

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6423349号
(P6423349)

(45) 発行日 平成30年11月14日(2018.11.14)

(24) 登録日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(51) Int.Cl.		F I		
C O 7 D 207/333	(2006.01)	C O 7 D	207/333	C S P
A 6 1 K 31/4025	(2006.01)	A 6 1 K	31/4025	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2015-537212 (P2015-537212)	(73) 特許権者	506316557
(86) (22) 出願日	平成25年10月14日 (2013.10.14)		センター ナショナル ド ラ ルシエル
(65) 公表番号	特表2015-534958 (P2015-534958A)		シュ サイエнтиフィーク
(43) 公表日	平成27年12月7日 (2015.12.7)		フランス エフ-75794 パリ セデ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/071445		ックス 16 リュー ミシエル アンジ
(87) 国際公開番号	W02014/060366		ェ 3
(87) 国際公開日	平成26年4月24日 (2014.4.24)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成28年10月3日 (2016.10.3)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	1259868	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成24年10月16日 (2012.10.16)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100133400
前置審査			弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	パスカル・コラン
			フランス・78530・ビュク・リュ・ベ
			レイヨン・3

最終頁に続く

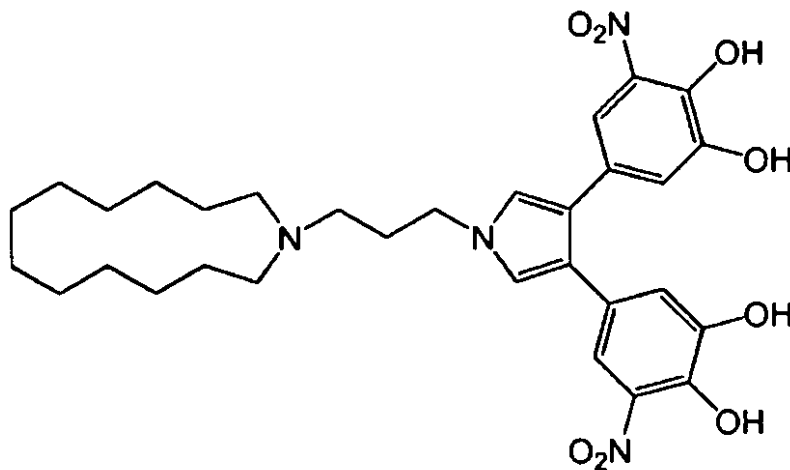
(54) 【発明の名称】 N-置換3, 4-ビス (カテコール) ピロール化合物、その調製、及びガンの治療のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式(1)；

【化1】



(1)

10

を有する化合物、又はその薬学的に許容される酸塩。

【請求項2】

20

前記薬学的に許容される酸塩が、塩酸塩であることを特徴とする、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

少なくとも1つの請求項1又は2に記載の化合物と、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項4】

薬剤として使用するための、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項5】

ガン治療剤として使用するための、請求項4に記載の化合物。

【請求項6】

30

ガンが、肺ガン、乳ガン、肝臓ガン、胃ガン、大腸ガン、直腸ガン、食道ガン、喉頭ガン、上咽頭ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、腎臓ガン、膀胱ガン、十二指腸ガン、子宮内膜ガン、胸膜ガン、皮膚ガン、精巣ガン、卵巣ガン、子宮ガン、脳ガン、骨のガン、口腔ガン、眼のガン、造血系のガン、又は、骨髄のガン若しくは神経外胚葉起源の腫瘍から選択されることを特徴とする、請求項5に記載の化合物。

【請求項7】

前記造血系のガンが、白血病、骨髄性白血病、又はリンパ腫である、請求項6に記載の化合物。

【請求項8】

前記骨髄のガン若しくは神経外胚葉起源の腫瘍が、膠芽腫である、請求項6に記載の化合物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規のN-置換3,4-ビス(カテコール)ピロール化合物、その調製、及びガンの治療におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞は、転座、遺伝子の増幅、レトロウィルスの挿入、突然変異、遺伝子欠損、及びエピジェネティック疾患に起因する、先天性又は後天性染色体変異から生じる。これら

50

の異常は、細胞周期、アポトーシス、増殖及び生存、DNAの修復及び安定化、並びに解毒遺伝子を含む、多数の遺伝子に影響を与える。

【0003】

大多数の通常の抗ガン化学療法は、薬剤の使用に必然的に基づいており、この作用機序は、細胞周期のS期における細胞DNAを攻撃することによる、又はG2/M期における細胞分裂に必要とされる有糸分裂紡錘体の微小管を攻撃することによる、細胞増殖の抑制を含む。さらなる抗ガン剤は、酸化ストレスを生じさせることにより、アポトーシスによるプログラム細胞死を引き起こすことを意図している。これらのアプローチの欠点は、薬剤の相対的な非特異性であり、これは健康な細胞に危害を加えないことは不可能である。複数の副作用が引き起こされる。より最近では、治療方法として、細胞毒性作用を用いずに、腫瘍成長を遅らせる又は止めるための障害を使用する新たな治療アプローチが開発された。この目標とする化学療法は、細胞増殖を抑制することによる、増殖因子シグナル伝達経路を阻害することによる、又は血管新生を阻害することによる、細胞増殖の詳細なメカニズムを対象にする。

10

【0004】

しかしながら、これらの新規な目標の抗ガン治療について、新たな形態の化学療法剤耐性が現れた。これらは、薬剤排出膜系の発現：すなわち、MDR1 (マルチドラッグ抵抗性 1、Multi Drug Resistance-1) 系等のABC (ATP-結合カセット、ATP-Binding Cassette) タンパク質と必然的に関連する、周知の化学療法剤耐性メカニズムとは相違する。この場合、ガン細胞が、プロアポトーシス経路阻害に関連する、生存経路を刺激することにより化学療法剤耐性を開発する。この生存経路は、チロシンキナーゼ活性受容体(EGFR, PDGFR, IGF1R)により活性化され、これら自体は成長因子により活性化される。これは、Src及びRasガン遺伝子と関連する、PI3K (ホスファチジルイノシトール 3OH キナーゼ)、PKC (ホスホイノシチド依存性チロシンキナーゼ)、Akt (セリン/トレオニンプロテインキナーゼ PKB)、PTEN (第10染色体で欠失しているホスファターゼ・テンシン・ホモログ)、FOXO (フォークヘッドボックスO、forkhead box O)、mTOR (哺乳類ラパマイシン標的)タンパク質から成る。通常、生存経路はアポトーシスに対して保護効果を有し、自食作用を誘発し得る。

20

【0005】

生存経路と発ガンとの間の関連性は、現在十分に確立されている。実際、生存経路をコードしている遺伝子中での変異は、70%の乳ガンを含む30%を超えるガンにおいて存在し、PIK3CA、PIK3CB、AKT1、AKT2遺伝子の活性化変異、PTEN機能の損失、及びSrc及びRasガン遺伝子の過剰発現がこの経路を制御する。

30

【0006】

数年間の間、生存経路を阻害するそうした化合物が、ガン細胞に効果的に闘うために開発されてきており、これらは、他の薬剤とともに増殖因子シグナル伝達を阻害する。

【0007】

最近の臨床試験は、生存経路の阻害が腫瘍形成を妨げることを明らかにしている。そのような、抗ガン治療としての生存経路阻害剤の使用は、ガンに対する新しい武器になる可能性がある。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】G. Koren-Goldshlager, Y. Kashman, M. Schleyer, J. Nat. Prod., 1998年, 61, 282-284

【非特許文献2】D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002年, 67, 245-258

【非特許文献3】J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zurcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989年, 72, 952-968

【非特許文献4】J. E. Baldwin, H. R. Vollmer, V. Lee, Tetrahedron Lett., 1999年,

50

40, 5401-5404

【非特許文献5】M. H. Weston, K. Nakajima, T. G. Back, J. Org. Chem., 2008年, 73, 4630-4637

【非特許文献6】) G. Koren-Goldshlager, Y. Kashman, M. Schleiter, J. Nat. Prod., 1998年, 61, 282-284

【非特許文献7】D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002年, 67, 245-258

【非特許文献8】L. E. Kiss, H. S. Ferreira, L. Torrao, M. J. Bonifacio, P. N. Palma, P. Soares-da-Silva, D. A. Learnmonth, J. Med. Chem., 2010年, 53, 3396-3411

【非特許文献9】X. Lu, S. Wan, J. Jiang, X. Jiang, W. Yang, P. Yu, L. Xu, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, Y. Wang, Eur. J. Med. Chem., 2011年, 46, 2691-2698

【非特許文献10】J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zurcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989年, 72, 952-968

【非特許文献11】D. E. Lewin, A. Lowy, J. Am. Chem. Soc., 1933年, 55, 1995-2000

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

そのため、抗ガン剤薬理学の主な目的の一つは、化学療法耐性及び健康的な細胞に対する毒性を有さずに、特定の分子標的によって、優れた治療効果を示し得る新規な薬剤についての継続的な研究である。

【0010】

これらの基本的な基準は、新規な抗腫瘍薬剤の選択に採用された。

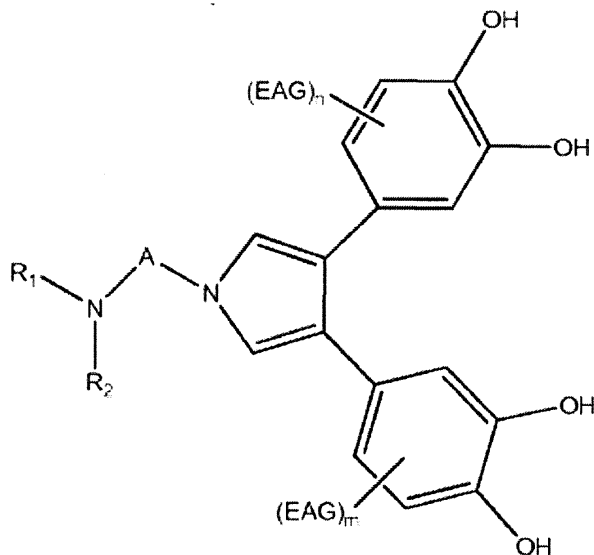
【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、以下の一般式(I)：

【0012】

【化1】



(I)

【0013】

(式中:- mは、0~3、好ましくは0~2の整数であり；

- nは、0~3、好ましくは0~2の整数であり；

- m + nは、1以上であり；

- EAGは、ハロゲン原子、NO₂、CF₃、CCl₃、CN、CO₂H、(C=O)NR₂、CH=NR、(C=S)OR、(C=O)SR、CS₂R、SO₂R、SO₂NR₂、SO₃R、P(O)(OR)₂、P(O)(R)₂、B(OR)₂基の中から独立して選択

10

20

30

40

50

される電子求引基であり、ここで、Rはアルキル(C₁-C₆)基、フェニル基、又は水素原子であり；

- Aは、飽和又は不飽和の、直鎖又は分岐した、1~10個の炭素原子を含む炭化水素鎖であり；

- R₁及びR₂はそれぞれ、互いに独立して、水素原子、CO-(C₁-C₆)-アルキル、(C₁-C₆)アルキル、フェニル、又はフェニル-(C₁-C₆)-アルキル基を表すか、または、R₁及びR₂は、これらと結合している窒素原子とともに、場合によって(C₁-C₆)アルキル基で置換される5~15員ヘテロ環を形成する)

を有する、その立体異性体及びこれらの混合物、又はこれらの薬学的に許容される酸性塩を含む、新規なN-置換3,4-ビス(カテコール)ピロール化合物、これらの調製、並びにガン(又は「癌」、「がん」)細胞に対してのこれらの抗有糸分裂活性及び作用機序に関する。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、化合物(1)で細胞を処理後、72時間で測定した成長曲線及びIC50値(細胞成長の50%減少を誘導する化合物の濃度)を示す図である。

【図2】図2は、化合物(1)のHCT-116細胞の数及び生存能力に対する効果を、化合物(1)の濃度(2a)及び処理時間(2b)の作用として表す図である。

【図3】図3は、正常なヒトHUVEC、NHDF、及びHFDPC細胞並びにHCT-116、U87、及びK652ガン細胞アノテーションに対する化合物(1)の作用を調べた結果を示す図である。

20

【図4】図4は、化合物(1)で処理したHCT-116細胞のフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。

【図5】図5は、HCT-116細胞を化合物(1)で24時間処理した後、細胞抽出物をウエスタンブロットで解析し、タンパク質p21及びp27の発現を調べた結果を示す図である。

【図6】図6aは、化合物(1)でHCT-116細胞を処理した後でカスパーゼ3及び7の活性をApo-ONE (Promega)を用いて測定した結果を示す図であり、図6bは、化合物(1)でHCT-116細胞を処理した後で、JC-1プローブ(MitoProbe(登録商標)JC-1アッセイ, Molecular Probes)を用いるフローサイトメトリーによりミトコンドリア膜電位の変化を調べた結果を示す図である。

【図7】図7は、化合物(1)で24時間HCT-116細胞を処理した後で、細胞抽出物をウエスタンブロット解析し、タンパク質LC3-I及びLC3-IIの発現を調べた結果を示す図である。

30

【図8】図8は、HCT-116を化合物(1)に24時間晒した後で、細胞抽出物をウエスタンブロット解析し、AKT p S473、FOXO-3、及びベルオキシレドキシシン1の発現を調べた結果を示す図である。

【図9】図9aは、DCF-DA(2',7'-ジクロロフルオレセインジアセテート、Sigma)を用いて、化合物(1)の細胞内H₂O₂濃度に対する効果をフローサイトメトリーで評価した結果を示す図であり、図9bは、その化合物(1)の濃度に対する影響を調べた結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

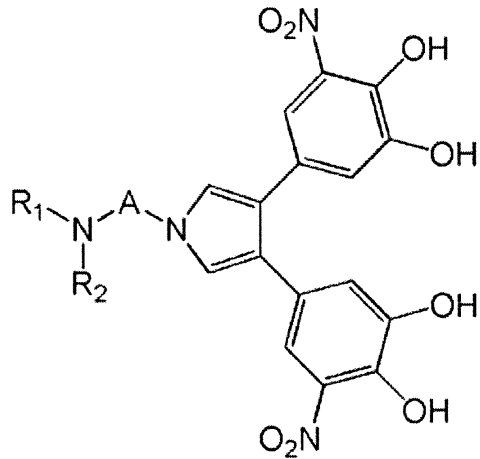
【0015】

特に、本発明は式(1a)を有する化合物及びそのガン治療薬としての使用に関する。

40

【0016】

【化2】



(1a)

10

【0017】

特に、基R₁及びR₂は、これらと結合している窒素原子とともに、R₁及びR₂が結合している窒素原子以外のヘテロ原子を含まない飽和ヘテロ環を形成する。より具体的には、R₁及びR₂は、これらと結合している窒素原子とともに、10～15員、好ましくは13員のヘテロ環を形成する。

20

【0018】

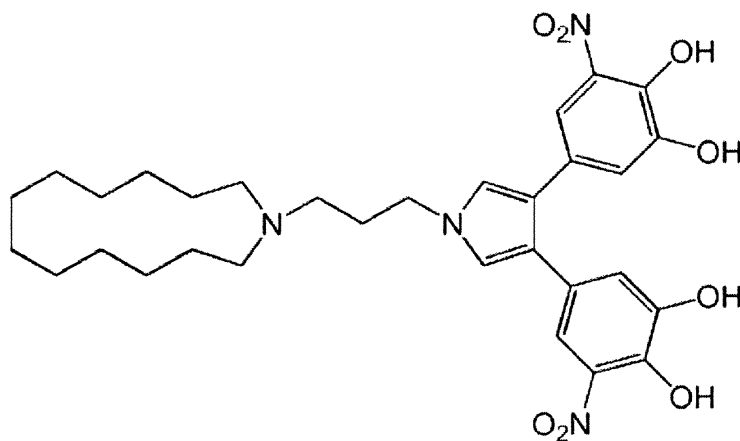
特に、鎖Aは3～6個、好ましくは3個の炭素原子を含む、直鎖飽和炭化水素鎖である。

【0019】

特に、本発明は式(1)：

【0020】

【化3】



30

(1)

40

【0021】

を有する化合物又はこれらの薬学的に許容される酸性塩、及びガン治療薬としてのこれらの使用に関する。

【0022】

in vitroにおいて、そのIC₅₀を包含する濃度で使用される化合物(1)は、正常なヒト細胞に対して細胞毒性をまったく示さない。

【0023】

特に、一般式(1)の化合物、より具体的には化合物(1a)、優先的には化合物(1)の好まし

50

い薬学的に許容される酸性塩は、塩酸塩である。

【0024】

本発明はまた、少なくとも1つの一般式(1)を有する化合物、より具体的には化合物(1a)、優先的には化合物(1)と、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物にも関する。

【0025】

本発明は、ガン、具体的には肺ガン、乳ガン、肝臓ガン、胃ガン、大腸ガン、直腸ガン、食道ガン、喉頭ガン、上咽頭ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、腎臓ガン、膀胱ガン、十二指腸ガン、子宮内膜ガン、胸膜ガン、皮膚ガン、精巣ガン、卵巣ガン、子宮ガン、脳のガン、骨のガン、口腔ガン、眼のガン、又は、造血系のガン、例えば、白血病ガン、骨髄性白血病ガン、リンパ腫ガン、骨髄ガン、若しくは神経外胚葉起源の腫瘍、例えば膠芽腫の治療における薬剤としての、化合物(1)、より具体的には化合物(1a)及び(1)の使用に関する。

10

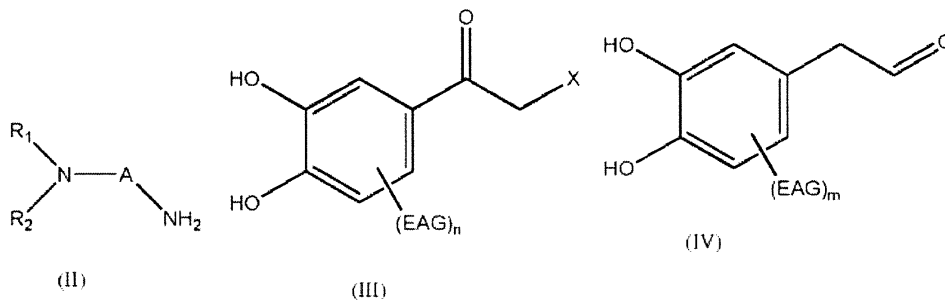
【0026】

本発明はまた、式(1)、より具体的には式(1a)及び(1)を有する化合物を調製するための方法であって、

a) 以下の式(II)を有するアミンと、以下の式(III)を有するハロゲン化物と、以下の式(IV)を有するアルデヒドとを反応させて

【0027】

【化4】



20

【0028】

(式中、n及びm、EAG、R₁、R₂、及びAは、一般式(1)において定義したとおりであり、Xはハロゲン原子を示す)、式(1)を有する化合物を得る工程、

b) 場合により、前の工程a)で得られた式(1)を有する化合物から薬学的に許容される塩を形成する工程を含む。

30

【0029】

この調製方法において、ハロゲン化物(III)及びアミン(II)は、アルデヒド(VI)を追加する前に、互いに最初に反応させることができる。好ましくは、ハロゲン化物(III)の基Xは、塩素、臭素、又はヨウ素原子である。

【0030】

結果

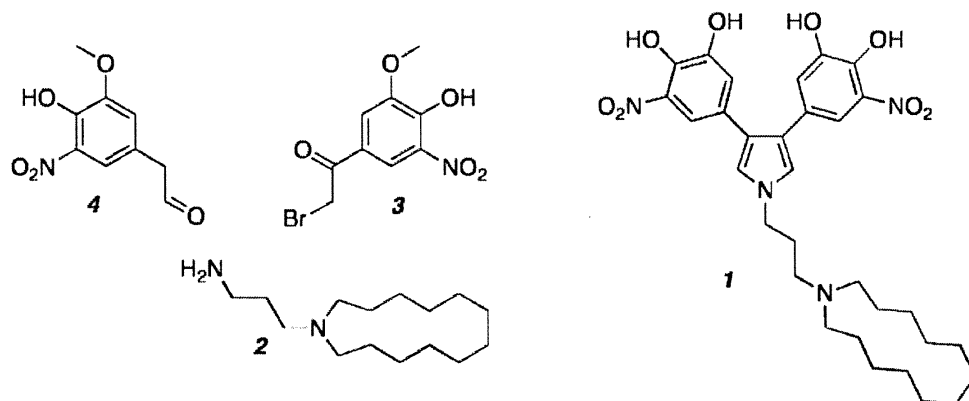
化学合成

化合物5,5'-(1-(3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロピル)-1H-ピロール-3,4-ジイル)ビス(3-ニトロベンゼン-1,2-ジオール)(1)を、以下に表される、フェナシルハライド3と、一級アミン2と、フェニルアセトアルデヒド4とを縮合することにより調製した。

40

【0031】

【化5】



10

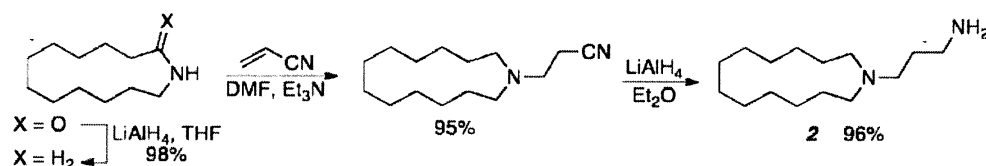
【0032】

N-(3-アミノプロピル)アザトリシクロデカン (2) ((a) G. Koren-Goldshlager, Y. Kasman, M. Schleyer, J. Nat. Prod., 1998年, 61, 282-284; (b) D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002年, 67, 245-258)を、以下のダイアグラム1に示すとおりに、市販のラウラクタムから得た。

【0033】

20

【化6】



ダイアグラム 1

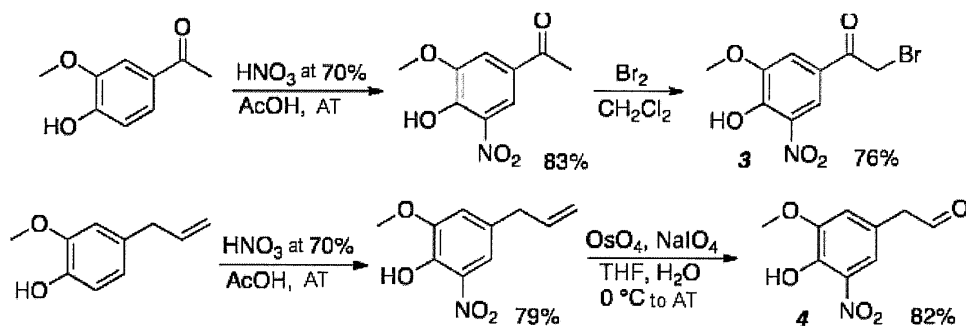
【0034】

化合物3 (J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zurcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989年, 72, 952-968) 及び4を、以下のダイアグラム2に示すとおりに調製した。

30

【0035】

【化7】



40

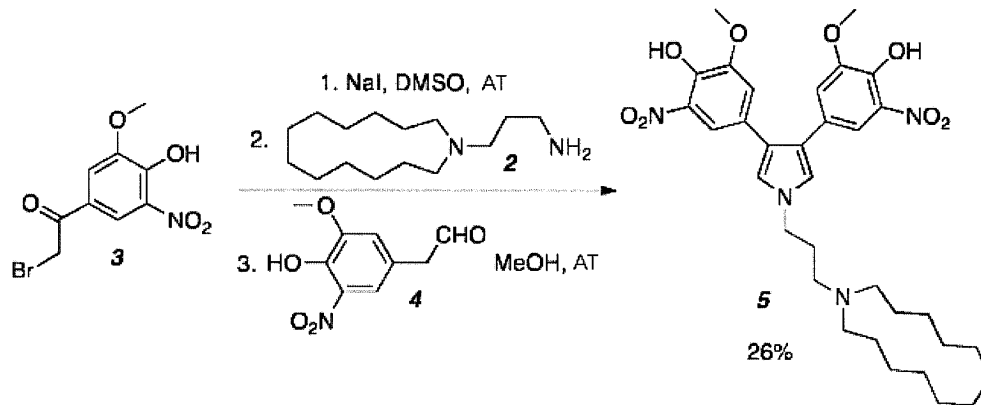
ダイアグラム 2

【0036】

アミン2、ハロゲン化物3、及びフェニルアセトアルデヒド4からのピロール5の合成のための単一形形成法(又はモノトープ形成法)を開発した(ダイアグラム3)。

【0037】

【化 8】



10

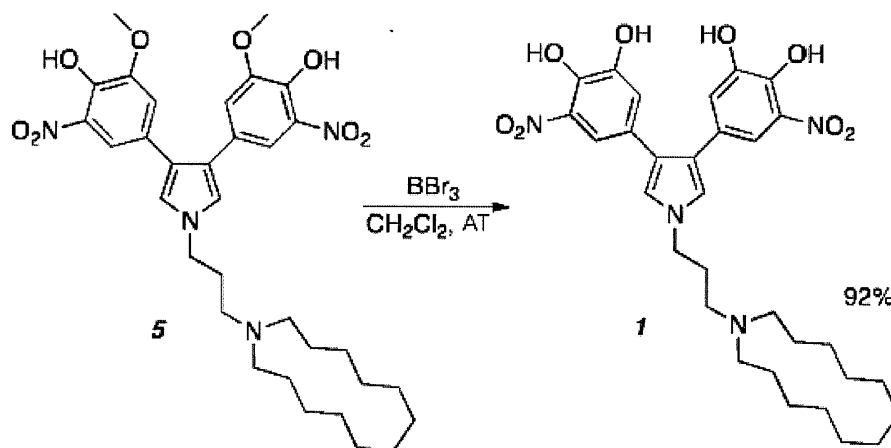
ダイアグラム 3

【 0 0 3 8】

化合物 5 を BBr_3 のジクロロメタン溶液で処理することにより、脱メチル化生成物 (1) を得た (ダイアグラム 4)。

【 0 0 3 9】

【化 9】



20

30

ダイアグラム 4

【 0 0 4 0】

対応する塩酸塩を、HCl のメタノール溶液で処理することにより得た。

【実施例】

【 0 0 4 1】

試験セクション

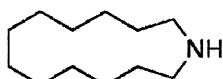
3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロパン-1-アミン(2)の調製

【 0 0 4 2】

アザシクロトリデカン ((a) J. E. Baldwin, H. R. Vollmer, V. Lee, Tetrahedron Lett., 1999年, 40, 5401-5404; (b) M. H. Weston, K. Nakajima, T. G. Back, J Org. Chem., 2008年, 73, 4630-4637)

【 0 0 4 3】

【化 1 0】



50

【 0 0 4 4 】

室温、アルゴン中で、アザシクロトリデカン-2-オン(4.3 g; 21.8 mmol)のTHF (100 ml)溶液に、LiAlH₄ (1.5 g; 39.5 mmol)をゆっくり加えて、この反応混合物を加熱して16時間還流させる。その後、0 で飽和Na₂SO₄溶液をゆっくり加えて過剰なLiAlH₄を中和し、次いで、水相全体を吸収するための過剰な固体K₂CO₃とともに1:1 エーテル/ペンタン混合物(200 ml)を加える。その後、有機相を沈殿させ、沈殿物を1:1 エーテル/ペンタン混合物で3回洗浄する。減圧下で溶媒を取り除き、無色の油の形態のアザシクロトリデカン(3.9 g; 98%)を得る。¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 2.62 (4 H; t; J = 5.1 Hz); 1.57-1.25 (20 H; m). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 47.9; 27.9; 26.5; 26.0; 25.4; 24.6.

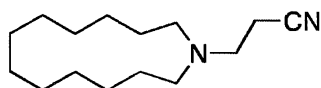
10

【 0 0 4 5 】

3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロパンニトリル

【 0 0 4 6 】

【化 1 1】



【 0 0 4 7 】

アルゴン中で、アザシクロトリデカン(3.8 g; 20.7 mmol)及びトリエチルアミン(50 μ l; 0.35 mmol)のDMF(15 ml)溶液に、アクリロニトリル(7.7 ml; 115 mmol)を加え、この反応混合物を70 で16時間攪拌する。反応混合物をエーテルで抽出し、有機相を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮(脱水)させて、無色の油の形態の3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロパンニトリルを得る(4.64 g; 95%)。¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 2.76 (2 H; t; J = 7.2 Hz); 2.50-2.35 (6 H; m); 1.55-1.28 (20 H; m). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 53.7; 49.7; 26.5; 26.2; 25.23; 25.18; 15.7.

20

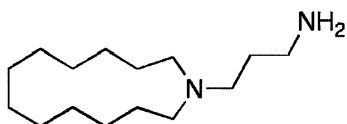
【 0 0 4 8 】

3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロパン-1-アミン (2) ((a) G. Koren-Goldshlager, Y. Kashman, M. Schleiter, J. Nat. Prod., 1998年, 61, 282-284; (b) D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002年, 67, 245-258)

30

【 0 0 4 9 】

【化 1 2】



【 0 0 5 0 】

0 、アルゴン中で、3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロパンニトリル(0.5 g; 2.1 mmol)のエーテル(15 ml)溶液に、LiAlH₄ (0.3 g; 7.9 mmol)をゆっくり加え、この反応混合物を33 で15分間攪拌する。その後、0 で飽和Na₂SO₄溶液をゆっくり加えて過剰なLiAlH₄を中和し、次いで、固体K₂CO₃を加えて水相全体を吸収させる。有機相を沈殿させ、沈殿物をエーテルで3回洗浄する。減圧下で溶媒を除去し、無色の油の形態の化合物2(0.49 g, 96%)を得る。¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) (ppm) 2.74 (2 H; t; J = 7.0 Hz); 2.40-2.28 (6 H; m); 1.57 (2 H; quint; J = 7.0 Hz); 1.44-1.32 (22 H; m). ¹³C NMR (CDCl₃; 125 MHz) (ppm) 54.4; 52.8; 41.2; 31.7; 26.7; 26.5; 26.3; 25.8; 25.6.

40

【 0 0 5 1 】

2-プロモ-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)エタノン (3)の調製

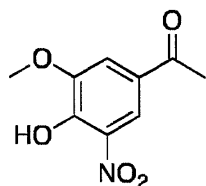
【 0 0 5 2 】

50

1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)エタノン ((a) L. E. Kiss, H. S. Ferreira, L. Torrao, M. J. Bonifacio, P. N. Palma, P. Soares-da-Silva, D. A. Learnmonth, *J. Med. Chem.*, 2010年, 53, 3396-3411; (b) X. Lu, S. Wan, J. Jiang, X. Jiang, W. Yang, P. Yu, L. Xu, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, Y. Wang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011年, 46, 2691-2698).

【 0 0 5 3 】

【化 1 3】



10

【 0 0 5 4 】

室温で、4'-ヒドロキシ-3'-メトキシアセトフェノン (10 g; 60.2 mmol)の酢酸(140 ml)溶液に、70% HNO₃ (4.2 ml; 66.3 mmol)を加える。反応混合物を30分間攪拌し、黄色の結晶を濾過し、エーテルで洗浄し、乾燥させて1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)エタノン (10.5 g; 83%)を得る。mp 158-159 °C (lit. 159-161 °C, エタノール, X. Lu, S. Wan, J. Jiang, X. Jiang, W. Yang, P. Yu, L. Xu, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, Y. Wang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011年, 46, 2691-2698). ¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 11.09 (1 H; s), 8.30 (1 H; d; J = 1.5 Hz); 7.75 (1 H; d; J = 1.5 Hz); 4.01 (3 H; s); 2.62 (3 H; s). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 194.9; 150.4; 150.1; 133.0; 128.3; 117.7; 115.3; 56.9; 26.0. IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹ 3228; 3091; 2988; 2925; 1676; 1612; 1535; 1413; 1378; 1350; 1329; 1218; 1136; 1047; 869; 735; 709; HRMS (DE) (m/z) [M-H]⁻ C₉H₈NO₅ 210.0402について計算される; 210.0404が得られる。

20

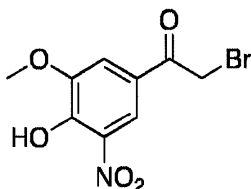
【 0 0 5 5 】

2-プロモ-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)エタノン (3) (J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zurcher, M. Da Prada, *Helv. Chim. Acta*, 1989年, 72, 952-968).

30

【 0 0 5 6 】

【化 1 4】



【 0 0 5 7 】

室温で、1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)エタノン (9.6 g; 45.5 mmol)のCH₂Cl₂ (200 ml)溶液に、臭素(2.4 ml; 46.8 mmol)ゆっくり加え、この反応混合物を10分間攪拌する。この間、臭素の色が完全に消える。その後、ペンタン (400 ml)を加える。10分後、ドラフト内で黄色の結晶を濾過し、1:1 ペンタン/エーテル混合物で洗浄し、乾燥させて化合物3 (10 g; 76%)を得る。mp 143-145 °C (lit. 147-149 °C; J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zurcher, M. Da Prada, *Helv. Chim. Acta*, 1989年, 72, 952-968). ¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 11.18 (1 H; s), 8.36 (1 H; d; J = 1.8 Hz); 7.77 (1 H; d; J = 1.8 Hz); 4.44 (2 H; s); 4.03 (3 H; s). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 188.7; 150.7; 150.6; 133.0; 125.0; 118.3; 115.9; 57.0; 29.4. IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹ 3366; 3093; 2991; 2942; 1765; 1689; 1608; 1535; 1386; 1246; 1151; 1060; 912; 887; 850; 762. HRMS (DE) (m/z) [M-H]⁻ C₉H₇⁷⁹BrNO₅ 287.9508につ

40

50

いて計算される; 287.9480が得られる.

【0058】

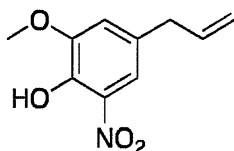
2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)アセトアルデヒド(4)の調製

【0059】

4-アリル-2-メトキシ-6-ニトロフェノール (D. E. Lewin, A. Lowy, J. Am. Chem. Soc., 1933年, 55, 1995-2000).

【0060】

【化15】



10

【0061】

室温で、オイゲノール(6.76 g; 41.2 mmol)の酢酸(100 ml)溶液に、70% HNO₃ (2.8 ml; 44.2 mmol)を加える。反応混合物を15分間攪拌し、エーテルで抽出し、食塩水で勢いよく洗浄し、最後にリン酸緩衝液(pH = 7)で洗浄する。このエーテル溶液を同じ容量のペンタンで希釈し、シリカゲル上で濾過し、減圧下で濃縮させて、暗赤色のオイル形態の4-アリル-2-メトキシ-6-ニトロフェノール (6.36 g, 79%)を得る。¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 10.61 (1 H; s), 7.48 (1 H; d; J = 1.5 Hz); 6.96 (1 H; d; J = 1.5 Hz); 5.91 (1 H; m); 5.20-5.08 (2 H; m); 3.92 (3 H; s); 3.35 (2 H; d; J = 6.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 149.8; 144.8; 135.9; 133.6; 131.2; 118.6; 117.1; 115.0; 56.7; 39.4. IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹ 3225; 3080; 2976; 2939; 1639; 1539; 1428; 1390; 1326; 1259; 1133; 1061; 916; 763. HRMS (DE) (m/z) [M+Na]⁺ C₁₀H₁₁NNaO₄ 232.0586について計算される; 232.0578が得られる.

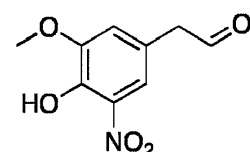
20

【0062】

2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)アセトアルデヒド (4)

【0063】

【化16】



30

【0064】

で、4-アリル-2-メトキシ-6-ニトロフェノール (2.0 g; 9.6 mmol)のTHF (23 ml)及び水(8 ml)の溶液に、0.166 Mの四酸化オスミウム(23 mg/0.09 mmol)の7:5 THF/水混合物(0.55 ml)溶液を加える。5分後、NaIO₄ (4.8 g; 22 mmol)を加える。反応混合物を0で1時間攪拌し、1時間かけて徐々に室温まで戻し、1:1 CH₂Cl₂/エーテル混合物で抽出し、有機相を食塩水で1回洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、25℃、減圧下で濃縮させる。残留物を最小量のCH₂Cl₂に溶かし、1:1 ペンタン/エーテル混合物を加える。黄色い結晶が形成するまで25℃、減圧下で溶媒を蒸発させ、ペンタンを加えて溶液をもう一度濃縮させる。結晶を濾過し、化合物4 (1.66 g, 82%)を得る。mp 130-132 °C. ¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) (ppm) 10.71 (1 H; s), 9.80 (1 H; t; J = 1.8 Hz); 7.57 (1 H; d; J = 1.8 Hz), 6.97 (1 H; d; J = 1.8 Hz), 3.96 (3 H; s); 3.74 (2 H; d; J = 1.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 197.8; 150.4; 145.8; 133.8; 123.1; 119.0; 116.6; 56.8; 49.5. IR (neat) ν_{\max} cm⁻¹ 3226; 1720; 1583; 1449; 1333; 1264; 1238; 1134; 1064; 921; 764. HRMS (DE) (m/z) [M-H]⁻ C₉H₈NO₅ 210.0402について計算される; 210.039

40

50

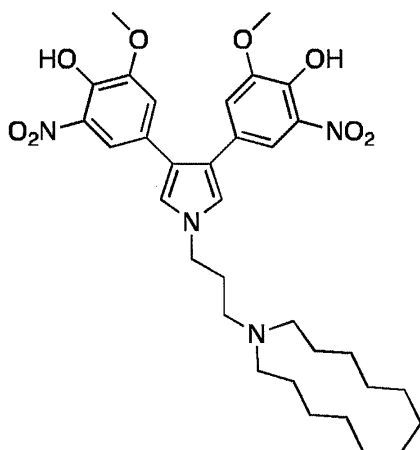
9が得られる。

【0065】

5-(1-(3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロピル)-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-5-ニトロフェニル)-1H-ピロール-3-イル)-3-ニトロベンゼン-1,2-ジオール (5)

【0066】

【化17】



10

【0067】

臭化フェナシル3 (1.23 g; 4.2 mmol)及びNaI (3.2 g; 21 mmol)を、アミン2 (1 g, 4.2 mmol)のDMSO (20 ml)溶液に室温、アルゴン中で加え、この反応混合物を室温で15分間攪拌する。その後、アルデヒド4 (900 mg, 4.3 mmol)のメタノール(60 ml)溶液を加え、この反応混合物を室温で16時間攪拌する。CH₂Cl₂で抽出し、有機相を飽和NaHCO₃溶液、食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、減圧下及びシリカゲルクロマトグラフィー(80:1 CH₂Cl₂/MeOHを用いるCH₂Cl₂のグラジエント溶出)で濃縮し、アモルファスの赤色の固体の形態で化合物5 (682 mg, 26%)を得る。 ¹H NMR (CDCl₃; 500 MHz) (ppm) 7.65 (2 H; d; J = 2.0 Hz); 7.01 (2 H; d; J = 2.0 Hz); 6.87 (2 H; s); 4.05 (2 H; t; J = 7.0 Hz); 3.77 (6 H; s); 2.70-2.43 (6 H; m); 2.15 (2 H; quint; J = 7.5 Hz); 1.66-1.34 (20 H; m). ¹³C NMR (CDCl₃; 75 MHz) (ppm) 149.7; 144.8; 133.9; 126.7; 121.0; 120.7; 118.7; 114.5; 56.8; 53.0; 51.7; 47.7; 27.9; 25.7; 25.6; 25.5; 25.2; 23.9. IR (neat) ν_{max} cm⁻¹ 3255; 2930; 2859; 1552; 1522; 1464; 1337; 1240; 1156; 919; 732. HRMS (DE) (m/z) [M+H]⁺ C₃₃H₄₅N₄O₈ 625.3237について計算される; 625.3228が得られる。

20

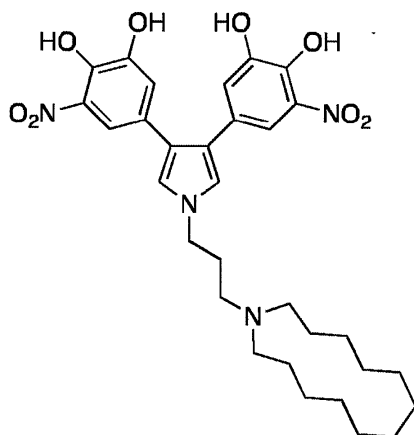
30

【0068】

5,5'-(1-(3-(アザシクロトリデカン-1-イル)プロピル)-1H-ピロール-3,4-ジイル)ビス(3-ニトロベンゼン-1,2-ジオール) (1)

【0069】

【化18】



10

【0070】

室温、アルゴン中で、化合物5 (50 mg; 0.080 mmol) に BBr_3 (CH_2Cl_2 の 1M 溶液、2 ml; 2 mmol) を加える。この不均一な混合物を室温で 30 分間攪拌する。1:1 CH_2Cl_2 /ペンタン混合物 (30 ml) を加えて、5 分後、沈殿物を分離し、同じ溶媒混合物で洗浄し、最小量の 10:1 CH_2Cl_2 /エタノールに溶解させる。この溶液をシリカゲルカラム上に導入し、20:1 CH_2Cl_2 /エタノールで溶出し、減圧下で濃縮して赤-橙色のアモルファス固形物の形態で化合物1 (44 mg; 92%) を得る。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) (ppm) 7.44 (2 H; d; $J = 1.8$ Hz); 7.00 (2 H; s); 6.97 (2 H; d; $J = 1.8$ Hz); 4.12 (2 H; t; $J = 6.3$ Hz); 3.30-3.12 (6 H; m); 2.32 (2 H; quint; $J = 6.0$ Hz); 1.85-1.70 (4 H; m); 1.60-1.39 (16 H; m). $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD ; 75 MHz) (ppm) 147.5; 141.9; 134.7; 127.0; 121.4; 121.3; 120.5; 113.5; 52.4; 52.0; 46.1; 25.9; 25.3; 24.6; 24.2; 23.9; 21.2. IR (neat) ν_{max} cm^{-1} 3379; 2932; 1621; 1555; 1471; 1300; 1236; 803; 762; 667. HRMS (DE) (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_8$ 597.2924 について計算される; 597.2938 が得られる。

20

【0071】

塩酸塩 1 · HCl

化合物1の最小量のジクロロメタン溶液に、エーテル中で希釈した 2M HCl のメタノール (5当量) 溶液を加える。次いで、形成した沈殿物を濾過し、乾燥させる。MP 179-184 °C (確定). $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$; 300 MHz) (ppm) 7.19 (2 H; d; $J = 3.0$ Hz); 7.06 (2 H; s); 6.90 (2 H; d; $J = 3.0$ Hz); 4.00 (2 H; t; $J = 6.0$ Hz); 3.15-2.97 (6 H; m); 2.24 (2 H; quint; $J = 6.0$ Hz); 1.75-1.58 (4 H; m); 1.44-1.28 (16 H; m). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$; 75 MHz) (ppm) 148.0; 140.4; 137.7; 126.7; 121.3; 120.5; 120.1; 113.5; 51.9; 51.2; 46.7; 25.9; 25.7; 24.9; 24.7; 24.4; 20.9. IR (neat) ν_{max} cm^{-1} 3111; 2930; 2861; 1552; 1463; 1293; 1233; 1061; 866; 801; 762. HRMS (DE) (m/z) $[\text{M}-\text{HCl}-\text{H}]^-$ $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_8$ 595.2768 について計算される; 595.2773 が得られる。

30

【0072】

In vitro 生体試験

化合物(1)の生体活性を3つの異なるガン細胞系:

- HCT-116 (結腸直腸ガン)
- U87 (グリア芽腫)
- K562 (骨髄性白血病)

及び3つの正常な非ガン細胞タイプ:

- HUVEC (ヒト臍帯血管内皮細胞)
- NHDF (ヒト皮膚線維芽細胞)
- HFDPC (ヒトの毛包の毛乳頭細胞)

で、in vitro で試験した。

40

【0073】

50

本試験のために選択された細胞を、37 で、異なる濃度で培地に加えた化合物(1)の存在下で、異なる時間培養した。

【 0 0 7 4 】

実施した試験のセットは、試験下における化合物の毒性の程度を測定すること、これらの細胞周期に対する効果、並びにこれらの自食（オートファジー）応答及びアポトーシスによる細胞死を誘発する能力の研究を可能にした。本出願人は、これらの分子標的を決定するためにこれらの作用機序を調べた。

【 0 0 7 5 】

1. 化合物(1)の細胞死に対する効果の研究

【 0 0 7 6 】

化合物(1)のHCT-116、U87、及びK562細胞成長に対する効果を、細胞成長試験((CellTiter-Blue(登録商標) Cell Viability Assay, Promega)を用いて評価した。化合物(1)で細胞を処理した後72時間で測定した成長曲線及びIC50値(細胞成長の50%減少を誘導する化合物の濃度)を図1に示す。HCT-116細胞は30 nMであり、U87細胞は45 nMであり、K562は70 nMである。

【 0 0 7 7 】

化合物(1)の細胞成長における効果を、HCT-116細胞系についてより詳細に示した。この試験は、濃度と試験下での細胞の分子に対する暴露時間(24時間、48時間、及び72時間)との作用として、トリパンブルー染色法により、死細胞を除いた後の生細胞の数を数えることにより行った。

【 0 0 7 8 】

図2は、化合物(1)のHCT-116細胞の数及び生存能力に対する効果を、この濃度及び処理時間の作用として表している。

【 0 0 7 9 】

図2aで示される結果は、細胞の数が化合物(1)の濃度及び処理時間に依りて減少することを実証している。25nMでの化合物(1)は、すでに24時間の処理から40%の細胞数の減少作用を示し、IC50より大きい濃度において、48時間の処理から80%の阻害にまで達している。しかしながら、この阻害効果は細胞の生存の変化の欠如と関連している(図2b)。このことは、化合物(1)の作用が細胞増殖抑制性であり、細胞毒性ではないことを示唆している。

【 0 0 8 0 】

ガン細胞に対する化合物(1)の作用の特異性を調べるために、本出願人は、正常なヒトH UVEC、NHDF、及びHFDPC細胞並びにHCT-116、U87、及びK652ガン細胞アノテーションに対するこれらの効果を評価した。図3の結果は、化合物(1)での72時間の処理後に測定されたIC50が、HUVEC細胞では2 μmで、NHDF細胞では5 μMで、HFDPCでは10 μMであることを示している。

【 0 0 8 1 】

そのため、IC50値はガン細胞において求められた値と比べて、正常の細胞で最大300倍になる。このことは、悪性細胞が、正常細胞に比べて化合物(1)の作用に対して顕著に感受性があることを明らかに示している。

【 0 0 8 2 】

2. 細胞周期に対する化合物(1)の効果の研究

【 0 0 8 3 】

化合物(1)で処理したHCT-116細胞のフローサイトメトリー分析(FC500, Beckman Coulter)は、この化合物がG0/G1期における細胞分裂を抑制することを実証した。この効果は、30及び50 nMの濃度で用いられた化合物(1)の細胞への24時間の暴露の後で顕著である(図4)。

【 0 0 8 4 】

3. 細胞周期の停止に關与するタンパク質p21及びp27の発現に対する化合物(1)の効果の研究

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

毒性を示さずに細胞の数を減少させることと、G0/G1における細胞周期の停止を示す上述した結果をもとに、本出願人は、G0/G1での細胞周期の停止に関連するタンパク質p21及びp27の発現を評価した。タンパク質p27の遺伝子は、FOXO3により制御されることが説明されており、一方、タンパク質p21の遺伝子は、p53転写因子により制御され、とりわけ酸化ストレスにより刺激される。HCT-116細胞を化合物(1)で24時間処理した。次いで、細胞抽出物をウエスタンブロットで解析した。図5に表される結果は、25及び50 nMの濃度での化合物(1)での処理後にタンパク質p27の発現が増加することを実証している。化合物(1)は、タンパク質p21の発現には有意な効果は示さない。

【 0 0 8 6 】

4. アポトーシス誘導に対する化合物(1)の効果の研究

【 0 0 8 7 】

化合物(1)がアポトーシスによる細胞死を誘導しないことを支持するために、24時間処理したHCT-116細胞を解析し、カスパーゼ3及び7の活性及びミトコンドリア膜電位の変化を評価した。

【 0 0 8 8 】

アポトーシスのマーカー酵素であるカスパーゼ3及び7の活性を、5 nM~75 nMまで濃度を変化させた化合物(1)でHCT-116細胞を処理した後でApo-ONE (Promega) を用いて測定した。図6aに表した結果は、試験での化合物(1)分子での処理後にこれらの酵素の活性に変化がないことを示している。

【 0 0 8 9 】

mで表されるミトコンドリア膜電位の試験を、JC-1プローブ(MitoProbe(登録商標) JC-1アッセイ, Molecular Probes)を用いるフローサイトメトリーにより行った。JC-1は、親油性アニオン性化合物であり、ミトコンドリアに選択的に浸透し、膜電位が上昇する場合、その色を緑から赤に変化させる。正常細胞とは異なり、アポトーシスにおける細胞は低い mを示し、これはJC-1プローブの強い緑色に関連付けられる。

【 0 0 9 0 】

図6bに表される結果は、25 nM~100 nMまでの異なる濃度での化合物(1)のHCT-116細胞の処理が、mを有意に変化させないことを示している。これらの全ての結果は、化合物(1)がカスパーゼ依存性アポトーシス経路(I型プログラム細胞死)を誘導しないことを示す。

【 0 0 9 1 】

5. 自食作用の研究

【 0 0 9 2 】

化合物(1)により誘導される細胞周期の停止がオートファジー(自食反応)を誘導するかどうかを調べることを目的に、異なる投与量の化合物(1)で24時間HCT-116細胞を処理した。次いで、細胞抽出物をウエスタンブロット解析に供し、タンパク質LC3-IIの発現を観察した。実際、タンパク質LC3は細胞中にサイトゾル型(LC3-I)又は食胞(ファゴソーム)に関連した形態(LC3-II)で存在する。後者は、オートファジーのマーカーである。

【 0 0 9 3 】

図7に示す結果は、5 nM~100 nMの間の濃度で用いられた化合物(1)の存在下で、LC3-Iの発現が増加することを明らかに示している。

【 0 0 9 4 】

6. 化合物(1)の作用機序の研究

【 0 0 9 5 】

化合物(1)での処理の後にアポトーシスを起こさずに自食応答を伴うG0/G1期における細胞周期の停止の観点から、本出願人は、PI3キナーゼ Akt - Foxoを含む生存経路に対するこの化合物の作用を調べた。このシグナル伝達経路は、非常に頻繁に、多くのガン細胞において(刺激により)破壊されることが見いだされており、これらの生存の一因となっている。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

図 8 に示される結果は、化合物(1)がこの生存経路を阻害していることを示している。実際に、HCT-116を5 nM ~ 100 nMの異なる濃度の化合物(1)の作用に24時間晒した。細胞抽出物のウェスタンブロット解析は、25nMからの濃度の化合物(1)が、Aktタンパク質のセリン473のリン酸化を完全に抑制することを明らかにした(図8a)。これはタンパク質FOX08の発現を促進し(図8b)、この合成はAkt-リン酸化タンパク質により低減される。それはタンパク質ペルオキシレドキシン1の発現を促進し、この遺伝子はFOX03因子の制御下にあると説明される(図8c)。

【 0 0 9 7 】

タンパク質ペルオキシレドキシンは、ペルオキシダーゼ活性を有する酵素であり、細胞内過酸化水素(H₂O₂)濃度を調節する。そのため、本出願人は、細胞内H₂O₂のマーカースとしてのDCF-DA(2',7'-ジクロロフルオレセインジアセテート、Sigma)を用いて、化合物(1)の細胞内H₂O₂濃度に対する効果を評価した。過酸化水素は、細胞内の第2のメッセンジャーである。これは、その濃度により、増殖又はアポトーシス等の多数の機能を制御する。この濃度の低下は、増殖の減少と関連する。50 nMの濃度の化合物(1)で処理されたHCT-116細胞のフローサイトメトリー解析結果は、18時間の処理後で、細胞内H₂O₂濃度の約50%の低下を示す(図9a)。確認された効果は投与量依存性である(図9b)。

10

【 図 1 】

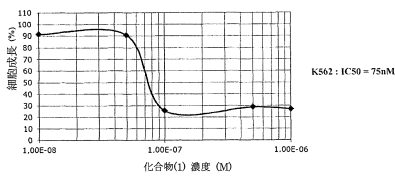
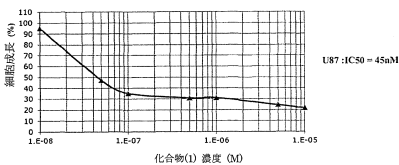
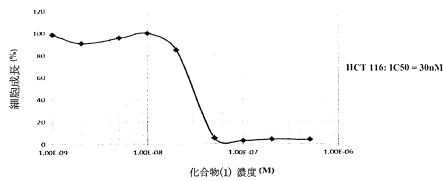


FIGURE 1

【 図 2 】

	24hrs	48hrs	72hrs
10nM	-12%	-18%	-20%
25nM	-40%	-62%	-50%
50nM	-44%	-83%	-91%
100nM	-44%	-83%	-92%
200nM	-45%	-86%	-94%

FIGURE 2a

	24hrs	48hrs	72hrs
% 生存率	% 生存率	% 生存率	% 生存率
C	98	99	99
10nM	98	99	99
25nM	98	98	99
50nM	97	96	95
100nM	97	97	98
200nM	98	94	95

FIGURE 2b

【 図 3 】

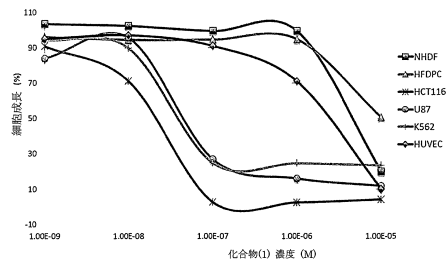


FIGURE 3

【 図 4 】

	G0/G1 %	S %	G2/M %
NT1	27	47	26
NT2	26	43	31
NT: 未処理			
10 nM	28	47	25
30 nM	42	40	18
50 nM	64	21	15

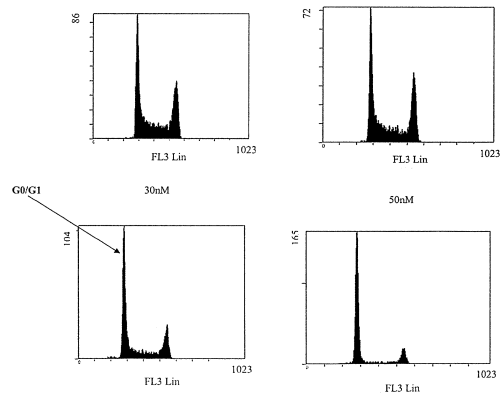


FIGURE 4

【 図 5 】

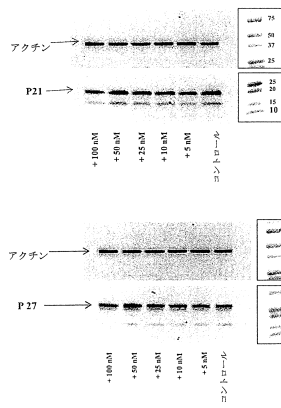


FIGURE 5

【 図 6 】

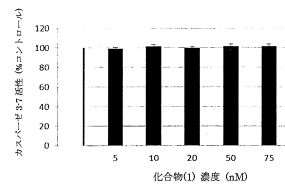


FIGURE 6a

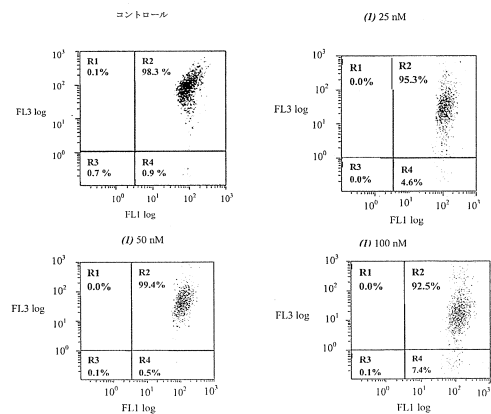


FIGURE 6b

【 図 7 】

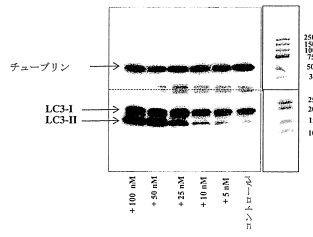


FIGURE 7

【 図 8 】

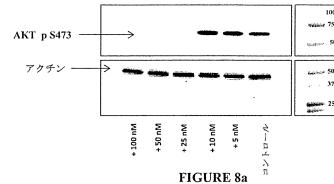


FIGURE 8a

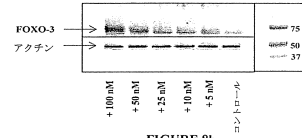


FIGURE 8b

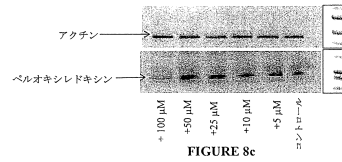


FIGURE 8c

【 図 9 】

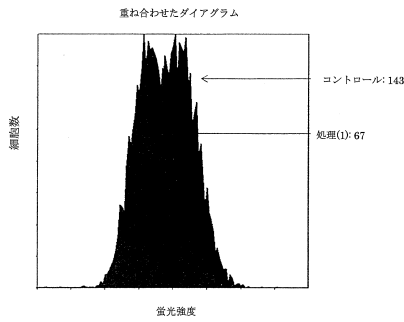


FIGURE 9a

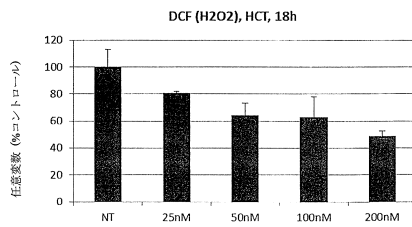


FIGURE 9b

フロントページの続き

- (72)発明者 マクシム・エゴロフ
フランス・44340・ブーグネ・シュマン・デ・カントン・25
- (72)発明者 ベルナル・デルベシュ
フランス・92140・クラマル・アレ・ルイズ・1
- (72)発明者 ジョアンナ・バカラ
フランス・75012・パリ・アヴェニュー・ドゥ・サン・マンデ・9/11
- (72)発明者 マリア・アチャブ
フランス・91190・ジフ・シュル/イヴェット・ルート・ドゥ・シャトーフォール・(番地なし)・レジデンス・デュ・シャトーフォール・パティマン・アッシュ
- (72)発明者 ジェローム・ピニオン
フランス・91530・ル・ヴァル・サン・ジェルマン・ヴォワ・デ・グッタン・35
- (72)発明者 オディル・トワゾン
フランス・91120・パレゾー・リュ・ロワイヨン・18
- (72)発明者 ミシェル・ベネシ
フランス・91190・ジフ・シュル/イヴェット・アヴェニュー・デュ・ジェネラル・ルクレール・160・パティマン・2

審査官 早川 裕之

- (56)参考文献 特表平07-507276(JP,A)
特表2002-526540(JP,A)
特表2002-508357(JP,A)
国際公開第2008/064317(WO,A1)
国際公開第2008/064318(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07D 207/333
A61K 31/4025
A61P 35/00
A61P 35/02
CAplus/REGISTRY(STN)