

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6404220号
(P6404220)

(45) 発行日 平成30年10月10日 (2018. 10. 10)

(24) 登録日 平成30年9月21日 (2018. 9. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 311/12 (2006. 01)

C O 7 D 311/12 C S P

C O 7 D 311/14 (2006. 01)

C O 7 D 311/14

A 6 1 K 31/352 (2006. 01)

A 6 1 K 31/352

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006. 01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 17 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-533430 (P2015-533430)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月25日 (2013. 9. 25)
 (65) 公表番号 特表2016-500649 (P2016-500649A)
 (43) 公表日 平成28年1月14日 (2016. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2013/084146
 (87) 国際公開番号 W02014/048313
 (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
 審査請求日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)
 (31) 優先権主張番号 201210363366.6
 (32) 優先日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)
 (31) 優先権主張番号 201210363367.0
 (32) 優先日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 515083848
 シェンドーン イーンドーン イーンハオ
 バイオテクノロジー, インコーポレイテ
 イド
 中華人民共和国, シェンドーン 2 6 4 6
 7 0, イエンタイ, ガオシンチュイ, ハー
 ンティエンルウ ナンバー 1 0 1
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

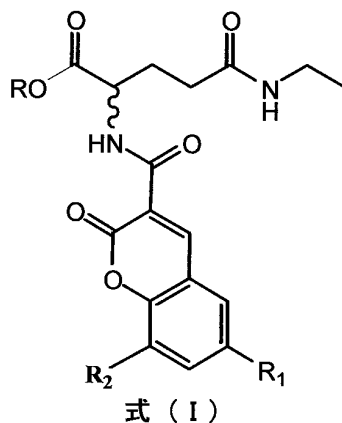
(54) 【発明の名称】 テアニン誘導体とカルボン酸クマリン誘導体との縮合生成物、その中間体、調製方法、及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I)

【化 1】



式 (I)

(式中、

【表 1】

(Ia)	R= CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H	~~~~~ =
(Ib)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H	~~~~~ =
(Ic)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =H	~~~~~ =
(Id)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =H	~~~~~ =
(Ie)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =F	R ₂ =H	~~~~~ =
(If)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NO ₂	R ₂ =H	~~~~~ =
(Ig)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =Cl	~~~~~ =
(Ih)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =Br	~~~~~ =
(Ii)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NH ₂	R ₂ =H	~~~~~ =

10

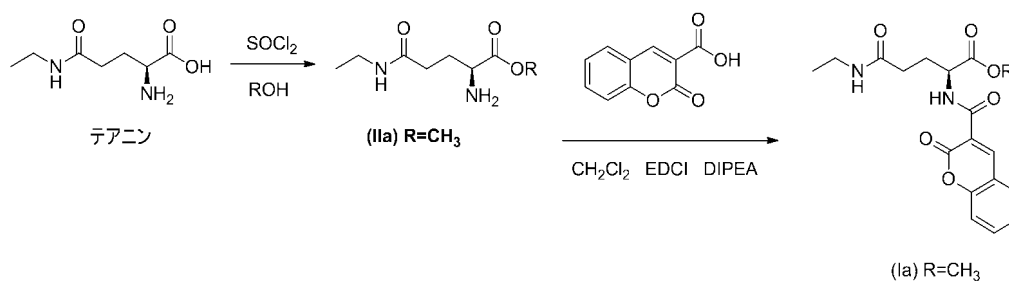
)

により表される、化合物。

【請求項 2】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I a を調製する方法。

【化 2】

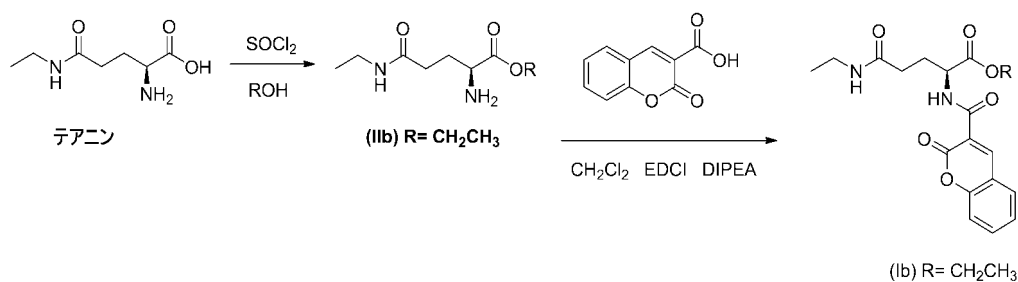


20

【請求項 3】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I b を調製する方法。

【化 3】



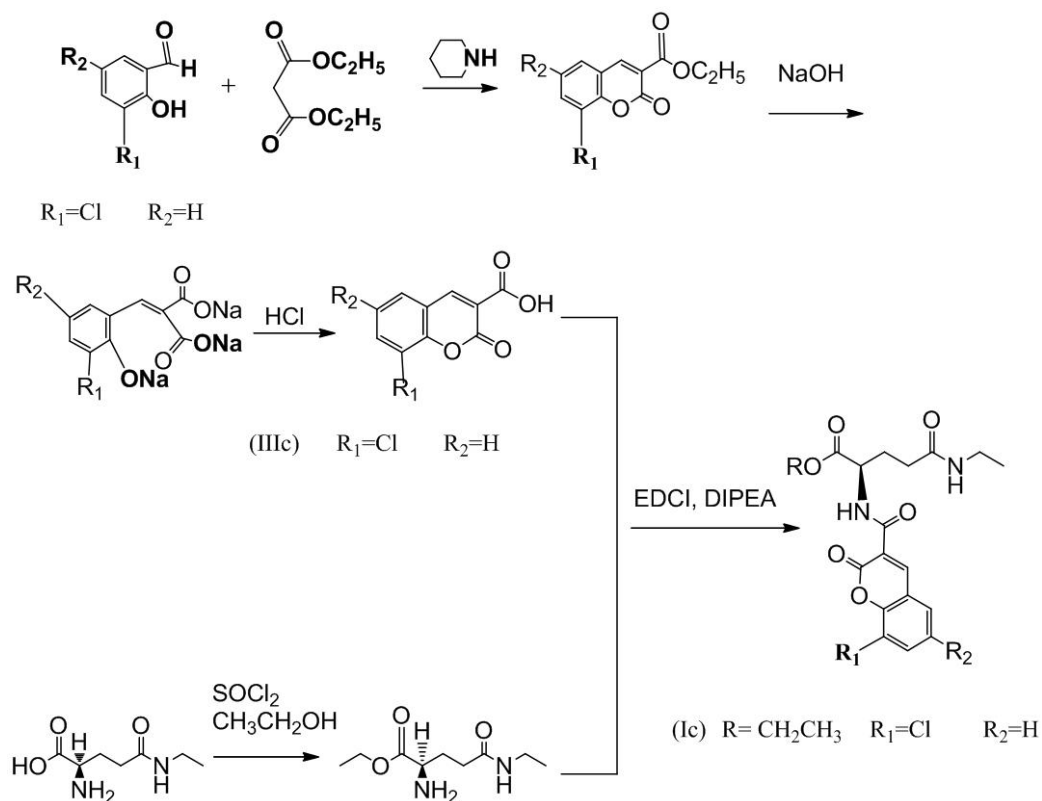
30

【請求項 4】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I c を調製する方法。

40

【化 4】



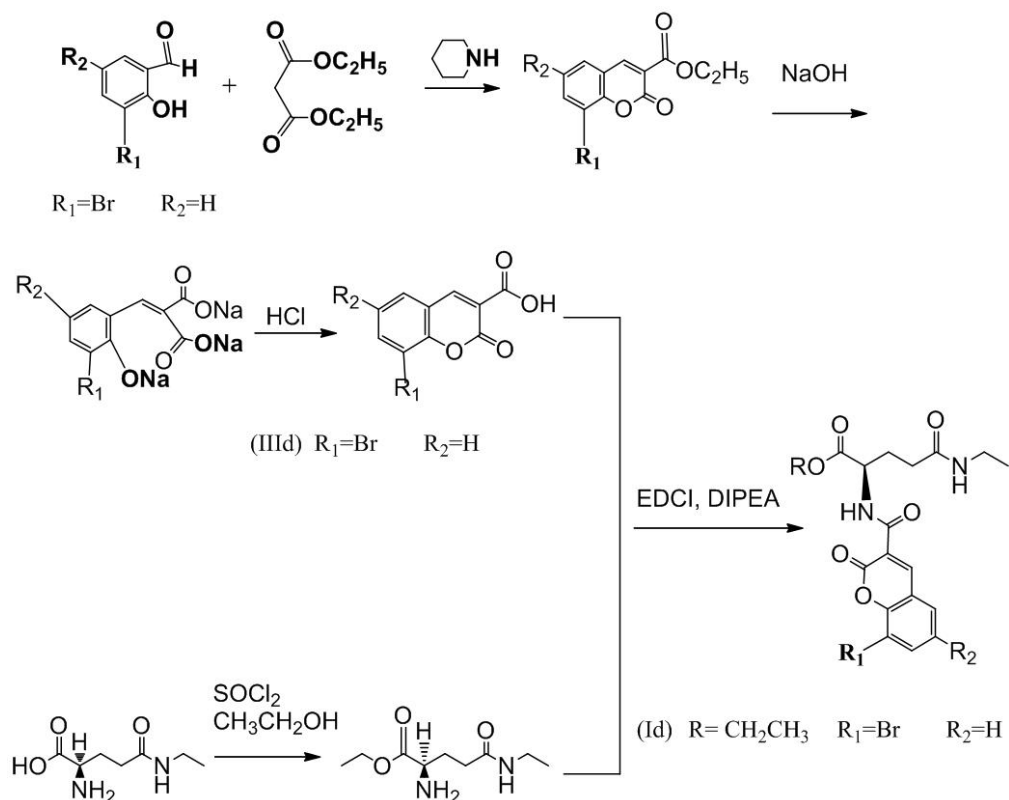
10

20

【請求項 5】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I d を調製する方法。

【化 5】



30

40

【請求項 6】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I e を調製する方法。

$R_1 = F \quad R_2 = H$

(IIIe) $R_1 = F \quad R_2 = H$

(Ie) $R = CH_2CH_3 \quad R_1 = F \quad R_2 = H$

20

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I f を調製する方法。

$$\begin{array}{c}
 \text{R}_2 \\
 | \\
 \text{C}_6\text{H}_2(\text{R}_1)(\text{CHO})(\text{OH}) + \text{O}=\text{C}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2 \xrightarrow{\text{NH}} \text{R}_2-\text{C}_6\text{H}_2(\text{R}_1)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5 \xrightarrow{\text{NaOH}} \\
 \text{R}_1=\text{NO}_2 \quad \text{R}_2=\text{H}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{c}
 \text{R}_2 \\
 | \\
 \text{C}_6\text{H}_2(\text{R}_1)(\text{ONa})_2-\text{C}(=\text{O})\text{ONa} \xrightarrow{\text{HCl}} \text{R}_2-\text{C}_6\text{H}_2(\text{R}_1)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \quad (\text{IIIIf}) \quad \text{R}_1=\text{NO}_2 \quad \text{R}_2=\text{H}
 \end{array}$$

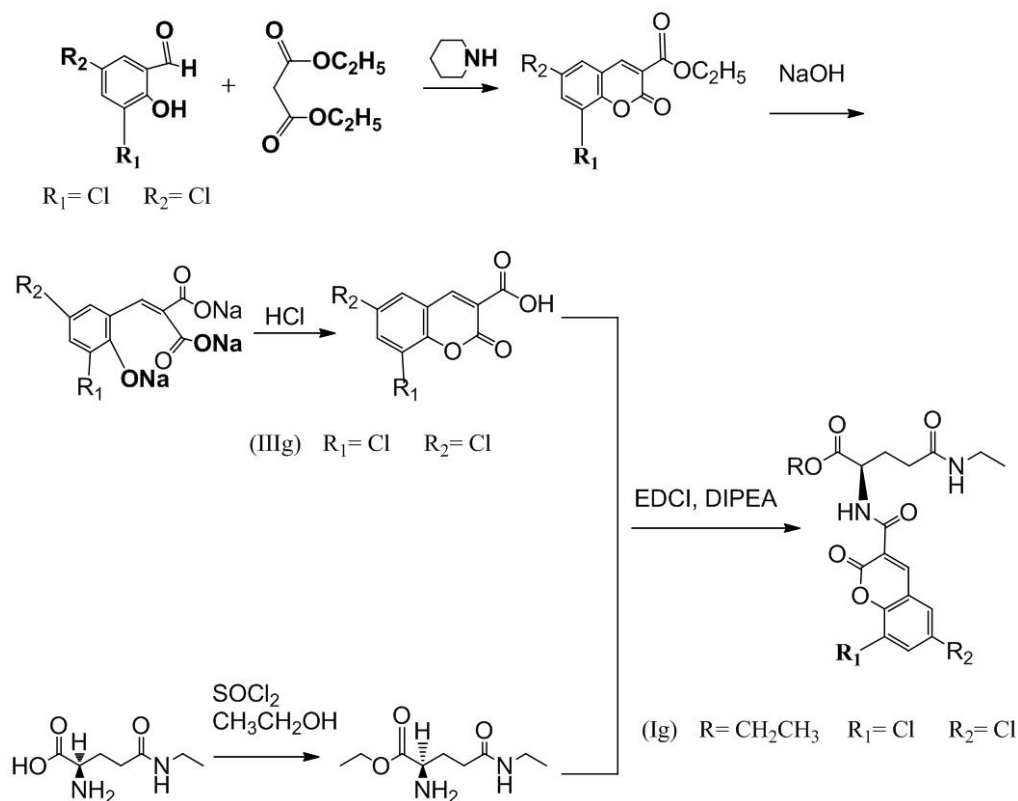
$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \xrightarrow[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}]{\text{SOCl}_2} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 \quad (\text{If}) \quad \text{R}=\text{CH}_2\text{CH}_3 \quad \text{R}_1=\text{NO}_2 \quad \text{R}_2=\text{H}
 \end{array}$$

$$\text{R}_2-\text{C}_6\text{H}_2(\text{R}_1)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{DIPEA}]{\text{EDCI}} \text{Product 10}$$

40

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I g を調製する方法。

【化 8】



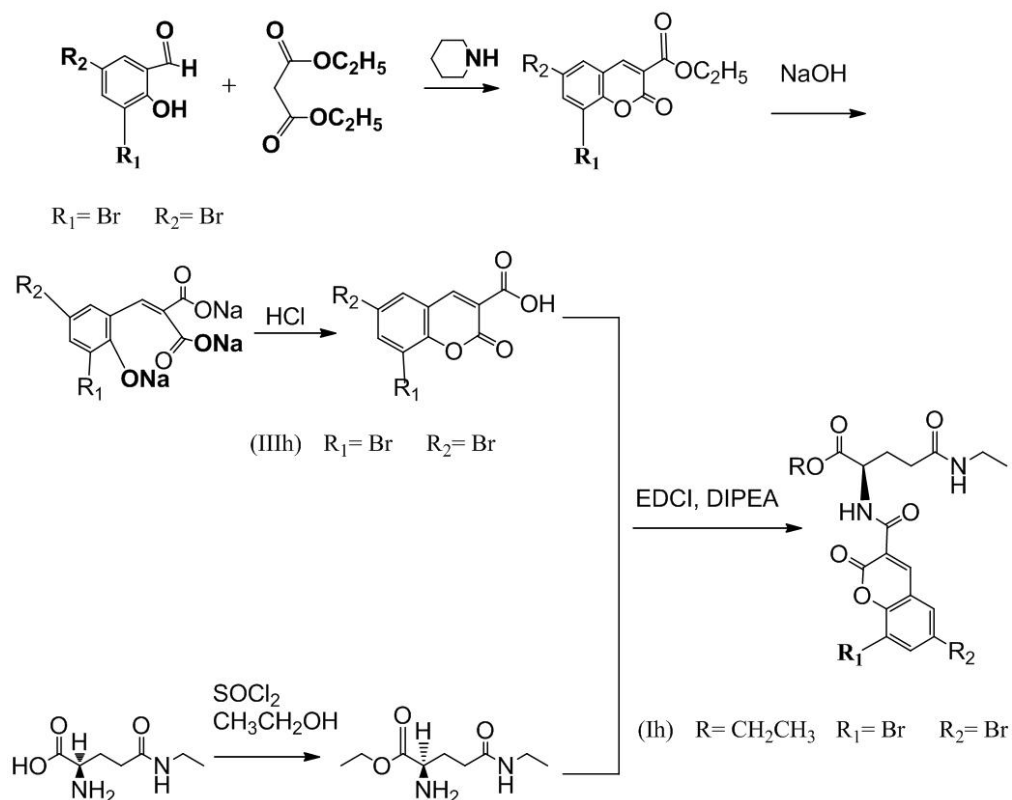
10

20

【請求項 9】

下記化学反応式により、請求項 1 に記載の化合物 I h を調製する方法。

【化 9】



30

40

【請求項 10】

請求項 1 に記載の化合物及び任意に薬剤的に許容できる賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 11】

前記医薬組成物が、嚥下可能な錠剤、頬側錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル

50

剤、懸濁剤、シロップ剤、注射液、塗り広げできるペースト、ゲル、軟膏、又はソープの形態で使用する、請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

前記医薬組成物が種々の医薬剤形であり、前記医薬剤形が、乳化可能ナリポソーム、ミクロスフィア、及びナノスフィアから選択される、請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

ヒトの肺癌、乳癌、肝臓癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、胃癌、食道癌、喉頭癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、皮膚癌、気管支癌、細気管支癌、尿道癌、腎臓癌、口腔癌、膣癌、胆管癌、膵臓癌、膀胱癌、脳癌、神経腫、及び鼻咽頭癌の予防及び治療における使用のための、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 4】

ヒストンメチルトランスフェラーゼ E Z H 2 の阻害における使用のための、又はヒストンデアセチラーゼの阻害における使用のための、又は、腫瘍、炎症、心血管疾患、及び免疫不全に関連した因子である N F - B の阻害における使用のための、又は、腫瘍、炎症、心血管疾患、及び免疫不全に関連する、V E G F R、E G F R、c - M e t、K - R a s、H - R a s、A k t、サイクリン D 1、- カテニン、E R -、M M P - 9、M M P - 2、D v 1 - 1、D v 1 - 2、D v 1 - 3、B c 1 - 2、H D A C 3 及び H D A C 4 からなる群から選択される因子のタンパク質レベルの低下における使用のための、又は、B a x、p 5 3、p 2 1、E - カドヘリン、カスパーゼ 3、及びチトクロム C のタンパク質レベルの増加における使用のための、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 5】

放射線療法と相乗作用する、又は、放射線療法、化学療法、外科治療、温熱療法、及び集学的治療と協同した腫瘍治療における使用のための、化学療法剤と一緒に使った、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記腫瘍が、ヒトの肺癌、乳癌、肝臓癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、胃癌、食道癌、喉頭癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、皮膚癌、気管支癌、細気管支癌、尿道癌、腎臓癌、口腔癌、膣癌、胆管癌、膵臓癌、膀胱癌、脳癌、神経腫、及び鼻咽頭癌からなる群から選択される、請求項 1 4 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 7】

炎症、心血管疾患、及び免疫不全の予防及び治療における使用のための、又は、上述の疾患の臨床診断蛍光標識における使用のための、又は生活用品の蛍光標識の化合物の組合せにおける使用のための、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本発明は、医療技術、特に、テアニン誘導体とカルボン酸クマリン誘導体との縮合生成物である式 (I) により表される化合物、両方とも前記縮合生成物の中間体である式 (I I) 及び式 (I I I) により表される化合物、これらの化合物を調製する方法、前記化合物を含む医薬組成物、並びに腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全疾患、及び同種のものの予防及び治療のための医薬品を調製する際のその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒトの肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、リンパ腫、メラノーマ、及び同種のものなどの悪性腫瘍の異常な増殖、浸潤、及び転移は、毎年数万人の患者の死

50

亡の重大な理由である。悪性腫瘍の発生率も特定のレベルのままであり、悪性腫瘍は、ヒトの健康をひどく脅かす主要な疾患になった。化学療法及び放射線療法の臨床的な毒性作用及び副作用により、前記疾患の効果的な予防及び治療のためのこれらの療法の利用は制限されてきた。テアニン（グルタミルエチルアミンとしても知られる）は、茶の質を示す特徴的なアミノ酸である。テアニンには、食品成分としての毒性作用及び副作用が全くないので、その量が制限されずに食品添加物として食品産業において広く使用されている。試験によると、テアニンが腫瘍中の抗癌医薬品の濃度を高め、ヒトの卵巣癌を相乗的に治療し得ることが示された（Sadzuki et al, Toxicol Lett 123:159-67, 2001）。発明者らの以前の実験は、テアニンが肝臓癌及び肺癌を阻害する効果を有することを証明した（Liu, et al, Cytotechnology 59:211-217, 2009; Zhang et al. Biosci Biotechnol Biochem 2002, 66 (4):711-6）。本発明において、テアニン誘導体とカルボン酸クマリン誘導体との新規な縮合生成物及び前記縮合生成物の中間体は、化学的方法によりテアニンから形成され、前記化合物の抗腫瘍活性は抗癌医薬品及びテアニンの活性を上回る。

【0003】

ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2阻害剤及びSAHA（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）、バルプロ酸、酪酸ナトリウム、及び同種のものなどのヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤は、米国において血液腫瘍及び固形腫瘍のI相又はII相臨床試験にかけられ、EZH2及びHDACは、乳癌、肺癌、前立腺癌、白血病、膵臓癌、子宮頸癌、腸の癌、肝臓癌、及び他の悪性腫瘍を含む種々のヒトの癌において過剰発現しており、抗癌医薬品の標的としてのEZH2及びHDACに関する数多くの研究が米国で実施され、これらのEZH2阻害剤及びHDAC阻害剤は、種々の腫瘍の治療に広く使用されており、実用の見込みが良好な潜在的な新規抗癌医薬品と考えられている（Yamaguchi et al., Cancer Sci., 10:355-62, 2010; Denis, et al., Clin Exp Metastasis 25:183-189, 2008; Kelly et al., Nat Clin Pract Oncol 2:150-157, 2005; Martinez-Iglesias et al., Clin Transl Oncol. 10:395-8, 2008）。

【0004】

核タンパク因子NF- κ Bは、種々の腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患を促進するタンパク因子であると考えられており、疾患の予防及び治療の重要な標的になりつつある（Ishii et al., J Clin Biochem Nutr 50:91-105, 2012）。

【0005】

VEGFR、EGFR、c-Met、及びER- α などの高レベルの受容体、並びに腫瘍のシグナル伝達に関連しているK-Ras、H-Ras、Akt、サイクリンD1、MMP-9、MMP-2、Dvl-1、Dvl-2、Dvl-3、 β -カテニン、及びBcl-2などのタンパク因子の異常な過剰発現が、種々の腫瘍の発生及び進行に関連している一方で、腫瘍抑制因子タンパク質p53、p21、E-カドヘリン、カスパーゼ3、Bax、及びチトクロムCのレベル増加は、種々の癌細胞の増殖、浸潤、及び（又は）転移の阻害を示す（Cengel, et al., Neoplasia 9:341-8, 2007; Huang et al., Biochem Pharmacol 77:794-803, 2009; Prasad et al, Oncology. 73:112-7, 2007）。そのため、これらの癌関連因子は、癌の予防及び治療の潜在的な重要な標的となり、これらのタンパク因子の発現レベル及び活性に効果的に影響を与えることができる化合物は、癌の予防及び治療において広い実用の見込みを有する。

【0006】

テアニン誘導体とカルボン酸クマリン誘導体との縮合生成物である式（I）により表される化合物、並びに式（II）及び式（III）により表されるその中間体は、全て本発

10

20

30

40

50

明により与えられるが、上述のタンパク因子のレベル及び活性に著しく影響を与えることができ、そのため、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全疾患、及び他の疾患の予防及び治療のための阻害剤の調製において広い見込みを有する。

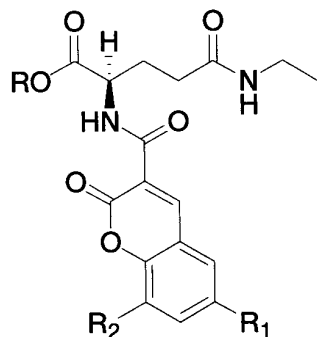
【発明の概要】

【 0 0 0 7 】

本発明の一目的は、式 (I) により表される化合物並びに式 (I I) 及び式 (I I I) により表されるその中間体を提供することである：

【 0 0 0 8 】

【化 1】



式 (I)

式中、

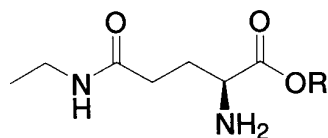
【 0 0 0 9 】

【表 1】

(Ia)	R= CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H
(Ib)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H
(Ic)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =H
(Id)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =H
(Ie)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =F	R ₂ =H
(If)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NO ₂	R ₂ =H
(Ig)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =Cl
(Ih)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =Br
(Ii)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NH ₂	R ₂ =H

【 0 0 1 0 】

【化 2】



式 (I I)

式中、

【 0 0 1 1 】

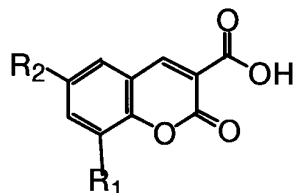
【 表 2 】

(IIa)	R= CH ₃
(IIb)	R= CH ₂ CH ₃

【 0 0 1 2 】

【 化 3 】

10



式 (I I I)

20

式中、

【 0 0 1 3 】

【 表 3 】

(IIIc)	R ₁ =Cl	R ₂ =H
(IIId)	R ₁ =Br	R ₂ =H
(IIIe)	R ₁ =F	R ₂ =H
(IIIf)	R ₁ =NO ₂	R ₂ =H
(IIIg)	R ₁ =Cl	R ₂ =Cl
(IIIh)	R ₁ =Br	R ₂ =Br

30

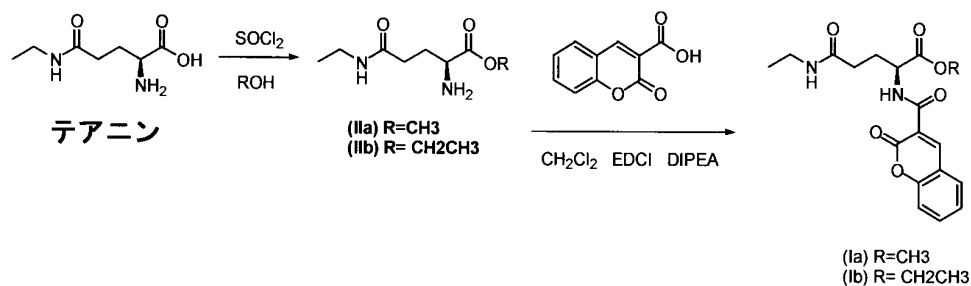
【 0 0 1 4 】

本発明の別な目的は、本発明の化合物を調製する方法を提供することである：

1) 以下に下記の化合物 I a ~ I b 及び I I a ~ I I b を調製する方法

【 0 0 1 5 】

【 表 1 】



40

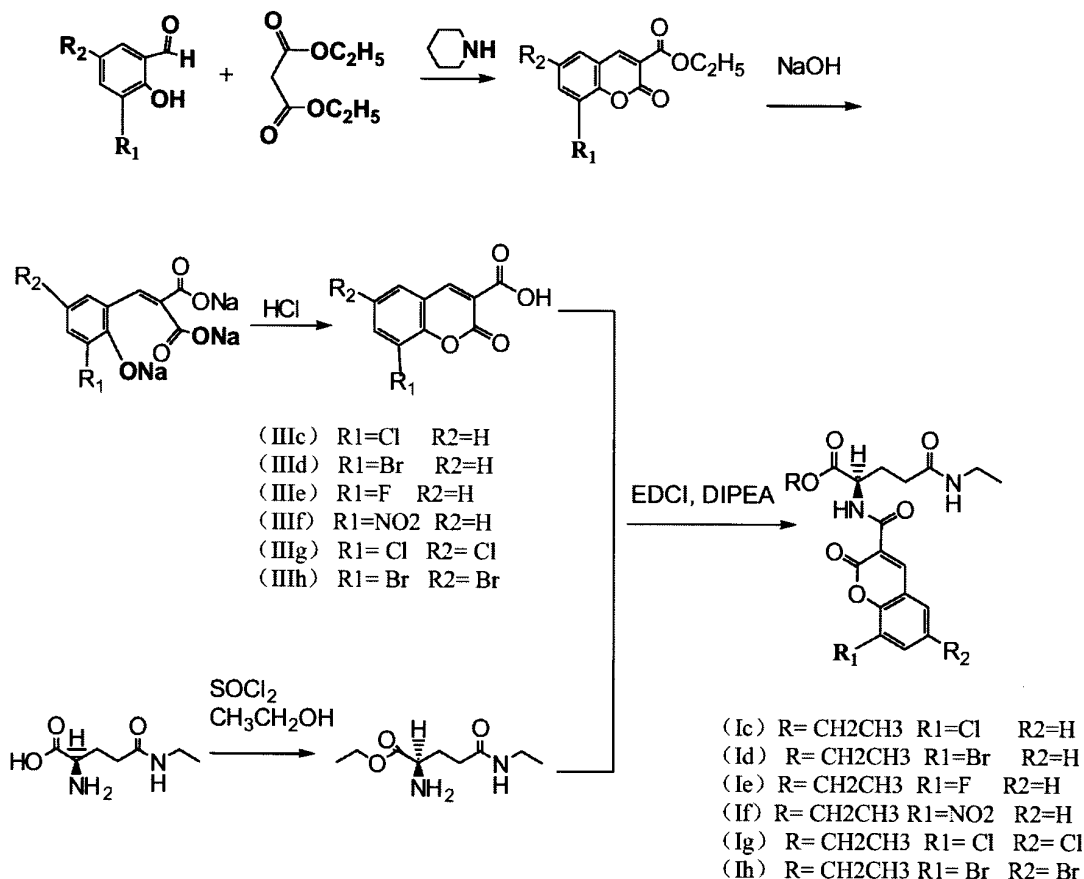
;

2) 以下に記載の化合物 I c ~ I h 及び I I I c ~ I I I h を調製する方法

50

【 0 0 1 6 】

【 表 5 】



3) 先に記載の化合物 I i を調製する方法：化合物 I i は、化合物 I f を還元条件下で還元することにより容易に得ることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明の別な目的は、少なくとも1種の本発明の化合物及び任意に薬剂的に許容できる賦形剤を含む、本発明の化合物を含む医薬組成物を提供することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の別な目的は、本発明の化合物、又は式 (I I I a) により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式 (I I I a) により表される化合物を含む医薬組成物の、医薬品の調製、とりわけ、ヒトの肝臓癌、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療のための医薬品の調製における使用を提供することである。したがって、本発明は、ヒトの肝臓癌、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療の方法であって、治療すべき患者に、治療上有効な量の少なくとも1種の本発明の化合物、又は式 (I I I a) により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式 (I I I a) により表される化合物を含む医薬組成物を投与することを含む方法を提供する：

【 0 0 1 9 】

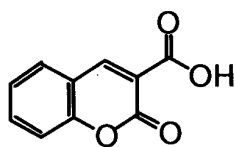
10

20

30

40

【化 4】



式 (I I I a)。

10

【0020】

本発明は、ヒトの肝臓癌、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療のための本発明の化合物、又は式 (I I I a) により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式 (I I I a) により表される化合物を含む医薬組成物にさらに関する。

【0021】

本発明の別な目的は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ E Z H 2 阻害剤の調製における、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤の調製における、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進に関連する因子である N F - B の阻害剤の調製における、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連する V E G F R、E G F R、c - M e t、E R - 、K - R a s、H - R a s、A k t、サイクリン D 1、M M P - 9、M M P - 2、D v 1 - 1、D v 1 - 2、D v 1 - 3、 - カテニン、及び B c 1 - 2 を含む因子の阻害剤の調製における、並びに、B a x、p 5 3、p 2 1、E - カドヘリン、カスパーゼ 3、及び細胞質 / ミトコンドリアチトクロム C の比率を増加させる活性化因子の調製における、本発明の化合物、又は式 (I I I a) により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式 (I I I a) により表される化合物を含む医薬組成物の使用を提供することである。したがって、本発明は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ E Z H 2 を阻害する方法、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) を阻害する方法、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進と関連した因子である N F - B を阻害する方法、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連している V E G F R、E G F R、c - M e t、E R - 、K - R a s、H - R a s、A k t、サイクリン D 1、M M P - 9、M M P - 2、D v 1 - 1、D v 1 - 2、D v 1 - 3、 - カテニン、及び B c 1 - 2 を含む因子を阻害する方法、並びに、B a x、p 5 3、p 2 1、E - カドヘリン、カスパーゼ 3、及び細胞質 / ミトコンドリアチトクロム C の比率を増加させる方法を提供する。

20

30

【0022】

本発明は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ E Z H 2 を阻害するための、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) を阻害するための、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進と関連した因子である N F - B を阻害するための、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連している V E G F R、E G F R、c - M e t、E R - 、K - R a s、H - R a s、A k t、サイクリン D 1、M M P - 9、M M P - 2、D v 1 - 1、D v 1 - 2、D v 1 - 3、 - カテニン、及び B c 1 - 2 を含む因子を阻害するための、並びに B a x、p 5 3、p 2 1、E - カドヘリン、カスパーゼ 3、及び細胞質 / ミトコンドリアチトクロム C の比率を増加させるための本発明の化合物にさらに関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】図 1 は、実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h のインピボ及びインピトロで検出された蛍光画像を表す。

【発明を実施するための形態】

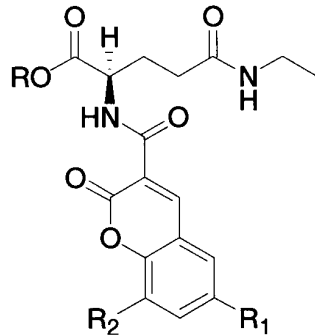
50

【 0 0 2 4 】

本発明の一目的は、式（Ⅰ）により表される化合物並びに式（ⅠⅠ）及び式（ⅠⅠⅠ）により表されるその中間体を提供することである：

【 0 0 2 5 】

【化 5】



10

式（Ⅰ）

式中、

20

【 0 0 2 6 】

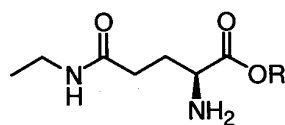
【表 6】

(Ia)	R= CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H
(Ib)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =H	R ₂ =H
(Ic)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =H
(Id)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =H
(Ie)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =F	R ₂ =H
(If)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NO ₂	R ₂ =H
(Ig)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Cl	R ₂ =Cl
(Ih)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =Br	R ₂ =Br
(Ii)	R= CH ₂ CH ₃	R ₁ =NH ₂	R ₂ =H

30

【 0 0 2 7 】

【化 6】



40

式（ⅠⅠ）

式中、

【 0 0 2 8 】

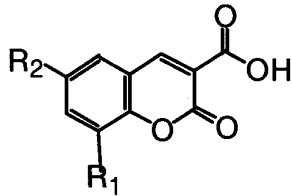
【表 7】

(IIa)	R= CH ₃
(IIb)	R= CH ₂ CH ₃

【 0 0 2 9 】

【化 7】

10



式 (I I I)

式中、

20

【 0 0 3 0 】

【表 8】

(IIIc)	R ₁ =Cl	R ₂ =H
(IIId)	R ₁ =Br	R ₂ =H
(IIIe)	R ₁ =F	R ₂ =H
(IIIf)	R ₁ =NO ₂	R ₂ =H
(IIIg)	R ₁ =Cl	R ₂ =Cl
(IIIh)	R ₁ =Br	R ₂ =Br

30

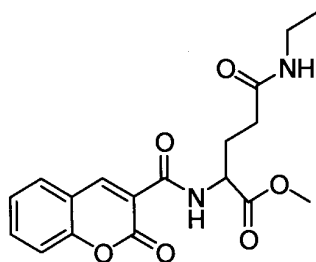
【 0 0 3 1 】

具体的には、化合物 I a の名称は、TMC と呼ばれるメチル 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - 2 - (2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) ペンタノエートであり、化合物 I a は、以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 3 2 】

【化 8】

40



Ia

化合物 I a は、白色粉末状固体であり、154 の融点又はそれより高温で分解する。

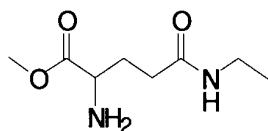
50

【 0 0 3 3 】

中間体テアニンメチルエステル I I a は、以下の構造式により示される：

【 0 0 3 4 】

【 化 9 】



I I a

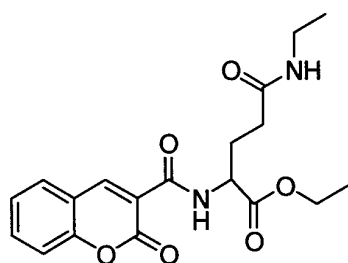
10

【 0 0 3 5 】

化合物 I b の名称は、T E C と呼ばれるエチル 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - 2 - (2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) ペンタノエートであり、化合物 I b は以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 3 6 】

【 化 1 0 】



Ib

20

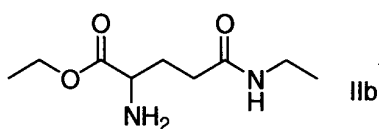
化合物 I b は、白色粉末状固体であり、180 の融点又はそれより高温で分解する。

【 0 0 3 7 】

中間体テアニンエチルエステル I I b は以下の構造式により示される：

【 0 0 3 8 】

【 化 1 1 】



IIb

30

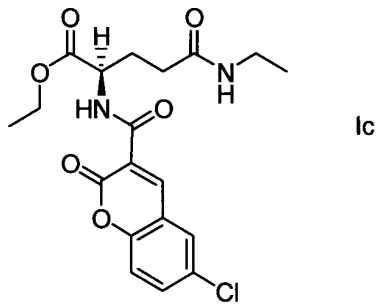
40

【 0 0 3 9 】

化合物 I c の名称は、T C 1 C と呼ばれる (R) - 2 - (6 - C 1 - 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I c は以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 4 0 】

【化 1 2】



10

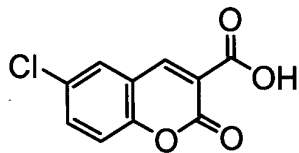
化合物は、薄黄色の粉末状固体であり、242 の融点又はそれより高温で分解する。

【0041】

中間体6 - クロロクマリン - 3 - カルボン酸は、以下の式により示される：

【0042】

【化 1 3】



20

IIIc。

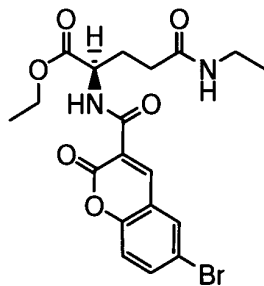
【0043】

化合物Idの名称は、TBrCと呼ばれる(R) - 2 - (6 - Br - 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物Idは以下に示される化学構造式を有する：

30

【0044】

【化 1 4】



40

Id

化合物は、薄黄色の粉末状固体であり、211 の融点又はそれより高温で分解する。

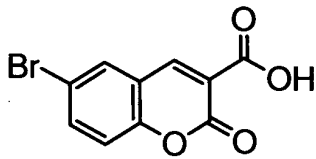
【0045】

中間体6 - ブロモクマリン - 3 - カルボン酸III dは、以下の式により示される：

50

【 0 0 4 6 】

【 化 1 5 】



I I I d。

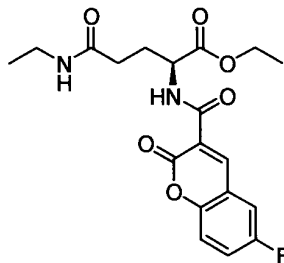
10

【 0 0 4 7 】

化合物 I e の名称は、T F C と呼ばれる (R) - 2 - (6 - F - 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I e は、以下の式により示される化学構造式を有する：

【 0 0 4 8 】

【 化 1 6 】



I e

20

30

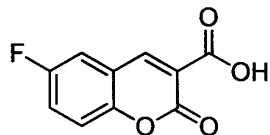
化合物は、薄黄色の粉末状固体であり、65 の融点及びそれ以上で分解する。

【 0 0 4 9 】

中間体 6 - フルオロクマリン - 3 - カルボン酸 I I I e は以下に示される：

【 0 0 5 0 】

【 化 1 7 】



I I I e。

40

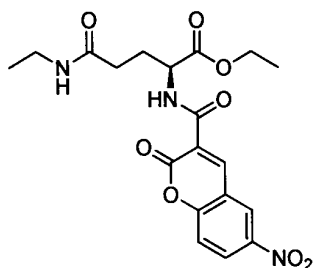
【 0 0 5 1 】

化合物 I f の名称は、T N C と呼ばれる (R) - 2 - (6 - ニトロ - 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I f は、以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 5 2 】

50

【化 1 8】



10

I f

化合物は、薄黄色の粉末状固体であり、300 の融点又はそれより高温で分解する。

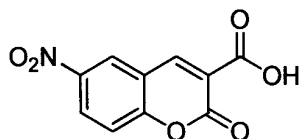
【0053】

中間体 6 - ニトロクマリン - 3 - カルボン酸 I I I f は、以下に示される：

【0054】

【化 1 9】

20



I I I f

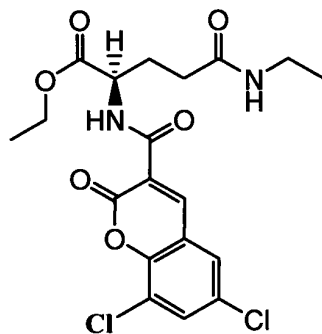
【0055】

化合物 I g の名称は、D T C 1 C と呼ばれる (R) - 2 - (6, 8 - ジクロロ - 2 - オキシ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキシ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I g は以下に示される化学構造式を有する：

30

【0056】

【化 2 0】



40

I g

【0057】

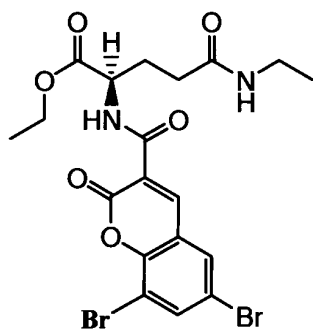
化合物 I h の名称は、D T B r C と呼ばれる (R) - 2 - (6, 8 - ジブロモ - 2 - オ

50

キソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I h は以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 5 8 】

【 化 2 1 】



10

I h

化合物 I g と I h はどちらも薄黄色の粉末状固体であり、それぞれ 1 3 6 及び 1 2 1 の融点又はそれより高温で分解する。

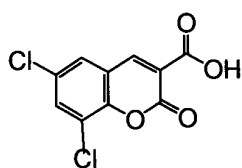
20

【 0 0 5 9 】

中間体 6 , 8 - ジクロロ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I g は以下の式により示される：

【 0 0 6 0 】

【 化 2 2 】



30

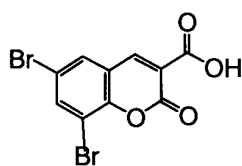
III g。

【 0 0 6 1 】

中間体 6 , 8 - ジブロモ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I h は、以下の式により示される：

【 0 0 6 2 】

【 化 2 3 】



40

III h。

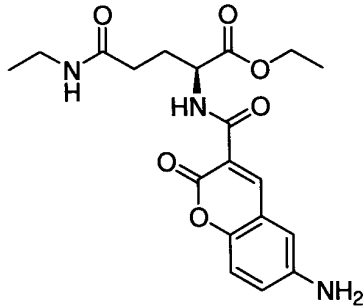
【 0 0 6 3 】

50

化合物 I i の名称は、(R) - 2 - (6 - アミノ - 2 - オキソ - 2 H - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミド) - 5 - エチルアミノ - 5 - オキソ - ペンタン酸エチルエステルであり、化合物 I i は以下に示される化学構造式を有する：

【 0 0 6 4 】

【 化 2 4 】



10

I i。

【 0 0 6 5 】

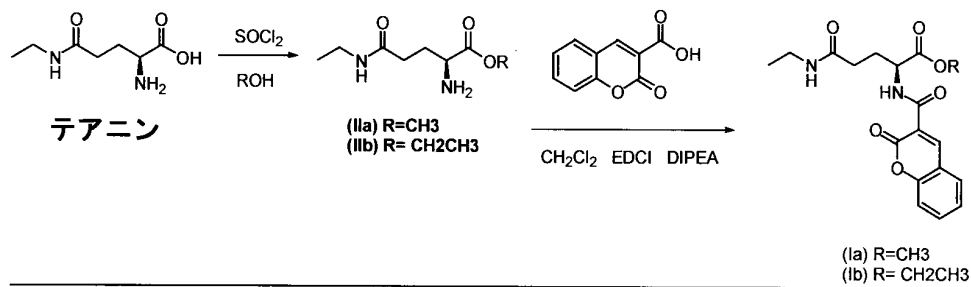
本発明の別な目的は、本発明の化合物を調製する方法を提供することである：

20

1) 以下に記載の化合物 I a ~ I b 及び I I a ~ I I b を調製する方法

【 0 0 6 6 】

【 表 2 】



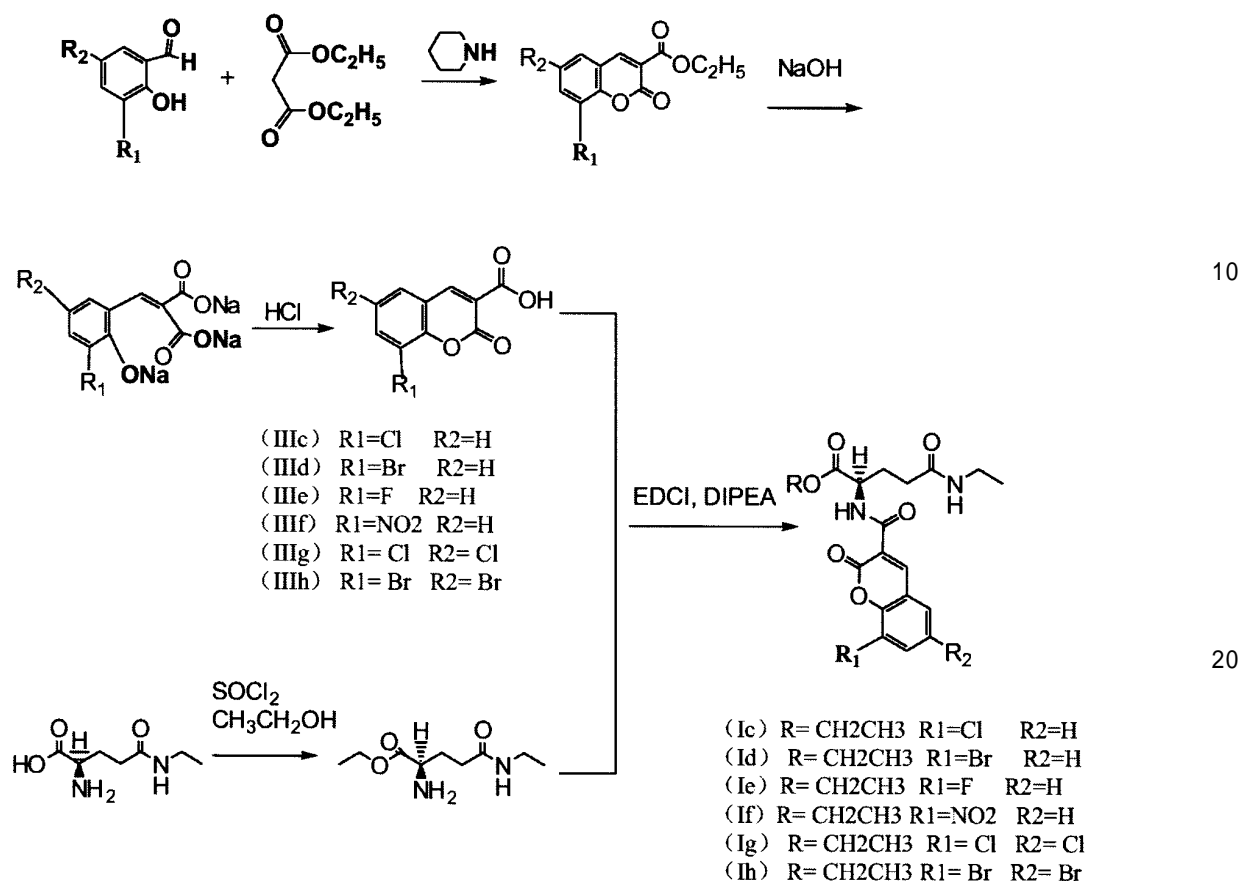
30

；

2) 以下に記載の化合物 I c ~ I h 及び I I I c ~ I I I h を調製する方法

【 0 0 6 7 】

【表 10】



3) 化合物 I i を調製する方法：化合物 I i は、還元条件下で化合物 I f を還元することにより容易に得ることができる。

【0068】

本発明は、本発明の化合物を含む医薬組成物をさらに提供する。本発明は、少なくとも1種の本発明の化合物及び任意に薬剤的に許容できる賦形剤を含むそのような医薬組成物を提供する。

【0069】

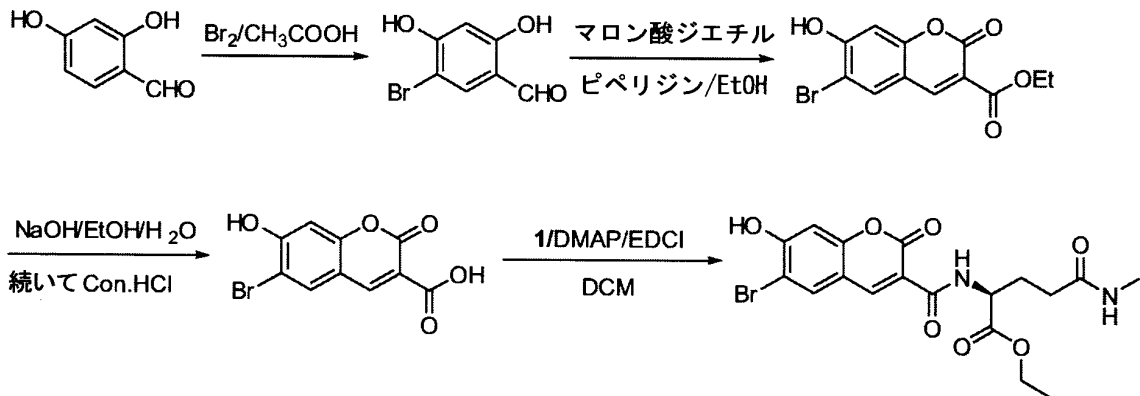
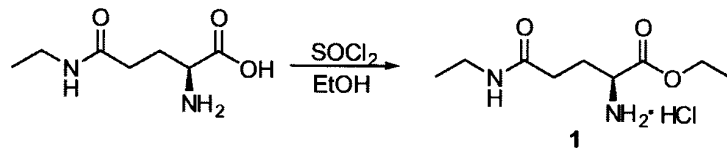
本明細書では、特記されない限り、用語「プロドラッグ」は、生物学的条件下で（インピトロ又はインピボ）加水分解され、酸化され、又は他の反応を受けて、本発明の化合物を提供できる誘導体を意味する。プロドラッグは、生物学的条件下での反応により活性形態に変換されるか、又はその未反応の形態で活性を有する。一般に、プロドラッグは、1 Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed) に記載される方法など、公知の方法により調製できる。

【0070】

プロドラッグは、以下の方法による化学修飾により調製できる：本発明の化合物のプロドラッグは、以下に示される通り、単糖類、例えばグルコース、又はビタミンC、プロパンジオール、並びに他の炭水化物及びアルコール化合物を、クマリン誘導体の7-ヒドロキシル基又はテアニン誘導体のアミノ基、アルキル基、及びカルボニル基に結合し、そのような修飾により形成されたグルコシド結合、エステル結合、アミド結合、及び同種のものインピボで加水分解され、そのためプロドラッグは、本発明の活性な化合物に変換されて、生物活性を発揮できる。

【 0 0 7 1 】

【 表 1 1 】



10

20

【 0 0 7 2 】

同様に、ヒドロキシル基又は類似の基を、式 (I a)、(I b)、(I c)、(I d)、(I e)、(I f)、(I g)、(I h)、及び (I i) により表される本発明の化合物に導入することができる。

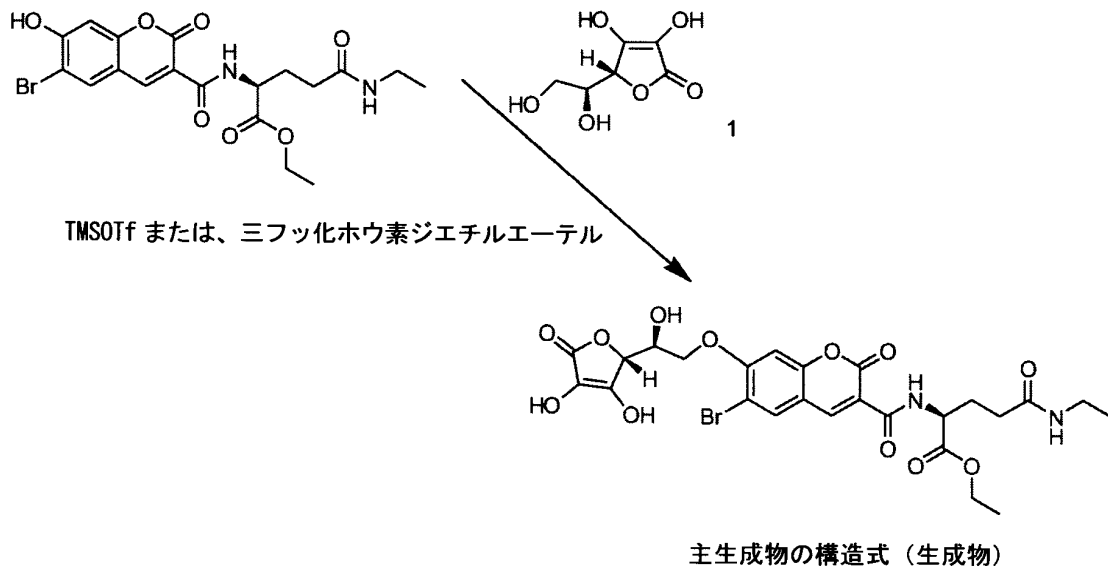
【 0 0 7 3 】

さらに、上述の 7 - ヒドロキシル基及びヒドロキシル基が導入され得るどのような他の部位 (例えば、5 - ヒドロキシル基又はテアニンの直鎖上の可能性のある部位) も、単糖類、例えばグルコース、又はビタミン C、プロパンジオール、又は他の炭水化物及びアルコール化合物により修飾でき、本発明の化合物のプロドラッグを与える他の可能性のある修飾成分及びそのような修飾により形成されたグリコシド結合、エステル結合、アミド結合、及び同種のものは、インビボで加水分解され得るので、プロドラッグは、本発明の活性な化合物又は本体 (又は基礎) が本発明の化合物である化合物に変換されて、生物活性を発揮できる。

30

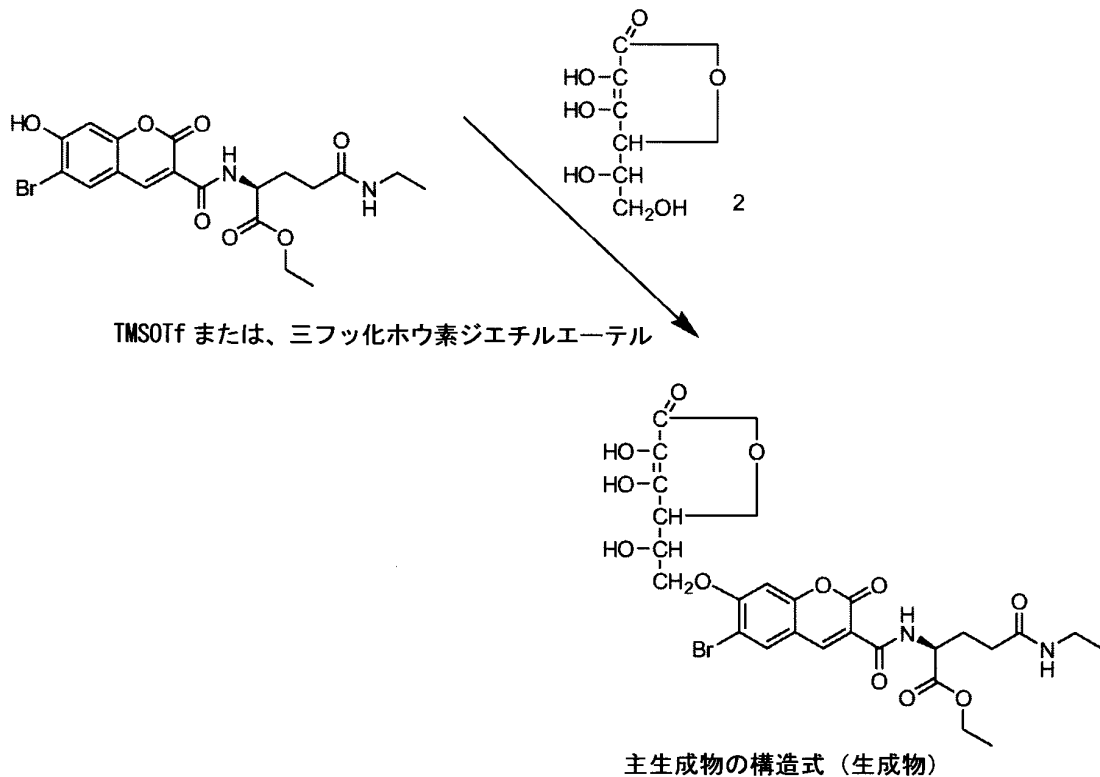
【 0 0 7 4 】

【表 1 2】



10

20



30

40

【0075】

特定の量の活性成分を含む種々の医薬組成物を調製する方法は公知であるか、又は本発明の開示により当業者に明らかである。REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E W, ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995)に記載される通り、医薬組成物を調製する方法は、適切な医薬賦形剤、担体、希釈剤、及び同種のものなどを組み込む工程を含む。

50

【 0 0 7 6 】

本発明の医薬調合物を調製する公知の方法は、従来の混合、溶解、又は凍結乾燥方法を含む。本発明の化合物は、医薬組成物に製造され、経口又は非経口投与（静脈内、筋肉内、局所、又は皮下の方法により、鼻腔内及び他の部分への噴霧、錠剤のペースティング（*pasting*）、及び同種のもの）などの選択された投与様式に好適な種々の方法で患者に投与することができる。

【 0 0 7 7 】

そのため、薬剂的に許容できる担体（不活性な希釈剤又は同化でき食べられる担体など）と組み合わせられた本発明の化合物は、経口投与など、全身投与できる。それらは、硬質又は軟質ゼラチンカプセルに封入することも、圧縮して錠剤にすることもできる。経口投与には、活性化合物は、1種以上の賦形剤と組み合わせることができ、嚥下可能な錠剤、頬側錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウェファ、及び同種のものの形態で使用できる。そのような組成物又は調合物は、少なくとも0.1%の活性化合物を含んでいるはずである。組成物又は調合物中の比率は、所与の単位剤形の重量の約1%から約99%の範囲で変わり得る。そのような治療上有用な組成物において、活性化合物の量は、効果的な投与量を得るのに充分でなくてはならない。

【 0 0 7 8 】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤、及び同種のものは、トラガカント、アラビアゴム、コーンスターチ、若しくはゼラチンなどの結合剤；リン酸水素カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸、及び同種のものなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；スクロース、フルクトース、ラクトース、若しくはアスパルテームなどの甘味剤；又はペパーミント、ウィンターグリーン油、若しくはチェリーフレーバーなどの着香剤を含み得る。単位剤形がカプセルである場合、上記の材料に加え、植物油又はポリエチレングリコールなどの液体担体も含まれてよい。種々の他の材料も、コーティング又は固体単位剤形を他の方法で変えることのできる他の物理的形態として存在してよい。例えば、錠剤、丸剤、又はカプセル剤は、ゼラチン、ワックス、シェラック、又は糖、及び同種のものなどにより被覆できる。シロップ剤又はエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてのスクロース又はフルクトース、保存剤としてのメチルパラベン又はプロピルパラベン、染料、及び着香剤（チェリーフレーバー又はオレンジフレーバーなど）を含み得る。もちろん、単位剤形を調製するためのどの材料も、薬剂的に許容でき、使用量で基本的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物を混合して、徐放調合物及び徐放性装置にできる。

【 0 0 7 9 】

活性化合物は、注入又は注射により静脈内に又は腹腔内に投与できる。活性化合物又はその塩の水溶液を調製でき、任意に非毒性の界面活性剤と混合できる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、グリセロール三酢酸エステル、及びこれらの混合物中の分散剤並びに油中の分散剤も調製できる。通常の貯蔵及び使用条件下で、これらの調合物は、微生物の増殖を防ぐための保存剤を含む。

【 0 0 8 0 】

注射又は注入に好適な医薬剤形は、活性成分（任意にリポソームに包まれている）を含む滅菌された水溶液若しくは分散剤又は滅菌された粉末を含み得るが、それらは滅菌された注射用又は注入用の溶液又は分散剤の即時調合物に好適である。どのような場合でも、最終剤形は、滅菌され、液体で、加工及び貯蔵条件下で安定でなければならない。液体担体は、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロパンジオール、液体ポリエチレングリコール、及び同種のものなど）、植物油、非毒性のグリセリド、及びこれらの好適な混合物などの溶媒でも液体分散媒体でもよい。例えば、リポソームの形成、分散剤の存在下での要求される粒径の維持、又は界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持できる。種々の抗菌剤及び抗真菌剤（パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、及び同種のものなど）を使用して、微生物を防ぐことができる。多くの場合で、糖、緩衝剤、又は塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注射用組

10

20

30

40

50

成物の遅延した吸収は、吸収遅延剤（モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど）の組成物の使用により達成できる。

【0081】

滅菌注射液は、適切な溶媒中の要求される量の活性化化合物を、先に列記された種々の成分と組み合わせ、次いで、濾過及び滅菌を実施することにより調製できる。滅菌注射液から滅菌散剤を調製する場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技法であり、それにより、活性成分の粉末及び先の滅菌濾過された溶液中で必要とされた他の成分の粉末ができるだろう。

【0082】

有用な固体担体には、粉碎した固体がある（滑石、粘土、微結晶性セルロース、二酸化ケイ素、酸化アルミニウム、及び同種のものなど）。有用な液体担体には、水、エタノール、エチレングリコール、又は水 - エタノール / エチレングリコール混合物があり、本発明の化合物を、非毒性の界面活性剤の介助の下で、効果的な含量で液体担体に溶解又は分散させることができる。補助剤（香料など）及び追加の抗微生物剤を、所与の用途のための性質を最適にするために加えることができる。

【0083】

増粘剤（合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪族アルコール、修飾されたセルロース、又は修飾された無機物質など）を液体担体と共に使用して、使用者の皮膚に直接塗布できる、塗り広げできるペースト、ゲル、軟膏、ソープ、及び同種のものなどを形成できる。

【0084】

治療のための化合物の要求される量は、選択された具体的な塩のみでなく、適用様式、治療すべき疾患の性質、並びに患者の年齢及び状態にも依存し、そして、現場の医師又は臨床医の決定に依存する。

【0085】

上述の調合物は単位剤形で存在し得るが、それは投薬単位を含む物理的に分散した単位であり、ヒトの体及び他の哺乳動物への送達に好適である。単位剤形は、カプセル剤又は錠剤でも、複数のカプセル剤又は錠剤でもよい。関与する具体的な治療によって、活性成分の投薬単位の量は、約 1 mg から約 2000 mg 又はそれ以上の範囲で変更又は調整できる。

【0086】

さらに、本発明は、ポリマー性ミセル、ナノエマルジョン、サブミクロエマルジョン（submicron emulsions）、マイクロカプセル、ミクロスフィア、リポソーム、ニオソーム（非イオン性界面活性剤ベシクルとしても知られる）、及び同種のものを含む微粒子分散システムを利用して調製される医薬品など、乳化可能なリポソーム、ミクロスフィア、及びナノスフィアなどの種々の新しい医薬剤形の適用をさらに含む。

【0087】

本発明は、本発明の化合物、又は式（III a）により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式（III a）により表される化合物を含む医薬組成物の、医薬品、とりわけ、ヒトの肝臓癌、乳癌、膵臓癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療のための医薬品の調製における使用をさらに提供する。したがって、本発明は、ヒトの肝臓癌、乳癌、膵臓癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療の方法であって、治療すべき患者に、治療上有効な量の少なくとも 1 種の本発明の化合物、又は式（III a）により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式（III a）により表される化合物を含む組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0088】

本発明は、ヒトの肝臓癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫、メラノーマ、及び他の腫瘍の予防及び治療のための、本発明の化合物、又は式（III a）により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式（III a）により表される化合

10

20

30

40

50

物を含む組成物にさらに関する。

【0089】

本発明の別な目的は、ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2阻害剤の調製における、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤の調製における、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進と関連した因子であるNF- κ Bの阻害剤の調製における、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連しているVEGFR、EGFR、c-Met、ER- α 、K-Ras、H-Ras、Akt、サイクリンD1、MMP-9、MMP-2、Dvl-1、Dvl-2、Dvl-3、 β -カテニン、及びBcl-2/Baxを含む因子の阻害剤の調製における、p53、p21、E-カドヘリン、カスパーゼ3、及び細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を増加させる活性化因子の調製における、本発明の化合物、又は式(IIIa)により表される化合物、又は本発明の化合物若しくは式(IIIa)により表される化合物を含む医薬組成物の使用を提供することである。したがって、本発明は、ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2を阻害する方法、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)を阻害する方法、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進と関連した因子であるNF- κ Bを阻害する方法、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連しているVEGFR、EGFR、c-Met、ER- α 、K-Ras、H-Ras、Akt、サイクリンD1、 β -カテニン、MMP-9、MMP-2、Dvl-1、Dvl-2、Dvl-3、及びBcl-2を含む因子を阻害する方法、並びにBax、p53、p21、E-カドヘリン、カスパーゼ3、及び細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を増加させる方法を提供する。

10

20

【0090】

本発明は、ヒストンメチルトランスフェラーゼEZH2を阻害するための、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)を阻害するための、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患の促進と関連した因子であるNF- κ Bを阻害するための、腫瘍、炎症、心血管疾患、免疫不全、及び他の疾患と関連しているVEGFR、EGFR、c-Met、ER- α 、K-Ras、H-Ras、Akt、サイクリンD1、 β -カテニン、MMP-9、MMP-2、Dvl-1、Dvl-2、Dvl-3、及びBcl-2/Baxを含む因子を阻害するための、並びにp53、p21、E-カドヘリン、カスパーゼ3、及び細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を増加させるための本発明の化合物にさらに関する。

30

【0091】

本発明の化合物は、腫瘍の治療のための放射線療法、化学療法、手術、温熱療法、及び同種のものと同様に組み合わせることができ、腫瘍の治療のための放射線療法、化学療法、手術、温熱療法、及び同種のものと同様に協同する医薬品の調製に使用できる。

【0092】

本発明の化合物は腫瘍細胞を効果的に殺傷でき、腫瘍の治療において、放射線療法及び化学療法医薬品の効果を増大することができ、腫瘍の阻害における化合物の効果は、抗癌医薬品及びテアニンの効果を上回る；さらに、毒性作用及び副作用は大きく低下しており、化合物は明らかな毒性作用及び副作用を全く有さない。

【0093】

腫瘍には、肺癌、乳癌、肝臓癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、胃癌、食道癌、脳腫瘍及び神経原性腫瘍、喉頭癌、白血病、リンパ腫、メラノーマ、子宮癌、網膜腫瘍、卵巣癌、皮膚癌、気管支癌、細気管支癌、尿道癌、腎臓癌、口腔癌、膣癌、胆管癌、膵臓癌、膀胱癌、鼻咽頭癌、及び他の様々な腫瘍がある。

40

【0094】

本発明により提供される化合物は、化学療法の効果と放射線療法との相乗作用を一体化でき、より広い用途、より良い治療効果、より小さい毒性作用及び副作用、より広い適応症、並びにより大きい潜在的な適用価値(application value)及び市場利益(market benefits)を有する新規な抗腫瘍医薬品である。

【0095】

50

本発明により得られた化合物及びその中間体は、筋肉内、皮下、静脈内、及び腹腔内注射、又は経口投与により使用でき、種々のヒトの癌細胞、動物の癌細胞、及び動物におけるヒトの癌異種移植片の治療の効果は、テアニン及びいくつかの臨床用抗癌医薬品、例えばピンクリスチン、ダウノルビシン、シクロホスファミド、エンドスター、及び同種のものより良好である。

【0096】

本発明により得られた化合物及びその中間体の蛍光特性は、以下の方法により応用できる。蛍光特性の応用について：1) 蛍光標識として：暗所での全ての標識及び装飾、照明識別子、装飾、玩具、小道具、日用品の特定の蛍光サイン、省エネルギーランプ、ネオンランプ、衣類、帽子、靴、手袋、及びリュックサックなどの黒い衣類 (dark clothes)、位置のロゴ (position logos) 及び器具の安全状態、及び同種のもののために。2) 周囲 pH 値、 O_2 、 CO_2 、Na、Ca、 NO_3 、酸化還元状態、及び同種のもので変化する場合に色の変化を伴う、環境変化及び食品の質の指示薬など環境状態の変化の指示薬として (Ca^{2+} が化合物の蛍光プローブ溶液に加えられる場合、プローブの蛍光強度が約 450 nm で鋭く増加し；クマリンタイプのアニオン性蛍光プローブが使用される場合、そのようなプローブは選択的に水溶液中の HSO_3^- 及び同種のを特定できるなど)。化合物は、例えば、医療衛生の側面において、分子プローブとして試験研究及び応用に利用でき、本発明の化合物が細胞又は医薬品又は成分を標識するために使用される場合、化合物は、細胞中又は体内でのその位置、インビボでの細胞の移動位置、並びにタンパク質、酵素、受容体、及び同種のものなどの結合標的を表示でき、それにより、診断予測及び評価の効果を実現させる。

【0097】

以下の実施形態において、本発明がさらに説明される。以下の実施形態が、本発明の範囲を限定するよりも、本発明を説明するためにのみ利用されることを理解されたい。

【0098】

以下の実施形態で使用される化学原材料は、市販されているか、当分野に周知である方法により合成される。

(適用に関連する温度は、摂氏温度を指す)。

【実施例】

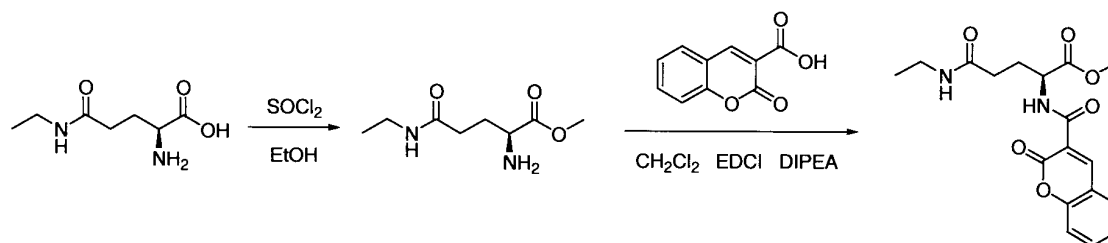
【0099】

実施形態 1：化合物 Ia 及びその中間体 IIa の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

【0100】

【表 13】



【0101】

工程 1：テアニンメチルエステル IIa の調製

テアニンを、87 g/L の比率でメタノールに溶解させ (すなわち、87 g のテアニンを 1 リットルのメタノールに溶解させた)、次いで、塩化スルホニルを、ゆっくりと 55 ml の体積比で前記系に加え、混合物を室温で 1 時間攪拌し、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンメチルエステル IIa を与えた。

【 0 1 0 2 】

工程 2 : T M C I a の調製

20 g のテアニンメチルエステルを、2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、27 g の 3 - カルボン酸クマリンを加え、次いで、0.21 L の D I P E A (ジイソプロピルエチルアミン) 及び 76 g の E D C I をそれぞれ加えた。生じた混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物である T M C I a を回収した。生成物は、薄黄色の粉末状固体であり、180

の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：
 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.15 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.10-2.17 (m, 1H), 2.28-2.31 (m, 2H), 2.34-2.41 (m, 1H), 3.27-3.33 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 4.78-4.83 (m, 1H), 6.07 (br s, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.67-7.71 (m, 2H), 8.88 (s, 1H), 9.35 (br d, 1H, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) 14.81, 28.72, 32.57, 34.47, 52.29, 52.63, 116.75, 117.93, 118.47, 125.39, 129.89, 134.40, 148.81, 154.57, 161.17, 161.74, 171.22, 171.75; ESI-MS m/z 361 $[\text{M}+1]$.

10

【 0 1 0 3 】

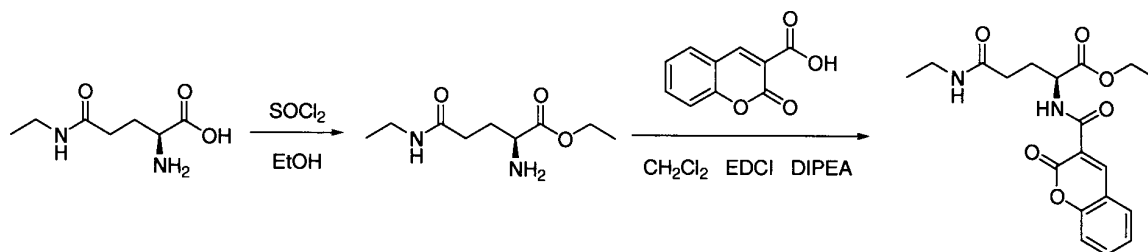
実施形態 2 : 化合物 I b 及びその中間体 I I b の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

【 0 1 0 4 】

【表 1 4】

20



【 0 1 0 5 】

工程 1 : テアニンエチルエステル I I b の調製

テアニンを、87 g / L の比率でエタノールに溶解させ（すなわち、87 g のテアニンを 1 リットルのメタノールに溶解させた）、次いで、塩化スルホニルを、ゆっくりと、55 ml の体積比で前記系に加え、混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンエチルエステル I I b を得た。

30

【 0 1 0 6 】

工程 2 : T E C I b の調製

20 g のテアニンエチルエステルを、2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、27 g の 3 - カルボン酸クマリンを加え、次いで、0.21 L の D I P E A (ジイソプロピルエチルアミン) 及び 76 g の E D C I をそれぞれ加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物である T E C I b を回収した。生成物は薄黄色の粉末状固体であり、180 の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：

40

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 1.11 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.28 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 2.17-2.28 (m, 3H), 2.31-2.40 (m, 1H), 3.23-3.28 (m, 2H), 4.10-4.13 (m, 1H), 4.18-4.22 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz), 5.61 (br s, 1H), 6.90 (dt, 1H, $J = 7.5, 0.8$ Hz), 6.97 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.28 (dd, 1H, $J = 7.7, 1.6$ Hz), 7.34 (dt, 1H, $J = 8.5, 1.6$ Hz), 8.39 (s, 1H), 12.96 (br s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) 14.2, 14.8, 29, 32, 34, 61, 70, 117, 118.5, 118.9, 131, 132, 160, 167, 170, 171; ESI-MS m/z 375 $[\text{M}+1]$.

【 0 1 0 7 】

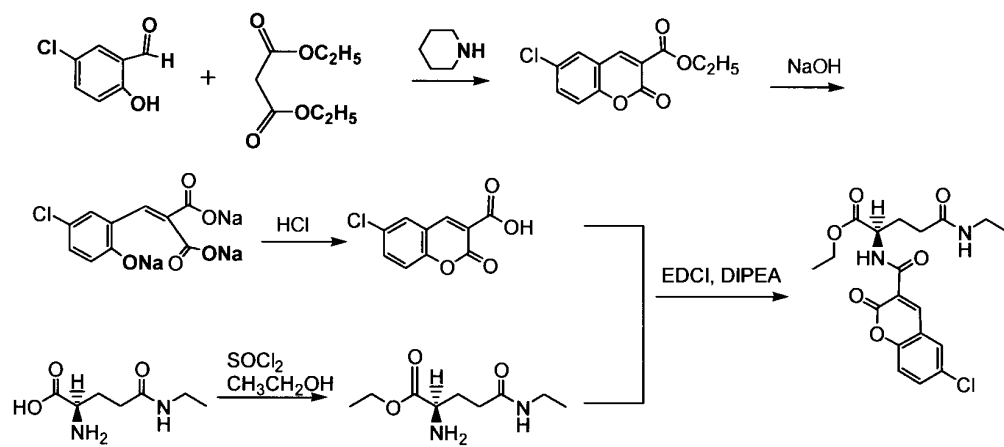
50

実施形態 3 : 化合物 I c 及びその中間体 I I I c の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

【 0 1 0 8 】

【 表 3 】



10

【 0 1 0 9 】

工程 1 : 6 - クロロ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I c の調製

(1) 2 0 0 g の 5 - クロロサリチルアルデヒド、2 0 0 m L のマロン酸ジエチル、6 0 0 m L の無水エタノール、1 0 m L のピペリジン (1 0 . 3 g)、及び 1 m l の氷酢酸を順次加えた；(2) 前記混合物を、水浴中で、無水状態で 2 時間 8 0 で攪拌し還流し、冷却した；(3) 約 6 0 0 m L の冷水 (0) を加え、結晶の沈澱の後で混合物を濾過し、フィルターケーキを、氷水 (0) で冷却した 1 0 0 m L の 5 0 % エタノールで 2 回洗浄すると、6 - クロロクマリン - 3 - カルボキシレートを得た；(4) 1 2 4 g のエチル 6 - クロロクマリン - 3 - カルボキシレート及び 1 0 0 g の水酸化ナトリウムをそれぞれ加え、5 0 0 m L の無水エタノール及び 5 0 0 m L の水を加え、混合物を、水浴中で、8 0 で約 2 時間加熱し還流した；並びに (5) 混合物を、反応後に、直ちに 0 の氷浴に入れ、系から固体を沈殿させるために、濃塩酸を加えて系の pH 値を 2 ~ 3 にし、混合物を氷浴により冷却し、次いで濾過し、フィルターケーキを少量の氷水で洗浄し、乾燥させた粗生成物を水による再結晶により精製すると、6 - クロロクマリン - 3 - カルボン酸 I I I c を得た。

30

【 0 1 1 0 】

工程 2 : テアニンエチルエステル I I b の調製

テアニンを、8 7 g / L の比率でエタノールに溶解させ (すなわち、8 7 g のテアニンを 1 リットルのメタノールに溶解させた)、次いで、塩化スルホニルを、5 5 m l の体積比で前記系にゆっくりと加え、混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンエチルエステル I I b を得た。

40

【 0 1 1 1 】

工程 3 : T C I C I c の調製

2 0 g のテアニンエチルエステルを 2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、2 7 g の 6 - クロロ - クマリン - 3 - カルボン酸を加え、0 . 2 1 L の D I P E A (ジイソプロピルエチルアミン) 及び 7 6 g の E D C I をそれぞれ加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物である T C I C I c を回収した。生成物は薄黄色の粉末状固体であり、2 4 2 の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : 1.12 (t, J = 7.25 Hz, 3H, CH₃), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 2.15-2.40 (m, 4H, CH₂), 3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 4.14 (m, 1H, NH-CH), 4.2

50

1 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O-CH₂), 5.47 (br, 1H, NH), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, クマリン-8H), 7.25-7.28 (m, 2H, クマリン-5H,7H), 8.33 (s, クマリン-4H), 12.93 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR : 14.1 (CH₃), 14.8 (CH₃), 29.1 (CH₂), 32.0 (CH₂), 34.4 (CH₂), 61.6 (CH), 70.0 (CH₂), 118.7 (C), 119.3 (CH), 123.4 (C), 130.9 (CH), 132.7 (CH), 159.6 (C), 166.3 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (m/z): 407.1 [M-H]⁻.

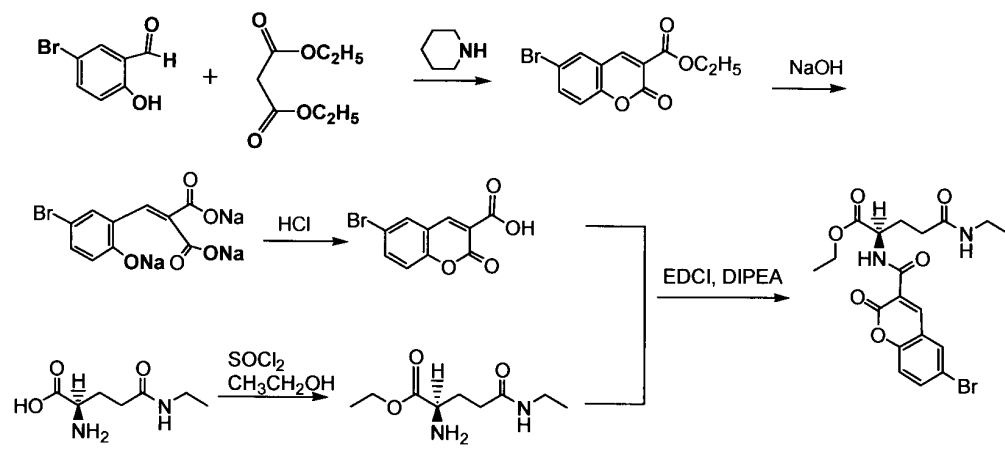
【 0 1 1 2 】

実施形態 4 : 化合物 I d 及びその中間体 I I I d の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである :

【 0 1 1 3 】

【 表 4 】



【 0 1 1 4 】

工程 1 : 6 - プロモ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I d の調製

(1) 2 0 0 g の 5 - プロモサリチルアルデヒド、2 0 0 m L のマロン酸ジエチル、6 0 0 m L の無水エタノール、1 0 m L のピペリジン (1 0 . 3 g)、及び 1 m L の氷酢酸を順次加えた ; (2) 混合物を、水浴中、無水状態で、8 0 °C で 2 時間攪拌し還流し、冷却した ; (3) 約 6 0 0 m L の冷水 (0 °C) を加え、結晶の沈澱後に混合物を濾過し、フィルターケーキを、氷水 (0 °C) により冷却した 1 0 0 m L の 5 0 % エタノールで 2 回洗浄すると、6 - プロモクマリン - 3 - カルボキシレートを得た ; (4) 1 2 4 g のエチル 6 - プロモクマリン - 3 - カルボキシレート及び 1 0 0 g の水酸化ナトリウムをそれぞれ加え、次いで、5 0 0 m L の無水エタノール及び 5 0 0 m L の水を加え、生じた混合物を、水浴中で、8 0 °C で約 2 時間加熱し還流した ; 並びに (5) 混合物を、反応後に、直ちに 0 °C の氷浴に入れ、系から固体を沈殿させるために、濃塩酸を加えて系の pH 値を 2 ~ 3 にし、混合物を氷浴により冷却し、次いで濾過し、フィルターケーキを少量の氷水で洗浄し、乾燥させた粗生成物を水による再結晶により精製すると、6 - プロモクマリン - 3 - カルボン酸 I I I d を得た。

【 0 1 1 5 】

工程 2 : テアニンエチルエステル I I b の調製

テアニンを、8 7 g / L の比率でエタノールに溶解させ (すなわち、8 7 g のテアニンを 1 リットルのメタノールに溶解させた)、次いで、塩化スルホニルを、ゆっくりと、5 5 m L の体積比で前記系に加え、混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンエチルエステル I I b を得た。

【 0 1 1 6 】

工程 3 : T B r C I d の調製

2 0 g のテアニンエチルエステルを、2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、2 7 g の 6 - プロモ - クマリン - 3 - カルボン酸を加え、次いで、0 . 2 1 L の D I P E A (ジイ

10

20

30

40

50

ソプロピルエチルアミン)及び76gのEDCIをそれぞれ加えた。混合物を室温で1時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物を回収すると、T B r C I dを得た。生成物は、薄黄色の粉末状固体であり、211の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：

$^1\text{H-NMR}$: 1.12 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.17-2.38 (m, 4H, CH_2), 3.26 (m, 2H, NH-CH_2), 4.15 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH-CH), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O-CH_2), 5.50 (br, 1H, NH), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, クマリン-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, クマリン-5H,7H), 8.32 (s, クマリン-4H), 12.95 (s, 1H, NH).
 $^{13}\text{C-NMR}$: 14.2 (CH_3), 14.8 (CH_3), 29.1 (CH_2), 32.0 (CH_2), 34.4 (CH_2), 61.6 (C H), 70.0 (CH_2), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (m/z): 451.0 [M-H] $^-$.

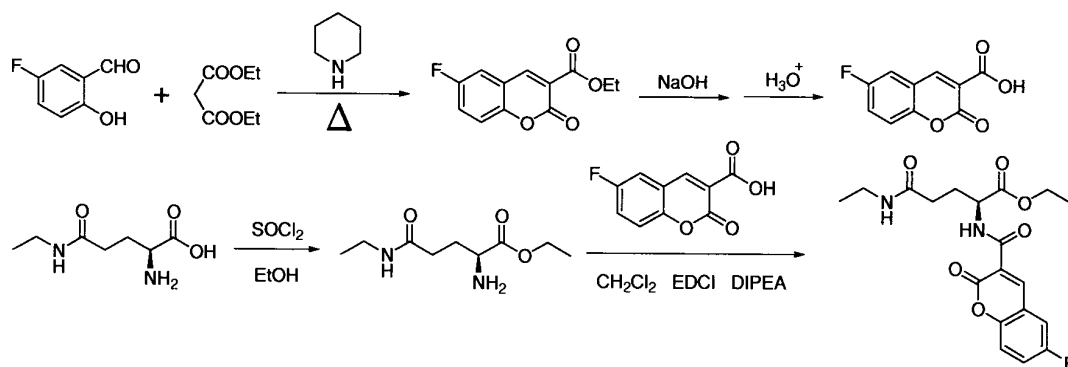
【0117】

実施形態5：化合物I e及びその中間体I I I eの調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

【0118】

【表17】



【0119】

工程1：6-フルオロ-クマリン-3-カルボン酸I I I eの調製

(1) 200gの5-フルオロサリチルアルデヒド、200mLのマロン酸ジエチル、600mLの無水エタノール、10mLのピペリジン(10.3g)、及び1mLの氷酢酸を順次加えた；(2)混合物を、水浴中、無水状態で、80で2時間攪拌し還流し、冷却した；(3)約600mLの冷水(0)を加え、結晶の沈澱後に混合物を濾過し、氷水(0)により冷却した100mLの50%エタノールで2回洗浄すると、6-フルオロクマリン-3-カルボキシレートを得た；(4)124gのエチル6-フルオロクマリン-3-カルボキシレート及び100gの水酸化ナトリウムをそれぞれ加え、次いで、500mLの無水エタノール及び500mLの水を加え、生じた混合物を、水浴中で、80で約2時間加熱し還流した；並びに(5)混合物を、反応後に、直ちに0の氷浴に入れ、系から固体を沈殿させるために、濃塩酸を加えて系のpH値を2~3にし、系を氷浴により冷却し、次いで濾過し、少量の氷水で洗浄し、乾燥させた粗生成物を水による再結晶により精製すると、6-フルオロクマリン-3-カルボン酸I I I eを得た。

【0120】

工程2：テアニンエチルエステルI I bの調製

テアニンを、87g/Lの比率でエタノールに溶解させ(すなわち、87gのテアニンを1リットルのメタノールに溶解させた)、次いで、塩化スルホニルを、ゆっくりと、55mLの体積比で前記系に加え、混合物を室温で1時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンエチルエステルI I bを得た。

【 0 1 2 1 】

工程 3 : T F C I e の調製

20 g のテアニンエチルエステルを 2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、27 g の 6 - フルオロ - クマリン - 3 - カルボン酸を加え、次いで、0.21 L の D I P E A (ジイソプロピルエチルアミン) 及び 76 g の E D C I をそれぞれ加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物を回収すると T F C I e を得た。生成物は、薄黄色の粉末状固体であり、300 の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：

m.p.: 109-111 . $^1\text{H-NMR}$: 1.12 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 2.17-2.38 (m, 4H, CH_2), 3.26 (m, 2H, NH-CH_2), 4.15 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH-CH), 4.21 (q, J = 7.1 Hz, 2H, O-CH_2), 5.50 (br, 1H, NH), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 1H, クマリン-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, クマリン-5H,7H), 8.32 (s, クマリン-4H), 12.95 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$: 14.2 (CH_3), 14.8 (CH_3), 29.1 (CH_2), 32.0 (CH_2), 34.4 (CH_2), 61.6 (CH), 70.0 (CH_2), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (m/z): 451.0 [M-H]⁻.

10

【 0 1 2 2 】

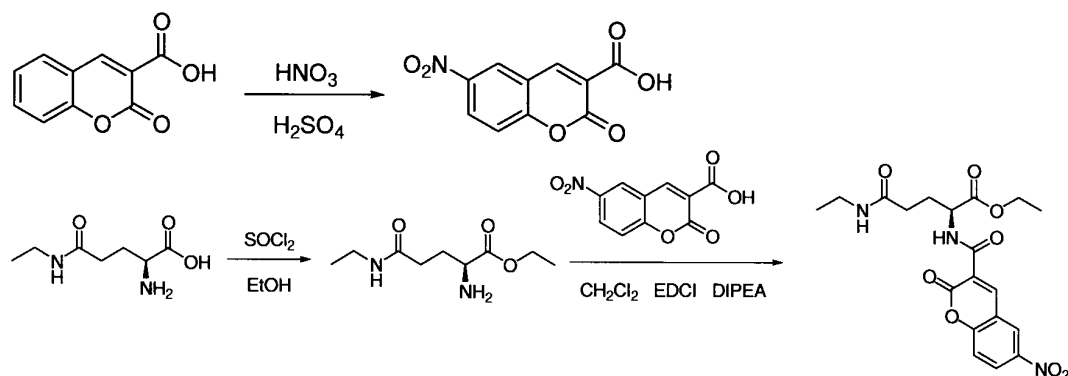
実施形態 6 : 化合物 I f 及びその中間体 I I I f の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

20

【 0 1 2 3 】

【表 1 8】



30

【 0 1 2 4 】

具体的な工程 1 : 6 - ニトロ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I f の調製

50 g のクマリン - 3 - 酸を 240 mL の濃硫酸に溶解させ、-10 に冷却し、濃硝酸と濃硫酸の混合酸溶液 (80 mL、濃硝酸と濃硫酸の体積比は 1 : 3 である) を加え、混合物を 0 で 1 時間攪拌し、次いで、温度を室温まで上げ、混合物をさらに 1 時間反応させた。反応溶液を 5000 mL の氷水に注ぎ、静置して結晶化させ、結晶を濾過し、氷水で洗浄し、乾燥させると、6 - ニトロクマリン - 3 - カルボン酸 I I I f を得たが、薄黄色非晶質固体であった。

40

【 0 1 2 5 】

工程 2 : テアニンエチルエステル I I b の調製

テアニンを、87 g / L の比率でエタノールに溶解させ (すなわち、87 g のテアニンを 1 リットルのメタノールに溶解させる)、次いで、塩化スルホニルを、ゆっくりと 55 mL の体積比で前記系に加え、混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮すると、テアニンエチルエステル I I b を得た。

【 0 1 2 6 】

50

工程 3 : T N C I f の調製

20 g のテアニンエチルエステルを 2 L の無水ジクロロメタンに溶解させ、27 g の 6 - ニトロ - クマリン - 3 - カルボン酸を加え、次いで、0.21 L の D I P E A (ジイソプロピルエチルアミン) 及び 76 g の E D C I をそれぞれ加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物を回収すると T N C I f を得た。生成物は、薄黄色の粉末状固体であり、165

の融点又はそれより高温で分解し、化合物の構造特性は以下の通りであった：
 m.p.: 109-111 . $^1\text{H-NMR}$: 1.12 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 2.17-2.38 (m, 4H, CH_2), 3.26 (m, 2H, NH-CH_2), 4.15 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH-CH), 4.21 (q, J = 7.1 Hz, 2H, O-CH_2), 5.50 (br, 1H, NH), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 1H, クマリン-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, クマリン-5H,7H), 8.32 (s, クマリン-4H), 12.95 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-NMR}$: 14.2 (CH_3), 14.8 (CH_3), 29.1 (CH_2), 32.0 (CH_2), 34.4 (CH_2), 61.6 (CH), 70.0 (CH_2), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (m/z): 451.0 [M-H]⁻.

10

【 0 1 2 7 】

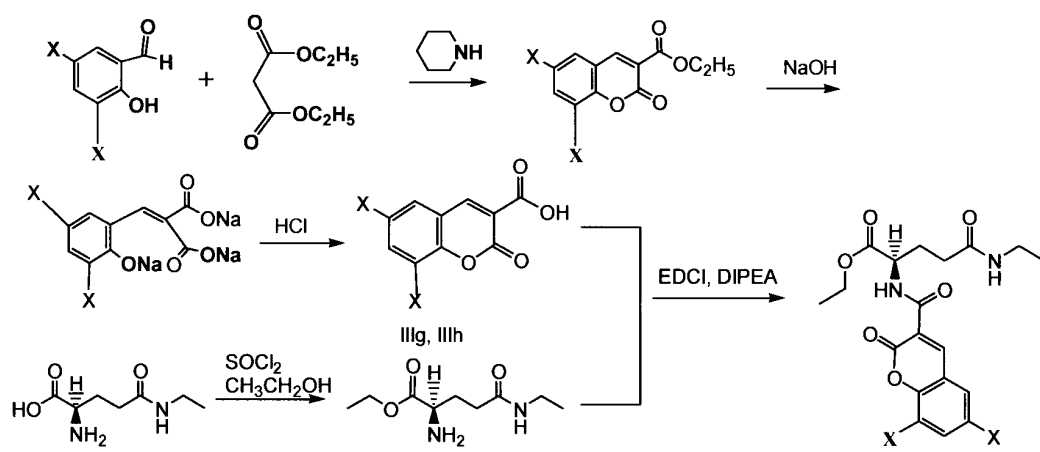
実施形態 7 : 化合物 I g 及び I h 並びにその中間体 I I I g 及び I I I h の調製

反応の全般的な工程は以下の通りである：

【 0 1 2 8 】

【 表 5 】

20



30

X = Cl 且つ I I I g = D C l C である場合、最終生成物は I g である；X = Br 且つ I I I h = D B r C である場合、最終生成物は I h である。

【 0 1 2 9 】

工程 1 : 6 , 8 - ジクロロ - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I g 及び 6 , 8 - ジブromo - クマリン - 3 - カルボン酸 I I I h の調製

40

(1) 200 g の 3 , 5 - ジクロロサリチルアルデヒド又は 3 , 5 - ジブromoサリチルアルデヒド、200 mL のマロン酸ジエチル、600 mL の無水エタノール、10 mL のピペリジン (10.3 g)、及び 1 mL の氷酢酸を順次加えた；(2) 混合物を、水浴中で、無水状態で、80 で 2 時間攪拌し還流し、冷却した；(3) 約 600 mL の冷水 (0) を加え、沈殿の結晶の後、混合物を濾過し、結晶を、氷水 (0) で冷却した 100 mL の 50 % エタノールで 2 回洗浄すると、6 , 8 - ジクロロクマリン - 3 - カルボキシレート又は 6 , 8 - ジブromoクマリン - 3 - カルボキシレートを得た；(4) 124 g の 6 , 8 - ジクロロクマリン - 3 - カルボキシレート又は 6 , 8 - ジブromoクマリン - 3 - カルボキシレート、及び 100 g の水酸化ナトリウムをそれぞれ加え、次いで、500 mL の無水エタノール及び 500 mL の水を加え、混合物を、水浴中で 80 で約 2 時間

50

加熱し還流した；並びに（５）生じた混合物を、反応の後に、直ちに０ の氷浴に入れ、系から固体を沈殿させるために、濃塩酸を加えて系のｐＨ値を２～３にし、系を氷浴により冷却し、次いで濾過し、少量の氷水により洗浄し、乾燥させた粗生成物を水による再結晶により精製すると、６，８ - ジクロロクマリン - ３ - カルボン酸又は６，８ - ジブロモクマリン - ３ - カルボン酸を得た。

【 ０ １ ３ ０ 】

工程２：テアニンエチルエステルⅡⅡｂの調製

テアニンを、８７ｇ／Ｌの比率でエタノールに溶解させ（すなわち、８７ｇのテアニンを１リットルのメタノールに溶解させた）、次いで、塩化スルホニルを、体積比５５ｍｌで前記系にゆっくりと加え、混合物を室温で１時間攪拌し、次いで、生じた混合物を減圧下で濃縮するとテアニンエチルエステルを得た。

10

【 ０ １ ３ １ 】

工程３：ＤＴＣＩＣⅡⅡｇ及びＤＴＢｒＣⅡⅡｈの調製

２０ｇのテアニンエチルエステルを２Ｌの無水ジクロロメタンに溶解させ、２７ｇの６，８ - ジクロロ - クマリン - ３ - カルボン酸又は６，８ - ジブロモクマリン - ３ - カルボン酸を加え、次いで、０．２１ＬのＤＩＰＥＡ（ジイソプロピルエチルアミン）及び７６ｇのＥＤＣⅡをそれぞれ加えた。混合物を室温で１時間攪拌し、次いで、混合物を減圧下で濃縮して溶媒を除去し、残渣をカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物を回収すると、ＤＴＣＩＣⅡⅡｇ又はＤＴＢｒＣⅡⅡｈを得た。生成物は、薄黄色の粉末状固体であり、１３６ 又は１２１ の融点又はそれより高温で分解し、２つの化合物の構造特性は以下の通りであった：(Ⅰ) DTCIC: ¹H-NMR : 1.11 (t, J = 7.2 Hz, 3H, NHCH₂CH₃), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.19-2.40 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.20-3.29 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 4.18-4.25 (m, 3H), 6.20 (br s, 1H, NH), 7.19 (d, J = 2.4 Hz, 1H, クマリン-5H), 7.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H, クマリン-7H), 8.35 (s, クマリン-4H), 14.02 (br s, 1H, NH); 12.95 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR : 13.92 (CH₃), 14.52 (CH₃), 28.90 (CH₂), 31.45 (CH₂), 34.16 (CH₂), 61.49 (CH), 69.08 (CH₂), 119.15 (C), 122.43 (CH), 122.65 (C), 129.31 (CH), 132.31 (CH), 156.07 (C), 165.68 (C), 170.14 (C), 171.04 (C). ESI-MS (m/z): 441.0 [M-H]⁻.

20

(Ⅱ) DTBrC: ¹H-NMR : 1.12 (t, J = 7.3 Hz, 3H, NHCH₂CH₃), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.17-2.28 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.22-3.29 (m, 2H, NHCH₂CH₃), 4.18-4.26 (m, 3H), 5.75 (br s, 1H, NH), 7.38 (d, J = 2.3 Hz, 1H, クマリン-5H), 7.71 (d, J = 2.3 Hz, 1H, クマリン-7H), 8.32 (s, クマリン-4H), 14.12 (br s, 1H, NH); 12.95 (s, 1H, NH). ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) : 14.07 (CH₃), 14.71 (CH₃), 28.99 (CH₂), 31.65 (CH₂), 34.34 (CH₂), 61.66 (CH), 69.16 (CH₂), 109.80 (C), 112.09 (CH), 119.82 (C), 133.14 (CH), 137.96 (CH), 157.48 (C), 165.63 (C), 170.20 (C), 171.04 (C). ESI-MS (m/z): 528.5 [M-H]⁻.

30

【 ０ １ ３ ２ 】

実施形態８：実施形態１～７で得られた化合物及びその中間体並びに式（ⅡⅡⅡａ）により表される化合物の種々のヒトの癌細胞に対する不活性化効果

【 ０ １ ３ ３ 】

実施形態１～７で得られた化合物及びその中間体、陽性対照抗癌薬、及び同種のものの、インビトロで培養された種々のヒトの癌細胞に対する不活性化効果を、文献の方法の通りに決定し（Zhang Y, et al., Cytotechnology 2009, 59 (3): 191 - 200）、結果を表１に示した。

40

【 ０ １ ３ ４ 】

１．細胞系及び細胞培養：ヒト肺癌細胞Ａ５４９及びＨ４６０、ヒト乳癌細胞ＭＣＦ－７及びＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ヒト胃癌細胞ＢＧＣ－８２３、ヒト前立腺癌細胞ＰＣ－３、ヒト慢性白血病細胞Ｋ５６２、ヒトリンパ腫細胞Ｕ９３７、ヒト肝臓癌細胞ＳＭＭＣ７７２１及びＨｅｐＧ２、ヒト結腸癌細胞ＨＴ２９、ヒト膵臓癌細胞ＰＡＮＣ－１及びＢｘＰＣ３、ヒト子宮頸癌Ｈｅ１ａ細胞系、ヒト脳腫瘍細胞Ｄａｏｙ、ヒト神経腫細胞Ｄ５４

50

及び強い薬剤耐性を有するヒト口腔類表皮癌細胞KBV200系、マウスメラノーマ細胞B16、並びに高転移性Lewis肺癌細胞系を、米国のアメリカンタイプカルチャーコレクションから購入した。これらの細胞を、DMEM及びRPMI-1640培養液で別々に培養した。

【0135】

2. 機器及び装置：

二酸化炭素インキュベーター：3111、米国のThermo Company；及び倒立蛍光顕微鏡：TE2000-U、日本のNikon Company。倒立顕微鏡：CKX31、日本のOlympus Company；卓上高速冷却遠心機：5810R、ドイツのEppendorf Company；マイクロピペット：ドイツのEppendorf Company；細胞培養プラスチックプレート（96-ウェル）：BD company；マイクロプレートリーダー：SYNERGY HT多機能マイクロプレートリーダー、米国のBIO-TEK Company；製氷機：XB 70、GRANT Company；及び生体用のインビトロX線及び蛍光画像化装置：Kodak Image Station 2000：米国のCarestream Health Company。

10

【0136】

実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体並びに式(IIIa)により表される化合物の、癌細胞のインビトロの増殖に対する阻害効果を試験するためにMTT法を採用し、トリパンブルー染色法を確認のために利用した。手順は以下の通りであった：

20

【0137】

1. 主な試薬、細胞系及び、機器：

癌細胞系及び機器は、上記1及び2に記載した。

RPMI1640及びDMEM培養液：Hyclone Company；

不活性化ウシ胎児血清：Hyclone Company；

トリプシン：Amersco Company；0.4%トリパンブルー：Sigma Company；

メチルチアゾリルテトラゾリウム(MTT)：Sigma Company；

【0138】

2. 実験手順：

30

(1) 0.25%トリプシンを使用して、対数増殖期にある癌細胞を消化し、単細胞懸濁液を調製し、細胞の濃度を $5 \times 10^4 / \text{mL}$ に調整し、調整した懸濁液を、ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ で96ウェルの培養プレートに接種した；

【0139】

(2) 培養プレートを、飽和湿度及び5%の CO_2 の37℃のインキュベーターに移し、24時間培養した；実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体並びに式(IIIa)により表される化合物又は陽性対照抗癌薬を、 $1 \sim 1000 \mu\text{M} / \text{L}$ の濃度で加えて、最終濃度を $0.1 \sim 1500 \mu\text{M} / \text{L}$ にした。対照ウェル(200 μL の細胞懸濁液を加えるのみ)及び薬物不含ブランク対照ウェル(0.01% DMSOの溶媒を含む)を設定し、各群には8ウェルが含まれ、プレートを、飽和湿度及び5%の CO_2 の37℃のインキュベーターに配置して培養した；

40

【0140】

(3) 96ウェルプレートを、投薬後48時間及び72時間で取出し、元の培地を吸引により注意深く取り除き、 $100 \mu\text{L}$ の血清不含DMEM培地及び $10 \mu\text{L}$ のMTT($5 \text{ mg} / \text{mL}$)溶液を各ウェルに加えた。プレートをさらに4時間連続して培養し、次いで培養を停止した；

【0141】

(4) ウェル中の上清を、吸引により注意深く取り除き、各ウェルに $150 \mu\text{L}$ のDMSOを加え、室温で10～15分間振とうして、結晶を完全に溶解させた。

【0142】

50

(5) 比色定量分析：波長を 5 7 0 n m に選択し、各ウェルの吸光度 (A 値) をマイクロプレートリーダーで決定し、結果を記録した；実験を 3 回繰り返した；

【 0 1 4 3 】

(6) 実験結果を、以下の式により計算した：相対生存率 = (各実験群の A 値 / 細胞対照群の A 値) × 1 0 0 %

【 0 1 4 4 】

半数効果濃度 (I C 5 0 、すわわち、阻害率が 5 0 % である薬物濃度、半数阻害濃度としても知られる) の計算：

【 0 1 4 5 】

検出された成分の I C 5 0 を、回帰方程式を利用して計算した。

10

【 0 1 4 6 】

3 . 実験結果 (表 1 参照)

【 0 1 4 7 】

【表 20】

表 1 実施形態 1～7 で得られた化合物及びその中間体のヒト癌細胞の増殖に対する阻害効果

細胞株	化合物濃度 (mM/L)	化合物 Ia	化合物 IIa	化合物 Ib	化合物 Ic	化合物 IIIa	化合物 IIIc	化合物 IIb	化合物 Id	化合物 IIId*	抗癌薬陽性対照	溶媒対照
A549	0.3 ±0.06*	0.65 ±0.03*	0.125 ±0.05*	0.128 ±0.06*	>0.7*	0.6 ±0.03*	0.5 ±0.03*	0.139 ±0.05*	0.6mM/L* ±0.03	ペンクリスチン 0.22 *±0.04	-	-
H460	0.23* ±0.06	0.5 ±0.04	0.113 ±0.04	0.106 ±0.05*	>0.70 *	0.35 ±0.05*	0.4 ±0.01 *	0.101* ±0.05	0.5 * ±0.03	ダウノルビシン 0.063 *±0.04	-	-
MCF-7	0.22* ±0.05	0.45 ±0.06	0.103 ±0.05	0.095 * ±0.04	>0.70 *	0.3* ±0.04	0.3 * ±0.02	0.102 * ±0.05	0.4 * ±0.02	ダウノルビシン 0.058 *±0.04	-	-
MDA-MB-231	0.24* ±0.06	0.48 ±0.06	0.109 ±0.05	0.87 * ±0.04	>0.7 *	0.5 L* ±0.06	0.4 * ±0.06	0.091 * ±0.06	0.5 * ±0.03	ペンクリスチン 0.13 *±0.04	-	-
BGC-823	0.123 * ±0.05	0.31 ±0.06	0.127 ±0.05	0.066 * ±0.05	>0.70 *	0.30* ±0.05	0.6 * ±0.05	0.065 * ±0.06	0.70 * ±0.05	ゲニステイン 0.135*±0.05 ダウノルビシン 0.068 *±0.03	-	-
PC-3	0.146* ±0.03	0.35 * ±0.05	0.125 * ±0.04	0.105 * ±0.04	>0.50	0.5 * ±0.05	0.4 * ±0.05	0.11 * ±0.04	0.5 * ±0.05	ダウノルビシン 0.051 *±0.03	-	-
U937	0.066 ±0.01 *	0.35 * ±0.03	0.09 * ±0.03	0.052 * ±0.03	>0.70 *	0.5 * ±0.1	0.4 * ±0.1	0.124 * ±0.3	0.5 * ±0.05	カルボプラチン 0.058±0.03*	-	-
PANC-1	0.067 ±0.03 *	0.28* ±0.04	0.065 * ±0.03	0.054 * ±0.03	>0.70 *	0.5 * ±0.01	0.4 * ±0.01	0.055 * ±0.03	0.5 * ±0.03	ダウノルビシン 0.055 *±0.03	-	-
HeLa	0.064 ±0.02 *	0.33* ±0.04	0.063 * ±0.02	0.35 * ±0.1	>0.70 *	0.6 * ±0.01	0.5 * ±0.01	0.075 * ±0.01	0.6 * ±0.03	シスプラチン 0.066 *±0.006	-	-
S-7721	0.075 ±0.03 *	0.23* ±0.04	0.017 * ±0.03	0.075 * ±0.03	>0.50 *	0.5 * ±0.1	0.4 * ±0.1	0.065 * ±0.3	0.5 * ±0.1	ペンクリスチン 0.078±0.03*	-	-
HT29	0.062 * ±0.2	0.25 * ±0.04	0.105 * ±0.05	0.105 * ±0.05	>0.70 *	0.7 * ±0.05	0.6 * ±0.05	0.045 * ±0.05	0.7 * ±0.05	ダウノルビシン 0.063 *±0.03*	-	-
B16	0.145 * ±0.05	0.45* ±0.02	0.11 * ±0.02	0.125 * ±0.05	>0.70 *	0.6 * ±0.02	0.5 * ±0.02	0.12 * ±0.02	0.6 * ±0.02	シスプラチン 0.067±0.03*	-	-
K562	0.248 * ±0.05	0.35* ±0.02	0.15 * ±0.02	0.105 * ±0.15	>0.70 *	0.6 * ±0.02	0.6 * ±0.02	0.125 * ±0.05	0.6 * ±0.05	エトポシド 0.085*±0.03	-	-
LLC	0.185 * ±0.04	0.1 * ±0.03	0.115 * ±0.02	0.131* ±0.04	>0.70 *	0.4 * ±0.03	0.3 * ±0.02	0.116 * ±0.04	0.4 * ±0.03	ノルカンタリジン 0.015 *±0.01	-	-
BxPc3	0.35 * ±0.01	0.6* ±0.02	0.105 * ±0.02	0.089* ±0.03	>0.70 *	0.5 * ±0.03	0.3 * ±0.02	0.116 * ±0.04	0.06*±0.03	ノルカンタリジン 0.06*±0.03	-	-
HepG2	0.25 * ±0.05	0.6* ±0.02	0.225 * ±0.03	0.093* ±0.02	>0.70 *	0.3 * ±0.03	0.3 * ±0.03	0.125 * ±0.04	0.037*±0.01	ペンクリスチン 0.037*±0.01	-	-
Cask'i	0.21 * ±0.04	0.32* ±0.03	0.116* ±0.05	0.086* ±0.02	>0.70 *	0.4 * ±0.03	0.4 * ±0.03	0.101 * ±0.04	0.089*±0.03	エトポシド 0.089*±0.03	-	-
Dac'y	0.25 * ±0.03	0.4* ±0.02	0.135 * ±0.02	0.086* ±0.03	>0.70 *	0.4 * ±0.03	0.4 * ±0.02	0.128 * ±0.03	0.0016*±0.0001	シスプラチン 0.0016*±0.0001	-	-
D54	0.16 * ±0.03	0.4* ±0.03	0.165 * ±0.03	0.098* ±0.02	>0.70 *	0.3 * ±0.03	0.3 * ±0.02	0.092 * ±0.04	0.021*±0.001	シスプラチン 0.021*±0.001	-	-
KBV200	0.24 * ±0.02	0.38* ±0.04	0.136* ±0.02	0.097* ±0.02	>0.70 *	0.4 * ±0.03	0.3 * ±0.03	0.112 * ±0.02	0.001*±0.0003	ダウノルビシン 0.001*±0.0003	-	-

【表 2 1】

表 1—続き		薬物濃度 (nM/L)	化合物 Ie *	化合物 IIle*	化合物 If*	化合物 IIIf*	化合物 Ig*	化合物 Ih*	化合物 IIlg*	化合物 IIlh*	抗癌薬陽性対照	溶媒対照
細胞株	A549	0.141 *±0.04	0.45 *	0.45 *	0.122 *	0.58 *	0.045*	0.056*	0.33 *	0.45*	ビンクリスチン 0.22 *±0.04 *	-
	H460	0.10 *	0.45 *	0.45 *	0.10 *	0.46 *	0.093*	0.109*	0.4 *	0.55 *	ダウノルビン 0.063 *±0.04	-
MCF-7		0.115*	0.39*	0.39*	0.112 *	0.4*	0.075*	0.091 *	0.41*	0.45*	ダウノルビン 0.058 *±0.04	-
		±0.03	±0.02	±0.02	±0.04	±0.04	±0.03	±0.04	±0.02	±0.02		
MDA-MB231		0.09 *	0.52 *	0.52 *	0.110 *	0.47 *	0.092 *	0.098 *	0.46 *	0.42 *	ビンクリスチン 0.13 *±0.04	-
		±0.03	±0.03	±0.03	±0.04	±0.04	±0.04	±0.04	±0.03	±0.03		
BGC-823		0.143*	0.70 *	0.70 *	0.115 *	0.65 *	0.06 *	0.085 *	0.38 *	0.48 *	ゲニステイン 0.135 *±0.03	-
		±0.03	±0.05	±0.05	±0.06	±0.02	±0.005	±0.03	±0.03	±0.04	ダウノルビン ±0.05	
PC-3		0.127 *	0.52 *	0.52 *	0.171 *	0.53 *	0.045 *	0.087 *	0.31 *	0.41 *	ダウノルビン 0.051 *±0.03	-
		±0.06	±0.05	±0.05	±0.05	±0.04	±0.004	±0.03	±0.05	±0.05		
U837		0.126 *	0.56 *	0.56 *	0.121 *	0.45 *	0.038 *	0.057 *	0.35 *	0.39 *	カルボプラチン 0.058±0.03*	-
		±0.6	±0.06	±0.06	±0.4	±0.06	±0.02	±0.03	±0.03	±0.04		
PANC-1		0.072 *	0.48 *	0.48 *	0.077 *	0.43 *	0.071 *	0.078 *	0.43 *	0.48 *	ダウノルビン 0.055 *±0.03	-
		±0.01	±0.03	±0.03	±0.03	±0.04	±0.006	±0.03	±0.01	±0.01		
Hela		0.071 *	0.6 *	0.6 *	0.071 *	0.58 *	0.066 *	0.058 *	0.26 *	0.29 *	シスプラチン 0.066 *±0.06	-
		±0.03	±0.03	±0.03	±0.03	±0.05	±0.004	±0.03	±0.01	±0.02		
S-7721		0.061 *	0.49 *	0.49 *	0.061 *	0.46 *	0.078 *	0.086 *	0.49 *	0.53 *	ビンクリスチン 0.078±0.03*	-
		±0.3	±0.6	±0.6	±0.3	±0.6	±0.04	±0.04	±0.04	±0.1		
HT29		0.24*	0.57 *	0.57 *	0.153 *	0.46 *	0.099 *	0.108 *	0.48 *	0.59 *	ダウノルビン 0.063 *±0.03*	-
		±0.05	±0.05	±0.05	±0.04	±0.04	±0.05	±0.05	±0.04	±0.05		
B16		0.23*	0.6 *	0.6 *	0.28 *	0.67 *	0.125 *	0.146 *	0.5 *	0.46 *	シスプラチン 0.067±0.03*	-
		±0.05	±0.06	±0.06	±0.06	±0.03	±0.05	±0.05	±0.06	±0.02		
K562		0.13*	0.3 *	0.3 *	0.091 *	0.3 *	0.057 *	0.079 *	0.42 *	0.48 *	エトポシド 0.085*±0.03	
		±0.05	±0.05	±0.05	±0.04	±0.04	±0.03	±0.03	±0.06	0.06		
LLC		0.11*	0.38*	0.38*	0.10 *	0.37 *	0.036 *	0.053 *	0.25 *	0.35 *	ノルカンタリジン 0.015*±0.001	-
		±0.03	±0.03	±0.03	±0.04	±0.06	±0.02	±0.04	±0.05	0.06		
BxPc3		0.26*	0.5 *	0.5 *	0.18 *	0.114 *	0.119 *	0.128 *	0.3 *	0.4 *	ノルカンタリジン 0.06*±0.02	
		±0.05	±0.06	±0.06	±0.03	±0.04	±0.04	±0.04	±0.06	±0.05		
HepG2		0.23*	0.4 *	0.4 *	0.13 *	0.36 *	0.046 *	0.056*	0.42 *	0.145*	ビンクリスチン 0.037*±0.02	
		±0.09	±0.08	±0.08	±0.06	±0.07	±0.02	±0.03	±0.02	0.06		
Cask i		0.23*	0.38*	0.38*	0.12 *	0.3 *	0.036 *	0.053 *	0.25 *	0.135 *	エトポシド 0.089*±0.03	
		±0.04	±0.06	±0.06	±0.04	±0.05	±0.02	±0.03	±0.06	±0.03		
Daoy		0.21 *	0.5*	0.5*	0.129 *	0.4*	0.11 *	0.121*	0.35*	0.35*	シスプラチン 0.0016*±0.001	-
		±0.06	±0.06	±0.06	±0.04	±0.06	±0.04	±0.04	±0.06	±0.03		
D54		0.15 *	0.3*	0.3*	0.105 *	0.3*	0.079 *	0.087*	0.3 *	0.3 *	シスプラチン 0.021*±0.001	-
		±0.05	±0.03	±0.03	±0.03	±0.02	±0.02	±0.03	±0.05	±0.06		
KBV200		0.21 *	0.3*	0.3*	0.102*	0.3*	0.084*	0.072*	0.3 *	0.3 *	ダウノルビン 0.001*±0.0001	-
		±0.04	±0.06	±0.06	±0.02	±0.06	±0.03	±0.03	±0.06	±0.03		

【0149】

備考：*、溶媒対照群と比べて $p < 0.05$ ；MTTによる細胞の増殖を試験する方法に関して、上記実験方法を参照されたい。上記結果を、トリパンブルー染色法により確認し、トリパンブルー染色法の結果は、化合物の同じ効果を示した。§は、50%の癌細胞が、それぞれ列記された化合物による処理の72時間後に生存した薬物濃度（IC50）を指す。

10

20

30

40

50

【0150】

A549：ヒト肺癌細胞；NCI-H460：H460ヒト肺癌細胞；MB231：MDA-MB231（エストロゲン受容体陰性の高転移性ヒト乳癌細胞）；MCF-7：エストロゲン受容体陽性のヒト乳癌細胞；S-7721：SMMC7721（ヒト肝臓癌細胞）；PANC-1：ヒト膵臓癌細胞；Hela：ヒト子宮頸癌細胞；LLC：Lewis肺癌（高転移性マウス肺癌）細胞；BGC-823：ヒト胃癌細胞；PC-3：ヒト前立腺癌細胞；U937：ヒト組織球性リンパ腫細胞；ヒト肝臓癌細胞；HT29：ヒト結腸癌細胞；B16：メラノーマ細胞；K562：ヒト白血病細胞；BxPc3：ヒト膵臓癌細胞；HepG2：ヒト肝臓癌細胞；Caski：ヒト子宮頸癌細胞；Daoy：ヒト脳腫瘍細胞；D54：神経腫細胞；及びKBV200：薬剤耐性の強いヒト口腔類表皮癌細胞。

10

【0151】

実施形態9：ヌードマウスにおける種々のヒトの癌異種移植片の増殖及びマウスの肺癌の転移の阻害における、実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体の実験

動物における種々のヒトの癌異種移植片のインビボ増殖に対する実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体の阻害効果を、文献の方法により決定し（George N. Naumov, et al. Combined Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Blockade Inhibits Tumor Growth in Xenograft Models of EGFR Inhibitor Resistance Clin Cancer Res 2009, 15:3484-3494; Yang Zhenzhou, et al.,), 結果を表2に示す。

20

【0152】

1. 実験動物、細胞系、主な試薬、及び機器：

SPFグレードの動物実験室で飼育され、動物許可番号(animal license number) SCXK (Beijing) 2009-0004の付いた、Beijing Huafukang Experimental Animal Centerから購入した、4～5週齢で18～22gの雌のSPF-レベルBALB/cヌードマウス及びC57/BL6Jブラックマウス；及びIVC（個別換気ケージ）：Suzhou Suhang Technology Equipment Co., Ltd.；及びヒト肺癌細胞A549、エストロゲン受容体陰性ヒト乳癌細胞MDA-MB231、エストロゲン受容体陽性ヒト乳癌細胞MCF-7、ヒト肝臓癌細胞SMMC7721、ヒト膵臓癌細胞PANC-1、ヒト子宮頸癌細胞Hela、高転移性Lewis肺癌細胞系、並びに他の機器は上述の通りであった。RPMI 1640及びDMEM培養液：Hyclone Company；不活性化ウシ胎児血清：Hyclone Company、-20で保存；トリプシン：Amersco Company；及び0.4%トリパンブルー：Sigma Company；

30

【0153】

2. 実験手順：

40

(1) 細胞培養及び移植された腫瘍を有する動物モデルの確立：ヒト癌細胞株を、DMEM培養液又は10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培養液中で、37及び5%のCO₂の条件下で、別々に培養した。対数増殖期にある細胞を回収し、 $2 \times 10^7 / \text{ml}$ の濃度の単細胞懸濁液を調製し、0.1mlの懸濁液を、ウルトラクリーンワークベンチ中で、各ヌードマウスの腿の裏側に、別々に皮下接種し、注射点のそれぞれを毎日観察して、発赤、腫脹、潰瘍化の有無を確認した。2～5週後、明らかな発疹が注射部分に現れ、直径約10～15mmの皮下結節が全てのヌードマウスに現れ、移植腫瘍モデルを確立した；マウスのLewis肺癌転移モデルの確立について、濃度 $6 \times 10^6 / \text{ml}$ の単細胞懸濁液を調製し、0.1mlの細胞懸濁液を、C57/BL6Jブラックマウスの尾静脈に静脈注射し、群分け後第2日から薬物を投与したが、ヌードマウスの薬物の投与量

50

及び方法は以下に記載する。

【0154】

(2) マウスの群分け及び薬物送達：皮下異種移植片モデルヌードマウスを、接種の2～5週間後に、各群7匹のマウスで無作為に3群に分けた；陰性対照群（0.05% DMSOの溶媒）、1日1回の0.2 ml / マウスの腹腔内注射；薬物及び成分を腹腔内注射した（60～90 mg / kg）：陽性対照群、抗癌薬シスプラチン（1.5 mg / kg / 日）、シクロホスファミド（60 mg / kg / 2日）、及びエンドスター（8 mg / kg）、並びに実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体の群、1日1回、投薬を3～5週間実施した。

【0155】

インビボ腫瘍のEZH2及びHDACの酵素活性に対する薬物の効果の検出のために、腫瘍を、投薬の6時間後に別々に摘出し、総タンパク及び核タンパク質を別々に抽出して、酵素の活性を検出及び分析した。マウスを、DMSO溶媒（0.05%）の陰性対照、25 mg / kg / マウスのSAHA（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）の陽性対照、又は実施形態1～7で得られた化合物及びその中間体により処置した後、腫瘍を取りだし、総タンパク及び核タンパク質を総タンパク溶解物及び核タンパク質溶解物により抽出して（総タンパク溶解物、核タンパク質溶解物、及びPMSFは、Beyotime Biotechnology of Instituteから購入した）、1 mgの腫瘍組織を1 mlの溶解物に加え、10 µlのPMSFを加え、均一な混合のために繰り返し解離し、次いで、試料を15分間氷上に置き、1.5 mLのEPパイプに移し、14000 r / 分及び4 で10分間遠心分離し、上清のタンパク抽出物を滅菌EPパイプに移して、酵素活性を検出した。

【0156】

(3) ヌードマウスにおける腫瘍の増殖の観察：ヌードマウスの活動（餌の摂取、糞尿の特徴、精神状態、及び同種のもの）並びに移植された腫瘍の腫瘍増殖時間及び増殖状況を毎日観察し、体重及び腫瘍の大きさを2～3日ごとに測定した。各腫瘍の長径a及び短径b（mm）をノギスにより測定し、 $V = 1/2 \cdot a \cdot b^2$ （mm³）で体積を計算した；

【0157】

(4) 動物の屠殺：処置実験後に、マウスに麻酔をかけ、写真撮影した；ヌードマウスの首を折って屠殺し、腫瘍組織を滅菌条件下で剥ぎ取り、腫瘍の重量を量った；種々の器官及び組織の病理及び毒性に対する薬物の効果を検出した。

【0158】

(5) 実験群の移植された腫瘍の重量を、ブランク対照群の腫瘍（又は肺転移）の重量と比較して、腫瘍阻害率を計算した、すなわち、腫瘍阻害率（%）=（1 - 実験群の平均腫瘍重量 / 対照群の平均腫瘍重量）× 100 %。

【0159】

3. 実験結果（表2参照）

【0160】

10

20

30

【表 2 2】

試験した化合物の治療効果 s (阻害率%) *														
腫瘍種類	化合物 Ia	化合物 Ib	化合物 Ic	化合物 Id	化合物 Ie	化合物 If	化合物 Ig	化合物 Ih	化合物 IIb	化合物 IIa	A/シスプラチン B/ CTX	ES	対照	
A549	48.6% ±5.9	53.6% ±5.5	61.6% ±5.5	63.6% ±6.3	55.5% ±6.9	58.6% ±5.2	56.6% ±5.8	53.8% ±6.7	33.3% ±6.3	29.6% ±6.9	A/46.7%±6.5*; B/52.4%±6.9*	38.9% ±7.1*	-	
	50.1% ±8.7	59.1% ±7.6	54.1% ±7.3	53.1% ±7.9	50.9% ±7.5	52.6% ±7.1	59.1% ±7.8	55.1% ±8.6	44.5% ±5.2	31.1% ±5.3	A/61.3%±6.7*; B/.43.7%±7.9*	33.5% ±9.8*	-	
MCF-7	50.1% ±6.1	52.6% ±7.8	58.6% ±8.1	56.6% ±7.1	66.8% *±9.2	68.6% ±8.1	65.7% ±7.8	58.9% ±7.9	43.2% ±7.6	39.8% ±7.9	A. 39.9%±7.8; B. 45.2%±8.3	36.6% ±9.7	-	
S-7721	52.7% ±11.5*	60.8% ±8.9	63.2% ±8.6	67.2% ±8.6	64.8% ±9.3	65.7% ±8.6	53.6% ±9.7*	57.7% ±8.9*	44.6% ±11.3*	36.6% ±11.1*	A. 69.6%±7.9; B. 47.7%±8.7	28.9% ±10.6	-	
PANC-1	55.8% ±7.9	54.6% ±8.3	56.5% ±8.6	54.2% ±9.6	56.6% ±9.9	53.6% ±9.7	55.6% ±9.3	51.3% ±9.8	32.3% ±12.5	33.4% ±11.3*	A/25.3%±7.7	16.8% ±12.6	-	
HeLa	54.7% ±8.8	53.9% ±9.1	53.7% ±8.6	57.9% ±9.5	60.7% ±9.9	50.9% ±8.5	56.7% ±8.9	62.9% ±8.5	41.7% ±11.5	38.7% ±10.5	A. 36.6%±7.5	17.2% ±11.8	-	
LLC	55.4% ±9.8#	58.2% ±9.6#	74.2% ±9.1#	69.2% ±7.7#	61.6% ±8.5#	67.5% ±8.6#	75.5% ±13.6#	77.9% ±13.1#	52.3% ±11.2#	36.8% ±8.9	A/46.5%±12.6# ; B/ 37.1%±9.8#	42.7% ±13.8#	-	

【0161】

備考：* $p < 0.05$ ；関連する試験方法について、上記の実験方法パートを参照されたい；s 阻害率%は、DMSO 溶媒対照群の腫瘍の重量と比較した投薬群の腫瘍の重量の平均阻害率(%)である；及び#は、マウスの Lewis 肺癌の腫瘍肺転移阻害率%である。

【0162】

10

20

30

40

50

A 5 4 9 : ヒト肺癌細胞 ; M B 2 3 1 : M D A - M B 2 3 1 (エストロゲン受容体陰性の高転移性ヒト乳癌細胞) ; M C F - 7 : エストロゲン受容体陽性のヒト乳癌細胞 ; S - 7 7 2 1 : S M M C 7 7 2 1 (ヒト肝臓癌細胞) ; P A N C - 1 : ヒト膵臓癌細胞 ; H e l l a : ヒト子宮頸癌細胞 ; L L C : L e w i s 肺癌 (高転移性マウス肺癌) 細胞 ; T M C : T M C 群 ; T E C : T E C 群 ; T C L C : T C L C 群 ; T B r C : T B r C 群 ; T F C : T F C 群 ; T N C : T N C 群 ; D T C L C ; D T C L C 群 ; D T B r C : D T B r C 群 ; T E : T E 群 ; T M : T M 群 ; A : シスプラチン群 ; B : C T X 群 ; E S : エンドスター群 ; 及び対照 : 溶媒対照 (D M S O) 。

【 0 1 6 3 】

動物の病理及び毒物学の分析結果は、実験期間の間、正常なマウス及びヒト癌異種移植片を有するヌードマウスを、60 mg / kg の投与量で全て合成成分により処置すると、毒性作用及び副作用が全く検出されず、体重減少が全く観察されず、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、消化管、性腺、脳、及び骨格筋に毒性が全く見られなかったことを示した。シスプラチン及びシクロホスファミドの陽性対照薬物群において、マウスは、投薬の2週間後に、体重減少、食欲不振、異常な腫脹、及び緩慢な動作、並びに他の現象により示される毒性反応を有した。シスプラチン、シクロホスファミド、及びエンドスターの陽性対照群においても、マウスは、体重減少、食欲不振、緩慢な動作、及び同種のものの毒性現象を有した。

10

【 0 1 6 4 】

急性毒性実験結果は、2500 mg / kg の投与量で本発明の合成成分の経口投与から、マウスの死亡が全く見られないことを示した。

20

【 0 1 6 5 】

【表 2 3】

腫瘍種類															試験した化合物の治療効果 5 (阻害率%) *														
腫瘍種類		化合物 Ia	化合物 Ib	化合物 Ic	化合物 Id	化合物 Ie	化合物 If	化合物 Ig	化合物 Ih	化合物 Iib	化合物 Ila	A/シスプラチン B/ CTX	ES	対照															
表 2 - 2	動物及びマウスの肺癌転移における種々のヒト癌異種移植片のインビロ増殖に対する実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物及びその中間体の阻害効果	A549	51.6** ±9.9	60.6** ±9.5	67.6** ±5.5	69.6** ±6.3	61.5** ±8.9	64.6* ±9.2	66.6**± 9.9	63.8** ±8.9	38.6** ±8.8	31.7** ±8.9	A/46.7**±6.5*; B/52.4**±6.9*	38.9% ±7.1*	-														
			MB-231	60.1** ±9.5	69.1** ±9.6	65.5** ±7.8	66.7** ±8.9	60.9** ±9.5	62.3* ±9.8	72.1** ±9.8	75.1** ±9.3	47.8** ±9.2	36.1** ±8.8	A/61.3**±6.7*; B/43.7**±7.9*	33.5% ±9.8*	-													
				MCF-7	61.3** ±8.9	63.8** ±9.6	68.8** ±9.9	66.9** ±9.6	69.8** ±9.8	72.6** ±8.1	76.9** ±10.9	75.9** ±9.9	46.8** ±8.9	41.3** ±8.7	A. 39.9**±7.8; B. 45.2**±8.3	36.6** ±9.7	-												
					S-7721	61.9% ±10.8*	66.6** ±9.7	69.2** ±9.6	75.7** ±9.5	69.9** ±9.6	75.7** ±10.8	70.6% ±10.6*	78.7% ±11.7*	46.8% ±10.9*	38.2% ±12.1*	A. 69.6**±7.9; B. 47.7**±8.7	28.9** ±10.6	-											
	PANC-1	60.5** ±9.3	65.9** ±9.6	66.7** ±9.3	64.8** ±9.9	64.6** ±9.3	67.3** ±10.5	68.9** ±11.9	67.3** ±10.7	34.8** ±10.3	37.7% ±10.7*	A/25.3**±7.7	16.8** ±12.6	-															
		Hela	62.9** ±9.6	63.8** ±10.5	65.8** ±9.8	71.9** ±10.7	70.5** ±9.3	66.8** ±9.8	70.3** ±9.6	72.6** ±9.7	41.7** ±11.5	38.7** ±10.5	A. 36.6**±7.5	17.2** ±11.8	-														
			LLC	60.9** ±10.6#	69.6** ±8.9#	79.2** ±9.6#	82.5** ±10.7#	70.8** ±9.3#	75.8** ±9.2#	79.9** ±12.3#	80.7** ±12.8#	54.7** ±12.4#	38.5** ±10.7	A/46.5**±12.6# ; B/ 37.1**±9.8#	42.7** ±13.8#	-													

【0166】

備考：* $p < 0.05$ ；関連する試験方法について、上記の実験方法パートを参照されたい；s 阻害率%は、DMSO 溶媒対照群の腫瘍の重量と比較した投薬群の腫瘍の重量の平均阻害率(%)である；及び#は、マウスの Lewis 肺癌の腫瘍肺転移阻害率%である。

【0167】

10

20

30

40

50

A 5 4 9 : ヒト肺癌細胞 ; M B 2 3 1 : M D A - M B 2 3 1 (エストロゲン受容体陰性の高転移性ヒト乳癌細胞) ; M C F - 7 : エストロゲン受容体陽性のヒト乳癌細胞 ; S - 7 7 2 1 : S M M C 7 7 2 1 (ヒト肝臓癌細胞) ; P A N C - 1 : ヒト膵臓癌細胞 ; H e l l a : ヒト子宮頸癌細胞 ; L L C : L e w i s 肺癌 (高転移性マウス肺癌) 細胞 ; T M C : T M C 群 ; T E C : T E C 群 ; T C L C : T C L C 群 ; T B r C : T B r C 群 ; T F C : T F C 群 ; T N C : T N C 群 ; D T C L C : D T C L C 群 ; D T B r C : D T B r C 群 ; T E : T E 群 ; T M : T M 群 ; A : シスプラチン群 ; B : C T X 群 ; E S : エンドスター群 ; 及び対照 : 溶媒対照 (D M S O) 。

【 0 1 6 8 】

動物の病理及び毒物学の分析結果は、実験期間の間、正常なマウス及びヒト癌異種移植片を有するヌードマウスを、90 mg / kg の投与量で全て合成成分により処置すると、毒性作用及び副作用が全く検出されず、体重 (e i g h t) 減少が全く観察されず、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、消化管、性腺、脳、及び骨格筋に毒性が全く見られなかったことを示した。シスプラチン及びシクロホスファミドの陽性対照薬物群において、マウスは、投薬の2週間後に観察された、体重減少、食欲不振、及び異常な腫脹、及び緩慢な動作、並びに他の現象により示される毒性反応を有した。シスプラチン、シクロホスファミド、及びエンドスターの陽性対照群においても、マウスは、体重減少、食欲不振、緩慢な動作、及び同種のものの毒性現象を有した。

【 0 1 6 9 】

急性毒性実験結果は、2500 mg / kg の投与量で本発明の合成成分の経口投与から、死亡が全く見られないことを示した。

【 0 1 7 0 】

実施形態 10 : 実施例 1 ~ 7 で得られた化合物の蛍光画像化

実施例 1 ~ 7 で得られた化合物の蛍光画像及び波長範囲を、文献の方法により決定し (Chen Y , et al . , 2 - (3 - { 1 - C a r b o x y - 5 - [(6 - [1 8 F] f l u o r o - p y r i d i n e - 3 - c a r b o n y l) - a m i n o] - p e n t y l } - u r e i d o) - p e n t a n e d i o i c a c i d , [1 8 F] D C F P y L , a P S M A - b a s e d P E T i m a g i n g a g e n t f o r p r o s t a t e c a n c e r . C l i n C a n c e r R e s , 2 0 1 1 , 1 7 (2 4) : 7 6 4 5 - 5 3 .) 、結果を表 3 及び図 1 に示した。

【 0 1 7 1 】

1 . 実験動物、細胞系、主な試薬、及び機器 : 詳細は実施形態 9 を参照されたい。

【 0 1 7 2 】

2 . 実験手順 : インビトロ蛍光画像化及び検出に関して : 実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h を、1 . 5 m l プラスチック遠心管中で、濃度 6 0 m g / 0 . 2 m l の溶液に調製し、蛍光シグナル及び画像を、それぞれ、以下の励起及び発光波長条件で、多機能マイクロプレートリーダー及び動物インビボ画像化装置で検出及び記録し、得られた結果を表 3 及び図 1 に示す (小さい試験管の写真) ; インビボの蛍光画像の検出に関して : 実験動物の (飲料水は通常通り与えながら) 絶食処置の 1 6 時間後、実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h の溶液を、6 0 m g / k g 体重 / 0 . 2 m l の濃度で調製し、動物に腹腔内投与し、蛍光画像を、以下の励起及び発光波長条件下で、動物インビボ画像化装置で検出及び記録し、得られた結果を図 1 に示した (動物インビボ画像化写真) ; 実験の励起波長範囲は 3 6 0 n m ~ 5 9 0 n m であった ; 検出波長範囲は 4 1 0 n m ~ 7 0 0 n m であった。

【 0 1 7 3 】

3 . 実験結果 (表 3 参照)

【 0 1 7 4 】

【表 2 4】

表 3 実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h のインビボ及びインビトロで
検出可能な蛍光画像及び波長範囲

化合物及び 蛍光波長	化合物 Ia	化合物 Ib	化合物 Ic	化合物 Id	化合物 Ie	化合物 If	化合物 Ig	化合物 Ih
励起nm	360-610	360-610	360-610	36-610	360-610	360-610	360-610	360-610
発光nm	430-650	430-650	430-670	430-670	430-650	430-650	430-690	430-690

10

【0175】

備考：実験検出条件：実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h のインビボ及びインビトロで検出可能な蛍光画像及び波長範囲。

(1) 投与濃度：60 mg / kg 体重 / 0.2 ml ; 及び (2) 励起波長範囲：360 nm～590 nm ; 及び検出可能な波長範囲：410 nm～690 nm。

【0176】

実施形態 11：実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h の、動物における E Z H 2 酵素の活性に対する阻害効果

【0177】

1. 実験動物、細胞系、機器、及び主な試薬：

20

実験動物：ヌードマウス；細胞系及び機器に関しては、詳細は実施形態 9 の動物実験パートを参照されたい。

【0178】

E Z H 2 Assay Kit、B P S Bioscience Company から購入。

【0179】

実施形態 1～7 で得られた化合物の E Z H 2 の酵素活性に対する阻害効果を検出し、実験方法は、操作のためのキットの説明書に厳密に従い、工程は以下の通りであった：

【0180】

2. 実験手順：

30

(1) 150 µl の T B S T 緩衝液を、マイクロプレートの各反応ウェルに加え、室温で 15 分間インキュベートし、緩衝液を除いた；

【0181】

(2) S - アデノシルメチオニン及び E Z H 2 酵素使用溶液を、説明書に従って調製し、操作を氷浴上に保った；

【0182】

(3) ブランク対照生成物、基質対照生成物、陽性対照生成物、及び阻害剤対照生成物を、説明書に示された比率で調製した；

【0183】

(4) 調製した種々の対照生成物及び試験すべき試料（各群で、E Z H 2 酵素を腫瘍タンパク質抽出物に替えた）を、それぞれ反応ウェルに 50 µl / ウェルで加え、室温で 1 時間反応させ、各試料で、2 つの平行なウェルを設定したが、各群において腫瘍タンパク質抽出物を得る方法は、実施形態 9 の実験手順に記載された通りであった；プレートの洗浄及びブロッキング：200 µl の T B S T 緩衝液を、プレートの洗浄のために各反応ウェルに加え、3 回繰り返した；100 µl のブロッキング緩衝液を、各反応ウェルにさらに加え、ブロッキングのために振とうベッド（shaking bed）上で 10 分間振とうし、液体を除いた；

40

【0184】

(5) 希釈した一次抗体使用溶液を、100 µl / ウェルで反応ウェルに加え、振とうベッドで 1 時間反応させた；

50

【 0 1 8 5 】

(6) プレートを洗浄してブロックした：操作は、操作 (4) と同じであった；

【 0 1 8 6 】

(7) 希釈した H R P 標識二次抗体使用溶液を、 1 0 0 μ l / ウェルで反応ウェルに加え、振とうベッドで 3 0 分間反応させた；

【 0 1 8 7 】

(8) プレートを洗浄してブロックした：操作は、操作 (4) と同じであった；

【 0 1 8 8 】

(9) 等しい体積の H R P 化学ルミネセンス基質 A と B を氷浴上で均一に混合し、 1 0 0 μ l / ウェルで反応ウェルに加えた；且つ

10

【 0 1 8 9 】

(1 0) 蛍光値を、直ちに、マイクロプレートリーダーで読み取った。

【 0 1 9 0 】

3 . 実験結果 (表 4 参照)

【 0 1 9 1 】

【表 25】

表 4 腫瘍の増殖、浸潤、及び転移、心血管疾患及び脳血管疾患、免疫不全、炎症などに密接に関連していた酵素活性のインビボ調節に対する実施形態 1～7 で得られた化合物 Ia～Ih の効果

効果濃度		調節効果を実現する効果的な投与量及び実施形態1～7で得られた化合物Ia～Ihのインビボの腫瘍増殖に関連する重要な酵素活性に対する減少又は増加率(%)									
酵素活性	化合物Ia	薬物陽性対照	化合物Ib	薬物陽性対照	化合物Ic	薬物陽性対照	化合物Id	薬物陽性対照	溶媒対照		
		(SAHA)		(SAHA)		(SAHA)		(SAHA)			
EZH2酵素活性の減少/阻害率(%)	52%(LLC)-54%(SMMC-7721)	50%(LLC)-49%(SMMC-7721)	54%(A549)-57%(SMMC-7721)	53%(A549)-49%(SMMC-7721)	61%(A549)-59%(SMMC-7721);58%(MDA-MB231);56%(MCF7)	53%(A549);49%(SMMC-7721);55%(MDA-MB231);53%(MCF7)	61%(A549)-59%(SMMC-7721);58%(MDA-MB231);56%(MCF7)	53%(A549)-49%(SMMC-7721);55%(MDA-MB231);53%(MCF7)	-		
	55%及び52%(LLC)-60%及び58%(SMMC-7721)	51%及び49%(LLC)-55%及び57%(SMMC-7721)	65%及び62%(A549)-63%及び61%(SMMC-7721)	63%及び61%(A549)-55%及び57%(SMMC-7721)	71%及び73%(A549)-65%及び67%(SMMC-7721);63%及び65%(MDA-MB231);60%及び63%(MCF7)	63%及び61%(A549)-55%及び57%(SMMC-7721);56%及び59%(MDA-MB231);53%及び56%(MCF7)	71%及び73%(A549)-65%及び67%(SMMC-7721);63%及び65%(MDA-MB231);60%及び63%(MCF7)	63%及び61%(A549)-55%及び57%(SMMC-7721);56%及び59%(MDA-MB231);53%及び56%(MCF7)	-		
	56%及び53%(LLC)-61%及び63%(SMMC-7721)	55%及び52%(LLC)-60%及び63%(SMMC-7721)	66%及び67%(A549)-63%及び65%(SMMC-7721)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721)	75%及び79%(A549)-73%及び77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	75%及び79%(A549)-73%及び77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
H3アセチル化レベルの増加(%)	56%及び53%(LLC)-61%及び63%(SMMC-7721)	55%及び52%(LLC)-60%及び63%(SMMC-7721)	66%及び67%(A549)-63%及び65%(SMMC-7721)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721)	75%及び79%(A549)-73%及び77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	75%及び79%(A549)-73%及び77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%及び66%(A549)-60%及び63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	63%(SMMC-7721)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	77%(SMMC-7721);70%及び72%(MDA-MB231);67%及び69%(MCF7)	63%(SMMC-7721);57%及び60%(MDA-MB231);55%及び58%(MCF7)	-		
H4アセチル化レベルの増加(%)	60%及び63%(LLC)-65%及び68%(SMMC-7721)	55%及び56%(LLC)-61%及び64%(SMMC-7721)	68%及び69%(A549)-65%及び68%(SMMC-7721)	65%及び67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721)	78%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	65%及び67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	78%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	65%及び67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	-		
	63%(LLC)-65%及び68%(SMMC-7721)	56%(LLC)-61%及び64%(SMMC-7721)	69%(A549)-65%及び68%(SMMC-7721)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	-		
	63%(LLC)-65%及び68%(SMMC-7721)	56%(LLC)-61%及び64%(SMMC-7721)	69%(A549)-65%及び68%(SMMC-7721)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	-		
	63%(LLC)-65%及び68%(SMMC-7721)	56%(LLC)-61%及び64%(SMMC-7721)	69%(A549)-65%及び68%(SMMC-7721)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	80%及び80%(A549)-75%及び78%(SMMC-7721);72%及び75%(MDA-MB231);70%及び73%(MCF7)	67%(A549)-61%及び64%(SMMC-7721);57%及び62%(MDA-MB231);58%及び62%(MCF7)	-		

【0192】

10

20

30

40

【表 2 6】

表 4-1 続き		化合物 Ie	薬物陽性対照 (SAHA)	化合物 If	薬物陽性対照 (SAHA)	化合物 Ig	化合物 Ih	薬物陽性対照 (SAHA)	溶媒対照
酵素活性 EZH2 酵素活性 の減少/阻害率 (%)	効果濃度	58% (A549) - 56% (SMNC7721) ; 59% (MDA-MB231) 62% (MCF7)	53% (A549) - 49% (SMNC7721) ; 55% (MDA-MB231) 53% (MCF7)	65% (A549) - 64% (SMNC7721) ; 63% (MDA-MB231) 66% (MCF7)	53% (A549) - 49% (SMNC7721) ; 55% (MDA-MB231) 63% (MCF7)	57% (A549) - 58% (SMNC7721) ; 61% (MDA-MB231) 65% (MCF7)	55% (A549) - 56% (SMNC7721) ; 59% (MDA-MB231) 61% (MCF7)	52% (A549) ; 48% (SMNC7721) ; 54% (MDA-MB231) 52% (MCF7)	-
	HDAC3 及び HDAC4 酵素活性 の減少/阻害率 (%)	70% 及び 72% (A549) - 63% 及び 65% (SMNC7721) ; 60% 及び 62% (MDA-MB231) 65% 及び 67% (MCF7)	63% 及び 61% (A549) - 55% 及び 57% (SMNC7721) ; 56% 及び 59% (MDA-MB231) 53% 及び 56% (MCF7)	73% 及び 75% (A549) - 66% 及び 68% (SMNC7721) ; 65% 及び 67% (MDA-MB231) 69% (MCF7)	63% 及び 61% (A549) - 55% 及び 57% (SMNC7721) ; 56% 及び 59% (MDA-MB231) 53% 及び 56% (MCF7)	61% 及び 63% (A549) - 62% 及び 64% (SMNC7721) ; 64% 及び 66% (MDA-MB231) 66% (MCF7)	57% 及び 59% (A549) - 60% 及び 62% (SMNC7721) ; 62% 及び 64% (MDA-MB231) 66% (MCF7)	62% 及び 60% (A549) - 54% 及び 56% (SMNC7721) ; 55% 及び 58% (MDA-MB231) 52% 及び 55% (MCF7)	-
	H3 アセチル化 レベルの増加 (%)	73% 及び 76% (A549) - 71% 及び 74% (SMNC7721) ; 72% 及び 75% (MDA-MB231) 69% 及び 71% (MCF7)	63% 及び 66% (A549) - 60% 及び 63% (SMNC7721) ; 57% 及び 60% (MDA-MB231) 55% 及び 58% (MCF7)	76% 及び 79% (A549) - 75% 及び 78% (SMNC7721) ; 73% 及び 75% (MDA-MB231) 73% (MCF7)	63% 及び 66% (A549) - 60% 及び 63% (SMNC7721) ; 57% 及び 60% (MDA-MB231) 55% 及び 58% (MCF7)	65% 及び 67% (A549) - 66% 及び 68% (SMNC7721) ; 69% 及び 71% (MDA-MB231) 72% 及び 74% (MCF7)	64% 及び 66% (A549) - 65% 及び 67% (SMNC7721) ; 67% 及び 69% (MDA-MB231) 68% 及び 70% (MCF7)	61% 及び 63% (A549) - 61% 及び 63% (SMNC7721) ; 58% 及び 60% (MDA-MB231) 54% 及び 56% (MCF7)	-
	H4 アセチル化 レベルの増加 (%)	75% 及び 77% (A549) - 71% 及び 73% (SMNC7721) ; 73% 及び 76% (MDA-MB231) 75% 及び 77% (MCF7)	65% 及び 67% (A549) - 61% 及び 64% (SMNC7721) ; 57% 及び 62% (MDA-MB231) 58% 及び 62% (MCF7)	77% 及び 80% (A549) - 76% 及び 78% (SMNC7721) ; 73% 及び 74% (MDA-MB231) 74% 及び 76% (MCF7)	65% 及び 67% (A549) - 61% 及び 64% (SMNC7721) ; 57% 及び 62% (MDA-MB231) 58% 及び 62% (MCF7)	72% 及び 74% (A549) - 73% 及び 75% (SMNC7721) ; 74% 及び 76% (MDA-MB231) 76% 及び 78% (MCF7)	70% 及び 72% (A549) - 71% 及び 73% (SMNC7721) ; 72% 及び 74% (MDA-MB231) 73% 及び 75% (MCF7)	64% 及び 66% (A549) - 60% 及び 62% (SMNC7721) ; 56% 及び 60% (MDA-MB231) 57% 及び 59% (MCF7)	-

【0193】

備考：* $p < 0.05$ ；関連する試験方法に関して、上記実験方法パートを参照されたい。H3 及び H4 アセチル化レベル (%) は、ウェスタンブロッティングによる LLC (高転移性 Lewis マウス肺癌) の分析により得た：前記方法は、以下の実施形態 12 ~ 13 の関連するパートの内容に詳細に記載される通りであった。

【0194】

実施形態 12：実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 Ia ~ Ih のヒストンメチルトランスフェラーゼ (HDAC) の活性に対する阻害効果

10

20

30

40

50

【 0 1 9 5 】

1. 実験動物、細胞系、機器、及び主な試薬：

実験動物：ヌードマウス；細胞系及び機器に関して、詳細は実施形態 9 の動物実験パートを参照されたい。

EpiQuik HDAC Activity / Inhibition Assay Kit (Colorimetric) : Epigentek Company ;

EpiQuik Nuclear Extraction Kit、Epigentek Company ;

【 0 1 9 6 】

2. 実験手順：

10

【 0 1 9 7 】

(1) 薬物処置の後、腫瘍核抽出物を、EpiQuik Nuclear Extraction Kit の説明書の操作要件に厳密に従って調製した (実施形態 9 の実験手順 を参照されたい) ；各試料で、2 つの平行なウェルを設定した；

【 0 1 9 8 】

(2) 5 0 μ l の希釈試料溶液を、各反応ウェルに加え、プレート、プレートシールフィルムで密封し、室温で 3 0 分間反応させた；

【 0 1 9 9 】

(3) プレートシールフィルムを注意深く剥がし、液体を除き、乾燥させ、1 5 0 μ l の洗浄液を各ウェルに加え、3 0 秒静置し、次いで液体を除き、2 回繰り返し、乾燥させた；

20

【 0 2 0 0 】

(4) 2 μ l の HDAC 酵素又は腫瘍組織核抽出物を、それぞれ、2 8 μ l の希釈した試料溶液と均一に混合し、ウェルに加え、プレートをプレートシールフィルムで密封し、3 7 $^{\circ}$ C で 6 0 分間反応させた；

【 0 2 0 1 】

(5) プレートを 3 回洗浄したが、操作は (3) と同じであった；希釈した抗体捕捉使用溶液を、5 0 μ l / ウェルで各反応ウェルに加え、振とうベッド上で、室温で 6 0 分間反応させた；

【 0 2 0 2 】

30

(6) プレートを 4 回洗浄したが、操作は (3) と同じであった；

【 0 2 0 3 】

(7) 希釈した抗体検出使用溶液を、5 0 μ l / ウェルで各反応ウェルに加え、室温で 3 0 分間反応させた；

【 0 2 0 4 】

(8) プレートを 5 回洗浄したが、操作は (3) と同じであった；発色剤を、1 0 0 μ l / ウェルで加え、暗所発色 (dark development) を 2 ~ 1 0 分実施した；

【 0 2 0 5 】

(9) 5 0 μ l の停止溶液を、標準生成物のあるウェルの色が中程度の強度で青になったとき、反応を停止するために各ウェルに加えると、色は、添加後直ちに青から黄色に変わった；

40

【 0 2 0 6 】

(1 0) 各ウェルの吸光度 (OD 値) を、4 5 0 nm の波長で順次測定した；測定は、停止溶液の添加後 1 5 分以内に実施しなければならない；且つ

【 0 2 0 7 】

(1 2) 酵素活性阻害率を、以下の式により計算した：

阻害率 % = [1 - (陽性対照の OD - 試料の OD) / (陽性対照の OD - ブランク対照の OD)] 1 0 0 %

【 0 2 0 8 】

50

3. 実験結果 (表4 参照)

【0209】

実施形態13：種々の腫瘍の増殖、浸潤、及び転移、心血管疾患、免疫不全、炎症、及び同種のものに密接に関連していたタンパク因子のレベルの調節における実施形態1～7で得られた化合物I a～I hの効果に関する実験

【0210】

ウェスタンブロッティング法を適用して、以下の腫瘍に関連したタンパク因子のレベルの調節における、実施形態1～7で得られた化合物I a～I hの効果を検出し、手順は以下の通りであった：

【0211】

1. 主な試薬及び機器：

抗体：VEGFR、EGFR、c-Met、K-Ras、H-Ras、Akt、NF-B、サイクリンD1、ER-、Dvl-1、Dvl-2、Dvl-3、MMP-9、MMP2、-カテニン、Bcl-2、Bax、p53、p21、E-カドヘリン、及びカスパーゼ3タンパク質の一次抗体、American Cell Signaling Technology Company及びSanta Cruz Technology Companyから購入；並びに、H3アセチル化、H4アセチル化、及びHDAC (HDAC3、HDAC4、及び同種のもの) Antibody Sample Kits、米国のCell Signaling Technology Companyから購入。

RPMI-1640、DMEM培養液及び不活性化ウシ胎児血清：Hyclone Companyから購入；トリプシン：Amersco Companyから購入；タンパク質分子マーカー及び0.4%トリパンブルー：米国のSigma Companyから購入；PVDFフィルム：Millipore Companyから購入；

【0212】

総タンパク溶解物、核タンパク質溶解物、及びPMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) 溶液：Beyotime Biotechnology of Instituteから購入；二次抗体：西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヤギ抗体、カラープレステインドタンパク質分子量マーカー、ECL Plusルミネセンスキット、定着パウダー (fixing powder) 及び発色パウダー (developing powder)：Beyotime Biotechnology of Instituteから購入；医療用X線フィルム：Kodak Companyから購入。

【0213】

二酸化炭素インキュベーター：3111、米国のThermo Company；倒立顕微鏡：CKX31、日本のOlympus Company；卓上高速冷却遠心機：5810R、ドイツのEppendorf Company；マイクロピペット：ドイツのEppendorf Company；細胞培養プラスチックプレート (6ウェル)：Nunc lon company；小型垂直式電気泳動槽：米国のBIO-RAD Company；小型ウェット式電気転写槽：米国のBIO-RAD Company；脱色振とうベッド (decolorization shaking bed)：TS-1型、Jiangsu Haimen Kylin-Bell Lab Instruments Co., Ltd.；製氷機：XB 70、GRANT Company；OMEGA10ゲル画像化分析器：米国のulTRA LUM Company；密封装置：SF-B、Wenzhou Xingye Machinery Co., Ltd.；タンパク分析ライトボックス：Shanghai Jingke Industrial Co., Ltd.

【0214】

2. 実験手順：

(1) 細胞処理：対数増殖期にある細胞を、6 ウェルプレートに接種し、検出された実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h 及び陽性対照薬物シクロホスファミド、及び同種のを、細胞の密度が約 70 % ~ 80 % になったときに、それぞれ細胞に加え、最終濃度をそれぞれ 1 ~ 1500 $\mu\text{M/L}$ にし、薬物でなく溶媒 (0.01 % DMSO) を含む等しい体積の細胞培養液を有する対照群を設定し、連続的に 48 時間培養し、次いで細胞を回収した；

【0215】

(2) 細胞タンパク質の抽出：冷 PBS で 2 回洗浄した後、細胞を、総タンパク又は核タンパク質溶解物で溶解させ、10 μL の PMSF を 1 mL の溶解物に加え、均一な混合のために繰り返し解離し、氷上に 15 分間置いた；試料を 1.5 mL の EP パイプに移し、14000 r / 分及び 4 で 10 分間遠心分離し、上清を滅菌 EP パイプに移し、-80 で保存した；且つ

【0216】

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE)：等しい体積のタンパク質溶解物試料を使用して、タンパク質を分離し、膜転写、及びブロッキング、適切な一次抗体及び二次抗体で順次処理し、膜を洗浄し、次いで、ECL キットにより発色し、プロットタンパク質のバンドを、X 線フィルムの感光により検出した；Gel - Pro Analyzer を、灰色度 (gray degree) の定量的な分析に利用し、種々の濃度の対照群及び薬物処置群の光学濃度値を、それぞれ内部標準と比較し、得られた比率をそれぞれ対照群と比較し、タンパク質発現レベルを半定量化した。

【0217】

3. 実験結果 (表 5 及び表 6 参照)

【0218】

【表 27】

表 5 腫瘍の増殖、浸潤、及び転移、心血管疾患及び脳血管疾患、免疫不全、炎症などに密接に関連していたタンパク因子の阻害における実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h の効果

効果濃度 (mM/L)	化合物 Ia	化合物 Ib	化合物 Ic	化合物 Id	薬物陽性対照	ブランク対照 (溶媒)
タンパク質又は酵素						
Bcl-2/Bax	<0.125*	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
サイクリンD1	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
Akt	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
K-Ras	<0.085 *	<0.075 *	<0.065 *	<0.06 *	>1.0 *	-
H-Ras	<0.085 *	<0.075 *	<0.065 *	<0.06 *	>1.0 *	-
NF- κ B	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.08 *	>1.0 *	-
NF- κ B-DNA結合活性	<0.135 *	<0.13 *	<0.125 *	<0.12 *	>1.0 *	-
核 β -カテニン	<0.12 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
Dvl-1	<0.135 *	<0.30 *	<0.25 *	<0.25 *	>1.0 *	-
VEGFR1	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
VEGFR2	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
EGFR	<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.0 *	-
c-Met	<0.16 *	<0.155 *	<0.5 *	<0.15 *	>1.0 *	-
HDAC3	<0.075 *	<0.07 *	<0.065 *	<0.065 *	>0.5 *	-
HDAC4	<0.065 *	<0.06 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.5 *	-

【0219】

【表 28】

表 5－続き

タンパク質又は酵素	効果濃度 (mM/L)	関連する重要なシグナル伝達経路受容体、調節タンパク質、 及びキナーゼの阻害のための実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h の効果濃度 (IC50)			
		化合物 Ie	化合物 If	薬物陽性対照 (エンドスター、 シクロホスファミド)	ブランク対照 (溶媒)
Bcl-2/Bax		<0.18 *	<0.09 *	>0.25 *	－
サイクリン D1		<0.16 *	<0.09 *	>0.25 *	－
Akt		<0.16 *	<0.09 *	>0.25 *	－
K-Ras		<0.06 *	<0.055 *	>0.25 *	－
H-Ras		<0.06 *	<0.055 *	>0.25 *	－
NF-κB		<0.06 *	<0.06 *	>0.25 *	－
NF-κB-DNA結合活性		<0.1 *	<0.10 *	>0.25 *	－
核β-カテニン		<0.065 *	<0.09 *	>0.25 *	－
Dvl-1		<0.15 *	<0.20 *	>0.25 *	－
VEGFR1		<0.11 *	<0.09 *	>0.25 *	－
VEGFR2		<0.09 *	<0.09 *	>0.25 *	－
EGFR		<0.11 *	<0.1 *	>0.25 *	－
c-Met		<0.145 *	<0.141 *	>0.25 *	－
HDAC3		<0.055 *	<0.055 *	>0.25 *	－
HDAC4		<0.05 *	<0.045 *	>0.25 *	－

【0220】

【表 29】

表5－続き

タンパク質又は酵素	効果濃度 (mM/L)	関連する重要なシグナル伝達経路受容体、調節タンパク質、 及びキナーゼの阻害のための実施形態 1～7 で得られた化合物 及びその中間体の効果濃度 (IC50)		
	化合物 Ig	化合物 Ih	薬物陽性対照 (エンドスター)	ブランク対照 (溶媒)
Bcl-2/Bax	<0.07 *	<0.07 *	> 500mg/L*	－
サイクリン D1	<0.07 *	<0.07 *	> 500mg/L	－
Akt	<0.07 *	<0.07 *	> 500mg/L *	－
K-Ras	<0.065 *	<0.065 *	> 500mg/L *	－
H-Ras	<0.065 *	<0.065 *	> 500mg/L *	－
NF-κB	<0.1 *	<0.1 *	>500mg/L *	－
NF-κB-DNA結合活性	<0.125 *	<0.125 *	> 500mg/L *	－
核β-カテニン	<0.1 *	<0.1 *	> 500mg/L *	－
Dvl-1	<0.125 *	<0.25 *	> 500mg/L *	－
VEGFR1	<0.1 *	<0.1 *	> 250mg/L *	－
VEGFR2	<0.1 *	<0.1 *	> 250mg/L *	－
EGFR	<0.1 *	<0.1 *	> 500mg/L *	－
c-Met	<0.15 *	<0.5 *	> 500mg/L *	－
HDAC3	<0.065 *	<0.065 *	> 500mg/L *	－
HDAC4	<0.05 *	<0.05 *	> 500mg/L *	－
Dvl-2	<0.1 *	<0.1 *	> 250mg/L *	－
Dvl-3	<0.1 *	<0.1 *	> 250mg/L *	－
ER-α	<0.1 *	<0.1 *	> 250mg/L *	－
MMP9	<0.065 *	<0.065 *	> 250mg/L *	－
MMP2	<0.05 *	<0.05 *	> 250mg/L *	－

【0221】

備考：p < 0.05；関連する試験方法について、上記実験方法パートを参照されたい。

【0222】

表中の関連するタンパク因子は、全て、ヒト肝臓癌細胞、Lewis肺癌細胞、及び他の癌細胞系、並びにこれら腫瘍組織のタンパク質溶解物由来のものであり、実施形態1～7で得られた化合物Ia～Ih又は陽性対照抗癌薬又はDMSO溶媒により処置し、結果をウェスタンブロットティングによる検出及び分析により与えた。

【0223】

【表 3 0】

表6 腫瘍の増殖、浸潤、及び転移、心血管疾患及び脳血管疾患、免疫不全、炎症などに密接に関連していたタンパク因子レベル及び酵素活性に対する実施例1～7で得られた化合物I a～I hの効果

タンパク質又は酵素	効果濃度	関連する重要な調節タンパク質の発現レベル及び酵素活性の調節のための実施形態1～7で得られた化合物I a～I hの効果濃度 (mM/L)				
		化合物 I a	化合物 I b	化合物 I c	化合物 I d	薬物陽性対照 ブランク対照 (溶媒)
p53を50%増加させる		<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.5 *
p21を50%増加させる		<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.5 *
カスパーゼ-3を50%増加させる		<0.125 *	<0.12 *	<0.1 *	<0.1 *	>1.5 *
細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を50%増加させる		<0.075 *	<0.07 *	<0.065 *	<0.065 *	>1.0 *
E-カドヘリンを50%増加させる		<0.075 *	<0.07 *	<0.065 *	<0.065 *	>1.0 *

10

20

【 0 2 2 4 】

【表 3 1】

表6－続き

タンパク質又は酵素	効果濃度	関連する重要な調節タンパク質の発現レベル及び酵素活性の調節のための実施形態1～7で得られた化合物I a～I hの効果濃度 (mM/L)		
		化合物 I e	化合物 I f	薬物陽性対照 (エンドスター、シクロホスファミド) ブランク対照 (溶媒)
p53を50%増加させる*		<0.1 *	<0.065 *	>0.25 *
p21を50%増加させる*		<0.1 *	<0.065 *	>0.25 *
カスパーゼ-3を50%増加させる*		<0.1 *	<0.08 *	>0.25 *
細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を50%増加させる*		<0.065 *	<0.065 *	>0.25 *
E-カドヘリンを50%増加させる*		<0.065 *	<0.065 *	>0.25 *

30

40

【 0 2 2 5 】

【表 3 2】

表 6－続き

タンパク質又は酵素	効果濃度 関連する重要な調節タンパク質の発現レベル及び酵素活性の調節のための実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h の効果濃度 (IC50) (mM/L)			
	化合物 Ig	化合物 Ih	薬物陽性対照 (ビンクリスチン)	ブランク対照 (溶媒)
p53を50%増加させる	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	－
p21を50%増加させる	<0.07 *	<0.1 *	>0.07	－
カスパーゼ-3を50%増加させる	<0.07 *	<0.07 *	>0.07	－
細胞質/ミトコンドリアチトクロムCの比率を50%増加させる	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	－
E-カドヘリンを50%増加させる	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	－

10

【 0 2 2 6 】

20

備考：* $p < 0.05$ ；関連する試験方法について、上記実験方法パートを参照されたい。

#：関連する腫瘍抑制因子タンパク質 p 5 3、細胞周期阻害タンパク質 p 2 1、細胞アポトーシスヒドロラーゼカスパーゼ - 3、細胞質 / ミトコンドリアチトクロム C の比率、及び細胞接着タンパク質 E - カドヘリンの結果は全て、実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h 又は陽性対照抗癌薬又は DMSO 溶媒で処置された肝臓癌細胞、Lewis 肺癌細胞、及び他の癌細胞系、並びにこれら腫瘍組織のタンパク質溶解物のウェスタンブロッティングによる検出及び分析結果であった。

【 0 2 2 7 】

実施形態 1 4：核タンパク因子 NF - B (p 6 5) - DNA 結合活性 (EMSA) に対する実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h の阻害効果のインビトロ実験

30

【 0 2 2 8 】

1. 主な試薬及び機器：

化学ルミネセンス EMSA キット：米国の Pierce Biotechnology Company；

ピオチン標識 EMSA プローブ NF - B：米国の Pierce Biotechnology Company；

タンパク質分子マーカー及び 0.4% トリパンブルー：米国の Sigma Company；PVD F フィルム：Millipore Company；

核タンパク質溶解物及び PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) 溶液：Beyotime Biotechnology of Institute；

40

カラーステインドタンパク質分子量マーカー、ECL Plus ルミネセンスキット、定着パウダー及び発色パウダー：Beyotime Biotechnology of Institute。医療用 X 線フィルム：Kodak Company。

【 0 2 2 9 】

2. 実験手順：

癌細胞を、1～500 $\mu\text{M/L}$ の実施形態 1～7 で得られた化合物 I a～I h 及び 0.1～1000 $\mu\text{M/L}$ のビンクリスチン及び DMSO (0.01%) で 48 時間処置して、細胞核タンパク質抽出物を得たが、この方法は、実施形態 6 の実験パートに詳細に記載された通りであった。NF - B (p 6 5) - DNA 結合活性に対する阻害効果のインビ

50

トロ実験を、米国のPierce Biotechnology Companyの化学ルミネセンスEMSAキットにより適用し、実験方法は、キットの説明書に従って厳密に操作し、具体的な手順は以下の通りであった：

【0230】

(1) EMSAゲルの調製

EMSAゲルの調製は以下の表に示した。薬物により処置した細胞を、核タンパク質抽出溶液(Beyotime Biotechnology of Instituteにより提供)により抽出して、核タンパク質抽出物を得て、10 μ g/パイプの核タンパク質抽出物を、以下の表に示される試料反応及び電気泳動検出及び分析にそれぞれ使用した。

10

【0231】

【表33】

表7-1 4%* ポリアクリルアミドゲルの調製

成分の名称	試料の添加体積
TBE 緩衝液(10X)	1.0ml
再蒸留水	16.2ml
39:1 アクリルアミド	2ml
80% グリセロール	625 μ l
10% 過硫酸アンモニウム	150 μ l
TEMED	10 μ l

20

【0232】

(2) プレ電気泳動：ゲルを、0.5 \times TBE電気泳動緩衝液で充填された電気泳動タンク中で固定し、10V/cmで90分間電気泳動にかけた。プローブ結合反応は以下の通りであった：

【0233】

【表34】

表7-2 陰性対照反応

成分の名称	体積
ヌクレアーゼフリー水	7 μ l
EMSA/ゲルシフト結合緩衝液(5X)	2 μ l
細胞核タンパク質又は精製された転写因子	0 μ l
標識プローブ	1 μ l
総体積	10 μ l

30

【0234】

40

【表 3 5】

表 7-3 試料反応

成分の名称	体積
ヌクレアーゼフリー水	0μl
EMSA/ゲルシフト結合緩衝液 (5X)	2μl
細胞核タンパク質又は精製された転写因子	7μl
標識プローブ	1μl
総体積	10μl

10

【0 2 3 5】

成分を、上記表に従って順次 E P パイプに加え、均一に混合し、室温で 1 5 分間静置して、起こる可能性のある非特異的なプローブとタンパク質の結合を除いた。1 μ l のビオチン標識プローブ NF - B をそれぞれ加え、室温で 2 0 分間静置した。

【0 2 3 6】

(3) 電気泳動：新しい 0 . 5 × T B E 電気泳動緩衝液に交換、1 0 V / c m で 1 . 5 時間電気泳動にかけ、ゲルの温度が確実に 3 0 以下であるようにした。

【0 2 3 7】

(4) 膜転写：E M S A ゲル上の核タンパク因子と結合プローブを、ナイロン膜に転写するプロセスは、氷浴中 3 8 0 m A で 4 0 分間電氣的に転写した。

20

【0 2 3 8】

(5) 紫外線架橋：ナイロン膜を、2 5 4 n m 紫外線ランプの下に置き、1 5 分間照射した。

【0 2 3 9】

(6) 化学ルミネセンスによるビオチン標識プローブの検出：架橋したナイロン膜を、ブロッキング溶液によりブロックし、処理された膜を、キットの要件に従って、X 線露光、発色、及び定着に付し、結果を分析した。

【0 2 4 0】

3 . 実験結果

30

【0 2 4 1】

【表 3 6】

表 8 腫瘍の増殖、浸潤、及び転移、心血管疾患及び脳血管疾患、免疫不全、炎症などに密接に関連していた核タンパク因子 NF-κB (p65) 並びに DNA 活性 (細胞及び腫瘍組織核タンパク質) に対する実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h の阻害効果

効果濃度 阻害率 (%)	実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h の、核タンパク因子 NF-κB (p65) と DNA の結合の 50% 阻害のための効果濃度*							
	化合物 Ia	化合物 Ib	化合物 Ic §	化合物 Id	化合物 Ie	化合物 If	薬物陽性 対照 §	溶媒 対照
A549 細胞の 50% 阻害		<0.135 *	<0.125 *	<0.11 *	<0.12	<0.10 *	>1.0 *	-
SMMC7721 細胞の 50% 阻害	<0.125 *	<0.12 *	<0.125 *	<0.08* *	<0.121	<0.10 *	>1.0 *	-
MDA-MB231 細胞の 50% 阻害			<0.125 *	<0.1 *	<0.11	<0.10 *	>1.0 *	-
MCF7 細胞の 50% 阻害			<0.125* *	<0.1 *	<0.10	<0.10 *	>1.0 *	-
Lewis 肺癌細胞の 50% 阻害	<0.135 *							

40

50

【 0 2 4 2 】

【 表 3 7 】

表 8 - 続き

<div> <div>効果濃度</div> <div>阻害率 (%)</div> </div>	実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物 I a ~ I h の、核タンパク因子 NF- κ B (p65) と DNA の結合の 50% 阻害のための効果濃度			
	化合物 Ig §	化合物 Ih §	薬物陽性対照 § (ビンクリスチン)	ブランク対照 (溶媒)
A549 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-
SMMC7721 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-
MDA-MB231 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-
MCF7 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-
PANC-1 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-
HeLa 細胞の 50% 阻害	<0.07 *	<0.07 *	>0.07 *	-

10

【 0 2 4 3 】

§ インビボ腫瘍組織核タンパク質溶解物を検出に使用した場合、腹腔内注射用の実施形態 1 ~ 7 で得られた化合物及びシクロホスファミドの量は、それぞれ 60 mg / kg 及び 25 mg / kg であった。

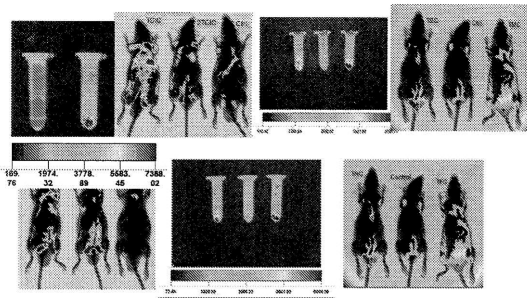
20

【 0 2 4 4 】

追加の注釈：本発明の出願及び結果に関連する研究は、National 863 プログラム “Research and development of tumor protein molecular markers (2012AA020206)” 及び Shandong Province Science and Technology Development Plan Project “Structural transformation and optimization of ester catechins (EGCG) and other active components and research of new anti-cancer candidate drugs (2009GG10002087)”、並びに Natural Science Foundation Project of Shandong Province (ZR2012HM016) により資金援助された。

30

【図 1】



TC1C = 化合物 Ic
 Control 又は Ctrl: 对照
 TMC = 化合物 Ia
 TEC = 化合物 Ib
 TNC = 化合物 If
 TFC = 化合物 Ic
 TBrC = 化合物 Id
2TC1C = 化合物 Ig
2TBrC = 化合物 Ih

図 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14

- (31)優先権主張番号 201210363369.X
 (32)優先日 平成24年9月27日(2012.9.27)
 (33)優先権主張国 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 201210363378.9
 (32)優先日 平成24年9月27日(2012.9.27)
 (33)優先権主張国 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 201210515826.2
 (32)優先日 平成24年12月6日(2012.12.6)
 (33)優先権主張国 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 201210515827.7
 (32)優先日 平成24年12月6日(2012.12.6)
 (33)優先権主張国 中国(CN)
 (31)優先権主張番号 201310030234.6
 (32)優先日 平成25年1月28日(2013.1.28)
 (33)優先権主張国 中国(CN)

(74)代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ジャン グオイーン
 中華人民共和国, シャンドーン 2 6 4 6 7 0, イエンタイ, ガオシンチュイ, ハーンティエンル
 ウ ナンバー 1 0 1

(72)発明者 ジャン イーン
 中華人民共和国, シャンドーン 2 6 4 6 7 0, イエンタイ, ガオシンチュイ, ハーンティエンル
 ウ ナンバー 1 0 1

(72)発明者 ウー ベンハオ
 中華人民共和国, シャンドーン 2 6 4 6 7 0, イエンタイ, ガオシンチュイ, ハーンティエンル
 ウ ナンバー 1 0 1

(72)発明者 ジャン グオホワ
 中華人民共和国, シャンドーン 2 6 4 6 7 0, イエンタイ, ガオシンチュイ, ハーンティエンル
 ウ ナンバー 1 0 1

審査官 安藤 倫世

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 9 9 1 6 (J P , A)

特表 2009-541445 (JP, A)

WATSON, B. T. ET AL, Solid phase synthesis of substituted coumarin-3-carboxylic acids via the Knoevenagel condensation, Tetrahedron Letters, 1998年, 39(33), 6087-6090

PENG, S. ET AL, Facile synthesis of 4-substituted 3,4-dihydrocoumarins via an organocatalytic double decarboxylation process, Organic & Biomolecular Chemistry, 2012年, 10(13), 2537-2541

CLINTON, R. O. ET AL, Coumarins. I. Derivatives of 3- and 4-coumarincarboxylic acids, Journal of the American Chemical Society, 1949年, 71, 3602-3606

CHIMENTI, F. ET AL, Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study, Bioorganic and medicinal chemistry letters, 2004年, 14(14), 3697-3703

CREAVEN, B. S. ET AL, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver(I) complexes, Inorganica chimica acta, 2006年, 359(12), 3976-3984

KATHURIA, A. ET AL, Substituted coumarin derivatives: synthesis and evaluation of anti proliferative and Src kinase inhibitory activities, Chemistry & Biology Interface, 2011年, 1(2), 279-296

BISSET, G. M. F. ET AL, The Synthesis and Thymidylate Synthase Inhibitory Activity of L- -L-Linked Dipeptide and L- -Amide Analogs of 2-Desamino-2-methyl-N10-propargyl-5, 8-dideazafolic acid (ICI 198583), Journal of Medicinal Chemistry, 1994年, 37(20), 3294-3302

CHEN, L. ET AL, Inhibitory effects of TBrC against the growth of lung cancer cells and the molecular mechanisms of action, Anhui Nongye Daxue Xuebao, 2013年, 40(2), 242-249

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D

A61K

CAplus / REGISTRY (STN)