

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7701403号
(P7701403)

(45)発行日 令和7年7月1日(2025.7.1)

(24)登録日 令和7年6月23日(2025.6.23)

(51)国際特許分類

C 0 7 D 209/88 (2006.01)	F I	C 0 7 D 209/88
A 6 1 K 31/403(2006.01)		A 6 1 K 31/403
A 6 1 K 31/4162(2006.01)		A 6 1 K 31/4162
A 6 1 K 31/437(2006.01)		A 6 1 K 31/437
A 6 1 K 31/4439(2006.01)		A 6 1 K 31/4439

C S P

請求項の数 2 外国語出願 (全125頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-75706(P2023-75706)
 (22)出願日 令和5年5月1日(2023.5.1)
 (62)分割の表示 特願2019-524895(P2019-524895
)の分割
 原出願日 平成29年11月14日(2017.11.14)
 (65)公開番号 特開2023-101521(P2023-101521
 A)
 (43)公開日 令和5年7月21日(2023.7.21)
 審査請求日 令和5年5月30日(2023.5.30)
 (31)優先権主張番号 16198731.8
 (32)優先日 平成28年11月14日(2016.11.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 518434555
 マックス - デルブリュック - セントルム
 フュール モレキュラー メディツイン
 イン デア ヘルムホルツ - ゲマインシャ
 フト
 ドイツ連邦共和国, 13125 ベルリ
 ン, ロベルト - レスレ - シュトラーセ
 10
 (73)特許権者 502327850
 フォルシュングスフェアブント ベルリン
 エー ファウ
 F o r s c h u n g s v e r b u n d
 B e r l i n e . V .
 ドイツ連邦共和国 ベルリン ルドヴェア
 ショセー 17

最終頁に続く

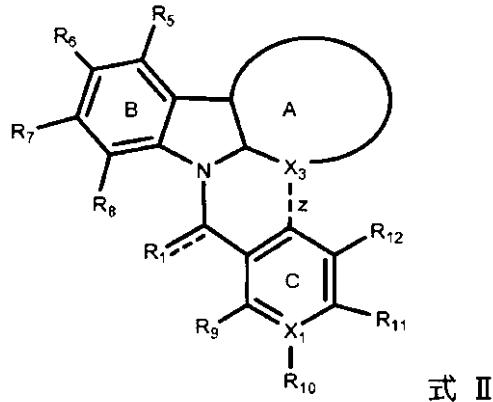
(54)【発明の名称】 遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- B経路の選択的阻害剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 I I :

【化1】



〔上式中

R₁は、O原子であり；R₅は、H、ハロゲン、C1～C5のアルキル、アルケニル、アルコキシ、またはアミンであり；

R₆ は、H、OH、ハロゲン、C1～C5のアルキル、アルコキシ、またはアルコキシアミドであり；

R₇ は、H、ハロゲン、C1～C5のアルキル、またはアルコキシであり；

R₈ は、ハロゲン、C1～C5のアルキル、またはアルコキシであり；ここで、R₅からR₇の少なくとも1つはHでない；

R₉ は、H、ハロゲン、C1～C5のアルキル、またはアルコキシであり；

R₁₀ は、H、ハロゲン、C1～C5のアルキル、またはアルコキシであり；

R₁₁ は、ハロゲン、C1～C5のアルキル、アルコキシ、またはカルボキシルであり；

R₁₂ は、H、ハロゲン、C1～C5のアルキル、またはアルコキシであるか；

あるいは、X₁がCである場合、R₉とR₁₀、R₁₀とR₁₁、R₁₁とR₁₂、またはR₁₂と環Cの結合zの位置にあるC原子とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成し、該環構造は0、1または2個のヘテロ原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

X₁とX₃は、NまたはC原子であり；

環Aは、5員または6員の芳香族環構造であり、該環構造はOおよび/またはN原子から選択されたヘテロ原子を0、1または2個含み、ここで、環Aが5員の芳香族環構造である場合にX₃はN原子であり、環Aが6員の芳香族環構造である場合にX₃はC原子であり、前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アリール（ハロゲン、C1～C3アルキル、または-OCH₃によって置換されていてよい）、およびアルコキシアミンから選択された同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換され；

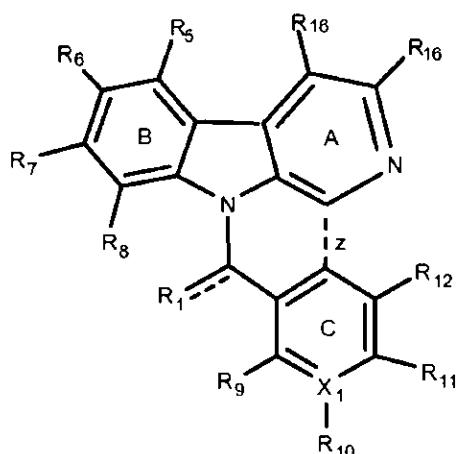
結合zは、存在してもしなくてもよく、ここで結合zが存在しない場合：

環Cの結合zの位置にあるC原子は、ハロゲンまたはC1～C7アルキルで置換されてもよく、かつ環AのX₃は、H、OH、またはハロゲンで置換されてもよいか、またはX₃がC原子である場合、H、OH、またはハロゲンで置換されてもよい。】により表される化合物。

【請求項2】

式II-b：

【化2】



式 II-b

〔上式中

X₁はCであり；

R₁はOであり；

R₅はH、ハロゲン、C1～C5アルキル、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂C₂H₅、-OCH₂CH₂CH₂CH₃であり；

10

20

30

40

50

R₆はH、O H、ハロゲン、C 1～C 5アルキル、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃、または-OCH₂CH₂CH₂CH₃であり；
R₇はH、ハロゲン、C 1～C 5アルキル、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-OCH₂CH₂CH₃、または-OCH₂CH₂CH₂CH₃であり；
R₈はハロゲン、C 1～C 3アルキル、またはアルコキシであり；
ここで、R₅～R₇の少なくとも1つはHでない；
R₉～R₁₂は同一でも異なってもよい、Hまたは-OCH₃であり；
R₁₆は同一でも異なってもよい、H、-C(O)OCH₃、-C(O)OH、またはアリール(ハロゲン、C 1～C 3アルキル、または-OCH₃によって置換されていてもよい)；
結合zは存在する。】

により表される、請求項1に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B(NF-カッパB)活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる化合物およびそれらの使用に関する。好ましくは、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B活性化を示す癌患者の治療における使用に関する。本発明は更に、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK-NF-B活性化に関連した疾患に苦しむ患者の治療のための本発明化合物を含む医薬組成物に関する。

10

【背景技術】

【0002】

変化への適応は生物の生存にとって重要である。環境的、化学的および物理的並びに微生物学的变化は、正常な組織機能や細胞の恒常性を脅かし、生育や生理機能に対するストレスの原因を表す。ストレスに対する主な応答は、遺伝子発現プログラムを変更することにより細胞機能に影響を及ぼす細胞のシグナル伝達である。NF-B(活性化B細胞の核因子 軽鎖エンハンサー)系は、細胞のストレス応答の主な担い手である。NF-Bは広く存在しあつ迅速に誘導可能な転写因子(TF)である。NF-Bにより調節される数百個の標的遺伝子が同定されている。それらの標的遺伝子の大部分は免疫系と炎症、細胞周期、増殖および細胞死の制御に関わっている。生育やストレス応答におけるそれの顕著な機能の他に、無制御なNF-Bが、最も重要には慢性炎症、自己免疫疾患および癌を初めとする多数の疾患の原因となる。

20

【0003】

NF-B活性化を誘導する刺激剤としては、炎症促進性サイトカイン、PAMPs(病原体関連分子パターン)、免疫受容体および様々な種類の細胞ストレス、例えば線照射(IRR)の関与が挙げられる。活性化されたNF-B経路は、非コードRNA(リボ核酸)または細胞の生存と増殖、接着とマトリクス改造、リンパ球活性化、宿主防御または免疫と炎症を制御するタンパク質をコードする標的遺伝子の転写調節により様々な細胞の効果を調節する。

30

【0004】

NF-Bは、コンビナトリアルのホモ二量体とヘテロ二量体を形成する、5つの構成員p65/RelA、RelB、c-Rel、p105/p50およびp100/p52を含むTFの1ファミリーである(Hayen & Ghosh; 2012)。構造上、全てのNF-Bサブユニットは、N末端ドメイン(NTD)から構成されるRel相同性ドメイン(RHD)、および二量化ドメイン(DID)に続いて核移行シグナル(NLS)を特徴とする。RHDは、別のサブユニットとの二量化、核内移行、DNA結合およびIBタンパク質への結合といった重要な機能の大部分を促進する。

40

【0005】

Relタンパク質は更に、転写開始に必要とされるC末端転写活性化ドメイン(TAD)

50

) の存在により特徴づけられる。前駆体タンパク質 p 1 0 5 と p 1 0 0 は、それぞれ N F - K B 1 と N F K B 2 の遺伝子産物である。ユビキチン化とプロテアソームでのプロセシングにより、p 1 0 5 と p 1 0 0 はそれぞれ成熟 N F - B サブユニット p 5 0 と p 5 2 をもたらす。

【 0 0 0 6 】

N F - B サブユニットの様々な翻訳後修飾 (P T M s) 、例えばリン酸化やアセチル化が、コンホメーション変化を誘導し、それによりユビキチン化、安定性、タンパク質間相互作用および標的遺伝子発現の調節に影響を与える (Christian 他; 2016) 。

【 0 0 0 7 】

不活性 N F - B 二量体は、I B タンパク質への会合により細胞質中に隔離される。 I K K / N F - B 経路の活性化と同時に、I K K 複合体は I B をリン酸化し、それによってリジン 4 8 連結 (K 4 8) ユビキチン化と、その後のプロテアソーム分解のための目印を付ける (Scheidereit, 1998, Hayden & Ghosh; 2008, Scheidereit; 2006) 。次いで遊離された N F - B 二量体が核に移行し、標的遺伝子の転写を制御する。

【 0 0 0 8 】

I B (核因子 B の阻害剤) タンパク質は、N F - B の阻害剤であり、核内移行から N F - B を保持することによる分子スイッチを表す。I B タンパク質は、特有の構造的特徴として、N F - B 二量体への結合を促進するアンキリン反復ドメイン (A R D) を収容する。

【 0 0 0 9 】

I B 、 I B および I B は、N L S のマスキングにより細胞質中に N F - B 二量体を隔離し、そして N F - B の活性化は I B s からの遊離を必要とする。主な阻害剤である I B からの N F - B の遊離は、位置 S 3 2 と S 3 6 の N 末端の 2 つのセリン (S 、 S e r) の所でのリン酸化を必要とする。I B から N F - B を遊離させるために、リン酸化は重要であるが十分ではなく、追加の工程としての I B のタンパク質分解が不可欠である。

【 0 0 1 0 】

I K K 複合体の活性化は、N F - B シグナル伝達の基本的機序である。プロトタイプ複合体は、2 つの触媒サブユニット I K K と I K K および調節サブユニット I K K / N E M O (N F - B 必須修飾因子) (Hinz & Scheidereit; 2014) から成る (Hinz & Scheidereit; 2014) 。刺激されると、I K K 複合体は必須セリン残基上で I B をリン酸化する。このリン酸化の結果として、E 3 リガーゼ S C F ^{T r C P} が、I B 上の K 4 8 結合ユビキチン鎖を攻撃する。この分解シグナルが 2 6 S プロテアソームによる I B の分解をもたらし、結果として遊離の N F - B ヘテロ二量体の放出に至る。

【 0 0 1 1 】

I K K 複合体活性化には様々なシグナル伝達事象が要求される。大部分の I K K / N F - B 経路は、キナーゼ T A K 1 [T G F (形質転換増殖因子) 活性化キナーゼ 1] のユビキチン媒介自己リン酸化に至る上流のシグナル伝達を含む。T A K 1 の自己リン酸化は、K 6 3 結合ユビキチン鎖への T A K 1 / T A B 2 / 3 複合体のリクルートにより活性化される。活性化された T A K 1 は、活性化ループ中の I K K と I K K をそれぞれ S 1 7 6 と S 1 7 7 の所でリン酸化する (Zhang 他; 2014) 。I K K 複合体は単に I B タンパク質をリン酸化するだけでなく、N F - B サブユニット p 6 5 もリン酸化する。

【 0 0 1 2 】

古典的 (canonical) I K K / N F - B 活性化は、サイトカイン類、例えば I L - 1 (インターロイキン - 1) や T N F (肿瘍壞死因子) および T o 1 1 様受容体アゴニストといった炎症性刺激因子により強力に活性化される (Zhang 他; 2014) 。それらの細胞膜に結合した受容体ヘリガンドが結合すると同時に、シグナルが細胞質に伝達される。ここで、アダプタータンパク質が、キナーゼやユビキチンリガーゼのようなシグナル伝達成分を受容体複合体の方へリクルートする。古典的 N F - B の活性化は、様々なユビキチン鎖結合とタンパク質リクルートの複雑な相互作用により媒介され、これが最終的に I

10

20

30

40

50

KK のポリユビキチン結合と、TAK1によるIKK / のリン酸化をもたらす。

【0013】

活性化されたIKK複合体はS536位でp65を、そしてS32位とS36位でIBをリン酸化し、これがプロテアソーム分解を引き起こす。遊離された活性型p65/p50ヘテロ二量体が核に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。負のフィードバックループとしてIBが再合成され、これがNF-B活性化を減弱させる。別の負のフィードバックループは、脱ユビキチン化酵素A20の発現を表す。A20は、結合したK63ユビキチン鎖を開裂させることにより RIP1(受容体相互作用性タンパク質1)を脱ユビキチン化する。

【0014】

非古典的(または代替的)NF-Bシグナル伝達は、前駆体p100のプロテアソームでのプロセシングに依存し、これはp52の形成をもたらす。非古典的伝達の特徴は、de novoタンパク質合成の必要条件であり、古典的NF-Bシグナル伝達とは対照的に、独特の緩やかな速度論である。非古典的NF-B活性化の活性化中心成分は、NF-B誘導性のキナーゼ(NIK)とIKKである。

【0015】

NIKは、プロテアソームによる固定状態条件下で、TRAF3(腫瘍壞死因子(TNF)受容体関連因子-3)-TRAF2-cIAP(アポトーシスタンパク質阻害剤)破壊複合体により媒介されるユビキチン化を伴う機序を通して恒常的に分解される。非古典的NF-Bシグナル伝達のトリガーは、LT-(リンホトキシン)、BAFF(TNFファミリーに属するB細胞活性化因子)、CD40、RANK(核因子Bの受容体活性化因子)、TNFR2、Fn14等をはじめとするTNF受容体スーパーファミリーメンバーの一部のリガンドである。受容体が刺激されると、TRAF3が分解され、結果としてNIKが細胞内に蓄積する。蓄積されたNIKは、ループセリンの所でIKKをリン酸化し、次いでp100をC末端の中でリン酸化する。リン酸化された前駆体分子はK48結合ユビキチン鎖により修飾され、p100のプロテアソームプロセシングを惹起させる。

【0016】

非古典的NF-Bシグナル伝達の結果として、p52が生産され、これが優先的にRE1Bに結合する。活性化型NF-Bヘテロ二量体のp52/RE1Bは核に移行し、その共通配列に結合し、二次リンパ組織形成、B細胞の生存と成熟、樹状細胞活性化および骨代謝のような特異的な免疫学的過程を調節する(Sun; 2012)。しかしながら、病理学的機序は、無秩序なNIK安定化またはIKK活性化を引き起こし得る。結果として非古典的NF-B経路が構成的に活性化され、それは多数の重篤な疾患、例えば自己免疫、炎症、およびホジキンリンパ腫のような悪性リンパ腫の発症に関連付けられている。

【0017】

遺伝毒性ストレスは、DNA損傷応答(DDR)と呼ばれる複雑な細胞過程を誘発する。DDRは、遺伝毒性ストレスの程度に依存して、細胞周期停止やDNA修復、老化、静止、アポトーシスまたは他の種類の細胞死といった細胞運命決定を調節する。DNA二本鎖の破断は、核から細胞質へのシグナル伝達カスケードを誘導し、最終的にサイトカイン誘発NF-B活性化と同様にしてIKK活性化を引き起こす(Stilmann他;2009)。

【0018】

遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化は、二分岐経路により媒介される(図1)。2つの独立の分子センサーATM(血管拡張性失調症遺伝子)とPARP1[ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ-1]は、DNAの損傷を認識し、DDRを開始させる。PARP1とATMの両者は、ストレス応答の開始からDNA損傷修復の促進に至るまでDDRにおいて様々な機能を果たす。最も顕著なキナーゼATMの基質は腫瘍抑制タンパク質p53であり、これはその標的遺伝子の制御により抗増殖性機能を発揮する。わずかな程度のDNA損傷は、その損傷が消失するまで、可逆的細胞周期停止をもたらす。修復不可能な程度のDNA損傷は、より広範な細胞応答を引き起こす。悪性形質転換

10

20

30

40

50

に対して生物体を保護するために、病的細胞は、細胞老化と呼ばれる非増幅性状態に不可逆的に突入するか、またはアポトーシスを受ける (Shiloh & Ziv; 2013)。

【 0 0 1 9 】

D S B s の誘導は、自己リン酸化により A T M の活性化をもたらし、そして P A R P 1 によるポリ (A D P - リボース) (P A R) の合成を引き起こし、これが足場機能を有すると思われる。続いて、 P A R P 1 の活性化は、センサータンパク質である A T M と P A R P 1 並びに S U M O (ユビキチン類似因子 small ubiquitin-related modifier) 、 E 3 - リガーゼ P I A S y (活性化 S T A T のタンパク質阻害剤) 、 L R P 1 6 / M A C R O D 1 、および I K K 複合体サブユニット I K K を含有する核シグナロソームの形成をもたらす (Stilmann他; 2009; Wu他、 2015)。

10

【 0 0 2 0 】

遺伝毒性ストレスの誘導と同時に、 I K K は核インポーター I P O 3 (importin3) と相互作用することにより核内に移行され、自己 P A R 化 P A R P 1 に結合することによりシグナロソームに取り込まれる。 I K K は A T M によりリン酸化され、 P I A S y により S U M O 化される。

【 0 0 2 1 】

続いて、 I K K は細胞質に移行し、十中八九新しく形成された I K K ホロ複合体 (holocomplex) 中に取り込まれる。同時に、リン酸化された A T M が C a ²⁺ 依存性方式で細胞質に移行し、細胞質シグナロソームの形成を開始させる (Hinz他; 2010)。 A T M は T R A F 6 を活性化して、 U b c - 1 3 媒介 K 6 3 結合ポリユビキチン化をもたらし、これは c I A P 1 と T A B 2 - T A K 1 リクルートおよび続発の T A K 1 活性化のための足場として機能し、そして I K K の直鎖状ユビキチン化をもたらし、これは直鎖状ユビキチン結合複合体 (L U B A C) により達成される。細胞状況と刺激剤の種類に依存して、追加の調節成分 (E L K S 、 X I A P または R I P 1) がこの経路の活性化に参加すると提唱されている。最後に、 I K K の c I A P 1 - 依存性モノユビキチン化は、本質的に、 I K K 複合体の活性化、 I B 分解およびその後の N F - B 活性化のために核と細胞質のシグナロソーム形成を必要とする (Hinz他; 2010)。

20

【 0 0 2 2 】

遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 経路は、生理学的に起こる D N A 損傷または治療により誘発される D N A 損傷のいずれかによる細胞の生存促進 (pro-survival) シグナル伝達の主な調節因子である。従って、遺伝毒性ストレスにより誘導されるおよび D D R により誘導される I K K / N F - B 活性化は、発育、遺伝病、加齢および癌をはじめとする多くの状態のアウトカム (転帰) に影響を与える。

30

【 0 0 2 3 】

悪性 N F - B 活性化は、発癌を促進する炎症に関連があり、これは炎症性サイトカイン分泌の結果として増殖性環境を維持することによる腫瘍形成の推進力である (Hanahan & Weinberg; 2011)。更に、 N F - B は、標的遺伝子の転写調節を通して細胞増殖、血管形成および転移に影響を及ぼし得る (Baud & Karin; 2009)。構成的に活性化される N F - B が、ある種のヒト癌並びに造血系およびリンパ系悪性から誘導された腫瘍細胞系、例えば多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、 T 細胞リンパ腫およびボジキンリンパ腫から誘導された腫瘍細胞系において見つかっている。同様に、上昇した N F - B 活性化が、黒色腫細胞、肺癌細胞、膀胱癌細胞、乳癌細胞および膵臓腺癌細胞において認められた。

40

【 0 0 2 4 】

また、 N F - B による発癌の促進は、減弱された細胞死シグナル伝達に関連付けられる。 T N F 誘発 N F - B 活性化は、抗アポトーシス遺伝子発現の調節においておよび結果的にアポトーシスの阻害において役割を果たしている。同様に、遺伝毒性ストレス活性化 N F - B 経路は、抗アポトーシスタンパク質、例えば c I A P 1 、 c I A P 2 の発現を調節することが示された。加えて、 N F - B は A 1 / B f 1 - 1 の発現を調節し、 A 1 / B f 1 - 1 はチトクロム c のミトコンドリア放出を阻害することによりエトポシド

50

誘発細胞死を強力に抑制した。重要なことに、その抗アボトーシス活性に基づいて、遺伝毒性ストレスによるNF- κ B活性化が癌療法耐性に強く寄与すると思われ、かくしてNF- κ Bシグナル伝達の阻害が化学増感をもたらすかもしれない(Lim他;2012)。

【0025】

NF- κ B経路の活性化は、発癌と癌治療耐性機序の推進力であると考えられるので、化学療法処置のための状況依存性の有用なアジュvantとして薬理学的阻害が示唆されている。プロテアソーム阻害剤が最初に用いられたNF- κ B経路阻害剤であった。しかしながら、プロテアソーム阻害剤は、不確定な分子特異性を有し、古典的および非古典的NF- κ B経路を標的とする。何故なら両シグナル伝達カスケードとも分解またはプロセシング機能に頼っているからである。プロテアソーム阻害剤による患者処置の用量制限毒性作用は、末梢神経障害、血小板減少症、好中球減少症、貧血、疲労および下痢を包含する。一般的なIKK/NF- κ B経路阻害は、その多面的機能ゆえに全身毒性と重篤な副作用を引き起こす(Baud & Karin; 2009)。

【0026】

癌は無制御な細胞増殖に関係があり、癌治療は、放射線療法または化学療法による処置を通して、DNA損傷の誘導により望ましくない細胞分裂と増殖を停止させることに重点的に取り組んでいる。よって、化学療法や放射線療法のようなDNAを損傷させる癌治療は、DNA損傷応答(DDR)の一部として、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B経路の活性化を触発する。結果として、IKK/NF- κ B経路は、老化、遺伝的疾患、再灌流傷害、発作、神経変性および酸化ストレス誘発DNA損傷といった他の状態の他に、新規なタイプの癌治療の潜在的標的であると考えられる。それにもかかわらず、IKK/NF- κ B経路の一般的な阻害は、IKKとNF- κ Bの多向性機能ゆえに広域の免疫抑制と重篤な副作用を引き起こし、従って患者に治療方針として適用できない。

【0027】

WO 2007/097981 A2は、癌の治療用としてIKK阻害剤としての-カルボリンを記載している。IKKの経路特異的阻害は全く記載されていない。

Hsu MJ他(Biochemical Pharmacology, Elsevier, US, 第70巻、第1号、2005年7月1日)は、癌の一般的治療のための本明細書に開示されるのと同様な分子の使用を記載している。

【0028】

WO 2011/011186 A2には、癌の治療に用いられる、本発明の化合物と同様である阻害剤の群が開示されている。

Du Hongtao他(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Pergamon, Amsterdam, NL, 第26巻、第16号、2016年7月1日)は、潜在的抗癌剤としてのN9-置換ハルミン誘導体の合成と生物学的評価を記載している。

【0029】

Lin Yi-Chien他(European Journal of Medicinal Chemistry, 第110巻、2016年1月7日)は、結腸直腸癌細胞に対して高い細胞傷害活性を有する新規3,9-置換[]-カルボリン誘導体の合成と、その構造-活性相関を開示している。

EP 1634881 A1は、放射線療法と併用して癌療法で使用される、-カルボリンをベースにした分子を記載している。

【0030】

Chen他(International Journal of Cancer, 第114巻、第5号、2005年5月1日)は、新規ハルミン誘導体の抗腫瘍作用と神経毒性作用、並びにその構造-活性相関分析を記載している。

Lamchouri他(Research on Chemical Intermediates, 第39巻、第5号、2012年8月15日)は、抗腫瘍および神経毒性[]-カルボリンアルカロイドの定量的構造-活性相関を研究している。

【0031】

Zhang他(European Journal of Medicinal Chemistry, 第65巻、21-31頁)は、

10

20

30

40

50

新規抗腫瘍剤としてのN 2 - アルキル化第四級〔 〕 - カルボリンの合成とその構造 - 活性相関を記載している。

Willemann他 (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第17巻、第13号、7月1日) は、5, 6 - 芳香族複素環付加ピリジン - 2, 4 - ジアミンの合成と細胞傷害活性を開示している。

【0032】

Rocca他 (ChemMedChem, 第11巻、第16号、2016年3月23日初版) は、ファーマコフォア (薬理作用団) 構造をベースにしたバーチャルスクリーニングとドッキング改善との組み合わせによる、h-telo/c-myc G - 四量体のための新規双方向性結合剤のhit識別を記載している。識別された分子の癌治療への使用が示唆されている。

Almerico他 (Journal of Molecular Graphics and Modelling, 第42巻、2013年3月19日) は、A3アデノシン受容体の潜在的阻害剤を記載している。

【0033】

Silva他 (Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012, 1372-1379頁) は、C-2位にN - (置換ベンジリデン)カルボヒドラジド基とN - アルキルカルボキサミド基を有するベンゾ[4,5]カンチン - 6 - オンの合成、抗腫瘍活性、抗トリパノソーム活性および抗リシューマニア活性を記載している。

Lamkanfi他 (The Journal of Cell Biology, 第173巻、第2号、2006年4月17日) は、NF - Bのカスパーゼ媒介活性化の機序を要約している。

Jin他 (Cancer Research, 第69巻、第5号、2009年2月10日) は、cIAP1、cIAP2およびXIAPが遺伝毒性ストレスにより誘導される核因子B活性化を調節する非冗長経路を介して協調的に作用することを示している。

【0034】

引用した文書のいずれも、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF - B活性化を示す癌を患っている対象者のまたは遺伝毒性癌治療がIKK/NF - B活性化を誘導するような対象者の処置において特異的に医薬として用いられる化合物を開示していない。技術の現状では、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF - B経路に特異的に作用するが、IKKを直接には阻害せず、かつIKK/NF - B活性化をもたらす他の経路を未影響にしておくような化合物を全く記載していない。更に、本発明の化合物は従来技術において全く記載されていない。

【0035】

よって、新しいクラスの経路依存性阻害剤であって、刺激剤特異的NF - B活性化のみを妨害し、他のNF - B活性化形式は無傷にしておくような新規阻害剤を開発する必要がある。癌治療耐性機序におけるNF - Bの重要な役割を考慮すると、遺伝毒性ストレスにより誘導されるプロIKK/NF - B経路を照準にしたターゲット療法を開発する緊急の必要性がある。本発明者らの知る限り、この経路に特異的なNF - B阻害剤は今までに1つも報告されていない。

従来技術に照らして、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF - B活性化に関連した疾患の治療のための追加の手段を提供することが依然として当業界で重要な責務である。

【発明の概要】

【0036】

従来技術に鑑みて、本発明に内在する技術的課題は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF - B活性化に関連した疾患の治療のための追加の手段を提供することである。

この課題は、独立請求項の特徴により解決される。本発明の好ましい実施形態は従属請求項により提供される。

【0037】

本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF - B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式I:

10

20

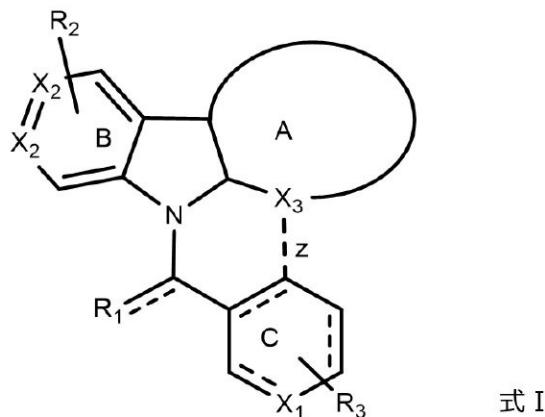
30

40

50

【0038】

【化1】



10

【0039】

〔上式中

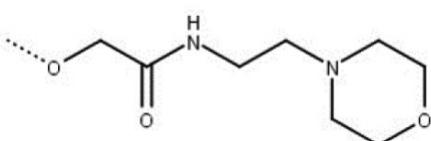
R1はHまたはOであり；

R2は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいはR2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0040】

【化2】



30

【0041】

(OCH2CONHCC2H4NC4H8O)またはOC2H4OC2H4NH2であり；

R3は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成し、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含むことができ；

X1、X2、X3はNまたはC原子であり、好ましくはC原子であり；

環Aは5または6員の芳香族環構造であり、該環構造は任意にOおよび/またはNから選択されたヘテロ原子を0、1または2個含み、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、

40

ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えばCONHCC3H6OCH3から選択された、同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがあり；

結合zは存在してもしなくてもよく、ここで結合zが存在しない場合：

環Cの結合zのC原子がR3で置換され、かつ

50

環 A の X 3 が H、O H、ハロゲン、好ましくは B r、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンで置換される] により表される化合物に関する。

【0042】

好ましい実施形態では、式 I の化合物が、0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 つが H でないことにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 I の化合物が、X 3 が C 原子であることにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 I の化合物が、R 1 = O 原子であることにより特徴づけられる。

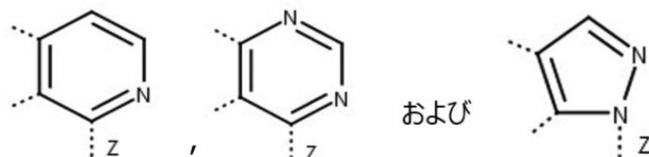
好ましい実施形態では、式 I の化合物が、環 A が 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む 5 員または 6 員の芳香族複素環構造であることにより特徴づけられる。

【0043】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I KK / NF - B 活性化に関連した疾患の治療において医薬として使用される、式 I の化合物であって、ここで環 A が

【0044】

【化 3】



10

20

【0045】

からなる群より選択された芳香族複素環構造である化合物に関する。

【0046】

好ましくは、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I KK / NF - B 活性化を示す癌を罹患している対象者の治療において医薬として用いられる式 I の化合物に関する。

30

【0047】

全く驚くべきことに、DNA 損傷のような遺伝毒性ストレスを受けると活性化される I KK / NF - B 活性化に至る経路を選択的に阻害する化合物を発見した。そのような化合物を同定するためのあらゆる試みは今まで不成功であり、NF - B 経路阻害は主に I KK 複合体の直接ターゲティングにより行われていた。

【0048】

NF - B 経路は多数の作用と機能があり、その全てが I KK に依存しているために、I KK 複合体または他の下流分子の直接阻害が、広域の免疫抑制を含む許容できない副作用を引き起こし、感染の高リスクがあり、かつ癌細胞を免疫学的監視から逃避させてしまう可能性がある。既知 NF - B 経路阻害剤のこれらの欠点は、本発明の方法により、特に式 I、I - a、I - b、II、II - a、II - b、III、III - a、IV、IV - a、V、V I、V II のもとに本明細書中に記載の化合物によって克服される。

40

【0049】

従来技術において、一般的な I KK 阻害剤は記載されている。対照的に、本発明の化合物は I KK / NF - B の経路選択的阻害剤であり、これは I KK に対して直接には作用しない。以前に記載された I KK 阻害剤は直接的 I KK 阻害剤であり、遺伝毒性ストレスにより誘導される I KK - NF - B シグナル伝達と、I KK を通して NF - B を活性化する多数の別の経路とを識別しない。

50

【0050】

式Iの化合物は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B経路の活性化を主に阻害するが、古典的および非古典的経路を含むNF-B活性化の別経路は阻害しない（またはごく小程度に阻害し、大きくは阻害せず、すなわち遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B経路と同じ程大きくは阻害しない）。従って、それらの化合物により示される阻害は、この経路が別のIKK/NF-B経路よりも大きく阻害されるように、「遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B経路に特異的」である。この選択的阻害は、古典的および非古典的NF-B活性化を含む別のNF-B活性化経路の阻害に起因する副作用を排除または低減させることができるという利点を有する。このため、数日間、数週間または数年間でさえも延長された期間に渡り、本明細書中に記載されるような一般式の化合物での処置を許容できるようになり、それにより技術の現状で既知の手段を上回る新規臨床的状況を提供する。従って新規投薬レジメンが可能である。

10

【0051】

本発明者らの知るところでは、本明細書に記載の化合物は、新規技術的効果、すなわち遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B活性化の阻害により定義される。

【0052】

本発明化合物の有利な効果は、IKK/NF-B経路の活性化の阻害を通して媒介され、この阻害は、独特なタンパク質間相互作用（核PARP1シグナロソーム）、翻訳後修飾（IKKのSUMO化とリン酸化）、輸送過程（細胞質ATMインポート）あるいはDNA DS Bのまたは遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-Bシグナル伝達力スケードの他の特別な成分（これは任意の別のNF-B経路の活性化に関与しないかまたは該経路と共有しない）による機能的妨害を通して遺伝毒性ストレスまたは二本鎖切断（DSB）に応答して起こる。

20

【0053】

驚くべきことに、本明細書に記載の前記式の化合物は、マイクロモル以下の濃度で遺伝毒性誘発NF-B活性化を阻害するのに効果的であり、その一方で古典的NF-B経路の阻害は全く検出できなかった。本明細書に開示される化合物での処置の驚くべき重大な利点は、それらが、酵素活性に影響を与えることなく、ATMの核外輸送とPARP1シグナロソームの形成の両方を阻害したという点である。このことは、本発明の化合物によるATMとPARP1の下流のシグナル伝達力スケードの阻害が、NF-B活性化に特異的であり、かつ腫瘍抑制タンパク質p53のような別のATM基質の活性化を妨害せず、ゆえにATMとPARP1の他の機能の妨害から生じる副作用の発生を予防するため、本発明の重大な利点である。式Iの化合物での処置の別の利点は、アポトーシスの増加をもたらす、抗アポトーシス遺伝子の発現の減少であり、これは例えば癌の場合に有益である。

30

【0054】

従って、本発明の化合物により達成される技術的効果は、新規患者群の治療、例えばNF-B阻害のオフターゲット（off target）副作用に対して以前に感受性であった患者群の治療、または特にDNA損傷性癌治療に対し耐性を示す癌状態を有する患者の治療を可能にする。この特定の患者集団は医療従事者に大きな課題を提示し、本明細書に記載の化合物はこの課題への有力な解決手段である。

40

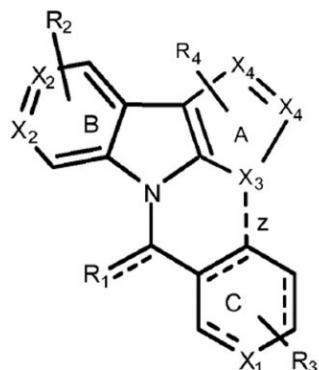
【0055】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式I-aの化合物：

【0056】

50

【化4】



式 I - a

10

【0057】

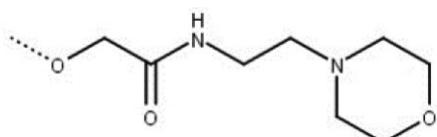
〔上式中

R 1 は H または O 原子であり；
 R 2 は 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、
 C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいは R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0058】

【化5】



【0059】

30

または O C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり；

R 3 は 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、
 C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいは、2 つの（隣接）R 3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

R 4 は 0 ~ 2 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、
 C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミン、アリールであり；

40

X 1、X 2 は N または C 原子であり、好ましくは C であり；

X 3 は N 原子であり；

X 4 は N または C 原子であり、好ましくは 1 個だけの X 4 が N であり；

結合 z は存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の C 原子が R 3 で置換され、かつ

環 A の X 3 が H、C 1 ~ C 7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミン、アリールで置換される】
 に関する。

【0060】

50

好ましい実施形態では、式 I - a の化合物は、R 4 が 0 ~ 2 個の、同一でも異なっても

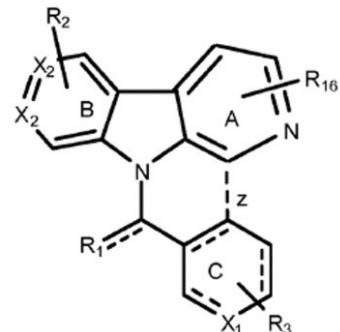
よい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル(任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される)、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル(任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される)、アルコキシアミン、例えばCONHC3H6OCH3から選択されることにより特徴づけられる。

【0061】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式I-bの化合物：

【0062】

【化6】



式I-b

10

20

【0063】

〔上式中〕

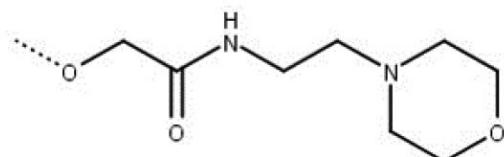
R1はHまたはO原子であり；

R2は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいはR2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0064】

【化7】

30



【0065】

またはOC2H4OC2H4NH2であり；

R3は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの(隣接)R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含むことができ、

X1、X2はNまたはCであり、好ましくはCであり；

R16は0～3個の、好ましくは0、1、2個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C7、好ましくはC1～C5のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

40

50

結合 z は存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の C 原子が R 3 で置換され、かつ

環 A の結合 z の C 原子が H、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミン、アリールで置換される】

に関する。

【0066】

好ましい実施形態では、式 I - b の化合物は、0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 つが H でないことにより特徴づけられる。

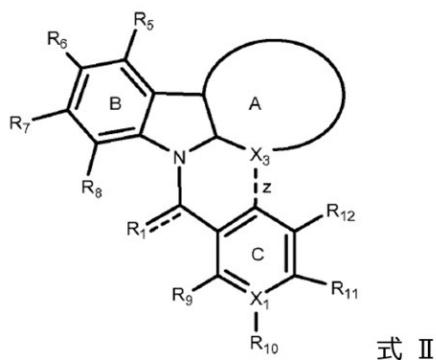
好ましい実施形態では、式 I - b の化合物は、R 1 = O 原子であることにより特徴づけられる。

【0067】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される N F - B 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I I の化合物：

【0068】

【化 8】



10

20

【0069】

〔上式中

30

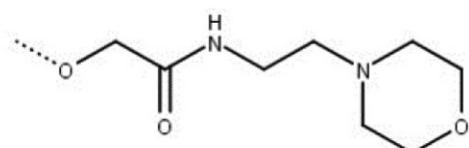
R 1 は H または O 原子であり；

R 5 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br、F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルケニル、アルコキシ、アミン、最も好ましくは H であり；

R 6 は H、OH、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、またはアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0070】

【化 9】



40

【0071】

または O C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり；

R 7 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 8 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくは H であり；

50

R 9 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 10 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 11 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R 12 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであるか；

あるいは、X 1 が C である場合、R 9 と R 10、R 10 と R 11、R 11 と R 12、または R 12 と環 C の結合 z の位置にある C 原子とが、任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

X 1 と X 3 は N または C 原子であり；

環 A は 5 員または 6 員の芳香族環構造であり、該環構造は任意に O および / または N 原子から選択されたヘテロ原子を 0、1 または 2 個含み、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、

ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば CO - フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C 1 ~ C 3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば CONH C 3 H 6 O C H 3 から選択された、同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることあり；

結合 z は存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の位置にある C 原子がハロゲン、好ましくは C 1、Br、F、C 1 ~ C 5、好ましくは C 1 ~ C 3 アルキルで置換され、かつ

環 A の X 3 が任意に H、C 1 ~ C 5、好ましくは C 1 ~ C 3 アルキルで置換されるか、または X 3 が場合により H、C 1 ~ C 5、好ましくは C 1 ~ C 3 アルキル、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 または F を有する C 原子である】

に関する。

【0072】

好ましい実施形態では、式 II の化合物は、R 5 ~ R 8 の少なくとも 1 つが H でないことにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 II の化合物は、X 3 が C 原子であることにより特徴づけられる。

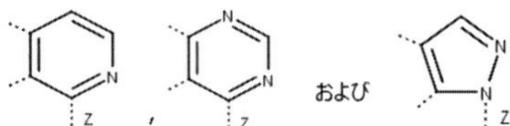
好ましい実施形態では、式 II の化合物は、R 1 が O 原子であることにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 II の化合物は、環 A が 1 個または 2 個のヘテロ原子を含む 5 員または 6 員の芳香族複素環構造であることにより特徴づけられる。

環 A は、

【0073】

【化 10】



からなる群より選択された芳香族複素環構造である。

10

20

30

40

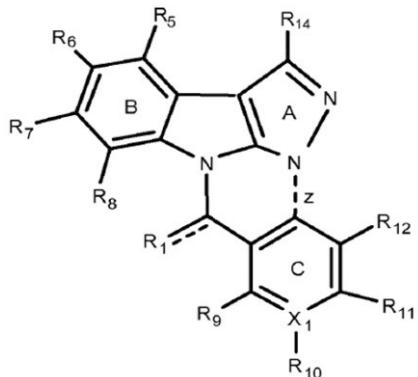
50

【0074】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式II-aの化合物：

【0075】

【化11】



式II-a

10

【0076】

〔上式中〕

20

X1はCまたはN原子、好ましくはCであり；

R1はHまたはO原子であり；

R5はH、ハロゲン、好ましくはC1、Br、F、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R6はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、またはOC2H4OC2H4NH2であり；

R7はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R8はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R9はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはFであり；

R10はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R11はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R12はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであるか；

あるいは、X1がC原子である場合、R9とR10、R10とR11、R11とR12、またはR12と環Cの結合zの位置にあるC原子（結合zが存在しない場合）とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子、より好ましくは2個のO原子を含み、あるいはフェニルを形成することができ；

R14はH、C1～C5、好ましくはC1～C3アルキルであり；

結合zは存在してもしなくてもよく、ここで結合zが存在しない場合：

環Cの結合zの位置にあるC原子がH、ハロゲン、好ましくはC1、Br、F、C1～C5、好ましくはC1～C3アルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシで置換され、かつ

環Aの結合zのN原子がH、C1～C5、好ましくはC1～C3アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、アルコキカルボニル、アミン、アリールで

30

40

50

置換される】

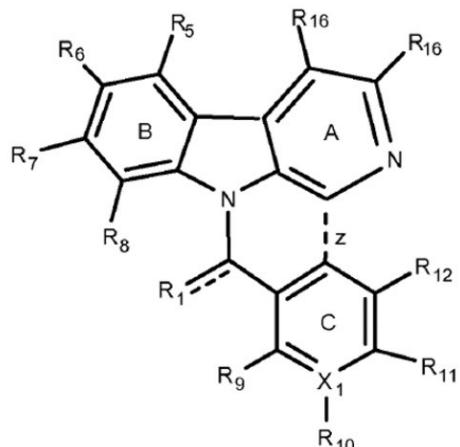
に関する。

【0077】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式II-bの化合物：

【0078】

【化12】



式 II-b

10

20

【0079】

〔上式中

X1はCまたはN原子、好ましくはCであり；

R1はHまたはO原子であり；

R5はH、ハロゲン、好ましくはC1、Br、F、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R6はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、またはOC2H4OC2H4NH2であり；

R7はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R8はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R9はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはFであり；

R10はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R11はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R12はH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R16は同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであるか；

あるいは、X1がC原子である場合、R9とR10、R10とR11、R11とR12、またはR12と環Cの結合zの位置にあるC原子（結合zが存在しない場合）とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子、より好ましくは2個のO原子を含み、ある

30

40

50

いはフェニルを形成し；

R 1 4 は H、C 1 ~ C 5、好ましくは C 1 ~ C 3 アルキルであり；

結合 z は存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の位置にある C 原子が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br、F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシで置換され、かつ

環 A の結合 z の C 原子が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミン、アリールで置換される]

に関する。

10

【0080】

好ましい実施形態では、式 III - b の化合物は、R 5 ~ R 8 の少なくとも 1 つが H でないことにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 III - b の化合物は R 1 = O であることにより特徴づけられる。

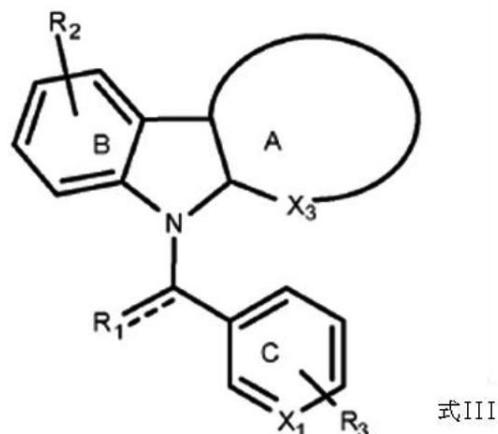
【0081】

本発明の更なる態様は、式 III の化合物、好ましくは本明細書に記載されるようなそれの医学的用途に関する。

【0082】

【化13】

20



30

【0083】

上式中、式 III の置換基は次の通りである：

R 1 は H または O 原子であり；

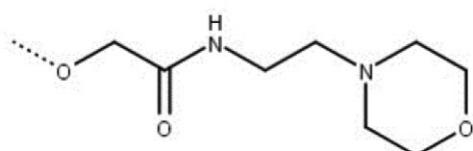
R 2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

40

あるいは、R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0084】

【化14】



【0085】

50

または $O C_2 H_4 O C_2 H_4 N H_2$ であり；

R_3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成し、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成し；

X_1 、 X_3 は N または C であり；

環 A は 1 個または 2 個の N 原子を含む 5 員の芳香族複素環構造であり、ここで X_3 は N 原子でなければならず、好ましくはピラゾリル環またはイミダゾリル環を形成し；

あるいは環 A は 1 個の N 原子を含む 6 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピリジル環を形成し、

ここで環 A の環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば C_0 -フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば $C_0 N H C_3 H_6 O C H_3$ から選択された、同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることがある。

【0086】

一実施形態では、前の段落において言及した置換基は、 R_2 がカルボキシルでないことにより特徴づけられ、ここで残りの置換基は前の段落において言及したものと同じである。

【0087】

好ましい実施形態では、式 III の化合物は、0 ~ 4 個の R_2 のうちの少なくとも 1 つが H でないことにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 III の化合物は、 X_3 が C 原子であることにより特徴づけられる。

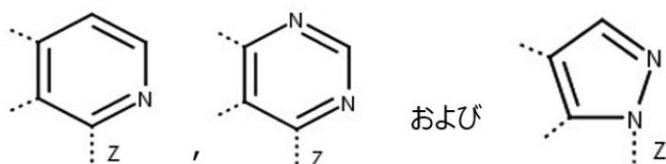
好ましい実施形態では、式 III の化合物は、 R_1 が O 原子であることにより特徴づけられる。

【0088】

好ましい実施形態では、式 III の化合物は、環 A が下記：

【0089】

【化15】



および

【0090】

からなる群より選択された芳香族複素環構造であることにより特徴づけられる。

【0091】

本発明の更なる態様は、式 III-a の化合物、および好ましくは本明細書に記載されるようなその医学的用途に関する：

【0092】

10

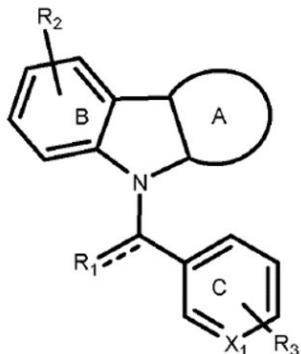
20

30

40

50

【化16】



式 III-a

10

【0093】

上式中

R1はHまたはOであり；

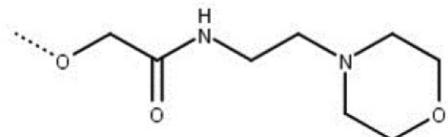
R2は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであり、

あるいは、R2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0094】

【化17】



【0095】

30

またはOC2H4OC2H4NH2であり；

R3は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成し、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含むことができ、またはフェニルを形成し；

X1、X3はNまたはCであり；

環Aは1個または2個のN原子を含む5員または6員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えばCONHC3H6OCH3から選択された、同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがある。

40

【0096】

一実施形態では、前の段落において言及した置換基は、R2がカルボキシルでないことにより特徴づけられ、ここで残りの置換基は前の段落において記載したものと同じである。

50

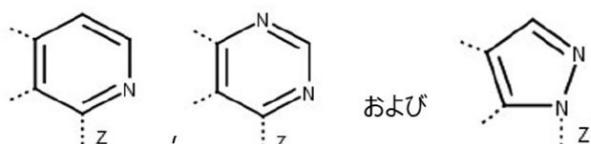
好ましい実施形態では、式 I I I - a の化合物は、0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 個が H でないことにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 I I I - a の化合物は、R 1 が O 原子であることにより特徴づけられる。

好ましい実施形態では、式 I I I - a の化合物は、環 A が下記：

【0097】

【化18】



10

【0098】

からなる群より選択された芳香族複素環構造であることにより特徴づけられる。

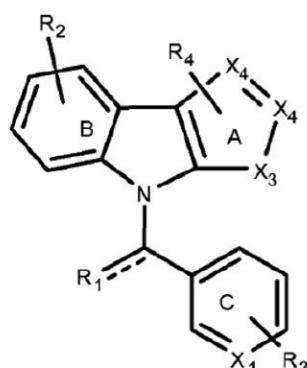
【0099】

本発明の更なる態様は、式 I V の化合物、および好ましくは本明細書に記載のその医学的用途に関する。

【0100】

【化19】

20



30

式 IV

【0101】

上式中、

R 1 は H または O であり；

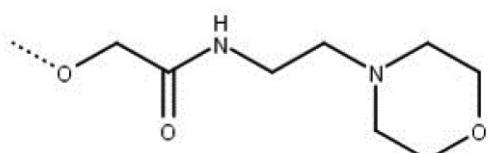
R 2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくは B r、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

40

あるいは、R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0102】

【化20】



【0103】

50

または $\text{O C}_2\text{H}_4\text{O C}_2\text{H}_4\text{N H}_2$ であり；

R_3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成することができ、

X_1 は C または N 原子であり；

X_3 は N 原子であり；

X_4 は N または C 原子であり；

R_4 は、0 ~ 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリールから選択された基であることができる。

【0104】

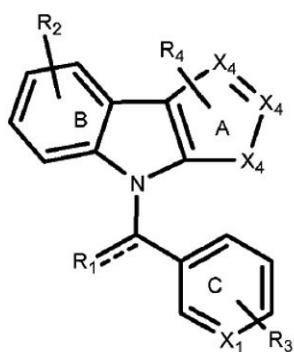
好ましい実施形態では、式 IV の化合物は、 R_4 が、H、O、H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば CO - フェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えば フェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば $\text{CONHC}_3\text{H}_6\text{OCH}_3$ 、から選択された同一でも異なるてもよい 0 ~ 2 個の基であることにより特徴づけられる。

【0105】

好ましい実施形態では、本発明は、式 IV - a の化合物および好ましくは本明細書に記載のその他の医薬的用途に関する：

【0106】

【化21】



式 IV-a

【0107】

上式中、

R_1 は H または O 原子であり；

R_2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なるてもよい、H、O、H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであり、

あるいは、 R_2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0108】

10

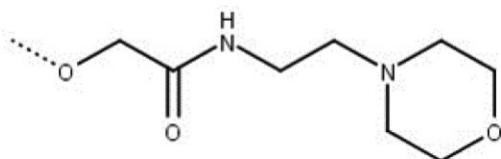
20

30

40

50

【化22】



【0109】

または $\text{OCH}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ であり；

R_3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O 10 H、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成することができ、

X1 は C または N 原子、好ましくは C 原子であり；

X4 は N または C 原子であり、ここで少なくとも 1 つの X4 が N 原子であり；

R_4 は、0 ~ 2 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br 20 、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、カルボキシカルボニル、アミン、アリールから選択された基であることができる。

【0110】

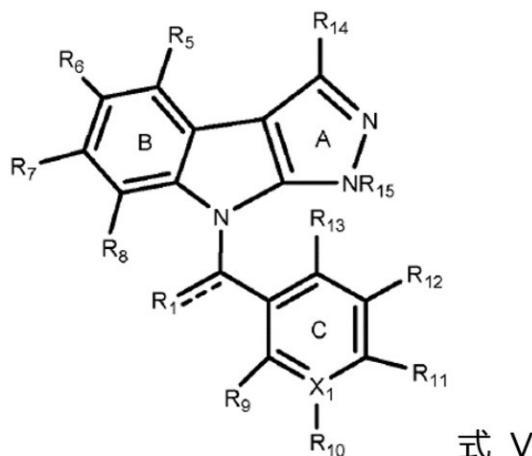
好ましい実施形態では、式 IV-a の化合物は、 R_4 が、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば CO-フェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば CONHC3H6OCH3、から選択された同一でも異なるてもよい 0 ~ 2 個の基であることにより特徴づけられる。

【0111】

好ましい実施形態では、本発明は、式 V の化合物および好ましくは本明細書に記載のそれの医薬的用途に関する：

【0112】

【化23】



式 V

10

20

30

40

50

【0113】

上式中、

X₁はCまたはN原子であり；

R₁はHまたはO原子であり；

R₅はH、ハロゲン、好ましくはC₁、Br、F、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R₆はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、またはOC₂H₄OC₂H₄NH₂であり；

R₇はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R₈はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

R₉はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはFであり；

R₁₀はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R₁₁はH、ハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R₁₂はH、ハロゲン、好ましくはBr、C₁もしくはF、C₁～C₅の、好ましくはC₁～C₃のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R₁₃はハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはFであり；

あるいはX₁がC原子である場合、R₉とR₁₀、R₁₀とR₁₁、R₁₁とR₁₂、またはR₁₂とR₁₃とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN、より好ましくは2個のO原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

R₁₄はH、C₁～C₅、好ましくはC₁～C₃アルキルであり；

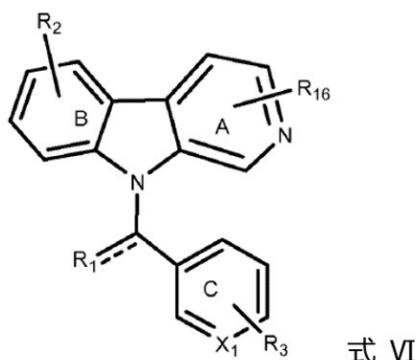
R₁₅は、H、C₁～C₅、好ましくはC₁～C₃アルキル、カルボニル、CO-アリル、好ましくはベンゾイルであり、前記ベンゾイルは、任意によりハロゲン、好ましくはC₁、BrもしくはF、C₁～C₅、好ましくはC₁～C₃アルキル、アルコキシによって置換される。

【0114】

好ましい実施形態では、本発明は、式VIの化合物、および好ましくは本明細書に記載のようなその医学的用途に関する：

【0115】

【化24】



【0116】

上式中、

R₁はHまたはO原子であり；

10

20

30

40

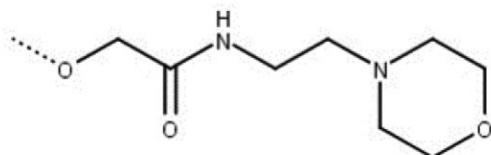
50

R₂ は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C₁ ~ C₇ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであり、

あるいは、R₂ はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0117】

【化25】



10

【0118】

またはOC₂H₄OC₂H₄NH₂ であり；

R₃ は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C₁ ~ C₇ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R₃ 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成し、

X₁ は N または C 原子であり；

R₁₆ は、0 ~ 3 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくは Cl、Br もしくは F、C₁ ~ C₅ の、好ましくは C₁ ~ C₃ のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであることができる。

【0119】

好ましい実施形態では、本発明は、0 ~ 4 個の R₂ の少なくとも 1 つが H ではない、一般式 V I の化合物、および本明細書に記載のようなその医学的用途に関する。

好ましい実施形態では、本発明は、R₁ = O 原子である、式 V I の化合物、および本明細書に記載のようなその医学的用途に関する。

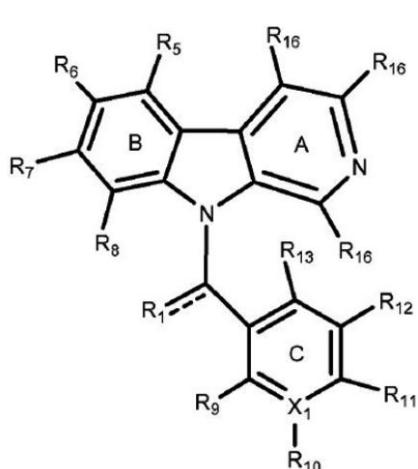
30

【0120】

好ましい実施形態では、本発明は、式 V I I の化合物、および好ましくは本明細書に記載のその医薬的用途に関する：

【0121】

【化26】



式 VII

40

50

【0122】

上式中、

X 1 は C または N 原子であり；

R 1 は H または O 原子であり；

R 5 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくは H であり；

R 6 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、または OC₂H₄OC₂H₄NH₂ であり；

R 7 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 8 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくは H であり；

R 9 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F であり；

R 10 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 11 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R 12 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 13 は H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F であり；

あるいは X 1 が C 原子である場合、R 9 と R 10、R 10 と R 11、R 11 と R 12、または R 12 と R 13 とが、任意に 5 個もしくは 6 個の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

R 16 は同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシである。

【0123】

本発明の更なる態様は、式 V I I の置換基が下記のものである、式 V I I の化合物または本明細書に記載のようなその医学的用途に関する：

X 1 が C または N 原子であり；

R 1 が H または O 原子であり；

R 5 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくは H であり；

R 6 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、または OC₂H₄OC₂H₄NH₂ であり；

R 7 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 8 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくは H であり；

R 9 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F であり；

R 10 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 11 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R 12 が H、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 13 が H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F であり；

10

20

30

40

50

あるいはX1がC原子である場合、R9とR10、R10とR11、R11とR12、またはR12とR13とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成し、該環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子、より好ましくは2個のO原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

R16が同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

ここでR16がメチルである場合、環Cが唯一のC1原子で置換される。

【0124】

好ましい実施形態では、R5～R8の少なくとも1つがHでない、式VIIの化合物および好ましくは本明細書に記載のようなその医学的用途に関する。 10

好ましい実施形態では、R1=O原子である、式VIIの化合物、および好ましくは本明細書に記載のようなその医学的用途に関する。

【0125】

好ましい実施形態では、本発明の化合物は表1に与えられる化合物群より選択される。好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B活性化に関連した疾患の治療における医薬としての表1の化合物に関する。

【0126】

【表1-1】

表1：本発明の化合物

構造	ID	実施例	IUPAC	MS(ES+) [M+H]: m/e
	D12	11	(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)(4-メトキシフェニル)メタノン	333
	D11	10	(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)(フェニル)メタノン	303
	D06	6	9-(3,4-ジクロロベンジル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール	357/359 ジクロロパターン
	D13	12	ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)メタノン	347
	D04	4	9-ベンジル-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール	319

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	D07	7	9-((6-ブロモベンゾ[<i>d</i>][1,3]ジオキソール-5-イル)メチル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール	411/413 ブロモパターン
	D01	1	9-(2-クロロベンジル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール	323
	D16	17	5,6,11,12-テトラメトキシ-8H-ベンゾ[<i>c</i>]インドロ[3,2,1- <i>ij</i>][1,5]ナフチリジン-8-オン	391
	D15	14	(2-クロロピリジン-3-イル)(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール-9-イル)メタノン	338
	D02	2	9-(2-クロロベンジル)-7-メトキシ-1-メチル-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール	337
	D05	5	9-ベンジル-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール	289
	D18	8	9-(2-ブロモ-5-メトキシベンジル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール	397/399 ブロモパターン
	D03	3	3-メトキシ-4-((6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール-9-イル)メチル)安息香酸	363
	D17	15	(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4- <i>b</i>]インドール-9-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン	353
	D09	24	5-(ピリジン-3-イル)フェナントリジン-6(5H)-オン	273

10

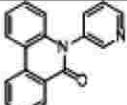
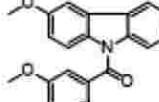
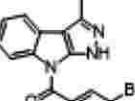
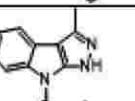
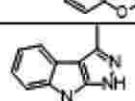
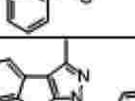
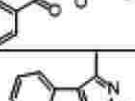
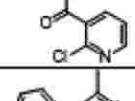
20

30

40

50

【表 1 - 3】

				
	D14	13	(2-ブロモ-5-メトキシフェニル)(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)メタノン	411/413 (ブロモパターン)
		18	(3-ブロモフェニル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン	354/356 ブロモパターン
		19	(4-メトキシフェニル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン	323
		20	(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)(フェニル)メタノン	276
		21	(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス(フェニルメタノン)	380
		22	(2-クロロピリジン-3-イル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン	311/313 クロロパターン
		23	(2-ブロモ-6-クロロフェニル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン	388/390 同位体パターン

【0127】

更なる実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる化合物であって、表1または表2に提供される化合物群から選択される化合物に関する。

【0128】

10

20

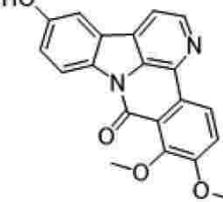
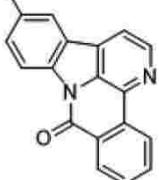
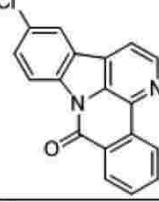
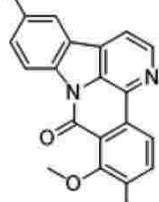
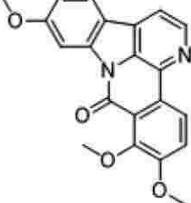
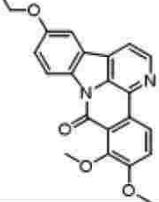
30

40

50

【表 2 - 1】

表2：医薬として用いられる本発明の化合物

構造	実施例	IUPAC	[M+H]: m/e
	45 (ID MW01)	12-ヒドロキシ-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	347
	C3	12-メチル-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	285
	C4	12-クロロ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	305
	C2	12-フルオロ-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	349
	C1	6,7,11-トリメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	361
	B7	6,7-ジメトキシ-12-プロポキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	389

10

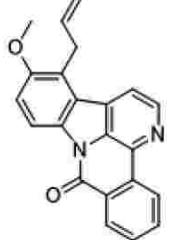
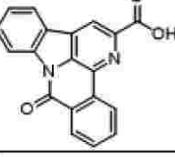
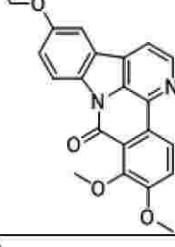
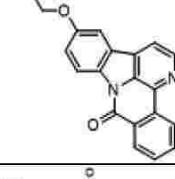
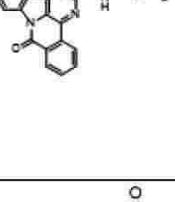
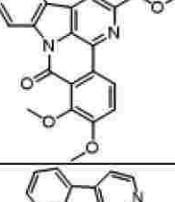
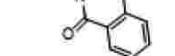
20

30

40

50

【表 2 - 2】

	C5	13-アリル-12-メトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	341
	A5	8-オキソ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボン酸	315
	B5	12-エトキシ-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	375
	B4	12-ブトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	343
	A7	N-(3-メトキシプロピル)-8-オキソ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボキサミド	386
	A4	6,7-ジメトキシ-8-オキソ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボン酸メチル	389
	A6 (= Ex. 16; ID: D10)	8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	271

10

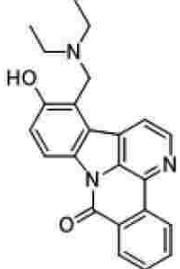
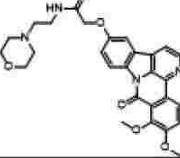
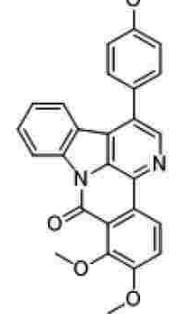
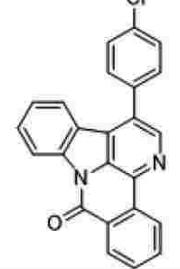
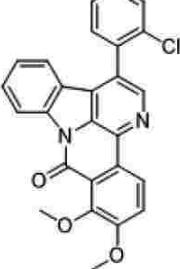
20

30

40

50

【表 2 - 3】

	B2	13-((ジエチルアミノ)メチル)-12-ヒドロキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	372
	B3	2-((6,7-ジメトキシ-8-オキソ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-12-イル)オキシ)-N-(2-モルホリノエチル)アセトアミド	517
	A3	6,7-ジメトキシ-1-(4-メトキシフェニル)-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	437
	A1	1-(4-クロロフェニル)-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	381
	A2	1-(2-クロロフェニル)-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	441

10

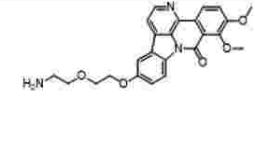
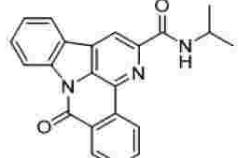
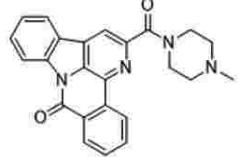
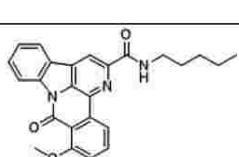
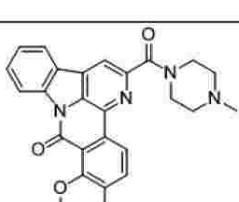
20

30

40

50

【表 2 - 4】

		12-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	434
	A8	N-イソプロピル-8-オキソ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボキサミド	356
	B1	2-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	397
	B6	6,7-ジメトキシ-8-オキソ-N-ペンチル-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボキサミド	444
	B8	6,7-ジメトキシ-2-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	457

10

20

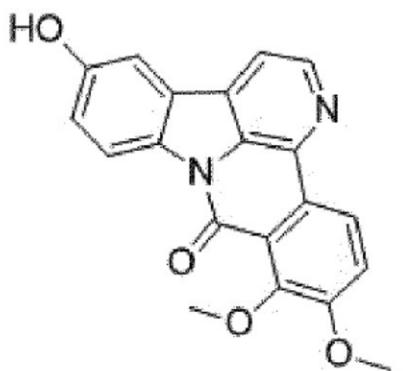
30

【0129】

好ましい実施形態では、本発明は、上記態様のいずれか1つに従った医薬として用いられる化合物であって、

【0130】

【化27】



40

である化合物に関する。

【0131】

本発明の更に好ましい実施形態では、式I～VIIが、図12(D)に開示されるよう

50

な環構造 B または C により規定されうる。それらの好ましい構造を式 I ~ V I I の 1 または複数の中に組み込むことができるが、一方でその式の残りの置換基は好ましくは上記に開示されたもののままである。

【 0 1 3 2 】

本発明の別の好ましい実施形態では、治療すべき疾患は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 活性化に関連するものである。

本発明の別の好ましい実施形態では、治療すべき疾患が癌である。

【 0 1 3 3 】

本発明の別の好ましい実施形態では、癌が、遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 活性化に関連する。

10

【 0 1 3 4 】

本発明の別の好ましい実施形態では、当該化合物は、T N F - および / または I L - 1 により誘導される N F - B シグナル伝達を阻害することに比較して、遺伝毒性ストレスにより誘導される N F - B シグナル伝達を阻害することにおいてより一層効果的である。この特徴は、当該化合物の定義のためにおよび従来技術に記載の別の化合物からの区別のために適当である、本明細書に記載の化合物の機能的特徴に関連する。

【 0 1 3 5 】

本発明の別の好ましい実施形態は、欠陥のある D N A 修復機序に起因するゲノム不安定性に関連した、疾患の治療に関する。本発明の好ましい実施形態では、D N A 修復機序の欠陥が、1 もしくは複数の D N A 修復遺伝子の遺伝的変化またはエピジェネティック変異に基づいている。

20

【 0 1 3 6 】

本発明の別の好ましい態様では、治療すべき癌が、治療により誘発される腫瘍細胞アポトーシスに対する N F - B 媒介耐性に関連する。

【 0 1 3 7 】

本発明の別の好ましい実施形態では、該化合物が 1 または複数の別の癌治療、このましくは D N A 損傷を誘導する癌治療と併用して投与される。

本発明の好ましい実施形態では、該化合物が放射線療法と併用して投与される。本発明の別の好ましい実施形態では、該化合物が遺伝毒性ストレスにより誘導される化学療法と併用して投与される。

30

【 0 1 3 8 】

本発明の別の好ましい実施形態は、遺伝毒性ストレスにより誘導される N F - B シグナル伝達の阻害のためのインビトロ (in vitro) 法における、好ましくは細胞ベースのアッセイにおける、本発明の化合物の使用に関する。

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の化合物は、D N A 修復機序の阻害のためのインビトロ法において、好ましくは細胞ベースのアッセイにおいて用いられる。

更に、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 活性化に関連した疾患を患っている対象者の治療のための医薬組成物であって、本発明の化合物と医薬的に許容される担体物質を含む組成物に関する。

【 0 1 3 9 】

〔 本発明の更なる実施形態 〕

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I の化合物であって、R 1 が H または O 原子であり；

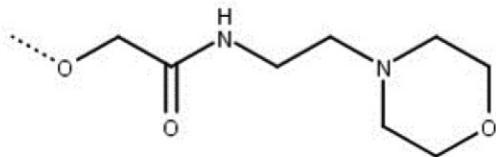
R 2 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは B r、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、または R 2 がアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【 0 1 4 0 】

40

50

【化28】



【0141】

または $O C_2 H_4 O C_2 H_4 N H_2$ であり、ここで $0 \sim 4$ 個の R_2 のうちの少なくとも 1 つが H ではなく；

R_3 が $0 \sim 4$ 個の、同一でも異なってもよい、 H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

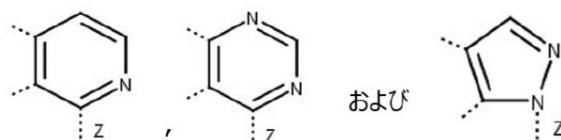
あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

X_1 、 X_2 、 X_3 が N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

環 A が O および N 原子から選択された 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む、5 員または 5 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0142】

【化29】



【0143】

からなる群より選択され、ここで前記環構造は、任意に H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えは $C O$ -フェニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えはフェニル（任意にハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えは $C O N H C_3 H_6 O C H_3$ から選択された、同一でも異なってもよい $0 \sim 3$ 個の置換基で置換されることがあり；

結合 z が存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の C 原子が R_3 で置換され、かつ

環 A の X_3 が H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキカルボニル、アミンで置換される

式 I の化合物に関する。

【0144】

好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される $I K K / N F - B$ 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I の化合物であって、 R_1 が H または O 原子であり；

R_2 が $0 \sim 4$ 個の、同一でも異なってもよい、 H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいは R_2 がアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えは

10

20

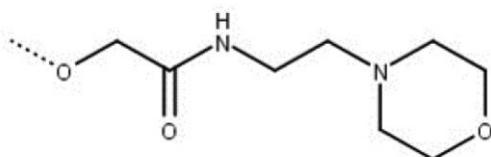
30

40

50

【0145】

【化30】



【0146】

または $O C_2 H_4 O C_2 H_4 N H_2$ であり；

10

R_3 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

X1、X2 が N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

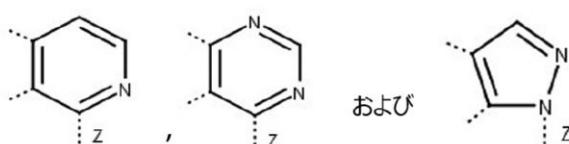
X3 が C 原子であり；

環 A が O および / または N 原子から選択された 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む、5 員または 6 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

20

【0147】

【化31】



【0148】

30

からなる群より選択され、ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば C_6 -フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば $C_6H_5CONHCH_3$ 、から選択された同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることがあり；

結合 z が存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z 上の C 原子が R_3 で置換され、かつ

環 A の X3 が H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンで置換される

40

式 I の化合物に関する。

【0149】

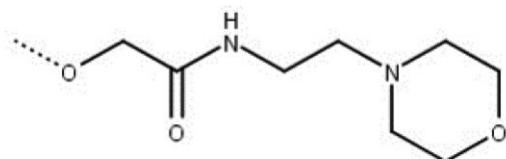
好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I KK / NF-B 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I の化合物であって、 R_1 が O 原子であり；

R_2 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、C1 もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、または R_2 がアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

50

【0150】

【化32】



【0151】

または $\text{OCH}_2\text{CH}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ であり；

R_3 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

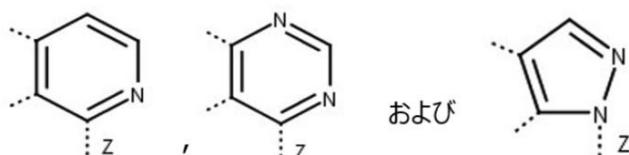
あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

X1、X2、X3 が N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

環 A が O および N 原子から選択された 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む、5 員または 6 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0152】

【化33】



【0153】

からなる群より選択され、ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば CO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1 ~ C3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば CONHC3H6OCH3 から選択された、同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることがあります；

結合 z が存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の C 原子が R_3 で置換され、かつ

環 A の X3 が H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンで置換される

式 I の化合物に関する。

【0154】

好ましい実施形態では、式 I の化合物は、遺伝毒性ストレスにより誘導される IKK/NF-B 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I の化合物であって、

 R_1 が O 原子であり；

R_2 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C1 ~ C7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、または R_2 がアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

10

20

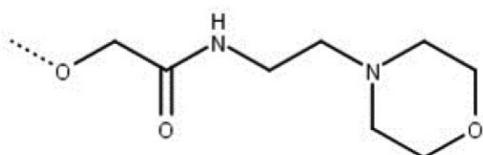
30

40

50

【0155】

【化34】



【0156】

または $O C_2 H_4 O C_2 H_4 N H_2$ であり、ここで 0 ~ 4 個の R_2 のうちの少なくとも 1 つが H ではなく；

R_3 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、 H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

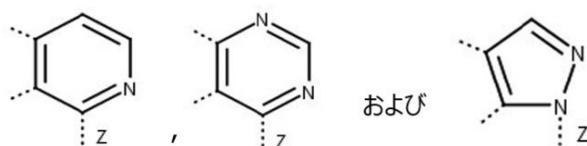
あるいは、2つの（隣接） R_3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

X_1 、 X_2 、 X_3 が N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

環 A が O および / または N 原子から選択された 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む、5 員または 6 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0157】

【化35】



【0158】

からなる群より選択され、ここで前記環構造は任意に、 H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えば C_6 -フェニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えば $C_6 H_5 N H C_3 H_6 O C H_3$ 、から選択された同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることがあり；

結合 z が存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z の C 原子が R_3 で置換され、かつ

環 A の X_3 が H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンで置換される

式 I の化合物に関する。

【0159】

好ましい態様では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される $I K K / N F - B$ 活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる、式 I の化合物であって、

R_1 が O 原子であり；

R_2 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、 H 、 $O H$ 、ハロゲン、好ましくは B_r 、 C_1 もしくは F 、 $C_1 \sim C_7$ のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、または R_2 がアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

10

20

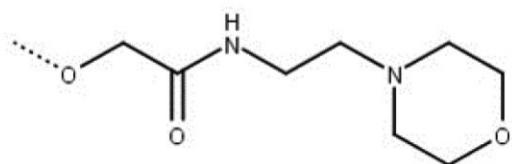
30

40

50

【0160】

【化36】



【0161】

10

または $\text{OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ であり、ここで 0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 つが H ではなく；

R 3 が 0 ~ 4 個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2 つの（隣接）R 3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含むことができ、

X 1、X 2 が N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

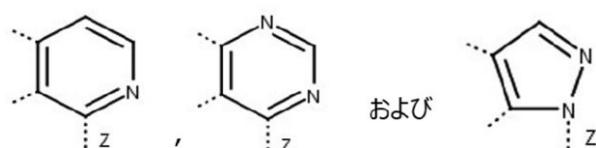
X 3 が C 原子であり；

環 A が O および / または N 原子から選択された 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を含む、5 員または 6 員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0162】

20

【化37】



30

【0163】

からなる群より選択され、ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えは CO-フェニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミン、アリール、例えはフェニル（任意にハロゲン、C 1 ~ C 3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキアミン、例えは CONHC₃H₆OCH₃、から選択された同一でも異なってもよい 0 ~ 3 個の置換基で置換されることがあり；

結合 z が存在してもしなくてもよく、ここで結合 z が存在しない場合：

環 C の結合 z 上の C 原子が R 3 で置換され、かつ

環 A の X 3 が H、OH、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンで置換される

式 I の化合物に関する。

【0164】

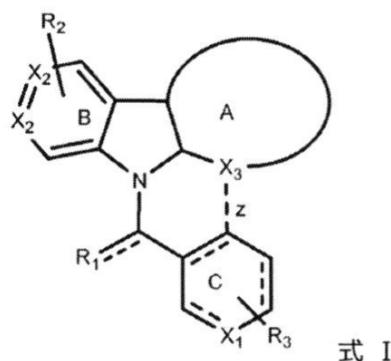
40

本発明の更なる態様は、式 I の化合物および好ましくは本明細書に記載のその医学的用途に関する：

【0165】

50

【化38】



10

【0166】

上式中

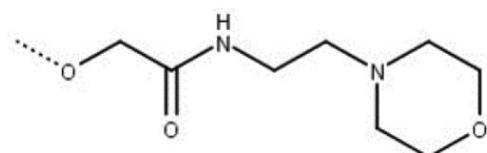
R1はO原子であり；

R2は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、あるいはR2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0167】

【化39】



【0168】

30

またはOC2H4OC2H4NH2であり、ここで0～4個のR2のうちの少なくとも1つがHではなく；

R3は0～4個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含むことができ、

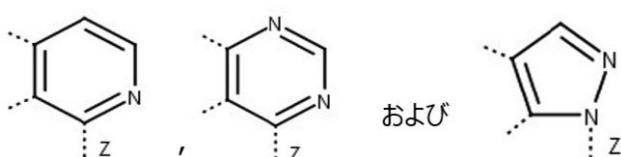
X1、X2はNまたはC原子、好ましくはC原子であり；

環Aは5員または6員の芳香族環構造であり、該環構造は任意にOおよび/またはN原子から選択されたヘテロ原子を1または2個含み、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

40

【0169】

【化40】



50

【0170】

からなる群より選択され、ここで環Aが5員の環構造である場合、 $X_3 = N$ 原子であり；環Aが6員の環構造である場合、 $X_3 = C$ 原子であり；

ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えばCONHC₃H₆OCH₃、から選択された同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがあり；

結合zは存在してもしなくてもよく、ここで結合zが存在しない場合：

10

環Cの結合zのC原子がR₃で置換され、かつ

環Aの X_3 がH、OH、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンで置換される。

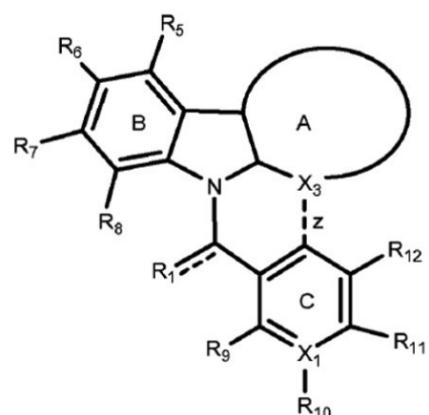
【0171】

本発明の更なる態様では、式IIの化合物および本明細書に記載のようなその医学的用途に関し、

【0172】

【化41】

20



30

【0173】

上式中

R1はO原子であり；

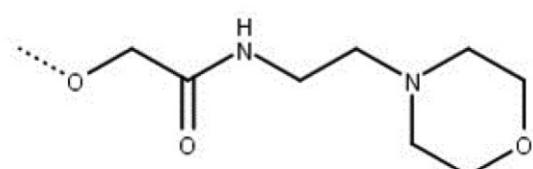
R5はH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルケニル、アルコキシ、アミン、最も好ましくはHであり；

R6はH、OH、ハロゲン、好ましくはC1、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、またはアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

40

【0174】

【化42】



50

【0175】

またはO C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり；

R 7 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 8 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、最も好ましくはHであり；

ここでR 5～R 8の少なくとも1つがHではなく；

R 9 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 10 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであり；

R 11 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシ、カルボキシルであり；

R 12 はH、ハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5の、好ましくはC 1～C 3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシであるか；

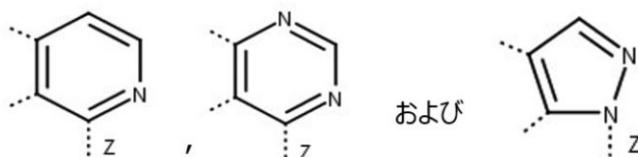
あるいは、X 1 がC 原子である場合、R 9 とR 10、R 10 とR 11、R 11 とR 12、またはR 12 と環C の結合z の位置にあるC 原子とが、任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該環構造は0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはO またはN 原子、より好ましくは2個のO 原子を含み、あるいはフェニルを形成し；

X 1、X 3 はN またはC 原子であり；

環A は5員または6員の芳香族環構造であり、該環構造はO および/またはN から選択されたヘテロ原子を1または2個含み、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0176】

【化43】



10

20

30

【0177】

からなる群より選択され、ここで環A が5員の環構造である場合、X 3 = N 原子であり；環A が6員の環構造である場合、X 3 = C 原子であり；

ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C 1もしくはF、C 1～C 7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル(任意にハロゲン、C 1～C 3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される)、アルコキシアミン、例えばCONHC 3H 6OCH 3、から選択された同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがあります；

結合z は存在してもしなくてもよく、ここで結合z が存在しない場合：

環C の結合z の位置のC 原子が潜在的にハロゲン、好ましくはC 1、BrもしくはF、C 1～C 5、好ましくはC 1～C 3アルキルで置換され、かつ

環A のX 3 が任意にH、C 1～C 5、好ましくはC 1～C 3アルキル、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C 1またはF で置換され、またはX 3 がC 原子である場合、H、C 1～C 5、好ましくはC 1～C 3アルキル、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C 1もしくはF で置換される。

【0178】

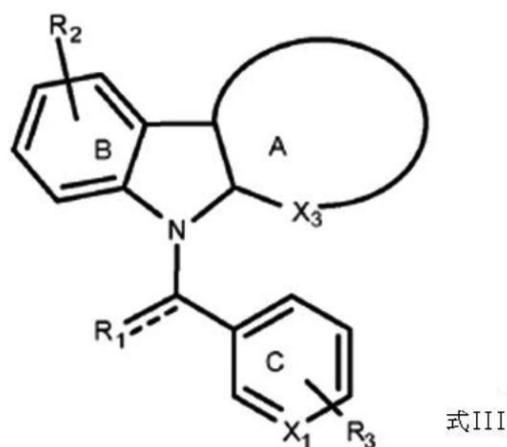
本発明の更なる態様は、式IIIの化合物、および好ましくは本明細書中に記載のようなその医学的用途に関し、

40

50

【0179】

【化44】



10

【0180】

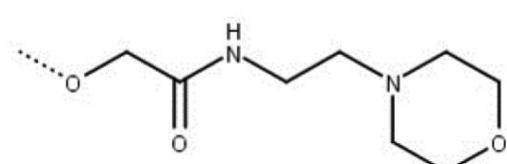
ここで式IIIの置換基は次の通りである：

R1はO原子であり；

R2は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、アルコキカルボニル、アミンであるか、またはR2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0181】

【化45】



20

30

【0182】

またはOC2H4OC2H4NH2であり、ここで0～4個のR2のうちの少なくとも1つがHではなく；

R3は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成し、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含み、またはフェニルを形成し；

X1、X3はNまたはC原子、好ましくはC原子であり；

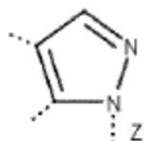
環Aは1個または2個のN原子を含む5員の芳香族複素環構造であり、ここでX3はNでなければならず、好ましくはピラゾリルまたはイミダゾリル環、好ましくは

【0183】

40

50

【化46】



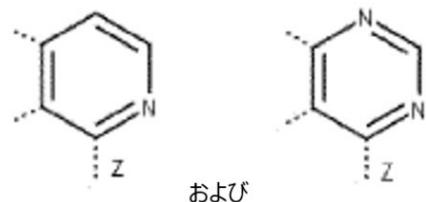
【0184】

を形成し、あるいは環Aは1個または2個のN原子を含む6員の芳香族複素環構造であり、ここでX3はC原子でなければならず、好ましくは下記

10

【0185】

【化47】



20

【0186】

からなる群より選択され、

ここで環Aの環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えばCONHC₃H₆OCH₃、から選択された同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがある。

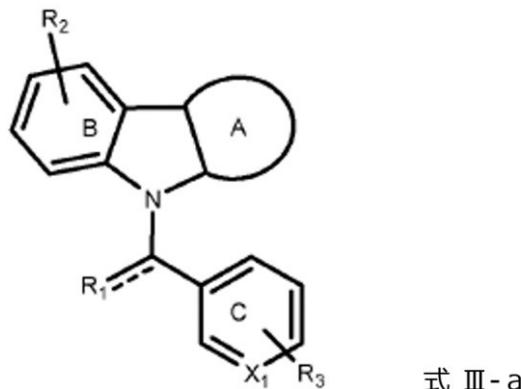
【0187】

本発明の更なる態様は、式III-aの化合物、および本明細書中に記載のようなその医学的用途に関し、

30

【0188】

【化48】



40

【0189】

上式中

R1はO原子であり；

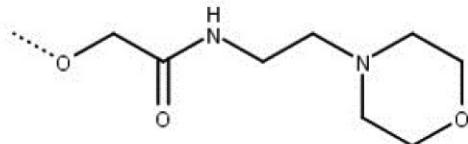
R2は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O

50

H、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、アルコキシカルボニル、アミンであり、あるいは、R2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0190】

【化49】



10

【0191】

またはOC2H4OC2H4NH2であり、ここで0～4個のR2の少なくとも1つがHではなく；

R3は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含むことができ、またはフェニルを形成し；

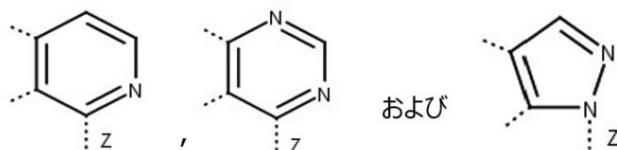
20

X1、X3はNまたはC原子であり；

環Aは1個または2個のN原子を含む5員または6員の芳香族複素環構造であり、好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成し、より好ましくは下記

【0192】

【化50】



30

【0193】

から成る群より選択され、ここで前記環構造は任意に、H、OH、ハロゲン、好ましくはBr、C1もしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、例えばCO-フェニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリール、例えばフェニル（任意にハロゲン、C1～C3アルキル、アルコキシ、アミンで置換される）、アルコキシアミン、例えばCONHC3H6OCH3、から選択された同一でも異なってもよい0～3個の置換基で置換されることがある。

40

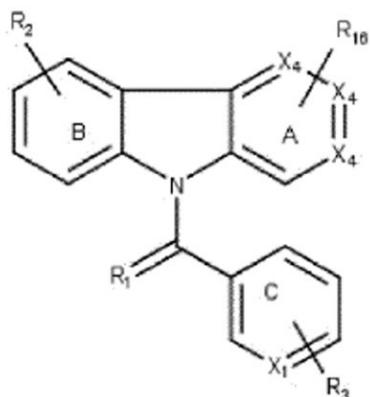
【0194】

本発明の更なる態様は、式VIIの化合物、および好ましくは本明細書中に記載のようなその医学的用途に関し、

【0195】

50

【化 5 1】



式 VIII

10

【0 1 9 6】

上式中

R 1 は O 原子であり；

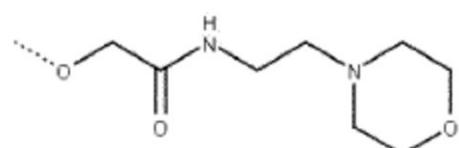
R 2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは B r、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

あるいは、R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0 1 9 7】

【化 5 2】



30

【0 1 9 8】

または O C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり、ここで 0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 つが H ではなく；

R 3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは B r、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2 つの（隣接）R 3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成することができ；

40

X 1 は N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

X 4 は N または C 原子であり、それにより少なくとも 1 つの X 4 が N 原子であり；

R 1 6 は 0 ~ 3 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくは C 1、B r もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシである。

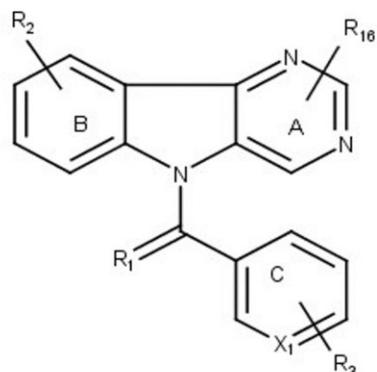
【0 1 9 9】

本発明の更なる態様は、式 IX の化合物、および好ましくは本明細書に記載のようなそれの医学的用途に関し、

50

【0200】

【化53】



式 IX

10

【0201】

上式中

R1はO原子であり；

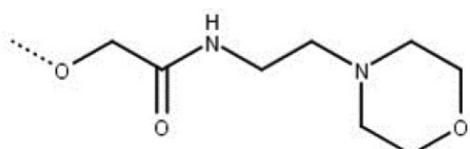
R2は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

あるいは、R2はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0202】

【化54】



30

【0203】

またはOC2H4OC2H4NH2であり、ここで0～4個のR2の少なくとも1つがHではなく；

R3は0～4個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくはBr、ClもしくはF、C1～C7アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2つの（隣接）R3置換基が任意に5員もしくは6員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に0、1または2個のヘテロ原子、好ましくはOまたはN原子を含み、より好ましくは2個のO原子を含み、またはフェニルを形成することができ；

40

X1はNまたはC原子、好ましくはC原子であり；

R16は0～3個の、好ましくは0、1または2個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくはCl、BrもしくはF、C1～C5の、好ましくはC1～C3のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシである。

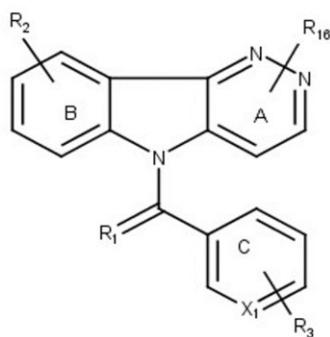
【0204】

本発明の更成る態様は、式Xの化合物、および好ましくは本明細書中に記載のようなそれの医学的用途に関し、

【0205】

50

【化 5 5】



式 X

10

【0206】

上式中

R 1 は O 原子であり；

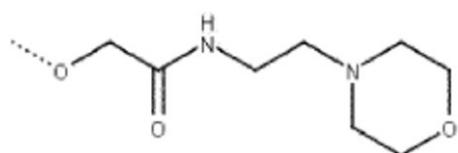
R 2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

あるいは、R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

20

【0207】

【化 5 6】



30

【0208】

または O C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり、ここで 0 ~ 4 個の R 2 の少なくとも 1 つが H ではなく；

R 3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは Br、C 1 もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2 つの（隣接）R 3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成することができ；

40

X 1 は N または C 原子、好ましくは C 原子であり；

R 1 6 は 0 ~ 3 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくは C 1、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシである。

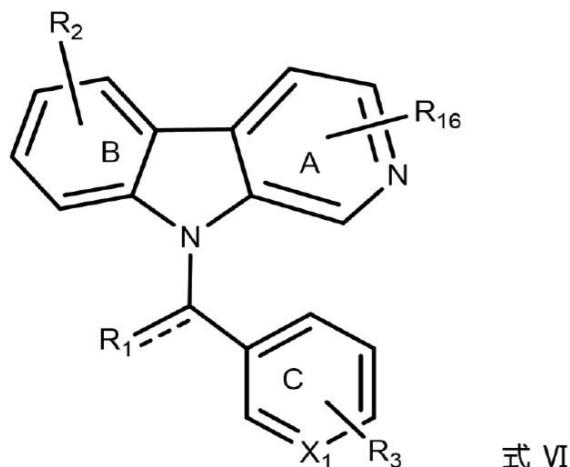
【0209】

好ましい実施形態では、本発明は式 V I の化合物、および本明細書中に記載のようなそれの医学的用途に関し、

【0210】

50

【化 5 7】



式 VI

【0 2 1 1】

上式中

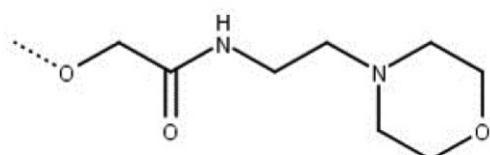
R 1 は O 原子であり；

R 2 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであり、

あるいは、R 2 はアルコキシアミン、アルコキシアミド、例えば

【0 2 1 2】

【化 5 8】



20

30

【0 2 1 3】

または O C 2 H 4 O C 2 H 4 N H 2 であり、ここで 0 ~ 4 個の R 2 のうちの少なくとも 1 つが H ではなく；

R 3 は 0 ~ 4 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、O H、ハロゲン、好ましくは Br、Cl もしくは F、C 1 ~ C 7 のアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、カルボニル、カルボキシル、アルコキカルボニル、アミンであるか、

あるいは、2 つの（隣接）R 3 置換基が任意に 5 員もしくは 6 員の芳香族環構造を形成することができ、該芳香族環構造は任意に 0、1 または 2 個のヘテロ原子、好ましくは O または N 原子を含み、より好ましくは 2 個の O 原子を含み、またはフェニルを形成することができ；

X 1 は N または C であり；

R 16 は 0 ~ 3 個の、好ましくは 0、1 または 2 個の、同一でも異なってもよい、H、ハロゲン、好ましくは Cl、Br もしくは F、C 1 ~ C 5 の、好ましくは C 1 ~ C 3 のアルキル、アルコキシ、好ましくはメトキシである。

【0 2 1 4】

好ましい実施形態では、本発明の化合物は表 1 および / または表 3 に与えられる化合物群より選択される。好ましい実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導される I KK / N F - B 活性化に関連した疾患の治療における医薬としての、表 1 および /

40

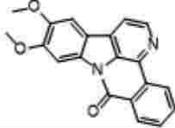
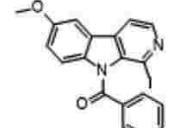
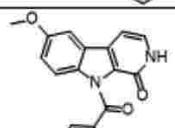
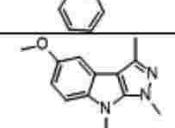
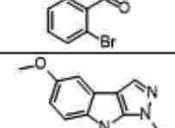
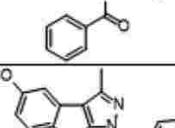
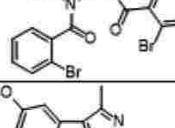
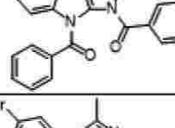
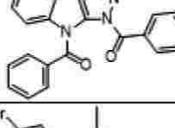
50

または表3記載の化合物に関する。

【0215】

【表3-1】

表3：本発明の追加の化合物

構造	実施例	IUPAC	MS(ES+) [M+H]: m/e
	27	11,12-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	331
	28	(1-ヨード-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)(フェニル)メタノン	428
	29	9-ベンゾイル-6-メトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オン	319
	30	(2-ブロモフェニル)(5-メトキシ-1,3-ジメチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン	398/400 同位体パターン
	31	(5-メトキシ-1-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)(フェニル)メタノン	306
	32	(5-メトキシ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((2-b)-メタノン)	566/568/570 同位体パターン
	33	(5-メトキシ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス(フェニルメタノン)	410
	34	(5-ブロモ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス(フェニルメタノン)	458 同位体パターン
	35	(5-ブロモ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((2-ブロモフェニル)メタノン)	616 同位体パターン

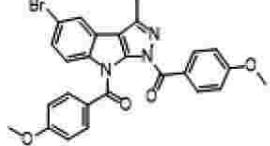
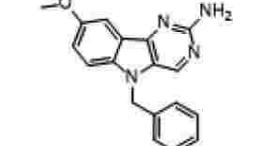
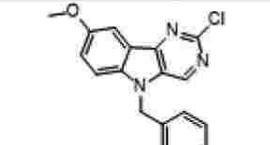
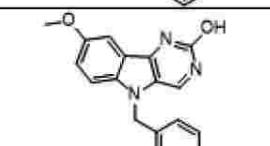
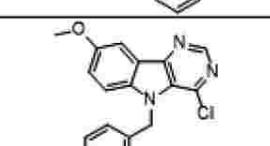
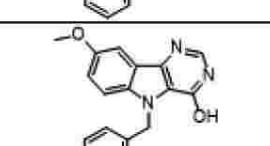
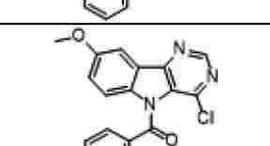
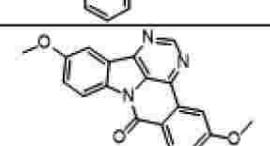
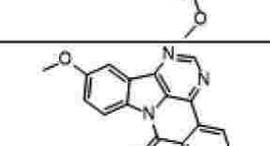
10

20

30

40

【表 3 - 2】

	36	(5-ブロモ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((4-メトキシフェニル)メタノン)	518/520 同位体パターン
	37	5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール-2-アミン	305
	38	5-ベンジル-2-クロロ-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール	324
	39	5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール-2-オール	306
	40	5-ベンジル-4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール	324
	41	5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール-4-オール	306
	42	(4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピラゾロ[5,4-b]インドール-5-イル)(フェニル)メタノン	338
	43	5,6,12-トリメトキシ-8H-ジベンゾ[b,f]ピラゾロ[4,5,6-hi]インドリジン-8-オン	362
	44	12-メトキシ-8H-ジベンゾ[b,f]ピラゾロ[4,5,6-hi]インドリジン-8-オン	302

10

20

30

40

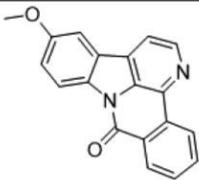
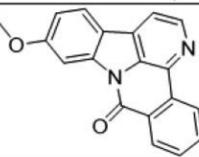
【0216】

更なる実施形態では、本発明は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる化合物に関し、該化合物は表1、表2、表3および/または表4に与えられた化合物群より選択される。

【0217】

【表 4】

表 4 : 医薬として用いられる本発明の追加の化合物

構造	実施例	IUPAC	MS(ES+) [M+H]: m/e
	25	12-メトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	301
	26	11-メトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン	301

【図面の簡単な説明】

【0218】

【図1】遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-Bシグナル伝達カスケードの単純化モデル。

【図2】MW01は、DNA損傷により誘導されるp65核内移行の特異的阻害剤である。

【図3】MW01によるDNA損傷により誘導されるNF-B活性化の濃度依存性阻害。

【図4】MW01はTNF-刺激によるNF-B活性化を阻害しない。

【図5】MW01はIL-1-刺激によるNF-B活性化を阻害しない。

【図6】MW01による遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化の阻害は、TAK1活性化の上流で起こる。

【図7】MW01は、ATMの細胞質内蓄積を阻止することにより遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化を阻害する。

【図8】MW01は核PARP1-シグナロソームの形成を阻害する。

【図9】MW01はATMの酵素活性を阻害しない。

【図10】MW01はPARP1の酵素活性を阻害しない。

【図11】MW01は、遺伝毒性ストレス後の不可欠なIKK翻訳後修飾の形成を阻害する。

【図12】MW01およびその誘導体の分子構造の概観。

【図13】誘導体と比較したMW01の構造-活性相関分析。

【図14】PARP阻害剤による遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化の阻害は、細胞型に依存する。

【図15】DNA損傷後の抗アポトーシス遺伝子とプロアポトーシス遺伝子のmRNA発現に対するMW01の影響。

【図16】MW01は遺伝毒性ストレス後のアポトーシス細胞死を増加させる。

【図17】MW01は、未処置細胞において細胞あたりH2AX_fociを有意に増加させる。

【発明を実施するための形態】

【0219】

【発明の詳細な説明】

全ての引用される特許文献と非特許文献は、その全内容が参考として本明細書中に援用される。

本発明は、遺伝毒性ストレスに関連した疾患、好ましくは遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B(NF-カッパB)活性化に関連した疾患の治療において医薬として用いられる化合物およびそれらの使用に関する。

【0220】

本明細書中に記載される化合物に関して、用語「アルキル」は、1～7個の炭素原子の分枝状または直鎖状飽和炭化水素基、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル等を指す。好ましいアルキル基は1～7個の炭素原子、より好ましくは1～4個の炭素原子を有する。本明細書に記載の任意の1または複数のアルキル基が「置換されたアルキル」であってよく、その場合1つ以上の水素原子がハロゲン、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、ヒドロキシル、アリールまたはカルボキシルのような置換基で置換される。

【0221】

用語「アルケニル」は、好ましくは2～7個の炭素原子、より好ましくは2～4個の炭素原子を含む、直鎖状、分枝状、または環状の炭化水素配置およびそれらの組み合わせであって、アルケンから1つの水素原子が除去されて形成されるもの、例えばエテニル等を生成するものを指す。 10

【0222】

用語「アルキニル」は、好ましくは2～7個の炭素原子、より好ましくは2～4個の炭素原子を含む、直鎖状、分枝状、または環状の炭化水素配置およびそれらの組み合わせであって、アルキンから1つの水素原子が除去されて形成されるもの、例えばエチニル等を生成するものを指す。

【0223】

用語「シクロアルキル」は、水素原子の除去によりシクロアルカンから誘導され、それにより好ましくはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルまたはシクロヘキシル等を形成する配置を指す。 20

【0224】

用語「アルコキシ」は、好ましくは1～7個の炭素原子、より好ましくは1～4個の炭素原子を含む、直鎖状、分枝状、または環状の炭化水素配置およびそれらの組み合わせであって、結合箇所に酸素原子を含む（例えばO-アルキル）ものを指す。「アルコキシ基」の一例は、式-O-Rにより表され、ここでRはアルキル基であって、任意にアルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、ハロゲン化アルキル、またはヘテロシクロアルキル基で置換されるアルキル基ができる。適当なアルコキシ基としては、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、n-ブトキシ、i-ブトキシ、sec-ブトキシ、シクロヘキシルオキシ等が挙げられる。 30

【0225】

用語「アルキルチオ」は、好ましくは1～7個の炭素原子、より好ましくは1～4個の炭素原子を含む、炭素が結合したスルフヒドリル(sulphydryl)又はスルフィドリル(sulphydryl)を含む構造を指し(-C-SHまたはR-SH、ここでRはアルキルである)、それは結合箇所にS原子を含む（例えばS-アルキル）。アルキルチオはn=0であるときのRS(O)_nとして表すことができる。n=1または2である基RS(O)_nは、それぞれスルホキシドとスルホンを指し、これらの基も本発明の化合物の置換基である。

【0226】

用語「アシル」は、二重結合で結合された酸素原子とアルキル基とを含むオキソ酸からの1個以上のヒドロキシル基の除去により誘導され、-RC(=O)を形成する構造を指す。従って、アシルは、式-C(=O)-の基を指すカルボニルを包含する。カルボニルを含む基としては、炭素-酸素二重結合(C=O)を含む任意の置換基、例えばアミド、カルボキシ基、エステル、尿素、カルバメート、カーボネート並びにケトンおよびアルデヒド、例えば-CORまたは-RC(=O)Oをベースにした置換基が挙げられ、ここでRはアルキル、ヘテロアルキル、ヒドロキシルまたは第二級、第三級もしくは第四級アミンである。 40

【0227】

「アルコキシカルボニル」は、アルコキシで置換されたカルボニル基（例えば-C(=O)OR）を指し、ここでRは任意に置換されることがあるアルキル、アリール、アラル

10

20

30

40

50

キル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキルまたは同様な成分を表す。

【0228】

用語「アリール」は、任意の炭素ベースの芳香族基を指し、非限定的には、ベンゼン等を含む。用語「芳香族」は、「ヘテロアリール基」も含み、これは芳香族基の環の中に少なくとも1つのヘテロ原子が含まれている芳香族基として定義される。ヘテロ原子の例としては、非限定的に、窒素、酸素、硫黄が挙げられる。アリール基はアルキル、アルキニル、アルケニル、アリール、ハライド、ニトロ、アミノ、エステル、ケトン、アルデヒド、ヒドロキシ、カルボン酸、またはアルコキシをはじめとする1つ以上の基により置換されることができ、あるいはアリール基は非置換であることもできる。

【0229】

用語「アミン」は、式 - N R R の基を指し、ここで R と R は、独立的に、水素または上述したようなアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、ハロゲン化アルキルもしくはヘテロシクロアルキル基であることができる。用語「アミド」(amide / amido)は、式 - C (O) N R R により表され、ここで R と R は独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、ハロゲン化アルキルまたはヘテロシクロアルキル基であることができる。適当なアミド基はアセトアミド基である。

【0230】

任意に1つ以上のNまたはO原子を含む5員または6員の環構造は、好ましくはシクロアルキル、シクロアルカンおよび非芳香族複素環（例えばモルホリン、ピペリジン、ピペラジン、チオモルホリン、テトラヒドロフラン）、芳香族環構造、例えばフェニル、ナフタレン、芳香族複素環、例えばフラン、ピロール、オキサゾール、チオフェン、チアゾール、ピラゾール、イミダゾール、並びにピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピラン、チオピラン、オキサジン、アゼピン、チエピン、オキセタン等に関する。5員または6員の環構造は好ましくはピラゾリル、イミダゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジル、ピラジニル環を形成する。

【0231】

「カルボニル」は式 - C (O) - の基を指す。カルボニル含有基としては、炭素 - 酸素二重結合 (C = O) を含む任意の置換基、例えばアシル基、アミド、カルボキシ基、エステル、尿素、カルバメート、カーボネート、並びにケトンおよびアルデヒド、例えば - C O R または - R C H O をベースにした置換基が挙げられ、ここで R は脂肪族、ヘテロ脂肪族、アルキル、ヘテロアルキル、ヒドロキシル、または第二級、第三級もしくは第四級アミン、フェニル、置換フェニル（例えばハロゲン、C 1 ~ C 3 アルキル、アルコキシ、アミンで置換されたフェニル）、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アミン、アリールである。

【0232】

用語「アルキルアミノ」は、少なくとも1つの水素原子がアミノ基で置き換えられている上記で定義したアルキル基を指す。

【0233】

単独でのまたは組み合わせての「アミノカルボニル」は、アミノで置換されたカルボニル（カルバモイル）基を意味し、ここで該アミノ基は任意に単置換または二置換され、例えばアルキル、アリール、アラルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アルカノイル、アルコキシカルボニル、アラルコキシカルボニル等で置換されることがある。アミノカルボニル基は - N (R) - C (O) - R (ここで R は置換基または H である) または - C (O) - N (R) であることができる。

【0234】

「カルボキシル」は - COOH 基を指す。置換されたカルボキシルは - COOR を指し、ここで R は脂肪族、ヘテロ脂肪族、アルキル、ヘテロアルキル、またはカルボン酸もしくはエステルである。

【0235】

10

20

30

40

50

用語「ヒドロキシル」は式-OHにより表される。

【0236】

用語「ヒドロキシアルキル」は、少なくとも1つの水素原子がヒドロキシル基で置換されているアルキル基を指す。用語「アルコキシアルキル基」は、少なくとも1つの水素原子が上記アルコキシ基により置換されているアルキル基として定義される。

【0237】

用語「アラルキル」は、上記で定義したアルキル基が上記で定義したアリール基に結合されているアリール基を指す。アラルキル基の例はベンジル基である。

【0238】

任意に置換されることがある基、例えば「任意に置換されるアルキル」とは、置換された場合、アルコキシ、任意に置換されるアルコキシ、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、アリール、カルボキシアルキル、任意に置換されるシクロアルキル、任意に置換されるシクロアルケニル、ハロゲン、任意に置換されるヘテロアリール、任意に置換されるヘテロシクリル、ヒドロキシ、スルホニル、チオールおよびチオアルコキシから選択された1～5個の置換基、典型的には1, 2または3個の置換基を有する基、例えばアルキル基を指す。特に、任意に置換されるアルキル基としては、例えば、ハロアルキル基、例えばフルオロアルキル基、非限定的にはトリフルオロメチル基が挙げられる。それらの潜在的な任意置換基は、任意置換基が言及されている場合に本明細書中に開示された式中の全ての基に適用される。好ましい任意置換基はヒドロキシル、アルキル、アルコキシ、カルボニル、アルコキシカルボニル、NO₂、アミンである。

10

【0239】

本開示の化合物の特定の例は、1つ以上の不斉中心を含む；ゆえに、それらの化合物は異なる立体異性形で存在しうる。従って、化合物と組成物は、個別の純粋な光学異性体として提供されるかまたは立体異性体混合物、例えばラセミ体混合物として提供することができる。ある態様では、本明細書に開示される化合物は、実質的にエナンチオピュアな(enantiopure)形、例えば90%鏡像体過剩率、95%鏡像体過剩率、97%鏡像体過剩率、または99%超の鏡像体過剩率で、例えばエナンチオピュアな形で、合成されるかまたはそのような形であるように精製される。

20

二重結合の位置の点線は、存在しても存在しなくてもよい任意の二重結合を表す。

30

【0240】

開示化合物の保護誘導体は、例えばその開示化合物の合成への使用が期待される。開示化合物に関する使用に適当である様々な保護基がGreene & Wuts Protective Groups in Organic Synthesis; 第3版; John Wiley & Sons, New York, 1999中に開示されている。一般に、保護基は分子の残りの部分に影響を与えないような条件下で除去される。そのような方法は当業界で周知であり、酸加水分解、水素化分解等がある。

【0241】

本発明の化合物は、様々な多形で存在し、例えば非晶質および結晶質多形体として存在することができる。本発明の化合物の全ての多形は本発明の範囲内に属し、本発明の追加の態様を構成する。

40

【0242】

本発明の化合物は、水素の重水素置換を含んでもよい。この置換は、ある状況下では改善された代謝安定性をもたらす (Nature Reviews Drug Discovery 15, 219-221 (2016))。

【0243】

本明細書に記載の化合物の置換基と置換パターンは、化学的に安定でありかつ従来既知の技術によりおよび更に本開示に記載された方法により容易に合成することができる化合物を提供するように当業者が選択することができる。

【0244】

本発明は更に、本明細書中に記載の化合物の医薬的に許容される塩に関する。用語「医

50

薬的に許容される塩」は、常法により調製された本明細書に記載の化合物の塩またはエステル、例えば無機酸および有機酸の塩基性塩、例えば非限定的に、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、リンゴ酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、コハク酸、マレイン酸、サリチル酸、安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸等の塩基性塩を包含する。本明細書に言及される任意の化合物は、その医薬的に許容される塩として代わりに投与することができる。無機塩基および有機塩基の酸性塩も包含され、非限定的に、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、トリエチルアミン等も含む。

【0245】

「医薬的に許容される塩」とは、遊離酸、塩基、および両性イオン形も包含する。適当な医薬上許容される塩の記載は、Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, Wiley VCH (2002) 中に見つけることができる。治療用途には、化合物の塩は、対イオンが医薬的に許容されるようなものである。しかしながら、医薬的に許容されない塩である酸や塩基の塩も、例えば医薬上許容される化合物の調製や精製において、用途を見出すことができる。

10

【0246】

本開示の別の態様は、対象者への投与用に調製された医薬組成物を含み、これは本明細書に開示された 1 または複数の化合物の治療有効量を含む。ある態様では、医薬組成物は疼痛の治療に有用である。開示化合物の治療有効量は、投与経路、対象者の種、および処置すべき対象の物理的特性に依存するだろう。考慮すべきである特定の因子としては、病期の重篤度、病期、体重、食事、併用薬物療法が挙げられる。開示化合物の治療有効量を決定することへのそれらの因子の関連性は、当業者により認識されている。

20

【0247】

対象者への投与のための医薬組成物は、特定の分子に加えて、少なくとも 1 つの追加の医薬的に許容される添加剤、例えば担体、增量剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤、界面活性剤等を含むことができる。医薬組成物は、更に 1 以上の追加の活性成分、例えば抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤等も含むことができる。それらの製剤に有用な医薬的に許容される担体は常用のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第19版 (1995) は、本明細書に開示される化合物の薬物送達に適当な組成物と製剤を記載している。

30

【0248】

一般に、担体の性質は、使用する特定の投与方式に依存するだろう。例えば、非経口製剤は、一般に、水、生理学的食塩水、平衡塩類溶液、ブドウ糖液、グリセロール等といった医薬的および生理学的に許容される液体を含む注射液を賦形剤として含有する。固体組成物 (例えば粉剤、ピル、錠剤またはカプセル剤形) の場合、常用の非毒性固体担体として、例えば薬用のマンニトール、ラクトース、スターチまたはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与する医薬組成物は、少量の非毒性の補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、保存剤、pH 緩衝剤等、例えば酢酸ナトリウムまたはソルビタンラウリン酸モノエステルを含むことができる。

40

【0249】

本開示の様々な治療法に従って、当該化合物は、治療または予防法を探している疾患の管理に関連した従来の方法論と矛盾しないやり方で対象者に送達することができる。本明細書の開示によれば、予防的にまたは治療的に有効な量の化合物および / または別の生物学的活性剤が、そのような処置の必要な対象者に、特定の疾患もしくは状態またはその 1 以上の症状を予防し、抑制し、そして / または改善するのに十分な時間と条件の下で投与される。

【0250】

化合物の「投与」または「投与する」は、本明細書中に記載のような化合物、化合物のプロドラッグまたは医薬組成物を提供することを意味すると解釈すべきである。化合物または組成物は、他の者により対象患者に投与することができ (例えば静脈内) またはそれ

50

は患者により自己投与することができる（例えば錠剤）。

【0251】

病状の治療において医薬として用いられる化合物へのいずれの参照も、化合物または前記化合物を含む組成物の、それが必要な対象者への投与を含む前記症状を治療する方法、あるいは前記症状の治療の際の化合物のまたは前記化合物を含む組成物の使用に関する。

【0252】

投薬量は、標的部位（例えば肺または体循環）での所望の濃度を維持するように専門医により変更することができる。投与の形式、例えば静脈内または皮下投与に比べて、経皮、直腸、経口、肺または経鼻投与に基づいて、より高濃度または低濃度を選択することができる。投薬量は、投与される製剤の放出速度、例えば、肺内噴霧剤対粉剤、徐放経口剤対注入粒剤または経皮投与製剤などの放出速度に基づいて調整することもできる。

10

【0253】

本発明はまた、本明細書に開示された様々な病状を患っている対象者の治療方法に関する。該治療法は、好ましくは本開示の化合物の治療有効量を、治療を必要とする対象者に投与することを含む。

【0254】

本発明の観点では、用語「医薬」は、疾病を診断、治療、処置または予防するために用いられる薬剤、調合薬または医薬品を指す。それは疾病を治療または予防する特性を有するとして示された任意の物質または物質の組み合わせを指す。この用語は、薬理学的、免疫学的または代謝的作用を発揮することにより生理学的機能を回復、修正または改善する、あるいは医学診断を行うといういずれかの目的で利用または投与することができる、任意物質または物質の組み合わせを含む。医薬という用語は、生物学的薬剤、小分子薬、または生理学的過程に作用する物理的物質を含む。

20

【0255】

本発明によれば、用語「治療」は、徵候もしくは兆候が発生し始めた後の疾病または病的状態の兆候もしくは症状を軽減する治療的介入を指す。本明細書中で用いる場合、疾病または病的状態に関して用いる用語「改善する」とは、任意の観察できる有利な治療効果を指す。有利な効果は、例えば、感受性の対象者において疾病の臨床症状の発症の遅延、該疾病の一部のもしくは全ての臨床症状の重篤度の減少、疾病の遅い進行、患者の全体的健康もしくは幸福の改善、または特定の疾患に特異的な、当技術分野で周知である他のパラメータにより、証明することができる。

30

【0256】

本発明は、対象者の治療的および予防的処置の両方を包含する。「予防的」処置は、発生病理学のリスクを減少させる目的で、疾病の兆候を示さないかまたは初期の兆候のみを示す対象者に施される処置である。

【0257】

用語「疾病」は、特定の異常状態、本発明の観点では、生物体の一部または全部に影響する構造または機能の障害を指す。それは、罹患した者に疼痛、機能不全、苦痛または死を引き起こすような任意の状態を指し、損傷、身体障害、障害、症候群、感染、個別の症状、逸脱行動、並びに構造および機能の非定型変異を包含する。疾患は体の正常な恒常作用（ホメオスタシス）の機能不全に関連付けられる。疾患は後天性、先天性、慢性、急性、遺伝性、特発性、遺伝性（hereditary / inherited）であることができる。本発明の態様での別の同等の用語は、病、障害、病状、症候群または罹患前である。疾患は限局性、散在性、全身性であることができる。

40

【0258】

本発明に関連して用いられる場合、用語「遺伝毒性ストレス」は、任意の一定の物質、化合物、環境シグナル、環境物質、照射、および/または細胞代謝物、例えば、DNAやRNAのような全ての種の核酸を含む遺伝物質に損傷を誘発するROSを指す。ゲノムは各細胞分裂周期の間に潜在的に有害な遺伝毒性事象に曝される。このDNA損傷の内在性源は、細胞の代謝またはDNA複製と組換え時の日常的エラーに起因する。加えて、紫外

50

光、酸化ストレス、化学的突然変異原といった外因性遺伝毒性物質への細胞や生物体の暴露は、様々なヌクレオチド修飾やDNA鎖の切断を引き起す。ゲノムへのそういった攻撃に打ち勝つために、細胞は、細胞周期の停止を誘導して、被った損傷を修復するのに十分な時間を与える応答系を進化させた。遺伝毒性ストレスは、DNA損傷を誘発し、それがDNA修復の活性化をもたらす。遺伝毒性ストレス応答系はDNA修復を含み、適当なDNA修復経路を活性化し、あるいは修復できない場合には、アポトーシスを誘導する。突然変異またはゲノム不安定性の形でのDNA損傷は、毒性物質、例えば抗癌剤として投与された細胞毒性薬、紫外線日光、背景電離放射線、食品や環境中の化学薬品、および代謝の間に細胞内で生産される高反応性分子への暴露により引き起される遺伝毒性ストレスから生じる。同様な種類のDNA損傷は様々な剤に応答して起り、突然変異、塩基とヌクレオチドの脱離、二量体の形成、鎖の切断、架橋、染色体異常を誘発する。それらのタイプの損傷の一部は、加齢とともに核またはミトコンドリアDNA中に蓄積する（例えば点変異、一本鎖切断、DNA架橋、付加／欠失、酸化的ダメージ、およびメチル化塩基）。

【0259】

NF-B（活性化B細胞の核因子 軽鎖エンハンサー）は、DNAの転写、サイトカイン生産と生存、細胞の分化と増殖を無制限に制御するタンパク質複合体である。NF-Bは、ほとんど全ての細胞に見つかり、ストレス、サイトカイン、フリーラジカル、重金属、紫外線、酸化LDL、細菌やウイルス抗原のような刺激に対する細胞応答に関与する。NF-Bは感染に対する免疫応答を制御する上で重要な役割を果たし、また適応免疫と先天性免疫において様々な重要な役割を果たしている。NF-Bの不正な制御は、癌、炎症疾患および自己免疫疾患、敗血性ショック、ウイルス感染および不適当な免疫系発達に関連付けられている。NF-Bはシナプス可塑性と記憶の過程にも関与している。NF-Bファミリーのタンパク質は全てそれらのN末端にRel相同ドメインを共有している。

【0260】

RelA、RelBおよびc-RelといったNF-Bタンパク質のサブファミリーは、それらのC末端に転写活性ドメインを有する。対照的に、NF-B1とNF-B2タンパク質は、大きな前駆体p105とp100として合成され、それはそれぞれプロセシングを受けて成熟NF-Bサブユニットp50とp52になる。p105とp100のプロセシングは、ユビキチン／プロテアソーム経路により媒介され、アンキリン反復配列を含むそれらのC末端領域の選択的分解を伴う。p100からのp52の生成は厳重に管理されたプロセスである一方で、p50はp105の構成的プロセシングから生産される。p50とp52タンパク質は転写を活性化する本質的能力は持たず、B要素がホモ二量体として結合すると転写リプレッサー（抑制因子）として働くと提唱されている。実際、これは、遺伝子操作によって転写活性化因子（RelA-p50ヘテロ二量体）に加えてI-B（全長p105）と類似のリプレッサー（p50ホモ二量体）を取り除く研究である、p105-ノックアウト研究の解明を混乱させる。

【0261】

NF-Bは細胞応答を制御するのに重要である。その理由は、それが「迅速に作用する（rapid-acting）」一次転写因子、すなわち不活性状態で細胞中に存在し、活性化状態になるために新たなタンパク質合成を必要としない転写因子のカテゴリーに属する。これは、NF-Bを有害な細胞刺激に対して急性応答因子にする。NF-B活性の既知の誘導因子は、非常に多種多様であり、反応性酸素種（ROS）、腫瘍壞死因子（TNF）、インターロイキン1（IL-1）、細菌性リポ多糖（LPS）、イソプロテレノール、コカイン、および電離放射線を包含する。多くの細菌産生物や多種多様な細胞表面受容体の刺激が、NF-B活性化と、遺伝子発現の急速な変化を引き起す。特異的パターン認識分子としてのToll様受容体（TLR）の同定と、TLRsの刺激がNF-Bの活性化を引き起すという知見が、どのようにして多様な病原体がNF-Bを活性化するかの本発明者らの理解を高めた。例えば、本発明者らの研究は、グラム陰性菌

10

20

30

40

50

のLPS成分の受容体としてTLR4を同定した。

【0262】

未刺激状態の細胞では、NF-B二量体は、I-B（B阻害剤）と呼ばれる1つの阻害剤ファミリー（これはアンキリン反復と呼ばれる配列の多重コピーを含むタンパク質である）により細胞質中に閉じ込められている。それらのアンキリン反復ドメインによって、I-Bタンパク質はNF-Bタンパク質の核移行シグナル（NLS）をマスクし、それらを不活性型の状態で細胞質に閉じ込めたままにしている。I-Bは、N末端制御ドメインに続き、6つ以上のアンキリン反復配列とC末端付近にPESTドメインを有している。I-BファミリーはI-、I-、I-BおよびBcl-3から成るが、最もよく研究されており重要であるI-Bタンパク質はI-Bである。

10

【0263】

C末端部分のアンキリン反復の存在のため、p105とp100もI-Bタンパク質として機能する。p100のC末端半分は、しばしばI-Bと呼ばれ、それも阻害剤として機能する。発生学的な刺激、例えばLT-Rを通して伝達される刺激に応答して起こるI-B分解は、NIK依存性の非古典的（non-canonical）経路においてNF-B二量体の活性化を増強する。

【0264】

NF-Bの活性化は、I-Bタンパク質のシグナル誘導分解により開始される。これは主に「IKK」またはI-Bキナーゼと呼ばれるキナーゼの活性化を介して起こる。従って、本特許出願において用いる用語「IKK/NF-B活性化」という用語は、IKKの活性化を通したNF-Bの活性化を指す。

20

【0265】

IKKは、触媒性IKKとIKKサブユニットのヘテロ二量体と、NEMO（NF-B必須モジュレーター）またはIKKと称する「マスター」制御タンパク質から構成される。シグナルにより活性化されると、I-BキナーゼがI-B制御ドメイン中に位置する2つのセリン残基をリン酸化する。それらのセリン（例えば、ヒトI-Bではセリン32と36）のリン酸化と同時に、I-B阻害剤分子はユビキチン化と呼ばれる過程により修飾され、プロテアソームによる分解を受ける。I-Bの分解により、NF-B複合体は遊離されて自由になり核へと移行し、そこで近隣の、NF-BのためのDNA結合部位を有する特定の遺伝子の発現を「発動させる（turn-on）」。次いでNF-Bによるそれらの遺伝子の活性化が所定の生理学的応答、例えば炎症または免疫応答、細胞生存応答、または細胞増殖を引き起こす。NF-Bは自身のリプレッサーであるI-Bの発現を発動させる。新たに合成されたI-Bが次いでNF-Bを再抑制し、それによりオートフィードバック・ループを形成し、NF-B活性レベルの振動、抑制（dampening）および下流制御（ダウンレギュレーション）をもたらす。

30

【0266】

本発明によれば、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-B活性化は、遺伝毒性ストレスの発生を通して誘導されるシグナル伝達経路に関し、該経路はIKKの活性化と結果としてNF-Bの活性化に至る。遺伝毒性ストレスは、2つの対応するシグナル伝達軸を触発し、古典的な（canonical）NF-Bシグナル伝達カスケードと同様にしてI-Bキナーゼ（IKK）複合体を活性化させる。第一軸は、DNA鎖切断センサーであるポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ-1（PARP-1）により開始され、それが一過性核質複合体を構築し、PIASy媒介SUMO化と、変異された血管拡張性失調症遺伝子（ATM）により媒介される核IKKのリン酸化を発動させる。修飾されたIKKは細胞質に戻り、新しく形成されたIKK複合体に集成する。同時にATMが細胞質に移行し、TRAF6に結合し、そのK63結合ポリユビキチン化を触発する。活性化されたTRAF6はcIAP1とTAB2-TAK1をリクルートし、結果としてTAK1活性化とIKKリン酸化を引き起こす。しかしながら、IKK複合体の最終的活性化は、リジン285位でのIKKのcIAP1依存性IKKモノユビキチン化を必要とし、それは核のPARP1シグナルソームの形成と、TRAF6のATM依存性活

40

50

性化による細胞質シグナル伝達軸の活性化に依存する。

【0267】

遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化に関連した疾患としては、限定されないが、疾病の進行中に起こる、確立された疾病に起こる、または疾病の化学療法もしくは放射線療法の結果として起こる、癌、特に結腸癌、胃癌、乳癌、黒色腫、骨髓異形症候群、急性骨髓性白血病(AML)、増加したPARP-1発現による腫瘍、例えばユーリング肉腫、悪性リンパ腫、結腸直腸発癌の初期、血液細胞癌、非定型および定型子宮内膜増殖症、乳癌、子宮癌、肺癌および卵巣癌が挙げられる。遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化に関連した非癌疾患および状態には、限定されないが、I型糖尿病、II型糖尿病、発作、くも膜下出血(SAH)、再灌流傷害、特に腎臓および心臓の再灌流傷害、アテローム性動脈硬化症、早老症並びに老化が含まれる。

【0268】

当業者は、標準的な分析手段を用いることにより、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化を顯示する癌を患っている対象者を同定することができる。治療すべきである本発明の対象を同定するために、癌患者からの腫瘍標本において遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF- κ B活性化を同定するアッセイは多数存在し、その一部が下記に示される。以下の方法は、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化を示す癌を患っている対象者を同定するためのアッセイの例であり、該アッセイの網羅的(完全)なリストとして解釈してはならない。

【0269】

次の5種のタンパク質修飾は、IKK/NF- κ B活性化が遺伝毒性ストレス、例えばDNA二本鎖切断(DSB)(これは例えば化学療法薬または放射線照射により生じさせることができる)により誘導されたことを示す:ホスホ-Ser 139 H2A.X、ホスホ-Ser 1981-ATM、ホスホ-Ser 85 IKK、IKKのLys 285位でのモノユビキチン化、およびホスホ-Ser 536-RelA(それらの修飾についての参考はHinz他(2009)Mol Cell中に見つかる)。指摘したタンパク質修飾は、市販の抗体を用いる確立された方法により、例えばウエスタンプロット分析または他の抗体ベースの技術を使ってアッセイすることができる。それらの修飾を検出するための追加の方法は質量分析技術である。

【0270】

1) ホスホ-Ser 139 H2A.X: PI3K様キナーゼATM、ATRおよびDNA-PKによる、残基Ser-139の所でのH2A.Xのリン酸化は、化学療法薬または放射線照射によるDSBの生成に対する細胞応答についての初期の情報読み出し(readout)である。

2) ホスホ-Ser 1981-ATM: この修飾は化学療法薬または放射線照射により生成したDSBsによるATMの活性化を示す。

3) ホスホ-Ser 85 IKK: 現在の知見によれば、この修飾はDSBsを有する細胞においてのみ検出され、DSB-活性化ATMの存在を示す。それはDSBによるNF- κ B活性化を促進する。

4) IKKのLys 285位におけるモノユビキチン化: この残基のユビキチン化は、サイトカイン誘発NF- κ Bに比較して、遺伝毒性ストレス(すなわちDSB)誘発NF- κ Bにおいてより高度に生じる。

5) ホスホ-Ser 536-RelA: この修飾は、遺伝毒性ストレスにより誘導される経路に限定されない、多岐の活性化経路を通したNF- κ B活性化を示す。

【0271】

本発明の化合物の適用および医薬としてのその使用に適当である患者および遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF- κ B活性化を示す癌を罹患している対象者としては、DNA損傷を誘発する化学療法または放射線で処置しているまたは以前に処置された任意の癌型を有する対象者を含む。

【0272】

10

20

30

40

50

本発明の化合物の使用は、ある場合には、遺伝毒性療法（化学療法、放射線療法）における「追加（add-on）」薬として、アポトーシスに対するN F - B 依存性保護を抑制することにより、癌 / 腫瘍細胞の致死を増加させるために主に使用することができる。かくして、治療成功率を改善することができる悪性腫瘍の広範スペクトルが得られるだろう。

【 0 2 7 3 】

P A R P 1 - P I A S y - A T M - I K K 複合体およびA T M - T R A F 6 軸は、多数の異なる癌型において化学療法および / または放射線療法により活性化されるだろうと予想される。上記のアッセイは、ある特定の疾患において各々の標準的化学療法または放射線療法プロトコルによる遺伝毒性ストレスにより誘導されるN F - B 経路の活性化を確認するために用いることができる。該アッセイは、本発明の化合物を適用すると決定するために治療耐性の癌にも用いることができる。該アッセイは、未修復の高レベルのD N A 損傷を有すると予想される癌への任意治療に先立って適用することができる（例えばD N A 修復遺伝子中の変異が実証されている場合）。

【 0 2 7 4 】

好ましい態様において、本発明は治療すべき疾患としての癌に関する。本発明に係る癌は、白血病、リンパ腫、肉腫、黒色腫および癌腫をはじめとする、哺乳動物に見られるあらゆる型の癌または新生物または悪性腫瘍を指す。癌の例は、乳癌、肺腺癌、結腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および前立腺癌である。

【 0 2 7 5 】

本発明の関連において、白血病は、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血性白血病、好塩基球性白血病、芽球性白血病、ウシ白血病、慢性骨髓性白血病、皮膚白血病、胎児性白血病、好酸球性白血病、Gross白血病、毛様細胞性白血病、血球芽細胞性白血病、血球母細胞性白血病、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性单球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病、リンパ性白血病、リンパ肉腫細胞白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、小骨髓芽球性白血病、单球性白血病、骨髓芽球性白血病、骨髓性白血病、骨髓顆粒球性白血病、骨髓单球性白血病、Naegeli白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、前骨髓性白血病、Rieder細胞白血病、シリング白血病、幹細胞白血病、亜白血病性白血病、および未分化細胞白血病を含むが、それに限定されない。

【 0 2 7 6 】

本発明によれば、リンパ腫は、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫（B細胞およびT細胞リンパ腫）を含むが、これに限定されず、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、原発性縦隔B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ組織（M A L T）リンパ腫としても知られる節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫および脾性辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫（W a l d e n s t r o mマクログロブリン血症）、毛様細胞白血病性原発性中枢神経系（C N S）リンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫 / 白血病、末梢T細胞リンパ腫、皮膚T細胞性リンパ腫（菌状息肉腫、セザリー症候群など）、くすぶり型、慢性型、急性型およびリンパ腫亜型を含む成人T細胞白血病 / リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラー細胞 / T細胞リンパ腫、鼻型、腸症型腸管T細胞リンパ腫（E A T L）、未分化大細胞リンパ腫（A L C L）、および未特定末梢性T細胞リンパ腫を含む。

【 0 2 7 7 】

本発明の関連において定義される肉腫としては、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、A b e r n e t h y肉腫、脂肪組織肉腫、脂肪肉腫、胞巣状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色種肉腫、絨毛腫、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球肉腫、イエンセン肉腫、カポジ肉腫、クッパー細胞

10

20

30

40

50

肉腫、血管肉腫、白血球肉腫、悪性間葉腫肉腫、傍骨性肉腫、網状赤血球肉腫、ラウス肉腫、血清肉腫、滑膜肉腫、および毛細管拡張性肉腫が挙げられるが、それに限定されない。

【0278】

本発明による黒色腫には、例えば、末端性黒子性黒色腫、無色素性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、Harding-Passsey黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、結節型黒色腫、爪下黒色腫、および表在拡大型黒色腫が含まれるが、これらに限定されない。

【0279】

本発明によって定義される癌腫には、細葉細胞癌、房癌腫、腺様囊胞癌腫、腺房細胞癌、腫囊胞腫、腺様囊胞癌、腺癌、副腎皮質癌、肺胞癌、肺胞細胞癌、基底細胞癌、基底細胞癌腫、類基底細胞腫、基底有棘細胞癌、気管支肺胞癌、気管支癌、気管支性癌、脳状癌、胆管細胞癌、絨毛癌、膠様癌、面皰癌、小体癌、篩状癌、よろい状癌、皮膚癌、円筒癌、円柱細胞癌、腺管癌、デュラム癌、胚性癌、脳様癌、類表皮癌、腺様上皮癌、外方増殖性癌、潰瘍癌、線維癌、ゼラチン状癌、膠様癌、巨細胞癌、巨大細胞性癌、腺癌、下流膜細胞癌、毛母体癌、血液様癌、ヒュルトレ細胞癌、肝細胞癌、ヒアリン癌、副腎様癌、乳児胚性癌、上皮内癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher癌、Kulchitzky細胞癌、大細胞癌、レンズ状癌、脂肪腫癌、リンパ上皮癌、髓様癌、髓質様癌、メラニン性癌、軟性潰瘍腫、粘液性癌、粘液癌、粘液細胞性癌、粘膜表皮性癌、粘液癌、粘液性癌、粘液腫状癌、鼻咽腔癌、燕麦細胞癌、骨化癌、類骨癌、乳頭癌、門脈周辺癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、糊状癌、腎臓の腎細胞癌、補充細胞癌、肉腫様癌、シュナイダー癌、スキルス癌、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、solanoид癌、橢円状細胞癌、紡錘細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、糸状癌、毛細管拡張性癌、毛細血管拡張性癌、移行細胞癌、結節性癌、結節状癌、いぼ状癌、および絨毛癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0280】

本発明による追加の癌は、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板増加症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃癌、結腸癌、悪性肺臓島腫、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、食道癌、尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌を含むが、これらに限定されない。

【0281】

本発明に関連して、「DNA損傷」という用語は、DNA鎖の切断、DNA骨格からの塩基の欠失、または化学的に変化した塩基など、DNAの化学構造の変化を指す。自然に発生するDNAへの損傷は、代謝または加水分解過程から生じる可能性がある。代謝は、中でも活性酸素種、反応性窒素種、反応性カルボニル種、脂質過酸化物およびアルキル化剤をはじめとするDNAを損傷する化合物を放出し、一方で加水分解はDNA中の化学結合を切断する。ほとんどのDNA損傷はDNA修復を受けることができるが、そのような修復は100%有効ではない。未修復のDNA損傷は、成体哺乳動物の脳または筋肉内の細胞などの非複製性細胞に蓄積し、老化を引き起こしうる。結腸の内側にある膜の細胞などの複製性細胞では、DNAの錆型鎖における過去の損傷の複製時にまたはDNA損傷の修復中にエラーが発生する。これらのエラーは突然変異またはエピジェネティック変異を引き起こす可能性がある。これらのタイプの変異は両方とも複製され、その後の細胞世代に受け継がれるだろう。これらの変異は遺伝子機能または遺伝子発現の調節を変更し、そしておそらく癌への進行に寄与し得る。DNA損傷を修復できない場合、転写や複製の阻害、突然変異誘発、および/または細胞傷害性が生じる可能性がある。ヒトでは、DNA損傷は、様々な遺伝的に受け継がれる疾患、老化、および発癌に関与することが示されている。

【0282】

すべての真核細胞は、DNA損傷による潜在的に有害な作用を打ち消すために多面的な応答を進化させた。DNA損傷または複製の停止を感じると、細胞周期チェックポイント

10

20

30

40

50

トが活性化されて細胞周期の進行を停止させ、損傷が娘細胞へと受け継がれる前に修復のための時間を設ける。チェックポイント活性化に加えて、DNA損傷応答は、転写プログラムの誘導、DNA修復経路の増強、損傷の程度が深刻な場合にはアポトーシスの開始を引き起こす。遺伝物質が細胞内で正確に維持され、複製され、そして分離されるように、これらの全ての過程が注意深く連係される。

【0283】

「DNA修復」という用語は、本発明の関連において使用される場合、DNA損傷後に失った情報を回復するための幾つかの細胞過程または経路のことを指す。これらの過程および経路は、G1期チェックポイント、S期チェックポイント、G2期-M期チェックポイントなどの細胞周期チェックポイント、並びに直接反転、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、DNAミスマッチ修復、および二本鎖切断修復などのDNA修復経路を含むが、これらに限定されない。DNA修復率は、細胞の種類、細胞の年齢、細胞外環境など、さまざまな要因に依存する。

【0284】

大量のDNA損傷を蓄積し続けた細胞、またはそのDNAに生じた損傷をもはや効果的に修復できない細胞は、老化として知られる不可逆的な休止状態、プログラムされた細胞死プログラムであるアポトーシス、他の細胞死プログラム、例えば壊死、非アポトーシスプログラム細胞死またはネクロトーシス、癌性の腫瘍の形成を引き起こしうる無秩序な細胞分裂といった、様々な細胞過程を受ける可能性がある。

【0285】

本発明の意味において、「DNA修復遺伝子」という用語は、DNA修復機構や経路の制御または調節に関与する全ての遺伝子を指す。これらには、限定するものではないが、塩基除去修復(BER)に関しては、UNG、SMUG1、MBD4、TDG、OGG1、MUTYH(MYH)、NTHL1(NTH1)、MPG、NEIL1、NEIL2、NEIL3、APEX1(APE1)、APEX2、LIG3、XRCC1、PNKP、APLF(CC2ORF13)；DNAに結合するポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)酵素に関しては、PARP1(ADPRT)、PARP2(ADPRTL2)、PARP3(ADPRTL3)；損傷の直接反転に関してはMGMT、ALKBH2(ABH2)、ALKBH3(DEPC1)；DNA-トポイソメラーゼ架橋の修復に関してはTDP1、TDP2(TTRAP)；ミスマッチ切除修復(MMR)に関してはMSH2、MSH3、MSH6、MLH1、PMS2、MSH4、MSH5、MLH3、PMS1、PMS2L3；ヌクレオチド除去修復(NER)に関しては、XPC、RAD23B、CETN2、RAD23A、XPA、DDB1、DDB2(XPE)、RPA1、RPA2、RPA3、TFIIF、ERCC3(XPB)、ERCC2(XPD)、GTF2H1、GTF2H3、GTF2H4、GTF2H5(TTDA)、CDK7、CCNH、MNAT1、ERCC5(XPG)、ERCC1、ERCC4(XPF)、LIG1；NER関連ERCC8(CSA)、ERCC6(CSB)、UVSSA(KIAA1530)、XAB2(HCNP)、MMS19；相同組換えに関しては、RAD51、RAD51B、RAD51D、DMC1、XRCC2、XRCC3、RAD52、RAD54L、RAD54B、BRCA1、SHFM1(DSS1)、RAD50、MRE11A、NBN(NBS1)、RBBP8(CTIP)、MUS81、EME1(MMS4L)、EME2、GIYD1(SLX1A)、GIYD2(SLX1B)、GEN1；ファンコニ貧血に関しては、FANCA、FANCB、FANCC、BRCA2(FANCD1)、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG(XRCC9)、FANCI(KIAA1794)、BRIP1(FANCI)、FANCL、FANCM、PALB2(FANCN)、RAD51C(FANCO)、BTBD12(SLX4)(FANCP)、FAAP20(C1orf86)、FAAP24(C19orf40)；非相同末端結合に関しては、XRCC6(Ku70)、XRCC5(Ku80)、PRKDC、LIG4、XRCC4、DCLRE1C(Artemis)、NHEJ1(XLF, Cernunnous)；ヌクレオチドポールの調節については、NUDT1(MTH1)、D

10

20

30

40

50

UT、PRM2B (p53R2) ; DNAポリメラーゼ(触媒サブユニット)については、POLB、POLG、POLD1、POLE、PCNA、REV3L (POLZ)、MAD2L2 (REV7)、REV1L (REV1)、POLH、POLI (RAD30B)、POLQ、POLK (DINB1)、POLL、POLM、POLN (POL4P) ; ヌクレアーゼの編集およびプロセシングすることに関しては、FEN1 (DNase IV)、FAN1 (MTMR15)、TREX1 (DNase III)、TREX2、EXO1 (HEX1)、APTX (アプラタキシン)、SPO11、ENDOV ; ユビキチン化および修飾に関しては、UBE2A (RAD6A)、UBE2B (RAD6B)、RAD18、SHPRH、HLTF (SMARCA3)、RNF168、SPRTN (C1orf124)、RNF8、RNF4、UBE2V2 (MMS2)、UBE2N (UBC13) ; クロマチン構造と修飾に関しては、H2AFX (H2AX)、CHAF1A (CAF1)、SETMAR (METNASE) ; DNA損傷剤に対する感受性に関連した疾患における遺伝子欠損に関しては、BLM、WRN、RECQL4、ATM、TTDN1 (C7orf11) ; 既知のまたは疑わしいDNA修復機能を有する他の同定された遺伝子に関しては、DCLRE1A (SNM1)、DCLRE1B (SNM1B)、RPA4、PRPF19 (PSO4)、RECQL (RECQL)、RECQL5、HELQ (HEL308)、RDM1 (RAD52B)、OBFC2B (SSB1) ; 他の保存されたDNA損傷応答遺伝子についてはATR、ATRIP、MDC1、RAD1、RAD9A、HUS1、RAD17 (RAD24)、CHEK1、CHEK2、TP53、TP53BP1 (53BP1)、RIF1、TOPBP1、CLK2、PER1が含まれる。

【0286】

本発明の一実施形態では、化合物は、TNF- (TNF) および / または IL-1 により誘導されるNF- Bシグナル伝達の阻害と比較して、好ましくは遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF- Bシグナル伝達を阻害することにおいてより効果的である。

【0287】

本発明によれば、TNF すなわち腫瘍壞死因子アルファは、全身性炎症に関する細胞シグナル伝達タンパク質(サイトカイン)であり、急性期応答を構成するサイトカインの1つである。TNF は免疫細胞を調節し、発熱、アポトーシス細胞死、悪液質、炎症を誘発し、腫瘍形成とウイルス複製を阻害し、そしてIL1とIL6産生細胞を介して敗血症に応答することができる。TNF 産生の異常調節は、アルツハイマー病、癌、大うつ病、乾癬および炎症性腸疾患 (IBD) をはじめとする様々なヒトの疾患に関係があるとされている。TNF は、2つの受容体、TNFR1 (TNF受容体タイプ1 ; CD120a ; p55/60) とTNFR2 (TNF受容体タイプ2 ; CD120b ; p75/80) に結合することができる。TNFRシグナル伝達は、NF- Bの活性化を含む、複数の細胞内シグナル伝達経路の活性化を誘導する。

【0288】

本発明の意味において、IL-1 は、他の名称の中でも、「白血球発熱物質」、「白血球内因性メディエーター」、「単核細胞因子」、「リンパ球活性化因子」としても知られており、それはヒトではIL1B遺伝子によってコードされるサイトカインタンパク質である。IL-1 は、サイトカインのインターロイキン1ファミリーの一員である。このサイトカインは、活性化マクロファージにより前駆タンパク質として産生され、それはカスパーゼ1 (CASP1 / ICE) によりタンパク質分解的にその活性型へとプロセシングされる。このサイトカインは炎症反応の重要なメディエーターであり、細胞増殖、分化およびアポトーシスを含む様々な細胞活性に関与している。

【0289】

本発明の関連において、用語「TNF および / または IL-1 により誘導されるNF- Bシグナル伝達」とは、TNF および / または IL-1 で刺激されると活性化される古典的または標準的NF- Bシグナル伝達経路の活性化を指す。古典的シグナル伝達経路において、NF- B / Relタンパク質はI Bタンパク質により結合され阻害される。TNF やIL-1 などの炎症誘発性サイトカイン、LPS、成長因子、お

10

20

30

40

50

および抗原受容体は、I-Bタンパク質をリン酸化するIKK複合体活性化（IKK、IKK、およびNEMO）に至るシグナル伝達カスケードを誘導する。I-Bのリン酸化は、そのユビキチン化とプロテアソーム分解をもたらし、NF-B/Rel複合体を遊離させる。活性型NF-B/Rel複合体は、翻訳後修飾（リン酸化、アセチル化、グリコシル化、ユビキチン化）により更に活性化され、核に移行し、そこで単独で、またはAP-1、EtsおよびStatといった他の転写因子と一緒に、それらは標的遺伝子の発現を誘導する。

【0290】

本発明はまた、欠陥のあるDNA修復機構によるゲノムの不安定性に関連した疾患の治療に関する。

10

【0291】

本発明の関連において使用される「ゲノム不安定性」という用語は、1つの細胞系統のゲノム内での高頻度の突然変異を指す。そのような突然変異は、核酸配列の変化、染色体再配列または異数性を含み得る。ゲノムの不安定性は細菌で起こる。多細胞生物では、ゲノムの不安定性が発癌の中心となり、多様な癌型で発生する。当業者は、日常的な試験によりゲノム不安定性と関連した癌を容易に同定することができる。ゲノム不安定性に関連する癌以外の他の疾患は、筋萎縮性側索硬化症や神経筋疾患、筋緊張性ジストロフィーなどの神経変性疾患を含む。

【0292】

多くの神経障害および神経変性障害は、DNA修復経路の遺伝性または後天性の欠陥、または過剰な遺伝毒性酸化ストレスによるゲノム不安定性に関連づけられる。これは、色素性乾皮症、コケーン症候群、硫黄欠乏性毛髪発育異常症（トリコチオジストロフィー）、ダウン症、トリプルA症候群、軸索変性性ニューロパチー1を伴う脊髄小脳性運動失調症、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群および筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、様々な脊髄小脳性運動失調症、フリードライヒ運動失調症、筋緊張性ジストロフィー1型と2型、毛細血管拡張症運動失調症、毛細血管拡張症運動失調症様障害、ナイマー・ヘン破損症候群およびアルツハイマー病をはじめとする、多くのそのような疾患について確立されている。色素性乾皮症、コケーン症候群、硫黄欠乏性毛髪発育異常症、ダウン症候群およびトリプルA症候群は、DNAスクレオチド切除修復経路に欠陥があり、軸索変性性ニューロパチー1を伴う脊髄小脳性運動失調、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、ダウン症候群および筋萎縮性側索硬化症は、酸化ストレスの増加およびこれが引き起こすDNAへの損傷を処理するための塩基除去修復経路の不能を生じるかまたはそれと関連付けられる。ハンチントン病、様々な脊髄小脳性運動失調症、フリードライヒ運動失調症および筋緊張性ジストロフィー1型および2型はしばしば、おそらくゲノム不安定性に起因するDNAの反復配列の異常な拡大を有し、そして毛細血管拡張性運動失調症、毛細血管拡張性運動失調症様障害、ナイマー・ヘン破損症候群およびアルツハイマー病は、DNA二本鎖切断の修復に関与する遺伝子に欠陥がある。

20

30

【0293】

癌においては、ゲノム不安定性は形質転換の前にまたはその結果として起こり得る。ゲノム不安定性とは、DNAまたは染色体の余分なコピーの蓄積、染色体転座、染色体逆位、染色体欠失、DNAの一本鎖切断、DNAの二本鎖切断、DNA二重らせんへの外来物質のインターラーション、またはDNAの損失か遺伝子の誤発現のいずれかを引き起こし得るDNA三次元構造のいずれかの異常な変化を指すが、それらに限定されない。これらの事象の予測不可能な性質もまた、腫瘍細胞の間で観察される不均一性の主な一因である。

40

【0294】

ゲノム不安定性に関連する他の疾患としては、腫瘍を含む、早老症候群（PS）および潜在的に関連するNF-B依存性病変が挙げられる。PSの例としては、ウェルナー症候群（WS）、ブルーム症候群（BS）、ロスマンド・トムソン症候群（RTS）、コケーン症候群（CS）、色素性乾皮症（XP）、硫黄欠乏性毛髪発育異常症（TTD）、合

50

併型色素性乾皮症 - コケーン症候群 (X P - C S) 、拘束性皮膚症 (R D) 、およびハッシュソン・ギルフォード早老症候群 (H G P S) が挙げられる。

【 0 2 9 5 】

本発明の関連において、「欠陥のある」という用語は、それが正しく機能するのを妨げる問題または欠陥を有する、DNA修復系またはDNA損傷応答系のような細胞機構の何かを指す。

【 0 2 9 6 】

本発明の関連において、「改変」という用語は、本発明の関連において使用されるとき、何らかの元の状態が変化または変更されるように行われる任意の種類の変更、修正または調整を指す。従って、遺伝子改変とは、核酸分子のヌクレオチド配列に関して生じる変化を含む、遺伝物質上で起こっている変化を指す。エピジェネティック変異は、分子のヌクレオチド配列を変えない、核酸分子（例えばDNA分子）のエピジェネティック状態の変化を指す。エピジェネティック変異は核酸上またはクロマチン上で起こり得、これはヒストンおよびヒストン修飾を含む。エピジェネティック修飾または変異は、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシリ化およびシトルリン化を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 2 9 7 】

本発明の意味における「耐性」という用語は、疾患または状態を治療する際の抗菌薬、駆虫薬または抗腫瘍薬などの薬物の有効性の低下を指す。この用語は、例えば、薬物に対して、または病原体もしくは癌細胞に対して向けられる別の治療もしくは機構に対して「獲得された」耐性を有する病原体もしくは癌細胞に関して使用される。抗菌薬耐性および抗腫瘍薬耐性は、生物または癌細胞が複数の薬物に対して耐性である場合、多剤耐性であると言われる。

20

【 0 2 9 8 】

本発明によれば、癌治療耐性とは、化学療法、放射線療法、細胞療法および標的療法のような治療に対する、様々な機序を経由した癌細胞による耐性の発生を指す。これらの機序は、癌細胞および/または癌細胞が存在する微小環境における特定の遺伝的およびエピジェネティック変化を含む。また、NF - B 経路を含む様々なシグナル伝達経路の活性化は、癌治療耐性の発達に寄与しうる。「アポトーシスに対するNF - B 媒介耐性」という用語は、本発明の関連において使用される場合、遺伝毒性ストレス活性化NF - B 経路がアポトーシスの誘導を阻害するような細胞機序のことを指す。DNA損傷性のある癌治療に応答したNF - B 活性化は、誘導性の腫瘍細胞耐性の主な細胞機序である。

30

【 0 2 9 9 】

本発明の意味において治療誘発性腫瘍細胞アポトーシスに対するNF - B 媒介耐性に関連する癌には、BRCA1またはBRCA2変異卵巣癌、乳癌、子宮頸癌、胃癌、膵臓癌または前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 0 】

本明細書に記載の本発明化合物は、それが固体、液体またはエアロゾル形態で投与されるかどうか、注射のような投与経路のために無菌である必要があるかどうかに応じて、異なる種類の担体を含むことができる。本発明は、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻腔内、硝子体内、膣内、直腸内、局所的、腫瘍内、筋肉内、皮下、結膜下、膀胱内、粘膜内、心膜内、臍内、眼内、経口、局所的、局部、吸入（例えばエアロゾル吸入）、注射、注入、持続注入、局所灌流入浴、標的細胞に直接に、カテーテルを介して、クリーム中で、脂質組成物（例えばリポソーム）中で、当業者に知られているような他の方法または前記の任意組み合わせにより、投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版、Mack Printing Company, 1990を参照のこと）。

40

【 0 3 0 1 】

本発明において、用語「癌治療」は、手術、化学療法、放射線療法、照射療法、ホルモ

50

ン療法、標的療法、細胞療法、癌免疫療法、モノクローナル抗体療法を含むがこれらに限定されない、あらゆる種類の癌治療を指す。

【0302】

化合物の投与は、単剤療法として個別に、または1つ以上の他の癌療法と併用して行うことができる。本発明の関連において、「併用して」という用語は、本発明による化合物を投与される個体が、必ずしも同時に起こるわけではない別の癌治療を、単一の薬理学的組成物中でまたは同じ経路を介して受けることを示す。従って「併用」とは、複数の癌治療により癌に罹患している個体を治療することを指す。併用投与は同時治療または共同治療を含み、治療が互いに数分以内に、同じ時間に、同じ日に、同じ週に、または同じ月に行われることができる。

10

【0303】

本発明の意味におけるDNA損傷誘発性癌治療は、照射療法および化学療法を含み、そしてDNA損傷を修復するための細胞の能力を圧倒して細胞死を引き起こすことによる作用を含むが、これらに限定されない。

【0304】

これに関連して、化学療法は、標準化された化学療法レジメンの一部として1つ以上の抗癌剤（化学療法薬）を使用する癌治療のカテゴリーを指す。化学療法は治癒目的（ほとんど常に薬の併用を伴う）で行われる場合もあれば、延命または症状の軽減を目的とする場合もある（緩和的化学療法）。化学療法は内科腫瘍学（癌の薬物療法を専門とする医学分野）の主なカテゴリーの1つである。化学療法薬は癌を治療するために使用され、数日から数週間の期間にわたって2以上の薬剤を組み合わせて、1つ以上の周期計画で投与される。このような薬剤は、高い増殖速度を有する細胞、例えば癌それ自体に対してだけでなく、消化管（恶心および嘔吐を引き起こす）、骨髄（様々な血球減少症を引き起こす）および毛髪（禿頭症を生じる）に対しても毒性である。

20

【0305】

化学療法剤は、限定されないが、アクチノマイシン、オールトランス型レチノイン酸、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチニン、カペシタビン、シスプラチニン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、メクロレタミン、メルカブトプリン、メトトレキサート、ミトキサンtron、オキサリプラチニン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルルビシン、ビンブラスチニン、ビンクリスチニン、ビンデシン、ビノレルビンを包含する。

30

【0306】

本発明の関連における照射または放射線療法は、一般に癌細胞または腫瘍細胞などの悪性細胞を制御または死滅させるための癌治療の一部として、電離放射線または紫外-可視(UV/VIS)放射線を使用する治療アプローチに関する。放射線療法は、それらが身体の1領域に限局化される場合、多くの癌型において治癒的でありうる。それは原発性悪性腫瘍（例えば乳癌の早期）を切除するための手術後の腫瘍の再発を予防するために、補助療法の一部として使用することもできる。放射線療法は化学療法と相乗的であり、感受性癌では化学療法の前、最中、および後に使用されている。放射線療法は、細胞増殖を抑制するその能力のために癌性腫瘍に一般的に適用される。電離放射線は癌性組織のDNAを損傷して細胞死をもたらすことにより機能する。放射線療法は全身的または局所的に使用することが可能である。

40

【0307】

放射線療法は癌性細胞のDNAを損傷することによって機能する。このDNA損傷は、光子または荷電粒子という2種類のエネルギーのうちの1つによって引き起こされる。この損傷は、DNA鎖を構成する原子の直接的または間接的イオン化である。間接的イオン化は水のイオン化の結果として起こり、ヒドロキシリラジカルを含むフリーラジカルが形

50

成され、それがDNAにダメージを与える。光子療法では、放射線効果の大部分がフリーラジカルにより媒介される。細胞は一本鎖DNA損傷や二本鎖DNA損傷を修復するための機序を有する。しかしながら、二本鎖DNA切断は修復がはるかに困難であり、劇的な染色体異常や遺伝子欠失を招く可能性がある。標的指向性(ターゲティング)二本鎖切断は、細胞が細胞死を受ける可能性を高める。

【0308】

光子放射線療法で使用される放射線量はグレイ(Gy)単位で測定され、治療すべき癌の型と病期に依存して異なる。根治的治療では、固形上皮腫瘍の典型的線量は60~80 Gyの範囲であり、リンパ腫は20~40 Gyで治療される。予防的(補助)線量は典型的には、1.8~2 Gy画分で約45~60 Gyである(乳癌、頭部癌、および頸部癌)。

10

【0309】

従来の外照射療法、定位照射(放射線外科手術)、仮想シミュレーション、三次元原体照射療法、および強度変調放射線療法、強度変調放射線療法、強度変調放射線療法(IMRT)、強度変調回転放射線療法(VMAT)、粒子療法、オージェ療法、小線源療法、術中放射線療法、放射線同位体療法、深吸気息止めをはじめとする、様々な種類の放射線療法が知られている。

【0310】

外照射療法は、X線、ガンマ線および荷電粒子を含み、全体的な治療アプローチに応じて低線量率または高線量率として適用することができる。

【0311】

内照射療法では、放射性物質を1つ以上のモノクローナル抗体に結合させることができる。例えば、放射性ヨウ素は甲状腺悪性腫瘍に使用することができる。前立腺癌では、高線量用法(HDR)または低線量用法(LDR)の近接照射療法をIRと併用することができる。

20

【0312】

本発明によれば、DNA損傷を誘導する化学療法は、化学療法薬、例えば非限定的に、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン、ミトキサントロンなどのアントラサイクリン類；イリノテカン(CPT-11)やトポテカンなどのトポイソメラーゼIの阻害剤；エトポシド、テニポシドおよびタフルポシドを含むトポイソメラーゼIIの阻害剤；カルボプラチニン、シスプラチニンおよびオキサリプラチニンなどの白金系の薬剤；並びにブレオマイシンのような他の化学療法薬の投与を含む。

30

【0313】

医薬組成物は、経口、直腸、眼内、鼻腔内、肺内、もしくは経皮送達による投与、または他の表面への局所送達による投与を含む、様々な粘膜投与様式によって対象者に投与することができる。任意に、組成物は、筋肉内、眼内、皮下、静脈内、動脈内、関節内、腹腔内、髄腔内、脳室内または非経口経路を含む、非粘膜経路によって投与することができる。

【0314】

本開示の組成物は、生理学的条件に近似させるのに必要とされる医薬的に許容される担体物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、等張化剤、湿润剤など、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、およびトリエタノールアミンオレエートを含むことができる。固体組成物の場合、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む、従来の非毒性の医薬的に許容される賦形剤を使用することができる。

40

【0315】

本開示はまた、哺乳類対象における疾病および他の状態の予防および治療に用いられる、本明細書に記載の医薬組成物、活性成分、および/またはそれらを投与するための手段を含む、キット、包装品および多容器ユニットを包含する。

50

【0316】

本発明を下記図面により更に説明する。これらは本発明の範囲を限定する意図ではなく、本明細書中に記載される本発明のより詳細な説明のために提供される本発明の態様の好みの実施形態を表すものである。

【0317】

〔図面の詳細な説明〕

図1: DNA二本鎖が切断されると、センサーパク質であるATMとPARP1が活性化される。PARP1はポリ(ADP)リボース(PAR)鎖の自己修飾を受け、IKK複合体のサブユニットIKK_α、PIASyおよび活性化型ATMのリクルートのための足場として働く。この核PARP1シグナロソームの形成は、PIASyによるIKK_α-SUMO化とATMによるリン酸化という翻訳後修飾を引き起こす。SUMO化されリン酸化されたIKK_αは細胞質へと輸送され、そこでおそらくIKKホモ複合体に組み込まれる。同時に、ATMは細胞質に移行する。TRAF6に結合した後、それはUbC13-アシスト型リシン63結合ユビキチン鎖により自己ユビキチン化を活性化する。これらのユビキチン鎖は、TAB2-TAK1、cIAP1、およびIKK複合体などの重要なシグナル伝達成分をリクルートするための足場として機能する。細胞質シグナロソームへのTAK1のユビキチン媒介結合はTAK1自己リン酸化を引き起こし、それが続いてTAK1によるプライミングIKKリン酸化と、IKK_αのセリン残基の自己リン酸化をもたらす。エクスポートされたSUMO化IKK_αと細胞質ATM-TRAF6依存性軸との収束は、Lys285位でのIKK_αのモノユビキチン化に必要であり、ひいては完全なIKK活性化に必須である(Hinz et al., 2010; Stilman et al., 2009)。追加の段階として、IKK_αのLUBAC依存性M1結合ユビキチン化は、遺伝毒性NF- κ B経路にとって必要不可欠であることが示された。IKK複合体の活性化は、古典的なNF- κ B活性化と同様に、I κ Bの分解とNF- κ Bヘテロ二量体p65/p50の活性化をもたらす。

【0318】

図2: U2OS細胞を前処理し、DMSOまたはMW01と共にインキュベートした。エトポシドの投与によりDNA損傷が誘発された。2時間後に細胞を固定し、核をDAP-Iで染色した。DNA DSBの指標であるp65とホスホ-H2AXを免疫蛍光により染色した。画像は、40倍の対物レンズで共焦点Zeiss 710 LSMのもとで撮影した。

【0319】

図3: (A) U2OS細胞を384ウェルプレート中で二通りに漸増濃度のMW01で前処理した。次いで、細胞をエトポシドで処理し、固定し、そしてp65のIFを行った。p65の細胞質と核内限局化の空間的測定を用いてp65移行率の計算に使用した。(B) U2OS細胞をDMSO、MW01で前処理し、-IRで照射した。90分後、細胞を溶解し、SDS-PAGE/WBおよびEMSAにかけた。(C) 細胞を指摘のような異なる濃度のMW01で前処理し、-IR(C)またはエトポシド(D)で処理し、それぞれWBまたはEMSA分析にかけた。(C)中のLDHはローディング・コントロールを表す。

【0320】

図4: (A) U2OS細胞を384ウェルプレート中で三通りに漸増濃度のMW01で前処理した。次いで、細胞をTNF- α で処理し、固定し、そしてp65のIF染色にかけた。p65の細胞質と核シグナルの空間的測定を用いてp65移行率の計算に使用した。(B) U2OS細胞を10または20 μ Mの濃度のMW01で前処理し、TNF- α で感作した。細胞溶解物をSDS-PAGE/WB分析にかけた。(C) HEK293細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、次いでエトポシドまたはTNF- α を投与した。細胞溶解物をEMSAに用いた。

【0321】

図5: (A) U2OS細胞をMW-01で前処理した後、IL-1 β で感作した。細胞溶解物をSDS-PAGE/WBおよびEMSAに使用した。(B) 漸増濃度のMW01

10

20

30

40

50

で前処理した細胞を I L - 1 で刺激した。細胞溶解物を S D S - P A G E / W B に使用し、指摘した抗体で染色した。

【 0 3 2 2 】

図 6 : (A) U 2 O S 細胞を D M S O または M W 0 1 で前処理し、照射した。 I L - 1 による細胞の刺激は、 I B と p 6 5 リン酸化のための陽性対照 (ポジティブコントロール) として働いた。細胞を指摘の時点で溶解させ、 W B 分析に使用した。 (B 、 C) (A) と同様の実験設定。 (D) (A ~ C) と同様の実験であるが、別の時点で分析し、 H e p G 2 細胞を用いて実施した。 P A R P 1 と L D H はローディング・コントロールとして働く。

【 0 3 2 3 】

図 7 : A T M の細胞質内蓄積。 (A) 分離した核抽出物 (N E) と細胞質抽出物 (C E) を用いた分画実験。 P A R P 1 および L D H 染色はローディングと分画の対照 (コントロール) として働いた。照射と指摘の時間での細胞取得の前に、細胞を D M S O または M W 0 1 (5 μ M) で前処理した。 N E と C E を S D S - P A G E / W B 法にかけた。 (B) U 2 O S 細胞を処理 2 日前にカバーガラス上に播種した。細胞を溶媒 D M S O のみでまたは M W 0 1 で前処理した後、照射し、細胞固定し、次いで免疫染色した。

【 0 3 2 4 】

図 8 : (A) H e p G 2 細胞を D M S O または M W 0 1 で前処理し、照射した。核細胞抽出物 (N E) を P I A S y 免疫沈降 (I P) に使用した。ウエスタンプロット膜を指示抗体と共にインキュベートした。 (B) I K K I P を用いた (A) に示されるような実験。 (C) (B) に示されるような実験であるが、 H E K 2 9 3 細胞において実施。 (D) 実験は (A) に示されるように実施したが、 M E F 細胞で繰り返した。

【 0 3 2 5 】

図 9 : H e p G 2 細胞を D M S O 、 M W 0 1 (5 μ M) または A T M 阻害剤の K u 5 5 9 3 3 (1 0 μ M) と共にプレインキュベートし、照射した。 6 0 分後、細胞を採取して処理した。指示抗体を用いてウエスタンプロッティング膜の免疫化学染色を行った。

【 0 3 2 6 】

図 1 0 : (A) M E F 細胞を指示した物質で前処理し、照射し、そして細胞溶解物を特異的抗体を用いたポリ (A D P) リボース探査に用いた。 (B) 実験は (A) について記載したように行なったが、 U S O S 細胞を用いた。

【 0 3 2 7 】

図 1 1 : (A) H E K 2 9 3 細胞を D M S O 、 M W 0 1 または A T M 阻害剤 K U 5 5 9 3 3 と共にプレインキュベートし、照射した。溶解物を S D S - P A G E / W B 分析にかけた。特定の I K K S 8 5 バンド (下側のバンド) は、照射後の誘導と、 A T M i および - ホスファターゼ (- P P) 処理に対する感受性により同定した。星印は、誘導性でも A T M i 感受性でもない非特異的バンドを示す。 (B) M E F 細胞を使って (A) に示す通りに実験を行った。 (C) H E K 2 9 3 細胞を D M S O または M W 0 1 で前処理し、照射し、溶解した。その溶解物を用いて、 I K K 抗体により I K K を免疫沈降させた。

【 0 3 2 8 】

図 1 2 : (A) M W 0 1 および試験した誘導体の分子構造。 (B) M W 0 1 分子構造における環系の体系的命名法 (Markgraf 他; 2005) 。 (C) M W 0 1 および試験した誘導体 D 0 1 ~ D 1 8 の分子構造。 (D) 式 I ~ V I I の好ましい環 C 構造と式 I ~ V I I の好ましい環 B 構造のバリエーション。

【 0 3 2 9 】

図 1 3 : (A) エトボシド処理の前に、 U 2 O S 細胞を D M S O 、 M W 0 1 またはその誘導体 M W 0 1 A 1 ~ M W 0 1 C 5 で 1 0 μ M 濃度で 2 時間、前処理した。エトボシドと共にインキュベートした後、細胞を採取し、溶解し、そして S D S - P A G E / W B 分析に供した。ホスホ - S 5 3 6 p 6 5 シグナル強度並びに p 6 5 シグナル強度を C C D カメラを使って検出し、バンド強度をデンシトメトリー分析に使用した。 D M S O およびエ

10

20

30

40

50

トポシド処理対照を「1」に設定した。4つの独立した実験を行い、Grubb検定を用いて統計的異常値を同定し除去した。偏差は平均値の標準誤差(SEM)として表示される。(B)エトポシド処理前に、NF-kB/293/GFP-luc細胞を、濃度10μMのDMSO、MW01またはその誘導体MW01D01～MW01D18で1.5時間前処理した。4.5時間のインキュベーション後、NF- κ B依存性ルシフェラーゼ発現を化学発光の検出により測定した。DMSOとエトポシドで処理した対照(コントロール)を1に設定した。12回の独立した実験を実施した。

【0330】

図14：(A) U2OS細胞を、エトポシドでの同時処理の前に、異なる濃度のオラパリブで前処理した。90分後に完全細胞溶解を行い、清澄化した溶解物を指示抗体を用いるWB分析に使用した。(B) U2OS細胞をDMSO、オラパリブまたはATM阻害剤のKu55933で前処理し、エトポシドで同時処理した。45分後に細胞を回収し、SDS-PAGE/WBにかけた。指示抗体を用いて膜を染色した。PAR鎖形成の阻害におけるオラパリブの機能性を制御するために、(A)および(E)の実験と同時に(B)の実験を行った。(C)(A)のデンシティメトリー分析と(A)に示すように実施した2つの追加の独立した実験。(D) U2OS細胞を照射前に指摘した物質で前処理した。90分後、mRNAを単離し、cDNAに転写し、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)を用いた指摘の遺伝子の発現分析に使用した。(E) HepG2細胞を照射前にPARP阻害剤のオラパリブ、3-ABおよびEB-47で前処理した。15分後と90分後に細胞を取得し、SDS-PAGE/WBにかけた。指摘の抗体を用いて膜を染色した。エラーバーはSEMに等しい。

10

20

30

40

【0331】

図15：(A)(B) U2OS細胞を照射前にDMSOまたはMW01で前処理した。8時間後、mRNAを単離し、cDNAに逆転写した。得られたcDNAを用いて、抗アポトーシスのmRNA用の遺伝子特異的エクソン-エクソン間プライマー(A)およびプロアポトーシス遺伝子(B)を使ってqRT-PCRを実施した。

【0332】

図16：(A) U2OS細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、照射した。IRの8時間後に細胞を溶解させ、ウエスタンプロットティングと免疫化学染色に使用した。(B) HEK293細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、照射した。48時間後、細胞を固定し、クリスタルバイオレット染色した。溶解したクリスタルバイオレットを、595nmの波長での可視光分光光度計での吸光度測定に使用した。(C) HEK293細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、照射した。集団内の生存細胞率は、フローサイトメトリーによるアネキシンVとヨウ化プロピジウム陽性細胞の排除により計算した。(D) MEF細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、照射した。-IR後24時間後と48時間後に、細胞をアネキシンV染色に使用した。アネキシンV陽性細胞集団の比率をフローサイトメーターを使って分析した。(E)(D)に示すのと同様であるがHT1080を使って実験を行い、細胞をフローサイトメトリーにより測定した。(D) MEF細胞をDMSOまたはMW01で前処理し、照射した。-IRの24時間後と48時間後に、細胞をアネキシンV染色に使用した。(E)(D)に示すのと同様であるがHT1080細胞を使って実験を行い、照射8時間後にHT1080細胞を処理した。統計的有意性はスチューデントt検定を使って算出した。

30

【0333】

図17：(A)スライドガラス上で増殖させたU2OS細胞を、DMSOまたはMW01(5μM)と共に30分間インキュベートした。次いで、細胞を線照射(5Gy)または模擬照射(模擬IR)した。5時間後、細胞を固定し、免疫蛍光染色法にかけた。DNA損傷を示すH2AX fociおよび核(1条件あたりn=480個の核)を、核1個あたりの平均foci数の算出のために計数した。有意性はスチューデントt検定を用いて算出した。

【実施例】

50

【0334】

本発明を以下の実施例により更に説明する。これらは本発明の範囲を限定する意図ではなく、本明細書に記載する本発明のより詳細な説明のために提供される本発明の態様の好みの実施形態を表す。

〔実施例で使用する方法〕

【0335】

R N A の単離

R N A 単離用に、細胞を氷冷P B Sで洗浄した。次いで製造業者の指示書 (Qiagen, R Neasy RNA isolation KIT) に従ってR N Aの単離を行った。製造業者の指示書に従ってR N A試験用チップ (Agilent RNA 6000 Nano Kit) を使用してバイオアナライザー上で28sと18sのリボソームR N Aの比率を測定することにより、単離されたR N Aの完全性を保証した。

10

【0336】

核酸濃度の決定

U V分光光度計を使用して、D N A / R N A濃度をO D 2 6 0で測定した。タンパク質または化学物質の混入は、O D 2 6 0 / 2 8 0比およびO D 2 6 0 / 2 3 0比を測定することによって確認した。約2のO D 2 6 0 / 2 8 0比を有する試料について更に分析を実施した。

【0337】

逆転写酵素P C Rおよび定量的リアルタイムP C R (q R T - P C R)

20

相補的D N A (c D N A)を作製するために、500~1000ngの全R N Aを、iScrip cDNA合成キット (Promega)を製造業者の指示書に従って使用してc D N Aへと転写した。

試料中の特定m R N A (メッセンジャーR N A)種を定量するために、R N Aを単離し、濃度測定し、m R N Aをc D N Aに転写した。サンプル中の特定遺伝子のm R N A転写物の量は、遺伝子特異的プライマーを使用してC - 1 0 0 0 サーマルサイクラー (Biorad)を使用することによって定量した。目的遺伝子の発現は、C F Xマネージャーソフトウェアを用いて2または3つの参照遺伝子 (H R P T 1、R P L _ 1 3 aおよびB 2 M)にに対して正規化した。m R N Aの誘導率は、比較C t法 - C t法により未処理の試料レベルに対比して計算した。

30

【0338】

細胞培養

全ての細胞株は、相対湿度95%、5%CO₂雰囲気の条件下で、10%F C Sおよびペニシリン/ストレプトマイシン (100U / m L および100μg / m L)を補足した培地中で培養した。U 2 O S細胞とH E K 2 9 3細胞はD M E M中で培養し、マウス胚線維芽細胞はD M E M G l u t a m a x中で培養し、そしてH e p G 2細胞はR P M I 1 6 4 0培地中で培養した (全てGibcoより入手)。継代用に、細胞をP B Sで洗浄し、プレートから細胞が脱着するまでトリプシン/EDTA溶液を使って37でトリプシン処理した後、対応する培地中に懸濁した。分割比は1:3から1:5 (U 2 O S、H e p G 2) および1:10から1:15 (M E FとH E K 2 9 3)の間であった。液体窒素中の凍結保存のため、細胞を37でトリプシン処理し、培地中に懸濁し、320×gで5分間の遠心分離によりペレット化した。その後、細胞を凍結用培地 (20%F C S、10%D M S Oおよびペニシリン/ストレプトマイシンが補足された対応する培地)中に再懸濁し、-80の冷凍庫中でイソプロパノールを含む凍結ボックスの中で凍結した。翌日、細胞を液体窒素に移した。細胞の解凍は恒温浴中37で行った。一部凍結したままの細胞を、37に予熱した培地中にピペットで滴下添加し、300×gで5分間遠心分離した。最後に、細胞を新鮮な完全培地に再懸濁した。

40

【0339】

古典的N F - B経路の活性化のために、細胞を組換えヒトT N F (10ng / m L)またはI L - 1 (10ng / m L)で37にて20~30分間処理した。C s 1 3

50

7線源 (OB29 Irradiator, STS Braunschweig) での細胞のイオン化照射により、または $20 \sim 50 \mu M$ の濃度のエトポシドの2時間投与によるトポイソメラーゼⅠⅡ酵素の阻害により、遺伝毒性ストレスを適用した。

【0340】

免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡

免疫蛍光染色のために、 0.95×10^5 個の細胞を、オートクレーブ処理したカバーガラス上の6ウェルプレートに播種した。細胞密集度は実験の開始（播種から2~3日）に書き取らせた。実験の実施後、細胞をPBSで洗浄し、4% PFA/二重蒸留水 (ddH₂O) を用いてRTにて10分間固定した。2回の追加の洗浄工程後、細胞をPBS中0.12%グリシン/0.2%サポニンを含む溶液と共に10分間インキュベートし、次いでPBS中10%FCS/0.2%サポニンを含む溶液を使って1時間ブロックした。一次抗体インキュベーションは4で一晩行った (PBS中0.2%サポニンで1:500希釈)。翌日、カバーガラスをPBS中0.2%サポニンを含む溶液で5回洗浄した。蛍光団結合二次抗体 (PBS中0.2%サポニンで1:1000希釈) を室温 (RT) で1時間 (1h) インキュベートした。PBS中の0.2mg/mL DAPIを使って5分間、または DAPI/Mowiolを直接のせることにより核染色した。最後に、カバーガラスをPBS中の0.2%サポニンで5回、次にddH₂Oで2回洗浄した。40倍または63倍の対物レンズを備えたZeiss 710 LSMを使って、共焦点顕微鏡検査を実施した。

10

【0341】

クリスタルバイオレット染色

クリスタルバイオレット染色用に、細胞を氷冷PBSで洗浄し、換気フード下でPBS中4%PFAで15分間固定した。PBSで洗浄後、細胞を0.1%クリスタルバイオレットで室温で20分間染色した。その後、細胞をPBSで3回再洗浄し、風乾した。細胞を振とうしながら10%酢酸と共にインキュベートした。次に、0.25mLの染色剤をddH₂O中に1:4希釈し、分光光度計を使って、プランクとして10%酢酸に対して595nmの吸光度を測定した。

20

【0342】

フローサイトメトリー

細胞を氷冷PBSで洗浄し、トリプシン/EDTA溶液を用いて培養皿から剥離させた。剥離した細胞を300×gで5分間遠心した。初期アポトーシス細胞の検出は、製造元の指示書 (eBioscience Annexin V-FITCアポトーシス検出キット) に従ってアネキシンV-FITC抗体で染色することにより行った。壊死細胞と後期アポトーシス細胞は、測定前にヨウ化プロピジウム (最終濃度1μg/mL) の添加により染色した。

30

【0343】

細胞採取

目的の組織培養プレートを氷冷PBSで洗浄した。細胞スクレーパーを使ってPBS中で細胞を掻き取り、その細胞懸濁液を1.5mLの反応管に移した。4で15秒間、20,000×gで遠心分離することにより細胞をペレット化した。上清を捨て、細胞を急速冷凍するかまたは直接溶解させた。

40

【0344】

全細胞溶解

細胞ペレットを氷上で3倍容のBaeuerle溶解緩衝液中に再懸濁し、4で適度に振盪しながら20分間溶解した。サンプルを4で20,000×gで10分間遠心分離し、そして全細胞タンパク質抽出物に相当する上清を、新しい1.5mLの反応管に移した。

【0345】

細胞内分画

核画分と細胞質画分の調製のために、細胞を緩衝液A [1mM DTT、10mM NaF、20mM -グリセロリン酸、250nM NaVO₃、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) および50nM カリクリンAを補足] で溶解した。細胞溶解物を0.2%NP-40の最終濃度に調整し、10秒間ボルテックスで攪拌し、遠沈した。細胞質抽

50

出物 (C E) に対応する上清を新たな 1 . 5 mL の反応管に移した。ペレットを緩衝液 A で洗浄し、緩衝液 C で再懸濁し、4 度で 20 分浸透した。14,000 r p m での 10 分間の遠心分離後、核抽出物 (N E) に相当する上清を、新たな反応キャップの中に移した。

【 0 3 4 6 】

タンパク質濃度の決定

細胞溶解物のタンパク質濃度測定用に、1 ~ 2 μ L のタンパク質抽出物を、dd H₂O で 1 : 5 希釈した 1 mL の Bradford 試薬と混合した。分光光度計を使って溶解緩衝液リファレンスに対して 595 nm の波長で吸光度を測定し、BSA 検量線と比較した。

【 0 3 4 7 】

免疫沈降

細胞溶解後、サンプルのタンパク質濃度を測定した。インプットコントロール用に、40 μ g の溶解物を 6 × SDS 緩衝液と混合し、95 度で 4 分間加熱することにより変性させた。約 1500 μ g タンパク質溶解物をブルダウンに使用し、サンプル容量は溶解緩衝液と同等にした。溶解物を 30 μ L のセファロース A またはセファロース G ビーズ (ブルダウンに用いる抗体種による) を用いて 30 分間予備清澄化し、1,500 g で 5 分間遠心分離した。上清を新しい反応管に移した。清澄化した溶解物に一次抗体 (2 ~ 2 . 5 μ g) を添加し、4 度で回転させながら一晩免疫沈降させた。翌日、1 サンプル当たり 30 μ L のセファロースビーズを抗体の固定化に使用した。IP での 4 回の洗浄後、3 × SDS 緩衝液と混合しそして 95 度で 4 分間加熱することにより、沈澱タンパク質を溶出させた。

【 0 3 4 8 】

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE)

SDS - PAGE 用の細胞溶解物の調製のために、20 ~ 40 μ g のタンパク質溶解物を 6 × 反応緩衝液と混合し、95 度で 4 分間加熱した。煮沸後、サンプルをポリアクリルアミドゲル上にロードした。分離用ゲルと濃縮用 (stacking) ゲルとから成るゲルを流し込んだ。分離用ゲル内のアクリルアミド濃度は、実験ごとに、および一定の分子量の間での所望の分離によって異なるが、一般的には 8 % ~ 12 % の範囲であった。

【 0 3 4 9 】

・濃縮用ゲル

Tris - HCl, pH 6 . 8 125 mM

アクリルアミド 5 %

SDS 0 . 1 %

APS (過硫酸アンモニウム) 0 . 1 %

TEMED 0 . 1 %

・分離用ゲル

Tris - HCl, pH 8 . 8 375 mM

アクリルアミド 8 - 12 %

SDS 0 . 1 %

APS 0 . 075 %

TEMED 0 . 05 %

【 0 3 5 0 】

サンプルをアプライした後、80 V の電圧を印加して、濃縮用ゲルと分離用ゲルの境界線の所でタンパク質を濃縮させるようにした。その後、電圧を 140 V に上げ、タンパク質を約 2 時間分離した。

【 0 3 5 1 】

ウエスタンブロッティング

SDS - PAGE (6 . 3 . 5) により分離したタンパク質を、移行緩衝液と半乾式ブロッティング装置を使ってウエスタンブロッティング (WB) 法によりメタノール活性化 PVDF 膜に固定化した。6 × 9 cm の膜あたり 80 mA の定電流を 90 分間印加することにより、タンパク質を膜に移行させた。小さいタンパク質 (< 30 kDa) の移行の場

10

20

30

40

50

合には、プロッティング時間を30分に短縮した。

【0352】

膜上のタンパク質の免疫化学的検出

P V D F 膜上へのタンパク質の移行後、T B S T 緩衝液中5%脱脂粉乳粉（またはリン酸化特異的抗体の場合はT B S T 中の3% B S A）中で室温で1時間膜をインキュベートすることにより、抗体の非特異的結合をブロックした。1:1000希釈したT B S T 中5%脱脂粉乳粉またはT B D T 中3% B S A（リン酸化特異的抗体の場合）中の一次抗体溶液と共に膜を4で一晩インキュベートした。翌日、膜をT B S T で5分間3回洗浄した。次に、使用した対応する一次抗体のF c部分に対するH R P 結合二次抗体（1:1000）と共に膜を1時間インキュベートした。T B S T で3回、P B S で1回、各5分間洗浄した後、C C D カメラシステム（Fusion Solo）を用いて化学発光の光子放出を検出した。増強化学発光（E C L）溶液（Millipore）をH R P 基質として使用した。

【0353】

Restore PLUS WB剥離用バッファー（Thermo Scientific）を室温で35分用いて、膜を剥がし、その後の多重抗体での探索ができるようにした。T B S T で徹底的に洗浄した後、T B S T 中5%脱脂粉乳で膜を1時間再ブロックし、次の一次抗体と共に一晩インキュベートした。

【0354】

H 2 K / N F - B オリゴヌクレオチド調製

オリゴヌクレオチドは、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）精製済のB a m H I 末端として注文した。アニーリングには、5 μ g の各鎖を50 μ L のアニーリング緩衝液中で90で10分間インキュベートし、200 n g / μ L の最終濃度にした。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをサーマルブロック中で一晩冷却させ、その後-20で保存した。1 μ g のハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを1 μ g の一本鎖オリゴヌクレオチドと比較することにより、12%ポリアクリルアミドゲル中でオリゴヌクレオチドのアニーリングを分析した。

【0355】

N F - B オリゴヌクレオチドの放射性標識と精製

H 2 K / N F - B プローブの放射性標識のために、反応レシピに従い、混合物を25で15分間インキュベートした。放射性標識N F - B プローブの精製は、QIAquick Nucleotide Removal Kit（Qiagen）を製造元の指示書に従って使用して実施した。放射性標識はシンチレーションカウンターを使って測定した。放射性プローブは-20で保存した。

【0356】

・ 標識レシピ：

H 2 O 10.2 μ L

D N A - オリゴヌクレオチド（200 n g ）1.0 μ L

10 × K l e n o w（クレノウ）緩衝液 2.5 μ L

d C T P、d G T P、d T T P（各2 m M ）1.8 μ L

[3 2 P] - d A T P 7.5 μ L (3 M B q)

D N A P o l I（クレノウ断片、5 U / μ L ）0.2 μ L (1 U)

【0357】

電気移動度シフトアッセイ（E M S A）

核溶解物または全細胞溶解物を、³²P - 標識N F - B D N A コンセンサス配列と共にインキュベートした。下記のシフト混合物レシピに従ってシフト混合物を調製した。

【0358】

・ E M S A 用シフト混合物（H 2 K / N F - B ）

全溶解物 3 ~ 5 μ g

2 × シフト緩衝液 10.0 μ L

B S A (1 0 n g / μ L) 1.0 μ L

10

20

30

40

50

D T T (1 0 0 m M) 0 . 4 μ L
 ポリ d I - d C (2 μ g / μ L) 1 . 0 μ L
 32 P 標識オリゴヌクレオチド 4 5 , 0 0 0 c p m
 d d H₂O 、 2 0 μ L

【 0 3 5 9 】

シフト混合物を 3 7 で 3 0 分間インキュベートした後、サンプルを EMSA ゲルにロードした。

・ EMSA ゲルレシピ (未変性ポリアクリルアミドゲル)

d d H₂O 4 4 m L

1 0 × T B E 6 m L

10

アクリルアミド (3 0 %) 1 0 m L

A P S (1 0 %) 4 5 0 μ L

T E M E D 4 5 μ L

【 0 3 6 0 】

電気泳動のために、 2 6 m A の電流を 2 時間印加した。Whatman 紙上でゲルを乾燥させ、 - 8 0 で一晩インキュベートした後、シグナルをオートラジオグラフィーフィルム (GE Healthcare) 上で可視化した。放射性物質を使った作業はすべて、放射性作業に適した監視作業領域において実施した。

【 0 3 6 1 】

〔 実施例の結果 〕

20

高含量スクリーニングによる MW 0 1 の同定

D N A 損傷により誘導される N F - B 経路の特異的阻害剤を同定するために、ディファレンシャル (differential) スクリーニングアッセイを設計した。遺伝毒性ストレスによる N F - B シグナル伝達の阻害剤の一次スクリーニングでは、ChemBioNet からの化合物ライブラリーとアカデミック化学者からの寄贈化合物を利用した。エトポシドの適用により D N A 損傷を作用させた。p 6 5 核内移行を阻害した全ての化合物を、その後のカウンタースクリーニングのために採用した。カウンタースクリーニング用に、 T N F の投与を用いて古典的 N F - B シグナル伝達を誘導した。T N F により誘導された古典的 N F - B 活性化を阻害する全ての物質を、 D N A 損傷経路特異的物質の候補のリストから切り捨てた。

【 0 3 6 2 】

0 . 4 6 μ M というその I C₅₀ 値、 1 2 0 % というその活性変化率 (I C₅₀ 測定アッセイにおいて記録されるような) 、および - 0 . 9 という計算された H i l l 係数に基づいて、化合物 MW 0 1 を更なる分析のために選んだ。MW 0 1 は、エトポシド刺激に応答して N F - B 活性化を阻害したが、 T N F 刺激後には阻害しなかったので、遺伝毒性ストレスにより誘導される I K K / N F - B 活性化の特異的選択阻害を示すものとして特定された。

30

【 0 3 6 3 】

D N A 損傷特異的 N F - B 阻害剤としての化合物 MW 0 1 の検証

M W 0 1 は遺伝毒性ストレスによる N F - B 活性化を阻害する

40

小分子 MW 0 1 は、差次の識別 (differential discrimination) により最も有望な遺伝毒性ストレス特異的 N F - B 阻害剤として同定されたが、他の提供者からの物質によるさらなる検証が必要であった。従って、リード化合物 MW 0 1 の新鮮な原液を供給業者から入手し、 D M S O に溶解し、 p 6 5 の I F 染色を使ってエトポシド誘導 p 6 5 核内移行の再現性ある阻害について試験した (図 2) 。加えて、 D N A D S B の感受性マーカーとしての H 2 A X f o c i を可視化した。ディファレンシャルスクリーニングで実施したのと同様に、 MW 0 1 での細胞の前処理は、エトポシドの投与による D N A D S B 誘導と同時に起こる p 6 5 移行を阻害した。

【 0 3 6 4 】

M W 0 1 の測定 I C₅₀ 曲線は、 M W 0 1 がエトポシド刺激による p 6 5 の核内移行を濃

50

度依存形式で阻害することを示し(図3A)、5 μMの濃度がp65核内移行の最大阻害に十分であることを示した。

【0365】

エトポシド処理に加えて、追加の実験においてDNA損傷を誘導する代替法として細胞の線照射を使用した。MW01で細胞を前処理すると、-IR誘導NF-B DNA結合活性とS536位でのp65リン酸化が阻害され(図3B)、エトポシド非依存的なNF-B阻害を示した。エトポシド処理について観察されたように、MW01での前処置も、-IR後のp65 S536位リン酸化の濃度依存性阻害をもたらした(図3C)。p65の核内移行とp65のS536リン酸化に加えて、エトポシドにより誘導されるNF-B DNA結合活性も、同様に濃度依存的に、MW01前処理によって阻害された(図3D)。

10

【0366】

総合すれば、MW01によるp65 S536リン酸化の濃度依存性阻害(図3C)は、観察されたp65核内移行の阻害についての対応する結果(図3A)と完全に一致する。

【0367】

よって、p65核内移行、p65 S536リン酸化およびNF-B DNA結合活性の分析は、MW01を遺伝毒性ストレス誘導NF-B活性化の真の阻害剤として確認する。

【0368】

MW01は古典的NF-B活性化を阻害しない

20

古典的NF-Bシグナル伝達経路は、細胞外リガンドがその細胞膜結合型受容体に結合することによって開始され、それが細胞内シグナル伝達カスケードを開始させて最終的にIKK複合体を活性化し、結果としてNF-Bを活性化する。遺伝毒性ストレスにより誘導されるNF-B活性化に対する特異性を確認するために、TNFを使ってNF-B活性化を刺激する実験においてMW01を試験した。

【0369】

MW01は様々な濃度でp65核内移行率に影響を及ぼさなかった(図4A)。その上、10 μMと20 μMの濃度でのMW01による細胞の前処理は、TNFで刺激しても誘導されたNF-B DNA結合活性を干渉しなかった(図4C)。

【0370】

この実験をHEK293細胞においても実施し、MW01の細胞株非依存性阻害効果を実証した。

30

【0371】

遺伝毒性ストレスで誘導されるNF-B活性化と、IL-1で刺激される同活性化は、ユビキチンE3リガーゼTRAF6を重要なシグナル伝達モジュールとして共有する。活性化されると、TRAF6はK63結合ユビキチン鎖により自己修飾され、それはアダプタータンパク質TAB2を介したTAK1のリクルートのための足場として働く(Hinz他;2010)。

【0372】

従って、MW01を分析し、それがIL-1で誘導されるNF-B活性化を阻害するかどうかを調べた。

40

【0373】

両化合物による前処理は、IL-1刺激後にp65 S536位リン酸化もNF-B DNA結合活性もどちらも阻害しなかった(図5A)。更に、MW01を100 μMまでの高濃度でIKK活性化とp65 S536リン酸化に対するそれらの影響について調べたが、IKKまたはp65のリン酸化状態に全く影響を及ぼさなかった(図5B)。

【0374】

要約すれば、MW01は、TNFまたはIL-1のいずれかにより誘導される古典的NF-Bシグナル伝達を阻害せず、従ってDNA損傷で誘導されるNF-B経路に対する特異性を有することを示した。

50

【0375】

MW01は、DNA損傷誘導NF-B活性化に必要である、核から細胞質へのシグナル伝達を阻害する

MW01による遺伝毒性ストレス誘導NF-B活性化の阻害は、TAK1活性化の下流で起こる

TNFとIL-1で誘導されるNF-B活性化は、I-Bとp65のリン酸化の下流のリン酸化によるTAK1とIKKの活性化を含むシグナル伝達カスケードに依存性である。化合物が遺伝毒性ストレス依存性形式でTAK1の下流のNF-B活性化を阻害する可能性を除外するために、MW01で前処理した細胞のシグナル伝達の動態を分析した(図6)。

10

【0376】

細胞をMW01で前処理し、照射し、経時的実験において指摘の時点で採取した(図6A)。MW01での細胞の前処理は、-IR後45分および60分でのI-Bリン酸化の完全阻害を生じた。

【0377】

同様に、-IR後の45分及び60分におけるp65 S536リン酸化は、MW01によって阻害された。リン酸化がIKK活性化の結果であることを考慮して、IKKのリン酸化状態を次のステップで分析した(図6B)。MW01による細胞の前処理も、照射の90分後にIKKリン酸化を無効にした。

20

【0378】

キナーゼTAK1は該経路のIKKの上流に位置し、同様にリン酸化により活性化される。MW01前処理は照射後45分と60分でのTAK1リン酸化を強力に阻害した(図6C)。この結果は、HepG2細胞においても当てはまった。TAK1とp65リン酸化はMW01での前処理により消失したが、-IRの結果としてATMがリン酸化された(図6D)。特に、HepG2細胞におけるTAK1とp65リン酸化の反復阻害は、遺伝毒性ストレスにより活性化されるNF-Bシグナル伝達に対するMW01の細胞株非依存性の一般的な阻害機能を示す。

【0379】

総合すると、これらの結果は、この阻害されたステップが、遺伝毒性ストレスにより開始されるNF-Bシグナル伝達カスケードの中のTAK1活性化の上流にあることを強力に示唆する。

30

【0380】

MW01はATMの細胞質内蓄積をブロックすることにより遺伝毒性ストレス誘導NF-B活性化を阻害する

DNA DSB活性化キナーゼATMは主に核内に存在するが、DNA損傷すると細胞質に移行する。Hinz他は、細胞質内への活性化ATMの蓄積がTRAF6の活性化とその後のK63結合ユビキチン鎖によるTRAF6の自己ユビキチン化を引き起こすことを示した。ユビキチン鎖は、TAK1やIKK複合体を含むシグナル伝達成分のリクルートのための足場として働く(Hinz他;2010)。よって、この核-細胞質間のシグナル伝達カスケードは、ATMの細胞質移行を必要とする機序によりIKK複合体の活性化を引き起こす。

40

【0381】

-IR後にDNA損傷により誘導された細胞質内ATM蓄積に対するMW01の影響を分析するために、分画実験を実施した。MW01による細胞の前処理は、照射後45分と90分での核抽出物においてリン酸化ATMの検出に何ら影響しなかった(図7A)(レーン2~3をレーン5~6と比較せよ)。しかしながら、細胞質抽出物中の活性化ATM種の検出は、MW01前処理サンプルでは消失した(レーン8~9をレーン11~12と比較せよ)。全ATM量の分析は、MW01による細胞の前処理が、照射後45分での細胞質内ATM蓄積を阻害することを明らかに示した(図7A)(レーン8をレーン11と比較せよ)。HepG2細胞の代わりにU2OSを試験した時にも同じ結果が得られた

50

(データは示していない)。更に、DNA DSBによるATM再局在化に対するMW01の効果についてIFにより分析した(図7B)。照射は細胞質と細胞周縁質へのATMの移行を引き起こした。対照的に、MW01で処理したサンプルでは、ATMは主に核内に限局化された。IFイメージングの結果は、分画実験で観察された結果を強く支持した。

【0382】

分画実験の結果は、MW01による標的シグナル伝達段階が、ATM細胞質移行に相当するレベルおよびおそらくその下流に位置することを示す。従って、ATMで媒介されるTRAF6刺激NF- κ B活性化について観察された結果(図5B)を考慮すると、TRAF6活性化が直接的に標的とされるのではなく、両化合物によって、抑制された細胞質内ATM蓄積の結果として廃止されるというのが妥当である。

10

【0383】

MW01は、PARP1とATM活性化の下流のDNA損傷により誘導されるNF- κ B活性化を抑制する

核PARP1-シグナロソームの形成がMW01により抑制される

核のIKK-PIASy-PARP1-ATMシグナロソームの形成は、遺伝毒性ストレス誘導NF- κ Bシグナル伝達カスケードを発動させるのに重要である。このシグナロソームの形成はPARP1を必要とし、その酵素活性がDNA DSBにより活性化されて、ポリ(ADP)-リボース(PAR)鎖をその基質上と自身上に結合させる。それらのポリマーはシグナロソームの残りの構成成分のリクルートのための足場として働く(Stilman他;2009)。シグナロソーム形成に対するMW01の影響を、免疫共沈降(Co-IP)を使った相互作用研究により分析した。PIASyの免疫沈降は、リン酸化されたATM-S1981種の照射誘導Co-IPをもたらしたが、それはMW01での前処理後に消失した(図8A)。PARP1とIKKとの相互作用を、IKKの免疫沈降により分析した。PARP1は、未照射の細胞溶解物と照射細胞溶解物からIKKを免疫沈降させた。重要であるのは、PARP1がMW01での前処理後にはIKKと免疫共沈降しなかったことである(図8B)。MW01がIKKとPARP-1とのCo-IPを廃止させたという結果は、HEK293細胞においても観察され(データは示していない)、このことは作用形態が細胞型非依存性であることを示す。

20

【0384】

次に、HEK293細胞を用いて、IKK-PIASy相互作用に対するMW01処置の影響を調べた。IKKとのPIASy免疫共沈降は、照射により誘導可能でありかつ依存性であるが、細胞をMW01で処理した時にはその相互作用は廃止された(図8C)。加えて、それらの知見について他の種や細胞型に非依存的な一般化を行うためにマウスMEFを使用した(図8D)。HepG2またはHEK293細胞に見られるよう、MW01での前処理は、PARP1、p-ATM S1981またはPIASyとのIKKの相互作用を廃止させるが、一方でDMSO前処理サンプルについてはそのような相互作用が観察された。MW01によるシグナロソーム形成の種非依存性の阻害は、作用形態が一般的でかつ保存された機序に基づいていることを示す。

30

【0385】

MW01はATMの酵素活性を阻害しない

DNA DSBに対する細胞DDRの活性化は、セリンキナーゼATMの活性化に強く依存する。活性化されたATMは、哺乳類細胞内の大量の基質をリン酸化することができ、細胞周期停止、DNA修復またはアポトーシスを制御することができる(Shiloh & Ziv;2013)。同様に、それは遺伝毒性ストレス媒介NF- κ Bシグナル伝達経路の必須の構成要素である(Hinz他;2010)。

40

【0386】

従って、ATMの酵素活性を、照射後にMW01で前処理した細胞において分析した。様々な基質のリン酸化が実際にATM依存性であることを証明するために、MW01をATM阻害剤KU55933と比較して試験した。KU55933での細胞の処理は、ATM自己リン酸化とATM基質p53BP1、p53およびKAP1のリン酸化を阻害し

50

た。MW01による細胞の前処理がp53bp1のリン酸化状態に対して軽度の効果を有したのにかかわらず、溶媒とATMiコントロールに比較したATM並びに他の基質p53とKAP1のリン酸化状態に対しては全く影響が観察されなかった。加えて、図2に既に示したように、MW01前処理は、エトボシド処理後にATM基質であるヒストンH2AXのリン酸化の損傷を引き起こさなかった。重要であるのは、MW01処理がp65S536リン酸化レベルを大幅に減少させたことである(図9)。

【0387】

総合すると、ATM自己リン酸化および基質リン酸化の分析は、ATMの酵素活性がMW01での細胞の前処理により影響を受けないことを示す。

【0388】

MW01はPARP1の酵素活性を阻害しない

Stilmannと共同研究者らは、PARP1の酵素活性がPARP1シグナローム形成に必須であることおよびDNA損傷で誘導されるNF-Bシグナル伝達カスケードを開始させるための別のシグナル伝達成分のリクリートに必要であることを記載した(Stilmann他;2009)。従って、PARP1酵素機能に対するMW01の影響を分析した。照射すると、MEF細胞とU2OS細胞でDMSOおよびMW01で前処理したサンプルにおいて、PAR鎖特異的抗体を使って濃いバンドが検出された(図10A～B)。対照的に、PARP阻害剤のEB-47、3-AB(図10A)または臨床承認薬であるオラパリブ(Mullard;2014)での細胞の前処理は、PAR鎖形成の阻害を引き起こした(図10A+B)。よって、MW01がヒトおよびマウス細胞においてPARP1酵素活性の活性化を妨害しないことが証明された。

【0389】

MW01は、遺伝毒性ストレス後のIKKの不可欠な翻訳後修飾(PTM)の形成を阻害する

照射時のPARP1シグナローム形成は、DNA損傷により誘導されるNF-Bシグナル伝達のための必要条件である。何故なら、IKKは少なくとも3つの異なるPTMを受けなければならないからである。DNA DSB後、IKKはPARP1シグナローム内のPIASyによりSUMO化される(Stilmann他;2009)。次いで、ATMがIKKをセリン85位のところでリン酸化する(Z.H. Wu他;2006)。活性化されたシグナル伝達カスケードの結果として、IKKがcIAP1によりモノユビキチン化される(Hinz他;2010)。

【0390】

S85位におけるATM依存性IKKリン酸化に対するMW01の影響を分析するために、細胞を照射前にMW01で前処理した。MW01前処理並びにATMの阻害は、ヒト(図11A)およびマウス細胞(図11B)において、S85位でのIKKリン酸化を廃止(消失)させた。

【0391】

MW01前処理はIKKS85リン酸化並びにATMの阻害を無効にした。SDS-PAGEにかける前に、追加のコントロールとしてタンパク質ホスファターゼでの細胞溶解物(ライセート)の処理を用いて、実際に検出されたバンドがリン酸化依存性であることを示した。

【0392】

次に、IKK複合体活性化の必要条件であるIKKモノユビキチン化(Hinz他;2010)を、IKKの免疫沈降により分析した。IKKモノユビキチン化種の特徴的バンド(Hinz他;2010)は、DMSOで前処理し照射したサンプルにおいてのみ観察された。MW01での細胞の前処理は、IKKモノユビキチン化の消失を引き起こした(図11C)。

【0393】

結論として、MW01での細胞の前処理が、DNA損傷により誘導されるNF-B活性化に必要である必須のIKK翻訳後修飾の形成を阻害した。

10

20

30

40

50

【0394】

MW01の構造-活性関係の分析

MW01の様々な誘導体を入手し(図12A)、そしてS536位でのp65の遺伝毒性ストレス誘導リン酸化を阻害するそれらの能力について試験した。ウエスタンプロットバンドのデンシットメトリーを用いて、p65 S536リン酸化のシグナル強度と全p65量を定量した。p65 S536リン酸化のシグナル強度は、全p65のシグナル強度に対して正規化され、そしてその百分率がDMSO/エトポシドに対して正規化され、それをMW01/エトポシド同時処理サンプルと比較した(図13)。MW01誘導体のMW01C2、MW01C3およびMW01C4は、エトポシド同時処理後にNF-B活性化を強力に阻害した結果として、最低のp-p65/p65比を示した。MW01に比較して、それらの化合物は、ヒドロキシル基がそれぞれフッ素、塩素またはメチル基のいずれかの小さな置換基で置き換えられた誘導体である。更に、MW01C3とMW01C4は、2つのメトキシ基に関して芳香族環系Vの置換基が存在しないという点で異なっている(図12B)。メトキシ基は、誘導体の阻害機能に必須であるとは思われなかったが、潜在的にそれらの溶解度に対して影響を与えるかもしれない。

【0395】

ヒドロキシル基の置換に比較して、MW01C1の環系I中の隣接炭素原子の所のメトキシ基の存在もまた非常に有力な誘導体をもたらした。

【0396】

よって、構造-活性関係を分析することにより、MW01のヒドロキシル基が、阻害機能を維持できる構造的または共有結合的修飾に適した位置であるとして同定された。更に、このヒドロキシル基は求核置換のような別の反応にも適当である。

【0397】

MW01に対比して、PARP1阻害剤は細胞型依存性方式で遺伝毒性ストレス後のNF-B活性化を阻害する。

DNAへの損傷は、細胞の生存にとって重大な脅威であり、細胞の運命を調節するDNA損傷応答を誘導する。DNA損傷に感受性のタンパク質PARP1がDDRにおいて多数の機能を有することが文献に示されている。それは一本鎖切断修復、転写の制御およびNF-B媒介生存促進性シグナル伝達への関与の達成にとって重要である(Gibson & Kraus; 2012)。Stilmann他(2009)は、遺伝毒性ストレス活性化NF-B経路が、シグナロソーム成分のリクルートのための足場としてのPARP1依存性PAR鎖形成に依存することを機能の喪失研究(loss-of-function)により記載した。結果として、PARP1阻害剤の適用がシグナル伝達カスケードを阻害した。その研究において、著者らは薬理学的PARP1阻害剤である3-ABとEB-47を使用した。3-ABによるHePG2細胞の処理は、照射後にPAR鎖形成とNF-B DNA結合活性を阻害した。加えて、該研究は、3-ABまたはEB-47で処理したMEF細胞が、エトポシド投与後にPAR鎖形成とNF-B結合活性を喪失したことを示した(Stilmann他; 2009)。

【0398】

MW01をPARP阻害剤と比較するために、臨床承認薬であるオラパリブによるPARP1の阻害が、シグナロソーム形成を阻害しそして結果としてp65のリン酸化を阻害するかどうかを調べた。U2OS細胞を0.63 μM~10.0 μMに及ぶ漸増する濃度のオラパリブで前処理した。次いで、細胞をエトポシドで同時処理し、エトポシド投与の90分後に細胞を採取し、S536位でのp65のそれらのリン酸化状態について分析した。DMSO/エトポシド同時処理対照に比較して、p65 S536リン酸化の有意な減少は全く検出できなかった(図14A)。オラパリブで媒介されるPAR鎖形成阻害が対照実験により確認された(図14B)。その場合、細胞をDMSO、3 μMオラパリブまたは10 μMのATM阻害剤Ku55933で前処理した。エトポシド投与後45分に細胞を収得し、PAR鎖形成について試験した。図14Aに示されるような実験を2種類の生物学的複製物において繰り返した。3実験全てのS536位リン酸化p65と完全p

65のシグナル強度をデンシトメトリーにより定量した。結果は、図14C中にシグナル強度比として示される。オラパリブ/エトボシド同時処理サンプルとDMSO/エトボシド同時処理サンプルとの比較の結果、オラパリブ処理が、PAR鎖形成の阻害に関わらず、U2OS細胞のp65 S536リン酸化に影響しないことがわかった。

【0399】

一般的NF-B活性化に対するオラパリブによるPARP1阻害の影響を調べるために、NF-B標的遺伝子のqRT-PCR分析を実施した。

【0400】

NFKBIA(I-Bをコードする)、TNFAIP3(A20をコードする)およびCXCL8(IL-8をコードする)の相対的正規化mRNAレベルは、照射しなかった全てのサンプルに比較して、照射したDMSOサンプルにおいて強力に増加した。オラパリブでの細胞の前処理は、DMSO対照サンプルに比較して、照射後に標的遺伝子発現を変化させなかった。対照的に、MW01またはATM阻害剤KU55933のいずれかでの細胞の前処理は、照射によるNFKBIA、TNFAIP3およびCXCL8 mRNA誘導の完全阻害をもたらした(図14D)。

10

【0401】

次に、HepG2細胞においてオラパリブによりPARP1阻害に関わらずp65がリン酸化されるかどうかを調べた(図14E)。期待通り、PARP阻害剤オラパリブ、3-APおよびEB-47でのHepG2細胞の前処理が、図14Dに示されるようなDMSO/IR処理サンプルにおいて検出された、照射後15分でのPAR鎖形成を喪失させた。PAR鎖形成の阻害は、オラパリブ処理サンプルと3-AB処理サンプルにおいて、照射後90分でp65のS536位のリン酸化の減少を引き起こした。興味深いことに、EB-47処理サンプルではPAR鎖形成の阻害にかかわらずp-p65 S536リン酸化が検出された。

20

【0402】

図14に示された結果は、オラパリブ媒介およびEB-47媒介PARP1阻害の細胞型特異的影響を指摘する。これと一致して、HEK293細胞では、PARP1依存性PAR鎖形成の阻害がNF-B DNA結合活性を廃止させなかった(データは示していない、Michael Stilmann博士との個人的連絡による)。

30

【0403】

まとめると、MW01に対比して、PARP阻害剤(3-AB、EB-47およびオラパリブ)によるPARP1依存性PAR鎖形成の阻害は、遺伝毒性ストレス後のp65活性化を細胞型依存性形式で阻害する。

【0404】

DNA損傷により誘導されるNF-BのMW01媒介阻害による細胞の放射線増感作用細胞アポトーシスは、アポトーシス拮抗および促進シグナルのプロセシングに依存して微調整される機序であり、NF-Bの抗アポトーシス機能は文献中に既に記載されている(Kucharczak他;2003)。MW01によるNF-Bの阻害がアポトーシスシグナル伝達の上流制御(アップレギュレーション)をもたらすことを証明するために、抗アポトーシス遺伝子産物の発現の誘導を定量的リアルタイムPCR法により分析した。MW01でのU2OS細胞の前処理は、DMSO対照に比較して、遺伝子BIRC3(cIAP2をコードする)、XIAPまたはBCL2L1(BCL-XLをコードする)のmRNA発現を有意に変更しなかった。細胞の-IRは、照射した対照においてBIRX3 mRNAのほぼ2倍の誘導をもたらしたが、一方でMW01前処理細胞ではBIRC3 mRNAが下方制御された。BIRC3 mRNAと同様に、MW01は、XIAPの発現を中程度に阻害し、BCL2L1の発現を完全に阻害した。抗アポトーシス遺伝子制御に対する最強の効果は、図14Dに示されるように、TNFAIP3(A20をコードする)において検出された。MW01での細胞の前処理は、照射対照に比較して-IR後のTNFAIP3のmRNA発現を廃止させた。

40

【0405】

50

次に、アポトーシス促進性遺伝子 B B C 3 (P U M A をコードする) および P M A I P 1 (N O X A をコードする) の m R N A 発現を分析した。 B B C 3 m R N A 発現は、 M W 0 1 での細胞の前処理により影響を受けなかった。細胞の照射後、陽性対照 (ポジティブコントロール) において B B C 3 m R N A 発現が 4 倍多く誘導された。 M W 0 1 での前処理はわずかに減少した発現をもたらし、これはまだ 3 倍誘導されていた (図 1 5 B)。

【 0 4 0 6 】

P M A I P 1 の m R N A 発現は、 M W 0 1 での前処理により既に増加されていた。 M W 0 1 前処理サンプル P M A I P 1 の m R N A 発現は、照射後に更に高められたが、照射サンプルでは全く変化がなかった (図 1 5 B)。

【 0 4 0 7 】

遺伝毒性ストレス後のアポトーシス細胞死に対する M W 0 1 の影響を更に詳しく分析するために、アポトシスマーカーを調査した。それらのマーカーの 1 つは、 P A R P 1 のカスパーゼ - 3 依存性開裂である。 U 2 O S 細胞を M W 0 1 と共にプレインキュベートすると、静止細胞において P A R P 1 開裂のわずかな増加が観察された。細胞の照射後、照射対照サンプルにおいて P A R P 1 開裂のわずかな増加が検出された。対照的に、 M W 0 1 とのプレインキュベーションは、 P A R P 1 の開裂を強力に増加させた (図 1 6 A)。

【 0 4 0 8 】

クリスタルバイオレット染色を用いて、 照射前の細胞の化合物前処理が、細胞数に対して影響を及ぼすかどうかを分析した。 M W 0 1 での細胞の前処理は、以前に D M S O 処理サンプルに比較して細胞数を減少させた。細胞の照射後、 M W 0 1 での前処理は、 D M S O / I R 対照に比較して細胞数の更なる減少に対して有意な効果があった (図 1 6 B)。

【 0 4 0 9 】

細胞数の減少が増殖の低減により引き起こされたのかどうかを調べるために、アネキシン V および / またはヨウ化プロピジウム染色陽性細胞の排除により、化合物処理と照射後の生存細胞の割合を測定した。クリスタルバイオレット染色の結果と同様に、 M W 0 1 前処理は非照射細胞に対してある程度の効果を発揮した。生存細胞の割合は D M S O 対照に比較してわずかに減少した。しかしながら、照射後に D M S O サンプルにおいて約 1 4 % 低い生存細胞が測定され、 M W 0 1 サンプルでは 1 7 % 低い生存細胞が測定された (図 1 6 C)。

【 0 4 1 0 】

細胞に対する M W 0 1 の増感作用を、 2 G y という低い放射線量 (細胞が修復できる量である) を用いて M E F 細胞において試験した。細胞を M W 0 1 で前処理し、照射し、照射後 2 4 時間または 4 8 時間でのアネキシン V 染色により分析した。 2 4 時間後、 M W 0 1 での細胞の処理は、約 1 0 % のアネキシン V 陽性細胞の増加をもたらした。これは、図 1 5 に示した結果と一致し、 I R を使用しなくても M W 0 1 で処理した細胞においてアポトーシスシグナル伝達の増加が認められることを示している。細胞のアネキシン V 染色は、 M W 0 1 処理サンプルにおいて 2 G y の 照射後に更に増加された (約 3 4 %) が、 D M S O 対照ではわずかな増加のみであった。 M W 0 1 処理サンプルと M W 0 1 / - I R 同時処理サンプルとのアネキシン V 陽性細胞を比較すると、約 1 2 % という、低 照射線量で誘導されるアポトーシスに対する増感効果が認められた (図 1 6 D)。

【 0 4 1 1 】

加えて、 N F - B 阻害の増感作用を H T 1 0 8 0 細胞においても試験した。 D M S O または M W 0 1 での前処理後、細胞を 1 0 G y の線量で照射し、アネキシン V 染色により分析した。 M W 0 1 での細胞の同時処理は、照射対照に比較してアネキシン V 染色に有意な増加をもたらした。初期アポトーシス細胞群ではほぼ 2 倍であった (図 1 6 E)。

【 0 4 1 2 】

本項目の結果を考慮すると、 D N A D S B の誘導と組み合わせた M W 0 1 での細胞の同時処理が、単独処理に比較してアポトーシス細胞の割合を増加させた。

【 0 4 1 3 】

M W 0 1 は、 N K - B 非依存性である D N A 修復機序を阻害する

10

20

30

40

50

U2OS細胞をスライドガラス上で増殖させ、DMSOまたはMW01(5 μM)と共に30分間インキュベートした。次いで、細胞を照射(5 Gy)または偽照射(偽IR)した。5時間後、細胞を固定し、免疫蛍光染色法に供した。DNA損傷を示すH2AX fociおよび核(条件あたりn=480核)を、核1個あたりの平均foci数の計算のためにカウントした。有意性はスチューデントt検定を使って算出した。

【0414】

MW01による細胞の処理は、未処理(非照射)細胞における細胞当たりのfociの有意な増加をもたらし、遺伝毒性ストレスにより誘導されるIKK/NF-シグナル伝達経路に加えて、定常状態で生じる他のDNA修復機序を阻害することを示した。

10

【0415】

〔本発明の化合物の例〕

化合物の合成の最終段階において、トリフルオロ酢酸または酢酸のような酸を使用した。例えば、酸に不安定な保護基(例えばt-Bu基)のためにトリフルオロ酢酸を使用する場合、またはそのような酸を含む溶離液を使ったクロマトグラフィーにより化合物を精製する場合、ある場合には、後処理手順に依存して、例えば凍結乾燥法の詳細に依存して、化合物は部分的にまたは完全に、使用した酸の塩の形、例えば酢酸塩、ギ酸塩もしくはトリフルオロ酢酸塩または塩酸塩の形で得られた。同様に塩基性中心、例えば塩基性窒素を含む出発物質または中間体は、遊離塩基の形でまたは塩の形、例えばトリフルオロ酢酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩または塩酸塩のような形で得られるかまたは使用された。

20

【0416】

〔使用した略語〕

アセトニトリル ACN

水性 aq.

tert-ブチル t-Bu

ジベンジリデンアセトン dba

ジクロロメタン DCM

4-ジメチルアミノピリジン DMAp

N,N-ジメチルホルムアミド DMF

ジメチルスルホキシド DMSO

30

エタノール EtOH

酢酸エチル EtOAc

ギ酸 FA

高性能液体クロマトグラフィー HPLC

メタノール MeOH

N-メチル-2-ピロリドン NMP

室温20~25 RT

飽和 sat.

トリエタノールアミン TEA

テトラヒドロフラン THF

40

トリフルオロ酢酸 TFA

【0417】

LCMS(方法1)：機器：Agilent Technologies HPLC1200シリーズに接続したAgilent Technologies 6220 Accurate Mass TOF LC/MS；カラム：Thermo Accuore RP-MS；粒径：2.6 μm；寸法：30 × 2.1 mm；溶離液A：0.1% FA/H₂O；溶離液B：0.1% FA/ACN；グラジェント：0.00分95% A、0.2分95% A、1.1分1% A、2.5分停止時間、1.3分ポスト時間；流速：0.8 mL/min；UV検出：220 nm、254 nm、300 nm。

【0418】

LCMS(方法2)：機器：Agilent Technologies HPLC1290 Infinityシリーズに

50

接続したAgilent Technologies 6120 Quadrupole LC/MS；カラム：Thermo AccuTOF RP-MS；粒径：2.6 μm；寸法：30 × 2.1 mm；溶離液A：0.1%FA/H₂O；溶離液B：0.1%FA/ACN；グラジエント：0.00分95%A、0.2分95%A、1.1分1%A、2.5分停止時間、1.3分ポスト時間；流速：0.8 mL/分；UV検出：220 nm、254 nm、300 nm。

【0419】

分取HPLC（方法1）：機器：Waters preparative HPLCシステム：二元グラジエントモジュール2545、UV検出器2489、Waters prepインジェクト、およびWatersフラクションコレクターI IIから構成；カラム：Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleodur 100-7 C18ec；溶離液A：0.1%TFA/H₂O；溶離液B：0.1%TFA/ACN；グラジエント：0.00分85%A、2.00分85%A、22.00分15%A、25.00分15%A、26.00分0%A、28.00分0%A、29.00分85%A、30.00分85%A、30.10分停止；流速：30 mL/分；UV検出：254 nm。

10

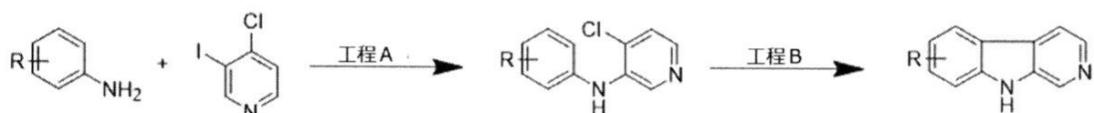
【0420】

分取HPLC（方法2）：機器：Waters preparative HPLCシステム：二元グラジエントモジュール2545、UV検出器2489、Waters prepインジェクト、およびWatersフラクションコレクターI IIから構成；カラム：Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleodur 100-7 C18ec；溶離液A：0.1%TFA/H₂O；溶離液B：0.1%TFA/ACN；グラジエント：0.00分70%A、2.00分70%A、22.00分10%A、25.00分10%A、26.00分0%A、28.00分0%A、29.00分70%A；30.00分70%A、30.10分停止；流速：30 mL/分；UV検出：254 nm。

20

【0421】

【化59】



30

【0422】

-カルボリン（例えば6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール）の合成は、Laha他（Laha, J.K.他、J.Org. Chem. (2011) 76, 6421-6425）により記載された通りに実施した。

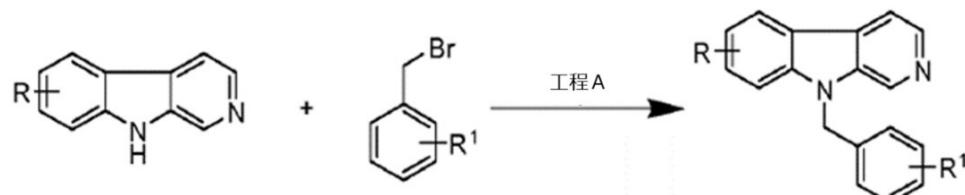
【0423】

9-ベンジル-9H-ピリド[3,4-b]インドール誘導体への一般的な反応：

【0424】

【化60】

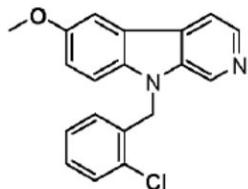
40



【0425】

50

実施例 1 : 9 - (2 - クロロベンジル) - 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール
 【 0 4 2 6 】
 【 化 6 1 】



10

【 0 4 2 7 】

1 mL の D M F 中の 27.6 mg の 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール (0 . 14 ミリモル、 1 . 0 当量) の溶液に、窒素下で 8 . 91 mg の水素化ナトリウム (0 . 22 ミリモル、 1 . 6 当量) を添加した。混合物を R T で 20 分間攪拌し、 1 mL の D M F 中の 34.3 mg (0 . 17 ミリモル、 1 . 2 当量) の 2 - クロロベンジルプロミドと 1 . 7 mg の D M A P (0 . 01 ミリモル、 0 . 1 当量) の溶液を滴下添加した。添加完了後、反応混合物を 70 °C で 3 時間攪拌した。反応終了後、混合物を水で希釈し、飽和 N a H C O 3 溶液を加えた。水相を D C M で 3 回抽出した。合わせた有機相を硫酸マグネシウム上で乾燥し、次いで溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液として D C M / M e O H の勾配を使ったシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発させ、固体として表記化合物を得た。

収量 : 25.9 mg 、 M S (E S +) [M + H] : m / e = 323

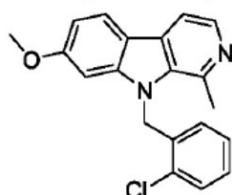
20

【 0 4 2 8 】

実施例 2 : 9 - (2 - クロロベンジル) - 7 - メトキシ - 1 - メチル - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール

【 0 4 2 9 】

【 化 6 2 】



30

【 0 4 3 0 】

表題化合物は、実施例 1 に記載の手順を用いることにより調製したが、 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドールの代わりにハルミンを使用した点が異なった。

収量 : 19.3 mg 、 M S (E S +) [M + H] : m / e = 337

40

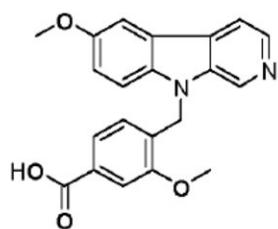
【 0 4 3 1 】

実施例 3 : 3 - メトキシ - 4 - ((6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 9 - イル) メチル) 安息香酸

【 0 4 3 2 】

50

【化63】



10

【0433】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルプロミドの代わりに4-(プロモメチル)-3-メトキシ安息香酸メチルを使用した点が異なった。

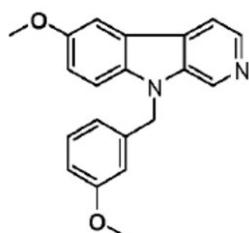
収量：12.2mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 363

【0434】

実施例4：9-ベンジル-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール

【0435】

【化64】



20

【0436】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルプロミドの代わりに3-メトキシベンジルプロミドを使用した点が異なった。

30

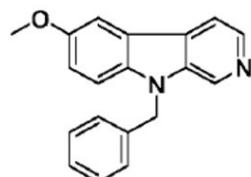
収量：22.4mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 319

【0437】

実施例5：9-ベンジル-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール

【0438】

【化65】



40

【0439】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルプロミドの代わりにベンジルプロミドを使用した点が異なった。

収量：16.7mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 289

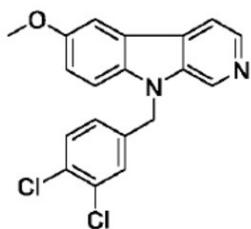
【0440】

実施例6：9-(3,4-ジクロロベンジル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール

50

【0441】

【化66】



10

【0442】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルブロミドの代わりに3,4-ジクロロベンジルブロミドを使用した点が異なった。

収量：19mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 357/359 ジクロロパターン

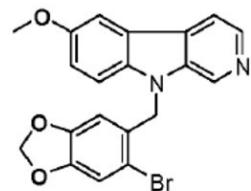
【0443】

実施例7：9-((6-ブロモベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-イル)メチル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール

【0444】

【化67】

20



【0445】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルブロミドの代わりに5-ブロモ-6-ブロモメチル-1,3-ベンゾジオキソールを使用した点が異なった。

30

収量：11.4mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 411/413 ブロモパターン

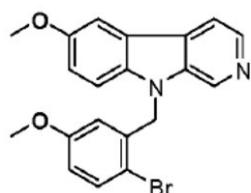
【0446】

実施例8：9-((2-ブロモ-5-メトキシベンジル)-6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール

【0447】

【化68】

40



【0448】

表題化合物は、実施例1に記載の手順を用いることにより調製したが、2-クロロベンジルブロミドの代わりに2-ブロモ-5-メトキシベンジルブロミドを使用した点が異なった。

50

収量 : 3.5 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 397/399 プロモパターン

【0449】

9-(2-アロイル)カルバゾール誘導体への一般的な反応:

【0450】

【化69】



10

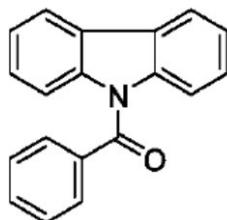
【0451】

実施例9: 9-(2-ベンゾイル)カルバゾール (D08) (CAS: 19264-68-7)

【0452】

【化70】

20



【0453】

表題化合物は、5 mLのトルエン/DMF (1:1)中の100 mgカルバゾール (0.60ミリモル、1.0当量)の冷却 (0) 溶液に、23.9 mgの水素化ナトリウム (0.60ミリモル、1.0当量)を窒素下で添加することにより調製した。0で30分間攪拌した後、200 μLのトルエン中の69.4 μL塩化ベンゾイル (0.60ミリモル、1.0当量)の溶液を滴下添加した。反応混合物をRTで17時間攪拌し、沈澱した固体をろ過し、EtOAcで洗浄した。ろ液を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液としてシクロヘキサン/EtOAcの勾配を使ったシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発し、固体として表題化合物を得た。

30

収量: 107 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 272

【0454】

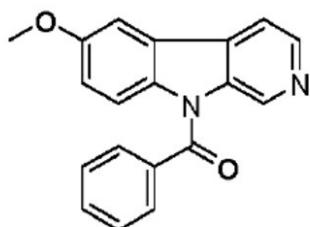
実施例10: (6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル) (フェニル)メタノン (CAS: 19264-69-8)

40

【0455】

50

【化71】



10

【0456】

表題化合物は、5 mLトルエン / DMF (1:1) 中の 10 mg の 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3, 4 - b] インドール (0.05 ミリモル、1.0 当量) の冷却溶液 (0) に、2.02 mg の水素化ナトリウム (0.05 ミリモル、1.0 当量) を窒素下で添加することにより調製した。0 で 30 分間攪拌した後、17 μ L のトルエン中の 5.9 μ L の塩化ベンゾイル (0.05 ミリモル、1.0 当量) の溶液を滴下添加した。反応混合物を RT で 2 時間攪拌し、次いで溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液として DCM / MeOH の勾配を使ったシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発し、表題化合物を得た。次いでこの生成物を分取 HPLC 方法 1 により再精製した。生成物を含む画分を蒸発させ、凍結乾燥して固体を得た。生成物はトリフルオロ酢酸塩として得られた。

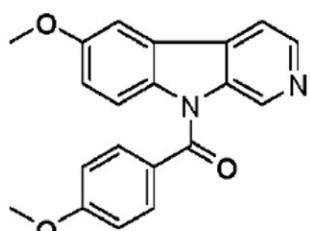
収量：8.1 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 303

【0457】

実施例 11：(6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3, 4 - b] インドール - 9 - イル) (4 - メトキシフェニル) メタノン

【0458】

【化72】



30

【0459】

表題化合物は、2.0 mL の ACN 中の 20 mg の 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3, 4 - b] インドール (0.10 ミリモル；1 当量) の懸濁液に、41 μ L の 4 - メトキシベンゾイルクロリド (0.30 ミリモル；3.00 当量)、37.0 mg の DMAAP (0.30 ミリモル；3.00 当量)、および 42 μ L の TEA (0.30 ミリモル；3.00 当量) を順次添加することにより調製した。生じた混合物を RT で 1 時間攪拌した。次いで、反応混合物を 1 mL の水で希釈し、ろ過し、分取 HPLC 方法 1 により精製した。生成物を含む画分を蒸発させ、凍結乾燥して固体を得た。生成物はトリフルオロ酢酸塩として得られた。

収量：19.2 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 333

【0460】

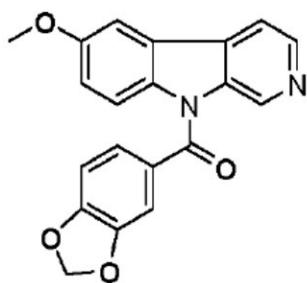
実施例 12：ベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - イル (6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3, 4 - b] インドール - 9 - イル) メタノン

40

50

【0461】

【化73】



10

【0462】

表題化合物は、実施例11に記載の手順を用いることにより調製したが、4-メトキシベンゾイルブロミドの代わりにピペロニロイルクロリドを使用した点が異なった。

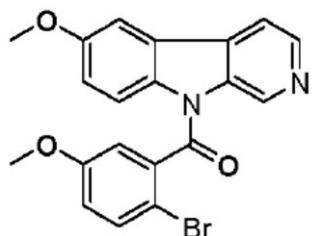
収量：41.5mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 347

【0463】

実施例13：(2-ブロモ-5-メトキシフェニル)(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)メタノン

【0464】

【化74】



20

30

【0465】

表題化合物は、実施例11に記載の手順を用いることにより調製したが、4-メトキシベンゾイルクロリドの代わりに2-ブロモ-5-メトキシベンゾイルクロリドを使用した点が異なった。

収量：25.2mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 411/413 (ブロモバターン)

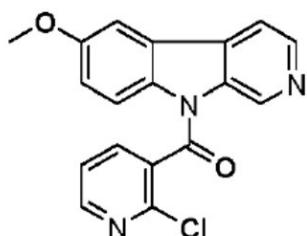
【0466】

実施例14：(2-クロロピリジン-3-イル)(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)メタノン

40

【0467】

【化75】



50

【0468】

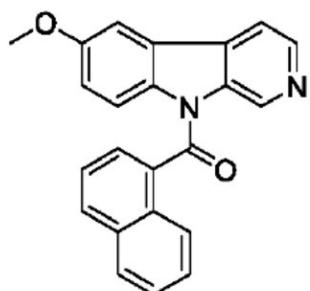
表題化合物は、実施例11に記載の手順を用いることにより調製したが、4-メトキシベンゾイルクロリドの代わりに2-クロロニコチノイルクロリドを使用した点が異なった。
収量：5.4mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 338

【0469】

実施例15：(6-メトキシ-9H-ピリド[3,4-b]インドール-9-イル)(ナフタレン-1-イル)メタノン

【0470】

【化76】



10

【0471】

表題化合物は、実施例11に記載の手順を用いることにより調製したが、4-メトキシベンゾイルクロリドの代わりに1-ナフトイルクロリドを使用した点が異なった。

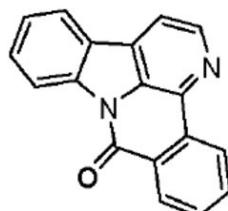
収量：17.3mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 353

【0472】

実施例16：8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン(CAS 38478-71-6)

【0473】

【化77】



30

【0474】

表題化合物は、86mgの9H-ピリド[3,4-b]インドール-1-イルトリフルオロメタンスルホン酸塩(0.272ミリモル、1.00当量)、68.5mgの2-メトキシカルボニルフェニルボロン酸(0.381ミリモル、1.40当量)、12.5mgのPd2(dba)3(0.014ミリモル、0.05当量)、7.1mgのトリフェニルホスフィン(0.027ミリモル；0.10当量)を2.7mLのトルエンと1.8mLのEtOH中に溶かした。その溶液を窒素で5分間パージした。反応混合物に0.9mLの飽和Na2CO3水溶液を加え、その混合物を窒素で5分間パージした。次いで、該溶液を80℃で90分間攪拌した。それをEtOHで希釈し、水で2回洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液としてDCM/MeOHの勾配を用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発させ、固体として表題化合物を得た。

収量：30mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 271

【0475】

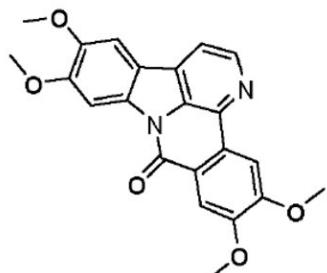
40

50

実施例 17 : 5, 6, 11, 12 - テトラメトキシ - 8H - ベンゾ [c] インドロ [3, 2, 1 - ij] [1, 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0476】

【化78】



10

【0477】

表題化合物は、80 mg の 6, 7 - ジメトキシ - 9H - ピリド [3, 4 - b] インドール - 1 - イルトリフルオロメタンスルホン酸塩 (0.202 ミリモル；1.00 当量)、67.9 mg の 4, 5 - ジメトキシ - 2 - (メトキシカルボニル) ベンゼンボロン酸 (0.283 ミリモル；1.40 当量)、9.2 mg の $Pd_2(dba)_3$ (0.010 ミリモル；0.05 当量)、5.3 mg のトリフェニルホスフィン (0.020 ミリモル；0.10 当量) を 2.3 mL のトルエンと 1.8 mL の $EtOH$ に溶かした。その溶液を窒素で 5 分間バージした。反応混合物に 0.6 mL の飽和炭酸ナトリウム水溶液を加え、その混合物を再び窒素で 5 分間バージした。次いで、該溶液を 80 で 17 時間攪拌した。それを酢酸エチルで希釈し、水で 2 回洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液として DCM / MeOH の勾配を用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発させて表題化合物を得た。この生成物を次に分取 HPLC 方法 2 により更に精製した。生成物を含む画分を減圧蒸発させ、白色固体を得た。生成物はトリフルオロ酢酸塩として得られた。

20

収量：0.4 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 391

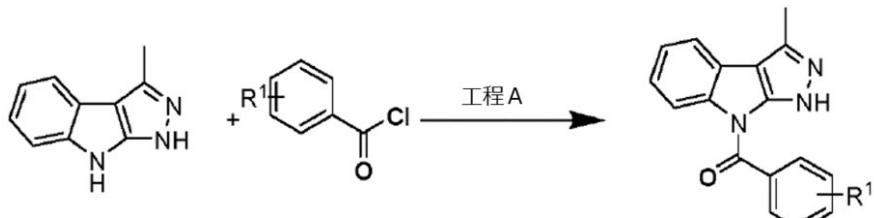
【0478】

メチルピラゾロ [3, 4 - b] インドール誘導体の一般的な反応

30

【0479】

【化79】



40

【0480】

3 - メチルピラゾロ [3, 4 - b] インドールは文献の手順に従って合成した (Monge, A. 他、Eur. J. Med. Chem. (1991) 26, 179-188)。

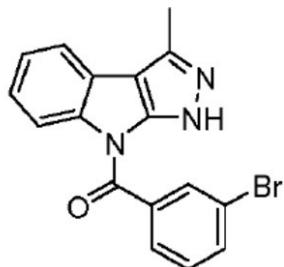
【0481】

実施例 18 : (3 - ブロモフェニル) (3 - メチルピラゾロ [3, 4 - b] インドール - 8 (1H) - イル) メタノン

【0482】

50

【化80】



10

【0483】

表題化合物は、2.9 mL の ACN 中の 25 mg の 3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール(0.146 ミリモル；1.00 当量)の懸濁液に、57.7 μ L の 3-プロモベンゾイルクロリド(0.438 ミリモル；3.00 当量)、53.7 mg の 4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.438 ミリモル；3.00 当量)および 60.7 μ L の TEA(0.438 ミリモル；3.00 当量)を順次添加することにより調製した。その混合物を RT で少なくとも 3 時間攪拌した。反応完了後、反応混合物を 1 mL の水で希釈し、ろ過し、分取 HPLC 方法 1 により精製した。生成物を含む画分を蒸発させ、凍結乾燥して固体を得た。生成物はそのトリフルオロ酢酸塩として得られた。

収量：2.5 mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 354/356 プロモパターン

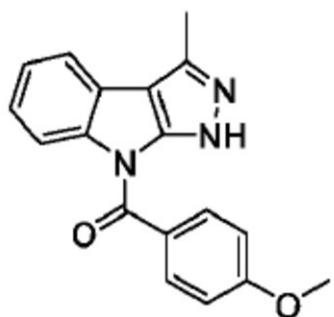
20

【0484】

実施例 19：(4-メトキシフェニル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン

【0485】

【化81】



30

【0486】

表題化合物は、実施例 18 に記載の手順を用いることにより調製したが、3-プロモベンゾイルクロリドの代わりに 4-メトキシベンゾイルクロリドを用い、反応スケールを 100 mg の 3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール(0.584 ミリモル；1.00 当量)に合わせて実施する点が異なった。

収量：94.6 mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 323

40

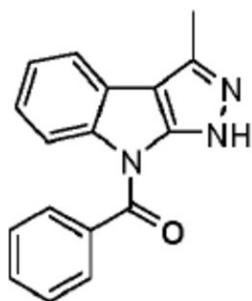
【0487】

実施例 20：(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)(フェニル)メタノン

【0488】

50

【化82】



10

【0489】

表題化合物は、実施例18に記載の手順を用いることにより調製したが、3-プロモベンゾイルクロリドの代わりにベンゾイルクロリドを用いた点が異なった。

収量：5.5mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 276

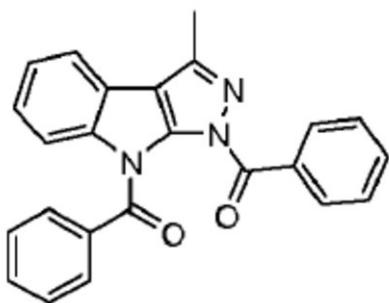
【0490】

実施例21：(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス(フェニルメタノン)

【0491】

【化83】

20



30

【0492】

表題化合物は、実施例20の合成からの副産物として得られた。

収量：7.8mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 380

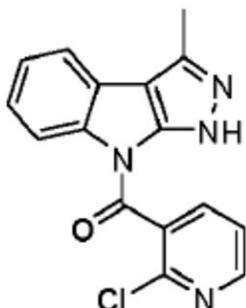
【0493】

実施例22：(2-クロロピリジン-3-イル)(3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン

【0494】

【化84】

40



【0495】

表題化合物は、実施例18に記載の手順を用いることにより調製したが、3-プロモベ

50

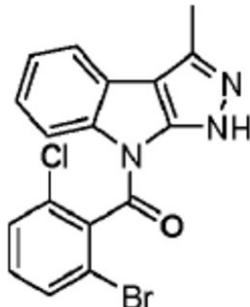
ンゾイルクロリドの代わりに 2 - クロロニコチノイルクロリドを用いた点が異なった。
収量： 12.1 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 311 / 313 クロロパ
ターン

【0496】

実施例 23：(2 - ブロモ - 6 - クロロフェニル) (3 - メチルピラゾロ [3,4-b] インドール - 8 (1H) - イル) メタノン

【0497】

【化85】



10

【0498】

表題化合物は、実施例 18 に記載の手順を用いることにより調製したが、3 - ブロモベ
ンゾイルクロリドの代わりに 2 - ブロモ - 6 - クロロベンゾイルクロリドを用いた点が異
なった。

20

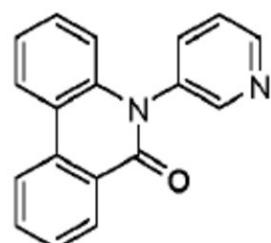
収量： 8.7 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 388 / 390 同位体パタ
ターン

【0499】

実施例 24：5 - (ピリジン - 3 - イル) フェナントリジン - 6 (5H) - オン

【0500】

【化86】



30

【0501】

表題化合物は、150 mg の 6 (5H) - フェナントリジノン (0.77ミリモル；1
. 00当量)、111 μ L の 3 - ブロモピリジン (1.15ミリモル；1.50当量)、
106 mg の炭酸カリウム (0.77ミリモル；1.00当量)、2.7 mg のヨウ化銅
(I) (0.04ミリモル；0.05当量) をフラスコに投入することにより調製した。
その固体に 900 μ L の NMP (7.7ミリモル；10.0当量) を加えた。混合物を 1
80 に加熱し、出発物質：生成物の変換比 1 : 1 で反応を停止させた。次いで、反応混
合物をジエチルエーテルで希釈し、水で抽出した。水相をジエチルエーテルで 3 回洗浄し
た。合わせた有機相を水で 1 回洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発さ
せた。溶媒を減圧蒸発させている間に、出発物質が白色固体として沈殿したので、それ
をろ過により除去した。ろ液を蒸発乾固させた。粗生成物を、溶離液としてシクロヘキサン
/ EtOAc の勾配を用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を含
む画分を減圧蒸発させ、表題化合物を得た。

40

収量： 62 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 273

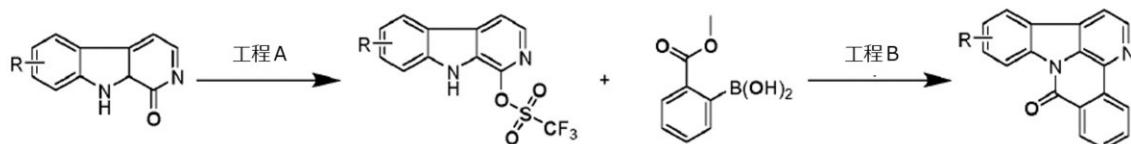
50

【0502】

- カルボリノン誘導体への一般的な反応

【0503】

【化87】



10

【0504】

- カルボリノン誘導体（例えば6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン）は、文献に記載の通りに合成した（La Regina, G.他、*Synthesis* (2014), 46, 2093-2097）。

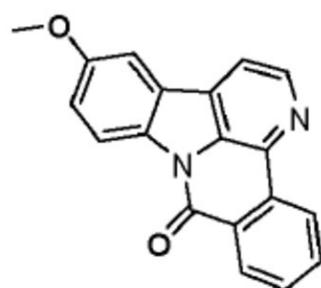
【0505】

実施例 25 : 12 - メトキシ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0506】

【化88】

20



【0507】

30

表題化合物は、78.9 mg の 6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン (0.368 ミリモル、1.0 当量) を 3.8 mL のピリジン中に溶かすことにより調製した。その溶液を 4 ℃ に冷却し、窒素でバージした。この溶液に 439 μL のトリフリニン酸無水物 (0.737 ミリモル、2.0 当量) を滴下添加した（約 30 分間）。混合物を RT で 45 分間攪拌した。

【0508】

反応の完了後、混合物を水に注ぎ、水相を EtOAc で 3 回抽出した。合われた有機相を硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物 (6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - イルトリフルオロメタンスルホネート) を更に精製することなく次の工程に使用した。

40

【0509】

73 mg の 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - イルトリフルオロメタンスルホネート (0.179 ミリモル、1.0 当量) 、45 mg の (2 - (メトキシカルボニル) フェニル) ボロン酸 (0.251 ミリモル、1.4 当量) 、8.2 mg のトリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (0) (0.009 ミリモル、0.05 当量) および 4.7 mg のトリフェニルホスフィン (0.018 ミリモル、0.1 当量) を 1.8 mL のトルエンと 1.2 mL のエタノール中に溶かした。その溶液を窒素でバージし、0.6 mL の飽和炭酸ナトリウム水溶液を加えた。生じた混合物を 80 ℃ で 90 分間攪拌した。反応の完了後、混合物を EtOAc で希釈し、有機相を水で 2 回洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離液として DCM

50

/ MeOHを用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、その後、ACN / 水を用いるHPLCにより更に精製した。

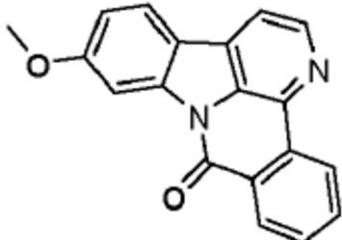
収量: 18 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 301

【0510】

実施例26: 11-メトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0511】

【化89】



10

【0512】

表題化合物は、実施例25に記載の手順を用いることにより調製したが、6-メトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オンの代わりに7-メトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オンを用いた点が異なった。

20

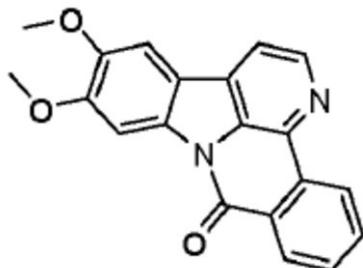
収量: 5 mg、MS (ES+): [M+H]: m/e = 301

【0513】

実施例27: 11,12-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0514】

【化90】



30

【0515】

表題化合物は、実施例25に記載の手順を用いることにより調製したが、6-メトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オンの代わりに6,7-ジメトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オンを用いた点が異なった。

40

収量: 5 mg、MS (ES+): [M+H]: m/e = 331

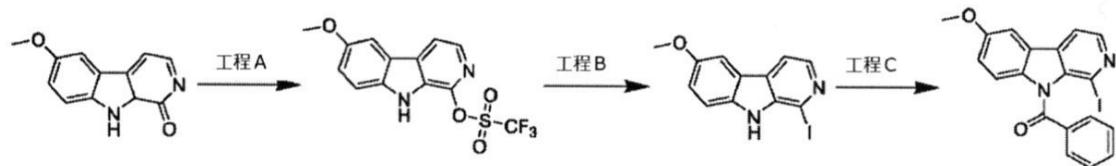
【0516】

6-メトキシ-2,9-ジヒドロ-1H-ピリド[3,4-b]インドール-1-オン誘導体への一般的な反応

【0517】

50

【化91】



10

【0518】

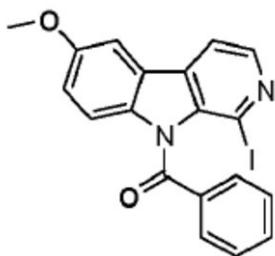
6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オンは、文献に記載の通りに合成した (La Regina, G.他、*Synthesis* (2014), 46, 2093-2097)。

【0519】

実施例 28 : (1 - ヨード - 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 9 - イル) (フェニル) メタノン

【0520】

【化92】



20

【0521】

表題化合物は、78.9 mg の 6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン (0.368 ミリモル、1.0 当量) を 3.8 mL のピリジン中に溶かすことにより調製した。その溶液を 4 に冷却し、窒素でバージした。この溶液に 439 μL のトリフリン酸無水物 (0.737 ミリモル、2.0 当量) を滴下添加した (約 30 分間)。混合物を RT で 45 分間攪拌した。

30

【0522】

反応の完了後、混合物を水に注ぎ、水相を EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機相を硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物 (6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - イルトリフルオロメタンスルホネート) を更に精製することなく次の工程に使用した。

【0523】

100 mg の 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - イルトリフルオロメタンスルホネート (0.289 ミリモル、1.0 当量) と 216 mg のヨウ化ナトリウム (1.44 ミリモル、5.0 当量) を窒素下で 0.7 mL のアセトニトリルに溶かした。その溶液を 0 に冷却し、50 μL のトリフリン酸 (0.578 ミリモル、2.0 当量) を滴下添加した (約 15 分間)。添加完了後、混合物を室温で 3 時間攪拌した。反応完了後、混合物を EtOAc と水で希釈し、0 に冷却した。水性相を NaOH (c = 1.0 モル / L、< 1 mL) で pH 1.0 になるよう調整し、次いで相分離した。有機相をチオ硫酸ナトリウム溶液 (w 5 %)、NaOH (c = 1 モル / L) およびブラインで順次洗浄した。有機相を硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、シクロヘキサン / EtOAc / MeOH を溶離剤として用いるシリカゲルクロマトグラ

40

50

フィーにより精製し、1 - ヨード - 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドールを得た。1 . 2 mL の A C N 中の 20 mg の 1 - ヨード - 6 - メトキシ - 9 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール (0 . 062 ミリモル、1 . 0 当量) の懸濁液に、21 μ L のベンゾイルクロリド (0 . 19 ミリモル；3 . 0 当量)、22 . 6 mg の D M A P (0 . 19 ミリモル；3 . 0 当量) および 26 μ L の T E A (0 . 19 ミリモル；3 . 0 当量) を順次添加した。混合物を R T で 72 時間攪拌した。その後、反応混合物を 1 mL の水で希釈し、ろ過し、分取 H P L C 方法 1 により精製した。

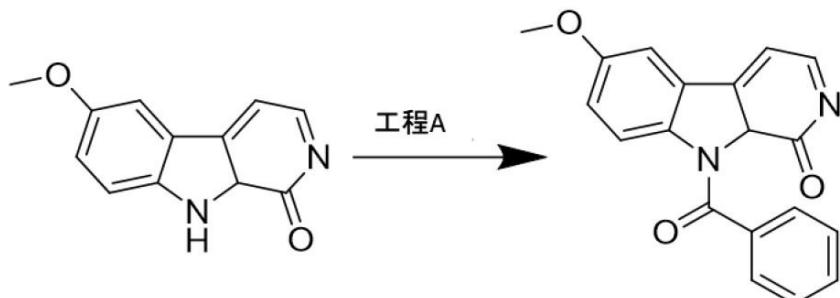
収量：15 mg、M S (E S +) [M + H] : m / e = 428

【0524】

6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン
誘導体への一般的な反応

【0525】

【化93】



10

20

【0526】

6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オンは、文献に記載の通りに合成した (La Regina, G. 他、*Synthesis* (2014), 46, 2093-2097))。

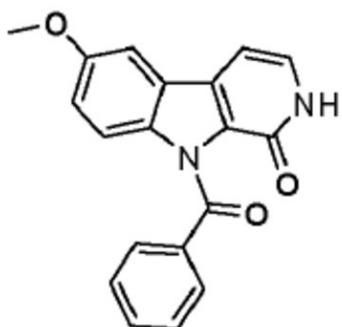
【0527】

実施例 29 : 9 - ベンゾイル - 6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン

30

【0528】

【化94】



40

【0529】

表題化合物は、1 . 2 mL の A C N 中の 20 mg の 6 - メトキシ - 2 , 9 - ジヒドロ - 1 H - ピリド [3 , 4 - b] インドール - 1 - オン (0 . 093 ミリモル、1 . 0 当量) の懸濁液に、33 μ L のベンゾイルクロリド (0 . 28 ミリモル；3 . 0 当量)、34 . 2 mg の D M A P (0 . 28 ミリモル；3 . 0 当量) および 34 μ L の T E A (0 . 28 ミリモル；3 . 0 当量) を順次添加することにより調製した。混合物を R T で 72 時間攪拌した。その後、反応混合物を 1 mL の水で希釈し、沈殿物をろ過により除去した。ろ液は生成物を含み、それを凍結乾燥により乾燥し、分取 H P L C 方法 1 により精製した。

50

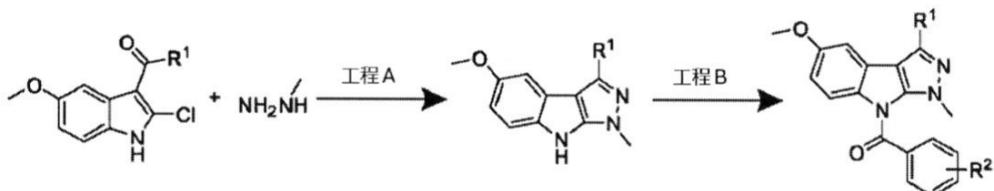
収量: 9 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 319

【0530】

(1-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)(フェニル)メタノン誘導体への一般的反応

【0531】

【化95】



10

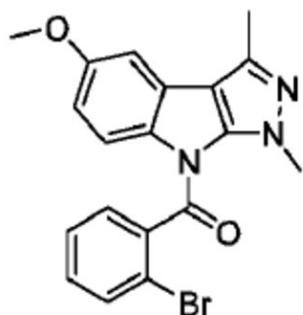
【0532】

実施例30: (2-ブロモフェニル)(5-メトキシ-1,3-ジメチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)メタノン

【0533】

【化96】

20



30

【0534】

表題化合物は、100 mg の 1-(2-クロロ-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル)エタノン (0.45 ミリモル、1.0 当量) と 71 μL のモノメチルヒドラジンを 1.3 mL のエタノールに溶かすことにより調製した。その溶液を還流させながら 12 時間維持した。反応完了後、混合物を冷まし、沈殿した生成物をろ過により取集した。固体化合物をエタノールで洗浄し、純粋な 5-メトキシ-1,3-ジメチル-1,8-ジヒドロピラゾロ[3,4-b]インドールを得た。1.9 mL の ACN 中の 20 mg の 5-メトキシ-1,3-ジメチル-1,8-ジヒドロピラゾロ[3,4-b]インドール (0.093 ミリモル、1.0 当量) の懸濁液に、36 μL の 2-ブロモベンゾイルクロリド (0.28 ミリモル、3.0 当量)、34 mg の DMAP (0.28 ミリモル、3.0 当量) および 39 μL の TEA (0.28 ミリモル、3.0 当量) を順次添加した。その混合物を RT で 6 時間攪拌した。その後、反応混合物を水で希釈し、沈殿した生成物をろ過により取集した。

40

収量: 17 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 398/400 同位体パターン

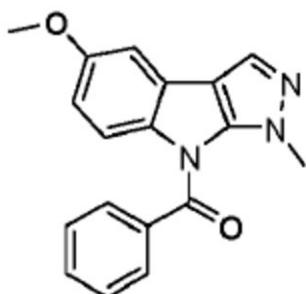
【0535】

実施例31: (5-メトキシ-1-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-8(1H)-イル)(フェニル)メタノン

【0536】

50

【化97】



10

【0537】

表題化合物は、実施例30に記載の手順を用いることにより調製したが、1-(2-クロロ-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル)エタノンの代わりに2-クロロ-5-メトキシインドール-3-カルバルデヒドを用い、そして2-プロモベンジルクロリドの代わりにベンジルクロリドを用いた点が異なった。

収量：15mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 306

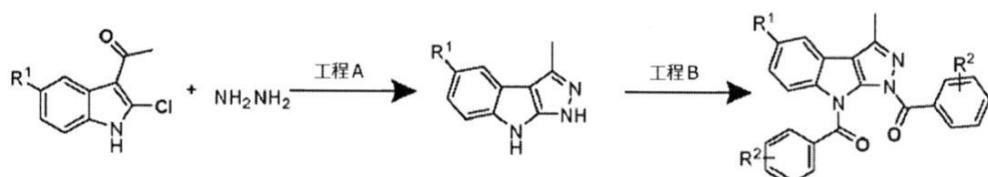
【0538】

ピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイルビス(フェニルメタノン)誘導体への一般的な反応

20

【0539】

【化98】



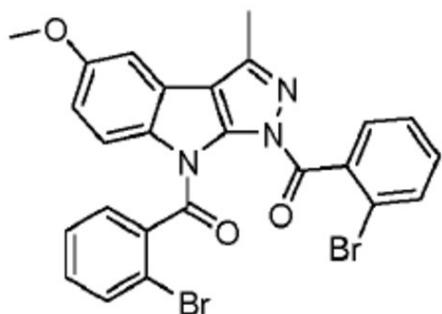
30

【0540】

実施例32：(5-メトキシ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((2-プロモフェニル)メタノン)

【0541】

【化99】



40

【0542】

表題化合物は、200mgの1-(2-クロロ-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル)エタノン(0.90ミリモル、1.0当量)と131μLのヒドラジン水和物を2.7mLのエタノールに溶かすことにより調製した。その溶液を還流させながら8時間

50

維持した。反応完了後、混合物を冷まし、沈殿した生成物をろ過により収集した。固体化合物をエタノールで洗浄し、純粋な 5 - メトキシ - 3 - メチル - 1 , 8 - ジヒドロピラゾロ [3 , 4 - b] インドールを得た。2 mL の A C N 中の 20 mg の 5 - メトキシ - 3 - メチル - 1 , 8 - ジヒドロピラゾロ [3 , 4 - b] インドール (0 . 0 9 9 ミリモル、1 . 0 当量) の懸濁液に、35 μ L の 2 - プロモベンゾイルクロリド (0 . 3 0 ミリモル、3 . 0 当量) 、36 mg の D M A P (0 . 3 0 ミリモル、3 . 0 当量) および 41 μ L の T E A (0 . 3 0 ミリモル、3 . 0 当量) を順次添加した。その混合物を R T で 6 時間攪拌した。その後、反応混合物を水で希釈し、沈殿した生成物をろ過により収集し、A C N で洗浄した。

収量 : 30 mg、M S (E S +) [M + H] : m / e = 566 / 568 / 570 同位体パターン

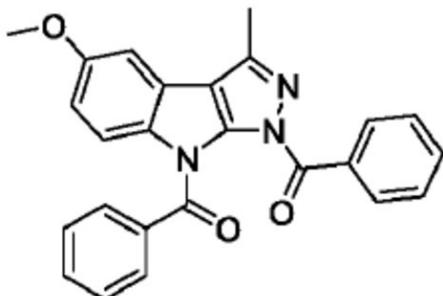
10

【 0 5 4 3 】

実施例 3 3 : (5 - メトキシ - 3 - メチルピラゾロ [3 , 4 - b] インドール - 1 , 8 - ジイル) ビス (フェニルメタノン)

【 0 5 4 4 】

【 化 1 0 0 】



20

【 0 5 4 5 】

表題化合物は、実施例 3 2 に記載の手順を用いることにより調製したが、2 - プロモベンゾイルクロリドの代わりにベンゾイルクロリドを用いた点が異なった。

収量 : 13 mg、M S (E S +) [M + H] : m / e = 410

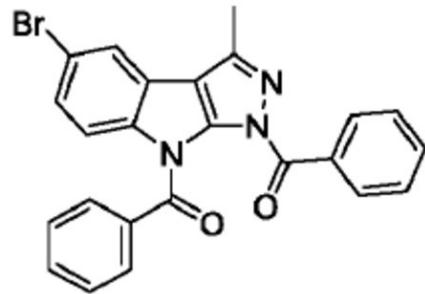
30

【 0 5 4 6 】

実施例 3 4 : (5 - プロモ - 3 - メチルピラゾロ [3 , 4 - b] インドール - 1 , 8 - ジイル) ビス (フェニルメタノン)

【 0 5 4 7 】

【 化 1 0 1 】



40

【 0 5 4 8 】

表題化合物は、実施例 3 2 に記載の手順を用いることにより調製したが、1 - (2 - クロロ - 5 - メトキシ - 1 H - インドール - 3 - イル) エタノンの代わりに 1 - (5 - プロモ - 2 - クロロ - 1 H - インドール - 3 - イル) エタン - 1 - オンを用い、そして 2 - プロモベンゾイルクロリドの代わりにベンゾイルクロリドを用いた点が異なった。

50

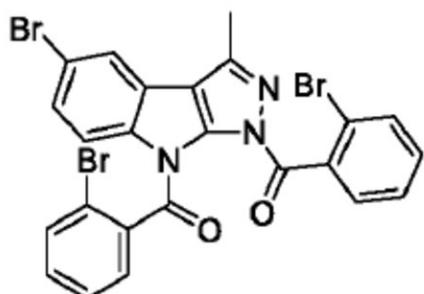
収量 : 5 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 458 同位体パターン

【0549】

実施例35：(5-ブロモ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((2-ブロモフェニル)メタノン)

【0550】

【化102】



10

【0551】

表題化合物は、実施例32に記載の手順を用いることにより調製したが、1-(2-クロロ-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル)エタノンの代わりに1-(5-ブロモ-2-クロロ-1H-インドール-3-イル)エタン-1-オンを用いた点が異なった。

収量 : 14 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 616 同位体パターン

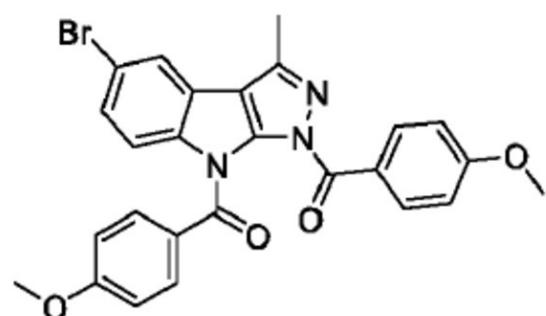
20

【0552】

実施例36：(5-ブロモ-3-メチルピラゾロ[3,4-b]インドール-1,8-ジイル)ビス((4-メトキシフェニル)メタノン)

【0553】

【化103】



30

【0554】

表題化合物は、実施例32に記載の手順を用いることにより調製したが、1-(2-クロロ-5-メトキシ-1H-インドール-3-イル)エタノンの代わりに1-(5-ブロモ-2-クロロ-1H-インドール-3-イル)エタン-1-オンを用い、そして2-ブロモベンジルクロリドの代わりに4-メトキシベンジルクロリドを用いた点が異なった。

収量 : 18 mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 518 / 520 同位体パターン

40

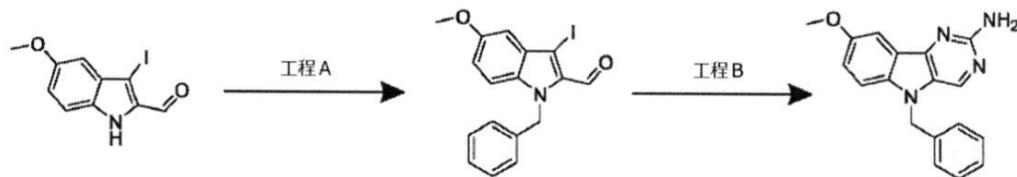
【0555】

5-ベンジル-5H-ピリミド[5,4-b]インドール誘導体(実施例37)への一般的反応

【0556】

50

【化104】



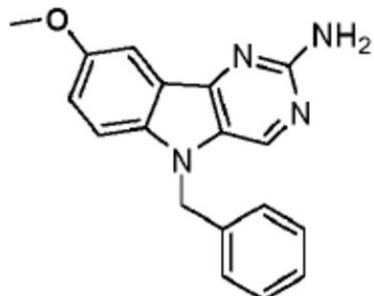
10

【0557】

実施例37：5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドール-2-アミン

【0558】

【化105】



20

【0559】

表題化合物は、4 mLの乾燥DMF中の600 mgの5-メトキシ-3-ヨード-1H-インドール-2-カルバルデヒド(2.00ミリモル、1.0当量)の溶液を、4 mLの乾燥DMF中の62.2 mgの水素化ナトリウム(灯油中60%)(2.59ミリモル、1.3当量)の溶液に0にて滴下添加した。混合物を0で20分間攪拌し、946 μ Lのベンジルプロミド(7.97ミリモル、4.0当量)の溶液を加えた。生じた懸濁液を室温で1時間攪拌し、追加の38.3 mgの水素化ナトリウム(灯油中60%)(1.59ミリモル、0.8当量)と473 μ Lのベンジルプロミド(3.99ミリモル、2.0当量)を加えた。混合物を更に室温で12時間攪拌した。反応の完結後、混合物を氷水で急冷し、EtOAcで抽出した。有機相を水とブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離剤としてシクロヘキサン/EtOAcを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、純粋な1-ベンジル-3-ヨード-5-メトキシ-1H-インドール-2-カルバルデヒドを得た。

30

【0560】

工程B：2.5 mLの乾燥DMSO中の300 mgの1-ベンジル-3-ヨード-5-メトキシ-1H-インドール-2-カルバルデヒド(0.77ミリモル、1.0当量)、147 mgのグアニジン(1.53ミリモル、2.0当量)、500 mgの炭酸セシウム(1.53ミリモル、2.0当量)、14.6 mgのヨウ化銅(I)(0.08ミリモル、0.1当量)および1,10-フェナントロリンの懸濁液を窒素下で90で48時間攪拌した。反応完了後、水とEtOAcを加え、混合物をセライトろ紙によりろ過した。水性相をEtOAcで2回抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。粗生成物を、溶離剤としてシクロヘキサン/EtOAcを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。生成物を分取HPLC方法3によりもう一度再精製した。

40

50

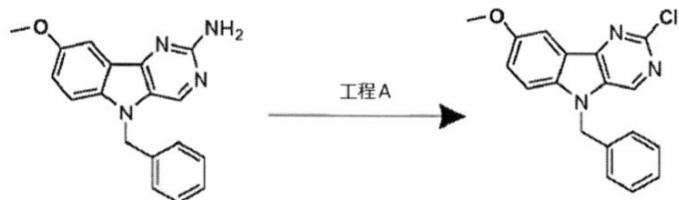
収量: 3.6 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 305

【0561】

5-ベンジル-5H-ピリミド [5,4-b]インドール誘導体 (実施例38) への一般的反応

【0562】

【化106】



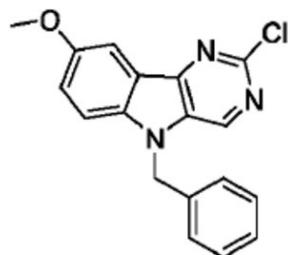
10

【0563】

実施例38: 5-ベンジル-2-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド [5,4-b]インドール

【0564】

【化107】



20

【0565】

表題化合物は、1.5 mg の 5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピリミド [5,4-b]インドール-2-アミン (実施例43) (0.05ミリモル、1.0当量) を 0.5 mL の 1,2-ジクロロエタン中に溶かすことにより調製した。その溶液を -10 に冷却し、0.1 mL の 1,2-ジクロロエタン中の 2.5 mg の三塩化アンチモン (0.11ミリモル、2.2当量) の溶液を加えた。その後、27.7 μL の *tert*-ブチルニトリル (0.23ミリモル、4.7当量) を滴下添加した。反応混合物を -10 で 2 時間攪拌し、次に氷水を加えた。反応完了後、混合物を EtOAc で 3 回抽出した。合せた有機相を水で 1 回洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。生成物を分取HPLC方法1を用いて精製した。

30

収量: 1.6 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 324

40

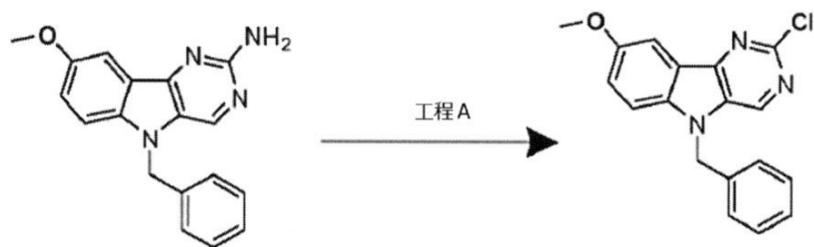
【0566】

5-ベンジル-5H-ピリミド [5,4-b]インドール誘導体 (実施例39) への一般的反応

【0567】

50

【化108】



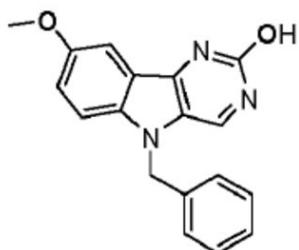
10

【0568】

実施例39：5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドール-2-オール

【0569】

【化109】



20

【0570】

表題化合物は、15mgの5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドール-2-アミン(実施例43)(0.05ミリモル、1.0当量)を0.2mLの酢酸中に溶かすことにより調製した。その溶液を10℃に冷却し、68μLの水に溶かした10mgの亜硝酸ナトリウム(0.15ミリモル、3.0当量)の溶液を加えた。反応混合物を30分間攪拌し、次いで1.5mLの水を加え、溶液を90℃で4時間攪拌した。

30

反応完了後、溶媒を減圧留去し、残渣を水中に取り、EtOAcで3回抽出した。合せた有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥し、溶媒を減圧蒸発させた。

収量：12mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 306

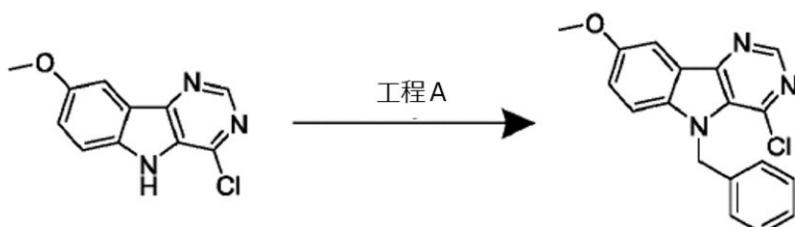
【0571】

5-ベンジル-5H-ピリミド[5,4-b]インドール誘導体(実施例40)への一般的な反応

【0572】

【化110】

40



【0573】

4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドールは市販のものか

50

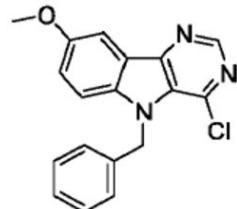
ら入手した。

【0574】

実施例40：5-ベンジル-4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド [5,4-b] インドール

【0575】

【化111】



10

【0576】

表題化合物は、60mgの4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド [5,4-b] インドール (0.26ミリモル、1.0当量)を4mLのDMFに溶かすことにより調製した。この溶液に16mgの水素化ナトリウム (油中60%) (0.41ミリモル、1.6当量)と3.1mg DMAP (0.03ミリモル、0.1当量)を加えた。混合物をRTで約20間攪拌し、そこに53mg (0.31ミリモル、1.2当量)のベンジルブロミドを滴下添加した。添加終了後、反応混合物を70°Cで18時間攪拌した。反応完了後、溶媒を留去し、粗生成物を分取HPLC方法1により精製した。

20

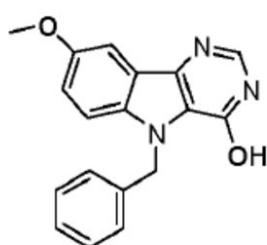
収量：11.6mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 324

【0577】

実施例41：5-ベンジル-8-メトキシ-5H-ピリミド [5,4-b] インドール-4-オール

【0578】

【化112】



30

【0579】

表題化合物は、実施例40の合成からの副産物として得られた。

収量：14.8mg、MS (ES+) [M+H] : m/e = 306

40

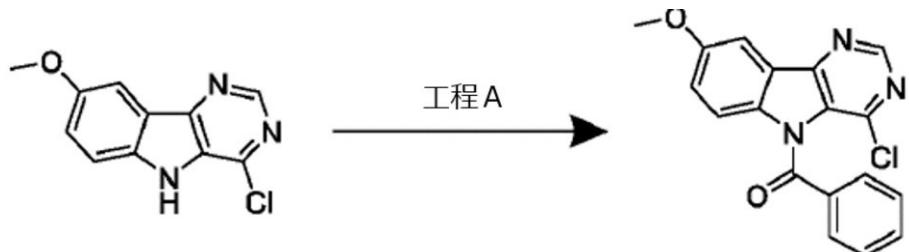
【0580】

フェニル (5H-ピリミド [5,4-b] インドール-5-イル) メタノン誘導体への一般的な反応

【0581】

50

【化113】

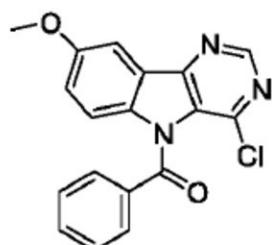


【0582】

実施例42：(4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドール-5-イル)(フェニル)メタノン

【0583】

【化114】



10

【0584】

表題化合物は、5mLのACN中の60mgの4-クロロ-8-メトキシ-5H-ピリミド[5,4-b]インドール(0.26ミリモル、1.0当量)の懸濁液に、89μLのベンゾイルクロリド(0.77ミリモル、3.0当量)、94mgのDMAP(0.77ミリモル、3.0当量)および107μLのTEA(0.7ミリモル、3.0当量)を順次添加することにより調製した。混合物をRTで18時間攪拌し、追加の89μLのベンゾイルクロリド(0.77ミリモル、3.0当量)と107μLのTEA(0.7ミリモル、3.0当量)を加えた。その後、反応混合物を水で希釈し、沈殿を除去した。ろ液を真空乾燥し、粗生成物を、溶離剤としてシクロヘキサン/EtOAcを用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

収量：14.7mg、MS(ES+) [M+H] : m/e = 338

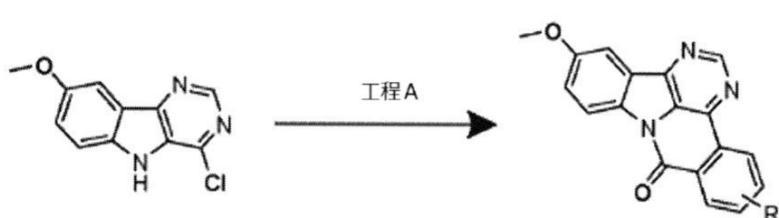
【0585】

8H-ジベンゾ[b,f]ピリミド[4,5,6-hi]インドリジン-8-オン誘導体への一般的な反応

【0586】

【化115】

30



40

【0587】

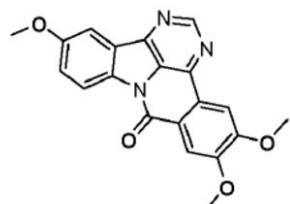
実施例43：5,6,12-トリメトキシ-8H-ジベンゾ[b,f]ピリミド[4,

50

5,6-hi] インドリジン-8-オン

【0588】

【化116】



10

【0589】

表題化合物は、40 mg の 4 - クロロ - 8 - メトキシ - 5H - ピリミド [5,4 - b] インドール (0.171 ミリモル、1.0 当量) と 88 mg のヘキサフルオロリン酸プロモトリピロリジノホスホニウム (0.19 ミリモル、1.1 当量) を窒素下で 1.4 mL の 1,4 - ジオキサン中に溶解することにより調製した。その溶液に、47 μ L のトリメチルアミンを加え、混合物を 70 $^{\circ}$ C で 2 時間攪拌した。その後、27 mg の 4,5 - ジメトキシ - 2 - (メトキシカルボニル) ベンゼンボロン酸 (0.18 ミリモル、1.05 当量)、6.0 mg のビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) ジクロリド (0.009 ミリモル、0.05 当量)、36 mg の炭酸ナトリウム (0.34 ミリモル、2.0 当量) および 0.7 mL の水を加えた。混合物を 70 $^{\circ}$ C で 18 時間攪拌すると懸濁液が生じた。反応完了後、固体生成物をろ過により取り出し、水と MeOH で洗った。

収量: 41 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 362

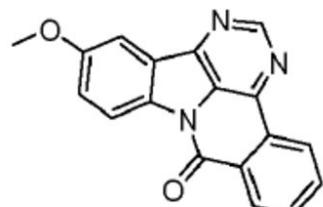
20

【0590】

実施例 44: 12 - メトキシ - 8H - ジベンゾ [b, f] ピリミド [4,5,6 - hi] インドリジン - 8 - オン

【0591】

【化117】



30

【0592】

表題化合物は、実施例 43 に記載の手順を用いることにより調製したが、4,5 - ジメトキシ - 2 - (メトキシカルボニル) ベンゼンボロン酸の代わりに 2 - メトキシカルボニルフェニルボロン酸を用いた点が異なった。

収量: 47 mg、MS (ES+) [M+H]: m/e = 302

40

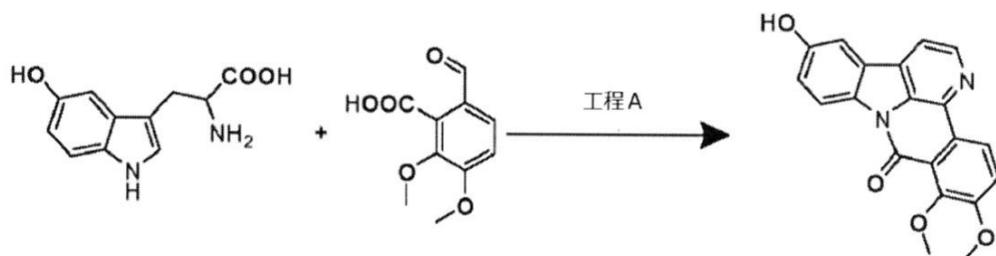
【0593】

実施例 45 (MW01) への一般的反応

【0594】

50

【化 1 1 8 】



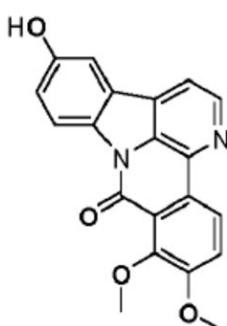
10

(0 5 9 5)

実施例 4 5 : 1 2 - ヒドロキシ - 6 , 7 - ジメトキシ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 8 - オン

[0 5 9 6]

【化 1 1 9】



20

〔 0 5 9 7 〕

表題化合物は、2.00 g の L-5-ヒドロキシトリプトファン (9.1 ミリモル、1.0 当量) と 2.10 g の 2-カルボキシ-3,4-ジメトキシベンズアルデヒド (1.0 ミリモル、1.1 当量) を 9 mL の 氷酢酸中に溶かすことにより調製した。液体の中に一定の空気流を吹き込みながら、その液体を 6 時間還流させ、そして更に 18 時間還流させておいた。反応完了後、固体生成物をろ過により取り出し、水と酢酸で洗浄した。粗生成物を D M F から結晶化させた。

30

收量: 1.18 g, M.S.(E.S+)[M+H]: m/e = 347

(0 5 9 8)

当業者に周知である合成手順を用いることによりおよび上述した一般手順を適用することにより、調製することができる本発明の他の化合物のさらなる例は以下のものである：

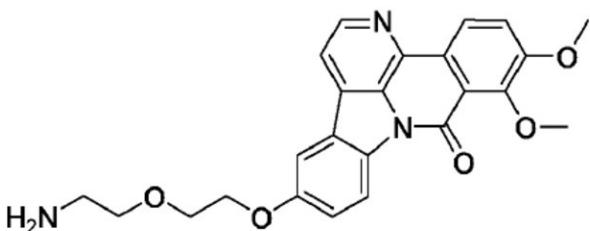
[0 5 9 9]

例：12 - (2 - (2 - アミノエトキシ)エトキシ) - 6, 7 - ジメトキシ - 8H - ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-iji][1,5]ナフチリジン - 8 - オン

40

(0 6 0 0)

【化 1 2 0 】



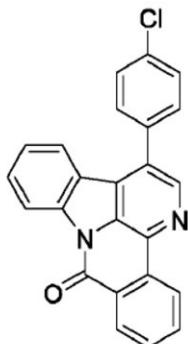
50

【0601】

例 A 1 : 1 - (4 - クロロフェニル) - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3, 2, 1 - ij] [1, 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0602】

【化121】



10

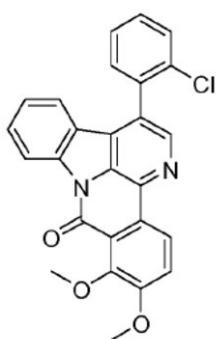
【0603】

例 A 2 : 1 - (2 - クロロフェニル) - 6, 7 - ジメトキシ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3, 2, 1 - ij] [1, 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0604】

【化122】

20



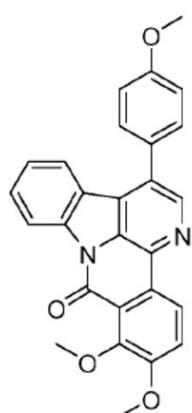
30

【0605】

例 A 3 : 6, 7 - ジメトキシ - 1 - (4 - メトキシフェニル) - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3, 2, 1 - ij] [1, 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0606】

【化123】



40

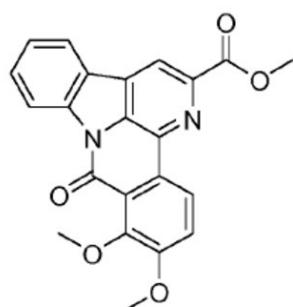
【0607】

例 A 4 : 6, 7 - ジメトキシ - 8 - オキソ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3, 2, 1 - ij] [1, 5] ナフチリジン - 2 - カルボン酸メチル

50

【0608】

【化124】



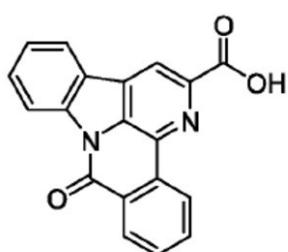
10

【0609】

例 A 5 : 8 - オキソ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 2 - カルボン酸

【0610】

【化125】



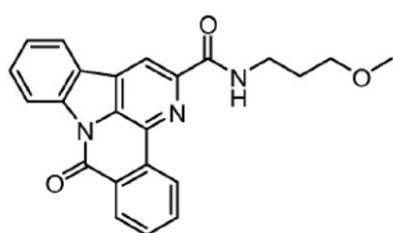
20

【0611】

例 A 7 : N - (3 - メトキシプロピル) - 8 - オキソ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 2 - カルボキサミド

【0612】

【化126】



30

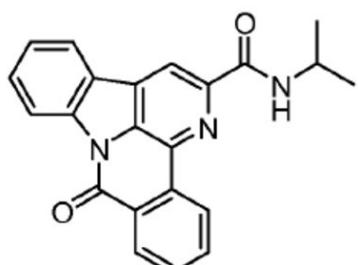
【0613】

例 A 8 : N - イソプロピル - 8 - オキソ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 2 - カルボキサミド

40

【0614】

【化127】



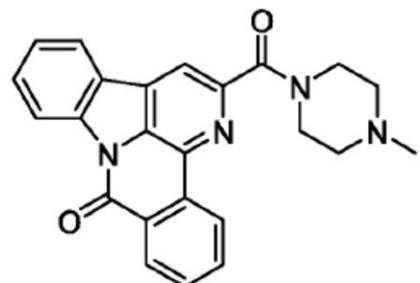
50

【0615】

例 B 1 : 2 - (4 - メチルピペラジン - 1 - カルボニル) - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0616】

【化128】



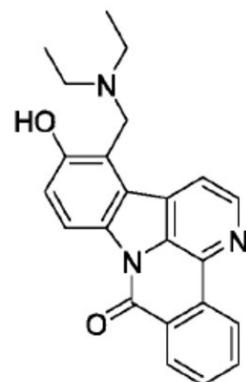
10

【0617】

例 B 2 : 13 - ((ジエチルアミノ)メチル) - 12 - ヒドロキシ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 8 - オン

【0618】

【化129】



20

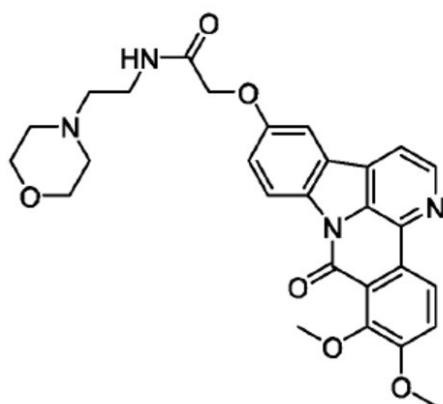
30

【0619】

例 B 3 : 2 - ((6 , 7 - ジメトキシ - 8 - オキソ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5] ナフチリジン - 12 - イル) オキシ) - N - (2 - モルホリノエチル) アセトアミド

【0620】

【化130】



40

【0621】

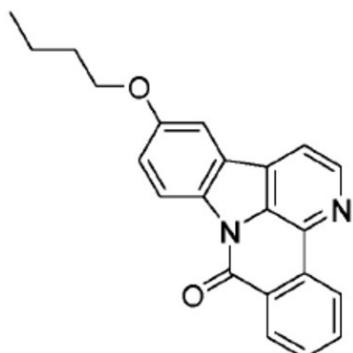
例 B 4 : 12 - プトキシ - 8 H - ベンゾ [c] インドロ [3 , 2 , 1 - i j] [1 , 5]

50

】ナフチリジン - 8 - オン

【0622】

【化131】



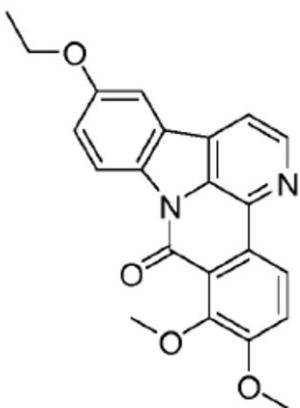
10

【0623】

例B5：12-エトキシ-6,7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0624】

【化132】



20

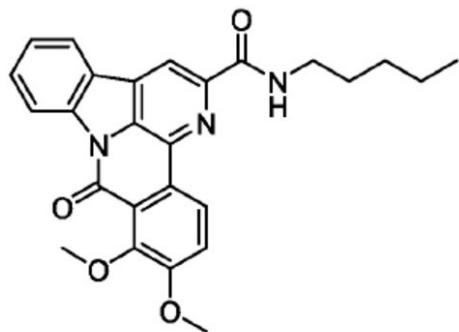
30

【0625】

例B6：6,7-ジメトキシ-8-オキソ-N-ペンチル-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-2-カルボキサミド

【0626】

【化133】



40

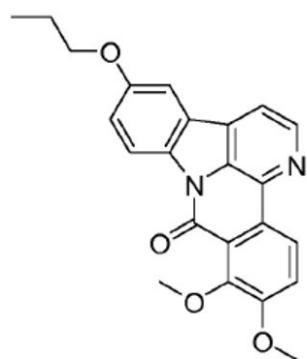
【0627】

例B7：6,7-ジメトキシ-12-プロポキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0628】

50

【化134】



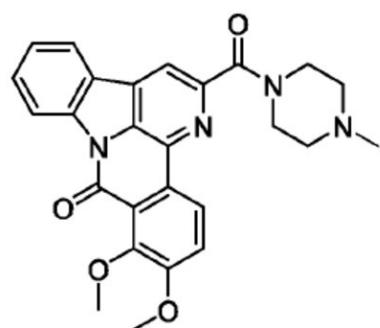
10

【0629】

例B8: 6, 7-ジメトキシ-2-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)-8H-ベンゾ[c]インドロ[3, 2, 1-ij][1, 5]ナフチリジン-8-オン

【0630】

【化135】



20

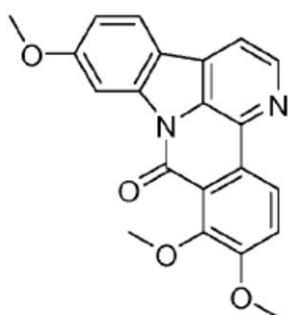
【0631】

例C1: 6, 7, 11-トリメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3, 2, 1-ij][1, 5]ナフチリジン-8-オン

30

【0632】

【化136】



40

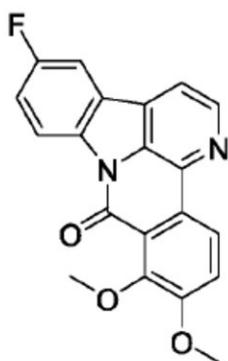
【0633】

例C2: 12-フルオロ-6, 7-ジメトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3, 2, 1-ij][1, 5]ナフチリジン-8-オン

【0634】

50

【化137】



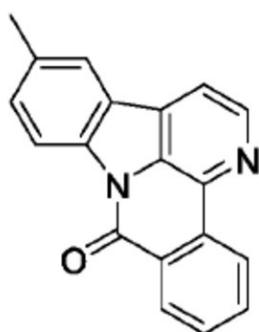
10

【0635】

例C3：12-メチル-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0636】

【化138】



20

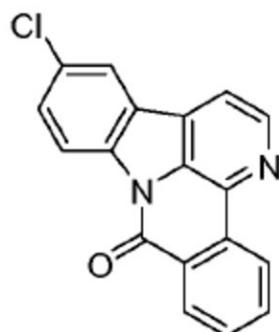
【0637】

例C4：12-クロロ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

30

【0638】

【化139】



40

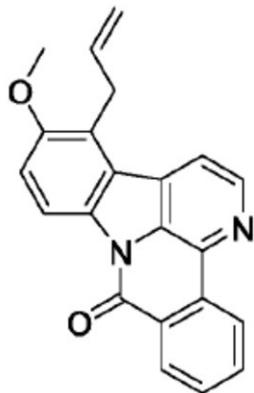
【0639】

例C5：13-アリル-12-メトキシ-8H-ベンゾ[c]インドロ[3,2,1-ij][1,5]ナフチリジン-8-オン

【0640】

50

【化140】



10

【0641】

参考文献

- Baud, V. & Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8, 33-40, (2009).
- Christian, F., Smith, E. L. & Carmody, R. J. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation. *Cells* 5, (2016).
- Gibson, B. A. & Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 411-424, (2012). 20
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674, (2011).
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362, (2008).
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26, 203-234, (2012).
- Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S. C., Khanna, K. K., Dittmar, G. & Scheidereit, C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-ClAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell* 40, 63-74, (2010). 30
- Hinz, M., Arslan, S. C. & Scheidereit, C. It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunol Rev* 246, 59-76, (2012).
- Hinz, M. & Scheidereit, C. The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Rep* 15, 46-61, (2014).
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. & Gelinas, C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8961-8982, (2003).
- Lim, K. H., Yang, Y. & Staudt, L. M. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Immunol Rev* 246, 359-378, (2012).
- Mullard, A. European regulators approve first PARP inhibitor. *Nat Rev Drug Discov* 13, 877-877, (2014). 40
- Scheidereit, C. (1998) Signal transduction: Docking IkappaB kinases. *Nature* 395, 225-226
- Scheidereit, C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25, 6685-6705, (2006).
- Shiloh, Y. & Ziv, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 197-210, (2013).
- Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S. C., Zimmer, A., Schreiber, V. & Scheidereit, C. A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IkappaB kinase activation. *Mol Cell* 36, 365-378, (2009). 50

Sun, S. C. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev* 246, 125-140, (2012).

Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M. & Ashwell, J. D. Sensing of Ly s 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 8, 398-406, (2006).

Wu, Z., Wang C., Bai, M., Li, X., Mei, Q., Li, X., Wang, Y., Fu, X., Luo, G., & Han, W. (2015) An LRP16-containing preassembly complex contributes to NF- κ B activation induced by DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 43(6):31 67-79

Zhang, J., Clark, K., Lawrence, T., Peggie, M. W. & Cohen, P. An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by auto phosphorylation. *Biochem J* 461, 531-537, (2014).

【図面】

【図1】

【図2】

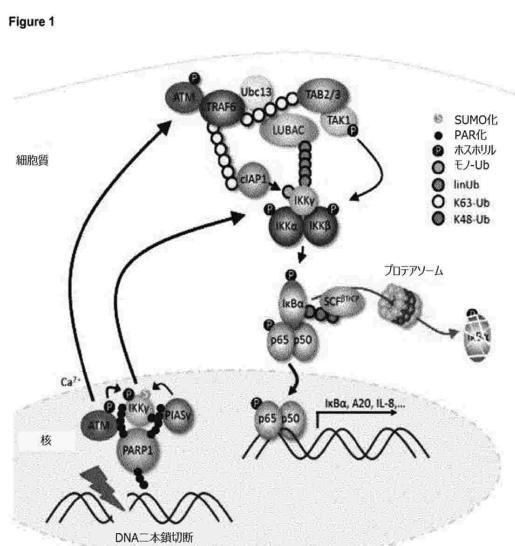
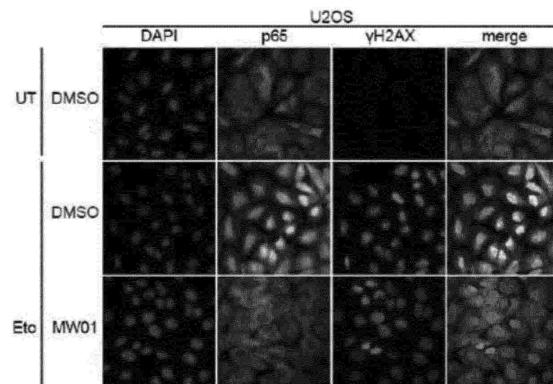


Figure 2



10

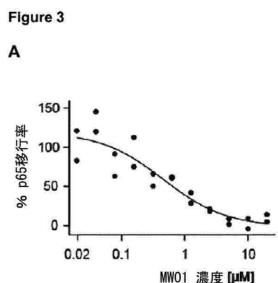
20

30

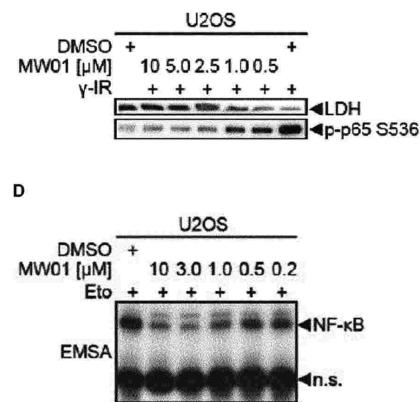
40

50

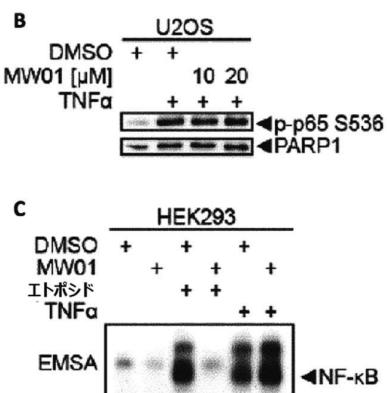
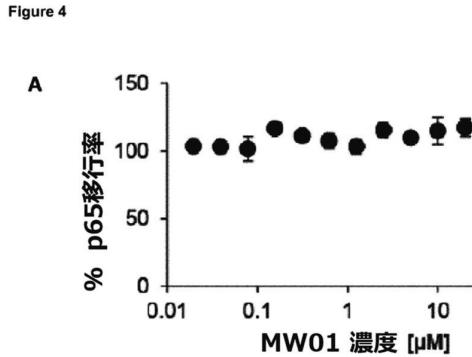
【図3】



C



【図4】



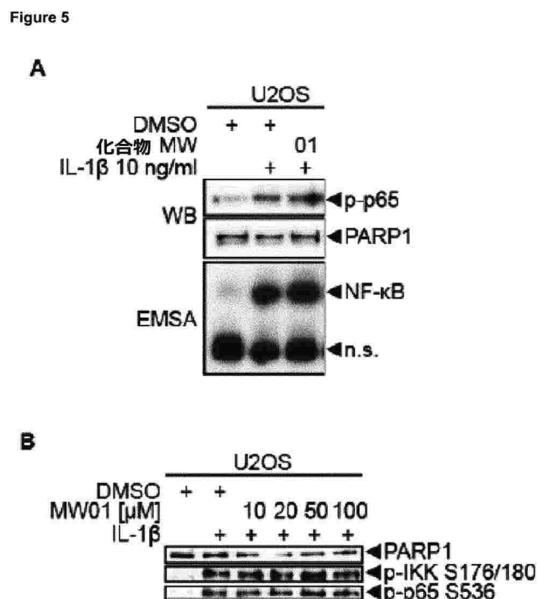
10

20

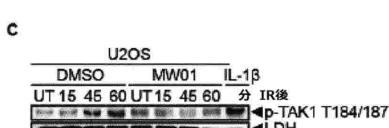
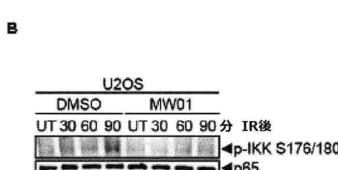
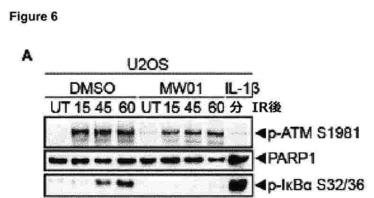
30

40

【図5】



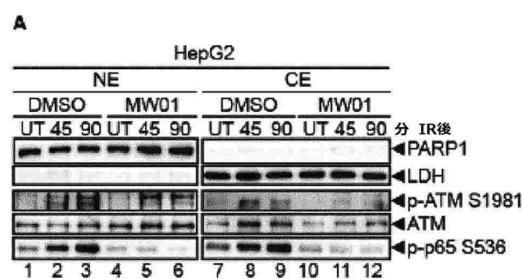
【図6】



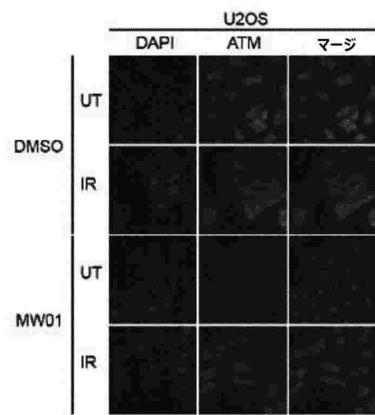
50

【図7】

Figure 7

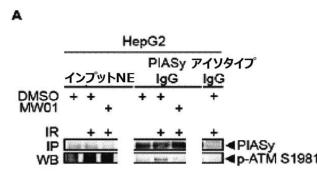


B

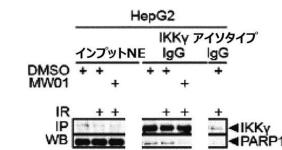


【図8】

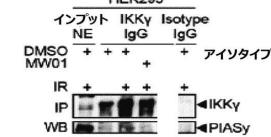
Figure 8



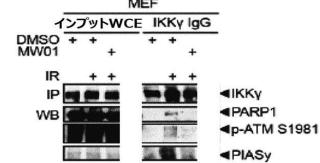
B



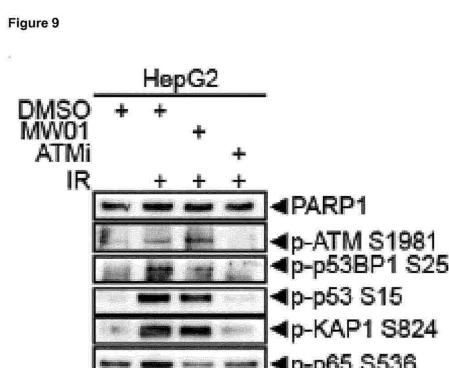
C



D



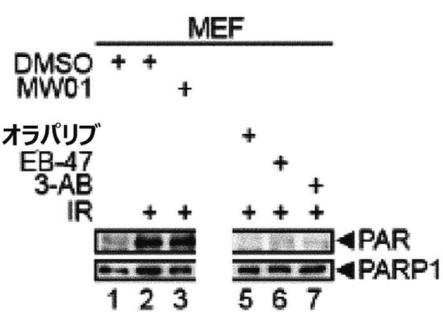
【図9】



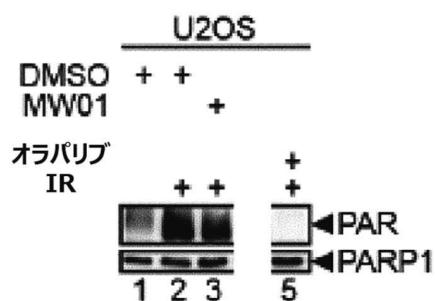
【図10】

Figure 10

A



B



10

20

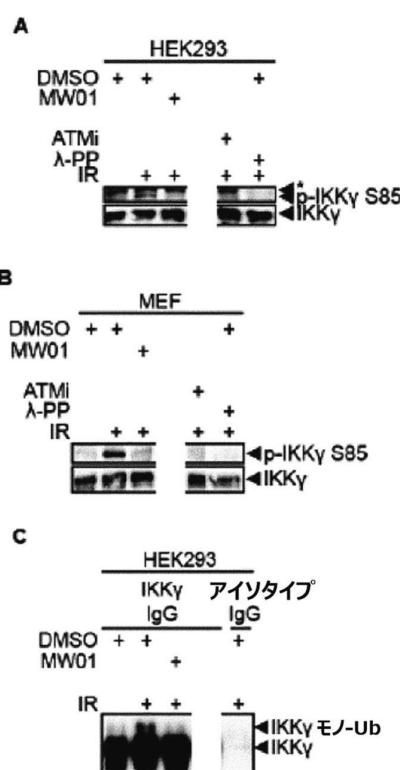
30

40

50

【図 1 1】

Figure 11

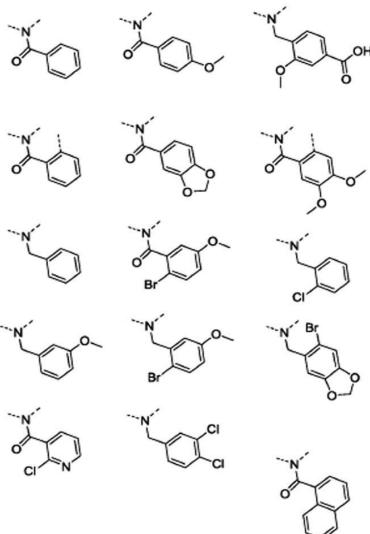


【図 1 2】

Figure 12

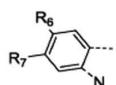
D

式 I-VII の好ましい環 C 構造のバリエーション



10

環 B のバリエーション



R6 = OMe; R7 = H, OMe

R6 = H; R7 = H, OMe

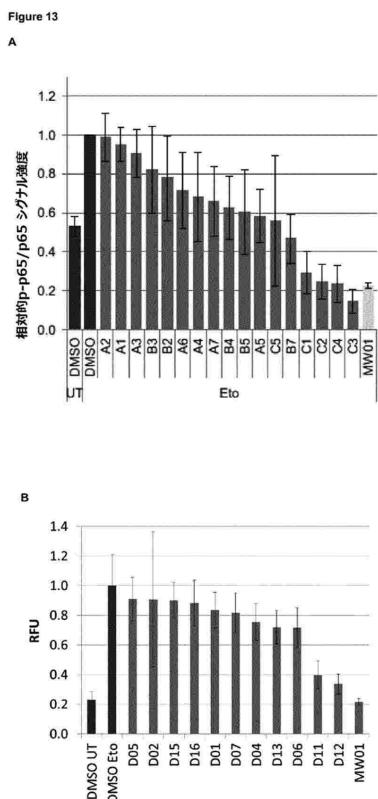
R6 = Me, R7 = H

R6 = H; R7 = Me

20

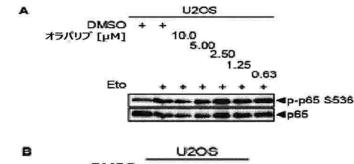
これにより R5 と R8 は H である

【図 1 3】

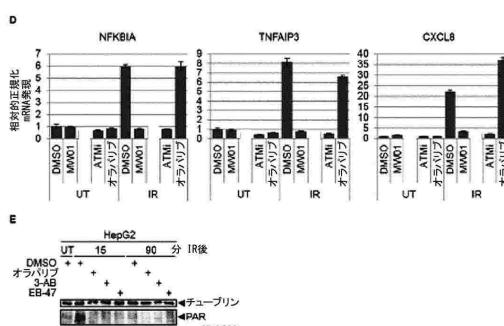
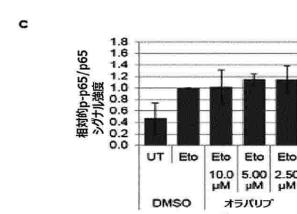
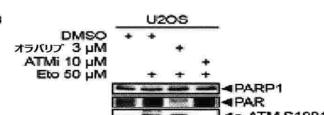


【図 1 4】

Figure 14



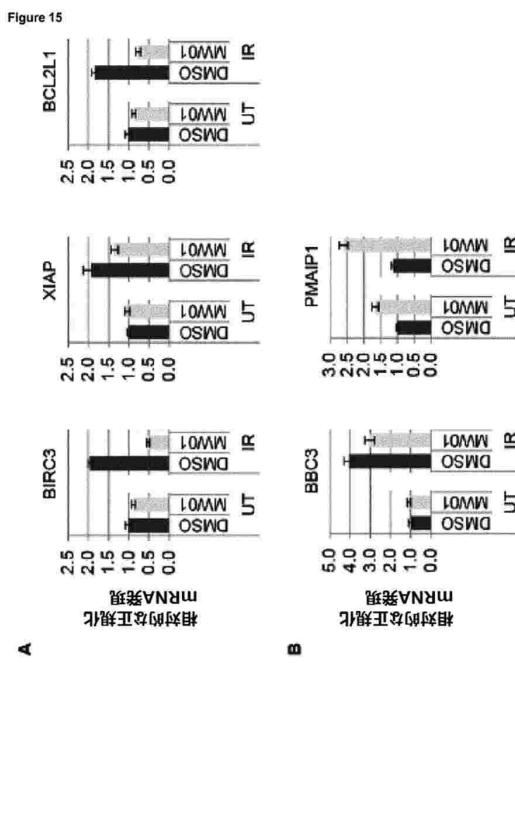
30



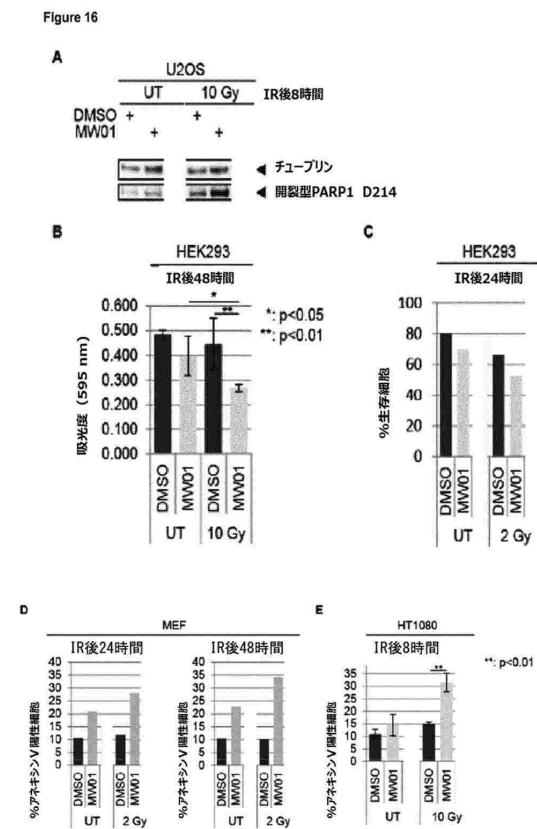
40

50

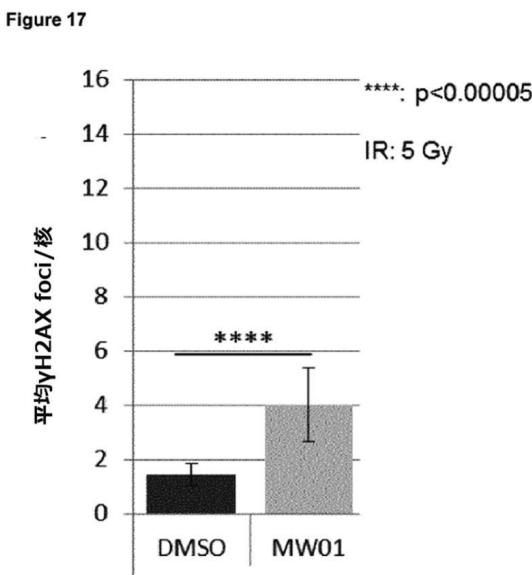
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K 31/444 (2006.01)	A 6 1 K 31/444
A 6 1 K 31/473 (2006.01)	A 6 1 K 31/473
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 D 401/04 (2006.01)	C 0 7 D 401/04
C 0 7 D 471/06 (2006.01)	C 0 7 D 471/06
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 1 3 8
C 0 7 D 471/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 1 4 0
	C 0 7 D 471/04 1 0 3

R u d o w e r C h a u s s e e 1 7 , D - 1 2 4 8 9 B e r l i n , G e r m a n y

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100203828

弁理士 喜多村 久美

(72)発明者 クラウス シェイデライト

ドイツ連邦共和国, 1 0 6 2 9 ベルリン, ドロイセンシュトラーセ 1 6

(72)発明者 ミヒヤエル ビレンプロック

ドイツ連邦共和国, 1 3 1 8 7 ベルリン, シエンホルツァー シュトラーセ 1 2 アー

(72)発明者 ペーター リンデマン

ドイツ連邦共和国, 1 3 1 8 7 ベルリン, ペスタロツツィシュトラーセ 3

(72)発明者 ジルケ ラデツキー

ドイツ連邦共和国, 1 2 6 8 3 ベルリン, ロートラウトシュトラーセ 2 6

(72)発明者 イエンス ペーター フォンクリーズ

ドイツ連邦共和国, 1 6 3 4 1 パンケタール, クラウスター ラー シュトラーセ 2 0

(72)発明者 マルク ナザレ

ドイツ連邦共和国, 1 2 2 0 9 ベルリン, パラレルシュトラーセ 1 4 ツェー

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 0 4 1 1 2 5 (WO , A 1)

特表2 0 0 9 - 5 2 6 8 5 5 (J P , A)

特表2 0 1 2 - 5 3 3 6 2 3 (J P , A)

特表2 0 0 6 - 5 2 6 5 8 0 (J P , A)

特許第7 3 0 7 6 7 7 (J P , B 2)

Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012年, pp.1372-1379

Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2013年, 42, pp.62-72

ChemMedChem, 2016年, 11(16), pp.1721-1733

Biochemical Pharmacology, 70(1), 2005年, pp.102-112

European Journal of Medicinal Chemistry, 2016年, 110, pp.98-114

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016年, 26(16), pp.4015-4019

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A 6 1 K 3 1 / 4 3 7

A 6 1 K 3 1 / 4 0 3
A 6 1 K 3 1 / 4 4 4
A 6 1 K 3 1 / 4 7 4 5
A 6 1 K 3 1 / 4 1 6 2
A 6 1 K 3 1 / 4 4 3 9
A 6 1 K 3 1 / 4 7 3
A 6 1 K 3 1 / 5 1 9
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C 0 7 D 4 0 1 / 0 4
C 0 7 D 2 0 9 / 8 8
C 0 7 D 4 7 1 / 0 4
C 0 7 D 4 7 1 / 0 6
C 0 7 D 4 8 7 / 0 4
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)