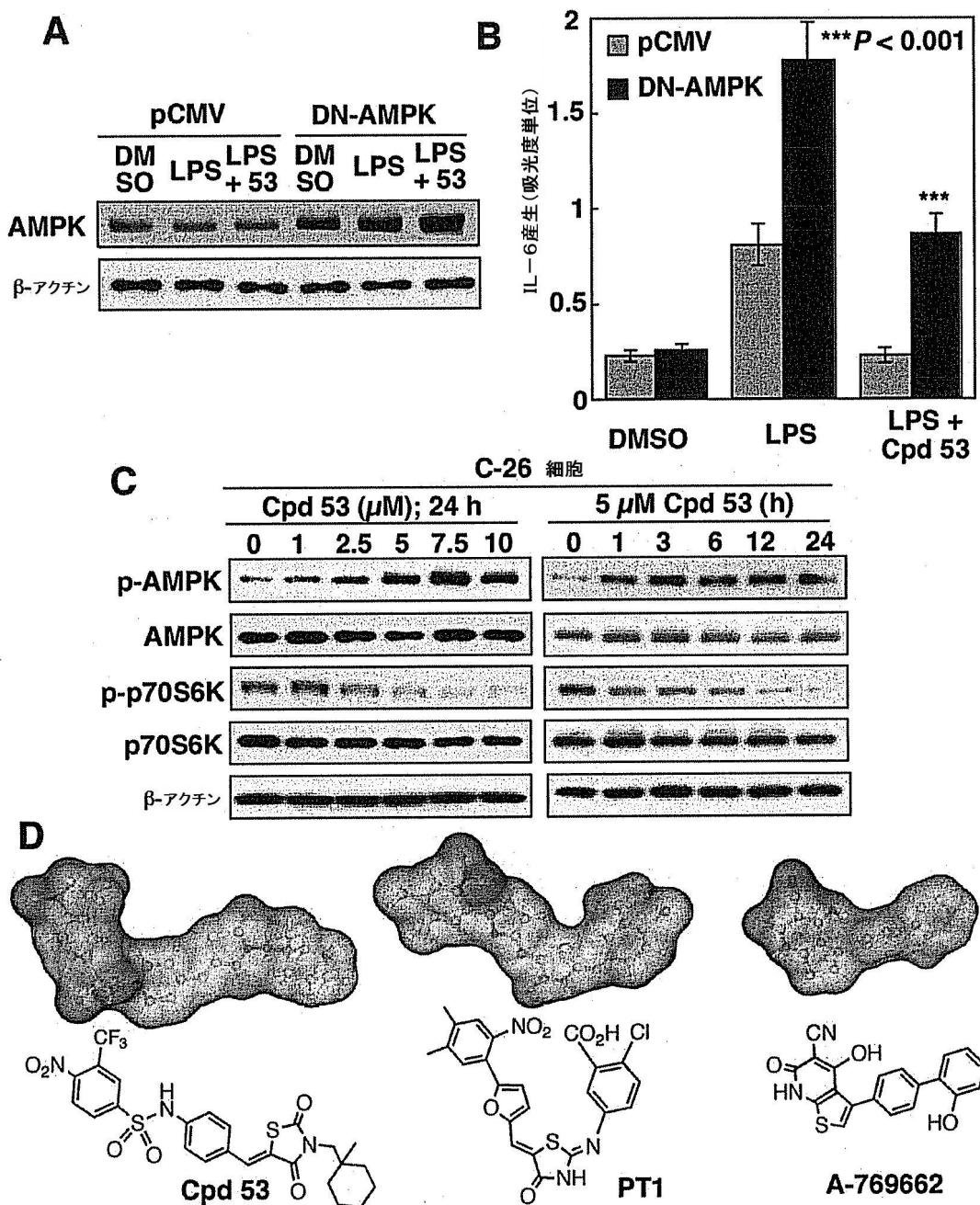


Figure 18

フロントページの続き

(72)発明者 チェン , チン - シー

アメリカ合衆国 オハイオ 43221 , アッパー アーリントン , サフォーク ロード 1
840

(72)発明者 グー , ジー - ファ

中華人民共和国 台湾 , 110 , タイペイ , ウ - シン ストリート 394 レーン ナン
バー 6 , ピー 1 エフ

審査官 井上 明子

(56)参考文献 國際公開第2009 / 105621 (WO , A1)

MOLECULAR PHARMACOLOGY , 2009年 7月 , vol. 76, no. 1 , pages 47-57

JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY , 2008年 4月 , vol. 51, no. 7 , pages 2100-2107

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61K 31 / 00 - 33 / 44

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)