

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5225104号
(P5225104)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl.	F 1	
C07D 401/14	(2006.01)	C07D 401/14 C S P
A61K 31/506	(2006.01)	A61K 31/506
A61P 17/06	(2006.01)	A61P 17/06
A61P 35/00	(2006.01)	A61P 35/00
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00 1 1 1

請求項の数 10 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2008-550742 (P2008-550742)
(86) (22) 出願日	平成19年1月16日 (2007.1.16)
(65) 公表番号	特表2009-523760 (P2009-523760A)
(43) 公表日	平成21年6月25日 (2009.6.25)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2007/050376
(87) 國際公開番号	W02007/082878
(87) 國際公開日	平成19年7月26日 (2007.7.26)
審査請求日	平成21年12月11日 (2009.12.11)
(31) 優先権主張番号	06100584.9
(32) 優先日	平成18年1月19日 (2006.1.19)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者	390033008 ジャンセン・ファーマシューチカ・ナーム ローゼ・フェンノートシャツブ JANSSEN PHARMACEUTI CA NAAMLOZE VENNOOT SCHAP ベルギー・ビー・2340-ビールセ・ト ウルンホウトセベーグ30
(74) 代理人	110000741 特許業務法人小田島特許事務所

最終頁に続く

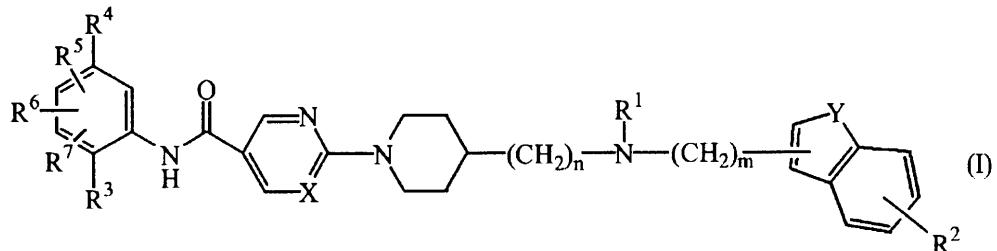
(54) 【発明の名称】新しい、ヒストンデアセチラーゼのインヒビターとしてのアミノフェニル誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I)

【化 1】



10

[式中、

n は値 0、1 又は 2 をもつ整数であり、そして n が 0 である時は直接結合が意図されており、

m は値 1 又は 2 をもつ整数であり、

X は N 又は C H であり、

Y は O、S 又は N R⁸ であり、ここでR⁸ は水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルオキシ C₁₋₆アルキル、C₃₋₆シクロアルキル、C₃₋₆シクロアルキルメチル、フェニル C₁₋₆アルキル、-C(=O)-CH₂R⁹R¹⁰

20

又は $-S(=O)_2-N(CH_3)_2$ であり、ここで

R^9 及び R^{10} はそれぞれ独立して水素、アミノ、 C_{1-6} アルキル又はアミノ C_{1-6} アルキルであり、そして

Y が NR^8 でありそして R^2 がインドリルの 7 位上にある時は、 R^2 及び R^8 が一緒になつて 2 値の基

$- (CH_2)_2 -$ (a-1) 又は

$- (CH_2)_3 -$ (a-2)

を形成してもよく、

R^1 は水素、 C_{1-6} アルキル、ヒドロキシ C_{1-6} アルキル、シアノ C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、 C_{1-6} アルキルカルボニル又はモノ-もしくはジ(C_{1-6} アルキル)アミノスルホニルであり、

R^2 は水素、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、 C_{1-6} アルキル、シアノ、 C_{2-6} アルケニル、ポリハロ C_{1-6} アルキル、ニトロ、フェニル、 C_{1-6} アルキルカルボニル、ヒドロキシカルボニル、 C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ、 C_{1-6} アルキルオキシ又はモノ-もしくはジ(C_{1-6} アルキル)アミノであり、

R^3 はヒドロキシ又はアミノであり、

R^4 は水素、チエニル、フラニル又はフェニルであり、そしてチエニル、フラニル又はフェニルはそれぞれ場合により、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、フェニル、 C_{1-6} アルキル、(ジ C_{1-6} アルキル)アミノ、 C_{1-6} アルキルオキシ、フェニル C_{1-6} アルキルオキシ、ヒドロキシ C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルオキシカルボニル、ヒドロキシカルボニル、 C_{1-6} アルキルカルボニル、ポリハロ C_{1-6} アルキルオキシ、ポリハロ C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルホニル、ヒドロキシカルボニル C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ、アミノスルホニル、アミノスルホニル C_{1-6} アルキル、イソオキサゾリル、アミノカルボニル、フェニル C_{2-6} アルケニル、フェニル C_{3-6} アルキニル又はピリジニル C_{3-6} アルキニルで置換されていてもよく、

R^5 、 R^6 及び R^7 はそれぞれ独立して水素、アミノ、ニトロ、フラニル、ハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルオキシ、トリフルオロメチル、チエニル、フェニル、 C_{1-6} アルキルカルボニルアミノ又はアミノカルボニル C_{1-6} アルキルである]

の化合物、又はその N -オキシド、製薬学的に許容される付加塩若しくは立体化学的異性体。

【請求項 2】

- a) n が 0 又は 1 であり、
- b) m が 1 又は 2 であり、
- c) X が N 又は CH であり、
- d) Y が NR^8 であり、ここで R^8 が水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{3-6} シクロアルキル又は C_{3-6} シクロアルキルメチルであり、
- e) R^1 が水素、 C_{1-6} アルキル、ヒドロキシ C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルカルボニル又は C_{1-6} アルキルスルホニルであり、
- f) R^2 が水素又はハロであり、
- g) R^3 がアミノであり、
- h) R^4 が水素又はチエニルであり、そして
- i) R^5 、 R^6 及び R^7 がそれぞれ水素である、

請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

- a) n が 1 であり、
- b) m が 1 であり、
- c) X が N であり、
- d) Y が NR^8 であり、ここで R^8 がメチルであり、
- e) R^1 が水素であり、
- f) R^2 が水素又はハロであり、

10

20

30

40

50

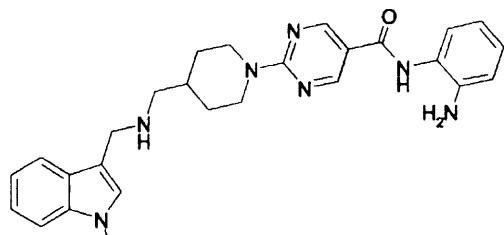
g) R^3 がアミノであり、
 h) R^4 が水素又は 2 - チエニルであり、そして
 i) R^5 、 R^6 及び R^7 がそれぞれ水素である、

請求項 1 記載の化合物。

【請求項 4】

化合物が化合物 N o . 2 、すなわち式

【化 2】



10

の化合物である請求項 1 記載の化合物。

【請求項 5】

製薬学的に許容される担体及び、有効成分として、治療的有効量の、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物を含んでなる製薬学的組成物。

【請求項 6】

製薬学的に許容される担体及び請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物が密接に混合される、請求項 5 に請求の製薬学的組成物の調製方法。

20

【請求項 7】

医薬としての使用のための請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 8】

増殖性疾患の処置のための医薬の調製のための、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物の使用。

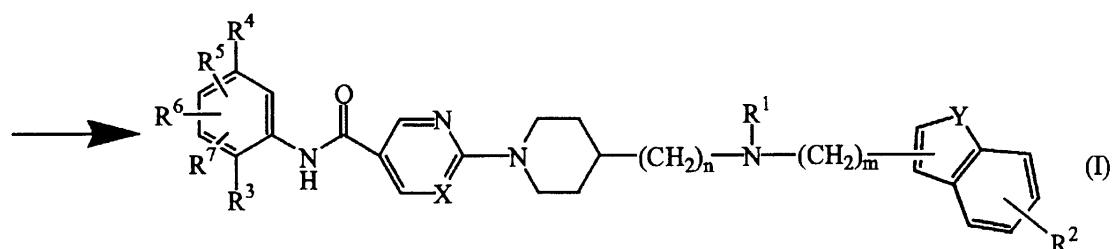
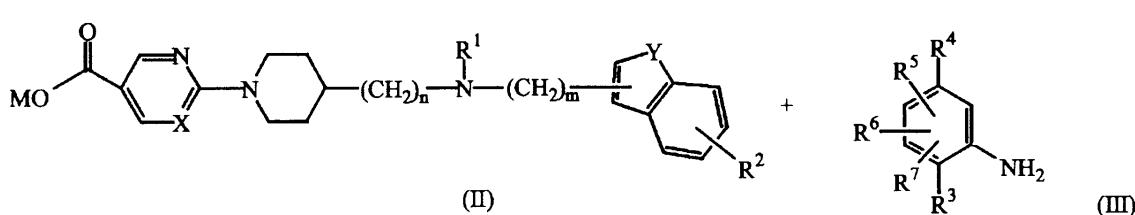
【請求項 9】

抗癌剤及び請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の HDAC インヒビターの組み合わせ物。

【請求項 10】

30

a) 塩基の存在下で、その M が水素又はアルカリ金属を表す式 (II) の中間体を、式 (III) の化合物と反応させる方法を特徴とする、請求項 1 記載の化合物の製造方法：
 【化 3】



40

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明はヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害酵素活性を有する化合物を対象にする。それは更に、それらの調製法、それらを含んでなる組成物並びに、H D A Cを阻害するための、そして医薬としての、例えば、癌及び乾癬のような増殖性状態を抑制するための医薬としての、インビトロ及びインビボ双方のそれらの使用を対象にする。

【背景技術】

【0002】

核のヒストンは、遺伝子の転写並びに、複製、修復、組み換え及び染色体分離のような他のD N Aテンプレート過程を制御する役目をもつ機構の不可欠な、動的成分として知られる。それらはアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化及びA D P - リボシル化を包含する翻訳後修飾の対象である。

10

【0003】

本明細書で「H D A C」と呼ばれる1種又は複数のヒストンデアセチラーゼは、核の又クレオソームのヒストンH 2 A、H 2 B、H 3及びH 4を包含する、タンパク質のリシン残基上のアセチル修飾物の除去を触媒する酵素である。H D A Cは、本明細書で「H A T」と呼ばれる1種又は複数のヒストン・アセチルトランスフェラーゼと一緒に、ヒストンのアセチル化レベルを制御する。又クレオソームのヒストンのアセチル化の平衡は多数の遺伝子の転写に重要な役割を果たす。ヒストンのアセチル化低下は遺伝子転写の後退をもたらす凝縮されたクロマチン構造を伴ない、他方アセチル化されたヒストンは、より開放されたクロマチン構造及び転写の活性化を伴なう。

20

【0004】

11種の、構造的に関連したH D A Cが記載されており、2群に分類される。第I群のH D A CはH D A C 1、2、3、8及び11よりなり、他方第I I群のH D A CはH D A C 4、5、6、7、9及び10よりなる。第3群のH D A Cのメンバーは第I群及び第I I群のH D A Cと構造的には関連していない。第I / I I群のH D A Cは亜鉛依存性機序により作動し、他方第I I I群のH D A CはN A D依存性である。

【0005】

ヒストンに加えて、その他のタンパク質、とりわけp 5 3、G A T A - 1及びE 2 Fのような転写因子；グルココルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、エストローゲン受容体のような核受容体；並びにp R bのような細胞周期制御タンパク質もまた、アセチル化のための基質であった。タンパク質のアセチル化は、p 5 3の安定化、コファクターの採用及び増加したD N A結合のようなタンパク質の安定化と関連付けられてきた。p 5 3は、D N A損傷のような種々のストレス信号に反応して細胞周期の停止又はアポトーシスを誘導する可能性がある腫瘍サプレッサーである。p 5 3誘導の細胞周期停止の主要標的はp 2 1遺伝子であるように見える。p 5 3によるその活性化の次に、p 2 1は、G 1及びG 2相の両方における細胞周期停止、老衰期間中のその調節過剰及び増殖している細胞核の抗原とのその相互反応をもたらすサイクリン / サイクリン - 依存性キナーゼ複合物とのその関連により特定してきた。

30

【0006】

H D A Cのインヒビターの研究により、それらが細胞周期停止、細胞分化、アポトーシス及び形質転換された表現型の逆転において重要な役割を果たすことが示される。

40

【0007】

例えば、インヒビターのトリコスタチンA (T S A)はG 1及びG 2相の両方において細胞周期停止を誘導し、異なる細胞系列の形質転換表現型を逆転し、そしてフレンド白血病細胞及び他の細胞の分化を誘導する。T S A (及びスペロイルアニリドヒドロキサム酸S A H A)はマウスにおいて、細胞増殖を阻害し、末端の分化 (t e r m i n a l d i f f e r e n t i a t i o n)を誘導し、そして腫瘍の形成を抑制することが報告された(非特許文献1参照)。

【0008】

トリコスタチンAはまた、纖維症、例えば肝纖維症及び肝硬変の処置に有用であることが報告された(特許文献1参照)。

50

【0009】

H D A C インヒビターの薬作用発生団は、H D A C の亜鉛含有活性部位と相互反応する金属結合領域、リンカー領域及び、活性部位の縁上の残基と相互反応する表面認識領域又はキャッシング領域よりなる。

【0010】

H D A C のインヒビターはまた、p 2 1 遺伝子の発現を誘導することが報告されている。これらのインヒビターによるp 2 1 遺伝子の転写活性化は、p 2 1 プロモーター領域における、ヒストンH 3 及びH 4 のアセチル化の後のクロマチン再形成により促進される。p 2 1 のこの活性化はp 5 3 - 非依存性の様態で起り、従ってH D A C インヒビターは多数の腫瘍の証明の、突然変異p 5 3 遺伝子をもつ細胞中で作用する。

10

【0011】

更にH D A C インヒビターは宿主の免疫反応の増強及び腫瘍脈管形成の抑制のような間接的作用をもつことができ、従って原発腫瘍の増殖を抑制し、転移を妨げることができる（非特許文献2 参照）。

【0012】

以上を考察すると、H D A C インヒビターは、突然変異p 5 3 遺伝子をもつ腫瘍を含む細胞増殖疾患又は状態の処置に大きな可能性をもつことができる。

【0013】

2003年8月14日公開の特許文献2はヒストンデアセチラーゼのインヒビターとしての2環式ヒドロキサメートを開示している（特許文献2 参照）。

20

【0014】

なかでも2003年9月18日に公開された特許文献3、4、5、6、7、8、9、10はヒストンデアセチラーゼのインヒビターとしての置換ピペラジニルピリミジニルヒドロキサム酸を開示しており、特許文献8は更にR 3 0 6 4 6 5 を開示している（特許文献3～10 参照）。

【0015】

2003年10月9日公開の特許文献11はH D A C インヒビターとして、ピペラジン結合を含んでなるカルバミン酸化合物を開示している（特許文献11 参照）。

【0016】

2003年10月23日公開の特許文献12はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしての置換ピペラジニルフェニルベンズアミド化合物を開示している（特許文献12 参照）。

30

【0017】

2003年11月13日公開の特許文献13はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのベンズアミドを開示している（特許文献13 参照）。

【0018】

2004年1月29日に公開の特許文献14はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのアリール基とヒドロキサメート間にアルキルリンカーを含有する誘導体を開示している（特許文献14 参照）。

【0019】

2004年2月12日公開の特許文献15はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしての、（ヘテロ）アリールアルケニル置換2環式ヒドロキサメートを開示している（特許文献15 参照）。

40

【0020】

2004年6月24日公開の特許文献16は薬理学的物質としてのアリーレン - カルボン酸（2 - アミノ - フェニル） - アミド誘導体を開示している（特許文献16 参照）。

【0021】

2004年7月29に公開の特許文献17は抗炎症及び抗腫瘍作用をもつN - ヒドロキシ - ベンズアミドの誘導体を開示している（特許文献17 参照）。

【0022】

50

2004年7月29日公開の特許文献18はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしての、置換アリールヒドロキサメート誘導体を開示している（特許文献18参照）。

【0023】

2004年、8月19日に公開の特許文献19は薬理学的物質としてのモノ-アシル化O-フェニレンジアミン誘導体を開示している（特許文献19参照）。

【0024】

2004年8月19日公開の特許文献20はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのジアミノフェニレン誘導体を開示している（特許文献20参照）。

【0025】

2004年8月26日公開の特許文献21はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのベンズアミド誘導体を開示している（特許文献21参照）。

10

【0026】

2004年8月26に公開の特許文献22はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのインドール、ベンズイミダゾール及びナフトイミダゾールを開示している（特許文献22参照）。

【0027】

2004年9月30日に公開の特許文献23はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしての非芳香族複素環式環系に結合されたヒドロキサメートを開示している（特許文献23参照）。

【0028】

2004年10月14日公開の特許文献24はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのオキシム誘導体を開示している（特許文献24参照）。

20

【0029】

2004年10月28日に公開の特許文献25はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのヒドロキサメート誘導体を開示している（特許文献25参照）。

【0030】

2005年、3月31に公開の特許文献26はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのベンズイミダゾールを開示している（特許文献26参照）。

【0031】

2005年、4月7日に公開の特許文献27及び28はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのベンズアミドを開示している（特許文献27、28参照）。

30

【0032】

2005年5月6日に公開された特許文献29はヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのアシル尿素に結合された及びスルホニル尿素に結合されたヒドロキサメートを開示している（特許文献29参照）。

【0033】

2005年5月6日に公開の特許文献30はまた、ヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのニアリール結合ヒドロキサメートを開示している（特許文献30参照）。

【0034】

2005年8月18日に公開の特許文献31は、ヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのチアゾリルヒドロキサム酸及びチアジアゾリルヒドロキサム酸を開示している（特許文献31参照）。

40

【0035】

2005年9月22日に公開の特許文献32は、ヒストンデアセチラーゼインヒビターとしてのヘテロ五環式ヒドロキサム酸を開示している（特許文献32参照）。

【0036】

2005年10月6日に公開の特許文献33は、ヒストンデアセチラーゼとしてのアルケニルベンズアミドを開示している（特許文献33参照）。

【0037】

本発明の化合物は構造、それらの薬理作用及び／又は薬理学的効力において先行技術と

50

異なる。

【0038】

解決するべき問題は、増加した生体利用能及び／又はインビボの効力を有する、高い酵素活性及び細胞活性をもつヒストンデアセチラーゼインヒビターを提供することである。

【0039】

本発明の新化合物は前記の問題を解決する。本発明の化合物は優れたヒストンデアセチラーゼ阻害酵素活性及び細胞活性を示す。それらはp21遺伝子を活性化する高い能力を有する。それらは望ましい薬物動態学的プロファイル及びP450酵素に対する低い親和性をもつことができ、それがより広い安全範囲をも許容する、不都合な薬物-薬物相互作用の危険性を軽減する。本発明の化合物の有利な特徴は代謝安定性、溶解度及び／又はp21誘導能である。更にとりわけ本発明の化合物は水溶液中の増加した安定性を有しそして／又はインビボのp21プロモーター誘導能を高めた。

【特許文献1】Geerts et al. , 欧州特許第0 827 742号明細書、1998年3月11日公開

【特許文献2】欧州特許第1472216号明細書

【特許文献3】欧州特許第1485099号明細書

【特許文献4】欧州特許第1485348号明細書

【特許文献5】欧州特許第1485353号明細書

【特許文献6】欧州特許第1485354号明細書

【特許文献7】欧州特許第1485364号明細書

【特許文献8】欧州特許第1485365号明細書

【特許文献9】欧州特許第1485370号明細書

【特許文献10】欧州特許第1485378号明細書

【特許文献11】欧州特許第1492534号明細書

【特許文献12】欧州特許第1495002号明細書

【特許文献13】欧州特許第1501508号明細書

【特許文献14】国際公開出願第04/009536号パンフレット

【特許文献15】欧州特許第1525199号明細書

【特許文献16】欧州特許第1572626号明細書

【特許文献17】欧州特許第1581484号明細書

【特許文献18】欧州特許第1585735号明細書

【特許文献19】欧州特許第1592667号明細書

【特許文献20】欧州特許第1590340号明細書

【特許文献21】欧州特許第1592665号明細書

【特許文献22】国際公開出願第04/072047号パンフレット

【特許文献23】欧州特許第1608628号明細書

【特許文献24】欧州特許第1613622号明細書

【特許文献25】欧州特許第1611088号明細書

【特許文献26】国際公開出願第05/028447号パンフレット

【特許文献27】国際公開出願第05/030704号パンフレット

【特許文献28】国際公開出願第05/030705号パンフレット

【特許文献29】国際公開出願第05/040101号パンフレット

【特許文献30】国際公開出願第05/040161号パンフレット

【特許文献31】国際公開出願第05/075469号パンフレット

【特許文献32】国際公開出願第05/086898号パンフレット

【特許文献33】国際公開出願第05/092899号パンフレット

【非特許文献1】Finnin et al. , Nature, 401: 188 - 193
. 1999

【非特許文献2】Mai et al. , Medicinal Research Reviews, 25: 261 - 309, 2005

10

20

30

40

50

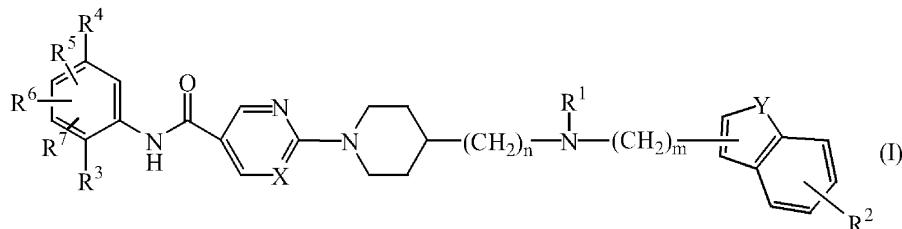
【発明の開示】

【0040】

本発明は式(I)

【0041】

【化1】



【0042】

[式中、

nは値0、1又は2をもつ整数であり、そしてnが0である時は直接結合が意図されており、

mは値1又は2をもつ整数であり、

XはN又はCHであり、

YはO、S又はNR⁸であり、ここで

R⁸は水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルオキシC₁₋₆アルキル、C₃₋₆シクロアルキル、C₃₋₆シクロアルキルメチル、フェニルC₁₋₆アルキル、-C(=O)-CH₂R⁹R¹⁰又は-S(=O)₂-N(CH₃)₂であり、ここで

R⁹及びR¹⁰はそれぞれ独立して水素、アミノ、C₁₋₆アルキル又はアミノC₁₋₆アルキルであり、そして

YがNR⁸でありそしてR²がインドリルの7位上にある時は、R²及びR⁸が一緒になって2価の基



を形成してもよく、

R¹は水素、C₁₋₆アルキル、ヒドロキシC₁₋₆アルキル、シアノC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルスルホニル、C₁₋₆アルキルカルボニル又はモノ-もしくはジ(C₁₋₆アルキル)アミノスルホニルであり、

R²は水素、ヒドロキシ、アミノ、ハロ、C₁₋₆アルキル、シアノ、C₂₋₆アルケニル、ポリハロC₁₋₆アルキル、ニトロ、フェニル、C₁₋₆アルキルカルボニル、ヒドロキシカルボニル、C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ、C₁₋₆アルキルオキシ又はモノ-もしくはジ(C₁₋₆アルキル)アミノであり、

R³はヒドロキシ又はアミノであり、

R⁴は水素、チエニル、フラニル又はフェニルであり、そしてチエニル、フラニル又はフェニルはそれぞれ場合により、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、フェニル、C₁₋₆アルキル、(ジC₁₋₆アルキル)アミノ、C₁₋₆アルキルオキシ、フェニルC₁₋₆アルキルオキシ、ヒドロキシC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルオキシカルボニル、ヒドロキシカルボニル、C₁₋₆アルキルカルボニル、ポリハロC₁₋₆アルキルオキシ、ポリハロC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルスルホニル、ヒドロキシカルボニルC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ、アミノスルホニル、アミノスルホニルC₁₋₆アルキル、イソオキサゾリル、アミノカルボニル、フェニルC₂₋₆アルケニル、フェニルC₃₋₆アルキニル又はピリジニルC₃₋₆アルキニルで置換されていてもよく、

R⁵、R⁶及びR⁷はそれぞれ独立して水素、アミノ、ニトロ、フラニル、ハロ、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルキルオキシ、トリフルオロメチル、チエニル、フェニル、C₁₋₆アルキルカルボニルアミノ又はアミノカルボニルC₁₋₆アルキルである]

の化合物、またはそのN-オキシド、製薬学的に許容される付加塩もしくは立体化学的異

20

30

40

50

性体を対象とする。

【0043】

用語「ヒストンデアセチラーゼインヒビター」又は「ヒストンデアセチラーゼのインヒビター」は、ヒストンデアセチラーゼと相互反応することができ、その活性、より具体的にはその酵素活性を阻害することができる化合物を特定するために使用される。ヒストンデアセチラーゼ酵素活性を阻害する方法は、ヒストンからアセチル基を除去するヒストンデアセチラーゼの能力を減少させる方法を意味する。このような阻害は好ましくは特異的である、すなわちヒストンデアセチラーゼインヒビターが何か他の、無関係の生物学的効果をもたらすために要するインヒビターの濃度より低い濃度で、ヒストンからアセチル基を除去するためのヒストンデアセチラーゼの能力を低下させる。

10

【0044】

以上の定義及び以後に使用される、ハロはフルオロ、クロロ、プロモ及びヨードを含めし、 C_{1-2} アルキルは例えばメチル又はエチルのような1又は2個の炭素原子を有する直鎖飽和炭化水素基を定義し、 C_{1-6} アルキルは C_{1-2} アルキル及び、例えばプロピル、ブチル、1-メチルエチル、2-メチルプロピル、ペンチル、2-メチルブチル、ヘキシル、2-メチルペンチル等のような、3~6個の炭素原子を有する直鎖及び分枝鎖飽和炭化水素基を定義し、ポリハロ C_{1-6} アルキニルは3個の同一の又は異なるハロ置換基を含有する C_{1-6} アルキル、例えばトリフルオロメチルを定義し、 C_{2-6} アルケニルは、例えば、エテニル、2-プロペニル、3-ブテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、3-メチル-2-ブテニル、等のような、1個の二重結合を含有し、そして2~6個の炭素原子を有する直鎖及び分枝鎖炭化水素基を定義し、 C_{3-6} アルキニルは例えば2-プロピニル、3-ブチニル、2-ブチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、3-ヘキシニル、等のような、1個の三重結合を含有し、そして3~6個の炭素原子を有する直鎖及び分枝鎖の炭化水素基を定義し、 C_{3-7} シクロアルキルはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル等のような3~7個の炭素を有する環式炭化水素基を包含する。

20

【0045】

製薬学的に許容される付加塩は、製薬学的に許容される酸付加塩及び製薬学的に許容される塩基の付加塩を包含する。前記の製薬学的に許容される酸付加塩は、式(I)の化合物が形成することができる治療的に有効な無毒の酸付加塩形態を含んでなることを意味する。塩基性を有する式(I)の化合物は、前記の塩基形態を適当な酸で処理することにより、それらの製薬学的に許容される酸付加塩に転化させることができる。適当な酸は例えば、ハロゲン化水素酸(例えば塩酸又は臭化水素酸)、硫酸、硝酸、リン酸等の酸のような無機酸、あるいは例えば酢酸、トリフルオロ酢酸、プロパン酸、ヒドロキシ酢酸、乳酸、ピルビン酸、蔥酸、マロン酸、琥珀酸(すなわちブタンジオン酸)、マレイン酸、スマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクラミン酸、サリチル酸、p-アミノ-サリチル酸、パモエ酸等の酸のような有機酸を含んでなる。

30

【0046】

酸性を有する式(I)の化合物は、前記の酸形態を適当な有機又は無機塩基で処理することにより、それらの製薬学的に許容される塩基付加塩に転化させることができる。適当な塩基塩形態は例えば、アンモニウム塩、アルカリ及びアルカリ土類金属塩(例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム塩等)、有機塩基との塩(例えばベンザチン、N-メチル-D-グルカミン、ヒドラバミン塩)及び、例えばアルギニン、リシン等のようなアミノ酸との塩を含んでなる。

40

【0047】

用語の「酸又は塩基付加塩」はまた、式(I)の化合物が形成することができる水和物及び溶媒付加形態物を含んでなる。このような形態物の例は例えば、水和物、アルコラート等である。

【0048】

50

本明細書で使用される用語「式(Ⅰ)の化合物の立体化学的異性体」は、式(Ⅰ)の化合物が所有することができる、同一配列の結合により結合された同一原子よりなるが、互換性でない異なる三次元構造を有するすべての可能な化合物を定義する。別に言及され又は示されない限り、化合物の化学名は、該化合物が所有することができるすべての可能な立体化学的異性体形態の混合物を包含する。該混合物は該化合物の基礎分子構造のすべてのジアステレオマー及び/又はエナンチオマーを含有することができる。純粋な形態又は相互に混合された、双方の、式(Ⅰ)の化合物のすべての立体化学的異性体形態が本発明の範囲内に包含されることが意図される。

【0049】

式(Ⅰ)の化合物のN-オキシドはそこで、1個又は複数の窒素原子がいわゆるN-オキシド、特にその1個又は複数のピペリジン-、ピペラジン又はピリダジニル-窒素がN-酸化されているN-オキシドに酸化されている、式(Ⅰ)化合物を含んでなることを意味する。

【0050】

幾つかの式(Ⅰ)化合物はまた、それらの互変異性体で存在することができる。前記の式中には明白に記載されていないが、このような形態は本発明の範囲内に包含されることが意図される。

【0051】

用語「式(Ⅰ)の化合物」はまた、以後使用される時はいつも、製薬学的に許容される付加塩及びすべての立体異性体をも包含することを意味する。

【0052】

本明細書で使用される用語「ヒストンデアセチラーゼ」及び[HDAC]は、ヒストンのN-末端のリシン残基の-アミノ基からアセチル基を除去する酵素の1族のいずれか1個を表すことが意図される。文脈により別に示されない限り、用語「ヒストン」はあらゆる種からのH1、H2A、H2B、H3、H4及びH5を包含するいずれかのヒストンタンパク質を表すことを意味する。ヒトのHDACタンパク質又は遺伝子生産物はそれに限定せずに、HDAC-1、HDAC-2、HDAC-3、HDAC-4、HDAC-5、HDAC-6、HDAC-7、HDAC-8、HDAC-9、HDAC-10及びHDAC-11を包含する。ヒストンデアセチラーゼはまた、原生動物又はカビ・真菌源から誘導することができる。

【0053】

興味深い化合物の第1の群は、そのR⁴が水素以外である式(Ⅰ)の化合物よりなる。

【0054】

興味深い化合物の第2の群は、1項又は複数の以下の制約が適用される式(Ⅰ)の化合物よりなる：

- a) nが0又は1であり、
- b) mが1又は2であり、
- c) XがN又はCHであり、
- d) YがNR⁸であり、ここでR⁸が水素、C₁₋₆アルキル、C₃₋₆シクロアルキル又はC₃₋₆シクロアルキルメチルであり、
- e) R¹が水素、C₁₋₆アルキル、ヒドロキシC₁₋₆アルキル又はC₁₋₆アルキルスルホニルであり、
- f) R²が水素又はハロであり、
- g) R³がアミノであり、
- h) R⁴が水素又はチエニルであり、そして
- i) R⁵、R⁶及びR⁷がそれぞれ水素である。

【0055】

興味深い化合物の第3の群は、1項又は複数の以下の制約が適用される式(Ⅰ)の化合物よりなる：

- a) nが0又は1であり、

10

20

30

40

50

- b) m が 1 又は 2 であり、
- c) X が N 又は CH であり、
- d) Y が NR⁸ であり、ここで R⁸ が水素、C₁ - C₆ アルキル、C₃ - C₆ シクロアルキル又はC₃ - C₆ シクロアルキルメチルであり、
- e) R¹ が水素、C₁ - C₆ アルキル、ヒドロキシC₁ - C₆ アルキル、C₁ - C₆ アルキルカルボニル又はC₁ - C₆ アルキルスルホニルであり、
- f) R² が水素又はハロであり、
- g) R³ がアミノであり、
- h) R⁴ が水素であり、そして
- i) R⁵ 、 R⁶ 及び R⁷ がそれぞれ水素である。

10

【0056】

興味深い化合物の第4の群は、1項又は複数の以下の制約が適用される式(I)の化合物よりなる：

- a) n が 0 又は 1 であり、
- b) m が 1 又は 2 であり、
- c) X が N 又は CH であり、
- d) Y が NR⁸ であり、ここで R⁸ が水素、C₁ - C₆ アルキル、C₃ - C₆ シクロアルキル又はC₃ - C₆ シクロアルキルメチルであり、
- e) R¹ が水素、C₁ - C₆ アルキル、ヒドロキシC₁ - C₆ アルキル、C₁ - C₆ アルキルカルボニル又はC₁ - C₆ アルキルスルホニルであり、
- f) R² が水素又はハロであり、
- g) R³ がアミノであり、
- h) R⁴ が水素又はチエニルであり、そして
- i) R⁵ 、 R⁶ 及び R⁷ がそれぞれ水素である。

20

【0057】

興味深い化合物の第5群は、1項又は複数の以下の制約が適用される式(I)の化合物よりなる：

- a) n が 1 であり、
- b) m が 1 又は 2 であり、
- c) X が N 又は CH であり、
- d) Y が NR⁸ であり、ここで R⁸ が C₁ - C₆ アルキル、例えばメチル又はエチルであり、
- e) R¹ が水素、ヒドロキシC₁ - C₆ アルキル又はC₁ - C₆ アルキルスルホニルであり、
- f) R² が水素あるいはハロ、例えば特に4-、5-又は7-位のフルオロ又はクロロであり、
- g) R³ がアミノであり、
- h) R⁴ が水素又はチエニルであり、そして
- i) R⁵ 、 R⁶ 及び R⁷ がそれぞれ水素である。

30

【0058】

もっとも好ましい化合物の群は、1項又は複数の以下の制約が適用される式(I)の化合物よりなる：

- a) n が 1 であり、
- b) m が 1 であり、
- c) X が N であり、
- d) Y が NR⁸ であり、ここで R⁸ がメチルであり、
- e) R¹ が水素であり、
- f) R² が水素あるいはハロ、例えば特に4-、5-又は7-位のフルオロ又はクロロであり、
- g) R³ が - NH₂ であり、
- h) R⁴ が水素又は2-チエニルであり、そして

40

50

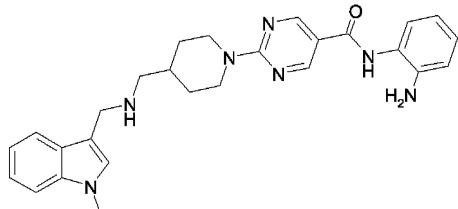
i) R⁵、R⁶及びR⁷がそれぞれ水素である。

【0059】

特に好ましい式(I)の化合物は化合物No.2、すなわち式

【0060】

【化2】



10

【0061】

の化合物である。

【0062】

式(I)の化合物、それらの製薬学的に許容される塩及びN-オキシド及び立体化学的異性体は、従来の方法で製造することができる。出発原料及び幾つかの中間体は知られた化合物であり、そして市場で入手することができるか又は当該技術分野で一般に知られた従来の反応方法に従って又は欧州特許出願第1485099号、第1485348号、第1485353号、第1485354号、第1485364号、第1485365号、第1485370号及び第1485378号明細書中に記載されたように製造することができる。式(I)の最終化合物を取得する他の方法は実施例中に説明される。

20

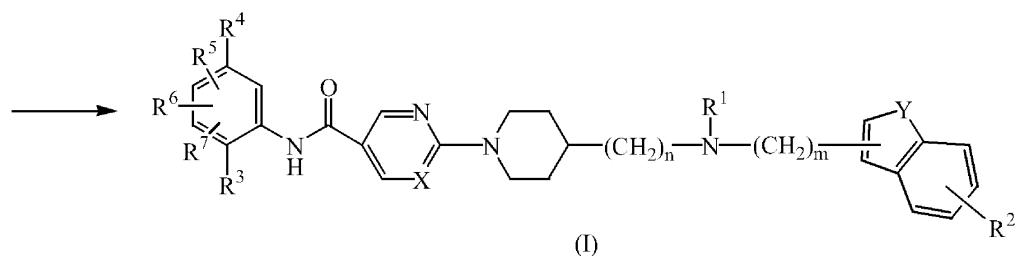
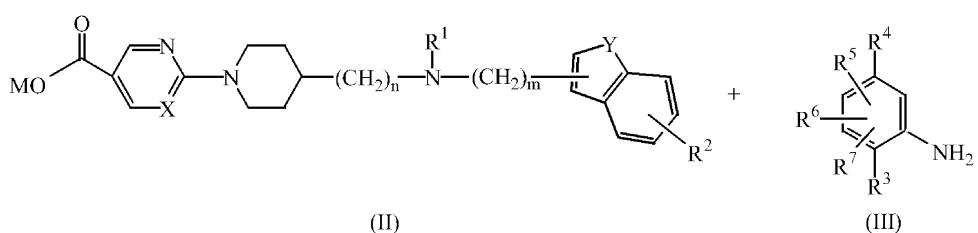
【0063】

式(I)の化合物は、例えばトリエチルアミン及びベンゾトリアゾル-1-イルオキシトリピロリジノ-ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)のような塩基の存在下で、そのMが水素あるいはアルカリ金属、例えばナトリウム又はリチウムを表す式(II)の中間体を式(III)の化合物と反応させることにより製造することができる。前記反応は例えばテトラヒドロフラン又はジクロロメタン又はそれらの混合物のような適当な溶媒中で実施される。

【0064】

30

【化3】



40

【0065】

あるいはまた、式(I)の化合物は、例えば、ジクロロメタンのような適当な溶媒中でスルホニルクロリド(SOCl₂)との処理により式(II)の化合物を酸塩化物に転化させ、次にジクロロメタン又はTHFのような適当な溶媒中でピリジンのような塩基の存

50

在下で、生成される酸塩化物化合物を式（Ⅲ）の化合物と反応させることにより製造することができる。

〔 0 0 6 6 〕

式（Ⅰ）の化合物はまた、分子中の他の基の感受性に応じて、当該技術分野で知られた反応又は官能基転化により相互に転化させることができ、例えばカルボン酸エステルの対応するカルボン酸又はアルコールへの加水分解；アミドの対応するカルボン酸又はアミンへの加水分解；ニトリルの対応するアミドへの加水分解；フェニル上のアミノ基を当該技術分野で知られたジアゾ化反応及び次の、水素によるジアゾ基の置換により水素により置換することができ；アルコールをエステル及びエーテルに転化させることができ；第一級アミンを第二級又は第三級アミンに転化させることができ；二重結合を対応する単結合に水素化することができ；フェニル基上のヨード基を適当なパラジウム触媒の存在下で一酸化炭素の挿入によりエステル基に転化させることができる。

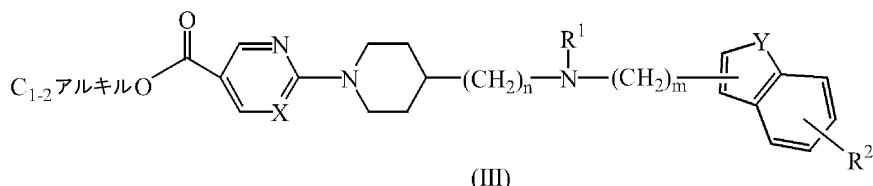
10

〔 0 0 6 7 〕

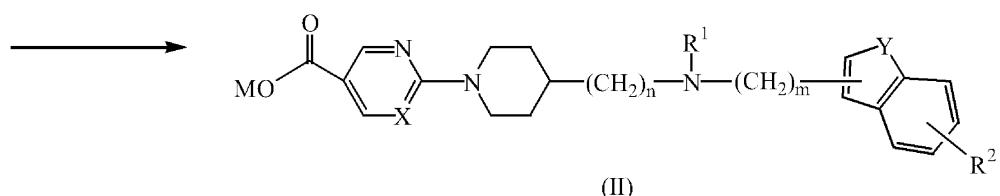
式(II)の中間体は、一般に還流下で、エタノールのような適当な溶媒中で、式(II)の中間体を適当な酸性溶液、例えば塩酸又は適当なアルカリ金属塩基、例えば水酸化ナトリウムと反応させることにより製造することができる。

〔 0 0 6 8 〕

【化 4】



20



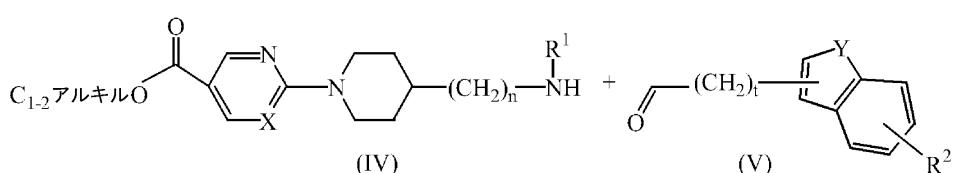
80

[0 0 6 9]

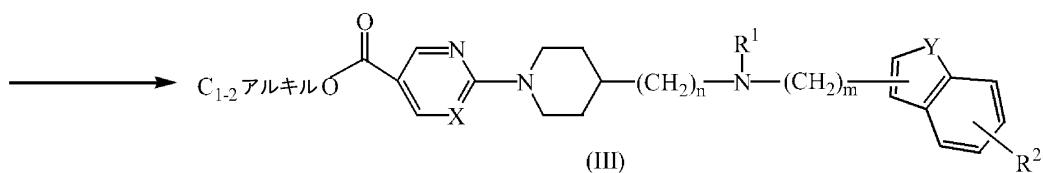
式(III)の中間体は、アルコール、例えばメタノールのような適当な溶媒中で、ホウ水素化ナトリウム、例えばテトラヒドロボウ酸ナトリウムのような適当な試薬の存在下で、式(IV)のカルボン酸エチルエステルを、その τ が0又は1である式(V)の適当なカルボキシアルデヒドと反応させることにより製造することができる。

[0 0 7 0]

【化 5】



40



〔 0 0 7 1 〕

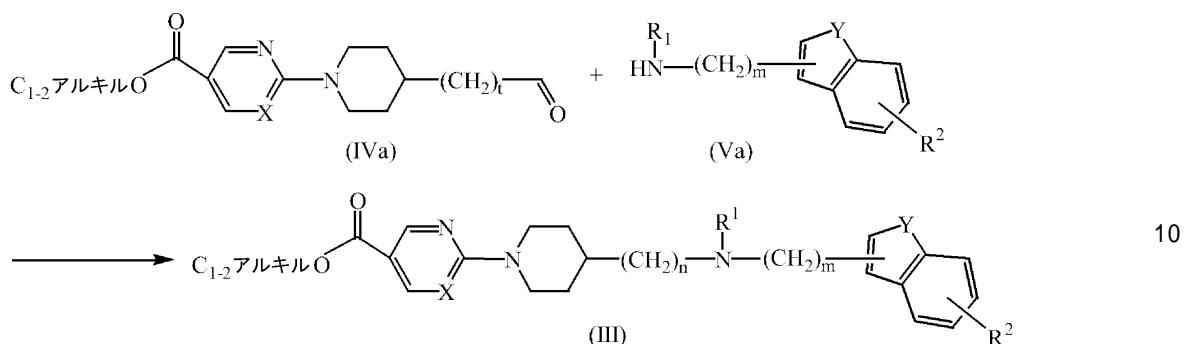
同様な方法で、式 (I I I) の中間体は、式 (I V a) の中間体を前記の式 (V a) の

50

中間体と反応させることにより製造することができる。

【0072】

【化6】



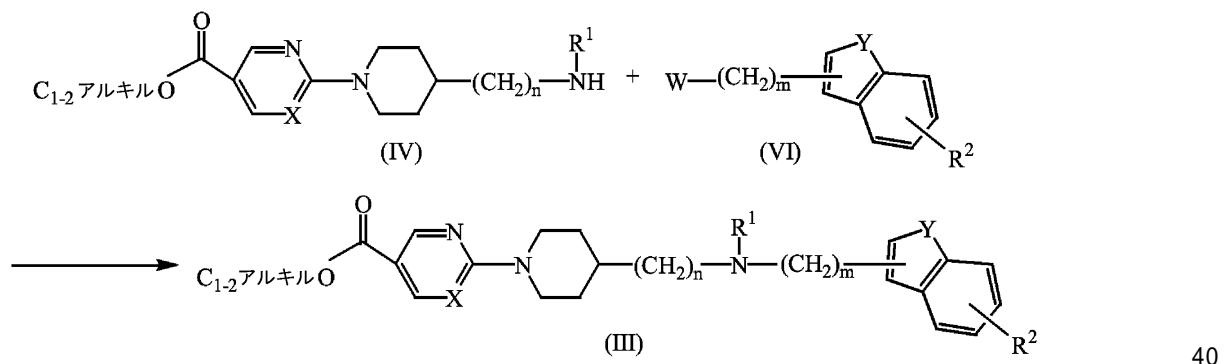
【0073】

式(IIII)の中間体はまた、式(VI)の中間体を、そのWが例えハロ(例えフルオロ、クロロ、ブロモ又はヨード)あるいはメチルスルホニルオキシ、4-メチルフェニルスルホニルオキシ等のようなスルホニルオキシ基のような適当な離脱基である、式(VII)の中間体と反応させることにより製造することができる。その反応は、例えアルコール(例えメタノール、エタノール、2-メトキシ-エタノール、プロパノール、ブタノール等)；エーテル(例え4,4-ジオキサン、1,1'-オキシビスプロパン等)；ケトン(例え4-メチル-2-ペンタノン又はN,N-ジメチルホルムアミド、ニトロベンゼン、アセトニトリル等)のような反応不活性溶媒中で実施することができる。例えアルカリ又はアルカリ土類金属炭酸塩又は炭酸水素塩(例えトリエチルアミン又は炭酸ナトリウム)のような適当な塩基の添加は反応経過中に放出される酸を除去するために利用することができる。反応を促進するために少量の適当な金属ヨウ化物、例えヨウ化ナトリウム又はカリウムを添加することができる。攪拌は反応速度を促進することができる。反応は好都合には、室温と反応混合物の還流温度の範囲内の温度で実施され、そして所望される場合は反応は高圧下で実施することができる。

【0074】

【化7】

20



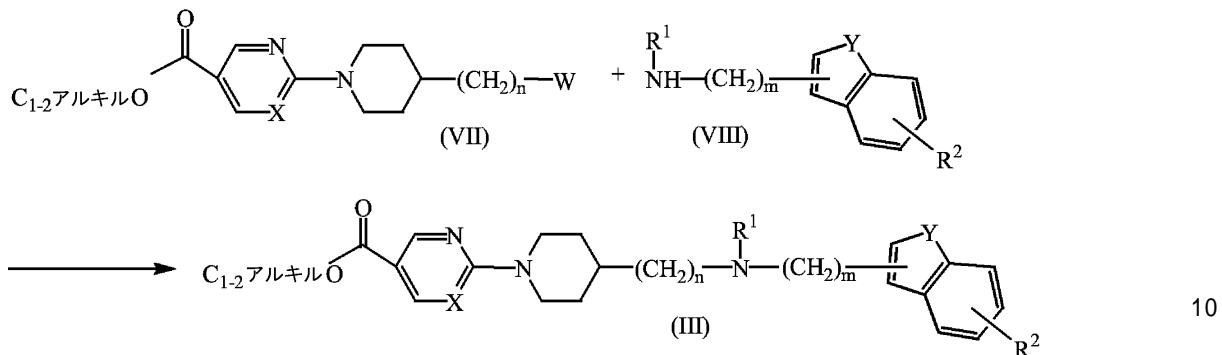
【0075】

同様な方法で、式(IIII)の中間体は、式(VII)の中間体を、そのWが前記のような適当な離脱基である式(VIII)の中間体と反応させることにより製造することができる。

【0076】

40

【化8】



【0077】

式(I)の化合物及び幾つかの中間体はそれらの構造中に少なくとも1個のステレオジエン中心をもつかも知れない。このステレオジエン中心はR又はS配置で存在することができる。

【0078】

前述の方法で製造される式(I)の化合物は一般に、エナンチオマーのラセミ混合物であり、それらは当該技術分野で知られた分割法に従って相互から分割することができる。式(I)のラセミ化合物は適当なキラル酸との反応により、対応するジアステレオマー塩形態に転化させることができる。該ジアステレオマー塩形態を次に、例えば選択的又は分別結晶化により分離して、エナンチオマーをアルカリによりそれらから遊離させる。式(I)の化合物のエナンチオマー形態を分離する代りの方法は、キラル固定相を使用する液体クロマトグラフィーを伴なう。該純粋な立体化学異性体形態はまた、その反応が立体特異的に起る場合は、適当な出発材料の、対応する純粋な立体化学的異性体形態から誘導することができる。特定の立体異性体が所望される場合は、該化合物は好ましくは立体特異的製造法により合成されるであろう。これらの方法は有利にはエナンチオマーとして純粋な出発材料を使用するであろう。

【0079】

式(I)の化合物、それらの製薬学的に許容される酸付加塩及び立体異性体形態は、それらがヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害効果を有するという貴重な薬理学的特性を有する。

【0080】

本発明は、有効量の本発明の化合物を投与することにより、形質転換細胞を包含する細胞の異常増殖を抑制する方法を提供する。細胞の異常増殖は正常な制御機構と独立した細胞増殖(例えば接触阻止の喪失)を表す。これは直接には癌細胞の増殖の停止、末端分化及び/又はアポトーシスを誘導することによる、そして間接的には、腫瘍の新生血管形成を抑制する双方による、腫瘍増殖の抑制を包含する。

【0081】

本発明はまた、有効量の本発明の化合物をこのような処置を要する被験体、例えば哺乳動物(そしてより具体的にはヒト)に投与する方法による、腫瘍の増殖を抑制する方法を提供する。とりわけ本発明は、有効量の本発明の化合物の投与による腫瘍の増殖を抑制する方法を提供する。抑制することができる腫瘍の例は、限定せずに、肺癌(例えば腺癌及び非小細胞肺癌を包含する)、膵臓癌(例えば外分泌膵癌のような膵癌)、結腸癌(例えば結腸腺癌及び結腸腺腫のような、例えば結腸直腸癌)、進行疾患を包含する前立腺癌、リンパ系の造血器官腫瘍(例えば急性リンパ性白血病、B-細胞リンパ腫、ブルキットリンパ腫)、骨髄性白血病(例えば、急性骨髄性白血病(AML))、甲状腺濾胞腺癌、骨髄異形成症候群(MDS)、間葉細胞源の腫瘍(例えば纖維肉腫及び横紋筋肉腫)、メラノーマ、奇形癌、神経芽細胞腫、神経膠腫、皮膚の良性腫瘍(例えば、角化棘細胞腫)、乳癌(例えば進行乳癌)、腎臓癌、卵巣癌、膀胱癌及び表皮癌である。

10

20

30

40

50

【0082】

本発明に従う化合物は、他の治療目的、例えば、

- a) 癌を処置するための腫瘍の放射線照射前、その間又はその後に本発明に従う化合物を投与することにより放射線治療に対して腫瘍を感受性化させる、
- b) 関節リューマチ、変形性関節炎、若年性関節炎、痛風、多発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎及び全身性エリテマドーデスのような関節症及び骨病理状態を処置する、
- c) 血管増殖障害、アテローム性動脈硬化症及び再狭窄を包含する平滑筋細胞増殖を抑制する、
- d) 潰瘍性大腸炎、クローン病、アレルギー性鼻炎、移植片対宿主病、結膜炎、喘息、A R D S、ベーチェット病、移植拒絶、蕁麻疹、アレルギー性皮膚炎、円形脱毛症、強皮症、発疹、湿疹、皮膚筋炎、ニキビ、糖尿病、全身性エリテマドーデス、川崎病、多発性硬化症、気腫、囊胞性纖維症及び慢性気管支炎のような炎症状態及び皮膚状態を処置する、
- e) 子宮内膜症、子宮筋腫、不正子宮出血及び子宮内膜増殖症を処置する、
- f) 網膜及び脈絡膜血管に影響する血管疾患を包含する眼科血管形成を処置する、
- g) 心機能不全を処置する、
- h) H I V 感染症の処置のような免疫抑制状態を抑制する、
- i) 腎機能不全を処置する、
- j) 内分泌障害を抑制する、
- k) 糖新生の機能不全を抑制する、
- l) 神経病理、例えばパーキンソン病あるいは、認識障害、例えばアルツハイマー病又はポリグルタミン関連神経疾患をもたらす神経病理を処置する、
- m) 精神障害、例えば精神分裂病、双極性障害、鬱病、心配症及び精神病を処置する、
- n) 神経筋肉病理、例えば筋萎縮性側索硬化症を抑制する、
- o) 脊髄筋萎縮症を処置する、
- p) 遺伝子の発現を強化することにより、処置に敏感な他の病理学的状態を処置する、
- q) 遺伝子治療を高める、
- r) 脂質生成を抑制する、
- s) マラリアのような寄生虫症を処置する、

のために、使用することができる。

【0083】

従って、本発明は、医薬としての使用のための式(I)の化合物並びに、1種又は複数の前記の状態を処置するための医薬の製造のための、式(I)のこれらの化合物の使用を開示する。

【0084】

式(I)の化合物、それらの製薬学的に許容される酸付加塩及び立体異性体形態は、それらを、標識化合物とH D A C間の複合体の形成を検出又は測定する方法を含んでなる、生体サンプル中のH D A Cを検出又は特定するために使用することができるという貴重な診断的特性を有することができる。

【0085】

検出又は特定法は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、等のような標識物質で標識される化合物を使用することができる。放射性同位元素の例は¹²⁵I、¹³¹I、³H及び¹⁴Cを包含する。酵素は通常、順次検出可能な反応を触媒する適当な基質の共役により検出可能にさせられる。それらの例は、例えばベータ-ガラクトシダーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ及びマレートデヒドロゲナーゼ、好ましくはホースラディッシュのペルオキシダーゼを包含する。発光物質は例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオリン及びルシフェラーゼを包含する。

【0086】

生体サンプルは体組織又は体液と定義することができる。体液の例は脳脊髄液、血液、血漿、血清、尿、喀痰、唾液等である。

10

20

30

40

50

【0087】

それらの有用な薬理学的特性を考慮すると、主題化合物は投与目的のための種々の製薬学的剤形に調合することができる。

【0088】

本発明の製薬学的組成物を製造するためには、有効成分として、有効量の塩基又は酸付加塩形態の特定の化合物を、投与に所望される製造物の形態に応じて広範な形態を探ることができる、製薬学的に許容される担体と密接な混合物に組み合わせる。これらの製薬学的組成物は望ましくは、好ましくは経口、直腸内、経皮的又は非経口注射による投与に適した単一の投与剤形にある。例えば、経口投与剤形の組成物を製造する際には、懸濁物、シロップ、エリキシル及び液剤のような経口液体製造物の場合には、例えば水、グリコール、油、アルコール、等のようないずれかの通常の製薬学的媒質、あるいは散剤、ピル、カプセル及び錠剤の場合にはデンプン、糖、カオリン、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等のような固体担体を使用することができる。

【0089】

それらの投与の容易さのために錠剤及びカプセルがもっとも有利な経口投与単位剤形を表し、その場合には明らかに固体の製薬学的担体が使用される。非経口組成物のための担体は、例えば溶解性を補助するための他の成分を包含することはできるが、通常は、少なくとも大部分は滅菌水を含んでなるであろう。例えば、その担体が生理食塩水、ブドウ糖液又は生理食塩水とブドウ糖液の混合物を含んでなる注射液を製造することができる。適当な液体担体、懸濁剤等を使用することができる注射用懸濁液もまた製造することができる。経皮的投与に適した組成物中では、担体は、場合により、皮膚に対して有意な有害効果を誘導しない、少量の、あらゆる性状の適当な添加剤と組み合わせてもよい浸透促進剤及び/又は適当な湿潤化剤を場合により含んでなる。該添加剤は皮膚に対する投与を容易にし、そして/又は所望の組成物を製造する補助になることができる。これらの組成物は種々の方法で、例えば経皮的パッチとして、スポットオン剤として又は軟膏として投与することができる。

【0090】

投与の容易さ及び用量の均一性のために、前記の製薬学的組成物を投与単位剤形に調合することは特に有益である。本明細書及び請求項に使用される投与単位剤形は、各単位が、必要な製薬学的担体と一緒に、所望の治療効果をもたらすように計算された、前以て決定された量の有効成分を含有する、単一投与物として適した物理的に分割された単位を表す。このような投与単位剤形の例は錠剤(刻み目付き錠剤又はコート錠)、カプセル、ピル、散剤分包、ウエファー、注射液又は懸濁物、小匙1杯、大匙1杯等並びにそれらの分離された複数物である。

【0091】

当業者は、以後に提示される試験結果から、有効量を容易に決定することができるであろう。概略的に治療的有効量は0.005mg/kg~100mg/kg体重、そしてとりわけ0.005mg/kg~10mg/kg体重であろうと推測される。必要量を1日に適当な間隔を空けて2、3、4又は5回以上の分割量として投与することが適当かも知れない。該分割量は例えば、単位投与剤形当たり0.5~500mg、そしてとりわけ10mg~500mgの有効成分を含有する単位投与剤形として調合することができる。

【0092】

本発明のもう1つのアспектとして、特に医薬としての使用のための、より具体的には癌又は関連疾患の処置における、もう1種の抗癌剤とのHDAC-インヒビターの組み合わせ物が想定される。

【0093】

前記の状態の処置のために、本発明の化合物を有利には、1種又は複数の他の医薬、より具体的には他の抗癌剤と組み合わせて使用することができる。抗癌剤の例は、
 - 白金配位化合物、例えばシスプラチニン、カルボプラチニン又はオキサリプラチニン、
 - タキサン化合物、例えばパクリタキセル又はドセタキセル、

10

20

30

40

50

- カンプトテシン化合物のようなトポイソメラーゼⅠインヒビター、例えばイリノテカン又はトポテカン、
- 抗癌性ポドフィロトキシン誘導体のようなトポイソメラーゼⅠⅡインヒビター、例えばエトポシド又はテニポシド、
- 抗腫瘍ビンカアルカロイド、例えばビンプラスチン、ビンクリスチン又はビノレルビン
- 抗腫瘍ヌクレオシド誘導体、例えば5-フルオロウラシル、ゲンシタビン又はカペシタビン、
- ナイトロジエン・マスターⅡ又はニトロソ尿素のようなアルキル化剤、例えばシクロホスホアミド、クロランブシル、カルムスチン又はロムスチン、
- 抗腫瘍、アントラサイクリン誘導体、例えばダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン又はミトキサントロン、
- HER2抗体、例えばトラストズマブ、
- エストロゲン受容体アンタゴニスト又は選択的エストロゲン受容体モジュレーター、例えばタモキシフェン、トレミレン、ドロルオキシフェン、ファスロデックス又はラルオキシフェン、
- エキセメスタン、アナストロゾール、レトラゾール及びボロゾールのようなアロマターゼインヒビター、
- レチノイド、ビタミンD及びレチノイン酸代謝阻害剤(RAMBAs)のような分化剤、例えばアキュタン、
- DNAメチルトランスフェラーゼインヒビター、例えばアザシチジン、
- キナーゼインヒビター、例えばフラボペリドール、イマチニブメシレート又はゲフィチニブ、
- ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、
- 他のHDACインヒビター、
- ユピキチン-プロテアソム経路のインヒビター、例えばVelcade、あるいはYondelis、

である。

【0094】

用語「白金配位化合物」は本明細書では、イオンの形態の白金を提供するいずれかの腫瘍細胞増殖阻害白金配位化合物を表すために使用される。

【0095】

用語「タキサン化合物」はタキサン環系を有し、特定の種のイチイの木(Taxus)からの抽出物に関連した又はそれから誘導される化合物の1クラスを示す。

【0096】

用語「トポイソメラーゼインヒビター」は真核細胞中のDNA位相を変えることができる酵素を示すために使用される。それらは重要な細胞機能及び細胞増殖に必須である。真核細胞には2種のトポイソメラーゼ、すなわちⅠ型及びⅡ型がある。トポイソメラーゼⅠは約100,000の分子量のモノマー酵素である。この酵素はDNAに結合して、一時的な単鎖分解を誘導し、二重らせんを解き(又は解かせ)、そして次にDNA鎖から解離する前にその分解を再シールする。トポイソメラーゼⅡはDNA鎖分解物の導入又は遊離ラジカルの形成に関する、同様な作用機序を有する。

【0097】

用語「カンプトテシン化合物」は中国茶のカンプトテシン・アクミナタ(Camptotheacin acuminate)及びインドの木のノタポヂテ・フェチダ(Nothapodytes foetida)から誘導される非水溶性アルカロイドである親カンプトテシン化合物に関連した、又はそれから誘導される化合物を表すために使用される。

【0098】

用語「ポドフィロトキシン化合物」はマンドレークの植物から抽出される、親ポドフィロトキシンに関連した、又はそれから誘導される化合物を示すために使用される。

【0099】

10

20

30

40

50

用語「抗腫瘍ビンカアルカロイド」はツルニチソウ (*V i n c a r o s e a*) の抽出物に関連した、又はそれから誘導される化合物を示すために使用される。

【0100】

用語「アルキル化剤」は生理学的条件下で、D N A のような生物学的に必須の高分子にアルキル基を与える能力を有するという共通の特徴をもつ広範な化学薬品の群を包含する。大部分はナイトロジエンマスター及びニトロソ尿素のような、より重要な物質であるが、有効なアルキル化部分は、複雑な分解反応（その幾つかは酵素による）後にインビボで生成される。アルキル化剤のもっとも重要な薬理学的作用は、細胞増殖、とりわけD N A合成及び細胞分裂に関与する基本的機序を乱すものである。急速に増殖している組織中のD N A機能及び結合性を阻害するアルキル化剤の能力が、それらの治療的適用及び多数のそれらの毒性の基礎を提供する。

10

【0101】

用語「抗腫瘍アントラサイクリン誘導体」は、グリコシド結合により結合された稀有な糖のダウノスアミンをもつてアントラサイクリン環構造をもつことを特徴とする、カビ・真菌の *S t r e p . p e u t i c u s* var. *c a e s i u s* から得られる抗生物質及びそれらの誘導体を含んでなる。

【0102】

原発性乳癌におけるヒト表皮増殖因子受容体2タンパク質 (H E R 2) の増殖は、特定の患者に対する低い臨床予後と関連することが示された。トラストズマブはH E R 2受容体の細胞外領域に高い親和性及び特異性をもって結合する、著しく精製された組み換えD N A - 誘導ヒト化モノクローナルI g G 1カッパ抗体である。

20

【0103】

多数の乳癌はエストロゲン受容体を有し、これらの腫瘍の増殖はエストロゲンにより刺激され得る。用語「エストロゲン受容体アンタゴニスト」及び「選択的エストロゲン受容体モジュレーター」は、エストロゲン受容体 (E R) に結合するエストラジオールの競合的インヒビターを示すために使用される。選択的エストロゲン受容体モジュレーターはE Rに結合されると、受容体の三次元形態に変化を誘導し、D N A上のエストロゲン反応性要素 (E R E) に対するその結合を変化させる。

【0104】

閉経後の女性においては、循環エストロゲンの主要な生成源は、末梢組織におけるアロマターゼ酵素による、副腎及び卵巣のアンドロゲン（アンドロステンジオン及びテストステロン）のエストロゲン（エストロン及びエストラジオール）への転化からである。アロマターゼ阻害又は不活性化によるエストロゲンの剥奪はホルモン依存性乳癌をもつ何人かの閉経後患者に対する有効な選択的処置である。

30

【0105】

用語「抗エストロゲン剤」は本明細書では、エストロゲン受容体アンタゴニスト及び選択的エストロゲン受容体モジュレーターのみならずまた、前記のようなアロマターゼインヒビターを包含するために使用される。

【0106】

用語「分化剤」は種々の方法で、細胞増殖を阻害し、分化を誘導することができる化合物を包含する。ビタミンD及びレチノイドは、広範な正常及び悪性の細胞タイプの増殖及び分化を制御するのに重要な役割を果たすことが知られている。レチノイン酸代謝阻害剤 (R A M B A) は、レチノイン酸のチトクロームP 4 5 0 - 媒介異化作用を阻害することにより内在レチノイン酸のレベルを増加する。

40

【0107】

D N Aメチル化の変化はヒト新生物におけるもっとも一般的な異常の1つである。選択される遺伝子のプロモーター内のメチル化亢進は通常、関与する遺伝子の不活性化を伴なう。用語「D N Aメチルトランスフェラーゼインヒビター」は、D N Aメチルトランスフェラーゼの薬理学的阻害及び腫瘍サプレッサーの遺伝子発現の再活性化により作用する化合物を示すために使用される。

50

【0108】

用語「キナーゼインヒビター」は細胞周期の進行及びプログラムされたアポトーシス(アポトーシス)に関与するキナーゼの強力なインヒビターを含んでなる。

【0109】

用語「ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター」はRas及び他の細胞内タンパク質のファルネシル化を抑制するようにされた化合物を示すために使用される。それらは悪性細胞の増殖及び生存に影響をもつことが示されている。

【0110】

用語「他のHDACインヒビター」は、限定せずに、

-カルボキシレート、例えばブチレート、桂皮酸、4-フェニルブチレート又はバルプロ酸、

-ヒドロキサム酸、例えばスペロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、ピペラジン含有SAHA類似体、ニアリールヒドロキサメートA-161906及びそのカルボゾリルエーテル-、テトラヒドロピリジン-及びテトラロン-類似体、二環式アリール-N-ヒドロキシカルボキシアミド、ピロキシアミド、CG-1521、PXD-101、スルホンアミドヒドロキサム酸、LAQ-824、LBH-589、トリコスタチンA(TSA)、オキサムフラチン、スクリプタイド、スクリプタイド関連三環式分子、m-カルボキシ桂皮酸ビスヒドロキサム酸(CBHA)、CBHA-様ヒドロキサム酸、トラポキシン-ヒドロキサム酸類似体、CRA-024781、R306465及び関連ベンゾイル-及びヘテロアリール-ヒドロキサム酸、アミノスペレート及びマロニルジアミド、

-環式テトラペプチド、例えばトラポキシン、アピジシン、デプシペプチド、スピルコスタチン-関連化合物、RedFK-228、スルフヒドリル-含有環式テトラペプチド(SCOP)、ヒドロキサム酸含有環式テトラペプチド(CHAP)、TAN-174及びアズムアミド、

-ベンズアミド、例えばMS-275又はCI-994、あるいは

-デブデシン

を含んでなる。

【0111】

用語「ユビキチン-プロテアソム経路のインヒビター」は細胞周期の制御タンパク質を包含するプロテアソム中の細胞タンパク質の標的とされた破壊を阻害する化合物を特定するために使用される。

【0112】

癌の処置のためには、本発明に従う化合物を、放射線照射と一緒に前記のような患者に投与することができる。放射線照射はイオン化光線、そしてとりわけガンマ光線、特に線形加速器により又は今日一般に使用されている放射性核種により放出されるものを意味する。放射性核種による腫瘍の照射は外部からでも内部からでもよい。

【0113】

本発明はまた、抗癌剤及び本発明に従うHdacインヒビターの本発明に従う組み合わせ物を対象にする。

【0114】

本発明はまた、例えば腫瘍細胞の増殖を抑制するための医学的治療における使用のための本発明に従う組み合わせ物を対象とする。

【0115】

本発明はまた、腫瘍細胞の増殖を抑制するための本発明に従う組み合わせ物を対象とする。

【0116】

本発明はまた、有効量の本発明に従う組み合わせ物を被験体に投与する方法を含んでなる、ヒトの被験者における腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を対象とする。

【0117】

本発明は更に、有効量の本発明に従う組み合わせ物を投与する方法により、形質転換細

10

20

30

40

50

胞を包含する細胞の異常増殖を抑制する方法を提供する。

【0118】

他の医薬及びH D A C インヒビターは同時に（例えば別の組成物又は単一組成物中で）又はどんな順序でも連続的に投与することができる。後者の場合には、2種の化合物は有益な又は相乗的效果が確実に達成されるのに十分な期間内そして量及び方法で投与されるであろう。投与の好ましい方法及び順序並びに組み合わせ物の各成分それぞれの投与量及び計画は、投与される特定のその他の医薬及びH D A C インヒビター、それらの投与経路、処置される特定の腫瘍及び処置される特定の宿主に左右されるであろう。投与の最適な方法及び順序並びに投与量及び計画は、従来の方法を使用し、そして本明細書に提示された情報を考慮して当業者により容易に決定することができる。

10

【0119】

白金配位化合物は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき1~500mg (mg / m²)、例えば50~400mg / m²、特にシスプラチニンに対しても約75mg / m²、そしてカルボプラチニンに対しては約300mg / m²の用量で投与される。

【0120】

タキサン化合物は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき50~400mg (mg / m²)、例えば75~250mg / m²、特にパクリタキセルに対しては約175~250mg / m²、そしてドセタキセルに対しては約75~150mg / m²の用量で投与される。

20

【0121】

カンプトテシン化合物は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき0.1~400mg (mg / m²)、例えば1~300mg / m²、特にイリノテカニンに対しては約100~350mg / m²、そしてトポテカニンに対しては約1~2mg / m²の用量で投与される。

【0122】

抗腫瘍ポドフィロトキシン誘導体は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき30~300mg (mg / m²)、例えば50~250mg / m²、特にエトポシドに対しては約35~100mg / m²、そしてテニポシドに対しては約50~250mg / m²の用量で投与される。

30

【0123】

抗腫瘍ピンカルカロイドは有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき2~30mg (mg / m²)、特にピンプラスチニンに対しては約3~12mg / m²、ピンクリスチニンに対しては約1~2mg / m²、そしてビノレルビンに対しては約10~30mg / m²の用量で投与される。

【0124】

抗腫瘍ヌクレオシド誘導体は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき200~2500mg (mg / m²)、例えば700~1500mg / m²、特に5-FUに対しては約200~500mg / m²、ゲムシタビンに対しては約800~1200mg / m²、そしてカペシタビンに対しては約1000~2500mg / m²の用量で投与される。

40

【0125】

ナイトロジエンマスターD又はニトロソ尿素のようなアルキル化剤は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方メーターにつき100~500mg (mg / m²)、例えば120~200mg / m²、特にシクロホスホアミドに対しては約100~500mg / m²、クロランプシルに対しては約0.1~0.2mg / m²、カルムスチンに対しては約150~200mg / m²、そしてロムスチンに対しては約100~150mg / m²の用量で投与される。

【0126】

抗腫瘍アントラサイクリン誘導体は有利には、1コースの処置当たり、体表面積1平方

50

メーターにつき 10 ~ 75 mg (mg / m²)、例えば 15 ~ 60 mg / m²、特にドキソルビシンに対しては約 40 ~ 75 mg / m²、ダウノルビシンに対しては約 25 ~ 45 mg / m²、そしてイダルビシンに対しては約 10 ~ 15 mg / m² の用量で投与される。

【0127】

トラストズマブは有利には、1コースの処置当たり、体表面積 1 平方メーターにつき 1 ~ 5 mg (mg / m²)、特に 2 ~ 4 mg / m² の用量で投与される。

【0128】

抗エストロゲン剤は有利には、特定の薬剤及び処置される状態に応じて 1 日に約 1 ~ 100 mg の用量で投与される。タモキシフェンは有利には 5 ~ 50 mg、好ましくは 10 ~ 20 mg を 1 日 2 回の用量で経口投与され、治療効果を達成し、維持するために十分な期間、治療を継続する。トレミフェンは有利には 1 日 1 回約 60 mg の用量で経口投与され、治療効果を達成し、維持するために十分な期間治療を継続する。アナストロゾールは有利には 1 日 1 回約 1 mg の用量で経口投与される。ドロキシフェンは有利には 1 日 1 回約 20 ~ 100 mg の用量で経口投与される。ラロキシフェンは有利には 1 日 1 回約 60 mg の用量で経口投与される。エキセメスタンは有利には 1 日 1 回約 25 mg の用量で経口投与される。

【0129】

これらの用量は 1 コースの処置当たり例えば 1 回、2 回又は 3 回以上投与することができ、それを例えば 7、14、21 又は 28 日毎に反復することができる。

【0130】

それらの有用な薬理学的特性を考慮すると、本発明に従う組み合わせ物の成分、すなわち他の医薬及び HDAC インヒビターは、投与目的のための種々の製薬学的剤形に調合することができる。成分は個々の製薬学的組成物中に別々に又は両成分を含有する単一の製薬学的組成物中に調合することができる。

【0131】

従って、本発明はまた 1 種又は複数の製薬学的担体と一緒に、他の医薬及び HDAC インヒビターを含んでなる製薬学的組成物を対象とする。

【0132】

本発明はまた、1 種又は複数の製薬学的担体と一緒に、抗癌剤及び本発明に従う HDAC インヒビターを含んでなる製薬学的組成物の形態の本発明に従う組み合わせ物を対象とする。

【0133】

本発明は更に、腫瘍細胞の増殖を抑制するための製薬学的組成物の製造における本発明に従う組み合わせ物の使用を対象とする。

【0134】

本発明は更に、癌を罹患する患者の処置における、同時の、別々の又は連続的使用のための組み合わせ製造物としての、第 1 の有効成分としての本発明に従う HDAC インヒビター及び第 2 の有効成分としての抗癌剤を含有する製品を対象とする。

【0135】

実験部門

以後、「K₂CO₃」は炭酸カリウム、「CH₂Cl₂」はジクロロメタン、「MgSO₄」は硫酸マグネシウム、「DIP E」はジイソプロピルエーテル、「THF」はテトラヒドロフラン、「EtOAc」は酢酸エチル、「DMF」は N, N - ジメチルホルムアミド、「DMSO」はジメチルスルホキシド、「Et₃N」はトリエチルアミン、「NaBH₄」はナトリウムテトラヒドロボレート (- 1)、「NaBH₃CN」はシアノホウ素化ナトリウム、「PyBOP」はベンゾトリアゾル - 1 - イルオキシ - トリスピロリジノ - ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート、「DIP EA」は N - エチル - N - (1 - メチルエチル) - 2 - プロパンアミン、「NH₄OH」は水酸化アンモニウム、「CH₃OH」はメタノール、「NH₄HCO₃」は炭酸水素アンモニウム、そして「M」。

P.」は融点を意味する。

【0136】

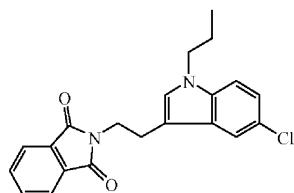
A. 中間体の製造

実施例 A 1

a) 中間体 1 の製造

【0137】

【化 9】



10

【0138】

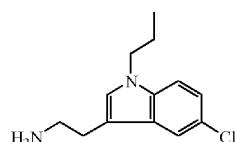
2 - [2 - (5 - クロロ - 1 H - インドル - 3 - イル) エチル] - 1 H - イソインドール - 1 , 3 (2 H) - ジオン (0 . 0 1 7 モル) の溶液 (1 7 m l の D M F 中) を水素化ナトリウム (0 . 0 3 4 モル) の懸濁物 (1 1 m l の D M F 中) に室温、 N₂ 流下で添加した。混合物を室温で 1 時間攪拌した。 1 - ヨードプロパン (0 . 0 3 4 モル) を滴下した。混合物を室温で 2 時間攪拌し、 H₂O 及び N a C l 中に注入し、 E t O A c で抽出した。有機層を H₂O で洗浄し、乾燥し (M g S O₄) 、濾過し、溶媒を蒸発させると、 7 . 7 7 g の中間体 1 を取得した。

20

b) 中間体 2 の製造

【0139】

【化 10】



30

【0140】

中間体 1 (0 . 0 2 1 モル) 及びヒドラジン / H₂O (0 . 1 0 6 モル) の混合物 (1 0 0 m l のエタノール中) を 2 時間攪拌還流し、次に室温に冷却し、 H₂O 中に注入し、 C H₂C l₂ で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (M g S O₄) 、濾過し、溶媒を蒸発させると、 5 g (1 0 0 %) の中間体 2 を取得した。

【0141】

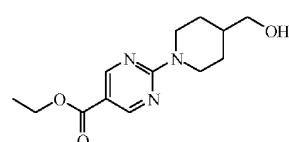
実施例 A 2

a) 中間体 3 の製造

【0142】

【化 11】

40



【0143】

2 - (メチルスルホニル) - 5 - ピリミジンカルボン酸エチルエステル (0 . 0 9 4 モル) の溶液 (4 0 m l のアセトニトリル中) を 4 - ピペリジンメタノール (0 . 0 8 6 モル) 及び K₂C O₃ (0 . 1 7 2 モル) の懸濁物 (2 0 0 m l のアセトニトリル中) に 1 0 、 N₂ 流下で添加した。混合物を室温に戻し、次に 4 時間攪拌し、 H₂O 中に注入し

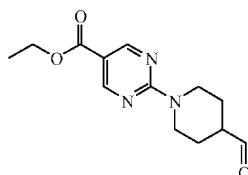
50

、そして *E t O A c* で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (*M g S O₄*)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (23 g) をアセトニトリル / ジエチルエーテルから結晶化させた。母層を蒸発させ、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離剤: *C H₂ C l₂ / C H₃ O H / N H₄ O H 97 / 3 / 0.1*; 20 ~ 45 μ m) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると 4.6 g (20%) (*M. P.*: 129) の中間体 3 を取得した。

b) 中間体 4 の製造

【0144】

【化12】



10

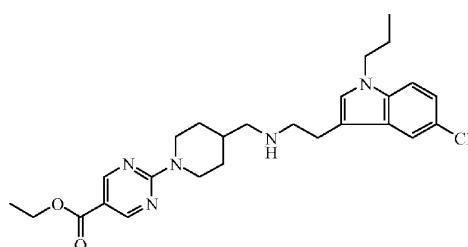
【0145】

D M S O (0.127 モル) をエタンジオイル・ジクロリド (0.061 モル) の溶液 (110 ml の *C H₂ C l₂* 中) に -78、*N₂* 流下で添加した。混合物を 15 分間攪拌した。中間体 3 (0.051 モル) の溶液 (200 ml の *C H₂ C l₂* 中) を添加した。混合物を -78 で 1 時間 30 分間攪拌した。*E t₃ N* (0.26 モル) を滴下した。混合物を -78 で 15 分間攪拌し、次に室温に 2 時間 30 分間かけて冷却した。*H₂ O* を添加した。混合物を *C H₂ C l₂* で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (*M g S O₄*)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (14 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離剤: シクロヘキサン / *E t O A c* 70 / 30; 20 ~ 45 μ m) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると 7.6 g (57%) の中間体 4 を取得した。

c) 中間体 5 の製造

【0146】

【化13】



20

【0147】

N a B H₃ C N (0.034 モル) 及び酢酸 (0.023 モル) を中間体 2 (0.021 モル) 及び中間体 4 (0.021 モル) の溶液 (500 ml の *C H₃ O H* 中) に *N₂* 流下で添加した。混合物を 72 時間攪拌し、10% *K₂ C O₃* 溶液中に注入し、*E t O A c* で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (*M g S O₄*)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (10.4 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離剤: *C H₂ C l₂ / C H₃ O H / N H₄ O H 97 / 3 / 0.1*; 15 ~ 40 μ m) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると 5.5 g (54%) の中間体 5 を取得した。

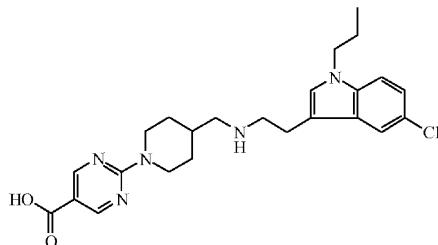
d) 中間体 6 の製造

【0148】

30

40

【化14】



【0149】

中間体5(0.001モル)及び水酸化ナトリウム(0.004モル)の混合物(50m1のエタノール中)を5時間攪拌還流し、次に室温に冷却し、蒸発乾燥させた。残渣をジエチルエーテル中に取った。沈殿物を濾取し、乾燥すると、0.407g(85%)(M.P. : > 260°C)の中間体6をナトリウム塩(.Na)として取得した。

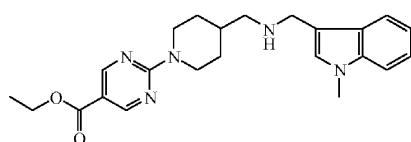
【0150】

実施例A3

a) 中間体7の製造

【0151】

【化15】



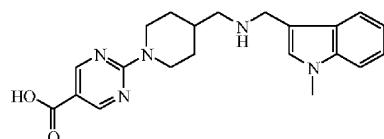
【0152】

2 - [4 - (アミノメチル) - 1 - ピペリジニル] - 5 - ピリミジンカルボン酸エチルエステル(0.0076モル)及び1 - メチル - 1H - インドール - 3 - カルボキシアルデヒド(0.0114モル)の混合物(80m1のCH₃OH中)を15時間攪拌還流し、次に室温に冷却した。NaBH₄(0.012モル)を滴下した。混合物を室温で1晩攪拌し、H₂O中に注入し、EtOAcで抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣(3.2g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離剤: CH₂Cl₂ / CH₃OH / NH₄OH 95 / 6 / 0.5; 15 ~ 40 μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、1.6g(53%)の中間体7を取得した。

b) 中間体8の製造

【0153】

【化16】



【0154】

中間体7(0.0037モル)及び水酸化ナトリウム(0.0074モル)の混合物(60m1のエタノール中)を50°Cで15時間攪拌し、次に室温に冷却し、溶媒を蒸発乾燥すると、1.5g(100%)の中間体8をナトリウム塩(.Na)として取得した。

【0155】

実施例A4

a) 中間体9の製造

【0156】

10

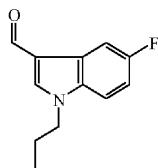
20

30

40

50

【化17】



【0157】

水素化ナトリウム（0.0026モル、油中60%）を5-フルオロ-1H-インドール-3-カルボキシアルデヒド（0.0024モル）の溶液（8mlのDMF中）にN₂流下で分割添加した。混合物を室温で30分間攪拌した。1-ヨードプロパン（0.0029モル）を滴下した。混合物を室温で2時間攪拌し、氷水上に注入した。沈殿物を濾取り、H₂Oで洗浄し、乾燥すると、0.44g（88%）の中間体9を取得した。
10

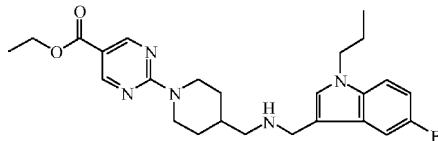
【0158】

実施例A5

a) 中間体10の製造

【0159】

【化18】



20

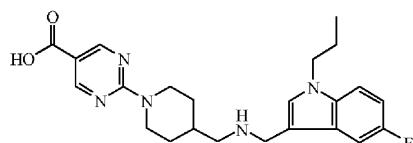
【0160】

2-[4-(アミノメチル)-1-ピペリジニル]-5-ピリミジンカルボン酸エチルエステル（0.0053モル）、中間体9（0.008モル）及びMgSO₄（1.5g）の混合物（100mlのCH₃OH中）をN₂流下で1晩攪拌還流し、次に5℃に冷却した。NaBH₄（0.0091モル）を添加した。混合物を室温で4時間攪拌し、H₂O中に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し（MgSO₄）、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣（3.4g）をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー（溶離剤：CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 97/3/0.5；15~40μm）により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、1.3g（54%）の中間体10を取得した。
30

b) 中間体11の製造

【0161】

【化19】



40

【0162】

中間体10（0.0029モル）及び水酸化ナトリウム（0.0057モル）の混合物（50mlのエタノール中）を60℃で1晩攪拌し、次に室温に冷却し、溶媒を蒸発させると0.8g（54%）の中間体11をナトリウム塩（.Na）として取得した。

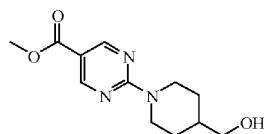
【0163】

実施例A6

a) 中間体12の製造

【0164】

【化20】



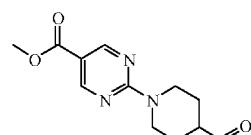
【0165】

4-ピペリジンメタノール(0.033モル)の溶液(80mlのCH₂Cl₂中)を2-クロロ-5-ピリミジンカルボン酸メチルエステル(0.066モル)及びDIPPEA(0.083モル)の溶液(100mlのCH₂Cl₂中)に室温、N₂流下で添加した。混合物を室温で3時間30分間攪拌し、氷水上に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣をペンタン中に取った。沈殿物を濾取し、乾燥すると7.88g(95%)の中間体12を取得した。

b) 中間体13の製造

【0166】

【化21】



10

20

【0167】

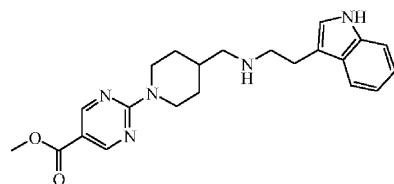
DMSO(0.058モル)をエタンジオイル・ジクロリド(0.0278モル)の溶液(50mlのCH₂Cl₂中)に-78℃、N₂流下で滴下した。混合物を15分間攪拌した。中間体12(0.023モル)の溶液(200mlのCH₂Cl₂中)を滴下した。混合物を-78℃で1時間30分間攪拌した。Et₃N(0.118モル)を滴下した。混合物を-78℃で1時間攪拌し、H₂O中に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣をジエチルエーテルから結晶化した。沈殿物を濾取し、乾燥すると、3.06g(54%)の中間体13を取得した。

30

c) 中間体14の製造

【0168】

【化22】



【0169】

40

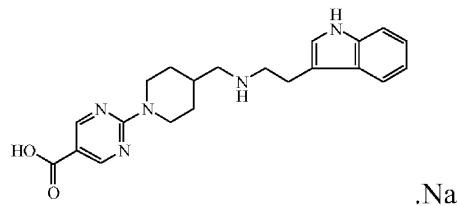
NaBH₃CN(0.019モル)を中間体13(0.0125モル)及び1H-インドール-3-エタンアミン(0.0125モル)の溶液(250mlのCH₃OH中)に5℃、N₂流下で滴下した。酢酸(1ml)を添加した。混合物を室温で48時間攪拌した。K₂CO₃10%を添加した。混合物をCH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣(5g)をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー(溶離剤:CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 96/4/0.3; 15~40μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、3g(60%)の中間体14を取得した。

d) 中間体15の製造

【0170】

50

【化23】



【0171】

中間体14(0.0064モル)及び水酸化ナトリウム(0.025モル)の混合物(80mlのエタノール中)を80℃で1晩攪拌し、次に室温に冷却し、蒸発させた。残渣をジエチルエーテル中に取った。沈殿物を濾取し、乾燥すると、2g(78%)の中間体15をナトリウム塩(.Na)として取得した。 10

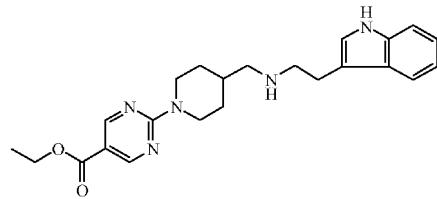
【0172】

実施例A7

a) 中間体16の製造

【0173】

【化24】



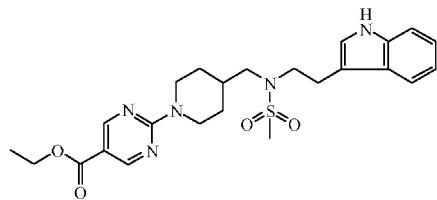
【0174】

2-[4-(アミノメチル)-1-ピペリジニル]-5-ピリミジンカルボン酸エチルエステル(0.0049モル)、1H-インドール-3-エタノール・メタンスルホネット(0.0054モル)及びK₂CO₃(0.01モル)の混合物(20mlのアセトニトリル中)を1晩攪拌還流し、次に冷却し、氷水上に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣(2.2g)をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー(溶離剤:CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 96/4/0.2; 15~40μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.442g(22%)の中間体16を取得した。 30

b) 中間体17の製造

【0175】

【化25】



【0176】

メタンスルホニルクロリド(0.0018モル)を中間体16(0.0012モル)及びEt₃N(0.0036モル)の溶液(15mlのCH₂Cl₂中)に室温で滴下した。混合物を室温で1晩攪拌し、H₂O中に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し(MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させると、0.6g(100%)の中間体17を取得した。 40

10

20

30

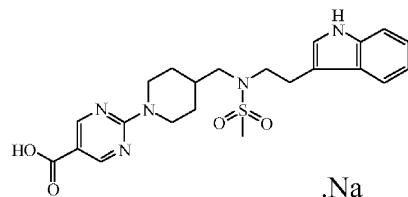
40

50

c) 中間体 18 の製造

【0177】

【化26】



10

【0178】

中間体 17 (0.012 モル) 及び水酸化ナトリウム (0.036 モル) の混合物 (40 ml のエタノール中) を 60 度で 5 時間攪拌し、次に蒸発乾燥させた。残渣をジエチルエーテル中に取った。混合物を蒸発乾燥させると 0.6 g (100%) の中間体 18 をナトリウム塩 (.Na) として取得した。

【0179】

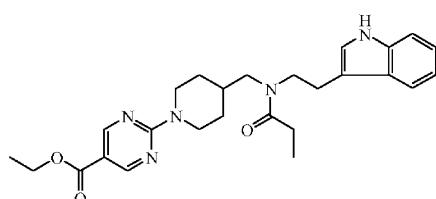
実施例 A 8

a) 中間体 19 の製造

【0180】

【化27】

20



【0181】

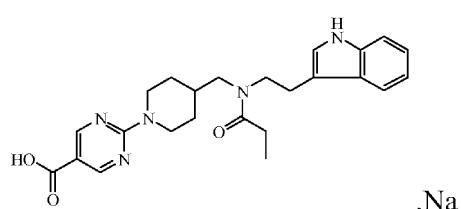
プロパノイルクロリド (0.0018 モル) を中間体 16 (0.0012 モル) の溶液 (0.5 ml の Et₃N 及び 1.5 ml の CH₂Cl₂ 中) に 0 度で添加した。混合物を室温で 1 晩攪拌し、氷水中に注入し、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を水で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させると、0.56 g (100%) の中間体 19 を取得した。この生成物を次の反応工程に直接使用した。

30

b) 中間体 20 の製造

【0182】

【化28】



40

【0183】

中間体 19 (0.0012 モル) 及び水酸化ナトリウム (0.15 モル) の混合物 (50 ml のエタノール中) を 60 度で 6 時間攪拌し、次に室温に冷却し、蒸発させた。残渣をジエチルエーテル中に取った。混合物を蒸発乾燥させると、0.55 g (100%) の中間体 20 をナトリウム塩 (.Na) として取得した。この生成物を次の反応工程に直接使用した。

【0184】

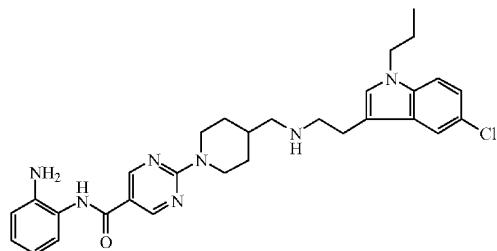
50

B. 化合物の製造

実施例 B 1 化合物 1 の製造

【0185】

【化29】



10

【0186】

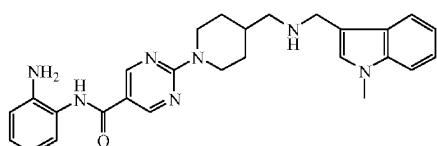
Et_3N (0.0037モル) を中間体6 (0.0008モル)、1,2-ベンゼンジアミン-塩酸 (0.0019モル) 及び PyBOP (0.0017モル) の溶液 (40mlのTHF及び40mlのCH₂Cl₂中) に室温で添加した。混合物を室温で2日間攪拌し、氷水上に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (1.2g) をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: CH₂Cl₂ / CH₃OH / NH₄OH 94 / 6 / 0.5; 15~40μm) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させた。得られた残渣 (0.078g) をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: CH₂Cl₂ / CH₃OH / NH₄OH 98 / 2 / 0.2~90 / 10 / 1; 3.5μm) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.049g (11%) (M.P.: 80) の化合物1を取得した。

【0187】

実施例 B 2 化合物 2 の製造

【0188】

【化30】



30

【0189】

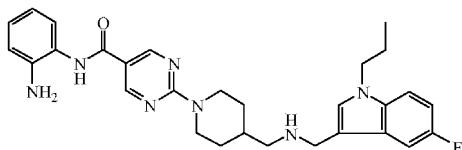
Et_3N (0.0108モル) を中間体8 (0.0025モル) 及び1,2-ベンゼンジアミン-塩酸 (0.0058モル) 及び PyBOP (0.005モル) の溶液 (50mlのDMF / タミ中) に室温で添加した。混合物を室温で48時間攪拌し、H₂O中に注入し、濾過した。濾液を EtOAcで抽出し、次にH₂Oで3回洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (1.8g) をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: CH₂Cl₂ / CH₃OH / NH₄OH 95 / 5 / 0.5; 15~40μm) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させた。得られた残渣 (0.262g、22%) をアセトニトリル / DIPPEから結晶化した。沈殿物を濾取し、乾燥すると、0.106g (M.P.: 142) の化合物2を取得した。

【0190】

実施例 B 3 化合物 3 の製造

【0191】

【化 3 1】



【 0 1 9 2 】

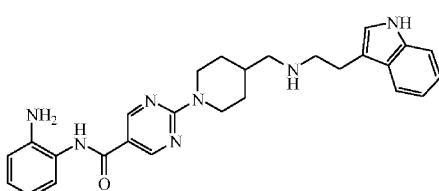
Et_3N (0.0072モル)を中間体11(0.0018モル)、1,2-ベンゼンジアミン-塩酸(0.0045モル)及び PyBOP (0.0036モル)の溶液(20m1のTHF及び20m1の CH_2Cl_2 中)に添加した。混合物を室温で72時間攪拌し、 H_2O 中に注入し、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を H_2O で洗浄し、乾燥し(MgSO_4)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣(3g)をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー(溶離剤： CH_2Cl_2 / $\text{CH}_3\text{OH} / \text{NH}_4\text{OH}$ 93 / 7 / 0.5 ; 15~40 μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.13g(14%) ($\text{M.P.} : 85^\circ\text{C}$)の化合物3を取得した。

〔 0 1 9 3 〕

実施例 B 4 化合物 4 の製造

【 0 1 9 4 】

【化 3 2】



【 0 1 9 5 】

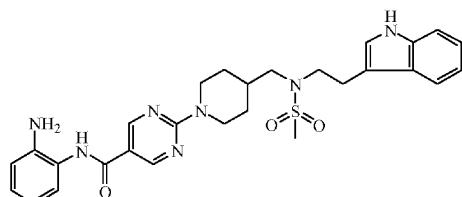
*E t*₃ N (0.01モル)を中間体15 (0.0025モル)、1,2-ベンゼンジアミン-塩酸 (0.0057モル)及びPyBOP (0.005モル)の溶液 (15m1)のTHF及び15m1のCH₂Cl₂中)に室温で添加した。混合物を室温で48時間攪拌し、H₂O中に注入し、CH₂Cl₂で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (0.13g)をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: CH₂Cl₂ / CH₃OH / NH₄OH 92 / 8 / 0.5; 15~40 μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させた。この画分 (0.13g)をシリカゲル上逆相クロマトグラフィー (溶離剤: CH₃OH / NH₄HCO₃ 60 / 40; 5 μm)により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.07g (M.P.: 95°)の化合物4を取得した。

【 0 1 9 6 】

実施例 B 5 化合物 5 の製造

【 0 1 9 7 】

【化 3 3】



[0 1 9 8]

E t₃ N (0.6 ml) を中間体 18 (0.001 モル)、1,2-ベンゼンジアミン-塩酸 (0.0024 モル) 及び PyBOP (0.002 モル) の溶液 (5 ml の THF 50

及び 5 m l の C H₂ C l₂ 中) に添加した。混合物を室温で 7 2 時間攪拌し、 H₂ O 中に注入し、 C H₂ C l₂ で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (M g S O₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (1.5 g) をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: C H₂ C l₂ / C H₃ O H / N H₄ O H 9 8 / 2 / 0.2; 1 5 ~ 4 0 μ m) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.027 g (5%) (M . P . : 1 0 5) の化合物 5 を取得した。

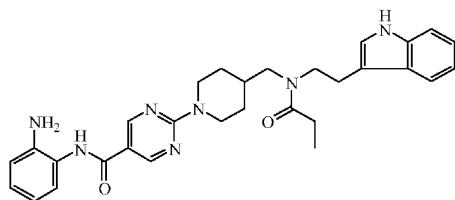
【0199】

実施例 B 6 化合物 6 の製造

【0200】

【化34】

10



【0201】

E t₃ N (0.0048 モル) を中間体 2 0 (0.0012 モル)、1,2-ベンゼンジアミン-塩酸 (0.0027 モル) 及び P y B O P (0.0024 モル) の溶液 (5 m l の C H₂ C l₂ 及び 5 m l の T H F 中) に添加した。混合物を室温で 4 8 時間攪拌し、水中に注入し、 C H₂ C l₂ で抽出した。有機層を分離し、乾燥し (M g S O₄)、濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣 (1.5 g) をシリカゲル上カラムクロマトグラフィー (溶離剤: E t O A c / C H₃ O H / N H₄ O H 9 3 / 7 / 0.5; 1 5 ~ 4 0 μ m) により精製した。純粋な画分を回収し、溶媒を蒸発させると、0.16 g (25%) の化合物 6 を取得した。

20

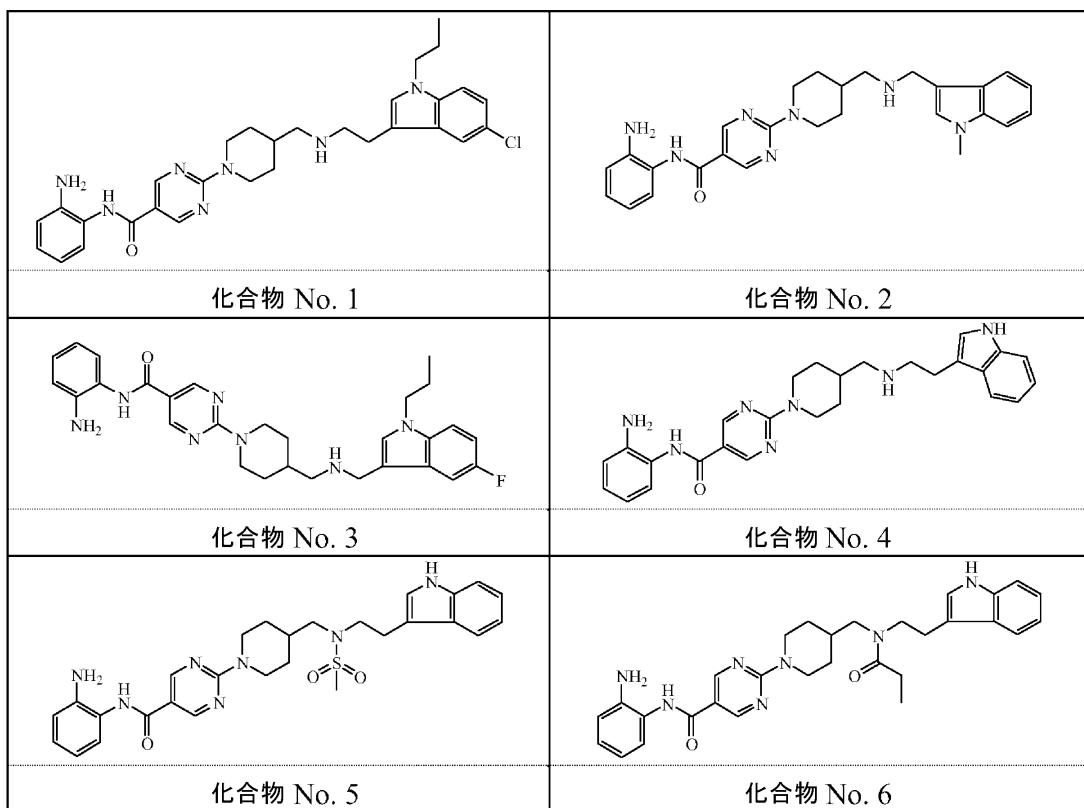
【0202】

表 F - 1 は前記の実施例の 1 つに従って製造された化合物を記載する。

【0203】

【表1】

表F-1



【0204】

C. 薬理学的実施例

ヒストンデアセチラーゼの阻害のインピトロアッセイ（実施例C.1参照）は、式（I）の化合物により得られるHDAC酵素活性の阻害を測定する。

【0205】

式（I）の化合物の細胞活性は、細胞毒性又は生存に対し、比色アッセイを使用して、A2780腫瘍細胞について測定した（Mosmann T, Journal of Immunological Methods 65:55-63, 1983）（実施例C.2参照）。

【0206】

化合物の溶解度は溶液中に滞留する化合物の能力を測定する。第1の方法において、希釈時に水溶液中に滞留する化合物の能力を測定する（実施例C.3.a参照）。DMSO-ストック溶液を異なる連続工程で単一のバッファー水性溶媒で希釈する。次にこの方法で混合物をBD Gentest Solubility Scanner中で沈殿物の存在についてスキャンする。第2の方法において、異なるpHにおける化合物の溶解度を化学発光室素検出計の使用により測定することができる（実施例C.3.b参照）。

【0207】

薬剤の透過性は1つの媒質からもう1つの媒質中へ又はそれを通って移動するその能力を表す。特に、腸膜を通って血流中へそして/又は血流から標的中へ移動するその能力を表す。透過性（実施例C.4参照）はフィルター固定された人工膜のリン脂質の2層の形成により測定することができる。フィルター固定人工膜アッセイにおいては、システムがバッファー水溶液と接触する時に、多層状の2層がフィルターチャンネルの内側に形成する条件下で、各複合体のウェルが、ジオレオイルホスファチジル-コリンの2%（w/t/v）のドデカン溶液でコートされた、125μmの微細フィルターディスク（0.45μmの孔）により分離された、底部に供与体溶液そして上部に受容体溶液を含む2室に分け

10

20

30

40

50

られるように、96 - ウェルの微量滴定プレート及び96 - ウェルフィルタープレートにより「サンドイッチ」が形成される。この人工膜を通る化合物の透過性はcm / 秒で測定される。その目的は2種の異なるpH、4.0と7.4における平行な人工膜を通る薬剤の透過性を求めることがある。化合物の検定は250と500nm間の最適な波長でUV-分光分析により実施される。

【0208】

薬剤の代謝は、脂溶性の生体異物又は生物体内生化合物が1種又は複数の極性の、水溶性の、そして排泄可能な代謝物に酵素により転化されることを意味する。薬剤代謝の主要器官は肝臓である。代謝生成物はしばしば、親薬剤より活性が低いか又は不活性である。しかし、いくつかの代謝物は高められた活性又は毒性効果を有することがある。従って薬剤代謝は「解毒」及び「中毒」双方の過程を包含する可能性がある。薬剤及び化学薬品を処理する生物の能力を決定する主要な酵素系の1つは、NADPH依存性酵素であるチトクロームP450モノオキシゲナーゼにより代表される。化合物の代謝安定性は細胞以下のヒト組織の使用によりインビトロで決定することができる（実施例C.5.a.参照）。ここで化合物の代謝安定性はミクロソームとのこれらの化合物の15分間のインキュベート後に代謝された薬剤の%として表される。化合物の定量はLC-MS分析により決定された。

【0209】

DNA損傷剤及びヒストンデアセチラーゼインヒビターを包含する広範な抗腫瘍剤がp21タンパク質を活性化することが示された。DNA損傷剤は腫瘍サプレッサーp53によりp21遺伝子を活性化し、他方ヒストンデアセチラーゼインヒビターは転写因子Sp1によりp21遺伝子を転写により活性化する。従って、DNA損傷剤はp53反応性要素によりp21プロモーターを活性化し、他方、ヒストンデアセチラーゼインヒビターはSp1部位（TATAボックスに対して-60bp～+40bp領域に位置する）によりp21プロモーターを活性化し、両者がp21タンパク質の増加した発現をもたらす。細胞中のp21プロモーターがp53反応性要素を含まないp21の1300bpプロモーターフラグメントよりなる時は、それに従ってDNA損傷剤に非反応性である。

【0210】

p21を誘導する化合物の能力は、細胞レベルのHDAC阻害の結果としてのp21を誘導する化合物の能力を試験することにより評価することができる。細胞はp53反応性要素を含有しないp21の1300bpプロモーターフラグメントを含有する発現ベクターで安定にトランスフェクションすることができ、そこで対照レベルに比較して、リポーター遺伝子発現の増加が化合物をp21誘導能をもつものと特定する。リポーター遺伝子は蛍光タンパク質であり、リポーター遺伝子の発現は発光される蛍光の量として測定される（実施例C.6.参照）。

【0211】

特異的HDACインヒビターは豊富なCYP P450タンパク質のような他の酵素を阻害しないにちがいない。CYP P450（大腸菌発現）タンパク質3A4、2D6及び2C9はこれらの特異的基質を蛍光分子に転化させる。CYP3A4タンパク質は7-ベンジルオキシ-トリフルオロメチルクマリン（BFC）を7-ヒドロキシ-トリフルオロメチルクマリンに転化させる。CYP2D6タンパク質は3-[2-(N,N-ジエチル-N-メチルアミノ)エチル]-7-メトキシ-4-メチルクマリン（AMMC）を3-[2-(N,N-ジエチルアミノ)エチル]-7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン塩酸に転化し、そしてCYP2C9タンパク質は7-メトキシ-4-トリフルオロメチルクマリン（MFC）を7-ヒドロキシ-トリフルオロメチルクマリンに転化させる。酵素反応を阻害する化合物は蛍光信号の減少をもたらすであろう。

【0212】

実施例C.1. 蛍光標識基質によるヒストンデアセチラーゼの阻害に対するインビトロアッセイ

BiomolのHDAC蛍光活性アッセイ / 薬剤発見キット（カタログ番号：AK-5

10

20

30

40

50

00-0001)を使用した。H D A C 蛍光活性アッセイは F lu o r d e L y s (F lu o r o g e n i c H i s t o n e d e A c e t y l a s e L y s y l) (蛍光発生ヒストンデアセチラーゼリシリル) 基質及び発色剤の組み合わせ物に基づく。F lu o r d e L y s 基質はアセチル化リシン側鎖を含んでなる。その基質の脱アセチル化は、第2工程において、F lu o r d e L y s 発色剤による処理が発蛍光団を生成するように基質を感受性にさせる。

【0213】

H e L a 核抽出物(供給会社: B i o m o l)を75 μMの基質とともに60 μg / m lでインキュベートした。F lu o r d e L y s 基質を25 mMのトリス、137 mMのN a C l 、2.7 mMのK C l 及び1 mMのM g C l ₂ . 6 H ₂ Oを含有するバッファー-(pH 7.4)中に添加した。30分後、1容量の発色剤を添加した。発蛍光団を355 nm光線で励起し、発光(450 nm)を蛍光プレート読み取り装置上で検定した。

【0214】

各実験につき、対照(H e L a 核抽出物及びバッファーを含有)、ブランクインキュベート(バッファーを含有するが、H e L a 核抽出物を含まない)及びサンプル(D M S O に溶解され、更にバッファー中に希釈された化合物及びH e L a 核抽出物を含有)を平行して実施した。第1に、化合物を10⁻⁵ Mの濃度で試験した。化合物が10⁻⁵ Mで活性を示した時に、そこで化合物が10⁻⁵ Mと10⁻⁹ Mの間の濃度で試験される濃度-反応曲線を作成した。すべてのサンプルを4回試験した。各試験において、ブランク値を対照及びサンプル値の両方から差し引いた。対照サンプルは100%の基質の脱アセチル化を表した。各サンプルに対する蛍光は対照の平均値の百分率として表した。適当なI C ₅₀-値(代謝物の量を対照の50%に減少させるために要する薬剤濃度)を漸増データに対するp r o b i t 分析を使用して計算した。ここで試験化合物の効果はp I C ₅₀(I C ₅₀-値のマイナス対数値)として表される(表F-2参照)。

【0215】

実施例C.2. A 2 7 8 0 細胞に対する抗増殖作用の測定

試験されるすべての化合物をD M S O に溶解し、更に培養培地中に希釈した。細胞増殖アッセイにおける最終D M S O 濃度は0.1%(v / v)を決して超えなかった。対照は化合物を含まずにA 2 7 8 0 細胞及びD M S O を含有し、そしてブランクはD M S O を含有したが、細胞を含まなかった。MTTをP B S 中5 mg / m lに溶解した。N a O H (1 N)でp H 1 0 . 5 にバッファーされた、0.1 Mのグリシン及び0.1 MのN a C l よりなるグリシンバッファーを製造した(すべての試薬はM e r c k から購入した)。

【0216】

ヒトA 2 7 8 0 卵巣ガン細胞(T. C. H a m i l t o n 博士[F o x C h a s e C a n c e r C e n t r e , P e n n s y l v a n i a , U S A]からの提供品)を、2 mMのL-グルタミン、50 μg / m l ゲンタマイシン及び10%のウシ胎仔血清を添加されたR P M I 1 6 4 0 培地中に培養した。細胞を37°の湿潤化5%CO₂ 霧囲気内で単層培養物として定常的に維持した。細胞は1:40の分離比率のトリプシン/EDTA溶液を使用して、毎週1回処理した(p a s s a g e d)。すべての培地及び補助物はL i f e T e c h n o l o g i e s から購入した。細胞はG e n - P r o b e マイコプラズマ組織培養キット(供給会社: B i o M e r i e u x)を使用して決定されるようマイコプラズマ汚染はなかった。

【0217】

細胞をN U N C TM 9 6 - ウエル培養プレート(供給会社: L i f e T e c h n o l o g i e s)中に播種し、1晩プラスチックに付着させた。プレート付着に使用された密度は、200 μlの培地総量でウェル当たり1500の細胞であった。プレートに対する細胞付着後に、培地を変え、薬剤及び/又は溶媒を200 μlの最終容量まで添加した。4日間のインキュベート後、培地を200 μlの新鮮な培地と交換し、細胞密度及び生存性をMTT-基質のアッセイを使用して測定した。各ウェルに対し、25 μlのMTT溶液を添加し、細胞を更に37°で2時間インキュベートした。次いで培地を注意して吸引

10

20

30

40

50

し、青色のMTT-フォルマザン生成物を、25 μ lのグリシンバッファー、次いで100 μ lのDMSOの添加により可溶化させた。微量試験プレートを微量プレートシェーカー上で10分間震盪し、540 nmにおける吸収を E_{max} 96 - ウェル分光比色計(供給会社: Sopachem)を使用して測定した。1回の実験中、各実験条件に対する結果は3回の重複ウェルの平均である。最初のスクリーニングの目的のためには、化合物を10⁻⁶ Mの単一の固定濃度で試験した。有効化合物に対しては実験を反復して、完全な濃度-反応曲線を確立した。各実験に対し、対照(薬剤を含まない)及びブランクインキュベート(細胞も薬剤も含まない)を平行して実施した。ブランク値をすべての対照及びサンプル値から差し引いた。各サンプルに対し、細胞増殖に対する平均値(吸収単位における)は対照の細胞増殖の平均値の百分率として表された。適当な場合には、IC₅₀-値(対照の50%まで細胞増殖を減少させるために要する薬剤の濃度)を漸増データに対するprobit分析を使用して計算した(Finney, D. J., Probit Analyses, 2nd Ed. Chapter 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962)。ここで試験化合物の効果はpIC₅₀(IC₅₀-値のマイナス対数値)として表される(表F-2参照)。

【0218】

実施例C.3. 溶解度

C.3.a. 水性媒質中の動力学的溶解度

5000-9.8 μ M(1/2希釈物)からのDMSO-ストック溶液を96ウェルストック溶液プレート中でDMSO中に製造する(200 μ l/ウェル)。各希釈後、サンプルを混合する。次にこれらのDMSO溶液のアリコート(2 μ l)を、200 μ l/ウェルの水性バッファーを含有する2個の他の96ウェルバッファープレートに移す。各バッファープレートは水性バッファー(pH 7.4)又は水性バッファー(pH 4.0)のいずれかを含有する。最後の希釈後、バッファープレートを混合し、サンプルを1/2時間室温で安定化する。偶発的誤差を排除するために各化合物に対して希釈を二重に実施する。次に混合物を沈殿の発生に対してBD Gentest Solubility Scannerにおいてスキャンする。混合物中の沈殿物の不在/存在に基づき、動力学的溶解度を外挿により計算する。3クラスへの評価を実施する。

【0219】

高い溶解度をもつ化合物は3の評価を与えられ、そして50 μ M以上の溶解度を有する。中程度の溶解度をもつ化合物は2の評価を与えられ、10 μ Mを超える50 μ M未満の溶解度を有する。低い溶解度をもつ化合物は1の評価を与えられ、これらの化合物に対して、溶解度は10 μ M以下である。

【0220】

3種の化合物が試験され、アッセイにおける両方のpHにおいて1の評価を得た。

【0221】

C.3.b. pH 2.3における溶解度

pH 2.3における化合物の溶解度はまた、化学発光室素検出計の使用により測定することができる(表F-2を参照)。

【0222】

実施例C.4 平行な人口膜の透過性の分析

ストックサンプル(100%DMSO中5mMのストック溶液の10 μ lのアリコート)をpH 4又はpH 7.4の水性バッファー系の2mL含有ディープウェルプレート又はプレミックスプレート中に希釈した(PSR4 System Solution Concentrate(pION))。

【0223】

サンプルを対照プレートに添加する前に、150 μ lのバッファーをウェルに添加し、ブランクのUV-測定を実施した。その後、バッファーを廃棄し、そのプレートを対照プレートとして使用した。すべての測定をUV-抵抗性プレート(供給会社: Costar)として実施した。

10

20

30

40

50

又はGreiner)において実施した。

【0224】

対照プレートのプランク測定後、150 μ lの希釈サンプルを対照プレートに添加し、200 μ lの希釈サンプルを供与体プレート1に添加した。受容体フィルタープレート(供給会社: Millipore, タイプ: MAIP N45)を4 μ lの人口膜形成溶液(0.1%の2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノールを含有するドデカン中1,2-ジオレオイル-sn-グリセル-3-ホスホコリン)でコートしそして供与体プレート1の上部に配置して、「サンドイッチ」を形成した。バッファー(200 μ l)を上部の受容体ウェル中に分配した。サンドイッチを蓋でカバーし、暗所、室温で18時間保存した。

10

【0225】

受容体プレート2のプランク測定を、ウェルに150 μ lのバッファーを添加し、次にUV-測定により実施した。受容体プレート2のプランク測定後、バッファーを廃棄し、150 μ lの受容体溶液を受容体フィルタープレート1から受容体プレート2に移した。次に受容体フィルタープレート1をサンドイッチから外した。供与体プレート2のプランク測定後(前記参照)、150 μ lの供与体溶液を供与体プレート1から供与体プレート2に移した。供与体プレート2、受容体プレート2及び対照プレートウェルのUVスペクトルをスキャンした(SpectraMAX 190)。すべてのスペクトルをPSR4p Command Softwareにより処理して、透過性を計算した。すべての化合物を三重測定した。カルバマゼピン、グリセオフルビン、アシクログアニシン、アテノロール、フロセミド及びクロロチアジドを各実験の標準物として使用した。化合物を低い透過性(平均効果 $< 0.5 \times 10^{-6}$ cm/秒; 評価1)、中程度の透過性(1×10^{-6} cm/秒 > 平均効果 0.5×10^{-6} cm/秒; 評価2)又は高い透過性(1×10^{-6} cm/秒; 評価3)をもつ3分類に評価した。

20

【0226】

実施例C.5 代謝の安定性

細胞以下の組織製造物をGorrod等(Xenobiotica 5:453-462, 1975)に従って、組織の機械的ホモジネート化後の遠心分離により製造した。肝組織を氷冷した0.1MのTris-HCl(pH 7.4)バッファー中ですすいで、過剰な血液を洗浄した。次に組織をプロット乾燥し、秤量し、外科用はさみを使用して粗く刻んだ。組織片を、Teflon乳棒の付いたPotter-S(Braun, Italy)又はSorvall Omni-Mixホモジナイザーのいずれかを使用して、7×10秒間、3容量の氷冷0.1Mのリン酸バッファー(pH 7.4)中にホモジナイズした。双方の場合に、容器はホモジナイズ工程中氷中/上に維持された。

30

【0227】

組織ホモジネートをSorvall遠心分離装置又はBeckmann Ultrace ntrifugeを使用して4で20分間9000×gで遠心分離した。生成された上澄みを-80で保存し、「S9」と記号を付けた。

【0228】

S9画分を更に、Beckmann超遠心分離装置を使用して60分間(4)100.000×gで遠心分離することができる。生成された上澄みを注意して吸引し、アリコートし、「シトソール」と記号を付けた。ペレットを0.1Mのリン酸バッファー(pH 7.4)中に再懸濁させて、0.5gの最初の組織重量に対して1mlの最終容量にし、「ミクロソーム」と記号を付けた。

40

【0229】

すべての細胞以下の画分をアリコートし、液体窒素中で瞬間凍結し、使用まで-80で保存した。

【0230】

試験されるサンプルとして、インキュベート混合物はPBS(0.1M)、化合物(5 μ M)、ミクロソーム(1mg/ml)及びNADPH-生成系(0.8mMのグルコ-

50

ス - 6 - リン酸、0.8 mMの塩化マグネシウム及び0.8単位のグルコース - 6 - リン酸脱水素酵素)を含有した。対照サンプルは同様な物質を含有したが、ミクロソームは熱不活性化(95度10分間)ミクロソームで置き換えられた。対照サンプル中の化合物の回収は常に100%であった。

【0231】

混合物を37度5分間プレインキュベートした。反応は0.8 mMのNADPの添加により時点ゼロ(t=0)で開始し、サンプルを15分間(t=15)インキュベートした。反応を2容量のDMSOの添加により終結した。次にサンプルを900×gで10分間遠心分離し、上澄みを分析まで24時間を超えないように室温で保存した。すべてのインキュベートを二重に実施した。上澄みの分析をLC-MS分析により実施した。サンプルの溶離をXterra MS C18(50×4.6 mm, 5 μm, Waters, US)上で実施した。Alliance 2790(供給会社:Waters, US)HPLCシステムを使用した。溶離は2.4 ml/分の流速で、バッファーA(H₂O/アセトニトリル(95/5)中25 mMの酢酸アンモニウム(pH 5.2))、アセトニトリルの溶媒B及びメタノールの溶媒Cにより実施された。使用した勾配は、有機相濃度を、5分間にわたり0%から50%のB及び50%のCに、1分間にわたり100% Bまで直線状に増加し、有機相濃度は更に1.5分間一定に維持された。サンプルの総注入容量は25 μlであった。

【0232】

検出計として、ESI源を備えたQuattro(供給会社:Micromass, Manchester, UK)トリプル四極子質量分析装置を使用した。エネルギー源及び脱溶媒和温度はそれぞれ120及び350に設定され、ネプライザー及び乾燥ガスとして窒素を使用した。データをポジティブスキャンモード(单一イオン反応)で獲得した。コーン電圧を10Vに設定し、滞留時間は1秒であった。

【0233】

代謝安定性は活性ミクロソーム(E(act))の存在下で15分間のインキュベート後の化合物の代謝%として表した、

【0234】

【数1】

$$(代謝\% = 100\% - ((\frac{t=15\text{における}E(\text{act})\text{の総イオン流(TIC)}}{t=0\text{における}E(\text{act})\text{のTIC}}) \times 100))$$

【0235】

20%未満の代謝率を有する化合物は著しく代謝的に不安であるものと定義され、3の評価を与えられた。20~70%の間の代謝を有する化合物は中程度に不安であると定義され、2の評価を与えられ、そして70%を超える代謝率を示す化合物は低い代謝安定と定義され、1の評価を与えられた。代謝安定性のスクリーニングが実施される時は3種の対照化合物が常に包含された。ベラパミルは低い代謝安定性(代謝% = 73%)をもつ化合物として包含された。シアブリドは中程度の代謝安定性(代謝% = 45%)をもつ化合物として包含され、そしてプロパノールは中程度から高い代謝安定性(25%の代謝)をもつ化合物として包含された。これらの対照化合物は代謝安定性アッセイの有効性を証明するために使用された。2種の化合物が試験され、それぞれ3の評価及び2の評価を得た。

【0236】

実施例C.6 p21誘導能

A2780細胞(ATCC)を37度の、5%CO₂を含む湿潤化インキュベーター内の、10%FCS、2 mMのL-グルタミン及びゲンタマイシンを添加された RPMI 1640培地で培養した。すべての細胞培養液はGibco-BRL(Gaithersburg, MD)により提供される。他の材料はNuancにより提供される。

【0237】

ゲノムDNAを、増殖しているA2780細胞から抽出し、p21プロモーターのネス

10

20

30

40

50

ト化されたPCR単離物のテンプレートとして使用した。第1の増殖を、テンプレートとしてゲノムDNAを含むオリゴヌクレオチド対GAGGGCGCGGGTGCCTGG及びTGCCTGCCGCTCTCACCCを使用して55℃のアニーリング温度で20周期につき実施した。TATAボックスに対して-4551~+88フラグメントを含有する生成された4.5kbのフラグメントを、88℃のアニーリングにより20周期につき、オリゴヌクレオチドTCGGGTACCGAGGGCGCGGTGCCTGG及びATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCACCCで再増殖させて4.5kbフラグメントを生成し、次いで88℃のアニーリングにより20周期につき、オリゴヌクレオチド対TCGGGTACCCGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATC及びATACTCTCGAGTGCCCGCCGCTCTCACCCにより再増殖させて、TATAボックスに対して-1300~+88フラグメントを含有する1.3kbフラグメントをもたらした。オリゴヌクレオチド中に存在する制限部位XbaI及びKpnI(下線配列)をサブクローン生成に使用した。

【0238】

ルシフェラーゼリポーターをKpnI及びXbaI制限部位においてpGL3-塩基性から除去し、ZsGreenリポーター(pZsGreen1-N1プラスミドから)により置き換えた。XbaI及びKpnI部位のpGL3-塩基性-ZsGreen中へのヒトp21プロモーター領域の前記の1.3kbフラグメントの挿入により、pGL3-塩基性-ZsGreen-1300を構成した。すべての制限酵素はBoehringer Manheim(ドイツ)により提供される。A2780細胞を 2×10^5 細胞の密度で6-ウェルのプレートに添加し、24時間インキュベートし、製造業者により説明されるようにLipofectamine 2000(Invitrogen, Brussels, ベルギー)を使用することにより、2μgのpGL3-塩基性-ZsGreen-1300及び0.2μgのpSV2neoベクトルによりトランスフェクションさせた。トランスフェクション細胞はG418(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)により10日間選択し、単一の細胞懸濁物を増殖させた。3週後、単一のクローンを得た。

【0239】

A2780の選択されたクローンを增量させ(expanded)、96-ウェルのプレート中にウェル当たり10000細胞で播種した。播種の24時間後に、細胞を化合物(近位のp21プロモーター領域中のsp1部位に影響する)とともに更に24時間処理した。次いで、細胞を30'間、4%のPFAで固定し、Hoechstの染料により対比染色した。ZsGreen生産及び従って蛍光をもたらすp21プロモーターの活性化をAscent Fluoroskan(Thermo Lab systems, Brussels, ベルギー)によりモニターした。

【0240】

各実験につき、対照(薬剤を含まない)及びブランクインキュベート(細胞も薬剤も含まない)を平行して実施した。ブランク値をすべての対照及びサンプル値から差し引いた。各サンプルにつき、p21誘導の値は、対照中に存在するp21の値の百分率として表した。130%を超える誘導百分率を有意な誘導と定義した。

【0241】

実施例C.7 P450阻害能

試験されたすべての化合物をDMSO(5mM)に溶解し、アセトニトリル中に 5×10^{-4} Mに更に希釈した。アッセイバッファー(0.1MのNaKリン酸バッファー、pH7.4)中に更に希釈し、最終溶媒濃度は2%を決して超えなかった。

【0242】

CYP3A4タンパク質のアッセイは、100μlの総アッセイ容量中に、ウェル当たり15pモルのP450/1mgのタンパク質(0.01MのNaKリン酸バッファー+1.15%のKCl中)、NADPH生成系(アッセイバッファー中、3.3mMのグルコース-6-リン酸、0.4U/mlのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、1.

10

20

20

30

40

40

50

3 mMのNADP及び3.3 mMのMgCl₂.6H₂O)及び化合物を含んでなる。37で5分間のプレインキュベート後に、アッセイバッファー中に150 μMの蛍光プローブ基質BFCの添加により酵素反応を開始した。室温で30分間のインキュベート後に、2容量のアセトニトリルの添加後に反応は終結した。405 nmの励起波長及び535 nmの発光波長で蛍光の測定を実施した。本実験における対照化合物としてケトコナゾール(IC₅₀-値=3×10⁻⁸ M)を包含した。

【0243】

CYP2D6タンパク質のアッセイは、100 μlの総アッセイ容量において、ウェル当たり、6 pモルのP450/1 mgのタンパク質(0.01 MのNaKリン酸バッファー+1.15%のKC1中)、NADPH生成系(アッセイバッファー中、0.41 mMのグルコース-6-リン酸、0.4 U/mlのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、0.0082 mMのNADP及び0.41 mMのMgCl₂.6H₂O)及び化合物を含んでなる。37で5分間のプレインキュベート後に、アッセイバッファー中に3 μMの蛍光プローブ基質AMMCの添加により酵素反応を開始した。室温で45分間のインキュベート後、2容量のアセトニトリルの添加後に反応を終結した。405 nmの励起波長及び460 nmの発光波長で蛍光の測定を実施した。本実験の対照化合物としてキニジン(IC₅₀-値<5×10⁻⁸ M)を包含した。

【0244】

CYP2C9タンパク質のアッセイは、100 μlの総アッセイ容量において、ウェル当たり、15 pモルのP450/1 mgのタンパク質(0.01 MのNaKリン酸バッファー+1.15%のKC1中)、NADPH生成系(アッセイバッファー中、3.3 mMのグルコース-6-リン酸、0.4 U/mlのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、1.3 mMのNADP及び3.3 mMのMgCl₂.6H₂O)及び化合物を含んでなる。37で5分間のプレインキュベート後、アッセイバッファー中に200 μMの蛍光プローブ基質MFCの添加により酵素反応を開始した。室温で30分間のインキュベート後、2容量のアセトニトリルの添加後に反応は終結した。405 nmの励起波長及び535 nmの発光波長で蛍光の測定を実施した。本実験の対照化合物としてスルファフェナゾール(IC₅₀-値=6.8×10⁻⁷ M)を包含した。

【0245】

最初のスクリーニングの目的のためには、化合物は1×10⁻⁵ Mの単一の固定濃度で試験された。有効な化合物に対しては、全体の濃度-反応曲線を確立するために実験を反復した。各実験につき、対照(薬剤を含まない)及びプランクインキュベート(酵素も薬剤も含まない)を平行して実施した。すべての化合物を4重実験で測定した。プランク値をすべての対照及びサンプル値から引いた。各サンプルにつき、サンプルのP450活性の平均値(相対的蛍光単位で)を対照のP450活性の平均値の百分率として表した。抑制百分率は100%引く、サンプルのP450活性の平均値として表した。適当な場合には、IC₅₀-値(対照の50%までP450活性を減少させるために要する薬剤の濃度)を計算した。

【0246】

表F-2は実施例C.1、C.2及びC.3.b.に従って試験された化合物の結果を示す(プランクは関連化合物に対して利用可能な値がないことを示す)。

【0247】

【表2】

表F-2

化合物番号	酵素活性 pIC50 C.1	細胞活性 pIC50 C.2	溶解度 C.3.b. pH = 2.3 (mg/ml)
1	<6	5.5	
2	4.8	7.0	3.7
3	<6	5.8	
4	<6		
5	<6		

10

【0248】

D. 組成物実施例：フィルムコート錠

錠剤コアの製造

100 g の式 (I) の化合物、570 g のラクトース及び200 g のデンプンの混合物を十分混合し、その後、5 g のナトリウムデシルスルフェート及び10 g のポリビニル-ピロリドンの溶液 (約200 ml の水中) で湿潤化する。湿った粉末混合物をふるい、乾燥し、再度ふるう。次いで100 g の微細結晶セルロース及び15 g の水素化植物油を添加する。全体を十分に混合し、打錠すると、各10 mg の式 (I) の化合物を含んでなる10.000錠を与える。

20

【0249】

コーティング

10 g のメチルセルロースの溶液 (75 ml の変性エタノール中) に5 g のエチルセルロースの溶液 (150 ml のジクロロメタン中) を添加する。次いで75 ml のジクロロメタン及び2.5 ml の1,2,3-プロパントリオールを添加する。10 g のポリエチレングリコールを融解し、75 ml のジクロロメタン中に溶解する。後者の溶液を前者に添加し、次に2.5 g のマグネシウムオクタデカノエート、5 g のポリビニルピロリドン及び30 ml の濃厚色素懸濁液を添加し、全体をホモジネート化する。コーティング装置内で、錠剤のコアをこのように得た混合物でコートする。

30

フロントページの続き

(72)発明者 アンジボ , パトリク・ルネ

フランス・エフ - 27106 バルドレユイルセーデクス・ビーピー615・カンピュドメグルモン
・デイビジョンオブジヤンセン - シラグ・ジョンソンアンドジョンソンファーマシユーチカルリサ
ーチアンドデベロップメント

(72)発明者 ピラト , イザベル・ノエル・コンスタンス

フランス・エフ - 27106 バルドレユイルセーデクス・ビーピー615・カンピュドメグルモン
・デイビジョンオブジヤンセン - シラグ・ジョンソンアンドジョンソンファーマシユーチカルリサ
ーチアンドデベロップメント

(72)発明者 ルー , ブルノ

フランス・エフ - 27106 バルドレユイルセーデクス・ビーピー615・カンピュドメグルモン
・デイビジョンオブジヤンセン - シラグ・ジョンソンアンドジョンソンファーマシユーチカルリサ
ーチアンドデベロップメント

(72)発明者 アルツ , ジヤニン

ベルギー・ビー - 2340 ビールセ・トゥルンホウトセベーク30・ジヤンセン・ファーマシュー
チカ・ナームローゼ・フエンノートシヤツブ

審査官 中西 聰

(56)参考文献 国際公開第2005/030705 (WO , A1)

国際公開第03/092686 (WO , A1)

特表2005-519950 (JP , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 07 D 401/00

A 61 K 31/00

A 61 P 17/00 - 43/00

C A P L U S / R E G I S T R Y (S T N)