

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4104164号
(P4104164)

(45) 発行日 平成20年6月18日 (2008. 6. 18)

(24) 登録日 平成20年4月4日 (2008. 4. 4)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 J 41/00 (2006. 01)

C O 7 J 41/00

A 6 1 K 31/575 (2006. 01)

A 6 1 K 31/575

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 31/10 (2006. 01)

A 6 1 P 31/10

A 6 1 P 31/12 (2006. 01)

A 6 1 P 31/12

請求項の数 25 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-502307
 (86) (22) 出願日 平成8年6月7日 (1996. 6. 7)
 (65) 公表番号 特表2002-515019 (P2002-515019A)
 (43) 公表日 平成14年5月21日 (2002. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/010508
 (87) 国際公開番号 W01996/040728
 (87) 国際公開日 平成8年12月19日 (1996. 12. 19)
 審査請求日 平成15年6月2日 (2003. 6. 2)
 (31) 優先権主張番号 08/475, 572
 (32) 優先日 平成7年6月7日 (1995. 6. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/476, 855
 (32) 優先日 平成7年6月7日 (1995. 6. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

ジェネーラ コーポレーション
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 プリ
 マウス ミーティング キャンパス ドラ
 イブ 5 1 1 0

(74) 代理人

弁理士 山本 秀策

(72) 発明者

ザスロフ マイケル
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 メリ
 オン ステーション リンデン レイン
 2 7 4

(72) 発明者

シンナー アン
 アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州
 ティーネック ウィンダム ロード 5 9
 5

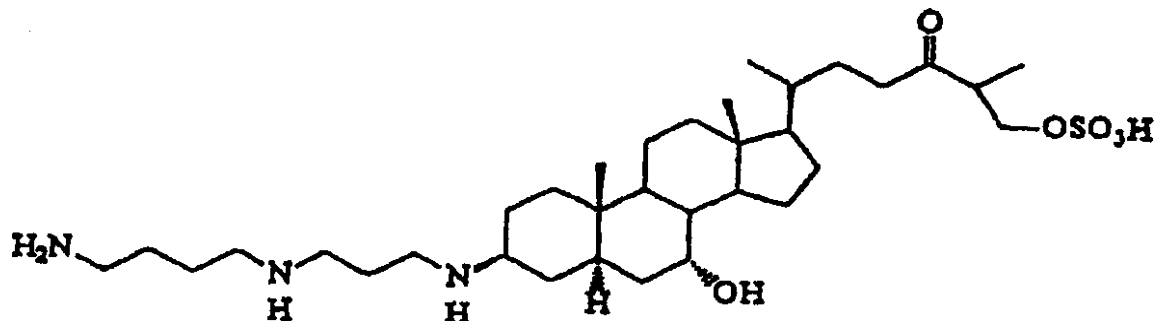
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナトリウム／プロトン交換体 (NHE) の阻害剤として有用なアミノステロール化合物、同阻害剤を使用する薬学的方法および組成物、ならびに化合物のNHE阻害効果を評価する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



【請求項 2】

以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



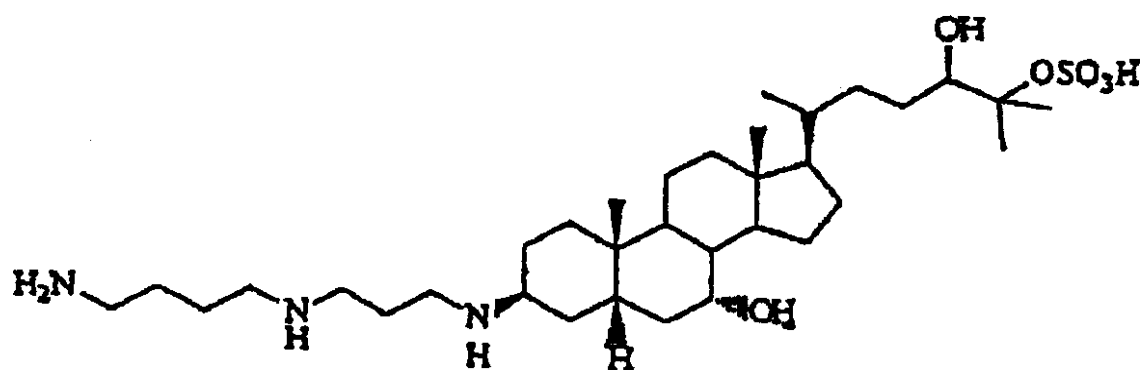
以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



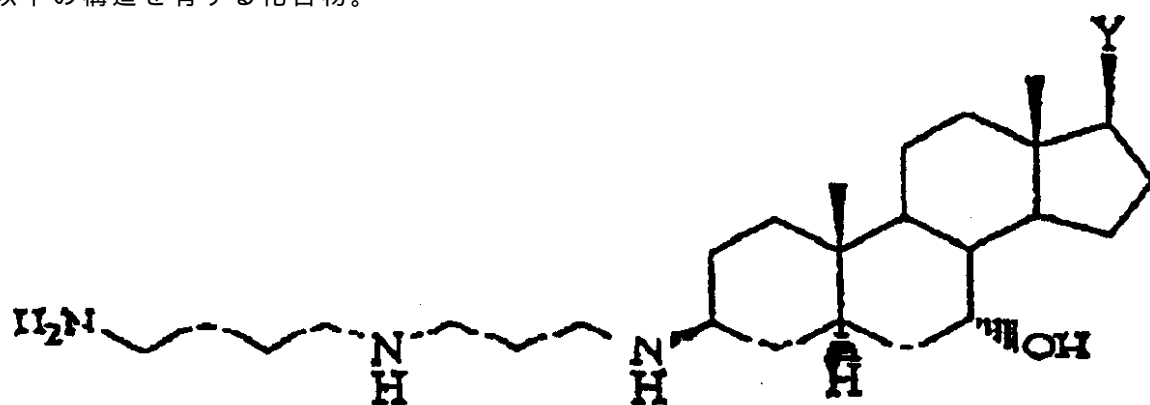
以下の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩。



10

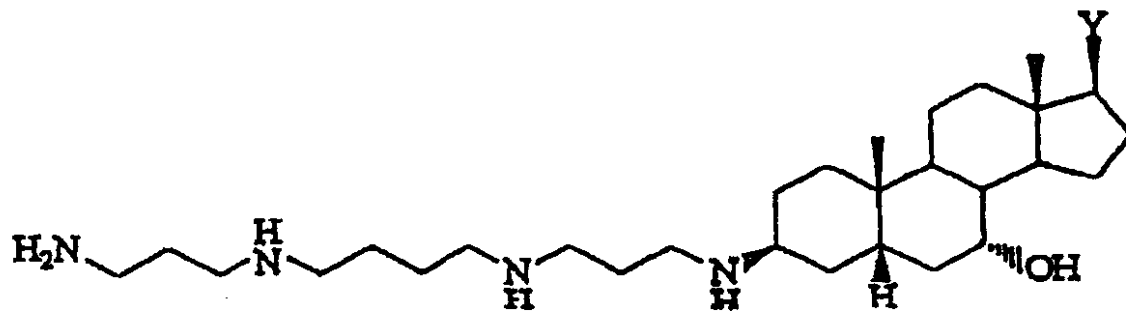
【請求項 7】

以下の構造を有する化合物。



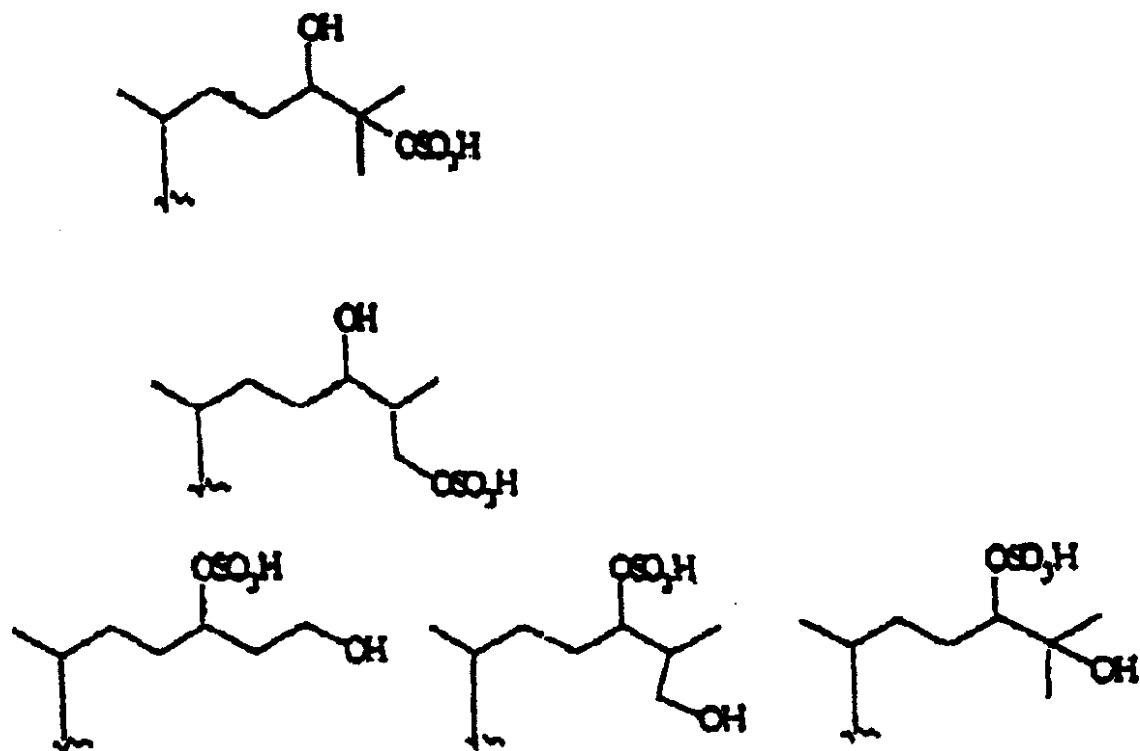
20

または



30

(式中、Yは



からなる群から選択される構成要素である。)

【請求項 8】

細胞の増殖を阻害するための薬剤を製造するための、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用であって、該細胞は、悪性細胞、血管平滑筋細胞、およびリンパ球からなる群より選択される、使用。

【請求項 9】

微生物因子によって生じる感染を治療するための薬剤を製造するための、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 10】

前記微生物因子が、細菌、ウイルス、真菌および原生動物からなる群から選択される、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

癌、T 細胞リンパ球の増殖性疾患、うっ血性心不全、および虚血からなる群より選択される疾患の処置のために、NHE を阻害するための薬剤を製造するための、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 12】

リンパ球の増殖を阻害することによって免疫系を抑制するための薬剤を製造するための、請求項 3 に記載の化合物の使用。

【請求項 13】

ウイルス標的細胞の増殖を抑制することによってウイルス感染症を治療するための薬剤を製造するための、請求項 3 に記載の化合物の使用。

【請求項 14】

動脈圧を制御するための薬剤を製造するための、請求項 3 に記載の化合物の使用。

【請求項 15】

心虚血を予防するための薬剤を製造するための、請求項 3 に記載の化合物の使用。

【請求項 16】

移植臓器を維持するための薬剤を製造するための、請求項 3 に記載の化合物の使用。

【請求項 17】

細胞の増殖を阻害するための組成物であって、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を含み、該細胞は、悪性細胞、血管平滑筋細胞、およびリンパ球からなる群よ

り選択される、組成物。

【請求項 18】

微生物因子によって生じる感染を治療するための組成物であって、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項 19】

前記微生物因子が、細菌、ウイルス、真菌および原生動物からなる群から選択される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

癌、T 細胞リンパ球の増殖性疾患、うっ血性心不全、および虚血からなる群より選択される疾患の処置のために、NHE を阻害するための組成物であって、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、組成物。

10

【請求項 21】

リンパ球の増殖を阻害することによって免疫系を抑制するための組成物であって、請求項 3 に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項 22】

ウイルス標的細胞の増殖を抑制することによってウイルス感染症を治療するための組成物であって、請求項 3 に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項 23】

動脈圧を制御するための組成物であって、請求項 3 に記載の化合物を含む、組成物。

【請求項 24】

心虚血を予防するための組成物であって、請求項 3 に記載の化合物を含む、組成物。

20

【請求項 25】

移植臓器を維持するための組成物であって、請求項 3 に記載の化合物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、ナトリウム/プロトン交換体 (NHE) の阻害剤として有用なアミノステロール化合物に関する。本発明は、また、同化合物を含有する薬学的組成物および同化合物の NHE の阻害における用途に関する。本発明は、さらに、NHE 阻害剤としての効果について、化合物をスクリーニングするための検定方法に関する。

発明の背景

30

生体細胞の各々は、自身の酸塩基平衡を、より具体的には、自身の水素イオン濃度またはプロトン濃度を維持しなければならない。水素イオン濃度がごくわずかに変化するだけでも、細胞中の化学反応の速度は、抑制されたり、加速されたりと、顕著に変化する。広義的で一般的には、人が、水素イオン濃度が高いとき (アシドーシス)、その人は昏睡で死亡する可能性が高く、水素イオン濃度が低いとき (アルカローシス)、この人はテタニーまたは痙攣で死亡することがある。このような両極端の場合を通じて、関係する細胞および水素イオン濃度の経験値に依存する疾患および症状は様々である。従って、水素イオン濃度を調節することは、ホメオスタシスの最も重要な局面の 1 つである。

水素イオン濃度を表す簡略な方法は、 $pH: pH = \log 1 / (H^+ \text{濃度}) = -\log (H^+ \text{濃度})$ である。正常な細胞の pH は 7.4 であるが、7.0 未満または 7.7 より大きい pH では、人はほんの数時間しか生きられない。このように、pH の維持は生存するために重要である。

40

pH 平衡を維持する機序にはいくつかある。例えば、静止期および構成期には、細胞は、赤血球などの細胞を介してプロトン交換を行う機序として十分に検討されている、塩素イオン/重炭酸イオン交換体を利用していると思われる。

また、マイトジェン、増殖因子、精子等によって誘発される加速増殖期には、細胞は、別の細胞のしくみを利用して、緊急に対処しなければならない旺盛な代謝を回転させる。これが、ナトリウム/プロトン (Na^+/H^+) 交換体、"NHE" で、"対向輸送体" とも呼ばれる。NHE は多数の役割および多数の組織において作用するので、生体は NHE ファミリーを発生させており、最近の研究は、ある種の組織に局在し、種々の機能に関連す

50

る N H E "アイソフォーム" ファミリーについて解明している。以下に、最も重要と思われる N H E アイソフォームを列挙する。

N H E 1 は、ハウスキーピング交換体で、高血圧においては制御されないと考えられ、細胞内 p H 調節に対して作用を発揮すると考えられ、また、この交換体を管理することによって、虚血傷害から患者を予防するとも考えられている。

N H E 1 は、遺伝的に糖尿病に関連があり、従って、N H E 1 の阻害は、膵臓のベータ細胞に対する影響を通して、糖尿病の進行を変化させることができる可能性がある。また、グルコースに応答して生じる血管平滑筋細胞の増殖は、N H E 1 a の発現の増加に関連がある。

N H E 1 は有核赤血球上に存在し、高濃度のアミロライドによって阻害される。この N H E アイソフォームは、c A M P 依存的なアドレナリン様因子によって調節される。

N H E 2 は消化管および骨格筋の多数の細胞に関連がある。これを阻害することによって、血管平滑筋肥厚または心肥大などの過形成状態または肥大状態の進行を変化させることができると考えられる。横紋筋肉腫および平滑筋腫などの筋原性癌は当然考慮されるべき治療対象である。

N H E 3 は結腸に関連がある。以下に記載する研究は、内皮細胞に関連するものであることを示している。これを阻害することによって、結腸の水交換などの機能が影響を受けたり（腸の流体流動を増加させ、例えば、便秘の原因となる）、結腸癌等が影響を受けらるだろう。内皮細胞に対しては、この交換体を阻害することによって、正常な増殖が阻害されるだろう。

N H E 4 は腎臓のある種の細胞に関連があり、細胞の容量調節に対して作用を発揮すると思われる。これに対する特異的な阻害剤は腎機能に影響を及ぼし、高血圧にの治療効果が期待される。

N H E 5 はリンパ組織および脳細胞に関連がある。N H E 5 を阻害することによって、これらの細胞に関係する増殖性疾患を阻害するはずである。N H E 5 は、H I V 等のウィルス感染に応答して生じるダリア細胞の増殖に関与する有力物質として可能性が高い。

上記するように、N H E は生体を援助するように作用するが、N H E 機能を阻害することによって、多大な治療上の利点を得られるはずである。例えば、N H E は通常では、細胞内 p H が所定の酸性値より低下したときのみ作用するが、増殖因子によって刺激されると、細胞が " 正常な " 静止 p H で平衡を保っていても、細胞の N H E は機能を開始してしまう。結果として、N H E は、正常な状態では不活性であるはずの p H で、細胞からプロトンにくみ出し始める。細胞は進行的なプロトンの損失を受け、基本総緩衝能を増加させたり、場合によっては実際にアルカリ化する。ポンプの作動が妨害されている状況では、増殖刺激によっても細胞は機能しない。従って、N H E ファミリーの阻害物質は、増殖阻害作用を発揮すると考えられる。

激しい酸性ストレス下、すなわち組織に酸素（または血液供給）が与えられない状態では、N H E ファミリーはその結果生じる回復不能な損傷に関与すると考えられる。例えば、心臓に向かう血流が妨害されると、局所的なアシドーシスが生じる。心筋細胞は根本的な内部酸性化を生じる。この酸性化は休眠中の N H E を活性化する。これらの交換体は細胞から容易にプロトンを排出し、ナトリウムと交換する。結果として、細胞内ナトリウム濃度が上昇する。続いて、ナトリウム - カルシウム交換体が活性化され、内部のナトリウムと外部のカルシウムを交換する。内部の $C a^{+}$ 濃度が上昇すると、細胞死、収縮性の低下および不整脈が生じる。従って、虚血後心筋障害およびそれに伴う不整脈は N H E 依存性機序によって生じると考えられ、従って、この N H E を阻害することによってこのような障害の発生が予防されるはずである。N H E が N a の内在化を阻害し、p H 値低下の結果として代謝活性を低下させると、細胞の障害は避けられると考えられる。このように、心臓虚血に対して用いられる N H E 阻害剤の開発に関心が高まっている。

N H E ファミリーの他の構成要素は、上皮表面の水およびナトリウムの輸送に対して典型的な作用を発揮すると思われる。特に、結腸に見られる N H E 3 アイソフォームは、結腸内腔の流体量を調節する役割を担うと考えられる。このポンプは下痢症例では阻害されて

10

20

30

40

50

いる。腎臓の近位尿細管に存在するN H E 3アイソフォームは、腎臓の酸塩類交換に関しては同様の機能を発揮すると考えられる。従って、N H E ファミリーの阻害剤は、高血圧治療のための治療剤として認められている。

N H E 作用の阻害に関して予測される真価から、科学者はN H E 阻害剤を探し出した。最も広範に研究されたN H E 阻害剤は、利尿薬として臨床上使用されるグアニジン修飾ピラジンであるアミロライドである。種々のアルキル置換基を導入することによって、多数の誘導体が作られた。これらの誘導体は、周知の阻害剤がないN H E 5を除いて、周知で、上記したN H E アイソフォームとともに研究されている。

特定の交換体に対する阻害剤の活性が、すでに測定されている。以下の表Aからわかるように、各交換体は各阻害剤に対して種々の応答スペクトルを示す：

表A

	アミロライド K i (μ M)	DMA K i (μ M)	MPA K i (μ M)
N H E 1	3	0 . 1	0 . 0 8
N H E 2	3	0 . 7	5 . 0
N H E 3	1 0 0	1 1	1 0

注：DMA＝ジメチルアミロライド；MPA＝メチルプロピルアミロライド。

コウニロン (C o u n i l l o n) ら、モレキュラー ファーマコロジー (M o l e c u l a r P h a r m a c o l o g y) 、 1 9 9 3 年 4 4 巻 1 0 4 1 ～ 1 0 4 5 ページ参照。

コウニロン (C o u n i l l o n) らが記載したN H E 阻害剤は、H H E 1 に対する特異性を示す。従って、このアイソフォームの阻害が有用である症状の治療に用いられる。しかしながら、これらの阻害剤は他の周知のN H E アイソフォームを標的にしていない、例えば、N H E 3 は影響されない。

以下に説明するように、N H E 3 は内皮細胞上で発現しており、これを阻害することによって、抗血管形成作用が生じる。本発明によるアミノステロール化合物によって阻害されるN H E アイソフォームの種類は、アミロライドまたはコウニロン (C o u n i l l o n) らの化合物によって阻害されるものとは異なり、また異なった薬理作用を有する。

また、コウニロン (C o u n i l l o n) らは、ある種のベンゾイルグアニジン誘導体が他のN H E アイソフォームを阻害することも報告した。特に、(3 - メチルスルホニル - 4 - ピペリジノベンゾイル) グアニジンメタンサルホネートは、以下の表に示すように、N H E 1 に対する特に選択性を示す。

表 B

N H E アイソフォーム	K i (μ M)
N H E 1	0 . 1 6
N H E 2	5 . 0
N H E 3	6 5 0

10

アミロライドの化学構造に基本骨格とするこれらのベンゾイルグアニジン化合物は、N H E 1 の阻害には極めて大きな特異性を示すが、N H E 2 および N H E 3 に対してもかなりの活性を保持している。広範に分布する " ハウスキーピング " アイソフォームである、N H E 1 の薬学的阻害を達成すると、N H E 2 および N H E 3 の好ましくない不活性化が生じると考えられる。

従って、当業者は、単一の特定の N H E に対する選択的な作用を示す N H E 阻害剤の探求を続けている。このような阻害剤は、組織の増殖に対する N H E の影響を妨害することによって、より正確に組織を阻害し得るだろう。

従って、研究者は、種々の N H E に特異的な阻害剤を開発することは、不整脈の治療、心筋梗塞の治療および予防、狭心症および心臓の虚血性疾患の治療および予防、末梢および中樞神経系の虚血性疾患の治療および予防、末梢器官および四肢の虚血性疾患の治療および予防、ショックの治療、抗動脈硬化剤の供給、糖尿病合併症の治療、癌の治療、肺、肝臓および腎臓の繊維症を含む繊維性疾患の治療および前立腺肥大の治療を含む疾患および症状を有する患者の総括的な新規な治療法の開発を可能にすると考えている。他の治療対象には、H I V、H P V および H S V などのウィルス疾患の治療、悪性腫瘍の予防、糖尿病（すなわち、膵島細胞傷害）の予防、糖尿病の血管合併症の予防、例えば黄斑変性、リウマチ性関節炎、乾癬、癌、悪性血管腫等の異常な血管新生疾患の治療、血管再狭窄の予防、高血圧関連血管障害の予防、免疫抑制および膠原性血管疾患の治療が挙げられる。

20

細菌、真菌および原生動物の N H E に対する阻害剤も、特異的な抗菌剤として有用であると考えられる。全ての生細胞が一種または別種の N H E を使用して、細胞内の Na^+ および pH のホメオスタシスを維持していることは周知である。N H E は多数の細菌および真菌からクローニングされており、ほ乳類のアイソフォームと一部配列相同性を有する。標的物質として特定の細菌または真菌の N H E を使用して、ほ乳類のアイソフォームに対して、特に有利で、または活性を持たないような交換体に対する特異性が高い阻害剤を開発するできるはずである。このような化合物は、異なる機序を有する抗生物質として有用であるだろう。

30

このように、当該技術分野において、N H E の特異的な阻害剤が必要である。さらに、種々の治療的用途のための N H E 阻害剤を開発することが必要である。

発明の概要

本発明は、種々の N H E を阻害する種々のアミノステロール化合物を提供することによって、当該技術分野の需要を満たすものである。本発明は、N H E に阻害剤用を示すアミノステロール化合物および同化合物を含有する組成物に関する。

40

このように、本発明は、N H E の阻害剤として有用な、化合物 F X 1 A、化合物 F X 1 B、化合物 1 3 6 0、化合物 1 3 6 1、化合物 3 7 1、化合物 1 4 3 7 および化合物 3 5 3 などの、新規に単離および合成されたアミノステロール化合物に関する。これらのステロイド化合物の中には、種々の N H E を阻害することが見いだされているものもあれば、単一の特定の N H E を有利に阻害することが見いだされているものもある。

さらに、本発明は、本発明の化合物を使用する薬学的用途および治療方法に関する。本発明は、また、過去に単離され、その特徴が解明されている、スクアラミンに関する新規な用途に関する。

50

また、本発明は、化合物の治療効果を評価するために有利なスクリーニング方法に関する。特に、NHE阻害作用および治療的效果に関して化合物をスクリーニングするための便利な方法であることが見いだされているオタマジヤクシ検定法が開発された。

本発明の特に好ましい化合物は、化合物1436（または、その薬学的に許容される塩）である。本発明は、有効量のこの化合物および薬学的に許容される賦形剤または担体とを含む薬学的組成物に関する。本発明は、さらに、有効量の化合物1436を投与することを含む、細胞の増殖を阻害する方法、特に、細胞が悪性細胞、血管平滑筋細胞、気管支平滑筋細胞、繊維芽細胞、リンパ球またはリンパ組織、筋肉、骨、軟骨、上皮、造血組織または神経組織である同方法に関する。さらに、本発明は、有効量の化合物1436とスクアラミンとを組み合わせることを含む、細胞の増殖を阻害する方法に関する。本発明は、また、有効量の化合物1436を投与することを含む、リンパ球の増殖を阻害することによって、免疫系を抑制する方法に関する。また、本発明は、有効量の化合物1436を投与することを含む、脊椎動物の成長の抑制に関する。本発明は、また、有効量の化合物1436を投与することを含む、ウィルス標的細胞の増殖を抑制することによるウィルス感染症の治療に関する。有効量の化合物1436を投与することを含む、動脈圧を制御する方法も好ましい。また、本発明は、有効量の化合物1436を投与することを含む、心筋虚血を予防する方法に関する。本発明は、また、有効量の化合物1436を投与することを含む、移植臓器を維持する方法に関する。さらに、本発明は、有効量の化合物1436を投与することを含む、細菌、ウィルス、真菌および原生動物などの微生物因子によって生じる感染症を治療する方法に関する。本発明は、また、NHEを阻害するために有効量のこの化合物を投与することに関する。

本発明は、また、有効量のスクアラミン（または、その薬学的に許容される塩）を投与することを含む、NHE3を阻害する方法、好ましくは、病状進行過程において発現されるこのNHEアイソフォームを特異的に阻害する方法に関する。本発明による別の方法は、有効量のスクアラミンを投与することを含む、内皮細胞、特に新しい毛細血管の内皮細胞の増殖を阻害することに関する。

本発明は、また、(i)検定する対象化合物を含有する水溶液（例えば、 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度）を調製し、(ii)該溶液中にオタマジヤクシを入れ、(iii)少なくとも一時間間隔後に（例えば、約1時間）顕微鏡下で該オタマジヤクシ（例えば、尾および/または四肢）を観察する工程を含む、オタマジヤクシ検定法を実施することを含む、NHE阻害活性または抗血管形成活性に関して化合物を評価する方法に関する。好ましくは、オタマジヤクシはアフリカツメカエルのオタマジヤクシで、さらに好ましくは発生段階59~60のアフリカツメカエルのオタマジヤクシである。同検定法は、単独で、または別の検定法、例えば、ヒナ漿尿膜検定法および/またはヒナ胚卵黄毛細血管退行検定法と組み合わせて行ってもよい。

他の態様、目的および利点は、本発明の好ましい特徴および実施態様を添付の図面と併せて示した、以下の詳細な開示から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

図1Aおよび1Bは、ウサギのナトリウム/プロトン交換体アイソフォーム3（NHE3）の、スクアラミンによる阻害作用を示す。図1Aは、 40mM NH_4Cl に接触させることによって酸を予め負荷した細胞に関して、細胞外ナトリウムイオン濃度の回復（x軸）の関数としてpH回復速度（y軸）をプロットしたもので、“+”印の曲線は対照（薬剤無添加）を示し、“W”印の曲線はスクアラミンを示す。図1Bは、酸を予め負荷しなかった細胞に関して、 $5\mu\text{g/ml}$ のスクアラミンの添加後の時間（x軸）の関数として、実際の内部pH（y軸）を示す。

図2Aは、ウサギのナトリウム/プロトン交換体アイソフォーム1（NHE1）の、スクアラミンによる阻害作用の欠失を示す。図2Bは、ヒトNHE1の、スクアラミンによる阻害作用の欠失を示す。内部pH対時間のこれらプロットにおいて、“o”印の曲線はスクアラミンを示し、“+”印のものは対照（スクアラミンを添加しないでインキュベートした細胞）を示す。

図 3 A、3 B および 3 C は、内皮細胞が他の膜作用剤よりスクアラミンに対する感受性が大きいこと（x 軸の 3 より大きい側の棒グラフ）、および内皮細胞は、上皮細胞および繊維芽細胞より、スクアラミンに対する感受性が大きいことを示す。図 3 A は、ウシの肺内皮細胞に対する $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の本発明の薬剤の投与を示すが、図 3 B および 3 C は、それぞれ、ヒト上皮細胞およびヒト包皮繊維芽細胞に対する $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の膜作用剤の投与を示す。

図 4 A、4 B および 4 C は、スクアラミンの皮下投与、腹腔内投与および経口投与によるマウスメラノーマの増殖の抑制作用を示したものである。

図 5 は、種々の用量（"o" = $10 \text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ 、"+" = $20 \text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ 、"o" = $40 \text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ ；d = 日）のスクアラミンによる、免疫寛容（RAG-1）マウスにおけるヒトメラノーマ 1205 Lu の増殖の抑制を示す。

図 6 は、化合物 319 の腹腔内投与による、マウスにおけるマウスメラノーマの抑制を示す。

図 7 は、マウス I V P K 試験で得られた、化合物 319 の薬物動態学的クリアランスを示す。

図 8 は、マウス I V P K 試験で得られたスクアラミンの薬物動態学的クリアランスを示す。

図 9 は、ツノザメの肝臓由来のアミノステロールの H P L C パターンであり、これらの化合物の多様性を示す。

図 10 は、N H E 3 に対する化合物 1436 の阻害作用を示す。

図 11 は、L 1210 白血病を有するマウスにおける、生存率に対する化合物 1436 の効果を示す。

図 12 は、スクアラミンと化合物 1436 とは、マウスのマウスメラノーマの増殖の抑制に対して相乗作用を発揮することを示す。

図 13 および 14 は、化合物 1436（図 13）およびスクアラミン（図 14）による、インビトロでのヒト冠動脈平滑筋の増殖の抑制を、濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に対して吸光度をプロットして示したものである。

図 15 は、図 14 A および 14 B に示したデータの拡大図で、化合物 1436 およびスクアラミンは共にインビトロにおいて、ヒト冠動脈平滑筋の増殖を抑制することを証明している。

図 16 は、化合物 1436 がマウスの成長を用量依存的に抑制することを示す。

図 17 A および 17 B は、ヒトメラノーマに対する化合物 353 およびスクアラミンの効果を示す。

詳細な説明

アミノステロール化合物の合成

スクアラミンとして周知なステロイドは、ザスロフ（Zasloff）らに付与された米国特許第 5,192,756 号の主題であり、その開示内容は参照として本明細書に含まれる。この化合物は、細菌、真菌および原生動物を死滅させる広い抗菌スペクトルを有する抗生物質である。スクアラミン、化合物 1256 の全立体化学を以下に示す。スクアラミンの全化学合成は 1994 年に報告された。

実施例 1 サメ肝臓単離物の調製

スクアラミンに加えて、少なくとも 10 種類のおきらかに異なるアミノステロール化合物をツノザメの肝臓の抽出物から回収した。アミノステロール化合物を調製するために、サメの肝臓をメタノール：酢酸で抽出した。水性抽出物を c18 シリカに吸着させ、70% アセトニトリルで溶出し、溶出物を S P セファデックスに吸着させ、1.5 M NaCl で溶出した。溶出物を 5 M NaCl で調整して、ステロイドを塩析させた。沈殿物をセライト（Celite）で濾過し、熱湯、次いでメタノールで溶出した。溶出物は容量を少なくして、1 インチの C18 カラムに供し、アセトニトリルの濃度勾配を徐々に上げ、クロマトグラフィーを行った。画分を採取し、蒸発によって濃縮し、薄層クロマトグラフィー（TLC）で別々に分析をした。

サメの肝臓 40 kg から単離されたアミノステロール化合物の HPLC パターンを第 9 図に示す。モール (Moore) らの、プロシーディング ナチュラル アカデミック サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 1993 年、90 巻、1354 ~ 1358 ページに記載されているように、最終的な HPLC 精製を実施した。HPLC 画分は、シリカ薄層クロマトグラフィー (6 : 3 : 1 CH₂Cl₂ : MeOH : NH₄OH) でそれぞれ展開し、ヨウ素蒸気中で可視化した。画分 40 は、溶出パターンの中でもより親水性部分を示し、画分 66 はより疎水性部分を示す。

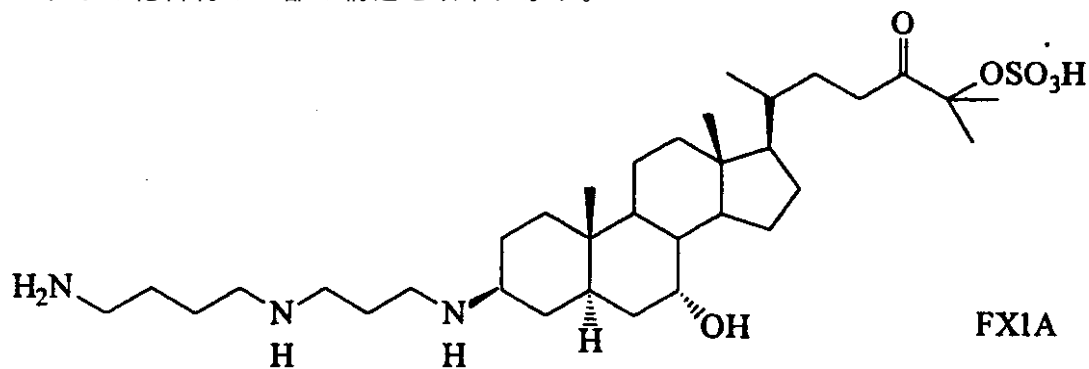
スクアラミンは、画分 62 付近から溶出が始まり、画分 80 まで続いた。また、他のステロイドは、以下の表 1 に示すように、画分 43 ~ 47 (R_f 0.82)、53 ~ 55 (R_f 1.02)、56 ~ 59 (R_f 0.51)、57 ~ 62 (R_f 0.96)、60 ~ 64 (R_f 0.47) および 61 ~ 66 (R_f 1.06) の間で溶出されるのが観察された。

表 1

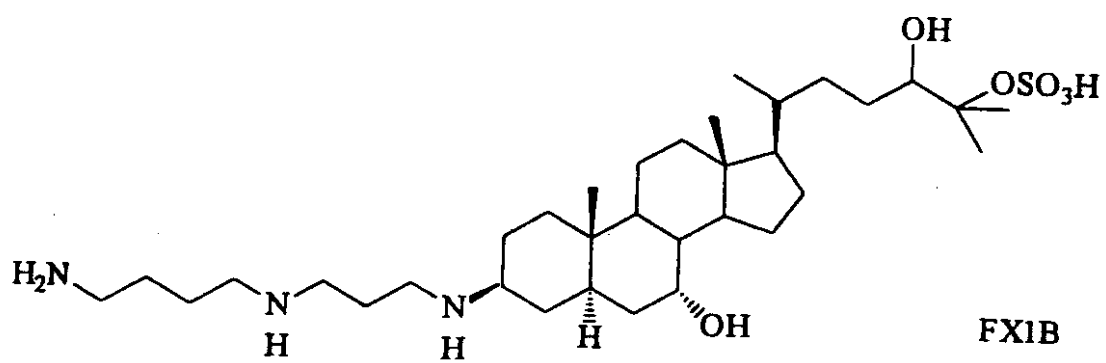
サメ肝臓から単離されたアミノステロールの化学的および構造的特性

画分	TLC R _f 値	化合物 No.	質量
43 - 47	0.82	FX1A	664.5
		FX1B	641.5
53 - 55	1.02	1360	641.49
56 - 59	0.51	FX3	
57 - 62	0.96	1437	657.52
60 - 64	0.47	1436	684.52
61 - 66	1.05	1361	543.48
63 - 80	1.0	1256	627.98

これらの化合物の一部の構造を以下に示す。

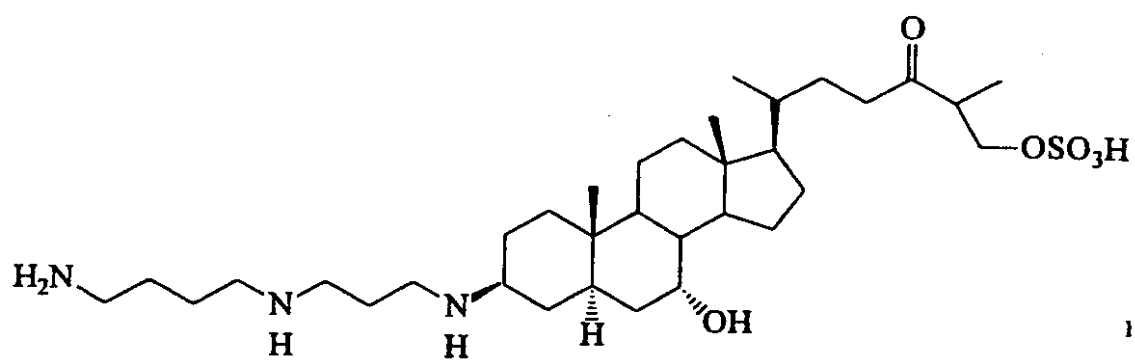


MSI- FX1A

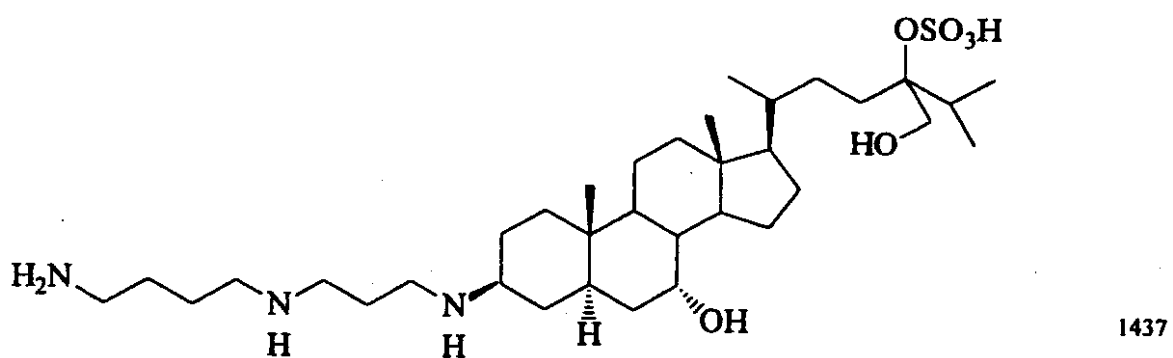


MSI- FX1B

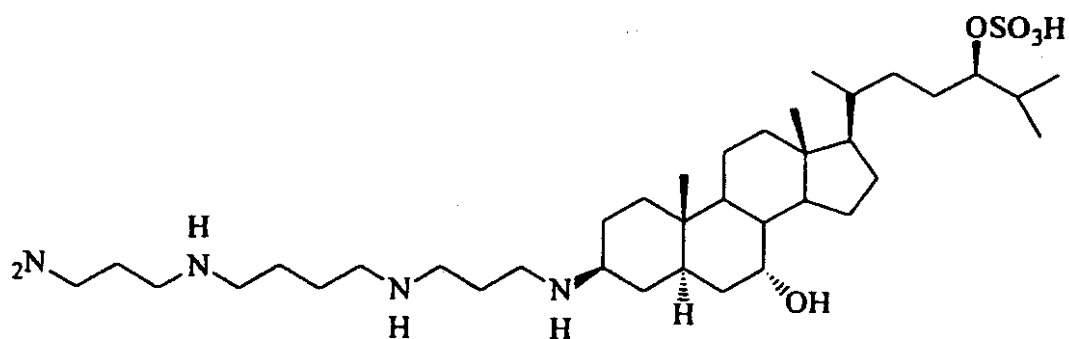
10



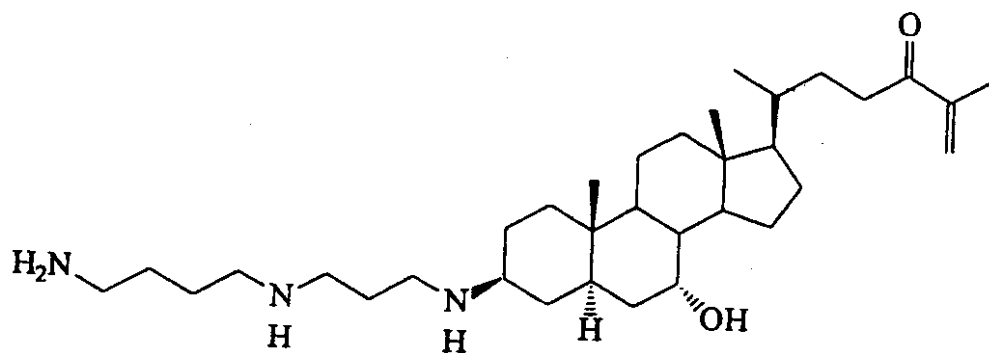
20



30

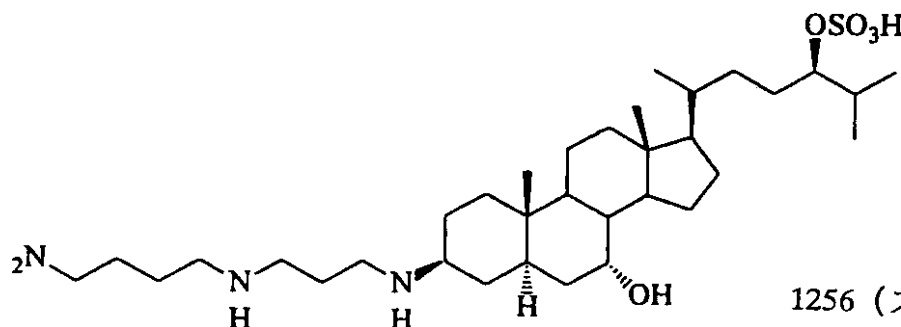


40



1361

10



1256 (スクアラミン)

20

これらの化合物の各々は、以下に示すように単離、精製、物性値の測定、NMRによる構造決定を行った。

化合物 1360

分取C18RP-HPLCによる画分2の主要ステロイドであるこの化合物は、NaClの増加濃度勾配で溶出させるスルホエチルアスパルトアミドHPLCを使用した強陽イオン交換によって精製した。ステロイド画分は、シリカTLCをCH₂Cl₂:CH₃OH:NH₄OH(6:3:1)で展開し、ヨウ素で可視化して、検定した。次いで、ステロイド画分を集めて、0.1%TFA水溶液中CH₃CNを増加濃度勾配で、C18RP-HPLCで再びクロマトグラフィーを行った。精製した化合物のTLC分析では、単一のスポットを示し、スクアラミン(R_fスクアラミン=1.0)に対してR_f=1.02であった。

30

化合物1360の次の単離物については、強陽イオン交換クロマトグラフィーを実施しなかった。その代わりに、分取C18RP-HPLCにより集めた画分を、軽度なCH₃CN濃度勾配を使用したC18またはC8RP-HPLCに供した。画分は、TLCおよびD₂Oに溶解した試料について¹H-NMRで検定した。

FAB-MSで分析したとき、化合物は、典型的に、陽イオンモードにおいて、642.5ダルトンに非常に弱い(M+H)+信号と、562.5ダルトンに強力なフラグメントとを示した。陰イオンFAB-MSにおいて、640.4ダルトンに(M-H)-が観察された。続いて実施した、エレクトロスプレーイオン化(ESI-MS)分析は、多くのTFA付加物が付いた親分子の質量641.4に一致する強力な(M+H)+信号および(M-H)-信号を示した。これは、化合物1360の硫酸塩の不安定性はFAB条件下ではさらに顕著になることを示唆している。

40

FAB陽イオンモードにおける親分子イオンは強度が非常に弱いので、正確な質量の測定は脱硫フラグメントについて実施した。正確な質量561.49325が観察された。次いで、SO₄の質量を加えることによって、分子式C₃₄H₆₃N₃O₆Sに相当する、親分子の正確な質量641.49が算出された。スクアラミン(C₃₄H₆₅N₃O₅S)と比較して、酸素原子が1個多く、水素原子が2個少ないこの分子式は、カルボニル基を有する化合物であることを示している。

D₂Oに溶解した化合物の¹H-NMR(300MHz)は、スクアラミンと識別できるいくつかの特徴を示した。化合物1360については、 δ = 4.15 ppmで共鳴が出現す

50

る最低磁場は、2個のプロトンからなる積分値をもつ少なくとも7シグナルからなる分裂パターンを示した。スクアラミンについては、 $\delta = 4.2$ ppmでの低磁場での共鳴は硫酸位置(H24)で、1個のプロトンからなる積分値をもつ5シグナルからなる多重線が300 MHzで出現した。2.6 ppmでは、化合物1360も2個のプロトンによる分解能の悪い多重線を示した。文献と比較すると、これらの共鳴はカルボニル基の1位のメチレンプロトンによると思われる。スクアラミンでは、2.2~2.75の領域は共鳴を示さなかった。化合物1360は2個のはっきりしたメチル二重線、1つは0.95 ppmに、もう1つは1.1 ppmに示された。これは、3個のメチル基が0.9~1.05 ppmの領域において重なった二重線として分裂するスクアラミンとは異なる。他の共鳴の特徴は、2種のステロイドでは極めて似通っていた。高磁場メチル領域では、化合物1360とスクアラミンは共に、それぞれ0.85および0.65 ppmに、19位および18位の分解能の悪い一重線メチルシグナルを示した。ステロイド核(1.0~2.1 ppm)およびスペルミジン由来の共鳴も、化合物1360およびスクアラミンでは同じ特徴的なパターンを示した。環のアルコール位のH7は、D₂Oに溶解した両ステロイドにおいて、3.85 ppmに共鳴を示した。

D₂O中で実施したCOSY (correlated spectroscopy) スペクトル(300 MHz)によって、27位の硫酸、 $-\text{CH}_2\text{OSO}_3-$ が確定した。2次元(2D)プロット中の特徴的なクロスピークパターンは、 $\delta = 1.1$ の二重線ピークは26位のメチルであり、3.05 ppmでは25位のHと相関関係があり(ポリアミンの共鳴によって隠蔽されている)、4.15 ppmでは複雑な多重線に最接近していたことを示した。

2Dマップのポリアミン領域は、スペルミジンの分裂パターンに一致し、化合物1360はスクアラミンと同じポリアミンを持つことを確認した。しかし、D₂O中の2Dマップは、特にステロイド核領域において多数のクロスピーク信号が出現せず、完全な一次構造を確定することができなかった。

化合物1360を真空下で乾燥し、窒素中でDMSO-d₆に溶解し、次いで、凍結融解ポンプを反復させて窒素下で密封した。300 MHzおよび600 MHzで¹H-NMRスペクトル分析を実施した。DMSO中の化合物のプロトン共鳴は全て分解能力がよく(ポリアミン領域(2.8~3.1)を除いて)、D₂O中の帰属方向にシフトした。例えば、27位の多重線は高磁場の3.77 ppmにシフトし、H7プロトンは3.6 ppmにシフトした。また、新たな二重線シグナル(1H分の積分値)が4.17 ppmに出現した。この新たな共鳴は、H7と2Dとの相関性に基づき、7位のヒドロキシルであると同定されたが、これは600 MHzではあきらかであった。D₂O中では溶媒と速やかに交換してしまうために、この共鳴は観察されなかった。DMSO中の化合物1360の2Dマップにおいて、最初にD₂O中で2D COSYマップから推定された27位の硫酸基の位置が再確認された。

化合物1360およびスクアラミンの2D COSYマップを注意深く比較することによって、24位にカルボニル基が存在することが示唆された。2プロトン分の積分値を有する2.5 ppm(D₂O中では2.6 ppm)に中心をもつ多重線は、H23a, b(24位のカルボニル基の1位に位置する)と同定され、H22a, bと最も近い位置で相関関係がある強力なクロスピークを示した。総相関分光分析(total correlation spectroscopy experiment(TOCSY))では、ステロイドのピークテールに沿って磁気が伝搬することによって、新たなクロスピークがH22/H21として識別できた。23位から24位へ、さらに24位から25位へ磁気を伝搬させるシグナルは、2D COSYおよびTOCSYではあきらかに消失していた。22-23-24-25-26/27に関して最も近い位置のクロスピークを示すスクアラミンのCOSYとは異なり、化合物1360は相関が妨害されていることを示し、これは24位の官能基がプロトンシグナルの移動を妨害したことを示唆している。しかしながら、24位のアルコールから21~26および27位による全てのプロトン相関を予測できるので、C=Oをアルコールに還元することによって構造をあきらかにすることができる

。

DMSO中の化合物1360の ^{13}C -NMRは、34位の炭素シグナルを示した。スクアラミンと比較して、化合物1360は212 ppmに1個のカルボニル基を有する(C24)。C27は、硫酸スキムノール(scymanol sulfate)について報告された値に一致して、67 ppmで共鳴した。

化合物1361

化合物1361は2種類の方法でサメの肝臓の調製物から単離された：第1には、化合物1360の分解産物として、；次いで、分取C18RP-HPLCにおいて、スクアラミンよりわずかに速い保持時間で分画される少量のアミノステロール成分(画分VI成分)としてである。各アミノステロールを均一になるように精製するための早期の試みにおいて、C18RP-HPLCで収集した画分について、 CH_2Cl_2 ： CH_3OH ： NH_4OH 6：3：1を用いたシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーを実施し、アミノステロールをTLCプレート上で検定した。収集した遊離塩基性ステロイドについては、分析用カラムを使用してC18RP-HPLCを再度実施した。RP-HPLC溶出パターンは、2種類の主要ステロイド、すなわち、化合物1360および高濃度の CH_3CN で溶出するより疎水性のステロイドを示した。化合物1360の27位の硫酸基は不安定なので、あきらかに塩基触媒脱離によって、化合物1361が形成される。

D_2O 中の化合物1361の ^1H スペクトルの明白な特徴には、硫酸塩を有する27位のメチレンプロトンに相当する $\delta = 4.15$ ppmに多重線が消失していることがあった。 D_2O 中で $\delta = 5.95$ および 6.15 の2個の新たな一重線プロトンは、各々がH1個分の積分値を有し、ビニルプロトンと同定された。また、化合物1360の $\delta = 0.90$ のメチル二重線とは異なり、新たなステロイドは、アリルメチルの特徴を示す、 $\delta = 1.8$ ppmに一重線メチルを示した。ビニル基およびアリルメチルの化学シフトは、文献の値と比較して矛盾がない。にもかかわらず、 ^1H スペクトルは、24位のカルボニル基の位に、 $\delta = 2.75$ ppmのメチレンシグナルが存在することを含む、化合物1360の特徴を示した。ポリアミン領域は、スクアラミンと同様の分裂パターンを示し、スペルミジン付加を確認した。

正確な質量である543.4823はFAB-MS(陽イオンモード)によって測定した。分子式 $\text{C}_{34}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_2$ は、計算値が543.4842で、実験で観察された値とよく一致した。化合物1361のこの分子式は、親分子、化合物1360から硫酸が脱離したものと一致する。さらに、化合物1361の分子式は、二重結合当量(double bond equivalent (DBE))は、5.5で、これと比較して化合物1360は5.0で、化合物1256は4.0であった；このDBE値は化合物1361の付加不飽和に一致する。

化合物1436

この化合物および以下に記載するステロイドは、分取C18RP-HPLCで得られた画分を軽度な CH_3CN 濃度勾配条件下で、小型のC18カラムに用いて精製した。化合物1360および1361を精製する際には、強陽イオン交換クロマトグラフィー、シリカゲル(SG)フラッシュクロマトグラフィー、次いでRP-HPLCを使用した。pHが不安定であると認められるときには、これらの実験計画を適用でしなかった。

化合物1436は、C18RP-HPLCにおいて、スクアラミンよりわずかに速い保持時間で溶出されるが、TLC上の $R_f = 0.47$ は、アルカリ条件下ではスクアラミンよりかなり極性が大きい化学構造を有することを示唆している(CH_2Cl_2 ： CH_3OH ： NH_4OH 6：3：1)。

D_2O 中での ^1H -NMRスペクトル(400 MHz)では、スクアラミンとは異なるポリアミン領域を示した。分裂パターンおよび積分値は共にスペルミジンよりスペルミン、すなわち、N-(3-アミノプロピル)-1,4-ブタンジアミンよりもN,N'-ビス-3-アミノプロピル-1,4-ブタン-ジアミンに類似している。にもかかわらず、 ^1H スペクトルはスクアラミンと同一であるように思われた：すなわち、24硫酸位の $\delta = 4.15$ にプロトン1個、；H7アルコール環位置に相当する $\delta = 3.85$ にプロトン1個

10

20

30

40

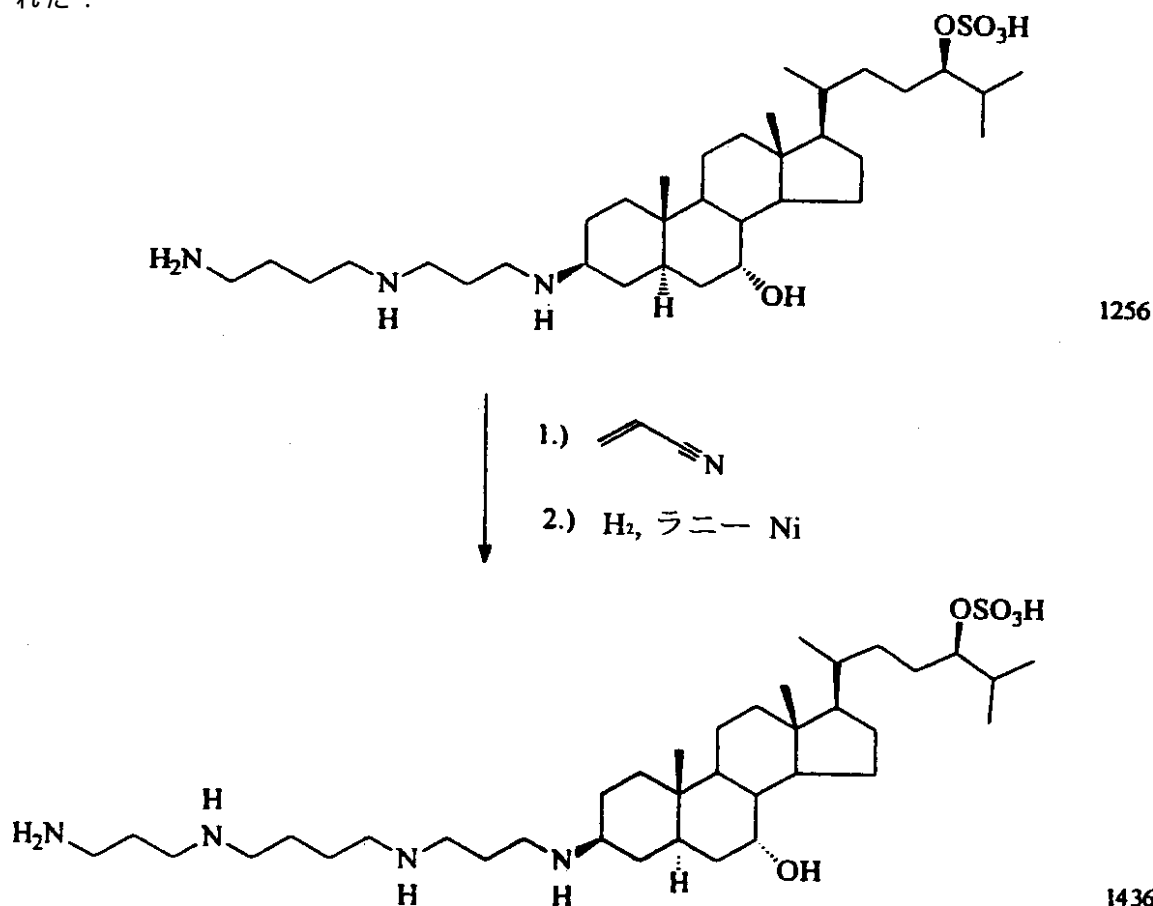
50

、；メチル 2 1 およびメチル 2 6 および 2 7 に相当する、0 . 8 5 ~ 0 . 9 5 p p m に重なり合った 3 個の二重線を示した。スペルミンの同定は、D₂O 中で C O S Y を実施し、クロスピークパターンを D₂O 中のスクアラミンと同様、スペルミン (C₁₀H₂₆N₄) およびスペルミジン (C₇H₁₉N₃) の標品と比較することによって確認された。アミノステロールの C O S Y スペクトルは、一般に、D₂O 中ではクロスピークの完全な 2 次元マップを与えず、従って、最も近い位置の完全な帰属を利用することができないが、ポリアミン領域は、スペルミジンとスペルミンとを識別するための信頼性のあるシグナルパターンとして用いられた完全なオフダイアゴナル (o f f - d i a g o n a l) クロスピークを示した。

化合物 1 4 3 6 の ¹³C スペクトルは、D₂O 中でさらに 3 個のシグナルを示したが、ステロイドの炭素骨格は D₂O 中ではスクアラミンと同じであった。D E P T - 1 3 5 (d i s t o n i o n l e s s e n h a n c e d p o l a r i z a t i o n t r a n s f e r) を、メチルシグナルおよびメチンシグナルが正のシグナルとなるように、メチレン基が負のシグナルになるように、第 4 級炭素の強度が 0 になるように実施した。化合物の D E P T - 1 3 5 により、これら 3 個の追加シグナルがメチレン (負) であることが明らかになった。

C₃₇H₇₂N₄O₅S の分子式は、計算値が 6 8 4 . 5 3 0 1 7 であり、高分解能 F A B - M S (陽イオンモード) によって測定した実測値 6 8 4 . 5 2 1 6 とよく一致した。質量の追加分 5 8 ダルトン (6 8 4 . 5 とスクアラミンの 6 2 7 . 5 の差) は、スペルミンによって挿入された 3 - アミノプロピル基の存在と一致する。さらに、親イオンの偶数の質量数は、窒素数が偶数である化合物を予測する窒素則に一致する。F A B - M S はまた、6 8 5 a m u (a t o m i c m a s s u n i t s) では (M + H) + 親分子より小さい、8 0 および 9 8 質量単位の種への断片化した。これらの断片は、硫酸の消失に次いで脱水が生じたことを示しており、F A B - M S 条件下でのスクアラミンの構造が不安定であることと一致する。

化合物 1 4 3 6 は、以下の反応式によって化合物 1 2 5 6 (スクアラミン) から合成された：



無水メタノール 800 μ l にスクアラミン (TFA 塩) 95 mg (0.106 mmol) を溶解したものを丸底フラスコに入れた。この混合物に、トリエチルアミン 118 μ l (0.848 mmol) を添加し、次いで、希釈したアクリロニトリル溶液 (70 μ l のアクリロニトリルをメタノールで 1000 μ l に希釈した) 100 μ l を添加した。6 時間後、希釈したアクリロニトリル溶液 40 μ l (0.042 mmol) をさらに添加した。24 時間後、TLC において、出発物質と、 $R_f = 0.7$ (スクアラミンは $R_f = 0.5$) の生成物の存在が示された。反応を停止し、フラッシュクロマトグラフィー (12:3:1 から 6:3:1、 CH_2Cl_2 : MeOH: NH_4OH) によって生成物を単離した。得られた生成物は、TLC では単一スポットであったが、NMR スペクトルでは混合物であると思われた。得られた生成物と、ラニーニッケル 10 mg、水酸化ナトリウム 7.3 mg および無水エタノール 5 ml と水素化用フラスコに添加し、40 psi で、17 時間水素化した。これにより、標品より低い位置にスポットして行った TLC 上で、分離可能な (フラッシュクロマトグラフィー、6:3:1、 CH_2Cl_2 : MeOH: NH_4OH) 2 つの生成物が観察された (天然物質から単離された化合物 1436)。逆相クロマトグラフィーによってこの生成物を分離して、純物質 1.5 mg を得た。この化合物は 685 の正の質量 ($M+1$) イオンを有し、その ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは天然物質から単離された物質と同一であり、従って、その特徴および構造を確認することができた。

10

化合物 1437

このステロイドは、分取 C18 において化合物 1360 の直後に溶出し、TLC 上では $R_f = 0.96$ を示す。このことは、スクアラミンより極性が大きいことを反映している。 D_2O 中の ^1H NMR (400 MHz) は、メチル領域、ステロイド核およびスベルミジン領域並びに環上ヒドロキシル位の 7H については、スクアラミンと本質的に同じであると思われた。 ^1H スペクトルからは、24 位の硫酸のプロトン 1 個に相当する $\delta = 4.15$ ppm の多重線があきらかに消失していた。一方、特徴的なジェミナル (gem) アルコールカップリングとプロトン 2 個分の積分値を有する $\delta = 3.95$ を中心とする新たなシグナルが観察された。

20

スクアラミンと比較すると、 D_2O 中の化合物 1437 の ^{13}C スペクトルは、わずかに 2 カ所が顕著に変化していただけであった。1 つの新たなシグナルは $\delta = 72$ ppm に出現し、その DEPT-135 シグナルが負であったので、結果的に $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基と同定された。スクアラミンにおいては、硫酸の位置は $\delta = 86$ ppm では第 1 級炭素と同定された (正の DEPT-135 シグナル)。しかしながら、化合物 1437 に関しては、硫酸の位置の炭素の共鳴は $\delta = 76$ ppm にシフトし、DEPT-135 シグナルを示さなかったもので、それを第 4 級炭素と同定した。これらのデータに一致するアミノステロール構造は、エルゴステロールの炭素骨格を有し、炭素 24 は硫酸基を有し、炭素 24' はアルコールである。

30

陽イオンモードの FAB-MS は、 $m/z = 658.6$ に ($M+H$)⁺ を示し、硫酸の消失によって $m/z = 578.6$ に断片化した；陰イオンモード分析は、 $m/z = 656.4$ に擬親イオン ($M-H$)⁻ を確認した。正確な質量 578.5264 は、親分子のシグナルの強度が小さかったために、脱硫酸フラグメントについて測定した。次いで親イオンの正確な質量は (硫酸基の質量を加えることによって) 657.526 と算出された。化合物 1437 は、スクアラミンより 30 ダルトン大きく、これは $-\text{CH}_2\text{OH}$ 部分がさらに挿入されていることによって説明された。

40

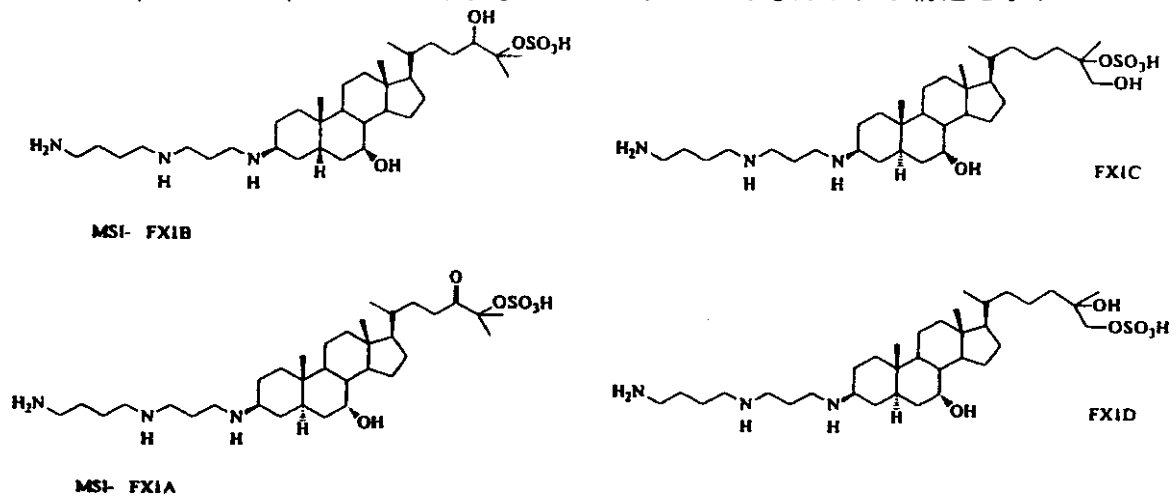
画分 I 中のステロイド

画分 I (FX1) は、分取 C18 RP-HPLC から最も早く溶出するステロイド画分である。TLC 分析は、典型的に、 $R_f = 0.80 \sim 0.84$ (スクアラミン $R_f = 1.0$ に対して) の単一主要スポットと TLC の原点にとどまったたんばく質とを示した。濃縮した試料 (3 mg/ml) を用いて TLC を展開した場合には、主要成分より R_f 値がわずかに大きい、または小さい新たなスポットの痕跡が識別された。

孔のサイズ 60 ~ 100 で、非常に軽度な CH_3CN 濃度勾配を用い、C18 カラムを

50

使用した高分解能 R P - H P L C を実施したとき、画分 I は 7 種もの成分に分離され、I - 1、I - 2、I - 3、I - 4、I - 5、I - 6 および I - 7 と命名された。ステロイド F X 1 A、F X 1 B、F X 1 C および F X 1 D について考えられる構造を示す：

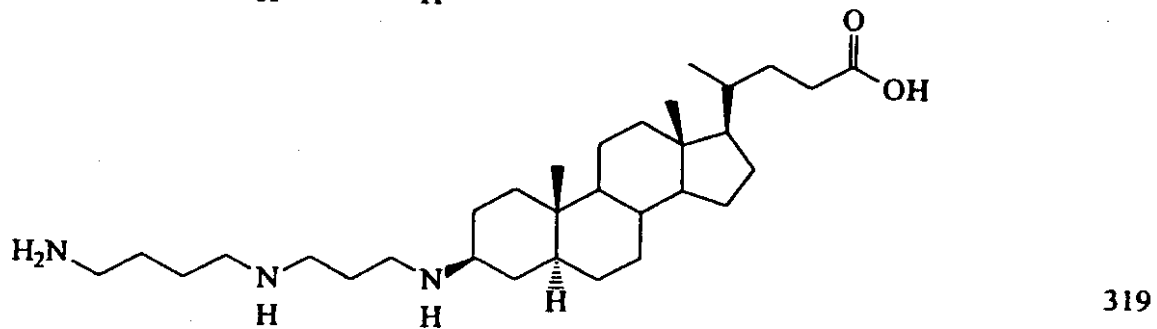
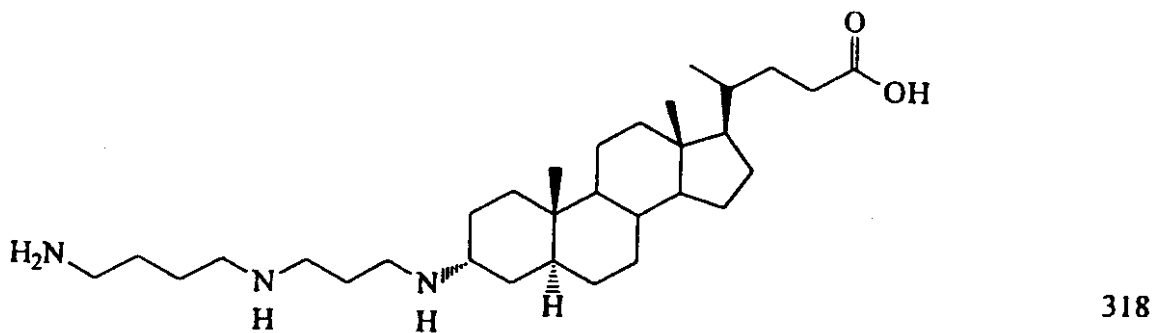
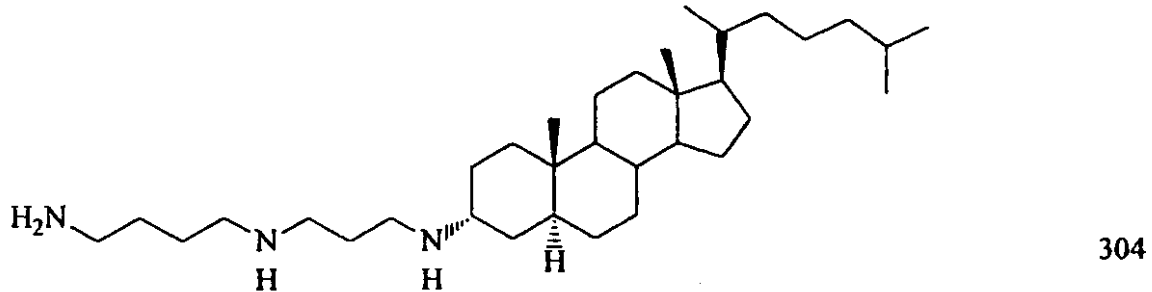
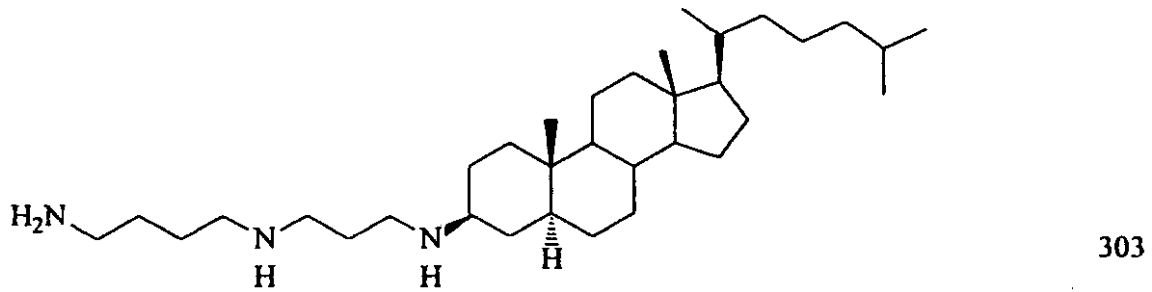


10

実施例 2 アミノステロールの合成

サメの肝臓から単離された上記の化合物に加えて、合成アミノステロール化合物が開発されている。実施例 A ~ G において特定された化合物を含む種々のポリアミノステロール化合物が、1994 年 9 月 13 日出願の国際出願第 P C T / U S 9 4 / 1 0 2 6 5 号の米国国内段階に相当する米国特許出願第 0 8 / 4 1 6 , 8 8 6 号明細書に記載されており、その開示内容は本明細書に参照として含まれている。同明細書に例が挙げられている化合物には以下のものを含む：

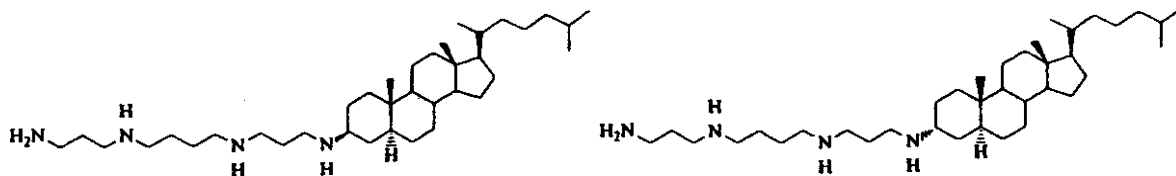
20



さらにアミノステロール化合物も開発された。本発明の好ましい化合物には以下に例を挙げる物が含まれる。

例 H

化合物 353 および化合物 354 の調製：



353

354

化合物 303 の調製と同様の方法で、シアノボロハイドライドナトリウムを用いて 5 - コレスタン - 3 - オンをスペルミン（4 当量）に還元カップリングすることによって上記化合物を調製した。精製はシリカゲル（クロロホルム：メタノール：イソプロピルアミン 9：3：1 から 3：3：1 の濃度勾配溶出）で実施した。化合物 303 と同じ方法で、化合物 353（高極性）および化合物 354（低極性）を塩酸塩にした。 - アミノ化合物

10

20

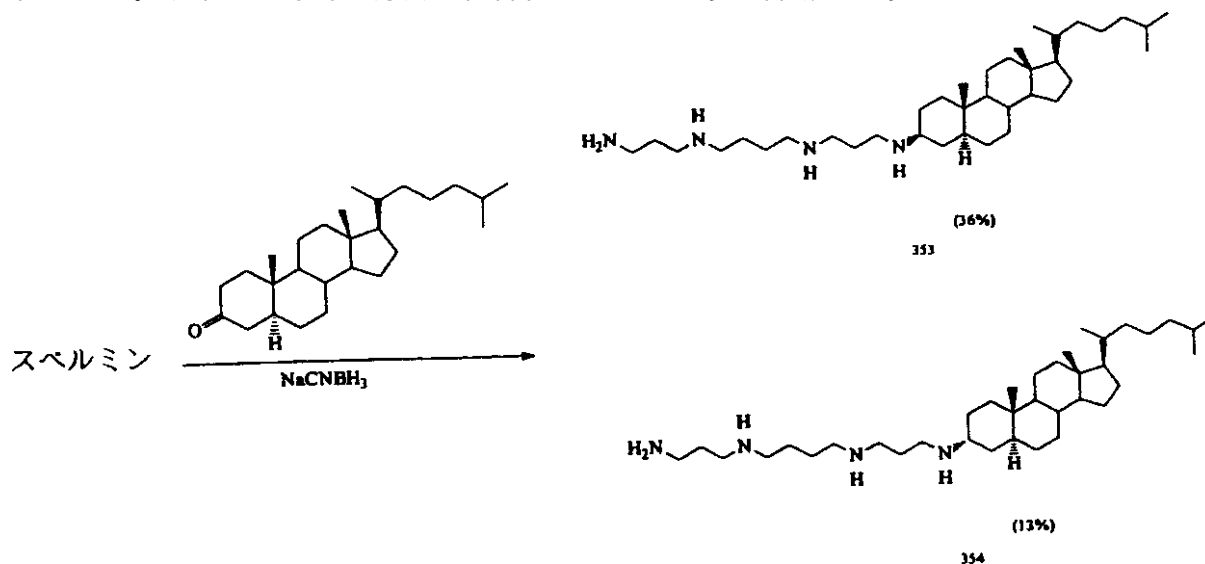
30

40

50

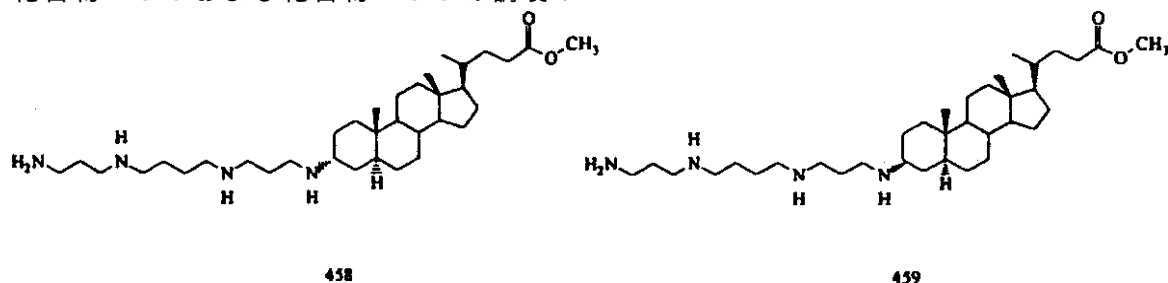
354: ^1H -NMR (200 MHz, CD_3OD) : 3.47 (m, 1H), 3.3 ~ 2.9 (m, 12H), 2.3 ~ 1.0 (m, 39H), 1.0 ~ 0.8 (m, 12H), 0.70 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}) : 3396, 2934, 1594, 1457, 1383; MS (+FAB) : 573.6 (M+1); $\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ としての分析計算値: C = 60.31, H = 10.67, N = 7.60; 実測値: C = 60.01, H = 10.83, N = 7.67。 - アミノ化合物353: ^1H -NMR (200 MHz, CD_3OD) : 3.3 ~ 3.0 (m, 13H), 2.2 ~ 1.0 (m, 39H), 1.0 ~ 0.8 (m, 12H), 0.70 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}) : 2945, 1596, 1466, 1383; MSによる正確な質量 (+FAB) 計算値: 573.5853; 実測値: 573.5801; $\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ としての分析計算値: C = 58.87, H = 10.68, N = 7.42; 実測値: C = 58.49, H = 10.94, N = 7.94。

化合物353は、スペルミンとコレステロールとの単純な付加物で、非常に低価格の化合物である。以下の直線的な方法で化合物354のように合成されうる:



実施例 I

化合物458および化合物459の調製:

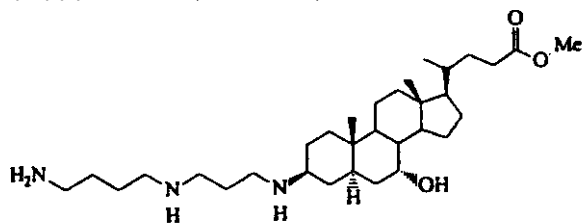


化合物353の合成と同様に、3-オキソ-5-コラノエートとスペルミン (1.35当量) とから上記化合物を調製した。シリカゲル (クロロホルム: メタノール: イソプロピルアミン 6: 3: 1 から 3: 5: 2 の濃度勾配溶出) で精製した結果、低極性の - アミノ化合物458と高極性の - アミノ化合物とが得られた。化合物303に実施したように、これらの化合物を塩酸塩に変換した。化合物458: ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.64 (s, 3H), 3.45 (m, 1H), 3.25 ~ 3.05 (m, 12H), 2.4 ~ 1.0 (m, 36H), 0.93 (d, J = 6 Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.70 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}) : 2943, 1741, 1458, 1169; MS (+FAB) : 575.6 (M+1); $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 4\text{HCl} \cdot 1.2\text{H}_2\text{O}$ としての分析計算値: C = 56.63, H = 9.83, N = 7.55; 実測値: C = 56.58, H = 9.46, N = 7.29。化合物459: ^1H

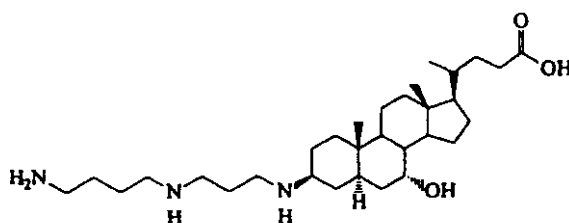
- NMR (400 MHz, CD₃OD) : 3.63 (s, 3H)、3.2~3.0 (m, 13H)、2.4~1.0 (m, 36H)、0.92 (d, J = 6 Hz, 3H)、0.86 (s, 3H)、0.69 (s, 3H); IR (KBr, cm⁻¹) : 2942、1739、1595、1459、1382、1170; MS (+FAB) : 575.6 (M+1); C₃₅H₆₆N₄O₂ - 4HCl - 1.4H₂Oとしての分析計算値: C = 56.35、H = 9.84、N = 7.51; 実測値: C = 56.35、H = 9.26、N = 7.67。

実施例 J

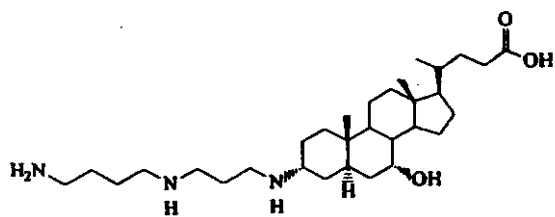
化合物 380、381、382 および 394 の調製:



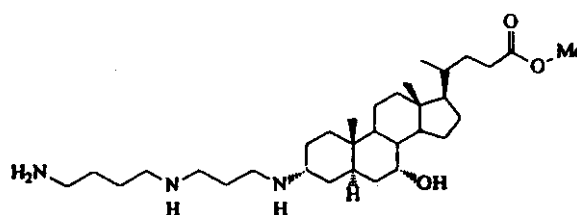
380



381



382



394

イイダ (Iida) らケミファーマブル (Chem. Pharm. Bull.) 1993 年 41 巻 (4 号) 763~765 ページの方法によって、ステロイド化合物、メチル 7-ヒドロキシ-3-オキソ-5-コラノエートを調製した。シアノボロハイドライドナトリウムを用いてこのステロイドとポリアミン化合物 301 とをカップリングし、トリフルオロ酢酸を用いて BOC 基を除去し、リチウムハイドライドを塩基として使用した以外は、化合物 319 を調製したように、エステルを加水分解した。シリカゲル (クロロホルム: メタノール: イソプロピルアミン 15: 4: 1 から 10: 4: 1) で精製を実施した。化合物 381 および 382 を 2 M アンモニアのメタノール溶液で処理し、蒸発させて (3 × 20 ml)、イソプロピルアミンを除去した。化合物 303 のように塩酸塩を調製した。

化合物 380、C₃₂H₅₉N₃O₃: ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) : 3.83 (br s, 1H)、3.66 (s, 3H)、2.8~2.4 (m, 9H)、2.3~1.0 (m, 32H)、0.92 (d, J = 6 Hz, 3H)、0.78 (s, 3H)、0.65 (s, 3H); IR (KBr, cm⁻¹) : 3278、2928、1736、1447、1163; MS (+FAB) : 534 (M+1)。

化合物 381、C₃₁H₅₇N₃O₃ - 1.7H₂O; ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) : 3.80 (br s, 1H)、3.0~2.5 (m, 9H)、2.2~1.1 (m, 32H)、0.94 (d, J = 6 Hz, 3H)、0.84 (s, 3H)、0.69 (s, 3H); IR (KBr, cm⁻¹) : 3380、2929、1560、1395; MS (+FAB) 計算値: 520.4478 (M+1); 実測値: 520.4506; 分析計算値: C = 67.64、H = 11.06、N = 7.63; 実測値: C = 67.64、H = 10.24、N = 7.83。

化合物 382、C₃₁H₅₇N₃O₃ - 2H₂O: ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) : 3.80 (br, s, 1H)、3.15 (br, s, 1H)、3.1~2.6 (m, 8

10

20

30

40

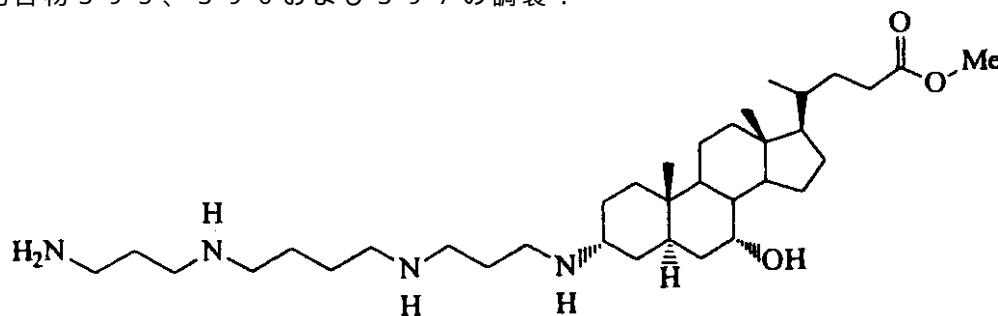
50

H)、2.2~1.1(m、32H)、0.96(d、J=6Hz、3H)、0.85(s、3H)、0.69(s、3H); IR(KBr、 cm^{-1}): 3416、2930、1560、1395; MS(+FAB)計算値: 520.4478(M+1); 実測値: 520.4489; 分析計算値: C=66.99、H=11.06、N=7.56; 実測値: C=66.93、H=10.16、N=7.28。

化合物394、 $\text{C}_{32}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 3\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: ^1H -NMR(200MHz、 CD_3OD): 3.83(br、s 1H)、3.64(s、3H)、3.48(br s、1H)、3.3~2.9(m、8H)、2.4~1.1(m、32H)、0.94(d、J=6Hz、3H)、0.87(s、3H)、0.70(s、3H); MS(+FAB): 535(M+1); 分析計算値: c=58.93、H=9.74、N=6.44、
実測値: C=58.71、H=10.13、N=6.39。

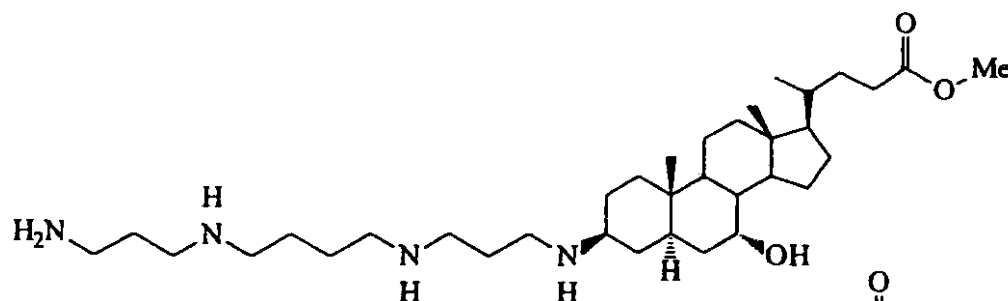
実施例 K

化合物395、396および397の調製:



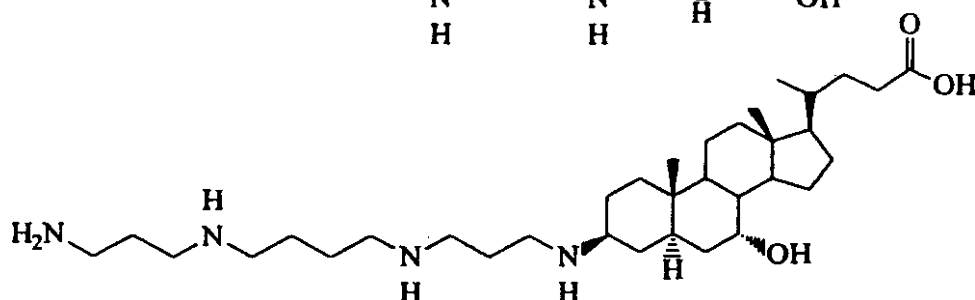
395

20



396

30



397

シアノボロハイドライドナトリウムを用いてメチル7-ヒドロキシ-3-オキソ-5-コラノエートとスペルミン(2当量)とをカップリングし、リチウムハイドライドを塩基として使用した以外は、化合物319の調製のようにエステルを加水分解した。シリカゲル(クロロホルム:メタノール:イソプロピルアミン15:5:1から5:5:1)で化合物395および396の精製を実施した。化合物397の精製はシリカゲル(ベンゼン:メタノール:イソプロピルアルコール2:6:1)で実施し、2Mアンモニアのメタノール溶液で処理して(3×20ml)、イソプロピルアミンを除去した。化合物303と同じ方法で、化合物395および396の塩酸塩を調製した。

化合物395、 $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 4\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: ^1H -NMR(200MHz、 CD_3OD): 3.80(br s、1H)、3.64(s、3H)、3.3~3.0(m、13H)、2.4~1.0(m、34H)、0.94(d、J=6Hz、3H)、0.87(s、3H)、0.70(s、3H); 分析計算値: C=54.40、H=9.65、N=7.25; 実測値: C=54.16、H=9.31、N=7.12。

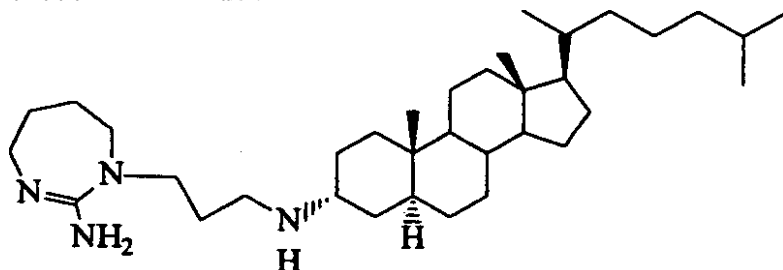
50

化合物 396、 $C_{35}H_{66}N_4O_3 \cdot 4HCl \cdot 5H_2O$: MS (+FAB) : 592 (M+1) ; 分析計算値 : C = 56.37、H = 9.60、N = 7.51 ; 実測値 : C = 56.43、H = 9.83、N = 7.27。

化合物 397、 $C_{34}H_{64}N_4O_3$: 1H -NMR (200 MHz、 CD_3OD) : 3.78 (br s、1H)、2.9~2.5 (m、13H)、2.2~1.1 (m、34H)、0.95 (d、J = 6 Hz、3H)、0.87 (s、3H)、0.70 (s、3H) ; MS (+FAB) : 577.3 (M+1)。

実施例 L

化合物 393 の調製 :

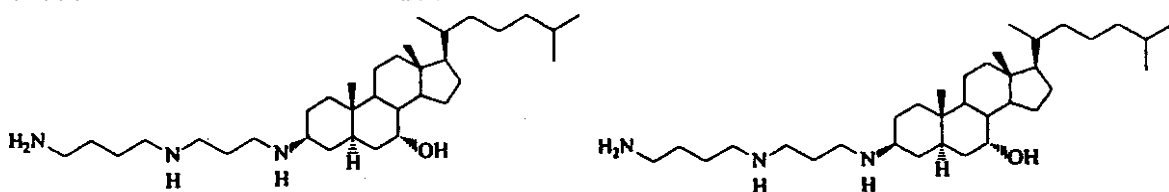


393

窒素下で化合物 304 (210 mg、0.41 mmol) をメタノール (10 ml) に溶解し、o-メチルイソウレア塩酸塩 (50 mg、0.45 mmol) と 1 N 水酸化ナトリウム溶液 (0.45 ml、0.45 mmol) とを用いて処理した。23 時間後、さらに o-メチルイソウレアを添加し (102 mg、0.92 mmol)、反応を 7 時間持続させ、1 N 塩酸溶液で停止させ (pH < 7)、蒸発させた。残留物を、1 N 水酸化ナトリウム (50 ml) とクロロホルム (100 ml) に分配させた。追加のクロロホルム (50 ml) で洗浄後、有機層を合わせたものを乾燥し (Na_2SO_4)、濃縮した。シリカゲル (直径 2 cm、5% から 15% メタノールの塩化メチレン溶液による濃度勾配) のフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、白色の固形物を得た (32 mg)。この物質をクロロホルム (3 ml) に溶解して、氷浴で冷却し、1 M 塩化水素のエーテル溶液 (1 ml) で処理し、真空下で濃縮し、化合物 393 を得た (37 mg、収率 14%)。 $C_{35}H_{64}N_4 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$: 1H -NMR (200 MHz、 CD_3OD) : 3.5~3.3 (m、5H)、3.2~3.0 (m、4H)、2.2~1.0 (m、37H)、0.95~0.86 (m、9H)、0.70 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3306、3153、2934、1654、1586、1445、1383 ; MS (+FAB) : 541.4 (M+1) ; 分析計算値 : C = 64.69、H = 10.86、N = 8.62、実測値 : C = 65.06、H = 10.98、N = 8.83。

実施例 M

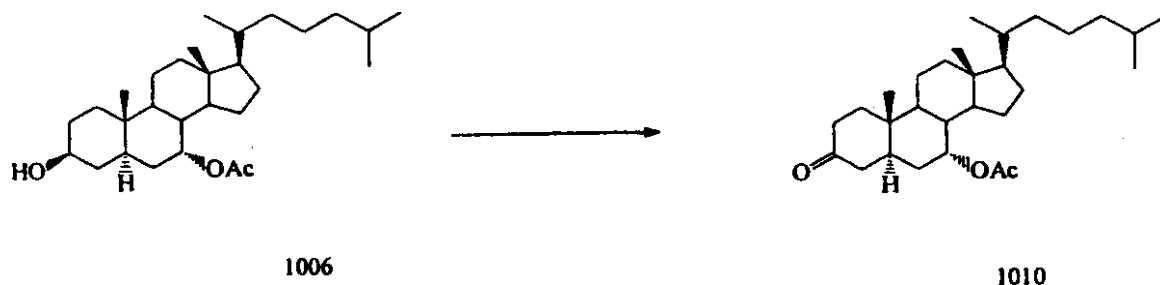
化合物 370 および 371 の調製 :



370

371

化合物 1010 の調製 :

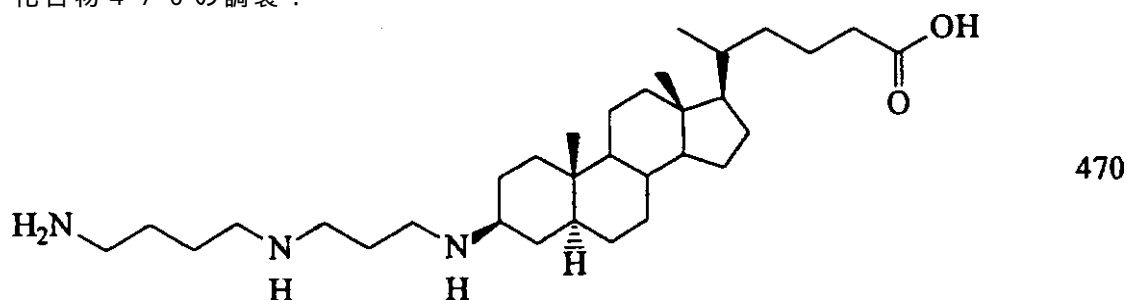


塩化クロム酸ピリジニウム (6.85 g、31.8 mmol) のジクロロメタン (130 ml) 懸濁液に、化合物 1006 (5.96 g、13.3 mmol) のジクロロメタン (70 ml) 溶液を添加した。室温で3時間攪拌後、反応混合物をエーテル (100 ml) で希釈し、濾過してから、エーテルで洗浄した。有機層を5%水酸化ナトリウム溶液、5%塩酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム、食塩水で洗浄した。乾燥したエーテル層を蒸発して、フラッシュクロマトグラフィー (6 cm、0から20%の酢酸エチルのヘキサン溶液による濃度勾配) によって精製し、純粋な化合物 1010 (5.25 g、収率77%) を得た。¹H-NMR (200 MHz、CDCl₃) : 4.92 (m、1H)、2.5~1.0 (m、29H)、2.06 (s、3H)、1.03 (s、3H)、0.91 (d、J = 6.5 Hz、3H)、0.87 (d、J = 6.5 Hz、6H)、0.67 (s、3H) ; IR (KBr、cm⁻¹) : 2949、1736、1468、1372、1244、1023 ; MS (ES+) : 467.8 (M+Na)。

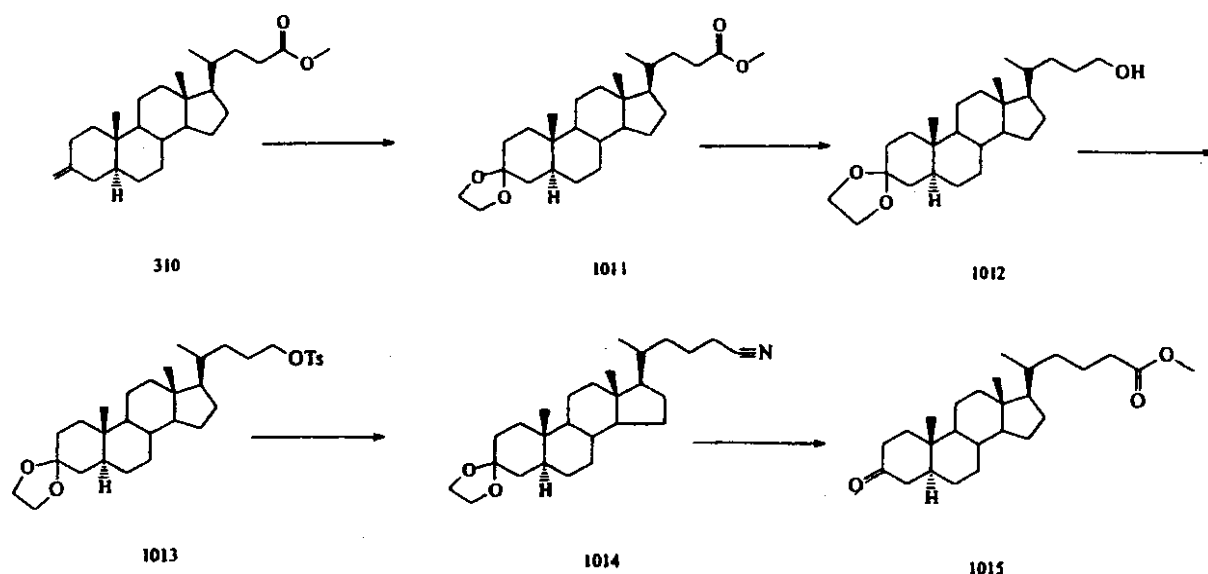
化合物 370 および 371 の調製 : シアノボロハイドライドナトリウムを用いて、ステロイド 1010 とポリアミン 301 とをカップリングさせ、トリフルオロ酢酸を用いて BOC 基を除去し、水酸化ナトリウムを塩基として使用した以外は、化合物 319 の調製と同様にアセテートを加水分解した。シリカゲル (ベンゼン : メタノール : イソプロピルアミン 2 : 6 : 1) で精製した。化合物 370 (¹H-NMR (200 MHz、CD₃OD) : 3.80 (m、1H)、2.97 (m、1H)、2.9~2.6 (m、8H)、2.1~1.0 (m、35H)、0.94 (d、J = 6.5 Hz、3H)、0.88 (d、J = 6.5 Hz、6H)、0.87 (s、3H)、0.70 (s、3H)) および化合物 371 (¹H-NMR (200 MHz、CD₃OD) : 3.77 (m、1H)、2.8~2.5 (m、9H)、2.1~1.0 (m、35H)、0.93 (d、J = 6.5 Hz、3H)、0.88 (d、J = 6.5 Hz、6H)、0.83 (s、3H)、0.69 (s、3H)) を、化合物 303 の調製のように、塩酸塩にした。化合物 370 : IR (KBr、cm⁻¹) : 3415、2948、1595、1467、1382、1031 ; MS (+FAB) : 532.4 (M+1) ; C₃₄H₆₅N₃O · 3HCl · 2H₂O の分析計算値 : C = 60.29、H = 10.71、N = 6.20 ; 実測値 : C = 60.01、H = 11.09、N = 6.3。化合物 371 : IR (KBr、cm⁻¹) : 3414、2953、1596、1468、1381、1033 ; MS (+FAB) : 532.4 (M+1) ; C₃₄H₆₅N₃O · 2H₂O の分析計算値 : C = 60.29、H = 10.71、N = 6.20 ; 実測値 : C = 60.49、H = 11.00、N = 6.47。

実施例 N

化合物 470 の調製 :



前駆体の調製 :



10

化合物 1011 および 1012 の調製：メチル 3 - オキソ - 5 - コラノメート（化合物 310、2.00 g、5.15 mmol）、p - トルエンスルホン酸（250 mg）およびエチレングリコール（25 ml）のベンゼン（160 ml）溶液を 6 時間水を除去しながら加熱還流した。室温に冷却後、飽和炭酸水素ナトリウム（30 ml）を添加し、水層をベンゼンおよび酢酸エチルで抽出した。有機層を水および食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、蒸発させて、化合物 1011 を得、精製しないで次の工程に使用した。

20

1 M 水素化アルミニウムリチウム（25 ml、25 mmol）のエーテル溶液を窒素下化合物 1011 の無水エーテル（80 ml）溶液で処理し、5 時間加熱還流した。終夜攪拌後、反応混合物を 0 で、水および 2 N 水酸化ナトリウム溶液を用いて反応を停止した。水層をエーテルで抽出し、次いで食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて、化合物 1012（1.80 g、収率 86%）を得た。 ^1H -NMR（400 MHz、 CDCl_3 ）：3.94（s、4H）、3.62（m、2H）、2.0~1.0（m、28H）、0.92（d、 $J = 6\text{ Hz}$ 、3H）、0.81（s、3H）、0.66（s、3H）。

化合物 1013 および 1014 の調製：化合物 1012（3.63 g、8.97 mmol）の無水ピリジン（16 ml）溶液を、室温で p - トルエンスルホニルクロライド（2.3 g、12.1 mmol）で処理し、終夜放置した。氷水を添加して、反応混合物を攪拌しながら 30 分間放置した。次いで、6 N 塩酸を添加し（70 ml）、水層をジクロロメタンおよびエーテルで抽出した。有機層を 2 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウムおよび食塩水で洗浄し、乾燥し、蒸発させて粗化合物 1013 を得た。化合物 1013 をジメチルスルホキシド（40 ml）に溶解して、窒素下、90 で、2.5 時間、シアン化ナトリウム（1.4 g、28 mmol）で処理した。冷却後、反応混合物を氷水で処理し、エーテルおよびジクロロメタン中に抽出した。有機層を食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥し、クロマトグラフィー（直径 4 cm、0 から 25% 酢酸エチルのヘキサン溶液の濃度勾配）によって精製し、純粋な化合物 1014 を得た。 ^1H -NMR、 CDCl_3 ）：3.94（s、4H）、2.32（m、2H）、2.0~1.0（m、28H）、0.93（d、 $J = 6\text{ Hz}$ 、3H）、0.81（s、3H）、0.66（s、3H）；IR（KBr、 cm^{-1} ）：2930、2247、1445、1381、1357、1133、1091、928、899；MS（+FAB）：414.4（ $M + 1$ ）。

30

40

化合物 1015 の調製：化合物（1014（480 mg、1.16 mmol）の酢酸（35 ml）と濃塩酸（25 ml）との溶液を 25 時間還流した。溶媒を蒸発させた後、残留物を水と酢酸エチルとに分配させた。乾燥および蒸発後、粗カルボン酸をメタノール（25 ml）に溶解し、濃塩酸（1 ml）で処理し、20 分間還流した。溶媒を蒸発させた後、生成物を酢酸エチルと水とに溶解し、酢酸エチルで再度抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、フラッシュクロマトグラフィー（直径 2 cm、0 から 2

50

5%酢酸エチルのヘキサン溶液の濃度勾配溶出)によって精製し、純粋な化合物1015を得た(298mg、収率64%であった)m.p.147~148。¹H-NMR(400MHz、CDCl₃):3.67(s、3H)、2.4~1.0(m、30H)、1.01(s、3H)、0.93(d、J=6Hz、3H)、0.68(s、3H);¹³C-NMR(400MHz、CDCl₃):212.3、174.5、56.5、56.1、54.0、51.6、46.9、44.9、42.8、40.1、38.8、38.4、35.8、35.7、35.6、34.7、31.9、29.2、28.4、24.2、21.7、21.6、18.8、12.2、11.7;MS(+FAB):403.3(M+1);C₂₆H₄₂O₃の分析計算値:C=77.56、H=10.51;実測値C=77.49、H=10.52。

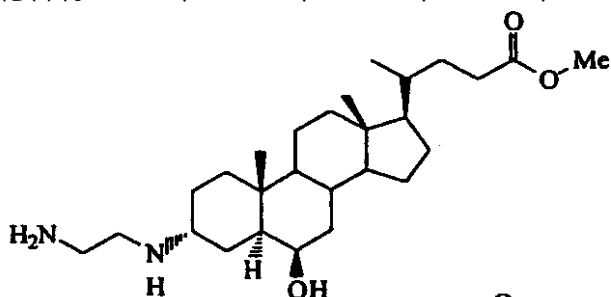
10

化合物470の調製:シアノボロハイドライドナトリウムを用いてステロイド1015とポリアミン301とをカップリングさせ、トリフルオロ酢酸でBOC基を除去し、水酸化リチウムを塩基として使用した以外は、化合物319の調製のように、エステルを加水分解した。シリカゲル(クロロホルム:メタノール:イソプロピルアミン14:4:1から4:4:1の濃度勾配溶出)で精製した。メタノール:クロロホルム(3×)で蒸発後、化合物を2Mアンモニアのメタノール溶液で処理し、イソプロピルアミンを蒸発(3×20ml)除去した。¹H-NMR(400MHz、CD₃OD):2.8~2.6(m、9H)、2.2~1.0(m、9H)、2.2~1.0(m、36H)、0.92(d、J=6Hz、3H)、0.80(s、3H)、0.66(s、3H);MS(+FAB):518.4(M+1);分析計算値:C=71.73、H=11.47、N=7.84;実測値:C=71.03、H=11.06、N=7.53。

20

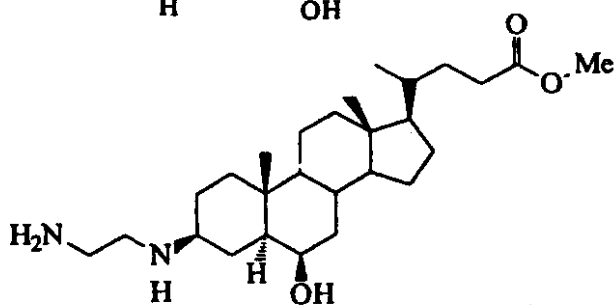
実施例O

化合物431、432、433、465、466、467および469の調製。

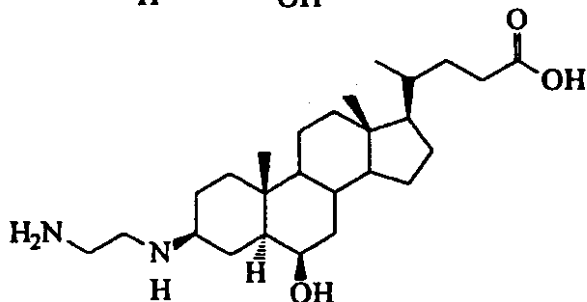


431

30

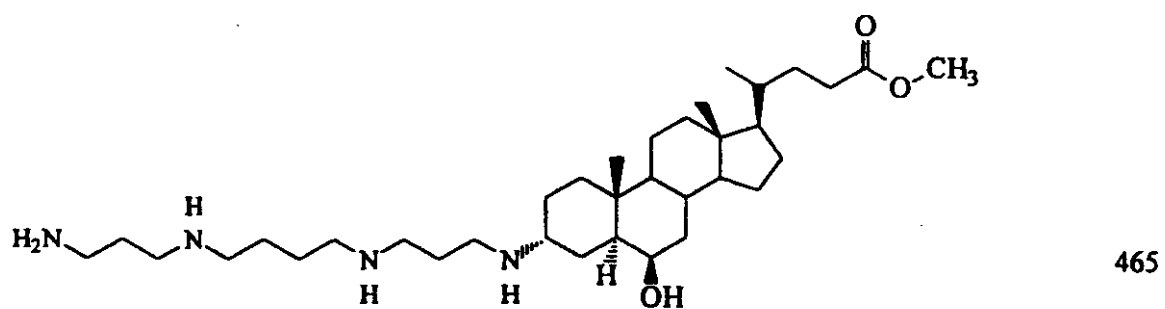


432

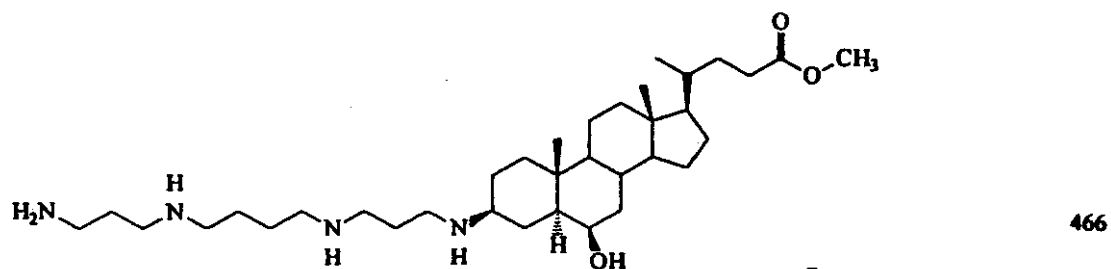


433

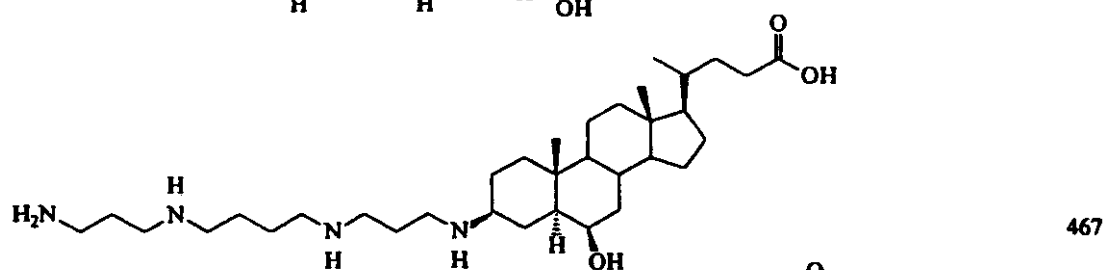
40



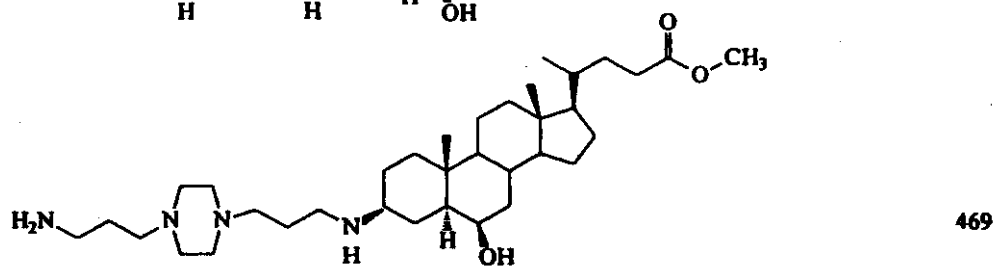
10



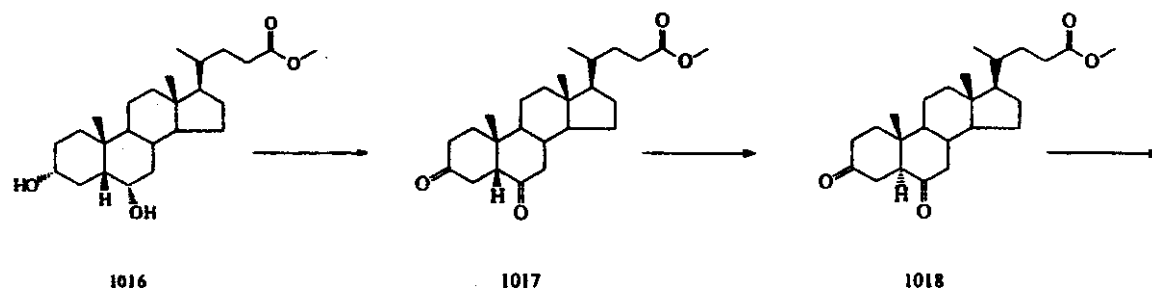
20



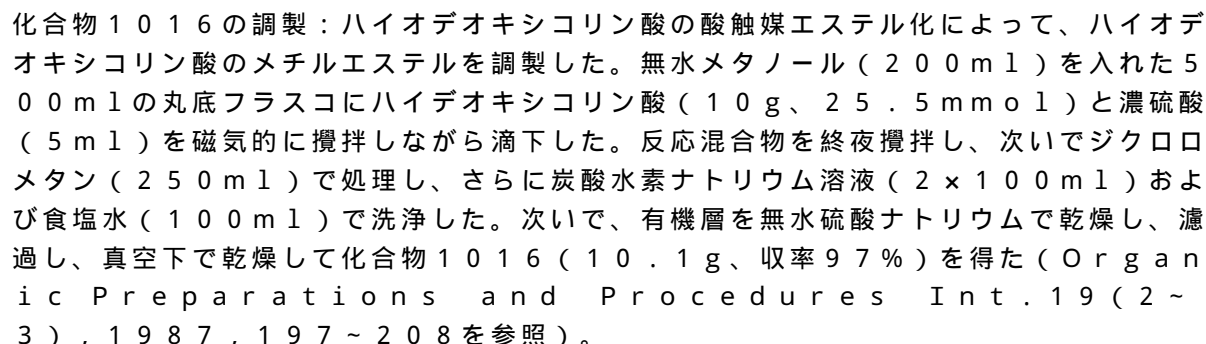
30



前駆体の調製：



40



化合物 1017 の調製：ハイドオキシコリン酸メチルを塩化クロム酸ピリジニウムで酸化することによって、3, 6 - ジオキソステロールを調製した。化合物 1016 (10.1 g、25 mmol) をジクロロメタン (200 ml) に溶解した。氷浴中で磁気的に攪拌中のフラスコに、塩化クロム酸ピリジニウム (33 g、150 mmol) を添加した。反応混合物を室温にまで加温し、生成物が TLC 上で見られるまで 8 時間反応を継続した。真空下でジクロロメタンの大部分を除去し、次いで酢酸エチル (250 ml) をフラスコに添加した。フラスコの底に存在するクロムの外皮をへらで壊し、フラスコの内容物をセライト (Celite) カラムで濾過した。次いで、カラムからの溶出物を真空下で容量を減らし、フロリジル (florisil) カラム (酢酸エチルで溶出) で濾過した。再び溶出物を約 200 ml まで容量を減らし、ジエチルエーテル (100 ml) を添加してから、炭酸水素ナトリウム (2 x 250 ml)、次いで食塩水 (250 ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、真空下で乾燥した。再結晶をする前のメチル 3, 6 - ジオキソ - 5 - コラン - 24 - オエート 1017 の総収量は 9.6 g (24 mmol、96%) であった (Organic Preparations and Procedures Int. 19 (2~3), 1987, 197~208 を参照)。クロムが残存している場合には、多数の溶媒 (無水メタノール、酢酸エチルのヘキサン溶液またはジエチルエーテルのヘキサン溶液) で生成物を再結晶してもよい。

化合物 1018 の調製：5 ステロールの酸触媒異性化によって、3, 6 - ジオキソ - 5 ステロールを調製した。メタノール (250 ml) に、3, 6 - ジオキソ - 5 ステロール 1017 (9.6 g、24 mmol) とテトラヒドロフラン (25 ml) を添加して、ステロールを完全に溶解した。濃塩酸 (12.5 ml) を加え、反応を終夜進行させた。次いで、真空下で溶媒を除去して、9.6 g (収率 100%) のメチル 3, 6 - ジオキソ - 5 - コラン - 24 オエート 1018 (Organic Preparations and Procedures Int. 1987 年 19 巻 (2 ~ 3 号)、197 ~ 208 ページ参照；著者は HCl ではなくナトリウムメトキシドを使用して塩基触媒異性化を使用した) を得た。

化合物 1019 の調製：種々の方法を使用して、メチル 3, 6 - ジオキソ - 5 a - コラン - 24 - オエート 1018 の単保護を実施することができる。1つの方法は、触媒の p - トルエンスルホン酸の存在下にて、化合物 1018 (9.6 g、23.8 mmol) のトルエン溶液 (250 ml) とエチレングリコール (1.77 g、28.5 mmol) とを還流することを含む。トルエン/水共沸混合物を除去するためにディーンスタークトラップ (Dean Stark trap) を使用した。約 20 分後に TLC によって反応が終了したと判断した。砕氷を加えた炭酸水素ナトリウム溶液 (500 ml) にトルエン溶

液をそそぐことによって反応を停止させた。有機層を追加の炭酸水素ナトリウム (200 ml) と食塩水 (200 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、真空下で乾燥した。粗精製物をシリカゲル (4 cm × 25 cm、33% 酢酸エチルのヘキサン溶液で溶出) を用いてクロマトグラフィーを行った。メチル 3 - ジオキソラン - 6 - オキソ - 5 - コラン - 24 - オエート 1019 (8.9 g、81%) はカラムから 2 番目のバンドとして溶出する；他に存在した唯一の生成物は低極性のジ - ジオキソランであった。続いての方法は選択性をあきらかに増大させるもので、トルエンの代わりにベンゼンを使用し、TLC で反応を追跡することによって、さらによりよい結果を得た。低沸点溶媒中で重大な二保護が生じる前に反応を停止させることができる。化合物 1019 : m.p. 124 ~ 126 ; ^1H -NMR (200 MHz、 CDCl_3) : 4.04 ~ 3.93 (m、4H)、3.68 (s、3H)、0.95 (d、 $J = 6\text{ Hz}$ 、3H)、0.78 (s、3H)、0.69 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 2945、1742、1709、1439、1381、1313、1162、1090 ; MS (FD) : 446 (M^+)、388。

10

化合物 1020 の調製：ボロハイドライドナトリウムと反応させることによって、単保護されたジケトンから高収率で 6 - ヒドロキシステロールを調製した。3 - ジオキソラン - 6 - オキソステロール 1019 (5 g、11 mmol) をテトラヒドロフラン (10 ml) に溶解し、ボロハイドライドナトリウム (2.5 g、66 mmol) を加えた無水メタノール (200 ml) に添加した。ボロハイドライドナトリウムを溶解し、約 20 ~ 30 分攪拌してからステロールを添加した。終夜攪拌後、反応混合物をクロロホルム (500 ml) で処理し、蒸留水 (2 × 200 ml)、次いで食塩水 (100 ml) で洗浄した。次いで、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、真空下で濃縮し、シリカゲル (4 cm × 25 cm、ヘキサン：酢酸エチル：塩化メチレン 2 : 1 : 1 で溶出) のフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、メチル 3 - ジオキソラン - 6 - ヒドロキシ - 5 - コラン - 24 - オエート 1020 (4.35 g、収率 87%) を得た。別の方法として、カラムクロマトグラフィーを必要とすることなしに、粗生成物をベンゼンのヘキサン溶液、酢酸エチルのヘキサン溶液、またはクロロホルムのヘキサン溶液 (2 ×) で再結晶して、高純度の生成物を得てもよい。化合物 1020 : m.p. 164 ; ^1H -NMR (200 MHz、 CDCl_3) : 4.04 ~ 3.93 (m、4H)、3.77 (br s、1H)、3.66 (s、3H)、1.03 (s、3H)、0.92 (d、 $J = 6\text{ Hz}$ 、3H)、0.69 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3533、2937、1726、1438、1379、1255、1191、1096 ; X線解析は予想された構造を示した。

20

30

化合物 1021 の調製：酸性アセトン溶液を使用して 3 - ジオキソランの保護基を除去した。3 - ジオキソラン - 6 - ヒドロキシ - ステロール 1020 (4.0 g、8.9 mmol) をアセトン (200 ml) に溶解し、濃塩酸溶液 (10 ml) で処理した。約 1 時間後、反応混合物を炭酸水素ナトリウム溶液中に注いだ。溶液をジクロロメタン (3 × 200 ml) で抽出し、蒸留水 (100 ml)、次いで食塩水 (100 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、真空下で蒸発して、メチル 3 - オキソ - 6 - ヒドロキシ - 5 - コラン - 24 - オエート 1021 (3.45 g、収率 100%) を得た： ^1H -NMR (200 MHz、 CDCl_3) : 3.8 (br m、1H)、3.69 (s、3H)、1.24 (s、3H)、0.95 (d、 $J = 6\text{ Hz}$ 、3H)、0.74 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3447、2954、1742、1707、1431。

40

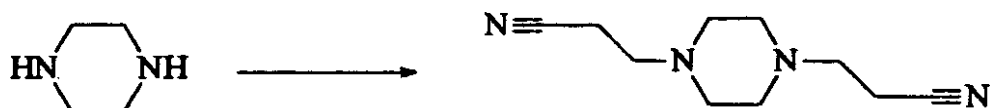
化合物 431 および 432 の調製：エチレン - ジアミン化合物を以下のように調製した。メタノール：テトラヒドロフラン 50 : 50 (100 ml) とエチレンジアミン (2 ml) とからなる溶液を磁氣的に攪拌させながら、酢酸で処理して、pH を約 6 まで低下させた。3 - オキソステロール 1021 (1.5 g、3.7 mmol) を添加して、混合物を 15 分間攪拌した。シアノボロハイドライドナトリウム (1 g、16 mmol) を 10 ml のメタノールに溶解し、反応容器に添加し、酢酸を添加することによって pH を再度 6

50

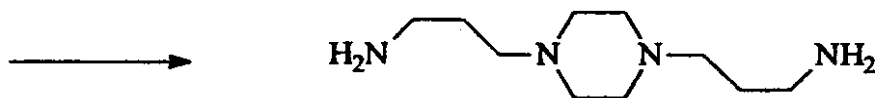
に調整した。反応物を1時攪拌し、フラスコの内容物を碎氷入りのpH10.5の炭酸塩緩衝液(250ml)中に注いだ。溶液をクロロホルム(5×150ml)で抽出した。有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、真空下で乾燥し、シリカゲル(4cm×25cm、クロロホルム：メタノール：イソプロピルアミン8：2：1で溶出)のフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、低極性の - 異性体431(260mg、収率15%)と高極性の - 異性体432(840mg、収率49%)を得た。化合物431：¹H-NMR(400MHz、CD₃OD)：3.74(m、1H)、3.65(s、3H)、3.53(m、1H)、1.06(s、3H)、0.94(d、J=6Hz、3H)、0.74(s、3H)；IR(KBr、cm⁻¹)：3426、2943、1740、1590、1438、1379、1258、1168、1027；MS(+FAB)：449.5(M+1)；C₂₇H₄₈N₂O₃ - 2HCl - 0.7H₂Oの分析計算値：C=60.70、H=9.70、N=5.24；実測値：C=60.97、H=9.68、N=5.34。化合物432：¹H-NMR(400MHz、CD₃OD)：3.75(m、1H)、3.64(s、3H)、1.02(s、3H)、0.94(d、J=6Hz、3H)、0.73(s、3H)；IR(KBr、cm⁻¹)：3560、3366、3257、2936、1726、1648、1605、1438、1376、1166、1047；MS(+FAB)：449.5(M+1)；C₂₇H₄₈N₂O₃ - 0.4H₂Oの分析計算値：C=71.13、H=10.79、N=6.14；実測値：C=71.15、H=10.71、N=6.28。

化合物465および466の調製：無水メタノール(100ml)を入れたフラスコを磁氣的に攪拌させながら、化合物1021(1.5g、3.7mmol)、スベルミン(2g、9.9mmol)、粉末3 シーブ(sieves)(2g)を添加し、pHが6になるまで酢酸を加えた。フラスコを密封し、内容物を終夜攪拌し、次いでシアノボロハイドライドナトリウム(1g、16mmol)のメタノール溶液(10ml)を添加した。酢酸でpHを再度調整し、反応混合物を8時間攪拌した。エチレンジアミン化合物と同様に反応を停止させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(5cm×25cm、クロロホルム：メタノール：イソプロピルアミン4：5：1で溶出)によって精製し、低極性の - アミノ異性体465と高極性の - アミノ異性体466を得た。アミノステロールの総収量は1.3g(収率58%)であった。化合物465：¹H-NMR(400MHz、CD₃OD)：3.75(m、1H)、3.65(s、3H)、3.54(m、1H)、1.06(s、3H)、0.95(d、J=6Hz、3H)、0.74(s、3H)；IR(KBr、cm⁻¹)：3406、2944、1740、1596、1466、1168、1049、1027；MS(+FAB)：591.4(M+1)；C₃₅H₆₆N₄O₃ - 4HCl - 1.2H₂Oの分析計算値：C=55.43、H=9.62、N=7.39；実測値：C=55.70、H=9.15、N=7.12。化合物466：¹H-NMR(400MHz、CD₃OD)：3.79(m、1H)、3.65(s、3H)、1.06(s、3H)、0.95(d、J=6Hz、3H)、0.74(s、3H)；IR(KBr、cm⁻¹)：3406、2944、1740、1595、1459、1381、1167、1051、1026；MS(+FAB)：591.4(M+1)；C₃₅H₆₆N₄O₃ - 4HCl - 1.2H₂Oの分析計算値：C=55.43、H=9.62、N=7.39；実測値：C=55.48、H=9.03、N=7.33。

化合物469の調製：この化合物は、化合物466に使用した方法と同様の方法で、ポリアミン1023を使用して調製した。



1022



1023

10

アクリロニトリルの2度添加によってピペラジンからポリアミンを調製し、化合物1022を得、ラニーニッケルで触媒した水素化によって還元した。 - アミノ異性体469：
¹H-NMR (400 MHz、CD₃OD) : 3.78 (m、1H)、3.64 (s、3H)、3.5~3.3 (m、8H)、3.2~3.0 (m、9H)、2.4~1.0 (m、30H)、1.03 (s、3H)、0.92 (d、J = 6 Hz、3H)、0.71 (s、3H)；IR (KBr、cm⁻¹) : 3406、2943、1736、1594、1443、1165；MS (+FAB) : 589.4 (M+1)；C₃₅H₆₄N₄O₃ - 4HCl - 3H₂Oの分析計算値：C = 53.29、H = 9.46、N = 7.10；実測値：C = 53.06、H = 8.90、N = 8.43。

20

化合物433および467の調製：遊離塩基としてのアミノステロールメチルエステル (1 mmol) の一定量を計量して25 mlの丸底フラスコに入れた。アミノステロールを最小量のテトラヒドロフラン (2 ml) に溶解し、1 N水酸化カリウム溶液 (10 ml) で処理して、1時間磁気的に攪拌した。次いで、溶液を1 N HClで中和し、溶媒を真空下で除去した。残留物を最小量の脱イオン水に溶解し、オクタデシル基を官能基とするシリカゲルカラム (Aldrich、2 × 10 cm、アセトニトリルを添加した2%トリフルオロ酢酸水溶液による濃度勾配溶出) に供した。アミノステロールを含む分画を収集し、溶媒を真空下で除去した。アミノステロールを0.1 N HClに再溶解し、溶媒を真空下で除去して (2 ×)、トリフルオロ酢酸を完全に除去した。結果として得られた塩酸塩にベンゼンを添加し、次いで終夜蒸発させて水をできる限り除去した。

30

エチレンジアミン - アミノ異性体433はHClでは処理せず、トリフルオロ酢酸塩として単離した。化合物433：¹H-NMR (400 MHz、CD₃OD) : 3.78 (m、1H)、1.06 (s、3H)、0.95 (d、J = 6 Hz、3H)、0.74 (s、3H)；IR (KBr、cm⁻¹) : 3533、3488、2941、1716、1679、1615、1489、1431、1191；MS (+FAB) : 435.5 (M+1)、531.5 (少量のトリフルオロアセタミドが含有されている可能性あり)；C₂₆H₄₆N₂O₃ - 2TFA - 0.7H₂Oの分析計算値：C = 53.36、H = 7.37、N = 4.15；実測値：C = 54.36、H = 7.45、N = 4.40。

40

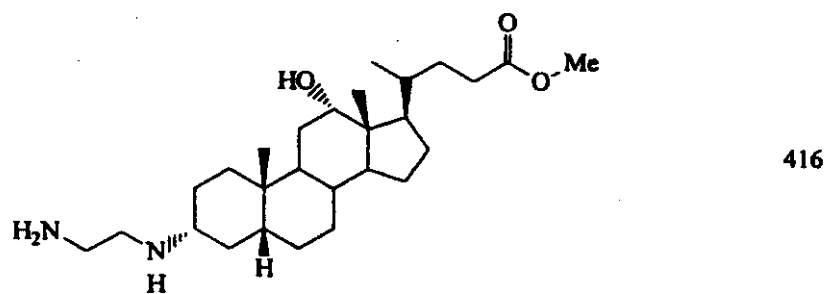
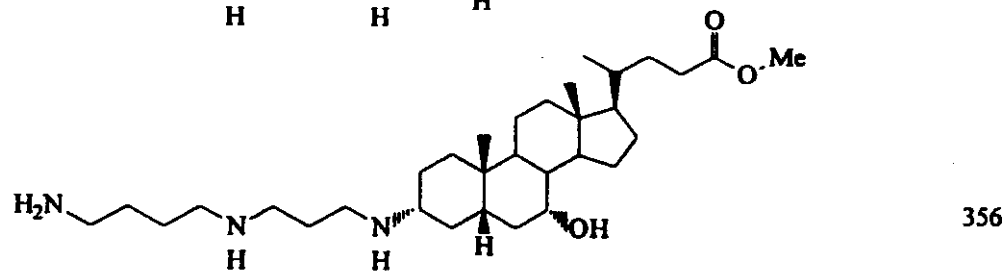
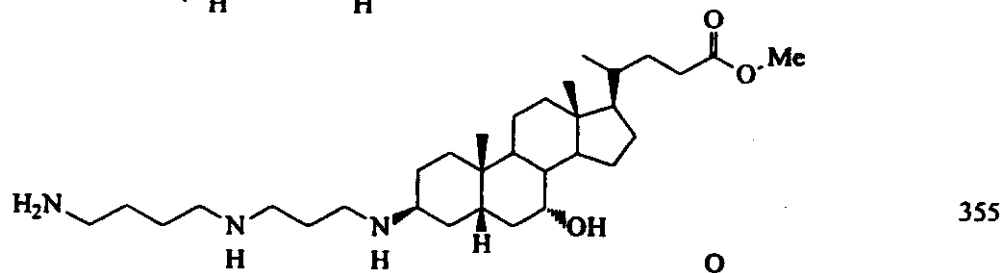
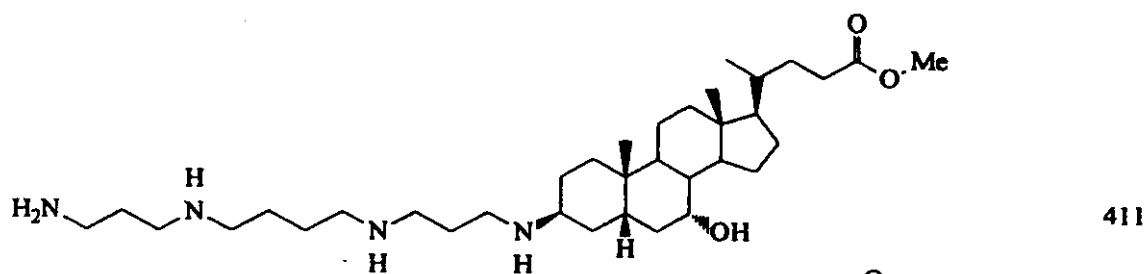
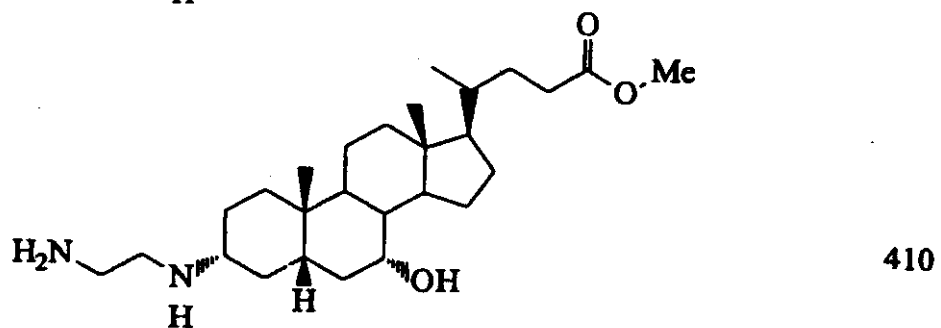
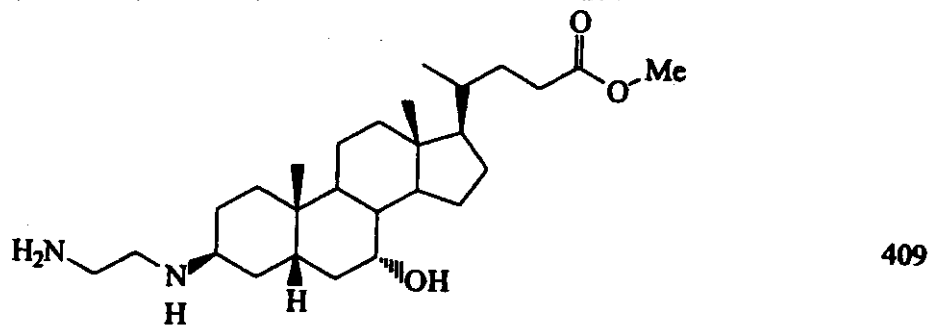
スベルミン - アミノ異性体467：¹H-NMR (400 MHz、CD₃OD) : 3.80 (m、1H)、1.05 (s、3H)、0.95 (d、J = 6 Hz、3H)、0.73 (s、3H)；IR (KBr、cm⁻¹) : 3406、2944、1718、1637、1458；MS (+FAB) : 577.4 (M+1)；C₃₄H₆₄N₄O₃ - 4HCl - 4H₂Oの分析計算値：C = 51.38、H = 9.64、N = 7.05；実測値：C = 51.40、H = 8.77、N = 7.01。

実施例 P

胆汁酸メチルエステル409、410、411、355、356、416、448、41

50

4、415、412、413、417および449の調製：





10



20

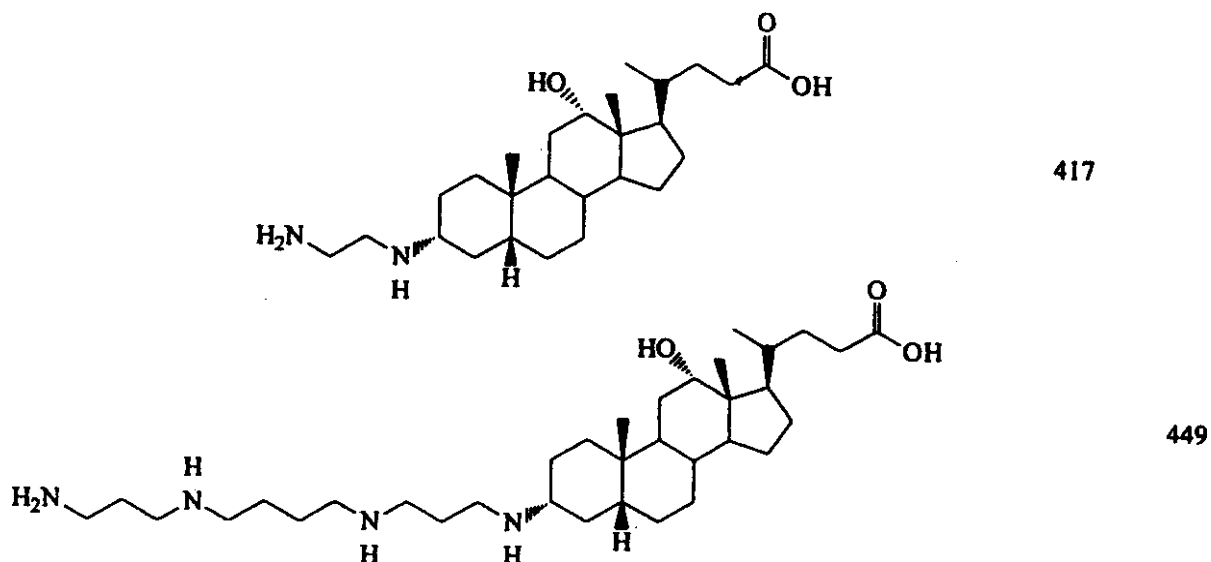


30

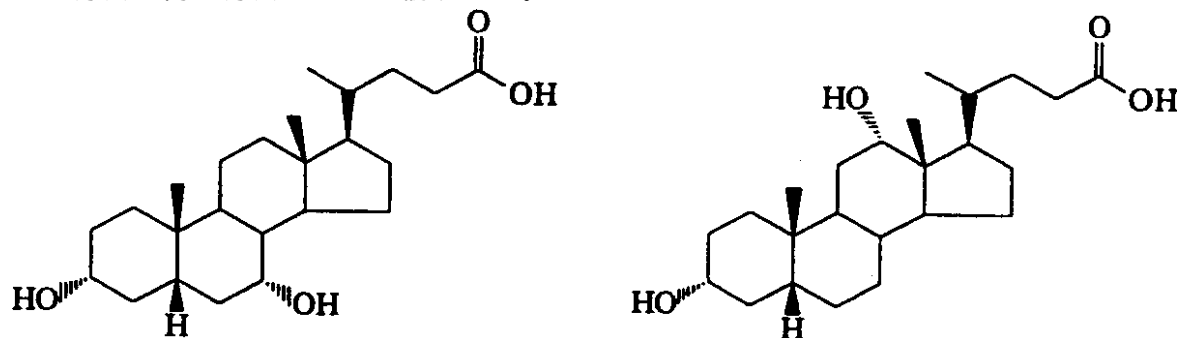


40





前駆体の調製：以下に構造を示すケノデオキシコール酸およびデオキシコール酸のメチルエステルについては、ヒデオキシコール酸を化合物 1 0 1 6 にエステル化するために用いた方法と同じ方法によって調製した。



ケノデオキシコール酸

デオキシコール酸

3 - ケトステロイドを調製するための胆汁酸エステルの炭酸銀酸化：適当なアミンを用いた 3 - オキシステロールの還元アミノ化によって、ケノデオキシコール酸誘導体およびデオキシコール酸誘導体を調製した。同様の方法によって 3 - オキシステロールを調製した。4 当量の硝酸銀を脱イオン水に溶解し、十分量のセライトを添加して、セライト上に 50 % 炭酸銀を付着させることによって、炭酸銀が付着したセライトを調製した。磁氣的に攪拌中の溶液に、脱イオン水に溶解した 2 . 2 当量の炭酸ナトリウム添加し、絶え間なく激しく攪拌した。結果として炭酸銀が付着したセライトをガラスフリットロートを通して濾過し、テトラヒドロフランで洗浄し、真空デシケータ中で乾燥させた。酸化する胆汁酸のメチルエステルをトルエンに溶解し、2 当量の炭酸銀付着セライトで処理し、水を共沸除去するために、ディーンスターク (Dean Stark) 装置を使用して加熱還流した。両ステロールについて、6 時間未満で酸化が終了した。両ステロールの合成において、生じた生成物は唯一所望の 3 - オキシステロールであった。溶液を濾過し、真空下で溶媒を除去した。両合成で得られた生成物を酢酸エチルのヘキサン溶液で簡単に再結晶し、高収率で (両合成において > 89 %) 3 - オキシステロールを得た。

化合物 4 0 9 および 4 1 0 の調製：ケノデオキシコール酸の 3 - オキシステロールメチルエステル (1 . 5 g、3 . 7 mmol) をメタノールに溶解し、10 倍の過剰量のエチレンジアミン (2 . 5 ml) に添加した。酢酸で pH を約 6 まで低下させ、メタノールに溶解した NaBH_3CN (1 g、15 . 9 mmol) を添加し、酢酸で pH を再び調整した。溶液を 1 時間攪拌し、次いで、化合物 4 3 1 と同様の方法で反応を停止させ、精製した。アミノステロールの総収率は 58 % で、 α -アミノ異性体と低極性 β -アミノ異性体と

のおおよその割合は7 : 3であった。 - アミノ異性体409 : ^1H -NMR (400 MHz、 CD_3OD) : 3.81 (m、1H)、3.68 (s、3H)、3.42 (m、1H)、1.04 (s、3H)、0.95 (d、6.5 Hz、3H)、0.72 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3428、2940、2055、1740、1591、1440、1377、1169、1077、984 ; MS (+FAB) : 449.3 (M+1) ; $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_3 - 2\text{HCl} - 1.2\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値 : C = 59.70、H = 9.72、N = 5.16 ; 実測値 : C = 59.59、H = 9.49、N = 5.15。 - アミノ異性体410 : ^1H -NMR (400 MHz、 CD_3OD) : 3.82 (m、1H)、3.65 (s、3H)、3.05 (br m、1H)、1.00 (s、3H)、0.94 (d、J = 6.5 Hz、3H)、0.72 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3522、2944、2017、1718、1619、1448、1377、1314、1282、1260、1163、1018 ; MS (+FAB) : 449.3 (M+1) ; $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_3 - 2\text{HCl} - 3.7\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値 : C = 55.13、H = 9.84、N = 4.76 ; 実測値 : C = 55.03、H = 9.32、N = 4.78。

化合物411の調製 : 以下の変更を除いて、エチレンジアミンと同じ方法でこのスペルミン化合物を調製した。ケノデオキシコール酸の3 - オキソステロールメチルエステル1 gと、スペルミン1 g (約2当量) を使用し、クロマトグラフィーはより極性の高い溶媒系 (すなわち、 CHCl_3 : メタノール : イソプロピルアミン 5 : 4 : 1) を使用した。アミノステロールの総収率は48%であった。 - アミノ異性体411との比は、分離が不完全であったために測定されなかった。化合物411 : ^1H -NMR (400 MHz、 CD_3OD) : 3.83 (m、1H)、3.65 (s、3H)、3.42 (m、1H)、1.04 (s、3H)、0.95 (d、J = 6.5 Hz、3H)、0.70 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3404、2946、2059、1739、1595、1458、1378、1168、1073、1012、985、759 ; MS (+FAB) : 591.4 (M+1) ; $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_3 - 4\text{HCl} - 4\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値 : C = 51.97、H = 9.72、N = 6.93 ; 実測値 : C = 51.65、H = 8.53、N = 6.77。

化合物355および356の調製 : シアノボロハイドライドナトリウムを用いてケノデオキシコール酸の3 - オキソステロールメチルエステルとポリアミン301とをカップリングさせ、トリフルオロ酢酸を用いてBOC基を除去し、化合物319の調製のようにエステルを加水分解した。シリカゲル (クロロホルム : メタノール : イソプロピルアミン 15 : 4 : 1 から 10 : 4 : 1) で精製した。低極性 - アミノ異性体355、 $\text{C}_{32}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_3$: ^1H -NMR (400 MHz、 CDCl_3) : 3.87 (m、1H)、3.68 (s、3H)、3.15 (m、1H)、3.0 ~ 2.7 (m、8H)、2.4 ~ 1.0 (m、32H)、0.99 (s、3H)、0.91 (d、J = 6 Hz、3H)、0.66 (s、3H) ; MS (DCI) : 534 (M+1)。高極性 - アミノ異性体356、 $\text{C}_{32}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_3 - 3\text{HCl}$: ^1H -NMR (400 MHz、 CD_3OD) : 3.82 (m、1H)、3.25 ~ 2.95 (m、9H)、2.5 ~ 1.0 (m、32H)、0.97 (s、3H)、0.94 (d、J = 6 Hz、3H)、0.69 (s、3H) ; MS (DCI) : 534 (M+1)。

化合物1416の調製 : デオキシコール酸誘導体を調製するために使用した方法は、ケノデオキシコール酸誘導体の調製に使用した方法と同じであった。エチレンジアミン化合物については、アミノステロールの総収率は62%で、 - アミノ異性体416と - アミノ異性体との比は4 : 1であった。化合物416 : ^1H -NMR (400 MHz、 CD_3OD) : 3.97 (m、1H)、3.68 (s、3H)、3.22 (br m、1H)、1.02 (d、J = 6.5 Hz、3H)、1.01 (s、3H)、0.73 (s、3H) ; IR (KBr、 cm^{-1}) : 3418、2940、1739、1616、1456、1379、1253、1169、1036 ; MS (+FAB) : 449.4 (M+1) ; $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_3 - 2\text{HCl} - 0.5\text{H}_2\text{O}$: C = 61.12、H = 9.69、N = 5.28 ; 実測値 : C = 61.20、H = 9.50、N = 5.07。

化合物 448 の調製：デオキシコール酸のスペルミン誘導体については、アミノステロールの総収率は 46% であった（反応停止が困難だったために低収率となった可能性が高い）。分離が不完全であったため、 α -アミノ異性体 448 と β -アミノ異性体との比は測定されなかった。化合物 448： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.98 (m, 1H)、3.67 (s, 3H)、1.01 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、1.01 (s, 3H)、0.73 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 2944、1738、1594、1451、1378、1169、1038、758; MS (+FAB): 591.5 ($M + 1$); $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 4\text{HCl} \cdot 2.3\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値: C = 54.02、H = 9.66、N = 7.20; 実測値: C = 54.00、H = 8.64、N = 7.22。

10

化合物 414 および 415 の調製：6-ヒドロキシ 433 の調製のようにメチルエステルから遊離酸を調製した。 α -アミノ異性体 414： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.83 (m, 1H)、3.06 (br m, 1H)、1.04 (s, 3H)、0.96 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、0.73 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 2940、2053、1709、1452、1378、1167、1076、1007、975; MS (+FAB): 435.5 ($M + 1$); $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値: C = 58.41、H = 9.62、N = 5.24; 実測値 C = 58.24、H = 9.40、N = 5.47。 β -アミノ異性体 415： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.83 (m, 1H)、3.47 (m, 1H)、1.06 (s, 3H)、0.95 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、0.73 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 3488、2935、2054、1709、1593、1499、1450、1246、1168、1077、1022、984; MS (+FAB): 435.5 ($M + 1$); $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ の分析測定値: C = 58.41、H = 9.62、N = 5.24; 実測値: C = 58.59、H = 9.35、N = 5.43。

20

化合物 412、413、417 および 449 の調製：上記の方法と同様の方法を使用してこれらの化合物を製造した。

α -アミノ 412： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.83 (m, 1H)、3.00 (br m, 1H)、1.04 (s, 3H)、0.96 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、0.74 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 3413、2942、2061、1710、1594、1460、1377、1167、1074; MS (+FAB): 577.7 ($M + 1$); $\text{C}_{34}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 4\text{HCl} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値: C = 53.19、H = 9.58、N = 7.30; 実測値: C = 53.27、H = 9.47、N = 7.32。

30

β -アミノ 413： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 3.8 (m, 1H)、3.4 (m, 1H)、1.05 (s, 3H)、0.96 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、0.73 (s, 3H); MS (+FAB): 577.7 ($M + 1$)。

デオキシコール酸エチレンジアミン 417 (α -アミノ異性体)： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 4.03 (m, 1H)、3.22 (br m, 1H)、1.03 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、1.00 (s, 3H)、0.74 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 2940、1706、1456、1379、1254、1034; MS (+FAB): 435.4 ($M + 1$); $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値: C = 57.45、H = 9.64、N = 5.15; 実測値: C = 57.32、H = 9.22、N = 5.13。

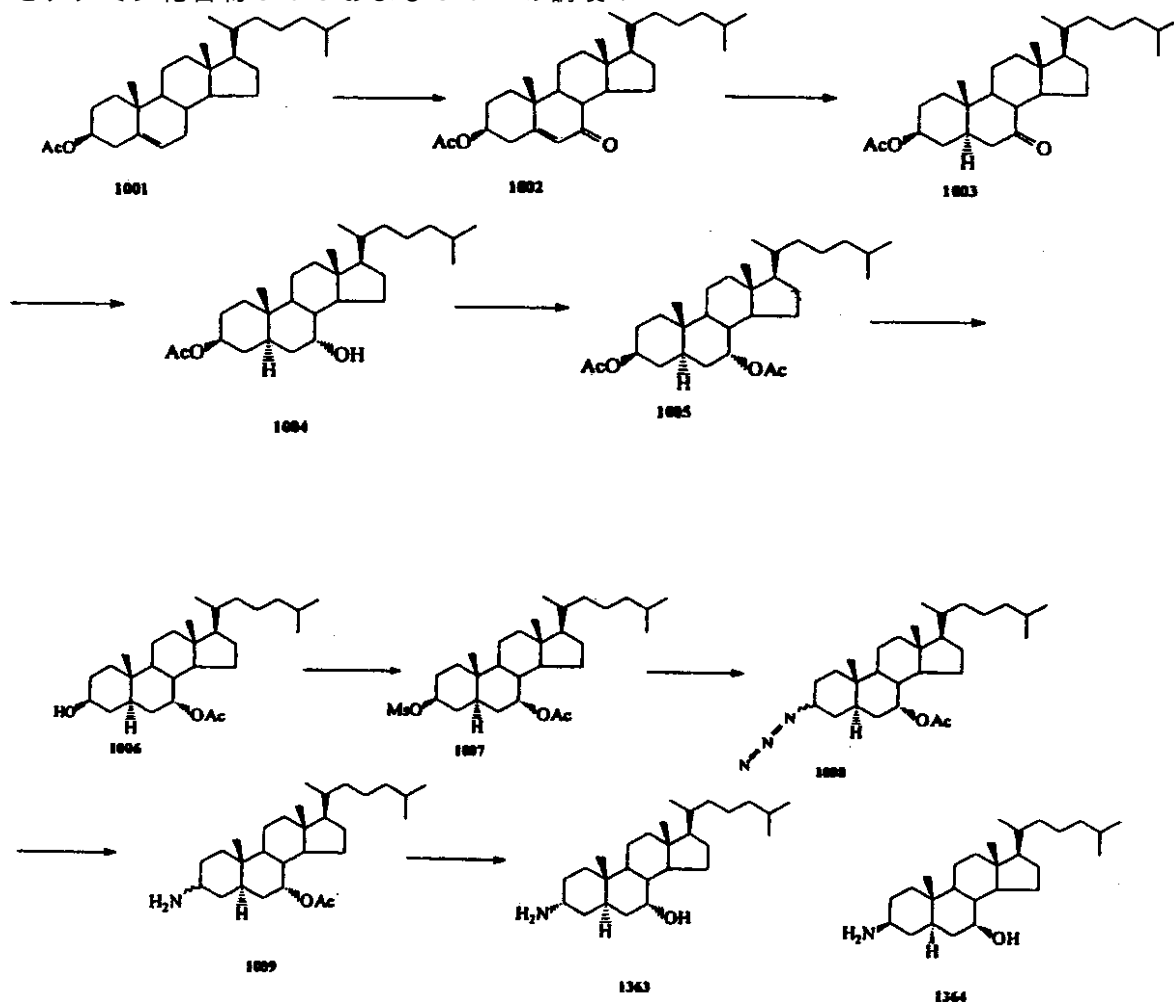
40

デオキシコール酸スペルミン 499 (β -アミノ異性体)： ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) : 4.02 (m, 1H)、1.04 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 3H)、1.00 (s, 3H)、0.75 (s, 3H); IR (KBr, cm^{-1}): 2941、1716、1448、1038; MS (+FAB): 577.4 ($M + 1$); $\text{C}_{34}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 4\text{HCl} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値: C = 54.57、H = 9.54、N = 7.47; 実測値: C = 54.31、H = 8.71、N = 7.80。

実施例 O

50

モノアミン化合物 363 および 364 の調製：



化合物 1002 の調製：三酸化クロム（72.6 g、660 mmol）のジクロロメタン（1000 ml）懸濁液に、-78℃にて 3,5-ジメチルピラゾール（63.4 g、660 mmol）を添加した。20 分後に、酢酸コレステリル（化合物 1001、24 g、56 mmol）を添加し、混合物を室温まで徐々に加温し、終夜攪拌した。反応混合物（0）5 N 水酸化ナトリウム溶液（280 ml）を添加し、混合物を 1 時間攪拌した。有機層を 2 N HCl、水および食塩水で洗浄した。溶媒を除去した後、粗生成物をクロマトグラフィー（6 cm、10% から 30% 酢酸エチルのヘキサン溶液）で溶出で精製し、出発物質（6.78 g）と化合物 1002（12.78 g、52%）を得た。¹H-NMR（200 MHz、CDCl₃）：5.71（s、1H）、4.7（br m、1H）、2.5~1.0（m、27H）、2.05（s、3H）、1.21（s、3H）、0.92（d、J = 6.5 Hz、3H）、0.86（d、J = 7 Hz、3H）、0.68（s、3H）。

化合物 1003 の調製：化合物 1002（14.32 g、32.3 mmol）の酢酸エチル溶液（1.4 l）に窒素を通気し、酸化白金（IV）（263 mg）で処理し、室温で 3 時間水素ガス（常圧）を通気した。セライトで濾過後、溶液を蒸発、フラッシュクロマトグラフィー（6 cm、0 から 20% 酢酸エチルのヘキサン溶液で濃度勾配溶出）で精製して、純粋な化合物 1003 を得た（10.86 g、収率 76%）。¹H-NMR（200 MHz、CDCl₃）：4.67（br m、1H）、2.4~1.0（m、29H）、2.02（s、3H）、1.10（s、3H）、0.90（d、J = 6.5 Hz、3H）、0.86（d、J = 6.5 Hz、6H）、0.65（s、3H）；IR（KBr、cm⁻¹）：2950、1730、1707、1471、1373、1264、1032；MS（+FAB）：445.7（M+1）。

化合物 1004 および 1005 の調製：化合物 1003（11.62 g、26.1 mmol）

1) のテトラヒドロフラン (THF) (500 ml) 溶液に 1 MK - セレクトライド (Selectride)^R (80 ml、80 mmol) の THF 溶液を室温で添加した。50 で 5 時間後、反応混合物を氷浴で冷却し、次いで 30% 過酸化水素 (45 ml) および飽和塩化アンモニウム溶液 (20 ml) で処理した。有機層を分離し、水層をエーテル (3 × 100 ml) で抽出し、有機層を合わせて、飽和炭酸水素ナトリウム、塩化アンモニウムおよび水で洗浄した。乾燥後、粗生成物をクロマトグラフィー (6 cm、0 から 30% 酢酸エチルのヘキサン溶液で濃度勾配溶出) によって精製し、化合物 1004 を得 (10.95 g、24.5 mmol)、ジメチルアミノピリジン (30.30 g、248 mmol) とともにジクロロメタン (200 ml) に溶解し、無水酢酸 (40 ml、424 mmol) で 19 時間処理した。この溶液にメタノール (150 ml) を添加し、溶媒を蒸発させた。残留物を酢酸エチルに溶解し、2 N 塩酸 (3 × 150 ml)、水 (100 ml)、飽和炭酸ナトリウム (3 × 100 ml) および食塩水 (2 × 100 ml) で洗浄した。有機層を乾燥し、蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (6 cm、0 から 20% 酢酸エチルのヘキサン溶液による濃度勾配溶出) によって精製し、化合物 1005 を得た (11.47 g、収率 90%)。¹H - NMR (200 MHz、CDCl₃) : 4.88 (m、1 H)、4.71 (br m、1 H)、2.08 (s、3 H)、2.02 (s、3 H) 2.0 ~ 1.0 (m、29 H)、0.92 ~ 0.83 (m、12 H)、0.64 (s、3 H) ; IR (KBr、cm⁻¹) : 2954、2867、1730、1468、1367、1257、1025 ; C₃₁H₅₂O₄ の分析計算値 : C = 76.18、H 10.72 ; 実測値 : C = 76.09、H = 10.56。

化合物 1006 の調製 : 化合物 1005 (10.85 g、22.2 mmol) およびシアニ化ナトリウム (1.20 g、24.4 mmol) のメタノール (420 ml) 溶液を室温で終夜攪拌し、次いで 10 時間還流した。溶媒を蒸発させ、残留物をジクロロメタン水溶液に溶解し、2 N 塩酸で酸性化した。ジクロロメタンで抽出後、有機層を食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて、化合物 1006 を得た (9.22 g、収率 92%)。¹H - NMR (200 MHz、CDCl₃) : 4.89 (m、1 H)、3.62 (br m、1 H)、2.07 (s、3 H)、2.0 ~ 1.0 (m、29 H)、0.90 (d、J = 6 Hz、3 H)、0.87 (d、J = 6.5 Hz、6 H)、0.82 (s、3 H)、0.64 (s、3 H) ; IR (KBr、cm⁻¹) : 3446、2935、1735、1469、1375、1245、1042、941 ; MS (+ES) : 470 (M + Na)。

化合物 1007、1008 および 1009 の調製 : 化合物 1006 (892 mg、2.0 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (20 ml) に窒素下 (-10 乃至 -5) で、トリエチルアミン (3 ml、22 mmol) およびメタンスルホニルクロライド (0.40 ml、5.2 mmol) のジクロロメタン (4 ml) 溶液を添加した。40 分後、混合物を 1 N 塩酸溶液 (100 ml) 中に注ぎ、有機層を分離した。ジクロロメタン (3 × 20 ml) で抽出後、有機層を 1 N 塩酸溶液 (30 ml)、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (30 ml) および食塩水 (2 × 30 ml) で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を蒸発させて、化合物 1007 を得、精製しないで次のステップに使用した。

粗精製 1007 をジメチルホルムアミド (50 ml) に溶解し、アジ化ナトリウム (2.0 g、31 mmol) で処理し、100 までの温度で 18 時間加熱した。冷却後、反応混合物を水 (250 ml) で希釈し、ジクロロメタン (3 × 150 ml) で抽出し、水 (3 × 100 ml) で洗浄し、乾燥し (Na₂SO₄)、濾過し、蒸発させて化合物 1008 を得、精製しないで次のステップで使用した。

化合物 1008 の無水テトラヒドロフラン (60 ml) 溶液を 1 M リチウムアンモニウムハイドライド (20 ml、20 mmol) で処理し、5 時間加熱還流した。氷浴で冷却後、混合物に水 (50 ml)、次いで 2 M 水酸化ナトリウム溶液 (200 ml) を添加した。水層をジクロロメタン (3 × 150 ml) で抽出し、次いで食塩水 (2 × 100 ml) および水 (50 ml) で洗浄した。乾燥した有機層を蒸発させて化合物 1009 を得、精製しないで次のステップに使用した。

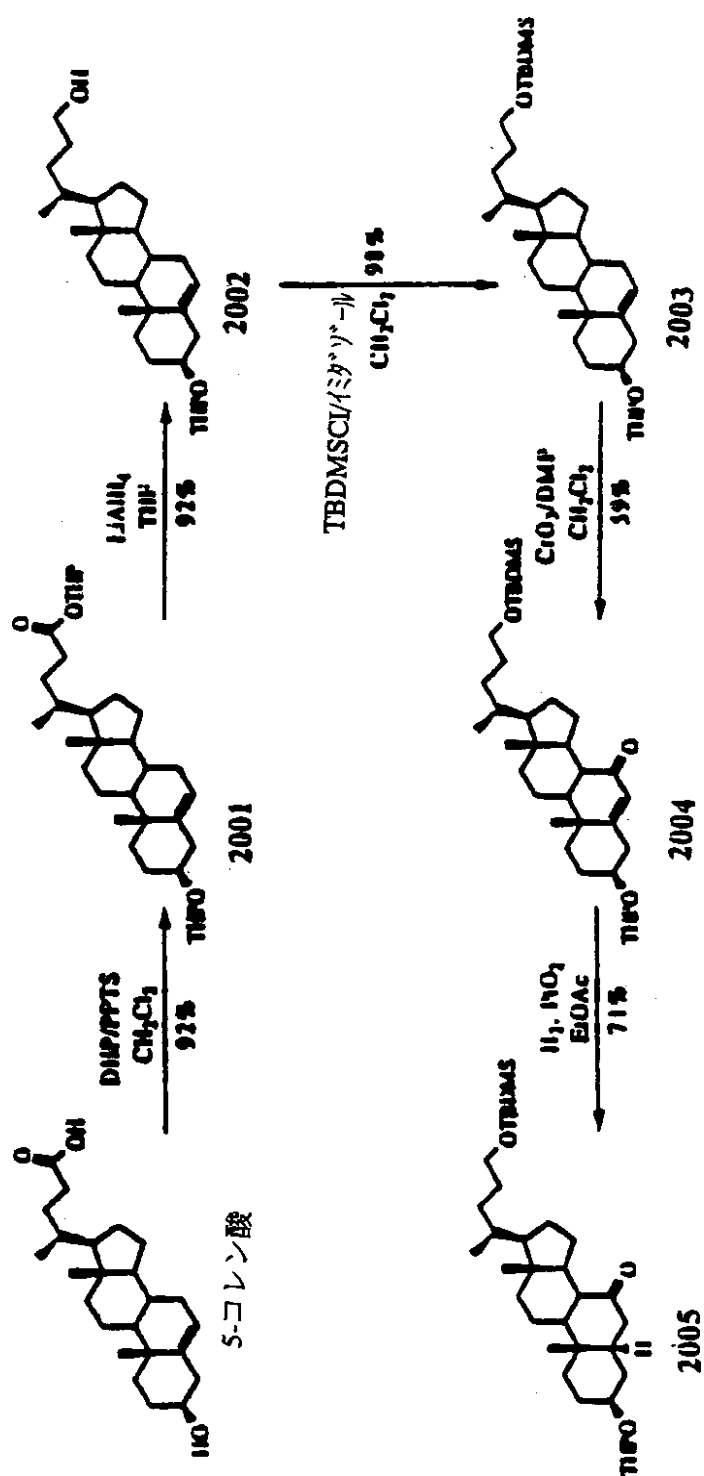
化合物 1363 および 1364 の調製：粗精製化合物 1009 をメタノール（40 ml）に溶解し、80 にて、2 N 水酸化ナトリウム溶液（40 ml）で 12 時間処理した。蒸発後、水を添加し（40 ml）、次いでジクロロメタン（3 × 60 ml）で抽出した。食塩水で洗浄後（3 × 50 ml）、有機層を乾燥し（ Na_2SO_4 ）、濾過し、蒸発した。フラッシュクロマトグラフィー（直径 2 cm、ジクロロメタン：メタノール：水酸化アンモニウム 95：4.5：0.5 で溶出）で精製して、化合物 1363（遅い溶出； ^1H -NMR（200 MHz、 CDCl_3 ）：3.82（m、1H）、3.19（m、1H）、2.0～1.0（m、29）、0.91（d、 $J = 6.5\text{ Hz}$ 、3H）、0.87（d、 $J = 6.5\text{ Hz}$ 、6H）、0.78（s、3H）、0.65（s、3）；IR（KBr、 cm^{-1} ）：3362，2931，1575，1467，1382；MS（+FAB）：404.4（ $M + 1$ ）、および化合物 1364（速い溶出； ^1H -NMR（200 MHz、 CDCl_3 ）：3.4（br m、1H）、3.2（m、1H）、2.0～1.0（m、29H）、0.91（d、 $J = 6.5\text{ Hz}$ 、3H）、0.86（d、 $J = 6.5\text{ Hz}$ 、6H）、0.80（s、3H）、0.68（s、3H）を得た。各化合物をメタノールに溶解して、1 N 塩酸のエーテル溶液の過剰量で処理し、蒸発させ、塩酸塩を得た。化合物 1363（646 mg、4 ステップの総収率 74%）： $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{NO} \cdot \text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ の分析計算値：C = 72.20、H = 11.44、N = 3.12；実測値：C = 72.40、H = 11.44、N = 3.26。化合物 1364（50 mg、4 ステップの総収率 6%）：MS（+FAB）：404.4（ $M + 1$ ）； $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{NO} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の分析計算値：C = 70.78、H = 11.44、N = 3.06；実測値：C = 71.02、H = 11.33、N = 3.35。

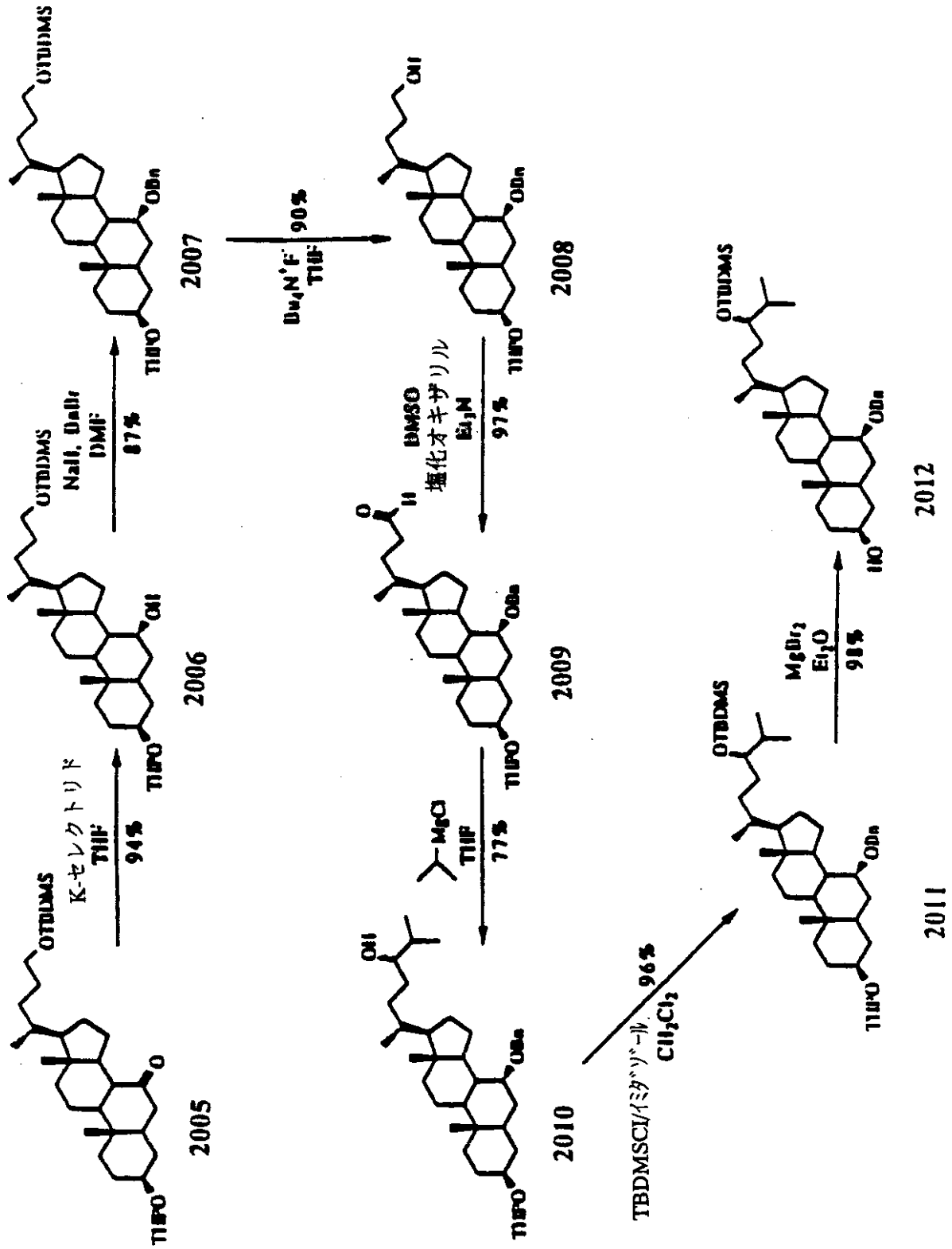
実施例 R

化合物 388 および 387 の調製：

10

20



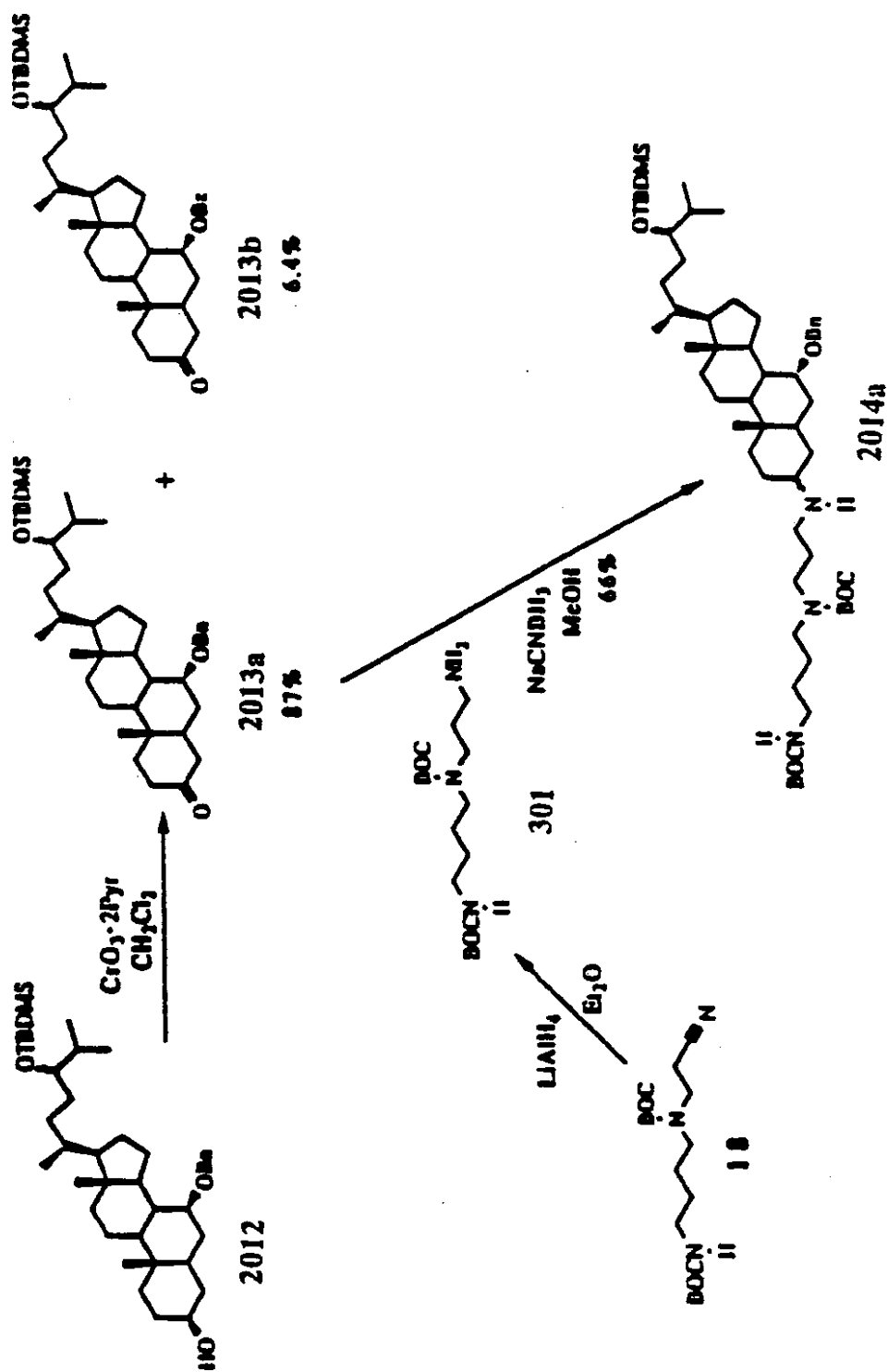


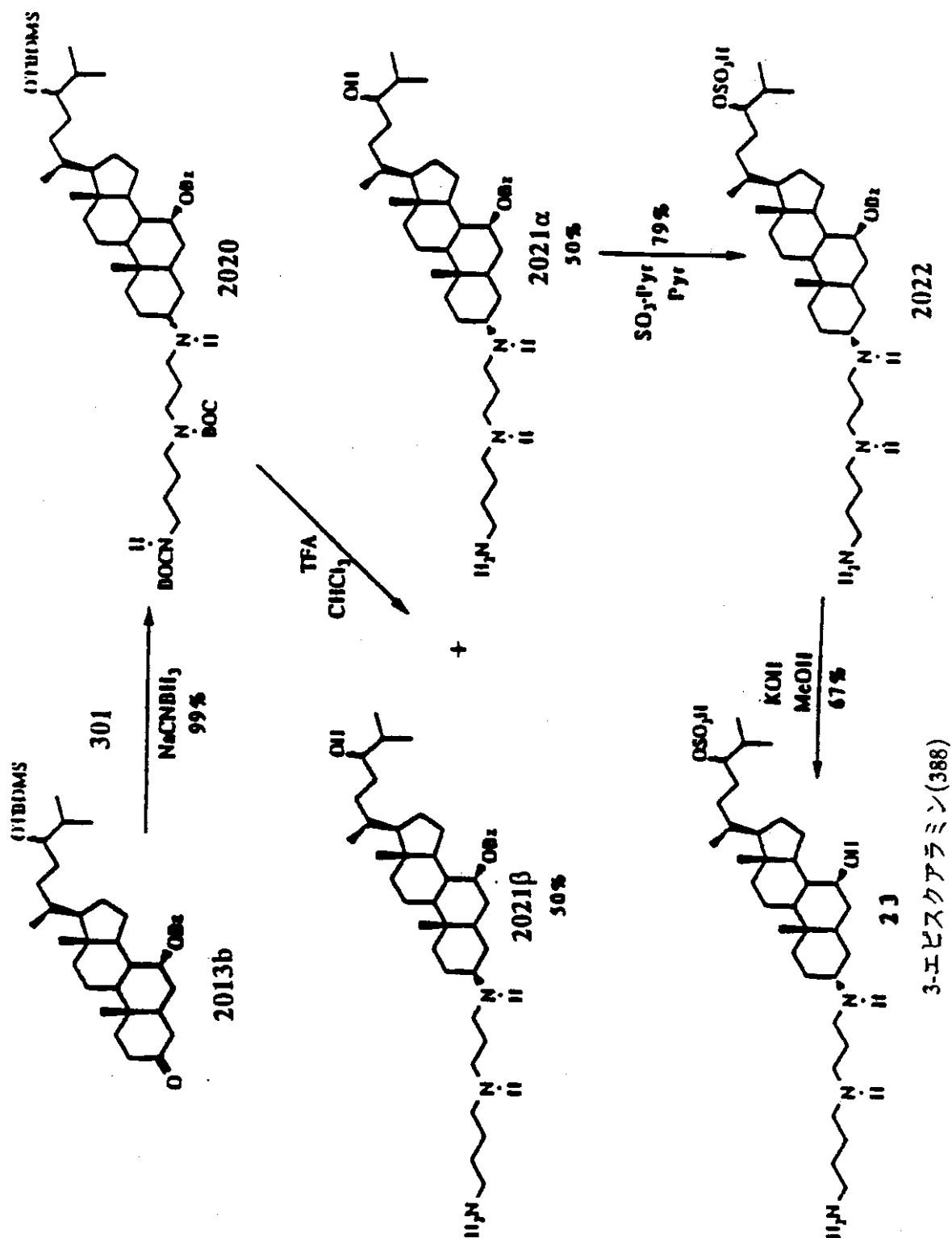
10

20

30

40





^1H -NMRスペクトルはバリアン (Varian) XL-200 (200 MHz) またはバリアンユニティ (Varian Unity) 500 (500 MHz) NMR スペクトロメーターで得た。赤外スペクトルはパーキンエルマー (Perkin Elmer) 298 スペクトロメーターで記録した。直接挿入プローブ (Direct insertion probe (DIP)) 化学的イオン化質量スペクトルデータは、ヒューレットパッカード (Hewlett Packard) HP 5087 GC-MS で得た。融点は、トーマスフーパー (Thomas Hoover) キャピラリー融点測定装置で測定され、補正は行わなかった。元素分析は、ニュージャージー州ホワイトハウスのクオンタティティブテクノロジー社 (Quantitative Technologies Inc.) によって実施された。FAB 質量スペクトルデータ (低分解能および高分解能) は

10

20

30

40

50

、ペンシルバニア州ウェストチェスターのエム・スキャン社 (M - S c a n I n c .) から入手した。

5 - コレン酸は、ステラロイズ (S t e r a l o i d s) 社から入手し、そのまま使用した。以下の試薬はアルドリッチケミカル社 (A i d r i c h C h e m i c a l C o m p a n y) から購入し、指示のない限りそのまま使用した：ジヒドロピラン (使用前に蒸留)、p - トルエンスルホン酸、水素化アルミニウムリチウム、t - ブチルジメチルシリルクロライド、イミダゾール、3 , 5 - ジメチルピラゾール、酸化白金 (I V)、トリ - s e c - ブチルボロハイドライドカリウム (K - S e l e c t r i d e^R、T F A 中 1 M)、過酸化水素 (30%)、水素化ナトリウム (鉱物油中 60%)、臭化ベンジル (使用前に蒸留)、フッ化テトラブチルアンモニウム (T H F 中 1 M)、塩化オキサリル、ジイソプロピルエチルアミン、ジメチルスルホキシド、(使用前に蒸留)、塩化イソプロピルマグネシウム (T H F 中 2 M)、臭化マグネシウム、シアノボロハイドライドナトリウム (T H F 中 1 M)、10%パラジウム炭素および硫黄トリオキシドピリジン複合体。T H F および E t₂O はナトリウム/ベンゾフェノンケテルから蒸留した。ピリジンは K O H から蒸留した。塩化メチレンおよびペンタンは C a H₂ から蒸留した。D M F は減圧下で B a O から蒸留した。メタノールは、使用前に 3 分子ふるい (m o l e c u l a r s i e v e s) で乾燥した。P P T S は、ミヤシタ (M i y a s h i t a) らの方法、ジャーナル オルガニック ケミストリー (J . O r g . C h e m .) 1977 年 42 巻 3772 ページ、によって調製された。分子ふるいは使用前にオープン (170) で終夜乾燥された。シリカゲル (E M S c i e n c e S i l i c a G e l 60 , 230 ~ 400 メッシュ) を全てのフラッシュクロマトグラフィーにおいて使用した。

3 - テトラヒドロピラニルオキコル - 5 - エン - 24 - オイックアシッド 24 - テトラヒドロピラニルエステル (2001) の調製：

5 - コレン酸 (7.58 g、20 mmol) は乾燥 C H₂ C l₂ (300 ml) 溶液中に懸濁させた。蒸留したジヒドロピラン (19.0 ml、200 ml) を添加し、次いで触媒量のピリジニウム p - トルエンスルホネート (1.1 g、4.0 mmol) を添加した。アルゴン下で懸濁液を室温にて、終夜攪拌した。この間にステロイドは溶液になった。得られた溶液を飽和 N H₄ C l 水溶液 (2 x)、飽和 N a H C O₃ 水溶液 (2 x)、飽和 N a C l 水溶液で洗浄した。有機層を無水 M g S O₄ で乾燥し、濾過し、真空下で溶媒を除去した。粗固形物をフラッシュクロマトグラフィー (S i O₂、ヘキサン / E t O A c (10 : 1)) によって精製し、化合物 2001 を白色固形物として得た (9.8 g、18.5 mmol、92%)。¹H - N M R (500 M H z、C D C l₃) : 5.96 (b r s、1 H、T H P エステルメチン H)、5.37 ~ 5.32 (m、1 H、C - 6 H)、4.72 (b r s、1 H、T H P エステルメチン H)、3.95 ~ 3.87 (m、2 H、T H P C H₂ O)、3.71 ~ 3.64 (m、1 H、T H P C H₂ O)、3.58 ~ 3.44 (m、2 H、T H P C H₂ O および C - 3 H)、1.01 (s、3 H、C - 19 H)、0.94 (d、J = 6.3 H z、3 H、C - 21 H)、0.68 (s、3 H、C - 18 H)。

3 - テトラヒドロピラニルオキシコル - 5 - エン - 24 - オール (2002) の調製：化合物 2001 (16.1 g、30 mmol) の無水テトラヒドロフラン (T H F、150 ml) 溶液、L i A l H₄ (5.5 g、145 mmol) の無水 T H F (200 ml) 懸濁液に添加した。懸濁液をアルゴン下で終夜、機械的攪拌子を用いて 0 にて攪拌した。得られた灰色のスラリーに、E t O A c を加え、次いで飽和 N a₂ S O₄ 水溶液を加えた。N a₂ S O₄ を添加している間に、白色の沈殿が形成し、溶液は透明になった。無水 N a₂ S O₄ を添加して、混合物を 15 分間攪拌し、次いで濾過した。濾過物を酢酸エチルで十分に洗浄し、濾液を真空下で濃縮した。結果として得られた固形物をフラッシュクロマトグラフィー (S i O₂、ヘキサン : E t O A c 5 : 1) によって精製し、化合物 2002 を白色固形物として得た (12.3 g、27.7 mmol、92%)。¹H - N M R (500 M H z、C D C l₃) : 5.37 ~ 5.32 (m、1 H、C - 6 H)、4.72 (b r s、1 H、T H P メチン H)、3.95 ~ 3.88 (m、1 H、T H F C H₂ O)、

3.62 ~ 3.47 (m, 4H, THF CH_2O および C-3H および C-24H)、
1.01 (s, 3H, C-19H)、0.93 (d, J = 6.6 Hz, C-21H)、0.
68 (s, 3H, C-18H); IR (CHCl₃) 3610、2900 cm⁻¹; MS
(CI/イソブタン) m/z 445 (M+1, 2%)。343 (M+1 - THPOH、10
0%) : m.p. 130 ~ 131。

24 - t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシコル - 5 -
エン (2003) の調製 :

化合物 2002 (7.6 g、17 mmol) の無水 CH₂Cl₂ (300 ml) 溶液を t -
ブチルジメチルシリルクロライド (TBDMSCl、1.0 M) とイミダゾール (0.5
M) の無水 CH₂Cl₂ (38.0 ml、38.0 mmol TBDMSCl) 溶液で処理し
た。溶液をアルゴン下で終夜室温にて攪拌した。得られた溶液を飽和 NaHCO₃ 水溶液
中に注ぎ、混合物を CH₂Cl₂ (3x) で抽出した。得られた固形物をフラッシュクロマ
トグラフィー (SiO₂、ヘキサン : EtOAc を 20 : 1 から 5 : 1 に濃度勾配させる
) によって精製し、化合物 2003 を得た (9.4 g、17 mmol、98%)。¹H -
NMR (500 MHz、CDCl₃) : 5.38 ~ 5.32 (m, 1H, C-6H)、
4.72 (br s, 1H, THPメチンH)、3.95 ~ 3.88 (m, 1H, THP
 CH_2O)、3.60 ~ 3.46 (m, 4H THP CH_2O および C-3H および C -
24H)、1.01 (s, 3H, C-19H)、0.93 (d, J = 6.6 Hz, C-2
1H)、0.89 (s, 9H, t - Bu)、0.67 (s, 3H, C-18H)、0.0
5 (s, 6H, TBDMSC CH_3) ; IR (CHCl₃) 2900 cm⁻¹; MS (CI/
イソブタン) m/z 559 (M+1, 1%)、474 (M+1 - THP、12%)、45
7 (M+1 - THPOH、18%)、343 (M+1 - THP - TBDMSCOH、6%)
、325 (M+1 - THPOH - TBDMSCOH、100%) ; m.p. 116 ~ 118
; C₃₅H₆₂O₃Si の分析計算値 : C = 75.21、H = 11.18 ; 実測値 : C = 7
5.37、H = 11.24。

24 - t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシコル - 5 -
エン - 7 - オン (2004) の調製 :

三酸化クロム (6.43 g、64.4 mmol) を無水 CH₂Cl₂ (100 ml) 中に懸
濁させた。アルゴン下で機械的に攪拌した懸濁液をドライアイス/アセトン浴中で - 78

まで冷却した。3, 5 - ジメチルピラゾール (6.18 g、64.4 mmol) を固形
物として懸濁液に添加し、混合物を - 78 にて 25 分間攪拌し、複合体を完全に形成さ
せた。次いで、化合物 2003 (3.10 g、5.37 mmol) を固形物として混合物
に添加し、反応混合物を徐々に室温にまで加温し、終夜攪拌した。次いで、混合物を 50
0 ml 丸底一頸フラスコに移し、シリカゲル (フラッシュグレード) を添加した。スラー
ーを柔らかい固形状になるまで濃縮し、湿潤させて充填したフラッシュカラム (SiO₂
) の上部にのせて、生成物をヘキサン : 酢酸エチル (30 : 1 から 15 : 1 から 6 : 1 か
ら 3 : 1 の濃度勾配) で溶出した。所望の生成物、化合物 2004 (1.80 g、59%
) を白色固形物として得た。¹H - NMR (500 MHz、CDCl₃) : 5.65 & 5
.63 (2s, 1H, C-6H)、4.70 ~ 4.64 (m, 1H, THPメチン)、3
.90 ~ 3.81 (m, 1H, THP CH_2O)、3.70 ~ 3.62 (m, 1H, C
- 3H または THP CH_2O)、3.57 (t, J = 6.6 Hz、2H, C-24H)
、3.52 ~ 3.46 (m, 1H, C-3H または THP CH_2O)、1.19 (s、
3H, C-19H)、0.93 (d, J = 6.3 Hz, C-21H)、0.90 (s, 9
H, t - ブチル)、0.68 (s, 3H, C-18H)、0.05 (s, 6H, TBDM
S CH_3) ; IR (CHCl₃) 2900、1650 cm⁻¹; MS (CI/イソブタン)
m/z 573 (M+1, 11%)、489 (M+1 - THP、100%) ; m.p. 11
8 ~ 120。

24 - t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシコル - 5
- コラン - 7 - オン (2005) の調製 :

化合物 2004 (1.0 g、1.75 mmol) を EtOAc (75 ml) に溶解し、酸

10

20

30

40

50

化パラジウム (IV) (0.012 g、0.049 mmol) を添加した。混合物を水素化装置 (常圧) に収容した。真空排気して、溶解している酸素を除去し、次いで水素を通気した。真空排気と水素通気工程を2回繰り返した。水素下、常圧下で反応物を2.5時間攪拌した。反応混合物をセライトで濾過し、真空下で濃縮した。粗精製物をフラッシュクロマトグラフィー (SiO₂、ヘキサン: EtOAc 20:1からの濃度勾配) によって精製し、化合物2005を白色固形物として得た (0.70 g、71%)。24-t-ブチルジメチルシリルオキシ-3-テトラヒドロピラニルオキシコル-5-コラン-7-オールを副産物として得た (21%)。 (注: この副産物は、コリン (Collins) 試薬を用いて64%の収率で所望のケトン2005に変換させることができた。)

化合物2005: ¹H-NMR (500 MHz、CDCl₃) : 4.73~4.66 (m、1H、THPメチンH)、3.95~3.85 (m、1H、THP-CH₂O)、3.66~3.52 (m、3H、THPCH₂OおよびC-24H)、3.50~3.45 (m、1H、C-3H)、1.08 (s、3H、C-19H)、0.91 (d、J = 6.6 Hz、C-21H)、0.89 (s、9H、t-Bu)、0.64 (s、3H、C-18H)、0.04 (s、6H、TBDMS-CH₃) ; IR (CHCl₃) 2900、1685 cm⁻¹ ; MS (CI/イソブタン) m/z 575 (M+1, 85%) 491 (M+1-THP、100%) ; m.p. 166~170 ; C₃₅H₆₂O₄Siの分析計算値: C = 73.12、H = 10.87 ; 実測値: C = 72.88、H = 10.78。

24-t-ブチルジメチルシリルオキシ-3-テトラヒドロピラニルオキシ-5-コラン-7-オール (2006) の調製:

K-セレクトリド (Selectride)^R (トリ-sec-ブチルボロハイドライドカリウム) (8.9 ml、THF中1M、8.9 mmol) を、室温にて、アルゴン下でケトン2005 (1.7 g、3.0 mmol) の無水THF溶液 (50 ml) にシリンジを介して滴下した。反応混合物を油浴中で50℃まで加熱し、5時間攪拌した。混合物を室温まで冷却し、次いで30% H₂O₂を、ガスの発生が停止するまで、滴下することによって、反応を停止した。飽和NH₄Cl水溶液を添加し、水溶液をEt₂Oで抽出した (3×)。有機層を合わせて飽和NaHCO₃水溶液 (2×)、蒸留水 (2×) および飽和NaCl水溶液で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥し、濾過し、溶媒を真空下で除去した。粗精製物をフラッシュクロマトグラフィー (SiO₂、ヘキサン: EtOAc 10:1) で精製し、アルコール2006を白色固形物として得た (1.6 g、94%)。 ¹H-NMR (500 MHz、CDCl₃) : 4.73~4.66 (m、1H、THPメチンH)、3.95~3.85 (m、1H、THP-CH₂O)、3.82 (s、1H、C-7H)、3.66~3.52 (m、3H、THPCH₂OおよびC-24H)、3.50~3.45 (m、1H、C-3H)、1.08 (s、3H、C-19H)、0.91 (d、J = 6.6 Hz、C-21H)、0.89 (s、9H、t-Bu)、0.64 (s、3H、C-18H)、0.04 (s、6H、TBDMS-CH₃) ; MS (CI/イソブタン) m/z 577 (M+1, 5%)、493 (M+1-THP、22%)、475 (M+1-THPOH、26%)、458 (M+1-THPOH-H₂O、38%)、343 (M+1-THPOH-TBDMSOH-H₂O、100%) ; IR (CHCl₃) 3430、2860 cm⁻¹ ; m.p. 130~133 ; C₃₅H₆₄O₄Siの分析計算値: C = 72.86、H = 11.18 ; 実測値: C = 72.69、H = 11.32。

7-ベンジルオキシ-24-t-ブチルジメチルシリルオキシ-3-テトラヒドロピラニルオキシ-5-コラン (2007) の調製:

炎で乾燥させた丸底フラスコに攪拌子を入れ、水素化ナトリウム (鉍物油中60%、28 mg、0.69 mmol) を添加し、しきりとガス導入針を備え、アルゴンを通気した。無水ペンタンで洗浄して (3×) 鉍物油を除去し、ペンタンを除去して水素化ナトリウムを粉末として得た。無水DMF (2.0 ml) を添加した。アルコール2006 (40 mg、0.069 mmol) の無水THF (2 ml) 溶液をシリンジを介して滴下した。反応混合物を終夜攪拌し、次いで油浴中で20分間40℃まで加熱した。蒸留直後の臭化ベ

ンジル (0.165 ml、1.38 mmol) を滴下し、反応混合物を 40 で 10 時間攪拌した。反応物を室温まで冷却し、溶媒を減圧下で除去した。フラスコを真空下に終夜放置し、残存する全ての DMF を除去した。粗精製物をフラッシュクロマトグラフィー (SiO₂、ヘキサン : EtOAc 50 : 1) によって精製し、化合物 2007 を白色固形物として得た (40 mg、0.060 mmol、87%)。EtOAc 濃度を増加させる濃度勾配によって、出発物質 (3 mg、8%) だけでなく、7 - ホルメート (1 mg、1%) を含む他の成分も回収された。化合物 2007 : ¹H - NMR (500 MHz、CDCl₃) 7.35 ~ 7.20 (m、5 H、ベンジル Ar - CH₂)、4.73 ~ 4.66 (m、1 H、メチン H)、4.535 (d、J = 12.0 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.53 (d、J = 12.0 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.26 (d、J = 12.2 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.245 (d、J = 11.8 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、3.95 ~ 3.85 (m、1 H、THP - CH₂O)、3.66 ~ 3.52 (m、3 H、THP - CH₂O および C - 24 H)、3.50 ~ 3.45 (m、1 H、C - 3 H)、1.08 (s、3 H、C - 19 H)、0.91 (d、J = 6.6 Hz、C - 21 H)、0.89 (s、9 H、t - Bu)、0.64 (s、3 H、C - 18 H)、0.04 (s、6 H、TBDMS - CH₃) ; MS (CI/イソブタン) m/z 668 (M + 1, 6%)、584 (M + 1 - THP、18%)、475 (M + 1 - THPOH 30%)、457 (M + 1 - THPOH - HOBn、58%)、343 (M + 1 - THP - HOBn - TBDMSOH、100%)、325 (M + 1 - THPOH - TBDMSOH - HOBn、83%)。

7 - ベンジルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシ - 5 - コラン - 24 - オール (2008) の調製 :

化合物 2007 (0.0527 g、0.079 mmol) の無水 THF (4 ml) 溶液を Ar 下でテトラブチルアンモニウムフルオライド (TBAF) (0.237 ml、THF 中 1 M、0.237 mmol) で処理した。出発物質が TLC によって確認されなくなるまで、溶液を攪拌した。溶媒を真空下で除去し、残留物を 5 ml CH₂Cl₂ 中にとり、5 ml 飽和 NaHCO₃ 溶液で洗浄し、水層を 5 ml CH₂Cl₂ で 2 回抽出した。有機層を合わせて無水 MgSO₄ で乾燥し、濾過し、溶媒を真空下で除去した。フラッシュクロマトグラフィー (SiO₂、ヘキサン : EtOAc 8 : 1) により、化合物 2008 (0.0395 g、90%) を白色泡状固形物として得た。¹H - NMR (500 MHz、CDCl₃) : 7.35 ~ 7.34 (m、5 H、ベンジル Ar - H)、4.71 ~ 4.69 (m、1 H、THP エーテルメチン H)、4.585 (d、J = 11.8 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.58 (d、J = 11.8 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.315 (d、J = 12.0 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、4.29 (d、J = 12.0 Hz、1/2 H、ベンジル - CH₂)、3.94 ~ 3.90 (m、1 H、THP OCH₂)、3.62 ~ 3.58 (m、3 H、C - 24 H および THPOCH₂)、3.50 ~ 3.48 (m、1 H、C - 3 H)、3.45 (s、1 H、7 - H)、0.92 (d、J = 6.6 Hz、3 H、C - 21 H)、0.81 (s、3 H、C - 19 H)、0.63 (s、3 H、C - 18 H) (注 : 生成物はジアステレオマー混合物である) ; IR (CHCl₃) 3600、2900 cm⁻¹ ; MS (CI/イソブタン) m/z 554 (M + 1、2%)、361 (M + 1 - THP - HOBn、42%)、343 (M + 1 - THP - HOBn、H₂O、100%) ; m.p. 52 ~ 56 ; C₃₆H₅₆O₄ 分析計算値 : C = 78.21、H = 10.21 ; 実測値 : C = 77.93、H = 10.39。

7 - ベンジルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシ - 5 - コラン - 24 - アール (2008) の調製 :

DMSO (0.01 ml、0.14 mmol) の CH₂Cl₂ (0.1 ml) 溶液を、攪拌中のオキサリルクロライド (0.008 ml、0.0917 mmol) の無水 CH₂Cl₂ (2 ml) 溶液に - 78 で、無水条件下で (乾燥管) 滴下した。この溶液を - 78 で 15 分間攪拌した、次いでステロイド 2008 (0.0234 g、0.0423 mmol) の無水 CH₂Cl₂ (0.5 ml) 溶液を滴下し、溶液を - 78 で 40 分間攪拌した。

ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.08 ml、0.458 mmol) を添加し、溶液を 30 分間攪拌しながら 0 まで加温した。飽和 NaHCO_3 水溶液 (5 ml) を添加し、溶液を 5 ml CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。有機層を合わせて、5 ml の飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、溶媒を真空下で除去した。フラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、ヘキサン： EtOAc 10：1) によって、化合物 2009 (0.0226 g、97%) を白色泡状固形物として得た。 ^1H -NMR (500 MHz、 CDCl_3) : 9.76 (s、1H、C-24H)、7.35~7.34 (m、5H、ベンジル Ar-H)、4.71~4.69 (m、1H、THPエーテルメチンH)、4.59 (d、 $J = 11.8 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、4.585 (d、 $J = 11.8 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、4.30 (d、 $J = 12.0 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、4.29 (d、 $J = 12.0 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、3.95~3.89 (m、1H、THPOC CH_2)、3.63~3.58 (m、3H、C-24HおよびTHPOC CH_2)、3.50~3.47 (m、1H、C-3H)、3.45 (s、1H、7-H)、2.49~2.42 (m、1H、C-23H)、2.37~2.31 (m、1H、C-23H)、0.958 (d、 $J = 6.5 \text{ Hz}$ 、3H、C-21H)、0.81、(s、3H、C-19H)、0.63 (s、3H、C-18H) (注：生成物はジアステレオマー混合物である)；IR (CHCl_3) 2900、1700 cm^{-1} ；MS (CI/イソブタン) m/z 552 ($M+1$ 、0.4%)、465 ($M+1$ -THP、3%)、449 ($M+1$ -THPO、14%)、375 ($M+1$ -THP-Bn、7%)、359 ($M+1$ -THP-HOBn、68%)、341 ($M+1$ -THP-HOBn- H_2O 、100%)； $m.p.$ 50~54； $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}$ の分析計算値：C = 78.50、H = 9.88；実測値：C = 78.11、H = 10.04。

7 - ベンジルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシコレスタン - 24 - オール (2010) の調製：

化合物 2009 (0.374 g、0.679 mmol) の無水 THF (10 ml) 溶液をアルゴン下、室温にて、塩化イソプロピルマグネシウム (2 ml、THF 中で 2 M、5.43 mmol) で処理した。出発物質が TLC 上で消失するまで、反応液を攪拌した。 NH_4Cl 水溶液 (10%、15 ml) を添加して、反応を停止し、真空下で THF を除去した。蒸留水 (5 ml) を添加して、溶液を 15 ml CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。有機層を合わせて、飽和 NaCl 水溶液 (15 ml) で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、溶媒を真空下で除去した。フラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、ヘキサン： EtOAc 12：1) によって、化合物 2010 (0.3117 g、77%) を白色泡状として得た。 ^1H -NMR (500 MHz、 CDCl_3) : 7.35~7.34 (m、5H、ベンジル Ar-H)、4.71~4.69 (m、1H、THPエーテルメチンH)、4.585 (d、 $J = 11.9 \text{ Hz}$ 、1H、ベンジル- CH_2)、4.31 (d、 $J = 12.0 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、4.295 (d、 $J = 12.0 \text{ Hz}$ 、1/2 H、ベンジル- CH_2)、3.94~3.91 (m、1H、THP、OC CH_2)、3.50~3.48 (m、1H、C-3H)、3.45 (s、1H、C-7H)、3.32~3.31 (m、1H、C-24H)、0.81 (s、3H、C-19H)、0.63 (d、 $J = 2.4 \text{ Hz}$ 、3H、C-18H) (注：生成物はジアステレオマー混合物である)；IR (CHCl_3) 3605、2900 cm^{-1} ；MS (CI/イソブタン) m/z 595 ($M+1$ 、10%)、401 ($M+1$ -THP-Bn- H_2O 、25%)、385 ($M+1$ -THP-HOBn、 H_2O 、100%)； $m.p.$ 55~59； $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_4$ の分析計算値：C = 78.74、H = 10.50；実測値：C = 78.65、H = 10.54。

7 - ベンジルオキシ - 24 - t - ブチルジメチルシリルオキシ - 3 - テトラヒドロピラニルオキシコレスタン (2011) の調製：

化合物 2010 (0.050 g、0.084 mmol) の乾燥 CH_2Cl_2 (1 ml) 溶液を、t - ブチルジメチルシリルクロライド (TBDMSCl、0.5 M) とイミダゾール (1.0 M) の乾燥 CH_2Cl_2 (0.80 ml、0.40 mmol TBDMSCl) 溶液で処理した。反応液を室温、アルゴン気流下で 24 時間攪拌した。飽和 NaHCO_3 水溶

液 (5 m l) を添加して、溶液を 1 0 m l CH_2Cl_2 で 3 回抽出した。有機層を合わせて、1 0 m l 飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥した。濾過と真空下での溶媒除去に次いで実施した、フラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、ヘキサン : EtOAc 2 0 : 1) によって所望の生成物 2 0 1 1 (0 . 0 5 7 g、9 6 %) が白色固形物として得られた。 ^1H -NMR (5 0 0 M H z、 CDCl_3) : 7 . 3 5 ~ 7 . 3 4 (m、5 H、ベンジル Ar-H)、4 . 7 0 ~ 4 . 6 9 (m、1 H、THP エーテルメチン H)、4 . 5 9 (d、 $J = 12 . 0 \text{ Hz}$ 、1 H、ベンジル - CH_2)、4 . 3 1 5 (d、 $J = 12 . 0 \text{ Hz}$ 、1 / 2 H、ベンジル - CH_2)、4 . 3 1 (d、 $J = 12 . 0 \text{ Hz}$ 、1 / 2 H、ベンジル - CH_2)、3 . 9 4 ~ 3 . 9 1 (m、1 H、 THPOCH_2)、3 . 6 2 ~ 3 . 5 8 (m、1 H、 THPOCH_2)、3 . 5 0 ~ 3 . 4 8 (m、1 H、C - 3 H)、3 . 4 5 (s、1 H、C - 7 H)、3 . 3 7 ~ 3 . 3 5 (m、1 H、C - 2 4 H)、0 . 8 9 (d、 $J = 1 \text{ Hz}$ 、9 H、 $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ 、C - 2 4 位のジアステレオマー)、0 . 8 1 (s、3 H、C - 1 9 H)、0 . 6 2 (s、3 H、C - 1 8 H)、0 . 0 4 および 0 . 0 3 (2 s、6 H、 $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ 、ジアステレオトピックおよび/またはジアステレオマー) (注 : 生成物はジアステレオマー混合物である) ; IR (CHCl_3) 2 9 0 0 cm^{-1} ; MS (CI / イソブタン) m/z 7 0 9 ($M + 1$ 、2 0 %)、3 6 7 ($M + 1$ - THPOH - HOBn - TBDMSOH 、1 0 0 %) ; $m.p.$ 5 2 ~ 5 8 ; $\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_4\text{S}$ の分析計算値 : C = 7 6 . 2 1、H = 1 0 . 8 0 ; 観察値 C = 7 6 . 1 1、H = 1 0 . 8 1。

7 - ベンジルオキシ - 2 4 - t - ブチルジメチルシリルオキシコレスタン - 3 - オール (2 0 1 2) の調製 :

化合物 2 0 1 1 (0 . 0 5 7 g、0 . 0 8 0 3 m m o l) をアルゴン下で乾燥 Et_2O (3 m l) に溶解した。 MgBr_2 (0 . 1 4 2 g、0 . 7 7 1 m m o l) を個体として速やかに添加し、出発物質が TLC 上で消失するまで、混合物を攪拌した。 H_2O (1 0 m l) を添加し、混合物を 1 0 m l の Et_2O で 3 回抽出した。有機層を合わせて、無水 MgSO_4 で乾燥し、溶媒を真空下で除去した。フラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、ヘキサン : EtOAc 7 : 1) によって、化合物 2 0 1 2 (0 . 0 4 9 3 g、9 8 %) を白色泡状物として得た。 ^1H -NMR (5 0 0 M H z、 CDCl_3) : 7 . 3 6 ~ 7 . 3 5 (m、5 H、ベンジル Ar-H)、4 . 5 9 (d、 $J = 12 . 0 \text{ Hz}$ 、1 H、ベンジル - CH_2)、4 . 3 4 (d、 $J = 12 . 0 \text{ Hz}$ 、1 H、ベンジル - CH_2)、3 . 6 5 ~ 3 . 6 0 (m、1 H、C - 3 H)、3 . 4 7 5 (d、 $J = 2 . 4 \text{ Hz}$ 、1 H、C - 7 H)、3 . 4 0 ~ 3 . 3 6 (m、1 H、C - 2 4 H)、0 . 9 1 (d、 $J = 0 . 9 \text{ Hz}$ 、9 H、 $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ 、C - 2 4 位のジアステレオマー)、0 . 8 2 (s、3 H、C - 1 9 H)、0 . 6 5 (s、3 H、C - 1 8 H)、0 . 0 5 および 0 . 0 4 (s、6 H、 $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ 、ジアステレオトピックおよび/またはジアステレオマー) (注 : 生成物はジアステレオマーの混合物である) ; IR (CHCl_3) 3 6 0 0、2 9 0 0 cm^{-1} ; MS (CI / イソブタン) m/z 6 2 4 ($M + 1$ 、3 %)、5 0 1 ($M + 1$ 、3 %)、5 0 1 ($M + 1$ - OTHP 、6 %)、3 8 5 ($M + 1$ - OTHP - TBDMS 、6 8 %)、3 6 7 ($M + 1$ - THPOH - TBDMSOH 、1 0 0 %) ; $m.p.$ 5 5 ~ 5 8 ; $\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{O}_3\text{Si}$ の分析計算値 : C = 7 6 . 8 6、H = 1 0 . 9 7 ; 実測値 : C = 7 6 . 6 9、H = 1 0 . 8 7。

7 - ベンジルオキシ - 2 4 - t - ブチルジメチル - シリルオキシコレスト - 3 - オン (2 0 1 3 a) および 7 - ベンゾイルオキシ - 2 4 - t - ブチルジメチルシリルオキシコレスタン - 3 - オン (2 0 1 3 b) の調製 :

化合物 2 0 1 2 (0 . 2 2 9 g、0 . 3 6 6 4 m m o l) の無水 CH_2Cl_2 (3 0 m l) 溶液を、コーリンの (Collins) 試薬 (0 . 3 8 5 g、1 . 4 9 m m o l) で処理した。混合物を、アルゴン下、室温で終夜攪拌した。この時点で、出発物質は TLC によって確認されなかった。セライトを添加し、混合物を 2 0 分間攪拌し、次いでセライドパッドで濾過した。残留物を CH_2Cl_2 で十分にすすいだ。溶媒を真空下で除去した。フラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、ヘキサン : EtOAc 2 0 : 1) によって、所

10

20

30

40

50

望の生成物 2013a (0.198 g, 87%) を白色固形物として、並びに 7 - ベンゾエート 2013b (0.015 g, 6.4%) を白色泡状物として得た。注：反応を高濃度で開始した場合には、ベンゾエートはさらに高収量で得られた。化合物 2013a：¹H - NMR (500 MHz, CDCl₃) : 7.35 ~ 7.27 (m, 5 H, ベンジル Ar - H)、4.55 (d, J = 11.7 Hz, 1 H, ベンジル - CH₂)、4.32 (d, J = 11.7 Hz, ベンジル - CH₂)、3.495 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, C - 7 H)、3.38 ~ 3.55 (m, 1 H, C - 24 H)、1.02 (s, 3 H, C - 19 H)、0.90 (d, J = 0.8 Hz, 9 H, SiC(CH₃)₃, C - 24 位のジアステレオマー)、0.67 (s, 3 H, C - 18 H)、0.04 および 0.03 (s, 6 H, Si(CH₃)₃, ジアステレトピックおよび/またはジアステレオマー) (注：生成物はジアステレオマーの混合物である)；IR (CHCl₃) 2900、1690 cm⁻¹；MS (CI/イソブタン) m/z 624 (M + 1, 50%)、534 (M + 1 - Bn, 7%)、518 (M + 1 - OBn, 36%)、492 (M + 1 - HOSi(Me)₂t-Bu, 28%)、383 (M + 1 - C₁₄H₃₀OSi, 100%)。化合物 2013b：¹H - NMR (500 MHz, CDCl₃) : 8.03 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, ベンゾエート Ar H)、7.59 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, Ar)、7.48 (t, J = 7.7 Hz, 2 H, Ar H)、5.20 (br s, 1 H, C - 7 H)、3.35 ~ 3.31 (m, 1 H, C - 24 H)、1.08 (s, 3 H, C - 19 H)、0.86 (d, J = 3.7, 9 H, SiC(CH₃)₃)、0.71 (s, 3 H, C - 18 H) (注：生成物はジアステレオマー混合物である)；IR (CHCl₃) 2900、1690 cm⁻¹；MS (CI/イソブタン) m/z 637 (M + 1, 3%)、516 (M + 1 - OBz, 16%)、382 (M + 1 - oBz - TBDMHSOH, 100%)；m.p. 62 ~ 65。

7 - ベンジルオキシ - 3 - (5, 10 - ジ - t - ブトキシカルボニル - 1, 5, 10 - トリアザデシル) - 24 - t - ブチルジメチルシリルオキシコレスタン (2014a) の調製：

化合物 2013a (0.07 g, 0.11 mmol) の混合物と、約 2 当量のアミノ化合物 301 (化合物 2018 から化合物 301 への還元で得られた収率 60% の生成物として) と、および 3 分子ふるい (0.5 g) の MeOH (6 ml, 3 分子ふるいは乾燥処理済み) 溶液とをアルゴン下で、室温にて 12 時間攪拌した。NaCNBH₃ (0.33 ml, THF 中 1 M, 0.33 mmol) を添加し、溶液をアルゴン下で、室温にて 24 時間攪拌した。混合物をセライトで濾過し、残留物を MeOH および CH₂Cl₂ で十分に洗浄し、溶媒を真空下で除去した。残留物を CH₂Cl₂ (10 ml) に溶解し、NaOH 水溶液 (5%) で塩基性にした H₂O 5 ml で 2 回洗浄し、飽和 NaCl 水溶液 5 ml で 2 回洗浄した。水層を合わせて、CH₂Cl₂ で逆抽出し、有機層を合わせて、無水 MgSO₄ で乾燥した。濾過、真空下での溶媒の除去、およびフラッシュクロマトグラフィー (SiO₂, CH₂Cl₂ 中 2% MeOH から CH₂Cl₂ 中 10% MeOH へ極性を増加させる濃度勾配) によって、所望の生成物 2014a (0.07 g, 66%) および t - BOC 基一つが脱離し、過剰のアミンが混合している高極性生成物、化合物 2014b を得た。化合物 2014a：¹H - NMR (500 MHz, CDCl₃) : 7.36 ~ 7.28 (m, H, ベンジル Ar - H)、4.63 (d, J = 12.0 Hz, 1/2 H, ベンジル - CH₂)、4.58 (d, J = 12.0 Hz, ベンジル - CH₂)、4.33 (t, J = 1.25 Hz, 1 H, ベンジル - CH₂)、3.49 (s, 1 H, c - 7 H)、3.46 ~ 3.14 (m, 8 H, N(BOC)CH₂ & C - 24 H)、2.91 ~ 2.86 (m, 2 H, NCH₂)、1.47 ~ 1.41 (m, 18 H, 2 × COC(CH₃)₃)、0.90 (s, 9 H, SiC(CH₃)₃)、0.84 (s, 3 H, C - 19 H)、0.64 (s, 3 H, C - 18 H)、0.05 および 0.04 (s, 6 H, Si(CH₃)₂, ジアステレトピックおよび/またはジアステレオマー) (注：この生成物はジアステレオマーの混合物)。

7 - ベンジルオキシ - 3 - (1, 5, 10 - トリアザデシル) コレスタン - 24 -

オール(2015)および7-ベンジルオキシ-3-(1,5,10-トリアザデシル)コレスタン-24-オール(2015)の調製:

TFA(1.8 ml、24 mmol)を化合物2014a(0.386 g、0.4 mmol)のCHCl₃(15 ml)溶液に室温で添加した。出発物質がTLCで確認されなくなるまで、反応物を撹拌した。真空下で溶媒を除去し、残留物を分取TLC(SiO₂、2000 μm、CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH 6:3:1、R_f=0.46)によって精製し、所望の3-生成物2015(0.122 g、48%)と3-異性体2015(0.109 g、43%)とを得た。化合物2015および2015を得る条件と同じ条件下で、化合物2014bをTFAで処理することが可能であった。化合物2015: ¹H-NMR(500 MHz、CD₃OD): 7.32~7.35(m、5H、ベンジル Ar-H)、4.57(d、J=11.7 Hz、1H、ベンジル-CH₂)、4.31(d、J=11.7 Hz、1H、ベンジル-CH₂)、3.52(s、1H、C-7H)、3.22~3.21(m、2H、C-24HおよびNCH₂)、2.86(t、J=7.1 Hz、2H、NCH₂)、2.81(t、J=6.6 Hz、2H、NCH₂)、2.74(t、J=7.0 Hz、2H、NCH₂)、2.67(t、J=6.3 Hz、2H、NCH₂)、0.85(s、3H、C-19H)、0.683(s、1.5H、C-18、C-34位のジアステレオマー)、0.678(s、1.5H、C-18、C-24位のジアステレオマー); MS(pos. FAB) m/z 638.6(M+1、100%)。化合物2015: ¹H-NMR(500 MHz、CD₃OD): 7.35~7.22(m、5H、ベンジル Ar-H)、4.61(d、J=11.4 Hz、1H、ベンジル-CH₂)、4.28(d、J=11.5 Hz、1H、ベンジル-CH₂)、3.53(s、1H、C-7H)、3.42(s、1H、C-3H)、3.24~3.20(m、2H、C-24HおよびNCH₂)、3.08~3.02(m、2H、NCH₂)、2.96(t、J=6.9 Hz、2H、NCH₂)、0.85(s、3H、C-19H)、0.691(s、1.5H、C-18、C-24位のジアステレオマー)、0.686(s、1.5H、C-18、C-24位のジアステレオマー); MS(pos. FAB) m/z 638.6(M+1)、100%)。

3-(1,5,10-トリアザデシル)コレスタ-7,24-ジオール(2016)の調製:

化合物2015(0.0128 g、0.02 mmol)の無水EtOH(8 ml)溶液に、触媒量の10% Pd/Cおよび2滴の濃塩酸を滴下した。混合物をパール(Parr)の水素化装置に配置し、55 psi(H₂)下で24時間振とうした。溶液をセライトパッドで濾過し、残留物をEtOHおよびMeOHで十分に洗浄し、溶媒を真空下で除去した。所望の精製物2016(0.0074 g、68%)を得た。生成物がTLCで不純物を含みなかった場合は、さらに精製することなしに使用した。TLCで不純物が観察された場合には、物質をフラッシュクロマトグラフィーによって精製した(SiO₂、CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH 15:4:1)。¹H-NMR(500 MHz、CD₃OD): 3.79(s、1H、C-7H)、3.22~3.13(m、6H、2×CH₂NおよびC-24HおよびC-3H)、3.09(t、J=7.4、2H、CH₂N)、2.99(t、J=7.3 Hz、2H、CH₂N)、0.87(s、3H、C-19H)、0.694(s、1.5H、C-18H、C-24位のジアステレオマー)、0.691(s、1.5H、C-18H、C-24位のジアステレオマー)。

スクアラミン(化合物1256)の調製:

化合物2016(0.0176 g、0.032 mmol)を濃塩酸のMeOH溶液(10 ml MeOH中濃塩酸1 ml)に溶解した。溶液を15分間撹拌し、真空下で溶媒を除去した。乾燥した粗生成物に、SO₃-ピリジン複合体(0.010 g、0.064 mmol)を添加し、フラスコにアルゴンを通気した。無水ピリジン(1 ml)を添加し、油浴中で溶液を80℃まで加温し、2時間撹拌した。MeOH(2 ml)を添加した。フラスコを油浴から出し、混合物を15分間撹拌した。真空下で溶媒を除去し、残留物をMeOHに懸濁し、セライトパッドで濾過した。残留物をMeOHで十分に洗浄した。フラッシ

10

20

30

40

50

クロマトグラフィー (SiO_2 、 CH_2Cl_2 : MeOH : NH_4OH 12 : 4 : 1) により、所望の生成物 1256 (0.0113 g、56%) を白色固形物として得た。 ^1H -NMR (500 MHz、 CD_3OD) : 4.13 ~ 4.10 (m、1H、C-24H)、3.79 (s、1H、C-7H)、3.22 ~ 3.10 (m、5H、 CH_2N)、3.08 (t、 $J = 6.7$ Hz、2H、 CH_2N)、2.98 (t、 $J = 6.8$ Hz、2H、 CH_2N)、0.87 (s、3H、C-19H)、0.70 (s、3H、C-18H) ; MS (pos. FAB) m/z 628.4 ($M+1$ 、57%)、548.5 ($M+1 - \text{SO}_3$ 、23%)、530.5 ($M+1 - \text{H}_2\text{SO}_4$ 、100%) ; 高分解能 MS (pos. FAB) m/z 628.4669 (計算値 : 628.4723)。

5, 10 - ジ - t - ブトキシカルボニル - 1, 5, 10 - トリアザデカン (301) の調製 :

ニトリル 2018 (0.0624 g、0.181 mmol) の無水 Et_2O (0.30 ml) 溶液を LiAlH_4 (0.024 g、0.63 mmol) の無水ジエチルエーテル (1 ml) 懸濁液に 0 において添加した。混合物を 0 にて 30 分間攪拌した。 NaOH 水溶液 (1 M) を添加して、過剰の LiAlH_4 を中和し、得られた白色の懸濁物をセライトパッドで濾過した。残留物を Et_2O で十分に洗浄し、有機層を合わせて、 H_2O で洗浄した。 H_2O 層を Et_2O で抽出し、エーテル層を合わせて、飽和 NaCl 水溶液で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、溶媒を真空下で除去した。粗生成物 301 (0.056 g、88%) の ^1H -NMR スペクトル (500 MHz) は、文献 (Tetrahedron 46, 1990, 3267 - 3286) に報告されているものと同じであり、この物質を精製しないで使用した。

7 - ベンゾイルオキシ - 3 - (5, 10 - ジ - t - ブトキシカルボニル) - 1, 5, 10 - トリアザデシル) - 24 - t - ブチルジメチルシリルオキシコレスタン (2020) の調製 :

化合物 2013a から化合物 2014a に転換させるために上記した方法を使用して、化合物 2013b (0.110 g、0.1726 mmol) を化合物 2020 (0.166 g、99%) に転換させた。 ^1H -NMR (500 MHz、 CDCl_3) : 8.19 (d、 $J = 7.6$ Hz、1/2 H、ベンゾエート - ArH)、8.05 (d、 $J = 7.4$ Hz、3/2 H、ベンゾエート - ArH)、7.61 ~ 7.58 (m、1H、ベンゾエート - ArH)、7.55 ~ 7.45 (m、2H、ベンジル Ar - H)、5.23 (s、1/4 H、C-7H)、5.16 (s、3/4 H、C-7H)、4.78 ~ 4.64 (m、1H)、3.40 ~ 3.22 (m、2H)、3.20 ~ 3.06 (m、3H、 NCH_2)、2.98 ~ 2.8 (m、4H、 NCH_2)、0.673 (s、1.5H、C-18、C-24 位のジアステレオマー)、0.667 (s、1.5H、C-18、C-24 位のジアステレオマー)。

7 - ベンゾイルオキシ - 3 - (1, 5, 10 - トリアザデシル) コレスタン - 24 - オール (2021) および 7 - ベンゾイルオキシ - 3 - (1, 5, 10 - トリアザデシル) コレスタン - 24 - オール (2021) の調製 :

化合物 2014a を化合物 2015 および 2015 に転換するために上記した同じ方法で、化合物 2020 (0.166 g、0.1717 mmol) を化合物 2021 および 2021 (3 および 3 生成物の 1 : 1 混合物の定量的収量) に転換した。化合物 2021 : ^1H -NMR (500 MHz、 CD_3OD) : 8.01 (d、 $J = 8.3$ Hz、2H、ベンゾエート - ArH)、7.61 ~ 7.59 (m、1H、ベンゾエート - ArH)、7.51 ~ 7.45 (m、2H、ベンジル Ar - H)、5.14 (s、1H、C-7H)、3.20 ~ 3.15 (m、1H)、2.90 ~ 2.75 (m、4H、 NCH_2)、2.72 (t、 $J = 6.9$ Hz、2H、 NCH_2)、2.65 (t、 $J = 6.7$ Hz、2H、 NCH_2)、0.85 (s、3H、C-19H)、0.726 (s、1.5H、C-18、C-24 位のジアステレオマー)、0.723 (s、1.5H、C-18、C-24 位のジアステレオマー) ; MS (pos. FAB) m/z 652.5 ($M+1$ 、100%)、530.5 ($M+1 - \text{HOBz}$ 、6%)。化合物 2021 : ^1H -NMR (

500 MHz、 CD_3OD) : 8.01 (d、 $J = 8.3 \text{ Hz}$ 、2H、ベンゾエート - ArH)、7.61~7.59 (m、1H、ベンゾエート - ArH)、7.51~7.45 (m、2H、ベンジル Ar - H)、5.12 (s、1H、C - 7H)、3.19~3.15 (m、1H)、2.86 (s、1H)、2.70~2.60 (m、4H、 NCH_2)、2.60~2.54 (m、2H、 NCH_2)、2.54~2.49 (m、2H、 NCH_2)、0.73 (s、3H、C - 24位のジアステレオマー) ; MS (pos. FAB) m/z 652.5 ($M+1$ 、100%)、530.5 ($M+1$ - HOBz、10%)。7 - ベンゾイルオキシ - 3 - (1, 5, 10 - トリアザデシル) コレスタン - 24 - 硫酸塩 (2022) の調製 :

化合物 2016 を化合物 2017 に転換するために上記した方法のように、化合物 2021 (0.0214 g、0.0328 mmol) を化合物 2022 (0.0190 g、79%) に転換した。 ^1H - NMR (500 MHz、 CD_3OD) : 8.21~8.14 (m、2H、ベンゾエート - ArH)、7.62~7.50 (m、2H、ベンゾエート - ArH)、5.18~5.09 (m、1H、C - 7H)、4.22~4.16 (m、1/2 H、C - 24H)、4.10~4.06 (m、1/2 H、C - 24H)、3.43 (br、s、1H、C - 3H)、3.22~3.10 (m、5H、 CH_2N)、3.09 (t、 $J = 7.5 \text{ Hz}$ 、2H、 CH_2N)、3.04 (br、s、2H、 CH_2N)、2.99~2.96 (m、2H、 CH_2N)、0.60 (s、3/2 H、C - 18H)、0.52 (s、3/2 H、C - 18H) (注：化合物は C - 24 位のジアステレオマーの混合物である)。

3 - エピスクアラミン (388) の調製 :

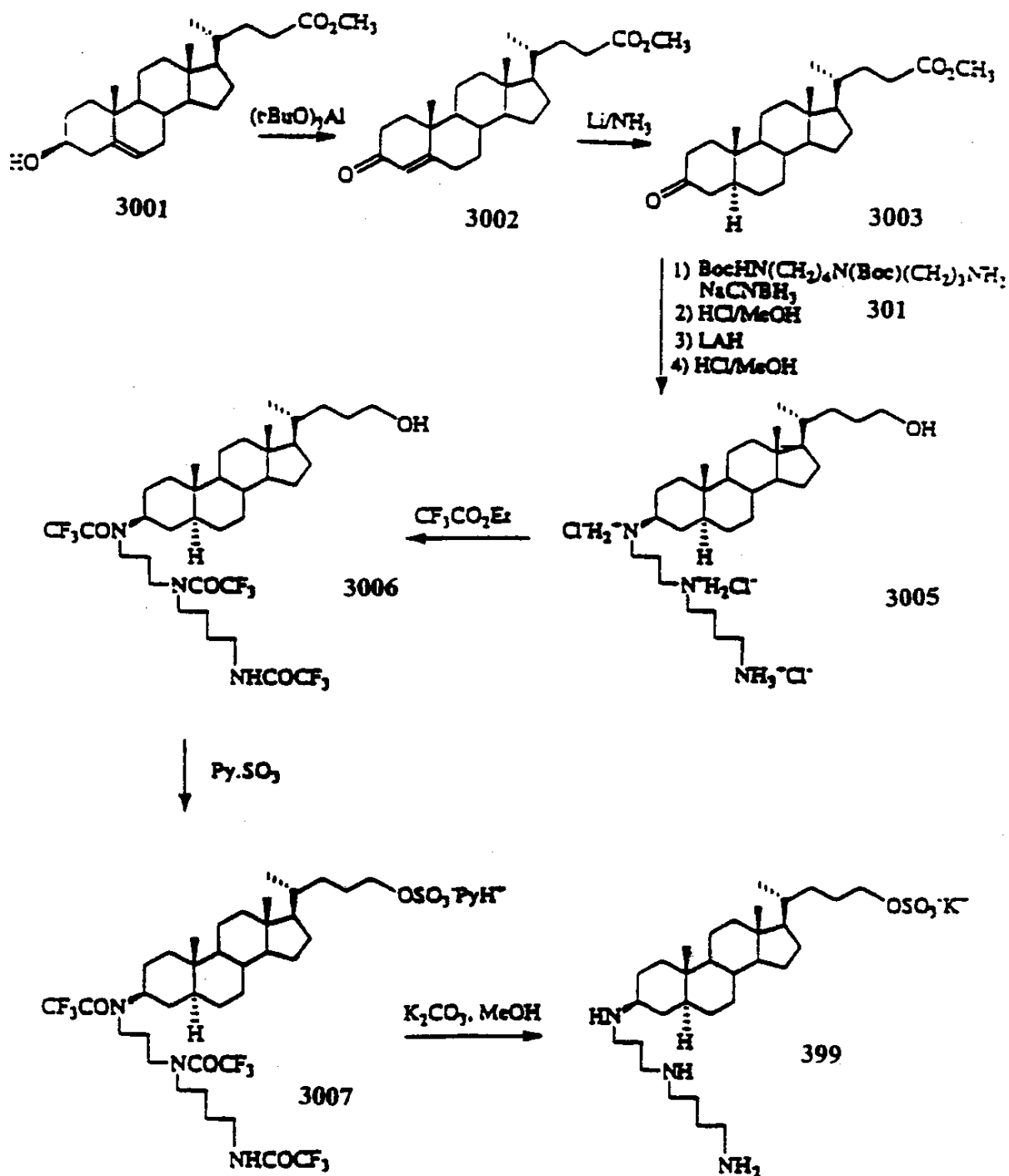
化合物 2022 (0.066 g、0.085 mmol) を KOH のメタノール溶液 (5%、% ml) に溶解し、7 時間還流した。TLC により出発物質が確認されなかった。濃塩酸の 5% (v/v) メタノール溶液による中和に次いで、溶媒除去およびフラッシュクロマトグラフィー (SiO_2 、 CH_2Cl_2 : MeOH : NH_4OH 12 : 4 : 1) により、所望の生成物 2023 (0.0365 g、67%) を得た。 ^1H - NMR (500 MHz、 CD_3OD) : 4.14~4.09 (m、1H、C - 24H)、3.80 (s、1H、C - 7H)、3.48 (s、1H、C - 3H)、3.24~3.15 (m、4H、 CH_2N)、3.10 (t、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ 、2H、 CH_2N)、3.01 (t、 $J = 7.1 \text{ Hz}$ 、2H、 CH_2N)、0.86 (s、3H、C - 19H)、0.69 (s、3H、C - 18H) ; MS (pos. FAB) m/z 628.5 ($M+1$ 、18%)、548.5 ($M+1$ - SO_3 、65%)、530.4 ($M+1$ - H_2SO_4 、100% ; 高分解能 MS (pos. FAB) m/z 628.4713 (計算値 : 628.4723)。

3 - エピスクアラミンデスルフェート (3 - (1, 5, 10 - トリアザデシル) コレスタン - 7 , 24 - ジオール、387) の調製 :

化合物 2015 を化合物 2016 に転換させるために上記したように、化合物 2015 (0.089 g、0.1397 mmol) を化合物 387 (0.0372 g、49%) に転換した。 ^1H - NMR (500 MHz、 CD_3OD) : 3.80 (s、1H、C - 7H)、3.48 (s、1H、C - 3H)、3.24~3.15 (m、4H、 CH_2N)、3.10 (t、 $J = 7.4 \text{ Hz}$ 、2H、 CH_2N)、3.00 (t、 $J = 7.3 \text{ Hz}$ 、2H、 CH_2N)、0.86 (s、3H、C - 19H)、0.69 (2s、3H、C - 18H)、MS (pos. FAB) m/z 548.5 ($M+1$ 、100%) ; 高分解能 MS (pos. FAB) 548.5162 (計算値 : 548.5155)。

実施例 S

化合物 399 の調製 :



3 - オキソ - 4 - コレン酸メチルエステル 3002 の調製 :

3 - ヒドロキシ - 5 - コレン酸メチルエステル 3001 (24.16 g、57.11 mmol) と、アンモニウムトリ - *t* - ブトキシド (56.27 g、228.43 mmol) と、イソプロピルメチルケトン (50 ml) の無水トルエン (150 ml) 溶液を攪拌し、120 °C まで (油浴) 6 時間加熱した。次いで、反応混合物を室温まで冷却し、トルエン (100 ml) で希釈し、2 N HCl (70 ml) で酸性化した。有機層を分離し、水層をトルエン (3 × 50 ml) で抽出した。有機層を合わせて、水 (1 × 50 ml)、飽和 NaHCO₃ (2 × 50 ml)、水 (1 × 50 ml)、食塩水 (1 × 50 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、真空下で蒸発させ、粗生成物を得た。トルエン、次いで酢酸エチル/ヘキサン (5、10、20 および 40 %) 溶媒系を使用した粗生成物のフラッシュクロマトグラフィーにより、不純物を含まない、白色固形物、3 - オキソ - 4 - コレン酸メチルエステル 3002 (13.43 g、60 %) を得た。¹H - NMR (400 MHz、CDCl₃) : 0.71 (3H、s、18 - CH₃)、0.90 (3H、d、21 - CH₃)、1.17 (3H、s、19 - CH₃)、3.66 (3H、s、CO₂

CH_3) および 5.71 (1H, s, 4-H)。

3-オキソ-5-コラン酸メチルエステル3003の調製:

3-オキソ-4-コレン酸メチルエステル3002 (13.0 g、23.68 mmol) の無水エーテル (50 ml) 溶液に、蒸留した液体アンモニア (70 ml) を -78 にて添加した。青色が10分間持続して発色するようになるまで、リチウム (1.0 g、144.1 mmol) を少量添加した。その後、溶液を固形の NH_4Cl (50 g) で中和した。アンモニアを蒸発させ、得られた残留物を水 (100 ml) とエーテル (150 ml) とに分配した。水溶液をエーテル (3 × 50 ml) でさらに抽出した。抽出液を合わせて、食塩水で洗浄し (1 × 70 ml)、乾燥し (MgSO_4)、濾過し、真空下で濃縮し、粗生成物を得た。酢酸エチル:ヘキサン (2:8) を使用したシリカゲルでの粗生成物のフラッシュクロマトグラフィーにより、不純物を含有しない3-オキソ-5-コラン酸メチルエステル3003 (3.85 g、29%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 0.69 (3H, s, 18- CH_3), 0.91 (3H, d, 21- CH_3), 1.02 (3H, s, 19- CH_3) および 3.66 (3H, s, CO_2CH_3)。N-(3'-アミノプロピル)-N,N'-(ジ-第3級-ブトキシカルボニル)-1,4-ジアミノブタン301の調製:

(a) 1,4-ジアミノブタン (8.6 g、97.6 mmol) のメタノール (3.0 ml) 溶液に、アクリロニトリル (6.2 g、116.8 mmol) のメタノール (3.0 ml) 溶液を 0 にて添加し、混合物を12時間攪拌した。真空下での溶媒の蒸留により、N-(2'-シアノエチル)-1,4-ジアミノブタンを無色の油状物質として得た (11.0 g、80%)。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 1.45 (4H, br, - CH_2CH_2 -), 2.46 (2H, t), 2.58 (2H, t), 2.62 (2H, t) および 2.84 (2H, t)。

(b) N-(2'-シアノエチル)-1,4-ジアミノブタン (5.6 g、40 mmol) のジクロロメタン (140 ml) 溶液に、ジ-t-ブチルジカルボネート (1.92 g、8.8 mmol) のジクロロメタン (20 ml) 溶液を室温にて滴下し、混合物を12時間攪拌した。有機溶媒を真空下で除去し、残留した油状物質を酢酸エチル (150 ml) に溶解し、飽和 NaHCO_3 (2 × 75 ml)、水 (2 × 75 ml)、食塩水 (75 ml) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、蒸発させて、粗粘性油を得た。粗生成物をシリカゲルによるフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、不純物を含有しない (N-(2'-シアノエチル)-N,N'-(ジ-t-ブトキシカルボニル)-1,4-ジアミノブタンを無色の粘性油 (8.4 g、75%) として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 1.44 (9H, s, t-Boc), 1.46 (9H, 合併 s, t-Boc), 2.60 (2H, m), 3.15 (2H, m), 3.28 (2H, t) および 3.45 (2H, t); CIMS (m/e) : 342 ($\text{M}+1$, 62%), 239 (100%), 186 (83.1%)。

(c) 水素化アルミニウムリチウム (1.8 g、48.9 mmol) の無水エーテル (300 ml) 懸濁液に、0 にて、N-(2'-シアノエチル)-N,N'-(ジ-t-ブトキシカルボニル)-1,4-ジアミノブタン (4.8 g、13.8 mmol) の無水エーテル (150 ml) 溶液を滴下し、混合物を30分間攪拌した。過剰な水素化アルミニウムリチウムを 0 にて、1N NaOH で中和し、得られた白色懸濁物をセライトで濾過し、エーテルで洗浄し、エーテル抽出物を食塩水で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、濾過し、真空下で蒸発させ、粗油を得た。粗生成物をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーで精製し、不純物が含有されていない N-(3'-アミノプロピル)-N,N'-(ジ-t-ブトキシカルボニル)-1,4-ジアミノブタン301 (3.3 g、68%) を無色の油状物質として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 1.44 (18H, s, 2 (t-Boc)), 2.68 (2H, t), 3.05 ~ 3.25 (6H, br), および 4.65 (1H, br); CIMS (m/e) : 346 ($\text{M}+1$, 100%), 290 (3.1%), 246 (32.2%)。

3-N-1-{N[3-(4-アミノブチル)]-1,3-ジアミノプロパン}-24

- ヒドロキシ - 5 - コラントリヒドロクロライド 3 0 0 5 の調製 :

3 - オキシ - 5 - コラン酸メチルエステル 3 0 0 3 (3 . 0 g、7 . 7 3 m m o l) と N - (3 ' - アミノプロピル) - N , N ' - (ジ - t - ブトキシカルボニル) - 1 , 4 - ジアミノブタン 3 0 1 (4 . 0 1 g、1 1 . 6 0 m m o l) のメタノール溶液 (1 5 0 m l) に、3 分子ふるい (1 0 g) および NaCNBH_3 (0 . 7 3 g、1 1 . 6 1 m m o l) とを添加した。反応混合物を室温で 1 6 時間攪拌した。セライトで濾過後、メタノールを真空下で除去した。残留物をメタノール (5 0 m l) に溶解し、次いで予め HCl ガスを飽和させおいたメタノール (1 5 m l) を添加した。反応混合物を室温で 6 時間攪拌した。真空下でメタノールを除去した後、粗生成物をテトラヒドロフラン (1 0 0 m l) に溶解し、次いで水素化アルミニウムリチウム (1 . 5 0 g、3 9 . 5 2 m m o l) を一度に添加した。反応混合物を緩やかに 8 時間還流した。反応混合物を 0 まで冷却し (氷浴)、次いで白色固形の顆粒状物質が形成されるまで、2 N NaOH を滴下した。フラスコを傾斜させてテトラヒドロフランを除き、残留物をトルエン (3 x 5 0 m l) で抽出し、有機層を合わせて、乾燥し (K_2CO_3)、濾過し、真空下で蒸発させて、残留物を得た。残留物を無水メタノール (5 0 m l) に溶解し、次いで HCl ガスを予め飽和させたメタノール (2 0 m l) を添加した。1 時間後、過剰なメタノールを真空下にて除去し、白色固形物を得た。クロロホルム : メタノール : イソプロピルアミン (1 5 : 1 : 1) を使用したシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって粗生成物を精製し、不純物を含むしない 3 - N - 1 - { N [3 - (4 - アミノブチル)] - 1 , 3 - ジアミノプロパン } - 2 4 - ヒドロキシ - 5 - コラントリヒドロクロライド 3 0 0 5 (1 . 1 0 g、2 4 %)。 ^1H - NMR (4 0 0 M H z、 CD_3OD) : 0 . 7 1 (3 H、s、1 8 - CH_3)、0 . 8 9 (3 H、s、1 9 - CH_3)、0 . 9 6 (3 H、d、2 1 - CH_3)、2 . 9 0 ~ 3 . 4 0 (9 H、m) および 3 . 5 1 (2 H、b r t、 CH_2O) ; MS - FAB (陽イオン) : 4 9 0 (M + 1、1 0 0 %)、4 1 9 (8 %) および 3 6 0 (7 . 5 %)。

3 - N - 1 - { N [3 - (4 - トリフルオロアセチル) アミノブチル] - 1 , 3 - ジ (トリフルオロアセチル) ジアミノプロパン } - 2 4 - ヒドロキシ - 5 - コラン 3 0 0 6 の調製 :

3 - N - 1 - { N [3 - (4 - アミノブチル)] - 1 , 3 - ジアミノプロパン } - 2 4 - ヒドロキシ - 5 - コラントリヒドロクロライド 3 0 0 5 (0 . 9 5 g、1 . 5 8 m m o l) の無水メタノール (2 0 m l) 溶液に、室温で無水トリエチルアミン (2 . 2 9 m l、1 5 . 8 m m o l) を添加し、次いでエチルトリフルオロ酢酸 (2 . 8 m l、2 3 . 5 3 m m o l) を添加し、混合物を 2 0 時間攪拌した。過剰のメタノールおよび低沸点有機試薬を真空下にて除去することによって、白色残留物を得た。残留物を酢酸エチル (5 0 m l) に溶解し、次いで 2 N HCl (3 x 2 0 m l)、水 (2 x 2 0 m l)、飽和 NaHCO_3 (3 x 2 0 m l) および食塩水 (1 x 2 0 m l) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、濾過し、真空下にて蒸発させて、不純物を含むしない白色固形物、3 - N - 1 - { N [3 - (4 - トリフルオロアセチル) アミノブチル] - 1 , 3 - ジ (トリフルオロアセチル) ジアミノプロパン } - 2 4 - ヒドロキシ - 5 - コラン 3 0 0 6 (0 . 7 7 g、7 3 %) を得た。 ^1H - NMR (4 0 0 M H z、 CDCl_3) : 0 . 7 1 (3 H、s、1 8 - CH_3)、0 . 8 9 (3 H、s、1 9 - CH_3)、0 . 9 6 (3 H、d、2 1 - CH_3)、3 . 0 1 ~ 3 . 5 7 (1 1 H、m、4 x CH_2N + 1 x CHN + CH_2O)。3 - N - 1 - { N [3 - [4 - トリフルオロアセチル) アミノブチル] - 1 , 3 - ジ (トリフルオロアセチル) ジアミノプロパン } - 2 4 - ヒドロキシ - 5 - コラン 2 4 - ピリジニウム硫酸 3 0 0 7 の調製 :

化合物 3 0 0 6 (0 . 7 0 g、1 . 0 5 m m o l) の乾燥ピリジン (2 0 m l) 溶液に、室温にて、三酸化硫黄ピリジン複合体 (0 . 7 5 g、4 . 7 1 m m o l) を添加し、混合物を 6 時間攪拌した。真空下にて過剰なピリジンを除去し、固形の残留物を得、この固形物からクロロホルム (5 x 2 0 m l) を用いて硫酸化合物を抽出した。クロロホルムを除去することによって、白色の固形物、3 - N - 1 - { N [3 - [4 - トリフルオロア

10

20

30

40

50

セチル)アミノブチル)] - 1, 3 - ジ(トリフルオロアセチル)ジアミノプロパン} - 24 - ヒドロキシ - 5 - コラン24 - ピリジニウム硫酸3007と過剰の試薬(1.0 g)とを得た。さらに精製することなしに、粗生成物を次の工程に使用した。

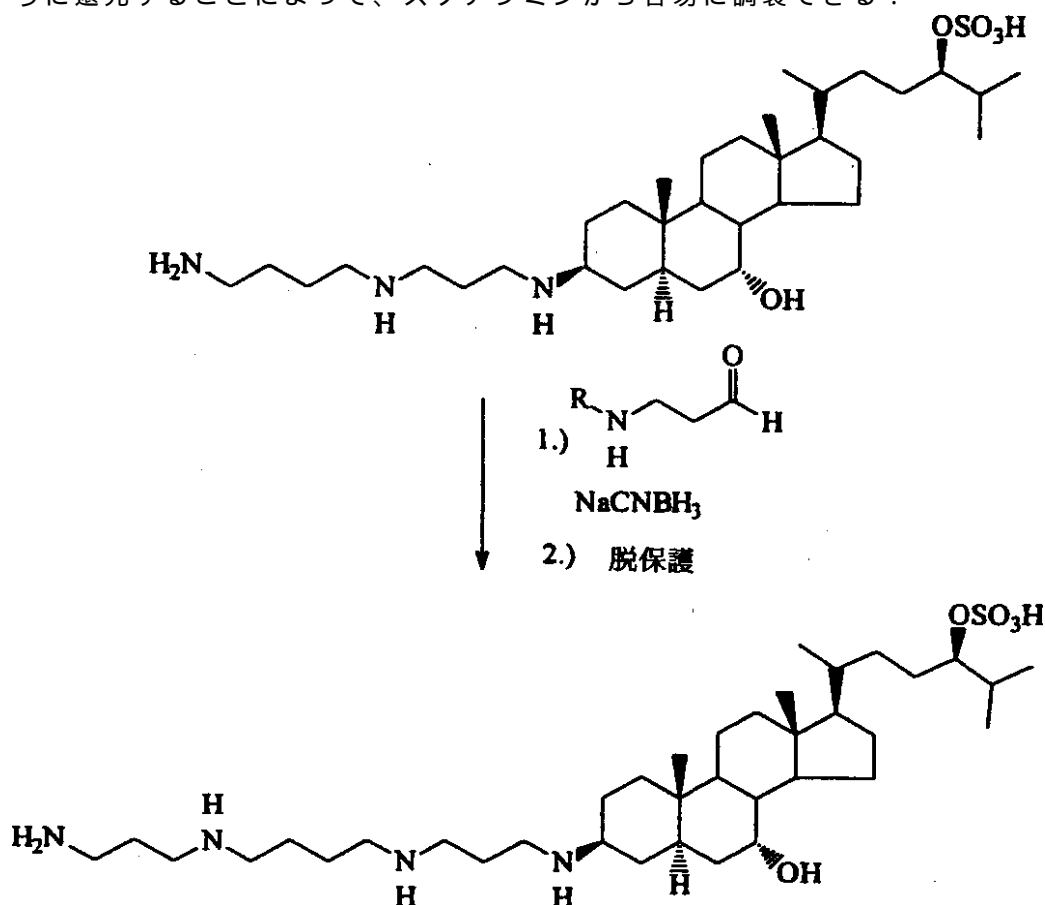
3 - N - 1 - {N[3 - (4 - アミノブチル)] - 1, 3 - ジアミノプロパン} - 24 - ヒドロキシ - 5 - コラン24 - 硫酸カリウム(399)の調製:

粗化合物3007(1.0 g)のメタノール溶液(25 ml)に、室温にて、炭酸カリウム水溶液(10 ml)を添加し、混合物を終夜攪拌した。18時間後、過剰のメタノールおよび水を真空下にて除去し、残留物を得た。残留物をメタノール(3 × 30 ml)で抽出した。メタノール抽出液を合わせて、真空下にて濃縮し、粗生成物を得た。ジクロロメタン:メタノール:水酸化アンモニウム(7:2:1)(使用前にMgSO₄で乾燥した)を使用したシリカゲルで、粗生成物をフラッシュクロマトグラフィーすることによって、白色固形物、3 - N - 1 - {N[3 - (4 - アミノブチル)] - 1, 3 - ジアミノプロパン} - 24 - ヒドロキシ - 5 - コラン24 - 硫酸カリウムすなわち化合物399(0.22 g、化合物3006に対して35%)。¹H - NMR(400 MHz, CD₃OD): 0.74(3H, s, 18 - CH₃)、0.92(3H, s, 19 - CH₃)、1.0(3H, d, 21 - CH₃)、2.95 - 3.24(9H, m)および4.00(2H, br t, CH₂OSO₃) ; MS - FAB(陽イオン)(m/e): 570(M⁺ + 2, 85%)、490(44%)、430(15%)、402(16%) ; MS - FAB(陰イオン)(m/e): 568(M⁺, 3.7%)、495(10%)、452(7%)、438(17%)、423(14%)。

実施例 T

化合物1436の調製:

この化合物は、 - アラニンアルデヒドをカップリングさせ、次いで以下の略図に示すように還元することによって、スクアラミンから容易に調製できる:



上記の方法によって、サメの肝臓に大量に含有されるスクアラミンから、スクアラミンの約5%の量が含有される化合物1436へ容易に転換させられる。

本願明細書の表IおよびIIに示す化合物などの他のアミノステロール化合物も、上記と

同様の方法で調製できる。

治療活性および利用性

スクアラミンなどのアミノステロール化合物は、NHEの効果的な阻害剤であることが見いだされている。スクアラミンの抗菌作用機序を解明しようとする際に、スクアラミンは都合のいいことに特定のNHEアイソフォーム、すなわちNHE3を阻害するが、NHE1を阻害しないことが見出されている。また、スクアラミンは特殊な機序を介して交換体を阻害することが調べられている。スクアラミンおよび他のアミノステロールの特殊で、有利な作用および有用性は、さらに、以下に考察する実験結果からあきらかである。

NHE3の特異的阻害：

スクアラミンの、NHE阻害の特異性を測定するために、テセ(Tse)らがジャーナル
バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.) 1993年、268巻、
11917~11924ページに概説した手法によって、ヒトNHE1またはヒトNHE
3を発現する細胞株に対するスクアラミンの作用を検定した。酸負荷後、または酸負荷を
行わないで、内部pHを測定し、結果を図1Aおよび図1Bに示す。

特に、レビン(Levine)らが、ジャーナル バイオロジカル ケミストリー(J.
Biol. Chem.) 1993年、268巻、25527~25535ページに記載し
たダルベッコの改良イーグル(Dulbecco's - modified Eagle's
s)補足培地でウサギNHE3をトランスフェクトしたPS120繊維芽細胞を増殖させ
た。レビン(Levine)らが記載したように、pH指標として、蛍光色素BCECF
- AM(2', 7' - ビス(カルボキシエチル) - 5(6) - カルボキシフルオレセイン
アセトキシメチルエステル)を使用して、5 μ g/mlスクアラミンで処理した後の内部
pH変化について、ガラスカバー上に増殖させたトランスフェクト細胞を検定した。40
mM NH₄Clと接触させることによって酸で前負荷した細胞について、細胞外ナトリウム
イオン濃度回復の関数としてpH回復速度をモニターし、その結果を図1Aに示す。酸
で前負荷しなかった細胞については、スクアラミン添加後の時間の関数として実際の内部
pH値をモニターし、その結果を図1Bに示す。

図1Aおよび図1Bからわかるように、スクアラミンはK_m値およびV_{max}値のプロトン濃
度においてNHE3を阻害した。一方、アミロライドなどの既存の薬剤はV_{max}にのみ影
響を与えた。

このように、アミノステロールスクアラミンは、細胞が分泌しうるプロトンの絶対数を低
下させる(V_{max}作用)ばかりでなく、この阻害剤の存在下で細胞にpHを低下させる(
K_m作用)。結果として、ナトリウム/プロトン交換体は、アミロライドよりもスクアラ
ミンによってより顕著に不活性化される。

図1Aおよび図1Bに示すNHE3に対する作用とは異なり、スクアラミンは図2Aおよ
び図2Bに示すようにヒトNHE1およびウサギNHE1に阻害作用を示さなかった。ウ
サギまたはヒトNHE1をトランスフェクトしたPS120繊維芽細胞を上記のように増
殖させた。蛍光色素BCECF - AMと、40mM NH₄Clに接触させることによって
、酸で前負荷した細胞とを使用して5 μ g/mlスクアラミンで処理した後の内部pH変
化についても、ガラスカバー上に増殖させたウサギNHE1(図2A)またはヒトNHE
1(図2B)を発現するトランスフェクト細胞を検定した。細胞外ナトリウムイオン濃度
回復の関数としてpH回復速度をモニターした。

また、図1Bよりあきらかなように、これらの細胞の定常pHも阻害された。このよう
に、プロトン交換に対してスクアラミンが影響を与えることによって、細胞は、ポンプが活
性化される前に、スクアラミンの存在下でpHを低下させられる。

これらの研究によって、スクアラミンは、NHE1よりもNHE3に対して特異性を有す
る阻害剤であることが発見されている。さらに、スクアラミンはポンプが活性化される前
に、細胞にpHを低下させる阻害剤とされている。図1A、1B、2Aおよび2Bに示す
結果は、スクアラミンは特有のNHE特異性を示すことを表している。

NHE3の発現：

NHE3に対するこのような特異的な影響が重要であることにはいくつかの理由がある

10

20

30

40

50

。N H E 3 は、限られた細胞種の先端面に含有され、N H E 1 よりもさらに特殊化されている。治療上特に関心が集まる細胞は内皮細胞である。

P C R を使用して、ヒト微小血管およびヒト肺動脈内皮細胞におけるこの対向輸送体の発現があきらかになった。チョムクツインスキー (Chomczynski) らの改良法、アナル バイオケム (Anal. Biochem.) 1987 年 162 巻 156 ページ、によって、原ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC)、ヒトメラノーマ細胞 w m 1617 およびヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) から総 RNA を単離し、次いで一次鎖 cDNA 合成キット (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) を使用して MMLV 逆転写酵素で逆転写した。クローンテック (Clontech) 社から入手したヒト小腸総 RNA も同様に逆転写した。

アンプリタックディーエヌエーポリメラーゼキット (AmpliTaq DNA Polymerase kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT)) の試薬と、ヒト N H E 3 に特異的な 2 種のオリゴヌクレオチド (B13: 5' - CATCTGGACCTGGAACACG - 3' ; B14: 5' - CGTAGCTGATGGCATCCTTC - 3') の各々を 400 ng を含有する 50 μ l 反応混合物中で、約 80 ng の cDNA 産物を温度変化 94 で 5 分を 1 サイクル、94 で 50 秒、57 で 1 分、71 で 2 分を 38 サイクル、最後に 72 で 10 分、その後 4 に冷却するサイクルを行い増幅した。この試料の 20 μ l を 1.7% アガロースゲルで分析した。以下の表 2 に示すように、ほとんどの例において約 550 bp の予想された N H E 3 の P C R バンドが観察された。

各 P C R 反応物の 1 μ l を、2 種の内部プライマー (B15: 5' - CTGGTCTTCATCTCCGTGTAC - 3' ; B16: 5' - AGCTCGTGGAA - GACATTCAGG) を用いて、温度変化 94 で 5 分を 1 サイクル、94 で 50 秒、58 で 1 分、71 で 2 分を 35 サイクル、最後に 72 で 10 分、次いで 4 に冷却するサイクルで、さらに 50 μ l 反応混合物中で、ネスティド (nested) P C R によって分析した。この反応物の約 20 μ l をさらに 1.7% アガロースゲルで分析した。以下の表に示すように、全ての場合において、約 490 bp の予想された N H E 3 の P C R バンドが観察された。HPAEC および HMVEC ネスティド P C R バンドの末端部からの DNA 塩基配列解析によって、両者は予想されたヒト N H E 3 の塩基配列を有することが確認された。

表 2

ヒト内皮細胞株におけるヒト N H E 3 の発現

P C R によるヒト N H E 3 の可視検出

<u>総 RNA 源</u>	<u>第 1 回 P C R</u>	<u>第 2 回ネスティド P C R</u>
小腸	—	+
ヒトメラノーマ	+	+
HPAEC	+	+
HMVEC	+ / — (複数バンド)	+

このように、多種の内皮細胞の増殖/形状に関連がある事象はスクアラミンおよび機能的関連化合物によって阻害される。以下に記載した実験を実施して、このアミノステロールの効果を評価した。

インビトロにおける、内皮細胞、繊維芽細胞および上皮細胞の増殖阻害:

形質転換されていないヒト細胞をスクアラミンの濃度を増加させる条件下で増殖させるとき、以下の実験によって示すように、内皮細胞はスクアラミンに対して特に感受性を示す。ウシ肺内皮細胞、ヒト上皮細胞株 MCF10A、およびヒト包皮繊維芽細胞を、ペプチ

ドおよびスクアラミンを含む12種の膜作用剤の存在下でインキュベートした。
具体的には、ウシ肺内皮細胞、ヒト上皮細胞系MCF10A、およびヒト包皮繊維芽細胞を以下の12種の膜作用剤：(1)RGD[KIAGKIA]₃-NH₂；(2)d-[KKLLKKL]₂-NH₂；(3)スクアラミン；(4)SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR；(5)FLGGLIKIVPAMICAVTKKC；(6)マガイニン(Magainin)2；(7)PGLA；(8)GFASFLLGKALKAAALKIGANLLGGTPQQ；(9)PR-39；(10)1-[KKLLKKL]₂-NH₂(11)セクロピン(Cecropin)B；および(12)[KIAGKIA]₃-NH₂の存在下でインキュベートした。細胞増殖は600nmの吸光度によって測定した。結果を図3A～3Cに示す。

10

図3Aからあきらかなように、スクアラミンは1μg/mlでウシ肺動脈内皮細胞(BPE)の増殖を阻害した。一方、10μg/mlでは上皮細胞(図3B)および繊維芽細胞(図3C)系の増殖に全く影響を与えなかった。しかしながら、上皮細胞の増殖を阻害したペプチドはBPEに対しては全く影響を与えなかった。このように、内皮細胞は、繊維芽細胞および上皮細胞よりもスクアラミンに対する感受性が強い。

インビトロにおける内皮細胞の索状組織形成阻害

内皮細胞は、インビトロの種々の早期形成段階において、毛細管に似た管状集合物を形成する能力を有する。必須増殖因子と効果的な基層のある比較的特異的な条件下で、このような変換が生じる。増殖因子と内皮細胞との相互作用および基層への付着がNHEを活性化することが報告されている。この交換体の活性化は、内皮細胞の多細胞管状構造への形態変換が続いて生じるために必要であると考えられる。

20

VGEF(血管内皮増殖因子)の存在下で培養したとき、ヒト微小血管細胞が形成する索状様構造に対する化合物の効果と、コラーゲンマトリックスに対する塩基性繊維芽細胞増殖とを評価するために、標準的な索状組織形成検定法を使用した。結果を以下の表に示す。

。

表 3

内皮細胞の索状組織形成における種々のアミノステロール化合物の効果

	$\mu\text{g/ml}$				
	<u>0.01</u>	<u>0.1</u>	<u>1.0</u>	<u>10.0</u>	
フマギリン		—	+ / —	+	
スクアラミン	—	+	+	+	10
化合物 319	—	+	+	+	
化合物 353		+	+	+	
化合物 410		—	+	+*	
化合物 411		—	—	+	
化合物 412		—	—	+	
化合物 413		—	—	+	
化合物 415		—	—	+ / T	20
化合物 371			T	T	
化合物 432			—	—	
化合物 449			—	+ / —	
化合物 467			—	—	

注： + 血管新生障害

— 血管新生障害なし

T 毒性

* 10 $\mu\text{g/ml}$ で細胞球状化

表 3 に示すように、スクアラミンは約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で索状組織形成を障害し、これと比較して、フマギリン (Fumagillin) は 10 $\mu\text{g/ml}$ で同活性を示す。これらの濃度では、スクアラミンは細胞の生存または増殖に顕著に影響するとは思われない。インビトロにおけるこのような性質は、さらに複雑なインビボモデルにおける抗血管新生作用とおおよそ関連があると思われる (Goto et al., Lab Investigation 69, 1993, 508-518 参照)。

LPS の誘導による好中球のヒト臍静脈内皮細胞への付着：

リポポリサッカライド (LPS) およびある種のサイトカインによるある種の刺激に内皮細胞を接触させると、細胞膜上に特定の接着分子が誘導され、白血球の結合を促進する。これらの白血球 - 内皮細胞相互作用は、細菌侵入部位への白血球の局在化および毛細血管から周囲組織空間への白血球の血管外遊出の促進に必要であると考えられる。白血球接着分子には、セレクトリン (Selectins) および ICAM-1 がある。

スクアラミンがこの特別な内皮細胞機能を障害するかどうかを測定するために、ギャンブル (Gamble) らの、ジェイ イム メソッド (J. Imm. Methods) 1988 年 109 巻 175 ~ 184 ページに概説されるように、標準的な接着検定法を実施した。内皮細胞系における細胞表面リガンドの発現は、ヒト臍静脈内皮細胞、精製好中球および LPS (100 ng/ml) および TNF- (40 ng/ml) などの細胞表面リガ

10

20

30

40

50

ンドの誘導因子を使用する系での顆粒球への接着を起こすことが報告されている。これらの実験系において、ウェルあたり約 2×10^5 個のヒト臍静脈細胞（継代数 2 ~ 6）を播種した。無血清培地で終夜細胞を増殖させた。誘導するために、好中球を添加する 6 時間前に TNF - （ 40 ng/ml ）を内皮細胞に添加するか、または 4 ~ 6 時間前に LPS （ 100 ng/ml ）を添加した。LPS 結合たんぱく質の原料を提供することのために、ウェルに 1 % FBS を添加することによって LPS 応答が増加されることが見出された。内皮細胞の活性化後に、ウェルあたり約 50×10^6 個の好中球を添加した。プレートを室温で 30 分緩徐に振とう後に、培地を除去し、無血清培地で 3 回洗浄し、各ウェルの写真を撮影した。LPS または TNF - 添加時に $10 \mu\text{g}$ 、 $1.0 \mu\text{g}$ または $0.1 \mu\text{g}$ のスクアラミンをに添加することによって、スクアラミンの影響を試験するための実験を実施した。好中球の添加時に第 2 の同量のスクアラミンを添加した。ICAM - 1 のモノクローナル抗体を陽性対照とした。

3 種の濃度を使用したとき、活性化ヒト内皮細胞を使用した好中球接着に対するスクアラミンの阻害作用は観察されなかった。好中球の添加前に ICAM - 1 のモノクローナル抗体 $40 \mu\text{g/ml}$ を添加したときは、約 50 % の接着阻害が観察された。

これらの結果は、インビトロにおいては、スクアラミンによる内皮細胞の NHE の阻害は、増殖および毛細管形成に影響を与えるが、この細胞内の全ての信号伝達経路を阻害するわけではないことを示している。このように、白血球を感染部位へ遊走させる内皮細胞の能力などのある種の " ハウスキーピング " 機能はスクアラミンによって妨害されない。これは、スクアラミンは血管新生を阻害するために使用することはできるが、感染部位または炎症部位への白血球の遊走などのある種の重要な内皮細胞機能を阻害することはないことを明らかにしている。

増殖阻害作用：

漿尿膜モデル：

典型的な漿尿膜モデルを使用して、スクアラミンが毛細管増殖阻害剤であることが見出されている。漿尿膜モデル（CAM モデル）内において増殖中の毛細管は、新たな血管増殖を阻害する能力に関して薬剤の効果を評価する系として使用されている。血管新生は、胚発生第 1 週に極めて活発である。その後、毛細管増殖は、" 新規 " 形成ではなく、主に " 伸長 " が特徴となる。

標準的な検定法においては、薬剤は、血管新生が生じる胚領域に局所的に適用される。薬剤適用から約 7 日に目視検査によって評価して、この過程を阻害する能力によって薬剤を評価する。新規毛細管形成期間中に血管の増殖を阻害するが、毛細管形成期以降の毛細管増殖は阻害しない薬剤は、特異性の低い毒性物質とは識別され、" 特異的な " 血管新生阻害剤として一般に認められる。使用した検定法は、アウエルバッハ（Auerbach）らの、ファルマセラ（Pharma. Ther.）1991 年 51 巻 1 ~ 11 ページに詳細に記載されている。結果を以下に表で示す。

10

20

30

表 4

CAMモデルにおける毛細管増殖阻害

3 日令胚	スクアラミン適用 (μ g)	陽性パーセント		
		検定 1	検定 2	平均
	0.65	28		
	1.25	18	18	18
	2.5	35	18	27
	5.0	91	57	74
	20	52*	58*	55
	40	50*	13*	32

注： * ある程度の血管炎症が認められた。

13 日令胚 スクアラミン適用

(μ g)	陽性パーセント
5.0	0/26

表 4 からわかるように、3 日令 CAM に 0.65 μ g 程度のスクアラミンを適用しても、CAM 血管の血管新生が阻害された。一方、13 日令のヒナに 10 倍量のスクアラミンを適用しても阻害作用は発揮されなかった。

このように、典型的な血管新生検定法において、スクアラミンは、文献に現在までに記載されている最も活性の強い化合物の効力に匹敵して、強力ではあるが、特異的な阻害活性を示した。この作用は、毛細管増殖の毒性作用による阻害ではなく、血管新生の抑制に相当する。

3 ~ 5 日ヒナ胚モデルの卵黄毛細管

”典型的な”ヒナ漿尿膜モデルにおけるスクアラミンを評価する経過において、このステロイドは 3 ~ 5 日令のヒナ胚の毛細管の血管構造に劇的で急速な影響を与えることが観察された。ヒナ胚卵黄毛細管検定法を使用して、毛細管の退行を誘導する能力について、この化合物を試験した。0.1 ml の 15 % フィコール (Ficol) 400 および PBS 中の胚に各化合物を添加し、60 分後に血管の退行を評価した。

スクアラミンは 3 - ~ 5 - 日令ヒナ胚の卵黄毛細管を阻害することが見出された。3 日令ヒナ胚は、多数の血管が出現し、”数字の 8”形の構造をとる、すなわち、両極に向かって外側に伸びる血管の輪の中心に胚が位置する胚盤からなる。この胚構造にスクアラミンを適用することによって (15 % フィコール (Ficol) および PBS 中 0.1 ml)、卵黄の血管の進行的な”じゅず状化 (beading up)”が生じ、最も細い毛細管からこのような変化を示し始める。約 15 分の遅滞期の後、一般に”静脈”側の毛細管と第 2 の毛細管との間に狭窄が観察された。拍動性の血流が絶え間なく続いたことにより、行き止まりになった管が”膨潤”し、つながっていた部分が切れ、”血島”に似た閉じた血管囊が形成された。この過程は進行し、一番太い血管だけが無傷のまま残った。胚の心臓は絶え間なく活発に拍動した。出血は見られず、毛細管構造の完全性を反映している。また、血流中の赤血球の破壊は顕微鏡では観察されず、溶血が生じていないことを示している。

毛細管の”退行”と通常呼ばれる事象を証明すると思われるこの検定法を使用して、60 分で効果を得るために必要なスクアラミンの最小濃度を決定することができる。結果を以

下の表に示す。

表 5

ヒナ胚卵黄毛細管退行検定における種々のアミノステロール化合物の影響

化合物	使用化合物量 (μg)					
	1 0	1	0 . 1	0 . 0 1	0 . 0 0 1	
化合物 1 4 3 6	+	+	+	+	+ / -	10
化合物 3 1 9	+	+	+	+	+ / -	
スクアラミン	+	+	+	+	0	
化合物 4 1 5		+	+	+	0	
化合物 4 1 0		+	+ / -	+ / -	0	
化合物 4 1 2		+	0	0	0	20
化合物 4 1 1		+ / -	0	0	0	
化合物 3 8 2	+	+	0	0	0	
化合物 1 3 6 4	+	+	0	0	0	
化合物 3 7 1	+	+ / -	0	0	0	
化合物 3 9 6		+	0	0	0	30
化合物 3 5 3		+ / -				
化合物 4 1 3		0				
化合物 4 1 4		0				
化合物 3 8 1		0				
化合物 3 0 3		0				40
化合物 3 1 8		0				
化合物 4 0 9		0				
化合物 1 3 6 0		0				
賦形剤	0	0	0	0	0	

注：+ 血管反応有り

- 血管反応なし

+/- 反応不定

賦形剤 リン酸緩衝液添加生理食塩水中フィコール (F i c o l) 1 5 %

表 5 からあきらかなように、培地 0 . 1 m l 中にスクアラミンが 0 . 1 ~ 0 . 0 1 μg 含有されていれば、変化を誘導できる。種々の範囲の活性を有する化合物が見出され、スクアラミン、化合物 3 1 9 および化合物 4 1 5 が特に活性が強かった。この実験は、試験したステロイドは数分の時間間隔で毛細管を劇的に再構成できることを示している。この結果は、スクアラミンは N H E の阻害を介してこの作用を発揮することを反映している。

オタマジャクシ検定法

オタマジャクシ、好ましくは発生段階 59 ~ 60 のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を使用する、新規に開発された検定法を使用して、オタマジャクシの尾における毛細管の閉塞をモニターすることによって化合物の効果を検討した。胚組織と成体期の組織とをともに有する変態による移行期を示すので、これらの発生段階の動物を使用した。本発明の化合物は、胚組織の形状、生存および完全性に影響するが、成体組織には影響せず、強力で、特異性の高い選択性を有する。例えば、動物の成体および胚の上皮全てを破壊する物質は毒性物質と認められる。胚組織のみを破壊する物質は非常に特有な特異性を示す。

本発明の検定法において、オタマジャクシを、試験化合物の蒸留水、好ましくはその 100 ml を入れたペトリ皿に入れる。試験化合物の好ましい濃度は約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至約 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。液体の容量は、動物が自由に泳ぎ、溶液から水分を摂取するのに十分な量である。このように、観察される結果は、薬剤が経口経由で吸収され、その後全身に分布して生じる。液体の容量が、経口経由の摂取を可能にするほど十分でない場合には、観察される効果は、体表面上皮を介する吸収によるものになるだろう。従って、本発明の簡単な検定法によって、化合物が経口で利用可能かどうかを識別することができる。本発明の検定法の別の実施態様において、標準的な方法を使用して、化合物の水溶液を直接動物の腹腔内に注射してもよい。約 0.05 mg/ml 乃至約 0.5 mg/ml の化合物の約 0.05 ml 水溶液の濃度が好ましい。

一定時間、典型的には約 60 分経過後に、約 100 倍の倍率の倒立顕微鏡下にて、オタマジャクシの尾の毛細管を通る血流の閉塞が観察される。

オタマジャクシを、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のスクアラミンを含有する蒸留水中に入れたとき、尾の毛細管の血流が止まるのが観察された。この過程は尾から頭部方向に生じた。再も遠位部の血管内の血流が最初に止まり、次に太い血管内の血流が止まった。この期間中、絶え間ない心拍動、大血管の拍動性膨張によってあきらかなように、循環器系は強靱性を保っており、極めて興味深いことには、四肢の細い毛細管の血流は変化しないことが観察された。このように、血流の選択的な停止が局部に観察された。動物をスクアラミン中に数日間維持すると、閉塞した血管系によって灌流される動物の領域に対応して、尾ひれの末梢領域同様、尾の最も遠位領域の閉塞の進行が観察される。

この作用は、あきらかに、尾の毛細管の定常期直径が選択的に変化することによって生じる。内皮細胞の NHE を阻害することによって、あきらかに、毛細管を形成する細胞の形状が変化し、血流が低下する。オタマジャクシの " 成体 " 部分 (四肢) の毛細管床の機能が妨害されないのは、スクアラミンがある種の毛細管に選択性を有することを示す。オタマジャクシの尾毛細管閉塞検定の結果から、化合物 319、スクアラミンおよび化合物 1436 が、一般的な血管閉塞作用を誘導することが見出された。

メラノーマの増殖抑制：

経口および非経口投与経路によるマウスにおけるメラノーマの増殖抑制：

C57B マウスの B16 メラノーマの増殖は、血管新生に依存する。従って、これは、癌の増殖に対する血管新生阻害剤の効果を評価するために認知されたモデルである。

癌の増殖に対する血管新生阻害剤の評価のための認められたモデルである、C57B マウスの B16 メラノーマ細胞の増殖を利用して、スクアラミンの、皮下投与、腹腔内投与および経口投与の効果を評価した。B16 メラノーマ細胞の接種物を C57B マウスの背に皮下移植した結果、図 4A ~ 4C に示すように、30 ~ 40 日にわたってメラノーマ病変が進行的に増殖した。

このモデルでは、化学療法剤による治療の有無にかかわらず、転移の徴候はほとんど観察されなかった。動物を皮下投与 (図 4A)、腹腔内投与 (図 4B) または経口投与 (図 4C) によってスクアラミンで治療したとき、腫瘍容量の用量依存的な抑制が観察された。体重および血液学的要因の測定では、大きな低下を示さなかった。スクアラミン自身は、非常に高濃度の場合を除いて、培養中の B16 に対してわずかな細胞増殖抑制作用しか示さないもので、腫瘍のこのような応答は毛細管発生の妨害に二次的であると説明される。

免疫寛容マウスにおけるヒトメラノーマの増殖抑制：

図5からあきらかなように、メラノーマ1250Luは、RAG-1マウスに移植後活発に増殖する。スクアラミンは、RAG-1マウスのメラノーマ1205Luの増殖を用量依存的に抑制することが見出されている。

スクアラミンは、腫瘍が約0.1mlに到達後投与され、図5によってあきらかなように、腫瘍の用量依存的であきらかな抑制が見られた。処理中止後、腫瘍の増殖は未処理の対照と同様の速度で持続した。これは、この状況におけるスクアラミンの影響は可逆的であることを示している。

ウサギにおける腫瘍による角膜血管新生の抑制：

VX2癌細胞をウサギの角膜に移植することによって、数日以内に新たな血管が誘導された(Tamargo et al., Cancer Research 51, 1991, 672-675)。この癌は、新たな血管増殖を刺激する増殖因子を分泌すると考えられる。このように、このモデルは、腫瘍の転移性拡散、糖尿病性網膜症、黄斑変性およびリウマチ性関節炎を含む血管新生の病的疾患の治療における治療有用性のインビボにおける証拠となる。

本実験は、公知の実験計画に基づき実施した。すなわち、評価する対象の薬剤の一定濃度を含有するポリマーに隣接して腫瘍を移植した。ポリマーは腫瘍のすぐ近くに徐々に薬剤を放出し、薬剤の局所濃度を高く持続させる。本実験において、ELVAX 40P (DuPont, Wilmington, DE)のペレットに導入されたスクアラミンは、7日めおよび14日めには約60%、21日めには約25%新たな血管の形成を阻害した。

上記の実験によってあきらかなように、スクアラミンはNHE3の強力な阻害剤となる。従って、スクアラミンは、インビボにおいて新たな血管形成が関与する場合には常に、非常に有用な治療媒介となるはずである。

実際に、新たな血管形成に依存するいかなる病的な過程もNHE3の阻害によって治療されうる。スクアラミンは、血管新生過程を阻害する薬剤として、血管新生の妨害が病状進行の強度を低下させるような、血管新生の持続に依存する疾患または障害の治療に対して治療上の有用性を有する。このように、スクアラミンは、固形腫瘍の増殖および転移、リウマチ性関節炎、乾癬、糖尿病性網膜症、黄斑変性、血管新生緑内障、乳頭腫、水晶体後方線維増殖および臓器拒絶反応を含む障害の治療に有用である。

さらに、他のアミノステロイドは抗血管形成作用を示すことが報告されている。上記のような、利用性を判定するための、ヒナ胚毛細管退行検定、オタマジヤクシ検定、内皮索状組織形成を阻害するための検定およびNHEを直接阻害するための検定を含む種々の検定法を化合物について実施した。上記のデータからあきらかなように、ヒナ、オタマジヤクシおよびインビトロにおける内皮細胞の索状組織形成阻害から得られた結果はすぐれた相関性を示す。

これらの検定法を適用することによって、スクアラミンのすぐれた代替物として化合物319が見いだされた。実際に、NHE阻害剤としての効力；簡単な合成経路；特異性、すなわちCNS作用がない点においてはスクアラミンに勝ることが見出された。化合物319の特性をさらに以下に示す。

メラノーマ増殖抑制：

化合物319は、インビボにおいて、B16メラノーマに対して作用することが見出された。上記のマウスメラノーマ検定法から得られた結果を示す図6に見られるように、化合物の皮下投与によって、C57BマウスのB16をスクアラミンとほぼ同じ程度抑制した(図4B)。

薬物動態学的クリアランス

化合物319はまた、スクアラミンより速やかな薬物動態学的クリアランスを示す。クリアランスを評価するために、化合物319およびスクアラミンについてマウスIVPK試験を実施した。化合物を静脈内投与し、血液試料を10分ごとに採取した。投与したステロイドの濃度をHPLC分析によって測定した。図7に示すように、静脈投与後、化合物は約14分の半減期でマウスの血流中から除去された。これと比較して、図8に示すよ

10

20

30

40

50

うに、スクアラミンは約35分の半減期で除去された。

化合物319の誘導体によってインビボにおいてクリアランスをさらに低下させることが可能であるはずである。薬物の一定の投与量で血中濃度を高くし、投与回数を減らすために、血流中の薬剤の半減期を延長することは有用であることが多い。ポリアミンは、ポリアミン残基の遊離末端アミノ基を分解する種々の酸化酵素によって容易に代謝される。セラー (Seller) ら、プログ ドラッグ リザ (Prog. Drug. Res.) 1994年43巻88~126ページ参照。1級アミンをアルキル化することによって、一般に、この代謝経路は遅延される。セラー (Seller) ら、同上。このように、化合物319または代謝可能なポリアミンを有するいかなるステロイド化合物の1級アミンを単にアルキル化することによって、この種の簡単な変更が生物学的寿命を延長することが予想される。

10

アフリカツメガエルのオタマジャクシ検定法：

上記のオタマジャクシ検定法は、ほ乳類に導入されたときの各ステロイド化合物の薬理学的対象を測定するためおよび合成化合物が属する薬理学的分類を決定するための有利な方法である。検定において、ステロイド化合物の各々を100mlの蒸留水に10µg/mlの濃度で溶解した。発生段階59~60のアフリカツメガエルのオタマジャクシを入れ、1時間後に光学顕微鏡および肉眼的観察によって評価した。

試験したステロイド化合物は、この動物において異なる独特の薬理学的応答を生じることが観察された：

化合物1256 (スクアラミン)：尾の細い毛細管の血管閉塞。四肢の血流には無影響。2時間以内に不活動および死亡が生じた。

20

F X 1：1時間以内に糞物質の排泄増加。12時間までに、溶液はかなりの量の糞骸を含んだ。動物の循環系は充血しており、血液病理学的刺激を示唆している。

化合物1360：ある種の赤血球の膨潤および溶解が生じ、尾のある種の小血管内に核が蓄積した。その後、これらの核による栓周囲の尾部分に組織の損傷が生じた。

化合物1361：化合物1360と同様。

化合物1436：全体的な活動が徐々に低下。心拍動は依然として強力で、神経系の抑制を示唆した。頭部および尾部のメラニン形成細胞が膨潤し始め、最初は核が目に見えるほどになり、その後破壊して断片化した。動物は約2時間までに死亡した。

化合物1437：動物の尾および触覚などの胚部分を覆う上皮が層状に脱皮し始めた。細胞の層は最初は無傷であるが、徐々に次々に剥離する。トリパンプルー染色は、細胞死が生じたことを証明する。動物は活発で、組織の損傷はほとんど見られなかった。

30

F X 3：尾の筋束はミオグロビンが漏出し始めた。骨格筋の横紋がはっきりしなくなった。筋節が分離し始めた。

マイトジェン刺激によるヒトT細胞増殖の阻害

ヒトT細胞のマイトジェン刺激による増殖を阻害するための検定法などの、特定の検定法を使用して、特有の生物活性を有するステロイドを識別した。マイトジェンが誘導する細胞増殖は、NHEの活性に依存することが報告されている。このように、どのステロイドが特有の細胞に対して作用するかを測定するためには、どのステロイドがマイトジェン (または増殖因子) が活性化する細胞増殖を阻害するかを測定することのみが必要である。Tリンパ球は、HIV感染の宿主となるリンパ球様細胞である。ヒトリンパ球の形質転換を阻害するステロイドは、原則として、HIV感染中に活性化される可能性が高いNHEに作用する。実際に、GP120は、細胞受容体に結合することによって、海馬細胞のNHEを活性化するので (Benos et al., J. Biol. Chem. 269. 1954. 13811-13816)、同様の事象がウィルスとリンパ球との相互作用によって早期に生じるという仮定は妥当である。これは、次の検定法の基礎となった。

40

採取直後のヘパリン処理した血液を、10µg/mlフィトヘマグルチニン (PHA) を含む10% FCS添加RPMI培地を加えた組織培養フラスコに入れた。その後、1、5および10µg/mlの精製した種々のステロイド化合物を加えた。培養物を72時間インキュベートし、その後、コルセミドを1µg/mlの濃度となるよう添加した。培養を

50

さらに2時間続け、細胞を採取した。ギムザ染色後に、標準的な細胞化学的方法を使用して、有糸分裂像を評価した。結果を以下の表に示す。

表 6

P H A に刺激されたヒトリンパ球の阻害

(対照の%)

化合物	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1 2 5 6	3	8	10
1 3 6 0	5	5	5
1 4 3 6	20	50	80
1 4 3 7			10
F X 3			5

上記の表からわかるように、化合物 1 4 3 6 は極めて強力に芽細胞の形質転換を阻害し、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では75%を上回る阻害が観察された。スクアラミンについてはこの濃度ではいくぶんかの影響は観察されたが、他のステロイドはかなり活性が弱かった。この簡単な検定法を使用することによって、T細胞リンパ球に活発に伝播するウィルス感染を含むT細胞リンパ球の増殖性疾患の治療に使用するための化合物 1 4 3 6 を同定した。

関連のある細胞および適当な増殖因子を使用した、同様の種類の検定法は容易に構成される。このように、血管形成後の血管平滑筋細胞の増殖を阻害する際にどのステロイドが有用であるかを測定するためには、以下のように、ヒト冠動脈平滑筋を用いた培養系を準備し、PDGF刺激によるこれらの細胞の増殖をどのステロイドが阻害するかを測定しさえすればよい。

種々の細胞の阻害

ベイカー (Baker) ら、キャンサー レス (Cancer Res.) 1993年5月3巻3052~3057の検定法を使用して、化合物 1 4 3 6 は、非常に広範囲にわたる種々の細胞を阻害することが観察された。以下の表7に記載するように、組織培養で評価された悪性腫瘍、内皮細胞および血管平滑筋細胞全ては阻害作用に感受性を示した。このように、化合物 1 4 3 6 は、多種類の組織の、増殖因子に依存した増殖の抑制において適用できる。

表 7

化合物 1 4 3 6 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) がインビトロで阻害した癌細胞

ヒト結腸癌	SW 9 4 8
ヒト結腸癌	HT 2 9
ヒト卵巣癌	SK O V 3
ヒトメラノーマ	WM 1 6 1 7
ルイスラットの肺癌	
マウス B 1 6 メラノーマ	
マウス L 1 2 1 0 白血病	

10

化合物 1 4 3 6 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) がインビトロで阻害した未形質転換細胞

ウシ胚内皮細胞
ヒト微小血管内皮細胞
ヒト臍静脈内皮細胞
ヒト冠動脈平滑筋細胞

20

N H E 3 の阻害

化合物 1 4 3 6 はまた、ウサギ N H E 3 を阻害することが見出された。図 1 A および 1 B に関連して上記したように、ウサギ N H E 3 をトランスフェクトした P S 1 2 0 繊維芽細胞を増殖させ、 $40 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ を接触させることによって酸を前負荷した。上記のように、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の化合物との接触後の細胞外ナトリウムイオン濃度の回復の関数として pH 回復速度として表される細胞内部 pH 変化を、蛍光色素 B C E C F - A M を用いて検定した。結果を図 1 0 に示す。

このように、化合物 1 4 3 6 は N H E 3 の阻害剤である。しかしながら、上記のように、培養中の細胞およびインビボにおけるいくつかのモデルにおいて評価するとき、化合物 1 4 3 6 が起こす N H E 3 の阻害からは、スクアラミンと化合物 1 4 3 6 との全く異なる薬理作用を十分に説明されない。これは、化合物 1 4 3 6 は、N H E 3 に加えて別の N H E を阻害していたことを示唆した。妥当な候補の N H E は、少なくともリンパ球様細胞、脳および精巣において発現される N H E 5 である（最近、クローニングされた、K l a n k e e t a l . , G e n o m i c s 2 5 , 1 9 9 5 , 6 1 5 - 6 2 2 参照）。

30

N H E 5 発現細胞の阻害

N H E 5 は化合物 1 4 3 6 によって影響される他の N H E であるかどうかを調べるために、この化合物によって阻害される細胞が N H E 5 を発現するかどうかを調べる試験を実施した。クランケ (K l a n k e) らの方法とクランケ (K l a n k e) らに記載されているような適当な P C R プライマーとを使用して、N H E 5 は、化合物 1 4 3 6 に感受性を示す全ての細胞において発現されることが見出された（以下の表参照）。クローンテックラボラトリーズ (C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s) (P a l o A l t o , C A) 社から購入した単離総 RNA または総 RNA またはポリ A + RNA から総 c D N A を調製した。最初の P C R サイクルの反応は、ヒト N H E 1、ヒト N H E 3 またはヒト N H E 5 に特異的なプライマーと 80 ng cDNA を用い、また、c D N A 起源としてポリ A + RNA を使用する場合には、 1.5 ng cDNA を用いて、上記表 2 に関連して記載したように実施した。全ての場合においてアニーリング温度は 57°C とした。次いで、第 2 のサイクルの P C R 反応において、N H E 5 検出用プライマーを用いる第 2 の P C R のアニーリング温度を 65°C にしたことを除いて、表 2 に関連して記載したような条件で

40

50

、ヒトNHE1およびヒトNHE5については半ネステッドPCR反応を実施し、ヒトNHE3についてはネステッドPCR反応を実施した。結果を以下に示す。

表 8

対向輸送体	N H E 1		N H E 3		N H E 5		
PCRの回数	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	
<u>分析した細胞株または組織</u>							
副腎	+	+	—	+	+	+	10
脳、全体	+	+	+	+	+	+	
小腸	—	+	—	+			
骨格筋	+	+	—	— / + *	—	+	
HPAEC (内皮)	+	+	+	+	+	+	20
HMVEC (内皮)	+	+	—	+	+	+	
CaCO ₂ (上皮)	+	+	+	+	+	+	
メラノーマ (WM1617)	+	+	+	+	+	+	
結腸癌 (ポリA+RNA)	+	+	+	+	—	—	
白血病HL-60	+	+	—	+	—	+	
白血病MOLT4	+	+	—	+	—	+	
(ポリA+RNA)							
星状細胞腫	+		+		+		30
神経グリア芽細胞腫	+		+		+		

注：*＝複数のPCRバンドが観察された。

NHE3と塩基配列が似ているNHE5は化合物1436のより効果的な阻害標的であると考えられる。NHE3とNHE5を共に発現する細胞は、化合物1436による両NHEアイソフォームの阻害を受けるだろうが、スクアラミンの存在下ではNHE3のみ阻害されるだろう。

マウス白血病の阻害：

化合物1436は多数の癌細胞の増殖に対して阻害活性を有するので、典型的なマウス白血病モデルにおいて化合物1436を調べた(Baker et al., Cancer Res. 53, 1993, 3052-3057)。動物の100%に白血病を生じさせる摂取量のL1210リンバ芽球性白血病細胞をC57Bマウスに接種した。1、5、10mg/kgの化合物1436を3日ごとにマウスに腹腔内投与した。図11に示すように、化合物1436の最高投与量においてかなりの延命が達成された。

治療経過中に測定された血液学的特性は特に興味深い。動物をシスプラチンと化合物1436で治療した。以下の表9からあきらかなように、シスプラチンで治療された動物は28日めまでに、骨髓の赤血球前駆体の抑制されたため顕著な貧血を発症した。一方、化合物1436で治療された動物はほぼ正常なヘマトクリット値を示し、その証拠にかなりの顆粒球数が認められた。

表 9

		R B C (1 0 ⁶ / m m ³)		R B C (1 0 ⁶ / m m ³)	
薬剤	治療	早期時間	後期時間	早期時間	後期時間
シスプラチン	5 x 10 ⁵ L1210 細胞 を i p , d 1 マウスに接種 シスプラチン 8 m g / k g i p 注射	9 . 4	1 . 5	8 . 1	1 8 . 1
化合物 1 4 3 6	5 x 10 ⁵ L1210 細胞 を i p , マウス に接種 化合物 1 4 3 6 を 1 0 m g / k g i p q 4 d 注射	4 . 8	8 . 8	3 . 3	3 . 7

10

20

腫瘍増殖の相乗作用：

腫瘍の増殖は悪性細胞のクローンの伸展と支持血管供給の発生とに関係するという考えに基づいて、化合物 1 4 3 6 とスクアラミンとを組み合わせたものについて試験し、固形腫瘍増殖に相乗作用を発揮するかどうかを調べた。この概念を B 1 6 メラノーマモデルにおいて評価した。

動物に B 1 6 メラノーマを移植し、その後、化合物 1 4 3 6 または 1 2 5 6 を併用または別々に投与して治療した。図 1 2 からあきらかなように、スクアラミンを 5 m g / k g / 日の用量で、または化合物 1 4 3 6 を 1 0 m g / k g の用量で 3 日ごとに投与したとき、腫瘍容量に対する重大な影響は観察されなかった。一方、両薬剤を併用して投与したとき、腫瘍の増殖のかなりの低下が観察された。スクアラミン 1 5 m g / k g / 日の投与または化合物 1 4 3 6 単独のつまり許容できるスケジュールによる投与はどちらもこの作用を発揮しなかった。このように、これら 2 種の化合物の併用は、血管新生に依存する腫瘍に対して、転移性拡散を予防する可能性のある治療上の有用性を示す。

30

リンパ指向性ウィルスに対するアミノステロール化合物の効果：

化合物 1 4 3 6 は、上記のように、好ましくない毒性作用を示すことなく、P H A 刺激によるヒト T 細胞の増殖を阻害し、マウスのリンパ芽球性白血病の増殖を抑制するので、H I V の阻害剤としてインビトロで評価するための妥当な候補物質となると思われる。P H A 刺激を受けたリンパ球に、感染多重度が 1 0 の H I V の臨床分離株を接種した。新鮮なリンパ球を採取し、P H A および I L - 2 で刺激した。3 日後、ウィルス (H I V 臨床分離株) の 1 0 0 0 T C I D を 1 時間適用した M . O . I . は 1 : 1 0 であった。細胞を洗浄し、用量応答的に培地に薬剤を適用した。3 日後、上清を 1 / 2 容量の新鮮培地および 1 / 2 容量の新鮮薬剤と交換した。7 日後、界面活性剤を添加し、H I V P - 2 4 抗原を E l i s a によって測定した。リンパ球の生存については、ウィルスの遺伝子産物 p 2 4 の出現によって評価した。結果を以下の表に示す。

40

表 10

化合物 1436 による HIV 複製の阻害

濃度 μM	p-24 Elisa	生存率%
0.5	40561	91
1	7564	—
5	3426	—
10	421	95
20	9	90.1

10

上記のように、 $10 \mu\text{g/ml}$ の化合物 1436 は抗原の合成を効果的に 97% 阻害したが、リンパ球の生存率は 95% に維持されていた。

上記の実験は、リンパ指向性のウイルス疾患の治療に対する化合物 1436 の有用性をあきらかに裏付けている。これらの研究に基づいて、特定のウイルスの特定の細胞標的の特定の NHE 阻害剤を同定することによって、所定の感染性病因に対する効果的な抗ウイルス治療が合理的に開発されるはずである。このように、呼吸器上皮細胞に対して作用するアミノステロール系 NHE 阻害剤は、これらの細胞に伝播するヘルペス、インフルエンザおよび RSV などの呼吸器系ウイルスの治療に効果的であるはずである。この概念は、CNS (ヘルペス) および肝臓 (肝炎) に感染するウイルスに広げて考えることができる。この方法は、細胞の増殖および効果的な細胞内のウイルス増殖に必要な、細胞 NHE の活性化を防ぐことによって、ウイルスの標的細胞への感染を予防する。

20

インスリン分泌に対する影響：

本発明のアミノステロール化合物の別の作用を検討する際に、膵臓の島細胞からのインスリンの放出には、島細胞の NHE の活性化、特にグルコースによって刺激される機序を介して活性化される必要があることがわかった。島細胞の過剰刺激は、II 型糖尿病における島細胞機能の欠失になんらかの作用をしている可能性があると考えられる。また、島細胞 NHE が過剰活性する遺伝的機序が、I 型糖尿病においてなんらかの作用をしていることが示唆されている。

30

このように、島細胞機能を抑制させられるなら、遺伝的罹患しやすい、または後天的過程 (肥満) を介して危険な状態に陥った個体の糖尿病の発症を遅延または軽減させられる可能性がある。インスリンの分泌を司る NHE を阻害することは、このような状況における治療効果を生ずると考えられる。

ステロイド投与またはインスリンの分泌を司る NHE の効果を検討するために、サメの肝臓由来のアミノステロール化合物のいくつかを絶食マウスに投与した。雄 CD-1 マウスを 4 つの治療群の 1 つに割り当てた。グルコメーター (Lifescan Glucometer II および One Touch test strips) を使用して全血糖を測定した。統計分析は、一元分散分析 (ANOVA)、次いでボンフェローニ (Bonferroni) の t-検定によって実施した。結果を以下の表に示す。

40

表 1 1

マウスの絶食時血糖に与える化合物の効果

群	n	化合物	総投与量 m g / k g	治療	絶食時血糖
					平均 + S E M (m g / d l)
1	5	—	—	終夜絶食後採血	38 ± 5.2
2	4	1437 (水溶液)	20	0日目午後10 mg/kg i.v. 終夜絶食、1日目午前 10 mg/kg i.v.、2回目 投与30分後に採血	82 ± 15.3
3	4	1256 (水溶液)	20	0日目午後10 mg/kg i.v. 終夜絶食、1日目午前 10 mg/kg i.v.、2回目 投与30分後に採血	
4	3	1436 (D5W溶液)		0日目午後10 mg/kg i.v. 終夜絶食、1日目午前 10 mg/kg i.v.、2回目 投与30分後に採血	

10

20

上記のデータからあきらかなように、これらのステロイド化合物の投与後に血糖値は正常の2～3倍の間に増加した。第2群の絶食時血糖は、第1群と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$)。第4群の絶食時血糖は、第1群と比較して有意に上昇した。このように、化合物1436のD5W(5%グルコース)溶液または化合物1437の水溶液を静脈内投与することによってマウスに高血糖を惹起したと思われる。基礎生理学的原理から示唆されるように、観察された高血糖応答は、インスリンの分泌阻害によって生じられると思われる。このように、化合物1436などの化合物の長期的慢性投与は、I型糖尿病およびII型糖尿病の発症予防または発症遅延に効力を有すると思われる。

30

動脈平滑筋の成長に対する効果：

本発明のアミノステロール化合物はまた、動脈内の平滑筋の増殖因子が介在する成長の阻害に利用できると思われる。冠動脈血管形成後には、外科的に処置された血管壁内の血管平滑筋の修復的成長に二次的に通常、再閉塞が生じる。この過程は、一般に7～10日の経過を経て起こる。動脈内の平滑筋の増殖因子が介在する成長を薬剤が予防できるかどうかを評価するために、ヒト冠動脈平滑筋の成長に対する化合物1436の効果をインビトロにおいて調べた。化合物1436の結果を図13に示し、スクアラミンの結果を図14に示し、図15は両者を合わせた対数図である。

40

図13からわかるように、約10～12 $\mu\text{g/ml}$ の化合物1436はこれらの細胞の増殖を抑制する効果を示した。例えば、生存性を喪失させることなく、約11 $\mu\text{g/ml}$ のこのステロイドの存在下にて、細胞を静止状態に維持させることができた。この実験は、血管形成後の数日間、近位血管における徐放性投与によって、血管形成部位へ化合物1436を局所的に投与することによって、血管内皮が連続性を再生し、急性傷害部位周辺の細胞変化が沈静化する期間、筋の成長を低下させることができたことを示唆する。

50

成長および体重増加に対する効果：

正常に成長するマウスにおいて化合物 1 4 3 6 の生理的效果を評価している間に、このステロイド化合物は、成長しているマウスにおける直線的成長および体重増加を用量依存的に抑制することがあきらかになった。動物には 1 日目から Q T D (i . p .) を投与した。図 1 6 は、1 0 m g / k g Q T D i . p . 、5 m g / k g Q T D i . p . および 1 m g / k g Q T D i . p . で治療した C 5 7 B マウスは用量依存的に成長 G 低下したことを示す。第 6 回投与後、1 0 m g / k g Q T D を投与した動物の成長は、治療開始から約 1 ヶ月間に成長がほぼ完全に阻害される程度まで抑制された。5 m g / k g Q T D を投与した動物は、未治療の対照と比較して、成長が約 5 0 % 低下したが、1 m g / k g Q T D を投与した動物は約 1 0 % 影響されただけであった。治療動物は外見上あきらかに健康で、全ての動物が活発で、肢体の均整は正常であり、悪液質はなく、外見上の臨床的健康状態はすぐれていた。動物は、まるで下垂体切除動物のように見られた。

10

化合物 1 4 3 6 は、多種多様の細胞および組織の増殖をあきらかに阻害し、このことは、ある程度は、観察した成長の根本的抑制を説明するものである。しかしながら、これらの動物の異常な健康良好状態は、他の機序が関与しているにちがいないこと、すなわち、下垂体機能の阻害に関係する機序を示唆している。化合物 1 4 3 6 は、下垂体前葉ホルモンの分泌を部分的に阻害して、観察された成長抑制が生じると考えられる。

化合物 1 4 3 6 の正確な機序にもかかわらず、この性質は、動物に投与されたとき、予測できない様式の抗増殖作用を発揮することを示唆している。化合物 1 4 3 6 は、増殖中の細胞に作用することによって、増殖因子が誘導する細胞の増殖を阻害するだけでなく、中枢の内分泌レベルで増殖促進ホルモン分泌を阻害する。このように、化合物 1 4 3 6 は、動物を " 成長阻害 " 状態にする。このような状態では、悪性細胞は、成長ホルモン、およびおそらく、L H および F S H などのホルモンによる最適な外因性ホルモン刺激を受けない。インスリン同様、エストロゲンおよびプロゲステロンなどのホルモンの分泌の制御障害が起こる可能性が高い。ウィルス感染細胞は生理的に好ましくない条件下に置かれ、ウィルス感染効率は劇的に低下されるはずである。増殖が抑制された免疫学的異種細胞は、これらの " 異種 " 細胞を動態学的に捕獲する可能性を与えられた存在する免疫系によって排除されるはずである。

20

動脈の抵抗性に対する効果：

化合物 1 4 3 6 は、また静脈内 (i . v .) 投与によって、ラットの動脈抵抗を低下させることも見出されている。2 0 0 g のラットの右頸動脈にカテーテルを挿入し、総投与量 5 m g / k g までの化合物を 1 0 秒間で導入した。3 0 秒以内に、平均動脈圧が約 1 0 0 m m H g から約 7 0 m m H g に低下し、脈圧が約 4 0 m m から約 1 0 m m まで顕著に低下した。血圧の低下にもかかわらず、心拍数の有意な増加は観察されなかった。心拍出量が基本的に影響されなければ、原則的には、全身血管抵抗が低下すると、血圧の低下が生じるだろう。

30

この効果は、重大な変化を生じることなく、3 0 分間継続した。その時点において、4 0 μ g のノルアドレナリンを導入した。ほぼ即時の血圧上昇がみられ、脈圧がそれに伴い増加した。このデータは、化合物 1 4 3 6 の効果は、標準的な薬理学的治療によって容易に回復可能であることを示している。

40

化合物 1 4 3 6 の動脈抵抗および動脈血圧を低下させる能力は、抗高血圧剤としてのこの化合物の用途を示している。この化合物は代償性頻脈を誘発するとは思われないので、正味の作用は、心臓の後負荷を低下させることである。循環器系に対するこの種の効果の生理学的な結果は、心肥大および細動脈平滑筋増殖過程を緩徐化することだろう。化合物 1 4 3 6 はこのような性質を有するので、後負荷の低下が所望されるうっ血性心不全の効果的な治療剤となるはずである。作用の速やかさと回復の容易さ、および最小限の頻脈作用によって、この化合物は有用な治療剤となる。

このように、化合物 1 4 3 6 は過去には周知ではなく、有用な性質と利用性を有する抗増殖性治療剤である。この化合物は、あきらかに特定の組織または全器官系の増殖の抑制が所望される疾患に利用できる。

50

虚血の心毒性作用の抑制：

N H Eファミリーの阻害剤は、心虚血症状の治療に対して治療的役割を果たす可能性があることが示唆されている。このような症状は心臓発作の後、心不全中、ドナーから被移植者への臓器移植経過中に生じる。

化合物 1 4 3 6 がこのような症状に有用かどうかを測定するために、以下の実験を実施した。若体のアフリカツメガエルの心臓を生体から摘出した。クレブス - リンガー緩衝液とアドレナリン 5 0 μ g / m l とを含有するペトリ皿に心臓を入れ、肉眼で検査した。室温で、心臓は約 1 時間協調的（心房拍動に続いて心室拍動）に拍動を継続した。1 0 μ g / m l の化合物 1 4 3 6 の存在下では、自発的拍動は 2 4 時間まで継続した。心房ペースメーカーおよび心房拍動の心室への伝導はこの期間中活発であった。

このようなエキスピボにおける心活動の持続現象を説明する正確な機序は十分には解明されていないが、化合物 1 4 3 6 は、N H E 3 および N H E 5 を阻害することによって、これらの N H E を遮断することによる心臓内カルシウムの蓄積を防ぐと考えられている。当該技術分野においては現在、虚血中に蓄積する細胞内酸が N H E によって細胞外ナトリウムと交換されると理解されている。また、細胞内に流入されるナトリウムはその後、ナトリウム/カルシウム交換体の作用によって、細胞外のカルシウムと交換されて排除される。心臓死および心不整脈に至るのは、この経路を介してカルシウムが流入するためである。化合物 1 4 3 6 は、N H E を遮断することによって、プロトンまたは酸が心細胞から流出し、エネルギーの消費および拍出量を低下させるのを防ぎ、また障害性カルシウムの流入を防いで、細胞を保護する作用を有する。

特徴的な検定法としての抗増殖性検定法および腫瘍増殖抑制検定法：

上記のように、オタマジャクシ検定法を使用して追加の化合物についてスクリーニングした。1 0 μ g / m l の化合物 1 4 3 6 の存在下にて、発生段階 5 9 ~ 6 0 のアフリカツメガエルのオタマジャクシは、神経系の抑制とともに、頭部、体幹および尾のメラニン形成細胞の劇的な破壊を受けた。上皮細胞の完全性、血流、赤血球量、組織の完全性、筋繊維の横紋または消化管活動には全く影響が観察されなかった。

機能的に類似した化合物をスクリーニングするためにオタマジャクシ検定法を使用して、化合物 3 5 3、3 7 1 および 4 1 3 は、化合物 1 4 3 6 と同様の効果を発揮することが見出された。これらのうち、化合物 3 5 3 は、上記のように合成が容易なので、特に好ましい。この化合物はまた、他の有利な性質を示すことも見出された。

上記の増殖抑制方法を使用して、以下に記載するように、化合物 3 5 3 はメラノーマおよび多数の癌細胞に対して強力な活性を示すことが測定された：

表 1 2

癌細胞に対する化合物 3 5 3 の細胞毒性作用

細胞	I C ₅₀ (μ g / m l)
ヒトメラノーマ WM 1 1 6 7	3 . 0
ルイスラットの肺癌	1 . 9

また、ベーカー (B a k e r) ら、キャンサー リス (C a n c e r R e s .) 1 9 9 4 年、5 3 巻、3 0 5 2 ~ 3 0 5 7 ページの方法を使用したとき、図 1 7 A に示すように、メラノーマの増殖に対する化合物 3 5 3 の効果は、最初の 1 2 時間のインキュベーション中には効果は小さかったが、4 8 時間にわたって極めて顕著であった。比較のために、ヒトメラノーマに対するスクアラミンの効果を図 1 7 B に示す。

化合物 3 5 3 に接触させた細胞を分析すると、アポトーシス細胞死が誘導されたことがわかった。このように、このアミノステロール化合物は、化合物 1 4 3 6 と同じ選択性の高い細胞死機序を示す。

上記したように、化合物 1 4 3 6 はオタマジャクシにおいて、メラニン形成細胞破壊作用を示すが、この化合物は、スクアラミンとほぼ同じ強さで卵黄毛細管を退行させる。これ

とは違って、化合物 353 は、ヒナ胚毛細管には何ら影響を示さない。このように、化合物 353 は、NHE3 より強力に NHE5 を阻害し、化合物 1436 よりも選択性も大きいと思われる。化合物 353 は、天然に存在する分子より特異性が高いアミノステロール化合物を製造することが可能であることを示している。

化合物 1437 (画分 4) はめずらしいエルゴステロール様側鎖を含有する。オタマジャクシの尾を覆う胚上皮に対する劇的な作用に基づいて、この分子はサメから抽出される他の全てのステロイド類から容易に識別される。

上記のオタマジャクシ検定法において、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のこのステロイド化合物に接触させてから 60 分以内に、仮性皮膚が層状に剥離するのが観察された。この変化が迅速に起こったことから、この上皮組織が発現する NHE が標的であることが示唆される。接着に
10
関係する NHE 活性および細胞膜たんぱく質は相互に交信しているので (Schwartz et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 888, 7849-7853)、上皮上の NHE を阻害すると、上皮と下層との間の細胞接触が破壊され、剥離に至ると言われている。

上記の検定法を使用して、数種の癌種に対する化合物 1437 の抗癌作用を調べた。化合物 1437 は、ヒト卵巣癌、SKOV3 に対する抗癌活性を示すことがわかった。このように、化合物 1437 は、感受性の表現型を示す癌腫の治療に有用である可能性がある。上記研究が証明するように、化合物 1437 は、“中皮様”上皮層、1 層だけの細胞層からなる皮膚層を標的とする。このような層は、ヒト腹膜、滑膜、心膜および上衣などの上皮表面に類似している。従って、化合物 1437 は、このような組織およびそれらから派
20
生する悪性物に対する抗増殖作用を示すはずである。また、これらの組織はウィルスの感染を支持することがあるので、このような場合には、この化合物は治療的抗ウィルス作用を提供するはずである。

アフリカツメガエルのオタマジャクシ検定法を用いて、化合物 1437 と化学的な類似性はほとんどないが、上皮の剥離作用に関しては同じ薬理作用を生じる化合物を同定することが可能である。このような方法により、化合物 409、410、416、431、432 および 433 は機能的に化合物 1437 に類似していることが見出された。

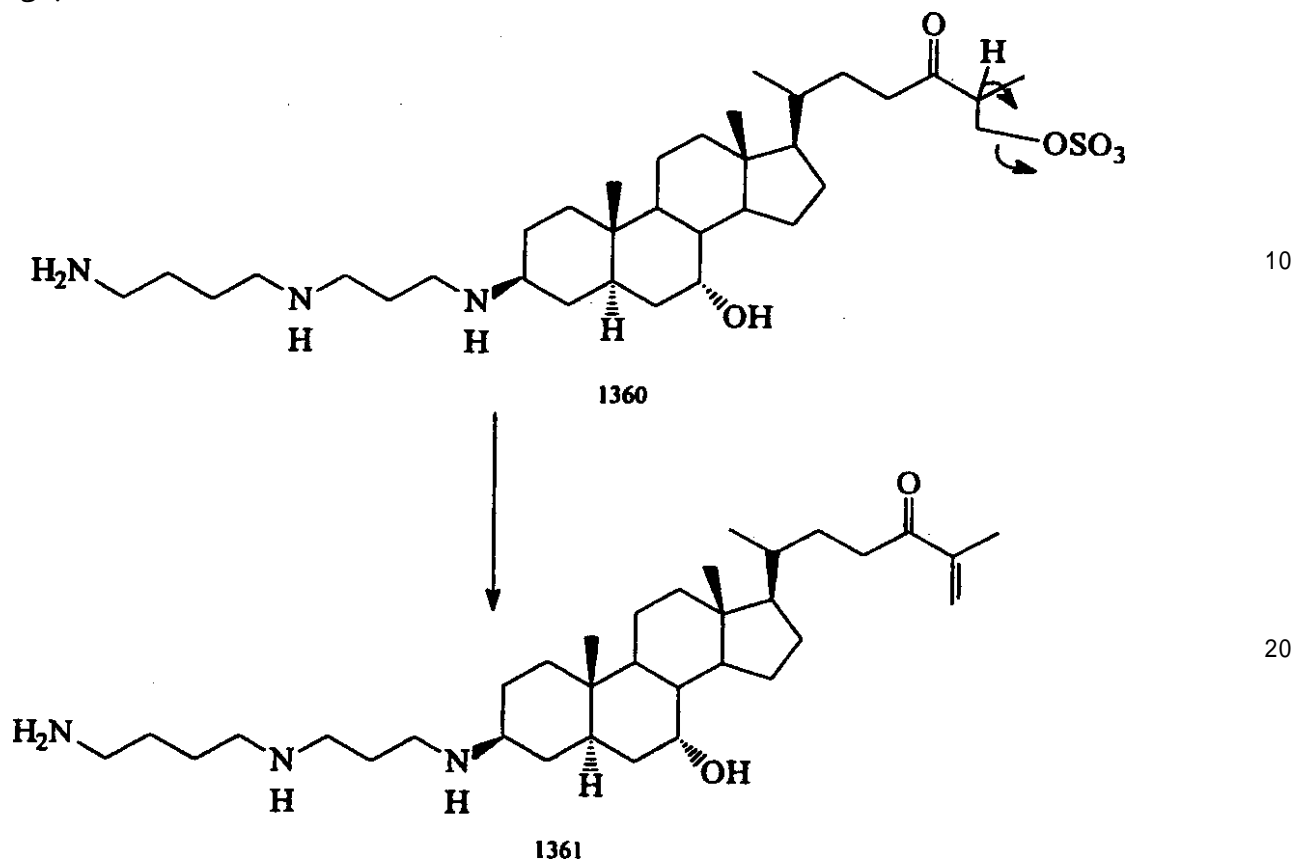
ステロイド 1360 (画分 2) は、炭素 24 位にケト基と C27 ヒドロキシル基に硫酸基を有する側鎖をもつ。構造は幾分スクアラミンに類似しているが、オタマジャクシおよび
30
ヒナ胚検定法において、劇的に異なる薬理作用を示す。

発生段階 59 ~ 60 のオタマジャクシを化合物 1360 の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液に入れたとき、尾全体の広範な血管閉塞が 60 分以内に生じ、近位部より遠位部が程度が大きかった。赤血球の目視可能な膨潤によって閉塞が生じ、その後破裂して、核が放出された。核は、血管床によって、遠位部の動静脈に運ばれる。これは、大きさと重さの異なる硬貨を特殊な収集管内に分ける硬貨選別機械に似ている。核がこれらの血管内に蓄積されると、血流は近位側で遮断された。核による栓が形成されてから 20 ~ 30 分以内に、これらの栓の周辺の組織は破壊し始めた。まるで、核がこれらの組織を支える土台物質を本質的に溶解する加水分解酵素を放出しているように思われた。

ヒナ胚検定において、化合物 1360 は、オタマジャクシで見られるものとは異なる効果を生じた。20 分以内に、化合物に接触しない赤血球より酸化度が高いことを反映して、
40
胚の血管を循環する血液はより明るい赤色を示した。多種の機序によってこの効果が説明されるだろうが、化合物 1360 に接触後では、ヒナの赤血球の内部 pH はよりアルカリ性になっていたと考えられる。これは、この細胞の NHE の活性化によって生じるのだろう。さらに、この交換体の活性化は細胞の膨潤、すなわちオタマジャクシで観察された現象も生じるだろう。

両生類および魚類 (およびおそらく鳥類) の有核赤血球は、NHE1 - と呼ばれる特殊な NHE を発現することが知られている。特徴が解明された他の全てのものとは異なり、この交換体は cAMP によって活性化され、ヘモグロビンの酸化状態に影響される。このデータは、化合物 1360 がこの交換体を活性化するであろうことを示している。さらに、この化合物は、示唆された様式で機能するように理想的な化学構造を有する。弱アルカ
50

リ性の条件下では、以下に概略図で示すように、化合物 1360 は 27 位のヒドロキシル基の脱水、硫酸基の脱離および対応する 27 - エンの形成を受けることが見いだされている：



このように、細胞内部のアルカリ度が増すと、化合物 1360 の寿命は短くなり、それによって異常な形で "フィードバック" する。化合物 1360 の加水分解産物である化合物 1361 は同じ NHE に阻害作用を示す可能性がある。

データによれば、化合物 1360 は、胚発生段階の血液細胞上に存在する NHE とあきらかに相互作用することがわかる。ヒト胎児は、鳥類、魚類および両生類と大きさが同じ有核赤血球細胞を発生するので、ヒトのある種の血液細胞、おそらく胎児の血液細胞もこの化合物の標的細胞となると思われる。胎児 NHE の活性化は、低酸素障害から胎児を保護することを目的とする治療方法に対して有用かもしれない。

化合物 1360 の全適用範囲を言うには、ヒトにおける赤血球 NHE アイソフォームの分布について記載しなければならない。しかしながら、NHE の阻害剤ではなく、刺激作用であるように思われる場合もある。いずれにしても、化合物 1360 は、抗菌、抗真菌、抗ウイルス等、胎児仮死治療および悪性血液腫瘍治療のために使用されるだろう。

画分 3 (FX3) の化学構造はまた完全には決定されていないが、薄層クロマトグラフィーの結果から、化合物 1436 に構造がよく似た、ステロイドに関連するスペルミンを有する。このステロイド化合物は、オタマジャクシの胚骨格筋に対して顕著な効果を示す。オタマジャクシ検定法において、化合物との接触から 1 時間以内に、発生段階 59 ~ 60 のオタマジャクシの尾の筋束から茶色の色素の漏洩が観察された。横紋はぼやけて、不明瞭になった。心拍動および四肢の筋活動を含む他の機能は影響を受けなかった。これらの観察は、FX3 は筋肉を含む初期の間葉を標的にしていることを示唆する。

オタマジャクシの観察をヒトにまで広げて考えられるとすると、FX3 はある種の間葉細胞の増殖に顕著に影響を与えることになる。このように、FX3 は、横紋筋、軟骨、繊維芽細胞性組織、骨および脂肪組織の癌などの、間葉細胞由来の種々の癌の治療に有用であろう。

また、繊維芽細胞の増殖が影響される場合には、繊維芽細胞の増殖が望ましくない状況において、繊維芽細胞の増殖の制御に有用であろう。すなわち、CNS 損傷の癒痕化が予防

されるだろう。線維症が合併する部位の外科処置後の望ましくない瘢痕化は重要な治療標的であるだろう。心臓、腎臓および肝臓疾患に見られるような繊維芽細胞性増殖の全体の状態を軽減できるだろう。

筋肉の成長を阻害するならば、F X 3 はある種の心疾患に見られるような筋肉の肥厚性疾患の阻害に用いることができるだろう。

アフリカツメガエルのオタマジャクシ検定法を用いて、数種のアミノステロール化合物は、F X 3 と同様の薬理作用を示すものとして同定された。これらの化合物には、化合物 3 7 0、4 1 2、4 5 8、4 5 9、4 6 5 および 4 6 6 が含まれる。これらの化合物は、一般に、スペルミン残基を共有する。これらは化学的にはスクアラミンより単純で、天然に存在するステロイドより、薬剤化にかかるの費用が安い。

10

画分 1 (F X 1 A) ステロイドの構造を上を示す。水中では速やかに他の分子 (F X 1 B) に転換されるようである。上記の検定法を使用したとき、F X 1 A は、アフリカツメガエルに独特の薬理作用を発揮する。

オタマジャクシの周囲の水の中にこのステロイド化合物を加えてから数時間以内に、糞の排泄が劇的に増加する。多種の脊椎動物の消化管において、N H E が腸の液体分泌の調節に用いられているので、画分 1 はこのような N H E に作用すると考えられる。糞物質の増加は、結腸の N H E が阻害されるときヒトに生じる症状である " 下痢 " に相当するだろう。このステロイド化合物は全体的な活動、筋の完全性に、また目視可能ないかなる組織の生存にもほとんど影響を与えないので、ナトリウム - 水交換の調節などの生理学的機能を発揮するのかもしれない。

20

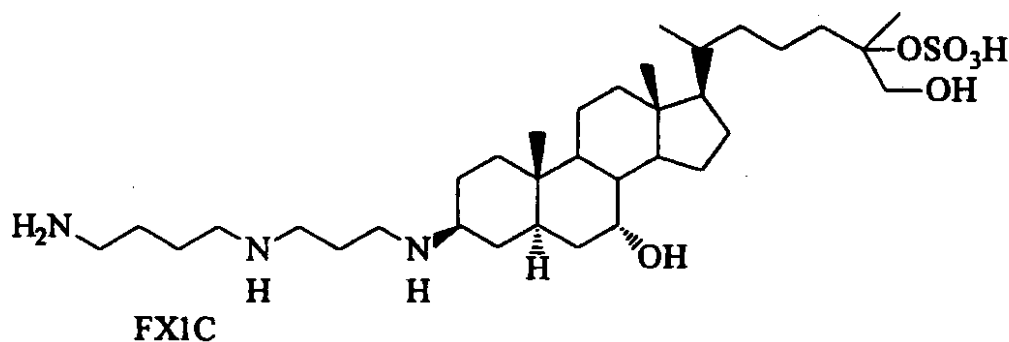
ステロイド化合物と標的の特徴が十分解明された後ではその用途はより明瞭になるが、オタマジャクシのデータは、画分 1 はある種の生理学的傷害におけるナトリウム/プロトン交換の調節に有用であることを示唆している。これらには、高血圧、膵嚢胞性線維症および便秘の治療が含まれる。

腸の流体動態に対して影響するので、この薬剤は感受性細菌、寄生虫、真菌等を死滅させる一方、腸から感染菌の放出を促進する作用を有する抗菌剤ともなろう。画分 1 はまた、有効な抗菌剤、抗寄生虫剤または抗真菌剤としての有用であろう。

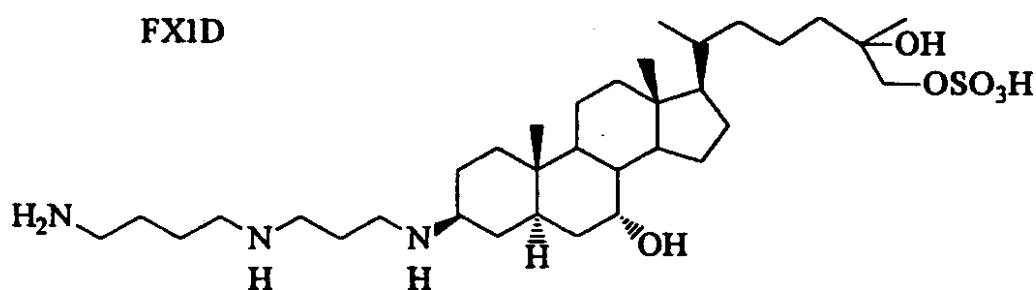
アフリカツメガエルのオタマジャクシの検定法を使用することによって、分画 1 と同様の薬理活性を有するアミノステロール化合物が同定された。驚くべきことに、これらの化合物は化合物 1 3 6 4 と化合物 4 1 4 を含むことが見出された。これらの化合物は画分 1 と同じ効力を発揮するが、それらは化学的には単純な構造を有する。

30

予備試験データは、図 9 に示すように、逆相クロマトグラフィーによる分離によって、画分 1 よりわずかに早く溶出する、少なくとも 2 種の親水性ステロイドが存在することを示した。これらのステロイドの構造を以下に示す。



10



FX1CおよびFX1Dは、化合物1437に類似して、スクアラミンに似た1個の硫酸基と追加の水酸基とを有するステロイドであることがわかる。

20

他ののアミノステロール化合物の構造：

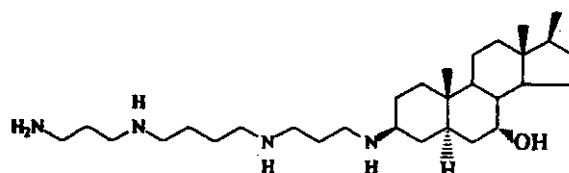
スクアラス アカンシアス (*Squalus acanthias*) から単離された種々のアミノステロイドから、この動物の組織からまだ単離されていない関連のあるアミノステロール化合物が存在することを予測することができる。これらのステロール化合物は、現在までに決定された構造と、コレステロール側鎖が受ける可能性がある周知の生化学的変化とに基づいて、脊椎動物の組織中に存在することが推論される (Tammam, "Bile Salts in Fishes," Chemical Zoology, (eds. Florkin et al.), Academic Press, 1974, 595-612)。

30

このように、24位の硫酸ヒドロキシル基を形成するスクアラミンの存在に基づいて、以下に示すように、スクアラミンステロイド核とアミノステロール部分を有するが、側鎖の硫酸ヒドロキシル基の位置は異なる他の誘導体を発見することができるはずである。水酸化は25位、26位または27位の炭素上で生じうるので、また各々は立体特異性を示すので、自然界にそれらの存在を期待すること、および独自の薬理作用を示すことを想定することは妥当である。

同様に、コレステロール側鎖に1個の硫酸基と第2の水酸基を有するステロイドの存在は、側鎖の硫酸化および1箇所での水酸化のパターンに多様性が存在するであろうことを示唆している。このように、硫酸基形成が24位、25位、26位および27位炭素上にみられるアミノステロールは天然に存在する可能性が高い。一方、これら4種の硫酸アミノステロールの各々は利用可能な24位、25位、26位および27位の炭素が水酸化されてもよい。少なくとも以下のステロイド化合物は、ここに示した帰納的論理とデータに基づいて、天然産物から単離されうる：

40



ステロイド[®] B

30

40

50

本明細書末の表 I に示すように、抗菌/抗真菌スペクトルは化合物ごとに異なる。このよ

うに、スクアラミン様の薬理活性を有するまたは有しない抗菌ステロイドを得ることが可能である。

表Ⅰの後の表ⅠⅠに記載するように、検定によって天然および合成アミノステロール化合物の活性が異なる。前記を考慮すると、スクアラミン様の薬理活性を有するまたは有しないステロイドをスクリーニングすることが可能である。

N H E アイソフォームの選択：

分子生物学的方法を使用することによって、どのN H E アイソフォームが悪性腫瘍などの特定の細胞において発現されるかを測定することが可能である。ヒトメラノーマはN H E 1、N H E 3およびN H E 5を発現し、ヒト腺癌は主にN H E 3を発現する（表8参照）

。

このように、スクアラミンまたは化合物319などのN H E 3に対してより特異的な阻害剤を使用することによって、この種の腺癌を極めて効果的に治療されるだろう。一方、メラノーマはN H E 3とともにかなりの量のN H E 5を発現する。このように、この悪性腫瘍は、N H E 3およびN H E 5の両方に対する阻害剤、例えば化合物1436単独使用またはスクアラミンとの併用などによって治療されるべきである。

要約すると、本発明は、標的組織において発現されるN H E アイソフォームを診断的に評価することによって確立される、アミノステロールN H E 阻害剤の利用を可能にしている。診断的手法としては、特定のN H E アイソフォームたんぱく質の免疫学的検出、特異的な塩基配列情報を利用するP C Rおよび標準的な方法による分子生物学的手法が挙げられる。

このように、本発明の他の実施態様は、本発明の明細書および実施例を考慮することによって当業者にあきらになる。上記の実施態様および好ましい特徴は例として考慮されるべきであり、本発明は添付の請求の範囲の内容によって規定される。

10

20

表 I

天然及び合成アミノステロールの抗菌活性

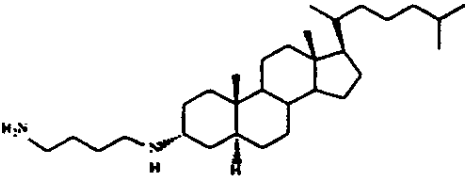
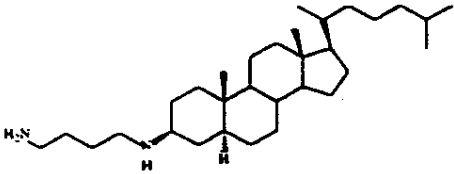
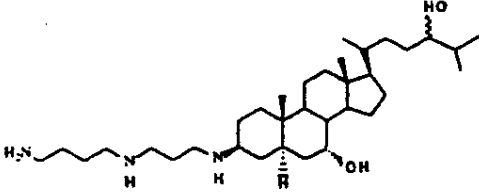
構造	MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)				
	黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジタ・アルビカンズ	
 MSI-1240A	4	>256	>256	64	10
 MSI-1241A	16	>256	>256	>256	20
 MSI-1232	4-16	32	128	64	30

表 I (続き)

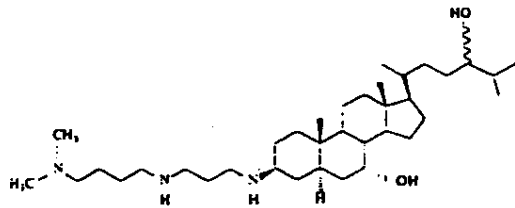
抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンタリナ
---------	-----	-----	-------

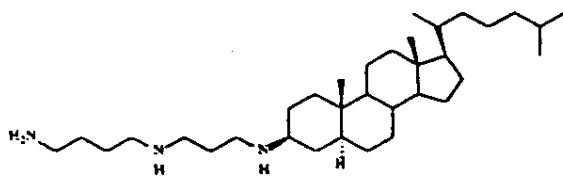
8-16	64	128	64
------	----	-----	----

構造



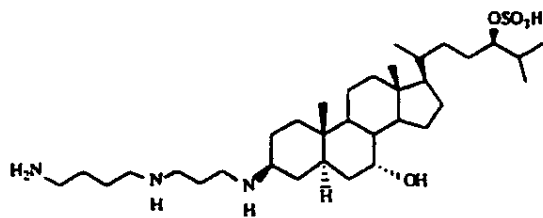
MSI- 1239A

10



化合物 303

20



MSI- 1256

30

0.5-1	2-4	16	8
-------	-----	----	---

表 I (続き)

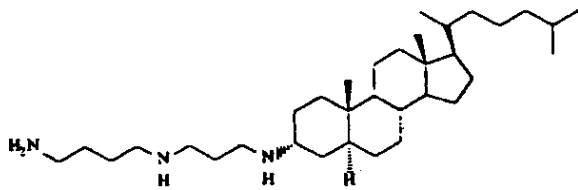
抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカン
---------	-----	-----	------------

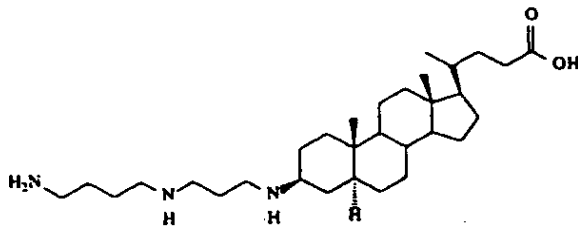
2-4	128	128	128
-----	-----	-----	-----

構造



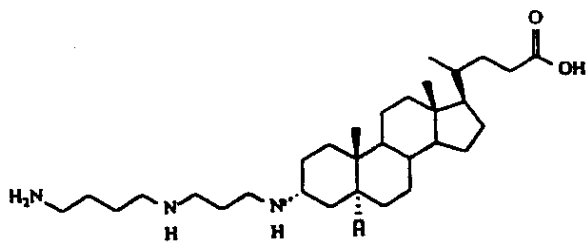
化合物 304

10



化合物 319

20



化合物 318

30

64	32-64	32	8
----	-------	----	---

128	32	64	>256
-----	----	----	------

表 I (続き)

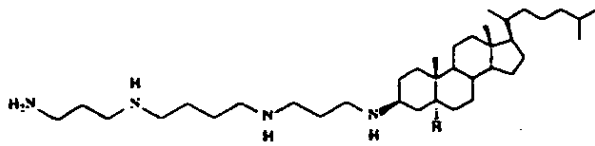
抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

構造

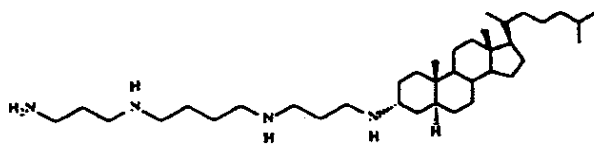
黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカンス
---------	-----	-----	-------------

16	128	64	32
----	-----	----	----



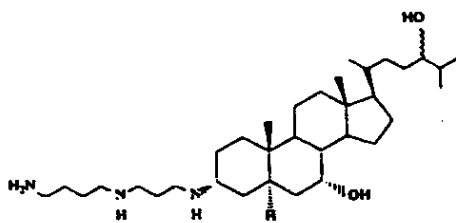
化合物 353

10



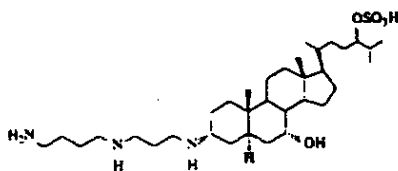
化合物 354

20



化合物 387

30



化合物 388

40

8	64-128	64	16-32
---	--------	----	-------

16-32	128	256	64
-------	-----	-----	----

2-4	4-8	16	16
-----	-----	----	----

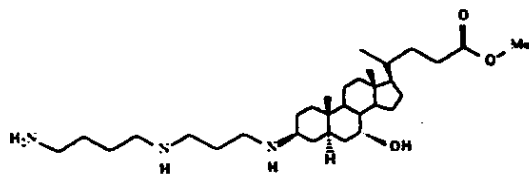
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンタリウム・アルベカン
---------	-----	-----	--------------

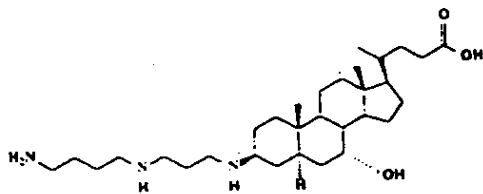
構造



化合物 380

4-8	32	64	32
-----	----	----	----

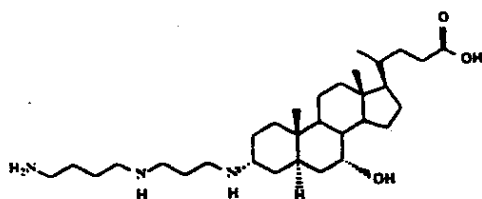
10



化合物 381

32	64	32	128
----	----	----	-----

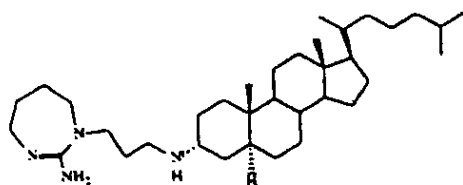
20



化合物 382

16	64	32	32
----	----	----	----

30



化合物 393

2	>256	>256	32
---	------	------	----

40

構造

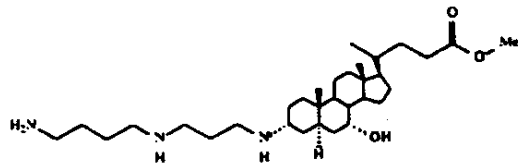
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

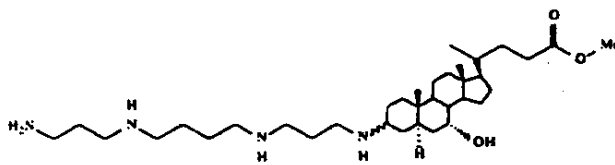
黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジタ・アルビカンズ
---------	-----	-----	-------------

4	64	64	32
---	----	----	----



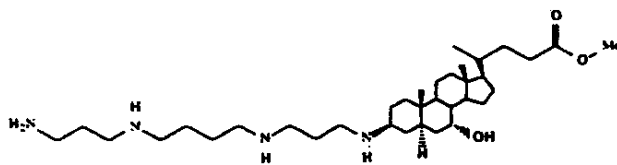
化合物 394

10



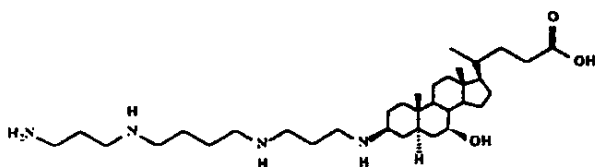
化合物 395

20



化合物 396

30



化合物 397

4	32	64	64
---	----	----	----

2-4	64	128	16
-----	----	-----	----

16	32-64	16	32
----	-------	----	----

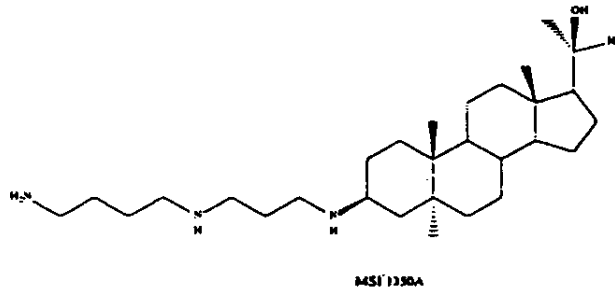
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

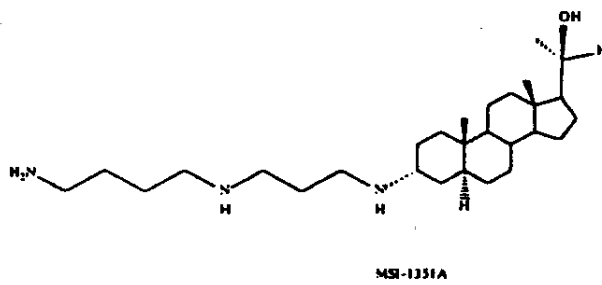
黄色ブドウ 球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジタ -アルカリス
-------------	-----	-----	----------------

構造



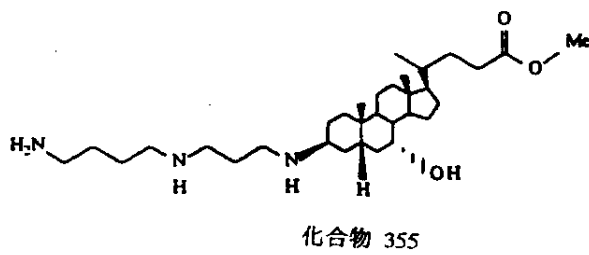
4	32-64	256	64
---	-------	-----	----

10



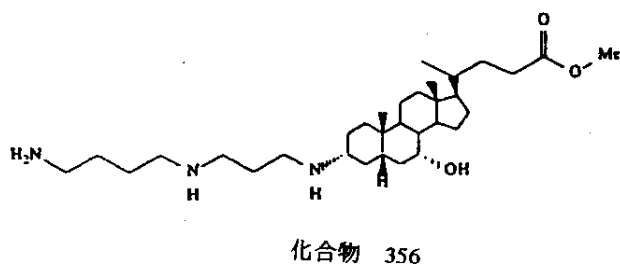
16	64	128	128
----	----	-----	-----

20



64	256	>256	256
----	-----	------	-----

30



4	32-64	64	64
---	-------	----	----

40

表 I (続き)

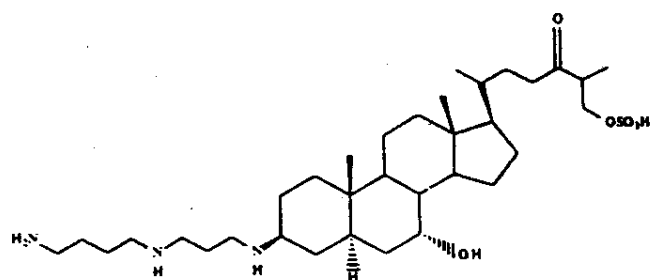
抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジタ・アルビカンズ
---------	-----	-----	-------------

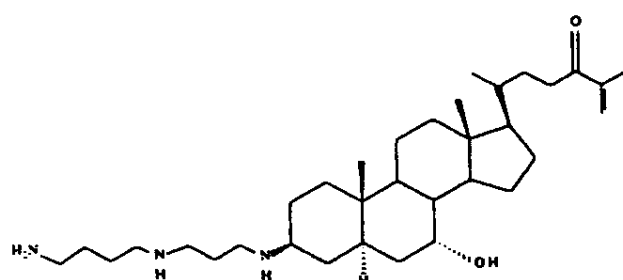
8	128	128	32
---	-----	-----	----

構造



化合物 1360

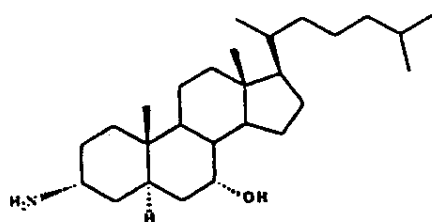
10



化合物 1361

4	32	128	4
---	----	-----	---

20



化合物 1363

2	>256	>256	2
---	------	------	---

30

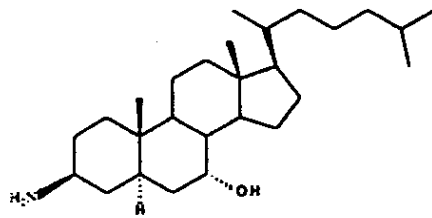
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカンス
---------	-----	-----	-------------

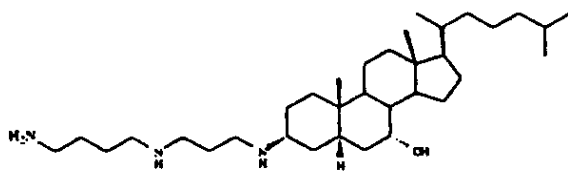
構造



化合物 1364

2	>256	>256	2
---	------	------	---

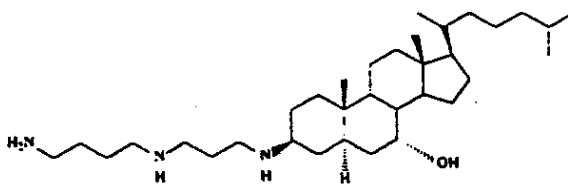
10



化合物 370

4	32	64	2
---	----	----	---

20



化合物 371

4	64	64	2
---	----	----	---

30

表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

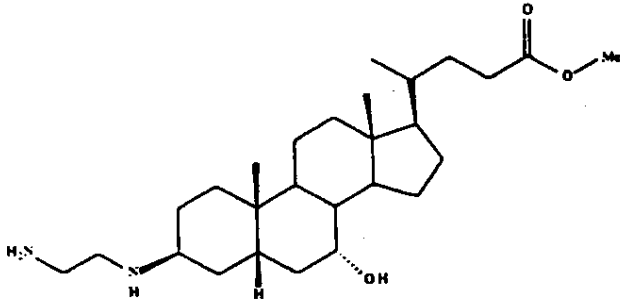
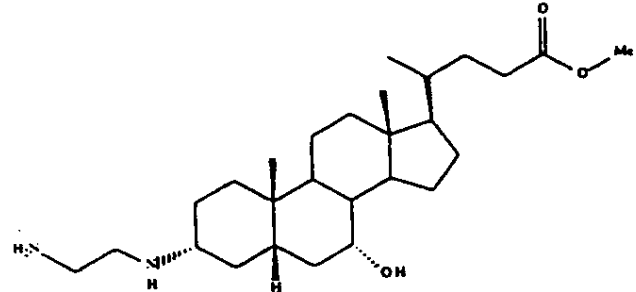
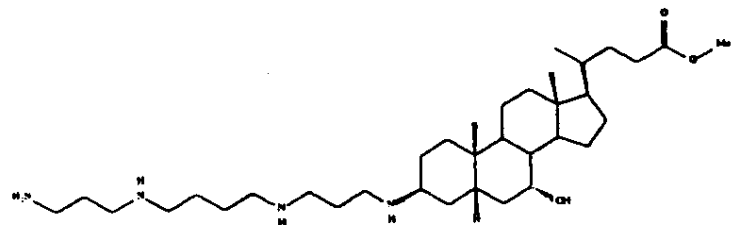
構造	黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アブヒカンス	
 <p>化合物 409</p>	32	64	128	16	10
 <p>化合物 410</p>	16	16	32	16	20
 <p>化合物 411</p>	8	64	64	2	30

表 I (続き)

抗菌活性

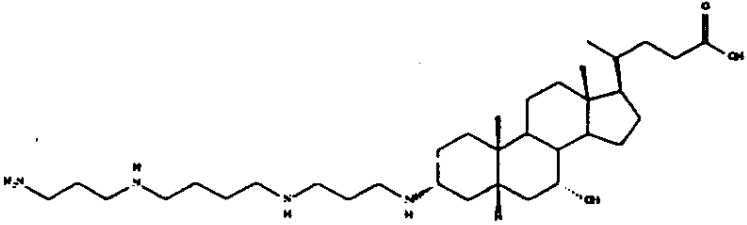
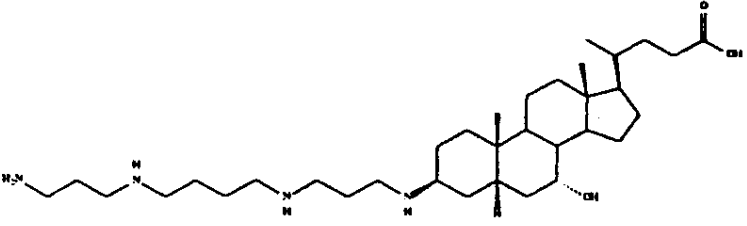
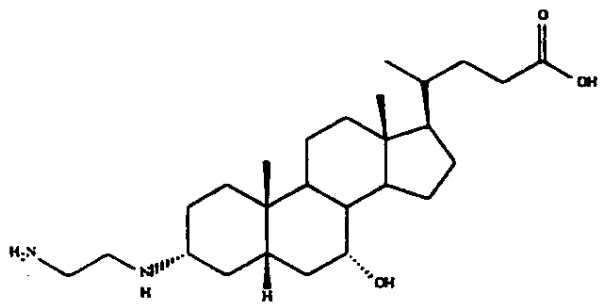
構造	MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)			
	黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アブヒカソス
 <p>化合物 412</p>	8	64	8	8
10				
 <p>化合物 413</p>	8	256	64	32
20				
 <p>化合物 414</p>	32	64	64	64
30				

表 I (続き)

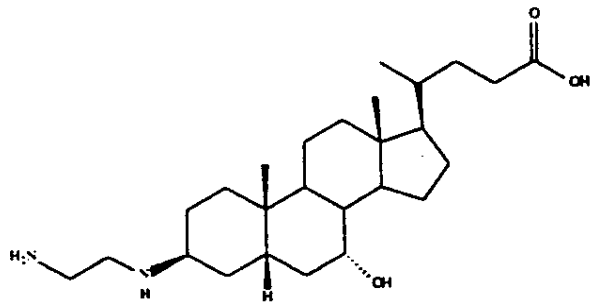
抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカン
---------	-----	-----	------------

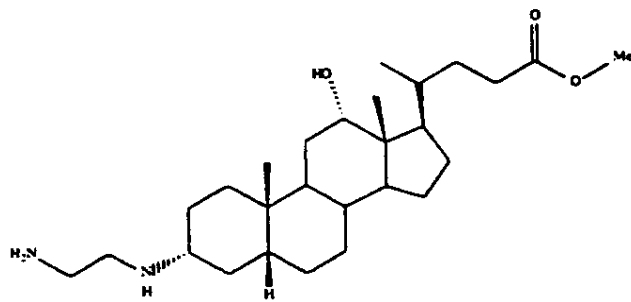
128	128	256	256
-----	-----	-----	-----

構造



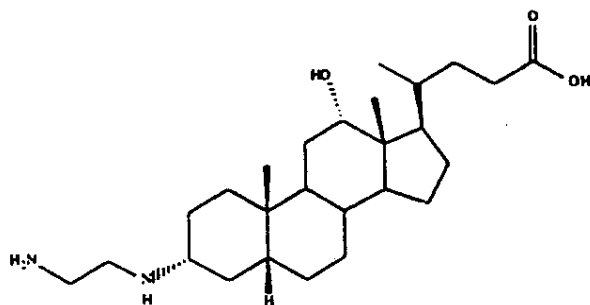
化合物 415

10



化合物 416

20



化合物 417

30

8	8	16-32	32
---	---	-------	----

16-32	64	128	32
-------	----	-----	----

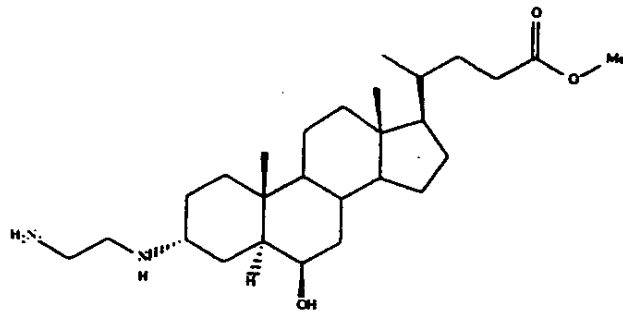
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカンス
---------	-----	-----	-------------

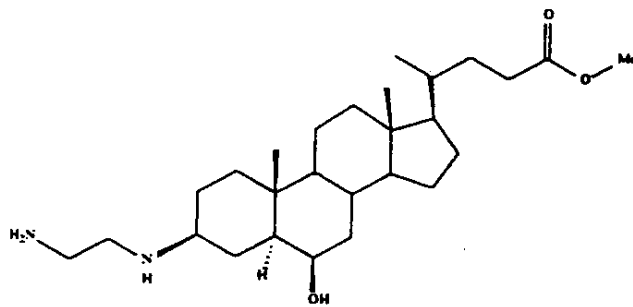
構造



化合物 431

16	32-44	128	8
----	-------	-----	---

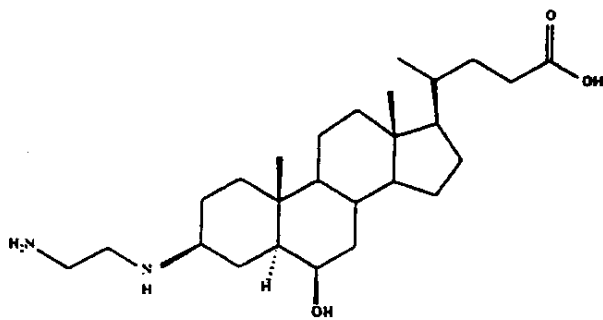
10



化合物 432

1	8-16	64	2-4
---	------	----	-----

20



化合物 433

>256	>256	128	>256
------	------	-----	------

30

40

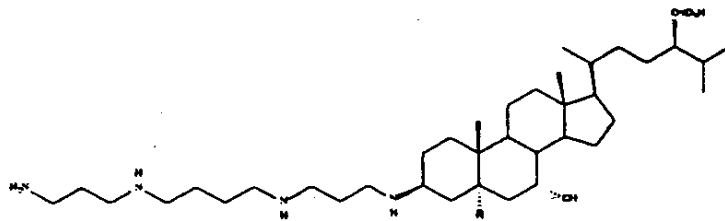
表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

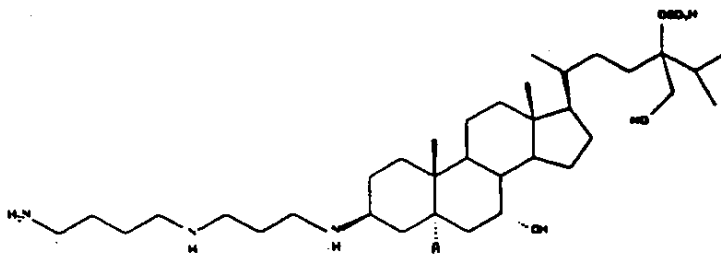
黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンタリナ

構造



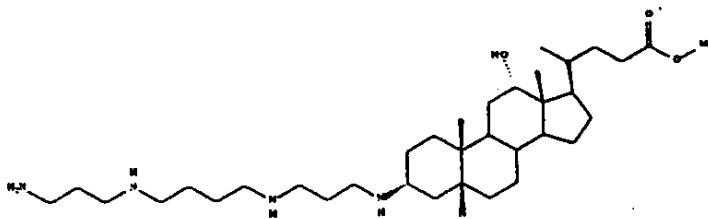
化合物 1436

10



化合物 1437

20



化合物 448

30

2	16	8	8
---	----	---	---

表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

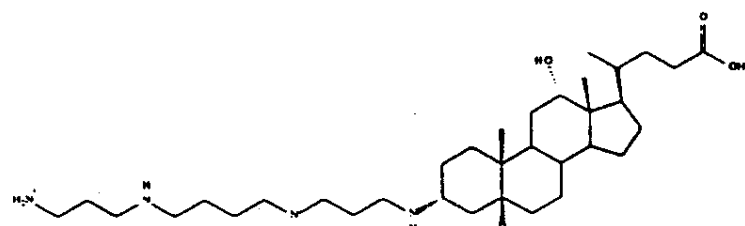
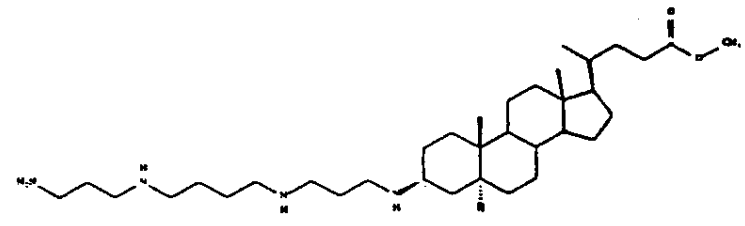
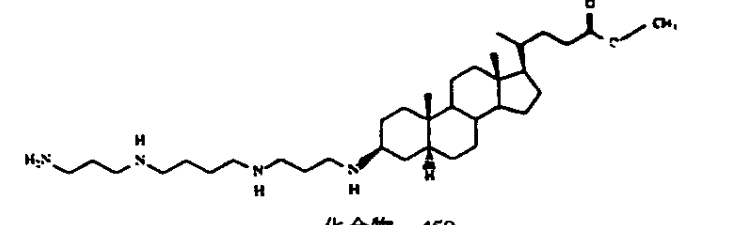
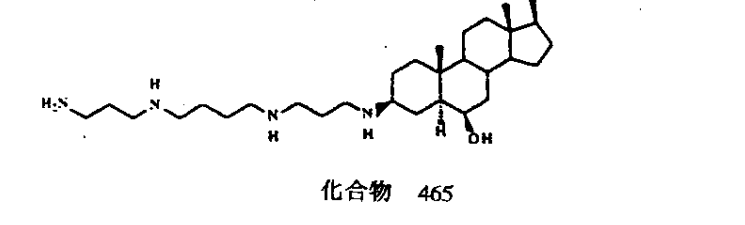
構造	黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	カンジダ・アルビカンス
 <p>化合物 449</p>	4	8-16	4	4
10				
 <p>化合物 458</p>	4	32	64	2
20				
 <p>化合物 459</p>	1-2	32	64	2
30				
 <p>化合物 465</p>	2-4	32	128	4
40				

表 I (続き)

抗菌活性

MIC 値 ($\mu\text{g/mL}$)

構造

黄色ブドウ
球菌

大腸菌

緑膿菌

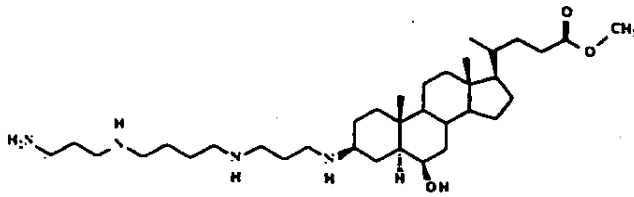
カンタ
・アルカス

2

32

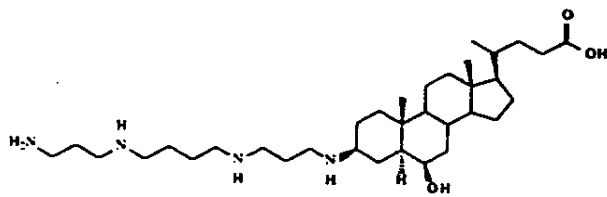
32

2



化合物 466

10



化合物 467

20

表 I I

ヒナ胚およびオタマジヤクシ検定法における
天然および合成アミノステロールの活性

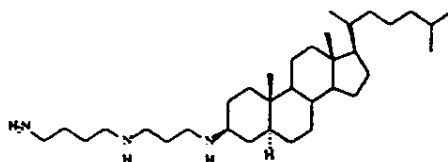
V: 血管; M: メラニン形成細胞; E: 上皮; TB: 組織破壊;
GI: 消化管; Mus: 筋肉; Tox: 2時間致死率

30

構造	最小有効濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジヤクシ (10 $\mu\text{g/mL}$)			乗状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$) HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$) LLC MTT ($\mu\text{g/mL}$)

303

>10

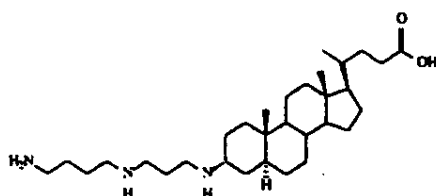


V	M	E	TB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

40

318

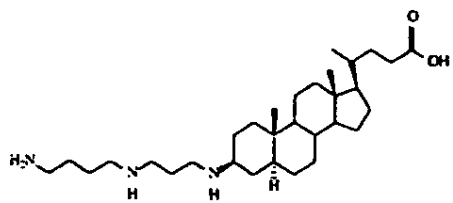
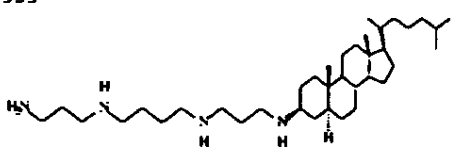
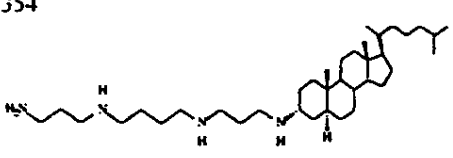
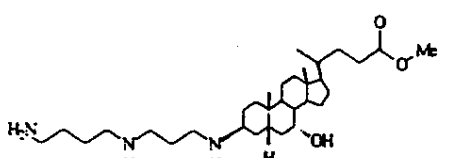
>10



V	M	E	TB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

50

表 II (続き)

構造	最小有効濃度(μg/mL)										
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ (10μg/mL)					糸状組 織形成 (μg/mL)	HM MTT 検定法 (μg/mL)	MTT (μg/mL)		
319	0.001	Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox	13.8		
		-	-	-	-	-	-	-			
353	>1	Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox	10	3.0	1.9
		-	+	-	-	-	-	+			
354	>10	Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox			
		-	-	-	-	-	-	-			
355		Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox			
		+	-	-	-	-	-	±			

10

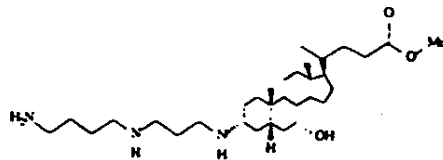
20

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			素状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$)
					HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)
					MTT ($\mu\text{g/mL}$)

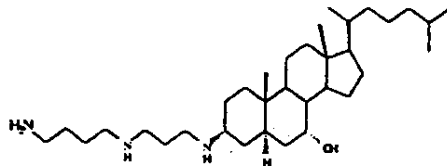
356



Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
+	-	-	-	-	-	+

10

370



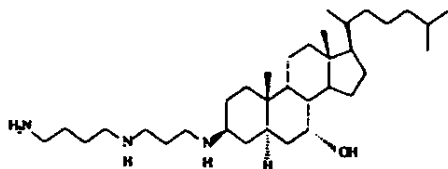
>10

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

4.0

20

371



1-10

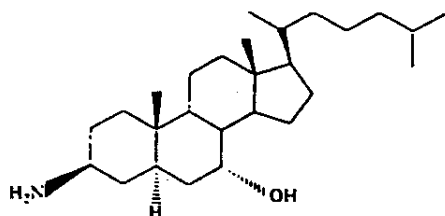
Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	+	-	-	-	-	+

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)	糸状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$)	HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)	MTT ($\mu\text{g/mL}$)

364

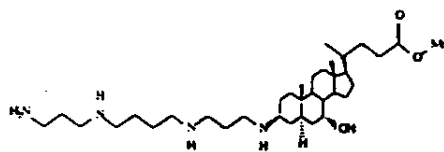


1

V	M	E	IR	GI	Mus	Tox
+	-	±	-	-	-	+

10

396

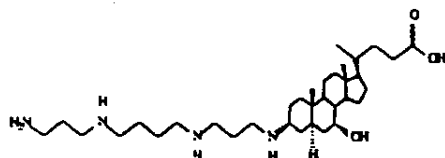


10

<u>V</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>IR</u>	<u>GI</u>	<u>Mus</u>	<u>Tex</u>
-	-	-	-	-	-	+

20

397



1

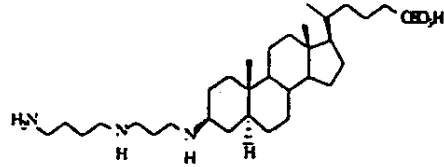
<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	<u>IR</u>	<u>GI</u>	<u>Mus</u>	<u>Tox</u>
-	-	-	-	-	-	+

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度(μg/mL)				
	ヒナ胚 検定法 (μR)	オタマジャクシ (10μg/mL)	系胚組 織形成 (μg/mL)	HM MTT 検定法 (μg/mL)	MTT (μg/mL)

399

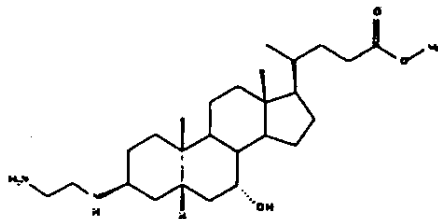


>10

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	+	-	-	-

10

409

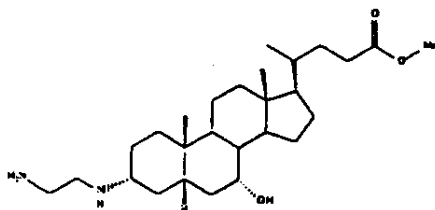


>1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	+	+	-	-	-

20

410



0.01

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
±	-	+	+	-	-	+

10

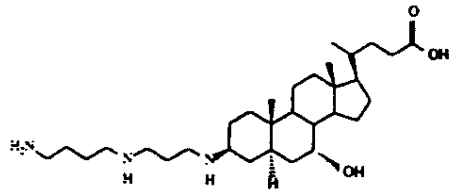
2.6

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			
		素状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$)	HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)	MTT ($\mu\text{g/mL}$)	

381

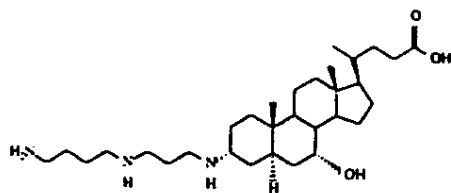


>10

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	+

10

382



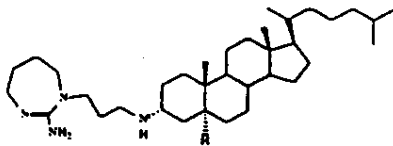
0.01

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	+

58.6

20

393

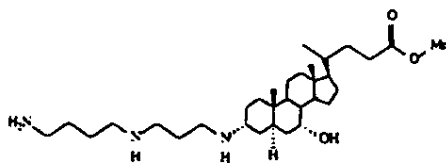


>10

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	±	-	-	-	-	+

30

394



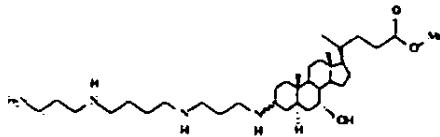
>10

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-						

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μE)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			絮状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$) HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$) MTT ($\mu\text{g/mL}$)

395

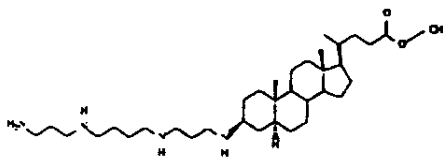


>10

V	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

10

459



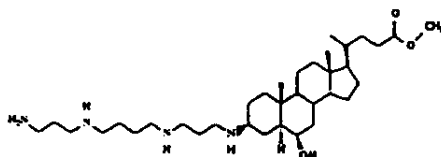
>1

V	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	=	-	-	+	-

5.0

20

465



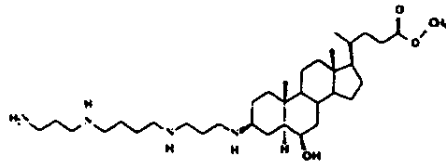
V	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	=	-	-	+	+

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μR)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			素状組 糖形成 ($\mu\text{g/mL}$)
					HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)
					MTT ($\mu\text{g/mL}$)

466

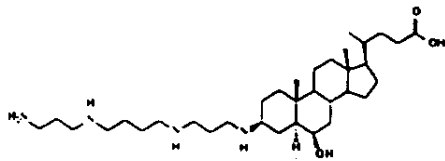


1

Σ	Δ	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	±	-	-	-	-

10

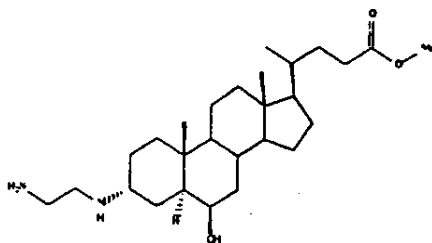
467



Σ	Δ	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	+

20

431



>1

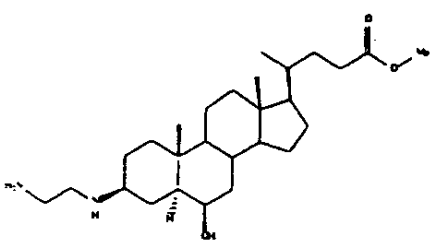
Σ	Δ	E	IB	GI	Mus	Tox
±	-	-	+	-	-	+

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度(μg/mL)						
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジクシ (10μg/mL)				素状粗 糖形成 (μg/mL)	HM MTT 検定法 (μg/mL)

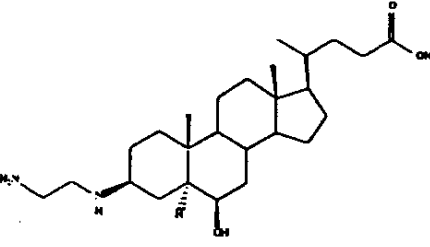
432



>1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	+	-	-	-	-

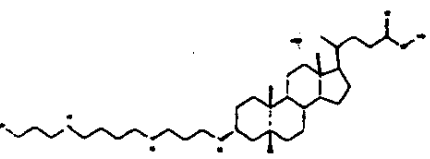
433



1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	+	-	=	-	-

448



1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
=	-	+	+	-	-	-

10

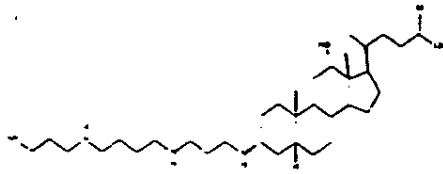
20

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			素状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$) HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$) MTT ($\mu\text{g/mL}$)

449

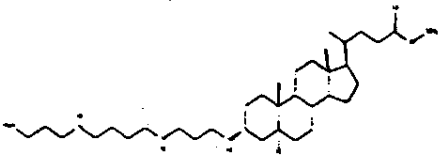


>1

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	-	±	±	-	-	+

10

458



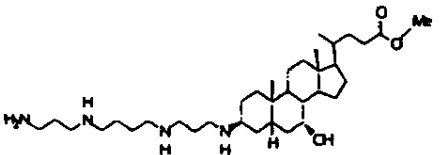
>1

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	-	±	-	-	+	+

6.8

20

411



>1

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
±	-	-	-	-	-	+

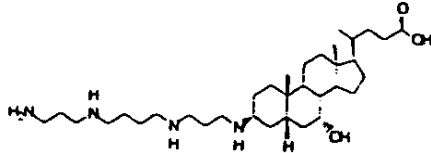
10

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度(μg/mL)			
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ (10μg/mL)	索状組 織形成 (μg/mL)	HM MTT 検定法 (μg/mL)

412



I

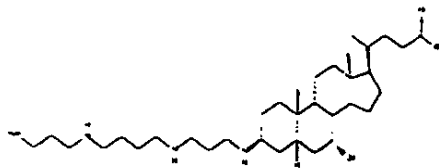
Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	+

>10

18.1

10

413



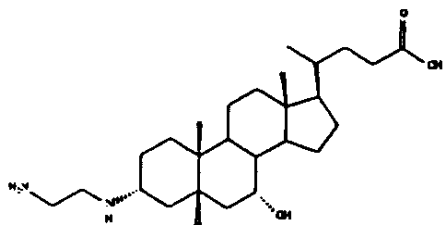
>1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	+	-	-	-	-	+

>10

20

414



>1

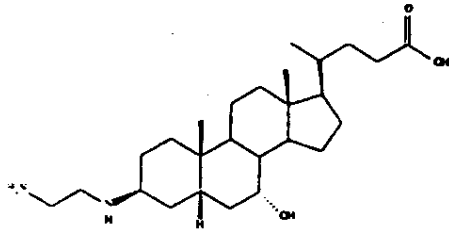
Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	+	-	-

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ ($10\mu\text{g/mL}$)			
		栗状組 塊形成 ($\mu\text{g/mL}$)	HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)	MTT ($\mu\text{g/mL}$)	

415



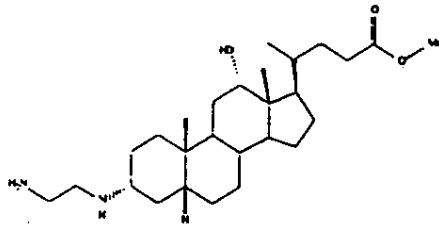
>1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

>10

10

416



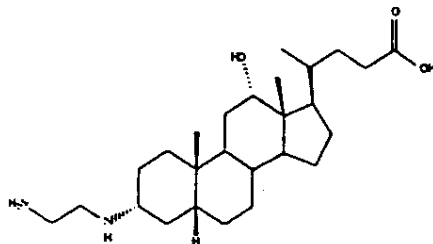
>1

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
±	-	+	+	-	-	+

2.4

20

417



>1

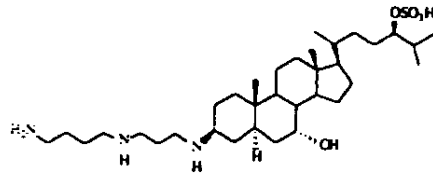
Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	-	-	-

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度(μg/mL)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ (10μg/mL)	素胚組 織形成 (μg/mL)	HM MTT 検定法 (μg/mL)	MTT (μg/mL)

1256



0.01

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
+	-	-	-	-	-	+

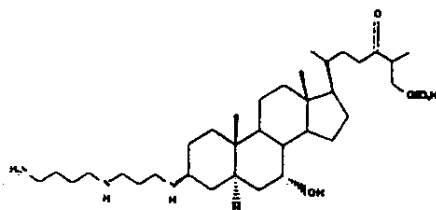
0.01-0
1

7.8

13.2

10

1360

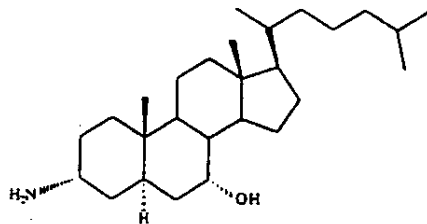


>10

Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	+	+	-	-	-

20

1363



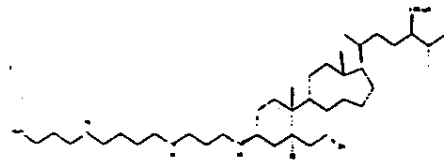
Y	M	E	IB	GI	Mus	Tox
-	-	-	-	+	-	-

30

表 II (続き)

構造	最小有効濃度($\mu\text{g/mL}$)				
	ヒナ胚 検定法 (μg)	オタマジャクシ (10 $\mu\text{g/mL}$)			乗状組 織形成 ($\mu\text{g/mL}$)
			HM MTT 検定法 ($\mu\text{g/mL}$)	MTT ($\mu\text{g/mL}$)	

1436



I

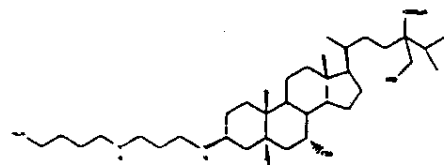
Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	+	±	-	-	-	+

6.9

16.7

10

1437



>1

Y	M	E	IR	GI	Mus	Tox
-	-	+	-	-	-	-

20

【図 1 A】

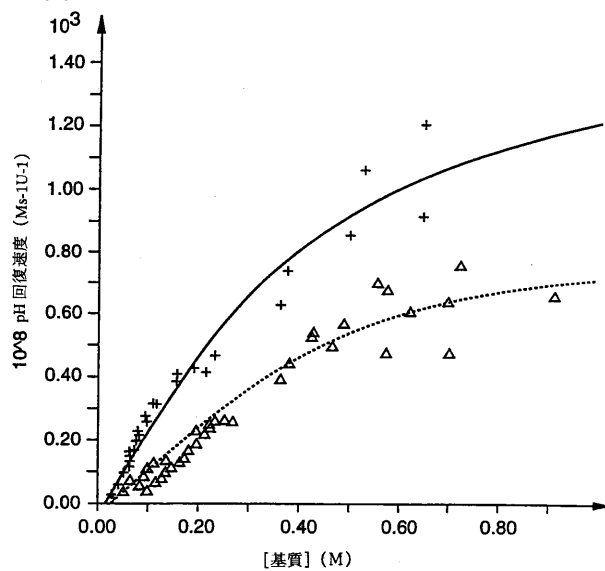


FIG. 1A

【図 1 B】

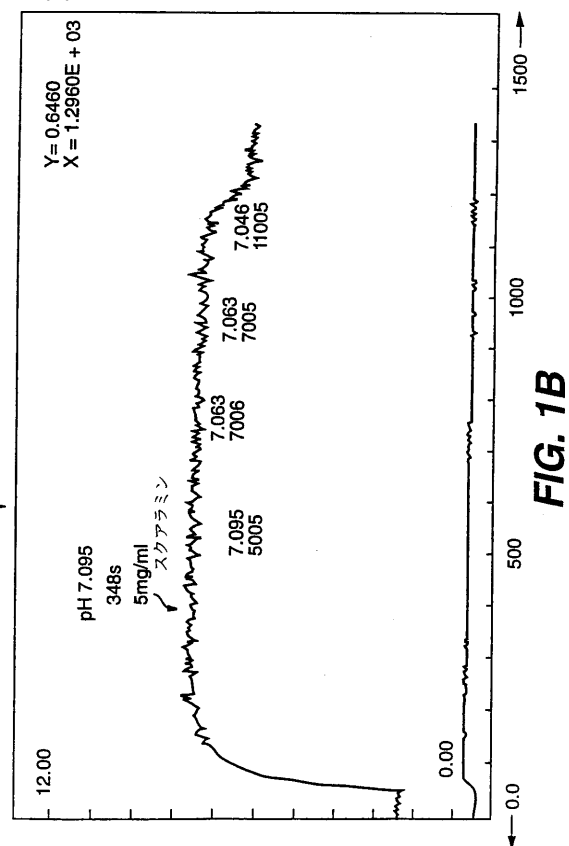
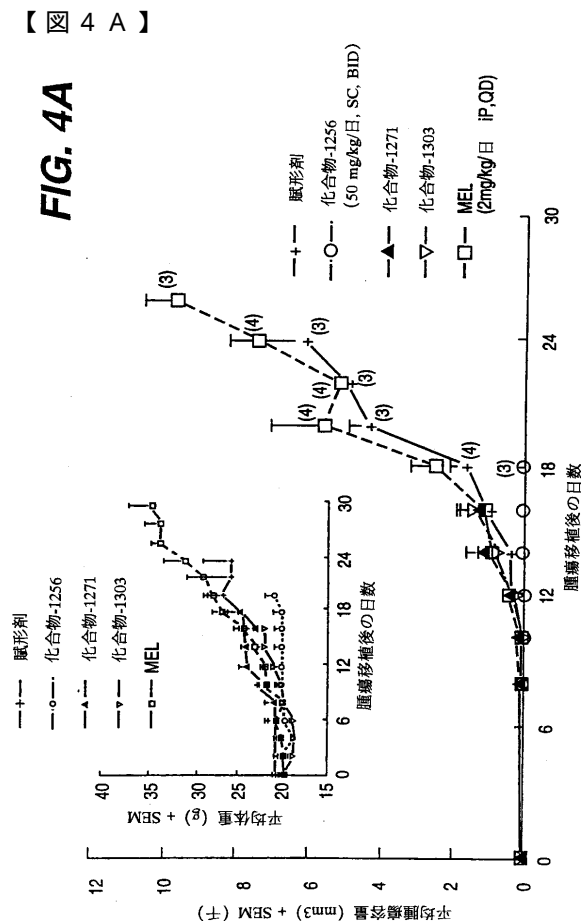
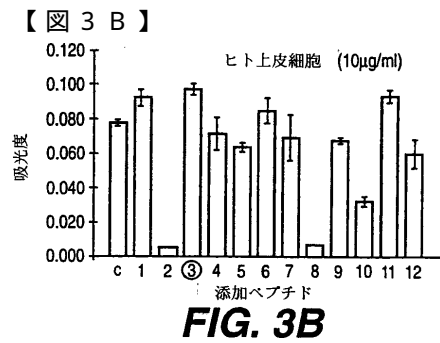
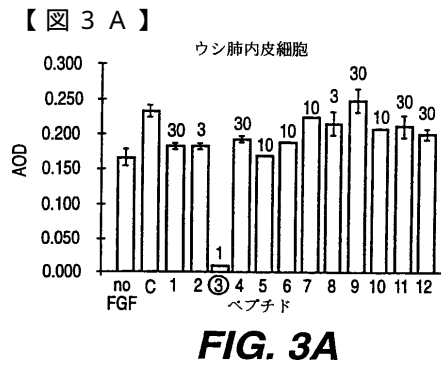
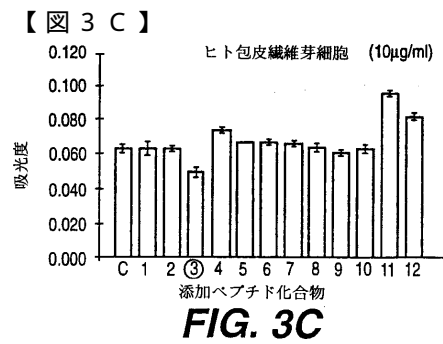
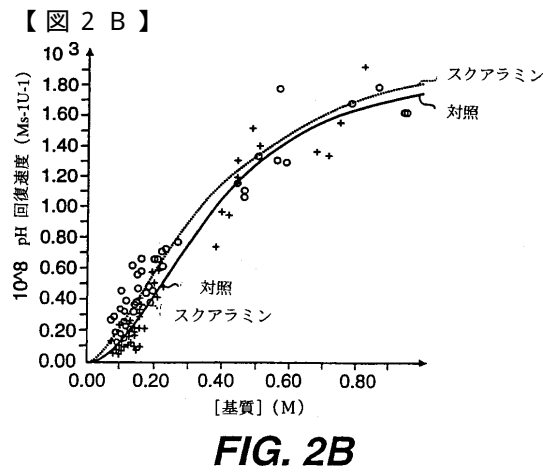
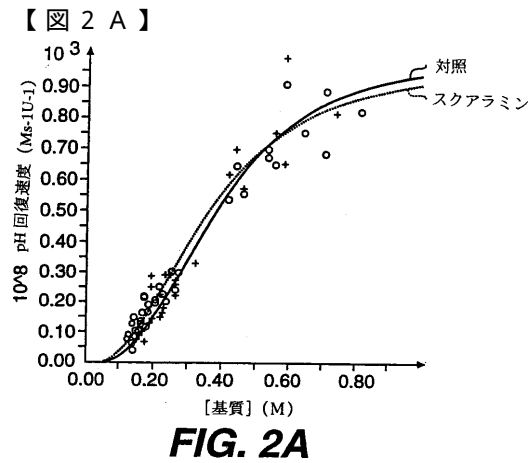
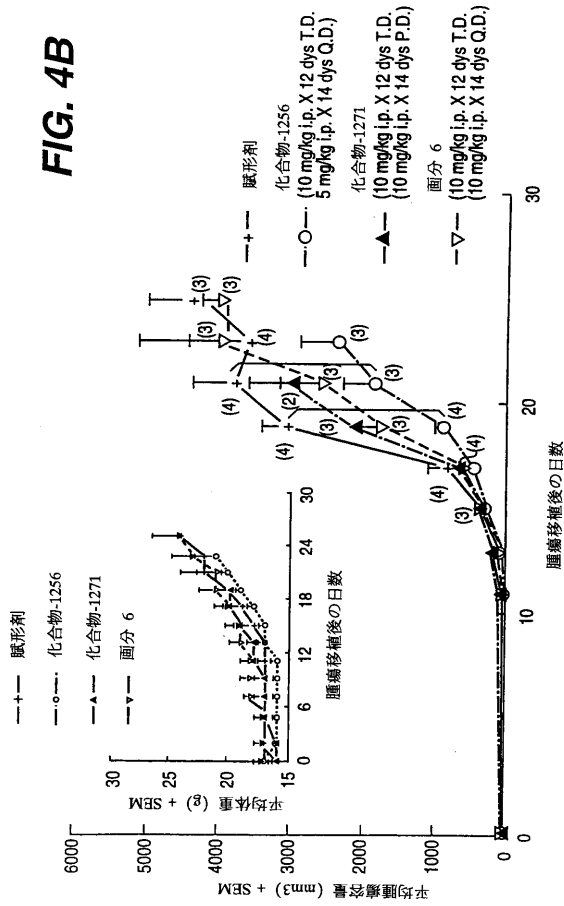


FIG. 1B



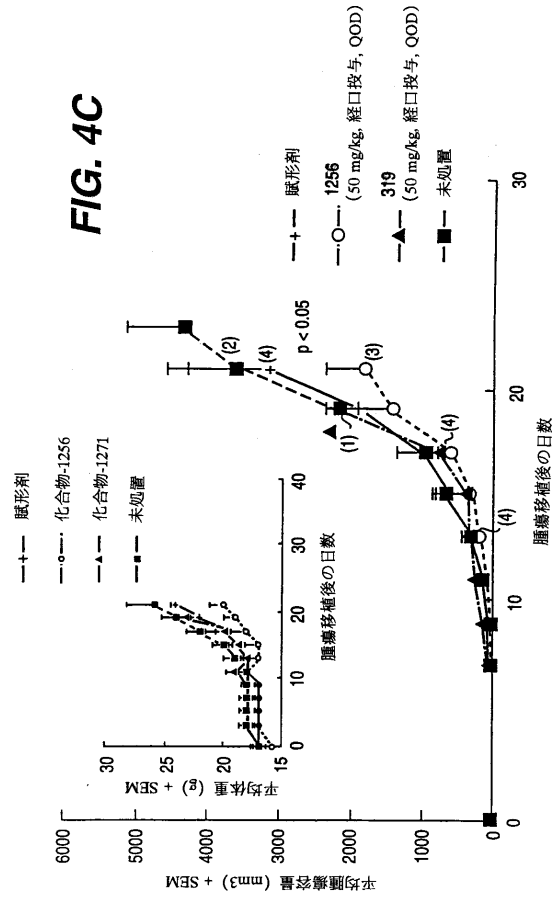
【図 4 B】

FIG. 4B



【図 4 C】

FIG. 4C



【図 5】

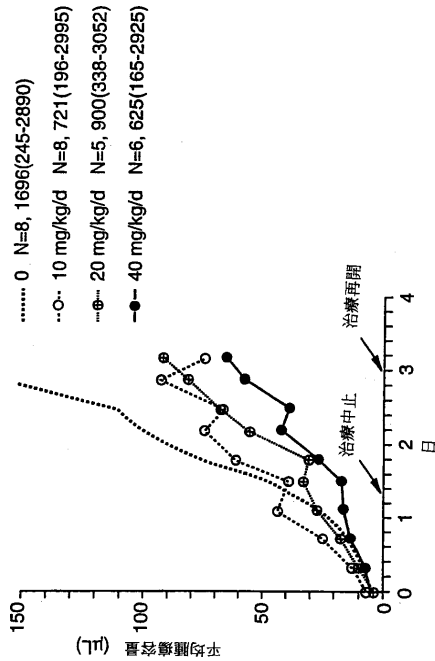
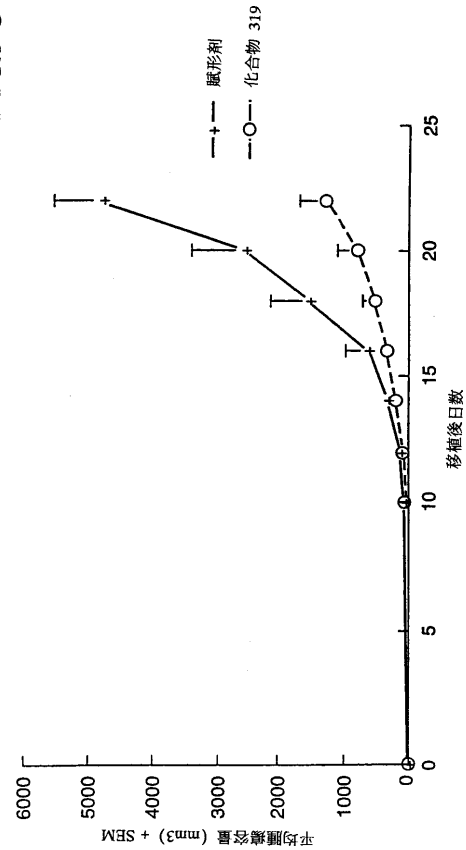


FIG. 5

FIG. 6



【図 7】

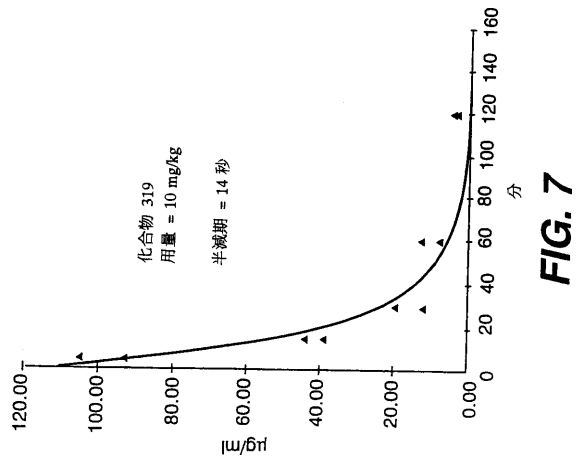


FIG. 7

【図 8】

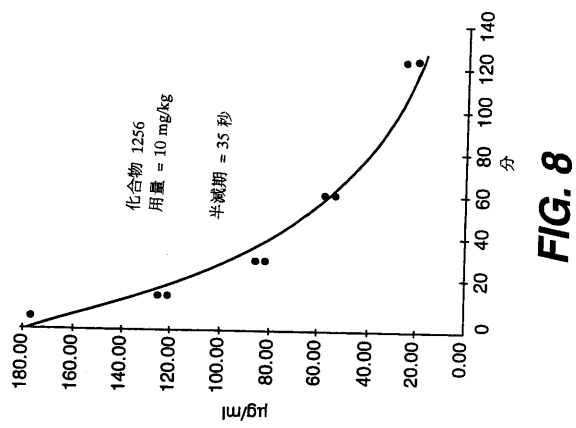


FIG. 8

【図 10】

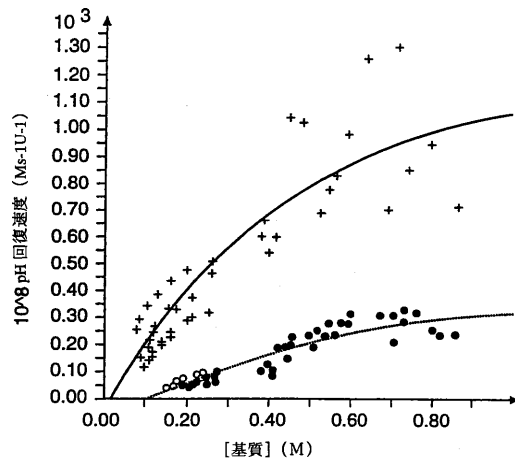


FIG. 10

【図 9】

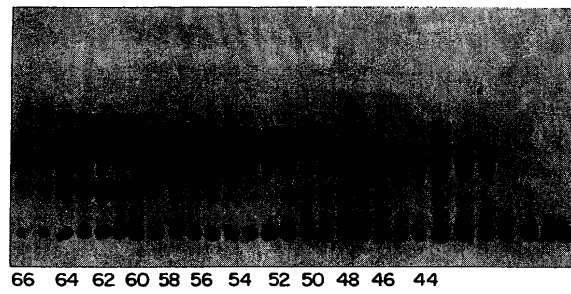


FIG. 9

【図 11】

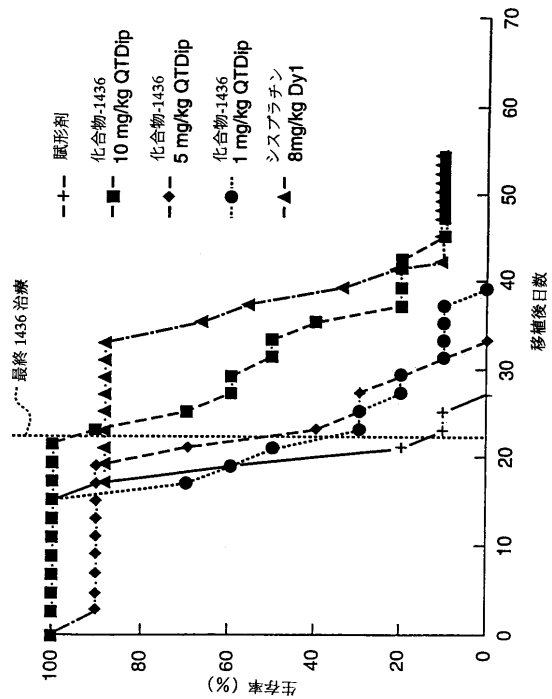
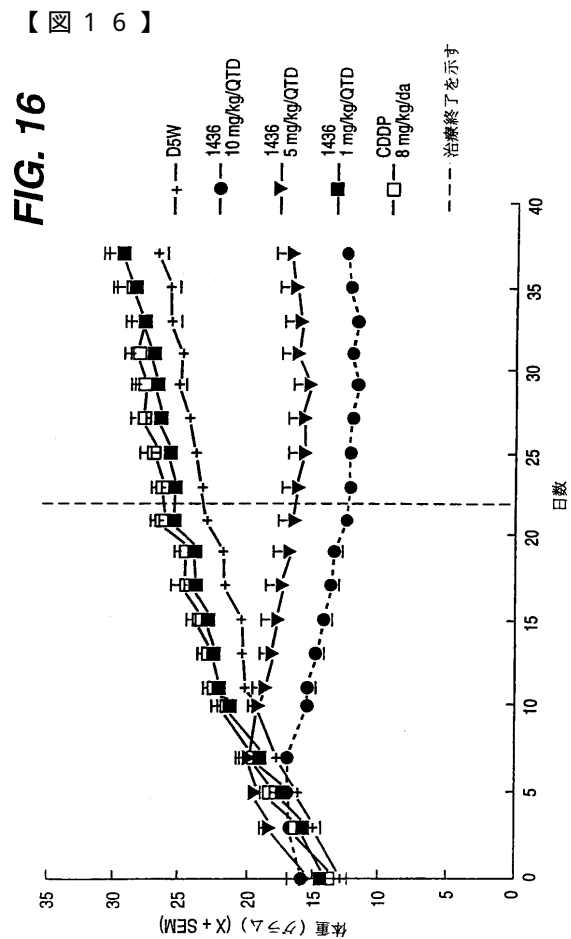
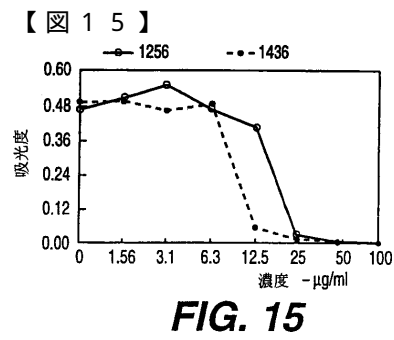
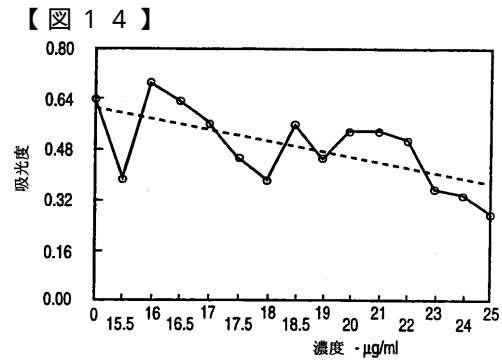
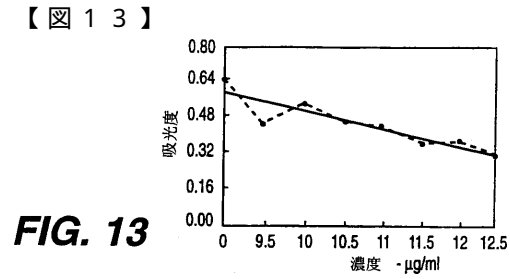
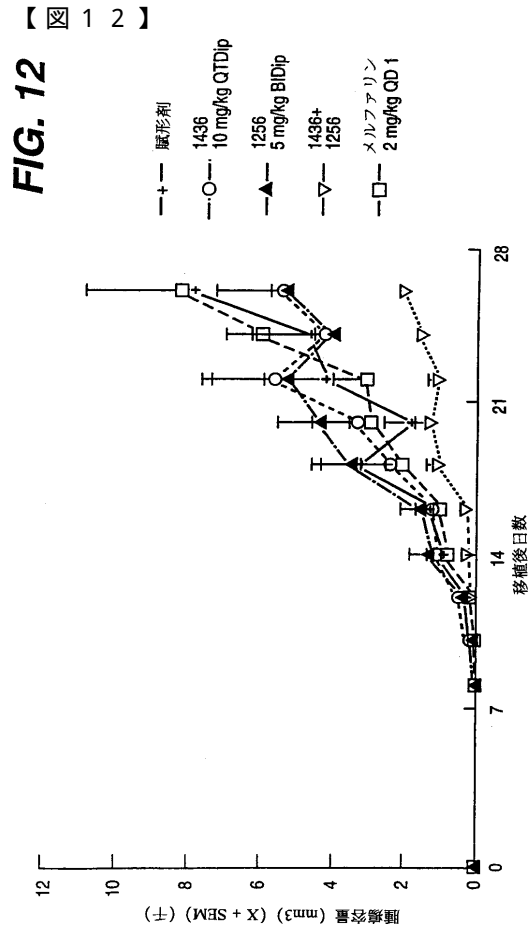
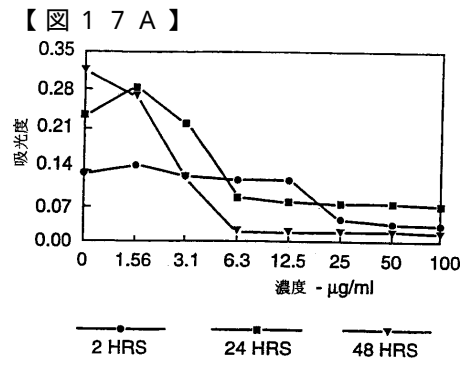
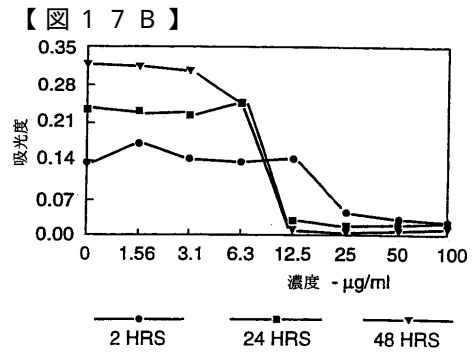


FIG. 11



**FIG. 17A****FIG. 17B**

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(31)優先権主張番号 08/479,455
 (32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/483,057
 (32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/483,059
 (32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/487,443
 (32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 08/479,457
 (32)優先日 平成7年6月7日(1995.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 キンニー ウィリアム
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 チャーチビル エルム アベニュー 1 1 5
 (72)発明者 ウィリアムズ ジョン
 アメリカ合衆国 ニュー ジャージー州 ロビンズビル ダーベル ドライブ 1 1
 (72)発明者 ラオ ミーナ
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ホルスハム ログ ポンド ドライブ 2 5
 (72)発明者 アンダーソン マーク
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ノリス タウン フェア ビュー レイン 8 0 2 0
 (72)発明者 マクレイン マイケル
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ランズデイル グリーン スプリング サークル 1 0 3
 (72)発明者 ジョーンズ スティーブン
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ウェスト チェスター ケント コート 1 0 3 ビー

審査官 齋藤 恵

(56)参考文献 米国特許第 0 5 1 9 2 7 5 6 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C07J 41/00
 A61K 31/00 - 575
 CA(STN)
 REGISTRY(STN)