

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5952257号
(P5952257)

(45) 発行日 平成28年7月13日(2016.7.13)

(24) 登録日 平成28年6月17日(2016.6.17)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 D 491/052	(2006.01)	C O 7 D 491/052	C S P
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 K 31/407	(2006.01)	A 6 1 K 31/407	
C O 7 D 519/00	(2006.01)	C O 7 D 519/00	
C O 7 H 19/02	(2006.01)	C O 7 D 519/00	3 O 1

請求項の数 4 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-501127 (P2013-501127)
(86) (22) 出願日	平成24年2月23日(2012.2.23)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/054472
(87) 国際公開番号	W02012/115209
(87) 国際公開日	平成24年8月30日(2012.8.30)
審査請求日	平成26年8月15日(2014.8.15)
(31) 優先権主張番号	特願2011-38941 (P2011-38941)
(32) 優先日	平成23年2月24日(2011.2.24)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	507051732 株式会社ティムス 東京都稲城市百村211番地の10
(74) 代理人	100079049 弁理士 中島 淳
(74) 代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
(74) 代理人	100099025 弁理士 福田 浩志
(72) 発明者	蓮見 憲司 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学 法人東京農工大学内
(72) 発明者	鈴木 絵里子 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学 法人東京農工大学内

最終頁に続く

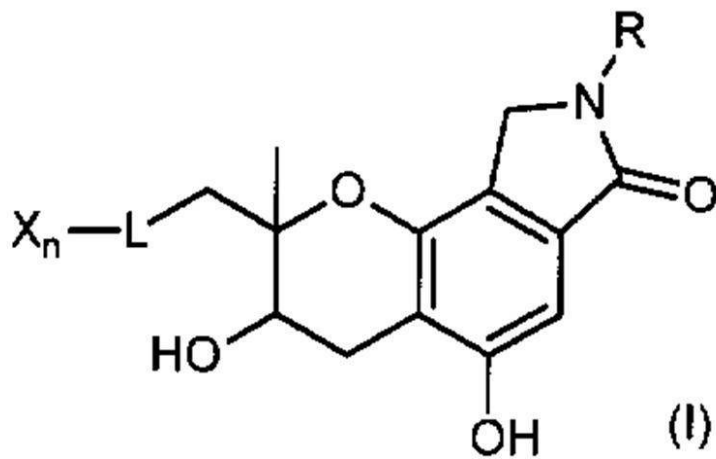
(54) 【発明の名称】 可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(Ⅰ)で表される化合物を含む可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤。

【化 1】



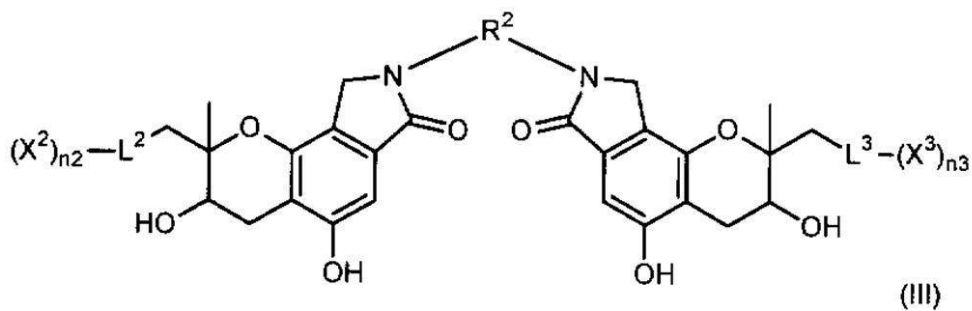
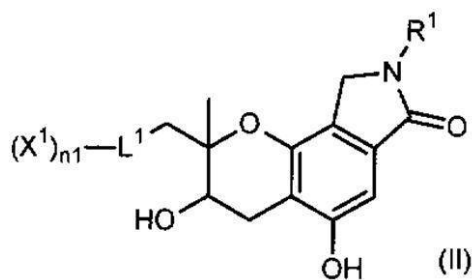
(式中、Rは、水素原子、 α -アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基、複素環基、炭素数2～8のアルキル基、又はアリール基を示す。Lは、炭素数4～10の脂肪族炭化水素基を示し、Xは、ヒドロキシ基又はカルボキシ基を示す。nは、0～2の整数を示す)

20

【請求項 2】

前記一般式(I)で表される化合物は、下記一般式(II)で表される化合物、又は一般式(III)で表される化合物である請求項1に記載の可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤。

【化 2】



(式中、L¹、L²及びL³はそれぞれ独立に、炭素数4～10の脂肪族炭化水素基を示す。X¹、X²及びX³はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基又はカルボキシ基を示す。n¹

50

、 n_2 及び n_3 はそれぞれ独立に、0 ~ 2 の整数を示す。

R^1 は、水素原子又は下記 (A) から (D) のいずれかを示す。

(A) - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基。

(B) フェニル基、炭素数 1 ~ 5 のアルキル基及びカルバモイル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有していてもよい含窒素複素環基。

(C) ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、炭素数 7 ~ 14 のアリールアルキル基、チオウレイド基及びフルオレサミンから水素原子を1つ取り除いて構成される基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有していてもよい炭素数 2 ~ 6 のアルキル基。

(D) ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基及びアリールカルボニル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有していてもよいアリール基。

10

R^2 は、カルボキシ基を有していてもよい炭素数 2 ~ 8 のアルキレン基、及び硫黄原子からなる群より選ばれる少なくとも1種から構成される2価の連結基を示す)

【請求項 3】

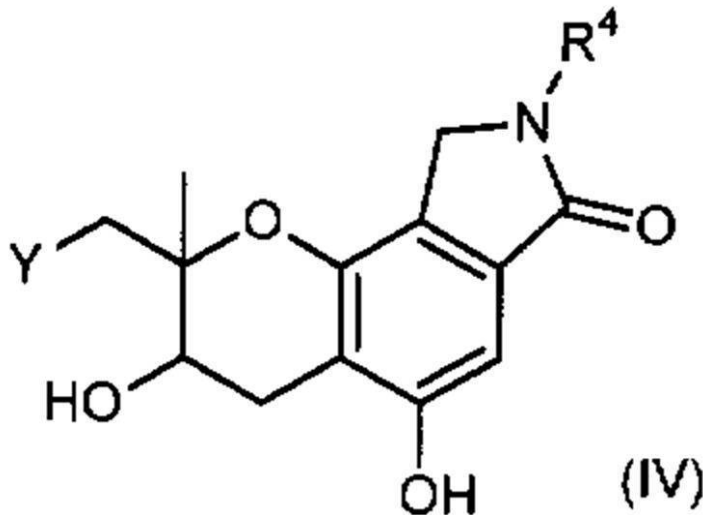
前記 - アミノ酸が、天然アミノ酸、天然アミノ酸の D 体、又は、ヒドロキシ基、カルボキシ基及び炭素数 1 ~ 5 のアルキル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有していてもよいフェニルグリシンである請求項 1 又は請求項 2 に記載の可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤。

【請求項 4】

下記一般式 (IV) で表される化合物。

20

【化 3】

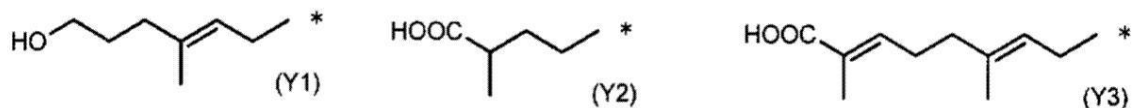


30

40

(式中、 R^4 は、___ - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基、複素環基、炭素数 2 ~ 8 のアルキル基、又はアリール基を示す。Y は、下記化学式 (Y1) ~ (Y3) のいずれかを示す。下記化学式中、* は結合位置を示す)

【化 4】



50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

アラキドン酸カスケードは、様々な細胞外及び/又は細胞内シグナルにตอบสนองしてアラキドン酸が原形質膜の脂質貯蔵から遊離される脂質シグナル伝達カスケードであり、生体内の広範に分布する。遊離されたアラキドン酸は、様々な酸化酵素によって、炎症において重要な役割をするシグナル伝達脂質に転換される。これらの脂質シグナル伝達カスケードを制御することは、多数の炎症性障害を処置するために使用される多くの市販薬にとって依然として重要な戦略である。例えば、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）は、シクロオキシゲナーゼ（COX1及びCOX2）を阻害することによりアラキドン酸のプロスタグランジンへの転換を抑制する。

10

【0003】

ある種のシトクロムP450依存性酵素が、アラキドン酸をエポキシエイコサトリエン酸（EET）として公知である一連のエポキシド誘導体に転換する。これらのEETは、全身に発現が認められ、特に内皮細胞、腎臓、肝臓で高い発現が見られる。アラキドン酸の代謝物であるプロスタグランジン及びロイコトリエン経路の多くの最終生成物とは対照的に、EETは様々な抗炎症及び抗高血圧特性を有し、強力な血管拡張薬及び血管透過性のメディエーターであることが公知である。

20

【0004】

EETはインビボ（*in vivo*）で強力な効果を有する一方、EETのエポキシド構造は、可溶性エポキシドヒドロラーゼ（sEH）によって、活性が低いジヒドロキシエイコサトリエン酸（DHET）の形態に急速に加水分解される。sEHの阻害は、高血圧動物の血圧を低下させ（例えば、*Circ Res.*, 87(11), 992-8(2000)、及び*J. Biol. Chem.*, 275, 40504-10(2000)参照）たり、炎症促進性の一酸化窒素（NO）、サイトカイン、及び脂質メディエーターの産生を低下させたり、インビボでリポキシンA4産生を増強することによって炎症消散に寄与したりする（例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102(28), 9772-7(2005)参照）ことが見いだされている。

30

【0005】

またsEHは、2つの機能を持つ酵素であり、EETをDHETに変換するヒドロラーゼ活性のほか、ホスファターゼ活性を有することが明らかとなっている。ホスファターゼ活性の作用については不明な点が多いが、コレステロール代謝に寄与している可能性が示唆されている（例えば、*J. Biol. Chem.*, 283(52), 36592-8(2008)参照）。

【0006】

上記に関連して様々な低分子化合物が、sEHを阻害し、EETレベルを上昇させることが見いだされている（例えば、*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 311-33(2005)、及び特表2010-521475号公報参照）。このような低分子化合物は代表的に、アダマンチル尿素構造又は置換もしくは無置換のフェニル構造を含んでいる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

これまでに発見された各種のsEH阻害剤は、いずれもsEHのヒドロラーゼ活性に対する阻害作用のみが確認されており、sEHのホスファターゼ活性を阻害する化合物の報告は少ない（例えば、*Recent Patents on Cardiovascu*

50

lar Drug Discovery, 2006, 1, 67-72)。

本発明は、可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) のホスファターゼ活性を阻害可能で、優れた可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害活性を有する可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

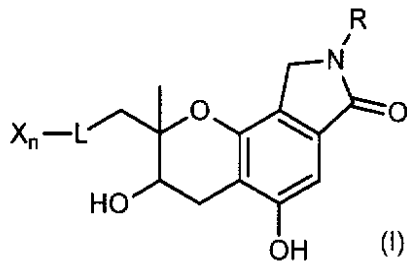
【0008】

前記課題を解決するための具体的手段は以下の通りであり、本発明は以下の態様を包含する。

本発明の第一の態様は、下記一般式 (I) で表される化合物を含む可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤である。

【0009】

【化1】



【0010】

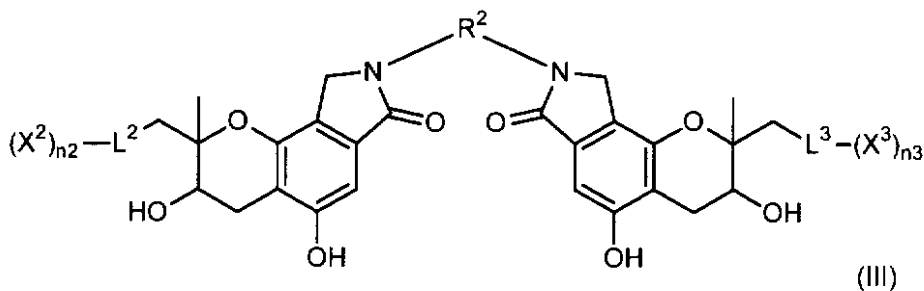
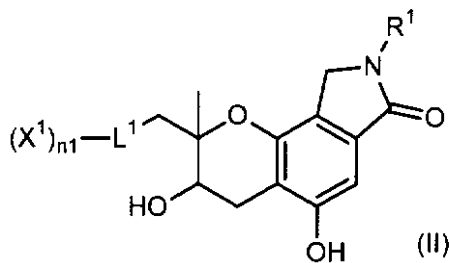
式中、Rは水素原子、 α -アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基、複素環基、炭素数2~8のアルキル基、又はアリール基を示す。Lは炭素数4~10の脂肪族炭化水素基を示し、Xはヒドロキシ基又はカルボキシ基を示す。nは0~2の整数を示す。

【0011】

前記一般式 (I) で表される化合物は、下記一般式 (II) で表される化合物又は一般式 (III) で表される化合物であることが好ましい。

【0012】

【化2】



【0013】

10

20

30

40

50

式中、 L^1 、 L^2 及び L^3 はそれぞれ独立に、炭素数 4 ~ 10 の脂肪族炭化水素基を示す。 X^1 、 X^2 及び X^3 はそれぞれ独立に、ヒドロキシ基又はカルボキシ基を示す。 n_1 、 n_2 及び n_3 はそれぞれ独立に、0 ~ 2 の整数を示す。

R^1 は、水素原子又は下記 (A) から (D) のいずれかを示す。

(A) - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を 1 つ取り除いた残基。

(B) フェニル基、炭素数 1 ~ 5 のアルキル基及びカルバモイル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよい含窒素複素環基。

(C) ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、炭素数 7 ~ 14 のアリールアルキル基、チオウレイド基及びフルオレサミンから水素原子を 1 つ取り除いて構成される基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよい炭素数 2 ~ 6 のアルキル基。

(D) ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基及びアリールカルボニル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよいアリール基。

R^2 は、カルボキシ基を有していてもよい炭素数 2 ~ 8 のアルキレン基、及び硫黄原子からなる群より選ばれる少なくとも 1 種から構成される 2 価の連結基を示す。

【0014】

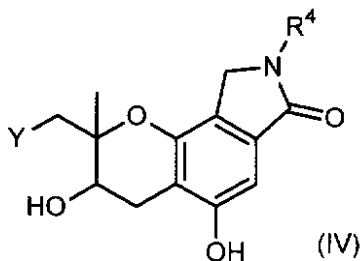
前記 - アミノ酸は、天然アミノ酸、天然アミノ酸の D 体、又は、ヒドロキシ基、カルボキシ基及び炭素数 1 ~ 5 のアルキル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよいフェニルグリシンであることが好ましい。

【0015】

本発明の第二の態様は、下記一般式 (IV) で表される化合物である。

【0016】

【化 3】

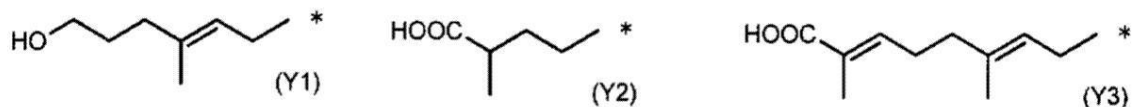


【0017】

式中、 R^4 は、 - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を 1 つ取り除いた残基、複素環基、炭素数 2 ~ 8 のアルキル基、又はアリール基を示す。Y は下記化学式 (Y1) ~ (Y3) のいずれかを示す。下記化学式中、* は結合位置を示す。

【0018】

【化 4】



【0020】

本発明の第三の態様は、前記可溶性エポキシドハイドロラーゼ阻害剤を含む炎症性疾患の治療剤である。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の第四の態様は、前記可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤である。

【0022】

本発明の第五の態様は、前記可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤をがん悪液質の治療を必要とする哺乳類に投与することを含むがん悪液質の治療方法である。

【0023】

本発明の第六の態様は、前記可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤のがん悪液質治療剤への使用である。

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、可溶性エポキシドヒドロラーゼのホスファターゼ活性を阻害可能で、優れた可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害活性を有する可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】モデルがん動物におけるヒラメ筋重量変化に対するS M T P - 7の作用の一例を示すグラフである。

【図2】モデルがん動物における頸骨重量変化に対するS M T P - 7の作用の一例を示すグラフである。

【図3】モデルがん動物における脾臓重量変化に対するS M T P - 7の作用の一例を示すグラフである。

【図4】モデルがん動物におけるヒラメ筋重量変化に対するS M T P - 4 4 Dの作用の一例を示すグラフである。

【図5】モデルがん動物における頸骨重量変化に対するS M T P - 4 4 Dの作用の一例を示すグラフである。

【図6】モデルがん動物における肝臓重量変化に対するS M T P - 4 4 Dの作用の一例を示すグラフである。

【図7】モデルがん動物における脾臓重量変化に対するS M T P - 4 4 Dの作用の一例を示すグラフである。

【図8】モデルがん動物における血漿アルブミン値に対するS M T P - 4 4 Dの作用の一例を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明の可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害剤を含むがん悪液質の治療剤は、下記一般式(I)で表される化合物の少なくとも1種を含む。下記一般式(I)で表される特定の構造を有することで、優れた可溶性エポキシドヒドロラーゼ阻害活性(以下、「s E H」ともいう)を示す。さらに可溶性エポキシドヒドロラーゼのホスファターゼ活性を阻害可能である。

【0027】

下記一般式(I)で表される化合物は、その構造中に1個又は複数個の不斉炭素原子又は不斉中心を含む場合があり、2種以上の光学異性体が存在する場合もある。本発明は各々の光学異性体及びそれらが任意の割合で含まれる混合物をも全て包含するものである。

また下記一般式(I)で表される化合物は、その構造中に、炭素-炭素二重結合に由来する2種以上の幾何異性体が存在する場合もある。本発明は各々の幾何異性体が任意の割合で含まれる混合物をも全て包含する。

【0028】

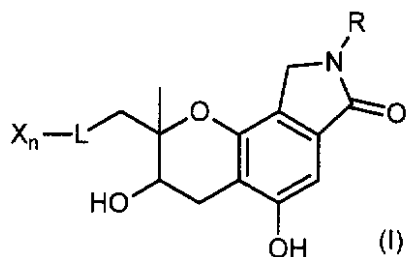
10

20

30

40

【化5】



10

【0029】

式中、Rは水素原子、 α -アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基、置換基を有していてもよい複素環基、置換基を有していてもよい炭素数2～8のアルキル基、又は置換基を有していてもよいアリアル基を示す。

Lは炭素数4～10の脂肪族炭化水素基を示す。XはLで示される脂肪族炭化水素基における置換基であり、ヒドロキシ基又はカルボキシ基を示す。nはLにおける置換基Xの置換数であり、0～2の整数を示す。

【0030】

一般式(I)のRにおける α -アミノ酸は特に制限されず、天然アミノ酸であっても、非天然アミノ酸であってもよい。また天然アミノ酸に置換基が導入されたアミノ酸誘導体であってもよい。さらに α -アミノ酸が2以上のアミノ基を有する場合、いずれのアミノ基が取り除かれてもよい。

20

中でも α -アミノ酸は、sEH阻害活性の観点から、天然アミノ酸、天然アミノ酸のD体、又は、ヒドロキシ基、カルボキシ基及び炭素数1～5のアルキル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有してもよいフェニルアラニン若しくはフェニルグリシンであることが好ましく、天然アミノ酸、天然アミノ酸のD体、又は、ヒドロキシ基、カルボキシ基及び炭素数1～5のアルキル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有してもよいフェニルグリシンであることがより好ましい。

【0031】

天然アミノ酸は、天然に存在し得るアミノ酸であれば特に制限されない。例えば、グリシン、アラニン、スレオニン、バリン、イソロイシン、チロシン、システイン、シスチン、メチオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、リシン、ヒドロキシリシン、オルニチン、シトルリン、ホモシステイン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、ホモシスチン、ジアミノピメリン酸、ジアミノプロピオン酸、セリン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン等が挙げられる。

30

【0032】

天然アミノ酸に置換基が導入されたアミノ酸誘導体における置換基としては、例えば、ニトロ基、ヒドロキシ基、炭素数7～16のアリアルアルキル基、ウレイド基、チオウレイド基、カルボキシ基、フルオレサミンから水素原子を1つ取り除いて構成される基等が挙げられる。前記アミノ酸誘導体における置換基は可能な場合にはさらに置換基を有していてもよい。置換基が有する置換基はアミノ酸誘導体における置換基と同様である。

40

【0033】

一般式(I)のRにおけるアミノ糖は、アミノ基を少なくとも1つ有する糖誘導体であれば特に制限されない。具体的には例えば、グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン、ノイラミン酸等を挙げるができる。

【0034】

一般式(I)のRにおける複素環基としては、ヘテロ原子を含む環状基であれば特に制限されず、脂肪族複素環基及び芳香族複素環基のいずれであってもよい。またヘテロ原子としては窒素原子、酸素原子、硫黄原子等を挙げるができる。

50

中でも、s E H阻害活性の観点から、ヘテロ原子として窒素原子を含む含窒素複素環基であることが好ましく、プリン、ピリジン、ピリダジン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、及びピラゾロンからなる群より選ばれる複素環化合物から水素原子を一つ取り除いて構成される複素環基であることがより好ましく、プリン、ピリジン、及びピラゾロンからなる群より選ばれる複素環化合物から水素原子を一つ取り除いて構成される複素環基であることがさらに好ましい。なお、複素環化合物から水素原子を取り除く位置は特に制限されない。中でも複素環化合物の炭素原子上から取り除かれることが好ましい。

【0035】

Rにおける複素環基は置換基を有していてもよい。複素環基における置換基としては、例えば、炭素数1～5のアルキル基、炭素数14以下のアリール基、カルボキシ基、カルバモイル基、スルホン酸基等を挙げることができる。中でもフェニル基及びカルバモイル基から選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。

10

複素環基における置換基の数は特に制限されないが、3以下であることが好ましい。

【0036】

一般式(I)のRにおける炭素数2～8のアルキル基としては、直鎖状、分岐鎖状及び環状のいずれであってもよい。なかでも直鎖状又は分岐鎖状であることが好ましく、直鎖状であることがより好ましい。また炭素数は2～6であることが好ましい。なお、アルキル基の炭素数にはアルキル基上の置換基の炭素数は含まれない。

【0037】

Rにおけるアルキル基は置換基を有していてもよい。アルキル基における置換基としては、炭素数1～5のアルキル基、炭素数14以下のアリール基、炭素数16以下のアリールアルキル基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、カルバモイル基、スルホン酸基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、ウレイド基、チオウレイド基、アルキルスルフィド基、アルキルジスルフィド基、一般式(I)で表される化合物からRを取り除いて構成される基、フルオレサミンから水素原子を1つ取り除いて構成される基等を挙げることができる。中でも、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、炭素数7～14のアリールアルキル基、チオウレイド基、一般式(I)で表される化合物からRを取り除いて構成される基、及びフルオレサミンから水素原子を1つ取り除いて構成される基からなる群より選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。

20

【0038】

アルキル基における置換基の数は特に制限されないが、3以下であることが好ましい。

またアルキル基における置換基は可能な場合にはさらに置換基を有していてもよい。置換基が有する置換基はアルキル基における置換基と同様である。

30

【0039】

一般式(I)のRにおけるアリール基は、炭素数6～14のアリール基であることが好ましく、炭素数6～10のアリール基であることがより好ましく、フェニル基であることがさらに好ましい。

【0040】

Rにおけるアリール基は置換基を有していてもよい。アリール基における置換基としては、炭素数1～5のアルキル基、炭素数14以下のアリール基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基、アリールカルボニル基等を挙げることができる。中でも、ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基及びアリールカルボニル基からなる群より選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。

40

【0041】

アリール基における置換基の数は特に制限されないが、3以下であることが好ましい。

またアリール基における置換基は可能な場合にはさらに置換基を有していてもよい。置換基が有する置換基はアリール基における置換基と同様である。さらにアリール基における置換基は可能な場合には、置換基同士が結合して環状構造を形成してもよい。

【0042】

Lで示される炭素数4～10の脂肪族炭化水素基は、直鎖状、分岐鎖状及び環状のいずれ

50

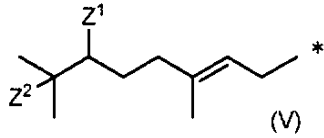
れであってもよい。また不飽和結合を含んでいてもよい。中でも直鎖状又は分岐鎖状の不飽和結合を含んでもよい脂肪族炭化水素基であることが好ましい。

【0043】

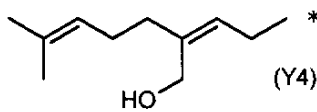
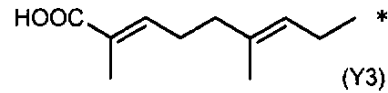
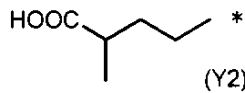
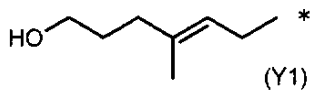
一般式(I)において、 $-L-X_n$ で表される基は、sEH阻害活性の観点から、下記一般式(V)、化学式(Y1)~(Y4)のいずれかで表されることが好ましい。

【0044】

【化6】



10



20

【0045】

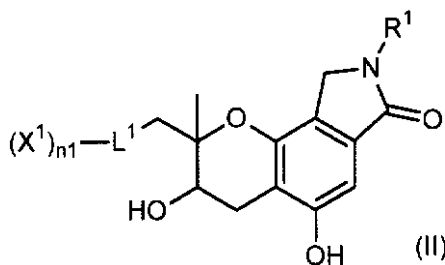
一般式(V)中、 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して、水素原子若しくはヒドロキシ基であるか、又は一緒になって単結合を形成する。なお、化学式中の「*」は結合位置を示す。

【0046】

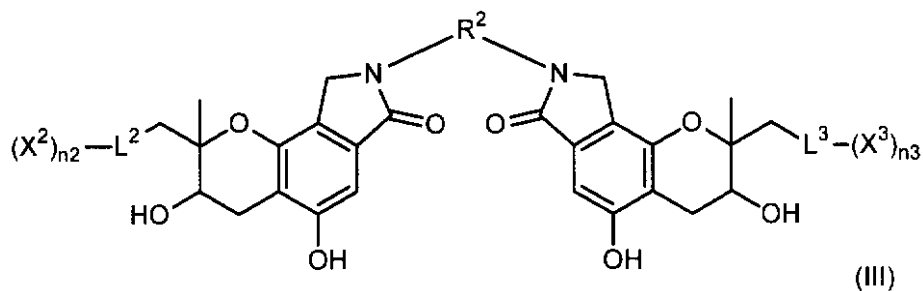
前記一般式(I)で表される化合物は、下記一般式(II)で表される化合物又は一般式(III)で表される化合物であることが好ましい。

【0047】

【化7】



40



50

【0048】

式中、 L^1 、 L^2 及び L^3 はそれぞれ独立に、炭素数 4 ~ 10 の脂肪族炭化水素基を示す。 L^1 、 L^2 及び L^3 の詳細は、一般式 (I) における L と同様であり、好ましい態様も同様である。また、 $-L^1-(X^1)_{n_1}$ 、 $-L^2-(X^2)_{n_2}$ 及び $-L^3-(X^3)_{n_3}$ で表される基の好ましい態様は、 $-L-X_n$ で表される基と同様である。

【0049】

R^1 は、水素原子又は下記 (A) から (D) のいずれかを示す。

- (A) - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を 1 つ取り除いた残基。
- (B) フェニル基、炭素数 1 ~ 5 のアルキル基及びカルバモイル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよい含窒素複素環基。
- (C) ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、炭素数 7 ~ 14 のアリールアルキル基、チオウレイド基及びフルオレサミンから水素原子を 1 つ取り除いて構成される基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよい炭素数 2 ~ 6 のアルキル基。但し、カルボキシメチル基を有する場合を除く。
- (D) ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基及びアリールカルボニル基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよいアリール基。

【0050】

R^1 における - アミノ酸及びアミノ糖は、一般式 (I) の R における - アミノ酸及びアミノ糖と同義であり、好ましい態様も同様である。

【0051】

R^1 における含窒素複素環基は、少なくとも窒素原子を含む環状基であれば特に制限されず、飽和複素環基、不飽和複素環基及び芳香族複素環基のいずれであってもよい。またヘテロ原子として窒素原子に加えて、酸素原子、硫黄原子等を含んでもよい。

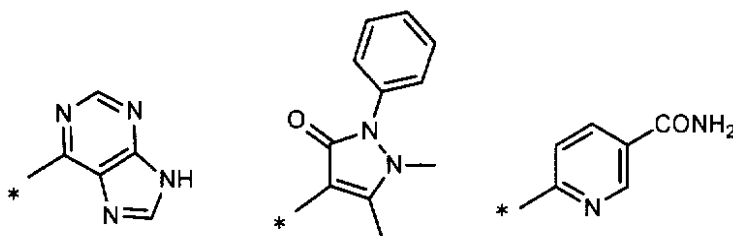
【0052】

含窒素複素環基の具体例としては、プリン、ピリジン、ピリダジン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピラゾロンからなる群より選ばれる複素環化合物から水素原子を一つ取り除いて構成される複素環基を挙げることができる。中でも、プリン、ピリジン、及びピラゾロンからなる群より選ばれる複素環化合物から水素原子を一つ取り除いて構成される複素環基であることが好ましい。

R^1 における含窒素複素環基の具体例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されない。なお、以下の化学式中、「*」は結合位置を示す。

【0053】

【化 8】



【0054】

R^1 における炭素数 2 ~ 6 のアルキル基は、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、カルバモイルオキシ基、炭素数 7 ~ 14 のアリールアルキル基、チオウレイド基、及びフルオレサミンから水素原子を 1 つ取り除いて構成される基からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の置換基を有していてもよい。これらの置換基は可能な場合にはさらに置換基を有していてもよい。該置換基としては上記と同様の置換基を挙げることができる。

R^1 におけるアルキル基の具体例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されない。なお、以下の化学式中、「*」は結合位置を示す。

10

20

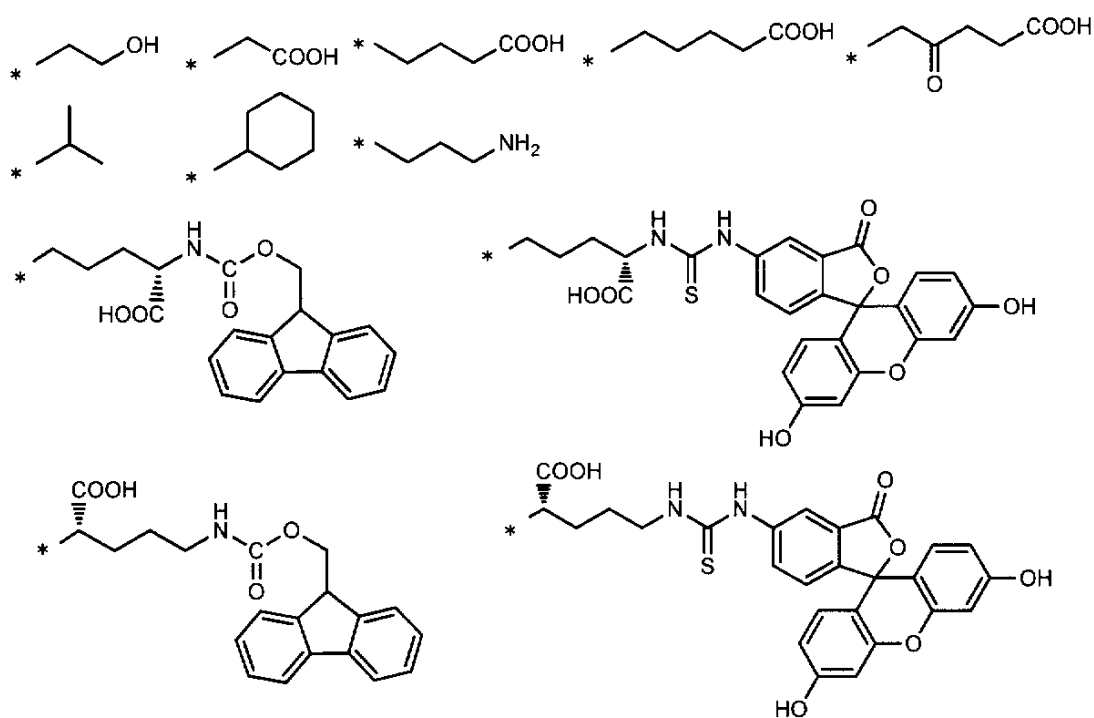
30

40

50

【 0 0 5 5 】

【 化 9 】



10

20

【 0 0 5 6 】

R¹におけるアリール基としては、炭素数6～14以下のアリール基であることが好ましく、炭素数6～10のアリール基であることがより好ましく、フェニル基であることがさらに好ましい。

【 0 0 5 7 】

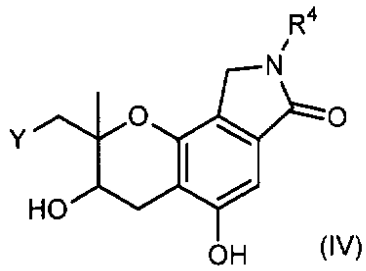
R¹におけるアリール基は、ヒドロキシ基、カルボキシ基、スルホン酸基、カルバモイル基及びアリールカルボニル基からなる群より選ばれる少なくとも1種の置換基を有していてもよい。アリール基における置換基の数は特に制限されないが、3以下であることが好ましい。またアリール基における置換基は可能な場合にはさらに置換基を有してもよい。置換基が有する置換基はアリール基における置換基と同様である。さらにアリール基における置換基は可能な場合には、置換基同士が結合して環状構造を形成してもよい

30

R¹におけるアリール基の具体例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されない。なお、以下の化学式中、「*」は結合位置を示す。

【 0 0 5 8 】

【化12】



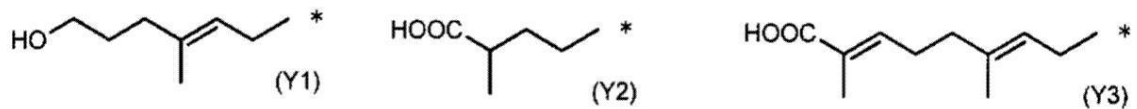
10

【0063】

一般式(IV)中、R⁴は、 - アミノ酸若しくはアミノ糖からアミノ基を1つ取り除いた残基、複素環基、炭素数2~8のアルキル基、又はアリール基を示す。Yは下記化学式(Y1)~(Y3)のいずれかを示す。下記化学式中、*は結合位置を示す。

【0064】

【化13】



20

【0065】

一般式(IV)におけるR⁴の詳細は、一般式(I)におけるRと同様であり、好ましい態様も同様である。

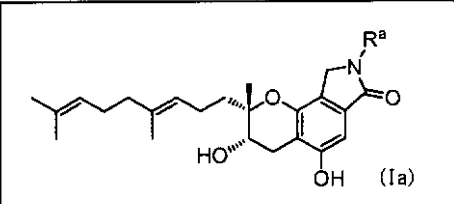
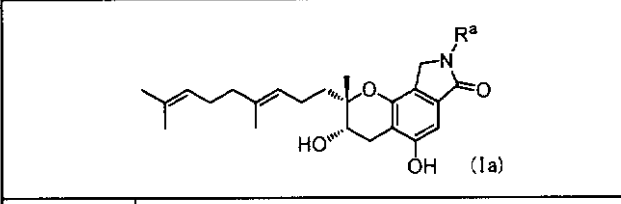
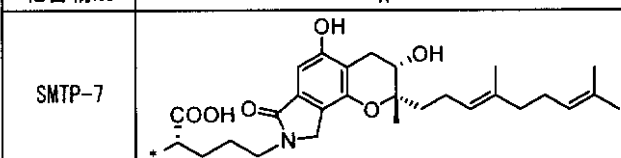
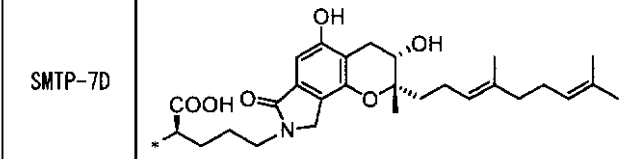
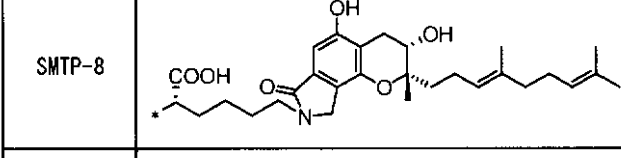
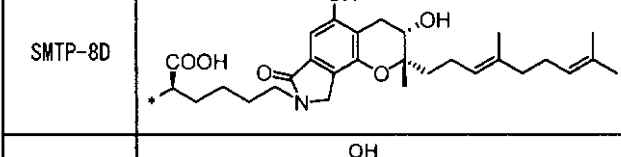
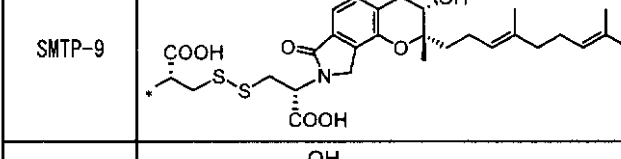
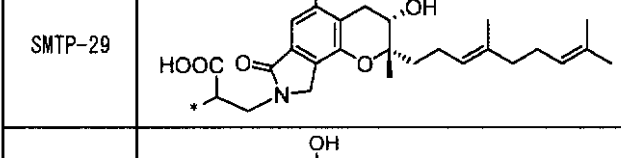
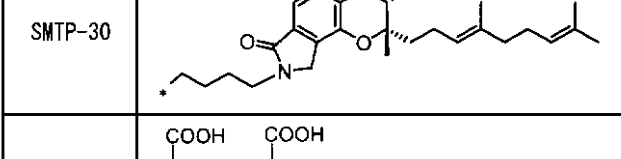
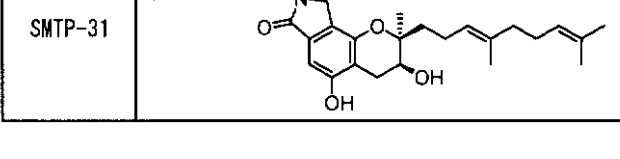
【0066】

一般式(I)で表される化合物の具体例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されない。なお、表中の「*」はR^a、R^b、R^c、R^d、及びR^eにおける結合位置を示す。但し、一般式(I)で表される化合物には、SMTP-0、SMTP-0a、SMTP-0b、SMTP-0c及びSMTP-0eは含まれない。

30

【0067】

【化 1 4】

 (1a)		 (1a)	
化合物No	R ^a	化合物No	R ^a
SMTp-0	*-H	SMTp-7	
SMTp-1	*-CH ₂ CH ₂ OH	SMTp-7D	
SMTp-3	*-CH(OH)CH ₂ COOH	SMTp-8	
SMTp-4	*-CH ₂ CH ₂ Ph	SMTp-8D	
SMTp-4Me	*-CH ₂ CH ₂ Ph	SMTp-9	
SMTp-4D	*-CH ₂ CH ₂ Ph	SMTp-29	
SMTp-5	*-CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	SMTp-30	
SMTp-5D	*-CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH	SMTp-31	
SMTp-6	*-CH ₂ CH ₂ Ind		
SMTp-6D	*-CH ₂ CH ₂ Ind		

10

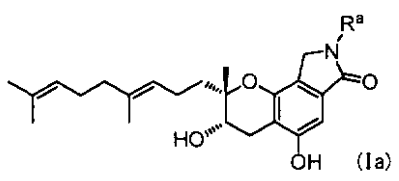
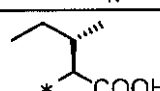
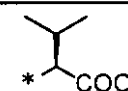
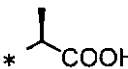
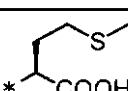
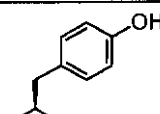
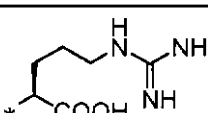
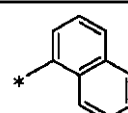
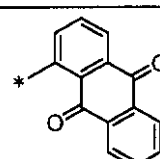
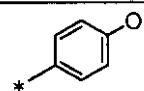
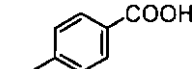
20

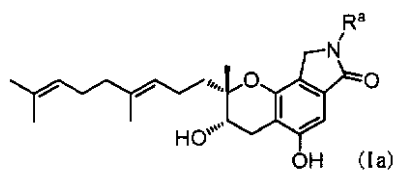
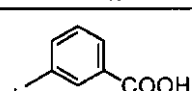
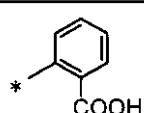
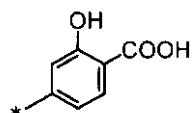
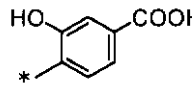
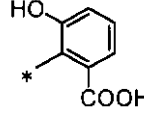
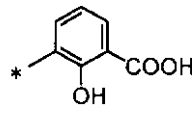
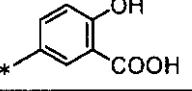
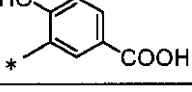
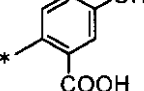
30

40

【 0 0 6 8 】

【化 1 5】

 (1a)	
化合物No	R ^a
SMTP-10	
SMTP-11	
SMTP-12	
SMTP-13	
SMTP-14	
SMTP-15	
SMTP-16	
SMTP-17	
SMTP-18	
SMTP-19	

 (1a)	
化合物No	R ^a
SMTP-20	
SMTP-21	
SMTP-22	
SMTP-23	
SMTP-24	
SMTP-25	
SMTP-26	
SMTP-27	
SMTP-28	

10

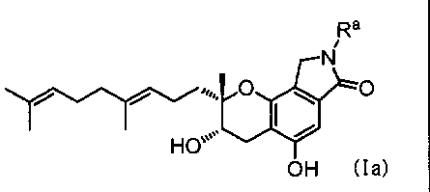
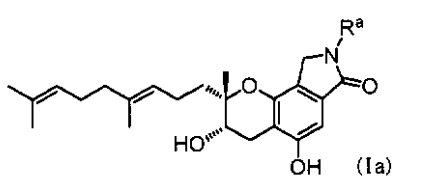
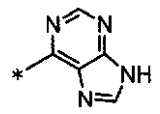
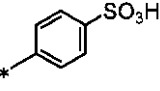
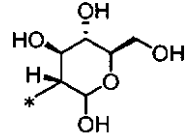
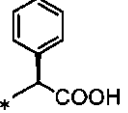
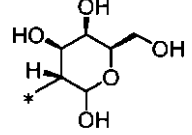
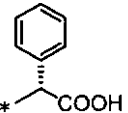
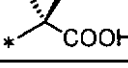
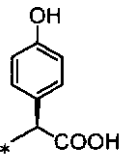
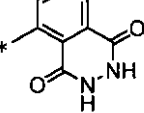
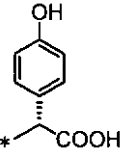
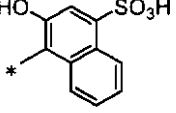
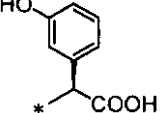
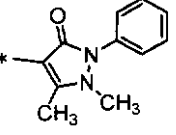
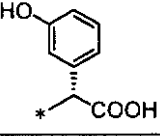
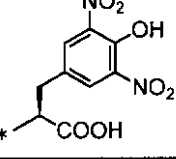
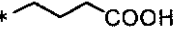
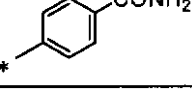
20

30

40

【 0 0 6 9 】

【化 1 6】

 (Ia)		 (Ia)	
化合物No	R ^a	化合物No	R ^a
SMTp-32		SMTp-42	
SMTp-33		SMTp-43	
SMTp-34		SMTp-43D	
SMTp-35		SMTp-44	
SMTp-36		SMTp-44D	
SMTp-37		SMTp-45	
SMTp-38		SMTp-45D	
SMTp-39			
SMTp-40			
SMTp-41			

10

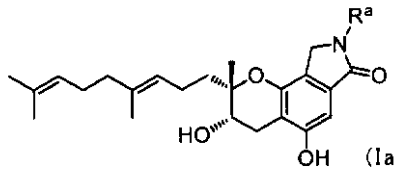
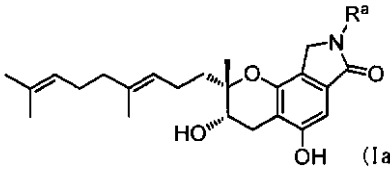
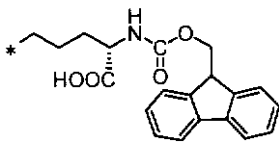
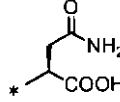
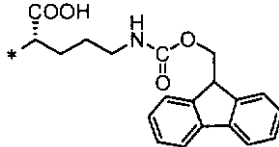
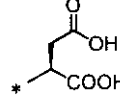
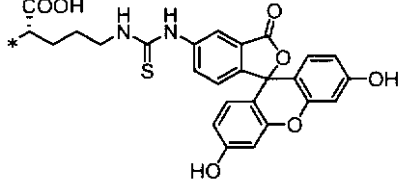
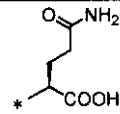
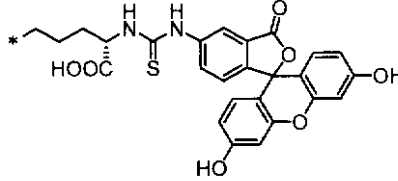
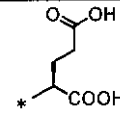
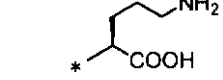
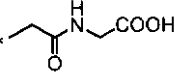

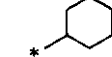

20

30

40

【 0 0 7 0 】

【化 1 7】

 (1a)		 (1a)	
化合物No	R ^a	化合物No	R ^a
SMTp-46		SMTp-52	
SMTp-47		SMTp-53	
SMTp-48		SMTp-54	
SMTp-49		SMTp-55	
SMTp-50		SMTp-56	
		SMTp-57	
		SMTp-58	
		SMTp-59	

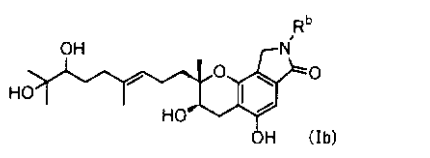
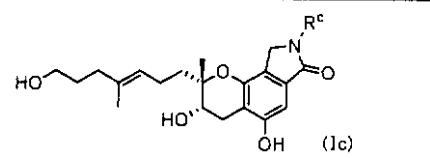
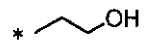

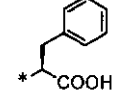
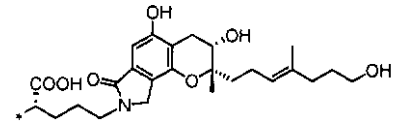
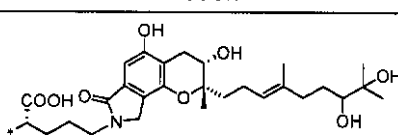


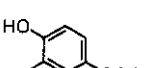
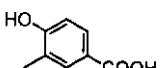
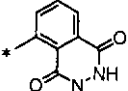
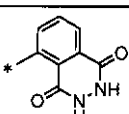
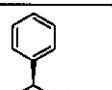
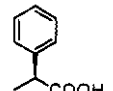
10

20

30

【 0 0 7 1】

【化 1 8】

 (Ib)		 (Ic)	
化合物No	R ^b	化合物No	R ^c
SMTp-0e	*-H	SMTp-0a	*-H
SMTp-2	* 	SMTp-4a	* 
SMTp-4e	* 	SMTp-7a	
SMTp-7e		SMTp-21a	* 
SMTp-21e	* 	SMTp-27a	* 
SMTp-27e	* 	SMTp-36a	* 
SMTp-36e	* 	SMTp-43a	* 
SMTp-43e	* 		

10

20

30

【 0 0 7 2 】

【化19】

 (Id)		 (Ie)	
化合物No	R ^d	化合物No	R ^e
SMTP-0b	*-H	SMTP-0c	*-H
SMTP-4b		SMTP-4c	
SMTP-7b		SMTP-7c	
SMTP-21b		SMTP-21c	
SMTP-27b		SMTP-27c	
SMTP-36b		SMTP-36c	
SMTP-43b		SMTP-43c	

10

20

30

【0073】

一般式(I)で表される化合物は、化学合成によって得たものでもよく、糸状菌、例えば、スタキボトリス・ミクロスポラ(Stachybotrys microspora、例えば、IFO30018株)の培養物から精製して得たものでもよい。前記一般式(I)で表される化合物を糸状菌の培養物から精製して得る方法として、例えば、スタキボトリス・ミクロスポラの培養液に所定の有機アミノ化合物を添加したときに得られた培養物から目的の化合物を精製することを含む方法が挙げられる。これらの方法は、例えば、特開2004-224737号公報、特開2004-224738号公報、及びWO2007/111203号公報等を適宜参照して行うことができる。

40

【0074】

一般式(I)で表される化合物は、鏡像異性体、ジアステレオマー、及び鏡像異性体どうし又はジアステレオマーどうしの混合物でもよい。鏡像異性体、ジアステレオマー、及び鏡像異性体どうし又はジアステレオマーどうしの混合物は、化学合成によって得たものでもよく、糸状菌の培養物から精製して得たものでもよい。糸状菌の培養物から精製して得る場合には、糸状菌の培地に添加する有機アミノ化合物のD体又はL体を用いることで、それぞれに対応した鏡像異性体を得ることができる。

【0075】

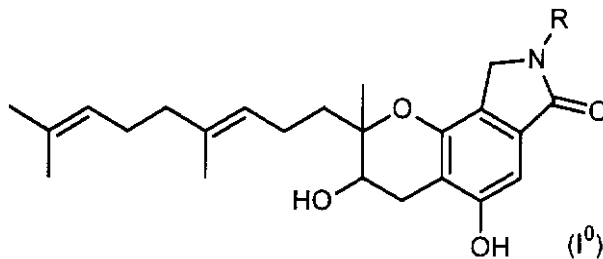
また一般式(IV)で表される化合物は、化学合成によって得ることができる。また例えば、下記一般式(I⁰)で表される化合物(以下、「SMTP誘導體」ともいう)を、

50

糸状菌等から選択される微生物の培養液中に添加して、水酸化反応又は酸化反応させることで製造することもできる。下記一般式 (I⁰) における R は、一般式 (I) における R と同義である。なお、一般式 (I⁰) で表される化合物の製造方法については既述一般式 (I) で表される化合物と同様である。

【0076】

【化20】



10

【0077】

一般式 (IV) で表される化合物は、鏡像異性体、ジアステレオマー、及び鏡像異性体どうし又はジアステレオマーどうしの混合物でもよい。鏡像異性体、ジアステレオマー、及び鏡像異性体どうし又はジアステレオマーどうしの混合物は、化学合成によって得たものでもよく、糸状菌の培養物から精製して得たものでもよい。糸状菌の培養物から精製して得る場合には、糸状菌の培地に添加する一般式 (I⁰) で表される化合物を適宜選択することで、それぞれに対応した鏡像異性体を得ることができる。

20

【0078】

一般式 (I) で表される化合物は、遊離形態、薬学的に許容され得る塩若しくはエステルの形態、又は溶媒和物の形態で用いることができる。一般式 (I) で表される化合物の薬学的に許容され得る塩の形成に好適な無機酸又は有機酸としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、又はクエン酸、ギ酸、フマル酸、リンゴ酸、酢酸、コハク酸、酒石酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。またナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ金属又はアルカリ土類金属を含む化合物、アミン化合物、又は塩基性アミノ酸も、一般式 (I) で表される化合物の薬学的に許容され得る塩の形成に好適である。また、一般式 (I) で表される化合物の薬学的に許容され得るエステルの形成には、炭素数 1 ~ 10 個のアルコール又は炭素数 2 ~ 10 個のカルボン酸などが好適であり、好ましくは、炭素数 1 ~ 4 個のアルコール又は炭素数 2 ~ 4 個のカルボン酸などであり、より好ましくはメチルアルコール、エチルアルコール、酢酸、又はプロピオン酸などである。また、水などが、一般式 (I) で表される化合物の薬学的に許容され得る溶媒和物の形成に好適である。

30

【0079】

一般式 (I) で表される化合物を含む sEH 阻害剤は、種々の sEH を媒介する疾患を処置するために使用することができる。sEH を媒介する疾患としては、例えば、高血圧疾患、心血管疾患、虚血性疾患、高コレステロール疾患、肥満症、自己免疫疾患、炎症性疾患、肺疾患、がん悪液質及び糖尿病関連疾患等を挙げることができる。

40

【0080】

一般式 (I) で表される化合物を種々の疾患を処置するために医薬組成物として使用する場合、一般式 (I) で表される化合物は、遊離形態、薬学的に許容可能な塩又はエステルなど、医薬として通常適用可能な形態で医薬組成物中に含有することができる。

また一般式 (I) で表される化合物を含む医薬組成物は、各種投与形態に応じて適宜剤型を変更することができる。経口投与形態としては、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤又はシロップ剤等を挙げることができ、非経口投与形態としては、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、貼付剤等を挙げることができる。

50

これらの形態を維持するために、これらの用途に使用可能な周知の溶媒、賦形剤等の添加剤を含むことができる。

【0081】

一般式(I)で表される化合物を含む医薬組成物は、年齢、体重、症状に応じて適切な投与量で投与することができ、例えば静脈内投与の場合には、成人1日あたり有効成分量として、1mg/kgから25mg/kgの投与、経口投与の場合には、成人1日あたり有効成分量として、2mg/kgから200mg/kgの投与が好ましく、投与期間は、年齢、症状に応じて任意に定めることができる。

【0082】

一般式(I)で表される化合物を含む医薬組成物は、炎症性疾患の治療剤として用いられることが好ましい。すなわち本発明の別の態様は一般式(I)で表される化合物を含む炎症性疾患の治療剤である。一般式(I)で表される化合物を含むことで、炎症反応を効果的に抑制することができ、炎症性疾患を治療することができる。

10

【0083】

また一般式(I)で表される化合物を含む医薬組成物は、がん悪液質の治療剤として用いられることが好ましい。すなわち本発明の別の態様は一般式(I)で表される化合物を含むがん悪液質の治療剤である。前記がん悪液質の治療剤は、一般式(I)で表される化合物を含むことで、がん悪液質の特徴的な症状である脂肪や骨格筋の消耗を効果的に抑制することができる。さらにがん悪液質の症状を緩和することでがん化学療法の効果をより向上させることができる。

20

【0084】

さらに一般式(I)で表される化合物は、がん悪液質の治療方法に適用することができる。すなわち本発明の別の態様は一般式(I)で表される化合物を、がん悪液質の治療を必要とする哺乳類に、治療に必要な量で投与することを含むがん悪液質の治療方法である。一般式(I)で表される化合物を、がん悪液質の治療を必要とする哺乳類に投与する方法としては、前記医薬組成物をがん悪液質の治療を必要とする哺乳類に投与する方法が挙げられる。前記医薬組成物の詳細、投与方法等は既述のとおりである。

【実施例】

【0085】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、特に断りのない限り「%」は質量基準である。また以下では、一般式(I)で表される化合物をSMTPT誘導体ともいう。

30

【0086】

(SMTPT誘導体の調製)

公知の方法(Hasumi et al., J. Antibiot., 60(7); 463-468, 2007)にて培養したSMTPT-0を含む培養液を2倍量のメタノールで抽出し、菌体をろ過し、ろ液を回収した。溶媒を留去した後、遠心分離によって上清と沈殿物に分離し、水相に不溶性の沈殿物にアセトンを加えた。これをさらに遠心分離によって分離し、アセトンに溶解する上清を回収、これを濃縮・乾固した。得られた乾燥物をシリカゲルクロマトグラフィーに供し、展開溶媒にヘキサン及びアセトンを用いた。展開溶媒としてヘキサンとアセトンを用いたステップワイズで溶出を行い、ヘキサン：アセトン=60：40のフラクションにSMTPT-0を確認した。このフラクションを濃縮・乾固し、得られた粗精製物を添加化合物とした。

40

【0087】

(SMTPT誘導体を代謝する糸状菌のスクリーニング)

スクリーニングには、東京農工大学 発酵学研究室が保有する、土壌由来の分離糸状菌131株を使用した。

使用した培地は、3.5(w/v)%グルコース、1(w/v)%コーンスターチ、2(w/v)%大豆ミール、0.5(w/v)%ポリペプトン、0.5(w/v)%細菌用魚エキス、0.3(w/v)%酵母エキス、0.2(w/v)%NaCl、0.05(w

50

/v)% K_2HPO_4 、0.005 (w/v)% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ よりなる。培地のpHを5.8に調整した後、0.01 (v/v)%となるようCB442を添加し、オートクレーブで滅菌した。

同培地20mLを含む100mL容バツフル付き三角フラスコに、各保存スラントより1白金耳ずつ植菌し、25、180rpmで振盪培養した。培養3日目に、フラスコ1本あたり5mLの滅菌水を添加して振盪培養を継続した。

培養4日目に2.5mg/本又は10mg/本となるようアセトンに溶解したSMT P-0を100 μ L加えさらに培養を継続し、培養7日目に50mLメタノールを加えて1時間振盪抽出した。抽出液の一部を取り分けて、培養上清320 μ L相当をHPLCで分析し、SMT P-0代謝産物と推定されるピークを多く含む、F039株及びF388を選抜した。

10

【0088】

<実施例1>

SMT P-0aの調製

斜面培地からF039を、上記と同様の組成の培地100mLを含む500mL容バツフル付き三角フラスコに植菌し、25、180rpmで4日間培養し、これを前培養液とした。同様の培地100mLを含む500mL容バツフル付き三角フラスコに、前培養液を終濃度5%となるよう添加し、同様の条件で培養した。培養3日目に100mg/本となるようアセトンに溶解したSMT P-0を1mL添加して、さらに4日間培養を行った。4日後にメタノールを200mL/フラスコ加えて、2時間振盪抽出した。減圧濾過によって菌体を除去し、上清に含まれるメタノールを留去した。濃縮液を遠心分離し、分離した上清を酢酸エチルで抽出した。得られた酢酸エチル層を濃縮・乾固し、この乾固物と沈殿物をまとめてメタノールに溶かした。前処理及び遠心分離によって、不溶物を除去した後、上清をODSカラム(Inertsil PREP-ODS、30 \times 250mm; GL Science)を用いた逆相HPLC(流速25mL/min, カラム温度40)で精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水、及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒10~100%の30分間のリニアグラジエントによって溶出し、溶出時間20.6分のピークを分取し、得られたフラクションを濃縮・乾固した。

20

得られた乾燥物をメタノールに溶解し、再度逆相HPLCを用いて精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)アセトニトリルを用い、(B)溶媒50%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間14.2分のピークを分取した。有機溶媒を留去した後、水相を凍結乾燥し、再度、同様の条件でHPLC精製を行った結果、32.3mgの白色粉末を得た。

30

これを50mM酢酸アンモニウムを含む50%メタノール溶液に溶解し、同様の組成の溶媒を移動層として用い、アイソクラティック条件で逆相HPLCを行った。溶出時間16.2分のピークを分取し、メタノールを留去した。水相を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を濃縮・乾固し、19.5mgのSMT P-0aを得た。

【0089】

<実施例2>

SMT P-0bの調製

斜面培地からF388を、スクリーニングと同様の組成の培地100mLを含む500mL容バツフル付き三角フラスコに植菌し、25、180rpmで4日間培養し、これを前培養液とした。同様の培地100mLを含む500mL容バツフル付き三角フラスコに、前培養液を終濃度5%となるよう添加し、同様の条件で培養した。培養2日目に100mg/本となるようアセトンに溶解したSMT P-0を1mL添加して、さらに5日間培養を行った。培養終了日にメタノールを200mL/フラスコ加えて、2時間振盪抽出した。減圧濾過によって菌体を除去し、上清に含まれるメタノールを留去した。濃縮液を遠心分離し、分離した上清を酢酸エチルを用いて分配し、その水層をHP-20カラムに供した。展開溶媒に水とメタノールを用いたステップワイズで溶出を行い、水:メタノール=50:50の画分を濃縮・乾固した。乾固物をメタノールに溶かし、不溶物を除去し

40

50

た後、上清をODSカラム(Inertsil PREP-ODS、30 × 250 mm ; GL Science)を用いた逆相HPLC(流速25 mL/min, カラム温度40)で精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水、及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒10~100%の30分間のリニアグラジエントによって溶出し、溶出時間20分のピークを分取し、得られたフラクションを濃縮・乾固した。

得られた乾固物をアセトニトリルと精製水の混合液に溶解し、再度逆相HPLCを用いて精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)アセトニトリルを用い、(B)溶媒20%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間22分のピークを分取した。有機溶媒を留去した後、水相を凍結乾燥した。乾固物に対しヘキサン洗浄を3回行った後、乾固させた結果、10.6 mgの白色固体としてSMT P-0 bを得た。

10

【0090】

<実施例3>

SMT P-0 cの調製

斜面培地からF388を、上記と同様の組成の培地100 mLを含む500 mL容バッフル付き三角フラスコに植菌し、25、180 rpmで4日間培養し、これを前培養液とした。同様の培地100 mLを含む500 mL容バッフル付き三角フラスコに、前培養液を終濃度5%となるよう添加し、同様の条件で培養した。培養2日目に100 mg/本となるようアセトンに溶解したSMT P-0を1 mL添加して、さらに5日間培養を行った。培養終了日にメタノールを200 mL/フラスコ加えて、2時間振盪抽出した。減圧濾過によって菌体を除去し、上清に含まれるメタノールを留去した。濃縮液を遠心分離し、分離した上清を酢酸エチルで抽出した。乾固物をメタノールに溶かし、前処理及び遠心分離によって、不溶物を除去した後、上清をODSカラム(Inertsil PREP-ODS、30 × 250 mm ; GL Science)を用いた逆相HPLC(流速25 mL/min, カラム温度40)で精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水、及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒50~100%の30分間のリニアグラジエントによって溶出し、溶出時間26.5分のピークを分取し、得られたフラクションを濃縮・乾固した。

20

得られた乾固物をアセトニトリルと精製水の混合液に溶解し、再度逆相HPLCを用いて精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)アセトニトリルを用い、(B)溶媒30%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間37分のピークを分取した。有機溶媒を留去した後、水相を凍結乾燥した。乾固物に対しヘキサン洗浄を3回行った後、乾固させた結果、8.4 mgの薄黄色固体としてSMT P-0 cを得た。

30

【0091】

<実施例4>

SMT P-0 d及びSMT P-0 eの調製

SMT P生産菌であるStachybotrys microsporaのスラントからSMT P生産用前培養培地に植菌し、25、180 rpmで4日間培養した。この培養後の前培養培地を5%(v/v)でSMT P生産用本培養培地100 mL × 5本に接種し、25、180 rpmで4日間培養した。本培養4日目に0.1%(w/v)NH₄Clを添加し、さらに同条件でNH₄Cl添加から8日間培養した。8日目に200 mLずつメタノールを加えブローアウトを行い、2時間、180 rpmで撹拌して抽出した。

40

【0092】

得られたブロー溶液を吸引ろ過により菌体を除去後、メタノールを減圧留去した。残った水層と沈殿物について、溶液に対し等量2回、半量2回で酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチル層を合して減圧留去し、オイルポンプで1晩減圧して、乾固させた。乾固物をメタノールに溶かしてプレカラム(Lichrolut RP-18-100 mg)に通して前処理した後、ODSカラム(Inertsil PREP-ODS、4.6 × 250 mm ; GL Science)を用いた逆相HPLC(流速25 mL/min、カラム温度40)で精製した。移動層には(A)0.1%ギ酸水、及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒50~100%の30分間のリニアグラジエントによって溶出し、溶出

50

時間5分のピーク、12分のピーク、20分のピーク及び26分のピークをそれぞれ分取し、得られたフラクションを濃縮・乾固した。

【0093】

得られた5分のピークの乾固物を、再度逆相HPLCを用いて精製した。条件はカラム内温度40、流速は25ml/minとし、移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒45%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間31分のピークを分取した。次いで1回目の逆相HPLC分取における溶出時間12分のピークと合わせ、同じ逆相HPLCにてもう一度分取を行った。条件はカラム内温度40、流速は25ml/minとし、移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)アセトニトリルを用い、(B)溶媒25%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間19分のピークを分取した。単離されたフラクションについて乾固して18.8mgの白色の固体として、SMTP-0eを得た。

10

【0094】

1回目の逆相HPLC分取における溶出時間20分のピークについて、同じ逆相HPLCを用いて精製した。条件はカラム内温度40、流速は25ml/minとし、移動層には(A)0.1%ギ酸水及び(B)メタノールを用い、(B)溶媒60%のアイソクラティック条件にて行い、溶出時間29分のピークを分取した。単離されたフラクションについて乾固して、23.7mgの白色の固体として、SMTP-0dを得た。

【0095】

SMTP-0a、0b、0c、0d及び0eの物理化学的性状及び構造解析

20

UVスペクトルは、メタノールを溶媒として用いmodel 320 spectrometer (日立ハイテク社製)で測定した。

赤外(IR)スペクトルは、JIR-WINSPEC spectrometer (JEOL社製)を用い、SMTP-0a、SMTP-0d及びSMTP-0eはNaCl法、SMTP-0b及びSMTP-0cはKBr法にて測定した。MALDI-TOF-MASS(MS)スペクトルは、マトリクスとして -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を用いて、Voyager DESTR spectrometer (Applied Biosystem社製)で測定した。

NMRスペクトルは、メタノール-d₄ (Acros Organics社製)を用いて、Alpha-600 spectrometer (JEOL社製)で測定した。

30

旋光度は、メタノールを溶媒として用いmodel DIP-360 (JASCO社製)で測定した。

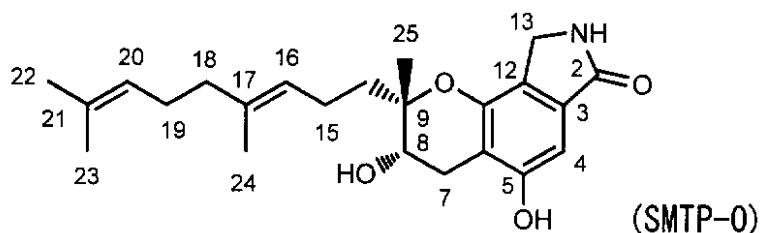
【0096】

物理化学的性状及び構造解析結果を表1～表4に示す。

尚、各SMTP-0a、0b、0c、0d及び0eの原子の位置番号は、以下に示すようなSMTP-0と一致させて表記した。

【0097】

【化21】



40

【0098】

NMRとMSのデータから、SMTP-0aは21-23番目の炭素原子がなく、代わりに20番目の炭素原子にヒドロキシ基がある構造であった。

50

UVスペクトルは、213 nm、254 nm、303 nmで極大吸収を認めた。

またIRスペクトルでは、 3265 cm^{-1} 、 2933 cm^{-1} 、 1670 cm^{-1} 、 1614 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1360 cm^{-1} 、 1227 cm^{-1} 、 1161 cm^{-1} 、 1078 cm^{-1} に吸収が認められた。

【0099】

SMT P - 0 bは19 - 23番目の炭素原子がなく、代わりに18番目の炭素原子がカルボン酸のカルボニル炭素に変わっている構造であった。

UVスペクトルは、214 nm、255 nm、303 nmで極大吸収を認めた。

またIRスペクトルでは、 3290 cm^{-1} 、 2945 cm^{-1} 、 1678 cm^{-1} 、 1610 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1367 cm^{-1} 、 1209 cm^{-1} 、 1161 cm^{-1} 、 1076 cm^{-1} に吸収が認められた。

10

【0100】

SMT P - 0 cは22番目の炭素原子がカルボン酸のカルボニル炭素に変わっている構造であった。

UVスペクトルは、214 nm、253 nm、302 nmで極大吸収を認めた。

またIRスペクトルでは、 3277 cm^{-1} 、 2983 cm^{-1} 、 2927 cm^{-1} 、 1689 cm^{-1} 、 1614 cm^{-1} 、 1543 cm^{-1} 、 1466 cm^{-1} 、 1358 cm^{-1} 、 1267 cm^{-1} 、 1167 cm^{-1} 、 1084 cm^{-1} に吸収が認められた。

。

【0101】

20

SMT P - 0 dは24番目の炭素原子にヒドロキシ基を有する構造であった。

UVスペクトルは、213 nm、254 nm、302 nmで極大吸収を認めた。

またIRスペクトルでは、 3284 cm^{-1} 、 2966 cm^{-1} 、 2921 cm^{-1} 、 2862 cm^{-1} 、 1670 cm^{-1} 、 1614 cm^{-1} 、 1462 cm^{-1} 、 1360 cm^{-1} 、 1227 cm^{-1} 、 1165 cm^{-1} 、 1078 cm^{-1} 、 1034 cm^{-1} に吸収が認められた。

【0102】

SMT P - 0 eは20番目と21番目の炭素原子にともにヒドロキシ基がある構造であった。

UVスペクトルは、213 nm、255 nm、302 nmで極大吸収を認めた。

30

またIRスペクトルでは、 3329 cm^{-1} 、 2976 cm^{-1} 、 2937 cm^{-1} 、 2866 cm^{-1} 、 1672 cm^{-1} 、 1608 cm^{-1} 、 1464 cm^{-1} 、 1360 cm^{-1} 、 1221 cm^{-1} 、 1159 cm^{-1} 、 1078 cm^{-1} に吸収が認められた。

。

【0103】

	SMTP-0a	SMTP-0b	SMTP-0c
Appearance	Colorless oil	White solid	Pale yellow solid
Molecular formula	C ₂₀ H ₂₇ NO ₅	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	C ₂₃ H ₂₉ NO ₆
MALDI-TOF-MS (<i>m/z</i>)			
Found (<i>M</i> + <i>H</i>) ⁺	362.2048	350.1618	416.2034
Calcd:	362.1968 for C ₂₀ H ₂₈ NO ₅	350.1604 for C ₁₈ H ₂₄ NO ₆	416.2073 for C ₂₃ H ₃₀ NO ₆
UV λ _{max} ^{MeOH} , nm (ε)	213 (36,866), 254 (6,217), 303 (2,855)	214 (40,553), 255 (6,980), 303 (2,792)	214 (54,365), 253 (7,719), 302 (3,320)
IR ^{a)} ν _{max} , cm ⁻¹	3265, 2933, 1670, 1614, 1464, 1360, 1227, 1161, 1078	3290, 2945, 1678, 1610, 1464, 1367, 1209, 1161, 1076	3277, 2983, 2927, 1689, 1614, 1543, 1466, 1358, 1267, 1167, 1084
Specific rotation [α] _D ²⁵	-5.4° (c 1.0, MeOH)	-2.6° (c 0.86, MeOH)	-0.6° (c 0.42, MeOH)

a) Neat for SMTP-0a and KBr for SMTP-0b and -0c.

【表 2】

No.	SMTP-0		SMTP-0a		SMTP-0b		SMTP-0c	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2	170.24		174.24		174.25		174.24	
3	131.78		132.50		132.49		132.50	
4	99.44	6.62 (1H, s)	100.88	6.74 (1H, s)	100.85	6.73 (1H, s)	100.88	6.74 (1H, s)
5	155.93		157.93		157.93		157.94	
6	111.29		113.51		113.50		113.53	
7	26.59	2.82 (1H, dd, J = 5.5, 17.4) 2.45 (1H, dd, J = 7.7, 17.6)	27.75	2.97 (1H, dd, J = 5.1, 17.6) 2.65 (1H, dd, J = 6.6, 17.6)	27.70	2.97 (1H, dd, J = 5.1, 17.6) 2.65 (1H, dd, J = 7.3, 17.6)	28.19	2.98 (1H, dd, J = 5) 2.65 (1H, dd, J = 6)
8	66.01	3.73 (1H, t, J = 6.4)	68.42	3.87 (1H, t, J = 6.0)	68.44	3.85 (1H, dd, J = 5.1, 7.3)	68.41	3.87 (1H, dd, J = 5)
9	78.52		80.17		80.24		80.17	
11	148.45		150.17		150.13		150.17	
12	121.61		124.11		124.15		124.12	
13	41.95	4.09 (1H, d, J = 16.9) 4.05 (1H, d, J = 16.9)	44.19	4.25 (1H, d, J = 17.6) 4.21 (1H, d, J = 17.6)	44.18	4.22 (2H, s)	44.19	4.25 (1H, d, J = 17) 4.22 (1H, d, J = 17)
14	37.14	1.59 (2H, m)	38.54	1.67 (2H, m)	38.22	1.53 (2H, m)	38.46	1.67 (2H, m)
15	20.93	2.10 (2H, m)	22.56	2.18 (2H, m)	21.79	1.65 (2H, m)	22.57	2.19 (2H, m)
16	124.16	5.11 (1H, t, J = 6.6)	125.52	5.17 (1H, br t, J = 6.6)	35.37	1.65 (1H, m)	126.31	5.20 (1H, t, J = 6.9)
17	134.18		135.99		40.69	2.41 (1H, m)	135.37	
18	39.04	1.91 (2H, m)	36.86	2.01 (2H, t, J = 7.8)	180.79		39.35	2.09 (2H, t, J = 7.3)
19	26.06	1.99 (2H, m)	31.94	1.59 (2H, m)			27.75	2.27 (2H, m)
20	123.98	5.04 (1H, t, J = 7.1)	62.63	3.49 (2H, t, J = 6.6)			142.93	6.70 (1H, t, J = 6.9)
21	130.52						129.51	
22	25.27	1.61 (3H, s)					172.30	
23	17.36	1.53 (3H, s)					12.58	1.77 (3H, s)
24	15.48	1.54 (3H, s)	15.88	1.59 (3H, s)	17.66	1.12 (3H, d, J = 6.6)	15.82	1.60 (3H, s)
25	17.95	1.15 (3H, s)	18.78	1.27 (3H, s)	18.77	1.25 (3H, s)	18.77	1.26 (3H, s)

10

20

30

40

【表 3】

SMTP-0d		SMTP-0e	
Appearance	Pale yellow solid	Appearance	White solid
Molecular formula	C ₂₃ H ₃₁ NO ₅	Molecular formula	C ₂₃ H ₃₃ NO ₆
MALDI-TOF-MS (m/z)		ESI (m/z)	
Found (M + H) ⁺ :	402.2231	Found (M + Na) ⁺ :	442.2207
Calcd:	402.2280 for C ₂₃ H ₃₂ NO ₅	Calcd:	442.2206 for C ₂₃ H ₃₃ NO ₆ Na
UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	213 (40,341), 254 (6,336), 302 (2,887)	UV λ _{max} ^{MeOH} nm (ε)	213 (34,406), 255 (5,774), 302 (2,647)
IR ν _{max} (neat) cm ⁻¹	3284, 2966, 2921, 2862, 1670, 1614, 1462, 1360, 1227, 1165, 1078, 1034	IR ν _{max} (neat) cm ⁻¹	3329, 2976, 2937, 2866, 1672, 1608, 1464, 1360, 1221, 1159, 1078
Specific rotation [α] _D ²⁵	-1.7° (c 1.0, MeOH)	Specific rotation [α] _D ²⁵	11.2° (c 1.0, MeOH)

10

【 0 1 0 6 】

【表 4】

No.	SMTP-0		SMTP-0d		SMTP-0e	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
2	170.24		174.21		174.23	
3	131.78		132.52		132.49	
4	99.44	6.62 (1H, s)	100.90	6.75 (1H, s)	100.86	6.71 (1H, s)
5	155.93		157.92		157.94	
6	111.29		113.50		113.49	
7	26.59	2.82 (1H, dd, J = 5.5, 17.4) 2.45 (1H, dd, J = 7.7, 17.6) 3.73 (1H, t, J = 6.4)	27.73	2.98 (1H, dd, J = 5.4, 17.4) 2.65 (1H, dd, J = 7.2, 17.4) 3.88 (1H, t, J = 6.0)	27.75	2.94 (1H, dd, J = 5.1, 17.7) 2.62 (1H, dd, J = 6.6, 17.4) 3.84 (1H, t, J = 5.7)
8	66.01		68.33		68.40	
9	78.52		80.12		80.18	
11	148.45		150.10		150.17	
12	121.61		124.11		124.11	
13	41.95	4.09 (1H, d, J = 16.9) 4.05 (1H, d, J = 16.9)	44.19	4.24 (2H, s)	44.19	4.19 (2H, m)
14	37.14	1.59 (2H, m)	38.89	1.71 (2H, m)	37.82	1.64 (2H, m)
15	20.93	2.10 (2H, m)	22.17	2.27 (2H, m)	22.58	2.16 (2H, m)
16	124.16	5.11 (1H, t, J = 6.6)	128.85	5.30 (1H, t, J = 7.5)	125.53	5.17 (1H, m)
17	134.18		139.76		136.36	
18	39.04	1.91 (2H, m)	36.00	2.09 (2H, m)	38.54	2.16 (1H, m) 1.95 (1H, m)
19	26.06	1.99 (2H, m)	27.90	2.09 (2H, m)	30.70	1.30 (1H, m) 1.28 (1H, m)
20	123.98	5.04 (1H, t, J = 7.1)	125.41	5.08 (1H, m)	78.96	3.17 (1H, d, J = 10.2)
21	130.52		132.26		73.77	
22	25.27	1.61 (3H, s)	25.84	1.63 (3H, s)	25.64	1.10 (3H, s)
23	17.36	1.53 (3H, s)	17.76	1.56 (3H, s)	24.94	1.07 (3H, s)
24	15.48	1.54 (3H, s)	59.84	4.06 (2H, br s)	16.00	1.56 (3H, s)
25	17.95	1.15 (3H, s)	18.76	1.27 (3H, s)	18.82	1.23 (3H, s)

20

30

40

【 0 1 0 7 】

< s E H 阻害活性の評価 1 >

- ハイドロラーゼ活性 1 -

s E H 阻害活性の評価は、25 mM bis - tris - HCl (pH 7.0) 100 μL / well 中、96 穴蛍光測定用黒色プレートを用いて行った。

所定の各濃度の SMTP 誘導体及び r h s E H (組換えヒト s E H、Cayman Chemical 社製) を 20 nM となるよう 50 μL の緩衝液に調製し、10 分間室温でインキュベーションした。

インキュベーション後、25 μM の s E H 基質 (3 - phenyl - oxirany) - acetic acid cyano - (6 - methoxy - naphthalen -

50

2-yl)-methyl ester (PHOME, フナコシ社製) を 50 μ L/well で添加し、37 で1分おきに15サイクル、連続的に蛍光強度を測定した。蛍光測定には1420 Multilabel Counter ARVOTM MX (Perkin Elmer 社製) を用いて、励起波長 355 nm、測定波長 460 nm で測定した。実験は2連あるいは3連で行った。結果を表5に示す。

【0108】

【表5】

化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (μ M)	化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (μ M)	
SMTP-0	6	SMTP-21	86	10
SMTP-0a	8	SMTP-23	8	
SMTP-0c	25	SMTP-24	14	
SMTP-4	10	SMTP-25	8	
SMTP-4Me	6	SMTP-26	17	
SMTP-5	22	SMTP-27	5	
SMTP-5D	20	SMTP-28	12	
SMTP-6	20	SMTP-29	12	20
SMTP-7	19	SMTP-34	38	
SMTP-8	16	SMTP-35	51	
SMTP-9	23	SMTP-37	12	
SMTP-11	38	SMTP-42	20	
SMTP-12	30	SMTP-43	18	
SMTP-13	35	SMTP-43D	15	
SMTP-14	25	SMTP-44	13	
SMTP-18	7	SMTP-44D	20	
SMTP-19	18			30

【0109】

< sEH 阻害活性の評価 2 >

- ハイドロラーゼ活性 2 -

ハイドロラーゼ活性を r h s E H の代わりに精製マウス s E H を用いて評価した。なお、精製マウス s E H は、HitrapTM NHS-activated HP (GE Healthcare, UK) に SMTP-50 を結合させたアフィニティーカラムにマウス肝臓ホモジネートをアプライし、12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid により溶出後、透析により精製したものをを用いた。

【0110】

sEH 阻害活性の評価は、25 mM bis-Tris-HCl (pH 7.0) 100 μ L/well 中、96穴蛍光測定用黒色プレートを用いて行った。

所定の各濃度の SMTP 誘導体及びマウス sEH を 20 nM となるよう 50 μ L の緩衝液に調製し、10分間室温でインキュベーションした。

インキュベーション後、25 μ M の sEH 基質 (3-phenyl-oxirany)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester (PHOME, フナコシ社製) を 50 μ L/well

50

1で添加し、37で1分おきに15サイクル、連続的に蛍光強度を測定した。蛍光測定には1420 Multilabel Counter ARVOTM MX (Perkin Elmer社製)を用いて、励起波長355nm、測定波長460nmで測定した。実験は2連あるいは3連で行った。結果を表6に示す。

【0111】

【表6】

化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (μ M)	化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (μ M)
SMTP-0	16	SMTP-23	16
SMTP-1	26	SMTP-24	23
SMTP-4	26	SMTP-25	14
SMTP-4Me	22	SMTP-26	13
SMTP-5	37	SMTP-27	7
SMTP-5D	67	SMTP-28	5
SMTP-6	23	SMTP-29	29
SMTP-7	35	SMTP-35	72
SMTP-8	27	SMTP-36	35
SMTP-9	34	SMTP-37	11
SMTP-11	55	SMTP-42	23
SMTP-12	47	SMTP-43	35
SMTP-13	34	SMTP-43D	44
SMTP-14	37	SMTP-44	18
SMTP-18	21	SMTP-44D	27
SMTP-19	20		

10

20

30

【0112】

< sEH阻害活性の評価3 >

- ホスファターゼ活性1 -

sEH阻害活性の評価は、アッセイ用緩衝液として、25mM bis-tris-HCl (pH7.0)を用い、96穴プレートを用いて行った。

96穴プレートに所定の各濃度となるようにSMTP誘導体を2.5 μ l添加した。次いで濃度が200nMであるrhSEH(組換えヒトsEH、Cayman Chemical社製)溶液を47.5 μ l添加した。

基質溶液として、0.2mg/lウシ血清アルブミンと2mM MgCl₂を含むアッセイ用緩衝液に、5mMとなるよう調製したp-ニトロフェニルホスフェート溶液を50 μ l添加した後、直ちに、450nmにおける吸光度を37で10分おきに12サイクル測定した。

40

SMTP誘導体としてSMTP-7を用いて測定したところ、IC₅₀は0.25 μ Mであった。

【0113】

< sEH阻害活性の評価4 >

- ホスファターゼ活性2 -

ホスファターゼ活性をrhSEHの代わりに上記と同様にして調製した精製マウスsEHを用い、基質としてAttophos(登録商標、Promega社製)を用いて評価した。

50

sEH阻害活性の評価は、アッセイ用緩衝液として、20 mM HBSS / Hepes (pH 7.4, 0.1 mg/ml ウシ血清アルブミンと1 mM MgCl₂を含む)を用い、96穴蛍光測定用黒色プレート(#CLS3370)を用いて行った。

96穴蛍光測定用黒色プレートに所定の各濃度となるようにSMTP誘導体を2 µl添加した。次いで濃度が10 nMである精製マウスsEH溶液を50 µl添加した。

基質溶液として、アッセイ用緩衝液に、10 µMとなるよう調製したAttophos溶液を50 µl添加した後、直ちに、励起波長485 nm及び535 nmにおける蛍光強度を37で1分おきに15サイクル測定した。測定は3連で行った。結果を表7に示す。

【0114】

【表7】

10

化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (µM)	化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (µM)
SMTP-0	8	SMTP-26	3
SMTP-0c	27	SMTP-27	5
SMTP-0d	59	SMTP-28	5
SMTP-1	26	SMTP-34	79
SMTP-4	7	SMTP-35	63
SMTP-4Me	40	SMTP-36	9
SMTP-5	6	SMTP-37	9
SMTP-6	14	SMTP-44	16
SMTP-7	7	SMTP-44D	17
SMTP-8	5	SMTP-52	29
SMTP-9	3	SMTP-53	24
SMTP-11	9	SMTP-54	32
SMTP-13	9	SMTP-55	30
SMTP-14	8	SMTP-56	37
SMTP-18	18	SMTP-57	15
SMTP-21	10	SMTP-58	21
SMTP-23	5	SMTP-59	50
SMTP-24	5		

20

30

【0115】

< sEH阻害活性の評価5 >

- ホスファターゼ活性3 -

ホスファターゼ活性をrh sEHの代わりに精製マウスsEHを用い、基質としてp-ニトロホスフェート(pNPP)を用いて評価した。

96穴プレートに所定の各濃度となるようにSMTP誘導体を2.5 µl添加した。次いで濃度が200 nMであるマウスsEH溶液を47.5 µl添加した。

基質溶液として、0.2 mg/lウシ血清アルブミンと2 mM MgCl₂を含むアッセイ用緩衝液に、5 mMとなるよう調製したp-ニトロフェニルホスフェート溶液を50 µl添加した後、直ちに、450 nmにおける吸光度を37で10分おきに12サイクル測定した。

【0116】

40

【表 8】

化合物No	sEH阻害活性 IC ₅₀ (μ M)	
SMTP-4	60	
SMTP-5D	66	
SMTP-7	35	
SMTP-8	37	10
SMTP-9	40	
SMTP-18	35	
SMTP-23	73	
SMTP-25	31	
SMTP-28	75	
SMTP-29	68	
SMTP-37	66	
SMTP-42	64	20
SMTP-43	54	
SMTP-43D	29	

【0117】

< sEH阻害活性の評価6 >

SMTP誘導体のsEH阻害活性について、HepG2細胞を用いて以下のようにして評価した。

24穴プレートにHepG2細胞を 1×10^6 cells/mlの濃度で500 μ lずつ播種して、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂のインキュベーターで一晩培養を行い、HepG2細胞をプレートに接着させた。上清を除去後、予めRPMI-1640培地(FBS10%、100 μ /ml: penicillin、100 μ g/ml streptomycin含有)に目的の濃度に調製したSMTP誘導体を500 μ lずつ添加した。10分間インキュベートした。 30

上清を除去後、内部標準物質である14,15DHET-d11(14,15-ジヒドロエイコサトリエン酸-d11標識物、最終濃度200ng/ml)と、14,15EET(14,15-エポキシエイコサトリエン酸、最終濃度0.3 μ M)とをHBSS緩衝液に溶解したものを添加した。次いで初期濃度と同濃度のSMTP誘導体を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂のインキュベーターで1時間インキュベートした。インキュベーション終了後、氷上にプレートを置いた状態で、ピペティングにより細胞をはがし、培地ごとガラスチューブに移した。すぐに酢酸エチル500 μ lを添加して、ボルテックスミキサにより懸濁させた。4 $^{\circ}$ C、3500rpm、1分間遠心し、上清を別のガラスチューブに移した。窒素ガス置換した遠心エバポレーターで1~2時間程度、溶媒を除去した後、残渣にメタノール100 μ lを加えて再懸濁し、10 μ lをLC-MS分析に供した。LC-MS分析はShimadzu社製のLCMS-2020を用い、内部標準物質を基準として14,15EETから14,15DHETへの変換量を測定することでSMTP誘導体のsEH阻害活性を評価した。結果を表9に示す。 40

【0118】

【表 9】

SMTP-7 (μ M)	sEH 活性 (%)
0	100 \pm 1
0.3	73 \pm 18
1	70 \pm 23
3	56 \pm 18
10	42 \pm 6

10

【0119】

以上から、一般式 (I) で表される化合物である SMTP 誘導体は、優れた sEH 阻害活性を示すことが分かる。また、従来知られている sEH のヒドロラーゼ活性阻害活性に加えて、ホスファターゼ活性阻害を示すことが分かる。

【0120】

< がん悪液質に対する作用 1 >

SMTP 誘導体のがん悪液質に対する作用について、がん細胞を移植したマウスを用いて以下のようにして評価した。一般式 (I) で表される化合物である SMTP 誘導体としては SMTP - 7 を用いた。

20

【0121】

使用動物：BALB/c CrSlc オス 8 週齢マウス

群構成：(N) ノーマル、n = 4 ;

(NS) ノーマル - SMTP (SMTP 誘導体投与群)、n = 4 ;

(C) コントロール (担がん、SMTP 誘導体非投与群)、n = 6 ;

(S) SMTP (担がん、SMTP 誘導体投与群)、n = 6 ;

投与量・方法：

群分け後、(N) 及び (C) 群については生理食塩水を、(NS) 及び (S) 群については SMTP - 7 10 mg / kg を、いずれも 10 ml / kg 用量で腹腔内に投与した。投与は 2 日に 1 回とした。また投与に合わせ、体重、摂餌量、腫瘍径の測定を行った。

30

がん細胞：Colon 26 (理研セルバンクより供)

Colon 26 は、あらかじめ BALB/c CrSlc 皮下に移植して、大きさが 1000 mm³ 前後になったところで摘出した。得られたがん細胞を PBS 中に、細胞濃度が 10% (w/v) となるように懸濁させて移植用のがん細胞懸濁液を調製した。

【0122】

[実験スケジュール]

予備飼育を 1 週間行った後、体重で仮群分けを行った。予め調製した移植用のがん細胞懸濁液を 100 μ l / body となるようにマウス皮下に移植した。移植後 14 日目に、体重および腫瘍サイズによって 4 群に分けた。群分け後より 2 日に 1 回の割合で生理食塩水または SMTP - 7 を腹腔内に投与した。投与開始後 14 日目に解剖し、筋重量および各種臓器重量を測定した。筋重量は、ヒラメ筋及び脛骨筋について測定を行った。また臓器重量については、心臓、腎臓、脾臓、及び肝臓について測定を行った。

40

【0123】

また、低アルブミン血症は悪液質の病態の一つであるため、投与開始後 14 日目に血中アルブミン値の定量を以下のようにして行った。

血中アルブミン値の定量は、和光純薬工業、アルブミン B - テストワコーを用い、添付の方法に準じて行った。すなわち、アルブミン発色試薬 1 ml に対し、標準ウシ血清又はサンプル血漿を 4 μ l 加え、十分に攪拌した後、室温で 10 分間放置した。その後 620

50

n mの波長で吸光度を測定し、標準ウシ血清に対応するスタンダードの値より、サンプル中のアルブミン値を算出した。

【 0 1 2 4 】

[評価結果]

体重及び摂餌量については、すべての群について、大きな差異は認められなかった。また腫瘍径について、(C)群と(S)群で大きな差異は認められなかった。

筋重量の評価結果を図1及び図2に示す。図1に示すように、コントロールである(C)群においては、(N)群、及びS M T P - 7投与群である(S)群と比べて有意にヒラメ筋重量が減少した。

また心臓、腎臓、及び肝臓については、すべての群について、大きな差異は認められなかった。一方、脾臓については、図3に示すように(N)群及び(N S)群に比べて、(C)群は有意に重量増加していた。また(C)群の方が(S)群よりも重量増加する傾向が見られた。

さらに、S M T P - 7は悪液質によるアルブミンの低下を改善する傾向をもたらすことがわかった。

【 0 1 2 5 】

< がん悪液質に対する作用 2 >

次に一般式(I)で表される化合物であるS M T P誘導体として、S M T P - 4 4 Dを用い、S M T P誘導体のがん悪液質に対する作用について以下のようにして評価した。

【 0 1 2 6 】

使用動物：B A L B / c C r S l c オス 8週齢マウス

群構成：(N)ノーマル、n = 4 ;

(N S)ノーマル - S M T P (S M T P誘導体投与群)、n = 4 ;

(C)コントロール(担がん、S M T P誘導体非投与群)、n = 6 ;

(S)S M T P (担がん、S M T P誘導体投与群)、n = 6 ;

投与量・方法：

群分け後、(N)及び(C)群については生理食塩水を、(N S)及び(S)群についてはS M T P - 4 4 D 1 0 m g / k gを、いずれも1 0 m l / k g用量で腹腔内に投与した。投与は2日に1回とした。また投与に合わせ、体重・摂餌量・腫瘍径の測定を行った。

がん細胞：C o l o n 2 6 (理研セルバンクより供与)

C o l o n 2 6は、あらかじめR P M I - 1 6 4 0培地に1 0 % F B Sを添加した培地で培養した。得られたがん細胞をP B S中に懸濁させて移植用のがん細胞懸濁液を調製した。

【 0 1 2 7 】

[実験スケジュール]

予備飼育を6日間行った後、体重で仮群分けを行った。予め調製した移植用のがん細胞懸濁液を 1×10^6 cells / 100 μ l / bodyとなるようにマウス左腰部皮下に移植した。移植後14日目に、体重および腫瘍サイズによって4群に分けた。群分け後より2日に1回の割合で生理食塩水またはS M T P - 4 4 Dを腹腔内に投与した。投与開始後20日目に解剖し、筋重量および各種臓器重量を測定した。筋重量は、ヒラメ筋及び脛骨筋について測定を行った。また臓器重量については、心臓、腎臓、脾臓、及び肝臓について測定を行った。

【 0 1 2 8 】

また投与開始後14日目に血中アルブミン値の定量を以下のようにして行った。

血中アルブミン値の定量は、和光純薬工業、アルブミンB - テストワコーを用い、添付の方法に準じて行った。すなわち、アルブミン発色試薬1 m lに対し、標準ウシ血清又はサンプル血漿を4 μ l加え、十分に攪拌した後、室温で10分間放置した。その後620 n mの波長で吸光度を測定し、標準ウシ血清に対応するスタンダードの値より、サンプル中のアルブミン値を算出した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 9 】

[評価結果]

体重及び摂餌量については、すべての群について、大きな差異は認められなかった。また腫瘍径について、(C)群と(S)群で大きな差異は認められなかった。

筋重量の評価結果を図4及び図5に示す。図4及び図5に示すようにコントロールである(C)群においては、(N)群、及びS M T P - 4 4 D投与群である(S)群と比べて有意に頸骨重量及びヒラメ筋重量が減少した。

また心臓及び腎臓については、すべての群について、大きな差異は認められなかった。一方、肝臓及び脾臓については、図6及び図7に示すように(N)群及び(NS)群に比べて、(C)群は有意に重量増加していた。また(C)群の方が(S)群よりも重量増加する傾向が見られた。

10

さらに、図8に示すように、S M T P - 4 4 Dは悪液質による低アルブミン血症を有意に改善することがわかった。

【 0 1 3 0 】

以上から、一般式(I)で表される化合物を投与することで、がん疾患に伴う骨格筋重量の減少を抑制できることがわかる。すなわち、一般式(I)で表される化合物はがん悪液質の治療に効果的である。

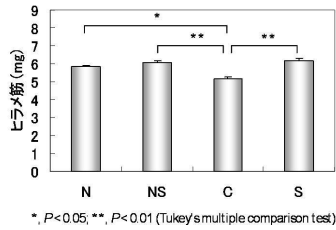
【 0 1 3 1 】

日本国出願2011-038941号の開示はその全体を本明細書に援用する。

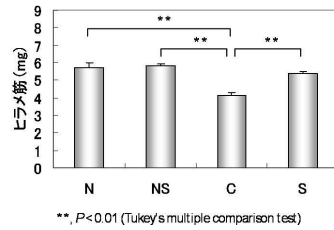
本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書に参照により取り込まれる。

20

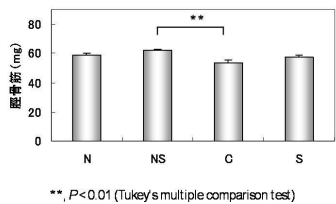
【 図 1 】



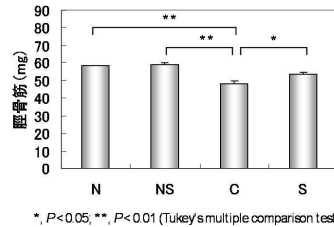
【 図 4 】



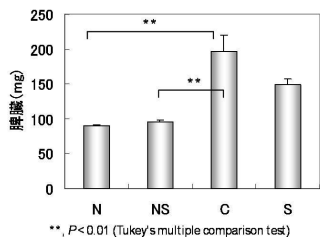
【 図 2 】



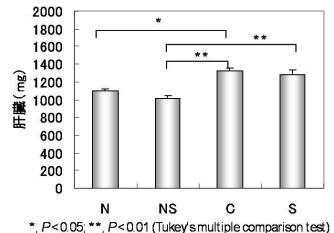
【 図 5 】



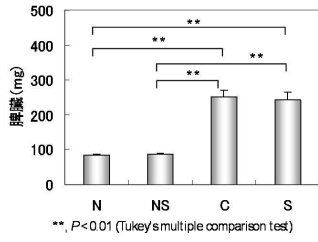
【 図 3 】



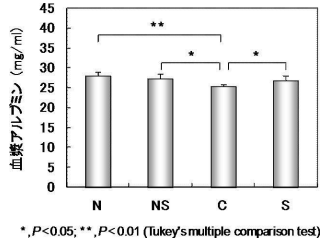
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/52 (2006.01)		C 0 7 H 19/02
A 6 1 K 31/502 (2006.01)		A 6 1 K 31/52
A 6 1 K 31/4155 (2006.01)		A 6 1 K 31/502
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)		A 6 1 K 31/4155
C 1 2 N 9/99 (2006.01)		A 6 1 K 31/7056
		C 1 2 N 9/99

(72)発明者 小川 哲弘
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内

(72)発明者 大竹 新也
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内

(72)発明者 北野 克和
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内

(72)発明者 長谷川 啓子
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内

(72)発明者 西村 直子
東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内

審査官 伊藤 清子

(56)参考文献 国際公開第98/056940(WO, A1)
特開2003-088397(JP, A)
特開2004-224738(JP, A)
国際公開第2011/004620(WO, A1)
国際公開第2010/110026(WO, A1)
J. Org. Chem., 1992, Vol.57, No.25, p.6700-6703
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2010年, 382(3), 245-253
Journal of Antibiotics, 1997年, 50(2), 172-174

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 4 9 1 / 0 5 2
A 6 1 K 3 1 / 4 0 7
A 6 1 K 3 1 / 4 1 5 5
A 6 1 K 3 1 / 5 0 2
A 6 1 K 3 1 / 5 2
A 6 1 K 3 1 / 7 0 5 6
A 6 1 P 4 3 / 0 0
C 0 7 D 5 1 9 / 0 0
C 0 7 H 1 9 / 0 2
C 1 2 N 9 / 9 9
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)