

(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2011-521986

(P2011-521986A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.

C07D 213/64 (2006.01)
C07D 405/04 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/4433 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

F 1

C 07 D 213/64
C 07 D 405/04
A 61 K 31/4412
A 61 K 31/4433
A 61 P 35/00

テーマコード(参考)

4 C 055
4 C 063
4 C 086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-512021(P2011-512021)
(86) (22) 出願日 平成21年6月4日(2009.6.4)
(85) 翻訳文提出日 平成23年2月7日(2011.2.7)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2009/004005
(87) 國際公開番号 WO2009/146910
(87) 國際公開日 平成21年12月10日(2009.12.10)
(31) 優先権主張番号 0810228.7
(32) 優先日 平成20年6月4日(2008.6.4)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

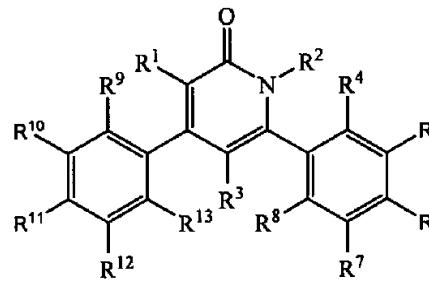
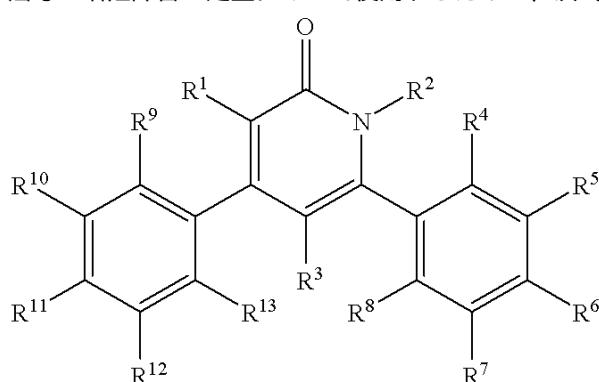
(71) 出願人 510322007
スピア・セラピューティクス・リミテッド
S p e a r T h e r a p e u t i c s
L i m i t e d
英國エルイー・7エルティ、レスター・
ヤー、レスター、リージェント・ロード1
10番、ウエスト・ウォーク・ビルディング
(74) 代理人 100068526
弁理士 田村 恭生
(74) 代理人 100100158
弁理士 鮫島 睦
(74) 代理人 100138900
弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌に対する4, 6-ジフェニルピリド-2-オン

(57) 【要約】

癌等の増殖障害の処置において使用するための、次式



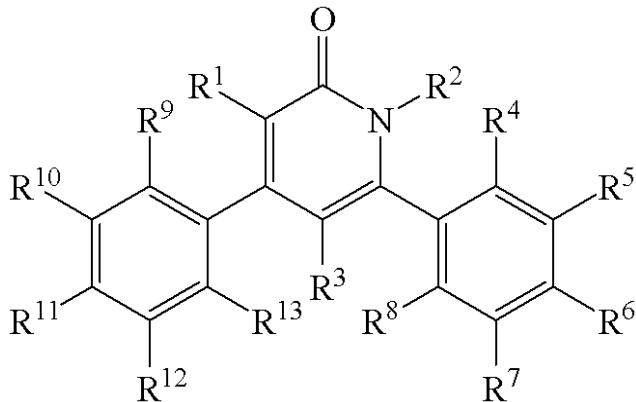
[式中、R¹、R²およびR³は独立にHまたは低級アルキルであり；R⁴、R⁵、R⁶、R⁷およびR⁸は独立に、H、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであつて、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合つたR⁴～R⁸のペアの少なくとも1つが一緒にになって-O-(CR¹⁴R¹⁵)_n-O-を形成し、ここでnは1または2であり、R¹⁴およびR¹⁵

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1】



(I)

[式中、

 R^1 、 R^2 および R^3 は独立にHまたは低級アルキルであり；

R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 は独立に、H、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合った R^4 ～ R^8 のペアの少なくとも1つが一緒になって-O-(CR¹⁴R¹⁵)_n-O-を形成し、ここでnは1または2であり、 R^{14} および R^{15} は独立にHまたは低級アルキルであり、 R^4 ～ R^8 の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであり；および

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} および R^{13} は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合った R^9 ～ R^{13} のペアの少なくとも1つが一緒になって-O-(CR¹⁶R¹⁷)_m-O-を形成し、ここでmは1または2であり、 R^{16} および R^{17} は独立にHまたは低級アルキルであり、 R^9 ～ R^{13} の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルである]

で示される化合物またはその製薬的に許容し得る塩、溶媒和物、アミド、エステル、エーテル、化学的に保護された形態またはプロドラッグ。

【請求項 2】

 R^6 および R^{11} の両方が-OMeである請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

R^9 、 R^{12} および R^{13} が独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、 R^{10} および R^{11} が一緒になって-O-C(R¹⁶R¹⁷)_m-O-を形成し、mが好ましくは1である、請求項1または2記載の化合物。

【請求項 4】

 R^9 、 R^{12} および R^{13} がHである請求項3記載の化合物。

【請求項 5】

 R^{16} および R^{17} の両方がHである請求項3または4記載の化合物。

【請求項 6】

R^9 ～ R^{13} の1つが-O-R¹⁸であり、 R^{18} は低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 7】

 R^{10} ～ R^{12} の1つ、好ましくは R^{11} 、が-O-R¹⁸である請求項6記載の化合物。

【請求項 8】

前記 R^9 ～ R^{13} の残りの基がHである、請求項6または7記載の化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

R^{18} が、 C_{1-4} または C_{1-3} アルキル、好ましくは n -プロピルである、請求項6～8のいずれかに記載の化合物。

【請求項 10】

R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 および R^8 の少なくとも2つが- O -低級アルキルである請求項1～9のいずれかに記載の化合物。

【請求項 11】

R^4 および R^6 または R^5 および R^6 が- O - R^{19} であり、残りの基が独立にH、ハロまたは低級アルキルであり； R^{19} が好ましくは C_{1-4} または C_{1-3} アルキル、好ましくはメチルである、請求項10記載の化合物。

10

【請求項 12】

R^6 が- O - R^{19} であり、 R^{19} は低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、 R^{19} は好ましくは C_{1-4} または C_{1-3} アルキル、好ましくはメチルである、請求項1～9のいずれかに記載の化合物。

20

【請求項 13】

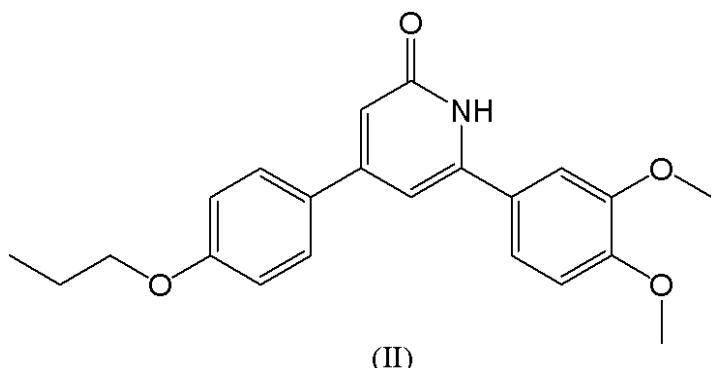
R^4 ～ R^8 の残りの基がHである請求項10～12のいずれかに記載の化合物。

【請求項 14】

各低級アルキルが C_{1-6} 、好ましくは C_{1-4} または C_{1-3} である請求項1～13のいずれかに記載の化合物。

【請求項 15】

前記化合物が

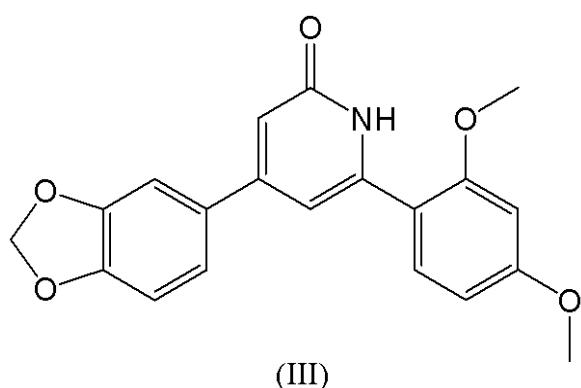
【化2】

30

である請求項1記載の化合物。

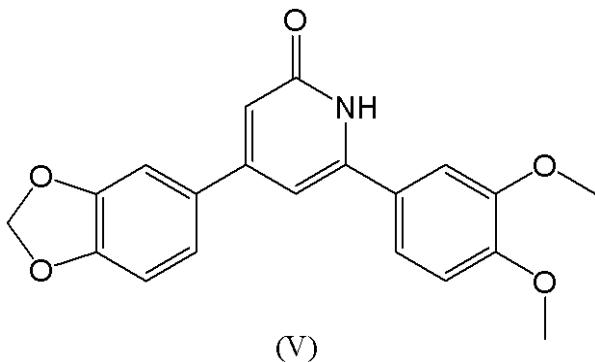
【請求項 16】

前記化合物が

【化3】

40

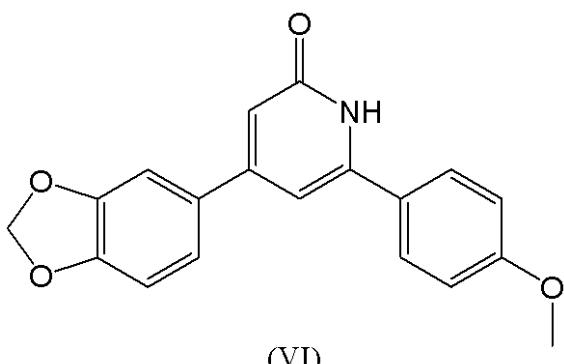
【化4】



10

または

【化5】



20

である請求項1記載の化合物。

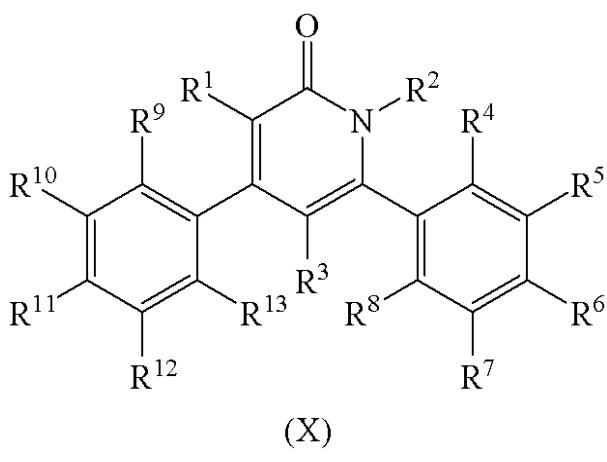
【請求項17】

請求項1～16のいずれかの化合物の代謝産物であって、CYP1B1酵素の基質としての該化合物の生成物である代謝産物。

【請求項18】

式(X)：

【化6】



30

(X)

40

〔式中、

R¹～R³は独立にHまたは低級アルキルであり；

R⁴～R¹³は独立にH、OH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、R⁴～R¹³の少なくとも1つがOHである]

を有する細胞毒性化合物またはその製薬的に許容し得る塩、溶媒和物、アミド、エステル、エーテル、化学的に保護された形態またはプロドラッグ。

【請求項19】

R⁶がC1であるとき、R¹²がOHまたはOMeではない、請求項18記載の細胞毒性化

50

合物。

【請求項 2 0】

R^5 がOMEであるとき R^{12} がOHではない、請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 1】

R^6 がOHであるとき R^{11} がOMEではない、請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 2】

$R^4 \sim R^{13}$ の少なくとも2つがOHである、請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 3】

R^4 、 R^7 および R^8 がHであり、好ましくは R^9 、 R^{12} および R^{13} がHである、請求項18記載の細胞毒性化合物。

10

【請求項 2 4】

$R^4 \sim R^8$ の少なくとも2つが-O-低級アルキルである、請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 5】

$R^9 \sim R^{13}$ の少なくとも2つがOHである、請求項24記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 6】

R^5 がOHまたは-O-低級アルキルであり、 R^6 がOHまたは-O-低級アルキルである、請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 2 7】

$R^9 \sim R^{13}$ の少なくとも2つがOHである、請求項26記載の細胞毒性化合物。

20

【請求項 2 8】

R^{10} および R^{11} がOHであり、残りの基がHである、請求項27記載の細胞毒性化合物。

。

【請求項 2 9】

$R^9 \sim R^{12}$ の少なくとも1つが-O-低級アルキルである、請求項26記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 0】

R^{11} が-O-低級アルキルである請求項29記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 1】

R^{11} が-OHであり、残りの基がHである、請求項26記載の細胞毒性化合物。

30

【請求項 3 2】

$R^4 \sim R^8$ の少なくとも1つがOHであり、 $R^9 \sim R^{13}$ の少なくとも1つが-O-低級アルキルであり、 $R^9 \sim R^{13}$ の残りの基が独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルである請求項18記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 3】

$R^4 \sim R^8$ の2つがOHであり、残りの基がH、ハロまたは低級アルキルである請求項32記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 4】

$R^9 \sim R^{13}$ の1つが-O-R¹⁸であり、R¹⁸は低級アルキルであり、残りの基が独立にH、OH、ハロまたは低級アルキルであり、 $R^{10} \sim R^{12}$ の1つが-O-R¹⁸であり、R⁹～R¹³の残りの基がHである、請求項33記載の細胞毒性化合物。

40

【請求項 3 5】

$R^9 \sim R^{13}$ の少なくとも1つがOHであり、 $R^4 \sim R^8$ の少なくとも1つが-O-低級アルキルであり、 $R^4 \sim R^{13}$ の残りの基が独立にH、ハロ、低級アルキル、-O-低級アルキルである、請求項18に記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 6】

$R^9 \sim R^{13}$ の2つがOHであり、残りの基がH、ハロまたは低級アルキルである、請求項35記載の細胞毒性化合物。

【請求項 3 7】

R^9 、 R^{12} および R^{13} が独立に、H、ハロまたは低級アルキルであり、 R^{10} および R^{11}

50

が両方ともOHであり、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷およびR⁸はの1または2つが-O-低級アルキルである、請求項36に記載の細胞毒性化合物。

【請求項38】

R⁴およびR⁶またはR⁵およびR⁶が-O-R¹⁹であり、R¹⁹は低級アルキルであり、残りの基が独立にH、ハロまたは低級アルキルである、請求項37に記載の細胞毒性化合物。

【請求項39】

R⁵およびR⁶が-O-R¹⁹であり、R⁴、R⁷およびR⁸が独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R⁹、R¹²およびR¹³が独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R¹⁰およびR¹¹が両方ともOHである、請求項38に記載の細胞毒性化合物。

10

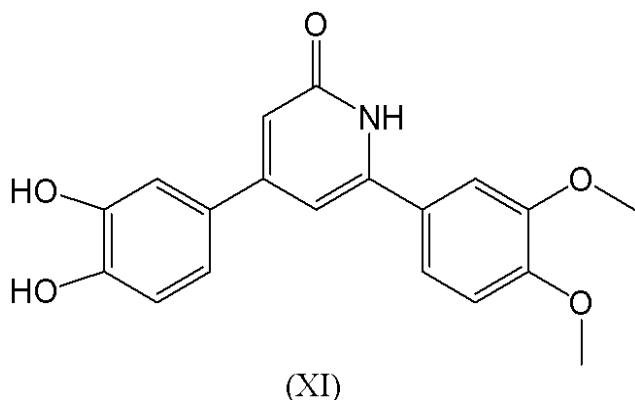
【請求項40】

各低級アルキルがC₁₋₆、好ましくはC₁₋₃である、請求項18～39のいずれかに記載の細胞毒性化合物。

【請求項41】

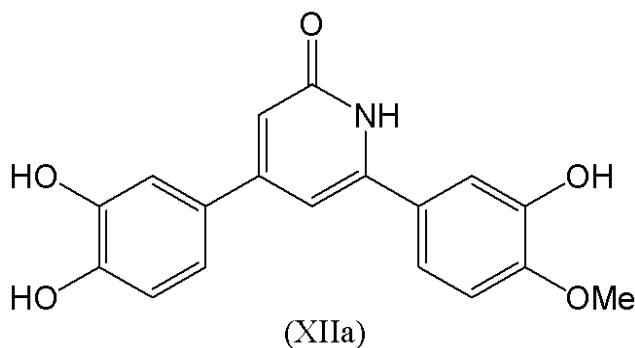
式

【化7】



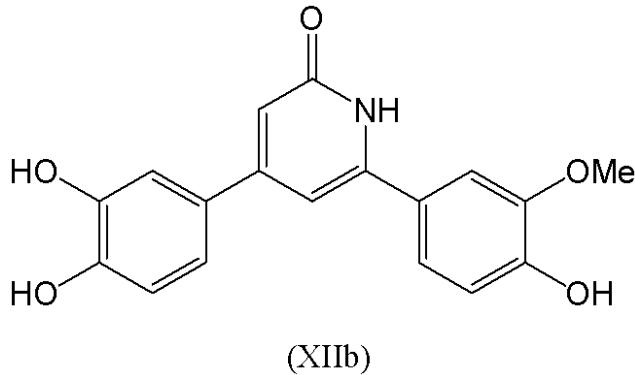
20

【化8】



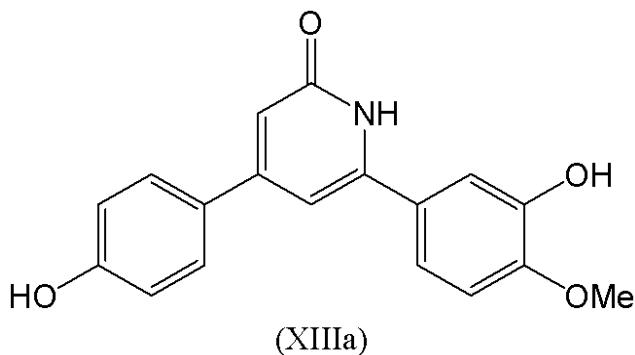
30

【化9】



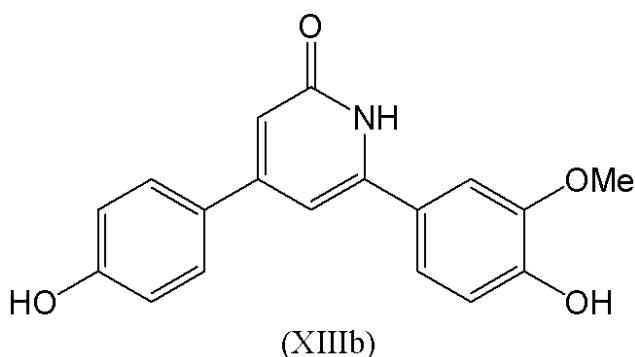
40

【化10】



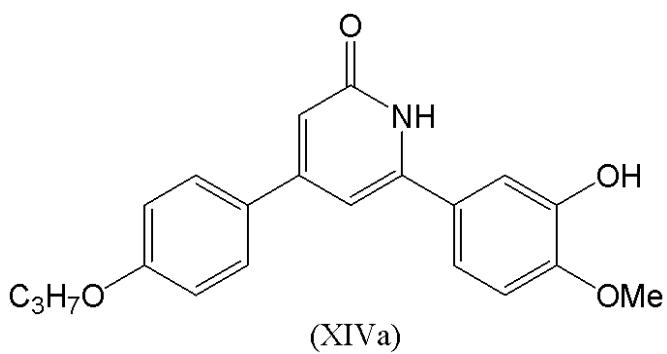
10

【化11】



20

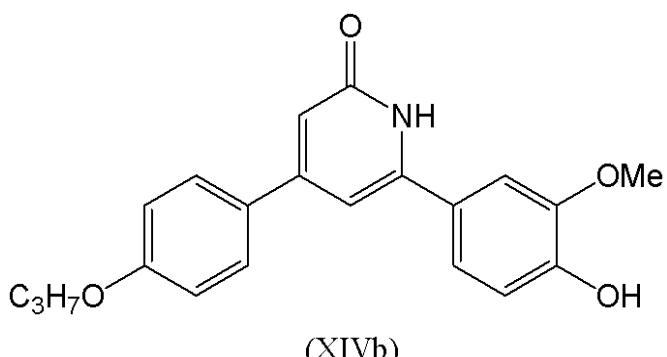
【化12】



30

または

【化13】



40

で示される化合物。

【請求項42】

治療によるヒトまたは非ヒト動物の身体の処置の方法において使用するための請求項1～41のいずれかに記載の化合物。

【請求項43】

増殖障害の処置において使用するための請求項1～41のいずれかに記載の化合物。

50

【請求項 4 4】

前記増殖障害が癌である、請求項 4 3 に記載の化合物。

【請求項 4 5】

前記癌が、肺、結腸、乳房、卵巣、前立腺、肝臓、脾臓、脳、膀胱、腎臓および皮膚の癌から選択される、請求項 4 4 記載の化合物。

【請求項 4 6】

増殖障害の処置において使用するための医薬の製造において使用するための、請求項 1 ~ 4 1 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 4 7】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれかに記載の化合物の治療上有効量を、必要とするヒトまたは非ヒト動物患者に投与することを含んでなる、増殖性障害の処置方法。 10

【請求項 4 8】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 4 1 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 1 7 に記載の化合物の治療上有効量を投与することを含んでなる処置方法であって、細胞毒性化合物が体内で生成する、方法。

【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれかに記載の 1 以上の化合物を、1 以上の製薬的に許容し得る添加剤とともに含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】**【0 0 0 1】**

本発明は、癌およびシトクローム P - 450 CYP1B1 を発現する細胞によって特徴付けられる他の増殖状態の処置または予防に使用するための新規化合物に関する。本発明はまた、そのような癌または他の増殖状態の処置または予防において使用するための、1 以上のかかる化合物を含有する医薬組成物、並びにヒトまたはヒト以外の動物におけるそのような癌または他の状態の治療方法を提供する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

シトクローム P - 450 CYP1B1 は、異物代謝酵素のシトクローム P - 450 ファミリーのダイオキシン誘導可能な形態である。CYP1B1 は、種々の組織学的タイプのヒトの癌の広い範囲で高頻度で発現し、正常な組織では発現しない（発現しても無視できるレベルである）（例えば、McFadyen MC, Melvin WT and Murray GI, "Cytochrome P450 Enzymes: Novel Options for Cancer Therapeutics", Mol Cancer Ther., 3(3): 363-71, 2004; McFadyen MC and Murray GI, "Cytochrome P450 1B1: a Novel Anticancer Therapeutic Target", Future Oncol., 1(2): 259-63, 2005; Sissung TM, Price DK, Sparr eboom A and Figg WD, "Pharmacogenetics and Regulation of Human Cytochrome P450 1B1: Implications in Hormone-Mediated Tumor Metabolism and a Novel Target for The rapeutic Intervention", Mol. Cancer Res., 4(3): 135-50, 2006 参照）。より具体的には、CYP1B1 は、膀胱、脳、乳房、結腸、頭部および頸部、腎臓、肺、肝臓、卵巣、精巣および皮膚癌において発現することが示されており、対応する正常な組織では発現はみられない。 30

【0 0 0 3】

例えば、Barnett, et al. は、Clin. Cancer Res., 13(12): 3559-67, 2007において、CYP1B1 が膠芽腫、未分化星細胞腫、乏突起膠腫および未分化乏突起膠腫を含む神経膠腫において過剰発現したが脳組織には影響を及ぼさなかったことを報告している。

【0 0 0 4】

Carnell, et al. は、Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 58(2): 500-9, 2004において、CYP1B1 が前立腺腺癌において過剰発現したが、対応する正常な前立腺組織では過剰発現はみられなかったことを示した。 40

50

【 0 0 0 5 】

Carnell et al. 2004 (前掲)はまた、CYP1B1が膀胱癌において発現することを示している (n = 22、100%)。

【 0 0 0 6 】

Downie, et al., in Clin. Cancer Res., 11(20): 7369-75, 2005およびMcFadyen, et al., in Br. J. Cancer, 85(2): 242-6, 2001は、CYP1B1の発現の増大が原発性および転移性の卵巣癌においてみられたが正常な組織では過剰発現はみられなかつことを報告している。

【 0 0 0 7 】

Gibson, et al., Mol. Cancer Ther., 2(6): 527-34, 2003およびKumarakulasingham, et al., Clin. Cancer Res., 11(10): 3758-65, 2005は、正常な組織と比較してCYP1B1が結腸腺癌で過剰発現したことを報告している。

【 0 0 0 8 】

いくつかの研究により、対応する正常な組織と比較して乳癌においてCYP1B1が過剰発現することが示されている(例えば、Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD and Melvin WT, "Tumor-Specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1", Cancer Res., 57(14): 3026-31, 1997; Haas S, Pierl C, Harth V, Pesch B, Rabstein S, Bruning T, Ko Y, Hamann U, Justenhoven C, Brauch H and Fischer HP, "Expression of Xenobiotic and Steroid Hormone Metabolizing Enzymes in Human Breast Carcinomas". Int. J. Cancer, 119(8): 1785-91, 2006; McKay JA, Murray GI, Ah-See AK, Greenlee WF, Marcus CB, Burke MD and Melvin WT, "Differential Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in Human Breast Cancer", Biochem. Soc. Trans., 24(2): 327S, 1996を参照)。

【 0 0 0 9 】

Everett, et al., J. Clin. Oncology, 25: 18S, 2007は、CYP1B1が悪性黒色腫および播種性疾患において過剰発現するが、正常な皮膚では過剰発現はみられないことを報告している。

【 0 0 1 0 】

Gibson, et al., 2003 (前掲)およびChang, et al., Toxicol. Sci., 71(1): 11-9, 2003はいずれもCYP1B1は正常な肝臓には存在しないが、ステージI-Vの肝臓への転移では過剰発現したことを報告している。

【 0 0 1 1 】

Greer, et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 45: 3701, 2004は、CYP1B1は、頭部および頸部の膀胱扁平上皮癌の悪性進行の間に過剰発現するが正常な上皮では過剰発現はみられなかつことを報告している。

【 0 0 1 2 】

McFadyen, et al., Br. J. Cancer, 91(5): 966-71, 2004は、腎臓癌においてCYP1B1を検出したが、対応する正常組織においては検出されなかつた。

【 0 0 1 3 】

Murray, et al., 2004 (前掲)は、免疫組織化学法を用い、正常な肺組織と比較して、肺癌細胞におけるCYP1B1の過剰発現を示した。

【 0 0 1 4 】

上記の数多くの開示から、CYP1B1の発現が幅広い様々な癌や他の増殖状態に特徴的であること、およびこのような様々な癌や他の状態を定義するのにCYP1B1発現を用いることができることは明かである。正常な(癌でない)細胞は有意のレベルのCYP1B1を発現しないので、CYP1B1発現細胞では細胞毒性を示すが正常な細胞では実質的に非毒性である化合物は、CYP1B1発現によって特徴付けられる癌における標的化された抗癌剤として有用であることが合理的に期待できる。「標的化された」は、のような化合物を全身に投与することができ、CYP1B1を発現する癌細胞の存在下でのみ活性化され、身体のそれ以外の部分では実質的に非毒性であることを意味する。

10

20

30

40

50

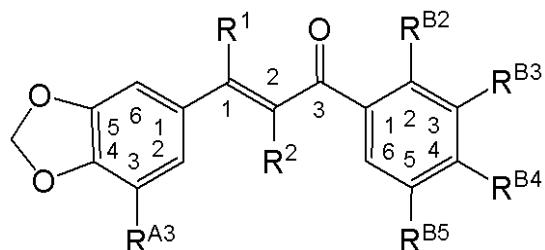
【0015】

さらに、数多くのシトクロームP450酵素は、様々な抗癌剤を代謝および無毒化することが知られている。McFadyen, et al. Biochem Pharmacol. 2001, Jul 15; 62(2): 207-12は、CYP1B1を発現しない細胞と比較して、CYP1B1を発現する細胞において、ドセタキセルの感受性の有意の減少を示した。この知見は、細胞におけるCYP1B1の存在がいくつかの細胞毒性薬に対する感受性を減少し得ることを示している。従って、CYP1B1活性化プロドラッグは、その薬物耐性がCYP1B1によって媒介される癌の治療に有用であろう。

【0016】

WO-A-03/028713は、3,4-メチレンジオキシカルコンがCYP1B1発現細胞においてそのような細胞毒性を示す増殖状態の処置に使用するための3,4-メチレンジオキシカルコンを開示している。WO-A-03/028713によれば、そのような置換されたカルコンは式(A)で示される:

【化1】



(A)

[式中、

R^{B2} 、 R^{B3} 、 R^{B4} および R^{B5} はそれぞれ独立に-H、-OHまたは-OMEであり；

R^1 および R^2 はそれぞれ独立に-H、置換されていてもよいC₁₋₄アルキルまたは置換されていてもよいC₅₋₂₀アリールであり；

R^{A3} は-H、-OH、-OC(=O)R^E、-OS(=O)₂OHまたは-OPO(=O)(OH)₂であり；および

R^E は-H、置換されていてもよいC₁₋₆アルキル、置換されていてもよいC₃₋₂₀ヘテロサイクリルまたは置換されていてもよいC₅₋₂₀アリールである]。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、癌細胞において細胞毒性を示すが、正常な細胞においては示さない代替化合物を提供することである。

【0018】

本発明のさらなる目的は、癌または他の増殖状態の処置または予防に適切に使用することができる代替化合物を提供することである。

【0019】

本発明のさらなる目的は、その薬剤耐性がCYP1B1によって媒介される癌の処置または予防のために使用することができる化合物を提供することである。

【0020】

本発明のさらなる目的は、癌または他の増殖状態を処置または予防する代替法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0021】

従って、本発明の一態様によれば、式I:

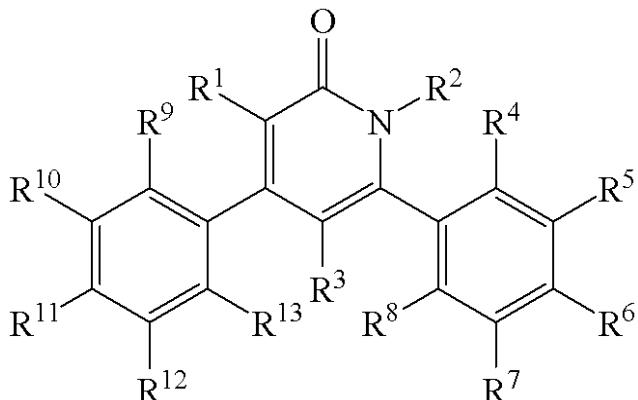
10

20

30

40

【化2】



(I)

[式中、

R¹、R²およびR³は独立にHまたは低級アルキルであり；

R⁴、R⁵、R⁶、R⁷およびR⁸は独立に、H、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合ったR⁴～R⁸のペアの少なくとも1つが一緒になって-O-(CR¹⁴R¹⁵)_n-O-を形成し、ここでnは1または2であり、R¹⁴およびR¹⁵は独立にHまたは低級アルキルであり、R⁴～R⁸の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであり；および

R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²およびR¹³は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合ったR⁹～R¹³のペアの少なくとも1つが一緒になって-O-(CR¹⁶R¹⁷)_m-O-を形成し、ここでmは1または2であり、R¹⁶およびR¹⁷は独立にHまたは低級アルキルであり、R⁴～R⁸の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであり、R¹⁶およびR¹⁷は独立にHまたは低級アルキルであり、R⁹～R¹³の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルである]

で示される化合物およびその製薬的に許容し得る塩、溶媒和物、アミド、エステル、エーテル、化学的に保護された形態またはプロドラッグを提供する。

【0022】

本発明の化合物は、CYP1B1酵素を発現する細胞では細胞毒性を示すが、CYP1B1を発現しない正常な細胞においては実質的に無毒であることが見出された。本発明の化合物はまたCYP1A1酵素を発現する細胞においても細胞毒性を示し得る。ゆえに、実際のところ、本発明の化合物は、CYP1B1により細胞毒性の薬剤に変換される非毒性のプロドラッグである。

【0023】

好ましくは、本発明の化合物は、以下で定義されるように、1.0 μM未満、好ましくは5 μM未満、さらに好ましくは1.0 μMまたは0.5 μM未満のIC₅₀値を有する。

【0024】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物の細胞毒性は、CYP1B1を発現するよう遺伝子操作された細胞と段階希釈した化合物とをインキュベーションすることにより測定することができる。好ましくは、該細胞はChinese Hamster Ovary (CHO)細胞であり、この細胞は組換えCYP1B1およびシトクロームP-450還元酵素(CPR)を含むことができる。ヒトP-450還元酵素と同時発現させる場合、高レベルの機能的な酵素は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子増幅を用いて達成することができる。一般的に、操作した細胞を化合物とインキュベーションし、適当な時間(例えば96時間)後、適当なアッセイ試薬とさらにインキュベーション(例えば1.5時間)して、培地中の生細胞数を指標とする。適当なアッセイ試薬はMTS(以下参照)であり、これは細胞に

よって組織培地中に溶解するホルマザン産物に生物還元される。ホルマザン産物の吸光度を 510 nm にて直接測定することができ、490 nm または 510 nm での吸光度によって測定されるホルマザン産物の量は培地中の生細胞数に直接比例する。本発明の化合物の IC₅₀ 値の算出方法は、以下の実施例 1 に記載する。

【0025】

比較することによって、本発明の化合物の IC₅₀ を、CYP1B1 を含まない細胞（例えば Chinese Hamster Ovary 細胞）、例えば野生型 CHO 細胞、において測定することができる。本発明の化合物は、好ましくは、少なくとも 20 倍の選択性を CYP1B1 発現細胞に対して有し、ここで「～倍の選択性」とは、ある特定の化合物の非 CYP1 発現細胞における IC₅₀ 値を、同一化合物の CYP1B1 発現細胞における IC₅₀ 値で割った値として定義される。10

【0026】

こうして、本発明は、ヒトまたは動物の身体の処置、特に、例えば、CYP1B1 を発現する細胞によって特徴づけられる増殖状態を含む、ヒトまたは非ヒト動物における、増殖性障害または増殖性疾患等の処置または予防に使用するための、1 またはそれ以上の、上記の製薬的に許容し得る塩、溶媒和物およびプロドラッグを含む本発明化合物の使用を包含する。より具体的には、本発明は、CYP1B1 発現によって特徴付けられる癌の処置のための、1 またはそれ以上の本発明化合物の使用を包含する。

【0027】

本発明のさらなる態様によれば、本発明の少なくとも 1 つの化合物の治療上有効な量を、そのような処置を必要とするヒトまたは非ヒト動物の患者に投与することを含んでなる、増殖状態の処置または予防の方法を提供する。20

【0028】

本明細書において用いられる「増殖状態」なる語は、in vitro または in vivo で新生物のまたは肥厚増殖等、好ましくない過剰なまたは異常な細胞の望ましくないまたは制御不能な細胞増殖によって特徴付けられる疾患または障害を意味する。増殖状態の例としては、悪性新生物および腫瘍、癌、白血病、乾癬、骨疾患、纖維増殖疾患（例えば、結合組織の）およびアテローム性動脈硬化を含む、前癌状態および癌の状態の細胞増殖である。

【0029】

この増殖状態は、CYP1B1 を発現する細胞によって特徴付けられる。30

【0030】

この増殖状態は、膀胱、脳、乳房、結腸、頭部および頸部、腎臓、肺、肝臓、卵巣、前立腺および皮膚の癌から選択される。いくつかの実施形態では、この増殖状態は、固体癌を包含し得る。

【0031】

本明細書における「処置」なる語は、増殖状態に対するいくつかの望ましい治療効果：例えば、進行速度の減少、進行の停止、障害の改善またはその状態の治癒を含む障害の進行阻害が達成される、ヒトまたは非ヒト動物の治療による処置を意味する。予防的手段としての治療もまた含まれる。本明細書において用いられる「治療上有効な量」なる語は、合理的な利益 / リスク比に見合う、治療効果をもたらすのに有効な、本発明の 1 またはそれ以上の化合物またはそのような 1 またはそれ以上の化合物を含有する医薬製剤の量を意味する。40

【0032】

従って、本発明の化合物は、抗癌剤として用いることができる。本明細書における「抗癌剤」なる語は、癌を処置する化合物（即ち、癌の処置に有用な化合物）を意味する。本発明の化合物の抗癌作用は、細胞増殖の調節、血管形成の阻害、転移の阻害、浸潤の阻害またはアポトーシスの促進を含む 1 またはそれ以上のメカニズムによってもたらされうる。

【0033】

本発明の化合物の適当な用量が患者ごとに異なることは理解される。最適な用量は、本

10

20

30

40

50

発明の処置の何らかのリスクまたは有害な副作用と治療上の利益のレベルとのバランスを考えて決定される。選択される用量レベルは、具体的化合物の活性、投与経路、投与の時間、化合物の排出速度、治療の期間、組み合わせて用いる他の薬物、化合物または物質、年齢、性別、体重、病状、健康状態および患者の病歴を含む様々なファクターに依存する。化合物の量および投与経路は、一般的に、用量は、所望の効果を達成する作用部位での局所的な濃度を達成するものとされるが、結局のところ、医師の裁量である。

【0034】

in vivoでの投与は、処置の期間を通じて、1回用量での投与、連続的または断続的に行うことができる。投与の最も効果的な手段および用量を決定する方法は、当業者に十分に知られており、治療に用いる製剤、治療の目的、標的細胞、および処置される対象により変更し得る。処置される標的細胞および処置される患者は。処置を行う医師により選択される用量のレベルとパターンを用いて1回または複数回の投与を行うことができる。

10

【0035】

一般に、本発明の1またはそれ以上の1回用量は、約1μg～約5000μg/kg(患者の体重)の範囲である。例えば、1、5、10、25、50、100、250、1000、2500または5000μg/kg/日である。化合物が塩、溶媒和物、プロドラッグ等である場合、投与量は親化合物に基づいて計算することができ、そのため使用される現実の重量は比例して増大し得る。

【0036】

いくつかの実施形態では、本発明の1またはそれ以上の化合物は、上記のような増殖状態の処置のための組合せ治療において、即ち他の薬剤、例えば細胞毒性薬と組み合わせて、用いることができる。

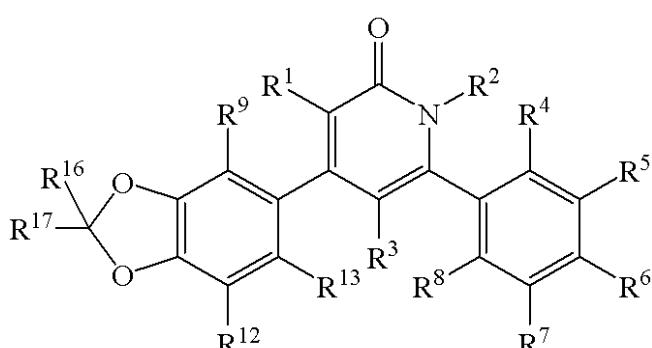
20

【0037】

いくつかの実施形態では、上記式IのR⁹、R¹²およびR¹³は、独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R¹⁰およびR¹¹は一緒になって-O-C(R¹⁶R¹⁷)_m-O-を形成していてもよい。mは好ましくは1である。好ましくは、R⁹、R¹²およびR¹³はHであってよい。R¹⁶およびR¹⁷はいずれもHであってよい。即ち、いくつかの実施形態では、本発明の化合物は式Ia：

【化3】

30



(Ia)

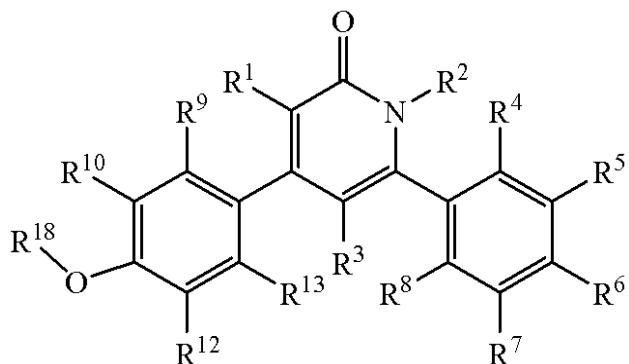
40

で示される。

【0038】

あるいは、R⁹～R¹³の1つが-O-R¹⁸であってよく、R¹⁸は低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよい。例えば、R¹⁸はC₁₋₄またはC₁₋₃アルキル、好ましくはn-プロピルであってよい。このような場合には、R¹⁰～R¹²の1つ、好ましくはR¹¹が-O-R¹⁸であり、該R⁹～R¹³の残りの基がHであってよい。従って、いくつかの実施形態では、本発明の化合物は式Ib：

【化4】



(Ib)

10

で示される。

【0039】

本明細書で用いられる「低級アルキル」なる語は、C₁₋₆アルキル基、好ましくはC₁₋₄またはC₁₋₃を意味する。このような低級アルキル部分は、直鎖状でも分岐鎖でもよい。該低級アルキル基は、置換されていてもよく、または1またはそれ以上のハロ部分で置換されていてもよい。例えば、メチル基は1またはそれ以上のフルオロ基で置換されていてもよい。

20

【0040】

本明細書において用いられる「ハロ」はフルオロ-、クロロ-、ブロモ-またはヨード-、好ましくはフルオロを意味する。

【0041】

好ましくは、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷およびR⁸の1または2個が-O-低級アルキルであってよい。このような化合物は、CYPIB1を発現している細胞において特に細胞毒性であることが分かっている。

30

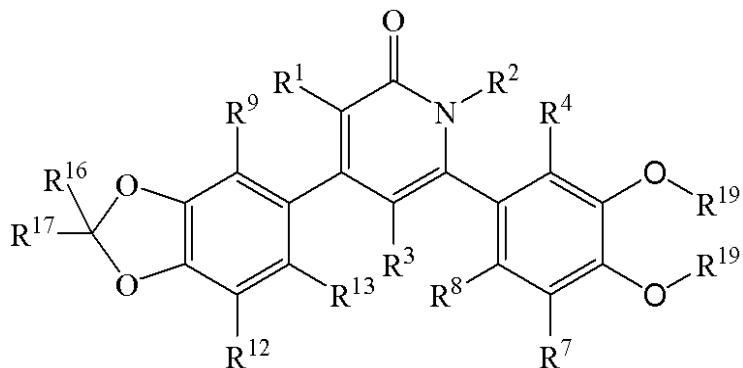
【0042】

従って、いくつかの実施形態では、R⁴およびR⁶またはR⁵およびR⁶は、-O-R¹⁹であってよく、R¹⁹は低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよい。

【0043】

いくつかの好ましい実施形態では、R⁵およびR⁶は-O-R¹⁹であり、R⁴、R⁷およびR⁸は独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R⁹、R¹²およびR¹³は独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R¹⁰およびR¹¹は一緒になって-O-C(R¹⁶R¹⁷)_m-O-を形成していてもよく、ここでmは好ましくは1である。従って、本発明の化合物は式I'：

【化5】



(Ia')

40

50

で示される。

【0044】

あるいは、R⁶は-O-R¹⁹であり、それ以外のR⁵、R⁷およびR⁸は独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよい。

【0045】

好ましくは、R¹⁹はC₁₋₄またはC₁₋₃アルキル、好ましくはメチルであってよい。

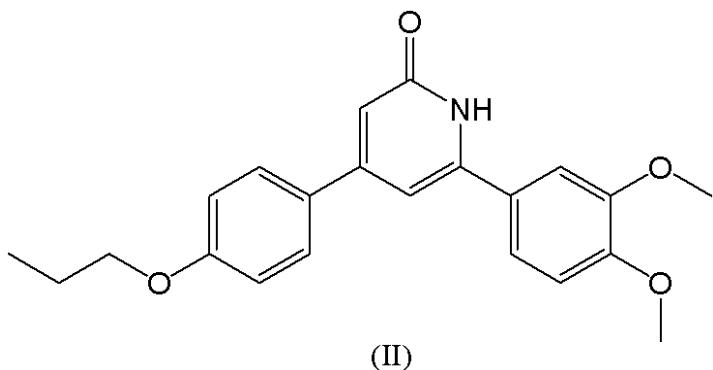
【0046】

さらに、R⁴～R⁸の残りの基はHであってよい。

【0047】

例として、本発明の化合物は、式II：

【化6】



10

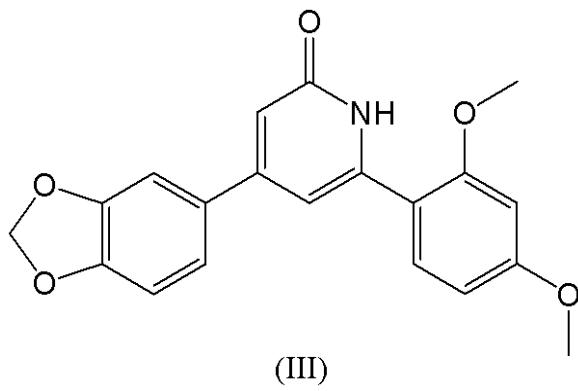
20

で示される。

【0048】

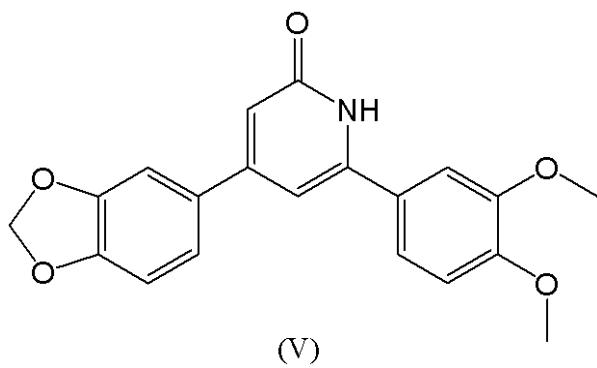
本発明の化合物のさらなる例は、式III、IV、VおよびVI：

【化7】



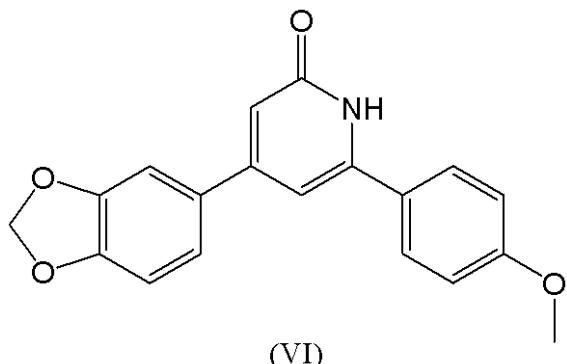
30

【化8】



40

【化9】



10

で示される。

【0049】

上記したとおり、本発明の化合物には式Iの製薬的に許容し得る塩および溶媒和物が含まれる。

【0050】

製薬的に許容し得る塩の例は、本発明の一部を構成する、Berge, et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19に記載されている。

【0051】

本明細書において一般的な意味で用いられる「溶媒和物」は、式Iの化合物と溶媒との複合体を意味する。溶媒が水である場合は、溶媒和物は、便宜上、水和物（例えば一水和物、二水和物、三水和物等）を指すとしてよい。

【0052】

本発明はまた、細胞におけるCYP1B1の発現によって特徴付けられる障害または疾患、特に上記の癌を含む固形腫瘍または固形癌、などの増殖状態の処置における使用のための医薬製剤の製造における1またはそれ以上の本発明の化合物の使用を包含する。

【0053】

したがって、本発明のさらなる態様では、1またはそれ以上の本発明の化合物を、場合により1またはそれ以上の製薬的に許容し得る添加剤とともに含んでなるこのような医薬製剤を提供する。

【0054】

本明細書において用いられる「製薬的に許容し得る添加剤」なる語は、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題または合併症を伴わず、合理的な利益／リスク比にふさわしい、患者の組織に接触させて使用するのに適した製薬的な添加剤を意味する。それぞれの添加剤はまた、製剤の他の成分と適合するという意味で「許容し得る」ものであらなければならない。

【0055】

好ましくは、本発明の組成物は単位投与形態として製剤化することができる。各単位投与形態は、本発明の1またはそれ以上の化合物の日用量をすべてまたは予め決められたその分割した量（例えば、日用量の半分または4分の1）を含有することができる。

【0056】

従って、本組成物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、滅菌非経口溶液または懸濁剤、定量エアロゾルまたは液体スプレー、点滴剤、アンプル、自動注入装置、坐剤、クリーム剤またはジェル剤として製剤化することができる。

この組成物は、経口、腸溶、非経口、髄腔内、舌下、直腸内、または局所投与または吸入または吹送による投与用に適合させることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤またはウェハー等の経口組成物は特に好ましい。

【0057】

錠剤等の固体の投与形態を製造するには、この1またはそれ以上の化合物を、1または

20

30

40

50

それ以上の製薬的な添加剤、例えば慣用の錠剤添加剤（例えば、コーンスター・チ、ラクトース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガム等）または他の製薬的な希釈剤（例えば水）と混合し、実質的に相同（ホモローガス）なこの1またはそれ以上の化合物の混合物を含有する固体のプレフォーミュレーション組成物を形成し、この1またはそれ以上の化合物を組成物全体に分散させ、組成物を、錠剤、丸剤およびカプセル剤のような有効性の等しい単位投与形態にさらに容易に分割することができる。

【0058】

次いで、この固形のプレフォーミュレーション組成物を、0.1～約500mgの1またはそれ以上の化合物を含有し得る上記の単位投与形態にさらに分割することができる。好ましい単位投与形態は、1～500mg、例えば、1、5、10、25、50、100、300または500mgの化合物を含有する。

10

【0059】

錠剤または丸剤を製剤化する場合は、この錠剤または丸剤をコーティングするかまたは投与形態に持続的作用の利点がもたらされるように調合することができる。例えば、この錠剤または丸剤は内部の投与形態と外部の投与形態のコンポーネントを含んでなることができ、外部のコンポーネントが内部のコンポーネントを包むエンベロープの形態である。これら2つのコンポーネントは、胃での崩壊を防ぎ、十二指腸へと損傷なく通過するまたは放出を長引かせることができるように腸溶層で隔てられていてもよい。数多くのポリマー酸や、ポリマー酸とセラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースなどの材料との混合物など、様々な材料が、このような腸溶層またはコーティングに用いられることが知られている。

20

【0060】

あるいは、本発明の医薬組成物は、経口または注射により投与するための液体の投与形態；例えば水溶液、適当に風味を付けたシロップ、水性または油性懸濁液、または例えば、綿実油、ゴマ油、ココナッツ油またはピーナツ油などの食用油並びにエリキシルまたは同様の製薬用ビークルを用いた風味を付けたエマルジョンとして製剤化することができる。水溶性の懸濁剤のための適当な分散剤または懸濁化剤としては、合成および天然のガム類（例えば、トラガカント、アカシア、アルギン酸、デキストラン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンまたはゼラチン）が挙げられる。

30

【0061】

活性化合物および活性化合物を含有する組成物の適当な用量が患者ごとに異なることは認識される。最適な用量の決定は、一般に、本発明の処置の何らかなリスクまたは有害な副作用に対する治療上の利益のレベルとのバランスを考えて行う。選択される用量レベルは、具体的化合物の活性、投与経路、投与の時間、化合物の排出速度、治療の期間、組み合わせて用いる他の薬物、化合物または物質、年齢、性別、体重、病状、健康状態および患者の病歴を含む様々なファクターに依存する。化合物の量および投与経路は、一般的に、用量は、所望の効果を達成する作用部位での局所的な濃度を達成するものとされるが、結局のところ、医師の裁量である。

40

【0062】

上記のとおり、本発明の化合物は、CYP1B1酵素を発現しない細胞では実質的に細胞毒性を示さないことが分かっている。理論に束縛されることを意図するものではないが、本発明の化合物は、CYP1B1を発現する細胞内でCYP1B1により、細胞毒性を有する活性な代謝物に変換される。実験データは、そのような活性な細胞毒性化合物が、CYP1B1発現に関係なく動物細胞において一般的に細胞毒性である広範なスペクトルを有するキナーゼ阻害剤であることを示している。CYP1B1を発現する細胞におけるCYP1B1による、本発明の化合物の非細胞毒性の前駆体から活性な細胞毒性の化合物への変換は、本発明の化合物を、CYP1B1発現により特徴付けられる増殖状態の処置または予防のための標的化された抗癌剤としての使用に適したものにしている。

50

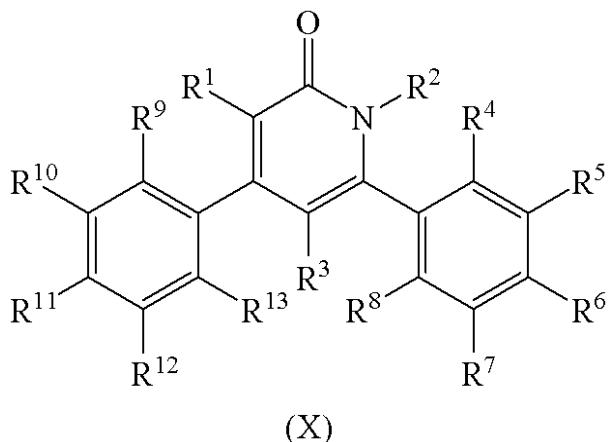
【0063】

従って、本発明のさらに別の態様では、細胞毒性化合物が、本発明の化合物に対するCYT1B1酵素の触媒活性の産物となるような、本発明の細胞毒性化合物を提供する。CYT1B1酵素の触媒活性が2つの異なるメカニズムが関与していると理解される：1)脱アルキル化または2)ヒドロキシル化。本発明は、本発明の化合物の脱アルキル化またはヒドロキシル化された形態の両方を包含する。

【0064】

いくつかの実施形態では、本発明の細胞毒性化合物は、式X：

【化10】



10

20

30

40

50

【式中、

R¹～R³は独立にHまたは低級アルキルであり；

R⁴～R¹³は独立にH、OH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、R⁴～R¹³の少なくとも1つがOHである】

で示される化合物およびその製薬的に許容し得る塩、溶媒和物、アミド、エステル、エーテル、化学的に保護された形態またはプロドラッグである。

【0065】

好ましくは、R⁴～R¹³の少なくとも1つがOHである。

【0066】

いくつかの実施形態では、R⁴、R⁷およびR⁸はHであり、好ましくはR⁹、R¹²およびR¹³はHである。

【0067】

さらに好ましい実施形態では、R⁴～R⁸の少なくとも2つが-O-低級アルキル、好ましくはR⁹～R¹³の少なくとも2つがOHである。

【0068】

あるいは、R⁵はOHまたは-O-低級アルキルであり、R⁶はOHまたは-O-低級アルキルであり、であり、好ましくはR⁹～R¹³の少なくとも2つがOHである。さらに、R¹⁰およびR¹¹はOHであり、残りの基はHであってよい。

【0069】

さらなる実施形態では、R⁵がOHまたは-O-低級アルキルであり、R⁶がOHまたは-O-低級アルキルであるとき、R⁹～R¹²の少なくとも1つは-O-低級アルキルであり、好ましくはR¹¹は-O-低級アルキルである。

【0070】

さらなる実施形態では、R⁵がOHまたは-O-低級アルキルであり、R⁶がOHまたは-O-低級アルキルであるとき、R¹¹はOHであり、残りの基はHである。

【0071】

R⁴～R⁸の少なくとも1つがOHであり、R⁹～R¹³の少なくとも1つが-O-低級アルキルであり、R⁴～R¹³の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであってよい。

【0072】

いくつかの実施形態では、 $R^4 \sim R^8$ の2つがOHで残りの基はH、ハロ、または低級アルキルであってよく、好ましくはHである。 $R^4 \sim R^8$ のうちのこの2つは環上で互いに隣り合っていてよい。 $R^9 \sim R^{13}$ の1つは、-O-R¹⁸であってよく、R¹⁸はH、OH、上記の低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルである。この場合において、 $R^{10} \sim R^{12}$ の1つ、好ましくはR¹¹、は-O-R¹⁸であってよく、R⁹～R¹³の残りの基はHであってよい。

【0073】

あるいは、 $R^9 \sim R^{13}$ の少なくとも1つがOHであり、 $R^4 \sim R^8$ の少なくとも1つが-O-低級アルキルであり、 $R^4 \sim R^{13}$ の残りの基が独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであってよい。

10

【0074】

いくつかの実施形態では、 $R^9 \sim R^{13}$ のうち2つがOHであり、残りの基がH、ハロ、または低級アルキルであってよく、好ましくはHである。 $R^9 \sim R^{13}$ のうちのこの2つは環上で互いに隣り合っていてよい。従って、R⁹、R¹²およびR¹³は独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよく、R¹⁰およびR¹¹はいずれもOHであってよい。好ましくは、R⁹、R¹²およびR¹³はHであってよい。さらに、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷およびR⁸の1または2個が-O-低級アルキルであってよい。従って、いくつかの実施形態では、R⁴およびR⁶またはR⁵およびR⁶は-O-R¹⁹であってよく、R¹⁹は上記の低級アルキルであり、残りの基は独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよい。

20

【0075】

いくつかの好ましい実施形態では、R⁵およびR⁶は-O-R¹⁹であってよく、R⁴、R⁷およびR⁸は独立にH、ハロまたは低級アルキルであり；R⁹、R¹²およびR¹³は独立にH、ハロまたは低級アルキルであり、R¹⁰およびR¹¹はいずれもOHであってよい。

【0076】

あるいは、R⁶は-O-R¹⁹であり、R⁴、R⁵、R⁷およびR⁸の残りの基は、独立にH、ハロまたは低級アルキルであってよい。

【0077】

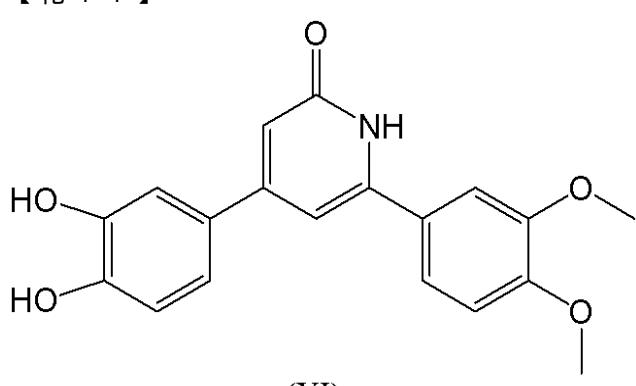
$R^4 \sim R^8$ の残りの基はHであってよい。

30

【0078】

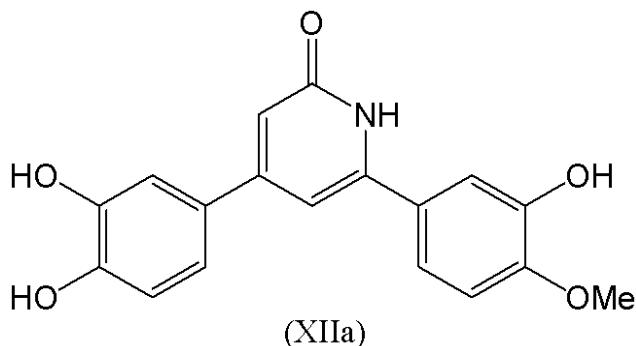
例として、本発明の細胞毒性化合物は、式XⅠ、XⅡ、XⅢ、XⅣおよびXⅤ：

【化11】



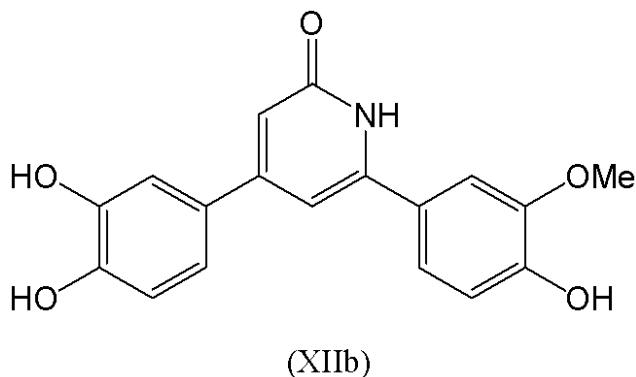
40

【化 1 2】



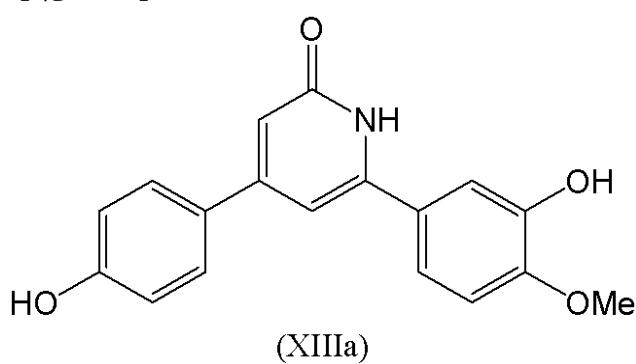
10

【化 1 3】



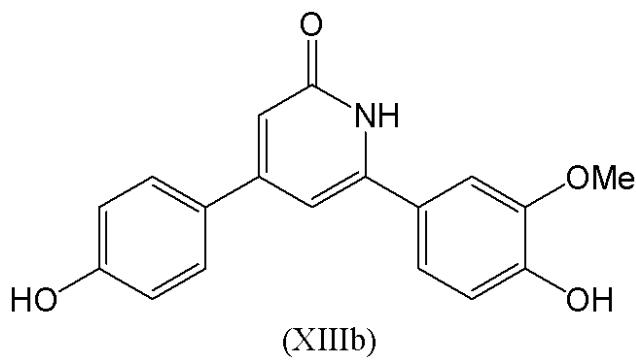
20

【化 1 4】



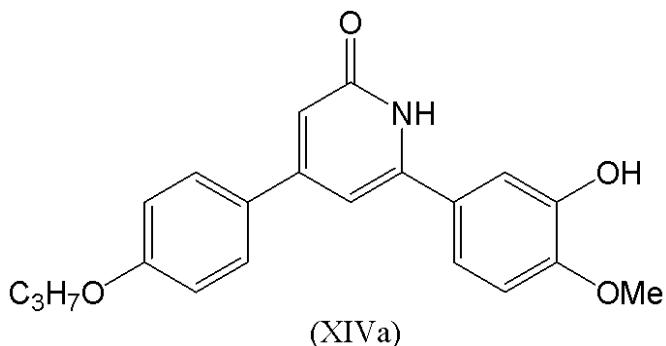
30

【化 1 5】



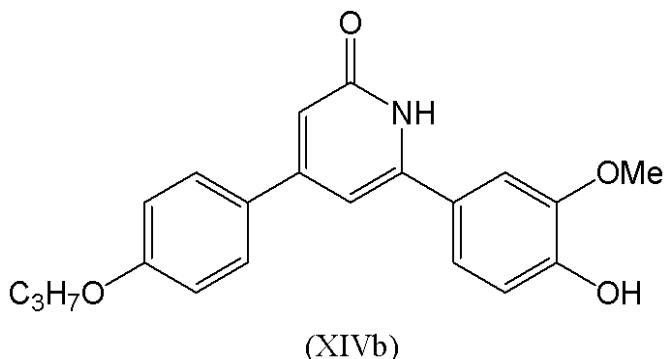
40

【化16】



10

【化17】



20

で示される。

【0079】

本明細書に示したまたは記載した化合物のすべての互変異性体は本発明の一部であることは認識される。さらに本発明は本明細書に記載した化合物の代謝物を含む。

【0080】

「互変異性体」は、その構造が原子の配置において明かに異なるが容易かつ迅速な平衡状態で存在する化合物を意味する。式Iの化合物は異なる互変異性体として表示することができることは理解される。化合物が互変異性体の形態を有する場合、すべての互変異性体の形態が本発明の範囲内にあり、化合物の命名によって如何なる互変異性体も排除されないことは理解される。

30

【0081】

本発明のいくつかの化合物は、互変異性体の形態として存在し得、また本発明の範囲内に包含されることを意図する。

【0082】

本発明の化合物、塩およびプロドラッグは、エノール型およびイミン型、およびケト型およびエナミン型を含むいくつかの互変異性体および幾何異性体およびそれらの混合物として存在し得る。このような幾何異性体はすべて本発明の範囲内に包含される。溶液中では、互変異性体は、互変異性体のセットの混合物として存在する。固体の形態では、通常一方の互変異性体に支配される。一方の互変異性体を記載してもよいが、本発明は、本化合物のすべての互変異性体を含む。

40

【0083】

互変異性体は、平衡状態にある2またはそれ以上の構造異性体の1つであり、一方の異性体から他方の異性体に容易に変換される。この反応は隣接する共役二重結合の切り替えに伴って水素原子のホルマール移動をもたらす。互変異性化が可能な溶液中では、互変異性体の化学平衡が達成される。互変異性体の正確な比率は、溶媒およびpH等を含む種々の因子に依存する。互変異性化により相互交換可能な互変異性体の概念は、互変異性と称される。

【0084】

可能な互変異性の様々なタイプのうち、2つが一般に観察されている。ケト-エノール

50

互変異性では、電子と水素のシフトが同時に起こる。環 - 鎖互変異性は、グルコースによって示される。糖鎖分子内のアルデヒド基 (- CHO) が同一分子内の水酸基 (- OH) の1つと反応する結果、環状(環の形状)形態が生じる。

【0085】

互変異性化は以下によって特徴付けられる：

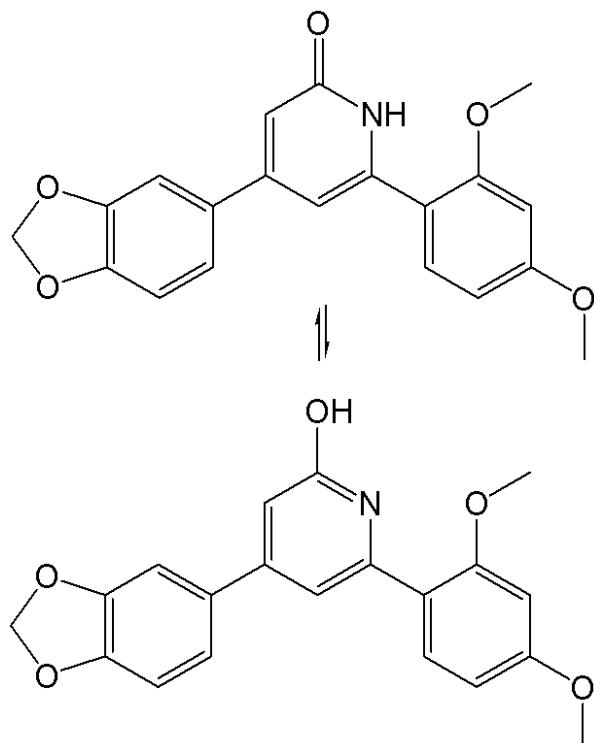
塩基：1. 脱保護；2. 非局在化アニオンの形成（例えばエノラート）；3. アニオンの位置と異なる位置でのプロトン化；酸：1. プロトン化；2. 非局在化カチオンの形成；3. カチオンと隣接する異なる位置での脱プロトン化。

【0086】

一般的な互変異性体のペアは以下のとおりである：ケトン - エノール、アミド - ニトリル、ラクタム - ラクチン、ヘテロ環におけるアミド - イミド酸互変異性（例えば、核酸塩基、グアニン、チミンおよびシトシン）、アミン - エナミンおよびエナミン - エナミン。

本発明の互変異性体の例は以下のとおりである：

【化18】



【0087】

さらに、中間体を含め、保護基を含む、示したまたは記載したすべての化合物は、本発明の一部であると認識される。「保護基」は、反応性を、マスク、減少または阻止する、分子内の反応性の基に結合した原子の集団を意味する。保護基が分子に結合している場合、保護基は化合物の化学的に保護された形態を形成する。保護基の例は、Green and Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2nd ed. 1991); Harrison and Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996); および Kocienski, Protecting Groups, (Verlag, 3rd ed. 2003)に記載されている。

【0088】

さらに、アミン保護基を含む、示したまたは記載したすべての化合物は、中間体を含め、本発明の一部であるとみなされる。「アミン保護基」なる語は、アミン、アミドまたは他の窒素含有部分を、特定の化学反応の条件に対して不活性な異なる基に変換する官能基を意味する。アミン保護基は好ましくは、分子の他の官能基に影響を及ぼさない条件下で良好な収率で容易且つ選択的に脱離される。アミン保護基の例としては、ホルミル、アセチル、ベンジル、t - ブチルジメチルシリル、t - ブチルジフェニルシリル、t - ブチル

10

20

30

40

50

オキシカルボニル (Boc)、p-メトキシベンジル、メトキシメチル、トシリ、トリフルオロアセチル、トリメチルシリル (TMS)、フルオレニル-メチルオキシカルボニル、2-トリメチルシリル-エトキシカルボニル、1-メチル-1-(4-ビフェニリル)-エトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル (CBZ)、2-トリメチルシリル-エタンスルホニル (SES)、トリチルおよび置換されたトリチル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (FMOc)、ニトロ-ベラトリルオキシカルボニル (Nvoc) 等が挙げられるがこれらに限定されない。他の適当なアミン保護基は当業者によって直接定義される。

【0089】

一般的なヒドロキシ保護基としては、ベンジルおよびトリチルエーテル並びにアルキルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、トリアルキルシリルエーテルおよびアリルエーテル等、ヒドロキシ基がアシル化またはアルキル化されるものが挙げられる。

10

【0090】

以下、本発明の実施形態を示す添付の図面を参照として単なる例示を目的として記載する。

20

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】トランスフェクトしたCHO/CYP1B1セルラインにおけるCYP1B1発現 (FIG. 1a)、およびトランスフェクトしたCHO/CYP1A1セルラインにおけるCYP1A1発現 (FIG. 1b) の検出を示すウェスタンプロッティングの画像である。

20

【図2】本発明の化合物の活性の結果としての腫瘍の重量 (g) を示すグラフである。

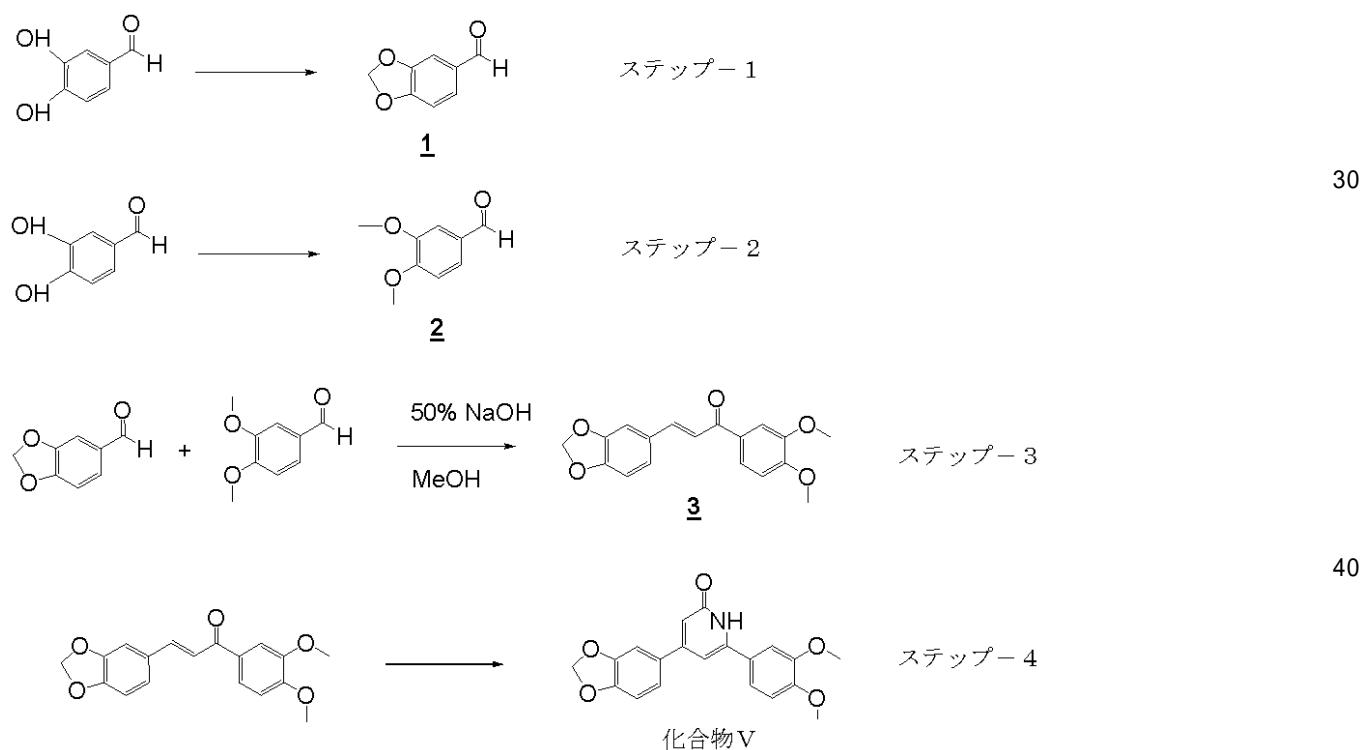
20

【発明を実施するための形態】

【0092】

合成1：化合物V

【化19】



ステップ1

4-ジヒドロキシベンズアルデヒド (5 g) のDMF (50 ml) 溶液に、K₂CO₃ (7.5 g)、ジヨードメタン (12.5 g) を加え、反応混合物を110 °C にて2時間還流した。反応の進行をTLCでモニターした。反応が完結したら、混合物を室温に冷却し、セライトベッドで濾過し、DCMで洗浄した。ろ液に水 (100 ml) を加え、化合物を

50

D C Mで抽出した(3×200ml)。集めた抽出液を水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮した。粗製の化合物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、10%EtOAc/ヘキサン)により精製して中間体1を得た。

【0093】

ステップ2

(2,4-ジヒドロキシフェニル)エタノン(10g)のアセトン(100ml)中の溶液に、K₂CO₃(45g)、DMSO₄(20.7g)を加え、反応混合物を65~70度一晩攪拌した。反応の進行をTLCでモニターした。反応が完結したら、混合物をセライトベッドで濾過し、アセトン(150ml)で洗浄した。ろ液を減圧下で濃縮し、得られた残留物を水(50ml)にとり、化合物をD C Mで抽出した(2×100ml)。集めた抽出液をNa₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮し、粗製の抽出物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、10%EtOAc/ヘキサン)で精製して不安定な中間体2を得た。10

【0094】

ステップ3

250ml容の一口丸底フラスコに、ピペロナール(3g)および3,4-ジメトキシアセトフェノン(3.6g)を入れ、MeOH(45ml)に溶解し、0~10度に冷却した。50%NaOH溶液(24ml)を加え、室温で2時間攪拌した。固体を濾過し、水で洗浄した。固体を60度で1時間乾燥させて中間体3を得た。

【0095】

ステップ4

100ml容の一口丸底フラスコに、中間体3(2g)、N-アセチルグリシンアミド(1g)、Cs₂CO₃(2.75g)をDMF(20ml)に溶解し、140~150度1時間30分加熱し、0~10度に冷却した。10%HCl溶液(20ml)(pH=1)を加え、反応混合物を4~5時間静置した。固体を析出させ、ヘキサンで洗浄した。化合物を60度で5時間乾燥して純度96%の生成物800mg(クリームイエローの固体)を得た。20

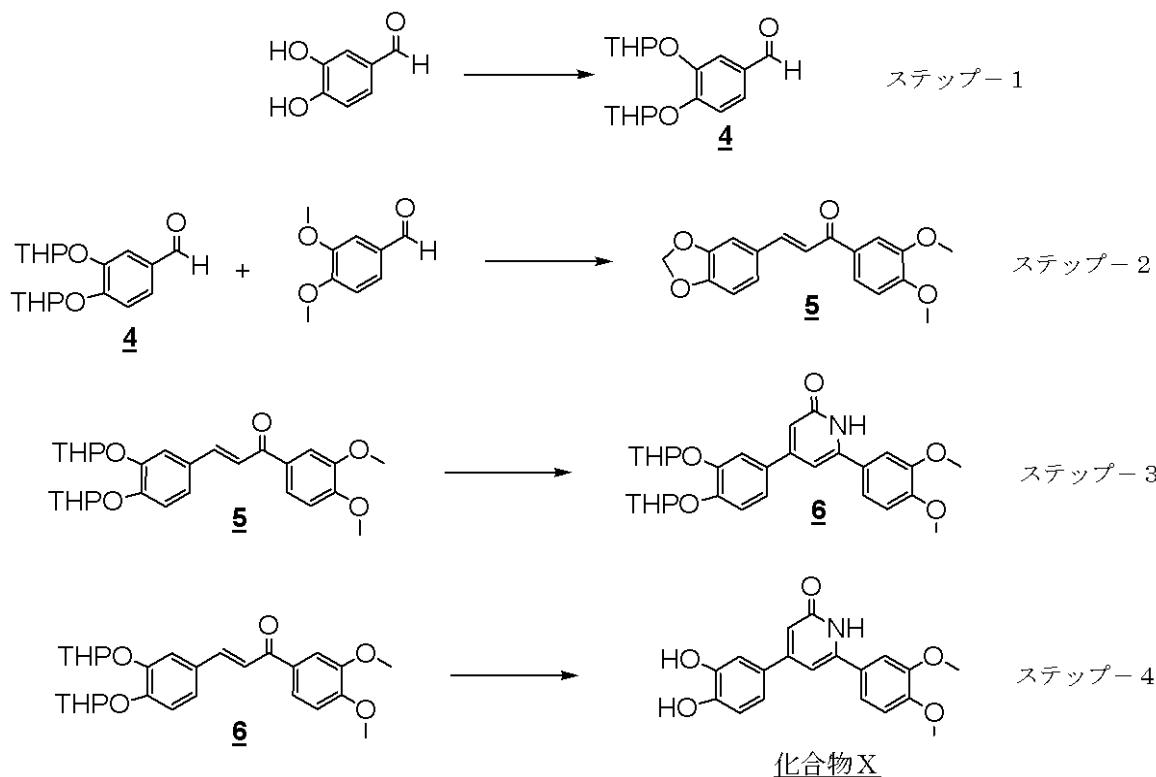
【0096】

合成2および3：化合物II、IIIおよびVI

化合物II、IIIおよび化合物VIを、上記の化合物Vの合成で用いた方法と同様にして合成した。30

合成4：化合物XI

【化20】



【0097】

ステップ1

(ガードチューブを取り付けた250mlの一口丸底フラスコを設置)

パラトルエンスルホン酸ピリジニウム(触媒量)およびDHP(9.23g)を、ジヒドロキシベンズアルデヒド(5g)のDCM(50ml)溶液に室温で加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応の進行をTLCでモニターした。若干の出発物質とともに、モノ保護された化合物も得られた。DCM層を水で洗浄(2×100ml)し、Na₂SO₄で乾燥し、ロータリーエバポレーターで蒸留して粗製物を得、これをカラムクロマトグラフィー(塩基性SiO₂&5~8%EtOAc/ヘキサン)で精製した。

【0098】

ステップ2

(ガードチューブを取り付けた一口丸底フラスコを設置)

化合物4(3g)のメタノール(30ml)溶液に、水酸化バリウム(5.522g)およびジメトキシアセトフェノン(1.7532g)を室温で加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応の進行をTLCによりモニターした。反応混合物を2NのHClで0にてクエンチした。メタノールを蒸留し、化合物を酢酸エチルにとり、水で洗浄した(3×100ml)。酢酸エチル層を分液し、Na₂SO₄で乾燥した。酢酸エチルをロータリーエバポレーターで蒸留し、生成物をカラムクロマトグラフィー(塩基性SiO₂&23%EtOAc/ヘキサン)で精製した。

【0099】

ステップ3

(ガードチューブと還流冷却器を取り付けた一口丸底フラスコを設置)

化合物5(1g)のDMF(10ml)溶液に、N-アセチルグリシンアミド(0.3222g)およびCs₂CO₃(0.9055g)を室温にて加え、140にて7時間加熱した。反応の進行をTLCでモニターした。水を反応混合物に加えた後、固体を析出させた。固体を濾過により除去し、減圧下で乾燥して明黄色の固体を形成した。

【0100】

ステップ4

10

20

30

40

50

(ガードチューブを取り付けた一口丸底フラスコを設置)

酢酸エチル(過剰量)に溶解した化合物6(1.2g)に、12NのHCl(触媒量)を0にて加えた。添加が完了したら、化合物を酢酸エチルから析出させた。固体を濾過し、40% EtOAc/ヘキサンで洗浄した後、真空下で完全に乾燥した。

【0101】

NMRおよび分子量データ

化合物III、V、VI、XIおよびIIのNMRおよび分子量データの詳細は、以下の表1のとおりである。

【表1】

Table 1: ¹NMRおよびMass (m/e)データ

10

構造	H NMR IN DMSO	MASS: m/e
化合物III	$\delta = 3.85$ (s, 6H); 6.12 (s, 2H); 6.70 (s, 2H); 6.75 (s, 2H); 7.10 (d, 1H); 7.33 (d, 1H); 7.42 (s, 1H); 7.50 (d, 1H); 7.61 (d, 1H).	352.05
化合物V	$\delta = 3.82$ (s, 3H); 3.89 (s, 3H); 6.06 (s, 2H); 6.49 (s, 1H); 6.88 (s, 1H); 7.03 (d, 1H); 7.05 (s, 1H); 7.36 (d, 1H); 7.40 (d, 1H); 7.43 (d, 1H); 11.56 (s, 1H).	352.05
化合物VI	$\delta = 3.82$ (s, 3H); 6.10 (s, 2H); 6.51 (s, 1H); 6.87 (s, 1H); 7.8 (d, 2H); 7.53 (d, 1H); 7.48 (d, 1H); 7.12 (d, 2H); 7.02 (s, 1H); 11.6 (s, 1H).	322.15
化合物XI	$\delta = 3.80$ (s, 3H); 3.86 (s, 3H); 6.73 (s, 1H); 6.82 (d, 1H), 7.12 (d, 1H); 7.16 (s, 1H), 7.19 (d, 1H); 7.21 (s, 1H); 7.51 (s, 1H), 7.57 (d, 1H).	338, 340, 360, 378, 403, 419, 420, 444
化合物II	$\delta = 1.05$ (t, 3H); 1.78 (m, 2H); 3.85 (s, 6H); 4.05 (t, 2H); 6.50 (s, 1H); 6.85 (s, 1H); 7.05 (d, 2H); 7.45 (d, 2H); 7.75 (d, 2H); 7.02 (s, 1H); 11.65 (s, 1H)	366.10

20

30

30

【0102】

実施例1：生物学的活性

野生型CHO細胞およびCYP1A1およびCYP1B1酵素を発現するように遺伝子操作されたCHO細胞におけるプロドラッグ細胞毒性

40

遺伝子操作されたCHO細胞を用いて、CYP1発現が関与する選択的な細胞死滅を示す。以下に記載する実験では、化合物を、CYP1A1 (CHO / CYP1A1) またはCYP1B1 (CHO / CYP1B1) 酵素のいずれか一方を発現するように遺伝子操作した野生型CHO細胞に暴露した。

【0103】

CHO細胞: Chinese Hamster Ovary (CHO) DUKX B11細胞を、10% FCS、各1単位 / ml のヒポキサンチンおよびチミジンおよびペニシリン (100IU / ml) およびストレプトマイシン (100μg / ml) を添加した -MEM中にて、文献記載の方法に従って標準的な細胞培養条件下で培養した (Ding S, et al., Arch. Biochem.

50

Biophys., 348: 403-410, 1997)。細胞は37にて、5%CO₂の湿潤雰囲気下で培養した。

【0104】

CHO/CYP1A1およびCHO/CYP1B1細胞：P450レダクターゼを同時発現する組換えCYP1A1および組換えCYP1B1を含むCHO細胞、即ち、それぞれ(CHO/CYP1A1)および(CHO/CYP1B1)、を0.4mg/ml G418二硫酸塩および0.3μMメトトレキセートを添加したCHO細胞用の標準的な培地(Sigma/Aldrich Co., Gillingham, Dorset, UK)を用いて文献(前掲)に記載方法にしたがって培養した。細胞は37にて、5%CO₂の湿潤雰囲気下で培養した。

【0105】

組換えCYP1A1およびCYP1B1発現

ヒトcDNA CYP1A1またはcDNA CYP1B1のいずれか一方のCHO細胞におけるジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子増幅を用い、ヒトP450レダクターゼと同時発現したときに高レベルの機能的酵素が達成されるようにした(前掲参照; Ding S, et al., Biochem J., 356(Pt 2): 613-9, 2001)。変換CYP1A1またはCYP1B1 cDNAを消化し、ほ乳類発現ベクターpDHFRにライゲーションし、それぞれプラスミドpDHFR/1A1およびpDHFR/1B1を作製した(前掲参照)。細胞培養およびCHODUKXB11へのDNAトランスフェクションを文献の記載に従って行い、トランスフェクションした細胞をヌクレオシド欠損培地での生育によってDHFR+表現型について選択した(前掲参照)。DHFR+クローニングをプールし、トランスフェクトしたCYP1A1またはCYP1B1 cDNAの増幅のため、MTXの漸増濃度(0.02~0.1μM)で培養した。0.1mMのMTX選択で生存した細胞クローニングを単離した後、さらに0.3μMのMTXにて選択した。得られたセルラインを免疫プロットティングによりCYP1A1またはCYP1B1発現について解析した。各酵素を高レベルで発現するセルラインを、文献(前掲)に記載の方法にしたがい、全長ヒトシトクロームP450レダクターゼ(CPR)cDNAを含むプラスミドpCDNA/HRで安定にトランスフェクトし、G418(0.8mg/ml)およびMTX(0.3μM)にて選択した。耐性クローニングを単離した後、G418の濃度を0.4mg/mlに減少させ、セルラインの均質性をクローニングの反復により確認した。cDNA CYP1A1を有するプラスミド、次いでCPR cDNAでトランスフェクトしたCHOセルラインをCHO/CYP1A1と称し、cDNA CYP1B1を有するプラスミド、次いでCPR cDNAでトランスフェクトしたCHOセルラインをCHO/CYP1B1と称した。

【0106】

CYP1A1およびCYP1B1の免疫化学的検出

細胞を回収し、文献に記載の標準的な方法を用いて音波処理により溶解した(Ding S, et al., 1997)。タンパク質(一般には50μgのリゼート)をSDS/PAGEによって分離し、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーし、標準的な方法を用いてプローブした(Paine MJ, et al., Arch. Biochem. Biophys., 328: 380-388, 1996)。細胞における酵素発現の免疫化学的検出のため、ヒトCYP1A1+レダクターゼSupersomes(商標)、ヒトCYP1A2+レダクターゼSupersomes(商標)およびCYP1B1+レダクターゼSupersomes(商標)(BD Biosciences, Oxford, UK)をポジティブコントロールとして用いた(一般に0.03~0.3pmole)。WB-1B1一次抗体(希釈率1:1500, BD Biosciences, Oxford, UK)およびCYP1A1と交差反応する抗CYP1A2抗体(希釈率1:2000, Cancer Research Technology, London, UK)を用いて、CYP1B1およびCYP1A1発現をそれぞれ検出した。二次抗体は、ヤギ抗ウサギIgGを希釈率1:500で使用した。Enhanced Chemiluminescence(ECL)ウェスタンプロットティング検出キット(GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Buckinghamshire, UK)を用いて免疫プロットを行った。

【0107】

細胞におけるCYP1A1およびCYP1B1発現のウェスタンプロットティングによるキ

10

20

30

40

50

ヤラクタリゼーション

図1 aは、CHO / CYP1B1 セルラインからのリゼートにおけるCYP1B1タンパク質発現の検出を示す典型的なウェスタンプロットであり、非トランスフェクトCHO DUKX B1 1 セルラインまたはCHO / CYP1A1 セルラインのいずれにおいても検出されなかった。バンドは、56 kDa の分子量に対応し、ヒトCYP1B1 Supersomal (商標) 酵素のバンドと一致した。

図1 bは、CHO / CYP1A1 セルラインからのリゼートにおけるCYP1A1タンパク質発現の検出を示す典型的なウェスタンプロットであり、非トランスフェクトCHOD UKX B1 1 セルラインまたはCHO / CYP1B1 セルラインのいずれにおいても検出されなかった。バンドは、60 kDa の分子量に対応し、抗CYP1A2抗体の交差反応性によって検出されたヒトCYP1A1 Supersomal (商標) 酵素のバンドと一致した。

【0108】

機能的CYP1活性

ERODアッセイは、機能的CYP1活性を確認するために広く用いられている (Chang TKおよびWaxman DJ, "Enzymatic Analysis of cDNA-Expressed Human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-Ethoxresorufin as Substrate", Methods Mol. Biol., 320: 85-90, 2006, the contents of which are incorporated herein by reference)。このアッセイは、580 nmでの蛍光を継続的にモニターし、7-エトキシレゾルフィンの、CYP1A1、CYP1A2、およびCYPB1によるO-脱アルキル化で生じた酵素産物レゾルフィンを測定するというものである。ERODアッセイおよび選択的および非選択的CYP1阻害剤を用い、上記のCHOセルラインが予想されるCYP1酵素を機能的な形態で発現していることを確認した。

【0109】

阻害剤の非存在下では、CHO / CYP1A1 およびCHO / CYP1B1 (野生型CHO細胞ではなく) は7-エトキシレゾルフィンをレゾルフィンに変換し、それによってこれら細胞に対する機能的CYP1発現が確認された(以下、表2参照)。

【0110】

予測したとおり、広範なスペクトルを有するCYP1阻害剤 - ナフトフラボンの添加は、両方のCYP1を発現する細胞において活性を消失させた(表2)。選択的阻害剤、テトラメトキシスチルベンは、CYP1A1と比較してCYP1B1に対して30倍選択的である(Chun YJ, Kim S, Kim D, Lee SK and Guengerich FP, "A New Selective and Potent Inhibitor of Human Cytochrome P450 1B1 and its Application to Antimutagenesis", Cancer Res 61(22): 8164-70, 2001)。テトラメトキシスチルベンは、両方のCYP1を発現するセルラインにおいて高濃度で活性を消失させ、(CYP1A1発現細胞と比較して) CYP1B1発現細胞において低濃度で優先的に活性を減少させた(表2)。

【表2】

Table2: CHO細胞における特異的CYP1活性 (pmol レゾルフィン 分⁻¹ mg タンパク質⁻¹)

阻害剤	CHO	CHO/CYP1A1	CHO/CYP1B1
	nd	29 ± 4	19 ± 3
α-ナフトフラボン (10 μmol)	nd	nd	nd
テトラメトキシスチルベン (5 μmol)	nd	nd	nd
テトラメトキシスチルベン (10 nM)	nd	26 ± 4	5 ± 2

【0111】

これら結果は、CYP1A1 およびCYP1B1 発現レベルが予測どおりであることの独自の裏付けを与えるものである。

【0112】

10

20

30

40

50

C H O、C H O / C Y P 1 A 1 および C H O / C Y P 1 B 1 セルラインにおける細胞毒性
I C₅₀ 値の測定

必要な培地 1 0 0 μ L 中の C H O、C H O / C Y P 1 A 1 または C H O / C Y P 1 B 1 の単一な細胞懸濁液を 9 6 ウェルプレートに、1 5 0 0 細胞 / ウェルで播種し、3 7 のインキュベーターに 2 4 時間置いた。次いで、D M S O 中の試験化合物のストック溶液を加えて 1 0 0、3 0、1 0、3、1、0. 3、0. 1、0. 0 3、0. 0 1、0. 0 0 3、0. 0 0 1、0 μ M の濃度範囲にした。D M S O の最終濃度 0. 2 % では、種々の C H O セルラインの増殖特性に影響はなかった。細胞を試験化合物と 9 6 時間インキュベーションした後、すべての培地を吸引し、新鮮な培地 1 0 0 μ L と交換して蒸発による培地の損失を補った。細胞を 2 0 μ L の M T S アッセイ試薬と 1 時間 3 0 分間インキュベーションし、プレートリーダーを用いてウェルごとの 5 1 0 n m での吸光度を測定した。各試験化合物の濃度について、以下を含む一連のコントロール：(a) 細胞 + 培地、(b) 細胞 + D M S O 0. 2 % を含有する培地、(c) 培地のみ、および(d) D M S O 0. 2 % および 0 ~ 1 0 0 μ M の濃度範囲の試験化合物を含む培地、に対して平均吸光度および標準偏差を計算した。細胞毒性の I C₅₀ 値を計算した。試験化合物に対する細胞増殖率（ここで、細胞増殖率 1 0 0 % は、非処理のコントロール細胞に対応する）のプロットから計算した。

10

【 0 1 1 3 】

本明細書において、細胞毒性の I C₅₀ 値は 5 0 % の細胞を死滅させる化合物の濃度として定義し、選択性の倍数は、非CYP1発現細胞における I C₅₀ を、CYP1A1またはCYP1B1発現細胞における I C₅₀ で割ることによって計算する。

20

【 0 1 1 4 】

Promega (商標) CellTiter 96 (商標) 水性非放射性細胞増殖 (M T S) アッセイ M T S アッセイは、増殖している生細胞の数の測定、細胞毒性または化学的感受性試験に関するホモジニアスな、比色分析法である (Cali JJ, et al., "Luminescence-Based Methods および Probes for Measuring Cytochrome P450 Activity", pp. 1-29. Promega Corporation, United States, 2004)。このアッセイは、テトラゾリウム化合物 [3 - (4, 5 -ジメチルチアゾール - 2 -イル) - 5 - (3 -カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 -スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム、内塩；M T S] および電子カップリング試薬 (フェナジンメトスルフェート) P M S の溶液から構成される。M T S は細胞によって、組織培地に溶解するホルマザン産物に生体内還元される。9 6 ウェルアッセイプレートから 5 1 0 n m にてホルマザン産物の吸光度を直接測定することができる。4 9 0 または 5 1 0 n m での吸光度によって測定されるホルマザンの量は、培地中の生細胞数に直接比例する。

30

【 0 1 1 5 】

以下のTable 3に示す本発明の化合物は、野生型 C H O 細胞に対する毒性は示されず（あるいは無視できる程度）、(C Y P 1 発現の非存在下で) 化合物が非毒性または実質的に非毒性のプロドラッグであることが確認された。プロドラッグの活性化のメカニズムは、2 種類の C Y P 1 発現セルライン：C H O / C Y P 1 A 1 および C H O / C Y P 1 B 1 に対するそれらの活性から推測される。例えば、化合物 V、化合物 V I および化合物 I I は、野生型および C Y P 1 A 1 発現 C H O 細胞の両方に対して非毒性であるが、8 0 n M (化合物 V) ~ 5 0 0 n M (化合物 V I) の I C₅₀ 値で C H O / C Y P 1 B 1 細胞の増殖を強力に阻害する。従って、化合物 I I 、V および V I は C Y P 1 B 1 活性化プロドラッグである。重要なことに、これら C Y P 1 B 1 選択性的プロドラッグは、非 C Y P 1 B 1 発現細胞よりも C Y P 1 B 1 発現細胞に対して 2 0 0 ~ 1 2 5 0 倍毒性が強い (Table 3)。化合物 I I I は C H O / C Y P 1 A 1 および C H O / C Y P 1 B 1 細胞に対して活性であり、C Y P 1 A 1 および C Y P 1 B 1 酵素のいずれによっても活性化されることを示している (Table 2)。

40

【表3】

Table 3: CHO、CHO/CYP1A1およびCHO/CYP1B1細胞におけるプロドラッグ活性

化合物‡	CHO IC ₅₀ μM	CHO/CYP1A1 IC ₅₀ μM	CHO/CYP1B1 IC ₅₀ μM
I I I	6.11 ± 0.34	0.95 ± 0.35	0.04 ± 0.03
V	> 100	> 100	0.08 ± 0.01
V I	> 100	> 100	0.5 ± 0.1
I I	> 50	> 50	0.09 ± 0.05

‡ 化合物番号は、上記式 I I ~ V I の化合物を意味する。

【0116】

実施例2：代謝産物活性

上記化合物の作用機序を調べるために、化合物Vおよびその推定代謝産物化合物X Iを Cerep DiversitySExpressキナーゼスクリーン (Thierry Jolas, Study No. 13991, In vitro Pharmacology: Diversity ExpressKinase Profile) にて試験した。

【0117】

キナーゼスクリーニング

Cerep Laboratories (Celle l' Evescault, France) によってキナーゼスクリーニングを行った。化合物は、単一の濃度(10 μM)で2回スクリーニングした。以下のTable 4に示す結果は、化合物X Iおよび化合物Vの存在下で得られる対照の比活性の阻害の百分率として示す：

$$\{100 - [(測定された比活性 / 対照の比活性) \times 100]\}$$

ATP濃度は、個々のキナーゼについての ATP Km値に対応する(Cerep, private communication)。各実験では、アッセイの信頼性を評価するために、参照化合物を化合物X Iおよび化合物Vと並行して試験した。参照化合物についての IC₅₀ 値は、過去の平均の許容限度内(± 0.5 log 単位)であった。

【0118】

親化合物(化合物V)および代謝産物(化合物X I)は両方とも10 μMで試験した。結果は、化合物X I(化合物Vではなく)が、癌形成において重要な役割を司ることが知られているさまざまなキナーゼを阻害することを示している(以下のTable 4参照)。

【表4】

Table 4: 化合物Vおよびその代謝産物のキナーゼ活性: 化合物X I

キナーゼ	グループ	ファミリー	対照に対する阻害 (%)	
			化合物V (10 μM)	化合物X I (10 μM)
C-Met (HGFR)	TK	Met	-5%	58%
CSK	TK	Csk	4%	98%
FGFR2	TK	FGFR	13%	98%
FGFR4	TK	FGFR	-3%	85%
FLT-1	TK	VEGFR	11%	98%
FLT-3	TK	PDGFR	21%	93%
Fyn	TK	Src	25%	100%
KDR (VEGFR2)	TK	VEGFR	19%	96%
Lyn	TK	Src	-1%	99%
PDGFR β	TK	PDGFR	7%	91%

【0119】

実施例3：シトクロームP450代謝

上記のとおり、本発明の化合物の特徴は、正常な組織では発現せず、さまざまな組織学的タイプのヒトの癌に高い頻度で発現するCYP1B1によるそれら化合物の代謝にある。正常な組織に存在するシトクロームP450酵素の基質ではないことを示すために、化合物VおよびIIを、Cerep (Mao Boryeu, Study No. 13652, ADME-Tox CYP Phenotyping, which is incorporated herein by reference)におけるCYP表現型検査で分析した。化合物VおよびIIを6種類のCYPsに暴露した（以下のTable 5参照）。結果は、どの化合物も主な異物代謝CYP酵素のいずれによっても有意に代謝されないことを示している。

10

【表5】

Table 5: CYP酵素の存在下での代謝安定性

CYP酵素	化合物V 親化合物平均 残存率 (%)	化合物II 親化合物平均 残存率 (%)	参照化合物	参照化合物 残存率 (%)
CYP1A2 (40pm/mL)	71	69	エトキシレゾル フィン	0
CYP2C9 (10pm/mL)	109	130	ジクロフェナク	0
CYP2C19 (10pm/mL)	111	127	イミプラミン	20
CYP2D6 (10pm/mL)	100	127	イミプラミン	3
CYP3A4 (10pm/mL)	93	122	テルフェナジン	14
CYP3A5 (10pm/mL)	87	126	ミダゾラム	1

20

【0120】

方法：シトクロームP450代謝

Cerep Laboratories (Redmond, WA, USA)によりCYP代謝試験を行った。化合物を、CYP酵素、NADP (1.3 mM)、D-グルコース-6-リン酸 (3.3 mM) およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの存在下、1 μMにて2回スクリーニングした。0および60分間インキュベーションした後、親化合物のレベルを、標準的なHPLC / MS / MS法を用いて測定した。結果は60分後に残存する親化合物の百分率で示す。

30

【0121】

実施例4：in vivoでの生物学的活性

in vivoでの候補薬物の効果を実証するため、異種移植試験を行った。この試験では、UTSCC-14異種移植腫瘍において、化合物IIの有効性を3種類の用量レベルでピークル対照と比較した。

40

40匹の雌性nu/nuマウス (7~9週齢、体重20~25グラム)に2e6 UTSCC-14細胞を皮下移植し、10日後、約100~150mm³の腫瘍量を有するマウスを、無作為に9匹ずつ4の群に分けた (Table 1)。すべての群に、29日間毎日腹腔内投与した。40日目に腫瘍を摘出し、重量を計った。

【0122】

実験に用いたUTSCC-14細胞は、トゥルク大学のReidar Grenman教授の研究室 (頭部および頸部外科部門、トゥルク大学、トゥルク、フィンランド)から入手したものであり、雄性の頭部および頸部癌患者の舌由来のグレードIIの原発性腫瘍から採取されたものである。

40

【表6】

Table 6	
群1	ビーカル対照(水中 50% DMSO) i.p. (5 ul/g)
群2	化合物II(水中 50% DMSO*) 7 mg/kg i.p. (5 ul/g)
群3	化合物II(水中 50% DMSO*) 20 mg/kg i.p. (5 ul/g)
群4	化合物II(水中 50% DMSO*) 50 mg/kg i.p. (5 ul/g)

【0124】

実験スケジュールをTable 7に示す。

10

【表7】

0日目	マウスへの細胞移植（マウス40匹、皮下 側腹）、2e6細胞／マウス
10日目	腫瘍の測定、マウス体重測定、4群にランダムにグループ分け
10日目	投薬開始
39日目	投薬終了
40日目	腫瘍の切除および腫瘍重量測定（最後の投与から24時間後）

【0125】

50%DMSO／水のストック溶液を作製するために、化合物IIを100%セルカルチャーグレードのDMSO中に40mg/mlで溶解／懸濁したのち、投与の直前にddH₂Oで希釈した。このストック溶液を用いて、50%DMSO／水で希釈して必要な濃度にすることによりすべての用量を調製した。

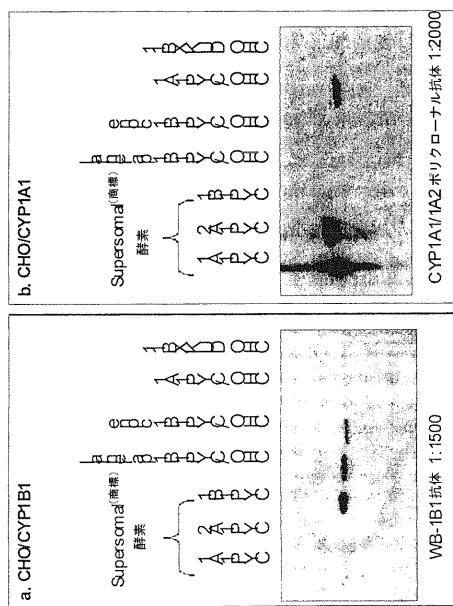
20

【0126】

図2は、試験の40日に切除した腫瘍重量をグラム数で示したものである。このグラフは、試験の終了時での腫瘍湿潤重量の用量依存的減少を示している。これらの結果は、癌患者から直接採取した細胞を用いたin vivoモデルでの活性を示している。この試験は、化合物II（および本明細書に記載した関連化合物）が、新しい癌治療の開発において有用であることの裏付けを与えるものである。

30

【図1】



【図2】

Figure 2: 肿瘍湿潤重量 (g)

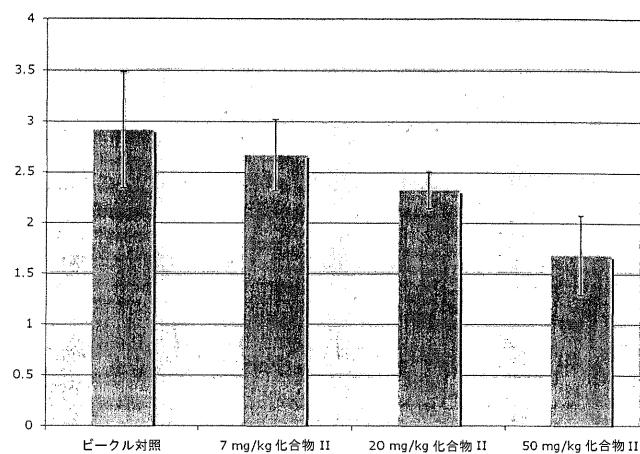


FIG.1

FIG.1a

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D213/64 C07D405/04 A61K31/443 A61P35/00

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)
C07D A61K A61P

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; PALUCHOWSKA ET AL.: "Substitution mode of the amide fragment in some new N-[omega.-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1 -yl]alkyl]pyrid-2(1H)-ones and their 5-HT1A/5-HT2A activity" XP002539005 retrieved from STN Database accession no. 2002:38477 Abstract; CAS-RN 459430-46-7. & POLISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY , 53(4), 369-376 CODEN: PJPAE3; ISSN: 1230-6002, 2001,</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1,6-9, 12-14, 18-21, 23,40

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document 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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later 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

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y 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 member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

29 July 2009

19/08/2009

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weisbrod, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/004005

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2008/133955 A (EXELIXIS INC [US]; KOLTUN ELENA S [US]; TSUHAKO AMY L [US]; AAY NAING) 6 November 2008 (2008-11-06) Abstract; claims 1, 11, 13-15; page 336, example 336. ----- X DATABASE BEILSTEIN [Online] BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002539006 Database accession no. 8425040, 8420176, 8425304, 8425743, 8436714 (BRNs) the whole document & SYNTHESIS, vol. 11, 1999, pages 1961-1970, ----- X KATRITZKY ET AL.: "Solid-Phase Synthesis of 4,6-Disubstituted and 3,4,6-Trisubstituted Pyrid-2-ones" J. COMB. CHEM., vol. 4, no. 4, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 249-250, XP009106205 ISSN: 1520-4766 Page 250, scheme 2, compounds 9a-i. ----- X US 2007/072833 A1 (WENDT MICHAEL D [US] ET AL) 29 March 2007 (2007-03-29) Page 25, example 64B. -& DATABASE PATENT CHEMISTRY [Online] Elsevier Inc.; XP002539007 Database accession no. 6721571 (PRN) Compound Identifier in Patent: example 64B. ----- A WO 03/028713 A (CANCER REC TECH LTD [GB]; POTTER GERARD ANDREW [GB]; BUTLER PAUL CRISP) 10 April 2003 (2003-04-10) cited in the application Abstract; claims; examples. ----- A BRUNO; NJAR: "Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anti-cancer drug development" BIOORG. MED. CHEM., vol. 15, no. 15, 8 June 2007 (2007-06-08), pages 5047-5060, XP022110107 ISSN: 0968-0896 Pages 5054-5057, chapter 4.1; page 5056, figure 11.c: activation of DMU-135 by Cyp1B1 to give DMU-117. -----	1-50 17-21, 23,32,40 17-21, 23,32,40 18-21,40 1-50 1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/004005

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2008133955	A	06-11-2008	EP	2074103 A1		01-07-2009
US 2007072833	A1	29-03-2007	NONE			
WO 03028713	A	10-04-2003	CA EP US	2462276 A1 1432413 A2 2004254149 A1	10-04-2003 30-06-2004 16-12-2004	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 105
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 13/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/10
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,J,P,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100076521

弁理士 坪井 有四郎

(74) 代理人 100162684

弁理士 吳 英燦

(72) 発明者 ジェラード・アンドリュー・ポッター

英国エルイー 1・9 ビージー、レイチェスター・シャー、レイチェスター、ド・モンフォール・ユニバーシティ、スクール・オブ・ファーマシー

(72) 発明者 フィリップ・ハクスリー

英国オーエックス 2 9・8 エイダブリュー、オックスフォード、フリーランド、プレムハイム・ライン 9 番

F ターム(参考) 4C055 AA01 BA03 BA08 BA16 BA42 BB02 CA01 DA08 DA16 DB02
 4C063 AA01 BB01 CC81 DD12 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 BC17 GA02 GA08 MA01 MA04 NA14 ZA02
 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZB21 ZB26

【要約の続き】

は独立にHまたは低級アルキルであり、R⁴～R⁸の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであり；およびR⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²およびR¹³は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルであって、少なくとも1つが-O-低級アルキルであるか；または環上で互いに隣り合ったR⁹～R¹³のペアの少なくとも1つが一緒になって-O-(C R¹⁶ R¹⁷)_m-O-を形成し、ここでmは1または2であり、R¹⁶およびR¹⁷は独立にHまたは低級アルキルであり、R⁹～R¹³の残りの基は独立にH、ハロ、低級アルキルまたは-O-低級アルキルである】

を有する化合物。