

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504268

(P2004-504268A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

C07D 215/20

A61K 31/192

A61K 31/355

A61K 31/47

A61P 5/14

F I

C07D 215/20

A61K 31/192

A61K 31/355

A61K 31/47

A61P 5/14

テーマコード (参考)

4C031

4C062

4C086

4C206

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 184 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-558439 (P2001-558439)
 (86) (22) 出願日 平成13年2月9日 (2001.2.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年8月12日 (2002.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/004168
 (87) 国際公開番号 W02001/058889
 (87) 国際公開日 平成13年8月16日 (2001.8.16)
 (31) 優先権主張番号 09/502,592
 (32) 優先日 平成12年2月11日 (2000.2.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

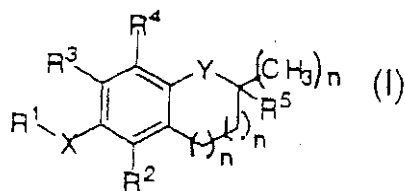
(71) 出願人 591026333
 リサーチ ディベロップメント ファンデーション
 RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
 アメリカ合衆国, 89703 ネバダ, カーソン シティ, ノース ディヴィジョン ストリート 402番地
 (74) 代理人 100080115
 弁理士 五十嵐 和壽
 (74) 代理人 100071478
 弁理士 佐田 守雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トコフェロール、トコトリエノール、その他のクロマン、及びそれらの側鎖誘導体とその利用法

(57) 【要約】

本発明は以下の構造式 (1) を有する抗増殖性化合物を提供する。

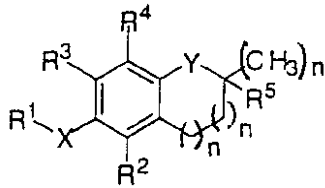


上の式で、Xは窒素、窒素、又は硫黄であり、Yは酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり、Yが酸素あるいは窒素である場合は、nは1であり、Yが硫黄の場合は、nは0である。さらに、上記化合物を含む組成物を投与するステップを含む、細胞内でアポトーシスを誘発する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造式を有する化合物において、



Xは酸素、窒素、又は硫黄で構成される群から選択されるものであり；

Yは酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり；Yが酸素、又は窒素である場合は、nは1であり、Yが硫黄である場合は、nはゼロであり；R¹はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボキシアミド、エステル、チオアミド、チオールエステル、チオール酸、糖類、アルコキシ結合糖類、アミン、スルホン酸塩、硫酸塩、燐酸塩、アルコール、エーテル、そしてニトリルで構成される群から選択されるものであり、；

R²は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R³は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁴はメチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁵はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボキシル、アミド、そしてエステルから選ばれるものであり、Yが窒素である場合は、その窒素はR⁶と置換され、R⁶は水素とメチルで構成される群から選択されるものであり、そして、Xが酸素でYが酸素である場合は、R²はメチル、R³はメチル、R⁴はメチル、そしてR⁵はフィチルであり、そしてR¹はブチル酸ではないことを特徴とする化合物。

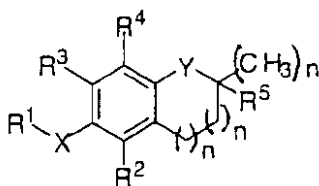
【請求項 2】

上記化合物が、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピオン酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) バレリアン酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) ヘキサン酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) オクタン酸、2, 5, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 7, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 8-ジメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) アセトアミド、メチル12, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2- (N, N- (カルボキシメチル) -2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) エタン-1-ol、2- (2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2RS- (4RS, 8RS, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5,

7, 8-テトラメチル- (2 R- (カルボキシ) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R- (2 R S, 6 R S, 10-トリメチルウンデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R- (2, 6, 10-トリメチル-1, 3, 5, 9 E: Z デカテトラエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、3- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R-8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピル-1-塩化アンモニウム、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (4 R, 8 R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-3-エン-6-イロキシ) 酢酸、6- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R- (4 R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (ヘプチル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (トリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (ヘプタデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R- (4, 8, -ジメチル-1, 3, 7 E Z ノフトリエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、E, Z, R S, R S- (フィチルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ) 酢酸、(R)-2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2- (3-プロペン・メチル・エステル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (プロピオネート) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、1-アザ- α -トコフェノール-6-イロキシ-酢酸、1-アザ- α -トコフェノール-6-イロキシ-メチル酢酸、1-アザ-N-メチル- α -トコフェノール-6-イロキシ-メチル・アセテート、1-アザ-N-メチル- α -トコフェノール-6-イロキシ-酢酸、及び、6- (2, 4-ジニトロフェニルアゾ (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2- (4, 8, 12-トリメチルトリデシル) -1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノリンで構成される群から選択されることを特徴とする請求項1記載の化合物。

【請求項3】

細胞増殖性疾患を治療するための方法において、薬学的に受け入れ可能な量の以下の構造式を有する化合物を動物に投与するステップを含み、



上記式において、

Xは酸素、窒素、硫黄で構成される群から選ばれ；

Yは酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり；Yが酸素又は窒素である場合は、nは1であり、Yが硫黄である場合は、nはゼロであり；

R¹はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボキシアミド、エステル、チオアミド、チオールエステル、チオール酸、糖類、アルコキシ結合糖類、アミン、スルホン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、アルコール、エーテル、そしてニトリルで構成される群から選択されるものであり、；

R²は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R³は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁴はメチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁵はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボキシル、アミド、そしてエステルから構成される群から選ばれるものであり、Yが窒素である場合は、

その窒素はR⁶と置換され、R⁶は水素とメチルで構成される群から選択されるものであることを特徴とする方法。

【請求項4】

前記化合物が、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピオン酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) ブチル酸、2, 5, 7, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 7, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 8-ジメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2- (N, N- (カルボキシメチル)-2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2RS- (4RS, 8RS, 12-トリメチル・トリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (2RS, 6RS, 10-トリメチルウンデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、3- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピル-1-塩化アンモニウム、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-3-エン-6-イロキシ) 酢酸、2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (ヘプタデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4, 8-ジメチル-1, 3, 7 E: Z ノフトリエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、E, Z, RS, RS- (フィチルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ) 酢酸、1-アザ- α -トコフェノール-6-イロキシ-酢酸及び1-アザ-N-メチル- α -トコフェノール-6-イロキシ-メチル酢酸で構成される群から選択されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記化合物がアポトーシス、DNA合成抑制、細胞サイクル抑制、あるいは細胞分化で構成される抗増殖効果を示すことを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項6】

前記動物がヒトであることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項7】

前記組成物が約1mg/Kgから約60mg/kgの範囲の量で投与されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項8】

前記組成物の投与が経口、局所、眼球内、鼻腔内、非経口、静脈、筋肉内、あるいは皮下注射で構成される群から選択されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項9】

前記細胞増殖性疾患が腫瘍性疾患及び非腫瘍性不全で構成される群から選択されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項10】

前記腫瘍性疾患が卵巣癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌螺旋、膀胱癌、肺癌、乳癌、睾丸癌、前立腺癌、神経膠腫、線維肉腫、網膜芽腫、黒色腫、軟組織肉腫、骨肉腫、白血病、結腸癌、腎臓癌腫、膵臓癌、基底細胞癌、そして扁平細胞癌で構成される群から構成されることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】

非腫瘍性疾患が乾癬、良性増殖性皮膚疾患、魚鱗癬、乳頭腫、レスチノシス、強皮症、血

管腫、ウィルス性疾患、及び自己免疫疾患で構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】

自己免疫疾患が自己免疫性甲状腺炎、多重硬化症、重症筋無力症、全身性紅斑狼瘡、疱疹状皮膚炎、セリアック病、及びリウマチ性関節炎で構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項 11 の方法。

【請求項 13】

前記非腫瘍性不全がウィルス性不全及び自己免疫性不全で構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 14】

前記ウィルス性不全がヒト免疫不全ウィルスであることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

10

【請求項 15】

前記自己免疫性不全が心臓血管斑形成、紫外線照射誘発皮損傷に関与する炎症性プロセス及び免疫成分に関係する不全で構成される群から選択されることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

請求項 3 記載の化合物と薬学的に受け入れ可能な基質で構成される医薬品組成物。

【請求項 17】

前記組成物が 2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチル
トリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R-
(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピオン酸、
2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)
クロマン-6-イロキシ) ブチル酸、2, 5, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R,
12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 7, 8-トリメチル
- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸
、2, 8-ジメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-
6-イロキシ) 酢酸、2- (N, N- (カルボキシメチル) -2- (2, 5, 7, 8-テ
トラメチル-2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキ
シ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2RS- (4RS, 8RS, 12-トリメ
チル・トリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (2RS, 6RS, 10-トリメチルウンデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸
、3- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル
) クロマン-6-イロキシ) プロピル-1-塩化アンモニウム、2, 5, 7, 8-テト
ラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-3-エン-
6-イロキシ) 酢酸、2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-
トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 硫酸トリエチルアンモニウム、6
- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル
) クロマン) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (ヘプタデシル)) クロ
マン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4, 8-ジメチル
-1, 3, 7 E:Z ノトリエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、E, Z, RS, R
S- (フィルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ) 酢酸、1-アザ- α -トコ
フェノール-6-イロキシ-酢酸及び 1-アザ-N-メチル- α -トコフェノール-6-
イロキシ-酢酸で構成される群から選択されることを特徴とする請求項 16 記載の医薬品
組成物。

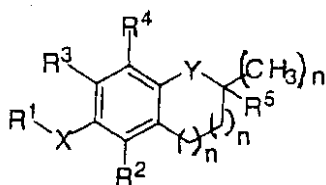
20

30

40

【請求項 18】

細胞のアポトーシスを誘発する方法において、前記細胞を薬学的に有効な量の以下の構造式を有する化合物と接触させるステップを含み、



上の式において、

Xは酸素、窒素、硫黄で構成される群から選ばれ；

Yは酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり；Yが酸素又は窒素である場合は、nは1であり、Yが硫黄である場合は、nはゼロであり；

R¹ はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボキシアミド、エステル、チオアミド、チオールエステル、チオール酸、糖類、アルコキシ結合糖類、アミン、スルホン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、アルコール、エーテル、そしてニトリルで構成される群から選択されるものであり、；

R² は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R³ は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁴ はメチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、糖類及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；

R⁵ はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボキシル、アミド、そしてエステルから選ばれるものであり、Yが窒素である場合は、その窒素はR⁶ と置換され、R⁶ は水素とメチルで構成される群から選択されるものであることを特徴とする方法。

【請求項19】

前記化合物が2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12- (トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピオン酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) ブチル酸、2, 5, 8-トリメチル-2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 7, 8-トリメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 8-ジメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2- (N, N- (カルボキシメチル) -2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2RS- (4RS, 8RS, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (2RS, 6RS, 10-トリメチルウンデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、3- (2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピル-1-塩化アンモニウム、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-3-エン-6-イロキシ) 酢酸、2- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 硫酸トリエチルアンモニウム、6- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (ヘプタデシル)) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R- (4, 8-ジメチル-1, 3, 7-E:Z ノノトリエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸、E, Z, RS, RS- (フィルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ) 酢酸、1-アザ-α-トコフェノール-6-イロキシ-酢酸及び1-アザ-N-メチル-α-トコフェノール-6-イロ

キシ-酢酸で構成される群から選択されることを特徴とする請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記方法が細胞増殖性疾患の治療に有益であることを特徴とする請求項18記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は一般的には有機化学と抗増殖性及びアポトーシス促進性物質に関するものである。より具体的には、本発明はクロマン系物質とその誘導体及び類似物、そして抗増殖性剤、アポトーシス促進性剤、免疫調整剤、及び抗ウィルス剤としての利用に関するものである。

10

【0002】

(先行技術の説明)

細胞増殖及び細胞死（アポトーシス）に関する生物学は非常に複雑であり、複数の細胞内情報伝達経路及び複数の相互作用する遺伝子生成物が関与している。癌細胞は細胞を数的に増殖させようとする細胞増殖の正常な調節制御にいくつかの欠陥を示す場合がある。さらに、癌細胞はプログラムされた細胞死あるいはアポトーシスと呼ばれる多段階プロセスによる異常な細胞の除去に関与するメカニズムにおいても欠陥を示す。従って、制御されない細胞増殖及び細胞死誘発情報伝達経路を誘発する抑制の組み合わせは癌細胞に対して成長及び生残上の利点をもたらす。

【0003】

20

細胞が数的に増殖するかどうかはネガティブに作用する成長調節遺伝子生成物とポジティブに作用する成長調節遺伝子生成物との間のバランス、及び機能的細胞死情報伝達経路が存在しているかどうかにかかっている。ネガティブに作用する成長調節遺伝子は細胞サイクルの閉塞に寄与する。ポジティブに作用する成長調節遺伝子は細胞が細胞サイクルを通じて進行するように刺激を与える。アポトーシスにかかわる遺伝子はアポトーシス促進性か抗アポトーシス性かのいずれかであり、そしてこれらの間のダイナミック・バランスが細胞が生きるか死ぬかを決定する。

【0004】

癌細胞は、生き残りその数を増大させるために、一定の期間に、それらに規制されずに成長し、アポトーシス促進性信号が存在していても生き残るようさせる能力を付与し、それらの細胞が免疫応答防御システムによる欠失及び除去から回避できるようにするような属性を形成する一連の突然変異を受ける。癌は手術かあるいは薬品で適切に措置しなければ個人の死を引き起こす可能性がある。

30

【0005】

種々の病理的細胞増殖状態が存在しており、それに対して治療効果をもたらすための新しい治療戦略と薬剤が必要である。これらの病理的状态は異常な細胞増殖あるいは細胞死信号に対する異常な応答をしめす可能性のあるほとんどすべての細胞タイプにおいて起こり得る。病理的な、あるいは異常な成長及び死特性を示す細胞タイプには、(1) 繊維芽細胞、(2) 欠陥内皮細胞、そして(3) 上皮細胞などがある。従って、すべての、あるいは個人のほとんどの器官及び組織系での局所的な、あるいは播種性病理状態を治療するためにあつた方法が必要である。

40

【0006】

ほとんどの癌は、それらが前立腺あるいは睾丸などの男性固有の癌であれ、あるいは乳房、卵巣、子宮頸部癌などの女性特有のものであれ、あるいはそれらが肝臓、皮膚、あるいは肺などの両性平等に影響を及ぼすものであれ、時間の経過と共に遺伝子障害と後生的イベントが増大し、最終的には今度に転移性で、治療が難しくなる。局所的な癌の外科手術による除去は、その癌が一次的な病変を超えて広がるより前の場合だけ有効であることが分かっている。その癌が他の組織及び器官に広がってしまうと、外科的手順はその病原性の、あるいは悪性の細胞を除去するために他の特殊な手段で補う必要がある。化学治療あるいは生物学的放射線治療など病理的、あるいは悪性細胞を措置するために一般的に用い

50

られている補助的な手順は腫瘍細胞だけに局所化されず、そして、悪性細胞に対して大きな破壊的影響を及ぼすが、同時に正常な細胞に対しても一定の影響を及ぼす。

【0007】

トコフェロール及びトコトリエノール、そしてビタミンEなどのいくつかの誘導体はアポトーシス促進性剤及びDNA合成停止剤として用いられている。構造的に、ビタミンEはクロマン・ヘッド及びアクリル側鎖で構成されている。天然のビタミンEには、アルファ(α)、ベータ(β)、ガンマ(γ)、及びデルタ(δ)トコフェロールと、α、β、γ、及びδトコトリエノールの8つの主要な形態がある。トコフェロール及びトコトリエノールの4つの形態はクロマン・ヘッドのメチル基の数が違っている(αは3つ、β及びγは2つ、そしてδは1つのメチル基を有している)。

10

【0008】

RRR-α-トコフェロール・コハク酸塩はエステル結合を介してクロマン・ヘッドの6-位置の水酸基構成要素の代わりにコハク酸を含むようにエステル結合を介して構造的に変性されたRRR-α-トコフェロールの誘導体である。このRRR-α-トコフェロールのエステル結合コハク酸塩構成要素はアポトーシスを起こし、DNA合成を停止する生物学的活性に影響を及ぼす最も強力な形態のビタミンEである。この形態のビタミンEは腫瘍細胞にはアポトーシスを受けさせるが、正常な細胞にはアポトーシスを誘発させる影響は及ぼさない。抗癌剤としてのこの形態のビタミンEの重要な利点は、多くの癌細胞が低レベルのエステラーゼを発言するか、あるいはコハク酸塩構成要素を切断して、RRR-α-トコフェロールのコハク酸塩を遊離RRR-α-トコフェロールに転化できるエステラーゼを発現しないことである。RRR-α-トコフェロールは強力な抗増殖性生物学的活性を示さないし、アポトーシスを引き起こす生物学的活性も示さない。しかしながら、エステル結合ビタミンEコハク酸は、宿主内の天然のエステラーゼがコハク酸塩構成要素を切断して、抗癌剤としては無効なRRR-α-トコフェロールにしてしまうので、*in vivo*では効果を示さない。

20

【0009】

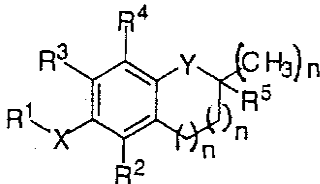
広い範囲の病態生理学的状态における望ましくない、あるいは制御できない細胞増殖を停止すると同時に正常な細胞にはほとんど影響を及ぼさない有効な手段がない点で不十分である。本発明は技術分野におけるこの長年のニーズと願望を満たすものである。

【0010】

(発明の要約)

本発明の1つの実施の形態で、以下の構造式を有する化合物が提供される。

30



【0011】

この式で、Xは酸素、窒素、又は硫黄であり；Yは酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり、Yが酸素、又は窒素である場合は、nは1であり、Yが硫黄である場合は、nはゼロであり；R¹はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボキシアミド、エステル、チオアミド、チオールエステル、チオール酸、糖類、アルコキシ結合糖類、アミン、スルホン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、アルコール、エーテル、そしてニトリルで構成される群から選択されるものであり、；そしてR²は水素、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；R³は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミンで構成される群から選ばれるものであり；R⁴はメチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミン

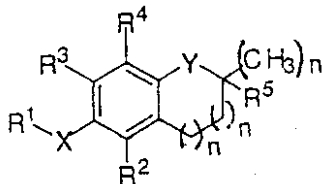
40

50

で構成される群から選ばれるものであり； R^5 はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボキシル、アミド、そしてエステルから選ばれるものであり、 Y が窒素である場合は、その窒素は R^6 と置換され、 R^6 は水素とメチルで構成される群から選択されるものであり、 X が酸素である場合は、 R^2 はメチル、 R^3 はメチル、 R^4 はメチル、そして R^5 はフィチルであり、そして R^1 はブチル酸ではないことを特徴としている。

【0012】

本発明の別の実施の形態で、薬学的に有効な量の以下の構造式を有する化合物を動物に投与するステップを含む細胞増殖性疾患を措置するための方法が提供される。



10

【0013】

この式で、 X は酸素、窒素、又は硫黄であり； Y は酸素、窒素、及び硫黄で構成される群から選択されるものであり、 Y が酸素、又は窒素である場合は、 n は1であり、 Y が硫黄である場合は、 n はゼロであり； R^1 はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボン酸、カルボン酸塩、カルボキシアミド、エステル、チオアミド、チオールエステル、チオール酸、糖類、アルコキシ結合糖類、アミン、スルホン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、アルコール、エーテル、そしてニトリルで構成される群から選択されるものであり； R^2 は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミンで構成される群から選ばれるものであり； R^3 は水素、メチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミンで構成される群から選ばれるものであり； R^4 はメチル、ベンジル・カルボン酸、ベンジル・カルボン酸塩、ベンジル・カルボキシアミド、ベンジル・エステル、コハク酸塩及びアミンで構成される群から選ばれるものであり； R^5 はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリル、ヘテロアリル、カルボキシル、アミド、そしてエステルから選ばれるものであり、 Y が窒素である場合は、その窒素は R^6 と置換され、 R^6 は水素とメチルで構成される群から選択されるものであることを特徴としている。

20

30

【0014】

本発明のさらに別の実施の形態で、ここに開示されているいずれかの化合物と薬学的に受け入れ可能な基質で構成される医薬品化合物が提供される。

【0015】

本発明のさらに別の実施の形態で、細胞を薬学的に有効な量の本発明の化合物を接触させるステップを含む細胞のアポトーシスを誘発させる方法が提供される。

【0016】

本発明のその他の、そしてさらなる形態、特徴、利点及び効果は開示の目的で以下に提供される本発明の現段階で好ましい実施の形態に関する以下の説明を最小することでさらに明らかになるであろう。

40

【0017】

(発明の詳細な説明)

以下の定義はここに開示されている発明を理解しやすくする目的で提供されるものである。具体的に定義されていないすべての用語はこの技術分野の用語の一般的な意味に即して解釈されるべきである。

【0018】

ここで用いられている『個体』という用語は動物及びヒトを指すものとする。

【0019】

50

ここで用いられている増殖細胞の成長を『生物学的阻害』あるいは『阻害』という用語は部分的、あるいは全体的成長阻害を含むものとし、また、上記細胞の増殖あるいは成長速度の低下も含むことを意図している。生物学的に阻害する量の本発明の組成物は、組織培養内の標的とする悪性の、あるいは異常に増殖中の細胞成長に対するテスト要素の影響の評価、動物や細胞培養中の腫瘍成長、あるいはこの技術分野の当業者に知られているいずれかの他の方法によって判定することができる。

【0020】

ここで用いられている『プログラムされた細胞死またはアポトーシスの誘発』という用語は確認された形態学的あるいは生物化学的アポトーシス性を示す細胞による部分的または全体的細胞死を含んでいる。アポトーシスを誘発する本発明の組成物の用量は、組織培養内の標的とする悪性の、あるいは異常に増殖中の細胞成長に対するテスト要素の影響の評価、動物や細胞培養中の腫瘍成長、あるいはこの技術分野の当業者に知られているいずれかの他の方法によって判定することができる。

10

【0021】

ここで用いられている『細胞サイクル停止の誘発』という用語は処理された細胞がG0/G1あるいはG2/M細胞サイクル段階でブロックされることによる成長停止を含むものとする。細胞サイクル停止を誘発する本発明の組成物の用量は、組織培養内の標的とする悪性の、あるいは異常に増殖中の細胞成長に対するテスト要素の影響の評価、動物や細胞培養中の腫瘍成長、あるいはこの技術分野の当業者に知られているいずれかの他の方法によって判定することができる。

20

【0022】

ここで用いられている『細胞分化の誘発』という用語は処理された細胞が細胞分化、つまり細胞分化が起こらない段階に入るように誘発されることによる成長停止を含むものとする。細胞分化を誘発する本発明による組成物の量は、組織培養内の標的とする悪性の、あるいは異常に増殖中の細胞成長に対するテスト要素の影響の評価、動物や細胞培養中の腫瘍成長、あるいはこの技術分野の当業者に知られているいずれかの他の方法によって判定することができる。

【0023】

本発明はトコフェロール、トコトリエノール、及び飽和フィチルまたは不飽和イソプレニル側鎖及びその類似物を有する、あるいは有さない他のクロマン誘導物を提供する。トコフェロール、トコトリエノール、及びその他のクロマン誘導物に対して異なった構成部分を取り付けるためにエーテル及びいくつかのその他の化学結合を用いることで、in vivoで使用するための新しい抗癌化合物がつくられる。本発明によるこれらの新しい化合物の一般的な構造を図1に示し、それらの好ましい化合物を図2に示し、そしてそれらの合成のいくつかの可能なルートを図3-15に示す。これらの分子の新しい特徴は、クロマン構造の位置R¹-R⁵の化学的機能化と、フィチル及びイソプレニル側鎖、特にトコフェロール及びトコトリエノールに基づく化合物の機能化を含んでいる(図1)。さらに、クロマン環酸素がヘテロ原子(N又はS)で置換された化合物も示されている(図14及び図15)。特に好ましい化合物は、2, 5, 7, 8-テトラメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(1)、2, 5, 7, 8-テトラメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)プロピオン酸(2)、2, 5, 8-トリメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(7)、2, 7, 8-トリメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(8)、2, 8-ジメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(9)、2-(N, N-(カルボキシメチル)-2-(2, 5, 7, 8-テトラメチルー2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(12)、2, 5, 7, 8-テトラメチルー(2RS-(4RS, 8RS, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸、2, 5, 7, 8-テトラメチルー(2R-(カルボキシ)クロマン-6-イロキシ)酢酸(1

30

40

50

5)、2、5、7、8-テトラメチル-2R-(2RS, 6RS, 10-トリメチルウン
 デシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(17)、3-(2、5、7、8-テトラメチル
 -(2R-(4R8, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)プロピ
 ル-1-塩化アンモニウム(19)、2、5、7、8-テトラメチル-(2R-(4R,
 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-3-エン-6-イロキシ)酢酸(20)
 、2-(2、5、7、8-トリメチル-(2R-(4R, 8, 12-トリメチルトリデシ
 ル)クロマン-6-イロキシ)硫酸トリエチルアンモニウム(21)、6-(2、5、
 7、8-テトラメチル-2R-(4R, 9, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-
)酢酸(22)、2、5、7、8-テトラメチル-(2R-(ヘプタデシル)クロマン-
 6-イロキシ)酢酸(25)、2、5、7、8-テトラメチル-2R-(4, 8, -ジメ
 チル-1, 3, 7EZ ノフトリエン)クロマン-6-イロキシ)酢酸(26)、E
 , Z, RS, RS-(フィチルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ)酢酸(27)
)、1-アザ- α -トコフェノール-6-イロキシ-酢酸(39)、1-アザ- α -トコ
 フェノール-6-イロキシ-メチル酢酸(40)、1-アザ-N-メチル- α -トコフェ
 ノール-6-イロキシ-メチル・アセテート(41)、1-アザ-N-メチル- α -トコ
 フェノール-6-イロキシ-酢酸(42)、及び、6-(2、4-ジニトロフェニルアゾ
 (2、5、7、8-テトラメチル-2-(4, 8, 12-トリメチルトリデシル)-1,
 2, 3, 4-テトラヒドロキノリン(43)などである。

【0024】

薬学的にデザインされた本発明の化合物は改良されたセラピューティックインデックスを
 有しており、癌細胞成長の強力なインヒビターであり、つまり、それらの化合物は高い抗
 腫瘍活性を有しており、しかも副作用は少ない。哺乳動物の体内では、知られているエー
 テル化合物が存在しないので、簡単には劣化されないこれらの化合物を癌や過剰な細胞増
 殖を伴う不全の治療と、細胞致死メカニズムが抑止されてしまった結果数が増大する細胞
 に対して、最小限の副作用で用いることができる。本発明によるこれらの化合物はアポト
 ーシス及びDNA合成停止を誘発することで癌細胞成長を阻害する。これらの化合物によ
 るアポトーシスの誘発はTGF- β 、ストレス・キナーゼ、及びFas/Fasリガンド
 信号経路の活性化によって媒介されている。他の経路、例えば、セラミドの生産によるア
 ポトーシスの誘発の可能性も排除できない。これらの成長阻害特性はこれらの化合物の異
 なった細胞タイプ及び系統の癌、非腫瘍性疾患、及びアポトーシス性信号経路に欠陥を伴
 う不全を誘発する増殖性疾患治療での使用を可能にしている。本発明による化合物のいく
 つかはアポトーシスの強力な誘発因子であると同時に、異なった細胞系統を代表する腫瘍
 細胞のDNA合成停止の強力な誘導物質でもある。

【0025】

癌及びその他の不全、そして過剰な細胞増殖や細胞が死ぬことができないという欠陥を伴
 う不全の治療における本発明による化合物の治療目的のための使用について以下に説明す
 る。新しい誘導体(表1及び2)はEC₅₀濃度で、ヒト乳癌細胞(MDA MB 435
 、MDA MB 231、及びMCF-7乳癌細胞)、ヒト前立腺癌細胞(PC-3、DU
 -145、及びLnCap)、ヒト卵巣腫瘍細胞(C-170)、ヒト子宮頸部腫瘍細胞
 (ME-180)、ヒト内皮細胞(RL-95-2)、ヒト・リンパ腫細胞(骨髓腫、ラ
 ジ、ラモス、ジュルカット、及びHL-60)、結腸癌細胞(HT-29及びDLD-1
)、及び肺癌細胞(A-549)のアポトーシスを誘発することが示されている。これら
 新しい誘導体は正常なヒト乳腺上皮細胞(HMEC)及び不死化された、しかし非腫瘍化
 MCF-10A乳腺細胞においてはアポトーシスを誘発しないことが示されている。

【0026】

本発明によるこれらの新しい化合物及び方法は腫瘍性疾患と非腫瘍性疾患の治療に用いる
 ことができる。腫瘍性疾患の代表的な例は卵巣癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、肺癌、乳癌
 、睾丸癌、前立腺癌、神経膠腫、線維種、網膜芽細胞種、軟組織肉腫、骨肉腫、白血病、
 結腸癌、腎臓癌、膵臓癌、基底細胞癌、及び扁平細胞癌である。非腫瘍性疾患の代表的な
 例は乾癬、良性増殖性皮膚疾患、魚鱗癬、乳頭腫、レスチノシス、強皮症、及び血管腫で

構成されるグループから選択される。

【0027】

本発明による化合物及び方法は選択された細胞が正常なプログラムされた細胞死またはアポトーシスを行うことができないことから発生する非腫瘍性疾患を治療するためにも用いることができる。細胞が死ぬことができないことで起きる疾患及び不全の代表的な例は自己免疫性疾患である。自己免疫性疾患は自己の細胞、組織、及び器官の免疫細胞破壊を特徴とする。自己免疫性疾患の代表的なグループは自己免疫性甲状腺炎、多重硬化症、重症筋無力症、全身性紅斑狼瘡、疱疹状皮膚炎、セリアック病、及びリ्यूマチ性関節炎などである。本発明は自己免疫ばかりに限定されず、心臓血管斑形成、紫外線照射誘発皮膚欠損に關与する炎症プロセスなどの免疫要素を有するすべての不全を含んでいる。

10

【0028】

本発明による化合物と方法はウィルス感染によって発生する不全及び疾患の治療にも用いることができる。ウィルス感染によって起きる疾患及び不全の代表的な例はヒト免疫欠損ウィルス（HIV）である。これらの化合物は細胞内信号ネットワークに対して作用するので、サイトカイン、ウィルス、バクテリア、毒素、重金属などのすべての外部細胞信号に対して影響を及ぼす能力を有している。

本発明による方法はいずれの動物の治療にでも用いることができる。最も好ましいことであるが、本発明による方法はヒトにおいて有用である。

【0029】

通常、薬学的に有効な細胞致死及び抗増殖性効果を達成するために、これらの化合物及びその類似物をいずれの薬学的に有効な量でも投与することができる。好ましくは、構造的に改変されたトコフェロール、トコトリエノール、及びそれらの類似物を約0.1 mg/kgから約100 mg/kgの範囲の用量で投与する。より好ましくは、構造的に改変されたトコフェロール、トコトリエノール、及びそれらの類似物を約1 mg/kgから約10 mg/kgの範囲の量で投与する。

20

【0030】

本発明による組成物の投与は経口、局所的、眼球内、鼻腔内、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、あるいはその他の適切な手段によって行うことができる。投与される用量は年齢、臨床段階及び個体の疾患や遺伝的傾向の程度、体重、併行して行っている治療があればその種類、そして病理的あるいは悪性状態の性質に依存する。本発明の方法で有効な伝達システムは経口投与のためのカプセル、錠剤、溶剤、懸濁液、エリキシル剤、あるいは溶液、懸濁液、あるいは乳剤などの殺菌された液体形状などである。局所的な使用のためには、軟膏、クリーム、あるいはスプレーなどの形状で用いることができる。いずれの不活性基質も好ましくは食塩水やリン酸緩衝食塩水などの適切な液化剤、あるいはエタノール、アセトン、あるいはDMSOなど本発明による方法で用いられる化合物が適切な可溶性を示すいずれかの担体との組み合わせで用いられる。

30

【0031】

本発明による組成物及び方法が治療効果をもたらす病理的な癌性あるいは非癌性細胞増殖状態及び正常な細胞死が行われないことによる細胞蓄積は幅広く存在している。これらの病理的な状態は異常な細胞増殖あるいはプログラムされた細胞死メカニズムにおける欠陥を発生し得るほとんどあらゆる細胞タイプにおいて起き得る。病理的あるいは異常な成長や異常な死を示す細胞タイプには、（1）繊維芽腫、（2）欠陥内皮細胞、及び（3）上皮細胞がある。上記のことから、本発明による方法はすべての、あるいは個体のほとんどの器官及び組織システムにおける局所的あるいは広い範囲に広がった病理状態の治療に有効である。

40

【0032】

具体的には、本発明による新しいクロマン化合物及びそれらの誘導体を用いて医薬品組成物をつくるのが考えられる。このような場合、その医薬品組成物は本発明による新しい化合物と薬学的に許容される担体とを含んでいる。この分野の当業者であれば、過度の実験を行わなくても、本発明による化合物及びそれらの類似物の適切な用量と投与ルートを

50

決めることができるであろう。

【0033】

本発明は癌細胞に向かうことができ、成長刺激信号を下方規制したり、成長抑止信号を上方規制したり、生残信号を下方規制したり、及び／または死信号を上方規制することができる新しい薬剤のデザインとその有効な利用法に向けられている。より具体的には、この発明は成長抑止因子を活性化させ、死信号経路を起動させ、そしてDNA合成を抑止する新しい薬剤をつくり、その特徴づけを行うものである。

【0034】

以下の実施例は本発明の種々の具体例を示す目的で記載されたものであり、いかなる形式でも本発明を限定するものではない。

10

【0035】

実施例 1

有機合成方法

飽和フィチルあるいは不飽和イソプレニル側鎖を有する、あるいはそれらを有さない種々のトコフェロール、トコトリエノール、及びその他のクロマン誘導体の合成はクロマン環システムの構造的改変（図3-13）及びクロマン環酸素のヘテロ原子置換（N又はS）（図14及び図15）によって行うことができる。これら構造的変種 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及びXは修飾されたクロマン基のグループを示しており、Yは酸素か、あるいはクロマン環酸素に置換されたヘテロ原子（N又はS）を示している。特にXが酸素の場合、アルキル化によって、異なった R^1 を含む多数の化合物を合成することができる。アルキル化後に、 R^1 基をさらに化学的に修飾すると、広範な新しい化合物を合成することができる。クロマン基のベンジル・メチル基を臭化すると R^2 、 R^3 、及び R^4 基の変種の合成を可能にする中間物が得られる。 R^5 基の変種合成も市販されている6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシル酸から開始すれば可能である。クロマン環酸素の窒素によるヘテロ原子置換が起きた場合、その窒素は水素かメチルである R^6 によって置換される可能性がある。トコフェロール類及びトコトリエノール類のXのアイデンティティーである酸素以外の基へのXの変化は、パラジウムを用いて（ $X-CH_2$ の場合）、あるいは求核芳香性置換基を用いて（XがN、あるいはSの場合）達成することができる。クロマン構造への他の可能な改変としては、3-4位置での不飽和及び5-構成要素フラニル環をつくりだす環縮小などである。

20

30

【0036】

用いられた試薬は市販されているか、あるいは公知の手順で調製することができた。無水 CH_2Cl_2 及びTHFは蒸留で得た。用いられた他のすべての溶媒は試薬である。無水反応条件は炉で乾燥されたガラス容器内で軽度にポジティブなアルゴン雰囲気下に保持された。EM Scienceから購入した230-400メッシュ・シリカを用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィを行った。Varian Unity分光計を用いて、それぞれ300.132 MHz及び75.033 MHzの周波数で、通常の 1H -及び ^{13}C -NMRスペクトルを得た。NMRスペクトルをTMS (0 ppm) あるいは $CDCl_3$ の等方性ピーク（ 1H と ^{13}C に対してそれぞれ7.26及び77.0 ppm）と比較した。Austinのテキサス大学のMass Spectrometry Centerで高解像度電子衝撃法分光測定を行った。

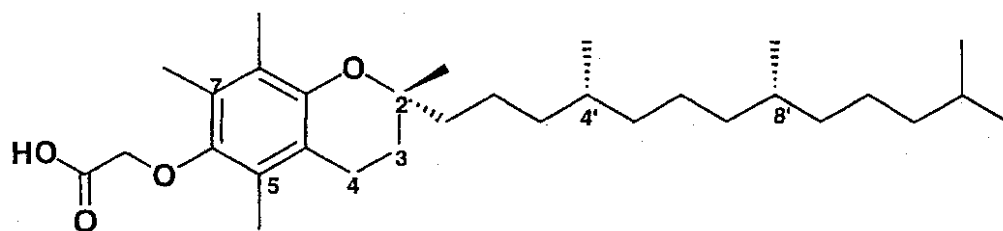
40

【0037】

実施例 2

新しいトコフェロール化合物の合成及び特徴づけ

2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (1)



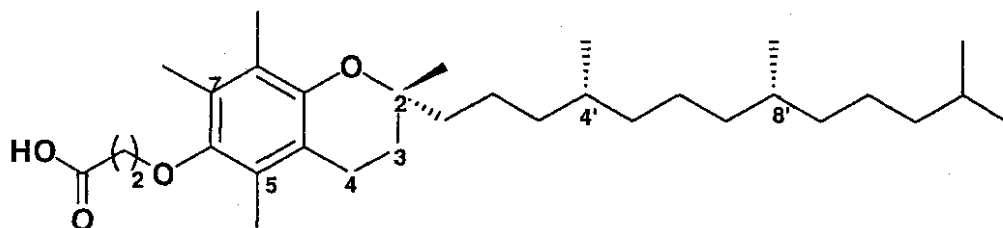
【0038】

R, R, R- α -トコフェロール (0.5 g, 1.16 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶かした溶液をブromo酢酸メチル (3.4 g, 8.3 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (1.2 g, 30 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 24 時間激しく攪拌した。5 N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 mL) で抽出した。結合したエーテル層を H₂O (3 x 30 mL) で洗浄して、その後 Na₂SO₄ で乾燥させた。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを 19% (v/v) EtOAc と酢酸 (2%) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行って精製した。得られた黄色の液体をジエチル・エーテル (30 mL) に溶かして、H₂O (3 x 20 mL) 及び食塩水 (1 x 20 mL) で洗浄してから、Na₂SO₄ で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、真空中で 48 時間乾燥した。これによって 1 がろう状の、白っぽい固体 (0.50 g, 88%) として得られた。¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-, CH₂-, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.34 (s, 2H, OCH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃), ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-, CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (C-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 69.2 (OCH₂), 75.0 (2-C), 117.8, 123.2, 125.4, 127.3 (アリル C), 147.0, 148.5 (アリル C-O), 173.7 (COOH); HRMS (CI, m/z); 489.394374 (M+H⁺, C₃₁H₅₃O₄ 489.394386 で計算)。すべてのアサインメントは HMQC, DEPT-135 及び ¹H-NOSEY を用いて確認。) 10 20 30 40

【0039】

2, 5, 7, 8-テトラメチルー (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピオン酸 (2)

化合物 2-6 は適切なブromoアルカン酸を用いて化合物 1 と同じ方法で合成した。



【0040】

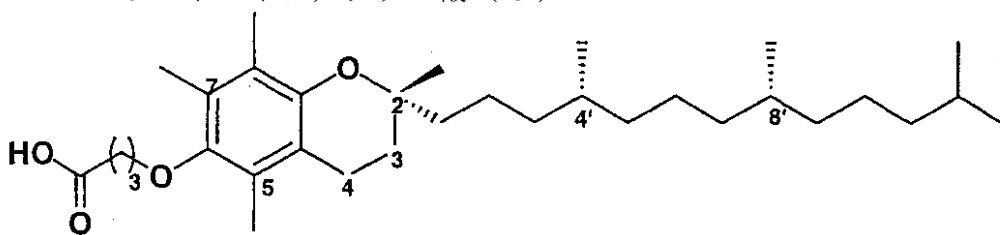
(収率 89%) ¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm): 0.87 (m, 1 50

2 H, 4 a' -, 8 a' -, 12 a' -, 13' -CH₃), 1.0-1.6 (m, 24 H, 4' -, 8' -, 12' -CH, 1' -, 2' -, 3' -, 5' -, 6' -, 7' -, 9' -, 10' -, 11' -, CH₂ -, 2 a-CH₃), 1.81 (m, 2 H, 3-CH₂), 2.09, 2.14, 2.19 ((3 x s, 9 H, 5 a-, 7 a-, 8 a-CH₃), 2.59 (t, J=6.6 Hz, 2 H, 4 CH₂), 2.85 (t, J=6.4 Hz, 2 H, CH₂COOH), 3.96 (t, J=6.4 Hz, 2 H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃), ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5 a-, 7 a-, 8 a-, CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2 a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 35.1, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 67.5 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.8, 127.8 (アリル C), 147.6, 148.0 (アリル C-O), 177.1 (COOH); HRMS (CI, m/z): 503.408610 (M+H⁺, C₃₂H₅₅O₄ 503.410036 で計算)。

10

【0041】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R-(4 R, 8 R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) ブチル酸 (3)



20

【0042】

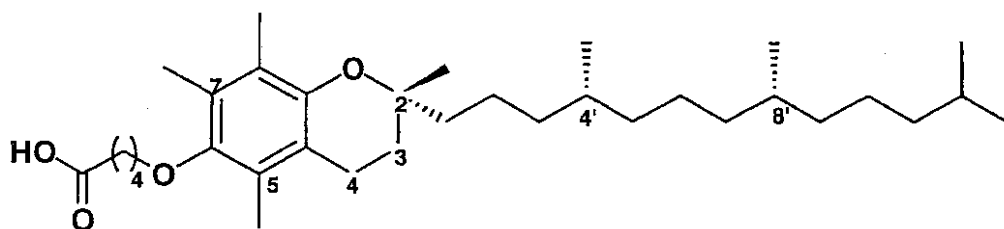
(収率 85%)。 ¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm): 0.87 (m, 12 H, 4 a' -, 8 a' -, 12 a' -, 13' -CH₃), 1.0-1.6 (m, 26 H, 4' -, 8' -, 12' -CH, 1' -, 2' -, 3' -, 5' -, 6' -, 7' -, 9' -, 10' -, 11' -, CH₂ -, 2 a-CH₃), 1.81 (m, 2 H, 3-CH₂), 2.14, 2.17, 2.21 ((3 x s, 9 H, 5 a-, 7 a-, 8 a-CH₃), 2.62 (t, J=6.6 Hz, 2 H, 4-CH₂), 2.72 (t, J=7.2 Hz, 2 H, CH₂COOH), 3.74 (t, J=6.1 Hz, 2 H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5 a-, 7 a-, 8 a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.9 (2 a-CH₃), 24.4, 24.8, 25.3 (CH₂), 28.0 (CH), 30.9, 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 71.3 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.7, 127.7 (アリル C), 147.8, 147.9 (アリル C-O), 178.9 (COOH); HRMS (CI, m/z): 516.424374 (M+H⁺, C₃₃H₅₇O₄ 516.424386 で計算)。

30

40

【0043】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 R-(4 R, 8 R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) バレイン酸 (4)

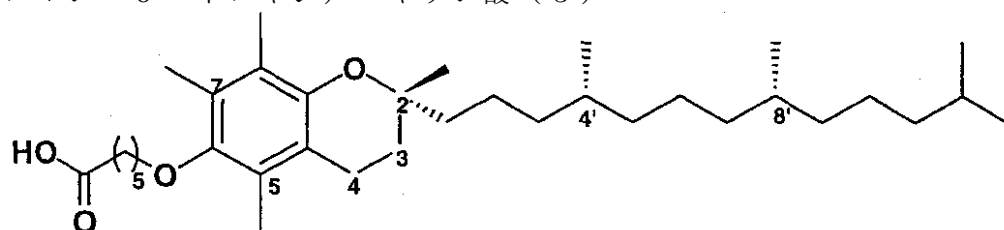


【0044】

(収率90%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1.0-1.6 (m, 28H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'- CH_2 -, 2a- CH_3), 1.81 (m, 2H, 3- CH_2), 2.09, 2.14, 2.18 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.49 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.59 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, 4- CH_2), 3.68 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, OCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.6, 19.7 (CH_3), 20.6, 21.0, 21.4 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.8, (25.7) (CH_2), 28.0 (CH), 30.0 (CH_2), 31.2 (3- CH_2), 32.7, 32.8 (CH), 35.8, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH_2), 72.2 (OCH_2), 74.9 (2-C), 117.8, 123.2, 125.4, 127.3 (アリル C), 147.6, 148.3 (アリル C-O), 178.7 (COOH); HRMS (CI, m/z); 530.433514 ($\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{O}_4$ 530.433516で計算)。

【0045】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)ヘキサン酸(5)



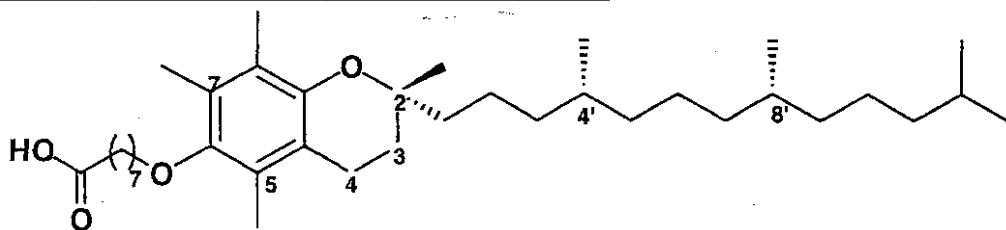
【0046】

(収率77%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1.0-1.6 (m, 30H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'- CH_2 -, 2a- CH_3), 1.81 (m, 2H, 3- CH_2), 2.08, 2.12, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.32 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2.57 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, 4- CH_2), 3.64 (t, $J=5.5$ Hz, 2H, OCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11.8, 11.9, 12.7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.6, 19.7 (CH_3), 20.6, 21.0 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.6, 24.8, 25.7 (CH_2), 28.0 (CH), 30.0 (CH_2), 31.3 (3- CH_2), 32.7, 32.8 (CH), 34.0, 37.3, 37.3, 3

7. 4, 39. 4, 40. 0 (CH_2), 72. 6 (OCH_2), 74. 7 (2-C), 117. 4, 122. 7, 125. 4, 127. 8 (アリル C), 147. 6, 148. 2 (アリル C-O), 179. 6 (COOH); HRMS (CI, m/z); 545. 457026 ($M+H^+$, $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{O}_4$ 545. 456986 で計算)。

【0047】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)オクタン酸(6)



10

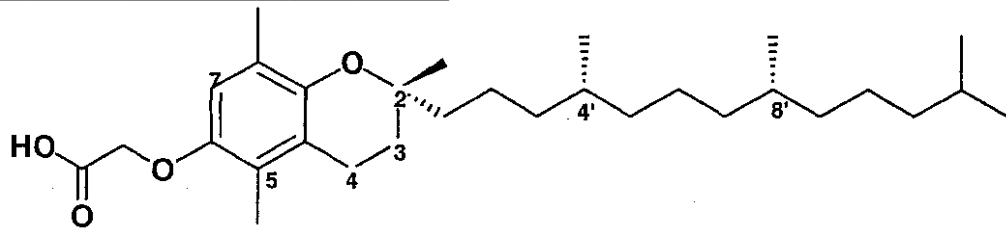
【0048】

(収率91%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0. 87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1. 0-1. 6 (m, 34H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-, CH_2 -, 2a- CH_3), 1. 81 (m, 2H, 3- CH_2), 2. 08, 2. 11, 2. 16 (3xs, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2. 36 (m, 2H, CH_2COOH), 2. 58 (t, $J=6. 6\text{ Hz}$, 2H, 4- CH_2), 3. 62 (t, $J=5. 5\text{ Hz}$, 2H, OCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11. 7, 11. 8, 12. 7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19. 6, 19. 7 (CH_3), 20. 6, 21. 0 (CH_2), 22. 6, 22. 7 (CH_3), 23. 8 (2a- CH_3), 24. 4, 24. 6, 24. 8, 25. 1, 26. 6 (CH_2), 28. 0 (CH), 30. 0 (CH_2), 31. 3 (3- CH_2), 32. 7, 32. 8 (CH), 34. 0, 37. 3, 37. 3, 37. 4, 39. 3, 40. 0 (CH_2), 72. 7 (OCH_2), 74. 6 (2-C), 117. 6, 122. 8, 125. 5, 127. 6 (アリル C), 147. 5, 148. 3 (アリル C-O), 179. 4 (COOH); HRMS (CI, m/z); 573. 484396 ($M+H^+$, $\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{O}_4$ 573. 488286 で計算)。

30

【0049】

2, 5, 8-トリメチル-(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(7)



40

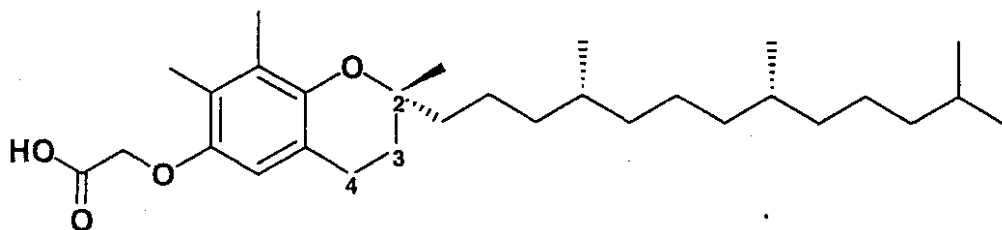
【0050】

R, R, R- α -トコフェロール (75 mg, 0. 18 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶かした溶液をメチル・プロモアセート (0. 4 g, 2. 8 mmol) と過剰な粉末化 NaOH (. 5 g, 12. 5 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24 時間活発に攪拌した。反応を5N HCl で酸性化して、ジエチル・エーテル

50

20

2, 7, 8-トリメチル- (2 R- (4 R, 8 R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (8)



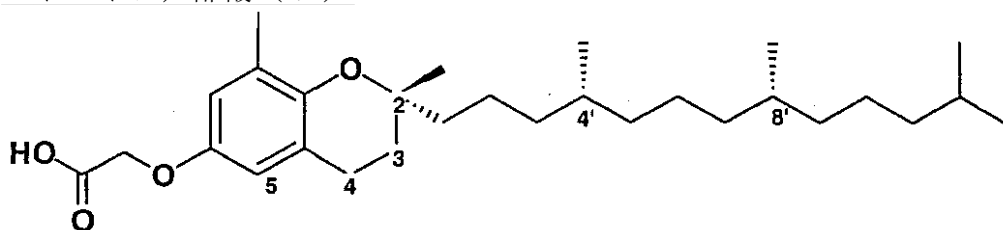
50

2 H, 3-CH₂), 2.12, 2.19 (2 x s, 6 H, 7a-, 8a-CH₃), 2.61 (t, J=6.6 Hz, 2 H, 4-CH₂), 4.59 (s, 2 H, OCH₂), 6.39 (s, 1 H, アリル CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.9, 12.0 (7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.7, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8, (CH₂), 27.9 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 66.6 (OCH₂), 75.7 (2-C), 110.6, 117.7, 125.0, 126.3 (アリル C), 146.9, 148.7 (アリル C-O), 175.0 (COOH); HRMS (CI, m/z); 475.377962 (M+H⁺, C₃₀H₅₁O₄ 475.378736で計算)。

10

【0053】

2, 8-ジメチル- (2R- (4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (9)



20

【0054】

N, N-ジメチルホルムアミド (5 ml) に R, R, R- α -トコフェロール (100 mg, 0.24 mmol) を溶かした溶液をブromo酢酸メチル (110 g, 0.25 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (1.0 g, 25 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24時間攪拌した。5N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 10 ml) で抽出した。結合したエーテル層を H₂O (3 x 10 ml) 及び食塩水 (1 x 10 ml) で洗浄して、その後 Na₂SO₄ で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを19% (v/v) EtOAc と酢酸 (2%) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。得られた黄色の液体をジエチル・エーテル (30 ml) に溶かして、H₂O (3 x 10 ml) 及び食塩水 (1 x 10 ml) で洗浄してから、Na₂SO₄ で乾燥した。得られた溶液を淡黄色のオイルに濃縮して、真空中で48時間乾燥した。この操作で、化合物9がろう状の、やや白っぽい固体として得られた (111 mg, 98%)。 ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12 H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24 H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂-, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2 H, 3-CH₂), 2.15 (s, 3 H, 8a-CH₃), 2.71 (t, J=6.6 Hz, 2 H, 4-CH₂), 4.59 (s, 2 H, OCH₂), 6.48 (d, J=3.0 Hz, 1 H, アリル CH), 6.61 (d, J=3.0 Hz, 1 H, アリル CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 16.2 (8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 24.0 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 27.9 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 65.7 (OCH₂), 75.8 (2-C), 112.3, 115.6, 121.1, 127.5 (アリル C), 147.2, 149.9 (アリル C-O), 174.8 (COOH); HRMS (CI, m/z); 460.3552022 (

30

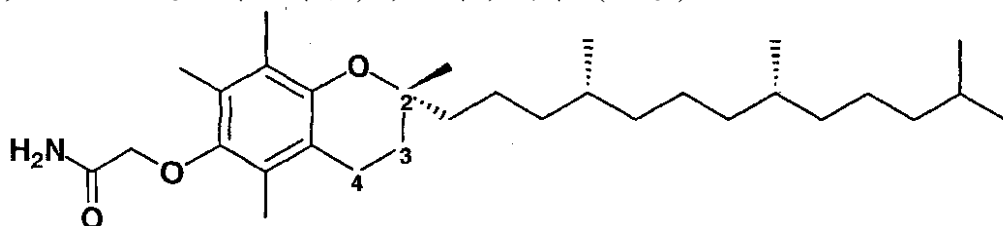
40

50

$M+H^+$, $C_{30}H_{51}O_4$ 460.355262で計算)。

【0055】

2, 5, 7, 8-テトラメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)アセトアミド(10)



10

【0056】

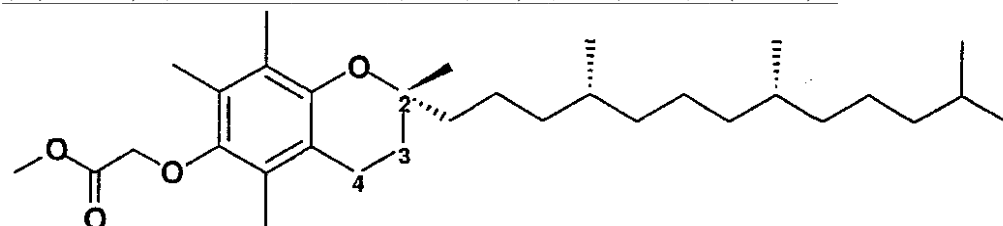
CH_2Cl_2 (5 ml) に化合物 1 (0.1 g, 0.2 mmol) を溶かした溶液を N-ヒドロキシ・コハク酸 (26 mg, 0.23 mmol) とジシクロヘキシルカルボジイミド (46 mg, 0.23 mmol) で処理した。2 分後に、白い沈殿物が形成された。得られた懸濁液を 2 時間攪拌した。反応物をさらに 6 時間攪拌した。この反応混合物を $-30^\circ C$ まで冷却して、ろ過した。ろ過物を濃縮して、得られた無色のオイルを EtOAc (35%, v/v) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この操作で白い固体が得られた (75 mg, 76%)。¹H-NMR ($CDCl_3$ / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂-, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.10, 2.12, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.19 (s, 2H, OCH₂), 6.36, 6.92 (2 x broad, 2H, NH); ¹³C-NMR ($CDCl_3$, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 70.9 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.8, 123.3, 125.4, 127.3 (アリル C), 146.5, 148.4 (アリル C-O), 172.1 (COOH); HRMS (CI, m/z); 488.409341 ($M+H^+$, $C_{31}H_{54}NO_4$ 488.410370 で計算)。

20

30

【0057】

メチルー12, 5, 7, 8-テトラメチルー(2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)アセテート(11)



40

【0058】

CH_2Cl_2 (5 mL) に化合物 1 (0.1 g, 0.2 mmol) を溶かした溶液を N, N-ジメチルアミノピリジン (26 mg, 0.23 mmol)、メタノール (1 mL) 及びジシクロヘキシルカルボジイミド (46 mg, 0.23 mmol) で処理した。2 分後に、白い沈殿物が形成された。得られた懸濁液を 6 時間攪拌した。この反応混

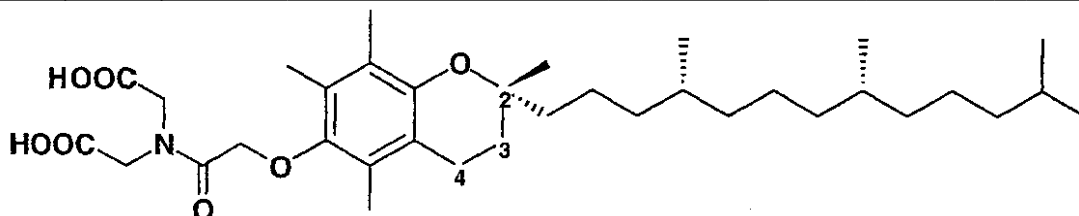
50

化合物を -30°C まで冷却して、ろ過した。ろ過物を濃縮して、得られた無色のオイルをEtOAc (40%, v/v) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行って精製した。この操作で白い固体が得られた (82 mg, 80% 8)。
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.10, 2.16, 2.20 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.32 (s, 2H, OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11, 7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 50.2 (OCH₃), 69.8 (OCH₂), 74.9 (2-C), 117.6, 123.0, 125.6, 127.5 (アリル C), 147.6, 148.2 (アリル C-O), 169.8 (COOH); HRMS (CI, m/z); 503.408411 (M+H⁺, C₃₂H₅₅O₄ 503.410036 で計算)。

20

【0059】

2-(N, N-(カルボキシメチル)-2-(2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(12)



【0060】

CH₂Cl₂ (5 ml) に化合物 1 (0.2 g, 0.4 mmol) を溶かした溶液をジエチル・イミノジアセテート (77 mg, 0.4 mmol)、及び O-7-アザベンゾトリアゾル-1-yl-N, N, N', N'-テトラメチルニウム・ヘキサフルオロホスフェート (HATU) (46 mg, 0.23 mmol) で処理した。12 時間後に、反応混合物をペースト状に濃縮して、その後、EtOAc (30%, v/v) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行って精製した。この操作で求められるジエステル中間物が無色のオイルとして得られた (150 mg, 55%)。
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 30H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.78 (m, 2H, 3-CH₂), 2.08, 2.13, 2.17, (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.58 (t, J=6.8 Hz, 2H, ZH, 4-CH₂), 4.19, 4.22 (q, J=7.4 Hz, 4H, OCH₂), 4.30, 4.33, 4.42 (3 x s, 6H, 2 x NCH₂, OCH₂); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11, 7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 14.0 (CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5

30

40

50

, 39.4, 40.0 (CH_2), 48.1, 48.1, 49.4 (NCH_2), 61.2, 61.5 (OCH_2), 71.8 (OCH_2), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.6, 127.4 (アリル C), 148.0, 148.1 (アリル C-O), 168.8 169.0 (CO); HRMS (CI, m/z): 660 ($M+H^+$, $\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{NO}_4$ 659.47610で計算)。

【0061】

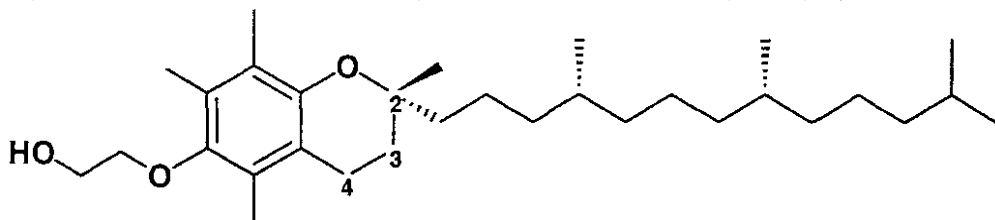
ジエステル中間物 (0.15 g, 0.23 mmol) をエタノール (4 ml) に溶かしたものを 1N NaOH (1 ml) で処理した。得られた濁った混合物を 70 °C の温度で 15 時間攪拌した。反応混合物を 1N HCl で酸性化して、エタノールを真空内で除去した。得られた水溶液を CHCl_3 (5 x 20 ml) で抽出して、結合有機層を Na_2SO_4 で乾燥した。これにより化合物 12 が白色固体 (0.13 g, 52%) として産出された。

【0062】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'- CH_2 , 2a- CH_3), 1.70 (m, 2H, 3- CH_3), 2.01, 2.05, 2.08 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.47 (m, 2H, 4- CH_2), 4.18 (m, 4H, 2 x NCH_2), 4.31 (m, 2H, OCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11.5, 11.6, 12.4 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.4, 19.5 (CH_3), 20.6, 21.0 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.8 (CH_2), 28.0 (CH), 31.2 (3- CH_2), 32.4, 32.5 (CH), 37.0, 37.2, 37.5, 39.1, 40.0 (CH_2), 48.1, 49.4 (NCH_2), 71.1 (OCH_2), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.4, 127.3 (アリル C), 147.8, 148.1 (アリル C-O), 168.8 169.0 (CO); HRMS (CI, m/z): 604.420882 ($M+H^+$, $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{NO}_7$ 604.421329で計算)。

【0063】

2-(2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)エタン-1-ol (13)、



【0064】

N, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に R, R, R- α -トコフェロール (0.5 g, 1.16 mmol) g、溶かした溶液をヨードエタノール (1.7 g, 10 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (2.5 g, 63 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 24 時間激しく攪拌した。5N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 ml) で抽出した。結合したエーテル層を H_2O (3 x 30 ml) 3 及び食塩水 (1 x 30 ml) で洗浄して、その後 Na_2SO_4 で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを 30% (v/v) EtOAc と 2% 酢酸をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行って精製した。得られた黄色の液体をジエチル・エーテル (30 ml) に溶かし

10

20

30

40

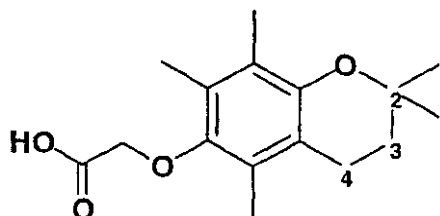
50

て、 H_2O (3 x 20 ml) 及び食塩水 (1 x 20 ml) で洗浄してから、 Na_2SO_4 で乾燥した。得られた溶液を淡黄色のオイルに濃縮して、真空中で48時間乾燥した。この操作で化合物13が黄色のオイルとして得られた (0.40 g、73%)。 ^1H -NMR (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12 H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1.0-1.6 (m, 24 H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'- CH_2 , 2a- CH_3), 1.81 (m, 2 H, 3- CH_2), 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9 H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.59 (t, $J=6.6$ Hz, 2 H, 4- CH_2), 3.79 (m, 2 H, OCH_2), 3.94 (m, 2 H, OCH_2); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.6, 19.7 (CH_3), 20.6, 21.0 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.8 (CH_2), 28.0 (CH), 31.2 (3- CH_2), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH_2), 63.1, 69.2 (OCH_2), 75.0 (2-C), 117.8, 123.4, 126.4, 128.3 (アリル C), 149.5, 149.2 (アリル C-O); MS (CI, m/z): 475 ($\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_3$ 474.40729で計算)。

10

【0065】

2-(2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-イロキシ) 酢酸 (14)

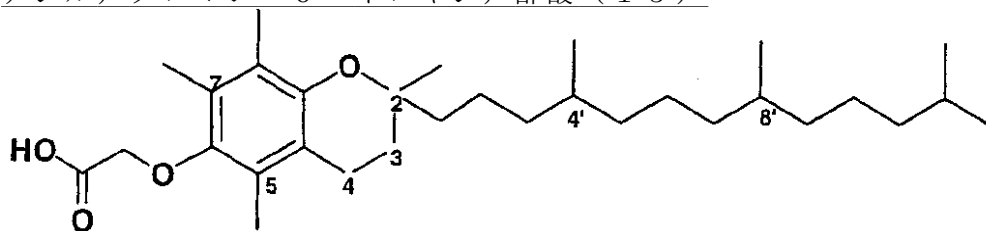


【0066】

N, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル-6-クロマン-6-オール (0.4 g, 1.36 mmol) 溶かした溶液をブromo酢酸メチル (0.8 g, 5.3 mmol) と過剰な量の粉末化NaOH (0.7 g, 18 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24時間激しく攪拌した。5N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 ml) で抽出した。結合したエーテル層を H_2O (3 x 30 ml) 及び食塩水 (1 x 30 ml) で洗浄して、その後 Na_2SO_4 で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを30% (v/v) EtOAcと2%酢酸をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。得られた黄色の液体をジエチル・エーテル (30 ml) に溶かして、 H_2O (3 x 20 ml) 及び食塩水 (1 x 20 ml) で洗浄してから、 Na_2SO_4 で乾燥した。得られた溶液を淡黄色のオイルに濃縮して、真空中で48時間乾燥した。この操作で化合物14が白い固体として得られた (0.31 g, 82%)。 ^1H -NMR (CDCl_3 / TMS, ppm): 1.31 (s, 6 H, CH_3), 1.81 (t, $J=7.8$ Hz, 3- CH_2), 2.10, 2.16, 2.19 (3 x s, 9 H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.61 (t, $J=7.8$ Hz, 2 H, 4- CH_2), 4.39 (s, 2 H, OCH_2), ^{13}C -NMR (CDCl_3 , ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 20.9, 26.8, 32.7 (アルキル), 69.1 (OCH_2), 72.9 (2-C), 117.5, 123.2, 125.5, 127.3 (アリル), 147.0 148.6 (O-アリル), 173.8 (COOH); HRMS (CI, m/z): 279.159238 ($\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4$ 279.159634で計算)。

50

2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R S- (4 R S, 8 R S, 12-トリメチルトリ
デシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (15)

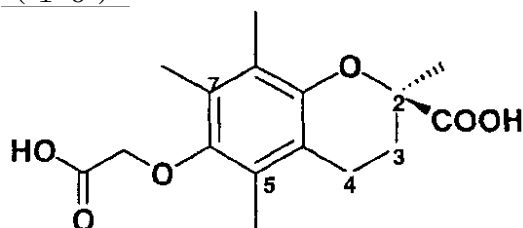


【 0 0 6 8 】

30

40

2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2 R- (カルボキシ) クロマン-6-イロキシ) 酢酸
(16)



50

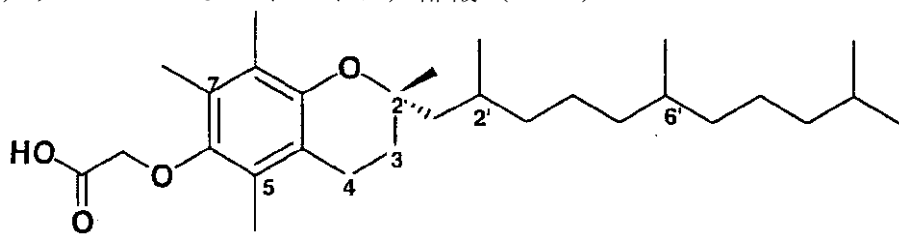
5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルン酸 (0.34 g, 1.36 mmol) 溶かした溶液をプロモ酢酸メチル (0.8 g, 5.3 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (1.2 g, 30 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 24 時間激しく攪拌した。5 N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 ml) で抽出した。結合したエーテル層を H₂O (3 x 30 ml) 及び食塩水 (1 x 30 ml) で洗浄して、その後、Na₂SO₄ で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを 30% (v/v) EtOAc と 2% 酢酸をヘキサンに溶かした溶液で、シリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行って精製した。得られた黄色の液体をジエチル・エーテル (30 ml) に溶かして、H₂O (3 x 20 ml) 及び食塩水 (1 x 20 ml) で洗浄してから、Na₂SO₄ で乾燥した。得られた黄色の液体を淡黄色のオイルに濃縮して、真空中で 48 時間乾燥した。この操作で化合物 16 が白い固体として得られた (0.33 g, 80%)。¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm): 1.52 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.10 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.16, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.56 (t, J=6.5 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.36 (s, 2H, OCH₂)。

10

【0071】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(2RS, 6RS, 10-トリメチルウンデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸 (17)

20



【0072】

10 g (40 mmol) の (-)-(s)-6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシル酸及び 0.5 g の p-トルエンスルホン酸一水化物を 200 ml のメタノール内に溶かしたものを攪拌し、4 時間リフラックスした。冷却後、この溶液を水で希釈して、ジエチルエーテルで抽出した。結合したエーテル層を飽和重炭酸ナトリウム水溶液、H₂O、及び食塩水 (1 x 30 ml) で洗浄して、Na₂SO₄ で乾燥した。得られた溶液を淡黄色のオイルに濃縮して、真空中で 48 時間乾燥した。この操作で 10 g (95%) のメチル (-)-(S)-6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシル酸塩が無色の固体として得られ、これがさらに精製を行わずに用いられた。¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm): 1.52 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.10 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.16, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.56 (t, J=6.5 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.55 (s, 3H, OCH₃); MS (CI, m/z): 264.422 M+H⁺, C₁₅H₂₀O₄ 265.3224 で計算。

30

40

【0073】

このエステル 2 g (7.58 mmol) を 7.5 ml の N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶かした溶液に 2.6 g (18.8 mmol) の無水粒状炭酸カリウムを加え、さらに 2.3 ml (20 mmol) のベンジルクロライドを加えた。得られたスラリーを室温で 41 時間攪拌してから、50 ml の水に注いで、エーテルを用いて通常の方法で処理した。生成物から 50 °C の温度下で高度の真空内で過剰なベンジルを取り除いた。この操作で、2.69 g (100%) の純粋な (TLC) (-)-(S)-6-ベンジロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシル酸メチル・エステルが融点 102-106 °C の黄色の固体として得られた。この化合物の分析標

50

本を（エーテル／メタノールから）融点 $108-109^{\circ}\text{C}$ の無色の固体として調製した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 1.54 (s, 3H, 2a- CH_3), 2.01 (m, 2H, 3- CH_2), 2.14, 2.17, 2.19 (3x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.51 (t, $J=6.7\text{ Hz}$, 2H, 4- CH_2), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 5.12 (s, 2H, 6- OCH_2), 7.15 (m, 5H, ArH) MS (CI, m/z): 355.232 $\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_4$ 354.448で計算。

【0074】

上記エーテル・エステル3.54 g (10 mmol)を20 mlのトルエン及び10 mlの CH_2Cl_2 に溶かした溶液を攪拌して、氷／アセトン槽で冷却し、さらに12 ml (18 mmol)の25%ジソブチルアルミニウム水酸化物をトルエン (Texas Alkyls)に溶かしたものを10分間かけて滴下して加えた。 -70°C で30分間攪拌してから、反応混合物を10 mlの MeOH を用いて(-70°C で)慎重に分解させた。50 mlの水と50 mlの1N硫酸水溶液を加えてから、その混合物を室温まで加温し、エーテルを用いて通常の方法で処理したところ、3.2 g (100%)の粗アルデヒド [(+) - 2-6-ベンジロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルバルデヒド] が粘性のあるオイルとして得られ、これを、19% (v/v) EtOAcをヘキサン内に溶かしたものをを用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出で精製した。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 1.53 (s, 3H, 2a- CH_3), 2.11 (m, 2H, 3- CH_2), 2.24, 2.27, 2.29 (3x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.481 (t, $J=6.7\text{ Hz}$, 2H, 4- CH_2), 5.19 (s, 2H, 6- OCH_2), 7.20 (m, 5H, ArH), 9.6 (s, 1H, CHO); MS (CI, m/z): 325.332 $\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_3$ 324.422で計算。

【0075】

9.6 gのプソイドヨノン 100 ml の95%エタノールに溶解して、0.68 gのホウ化水素ナトリウムをエタノールにとかしたものを室温で加えた後、その混合物を2時間攪拌して、一昼夜放置した。この混合物を2 gの水酸化ナトリウムを500 mlの水に溶かした溶液に加えた。この混合物をエーテルで抽出して、エーテル抽出物を水で洗浄し、乾燥、濃縮した。残油を真空蒸留したところ、無色のオイル (プソイドヨノール) ; 沸点 $112-120^{\circ}\text{C}/5\text{ mmHG}$ 、7.7 g (80%) が得られた。

【0076】

2.97 gのプソイドヨノールを10 mlのアセトニトリルに溶かした溶液に攪拌しながら、そして同時に温度を 30°C 以下に維持して、乾燥した塩化水素を乾燥したエーテル内でトリフェニルホスフィン溶液内を通過させて得たトリフェニルホスフィン塩酸塩4.53 gを加えた。この混合物を室温で一昼夜放置した後、減圧状態で 50°C の温度でアセトニトリルを除去した。残留物に4.47 gの (+) S-6-ベンジロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルバルデヒドを15 mlのジメチルホルムアミドに溶かしたものを加えてその混合物を攪拌した。澄んだ溶液を得られたので、0.352 gのナトリウムと7 mlの無水メタノールから得られたナトリウム・メトキシドを 15°C の温度下で滴下しながら加えて攪拌した。この反応混合物はイリド形成によって赤色に変色した。添加が終わった後、攪拌を 10°C の温度下で30分間継続し、その後混合物を 80°C までゆっくり加熱したところ、色が消失した。この生成物を200 mlの50%水性メタノールに注いで、乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留油分を20 mlのエーテル内に溶解して、塩化水銀のエーテル溶液を沈殿物が出なくなるまで加えた。沈殿物をろ過し、ろ過物を水で洗浄、乾燥、濃縮させたところ、4.7 gの黄色いオイルが得られた。シス及びトランス・アルケン (MS (CI, m/z) の粗混合物: 485.22, $\text{M}+\text{H}^+$, $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_2$ 484.7255で計算) を30 mlの酢酸エチル内に溶解して、炭素に対して5%パラジウム0.08 gを加え、その混合物を40 psiの H_2 内で30時間振動させてその後、セライトを通じてろ過し、酢酸エチルでよく

洗浄した。ろ過物を濃縮させて、EtOAcをヘキサンに溶かした溶液（1：9）を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行ったところ、2, 5, 7, 8-テトラメチル-（2R-（2RS, 6RS）10-トリメチルトリウンデシル）-6-クロマノールが得られた（収率：60%）。¹H-NMR（CDCl₃/TMS, ppm）：0.97（m, 12H, 2a'-, 6a'-, 10a'-, 11'-CH₃）, 1.1-1.7（m, 20H, 2'-, 6'-, 10'-CH, 1'-, 3'-, 4'-, 5'-, 7'-, 8'-, 9'-CH₂, 2a-CH₃）, 1.88（m, 2H, 3-CH₂）, 2.17, 2.19, 2.20（3xs, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃）, 2.63（t, J=6.7 Hz, 2H, 4-CH₂）；MS（CI, m/z）：403.27 M+H⁺, C₂₇H₄₆O₂ 402.6632で計算。

10

【0077】

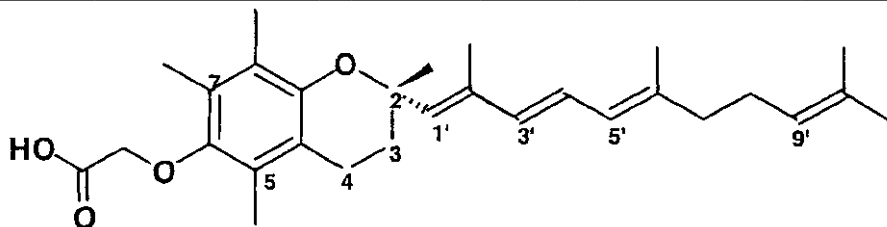
2, 5, 7, 8-テトラメチル-（2R-（2RS, 6RS）10-トリメチルトリウンデシル）-6-クロマノール（0.466g, 1.16mmol）をN, N-ジメチルホルムアミド（20mL）に溶かした溶液をブromo酢酸メチル（3.4g, 8.3mmol）と過剰な量の粉末化NaOH（1.2g, 30mmol）で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24時間激しく攪拌した。5N HClで反応を酸性化して、ジエチル・エーテル（3x30ml）で抽出した。結合したエーテル層をH₂O（3x10ml）及び食塩水（1x30ml）で洗浄して、その後Na₂SO₄で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを19%（v/v）EtOAcと酢酸（2%）をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この操作で化合物17が収率76%で得られた。¹H-NMR（CDCl₃/TMS, ppm）：0.97（m, 12H, 2a'-, 6a'-, 10a'-, 11'-CH₃）, 1.2-1.7（m, 20H, 2'-, 6'-, 10'-CH, 1'-, 3'-, 4'-, 5'-, 7'-, 8'-, 9'-CH₂, 2a-CH₃）, 1.92（m, 2H, 3-CH₂）, 2.18, 2.20, 2.23（3xs, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃）, 2.68（t, J=6.8 Hz, 2H, 4-CH₂）, 4.48（s, 2H, OCH₂）；MS（CI, m/z）：461.44 M+H⁺, C₂₉H₄₈O₄ 460.700で計算。

20

30

【0078】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-（2, 6, 10-トリメチル-1, 3, 5, 9-E:Zデカテトラエン）クロマン-6-イロキシ）酢酸（18）



40

【0079】

メチル-（S）-6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシレート（20g, 0.075mol）を50mlの乾燥DFMに溶かした溶液に、イミダゾール（13mg, 0.1911mol）とテトラブチルジメチルシリルクロライド（14g, 0.0933mol）を加えた。この混合物を23℃の温度下で24時間攪拌して、その後、エーテルで処理して、1N HCl内に注いだ。有機性抽出物を（食塩水、Na₂SO₄を用いて）乾燥させて、真空内で濃縮した。この粗生成物をフラッシュ・クロマトグラフィー（9：1ヘキサン；酢酸エチル）で精製したところ、6-〔ジメチル（1, 1-ジメチルエチル）シリル〕-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボキシレート（TBS保護メチル・エステル）が得られた。¹H-NMR

50

($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm) : 0.12 (s, 6H), 1.102 (s, 9H), 1.18 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.645 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.2 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H), 2.48–2.7 (m, 2H) 及び 3.72 (s, 3H, OCH_3) ; MS (CI, m/z) : 379.32 $\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 378.586 で計算。

【0080】

3.78 g (10 mmol) の上記エーテル・エステルを 20 ml のトルエンと 10 ml の CH_2Cl_2 内に溶かした溶液を乾燥した氷/アセトン槽で、12 ml (18 mmol) の 25% ジソブチルアルミニウム水酸化物をトルエンに溶かした溶液 (Texas Alkyls) を滴下しながら 10 分間かけて攪拌しながら冷却した。−70℃の温度下で 30 分間攪拌した後、反応混合物を 10 ml の MeOH を用いて慎重に分解させた (−70℃)。50 ml の水と 50 ml の 1N 硫酸水溶液を加えた後、混合物を室温まで加温して、エーテルを用いて通常の方法で処理したところ、3.2 g の粗アルデヒド [(+) S-6-([ジメチル(1, 1-ジメチルエチル)シリル]-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルバルデヒド] が粘性のあるオイルとして得られ、このオイルを 195 (v/v) EtOAc をヘキサンに溶かした溶液を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この溶液を濃縮し、真空内で 48 時間乾燥したところ、TBDs アルデヒド (78%) が融点 66–68℃の固体として得られた。¹H-NMR ($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm) : 0.12 (s, 6H), 1.1 (s, 9H), 1.38 (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.3–2.2 (m, 2H), 2.53 (m, 2H) 及び 9.82 (d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H) ; MS (CI, m/z) : 349.40 $\text{M} + \text{H}^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{SiO}_3$ 348.560 で計算。

【0081】

2.97 g のプソイドヨノールを 10 ml のアセトニトリルに溶かした溶液に攪拌しながら、同時に温度を 30℃以下に保持しつつ、乾燥した塩化水素を乾燥し、エーテルに溶かしたトリフェニルホスフィン内を通過させることで得たトリフェニルホスフィン塩酸塩 4.53 g を加えた。その混合物を室温で一昼夜放置した後、減圧状態の下で 50℃の温度でアセトニトリルを取り除いた。残留物に [(+) -S-6-[ジメチル(1, 1-ジメチルエチル)シリル]-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルバルデヒド] を 15 ml のジメチルホルムアミドに溶かしたものを 4.80 g を加えて、その混合物を攪拌した。澄んだ溶液を得られたので、0.352 g のナトリウムと 7 ml の無水メタノールから得られたナトリウム・メトキシドを 15℃の温度下で滴下しながら加えて攪拌した。この反応混合物は形成されたイリドによって赤色に変色した。添加が終わった後、攪拌を 10℃の温度下で 30 分間継続し、その後、混合物を 80℃までゆっくり加熱したところ、色が消失した。この生成物を 200 ml の 50% 水性メタノールに注いで、乾燥させ、真空中で濃縮させた。残留油分を 20 ml のエーテル内に溶解して、塩化水銀のエーテル溶液を沈殿物が出なくなるまで加えた。沈殿物をろ過し、ろ過物を水で洗浄、乾燥、濃縮させたところ、4.7 g の黄色いオイルが得られた。シス及びトランス・アルケンの粗混合物を THF に溶解して、テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリド (0.031 mol) を加えた。23℃の温度下で 40 分間攪拌した後、その混合物を水に注いで、エーテル内に抽出させた。エーテル・抽出物を乾燥、濃縮し、さらに、EtOAc をヘキサンに溶かした溶液 (1:9) を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行ったところ、2, 5, 7, 8-テトラメチル-(2R-(2, 6, 10-トリメチル-1, 3, 5, 9-EZデカテトラエン)-6-クロマノールが得られた (収率: 68%)。¹H-NMR ($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm) : 1.28 (s, 3H, 2a CH_3), 1.65 (s, 3H), 1.70 (s, 6H), 1.72 (s, 3H), 1.9 (m, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.53 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 2H, 4 CH_2), 5.13–5.27 (m, 3H) 及び 6.44 (m, 2H) ; MS (CI, m/z) : 395.17

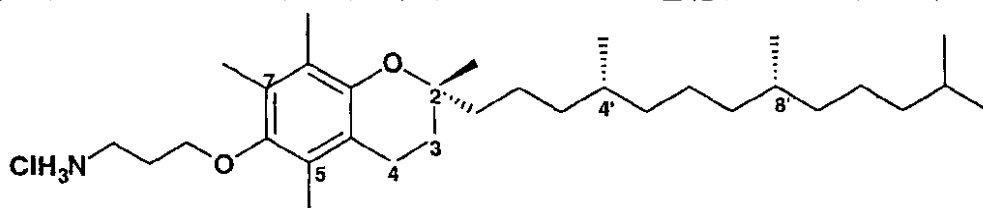
$M + H^+$, $C_{27}H_{38}O_2$ 394.60 で計算。

【0082】

2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R- (2, 6, 10-トリメチル- 1, 3, 5, 9, E: Z デカテトラエン) -6-クロマノール (0.457 g, 1.16 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶かした溶液をブロモ酢酸メチル (3.4 g, 8.3 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (1.2 g, 30 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 24 時間激しく攪拌した。5N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 mL) で抽出した。結合したエーテル層を H_2O (3 x 30 mL) で洗浄して、その後 Na_2SO_4 で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを 19% (v/v) EtOAc と酢酸 (2%) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。得られた液体をジエチル・エーテル (30 mL) に溶かして、 H_2O (3 x 20 mL) 及び食塩水 (1 x 20 mL) で洗浄してから、 Na_2SO_4 で乾燥した。得られた溶液を濃縮して、真空中で 48 時間乾燥した。この操作で化合物 18 が収率 67% で得られた。 1H -NMR ($CDCl_3$ / TMS, ppm): 1.24 (s, 3H, 2aCH₃), 1.63 (s, 3H), 1.72 (s, 6H), 1.74 (s, 3H), 1.92 (m, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.29 (s, 6H), 2.43 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4CH₂), 4.68 (s, 2H, OCH₂), 5.10-5.27 (m, 3H) 及び 6.34 (m, 2H); MS (CI, m/z): 452.24 $M-H^+$, $C_{27}H_{38}O_2$ 452.63 で計算。

【0083】

3- (2, 5, 7, 8-テトラメチル- (2R-4R-8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) プロピル-1-塩化アンモニウム (19)



【0084】

3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩 (1.0 g, 4.6 mmol) を 2:1 ジオキサン/ H_2O (45 mL) に溶かした溶液を 0°C まで冷却して、 K_2CO_3 (6.22 g, 45 mmol) とジ-tert-ブチル重炭酸塩 (1.5 g, 6.9 mmol) で処理した。この反応物を室温まで加温しながら 15 時間攪拌した。ジオキサンを真空内で取り除いて、残りの水性混合物を 5N 塩酸で酸性化して、酢酸エチル (5 x 25 mL) で抽出した。結合した有機層を $MgSO_4$ で乾燥したところ、3-ブロモ-N- (tert-ブトキシカルボニル) プロピルアミンが無色のオイルとして得られた (0.93 g, 93%)。 1H -NMR ($CDCl_3$ / TMS, ppm): 1.41 (s, 9H, CH₃), 2.02 (quintet, J=6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.23 (m, 2H, NCH₂), 3.41 (t, J=6.6 Hz, CH₂Br), 4.8 (broad, 1H, NH); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, ppm): 28.3 (CH₃), 30.7, 32.6, 38.9 (CH₂), 79.3 (quaternary C), 155.9 (CO); MS (CI, m/z): 239, 241 ($M+H^+$, $C_8H_{16}BrNO_2$ 237.03644 で計算)。

【0085】

N, N-ジメチルホルムアミド (15 mL) に R, R, R-α-トコフェロール (0.5 g, 1.16 mmol) を溶かした溶液を 3-ブロモ-N- (tert-ブトキシカルボニル) プロピルアミン (0.9 g, 3.8 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (0.32 g, 8 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 2

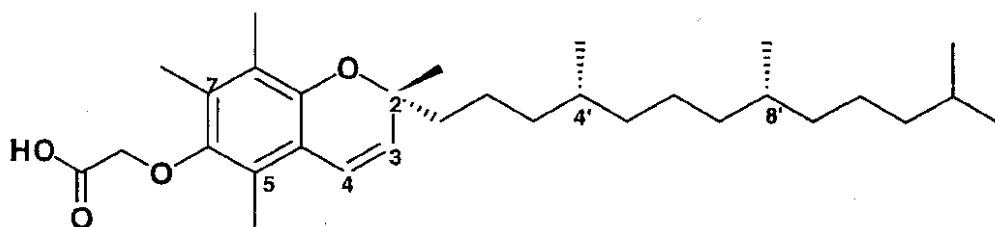
4時間激しく攪拌した。5 N HClで反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 ml) で抽出した。結合したエーテル層をH₂O (3 x 30 ml) で洗浄して、その後Na₂SO₄で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それをEtOAc (10% v/v) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この操作で、求めるエステルが無色のオイルとして得られた (0.45 g, 66%)。¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃)、1.0-1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃)、1.81 (m, 2H, 3-CH₂)、1.99 (quintet, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂)、2.07, 2.14, 2.16 (3xs, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃)、2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂)、3.43 (m, 2H, NCH₂)、3.73 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂)、4.34 (s, 2H, OCH₂) ; ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 12.0, 12.9 (5a-, 7a-, 8a-, CH₃)、19.6, 19.7 (CH₃)、20.6, 21.0 (CH₂)、22.6, 22.7 (CH₃)、23.7 (2a-CH₃)、24.4, 24.8 (CH₂)、27.9 (CH)、31.2 (3-CH₂)、32.7, 32.8 (CH)、37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.1 (CH₂)、70.2 (OCH₂)、74.8 (2-C)、117.5, 122.9, 125.5, 127.5 (アリルC)、147.5, 148.0 (アリルC-O)、156.0 (CO) ; MS (CI, m/z): 589 M+H⁺, C₃₇H₆₅NO₄ 587.49136で計算)。

【0086】

上に述べたN保護エーテル (0.1 g, 0.17 mmol) を4 N塩酸をジオキサン (1 mL, 4 mmol) 内に溶解して、4時間攪拌した。反応混合物上をアルゴンのストリームを流してジオキサンを取り除いた。得られた物質を真空内で8時間かけて乾燥したところ、化合物19が白い固体として得られた (82 mg, 99%)。¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃)、1.0-1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃)、1.81 (m, 2H, 3-CH₂)、1.99 (quintet, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂)、2.07, 2.11, 2.15 (3xs, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃)、2.29 (m, 2H, OCH₂) ; 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂)、3.43 (m, 2H, NCH₂)、3.79 (m, 2H, OCH₂) ; ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.8, 11.9, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-, CH₃)、19.6, 19.7 (CH₃)、20.6, 21.0 (CH₂)、22.6, 22.7 (CH₃)、23.9 (2a-CH₃)、24.4, 24.8 (CH₂)、28.0 (CH)、28.4 (CH₃)、31.2 (3-CH₂)、32.7, 32.8 (CH)、37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂)、74.8 (OCH₂)、75.0 (2-C)、117.5, 122.9, 126.0, 127.3 (アリルC)、147.8, 148.0 (アリルC-O) ; HRMS (CI, m/z): 487.438887 (M+H⁺, C₃₂H₅₇NO₂ 487.438935で計算)。

【0087】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4R, 8R, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-3-エン-6-イロキシ) 酢酸 (20)



【0088】

無水トルエン（150 mL）にR, R, R- α -トコフェロール（2 g、42 mmol）を溶かした溶液を加熱して還流し、その後、2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノ-1, 4-ベンゾキノン（0.96 g、4.2 mmol）で1時間間隔で4回処理した。この処理期間中に、反応混合物は暗赤色になり、その後、明るい色の固体が沈殿した。この反応物を室温まで冷却してろ過し、ろ過物を濃縮した。得られた暗色オイルを酢酸エチル（10% v/v）をヘキサンに溶かしたものをを用いたシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この操作で求める酢酸クロメンが無色のオイルとして得られた（1.74 g、88%）。¹H-NMR（CDCl₃/TMS, ppm）：0.87（m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃）、1.0-1.6（m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃）、2.07, 2.13, 2.18（3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₂）、2.35（s, 3H, CH₃CO-）、5.61, 6.52（2 x d, J=10.0 Hz, 2H, CH）；¹³C-NMR（CDCl₃, ppm）：11.5, 11.6, 13.1（5a-, 7a-, 8a-CH₃）、14.1（CH₃）、19.6, 19.7（CH₃）、20.4, 21.4（CH₂）、22.6, 22.7（CH₃）、24.4, 24.8（CH₂）、25.8（2a-CH₃）、27.9（CH）、30.8（3-CH₂）、32.7, 32.8（CH）、37.2, 37.4, 39.4, 41.0（CH₂）、60.3（2-C）、117.6, 119.7, 122.3, 122.6, 128.9, 129.6（アリル及びビニルC）、141.2, 148.4（アリルC-O）、169.4（CO）；HRMS（CI, m/z）：471.375799, M+H⁺, C₃₁H₅₀O₃ 470.375996で計算）。

【0089】

酢酸クロメン（1.0 g、2.13 mmol）をエタノールに溶かした溶液を2N NaOH（20 mL）で処理して、60℃の温度で90分間処理した。反応混合物を冷却して、5N塩酸で酸性化し、エタノールを真空中で取り除いた。得られた水溶液をエーテルで抽出して濃縮したところ、淡黄色のオイルが得られ、これを酢酸エチル（15% v/v）をヘキサンに溶かした溶液を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィーによって抽出した。この操作で、望ましいクロメン-6-オール中間物が無色のオイルとして得られた（0.92 g、98%）。¹H-NMR（CDCl₃/TMS, ppm）：0.87（m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃）、1.0-1.6（m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃）、2.14, 2.18, 2.19（3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃）、5.63, 6.55（2 x d, J=10.0 Hz, 2H, CH）；¹³C-NMR（CDCl₃, ppm）：10.8, 11.6, 12.4（5a-, 7a-, 8a-CH₃）、19.6, 19.7（CH₃）、21.3（CH₂）、22.6, 22.7（CH₃）、24.4, 24.8（CH₂）、25.2（2a-CH₃）、27.9（CH）、30.9（3-CH₂）、32.7, 32.8（CH）、37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.5（CH₂）、50.8（2-C）、116.2, 117.8, 120.1, 122.3, 1

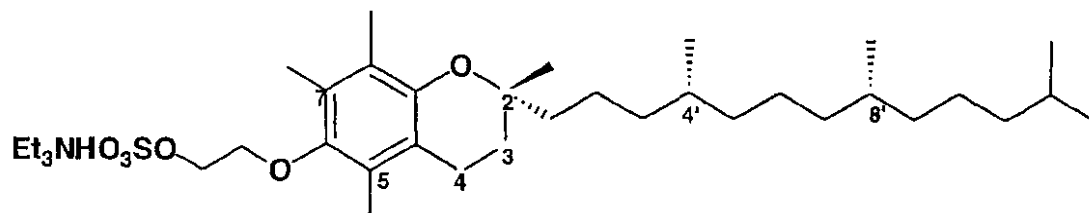
23.0, 130.0 (アリル及びビニルC), 144.6, 145.3 (アリルC-O), 169.4 (CO); HRMS (CI, m/z): 428.365275 M+H⁺, C₂₉H₄₈O₂ 428.365431で計算)。

【0090】

クロメン-6-オール中間物 (0.9 g, 2.1 mmol) をN, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶かした溶液をブromo酢酸メチル (3.4 g, 8.3 mmol) と過剰な量の粉末化NaOH (1.2 g, 30 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24時間激しく攪拌した。5N HClで反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 mL) で抽出した。結合したエーテル層をH₂O (3 x 30 mL) と食塩水 (1 x 30 mL) で洗浄して、その後Na₂SO₄で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それをEtOAc (19%, v/v) と2%酢酸をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。この操作で得られた黄色の液体をジメチル・エーテル (30 mL) 内に溶解して、H₂O (3 x 20 mL) 及び食塩 (1 x 20 mL) で洗浄して、Na₂SO₄で乾燥した。得られた溶液を淡黄色オイルに濃縮して、真空内で48時間乾燥した。これによって、化合物19が無色の化合物として得られたとして得られた (0.90 g, 88%)。¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 2.07, 2.10, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 4.37 (s, 2H, OCH₂), 5.62, 6.50 (2 x d, J=10.0 Hz, 2H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.3, 11.5, 12.9 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 25.6 (2a-CH₃), 27.9 (CH), 30.9 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.9 (CH₂), 60.5 (OCH₂), 69.1 (2-C), 118.0, 119.8, 122.8, 122.9, 129.6, 19.8 (アリル及びビニルC), 147.5, 147.8 (アリルC-O), 173.4 (CO); HRMS (CI, m/z): 487.378731 M+H⁺, C₃₁H₅₁O₄ 487.378736で計算)。

【0091】

2-(2, 5, 7, 8-テトラメチル-(2R-(4R, 8, 12-トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)硫酸トリエチルアンモニウム (21)



【0092】

2-(2, 5, 7, 8-テトラメチル-(2R-(4R, 8R, 12-2トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)エタン-1-オール (13) (0.1 g, 0.21 mmol) を無水DMF (2 mL) 及びピリジン (0.6 mL) に溶かした溶液を三酸化硫黄-N, N-ジメチルホルムアミド複合体 (0.16 g, 1.0 mmol) で処理して、得られた溶液を24時間攪拌した。この反応混合物を1N塩酸と共に急冷して、CH₂Cl₂ (5 x 5 mL) を用いて抽出した。ガス状アンモニアをCH₂Cl₂ 溶液に通して10分間泡立てた。得られた溶液を黄色のペーストに濃縮して、MeOH (10% v/v) とトリエチル・アミン (2%) をCHCl₃ に溶かした溶液を用いた

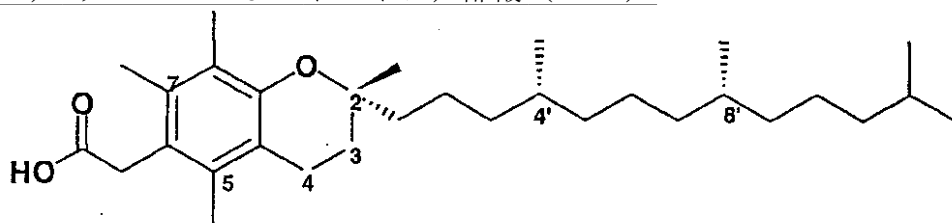
シリカ・ゲル・クロマトグラフィーを行って精製した。この操作によって、化合物 21 が黄色の準固体として得られた (92 mg, 77%)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 1.95, 2.01, 2.05 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.45 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.05 (m, 6H, NCH₂), 3.79 (m, 2H, OCH₂), 4.21 (m, 2H, OCH₂); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 9.46 (CH₃), 12.4, 12.6, 13.5 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 20.3, 20.4 (CH₃), 21.3, 21.7 (CH₂), 23.3, 23.4 (CH₃), 24.5 (2a-CH₃), 25.1, 25.5 (CH₂), 28.6 (CH), 31.9 (3-CH₂), 33.3, 33.4 (CH), 37.9, 38.1, 40.0, 40.8 (CH₂), 46.9 (NCH₂), 67.4, 71.9 (OCH₂), 75.5 (2-C), 118.3, 123.5, 123.5, 126.5, 128.3 (アリルC), 148.5 (アリルC-O); HRMS (CI, m/z): 554.364102, M-NH₃, C₃₁H₅₄O₆S 554.364119 で計算)。

20

【0093】

6-(2, 5, 7, 8 テトラメチル- (2R- (4R, 8, 12-トリメチルトリデシル) クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (22)



【0094】

30

R, R, R- α -トコフェロール (1.0 g, 23 mmol) を無水 CH_2Cl_2 (25 mL) に溶かした溶液を 0°C に冷却した。ジイソプロピルアミン (2 mL, 11.6 mmol) を加えて、その後トリフルオロメチルスルホン酸無水物 (5.0 g, 17.7 mmol) で滴下して加えた。溶液の色はすぐに暗色に変わり、24 時間攪拌しながら室温に加温した。反応物を水で急冷して、ジメチルエーテル (2 x 100 mL) で抽出した。結合したエーテル層を 1N HCl (50 mL)、H₂O (50 mL)、食塩水 (50 mL) で洗浄して、MgSO₄ で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイルに濃縮して、酢酸エチル (3%, v/v) をヘキサンに溶かした溶液を用いたシリカ・ゲル・クロマトグラフィーで精製した。この操作で求めるトリフレート中間物が黄色のオイルとして得られた (1.3 g、定量)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 / TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.07, 2.13, 2.21 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.62 (t, J=6.6 Hz, 2H, 4-CH₂); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11.9, 13.2, 14.0 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3

50

, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 75.6 (2-C), 118.4, 124.4, 126.7, 128.1 (アリルC), 139.6, 150.9 (アリルC-O); ¹⁹F-NMR (CDCl₃, ppm): HRMS (CI, m/z): 563.337803, (M+H⁺, C₃₀H₅₀O₄F₃S 563.338192で計算)。

【0095】

トリフレート (1.3 g, 2.31 mmol) を無水DMF (23 mL) に溶かした溶液をLiCl (0.98 g, 4.62 mmol)、トリフェニルホスフィン (0.37 g, 1.4 mmol)、2,6-ジールト-ブチル-4-メチルフェノール (2-3 結晶)、トリブチル(ビニル)スズ (0.73 g, 2.31 mmol)、及び、ジクロロビス(トリフェニルホスフィン)-パラジウム(II) (0.24 g, 0.35 mmol) で処理した。この混合物を120℃に加熱して、攪拌した。8時間後、反応物を室温に冷却して、H₂O (50 mL) とジエチル・エーテル (50 mL) の混合物に加えた。エーテル層を1N塩酸 (6 x 30 mL) 及びKFの飽和溶液 (6 x 30 mL) で洗浄した。エーテル溶液をNa₂SO₄で乾燥して、その後暗色オイルに濃縮した。この物質を酢酸エチル (3%、v/v) をヘキサンに溶かした溶液を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行うことで精製したところ、6-ビニルクロマン中間物が澄んだオイルとして得られた (0.38 g, 38%)。

【0096】

¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.86 (m, 2H, 3-CH₂), 2.20, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.62 (t, J=6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 5.18, 5.56 (2 x dd, J_{gem}=2.3 Hz, J_{cis}=11.2 Hz, J_{trans}=18.7 Hz, 2H=CH₂), 6.77 (dd, J=18.7, 11.2 Hz, 1H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.9, 16.3, 17.2 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.7, 19.8 (CH₃), 20.8, 21.1 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.9 (2a-CH₃), 24.5, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.5, 37.5, 39.4, 40.1 (CH₂), 74.9 (2-C), 116.7, 119.0, 122.0, 129.8, 131.2, 132.8, 136.8 (アリル/ビニルC), 150.9 (アリルC-O); HRMS (CI, m/z): 440.401602, (M+H⁺, C₃₁H₅₂O 440.401812で計算)。

【0097】

この6-ビニルクロマン中間物 (0.12 g, 0.27 mmol) を無水THF (1 mL) に溶かした溶液を0℃に冷却して、9-BBN (0.60 mL, 0.5 MをTHF、0.3 mmolに溶かしたもの) で処理した。この反応混合物を加熱して8時間還流した。反応を水 (1.5 mL) で急冷して、NaBO₃·4H₂Oで処理して、得られたスラリーを一昼夜攪拌した。ジエチル・エーテル (4 mL) とこの反応混合物をCH₂Cl₂ (2 x 20 mL) で抽出した。有機層を澄んだオイルまで濃縮して、それを酢酸エチル (50%, v/v) をヘキサンに溶かした溶液を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って濃縮した。この操作で、求める6-(2-ヒドロキシエチル)クロマン中間物が無色なオイルとして得られた (30 mg, 24%)。 ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-

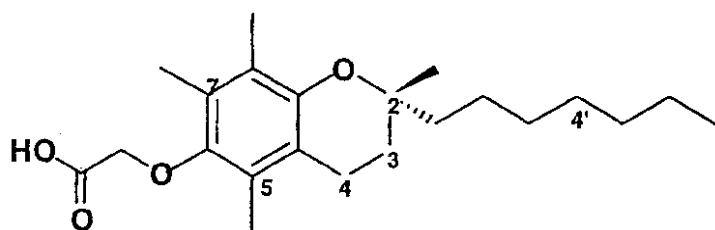
, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.17, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.68 (t, J=6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.01 (t, J=7.5 Hz, 2H, Ar-CH₂), 3.74 (t, J=7.5 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 12.0, 15.1, 16.0 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 62.2 (OCH₂), 72.6 (2-C), 116.8, 122.3, 124.9, 132.4, 133.9 (アリルC), 150.1 (アリルC-O); HRMS (CI, m/z): 458.412154, (M+H⁺, C₃₁H₅₄O₂ 458.412384で計算)。

【0098】

ピリジニウム・クロクロム酢酸塩 (32 mg, 0.1 mmol) を無水CH₂Cl₂ (0.5 mL) に溶かした溶液を6-(2-ヒドロキシエチル)クロマン中間物 (32 mg, 0.07 mmol) をCH₂Cl₂ (0.5 mL) に溶かした溶液で処理した。反応物を2時間攪拌した。この期間中は薄層クロマトグラフィーによって開始物質は見いだせなかった。ジエチル・エーテル (2 mL) を加えて、得られた溶液をセライトの薄いパッドを通じてろ過した。ろ過物を濃縮したところ、黄色いオイル (20 mg) が得られた。このオイルをt-BuOH (0.5 mL) に溶解して、ホスフェート緩衝液 (0.5 mL、1 N、pH=4.0)、2-メチル-2-ブテン (0.1 mL) 及びNaClO₂ (5.4 mg, 0.05 mmol) で処理した。40分間攪拌した後、反応混合物をCHCl₃ (6 x 10 mLで抽出して、結合した有機層をNa₂SO₄で乾燥した。このCHCl₃溶液を黄色のオイルに濃縮して、酢酸エチル (30%, v/v) 及び酢酸 (1%) をヘキサンに溶かした溶液を用いて予備的薄層クロマトグラフィー溶出で精製した。この操作で22が無色のオイルとして得られた (20 mg, 63%)。 ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0-1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.17, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.66 (t, J=6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.71 (s, 2H, CH₂COOH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 12.0, 15.3, 16.2 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 28.9, 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 72.6 (2-C), 117.1, 122.2, 124.9, 132.4, 132.7 (アリルC), 150.2 (アリルC-O), 179.2 (COOH); HRMS (CI, m/z): 472.391583, (M+H⁺, C₃₁H₅₂O₃ 472.391644で計算)。

【0099】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(ヘプチル)クロマン-6-イロキシ)酢酸 (23)



【0100】

臭化ヘキシルトリフェニルホスホニウム (0.880 g, 2.05 mmol) を 11 / 2 ml の無水 DME に溶かしたものを 0.86 ml (2.06 mmol) の 2.4 M n-ブチルリチウムをヘキサンに溶かした溶液を加えながら室温で攪拌した。得られた赤色の溶液を室温で 2 時間攪拌してから、[(+) S-6-ベンジロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルバルデヒド (306 mg, 0.9444 mmol) を 3 ml の無水 DME に加えた溶液を加えて、攪拌を 65 ~ 75 °C の温度下で 3 時間続けた。冷却後、反応混合物を冷たい希釈硫酸に注いで、通常の方法でエーテル処理を行った。エーテルを真空中で濃縮したところ、オイル状の物質が得られた。生成物をカラム・クロマトグラフィーで単離して、クロロホルムで溶出したところ、46 % の生成物を得た。シス及びトランス・アルケンの混合物を 30 ml の酢酸エチルに溶解して、50 mg の 5 % パラジウムと炭素の複合体を加えて、その混合物を 40 psi の H₂ の存在下で 10 時間振動を加えてから、セライトを通じてろ過し、酢酸エチルでよく洗浄した。ろ過物を濃縮して、EtOAc をヘキサンに溶かした溶液 (1 : 9) を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィーを行って精製したところ、(2R)-2, 5, 7, 8-(テトラメチル-2-(ヘプチル)-6-クロマノール) が得られた (収率 : 60 %)。¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm) : 0.89 (s, 3H), 1.3-1.5 (m, 15H), 1.89 (m, 2H), 2.2 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 及び 2.48 (t, J = 6.5 Hz, 2H); MS (CI, m/z) : 305.35 M+H⁺, C₂₀H₃₂O₂ 304.4746 で計算。

【0101】

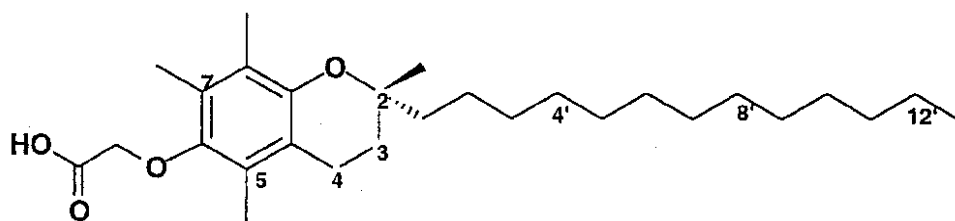
2, 5, 7, 8-テトラメチル-2-(ヘプチル)-6-クロマノール (0.353 g, 1.16 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶かした溶液をブromo酢酸メチル (3.4 g, 8.3 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (1.2 g, 30 mmol) で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で 24 時間激しく攪拌した。5 N HCl で反応を酸性化して、ジエチル・エーテル (3 x 30 mL) で抽出した。結合したエーテル層を H₂O (3 x 30 mL) と食塩水 (1 x 30 mL) で洗浄して、その後 Na₂SO₄ で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを 19 % (v/v) EtOAc と酢酸 (2 %) をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。得られた液体をジエチル・エーテル (30 mL) に溶かして、H₂O (3 x 20 mL) 及び食塩水 (1 x 20 mL) で洗浄してから、Na₂SO₄ で乾燥した。得られた溶液を濃縮して、真空中で 48 時間乾燥した。この操作によって化合物 23 が 36 % の収率で得られた。¹H-NMR (CDCl₃ / TMS, ppm) : 0.88 (s, 3H), 1.2-1.5 (m, 15H), 1.88 (m, 2H), 2.1 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.2 (s, 3H), 2.55 (t, J = 6.5 Hz, 2H) 及び 4.78 (s, 2H); HRMS (CI, m/z) : 363.2535 (M+H⁺, C₂₂H₃₅O₄ 363.2541 で計算)。

【0102】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(トリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸 (24)

化合物 24 及び 25 を適切な臭化ホスホニウムを用いて化合物 23 の合成の場合と同じ方 50

法で、適切な臭化ホスホニウムを用いて合成した。

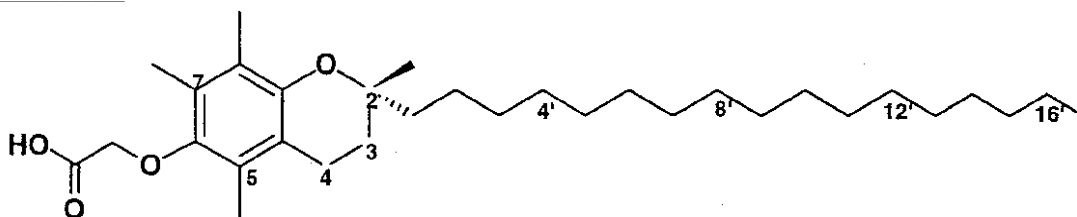


【0103】

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm): 0.83 (s, 3H), 1.25–1.57 (m, 27H), 1.88 (m, 2H), 2.1 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.55 (t, $J=6.6$ Hz, 2H) 及び 4.48 (s, 2H); MS (CI, m/z): 447.14 ($M+H^+$, $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$ 446.6732 で計算)。

【0104】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(ヘプタデシル)クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (25)



20

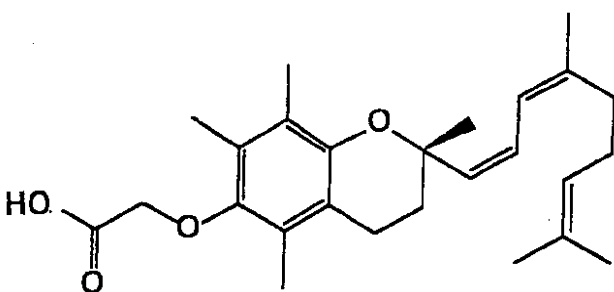
【0105】

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm): 0.83 (s, 3H), 1.15–1.67 (m, 35H), 1.88 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.55 (t, $J=6.4$ Hz, 2H) 及び 4.78 (s, 2H); MS (CI, m/z): 503.45 ($M+H^+$, $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$ 502.781 で計算)。

【0106】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(4, 8-ジメチル-1, 3, 7 E:Z ノノトリエン) クロマン-6-イロキシ) 酢酸 (26)

30



40

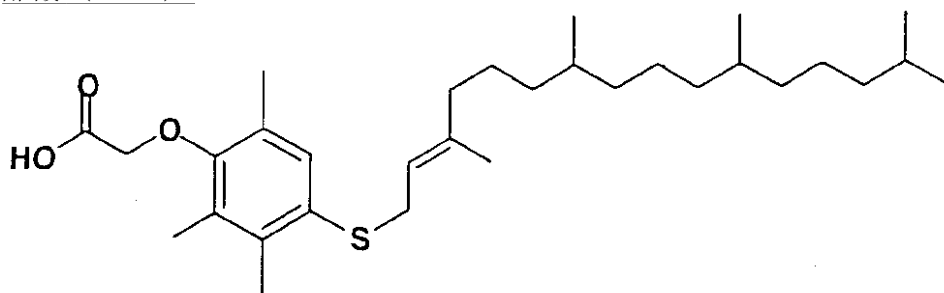
【0107】

プソイドイノールの代わりにネロールを用いた以外は化合物 18 の合成と同じ方法で化合物 26 を合成した。 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 / \text{TMS}$, ppm): 1.24 (s, 3H, 2aCH₃), 1.63 (m, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.74 (s, 6H), 1.92 (m, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.29 (s, 6H), 2.43 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, 4CH₂), 4.68 (s, 2H, OCH₃), 5.64 (m, 2H) 及び 5.27 (m, 1H); MS (CI, m/z): 413.24 ($M+H^+$, $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_4$ 412.0115 で計算)。

【0108】

50

E Z, R S, R S, R S - (フィチルトリエチルベンゼンチオール-6-イロキシ)
酢酸 (27)



10

【0109】

2, 3, 6-トリメチルフェノール (1.6 g, 11.8 mmol) を窒素でバブリングすることで酸素を取り除いた無水メタノール 50 mL 内に溶解した。アンモニウム・チオシアネート (2.2 g, 28.9 mmol) をこの溶液に加えて、その混合溶液を 0℃ まで冷却して、塩素ガスでバブリングした。最初の無色の均一な溶液がピンク色になり、白色物の形成と共に緑色になった。この溶液を 0℃ で 1 時間攪拌して、その後、さらに 4 時間 20℃ で攪拌した。溶解された塩素を窒素で泡立てて除去し、沈殿物をろ過で取り除いた。減圧状態でろ過物を蒸発させて、次いで高度の真空下 (0.1 torr) で乾燥させたところ、2.20 g (97%) の 2, 3, 5-トリメチル-4-ヒドロキシフェニルチオシアネートが合成の次のステップでの使用に十分に耐える程の純度で得られた。分析サンプルをヘキサンから再結晶化させたところ、融点 100.3℃ の結晶が得られた。¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.2 (s, 1H), 5.0 (s, 1H), 2.4 (s, 3H), 2.2 (s, 6H)。

20

【0110】

2, 3, 5-トリメチル-4-ヒドロキシフェニルチオシアネート (2 g, 10.3 mmol) を 25 mL の無水テトラヒドロフランを含む 100 mL の無水エーテルに溶解した。この溶液を 1 時間かけて滴下により LiAlH₄ (0.9 g, 24 mmol) を含む無水エーテル 100 mL に室温で加えた。さらに 20℃ で 4 時間後、未反応の LiAlH₄ を不均一混合物を 0℃ まで冷却して、湿ったエーテル (50 mL)、水 (50 mL)、及び 1N 塩酸 (50 mL) を加えて破壊した。さらに、50 mL の水を加えて、有機層を分離し、水 (2 x 50 mL)、NaHCO₃ 溶液 (2 x 50 mL)、水 (2 x 50 mL)、及び飽和 NaCl (50 mL) で洗浄した。有機層を無水 MgSO₄ で乾燥して、ろ過し、減圧状態で溶媒を取り除いた。5% 酢酸エチルをヘキサンに混ぜた溶液を用いてシリカ・ゲル・カラム・クロマトグラフィーを行ったところ、1.8 g (90%) の 2, 3, 5-トリメチル-4-ヒドロキシベンゼンチオールが融点 86℃ の白い粉末として得られた (Lit.¹ mp 86℃)。

30

【0111】

2, 3, 5-トリメチル-4-ヒドロキシベンゼンチオール (3 g, 17.83 mmol)、イソフィトール (4.8 g, 16.19 mmol)、無水塩化亜鉛 (1.2 g, 8.8 mmol) 及び 0.2 mL の氷酢酸を 30 mL の脱水エーテルに溶かしたものを 1 時間還流させた。そして溶液を 50℃ の温度で真空内で取り除いて、得られた赤色のオイルを 50 mL の石油エーテルと 20 mL の 70% 水性メタノールの混合物内に溶解した。エーテル層を (Na₂SO₄ で) 乾燥して、真空中で蒸発させたところ、赤色のオイルが得られ、これをヘキサン：エーテル混合物 (9:1) を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィーを行って精製したところ、3 g (38%) の E Z, R S, R S, R S-フィチルトリメチルヒドロキシベンゼンチオールが黄色のオイルとして得られた。¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.11 (s, 1H, Ar-H), 5.23 (t, 1H, ビニリック-H), 4.62 (s, 1H, OH), 3.34 (d, 2H, Ar-S-CH₂-), 2.41 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.19 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.18 (s, 3H, Ar-CH₃), 0.83-1.9

40

50

2 (m, 39H, フィチル鎖)。

【0112】

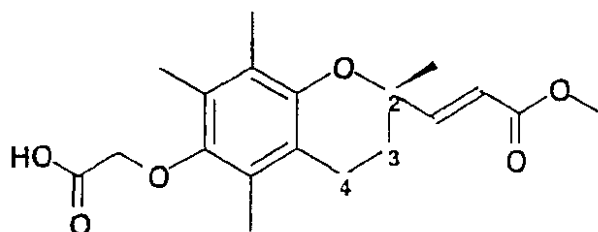
フィチルトリメチルヒドロキシベンゼンチオール (3 g, 6.7 mmol) を N, N-ジメチルホルムアミド (80 mL) に溶かした溶液をプロモ酢酸メチル (7.4 g, 48.3 mmol) と過剰な量の粉末化 NaOH (7 g, 175 mmol) で処理した。得られたピンク色のオイルを室温で 24 時間攪拌した。この反応混合物は 5 N 塩酸で酸性化して、エーテル (3 x 150 mL) で抽出した。結合したエーテル層を水 (3 x 150 mL) 及び食塩水 (1 x 150 mL) で洗浄して、その後乾燥した (Na₂SO₄)。このエーテル溶液を黄色のオイルに濃縮し、それを 20% EtOAc をヘキサンに溶かした溶液を用いてシリカ・ゲル・クロマトグラフィを行って精製したところ、3 g (88%) の E Z, R S, R S, R S- (フィチルトリメチルベンゼンチオール-6-イロキシ) 酢酸が黄色のオイルとして得られた。¹H-NMR (CDCl₃) δ 10.90 (s, 1H, COOH), 8.08 (s, 1H, Ar-H), 5.30 (t, 1H, ビニリッ-H), 4.35 (s, 2H, CH₂COOH), 3.42 (d, 2H, Ar-S-CH₂-), 2.34 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.25 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.22 (s, 3H, Ar-CH₃), 0.83-1.94 (m, 39H, フィチル鎖)。HRMS (CI, m/z): 504.362821 (M+H⁺, C₃₁H₅₃O₃S 504.363718 で計算。

10

【0113】

(R)-2-((2, 5, 7, 8-テトラメチル-2-(3-プロペン・メチル・エステル)クロマン-6-イロキシ)酢酸 (28)

20



【0114】

(カルボメトキシメチル)トリフェニル臭化ホスフィニウム (1.8 g, 4.32 mmol) を 12 mL の THF に溶かしたスラリーに 1.66 mL の n-BuLi (2.5 M をヘキサンに溶かしたもの) を滴下して加えた。得られた溶液を室温で 2 時間放置し、その後、(+)-S-6-[ジメチル(1, 1-ジメチルエチル)シリル]-2, 5, 7, 8-テトラメチル・クロマン-2-カルバルデヒド (1.31 g, 3.76 mmol) を 7 mL の THF に溶かした溶液をカニューラを用いて加えた。この溶液を室温で 44 時間攪拌し、次に、10 mL の 1 N 塩酸水溶液を加えた。その層を分離して、その後、水槽をエーテル (3 x 15 mL) で抽出した。結合した有機層を食塩水で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、ろ過した。ろ過物を濃縮した後、粗アルケンをジクロロメタンを用いたフラッシュ・クロマトグラフィで溶出で精製したところ、シス及びトランス・アルケンの混合物が 93% 収率で得られた。シス及びトランス・アルケン (3.76 mmol) のシリル・エーテル混合物を THF に加えて、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (0.041 mol) を加えた。23°C で 1.5 時間攪拌した後、この混合物を水に注いで、エーテル内に抽出した。このエーテル抽出物を乾燥、濃縮し、EtOAc をヘキサンに溶かした溶液 (3:7) を用いたシリカ・ゲル・クロマトグラフィによって精製し、2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(3-プロペンメチル・エステル)-6-クロマンのシス及びトランス両方の異性体を単離して、特徴づけを行った (収率: 68%)。¹H-NMR (CDCl₃): 1.65 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.12 (m, 2H, 3-CH₂), 2.39 (s, 9H, CH₃), 2.48 (m, 2H, 4-CH₂), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.11 (d, 1H, CH=), 及び 7.13 (d, 1H, CH=)。

30

40

50

【0115】

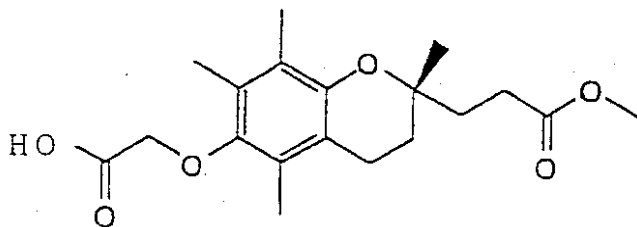
2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(3'プロペンメチルエステル)6-クロマン(0.353 g, 1.16 mmol)をN, N-ジメチルホルムアミド(20 mL)に溶かした溶液をプロモ酢酸メチル(3.4 g, 8.3 mmol)と過剰な量の粉末化NaOH(1.2 g, 30 mmol)で処理した。得られた黄色のスラリーを室温で24時間激しく攪拌した。5N HClで反応を酸性化して、ジエチルエーテル(3 x 30 mL)で抽出した。結合したエーテル層をH₂O(3 x 30 mL)及び食塩水(1 x 30 mL)で洗浄して、その後Na₂SO₄で乾燥した。このエーテル溶液を黄色のオイル状態まで濃縮して、それを119% (v/v) EtOAcと酢酸(2%)をヘキサンに溶かした溶液でシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製した。得られた液体をジエチル・エーテル(30 mL)に溶かして、H₂O(3 x 20 mL)及び食塩水(1 x 20 mL)で洗浄してから、Na₂SO₄で乾燥した。得られた溶液を濃縮して、真空中で48時間乾燥した。この操作によって化合物28が40%の収率で得られた。¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.68 (s, 3H, 2a, CH₃), 2.11 (m, 2H, 3CH₂), 2.36 (s, 9H, CH₃), 2.56 (m, 2H, 4CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.78 (s, 2H, OCH₂), 6.03 (d, 1H, CH=), 及び7.03 (d, 1H, CH=); MS (CI, m/z): 337.24 (M+H⁺, C₁₈H₂₄O₆ 336.3867で計算。

10

【0116】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-(2R-(プロピオネート)クロマン-6-イロキシ)酢酸(29)

20



【0117】

シス及びトランス・アルケン2, 5, 7, 8-テトラメチル-2R-(3プロペン・メチルエステル)-6-クロマンの混合物を30 mLの酢酸エチルに溶かして、50 mgの5%パラジウム炭素複合体を加え、その混合物を40 psiの水素内で24時間振動させてから、セライトを通じてろ過し、酢酸エチルでよく洗浄した。ろ過物を濃縮して、EtOAcをヘキサンに溶かした溶液(1:9)を用いたシリカ・ゲル・クロマトグラフィー溶出を行って精製したとこと、化合物29が得られた。¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.62 (s, 3H, 2a, CH₃), 2.0-2.3 (m, 6H, CH₂), 2.41 (s, 9H, CH₃), 2.53 (m, 2H, 4CH₂), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 及び4.88 (s, 2H, OCH₂); MS (CI, m/z), 339.34 M+H⁺, C₁₈H₂₆O₆ 338.4025で計算。

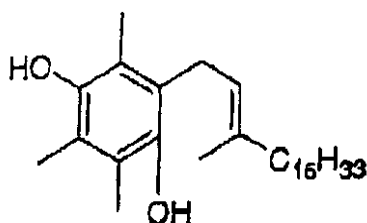
30

40

【0118】

実施例3

全ラセミ 1-アザ-α-トコフェロール類似物：フィチルトリメチルヒドロキノン(31)の合成

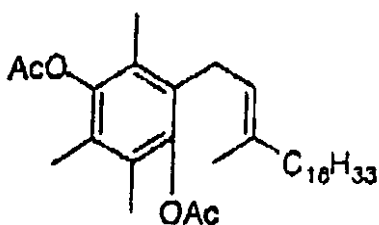


【0119】

トリメチルヒドロキノン (30, 7.5 g, 49.28 mmol)、イソフィトール (12 g, 40.47 mmol)、無水亜鉛塩化物 (3 g, 22.01 mmol) 及び 0.4 mL の氷酢酸を 60 mL の絶対エーテルに溶かしたものを 1 時間還流させた。この溶液を 50 °C で真空下で取り出して、得られたスラリーを 50 mL の石油エーテル及び 20 mL の 70 % 水性メタノールの混合物に溶かした。形成されたエマルジョンを 20 mL のエーテルを加えて破壊した。このエーテル層を乾燥して (Na_2SO_4)、そして真空中で蒸発させたところ、赤色の固体ペーストが得られ、これを 70 mL の石油エーテルを加えて、激しく破碎した。−78 °C に冷却した後、懸濁液を遠心分離にかけ、上澄み液の石油エーテルをデカントした。冷たい石油エーテル (10 mL) をその結晶性の物質に加えて、この操作を 2 度繰り返したところ、10 グラム (47 %) のねばねばした白い液体が得られ、これをさらに精製することなく次のステップで用いた。

【0120】

フィチルトリメチルヒドロキノン・ジアセテート (32)

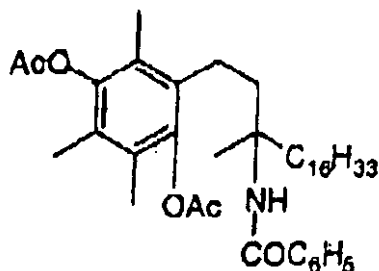


【0121】

粗のフィチルトリメチルヒドロキノン (31, 9 g, 20.1 mmol) を乾燥したピリジン (90 g) 及び酢酸無水物 (90 g) 内に溶解した。室温で 10 時間保存したあと、その混合物を氷 (200 mL) 上に注いで、エーテル (2 x 100 mL) で抽出した。このエーテル溶液を 3 N 硫酸 (2 x 100 mL)、10 % 重炭酸ナトリウム (2 x 100 mL)、そして再度水 (2 x 100 mL) で洗浄して、乾燥し (Na_2SO_4)、蒸発させたところ、10.2 g (95 %) のジアセテート (32) が黄色いオイルとして得られた。このオイルをさらに精製せずに次のステップで用いた。

【0122】

トリメチル (3, 7, 11, 15-テトラメチル-3-ベンズアミドヘキサデシル) ヒドロキノン・ジアセテート (33)



【0123】

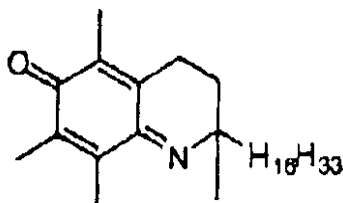
ベンソニトリル (10 g, 96.97 mmol)、濃縮硫酸 (10 g) と氷酢酸 (40 mL) の混合物に、0 °C で攪拌しながらジアセテート (32, 10 g, 19.43) を加えた。この溶液を室温で 10 時間保存してから、氷 (150 mL) 上に注いで

、エーテル（2 x 100 mL）で抽出した。エーテル抽出物を水（3 x 100 mL）及び飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄して中性にし、乾燥させ、真空中で蒸発させた。粗製品（21 g）をシリカ・ゲルでクロマトグラフィにかけ、石油エーテル：エーテル（9：1）で溶出させた。変化しなかったベンゾニトリルは最初に除去した。エーテルで溶出されたもので 11 g（88%）の石油エーテルから結晶化した生成物で、これから分析サンプル（33）を得た。m. p. 90–92 °C（Lit. 1, 94–95 °C）。

【0124】

2, 5, 7, 8-テトラメチル-2 (4, 8, 12-トリメチルトリデシル) 3, 4-ジ
 ハイドロキノリン-6 (2H)-ワン (37)

10



【0125】

ジアセテート（33, 13 g, 204. mmol）をメタノール 60 mL に溶かした溶液に、固体水酸化カリウム（11 g）を加えて、その混合物をアルゴン下で 45 分間還流させた。冷却後、溶液を氷水（100 mL）で希釈して、二酸化炭素の存在下でエーテル（3 x 100 mL）で抽出したところ、10 g（88%）の粗ハイドロキノ
 ン（34）が得られた。

20

【0126】

この生成物（34, 10 g, 18.1 mmol）を絶対エーテル（110 mL）に溶かした溶液をリチウム・アルミニウム水酸化物（20 g, 527 mmol）を絶対エーテル（110 mL）に溶かした懸濁液に 20 分間攪拌しながら滴下して加えた。この混合物を 14 時間還流させて、その後、二酸化炭素の存在下でメタノール（10 mL）、次いで 3 N 塩酸（30 mL）を滴下付加して加水分解した。エーテル（3 x 200 mL）で抽出した後、この粗固体ベンジルアミノ誘導体（35, 8.4 g, 86%）が得られた。

30

【0127】

この物質（35, 8.4 g, 15.6 mmol）を氷酢酸（120 mL）に溶かして、50 °C で水素化して、大気圧下で、2 g のパラジウムの存在下で木炭（5%）上で室温で 22 時間（あるいは水素吸着が終了するまで）放置した。冷却後、触媒をフィルタリングで取り除いて、溶液を水（50 mL）で希釈して、エーテル（3 x 80 mL）で抽出させ、乾燥させた（Na₂SO₄）。

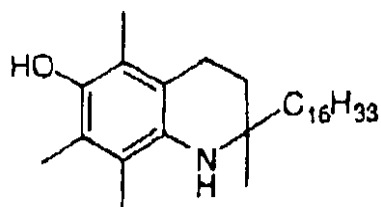
【0128】

この乾燥した化合物 36 の中性エーテル溶液に対して、新鮮な酸化銀（2.1 g, 8.93 mmol）を加え、その懸濁液を 14 時間攪拌した。アルゴン存在下でろ過して蒸発させた後、4 g の粗イミノキノン（37）が得られ、これをシリカ・ゲル上でクロマトグラフィにかけてヘキサン：エーテル（200：1）で溶出させたところ、2.4 g（63%）の純粋な黄色のオイルが得られた。HRMS（cl, m/z）： 428.389883（M+H⁺、C₂₉H₄₉NO 428.389241 で計算）。

40

【0129】

1-アザ-α-トコフェロール（38）

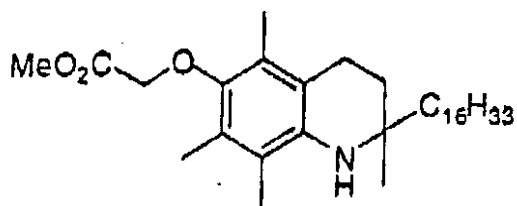
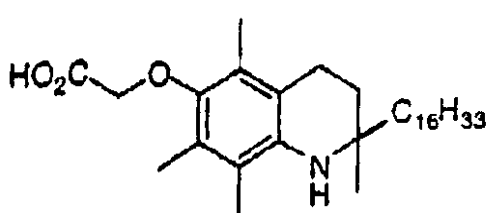


【0130】

10 mLのエーテルにイミノキノン(37, 1.34 g, 3.133 mmol)を溶かしたものを190 mgのリンドラー触媒の存在下で室温、大気圧下で水素化した。20時間後、触媒をアルゴン下でろ過で取り出して、ろ過物を真空中で蒸発させたところ、810 mg (60%)の粗赤色オイルが得られ、これをさらに精製せずに次のステップで用いた。

【0131】

1-アザ- α -トコフェロール-6-イロキシ酢酸(39)及び1-アザ- α -トコフェロール-6-イロキシメチル・アセテート(40)



【0132】

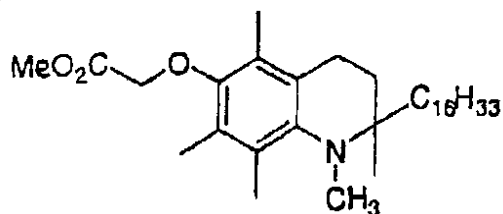
1-アザ- α -トコフェロール(38, 800 mg, 1.86 mmol)をDMF(30 mL)に溶かした溶液をメチル・ブROMOアセテート(2.1 g, 13.4 mmol)及び過剰な量の粉末化NaOH(1.9 g, 48.4 mmol)で処理した。得られた黄色の懸濁液を室温で24時間活発に攪拌した。この反応混合物を5N HClでpH6まで酸性化して、ジエチル・エーテル(3 x 30 mL)で抽出した。結合されたエーテル層を水(3 x 30 mL)、食塩水(1 x 40 mL)で洗浄して、乾燥した(Na₂SO₄)。エーテル溶液を黄色のオイルに濃縮して、CH₂Cl₂:MeOH:Ha(97:2:1)でシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行ったところ、300 mg (33%)のねばねばした黄色の固体(39)を得た。¹H-NMR(CDCl₃, ppm), 4.30(s, 2H, OCH₂), 3.30(s, 1H, NH), 2.59(t, 2H, Ar-CH₂), 2.18(s, 3H, Ar-CH₃), 2.12(s, 3H, Ar-CH₃), 2.00(s, 3H, Ar-CH₃), 1.80-0.84(m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃及びフィトル鎖)。¹³C-NMR(CDCl₃, ppm): 12.01, 12.77, 12.96, 19.60, 19.67, 19.72, 21.09, 22.60, 22.71, 24.42, 24.79, 26.56, 27.95, 32.11, 32.74, 37.26, 37.37, 37.42, 37.55, 37.65, 39.34, 41.36, 50.92, 69.50(脂肪族C), 117.69, 118.55, 125.99, 126.39, 138.07, 146.05(Ar-C), 173.18(COOH); (HRMS(CI, m/z): 488.411055(M+H⁺, C₃₁H₅₃NO₃ 488.410370で計算)。¹H-NMR(CDCl₃/TMS, ppm), 4.31(s, 2H, OCH₂), 3.85(s, 3H, CO₂CH₃), 3.32(s, 1H, NH), 2.61(t, 2H, Ar-CH₂), 2.23(s, 3H, Ar-CH₃), 2.17(s, 3H, Ar-CH₃), 2.01(s, 3H, Ar-CH₃), 1.81-0.86(m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃及びフィトル鎖)。¹³C-NMR(CDCl₃, ppm): 11.96, 12.67, 12.90, 19.57, 19.63, 19.69, 21.06, 21.95, 22.57, 22.68

, 24.38, 24.74, 26.49, 27.91, 32.25, 32.67, 32.70, 37.21, 37.33, 37.53, 39.31, 41.68, 50.43, 51.87, 69.97 (脂肪族C), 116.98, 117.72, 126.01, 126.36, 138.43, 146.18 (Ar-C), 169.83 (C=O) HRMS (CI, m/z): 502.425330 (M+H⁺, C₃₂H₅₅NO₃ 502.426020で計算)。

【0133】

1-アザ-N-メチル-α-トコフェロール-6-イロキシ-メチル-アセテート (41)

10



【0134】

文献2の手順に従って、粉末化KOH (500 mg, 7.77 mmol) をDMSO (30 mL) に溶かした混合物を0℃で5分間攪拌した。メチル・アセテート (40, 1.3 g, 23.32 mmol) を加えて、直ぐにCH₃I (3.3 g, 23.32 mmol) を加えた。攪拌を0.5時間続けてから (0℃)、混合物を水に注いだ。最終混合物の抽出物 (CH₂Cl₂, 3 x 40 mL) を組み合わせて、水 (40 mL)、食塩水 (40 mL) で洗浄してから、乾燥し (MgSO₄)、そして蒸発させた。得られた黄色のオイルを5% EtOAcを用いてシリカ・ゲル溶出を行い810 mg (60%) の淡黄色のオイルを得た。¹H-NMR (CDCl₃, ppm), 4.34 (s, 2H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, CO₂CH₃), 2.55 (t, 2H, Ar-CH₂), 2.49 (s, 3H, NCH₃), 2.24 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.20 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.13 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.82-0.82 (m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃ 及びフィチル鎖)。¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.72, 13.12, 14.27, 19.55, 19.68, 20.93, 22.57, 22.66, 22.88, 24.35, 24.74, 25.33, 25.37, 27.90, 32.59, 32.71, 37.23, 37.33, 37.51, 37.63, 38.49, 39.06, 39.29, 51.14, 69.57 (脂肪族C), 125.34, 126.36, 127.42, 130.32, 143.89, 150.33 (Ar-C), 169.73 (C=H)。化合物41はさらに精製せずに次のステップで用いた。

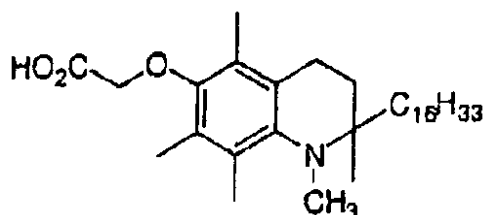
20

30

【0135】

1-アザ-N-メチル-α-トコフェロール-6-イロキシ酢酸 (42)

40



【0136】

エステル (41, 740 mg, 14.34 mmol) をエタノール (34 mL) に溶かした混合物に2N NaOH (9 mL, 10eq. 14.34 mmol) を滴下して加えた。その淡黄色溶液を室温で4時間攪拌した後に、その反応混合物を2N HClでpH6まで希釈して、次にEtOAc (3 x 100 mL) で抽出して、結合した有機層を水 (2 x 100 mL)、食塩水 (1 x 100 mL) で洗浄してから、蒸発

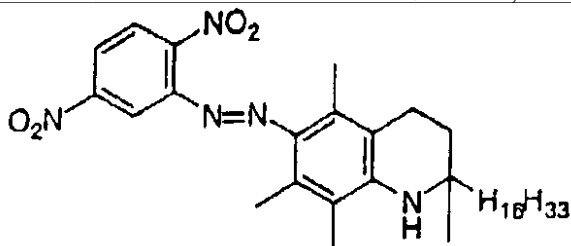
50

したところ、淡黄色のオイルを得た。このオイルを1%HOAc, 30%EtOAcをヘキサンに溶かしたものでシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出を行い、650 mg (90%)の生成物(42)が無色のオイルとして得られた。¹H-NMR (CDCl₃, ppm), 10.43 (s, 1H, CO₂H), 4.37 (s, 1H, OCH₂), 2.51 (t, 2H, Ar-CH₂), 2.43 (s, 3H, NCH₃), 2.22 (Ar-CH₃), 2.12 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.81-0.80 (m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃及びフィチル鎖)。¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.77, 13.18, 14.28, 19.68, 19.73, 20.80, 20.96, 22.62, 22.72, 23.00, 24.00, 24.41, 24.80, 25.37, 27.80, 32.77, 37.28, 37.30, 37.74, 38.00, 39.00, 39.35, 54.69, 69.17 (脂肪族C), 125.11, 126.55, 127.20, 130.63, 142.00, 149.60 (Ar-C), 173.62 (COOH)。HRMS (CI, m/z); 502.426327 (M+H⁺, C₃₂H₅₅NO₃ 502.406020で計算)。

10

【0137】

6-(2,4-ジニトロフェニルアゾ(2,5,7,8-テトラメチル-2-(4,8,12-トリメチルトリデシル)-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン(43))



20

【0138】

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(1.95 g, 9.82 mmol)を34 mLの加熱した絶対エタノールに加えて、3.4 mLの濃縮硫酸を注意深く加えた。この加熱された赤色の溶液を室温に冷却してから、12 mLの絶対エタノールにイミノキノン(37, 1.00 g, 2.34 mmol)を溶かしたものを攪拌しながら加えた。この混合物を室温下で70時間放置し、その後、120 mLの水で希釈して、エーテル(3 x 100 mL)で希釈した。結合したエーテル抽出物を水(6 x 100 mL)で洗浄して中性化して、真空中で蒸発させたところ2.9 gの部分的に結晶化した紫色の物質が得られた。この生成物を5%エーテルを石油エーテルに溶かしたものでシリカ・ゲル・クロマトグラフィ溶出したところ、1.35 g (95%)の紫色の結晶、融点72-73 °C (Lit 1, 73-75)が得られた。HRMS (CI, m/z): 608.417199 (M+H⁺, C₃₅H₅₃N₅O₄ 608.417581で計算)。

30

【0139】

実施例 4

40

細胞培養の条件

テスト用のすべての細胞株は確立されている標準的な条件を用いて、胎児牛血清を補給する標準培地で、5%のCO₂、37°Cで培養した。可塑性接着細胞をトリプシンで解離させて、洗浄し、計数され、直接実験に使用した。すべての細胞株を定常手順で実験し、マイコプラズマに汚染されていないことを検証した。

【0140】

実施例 5

新規なトコフェロール及びトコトリエノール化合物の溶解性及び希釈

全化合物を光感受性物質(光劣化性)と想定して取り扱った。最初にすべての化合物を無水エタノールに溶解し、その後、適切な媒体を用いて最終濃度が0.5%エタノールとな

50

るように希釈した。

【0141】

実施例 6

アポトーシスを誘発するため有効な濃度 (EC₅₀) の決定

親の構造的に改変されていない形状のトコフェロール類は一連の腫瘍細胞に対して有効なアポトーシス性質を示さないが、種々の組成物結合、あるいはサイズの拡大のいずれかによって構造的に修飾された29種類のRRR- α -トコフェロール化合物のうち15種類は、腫瘍細胞においてアポトーシスを起こさせることに非常に効果的で、同時に正常な細胞に対してはアポトーシス誘発性を示さなかった。化合物1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 25, 26, 39及び42は、(i)乳房(エストロゲン応答Michigan Cancer Foundation ヒト乳癌細胞株NO. 7、MCF-McGuire; 非エストロゲン応答 M. D. Anderson 転移性ヒト乳癌細胞株、MDA-MB-435; 及びエストロゲン非応答性M. D. Anderson 転移性ヒト乳癌細胞株、MDA-MB-231); (ii)前立腺(アンドロゲン応答ヒト前立腺癌細胞株、LnCaO及びアンドロゲン非応答ヒト前立腺癌細胞株、PC-3及びDU-145細胞株); (iii)前骨髄白血病細胞(ヒト前骨髄白血病細胞株HL-60), リンパ球系細胞株June-180及びHL-60); (iv)子宮けい部(ヒト子宮けい部癌細胞株、ME-180); (v)卵巣(ヒト卵巣癌細胞株、C-170細胞); (vi)子宮内膜(ヒト子宮内膜癌細胞株、RL-95-2細胞); (vii)結腸細胞株、DLD-1; 及び(viii)肺細胞株A-549を含む、多様な細胞系統からのヒトの癌細胞に特異的な有効な増殖阻害特性(アポトーシスの誘発)を示す。正常な一次乳房細胞(通常的一次初期成長段階ヒト乳腺上皮細胞、HME)と不死化した非腫瘍形成性乳腺細胞(Michigan Cancer Foundation; 不死化されているが非腫瘍形成性のヒト乳腺番号10A細胞, MCF-10A)は、上記薬学的にデザインされた形状のトコフェロールと培養された場合にアポトーシスを起こさない。

【0142】

癌細胞の増殖を制御する新規な薬品の治療上の有効な投与量は、DNA合成阻止、細胞サイクルの停止及び／または細胞死を介して50%癌細胞増殖を停止する増殖抑止濃度(IC₅₀)または有効濃度(EC₅₀)とも基準として決められ、本発明による14個の新しい化合物に関してテストされた一連の癌細胞のアポトーシスEC₅₀を表1及び表2に示す。

【0143】

【表1】

新規トコフェノール化合物によって誘導されるアポトーシス(ec50, 範囲 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

細胞型	VES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
乳癌																
HMEC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NT
MCF-10A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	NT
MDA-MB-435	5-10	5-10	10-20	5-10	N	N	N	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	20-30
MDA-MB-231	5-10	5-10	10-20	5-10	N	N	N	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	20-30
MCF-7	10-20	5-10	20-30	20-30	N	N	N	10-20	10-20	10-20	N	N	5-10	N	N	20-30
T47D	N	N	N	N	N	N	N	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
子宮がん																
ME-180	10-20	1-5	5-10	10-20	N	N	N	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	N
卵巣																
C-170	N	10-20	10-20	10-20	N	N	N	10-20	10-20	N	N	N	10-20	N	N	N
子宮内膜																
RL-95-2	10-20	10-20	10-20	10-20	N	N	N	5-10	1-5	5-10	N	N	5-10	N	N	N
前立腺																
PREC	N	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
LnCaP	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	N	2.5-5	5-10	5-10	N	N	>20-30	NT	N	NT
PC-3	10-20	5-10	5-10	5-10	N	N	N	5-10	5-10	5-10	NT	N	10-20	N	N	NT
DU-145	10-20	5-10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
結腸																
HT-29	5-10	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DLD-1	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
肺																
A-549	20-30	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
リンパ球																
ミエローム	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ラジ	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ラモス	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ジュルカット	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HL-60	10-20	5-10	10-20	10-20	N	N	N	5-10	10-20	10-20	N	N	20-30	N	N	NT

EC₅₀ = 50%のアポトーシスを誘導するトコフェノール化合物1~29の $\mu\text{g}/\text{ml}$; N=トコフェノール化合物1~29の1~60EC₅₀, $\mu\text{g}/\text{ml}$ で2日間テストしたときにアポトーシスは起きない。
 NT=未検出, *=毒性を示す化合物。

10

20

30

40

【0 1 4 4】

【表 2】

新規トコフェノール化合物によって誘導されるアポトーシス (EC50: 処理 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

細胞型	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	39	42	43
乳癌																	
HMEC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MCF-10A	NT	N	NT	N	N	N	NT	N	NT	N	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MDA-MB-435	N	NT	N	10-20	10-20	N	NT	N	N	N	20-40	NT	NT	NT	10-20	10-20	PPT.
MDA-MB-231	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MCF-7	N	10-20	N	10-20	5-10	N	15-20	N	N	N	N	10-20	NT	NT	NT	NT	NT
T47D	NT	10-20	NT	N	5-10	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
子宮がん																	
ME-180	NT	20-30	N	1-5	1-5	1-5	NT	NT	NT	N	*	NT	NT	NT	NT	NT	NT
卵巣																	
C-170	NT	20-30	N	1-5	*	N	NT	NT	NT	N	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
子宮がん																	
RL-95-2	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	N	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
前立腺																	
PREC	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
LnCap	NT	10-20	NT	5-10	5-10	N	NT	NT	N	N	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT
PC-3	NT	NT	NT	N	5-10	N	NT	N	N	N	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DU-145	NT	NT	NT	5-10	5-10	N	NT	N	N	N	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
結腸																	
HT-29	NT	N	N	NT	NT	NT	NT	N	NT	N	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DLD-1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	N	N	20-40	NT	NT	NT	NT	NT	NT
肺																	
A-549	NT	N	N	20-30	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
リンパ球																	
ミエローム	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ラジ	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ラモス	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ジュルカット	NT	10-20	N	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HL-60	NT	10-20	N	10-20	10	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT

EC₅₀ = 50%のアポトーシスを誘発するトコフェノール化合物1~29の $\mu\text{g}/\text{mL}$; N=トコフェノール化合物1~29の1~60 EC₅₀ $\mu\text{g}/\text{mL}$ で2日間テストしたときにアポトーシスは起らない。
NT=未検査。* = 毒性を示す化合物。

10

20

30

40

50

【0145】

実施例 7

アポトーシスのバイオアッセイ

細胞は12ウェルプレート内に 1.5×10^5 細胞/ウェルで培養した。細胞は一昼夜で接着可能にし、その後、新しいテスト化合物を0.01, 0.1, 1, 5, 10及び20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で1, 2, 3日間培養した。処理細胞 (浮遊体+トリプシン放出接着細胞) をペレット状にし、洗浄して、100%メタノール中に2 mg/mL のDAPI (4', 6-ジアミジン-2-フェニールインドール・ジハイドロクロライド) を溶かした溶

液で 37℃で 15 分間染色してから、さらに／または TUNEL で染色し、その後 Zeiss ICM 405 顕微鏡を用いて観察した。核が明らかに縮合または断片化したクロマチンを含む細胞はアポトーシスと判断された。データはアポトーシスを受けた細胞の割合として示されている。

【0146】

実施例 8

DNA 合成停止のバイオアッセイ

DNA 合成を検査するために、すべての細胞を 2.5×10^5 /mL の量で使用した。それらの細胞は、0.01, 0.1, 1, 5, 10 及び 20 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のそれぞれの化合物 1-29 (表 1 及び表 2) で処理して、各処理グループは 200 μl の量で 96 ウェル培養プレート (Corning, Corning NY) 内で 4 つ 1 組にして置いた。実験を二重で行い、一方は成長可能性テストに使用し、他方は DNA 合成を観察するための ^3H -TdR 摂取に関する実験用に用いた。プレートを 48 時間、37℃、5% CO_2 内で培養した。インキュベーションが完了する 8 時間前に、二重のうちの一方のプレートに ^3H -TdR を加えて、続けて 8 時間培養した。次に細胞を採取し (トリプシン化するには、接着細胞を収集する必要がある)、放射性同位体の取り込みは分当りのカウント数 (cpm) で判定した。インキュベーションの完了時の成長可能性に関する調査では、細胞をウェルから取り出し成長可能性をオリフトファン・ブルー排除法でチェックした。各処理グループの未処理細胞及び媒体処理細胞との比較で生存率と DNA 合成率を計算した。

10

20

【0147】

実施例 9

細胞サイクル停止に関するバイオアッセイ

上記細胞を新しいテスト試薬で 2-3 日間培養し、95%のエタノールで固定し、ヨウ化プロピジウムで染色した。DNA 含有量はアルゴンレーザを 488 nm に設定した Coulter Epics Elite Flow Cytometer を用いて判定した。同時に細胞サイズを計測し、データを Coulter Multicycle program を用いて各細胞サイクルにおける細胞の割合に関するデータを解析した。

【0148】

実施例 10

細胞分化に対するバイオアッセイ

新しい化合物が細胞分化を誘発するかどうか判定するために、細胞をカバー・スリップ上で培養し、95%エタノールで固定し、乳脂質を検出するために脂質に特異性を示す染色物質で染色した。さらに、実験室で作成したポリクロナール抗体を用いてそれらの細胞を免疫組織学的及びウェスタン解析によってタンパク質カゼインの存在を調べた。

30

【0149】

実施例 11

DNA 合成停止効果

細胞を 48 時間培養し、さらにトリチウム化チミジンとともに 8 時間培養し、収集し、計数した。データは分当りのカウント数として表されている。DNA 合成停止の検証はテスト化合物で処理された細胞が摂取するトリチウム化チミジンの低下によって判定する。さらに、DNA 合成停止の検証はヨウ化プロピジウムによる染色、及び標準的な細胞サイクル解析で判定する。

40

【0150】

実施例 12

アポトーシス誘発のメカニズム

これらの化合物によるアポトーシス誘発のメカニズムには 3 通りの明らかに違う信号経路；つまり、潜在的な形質転換成長因子- β (TGF- β) の活性化、Fas/Fas リガンドの信号経路の活性化、ストレス・キナーゼ (c-Jun N 末端キナーゼ) 経路が関していると考えられる。

50

【0151】

TGF- β は強力な増殖阻害分子であり、DNA合成停止の抑止及びアポトーシスの誘発によって細胞の増殖を阻害することが知られている。TGF- β はアポトーシス経路の誘発にしか関与しておらず、つまり、TGF- β がDNA合成停止に影響を及ぼしていることは現在のところ確証はない。しかしながら、この可能性が完全に排除されたわけではない。TGF- β は細胞によって潜在的に不活性形状でつくられ、分泌される。腫瘍増殖抑制因子として有効であるためには、潜在的なTGF- β が、潜在的なタンパク質を切断し、活性なTGF- β を放出するプロテアーゼをプロセッシング及び活性化するため適切な構造を形成する細胞表面タンパク質の誘発により活性化される必要がある。

【0152】

本発明による化合物がカテプシンDファミリー・プロテアーゼなどのプロテアーゼを活性化し、不活性なTGF- β に結合しプロテアーゼを介して活性化を可能にするマンノース-6-ホスフェート・レセプターをアップレギュレーションすることが示されている。下流のキナーゼを活性にするための細胞膜TGFレセプターI及びIIを介して活性TGF信号は、転写因子c-Jun, ATF-2及びEIK-1をリン酸塩化し、活性化するストレス・キナーゼまたはc-Jun N末端キナーゼ(JNK)と呼ばれている。転写因子c-Junの活性作用が延長されると、腫瘍細胞がアポトーシスを起こす。これらの転写因子は複数の転写因子パートナーと共にホモダイマーまたはヘテロダイマーとして作用してプロアポトーシス遺伝子を活性化すると同時に／またはDNA断片に誘導するアンチアポトーシス遺伝子をダウンレギュレーションする。本発明による化合物は正常な非腫瘍細胞におけるTGFの信号に抗増殖性的結果はもたらさない。

【0153】

Fas/Fasリガンド・アポトーシス信号経路と呼ばれる第2のアポトーシス誘発メカニズムは、本発明による新しい化合物によって活性化される。活性化されたFas/Fas信号はアポトーシスによる細胞死に迅速に誘導することができる。従って、Fas/Fasリガンドによる細胞死を腫瘍細胞がのがれるためには、アポトーシス経路を不活性化することが最も重要である。腫瘍細胞によるFas/Fasリガンド信号経路不活性化メカニズムは多様であるが、多くの腫瘍細胞はそれらの細胞膜上でのFasレセプター及びFasリガンドの発現をダウンレギュレーションする。

【0154】

最も重要なR, R, R-2-(2, 5, 7, 8-テトラメチル-2-(4, 8, 12トリメチルトリデシル)クロマン-6-イロキシ)酢酸(1)はFas/Fasリガンド抵抗性腫瘍細胞を誘発してFas/Fasリガンド感受性にする 것이示されている。化合物1はLNCaP前立腺細胞膜上におけるFasリガンドの発現を促進する能力も有している。研究では、Fas信号抵抗性ヒト乳癌細胞はFasレセプターをそれぞれの細胞質に保持しているが、化合物1を用いて培養すると、そのFasレセプターが細胞質から膜の方に移って行き、それによって細胞はFas信号感受性に戻してしまうことが示されている。さらに、この化合物は、同時に処理する場合、個別に処理した場合と比較してヒト乳癌細胞と先立腺癌細胞の両方で大量の細胞の死が発生するという点で抗-Fas誘発アポトーシスと相乗作用がある。Fas信号抵抗性腫瘍細胞をFas信号感受性腫瘍細胞に転換し、相乗的致死効果を示すことができる化合物1の能力は、宿主免疫監視システムと薬理的緩衝の両方で腫瘍細胞を破壊するための極めて重要なメカニズムである。本発明のよる化合物は正常な非腫瘍細胞のFas信号経路は活性化しない。

【0155】

これらの化合物は、おそらくはTGF- β 及びFas/Fasリガンド信号によって、JNKキナーゼ信号経路を活性化する。JNKの活性期間が長くなるとc-Jun及びATF-2転写因子の活性期間が長くなり、そのことが、アポトーシス促進遺伝子及び抗アポトーシス遺伝子の発現あるいは抑制の役割をそれぞれ果たすと考えられる。

【0156】

実施例13

10

20

30

40

50

DNA合成停止、細胞サイクル停止及び細胞分化誘発メカニズム

DNA合成停止、細胞サイクル停止、及び細胞分化誘発による成長阻害のメカニズムはこれまで、アポトーシスによる成長阻害メカニズムほどには十分に特徴づけられていなかった。これまでの研究で、本発明の化合物は、処理後24時間以内に腫瘍細胞のほぼ95%でDNA合成停止を誘発し、細胞サイクルに大きな影響を及ぼすことが示された。ここに述べられている化合物と共に培養された腫瘍細胞はG1細胞サイクル期で成長が阻害され、形態学的な変化を受け、乳脂質を発現し、細胞サイクルを阻止された細胞が分化を受けなかったことを示した。G1サイクル段階から細胞サイクルのS段階に細胞の入ることのインヒビターであることが分かっている遺伝子P21、及びP21遺伝子のタンパク質並びにmRNAはMDA-MB-435ヒト乳癌細胞を化合物1で処理することによってアップレギュレーションされる。

10

【0157】

実施例14

ヒト癌細胞に対するin vivoポテンシャル

本発明は治療剤として使用のポテンシャルも有している。ヌードマウスなど免疫が不十分な動物に異所性か正所性かのいずれかで移植されたヒト腫瘍細胞の腫瘍成長及び転移に関するin vivo研究、あるいは良く認識される動物モデルを用いたin vivo研究が行われている。免疫が不十分なマウスに移植したヒト腫瘍細胞の成長を阻害することは臨床テストのための予備臨床データを提供してくれる。in vivo研究は2つのヒト腫瘍細胞モデル、つまり転移性非エストロゲン応答性MDA-MB-435乳癌モデル及びアンドロゲン非応答性PPC-3前立腺癌モデルがあげられる。

20

【0158】

MDA-MB-435乳癌モデル

マーカータンパク質（緑色蛍光タンパク質）で安定にトランスフェクトされた病原体のないMDA-MB-435ヒト乳癌細胞は、免疫が不十分なヌードマウスあるいはSCIDマウスで固形腫瘍として成長する。その腫瘍を取り出して、断面が1mmサイズで乳房脂肪床に正所的に移植されるか、あるいは、雌のヌードマウスの後側腹部に異所的に移植する。腫瘍成長、転移及び動物の死が判定される。腫瘍成長は腫瘍サイズをカリパスで測定して評価する。致死させた時点で腫瘍を取り出して、サイズを計測し、組織化学的な実験に使用される。脾臓、リンパ節、肺、及び骨髄などの器管は、マーカーとして緑色蛍光タンパク質を発現するために組織の断面を組織化学的に染色することによって、転移性MDA-MB-435細胞が存在しているかどうか調べられる。

30

【0159】

PC-3前立腺癌モデル

マーカータンパク質（緑色蛍光タンパク質）で安定にトランスフェクトされた病原菌のないPC-3前立腺癌細胞を、ヌードマウス内で固形腫瘍として成長させる。その腫瘍を取り出して、1mm部のサイズで雌のヌードマウスの後側腹部に異所的に移植する。腫瘍の増殖、転移性、及び動物の死が判定される。致死させた時点で腫瘍を取り出して、サイズを計測し、組織化学的な実験に使用する。脾臓、リンパ節、肺、及び骨髄などの器官は、マーカーの緑色蛍光タンパク質を発現するために、組織を組織化学的に染色することによって、転移性PC-3細胞が存在しているかどうかを調べる。

40

【0160】

皮膚癌の動物モデル

皮膚癌をSENCAR及びSKH-1無毛マウス内で紫外線放射及び化学的処理(DMBA)によって誘発する。さらに、皮膚癌を自然に発生する皮膚基底細胞においてオンコジーンHer2/neuを特異的に発現するマウスを用いる。ここに開示されている化合物は皮膚癌が発生の前と後に毎日皮膚に局所的に塗布され、皮膚乳頭腫の発症が査定される。コントロールのマウスはその皮膚に局所的に媒体を塗布することを除けば、上と同様処理される。前悪性腫瘍の進行が観察される前に上記化合物が供給される場合、乳頭腫の治療におけるこれら化合物の効力と悪性腫瘍への転化に対して及ぼすそれらの能力を観

50

察する。

【0161】

実施例15

新しい化合物の補充

i n v i v oでの実験を開始する前に、悪影響を及ぼすことなく安全に投与することができる化合物のレベルを確認するために、腫瘍細胞致死効果を示す本発明の化合物を、レベルを変えて、ヌードマウス、S C I Dマウス、形質導入マウスに投与した。この化合物類は、標的器管に対する直接または局所注入を含む口頭、直接注射によるそれぞれのモデルに最も適した方法で投与される。化合物の許容可能な最高レベル及び有効な投与経路を確立した後、新規化合物を基本的に毎日投与し、腫瘍成長及び進行を上記のように判定する。

10

【0162】

実施例16

化合物1の最大許容投与量(MTD)の確立

前臨床的化学療法研究を実施する前に、化合物1の最大許容量を確立するために非腫瘍B a l b / c 雌マウスでそのアッセイを行った。化合物1を100%エタノールに溶解して、ストック溶液(100%エタノール 5 m l に化合物1を2 グラム溶解したもの) w p つくり、落花生油(ビタミンEで補強しないもの)に希釈して、20, 10及び5 m g / 0.1 m l 溶液を作成した。R R R - α - トコフェロール・コハク酸(V E S : コハク酸塩要素をエステル結合でR R R - α - トコフェロール付加したもの)を可溶化して上に述べた手順で希釈したところ、20 m g / 0.1 m l / ガーベージが作成され、追加比較サンプルとして使用された。全部で、B a l b / c 雌マウスを6グループ(各グループ5匹づつ)を配置して、全部で23日間、毎日化合物1と共に強制給餌を与えた。グループ1のマウスに対しては治療を行わず、比較対象として用いられた。グループ2のマウスは媒体物制御グループで、0.1 m l の媒体物(エタノール+措置グループと等しい量の落花生油) / マウス / 日の割合で、全部で23日与え、グループ3のマウスには全部で23日間、毎日20 m g / m l のV E S が与えられた。措置グループ3, 4, 5は23日間、毎日化合物1を5, 10, 及び20 m g が与えられた。グループ3, 4, 5で一日当たり5, 10, 20 m g / m l の量を与えられたマウスは全実験期間を十分に耐えた。体重を週ごとに判定したが、一日当たり5, 10, 20 m g / m l の量を与えられたマウスでは、V E S で措置したグループ、措置しなかったグループ、そして媒体物で措置したグループの比較対象マウスと比較して有意な差は認められなかった(図16、データは治療開始から11日目と12日目を示す)。マウスは活発で、毒性の兆候は認められなかった。MTDテスト終了の時点で、マウスを致死させて検査しても、毒性の証拠は認められなかった。

20

30

【0163】

実施例17

化合物1の化学治療効果

最大許容量調査は最も高いレベル(20 m g / 日 / 23日間)で投与された場合でも化合物1は毒性でないことを示しているが、しかしながら、用いられたレベルが非毒性レベルであったため、最大許容量は確立されなかった。前臨床化学療法調査のために、最大許容量が確定されていない状況で、21日間、強制給餌で30及び20 m g / 0.1 m l の補強が行われた。化合物1をエタノール5 m l あたり化合物1を2グラムの割合で溶解して、落花生油(ビタミンE非補強)に希釈して、0.1 m l あたり30及び20 m g のサンプルをつくった。媒体物制御ではエタノールと落花生油等量で構成されていた。この前臨床化学療法研究はB a l b / c 免疫妥協ヌードマウスに移植されたヒトM D A - M B - 435ヒト乳癌細胞、ヒトD U - 145前立腺癌細胞、そしてヒトH T - 20結腸腫瘍細胞を用いて行われた。

40

【0164】

全部で、40匹の免疫妥協ヌードマウスをテストに用い、各腫瘍タイプでそれぞれテスト化

50

合物（２つの治療グループでは２０及び３０ｍｇ／日の割合）が用いられた。それぞれ１０匹ずつで構成される４つの実験的措置グループ（２１日間、毎日媒体物１ｍｌを強制給餌で与えたグループ、２１日間、毎日化合物１を０．１ｍｌあたり３０ｍｇを与えたグループ、そして２１日間、毎日化合物１を０．１ｍｌあたり２０ｍｇを与えたグループ）を各腫瘍タイプに対して用いた。移植片調査では有効な化学治療薬品の確定された用量を提供した。ヒトＭＤＡ－ＭＢ－４３５乳癌細胞移植異種移植片のポジティブ・コントロールとして腹膜内に５日間毎日腹膜内に２０ｍｇ／Ｋｇの割合で投与されたトキサールを、ヒトＤＵ－１４５前立腺癌細胞に関するポジティブ・コントロールとして静脈内に５日間毎日１ｍｇ／Ｋｇの割合で投与したミトキサントロンを、そして、ヒトＨＴ－２９結腸癌細胞に対するポジティブ・コントロールとして５日間毎日３０ｍｇ／ｋｇの割合で投与された５フルオロウラシルをそれぞれ用いた。腫瘍細胞は左の脇腹に皮下注射で移植され、サイズが約７０ｍｇになるまで成長させておき、その後、毎日強制給餌を与えることでテスト化合物による治療を開始し、全部で２１日間継続された。マウスは毎日腫瘍サイズをカリパーで測定して観察した。マウスの治療は２１日間続けられたが、媒体物コントロール・グループの腫瘍の重さが５００ｍｇに達した時に致死された。一連の手順が終了した後、腫瘍を切除して腫瘍サイズを重さで判定した。致死させた際、化合物１テスト・グループの動物からはＨＰＬ分析を介して化合物１のレベルを判定するために（データ示さず）血清、腫瘍、及び心筋も取り出した。１日当たり化合物１を２０ｍｇと３０ｍｇずつそれぞれ投与した場合の化学療法的有効性は３つの腫瘍タイプのそれぞれについて２つの治療グループの腫瘍サイズを媒体物コントロール・グループと比較し、さらにそれらの２つの治療グループの主要のサイズをポジティブ・コントロールからの腫瘍グループと比較することで判定した。治療は２１日間行われ、実験は媒体物コントロール・グループの腫瘍の重さが５００ｍｇに達するまで継続された。

【０１６５】

*in vivo*での前臨床化学療法データを表３と表４及び図１７（Ａ）－（Ｃ）に示したが、これらは治療の２１－２２日目の状態を示している。ヒトＭＤＡ－ＭＢ－４３５乳がん細胞を移植され、化合物１を強制給餌で１日あたり２０ｍｇ及び３０ｍｇを与えられたヌードマウスの治療は移植された腫瘍細胞の平均腫瘍重量が、治療開始から２１日目の媒体物コントロール・グループの平均腫瘍重量と比較して２０．７及び４４．６％減少した。ポジティブ・コントロールであるタキサールは媒体物コントロール・グループの平均腫瘍成長と比較して、平均腫瘍成長を９０．３％減少させた（表３，４及び１７（Ａ）参照）。データは治療開始（第１日目）の体重増加に対する平均腫瘍成長の割合に変換して表４に示してある。ヒトＤＵ－１４５前立腺癌を移植されたヌードマウスを２１日間１日当たり化合物１を２０ｍｇ及び３０ｍｇずつ強制給餌で与えて治療した場合は２２日目に媒体物コントロール・グループの平均腫瘍成長と比較して、移植された腫瘍細胞の平均腫瘍重量が３１．５％及び２１．４％減少した（表３，４及び図１７（Ｂ））。ポジティブ・コントロールであるミトキサントロンは媒体物コントロール・グループの平均主要成長と比較して、平均腫瘍成長を２７．９％減少させた。ヒトＨＴ－２９ヒト結腸癌細胞を移植された免疫妥協ヌードマウスを２１日間、強制給餌で化合物１を１日あたり２０ｍｇ及び３０ｍｇずつ提供して治療した場合は、２２日目に媒体物コントロール・グループの平均腫瘍重量と比較してそれぞれ平均腫瘍重量（ｍｇ）が３３．３及び３４．５％低下した。ポジティブ・コントロールである５フラウラシルの場合は、媒体物コントロール・グループの平均腫瘍成長と比較して、平均腫瘍成長が３１．４％減少した。

【０１６６】

【表３】

MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells Transplanted in to Nude Mice

Mean tumor Weights (mg) Following Treatments							
Treatments	1	4	7	10	14	17	21
Vehicle	70.1	98.2	119.5	153.2	172.8	203.7	226.1
#1 (20 mg)	70.1	85.8	123.9	127.9	147.2	143.8	179.4
#1 (30 mg)	68.1	85.7	97.3	98.4	126.6	118.7	125.2
Taxol	70.7	71.5	38.2	11.7	5.7	3.6	6.8

10

DU-145 Human Prostate Cancer Cells Transplanted into Nude Mice

Mean tumor Weights (mg) Following Treatments							
Treatments	1	5	8	12	15	19	22
Vehicle	66.5	111.4	167.1	258.5	351.1	458.3	540.9
#1 (20 mg)	66.5	103.5	137.9	208	254.8	362.2	370.5
#1 (30 mg)	67.8	102.5	131.3	241.2	256.8	379.9	407
Mitoxantrone	66.8	107.2	141.1	185.4	205.2	325.3	389.4

20

HT-29 Human Colon Cancer Cells Transplanted into Nude Mice

Mean tumor Weights (mg) Following Treatments							
Treatments	1	5	8	12	15	19	22
Vehicle	80.3	91.7	133.2	185.6	204.8	260.1	372.2
#1 (20 mg)	59.5	84.0	97.0	124.6	147.3	198.0	248.2
#1 (30 mg)	40.0	83.0	96.7	129.3	144.1	176.1	243.8
5-FU	59.3	87.5	105.8	145.8	141.6	212.3	255.5

30

【 0 1 6 7 】

【 表 4 】

Percent mean tumor weight gain (mg) following treatments

MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments¹

Treatments	1	4	7	10	14	17	21
Vehicle	100	140.1	170.5	218.5	246.5	290.6	322.5
#1 (20 mg)	100	122.4	176.7	182.5	210.0	205.1	255.9
#1 (30 mg)	100	125.8	142.9	144.5	185.9	174.3	178.6
Taxol	100	101.1	-46.0	-83.7	-91.8	-99.5	-90.3

10

DU-145 Human Prostate Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments

Treatments	1	5	8	12	15	19	22
Vehicle	100	167.5	251.3	388.7	528.0	458.3	689.2
#1 (20 mg)	100	155.6	207.4	312.8	383.2	362.2	544.7
#1 (30 mg)	100	151.2	193.7	355.8	378.8	379.9	560.3
Mitoxantrone	100	160.5	211.2	277.5	307.2	487.0	582.9

20

HT-29 Human Colon Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments

Treatments	1	5	8	12	15	19	22
Vehicle	100	152.1	220.9	307.8	339.6	431.3	617.2
#1 (20 mg)	100	141.2	163.0	209.4	247.6	332.8	417.1
#1 (30 mg)	100	139.5	162.5	217.3	242.2	296.0	409.7
5-FU	100	147.6	178.4	245.9	247.2	358.0	430.0

30

【0168】

治療経過平均腫瘍重量増大% (mg) は、種々の治療経過における平均腫瘍重量を同一治療グループ内の1日当たりの平均腫瘍重量で割り、100を乗じて決定された。

【0169】

実施例18

ストック液、媒体物及び化合物1希釈物原液の調製

化合物1のストック液：

化合物1を2グラム、100%エタノール (ETOH) 5 ml に溶解し、37℃で攪拌した。これは溶液内に移行する化合物1の最大量である。

40

【0170】

希釈に続いて、2つの実験グループと媒体物コントロール・グループのエタノールを等しいレベルに保ちながら化合物1の適切なレベルを維持するために、乾燥した化合物1を加えた。

【0171】

化合物1をマウス1匹あたり0.1 ml 強制給餌で30 mg 与えた場合

化合物1ストック液1 ml、3 ml の枯渇ビタミンE落花生油、そして化合物1 (乾燥したもの) 800 mg を混ぜ合わせて、37℃で攪拌する。

【0172】

化合物1をマウス1匹あたり0.1 ml 強制給餌で20 mg 与えた場合

50

化合物 1 ストック液 1 m l、3 m l の枯渇ビタミン E 落花生油、そして化合物 1（乾燥したもの）400 m g を混ぜ合わせて、37℃で2時間程度溶液内で攪拌する。

【0173】

化合物 1 をマウス 1 匹あたり 0.1 m l 強制給餌で 10 m g 与えた場合

化合物 1 ストック液 1 m l、そしてビタミン E 枯渇落花生油 3 m l を混合する。

【0174】

媒体物

1 m l の E T O H と 3 m l のビタミン E 枯渇落花生油を混合する。

【0175】

実施例 19

10

A C I ラット癌のモデルにおける化合物 1 の化学的予防特性

免疫妥協されたヌードマウスに移植されたヒトの乳癌、前立腺癌、及び結腸腫瘍を *i n v i v o* に移植して処理するために化合物 1 が用いられた。ヒト乳癌に対して *i n v i v o* での化合物 1 の化学的予防効果は A C I ラット乳癌のモデルが発症するエストロゲン癌において示される。エストロゲン・ペレットを移植したラットの約 90% が、エストロゲンの移植後 6 ヶ月以内に乳癌を発症した。

【0176】

化合物 1 を 100% のエタノールに溶解し、ビタミン E 枯渇落花生油を用いて適切な投与量まで希釈した。最大許容投与量 (M T D, 悪影響を与えることなく投与可能な化合物最大投与量) は、実施例 14 及び 15 で述べたと同様に判定した。化合物 1 は M T D 及び 1 / 2 M T D で投与される。生後 4 週間目の A C I ラットにエストロゲン・ペレットを肩の皮下部分に移植した。M T D 及び 1 / 2 M T D では化合物 1 は強制飼養で投与された。乳腫瘍はエストロゲン移植して約 100 日後に比較対象グループで検出された。比較対象ラットの 90% がエストロゲン移植の後 6 ヶ月以内に乳癌を発症した。比較対象グループ及び処理グループにおいて腫瘍が発症している動物を処理開始後種々の時間間隔で致死させて、明確に腫瘍が形成されているかどうか乳房組織を検査し、さらに組織学的解析で検査した。

20

【0177】

本明細書では以下の文献を引用した。

1. Colowick, Sidney, P. and Kaplan, Nathan, O. Methods in Enzymology, Vol. XVIII, Vitamins and Coenzymes, Part C. Edited by Donald B. McCormick and Lemuel D. Wright. Section XII, PP. 335 30
2. Dhar, A., Lin, So., Klucik, J., Berlin, K. D., Madler, M. M., Lu., Ivery, R. T., Zachais, D., Brwon, C. W., Nelson, E. C, Birchbichler, P. J., Benbrook, D. M., Synthesis, Structure-Activity Relationships, and PARY-Ligand Interactions of Nitrogen Heteroarot inoids. J. Med. Chem. 42, pp. 3602-3614 (1999) 40

本命最初で取上げられたすべての特許あるいは刊行物は本発明が関係する分野の当業者のレベルを示している。さらに、これらの特許及び刊行物は、個々の刊行物が具体的、個別的に引用によって本明細書への組み込みが示唆されるように、全体としても引用によって本明細書に組み込まれる。

本発明は、その目的を実行するため、上記の、およびそれと本質的に付随した目的及び利点を達成するのに十分に適合していることは当業者には明らかであろう。上に述べた実施例は、ここに述べられている方法、手順、処理、分子、及び具体的な化合物は現段階での本発明の好ましい実施の形態を示し、例示のためのものであって、本発明の範囲の限定は 50

意図していない。特許請求の範囲に示されている発明の範囲に含まれる変更やその他の利用法は当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

上に要約的に述べた本発明の上記の特徴、利点、及び目的と、以下に明らかになる特徴、利点、及び目的を達成し、詳細に理解することができるように、添付図面に示すそのいくつかの実施の形態を参照して、本発明をより詳細に説明する。

これらの図面は本明細書の一部を構成するものである。しかしながら、添付図面は本発明の好ましい実施の形態を示すものであって、その範囲を限定する意図はない。

【図 1】 トコフェロール、トコトリエノール、及びその他のクロマン系化合物の一般的構造を示す図。

10

【図 2】 現段階で合成、テストされる一般的トコフェロール系化合物 1 - 29 を示す図。

【図 3】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

【図 4】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

【図 5】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

【図 6】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

【図 7】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

20

【図 8】 位置 R^1 でのクロマン系化合物の化学的変化を起こさせるための一般的合成的有機方式を示す図。

【図 9】 位置 R^2 でクロマン系化合物の化学変化を起こさせるための一般的合成有機方式を示す図。

【図 10】 位置 R^2 でクロマン系化合物の化学変化を起こさせるための一般的合成有機方式を示す図。

【図 11】 位置 R^3 及び R^4 でクロマン系化合物の化学変化を起こさせるための一般的合成有機方式を示す図。

【図 12】 位置 R^3 及び R^4 でクロマン系化合物の化学変化を起こさせるための一般的合成有機方式を示す図。

30

【図 13】 位置 R^5 でのクロマン系化合物の化学変化を起こさせるための一般的合成有機方式を示す図。

【図 14】 全ラセミ系 1 - アザー α - トコフェロール類似物のための一般的合成有機方式を示す図で、化合物 31 - 38 に関する合成方式を示す。

【図 15】 全ラセミ系 1 - アザー α - トコフェロール類似物のための一般的合成有機方式を示す図で、化合物 39 - 43 に関する合成方式を示す。

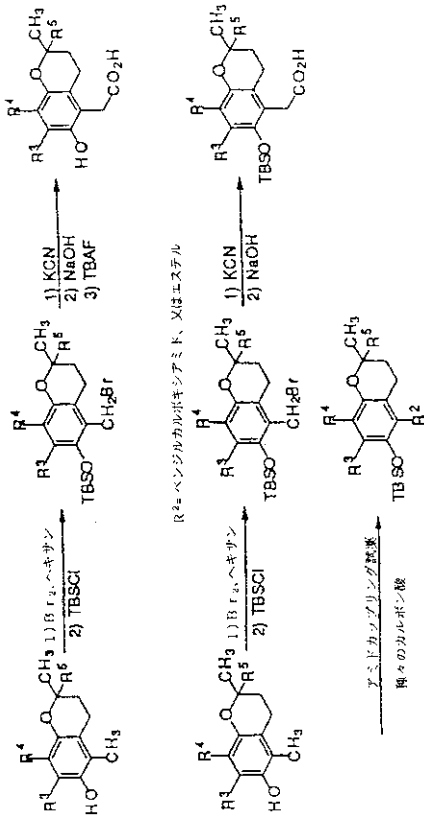
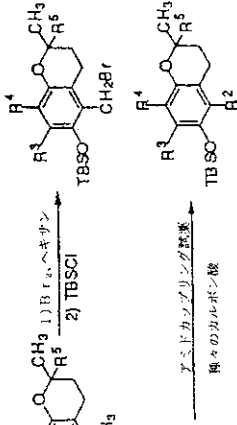
【図 16】 最大許容量調査の 11 日目及び 23 日目の非腫瘍 B a l b / c 雌マウスの平均体重を示す図。

【図 17】 M D A M B - 4 3 5 ヒト乳癌細胞 (A)、D U - 1 4 5 ヒト前立腺癌細胞 (B)、及び H T - 2 9 ヒト結腸癌細胞 (C) における治療後の平均腫瘍重量 % の比較を示す図。

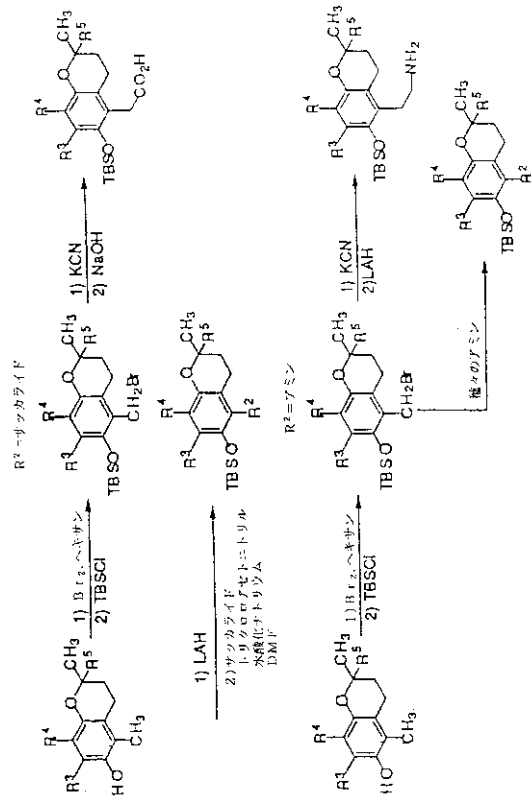
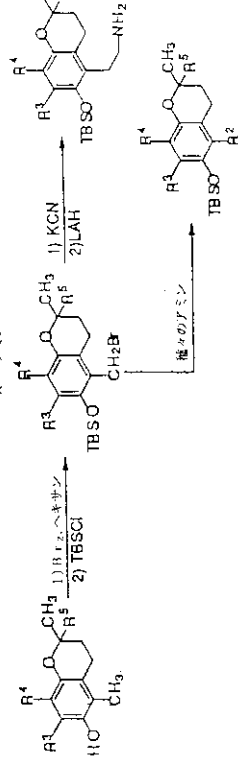
40

R²=ベンジルカルボキシ酸又はカルボン酸塩

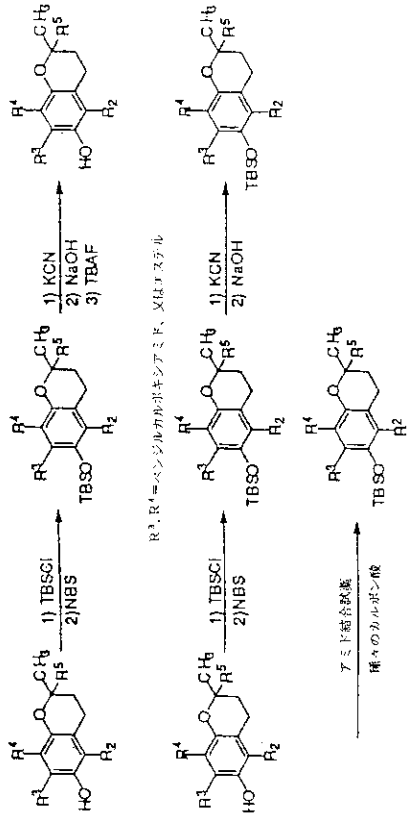
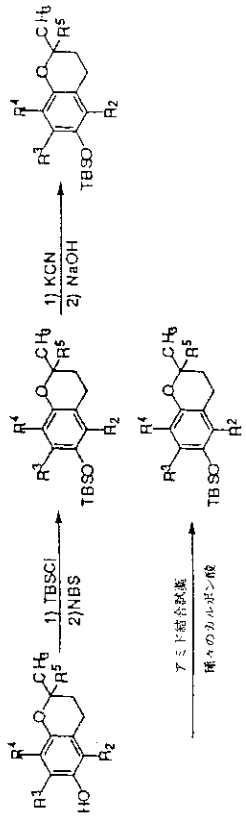
【図 9】

R²=ベンジルカルボキシアミド、又はエステルアミド結合試薬
種々のカルボン酸

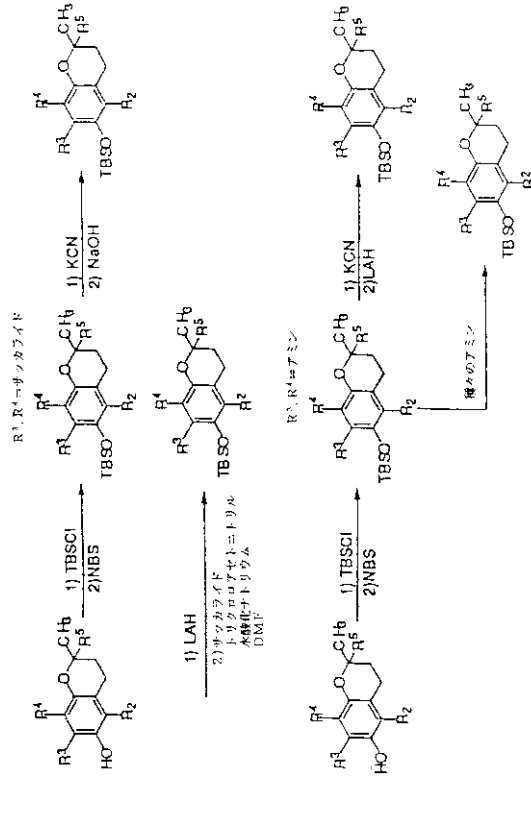
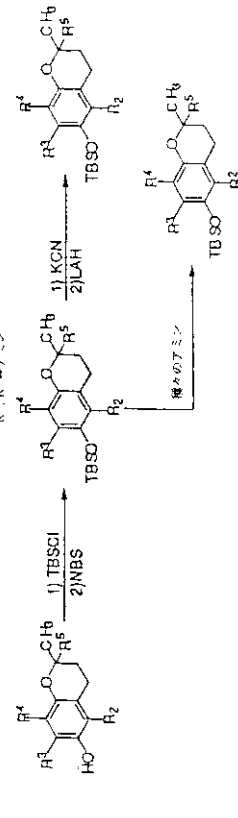
【図 10】

R²=アミンR³, R⁴=ベンジルカルボキシアミド、又はエステル

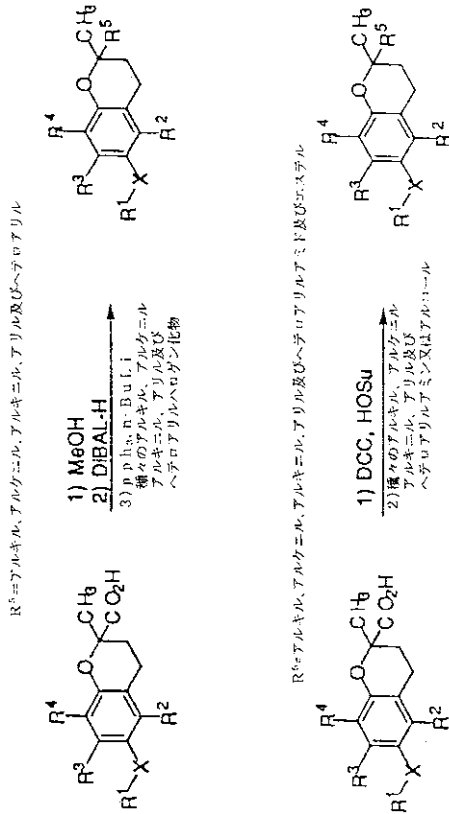
【図 11】

R³, R⁴=ベンジルカルボキシアミド、又はエステルアミド結合試薬
種々のカルボン酸

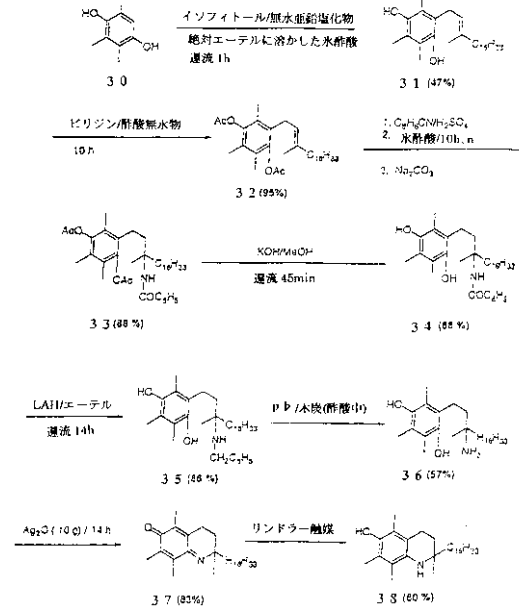
【図 12】

R³, R⁴=アミン

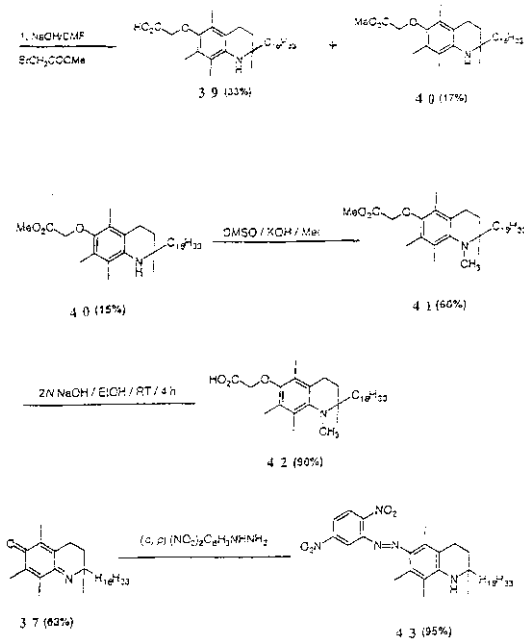
【図 1 3】



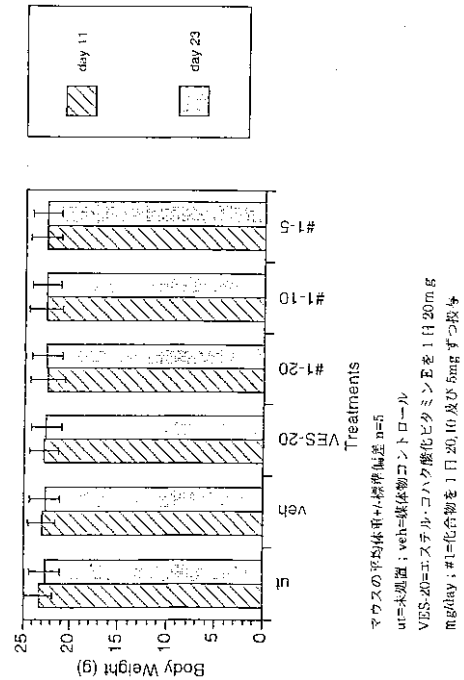
【図 1 4】



【図 1 5】

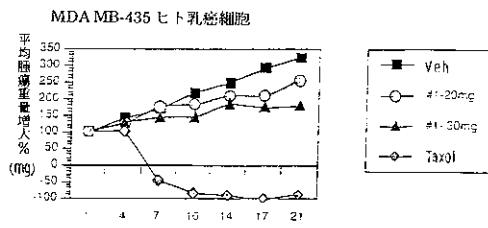


【図 1 6】

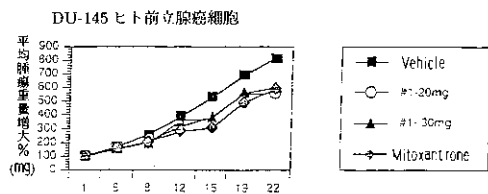


【図 17】

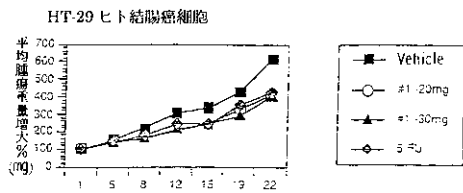
(A)



(B)



(C)



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
16 August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/58889 A1(51) International Patent Classification: C07D 311/20,
C07H 17/06TX 78741 (US); LIU, Shengquan, 302 West 38th Street,
No. 212, Austin, TX 78705 (US); ISRAEL, Karen, 8800
North III St., Apt. 2148, Austin, TX 78753 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/04168

(74) Agent: WELER, James E., 1 Riverway, Suite 1560,
Houston, TX 77056 (US).

(22) International Filing Date: 9 February 2001 (09.02.2001)

(25) Filing Language: English

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/502,592 11 February 2000 (11.02.2000) US

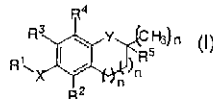
(71) Applicant: RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION [US/US]; 402 North Division Street, Carson City,
NV 89703 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(72) Inventors: SANDERS, Robert, G., 2003 Barton Hills
Drive, Austin, TX 78720 (US); KLINE, Kimberly, 2505
McCallum, Austin, TX 78703 (US); HURLEY, Laurence,
5811 Mesa Drive, No. 1316, Austin, TX 78731 (US);
GARDNER, Robb, 11900 Stonchollow Drive, No. 1031,
Austin, TX 78758 (US); MENCHACA, Maria, 13301
Tanya Trail, Austin, TX 78726 (US); YU, Weiping, 13413
Liquestrian Cove, Austin, TX 78727 (US); RAMANAN,
Puthucode, N., 2301 South Lakeshore Boulevard, Austin,

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/58889 A1

(54) Title: TOCOPHEROLS, TOCOTRIENOLS, OTHER CHROMAN AND SIDE CHAIN DERIVATIVES AND USES
THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides an antiproliferative compound having the structural formula (I) wherein X is oxygen, nitrogen or sulfur, Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and when Y is sulfur, n is 0. Also provided is a method for inducing apoptosis in a cell comprising administering a composition comprising a compound.

WO 01/58589

PCT/US01/04168

TOCOPHEROLS, TOCOTRIENOLS, OTHER CHROMAN AND SIDE
CHAIN DERIVATIVES AND USES THEREOF

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

10 The present invention relates generally to the fields of
organic chemistry and antiproliferative and pro-apoptotic
compounds. More specifically, the present invention relates to
chroman-based compounds and derivatives and analogs thereof,
and their uses as cell anti-proliferative, proapoptotic,
15 immunomodulating, and anti-viral agents.

Description of the Related Art

 The biology of cell proliferation and cell death
(apoptosis) is extremely complex, involving multiple intracellular
20 signaling pathways and multiple interacting gene products. Cancer
cells may exhibit multiple defects in normal regulatory controls of
cell proliferation which allow them to increase in number.
Furthermore, cancer cells exhibit defects in mechanisms that are
involved in eliminating abnormal cells by multi-step processes
25 referred to as programmed cell death or apoptosis. Thus,
combinations of unregulated cell proliferation and suppression of
death inducing signaling pathways give cancer cells both growth and
survival advantages.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

Whether a cell increases in numbers or not depends on a balance of expression of negatively-acting and positively-acting growth regulatory gene products, and the presence or absence of functional cell death signaling pathways. Negative-acting growth regulatory genes contribute to blockage of cells in the cell cycle. Positive-acting growth regulatory genes stimulate cells to progress through the cell cycle. Genes involved in apoptosis can be either proapoptotic or antiapoptotic, and the dynamic balance between them determines whether a cell lives or dies.

Cancer cells, in order to survive and increase their numbers, undergo a series of mutational events over time that remove regulatory controls that give them the ability to grow unchecked and survive even in the presence of proapoptotic signals, and develop attributes that permit them to escape detection and removal by the immune response defense system. Cancers may cause death of individuals unless removed by surgery or effectively treated with drugs.

A wide variety of pathological cell proliferative conditions exist for which novel therapeutic strategies and agents are needed to provide therapeutic benefits. These pathological conditions may occur in almost all cell types capable of abnormal cell proliferation or abnormal responsiveness to cell death signals. Among the cell types that exhibit pathological or abnormal growth and death characteristics are (1) fibroblasts, (2) vascular endothelial cells, and (3) epithelial cells. Thus, novel methods are needed to treat local or disseminated pathological conditions in all or almost all organ and tissue systems of individuals.

Most cancers, whether they be male specific such as prostate or testicular, or female specific such as breast, ovarian or

WO 01/58889

PCT/US01/04168

cervical or whether they affect males and females equally such as liver, skin or lung, with time undergo increased genetic lesions and epigenetic events, and eventually become highly metastatic and difficult to treat. Surgical removal of localized cancers has proven effective only when the cancer has not spread beyond the primary lesion. Once the cancer has spread to other tissues and organs, the surgical procedures must be supplemented with other more specific procedures to eradicate the diseased or malignant cells. Most of the commonly utilized supplementary procedures for treating diseased or malignant cells such as chemotherapy or bioradiation are not localized to the tumor cells and, although they have a proportionally greater destructive effect on malignant cells, often affect normal cells to some extent.

Some derivatives of tocopherols, tocotrienols and vitamin E have been used as proapoptotic and DNA synthesis inhibiting agents. Structurally, vitamin E is composed of a chromanol head and an alkyl side chain. There are eight major naturally occurring forms of vitamin E: alpha (α), beta (β), gamma (γ), and delta (δ) tocopherols and α , β , γ , and δ tocotrienols. Tocopherols differ from tocotrienols in that they have a saturated phytyl side chain rather than an unsaturated isoprenyl side chain. The four forms of tocopherols and tocotrienols differ in the number of methyl groups on the chromanol head (α has three, β and γ have two and δ has one).

RRR- α -tocopheryl succinate is a derivative of RRR- α -tocopherol that has been structurally modified via an ester linkage to contain a succinyl moiety instead of a hydroxyl moiety at the 6-position of the chroman head. This ester linked succinate moiety of RRR- α -tocopherol has been the most potent form of vitamin E

WO 01/58589

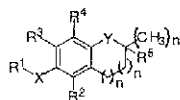
PCT/US01/04168

affecting the biological actions of triggering apoptosis and inhibiting DNA synthesis. This form of vitamin E induces tumor cells to undergo apoptosis, while having no apoptotic inducing effects on normal cells. The major advantage of this form of vitamin E as an anticancer agent is that many cancer cells either express low levels of esterases or do not express esterases that can cleave the succinate moiety, thereby converting the succinate form of RRR- α -tocopherol to the free RRR- α -tocopherol. RRR- α -tocopherol exhibits neither potent antiproliferative nor apoptotic triggering biological activity. However, the ester-linked vitamin E succinate is ineffective in vivo since natural esterases in the host cleave off the succinate moiety, rendering an ineffective anticancer agent, RRR- α -tocopherol.

The prior art is deficient in the lack of effective means of inhibiting undesirable or uncontrollable cell proliferation in a wide variety of pathophysiological conditions while having no to little effect on normal cells. The present invention fulfills this long-standing need and desire in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment of the present invention, there is provided a compound having a structural formula

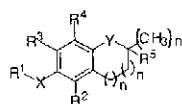


WO 01/58889

PCT/US01/04168

wherein X is oxygen, nitrogen or sulfur; Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and when Y is sulfur, n is 0; R¹ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl,
 5 carboxylic acid, carboxylate, carboxamide, ester, thioamide, thiolester, thiolacid, saccharide, alkoxy-linked saccharide, amine, sulfonate, sulfate, phosphate, alcohol, ether and nitrile; R² is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzyl
 10 ester, saccharide and amine; R³ is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylolester, saccharide and amine; R⁴ is selected from the group consisting of methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide,
 15 benzylolester, saccharide and amine; and R⁵ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxyl, amide and ester; wherein when Y is nitrogen, said nitrogen is substituted with R⁶, wherein R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and methyl; wherein when X is oxygen, R² is
 20 methyl, R³ is methyl, R⁴ is methyl and R⁵ is phytyl. R¹ is not butyric acid.

In another embodiment of the present invention, there is provided a method for the treatment of a cell proliferative disease comprising administering to an animal a pharmacologically effective
 25 dose of a compound having a structural formula



WO 01/58889

PCT/US01/04168

wherein X is oxygen, nitrogen or sulfur; Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and when Y is sulfur, n is 0; R¹ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, 5 carboxylic acid, carboxylate, carboxamide, ester, thioamide, thiolester, thiolacid, saccharide, alkoxy-linked saccharide, amine, sulfonate, sulfate, phosphate, alcohol, ether and nitrile; R² is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzyl 10 ester, saccharide and amine; R³ is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylolester, saccharide and amine; R⁴ is selected from the group consisting of methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, 15 benzylolester, saccharide and amine; and R⁵ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxyl, amide and ester; wherein when Y is nitrogen, said nitrogen is substituted with R⁶, wherein R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and methyl.

20 In yet another embodiment of the present invention, there is provided a pharmaceutical composition comprising a compound disclosed herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

25 In yet another embodiment of the present invention, there is provided a method of inducing apoptosis of a cell, comprising the step of contacting said cell with a pharmacologically effective dose of a compound of the present invention.

Other and further aspects, features, benefits, and advantages of the present invention will be apparent from the

WO 01/58889

PCT/US01/04168

following description of the presently preferred embodiments of the invention given for the purpose of disclosure.

5 **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

So that the matter in which the above-recited features, advantages and objects of the invention, as well as others which will become clear, are attained and can be understood in detail, more particular descriptions of the invention are briefly summarized. above may be had by reference to certain embodiments thereof which are illustrated in the appended drawings. These drawings form a part of the specification. It is to be noted, however, that the appended drawings illustrate preferred embodiments of the invention and therefore are not to be considered limiting in their scope.

Figure 1 shows general structure of tocopherol, tocotrienol and other chroman-based compounds.

Figure 2 shows general tocopherol-based compounds 1-29 presently synthesized and tested.

Figures 3A, 3B and 3C shows general synthetic organic approaches for the chemical variation of chromanol compounds at position R¹.

Figure 4 shows general synthetic organic approaches for the chemical variation of chromanol compounds at position R².

Figure 5 shows general synthetic organic approaches for the chemical variation of chromanol compounds at position R³ and R⁴.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

Figure 6 shows general synthetic organic approaches for the chemical variation of chromanol compounds at position R⁵.

Figure 7 shows general synthetic organic approaches for the all-racemic 1-aza- α -tocopherol analogs. Figure 7A shows the synthetic scheme for compounds 31-38 and Figure 7B shows the synthetic scheme for compounds 39-43.

Figure 8 shows the mean body weights of non-tumor Balb/c female mice at day 11 and day 23 of a maximum tolerated dose study.

Figure 9 shows the comparison of percent mean tumor weight following treatments in MDA MB-435 Human Breast Cancer Cells (Figure 9A), DU-145 Human Prostate Cancer Cells (Figure 9B) and HT-29 Human Colon Cancer Cells (Figure 9C).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The following definitions are given for the purpose of facilitating understanding of the inventions disclosed herein. Any terms not specifically defined should be interpreted according to the common meaning of the term in the art.

As used herein, the term "individual" shall refer to animals and humans.

As used herein, the term "biologically inhibiting" or "inhibition" of the growth of proliferating cells shall include partial or total growth inhibition and also is meant to include decreases in the rate of proliferation or growth of the cells. The biologically inhibitory dose of the composition of the present invention may be determined by assessing the effects of the test element on target

WO 01/58889

PCT/US01/04168

malignant or abnormally proliferating cell growth in tissue culture, tumor growth in animals and cell culture or any other method known to those of ordinary skill in the art.

As used herein, the term "induction of programmed cell death or apoptosis" shall include partial or total cell death with cells exhibiting established morphological and biochemical apoptotic characteristics. The dose of the composition of the present invention that induces apoptosis may be determined by assessing the effects of the test element on target malignant or abnormally proliferating cell growth in tissue culture, tumor growth in animals and cell culture or any other method known to those of ordinary skill in the art.

As used herein, the term "induction of cell cycle arrest" shall include growth arrest due to treated cells being blocked in G0/G1 or G2/M cell cycle phase. The dose of the composition of the present invention that induces cell cycle arrest may be determined by assessing the effects of the test element on target malignant or abnormally proliferating cell growth in tissue culture, tumor growth in animals and cell culture or any other method known to those of ordinary skill in the art.

As used herein, the term "induction of cellular differentiation" shall include growth arrest due to treated cells being induced to undergo cellular differentiation, a stage in which cellular proliferation does not occur. The dose of the composition of the present invention that induces cellular differentiation may be determined by assessing the effects of the test element on target malignant or abnormally proliferating cell growth in tissue culture, tumor growth in animals and cell culture or any other method known to those of ordinary skill in the art.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

The present invention provides tocopherols, tocotrienols, and other chroman derivatives with or without derivatives of saturated phytyl or unsaturated isoprenyl side chains and analogs; e.g., azo- and thiol- analogs, thereof. Utilizing ethers and several other chemical linkages to attach different moieties to tocopherol, tocotrienol and other chroman derivatives, novel anti-cancer compounds, for *in vivo* use, are produced. The general structures of the novel compounds of the present invention are shown in Figure 1, the preferred compounds are listed in Figure 2 and possible routes for their syntheses are provided in Figures 3-7. The novel features of these molecules include chemical functionalization of positions R¹ - R⁵ of the chroman structure, and chemical functionalization of the phytyl and isoprenyl side chains, particularly compounds based on tocopherols and tocotrienols (Figure 1). Additionally, compounds with heteroatom substitutions (N or S) for the chroman ring oxygen are presented (Figure 7). Particularly preferred compounds include 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (1), 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propionic acid (2), 2,5,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (7), 2,7,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (8), 2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (9), 2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (12), 2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (15), 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (17), 3-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-

WO 01/58589

PCT/US01/04168

yloxy)propyl-1-ammonium chloride (19), 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-3-ene-6-yloxy) acetic acid (20), 2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)triethylammonium sulfate (21), 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman)acetic acid (22), 2,5,7,8,-tetramethyl-(2R-(heptadecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid (25), 2,5,7,8,-tetramethyl-2R-(4,8,-dimethyl-1,3,7 EZ nonotrien)chroman-6-yloxy) acetic acid (26), E,Z,RS,RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-yloxy)acetic acid (27), 1-aza- α -tocopherol-6-yloxy-acetic acid (39), 1-aza- α -tocopherol-6-yloxy-methyl acetate (40), 1-aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy-methyl acetate (41), 1-aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy- acetic acid (42), 6-(2,4-Dinitrophenylazo(2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (43).

15 The pharmacodynamically designed compounds of the present invention have an improved therapeutic index and are potent inhibitors of cancer cell growth; i.e., they demonstrate high antitumor activity with minimal side effects. These compounds, which can not be readily degraded since there are no known
 20 etherases in mammals, may be used in the treatment of cancers and disorders involving excess cell proliferation, as well as for cells that accumulate in numbers due to suppressed cell killing mechanisms, with minimal side effects. The compounds of the present invention inhibit cancer cell growth by induction of apoptosis and DNA
 25 synthesis arrest. Induction of apoptosis by these compounds is mediated by activation of the TGF- β , stress kinase, and Fas/Fas ligand signaling pathways. Induction of apoptosis by other pathways, for example, ceramide production, are not excluded. These growth inhibitory properties allow these compounds to be

WO 01/58889

PCT/US01/04168

used in the treatment of proliferative diseases, including cancers of different cell types and lineages, non-neoplastic hyperproliferative diseases, and disorders with defects in apoptotic signaling pathways. Several of the compounds of the present invention are both strong
5 inducers of apoptosis and strong inhibitors of DNA synthesis arrest of tumor cells representing different cellular lineages.

The therapeutic use of the compounds of the present invention in treatment of cancers and other diseases and disorders involving excess cell proliferation or failure of cells to die is
10 illustrated. The novel derivatives (Tables 1 and 2) were shown at EC₅₀ concentrations to induce apoptosis of human breast cancer cells (MDA MB 435, MDA MB 231, and MCF-7 breast cancer cells), human prostate cancer cells (PC-3, DU-145 and LnCaP), human ovarian tumor cells (C-170), human cervical tumor cells (ME-180),
15 human endometrial cells (RL-95-2), human lymphoid cells (myeloma, Raji, Ramos, Jurkat, and HL-60), colon cancer cells (HT-29 and DLD-1) and lung cancer cells (A-549). The novel derivatives were shown to not induce apoptosis of normal human mammary epithelial cells (HMECs) and immortalized but non-tumorigenic
20 MCF-10A mammary cells.

These novel compounds and methods of the present invention may be used to treat neoplastic diseases and non-neoplastic diseases. Representative examples of neoplastic diseases are ovarian cancer, cervical cancer, endometrial cancer, bladder
25 cancer, lung cancer, cervical cancer, breast cancer, prostate cancer, testicular cancer, gliomas, fibrosarcomas, retinoblastomas, melanomas, soft tissue sarcomas, osteosarcomas, colon cancer, carcinoma of the kidney, pancreatic cancer, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. Representative examples of non-

WO 01/58589

PCT/US01/04168

neoplastic diseases are selected from the group consisting of psoriasis, benign proliferative skin diseases, ichthyosis, papilloma, restinosis, scleroderma and hemangioma.

The compounds and methods of the present invention
5 may be used to treat non-neoplastic diseases that develop due to failure of selected cells to undergo normal programmed cell death or apoptosis. Representative examples of diseases and disorders that occur due to the failure of cells to die are autoimmune diseases. Autoimmune diseases are characterized by immune cell
10 destruction of self cells, tissues and organs. A representative group of autoimmune diseases includes autoimmune thyroiditis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, dermatitis herpetiformis, celiac disease, and rheumatoid arthritis. This invention is not limited to autoimmunity, but includes all
15 disorders having an immune component, such as the inflammatory process involved in cardiovascular plaque formation, or ultra violet radiation induced skin damage.

The compounds and methods of the present invention may be used to treat disorders and diseases that develop due to
20 virus infections. Representative examples of diseases and disorders that occur due to virus infections are human immunodeficiency viruses (HIV). Since these compounds are working on intracellular signaling networks, they have the capacity to impact on any type of external cellular signal such as cytokines, viruses, bacteria, toxins,
25 heavy metals, etc.

The methods of the present invention may be used to treat any animal. Most preferably, the methods of the present invention are useful in humans.

WO 01/58589

PCT/US01/04168

Generally, to achieve pharmacologically efficacious cell killing and anti-proliferative effects, these compounds and analogs thereof may be administered in any therapeutically effective dose. Preferably, the structurally modified tocopherols and tocotrienols and analogs are administered in a dose of from about 0.1 mg/kg to about 100 mg/kg. More preferably, the structurally modified tocopherols and tocotrienols and analogs are administered in a dose of from about 1 mg/kg to about 10 mg/kg.

Administration of the compositions of the present invention may be by topical, intraocular, parenteral, oral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, or any other suitable means. The dosage administered is dependent upon the age, clinical stage and extent of the disease or genetic predisposition of the individual, location, weight, kind of concurrent treatment, if any, and nature of the pathological or malignant condition. The effective delivery system useful in the method of the present invention may be employed in such forms as capsules, tablets, liquid solutions, suspensions, or elixirs, for oral administration, or sterile liquid forms such as solutions, suspensions or emulsions. For topical use it may be employed in such forms as ointments, creams or sprays. Any inert carrier is preferably used in combination with suitable solubilizing agents, such as saline, or phosphate-buffered saline, or any such carrier in which the compounds used in the method, such as ethanol, acetone, or DMSO, of the present invention have suitable solubility properties.

There are a wide variety of pathological cancerous and noncancerous cell proliferative conditions and cell accumulations due to absence of normal cellular death for which the compositions and methods of the present invention will provide therapeutic

WO 01/58889

PCT/US01/04168

benefits. These pathological conditions may occur in almost all cell types capable of abnormal cell proliferation or defective in programmed cell death mechanisms. Among the cell types which exhibit pathological or abnormal growth or abnormal death are (1) fibroblasts, (2) vascular endothelial cells and (3) epithelial cells. It can be seen from the above that the methods of the present invention is useful in treating local or disseminated pathological conditions in all or almost all organ and tissue systems of individuals.

10 It is specifically contemplated that pharmaceutical compositions may be prepared using the novel chroman-based compounds and derivatives and analogs thereof of the present invention. In such a case, the pharmaceutical composition comprises the novel compounds of the present invention and a
15 pharmaceutically acceptable carrier. A person having ordinary skill in this art would readily be able to determine, without undue experimentation, the appropriate dosages and routes of administration of the compounds and analogs of the present invention.

20 Thus the present invention is directed toward the design and effective use of novel agents that can specifically target cancer cells and either down-regulate growth stimulatory signals, up-regulate growth inhibitory signals, down-regulate survival signals and/or up-regulate death signals. More specifically, this invention
25 creates and characterizes novel agents that activate growth inhibitory factors, trigger death signaling pathways, and inhibit DNA synthesis.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

The following examples are given for the purpose of illustrating various embodiments of the invention and are not meant to limit the present invention in any fashion.

5

EXAMPLE 1Synthetic Organic Methodology

The synthesis of a variety of tocopherol, tocotrienol, and other chroman derivatives with or without derivatives of saturated
10 phytyl or unsaturated isoprenyl side chains or analogs thereof is possible via structural modification of the chroman ring system (Figures 3-6) and heteroatom substitutions (N or S) for the chroman ring oxygen (Figure 7A and 7B). The structural variables R¹, R², R³, R⁴, R⁵, and X illustrate the groups on the chroman group that are
15 modified and Y represents either oxygen, or heteroatom substitutions (N or S) for the chroman ring oxygen. Using alkylation chemistry, a large number of compounds containing different R¹ groups can be synthesized, particularly when X is oxygen. After alkylation, further chemical modification of the R¹
20 groups permits the synthesis of a wide range of novel compounds. Bromination of the benzylic methyl groups of the chroman group provide intermediates that permit variation of the R², R³ and R⁴ groups. Variation of group R⁵ is also possible, particularly when starting from the commercially available 6-hydroxy-2,5,7,8-
25 tetramethylchroman-2-carboxylic acid. When a heteroatom substitution of nitrogen for the chroman ring oxygen occurs, then nitrogen may be substituted with R⁶ which is hydrogen or methyl. Variation of X to groups other than oxygen, which is the identity of X in tocopherols and tocotrienols, can be accomplished using

WO 01/58589

PCT/US01/04168

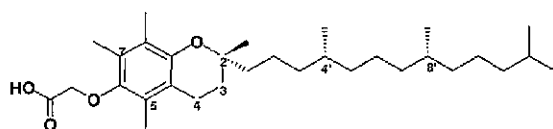
palladium chemistry (for X = CH₂) and nucleophilic aromatic substitution (for X = N or S). Other possible modifications to the chroman structure include unsaturation at the 3-4 positions and ring contraction to produce a five-membered furanyl ring.

Reagents employed were either commercially available or prepared according to a known procedure. Anhydrous CH₂Cl₂ and THF were obtained by distillation. All other solvents used were reagent. Anhydrous reaction conditions were maintained under a slightly positive argon atmosphere in oven-dried glassware. Silica gel chromatography was performed using 230-400 mesh silica purchased from EM Science. Routine ¹H- and ¹³C-NMR spectra were obtained on a Varian Unity spectrometer at 300.132 MHz and 75.033 MHz frequencies, respectively. NMR spectra were referenced to TMS (0 ppm) or to the isotopic impurity peak of CDCl₃ (7.26 and 77.0 ppm for ¹H and ¹³C, respectively). High resolution electron impact ionization mass spectroscopy was performed by the Mass Spectrometry Center at The University of Texas at Austin.

EXAMPLE 2

Synthesis and Characterization of Novel Tocopherol Compounds

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy) acetic acid (1)



WO 01/58589

PCT/US01/04168

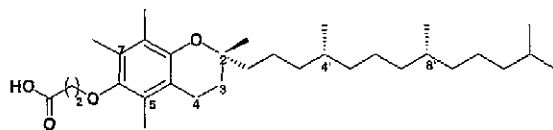
A solution of R,R,R- α -tocopherol (0.5 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 mL) and brine (1 x 30 mL), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 mL), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded **1** as a waxy, off-white solid (0.50 g, 88%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₂), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.34 (s, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₂), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 69.2 (OCH₂), 75.0 (2-C), 117.8, 123.2, 125.4, 127.3 (aryl C), 147.0, 148.5 (aryl C-O), 173.7 (COOH); HRMS (CI, m/z): 489.394374 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₃O₄ 489.394386). All assignments were confirmed using HMQC, DEPT-135, and ¹H-NOSEY.

WO 01/58589

PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy) propionic acid (2)

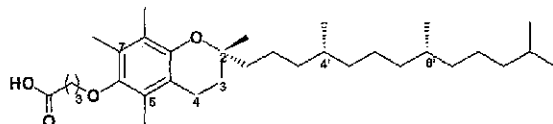
The compounds 2-6 are synthesized in a manner
 identical to the synthesis of 1 using the appropriate bromoalkanoic
 5 acids.



(89% yield). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH₂, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.09, 2.14, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 2.85 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.96 (t, J = 6.4 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 35.1, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 67.5 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.8, 127.8 (aryl C), 147.6, 148.0 (aryl C-O), 177.1 (COOH); HRMS (CI, m/z): 503.408610 (M + H⁺, Calc. for C₃₂H₅₂O₄ 503.410036).

20

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy) butyric acid (3)

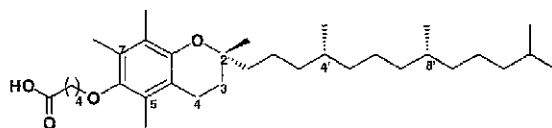


WO 01/58889

PCT/US01/04168

(85% yield). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 26H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.14, 2.17, 2.21 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.62 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 2.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.74 (t, J = 6.1 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₃), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.9 (2a-CH₃), 24.4, 24.8, 25.3 (CH₂), 28.0 (CH), 30.9, 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 71.3 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.7, 127.7 (aryl C), 147.8, 147.9 (aryl C-O), 178.9 (COOH); HRMS (CI, m/z): 516.424374 (M + H⁺, Calc. for C₃₃H₅₇O₄ 516.424386).

15 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)-valeric acid (4)



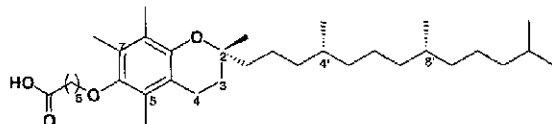
20 (90% yield). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 28H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.09, 2.14, 2.18 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.49 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂COOH), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.68 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0, 21.4 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-

WO 01/58889

PCT/US01/04168

CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 30.0 (CH₂), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 35.8, 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 72.2 (OCH₂), 74.9 (2-C), 117.8, 123.2, 125.4, 127.3 (aryl C), 147.6, 148.3 (aryl C-O), 178.7 (COOH); HRMS (CI, m/z): 530.433514 (M + H⁺, Calc. for C₃₄H₅₀O₄ 530.433516).

2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)hexanoic acid (5)



10

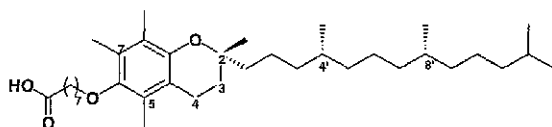
(77% yield). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 30H, 4', 8', 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.08, 2.12, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.32 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂COOH), 2.57 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.64 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.8, 11.9, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.6, 24.8, 25.7 (CH₂), 28.0 (CH), 30.0 (CH₂), 31.3 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 34.0, 37.3, 37.3, 37.4, 39.3, 40.0 (CH₂), 72.6 (OCH₂), 74.7 (2-C), 117.4, 122.7, 125.4, 127.8 (aryl C), 147.6, 148.2 (aryl C-O), 179.6 (COOH); HRMS (CI, m/z): 545.457026 (M + H⁺, Calc. for C₃₅H₆₁O₄ 545.456986).

25

WO 01/58589

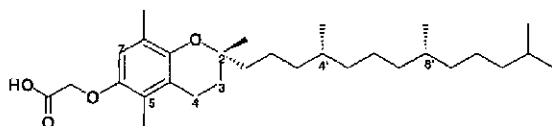
PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)octanoic acid (6)



5 (91% yield). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3/TMS , ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'- CH_3), 1.0 - 1.6 (m, 34H, 4'-, 8'-, 12'- CH , 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'- CH_2 , 2a- CH_3), 1.81 (m, 2H, 3- CH_2), 2.08, 2.11, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.36 (m, 2H, CH_2COOH), 2.58 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, 4- CH_2), 3.62 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2); ^{13}C -
 10 NMR (CDCl_3 , ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.6, 19.7 (CH_3), 20.6, 21.0 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.6, 24.8, 25.1, 25.7, 26.6 (CH_2), 28.0 (CH), 30.0 (CH_2), 31.3 (3- CH_2), 32.7, 32.8 (CH), 34.0, 37.3, 37.3, 37.4, 39.3, 40.0 (CH_2), 72.7 (OCH_2), 74.6 (2-C), 117.6, 122.8, 125.5, 127.6 (aryl C), 147.5,
 15 148.3 (aryl C-O), 179.4 (COOH); HRMS (CI, m/z): 573.484396 ($M + \text{H}^+$, Calc. for $\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{O}_4$ 573.488286).

2,5,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)acetic acid (7)



20

A solution of R,R,R- α -tocopherol (75 mg, 0.18 mmol) in N,N-dimethylformamide (2 mL) was treated with methyl

WO 01/58889

PCT/US01/04168

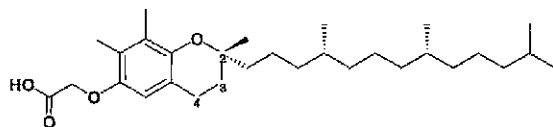
bromoacetate (0.4 g, 2.8 mmol) and an excess of powdered NaOH (0.5 g, 12.5 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 10 ml).
 5 The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 10 ml) and brine (1 x 10 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether
 10 (30 ml), washed with H₂O (3 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 7 as a waxy, off-white solid (80 mg, 97%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4', 8',
 15 ,12'-CH, 1',2',-,5',6',7',9',10',11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.14 (2 x s, 6H, 5a-, 8a-CH₃), 2.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.59 (s, 2H, OCH₂), 6.53 (s, 1H, aryl CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.2, 16.1 (5a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.7, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 27.9 (CH), 31.2
 20 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 66.8 (OCH₂), 74.8 (2-C), 113.8, 120.7, 123.1, 127.3 (aryl C), 147.1, 148.2 (aryl C-O), 175.3 (COOH); HRMS (CI, m/z): 475.377840 (M + H⁺, Calc. for C₃₀H₅₁O₄ 475.378736).

25

WO 01/58589

PCT/US01/04168

2,7,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)acetic acid (8)



5

A solution of R,R,R- α -tocopherol (100 mg, 0.24 mmol) in N,N-dimethylformamide (5 mL) was treated with methyl bromoacetate (1.1 g, 7.4 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.0 g, 25 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously
10 for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 10 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 10 ml) and brine (1 x 10 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel
15 chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 8 as a
20 waxy, off-white solid (110 mg, 97%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₂), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.19 (2 x s, 6H, 7a-, 8a-CH₃), 2.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.59 (s, 2H, OCH₂), 6.39 (s, 1H, aryl CH); ¹³C-NMR (CDCl₃,
25 ppm): 11.9, 12.0 (7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.7, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₂), 24.4, 24.8 (CH₂), 27.9 (CH), 31.2

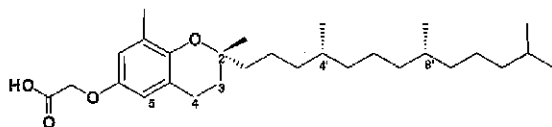
WO 01/58589

PCT/US01/04168

(3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 66.6 (OCH₂), 75.7 (2-C), 110.6, 117.7, 125.0, 126.3 (aryl C), 146.9, 148.7 (aryl C-O), 175.0 (COOH); HRMS (CI, m/z): 475.377962 (M + H⁺, Calc. for C₃₀H₅₁O₄ 475.378736).

5

2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (9)



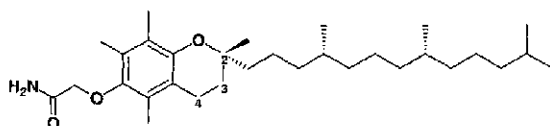
10 A solution of R,R,R- α -tocopherol (100 mg, 0.25 mmol) in N,N-dimethylformamide (5 mL) was treated with methyl bromoacetate (1.1 g, 7.4 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.0 g, 25 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N
15 HCl and extracted with diethyl ether (3 x 10 mL). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in
20 hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 mL), washed with H₂O (3 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 9 as a waxy, off-white solid (111 mg, 98%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm):
25 0.87 (m, 12H, 4a⁻, 8a⁻, 12a⁻, 13⁻-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4⁻, 8⁻, 12⁻-CH, 1⁻, 2⁻, 3⁻, 5⁻, 6⁻, 7⁻, 9⁻, 10⁻, 11⁻-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H,

WO 01/58889

PCT/US01/04168

3-CH₂), 2.15 (s, 3H, 8a-CH₃), 2.71 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.59 (s, 2H, OCH₂), 6.48 (d, J = 3.0 Hz, 1H, aryl CH), 6.61 (d, J = 3.0 Hz, 1H, aryl CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 16.2 (8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 24.0 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 27.9 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 65.7 (OCH₂), 75.8 (2-C), 112.3, 115.6, 121.1, 127.5 (aryl C), 147.2, 149.9 (aryl C-O), 174.8 (COOH); HRMS (Cl, m/z): 460.3552022 (M + H⁺, Calc. for C₃₀H₅₁O₄ 460.355262).

10 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetamide (10)



15 A solution of 1 (0.1 g, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was treated with N-hydroxysuccinimide (26 mg, 0.23 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (46 mg, 0.23 mmol). After 2 min, a white precipitate formed. The resulting suspension was stirred for 2 h. The reaction stirred for an additional 6 h. The reaction mixture was
20 cooled to -30 °C and filtered. The filtrate was concentrated and the resulting colorless oil was purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc (35%, v/v) in hexanes. This yielded a white solid (75 mg, 76%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4', 8', 12'-CH, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.10, 2.12, 2.16
25 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.19 (s,

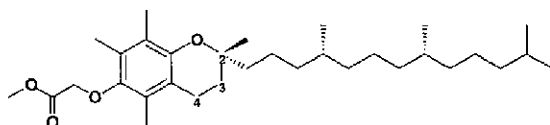
WO 01/58589

PCT/US01/04168

2H, OCH₂), 6.36, 6.92 (2 x broad, 2H, NH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 5 70.9 (OCH₂), 74.9 (2-C), 117.8, 123.3, 125.4, 127.3 (aryl C), 146.5, 148.4 (aryl C-O), 172.1 (COOH); HRMS (CI, m/z): 488.409341 (M + H⁺, Calc. for C₅₇H₅₄NO₃ 488.410370).

Methyl 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-

10 trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy)acetate (11)



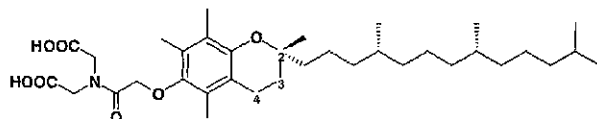
A solution of 1 (0.1 g, 0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was treated with N,N-dimethylaminopyridine (26 mg, 0.23 mmol), 15 methanol (1 mL) and dicyclohexylcarbodiimide (46 mg, 0.23 mmol). After 2 min, a white precipitate formed. The resulting suspension was stirred for 6 h. The reaction mixture was cooled to -30 °C and filtered. The filtrate was concentrated and the resulting colorless oil was purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc 20 (40%, v/v) in hexanes. This yielded a white solid (82 mg, 80%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.10, 2.16, 2.20 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 25 4.32 (s, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8

WO 01/58889

PCT/US01/04168

(2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 50.2 (OCH₃), 69.8 (OCH₂), 74.9 (2-C), 117.6, 123.0, 125.6, 127.5 (aryl C), 147.6, 148.2 (aryl C-O), 169.8 (COOH); HRMS (CI, m/z): 503.408411 (M + H⁺, Calc. for C₃₂H₅₅O₄ 503.410036).

2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (12)



10

A solution of 1 (0.2 g, 0.4 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was treated with diethyl iminodiacetate (77 mg, 0.4 mmol) and O-7-azabenzotriazol-1-yl-N,N',N'-tetramethyruonium hexafluorophosphate (HATU) (46 mg, 0.23 mmol). After 12 h, the reaction mixture was concentrated to a paste and then purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc (30%, v/v) in hexanes. This yielded the desired diester intermediate as colorless oil (150 mg, 55%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 30H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.78 (m, 2H, 3-CH₂), 2.08, 2.13, 2.17 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.58 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.19, 4.22 (q, J = 7.4 Hz, 4H, OCH₂), 4.30, 4.33, 4.42 (3 x s, 6H, 2 x NCH₂, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 14.0 (CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 48.1, 49.4 (NCH₂), 61.2,

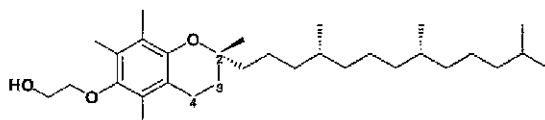
WO 01/58889

PCT/US01/04168

61.5 (OCH₂), 71.8 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.6, 127.4 (aryl C), 148.0, 148.1 (aryl C-O), 168.8, 169.0 (CO); MS (CI, m/z): 660 (M + H⁺, Calc. for C₃₅H₅₃NO₇ 659.47610).

A solution of the diester intermediate (0.15 g, 0.23 mmol) in ethanol (4 ml) was treated with 1 N NaOH (1 ml). The resulting cloudy mixture was stirred at 70 °C for 15 h. The reaction mixture was acidified with 1 N HCl and the ethanol was removed in vacuo. The resulting aqueous solution was extracted with CHCl₃ (5 x 20 ml) and the combined organic layers dried with Na₂SO₄. This yielded 12 (0.13 g, 52%) as a white solid. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4', 8', 12'-CH₂, 1', 2', 3', 5', 6', 7', 9', 10', 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.70 (m, 2H, 3-CH₂), 2.01, 2.05, 2.08 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.47 (m, 2H, 4-CH₂), 4.18 (m, 4H, 2 x NCH₂), 4.31 (m, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.5, 11.6, 12.4 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.4, 19.5 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.4, 32.5 (CH), 37.0, 37.2, 37.5, 39.1, 40.0 (CH₂), 48.1, 49.4 (NCH₂), 71.1 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.4, 127.2 (aryl C), 147.8, 148.1 (aryl C-O), 168.8, 169.0 (CO); HRMS (CI, m/z): 604.420882 (M + H⁺, Calc. for C₃₅H₅₃NO₇ 604.421329).

2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)ethan-1-ol (13)



WO 01/58589

PCT/US01/04168

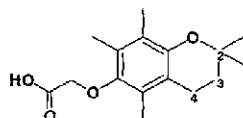
A solution of R,R,R- α -tocopherol (0.5 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with iodoethanol (1.7 g, 10 mmol) and an excess of powdered NaOH (2.5 g, 63 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 mL) and brine (1 x 30 mL), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 30% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 mL), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded **13** as yellow oil (0.40 g, 73%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.79 (m, 2H, OCH₂), 3.94 (m, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 63.1, 69.2 (OCH₂), 75.0 (2-C), 117.8, 123.4, 126.4, 128.3 (aryl C), 149.2, 149.5 (aryl C-O); MS (CI, m/z): 475 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₄O₃, 474.40729).

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2-(2,5,7,8-pentamethylchroman-6-yloxy)acetic acid

(14)



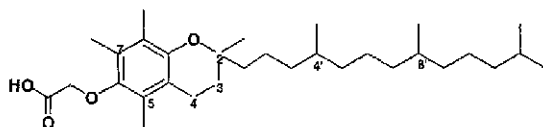
A solution of 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol (0.3 g, 1.36 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (0.8 g, 5.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (0.7 g, 18 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 30% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 14 as a white solid (0.31 g, 82%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.31 (s, 6H, CH₃), 1.81 (t, J = 7.8 Hz, 3-CH₂), 2.10, 2.16, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.61 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.39 (s, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 11.8, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 20.9, 26.8, 32.7 (alkyl), 69.1, (OCH₂), 72.9 (2-C), 117.5, 123.2, 125.5, 127.3 (aryl), 147.0, 148.6 (O-aryl), 173.8 (COOH); HRMS (CI, m/z): 279.159238 (M + H⁺, Calc. for C₁₆H₂₃O₄ 279.159634).

25

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyltridecyl)
chroman-6-yloxy)acetic acid (15)



A solution of all racemic α -tocopherol (0.5 g, 1.16
5 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl
bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH
(1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously
for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N
HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined
10 ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30
ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was
concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel
chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in
hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether
15 (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and
then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to
a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 15 as a
waxy, off-white solid (80%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.88 (m,
12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-
2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.84 (m, 2H, 3-CH₂),
20 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H,
4-CH₂), 4.34 (s, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.5, 11.7, 12.6
(5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.3 (CH₂), 22.6, 22.8
(CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.5, 24.9 (CH₂), 29.0 (CH), 31.6 (3-CH₂),
25 32.6, 32.8 (CH), 37.5, 37.8, 37.9, 39.5, 41.0 (CH₂), 69.3 (OCH₂),
75.1 (2-C), 117.9, 123.3, 125.5, 127.3 (aryl C), 147.0, 148.0 (aryl

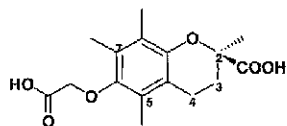
WO 01/58889

PCT/US01/04168

C-O), 173.9 (COOH); HRMS (CI, m/z): 489.394375 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₃O₄ 489.394383).

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(carboxy)chroman-6-yloxy)

5 acetic acid (16)

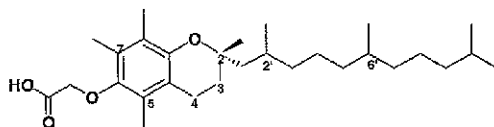


A solution of (-)-(R)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (0.34g, 1.36 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (0.8 g, 5.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (0.7 g, 1.8 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 30% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to light yellow oil and dried in vacuo for 48h. This yielded 16 as a white solid (0.33g, 80%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.52 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.10 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.16, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.56 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.36 (s, 2H, OCH₂).

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl)
chroman-6-yloxy)acetic acid (17)



5 A solution of 10g (40mmol) of (-)-(S)-6-hydroxy-
2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid and 0.5g of p-
toluenesulfonic acid monohydrate in 200 ml of methanol was
stirred and refluxed for 4hr. After cooling, the solution was diluted
with water and extracted with diethyl ether. The combined ether
10 layers were washed with saturated aqueous sodium bicarbonate
solution, H₂O, and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄.
The resulting solution was concentrated and dried in vacuo for 48 h.
This yielded 10 g (95%) of methyl (-)-(S)- 6-hydroxy-2,5,7,8-
tetramethylchroman-2-carboxylate as a colorless solid which was
15 used without further purification. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.52
(s, 3H, 2a-CH₃), 2.10 (m, 2H, 3-CH₂), 2.12, 2.16, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-
, 7a-, 8a-CH₃), 2.56 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.55 (s, 3H, OCH₃);
MS (CI, m/z): 264.422 M + H⁺, Calc. for C₂₃H₂₈O₄ 265.3224.

To a solution of 2g (7.58mmol) of this ester in 7.5ml of
20 N, N-dimethylformamide (DMF) was added 2.6 g (18.8mmol) of
anhydrous granular potassium carbonate followed by 2.3 ml (20
mmol) of benzylchloride. The resulting slurry was stirred at RT for
41 h then poured into 50 ml of water and worked up with ether in
the usual way. The product was freed of excess benzyl chloride at
25 50° under high vacuum. There was obtained 2.69g (100%) of pure
(TLC) (-)-(S)-6-benzoyloxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2carboxylic

WO 01/58889

PCT/US01/04168

acid methyl ester as a yellow solid, m.p. 102-106°. The analytical specimen of this compound was prepared as a colorless solid m.p. 108-109° (from ether/methanol). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.54 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.01 (m, 2H, 3-CH₂), 2.14, 2.17, 2.19 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.51 (t, J = 6.7 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 5.12 (s, 2H, 6-OCH₂), 7.15 (m, 5H, ArH); MS (CI, m/z): 355.232 M + H⁺, Calc. for C₂₇H₂₃O₄ 354.448.

A solution of 3.54 g (10mmol) of the above ether ester, in 20 ml of toluene and 10ml of CH₂Cl₂ was stirred with cooling from dry ice/acetone bath while 12 ml (18 mmol) of 25% disobutylaluminum hydride in toluene (Texas Alkyls) was added dropwise, over 10 min. After stirring at ca. -70° for 30 min, the reaction mixture was cautiously decomposed (-70°) with 10 ml of MeOH. Following the addition of 50 ml of water and 50 ml of 1N aqueous H₂SO₄ solution, the mixture was warmed to RT, and worked up with ether in the usual way giving 3.2 g (100%) of crude aldehyde ((+) S-6-Benzylxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbaldehyde) as a viscous oil which was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc in hexane. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) : 1.53 (s, 3H, 2a-CH₃), 2.11 (m, 2H, 3-CH₂), 2.24, 2.27, 2.29 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.481 (t, J = 6.7 Hz, 2H, 4-CH₂), 5.19 (s, 2H, 6-OCH₂), 7.20 (m, 5H, ArH), 9.6 (s, 1H, CHO); MS (CI, m/z): 325.332 M + H⁺, Calc. for C₂₁H₂₄O₃ 324.422.

A solution of 9.6g of pseudoionone was dissolved in 100 ml of 95% ethanol; after 0.68 g of sodium borohydride in ethanol had been added at room temperature, the mixture was stirred for 2 hr and then left standing overnight. The mixture was added to a solution of 2 g of sodium hydroxide in 500 ml of water. The mixture was extracted with ether, and the ether extract was washed

WO 01/58889

PCT/US01/04168

with water, dried, and concentrated. The distillation of the residual oil in vacuo gave a colorless oil (pseudoionol); bp 112-120°C/5mmHG. 7.7g (80%).

To a solution of 2.97g of pseudoionol in 10 ml of acetonitrile, there were added, under stirring and while the temperature was kept below 30°C, 4.53g of triphenylphosphine hydrochloride which had been obtained by passing dry hydrogen chloride into a solution of triphenylphosphine in dry ether. After the mixture had been left standing overnight at room temperature, the acetonitrile was removed under reduced pressure below 50°C. To the residue there were added 4.47 gm of (+) S-6-Benzoyloxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbaldehyde in 15 ml of dimethylformamide, and the mixture was stirred. When a clear solution was obtained, sodium methoxide prepared from 0.352 g of sodium and 7 ml of anhydrous methanol was stirred in, drop by drop below 15°C. The reaction mixture was turned red by the ylid formed. After the addition was complete, stirring was continued for 30 min at 10°C; then the mixture was gradually heated to 80°C, when the red color disappeared. The product was poured into 200 ml of 50% aqueous methanol, dried, and concentrated in vacuo. The residual oil was dissolved in 20 ml of ether, and an ethereal solution of mercuric chloride was added until no more precipitate formed. When the precipitate was filtered and the filtrate was washed with water, dried and concentrated, to give 4.7 g of yellow oil were obtained. The crude mixture of cis and trans alkene (MS (CI, m/z): 485.22, $M + H^+$, Calc. for $C_{34}H_{44}O_2$ 484.7255) was dissolved in 30 ml of ethyl acetate and 0.80 g of 5% palladium on carbon was added, and the mixture was shaken under 40 psi of H_2 for 30 hrs and then filtered through Celilte and rinsed well with

WO 01/58889

PCT/US01/04168

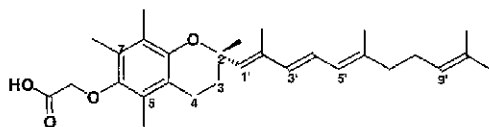
ethyl acetate. The filtrate was concentrated and purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc in hexane (1:9) to give 2,5,7,8-tetramethyl -(2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl))-6-chromanol (60% yield) ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.97 (m, 12H, 2a¹-, 6a¹-, 10a¹-, 11¹-CH₃), 1.1 - 1.7 (m, 20H, 2¹-, 6¹-,10¹-CH, 1¹-,3¹-4¹-,5¹-,7¹-,8¹-,9¹-CH₂, 2a-CH₃), 1.88 (m, 2H, 3-CH₂), 2.17, 2.19, 2.20 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.63 (t, J = 6.7 Hz, 2H, 4-CH₂); (MS (CI, m/z): 403.27, M + H⁺, Calc. for C₂₇H₄₆O₂ 402.6632.

A solution of 2,5,7,8-tetramethyl -(2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl))-6-chromanol (0.466 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. This yielded compound 17 in 76% yield. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.97 (m, 12H, 2a¹-, 6a¹-, 10a¹-, 11¹-CH₃), 1.2 - 1.7 (m, 20H, 2¹-, 6¹-,10¹-CH, 1¹-,3¹-4¹-,5¹-,7¹-,8¹-,9¹-CH₂, 2a-CH₃), 1.92 (m, 2H, 3-CH₂), 2.18, 2.20, 2.23 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 4.48 (s, 2H, OCH₂); MS (CI, m/z): 461.44, M + H⁺, Calc. for C₂₉H₄₈O₄ 460.700.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2,6,10-trimethyl-1,3,5,9-EZ
 decatetraen)chroman-6-yloxy) acetic acid (18)



5 To a solution of methyl (-)-(S)- 6-hydroxy-2,5,7,8-
 tetramethylchroman-2-carboxylate (20 gms 0.075mole) in 50ml of
 dry DMF, imidazole (13 gm, 0.1911mole), and tert-butyldimethyl-
 silylchloride (14 gm, 0.0933 mole) were added. The mixture was
 stirred at 23°C for 24 hr and then treated with ether and poured
 10 into 1N HCl. The organic extracts were dried (brine, Na₂SO₄) and
 concentrated in vacuo. The crude product was purified by flash
 chromatography (9:1 hexane :ethyl acetate) to yield 6-(dimethyl
 (1,1-dimethylethyl) silyl) - 2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-
 carboxylate (TBS protected methyl ester). . ¹H-NMR (CDCl₃/TMS,
 15 ppm) : 0.12(s, 6H), 1.102(s, 9H), 1.18 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 1.645
 (s, 3H), 2.07(s, 3H), 2.2 (t, J = 6.5hz 2H), 2.48-2.7 (m, 2H) and
 3.72(s,3H, OCH₃) (MS (CI, m/z): 379.32, M + H⁺, Calc. for C₂₁H₃₄O₄
 378.586.

A solution of 3.78 g(10mmol) of the above ether ester,
 20 in 20 ml of toluene and 10ml of CH₂Cl₂ was stirred with cooling
 from dry ice/acetone bath while 12 ml (18 mmol) of 25%
 diisobutylaluminum hydride in toluene (Texas Alkyls) was added
 dropwise, over 10 min. After stirring at ca. -70° for 30 min, the
 reaction mixture was cautiously decomposed (-70°) with 10 ml of
 25 MeOH. Following the addition of 50 ml of water and 50 ml of 1N
 aqueous H₂SO₄ solution, the mixture was warmed to RT, and worked

WO 01/58889

PCT/US01/04168

up with ether in the usual way giving 3.2g (90%) of crude aldehyde ((+)-S-6-(dimethyl(1,1-dimethylethyl)silyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbaldehyde) as a viscous oil which was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc in hexane.

5 Concentration of the solution followed by drying under vacuo for 48 h yielded TBDS aldehyde (78%) as a solid of mp 66-68°C. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) : 0.12(s, 6H), 1.1(s, 9H), 1.38 (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.16(s, 3H), 2.3-2.2 (m, 2H), 2.53 (m, 2H) and 9.82(d, J=1.4Hz, 1H); MS (CI, m/z): 349.40 M + H⁺, Calc. for

10 C₂₆H₃₂SiO₃, 348.560.

To a solution of 2.97 g of pseudoionol in 10 ml of acetonitrile, there were added, under stirring and while the temperature was kept below 30°C, 4.53 g of triphenylphosphine hydrochloride which had been obtained by passing dry hydrogen

15 chloride into a solution of triphenylphosphine in dry ether. After the mixture had then been left standing overnight at room temperature, the acetonitrile was removed under reduced pressure below 50°C. To the residue there were added 4.80 gm of ((+)-S-6-(dimethyl(1,1-dimethylethyl)silyl)-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-

20 carbaldehyde) in 15 ml of dimethylformamide, and the mixture was stirred. When a clear solution was obtained, sodium methoxide prepared from 0.352 g of sodium and 7 ml of anhydrous methanol was stirred in, drop by drop below 15°C. The reaction mixture was turned red by the ylid formed. After the addition was complete,

25 stirring was continued for 30 min at 10°C; then the mixture was gradually heated to 80°C, when the red color disappeared. The product was poured into 200 ml of 50% aqueous methanol, dried, and concentrated in vacuo. The residual oil was dissolved in 20 ml of ether, and an ethereal solution of mercuric chloride was added

WO 01/58889

PCT/US01/04168

until no more precipitate formed. When the precipitate was filtered and the filtrate was washed with water, dried and concentrated, to give 4.7 g of yellow oil were obtained. The crude silyl ether mixture of cis and trans alkene was dissolved in THF and tetra-n-butylammoniumfluoride (0.031mole) was added. After being stirred at 23°C for 40 minutes, the mixture was poured into water and extracted into ether. The ether extract was dried concentrated and purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc in hexane (1:9) to give 2,5,7,8-tetramethyl-2R- (2,6,10-trimethyl-1,3,5,9 E:Z decatetraen)- 6-chromanol (68% yield). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) : 1.28 (s, 3H, 2aCH₃), 1.65(s, 3H), 1.70(s,6H) 1.72 (s,3H), 1.9(m, 6H), 2.18 (s,3H), 2.35 (S, 6H), 2.53 (t, J = 6.6Hz, 2H, 4CH₂), 5.13 - 5.27 (m, 3H) and 6.44(m, 2H) ; MS (CI, m/z): 395.17 M + H⁺, Calc. for C₂₇H₃₈O₂ 394.60.

15 A solution of 2,5,7,8-tetramethyl-2R- (2,6,10-trimethyl-1,3,5,9 E:Z decatetraen)- 6-chromanol (0.457 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.2 g, 3.0 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated and dried in vacuo for 48 h. This yielded compound 18 in 67% yield. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) : 1.24 (s,

20

25

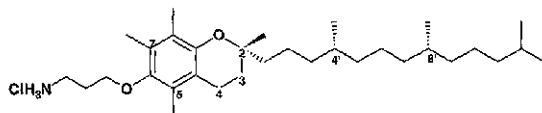
WO 01/58889

PCT/US01/04168

3H, 2aCH₃), 1.63(s, 3H), 1.72(s, 6H), 1.74 (s, 3H), 1.92(m, 6H), 2.18 (s, 3H), 2.29 (s, 6H), 2.43 (t, J = 6.6Hz, 2H, 4CH₂), 4.68 (s, 2H, OCH₂), 5.10 - 5.27 (m, 3H) and 6.34(m, 2H); MS (CI, m/z): 452.24 M - H⁺, Calc. for C₂₇H₃₈O₂ 452.63.

5

3-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propyl-1-ammonium chloride (19)



10 A solution of 3-bromopropylamine hydrobromide (1.0 g, 4.6 mmol) in a 2:1 dioxane/H₂O (45 mL) was cooled to 0 °C and treated with K₂CO₃ (6.22 g, 45 mmol) and di-tert-butyl dicarbonate (1.5 g, 6.9 mmol). The reaction was stirred for 15 h while warming to room temperature. The dioxane was removed in vacuo and the
15 remaining aqueous mixture was acidified with 5 N HCl and extracted with ethyl acetate (5 x 25 mL). The combined organic layers were dried with MgSO₄ and yielded 3-bromo-N-(tert-butoxycarbonyl)propylamine as a colorless oil (0.93 g, 93 %). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.41 (s, 9H, CH₃), 2.02 (quintet, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂), 3.23 (m, 2H, NCH₂), 3.41 (t, J = 6.6 Hz, CH₂Br), 4.8 (broad, 1H, NH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 28.3 (CH₃), 30.7, 32.6, 38.9 (CH₂), 79.3 (quaternary C), 155.9 (CO); MS (CI, m/z): 239, 241 (M + H⁺ Calc. for C₈H₁₆BrNO₂ 237.03644).

25 A solution of R,R,R-α-tocopherol (0.5 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (15 mL) was treated with 3-bromo-N-(tert-butoxycarbonyl)propylamine (0.9 g, 3.8 mmol) and an excess of

WO 01/58889

PCT/US01/04168

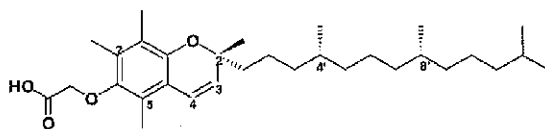
- powdered NaOH (0.32 g, 8 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and
- 5 brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc (10% v/v) in hexanes. This yielded desired ether as a colorless oil (0.45 g, 66%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 -
- 10 1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 1.99 (quintet, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂), 2.07, 2.14, 2.16 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.43 (m, 2H, NCH₂), 3.73 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.34 (s, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.7, 12.0, 12.9 (5a-, 7a-, 8a-
- 15 CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₂), 23.7 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 27.9 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.1 (CH₂), 70.2 (OCH₂), 74.8 (2-C), 117.5, 122.9, 125.5, 127.5 (aryl C), 147.5, 148.0 (aryl C-O), 156.0 (CO); MS (CI, m/z): 589 M + H⁺, Calc. for C₃₇H₆₅NO₄, 587.49136.
- 20 The above N-protected ether (0.1 g, 0.17 mmol) was dissolved 4 N HCl in dioxane (1 mL, 4 mmol) and stirred for 4 h. The dioxane was removed by blowing a stream of argon over the reaction mixture. The resulting material was dried in vacuo for 8 h yielding 19 as a white solid (82 mg, 99%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS,
- 25 ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 1.99 (quintet, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂), 2.07, 2.11, 2.15 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.29 (m, 2H, CH₂), 2.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.43 (m, 2H, NCH₂), 3.79 (m, 2H, OCH₂) ¹³C-NMR

WO 01/58889

PCT/US01/04168

(CDCl₃, ppm): 11.8, 11.9, 12.7 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.9 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 28.4 (CH₃), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 74.8 (OCH₂), 75.0 (2-C), 117.5, 122.9, 126.0, 127.3 (aryl C), 147.8, 148.0 (aryl C-O); HRMS (CI, m/z): 487.438887 (M + H⁺, Calc. for C₃₂H₅₇NO₂ 487.438935).

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)
chroman-3-ene-6-yloxy) acetic acid (20)



10

A solution of R,R,R- α -tocopherol acetate (2 g, 4.2 mmol) in anhydrous toluene (150 mL) was heated to reflux and then treated with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (0.96 g, 4.2 mmol) in 4 portions at 1 h intervals. The reaction was refluxed for 24 h. During this time the reaction mixture became a dark red color and then it precipitated a light colored solid. The reaction was cooled to room temperature, filtered, and the filtrate was concentrated. The resulting dark colored oil was purified by silica gel chromatography eluting with ethyl acetate (10%, v/v) in hexanes. This yielded the desired chromene acetate as a colorless oil (1.74g, 88%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 2.07, 2.13, 2.18 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃CO-), 5.61, 6.52 (2 x d, J = 10.0 Hz, 2H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.5, 11.6, 13.1 (5a-, 7a-, 8a-CH₃),

25

WO 01/58889

PCT/US01/04168

14.1 (CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.4, 21.4 (CH₃), 22.6, 22.7 (CH₃),
 24.4, 24.8 (CH₂), 25.8 (2a-CH₃), 27.9 (CH), 30.8 (3-CH₂), 32.7, 32.8
 (CH), 37.2, 37.4, 39.4, 41.0 (CH₂), 60.3 (2-C), 117.6, 119.7, 122.3,
 122.6, 128.9, 129.6 (aryl and vinyl C), 141.2, 148.4 (aryl C-O),
 5 169.4 (CO); HRMS (CI, m/z): 471.375799 M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₀O₃
 470.375996.

A solution of the chromene acetate (1.0 g, 2.13 mmol)
 in ethanol (20 mL) was treated with 2 N NaOH (20 mL) and stirred
 at 60 °C for 90 min. The reaction mixture was cooled, acidified
 10 with 5 N HCl, and the ethanol was removed in vacuo. The resulting
 aqueous solution was extracted with ether and concentrated to a
 light yellow oil that was purified by silica gel chromatography
 eluting with ethyl acetate (15%, v/v) in hexanes. This yielded the
 desired chromene-6-ol intermediate as a colorless oil (0.92 g, 98%).
 15 ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a⁻, 8a⁻, 12a⁻, 13⁻-
 CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4⁻, 8⁻, 12⁻-CH, 1⁻, 2⁻, 3⁻, 5⁻, 6⁻, 7⁻, 9⁻, 10⁻,
 11⁻-CH₂, 2a-CH₃), 2.14, 2.18, 2.19 (3 x s, 9H, 5a⁻, 7a⁻, 8a-CH₃),
 5.63, 6.55 (2 x d, J = 10.0 Hz, 2H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 10.8,
 11.6, 12.4 (5a⁻, 7a⁻, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.6,
 20 22.7 (CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 25.2 (2a-CH₃), 27.9 (CH), 30.9 (3-
 CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.5 (CH₂), 50.8 (2-C),
 116.2, 117.8, 120.1, 122.3, 123.0, 130.0 (aryl and vinyl C), 144.6,
 145.3 (aryl C-O), 169.4 (CO); HRMS (CI, m/z): 428.365275 M + H⁺,
 Calc. for C₂₉H₄₈O₂ 428.365431.

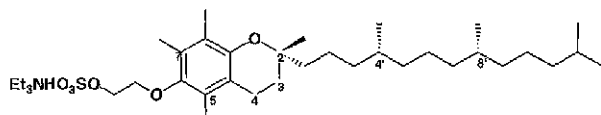
25 A solution of the chromene-6-ol intermediate (0.9 g, 2.1
 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl
 bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH
 (1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously
 for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N

WO 01/58889

PCT/US01/04168

HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting yellow liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated to a light yellow oil and dried in vacuo for 48 h. This yielded 19 as a colorless (0.90 g, 88%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a⁻, 8a⁻, 12a⁻, 13⁻-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4⁻, 8⁻, 12⁻-CH, 1⁻, 2⁻, 3⁻, 5⁻, 6⁻, 7⁻, 9⁻, 10⁻, 11⁻-CH₂, 2a-CH₃), 2.07, 2.10, 2.19 (3 x s, 9H, 5a⁻, 7a⁻, 8a-CH₃), 4.37 (s, 2H, OCH₂), 5.62, 6.50 (2 x d, J = 10.0 Hz, 2H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.3, 11.5, 12.9 (5a⁻, 7a⁻, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 25.6 (2a-CH₃), 27.9 (CH), 30.9 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.2, 37.4, 37.5, 39.3, 40.9 (CH₂), 60.5 (OCH₂), 69.1 (2-C), 118.0, 119.8, 122.8, 122.9, 129.6, 19.8 (aryl and vinyl C), 147.5, 147.8 (aryl C-O), 173.4 (CO); HRMS (CI, m/z): 487.378731 M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₁O₄ 487.378736.

2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)triethylammonium sulfate (21)

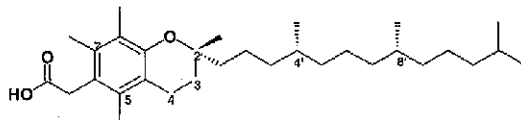


WO 01/58889

PCT/US01/04168

A solution of 2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy))ethan-1-ol (13) (0.1 g, 0.21 mmol) in anhydrous DMF (2 mL) and pyridine (0.6 mL) was treated sulfur trioxide-N,N-dimethylformamide complex (0.16 g, 1.0 mmol), and the resulting solution was stirred for 24 h. The reaction mixture was quenched with 1 N HCl and then extracted with CH₂Cl₂ (5 x 5 mL). Gaseous ammonia was bubbled through the CH₂Cl₂ solution for 10 min. The resulting solution was concentrated to a yellow paste and purified by silica gel chromatography eluting with MeOH (10%, v/v) and triethyl amine (2%) in CHCl₃. This yielded 21 as a yellow semi-solid (92 mg, 77%) ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 33H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 1.95 2.01, 2.05 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.45 (t, J = 6.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.05 (m, 6H, NCH₃), 3.79 (m, 2H, OCH₂), 4.21 (m, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 9.46 (CH₃), 12.4, 12.6, 13.5 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 20.3, 20.4 (CH₃), 21.3, 21.7 (CH₂), 23.3, 23.4 (CH₃), 24.5 (2a-CH₃), 25.1, 25.5 (CH₂), 28.6 (CH), 31.9 (3-CH₂), 33.3, 33.4 (CH), 37.9, 38.1, 40.0, 40.8 (CH₂), 46.9 (NCH₃), 67.4, 71.9 (OCH₂), 75.5 (2-C), 118.3, 123.5, 126.5, 128.3 (aryl C), 148.5 (aryl C-O); HRMS (CI, m/z): 554.364102 M - NH₃, Calc. for C₃₁H₅₄O₆S 554.364119.

25 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman)acetic acid (22)



WO 01/58889

PCT/US01/04168

A solution of R,R,R- α -tocopherol (1.0 g, 2.3 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (25 mL) was cooled to 0 °C. Diisopropylethyl amine (2 mL, 11.6 mmol) was added followed by the dropwise addition of trifluoromethylsulfonic anhydride (5.0 g, 17.7 mmol). The solution turned to a dark immediately and was allowed to warm to room temperature while stirring for 24 h. The reaction was quenched with H_2O and then was extracted with diethyl ether (2 x 100 mL). The combined ether layers were washed with 1 N HCl (50 mL), H_2O (50 mL), brine (50 mL), and then dried with MgSO_4 . The ether solution was concentrated to a yellow oil and purified by silica gel chromatography eluting with ethyl acetate (3%, v/v) in hexane. This yielded the desired triflate intermediate as a yellow oil (1.3 g, quantitative). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3/TMS , ppm): 0.87 (m, 12H, 4a', 8a', 12a', 13'- CH_3), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4', 8', 12'-CH, 1', 2', 3', 5', 6', 7', 9', 10', 11'- CH_2 , 2a- CH_3), 1.81 (m, 2H, 3- CH_2), 2.07, 2.13, 2.21 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a- CH_3), 2.62 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, 4- CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 11.9, 13.2, 14.0 (5a-, 7a-, 8a- CH_3), 19.6, 19.7 (CH_3), 20.6, 21.0 (CH_2), 22.6, 22.7 (CH_3), 23.8 (2a- CH_3), 24.4, 24.8 (CH_2), 28.0 (CH), 31.2 (3- CH_2), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH_2), 75.6 (2-C), 118.4, 124.4, 126.7, 128.1 (aryl C), 139.6, 150.9 (aryl C-O); $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): -73.52; HRMS (CL m/z): 563.337803 ($\text{M} + \text{H}^+$, Calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{F}_3\text{S}$ 563.338192).

A solution of the triflate (1.3 g, 2.31 mmol) in anhydrous DMF (23 mL) was treated with LiCl (0.98 g, 4.62 mmol), triphenylphosphine (0.37 g, 1.4 mmol), 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (2-3 crystals), tributyl(vinyl)tin (0.73 g, 2.31 mmol), and dichlorobis(triphenylphosphine)-palladium(II) (0.24 g, 0.35 mmol). This mixture was heated to 120 °C and stirred. After 2h, additional tributyl(vinyl)tin (0.73 g, 2.31 mmol). After 8 h, the

WO 01/58889

PCT/US01/04168

- reaction was cooled to room temperature and added to a mixture of H₂O (50 mL) and diethyl ether (50 mL). The ether layer was washed with 1 N HCl (6 x 30 mL) and a saturated solution of KF (6 x 30 mL). The ether solution was dried with Na₂SO₄ and then concentrated to a dark oil. This material was purified by silica gel chromatography eluting with ethyl acetate (3%, v/v) in hexane yielding the 6-vinylchroman intermediate as a clear oil (0.38 g, 38%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH₂, 1'-,2'-,3'-,5'-,6'-,7'-,9'-,10'-,11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.86 (m, 2H, 3-CH₂), 2.20, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.62 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 5.18, 5.56 (2 x dd, J_{gem} = 2.3 Hz, J_{cis} = 11.2 Hz, J_{trans} = 18.7 Hz, 2H, =CH₂), 6.77 (dd, J = 18.7, 11.2 Hz, 1H, CH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.9, 16.3, 17.2 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.7, 19.8 (CH₃), 20.8, 21.1 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.9 (2a-CH₃), 24.5, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.5, 37.5, 39.4, 40.1 (CH₂), 74.9 (2-C), 116.7, 119.0, 122.0, 129.8, 131.2, 132.8, 136.8 (aryl/vinyl C), 150.9 (aryl C-O); HRMS (CI, m/z): 440.401602 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₃₂O 440.401812).
- A solution of the 6-vinylchroman intermediate (0.12 g, 0.27 mmol) in anhydrous THF (1 mL) was cooled to 0 °C and treated with 9-BBN (0.60 mL, 0.5 M in THF, 0.3 mmol). The reaction mixture was heated to reflux for 8 h. The reaction was quenched with water (1.5 mL) and treated with NaBO₃·4H₂O and the resulting slurry was stirred overnight. Diethyl ether (4 mL) and the reaction mixture were extracted with CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). The organic layers were concentrated to a clear oil that was purified by silica gel chromatography eluting with ethyl acetate (50%, v/v) in hexane. This yielded the desired 6-(2-hydroxyethyl)chroman intermediate as

WO 01/58889

PCT/US01/04168

a colorless oil (30 mg, 24 %). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂), 2.17, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.01 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-CH₂), 3.74 (t, J = 7.5 Hz, 2H, OCH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 12.0, 15.1, 16.0 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 62.2 (OCH₂), 72.6 (2-C), 116.8, 122.3, 124.9, 132.4, 133.9 (aryl C), 150.1 (aryl C-O); HRMS (CI, m/z): 458.412154 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₄O₂ 458.412384).

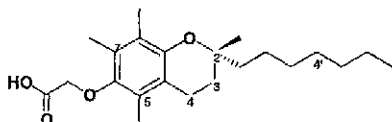
A solution of pyridinium chlorochromate (32 mg, 0.1 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.5 mL) was treated with a solution of the 6-(2-hydroxyethyl)chroman intermediate (32 mg, 0.07 mmol) in CH₂Cl₂ (0.5 mL). The reaction was stirred for 2 h at which time no starting material was visible by thin layer chromatography. Diethyl ether (2 mL) was added and the resulting solution was filtered through a thin pad of celite. The filtrate was concentrated and yielded a yellow oil (20 mg). This oil was dissolved in t-BuOH (0.5 mL) and treated with phosphate buffer (0.5 mL, 1 N, pH = 4.0), 2-methyl-2-butene (0.1 mL) and NaClO₂ (5.4 mg, 0.05 mmol). After stirring for 40 min, the reaction mixture was extracted with CHCl₃ (6 x 10 mL) and the combined organic layers were dried with Na₂SO₄. The CHCl₃ solution was concentrated to a yellow oil that was purified by preparative thin layer chromatography eluting with ethyl acetate (30%, v/v) and acetic acid (1%) in hexanes. This yielded 2.2 as colorless oil (20 mg, 63%). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.87 (m, 12H, 4a'-, 8a'-, 12a'-, 13'-CH₃), 1.0 - 1.6 (m, 24H, 4'-, 8'-, 12'-CH, 1'-, 2'-, 3'-, 5'-, 6'-, 7'-, 9'-, 10'-, 11'-CH₂, 2a-CH₃), 1.81 (m, 2H, 3-CH₂),

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2.17, 2.24, 2.28 (3 x s, 9H, 5a-, 7a-, 8a-CH₃), 2.66 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-CH₂), 3.71 (s, 2H, CH₂COOH); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 12.0, 15.3, 16.2 (5a-, 7a-, 8a-CH₃), 19.6, 19.7 (CH₃), 20.6, 21.0 (CH₂), 22.6, 22.7 (CH₃), 23.8 (2a-CH₃), 24.4, 24.8 (CH₂), 28.0 (CH), 28.9, 31.2 (3-CH₂), 32.7, 32.8 (CH), 37.3, 37.4, 37.5, 39.4, 40.0 (CH₂), 72.6 (2-C), 117.1, 122.2, 124.9, 132.4, 132.7 (aryl C), 150.2 (aryl C-O), 179.2 (COOH); HRMS (CI, m/z): 472.391583 (M + H⁺, Calc. for C₃₁H₅₂O₃ 472.391644).

10 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(heptyl)-chroman-6-yloxy)acetic acid (23)



A solution of hexyltriphenylphosphonium bromide (0.880g, 2.05mmol) in 11.2 ml of anhydrous DME was stirred at room temperature while 0.86 ml (2.06mmol) of 2.4 M n-butyllithium in hexane was added. The resulting red solution was stirred for 2h at room temperature, then a solution of ((+)-S-6-Benzoyloxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbaldehyde (306 mg, 0.944 mmol) in 3 ml of anhydrous DME was added and stirring was continued for 3 h at 65-75°C. After cooling, the reaction mixture was poured into cold dilute H₂SO₄ and work up ether was carried out in the usual manner. The ether was concentrated in vacuo to afford the oily material. Product was isolated using column chromatography and eluted with chloroform to yield 46% of the product. The mixture of cis and trans alkene was dissolved in 30 ml of ethyl acetate and 50 mg of 5% palladium on carbon was added,

WO 01/58889

PCT/US01/04168

and the mixture was shaken under 40 psi of H_2 for 10 hrs and then filtered through Celite and rinsed well with ethyl acetate. The filtrate was concentrated and purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc in hexane (1:9) to give (2R) 2,5,7,8-tetramethyl-2-(heptyl)-6-chromanol (60% yield) 1H -NMR ($CDCl_3$ /TMS, ppm): 0.89 (s, 3H), 1.3-1.5 (m, 15H), 1.89 (m, 2H), 2.2 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), and 2.48 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H); MS (CI, m/z): 305.35 $M + H^+$, Calc. for $C_{26}H_{32}O_2$ 304.4746).

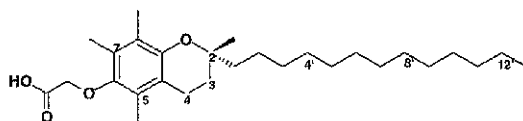
A solution of 2,5,7,8-tetramethyl-2-(heptyl) chromanol (0.353 g, 1.16 mmol) in N,N -dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined ether layers were washed with H_2O (3 x 30 mL) and brine (1 x 30 mL), and then dried with Na_2SO_4 . The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting liquid was dissolved in diethyl ether (30 mL), washed with H_2O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na_2SO_4 . The resulting solution was concentrated and dried in vacuo for 48 h. This yielded compound 23 in 36% yield. 1H -NMR ($CDCl_3$ /TMS, ppm): 1H -NMR ($CDCl_3$ /TMS, ppm): 0.88 (s, 3H), 1.2-1.5 (m, 15H), 1.88 (m, 2H), 2.1 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.2 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H) and 4.78 (s, 2H); HRMS (CI, m/z): 363.2535 ($M + H^+$, Calc. for $C_{32}H_{38}O_4$ 363.2541).

WO 01/58889

PCT/US01/04168

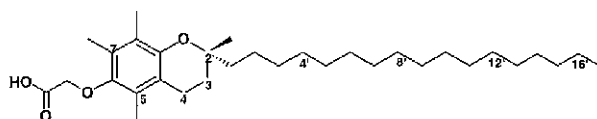
2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(tridecyl)____chroman-6-yloxy)acetic acid (24)

The compounds 24 and 25 were synthesized in manner identical to the synthesis of 23 using appropriate phosphonium bromide.



¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.83 (s, 3H), 1.25-1.57 (m, 27H), 1.88 (m, 2H), 2.1 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.20(s, 3H), 2.55 (t, J =6.6 Hz, 2H) and 4.48 (s, 2H) ; MS (CI, m/z): 447.14 M + H⁺, Calc. For C₂₈H₄₆O₄ 446.6732.

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(heptadecyl)____chroman-6-yloxy)acetic acid (25)



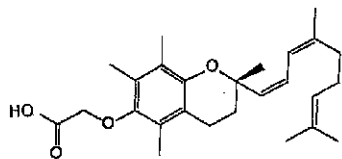
¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 0.86 (s, 3H), 1.15-1.67 (m, 35H), 1.88 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.23(s, 3H), 2.55 (t, J =6.4 Hz, 2H) and 4.78 (s, 2H) ; MS (CI, m/z): 503.45 M + H⁺, Calc. For C₃₂H₅₄O₄ 502.781.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4,8-dimethyl-1,3,7
nonotrien)-chroman-6-yloxy)-acetic acid (26) EZ

5

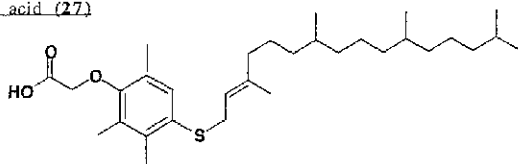


Compound **26** was synthesized in a manner identical to the synthesis of compound **18** using nerol instead of pseudoionol.

¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) : 1.24 (s, 3H, 2aCH₃), 1.63(m, 1H), 1.68 (s,3H), 1.74(s,6H), 1.92(m, 6H), 2.18 (s,3H), 2.29 (S, 6H), 2.43 (t, J = 6.6Hz, 2H, 4CH₂), 4.68 (s, 2H, OCH₂), 5.64(m, 2H) and 5.27 (m, 1H) ; MS (CI, m/z): 413.24 M +H⁺, Calc. for C₂₆H₃₆O₄ 412.0115.

EZ, RS, RS, RS-(phytyl(trimethylphenylthiol-6-yloxy)
acetic acid (27)

20



2,3,6-trimethylphenol (1.6 g, 11.8 mmol) was dissolved in 50 mL of anhydrous methanol which had been deoxygenated by bubbling with nitrogen. Ammonium thiocyanate (2.2 g, 28.9 mmol) was added to this solution which was then cooled to 0 °C and bubbled with chlorine gas. The initially colorless homogeneous solution becomes pink and then green with the formation of a white precipitate. The solution was stirred for 1 h at 0 °C and then for a further hour at 20 °C. The dissolved chlorine was removed by

WO 01/58889

PCT/US01/04168

bubbling with nitrogen and the precipitate removed by filtration. Evaporation of the filtrate under reduced pressure followed by drying under high vacuum (0.1 torr) yielded 2.20 g (97%) of 2,3,5-Trimethyl-4-hydroxyphenylthiocyanate in a form pure enough for the next step in the synthesis. An analytical sample was recrystallized from hexanes : white crystals, mp 100.3 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.2 (s, 1 H), 5.0 (s, 1 H) 2.4 (s, 3 H), 2.2 (s, 6 H).

2,3,5-Trimethyl-4-hydroxyphenylthiocyanate (2 g, 10.35 mmol) was dissolved in 100 mL of anhydrous ether containing 2.5 mL of anhydrous tetrahydrofuran. This solution was added dropwise over 1 h to 100 mL of anhydrous ether containing LiAlH₄ (0.9 g, 24 mmol) at room temperature. After a further hour at 20 °C, the unreacted LiAlH₄ was destroyed by cooling the heterogeneous mixture to 0 °C and adding moist ether (50 mL), H₂O (50 mL), and 1 N HCl (50 mL). A further 50 mL of water was added and the organic phase was separated and washed with water (2 x 50 mL), NaHCO₃ solution (2 x 50 mL), water (2 x 50 mL), and saturated NaCl (50 mL). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and filtered and the solvent removed under reduced pressure. Silica gel column chromatography with 5% ethyl acetate in hexane gave 1.8 g (90%) of 2,3,5-trimethyl-4-hydroxybenzenethiol as a white powder, mp 86 °C (Lit. ¹ mp 86 °C).

Solution of 2,3,5-trimethyl-4-hydroxybenzenethiol (3 g, 17.83 mmol), isophytol (4.8 g, 16.19 mmol), anhydrous zinc chloride (1.2 g, 8.8 mmol) and 0.2 mL of glacial acetic acid in 30 mL of absolute ether was refluxed for 1 h. The solvent was then removed in vacuo at 50 °C and the red oil obtained was dissolved in a mixture of 50 mL of petroleum ether and 20 mL of 70% aqueous methanol. The ether layer was dried (Na₂SO₄) and evaporated in

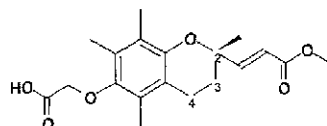
WO 01/58889

PCT/US01/04168

vacuo to give a red oil, which was purified by silica gel chromatography eluting with hexans:ether (9:1) to give 3g(38%) E,Z, RS, RS, RS-Phytyltrimethylhydroxybenzenethiol as yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.11 (s, 1 H, Ar-H), 5.23 (t, 1 H, vinylic-H), 4.62 (s, 1 H, OH), 3.34 (d, 2 H, Ar-S-CH₂-), 2.41 (s, 3 H, Ar-CH₃), 2.19 (s, 3 H, Ar-CH₃), 2.18 (s, 3 H, Ar-CH₃), 0.83-1.92 (m, 39 H, Phytol chain).

A solution of phytyltrimethylhydroxybenzenethiol (3g, 6.7 mmol) in N,N-dimethyl-formamide (80 mL) was treated with methyl bromoacetate (7.4 g, 48.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (7 g, 175 mmol). The resulting pink oil was stirred at RT for 24 h. The reaction mixture was acidified with 5 N HCl and extracted with ether (3 x 150 mL). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 150 mL) and brine (1 x 150 mL), and then dried (Na₂SO₄). The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 20% EtOAc in hexane to give 3 g (88%) of E,Z, RS, RS, RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-yloxy)acetic acid as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.90 (s, 1 H, COOH), 8.08 (s, 1 H, Ar-H), 5.30 (t, 1 H, vinylic-H), 4.35 (s, 2 H, CH₂COOH), 3.42 (d, 2 H, Ar-S-CH₂-), 2.34 (s, 3 H, Ar-CH₃), 2.25 (s, 3 H, Ar-CH₃), 2.22 (s, 3 H, Ar-CH₃), 0.83-1.94 (m, 39 H, Phytol chain). HRMS (CI, m/z): 504.362821(M+H⁺, Calc. for C₃₁H₅₃O₃S 504.363718).

(R)-2((2,5,7,8-tetramethyl-2-(3 propene methyl ester) chroman-6-yloxy)acetic acid (28)



WO 01/58889

PCT/US01/04168

To a slurry of (carbomethoxymethyl)triphenyl phosphonium bromide (1.8 gm, 4.32 mmol) in 12 ml of THF at °C was added 1.66 ml of n-BuLi (2.5M in hexane) dropwise. The resulting solution was removed to room temperature for 2h, and then a solution of (+)S-6-(dimethyl(1,1-dimethylethyl)silyl)-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carbaldehyde (1.31g, 3.76 mmol) in 7 ml THF was added via cannula. The solution was stirred at room temperature for 44hr and then 10 ml of 1N aq. HCl was added. The layer were separated and then aq. phase was extracted with ether (3 X 15 ml). The combined organic layer were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and filtered. After concentration of the filtrate, the crude alkene was purified by flash chromatography eluting with dichloromethane to give mixture of the cis and trans alkene in 93% yield. The silyl ether mixture of cis and trans alkene (3.76mmol) was dissolved in THF and tetra-n-butylammoniumfluoride (0.041mole) was added. After being stirred at 23°C for 1.5h, the mixture was poured into water and extracted into ether. The ether extract was dried concentrated and purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc in hexane (3:7) and both the cis and trans isomer of 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(3'propenemethyl ester)-6-chromanol were isolated and characterized (68% yield) ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.65 (s, 3H, 2a CH₃), 2.12 (m, 2H, 3CH₂), 2.39 (s, 9H, CH₃), 2.48 (m, 2H, 4 CH₂), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 6.11 (d, 1H, CH=) and 7.13 (d, 1H, CH=).

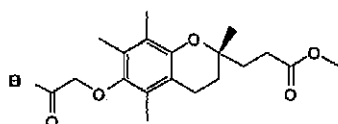
A solution of 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(3'propene methyl ester)6-chromanol (0.353 g, 1.16 mmol) in N,N-dimethylformamide (20 mL) was treated with methyl bromoacetate (3.4 g, 8.3 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.2 g, 30 mmol). The resulting yellow slurry was stirred vigorously for 24 h at room temperature.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

The reaction was acidified with 5 N HCl and extracted with diethyl ether (3 x 30 ml). The combined ether layers were washed with H₂O (3 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), and then dried with Na₂SO₄. The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with 19% (v/v) EtOAc and 2% acetic acid in hexanes. The resulting liquid was dissolved in diethyl ether (30 ml), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), and then dried with Na₂SO₄. The resulting solution was concentrated and dried in vacuo for 48 h. This yielded compound 28 in 40% yield. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.68 (s, 3H, 2a CH₃), 2.11 (m, 2H, 3CH₂), 2.36 (s, 9H, CH₃), 2.56 (m, 2H, 4 CH₂), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.78 (s, 2H, OCH₂), 6.03 (d, 1H, CH=) and 7.03 (d, 1H, CH=); MS (CI, m/z): 337.24 M+H⁺, Calc. for C₁₈H₂₄O₅ 336.3867.

2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(propionate)-chroman-6-yloxy)acetic acid (29)



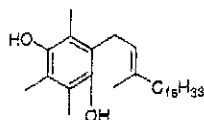
The mixture of cis and trans alkene 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(3 propene methylester)-6-chroman-6-ol was dissolved in 30 ml of ethyl acetate and 50 mg of 5% palladium on carbon was added, and the mixture was shaken under 40 psi of H₂ for 24 hrs and then filtered through Celite and rinsed well with ethyl acetate. The filtrate was concentrated and purified by silica gel chromatography eluting with EtOAc in hexane (1:9) to give compound # 29. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm): 1.62 (s, 3H, 2a CH₃), 2.0-2.3 (m, 6H, CH₂), 2.41

PCY/US01/D4168

5

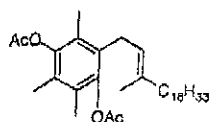
EXAMPLE 3

Phytyltrimethylhydroquinone (31)



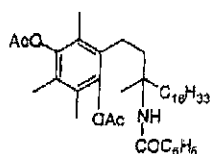
30

3



15

20



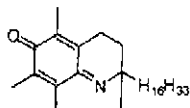
25

WO 01/58889

PCT/US01/04168

saturated sodium bicarbonate solution, dried (Na_2SO_4) and evaporated *in vacuo*. The crude product (21 g) was chromatographed on silica gel eluting with petroleum ether:ether (9:1). The unchanged benzonitrile was first removed. Elution with ether then afforded 11 g (88%) of product that was crystallized from petroleum ether to give analytical sample (33) m.p. 90-92 ° C (lit. 94-95 ° C).

2,5,7,8-Tetramethyl-2(4,8,12-trimethyltridecyl)-3,4-dihydroquinolin-6(2H)-one (37)



To a solution of the diacetate (33, 13 g, 20.4 mmol) in 60 mL of methanol, solid potassium hydroxide (11 g) was added and the mixture was refluxed under argon for 45 min. After cooling, the solution was diluted with ice-water (100 mL), and extracted under carbon dioxide with ether (3 x 100 mL) yielding 10 g (88%) of crude hydroquinone (34).

A solution of this product (34, 10 g, 18.1 mmol) in absolute ether (110 mL) was added dropwise with stirring during 20 min. to a suspension of lithium aluminum hydride (20 g, 527 mmol) in absolute ether (110 mL). The mixture was refluxed for 14 h and then hydrolyzed under carbon dioxide by the dropwise addition of methanol (10 mL) followed by 3N hydrochloric acid (30 mL). After extraction with ether (3 x 200 mL), the crude solid benzylamino derivative (35, 8.4 g, 86%) was obtained.

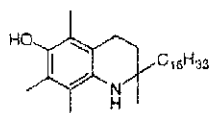
WO 01/58889

PCT/US01/04168

This material (35, 8.4 g, 15.6 mmol) was dissolved in glacial acetic acid (120 mL) and hydrogenated at 50 ° C and atmospheric pressure in the presence of 2 g of palladium on charcoal (5%) at room temperature for 22 h (or until the hydrogen absorption ceased). After cooling, the catalyst was filtered off, and the solution was diluted with water (50 mL), extracted with ether (3 x 80 mL) and dried (Na₂SO₄).

To this dry and neutral ether solution of 36 was added fresh silver oxide (2.1 g, 8.93 mmol), and the suspension was stirred for 14 h. After filtration under argon and evaporation, 4 g of the crude iminoquinone (37) was obtained, which was chromatographed on silica gel eluting with hexanes:ether (200:1) to yield 2.4 g (63%) of pure yellow oil. HMRS (CI, m/z): 428.389883 (M + H⁺, Calc. For C₂₉H₄₉NO 428.389241).

1-Aza- α -tocopherol (38)

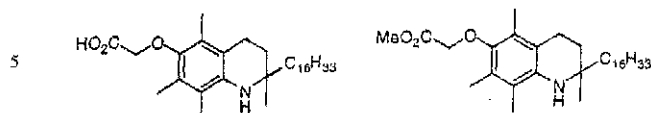


The iminoquinone (37, 1.34 g, 3.133 mmol) in 10 mL of ether was hydrogenated at room temperature and atmospheric pressure in the presence of 190 mg of Lindlar's catalyst. After 20 h, the catalyst was filtered off under argon and the filtrate was evaporated *in vacuo* to give 810 mg (60%) of crude red oil, which was used in the next step without further purification.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

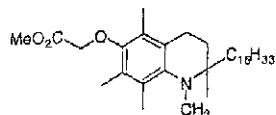
1-Aza- α -tocopherol-6-yloxy-acetic acid (39) and 1-Aza- α -tocopherol-6-yloxy-methyl acetate (40)



A solution of 1-Aza- α -tocopherol (38, 800 mg, 1.86 mmol) in DMF (30 mL) was treated with methyl bromoacetate (2.1 g, 13.4 mmol) and an excess of powdered NaOH (1.9 g, 48.4 mmol). The resulting yellow suspension was stirred vigorously for 24 h at room temperature. The reaction mixture was acidified with 5N HCl to pH6, and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined ether layers were washed with water (3 x 40 mL), brine (1 x 40 mL), and then dried (Na₂SO₄). The ether solution was concentrated to a yellow oil that was purified by silica gel chromatography eluting with CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (97:2:1) to give 300 mg (33%) of sticky yellow solid (39). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm) 4.30 (s, 2H, OCH₂), 3.30 (s, 1H, NH), 2.59 (t, 2H, Ar-CH₂), 2.18 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.12 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.00 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.80-0.84 (m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃ and phytol chain); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 12.01, 12.77, 12.96, 19.60, 19.67, 19.72, 21.09, 22.60, 22.71, 24.42, 24.79, 26.56, 27.95, 32.11, 32.74, 37.26, 37.37, 37.42, 37.55, 37.65, 39.34, 41.36, 50.92, 69.50 (aliphatic C), 117.69, 118.55, 125.99, 126.39, 138.07, 146.05 (Ar-C), 173.18 (COOH); (HRMS (CI, m/z): 488.411055 (M + H⁺, Calc for C₃₁H₅₃NO₃ 488.410370) and 150 mg (17%) of yellow oil (40). ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) 4.31 (s, 2H, OCH₂), 3.85 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.32 (s, 1H, NH), 2.61 (t, 2H, Ar-CH₂), 2.23 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.17 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.01 (s, 3H, Ar-CH₃),

PCY/US01/D4168

1-Aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy-methyl acetate



63

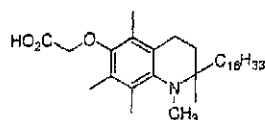
WO 01/58889

PCT/US01/04168

19.68, 20.93, 22.57, 22.66, 22.88, 24.35, 24.74, 25.33, 25.37, 27.90, 32.59, 32.71, 37.23, 37.33, 37.51, 37.63, 38.49, 39.06, 39.29, 51.14, 69.57 (aliphatic C), 125.34, 126.36, 127.42, 130.32, 143.89, 150.33 (Ar-C), 169.73 (C=O). The compound **41** was used in the next step without further purification.

1-Aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy)-acetic acid (**42**)

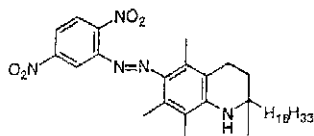
10



To the mixture of the ester (**41**, 740 mg, 14.34 mmol) in ethanol (34 mL) was added dropwise 2N NaOH (9 mL, 10eq. 14.34 mmol). After stirring the light yellow solution at room temperature for 4h, the reaction mixture was acidified with 2N HCl to pH6, and then extracted with EtOAc (3 x 100 mL) and the combined organic layers were washed with water (2 x 100 mL), brine (1 x 100 mL), dried (MgSO₄), and evaporated to give a light yellow oil. The oil was chromatographed over silica gel eluting with 1% HOAc, 30% EtOAc in hexans to give 650 mg (90%) of the product (**42**) as a colorless oil. ¹H-NMR (CDCl₃/TMS, ppm) 10.43 (s, 1H, CO₂H), 4.37 (s, 1H, OCH₂), 2.51 (t, 2H, Ar-CH₂), 2.43 (s, 3H, NCH₃), 2.22 (Ar-CH₃), 2.12 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.81-0.80 (m, 38H, Ar-CH₂CH₂, NCCH₃ and phytyl chain); ¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 11.77, 13.18, 14.28, 19.68, 19.73, 20.80, 20.96, 22.62, 22.72, 23.00, 24.00, 24.41, 24.80, 25.37, 27.80, 32.77, 37.28, 37.30, 37.74, 38.00, 39.00, 39.35, 54.69, 69.17 (aliphatic C), 125.11, 126.55, 127.20, 130.63,

PCY/US01/D4168

5 6-(2,4-Dinitrophenylazo(2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (43)



2,4-dinitrophenylhydrazine (1.95 g, 9.82 mmol) was dissolved in 34 mL of hot absolute ethanol and 3.4 mL of concentrated sulfuric acid was carefully added. The hot red solution was cooled to room temperature and the iminoquinone (37, 1.00 g, 2.34 mmol) in 12 mL of absolute ethanol was added with stirring. The mixture was allowed to stand at room temperature for 70 h, then diluted with 120 mL of water and extracted with ether (3 x 100 mL). The combined ether extracts were washed neutral with water (6 x 100 mL), dried (NaSO₄), and evaporated *in vacuo* to give 2.9 g of a partly crystalline dark violet mass. This product was chromatographed over silica gel eluting with 5% ether in petroleum ether to yield 1.35 g (95%) of violet crystals (**43**), m.p. 72-73 °C (lit.¹ 73-75). **HRMS** (CI, m/z): 608.417199 (M + H⁺, Calc. For C₃₅H₅₃N₅O₄ 608.417581).

WO 01/58889

PCT/US01/04168

EXAMPLE 4Cell Culture Conditions

5 All test cell lines were cultured at 37°C in 5% CO₂ in standard media supplemented with fetal calf serum, using established standard conditions. Plastic adherent cells were disassociated with trypsin, washed, counted, and used directly in experiments. All cells were examined routinely to verify no mycoplasma contamination.

10

EXAMPLE 5Solubility and Dilution of Novel Tocopherol and Tocotrienol15 Compounds

All compounds were handled as if they were light sensitive (photodegradable). All compounds were initially dissolved in absolute ethanol and subsequently diluted to a final concentration of 0.5% ethanol with the appropriate media.

20

EXAMPLE 6Determination of Effective Concentration (EC₅₀) to Induce Apoptosis

25 Whereas the parental non-structurally modified forms of tocopherols do not exhibit effective apoptotic properties against a battery of tumor cells, fifteen out of twenty-nine RRR- α -tocopherol compounds and two out of five 1-aza- α -tocopherol analogs, structurally modified via ether linked moieties of different

WO 01/58889

PCT/US01/04168

composition and size were extremely effective at inducing tumor cells to undergo apoptosis while having no apoptotic inducing properties on normal cells. Compounds 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 39, and 42 exhibit effective growth inhibitory (apoptotic inducing) properties specific for human cancer cells from a wide variety of cell lineages, including (i) breast (estrogen responsive Michigan Cancer Foundation human breast cancer cell line number 7, MCF-7 McGuire; non-estrogen responsive M.D. Anderson metastatic breast human cancer cell line, MDA-MB-435; and, estrogen non-responsive M.D. Anderson metastatic human breast cancer cell line, MDA-MB-231); (ii) prostate (androgen responsive human prostate cancer cell line, LnCaP and the androgen non-responsive human prostate cancer cell line, PC-3 and the DU-145 cell line); (iii) promyelocytic leukemia cells (human Promyelocytic Leukemia Cell Line, HL-60), lymphoid cell lines Jurkat and HL-60; (iv) cervical (human cervical cancer cell line, ME-180); (v) ovarian (human ovarian cancer cell line, C-170 cells); (vi) endometrial (human endometrial cancer cell line, RL-95-2 cells); (vii) colon cell lines DLD-1; and (viii) lung cell line A-549. Normal primary breast cells (normal primary early passage human mammary epithelial cells, HMEC) and immortalized, non-tumorigenic mammary cells (Michigan Cancer Foundation immortalized but non-tumorigenic human mammary number 10A cells, MCF-10A) do not undergo apoptosis when cultured with the above pharmacodynamically designed forms of tocopherol.

The effective therapeutic dose of novel reagents for controlling cancer growth is referred to as the growth inhibitory concentration (IC_{50}) or effective concentration (EC_{50}) that blocks 50% cancer growth via DNA synthesis inhibition, cell cycle blockage

WO 01/58889

PCT/US01/04168

and/or cell death. The apoptotic EC_{50} for a battery of test cancer cells for the twenty-nine novel RRR- α -tocopherol compounds and two of the five 1-aza- α -tocopherol analogues of this invention are presented in Tables 1 and 2.

TABLE 1
Apoptosis Induced by Novel Tocopherol Compounds (ec₅₀ range $\mu\text{g/ml}$)

Cell Type	YES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Breast Cancer																
HMEC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MCF-10A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MDA-MB-435	5-10	5-10	10-20	5-10	N	N	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	20-30
MDA-MB-231	5-10	5-10	10-20	5-10	N	N	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	20-30
MCF-7	10-20	5-10	20-30	20-30	N	N	10-20	10-20	10-20	10-20	N	5-10	N	5-10	N	20-30
T47D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cervical																
ME-180	10-20	1-5	5-10	10-20	N	N	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	N
Qvadin	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C-1270	N	10-20	10-20	10-20	N	N	10-20	10-20	10-20	10-20	N	N	10-20	N	N	N
Endometrial																
RL-95-2	10-20	10-20	10-20	10-20	N	N	5-10	1-5	5-10	5-10	N	N	5-10	N	N	N
Prostate																
PREC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
LNCaP	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	2-5	5-10	5-10	5-10	N	N	>20-30	N	N	N
PC-3	10-20	5-10	5-10	5-10	N	N	5-10	5-10	5-10	5-10	N	N	10-20	N	N	N
DJ-145	10-20	5-10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Skin																
H1-29	5-10	10-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
DL0-1	10-20	10-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lung																
A-549	20-30	19-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lymphoid Cells																
Myeloma	10-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Raji	10-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ramos	10-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Jurkat	10-20	19-20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
HL-60	10-20	5-10	10-20	10-20	N	N	N	5-10	10-20	10-20	N	N	20-30	N	N	N

EC₅₀, 50 μ g/ml of neoprol compounds 1-39 inducing 50% apoptosis; N = No apoptosis when treated for 2 days with 140 EC₅₀ μ g/ml of neoprol compounds 1-39; NT = Not tested; * compounds exhibiting toxicity.

WO 01/58589

PCT/US01/04168

TABLE 2
Apoptosis Induced by Novel Tocopherol Compounds (ec₅₀ range μ g/ml)

Cell Type	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	39	42	43
Breast Cancer																	
HMEC	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MCF-10A	NT	NT	NT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
MDA-MB-435	N	N	N	10-20	10-20	N	N	N	N	N	20-40	NT	NT	NT	NT	10-20	PPT
MDA-MB-231	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MCF-7	N	10-20	N	10-20	5-10	N	15-20	N	N	N	N	10-20	NT	NT	NT	NT	NT
T47D	NT	10-20	NT	N	5-10	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Cervical																	
ME-180	NT	20-30	N	1-5	1-5	1-5	NT	NT	NT	NT	*	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ovarian																	
C-170	NT	20-30	N	1-5	*	N	NT	NT	NT	NT	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Endometrial																	
RL-95-2	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Prostate																	
PREC	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
IntCap	NT	10-20	NT	5-10	5-10	N	NT	NT	N	N	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT
PC-3	NT	NT	NT	N	5-10	N	NT	N	N	N	20-30	N	NT	NT	NT	NT	NT
DU-145	NT	NT	NT	5-10	5-10	N	NT	N	N	N	20-30	N	NT	NT	NT	NT	NT
Colon																	
HT-29	NT	N	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
DLD-1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	20-40	NT	NT	NT	NT	NT	NT
LSH																	
A-549	NT	N	N	20-30	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Myeloid Cells																	
Myeloma	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Raw	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ramos	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Jurkat	NT	10-20	N	10-20	10-20	NT	NT	NT	NT	NT	20-30	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HL-60	NT	10-20	N	10-20	10	NT	NT	NT	NT	NT	N	NT	NT	NT	NT	NT	NT

EC₅₀ 50 μ g/ml of tocopherol compounds / 29 indicating 50% apoptosis; N = No apoptosis when treated for 2 days with 1-60 EC₅₀ μ g/ml of tocopherol compounds; 29; NT = Not tested; * = compounds exhibiting toxicity.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

EXAMPLE 7Bioassay for Apoptosis

Cells were cultured at 1.5×10^5 cells/well in 12 well
5 plates. Cells were allowed to adhere overnight, then incubated with
novel test compounds at 0.01, 0.1, 1, 5, 10 & 20 $\mu\text{g/mL}$ for 1, 2 and
3 days. After treatment, cells (floating + trypsin released adherent
cells) were pelleted, washed and stained with 2 $\mu\text{g/mL}$ DAPI (4',6-
diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) in 100% methanol for
10 15 minutes at 37°C and/or TUNEL stained, then viewed using a Zeiss
ICM 405 microscope. Cells whose nucleus contained clearly
condensed or fragmented chromatin were scored as apoptotic.
Data are presented as percent cells undergoing apoptosis.

15

EXAMPLE 8Bioassay for DNA synthesis arrest

To assay DNA synthesis, all cells were used at $2.5 \times$
20 $10^5/\text{mL}$. Cells were treated with each of the compounds 1-29
(Tables 1 and 2) at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 5, 10 and 20
 $\mu\text{g/mL}$ and 200 μL of each treatment group were plated in
quadruplicate in a 96 well culture plate (Corning, Corning NY).
Experiments were done in duplicate, one plate used for viability
25 testing and the other plate for examination of $^3\text{H-TdR}$ uptake to
monitor DNA synthesis. Plates were cultured for 48 hours at 37°C ,
5% CO_2 . Eight hours prior to the end of incubation, $^3\text{H-TdR}$ was
added to one of the duplicate plates and incubation continued for 8
hours. The cells were then harvested (trypsinization was required

WO 01/58889

PCT/US01/04168

to harvest adherent cells), and isotope uptake was determined as counts per minute (cpm). For viability studies, at the end of the incubation, the cells were removed from the wells and viability checked by the Trypan Blue Exclusion method. Percent viability and
5 percent DNA synthesis in comparison to untreated or vehicle treated cells of each treatment group were calculated.

EXAMPLE 9

10

Bioassay for Cell Cycle Arrest

The cells were cultured with novel test agents for 2-3 days, fixed in 95% ethanol and stained with propidium iodide overnight. DNA content was determined using a Coulter Epics Elite
15 Flow Cytometer with an argon laser setting of 488 nm. Cell size was measured simultaneously, and data were analyzed as to percent cells in each cell cycle phase using the Coulter Multicycle Program.

20

EXAMPLE 10Bioassay for Cellular Differentiation

To determine if the novel compounds were inducing cellular differentiation, the cells were cultured on cover slips, fixed
25 in 95% ethanol and stained with a lipid specific stain for detection of milk lipids. Additionally, cells were examined by immunohistology and by Western analyses for presence of milk protein casein, using polyclonal antibodies produced in the lab.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

EXAMPLE 11DNA Synthesis Arrest Effects

The cells were cultured for 48 hours, pulsed 8 hours
5 with tritiated thymidine, harvested and counted. Data are presented
as counts per minute. Verification of DNA synthesis arrest is
determined by reduced tritiated thymidine uptake by cells treated
with test compounds. Further verification of DNA synthesis arrest is
determined by propidium iodide staining and standard cell cycle
10 analyses.

EXAMPLE 1215 Mechanisms of Induction of Apoptosis

The mechanism of induction of apoptosis by these
compounds appears to involve three distinct apoptotic signaling
pathways; namely, activation of latent transforming growth factor-
beta (TGF- β), activation of the Fas/Fas ligand signaling pathways,
20 and signaling by the stress kinase (c-Jun N-terminal Kinase)
pathway.

TGF- β s are potent growth inhibitory molecules that are
known to inhibit cell growth by inhibition of DNA synthesis arrest
and by induction of apoptosis. TGF- β s are involved only in
25 induction of the apoptotic pathway, i.e., there is no evidence
currently that the TGF- β s effect DNA synthesis arrest; however, this
possibility has not been completely ruled out. TGF- β s are made and
secreted by cells in a latent non-active form. To be effective as
tumor growth inhibitors, the latent TGF- β s must be activated by

WO 01/58889

PCT/US01/04168

induction of cell surface proteins that provide a proper structure for processing and activating proteases that cut the latent protein and release the active TGF- β .

The compounds of the present invention are shown to
5 activate proteases such as cathepsin D family proteases, and upregulate the mannose-6-phosphate receptor which binds inactive TGF- β and permits activation via proteases. Active TGF- β signals via cell membrane TGF- β receptors I and II to activate down stream kinases referred to as stress kinases or c-Jun N-terminal Kinases
10 (JNK) which phosphorylate and activate transcription factors c-Jun, ATF-2 and Elk-1. Prolonged activation of transcription factor c-Jun causes tumor cells to undergo apoptosis. These transcription factors, acting as homodimers or heterodimers with a multitude of transcription factor partners activate proapoptotic genes and/or
15 downregulate antiapoptotic genes leading to DNA fragmentation. The compounds of the present invention do not generate an anti-proliferative outcome to TGF- β signaling in normal non-tumor cells.

A second apoptotic inducing mechanism called the Fas/Fas ligand apoptotic signaling pathway is activated by the novel
20 compounds of the present invention. Activated Fas/Fas ligand signaling may lead to rapid cell death by apoptosis. Thus, for tumor cells to escape death by Fas/Fas ligand, they must inactivate this most important apoptotic pathway. The mechanism for inactivation of the Fas/Fas ligand signaling pathway by tumor cells varies;
25 however, many tumor cells down regulate the expression of Fas receptor and Fas ligand on their membranes.

Most important, R,R,R-2-(2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid (1) has been shown to induce Fas/Fas ligand resistant tumor cells to become Fas/Fas

WO 01/58889

PCT/US01/04168

ligand sensitive. Compound 1 also has the ability to enhance the expression of Fas ligand on the membrane of LNCaP prostate cells. Studies show that Fas signaling resistant human breast cancer cells retain the Fas receptor in their cytoplasm, but when cultured with
5 compound 1, the Fas receptor is transported from the cytoplasm to the membrane; thereby rendering the cells Fas signaling sensitive. Furthermore, this compound is synergistic in anti-Fas triggered apoptosis in that greater amounts of cell killing is obtained with both human breast and prostate cancer cells when co-treated versus
10 when treated separately. The ability of compound 1 to convert Fas signaling resistant tumor cells to Fas signaling sensitive tumor cells and to exhibit synergistic killing effects provides an extremely important mechanism for destruction of tumor cells both by the host immune surveillance system as well as by pharmaceutical
15 intervention. The compounds of the present invention do not activate the Fas signaling pathway of normal non-tumor cells.

These compounds activate the JNK kinase signaling pathway, perhaps by TGF- β and Fas/Fas ligand signaling. Prolonged activation of JNK results in prolonged activation of c-Jun and ATF-2
20 transcription factors, which are postulated to play a role in expression or repression of proapoptotic and antiapoptotic genes, respectively.

EXAMPLE 13

25

Mechanism of Induction of DNA Synthesis Arrest, Cell Cycle Arrest and Cellular Differentiation

The mechanisms of growth inhibition by DNA synthesis arrest, cell cycle arrest and by induction of cellular differentiation

WO 01/58889

PCT/US01/04168

have not been characterized as fully as the mechanism of growth inhibition by apoptosis. Studies show that the compounds of the present invention have profound effects on the cell cycle, inducing DNA synthesis arrest of approximately 95% of the tumor cells within 5 24 hours of treatment. Tumor cells cultured with the compounds disclosed herein are growth inhibited in the G1 cell cycle phase, undergo morphological changes and express milk lipids, an indication that the cell cycle blocked cells have undergone differentiation. P21, a gene known to be an inhibitor of entrance of 10 cells from the G1 cell cycle phase to the S phase of the cell cycle, and the mRNA, as well as the protein of P21 gene, is up-regulated by treatment of MDA-MB-435 human breast cancer cells with compound 1.

15

EXAMPLE 14In Vivo Potential for Human Cancer Cells

The present invention has potential for use as 20 therapeutic agents. In vivo studies of tumor growth and metastasis of human tumor cells either ectopically or orthotopically transplanted into immune compromised animals, such as nude mice, or in vivo studies employing well recognized animal models are conducted. Inhibition of growth of human tumor cells 25 transplanted into immune compromised mice provides pre-clinical data for clinical trials. In vivo studies include two human tumor cell models, the metastatic non-estrogen responsive MDA-MB-435 breast cancer model, and the androgen non-responsive PC-3 prostate cancer model.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

MDA-MB-435 Breast Cancer Model:

Pathogen free MDA-MB-435 human breast cancer cells stably transfected with a marker protein (fluorescent green protein) are grown as a solid tumor in immune compromised nude or SCID mice. The tumors are removed, and 1 mm sections of equal size are orthotopically transplanted into the mammary fat pad or ectopically transplanted into the hind flank of female nude mice. Tumor growth, metastasis, and death of the animals are determined. Tumor growth is measured by caliper evaluations of tumor size. At the time of sacrifice, tumors are removed, measured for size, and used for histochemical examination. Organs such as spleen, lymph nodes, lungs, and bone marrow, are examined for metastatic MDA-MB-435 cells by histochemical staining of tissue sections for expression of the marker fluorescent green protein.

PC-3 Prostate Cancer Model

Pathogen free PC-3 human prostate cancer cells stably transfected with a marker protein (fluorescent green protein) are grown as a solid tumor in nude mice. The tumors are removed, and 1 mm sections of equal size are ectopically transplanted into the hind flank of male nude mice. Tumor growth, metastasis, and death of the animals are determined. At the time of sacrifice, tumors are removed, measured for size, and used for histochemical examination. Organs such as spleen, lymph nodes, lungs, bone marrow, are examined for metastatic PC-3 cells by histochemical staining of tissues for expression of the marker fluorescent green protein.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

Skin Cancer Animal Model

Skin cancer is induced in SENCAR and SKH-1 hairless mice by ultraviolet irradiation and chemical (DMBA) treatments. In addition, mice specifically expressing the oncogene Her-2/neu in skin basal cells that spontaneously develop skin cancer are used. The compounds disclosed herein are topically applied to the skin daily, before and after skin cancer initiation, and development of skin papilloma formation is assessed. Control mice are treated identically except that they receive vehicle treatments topically applied to their skin. The efficacy of these compounds in treating papilloma's as well as their ability to affect malignant conversion when supplied prior to premalignant progression is monitored.

15 **EXAMPLE 15**Supplementation with Novel Compounds

Prior to initiation of the in vivo experiments, the compounds of this invention that exhibit the greatest amount of tumor cell killing are administered to nude, SCID, transgene, and other mice at varying levels to establish the highest level of compound that can be administered safely without adverse effects. The compounds are administered in a model-appropriate manner; e.g., orally, injections, including injections directly into the target organ, or topically. After establishing the highest level of the compounds that can be tolerated and effective administration routes, the novel compounds are administered to the mice on a daily basis, and tumor growth and progression is determined as described above.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

EXAMPLE 16Establishing Maximum Tolerated Dose (MTD) of Compound 1

Prior to conducting the preclinical chemotherapeutic studies, compound 1 is assayed in non-tumor Balb/c female mice in an effort to establish the maximum tolerated dose. Compound 1 is dissolved in 100% ethanol to establish a stock solution (2 grams of compound 1 in 5 mls of 100% ethanol) and diluted in peanut oil (non vitamin E supplemented) to yield 20, 10, and 5 mg/0.1 ml. RRR- α -tocopherol succinate (VES; the succinate moiety is attached to RRR- α -tocopherol via an ester linkage) was solubilized and diluted as described above to yield 20 mg/0.1ml/gavage, serving as an additional control. A total of 30 Balb/c female mice were placed into 6 groups (5 mice/group) and supplemented by gavage with compound 1 daily for a total of 23 days. Group 1 mice were non treated and served as control; group 2 mice were the vehicle control group and received 0.1ml of vehicle (ethanol + peanut oil equivalent to treatment groups)/mouse/day for a total of 23 days, group 3 mice received 20 mg/ml of VES daily for a total of 23 days. Treatment groups 3, 4 and 5 were gavaged daily for 23 days with 5, 10, and 20 mgs of compound 1. Compound 1 at 5, 10, and 20 mg/day, administered daily by gavage to mice in groups 3, 4, and 5, respectively, for 23 days is tolerated well by the mice. Weights are determined weekly and there is no significant difference in the weights of the mice receiving compound 1 at 5, 10, and 20 mg/day when compared with the weights of the VES treated, untreated and vehicle treated control mice (Figure 8, data is for days 11 and 23 days treatment). Mice remained active and showed no signs of

WO 01/58889

PCT/US01/04168

toxicity. At the completion of the MTD studies, mice were sacrificed and no evidence of toxicity was observed upon autopsy.

5

EXAMPLE 17Chemotherapeutic effectiveness of compound 1

The maximum tolerated dose studies show that compound 1 administered at the highest level (20 mg/day/23 days) is not toxic; however, due to the non-toxic levels used, an maximum tolerated dose was not established. For the preclinical chemotherapeutic studies, in the absence of an maximum tolerated dose, the mice are supplemented with 30 and 20 mgs/0.1ml by gavage daily for 21 days. Compound 1 is dissolved in 100% ethanol at 2 grams of compound 1/5mls of ethanol, and diluted in peanut oil (nonsupplemented vitamin E) to yield 30 and 20 mgs of compound 1 per 0.1ml. Vehicle control consisted of a mixture of ethanol and peanut oil equivalents. The preclinical chemotherapeutic studies are conducted with compound 1, utilizing human MDA-MB-435 human breast cancer cells, human DU-145 prostate cancer cells, and human HT-20 colon tumor cells transplanted into Balb/c immune compromised nude mice.

A total of 40 immune compromised nude mice are utilized for testing each test compound (two treatment groups at 20 and 30 mg/day) in each tumor cell type. Four experimental treatment groups of 10 mice each (vehicle/0.1ml/gavage daily for 21 days, compound 1 at 30 mgs of compound #1/0.1ml gavage/daily for 21 days, and compound 1 at 20 mgs/of compound 1/0.1ml gavage daily for 21 days, for each tumor type are used. An

WO 01/58889

PCT/US01/04168

established dosage of effective chemotherapeutic drugs are used in the xenograft studies. Taxol at 20/mg/kg, administered intraperitoneally daily for 5 days, is used for a positive control for human MDA-MB-435 breast cancer xenografts; Mitoxantrone at 1 mg/kg, administered daily intravenously for 5 days, is used as the positive control for human DU-145 prostate cancer cells; and 5 Fluorouracil (5 FU) at 30 mg/kg, administered daily for 5 days, is used for a positive control for human HT-29 colon cancer cells. Tumor cells are transplanted subcutaneously into the left flank and permitted to grow to approximately 70 mg in size, test compound treatments by daily gavage are initiated, and continue for a total of 21 days. Mice are monitored daily for tumor size by caliper measurements. Mice are treated for 21 days; however, the mice are sacrificed when the tumors of the vehicle control reached 500 mg in weight. At the completion of the protocol, tumors are excised and tumor size established by weight. At the time of sacrifice, serum, tumor, and heart muscle are taken from animals in the two compound 1 test groups in order to establish levels of compound 1 via HPLC analyses (data not included). The chemotherapeutic effectiveness of compound 1 administered daily at 30 and 20 mgs/day is determined by comparing the tumor size of the two treatment groups with the vehicle control group for each of the three tumor types, and by comparing the size of the tumor in the two treatment groups with the tumor group from the positive control. Treatment is for 21 days, experiments are continued until mean weight of tumor for vehicle control reaches 500 mgs.

The *in vivo* preclinical chemotherapeutic data are depicted in Tables 3 and 4 and Figure 9A-C and are presented for 21-22 days of treatment. Treatment of nude mice transplanted with

WO 01/58889

PCT/US01/04168

human MDA-MB-435 breast cancer cells with compound 1 for 21 days at 20 and 30 mg/day by gavage reduced the mean tumor weight (mg) of the transplanted tumor cells by 20.7 and 44.6%, respectively when compared to the mean tumor weight of the vehicle control group at day 21 after treatment. The positive control, Taxol, reduces the mean tumor growth, when compared to mean tumor growth of vehicle control group, by 90.3% (Table 3, 4 & Figure 9A). Data are converted to percent mean tumor growth in relation to weight gain at the beginning of treatment (day 1) and are depicted in Table 4. Treatment of nude mice transplanted with human DU-145 prostate cancer cells with compound 1 for 21 days at 20 and 30 mg/day by gavage reduces the mean tumor weight (mg) of the transplanted tumor cells by 31.5 and 24.8%, respectively, when compared to the mean tumor weight of the vehicle control group at day 22 (Table 3, 4 & Figure 9B). The positive control, mitoxantrone reduces the mean tumor growth, when compared to mean tumor growth of vehicle control group, by 27.9%. Treatment of immune compromised nude mice transplanted with human HT-29 human colon cancer cells with compound 1 for 21 days at 20 and 30 mg/day by gavage reduces the mean tumor weight (mg) of the transplanted tumor cells by 33.3 and 34.5 %, respectively when compared to the mean tumor weight of the vehicle control group at day 22 (Table 3, 4 & Figure 9C). The positive control, 5 Fluorouracil, reduces the mean tumor growth, when compared to mean tumor growth of vehicle control group, by 31.4%.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

TABLE 3

MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells Transplanted in to Nude Mice

		Mean tumor Weights (mg) Following Treatments						
5	Treatments	1	4	7	10	14	17	21
	Vehicle	70.1	98.2	119.5	153.2	172.8	203.7	226.1
	#1 (20 mg)	70.1	85.8	123.9	127.9	147.2	143.8	179.4
	#1 (30 mg)	68.1	85.7	97.3	98.4	126.6	118.7	125.2
	Taxol	70.7	71.5	38.2	11.7	5.7	3.6	6.8

DUI-145 Human Prostate Cancer Cells Transplanted into Nude Mice

		Mean tumor Weights (mg) Following Treatments						
10	Treatments	1	5	8	12	15	19	22
	Vehicle	66.5	111.4	167.1	258.5	351.1	458.3	540.9
	#1 (20 mg)	66.5	103.5	137.9	208	254.8	362.2	370.5
15	#1 (30 mg)	67.8	102.5	131.3	241.2	256.8	379.9	407
	Mitoxantrone	66.8	107.2	141.1	185.4	205.2	325.3	389.4

HT-29 Human Colon Cancer Cells Transplanted into Nude Mice

		Mean tumor Weights (mg) Following Treatments						
20	Treatments	1	5	8	12	15	19	22
	Vehicle	80.3	91.7	133.2	185.6	204.8	260.1	372.2
	#1 (20 mg)	59.5	84.0	97.0	124.6	147.3	198.0	248.2
	#1 (30 mg)	40.0	83.0	96.7	129.3	144.1	176.1	243.8
	5-FU	59.3	87.5	105.8	145.8	141.6	212.3	255.5

WO 01/58889

PCT/US01/04168

Table 4:

Percent mean tumor weight gain (mg) following treatments

MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments¹

5	Treatments	1	4	7	10	14	17	21
	Vehicle	100	140.1	170.5	218.5	246.5	290.6	322.5
	#1 (20 mg)	100	122.4	176.7	182.5	210.0	205.1	255.9
	#1 (30 mg)	100	125.8	142.9	144.5	185.9	174.3	178.6
	Taxol	100	101.1	-46.0	-83.7	-91.8	-99.5	-90.3

10 DU-145 Human Prostate Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments

	Treatments	1	5	8	12	15	19	22
	Vehicle	100	167.5	251.3	388.7	528.0	458.3	689.2
	#1 (20 mg)	100	155.6	207.4	312.8	383.2	362.2	544.7
15	#1 (30 mg)	100	151.2	193.7	355.8	378.8	379.9	560.3
	Mitoxantrone	100	160.5	211.2	277.5	307.2	487.0	582.9

HT-29 Human Colon Cancer Cells

Percent Mean tumor Weight Gain (mg) Following Treatments

	Treatments	1	5	8	12	15	19	22
20	Vehicle	100	152.1	220.9	307.8	339.6	431.3	617.2
	#1 (20 mg)	100	141.2	163.0	209.4	247.6	332.8	417.1
	#1 (30 mg)	100	139.5	162.5	217.3	242.2	296.0	409.7
	5-FU	100	147.6	178.4	245.9	247.2	358.0	430.0

25 ¹Percent Mean Tumor Weight Gain (mg) following treatment was determined by dividing the mean tumor weight at various time periods following treatment by the mean tumor weight at day 1 within the same treatment group and multiplying by 100.

30

WO 01/58889

PCT/US01/04168

EXAMPLE 18Preparation of Stock Solution, Vehicle and Compound 1 Dilutions

Compound 1 was prepared weekly, and stored at 4°C.

- 5 The preparation procedures are as follows:

Stock Solution of Compound 1:

Dissolve 2 grams of compound 1 in 5 mls of 100% ethanol (ETOH) and vortex at 37°C. This is the maximum amount of compound 1 that will go into solution.

- 10 For the following dilutions, dry compound 1 is added to yield the appropriate levels of compound 1 while keeping the ethanol levels equal in the two experimental groups and the vehicle control group.

Compound 1 at 30 mg/0.1ml gavage/mouse:

- 15 Combine 1 ml of compound 1 stock solution, 3 mls of vitamin E depleted peanut oil and 800 mg of compound #1 (dry) and vortex at 37°C.

Compound 1 at 20 mg/0.1ml gavage/mouse:

- 20 Combine 1 ml of compound 1 stock solution, 3 mls of vitamin E depleted peanut oil and 400 mg of compound #1 (dry) and vortex at 37°C approximate 2 h until in solution.

Compound 1 at 10 mg/0.1ml gavage/mouse:

- Combine 1 ml of compound 1 stock solution and 3 mls of vitamin B depleted peanut oil.

- 25 Vehicle:

Combine 1 ml ETOH 3 mls of vitamin E depleted peanut oil.

EXAMPLE 19

Chemopreventive properties of compound 1 in an ACI rat cancer model.

5 Compound 1 is used in vivo to treat transplanted human breast, prostate, and colon tumors transplanted in immune compromised nude mice. The chemopreventive effectiveness of compound 1 in vivo against human breast cancer is shown in an estrogen cancer initiated ACI rat breast cancer model.
10 Approximately 90% of rats implanted with estrogen pellets develop breast cancer within 6 months after estrogen implantation.

 Compound 1 is dissolved in 100% ethanol and is diluted to the appropriate dosage using vitamin E depleted peanut oil. The maximum tolerated dose (MTD, maximum dose of compound that
15 can be administered without adverse affects) is determined as described in Examples 14 and 15. Compound 1 is administered at the maximum tolerated dose and 50% of the maximum tolerated dose. ACI rats at 4 weeks of age are subpannicularly implanted with estrogen pellets in the shoulder region. Compound 1 at maximum
20 tolerated dose and 50% of the maximum tolerated dose is administered by gavage. Breast tumors are detected in the control group at approximately 100 days following estrogen implantation. Ninety percent of the control rats develop breast cancer within 6 months after estrogen implantation. Tumor bearing animals from
25 control and treatment groups are sacrificed at various time intervals after treatment initiation, and mammary tissue is examined for obvious tumors, and further examined by histological analyses.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

The following references are cited herein.

1. Colowick, Sidney, P. and Kaplan, Nathan, O.
Methods in Enzymology, Vol. XVIII, Vitamins and Coenzymes, Part C.
Edited by Donald B. McCormick and Lemuel D. Wright. Section XII,
5 PP. 335.
2. Dhar, A., Liu, S., Klucik, J., Berlin, K.D., Madler,
M.M., Lu, S., Ivey, R.T., Zacheis, D., Brwon, C.W., Nelson, E.C.,
Birchbichler, P.J., Benbrook, D.M. Synthesis, Structure-Activity
Relationships, and RAR γ -Ligand Interactions of Nitrogen
10 Heteroarotinoids. *J. Med. Chem.* 42, pp. 3602-3614 (1999).

Any patents or publications mentioned in this
specification are indicative of the levels of those skilled in the art to
which the invention pertains. Further, these patents and
publications are incorporated by reference herein to the same
15 extent as if each individual publication was specifically and
individually indicated to be incorporated by reference.

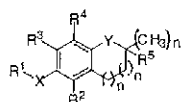
One skilled in the art will readily appreciate that the
present invention is well adapted to carry out the objects and obtain
the ends and advantages mentioned, as well as those inherent
20 therein. The present examples along with the methods, procedures,
treatments, molecules, and specific compounds described herein
are presently representative of preferred embodiments, are
exemplary, and are not intended as limitations on the scope of the
invention. Changes therein and other uses will occur to those
25 skilled in the art which are encompassed within the spirit of the
invention as defined by the scope of the claims.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound having a structural formula



- 5 wherein X is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur;

Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and when Y is sulfur, n is 0;

- 10 R¹ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxylic acid, carboxylate, carboxamide, ester, thioamide, thiolacid, thiolester, saccharide, alkoxy-linked saccharide, amine, sulfonate, sulfate, phosphate, alcohol, ethers and nitriles;

- 15 R² is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine;

- R³ is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine;

- 20 R⁴ is selected from the group consisting of methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine; and

- 25 R⁵ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxyl, amide and ester;

WO 01/58889

PCT/US01/04168

wherein when Y is nitrogen, said nitrogen is substituted with R⁶, wherein R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and methyl;

wherein when X is oxygen and Y is oxygen, R² is methyl,
 5 R³ is methyl, R⁴ is methyl and R⁵ is phenyl, R¹ is not butyric acid.

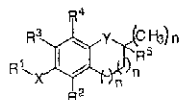
2. The compound of claim 1, wherein said compound is selected from the group consisting of 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-
 10 (4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) propionic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyl tridecyl)chroman-6-yloxy) valeric acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) hexanoic acid,
 15 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyl tridecyl)chroman-6-yloxy) octanoic acid, 2,5,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,7,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy) acetic
 20 acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) acetamide, methyl 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy) acetate, 2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyl tridecyl) chroman-6-yloxy) acetic acid, 2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-
 25 (4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy))ethan-1-ol, 2-(2,5,7,8-pentamethylchroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(carboxy)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-

WO 01/58889

PCT/US01/04168

trimethylundecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8,-
 tetramethyl-2R-(2,6,10-trimethyl-1,3,5,9 E,Z decatetraen)chroman-
 6-yloxy)acetic acid, 3-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-
 trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propyl-1-ammonium chloride,
 5 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-3-ene
 -6-yloxy) acetic acid, 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-
 trimethyltridecyl)chroman)acetic acid, 2,5,7,8,-tetramethyl-(2R-
 (heptadecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-
 (heptyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8,-tetramethyl-(2R-
 10 (tridecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,5,7,8,-tetramethyl-(2R-
 (heptadecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,5,7,8,-tetramethyl-2R-
 (4,8,-dimethyl-1,3,7 E,Z nonotrien)chroman-6-yloxy) acetic acid,
 E,Z,RS,RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-yloxy)acetic acid, (R)-
 2((2,5,7,8-tetramethyl-2-(3 propene methyl ester)chroman-6-
 15 yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(propionate)chroman-6-
 yloxy)acetic acid, 1-aza- α -tocopherol-6-yloxy)acetic acid, 1-aza- α -
 tocopherol-6-yloxy)acetic acid, 1-aza-N-methyl- α -tocopherol-6-
 yloxy)acetic acid, 1-aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy)acetic
 acid, and 6-(2,4-Dinitrophenylazo(2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-
 20 trimethyltridecyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline.

3. A method for the treatment of a cell proliferative
 disease comprising administering to an animal a pharmacologically
 25 effective dose of a compound having a structural formula



WO 01/58889

PCT/US01/04168

wherein X is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur;

Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and
5 when Y is sulfur, n is 0;

R¹ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxylic acid, carboxylate, carboxamide, ester, thioamide, thiolacid, thiolester, saccharide, alkoxy-linked saccharide, amine, sulfonate, sulfate, phosphate, alcohol, ethers and
10 nitriles;

R² is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine;

R³ is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine;
15

R⁴ is selected from the group consisting of methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine; and

R⁵ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxyl, amide and ester;
20

wherein when Y is nitrogen, said nitrogen is substituted with R⁶, wherein R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and methyl.
25

4 The method of claim 3, wherein said compound is selected from the group consisting of 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-

WO 01/58889

PCT/US01/04168

tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)
 propionic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-
 trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy)butyric acid, 2,5,8-trimethyl-
 (2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,7,8-
 5 trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy) acetic
 acid, 2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl) chroman-6-
 yloxy) acetic acid, 2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-
 (2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl) chroman-6-yloxy) acetic acid,
 2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyl tridecyl)chroman-
 10 6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-
 trimethylundecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 3-(2,5,7,8-
 tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-
 yloxy)propyl-1-ammonium chloride, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-
 (4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-3-ene-6-yloxy) acetic acid, 2-
 15 (2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl) chroman-6-
 yloxy)triethylammonium sulfate, 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-
 (4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman)acetic acid, 2,5,7,8,-
 tetramethyl-(2R-(heptadecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,5,7,8,-
 tetramethyl-2R-(4,8,-dimethyl-1,3,7 E/Z nonotrien)chroman-6-
 20 yloxy) acetic acid, E,Z,RS,RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-
 yloxy)acetic acid, 1-aza- α -tocopherol-6-yloxy)-acetic acid, and 1-
 aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy)- acetic acid.

25 5. The method of claim 3, wherein said compound
 exhibits an anti-proliferative effect comprising apoptosis, DNA
 synthesis arrest, cell cycle arrest, or cellular differentiation.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

6. The method of claim 3, wherein said animal is a human.

5 7. The method of claim 3, wherein said composition is administered in a dose of from about 1 mg/kg to about 60 mg/kg.

8. The method of claim 3, wherein administration of
10 said composition is selected from the group consisting of oral, topical, intraocular, intranasal, parenteral, intravenous, intramuscular, or subcutaneous.

15 9. The method of claim 3, wherein said cell proliferative disease is selected from the group consisting of neoplastic diseases and non-neoplastic disorders.

20 10. The method of claim 9, wherein said neoplastic disease is selected from the group consisting of ovarian cancer, cervical cancer, endometrial cancer, bladder cancer, lung cancer, breast cancer, testicular cancer, prostate cancer, gliomas, fibrosarcomas, retinoblastomas, melanomas, soft tissue sarcomas,
25 osteosarcomas, leukemias, colon cancer, carcinoma of the kidney, pancreatic cancer, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

11. The method of claim 9, wherein said non-neoplastic disease is selected from the group consisting of psoriasis, benign proliferative skin diseases, ichthyosis, papilloma, restinosis, scleroderma, hemangioma, viral diseases, and autoimmune diseases.

5

12. The method of claim 11, wherein said autoimmune diseases are selected from the group consisting of autoimmune thyroiditis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, dermatitis herpetiformis, celiac disease, and rheumatoid arthritis.

13. The method of claim 9, wherein said non-neoplastic disorders are selected from the group consisting of viral disorders and autoimmune disorders.

14. The method of claim 13, wherein said viral disorder is Human Immunodeficiency Virus.

15. The method of claim 13, wherein said autoimmune disorders are selected from the group consisting of the inflammatory process involved in cardiovascular plaque formation, ultraviolet radiation induced skin damage and disorders involving an immune component.

WO 01/58889

PCT/US01/04168

16. A pharmaceutical composition, comprising the compound of claim 3 and a pharmaceutically acceptable carrier.

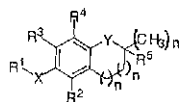
5 17. The pharmaceutical composition of claim 16, wherein said compound is selected from the group consisting of 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propionic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)butyric acid, 2,5,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,7,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 3-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propyl-1-ammonium chloride, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-3-ene-6-yloxy)acetic acid, 2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)triethylammonium sulfate, 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(heptadecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(4,8,-dimethyl-1,3,7-EZ-nonotrien)chroman-6-yloxy)acetic acid, E,Z,RS,RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-

WO 01/58889

PCT/US01/04168

yl oxy)acetic acid, 1-aza- α -tocopherol-6-yl oxy- acetic acid, and 1-aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yl oxy- acetic acid.

- 5 18. A method of inducing apoptosis of a cell, comprising the step of contacting said cell with a pharmacologically effective dose of a compound having a structural formula



- 10 wherein X is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur;

Y is selected from the group consisting of oxygen, nitrogen and sulfur wherein when Y is oxygen or nitrogen, n is 1 and when Y is sulfur, n is 0;

- 15 R¹ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxylic acid, carboxylate, carboxamide, ester, thioamide, thioacid, thiolester, saccharide, alkoxy-linked saccharide, amine, sulfonate, sulfate, phosphate, alcohol, ethers and nitriles;

- 20 R² is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylolester, saccharide and amine;

- R³ is selected from the group consisting of hydrogen, methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylolester, saccharide and amine;
- 25

WO 01/58889

PCT/US01/04168

R⁴ is selected from the group consisting of methyl, benzyl carboxylic acid, benzyl carboxylate, benzyl carboxamide, benzylester, saccharide and amine; and

R⁵ is selected from the group consisting of alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, carboxyl, amide and ester;

wherein when Y is nitrogen, said nitrogen is substituted with R⁶, wherein R⁶ is selected from the group consisting of hydrogen and methyl.

10

19. The method of claim 18, wherein said compound is selected from the group consisting of 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propionic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)butyric acid, 2,5,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,7,8-trimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,8-dimethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2-(N,N-(carboxymethyl)-2(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-(2RS-(4RS,8RS,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 2,5,7,8-tetramethyl-2R-(2RS,6RS,10-trimethylundecyl)chroman-6-yloxy)acetic acid, 3-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)propyl-1-ammonium chloride, 2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8R,12-trimethyltridecyl)chroman-3-ene-6-yloxy)acetic acid, 2-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-yloxy)triethylammonium sulfate, 6-(2,5,7,8-tetramethyl-(2R-

WO 01/58889

PCT/US01/04168

(4R,8,12-trimethyltridecyl)chroman)acetic acid, 2,5,7,8,-
 tetramethyl-(2R-(heptadecyl)chroman-6-yloxy) acetic acid, 2,5,7,8,-
 tetramethyl-2R-(4,8,-dimethyl-1,3,7 E:Z nonotrien)chroman-6-
 yloxy) acetic acid, E,Z,RS,RS-(phytyltrimethylbenzenethiol-6-
 5 yloxy)acetic acid, 1-aza- α -tocopherol-6-yloxy-acetic acid, and 1-
 aza-N-methyl- α -tocopherol-6-yloxy- acetic acid.

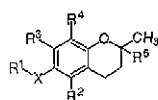
20. The method of claim 18, wherein said method is
 10 useful in the treatment of a cell proliferative disease.



FIG. 1

WO 01/58889

PCT/US01/04168



Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
1	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
2	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
3	(CH ₂) ₃ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
4	(CH ₂) ₄ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
5	(CH ₂) ₅ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
6	(CH ₂) ₇ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
7	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	H	CH ₃	phytyl
8	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	H	CH ₃	phytyl
9	CH ₂ CO ₂ H	H	H	CH ₃	phytyl
10	CH ₂ CONH ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
11	CH ₂ CO ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
12	CH ₂ CON(CH ₂ CO ₂ H) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
13	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
14	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
15	RS CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl

FIG. 2-1

WO 01/58889

PCT/US01/04168

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
16	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	COOH
17	R/RS CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
18	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	isoprenyl
19	NH ₃ Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
20	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
21	OSO ₃ NHET ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
22	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
23	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
24	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
25	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	phytyl
26	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	other
27	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	other
28	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	ester
29	CH ₂ CO ₂ H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	ester

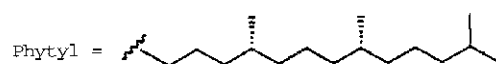
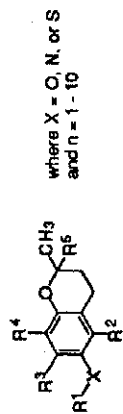


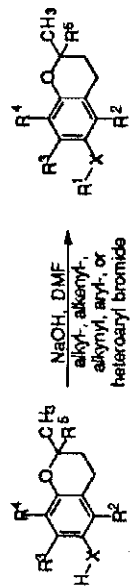
FIG. 2-2

WO 01/58889

PCT/US01/04168



R^1 = alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, and heteroaryl.



R^1 = alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, and heteroaryl carboxylic acids or carboxylates.

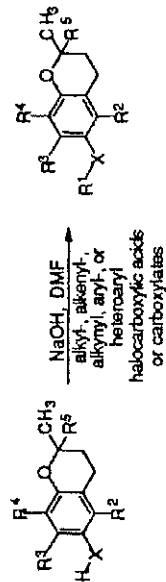


FIG. 3A-1

WO 01/58889

PCT/US01/04168

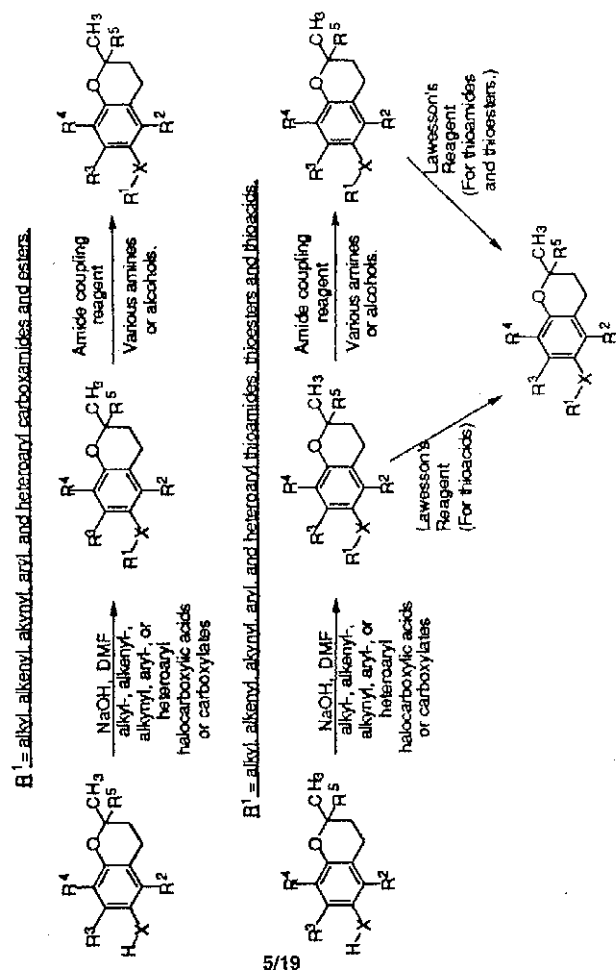
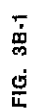


FIG. 3A-2



WO 01/58889

PCT/US01/04168

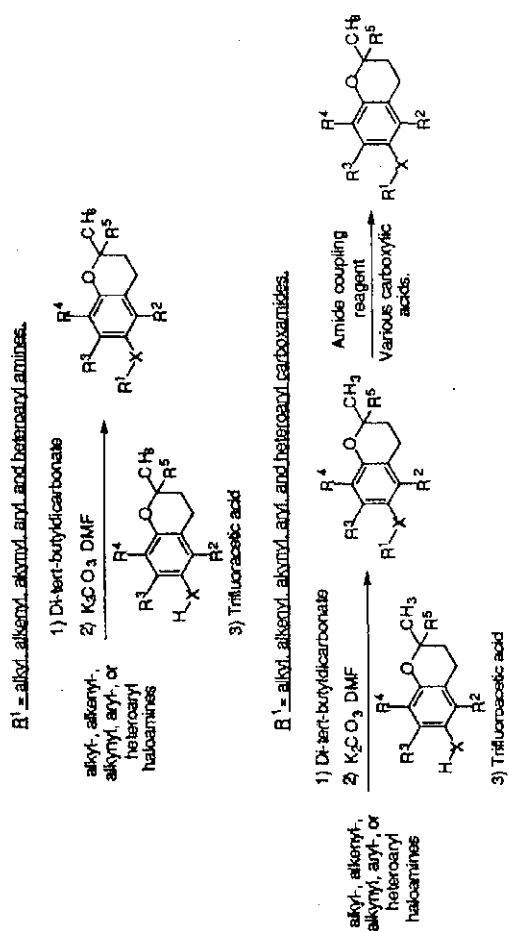


FIG. 3B-2

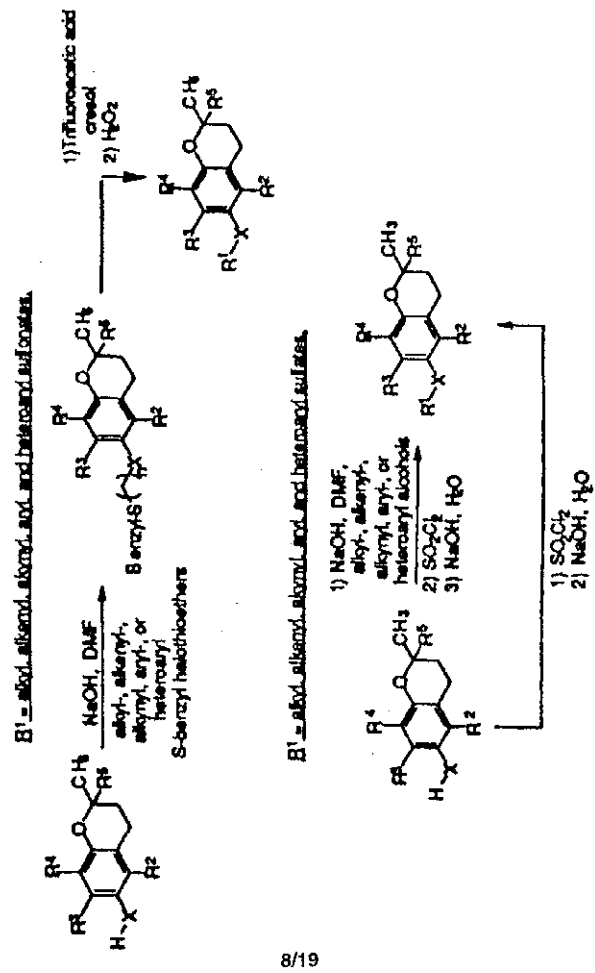


FIG. 3C-1

WO 01/58889

PCT/US01/04168

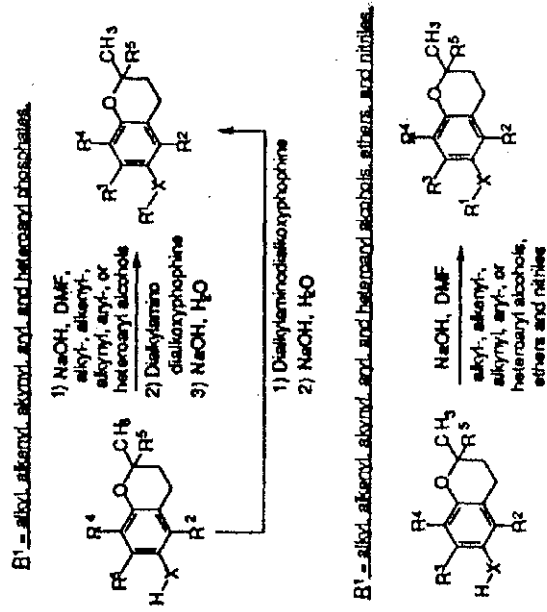


FIG. 3C-2

WO 01/58889

PCT/US01/04168

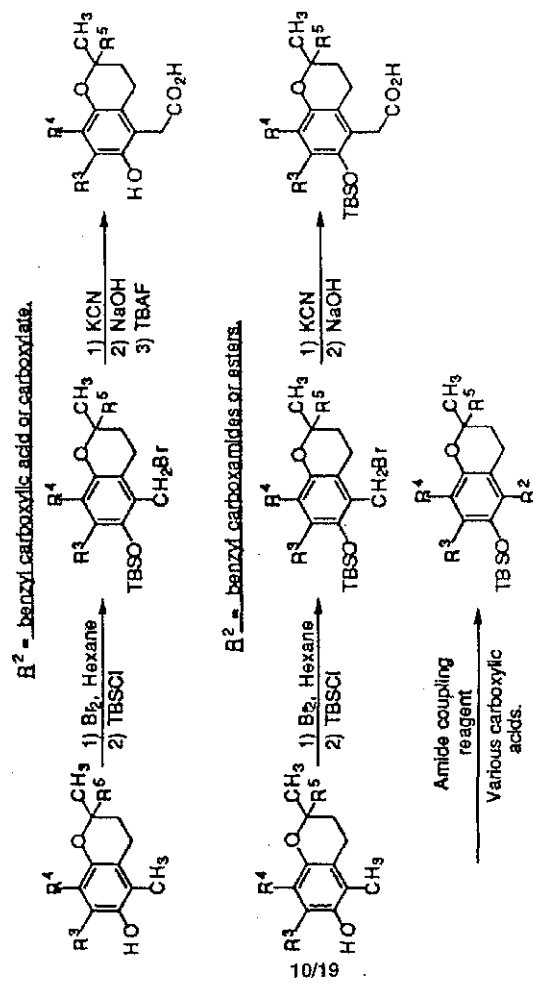
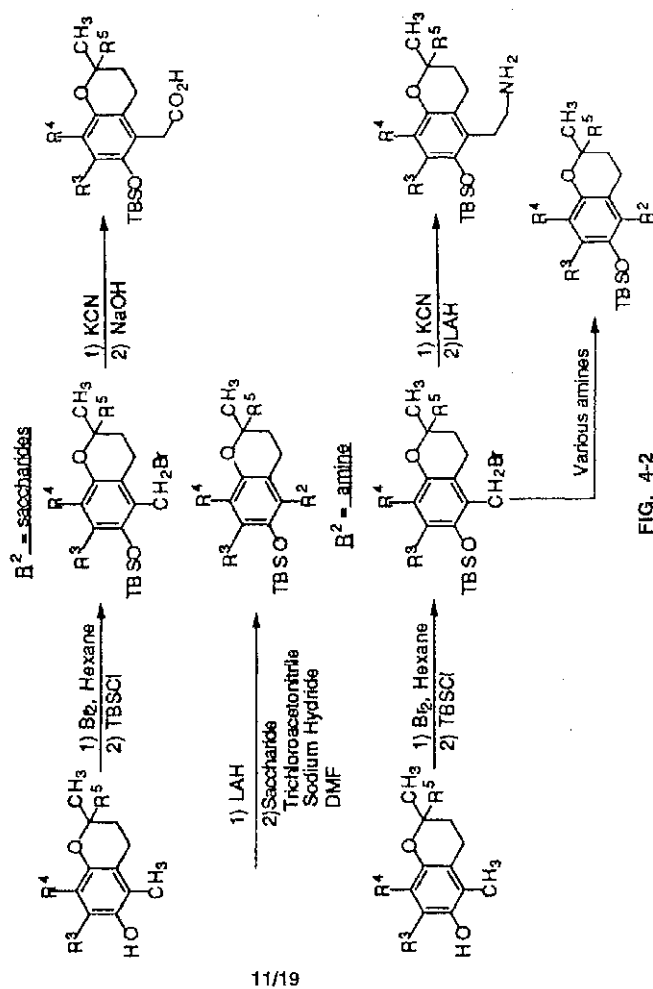


FIG. 4-1



WO 01/58889

PCT/US01/04168

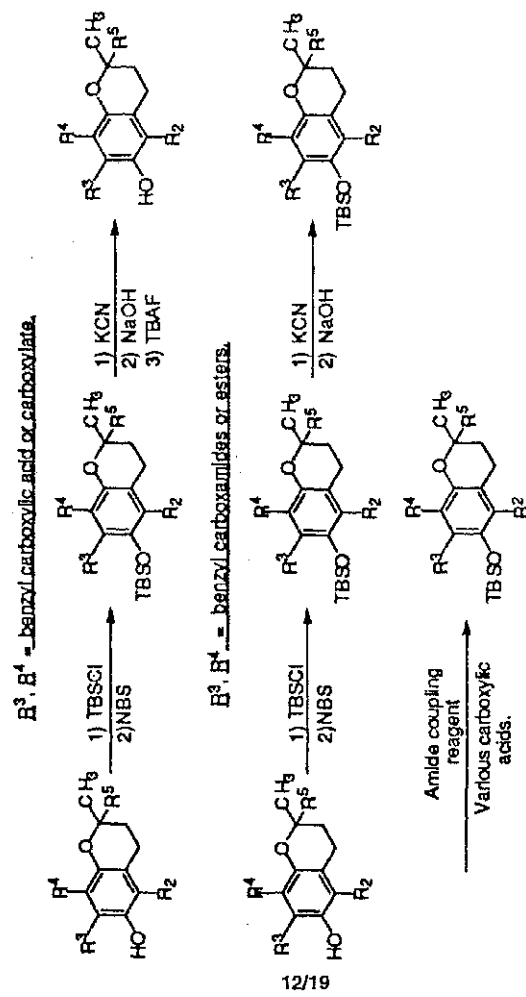


FIG. 5-1

WO 01/58889

PCT/US01/04168

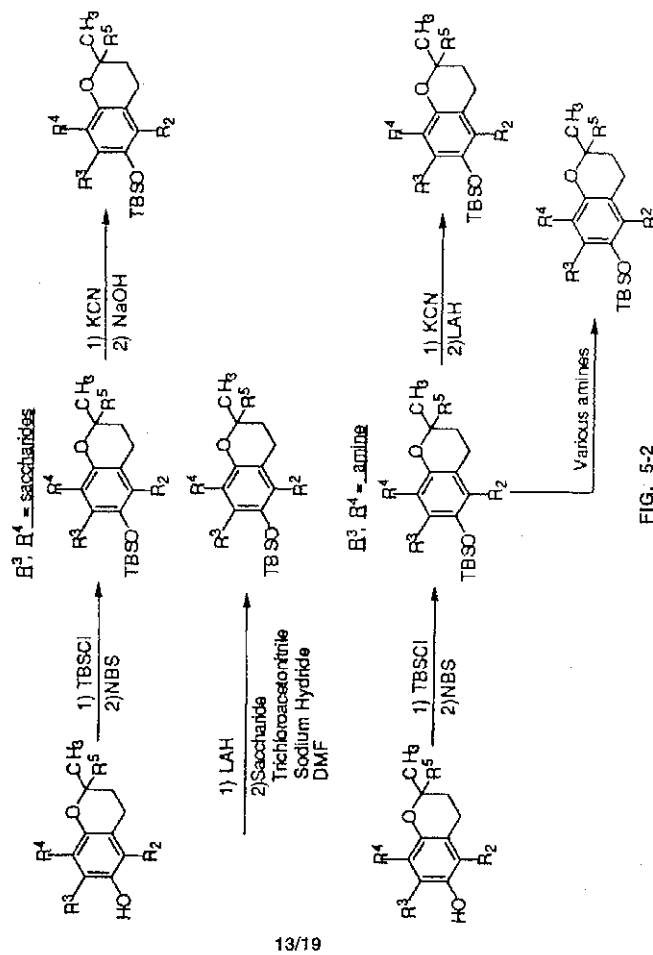
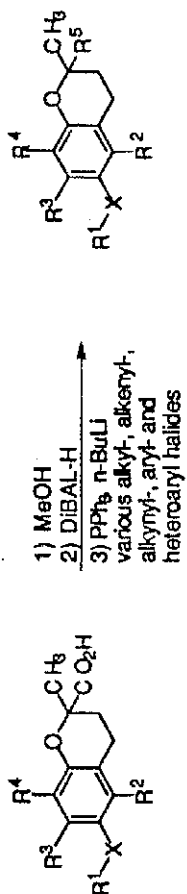


FIG. 5-2

WO 01/58889

PCT/US01/04168

$R^5 = \text{alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, and heteroaryl.}$



$R^5 = \text{alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, and heteroaryl amides and esters.}$

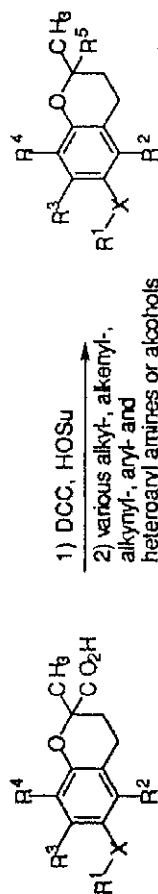
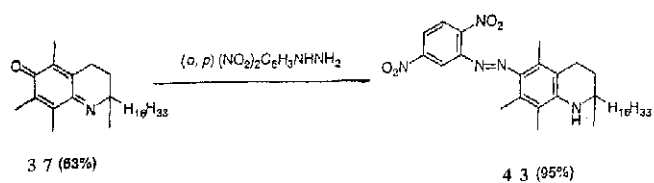


FIG. 6



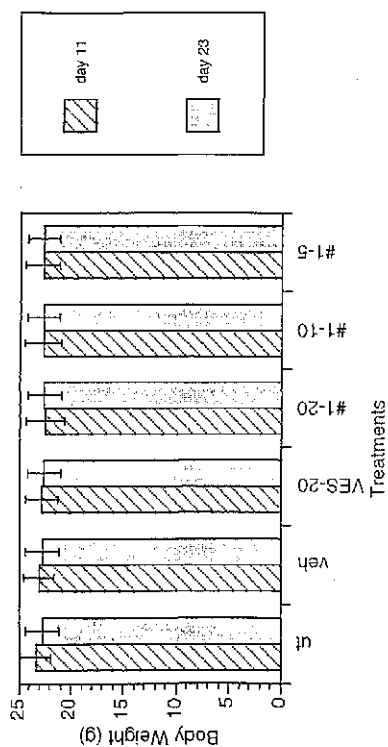
PCIT/US01/E4168



16/19

WO 01/58889

PCT/US01/04168



Mean body weights of mice $\pm$ S.D. with an $n=5$
ut = untreated; veh = vehicle control; VES-20 = ester succinated vitamin E at 20
mg/day; #1 = compound #1 at 20, 10, and 5 mg/day.

FIG. 8

WO 01/58889

PCT/US01/04168

MDA MB-435 Human Breast Cancer Cells

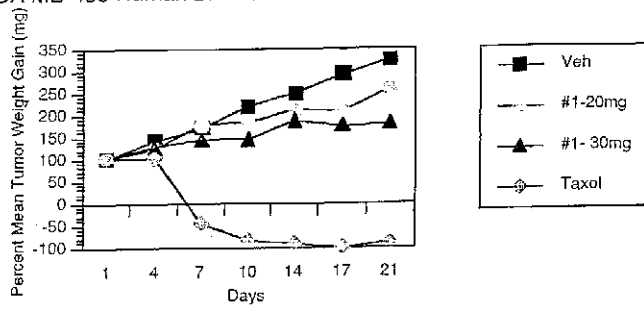


FIG. 9A

DU-145 Human Prostate Cancer Cells

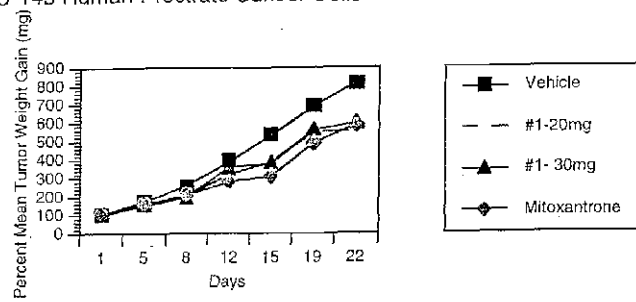


FIG. 9B

WO 01/58889

PCT/US01/04168

HT-29 Human Colon Cancer Cells

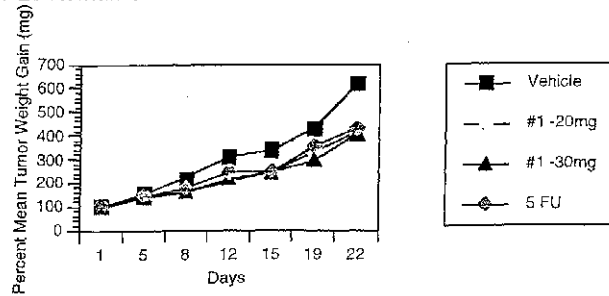


FIG. 9C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US91/04168
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07D 311/30; C07H 17/06; A07K 51/355, 31/7028 US CL : 549/408, 410, 412; 536/4.1; 514/32, 456, 458 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 549/408, 410, 412; 536/4.1; 514/32, 456, 458 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN structure search, EAST, Caplus text search search terms: tocopherol, chromanol, cancer, apoptosis, autoimmune, viral, HIV		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,114,957 A (HENDLER et al) 19 May 1992, see entire reference	3, 6-9, 11, 13, 14
X	US 5,315,017 A (LE BAUT et al) 24 May 1994, see entire reference	1-13, 15, 16
X	US 5,545,660 A (GRISAR et al) 13 August 1996, see entire reference	1, 3, 5-9, 11-13, 15, 16
X	US 4,457,918 A (HOLICK et al) 3 Jul 1984, see entire reference	1, 16
Y	US 5,135,945 A (ROBINSON et al) 4 Aug 1992, see entire reference	1-10, 16-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	*P* Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *A* Document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* Prior document published on or after the international filing date, in whole or in part, which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *I* Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be regarded to involve an inventive step when the document is taken alone *O* Document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art ** Document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *A* Document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 APRIL 2001		23 MAY 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer LEIGH C. MAHER Telephone No. (703) 304-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998) *

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/04168
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,917,060 A (ROSENAU et al) 29 Jun 1999, see entire reference	1, 16 --- 2, 17
X --- Y	US 4,665,204 A (WIRTH) 12 May 1987, see entire reference	1, 1--2, 17
Y	FARISS, M. W. et al "The selective antiproliferative effects of alpha-tocopheryl hemisuccinate. . ." Cancer Res. Vol. 54, Pages 3346-3351, see entire reference	1-10, 16-20
X --- Y	DJURIC, Z. et al "Growth inhibition of MCF-7 and MCF10A human breast cells. . ." Cancer Lett., Vol. 111, pages 133-139, (Caplus abstract) see abstract.	1, 3, 5, 6, 8-10, 16 --- 2, 4, 7, 17-20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 D 215/38	C 0 7 D 215/38	
C 0 7 D 311/58	C 0 7 D 311/58	
C 0 7 D 311/66	C 0 7 D 311/66	
C 0 7 D 311/72	C 0 7 D 311/72	1 0 2

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S,G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 サンダース, ロバート ジェ.
アメリカ合衆国 7 8 7 2 0 テキサス, オースティン, バートン ヒルズ ドライブ 2 0 0 5
- (72)発明者 クリーン, キンバリオ
アメリカ合衆国 7 8 7 0 3 テキサス, オースティン, マッカラム 2 5 0 5
- (72)発明者 ハーレイ, ローレンス
アメリカ合衆国 7 8 7 3 1 テキサス, オースティン, メサ ドライブ 5 8 1 1, ナンバー 1 3 1 6
- (72)発明者 ガードナー, ロブ
アメリカ合衆国 7 8 7 5 8 テキサス, オースティン, ストーンホロウ ドライブ 1 1 9 0 0, ナンバー 1 0 3 1
- (72)発明者 メンシャカ, マーラ
アメリカ合衆国 7 8 7 2 6 テキサス, オースティン, タンヤ トレイル 1 1 3 0 4
- (72)発明者 ユー, ウエイピング
アメリカ合衆国 7 8 7 2 7 テキサス, オースティン, イクエストリアン コーブ 1 3 4 1 3
- (72)発明者 ラマナン, プュチュコード エヌ.
アメリカ合衆国 7 8 7 4 1 テキサス, オースティン, サウス レイクショアー ブールバード 2 3 0 1
- (72)発明者 リュー, シェンクアン
アメリカ合衆国 7 8 7 0 5 テキサス, オースティン, ウエスト 3 8 ストリート 3 0 2, ナンバー 2 1 2
- (72)発明者 イスラエル, カレン
アメリカ合衆国 7 8 7 5 3 テキサス, オースティン, ノース アイエイチ 3 5, 8 8 0 0, エイピティ. 2 1 4 8

Fターム(参考) 4C031 DA04

4C062 FF19 FF69 FF73

4C086 AA01 AA02 AA03 BA08 BA09 BC28 MA01 MA04 MA52 MA55

	MA58	MA59	MA66	NA14	ZA01	ZA89	ZA94	ZA96	ZB08	ZB15
	ZB26	ZB27	ZB33	ZC06	ZC55					
4C206	AA01	AA02	AA03	DA29	MA01	MA04	MA72	MA75	MA78	MA79
	MA86	NA14	ZA01	ZA89	ZA94	ZA96	ZB08	ZB15	ZB26	ZB27
	ZB33	ZC06	ZC55							