

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4001636号

(P4001636)

(45) 発行日 平成19年10月31日(2007.10.31)

(24) 登録日 平成19年8月24日(2007.8.24)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 233/65 (2006.01)
A 6 1 K 31/166 (2006.01)
A 6 1 K 31/336 (2006.01)
A 6 1 K 31/37 (2006.01)
A 6 1 K 31/426 (2006.01)

C O 7 C 233/65
A 6 1 K 31/166
A 6 1 K 31/336
A 6 1 K 31/37
A 6 1 K 31/426

請求項の数 6 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-542547
(86) (22) 出願日 平成10年4月10日(1998.4.10)
(65) 公表番号 特表2001-521510(P2001-521510A)
(43) 公表日 平成13年11月6日(2001.11.6)
(86) 国際出願番号 PCT/IB1998/000768
(87) 国際公開番号 W01998/045253
(87) 国際公開日 平成10年10月15日(1998.10.15)
審査請求日 平成15年6月16日(2003.6.16)
(31) 優先権主張番号 60/043,360
(32) 優先日 平成9年4月10日(1997.4.10)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
アイソテクニカ、インコーポレイテッド
カナダ国 ティー5エス 1イー8 アル
バータ、エドモントン、108 アベニュー
17208
(74) 代理人
弁理士 山本 秀策
(72) 発明者
ヤッツコフ、ランドール ダブリュー.
カナダ国 ティー6アール 2ビー7 ア
ルバータ、エドモントン、ブチャナン ク
ローズ 215
(72) 発明者
フォスター、ロバート ティー.
カナダ国 ティー6ジェイ 1エックス9
アルバータ、エドモントン、120 ス
トリート 4211

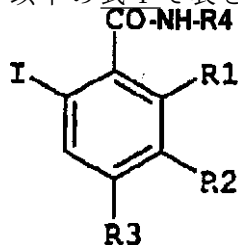
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガンおよびA I D S の処置のための活性化ヨード誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式 I で表される化合物:



式 I

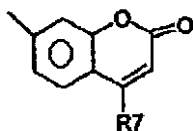
ここで、

R 1 は、H、NO₂ または NH₂ であり、R 2 または R 3 は、同じであるかまたは異なり、そして H、NO₂ または NH₂ であり、そして R 2 が NH₂ であるとき、R 1 および R 3 は、H であり；

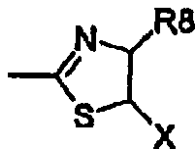
R4は、

(i) -CH₂CH=CH₂、(ii) -CH₂C≡CH、(iii) -NHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂；(iv) -NHCH₂CH₂N(CH₃)₂；

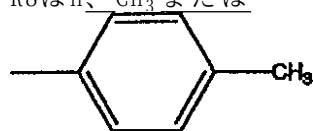
(v) $-(CH_2)_a N(R5)(R6)$ (ここで、 $a=1$ あるいは2であり、そしてR5およびR6は、H、または低級アルキルである)、
(vi)



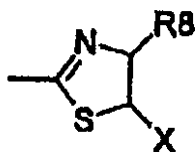
(ここで、R7はHまたはCF₃である)
(vii)



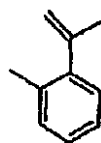
(ここで、Xは、H、-NO₂、-COOCH₃、-COOCH₂CH₃、あるいは-CH₂CH₃であり、そしてR8はH、CH₃または



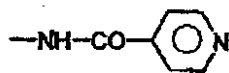
ある)
(viii)



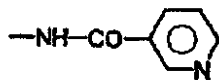
(ここで、Xは、H、-NO₂、-COOCH₃あるいは-CH₃であり、そしてR8はHまたはCH₃)
(ix)



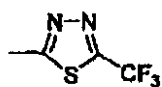
(x)



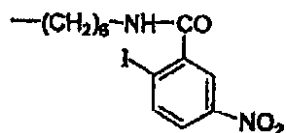
(xi)



(xii)



(xiii)



である。

10

20

30

40

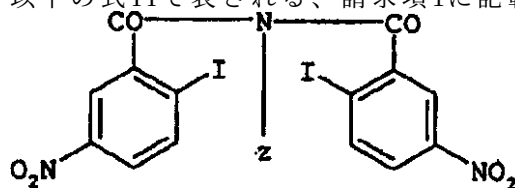
50

【請求項 2】

前記R2がNO₂であり、R1およびR3がHである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

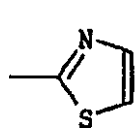
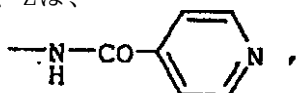
以下の式IIで表される、請求項1に記載の化合物：



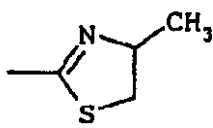
式II

10

ここで、Zは、



または



20

である。

【請求項 4】

請求項1から3のいずれかに記載の化合物ならびに薬学的に受容可能な賦形剤を含有する薬学的組成物。

【請求項 5】

結腸癌腫、骨髄腫、乳癌腫、黒色腫、肺癌腫、卵巣癌腫および白血病からなる群より選択される新生物疾患の処置において使用するための、請求項 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

結腸癌腫、骨髄腫、乳癌腫、黒色腫、肺癌腫、卵巣癌腫および白血病からなる群より選択される新生物疾患の処置において使用するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、治療有効量の請求項 1 ～ 3 のいずれか1項に記載の化合物を含む、薬学的組成物。

30

【発明の詳細な説明】

緒言と発明の背景

本発明は、活性化されたヨード誘導体の合成およびp-ADPRTおよびHIVのヌクレオキャプシドのような金属調節t蛋白質クフィンガー領域を標的化することによる抗腫瘍剤および抗ウィルス剤としての使用に関する。一連の活性化されたヨードベンズアミド誘導体は抗腫瘍および抗ウィルス薬物化合物として記載される。一般的に、これらの化合物は、キレート基、チオールトラップ基および活性化基を有する。ガン細胞およびウィルスの複製の防止における作用の仮想的なメカニズムは、ジンクフィンガー結合ドメインへの転写因子の結合の阻害を通して起こる。本化合物は、多種のヒトおよび動物の腫瘍および白血病細胞株の成長を低用量で阻害するのに効果的である。

40

ジンクフィンガー蛋白質

過去数年間において、一連の発見より、数種の蛋白質は、特定の蛋白質のコンフォメーションを安定化するのに基本的な役割を担う金属イオン、特に、亜鉛イオン(Zn²⁺)を含むことが、明らかにされた。(Berg, J. M., J. Biol. Chem., 265: 6513-6516, 1990; Berg, J. M., In Progress in Inorganic chemistry, 37: 143-190, 1989). これらの金属結合蛋白質の多くは核酸結合および遺伝子調節に関係する(Bravo, R., Cell Growth and Differentiation, 1: 305-309, 1990; Evans; R. M., およびHollenberg, S. M., Cell, 52: 1-3, 1988).

50

真核細胞の核酵素ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ[PARP(EC 2.4.2.30)]は、DNA鎖切断形成に応答して核受容体蛋白質へのニクトチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)のADP-リボース部分の転移を、触媒する(Udeaら, Annual Review of Biochemistry, 54, 73, 1985; Boulikas, T., Toxicology Letters, 67, 129, 1993; De Murciaら, Trends in Biochemical Sciences, 172, 1994)。このように形成された、蛋白質結合直鎖および分枝鎖ホモADPポリマーは、以下を含む数多くの重要な細胞プロセスに関連する。

1. DNA修復-Shell, S., Advances in Radiation Biology, 11, 1, 1984; Clear, J.E.ら, Mutation Research, 257, 1, 1991.
2. 細胞分化-Lautierら, Molecular and Cellular Biochemistry, 122, 171, 1993.
3. 遺伝子発現-Boulikas, T., Toxicology Letters, 67, 129, 1993.
4. アポトーシス-Kaufmannら, Cancer Research, 53, 3976, 1993.

10

ヒト酵素(116kDa)は、多機能性であり、二個のジンクフィンガーを含むN末端DNA結合(46kDa)、中央の自己修飾部位(22kDa)およびドメイン(54kDa)を含む

アポトーシスならびにADPRT

アポトーシスすなわちプログラム化された細胞死は、正常な胚ならびに成体の発生の間の特異的細胞欠失において、重要な役割を担う。アポトーシス細胞は、核DNAのフラグメント化ならびにアポトーシス体の形成によって特徴づけられる。分子遺伝子学的分析は、細胞外または細胞内因子により調節されるいくつかの致死遺伝子および生存遺伝子の関与を明らかにしてきている。標的細胞特異的受容体と相互作用し、細胞増殖、細胞周期の進行およびプログラム化された細胞死に関係するシグナルを伝達する多様なインデューサーおよびインヒビターが存在する。致死用量の化学療法剤および照射の適用による腫瘍細胞集団の除去は、ガン治療において、良く確立された戦略である。アポトーシス細胞死の分野における最近の発見は、抗腫瘍治療に重要なインパクトを与えることが期待される。アポトーシスは、幾つかの分子経路により人工的に操作することが可能な活性プロセスであることが知られている。

20

ポリADPRTは、DNA修復プロセスと一貫して関連している。ADPリボース化レベルは、外部要因によるDNA損傷によるポリADPRTの活性化後のヒトの疾患に、機械作用的に関連してきている。第一に、ポリADPRT活性は、用量依存的に、還元されたグルタチオンにより上昇調節され、酸化されたグルタチオンにより下降調節され、これは酵素のレドックス調節を確立する。第二に、ポリADPRT遺伝子の二つのDNA結合ドメインにおける二つのジンクフィンガーのシステイン残基は、酸化されると、おそらくDNA結合およびDNA修復における関与を妨げる。

30

芳香族C-ニトロソ誘導体の使用は、ウィルスにより誘発した疾患の処置のため、米国特許第5,516,941号に記載されている。ヨードニトロ誘導体の化学療法活性は、Mendeleyevにより報告されている(Biochemical Pharmacology, 50, 705-714, 1995)。本化合物の活性におけるニトロソ基の形成の重要性は、米国特許第5,670,518号に、開示された。この開示されたデータは、還元されたグルタチオンを用いて得られ、従って、遊離スルフィドイオンの存在が報告された化合物の活性にとって重要であると思われることを示す。ジンクフィンガーは、金属イオン、すなわちZn²⁺の配位内のスルフィドイオンを含む。開示された亜鉛放出実験において、EDTAは試薬の一つとして用いられ、EDTAの非存在下では如何なるデータも与えなかった。ジスルフィド置換ベンズアミドは、ジンクフィンガー阻害剤として示されている(Turfinら, Science, 270, 1194, 1995)。国際公開公報W0 96/22791は、抗腫瘍および抗ウィルス試薬として有用なニトロ基、ニトロソ基、ならびにアミノ基を含むリガンドを記載する。

40

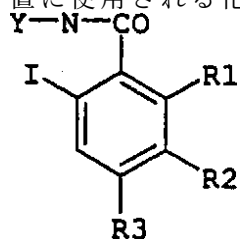
本発明により記載された化合物は、組み合わせられかつ増大した官能性を有する。この化合物は、ジンクフィンガー結合ドメインに結合することおよびこれを破壊することによってガン細胞およびウィルスの複製を阻害する。それらは、インビトロでのガン細胞成長の阻害において高い効率を示す。

発明の要旨

一つの局面において、本発明は、以下の式を有する腫瘍性疾患ならびにウィルス疾患の処

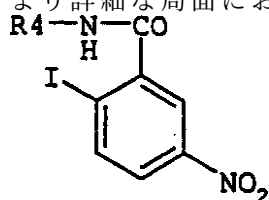
50

置に使用される化合物に関する。

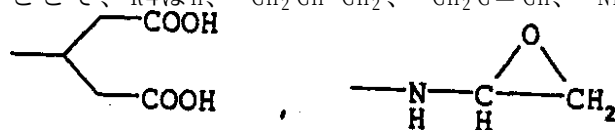


ここで、Yは、脂肪族基、芳香族基、ヘテロ環式基、炭水化物基からなる群より選択されたキレート基であり、YとNとは一緒になってヘテロ環式環を形成し、R1およびR3は同一かあるいは異なっており、そしてH、NO₂、またはNH₂であり、R2はNO₂あるいはNH₂であり、R2がNH₂のときはR1およびR3はHである。 10

より詳細な局面において、本発明は以下の式の化合物に関する。

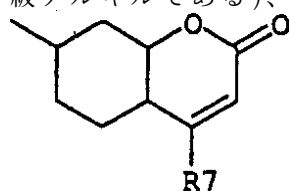


ここで、R4はH、-CH₂CH=CH₂、-CH₂C≡CH、-NHC≡CH、-NHCH=CH₂、OH、



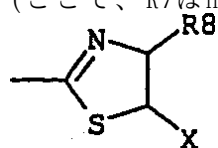
20

-(CH₂)_aN(R5)(R6) (ここで、a=1あるいは2であり、そしてR5およびR6は、Hもしくは低級アルキルである)、

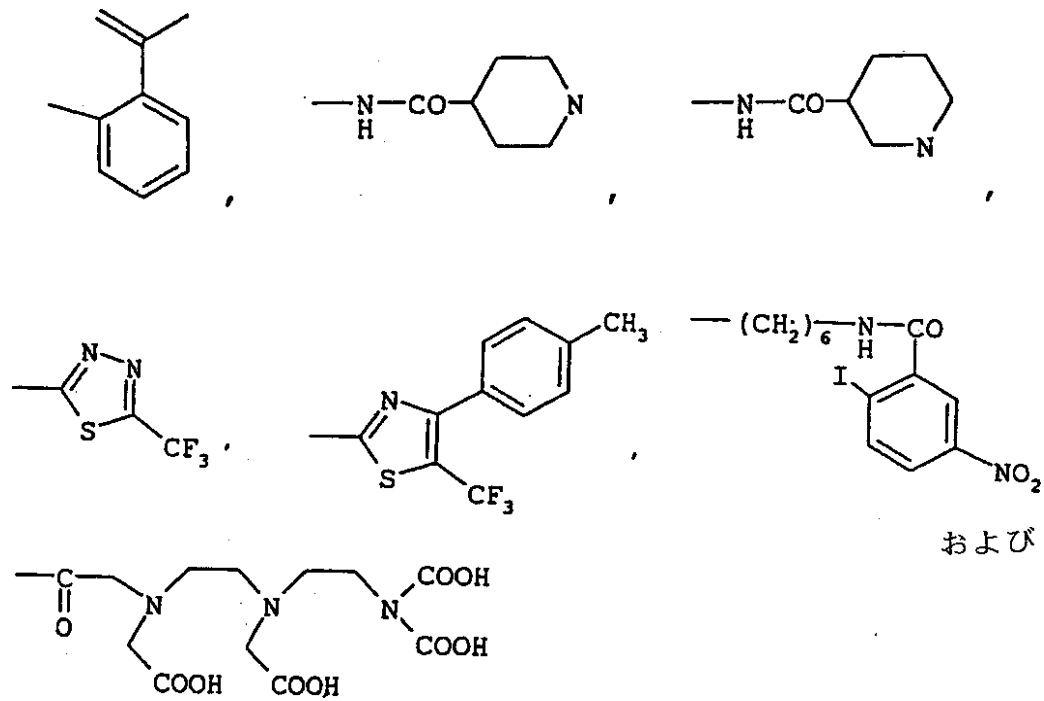


(ここで、R7はHあるいはCF₃である)、

30



(ここで、XはH、NO₂、-COOCH₃、CH₂、あるいはCH₃であり、そしてR8はHあるいはCH₃である)、

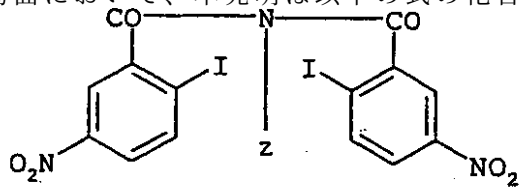


10

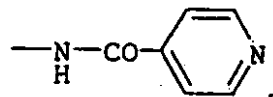
である。

別の局面において、本発明は以下の式の化合物に関連する。

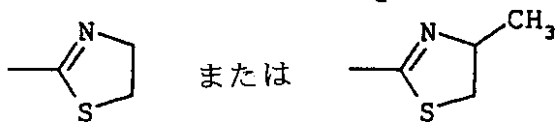
20



ここでZは

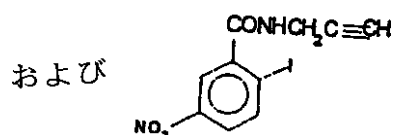
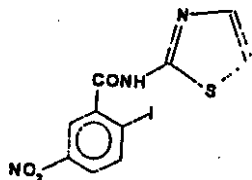
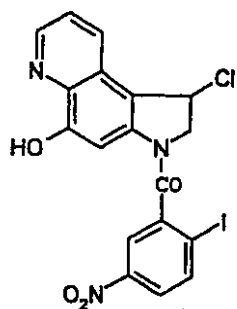


30



である。

なおさらなる局面は以下の化合物である。



本発明のさらなる局面は、薬学的に受容可能な賦形剤とともに上記化合物を含有する薬学的組成物ならびに腫瘍性疾患あるいはウィルス疾患の処置に使用される薬学的組成物である。

図面の説明

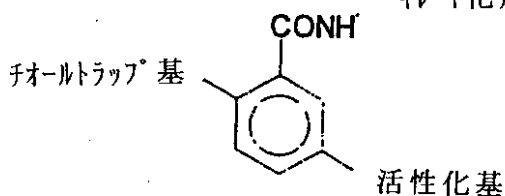
図1は、活性化ヨード誘導体の合成の概略的なまとめおよびキレート基の例の部分的リストである。

発明の詳細な説明

一連の活性化ヨード誘導体は、次の概念に基づいた標的ジंकフィンガーに発展してきている。

1. 競合キレート試薬あるいは金属イオン封鎖剤として作用する基
2. 放出したスルフィド部位をトラップするための官能基あるいは基
3. 官能性トラップ基を活性化するための官能基あるいは基
4. レセプター／リガンド相互作用を容易にするための分子のコンフォメーション

キレート化剤



いかなる理論にも束縛されることなく、これらの化合物の作用における提唱された機構を次に示す。

1. アミド結合でのキレート基は、ジंकフィンガーから亜鉛イオンを封鎖する。
2. 亜鉛イオンがこの系から涸渇すると直ぐに、発生した遊離チオール基は、分子のオルト位の官能基と反応し、安定な不可逆結合を形成する。ヨード基はこの目的のために選択される。求核性スルフィドイオンはヨード基を置換する。
3. ヨード基の置換は、活性化基、すなわち電子吸引性基により促進される。本発明の目的のために、1つまたは2つのニトロ基を選択した。

上記機構によって、本発明に記載した分子は、ポリADP-リボシルトランスフェラーゼのジंकフィンガーDNA結合ドメインにおいて、チオールと反応し得、DNA修復を阻害しそれによってアポトーシスを導くDNA損傷を増加させる。

誘導体の合成は次の工程を含む。(1)2-ヨード-5-ニトロ安息香酸の合成ならびに(2)適切な位置における基本的な構造へのキレート化剤の付加

パート I

2-ヨード安息香酸は通常の合成手順によりニトロ化される。粗2-ヨードニトロ安息香酸は、純粋な形態のメチル2-ヨード-5-ニトロベンゾエートへの転化によって精製される。本化合物は、反応混合物から結晶化する。エステルは高純度で酸に加水分解される。あるいは、酸は重炭酸塩溶液中での抽出、中和、濾過によって精製され得、そしてエチルアルコールから結晶化され得る。

パート II

方法A:

2-ヨード-5-安息香酸は、その酸クロリドを得るために塩化チオニルと処理される。更なる精製なしに、酸クロリドは、アミノ基を通してキレート化剤と反応される。アミド誘導体を調製するために、このメチルエステルは室温において5日の期間にわたって大過剰の無水アンモニアと処理される。

10

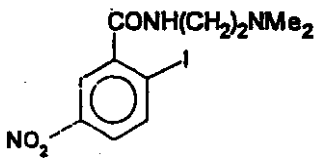
方法B:

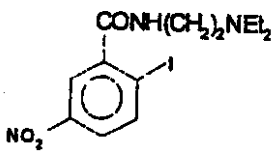
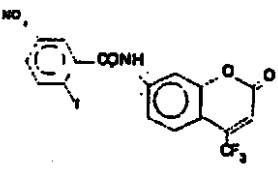
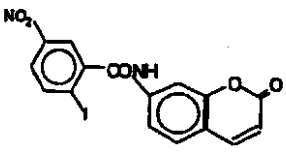
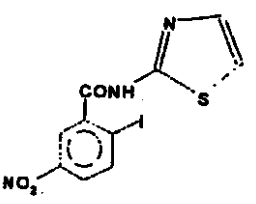
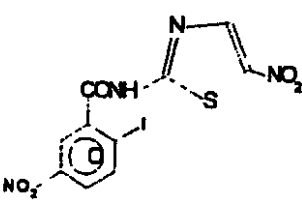
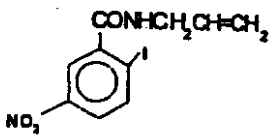
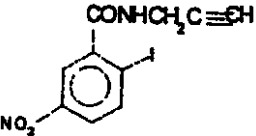
酸誘導体は乾燥DMF中に溶解させ、カルボジイミド誘導体と処理されて活性エステルを形成し、これは続いて、アミノ基をもつキレート基と処理される。結果として得られる反応混合物は24時間攪拌され、濾過される。反応混合物は濃縮され、水中に注がれる。分離した固体は濾過され、重炭酸塩溶液で洗浄され、結晶化あるいはカラムクロマトグラフィーにより精製される。

合成手順の概要を幾つかの非限定的なキレート基の例と共に図1に示す。この方法を用いて、表1に示した誘導体が調製された。

20

表 1:

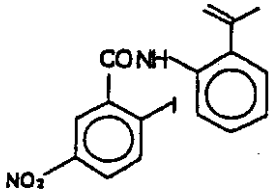
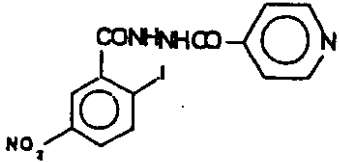
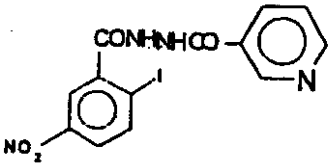
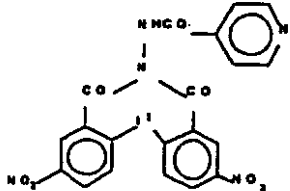
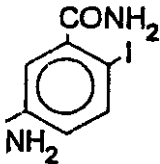
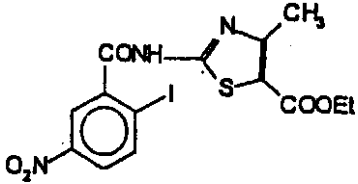
リファレンス番号	構造	分子量	融点
1		363	126 - 128°C

2		391	124 - 126°C
3		504	223 - 227°C
4		436	273 - 277°C
5		375	210 - 213°C
6		420	230 - 234°C
7		332	155 - 158°C
8		330	204 - 206°C

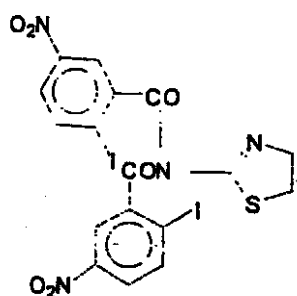
10

20

30

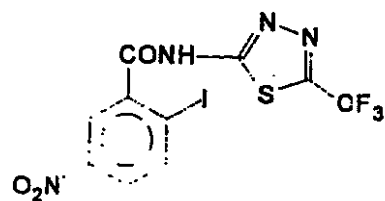
9		498	155 - 158°C	
10		412	256 - 259°C	10
11		412	217 - 221°C	
12		687		20
13		278	255 - 258°C	30
16		461	211 - 212°C	40

17



652

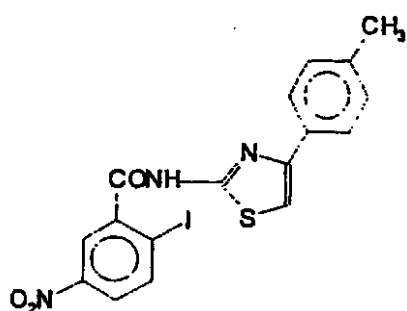
18



444.13

219 - 221 °C

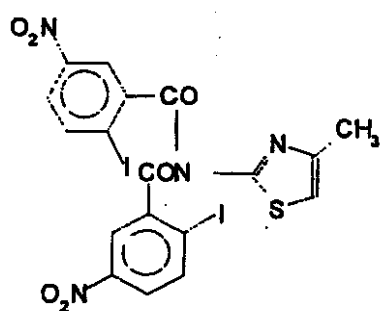
19



465

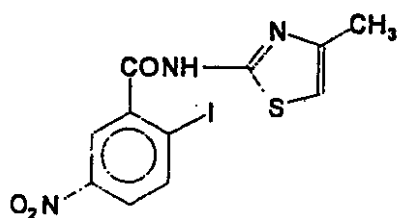
244 - 248 °C

20



664

21



389

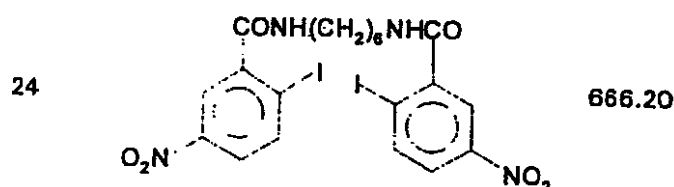
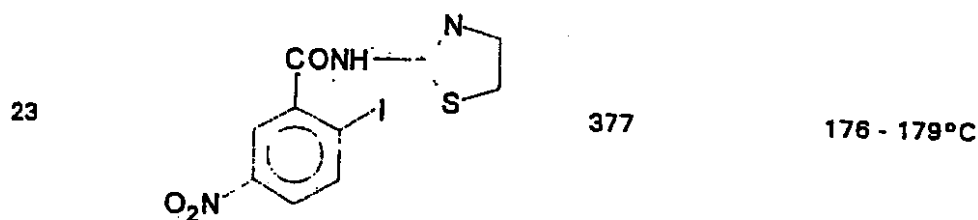
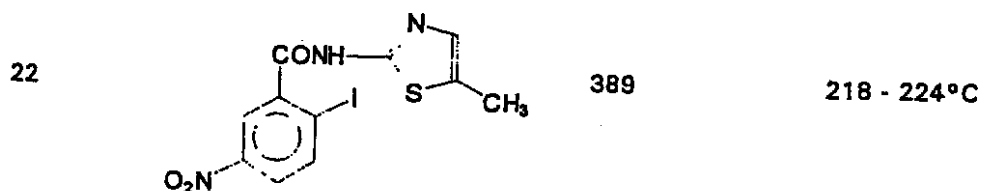
180 - 181 °C

10

20

30

40



実施例 1：2-ヨード-5-安息香酸：

2-ヨード安息香酸(100g)を400mL濃硫酸に溶解し、2リットル三口フラスコに仕込んだ。このフラスコに、還流冷却器、恒温槽ならびに滴下漏斗を装着した。発煙硝酸(400ml)を滴下した。この滴下は、二時間に渡り、温度が80°Cまで上昇するように調整した。滴下の間、反応混合物を激しく攪拌し、さらに二時間温度を80°Cに保持した。反応終了後、この反応混合物をゆっくりと克ち割った氷(3kg)に注いだ。内容物を放置しそして濾過した。黄色の沈殿物を回収し、30°Cで乾燥させた。収量は90gであった。

実施例 2：メチル2-ヨード-5-ニトロ-ベンゾエート：

5リットル三口フラスコ中で、2-ヨード-5-ニトロ安息香酸(100g)をメタノール(3000ml)に溶解した。このフラスコに還流冷却器を装着し、冷却しながら50mlの濃硫酸を注意深く加えた。添加を終了した後、この内容物を反応が終了するまで三日間環流した。反応はTLCにより追跡した。反応終了後、反応混合物を1000mlに濃縮し、冷却した。生成物は薄黄色粉末として結晶化した。この固体物質を濾過し、水およびメタノールで洗浄し、そして風乾した。収量は90gであった。

実施例 3：2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド：(15)

10リットルの三口フラスコ中で、精製したメチル-2-ヨード-5-ニトロ-ベンゾエート(100g)を無水メタノール(4000ml)に溶解した。この反応フラスコにメカニカルスターラーを装着した。この溶液を、氷冷しながら三時間無水アンモニアガスで飽和した。この反応混合物を五日間攪拌した。12時間の間隔をおいて溶液に清浄なアンモニアガスを通気した。反応は、TLCにより追跡し、五日後終了した。窒素ガスを反応溶液中に通気して、溶解した過剰のアンモニアガスを除去した。その後、反応溶液を1500mlに濃縮し、一晩で生成物が結晶化した。この固体物質を濾過し、氷で冷却したメタノールで洗浄し、そして風乾した。固体をエタノールから再結晶した。収量は80gであった。

実施例 4：(N,N-ジメチルアミノエチル)-2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド(1)：

2-ヨード-5-ニトロ-安息香酸(3mmoles)を乾燥ジクロロメタン-DMF混合物(v/v 4:1, 5ml)の溶液に溶解した。氷で冷却した溶液に6mmolesの塩化チオニルを加えた。この反応混合物を室温で二時間攪拌した。次いで、溶媒をロータリーエバポレーターを用いてエバポレートした。残渣を50°Cで30分間真空下で乾燥した。残渣を、精製せずに、乾燥ジクロロメタン(5ml)中に溶解した。次に、この溶液を0°Cに冷却した。この溶液に、トリエチルアミン(1ml)とN,N-ジメチルエチレンジアミン(3mmole)のジクロロメタン溶液を加えた。反応混合物を16時間室温で攪拌した。反応終了後、反応混合物を水に注ぎ、そして2M NaOHを用いてpH 12まで、塩基性化した。有機層を分離し、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウ

ムで乾燥させ、濃縮した。(N,N-ジメチルアミノエチル)-2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド化合物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離した。収率は70%であった。融点は126-128°Cであった。

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.27(s 6H, CH₃); 2.55(t J=5.7Hz, 2H, CH₂N-); 3.55(q, J=5.7Hz, 2H, CONHCH₂-); 6.56(br s, 1H, NH); 7.93(dd, J=3.0Hz, J=8.7Hz, 1H, フェニル, H=4); 8.21(d, J=3.0Hz, 1H, フェニル, H=6)

実施例 5 : (N,N-ジエチルアミノエチル)-2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド (2) :

実施例4に記載した方法に基づき、収率75%で調製した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.04(t, J=7.2Hz, 6H, CH₃CH₂); 2.58(q, J=7.2Hz, 4H, CH₃CH₂-), 2.69(t, J=5.7Hz, 2H, CH₂N-); 3.53(q, J=5.7Hz, 2H, CONHCH₂-); 6.64(br., s, 1H, NH); 7.93(dd, J=3.0Hz, J=8.7Hz, 1H, 芳香族 H-3); 8.10 (d, J=8.7Hz, 1H, 芳香族 H-4); 8.21(d, J=3.0 Hz, 芳香族 H-6).

10

融点は124-125°Cであった。

実施例 6 : N-(アリル)-2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド (7) :

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は58%であった。融点は155-158°Cであった。

¹H NMR(CDCl₃) δ 8.80(t, J=5.4Hz, 1H, NH); 8.20(d, J=8.4 Hz, 1H, フェニル H-4); 8.07(d, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-6); 7.96 (dd, J=8.4Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-3); 5.85-5.98(m, 1H, CH=); 5.30 (dd, J=17.7Hz, J=1.5Hz, 1H, =CH); 5.14(dd, J=10.5Hz, J=1.5 Hz, 1H, =CH); 3.88-3.11(m, 2H, CH₂-)

20

実施例 7 : N-(プロパルギル)-2-ヨード-5-ニトロ-ベンズアミド (8) :

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は20%であった。融点は204-206°Cであった。

¹H NMR(CDCl₃) δ 9.10 (t, J=5.1Hz, 1H, NH); 8.20(d, J=8.4Hz, 1H, フェニル H-6); 7.97(dd, J=8.4Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-3); 8.04(d, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-6) 4.07 (dd, J=2.4Hz, J=5.4 Hz, 2H, -CH₂-); 3.21 t, J=2.4Hz, アセチレン H)

30

実施例 8 : N-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンゾイル)-2-イソプロペニルアニリン (9) :

実施例4に記載した方法に基づき調製した。融点は155-158°Cであった。

¹H NMR: (CDCl₃) δ: 8.42 (d, J=8.1 Hz, 1H, フェニル H-6'), 8.29 (d, J=2.4 Hz, 1H, フェニル H-2'); 8.15 (d, J=9.0 Hz, フェニル H-6); 7.989 (dd, J=8.1Hz, J=2.4Hz, 1H, フェニル H-5), 7.91 (s, 1H, NH); 7.34-7.40 (m, 1H, フェニル H-3'); 7.17-7.25 (m, 2H, フェニル H-4 & H-5); 5.39 (d, J=1.2Hz, 1H, ビニルH); 5.10 (d, J=1.2Hz, 1H, ビニルH), 2.12 (s, 3H, CH₃)

実施例 9 : 7-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-4-トリフルオロメチル-2H-1-ベンゾピラン-2-オン (3) :

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は10%であった。融点は223-227°Cであった。

40

¹H NMR: (DMSO-d₆) δ 11.22 (s, 1H, NH); 8.39 (d, J=2.4 Hz, フェニル H-6'); 8.29 (d, J=8.7 Hz, 1H, フェニル H-4'); 8.06 (dd, J=8.7Hz, J=2.4Hz, 1H, フェニル H-3'); 7.96 (d, J=1.5Hz, 1H, ベンゾピラン H-8); 7.77 (dd, J=9Hz, J=1.5Hz, 1H, ベンゾピラン H-6); 7.68 (dd, J=9Hz, J=1.5Hz, 1H, ベンゾピラン H-3)

実施例10 : 7-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-2H-1-ベンゾピラン-2-オン (4) :

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は15%であった。融点は273-277°Cであった。

¹H NMR: (DMSO-d₆) δ 10.86(s, 1H, NH); 8.33 (d, J=2.7 Hz, 1H, フェニル H-6'); 8.27(d, J=8.7Hz, 1H, フェニル H-4'); 8.20 (d, J=2.4Hz, H' シ' ビ' ラン H-6); 8.17(d, J=9.9Hz, 1H, ベ' シ' ビ' ラン H-4'); 8.04(dd, J=8.7Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-3'); 7.76 (dd, J=8.7Hz, J=2.4Hz, 1H, ベ' シ' ビ' ラン H-7); 7.45 (d, J=8.7Hz, 1H, ベ' シ' ビ' ラン H-8); 6.53(d, J=9.9Hz, 1H, ベ' シ' ビ' ラン H-3)

実施例11: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-チアゾール(5)

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は16%であった。融点は210-213℃であった。

¹H NMR: (DMSO-d₆) δ 12.85(b.s., 1H, NH); 8.38 (d, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-6'); 8.26 (d, J=8.4Hz, 1H, フェニル H-4); 8.04 (dd, J=8.4Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-3'); 7.57 (d, J=3.6Hz, 1H, チアゾール H-4); 7.36 (d, J=3.6Hz, 1H, チアゾール H-5)

10

実施例12: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-5-ニトロ-チアゾール(6):

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は13%であった。融点は230-234℃であった。

¹H NMR: (DMSO-d₆) δ 13.5 - 14.00 (br, 1H, NH O); 8.72(s, 1H, ニトロチアゾール H-4); 8.52 (d, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-6'); 8.30 (d, J=8.7Hz, 1H, フェニル H-4); 8.09 (dd, J=8.7Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-4'); 8.09 (dd, J=8.7Hz, J=2.7Hz, 1H, フェニル H-3')

実施例13: N-(4'-ピリジル)-2-ヨード-5-ニトロフェニル ヒドラジド(10):

実施例4に記載した方法に基づき調製した。収率は55%であった。融点は256-259℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 11.11 (s, 1H, NH); 10.79 (s, 1H, NH); 8.81 (d, J = 5.7 Hz, 2H, ヒ' リジ' ル H-3, H-5); 8.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.18 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.06 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 7.86 (d, J = 5.7 Hz, 2H, ヒ' リジ' ル H-2, H-6)

20

実施例14: N-(3'-ピリジル)-2-ヨード-5-ニトロフェニルヒドラジド(11):

実施例4に記載した方法に基づき調製した。融点は255-258℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 11.01 (s, 1H, NH); 10.76 (s, 1H, NH); 9.10 (d, J = 1.5 Hz, 1H, ヒ' リジ' ル H-2); 8.79 (dd, J = 4.8 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, ヒ' リジ' ル H-6); 8.28 - 8.31 (m, 1H, ヒ' リジ' ル H-4); 8.29 (d, J = 8.7 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.18 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.06 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 7.59 (dd, J = 7.8 Hz, J = 4.8 Hz, 1H, ヒ' リジ' ル H-5)

30

実施例15: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-3-メチル-4-エチルカルボキシ-チアゾール(16):

融点は211-212℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 13.25 (s, br, 1H, NH); 8.43 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.27 (d, J = 8.7 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.05 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 4.27 (q, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₃); 2.59 (s, 3H, CH₃); 1.31 (t, J = 6.9 Hz, CH₃CH₂)

40

実施例16: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-2-チアゾリン(17):

融点は176-179℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 9.94 (s, br, 1H, NH); 8.52 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.31 (d, J = 8.4 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.01 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 3.75 (t, J = 7.5 Hz, 2H, チアゾリン H-4); 3.38 (m, 2H, チアゾリン H-5)

実施例17: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-5-トリフルオロメチル-1,2,4-チアジアゾール(18):

融点は219-221℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 14.02 (s, br, 1H, NH); 8.53 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.10 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4)

実施例18: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-4-トリル-チアゾール(19):

融点は244-248℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 12.98 (s, 1H, NH); 8.41 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.26 (d, J = 8.4 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.05 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 7.81 (d, J = 8.1 Hz, 2H, トリル H-3, H-5); 7.69 (s, 1H, チアゾール H-5); 7.25 (d, J = 8.1 Hz, 2H, トリル H-2, H-6); 2.33 (s, 3H, CH₃)

10

実施例19: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-4-メチル-チアゾール(21):

融点は218-224℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 12.78 (s, br, 1H, NH); 8.36 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.03 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 6.89 (s, 1H, チアゾール H-5); 2.29 (s, 3H, CH₃)

実施例20: 2-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-5-メチル-チアゾール(22):

融点は180-181℃であった。

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 12.78 (s, br, 1H, NH); 8.36 (d, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-6); 8.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H, フェニル H-3); 8.03 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, フェニル H-4); 6.89 (s, 1H, チアゾール H-5); 2.29 (s, 3H, CH₃)

20

実施例21: 1,6-ジ-(2'-ヨード-5'-ニトロ-ベンズアミド)-ヘキサン(24):

¹H NMR: (DMSO d₆) δ 8.59 (t, J = 5.7 Hz, 2H, NH); 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 2H, フェニル H-3); 8.03 (d, J = 2.7 Hz, 2H, フェニル H-6); 7.95 (dd, J = 8.4 Hz, J = 2.7 Hz, 2H, フェニル H-4); 3.22 - 3.29 (m, 4H, CH₂NH); 1.3 - 1.65 (2つのbr m, 8H, (CH₂)₄)

インビトロ活性

材料と方法

細胞培養: ヒト細胞株を、無菌条件下で、10% ウシ胎仔血清 (Hyclone)、2 mM L-グルタミン、ならびに重炭酸ナトリウムを含む RPMI 1640 (CellGrow) (完全培地) で、増殖させ、5% CO₂ および 95% の湿度を有する HEPA 濾過 Sterilcult CO₂ 組織培養インキュベーター (Forma) 中で、37℃ でインキュベートした (表 1)。マウス白血病細胞株を、10% ウマ血清 (Hyclone)、2 mM L-グルタミン、ならびに重炭酸ナトリウムを含むダルベッコの MEM 培地 (完全培地) 中で増殖させ、上記のようにインキュベートした。細胞を、週に二度継代培養し、実験に使用した。この培養物を GeneProbe[™] (Fisher) を使用してマイコプラズマ汚染についてスクリーニングし、陽性培養物を BM-Cyclin[™] 抗生物質コンビネーション (Boehringer Mannheim) で一定処置を用いて三継代にわたって汚染を取り除いた。マイコプラズマが存在しないと確認された培養物のみ抗細胞活性について化合物を試験するのに使用した。

30

表 2:

細胞株	起源
COLO 205	結腸腺がん
A549	気管支原性
RPMI 8226	骨髄腫
MCF7	胸部腺がん
M14	黒色腫
SK-MEL-5	黒色腫
SK-PV-3	卵巣腺がん
B16	マウス黒色病
L1210	マウス白血病
P388	マウス白血病

10

試験サンプル

試験化合物を、遮光下において4℃で保存した。試験化合物の重量を測定し、DMSOに溶解した。その後、この溶解した化合物を、沈殿を最小にするため一定の混合下で、温かい培地(RPMI 1640あるいはダルベッコのMEM)に連続希釈した。陽性の対照薬物であるドキソルビシンを、水に希釈した後、培地で希釈し、最終濃度を200nMにした。

20

実験計画

全ての実験において、細胞を採取し、遠心分離して培地を除去し、そして新鮮な完全培地中に懸濁した。サンプルを取って細胞密度を測定した。細胞計数を、Coulter Model Z1細胞カウンターを用いて決定し、生存率を、ヨウ化プロピジウム染色により測定し、続いてCoulter EPPICS Elite Flow cytometerで分析した。細胞のサンプルを、接着細胞株について 5×10^4 /mLの密度まで、そして懸濁株について、 1×10^5 /mLの密度まで完全な培地で調節した。組織培養クラスタープレート(96ウェル、接着ヒト株についてcat No. 3595 Costarおよびマウス白血病についてcat No. 25850 Corning)を100 μ L細胞で播種し、上述したようにインキュベートした。プレートの複製グループを、各株について設定し、単一の薬剤と組合せについての曝露オプションを調節した。それぞれの希釈について、プレティ

30

ニュートラルレッドアッセイ

接着細胞株に対する化合物の抗細胞効果は、ニュートラルレッド色素を用いて評価した。分析の日に、培地をサンプル細胞単層から除去し、そして0.1mLのニュートラルレッド溶液(0.5%ニュートラルレッド、HBSS:RPMI 1640(1:1), 0.05M HEPES, pH 7.2)と取り替えた。一時間37℃においてサンプルをインキュベーションした後、過剰の色素をブロットィングで除去し、単層を、0.85%NaCl溶液(一回の洗浄につき0.1mL)で二回洗浄した。色素と会合した細胞を、0.1M NaH_2PO_4 : エタノール(1:1)溶液/ウェルを0.2mL添加することによって抽出し、後に、35℃で一時間インキュベートした。それぞれの単層のニュートラルレッドの吸光度を、Denley Anthos 2001マイクロプレートリーダー上で550nm(620nmのリファレンスビーム)において測定した。データ処理のために、データをARCOMソフトウェアキャプチャープログラムを介して、Lotus 1-2-3に移した。

40

クリスタルバイオレットアッセイ

ニュートラルレッドの結晶化のために技術的困難性が生じるアッセイにおいて、クリスタルバイオレット染料手順を用いてプレート上に残された細胞の量を測定した。クリスタルバイオレット染色溶液[0.5%クリスタルバイオレット(w/v), 50%メタノール(v/v)、45%生理食塩水(v/v)、ならびに5%ホルマリン(v/v)]を染色の日に調製した。サンプルウェ

50

ルから培地を除去した後、二滴のクリスタルバイオレット染料をそれぞれのウェルに添加し、サンプルを、10分間周囲温度でインキュベートした。過剰の染料はデカントして除去し、水で洗浄し、プレートは、周囲温度で一晩乾燥させた。吸光度はDenley Anthos 2001マイクロプレートリーダーを用いて550nmで測定した。データを処理するため、データをARCOMソフトウェアキャプチャプログラムを介して、Lotus 1-2-3に移した。

XTTアッセイ

マウス白血病細胞株の抗細胞効果は、懸濁培養物により適したXTT色素変換アッセイを用いて評価した。XTT分析の日に、[2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルフォフェニル)-5-[(フェニルアミノ)カルボニル]-2H-テトラゾリウムヒドロキシド、内部塩、ナトリウム塩(Sigma)]を量り取り、培地に1 mg/mlで溶解した。PMS(フェナジンメトスルフェート)をPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)中5mMで調製し、4°Cでストック溶液として保存した。このPMSを、溶解させたXTTと混合し、最終濃度0.025mMにした。サンプルウェルを50μlのXTT溶液で処理し、プレートを37°Cで四時間インキュベートし、液体可溶性ホルマザン生成物に転化した。インキュベーション期間後、反応を一個のウェルにつき10% SDS溶液10μlを添加することによって停止させ、それぞれのプレートのウェル内容物を攪拌によって混合した。それぞれの単層中のホルマザンの吸光度はDenley Anthos 2001マイクロプレートリーダーを用いて450nm(620nmリファレンスビーム)で測定した。データを処理するため、データをARCOMソフトウェアキャプチャプログラムを介して、Lotus 1-2-3に移した。

実施例22:IC50アッセイ

上述した手順を用いて、細胞の増殖と成長を50%阻害するために必要な例示化合物の濃度(IC₅₀値)を、試験細胞株中で決定した。結果は表3に記載している。

表3：ヒトおよび動物細胞株における例示化合物のIC50濃度(μM)

細胞株	A549	B16	M14	MCF 7	SK MEL-5	SK-OV-3	COLO 205	RPM 18226	L1210	P388
リファレンス #										
1	332.86	47.9	473.87	133.42	40.11	404.11	266.78		283.29	352.95
2	333.38	9.21		128.15		400.46	342.93		122.82	379.71
3	362.55	15.84	126.08	114.05	37.74	44.01	39.88		44.15	14.31
4	> 500.00	15.86	> 500.00	> 500.00	> 500.00	395.45	> 500.00			
5	48.55	30.79	17.42	26.98	46.23	32.79	13.4			
6	86.51	54.99	140.89	80.9	131.83	129.73	116.85		> 6.17	
7	133.73	45.09	41.78		124.01	46.37	38.49			39.42
8	46.56	50.04	49.03	47.67	90.42	43.42	30.58			25.8
9	> 500.00	462.07	> 500.00	100.19	> 500.00	> 500.00				
10	> 500.00	300.87	> 500.00	> 500.00	> 500.00	360.8	441.08		> 18.52	> 18.52
11	387.43	128.84	466.55		413.09	381.33	110.97		55.56	> 55.56
12	297.89	45.98	133.6	117.71	45.36	45.65	35.83		39.82	39.73
13	> 500.00	499.87	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00			439.03
15	37.35	133.87	36.14		313.73	141.18	33.18			
16	30.12	7.93	37.29	34.32	41.73	41.19	31.23	10.58	41.11	11.22
17	126.62	27.89	37.89	46.88	42.79	32	> 500.00	> 500.00	29.19	0.9
18	15.67	20.78	27.29	24.04	28.82	73.01	41.29	15.71	28.38	12.84
19	162.56	5.15	14.43	35.5	51.34	33.18	18.23	11.75	13.54	2.43
20	48.38	8.46	15.1	36.1	47.08	10.84	42.63	13.67	38.45	11.72
21	43.66	5.13	13.16	12.5	15.04	15.7	5.59	3.33	12.84	3.44
22	45.2	5.2	14.51	14.81	15.3	16.09	13.5	12.66	12.83	3.64
23	> 500.00	128.6	150.5	161.6	124.7	> 500.00	81.89	236.8	> 500.00	352.9
24	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00	> 500.00

表3のデータからわかり得るように、例示化合物は、多種のヒトならびに動物ガン細胞株の成長を阻害するのに、優れた効率を示す。

物理化学的、毒物学的ならびに薬物動力学的特性の決定は、標準的な化学アッセイおよび生物学的アッセイを使用して、ならびに化学的、薬理的／毒物学的技術において知られ

ている数学的モデル化技術の使用を通して、なされ得る。治療有用性ならびに投薬レジメンは、そのような技術の結果から、ならびに適切な薬物動力学的および／または薬力学モデルの使用を通して外挿することができる。

本発明の化合物は、ヒト患者を含む、その必要がある動物ヘニートでまたは薬学的賦形剤／キャリアーと共に、投与され得る。薬学的キャリアーは固体または液体であり得る。

固体キャリアーは、香味剤、潤滑剤、可溶化剤、懸濁剤、フィラー、滑剤(glidant)、圧縮補助剤、バインダー、または錠剤崩壊剤としても作用し得る一つ以上の物質を含み得；それはまた、カプセル化物質であり得る。粉末においては、キャリアーは細かく分割された固体であり、これは細かく分割された活性成分との混合物である。錠剤において、この活性成分は、必要な圧縮特性を有するキャリアーと、適切な比率で混合され、所望の形状および大きさに圧縮される。この粉末や錠剤は99%までの活性成分を含み得る。適切な固体キャリアーは、例えば、リン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、デキストリン、でんぷん、ゼラチン、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリジン、低融点ワックスおよびイオン交換樹脂を含む。

10

液体キャリアーは、溶液、懸濁液、乳濁液、シロップ、エリキシル、ならびに加圧組成物を調製するときに使用される。この活性成分は、水、有機溶媒、それらの混合物あるいは薬学的に受容可能な油または脂肪のような薬学的に受容可能な液体キャリアーに溶解あるいは懸濁することができる。この液体キャリアーは、可溶化剤、乳化剤、緩衝剤、防腐剤、甘味料、香味料、懸濁剤、増粘剤、着色剤、粘度調節剤、安定化剤、もしくは浸透圧調節剤のような他の適切な薬学的添加剤を含み得る。経口投与および非経口投与のための液体キャリアーの適切な例は、水(部分的に上記の添加剤を含む、例えば、セルロース誘導体、おそらくカルボキシメチルセルロースナトリウム溶液)、アルコール(一価アルコールおよび多価アルコール、例えばグリコールを含む)ならびにそれらの誘導体、ならびに油(例えば分留されたココナッツオイルおよびアラキスオイル)を含む。非経口投与のために、このキャリアーはまた、オレイン酸エチルならびにミリスチン酸イソプロピルのような油状エステルであり得る。無菌液体キャリアーは、非経口投与のために、無菌液体形態の組成物に有用である。圧縮組成物のための液体キャリアーは、ハロゲン化炭化水素または他の薬学的に受容可能なプロペラント(propellant)であり得る。

20

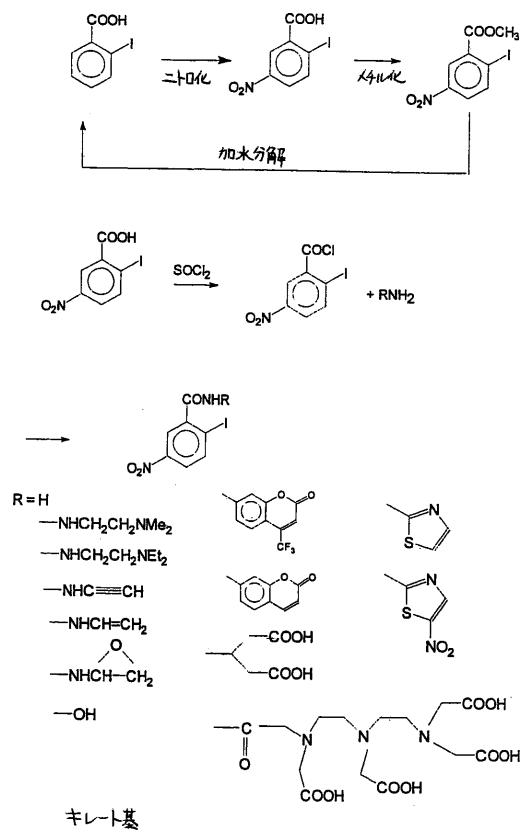
無菌の溶液または懸濁液である液体薬学的組成物は、例えば、筋肉内、膜腔内または皮下注射により使用され得る。無菌溶液はまた静脈内投与され得る。この化合物はまた、液体あるいは固体組成物の形態のいずれかで、経口投与され得る。

30

薬学的組成物は、例えば、錠剤やカプセルのような単位投薬形態であり得る。そのような形態においては、組成物は、適切な量の活性成分を含む単位用量に細分される。この単位投薬形態はパッケージされた組成物、例えば包装された粉末、バイアル、アンプル、予め満たされたシリンジまたは液体を含んだ小袋であり得る。この単位投薬形態は、例えば、カプセルもしくはそれ自身で錠剤であり得るか、あるいはそれは、適切な数の任意のこのような組成物のパッケージ形態であり得る。処置に使用される投薬は、本質的に医師によって決定されなければならない。

前述の実施例からわかるように、詳細に記載されていない手順は、従来のものである。変形および改良は当業者に明らかであり、上述した記載および添付の請求の範囲に含まれることが意図される。

40



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

A 6 1 K 31/433 (2006.01)
A 6 1 K 31/437 (2006.01)
A 6 1 K 31/4409 (2006.01)
A 6 1 K 31/4462 (2006.01)
A 6 1 K 31/4465 (2006.01)
A 6 1 K 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 31/12 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
C 0 7 C 233/78 (2006.01)
C 0 7 D 211/60 (2006.01)
C 0 7 D 211/62 (2006.01)
C 0 7 D 213/80 (2006.01)
C 0 7 D 277/18 (2006.01)
C 0 7 D 277/20 (2006.01)
C 0 7 D 277/44 (2006.01)
C 0 7 D 285/135 (2006.01)
C 0 7 D 303/48 (2006.01)
C 0 7 D 311/16 (2006.01)
C 0 7 D 311/18 (2006.01)
C 0 7 D 471/04 (2006.01)

F I

A 6 1 K 31/433
A 6 1 K 31/437
A 6 1 K 31/4409
A 6 1 K 31/4462
A 6 1 K 31/4465
A 6 1 K 35/02
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00
C 0 7 C 233/78
C 0 7 D 211/60
C 0 7 D 211/62
C 0 7 D 213/80
C 0 7 D 277/18
C 0 7 D 277/44
C 0 7 D 285/12
C 0 7 D 303/48
C 0 7 D 311/16
C 0 7 D 311/18
C 0 7 D 471/04

F

1 0 2

(72)発明者 ナイッカー, セルバラジ

カナダ国 ティー6ジェイ 3ジェイ4 アルバータ, エドモントン, 117ティージェイ ストリート 3304

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献 特表平08-510452 (JP, A)

特表平10-505856 (JP, A)

特開昭53-002448 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C233/00

A61K 31/00

C07D211/00

C07D213/00

C07D277/00

C07D285/00

C07D303/00

C07D311/00

C07D471/00

Caplus(STN)

REGISTRY(STN)