

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4060366号
(P4060366)

(45) 発行日 平成20年3月12日(2008.3.12)

(24) 登録日 平成19年12月28日(2007.12.28)

(51) Int. Cl. F I
C07C 59/42 (2006.01) C O 7 C 59/42
A61K 31/232 (2006.01) A 6 1 K 31/232
A61P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

請求項の数 8 (全 69 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平10-513962 (86) (22) 出願日 平成9年9月15日(1997.9.15) (65) 公表番号 特表2001-500866(P2001-500866A) (43) 公表日 平成13年1月23日(2001.1.23) (86) 国際出願番号 PCT/US1997/016342 (87) 国際公開番号 W01998/011049 (87) 国際公開日 平成10年3月19日(1998.3.19) 審査請求日 平成16年7月30日(2004.7.30) (31) 優先権主張番号 08/712,610 (32) 優先日 平成8年9月13日(1996.9.13) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド アメリカ合衆国 02115 マサチュー セッツ, ボストン, フラーンシス ストリ ート 75 (74) 代理人 弁理士 倉内 基弘 (74) 代理人 弁理士 風間 弘志 (72) 発明者 サーハン, チャールズ エヌ. アメリカ合衆国 02146 マサチュー セッツ, ブルックライン, チャペル スト リート 20, アパートメント ナンバー 812シー 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 リポキシン化合物及び細胞増殖性疾患の治療におけるそれらの利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

15R-5, 6, 15-トリヒドロキシ-7, 9, 13-トランス-11-シス-エイコ
 サテトラエン酸、

15R-5, 14, 15-トリヒドロキシ-6, 10, 12-トランス-8-シス-エイ
 コサテトラエン酸、及び

15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸の群から選ばれた実質的に精製された少なくとも
 一種の15-エピ-リポキシン化合物と、製薬上許容し得るキャリアーとを含む製薬組成
 物であり、患者における細胞の望ましくない増殖を防止するために使用される製薬組成物
 。

【請求項2】

上記15-エピ-リポキシン化合物は、

5S, 6R, 15R-5, 6, 15-トリヒドロキシ-7, 9, 13-トランス-11-
 シス-エイコサテトラエン酸、

5S, 14R, 15R-5, 14, 15-トリヒドロキシ-6, 10, 12-トランス-
 8-シス-エイコサテトラエン酸、及び

15R-15-エピ-リポキシン化合物の群から選ばれる請求項1の製薬組成物。

【請求項3】

細胞が上皮細胞である、請求項1又は2に記載の製薬組成物。

【請求項4】

細胞が白血球である、請求項 1 又は 2 に記載の製薬組成物。

【請求項 5】

細胞が内皮細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の製薬組成物。

【請求項 6】

細胞が繊維芽細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の製薬組成物。

【請求項 7】

細胞が癌様の成長をする、請求項 1 又は 2 に記載の製薬組成物。

【請求項 8】

有効量のアセチルサリチル酸を更に含む、請求項 1 ~ 7 いずれか 1 項に記載の製薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

発明の背景

リポキシンは、リポキシゲナーゼ (LO) 酵素系の作用によりアラキドン酸から誘導される生物学的に活性な一群のメディエーターである (Serhan, C.N. 及び Samuelsson, B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5335)。ヒト細胞型での形成は、5-LO 又は 15-LO により開始される (Serhan, C.N. (1991) J. Bioenerg. Biomembr. 23:105)。単一細胞型は、ヒトの好中球 - 血小板と好酸球との細胞間のエイコサノイドの生合成中にナノグラムレベルでリポキシシンを生成する (Serhan, C.N. 及び Sheppard, K.-A. (1990) J. Clin. Invest. 85:772)。LX は、種々の臓器系における細胞事象を調節する共役テトラエン含有エイコサノイドである。

20

リポキシシン A₄ (LXA₄) 及びリポキシシン B₄ (LXB₄) は、2つの主要なリポキシシンである。各々は、10 nM で、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性を、赤白血病細胞の核において増大させる (Beckman, B.S. 等 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 201:169)。各々は、nM のレベルで、迅速な血管拡張を誘出する (Busija, D.W. 等 (1989) Am. J. Physiol. 256:H468; Katoh, T. 等 (1992) Am. J. Physiol. 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32):F436)。リポキシシンの血管拡張効果は、文献的に周知である。例えば、マイクロモル量の LXA₄ の吸入による投与は、喘息患者における気管支収縮をブロックする (Christie, P.E. 等 (1992) Am. Rev. Respir. Dis. 145:1281)。

10⁻¹⁰ M の範囲において、LXA₄ は又、最適状態に及ばない濃度の顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) との組合せにおいても細胞増殖を刺激してミエロイド骨髄コロニー形成を誘導する (Stenke, L. 等 (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180:255)。LXA₄ は又、ヒトの単核細胞コロニー形成をも刺激する (Popov, G.K. 等 (1989) Bull. Exp. Biol. Med. 107:93)。

30

LXA₄ は、多形核白血球の走化性を阻止する (Lee, T.H. 等 (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180:1416)。リポキシシンの等モル量の組合せは、糸球体炎症における多形核好中球 - メサングウム細胞相互作用を調節することが見出されている (Brady, H.R. 等 (1990) Am. J. Physiol. 809)。多形核好中球 (PMN) の活性化は糸球体炎症の初期ステージと関連する構造的及び機能的に異常なメディエーターの放出を含む (Wilson, C.B. 及び Dixon, F.J. (1986) (The Kidney, B.M. Brenner 及び F.C. Rector 編、ペンシルベニア、Philadelphia: Saunders, p. 800-891))。

40

リポキシシンは、ロイコトリエン (LT) に対するアンタゴニストとして作用する (これらは、炎症のメディエーターである)。LXA₄ は、喘息患者における LTC₄ - 誘導された気道の閉塞を調節する (Christie, P.E. 等 (1992) Am. Rev. Respir. Dis. 145:1281)。LXA₄ は、LTD₄ - 及び LTB₄ - 媒介の炎症をモデル動物においてイン・ビボで阻止する (Badr, K.F. 等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3438; Hedqvist, P. 等 (1989) Acta Physiol. Scand. 137:571)。LXA₄ (nM) に以前にさらしておくことは、LTD₄ の腎臓での血管収縮作用をブロックする (Katoh, T. 等 (1992) Am. J. Physiol. 263 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 32):F436))。ロイコトリエン誘導された炎症は、例えば、関節炎、喘息、種々の型のショック、高血圧、腎臓病、アレルギー反応、及び心筋梗塞を含む循環系疾患において生じる。

50

リポキシンは、イン・ピボ投与して多くの病気を治療することのできる強力な低分子であるが、これらの分子は、イン・ピボでは短命である。天然のリポキシンと同じ生体活性を有するが、一層長いイン・ピボ半減期を有する化合物は、価値ある医薬であろう。

発明の要約

この発明は、実質的に精製された15-エピ-リポキシン化合物を特徴とする。一具体例において、この15-エピ-リポキシン化合物は、15R-5, 6, 15-トリヒドロキシ-7, 9, 13-トランス-11-シス-エイコサテトラエン酸であり、別の具体例においては、この酸は、5S, 6R配置(15-エピ-LXA₄)を有する。他の具体例においては、この15-エピ-リポキシン化合物は、15R-5, 14, 15-トリヒドロキシ-6, 10, 12-トランス-8-シス-エイコサテトラエン酸であり、この酸は、5S, 14R配置(15-エピ-LXB₄)を有する。更に別の具体例においては、この15-エピ-リポキシン化合物は、15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(15-HETE)でありこの酸は、15R配置を有する。

この発明は又、天然のリポキシンと同じか又は類似する活性領域を有するが、イン・ピボの異化作用に一層抵抗性である代謝変換領域を有するリポキシンアナログを特徴とする。それ故、本願に開示されているリポキシンアナログは、天然のリポキシンの生物学的活性を有するが、一層長い代謝半減期を有する。本願に開示されているリポキシンアナログのあるものは、更に、増大されたイン・ピボでの有効性(天然のリポキシンと比較して一層高いリポキシンレセプターに対する結合親和性又は増大された生体活性)を有している。天然のリポキシンと同様に、本願に開示されている低分子は、高度に強力であり且つ生体適合性(即ち、非毒性)である。しかしながら、天然のリポキシンと異なって、リポキシンアナログは、代謝を阻止し、抵抗し又はゆっくりと受け、それ故、一層長い薬理学的活性を有する。更に、本願に開示している化合物は、天然のリポキシンより一層親油性であり、それ故、生物学的膜によって一層容易に取り込まれる。

更に、この発明は、ある種の細胞の望ましくない増殖を、それらの細胞を有効量の実質的に精製された15-エピ-リポキシン化合物と接触させることに基づいて改善する方法を特徴とする。好適な具体例において、これらの細胞は、癌様の又は腫瘍性の成長をしている。更に好適な具体例において、これらの細胞は、上皮細胞、白血球、内皮細胞及び/又は繊維芽細胞よりなる群から選択される。この発明のある好適具体例においては、細胞をイン・ピボで接触させる。他の具体例においては、細胞をエキソ・ピボで接触させる。

この発明は又、患者における細胞増殖性疾患を、有効量の実質的に精製された15-エピ-リポキシン化合物を投与することによって改善する方法をも特徴とする。

他の面において、この発明は、本発明の実質的に精製された15-エピ-リポキシン化合物及び製薬上許容し得るキャリアーを有する製薬組成物を特徴とする。好適具体例において、15-エピ-リポキシン化合物は、患者における望ましくない細胞増殖を阻止するのに有効な量である。他の具体例においては、この製薬組成物は、有効量のアセチルサリチル酸(ASA)を含有する。

この発明は、更に、これらのリポキシン化合物の診断及び研究用途にも関係する。この発明の更なる特徴及び利点は、下記の詳細な説明及び請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

図1Aは、ヒトの腫瘍細胞株(A549細胞)肺胞II型上皮細胞におけるプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ(PGHS)及びリポキシゲナーゼ(LO)発現を示すグラフである。細胞を、T-75cm²フラスコ内で、インターロイキン1(IL-1)(1ng/ml)の存在下又は不在にて、37°Cで、24時間生育させた。抽出した全RNA(1µg)を取って、逆転写(RT)並びに、PGHS-1及び-2、15-、12-及び5-OL並びにグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)に特異的なオリゴヌクレオチドを用いるPCRに供した。放射性バンドをホスホルイメージャー分析により直接定量し、GAPDHの発現に標準化し、そしてIL-1にさらした後のmRNAレベルの増度として表した。図1Aの挿入図は、ヒトの肺組織及び抹消血単球(PBM)における15-LO mRNAの発現を示すものであり、

NDは、15-L O m RNA発現が検出されなかったことを意味している。

図1 Bは、37 で20分間、 $[^3\text{H}]$ -アラキドン酸(20 μM)にさらした透過性にしたIL-1 処理したA549細胞(1.5×10^6 細胞/ml)に由来する $[^3\text{H}]$ 標識したモノヒドロキシエイコサテトラエン酸(HEETE)のRP-HPLCプロファイルを示すグラフである。生成物を抽出し、メタノール:H₂O:酢酸(65:35:0.01; v/v/v)及びメタノール:酢酸(99.9:0.1, v/v)の直線状勾配を用いるクロマトグラフィーにかけた(1.0 ml/分の流量)。矢印は、合成の標準の同時クロマトグラフィーを示している。

図2 Aは、15-HEETEの生成を示すグラフである。A549細胞(6×10^6 細胞/フラスコ)をIL-1 (1 ng/ml)で24時間処理し、凍結融解にかけ(2サイクル)、ピヒクル(0.1% v/vエタノール(EtOH))、アセチルサリチル酸(ASA)、チトクロームP450インヒビター(17-オクタデシン酸(17-ODYA)、5 μM)又は5-L Oインヒビター(Rev-5901異性体5 μM)に20分間さらし、そしてアラキドン酸(20 μM)と共に37 で20分間インキュベートした。幾つかの実験においては、インキュベーション前に細胞を熱変性した(100、60分間)。インキュベーションをメタノール(2容)の添加により停止し、生成物を、逆相(RP)-高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)用に抽出した。データは、4~6個の別々のフラスコの平均 \pm SEMである。*、 $P < 0.05$ 及び**、 $P < 0.01$ (処理物対対照)を示してある。

図2 Bは、外因性起源からの15-HEETE形成のタイムコースを示すグラフである。A549細胞(1.5×10^6 細胞/ml)を、IL-1 (1 ng/ml)の存在下で又は不在において48時間生育させ、そしてA₂₃₁₈₇(5 μM)を伴って又は伴わないで4 mlのHBSS中でインキュベートした(37、30分間)。15-HEETEレベルを、RIAにより測定した。結果は、二連で測定した3つの異なる実験の平均 \pm SEMを表している。*、 $P < 0.05$ (処理物対対照)を示してある。

図3は、ASAによりトリガーを引かれた15-HEETEの相対的キラリティーを示すグラフである。A549細胞(10^7 細胞/フラスコ)をIL-1 (1 ng/ml)に24時間さらし、ピヒクル(0.1% v/vエタノール)()又はASA()で20分間処理し、次いで、アラキドン酸(20 μM)及びA₂₃₁₈₇(5 μM)を含むHBSS中でインキュベートした(37、30分間)。生成物を、(図1 Bのように)RP-HPLCによるクロマトグラフィーにかけ、そして15-HEETEを含む領域を集めてクロロホルムで抽出してジアゾメタンで処理した。キラリ分析を、Bakerbond DNBPG(方法に詳述)を用いて行った。結果は、類似の結果を示す2つの別々の実験を表している。図3の挿入図は、ASAの存在下(塗りつぶした棒)又は不在におけるA549由来の15Rと15S-HEETEの比を示している。

図4 Aは、上皮細胞-多形核好中球(PMN)同時刺激からの生成物のRP-HPLCクロマトグラムを示すグラフである。集密的A549細胞をIL-1 (1 ng/ml)に24時間さらし、ASA(20分間)で及びアラキドン酸(20 μM 、60秒間)で処理し、そして各々を、新たに単離したPMNと共にインキュベートし(1:8のA549細胞:PMN細胞比)、その後、4 mlのハンスの平衡塩溶液(HBSS)中でイオノホアA₂₃₁₈₇(5 μM)で、37 で30分間刺激した。生成物を、実施例5の方法の節に記載したようにして抽出して、RP-HPLCにかけた。クロマトグラムを300 nmにてプロットしたが、これは、 $n = 6$ の実験を示している。

図4 Bは、図4 Aに記載した上皮細胞-PMN同時刺激からの生成物のオンラインの紫外線(UV)スペクトルを示すグラフである。ピークBの下に溶出している物質は、優勢に15-エピ-LXB₄として同定された。

図4 Cは、図4 Aに記載した上皮細胞-PMN同時刺激からの生成物のオンラインのUVスペクトルを示すグラフである。図解したピークの下に溶出している物質は、優勢に15-エピ-LXA₄として同定された。

図5 Aは、上皮細胞-PMN同時刺激中にテトラエン含有リポキシン(リポキシンプラス

10

20

30

40

50

15 - エピ - リポキシン) の形成を調節する ASA を示すグラフである。A549 細胞を、アラキドン酸 (20 μ M、1 分間) 及び新たに単離した PMN の添加 (1 : 5 の A549 : PMN 細胞比) の前に、IL - 1 (1 ng/ml、24 時間) にさらし、ビヒクル (0.1% v/v) 又は ASA で処理した。同時刺激を、図 4 A におけるようにして行った。結果は、3 ~ 5 の別々のドナーからの平均 \pm SEM を表している。図 5 A の挿入図は、ASA の不在時 () 又は存在下 () における A549 細胞の PMN を伴う同時インキュベーションにおけるテトラエン含有リポキシン (リポキシンプラス 15 - エピ - リポキシン) の生成に対する細胞比の効果を示している。

図 5 B は、図 5 A において概説した条件に従う上皮細胞 - PMN 同時刺激中のペプチドロイコトリエン (LTC₄ プラス LTD₄) の形成を調節する ASA を示すグラフである。図 5 B の挿入図は、ASA の不在時 () 又は存在下 () における A549 細胞の PMN を伴う同時インキュベーションにおけるペプチドロイコトリエン (LTC₄ プラス LTD₄) の生成に対する細胞比の効果を示している。

図 6 A は、リポキシン A₄ (LXA₄)、リポキシン B₄ (LXB₄)、デキサメタゾン (DEX) 及びビヒクル単独での、A549 細胞数に対する経時的処置の効果を示すグラフである。96 ウェルプレート中の A549 細胞を、ビヒクル (0.15% EtOH) 又は等モル濃度 (10⁻⁶M) の LXA₄、LXB₄ 又は DEX で、最長で 96 時間 37 °C で処理した。示した間隔で、細胞を、3, (4, 5 - ジメチルチアゾイル - 2 - イル) 2, 5 (ジフェニル - テトラゾリウムプロミド) MTT アッセイ用に採取した。データは、四連で行った 3 ~ 7 の実験の平均 \pm SEM である。化合物対ビヒクルについて、*、P < 0.05 及び **、P < 0.005 を示してある。

図 6 B は、A549 細胞濃度を変化させたときの、A549 細胞増殖の阻害パーセントに対する LXA₄、LXB₄ 及び DEX 処理の効果を示すグラフである。A549 細胞を、示した濃度にて、LXA₄、LXB₄ 又は DEX に、37 °C で、72 時間さらした。結果は、四連で行った 5 ~ 8 実験の平均 \pm SEM である。結果は、ビヒクルに対する増殖の阻害パーセントとして表してある。化合物対ビヒクルについて、*、P < 0.05 **、P < 0.025 及び ***、P < 0.005 を示してある。

図 7 A は、A549 細胞を LXA₄、LXB₄ 及び DEX (5 nM ~ 500 nM の範囲で濃度を変える) の存在下で 72 時間生育させる 3H - チミジンの取込みで示した該細胞の DNA 合成に対する LXA₄、LXB₄ 及び DEX の効果を示すグラフである。アッセイの 24 時間前に、メチル [³H] チミジン (2 μ Ci/ml) を各ウェルに加えた。続いて、細胞を、DPBS²⁺ (4 °C) で 4 回洗い、0.25 N 水酸化ナトリウム (NaOH) で溶解させ、そして放射能の取込みをモニターした。値は、四連で行った 3 つの異なる実験の平均 \pm SEM を表している。結果は、ビヒクル単独に対する [³H] チミジンの取込みのパーセントとして表してある。化合物対ビヒクルについて、*、P < 0.05 及び **、P < 0.005 を示してある。

図 7 B は、A549 細胞を LXA₄、LXB₄ 及び DEX (1 μ M) の存在下で、12 ウェルの培養プレートに播種し、トリパン排除細胞を数えることにより 72 時間の時点において細胞カウントを得た場合における、A549 細胞の阻害に対する LXA₄、LXB₄ 及び DEX の効果を示すグラフである。値は、3 つの異なる実験の平均 \pm SEM を表している。結果は、緩衝液に対する増殖阻害パーセントとして表してある。化合物対ビヒクルについて、*、P < 0.05 を示してある。

図 8 は、15 - エピ - リポキシン生成に対して提案される生化学的経路を示す図式である。ASA - アセチル化 PGHS - 2 及び / 又は P450 活性は、15R - HETE に寄与する。上皮の 15R - HETE は、白血球 5 - LO により細胞間変換を受けて 15 - エピ - 5 (6) - エポキシテトラエン中間体となり、これは、15 - エピ - LXA₄ 及び 15 - エピ - LXB₄ の両者に共通である。

発明の詳細な説明

ここで用いる場合、以下の語句を以下のように定義する：

「リポキシン化合物」は、天然のリポキシン化合物 (リポキシン A₄ 又は リポキシン B₄)

10

20

30

40

50

及び/又は/リポキシナンalogを意味する。

「リポキシナンalog」は、「天然のリポキシ」の活性領域と同様に作用する「活性領域」を有するが、天然のリポキシと異なる「代謝変換領域」を有する化合物を意味する。リポキシナンalogには、天然のリポキシに構造的に類似する化合物、同じレセプター認識部位を共有する化合物、リポキシと同じ又は類似のリポキシ代謝変換領域を共有する化合物、及びリポキシのanalogであるとして技術的に認められる化合物が含まれる。リポキシナンalogには、リポキシナンalog代謝産物が含まれる。ここに開示した化合物は、少なくとも1つの不斉中心を含むことができる。不斉炭素原子が存在する場合には、少なくとも1つの立体異性体が可能であり、すべての可能な異性体は、示された構造表示内に含まれることを意図している。光学活性な(R)及び(S)異性体は、

10

当業者に公知の慣用技術を用いて分離することができる。本発明は、可能なジアステレオ異性体並びにラセミ及び光学的に分割される異性体を包含することを意図している。主題の発明で用いるのに好適なリポキシ化合物は、「15-エピ-リポキシ化合物」である。ここで用いる場合、「15-エピ-リポキシ化合物」は、15炭素における絶対配置がRであるリポキシ化合物である。

この用語「15-エピ-リポキシ化合物」は、前駆体を包含することを意図している。用語「前駆体」は、イン・ピボ、エキソ・ピボ及び/又はイン・ピトロで変換して、この発明の15-エピ-リポキシ化合物を形成することのできる化学的中間体をいうことを意図している。用語「前駆体」は又、イン・ピボでこの発明の15-エピ-リポキシ化合物に変換されるプロドラッグをも企図している(例えば、R.B.Silverman, 1992, 「The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action」、Academic Press, 第8章を参照されたい)。かかるプロドラッグの例には、イン・ピボ、エキソ・ピボ及び/又はイン・ピトロで、本発明の15-エピ-リポキシ化合物に加水分解され得、或いは、変換され得る水酸化物のエステル及び/又はカルボキシル基及び/又は化合物が含まれるが、これらに限定されない。

20

用語「対応するリポキシ」及び「天然のリポキシ」は、天然のリポキシ又はリポキシ代謝産物をいう。analogがリポキシ特異的なレセプターに対する活性を有する場合には、対応する又は天然のリポキシは、そのレセプターに対する正常のリガンドである。例えば、analogが、分化したHL-60細胞上のLXA₄特異的レセプターに対する特異的活性を有するLXA₄ analogである場合、対応するリポキシは、LXA₄である。

30

用語「活性領域」は、イン・ピボでの細胞相互作用に関係する天然のリポキシ又はリポキシanalogの領域を意味する。この活性領域は、細胞のリポキシレセプターの、又は巨大分子若しくは巨大分子複合体(酵素及びその補因子を含む)の「認識部位」に結合することができる。好適なリポキシA₄ analogは、天然のリポキシA₄のC₅~C₁₅を含む活性領域を有する。好適なリポキシB₄ analogは、天然のリポキシB₄のC₅~C₁₄を含む活性領域を有する。

用語「認識部位」又はレセプターは、技術的に認められ、一般に、機能的巨大分子(ある群の細胞性メッセンジャー例えばホルモン、ロイコトリエン及びリポキシは、これらのメッセンジャーに対する生化学的及び生理学的応答が開始される前に、先ずこの巨大分子と相互作用しなければならない)又は巨大分子の複合体をいうことを意図している。この出願で用いる場合には、レセプターは、無傷の若しくは透過性にした細胞において、又は組織(器官を含む)において単離することができる。レセプターは、生きた患者からのものであってもその患者中にあってもよく、又はクローン化することができる。レセプターは、正常に存在するものであっても、病気の状態により、傷害により又は人為的手段により誘導されるものであってもよい。この発明の化合物は、可逆的に、不可逆的に、競争的に、非競争的に、又は不競争的に(認識部位の天然基質に関して)結合することができる。

40

50

用語「代謝変換領域」は、一般に、リポキシン、リポキシンの代謝産物又はリポキシンアナログ（リポキシンアナログの代謝産物を含む）の部分であって、そこで、酵素又は酵素とその補因子が少なくとも一の代謝変換を行うことを試みる部分をいうことを意図している（該酵素又は酵素と補因子は、通常、リポキシンにて変換する）。この代謝変換領域は、変換を受け易くてよいか又は受け易くてはいけない。リポキシンの代謝変換領域の非制限的例は、C - 13, 14二重結合若しくはC - 15水酸基又はこれら両者を含むL X A₄の部分である。

用語「検出可能な標識分子」には、検出可能な標識分子が結合する化合物又はレセプター認識部位を追跡し又は同定するのに用いられる蛍光性、燐光性及び放射性標識した分子が含まれる。この標識分子は、当分野で公知の幾つかの方法の何れかによって検出することができる。

10

用語「標識したリポキシンアナログ」は、更に、放射性同位体（例えば、トリチウム（³H）、ジューテリウム（²H）、炭素（¹⁴C）、これらに限らない）で標識した化合物、或いは、別の方法で（例えば、蛍光で）標識した化合物を包含することが理解される。この発明の化合物は、例えば、動力学的結合実験のために、代謝経路及び酵素的機構を更に解明するために、又は分析化学の分野で公知の方法による特性決定のために標識し又は誘導体化することができる。

用語「代謝を阻害する」は、天然のリポキシンを代謝する酵素活性をブロックし又は減少させることを意味する。このブロック又は減少は、共有結合により、不可逆的結合により、不可逆的結合の実質的效果を有する可逆結合により、又は酵素がその通常の様式で他のリポキシンアナログ（リポキシンアナログ代謝産物を含む）、リポキシン又はリポキシン代謝産物に作用することを阻止する任意の他の手段により生じ得る。

20

用語「代謝に抵抗する」は、リポキシンを代謝させる酵素の少なくとも1つによる少なくとも1つの代謝分解性変換を受けられないことを包含することを意図している。代謝に抵抗するL X A₄アナログの2つの非制限的例は、1) 15 - オキソ型に酸化することのできない構造、及び2) 15 - オキソ型に酸化することはできるが13, 14 - ジヒドロ型への酵素的還元を受け易くない構造である。

用語「一層ゆっくり代謝を受ける」は、一層遅い反応動力学を有すること、又はリポキシンAを代謝させる酵素の少なくとも1つによる代謝変換のシリーズの完結に一層の時間を要することを意味する。一層ゆっくり代謝を受けるL X A₄アナログの非制限的例は、C - 15の水素化について、アナログがC - 16において立体的に障害を受けるので、L X A₄より一層高い遷移状態エネルギーを有する構造である。

30

用語「組織」は、無傷の細胞、血液、血液標品例えば血漿及び血清、骨、関節、筋肉、平滑筋及び臓器を包含することを意図している。

用語「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素、又はフルオロ、クロロ、プロモ及びヨードを包含することを意味する。

用語「製薬上許容し得る塩」は、技術的に認められた製薬上許容し得る塩を包含することを意図している。これらの非毒性塩は、通常、生理的条件下で加水分解され、有機及び無機の塩基を包含する。塩の例には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、銅及びアルミニウム並びに第1、第2及び第3アミン、塩基性イオン交換樹脂、プリン、ピペラジン等が含まれる。この用語は、更に、低級炭化水素基例えばメチル、エチル及びプロピルのエステルを包含することを意図している。

40

用語「製薬組成物」は、少なくとも1種のリポキシンアナログ又は、その製薬上許容し得る塩を活性成分として含み、製薬上許容し得るキャリアー及び適宜他の成分をも含むことができる。これらの組成物は、経口投与、直腸投与、眼への投与、肺投与、鼻投与、皮膚投与、局所投与、非経口投与（皮下投与、筋肉投与及び静脈投与）又は吸入投与に適した組成物を包含する。如何なる特定の症例においても最も適当な経路は、治療される病気の性質及び重さ並びに活性成分の性質に依存するであろう。これらの組成物は、単位投薬形態で提供することができ且つ製薬分野で周知の方法の何れかによって調製することができる。投薬養生法は、治療応答を改善する目的に合わせて調節することができる。例えば、

50

幾つかの分割された投薬を毎日投与することができ、又は投与量を経時的に減らすことができる。当業者は、通常、有効投薬量及び適当な養生法を決定することができる。リポキシナーナログの製薬組成物は又、リポキシナーナログ及び/又はリポキシナー代謝産物(リポキシナーナログの代謝産物を含む)を含む組合せをもいうことができる。組合せの非制限的例は、リポキシナーを代謝させる一の酵素を阻害し且つ適宜リポキシナーレセプター認識部位との特異的活性を有するリポキシナーナログ x 、及びリポキシナーレセプター認識部位との特異的活性を有し且つ適宜リポキシナー代謝を阻害し若しくは抵抗する第2のリポキシナーナログ y を含む混合物である。この組合せは、 x がリポキシナーを代謝させる酵素の1つを阻害するので、少なくとも y について一層長い組織半減期を生じる。従って、 y により媒介され又は打ち消されるリポキシナー作用は、増大される。

10

用語「実質的に純粋な又は精製された」リポキシナー化合物は、約20% (乾燥重量)未満の他の生物学的巨大分子を有し、好ましくは約5%未満の他の生物学的巨大分子を有する天然の又は合成の化合物を包含するとして定義される(但し、水、緩衝剤及び他の低分子、特に5000未満の分子量を有する分子は、存在してよい)。用語「精製された」は、ここで用いる場合、好ましくは、少なくとも80% (乾燥重量)の、一層好ましくは95~99重量%の範囲の、最も好ましくは少なくとも99.8重量%の同じ型の生物学的巨大分子の存在を意味する(但し、水、緩衝剤及び他の低分子、特に5000未満の分子量を有する分子は、存在してよい)。用語「純粋な」は、ここで用いる場合、好ましくは、すぐ上の「精製された」と同じ数値限定を有する。「単離された」及び「精製された」は、本来の状態の天然物質も包含しないし、成分に分離された(例えば、アクリルアミドゲルにて)が、純粋な物質又は溶液(例えば、夾雑蛋白質又はクロマトグラフィーの試薬例えば変性剤及びポリマー例えばアクリルアミド又はアガロースがない)として得られていない天然物質も包含しない。

20

用語「患者」は、炎症、炎症性応答、血管収縮、ミエロイド抑制及び/又は望ましくない細胞増殖により引き起こされる病気にかかり易い生きた生物を包含することを意図している。患者の例には、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ及びマウスが含まれる。この用語患者は、更に、トランスジェニック種を包含することを意図している。

用語「細胞増殖性疾患」は、細胞の望ましくない増殖を含む病気を包含する。かかる病気の非制限的例には、腫瘍(例えば、脳、肺(小細胞及び非小細胞)、卵巣、前立腺、乳腺又は大腸の腫瘍)又は他の癌腫若しくは肉腫(例えば、白血病、リンパ腫)が含まれる。用語「改善された」は、望ましくない細胞増殖及び/又は細胞増殖性疾患の治療、予防、制限及び/又は阻止を包含することを意図している。

30

リポキシナー化合物

本発明は、実質的に純粋な15-エピ-リポキシナー化合物が患者における望ましくない細胞増殖を改善するという驚くべき発見に基づいている。本発明の15-エピ-リポキシナー化合物は、15R-5,6,15-トリヒドロキシ-7,9,13-トランス-11-シス-エイコサテトラエン酸を、5S,6R配置(15-エピ-LXA₄)で含む。本発明の15-エピ-リポキシナー化合物は又、15R-5,14,15-トリヒドロキシ-6,10,12-トランス-8-シス-エイコサテトラエン酸を、5S,14R配置(15-エピ-LXB₄)で含む。本発明の15-エピ-リポキシナーは、更に、15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸を含む(特に、15R配置で)。

40

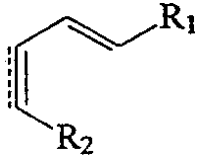
本発明は、リポキシナーがイン・ピボである細胞により独特の様式で急速に代謝されるという驚くべき発見に基づいている。他のLO誘導された生成物(例えば、ロイコトリエン)は、酸化とその後の酸化によって代謝される(Huwylar等(1992)Eur.J.Biochem.206,869-879)にもかかわらず、本発明は、リポキシナーが、リポキシナー分子のある部位に作用する一連の酸化及び還元反応により代謝されるという予想外の発見に基づいている。例えば、LXA₄代謝は、少なくとも部分的には、C-15ヒドロキシルの酸化によって生じ、15-オキシ-LXA₄を生成すること、C-13,14二重結合の還元が13,14-ジヒドロ-15-オキシ-LXA₄を生じ、更なる還元が13,14-ジヒドロ-LXA₄を生じることが見出されている。LXB₄及びその天然の異性体においては、類似の酸

50

化がC - 5ヒドロキシルにおいて生じ、還元がC - 6, 7二重結合にて生じる。
従って、本発明は、リポキシン活性を有するが、イン・ピボでの脱水素及びその後の分解を阻止するように化学的に修飾されたリポキシナーナログを特徴とする。これらのアナログにおいて、天然のリポキシンのC - 1 ~ C - 13部分は、保存され得、又は保存され得ない。C - 1 ~ C - 13部分の変種は、異なるシス又はトランスジオメトリー並びに置換を含む。これらの開示した化合物は、以下で、構造の属(これは、更に、亜属に分割される)により表される。下記の2つのR基の各々に含まれる亜属は、ページの左にローマ数字により表示する。

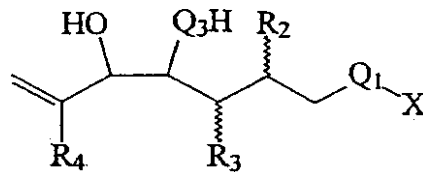
「活性領域」及び「代謝変換領域」(これらの用語は、両方とも、本明細書中に規定されている)を含む本願のリポキシンは、一般に、下記の構造のものである：

10



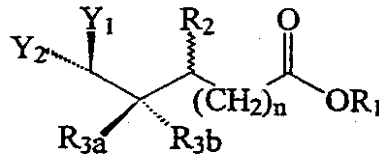
{ 式中、R₁は、

I, II, III, IV

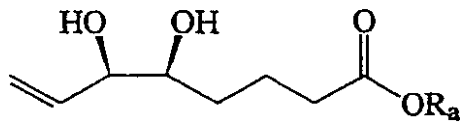


20

V

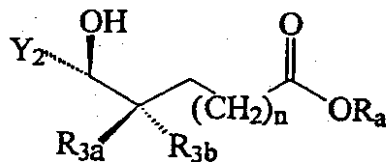


VI, VII, VIII,
IX, X



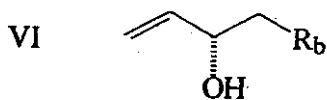
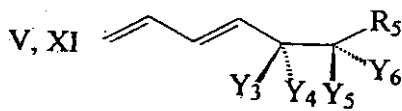
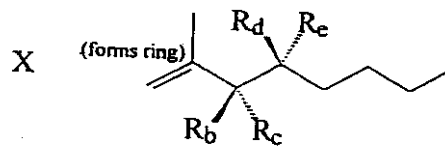
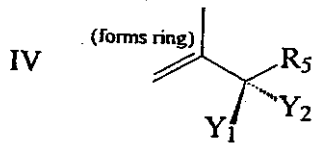
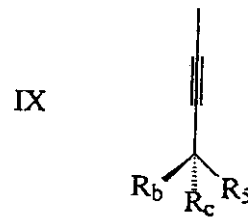
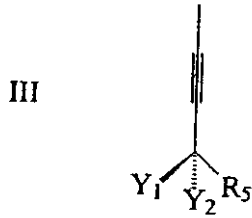
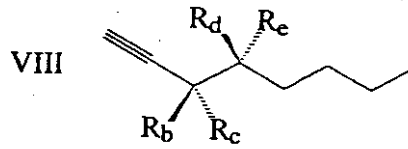
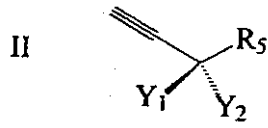
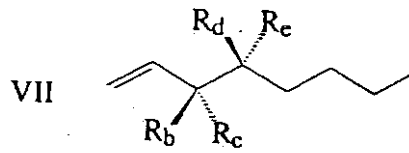
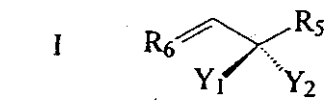
30

XI



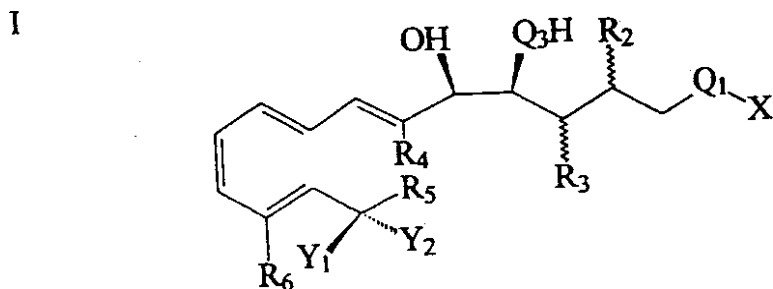
40

であってよく、そしてR₂は、



であってよい}。

一具体例において、この発明のリポキシシナンalogは、下記の構造式 I を有する：



{式中、Xは、R₁、OR₁又はSR₁であり；

(ここに、R₁は、

(i) 水素；

(ii) 1～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

(iii) 3～10炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7～12炭素原子のアラルキル；

10

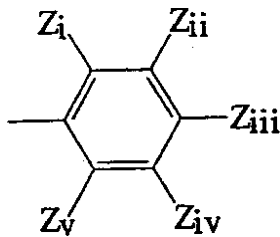
20

30

40

50

- (v) フェニル；
 (vi) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 及び水素よりなる群から選択され；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択される)

- (vii) 検出可能な標識分子；又は
 (viii) 2～8炭素原子の直鎖又は分枝鎖アルケニルである)

式中、 Q_1 は、 $(C=O)$ 、 SO_2 又は (CN) であり；

式中、 Q_3 は、 O 、 S 又は NH であり；

式中、 R_2 及び R_3 の一方は、水素であり、他方は、

- (a) H ；
 (b) 1～8炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；
 (c) 3～6炭素原子のシクロアルキル；
 (d) 2～8炭素原子のアルケニル（直鎖又は分枝鎖）；又は
 (e) $R_a Q_2 R_b$

(ここに、 Q_2 は、 $-O-$ 又は $-S-$ であり；

R_a は、0～6炭素原子のアルキレン（直鎖又は分枝鎖）であり；

R_b は、0～8炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）である）であり；

式中、 R_4 は、

- (a) H ；
 (b) 1～6炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）であり；

式中、 Y_1 又は Y_2 は、 $-OH$ 、メチル又は $-SH$ であり、そして式中、他方は、

- (a) H
 (b) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ ；そして Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲンである)；

- (c) 2～4炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；又は
 (d) 1～4炭素原子のアルコキシであり；

或は、 Y_1 及び Y_2 は、一緒になって

- (a) $=N$ ；又は
 (b) $=O$ であり；

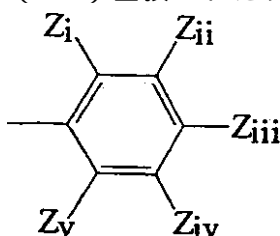
式中、 R_5 は、

- (a) 1～9炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；
 (b) $-(CH_2)_n - R_i$

(ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、

- (i) 3～10炭素原子のシクロアルキル；
 (ii) フェニル；又は

- (iii) 置換されたフェニル



10

20

30

40

50

(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、メトキシ及び $-SO_3H$ よりなる群から選択し；そしてここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択する)である)；

(c) $-R_a Q_a R_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$ ；

ここに、 R_a は、0～6炭素原子のアルキレン(直鎖又は分枝鎖)であり；

ここに、 R_b は、0～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)である)；

(d) $-C(R_{iii})(R_{iv})-R_i$

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

10

(i) H；

(ii) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、そして任意のZは、ハロゲンよりなる群から独立に選択する)；

(e) 1～8炭素原子及び1～6ハロゲン原子のハロアルキル(直鎖又は分枝鎖)であり；

そして

式中、 R_6 は、

(a) H；

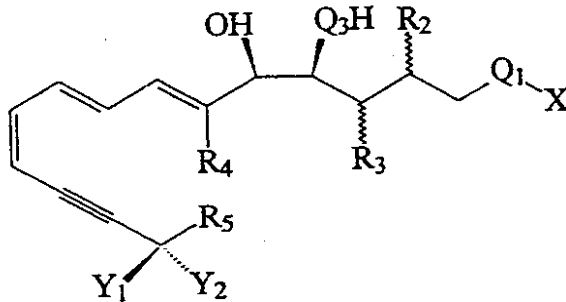
(b) 1～4炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

20

(c) ハロゲンである；但し、C-1位アミド、C-1位アルカノエート、及び製薬上許容し得る(5S, 6R, 15S)-トリヒドロキシ-7E, 9E, 11Z, 13E-エイコサテトラエン酸(LXA₄)のC-1位塩を除く；又、LXA₄のC-5、C-6及びC-15位アルカノエートを除く}。

この発明の一具体例において、リポキシンアナログは、下記の構造IIを有する：

II.



30

{ 式中、Xは、 R_1 、 OR_1 又は SR_1 であり；

(ここに、 R_1 は

(i) 水素；

(ii) 1～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

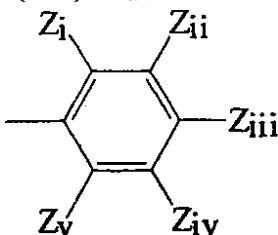
(iii) 3～10炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7～12炭素原子のアラルキル；

40

(v) フェニル；

(vi) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、水素及び $-SO_3H$ よりなる群から選択され；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に

50

、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択される)

(vii) 検出可能な標識分子例えば制限はしないが蛍光標識；又は

(viii) 2 ~ 8 炭素原子の直鎖又は分枝鎖アルケニルである)

式中、 Q_1 は、(C=O)、 SO_2 又は(C=N)であり；

式中、 Q_3 は、O、S又はNHであり；

式中、 R_2 及び R_3 の一方は、水素であり、他方は、

(a) H；

(b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

(c) 3 ~ 6 炭素原子のシクロアルキル；

(d) 2 ~ 8 炭素原子のアルケニル(直鎖又は分枝鎖)；又は

(e) $R_a Q_2 R_b$

(ここに、 Q_2 は、-O-又は-S-であり；

R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン(直鎖又は分枝鎖)であり；

R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)である)であり；

式中、 R_4 は、

(a) H；

(b) 1 ~ 6 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)であり；

式中、 Y_1 又は Y_2 は、-OH、メチル、-H又は-SHであり、そして式中、他方は、

(a) H；

(b) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ Z は、シアノ、ニトロ又はF、Cl、Br、Iを含むハロゲンである)；

(c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

(d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり；

或は、 Y_1 及び Y_2 は、一緒になって

(a) = N；又は

(b) = Oであり；

式中、 R_5 は、

(a) 1 ~ 9 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

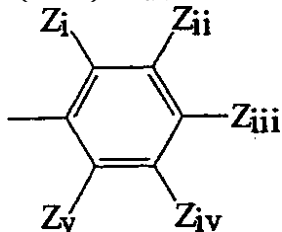
(b) $-(CH_2)_n - R_i$

(ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、

(i) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル；

(ii) フェニル；又は

(iii) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、-NO₂、-CN、-C(=O)- R_1 、メトキシ及び-SO₃Hよりなる群から選択し；ここに、 Z_i 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択する)である)；

(c) $-R_a Q_a R_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$ ；そして

ここに、 R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン(直鎖又は分枝鎖)であり；

ここに、 R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)である)；

(d) $-C(R_{iii})(R_{iv}) - R_i$

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

(i) H；及び

10

20

30

40

50

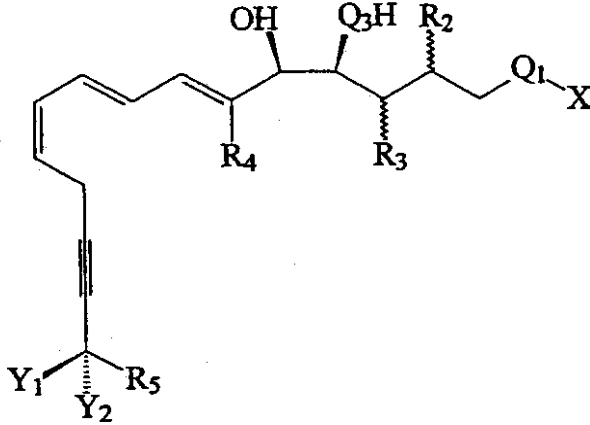
(ii) CH_aZ_b

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、任意のZは、ハロゲンよりなる群から独立に選択する)) ;

(e) 1 ~ 8 炭素原子及び 1 ~ 6 ハロゲン原子のハロアルキル (直鎖又は分枝鎖) である }。

この発明の一具体例において、リポキシアナログは、下記の構造IIIを有する :

III.



10

{ 式中、Xは、 R_1 、 OR_1 又は SR_1 であり ;

(ここに、 R_1 は

20

(i) 水素 ;

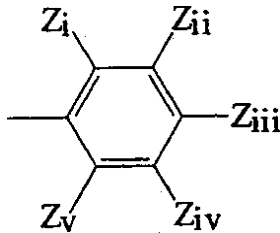
(ii) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(iii) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル ;

(iv) 7 ~ 12 炭素原子のアラルキル ;

(v) フェニル ;

(vi) 置換されたフェニル



30

(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、水素及び $-SO_3H$ よりなる群から選択され ; ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択される)

(vii) 検出可能な標識分子 ; 又は

(viii) 2 ~ 8 炭素原子の直鎖又は分枝鎖アルケニルである)

式中、 Q_1 は、 $(C=O)$ 、 SO_2 又は $(C=N)$ であり ;

式中、 Q_3 は、O、S又はNHであり ;

式中、 R_2 及び R_3 の一方は、水素であり、他方は、

40

(a) H ;

(b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(c) 3 ~ 6 炭素原子のシクロアルキル ;

(d) 2 ~ 8 炭素原子のアルケニル (直鎖又は分枝鎖) ; 又は

(e) $R_aQ_2R_b$

(ここに、 Q_2 は、 $-O-$ 又は $-S-$ であり ;

R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり ;

R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) である) であり ;

式中、 R_4 は、

(a) H ; 又は

50

(b) 1 ~ 6 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) であり ;
 式中、 Y_1 又は Y_2 は、ヒドロキシル、メチル、水素又はチオールであり、そして式中、
 他方は、

(a) H ;

(b) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲン [F、Cl、Br、I を含む] である) ;

(c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり ;

或は、 Y_1 及び Y_2 は、一緒になって

(a) = N ; 又は

(b) = O であり ; そして

式中、 R_5 は、

(a) 1 ~ 9 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

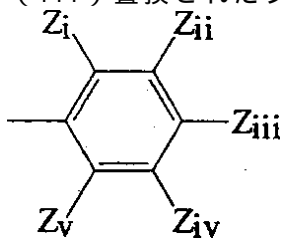
(b) $-(CH_2)_n - R_i$

(ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、

(i) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル ;

(ii) フェニル ;

(iii) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、メトキシ及び $-SO_3H$ よりなる群から選択し ; ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択する) である ;

(c) $-R_a Q_a R_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$;

ここに、 R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり ;

ここに、 R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) である) ; 又は

(d) $-C(R_{iii})(R_{iv})-R_i$

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

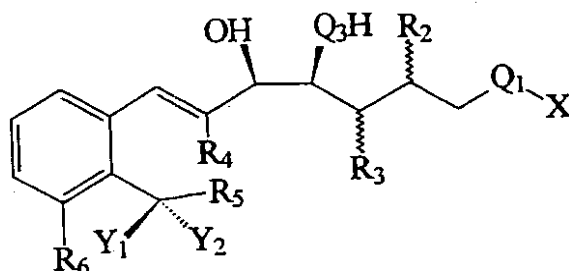
(i) H ;

(ii) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、Z は、ハロゲンよりなる群から独立に選択する) である}。

この発明の他の具体例において、リポキシアナログは、下記の構造式 IV を有する :

IV.



{ 式中、X は、 R_1 、 OR_1 又は SR_1 であり ;

(ここに、 R_1 は

(i) 水素 ;

10

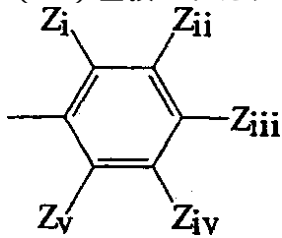
20

30

40

50

- (ii) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;
- (iii) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル ;
- (iv) 7 ~ 12 炭素原子のアラルキル ;
- (v) フェニル ;
- (vi) 置換されたフェニル



10

(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、メトキシ、水素及び $-SO_3H$ よりなる群から選択され；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択される)

- (vii) 検出可能な標識分子；又は
- (viii) 2 ~ 8 炭素原子の直鎖又は分枝鎖アルケニルである)

式中、 Q_1 は、 $(C=O)$ 、 SO_2 又は (CN) であり；

式中、 Q_3 は、 O 、 S 又は NH であり；

式中、 R_2 及び R_3 の一方は、水素であり、他方は、

- (a) H ；
- (b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;
- (c) 3 ~ 6 炭素原子のシクロアルキル ;
- (d) 2 ~ 8 炭素原子のアルケニル (直鎖又は分枝鎖) ; 又は
- (e) $R_a Q_2 R_b$

20

(ここに、 Q_2 は、 $-O-$ 又は $-S-$ であり；

R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり；

R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) である) であり；

式中、 R_4 は、

- (a) H ；又は
- (b) 1 ~ 6 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) であり；

30

式中、 Y_1 又は Y_2 は、 $-OH$ 、メチル又は $-SH$ であり、そして式中、他方は、

- (a) H ；
- (b) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲンである)；

- (c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;
- (d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり；

或は、 Y_1 及び Y_2 は、一緒になって

- (a) $=N$ ；又は
- (b) $=O$ であり；

40

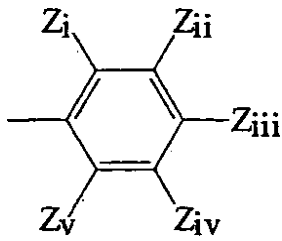
式中、 R_5 は、

- (a) 1 ~ 9 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;
- (b) $-(CH_2)_n - R_i$

(ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、

- (i) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル；
- (ii) フェニル；又は

(iii) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、メトキシ及び $-SO_3H$ よりなる群から選択し；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択する)である；

(c) $R_a Q_a R_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$ ；

ここに、 R_a は、0～6炭素原子のアルケン(直鎖又は分枝鎖)であり；

ここに、 R_b は、0～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)である)；

(d) $-C(R_{iii})(R_{iv})-R_i$

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

(i) H；又は

(ii) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、そしてZは、ハロゲンよりなる群から独立に選択する)；又は

(e) 1～8炭素原子及び1～6ハロゲン原子のハロアルキル(直鎖又は分枝鎖)であ

り；

そして

R_6 は、

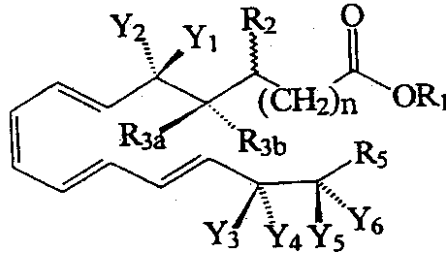
(a) H；

(b) 1～4炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；又は

(c) ハロゲンである}。

この発明の他の具体例において、リポキシアナログは、下記の構造式Vを有する：

V.



{式中、 R_1 は

(i) 水素；

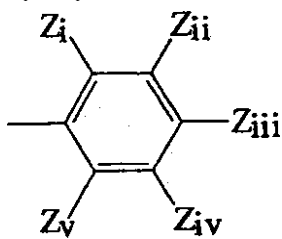
(ii) 1～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)；

(iii) 3～10炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7～12炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル；

(vi) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、水素及び $-SO_3H$ よりなる群から選択され；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素及びヒドロキシルよりなる群から選択される)

10

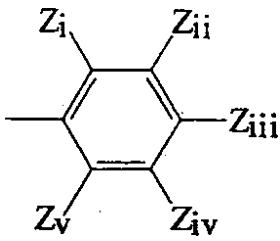
20

30

40

50

- (vii) 検出可能な標識分子；又は
 (viii) 2 ~ 8 炭素原子の直鎖又は分枝鎖アルケニルである)
 式中、 $n = 1 \sim 10$ であり；
 式中、 R_2 、 R_{3a} 及び R_{3b} は、独立に、下記より選択し；
 (a) H ；
 (b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ；
 (c) 3 ~ 6 炭素原子のシクロアルキル ；
 (d) 2 ~ 8 炭素原子のアルケニル (直鎖又は分枝鎖) ；又は
 (e) $R_a Q_2 R_b$
 (ここに、 Q_2 は、 $-O-$ 又は $-S-$ であり； 10
 R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり；そして
 R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) である) であり；
 式中、 Y_1 又は Y_2 は、 $-OH$ 、メチル、水素又は $-SH$ であり、そして式中、他方は、
 (a) H ；
 (b) $CH_a Z_b$
 (ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲンである) ；
 (c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ；
 (d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり； 20
 或は、 Y_1 及び Y_2 は、一緒になって
 (a) = N ；又は
 (b) = O であり；
 式中、 Y_3 又は Y_4 は、 $-OH$ 、メチル、水素又は $-SH$ であり、そして式中、他方は、
 (a) H ；
 (b) $CH_a Z_b$
 (ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ 任意の Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲンである) ；
 (c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ；
 (d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり； 30
 或は、 Y_3 及び Y_4 は、一緒になって
 (a) = N ；又は
 (b) = O であり；
 式中、 Y_5 又は Y_6 は、 $-OH$ 、メチル、水素又は $-SH$ であり、そして式中、他方は、
 (a) H ；
 (b) $CH_a Z_b$
 (ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ 任意の Z は、シアノ、ニトロ又はハロゲンである) ；
 (c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ；
 (d) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシであり； 40
 或は、 Y_5 及び Y_6 は、一緒になって
 (a) = N ；又は
 (b) = O であり；
 式中、 R_5 は、
 (a) 1 ~ 9 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ；
 (b) $-(CH_2)_n - R_i$
 (ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、
 (i) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル ；
 (ii) フェニル ；又は
 (iii) 置換されたフェニル



(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 及び $-SO_3H$ よりなる群から選択し；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素、メトキシ及びヒドロキシルよりなる群から選択する)である；

(c) $R_a Q_a R_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$ であり；そして

ここに、 R_a は、0～6炭素原子のアルケン(直鎖又は分枝鎖)であり；

ここに、 R_b は、0～8炭素原子のアルキル(直鎖又は分枝鎖)又は置換されたフェニルである)；

(d) $-C(R_{iii})(R_{iv})-R_i$

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

(i) H；又は

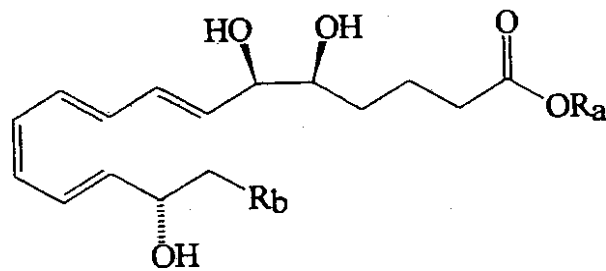
(ii) $CH_a Z_b$

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、そしてZは、ハロゲンよりなる群から独立に選択する)；又は

(e) 1～8炭素原子及び1～6ハロゲン原子のハロアルキル(直鎖又は分枝鎖)であり；但し、C-1位アミド、C-1位アルカノエート、及び製薬上許容し得る(5S、14R、15S)-トリヒドロキシ-6E、8Z、10E、12E-エイコサテトラエン酸(LXB₄)のC-1位塩を除く；又、LXB₄のC-5、C-6及びC-5位アルカノエートを除く}。

この発明の他の具体例において、リポキシナンalogは、下記の構造式VIを有する：

VI.

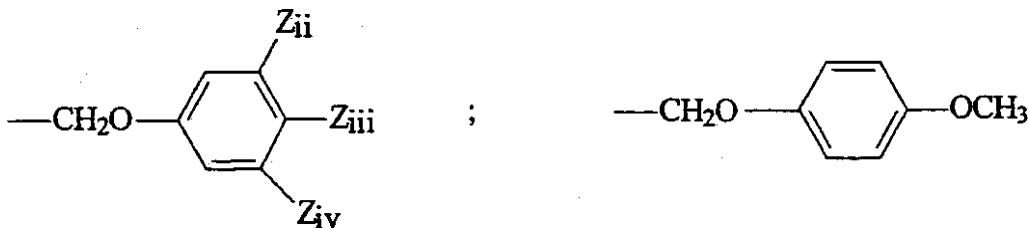


式中、 R_a は、下記の群より選択し；

(a) H；又は

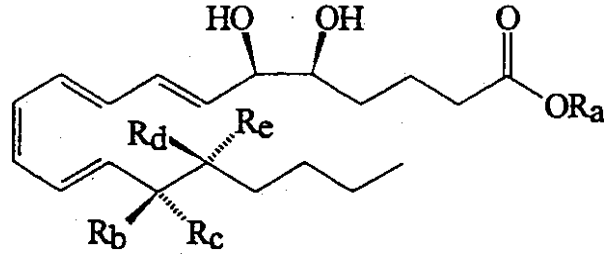
(b) 1～8炭素原子のアルキル；

式中、 R_b は、下記よりなる群から選択する：



この発明の他の好適具体例において、リポキシナンalogは、下記の構造式VIIを有する：

VII.



式中、 R_a は、下記の群より選択し；

(a) H；又は

(b) 1～8炭素原子のアルキル；

式中、 R_b 及び R_c は、独立に、下記の群から選択する：

(a) H；

(b) ヒドロキシル、又はチオール；

(c) メチル又はハロメチル（ $-CF_3$ 及び $-CH_2F$ を含む）；

(d) ハロゲン；

(e) 1～3炭素原子のアルコキシ（メトキシを含む）；

式中、 R_d 及び R_e は、独立に、下記の群から選択し；

(a) H；

(b) ヒドロキシル、又はチオール；

(c) メチル又はハロメチル（ $-CF_3$ 及び $-CH_2F$ を含む）；

(d) ハロゲン；

(e) 1～3炭素原子のアルコキシ（メトキシを含む）；又は

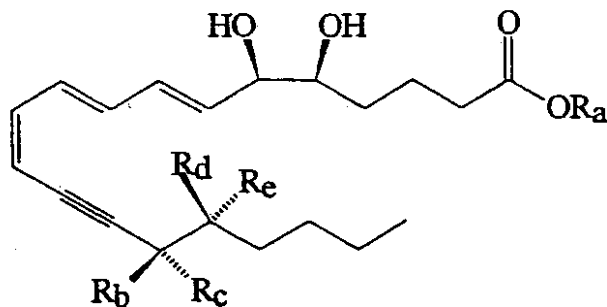
(f) 2～4炭素原子のアルキル又はハロアルキル（直鎖又は分枝鎖）；

但し、C-1位アミド、C-1位アルカノエート、及び製薬上許容し得る（5S、6R、15S）-トリヒドロキシ-7E、9E、11Z、13E-エイコサテトラエン酸（LXA₄）のC-1位塩；LXA₄のC-5、C-6及びC-15位アルカノエートを除く。

この発明の他の好適具体例において、リポキシアナログは、下記の構造式VIIIを有する

：

VIII.



式中、 R_a は、下記の群より選択し；

(a) H；又は

(b) 1～8炭素原子のアルキル；

式中、 R_b 及び R_c は、独立に、下記の群から選択する：

(a) H；

(b) ヒドロキシル、又はチオール；

(c) ハロメチル（ CF_3 を含む）；

(d) ハロゲン；

(e) 1～3炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；又は

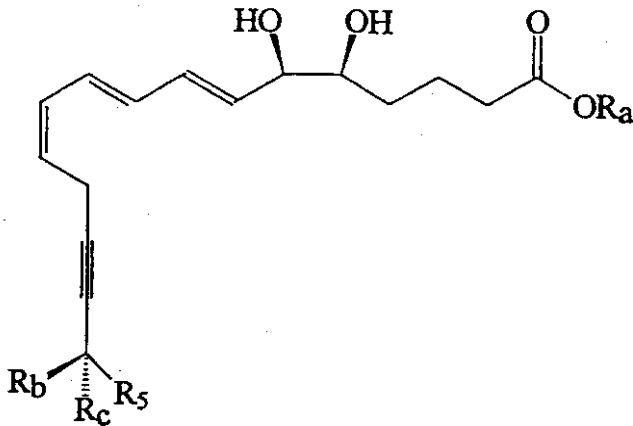
(f) 1～3炭素原子のアルコキシ；

式中、 R_d 及び R_e は、独立に、下記の群から選択する

(a) H；

- (b) ヒドロキシル、又はチオール；
 (c) メチル又はハロメチル（ $-CF_3$ 及び $-CH_2F$ を含む）；
 (d) ハロゲン；
 (e) 1～3炭素原子のアルコキシ（メトキシを含む）；又は
 (f) 2～4炭素原子のアルキル又はハロアルキル（直鎖又は分枝鎖）。

この発明の他の好適具体例において、リポキシンアナログは、下記の構造式IXを有する：
 IX.



10

式中、 R_a は、下記の群より選択し；

- (a) H；又は
 (b) 1～8炭素原子のアルキル；

20

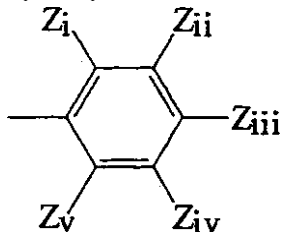
式中、 R_b 及び R_c は、独立に、下記の群から選択する：

- (a) H；
 (b) ヒドロキシル、又はチオール；
 (c) ハロメチル（ CF_3 及び CH_2F を含む）；
 (d) ハロゲン；
 (e) 1～3炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；
 (f) 1～3炭素原子のアルコキシ；そして

式中、 R_5 は、

- (a) 1～9炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）；
 (b) $-(CH_2)_n-R_i$
 (ここに、 $n = 0 \sim 4$ であり且つ R_i は、
 (i) 3～10炭素原子のシクロアルキル；
 (ii) フェニル；又は
 (iii) 置換されたフェニル

30



40

(ここに、 Z_i 、 Z_{iii} 及び Z_v は、各々、独立に、水素、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_i$ 及び $-SO_3H$ よりなる群から選択し；ここに、 Z_{ii} 及び Z_{iv} は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素、メトキシ及びヒドロキシルよりなる群から選択する)である)；

- (c) $R_aQ_aR_b$

(ここに、 $Q_a = -O-$ 又は $-S-$ であり；

ここに、 R_a は、0～6炭素原子のアルキレン（直鎖又は分枝鎖）であり；

ここに、 R_b は、0～8炭素原子のアルキル（直鎖又は分枝鎖）

又は置換されたフェニルである)；

- (d) $-C(R_{iii})(R_{iv})-R_i$

50

(ここに、 R_{iii} 及び R_{iv} は、独立に、下記よりなる群から選択する

(i) H; 又は

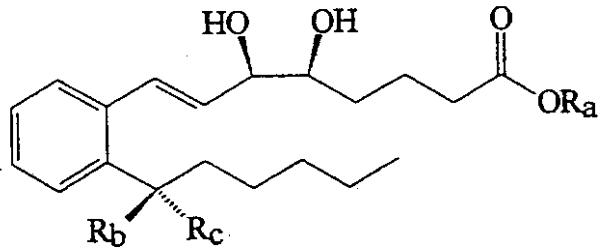
(ii) CH_aZ_b (

ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 + 3$ 、そしてZは、ハロゲンよりなる群から独立に選択する)) ; 又は

(e) 1 ~ 8 炭素原子及び 1 ~ 6 ハロゲン原子のハロアルキル (直鎖又は分枝鎖) である。

この発明の他の好適具体例において、これらの化合物は、下記の構造式 X を有する :

X.



10

式中、 R_a は、下記の群より選択し ;

(a) H; 又は

(b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

式中、 R_b 及び R_c は、独立に、下記の群から選択する :

(a) H; 20

(b) ヒドロキシル、又はチオール ;

(c) ハロメチル (例えば、 CF_3 を含む) ;

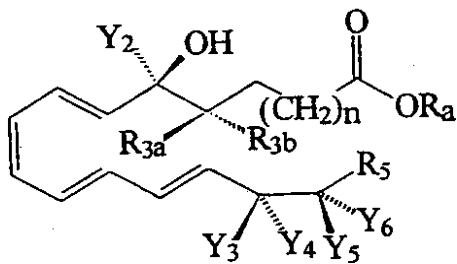
(d) ハロゲン ;

(e) 1 ~ 3 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(f) 1 ~ 3 炭素原子のアルコキシ (メトキシを含む) ;

この発明の他の好適具体例において、これらの化合物は、下記の構造式 XI を有する :

XI.



30

式中、 R_a は、

(i) 水素 ;

(ii) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ; 又は

(iii) 検出可能な標識分子であり ;

式中、 $n = 1 \sim 10$;

式中、 Y_2 、 R_{3a} 及び R_{3b} は、独立に、下記より選択し ;

40

(a) H ;

(b) 1 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(c) 3 ~ 6 炭素原子のシクロアルキル ;

(d) 2 ~ 8 炭素原子のアルケニル (直鎖又は分枝鎖) ; 又は

(e) $R_aQ_2R_b$

(ここに、 Q_2 は、 $-O-$ 又は $-S-$ であり ;

R_a は、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり ; そして

R_b は、0 ~ 8 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) である) であり ;

式中、 Y_1 は、 $-OH$ 、メチル又は $-SH$ であり、

式中、 Y_2 は、

50

(a) H ;

(b) C H_a Z_b

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ Zは、ハロゲンである) ; 又は

(c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) であり ;

式中、Y₃及びY₅は、独立に、下記よりなる群から選択し ;

(a) H ;

(b) C H_a Z_b

(ここに、 $a + b = 3$ 、 $a = 0 \sim 3$ 、 $b = 0 \sim 3$ 任意の Zは、シアノ、ニトロ又はハロゲンである) ; 又は

(c) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

式中、Y₄及びY₆は、独立に、下記よりなる群から選択し ;

(a) H ;

(b) 2 ~ 4 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

(c) 1 ~ 4 炭素原子のアルコキシ (直鎖又は分枝鎖) ; 又は

(d) ヒドロキシル又はチオール ; そして

式中、R₅は、

(a) 1 ~ 9 炭素原子のアルキル (直鎖又は分枝鎖) ;

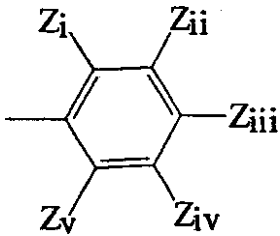
(b) - (C H₂)_n - R_i

(ここに、 $n = 0 \sim 3$ であり且つ R_iは、

(i) 3 ~ 10 炭素原子のシクロアルキル ;

(ii) フェニル ; 又は

(iii) 置換されたフェニル



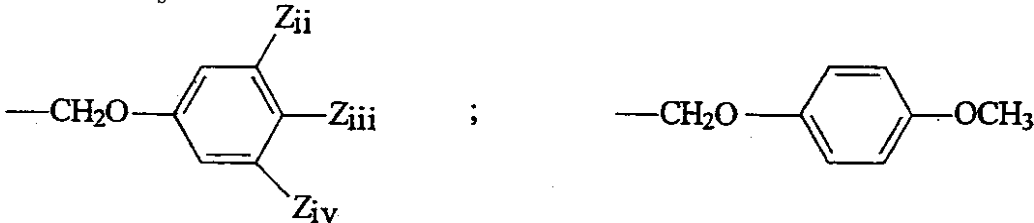
(ここに、Z_{iii}及びZ_{iv}は、各々、独立に、ハロゲン、メチル、水素、メトキシ及びヒドロキシルよりなる群から選択する) である ;

(c) R_a Q_a R_b

(ここに、Q_a = - O - 又は - S - であり ;

ここに、R_aは、0 ~ 6 炭素原子のアルキレン (直鎖又は分枝鎖) であり ;

ここに、R_bは、



(d) 1 ~ 8 炭素原子及び 1 ~ 6 ハロゲン原子のハロアルキル (直鎖又は分枝鎖) であり ; 但し、C - 1 位アミド、C - 1 位アルカノエート、及び製薬上許容し得る (5 S、1 4 R、1 5 S) - トリヒドロキシ - 6 E、8 Z、1 0 E、1 2 E - エイコサテトラエン酸 (L X B₄) の C - 1 位塩を除く ; 又、L X B₄ の C - 5、C - 6 及び C - 5 位アルカノエート (アセテート) を除く }。

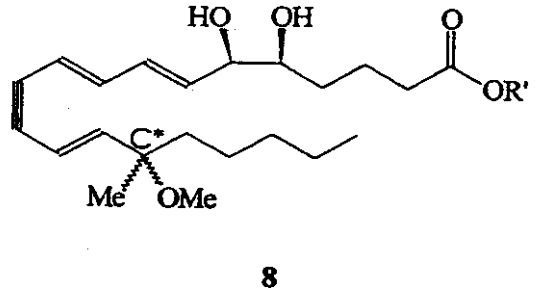
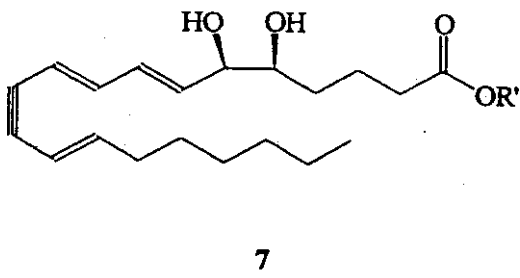
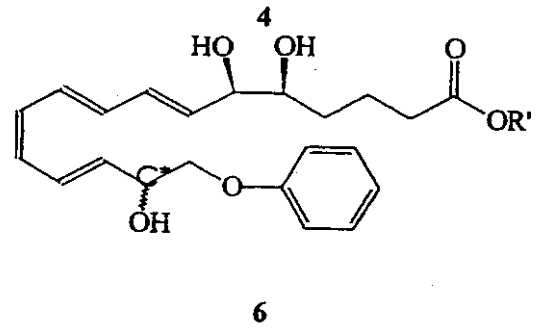
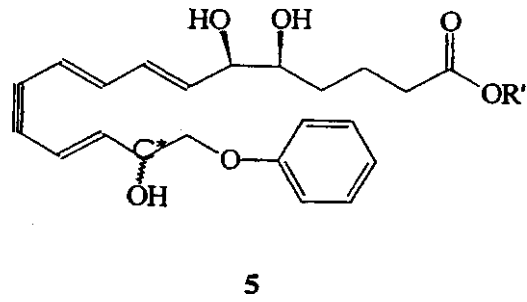
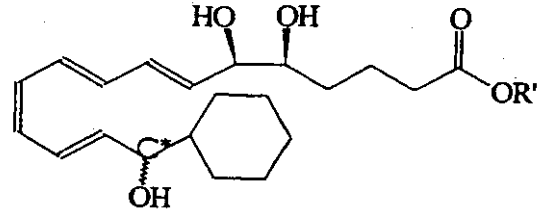
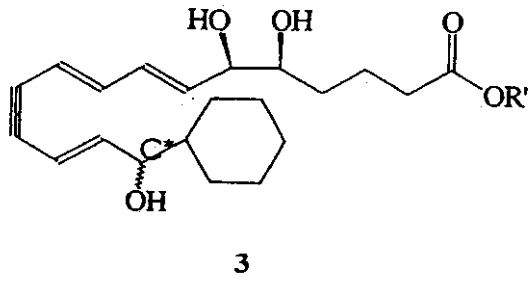
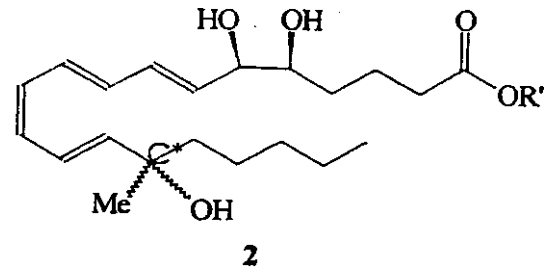
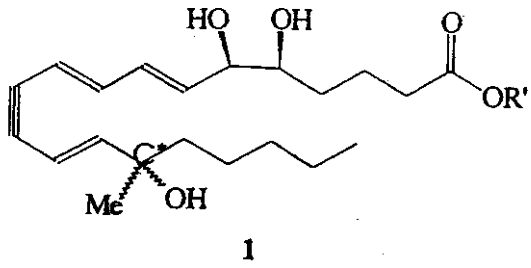
この発明の最も好適な具体例において、この発明の化合物は、下記の構造式を有する :

10

20

30

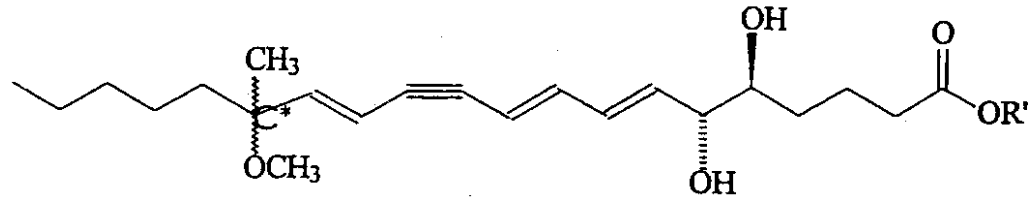
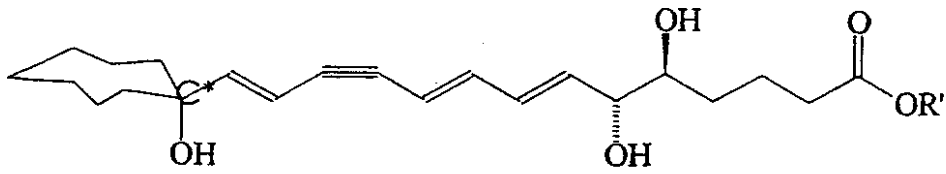
40



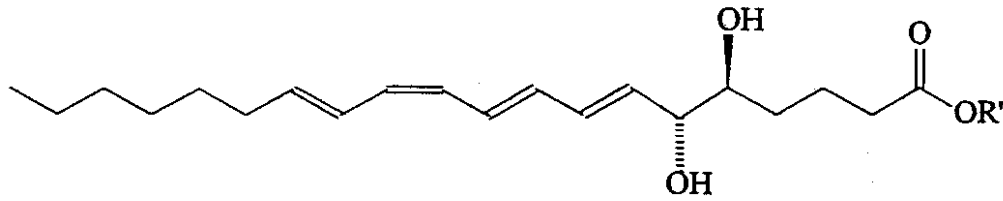
10

20

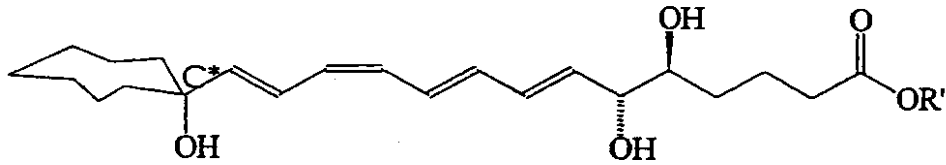
30



10



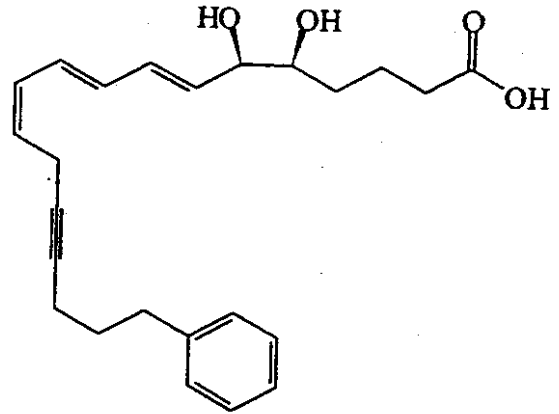
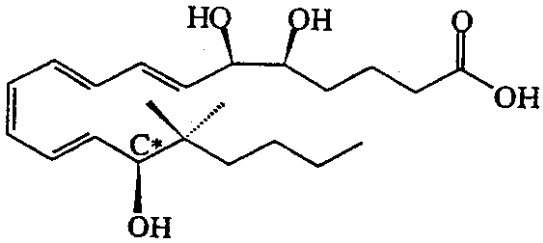
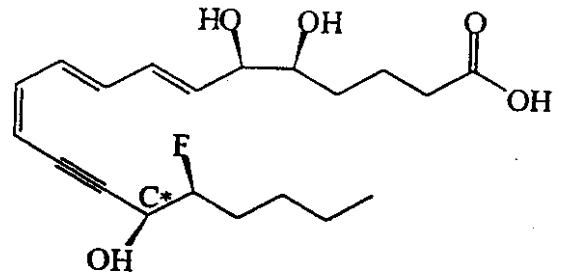
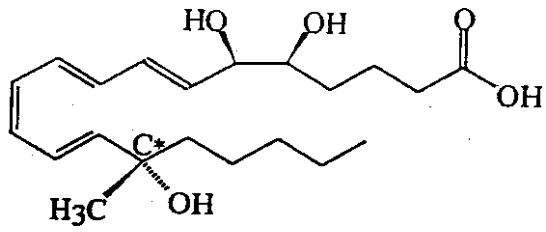
20



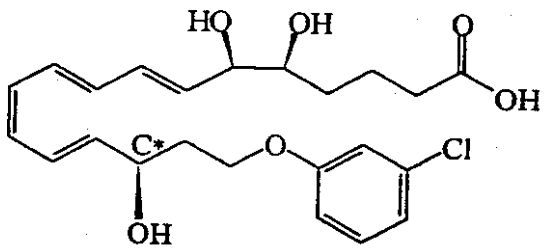
式中、R'は、H又はCH₃であり；

そして、式中、C*における置換基は、R配置である。

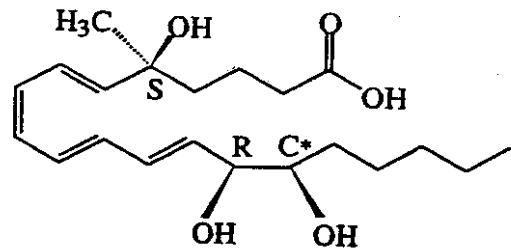
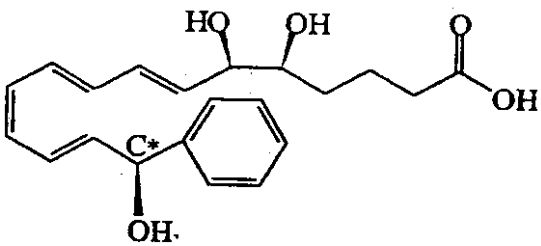
この発明の他の好適具体例において、この発明の化合物は、下記の構造式を有する：



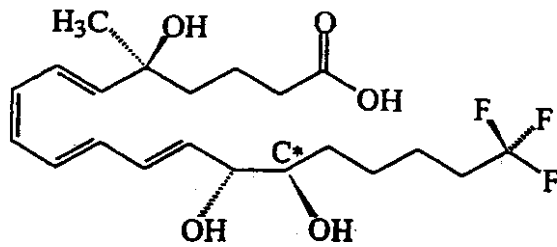
10



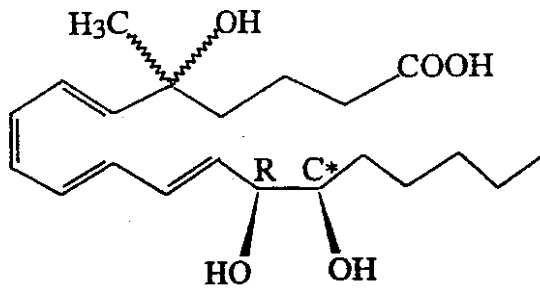
20



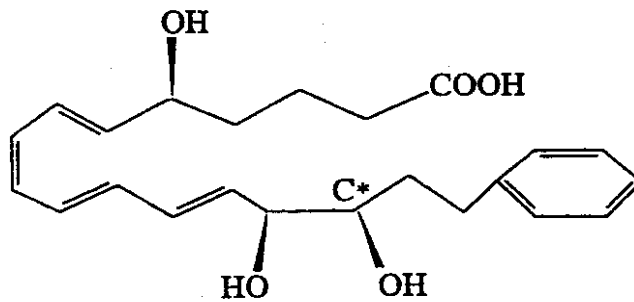
30



40



10



20

式中、C*における置換基は、R配置である。

リポキシン化合物の製造方法

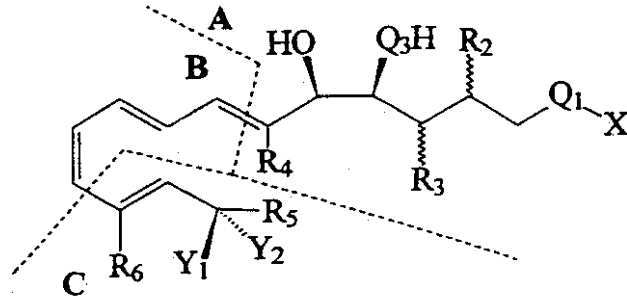
好適な化合物を、特に下記の実施例1に記載のようにして製造することができる。この発明の他の化合物を、標準的な化学の方法例えば選択的水素化、Pd(0)-Cu(I)カップリング、ウィッチヒ型カップリング、シャープレスエポキシ化及び主な中間体のカップリング後の不斉還元(以下に及び文献に記載)を用いてこの発明の安定なLXアナログを生成するリポキシン(LX)及びプロスタグランジンアナログ合成用の合わせたストラテジーによって製造することができる(Webber, S.E.等(1988) Adv. Exp. Med. Biol. 229:61; Raduchel, B. 及びVorbruggen, H. (1985) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 14:263; 及びNicolaou, K.C.等(1991) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:1100)。幾何学的変形物を、例えば米国特許第4,576,758号及びNicolaou, K.C.(1989) J. Org. Chem. 54:5527に記載されたように達成することができる。

30

下記のように、図式I中の垂属1を含むLXアナログ化合物を、3つの主要なフラグメント(A、B及びC)として製造し、次いで、それらを合わせて分子全体を形成することができる。

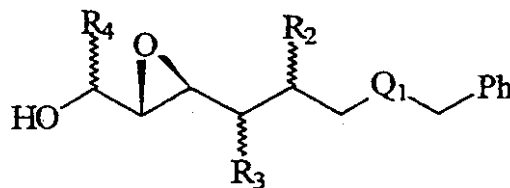
図式 I

1



10

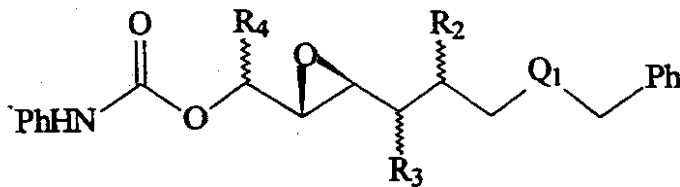
2



20

前駆体フラグメント 2 のためのエポキシアルコールの合成を、水素、フェニル、ハロゲン又はメチルから選択する置換基 R_2 、 R_3 及び R_4 を用いて生じることができる。これらの各エポキシアルコールの各々は、3 のようなフェニルウレタン誘導体に変換することができる。

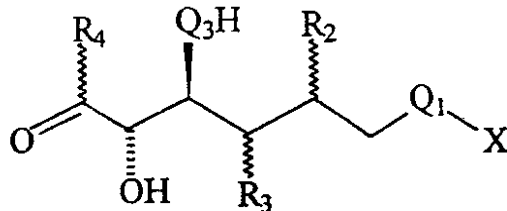
3



30

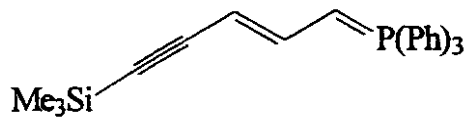
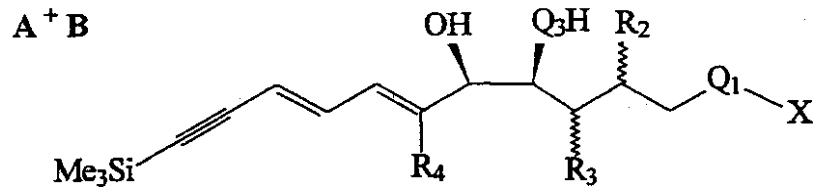
$PhNCO$ 、ピリミジン及び CH_2Cl_2 を使い、その後、 SN^2 オープニングによるルイス酸触媒を用いて、ビシナルジオールを、結合に必要な (R) 配置においては C - 6 に、やはり生物活性及び認識部位での結合のために確立された (S) 配置においては C - 5 に含む 1, 2 - サイクリックカーボネートを与える。これらのアルコールを、次に、4 のような前駆体 A フラグメントを生成するように保護する。

4



40

これらの A フラグメントを、今や、Webber, S.E. 等 (1988) Adv. Exp. Med. Biol. 229:61 におけるように、フラグメント B 中間体、ホスホニウムブロミド 5 と結合させて、グラム量で、結合された A + B フラグメント生成物 6 を生成することができる。

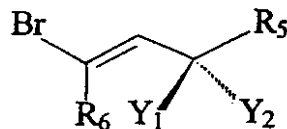
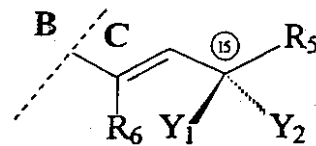
56

10

図式 I のフラグメント C 中間体を、A - B 結合物の調製と並行して生成する。これらの C フラグメントにおいて、 Y_1 及び / 又は Y_2 の置換基は、メチル、メトキシ、水素、シアノ、ニトロ又はハロゲンである（特定の実施例 3 を参照されたい）。こうして、15 - メチルを有すること及び / 又は例えば 16 - メチル若しくは 16 - フェノキシ誘導体は、これらの置換された $L X A_4$ アナログが脱水素化を受け易くなくする。

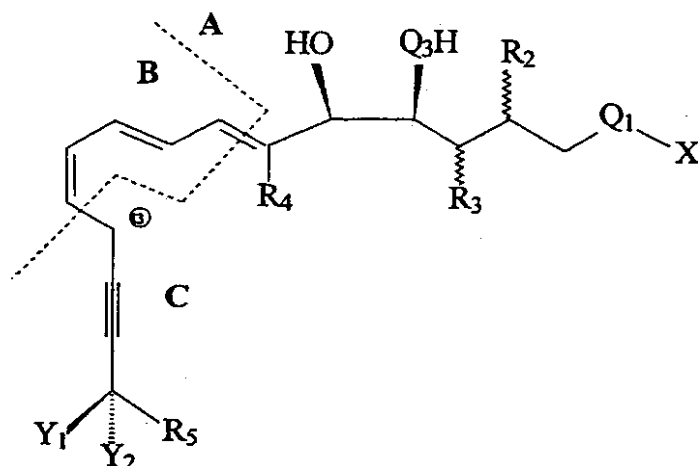
従って、酵素的酸化及び / 又は脱水素化に対する好適な抵抗性を有する C フラグメントは、キー部位の保護とその後の臭素化により変換されて、フラグメント C のビニルプロミド生成物例えば 6b を与えることができ、これは、触媒量の $P(Ph_3)_4$ 及び CuI を用いて 6 に結合されて属式 I の $L X A_4$ アナログの完全な主鎖構造を生成する。この図式を、

20

6b

30

図式 II



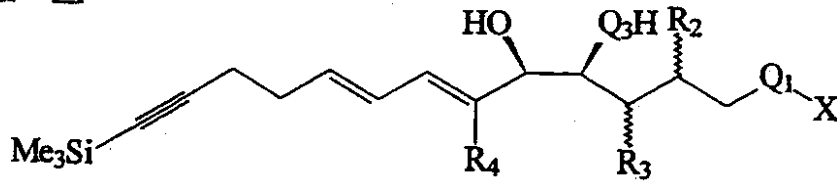
40

亜属式 II 及び III の範囲内のこの発明の化合物は、類似の方法で合成することができる。属 II 及び III の化合物は、先ず、フラグメント A の置換された化合物を個々に調製し、それらを、図式 I のように各々、個々に調製したフラグメント B に結合させて 7 即ち $A_1 + B_1$ フラグメント（示したように、 X 、 Q_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 に固有の置換を有する）を

50

生成することにより生成される。

7 A₁ + B₁



8



10

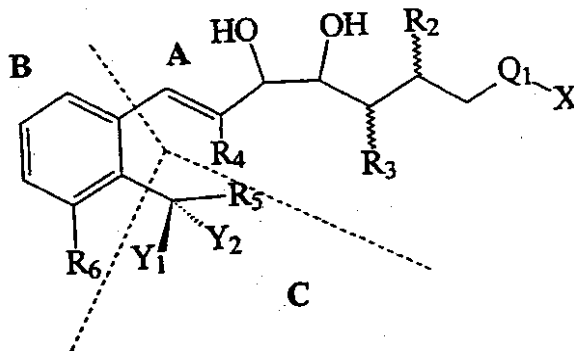
アセチレン性の基 C - 14, 15 及び - C - 20 末端置換を有する C₁ フラグメント 8 は、各々、構造 6 のプロスタグランジンアナログについて上記したように生成され、それらの対応するビニルプロミド生成物に変換されて (KCN JAC 1985, Webber) 個々の置換されたフラグメント C₁ 又は 8 種を生じ、これらは、触媒量の P (Ph₃)₄ 及び CuI を用いて 20 にカップリングして、アセチレン性の L X A₄ アナログクラスの結合された生成物を生成するのに適している。各々の最終生成物を、次いで、精製のために、迅速ダイオードアレイ検出を用いる勾配 RP - HPLC にかける (Enzymology 中の Serhan, C.N., Methods にあるように)。L X A₄ の C - 15 ~ C - 20 における修飾の存在は、立体障害を与えることによりデヒドロゲナーゼ及びオキシダーゼによる代謝を変えることができ、C - 15 ~ 末端置換を有する安定なプロスタグランジンアナログが製造されており、デヒドロゲナーゼによって代謝されない (Raduchel, B. 及び Vorbruggen, H. (1985) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 14:263 及び Vorbruggen, H. 等 (Chemistry, Biochemistry, and Pharmacological Activity of Prostanoids (Roberts, S.M., Scheinmann, F. 編) Oxford: Pergamon Press))。

20

属式 IV の範囲内のこの発明のシクロ L X A₄ 化合物は、下記の方法で作ることができる。

図式 III

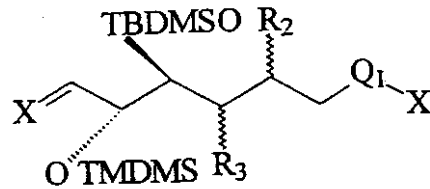
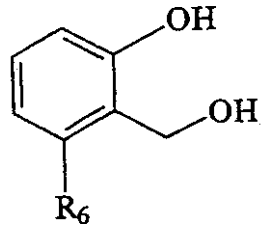
9



30

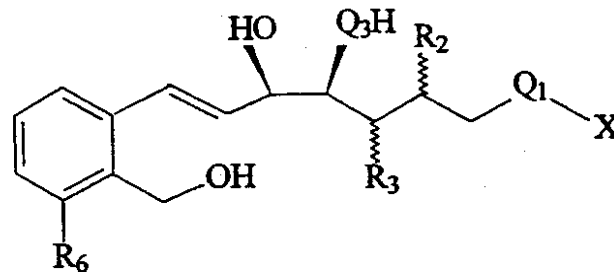
このクラスの親化合物も又、同様の全合成戦略にかけ、構造 30 中の 3 つの主要なフラグメント A、B 及び C を割り当てる。フラグメント A の前駆体を、Nicolaou, K.C. (1989) J. Org. Chem. 54:5527 において用いられた経路によって調製して、7 - シス, 11 - トランス - L X A₄ メチルエステルの合成において 10 を製造することができる。

40

1011

10

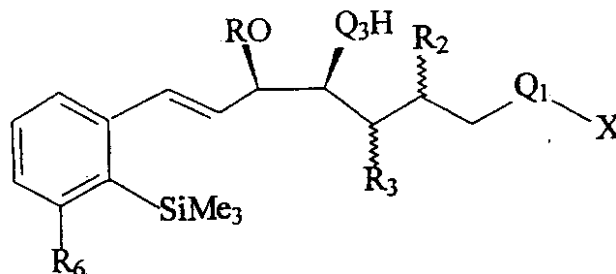
30中のフラグメントBは、前駆体 11 又はサリゲニン - ([O-ヒドロキシベンジルアルコール) を介して (Vorbruggen等, p.353) で生成されたようにして得られる。このベンジルアルコール 11 は、DMF中でNaHの存在下で 10 と (1:1で) 反応して 12 を与える。この鍵となる中間体を、BSTFA中でシリル化し、その後、C前駆体用にデザインした個々のフラグメントとカップリングさせる。

12

20

次いで、13 を、所定の個々のデザインのビニルプロミネートフラグメントCに、プロマイト前駆体を4.0当量のAgNO₃で処理し、次いで、7.0当量のKCN、EtOH/THF/H₂O (1:1:1) で処理する (0.25、2~4時間) ことにより結合させることができる。次いで、個々の生成物を、2~3時間CH₂Cl₂中での選択的触媒による穏やかな水素化のためにリンドラー触媒にかけて、属IVに属する個々の化合物を与える。各々をLiOH/THF中で鹸化して、RP-HPLCによる分離後に対応する遊離酸を与えることができる。

30

13

40

これらの属IVの化合物の発明を、以下の、15(±)メチル-シクロ-LXA₄メチルエステル及び対応する遊離酸の合成で、更に説明する。

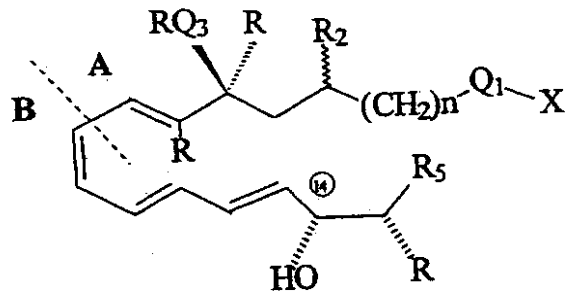
属式Vの範囲内のこの発明の化合物は、下記の方法で作ることができる。LXB₄を用いて研究された幾つかの系は、天然の化合物中の幾つかの部位が生物活性に必要であることを示している (Serhan, C.N. (1991) J. Bioenerg. and Biomembr. 23:105)。これらの部位は、C-14アルコールを(R)配置で含み、C-8, 9位にテトラエンの二重結合をS配置で含む。更に、本発明を生じた代謝研究に基づいて、幾つかの鍵となる付加部位が、LXB₄の生物活性を保護するのに必要であるとして同定されている。これらは、C-

50

15 アルコールをデヒドロゲナーゼ活性から保護すること（即ち、5-オキソ-LXB₄形成をブロックすること）； 8結合及び14(R)アルコールの両方を維持すること；及び 6-7二重結合の還元及び生じた化合物の / 酸化の阻止を含んでいる。

図式IV

14

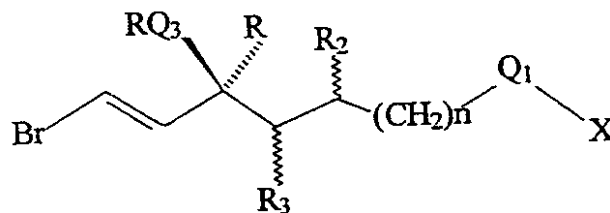


10

こうして、属V(14)は、生物活性に必要なLXB₄の領域を保持するが、代謝分解に利用し得る領域が修飾されている。再び、レトロ合成分析は、14でデザインされた3つのキーフラグメントA、B及びCに対する優先性を与える。キー中間体のLXB₄アナログクラスのメンバーを生成するカップリングは、LXA₄及びそのアナログについて概説した標準的技術即ち選択的水素化(8-シズジオメトリーを生成する)；ユニークな置換を有するA及びBフラグメントを結合するためのPd(0)-Cn(I)カップリング；必要な置換を有するCフラグメントを結合するためのウィッチヒ型カップリング及び14(R)ビシナルアルコールを生成するためのシャープレスエポキシ化を用いる(参考文献Nicolaou,K.C.等(1991)Angew.Chem.Int.Ed.Engl.30:1100),参考文献Weber,S.E.等(1988)Adv.Exp.Med.Biol.229:61 Ed.Wong,P.K.及びSerhan,C.N.並びにこれらにおいて引用されたものを参照されたい)。こうして、LXA₄アナログ及び天然のLXB₄の構造に対する類似のストラテジーを用いることにより、特定のアナログを得ることができる。

20

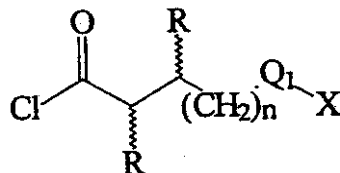
15



30

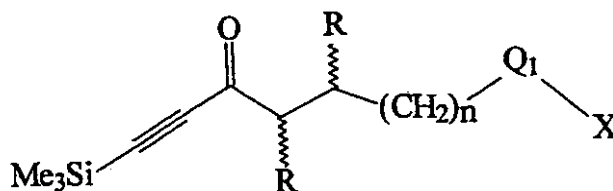
H、CH₃、OCH₃、フェニル、ハロ置換されたフェニルであってよいR₂、R₆、R₇に置換を有する15のAフラグメントを、標準的方法により、例えば16(式中、増大する鎖長の=C H₂)から生成する。

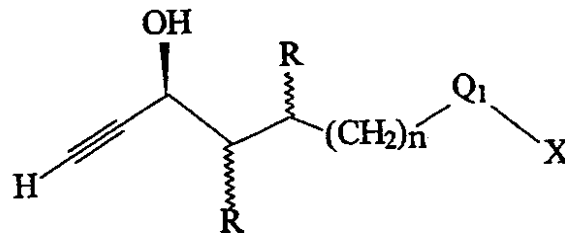
16



40

17

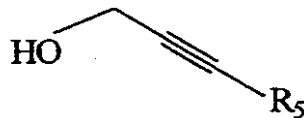
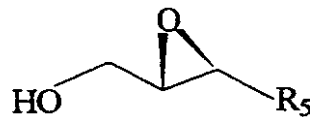


18

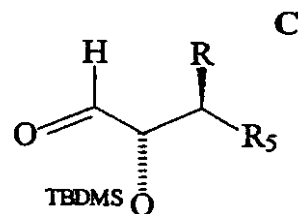
化合物 16 を、(Nicolaou, K.C. 等 (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1100-16) におけるようにしてトリメチルシリルアセチレン性中間体 17 を介して、ビニルプロミド 15 に変換する (17 をピナニル - 9 B B N により、次いで $n\text{-BuN}_4\text{NF}$ により THF 中で還元して 18 を生じ、これを、必須部分例えばアルコールを保護した後に臭素化にかけて 15 (フラグメント A) を与える)。

10

14 中のフラグメント C は、示したように R_5 置換を有する化合物 19 から生成する。

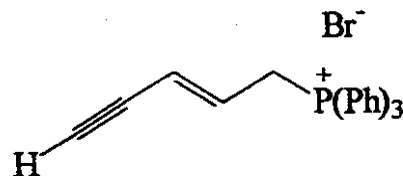
1920

20

21

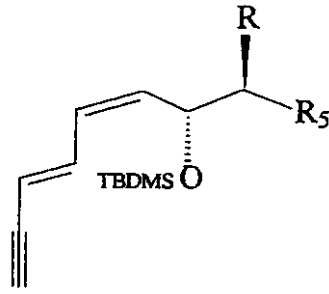
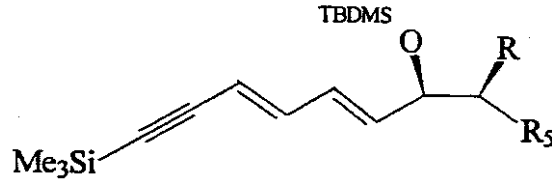
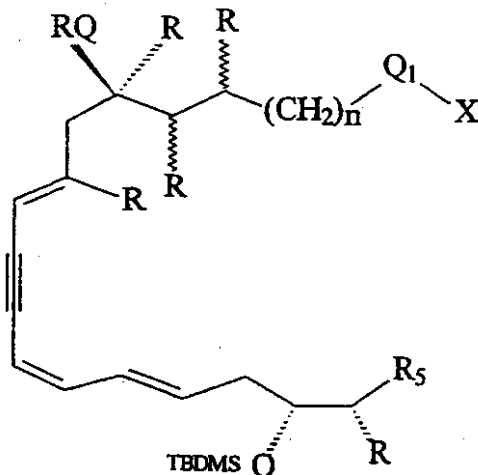
30

アセチレン性のアルコール 19 を、次いで、LAH 中で還元し、その後シャープレス不斉エポキシ化にかけて 20 を生成し、これを、RP-HPLC により単離して、(+) 異性体を生じ、これを用いて必要な $LX B_4$ アナログの C-14 アルコールを (R) 配置で生成し、化合物 20 を、 R_4 及び R_5 の置換基並びにアルコールの塩化メチレン中での PCC を用いる保護の後に対応するアルデヒド 21 に変換する。(Nicolaou, K.C. 等 (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:1100)

22

40

ホスホニウム塩 22 を、参考文献 (Weber, S.E. 等 (1988) *Adv. Exp. Med. Biol.* 229:61, Ed. Wong, P.K. 及び Serhan, C.N.) におけるようにして調製することができ、ここで用いて、 R_4 及び R_5 が置換を有するデザインされた置換を 23 の基に有する 23 を与えるウィッチヒ型カップリングにより、B-C フラグメントカップリングを生じることができる。この 23 のシスの二重結合は、 I_2 を 14 の親前駆体型を与える触媒として用いて異性化して、24 のようなトランス異性体を与えることができる。

232425

次いで、24の15へのカップリングを、Pd(0) - Cu(I)カップリングにより行って、14のアセチレン性前駆体(25で示す)を与える。選択的リンドラー触媒水素化の後に、個々のLXB₄アナログを、テトラエン骨格を個々の生成物を単離する簡便な方法として用いたRP - HPLCにより、迅速ジオールアレイ検出を用いて、更に精製することができる(Serhan, C.N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167)。

有用性

この発明の化合物は、天然のLXの生物学的活性を有するが、分解に一層抵抗性であり、或いは天然のLXの分解を阻止する。それ故、これらの開示した化合物は、患者における不十分な又は不適当なLX媒介の細胞応答と関連する多くの病気を治療し又は予防するための医薬としての有用性を有している。

開示した15 - エピ - リポキシン化合物の抗増殖効果に基づいて、この発明は、細胞を有効量の実質的に精製された15 - エピ - LX化合物と製薬上許容し得るキャリアーを含む製薬組成物と接触させることにより、望ましくない細胞増殖を改善する方法を提供する。この細胞は、イン・ピボ及び/又はイン・ビトロで接触させることができる。或いは、細胞を、患者から取り出し；本発明の実質的に精製された15 - エピ - リポキシン化合物とエキソ・ピボで接触させ、そして患者に移植することができる。この発明は又、患者における細胞増殖性疾患を改善する方法であって、有効量の実質的に精製された15 - エピ - LX化合物を投与することを含む方法をも提供する。

有効量は、通常、標的細胞集団に対する十分な曝露を確実にするのに必要な量である。かかる量は、通常、15 - エピ - LX化合物の性質、投与の様式、望ましくない細胞増殖又

10

20

30

40

50

は細胞増殖性疾患の重さ及び投薬養生法を決める際に当業者によって考慮される他の因子に依存する。

接触されるべき標的細胞は、癌様及び/又は腫瘍性の成長をするものであってよい。或いは、標的細胞は、再狭窄等の刺激に应答して異常細胞増殖をするものであってよく；及び/又は標的細胞は、元の細胞の遺伝的性質から変化させられた遺伝的性質を有する形質転換された細胞よりなるものであってよい。

好適な標的細胞には、上皮細胞、白血球、内皮細胞及び/又は繊維芽細胞が含まれる。

LXの選択細胞に対する刺激作用に基づいて、この発明は又、骨髄抑制性疾患を有する患者を、その患者に有効量のLXアナログを含む製薬組成物を投与することにより治療する方法をも提供する。この有効量は、通常、標的細胞集団に対する十分な曝露を確実にする

10

のに必要な量である。かかる量は、通常、アナログの性質、投与の様式、骨髄抑制の重さ及び投薬養生法を決める際に当業者によって考慮される他の因子に依存する。細胞増殖性のLXアナログの治療用途も又、細胞を患者から取り出し、細胞成長をイン・ピトロで刺激し、そしてその促進された細胞標品を全部又は部分的に患者に戻すことを含む。刺激中に又は細胞標品の導入と共に、追加の治療剤（例えばサイトカイン例えばGM-CSF）を、適宜、LXと共に用いることができる。

他の具体例においては、この発明の化合物を用いて、炎症又は炎症性応答を治療し又は予防する。LXA₄は、炎症のメディエーターである白血球の活性化を阻止する。LXA₄誘導される効果には、白血球の遊走の阻止、反応性酸素種の生成及び組織膨潤に関するプロ炎症性メディエーターの形成が含まれる。（Raud,J.等（1991）Adv.Exp.Med.Biol.314:185.Cell-Cell Interactions in the Release of Inflammation Mediators vol.314）LXB₄は、マウス造血幹細胞を用いるイン・ピボアッセイで、下痢及び失調を防ぐ等の放射線防護作用を示す（Walken,T.L.Jr.,（1988）J.Radiat.Res.29:255）。

20

白血球媒介の炎症又は炎症性応答は、種々の形態の喘息及び関節炎を含む多様な病気を引き起こし又はそれらに寄与する。物理的外傷、放射線への曝露その他の物理的創傷に対する炎症性応答は、本発明の内に含まれる。

他の具体例においては、この発明の化合物を用いて、ロイコトリエンの作用を打ち消すことによって炎症を治療し又は予防する。LXA₄は、LTB₄誘導される炎症を阻止して、血漿の漏出及び白血球の遊走の両方を、ハムスターのほお袋でのイン・ピボアッセイにおいてブロックする。（Hedqvist,P.等（1989）Acta Physiol.Scand.137:571）血漿の漏出及び白血球の遊走は、傷の治癒と炎症の両方において鍵となる事象である。LXA₄は又、LTD₄誘導される腎臓の血流力学的作用を打ち消し、部分的に腎臓における血流力学の調節の原因であるメサンギウム細胞へのLTD₄の結合をブロックする。（Badr,K.F.等（1989）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:438）

30

この発明の化合物を投与して、スルフィドペプチドロイコトリエン例えばLTD₄、LTC₄及びLTB₄の作用を打ち消すことができる。ロイコトリエン媒介の血管収縮応答は、喘息、アナフィラキシー反応、アレルギー反応、ショック、炎症、リウマチ関節炎、痛風、乾癬、アレルギー性鼻炎、成人呼吸障害症候群、クローン病、エンドトキシンショック、外傷性ショック、出血性ショック、腸虚血性ショック、腎糸球体疾患、良性前立腺肥大、炎症性腸疾患、心筋虚血、心筋梗塞、循環系ショック、脳傷害、全身性エリテマトーデ

40

他の具体例においては、この発明の化合物を用いて、血管収縮応答又は症状を治療し又は予防する。LXは、内皮依存性血管拡張（LXA₄）（Lefer,A.M.等（1988）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:8340）及び脳小動脈拡張を新生ブタにおいてイン・ピボで誘導する（LXA₄及びLXB₄）（Busija,D.W.等（1989）Am.J.Physiol.256:468）。更に、LXA₄は、迅速な小動脈拡張を、ハムスターのほお袋においてイン・ピボで誘導し（Dahlen,S.-E.等（1987）Acta Physiol.Scand.130:643）、ラットの腎臓血流力学において誘導する（Badr,K.F.等（1987）Biochem.Biophys.Res.Commun.145:408）。

血管収縮性応答及び症状は、腎臓の血流力学的病気（糸球体の病気を含む）、心血管疾患（高血圧症、心筋梗塞、心筋虚血及び血管の病気を含む）、及び胃腸病等の病気及び症状

50

を引き起こし、これらに寄与し又は関係する。

対応する天然のLXよりも長い組織半減期を有するものを同定するために、LXアナログ又は他の化合物をスクリーニングする方法も又、この発明に包含される。この方法を用いて、化合物が天然のLXと比較して代謝を阻止し、これに抵抗し又はそれを一層ゆっくりと受けるかどうかを決定することができる。この方法は、LXを代謝する少なくとも1種類の酵素を用意し、化合物をその酵素標品と接触させて、この化合物が酵素による代謝を阻止し、それに抵抗し又はそれを一層ゆっくりと受けるかどうか測定することによって行われる。LX認識部位を有する細胞例えば多形核好中球、末梢血液単球、及び分化したHL-60細胞は、酵素標品の適当な源中にある。LX認識部位は、自然に存在し得るし、又は人為的に誘導することができる(病状により又は怪我により)。人為的に誘導したLXA₄認識部位の非制限的例は、分化したHL-60細胞におけるかかる部位の誘導である。

10

一具体例において、酵素の調製は、細胞を採取すること及び凍結融解による溶解を3回繰り返した後に超遠心分離して100,000gの上清を産出することを含んだ。無細胞の100,000gのペレットも又、用いることができる。更に、酵素標品は、天然のLXの代謝に関与しないが、自然にLXを代謝する酵素によって行われる変換に類似の又は等しいLXに対する変換を行う任意の酵素を含んでよい。適当な酵素の非制限的例は、15-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼ、チトクロームP-450モノゲナーゼ(ヒトの白血球並びにラット及びヒトの肝ミクロソーム由来)である。

LX代謝産物の特性決定は、標準的技術例えば抽出、クロマトグラフィー及び定量的HPLCとその後のトリメチルシリル誘導体化、O-メトキシム誘導体化及びガスクロマトグラフィー/質量スペクトル分析を含んだ。この具体例の実験の詳細は、下記の実施例1に記載する。

20

LXアナログは又、LXレセプター認識部位との結合活性について、例えばこの化合物をレセプター認識部位と接触させ、その化合物が結合するか及びどの程度結合するかを測定することによりスクリーニングすることもできる。動力学的結合アッセイの例には、相同的置換、競争的結合、等温線及び平衡結合アッセイが含まれる。

レセプター認識部位は、常態で存在し得又はそれは、病状により、怪我により又は人為的手段によって誘導され得る。例えば、レチノイン酸、PMA又はDMSOを用いてHL-60細胞に分化を誘導することができる。分化したHL-60細胞は、LXA₄特異的レセプター認識部位を発現する。LX特異性についてスクリーニングすることのできる他の細胞の例には、PMN、上皮細胞及び末梢血液単球が含まれる。

30

競争するリガンドの選択は、認識部位の性質、天然基質の構造、当分野で公知の天然の基質の構造的又は機能的アナログ、及びかかる決定をする際に当業者によって考慮される他の因子に依存する。かかるリガンドは又、公知のレセプターのアンタゴニストをも包含する。この発明の化合物は、放射化学又は合成化学の分野で公知の標準的技術によって、²H、³H、¹³C及び¹⁴Cを含むアイソトープで放射性標識することができる。

この方法の一具体例において、誘導されたLXA₄認識部位の構造的異性を、LXB₄、LTC₄、LTB₄及びトリヒドロキシヘプタン酸メチルエステルを用いて評価した。この具体例の実験の詳細は、下記の実施例2に記載してある。

40

更に、この発明の化合物を用いて、炎症又は傷害の発生モデルとして、特定の細胞型に対してある作用を発揮することができる。例えば、LXA₄は、細胞内のCa²⁺の流動化、脂質の再建及びヒトのPMNにおける凝集を伴わない走化性を刺激する(Palmlad, J.等Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987) 145:168; Lee, T.H.等Clin. Sci. (1989) 77:195; Nigam, S.等J. Cell. Physiol. (1990) 143:512; Lusinskas, F.W.等(1990) Biochem. Pharmacol. 39:355)。LXA₄は又、LTB₄とFMLP誘導された応答例えばIP₃生成の両者をもブロックする。LXB₄は又、脂質の再建をも刺激する。LXA₄は、単離されたPKCを活性化し又、脳脊髄中に見出されるPKCの - 亜種に特異的である。(Hansson, A.等Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986) 134:1215; Shearman, M.S.等FEBS Lett. (1989) 245:167); 刊行物Nicolau, K.C.等Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1991) 30:1100及びそこにおい

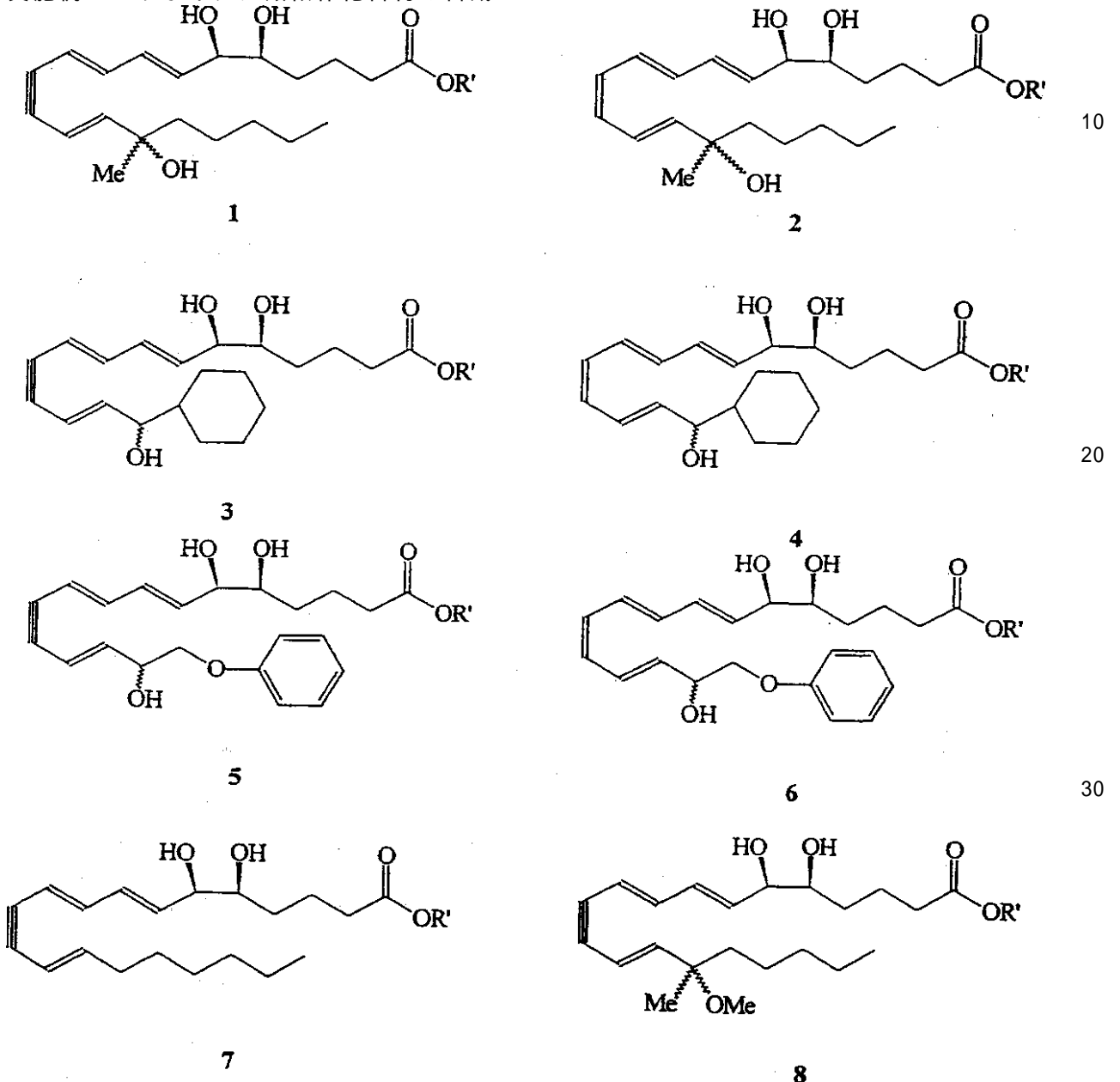
50

て引用された参考文献を明白に参考として本明細書中に援用する。

本発明を、更に、下記の実施例によって説明するが、これらを、更に制限するものと解すべきでない。背景を含むこの出願のすべての部分で引用されたすべての参考文献及び発行された特許の内容を、明白に参考として本明細書中に援用する。

実施例

実施例 1：リポキシン類似体化合物の合成



化合物 1 のメチルエステル前駆体の製造：

ベンゼン (1.5ml) への 3 - メチル - 3 - トリメチルシロキシ - 1 - プロモ - 1 - オクテン (130mg、0.44ミリモル) の溶液に、n - プロピルアミン (0.05ml、0.61ミリモル) および Pd (PPh₃)₄ (20mg、0.02ミリモル) を加え、溶液を光から防護した。ついで、凍結融解法によって脱気し、室温で45分間攪拌した。(7E, 9E, 5S, 6R)メチル 5, 6 - ジ (tert - ブチルジメチルシロキシ) ドデカ - 7, 9 - ジエン - 11 - イノアト (183mg、0.44ミリモル) (化合物 1 2) およびヨウ化銅 (14mg、0.07ミリモル) を加え、溶液を凍結融解法によってもう一度脱気した。混合物を室温で3時間攪拌し、NH₄Cl の飽和水溶液で失活させ、エーテルで抽出した。次いで、食塩水で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥し、溶媒を蒸発させた。フラッシュカラムクロマトグラフィー (シリカ、3% エーテルヘキサン) により、純粋な化合物を無色の液体として得た (171mg、収率57%)

。 T H F (0.5ml) へのこの化合物 (171mg、 0.25ミリモル) の溶液に、 n - B u N 4 F (0.9 ml、 0.90ミリモル) を加え、混合物を室温で攪拌した。反応を 2 時間で完了させ、その時点で水に注ぎ込み、エーテルで抽出した。エーテル抽出物を食塩水で洗浄し、 N a 2 S O 4 上で乾燥し、溶媒を蒸発させた。フラッシュカラムクロマトグラフィー (シリカ、 4 % M e O H / C H 2 C l 2) により、対応するラク톤のうちいくらかとともに、メチルエステル (24mg) を得た。 H P L C 保持時間 : 9.39分 (ミクロソルブ逆相、 4.6mm x 25cm、 C - 18カラム、 M e O H / H 2 O = 70 : 30、流量 = 1ml / 分、 U V 検出器 = 300nmにて)。 M e O H 中での U V : max283、 294、 311nm。 1 H - N M R (500MHz、 C D C l 3) : 6.53 (dd、 15.2、 10.9Hz、 1H)、 6.32 (dd、 J=15.1、 11.0Hz、 1H)、 6.17 (d、 J=15.9Hz、 1H)、 5.83 (dd、 J=17.5、 2.1Hz、 1H)、 5.80 (dd、 J=15.2、 6.7Hz、 1H)、 5.72 (dd、 J=17.0、 2.1Hz、 1H)、 4.14 (m、 1H)、 3.68-3.64 (m、 4H)、 2.35-2.31 (m、 2H)、 1.51-1.48 (m、 1H)、 1.43-1.42 (m、 2H)、 1.30-1.23 (m、 15H)、 0.85 (t、 3H)、 13 C - N M R (126MHz、 C D C l 3) : 150.01、 140.08、 132.95、 132.26、 112.43、 107.50、 75.23、 73.76、 42.49、 33.67、 32.17、 31.36、 27.96、 23.56、 22.58、 21.03、 14.03。

10

化合物 2 のメチルエステル前駆体の製造 :

化合物 1 のメチルエステル前駆体 (C H 2 C l 2 (1 ml) 中に 3 mg) の溶液をリンドラー触媒 (1 mg) と混合し、水素雰囲気下に置いた。混合物を暗かにて室温で攪拌し、その後、約 80% の転換まで H P L C に付した (1 時間)。シーライト越しの濾過、溶媒の蒸発、および H P L C による分離によって、純粋なメチルエステルを得た。

20

H P L C 保持時間 : 10.02分 (ミクロソルブ逆相、 10mm x 25cm、 C - 18カラム、 M e O H / H 2 O = 70 : 30、流量 = 4 ml / 分、 U V 検出器 = 300nmにて)。 M e O H 中での U V : max287、 301、 315nm。

化合物 3 のメチルエステル前駆体の製造 :

この化合物は、 (3 - シクロヘキシル - 3 - トリメチルシロキシ - 1 - プロモ - 1 - オクテンからの) 化合物 1 のメチルエステル前駆体の製造と同様にして製造した。この化合物の脱シリル化も、同様の方式で実施して、メチルエステルを得た。

H P L C 保持時間 : 8.02分 (ミクロソルブ逆相、 4.6mm x 25cm、 C - 18カラム、 M e O H / H 2 O = 70 : 30、流量 = 1 ml / 分、 U V 検出器 = 300nmにて)。 M e O H 中での U V : max282、 293、 311nm。 1 H - N M R (360MHz、 C D C l 3) : 6.56 (dd、 15.4、 10.9Hz、 1H)、 6.33 (dd、 J=15.2、 10.9Hz、 1H)、 6.13 (dd、 J=15.8、 6.5Hz、 1H)、 5.81 (dd、 J=15.2、 6.4Hz、 1H)、 5.80 (d、 J=15.6Hz、 1H)、 5.73 (dd、 J=15.4、 2.1Hz、 1H)、 4.15 (br、 1H)、 3.93-3.90 (m、 1H)、 3.67 (br、 1H)、 3.65 (s、 3H)、 2.34 (t、 2H)、 1.82-1.65 (m、 10H)、 1.46-1.38 (m、 3H)、 1.26-1.01 (m、 5H)。

30

化合物 4 のメチルエステル前駆体の製造 :

化合物 3 のメチルエステル前駆体の選択的水素化、その後の H P L C 精製によって、化合物 4 のメチルエステル前駆体を得た。

H P L C 保持時間 ; 9.72分 (ミクロソルブ逆相、 10mm x 25cm、 C - 18カラム、 M e O H / H 2 O = 70 : 30、流量 = 4 ml / 分、 U V 検出器 = 300nmにて)。 M e O H 中での U V : max288、 301、 315nm。 1 H - N M R (250MHz、 C 6 D 6) : 6.66-6.89 (m、 2H)、 5.95-6.24 (m、 4H)、 5.55-5.66 (m、 2H)、 3.82 (m、 1H)、 3.73 (m、 1H)、 3.41 (m、 1H)、 3.31 (s、 3H、 O C H 3)、 2.08 (t、 2H、 C H 2 C O O)、 1.00-1.81 (m、 18H)。

40

このメチルエステルは、標準的手法を用いて、対応するアルコールに転換することができる。

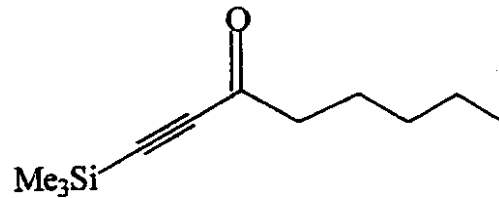
15 (R) - 15 - メチル - L X A 4 および 15 (±) メチル - L X A 4 の合成

Webber, S.E. et al. (1988) Adv. Exp. Med. Biol. 229:61 ; Nicolaou, K.C. et al. (1991) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:1100 ; および Vorbruggen, H. et al. : "Chemistry, Biochemistry, and Pharmacological Activity of Prostanoids" (Roberts, S.M., Scheinmann, F. eds.) Oxford, Pergamon Press のとおり、塩化ヘキサノイルによるビス (トリメチルシリル) アセチレンのフリーデル - クラフツのアシル化を用いて、アセチレン性ケトン a 約 1 g を製造

50

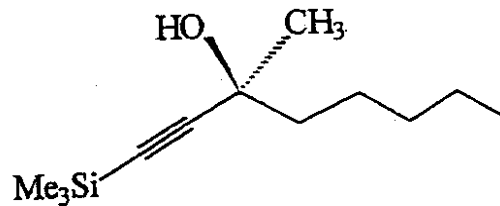
し、(-)-ピナイル-9-BBNを用いて還元して、CH₃N₂中の(S)アルコールを得て、C-15でのメチルを生成する。

a



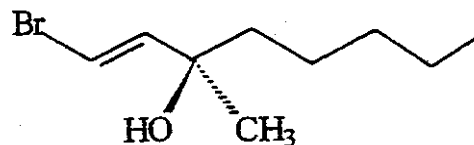
これに代えて、Vorbruggen, H. et al.: "Chemistry, Biochemistry, and Pharmacological Activity of Prostanoids" (Roberts, S.M., Scheinmann, F. eds.) Oxford, Pergamon Pressの
 10
 とおり、CH₃MgBrでケト基を処理して(60-70)、2,6-ルチジン(5.2ml)およびtert-ブチルジメチルシリルトリフラート(6.9ml)を順に加えて、0の乾燥CH₂Cl₂(~20ml)中でbの15(±)メチル(2~5g)を得ることができる。この反応を1時間混合し、次いで、水性抽出のためにエーテル100mlで希釈し、MgSO₄で乾燥する

b

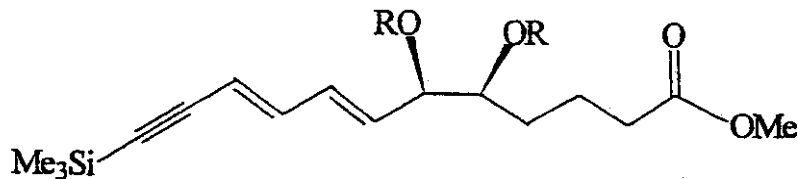


次いで、生成物cをdと結合するが、

c

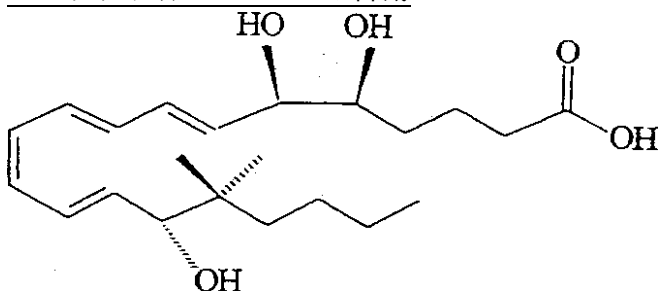


d



これは、Nicolaou, K.C. et al. (1991) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:1100; Nicolaou, K.C. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:5527およびWebber, S.B. et al. (1988) Adv. Exp. Med. Biol. 229:61のとおり生成する。図式IのフラグメントAからの構造dを、EtOH:THF:H₂O(1:1:1)を含有する4.0当量のAgNO₃、次いで7.0当量のKCNに0~25
 30
 で2時間懸濁させて、C-メチルエステルで保護された15-メチル-LXA₄類似体を生成し、これを濃縮し、THF中、4でLiOH(2滴、0.1M)で12~24時間けん化して、対応する遊離酸を得る。

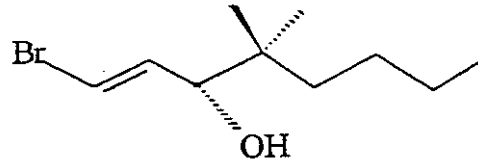
16-ジメチル-LXA₄の合成



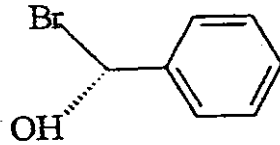
この化合物は、類似の戦略を用い、上記のdを上記を参照してeと結合するか、fと結合して15-フェニル-LXA₄類似体を生成するか、またはgと結合して17-m-クロロフ
 50

エノキシ-LXA4類似体を生成することによって生成する。

e

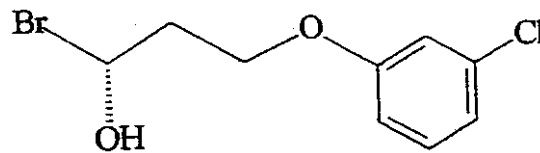


f



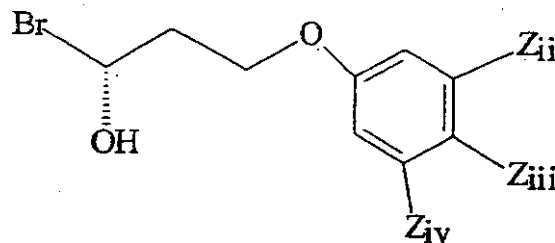
10

g



20

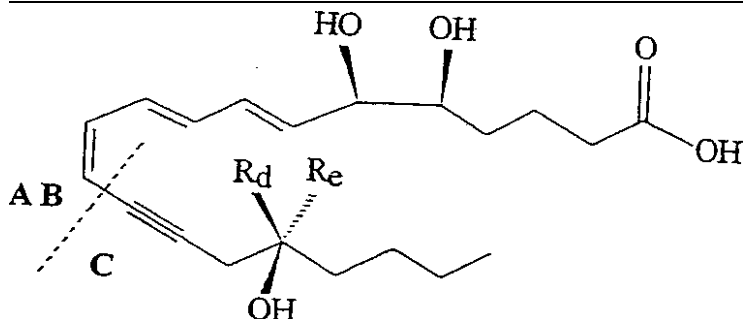
h



図式 I の適切な C フラグメント (すなわち e、f、g、h) は、それぞれ、対応する公知プロスタグランジン類似体について Raduchel, B および Vorbruggen, H. (1985) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 14:263 に総説されたとおりに製造する。h では、R = H ; C 1、メトキシまたはハロゲンである。

30

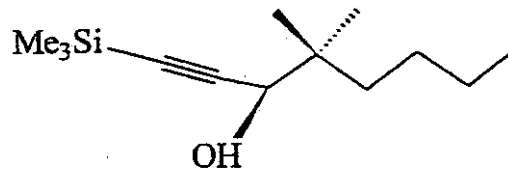
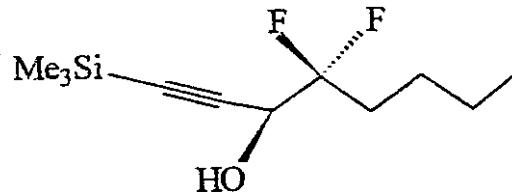
13, 14 - アセチレン性 LXA4 および 含ハロゲン類似体の合成



40

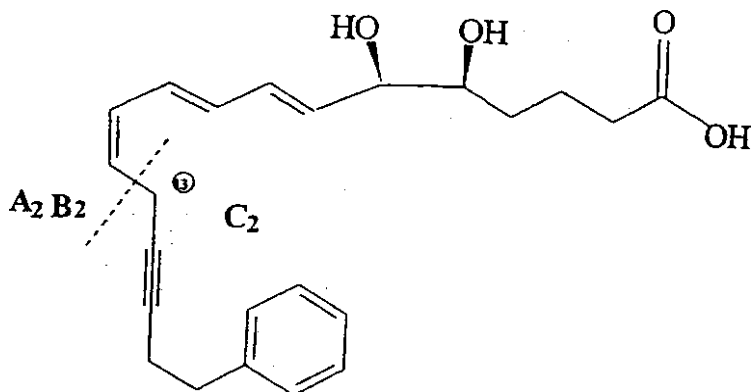
図式 II のフラグメントから生成された A2B2 を用いて、対応する C2 フラグメントを結合のために製造する。

構造 j および k を、Nicolaou, K.C. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:5527 のとおりに生成し、Raduchel, B および Vorbruggen, H. (1985) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 14:263 のとおりにメチル化し、7 と結合して、これらの LX 類似体を得る。これらの材料を、RP-HPLC に付して、上記を参照して精製してよい。

ik

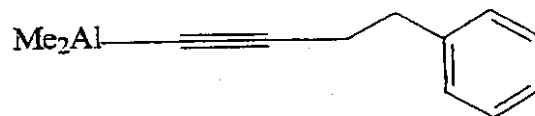
10

14, 15 - アセチレン性 L X A 4 の合成

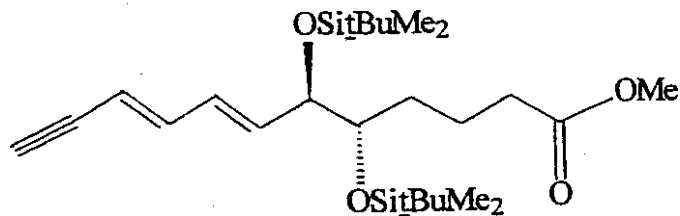


20

設計された結合した A2B2 フラグメントは、経路 II に示したフラグメント A1 および B1 の結合から製造して、7 または 4 の構造を上記のとおり実施して、フラグメント C2 に結合することができる。C2 フラグメントの 1 の前駆体は、プロスタグランジン類似体についての Raduchel, B および Vorbruggen, H. (1985) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res. 14:263 のとおりに製造することができる。

l

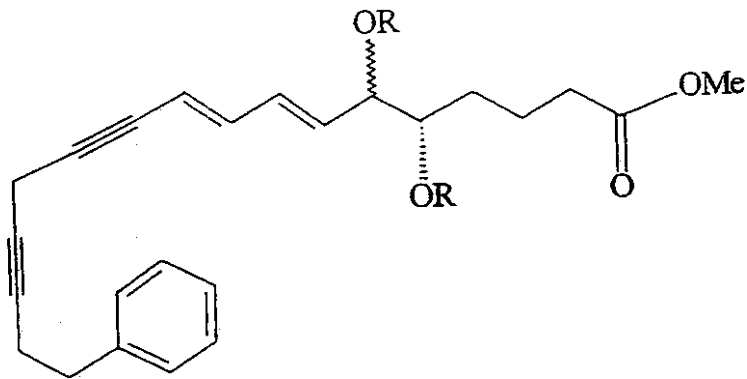
30

m

40

前記 [Nicolaou, K.C. et al (1989) J. Org. Chem. 54:5527] で製造した前駆体 m を、Me2Al を有する l とともにベンゼン中で、1.2 ~ 0.05 当量の Pd (PPh3)4、0.16 当量の CuI、n-PrNH2 に室温で 2 ~ 3 時間加えて、n を得る。

n

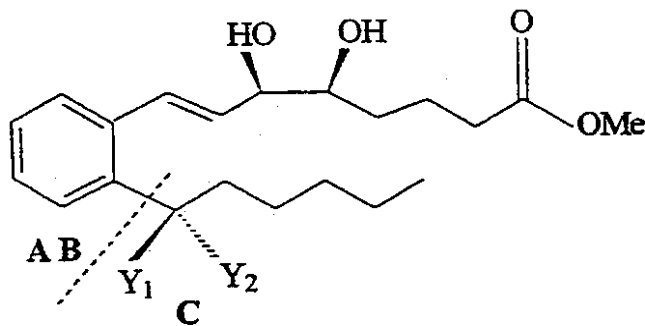


10

アルコール保護基 T B D M S = R を、10当量の H F - p y r、T H F、0 ~ 25 (4 時間) で除去した後、3.0当量の E t 3 N、M e O H、25 に15分間接触させて、L X 類の C - 1 カルボキシルと C - 5 アルコールとの間に通常は形成される、酸で誘導された ラクトンを開環する [Serhan, C. N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167 および Nicolaou, K. C. et al. (1989) J. Org. Chem. 54:5527]。5 重量% のリンドラー触媒による穏やかな処理の後、抽出された材料は、T H F 中での L i O H によるけん化に付して、標的分子の遊離酸を生成してよく、これを、Serhan, C. N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167 のとおりに、R P - H P L C 勾配移動相によって、更に精製に付すことができる。

15 (±) メチル - シクロ - L X A 4 の合成

o



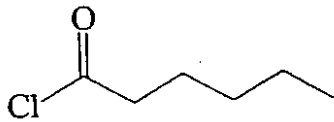
20

S i M e 3 誘導体としての化合物 o は、アルゴンに富ませた雰囲気下の 100ml 入り丸底フラスコに、脱気したベンゼン (20ml) に溶かして入れることができる (~ 1 ml)。これに、3.0 当量の臭化ビニルフラグメントを下記を参照して加える。このカップリング反応は、触媒量の P d (P P h 3) 4 および C u I 中で実施し、高速走査ダイオードで U V の多さによって追跡する、R P - H P L C にこの懸濁液のアリコートを注入することによって追跡できる。進行線は、23 で 1 ~ 3 時間進行し、その後、材料を酢酸エチル : H 2 O = 4 : 1 v/v で抽出し、ロータリーエバポレーターによる蒸発によって濃縮する。メチルエステルは、L i O H / T H F 中でけん化して、定量的収量の遊離カルボン酸を得ることができる。その他の誘導体は、上記のとおり、例えばジメチルその他の誘導体を与えるよう置換しておいた、フラグメント B の異なる部分とともにフラグメント A を用いて製造できる。これは、容易に入手できるケトン p を使い、C H 3 M g B r で処理して q を生成することによって得ることができ、これも、上記のとおり、P d (O) - C u I カップリングのような慣用の手法を用いて、フラグメント A に結合することができる。C - 15 からの鎖長の増大も得られる。

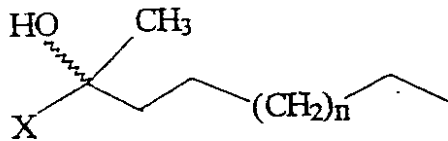
30

40

p

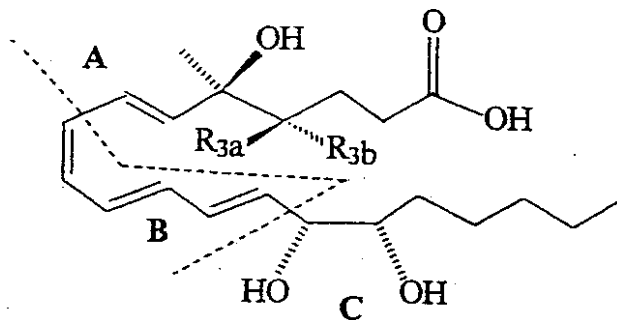


q

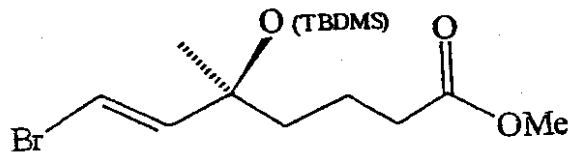


5 - メチル - L X B 4 および 4 , 4 - ジメチル - L X B 4 の合成

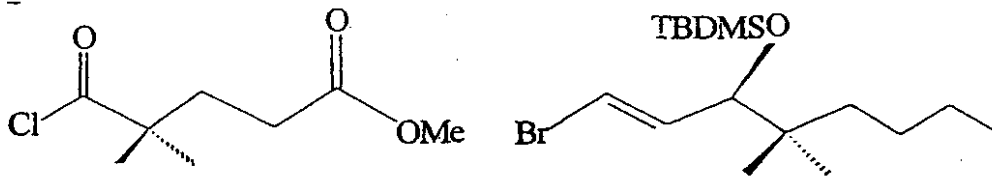
5 - メチル - L X B 4 は、5 - オキソ - L X B 4 形成を阻害または遷延する。上記に概略を示した一般的図式を用いて、A フラグメントを構成して、臭化ビニルの r 前駆体に 5 - メチルを保有させることができ、これを、Pd (O) - C u I カップリングによって、結合した B + C フラグメントに結合する。



r



s



t



臭化ビニル r は、その C - 4 の位置にジメチルまたは水素置換基のいずれかを有する s から得ることができる。フラグメント B + C を含む保護された前駆体 t は、参考文献 [Nicolaou, K.C. et al. (1991) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:1100-16] に報告されたとおりに生成する。化合物 t を、図示の臭化ビニルと結合することによって s または 28 へと転換する。こうして、標的分子は、溶媒として Et₂NH を含む脱気した丸底フラスコに、Et₂NH に 1.2 当量で注入した t とともに r を 1.0 当量 (1 g) で加えることによって、生成することができる。Pd (Ph₃P)₄ を 0.02 当量で加えて、s の 8 (9) 含有アセチレン性前駆体メチルエステルを得る。

10

20

30

40

50

材料を抽出し、 CH_2Cl_2 中のキノリン(0.5当量)に懸濁させてロータリーエバポレーターでの蒸発に付し、リンドラー触媒(10%; 25)および H_2 気流を用いた水素化に付して、8位でのアセチレン性二重結合を選択的に還元する。5-メチル-LXB4または4-ジメチル-LXB4メチルエステルのメチルエステルのテトラエン成分の形成は、還元の完了(すなわち1~3時間)を査定するためのRP-HPLCによって追跡することができる。次いで、生成物をTHF 25 μl 中でのLiOHで処理し、0 24 で8~24時間 H_2O を加えることによって、対応する遊離酸へとメチル エステルをけん化する。

実施例2: ヒト前骨髄球性白血病細胞および単球によるリポキシンA4の代謝: 半減期検定

HL-60細胞は、米国基準株コレクション(Rockville, MD)から、その他の細胞培養試薬は、GIBCO(Grand Island, NY)から購入した。ベルセン(EDTA)は、Whittaker Bioproducts(Walkersville, MD)から購入した。合成11, 12-アセチレン性LXA4メチルエステルおよびLX類は、Cascade Biochemical(Reading, 英国)から、15(S)-15-m-PGE1、PGE1および5-HETEは、Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI)からであった。[11, 12-3H]LXA4は、注文によるトリチウム化(NEt-259、ロット番号第0 2793-275号、New England Nuclear, Boston, MA)としてリンドラー触媒を用いて、11, 12-アセチレン性LXA4から製造した。トリチウム化した生成物は、RP-HPLCを用いて単離した[Fiore et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:16168; Serhan, C.N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167]。メトキシアミンおよびNADは、Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)から得た。二酸化マンガンおよびアダムス試薬は、Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI)から得た。

ヒトPMNは、健康な志願者から、ヘパリン添加した新鮮な静脈血の勾配遠心分離[Boyum, A. (1986) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:77]によって得た。HL-60細胞を、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μg /ml)、ウシ胎児血清(10%)(Hyclone, Logan, UT)で強化したRPMIに播種し、プラスチック製250ml入りフラスコ内で温置した(5% CO_2 雰囲気、37)。5 \times 10⁷個のHL-60細胞を内容する個々のフラスコを、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)の存在下または不在下で温置し(10または16nM、24~27時間)、Collins, S.J. (1978) Blood 70:1233のとおり、付着をマクロファージ様表現型の誘導について追跡した。グルコース(1 mg/ml)とともにPBSを内容するプラスチックのペトリ皿で、37 で1時間新鮮な単核球を平板培養した後、末梢血単球を得た[Goldyne, M.E. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:8815]。付着しなかった細胞を除去し、付着した単核球を、ベルセン(7 ml/プレート)を用いて静かに再懸濁させ、PBSで洗浄した。PMN(>98%)、付着単球(>95%)およびHL-60細胞を、温置のためPBSに懸濁させつつ、光学顕微鏡によって計数し、それぞれの事例で<2~3%がトリパンプルーに対して透過性であった。いくつかの実験のために、PMA(16 nM)で24~72時間処理したHL-60細胞から、無細胞上清を調製した。採集した後、分化した細胞を洗浄し、次いで、凍結融解による溶解、および遠心分離(100,000 g、1時間)に付した。

エイコサノイドとの温置は、内標準としてのPGB2または5-HETEのいずれかを含む冷メタノールで停止した(5-HETEは、15-オキソ-EETEを定量したときに用いた)。Sep-Pak C18を用いて生成物を抽出し、Serhan, C.N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167のとおり、定型的にクロマトグラフィーに付した。RP-HPLC系は、Altex Ultrasphere-ODSカラム(4.6mm \times 25cm)を装備したLKB勾配二重ポンプ、1 ml/分の流量、メタノール/ H_2O /酢酸(65:35:0.01)、およびLTB4の代謝物(すなわち20-COOHおよび20-OH-LTB4)とLXA4とを定量するのに用いた線形勾配(20~45分)でのメタノール/酢酸(99.99/0.1)による溶離(0~20分)で構成した。内標準の還元は、平均が82.2、S.D.が7.9(n=13)であった。化合物I~IVは、メタノール/ H_2O /酢酸(60:40:0.01、v/v/v)で3.0 ml/分の流量で溶離するAltex Ultrasphere-ODSカラム(10mm \times 25cm)を用いて分離した100,000g上清による15-オキソ-EETEの形成[Agins, A.P. et al. (1987) Agents Actions 21:397; Xun, C-Q. et al. (1991) Biochem. J.

10

20

30

40

50

279:553; および Sok, D-E. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 156:524 参照] は、R P - H P L C の後に、メタノール / H₂O / 酢酸 (70 : 30 : 0.01, v/v/v) で溶離し、1 ml / 分の流量で 280nm で追跡する O D S カラム (4.6mm x 25cm) を用いて定量した。単球由来の生成物も、メタノール / H₂O / 酢酸 (60 : 40 : 0.01, v/v/v) および 1 ml / 分の流量で溶離する、Hypersil カラム (5 I L, 4 mm x 300mm) を用いるクロマトグラフィーでクロマトグラフィーに付した。オンラインスペクトルは、H P L C 3D ChemStation というソフトウェア (D O S シリーズ) を備えたダイオードアレー検出器 (Hewlett-Packard 1040 M シリーズ II 型) を用いて記録した。スペクトルは、1.28 秒のサンプリング間隔で、4 nm のステップ、Bw = 10nm、レンジ = 235 ~ 360nm を用いて得た。

G C / M S は、HPG1030A というワークステーションおよび GC5890 を備えた Hewlett-Packard 5971A 質量選択的検出器四重極で実施した。カラムは、HP Ultra 2 (架橋結合した 5 % フェニルメチルシリコーンガム相 ; 25m x 0.2mm x 0.33 μ m) であり、注入は、ピス (T M S) トリフルオロアセトアミド (B S T F A) 中でスプリットレスモードで実施した。温度のプログラムは、150 で始動させ、10分で 250 に 20分で 325 に達した。標準的飽和脂肪酸メチルエステル (C 16 ~ C 26) は、下記の保持時間を与えた (分 : 秒、n = 6 の平均) : C 16、8.03 ; C 18、9.77 ; C 20、12.22 ; C 22、16.11 ; C 24、20.72 ; C 26、23.62。これを用いて、Serhan, C.N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167 のとおりに、それぞれの L X 由来代謝物の C 値を算出した。ジアゾメタンを製造し、メチルエステル生成物を B S T F A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) で処理して、M e 3 S i 誘導体を得た。メチルエステルの O - メトキシム誘導体は、Kelly, R.W. および Abel, M.H. (1983) Biomed. Mass Spectrom. 10:276 のとおりに製造した。接触水素化は、酸化白金 IV (1 ~ 2 mg) を発泡水素流で飽和させることによって (20 分、室温)、メタノール (1 ml) 中でアダムス試薬 (Aldrich, Milwaukee, WI) で実施した。抽出の後、材料をジアゾメタン、次いで B S T F A で処理した (終夜 ; 室温)。

結果

L X A 4 の代謝 : 健康な供与者の末梢血からの無傷の好中球は、外来 L X A 4 を有意に代謝しなかったが、同じ供与者からの細胞は、L X A 4 を酸化によって急速に変換した。対照的に、単球 / マクロファージ様の特徴を示す P M A 処理 H L - 60 細胞は、L X A 4 を急速に変換した。接触の最初の 60 秒以内に、> 70 % の L X A 4 が代謝された。P M A 処理の不在下では、無傷の H L - 60 細胞 (分化せず) も、それらの無細胞上清 (100,000 g) も L X A 4 を変換しなかった (n = 3)。

L X A 4 とともに温置した分化した H L - 60 細胞は、このエイコサノイドをいくつかの生成物に転換した。標識した L X A 4 は、トリチウムを有する 4 種類の主生成物 (化合物 I ~ IV と称する) に変換され、これらを捕集して、更に分析した。

化合物 I ~ IV の構造 : これらの化合物の構造的な研究を可能にする量を得るために、R P - H P L C での保持時間を、境界を示す 3H 標識の溶出像を用いて確定し、いくつかの温置からプールした非標識試料をクロマトグラフィーに付し、これらの領域内から個別に捕集して、G C / M S 分析に付した。ジアゾメタンおよび B S T F A での処理後に得られた生成物の、選ばれたイオン追跡は、化合物 I ~ IV は、それぞれ、L X A 4 とは異なる保持時間を与えたものの、それぞれ、m/z 203 [- C H (O S i M e 3) - (C H 2) 3 - C O O C H 3] で卓越したイオンを示して、L X A 4 の炭素 1 ~ 5 番 (カルボキシルの炭素が 1 番である) が修飾されなかったことを明らかにした。メチルエステル、すなわち L X A 4 のトリメチルシリル誘導体は、その電子衝撃スペクトルでは m/z 203 (基本ピーク) および 173 で卓越イオンを、582 でのその分子イオンとともに示した (M+4)。L X A 4 のこの誘導体の診断値のその他のイオンは、m/z 171 (203-32)、409 (M-173)、379 (M-203)、482 (M-100) および 492 (M-90) で観察される [Serhan, C.N. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5335; および Serhan, C.N. (1990) Meth. Enzymol. 187:167]。L X 類が、概して、極めて弱い分子イオンピークを与えることが公知である [Serhan, C.N. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5335] のは注目に値する。にもかかわらず、I & II と標識された化合物も、m/z 173 (M e 3 S i O₊ = C H - (C H 2) 3 - C H 3) で卓越イオ

10

20

30

40

50

ンを有し、これらのL X A 4誘導生成物の炭素15~20番フラグメントが無傷であることを示すが、化合物IIIおよびIVでは、 m/z 173が明らかではなかった。したがって、化合物I~IVがL X A 4の代謝物であるとの結論は、それらの物理的特性(H P L CおよびG C / M S)、トリチウム標識を有するとの知見、およびP M Aで処理しなかったH L - 60細胞との温置でのこれらの生成物の不在を根拠とした。

次に、化合物IIIおよびIVに焦点を当てた。L X A 4の炭素15~20番フラグメントでの構造的修飾を表わすようであったためである。酸化(炭素20番でのヒドロキシ化)は、一つの可能性であることから、誘導体形成後のL X A 4のそれぞれの20 - O Hおよび20 - C O O Hに起因し得るイオン、すなわち m/z 261および217($M e_3 S i O_+ = C H - (C H_2)_4 - C H_2 O S i M e_3$ および $M e_3 S i O_+ = C H - (C H_2)_4 - C O_2 M e$)を、得られた

10

G C - M Sデータ像で走査した。IIIまたはIVはいずれも、 m/z 261または217のいずれでも卓越イオンを示さず、これらの生成物が、酸化の結果であるとは思われなかった。M e_3 S i 誘導体、すなわち化合物IIIのメチルエステルの質量スペクトル(C値:24.3)を得た。そのスペクトルでの卓越イオンは、 m/z 203(基本ピーク、 $C H (O S i M e_3) - (C H_2)_3 - C O O H C H_3$)、171(203-32; $C H_3 O H$ の排除)、215[($M - 203$) - 90、トリメチルシラノール($M e_3 S i O H$)の排除]および99($O = C - (C H_2)_4 - C H_3$)で観察された。より低い強度のイオンは、 m/z 508(M_+)および418($M - 90$; $M e_3 S i O H$ の欠如)であった。これらのイオンの存在は、3H標識した化合物IIIと同時に溶出した材料が、L X A 4の15 - オキソ誘導体であることを示唆した。このことは、いくつかの系統の証拠、すなわち、 m/z 173($M e_3 S i O_+ = C H - (C H_2)_4 - C H_3$)での卓越イオンの実質的欠如、 m/z 99($O = C - (C H_2)_4 - C H_3$)の存在、テトラエン発色団の不在、および335~340nmのU V maxでの新たな発色団の出現によって裏付けられる。テトラエン発色団は、プロスタグランジン転換[Anggard,E.and Samuelsson,B.(1964) J.Biol.Chem.239:4097]に用いられたとおりに、L X A 4をクロロホルム中でM n O 2で処理することによって確認された。また接触水素化生成物の質量スペクトルは、 m/z 203(基本ピーク)、 m/z 99(66%)、 m/z 313($M - 203$ または $M - C H (O S i M e_3) - (C H_2)_3 - C O O H C H_3$; 35%)および m/z 171(36%)での卓越イオンと、 m/z 173での卓越イオンの不在とともに、25.1というC値を与えた。より弱いイオンが、 m/z 516(M_+)および m/z 426($M - 90$)に存在した。したがって、8 amuの上方シフト、およびこの飽和誘導体のフラグメント化とは、対応する15 - オキソ誘導体の生成と一致する。

20

30

このL X A 4誘導生成物を更に検証するため、IIIと標識されたピークの下で溶出する材料のアリコート、ジアゾメタンで処理し、次いで、メトキシ化し[Bergholte,J.M.et al.(1987) Arch.Biochem.Biophys.257:444のとおり]、B S T F Aで処理した。そのスペクトル(C値25.4)は、 m/z 203(基本ピーク)、171(203-32; $C H_3 O H$ の欠如)および229[$M - 128$ または $C H_3 O - N = C - (C H_2)_4 C H_3 - (2 \times 90)$]での卓越イオンを示した。より低い強度のイオンが、 m/z 537(M_+)、466($M - 71$ 、 t 開裂イオン $M - C H_2 (C H_2)_3 C H_3$)、481($M - 56$ または $M - C H_2 = C H - C H_2 - C H_3$ 、マックラファーター再配列イオン)、431[$M - 106$ (おそらく $C_7 H_5 N_+$)の欠如]、401[$M - 136$ ($M e_3 S i O H + C H_3 + \cdot O C H_3$ の排除)]および460($M - 77$ 、 $N O C H_3 + M e O H$ の排除)に存在した。やはり、アルコール含有C - 15フラグメント($M e_3 S i O_+ - C H - (C H_2)_4 - C H_3$)起源と思われる m/z 173でのイオンは、そのスペクトルに実質的に不在であった。したがって、存在するイオンは、メチルエステル、すなわちL X A 4の15 - オキソ含有誘導体から生成されたO - メトキシ誘導体に一致する。まとめると、これらの異なる誘導体で観察された卓越イオンは、IIIと標識されたピークの下で溶出する材料が、L X A 4の15 - オキソ生成物(すなわち15 - オキソL X A 4)であったことを示唆する。

40

化合物IVのメチルエステルであるM e_3 S i 誘導体(C値26.0)の質量スペクトルは、 m/z 203(基本ピーク、 $C H (O S i M e_3) - (C H_2)_3 - C O O H C H_3$)、171(203 - 32; $C H_3 O H$ の欠如)、99($O = C - (C H_2)_4 - C H_3$)および307($M - 203$ または $M - C H (O S i M e_3) - (C H_2)_3 - C O O H C H_3$)での卓越イオンを示した。より低い

50

強度のイオンが、 m/z 510 (M_+)、420 ($M - 90$ 、トリメチルシラノールの欠如) および208 ($M - (99 + 203)$) に存在した。そのUVスペクトルは、259、269および280nmに最大値を有する三重線の吸光を示し、共役トリエン発色団と整合する。これらのイオンの存在、およびUVスペクトルは、IVが、LXA4のジヒドロ-15-オキソ代謝物であったことを示唆する。この基本構造は、炭素15番の位置のケト基に一致する m/z 99でのイオンの存在と、炭素5および6番のアルコール基が無傷のままであることを示す基本ピークとしての m/z 203の存在とによって裏付けられた。加えて、トリエン発色団 ($\lambda_{\text{cal}} = 310\text{nm}$) の不在は、二重結合の欠如が、13~14位に存在して、観察されたトリエン発色団を与えたことを示す。まとめると、これらの結果は、化合物IVが13, 14-ジヒドロ-15-オキソ-LXA4であったことを示す。

10

メチルエステル、すなわち化合物IIの Me_3SiO 誘導体 (C 値 - 25.4) は、 m/z 203 (基本ピーク; $\text{CH}(\text{OSiMe}_3) - (\text{CH}_2)_3 - \text{COOHCH}_3$)、173 ($\text{Me}_3\text{SiO}_+ = \text{CH} - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH}_3$)、171 (203 - 32) および508 (M_+) でピークを与えた。その分子イオンは、LXA4誘導体より高い二つの質量単位であった。これらのイオン、および吸収: max MeOH の259nm、269および282nmの三重線の帯域は、化合物IIが、LXA4のジヒドロ誘導体であったことを示唆する。HL-60細胞からのメチルエステル、すなわち化合物Iの Me_3SiO 誘導体は、GCでは2種類の生成物を与えた。主要な方 (C 値 = 25.0) は、LXA4に類似するイオンをその質量スペクトルを与えたが、その分子イオンは、 m/z 586にあって、 m/z 555 ($M - 31$) および496 ($M - 90$) にもイオンが存在し、4個の二重結合のうち2個が還元されたことを示唆する (図示せず)。しかし、末梢血単球では同じ生成物が観察されず (上記参照)、したがって、ピークIからのHL-60細胞に由来する材料は、この実験ではそれ以上特性記述しなかった。I~IVの構造は、LXA4が、健全な白血球による酸化によっては代謝されず、ともに炭素15番のアルコールで脱水素され、また共役テトラエンからトリエン構造へと変換されることも示す。考え合わせると、これらの所見は、LXA4は、NAD依存性15-プロスタグランジン脱水素酵素 (5-PGDH)、すなわち基質としてのプロスタノイドとの類似の反応を行なうことが公知である酵素 [Anggard, E. and Samuelsson, B. (1964) J. Biol. Chem. 239:4097、また Hansen, H.S. (1976) Prostaglandins 12:647に総説] によって攻撃され得ることを示唆する。

20

15-PGDHの活性は、HL-60細胞で誘導されることが最近示され [Xun, C-Q. et al. (1991) Biochem. J. 279:553]、明らかに、基質としての15-HETEをPGE₂に比して92%の効率で利用する [Agins, AP. et al. (1987) Agents Actions 21:397]。実際、PMA処理したHL-60細胞から調製した100,000 g上清は、15-HETEを15-オキソ-EETEに転換し、分化後の脱水素酵素活性の存在を示した。LXA4は、15-HETEの触媒作用について競合し、ラインウィーバー-バークのプロットから算出した $K_i = 8.2 \pm 2.6 \mu\text{M}$ (S.E.M., $n = 6$) を示した。LXA4および15-HETEの等モル濃度では、LXA4は、15-オキソ-EETE形成をほぼ50%阻害した。100,000 g上清によるLXに対するPGE₁に比しての相対的転換は、LXA4、11-trans-LXA4およびLXB4が転換されたが、15-メチル-PGE₁は転換されないことを示した。まとめると、これらの結果は、15-PGDH、または同等の酵素系に対しては、 $LXA4 > 11\text{-trans-LXA4} > LXB4$ が基質であることを示唆する。

30

40

PMAは、単球-マクロファージ様細胞系統へのHL-60細胞の分化を誘導する [Collins, S.J. (1987) Blood 70:1233] ことから、末梢血単球を温置して、LXを代謝するかを決定した。LXは、単球に対して強い作用を示し [Stenke, L. et al. (1991b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 180:255]、これらの細胞は、エイコサノイドを酸化しない [Goldyne, M.E. et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:8815]。LLXA4は、無傷の単球 ($n = 5$) と透過性細胞 (凍結融解またはサポニン処理、 $n = 5$) との双方の懸濁液を接触させたとき、15-オキソ-LXA4、共役トリエンを有する生成物である13, 14-ジヒドロ-LXA4、および13, 14-ジヒドロ-15-オキソ-LXA4に転換された。分化したHL-60と同様に、単球は、30分以内に急速にLXA4を転換した ($> 60\%$)。無傷および透過性の単

50

球の双方でのこれらの代謝物の形成に関する時間的關係は、同様であり、15 - オキソ - L X A4という代謝物は、過渡的中間体であることを示唆する。また3H - L X A4 (d = 33) と温置した単球懸濁液では、13, 14 - ジヒドロ - 15 - オキソ - L X A4および13, 14 - ジヒドロ - L X A4が、それぞれ、放射性標識を有する主生成物であった。15.5 ~ 17分で13, 14 - ジヒドロ - L X A4の前に溶出する生成物が観察され、それが、トリエン発色団も示し、処理の際に起こったcis - trans異性化から生じた13, 14 - ジヒドロ - L X A4の11 - trans異性体であると思われたことは、注目に値する。未変性L X A4の11 - cis結合は、不安定であり、抽出や単離の際に全transへと容易に異性化する [Romano, M. and Serhan, C.N. (1992) *Biochemistry* 31:8269]。

実施例3：リポキシン受容体の類似体との結合親和性

ヒト前骨髄球性白血病細胞 (HL - 60) は、米国基準株コレクション (Rockville, MD) から購入した。RPMI および細胞培養試薬は、GIBCO (Grand Island, NY) から得た。合成L X A4、トリヒドロキシヘプタン酸 (メチルエステル)、L X B4、L T D4、L T C4 およびL T B4は、Biomol (Plymouth Meeting, PA) から、S K F 104353は、Smith Kline and Frech Laboratoriesから得た。ONO 4057は、ONO Pharmaceutical Co., Ltd (大阪、日本国) から得た。[14, 15 - 3H] L T B4 (32.8mCi / ミリモル)、[1 - 14C] アラキドン酸 (50.2mCi / ミリモル)、³²P ATP (3,000mCi / ミリモル)、[9, 10 - 3H (N)] パルミチン酸 (30.0mCi / ミリモル) および [9, 10 - 3H (N)] ミリスチン酸 (30.7mCi / ミリモル) は、New England Nuclear (DuPont Co., Boston, MA) から購入した。11, 12 - アセチレン性L X A4は、Cascade Biochemical (Reading, 英国) から得た。微量遠心分離管フィルター (0.45 μm 酢酸セルロース) は、PGC Scientific (Gaithersburg, MD) から、シリコーン [訳注：原文ではsilicon] 油 (d = 1.05 および d = 0.963) は、それぞれ、Harwick Chemical Corp. (Akron, OH) およびThomas Scientific (Swedesboro, NJ) から購入した。ニトロブルーテトラゾリウム、PMA、DMSO、プロテアーゼ、レチノイン酸およびアクチノマイシンDは、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。島活性化タンパク質 (IAP) は、LIST Biological Lab., Inc. (Campbell, CA) から得た。プラスチック器具類、ワットマンLK 6DのTLCプレートおよび溶媒 (HPLC等級) は、Fisher (Springfield, NJ) から得た。

[11, 12 - 3H] L X A4の製造：11, 12 - アセチレン性L X A4メチルエステルの滴定を、New England Nuclear (Boston, MA) による注文滴定サービス (NET - 259 : 92 - 2326) の下で実施した。略述すると、11, 12 - アセチレン性メチルエステルを、[Nicolaou, K.C. et al. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107:7517] のとおりにUV吸光および逆相HPLCによって特性記述し、塩化メチレン中でトリチウム雰囲気中に室温で接触させた。この温置を、リンドラー触媒 (1.0mg、Fluka Chemicalsより) の存在下で ~ 1時間攪拌した。得られた混合物を、メタノール中に貯蔵し、RP - HPLCを用いて単離した。トリチウム化した生成物を、光ダイオードアレー高速スペクトル検出器を備えた勾配HPLC系を用いて、メチルエステルとしてクロマトグラフィーに付した [Serhan, C.N., *Methods in Enzymology: Arachidonate Related Lipid Mediators*: Murphy, R.C., Fitzpatrick, F. (eds.), Vol 187. Orlando, FL, Academic, (1990) p.167]。この混合物は、合成標準との同時溶出によって決定した限りで、[11, 12 - 3H] L X A4と [11, 12 - 3H] - 11 - trans - L X A4メチルエステルとをともに (~ 1 : 3の比率) 含有した。RP - HPLCの後、[11, 12 - 3H] L X A4を含有する分画を捕集し、酢酸エチル中に抽出した。遊離酸は、LiOHけん化によって製造した [Fiore, S. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:16168]。これらの分画からの材料は、UV電子化学的検出HPLCに注入したとき、合成L X A4と同時溶離されたテトラエンを有する生成物を伴って、90%を超える放射能を示した。二つのHPLC系で基準L X A4の保持時間で溶出した材料を、結合実験用に採取した。[11, 12 - 3H] L X A4について算出した比活性は、40.5Ci / ミリモルであった。

細胞培養および分化：HL - 60細胞を、100 U / mlのペニシリン、100 μg / mlのストレプトマイシン、および10% ウシ胎児血清 (Hyclone, Logan, UT) で強化したRPMIに播種し、250ml入りフラスコ内で、5% CO₂雰囲気中で37 °Cで温置した。次いで、~ 50 x 10⁶個 / ml

10

20

30

40

50

の細胞を内容する個々のフラスコに、ジメチルスルホキシド (DMSO) (1.12体積%、120時間)、レチノイン酸 (RA) (1 μ M、120時間) またはホルボールミリステートアセテート (PMA) (20nM、48時間) を与えた。結合検定を実施する前に、Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まぬリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で細胞を2回洗浄し、計数し、トリス緩衝液 (10mM)、pH7.4に20 × 10⁶個/mlの細胞として懸濁させた [Fiore, S. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:16168]。 [Imaizumi, M. and Breitman, T. R. (1986) Blood 67:1273] のとおり、多形核の表現型の誘導を追跡するために、ニトロブルーテトラゾリウムによる還元を実施し、マクロファージ様表現型の誘導について細胞の付着を決定した [Collins, S. J. (1978) Blood 70:1233]。培養の第三継代に維持したヒト臍帯静脈の内皮細胞 (HUVEC) は、M. Gimbrone博士 (Birmingham and Women's Hospital Department of Biology) から得た。

10

末梢血からのPMN、血小板およびRBCの単離：健康な正常志願者の静脈穿刺後の新鮮なヘパリン添加した血液から、修正Boyum法 [Boyum, A (1986) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:77] によって、ヒトPMNを得た。PBSへの懸濁液を、ともに98%を超えてトリパンブルーを排除できる能力によって、細胞数および生存率について追跡した。赤血球は、PBS中での3回の遠心分離 (2,500rpm、21 分で10分間) 後のヘパリン添加した血液10mlから得た。以前に記載されたとおり [Serhan, C. N. and Sheppard, K. -A. (1990) J. Clin. Invest. 85:772]、酸性クエン酸デキストロース (9 : 1 v/v) 中で吸引した血液を用いて、血小板を単離した。

リガンドの結合：3H - LXA4および3H - LXB4の結合を、基本的にはFiore, S. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:16168のとおり実施した。細胞を10mMトリス緩衝液 (pH7.4、Ca²⁺ 2.5mM、Mg²⁺ 1.2mM) に懸濁させた後、アリコート (0.5ml) を3H - リガンドのみ (0.3nM) でか、または増加する濃度のホモリガンドその他の化合物 (3 ~ 300nM) の存在下で温置した (4 分で20分)。温置をシリコーン油 (d = 1.028) 上で急速に遠心分離し (60秒、12,000 g)、細胞に付随する放射能を液体シンチレーション計数 (Wallac 1409, Pharmacia, Piscataway, NJ) によって決定した。HUVEC細胞との結合実験は、3.5 × 10⁵個/ウェルの細胞を有する12ウェルプレートで実施した。10分後に、ウェルをPBSで2回洗浄し、細胞付随標識を、氷酢酸 (0.5ml) を加えることによって回収した。これらの検定から得られた結果は、Ligandというプログラム (Elsevier-Biosoft, Cambridge、英国) を用いて、その後の分析に提出した。

20

30

PLD活性：上記のとおり調製したヒトPMNおよびHL-60細胞 (50 × 10⁶個/ml) を、3H - ミリスチン酸または3H - パルミチン酸 (8 μ Ci / 50 × 10⁶個の細胞) とともにPBS中で37 分で40 ~ 60分間温置した。細胞による取込みは、加えた標識の60 ~ 80%にわたり、PMNおよびHL-60の細胞の総リン脂質群に、それぞれ7.1 ± 4.2% (n = 10; 平均 ± S. D.) および32.6 ± 10.3% (n = 6; 平均 ± S. D.) が取り込まれた。温置は、37 分で実施した (10 × 10⁶個の細胞 / PBS 1ml)。Billah, M. M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17069のとおり、ホスファチジルエタノール (PEt) 形成のための作用薬を、PBS 50 μ l中にか、または1 : 10 (v/v) のEtOH : PBSとして加えた。示した時間に、ここでは内標準として用いた1 - 14C - アラキドン酸 (5,000ppm) を含有する、氷冷CHCl₃ / MeOH (2 / 5、v/v) 3.5mlを加えることによって温置を停止して、抽出の復元を定量した。 [Serhan, C. N. and Sheppard, K. -A. (1990) J. Clin. Invest. 85:772] のとりに修正BlighおよびDyer抽出を用いて、試料を抽出した。CHCl₃ / MeOH (8 / 2、v/v) 50 μ l中に濃縮した有機相を、酢酸エチル / イソオクタン / 酢酸 / 水 (110 / 50 / 20 / 100、v/v/v/v) の有機相で50分間展開する線形K6DのTLCプレート上にスポットした [Billah, M. M. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17069]。この系で、ホスファチジル酸 (PA) はRf = 0.1 ± 0.04を、PEtはRf = 0.1 ± 0.04; n : 38 ± S. D. を与え、他のリン脂質 (原点に留まった) または中性脂質 (Rf = 0.75 - 0.90) から明確に分離された。脂質は、ヨウ素蒸気で可視化し、やはり各TLCプレートでスポットし、かつクロマトグラフィーに付した、基準標準との同時溶離によって特定した。PA、PEtおよび内標準に対応する領域を、掻き取り、液体シンチレーション計数によって定量した

40

50

。3H - ミリスチン酸または3H - パルミチン酸標識に加え、[1 - 14C] アラキドン酸 (0.25 μ Ci / 30 x 10⁶個のPMN) と³²P ATP (20 μ Ci / 50 x 10⁶個のPMN) とで標識した細胞を用いて、PAおよびPEt生成のLXA4で刺激された形成を追跡した。これらの実験で、PAは、溶媒系として酢酸エチル/イソオクタン/酢酸 (45 / 15 / 10、v/v/v) を用いて分解し [Bocckino, S.B. et al. (1989) Anal. Biochem. 180:24]、Rf = 0.46 \pm 0.03 (n = 15) を与えた。PEt形成について表4および5に報告したすべての値は、作用薬のみの存在下で得られたdpmから、作用薬および0.5% EtOHの存在下で測定したそれを減じることによって算出した。

LXA4で誘導されたPLD活性に対するIAPおよびスタウロスポリンの衝撃：記載のとおり (上記参照) 実施されたPLD活性検定の前に、IAPまたはスタウロスポリンのいずれかに細胞を接触させた。PMNのIAP処理は、以前に記載のとおり [Nigam, S. et al. (1990) J. Cell Physiol. 143:512] 実施し、HL - 60細胞は、IAPの存在または不在下で37[°]で2時間温置した [Kanaho, Y. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:23554]。アリコート (107個 / 0.5mlの細胞) を緩衝液0.4mlに加えた。次に、温置した細胞を、0.5% EtOHの存在または不在下で、100 μ lの賦形剤 (PBS、EtOH、0.04%) またはLXA4のいずれか (10⁻⁷Mおよび10⁻⁹M) に接触させた。スタウロスポリン (100nM) は、LXA4の添加以前に37[°]で5分間、細胞懸濁液に加えた。

結果

合成 [11, 12 - 3H] LXA4を製造した後、前骨髄細胞性細胞 (HL - 60) とのその特異的結合を、特性記述し、[14, 15 - 3H] LTB4の特異的結合との直接比較を実施した。定型的な表現型マーカーを追跡したとき、未処理HL - 60細胞は、3H - LXA4および3H - LXB4のリガンドの双方に対する低レベルの特異的結合を示した。DMSO (1.12%) またはレチノイン酸 (1 μ M) との5日間の接触によって誘導した分化は、両放射性リガンドに対する特異的結合の3 ~ 5倍の増加を伴った。マクロファージ様表現型の特徴を示すPMA処理細胞、すなわち、プラスチックに付着するNB T陰性細胞 [Imaizumi, M. and Breitman, T.R. (1986) Blood 67:1273 ; Collins, S.J. (1978) Blood 70:1233参照] も、3H - LXA4および3H - LXB4のリガンドの双方に対する特異的結合の外見へと導いた。4[°]での3H - LXA4との平衡結合には、10分で到達し、次の20分間は実質的に不変のままであった。

両3H - リガンドに対する特異的結合の誘導が、de novoの合成を要するか否かを査定するため、アクチノマイシンD (2 μ g/ml) をPMA温置とともに加えた。アクチノマイシンDは、両標識エイコサノイドに対する特異的結合のPMAで誘導される増大を阻害し、特異的結合部位のやはり阻害された外見とともにde novoのタンパク質合成の阻害を示唆する。プロテアーゼおよびグリコシダーゼ処理の衝撃を、3H - LXA4の特異的結合について2種類の分化HL - 60細胞およびヒトPMNで査定した。プロテアーゼ処理は、特異的結合を低下させ、LXA4の特異的結合部位のタンパク質成分を裏付ける追加の証拠を示した。

分化したHL - 60細胞、および [11, 12 - 3H] LXA4 (0.1 ~ 30nM) での等温結合検定からの結果は、[11, 12 - 3H] LXA4の特異的結合部位が、KD = 0.6 \pm 0.3nMを与えることを示した。ヒトPMNによるLXA4特異的結合では、Scatchardプロットの非線形部分が観察された [Fiore, S. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:16168]。HL - 60細胞によるLTB4特異的結合で、ここで得られた結果、すなわちKD = 0.12nMは、Harada [Xie, M. et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:45] が最近報告した値、すなわちKD = 0.23nMと基本的に一致する。

3H - LXA4のその特異的結合部位との相互作用を更に特性記述するために、分化したHL - 60細胞、LXA4、LXB4、LTB4、LTC4、およびロイコトリエン受容体拮抗薬SKF 104353 [LTD4拮抗薬 ; Harada, Y. (1990) Hiroshima J. Med-Sci. 39 ; 89] で、競合結合実験を実施し、ONO-4057 [LTB4拮抗薬 ; Gleason, J.G. et al. (1987) J. Med. Chem. 30:959] は、競合リガンドの可能性があると査定された。LXB4、LTB4、またはトリヒドロキシヘプタン酸 (メチルエステル) (300nM) は、いずれも、分化HL - 60細胞と

10

20

30

40

50

の3H-LXA4の特異的結合に代置できなかつたが、LTC4は、3の対数のモル数で過剰に加えたとき、特異的結合の~30%の低下を生じた。LXA4(300nM)が、分化HL-60細胞との3H-LTB4(0.3nM)の結合に競合できなかつたとの知見は、LXA4とLTB4が、別個の分類群の特異的結合部位と作用し合うことを示唆する。ロイコトリエン受容体拮抗薬のSKF 104353およびONO-4057は、分化HL-60細胞による3H-LXA4に入れ代らなかつたが、SKF 104353およびLTD4は、HUVECによる特異的な3H-LXA4の結合と競合するのに効果的であつた。HUVECは、 $11,0 \pm 2.6 \text{ nM}$ というKD、および $2.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ というBmaxを3H-LXA4に対して示し、LTD4競合については、実質的に同一の値が算出された。3H-LTB4の場合は、HUVECは、LTB4と特異的に結合しなかつたが、この3H-リガンドでの非特異的な細胞の会合が明白であつた(n=3; 図示せず)。3H-LXA4の特異的会合は、他のいくつかの調べた細胞型で明確ではなかつた。ここで、洗浄血小板、RBC類、細胞(Raji)、またはT細胞(Jurkat)の培養細胞系は、いずれも、3H-LXA4に対する特異的結合を示さなかつた。考え合わせると、これらの結果は、LXA4は、分化したHL-60細胞の、いずれのロイコトリエン受容体拮抗薬(SKF 104353またはONO-4057)にも感受性ではない独自の結合部位と作用し合うことを示す。HUVECでは、3H-LXA4の特異的結合は、LTD4とSKF 104353との双方に感受性であるが、ONO-4057にはそうではなく、この細胞型での3H-LXA4の特異的結合は、推定されるLTD4受容体とのその相互作用を反映している可能性があることを示唆する。

10

LXA4は、ヒト好中球でのホスファチジン酸形成を急速に刺激する[Nigan, S. et al. (1990) J. Cell Physiol. 143:512]。3H-LXA4の結合が、PLD活性化をあたえるのかを決定するため、PMNとHL-60との双方でPEtおよびPAを追跡した。結果は、これらの細胞でLXA4は、類似の経時的応答でPLD活性を刺激することを示した。LXA4(10^{-10} M)に接触させたPMNは、60秒以内にエタノール捕捉生成物のPEtを急速に生成したが、それは、5分までには基線レベルへと減衰した。添加EtOHの不在下では、PEtは、統計的有意レベルでは形成されなかつた。PEtについては、PMNと分化HL-60細胞との双方で二相濃度依存性が得られた。見かけの最大応答は、 $\sim 10^{-9} \sim 10^{-10} \text{ M}$ の濃度範囲で認められ、活性の第二のピークが、 10^{-7} M のLXA4で観察された。 10^{-8} M 未満では、走化性ペプチドのFMLPとLXA4との双方が、類似の強さという結果を示したが、何名かの供与者からのPMNでは、FMLPの方がやや強力であるようであつた。他の生合成経路の寄与の可能性を評価するため、LXA4で誘導されるPA形成も、 $^{32} \text{P}$ -ATPと[1- $^{14} \text{C}$]アラキドン酸との双方で標識したPMNで調べた。 $^{32} \text{P}$ 標識PAは、LXA4(10^{-7} M)への接触の30分後のみ、統計的有意なレベルで明らかであつたにすぎない。 $^{14} \text{C}$ アラキドン酸で標識された前駆体由来する $^{14} \text{C}$ 標識PAの形成では、類似の結果が得られた。これらの知見は、LXA4は、PMNでのPA形成のその他の経路も刺激できるが、接触の30分後のみすぎないことを示した。

20

30

LXA4と温置した分化HL-60細胞(3H-LXA4に対する特異的結合部位を発現)のみが、急速にPEtを生成したにすぎず、それは30秒以内に明白であつた。LXA4と温置した未分化HL-60細胞(10^{-9} M)は、PEtを急速に生成することがなかつた。これらの細胞による濃度依存性も、LXA4による二相応答を示し、 10^{-9} M で見かけの最大値を与えた。次に、LXA4を介したPLD活性化に關与する可能性があるシグナル導入事象を調べるため、PMNおよびHL-60細胞をIAPまたはスタウロスポリンのいずれかに接触させた。結果は、より低い濃度範囲($10^{-9} \sim 10^{-10} \text{ M}$)内で誘発されるLXA4介在性PLD活性は、両細胞型でのIAP処理に感受性があり、同様に、より高いLXA4の濃度(10^{-7} M)でのPLD活性は、スタウロスポリンによって阻害されたことを示す。したがって、 10^{-8} M 未満の濃度の両細胞系では、LXA4は、PLD活性を誘発する特異的結合部位と急速に作用し合い、そのために、機能的応答を与えるが、 $\mu \text{ M}$ 未満のLXA4の濃度範囲内では、やはりPLDの活性化へと導き得る追加の過程を刺激する可能性がある。

40

実施例4：リボキシンの生体活性の検定

50

好適な L X 類似体 (化合物 1 ~ 8 として上記に構造的に示す) のうちいくつかを、実施例 1 に記載したとおり、全合成によって製造した。H P L C を経由するこれらの化合物の製造および単離の後、初めに、生物学的活性保持の有無を決定するために、好中球接着検定および上皮細胞移行検定 [Nash, S. et al. (1987) J. Clin. Invest. 80:1104-1113; Nash, S. et al. (1991) J. Clin. Invest. 87:1474-1477; Parkos, C. A. et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:1605-1612; Parkos, C. A. et al. (1992) J. Cell. Biol. 117:757-764; Madara, J. L. et al. (1992) J. Tiss. Cult. Meth. 14:205-216 に記載のとおり] を用いて評価した。

化合物 1 ~ 8 (10⁻⁷ ~ 10⁻¹⁰ M) は、内皮細胞への好中球の接着、および上皮細胞でのこれらの移行を阻害することが見出された。アセチレン性前駆体 (化合物 1、3、5 および 7) は、それらのテトラエンの相手より物理的に安定であることが見出された。化合物 7 は、C15 の位置でのアルコール基、またはこの系列での他の修飾がなく、検定では全く生物学的活性を示さなかった。したがって、L X の C15 位の置換基は、少なくとも L X A4 類似体の生物学的活性に必要であるように思われる。15 - メチル - L X A4 (化合物 2) も、ロイコトリエン B4 が触発するヒト内皮細胞への多形核 (P M N) 接着を、~ 1 M の I C 50 で阻害することが判明した。L X 類似体 1 ~ 8 は、合成 L X A4 より大きいか、またはそれに等しい効力で移動を阻害することが見出された。化合物 7 は、L X A4 または他の類似体が誘導する阻害の濃度範囲内では、基本的に不活性であることが見出された。これらの好中球含有生物検定での結果は、C15 ~ C20 位に修飾を有する L X A4 類似体は、それらの生物学的作用を保持し、P M N の移行および接着事象を阻害できることを示す。

化合物 1 ~ 8 の「生体半減期」を、実施例 2 に記載のとおり、ホルボールエステル処理したヒト前骨髄細胞性白血病 (H L - 60) を用いて査定した。これらの細胞は、細胞温置への添加の 5 分以内に 95% 以上の L X A4 を転換した。この系で L X A4 は、15 - オキソ - L X A4 へと急速に変換された。しかし、同じ検定で、15 - メチル - L X A4 (化合物 2) およびシクロヘキシル - L X A4 (化合物 4) は、2 時間までの時間で、温置媒体中で定量的に回収された。これらの結果は、炭素 20 位 ~ 炭素 15 位での修飾は、白血球による L X A4 のそれ以上の代謝を妨げることを示す。

加えて、アセチレン性メチルエステルの L X A4 (化合物 1) の安定性は、抽出および逆相 H P L C 後に査定されたとおり、生体外での全血中での温置 (37 °C) の 60 分後に、基本的に無傷で回収された。考え合わせると、これらの結果は、L X 類似体は、in vitro でも生物学的作用を保持し、それ以上の代謝に耐性であることを示す。

実施例 5 : 細胞増殖に対する 15 - エピリポキシン類の効果

材料と方法

合成 (5 S, 6 R, 15 R)、- トリヒドロキシ - 7, 9, 13-trans - 11 - cis - エイコサテトラエン酸塩 : カルボキシメチルエステル (15 - エピ - L X A4 メチルエステル) は、全有機合成によって製造されたもので、N. A. Petasis 教授 (Department of Chemistry, University of Southern California) の寄贈であった。15 - エピ - L X A4 の遊離酸は、テトラヒドロフラン中での L i O H (0.1 M) による 15 - エピ - L X A4 - メチルエステルの、4 時間で 24 時間のけん化によって得た。合成エイコサノイドという参照試料は、Cascade Biochemical Limited (Reading, Berkshire, 英国) から得た。5 - L O (Rev 5901 の異性体) およびシトクロム P 450 (17 - オクタデカン酸、17 - O D Y A) 活性の阻害剤は、Bio mol (Plymouth Meeting, PA) から得た。放射能標識した ([³²P]) d C T P および ([³H]) アラキドン酸、ならびにメチルチミジンは、DuPont NEN (Boston, MA) から得た。イオノフォア (A 23187)、A S A、3, (4, 5 - ジメチルチアゾイル - 2 - イル) 2, 5 (ジフェニルテトラゾリウム = プロミド) (M T T) およびグアニジニウムイソチオシアナートは、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から購入した。組換えヒトインターロイキン 1 (I L - 1) は、R&D Systems (Minneapolis, MN) から得た。C a C 12 (0.6 m M) と M g C 12 (1.0 m M) とをともに含有するダルベッコリン酸緩衝食塩水 (pH 7.4) (D P B S 2₊)、ウシ胎児血清 (F B S)、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、Bio Whittaker (Walkersville, MD) から得た。ハンクの均衡塩類溶液 (H B S S) およ

び F - 1 2 K 栄養混合物は、Gibco Laboratories (Grand Island, NY) から得た。高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) 等級の溶媒、および塩化セシウムは、JT Baker (Phillipsburg, NJ) から、購入し、ギ酸メチルは、Eastman Kodak Co (Rochester, NY) から、Sep-Pak C18 カートリッジは、Waters Associates (Milford, MA) から得た。ジアゾメタンは、Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) から購入した N - メチル - N' - ニトロ - N - ニトログアニジンから製造した。N, O - ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) は、Pierce (Rockford, IL) から得た。第一鎖 cDNA 合成キットその他の分子生物学試薬は、Promega (Madison, WI) から得た。オリゴヌクレオチドプライマーは、Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) から購入した。

細胞の単離および培養

ヒト肺癌からのヒト II 型上皮 A549 細胞、およびヒト皮膚繊維芽細胞 (胸部) を、米国基準株コレクション (Rockville, MD) から入手した。A549 細胞系は、ヒト肺胞細胞癌腫が起源であり、容易に査定することができて、組織マクロファージの混入なしに培養で維持できたことから、有用な細胞系であった [Lieber, M. et al. (1976) 「II 型肺胞上皮細胞の特性を有するヒト肺癌腫からの連続的継代腫瘍細胞系 (A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells)」、Int. J. Cancer]。繊維芽細胞は、それらの限られた生存率の枠内で用い、それらの継代数を記録した (結果は、3 ~ 5 代からの細胞について報告した)。上皮 A549 細胞は、T - 75cm² の組織培養フラスコ内に播種し、10% 加熱不活性化 FBS、ペニシリン (50 U/ml) およびストレプトマイシン (50 g/ml) で強化した F - 1 2 K 培地で維持した。ASA その他の投薬を少なくとも 2 週間受けなかった、健康な供与者からのヒト PMN を、Ficoll-Hypaque 勾配遠心分離およびデキストラン沈降によって入手し [Boyum, A. (1986) 「ヒト血液からの単核細胞および顆粒球の単離: 1 g での一回遠心分離による単核細胞の、および遠心分離と沈降との併用による顆粒球の単離 (Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g)」、Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 77-89]、pH7.4 の DPBS₊ に懸濁させた。A549 細胞および PMN の生存率は、トリパンブルーを排除できるそれらの能力によって決定し、それぞれ、95 ± 2 および 97 ± 1 % であった。これらの値は、報告された温置の間、有意に変化することはなかった。

温置条件:

透過性にした A549 細胞 (高速凍結融解サイクルによって調製) に関連する温置の際は、IL - 1 処理した (1 ng/ml、24 時間) A549 細胞 (1.5 × 10⁶ 個/ml) を、担体 (0.1% EtOH)、ASA (500 M で用い続けた)、5 M の 17 - O D Y A、すなわちシトクロム P450 の阻害剤 [Muerhoff, A.S. et al. (1989) 「ウサギ肺でのプロスタグランジン、ならびに脂肪酸の および (- 1) 酸化: 特異的阻害剤としての、アセチレン性脂肪酸の機序に基づく不活性化剤 (Prostaglandin and fatty acid and (- 1) -oxidation in rabbit lung: acetylenic fatty acid mechanism-based inactivators as specific inhibitors)」、J. Biol. Chem. 244: 749-756]、または 5 mM の Rev 5901 異性体、すなわち 5 - L O 阻害剤のいずれかで前処理し、ドライアイス - アセトン浴中での高速凍結と室温での融解との二つのサイクルに付し (全サイクル < 20 分)、DPBS₊ 4 ml 中でアラキドン酸 (20 M) とともに 37 °C で 20 分間温置した。放射能標識したアラキドン酸に関連する実験では、[3H] - アラキドン酸 (0.25 Ci/ml) + 非標識アラキドン酸 (20 M) の添加で、37 °C で 20 分間の温置を開始した。

内在発生源からの 15 - H E T E の生成に関連する時間的経過の実験 (図 2 B 参照) には、無傷の A549 細胞を、IL - 1 (1 ng/ml) に 48 時間まで接触させ、次いで、担体 (0.1% EtOH を含有) または ASA で 20 分間処理した後、HBS 4 ml 中のイオノフォア A23187 (5 μM) を 37 °C で 30 分間加えた。

同時温置の実験では、密集 A549 細胞を、IL - 1 (1 ng/ml、24 時間) に接触させ、HBS 中で洗浄し、37 °C で、担体のみか、または ASA で 20 分間、そしてアラキドン酸

10

20

30

40

50

(20M)で60秒間処理した。同時温置は、A549細胞の単層にPMNを加えた後、HBS 4ml中のイオノフォアA23187(5 μ M)で37 $^{\circ}$ Cで30分間同時刺激することによって実施した。

エイコサノイド類の分析：

温置は、プロスタグランジンB2(200ng)を含有する2容の冷MeOHで停止し、Sep-Pak C18カートリッジを用いて、生成物を抽出した。ギ酸メチル分画中に溶出した材料を、N₂流下で濃縮し、モデル8452の分光光度計(Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA)で紫外吸光性材料を(メタノール中で)走査してから、逆相(RP)-HPLC系に注入した。この系は、二重ポンプ勾配(LKB, Bromma, スウェーデン国)、ダイオードアレー検出器(Hewlett-Packard 1040MシリーズII型)およびHPLC3D ChemStationというソフトウェアで構成された。採集されたUVデータは、300nmで再現して、共役テトラエンを、270nmでトリエンについて、また234nmでモノHETEについて追跡した。UVスペクトルはすべて、0.96秒のサンプリング間隔で、ステップ=4nm、Bw=10nm、およびレンジ=220~360nmを用いて得た。

A549細胞からのモノヒドロキシエイコサノイド類(すなわち、5-、12-および15-HETE)を、Ultrasphere-ODSカラム(5 μ m, 4.6mm \times 25cm)(Beckman Instruments, Fullerton, CA)を用い、1.0ml/分の流量で、第一相(t₀~20分)としてMeOH/H₂O/酢酸(65:35:0.01; v/v/v)で、第二相(20~45分)として線形勾配をMeOH/酢酸(99.9:0.1; v/v)で溶出させて分析した。15-HETEのR-およびS-鏡像異性体を、Hawkinsら(1988)が報告したそれ[Hawkins et al. (1988)「キラル相高圧液体クロマトグラフィーによるヒドロキシエイコサテトラエン酸誘導体の鏡像異性体の分割(Resolution of enantiomers of hydroxyeicosatetraenoate derivatives by chiral phase high-pressure liquid chromatography)」、Anal. Biochem. 173:456-462]に類似のキラルHPLC系を用いて、分割かつ特定した。略述すると、15-HETEのピークの下で溶出するRP-HPLC材料をクロロホルムで抽出し、エーテル性ジアゾメタン処理によってメチルエステルへと転換した後、Bakerbond DNBPG(共有原子価)キラルカラム(5 μ m, 4.6mm \times 25cm)(JT Baker, Phillipsburg, NJ)を用い、0.8ml/分の流量でn-ヘキサン/2-プロパノール(100:0.4; v/v)で溶出させて実施した。示したときは、内在発生源からの15-HETEの生成は、放射性免疫検定(RIA)によって追跡した。抗体は、5-HETEについて50%B/B₀での交差反応性が0.1%である15S-HETE(PerSeptive Diagnostics, Cambridge, MA)に対して誘発した。

A549細胞-PMNからのLX類(LX類および15-エピ-LX類を包含)の分析には、0.6ml/分の流量でMeOH/H₂O/酢酸(60:40:0.01; v/v/v)のアイソクラチック移動相で溶出させるWaters Bondapak C18(3.9 \times 300nm)カラム、または3ml/分の流量でMeOH/H₂O/酢酸(65:35:0.01; v/v/v)で溶出させるAltex Ultrasphere ODSカラム(5 μ m, 10mm \times 25cm)のいずれかを用いて、同時温置を実施した。Sep-Pakカートリッジ抽出物からのMeOH分画中に溶出したペプチドロイコトリエン類(LTC₄およびLTD₄)を、1ml/分でMeOH/H₂O/酢酸(65:35:0.01; v/v/v)、pH5.7で溶出させるBeckman Ultrasphere-ODSカラムを用いて分割した。15R-HETEとのPMNの温置を、MeOHで停止し、Sep-Pak C18抽出生成物のギ酸メチル分画を、3ml/分の流量でMeOH/H₂O/酢酸(65:35:0.01; v/v/v)で溶出させるAltex Ultrasphere ODSカラム(5 μ m, 10mm \times 25cm)に注入した。300nmで吸光するピークの下を、RP-HPLCの後に個別に捕集し、Claria, J. and Serhan, C.N. (1995)「アスピリンは、ヒト上皮細胞-白血球相互作用による従来は記載されていない生体活性エイコサノイドを誘導する(Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interaction)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9475-9479(引用により本明細書に明示的に組み込まれる)のとおり、5971A質量選択的的四重極検出器を備えたHewlett-Packard 5890 GCシリーズII型を用いたガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC-MS)によって分析した。

逆転写(RT)およびPCR：

グアニジニウムイソチオシアナート - 塩化セシウム法によって、総RNAをA549細胞から入手し、RTによって、cDNAを生成した。PGHS - 1およびPGHS - 2 [それぞれ(5'-TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT-3' (センス)、5'-GTG CAT CAA CAC AGG CG C CTC TTC-3' (アンチセンス))ならびに(5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3' (センス)および(5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3' (アンチセンス))]、15 - LO [5'-ATG GGT CTC TAC CGC ATC CGC GTG TCC ACT-3' (センス)および5'-CAC CCA GCG GTA ACA AGG GAA CCT GAC CTC-3' (アンチセンス)]、12 - LO [Funk,C.D.and Fitzgerald,G.A. (1991) 「ヒトの組織中のエイコサノイド形成酵素のmRNA (Eicosanoid forming enzyme mRNA in human tissues)」、J.Biol.Chem.266:12508-12513]、[5'-A GT TCC TCA ATG GTG CCA AC-3' (センス)および5'-ACA GTG TTG GGG TTG GAG AG-3' (アンチセンス)]、ならびに5 - LO [5'-GAA GAC CTG ATG TTT GGC TACC-3' (センス)および5'-AGG GTT CTC ATC TCC CGG-3' (アンチセンス)]の刊行された配列から、オリゴヌクレオチドプライマーを構成した。PGHS - 1、PGHS - 2およびGAPDHの試料を、94 で1分間の変性、58 で2分間のアニーリング、および72 で3分間の伸展の25サイクルの間に増幅した。5 -、12 - および15 - LOは、94 (1分)、55 (2分) および72 (2.5分)で35サイクルの間に増幅した。PCR生成物は、2%アガロースゲル中での電気泳動によって分析し、それらの正体を、制限酵素分析によって追跡した。特異的なPCR増幅された標的を検出するために、0.5Ciの[32P]dCTP(3,000Ci/ミリモル)をPCR混合物に加え、生成物を、Image-Quantというプログラミング(Molecular Dynamics, San Lorenzo, CA)を用い、燐光造影装置(phosphorimager)によって定量した。

10

20

細胞増殖：

微量培養3, (4, 5 - ジメチルチアゾイル - 2 - イル) 2, 5 (ジフェニル - テトラゾリウム = プロミド) (MTT) 検定 [Marshan, N.J., et al. (1995) 「細胞の増殖と機能とを測定するための微量培養テトラゾリウム検定の使用の厳格な査定 (A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assay to measure cell growth and function)、Growth Regul. 5:69-84] を用いて、細胞増殖に対するLXその他のエイコサノイド類の作用を調べた。指数相の維持培養からのA549細胞および繊維芽細胞を、100 μ lの体積の培養液中で計数し、複製用96穴培養プレート内に分与した (~2,000個/ウェル)。37 で24時間の後、培養液を除去し、化合物 (5 ~ 1,000nM) または担体 (培養液 + 0.15% エタノール) のいずれかを含有する新鮮培養液 (100 μ l) を、調べた各条件につき4個の複製体に加え、次いで、培養プレートを5%のCO₂雰囲気中、37 で96まで温置した。この期間の終点で、HBS S中の直前に調製したMTT 25 μ l (5mg/ml) をウェルに加え、プレートを37 で4時間温置した。色素溶液を吸引し、HBS Sでウェルを1回洗浄し、細胞に摂取された色素を、イソプロピルアルコール : 1規定HCl (96 : 4、v/v) 100 μ lに抽出し、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Menlo Park, CA) を用いて570nmで定量した。いくつかの実験では、細胞を12穴培養プレートで増殖させ、上記のとおり処理し、ノイバウエル血球計算盤を用いて計数した。生存率は、トリパンブルー - 排除検定を用いて定型的に査定した。A549細胞および繊維芽細胞については、示した実験の範囲内では、MTT値および細胞数に関して線形の関係が確立された ($r = 0.995$ 、 $P < 0.005$)。化合物 (5 ~ 1,000nM) または担体 (0.1% EtOH) の存在下で72時間増殖させたA549細胞を、0.25規定NaOHで溶解し、ウシ血清アルブミンを標準として用いるBio-Rad (Richmond, CA) の微量検定法を適用することによって、細胞性タンパク質含量を決定した。休止A549細胞での平均の細胞タンパク質含量は、 46.6 ± 1.5 pg/細胞であった。

30

40

チミジン取込みおよびDNA合成：

A549細胞 (~2 x 10⁴個/ml) を96穴プレートに播種し、24時間定着させ、化合物 (5 ~ 1,000nM) または担体 (培養液 + 0.1% エタノール) の存在下で更に72時間増殖させた。検定の24時間前に、2 Ci/mlのメチル - [3H]チミジン (比活性6.7Ci/ミリモル) を各ウェルに加えた [Cybulsky et al. (1992) 「エイコサノイド類は、系球体上皮細胞におけ

50

る表皮増殖因子受容体の活性化と増殖とを高める」(Eicosanoids enhance epidermal growth factor receptor activation and proliferation in glomerular epithelial cells)、Am.J.Physiol.262(Renal Fluid Electrolyte Physiol.31):F639-F646参照]。瞬間標識した後、各ウェルを冷D P B S₂で4回洗浄し、NaOH(0.25規定)で細胞を溶解し、放射能を測定した。統計的解析にはスチューデントのt検定を用い、差は、P値(0.05)で有意であると見なした。

結果

エイコサノイドは、PGHSまたはLO酵素経路によるアラキドン酸の初期酸化によって形成される[Samuelsson,B.et al.(1987)「ロイコトリエン類およびリポキシン類：構造、生合成および生物学的効果(Leukotrienes and Lipoxins:structures,biosynthesis,and biological effects)」、Science 237:1171-1176]。A459細胞では、エイコサノイド生成酵素のいずれが存在し、かつ/またはサイトカインによって調節されるのかを査定するため、IL-1の存在または不在で増殖させたA549細胞からのPGHS-1および-2、ならびに5-、12-および15-LOのmRNAレベルを、RT-PCR、次いで燐光造影装置での分析によって追跡した。図1Aに示したとおり、PGHS-2についてのmRNAレベルは、IL-1によるA549細胞の刺激の後、有意に上昇した(～2倍)。対照的に、PGHS-1および5-LOについてのmRNAレベルは、サイトカインへの細胞の接触後も有意に変化しなかった(図1A)。A549細胞は、サイトカイン誘導の前後に15-または12-LOのいずれの発現も示し得なかった(図1A)。A549細胞における15-LO mRNAの不在は、それぞれ、15-LO mRNAの陽性および陰性の供給源であることが公知の、ヒト肺組織および末梢血単球のRNAに並行してRT-PCRを実施することによって、更に確認された[Funk,C.D.and FitzGerald,G.A.(1991)「ヒトの組織中のエイコサノイド形成酵素のmRNA(Eicosanoid forming enzyme mRNA in human tissues)」、J.Biol.Chem.266:12508-12513参照](図1Aの挿図を参照されたい)。

気道上皮細胞が生産するモノヒドロキシ生成物の様相を特性記述するため、IL-1で刺激したA549細胞(1.5×10⁶個/ml)を、透過性にさせ、アラキドン酸と温置し、形成された生成物を、RP-HPLCによって抽出かつ分析した。クロマトグラフィー像は、合成15-HEETEと同時に溶出した、234nmで強いUV吸光を有する主生成物の存在を明らかにした。また、[3H]-アラキドン酸をIL-1処理したA549細胞に加えたとき、放射能標識された材料が、15-HEETEと同時に溶出するピークの下で回収された(図1B)。これらの実験では、5-または12-HEETEのいずれの形成も、一貫して観察されなかった。A549細胞のASA処理は、15-HEETEの形成の顕著な増加へと導いたが、17-ODYA、すなわちP450によるエイコサノイド代謝の報告された阻害剤[Muerhoff,A.S.et al.(1989)「ウサギ肺でのプロスタグランジン、ならびに脂肪酸の(ω-1)酸化：特異的阻害剤としての、アセチレン性脂肪酸の機序に基づく不活性化剤(Prostaglandin and fatty acid (ω-1)-oxidation in rabbit lung:acetylenic fatty acid mechanism-based inactivators as specific inhibitors)」、J.Biol.Chem.244:749-756]との透過性にさせたA549細胞の温置は、15-HEETEの～50%低下を招いた(図2A)。17-ODYAは、P450によるエイコサノイド代謝の強力な阻害剤であり、シクロオキシゲナーゼまたはLOのいずれの活性も選択的に阻害しない[Muerhoffら、および供給業者の支援資料参照]。5-LO阻害剤(Rev-5901異性体)は、A549細胞が生産する15-HEETEの量を、統計的有意な様式では変化させなかった。熱変性させたA549細胞は、15-HEETEの量を～90%減少させ、その形成における酵素的成分を示唆した。アラキドン酸塩の内在発生源からの15-HEETEの生成は、IL-1(1ng/ml)で24時間処理したA549細胞からも得られた(25.0±10.0ng/107個)。考え合わせると、これらの結果は、15-HEETEが、A549細胞が生成する主要なモノヒドロキシ生成物であることを示し、アセチル化されたPGHS-2およびシトクロムP450が、それぞれ、この生合成に寄与することを示唆する。

アラキドン酸塩の内在発生源からの15-HEETEの生成の時間的経過を調べるため、無傷

10

20

30

40

50

のA549細胞を、48時間までIL-1 (1 ng/ml)に接触させ、細胞上清中に存在する免疫反応性15-HETEの量を、特異的RIAを用いて追跡した。休止状態では、A549細胞は、有意レベルの免疫反応性15-HETEを生産した(19.1±10.5ng/107個、n=3、d=2)。これらの値は、IL-1の不在下でのイオノフォアA23187(5 M)の添加によって変化しなかった(図2B)。また、イオノフォア刺激の不在下では、A549細胞への48時間までのIL-1の添加は、15-HETEの生成の増加を招かなかった(図2B)。極めて対照的に、IL-1の添加+A549細胞のA23187による刺激は、15-HETEの生産の顕著な増大へと導いた(図2B)。最高レベルは、サイトカインへの接触の24時間に見出され、その後、15-HETEのレベルは低下した。

A549細胞が生産する15-HETEにおけるアルコールの立体化学に関心が持たれたため、IL-1で処理したA549細胞によって生成された15-HETEのRおよびS鏡像異性体の個々の相対量を、キラル相HPLC分析[方法の項参照]を用いて調べた。PGHS-2は、シトクロムP450とともに、アラキドン酸をそれぞれ15-HETEへと転換できる15-LO以外の酵素である。ASAでアセチル化されたPGHS-2に由来する15-HETEは、その炭素(C)-15のアルコール基を、主にR立体配置で有する[Holtzman, M.J. et al. (1992)「培養上皮細胞での薬理的に明確なプロスタグランジンH合成酵素の同定(Identification of a pharmacologically distinct prostaglandin H synthase in cultured epithelial cells)」、J.Biol.Chem.267:21438-21445]。ここで、IL-1で起動されたA549細胞が生産する15-HETEを、そのメチルエステルへと転換し、SP-HPLCキラル分析に付した。活性化されたA549細胞からの15-HETEは、65%がR、35%がSの立体配置にあった(図3)。ASAでのA549細胞の前処理(20分、37℃)は、15R-HETEの量の3倍の増加を招いたのに対し、15S-HETEの形成は、不変のままであった(図3)。ASAの存在下では、15R-HETEは、A549細胞が生産した15-HETE生成物の総量の85%を占めた。これらの結果は、ASAの存在下で、IL-1で起動されたA549細胞によって生成された15-HETEの大部分が、R立体配置であったことを示す。

経細胞エイコサノイド生合成は、脂質メジエーターの増幅とともに、新たなメジエーターの生成の重要な手段である[Marcus, A.J. (1995)「結直腸癌に対する予防としてのアスピリン(Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer)」、New Engl. J. Med. 333:656-658]。ASA処理後のヒト内皮細胞およびPMNの同時刺激は、新たな分類群の生体活性エイコサノイドの形成を招く[Claria, J. and Sehan, C.N. (1995)「アスピリンは、ヒト上皮細胞-白血球相互作用による従来は記載されていない生体活性エイコサノイドを誘導する(Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interaction)」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:9475-9479]。これらの新規エイコサノイド類は、15-エピ-LXとして特定され、それらの生合成は、ASAで誘発された内皮由来の15R-HETEの、白血球による変換を伴う。これらの結果からして、経細胞生合成による新規エイコサノイドの形成は、上皮細胞-PMN相互作用の際にも生じることがあり得る。この仮説を検証するため、密集A549細胞を、IL-1(1 ng/ml、24時間)に接触させ、ASAで処理し、PMNで同時刺激した。図4Aは、ASAに接触させた、刺激された細胞から得られた材料の代表的なHPLC像を示し、300nmでプロットしたときに強いUV吸光度を有する4種類の主生成物の存在を明らかにした。これらの生成物のオンラインでのスペクトル解析は、それらが、それぞれ、LXの基本構造を示す、共役テトラエン含有発色団に特徴的な三重線の吸光帯域を示した(301nmでの最大値、ならびに288および316±2 nmでの肩)(図4Bおよび4C)。

合成標準との同時溶出と、特徴的発色団の存在とに基づき、LXA4および15-エピ-LXA4をクロマトグラフィー像で特定した。これらの同時温置では、15-エピ-LXA4は、検出されたLXA4の総量の~88%を占めたが、それは、ASAに接触してIL-1で起動されたA549細胞によって生成された15-HETEの大部分が、主としてR立体配置であったという所見と一致する(図3、ならびに4A、4Bおよび4C参照)。このRP-HPLC系では、15-エピ-11-trans-LXA4およびLXB4が、11-trans-LX

10

20

30

40

50

A4および15-エピ-LXB4と同じく同時溶出した(図示せず)。これらのLX異性体は、HPLCによってはそれ以上分割されず、像では、それぞれ、ピークAおよびBとして標識されたピークの下に示されている(図4A)。ピークAおよびBの下の化合物は、OTMS、すなわちGC-MSでのメチルエステル誘導体として確かに分割された(下記に示す)。生成物は、~8:2の比率でそれらの15Rエピマーに優勢に存在した(n=3)。化合物C(図4A)は、従来特定されたLX類のいずれとも同時溶出せず、15R-HEETEとともに温置した活性化PMNからのEP-HPLC像にも存在した(データ示さず、n=5)。化合物Cの下に溶出する材料は、内皮細胞-PMN相互作用から最近単離された化合物IIIの物理的特性に適合した[Clarica, J. and Serhan, C.N. (1995)「アスピリンは、ヒト上皮細胞-白血球相互作用による従来は記載されていない生体活性エイコサノイドを誘導する(Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interaction)」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:9475-9479]。化合物Cの完全な立体化学は、決定待ちであるが、UVスペクトルのデータ、およびクロマトグラフィーでの移動度は、それが7-cis-11-trans-LXA4の15-エピマー形態であり得ることを示唆する[Nicolaou, K.C. et al. (1989)「ヒト好中球によって生成される新規7-cis-11-transリポキシンA4の特定:全合成、痙攣誘発活性、およびLXA4およびB4のその他の幾何学的異性体との比較(Identification of a novel 7-cis-11-trans lipoxin A4, generated by human neutrophils: total synthesis, spasmogenic activities and comparison with other geometric isomers of LXs A4 and B4)」、Biochim.Biophys.Acta 1003:44-63]。したがって、ASA処理後の上皮(A549細胞)-PMN同時刺激の際に生成されるLX類は、主として15-エピ-LXであった(図4A)。

LXを生産できることに加え、A549細胞との活性化PMNの同時温置も、ASAの不在下で、有意量(テトラエンを有するLXより~8倍)のペプチドロイコトリエン(pLT; LTC4およびLTD4)を生成する(図5Aおよび5B)。これらの同時温置の際に生成されるLXおよびpLT双方の量は、個々の細胞の比に依存する(図5Aおよび5Bの挿図)。PMNの添加前のASAへの気道上皮A549の接触(20分)は、LXの形成の増大、およびpLTの減少へと導く(図5Aおよび5B)。別個に温置したPMNまたはA549細胞は、いずれも、ASAの存在または不在下で、検出できるレベルのLXまたはpLTを生成しない(図5Aおよび5B、ならびに示さなかったデータ)。考え合わせると、これらの結果は、A549細胞-PMN相互作用の際に、LXとpLTとは、双方とも、経細胞の経路に起源があることを示す。

LXは、血管拡張剤であり、白血球の応答、例えば走化性、内皮細胞への接着、および上皮越しの移行を阻害する、強力な調節剤である[Serhan, C.N. (1994)「リポキシン生合成、および炎症および血管の事象におけるその影響(Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events)」、Biochim.Biophys.Acta 1212:1-25参照]。対照的に、pLTは、血管収縮剤と炎症推進との双方の作用を有するばかりでなく、繊維芽細胞、平滑筋および糸球体上皮細胞を包含するいくつかの細胞型の増殖を刺激する[Baud, L. et al. (1985)「ロイコトリエンC4は、ヒト糸球体上皮細胞に結合し、in vitroでのそれらの増殖を促進する(Leukotrien C4 binds to human glomerular epithelial cells and promotes their proliferation in vitro)」、J.Clin.Invest.76:374-377]。LXは、ラットの腎血液動態におけるLTD4の血管収縮剤作用を逆転し、LTC4で刺激される造血を阻害する[Serhan, C.N. (1994)「リポキシン生合成、および炎症および血管の事象におけるその影響(Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events)」、Biochim.Biophys.Acta 1212:1-25]。ASAは、15-エピ-LX形成を促進し、pLT生合成を阻害する(図5Aおよび5B)ため、これらのエイコサノイドは、ヒトの癌において、細胞増殖に対する逆調節作用を果たし、ASAの防護機序に寄与する可能性がある。そのため、これらのLO生成物の上皮細胞増殖に対する効果(図6Aおよび6B)を試験し、それらの作用を、可溶性微量培養テトラゾリウム(MTT)検定[Alley, M.C., et al. (1988)「微量培養を用いた、ヒト腫瘍細胞系のパネルに

10

20

30

40

50

よる薬物スクリーニングの実施可能性 (Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay)」、Cancer Res.48:589-601]を用いて、十分に確立された阻害剤であるデキサメタゾンのそれと比較した。これらの実験は、これらの細胞が生産する主要LXである15-エピ-LXではなく、生物検定に十分な量で入手できる合成LXA4およびLXB4で実施した。図6Aおよび6Bに示したとおり、LXA4およびLXB4は、A549細胞の増殖を、時間(A)および用量(B)に依存する様式で阻害した。LXA4およびLXB4は、デキサメタゾン[1μM]と同様に、処理の72~96時間後にA549細胞の増殖を阻害した(図6A)。72時間後には、LXA4は、これらの細胞でデキサメタゾンについて観察された抗増殖特性を共有した(図6A)[Croxtall,J.D.and Flower,R.J.(1992)「リポコルテンIは、A549肺線癌細胞系のデキサメタゾンで誘導される増殖の停止を仲介する(Lipocortin I mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line)」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3571-3575参照]。LXA4についての半最大阻害値(IC50)は、デキサメタゾンの~7nMであるそれと比較して、~80nMであった。0.5および1μMの濃度でのLXB4は、LXA4またはデキサメタゾンのいずれより3倍も活性であった(図6B)。興味深いことに、LXA4とLXB4とは、ともに、それぞれを連続3日間細胞に反復的に(すなわち24時間間隔で)加えたとき、A549細胞の増殖を阻害する基本的に等しい効力を示し(データ示さず、n=3、d=4)、LXがこれらの上皮細胞によって不活性化され得ることを示唆する。細胞の直接計数を用いた追加の実験(図7B)、および総細胞性タンパク質含量の測定(データ示さず、n=3、d=4)からの結果は、MTT検定で得られたものと平行し、したがって、A549細胞におけるLXの抗増殖作用を確認した。その上、3H-チミジン取込みによって決定した限りでのDNA合成の阻害が、A549細胞を50nMもしくはそれ以上の濃度のLXB4またはデキサメタゾンに72時間接触させたときに生じた(図7A)。化合物とのA549細胞の温置後は、トリパンプルー排除検定によって決定した限りでの細胞の生存率は、~98%であることが見出され、これらの化合物が、これらの実験で用いた濃度範囲内では細胞に有害ではないことを示した。LXA4およびLXB4の15-ヒドロキシエピマー形態(それぞれ15-エピ-LXA4および15-エピ-LXB4)は、これらの細胞から単離されたLXの支配的形態であったが、下記の表1に示したとおり、やはり上皮細胞増殖の強力な阻害剤であると判明した。

表1：細胞増殖に対するLXおよび15-エピ-LXの作用

化合物 [10 ⁻⁷	阻害の%	P値*
担体	1.6±10.3	NS
LXA4	16.3±5.2	NS
15-エピ-LXA4	20.1±1.9	<0.025
LXB4	30.0±8.5	<0.005
15-エピ-LXB4	79.3±0.3	<0.001&
デキサメタゾン	42.1±5.4	<0.005

細胞(A549細胞2,000個/ウェル)は、96穴プレートで増殖させ、担体(EtOH/F-12K培溶液中に0.15体積%)、または等モル濃度(10⁻⁷M)のLXA4、15-エピ-LXA4、LXB4、15-エピ-LXB4もしくはデキサメタゾンに37℃で72時間接触させた。値は、四重に実施した3~7回の実験からの±SEMを表わし、細胞増殖の阻害の%として表現されている。*P値は、細胞のみと比較した限りでの統計的な差を意味する。&15-エピ-LXB4についてはP<0.001。

等モルレベル(100nM)では、15-エピ-LXA4は、A549細胞の増殖をLXA4と同様の程度にまで阻害した。一方、活性化されたPMNによる15R-HETEの転換から単離し、A549細胞に戻して加えた15-エピ-LXB4は、LXB4より強い抗増殖活性を示した

(~ 34% の増殖阻害に対して ~ 80%、 $P < 0.001$; 表 1)。この化合物を、U V、H P L C および G C - M S によって特性記述した (C 値 : 23.3)。O T M S メチルエステルについての特徴的イオンは、 m/z 173 (基本ピーク)、203、289、379、および 482 での比較的卓越しないイオンであった (M_+ - 100) [その量の不足のため、分子イオンを得ることはできなかった]。したがって、図 4 B で B と標識されたピークの下での支配的材料は、15 - エピ - L X B 4 のそれと整合して、より短い C 値を示し、L X B 4 から O T M S、すなわち G C - M S 分析でのメチルエステルとして分離された。15 - エピ - L X B 4 および L X B 4 の質量スペクトルは、基本的に同一であった (示さず) が、それらの C 値は、別個であった。C として示したピークの下で溶出する (15 R - H E T E と温置した活性化 P M N から単離された) 材料も、上皮細胞の増殖に対する穏やかな阻害作用を示した ($18.2 \pm 2\%$ の増殖阻害、 $n = 3$ 、 $d = 4$)。極めて対照的に、それぞれ 10 \cdot 6 ~ 10 \cdot 9 M で試験した 15 - エピ - trans - L X A 4、11 - trans - L X B 4、8、9 - アセチレン性 L X B 4、ペプチドロイコトリエン (L T C 4 および L T D 4)、ならびに L X 前駆体 (15 S - および 15 R - H E T E) は、A 549 細胞の増殖を有意に阻害することができなかった (データ示さず、 $n = 3 \sim 5$ 、 $d = 4$)。これらの結果は、L X および 15 - エピ - L X が、A 549 細胞で細胞増殖を阻害する際に立体選択的作用を与えることを示す。L X A 4 および L X B 4 をヒト皮膚繊維芽細胞で試験して、それらがこの細胞型に対して抗増殖性であるか否かを決定した。10 \cdot 0 nM では、L X A 4 と L X B 4 とは、ともに、繊維芽細胞の増殖を阻害した。L X B 4 は、38.0 を示し (7.5% の阻害)、L X A 4 は、10.7 を示して (1.8%)、正の対照としてのデキサメタゾン (29.7 (0.4%)) と対比される ($n = 3$)。

ヒト気道の A 549 細胞における活性シクロム P 450 酵素系の存在 [Vogel, et al. (1994) 「形質転換性成長因子 1 は、ヒト肺癌の A 549 細胞での T C D D で誘導されるシクロム P 450 I A 1 の発現を阻害する (Transforming growth factor- 1 inhibits TCDD-induced cytochrome P450 I A 1 expression in human lung cancer A549 cells)」、Arch.Toxicol. 68:303-307] は、P 450 の阻害は、熱変性と同様に、これらの細胞での 15 - H E T E 生成を阻害するという結果 (図 2 A) と相俟って、上皮細胞におけるこの酵素系も、15 - H E T E の生成、および経細胞経路による 15 - エピ - リポキシンの生成に寄与することを示唆する (図 8)。考え合わせると、これらの所見 (図 1 ~ 4) は、気道上皮細胞 - P M N 相互作用の際に、15 - エピ - リポキシンの形成を始動できる (図 8) 二つの別個の酵素性経路 (すなわち、A S A - アセチル化 P G H S - 2 およびシクロム P 450) の存在を確定する。また、A S A が P 450 酵素を誘導できることからして [Pankow, D. et al. (1994) 「アセチルサリチル酸 - それはシクロム P 450 2E1 の誘導物質か (Acetylsalicylic acid-inducer of cytochrome P-450 2E1?)」、Arch.Toxicol. 68:261-265]、これら二つの独立した経路は、共同で作用して、15 - エピ - リポキシンを生成し得るという可能性があることに注目しなければならない。

等価のもの

当業者は、定型の実験以上のものを用いずに、本明細書に記載の特定の手順と等価の無数のものを認識するか、または確認できると思われる。そのような等価のものは、本発明の対象範囲内にあると見なされ、下記のクレームによって網羅される。

10

20

30

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL
- (B) STREET: 75 FRANCIS STREET
- (C) CITY: BOSTON
- (D) STATE: MASSACHUSETTS
- (E) COUNTRY: US
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 02115
- (G) TELEPHONE:
- (H) TELEFAX:

10

(ii) TITLE OF INVENTION: LIPOXIN COMPOUNDS AND THEIR USE IN
TREATING CELL PROLIFERATIVE DISORDERS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 12

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

- (A) ADDRESSEE: LAHIVE & COCKFIELD, LLP
- (B) STREET: 28 STATE STREET
- (C) CITY: BOSTON
- (D) STATE: MASSACHUSETTS
- (E) COUNTRY: USA
- (F) ZIP: 02109-1875

20

(v) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: PCT/US97/
- (B) FILING DATE:
- (C) CLASSIFICATION:

30

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: US 08/712,610
- (B) FILING DATE: 13-SEPTEMBER-1996

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: DECONTI, GIULIO A., JR.
- (B) REGISTRATION NUMBER: 31,503
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: BWI-112C2PC

40

(x) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: (617)227-7400
- (B) TELEFAX: (617)742-4214

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 24 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 10
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:
 TGCCCAGCTC CTGGCCCCGCC GCTT
 24
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 24 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- 20
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: YES
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:
 GTGCATCAAC ACAGGCGCCT CTC
 24
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:
- 30
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 27 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- 40
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:
 TTCAAATGAG ATTGTGGGAA AATTGCT
 27
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 24 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: YES
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4: 10
- AGATCATCTC TGCCTGAGTA TCTT 24
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 30 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear 20
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:
- ATGGGTCTCT ACCGCATCCG CGTGTCCACT 30
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6: 30
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 30 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
- (iv) ANTI-SENSE: YES
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6: 40
- CACCCAGCGG TAACAAGGGA ACCTGACCTC 30
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:
- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

10

AGTTCCTCAA TGGTGCCAAC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

20

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

ACAGTGTGG GGTGGAGAG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

40

GAAGACCTGA TGTTGGCTA CC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 18 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

AGGGTTCTCA TCTCCCGG

10

18

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

20

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

CCACCCATGG CAAATTCAT GGCA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

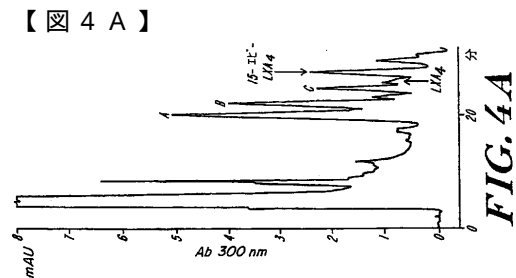
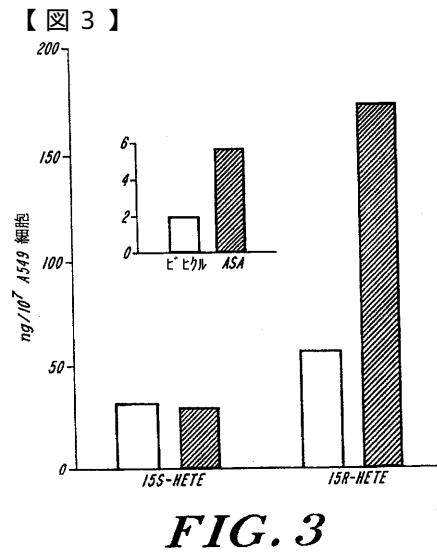
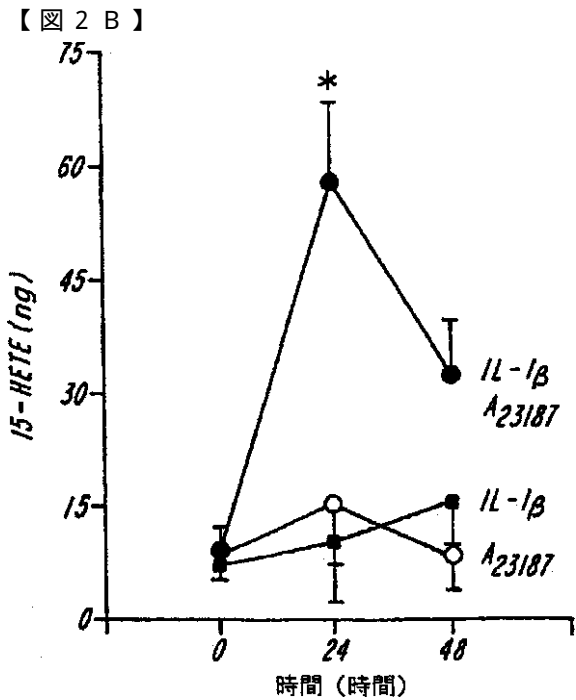
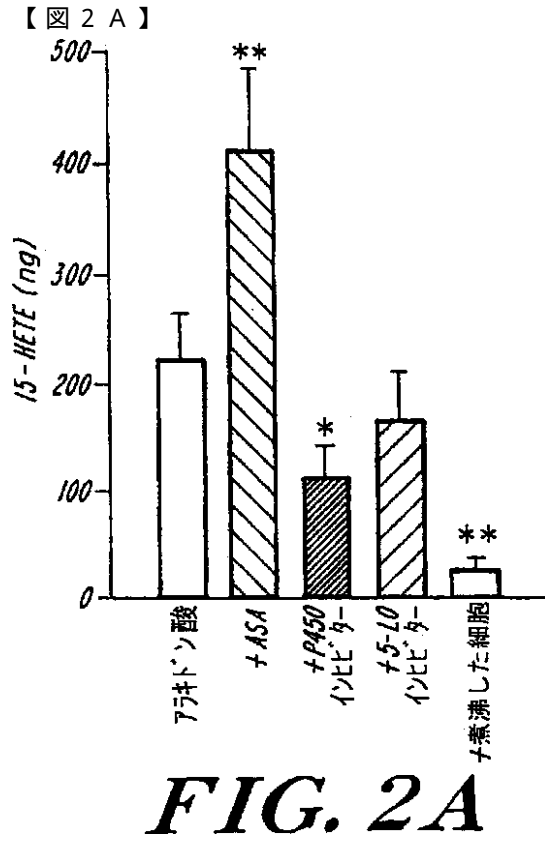
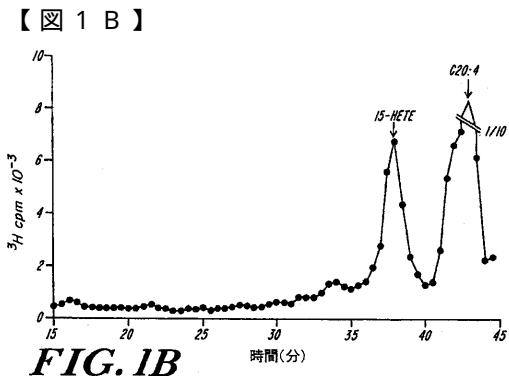
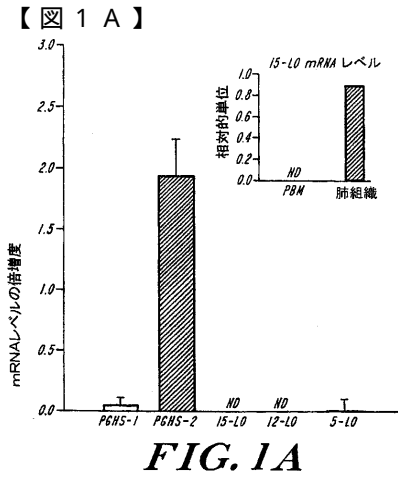
(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

TCTAGACGGC AGGTCAGGTC CACC

40

24



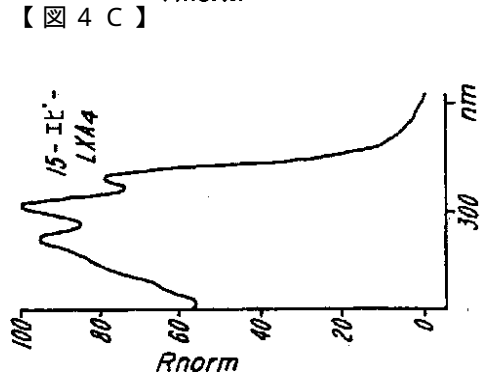
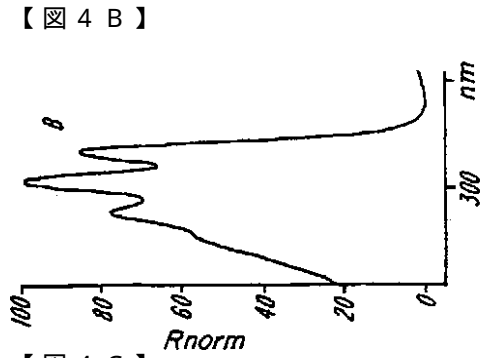
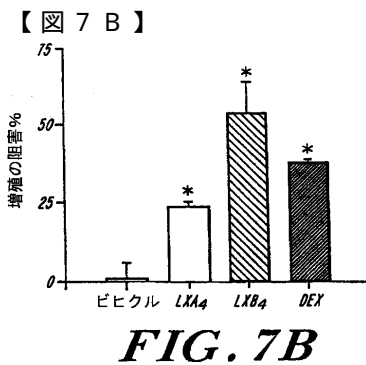
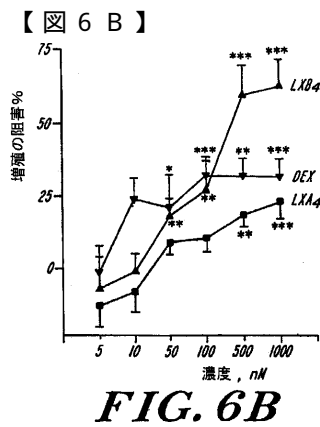
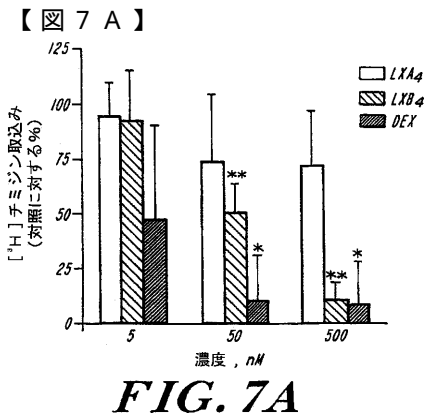
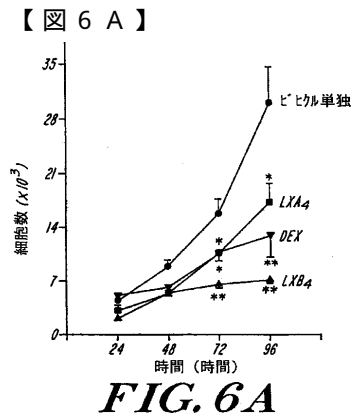
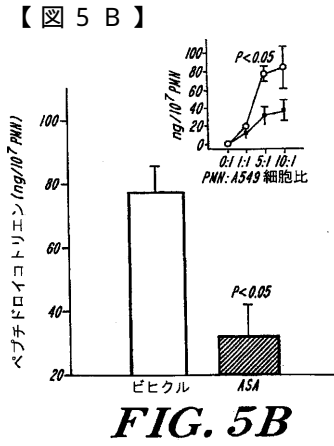
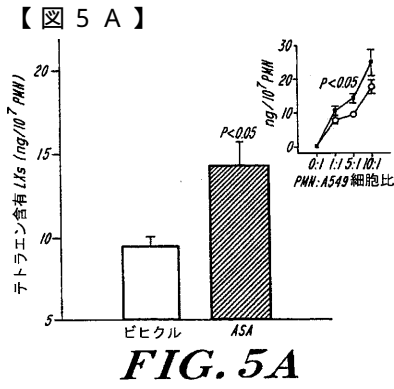


FIG. 4C FIG. 4B



【 図 8 】

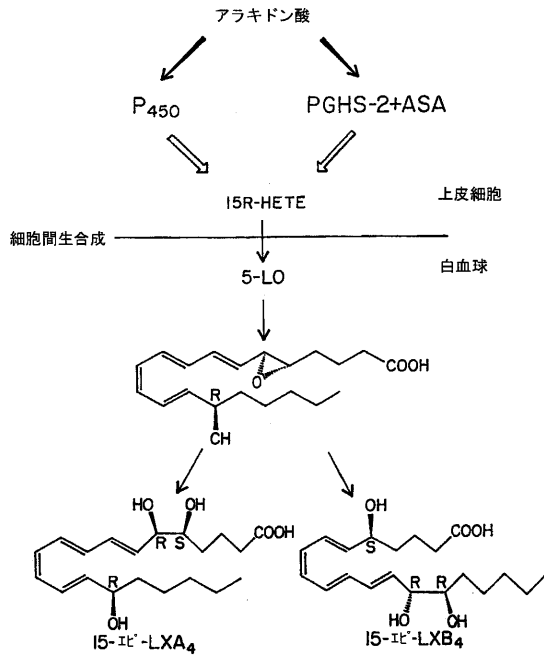


FIG. 8

フロントページの続き

審査官 井上 千弥子

(56)参考文献 国際公開第94/029262(WO, A1)

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995), 92(21), 9475-9

Biochemistry (1995), 34(44), 14609-15

Zhurnal Organicheskoi Khimii (1991), 27(4), 798-802

Molecular Medicine, Vol.2, No.5, September 1996, pp583-596

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 59/42

CA(STN)

REGISTRY(STN)