

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265915号  
(P5265915)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int.Cl.

<b>C07D 311/62</b>	<b>(2006.01)</b>	F 1	C O 7 D 311/62	C S P
<b>A61K 31/353</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 K 31/353	
<b>A61P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 P 35/00	
<b>A61P 35/02</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 P 35/02	
<b>A61P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 P 43/00	1 1 1

請求項の数 9 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2007-526180 (P2007-526180)  
 (86) (22) 出願日 平成17年8月15日 (2005.8.15)  
 (65) 公表番号 特表2008-509939 (P2008-509939A)  
 (43) 公表日 平成20年4月3日 (2008.4.3)  
 (86) 國際出願番号 PCT/CN2005/001262  
 (87) 國際公開番号 WO2006/017981  
 (87) 國際公開日 平成18年2月23日 (2006.2.23)  
 審査請求日 平成20年8月12日 (2008.8.12)  
 (31) 優先権主張番号 10/921,332  
 (32) 優先日 平成16年8月19日 (2004.8.19)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/649,569  
 (32) 優先日 平成17年2月4日 (2005.2.4)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501060541  
 ザ・ホンコン・ポリテクニック・ユニバーシティ  
 The Hong Kong Polytechnic University  
 香港、クーロン、フンホム(番地なし)  
 (73) 特許権者 507053356  
 ウェイン・ステイト・ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国ミシガン州48201, テトロイト, ジョン・アール 4100, エイチダブリューシーアールシー 516

前置審査

最終頁に続く

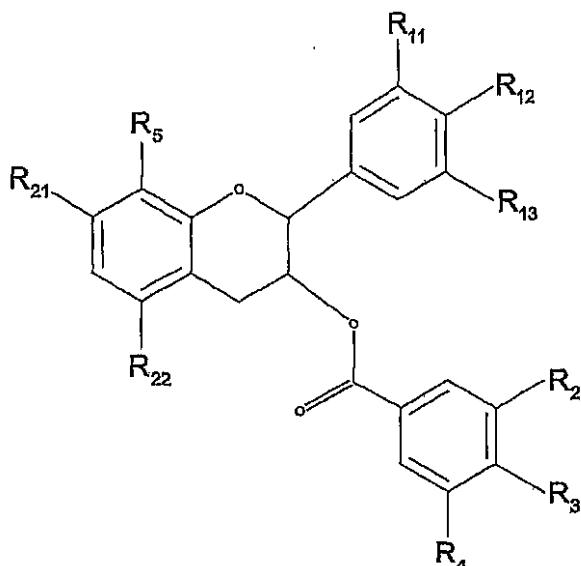
(54) 【発明の名称】プロテアソームを阻害するための(-)-エピガロカテキンガラート誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次式を有する、プロテアソームを阻害するための化合物

【化 1】



10

[ 式中、

20

・  $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は各々独立に、-H および  $C_{1\sim C_{10}}$  アシルオキシリル基からなる群から選択され、

・  $R_5$  は -H、 $C_{1\sim C_{10}}$ -アルキル、 $C_{2\sim C_{10}}$ -アルケニル、 $C_{2\sim C_{10}}$ -アルキニル、 $C_{3\sim C_7}$ -シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび  $C_{3\sim C_7}$ -シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した 7 種の基は各々、任意の組合せの 1 ~ 6 個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・  $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  のうち少なくとも 1 個は  $C_{1\sim C_{10}}$  アシルオキシリル基であり、

・  $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  のうち少なくとも 1 個は -H である] であって、

当該式が、下記の(1)から(5)のいずれか一つを満たす化合物：

(1)  $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である；

(2)  $R_{1\ 1}$  および  $R_{1\ 3}$  が各々 -H であり、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(3)  $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$  および  $R_{1\ 3}$  が各々 -H であり、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(4)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_{2\ 1}$  および  $R_{2\ 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  がアセテート基であり、 $R_3$  および  $R_4$  が各々 -H である；及び

(5)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_{2\ 1}$  および  $R_{2\ 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  および  $R_4$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  が -H である。

#### 【請求項 2】

$R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 3}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である、請求項 1 に記載の化合物。

#### 【請求項 3】

$R_{1\ 1}$  および  $R_{1\ 3}$  が各々 -H であり、 $R_{1\ 2}$ 、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である、請求項 1 に記載の化合物。

#### 【請求項 4】

$R_{1\ 1}$ 、 $R_{1\ 2}$  および  $R_{1\ 3}$  が各々 -H であり、 $R_{2\ 1}$ 、 $R_{2\ 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である、請求項 1 に記載の化合物。

#### 【請求項 5】

$R_2$  がアセテート基であり、 $R_3$  および  $R_4$  が各々 -H である、請求項 1 に記載の化合物。

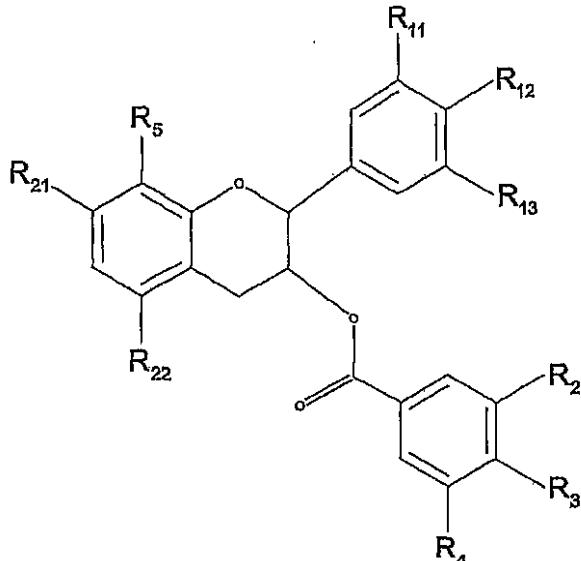
#### 【請求項 6】

$R_2$  および  $R_4$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  が -H である、請求項 1 に記載の化合物。

#### 【請求項 7】

次式を有する化合物の有効量を含む、腫瘍細胞増殖を低減するための医薬組成物

## 【化2】



10

[式中、

・  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々独立に、-H および  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリル基からなる群から選択され、

・  $R_5$  は -H、 $C_{1\sim 10}$ -アルキル、 $C_{2\sim 10}$ -アルケニル、 $C_{2\sim 10}$ -アルキニル、 $C_{3\sim 7}$ -シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび  $C_{3\sim 7}$ -シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した7種の基は各々、任意の組合せの1~6個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  のうち少なくとも1個は  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリル基である] であって、

当該式が、下記の(1)から(9)のいずれか一つを満たす医薬組成物：

(1)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である；

(2)  $R_{1\sim 1}$  が -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(3)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である；

(4)  $R_{1\sim 1}$  および  $R_{1\sim 3}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(5)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$  および  $R_{1\sim 3}$  が各々 -H であり、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(6)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  がアセテート基であり、 $R_3$  および  $R_4$  が各々 -H である；

(7)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  および  $R_4$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  が -H である；

(8)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  がアセテート基であり、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H である；及び

(9)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である。

20

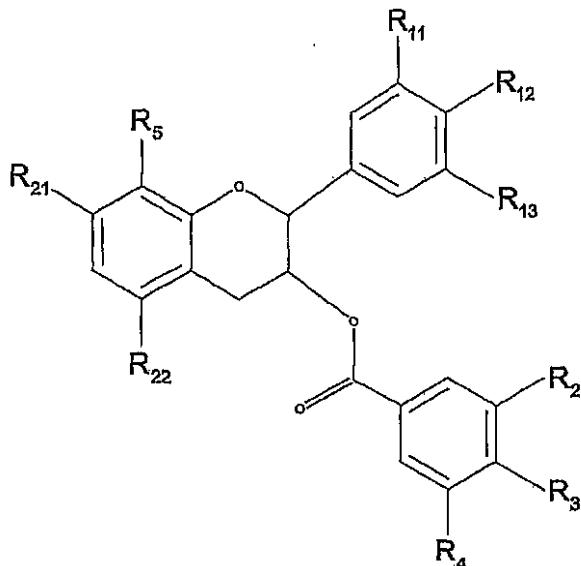
30

40

## 【請求項8】

腫瘍細胞増殖を低減するための医薬の製造における、次式を有する化合物の使用

## 【化3】



10

[式中、

・  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々独立に、-H および  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリル基からなる群から選択され、

・  $R_5$  は -H、 $C_{1\sim 10}$ -アルキル、 $C_{2\sim 10}$ -アルケニル、 $C_{2\sim 10}$ -アルキニル、 $C_{3\sim 7}$ -シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび  $C_{3\sim 7}$ -シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した7種の基は各々、任意の組合せの1~6個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  のうち少なくとも1個は  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリル基である] であって、

当該式が、下記の(1)から(9)のいずれか一つを満たす使用：

(1)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である；

(2)  $R_{1\sim 1}$  が -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(3)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$  および  $R_3$  が各々アセテート基である；

(4)  $R_{1\sim 1}$  および  $R_{1\sim 3}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(5)  $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$  および  $R_{1\sim 3}$  が各々 -H であり、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である；

(6)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  がアセテート基であり、 $R_3$  および  $R_4$  が各々 -H である；

(7)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_2$  および  $R_4$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  が -H である；

(8)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$  および  $R_{2\sim 2}$  が各々アセテート基であり、 $R_3$  がアセテート基であり、 $R_2$  および  $R_4$  が各々 -H である；及び

(9)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 1}$ 、 $R_{1\sim 2}$ 、 $R_{1\sim 3}$ 、 $R_{2\sim 1}$ 、 $R_{2\sim 2}$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  が各々アセテート基である。

20

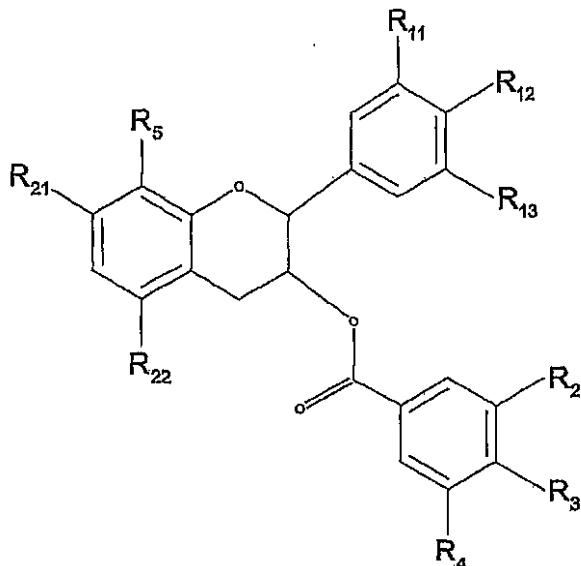
30

40

## 【請求項9】

次式を有する化合物の有効量を含む、プロテアソームを阻害するための組成物：

## 【化4】



10

[式中、

・  $R_{1\sim 4}$  は各々独立に、-H および  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリ基からなる群から選択され、

・  $R_5$  は -H、 $C_{1\sim 10}$ -アルキル、 $C_{2\sim 10}$ -アルケニル、 $C_{2\sim 10}$ -アルキニル、 $C_{3\sim 7}$ -シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび  $C_{3\sim 7}$ -シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した7種の基は各々、任意の組合せの1~6個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・  $R_{1\sim 4}$  のうち少なくとも1個は  $C_{1\sim 10}$  アシルオキシリ基であり、

・  $R_{1\sim 4}$  のうち少なくとも1個は -H である]であって、

当該式が、下記の(1)から(8)のいずれか一つを満たす組成物：

(1)  $R_{1\sim 4}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基である；

30

(2)  $R_{1\sim 4}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基である；

(3)  $R_{1\sim 4}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基である；

(4)  $R_{1\sim 4}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基である；

(5)  $R_{1\sim 4}$  が各々 -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基である；

(6)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基であり、 $R_5$  が各々 -H である；

40

(7)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基であり、 $R_5$  が -H である；及び

(8)  $R_5$  が -H であり、 $R_{1\sim 4}$  が各々アセテート基であり、 $R_5$  が -H である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、プロテアソーム阻害剤として使用するための、および/または癌細胞増殖を阻害するための(-)-エピガロカテキンガラートの誘導体に関する。

【背景技術】

50

## 【0002】

緑茶抽出物中に見られるポリフェノールとして、( - ) - エピカテキン ( E C )、( - ) - エピガロカテキン ( E G C )、( - ) - エピカテキン - 3 - ガラート ( E C G ) および( - ) - エピガロカテキン - 3 - ガラート ( E G C G ) がある。特に、最も豊富なカテキン ( - ) - E G C G は、緑茶カテキン ( G T C ) のなかでも化学予防剤および抗癌剤であることが分かった ( 4 . F u j i k i , H . J . C a n c e r R e s C l i n O n c o l . 1 9 9 9 , 1 2 5 , 5 8 9 ~ 9 7 頁 )。

## 【0003】

プロテアソームは大きなタンパク質複合体であり、使われなくなった、ミスフォールディングしたタンパク質の分解だけでなく、細胞周期およびアポトーシスに関する調節タンパク質の分解をも担う多触媒活性を示す。プロテアソーム依存性タンパク質分解では、まず、ユビキチンが基質と結合し、それに続いて基質が分解され、アミノ酸およびユビキチンが再利用される。ユビキチン / プロテアソーム依存性分解経路は、ヒト腫瘍細胞における、細胞増殖のアップレギュレーション、細胞死のダウンレギュレーション、薬物耐性の発生において重要な役割を果たす。したがって、プロテアソーム阻害剤は、新規な抗癌剤として大きな可能性を示す ( D o u , Q . P . , L i , B . D r u g R e s i s t U p d a t e 1 9 9 9 , 2 , 2 1 5 ~ 2 3 頁 )。天然 ( - ) - E G C G および合成によって誘導された ( + ) - E G C G は、プロテアソームのキモトリプシン活性の強力な阻害剤であり、増殖停止および / またはアポトーシスをもたらすことがわかっている ( S m i t h , D . M . , W a n g , Z . , K a z i , A . , L i , L . , C h a n , T . H . , D o n , Q . P . M o l M e d 2 0 0 2 , 8 , 3 8 2 ~ 9 2 頁 )。米国特許公報第 2 0 0 4 0 1 1 0 7 9 0 号 ( Z a v e r i l a ) には、化学療法薬および化学予防剤としての緑茶ポリフェノールの合成類似体が記載されているが、合成はラセミ化合物しか提供せず、緑茶に由来する天然に存在するカテキンは用いていない。

## 【0004】

P 1 3 K / A k t シグナル伝達は、周知の腫瘍細胞生存経路である ( V a n h a e s e b r o e c k , B . , A l e s s i , D . R . B i o c h e m J 2 0 0 0 , 3 4 6 , 5 6 1 ~ 7 6 頁 )。この経路を遮断することは、腫瘍増殖を阻害するための重要な機構と考えられている。リン酸化 A k t ( p - A k t ) は、A k t の活性型である。A k t は活性化されると、リン酸化および結果として生じるサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p 2 7 . 2 4 の阻害によって、細胞周期の進行を媒介できる。最近、( - ) - E G C G は、M M T V - H e r - 2 / n e u マウス乳癌 N F 6 3 9 細胞において、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼシグナルの減少を介して A k t キナーゼ活性を阻害し、腫瘍細胞増殖の低減をもたらすことが分かった ( P i a n e t t i , S . , G u o , S . , K a v a n a g h , K . T . , S o n e n s h e i n , G . E . C a n c e r R e s 2 0 0 2 , 6 2 , 6 5 2 ~ 5 頁 )。

## 【0005】

しかし、( - ) - E G C G には少なくとも 1 つの制限がある：低いバイオアベイラビリティしか示さない。ナカガワらの研究によって、5 6 m g の ( - ) - E G C G を経口投与されたラットでは、0 . 0 1 2 % の ( - ) - E G C G しか吸収され得ないということが示された ( N a k a g a w a , K . , M i y a z a w a , T . A n a l B i o c h e m . 1 9 9 7 , 2 4 8 , 4 1 ~ 9 頁 )。この低い吸収は、中性またはアルカリ性溶液中での ( - ) - E G C G の安定性が低いことによると考えられた。腸および体液の p H 値は中性またはわずかにアルカリ性であるので、G T C はヒトの体内では不安定となり、その結果、低いバイオアベイラビリティがもたらされる。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

したがって、本発明の目的は、先行技術において示される少なくとも 1 つまたは複数の問題を解決できる ( - ) - E G C G 誘導体を提供することである。最小としても、本発明

10

20

30

40

50

の目的は、一般の人々に有用な選択肢を提供することである。

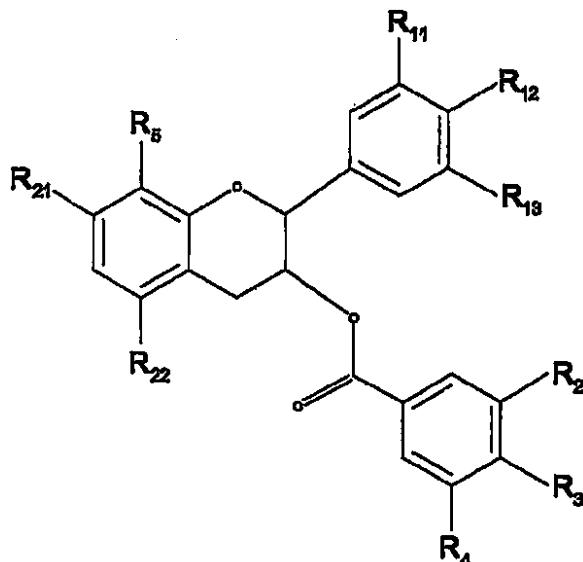
【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって、本発明は、次式を有するプロテアソームを阻害するための化合物を提供する：

【0008】

【化1】



10

20

30

40

【0009】

[式中、

・R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は各々独立に、-HおよびC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アシルオキシル基からなる群から選択され、

・R<sub>5</sub>は-H、C<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>-アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>-アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>-アルキニル、C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>-シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよびC<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>-シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した7種の基は各々、任意の組合せの1～6個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>のうち少なくとも1個はC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アシルオキシル基であり、

・R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>のうち少なくとも1個は-Hである]。

【0010】

R<sub>11</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>4</sub>が各々-Hであり、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>およびR<sub>3</sub>が各々アセテートまたはベンゾエート基であることが好ましい。

場合によっては、R<sub>11</sub>が-Hであり、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が各々アセテートまたはベンゾエート基である。

【0011】

さらに、R<sub>11</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>4</sub>が各々-Hであり、R<sub>12</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>およびR<sub>3</sub>が各々アセテートまたはベンゾエート基である。

場合によっては、R<sub>11</sub>およびR<sub>13</sub>が各々-Hであり、R<sub>12</sub>、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が各々アセテートまたはベンゾエート基である。

【0012】

R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>およびR<sub>13</sub>が各々-Hであり、R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が各々アセテートまたはベンゾエート基である場合もある。

本発明の上記化合物の一実施形態では、R<sub>5</sub>は-Hであり、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>21</sub>およびR<sub>22</sub>は各々アセテート基である。この特定の実施形態はまた、以下の3つの変形も提供する：

50

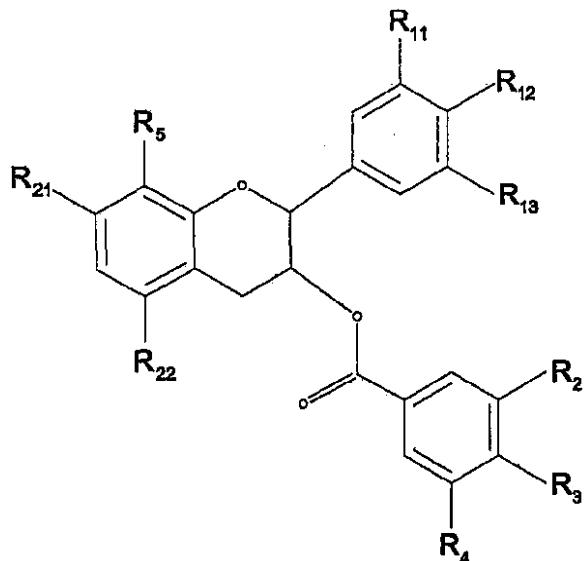
- ・ R<sub>2</sub> がアセテート基であり、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が各々 - H であるか、
- ・ R<sub>3</sub> がアセテート基であり、R<sub>2</sub> および R<sub>4</sub> が各々 - H であるか、または
- ・ R<sub>2</sub> および R<sub>4</sub> が各々アセテート基であり、R<sub>3</sub> が - H である。

## 【0013】

本発明のもう 1 つの態様は、次式を有する化合物の有効量を投与するステップを含む腫瘍細胞増殖を低減する方法を提供することである：

## 【0014】

## 【化 2】



10

20

30

## 【0015】

[式中、

・ R<sub>1~1</sub>、R<sub>1~2</sub>、R<sub>1~3</sub>、R<sub>2~1</sub>、R<sub>2~2</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が各々独立に、-H および C<sub>1~C10</sub> アシルオキシル基からなる群から選択され、

・ R<sub>5</sub> は -H、C<sub>1~C10</sub>-アルキル、C<sub>2~C10</sub>-アルケニル、C<sub>2~C10</sub>-アルキニル、C<sub>3~C7</sub>-シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび C<sub>3~C7</sub>-シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した 7 種の基は、任意の組合せの 1 ~ 6 個のハロゲン原子で置換されていることができ、

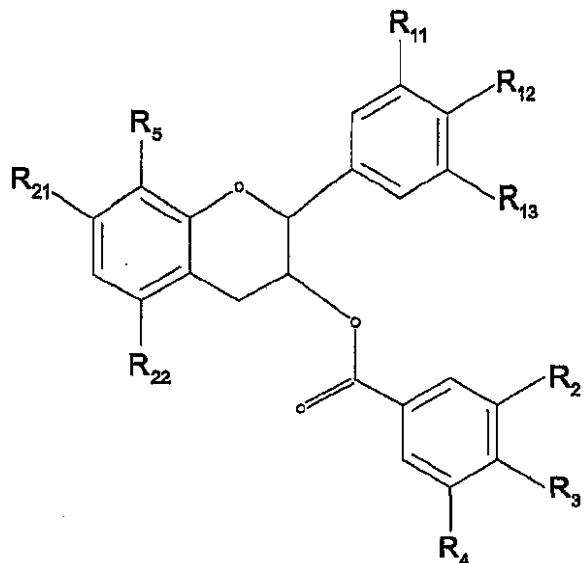
・ R<sub>1~1</sub>、R<sub>1~2</sub>、R<sub>1~3</sub>、R<sub>2~1</sub>、R<sub>2~2</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> のうち少なくとも 1 個は C<sub>1~C10</sub> アシルオキシル基である]。

## 【0016】

本発明のさらにもう 1 つの態様は、腫瘍細胞増殖を低減するための医薬の製造における、次式を有する化合物の使用を提供することである

## 【0017】

## 【化3】



10

## 【0018】

[式中、

- $R_{1\sim 4}$  が各々独立に、-H および  $C_{1\sim 10}$  アシリルオキシル基からなる群から選択され、

20

- $R_5$  は -H、 $C_{1\sim 10}$ -アルキル、 $C_{2\sim 10}$ -アルケニル、 $C_{2\sim 10}$ -アルキニル、 $C_{3\sim 7}$ -シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび  $C_{3\sim 7}$ -シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した 7 種の基は、任意の組合せの 1 ~ 6 個のハロゲン原子で置換されていることができる、

- $R_{1\sim 4}$  のうち少なくとも 1 個は  $C_{1\sim 10}$  アシリルオキシル基である]。

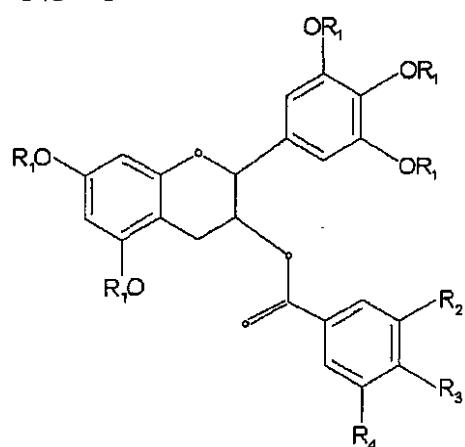
## 【0019】

本発明はまた、次式を有するプロテアソームを阻害するための化合物を提供する

## 【0020】

## 【化4】

30



40

## 【0021】

[式中、

- $R_1$  は -H であり、
- $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  は各々独立に、-H および -OH からなる群から選択され、
- $R_2$ 、 $R_3$  および  $R_4$  のうち少なくとも 1 個は -H である]。

## 【0022】

$R_2$  は -OH であり、 $R_3 = R_4 = -H$  であり得ることが好ましい。場合によって、 $R_3$  は -OH であり、 $R_2 = R_4 = -H$  であってもよく；または  $R_3$  が -H であり、 $R_2 =$

50

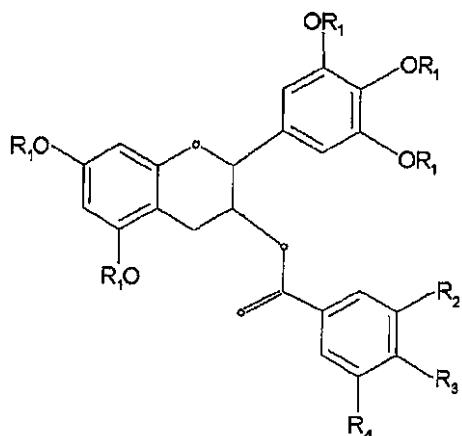
R<sub>4</sub> = -OHであってもよい。

【0023】

本発明はまた、次式を有する化合物の有効量を投与するステップを含む、腫瘍細胞増殖を低減する方法を提供する

【0024】

【化5】



10

【0025】

[式中、

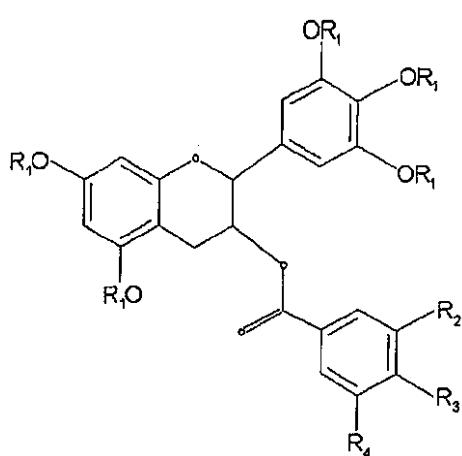
- ・R<sub>1</sub>は-Hであり、
- ・R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は各々独立に、-Hおよび-OHからなる群から選択され、
- ・R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>である場合には、R<sub>2</sub>は-OHではない]。

【0026】

本発明のもう1つの態様は、腫瘍細胞増殖を低減するための医薬の製造における、次式を有する化合物の使用を提供することである

【0027】

【化6】



30

【0028】

[式中、

- ・R<sub>1</sub>は-Hであり、
- ・R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は各々独立に、-Hおよび-OHからなる群から選択され、
- ・R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>である場合には、R<sub>2</sub>は-OHではない]。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

ここで、本発明を以下の段落において図を参照しながら実施例によって説明する。

本発明の目的、特徴および態様は、以下の説明において開示されるか、または以下の説明から明らかである。当業者には当然のことながら、本議論は、例示的実施形態の説明に

40

50

過ぎず、本発明のより広い態様を制限しようとするものではなく、より広い態様は例示的構成において具現される。

【0030】

本発明では、バイオアベイラビリティを向上させるプロドラッグ形態の(-)-EGCGを合成する。プロドラッグは、[i]中性pHの生理学的条件下での安定性の向上、[ii]in vivoで酵素によって加水分解され、その結果、親薬物が放出されるまで生物学的に不活性のままであること、[iii]最後に、プロ部分の基が低い全身毒性しか有さないことを示す。

【0031】

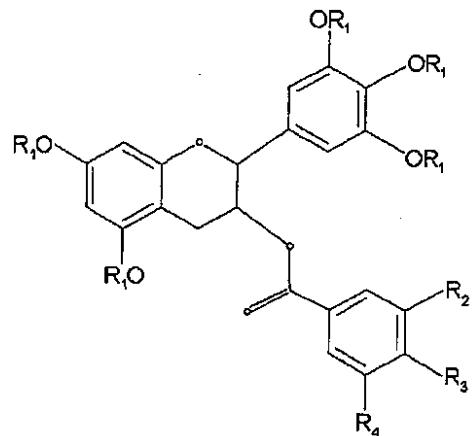
さらに、3種の(-)-EGCGの誘導体およびそのプロドラッグ形態を合成し、驚くべきことに、天然型の(-)-EGCG自体よりも高い効力を有することが分かっている。

【0032】

アルコール体の本発明の(-)-EGCGの誘導体の一般式は、次式を有する

【0033】

【化7】



10

20

【0034】

[式中、

30

- ・R<sub>1</sub>は-Hであり、
- ・R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は各々独立に、-Hおよび-OHからなる群から選択される]

。

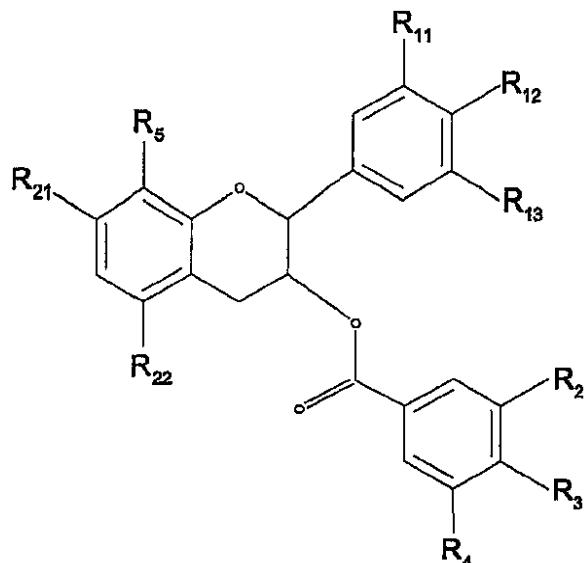
【0035】

当然ながら、R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>、R<sub>2</sub>が-OHである場合には、化合物は(-)-EGCGとなり、したがって、本発明の主題ではない。

エステル体の本発明の(-)-EGCGの誘導体の一般式は、次式を有する

【0036】

## 【化 8】



10

## 【0037】

[式中、

・ R<sub>1~1</sub>、R<sub>1~2</sub>、R<sub>1~3</sub>、R<sub>2~1</sub>、R<sub>2~2</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は各々独立に、- H および C<sub>1~C10</sub> アシルオキシル基からなる群から選択され、

20

・ R<sub>5</sub> は - H、C<sub>1~C10</sub>-アルキル、C<sub>2~C10</sub>-アルケニル、C<sub>2~C10</sub>-アルキニル、C<sub>3~C7</sub>-シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび C<sub>3~C7</sub>-シクロアルケニルからなる群から選択され、最後に記載した 7 種の基は各々、任意の組合せの 1 ~ 6 個のハロゲン原子で置換されていることができ、

・ R<sub>1~1</sub>、R<sub>1~2</sub>、R<sub>1~3</sub>、R<sub>2~1</sub>、R<sub>2~2</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> のうち少なくとも 1 個は C<sub>1~C10</sub> アシルオキシル基であり、

・ R<sub>1~1</sub>、R<sub>1~2</sub>、R<sub>1~3</sub>、R<sub>2~1</sub>、R<sub>2~2</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> のうち少なくとも 1 個は - H である]。

## 【0038】

上記の化合物の定義では、以下の群全体を表す総称を用いた。

30

C<sub>1~C6</sub> アシル：構造 - (CO) - R を有する（式中、R は、水素または 1 ~ 5 個の炭素原子を有する直鎖もしくは分岐アルキル基、例えば、メチル、エチル、プロピル、1 - メチルエチル、ブチル、1 - メチルプロピル、2 - メチルプロピル、1,1 - ジメチルエチル、ペンチル、2 - メチルブチルである）。アルキル基 R は、部分的または完全にハロゲン化されていてもよい。用語「部分的または完全にハロゲン化された」とは、このように特徴づけられた基では、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロフルオロメチル、ジクロロフルオロメチル、クロロジフルオロメチル、1 - フルオロエチル、2 - フルオロエチル、2,2 - デフルオロエチル、2,2,2 - トリフルオロエチル、2 - クロロ - 2 - フルオロエチル、2 - クロロ - 2,2 - デフルオロエチル、2,2 - デクロロ - 2 - フルオロエチル、2,2,2 - トリクロロエチルおよびペンタフルオロエチルのように、水素原子が、同一または異なるハロゲン原子で部分的または完全に置換されていてもよいことを表すものとする。

40

## 【0039】

C<sub>1~C10</sub> アシルオキシル：構造 - O - (CO) - R を有する（式中、R は - H、C<sub>1~C9</sub>-アルキル、C<sub>2~C9</sub>-アルケニル、C<sub>2~C9</sub>-アルキニル、C<sub>3~C7</sub>-シクロアルキル、フェニル、ベンジルおよび C<sub>3~C7</sub>-シクロアルケニルのうちいずれか 1 種であり得るが、最後に記載した 7 種の基は各々、直鎖または分岐アルキル基のいずれか、例えば、メチル、エチル、プロピル、1 - メチルエチル、ブチル、1 - メチルプロピル、2 - メチルプロピル、1,1 - ジメチルエチル、ペンチル、2 - メチルブチルで置

50

換されていてもよい)。アルキル基Rは、部分的または完全にハロゲン化されていてもよい。用語「部分的または完全にハロゲン化された」とは、このように特徴づけられた基では、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロフルオロメチル、ジクロロフルオロメチル、クロロジフルオロメチル、1-フルオロエチル、2-フルオロエチル、2,2-ジフルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、2-クロロ-2-フルオロエチル、2-クロロ-2,2-ジフルオロエチル、2,2-ジクロロ-2-フルオロエチル、2,2,2-トリクロロエチルおよびペントフルオロエチルのように、水素原子は同一または異なるハロゲン原子で部分的または完全に置換されていてもよいことを表すものとする。ヒドロキシメチル、2-アミノエチルまたは3-メトキシプロピル基のように、アルキル基Rは、ヒドロキシまたはアルコキシまたはアミノ基で部分的または完全に置換されていてもよい。

#### 【0040】

本発明に従い、ペルアセタート(-)-EGCG、1を合成した(図1)。1は、(-)-EGCGよりもより安定であることが分かった。プロドラッグは、精製20Sプロテアソームに対しては生物学的に不活性であったが、無傷の腫瘍細胞ではプロテアソームを強力に阻害した。さらに、無傷の腫瘍細胞への、親化合物ではなくプロドラッグの投与の結果、リン酸化Akt(p-Akt)が消失し、これは、この癌関連キナーゼの不活化を示す。最後に、1での白血病ジャーカット(Jurkat)T細胞の処理により細胞死が誘導された。

#### 【0041】

他のペルアセテート(peracetate)保護された茶ポリフェノールが、その保護されていない親よりも大きな生物活性を有するかどうかを評価するために、没食子酸の環上のヒドロキシル基が欠失している(-)-EGCGの数種の合成類似体を合成した。さらに、分子の安定性を高めるために、ヒドロキシル基をアセテートまたはベンゾエート基に変換してプロドラッグを作製した。驚くべきことに、保護された類似体は、無傷の腫瘍細胞において、その保護されていない対応物よりもより強力なプロテアソーム阻害剤であることが分かった。

#### 【0042】

本発明の化合物の合成および特性決定を以下の節で詳述する。

#### 【実施例】

#### 【0043】

##### 材料および方法

##### 試薬

ウシ胎児血清は、Tissue Culture Biologicals(Tulare, CA)から購入した。ペニシリン-ストレプトマイシン-1-グルタクスニン(Glutaxnine)の混合物、RPMIおよびDMEMはInvitrogen(Carlsbad, CA)製である。ジメチルスルホキシド(DMSO)、N-アセチル-L-システイン(NAC)、ヘキスト33342、3-(4,5)-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテオリウムブロミド(diphenylteoliniumbromide)(MTT)、ウシ血清アルブミン(BSA)および(-)-EGCGは、Sigma(St. Louis, MO)から購入した。Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC(プロテオソームのキモトリプシン様活性用)は、Biomo1(Plymouth Meeting, PA)から入手した。ウサギ由来精製20sプロテアソームは、Boston Biochem(Cambridge, MA)から入手した。Amplex Red H202アッセイキットは、Molecular Probes(Eugene, OR)から購入した。Bax(H280)およびユビキチン(P4D1)に対するモノクローナル抗体、ならびにIKB-a(C15)およびアクチン(C11)に対するポリクローナル抗体、ならびに抗ヤギ、抗ウサギおよび抗マウスIgG-ホースラディッシュペルオキシダーゼは、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)から購入した。p27に対するモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体(554069)は、BD Biosciences(San Diego, CA)から購入した。DAPIを含むVectashield Mounting Mediumは、Vector Laboratories Inc.(Burlingame, CA)から購入した。PARP切断部位に対して特異的であり、FITCが結合しているポリクローナル抗体は、Biosource(Camarillo, CA)から入手した。CaspACE FITC-VAD-FMKマーカーはPromega(Madison, WI)から購入した。

## 【0044】

合成茶ポリフェノール類似体の合成。1、2、2a、3、3a、4および4aの合成(図1)

10

1は文献の手順に従って調製したが(Kohri, T.、Nanjo, F.、Suzuki, M.、Seto, R.、Matsumoto, N.、Yamakawa, M.、Hojyo, H.、Hara, Y.、Desai, D.、Amin, S.、Conaway, C. C.、Chung, F. L. J. Agric Food Chem 2001, 49、1042~8頁)、1の合成をここに示す。1の合成には、出発材料として市販の(-)-EGCGを用いた。(-)-EGCGを無水酢酸およびピリジンで一晩処理することで、目的生成物1が収率82%で得られた(図1)。1の構造は<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMR、LRMSおよびHRMSによって確認した。

## 【0045】

## 【化9】

20

Mp 157.1°C

LRMS m/z (ESI) 817 (MNa<sup>+</sup>)

HRMS 実測値, 817.1544; C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>O<sub>19</sub>Na の理論値 817.1592.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.62 (s, 2H), 7.24 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.64 (br s, 1H), 5.18 (s, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 9H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.23 (s, 6H).

30

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 168.89, 168.40, 167.59, 167.43, 166.72, 166.20, 163.51, 154.71, 149.72, 149.64, 143.38, 143.29, 138.93, 135.06, 134.34, 127.41, 122.34, 118.79, 109.42, 109.00, 108.06, 76.46, 67.98, 25.85, 21.06, 20.75, 20.54, 20.11.

## 【0046】

(2S\*, 3R\*)-トランス-5, 7-ビス(ベンジルオキシ)-2-[3, 4, 5-トリス(ベンジルオキシ)フェニル]クロマン-3-オル(5)

この化合物は文献の手順に従って合成した(Li, L. H.、Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 3, 739~741頁)。

40

## 【0047】

(2S\*, 3R\*)-トランス-5, 7-ビス(ベンジルオキシ)-2-[3, 4, 5-トリス(ベンジルオキシ)フェニル]クロマン-3-イル-3-(ベンジルオキシ)ベンゾエート(2b)

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10mL)中、3-(ベンジルオキシ)安息香酸(0.12g、0.53mmol)の溶液に、一定量の(COCl)<sub>2</sub>(0.68mL)を加えた。この混合物を2時間還流した。その後、過剰の(COCl)<sub>2</sub>と溶媒を蒸留によって除去し、得られた残渣を真空中で一晩乾燥させた。残渣をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5mL)に再溶解し、0℃でCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10mL)中、5(0.20g、0.26mmol)およびDMAP(0.08g、0.64mmol)の溶液に加えた。次いで、この混合物を室温で一晩攪拌した

50

。飽和  $\text{NaHCO}_3$  を加えた。有機層を分離し、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、乾燥させ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させた。残渣を、カラムクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル 4 : 1)によって精製すると、化合物 2b が白色固体として得られた (0.22 g、88%)。

## 【0048】

## 【化10】

LRMS m/z (ESI) 989 ( $\text{MNa}^+$ )HRMS 実測値, 989.3657;  $\text{C}_{64}\text{H}_{54}\text{O}_9\text{Na}$  の理論値 989.3666.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)  $\delta$  7.54-7.12 (m, 30H), 6.72 (s, 2H), 6.29 (d,  $J=4.5$  Hz, 2H), 5.50 (q,  $J=7.0$  Hz, 1H), 5.10 (d,  $J=6.5$  Hz, 1H), 5.05-4.95 (m, 12H), 3.04 (dd,  $J=16.5, 6.0$  Hz, 1H), 2.89 (dd,  $J=16.5, 6.5$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz)  $\delta$  165.20, 158.81, 158.51, 157.53, 154.68, 152.73, 138.20, 137.60, 136.76, 136.64, 136.25, 133.24, 131.14, 129.32, 128.49, 128.42, 128.40, 128.29, 128.00, 127.96, 127.91, 127.80, 127.69, 127.62, 127.51, 127.43, 127.38, 127.10, 122.13, 119.93, 115.29, 106.13, 101.23, 94.25, 93.74, 78.38, 74.98, 71.07, 70.02, 69.81, 24.18.

## 【0049】

(2S\*, 3R\*) - ブラントス - 5, 7 - ビス(ヒドロキシ) - 2 - [3, 4, 5 - トリス(ヒドロキシ)フェニル]クロマン - 3 - イル - 3 - (ヒドロキシ)ベンゾエート(2)

THF / MeOH (28 mL / 28 mL) および  $\text{Pd(OH)}_2$  (0.19 g、炭素上 20%) 中、2b (0.23 g、0.24 mmol) の懸濁液を、 $\text{H}_2$  霧囲気下に置いた。得られた混合物を、反応が完了したことを tlc が示すまで室温で攪拌した。次いで、反応混合物を、綿を通して濾過して触媒を除去した。蒸発させた後、残渣をカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2 : 1)によって精製すると、生成物 2 が白色固体として得られた (80 mg、79%)。

## 【0050】

## 【化11】

LRMS m/z (ESI) 449 ( $\text{MNa}^+$ )HRMS 実測値, 449.0887;  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{Na}$  の理論値 449.0849.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz)  $\delta$  7.38-6.97 (m, 4H), 6.42 (s, 2H), 5.97 (q,  $J=2.5$  Hz, 2H), 5.40 (q,  $J=6.0$  Hz, 1H), 5.03 (d,  $J=6.0$  Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J=16.5, 5.0$  Hz, 1H), 2.74 (dd,  $J=16.5, 6.0$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz)  $\delta$  165.87, 157.00, 156.52, 156.03, 154.88, 145.42, 132.50, 130.91, 129.17, 120.29, 119.90, 115.45, 105.00, 98.07, 95.00, 94.12, 77.78, 70.15, 22.71.

## 【0051】

(2S\*, 3R\*) - ブラントス - 5, 7 - ビス(アセチルオキシ) - 2 - [3, 4, 5 - トリス(アセチルオキシ)フェニル]クロマン - 3 - イル - 3 - アセチルオキシベンゾエート(2a)

THF / MeOH (12 mL / 12 mL) および  $\text{Pd(OH)}_2$  (0.08 g、炭素上 50%) 中、2a (0.23 g、0.24 mmol) の懸濁液を、 $\text{H}_2$  霧囲気下に置いた。

20% ) 中、2b ( 0.1 g, 0.1 mmol ) の懸濁液を、H<sub>2</sub>雰囲気下に置いた。得られた混合物を、反応が完了したことを tlc が示すまで室温で攪拌した。次いで、反応混合物を、綿を通して濾過して触媒を除去した。濾液を蒸発させると、脱ベンジル化化合物 ( 2 ) が得られ、これを精製せずに直ちに次のステップに用いた。得られた脱ベンジル化化合物をピリジン ( 4 mL ) および無水酢酸 ( 2 mL ) に溶解した。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。その後、無水酢酸およびピリジンを真空除去した。得られた残渣を 20 mL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中に回収し、この溶液を 5 × H<sub>2</sub>O 5 mL およびブライン 5 mL で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、蒸発させた。粗生成物をカラムクロマトグラフィー ( ヘキサン : 酢酸エチル 1 : 1 ) によって精製すると、化合物 2a が白色粉末として得られた ( 0.061 g, 85% )。

10

## 【0052】

## 【化12】

Mp 71.6°C

LRMS m/z (ESI) 701 (MNa<sup>+</sup>)HRMS 実測値, 701.1541 C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>Na の理論値 701.1482.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.79 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.42 (t, J=8.0 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.17 (s, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.46 (q, J=5.5 Hz, 1H), 5.32 (d, J=5.5 Hz, 1H), 3.02 (dd, J=17.0, 5.0 Hz, 1H), 2.80 (dd, J=17.0, 6.0 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 9H).

20

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 169.10, 168.81, 168.24, 167.47, 166.61, 164.61, 154.00, 150.42, 149.76, 149.28, 143.47, 135.74, 134.48, 130.72, 129.42, 127.18, 126.68, 122.79, 118.58, 109.84, 108.81, 107.54, 69.17, 23.65, 20.96, 20.92, 20.65, 20.47, 20.10.

30

## 【0053】

( 2S\*, 3R\* ) - トランス - 5 , 7 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 2 - [ 3 , 4 , 5 - トリス ( ベンジルオキシ ) フェニル ] クロマン - 3 - イル 4 - ( ベンジルオキシ ) ベンゾエート ( 3b )

標題化合物を、5 ( 0.08 g, 0.1 mmol ) および 4 - ( ベンジルオキシ ) 安息香酸 ( 0.049 g, 0.22 mmol ) を用い、2b について記載した方法と同様に調製すると、3b が白色固体として得られた ( 0.087 g, 90% )。

## 【0054】

## 【化13】

LRMS m/z (ESI) 989 (MNa<sup>+</sup>)HRMS 実測値, 989.3666 C<sub>64</sub>H<sub>54</sub>O<sub>9</sub>Na の理論値 989.3666.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.91 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.47-7.22 (m, 30H), 6.95 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.74 (s, 2H), 6.31 (dd, *J*=5.5, 2.5 Hz, 2H), 5.52 (q, *J*=6.5 Hz, 1H), 5.14 (d, *J*=6.5 Hz, 1H), 5.07-4.97 (m, 12H), 3.02 (dd, *J*=17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J*=16.5, 7.0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 165.08, 162.49, 158.76, 157.53, 154.65, 152.69, 138.09, 137.63, 136.79, 136.70, 136.66, 136.00, 133.38, 131.61, 128.55, 128.49, 128.40, 128.29, 128.09, 127.96, 127.91, 127.78, 127.69, 127.62, 127.43, 127.38, 127.30, 127.09, 122.40, 114.33, 106.08, 101.30, 94.22, 93.67, 78.37, 74.98, 71.05, 69.95, 69.79, 69.26, 24.01.

## 【0055】

(2S\*, 3R\*)-トランス-5, 7-ビス(ヒドロキシ)-2-[3, 4, 5-トリス(ヒドロキシ)フェニル]クロマン-3-イル 4-(ヒドロキシ)ベンゾエート(3)

標題化合物を、3b (0.24 g, 0.25 mmol) を用い、2について記載した方法と同様に調製すると、3が白色固体として得られた (79 mg, 75%)。

## 【0056】

## 【化14】

LRMS m/z (ESI) 449 (MNa<sup>+</sup>)HRMS 実測値, 449.0840; C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>Na の理論値 449.0849.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δ 7.75 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.77 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.42 (s, 2H), 5.95 (dd, *J*=8.0, 2.5 Hz, 2H), 5.35 (q, *J*=6.0 Hz, 1H), 5.00 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 2.85 (dd, *J*=16.5, 5.0 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J*=16.5, 6.5 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz) δ 165.88, 161.99, 156.54, 156.05, 154.95, 145.41, 132.46, 131.31, 129.25, 120.61, 114.57, 104.98, 98.14, 94.91, 94.04, 78.00, 69.81, 22.98.

## 【0057】

(2S\*, 3R\*)-トランス-5, 7-ビス(アセチルオキシ)-2-[3, 4, 5-トリス(アセチルオキシ)フェニル]クロマン-3-イル 4-(アセチルオキシ)ベンゾエート(3a)

標題化合物を、3b (0.15 g, 0.16 mmol) を用い、2aについて記載した方法と同様に調製すると、3aが白色固体として得られた (92.6 mg, 88%)。

## 【0058】

## 【化15】

Mp 189.4°C

LRMS m/z (ESI) 701 (MNa<sup>+</sup>)

HRMS 実測値, 701.1467; C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>Na の理論値 701.1482.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.94 (d, J=9.0 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.13 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.69 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.63 (d, J=2.0 Hz, 1H), 5.45 (q, J=6.0 Hz, 1H), 5.32 (d, J=6.0 Hz, 1H), 3.01 (dd, J=16.5, 5.0 Hz, 1H), 2.79 (dd, J=16.5, 6.0 Hz, 1H); 2.31 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 168.81, 168.64, 168.26, 167.49, 166.62, 164.74, 154.48, 154.02, 149.76, 149.30, 143.49, 135.82, 134.50, 131.28, 126.76, 121.60, 118.59, 109.90, 108.80, 107.51, 69.01, 23.64, 20.97, 20.63, 20.46, 20.00.

## 【0059】

(2S\*, 3R\*) - トランス - 5, 7 - ビス (ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4, 5 - トリス (ベンジルオキシ) フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 5 - ビス (ベンジルオキシ) ベンゾエート (4b)

標題化合物を、5(0.3g、0.4mmol)および3, 5 - ビス (ベンジルオキシ) 安息香酸(0.27g、0.81mmol)を用い、2bについて記載した方法と同様に調製すると、4bが白色固体として得られた(0.36g、85%)。

## 【0060】

## 【化16】

LRMS m/z (ESI) 1095 (MNa<sup>+</sup>)

HRMS 実測値, 1095.4059; C<sub>71</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>Na の理論値 1095.4084.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.47-7.17 (m, 35H), 6.76 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.30 (d, J=4.5 Hz, 2H), 5.48 (q, J=7.0 Hz, 1H), 5.08 (d, J=7.0 Hz, 1H), 5.04-4.92 (m, 14H), 3.07 (dd, J=17.0, 5.5 Hz, 1H), 2.85 (dd, J=17.0, 7.0 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 165.14, 159.73, 158.98, 157.67, 154.88, 152.87, 137.77, 136.91, 136.82, 136.78, 136.29, 133.35, 131.86, 128.61, 128.56, 128.52, 128.41, 128.15, 128.10, 128.02, 127.94, 127.81, 127.76, 127.67, 127.51, 127.24, 108.52, 106.93, 106.30, 101.38, 94.43, 93.93, 78.57, 75.12, 71.17, 70.26, 70.15, 70.11, 69.92, 24.58.

## 【0061】

(2S\*, 3R\*) - トランス - 5, 7 - ビス (ヒドロキシ) - 2 - [3, 4, 5 - トリス (ヒドロキシ) フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 5 - ビス (ヒドロキシ) ベンゾエート (4)

標題化合物を、4b(0.17g、0.16mmol)を用い、2について記載した方法と同様に調製すると、4が白色固体として得られた(50mg、71%)。

## 【0062】

## 【化17】

LRMS m/z (ESI) 465 (MNa<sup>+</sup>)HRMS 実測値, 465.0844; C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>Na の理論値 465.0798.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz) δ 6.85 (d, J=2.0 Hz, 2H), 6.44 (t, J=2.0 Hz, 1H), 6.41 (s, 2H), 5.96 (s, 2H), 5.40 (dd, J=10.5, 5.0 Hz, 1H), 5.05 (d, J=5.0 Hz, 1H), 2.80 (dd, J=16.5, 5.0 Hz, 1H), 2.73 (dd, J=16.5, 5.0 Hz, 1H).

10

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz) δ 165.81, 158.10, 156.56, 156.06, 154.83, 145.43, 132.44, 131.49, 129.28, 107.34, 106.86, 104.81, 97.93, 94.88, 94.06, 77.60, 69.95, 22.28.

## 【0063】

(2S\*, 3R\*) - トランス - 5, 7 - ビス (アセチルオキシ) - 2 - [3, 4, 5 - トリス (アセチルオキシ) フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 5 - ビス (アセチルオキシ) ベンゾエート (4a)

標題化合物を、4b (0.15g, 0.14mmol) を用い、2aについて記載した方法と同様に調製すると、4aが白色固体として得られた (72mg, 70%)。

## 【0064】

## 【化18】

Mp 105.5°C

LRMS m/z (ESI) 759 (MNa<sup>+</sup>)HRMS 実測値, 759.1530; C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>O<sub>17</sub>Na の理論値 759.1537.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz) δ 7.54 (d, J=2.0 Hz, 2H), 7.17 (s, 2H), 7.13 (t, J=2.0 Hz, 1H), 6.69 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.64 (d, J=2.0 Hz, 1H), 5.45 (q, J=6.0 Hz, 1H), 5.29 (d, J=6.5 Hz, 1H), 3.01 (dd, J=17.0, 5.0 Hz, 1H), 2.79 (dd, J=17.0, 6.5 Hz, 1H), 2.30 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 6H).

30

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) δ 168.80, 168.62, 168.21, 167.45, 166.60, 163.78, 153.96, 150.78, 149.77, 149.27, 143.46, 135.55, 134.48, 131.26, 120.57, 120.29, 118.56, 109.79, 108.86, 107.57, 69.48, 23.77, 20.94, 20.86, 20.64, 20.45, 19.99.

## 【0065】

化合物1、2、3および4のカルボキシレート基または-OH基は容易にアシリル交換を受け得るので、当業者はこれらの化合物のカルボキシレート基上のアシリル基を交換できるはずである。

40

## 【0066】

合成茶ポリフェノール類似体の合成概要

民間の供給業者から購入した出発材料および試薬を、さらに精製することなく用いた。(2R, 3S) トランスおよび(2R, 3R) - シス - 5, 7 - ビス (ベンジルオキシ) - 2 - [4 - ベンジルオキシフェニル] クロマン - 3 - オル、(2R, 3S) トランスおよび(2R, 3R) - シス - 5, 7 - ビス (ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4 - ビス (ベンジルオキシ) - フェニル] クロマン - 3 - オル、(2R, 3R) - シス - 5, 7 - ビス

50

(ヒドロキシル) - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル)クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートの調製には文献の手順を用いた (Sheng Biao Wan, Tak Hang Chan. *Tetrahedron*, 2004, 60, 8207 頁)。

【0067】

無水 THF は、窒素下、ナトリウムベンゾフェノンケチルから蒸留した。無水塩化メチレンは、窒素下、CaH<sub>2</sub> から蒸留した。無水DMF は、真空下、CaH<sub>2</sub> から蒸留した。反応フラスコをN<sub>2</sub> 流下でフレーム乾燥した。感湿性の反応はすべて、窒素雰囲気下で実施した。フラッシュクロマトグラフィーはシリカ - ゲル 60 (70 ~ 230 メッシュ) を用いて実施した。融点は修正しなかった。<sup>1</sup>H-NMR および<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz) スペクトルは、CDCl<sub>3</sub> およびアセトン-d<sub>6</sub> を溶媒として用いた場合には、内部標準としてTMS を用いて測定した。高分解能(ESI)MS スペクトルは、QTOF - 2 Micromass 社製分光計を用いて記録した。

【0068】

(+ ) - (2R, 3S) - 5, 7 - ビス(ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4 - ビス(ベ  
ンジルオキシ)フェニル]クロマン - 3 - イル 4 - ベンジルオキシベンゾエート (10  
2)

N<sub>2</sub> 雰囲気下、乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) および1滴のDMF 中、4 - ベンジルオキシ安息香酸 (140 mg, 0.61 mmol) の溶液を、塩化オキサリル (1 mL) とともに3時間還流した。過剰の塩化オキサリルおよび溶媒を、蒸留によって除去し、残渣を真空下で3時間乾燥させ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解した。0 で、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) 中、(2R, 3S) - トランス - 5, 7 - ビス(ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4 - ビス(ベンジルオキシ)フェニル]クロマン - 3 - オル (195 mg, 0.3 mmol) およびDMAP (75 mg, 0.62 mmol) の溶液に、この溶液を滴下した。混合物を一晩攪拌し、次いで、飽和NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を加えた。有機層を分離し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で水層を抽出した。有機相を合わせ、乾燥させ(MgSO<sub>4</sub>)、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(EtOAc/n - ヘキサン = 1 / 4 v/v) によって精製すると、目的化合物が得られた (220 mg, 85.0%)。EtOAc およびn - ヘキサン中で再結晶化させると、白色粉末が得られた：融点148 ~ 150 °C, [α]<sub>D</sub> = +18.3 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>)。

【0069】

【化19】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):

δ 7.88 (d, J=8.6 Hz, 2 H), 7.43-7.28 (m, 25 H), 7.01 (s, 1 H), 6.93-6.88 (m, 4 H), 6.28 (s, 2 H), 5.53-5.50 (m, 1 H), 5.14 (d, J=6.4 Hz, 1 H), 5.11 (s, 2 H), 5.07 (s, 2 H), 5.04 (s, 2 H), 5.02 (s, 2 H), 5.01 (s, 2 H), 3.04 (A of ABq, J=16.8, 4.6 Hz, 1 H), 2.87 (B of ABq, J=16.8, 6.3 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 165.0, 162.3, 158.6, 157.4, 154.6, 148.5, 136.9, 136.6, 136.5, 135.9, 131.4, 130.9, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 127.1, 126.9, 122.3, 119.5, 114.6, 114.1, 113.1, 101.1, 94.1, 93.4, 78.0, 71.0, 70.9, 69.9, 69.8, 69.6, 69.1, 23.8; HRMS (ESI) calcd for C<sub>57</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>Na (M+Na) 883.3247, found 883.3241.

【0070】

(-) - (2R, 3R) - 5, 7 - ビス(ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4 - ビス(ベ  
ンジルオキシ)フェニル]クロマン - 3 - イル 4 - ベンジルオキシベンゾエート (10  
4)

102 の調製手順に続いて、4 - ベンジルオキシ安息香酸を用いて、(2R, 3R) - シス - 5, 7 - ビス(ベンジルオキシ) - 2 - [3, 4 - ビス(ベンジルオキシ)フェニ

10

20

30

40

50

ル] クロマン-3-オルをエステル化すると、104が得られ、収率86%であった。融点149~151、 $[\eta]_D = -3.1$  ( $c = 1.5$ 、CHCl<sub>3</sub>)、

【0071】

【化20】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.92 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.44-7.26 (m, 25 H), 7.15 (d, J=1.6 Hz, 1 H), 6.91-6.87 (m, 4 H), 6.32 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 6.28 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 5.63 (bs, 1 H), 5.08 (s, 2 H), 5.06 (s, 1 H), 5.03-5.00 (m, 6 H), 4.92 (AB, J=11.6 Hz, 2 H), 3.08 (bs, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  165.1, 162.5, 158.6, 157.9, 155.6, 148.9, 148.7, 137.1, 137.0, 136.8, 136.7, 136.0, 131.8, 131.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 122.5, 119.9, 114.6, 114.3, 113.5, 100.9, 94.6, 93.7, HRMS (ESI) calcd for C<sub>57</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>Na (M+Na) 883.3244, found 883.3241.

【0072】

(+) - (2R, 3S) - 5, 7 - ピス(ベンジルオキシ) - 2 - (4 - ベンジルオキシフェニル) クロマン - 3 - イル 4 - ベンジルオキシベンゾエート (110)

102の調製手順に続いて、4 - ベンジルオキシ安息香酸を用いて、(2R, 3S) - 5, 7 - ピス(ベンジルオキシ) - 2 - (4 - ベンジルオキシフェニル) クロマン - 3 - オルをエステル化すると、110が得られ、収率86%であった。融点117~119、 $[\eta]_D = +24.5$  ( $c = 1.2$ 、CHCl<sub>3</sub>)、

【0073】

【化21】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.86 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.42-7.26 (m, 22 H), 6.92 (AB, J=2.6 Hz, 4 H), 6.29 (AB, J=1.9 Hz, 2 H), 5.56-5.51 (m, 1 H), 5.17 (d, J=6.5 Hz, 1 H), 5.05 (s, 2 H), 4.98 (s, 4 H), 4.97 (s, 2 H), 3.10 (A of ABq, J=16.8, 5.4 Hz, 1 H), 2.88 (B of ABq, J=16.8, 6.6 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  165.2, 162.4, 158.8, 158.6, 157.6, 155.0, 136.8, 136.7, 136.1, 131.6, 130.3, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.5, 127.3, 127.1, 122.5, 114.8, 114.3, 101.4, 94.3, 93.6, 78.3, 70.0, 69.9, 69.8, 69.4, 24.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>50</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>Na (M+Na) 777.2828, found 777.2840.

【0074】

(-) - (2R, 3R) - 5, 7 - ピス(ベンジルオキシ) - 2 - (4 - ベンジルオキシフェニル) クロマン - 3 イル 4 - ベンジルオキシベンゾエート (111)

102の調製手順に続いて、4 - ベンジルオキシ安息香酸を用いて、(2R, 3R) - 5, 7 - ピス(ベンジルオキシ) - 2 - (4 - ベンジルオキシフェニル) クロマン - 3 - オルをエステル化すると、111が得られ、収率88%であった。融点129~131、 $[\eta]_D = -51.8$  ( $c = 3.9$ 、CHCl<sub>3</sub>)、

【0075】

## 【化22】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.88 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.43-7.27 (m, 22 H), 6.91 (s, 2 H), 6.89 (s, 2 H), 6.33 (d, J=2.0 Hz, 1 H), 6.27 (d, J=2.0 Hz, 1 H), 5.62 (bs, 1 H), 5.11 (bs, 1 H), 5.05 (s, 2 H), 5.01 (s, 2 H), 4.98 (s, 4 H), 3.09 (d, J=2.9 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 165.3, 162.4, 158.6, 158.4, 157.9, 155.6, 136.8, 136.7, 136.1, 131.7, 130.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 122.5, 114.5, 114.3, 100.9, 94.6, 93.7, 77.4, 70.0, 69.9, 69.8, 68.1, 26.0; HRMS (ESI) calcd for C<sub>50</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>Na (M+Na) 777.2828, found 777.2815.

10

## 【0076】

(+) - (2R, 3S) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 2 - (3, 4 - ジヒドロキシフェニル)クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエート(11)

H<sub>2</sub> 霧囲気下、THF / MeOH (1:1 v/v, 20 mL) の溶媒混合物中、102 (200 mg, 0.23 mmol) の溶液に、Pd(OH)<sub>2</sub> / C (20%, 100 mg) を加えた。得られた反応混合物を H<sub>2</sub> 下、室温で 6 時間攪拌し、反応が完了したことは TLC によって示された。反応混合物を濾過して触媒を除去した。濾液を蒸発させ、残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフ (10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、次いで、20% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) によって迅速に精製すると、11 が得られた (82 mg、収率 87%)：融点 220 ~ 222 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = +87.2 (c = 2.0, EtOH)。

20

## 【0077】

## 【化23】

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.98 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.13 (s, 1 H), 7.04 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 6.99-6.96 (m, 2 H), 6.27 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.19 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.62 (dd, J=11.8, 6.3 Hz, 1 H), 5.34 (d, J=6.3 Hz), 3.15 (A of ABq, J=16.5, 5.2 Hz, 1 H), 3.00 (B of ABq, J=16.5, 6.4 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 163.3, 160.0, 155.2, 154.5, 153.6, 143.1, 129.9, 128.7, 119.6, 116.6, 113.4, 113.3, 111.8, 111.7, 96.7, 93.8, 93.0, 76.2, 67.9, 21.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na (M+Na) 433.0899, found 433.0909.

30

## 【0078】

(-) - (2R, 3R) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 2 - (3, 4 - ジヒドロキシフェニル)クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエート(12)

11 の調製手順に続いて、104 を水素分解すると、12 が得られ、収率は 85% であった。融点 241 ~ 243 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = -145.2 (c = 0.5, EtOH)、(Lit - 144.4, c = 1, Me<sub>2</sub>CO 中)、<sup>4</sup>

40

## 【0079】

## 【化24】

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.89 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 7.19 (d, J=1.9 Hz, 1 H), 7.01 (A of ABq, J=8.2, 1.9 Hz, 1 H), 6.97 (d, J=8.8 Hz, 2 H), 6.89 (B of AB, J=8.2 Hz, 1 H), 6.17 (d, J=2.3 Hz, 1 H), 6.14 (d, J=2.3 Hz, 1 H), 5.65 (m, 1 H), 5.24 (bs, 1 H), 3.19 (A of ABq, J=17.4, 4.5 Hz, 1 H), 3.07 (B of AB, J=17.4, 2.0 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 164.8, 161.6, 156.8, 156.4, 156.0, 144.6, 144.5, 131.5, 130.3, 121.4, 118.0, 114.9, 114.6, 113.8, 97.8, 95.4, 94.7, 76.9, 68.5, 25.5; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na (M+Na) 433.0899, found 433.0895.

10

## 【0080】

(+) - (2R, 3S) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエート (112)

11の調製手順に続いて、110を水素分解すると、112が得られ、収率は90%であった。融点 253 ~ 255 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = +45.9 (c = 3.5, EtOH)。

## 【0081】

## 【化25】

20

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.74 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 7.26 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 6.81 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 6.76 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 6.04 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.95 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.39 (dd, J=12.4, 6.9 Hz, 1 H), 5.11 (d, J=6.9 Hz, 1 H), 3.21 (A of ABq, J=16.3, 5.3 Hz, 1 H), 2.98 (B of ABq, J=16.3, 7.0 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 163.7, 160.6, 156.0, 155.9, 155.1, 154.3, 130.4, 128.3, 126.8, 120.1, 113.9, 97.3, 94.4, 93.5, 77.0, 68.5, 23.0; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>Na (M+Na) 417.0950, found 417.0946.

30

## 【0082】

(-) - (2R, 3R) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエート (10)

11の調製手順に続いて、111を水素分解すると、10が得られ、収率は89%であった。融点 214 ~ 216 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = -116.1 (c = 2.0, EtOH)。

## 【0083】

## 【化26】

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.94 (d, J=8.6 Hz, 2 H), 7.56 (d, J=8.6 Hz, 2 H), 7.01 (d, J=6.8 Hz, 2 H), 6.95 (d, J=6.8 Hz, 2 H), 6.22 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.20 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.73 (bs, 1 H), 5.37 (bs, 1 H), 3.26 (A of ABq, J=17.4, 4.5 Hz, 1 H), 3.14 (B of ABq, J=17.4, 2.2 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 164.5, 161.3, 156.6, 156.5, 156.1, 155.8, 131.2, 129.3, 127.5, 121.1, 114.7, 114.4, 97.5, 95.2, 94.5, 76.7, 68.2, 25.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>Na (M+Na) 417.0950, found 417.0946.

40

## 【0084】

50

( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエートペンタアセテート ( 22 \* )

N<sub>2</sub> 霧囲気下、0で、ピリジン(1ml)中、( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエート 11 ( 20mg, 0.048mmol ) の溶液に、無水酢酸(0.2ml)を滴下した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。過剰のピリジンを真空下で蒸留した。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフ(EtOAc/n-ヘキサン、v/vで1/1)によって精製すると、22\*が得られた(34mg、収率95%)。融点：融点149~151、[η]<sub>D</sub>=+42.5(c=1.2, CHCl<sub>3</sub>)、

【0085】

【化27】

10

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.96  
9d, J=8.7 Hz, 2H), 7.31 (A of ABq, J=8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.26 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.21 (B of AB, J=8.4 Hz, 1H), 7.15 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.70 (d, J=2.2 Hz, 1H), 6.63 (d, J=2.2 Hz, 1H), 5.51 (dd, J=11.2, 6.0 Hz, 1H), 5.33 (d, J=6.0 Hz, 1H), 3.04 (A of ABq, J=16.8, 5.0 Hz, 1H), 2.83 (B of ABq, J=16.8, 6.0 Hz, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 6H);  
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 168.8, 168.7, 168.3, 167.9, 164.8, 154.5, 154.3, 149.8, 149.4,  
142.2, 142.1, 136.1, 131.3, 126.9, 124.3, 123.7, 122.0, 121.6, 121.3, 110.0, 108.7, 107.6, 77.7,  
69.1, 23.9, 21.0, 20.7, 20.5; HRMS (ESI) calcd for C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>O<sub>13</sub>Na (M+Na) 643.1428; found  
643.1437.

20

【0086】

( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエートペンタアセテート ( 23 \* )

22\*の調製手順に続いて、12をアセチル化すると、23\*が得られ、収率は96%であった。融点91~93、[η]<sub>D</sub>=-26.5(c=0.5, CHCl<sub>3</sub>)、

【0087】

【化28】

30

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.89 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.37 (d, J=1.9 Hz, 1H), 7.34 (A of ABq, J=8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.21 (B of AB, J=8.4 Hz, 1H), 7.10 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.74 (d, J=2.2 Hz, 1H), 6.59 (d, J=2.2 Hz, 1H), 5.64 (bs, 1H), 5.22 (bs, 1H), 3.11 (A of ABq, J=18.0, 4.5 Hz, 1H), 3.04 (B of ABq, J=18.0, 2.4 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 168.8, 168.6, 168.3, 167.9, 167.8, 164.9, 154.9, 154.4, 149.7, 142.0, 141.8, 135.7, 131.3, 126.9, 124.2, 123.4, 121.7, 121.5, 109.5, 108.8, 108.0, 67.5, 26.0, 21.0, 20.7, 20.5; HRMS (ESI) calcd for C<sub>32</sub>H<sub>28</sub>O<sub>13</sub>Na (M+Na) 643.1428; found 643.1420.

40

【0088】

( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートヘプタアセテート ( 24 \* )

22\*の調製手順に続いて、( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートをアセチル化すると(Sheng Biao Wan, Di Chen, Q. Pi

50

ng Dou and Tak Hang Chan. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12, 3521 頁)、24\* が得られ、収率は 95 % であった。融点 140 ~ 142 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +35.3 (c = 3.0, CHCl<sub>3</sub>)。

【0089】

【化29】

### <sup>1</sup>H NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.67 (s, 2 H), 7.28-7.26 (m, 2 H), 7.20 (d, J=8.3 Hz, 1 H), 6.68 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.62 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.47 (dd, J=11.8, 6.2 Hz, 1 H), 5.27 (d, J=6.2 Hz, 1 H), 3.02 (A of ABq, J=16.8, 5.2 Hz, 1 H), 2.81 (B of ABq, J=16.8, 6.6 Hz, 1 H), 2.29 (m, 9 H), 2.27 (s, 3 H), 2.26 (s, 3 H), 2.25 (s, 6 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 168.8, 168.2, 167.8, 167.5, 166.2, 163.3, 154.2, 149.8, 149.3, 143.3, 142.1, 138.9, 135.7, 127.5, 124.2, 123.7, 122.2, 121.6, 109.9, 108.8, 107.6, 77.5, 69.7, 24.0, 21.0, 20.7, 20.5, 20.0; ; HRMS (ESI) calcd for C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>O<sub>17</sub>Na (M+Na) 759.1537; found 759.1552.

【0090】

( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートヘプタアセテート ( 25 \* )

22\* の調製手順に続いて、( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 3 , 4 - ジヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートをアセチル化すると ( Sheng Biao Wan, Di Chen, Q. Ping Dou and Tak Hang Chan. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12, 3521 頁)、25\* が得られ、収率は 93 % であった。融点 105 ~ 107 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -14.5 (c = 1.2, CHCl<sub>3</sub>)。

【0091】

【化30】

### <sup>1</sup>H NMR

(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.62 (s, 2 H), 7.33 (d, J=1.2 Hz, 1 H), 7.31 (A of AB, J=8.4 Hz, 1 H), 7.20 (B of AB, J=8.4 Hz, 1 H), 6.73 (d, J=2.0 Hz, 1 H), 6.60 (d, J=2.0 Hz, 1 H), 5.63 (bs, 1 H), 5.20 (bs, 1 H), 3.10 (A of ABq, J=18.0, 4.5 Hz, 1 H), 3.00 (B of AB, J=18.0 Hz, 1 H), 2.28-2.27 (m, 15 H), 2.25 (s, 3 H), 2.23 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 168.8, 168.3, 167.9, 167.4, 166.2, 163.5, 154.9, 149.7, 143.3, 142.0, 141.9, 138.9, 135.3, 127.4, 124.3, 123.5, 122.2, 121.8, 109.4, 108.9, 108.0, 68.1, 25.9, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1; ; HRMS (ESI) calcd for C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>O<sub>17</sub>Na (M+Na) 759.1537; found 759.1571.

【0092】

( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエートテトラアセテート ( 114 )

22\* の調製手順に続いて、112 をアセチル化すると、114 が得られ、収率は 91 % であった。融点 167 ~ 169 °C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +3.2 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)。

【0093】

## 【化31】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.94 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 7.42 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 7.14 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 7.09 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 6.69 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 6.61 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 5.53 (dd, J=11.5, 6.3 Hz, 1 H), 5.31 (d, J=6.3 Hz, 2 H), 3.01 (A of ABq, J=16.7, 5.1 Hz, 1 H), 2.81 (B of ABq, J=16.7, 6.3 Hz, 1 H), 2.30 (s, 3 H), 2.28 (s, 3 H), 2.27 (s, 3 H), 2.25 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 169.1, 168.8, 168.7, 168.3, 164.7, 154.6, 154.5, 150.7, 149.8, 149.4, 134.8, 131.2, 127.5, 127.0, 121.8, 121.6, 110.2, 108.6, 107.6, 78.1, 69.1, 24.1, 21.0, 20.7; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>O<sub>11</sub> (M+H) 563.1553; found 563.1567; and calcd for C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>Na (M+Na) 585.1373; found 585.1387.

10

## 【0094】

( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 4 - ヒドロキシベンゾエートテトラアセテート ( 21 \* )

22\*の調製手順に続いて、10をアセチル化すると、21\*が得られ、収率は89%であった。融点144~145、[ ]<sub>D</sub>=-30.7 (c=2.5, CHCl<sub>3</sub>)、

## 【0095】

## 【化32】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.90 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 7.49 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 7.10 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 7.08 (d, J=8.7 Hz, 2 H), 6.74 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 6.59 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 5.64 (bs, 1 H), 5.22 (s, 1 H), 3.12 (A of ABq, J=17.7, 4.4 Hz, 1 H), 3.02 (B of ABq, J=17.7, 1.8 Hz, 1 H), 2.28 (s, 6 H), 2.27 (s, 3 H), 2.25 (s, 3 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 169.1, 168.9, 168.7, 168.4, 164.8, 155.2, 154.4, 150.5, 149.7, 134.5, 131.2, 127.4, 126.9, 121.6, 109.7, 108.7, 108.0, 67.7, 26.2, 21.0, 20.7; HRMS (ESI) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>Na (M+Na) 585.1373; found 585.1371.

20

## 【0096】

( + ) - ( 2 R , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートヘキサアセテート ( 16 \* )

22\*の調製手順に続いて、(+) - (2R, 3S) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) クロマン - 3 - イル 3, 4, 5 - トリヒドロキシベンゾエートをアセチル化すると (Sheng Biao Wan, Tak Hang Chan. Tetrahedron, 2004, 60, 8207頁)、16\*が得られ、収率は93%であった。融点96~98、[ ]<sub>D</sub>=+17.7 (c=1.0, CHCl<sub>3</sub>)、

## 【0097】

30

40

## 【化33】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.66 (s, 2 H), 7.41 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 7.10 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 6.68 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 6.62 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 5.51 (dd, J=12.2, 6.7 Hz, 1 H), 5.26 (d, J=6.7 Hz, 1 H), 3.02 (A of ABq, J=16.7, 5.3 Hz, 1 H), 2.81 (B of ABq, J=16.7, 6.6 Hz, 1 H), 2.30 (s, 6 H), 2.29 (s, 3 H), 2.28 (s, 3 H), 2.27 (s, 6 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 169.1, 168.8, 168.3, 167.5, 166.2, 163.3, 154.5, 150.7, 149.9, 149.4, 143.4, 138.9, 134.5, 127.5, 122.2, 121.8, 110.1, 108.7, 107.7, 78.0, 69.8, 24.3, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1; HRMS (ESI) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>Na (M+Na) 701.1482; found 701.1490.

10

## 【0098】

( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートヘキサセテート ( 19 \* )

22 \* の調製手順に続いて、( - ) - ( 2 R , 3 R ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - ( 4 - ヒドロキシフェニル ) クロマン - 3 - イル 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエートをアセチル化すると ( Sheng Biao Wan, Tak Hang Chan. Tetrahedron, 2004, 60, 8207 頁)、19 \* が得られ、収率は 91 % であった。融点 152 ~ 154 °C, [α]<sub>D</sub> = -35.5 (c = 2.5, CHCl<sub>3</sub>)、

20

## 【0099】

## 【化34】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.62 (s, 2 H), 7.46 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 7.11 (d, J=8.5 Hz, 2 H), 6.73 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 6.60 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 5.60 (bs, 1 H), 5.21 (s, 1 H), 3.10 (A of ABq, J=17.8, 4.5 Hz, 1 H), 3.00 (B of ABq, J=17.8, 1.8 Hz, 1 H), 2.28-2.26 (m, 18 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 169.1, 168.8, 168.3, 167.4, 166.2, 163.5, 155.1, 150.6, 149.7, 143.3, 138.8, 134.2, 127.5, 127.4, 122.2, 121.7, 109.5, 108.8, 108.0, 77.2, 68.3, 26.0, 21.0, 20.7, 20.5, 20.1; HRMS (ESI) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>Na (M+Na) 701.1482; found 701.1452.

30

## 【0100】

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 6 - ヒドロキシフェニル ] - 1 - フェニル - プロパン ( # a )

文献の手順 ( Li, L., Chan, T. H. Org. Lett. 2001, 5, 739 頁) に従って、シンナミルアルコールを、3 , 5 - ジベンジルオキシフェノールと反応させると、( # a ) が白色固体として得られた ( 収率 62 % )、融点 76 ~ 78 °C、

## 【0101】

## 【化35】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.40-7.24 (m, 15 H), 6.48(A of AB, J=15.9 Hz, 1 H), 6.35 (B of ABt, J=15.9, 5.5 Hz, 1 H), 6.27 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 6.16 (d, J=2.1 Hz, 1 H), 5.07 (s, 1H), 5.02 (s, 2 H), 4.99 (s, 2 H), 3.59-3.57 (d, J=5.5 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 158.5, 157.6, 155.4, 137.0, 136.8, 136.6, 130.2, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.3, 127.0, 126.8, 125.8, 106.6, 94.8, 93.4, 70.1, 69.9, 26.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>Na (M+Na) 445.1780, found 445.1793.

40

## 【0102】

50

( + ) - ( 1 S , 2 S ) - 3 - [ 2 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 6 - ヒドロキシフ  
エニル ] - 1 - フェニルプロパン - 1 , 2 - ジオール ( ( + ) - # b )

出発材料として ( # a ) およびジヒドロキシリ化試薬として A D - ミックス - を用いるが、文献の手順 ( L i , L . 、 C h a n , T . H . O r g . L e t t . 2 0 0 1 、 5 、 7 3 9 頁) に従って、 ( + ) - # b が白色固体として得られた ( 収率 4 7 % ) 、融点 1 2 1 ~ 1 2 3 、 [ ]<sub>D</sub> = + 4 . 7 ( c = 0 . 6 、 C H C l<sub>3</sub> ) 、

【 0 1 0 3 】

【 化 3 6 】

<sup>1</sup>H NMR

10

( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.38-7.19 (m, 13 H), 7.10 (m, 2 H), 6.23 (d, J=2.3 Hz, 1 H), 6.17 (d, J=2.3 Hz, 1 H), 4.94 (s, 2 H), 4.82 (AB, J=11.7 Hz, 2 H), 4.47 (d, J=6.6 Hz, 1 H), 3.97 (m, 1 H), 2.88 (A of ABt, J=14.6, 3.6 Hz, 1 H), 2.72 (b of ABt, J=14.6, 8.6 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 158.8, 157.6, 157.0, 140.0, 136.6, 136.5, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.7, 127.4, 127.3, 126.8, 126.5, 105.9, 95.6, 93.2, 76.6, 69.8, 69.7, 26.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>Na (M+Na) 479.1834, found 479.1841.

【 0 1 0 4 】

20

( + ) - ( 2 S , 3 S ) - シス - 5 , 7 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 2 - フェニルクロ  
マン - 3 - オル ( ( + ) - # c )

出発材料として ( + ) - # b を用いるが、文献の手順 ( L i , L . 、 C h a n , T . H . O r g . L e t t . 2 0 0 1 、 5 、 7 3 9 頁) に従って、 ( + ) - # c が白色固体として得られた ( 収率 4 7 % ) 、融点 6 0 ~ 6 2 、 [ ]<sub>D</sub> = + 0 . 9 ( c = 1 . 0 、 酢酸エチル ) 、

【 0 1 0 5 】

【 化 3 7 】

<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.49-7.30 (m, 15 H),

30

6.29 d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.27 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.02 (bs, 1 H), 4.99 (s, 4 H), 4.25 (bs, 1 H), 3.03 (A of ABt, J=17.2, 1.4 Hz, 1 H), 2.96 (B of ABt, J=17.2, 4.2 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 158.7, 158.2, 155.2, 138.1, 136.9, 136.8, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.4, 127.1, 126.2, 100.9, 94.6, 94.0, 78.6, 70.0, 69.8, 66.2, 28.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>Na (M+Na) 461.1729, found 461.1741.

【 0 1 0 6 】

( + ) - ( 2 S , 3 S ) - 5 , 7 - ジヒドロキシ - 2 - フェニルクロマン - 3 - イル  
3 , 4 , 5 - トリヒドロキシベンゾエート ( ( + ) - 1 5 )

40

出発材料として ( + ) - # c を用いるが、文献の手順 ( L i , L . 、 C h a n , T . H . O r g . L e t t . 2 0 0 1 、 5 、 7 3 9 頁) に従って、化合物 ( + ) - 1 5 が得られた ( 収率 9 0 % ) : 融点 2 5 8 ~ 2 6 0 ( 分解 ) 、 [ ]<sub>D</sub> = + 1 3 . 9 ( c = 3 . 5 、 エタノール ) 、

【 0 1 0 7 】

## 【化38】

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.73-7.71 (m, 2 H), 7.49-7.45 (m, 2 H), 7.41-7.38 (m, 1 H), 7.17 (s, 2 H), 6.24 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.23 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 5.76 (bs, 1 H), 5.44 (bs, 1 H), 3.27 (A of ABt, J=17.4, 4.5 Hz, 1 H), 3.14 (B of ABt, J=17.4, 1.4 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 164.7, 156.6, 156.3, 155.7, 144.7, 138.5, 137.6, 127.6, 127.3, 126.3, 120.4, 108.7, 97.7, 95.4, 94.6, 77.0, 68.1, 25.3; HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na (M+Na) 433.0899, found 433.0904.

10

## 【0108】

2 - ベンジル - 3 , 5 - ビス (ベンジルオキシ) フェノール (# d)

0 で、乾燥 D M F (120 mL) 中、水素化ナトリウム (鉱油中 60 % 分散物、2, 4 g、100 mmol) の攪拌懸濁液に、エタンチオール (10 g、216 mmol) を滴下した。1時間後、10のバッヂに 1, 3, 5 - トリベンジルオキシベンゼン (24 g、60 mmol) を加え、この混合物を 150 で 1.5 時間加熱した。反応物を冷却した後、水 (500 mL) を加え、混合物を E t O A c で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (ベンゼン) によって精製すると、四塩化炭素から再結晶化させた後に 3, 5 - ジベンジルオキシフェノールが白色固体として得られ (11 %)、E t O A c およびヘキサンから再結晶化させた後に生成物 # d が白色固体として得られた (56 %)。化合物 # d は融点 107 ~ 109 で同定された。

20

## 【0109】

## 【化39】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.36-7.23 (m, 15 H), 6.25 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 6.07 (d, J=2.2 Hz, 1 H), 4.96 (s, 2 H), 4.92 (s, 2 H), 3.99 (s, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 158.4, 157.9, 154.9, 140.7, 136.7, 136.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.8, 127.5, 127.3, 127.0, 125.6, 108.5, 94.7, 93.3, 70.2, 69.9, 28.3; HRMS (ESI) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>Na (M+Na) 419.1623, found 419.1645.

30

## 【0110】

(E) - 3 - [2 , 4 - ビス (ベンジルオキシ) - 5 - ベンジル - 6 - ヒドロキシフェニル] - 1 - [3 , 4 - ビス (ベンジルオキシ) フェニル] プロパン (# e)

室温、N<sub>2</sub> 霧囲気下、乾燥 C H<sub>2</sub>C l<sub>2</sub> (80 mL) 中、2 - ベンジル - 3 , 5 - ビス (ベンジルオキシ) フェノール (3.96 g、10 mmol) および (E) - 3 , 4 - ビス (ベンジルオキシ) シンナミルアルコール (3.46 g、10 mmol) の攪拌混合物に、25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / SiO<sub>2</sub> (1.6 g、4 mmol) をひとまとめにして加えた。得られた混合物を室温で一晩攪拌した。濾過し、蒸発させた後、残渣をシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー (E t O A c / n - ヘキサン = 1 / 7 v / v) によって精製し、E t O A c および n - ヘキサンから再結晶化すると、白色固体が得られた (3.4 g、収率 46.0 %)：融点 93 ~ 95 。

40

## 【0111】

## 【化40】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.41-7.22 (m, 30 H), 6.92 (s, 1 H), , 6.79 (s, 1 H), 6.78 (d, J=4.0 Hz, 1 H), 6.35 (A of AB, J=15.8 Hz, 1 H), 6.26 (s, 1 H), 6.13-6.07 (B of ABt, J=15.8, 5.0Hz, 1 H), 5.08 (s, 2 H), 5.07 (s, 2 H), 4.99 (s, 4 H), 4.02 (s, 2 H), 3.55 (d, J=5.0 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 156.1, 155.6, 154.0, 148.9, 148.2, 141.1, 137.2, 137.1, 131.0, 130.1, 128.5, 128.4, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 127.2, 127.1, 126.5, 125.7, 119.7, 114.9, 112.4, 109.6, 107.3, 91.4, 71.1, 70.5, 70.3, 28.8, 26.6; HRMS (ESI): calcd for C<sub>50</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>Na (M+Na) 747.3086, found 747.3096.

10

## 【0112】

( - ) - ( 1 R , 2 R ) - 3 - [ 2 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 5 - ベンジル - 6 - ヒドロキシフェニル ] - 1 - [ 3 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) フェニル ] プロパン - 1 , 2 - ジオール ( ( - ) - # f )

乾燥 D M F ( 3 0 m L ) にプロパン ( # e ) ( 3 . 4 g 、 4 . 6 m m o l ) を溶解し、この溶液にイミダゾール ( 1 . 0 3 g 、 1 5 . 2 m m o l ) および T B S C 1 ( 1 . 2 g 、 7 . 8 m m o l ) を逐次加えた。得られた混合物を室温で 3 日間攪拌し、次いで、飽和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を加えて反応をクエンチした。この混合物を E t O A c で抽出した。有機層を合わせ、乾燥させ ( MgSO<sub>4</sub> ) 、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフ ( n - ヘキサンおよび E t O A c = 9 / 1 v / v ) によって精製すると、 [ 3 , 5 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 6 - ベンジル - 2 - [ 3 - [ 3 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) フェニル ] アリル ] フェノキシ ] - t - ブチルジメチルシランが得られた。この物質をさらなる精製を行わずに次のステップに用いた。

20

## 【0113】

t - B u O H ( 5 0 m L ) および H<sub>2</sub>O ( 5 0 m L ) の溶媒混合物に A D - ミックス - ( 1 3 . 0 g ) およびメタンスルホンアミド ( 0 . 8 7 g ) を溶解した。得られた混合物を室温で 5 分間攪拌し、次いで、混合物を 0 に冷却し、ジクロロメタン ( 5 0 m L ) 中、 [ 3 , 5 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 6 - ベンジル - 2 - [ 3 - [ 3 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) フェニル ] - アリル ] フェノキシ ] - t - ブチルジメチルシランの溶液を加えた。この混合物を一晩攪拌した後、さらに 2 バッチの A D - ミックス - ( 各 1 3 . 0 g ) およびメタンスルホンアミド ( 各 0 . 8 7 g ) を各々 2 4 時間間隔で加えた。0 でさらに 2 4 時間攪拌した後、反応が完了したことが T L C によって示された。次いで、 1 0 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液を加えて反応をクエンチした。この混合物を E t O A c で抽出した。有機相を合わせ、乾燥させ ( MgSO<sub>4</sub> ) 、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフ ( n - ヘキサンおよび E t O A c = 4 / 1 v / v ) によって精製すると、 [ 3 , 5 - ビス ( ベンジルオキシ ) - 6 - ベンジル - 2 - [ 3 - [ 3 , 4 - ビス ( ベンジルオキシ ) フェニル ] - 1 , 2 - ジヒドロキシル - プロピル ] フェノキシ ] - t - ブチルジメチルシランが得られた。得られた化合物を T H F ( 7 5 m L ) に溶解し、 T B A F ( 1 0 m L 、 T H F 中 1 M ) を加えた。得られた混合物を室温で 4 時間攪拌し、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液を加えた。この混合物を E t O A c で抽出し、有機層を合わせ、乾燥させ ( MgSO<sub>4</sub> ) 、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー ( E t O A c / ヘキサン = 1 / 2 v / v ) によって精製し、次いで、 E t O A c およびヘキサンから再結晶化させると、白色固体が得られた ( 2 . 4 g 、 収率 6 7 % ) ( - ) - # f : 融点 1 5 7 ~ 1 5 9 、 [ ]<sub>D</sub> = - 5 . 5 ( c = 1 . 1 、 C H C l<sub>3</sub> ) 、

30

## 【0114】

40

## 【化41】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.41-7.09 (m, 25 H), 6.91 (d, J=1.6 Hz, 1 H), 6.77 (m, 2 H), 6.17 (s, 1 H), 5.06 (s, 4 H), 4.98 (s, 2 H), 4.82 (AB, J=11.9 Hz, 2 H), 4.42 (d, J=6.6 Hz, 1 H), 4.05 (s, 2 H), 3.91 (b, 1 H), 2.93 (A of ABt, J=14.5, 3.2 Hz, 1 H), 2.72 (B of ABt, 14.5, 8.5 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 156.4, 155.6, 155.3, 148.9, 148.8, 142.1, 137.2, 137.1, 137.0, 133.5, 128.6, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 127.2, 127.1, 126.7, 125.3, 119.9, 114.5, 113.6, 112.1, 111.2, 106.7, 90.9, 77.2, 76.7, 71.1, 70.9, 70.3, 70.2, 29.1, 26.8; HRMS (ESI) calcd for C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>Na (M+Na) 781.3141, found 781.3110.

10

## 【0115】

( - ) - ( 2 S , 3 R ) - ツラヌス - 5 , 7 ビス ( ベンジルオキシ ) - 8 - ベンジル - 2 - [ 3 , 4 - ビス - ( ベンジルオキシ ) フェニル ] クロマン - 3 - オル ( ( - ) - # g )

1, 2 - ジクロロエタン ( 50 mL ) 中、( - ) - # f ( 2.4 g, 3.1 mmol ) の懸濁液に、オルトギ酸トリエチル ( 1 mL )、続いて PPT S ( 450 mg, 1.8 mmol ) を加えた。この混合物を、固体が溶解するまで室温で 20 分間攪拌した。次いで、この混合物を、反応が完了したことが TLC によって示されるまで 55 度 5 時間加熱した。溶媒を蒸発させた後、残渣を DME ( 30 mL ) および MeOH ( 30 mL ) に溶解し、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ( 450 mg ) を加えた。この混合物を室温で一晩攪拌した。溶媒を蒸発させた後、残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー ( EtOAc / ヘキサン、1 / 3 v / v ) によって精製すると、目的生成物が白色固体として得られた ( 1.8 g、収率 77 % ) : 融点 145 ~ 146 °C, [α]<sub>D</sub> = -20.1 ( c = 1.3, CHCl<sub>3</sub> )。

20

## 【0116】

## 【化42】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.42-7.15 (m, 25 H), 6.93 (d, J=1.6 Hz, 1 H), 6.88 (A of AB, J=8.3 Hz, 1 H), 6.82 (B of ABt, J=8.3, 1.6 Hz, 1 H), 6.24 (s, 1 H), 5.13 (s, 2 H), 5.02 (s, 2 H), 5.00 (s, 2 H), 4.98 (s, 2 H), 4.63 (d, J=8.1 Hz, 1 H), 4.04 (AB, J=14.2 Hz, 2 H), 3.86 (m, 1 H), 3.10 (A of ABt, J=5.6, 16.4 Hz, 1 H), 2.67 (B of ABt, J=9.0, 16.4 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 155.8, 155.5, 152.9, 148.9, 148.8, 142.2, 137.2, 137.1, 137.0, 136.9, 131.2, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.2, 127.1, 127.0, 125.2, 120.2, 114.5, 113.2, 110.2, 102.4, 91.1, 81.2, 71.1, 70.9, 70.4, 69.9, 68.2, 28.6, 27.6. HRMS (ESI) calcd for C<sub>50</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>Na (M+Na) 763.3036, found 763.3032.

30

## 【0117】

( + ) - ( 2 R ) - 5 , 7 ビス ( ベンジルオキシ ) - 8 - ベンジル - 2 - [ 3 , 4 - ビス ( ベンジル - オキシ ) - フェニル ] クロマン - 3 - オン ( ( - ) - # h )

N<sub>2</sub> 雰囲気下、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 30 mL ) 中、( - ) - # g ( 900 mg, 1.2 mmol ) の攪拌溶液に、デスマーチン ペルヨージナン ( 6.3 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 15 % g / mL, 2.2 mmol ) をひとまとめにして加えた。この混合物を、出発材料がないことが TLC によって示されるまで、室温で約 2 時間攪拌した。続いて、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 ( 15 mL ) および 10 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 水溶液 ( 15 mL ) を加えて反応をクエンチした。有機層を分離し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で水層を抽出した。合わせた有機相を乾燥

40

50

させ ( $MgSO_4$ )、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(ベンゼン)によって精製し、次いで、 $CHCl_3$ およびエーテル中で再結晶化させると、目的化合物が得られた(770mg、86%)：融点143～145、 $[α]_D = -17.1$ ( $c = 1.1$ 、 $CHCl_3$ )。

【0118】

【化43】

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.43-7.07 (m, 25 H), 6.89 (s, 1 H), 6.84 (AB,  $J=8.5$  Hz, 2 H), 6.33 (s, 1 H), 5.13-5.04 (m, 6 H), 5.02 (s, 1 H), 4.99 (s, 2 H), 4.05 (AB,  $J=14.2$  Hz, 2 H), 3.67 (AB,  $J=20.8$  Hz, 2 H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  205.8, 156.5, 154.8, 152.5, 149.0, 148.7, 141.7, 137.1, 136.9, 136.8, 136.5, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.3, 127.1, 125.4, 120.0, 114.5, 113.2, 111.9, 102.4, 92.6, 82.9, 71.0, 70.5, 70.2, 34.0, 28.8; HRMS (ESI) calcd for  $C_{50}H_{42}O_6Na$  ( $M+Na$ ) 761.2879, found 761.2843.

【0119】

(+)-(2S,3S)-シス-5,7-ビス(ベンジルオキシ)-8-ベンジル-2-[3,4-ビス-(ベンジルオキシ)フェニル]クロマン-3-オル( $(+)-\#i$ )

$N_2$  霧囲気下、乾燥 THF (15 mL) にケトン(-)-#h (700mg、0.95 mmol) を溶解し、この溶液を -78 に冷却した。次いで、L-セレクトリド (1.5 mL、THF 中、1 M 溶液、1.5 mmol) を滴下した。得られた溶液を -78 で 8 時間攪拌した。反応が完了したことが TLC によって示された時点で、飽和  $NaHCO_3$  水溶液 (10 mL) を加えて反応をクエンチした。有機層を分離し、水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機相を乾燥させ ( $MgSO_4$ )、蒸発させた。残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(5% EtOAc / ベンゼン)によって精製し、次いで、エタノールおよび EtOAc を用いて再結晶化させると、目的生成物 (630mg、90%) が白色固体として得られた：融点129～131、 $[α]_D = +5.3$ ( $c = 1.2$ 、 $CHCl_3$ )。

【0120】

【化44】

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.44-7.07 (m, 25 H), 7.05 (s, 1 H), 6.93 (AB,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 6.26 (s, 1 H), 5.15 (s, 2 H), 5.02 (s, 2 H), 5.00 (s, 4 H), 4.92 (bs, 1 H), 4.20 (bs, 1 H), 4.10 (AB,  $J=14.5$  Hz, 2 H), 3.07 (A of AB,  $J=17.2$  Hz, 1 H), 2.92 (B of ABt,  $J=17.2, 4.2$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  156.2, 155.9, 152.8, 148.9, 148.5, 142.1, 137.2, 137.1, 137.0, 131.6, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.4, 127.2, 125.2, 118.9, 114.9, 112.9, 110.2, 101.1, 91.4, 78.0, 71.2, 71.0, 70.5, 70.0, 66.1, 28.6, 28.2; HRMS (ESI) calcd for  $C_{50}H_{44}O_6Na$  ( $M+Na$ ) 763.3036 found 763.3024.

【0121】

(+)-(2S,3S)-5,7ビス(ベンジルオキシ)-8-ベンジル-2-[3,4-ビス-(ベンジルオキシ)-フェニル]クロマン-3-イル-3,4,5-トリス(ベンジルオキシ)-ベンゾエート( $(+)-\#j$ )

$N_2$  霧囲気下、乾燥  $CH_2Cl_2$  (10 mL) および 1 滴の DMF 中、3, 4, 5-トリス(ベンジルオキシ)安息香酸 (170mg、0.39 mmol) の溶液を塩化オキサ

10

20

30

40

50

リル (1 mL) とともに 3 時間還流した。過剰の塩化オキサリルおよび溶媒を蒸留によって除去し、残渣を真空下で 3 時間乾燥させ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) に溶解した。0 で、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) 中、(+)-#i (150 mg, 0.20 mmol) および DMAP (75 mg, 0.62 mmol) の溶液に、この溶液を滴下した。この混合物を室温で一晩攪拌し、次いで、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を加えた。有機層を分離し、水層を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。有機相を合わせ、乾燥させ (MgSO<sub>4</sub>)、蒸発させた。残渣を、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (5% EtOAc / ベンゼン) によって精製すると、目的化合物 (215 mg, 91%) が得られた。CHCl<sub>3</sub> およびエーテル中で再結晶化させると白色粉末が得られた：融点 52 ~ 54 °C, [α]<sub>D</sub> = +37.5 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)。

【0122】

【化45】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.39-7.10 (m, 42 H), 6.99 (t, J=7.4 Hz, 1 H), 6.93 (AB, J=8.3 Hz, 2 H), 6.31 (s, 1 H) < 5.65 (bs, 1 H), 5.13 (bs, 1 H), 5.07 (s, 2 H), 5.02 (s, 4 H), 5.00 (s, 2 H), 4.92 (s, 4 H), 4.83 (AB, J=11.8 Hz, 2 H), 4.11 (s, 1 H), 3.15 (bs, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 165.2, 156.0, 155.9, 153.2, 152.3, 148.8, 148.6, 142.6, 142.2, 137.4, 137.2, 137.0, 136.5, 131.4, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.3, 127.2, 125.4, 125.1, 119.4, 114.6, 113.2, 110.3, 109.2, 101.0, 91.2, 75.1, 71.1, 70.5, 70.0, 68.6, 28.7, 26.2; HRMS (ESI) calcd for C<sub>78</sub>H<sub>66</sub>O<sub>10</sub>Na (M+Na) 1185.4554, found 1185.4542.

【0123】

(-) - (2S, 3R) - 5, 7 - ビス (ベンジルオキシ) - 8 - ベンジル - 2 - [3, 4 - ビス - (ベンジルオキシ) - フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 4, 5 - トリス (ベンジルオキシ) - ベンゾエート ((-) - #k)

出発材料として (-) - #g を用いるが、(-) - #j の調製のために用いた手順に従って、(-) - (2S, 3R) - 5, 7 - ビス (ベンジルオキシ) - 8 - ベンジル - 2 - [3, 4 - ビス (ベンジル - オキシ) フェニル] - クロマン - 3 - イル 3, 4, 5 - トリス (ベンジルオキシ) ベンゾエートが白色固体として得られた (収率 90%)：融点 103 ~ 105 °C, [α]<sub>D</sub> = -9.8 (c = 1.3, CHCl<sub>3</sub>)。

【0124】

【化46】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.37-7.11 (m, 42 H), 6.90 (s, 1 H), 6.77 (m, 2 H), 6.27 (s, 1 H), 5.42 (m, 1 H), 5.18 (d, J=6.3 Hz, 1 H), 5.06 (s, 4 H), 5.05-4.99 (m, 4 H), 4.97 (s, 4 H), 4.88 (s, 2 H), 4.12 (AB, J=14.1 Hz, 2 H), 3.01 (a of ABt, J=16.8, 5.0 Hz, 1 H), 2.89 (B of ABt, J=16.8, 6.4 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 156.0, 155.9, 155.4, 152.5, 152.3, 148.8, 148.6, 142.3, 142.1, 137.3, 137.1, 137.0, 136.9, 136.5, 131.3, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 125.3, 124.9, 114.6, 112.8, 110.2, 108.9, 101.5, 91.0, 78.0, 75.0, 71.2, 71.1, 71.0, 70.4, 70.0, 69.9, 28.6, 24.0; HRMS (ESI) calcd for C<sub>78</sub>H<sub>66</sub>O<sub>10</sub>Na (M+Na) 1185.4554, found 1185.4573.

【0125】

(+) - (2S, 3S) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 8 - ベンジル - 2 - [3, 4 - ジヒドロキシ - フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 4, 5 - トリヒドロキシベンゾエート (

10

20

30

40

50

( + ) - # I )

$\text{H}_2$  霧囲気下、THF / MeOH (1 : 1 v / v, 20 mL) の溶媒混合物中、( + ) - # j (200 mg, 0.17 mmol) の溶液に、Pd(OH)<sub>2</sub> / C (20%, 400 mg) を加えた。反応混合物を室温、 $\text{H}_2$  下で6時間攪拌し、その時点で反応が完了したことがTLCによって示された。反応混合物を濾過して触媒を除去した。濾液を蒸発させ、残渣を、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフ (10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、次いで、20% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) によって迅速に精製すると、( + ) - 8 - ベンジルカテキンガラート (( + ) - # 1) が得られた (82 mg、収率90%)：融点243 ~ 245 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = +123 (c = 1.8、アセトン)、

【0126】

【化47】

10

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.53 (d, J=7.4 Hz, 2 H), 7.42 (t, J=7.6 Hz, 2 H), 7.26-7.21 (m, 4 H), 7.04 (AB, J=8.2 Hz, 2 H), 6.31 (s, 1 H), 5.75 (bs, 1 H), 5.32 (bs, 1 H), 4.22 (AB, J=14.3 Hz, 2 H), 3.29 (a of ABt, J=17.4, 4.4 Hz, 1 H), 3.17 (b of AB, J=17.4 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 165.2, 154.2, 154.1, 153.6, 144.9, 144.6, 144.3, 142.6, 137.9, 130.6, 128.4, 127.8, 125.0, 120.9, 118.1, 114.7, 113.7, 109.1, 106.7, 98.0, 95.3, 77.1, 68.3, 25.9; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>Na (M+Na) 555.1267, found 555.1279.

20

【0127】

( - ) - (2S, 3R) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 8 - ベンジル - 2 - [3, 4 - ジヒドロキシ - フェニル] クロマン - 3 - イル 3, 4, 5 - トリヒドロキシベンゾエート (( - ) - 16)

出発材料として(-) - # k を用いるが、( + ) - # I の調製のための手順に従って、(-) - 8 - ベンジルカテキンガラート (( - ) - 16) が得られた (収率91%)：融点239 ~ 241 (分解)、[ ]<sub>D</sub> = -35 (c = 2.0、アセトン)、

【0128】

【化48】

30

<sup>1</sup>H NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.44 (d, J=7.1 Hz, 2 H), 7.33 (t, J=7.5 Hz, 2 H), 7.23 (s, 2 H), 7.21 (t, J=7.3 Hz, 1 H), 6.92-6.86 (m, 2 H), 6.34 (s, 1 H), 5.56 (m, 1 H), 5.35 (d, J=6.2 Hz, 1 H), 4.17 (AB, J=14.3 Hz, 2 H), 3.12 (A of ABt, J=16.5, 5.2 Hz, 1 H), 2.98 (b of ABt, J=16.5, 6.2 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (acetone-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 165.0, 154.1, 153.7, 152.8, 144.9, 144.7, 144.6, 142.2, 137.8, 130.2, 128.3, 127.5, 124.8, 120.5, 117.9, 114.8, 113.2, 108.8, 106.2, 98.2, 95.1, 77.7, 69.4, 23.5; HRMS (ESI) calcd for C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>Na 555.1267, found 555.1285.

40

【0129】

( - ) - E G C G および 1 の安定性試験

( - ) - E G C G または 1 (0.1 mM) を、 RPMI 1640 培養培地とともに37度インキュベートした。種々の時点で、15 μL の培地を、C-18 逆相カラム (C A P C E L L P A K C 18 U G 120, Shiseido Co., Ltd.、4.6 mm 内径 × 250 mm) を備える HPLC に注入した。流速 1 mL / 分、検出、UV 280 nm、( - ) - E G C G については、時点は 0、10、20、40、60、90、120 分とし、移動相、20% アセトニトリル水溶液および 0.01% TFA、プロドラッグ 1 については、時点は 0、30、60、90、120 分とし、移動相、50% アセトニトリル水溶液および 0.01% TFA。

50

## 【0130】

1の酵素的加水分解

$2 \times 10^6$  個ジャーカットT細胞に溶解バッファー(pH 5)(0.25 mL)を加えた。これによって、細胞の細胞膜を破壊し、細胞質酵素を放出することができる。培地を酵素にとって最適pH値(pH 7)に中和するPBS(0.75 mL)を加えた。プロドラッグ1(0.25 mM)を反応混合物中に加え、37でインキュベートした。上記で概説したように、種々の時点(0、30、60、90、120、150、180、210、240、300および360分)で反応混合物のアリコート(0.06 mL)を採取し、濾過し、HPLCに注入し、分析した。

## 【0131】

10

溶解物を含むか含まない培養培地におけるビタミンCの存在下での1の加水分解

化合物1(35 μM)を、ダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)(ビタミンC 1.67 mg/mLを含有する1 mL)とともに37でインキュベートした。種々の時点で、10 μLの溶液を、C-18逆相カラムを備えるHPLCに注入した。流速1 mL/分、検出、UV 280 nm、移動相、0~8分(20%アセトニトリル水溶液および0.016%TFA)、8~13分(20%アセトニトリル水溶液および0.016%TFA~60%アセトニトリル水溶液および0.008%TFAへ変動)。

## 【0132】

溶解物の存在下での1の加水分解を調べるために、同一濃度の1を、溶解物(0.15 mL溶解バッファーを含む $5 \times 10^5$ 個乳癌細胞)の存在下でDMEM(ビタミンC 1.67 mg/mLを含有する2 mL)とともにインキュベートした。上記で概説したように、種々の時点で、反応混合物のアリコート(0.06 mL)を採取し、濾過し、HPLCに注入し、分析した。

20

## 【0133】

細胞培養

ヒトジャーカットT細胞およびLNCaP細胞を、10%(v/v)ウシ胎児血清、100 U/mLペニシリンおよび100 μg/mLストレプトマイシンを補給した RPMIで培養した。非形質転換ナチュラルキラー細胞(YT株)は、10%(v/v)ウシ胎児血清、100 U/mLペニシリン、100 μg/mLストレプトマイシン、1 mM MEMピルビン酸ナトリウムおよび0.1 mM MEM非必須アミノ酸溶液を含有するRPMI培地で増殖させた。ヒト乳癌MCF-7細胞、正常(WI-38)およびサルウイルスで形質転換した(VA-13)ヒト線維芽細胞は、10%(v/v)ウシ胎児血清、100 U/mLペニシリン、100 pg/mLストレプトマイシンを補給したダルベッコの改変イーグル培地で増殖させた。すべての細胞培養は5%CO<sub>2</sub>雰囲気中、37で維持した。

30

## 【0134】

細胞抽出物調製およびウェスタンブロッティング

全細胞抽出物を、これまでに記載された通りに調製した(An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP. Novel dipeptidyl protease some inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. Cell Death Differ 1998; 5: 1062~75頁)。Bax、IKBa、p27、PAWおよびユビキチン化タンパク質発現の分析は、先に報告されたプロトコールに従い、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて実施した(An Bら)。

40

## 【0135】

(-) - EGC Gまたは合成茶ポリフェノールによる精製20 sプロテアソーム活性の阻害

50

20 s プロテアソームのキモトリプシン様活性の測定は、種々の濃度の、先に記載された天然および合成茶ポリフェノール(Nam Sら)とともにか、それらをともなわずに、0.5 μgの精製ウサギ20 s プロテアソームを40 μM 蛍光発生ペプチド基質、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMCとともにインキュベートすることによって実施した。

#### 【0136】

天然 / 合成茶ポリフェノールによる、無傷の細胞におけるプロテアソーム活性の阻害

VA-13またはWI-38細胞を、24ウェルプレートで70~80%コンフルエンシーまで増殖させ(2ml/ウェル)、続いて、25pM(-)-EGCG、2または2aで24時間処理した。次いで、40pM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC基質を37で2.5時間加え、キモトリプシン様活性を上記の通り測定した。あるいは、細胞を25μMの各化合物で4時間または24時間処理し、回収し、溶解した。次いで、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC(40μM)を、調製した細胞溶解物とともに2.5時間インキュベートし、キモトリプシン様活性を上記の通り測定した。

#### 【0137】

FITCと結合している抗切断PARPを用いるアポトーシス細胞の免疫染色

アポトーシス細胞の免疫染色を、FITCと結合している、切断されたボリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)を認識するポリクローナル抗体を添加することによって実施し、Axiovert 25(Zeiss; Thornwood, NY)顕微鏡で可視化した。細胞は60mmディッシュで約80%コンフルエンシーに増殖させた。次いで、VA-13細胞をVP-16、2または2a(25μM)で24時間処理した。処理後、懸濁液と接着細胞の両方を回収し、PBS pH 7.4中で2回洗浄した。以下に列挙したすべてのステップの間で細胞を洗浄し、すべての洗浄はPBSで1分間とした。次いで、氷冷70%エタノールで細胞を固定し、0.1% Triton-X-100で透過処理し、1%ウシ血清アルブミン( BSA )中、室温で30分間ブロッキングした。一次FITC結合p85/PARP抗体とのインキュベーションは、穏やかに搅拌しながら暗所、4で30分間とした。次いで、細胞懸濁液を、DAPIを含むVector Shield mounting mediumの存在下、ガラススライドに移した。画像はAxioVision 4.1を用いて獲得し、Adobe Photoshop 6.0ソフトウェアを用いて調整した。細胞死は、同一視野中の細胞全数にわたってアポトーシス細胞数を計数することによって定量化した。データは2連の実験の平均±SDである。

#### 【0138】

トリパンブルーアッセイ

トリパンブルーアッセイを用いて、示した天然および合成ポリフェノールで処理したジャーカットT細胞において細胞死を確認した。アポトーシス形態は、先に記載されるように、位相差顕微鏡を用いて評価した(Kazi A、Hill R、Long TE、Kuhn DJ、Twose E、Dou QP. Novel N-thiolated beta-lactam antibiotics selectively induce apoptosis in human tumor and transformed cells. Biochem Pharmacol 2004; 67: 365~74頁; Kuhn DJ、Smith DM、Pross S、Whiteside TL、Dou QP. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability. J Cell Biochem 2003; 89: 824~36頁)。

#### 【0139】

10

20

30

40

50

MTTアッセイ

MTTを用いて、腫瘍細胞の全体的な増殖に対するポリフェノールの効果を調べた。ヒト胸部MCF-7細胞を96ウェルプレートにプレーティングし、70~80%コンフルエンシーに増殖させ、続いて、24時間類似体を添加した。次いで、ウェルにPBS中、MTT(1mg/ml)を加え、37℃で4時間インキュベートし、代謝的に活性な細胞によってテトラゾリウム塩を完全に切断させた。次いで、MTTを除去し、100μlのDMSOを加え、560nmでマルチラベルプレートリーダー(Victor<sup>3</sup>; Perkin Elmer)を用いて比色分析を実施した。プロットした吸光度値は、3連の実験から得た平均である。

## 【0140】

10

軟寒天アッセイ

先に記載されたように(kazi Aら)、細胞の形質転換活性を調べるために、LNCaP細胞( $2 \times 10^4$ 個)を、(-)-EGCGまたは保護された茶類似体(25pM)の存在下、6ウェルプレート上の軟寒天に、またはDMSO(対照)にプレーティングした。

## 【0141】

核染色

各薬物処理の後、剥離および接着VA-13およびWI-38細胞を、ヘキスト33342で染色し、アポトーシスについて評価した。簡単には、細胞をPBS中で2回洗浄し、4℃で70%エタノールを用いて1時間固定し、PBS中で3回洗浄し、50pMヘキストを用い、暗所、室温で30分間染色した。剥離細胞をスライド上にプレーティングし、接着細胞は、10×または40×分解能の蛍光顕微鏡(Zeiss, Germany)を用いてプレート上で可視化した。AxioVision 4.1を用いDigital Scientificによって画像を獲得し、Adobe Photoshop 6.0を用いて調整した。

20

## 【0142】

合成茶ポリフェノールによるカスパーゼ-3活性の誘導

細胞を各化合物25μMで4時間または24時間処理し、次いで、回収し、溶解した。細胞溶解物にAc-DEVD-AMC(40μM)を2.5時間加え、カスパーゼ-3活性。

30

## 【0143】

結果ペルアセタート(-)-EGCG、1の化学安定性および酵素的加水分解

pH値が約8であり体液を模倣する培養培地(RMPI)において、1および(-)-BGCGの安定性が比較されている。0.1mMの(-)-EGCGまたは1を1mL RMPI中、37℃で、示した時間インキュベートした。種々の時点で、HPLCによって残存する試験化合物の量について培地を分析した。図2には分解曲線が示されている。

## 【0144】

(-) - EGCGを培養培地に溶解すると、20分以内に迅速に分解することがわかり、これによって、培地中で(-)-EGCGの安定性が低いことが実証された。図2に見られるように、1も培地中で分解したが、その分解速度は、(-)-EGCGと比較するとかなり遅かった。1は2時間後に完全に消失し、このことは、この培地中で(-)-EGCGよりも6倍より安定であるということを示す。したがって、(-)-EGCGのフェノール基のペルアセタート保護は、培養(おそらくは生理学的)条件において1を安定化することに関与する。

40

## 【0145】

培養培地条件下で、1がEGCGに加水分解されたかどうかを調べるために、実験を繰り返したが、ここでは、生じたEGCGの迅速な分解を防ぐためにビタミンCを(1.67mg/mlで)加えた。1が消失した時点で、新規ピークAが増大し、次いで、経時に強度が低下することがHPLCによって観察された。これに続いて、HPLCで別のピ

50

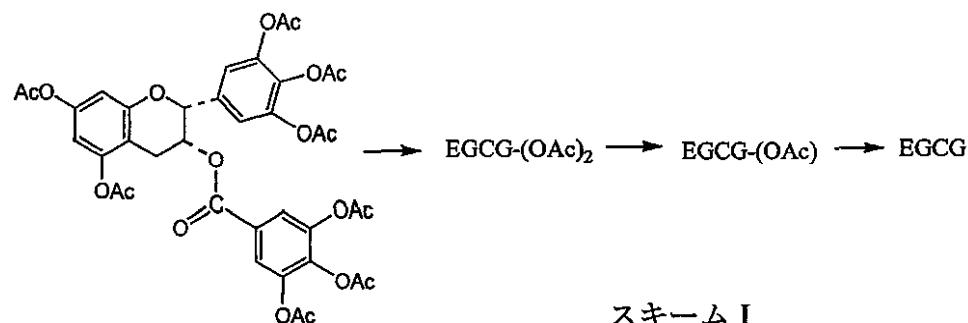
ーク B が現れ、これも最終的には低下した。最後に、EGCG と保持時間が同一である HPLC のピークが形成されることが観察された。これらの成分の経時的推移結果は図 3 に示した。EGCG の同一性は UV 分光法ならびに質量分析によって確認した。さらに、ピーク A および B の質量分析により、それらは、それぞれ EGCG のジアセタートおよびモノアセタートであることが示された。これらの結果から、化合物 1 は、培養培地条件下では、まず、ジアセタートに、次いで、モノアセタートに、最終的に EGCG に加水分解されるということが示唆された。

## 【0146】

細胞条件下での化合物 1 からの( - )-EGCG の生成は、( - )-EGCG の迅速な消失を防ぐためにビタミン C を添加することによってより明確に実証できた。この場合には、本発明者らは、乳癌細胞溶解物を含む培地内で実験を実施した。HPLC 分析により、図 3 同様、経時的推移結果(図 4)において、1 の消失とともに、A(二酢酸塩)、B(モノアセタート)、次いで( - )-EGCG の一時的な形成が示された。したがって、化合物 1 は、溶解物を添加した培地において、加水分解を受け、EGCG の二酢酸塩、次いで、モノアセタート、次いで、EGCG、最終的に、没食子酸を形成したと考えられる(スキーム 1)。

## 【0147】

## 【化49】



1

## 【0148】

1 および( - )-EGCG による、in vitro および in vivo におけるプロテアソーム活性の阻害

1 が( - )-EGCG のプロドラッグとして機能するなら、細胞の内側で脱アセチル化され、そこでその親化合物に変換するまで生物学的に不活性のままであるはずである。この仮説を調べるために、in vitro および無傷のジャーカット T 細胞の両方において、1 または( - )-EGCG(陽性対照として)のいずれかを用い、プロテアソーム活性を調べた。まず、1 および市販の( - )-EGCG を DMSO に溶解し、精製 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性に対するその効果を測定した。1 は、10 μM で精製 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害において完全に不活性であった(図 5)。対照的に、( - )-EGCG は、10 μM でプロテアソームのキモトリプシン様活性を 80 ~ 90 % 阻害した。したがって、予想したように、細胞系の外側にある 1 はプロテアソーム阻害剤ではない。

## 【0149】

1 が細胞の内側で( - )-EGCG に変換すれば、in vivo においてプロテアソーム阻害が検出されるはずである。この可能性を調べるために、ヒトジャーカット細胞を、25 μM の 1 または( - )-EGCG で 12 または 24 時間処理し、続いて、無傷の細胞においてキモトリプシン様特異的蛍光発生基質を用いること(図 6a) またはユビキチン化タンパク質についてのウエスタンプロット(図 6b) によってプロテアソーム活性を測定した。ジャーカット T 細胞の( - )-EGCG での 24 時間の処理によって、プロテアソーム活性が 31 % 阻害されたのに対し、1 では 42 % 阻害された(図 6a)。ポリユビキチン化タンパク質の細胞内レベルを分析するために、12 時間インキュベートした後

10

20

30

40

50

に細胞を溶解し、ウエスタンプロットティングに付した。1は、天然(-)-EGCGのものと同程度のレベルのユビキチン化タンパク質を示した(図6b)。したがって、1は、無傷の細胞におけるプロテアソーム活性の阻害において、(-)-EGCGと同等に強力か、そうでなければ(-)-EGCGよりも強力である。一方で、1はEGCGと比べて6倍より安定であるにもかかわらず、細胞におけるその生物学的活性の効力は、同様の程度には増加しなかった。1から生じるEGCG量、ひいては、細胞の内側でのその生物学的活性は、因子：1の細胞への相対的透過性、いずれかの時点で細胞中に存在し得るエステラーゼ酵素の量および抗酸化物質の量の組合せに応じて変わるという可能性がある。

#### 【0150】

##### 1および(-)-EGCGによる、ジャーカット細胞におけるAktの脱リン酸化

10

(-)-EGCGおよび1を、5、10および25μMでジャーカットT細胞とともに24時間インキュベートし、続いて、リン酸化Aktに対する特異的抗体を用いてウエスタンプロット解析を行った(図7)。25μMで活性化Aktの73%の減少をもたらすことがデンシティメトリー分析によって示された1での処理と比較して、(-)-EGCGは、25μMで、p-Aktのレベルを32%低減することが分かった(図7)。アクチノンはローディングコントロールとして用いた。

#### 【0151】

##### 1および(-)-EGCGによって誘導される細胞死

(-)-EGCGおよび1の、10μMで24時間処理したジャーカットT細胞において細胞死を誘導する能力も評価されている。(-)-EGCGは細胞死に対して最少の効果しか有さなかった(5%)に対し、1はその濃度で最大15%の細胞死を誘導できた(図8)。したがって、1の、細胞のプロテアソーム活性を阻害し(図6)、Aktを不活化する(図7)より大きな能力が、その細胞死誘導活性の増大と関連している(図8)。

20

#### 【0152】

##### アセチル化合成茶ポリフェノールは精製20sプロテアソーム活性を阻害しない

すべての保護された化合物および保護されていない化合物の最大25μMを、精製20sプロテアソームおよびキモトリプシン活性の蛍光発生基質とともに30分間インキュベートした。次いで、最大半量阻害濃度すなわちIC<sub>50</sub>を求めた。(-)-EGCGは最も強力であり、IC<sub>50</sub>は0.2μMであり、続いて、2である(IC<sub>50</sub>は約9.9μM)と分かった。化合物3および4のIC<sub>50</sub>値は14~15μMであると分かった。対照的に、保護された類似体はかなり活性が低かった: 25μMで<35%阻害。これは上記の結果と一致する。

30

#### 【0153】

保護された茶類似体は、無傷の腫瘍細胞においてより大きなプロテアソーム阻害効力を示す

合成茶類似体がin vivoでプロテアソームに対してどのような効果を有していたかを調べるために、ジャーカット細胞を各合成化合物25μMで4時間または24時間処理し、(-)-EGCGを対照として用いた(図9Aおよび9B)。4時間処理した後、ウエスタンプロット解析は、アセタート保護された類似体がより多量のユビキチン化タンパク質を誘導したことを示し(図9A、レーン5、7および9)、このことはプロテアソーム活性が抑制されていることを示す。ペルアセタート保護された(-)-EGCGは天然(-)-EGCGよりもより強力であることを示す上記の先のデータに基づいて、1を対照として用いた(図9A、レーン3対2)。さらに、2種のプロテアソーム標的として知られる、BaxおよびIBについてのウエスタンプロットは、これらのタンパク質の消失と、タンパク質のマルチユビキチン化体であると推測されるより高分子量のバンドの出現を示した(図9A、レーン3、5、7および9)。しかし、24時間処理した後、(-)-EGCGおよびその保護されていない類似体は、より多量のユビキチン化タンパク質を示した(図9B、レーン2、4、6および8)。これは、保護された類似体は、より早期の時点ではプロテアソームの強力な阻害剤であるという考え方および24時間処理し

40

50

た後には、ユビキチン化タンパク質は脱ユビキチン化酵素によって枯渇しているという考え方と一致する。p 27、別のプロテアソーム標的の蓄積も、保護された類似体 2 a、3 a および 4 a で処理したジャーカット細胞において見られる(図 9 B、レーン 9、5、7)。推定ユビキチン化 I B バンドは、2 a、3 a および 4 a で処理した細胞においてもまだ見られる(図 9 B、レーン 9、5、7)。24 時間処理では、推定ユビキチン化 I B バンドは、おそらくは脱ユビキチン化のためにここでは存在しない(図 9 B)。この実験ではアクチンをローディングコントロールとして用いた。

#### 【0154】

##### 保護された類似体は白血病細胞においてより多い細胞死を誘導する

類似体 4 および 4 a の対を用いる速度論実験では、保護されていない類似体 4 はユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導し、最高発現は 8 時間のポリフェノール処理後であることが分かった(図 9 C)。反対に、保護された 4 a は、2 時間という早期にユビキチン化タンパク質蓄積の増加を示し、最大 8 時間まで持続した(図 9 C)。アセテート保護された類似体が、他の癌細胞系において強力なプロテアソーム阻害剤であるかどうかを調べるために、前立腺癌 LNCaP 細胞を 25 μM の (-) - E G C G、1、2 a または 3 a で 24 時間処理し、対照として DMSO を用いた。実際、ユビキチン結合タンパク質が観察され、2 a および 3 a で処理した細胞において最大増加が見られた(図 9 D)。

#### 【0155】

##### 保護された類似体はより強力なアポトーシス誘導因子である

プロテアソーム阻害は、多種多様な癌細胞においてアポトーシスを誘導できるが、正常細胞、非形質転換細胞ではそうではないということがわかっている(An Bら)。ジャーカット T 細胞を、選択されたポリフェノールおよびその保護された類似体、各 25 μM で 24 時間処理し、アポトーシス細胞死を誘導するそれらの能力を調べた。トリパンブルー取り込みアッセイは、2 a、3 a および 4 a は、それぞれジャーカット細胞の 99、57 および 83 % の死を誘導するが、他のものはそうではないことを示した(図 10 A)。同様に、ウエスタンプロット解析は、2 a、3 a および 4 a のみが、24 時間後にアポトーシス特異的 PARP 切断を誘導することを示した(図 10 B)。切断 PARP 断片(p 85 : 緑色)のみを検出する免疫蛍光染色は、SV40 で形質転換した VA-13 細胞は、2 a によって誘導されるアポトーシスに対して高度に感受性であり、24 時間処理した後に 73 % がアポトーシス細胞であることを示した(図 10 C および 10 D)。保護されていない 2 は、かなり少ないアポトーシスしか誘導しなかった(21 %)が、陽性対照として用いた 25 μM の VP-16 は、92 % のアポトーシスを誘導した(図 10 C および 10 D)。DNA の A-T リッチ領域の副溝と結合する DAPI を用いる対比染色は、アポトーシス細胞において著しく低下し(図 10 C)、後期アポトーシスにおける DNA 断片化と一致する。

#### 【0156】

##### 保護されたポリフェノールによる腫瘍細胞増殖の阻害

次いで、処理された乳癌(MCF-7)細胞を 5 または 25 μM のペルアセタート保護された類似体で 24 時間、続いて、MTT 類似体で処理し、細胞増殖に対する効果を調べた。化合物 1 は、25 μM で細胞増殖を 40 % 阻害した(図 11 A)。保護された化合物 2 a、3 a および 4 a は、それぞれ 5 μM で 50 % 阻害を引き起こし、25 μM で 70 % 阻害を引き起こした(図 11 A)。

#### 【0157】

次いで、ヒト前立腺癌 LNCaP 細胞を、選択した茶ポリフェノール保護された類似体 1、2 a、3 a、4 a、各 25 μM で 24 時間処理し、続いて、アポトーシス性形態変化を調べた。再度、保護された類似体 2 a、3 a および 4 a は、著しい細胞死、剥離および細胞の断片化を引き起こした(図 11 B)。1 は軽度の形態変化を誘導し、他方、(-) - E G C G 処理は、肥大した、平板化した細胞をもたらし、これは増殖停止を示した。

#### 【0158】

軟寒天アッセイを用いて腫瘍細胞の形質転換活性を調べる。コロニー形成の抑止は、G

10

20

30

40

50

I 停止および / またはアポトーシスと関連している。LNCaP 細胞を、6 ウェルプレートに入れた軟寒天に加え、次いで、最初のブレーティング時に1度、25 μM の(-) - EGC G または保護された類似体で処理した(図11C)。21日後、コロニー形成を評価した。(-) - EGC G で処理した細胞は、DMSO で処理した対照細胞と比較して、コロニー形成の大半が減少を示した(図11C および 11D)。保護されたポリフェノールもまた、腫瘍細胞形質転換活性を阻害し、2a および 4a はコロニー形成の最も強力な阻害剤である(図11D)。

## 【0159】

保護された類似体による、腫瘍細胞におけるアポトーシスの選択的誘導

正常細胞ではなく腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導する能力は、新規抗癌剤にとって重要な尺度である。保護された化合物が正常細胞にも影響を及ぼすかどうかを調べるために、VA - 13 および WI - 38 細胞の両方を、25 μM の(-) - EGC G、2 または 2a で 24 時間処理し、プロテアソーム活性、核の形態変化および剥離を調べた。VA - 13 細胞において、正常 WI - 38 細胞を超えるプロテアソームのキモトリプシン様活性の差示的減少が見られた(図12A)。(-) - EGC G および 2 で処理した VA - 13 細胞では、プロテアソーム活性の 42 ~ 48 % 減少が観察され、他方、2a はプロテアソーム活性の 92 % を阻害した。反対に、WI - 38 細胞ではプロテアソーム活性は、3 種のポリフェノール処理すべてで - 5 % しか低下しなかった。

## 【0160】

次に、天然 (-) - EGC G、2 および 2a で処理した後のアポトーシス性核形態が調べられている(図12B)。SV - 40 で形質転換した VA - 13 細胞では、(-) - EGC G および 2 はアポトーシスをほとんど示さなかつたが、全く示さなかつたが、2a はアポトーシスを著しく誘導した。対照的に、すべての化合物で処理した正常 WI - 38 線維芽細胞はアポトーシスを受けず、極めてわずかな剥離が見られた。次いで、すべての保護された類似体間の比較を、25 μM、24 時間を用いて実施した。36 時間後、(-) - EGC G は、VA - 13 細胞においてアポトーシスを開始しなかつた(図12C)。保護された類似体のすべては、形質転換された細胞( VA - 13 )においてアポトーシスを誘導したが、正常(WI - 38) 細胞では誘導しなかつた(図12B および 12C)。同様に、白血病(ジャーカットT) および正常、非形質転換ナチュラルキラー( YT )細胞を、(-) - EGC G および 2a で 24 時間処理した場合に、ジャーカット細胞のみがアポトーシスを受けたことが PAW 切断から明らかであった(図12D)。

## 【0161】

新規合成茶ポリフェノール類似体による、精製 20S プロテアソーム活性の阻害

緑茶ポリフェノール(-) - EGC G は、3つの-OH 基を有する B 環を含み(図1)、精製 20S プロテアソームに対する IC<sub>50</sub> 値は 0.3 μM である(表1)。

## 【0162】

10

20

30

## 【表1】

表1. 合成茶ポリフェノールの、プロテアソーム活性の阻害<sup>1, 2</sup>

無保護体	IC <sub>50</sub> (μm)	保護体	IC <sub>50</sub> (μm)	
(-) - EGCG	0.30 ± 0.02			
No 16	0.59 ± 0.17	No24*	n.a. <sup>3</sup>	
No 6	2.69 ± 1.07	No19*	n.a. <sup>3</sup>	
No 15	4.56 ± 1.20			10
No 12	5.99 ± 0.13	No23*	n.a. <sup>3</sup>	
No 11	7.70 ± 0.14	No22*	n.a. <sup>3</sup>	
No 10	8.51 ± 0.47	No21*	n.a. <sup>3</sup>	

<sup>1</sup>精製20Sプロテアソームの阻害は、キモトリプシン様特異的蛍光発生基質(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC)を用いて評価した。20Sプロテアソームをポリフェノールとともに2時間インキュベートした。

<sup>2</sup>3連で実施した3つの独立した実験から得られた結果。

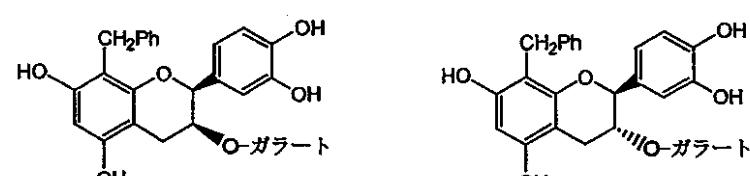
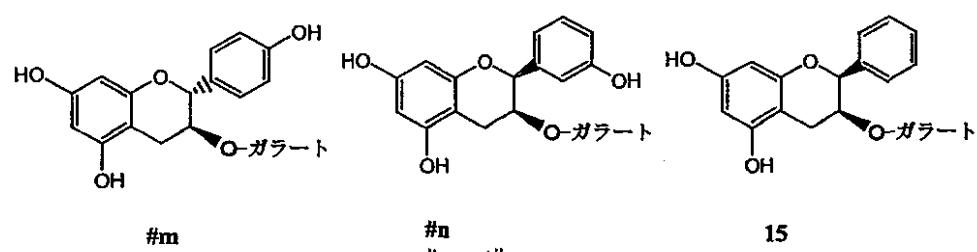
<sup>3</sup>n.a.は、25μMでの精製20Sプロテアソームの阻害活性が<20%であったことを示す。

## 【0163】

(-) - EGCGのB環からの-OHの除去により、in vitroにおいてプロテアソーム阻害効力が小さい(0.58 μM)(-) - EGCGが生じる。本発明者らは、B環-OH基の欠失の、プロテアソーム阻害および細胞死誘導能力に対する効果をさらに調べるために、B環の-OH基を排除した数種の新規EGCG類似体ならびにその推定プロドラッグ、ペルアセタート保護された対応物を合成した。精製20Sプロテアソームおよびキモトリプシン様蛍光発生基質を用いることによって、以下の保護されていないポリフェノール類似体のプロテアソーム阻害効果が調べられている：

## 【0164】

## 【化50】



## 【0165】

【表2】

化合物	IC50(μM)	参照
(-) - EGC G	0.30	本研究
(-) - ECG, 8	0.58	参照文献 a
(+) - CG, 7	0.73	参照文献 a
(-) - EZG, 6	2.69	本研究
(+) - ZG, #m	4.56	本研究
#n	0.84	本研究
#o	1.22	本研究
15	4.56	本研究
(+) - ECG	0.73	参照文献 a
#l	0.39	本研究
(-) - CG	0.75	参照文献 a
16	0.59	本研究

表2 天然および合成茶ポリフェノールの、20S原核生物プロテアソーム活性に対する

効果。参照文献 a は、Smith, D. M., Daniel, K. G., Wang, Z.  
10 ., Guida, W. C., Chan, T. H., Dou, Q. P. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 20  
04, 54, 58 頁

## 【0166】

プロテアソーム阻害活性と、B環およびD環の-OH基の数の間には良好な相関が観察される。B環から個々の-OH基を排除するにつれ、IC<sub>50</sub>値が段階的に増加し、観察された効力の順序は次の通りであった：(-) - EGC G (IC<sub>50</sub> 0.30 μM) > (-) - ECG (0.58 μM) > 6 (2.69 μM) > #m (4.56 μM) (図13および表1)。一連の化合物12、11(12のエピマー)およびD環に1個の-OHを含む10(図13)では、2個のB環-OH基を含む12および11が、1個のB環-OH基しか含まない10よりもより強力であることは一貫している(それぞれ5.99、7.70および8.51 μM、表1)。

## 【0167】

さらなるSAR分析も、B環-OH排除単独と比較して、D環からさらなる-OH基が除去された場合に、阻害効力がさらに低下することを示した。例えば、6は、10よりもより強力であり(2.69対8.51 μM)、(-) - ECGならびに(-) - CGは、No 12よりもより強力である[0.58および0.75対5.99 μM]。最後に、本発明者らは、A環周囲の疎水性作用を調べるために化合物16を含めた。実際、化合物16は、対応物(-) - CGよりもより活性であることが分かった[0.59対0.75 μM、図13、表1および2]。

## 【0168】

比較として、保護されたポリフェノール類似体の、精製プロテアソームに対する阻害活性も調べられている。予想どおり、ペルアセタート保護された類似体(\*)によって示される)は、その保護されていない類似体と比較して、精製20Sプロテアソームのキモトリシン様活性の強力な阻害剤ではなかったが、これはおそらく、変換に必要とされる細胞のエステラーゼの欠如のためである。すべての保護された類似体が25 μMで、精製20Sプロテアソーム活性の<20%しか阻害しなかった(表1)。

## 【0169】

合成茶ポリフェノールによる細胞のプロテアソーム活性の阻害

保護されていないポリフェノール類似体および保護されたポリフェノール類似体が、無

10

20

30

40

50

傷の細胞においてプロテアソーム活性を阻害できるかどうかを調べるために、白血病ジャーカットT細胞を各化合物25 μMで4時間および24時間処理し、続いて、細胞ペレットを回収し、調製した溶解物においてプロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した。保護されていない化合物は、無傷のジャーカットT細胞において制限されたプロテアソーム阻害を示すが、10および15は中程度の効力を示した(図14)。これらのデータは、保護されていない化合物のすべてではないがほとんどは、おそらくはその細胞不安定性のために、(-)-EGCG同様、細胞環境において中程度にしか活性でないということを示唆する。

#### 【0170】

24時間処理した後に、試験したペルアシルオキシル保護された、特に、ペルアセタート保護されたポリフェノールのすべてが、その保護されていない対応物よりもはるかに強力なプロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害剤であったことは重要である(図14)。特に、19\*は、24時間処理した後に、キモトリプシン様活性の97%を阻害したが、その保護されていないポリフェノール対応物6はキモトリプシン様活性の30%しか阻害しなかった。

#### 【0171】

アポトーシス促進性タンパク質Baxおよびサイクリン依存性キナーゼ阻害剤p27は天然のプロテアソーム標的である。ペルアセタート保護されたポリフェノールが無傷のプロテアソーム活性を阻害するとすれば、本発明者らはこれらの細胞におけるBaxおよびp27の蓄積を予想する。この考えを調べるために、ジャーカットT細胞を、保護された化合物および保護されていない化合物の両方で処理し、Baxおよびp27に対する特異的抗体を用いるウエスタンプロットによって溶解物を分析した(図15)。4時間処理した後、ペルアセタート保護された類似体24\*および19\*は、Bax(それぞれ3倍および2.5倍)ならびにp27(それぞれ6倍および11倍)の蓄積を増加できたが、それらの保護されていない類似体はそうではなかった(図15A)。24時間処理した後、Baxレベルは、ペルアセタート保護された化合物のすべてで処理した細胞において上昇した(24\*、19\*、21\*および23\*によってそれぞれ、13倍、12倍、40倍および36倍)。しかし、p27上昇は、24時間後に、主に21\*(2倍)および23\*(2倍)の処理で観察された(図15B)。さらに、4時間処理した後、ユビキチン化タンパク質のレベル、プロテアソーム阻害の指標は、保護された22\*によって大幅に上昇したが、その対応する保護されていない11ではそうではなかった(図15C)。これらのデータは、これらの化合物のプロテアソーム阻害活性のプロフィールと一致する(図14)。保護された類似体は、培養腫瘍細胞において活性プロテアソーム阻害剤に変換できることが示唆される。

#### 【0172】

##### 合成茶ポリフェノール類似体によるアポトーシス細胞死の誘導

これまでに、プロテアソーム阻害はアポトーシス誘導と関連していることがわかっている。B環/D環保護された類似体が細胞死を誘導できたかどうかを調べるために、ジャーカットT細胞をまず、すべての保護された類似体および保護されていない類似体25 μMで24時間処理し、続いて、トリパンブルー排除アッセイを行った(図16)。保護された類似体および保護されていない類似体の両方で4時間処理した後に、細胞形態の変化(縮んだ細胞および特徴的なアポトーシス性プレブ形成)が観察され、これらの変化は24時間処理した後には、保護された類似体で大幅に増加した(データは示していない)。さらに、ペルアセタート保護された類似体は、4時間インキュベートした後に細胞死の5~10倍の増加を誘導し、24時間では最大20倍増加した(図16)。対照的に、保護されていないポリフェノールははるかに少ない細胞死しか引き起こさず、24時間処理した後でさえ、3~5倍の増加にすぎなかった(図16)。

#### 【0173】

観察された細胞死(図16)がアポトーシスの誘導によるものであったかどうかを調べるために、ジャーカットT細胞において同様の実験を実施し、続いて、カスパーゼ-3活

10

20

30

40

50

性化およびP A R P 切断を測定した。ペルアセタート保護されたポリフェノールは、最高レベルのカスパーゼ - 3 活性を誘導した(図17A)。4時間の24<sup>\*</sup>処理は、約16倍の増加をもたらしたが、保護されていない16は4倍の増加しかもたらさなかった。さらに、保護された19<sup>\*</sup>処理は、カスパーゼ - 3 活性を16倍増加させたが、保護されていない対応物6には、はるかに小さい効果しかなかった(4倍)。24<sup>\*</sup>および19<sup>\*</sup>で処理した細胞においてP A R P 切断が検出されたが、保護されていない対応物16および6ではそうではないことは一貫している(図17B)。さらに、保護された化合物22<sup>\*</sup>は、4時間処理した後に細胞においてP A R P 切断を誘導できたが、保護されていない対応物11はそうではなかった(図17C)。

## 【0174】

10

ペルアセタート保護された(-)-EGCG類似体による、腫瘍細胞におけるアポトーシスの選択的誘導

正常細胞においてではなく腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導は、抗癌剤の重要な側面である。本発明者らは、ペルアセタート保護された類似体が正常細胞に影響を及ぼすかどうかを調べるために、白血病ジャーカットT細胞および非形質転換不死化ナチュラルキラー(Y T)細胞の両方を、外見的に最も強力なペルアセタート保護された類似体19<sup>\*</sup>で処理した。再度、白血病ジャーカットT細胞において、プロテアソーム標的タンパク質、Bax、p27(データは示していない)およびIB-(図18)のレベルが上昇した。しかし、非形質転換不死化Y T細胞では、これらのタンパク質のレベルは上昇しなかった。さらに、ジャーカットT細胞では、ユビキチン化タンパク質のレベルが用量依存的に蓄積した。対照的に、Y T細胞では、ユビキチン化タンパク質のレベルのわずかな、一時的な上昇しか検出されなかった。プロテアソーム活性の選択的阻害と一致して、アポトーシス特異的P A R P 切断はジャーカットTでのみ見られ、Y T細胞では見られなかった。したがって、強力なペルアセタート保護されたポリフェノールは、非形質転換Y T細胞において、プロテアソーム阻害と、それに続くアポトーシスを誘導しないことは明らかである。

20

## 【0175】

考察

緑茶由来の天然(-)-EGCGは、そのペルアセタート化合物1に変換した。さらに、ガラート環のヒドロキシル基の欠失を有する、数種の(-)-EGCGの合成類似体を合成した。さらに、ヒドロキシル基をアセテート基に変換してプロドラッグを作出したが、これは細胞の内側でエステラーゼによって切断され、親薬物に変換されることはできなかった。驚くべきことに、保護された類似体は、無傷の腫瘍細胞において、その保護されていない対応物よりもはるかにより強力なプロテアソーム阻害剤であった。白血病(ジャーカット)、充実腫瘍、形質転換細胞株において試験した場合に、保護された類似体が、保護されていないパートナーよりもより強力なアポトーシス誘導因子でもあったことは一貫している。保護された類似体のS A R分析により、その効力の順序は次の通りであると示された: 2a = 4a > 3a > 1 > (-)-EGCG。

30

## 【0176】

(-)-EGCGの保護された類似体を設計し、合成した。予想外なことに、これらの化合物は、in vivoでプロテアソーム阻害活性を有していると思われる。

40

ペルアシルオキシル、特に、ペルアセタート保護された類似体も、その保護されていない、ヒドロキシル化対応物よりもより強力なプロテアソーム阻害剤であるとわかる。プロテアソームのキモトリプシン様サブユニット(5)のN末端Thrは、(-)-EGCGのエステル結合された炭素に求核攻撃を行い、これによって、5-サブユニットへの不可逆的なアシル化が開始され、そのプロテアーゼ活性が阻害されるということが示唆された(Nam S、Smith DMおよびDow QP、J Biol Chem 276、13322~13330頁、2001)。しかし、ペルアセタート部分の付加により、エステル結合炭素の求電子特性が低下し、これによって精製20Sプロテアソームに対する阻害がかなり小さくなる。本研究で調べた保護されたポリフェノールも、精製20

50

Sプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して制限された阻害を示したことは驚くべきことではない（表1）。

#### 【0177】

プロテアソーム阻害の活性とB環の-OH基数の間には相関が示されている（表2）。保護されていない類似体のIC<sub>50</sub>値は、個々の-OH基が排除されるにつれ段階的に増加した（表1）。しかし、16は(-)-CGのA環のC<sub>8</sub>炭素から離れるさらなるベンゼン環を含むが、これは(-)-CGに対してわずかに増加したプロテアソーム阻害効力しか有していない（0.59対0.75μM）。

#### 【0178】

別の重要なSARにより、D環から-OH基がさらに排除されると、in vitroにおいてプロテアソーム阻害効力のさらなる低下がもたらされることが分かった（表1）。

#### 【0179】

図14に示されるように、ペルアセタート保護されたポリフェノールは、保護されていないポリフェノールよりもはるかにより強力なプロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害剤であった。ペルアセタート保護された類似体は、24時間での細胞のプロテアソームのキモトリプシン様活性の低下によって明らかのように、長期間安定であると思われる。対照的に、保護されていない類似体は、24時間処理した後には安定性を失うと思われる。細胞のプロテアソームのキモトリプシン様活性は、24時間後に類似体19\*によって97%阻害されたが、その保護されていない対応物6は、活性の30%しか阻害しなかった。その他の、保護された化合物対保護されていない化合物の対と比較して、22\*は、その対応物11から、キモトリプシン阻害効力の相対的に少ない増加しか示さず、これは、細胞において22\*が親薬物へ変換された可能性を示す。機構は十分には理解されていないが、細胞環境において、他のペルアセタート保護された緑茶類似体が、別個の強力な化合物に変換されるようである。

#### 【0180】

合成茶ポリフェノールでプロテアソームを阻害した後に数種のプロテアソーム標的タンパク質も評価した（図15）。Bax、p27およびユビキチン化タンパク質の蓄積によって表されるように、ペルアセタート保護された類似体は有効なプロテアソーム阻害剤に変換されるには、細胞および/または細胞抽出物の環境を必要とするというもう1つの証拠がデータから示された。保護された類似体は、in vitroモデルと比較して細胞モデルにおいて、その保護されていない対応物よりもより有効に標的タンパク質を蓄積できた。対照的に、保護されていない類似体は、標的タンパク質を保護された類似体の程度には蓄積しないようであり、これは-OH基からのプロトン供与とそれに続く分解の結果であり得る。データは、ペルアセタート保護された類似体は、in vivoで新規化合物への変換を受け、プロドラッグとして働くことをさらに示す。

#### 【0181】

トリパンブルー分析により、主に保護された類似体での処理後に誘導される、細胞死および特徴的なアポトーシス性形態変化の発生が確認された（図16）。再度、保護された類似体は、24時間で保護されていない類似体よりもより安定であると思われた（すべてにおいて50%より多い細胞死）。カスパーゼ-3活性により、アポトーシスが、保護された化合物とともに4時間インキュベートした後に起こったこと、カスパーゼ-3活性が対照と比較して最大16倍増加したことが確認される（図17）。PARP切断のウエスタンプロット解析により、19\*、24\*および22\*などの保護された類似体で4時間処理した後に出現したことがさらに示された。ペルアセタート保護された(-)-EGCG類似体、19\*が、ジャーカットT細胞においてアポトーシスを選択的に誘導したが、非形質転換YT細胞はあまり影響を受けないままであったことが最も重要であり（図18）、このことは、保護された類似体が新規抗癌物質に開発される可能性を示唆する。

#### 【0182】

要約すると、疫学的研究により、緑茶消費の抗癌的利益が示唆された。プロテアソーム

は、癌の病理的状態において示されており (Ciechanover A, Emborg J 17, 7151 ~ 7160 頁, 1998)、プロテアソームの阻害剤としての緑茶ポリフェノールは、いくつかの癌のための実行可能な治療であり得る。本発明者らの本研究は、ペルアセタート保護された-OH 基を含有する合成緑茶ポリフェノールは強力なプロテアソーム阻害剤であること、およびこれらの化合物をさらに調べることによって、この形の治療薬から得られるさらなる利益が解明される可能性があることをさらに示唆する。

#### 【0183】

本発明は、少なくとも(-)-EGCG と同程度には強力である(-)-EGCG の種々の誘導体を提供する。(-)-EGCG のカルボキシレート保護された形およびその誘導体は、保護されていない形よりもより安定であることがわかり、これをプロテアソーム阻害剤として用いて腫瘍細胞増殖を低減させることができる。さらに、1、2、3、4、19\*、21\*、22\* および 23\* の構造から、(-)-EGCG のガラート環のいくつかのヒドロキシル基は効力には重要でない可能性があるということがわかる。

#### 【0184】

本発明の好ましい実施形態を実施例によって詳述したが、当業者には本発明の改変および適応が生じることは明らかである。さらに、本発明の実施形態は、実施例または図面によってのみ制限されると解釈されなければならない。しかし、このような改変および適応は、特許請求の範囲に示される、本発明の範囲内にあるということは明確に理解されなければならない。例えば、一実施形態の一部として例示されるか、記載される特徴を、別の実施形態で用い、いっそうさらなる実施形態を得ることができる。したがって、本発明は、特許請求の範囲およびその等価物の範囲内に入るこのような改変および変形を対象とするものとする。

#### 【0185】

ここで、本発明の好ましい実施形態を、添付の図面を参照しながら実施例によって説明する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0186】

【図1】(-)-EGCG および本発明の(-)-EGCG 誘導体の例の構造を示す図である。

【図2】(-)-EGCG および 1 の分解曲線を示す図である。

【図3】ビタミン C の存在下での培養培地中のペルアセタート EGCG (1) の経時的推移結果 (面積対時間) を示す図である。化合物 1 : 、化合物 A (ジアセタート) : x、化合物 B (モノアセタート) : 、EGCG : 。

【図4】溶解物を添加したビタミン C の存在下での培養培地中のペルアセタート EGCG (1) の経時的推移結果 (面積対時間) を示す図である。化合物 1 : 、化合物 A (ジアセタート) : x、化合物 B (モノアセタート) : 、EGCG : 。

【図5】1 および (-)-EGCG による精製 20S プロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害を示す図である。

【図6a】図6a は in vivo での、1 および (-)-EGCG によるプロテアソーム活性の阻害を示す図である。

【図6b】図6b は 1 および (-)-EGCG で処理した後の、ユビキチンのウエスタンプロットアッセイを示す図である。

【図7】1 および (-)-EGCG で処理した p-Akt レベルの量を示す図である。

【図8】1 および (-)-EGCG で処理したジャーカット (Jurrkat) 細胞における細胞生存力を示す図である。

【図9a】示した各ポリフェノール 25 μM でジャーカット細胞を 4 時間処理し、続いて、ユビキチン、Bax、I-B、p27 およびアクチンに対する特異的抗体を用いてウエスタンプロット解析を行った結果を示す図である。矢印によって示されるバンドは、Bax および I-B のユビキチン化体である可能性がある。レーン 4、Ub-I-B バンドは、レーン 5 からの漏出の結果である可能性がある。示されるデータは 3 回の独立し

10

20

30

40

50

た実験を代表するものである。

【図9 b】示した各ポリフェノール25μMでジャーカット細胞を24時間処理し、続いて、ユビキチン、Bax、IB、p27およびアクチンに対する特異的抗体を用いてウエスタンプロット解析を行った結果を示す図である。矢印によって示されるバンドは、BaxおよびIBのユビキチン化体である可能性がある。

【図9 c】示した各ポリフェノール25μMでジャーカット細胞を最大8時間処理してウエスタンプロット解析を行った結果を示す図である。

【図9 d】示した化合物25μMでLNCaP細胞を24時間(D)処理してウエスタンプロット解析を行った結果を示す図である。

【図10 a】示したポリフェノール25μMでジャーカットT細胞を24時間処理した結果を示す図である。トリパンブルー取り込みアッセイ。データは全細胞集団にわたる死細胞の平均数±SDとして表されている。

【図10 b】示したポリフェノール25μMでジャーカットT細胞を24時間処理した結果を示す図である。PARP切断についてのウエスタンプロット。

【図10 c】示したポリフェノール25μMでVA-13細胞を24時間処理した結果を示す図である。FITCと結合しているp85切断PARP断片に対する特異的抗体を用いる後期アポトーシスの蛍光顕微鏡研究。DAPIでの対比染色法が、非アポトーシス細胞の対照として用いられている。画像は、倒立蛍光顕微鏡(Zeiss, Germany)を用いるAxioVisionソフトウェアを用いて得た。

【図10 d】示したポリフェノール25μMでVA-13細胞を24時間処理した結果を示す図である。同一視野中の全細胞数にわたってアポトーシス細胞数を計数することによるCにおけるアポトーシス細胞の定量化。データは2連の実験の平均±SDである。

【図11 a】乳癌細胞および前立腺癌細胞に対する合成アセチル化ポリフェノールの効果を示す図である。MTTアッセイ。乳癌MCF-7細胞を示した各化合物5または25μMで24時間処理した。

【図11 b】乳癌細胞および前立腺癌細胞に対する合成アセチル化ポリフェノールの効果を示す図である。形態変化。前立腺癌LNCaP細胞を、(-)-EGCGまたは保護された類似体25μMで24時間処理し、続いて、形態評価を行った。画像は、40×の倍率の位相差顕微鏡(Leica, Germany)を用いて得た。

【図11 c】乳癌細胞および前立腺癌細胞に対する合成アセチル化ポリフェノールの効果を示す図である。軟寒天アッセイ。LNCaP細胞を溶媒DMSOまたは(-)-EGCGもしくは保護された類似体25pMを含む軟寒天にプレーティングした。さらに薬物を添加することなく、細胞を21日間培養した。示したデータは、3連の実験を代表するスキヤンしたウェルである。

【図11 d】乳癌細胞および前立腺癌細胞に対する合成アセチル化ポリフェノールの効果を示す図である。C中のコロニーを自動計測器で定量し、平均値±SDとして示した。

【図12 a】示した化合物25μMで、正常WI-38およびSV-40形質転換VA-13細胞を24時間処理した結果を示す図である。無傷の細胞におけるプロテアソームのキモトリプシン様活性。

【図12 b】示した化合物25μMで、正常WI-38およびSV-40形質転換VA-13細胞を24時間処理した結果を示す図である。10×倍率での剥離細胞および接着細胞双方のアポトーシス形態についての核染色。パネルがないことは、細胞の剥離が全く起らなかつたことを示す。

【図12 c】示した化合物25μMで、正常WI-38およびSV-40形質転換VA-13細胞を36時間処理した結果を示す図である。40×倍率での剥離細胞および接着細胞双方のアポトーシス形態についての核染色。パネルがないことは、細胞の剥離が全く起らなかつたことを示す。

【図12 d】各化合物25μMで白血病ジャーカットT細胞および非形質転換Y-T細胞を24時間処理した結果を示す図である。PARPに対する特異的抗体を用いるウエスタンプロット解析。

10

20

30

40

50

【図13】(-)-EGCGの構造および本発明の(-)-EGCGペルアシルオキシリ誘導体の例の構造を示す図である。

【図13a】本発明の(-)-EGCGペルアシルオキシリ誘導体を合成する際の中間体を示す図である。

【図13b】本発明の(-)-EGCGペルアシルオキシリ誘導体を合成する際の中間体を示す図である。

【図14】溶媒(DMSO)および図13中の化合物25μMとともにジャーカットT細胞をブレインキュベートした際のキモトリプシン様活性を示す図である。

【図15】溶媒(DMSO)および図13中の化合物25μMで、ジャーカットT細胞を処理した際のプロテアソーム標的およびユビキチン化タンパク質の蓄積を示す図である。 10

【図16】溶媒(DMSO)および図13中の化合物25μMで、ジャーカットT細胞を処理した際の細胞死パーセンテージを示す図である。

【図17】溶媒(DMSO)および図13中の化合物25μMで、ジャーカットT細胞を処理した際のカスパーゼ-3の活性化を示す図である。

【図18】10および25μMの19<sup>\*</sup>で、ジャーカットT細胞および非形質転換ヒトナチュラルキラー(YT)細胞を4時間処理し、続いて、IB-、PARPおよびアクチンに対する特異的抗体を用いるウエスタンプロット解析を行った際の、腫瘍細胞におけるアポトーシスの誘導を示す図である。

【図1】

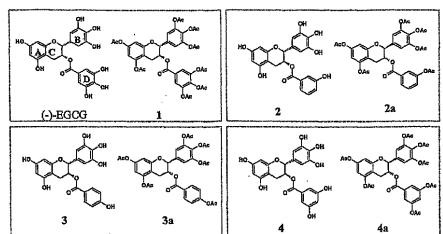
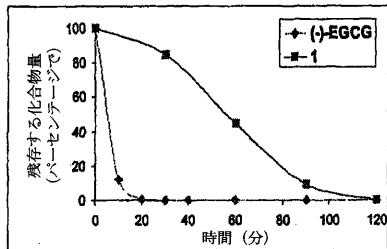
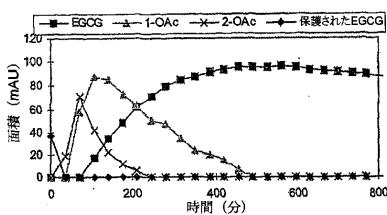


Figure 1

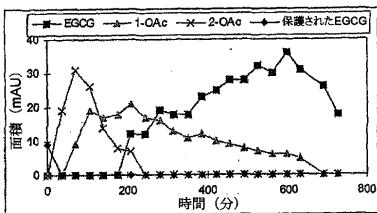
【図2】



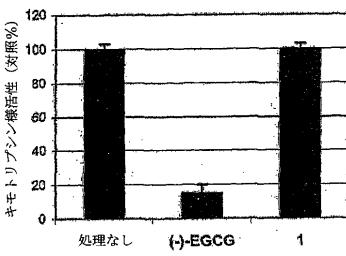
【図3】



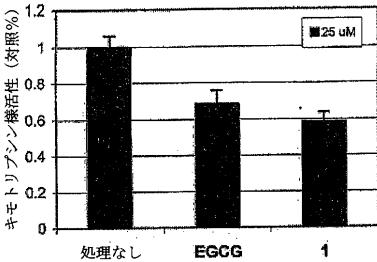
【図4】



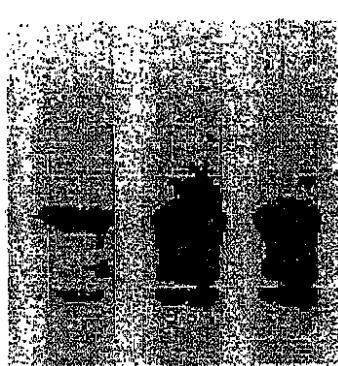
【図5】



【図6a】



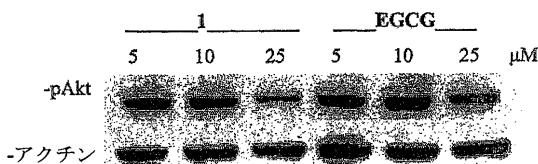
【図 6 b】



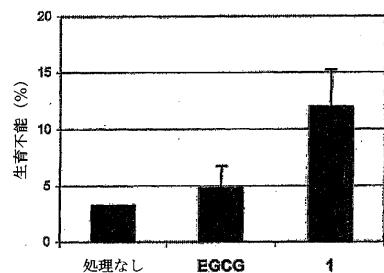
DMSO (-)EGCG 1

Figure 6b

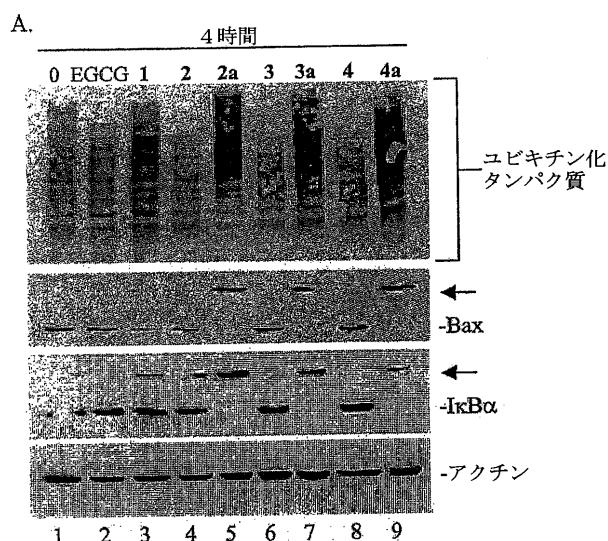
【図 7】



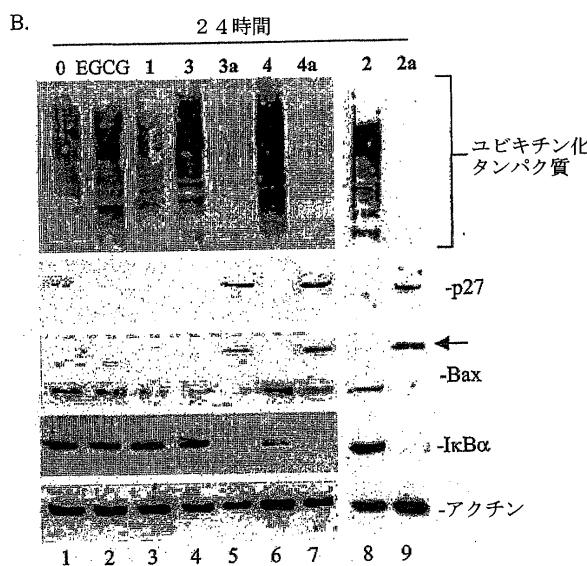
【図 8】



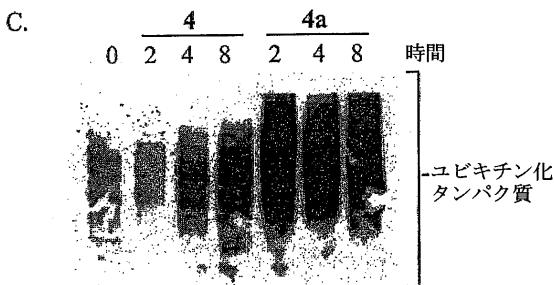
【図 9 a】



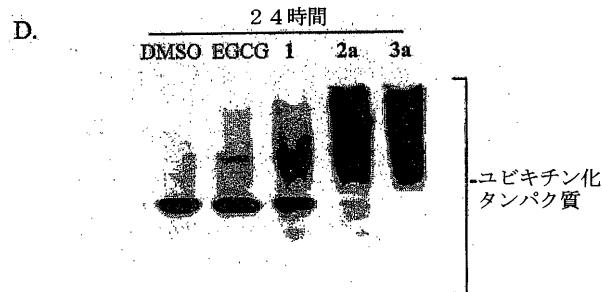
【図 9 b】



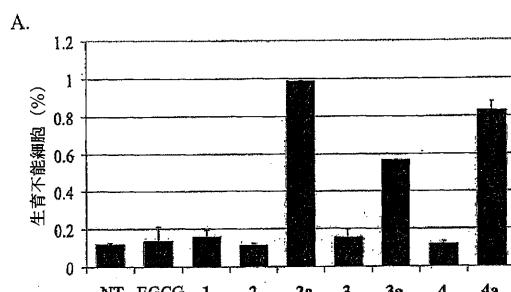
【図 9 c】



【図 9 d】



【図 10 a】



【図 10 b】

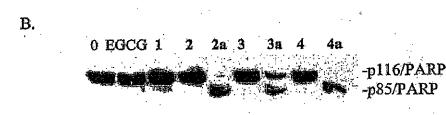
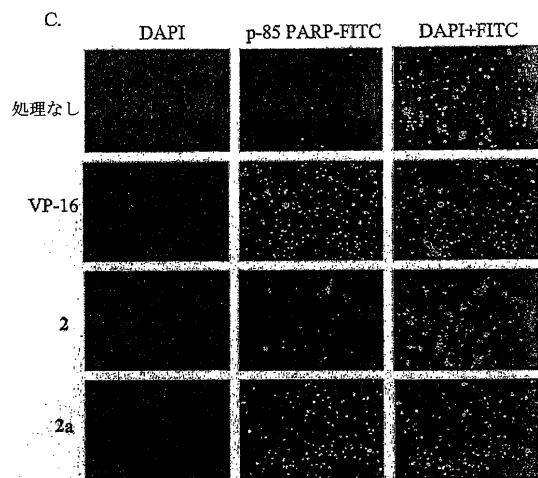
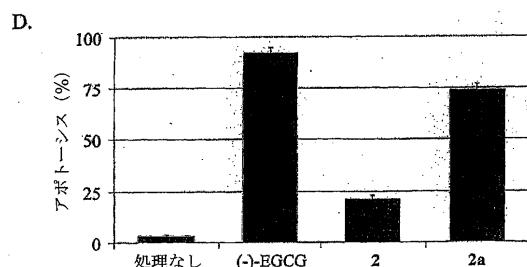


Figure 10b

【図 10 c】

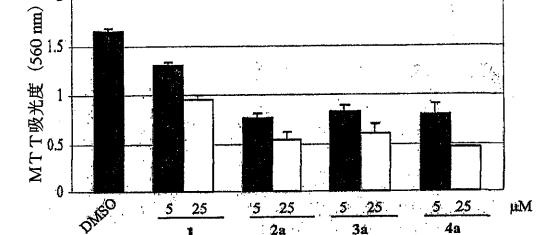


【図 10 d】



【図 11 a】

【図 11 a】



【図 11 b】

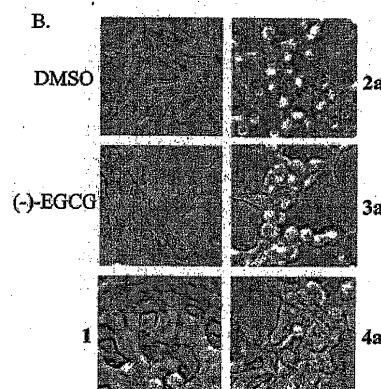


Figure 11b

【図 11 c】

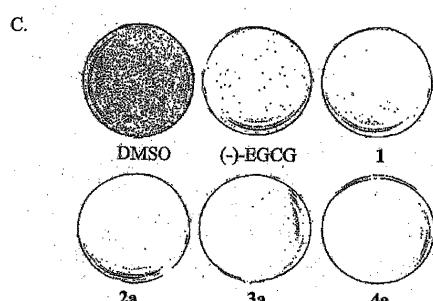
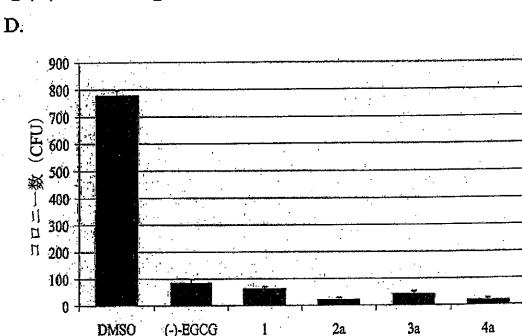
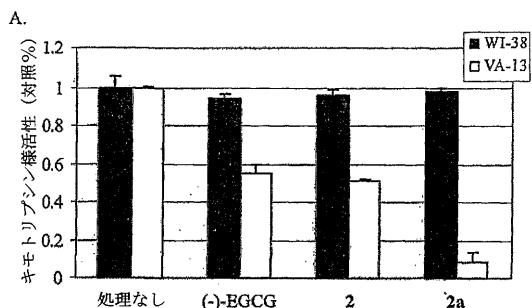


Figure 11c

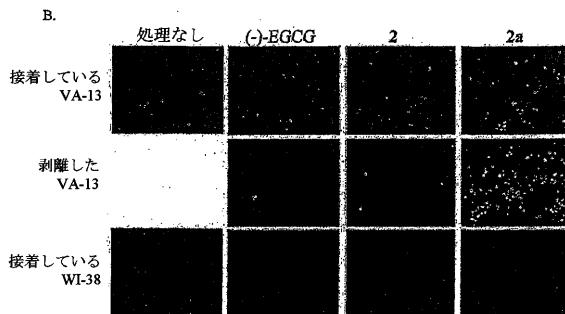
【図 11 d】



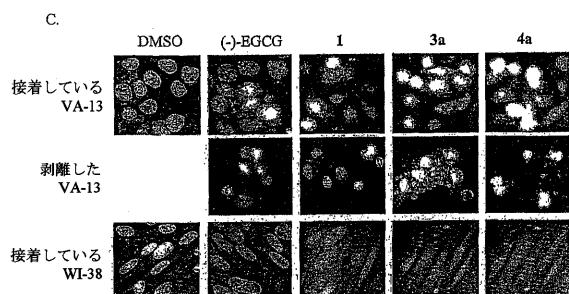
【図 12 a】



【図 12 b】



【 12c 】



【 図 1 2 d 】

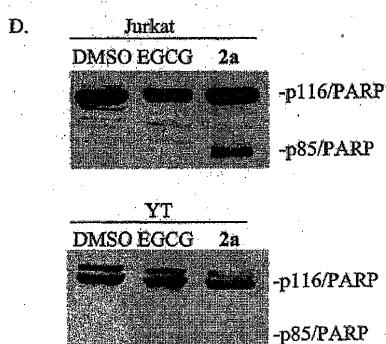


Figure 12d

( 四 13 )

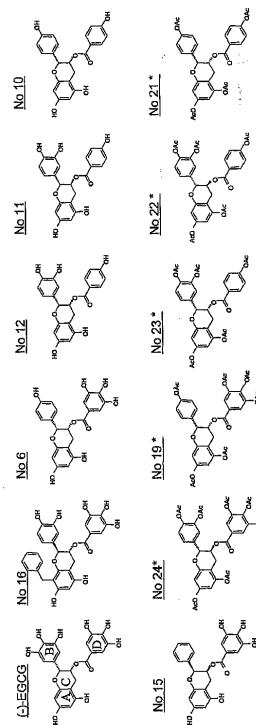


Figure 13

【図 1 3 a】

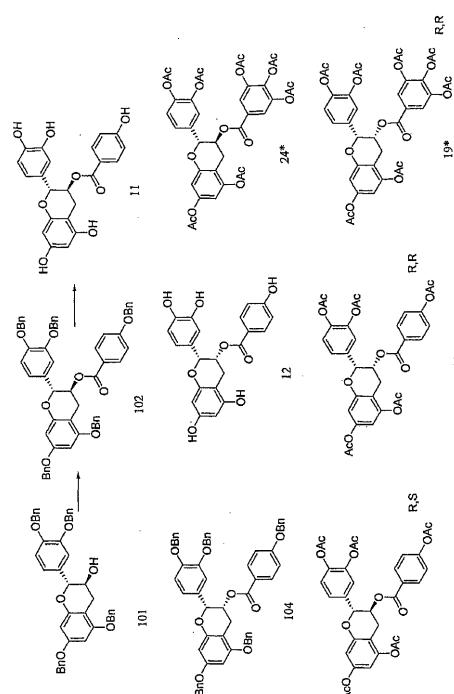


Figure 13a

( 义 1 3 b )

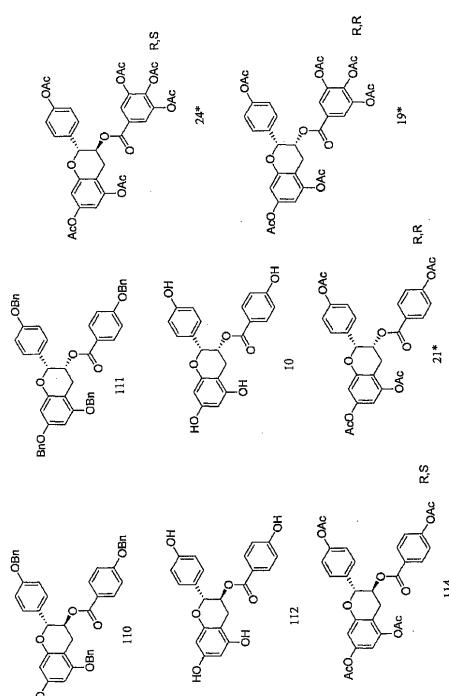
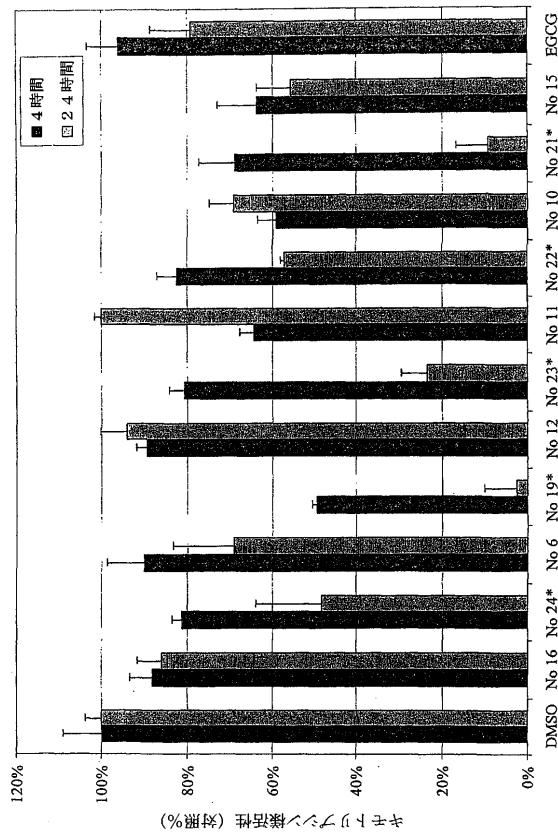
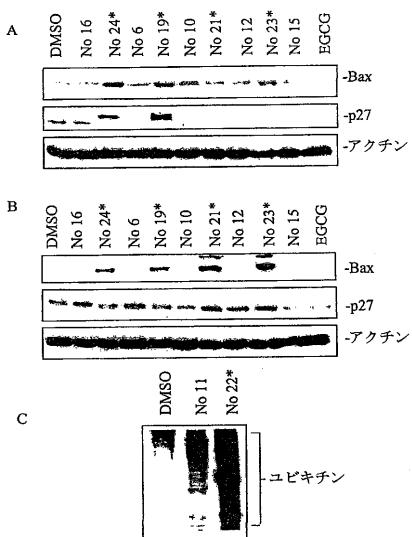


Figure 13b

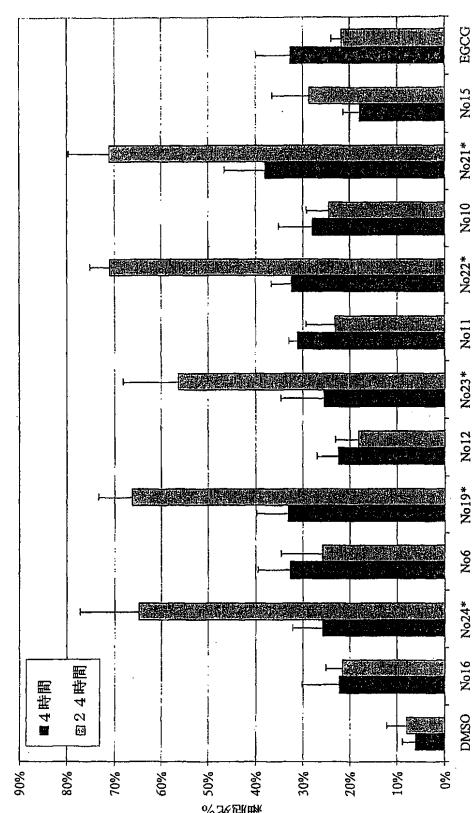
【図 14】



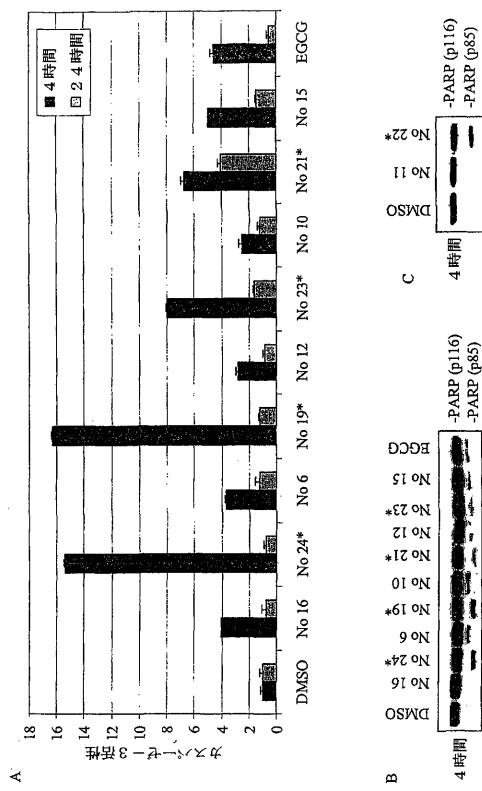
【図 15】



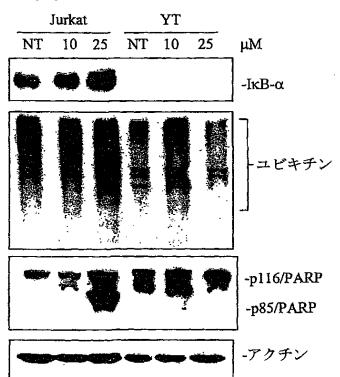
【図 16】



【図 17】



【図18】



---

フロントページの続き

(73)特許権者 398014333

ユニヴァーシティ オブ サウス フロリダ  
アメリカ合衆国 フロリダ 33612-9220, タンパ, スペクトラム ブールバード 3  
802, スイート 100

(73)特許権者 500094440

ザ・ロイヤル・インスティテューション・フォア・ザ・アドバンスメント・オブ・ラーニング/マ  
クギル・ユニヴァーシティ  
カナダケベック エイチ3エイ・2ティー-5, モントリオール, シャーブルック・ストリート  
・ウエスト 845

(74)代理人 100140109

弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092967

弁理士 星野 修

(74)代理人 100129458

弁理士 梶田 剛

(72)発明者 チャン, タク - ハン

香港, クーロン, フンホム, ディパートメント・オブ・アプライド・バイオロジカル・アンド・ケ  
ミカル・テクノロジー, シー / オー・ザ・ホンコン・ポリテクニック・ユニバーシティ

(72)発明者 ラム, ワイ - ハー

香港, クーロン, フンホム, ディパートメント・オブ・アプライド・バイオロジカル・アンド・ケ  
ミカル・テクノロジー, シー / オー・ザ・ホンコン・ポリテクニック・ユニバーシティ

(72)発明者 チョウ, ラリー・ミン - チュン

香港, クーロン, フンホム, ディパートメント・オブ・アプライド・バイオロジカル・アンド・ケ  
ミカル・テクノロジー, シー / オー・ザ・ホンコン・ポリテクニック・ユニバーシティ

(72)発明者 ドゥ, キン - ピン

アメリカ合衆国ミシガン州48201, デトロイト, ジョン・アール 4100, エイチダブリュ  
ーシーアールシー 516, ウェイン・ステイト・ユニバーシティ, スクール・オブ・メディスン  
, シー / オー・ディパートメント・オブ・パソロジー

(72)発明者 クーン, デボラ・ジョイス

アメリカ合衆国ミシガン州48201, デトロイト, ジョン・アール 4100, エイチダブリュ  
ーシーアールシー 516, ウェイン・ステイト・ユニバーシティ, スクール・オブ・メディスン  
, シー / オー・ディパートメント・オブ・パソロジー

(72)発明者 カジ, アスマムザマン

アメリカ合衆国ミシガン州48201, デトロイト, ジョン・アール 4100, エイチダブリュ  
ーシーアールシー 516, ウェイン・ステイト・ユニバーシティ, スクール・オブ・メディスン  
, シー / オー・ディパートメント・オブ・パソロジー

(72)発明者 ワン, シエン・ビヤオ

香港, クーロン, フンホム, ディパートメント・オブ・アプライド・バイオロジカル・アンド・ケ  
ミカル・テクノロジー, シー / オー・ザ・ホンコン・ポリテクニック・ユニバーシティ

(72)発明者 ランディス - ピウォワー, クリストイン・アール

アメリカ合衆国ミシガン州48201, デトロイト, ジョン・アール 4100, エイチダブリュ  
ーシーアールシー 516, ウェイン・ステイト・ユニバーシティ, スクール・オブ・メディスン  
, シー / オー・ディパートメント・オブ・パソロジー

審査官 早川 裕之

- (56)参考文献 特開昭57-118580(JP,A)  
特開昭57-120584(JP,A)  
国際公開第99/022728(WO,A1)  
米国特許出願公開第2004/0110790(US,A1)  
特開平10-254087(JP,A)  
*Bulletin of Magnetic Resonance*, 1995年, vol.17, 242-243  
*Liebigs Ann.Chem.*, 1957年, 177-182  
*Phytochemistry*, 1994年, vol.37, No.2, 533-538  
*Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004年, 12, 3521-3527  
*Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004年, 12, 5587-5593  
*Fine Chemicals*, 2002年, vol.19, No.2, 86-89  
*Natural Product Research and Development*, 2001年, vol.13, No.4, 12-15  
*Phytochemistry*, 1993年, vol.33, No.1, 171-174

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 D 311/62  
A 61 K 31/353  
A 61 P 35/00~02  
A 61 P 43/00  
C A p l u s (S T N)  
R E G I S T R Y (S T N)