

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5042411号  
(P5042411)

(45) 発行日 平成24年10月3日 (2012. 10. 3)

(24) 登録日 平成24年7月20日 (2012. 7. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/565 (2006. 01)

A 6 1 K 31/565

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

A 6 1 P 35/00

C O 7 J 1/00 (2006. 01)

C O 7 J 1/00

請求項の数 5 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2000-614980 (P2000-614980)  
 (86) (22) 出願日 平成12年4月28日 (2000. 4. 28)  
 (65) 公表番号 特表2002-543114 (P2002-543114A)  
 (43) 公表日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2000/001661  
 (87) 国際公開番号 W02000/066095  
 (87) 国際公開日 平成12年11月9日 (2000. 11. 9)  
 審査請求日 平成19年3月1日 (2007. 3. 1)  
 (31) 優先権主張番号 9910166. 9  
 (32) 優先日 平成11年4月30日 (1999. 4. 30)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 60/139, 520  
 (32) 優先日 平成11年6月16日 (1999. 6. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500232695  
 ステリックス リミテッド  
 イギリス国 エスエル1 3 エックスイー  
 パークシャー, スラウ, パス ロード  
 1 9 0  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72) 発明者 リード, マイケル ジョン  
 イギリス国 ダブリュー1 3 8 ビーゼット  
 ト ロンドン, ウィンボーン ガーデン  
 ズ 4 2

最終頁に続く

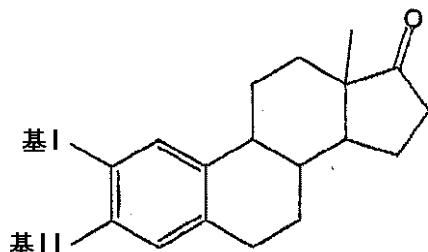
(54) 【発明の名称】 抗腫瘍剤としてのエストロン誘導体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

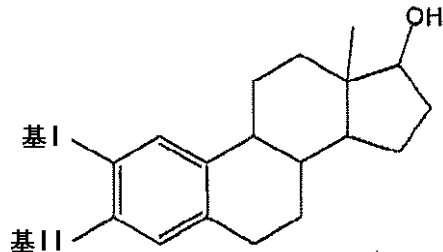
【請求項 1】

エストロゲン非依存性の腫瘍を処置するための薬物の製造における化合物または薬学的に活性なその塩の使用であって、ここで、該化合物は、以下の式：

【化 1】



または

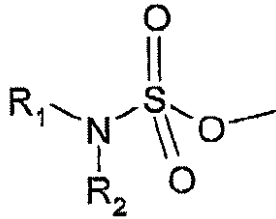


であり、

ここで、基 I が、C<sub>1</sub> - 6 アルキル基または C<sub>1</sub> - 6 アルコキシ基であり；そして

ここで、基 I I が、以下の式：

## 【化 2】



であり、

ここで、 $R_1$  および  $R_2$  の各々が、独立して、H またはアルキル、シクロアルキル、アルケニル、およびアリールから選択されるか、あるいは一緒にアルキレンを表し、そのまたはそれぞれのアルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルは、必要に応じて、1 つ以上のヘテロ原子またはヘテロ基を含む、

10

使用。

## 【請求項 2】

前記基 I が、メトキシ基である、請求項 1 に記載の使用。

## 【請求項 3】

前記化合物が、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメートである、請求項 2 に記載の使用。

## 【請求項 4】

前記基 I がエチル基である、請求項 1 に記載の使用。

20

## 【請求項 5】

前記化合物が、2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメートである、請求項 4 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、方法および使用に関する。詳細には、本発明は、医薬の製造のための方法に関する。

## 【0002】

「Molecular Cell Biology」第 3 版 Lodish ら、177 - 181 頁において議論されるように、異なる真核生物細胞は、全く異なる速度で増殖および分裂し得る。例えば、酵母細胞は、120 分毎に分裂し得、そしてウニおよび昆虫の胎児性細胞における受精卵の最初の分裂には 1530 分しかかからない。なぜならば 1 つの大きな予め存在する細胞が細別され (subdivided) ているからである。しかし、大部分の増殖する植物および動物細胞は、数が倍増するのに 10 ~ 20 時間かかり、そしてより遅い速度で二倍になるものもある。成体における多くの細胞 (例えば、神経細胞および横紋筋細胞) は、全く分裂せず; 線維芽細胞のような創傷を治癒する際に補助する他の細胞は、要求に応じて増殖するが、そうでなければ休止している。

30

## 【0003】

それにもかかわらず、分裂する全ての真核生物細胞は、2 つの娘細胞に等しい遺伝物質を寄与する準備ができていなければならない。真核生物細胞における DNA 合成は、細胞分裂周期の全体を通して起こらないが、細胞分裂の前の一部に限られる。

40

## 【0004】

真核生物細胞 DNA 合成と細胞分裂との間の関係は、全て増殖および分裂し得る哺乳動物細胞の培養において分析されている。細菌と対照的に、真核生物細胞は DNA 合成にはほんの一部の時間しか費やさず、細胞分裂 (有糸分裂) が完了するまで数時間であることが見出されている。従って、時間の間隔が、DNA 合成後と細胞分裂との間に存在し; 別の間隔が分裂後と DNA 合成の次の回の前の間に存在することが見出された。この分析により、真核生物細胞周期は、M (有糸分裂) 段階、 $G_1$  段階 (第 1 の間隔)、S (DNA 合成) 段階、 $G_2$  段階 (第 2 の間隔)、そして M に戻る段階からなるという結論が導かれた。有糸分裂の間の段階 ( $G_1$ 、S および  $G_2$ ) は、まとめて分裂間期として公知である。

50

## 【0005】

組織における多くの非分裂細胞（例えば、全ての休止繊維芽細胞）は、有糸分裂後かつDNA合成の直前に周期を阻止し；このような「休止」細胞は、細胞周期から外れてG<sub>0</sub>段階にあるといわれる。

## 【0006】

蛍光活性化細胞ソーター（FACS）を使用してその細胞の相対的DNA含有量を測定することにより、細胞周期の3つの分裂間期段階のうちの1つにある細胞を同定することが可能であり；G<sub>1</sub>（DNA合成前）にある細胞は、規定量xのDNAを有し；S（DNA複製）の間は、xと2xとの間であり、そしてG<sub>2</sub>（またはM）のときは2xのDNAである。

10

## 【0007】

動物細胞における有糸分裂および細胞質分裂の段階は、以下の通りである。

## 【0008】

（a）分裂間期。分裂間期のG<sub>2</sub>段階は、有糸分裂の開始の直前である。染色体DNAは複製され、そしてS段階の間にタンパク質に結合されるが、染色体はまだ明確な構造としては見られない。核は、光学顕微鏡の下で見ることができる核基礎構造である。DNA複製前の二倍体細胞において、各型の2つの形態学的染色体が存在し、そしてこの細胞は、2nであるといわれる。G<sub>2</sub>において、DNA複製後、この細胞は4nである。各染色体DNAの4つのコピーが存在する。姉妹染色体は、まだ互いに分離していないので、これらは姉妹染色分体と呼ばれる。

20

## 【0009】

b）初期前期。中心小体（各々が新しく形成された娘中心小体を有する）は、細胞の反対の極に向かって移動し始め；染色体は、長い糸として見られ得る。核膜は、小さいベシクルに分解し始める。

## 【0010】

（c）中前期および後前期。染色体圧縮が完了し；各可視染色体構造は、セントロメアで共に保持された2つの染色分体からなる。各染色分体は、新しく複製された2つの娘DNA分子のうちの1つを含む。微小管紡錘は、中心小体の直ぐ隣の領域から広がり始め、これらが極の近くに移動する。いくつかの紡錘糸は、極から極に達し；大部分は染色分体に延びてそして動原体で結合する。

30

## 【0011】

（d）中期。染色体は、細胞の赤道に向かって移動し、ここで赤道面に整列する。姉妹染色分体は、まだ分裂していない。

## 【0012】

（e）後期。2つの姉妹染色分体は、独立した染色体に分離する。各々紡錘糸により1つの極に連結されるセントロメアを含み、その極に移動する。従って、各染色体の1つのコピーは、各娘細胞に寄与される。同時に、細胞は細長くなり、同様に極から極へ紡錘も細長くなる。細胞質分裂は、分割溝が形成し始めるときに始まる。

## 【0013】

（f）終期。新しい膜が娘核の周りに形成し；染色体がほどけて、そしてより明瞭でなくなり、核は、再び見えるようになり、そして核膜は、各娘核の周りに形成する。細胞質分裂は、ほとんど完了し、そして紡錘は微小管および他の繊維が解重合する（depolymerise）ときに消える。有糸分裂の全体を通して、各極において「娘」染色分体は、全長になるまで生長する。終期において、元々の中心小体の各々の複製が完了し、そして新しい娘染色分体が、次の分裂間期の間に生成される。

40

## 【0014】

（g）分裂間期。細胞質分裂の完了の際に、細胞は、細胞周期のG<sub>1</sub>段階に入り、そして再び周期を続行する。

## 【0015】

細胞周期は、非常に重要な細胞過程であると理解される。正常細胞周期からの逸脱は、多

50

くの医学的疾患を生じる。増加した細胞周期および／または無制限の細胞周期は、癌を生じ得る。減少した細胞周期は、変性状態を生じ得る。

#### 【 0 0 1 6 】

癌は、大部分の西洋諸国において主要な死因のままである。これまでに開発された癌治療は、ホルモン依存性腫瘍の増殖を阻害するために、ホルモンの作用または合成をブロックする工程を包含している。しかし、より攻撃性の化学療法が、現在ではホルモン非依存性腫瘍の処置のために使用される。

#### 【 0 0 1 7 】

従って、ホルモン依存性および／またはホルモン非依存性腫瘍の抗癌処置のための、化学療法に伴う副作用のいくつかまたは全ての薬品の開発は、大部分の治療の進歩を表す。

10

#### 【 0 0 1 8 】

本発明は、癌、特に乳癌の処置における処置における使用に適切な組成物を提供しようと努める。

#### 【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用される以下の略語は、所定の意味を有する：

E 1 S、エストロン硫酸；

2 - M e O E 2、2 - メトキシエストラジオール；

2 - O H E 2、2 - ヒドロキシエストラジオール；

E M A T E、エストロン - 3 - O - サルファメート；

2 - M e O E M A T E、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート；

2 - M e O E 1、2 - メトキシエストロン；

G e n M A T E、ゲニスタイン - ビス - サルファメート ( g e n i s t a i n - b i s - s u l p h a m a t e ) ；

2 - M e O E 1 S、2 - メトキシエストロン硫酸；

E R、エストロゲンレセプター；

T d t、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ；

T U N E L、T b t - 媒介 d U T P - ニック末端標識。

#### 【 0 0 2 0 】

エストロゲンは、その合成の後に多数のヒドロキシル化および結合体化反応を受ける。最近まで、このような反応は最終的にエストロゲンを水溶性にし、そしてその身体からの除去を増強する代謝プロセスの一部であると考えられていた。いくつかのヒドロキシ代謝産物（例えば、2 - ヒドロキシおよび 1 6 - ヒドロキシ）および結合体（例えば、エストロン硫酸、E 1 S）は、エストロゲンが体内で有するいくつかの複雑な作用を決定する際に重要であるということが、今では明らかである（ 1 , 2 ）。

20

30

#### 【 0 0 2 1 】

B r a d l o w およびその共同研究者らは、乳癌の危険性を変更する状態に関連する、2 - ヒドロキシル化エストロゲンおよび 1 6 - ヒドロキシル化エストロゲンの形成を調べた。2 - ヒドロキシル化活性を増大する因子が、減少した癌の危険性に関連し、一方で 1 6 - ヒドロキシル化の増大は、乳癌の危険性を増大し得るという証拠が現在では存在する（ 3 ~ 6 ）。エストロゲン代謝産物の生物学的役割におけるさらなる興味は、2 - メトキシエストラジオール（図 1、1、2 - M e O E 2）が、抗有糸分裂特性を有する内因性代謝産物であるという増大する一連の証拠により刺激されてきた（ 7 ）。2 - M e O E 2 は、2 - ヒドロキシエストラジオール（2 - O H E 2）から、カテコールエストロゲンメチルトランスフェラーゼ（身体中全体に広く分布する酵素）により形成される。

40

#### 【 0 0 2 2 】

S e e g e r およびその共同研究者らは、比較的高い濃度の 2 - M e O E 2（ 1 μ m 以上）が、M C F - 7 乳癌細胞に対して細胞傷害性であることを元々報告した（ 8 ）。彼らはまた、2 - M e O E 2 が、混乱した微小管構造をまた有する細胞における均一でない染色体分配を引き起こすということも観察した。その後の研究により、2 - M e O E 2 が、正

50

常ヒト皮膚繊維芽細胞の形態学に効果を有さないが、形質転換された繊維芽細胞において顕著な効果を有することが明らかにされた(9)。

【0023】

インビボで2-MeOE2は、Meth A肉腫細胞、B16黒色腫細胞またはMDA-MB-435エストロゲンレセプター陰性(ER-)乳癌細胞の皮下注射から生じる腫瘍の増殖を阻害する(10、11)。これはまた、内皮細胞の増殖および移動、ならびにインビトロでの新脈管形成を阻害する。インビボで腫瘍増殖を阻害する2-MeOE2の能力は、腫瘍細胞の増殖の直接的な阻害よりも腫瘍に誘導される新脈管形成を阻害する能力に起因し得る(10)。

【0024】

2-MeOE2がその潜在的な抗マイトジェン効果および抗新脈管形成効果を行行使する機構は、なお解明されつつある。高濃度では、2-MeOE2が微小管の重合を阻害し得、そしてチューブリンに対するコルヒチンの結合の弱いインヒビターとして作用するという証拠が存在する(12)。しかし、最近、有糸分裂をブロックする濃度で、細胞中のチューブリンフィラメントは、解重合されないが、タキソール処置後に見られる形態学と同一の形態学を有することが見出された(13)。従って、タキソール(乳癌および卵巣乳癌治療に使用される薬物)の様に、2-MeOE2は、微小管動特性を安定化する(stabilizing)ことにより作用する。

【0025】

癌の新しい治療としての2-MeOE2の同定は、重要な進歩を示したが、経口投与されたエストロゲンのバイオアベイラビリティは、不十分である。さらに、これらは、最初に肝臓を通過する間にさらなる代謝を受け得る。乳癌治療のためのステロイドスルファターゼインヒビターを開発するように計画された研究の一部として、エストロン-3-O-サルファメート(図1、2、EMATE)は、有効な活性部位指向インヒビターとして同定された(14、15)。予期しないことに、EMATEは、ラットにおいて経口の子宮に効果のある活性が、エストラジオールの活性より100倍高く、潜在的なエストロゲン様特性を有することが明らかとなった(16)。その増強されたエストロゲン性は、赤血球(rcb)による吸収から生じると考えられ、これによりEMATEが肝臓を通過する間の不活性化から保護し、そして長期間の間EMATEをゆっくり放出するためのリザーバーとして作用する(17)。多くのA環改変アナログ(2-メトキシエストロン-3-O-サルファメート(3、2-MeOEMATE)を含む)が合成および試験された(18、19)。この化合物は、ステロイドスルファターゼインヒビターとしてEMATEと等しい効力であるが、エストロゲン性が欠けている。

【0026】

本発明は、細胞周期傷害の処置の方法を提供しようと努める。詳細には、本発明は、癌の処置方法を提供する。

【0027】

本発明の局面は、添付の特許請求の範囲において規定される。

【0028】

本発明は、癌(ホルモン依存性癌およびホルモン非依存性癌を含む)のような細胞周期傷害の処置において使用するために適した化合物を提供することにおいて有利である。

【0029】

さらに、本発明は、癌(例えば、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、肉腫、黒色腫、前立腺癌、膵臓癌など)および他の固形腫瘍の処置において使用するために適した化合物を提供するという点において有利である。

【0030】

本出願人は、本発明の化合物(例えば、2-MeOEMATE)が、乳癌細胞および繊維芽細胞の増殖に対して有する効果、ならびに細胞周期に対して有する効果を同定した。予備的なインビボでの研究において、2-MeOEMATEは、インタクトなラットにおいて、ニトロソメチル尿素(NMU)誘導乳癌の急速な後退を引き起こすということが

10

20

30

40

50

見出された。

【 0 0 3 1 】

本発明に従って、細胞周期は、阻害および／または予防および／または阻止される。好ましくは細胞周期は、予防および／または阻止される。

【 0 0 3 2 】

好ましい局面において、細胞周期は、 $G_2$  / M 段階において阻害および／または予防および／または阻止される。

【 0 0 3 3 】

好ましい局面において、細胞周期は、不可逆的に予防および／または阻害および／または阻止される。好ましくは、細胞周期は、不可逆的に予防および／または阻止される。好ましくは細胞周期は、不可逆的に予防および／または阻止される。

10

【 0 0 3 4 】

用語「不可逆的に予防および／または阻害および／または阻止される」は、本発明の化合物の適用後に、化合物の除去の際に、この化合物の効果、すなわち細胞周期の予防および／または阻害および／または阻止が、なお観測可能であるということを意味する。より詳細には、用語「不可逆的に予防および／または阻害および／または阻止される」は、プロトコル I に従ってアッセイされる場合に、目的の化合物で処理された細胞が、プロトコル I の段階 2 の後にコントロール細胞よりも少ない増殖を示すことを意味する。プロトコル I I は、実施例の後に記載される。

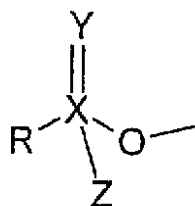
【 0 0 3 5 】

20

本発明の化合物は、少なくとも 1 つの環を含む環状化合物であって、ここで基 I および基 I I は、互いに独立して、この環状化合物の環に連結され；ここで基 I が、ヒドロカルビル基またはオキシヒドロカルビル基であり；そしてここで基 I I が、以下の式

【 0 0 3 6 】

【 化 4 】



30

の基であり、X は、P または S であり；X が P である場合、Y が、= O または S であり、Z が、- O H であり、そして R がヒドロカルビルまたは H であり；X が S である場合、Y が、= O であり、Z が、= O であり、そして R がヒドロカルビルまたは  $N(R_1)(R_2)$  であり、ここで  $R_1$  および  $R_2$  の各々が、H またはヒドロカルビル基から独立して選択される。

【 0 0 3 7 】

40

本明細書中で使用される場合、用語「ヒドロカルビル基」は、少なくとも C および H を含む基を意味し、そして必要に応じて 1 つ以上の他の適切な置換基を含み得る。このような置換基の例としては、ハロ - 、アルコキシ - 、ニトロ - 、炭化水素基、N - アシル基、環式基などが挙げられ得る。置換基が環式基である可能性に加えて、置換基の組合せは、環式基を形成し得る。ヒドロカルビル基が 1 つより多くの C を含む場合、これらの炭素は、必ずしも互いに連結している必要はない。例えば、少なくとも 2 つの炭素は、適切な元素または基を介して連結され得る。従って、ヒドロカルビル基は、ヘテロ原子を含み得る。適切なヘテロ原子は、当業者に明らかであり、そして例えば、イオウ、窒素および酸素が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

50

本発明の1つの好ましい実施形態において、ヒドロカルビル基は、炭化水素基である。

【0039】

本明細書において、用語「炭化水素」は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基のうちのいずれか1つであり、これらの基は、直鎖、分岐鎖もしくは環状またはアリール基であり得る。用語炭化水素はまた、必要に応じて置換された基も含む。炭化水素が、置換基を有する分岐した構造である場合、置換は、炭化水素骨格または分岐鎖のいずれか上にあり得；あるいは、置換は、炭化水素骨格上かつ分岐鎖上にあり得る。

【0040】

化合物は、環状化合物である。この点において、この化合物は、単環化合物または多環式化合物であり得る。本明細書において、用語「多環式」は、縮合環および非縮合環構造（これらの組合せを含む）を含む。

10

【0041】

環式基は、単環であり得るか、または多環式環構造である。

【0042】

1つの局面において、環式基は、C、H、O、N、P、ハロゲン（Cl、BrおよびIを含む）、SおよびPのうちの任意の1つ以上を含み得る。

【0043】

少なくとも1つの環式基は、複素環式基（複素環）または非複素環式基であり得る。

【0044】

少なくとも1つの環式基は、飽和環構造または不飽和環構造（例えば、アリール基）であり得る。

20

【0045】

好ましくは、少なくとも1つの環式基は、アリール基である。

【0046】

好ましくは、基Iおよび/または基IIは、アリール環に連結されるかまたは結合される。

【0047】

環式基が、多環式である場合、化合物の環成分のうちのいくつかまたは全ては、共に縮合しているかまたは1つ以上の適切なスペーサー基を介して連結され得る。

【0048】

多環式化合物は、多数の縮合環を含み得る。この局面において、この縮合環は、異なる大きさの環の任意の組合せ（例えば、3つの6員環（6, 6, 6）、6員環、7員環および6員環（6, 7, 6）、6員環および2つの8員環（6, 8, 8）など）を含み得る。

30

【0049】

1つの局面において、本発明は、多環式化合物が（6, 6, 7）環以外である化合物に関する。さらなる局面において、本発明は、多環式化合物が、7員環以外の環のみを含む。

【0050】

1つの局面において、環式基が多環式である場合、基Iおよび基IIは、各々この多環式化合物の同じ環に結合される。

【0051】

従って、本発明の1つの局面に従って、好ましくは化合物は、多環式化合物である。

40

【0052】

好ましくは、多環式化合物は、全ての置換基を含めて、約50個以下の炭素原子、より通常には約30～40個以下の炭素原子を含む。

【0053】

多環式化合物は、少なくとも2つの環成分を含み得るか、または少なくとも3つの環成分を含み得るか、または少なくとも4つの環成分を含み得る。

【0054】

好ましくは、多環式化合物は、4つの環成分を含む。

【0055】

50

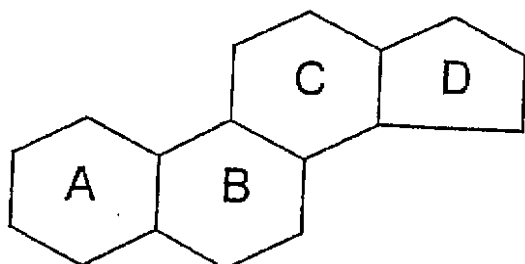
好ましい多環式化合物は、ステロイド環成分（すなわちシクロペントノフェナンスレン骨格）、またはその生体同配体（bio-isostere）を有する。

【0056】

当該分野で周知のように、古典的ステロイド性構造は、一般式：

【0057】

【化5】



10

を有す。

【0058】

上記の式において、環は、従来の様式で標識されてきた。

【0059】

20

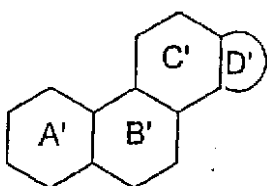
生物同配体の例は、任意の1以上の環A、B、CおよびDが、複素環式環である場合、ならびに/または任意の1以上の環A、B、CおよびDが、置換される場合、ならびに/または任意の1以上の環A、B、CおよびDが、修飾される場合であるが、ここで、サルファメート基が存在しない際の生物同配体は、ステロイド性特性を有する。

【0060】

この点で、好ましい多環式化合物の構造は、以下：

【0061】

【化6】



30

のように示され得、ここで、各環A'、B'、C'およびD'は、独立して複素環式環または非複素環式環を表し、この環は、独立して置換されても置換されなくてもよく、飽和であっても飽和でなくてもよい。

40

【0062】

例として、任意の1以上の環A'、B'、C'およびD'は、適切な基（例えば、アルキル基、アリール基、ヒドロキシ基、ハロ基、ヒドロカルビル基、オキシヒドロカルビル基など）で独立して置換され得る。

【0063】

D'の例は、少なくとも1つの置換基を有する、5または6員環の非複素環式環である。

【0064】

1つの好ましい実施形態において、環D'は、エチニル基で置換される。

【0065】

50



環 A'、B'、C' および D' のいずれか 1 つが、複素環式環である場合、好ましくは、複素環式環は、C 原子の組み合わせならびに少なくとも 1 つの N 原子および / または少なくとも 1 つの O 原子を含む。他の複素環式原子は、環中に示され得る。

#### 【0066】

本発明の化合物の適切な、好ましいステロイド性核環 A' ~ D' の例としては、デヒドロエピアンドロステロンおよびエストロンを含むエストロゲンの環 A ~ D が挙げられる。

#### 【0067】

本発明の好ましい化合物の好ましいステロイド性核環 A' ~ D' としては、以下の環 A ~ D が挙げられる：

( エストロンおよび置換エストロン、すなわち： )

10

エストロン

4 - OH - エストロン

6 - OH - エストロン

7 - OH - エストロン

16 - OH - エストロン

16 - OH - エストロン

17 - デオキシエストロン

エストロン

( エストラジオールおよび置換エストラジオール、すなわち： )

20

4 - OH - 17 - エストラジオール

6 - OH - 17 - エストラジオール

7 - OH - 17 - エストラジオール

4 - OH - 17 - エストラジオール

6 - OH - 17 - エストラジオール

7 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

16 - OH - 17 - エストラジオール

17 - エストラジオール

30

17 - エストラジオール

17 - エチニル - 17 - エストラジオール

17 - エチニル - 17 - エストラジオール

17 - デオキシエストラジオール

( エストリオールおよび置換エストリオール、すなわち： )

エストリオール

4 - OH - エストリオール

6 - OH - エストリオール

7 - ストリオール

17 - デオキシエストリオール

40

( デヒドロエピアンドロステロンおよび置換デヒドロエピアンドロステロン、すなわち： )

デヒドロエピアンドロステロン

6 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

7 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

16 - OH - デヒドロエピアンドロステロン

16 - OH - デヒドロエピアンドロステロン。

#### 【0068】

一般的な用語において、環系 A' B' C' D' は、種々の非干渉性置換基を含み得る。特に、環系 A' B' C' D' は、1 以上のヒドロキシ、アルキル、特に低級 ( C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ) ア

50

ルキル（例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチル、*sec*-ブチル、*t*-ブチル、 $n$ -ペンチル、および他のペンチル異性体、ならびに $n$ -ヘキシルおよび他のヘキシル異性体）、アルコキシ、特に低級（ $C_1 \sim C_6$ ）アルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシなど）、アルキニル（例えば、エチニル）、またはハロゲン（例えば、フッ素置換基）を含み得る。

【0069】

代替の実施形態において、多環式化合物は、ステロイド性核を含むかまたはこれに基づき得る。この点で、多環式化合物は、非ステロイド環系（例えば、ジエチルスチルボエストロール、スチルボエストロール（*stilboestrol*）、クマリン、フラボノイド、コンプレスタチン（*combrastatin*）および他の環系）を含むかまたはこれに基づき得る。本発明の組成物における使用または本発明の組成物としての使用のための他の適切な非ステロイド性化合物は、US-A-5567831に見出され得る。

10

【0070】

好ましくは、基 I および基 II は、互いにオルト位で、本発明の環式化合物の同一の環に各々結合される。

【0071】

好ましくは、多環式化合物は、ステロイド性構造を有し、そして基 I は、A 環に結合される。

【0072】

好ましくは、基 I は、ステロイド構造の A 環の 2 位に結合される。

20

【0073】

好ましくは、多環式化合物は、ステロイド性構造を有し、そして基 II は、A 環に結合される。

【0074】

好ましくは、基 II は、ステロイド性構造の A 環の 3 位に結合される。

【0075】

基 I は、ヒドロカルビル基またはオキシヒドロカルビル基である。

【0076】

本明細書中に示される場合、用語「ヒドロカルビル基」は、上記で規定される。

【0077】

本発明の 1 つの好ましい実施形態において、ヒドロカルビル基は、炭化水素基である。

30

【0078】

本明細書中で使用される場合、用語「炭化水素基」は、上記で規定される。

【0079】

好ましくは、炭化水素基は、式  $C_1 \sim C_6$ （例えば、 $C_1 \sim C_3$ ）である。

【0080】

化合物が、ステロイド性核を含む場合、好ましくは、A 環は、2 位でヒドロカルビル基を有する。

【0081】

より好ましくは、基  $C_1 \sim 6$  は、ステロイド性核の A 環の 2 位に結合される。

40

【0082】

好ましくは、ヒドロカルビル基は、アルキルである。

【0083】

アルキルは、好ましくは、1 ~ 5 炭素原子を含む低級アルキル基であり、すなわち、メチル、エチル、プロピルなどである。好ましくは、アルキル基は、メチルまたはエチルである。

【0084】

従って、好ましい実施形態において、化合物が、ステロイド性核を含む場合、A 環は、2 位でメチルまたはエチル置換基を有する。

【0085】

50

本明細書中で使用される場合、用語「オキシヒドロカルビル基」は、少なくともC、H、およびOを含む基を意味し、そして必要に応じて1以上の他の適切な置換基を含み得る。このような置換基の例としては、ハロ -、アルコキシ -、ニトロ -、アルキル基 -、環式基などが挙げられ得る。環式基である置換基の可能性に加えて、置換基の組み合わせは、環式基を形成し得る。オキシヒドロカルビル基が、1つのCより多くのCを含む場合、これらの炭素は、必ずしも互いに結合される必要はない。例えば、少なくとも2つの炭素は、適切な元素または基を介して結合され得る。従って、オキシヒドロカルビル基は、ヘテロ原子を含み得る。適切なヘテロ原子は、当業者に明らかであり、例えば、硫黄および窒素が挙げられる。

【0086】

10

本発明の1つの好ましい実施形態において、オキシヒドロカルボニル基は、オキシヒドロ炭素基である。

【0087】

本明細書中で、用語「オキシヒドロ炭素」とは、アルコキシ基、オキシアルケニル基、オキシアルキニル基のいずれか1つを意味し、この基は、直線状、分岐状または環式、あるいはオキシアリアル基であり得る。用語オキシヒドロ炭素とはまた、これらの基を含み得るが、それらは、必要に応じて置換される。オキシヒドロ炭素が、その上に置換基を有する分岐状構造である場合、置換基は、炭化水素バックボーンの上または分岐状の上にあるか；あるいは、置換基は、炭化水素バックボーンおよび分岐状の上にある。

20

【0088】

好ましいオキシヒドロカルビル基は、式 $C_1 \sim_6 O$ （例えば、 $C_1 \sim_3 O$ ）である。

【0089】

化合物が、ステロイド性核を含む場合、好ましくは、A環は、2位でオキシヒドロカルビル基を有する。

【0090】

より好ましくは、基 $C_1 \sim_6 O$ 基は、ステロイド性核のA環の2位に結合される。

【0091】

好ましくは、オキシヒドロカルビル基は、アルコキシである。

【0092】

30

アルコキシ置換基のアルキル基は、好ましくは、1～5炭素原子を含む低級アルキル基であり、すなわち、メチル、エチル、プロピルなどである。好ましくは、アルキル基は、メチルである。

【0093】

従って、好ましい実施形態において、化合物がステロイド性核を含む場合、A環は、2位にメトキシ置換基を有する。

【0094】

本発明の1つの好ましい実施形態において、好ましくは、化合物は、非エストロゲンである。用語「非エストロゲン」とは、エストロゲン活性を全く示さないかまたは実質的にエストロゲン活性を示さないことを意味する。本発明の1つの好ましい実施形態において、好ましくは、化合物は、ホルモン活性を表示または誘導する化合物に対して新陳代謝され得ない。

40

【0095】

本発明の1つの好ましい実施形態において、好ましくは、本発明の化合物は、経口的に活性である。

【0096】

本発明は、本発明の化合物が、細胞周期を予防および/または阻害および/または阻止するための有効な手段を提供するという、非常に驚くべき発見に基づく。

【0097】

本発明者らは、A環上にヒドロカルビル置換基またはオキシヒドロカルビル置換基を有し

50

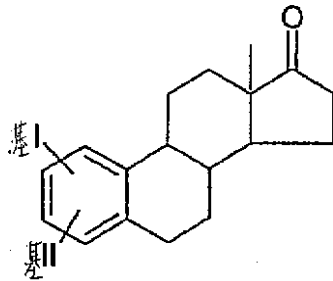
、かつ／またはA環上に基ⅠⅠの式の基を有する化合物が、細胞周期を予防および／または阻害および／または阻止において、強力（そして幾らかの場合において、非常に強力）であることを、見出した。

【0098】

本発明の好ましい化合物は、式：

【0099】

【化7】



10

を有し、ここで、環A、B、CおよびDは、独立して必要に応じて置換される。

【0100】

好ましくは、基Ⅰは、2位にある。

20

【0101】

好ましくは、基ⅠⅠは、3位にある。

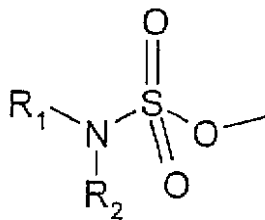
【0102】

1つの好ましい局面において、Xは、Sであり、そしてRは、N(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)である。

言いかえると、好ましくは、基ⅠⅠは、式：

【0103】

【化8】



30

の基であり、ここで、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>の各々は、Hまたはヒドロカルビル基から独立して選択される。

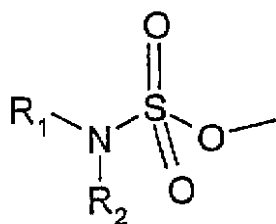
【0104】

40

従って、好ましい局面において、本発明は、細胞周期を防ぐ、そして／または阻害する、そして／または阻止するための医薬の製造における、環式化合物またはその薬学的に活性な塩の使用を提供し、ここで、この環式化合物は、少なくとも一つの環を含み、ここで、基Ⅰおよび基ⅠⅠが、互いに独立して、環式化合物の環に結合し；ここで、基Ⅰが、ヒドロカルビル基またはオキシヒドロカルビル基であり；そしてここで、基ⅠⅠが式

【0105】

【化9】



の基であり、ここで、 $R_1$ および $R_2$ のそれぞれは、独立してHまたはヒドロカルビル基から選択される。

【0106】

これらの好ましい化合物の基IIは、「サルファメート基」と呼ばれる。これらの好ましい化合物は、「サルファメート化合物」と呼ばれる。

【0107】

好ましくは、 $R_1$ および $R_2$ は、独立して、Hまたはアルキル、シクロアルキル、アルケニル、およびアリールから選択されるか、あるいは一緒にアルキレンを表し、ここで、そのまたはそれぞれのアルキルまたはシクロアルキルまたはアルケニルは、必要に応じて、1つ以上のヘテロ原子またはヘテロ基を含む。

【0108】

置換される場合、N - 置換サルファメート化合物は、1つまたは2つのN - アルキル、N - アルケニル、N - シクロアルキル、N - アシル、またはN - アリール置換基（好ましくは、それまたはそれぞれが最大10個の炭素原子を含む）を含み得る。 $R_1$ および/または $R_2$ がアルキルである場合、好ましい値は、 $R_1$ および $R_2$ がそれぞれ独立して1～5個の炭素原子を含む低級アルキル基（すなわち、メチル、エチル、プロピルなど）から選択されるものである。好ましくは、 $R_1$ および $R_2$ は、ともにメチルである。 $R_1$ および/または $R_2$ がアリールである場合、典型的な値は、フェニルおよびトリル（-PhCH<sub>3</sub>；o-、m-またはp-）である。 $R_1$ および $R_2$ がシクロアルキルを表す場合、典型的な値は、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどである。一緒に結合される場合、 $R_1$ および $R_2$ が、典型的には、4～6個の炭素原子の鎖を提供するアルキレン基を表し、必要に応じて、一つ以上のヘテロ原子またはヘテロ基（例えば、-O-または-NH-）によって割り込まれ、5、6または7員の複素環（例えば、モルホリノ、ピロリジノ、またはピペリジノ）を提供する。

【0109】

アルキル基（value）、シクロアルキル基、アルケニル基、アシル基、およびアリール基内で、本発明者らは、その中に置換基として、問題の化合物の細胞周期を阻止するそして/または阻害するそして/または妨げる活性を干渉しない一つ以上の基を含む、置換された基を含む。例示的な非干渉性置換基には、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキル、およびアリールが挙げられる。ヒドロカルビル基の非制限的な例は、アシル

【0110】

いくつかの好ましい実施形態において、 $R_1$ および $R_2$ の少なくとも1つがHである。

【0111】

本発明における使用に適切なサルファメート化合物の例、または本発明における使用に適切なサルファメート化合物に変換し得る適切な化合物の例は、当該分野で見出され得る（例えば、PCT/GB92/01587，PCT/GB97/03352，PCT/GB97/00444，GB 9725749.7，GB 9725750.5，US-A-5567831，US-A-5677292，US-A-5567831，WO-A-96/05216，およびWO-A-96/05217）。

## 【 0 1 1 2 】

例として、P C T / G B 9 2 / 0 1 5 8 7 は、エストロン依存性腫瘍（特に、乳癌）の処置における使用のためにそれらを含む新規なサルファメート化合物および薬学的組成物を教示する。これらのサルファメート化合物は、サルファメートエステルである。このようなインヒビターの例は、ステロイドのサルファメートエステル誘導体である。

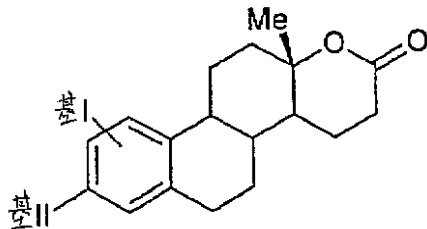
## 【 0 1 1 3 】

本発明における使用に適した別の化合物は、少なくとも以下

## 【 0 1 1 4 】

## 【 化 1 0 】

10



の構造的構造を有し、ここで、基 I I が、上記のようなサルファメート基を示し；そして環 A、B、C、および D が、独立して必要に応じて置換される。

20

## 【 0 1 1 5 】

好ましくは、基 I I が、サルファメート基に対する上記の好ましい式である。これに関して、 $R_1$  および  $R_2$  の少なくとも 1 つが H であることが好ましい。

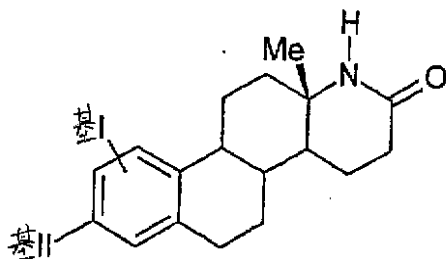
## 【 0 1 1 6 】

本発明における使用に適切な別の化合物は、少なくとも以下

## 【 0 1 1 7 】

## 【 化 1 1 】

30



の構造的構造を有し、ここで、基 I I が、上記のようなサルファメート基を示し；そして環 A、B、C、および D が、独立して必要に応じて置換される。

40

## 【 0 1 1 8 】

好ましくは、R は、サルファメート基に対する上記の好ましい式である。これに関して、 $R_1$  および  $R_2$  の少なくとも 1 つが H であることが好ましい。

## 【 0 1 1 9 】

本発明者は、A 環上のサルファメート基および A 環のヒドロカルビル置換基またはオキシヒドロカルビル置換基を有する化合物が、細胞周期を妨げるそして / または阻害するそして / または阻止する際に特に強力（ある場合には、非常に強力）である。

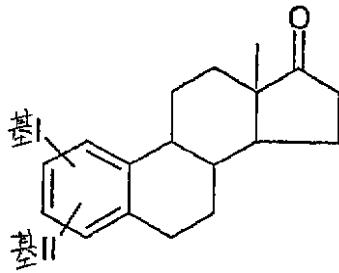
## 【 0 1 2 0 】

本発明の好ましい化合物は、式

## 【 0 1 2 1 】

50

## 【化 1 2】



10

を有し、

基 I I が、サルファメート基であり；そして

環 A、B、C、および D が、独立して必要に応じて置換される。

## 【0 1 2 2】

好ましくは、基 I が、2 位である。

## 【0 1 2 3】

好ましくは、基 I I が 3 位である。

## 【0 1 2 4】

本発明について、好ましくは、サルファメート化合物は、オキシヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物（特に、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート）またはその薬学的に活性な塩（それらのアナログを含む）である。

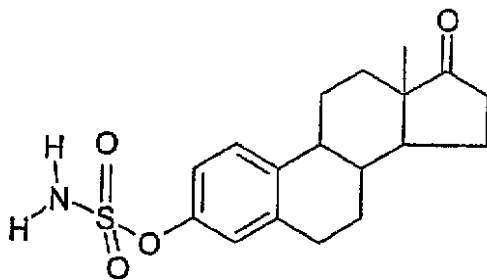
20

## 【0 1 2 5】

2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメートは、エストロン - 3 - O - サルファメート（他に、「EMATE」として公知）のアナログであり、これは、以下の構造：

## 【0 1 2 6】

## 【化 1 3】



30

を有し、2 - メトキシ EMATE と呼ばれ得る。

## 【0 1 2 7】

2 - メトキシ EMATE は、天然のエストロゲン代謝物、2 - メトキシエストロゲンのサルファモイル化誘導体である。この化合物は、2 - ヒドロキシラーゼによるエストロンのヒドロキシル化、引き続くカテコールエストロゲンメチルトランスフェラーゼによるメトキシ誘導体への代謝によって、肝臓中で形成される。

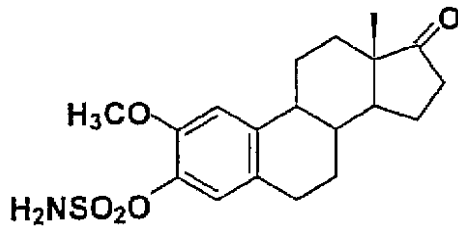
40

## 【0 1 2 8】

2 - メトキシ EMATE が、以下の式：

## 【0 1 2 9】

## 【化 1 4】



10

として示される式を有する。

【0130】

2 - メトキシ E M A T E は、少なくとも部分的に、細胞周期を妨げるそして / または阻害するそして / または阻止することによってインビボで作用すると考えられる。

【0131】

従って、非常に好ましい実施形態において、サルファメート化合物は、オキシヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物（特に、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート（2 - メトキシ E M A T E））である。

【0132】

これに関して、本発明者らは、 $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルコキシ置換基を A 環の 2 位に有するサルファメート化合物（特に、2 - メトキシ E M A T E）が、腫瘍の増殖を妨げるそして / または阻害するのに非常に強力であることを見出した。

20

【0133】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、オキシヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物であり、ここで、このサルファメート基が、ステロイド成分の 3 位であるそして / またはオキシヒドロカルビル基が、ステロイド成分の 2 位である。

【0134】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロンサルファメートのオキシヒドロカルビル誘導体である。

30

【0135】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートのオキシヒドロカルビル誘導体である。

【0136】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートの  $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルコキシ誘導体である。

【0137】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートの 2 -  $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルコキシ誘導体である。

【0138】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメートである。

40

【0139】

本発明について、サルファメート化合物は、好ましくは、ヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物（特に、2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメート）またはその薬学的に活性な塩（そのアナログを含む）であり得る。

【0140】

2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメートは、エストロン - 3 - O - サルファメートのアナログであり、2 - エチル E M A T E と呼ばれ得る。

【0141】

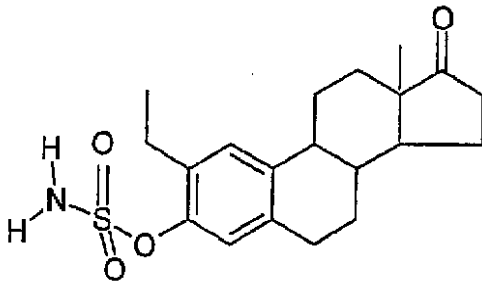
50



2 - エチル E M A T E は、以下の式：

【 0 1 4 2 】

【 化 1 5 】



10

として表される式を有する。

【 0 1 4 3 】

2 - エチル E M A T E は、少なくとも部分的に、細胞周期を妨げるそして / または阻害するそして / または阻止することによってインビボで作用すると考えられる。

【 0 1 4 4 】

従って、非常に好ましい実施形態において、サルファメート化合物は、ヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物（特に、2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメート（2 - エチル E M A T E ））である。

20

【 0 1 4 5 】

これに関して、本発明者らは、 $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルキル置換基を A 環の 2 位に有するサルファメート化合物（特に、2 - エチル E M A T E ）が、腫瘍の増殖を妨げるそして / または阻害するのに非常に強力であることを見出した。

【 0 1 4 6 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、ヒドロカルビルステロイド性サルファメート化合物であり、ここで、このサルファメート基が、ステロイド成分の 3 位であるそして / またはヒドロカルビル基が、ステロイド成分の 2 位である。

【 0 1 4 7 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロンサルファメートのヒドロカルビル誘導体である。

30

【 0 1 4 8 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートのヒドロカルビル誘導体である。

【 0 1 4 9 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートの  $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルキル誘導体である。

【 0 1 5 0 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、エストロン - 3 - O - サルファメートの 2 -  $C_{1-6}$ （例えば、 $C_{1-3}$ ）アルキル誘導体である。

40

【 0 1 5 1 】

1 つの実施形態において、好ましくは、サルファメート化合物は、2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメートである。

【 0 1 5 2 】

本発明のサルファメート化合物は、適切なアルコールを適切な塩化サルファモイル（ $R_1 R_2 N S O_2 C l$ ）と反応させることによって調製され得る。反応を実行するための好ましい条件は以下の通りである。水素化ナトリウムおよび塩化サルファモイルを、0 で、無水ジメチルホルムアミド中のアルコールの攪拌溶液に加える。続いて、この反応物を室温まで温めさせ、ここで、攪拌をさらに 24 時間続ける。反応混合物を重炭酸ナトリウムの

50

冷飽和溶液に注ぎ、そして得られた水相をジクロロメタンで抽出する。合わせた有機抽出物を、無水  $MgSO_4$  で乾燥させる。濾過に続き、減圧での溶媒エバポレーションおよびトルエンとの共エバポレーションによって、粗製の残渣を得、これをフラッシュクロマトグラフィーによってさらに精製する。好ましくは、アルコールは、塩化サルファモイルとの反応の前に適切に誘導体化される。必要な場合は、アルコールの官能基は、公知の方法で保護され得、そして保護基は、反応の終わりに除去され得る。

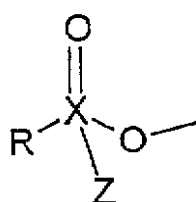
【0153】

本発明の1つの局面において、XがPであり、Yが=Oであり、そしてZが-OHであるか；またはXがSであり、Yが=Oであり、Zが=Oであり、そしてRがヒドロカルビルである。代替的に述べると、本発明の化合物は、スルホネート化合物またはホスホネート化合物であり、ここで、基Iが、式

10

【0154】

【化16】



20

の基であり、ここで、XがPまたはSであり；XがPである場合、Zが-OHであり；XがSである場合、Zが=Oであり；そしてRがヒドロカルビルである。

【0155】

好ましくは、スルホネート化合物またはホスホネート化合物は、多環式化合物である。より好ましくは、スルホネート化合物またはホスホネート化合物がステロイド性構造を有する。

【0156】

スルホネート化合物またはホスホネート化合物がステロイド性構造である場合、スルホネート化合物またはホスホネート化合物は、ステロイド性核のA環の3位に結合する少なくとも1つのスルホネート基またはホスホネート基を有し得る。

30

【0157】

さらに好ましい局面において、スルホネート化合物またはホスホネート化合物は、ステロイド核のA環の2位に結合した、少なくとも1つの炭化水素基、好ましくは  $C_{1-6}$  アルキルを含む。

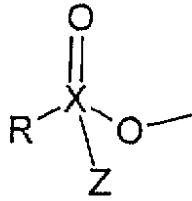
【0158】

従って、さらなる局面において、本発明は、ステロイド環および以下の式：

【0159】

40

【化17】



10

のスルホネート基またはホスホネート基を含む、スルホネート化合物またはホスホネート化合物を提供し、

ここで、

Xは、PまたはSであり；

XがPである場合には、Zは-OHであり、そしてRはヒドロカルビルまたはHであり；

XがSである場合には、Zは=Oであり、そしてRはヒドロカルビルであり；そして

ここで、スルホネート基またはホスホネート基は、ステロイド核のA環の3位に結合し；そして少なくとも1つの炭化水素基、好ましくはC<sub>1-6</sub>アルキルが、ステロイド核のA環の2位に結合する。

【0160】

20

これらの新規なスルホネート化合物またはホスホネート化合物は、医薬品において使用され得、好ましくは本発明に従って使用され得る。

【0161】

本発明において使用するために適したスルホネート化合物またはホスホネート化合物の例、あるいは本発明において使用するために適したスルホネート化合物またはホスホネート化合物に転換され得る適切な化合物の例は、当該分野において見出され得る（例えば、PCT/GB92/01586）。

【0162】

さらなる局面において、本発明は、細胞周期を予防および/または阻害および/または阻止させるための医薬品の製造における、組成物の使用を提供し、ここで、この組成物は、

30

以下を含有する：

(i) 本明細書中に規定のような化合物；ならびに

(ii) 本明細書中に規定のようなさらなる化合物；および/または

(iii) 薬学的に受容可能なキャリア、希釈剤、もしくは賦形剤；および/または

(iv) 生物学的応答改変剤；および/または

(v) 純粋な抗エストロゲン；および/または

(vi) 選択的エストロゲン応答改変剤 (SERM)；および/または

(vii) タキソール。

【0163】

用語生物学的応答改変剤 (「BRM」) としては、サイトカイン、免疫調節因子、増殖因子、造血調節因子、コロニー刺激因子、走化性、溶血性因子および血栓崩壊性因子、細胞表面レセプター、リガンド、白血球付着分子、モノクローナル抗体、予防的および治療的ワクチン、ホルモン、細胞外マトリックス成分、フィブロネクチンなどが挙げられる。

40

【0164】

好ましくは、生物学的応答改変剤は、サイトカインである。サイトカインの例としては、インターロイキン (IL) (例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-19)；腫瘍壊死因子 (TNF) (例えば、TNF- )；インターフェロン、および TGF- が挙げられる。

【0165】

50

好ましくは、サイトカインは、腫瘍壊死因子 ( T N F ) である。

【 0 1 6 6 】

本発明の好ましい局面に関して、 T N F は、任意の型の T N F ( 例えば、 T N F -  $\alpha$ 、 T N F -  $\beta$  ) であり得、これらの誘導体または混合物を含む。より好ましくは、サイトカインは、 T N F -  $\alpha$  である。

【 0 1 6 7 】

T N F に関する教示は、当該分野において見出され得る ( 例えば、 W O - A - 9 8 / 0 8 8 7 0 および W O - A - 9 8 / 1 3 3 4 8 ) 。

【 0 1 6 8 】

薬学的投与のために、本発明の組成物は、任意の適切な様式で、従来の薬学的処方技術および薬学的キャリア、アジュバント、賦形剤、希釈剤など ( 例えば、非経口投与のためのもの ) を利用して、処方され得る。およそその有効用量割合は、問題の化合物の個々の活性に依存し、そして平均体重 ( 7 0 K g ) の患者に対して、 1 0 0 ~ 8 0 0 m g / 日の範囲内である。好ましいより活性な組成物についての、より通常の投薬量割合は、 2 0 0 ~ 8 0 0 m g / 日、より好ましくは、 2 0 0 ~ 5 0 0 m g / 日、最も好ましくは、 2 0 0 ~ 2 5 0 m g / 日の範囲内である。これらは、単回用量レジメン、分離した用量レジメン、および / または数日間にわたって続く多回用量レジメンで、提供され得る。経口投与のためには、これらは、単位用量あたり 1 0 0 ~ 5 0 0 m g の処方物を含む、錠剤、カプセル剤、液剤または坐剤として処方され得る。あるいは、そして好ましくは、この処方物は、適切な非経口的に投与可能なキャリア中の、非経口投与のために処方され、そして 2 0 0 ~ 8 0 0 m g、好ましくは 2 0 0 ~ 5 0 0 m g、より好ましくは 2 0 0 ~ 2 5 0 m g の範囲の単回の毎日の投薬量割合を提供する。しかし、このような有効な毎日の用量は、活性成分の固有の活性および患者の体重に依存して変動し、このような変動は、医師の技術および判断の範囲内である。

【 0 1 6 9 】

本発明の化合物または処方物は、任意の適切な様式 ( 例えば、経口投与、局所投与 ( 例えば、パッチにより )、非経口投与、直腸投与または吸入スプレーによりのうちのいずれか 1 つ以上 ) で投与され得る。

【 0 1 7 0 】

処置の方法において、被験体は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。いくつかの適用については、好ましくは、ヒトは、女性である。

【 0 1 7 1 】

特定の適用について、本発明の化合物または組成物は、組合せ治療 ( スルファターゼインヒビターとともに、または例えば、アロマターゼインヒビター ( 例えば、 4 - ヒドロキシアンドロステンジオン ( 4 - O H A ) など ) と組合せてかのいずれか ) において使用され得ることが、予測される。

【 0 1 7 2 】

本発明に従って、組成物の成分は、混合物としてか、同時にかまたは連続的に、添加され得る。さらに、本発明に従って、成分の 1 つの発現を誘導する ( か、または発現を増加させる ) ことにより、組成物の少なくとも一部を、インサイチュで ( 例えば、インピボで ) 形成することが、可能であり得る。例えば、 T N F のような生物学的応答改変剤の発現を誘導する ( か、または発現を増加させる ) ことが、可能であり得る。例として、細菌性リポ多糖類 ( L P S ) およびムラミルジペプチド ( M D P ) を添加することにより、 T N F の発現を誘導する ( か、または発現を増加させる ) ことが、可能であり得る。これに関して、組合せでの細菌性 L P S および M D P は、成熟脾細胞からのインピトロでの T N F 産生およびインピボでの腫瘍後退を、刺激し得る ( F u k s ら B i u l l E k s p B i o l M e d 1 9 8 7 1 0 4 : 4 9 7 - 4 9 9 ) 。

【 0 1 7 3 】

本発明はまた、以下の組成物 / 化合物を提供する：

・細胞周期を予防および / または阻害および / または阻止させることにより、エストロゲ

10

20

30

40

50

ンレセプター陽性 ( E R + ) および E R 陰性 ( E R - ) の乳癌細胞の、インビトロでの増殖の阻害を引き起こすもの。

・インタクトなく (すなわち、卵巣摘出されていない) 動物における、ニトロソメチルウレア ( U M U ) 誘導乳房腫瘍の後退を引き起こすもの。

・癌細胞における細胞周期を予防および / または阻害および / または阻止させるもの。

・細胞周期を予防および / または阻害および / または阻止させることにより、インビボで作用するもの。

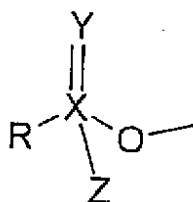
・細胞周期アゴニストとして作用するもの。

【 0 1 7 4 】

さらなる局面において、本発明は、環式化合物またはその薬学的に活性な塩の、細胞周期アゴニストの製造における使用を提供し、ここで、この環式化合物は、少なくとも 1 つの環を含み、ここで、基 I および基 I I は、互いに独立して、この環式化合物の環に結合し ; ここで基 I は、ヒドロカルビル基またはオキシヒドロカルビル基であり ; そしてここで、基 I I は、以下の式 :

【 0 1 7 5 】

【 化 1 8 】



の基であり、X は、P または S であり ; X が P である場合には、Y は = O または S であり、Z は - O H であり、そして R はヒドロカルビルまたは H であり ; X が S である場合には、Y は = O であり、Z は = O であり、そして R はヒドロカルビルまたは N ( R <sub>1</sub> ) ( R <sub>2</sub> ) であり、ここで、R <sub>1</sub> および R <sub>2</sub> の各々は、独立して、H またはヒドロカルビル基から選択される。

【 0 1 7 6 】

2 - メトキシエストロゲンのような本発明の化合物は、腫瘍増殖を阻害し得、そして新脈管形成を阻害し得る、新たなクラスの薬物として、明らかである。エストロゲンのスルファモイル化は、これらの効力およびバイオアベイラビリティを増強するので、本発明者らは、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート ( 2 - M e O E M A T E ) の合成およびそれが乳癌細胞の増殖を阻害する能力の、2 - メトキシエストロン ( 2 - M e O E 1 ) の能力との比較を、以下に記載する。2 - M e O E M A T E ( 1 μ M ) は、エストロゲンレセプター陽性 M C F - 7 乳癌細胞の増殖を 5 2 % 阻害したのに対し、2 - M e O E 1 は、この濃度ではほとんど効果を有さなかった。2 - M e O E M A T E はまた、エストロゲンレセプター陽性 M D A - M B - 2 3 1 乳癌細胞の増殖を阻害した。2 - M e O E M A T E への細胞の曝露は、これらの細胞の円形化 ( r o u n d u p ) および放出を引き起こし、このことは、この化合物が細胞のアポトーシスを誘導し得ることを提唱する。細胞周期分析は、2 - M e O E M A T E が G <sub>2</sub> / M 期において細胞の阻止を引き起こし、1 2 時間で検出可能な G <sub>2</sub> / M で阻止した細胞が増加することを、明らかにした。M C F - 7 細胞を 2 - M e O E M A T E に 2 4 時間曝露し、続いて薬物のない培地中で 2 4 時間培養することは、細胞の G <sub>2</sub> / M 期での阻止を逆転させなかった。T U N E L 分析は、2 - M e O E M A T E が、アポトーシスを、処置した M C F - 7 細胞の有意な割合において誘導したことを確認した。インタクトなラットにおけるニトロソメチルウレア誘導乳房腫瘍を使用する、予備的なインビボ研究において、2 - M e O E 1 ( 2 0 m g / k g / 日、経

口、11日間)は、腫瘍増殖にほとんど効果を有さなかった。対照的に、同じ用量の2-MeOEMATEは、11日の期間にわたって、2/3の腫瘍のほぼ完全な後退を生じた。2-MeOEMATEは、ホルモン依存性およびホルモン非依存性の乳房腫瘍の処置のための、かなりの治療能力を有するはずであることが、結論付けられる。

【0177】

まとめると、本発明は、腫瘍の処置において使用するための組成物、およびこれらを含む薬学的組成物を提供する。

【0178】

本発明を、例のみによってここに記載する。ここで、以下の図面に対して参照がなされるべきである。

10

【0179】

構造を示す図1；

グラフである図2；

写真板である図3；

写真板である図4；

写真板である図5；

グラフである図6；

グラフである図7；

グラフである図8；

グラフである図9；

20

グラフである図10；

グラフである図11；

構造を示す図12；

グラフである図13；

グラフである図14；

写真板である図15；および

グラフである図16。

【0180】

(一般的方法)

使用されるすべての試薬および溶媒は、他に記載されない限り、凡用性であるかまたは分析グレードであり、AldrichまたはSigma ChemicalsまたはLancaster Synthesisから購入した。

30

【0181】

シリカゲルは、シリカゲル(Merck、グレード60)をいい、そして出発物質を、UV光のもとで観測するかまたはリンモリブデン酸のメタン酸溶液で処理し、続いて加熱するかのはずれかで検出した。NMRスペクトルを、他に記載されない限り、溶媒としてアセトン-d<sub>6</sub>、CDCl<sub>3</sub>またはDMSO<sub>4</sub>-d<sub>6</sub>を用い、かつ内標としてTMSを用いて検出した。<sup>1</sup>H NMRおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルを、Jeol GX 270(270 MHzにおいて)およびJeol EX 400(400 MHzにおいて) NMR分光計上に記録した。以下の略語を使用して、<sup>1</sup>H NMRおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルにおける共鳴を記載する：s、シングレット；d、ダブレット；br、ブロード；t、トリプレット；q、カルテット；m、マルチプレット；および組み合わせ(例えば、dd、ダブレットのダブレット)。IRスペクトルを、Perkin-Elmer 782 Infra-Red分光計を用いてKBrディスクとして決定した。融点をReichert-Jung Kofler Block上で決定し、そして補正しなかった。マスマスペクトルを、VG 7070およびVG Autospec装置(Bath大学におけるMass Spectrometry Serviceにおいて)に記録した。FABマスマスペクトルを、m-ニトロベンゾイルアルコール(m-NBA)をマトリックスとして用いて実施した。HPLC安定性研究を、LDC Constametric 3000 HPLC PumpおよびSpectrometer 3000可変波長検出器を用いて決定し

40

50

た。CHN分析を、ガスクロマトグラフィー（Bath大学のMicroanalysis Serviceにおいて）を用いて決定した。

#### 【0182】

使用したすべての試薬および溶媒を、水分および光から離して保存し、使用する前に、乾燥した。低温度の実験を、0℃についてNaClを有する氷/水またはアセトンを含む炭素ジオキソドペレットのいずれかを含む十分に遮蔽された外部浴を用いるかあるいは冷プレートを用いて実施した。無水条件を必要とする実験を、自表（self-indicating）シリカを含む乾燥チューブの手段によって保護した。溶媒のエバポレーションを、減圧（水ポンプ）下でかつ一定時においてロータリーエバポレーターを用い、続いて、高真空ポンプを使用して実行した。サンプルを、高真空下かつ低温度にて乾燥チューブ中で乾燥した。

10

#### 【0183】

すべてのアッセイを、Department of Endocrinology and Metabolic Medicine, Imperial College School of Medicine, St. Mary's Hospital, Londonにて実行した。

#### 【0184】

（塩化スルファモイルの調製）

塩化スルファモイルを、AppelおよびBerger<sup>44</sup>の方法に従って、ギ酸とクロロスルホニルイソシアネートとの反応によって調製した。硫黄がない無水トルエン（150 ml）に、クロロスルホニルイソシアネート（25 g、177 mmol）を、N<sub>2</sub>雰囲気下0℃にて添加した。攪拌後、ギ酸（6.0 ml、156 mmol）を、N<sub>2</sub>下で0℃にて滴下した。生じた白色光エマルジョンを、一晩攪拌し続け、そしてトルエンを、水真空ポンプを用いて除去し、白色光の粗塩化スルファモイル（16.24%、79%）を得た。次いで、塩化スルファモイルの標準溶液（計算値、0.70 M）を、無水無硫黄不純物トルエン中に粗結晶生成物を溶解させることにより調製し、そしてN<sub>2</sub>下にて冷蔵庫に保存した。粉碎をこの塩化スルファモイル溶液に試みず、このモル濃度を、後処理後に得たもとの粗塩化スルファモイルの重量に従って見積もった。塩化スルファモイル溶液の調製のために使用したトルエンを、記載される方法<sup>45</sup>に従って精製した。冷トルエン（1~3 リットル）を、分液ロート中に入れ、冷濃H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（100 ml/l、3~4回）を用いて洗浄し、水で1回洗浄し、5% NaOH水溶液で1回洗浄し、そして再び中性になるまで水で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>続いて、金属ナトリウムで一晩乾燥し、次いで、金属ナトリウムからN<sub>2</sub>下で画分的に希釈し、そしてN<sub>2</sub>下暗所に保存した。

20

30

#### 【0185】

塩化スルファモイルを調製するために使用される無水ギ酸を、記載される方法<sup>45</sup>に従って精製した。ギ酸（98%）を、無水ホウ酸を用いて一晩乾燥し、次いで、N<sub>2</sub>下で希釈して、N<sub>2</sub>下にて暗所に保存した。

#### 【0186】

（スルファモイル化のための一般方法）

親化合物を用いて出発して、サルファメート誘導体を、他に示されない限り、Howarth<sup>14</sup>に記載される通りに原則的に調製した。この点で、無水DMF中の適切な親化合物の溶液を、水素化ナトリウム〔60%分散；モノヒドロキシおよびジヒドロキシ化合物に対してそれぞれ1.2および2.5当量〕を用いてN<sub>2</sub>雰囲気下0℃にて処理した。水素の放出が止まった後、トルエン中の塩化スルファモイル（過剰、計算値5~6当量）を、添加し、そして反応混合物を室温まで一晩温めた後ブラインに注ぎ、そして酢酸エチルを添加した。有機画分を、ブラインで徹底的に洗浄し、乾燥し（MgSO<sub>4</sub>）、濾過し、そして減圧下でエバポレートした。得た粗生成物を、フラッシュカラムクロマトグラフィーまたは調製用TLCによって生成し、続いて再結晶して対応するサルファメートを得た。すべての化合物を、分光分析および燃焼分析によって特徴づけした。

40

#### 【0187】

50

( 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート ( 2 - メトキシ E M A T E ) の合成 )

2 - メトキシ E M A T E ( 図 1、3、2 - Me O E M A T E ) を、0 にて水素化ナトリウムを用いて無水ジメチルホルムアミド中で 2 - メトキシエストロン ( 図 1、4、2 - Me O E 1 ) の溶液を処理することによって合成した。水素の放出が、止まった後、塩化スルファモイル ( 2 当量 ) を、添加し、そして反応混合物を、室温まで一晩暖めた。この化合物を、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、そしてこの化合物は、T L C により単一の純粋なスポットであり、満足な分光学的データおよび微量分析データを示した。

【 0 1 8 8 】

この点で、2 - メトキシエストロン ( 7 5 m g、0 . 2 5 0 m m o l ) は、粗生成物 ( 1 0 3 m g ) を与え、これを、クロロホルム / アセトン ( 8 : 1 ) を用いてシリカ ( 5 0 g ) 上で分取し、そしてエバポレーションの際に、第 2 の画分は、青白残渣 ( 8 3 m g、8 1 % ) を与え、これを、酢酸エチル / ヘキサン ( 1 : 2 ) 中で再結晶し、1 ( 6 9 m g ) を白色結晶として得た。m . p . = 1 7 7 ~ 1 8 0、クロロホルム / アセトン ( 8 : 1 および 4 : 1 ) に対してそれぞれ  $R_{fS} = 0 . 2 9$  および  $0 . 5 4$ 、かつ酢酸エチル / ヘキサン ( 2 : 1 および 1 : 1 ) に対してそれぞれ  $R_{fS} = 0 . 4 6$  および  $0 . 3 1$ 、

【 0 1 8 9 】

【 数 1 】

vmax (KBr) 3400, 3300 (-NH<sub>2</sub>),  
1610 (C=O), and 1380 (-SO<sub>2</sub>N-) cm<sup>-1</sup>.  $\delta_H$  (CDCl<sub>3</sub>) 0.922 (3H, s, C-18-CH<sub>3</sub>), 1.24- 2.87 (15H, m), 3.88 (3H, s, C-2-OCH<sub>3</sub>), 5. (2H, br s, 交換 : D<sub>2</sub>O, - SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 6.93 (1H, s, C-1- H) and 7.06 (1H, s, C-4-H). MS: m/z (+ve ion FAB in m- NBA, rel. intensity) 379.1 [100, (M)<sup>+</sup>], 300.0 [25, (M-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>]. MS: m/z (-ve ion FAB in m-NBA, rel. intensity) 378.0 [100, (M-H)<sup>-</sup>]. Acc. MS: m/z (FAB<sup>+</sup>) = 380.1515 C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>3</sub>S  
計算値 380.1532 分析値 C, 60.0; H, 6.7; N, 3.67; C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>S 計算値 C, 60.14; H, 6.64; N, 3.69%.

ゲニステイン ビス - サルファメート ( 図 1、5、G e n M A T E ) を、2 . 5 当量水素化ナトリウムが使用されることを除いて同一の手順によってゲニステイン ( 図 1、6 ) から調製した。

【 0 1 9 0 】

2 - メトキシエストロンおよび他のステロイド、サイトカラシン B を、S i g m a ( P o o l e、D o r s e t、U K ) から得た。スルファモイル反応のためのゲニステインを、L a n c a s t e r ( M a n c h e s t e r U K ) から得た。

【 0 1 9 1 】

( 2 - エチルエストロン ( 2 - E t E 1 ) および 2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメート ( 2 - E t E M A T E ) の合成 )

2 - エチルエストロン ( 2 - E t E 1 ) および 2 - エチルエストロン - 3 - O - サルファメート ( 2 - E t E M A T E ) を、以下のように調製した：手短には、エストロン - 3 - O - メチルエーテルの F r i e d e l - C r a f t s アセチル化および触媒的水素化、続いて、脱メチル化反応により、2 - エチルエストロン ( 2 - E t E 1 ) を得、これを、塩化スルファモイルと反応して、対応する 3 - O - サルファメート ( 2 - E t E M A T E ) を得た。2 - エチルエストラジオールを、異なる経路 ( 2 1 ) によって以前に合成した。化合物を、テトラヒドロフラン ( T H F ) 中の 1 0 m M ストックとして調製した。

【 0 1 9 2 】



( 2 - アセチルエストロン 3 - メチルエーテル ( 8 ) )  
 無水塩化アルミニウム ( 3 . 7 6 g 、 2 8 . 2 0 m m o l ) およびアセチルクロリド ( 2 . 0 m l 、 2 8 . 1 3 m m o l ) および無水ニトロメタン / ジクロロメタン ( 5 0 m l ) の 0 の懸濁液に、エストロンメチルエーテル ( 4 . 0 g 、 1 4 . 0 7 m m o l ) を添加した。室温にて 5 時間攪拌した後、この反応混合物を、10% HCl ( 1 0 0 m l ) に注ぎ、そして生じた混合物を、酢酸エチル ( 3 × 1 0 0 m l ) で抽出した。合わせた有機抽出物を、中性になるまでブラインで洗浄し、乾燥し ( M g S O <sub>4</sub> ) 、濾過し、そしてエバポレートした。得た黄色 / 茶色残渣を、メタノールを用いて粉碎し、そして生じた白色沈殿物を、濾過によって収集し、そして空気乾燥して白色個体 ( 4 . 3 g ) を得、これを、メタノールから再結晶して、8 を白色結晶 ( 4 . 0 g 、 8 7 % ) として得た ; m p 1 8 1 ~ 1 8 4 ( l i t . 1 8 9 ~ 1 9 0 ) <sup>224</sup> ; T L C ( クロロホルム / アセトン、8 : 1 ) : R f 0 . 8 2 ;

【 0 1 9 3 】

【 数 2 】

vmax (KBr) 1730 (C-17, C=O), 1670 (acetyl, C=O) cm<sup>-1</sup>; δ<sub>H</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 0.9 (3H, s, C-18-CH<sub>3</sub>), 1.39-2.54 (13H, m), 2.61 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.94 (2H, t, J = 4.4 Hz, C-6-H<sub>2</sub>), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.69 (1H, s, C-4-H), and 7.7 (1H, s, C-1-H); δ<sub>C</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 13.83 (q, C-18), 21.56 (t), 25.82 (t), 26.3 (q, CH<sub>3</sub>CO), 29.9 (t), 31.44 (t), 31.93 (t), 35.84 (t), 38.24 (d), 43.75 (d), 47.95 (s, C13), 50.33 (d), 55.5 (q, OCH<sub>3</sub>), 111.81 (d, C-4), 127.66 (d, C-1), 125.67 (s), 132.08 (s), 143.21 (s), 157.15 (s, C-3), 199.39 (s, C=O) and 220 (s, C-17-C=O). MS *m/z* (FAB+) 327.2 [100, (M+H)<sup>+</sup>], 311.2 (10), 173.2 (5). 分析値 C, 77.4; H, 8.04 C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> 計算値: C, 77.27; H, 8.03%.

( 2 - エチルエストロン 3 - メチルエーテル ( 9 ) )  
 T H F / エタノール ( 1 : 2 ) ( 3 0 m l ) 中の 8 ( 1 . 0 g 、 3 . 0 6 3 m m o l ) の溶液を、Pd - C ( 1 . 0 g 、 1 0 % ) の存在下で室温にて 5 0 p s i にて 2 4 時間水素添加した。補助触媒を濾過により除去した後、濾液をエバポレートして白色固体 ( 9 5 0 m g ) を得、これを、フラッシュクロマトグラフィー ( クロロホルム / アセトン勾配 ) によって分取した。極性の少ない画分は、白色個体 ( 8 0 5 m g ) を与え、これを、メタノールからさらに再結晶によって精製して、9 ( 7 7 5 m g 、 7 8 % ) を白色結晶として得た ; m p 1 1 2 ~ 1 1 5 ; T L C ( クロロホルム、およびクロロホルム / アセトン、8 : 1 ) : R f s それぞれ 0 . 5 6 および 0 . 7 8 ;

【 0 1 9 4 】

【 数 3 】

10

20

30

40

vmax (KBr)

1730 (C=O), 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 0.91 (3H, s, C-18- $\text{CH}_3$ ), 1.17 (3H, t,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.39-2.48 (13H, m), 2.62 (2H, q, C-2- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.87 (2H, m, C-6- $\text{H}_2$ ), 3.81 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 6.58 (1H, s, C-4-H), and 7.08 (1H, s, C-1-H);  $\delta_{\text{C}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 13.86 (q), 14.54 (q), 21.58 (t), 22.86 (t), 25.82 (t), 26.17 (t), 29.72 (t), 31.63 (t), 35.88 (t), 38.23 (d), 44.04 (d), 48.23 (s, C13), 50.38, 55.32 (q,  $\text{OCH}_3$ ), 110.8 (d, C-4), 126.34 (d, C-1), 130.08 (s), 131.31 (s), 134.71 (d), 155.41 (s) and 220 (C-17, C=O); MS  $m/z$  (FAB+) 312.1 [100, (M)<sup>+</sup>]. 分析値 C, 80.5; H, 9.03  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$  計算値 C, 80.73; H, 9.03%.

10

( 2 - エチルエストロン ( 10 ) )

塩化アルミニウム ( 1 . 2 8 g 、 9 . 6 1 5 m m o l ) 、 ヨウ化ナトリウム ( 1 . 4 4 g 、 9 . 6 1 5 m m o l ) および 9 ( 3 0 0 m g 、 9 6 1 . 5  $\mu$  m o l ) を、このオーダーでアセトニトリル ( 2 5 m l ) およびジクロロメタン ( 1 2 . 5 m l ) の混合物に  $\text{N}_2$  下 0 にて添加した。生じた懸濁液を、還流下で 8 時間加熱し、室温まで冷却し、次いで、水に注ぎ、続いて、ジクロロメタン (  $3 \times 1 0 0$  m l ) で抽出した。合わせた D C M 抽出液を、10% のチオ硫酸ナトリウム ( 1 0 0 m l ) 、ブラインで洗浄し、乾燥 (  $\text{MgSO}_4$  ) し、濾過し、そしてエバポレートして黄色の固体 ( 2 9 0 m g ) を得、これを、フラッシュクロマトグラフィー ( クロロホルム / アセトン勾配 ) によって分取した。単離した黄色の個体 ( 2 5 4 m g ) を、アセトンから再結晶によってさらに精製し、10 ( 2 4 0 m g 、 8 3 % ) を黄色の結晶として得た : m p 2 0 1 - 2 0 4 ; T L C ( クロロホルム および クロロホルム / アセトン ( 8 : 1 ) ) : R f それぞれ 0 . 3 および 0 . 6 5 ;

20

【 0 1 9 5 】

【 数 4 】

vmax

(KBr) 3300 (OH), 1720 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 0.91 (3H, s, C-18- $\text{CH}_3$ ), 1.22 (3H, t,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.38-2.51 (13H, m), 2.63 (2H, q, C-2- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.86 (2H, m, C-6- $\text{H}_2$ ), 4.68 (1H, br s, 反転 :  $\text{D}_2\text{O}$ , OH), 6.52 (1H, s, C-4-H) and (1H, s, C-1-H); MS  $m/z$  (FAB+) 298.0 [100, (M)<sup>+</sup>], 271.9 (10), 255.1 (10); MS  $m/z$  (FAB-) 297.1 [100, (M-H)<sup>-</sup>], 276.0 (45), 258.0 (40); Acc. mass (FAB+) 298.1928 計算値  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$  298.1933.

30

( 2 - エチルエストロン 3 - O - サルファメート ( 1 1 ) )

10 ( 1 5 0 m g 、 5 0 2 . 6  $\mu$  m o l ) および 2 , 6 - ジ - t - ブチル - 4 - メチルピリジン ( D B M P ) ( 3 1 0 m g 、 1 . 5 1 m m o l ) の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( 1 0 m l ) の攪拌溶液に塩化スルファモイルのトルエン溶液 ( 3 . 0 1 6 m m o l ) を滴下した。2 時間の攪拌後、反応混合物を、ジクロロメタン ( 1 0 0 m l ) で希釈し、そして生じた混合物を、ブラインで洗浄し、乾燥 (  $\text{MgSO}_4$  ) し、濾過し、そしてエバポレートした。得た残渣 ( 1 7 0 m g ) を、フラッシュクロマトグラフィー ( クロロホルム / アセトン勾配 ) によって分取し、そして単離した白色固体 ( 1 5 5 m g ) を、酢酸エチル / ヘキサン ( 1 : 2 ) からの再結晶によってさらに精製し、11 を白色結晶 ( 1 4 6 m g 、 7 7 % ) として得た ; m p 1 6 5 - 1 6 7 ; T L C ( クロロホルム / アセトン ( 8 : 1 ) ) : R f 0 . 4 1 ;

40

【 0 1 9 6 】

50

## 【数5】

$\nu_{\max}$  (KBr) 3500-3300 ( $\text{NH}_2$ ), 1720 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1390 ( $\text{SO}_2\text{N}$ )  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 0.91 (3H, s, C-18- $\text{CH}_3$ ), 1.22 (3H, t,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ -), 1.41-2.55 (13H, m), 2.71 (2H, q, C-2- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.89 (2H, m, C-6- $\text{H}_2$ ), 5.0 (2H, br s, 交換:  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{OSO}_2\text{NH}_2$ ), 7.11 (1H, s, C-4- $\text{H}$ ) and 7.2 (1H, s, C-1- $\text{H}$ ); MS  $m/z$  (FAB+) 531.2 [10, (M+H+NBA) $^+$ ], 377.1 [100, (M) $^+$ ], 298.2 [20, (M+H- $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) $^+$ ]; MS  $m/z$  (FAB-) 530.1 [30, (M+NBA)], 376.1 [100, (M-H)], 275.1 (10); Acc. MS (FAB+) 377.1683 計算値  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{S}$  377.1661. 10  
 分析値 C, 63.4; H, 3.73; N, 7.4 計算値:  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{S}$  C, 63.63; H, 3.71; N, 7.21%.

## (実施例1 - 細胞培養)

MCF-7 (Er+) および MDA-MB-231 (ER-) 乳癌細胞を、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から得た。細胞を、Eagleの最小基本培地 (EMEM) 中で HEPES 緩衝液 (20 mM) を用いて 25  $\text{cm}^2$  培養フラスコ中に慣用的に培養した。この培地を、L-グルタミン (2 mM)、炭酸水素ナトリウム (10 mM)、1% の非必須アミノ酸および 5% (v/v) 仔ウシ胎児血清 (FCS) を用いて補充した。試験化合物を添加する前に、細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を用いて洗浄し、そして処置物質を、フェノールレッドがない培地 (2% の裸の FCS および補充物を含む) 中に添加した。MCF-7 細胞の増殖における 2-MeOE1 または 2-MeOEMATE の効果を、Cell Titer 96 細胞増殖アッセイ (Promega, Southampton, Hants, UK) を用いて製造者の使用説明書に従って評価した。これについて、細胞 (ウェルあたり 5000) を、フェノールレッドおよび 10% FCS を含有する培地中に培養し、そしてアッセイを実施する前に薬物に 4 日曝した。MDA-MB-231 細胞について、細胞数を、Coulter 計算器を用いて決定した。 20

## 【0197】

繊維芽細胞の培養物について、反応した腫瘍組織を、刻み、そして EMEM 中で 37 °C にて コラゲナーゼ (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を用いて 18 ~ 24 時間インキュベートした。この分散細胞を、遠心分離によって収集し、培地を用いて 2 回洗浄し、コラゲナーゼを除去した。分散した細胞を、毎週を基本に継代させる前に、培養フラスコに播種し、コンフルエンスに増殖した。実験の目的のために、12 ウェルマルチプレートまたは 25  $\text{cm}^2$  フラスコを、繊維芽細胞を用いて播種し、そして 70 ~ 80% コンフルエンスまで増殖させた。細胞を、PBS を用いて洗浄し、そして Coulter 計算器を用いて細胞数を決定する前に、薬物に 24 時間曝した。 30

## 【0198】

コントロール細胞および処理した細胞の顕微鏡写真を、光の通常の条件下および Olympus CK2 顕微鏡下で Olympus SL35 Type 12 カメラを用いて (x 100 倍) 曝露下で取った。 40

## 【0199】

## (結果)

MCF-7 細胞の増殖における 2-MeOE1 または 2-MeOEMATE の 4 日にわたる効果を、マイクロウェルプレート増殖アッセイ (図 2) を用いて決定した。0.1  $\mu\text{M}$  または 1.0  $\mu\text{M}$  における 2-MeOE1 は、MCF-7 細胞の増殖においてほとんど効果を有さなかったが、10  $\mu\text{M}$  において 19% まで増殖を減少させた。反対に、2-MeOEMATE は、細胞増殖を 29% および 52% (それぞれ、0.1  $\mu\text{M}$  および 1.0  $\mu\text{M}$ ) まで阻害した。しかし、細胞増殖におけるさらなる効果を、細胞がより高い (10  $\mu\text{M}$ ) 濃度の 2-MeOEMATE に曝される場合、検出した。 50

## 【0200】

MCF-7細胞の2-MeOEMAへの曝露は、細胞形態学(図3)における注目すべき効果を有した。未処理の細胞(図3a)において、ほんの少しの成熟細胞を、視野あたり可視化し、一方で、2-MeOEMATE(1 $\mu$ M)で24時間処置した細胞について、成熟細胞および孤立細胞の数は、有意に増加した(図3b)。反対に、2-MeOE1(1 $\mu$ M)は、細胞形態学においてほとんど効果を有しなかった(図3c)。10 $\mu$ Mにおいて試験された場合、エストロンまたはEMATEは、細胞形態学に影響を及ぼさなかった(データは示されない)。2-MeOEMATE(1 $\mu$ M)は、ERネガティブMDA-MB-231乳癌細胞形態学および数において同様の効果を有した(図4aおよび4b)。1 $\mu$ Mにおいて、MDA-MB-231細胞の数は、未処理細胞と比べて21%まで減少された。間質コンパートメントが胸部腫瘍の容量の主要部分を構成する場合、胸部腫瘍誘導繊維芽細胞の形態学における2-MeOEMATEをまた、実験した(図5)。1 $\mu$ Mにおいて、細胞形態学における効果は、ほとんど検出されなかった(図5b)が、一方で、5 $\mu$ Mにおいて、繊維芽細胞の有意な部分の丸みが、生じた(図5c)。上皮細胞数における2-MeOEMATEの効果と反対に、それは、繊維芽細胞の数を減少しなかった。

10

## 【0201】

(実施例2-フローサイトメトリー分析)

細胞を2-MeOE1、2-MeOEMATEまたはビヒクルの存在下で48時間までの間培養した。細胞周期に対する2-MeOEMATEの効果の可逆性を調べるために、細胞を薬剤で24時間処理し、その後細胞を洗浄し、新しい培地で薬剤なしでさらに24時間培養した。

20

## 【0202】

DNA含有量の分析のために細胞を準備するために、細胞をトリプシン処理(0.25%トリプシン、0.02%EDTA)し、PBSで洗浄し、70%エタノールで固定した。細胞を遠心分離によって採取し、PBS(1~2 $\times 10^6$ 細胞/ml)で再び懸濁し、RNaseA(0.1mg/ml)で処理し、ヨウ化プロピジウム(0.05mg/ml)で30分間室温で染色した。細胞をフローサイトメーター(FACscan, Becton Dickinson, Immunocytometry System, Bedford MA)で分析した。

30

## 【0203】

(結果)

MCF-7細胞を2-MeOEMATE(10 $\mu$ M)で処理し、細胞周期分布をフローサイトメトリーで分析した。タイムコースの研究によって、G<sub>2</sub>/M期における細胞の連続的な増加を示し、処理後12時間で効果が明らかとなった(図6)。

## 【0204】

細胞周期のG<sub>1</sub>期における細胞の割合は、2-MeOEMATEに12時間または24時間さらした後、未処理細胞の66%から、それぞれ50%および23%に減少した。G<sub>2</sub>/M期の細胞の割合にも相当する増加があり、S期には細胞において検出できる変化がほとんどなかった。

40

## 【0205】

可逆性の研究では、再びMCF-7細胞を2-MeOEMATE(10 $\mu$ M)に24時間または48時間さらしたところ、細胞周期のG<sub>2</sub>/M期の細胞の割合の著しい増加を示した(図7a-d)。24時間薬剤にさらした細胞について、その後薬剤を取り除き、細胞を無薬剤培地でさらに24時間培養したところ、かなりの割合の細胞がG<sub>2</sub>/M期に引き止められたままであった(図7e)。細胞周期の前G<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>、SまたはG<sub>2</sub>/M期の細胞の定量(表1)によって、相互の、G<sub>1</sub>期の細胞の割合の減少およびG<sub>2</sub>/M期の増加が確かめられた。しかし、前G<sub>1</sub>期画分の細胞の割合のかなりの増加がまた検出された。前G<sub>1</sub>期画分の細胞がアポトーシスを起こしている細胞を示し得る。

## 【0206】

50

表1：2-MeOEMATE (10  $\mu$ M) の細胞周期分布に対する影響

	前G <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
コントロール24時間	9	51	21	19
2-MeOEMATE 24時間	22	10	8	60
2-MeOEMATE 24時間	27	8	7	57
+24時間無薬剤培地				
コントロール48時間	4	76	8	12
2-MeOEMATE 48時間	18	14	9	58

(実施例3 - TUNEL分析)

2-MeOEMATEのMCF-7細胞でアポトーシスを誘導する能力を、インサイチュ  
細胞死検出キット(Boehringer Mannheim UK Ltd., Lewes,  
East Sussex, UK)を用いて、TUNEL分析によって調査した。細胞  
を製造者の指示に従って固定し浸透化した。染色されたアポトーシスの細胞をフローサイ  
トメトリーで定量した。

【0207】

(結果)

前G<sub>1</sub>期の画分の細胞はアポトーシスを起こす細胞を表し得るという可能性を、TUNEL  
分析によるさらなる実験で確かめた(図8)。染色した後において、未処理細胞では蛍  
光標識した細胞の割合の増加を検出しなかった。対照的に、2-MeOEMATE (10  
 $\mu$ M)に48時間さらした後、蛍光標識した細胞の割合のかなりの増加があった。蛍光標  
識した細胞は、細胞集団の約10%を表した。この結果は2-MeOEMATEが、アポ  
トーシスを起こす細胞を誘導し得ることを示している。

【0208】

(実施例4 - インタクトなラットのNMUによって誘導される哺乳動物の腫瘍の増殖に対  
する2-MeOEMATEの効果)

哺乳動物の腫瘍の増殖に対する2-MeOEMATEの効果をルードウィグラット(Harlan  
Olac, Bicester, UK)を用いた予備研究で調査し、腫瘍はNMU  
の接種によって誘導した。腫瘍の発生を定期的に観察し、体積が0.5~1.0 cm<sup>3</sup>  
になった場合、動物にビヒクル(プロピレングリコール、200  $\mu$ l/日、経口)、2-  
MeOEMATE (20 mg/kg/日、経口)、あるいは2-MeOE1 (20 mg/kg/日、経口)を11日間毎日受容させた。腫瘍の長さおよび幅をカリパスで計測し、  
腫瘍の体積を記載されたように計算した(21)。

【0209】

(結果)

インピボでの腫瘍の増殖を阻害する2-MeOE1および2-MeOEMATEの能力を  
比較するために予備研究を行った。この研究のために哺乳動物の腫瘍の増殖をNMUの接  
種によって開始させた。腫瘍の体積が0.5~1.0 cm<sup>3</sup>に達したとき、薬剤を経口投  
与した。ビヒクルを受容した動物のうちの2匹は、腫瘍体積が増加し続け(平均82%)  
、これに対して3匹目の動物には腫瘍体積にほとんど変化は検出しなかった(図9)。2-  
MeOE1を受容した2匹の動物は、11日間の研究にわたって、一匹目の動物は腫瘍  
体積に変化はなく、もう一匹に中程度(25%)の減少が検出された。

【0210】

2-MeOEMATEを受容した3匹の動物は、一匹目の動物は腫瘍体積が6日目まで増  
加し続けたが、その後少し(8%)減少した。対照的に2-MeOEMATEを受容した  
他の2匹の動物は、腫瘍は急激に後退し、11日の最後には、かろうじて分かるぐらいで  
あった。2-MeOEMATEを受容した2匹の動物の後退する腫瘍体積を、さらに33  
日間観察し、この間、腫瘍の再増殖は検出されなかった。

【0211】

(実施例5 - 2-メトキシサルファメートまたは2-エチルエストロンサルファメートのMCF-7乳癌細胞の増殖に対する非可逆効果)

10

20

30

40

50

## 手順

## (段階 1)

MCF-7 乳癌細胞を多ウェル培養プレートに 1 ウェル当り  $10^5$  細胞の密度で播種した。次のように処理する際、細胞が付着して約 30% のコンフルエントになるまで増殖させた。

## 【0212】

コントロール - 無処理

2 - MeOE1 5  $\mu$ m

2 - MeOE1 1  $\mu$ m

2 - MeOEMATE 5  $\mu$ m

2 - MeOEMATE 1  $\mu$ m

2 - EtE1 5  $\mu$ m

2 - EtE1 1  $\mu$ m

2 - EtEMATE 5  $\mu$ m

2 - EtEMATE 1  $\mu$ m

細胞を 6 日間、上記の薬剤を含んだ増殖培地で、3 日ごとに培地 / 薬剤を変化させ、増殖させた。この期間の終わりには細胞の数をクォーターセルカウンターを用いてカウントした。

## 【0213】

実験のこの最初の段階の結果を図 10 に示す。コントロールと比較すると、2 - メトキシエストロンまたは 2 - エチルエストロンは細胞の増殖にほとんど効果がなかった。対照的に、5  $\mu$ m または 1 m の 2 - メトキシエストロンサルファメートで細胞を処理すると、細胞の数がそれぞれコントロールの細胞の数の 43% および 52% に減少した。2 - エチルエストロンサルファメートを用いた細胞の処理後の対応する数値はそれぞれ 36% および 50% であった。

## 【0214】

## (段階 2)

上述の薬剤で 6 日間細胞を処理したのち、細胞を 1 ウェル当り  $10^4$  細胞の密度で再播種した。それ以上の処理は加えなかった。細胞は増殖培地の存在下でさらに 6 日間増殖させておいた。この期間の最後に細胞の数を再びカウントした。

## 【0215】

実験のこの部分の結果を図 11 に示す。コントロールと比較して 2 - メトキシエストロンまたは 2 - エチルエストロンは細胞の数にほとんど効果が無く、これらの化合物はこれらの細胞に対する不可逆の増殖阻害の効果が無いことを示した。

## 【0216】

対照的に、2 - メトキシエストロンサルファメートまたは 2 - エチルエストロンサルファメートのどちらで処理した細胞も、激しく細胞の増殖を制限された。これらの結果は、一旦細胞が 2 - メトキシエストロンサルファメートまたは 2 - エチルエストロンサルファメートにさらされると、それらの増殖が非可逆的に損なわれることを示している。

## 【0217】

(実施例 6 - 非ヒドロカルビル基 / オキシヒドロカルビル基で置換したサルファメートの MCF-7 乳癌細胞の増殖に与える効果)

## 手順

上に記載した段階 1 および段階 2 をコントロール - 無処理、EMATE 20  $\mu$ M および EMATE 5  $\mu$ M を用いて繰り返した。

## 【0218】

段階 1 および段階 2 の結果は：

段階 1 EMATE 20  $\mu$ M = コントロールの 119%

EMATE 5  $\mu$ M = コントロールの 139%

段階 2 EMATE 20  $\mu$ M = コントロールの 103%

EMATE 5  $\mu$ M = コントロールの 98%

これらのデータは、細胞周期の抑制および/または防止および/または阻止を達成する本発明の化合物のヒドロカルビル基/オキシヒドロカルビル基での置換の重要性を示している。

#### 【0219】

(実施例7 - 細胞周期およびアポトーシス分析)

MCF7、CAL51、CAMA1およびZR-75-1の乳癌由来の細胞株をATCC (MCF7、CAMA1、ZR-75-1)またはDuttrillaux laboratory (CAL51) (22) から入手し、10% (v/v) ウシ胎仔血清および抗生物質を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で維持した。

10

#### 【0220】

DNA含有量を、ヨウ化プロピジウムで染色した細胞のフローサイトメトリー分析およびTdT媒介のdUTPニックエンドラベリング (TUNEL) によって、それぞれ記載 (20) されたように決定した。細胞周期のG2/M期の細胞の割合を、2N DNA含有量を有する細胞の4N DNA含有量を有する細胞に対する割合として計算した。前G1期のDNA含有量の細胞の割合を総細胞のパーセンテージとして計算した。

#### 【0221】

有糸分裂の細胞の割合を決定するために、薬剤処理の細胞をトリプシン処理で回収し、サイトスピンで調製した。細胞を氷冷したメタノールで5分間固定し、空気乾燥し、DNAをヨウ化プロピジウム (PI) (10% (v/v) 新生仔ウシ血清および0.05% (w/v) アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の0.1 mg/ml) で染色した。細胞をLSM510共焦点システム (Zeiss, Jena, Germany) を装備したZeiss Axiovert 100M顕微鏡を使用し、共焦点顕微鏡法で分析した。

20

#### 【0222】

本発明者らは、乳癌細胞株のサルファモイル化したエストロンの増殖抑制効果に対する異なった感受性が、細胞周期の阻止および/または細胞死の程度/時期の差異に関係しているのかどうかを調べた。これらの研究は2-EMATEに焦点を絞っている。なぜなら本発明者らは、たやすく比較的大量の本化合物を合成できるからである。本発明者らはまずヨウ化プロピジウム (PI) で染色した細胞のフローサイトメトリー分析を用いて、MCF7、ZR-75-1、CAL51およびCAMA1の細胞のDNA含有量に対する2-EMATEの効果を調査した (図13および表2)。細胞を500 nMの2-EMATEで処理した。なぜならこれはそれぞれの細胞株でかなりの増殖抑制を与える最も低い用量だからである (図14)。MCF7細胞は24時間以内に細胞周期のG2/M期に蓄積し、細胞は48時間後に最大数が阻止する (約60%の細胞)。72時間および96時間で細胞死を示す前G1期のDNA含有量の細胞におけるわずかな増加があったが、この阻止を実験の期間中維持した。G2/M期の阻止がこれらの細胞で遅れたけれども (72時間後のG2/M期の60%の細胞)、同様の結果がZR-75-1細胞で得られた。対照的に、マイクロタイタープレートアッセイ (図14) で、MCF7細胞あるいはZR-75-1細胞よりもっと感受性の高いCAL51およびCAMA1細胞はもっと迅速なG2/M期の阻止を経験した (約60%の細胞が24時間以内にG2/M期に存在した)。さらに2-EMATEは48時間以内にかなりの細胞死を誘導し、約半数の細胞が96時間後に死んだ (表2)。

30

40

#### 【0223】

(表2. 乳癌細胞株のDNA内容に対する2-EMATEの効果。) 2-EMATE (500 nM) に96時間までさらしたMCF7、ZR-75-1、CAL51およびCAMA1細胞の細胞周期パラメーター。G1/SあるいはG2/M期の細胞の割合を2NのDNA含有量を有する細胞の合計の4NのDNA含有量を有する細胞の合計のパーセンテージとして表す。前G1期のDNA含有量の細胞の割合を細胞の合計のパーセントとして表す。未処理細胞は96時間である。

50

【 0 2 2 4 】

【表 2】

細胞株	MCF7				ZR-75-1		
	<G1	G1/S	G2/M		<G1	G1/S	G2/M
未処理	2	77	23		1	79	20
24時間	5	63	37		1	84	15
48時間	5	38	62		6	60	40
72時間	12	34	66		12	37	63
96時間	8	29	71		9	20	80
細胞株	CAL51				CAMA1		
	<G1	G1/S	G2/M		<G1	G1/S	G2/M
未処理	1	78	22		4	70	30
24時間	2	38	62		4	33	67
48時間	10	18	82		16	25	75
72時間	21	32	68		36	33	67
96時間	44	23	77		51	33	67

10

フローサイトメトリー分析は、サルファモイル化エストロン誘導体で処理した細胞が、細胞周期の G 2 / M 期に阻止することを示した。2 - E t E M A T E または 2 - M e O E M A T E で処理した細胞はしばしば特徴的な「丸い」形態を持ち（参考文献 2 0 およびデータは示さない）、細胞が実際に有糸分裂で阻止することを示している。細胞が間期つまり有糸分裂期であるのか否かを決定するために、本発明者らは薬剤処理した M C F 7 細胞を P I で染色し染色体を視覚化した。予備実験で本発明者らは、「丸い」細胞は蛍光染色実験に使用したコラーゲン処理したガラススライドに固定しないことを発見し、そのため本発明者らは、トリプシン処理によって全ての細胞を回収し、染色の前にサイトスピンで調製した。コントロール M C F 7 細胞の大多数は濃縮されていない染色体を持つ間期の細胞に特徴的な、均一に染色された核を持った（図 1 5 および表 3）。対照的に、2 - E t E M A T E または 2 - M e O E M A T E で処理した、かなりの割合の細胞が有糸分裂に特徴づけられた濃縮された染色体を示した。そのため、サルファモイル化エストロン誘導体は有糸分裂の阻止を誘導する。F A C s アッセイの効果の欠如と一致して（図 1 3）、非サルファモイル化エストロン誘導体は有糸分裂細胞の数を増加させなかった。これらの実験でサイトスピンを使うことが必要であることから、サルファモイル化エストロン誘導体で処理した細胞の染色体の構造を決定するのは難しい。しかし、染色体は十分に濃縮されているようであり、細胞が前中期 / 中期に達していることが示唆された。

20

30

【 0 2 2 5 】

（表 3 . エストロン誘導体の M C F 7 細胞の有糸分裂に対する効果。）M C F 7 細胞を指示された化合物で 2 4 時間処理した。細胞はトリプシン処理で回収し、サイトスピンで調製した。DNA を P I で染色し、有糸分裂の細胞（すなわち、濃縮した染色体を有する）を総細胞のパーセンテージとして決定した。

【 0 2 2 6 】

40

薬剤	有糸分裂細胞
コントロール	4 %
2 - E t E M A T E、5 $\mu$ M	4 9 %
2 - E t E M A T E、5 0 0 n M	2 9 %
2 - M e O E M A T E、5 $\mu$ M	3 8 %
2 - M e O E M A T E、5 0 0 n M	2 6 %
2 - E t E 1、5 $\mu$ M	6 %
2 - E t E 1、5 0 0 n M	4 %

本発明者らは、T U N E L アッセイを用いて、P I 染色した細胞のフローサイトメトリーによって検出された細胞死がアポトーシスに起因したことを確かめた。2 - E t E M A T

50



Eにさらした後(500 nM、72時間)、アポトーシスを起こすCAL51およびCAMA1細胞の割合のかなりの増加があった(それぞれ60%および37%のTUNEL陽性細胞)(図16)。対照的に、2-ETEMATEをこの濃度で処理したMCF7あるいはZR-75-1細胞(それぞれ7%および10%)のTUNEL陽性のわずかな増加のみがあった。

#### 【0227】

まとめると、これらの分析は、サルファモイル化エストロンで短期間の増殖を抑制されることに対する乳癌細胞株の感受性の変化は細胞周期およびアポトーシスに対する効果の差異を反映していることを示している。2-ETEMATEは全ての細胞株においてG2/Mの阻止を誘導するが、これは、ER陽性のMCF7およびZR-75-1細胞よりも比較的感受性のER陰性のCAL51およびCAMA1細胞で、より迅速に起こった。さらに、2-ETEMATEは、MCF7およびZR-75-1細胞よりも、CAL51およびCAMA1細胞で、より能力のあるアポトーシスの誘導剤であった。

#### 【0228】

(考察)

本発明者らの結果は、2-メトキシエストロゲンあるいはそれらの合成アナログが癌治療の薬物の新しい種類であると示している証明(23、24)にさらに重みを加える。本化合物、例えば2-MeOEMATEは、以前に2-MeOE2に関して発見されたように、MCF-7およびMDA-MD-231の乳癌細胞の形態および成長に目立った効果を有した。胸の腫瘍に由来する線維芽細胞はまた、2-MeOEMATEに応答して同様の丸みを示したが、これらの細胞で形態的な変化を誘導するには、より高い濃度が必要であった。

#### 【0229】

2-MeOEMATEがER+およびER-の乳癌細胞の成長に与える目立った効果が、例えば2-メトキシエストロゲンサルファメートなどの本化合物が、ホルモン依存およびホルモン独立の胸腫瘍の両方に対して活性があるべきと確認している。1 μMでは2-MeOE1はMCF-7細胞の増殖に対してほとんど効果を持たなかった。これに対し、2-MeOEMATEは、この濃度では増殖を52%抑制した。インビトロアッセイでのサルファメート基の2-MeOE1への付加によって与えられる増加した能力の理由は、たやすく明らかににはならない。エストロゲンサルファメートを用いるインビボでの研究から、これらの化合物がゆっくりとrbcより放出され、ステロイドの血中濃度が延長して増加することが公知である(17)。他のインビボの研究は、EMATEが単一量あるいは複数量の後、長い期間、ステロイドスルファターゼを不活性化することができることを示した(25)。このようにEMATEは細胞性タンパク質に結合し、そこからゆっくりと放出されるようである。このことは、細胞の増殖を減少できる2-MeOE1の能力と比較して、インビトロのサルファメートの増強された能力の説明となり得る。

#### 【0230】

DNA分析から、本化合物は、例えば2-MeOE2およびタキソールのように2-MeOEMATEは、細胞周期の阻止、特に細胞周期のG<sub>2</sub>/M期の細胞の阻止を誘導することが明らかである(9、26、27)。しかし、2-MeOE2については、洗浄実験はかなりの割合の細胞が薬剤の除去後24時間までに細胞周期のG<sub>1</sub>/S期に再び入ったことを明らかにし(13)、その実験で細胞は最初の期間薬物にさらした後、無薬物培地で培養し続けた。対照的に本発明の化合物(2-MeOEMATE)では、細胞は薬物の除去後少なくとも24時間の間G<sub>2</sub>/M期に阻止したままであった。この発見は、本化合物は細胞タンパク質に結合し得るというさらなる証拠を提供する。

#### 【0231】

2-MeOEMATEは、全く新しい抗増殖効果を持っているが、有力なステロイドスルファターゼ抑制剤のままである(18)。

#### 【0232】

MCF-7細胞をEMATEにさらし、次いで薬物を除くために過度に洗浄するという同

10

20

30

40

50

様の実験は、ステロイドスルファターゼがほとんど完全に不活性の状態であることを示した(28)。

#### 【0233】

MCF-7細胞の成長を抑制するおよび、細胞が丸くなり放出されるのを誘導する2-MeOE2の能力は以前にこれらの細胞でのアポトーシスを誘導する能力の結果生じることが示されている(8, 9)。本調査では前G<sub>1</sub>期の画分の細胞のかなりの増加が、本化合物、すなわち2-MeOE MATE、にさらされた後に検出された。この画分中の細胞はアポトーシスを起こした細胞を示していると考えられる。TUNEL分析は2-MeOE MATEが細胞の集団がアポトーシスを起こすことを誘導することを確認した。2-MeOE2および、タキソールのような微小管の安定性を変化させる他の薬剤と同様に、本化合物(2-MeOE MATE)は腫瘍タンパク質のBcl-2のリン酸化を増加させることによって、おそらくアポトーシスを誘導する(27-29)。Bcl-2は抗アポトーシスであるタンパク質のファミリーに属しており、それらの能力は、アポトーシスがこれらのタンパク質をBaxのようなアポトーシス推進タンパク質と二量体化させること、およびアポトーシス推進タンパク質の不活性化を行なうことを抑制する(30, 31)。Bcl-2のリン酸化はBaxとの二量体になる能力を阻害し、アポトーシスの誘導を可能にする。Bcl-2のリン酸化は細胞周期のG<sub>2</sub>/M期の細胞の阻止期間に起こることが明示されている(30)。予備研究では、2-MeOE2は白血病細胞でのBcl-2のリン酸化を誘導することが分かっている(29)。このことは、2-メトキシエストロゲンが、微小管の損害を起こすタキソールおよび他の薬剤の作用と同様の作用メカニズムを有することを示している。

#### 【0234】

本化合物、特に2-MeOE MATEがインビトロ細胞増殖に与える目立った効果が、予備的なインビボ研究へと導いた。インビボでは、2-MeOE1を投与したある動物のNMU誘導性の哺乳動物の腫瘍は、穏やかな(25%)後退を示した。対照的に、2-MeOE MATEを投与した動物の2/3の腫瘍は研究11日後の終わりまでにほぼ完全に後退した。2-MeOE1と比較した2-MeOE MATEの増幅された効力は、スルファモイル化エストロゲンが親化合物より効力があるというインビトロの研究からの発見を支持する。

#### 【0235】

本化合物(2-メトキシエストロゲン)を用いた、ほかのインビボ腫瘍の研究もまた、奨励となる結果を生じたが、本研究で使用された量よりもはるかに高い量においてである。CH3マウスに1日おきに2-MeOE2(100mg/kg、経口)を投与したとき、皮下に接種したMethAサルコーマおよびB16黒色腫の腫瘍の成長をそれぞれ57%および83%とかなり減少させた(10)。本研究におけるように、この反応は比較的短い時間、12日という期間で達成された。これらの腫瘍の成長を抑制することに加えて、腫瘍の新生血管形成が目立って減少した。このことは、腫瘍増殖の阻害における2-メトキシエストロゲンの重要な作用を提唱する。2-MeOE2(75mg/kg/日、29日間)の経口投与もまた、SCIDマウスへのER-MDA-MB-435乳癌細胞の接種によって生じる腫瘍の成長を抑制した(11)。未処理のコントロールの腫瘍と比較して、腫瘍の体積は60%減少した。この比較的高い薬物使用量で毒性の副作用は検出されなかった。これらの動物研究に加えて、2-MeOE2は現在I/II期の試行を行なっているが、この試行の結果の詳細はまだ利用可能ではない(42, 43)。

#### 【0236】

インビボでの本研究では、2-MeOE MATEを使用したが、インビトロ調査では2-MeOE2が2-MeOE1よりも能力があると分かった(10)。しかしエストラジオールサルファメートでの実験から、胃の移行期に17-ヒドロキシル基が酸化され、ステロイドの還元形態がrbcから放出されることが公知である(17)。そのため、2-MeOE MATEの還元形態の経口投与から得られる利点は何も無いように思われる。

#### 【0237】

ほとんどの癌は最終的にホルモンか化学療法のいずれに対して抵抗性となるため、異なった細胞の標的に作用する薬物の開発は新しい癌療法の開発へのかなりの希望をもたらす。このタキソールの療法的用法は重要な発達であるが、その溶解度および毒性が長期使用を制限してしまうという問題がある。増強された効果、バイオアベイラビリティ、作用期間をもつ 2 - メトキシエストロゲンの形態としての 2 - M e O E M A T E の同定が、この薬剤が癌療法にとってのかなりの能力を持っていることを示唆している。

【 0 2 3 8 】

従って、要約すると、本発明は癌および、特に、乳癌の治療の際の使用に適した組成物および化合物を提供する。

【 0 2 3 9 】

特に、ある局面では、本発明は白血病および例えば胸、子宮内膜、前立腺、卵巣および膵臓の腫瘍などの固形腫瘍を含む癌の成長の阻害の問題に取り組む。

【 0 2 4 0 】

本発明は、エストロゲンに関連した条件に加え、ホルモンの条件を処置することに関することもまた考えられる。よって本発明はまたホルモン活性に影響を与え得、そして免疫応答に影響を与え得る組成物を提供しており、ここでは、この組成物は本発明の組成物である。

【 0 2 4 1 】

本発明の化合物 / 組成物は他の重要な医療とかかわりを有し得ることもまた理解される。

【 0 2 4 2 】

例えば、本発明の組成物は、W O - A - 9 8 / 0 5 6 3 5 に列挙されている障害の処置に有用であり得る。参照を容易にするために、列挙の一部をここに提示する：癌、炎症あるいは炎症性疾患、皮膚病学的疾患、発熱、心臓血管作用、出血、血液凝固および急性相反応、悪液質、食欲不振、急性感染、H I V 感染、ショック状態、対宿主性移植片反応、自己免疫疾患、再灌流障害、髄膜炎、片頭痛およびアスピリン依存の抗血栓症；腫瘍の増殖、侵襲および拡散、新脈管形成、転移、悪性の、腹水、および悪性の胸膜の滲出；大脳の虚血、虚血性心臓疾患、変形性関節症、慢性関節リウマチ、骨粗しょう症、喘息、多発硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、発作、脈管炎、クローン病および潰瘍性大腸炎；歯周炎、歯肉炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、水疱、角膜潰瘍化、網膜症、ならびに手術傷治療；鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー；再狭窄、うっ血性心臓不全、子宮内膜症、アテローム性動脈硬化症または内部硬化。

【 0 2 4 3 】

さらに、あるいは代替として、本発明の組成物はW O - A - 9 8 / 0 7 8 5 9 に列挙されている障害の処置に有用であり得る。参照を容易にするためにここで列挙の一部を提示する：サイトカインおよび細胞の増加 / 分化活性；免疫抑制薬あるいは免疫刺激剤活性（例えば、ヒト免疫欠損ウイルスの感染を含む免疫欠損の処置；リンパ球増殖の調節；癌および多くの自己免疫疾患の処置、および移植の拒絶の予防あるいは腫瘍の免疫の誘導のため）；造血の調節、例えば、脊髄あるいはリンパ球の疾患の処置；骨、軟骨、腱、靱帯および神経組織、例えば、創傷の治療、やけど、潰瘍、歯周病および神経変性の処置のため；小胞刺激ホルモンの抑制および活性化（受精能の調節）；化学走性活性 / ケモキネシス活性（例えば、特定の細胞型を傷害や感染の部位に動員するため）；うっ血および血栓崩壊の活性（例えば、血友病および発作の処置のため）；抗炎症性活性（例えば、敗血症性ショックあるいはクローン病の処置のため）；抗菌剤として；例えば、代謝または動作のモジュレーターとして；鎮痛薬として；特定の欠損疾患の処置；例えば、ヒトあるいは獣医学における乾癬の治療のとき。

【 0 2 4 4 】

さらに、あるいは代替として、本発明の組成物はW O - A - 9 8 / 0 9 9 8 5 に列挙されている障害の処置に有用であり得る。参照を容易にするためにここでリストの一部を提示する：マクロファージ抑制活性および / またはT細胞抑制活性、従って、抗炎症活性；抗

10

20

30

40

50

免疫活性、すなわち、炎症に関連しない反応を含む、細胞性および/または体液性の免疫反応に対する抑制効果；マクロファージおよびT細胞が、細胞外マトリックス成分およびフィブロネクチンに接着する能力、ならびにT細胞でのアップレギュレートされたfasレセプターの発現の抑制；以下を含む不必要な免疫反応および炎症の阻害：関節炎（慢性関節リウマチを含む）、過敏症、アレルギー反応、喘息、全身的紅斑性狼瘡、コラーゲン病および他の自己免疫疾患に関連する炎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化、アテローム硬化性心臓病、再灌流障害、心停止、心筋梗塞形成、血管炎症不全、呼吸困難症候群または他の心肺性疾患に関連する炎症、ペプシン潰瘍、ペプシン性大腸炎および他の胃腸道の疾患、ペプシン線維症、肝硬変もしくは他の肝臓疾患、甲状腺炎もしくは他の腺病、糸球体腎炎もしくは他の腎臓のおよび泌尿器科学の疾患、耳炎もしくは他の耳鼻咽喉科学の疾患、皮膚炎もしくは他の皮膚の疾患、歯周病もしくは他の歯の疾患、精巣炎もしくは精巣精巣上体炎、不妊症、精巣の外傷もしくは他の免疫関連の精巣病、胎盤機能不全、胎盤不全、習慣的中絶、子かん、子かん前および他の免疫および/もしくは免疫関連の婦人科学の病気、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ブドウ膜網膜炎、視覚神経炎、眼内炎症（例えば、網膜炎もしくは形斑状水腫、交感神経の眼炎、強膜炎、色素網膜炎、変性底病の免疫および炎症の構成物、眼性外傷の炎症構成物、感染によって起こされる眼性炎症、増殖性硝子体網膜症、急性虚血性眼神経障害、過度の瘢痕（例えば、緑内障濾過操作後、目の移植片に対する免疫反応および/または炎症反応）ならびに他の免疫および炎症に関連する眼病）に関連する炎症、中枢神経系（CNS）または任意の他の器官の両方で、免疫および/または炎症の抑制が有益である、自己免疫疾患あるいは状態あるいは障害に関連した炎症、パーキンソン病、パーキンソン病の治療の合併症および/または副作用、AIDS関連痴呆複合症、HIV-関連脳症、デビック病、シデンハム舞踏病、アルツハイマー病および他の変性疾患、CNSの状態または障害、ストークスの炎症構成物、ポリオ後症候群、精神的医学的障害の免疫および炎症の構成物、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性全脳炎、脳脊髄炎、急性神経障害、亜急性神経障害、慢性神経障害、ギヤン-バレー症候群、シデンハム舞踏病、重症筋無力症、偽腫瘍大脳、ダウン症候群、ハンティングトン病、筋萎縮外側硬化、CNS圧縮またはCNS外傷もしくはCNS感染の炎症要素、筋萎縮およびジストロフィーの炎症構成物、ならびに免疫および炎症の関連の疾患、中枢神経系および末梢神経系の状態または障害、外傷後の炎症、敗血性ショック、感染性疾患、手術の炎症性合併症または副作用、骨髄移植または他の移植の合併症および/または副作用、遺伝子治療の炎症ならびに/または免疫の合併症および副作用、例えば、ウイルスキャリアーでの感染による、あるいはエイズに関連した炎症、体液性および/または細胞性の免疫応答の抑圧もしくは抑制、単核細胞またはリンパ球の量を減らすことによる、単核細胞または白血球の増殖性疾患、例えば、白血病の治療または改善、天然または人工の細胞、組織および器官（例えば、角膜、骨髄、器官、レンズ、ペースメーカー、天然または人工の皮膚組織）の移植の際の、移植片拒絶の予防および/または処置のためのもの。

【0245】

（プロトコルI）

（非可逆の抑制）

（手順）

（段階1）

MC7-7乳癌細胞を、多ウェル培養プレートに1ウェル当たり $10^5$ 細胞の密度で播種した。以下のように処理する際、細胞を付着して約30%のコンフルエントになるまで増殖した。

【0246】

コントロール - 未処理

目的の化合物（COI）  $20 \mu\text{M}$

3日ごとに培地/COIを換え、細胞をCOIを含む増殖培地で6日間増殖した。この期間の最後には細胞の数をコールタル細胞カウンターを用いて計数した。

## 【 0 2 4 7 】

( 段階 2 )

COIで6日間細胞を処理した後、細胞を1ウェル当り $10^4$ 細胞の密度で再播種した。それ以上の処理は加えなかった。細胞は増殖培地の存在下でさらに6日間増殖させ続けた。この期間の最後に細胞の数を再び計数した。

## 【 0 2 4 8 】

上記明細書に記載した、すべての出版物および特許は本明細書中に参考として援用される。

## 【 0 2 4 9 】

本発明の様々な改変および変化は、発明の範囲および意図から逸脱することなく、当業者にとって明らかである。本発明を特定の好ましい実施形態に関して、記載したが、特許請求された本発明は過度にそのような特定の実施形態に制限されるべきではないと理解されるべきである。実際に、化学、生物学または関連分野の当業者にとって明らかな、本発明を実施するために記載した様式の様々な改変は、上記特許請求の範囲以内であることが意図される。

## 【 0 2 5 0 】

( 参考文献 )

1. Nebert, D. W. Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady-state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation and neuroendocrine function. *Molec. Endocrinol.*, 5:1203-1214, 1991.
2. Reed, M. J., Purohit, A., Woo, L. W. L., および Potter, B. V. L. The development of steroid sulphatase inhibitors. *Endocr. - Rel. Cancer*, 3:9-23, 1996.
3. Bradlow, H. L., Michnovicz, J. J., Telang, N. T., および Osborne, M. P. Effect of dietary indole-3-carbinol on oestradiol metabolism and spontaneous tumours in mice. *Carcinogenesis*, 12:1571-1574, 1991.
4. Bradlow, H. L., Sepkovic, D. W., Telang, N. T., および Osborne, M. P. Indole-3-carbinol: a novel approach to breast cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 728:180-200, 1995.
5. Bradlow, H. L., Davis, D. L., Lin, G., Sepkovic, D. W., および Tiwari, R. Effects of pesticides on the ratio of 16 $\alpha$ /2-hydroxyoestrone: a biological marker of breast cancer risk. *Environ. Health Perspect.*, 103(Suppl.):147-150, 1995.
6. Bradlow, H. L., Telang, N. T., Sepkovic, D. W., および Osborne, M. P. 2-Hydroxyoestrone: the 'good' estrogen. *J. Endocrinol.*, 150:S259-S265, 1996.
7. Zhu, B. T., および Conney, A. H. Is 2-methoxyoestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*, 58:2269-2277, 1998.

10

20

30

40

50

8. Seegers, J. C., Aveling, M. - L., Van Aswegen, C. H., Cross, M., Koch, F., および Joubert, W. S. The cytotoxic effects of oestradiol-17, catechol oestradiols and methoxyoestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J. Steroid Biochem.*, 32:797-809, 1989.
9. Seegers, J. C., Lottering, M. L., Grobler, C. J., Van Papendorp, D. H., Habbersett, R. C., Shou, Y., および Lehnert, B. E. The mammalian metabolite, 2-methoxyoestradiol affects p53 levels and apoptosis induction in transformed cells but not in normal cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 62:253-267, 1997.
10. Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M. S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P. P., および Schweigerer, L. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*, 368:237-239, 1994.
11. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., および D'Amato, R. J. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyoestradiol and taxol. *Cancer Res.*, 57:81-86, 1997.
12. D'Amato, R. J., Lin, C. M., Flynn, E., Folkman, J., および Hamel, E. 2-Methoxyoestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3964-3968, 1994. AND US Patent No. 5,504,074.
13. Attalla, H., Makela, T. P., Adlercreutz, H., および Andersson, L. C. 2-Methoxyoestradiol arrests cells in mitosis without depolymerising tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 228:467-473, 1996.
14. Howarth, N. M., Purohit, A., Reed, M. J., および Potter, B. V. L. Estrone sulphamates: potent inhibitors of estrone sulphatase with therapeutic potential. *J. Med. Chem.*, 37:219-221, 1994.
15. Purohit, A., Williams, G. J., Howarth, N. M., Potter, B. V. L., および Reed, M. J. Inactivation of steroid sulphatase by an active site-directed inhibitor, estrone-3-O-sulphamate. *Biochemistry*, 34:11508-11514, 1995.
16. Elger, W., Schwarz, S., Hedden, A., Reddersen, G., および Schneider, B. Sulphamates of various oestrogens as prodrugs with increased systemic and reduced hepatic oestrogen

- icity at oral application. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 55:395-403, 1995.
17. Elger, W., Palme, H.-J., および Schwarz, S. Novel oestrogen sulphamates: a new approach to oral hormone therapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 7:575-589, 1998.
18. Purohit, A., Vernon, K.A., Wagenaar-Humelink, A.E., Woo, L.W.L., Hejaz, H.A.M., Potter, B.V.L., および Reed, M.J. The development of A-ring modified analogues of oestrone-3-O-sulphamate as steroid sulphatase inhibitors with reduced oestrogenicity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 64:269-275, 1998. 10
19. Purohit, A., Hejaz, H.A.M., Woo, L.W.L., VanStrien, A.E., Potter, B.V.L., および Reed, M.J. Recent advances in the development of steroid sulphatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (In Press).
20. Woo, L.W.L., Purohit, A., Reed, M.J., および Potter, B.V.L. Active site directed inhibition of oestrone sulphatase by non-steroidal coumarin sulphamates. *J. Med. Chem.*, 39:1349-1351, 1996. 20
21. Wilkinson, J.R., Williams, J.C., Singh, D., Goss, P.E., Easton, D., および Coombes, R.C. Response of nitrosomethylurea-induced rat mammary tumor to endocrine therapy and comparison with clinical response. *Cancer Res.*, 46:4862-4865, 1986.
22. Vera, J.C., Reyes, A.M., Carcamo, J.G., Velasquez, F.V., Rivas, C.I., Zhang, R.H., Strobel, P., Iribarren, R., Scher, H.I., Slebe, J.C., および Golde, D.W. Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J. Biol. Chem.*, 271:8719-8724, 1996. 30
23. Cushman, M., He, H.-M., Katzenellenbogen, J.A., Lin, C.M., および Hamel, E. Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity and cytotoxicity of analogues of 2-methoxyoestradiol, an endogenous mammalian metabolite of oestradiol that inhibits tubulin polymerisation by binding to the colchicine binding site. *J. Med. Chem.*, 38:2041-2049, 1995. 40
24. Cushman, M., He, H.-M., Katzenellenbogen, J.A., Varma, R.K., Hamel, E., Lin, C.M., Ram, S., および Sachdeva, Y.P. Synthesis of analogues of 2-methoxyoestradiol with enhanced inh 50

- inhibitory effects on tubulin polymerisation and cancer cell growth. *J. Med. Chem.*, 40:2323-2334, 1997.
25. Purohit, A., Williams, G. J., Roberts, C. J., Potter, B. V. L., および Reed, M. J. In vivo inhibition of oestrone sulphatase and dehydroepiandrosterone sulphatase by oestrone-3-Osulphamate. *Int. J. Cancer*, 63:106-111, 1995.
26. Halдар, S., Jena, N., および Croce, C. M. Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:4507-4511, 1995. 10
27. Halдар, S., Chintapalli, J., および Croce, C. M. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 56:1253-1255, 1996.
28. Purohit, A., Reed, M. J., Morris, N. C., Williams, G. J., および Potter, B. V. L. Regulation and inhibition of steroid sulphatase activity in breast cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 784:40-49, 1996. 20
29. Attalla, H., Westberg, J. A., Andersson, L. C., Adlercreutz, H., および Makela, T. P. 2-Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 247:616-619, 1998.
30. Halдар, S., Basu, A., および Croce, C. M. Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.*, 57:229-233, 1997. 30
31. Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., El-Deiry, W. S., Kingston, D. G. T., Higgs, P. I., Nackers, L., および Fojo, T. Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res.*, 57:130-135, 1997.
32. Constantinou, A. I., Kamath, N., および Murley, J. S. Genistein inactivates bcl-2, delays the G<sub>2</sub>/M phase of the cell cycle and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer*, 34:1927-1934, 1998. 40
33. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.-I., Itoh, N., Shibuya, M., および Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 262:5592-5595, 1987.
34. Flier, J. S., Mueckler, M. M., Usher, P., および Lodish, H. F. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 50



nce, 235:1492-1495, 1987.

35. Shim, H., Chun, Y.-S., Lewis, B.C., および Dang, C.V. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-myc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:1511-1516, 1998.

36. Gould, G.W., および Holman, G.D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. Biochem. J., 295:329-341, 1993.

37. Brown, R.S., および Wahl, R.L. Overexpression of GLUT-1 glucose transporter in human breast cancer. Cancer, 72:2979-2985, 1993.

38. Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M., および Lechago, J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter GLUT-1 in human cancers. Cancer Res., 56:1164-1167, 1996.

39. Zamora-Leon, P., Golde, D.W., Concha, I.I., Rivas, C.I., Delgado-Lopez, F., Baselga, J., Nualart, F., および Vera, J.C. Expression of the fructose transporter GLUT-5 in human breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci., 93:1847-1852, 1996.

40. Tsakiridis, T., Vranic, M., および Klip, A. Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. J. Biol. Chem., 269:29934-29942, 1994.

41. Hamilton-Wessler, M., Ader, M., Getty, L.Dea, M., Hamm-Alvarez, S., および Bergman, R.N. Microtubule-disrupting agent taxol redresses insulin-stimulated glucose uptake in vivo. Diabetes, 45(Suppl. 2): Abstr. 615, 1996.

42. Brem, S. Angiogenesis antagonists: current clinical trials. Angiogenesis, 2:9-20, 1998.

43. Harris, A.L. Are angiostatin and endostatin cures for cancer? Lancet, 351:1598-1599, 1998.

44. Appel および Berger G. Uber das Hydrazidosulphamide (on hydrazidosulphamide) Chemische Berichte 1958; 91; 1339.

45. Perrin DD および Amarego WLF. Purification of laboratory chemicals. Pergamon press; Oxford 1988; 290.

【図面の簡単な説明】

【図1】 構造: 化合物 1、2 - メトキシエストラジオール (2 - MeOE2); 2、エストロン - 3 - O - サルファメート (SMATE); 3、2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (2 - MeOEMATE); 4、2 - メトキシエストロン (2 - Me

10

20

30

40

50

OE1) ; 5、ゲニスチン (genistein) ビス - サルファメート (GenMA TE) ; 6、ゲニスチン、7、2 - メトキシエストロン - 3 - スルフェート (2 - MeOE1S)。

【図2】 MCF - 7 乳癌細胞の増殖に対する、2 - メトキシエストロン (2 - MeOE1) または 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (2 - MeOE MA TE) の効果を示す、用量応答。細胞 (1 ウェルあたり 5000 個) を、薬物に 4 日間曝露した (平均 ± 標準偏差、n = 3)。

【図3】 24 時間後の MCF - 7 乳癌細胞に対する、a) ビヒクル、b) 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (2 - MeOE MA TE、1  $\mu$ M)、または 2 - メトキシエストロン (2 - MeOE1、1  $\mu$ M) の効果。

【図4】 24 時間後の MDA - MB - 231 乳癌細胞に対する、a) ビヒクル、または b) 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (2 - MeOE MA TE、1  $\mu$ M) の効果。

【図5】 24 時間における乳房腫瘍誘導線維芽細胞に対する、a) ビヒクル、b) 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (2 - MeOE MA TE、1  $\mu$ M) または c) 2 - MeOE MA TE (5  $\mu$ M) の効果。

【図6】 ビヒクル (A) または 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (10  $\mu$ M) で 4 時間 (B)、12 時間 (C) または 24 時間 (D) 処理した MCF - 7 乳癌細胞の DNA ヒストグラム。処理後 12 時間まで、G<sub>2</sub>/M 期での細胞の阻止の証拠が存在した。

【図7】 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (10  $\mu$ M) で処理した MCF - 7 乳癌細胞の DNA ヒストグラム。24 時間 (A) または 48 時間 (C) におけるコントロールと比較すると、薬物で処理した細胞は、24 時間 (B) および 48 時間 (D) における G<sub>2</sub>/M 期の細胞の割合の有意な増加を示し、さらにサブ G<sub>1</sub> 画分の増加を示した。24 時間の細胞の曝露の後に、薬物のない培地中でさらに 24 時間培養することによる薬物の除去は、G<sub>2</sub>/M 期での細胞の阻止を逆転させなかった (E)。

【図8】 コントロール MCF - 7 細胞 (A) または 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (10  $\mu$ M) に 48 時間曝露した細胞 (B) の、TUNEL 分析。ヒストグラムを、TdT の非存在下で染色した細胞 (塗りつぶし) または TUNEL 反応混合物で染色した細胞 (白抜き) について、重ね合わせる。下の図の棒は、TUNEL 陽性細胞を表し、そして処理した細胞の約 10% を表す。

【図9】 インタクトなラットにおけるニトロソメチルウレア誘導乳房腫瘍の増殖に対する、ビヒクル (プロピレングリコール、コントロール動物 1 ~ 3)、2 - メトキシエストロン (2 - MeOE1、20 mg / kg / 日、経口、11 日間、2 頭の動物において)、または 2 - メトキシエストロン - 3 - O - サルファメート (20 mg / kg / 日、経口、11 日間、3 頭の動物において) の効果。結果を、薬物投与の開始時の腫瘍体積と比較した、6 日目または 11 日目の腫瘍体積 (Vdn) (百分率で表現する) として表す。

【図10】 MCF - 7 乳癌細胞の増殖に対する、2 - メトキシエストロンもしくは 2 - エチルエストロン、またはこれらのサルファメート誘導体の効果。

【図11】 先行する曝露の後の MCF - 7 乳癌細胞の増殖に対する、2 - メトキシエストロンサルファメートまたは 2 - エチルエストロンサルファメートの不可逆的な効果。

【図12】 構造: 化合物 8、2 - アセチルエストロン 3 - メチルエーテル; 9、2 - エチルエストロン 3 - メチルエーテル; 10、2 - エチルエストロン; 11、2 - エチルエストロン 3 - O - サルファメート。

【図13】 プロピジウムヨード (propidium iodide) (PI) で染色した細胞のフローサイトメトリーを用いる、2 - EtE MA TE の、MCF7、ZR - 75 - 1、CAL51 および CAMA1 細胞の DNA 含有量に対する効果。

【図14】 MCF7、ZR - 75 - 1、CAL51 および CAMA1 に対する、2 - MeOE2、2 - MeOE1、2 - EtE1、2 - MeOE MA TE、および 2 - EtE MA TE の効果。

10

20

30

40

50

【図15】 2-EtEMATE 曝露の後の染色した核の写真板。

【図16】 MCF7、ZR-75-1、CAL51およびCAMA1に対する、2-EtEMATEの効果。

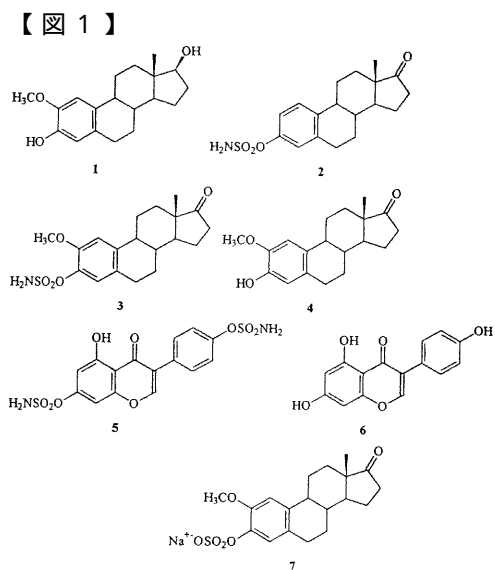
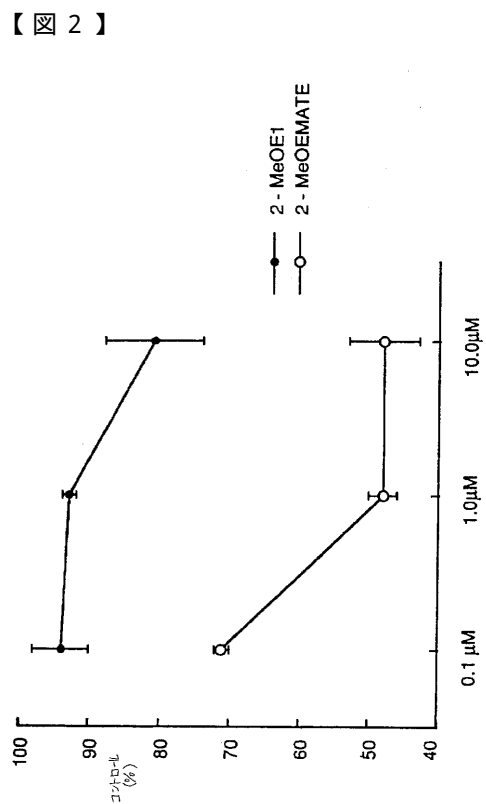


FIG.1



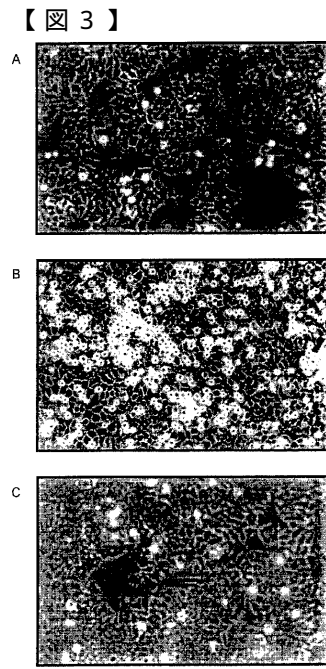


FIG. 3

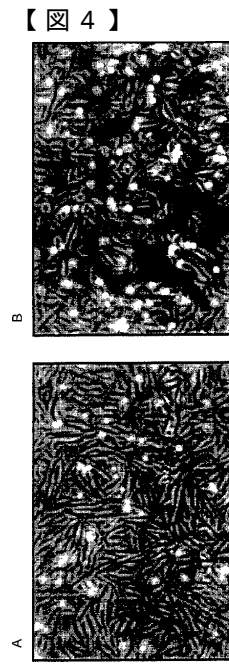


FIG. 4

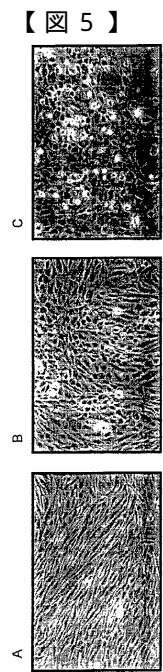
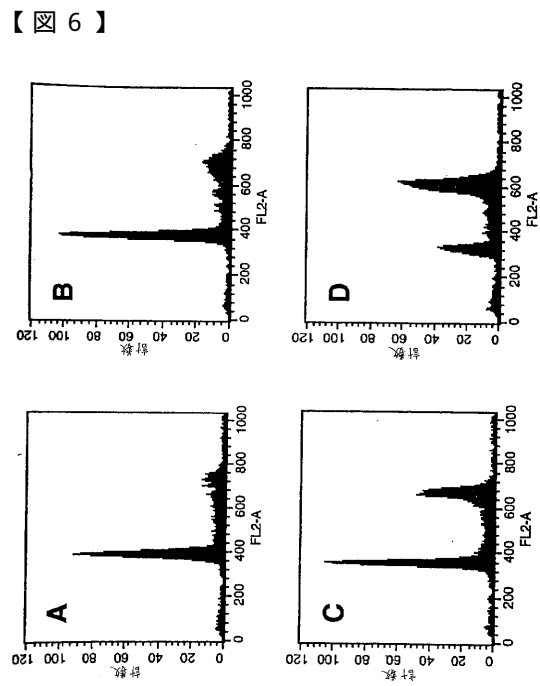
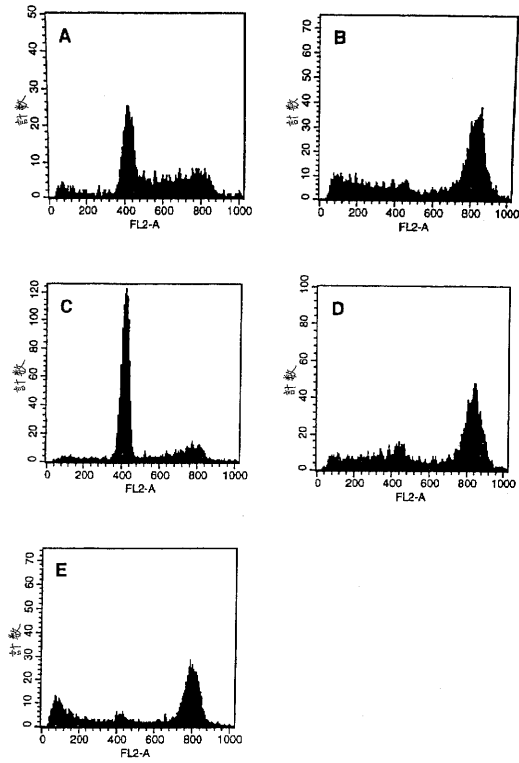


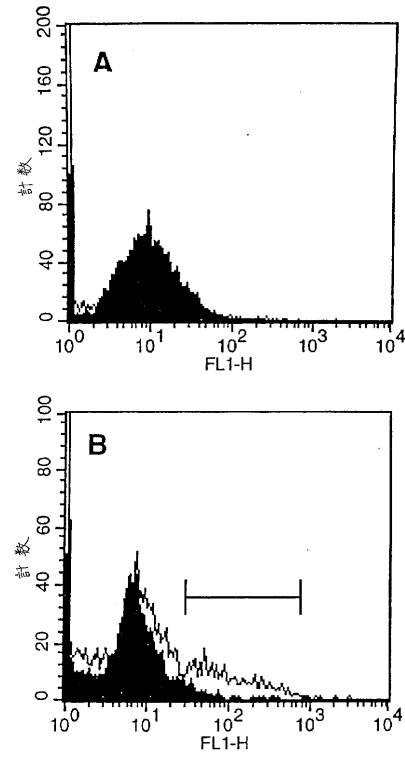
FIG. 5



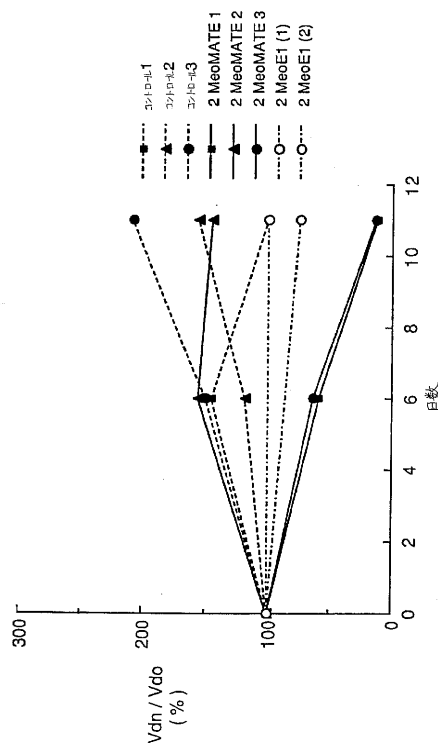
【図 7】



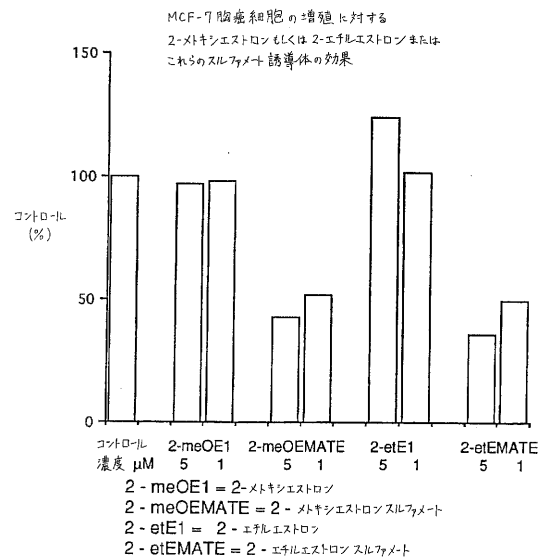
【図 8】



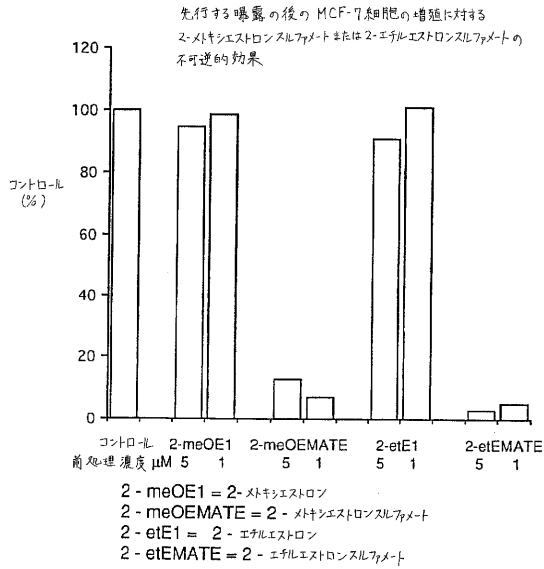
【図 9】



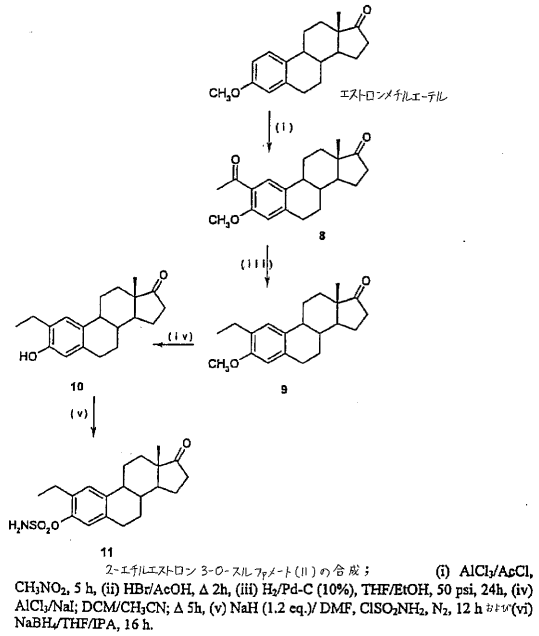
【図 10】



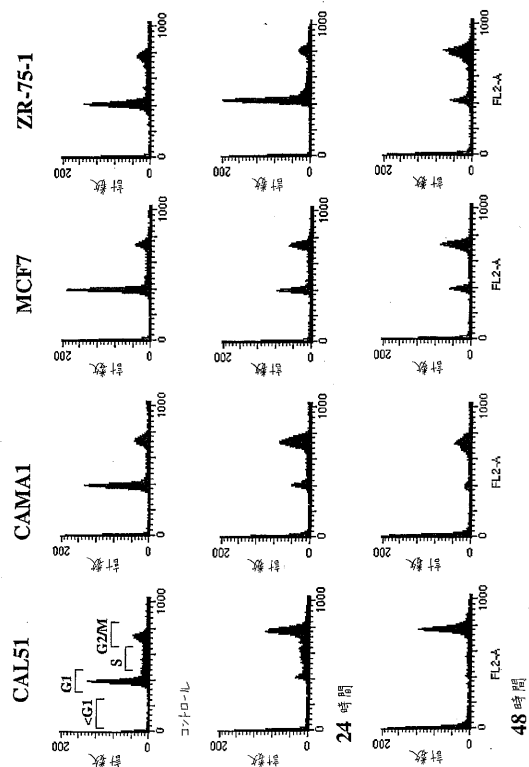
【図 1 1】



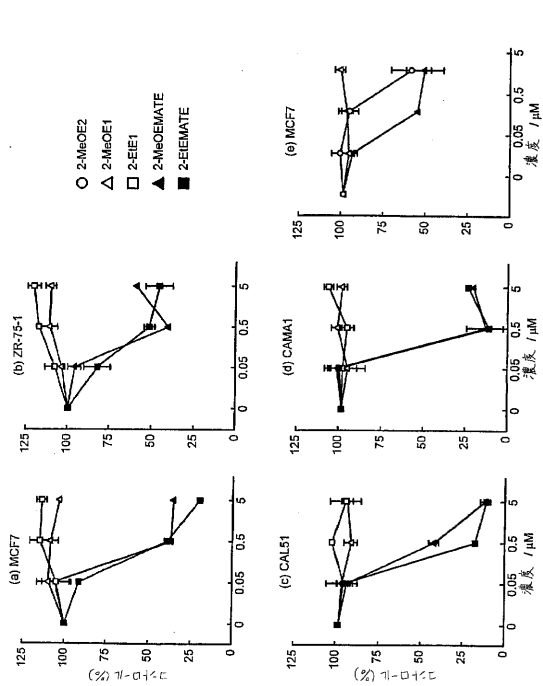
【図 1 2】



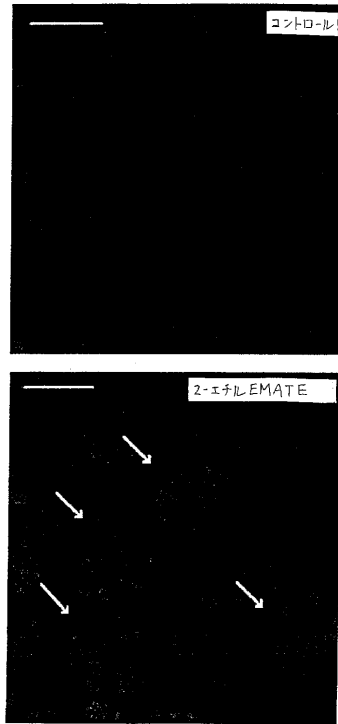
【図 1 3】



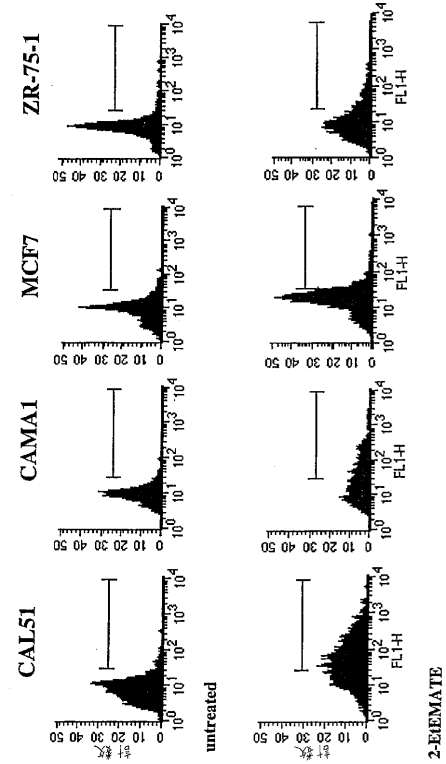
【図 1 4】



【図 15】



【図 16】



---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 0002113.9

(32)優先日 平成12年1月28日(2000.1.28)

(33)優先権主張国 英国(GB)

## 前置審査

(72)発明者 ポッター, バリー ピクター ロイド  
イギリス国 ビーエイ 17 ユーイー バス, バスフォード, ドーバーズ パーク 95

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第98/024802(WO, A1)

PUROHIT, A. et al., JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 英国, 1998年, Vol.64, No.5, p.269-275

CUSHMAN, M. et al., JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 米国, 1995年, Vol.38, No.12, p.2041-2049

KLAUBER, N. et al., CANCER RESEARCH, 1997年, Vol.57, No.1, p.81-86

KOSSODO, S. et al., British Journal of Cancer, 1995年, Vol.72, p.1165-1172

BUDD, G.T. et al., Cancer, 1991年, Vol.68, No.8, p.1694-1695

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/565

A61P 35/00

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)