

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5460054号
(P5460054)

(45) 発行日 平成26年4月2日(2014.4.2)

(24) 登録日 平成26年1月24日(2014.1.24)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	31/404 (2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 K	31/427 (2006.01)	A 6 1 K	31/427
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12

請求項の数 31 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-542528 (P2008-542528)	(73) 特許権者	508152917
(86) (22) 出願日	平成18年11月22日 (2006.11.22)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ
(65) 公表番号	特表2009-517401 (P2009-517401A)		ザ ユニバーシティー オブ テキサス
(43) 公表日	平成21年4月30日 (2009.4.30)		システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/061219		アメリカ合衆国 テキサス州 オースティン
(87) 国際公開番号	W02007/062399		ン ウェスト 第七 ストリート 201
(87) 国際公開日	平成19年5月31日 (2007.5.31)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成21年11月19日 (2009.11.19)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/739, 865	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成17年11月23日 (2005.11.23)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦

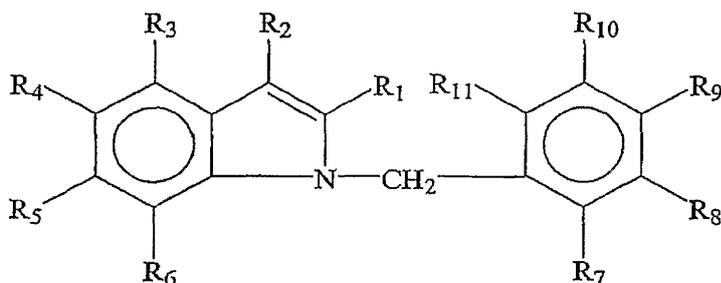
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍形成性 R a S 特異的細胞障害性化合物およびその使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上昇したレベルの R a s タンパク質を発現する細胞、または変異体 R a s タンパク質を発現する細胞において、変異体 R a s タンパク質の活性を阻害するのに十分な量の、以下の式を有する化合物、またはその塩を含む、R a s タンパク質の活性を阻害するための薬学的組成物：



式中、

- R₁ は、水素であり；
- R₂ は、メタノール、アルデヒド、またはエステル、であり；
- R₃ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；
- R₄ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；
- R₅ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₆ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₇ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

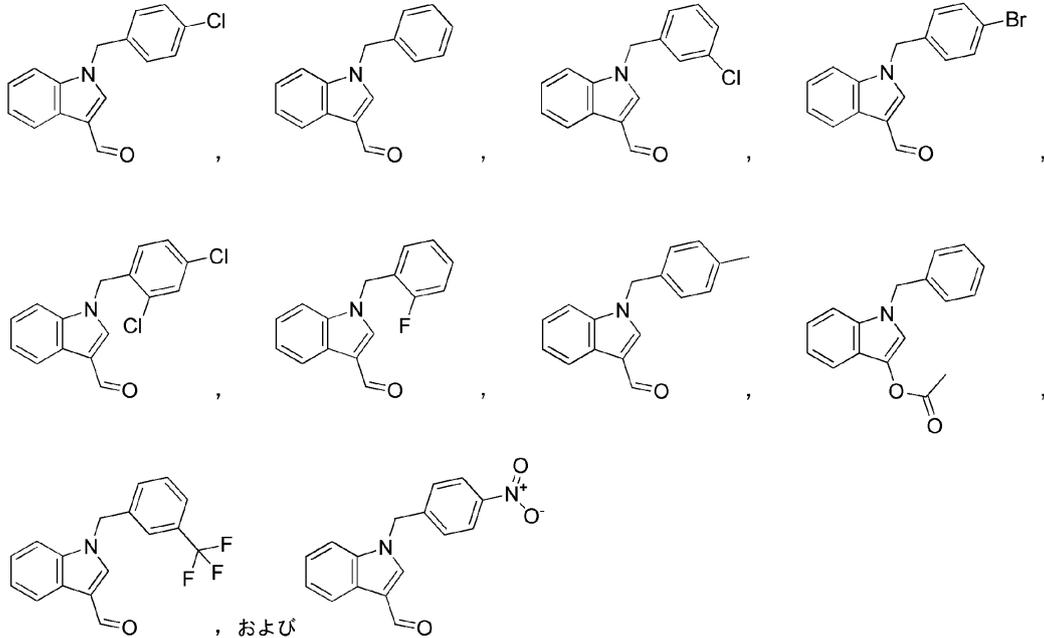
R₈ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₉ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₁₀ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；および

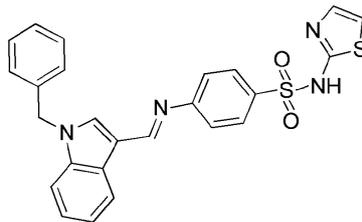
R₁₁ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

ここで、R₂ が、アルデヒド、またはエステルである場合、前記化合物は、以下：



からなる群より選択され；

または、前記化合物は以下：



である。

【請求項 2】

R₃ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₄ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₅ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₆ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₇ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペ

10

20

30

40

50

ンチルであり；

R₈は、クロロ、プロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₉は、クロロ、プロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₁₀は、クロロ、プロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；および

R₁₁は、クロロ、プロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルである、

請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】

R₂がアルデヒド基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項4】

R₉がクロロ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項5】

R₉がプロモ基である、請求項3記載の薬学的組成物。

【請求項6】

R₃がハロ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項7】

R₄がハロである、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項8】

R₅がメチルである、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項9】

R₆がアルキル基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項10】

R₇がクロロまたはプロモ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項11】

R₈がクロロまたはプロモ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項12】

R₉がクロロ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項13】

R₁₀がクロロまたはプロモ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項14】

R₁₁がクロロ基である、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項15】

化合物が、

1 - [(4-クロロフェニル)メチル] - 1H-インドール - 3-カルボアルデヒド (オンクラシン (Oncrasin) 1)、

1 - (3-クロロベンジル) - 1H-インドール - 3-カルボアルデヒド (オンクラシン 27)、

1 - (4-プロモベンジル) - 1H-インドール - 3-カルボアルデヒド (オンクラシン 29)、

スルファニルアミド、N4 - [(1-ベンジルインドール - 3-イル)メチレン] - N1 - 2 - チアゾリル (オンクラシン 42)、

[1 - (3,4-ジクロロベンジル) - 1H-インドール - 3-イル]メタノール (オンクラシン 49)、

10

20

30

40

50

[1 - (2 - フルオロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 5 1) 、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 0) 、

(1 - [3 - (トリフルオロメチル) ベンジル] - 1 H - インドール - 3 - イル) メタノール (オンクラシン 6 3) 、

1 - [(3 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 9) 、

1 - [(4 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 1) 、

1 - [(3 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 2) 、または

1 - [(4 - プロモフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 3) である、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 1 6】

変異体 R a s タンパク質が変異体 K - R a s タンパク質である、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 1 7】

K - R a s がアミノ酸のグリシン 1 2、グリシン 1 3、グルタミン 6 1、またはそれらの組み合わせにおいて変異している、請求項 1 6 記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

細胞が癌細胞である、請求項 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】

癌細胞が、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳腺、結腸直腸、食道、胃腸管、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮細胞である、請求項 1 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

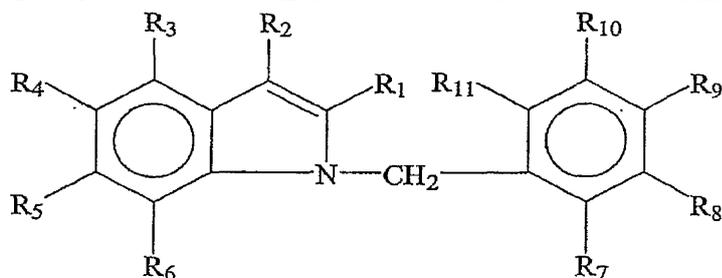
細胞が第二の抗癌治療を施される、請求項 1 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1】

第二の抗癌治療が手術、化学療法、放射線療法、または免疫療法である、請求項 2 0 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 2】

癌細胞において、アポトーシスを誘導する、または癌細胞の成長を阻害するのに十分な量の細胞障害性の化合物を含む、癌を処置するための薬学的組成物であって、細胞障害性化合物、またはその塩が以下の式を有する、薬学的組成物：



式中、

R₁ は、水素であり；

R₂ は、メタノール、アルデヒド、またはエステルであり；

R₃ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₄ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₅ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₆ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

10

20

30

40

50

R₇ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

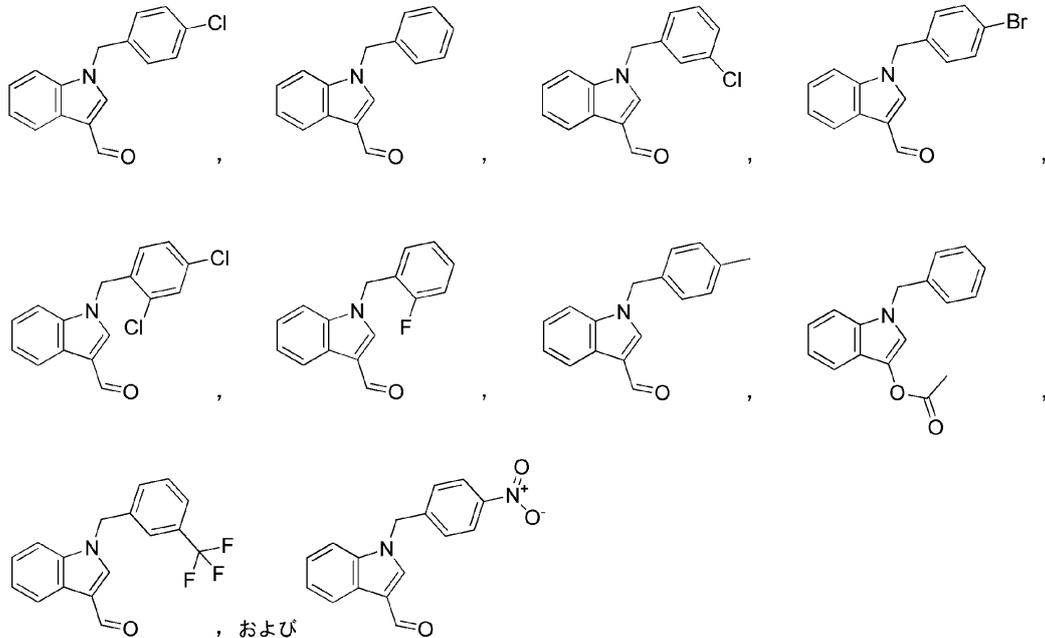
R₈ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₉ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₁₀ は、ハロ、水素、アルキルであり；および

R₁₁ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

ここで、R₂ が、アルデヒド、またはエステルである場合、前記化合物は、以下：

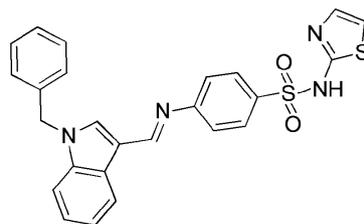


10

20

からなる群より選択され；

または、前記化合物は以下：



30

である。

【請求項 23】

R₃ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₄ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

40

R₅ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₆ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₇ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

50

R₈ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₉ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₁₀ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；および

R₁₁ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルである、

請求項 2 2 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 4】

化合物が、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル] - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン (Oncrasin) 1) 、

1 - (3 - クロロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 2 7) 、

1 - (4 - プロモベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 2 9) 、

スルファニルアミド、N 4 - [(1 - ベンジルインドール - 3 - イル) メチレン] - N 1 - 2 - チアゾリル (オンクラシン 4 2) 、

[1 - (3 , 4 - ジクロロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - イル] メタノール (オンクラシン 4 9) 、

[1 - (2 - フルオロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 5 1) 、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 0) 、

(1 - [3 - (トリフルオロメチル) ベンジル] - 1 H - インドール - 3 - イル) メタノール (オンクラシン 6 3) 、

1 - [(3 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 9) 、

1 - [(4 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 1) 、

1 - [(3 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 2) 、または

1 - [(4 - プロモフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 3) である、請求項 2 2 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 5】

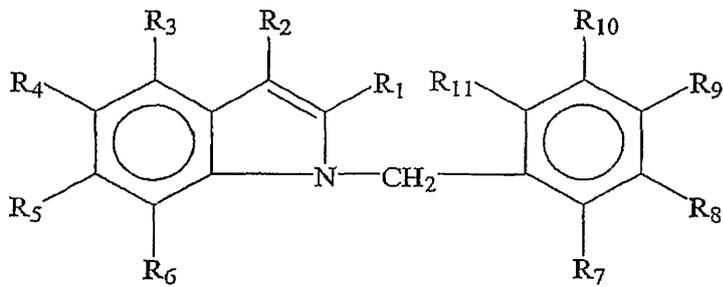
細胞において、細胞経路を調節するのに十分な量の、以下の式を有するオンクラシン化合物またはその塩を含む、細胞における細胞経路を調節するための薬学的組成物であって、経路が細胞における PKC 活性、細胞における NF B 活性化、細胞における RNA 転写、細胞における RNA スプライシング、および細胞における Raf - 1 活性からなる群より選択される、薬学的組成物：

10

20

30

40



式中、

R₁ は、水素であり；

10

R₂ は、メタノール、アルデヒド、またはエステルであり；

R₃ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₄ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₅ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₆ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₇ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₈ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

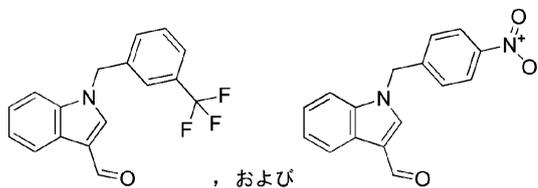
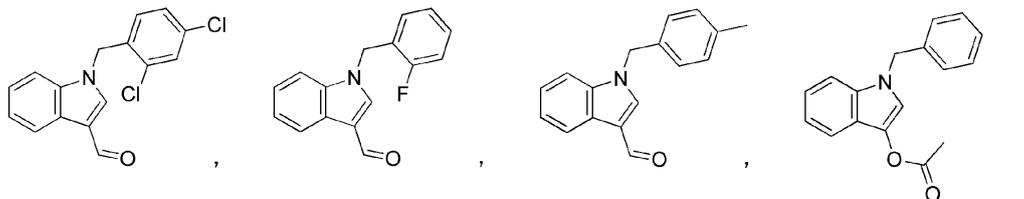
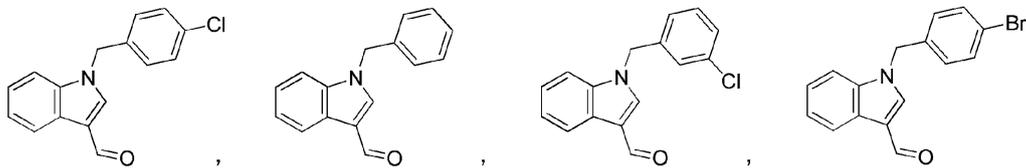
R₉ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₁₀ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；および

R₁₁ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

20

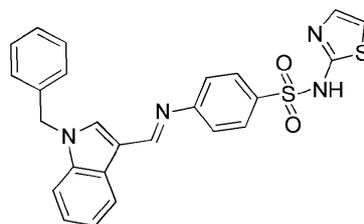
ここで、R₂ が、アルデヒド、またはエステルである場合、前記化合物は、以下：



からなる群より選択され；

40

または、前記化合物は以下：



である。

【請求項 26】

50

R₃ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₄ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₅ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₆ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₇ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₈ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₉ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₁₀ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；および

R₁₁ は、クロロ、プロモ、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、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルである、

請求項 25 記載の薬学的組成物。

【請求項 27】

化合物が、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル] - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン (Oncrasin) 1) 、

1 - (3 - クロロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 27) 、

1 - (4 - プロモベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 29) 、

スルファニルアミド、N4 - [(1 - ベンジルインドール - 3 - イル) メチレン] - N1 - 2 - チアゾリル (オンクラシン 42) 、

[1 - (3 , 4 - ジクロロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - イル] メタノール (オンクラシン 49) 、

[1 - (2 - フルオロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 51) 、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 60) 、

(1 - [3 - (トリフルオロメチル) ベンジル] - 1 H - インドール - 3 - イル) メタノール (オンクラシン 63) 、

1 - [(3 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 69) 、

1 - [(4 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 71) 、

10

20

30

40

50

1 - [(3 - クロロフェニル)メチル - 1H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン72)、または

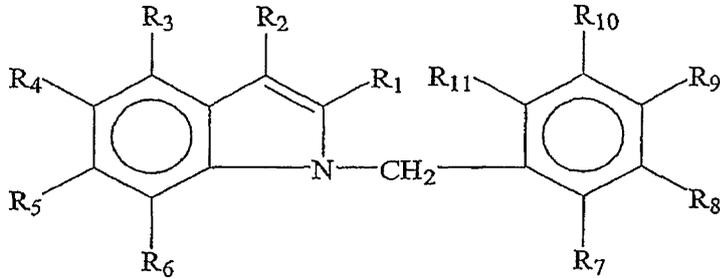
1 - [(4 - ブロモフェニル)メチル - 1H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン73)である、請求項25記載の薬学的組成物。

【請求項28】

PKC活性がPKC 活性である、請求項25記載の薬学的組成物。

【請求項29】

癌細胞の成長を阻害するのに十分な量の、以下の式を有する化合物、またはその薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される担体を含む、癌細胞の成長を阻害するための薬学的組成物：



式中、

R₁ は、水素であり；

R₂ は、メタノール、アルデヒド、またはエステルであり；

R₃ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₄ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₅ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₆ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

R₇ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

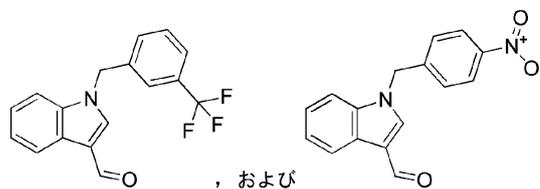
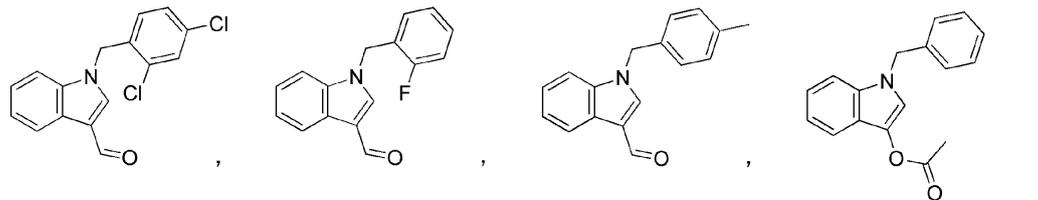
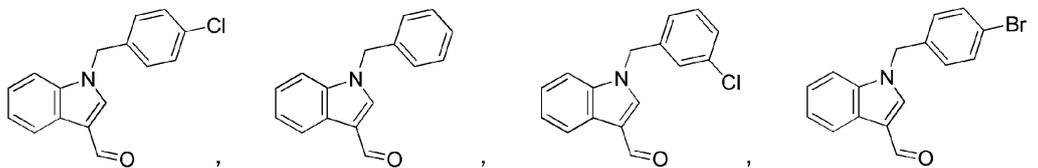
R₈ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₉ は、ハロ、水素、アルキル、ニトロ、またはトリフルオロメチルであり；

R₁₀ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；および

R₁₁ は、ハロ、水素、またはアルキルであり；

ここで、R₂ が、アルデヒド、またはエステルである場合、前記化合物は、以下：



からなる群より選択され；

10

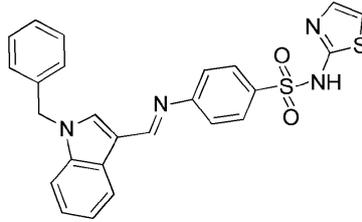
20

30

40

50

または、前記化合物は以下：



である。

【請求項 30】

R₃ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₄ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₅ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₆ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₇ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₈ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₉ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；

R₁₀ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルであり；および

R₁₁ は、クロロ、ブロモ、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはイソペンチルである、

請求項 29 記載の薬学的組成物。

【請求項 31】

化合物が、

1 - [(4-クロロフェニル)メチル] - 1H-インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン (Oncrasin) 1)、

1 - (3-クロロベンジル) - 1H-インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 27)、

1 - (4-ブロモベンジル) - 1H-インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 29)、

スルファニルアミド、N4 - [(1-ベンジルインドール - 3 - イル)メチレン] - N1 - 2 - チアゾリル (オンクラシン 42)、

[1 - (3,4-ジクロロベンジル) - 1H-インドール - 3 - イル]メタノール (オンクラシン 49)、

10

20

30

40

50

[1 - (2 - フルオロベンジル) - 1 H - インドール - 3 - カルボアルデヒド (オンクラシン 5 1) 、

1 - [(4 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 0) 、

(1 - [3 - (トリフルオロメチル) ベンジル] - 1 H - インドール - 3 - イル) メタノール (オンクラシン 6 3) 、

1 - [(3 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 6 9) 、

1 - [(4 - ニトロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 1) 、

1 - [(3 - クロロフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 2) 、 または

1 - [(4 - プロモフェニル) メチル - 1 H - インドール - 3 - メタノール (オンクラシン 7 3)] である、請求項 2 9 記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

I. 発明の分野

本発明は一般的に、癌の処置に関し、より具体的には、癌細胞、特にRas変異体および腫瘍形成性癌細胞の細胞死を誘導する、および/または細胞成長を抑制する低分子に関する。

【背景技術】

【0002】

II. 背景

3つの腫瘍形成性ras遺伝子、H-ras、K-ras、およびN-rasの活性化に至る変異は、90%の膵臓腫瘍、50%の結腸直腸腫瘍、および50%の肺腺癌、甲状腺腫瘍の50%、ならびに30%の骨髄性白血病を含む様々な腫瘍タイプにおいて頻繁に見いだされたが、これらの変異は、正常細胞には存在しない。3つのras遺伝子の中で、K-ras変異は、膵臓(70~90%)、結腸(50%)および肺(50%)の腺癌を含む腫瘍において最も頻繁に見いだされる。自然発生組み換えによって活性化されうるK-rasの対立遺伝子を保有するマウス系統は、広範囲の腫瘍タイプ、主に初期発生肺癌に対して高い素因を有する。HRAS(V12)またはKRAS(V12)変異体遺伝子の付加は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の触媒サブユニットおよびSV40初期ゲノム領域によって不死化されたヒト卵巣表面上皮細胞に、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成させるのに十分となりうる。その上、ドキシサイクリン誘導型腫瘍形成性H-rasまたはK-rasを除去すると、腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導して、トランスジェニックマウスの腫瘍の退縮を引き起こしうる。したがって、ras遺伝子の変異は、腫瘍形成および悪性表現型の維持において重要な役割を果たし、ras遺伝子のこれらの変異は、抗癌治療の重要な標的として役立つ。その上、活性なras機能は、レオウイルス、B型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、コクサッキーウイルス、およびいくつかの腺ウイルスのようないくつかのウイルスの複製にとって必要であることから、ras機能を抑制する物質は抗ウイルス治療薬として用いられる可能性がある。

【0003】

rasタンパク質は、それらが多様な膜受容体と相互作用して、細胞成長、増殖、分化および死亡を支配する多様なシグナル伝達経路のシグナル伝達を調節するためには、形質膜の内部小葉に移動しなければならないことから、形質膜へのrasの移動にとって必要な翻訳後修飾を妨害する物質が、ras機能の抑制に関して集中的に研究されている。たとえば、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤(FTI)は、前臨床および臨床癌治療において集中的に研究されている。しかし、このアプローチは、形質膜へのH-rasの移動を妨害するためには有効である可能性があるが、K-rasおよびN-rasでは有効ではなく、その理由はFTIの存在下では、N-およびK-Rasタンパク質は、ゲラニルゲラニル化されて、膜に移動す

10

20

30

40

50

るためである。いくつかのフェーズIIおよびフェーズIII試験からの臨床試験によっても、FTIが肺癌、膵臓癌、結腸直腸癌、膀胱癌、および前立腺癌において有意な単剤活性を示すことができないことが示された。このように、Ras変異体細胞の細胞死を特異的に誘導するまたは細胞増殖を抑制する新規化合物は、抗癌治療にとって望ましい。

【0004】

癌治療における主要な難題は、悪性細胞または悪性組織において高度に特異的である治療物質を同定することである。悪性細胞は、正常細胞と同じ代謝経路を有すること、および悪性細胞は、それらが多数の変異を含むにもかかわらず、「自己細胞」として採用されることから、今日用いられる全ての抗癌剤は、正常および癌様細胞によって共有される細胞標的に影響を及ぼす。その結果、従来の化学療法および放射線療法を用いることは、通常、低い治療指数によって限定される。実際に、今日用いられるほとんどの抗癌剤は、インビトロで急速に分裂する癌細胞を殺す能力があるために発見されており、このように、骨髓造血前駆細胞および消化管粘膜上皮細胞のような、急速に分裂する正常細胞に対しても毒性である (Kaelin, 2005 (非特許文献1))。それにもかかわらず、癌細胞における遺伝的および後成的変化のために、癌細胞を殺すが正常細胞を殺さない化合物に関する合成致死スクリーニングによって、腫瘍選択的細胞障害性物質を同定することが可能である。

10

【0005】

【非特許文献1】Kaelin, 2005

【発明の開示】

【0006】

20

発明の概要

本発明の態様は、癌細胞、特に腫瘍形成性のK-Rasおよび/または異型タンパク質キナーゼCを有する癌細胞に対して合成致死効果を有する化合物群(オンクラシン(Oncrasin)、腫瘍形成性Ras阻害化合物)に向けられる。オンクラシン化合物は、K-Ras変異を有する多様な肺、結腸、および膵臓癌細胞を、低いマイクロモルまたはナノモル濃度で有効に殺すことができるが、正常レベルの野生型K-Rasを有する正常細胞は殺さなかった。細胞障害性効果はアポトーシスの誘導に相関した。オンクラシン化合物の処置によって、異型タンパク質キナーゼC (PKCiまたはPKC)の異常な細胞内分布、RNAスプレオソームの凝集、またはRNAプロセシングの機能異常に至った。siRNAによるK-RasまたはPKC のノックダウンは、癌細胞におけるオンクラシン誘導性アポトーシスを減損させ、オンクラシン誘導性アポトーシスがK-Rasおよび/またはPKC の活性を必要とすることを示唆している。オンクラシン化合物はまた、Raf-1発現およびTNF 誘導性NF B活性化を抑制することができる。オンクラシン化合物のインビボ投与は、検出可能な毒性なく、ヌードマウスにおけるヒト異種移植腫瘍の成長を抑制して、腫瘍を有する動物の生存を延長した。試験した100を超える類似体の中で、約30のオンクラシン化合物が多様な癌細胞株における細胞障害性の誘導において有効である。この毒性は、合成致死またはRasタンパク質もしくはRas関連経路の誘導であると企図される。合成致死は、変異Rasタンパク質の存在に依存する必要はなく、野生型または変種Rasを有する細胞、すなわち病的な結末を有しない、このように「変異体」であると見なされない細胞において有効であってもよい。このように、オンクラシン化合物は、癌、炎症、および感染疾患の処置に関する有望な可能性がある物質となりうるであろう。

30

40

【0007】

前述を考慮して、ras変異体癌細胞を特異的に殺すことができる化合物を探索するために、本発明の方法の態様は、腫瘍細胞を選択的に殺すことができる化合物に関する化学ライブラリ(たとえば、ChemBridge Corporationライブラリ)をスクリーニングするために、不死化ヒト卵巣表面上皮細胞(T29と呼ばれる)および変異体H-ras(T29H)または変異体K-ras(R29K)のいずれかによって形質転換したその腫瘍形成性誘導細胞を用いることができる。T29K、T29H、またはその双方を選択的に殺すことができるが、親T29細胞を殺さないいくつかの化合物を同定することができる。T29Kに対して高度に特異的である1つの化合物(1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド、またはC

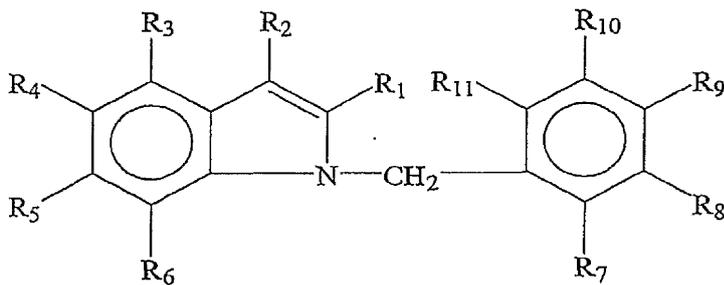
50

PMIC、すなわち腫瘍形成性Ras阻害化合物1であるオンクラシン-1)も同様に、K-ras変異を有するいくつかの肺癌細胞株に関して非常に有効である。この化合物は、33 μ M(調べた最高濃度)でT29、T29H、およびH322(肺癌細胞、ras野生型)に対して毒性ではないが、K-ras変異体T29KまたはH460(肺癌細胞)をそれぞれ、10 μ Mおよび1 μ Mで有効に殺すことができる。オンクラシン-1はまた、ヨウ化プロピジウム(PI)またはアネキシンV染色細胞の劇的な増加、カスパーゼ-3の切断、およびカスパーゼ-8の切断によって証明されるように、ras変異体細胞においてアポトーシスを誘導する。オンクラシン-1は、腫瘍細胞のrar-媒介増殖および生存において枢要な役割を果たすセリン/トレオニンキナーゼであるraf-1を劇的に低減させる。さらに、オンクラシン-1の類似体のいくつかは、より強力なKras-選択的細胞障害性効果を誘導することができることが決定された。併せて、これら

10

【0008】

本発明の態様には、毒性のリスクが低減されて治療的となりうる化合物および方法が含まれる。典型的に化合物は式Iによって表される一般式または構造を有するであろう。



式I

20

【0009】

特定の態様において、基R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、および/またはR₁₁はそれぞれ独立して、-H、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ハロ、プロモ、クロロ、ニトロ、メルカプト、またはC₁~C₁₅-アルキル、C₂~C₁₅-アルケニル、C₂~C₁₅-アルキニル、C₆~C₁₅-アリール、C₇~C₁₅-アラールキル、C₁~C₁₅-ヘテロアリール、C₂~C₁₅-ヘテロアラールキル、C₁~C₁₅-アシル、C₁~C₁₅-アルコキシ、C₂~C₁₅-アルケニルオキシ、C₂~C₁₅-アルキニルオキシ、C₆~C₁₅-アリールオキシ、C₇~C₁₅-アラールコキシ、C₁~C₁₅-ヘテロアリールオキシ、C₂~C₁₅-ヘテロアラールキルオキシ、C₁~C₁₅-アシルオキシ、C₁~C₁₅-アルキルアミノ、C₂~C₁₅-アルケニルアミノ、C₂~C₁₅-アルキニルアミノ、C₆~C₁₅-アリールアミノ、C₇~C₁₅-アラールキルアミノ、C₁~C₁₅-ヘテロアリールアミノ、C₂~C₁₅-ヘテロアラールキルアミノ、C₂~C₁₅-アミド、C₁~C₁₅-アルキルチオ、C₆~C₁₅-アリールチオ、C₇~C₁₅-アラールキルチオ、C₁~C₁₅-ヘテロアリールチオ、C₂~C₁₅-ヘテロアラールキルチオ、C₁~C₁₅-アシルチオ、もしくはC₀~C₁₅-シリルの置換型もしくは非置換型である。

30

【0010】

特定の態様において、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、および/またはR₁₁は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、ヘテロアラールキル、アシル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、アラールコキシ、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアラールキルオキシ、アシルオキシ、アルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、アラールキルアミノ、ヘテロアリールアミノ、ヘテロアラールキルアミノ、またはアミドの置換型または非置換型である。

40

【0011】

特定の局面において、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、および/またはR₁₁はそれぞれ独立して、

$-H$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_2)_2$,
 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-C(CH_3)_3$, $-CH_2C(CH_3)_3$, $-C_6H_5$,
 $-C_6H_4CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH(CH_2)_2$,
 $-C_6H_3(CH_3)_2$, $-C_6H_3(CH_3)CH_2CH_3$, F , Cl , Br , I , $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2CH_2CH_3$,
 $-OCH(CH_3)_2$, $-OCH(CH_2)_2$, $-OCH_2CF_3$, $-OCOCH_3$, $-OC_6H_5$, $-NH_2$, $-NHCH_3$,
 $-NHCH_2CH_3$, $-NHCH_2CH_2CH_3$, $-NHCH(CH_3)_2$, $-NHCH(CH_2)_2$, $-N(CH_3)_2$,
 $-N(CH_3)CH_2CH_3$, $-N(CH_2CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-NHCO_2C(CH_3)_3$, $-CH_2F$, $-CH_2Cl$,
 $-CH_2Br$, $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2OCH_2CH_3$, $-CH_2OCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2OCH(CH_3)_2$,
 $-CH_2OCH(CH_2)_2$, $-CH_2OCH_2CF_3$, $-CH_2OCOCH_3$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$,
 $-CH_2NHCH_2CH_3$, $-CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH(CH_3)_2$,
 $-CH_2NHCH(CH_2)_2$, $-CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2F$, $-CH_2CH_2Cl$, $-CH_2CH_2Br$, $-CH_2CH_2I$,
 $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2OCOCH_3$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_3$,
 $-CH_2CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH(CH_3)_2$,
 $-CH_2CH_2NHCH(CH_2)_2$, $-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCO_2C(CH_3)_3$, $-CH_2CH=CH_2$,
 $-CH_2CH=CHCH_3$, $-CH_2CH=CHCH_2CH_3$, $-CH_2CH=CHCH_2CH_2CH_3$,
 $-CH_2CH=CHCH(CH_3)_2$, $-CH_2CH=CHCH(CH_2)_2$, $-CF_3$, $-CN$, $-CH=CH_2$, $-CH=CHCH_3$,
 $-COH$, $-COCH_3$, $-COCH_2CH_3$, $-COCH_2CH_2CH_3$, $-COCH(CH_3)_2$, $-COCH(CH_2)_2$,
 $-COCH_2CF_3$, $-COC_6H_5$, $-COC_6H_4CH_3$, $-COC_6H_4CH_2CH_3$, $-COC_6H_4CH_2CH_2CH_3$,
 $-COC_6H_4CH(CH_3)_2$, $-COC_6H_4CH(CH_2)_2$, $-COC_6H_3(CH_3)_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$,
 $-CO_2CH_2CH_3$, $-CO_2CH_2CH_2CH_3$, $-CO_2CH(CH_3)_2$, $-CO_2CH(CH_2)_2$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$,
 $-CONHCH_2CH_3$, $-CONHCH_2CH_2CH_3$, $-CONHCH(CH_3)_2$, $-CONHCH(CH_2)_2$,
 $-CON(CH_3)_2$, $-CON(CH_2CH_3)CH_3$, $-CON(CH_2CH_3)_2$, $-CONHCH_2CF_3$, $-C_6H_4CH=CH_2$,
 $-C_6H_4CH=CHCH_3$, $-C_6H_4F$, $-C_6H_4Cl$, $-C_6H_4Br$, $-C_6H_4I$, $-C_6H_4OH$, $-C_6H_4OCH_3$,
 $-C_6H_4OCH_2CH_3$, $-C_6H_4OCOCH_3$, $-C_6H_4OC_6H_5$, $-C_6H_4NH_2$, $-C_6H_4NHCH_3$,
 $-C_6H_4NHCH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2Br$, $-C_6H_4CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2OCOCH_3$,
 $-C_6H_4CH_2NH_2$, $-C_6H_4N(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH_2CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2CH_2OH$,
 $-C_6H_4CH_2CH_2OCOCH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2NH_2$, $-C_6H_4CH_2CH=CH_2$, $-C_6H_4CF_3$, $-C_6H_4CN$,
 $-C_6H_4C\equiv CH$, $-C_6H_4C\equiv CCH_3$, $-C_6H_4C\equiv CSi(CH_3)_3$, $-C_6H_4COH$, $-C_6H_4COCH_3$,
 $-C_6H_4COCH_2CH_3$, $-C_6H_4COCH_2CF_3$, $-C_6H_4COC_6H_5$, $-C_6H_4CO_2H$, $-C_6H_4CO_2CH_3$,
 $-C_6H_4CONH_2$, $-C_6H_4CONHCH_3$, $-C_6H_4CON(CH_3)_2$, $-SH$, $-SCH_3$, $-SC_6H_5$, $-SCH_2C_6H_5$, または
 $-SCOCH_3$

である。

【 0 0 1 2 】

特定の局面において、 R_1 は、ハロ、クロロ、プロモ、水素、アルキル、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、 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペン
 チル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメチル、カルボキシエチル、カルボキシプロ
 ピル、カルボキシブチル、カルボニル、アルデヒド、エステル、またはケトン基であり；
 R_2 は、アルキル、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、
 sec -ブチル、 $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメチル、カ
 ルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、アルコール、メタノール、エ
 タノール、プロパノール、ブタノール、カロニル(caronyl)、アルデヒド、エステル、
 ケトン、ベンジル、またはアリールであり； R_3 は、ハロ、クロロ、プロモ、水素、アルキ
 ル、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、 sec -ブチル、

10

20

30

40

50

tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル (carboxymethoyl)、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_4 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、ケトン、アリール、ヘテロアリール、フラニル、インドリル、チオフェニル、チアゾリル、イミダゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、ピロリル、ピラジニル、ピリジル、ピリミジル、ピリミジニル、プリニル、シノリニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キノリン、イソオキサゾリル、イソキノリン、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、フェニル、またはピリジルである； R_5 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、アミド、アミン、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_6 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_7 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_8 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_9 は、ハロ、クロロ、ブロモ、水素、アルキル、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、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソペンチル、カルボキシメトイル、カルボキシエチル、カルボキシプロピル、カルボキシブチル、カロニル、アルデヒド、エステル、またはケトンであり； R_{10} は、ハロ、クロロ、

10

20

30

【 0 0 1 3 】

特定の局面において、 R_1 はハロ基であり、特に R_1 はクロロまたはブロモ基である。さらなる局面において、 R_2 は、ヒドロキシ、アルコキシ、アルデヒド、カルボキシ、またはカルボニル基であり、特に R_2 はアルデヒドである。なおさらなる局面において、 R_3 はクロロ基、特に R_3 はブロモ基である。なおさらなる局面において、 R_3 はハロ基である。特定の局面において、 R_4 は、ハロ、メチルエステル、またはメチルキノリンエステル基である。さらなる局面において、 R_5 は、メチルまたはアミド基である。なおさらなる局面において、 R_6 はアルキル基である。なおさらなる局面において、 R_7 は、クロロまたはブロモ基である。特定の局面において、 R_8 は、クロロまたはブロモ基である。さらなる局面において、 R_9 はクロロ基である。なおさらなる局面において、 R_{10} はクロロまたはブロモ基である。なおさらなる局面において、 R_{11} は、クロロ基である。

40

【 0 0 1 4 】

50

式または構造における文字「n」は、0、1、2、3、4、5、または6となりうる。

【0015】

いくつかの態様において、化合物の薬学的に許容される塩またはプロドラッグが提供される。本発明はまた、式または構造によって定義される化合物の光学異性体を提供する。特定の態様において、式または構造によって定義される化合物の光学異性体は他の光学異性体を実質的に含まない。他の態様において、2つまたはそれ以上の光学異性体が同じ組成物に存在する。これらの態様の一定において、2つの光学異性体はほぼ等量で存在する。いくつかの態様において、本発明は、化合物のエナンチオマー対のラセミ混合物を提供する。

【0016】

特定の態様において、化合物は、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド(オンクラシン1)、1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド(オンクラシン27)、1-(4-プロモベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド(オンクラシン29)、スルファニリアミド、N4-[(1-ベンジルインドール-3-イル)メチレン]-N1-2-チアゾリル(オンクラシン42)、[1-(3,4-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]メタノール(オンクラシン49)、[1-(2-フルオロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド(オンクラシン51)、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-メタノール(オンクラシン60)、(1-[3-(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-イル)メタノール(オンクラシン63)、1-(3-ニトロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド(オンクラシン68)、1-[(3-ニトロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-メタノール(オンクラシン69)、1-[(4-ニトロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-メタノール(オンクラシン71)、1-[(3-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-メタノール(オンクラシン72)、および/または1-[(4-プロモフェニル)メチル]-1H-インドール-3-メタノール(オンクラシン73)である。

【0017】

本発明のいくつかの方法において、癌細胞は腫瘍細胞である。さらに、インビトロ、インビボ、またはエクスピボで、細胞に本発明の組成物を投与してもよい。このように、癌細胞は患者に存在してもよい。患者は固形腫瘍を有してもよい。そのような場合、態様はさらに、腫瘍の全てまたは一部を切除することによるように、患者に手術を行うことを伴ってもよい。組成物は、手術の前、後、または同時に患者に投与してもよい。さらなる態様において、患者にはまた、直接、内視鏡によって、気管内、腫瘍内、静脈内、病変内、筋肉内、腹腔内、領域内、経皮、局所、動脈内、嚢内、または皮下に投与してもよい。組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20回またはそれ以上投与してもよく、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間毎、1、2、3、4、5、6、7日毎、1、2、3、4、5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月毎に投与してもよい。

【0018】

癌を処置する方法にはさらに、化学療法または放射線療法を患者に施す段階が含まれてもよく、それらは複数回施してもよい。化学療法には、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イフォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ビスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド(VP16)、タモキシフェン、タキソテール、タキソール、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メソトレキセート、ゲンシタピン、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、またはその任意の類似体もしくは誘導体変種が含まれるがこれらに限定されるわけではない。放射線治療には、X-線照射、UV-照射、 α -照射、電子線照射、またはマイクロ波が含まれるがこれらに限定されるわけではない。その上、細胞または患者に、本発明の方法の一部として、タキサンが含まれるがこれらに限定されるわけではない微小管安定化剤を投与してもよい。化合物

10

20

30

40

50

および/またはその誘導体または類似体のいかなるものも、これらの併用療法と共に用いることができると具体的に企図される。

【0019】

いくつかの態様において、そのような組成物を投与される癌細胞は、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳腺、結腸直腸、食道、胃腸管、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮細胞であってもよい。

【0020】

特定の局面において、Rasタンパク質は、変異体Rasタンパク質であり、特に変異体K-Rasタンパク質である。K-Rasは、タンパク質における任意のアミノ酸で変異を有することができ、特にアミノ酸のグリシン12、グリシン13、グルタミン61、またはそれらの組み合わせにおいて変異を有しうる。

10

【0021】

本発明によって企図される他の方法には、細胞障害性化合物またはその塩、代謝物、もしくはプロドラッグである、癌細胞に対して細胞障害性である化合物を、癌細胞のアポトーシスを誘導するためにまたは成長を阻害するのに十分な量で投与する段階を含む、癌を処置する方法が含まれる。ウイルスに感染したまたはウイルスに感染するリスクを有する対象に、本明細書に記述の化合物から選択される抗ウイルス化合物を、対象におけるウイルスの複製を低減させる、またはウイルスの増殖を阻害するのに十分な量で投与する段階を含む、ウイルス感染症を処置する方法。

【0022】

本明細書において用いられるように、「 IC_{50} 」という用語は、得られる最大反応の50%が起こる阻害用量を指す。

20

【0023】

本発明の態様にはまた、細胞におけるPKC活性、たとえばPKC および/またはPKC 活性；細胞におけるNF B活性化；細胞におけるRNA転写；細胞におけるRNAスプライシング；細胞におけるタンパク質代謝；細胞におけるタンパク質合成；細胞におけるタンパク質分解；細胞におけるRaf-1活性等が含まれるがこれらに限定されるわけではない様々な細胞経路を調節する方法が含まれる。

【0024】

同様に、癌細胞成長もしくはウイルス複製を阻害するため、または細胞における細胞経路を調節するのに十分な量の、本明細書に記述され、式を有する1つまたは複数の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくはエステルと、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物も企図される。

30

【0025】

本出願を通して、本発明の他の態様が考察される。本発明の1つの局面に関して考察されるいかなる態様も、本発明の他の局面およびその逆に当てはまる。実施例の章における態様は、本発明の全ての局面に応用可能である本発明の態様であると理解される。

【0026】

特許請求の範囲および/または明細書において用いる場合、「阻害する」、「低減させる」、もしくは「予防」、またはこれらの用語の任意の変化形には、所望の結果を達成するために任意の測定可能な減少または完全な阻害が含まれる。

40

【0027】

特許請求の範囲および/または明細書において「含む」という用語に結びつけて用いられる「1つの(a)」または「1つの(an)」という用語の使用は、「1」を意味する可能性があるが、同様に「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つより多い」という意味と一致する。

【0028】

本明細書において考察されるいかなる態様も、本発明の任意の方法または組成物に関して実行されうると企図され、およびその逆も同じである。特定の癌、ウイルス感染症、または障害に関連して考察されるいかなる態様も、異なる癌、ウイルス感染症、または障害

50

に関連して適用または実行されうる。さらに、本発明の組成物およびキットは、本発明の方法を達成するために用いることができる。

【0029】

本明細書を通して、「約」という用語は、値を決定するために使用される装置または方法に関する誤差の標準偏差が値に含まれることを示すために用いられる。

【0030】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替えのみを指すこと、または代替えが相互に排他的であることを明白に示していない限り、「および/または」を意味するために用いられるが、本開示は代替えのみおよび「および/または」を指す定義を支持する。

10

【0031】

本明細書および請求項において用いられるように、「含む (comprising)」という用語 (ならびに「含む (comprise)」および「含む (comprises)」のような任意の型の含む)、「有する (having)」 (ならびに「有する (have)」および「有する (has)」) のような任意の型の有する)、「含まれる (including)」 (ならびに「含む (includes)」) および「含む (include)」のような任意の型の含まれる) 、または「含有する (containing)」 (ならびに「含有する (contains)」および「含有する (contain)」) のような任意の型の含有する) は、包括的であるかまたは制限なしであり、さらなる引用されない要素または方法の段階を除外しない。

【0032】

本発明の他の目的、特色、および長所は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、この詳細な説明から、本発明の趣旨および範囲に含まれる様々な変更および改変が当業者に明らかとなるであろうことから、詳細な記述および特定の実施例は、本発明の特定の態様を示しているが、説明のために限って示されると理解すべきである。

20

【0033】

発明の詳細な説明

本発明は、本発明の態様が示される添付の図面を参照して、より詳細に記述されるであろう。しかし、本発明は多くの異なる型において具体化されてもよく、本明細書において述べた態様に限定されると解釈してはならない。むしろ、これらの態様は、本開示が十分かつ完全であるように、および本発明の範囲を当業者に十分に伝えるように提供される。類似の数值は全体を通して類似の要素を指す。

30

【0034】

I. RAS関連状態および経路

A. 癌

腫瘍形成性ras遺伝子、H-ras、K-ras、およびN-rasはしばしば、多様な腫瘍タイプにおいて見いだされる。K-ras遺伝子は、2つのスプライシングイソ型、すなわち大きいK-Ras 4Bおよび小さいK-Ras 4Aをコードする。K-Ras 4B、H-Ras、およびN-rasは至るところに発現されるが、K-Ras 4Aは主に腎臓、肝臓、および消化管組織において発現される (Pells et al, 1997 ; Fiorucci and Hall, 1988)。低分子グアニンヌクレオチド結合タンパク質のサブファミリーとして、Rasタンパク質は、活性なGTP結合型と非活性のGDP-結合型のあいだを循環する (Bar-Sagi and Hall, 2000 ; Colicelli, 2004)。RasとGTPとの結合は、GDP放出の触媒を通してグアニンヌクレオチド交換因子によって促進され、これはRasが標的タンパク質と相互作用するために必要である (Rossman et al., 2005)。GTPアーゼ活性化タンパク質によって増強される内因性のGTPアーゼ活性 (Bernards and Settleman, 2004) は、GTPをGDPに変換して、それによってGDP結合型の不活性なRasに至る。GTPアーゼ活性を減損させる、またはGDP結合能を減少させるRas変異によって、Rasは構成的に活性なGTP結合状態となる。Rasタンパク質はまた、他のメカニズムによっても活性化されうる。Ras変異の非存在下では、Rasタンパク質の活性の増加は、遺伝子増幅 (Galinana et al, 1995 ; Hoa et al, 2002 ; Filmus and Buick, 1985)、過剰発現 (Algarra et al, 1998 ; Coleman, 1994)、およびHer2のようなチロシンキナーゼ増殖因子受容体の上流のシグ

40

50

ナルの増加 (Ehrhardt et al., 2004; Rowley and Van Ness, 2002) により、ヒト癌において頻繁に検出される。

【 0 0 3 5 】

サイトゾルにおいて合成されるRasタンパク質は、形質膜の内部小葉に移動して、そこでそれらは多様な膜受容体と相互作用して、細胞成長、増殖、分化、および死亡を支配する多様なシグナル伝達を実行する。カルボキシ末端CAAXモチーフのシステイン残基でのファルネシル化、AAXペプチドの除去、およびC-末端でのファルネシル-システインのメチル化 (Hancock, 2003) を含む、翻訳後修飾のいくつかの段階は、形質膜へのRasの移動にとって肝要である。H-RasおよびN-Rasに関して、C-末端近傍でのシステイン残基上でのパルミトイル化も同様に膜へのRasの再局在にとって必要である。K-Rasに関して、C-末端に存在する多価塩基性ドメインは、膜局在化のための第二のシグナルとして役立つ (Cadeallader et al, 1994; Hancock et al, 1990)。Rasのファルネシル化はその生物機能にとって肝要であることから、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) は、前臨床および臨床癌治療において集中的に研究されている (Sebti and Adjei, 2004; Zhu et al, 2003; Baum and Kirschmeier, 2003)。しかし、このアプローチは、H-Rasの形質膜への移動を妨害するために有効である可能性があるが、FTIの存在下では、N-およびK-Rasタンパク質はゲラニルゲラニル化されて、膜へ移動することから、K-RasおよびN-Rasでは有効ではない (James, et al., 1995; Whyte et al., 1997; James et al., 1996)。いくつかのフェーズIIおよびフェーズIII臨床試験によっても、FTIが肺、膵臓、結腸直腸、膀胱、および前立腺癌において有意な単剤活性を有しないことが示された (Sebti and Adjei, 2004; Zhu et al., 2003; Baum and Kirschmeier, 2003)。したがって、腫瘍形成性のRasは抗癌治療にとって理想的な標的となりうるが、腫瘍形成性のRasを標的とする有効な治療物質はまだ臨床的に得られていない。

【 0 0 3 6 】

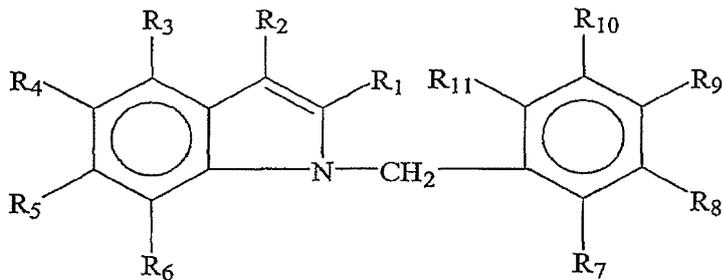
Ras-変異体癌細胞を特異的に殺すことができる化合物に関する現在進行中の探索において、ChemBridge Corporation (San Diego, CA) からの化学ライブラリをスクリーニングするために、本発明者らは、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットおよびSV40初期ゲノム領域 (T29と呼ばれる) によって不死化されたヒト卵巣表面上皮細胞、ならびにM. D. Anderson Cancer Center (Liu et al., 2004) のJinsong Liu博士の研究室において確立された、それぞれの変異体H-Ras (T29Ht1) または変異体K-Ras (T29Kt1) によって形質転換されたその腫瘍形成性誘導体細胞を用いた。細胞に基づく合成致死をスクリーニングに用いた。スクリーニングした化合物10,000個の中で、本発明者らは、オンクラシン-1 (腫瘍形成性Ras阻害化合物1) と呼ばれる化合物 (1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド) を同定し、これは広い範囲の用量においてT29Kt1細胞に対して高度に選択的であった。この化合物は、調べたいかなる用量においてもT29またはT29Ht1に対して毒性ではなかった。その上、オンクラシン-1は、K-ras変異を有するいくつかのヒト肺癌、結腸癌、および膵臓癌細胞に対して有効であった。本発明者らはまた、購入した、または本発明者の研究室において合成された、オンクラシン-1の構造と類似の化学構造を有する100個を超える類似体を試験して、それらの30個より多くがK-Ras変異を有する癌細胞に対して有効であることを見いだした。それらの約20個は、腫瘍形成性のRas-特異的細胞障害性の誘導において、オンクラシン-1より有効であるか、または同等に有効である。分子的研究から、オンクラシン化合物はアポトーシス、RNAスプレオソームの凝集、およびPKC の異常な細胞下分布、哺乳動物RNAポリメラーゼIIの最大のサブユニットの脱リン酸化を誘導することが判明した。siRNAによるK-RasまたはPKC のノックダウンによって、癌細胞におけるオンクラシン誘導性アポトーシスが減損し、オンクラシン誘導性アポトーシスがK-Rasおよび/またはPKC の活性を必要とすることを示唆している。その上、オンクラシン化合物は、Rafタンパク質発現を抑制して、TNF 誘導性NF B活性化を阻害することができる。このように、オンクラシン化合物は、最小の毒性を有する、有用な新しいクラスの腫瘍形成性Ras-選択的抗癌剤となりうるであろう。

【 0 0 3 7 】

T29KまたはT29H細胞を選択的に殺す化合物の効果を調べるために、これらの細胞における用量反応を決定するために、これらの化合物のいくつかをChemBridge Corporationから得た。調べた化合物6個中、1つの化合物(1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド)(オンクラシン1)は、広範囲の用量においてT29Kに関して高度に選択的であったが、他の化合物は限られた選択性または狭い選択的用量幅のいずれかを有した(図1)。このように、そのK-Ras特異的化合物の抗腫瘍効果に対して集中して研究を行った。経時的アッセイにより、オンクラシン-1がまたT29K細胞において時間依存型毒性を引き起こすが、他の化合物は引き起こさないことが示された。化学的に、この化合物は、癌の予防および処置のために試験されている多くの植物性食品の天然に存在する構成成分であるインドール-3-カルビノール(13C)と類似のコア構造を有する。しかし、13Cは

10

【0038】



20

式I

【0039】

オンクラシン-1(式I、式中R₂は、CH=Oであり; R₉はClであり; およびR₁、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₁₀、およびR₁₁は水素である)の抗腫瘍活性をさらに評価するために、この化合物の効果を、ras状態が異なる6個のヒト肺癌細胞株において試験した。結果は、オンクラシン-1が肺癌細胞株H460、H212、およびA549に対して非常に有効であることを示した。これらの3つの細胞株は、Krasにおいてそれぞれ、Q61H、G12C、およびG12S変異を含有する。オンクラシン-1はまた、ras状態が不明であるH226bに対しても有効である。オンクラシン-1は、H322(ras野生型)、H1299(Nrasにおいて変異)、およびA549(K12において変異)に対して有効ではない。この結果は、オンクラシン-1がKras変異を有する卵巣癌細胞に対して有効であるのみならず、Kras変異を有するいくつかの肺癌に対しても有効であることを示唆した。

30

【0040】

オンクラシン-1誘導性抗腫瘍活性が、細胞増殖の抑制または殺細胞によって引き起こされたか否かを調べるために、30 μM(T29またはT29Kに関して)または3 μM(H460に関して)による処置後のT29、T29KおよびH460細胞のアネキシンV/ヨウ化プロピジウム(PI)染色を行った。処置の12~24時間後、H460およびT29K細胞の70%~90%がアネキシンV、PI、または双方のいずれかに対して染色陽性であり、細胞の大部分がオンクラシン-1による処置によって殺されたことを示唆している。対照的に、H460およびT29K細胞の対照試料およびオンクラシン-1によって処置したT29細胞の試料は、アネキシンVおよび/またはPI陽性細胞が10%未満であった。この結果は、オンクラシン-1がT29KおよびH460細胞において殺細胞を有効に誘導することができることを示した。

40

【0041】

H460細胞におけるアポトーシス誘導も同様に分析した。H460細胞を1 μMオンクラシン-1によって6~24時間処置した。DMSOを処置した細胞を対照として用いた。次に、カスパーゼ-3およびカスパーゼ-8の切断を検出するために、細胞溶解物をウェスタンブロットアッセイのために用いた。結果は、オンクラシン-1がカスパーゼ-3およびカスパーゼ-8活性化を有効に誘導できることを示し、このことは、オンクラシン-1がこれらの細胞においてアポトーシスを誘導できることを示している。オンクラシン-1による処置後に、Rasシグナ

50

ル伝達経路に関係するいくつかの分子の発現も同様に評価した。ウェスタンブロット分析により、オンクラシン-1によるH460の処置によって、腫瘍細胞のRAR媒介増殖および生存において重要な役割を果たし、抗癌療法の重要な標的として役立つセリン/トレオニンキナーゼであるRaf-1の劇的な低減が起こることが示された。活性なRaf-1は、ミトコンドリアに移動して、そこでBadまたは他のタンパク質基質との相互作用によって抗アポトーシスシグナル伝達を実行することができる。Raf-1はまた、血管新生の際の内皮細胞生存の重要な調節物質でもある。Raf-1の除去により、細胞は細胞外シグナルによって調節されるキナーゼの正常な調節にもかかわらず、アポトーシスに対して過敏となる。このように、raf-1を抑制することによって抗腫瘍活性を誘導することが可能である。

【 0 0 4 2 】

類似の抗腫瘍効果がオンクラシン-1の類似体によって誘導されるか否かを調べるために、ChemBridge Corporationから4つの類似体を得て、H460、T29、およびT29K細胞におけるその細胞障害性効果を評価した。それらのうち3個はH460において非常に有効であった。それらの2個は、T29K細胞に対して非常に有効であり、他の2個は、T29細胞と比較した場合にT29KおよびT29H細胞に関して何らかの選択性を有するが効力は弱い。この結果は、オンクラシン-1のいくつかの類似体が抗腫瘍物質として機能しうることを示唆した。

【 0 0 4 3 】

低分子グアニンヌクレオチド結合タンパク質のサブファミリーとして、Rasは、活性なGTP-結合型と不活性なGDP-結合型のあいだを循環する。RasのGTPへの結合は、GDP放出の触媒を通してグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって促進され、これはRasと標的タンパク質との相互作用にとって必要である。GTPアーゼ活性化タンパク質 (GAP) によって増強される内因性のGTPアーゼ活性は、GTPをGDPに変換して、それによってGDP結合型の不活性なRasが得られる。GTPアーゼ活性を減損させる、またはGDP結合能を減少させるRas変異によって、rasは構成的に活性なGTP-結合状態となる。興味深いことに、オンクラシン-1は、グアニンと類似のコア構造を有する。オンクラシン-1が変異体rasタンパク質、または他のrasファミリーメンバーとの結合に関してGTPと競合するか否かは、明確でない。

【 0 0 4 4 】

Rasは、膵臓癌、および結腸直腸癌においてしばしば変異していることから、化合物およびその類似体はそれらの癌の処置にとって有用となる可能性がある。オンクラシン-1およびその類似体の抗腫瘍活性は、それらの癌に由来する培養癌細胞において査定されるであろう。それらの化合物のインビボ抗腫瘍活性はまた、ヒト癌異種移植片を有するヌードマウス、またはras遺伝子変異のために腫瘍を発症するトランスジェニックマウスにおいても研究されるであろう。

【 0 0 4 5 】

腫瘍形成性のRas変異は、膵臓癌の90%ならびに肺癌および結腸癌の50%を含む、ヒト癌の約30%において観察された。K-ras変異は、ヒト癌において最も頻繁である。ras機能を阻害することができるファルネシレートトランスフェラーゼ阻害剤 (FTI) が、癌の処置のための臨床試験において現在試験中である。FTIはH-ras変異に関して有効であるが、K-ras変異に関しては有効ではない。FTIに関するほとんどの臨床試験は、単独で用いた場合、おそらくK-ras変異がヒト癌では一般的であって、H-ras変異は一般的でないために失敗した。本明細書において記述される化合物は、K-ras変異体癌を有効に殺し、したがって癌治療に関してFTIより有効であることが証明される可能性がある。いくつかのウイルスは、Ras-活性細胞においてより有効に複製することが報告されている。このように、Ras-特異的細胞障害性化合物はまた、抗ウイルス治療のために用いられる可能性がある。

【 0 0 4 6 】

A. Rasシグナル伝達経路とオンクラシン誘導性アポトーシスの分子メカニズム

アポトーシス誘導の分子メカニズムは細胞死を行うためにいくつかの経路およびタンパク質を利用する。アポトーシスに関係するおよび/またはRasシグナル伝達経路に関係するタンパク質には、Bax、Bik、Bcl2、Bcl-XL、Raf-1、B-Raf、Akt、Mst1、ならびに異型タンパク質キナーゼC (αPKC) およびPKC が含まれるがこれらに限定されるわけではな

10

20

30

40

50

い。BaxおよびBikは前アポトーシスタンパク質であるが、Bcl2およびBclXLは抗アポトーシスタンパク質である。それらの前および抗アポトーシスタンパク質の比は、アポトーシスの誘導または阻害に関する重要な決定因子であると報告されている (Oltvai et al., 1993; Zhang et al., 2000)。Rafタンパク質は、Ras媒介シグナル伝達経路において重要な役割を果たすセリン/トレオニンキナーゼである (Jun et al., 1999; Wellbrock et al., 2004)。ヒトおよび他の脊椎動物において、A-Raf、B-Raf、およびC-Raf (Raf-1) をコードする3つのRAF遺伝子がそれぞれ存在する (Wellbrock et al., 2004; Garnett and marais, 2004)。Rafは、Rasによって活性化され、次にマイトゲン活性化タンパク質キナーゼ (MEK) および細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) シグナル伝達カスケード (Wellbrock et al., 2004) を活性化して、アポトーシスに対する抵抗性に至る。MEK/ERK経路の活性化のほかに、活性なRaf-1はミトコンドリアに移動して、Badまたは他のタンパク質基質との相互作用によって、抗アポトーシスシグナル伝達を実行する (von Gise et al., 2001; Wang et al., 1996)。Raf-1はまた、哺乳動物のsterile-20 kinase (MST2) の活性化を抑制することによってアポトーシスに対抗することができる (O'Neill et al., 2004)。最近、B-RAP遺伝子の様々な活性化変異が、悪性黒色腫 (60~70%)、甲状腺癌 (36~50%)、結腸直腸癌 (5~22%)、および漿液卵巣癌 (30%) ならびに低い頻度で広範囲の他のヒト癌 (Davies et al., 2002; von Gise et al., 2001) を含む様々なヒト癌において同定されており、抗癌治療におけるRafの重要性を強調する。

【 0 0 4 7 】

AKTおよび異型PKCs、PKC α 、およびPKC β はPI3K/PDK1経路によってRasによって活性化される。他のタンパク質キナーゼCメンバーとは異なり、PKC α およびPKC β は、ジアシルグリセロール (DAG)、Ca²⁺、またはホルボルエステルによる調節に対して非感受性であるが、ホスホイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) およびその脂質産物ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP3) (Nakanishi et al., 1993) によって活性化される。aPKCにおける3-ホスホイノシチド依存的タンパク質キナーゼ-1 (PDK1) によるThr410 (Thr403) のリン酸化は、PI3K依存的であり、aPKCsに関する直接のオン/オフスイッチとして役立つ (Le Good, 1998)。PDK1は構成的に活性なキナーゼであるが、その基質へのアクセスはホスホイノシチドによって調節される (Pullen et al., 1998; Stephens et al., 1998)。RasはGTP依存的にホスファチジルイノシトール-3-OHキナーゼ (PI3Ks) の触媒サブユニットと直接相互作用してPI3Kを活性化し (Rodriguez-Viciano et al., 1994; Pacold et al., 2000)、ホスファチジルイノシトール3,4,5-リン酸 (PIP3) (Vivanco and Sawyers, 2002) のような短命な二次伝達物質産物の生成ならびにaPKC (Le Good et al., 1998) およびAkt (Alessi et al., 1997) を含む、多くのPI3K/PDK-1依存的キナーゼの活性化に至る。その上、Rasタンパク質は、インビトロおよびインビボでaPKCと直接相互作用することができ、aPKC活性を調節する (Diaz-Meco et al., 1994; Fedorov et al., 2002)。証拠はまた、aPKCがRasシグナル伝達経路のシグナル伝達を媒介する (Fedorov et al., 2002; Berra et al., 1993) およびRas誘導性腫瘍形成にとって必要な (Murray et al., 2004) 下流のRasエフェクターとして機能することを証明した。

【 0 0 4 8 】

II. オンクラシン化合物

オンクラシンおよびオンクラシン類似体

化学的にオンクラシン-1は、癌の予防および処置のために調べられている多くの植物性食品の天然に存在する成分であるインドール-3-カルビノールと同じコア構造を有する (Brignall, 2001; Kelloff et al., 1996; Chinni et al., 2001)。オンクラシン-1はまた、その双方が癌の処置のために前臨床および臨床的に評価されているスリンダク (Taylor et al., 2000; Sun et al., 2002) およびロニダミン (Ravagnan et al., 1999; Papaldo et al., 2003) と構造類似性を有する。しかし、インドール-3-カルビノール、スリンダク、およびロニダミンは、T29、T29Kt1、T29Ht1、およびH460細胞において、調べたいかなる濃度 (100 μ Mまで; データは示していない) においてもいかなる細胞障害性効果も有せず、それらがインドール-3-カルビノール、スリンダク、およびロニダミンとは異なる

る抗癌スペクトルまたは分子標的を有することを示唆している。オンクラシン化合物はまた、同様にRas遺伝子変異体癌細胞において抗腫瘍活性を誘導するイソプレニルシステインカルボキシルメチルトランスフェラーゼ (Icmt)、2-[5-(3-メチルフェニル)-1-オクチル-1H-インドール-3-イル]アセトアミド (シスメチニル) の低分子阻害剤としてのインドールコア構造を有する (Winter-Vann et al., 2005)。シスメチニルは、野生型マウス胚線維芽細胞 (MEF) においてIcmt依存的成長阻害を誘導するが、Icmt-ノックアウトMEF細胞では成長阻害を誘導せず、ヒト結腸癌細胞の接着依存型成長を遮断すると報告されている (Winter-Vann et al., 2005)。シスメチニルは市販されていないため、本発明者らは、オンクラシン化合物がMEF細胞においてIcmt依存的成長阻害を誘導できるか否かを試験した。結果は、オンクラシン-1が、MEF細胞においてIcmt依存的成長阻害を誘導しないことを示した。野生型MEFおよびIcmt-/-MEF (Bergo et al., 2004) (University of California, San FranciscoのDr. SG Youngにより寄贈) はいずれもオンクラシン-1に対して抵抗性であった。調べた最高濃度 (100 μ M) において、オンクラシン-1のみが、双方の細胞において類似および軽度の成長抑制を誘導し、オンクラシンがシスメチニルとは異なる作用メカニズムを有することを示唆している。

10

【0049】

Chemical Abstract Serviceデータベース検索に基づいて、本発明者らは、オンクラシン-1の100個を超える類似体を得た。これらの化合物は本発明者らによって合成されたか、またはChemBridge Corporation、the National Cancer Institute [NCI] Drug Synthesis and Chemistry Branchから、またはアメリカ、ロシア、およびウクライナの様々な他の企業から得た。T29Kt1およびH460細胞において細胞毒性を誘導するが、T29細胞において誘導しない30を超える化合物が同定された。これらの中で、20を超える化合物がT29Kt1およびH460細胞における殺細胞活性においてオンクラシン-1と類似であるかまたはオンクラシン-1よりよい活性を示した。これらの細胞におけるIC₅₀に基づく簡潔な構造/活性相関 (SAR) 分析から、オンクラシン-1におけるインドールに付着した環構造がその活性に必要であり、環はベンジル環または五員環となりうることが示された。環における様々な置換によって、T29Kt1およびH460細胞におけるIC₅₀が変化する；しかし、そのような変化は定性的よりむしろ定量的である。インドールに付着したアルデヒド基をケトンまたは石炭酸基に変化させると、活性の劇的な低減が起こったが、ヒドロキシル基または塩に変化させると、特異性を失うことなく活性の増加に至った。調べた類似体、ならびにT29、T29 Kt1およびH460細胞におけるそのIC₅₀を表1に記載する。表2は、様々な他の癌細胞におけるいくつかの活性なオンクラシン化合物のIC₅₀を示す。

20

30

【0050】

A. 化合物の合成、精製、および品質の試験

本明細書において言及されるように、調べた化合物の多くは、ChemBridge Corporationから、またはNCI's Drug Synthesis and Chemistry Branchから得た。本発明者らはまた、その研究所において数ダースの類似体、たとえば1-[1-(2-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン、1-[1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン、1-[1-(4-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン、{1-[4-(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-イル}メタノール、1-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド、{1-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-イル}メタノール、1-(4-tert-ブチルベンジル)-1H-インドール-3-カルボン酸、(1-(4-tert-ブチルベンジル)-1H-インドール-3-イル)メタノール、1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-メトキシ-4-クロロフェニル)メチル]、1H-インドール-3-メタノール、1-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)メチル]、メタノール、1-[1-(b-D-グルコピラノシルオキシ)-1H-インドール-3-イル]、1H-インドール-3-メタノール、1-(b-D-リボフラノシルオキシ)、および1H-インドール-3-ピオシチン-ヒドラジド、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-(9Cl)を合成した。典型的に、2つのアプローチを用いて、新規類似体または市販されていない類似体を合成した。1つのアプローチは、インドール-3-メタノールまたはインドール-3-カルボン酸類似体を得るために、市販のインドール-3-カルボキシアリ

40

50

デヒド類似体の LiAlH_4 もしくは NaBH_4 による還元または KMnO_4 による酸化によって行った。第二のアプローチは、図12において示される様々な化合物構築ブロックを用いて新しい化合物を合成することであった。簡単に説明すると、構築ブロックA(インドールを含む) 1.0 mmolを無水DMSOに溶解して、 NaH 1.1 mmolと混合した。室温で1時間攪拌後、構築ブロックB(ハロゲン化ベンジル) 1.2 mmolを加えて、混合物を室温でさらに2~4時間攪拌した。次に、蒸留水(DMSOの3倍容積)を加えた後、混合物をクロロホルムまたはジクロロメタンによって抽出した。有機相を10% NaCl によって洗浄した。無水 Na_2SO_4 を加えることによって水残渣を除去し、次にこれを濾紙を通して濾過することによって除去した。次に、溶液をロータリー真空エバポレーションによって濃縮した。産物を、化合物の極性に基づいて、溶出剤として CH_2Cl_2 :n-ヘキサン(1:1)もしくは CHCl_3 :メタノール(20:1)を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、または様々な物質におけるその溶解度に基づく結晶化によって分離および精製した。次に、有機溶出液を真空エバポレーションによって除去して最終産物を得た。最終産物の純度および分子量は、高速液体クロマトグラフィー-質量分析(HPLC-MS)(本発明者らの施設の薬剤開発センターで実施)によって決定した。化合物の同一性は、核磁気共鳴(NMR)分析によって決定した。合成および精製後のオンクラシン-27のHPLC-MSおよびNMR分析の例を図13に示す。化合物のほとんどは95~99%を上回る純度を有し、その分子量はHPLC-MSによって示されるように予測分子量と一致した。HPLC-MSによって95%またはそれより高い純度が示された化合物のみを培養細胞における試験のために用いた。

10

【 0 0 5 1 】

20

(表1) オンクラシン類似体、ならびにT29、T29K、またはH460細胞における IC_{50}

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K001	75629-57-1	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-(9CI)	>4.5	5.6	6.6
K002	302828-82-6	4H-1, 2, 4-トリアゾール-4-アミン、N[[1-[(2, 4-ジクロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-イル]メチル]	>4.5	>4.5	4.8
K003	302829-20-5	1-(2-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒドN-エチルチオセミカルバゾン	>4.5	>4.5	4.75
K004	337506-29-3	N-[2-(1-ベンジル-2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチル]アセトアミド	<45	<45	<45
K005	525-02-0	[2-(1-ベンジル-5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-イル)エチル]アミン塩酸塩	4.8	4.8	5.2
K006	92407-89-1	[1-(2-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]メタノール	>4.5	5.6	7
K007	677015-20-2	4-[(3-ベンゾイル-1H-インドール-1-イル)メチル]ベンゾニトリル	>4.5	>4.5	>4.5
K008	3377-71-7	1-ベンジル-1H-インドール	>4.5	>4.5	>4.5
K009	5102-18-1	エタノン、1-(5-ヒドロキシ-2-メチル-1-フェニル-1H-インドール-3-イル)-	>4.5	>4.5	>4.5
K010	676537-97-6	(1-ベンジル-1H-インドール-3-イル)(シクロプロピル)メタノン	>4.5	>4.5	>4.5
K011	609823-07-6	メチル5-ヒドロキシ-2-メチル-1-(1-ナフチルメチル)-1H-インドール-3-カルボキシレート	5.5	5.5	5.8
K012	29957-93-5	1H-インドール-3-プロパノール、1-(フェニルメチル)-	>4.5	>4.5	>4.5
K013	2731-06-8	2-(2-メチル-1H-インドール-3-イル)エタンアミン	>4.5	>4.5	>4.5
K014	10511-51-0	1-ベンジルインドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5.3	7.6
K015	487-89-8	1H-インドール-3-カルボアルデヒド(9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K016	56344-53-7	7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-アミン、5, 6-ジメチル-7-(フェニルメチル)-	>4.5	>4.5	>4.5
K017	842975-80-8	7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-アミン、N-[3-(1H-イミダゾール-1-イル)プロピル]-5, 6-ジフェニル-7-	4.8	5	>4.5
K018	4584-39-8	1H-インドール-3-酢酸、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-5-メトキシ-2-メチル-	>4.5	>4.5	>4.5
K019	173458-80-5	7-ベンジル-4-クロロ-5, 6-ジメチル-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボニトリル	>4.5	>4.5	>4.5

10

20

30

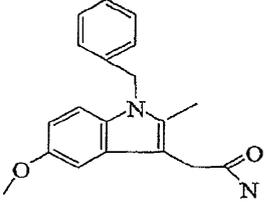
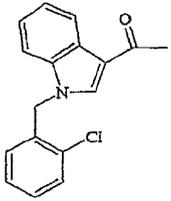
化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K020	833441-48-8		>4.5	>4.5	>4.5
K021	385382-15-0	1-[1-[2-(4-クロロフェニル)エチル]-5-ヒドロキシ-2-メチル-1H-インドール-3-イル]エタノン	>4.5	>4.5	>4.5
K022	342398-67-8	3-アセチル-1-[2-(3,4-ジメトキシフェニル)エチル]-2-メチル-1H-インドール-5-イル-2-フロアート	>4.5	>4.5	>4.5
K023	432008-82-7	メチル1-[4-メトキシフェニル]アセチル]-1H-インドール-3-カルボキシレート	>4.5	>4.5	>4.5
K024	583818-66-0	5-[[1-(3,4-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]メチレン]-2,4-イミダゾリジンジオン	>4.5	>4.5	>4.5
K025	151409-77-7	1-(1-ナフチルメチル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	>4.5	>4.5
K026	331869-66-0	エチル5-ヒドロキシ-1-[2-ヒドロキシ-2-(4-ニトロフェニル)エチル]-2-メチル-1H-ベンゾ[g]インドール-3	>4.5	>4.5	>4.5
K027	90815-01-3	1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	6.43	8.43
K028	90815-00-2	1-(2-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	>4.5	>4.5
K029	174367-70-5	1-(4-ブromoベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5	>4.5
K030	27018-76-4	1-ベンジル-1H-インドール-3-カルボン酸	>4.5	>4.5	>4.5
K031	155883-86-6	ヒドラジンカルボチオアミド、2-[[1-(フェニルメチル)-1H-インドール-3-イル]メチレン]-(9CI)	>4.5	5	>4.5
K032	146-82-7	1H-インドール-3-酢酸、1-[4-(4-クロロフェニル)メチル]-5-メチル-2-フェニル-(9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K033	500726-45-4	1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピラジン、5,6-ジクロロ-(9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K034	93548-92-6	1H-インドール-3-カルボン酸、2-クロロ-1-[(2,4-ジクロロフェニル)メチル]-(9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K035	NSC131904	IUPAC:(6-プロモ-3-メチル-2,3-ジヒドロインドール-1-イル)-フェニル-メタノン	>4.5	>4.5	>4.5
K036	94005-21-7	インドール-3-酢酸、1-ベンジル-5-メトキシ-(6CI, 7CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K037	NSC66574	IUPAC:2-[1-[4-(4-クロロフェニル)メチル]-2-エチル-5-メチル-インドール-3-イル]酢酸	>4.5	>4.5	>4.5
K038	NSC74617	IUPAC:2-[1-[4-(4-クロロフェニル)メチル]-2-エチル-5-メチル-インドール-3-イル]酢酸	>4.5	>4.5	>4.5
K039	NSC66575	IUPAC:2-[1-[4-(4-クロロフェニル)メチル]-5-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-インドール-3-IUPAC:2-[1-[4-(4-クロロフェニル)メチル]-5-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-インドール-3-	>4.5	>4.5	>4.5
K040	NSC77541	IUPAC:2-[1-(4-クロロベンゾイル)-5-メトキシ-2-メチル-インドール-3-イル]酢酸	>4.5	>4.5	>4.5
K041	NSC674196	IUPAC:tert-ブチル-2-アミノ-1-ベンジル-7a-メチル-5-オキソ-インドール-3-カルボキシレート	5.3	5.3	>4.5

10

20

30

40

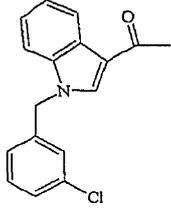
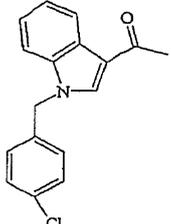
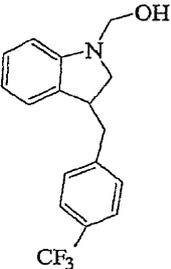
化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K042	28558-66-9 NSC54775	スルファニルアミド、N4-[(1-ベンジルインドール-3-イル)メチレン]-N1-2-チアゾリル-(8CI)	>4.5	6	8
K043		 <p>IUPAC:2-(1-ベンジル-5-メトキシ-2-メチル-インドール-3-イル)アセトアミド</p>	>4.5	>4.5	>4.5
K044		IUPAC:2-クロロ-N-[5-[(4-クロロ-2-メチル-フェニル)カルバモイルメチル]-4-オキソ-1,3-チアゾル-2-イル]ベンズアミド	>4.5	>4.5	>4.5
K045	NSC17383	IUPAC:2-[1-[(2-クロロフェニル)メチル]-2-メチル-5-メチルスルファニル-インドール-3-イル]エタンアミン	>4.5	>4.5	>4.5
K046	25791-28-0	2-インドリノン、1-ベンジル-3-(2-ピリジルメチレン)-(8CI)	5.3	5.3	>4.5
K047	109448-43-3	インドキシル、1-ベンジル、アセテート (6CI)	>4.5	4.5	5
K048	NSC99693	IUPAC:エチル2-(1-ベンジル-3-ヒドロキシ-2-オキソ-インドール-3-イル)アセテート	>4.5	>4.5	>4.5
K049	92407-93-7	[1-(3,4-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]メタノール	>4.5	6.5	7.5
K050	90815-03-5	1-(2,4-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5.8	7
K051	192997-17-4	1-(2-フルオロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	6.5	7
K052	420814-87-5	1-(2-クロロ-6-フルオロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	>4.5	>4.5
K053	93548-80-2	1-(2,6-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	>4.5	>4.5
K054	50264-69-2	1H-インダゾール-3-カルボン酸、1-[(2,4-ジクロロフェニル)メチル]-(9CI) (ロニダミン)	>4.5	>4.5	>4.5
K055	38194-50-2	1H-インデン-3-酢酸、5-フルオロ-2-メチル-1-[[4-(メチルスルフィニル)フェニル]メチレン]	>4.5	>4.5	>4.5
K056	63804-15-9	1H-インデン-3-酢酸、5-フルオロ-2-メチル-1-[[4-(メチルスルフィニル)フェニル]メチレン]	>4.5	>4.5	>4.5
K057	SW1	 <p>ACD:1-[1-(2-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン</p>	>4.5	>4.5	>4.5

10

20

30

40

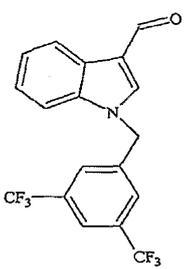
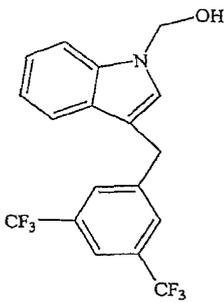
化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K058	SW2	 <p>ACD: 1-[1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン</p>	>4.5	4.5	>4.5
K059	SW3	 <p>ACD: 1-[1-(4-クロロベンジル)-1H-インドール-3-イル]エタノン</p>	>4.5	>4.5	>4.5
K060	92407-91-5	1H-インドール-3-メタノール、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-	>4.5	7.1	7.8
K61	93548-89-1	1H-インドール-3-カルボン酸、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-(9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K62	192997-22-1	1-[3-(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5.25	7.86
K63	R4-OH-3-CF3	ACD: {1-[3-(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-イル}メタノール	>4.5	6.25	7.4
K64	501660-56-6	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[[4-(トリフルオロメチル)フェニル]メチル]-(9CI)	>4.5	>4.5	5.8
K65	SW7	 <p>{1-[4-(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3-イル}メタノール</p>	>4.5	5.9	5.9
K66	151409-79-9	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(4-メチルフェニル)メチル]-	4.5	5.4	7.2
K67	664317-83-3	1H-インドール-3-メタノール、1-[(4-メチルフェニル)メチル]-(9CI)	4.8	6.1	7

10

20

30

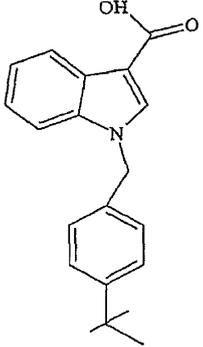
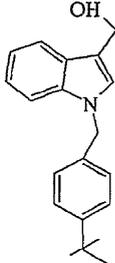
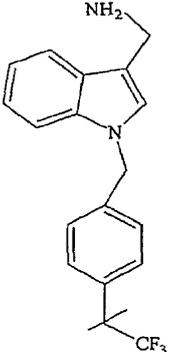
40

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K68	591210-47-8	1-(3-ニトロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	4.5	6.3	7.4
K69	678182-31-5	1H-インドール-3-メタノール、1-[(3-ニトロフェニル)メチル]-	>4.5	6.4	7.4
K70	192997-25-4	1-(4-ニトロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5	6.3
K71	678551-69-4	1H-インドール-3-メタノール、1-[(4-ニトロフェニル)メチル]-	>4.5	6.8	7.1
K27	90815-01-3	1-(3-クロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	4.5	7
K72	92407-90-4	1H-インドール-3-メタノール、1-[(3-クロロフェニル)メチル]- (9CI)	>4.5	5.75	5.9
K29	174367-70-5	1-(4-ブロモベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	6.6	8.5
K73	210426-43-0	1H-インドール-3-メタノール、1-[(4-ブromoフェニル)メチル]- (9CI)	>4.5	6.4	9.5
K50	90815-03-5	1-(2,4-ジクロロベンジル)-1H-インドール-3-カルボアルデヒド	>4.5	5	6.3
K74	92407-92-6	1H-インドール-3-メタノール、1-[(2,4- ジクロロフェニル)メチル]-	>4.5	5.8	7.1
K75	93548-82-4	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3,5- ジクロロフェニル)メチル]- (9CI)	>4.5	>4.5	>4.5
K76	SW23	 <p>1-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3- カルボアルデヒド</p>	5.2	5.4	5.9
K77	SW24	 <p>{1-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジル]-1H-インドール-3- イル}メタノール</p>	5.2	5.1	5.1

10

20

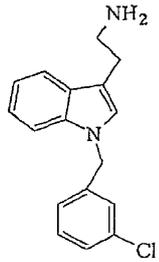
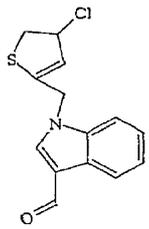
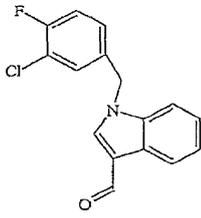
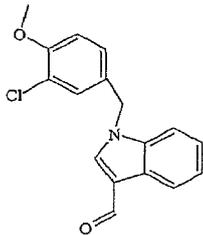
30

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K078	SW25	 <p>1-(4-tert-ブチルベンジル)-1H-インドール-3-カルボン酸</p>			
K079	SW26	 <p>(1-(4-tert-ブチルベンジル)-1H-インドール-3-イル)メタノール</p>			
K080	781589-99-9	1H-インドール-3-エタンアミン、1-[(2-メチルフェニル)メチル]-			
K081	SW28	 <p>1H-インドール-3-エタンアミン、1-[[3-(トリフルオロメチル)フェニル]メチル]-</p>			

10

20

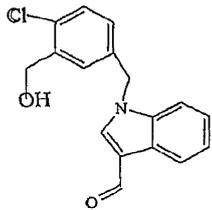
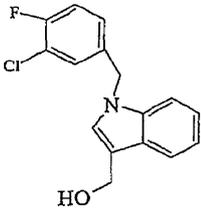
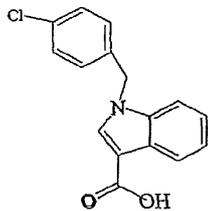
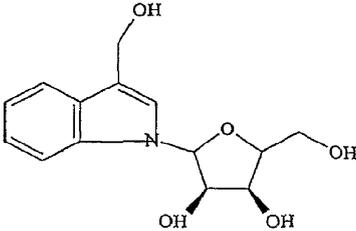
30

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K082	SW29	 <p>1H-インドール-3-エタンアミン、1-[(3-クロロフェニル)メチル]-</p>			
K83	SW30	 <p>1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(5-クロロ-2-チエニル)メチル]-</p>			
K84	SW31	 <p>1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)メチル]-</p>			
K85	SW32	 <p>1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-クロロ-4-メトキシフェニル)メチル]-</p>			

10

20

30

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460	
K86	SW33	 <p>1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-メトキシ-4-クロロフェニル)メチル]-</p>				10
K87	SW34	 <p>1H-インドール-3-メタノール、1-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)メチル]-</p>				
K88	SW35	 <p>1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-(フェニルメチル)-</p>				20
K89	10511-51-0	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-(フェニルメチル)-				
K90	53-85-0	1H-ベンズイミダゾール、5,6-ジクロロ-1-β-D-リボフラノシル-	>4.5	>4.5	>4.5	
K91	化学物質14					30
K92	121103-34-2	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、5-プロモ-1-(フェニルメチル)-				
K93	593235-84-8	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、5-プロモ-1-[(3-クロロフェニル)メチル]-				
K94	713085-30-4	1-プロパノン、1-[1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-イル]-				40

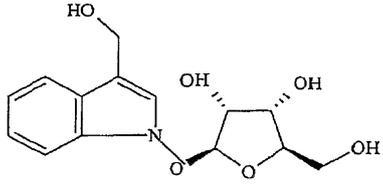
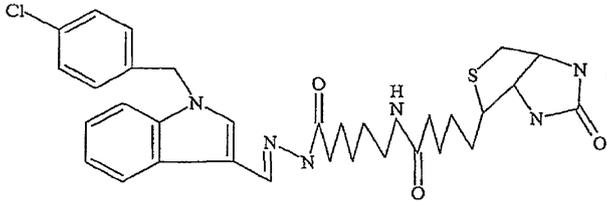
化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
K95	92407-86-8	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-2-メチル-			
K96	593236-94-3	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-クロロフェニル)メチル]-7-メチル-			
K97	664317-83-3	1H-インドール-3-メタノール、1-[(4-メチルフェニル)メチル]-			
K98	420811-32-1	1H-インドール-3-カルボン酸、1-(4-クロロベンゾイル)-、メチルエステル			
K99	592546-71-9	安息香酸、4-[(3-ホルミル-1H-インドール-1-イル)メチル]-			
K100	340318-80-1	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[2-(2-クロロフェノキシ)エチル]-			
K101	885526-36-3	1H-インドール-3-メタノール、5-メトキシ-1-(フェニルメチル)-			
K102	677345-08-3	メタノン、シクロプロピル[1-[(3,4-ジクロロフェニル)メチル]-1H-インドール-3-イル]-			
K103	676247-82-8	1H-インドール-3-メタノール、1-(1-ナフタレニルメチル)-			
K104	591210-47-8	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[(3-ニトロフェニル)メチル]-			
K105	401580-42-5	1H-インドール-3-カルボン酸、1-(4-フルオロベンゾイル)-、メチルエステル			
K106	487-60-5	b-D-グルコピラノシド、1H-インドール-3-イル			
K107	化学物質15	メタノール、1-[1-(b-D-グルコピラノシルオキシ)-1H-インドール-3-イル]-			
K108	34365-14-5	エタノン、1-[1-(b-D-グルコピラノシルオキシ)-1H-インドール-3-イル]-			
K109	754199-86-5	1H-インドール-3-カルボン酸、1-[(2,4-ジクロロフェニル)メチル]-、メチルエステル			
K110	412284-65-2	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、5-クロロ-1-メチル-			
K111	329061-82-7	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[2-(4-クロロフェノキシ)エチル]-			
K112	833441-48-8	1H-インドール-3-カルボニトリル、1-[(3-クロロフェニル)メチル]-			
K113	155134-26-2	1H-インドール-3-カルボン酸、1-(フェニルメチル)-、メチルエステル			
K114	29957-93-5	1H-インドール-3-プロパノール、1-(フェニルメチル)-			
K115	299936-51-9	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-(2-フェノキシエチル)-			
K116	22948-94-3	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-アセチル-			
K117	773101-94-3	1H-インドール、3-(1,3-ジオキサラン-2-イル)-1-(フェニルメチル)-			
K118	5414-45-9	キノリン、1-[(4-クロロフェニル)メチル]-1,2,3,4-テトラヒドロ-			
K119	107456-42-8	ベンズイミダゾール、1-p-クロロベンジル-			

10

20

30

40

化合物CAS番号 または識別番号		名称/構造	T29	T29k	H460
	H				
K120	862652-44-6	1H-インドール-3-カルボアルデヒド、1-[2-(1- ナフタレニルオキシ)エチル]-			
K121	89542-38-1	ベンゾチアゾリウム、3-[(4-クロロフェニル)メチル]-、 臭化物			
K122	906345-77-5	グルコシズロン酸、3-カルボキシインドリル			
K123	4958-11-6	インドリン、1-グルコピラノシル-			
K124	400782-50-5	1H-インドール、1-(b-D-グルコピラノシルオキシ)-5-ニトロ-			
K125	444794-70-1	1H-インドール、1-[(2-デオキシ-b-D-エリスロ- ペントフラノシル)オキシ]-4-メチル-			
K126	化学物質16	 <p>1H-インドール-3-メタノール、1-(b-D-リボフラノシルオキシ)-</p>			
K127	400782-53-8	1H-インドール、5-ニトロ-1-(b-D-リボフラノシルオキシ)-			
K128	78434-21-6	1H-ベンズイミダゾール-2-カルボニトリル、1-(b-D- グルコピラノシルオキシ)-			
K129	207598-26-3	b-D-ガラクトピラノシド、1-メチル-1H-インドール-3-イル			
K130	SW37 ビオチン	 <p>1H-インドール-3-ビオチン-ヒドラジド、1-[(4- クロロフェニル)メチル]-(9Cl)</p>	>4.5	5.6	6.4

10

20

30

【 0 0 5 2 】

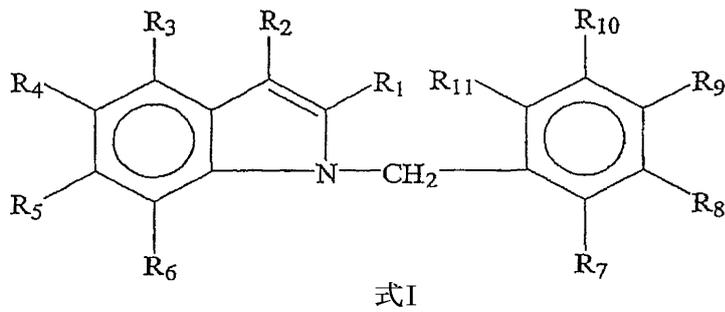
(表2) 異なる細胞株における活性 (IC₅₀ (-LogM))

細胞株	OnK-1	OnK-60	OnK62	OnK63	OnK68	OnK69	OnK71	OnK29	OnK73	OnK42	OnK6	OnK49	OnK29	OnK51	OnK27	OnK14
癌																
肺	6.6	7.8	7.8	7.4	7.4	7.4	7.1	8.5	8.5	8	7	7.5	8.5	7	8.4	7.6
肺	7	8.6	5.5	6.5	8.6	7.5	6.5	7.1	7	5.5	8.6	8.6	6.9	6.1	6.5	5.7
肺	5.6	8.5	5	5.8	7.2	7	5.8	5.5	5.8	5.3	7.4	8.5	5.3	5	5.4	4.5
肺	>4.5	5.7	5	>4.5	5.3	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	5	4.9	5	5	4.9	5	4.5
肺	5.8	6	5.1	5	5.5	5.9	5.1	5.5	5.5	5.3	5.4	5.2	5.5	5	4.8	5.2
結腸	5.5	7	4.9	5.1	6.8	6.5	5.5	5.6	5.5	5	6.3	8	5.5	5	5.4	5.1
結腸	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
結腸	6.4	7.6	5.5	6	7	7.1	6.4	7	6.5	6	6.9	8.6	6.6		6	6
結腸	6	>8.5	5.3	5.8	6.4	6	6.7	6.3	6.1	5	6.6	8.5	5.8	5	5.9	5.3
肺	4.5	4.5	5	4.5	4.5	>4.5	>4.5	4.5	>4.5	>4.5	4.5	5	4.5	>4.5	>4.5	>4.5
肺	>4.5	5.5	5	>4.5	5	>4.5	5	4.9	>4.5	>4.5	5	5	5.1	5.1	4.8	>4.5
膵臓	5.5	5.7	4.8	5	5.7	5.1	5	5.4	5.5	5	5.4	5	5.3	5.1	4.8	5.1
結腸	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
腎臓	6.1	6.7	5	5	6.7	6.5	5.4	6.6	6.1	5.4	5.7	7.5	5.6	5	5.7	5.5
腎臓	8	8	7	6.6	8	7.1	6.8	8.1	7.4	6.7	8	8	7.2	6.5	7.2	6.3
膵臓	5	5	4.5	4.5	4.5	4.5	6.9	6	5.5	5.5	4.9	4.9	5	4.5	4.5	4.5
結腸	5.4	5.3	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	4.5	4.5	>4.5	>4.5	5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
膵臓	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
肺	6.1	6	6	5.7	6	5.7	5.5	5.7	5.6	5.6	5.4	6.5	6.2	6.2	6.2	6
肺	>4.5	4.8	4.8	4.5	4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	4.5	5	5	5	>4.5	>4.5
肺	>4.5	4.8	4.8	4.5	4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.6	4.8	4.5	4.5	>4.5	>4.5
肺	>4.5	5	5	4.6	4.6	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.8	4	4.5	4.5	>4.5	>4.5
肺	>4.5	4.7	4.7	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	4.5	>4.5	>4.5	4.5	4.8	4.5	4.5	>4.5	>4.5
肺	>4.5	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.6	5.1	4.5	4.5	>4.5	>4.5
卵巣	5.6	7	6.8	6.6	6.6	6.6	5.6	5.3	5.9	5.9	6.2	8	8	4.5	4.5	5.5
卵巣	4.5	5.6	5	>4.5	5	>4.5	5	5	4.8	4.8	5.1	5	5	5	6.5	6
卵巣	4.6	5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	5	4.5	4.5	>4.5	5.3
卵巣	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	5.5	5.5	5.5	5	5.1	5.5	5.5	5.5	5.5
卵巣	5.8	6.2	6.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

10
20
30
40

【 0 0 5 3 】

B. オンクラシン化合物の化学式
 オンクラシン化合物の化学式は一般的に、一般式または式Iの構造によって定義されう
 る。



【 0 0 5 4 】

特定の態様において、基 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、および/または R_{11} はそれぞれ独立して、-H、ヒドロキシ、アミノ、シアノ、ハロ、ブロモ、クロロ、ニトロ、メルカプト、または $C_1 \sim C_{15}$ -アルキル、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルケニル、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルキニル、 $C_6 \sim C_{15}$ -アリール、 $C_7 \sim C_{15}$ -アラルキル、 $C_1 \sim C_{15}$ -ヘテロアリール、 $C_2 \sim C_{15}$ -ヘテロアラルキル、 $C_1 \sim C_{15}$ -アシル、 $C_1 \sim C_{15}$ -アルコキシ、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルケニルオキシ、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルキニルオキシ、 $C_6 \sim C_{15}$ -アリールオキシ、 $C_7 \sim C_{15}$ -アラルコキシ、 $C_1 \sim C_{15}$ -ヘテロアリールオキシ、 $C_2 \sim C_{15}$ -ヘテロアラルキルオキシ、 $C_1 \sim C_{15}$ -アシルオキシ、 $C_1 \sim C_{15}$ -アルキルアミノ、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルケニルアミノ、 $C_2 \sim C_{15}$ -アルキニルアミノ、 $C_6 \sim C_{15}$ -アールアミノ、 $C_7 \sim C_{15}$ -アラルキルアミノ、 $C_1 \sim C_{15}$ -ヘテロアリールアミノ、 $C_2 \sim C_{15}$ -ヘテロアラルキルアミノ、 $C_2 \sim C_{15}$ -アミド、 $C_1 \sim C_{15}$ -アルキルチオ、 $C_6 \sim C_{15}$ -アリールチオ、 $C_7 \sim C_{15}$ -アラルキルチオ、 $C_1 \sim C_{15}$ -ヘテロアリールチオ、 $C_2 \sim C_{15}$ -ヘテロアラルキルチオ、 $C_1 \sim C_{15}$ -アシルチオ、もしくは $C_0 \sim C_{15}$ -シリルの置換型もしくは非置換型である。

【 0 0 5 5 】

特定の態様において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、および/または R_{11} は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、アシル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアラルキルオキシ、アシルオキシ、アルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、アラルキルアミノ、ヘテロアリールアミノ、ヘテロアラルキルアミノ、またはアミドの置換型または非置換型である。

【 0 0 5 6 】

特定の局面において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、および/または R_{11} はそれぞれ独立して、

10

20

30

$-H$, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH(CH_2)_2$,
 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-C(CH_3)_3$, $-CH_2C(CH_3)_3$, $-C_6H_5$,
 $-C_6H_4CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH(CH_2)_2$,
 $-C_6H_3(CH_3)_2$, $-C_6H_3(CH_3)CH_2CH_3$, F , Cl , Br , I , $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2CH_2CH_3$,
 $-OCH(CH_3)_2$, $-OCH(CH_2)_2$, $-OCH_2CF_3$, $-OCOCH_3$, $-OC_6H_5$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$,
 $-NHCH_2CH_2CH_3$, $-NHCH(CH_3)_2$, $-NHCH(CH_2)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_3)CH_2CH_3$,
 $-N(CH_2CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-NHCO_2C(CH_3)_3$, $-CH_2F$, $-CH_2Cl$, $-CH_2Br$, $-CH_2OH$,
 $-CH_2OCH_3$, $-CH_2OCH_2CH_3$, $-CH_2OCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2OCH(CH_3)_2$, $-CH_2OCH(CH_2)_2$, 10
 $-CH_2OCH_2CF_3$, $-CH_2OCOCH_3$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2NHCH_2CH_3$,
 $-CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH(CH_3)_2$, $-CH_2NHCH(CH_2)_2$,
 $-CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2F$, $-CH_2CH_2Cl$, $-CH_2CH_2Br$, $-CH_2CH_2I$, $-CH_2CH_2OH$,
 $CH_2CH_2OCOCH_3$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_3$,
 $-CH_2CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH(CH_3)_2$,
 $-CH_2CH_2NHCH(CH_2)_2$, $-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCO_2C(CH_3)_3$, $-CH_2CH=CH_2$,
 $-CH_2CH=CHCH_3$, $-CH_2CH=CHCH_2CH_3$, $-CH_2CH=CHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH=CHCH(CH_3)_2$,
 $-CH_2CH=CHCH(CH_2)_2$, $-CF_3$, $-CN$, $-CH=CH_2$, $-CH=CHCH_3$, $-COH$, $-COCH_3$, 20
 $-COCH_2CH_3$, $-COCH_2CH_2CH_3$, $-COCH(CH_3)_2$, $-COCH(CH_2)_2$, $-COCH_2CF_3$, $-COC_6H_5$,
 $-COC_6H_4CH_3$, $-COC_6H_4CH_2CH_3$, $-COC_6H_4CH_2CH_2CH_3$, $-COC_6H_4CH(CH_3)_2$,
 $-COC_6H_4CH(CH_2)_2$, $-COC_6H_3(CH_3)_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, $-CO_2CH_2CH_3$, $-CO_2CH_2CH_2CH_3$,
 $-CO_2CH(CH_3)_2$, $-CO_2CH(CH_2)_2$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-CONHCH_2CH_3$,
 $-CONHCH_2CH_2CH_3$, $-CONHCH(CH_3)_2$, $-CONHCH(CH_2)_2$, $-CON(CH_3)_2$,
 $-CON(CH_2CH_3)CH_3$, $-CON(CH_2CH_3)_2$, $-CONHCH_2CF_3$, $-C_6H_4CH=CH_2$, $-C_6H_4CH=CHCH_3$,
 $-C_6H_4F$, $-C_6H_4Cl$, $-C_6H_4Br$, $-C_6H_4I$, $-C_6H_4OH$, $-C_6H_4OCH_3$, $-C_6H_4OCH_2CH_3$,
 $-C_6H_4OCOCH_3$, $-C_6H_4OC_6H_5$, $-C_6H_4NH_2$, $-C_6H_4NHCH_3$, $-C_6H_4NHCH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2Cl$, 30
 $-C_6H_4CH_2Br$, $-C_6H_4CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2OCOCH_3$, $-C_6H_4CH_2NH_2$, $-C_6H_4N(CH_3)_2$,
 $-C_6H_4CH_2CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2CH_2OCOCH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2NH_2$,
 $-C_6H_4CH_2CH=CH_2$, $-C_6H_4CF_3$, $-C_6H_4CN$, $-C_6H_4C\equiv CH$, $-C_6H_4C\equiv CCH_3$, $-C_6H_4C\equiv CSi(CH_3)_3$,
 $-C_6H_4COH$, $-C_6H_4COCH_3$, $-C_6H_4COCH_2CH_3$, $-C_6H_4COCH_2CF_3$, $-C_6H_4COC_6H_5$,
 $-C_6H_4CO_2H$, $-C_6H_4CO_2CH_3$, $-C_6H_4CONH_2$, $-C_6H_4CONHCH_3$, $-C_6H_4CON(CH_3)_2$, $-SH$,
 $-SCH_3$, $-SC_6H_5$, $-SCH_2C_6H_5$, または $-SCOCH_3$

である。

【 0 0 5 7 】

式または構造における文字「n」は、0、1、2、3、4、5、または6となりうる。

【 0 0 5 8 】

本明細書において用いられるように、「アミノ」は $-NH_2$ を意味し；「ニトロ」という用語は、 $-NO_2$ を意味し；「ハロ」という用語は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ を表し；「メルカプト」という用語は $-SH$ を意味し；「シアノ」という用語は $-CN$ を意味し；「シリル」という用語は $-SiH_3$ を意味し、および「ヒドロキシ」という用語は $-OH$ を意味する。

【 0 0 5 9 】

あるクラスの有機ラジカル（たとえば、アルキル、アリール、アシル等）を修飾するために用いる場合の「置換された」という用語は、そのラジカルの1つまたは複数の水素原子がヘテロ原子またはヘテロ原子含有基に置換されていることを意味する。特異的に置換された有機ラジカルを以下により詳細に定義する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

あるクラスの有機ラジカル（たとえば、アルキル、アリール、アシル等）を修飾するために用いる場合の「非置換」という用語は、そのラジカルのいかなる水素原子もヘテロ原子またはヘテロ原子含有基に置換されていないことを意味する。炭素原子または炭素と水素原子のみからなる基への水素原子の置換は、基を置換させるのに十分ではない。たとえば、 $-C_6H_4C-CH_3$ は、非置換アリール基の例であるが、 $-C_6H_4F$ は、置換アリール基の例である。特定の非置換有機ラジカルを以下により詳細に定義する。

【 0 0 6 1 】

「非置換 C_n -アルキル」という用語は、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに炭素-炭素二重結合または三重結合を有しない、さらに全体で、その全てが非芳香族である n 個の炭素原子、3個またはそれ以上の水素原子を有し、およびヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_1 - C_{10} アルキルは炭素原子1~10個を有する。「アルキル」という用語には、直鎖のアルキル基、分岐アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基、およびシクロアルキル置換アルキル基が含まれる。基- CH_3 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CH_2)_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-C(CH_3)_3$ 、および $-CH_2C(CH_3)_3$ は全て、非置換アルキル基の例である。

10

【 0 0 6 2 】

「置換 C_n -アルキル」という用語は、付着点として1個の飽和炭素原子を有し、炭素-炭素二重結合または三重結合を有しない、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、その全てが非芳香族である n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、それぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択される少なくとも1つのヘテロ原子を有するラジカルを指す。たとえば、置換 C_1 - C_{10} -アルキルは炭素原子1~10個を有する。以下の群は置換アルキル基の全ての例である：トリフルオロメチル、

20

$-CH_2F$, $-CH_2Cl$, $-CH_2Br$, $-CH_2OH$,

$-CH_2OCH_3$, $-CH_2OCH_2CH_3$, $-CH_2OCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2OCH(CH_3)_2$, $-CH_2OCH(CH_2)_2$,

$-CH_2OCH_2CF_3$, $-CH_2OCOCH_3$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$, $-CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2NHCH_2CH_3$,

$-CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2NHCH(CH_3)_2$, $-CH_2NHCH(CH_2)_2$,

30

$-CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2F$, $-CH_2CH_2Cl$, $-CH_2CH_2Br$, $-CH_2CH_2I$, $-CH_2CH_2OH$,

$CH_2CH_2OCOCH_3$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2N(CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_3$,

$-CH_2CH_2N(CH_3)CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2NHCH(CH_3)_2$,

$-CH_2CH_2NHCH(CH_2)_2$, $-CH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$, $-CH_2CH_2NHCO_2C(CH_3)_3$, および $-CH_2Si(CH_3)_3$

。

【 0 0 6 3 】

「非置換 C_n -アルケニル」という用語は、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有し、全体で、その全てが非芳香族である n 個の炭素原子、3個またはそれ以上の水素原子を有し、およびヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2 - C_{10} アルケニルは炭素原子2~10個を有する。非置換アルケニル基には、 $-CH=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-CH=CHCH_2CH_3$ 、 $-CH=CHCH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH=CHCH(CH_3)_2$ 、 $-CH=CHCH(CH_2)_2$ 、 $-CH_2CH=CH_2$ 、 $-CH_2CH=CHCH_3$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH=CHCH(CH_3)_2$ 、および $-CH_2CH=CHCH(CH_2)_2$ が含まれる。

40

【 0 0 6 4 】

「置換 C_n -アルケニル」という用語は、付着点として1個の非芳香族炭素原子を有し、少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素二重結合を有するが、炭素-炭素三重結合を有しない、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、およびそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を有するラ

50

ジカルを指す。たとえば、置換 C_2-C_{10} -アルケニルは、炭素原子2~10個を有する。基-CH=CHF、-CH=CHCl、および-CH=CHBrは、置換アルケニル基の例である。

【0065】

「非置換 C_n -アルキニル」という用語は、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、全体で、その全てが非芳香族である n 個の炭素原子、少なくとも1つの水素原子を有し、およびヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2-C_{10} -アルキニルは炭素原子2~10個を有する。基-C≡CHおよび-C≡CCH₃は非置換アルキニル基の例である。

【0066】

「置換 C_n -アルキニル」という用語は、付着点として1個の非芳香族炭素原子を有し、少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素三重結合を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、およびそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択される少なくとも1つのヘテロ原子を有するラジカルを指す。たとえば、置換 C_2-C_{10} -アルキニルは、炭素原子2~10個を有する。基-C≡CSi(CH₃)₃は、置換アルキニル基の例である。

10

【0067】

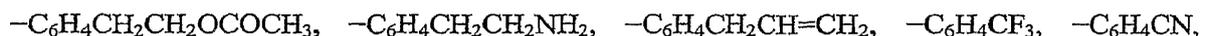
「非置換 C_n -アリール」という用語は、炭素原子のみを含む芳香環構造の一部である付着点としての1個の炭素原子を有し、さらに全体で n 個の炭素原子、5個またはそれ以上の水素原子を有し、ヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_6-C_{10} -アリールは炭素原子6~10個を有する。非置換アリール基の例には、フェニル、メチルフェニル、ジ(メチル)フェニル、 $-C_6H_4CH_2CH_3$ 、 $-C_6H_4CH_2CH_2CH_3$ 、 $-C_6H_4CH(CH_3)_2$ 、 $-C_6H_4CH(CH_2)_2$ 、 $-C_6H_3(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-C_6H_4CH=CH_2$ 、 $-C_6H_4CH=CHCH_3$ 、 $-C_6H_4C≡CH$ 、および $-C_6H_4C≡CCH_3$ が含まれる。アリール基にはまた、ナフチル、キノリル、インドリル等のような多環式縮合芳香族基が含まれる。

20

【0068】

「置換 C_n -アリール」という用語は、炭素原子のみを含む芳香環構造の一部である付着点としての炭素原子1個を有し、さらに全体で、 n 個の芳香族または非芳香族炭素原子、0、1、または複数の水素原子、およびそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択される少なくとも1個の非芳香族ヘテロ原子を有するラジカルを指す。たとえば、置換 C_6-C_{10} -アリールは、炭素原子6~10個を有する。以下の基、

30



40



は置換アリール基の例である。

【0069】

「非置換 C_n -アラルキル」という用語は、付着点として1個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、炭素原子の少なくとも6個が炭素原子のみを含む芳香環構造を形成する n 個の炭素原子、7個またはそれ以上の水素原子を有し、ヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_7-C_{10} -アラルキルは、炭素原子7~10個を有する。「アラルキル」には、アリール基に置換されたアルキルが含まれる。非置換アラルキルの例には、フェニルメチル(ベンジル)およびフェニルエチルが含まれる。

50

【0070】

「置換 C_n -アラルキル」という用語は、付着点として1個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、炭素原子の少なくとも6個が炭素原子のみを含む芳香環構造を形成する n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、およびそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択される少なくとも1個のヘテロ原子を有するラジカルを指す。たとえば、置換 C_7 - C_{10} -アラルキルは、炭素原子7~10個を有する。

【0071】

「非置換 C_n -ヘテロアリアル」という用語は、付着点として1個の芳香族炭素原子または1個の芳香族ヘテロ原子のいずれかを有し、さらに、全体で n 個の炭素原子、少なくとも1個の水素原子、および少なくとも1個のヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個およびヘテロ原子の全てが1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、非置換 C_1 - C_{10} ヘテロアリアルは、炭素原子1~10個を有する。たとえば、「ヘテロアリアル」という用語には、以下の化合物に由来する基が含まれる：ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、イソキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、ピリミジン等。

10

【0072】

「置換 C_n -ヘテロアリアル」という用語は、付着点として1個の芳香族炭素原子または1個の芳香族ヘテロ原子のいずれかを有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、少なくとも1個の水素原子、および少なくとも2個のヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個とヘテロ原子の少なくとも1個は、1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにヘテロ原子の少なくとも1個は1つまたは複数の芳香環構造の一部ではなく、さらに、それぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_1 - C_{10} -ヘテロアリアルは、炭素原子1~10個を有する。

20

【0073】

「非置換 C_n -ヘテロアラルキル」という用語は、付着点として1個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、少なくとも3個の水素原子、および少なくとも1個のヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個およびヘテロ原子の全てが芳香環構造を形成し、さらに、それぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2 - C_{10} ヘテロアラルキルは炭素原子2~10個を有する。

30

【0074】

「置換 C_n -ヘテロアラルキル」という用語は、付着点として1個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および少なくとも2個のヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個とヘテロ原子の少なくとも1個が1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにヘテロ原子の少なくとも1個が芳香環構造の一部ではなく、さらに、それぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば置換 C_2 - C_{10} ヘテロアラルキルは炭素原子2~10個を有する。

40

【0075】

「非置換 C_n -アシル」という用語は、付着点としてカルボニル基の1個の炭素原子を有し、さらに、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、1個または複数の水素原子、全体で1個の炭素原子を有し、およびさらなるヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_1 - C_{10} -アシルは、炭素原子1~10個を有する。基-COH、-COCH₃、-COCH₂CH₃、-COCH₂CH₂CH₃、-COCH(CH₃)₂、-COCH(CH₂)₂、-COC₆H₅、-COC₆H₄CH₃、-COC₆H₄CH₂CH₃、-COC₆H₄CH₂CH₂CH₃、-COC₆H₄CH(CH₃)₂、-COC₆H₄CH(CH₂)₂、および-COC₆H₃(CH₃)₂は、非置換アシル基の例である。

【0076】

「置換 C_n -アシル」という用語は、付着点でカルボニル基の一部である炭素原子1個を有

50

し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、およびカルボニル基の酸素のほか、少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_1 - C_{10} -アシルは、炭素原子1~10個を有する。置換アシルという用語には、カルバモイル、チオカルボキシレート、およびチオカルボン酸基が含まれる。以下の基、 $-COCH_2CF_3$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2CH_3$ 、 $-CO_2CH_2CH_3$ 、 $-CO_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-CO_2CH(CH_3)_2$ 、 $-CO_2CH(CH_2)_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHC_2H_5$ 、 $-CONHCH_2CH_3$ 、 $-CONHCH_2CH_2CH_3$ 、 $-CONHCH(CH_3)_2$ 、 $-CONHCH(CH_2)_2$ 、 $-CON(CH_3)_2$ 、 $-CON(CH_2CH_3)_2$ 、 $-CON(CH_2CH_3)_2$ 、および $-CONHCH_2CF_3$ は、置換アシル基の例である。

【0077】

10

「非置換 C_n -アルコキシ」という用語は、構造-ORを有する基を指し、式中Rは、上記で定義されている非置換 C_n -アルキルである。非置換アルコキシ基には、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、 $-OCH_2CH_2CH_3$ 、 $-OCH(CH_3)_2$ 、および $-OCH(CH_2)_2$ が含まれる。

【0078】

「置換 C_n -アルコキシ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -アルキルである構造-ORを有する基を指す。たとえば $-OCH_2CF_3$ は置換アルコキシ基である。

【0079】

「非置換 C_n -アルケニルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Rが非置換 C_n -アルケニルである構造-ORを有する基を指す。

【0080】

20

「置換 C_n -アルケニルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -アルケニルである構造-ORを有する基を指す。

【0081】

「非置換 C_n -アルキニルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Rが非置換 C_n -アルキニルである構造-ORを有する基を指す。

【0082】

「置換 C_n -アルケニルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -アルキニルである構造-ORを有する基を指す。

【0083】

「非置換 C_n -アリールオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -アリールである構造-OArを有する基を指す。非置換アリールオキシ基の例は、 $-OC_6H_5$ である。

30

【0084】

「置換 C_n -アリールオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -アリールである構造-OArを有する基を指す。

【0085】

「非置換 C_n -アラルキルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -アラルキルである構造-OArを有する基を指す。

【0086】

「置換 C_n -アラルキルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -アラルキルである構造-OArを有する基を指す。

40

【0087】

「非置換 C_n -ヘテロアリールオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -ヘテロアリールである構造-OArを有する基を指す。

【0088】

「置換 C_n -ヘテロアリールオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -ヘテロアリールである構造-OArを有する基を指す。

【0089】

「非置換 C_n -ヘテロアラルキルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -ヘテロアラルキルである構造-OArを有する基を指す。

50

【0090】

「置換 C_n -ヘテロアラルキルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -ヘテロアラルキルである構造-OArを有する基を指す。

【0091】

「非置換 C_n -アシルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Acが非置換 C_n -アシルである構造-OAcを有する基を指す。非置換アシルオキシ基には、アルキルカルボニルオキシおよびアリアルカルボニルオキシ基が含まれる。たとえば、-OCOCH₃は非置換アシルオキシ基の例である。

【0092】

「置換 C_n -アシルオキシ」という用語は、上記で定義されているように、Acが置換 C_n -アシルである構造-OAcを有する基を指す。置換アシルオキシ基には、アルコキシカルボニルオキシ、アリアルオキシカルボニルオキシ、カルボキシレート、アルキルカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、およびアルキルチオカルボニル基が含まれる。

10

【0093】

「非置換 C_n -アルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した1個または2個の飽和炭素原子を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、全体で、その全てが非芳香族であるn個の炭素原子、4個または複数の水素原子、全体で1個の窒素原子を含有し、さらなるヘテロ原子を含有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_1 - C_{10} -アルキルアミノは炭素原子1~10個を有する。アルキルアミノ基には、ジアルキルアミノ基が含まれる。非置換アルキルアミノ基には、-N

20

【0094】

「置換 C_n -アルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した1個または2個の飽和炭素原子を有し、炭素-炭素二重結合または三重結合を有しない、さらに、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、全体で、その全てが非芳香族であるn個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点の窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_1 - C_{10} -アルキルアミノは炭素原子1~10個を有する。

30

【0095】

「非置換 C_n -アルケニルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合、全体で、その全てが非芳香族であるn個の炭素原子、4個または複数の水素原子、全体で1個の窒素原子を含有し、さらなるヘテロ原子を含有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2 - C_{10} -アルケニルアミノは、炭素原子2~10個を有する。アルケニルアミノ基には、ジアルケニルアミノおよびアルキル(アルケニル)アミノ基が含まれる。

【0096】

「置換 C_n -アルケニルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素二重結合を有するが、炭素-炭素三重結合は有しない、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体でn個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点での窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_2 - C_{10} -アルケニルアミノは、炭素原子2~10個を有する。

40

【0097】

「非置換 C_n -アルキニルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合、全体で、その全てが非芳香族であるn個の炭素原子、少なくとも1個の水素原子、全体

50

で1個の窒素原子を含有し、さらなるヘテロ原子を含有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2-C_{10} -アルキニルアミノは、炭素原子2~10個を有する。アルキニルアミノ基には、ジアルキニルアミノおよびアルキル(アルキニル)アミノ基が含まれる。

【0098】

「置換 C_n -アルキニルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素三重結合を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点での窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば置換 C_2-C_{10} -アルキニルアミノは、炭素原子2~10個を有する。

10

【0099】

「非置換 C_n -アリールアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した少なくとも1個の芳香環構造を有し、芳香環構造は炭素原子のみを含み、さらに全体で n 個の炭素原子、6個またはそれ以上の水素原子、全体で1個の窒素原子を有し、さらなるヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_6-C_{10} -アリールアミノは、炭素原子6~10個を有する。アリールアミノには、ジアアリールアミノおよびアルキル(アリール)アミノ基が含まれる。

【0100】

「置換 C_n -アリールアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した少なくとも1個の芳香環構造を有し、芳香環構造は炭素原子のみを含み、さらに全体で n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点での窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_6-C_{10} -アリールアミノは、炭素原子6~10個を有する。

20

【0101】

「非置換 C_n -アラルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した1個または2個の飽和炭素原子を有し、全体で、炭素原子の少なくとも6個が炭素原子のみを含む芳香環構造を形成する n 個の炭素原子、8個またはそれ以上の水素原子、全体で1個の窒素原子を有し、およびさらなるヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_7-C_{10} -アラルキルアミノは炭素原子7~10個を有する。アラルキルアミノ基には、ジアラルキルアミノ、アルキル(アラルキル)アミノ、およびアリール(アラルキル)アミノ基が含まれる。

30

【0102】

「置換 C_n -アラルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した少なくとも1個または2個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、炭素原子の少なくとも6個が炭素原子のみを含む芳香環構造を形成する n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点での窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_7-C_{10} -アラルキルアミノは炭素原子7~10個を有する。

40

【0103】

「非置換 C_n -ヘテロアリールアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、少なくとも1個の水素原子、付着点としての窒素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個とさらなるヘテロ原子の全てが1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにそれぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば非置換 C_1-C_{10} -ヘテロアリールアミノは、炭素原子1~10個を有する。ヘテロアリールアミノ基には、アルキル(ヘテロアリール)アミノおよびアリール(ヘテロアリール)アミノ基が含まれる。

50

【0104】

「置換 C_n -ヘテロアリアルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、少なくとも1個の水素原子、付着点としての窒素原子のほかに少なくとも2個のさらなるヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個およびさらなるヘテロ原子の少なくとも1個が1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにさらなるヘテロ原子の少なくとも1個が1つまたは複数の芳香環構造の一部ではなく、さらにそれぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。置換 C_1 - C_{10} ヘテロアリアルアミノは、炭素原子1~10個を有する。

【0105】

「非置換 C_n -ヘテロアラルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した1個または2個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、少なくとも3個の水素原子、少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個とさらなるヘテロ原子の全てが芳香環構造を形成し、さらにそれぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、非置換 C_2 - C_{10} ヘテロアラルキルアミノは、炭素原子2~10個を有する。ヘテロアラルキルアミノ基には、アルキル(ヘテロアラルキル)アミノおよびアリアル(ヘテロアラルキル)アミノ基が含まれる。

【0106】

「置換 C_n -ヘテロアラルキルアミノ」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に付着した1個または2個の飽和炭素原子を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、付着点としての窒素原子のほかに少なくとも2個のさらなるヘテロ原子を有し、炭素原子の少なくとも1個とさらなるヘテロ原子の少なくとも1個が1つまたは複数の芳香環構造に組み入れられ、さらにヘテロ原子の少なくとも1個は芳香環構造の一部ではなく、さらにそれぞれのヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_2 - C_{10} ヘテロアラルキルアミノは炭素原子2~10個を有する。

【0107】

「非置換 C_n -アミド」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に対してその炭素原子を通して付着したカルボニル基を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の炭素原子、1個または複数の水素原子、全体で1個の酸素原子、全体で1個の窒素原子を有し、さらなるヘテロ原子を有しないラジカルを指す。たとえば非置換 C_1 - C_{10} -アミドは、炭素原子1~10個を有する。アミド基には、N-アルキル-アミド、N-アリアル-アミド、N-アラルキル-アミド、アシルアミノ、アルキルカルボニルアミノ、アリアルカルボニルアミノ、およびウレイド基が含まれる。基-NHCOCH₃は非置換アミド基の例である。

【0108】

「置換 C_n -アミド」という用語は、付着点として1個の窒素原子を有し、さらに窒素原子に対してその炭素原子によって付着したカルボニル基を有し、さらに、直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、 n 個の芳香族または非芳香族炭素原子、0、1、または複数の水素原子、カルボニル基の酸素のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば置換 C_1 - C_{10} アミドは炭素原子1~10個を有する。基-NHCO₂O(CH₃)₃は、置換アミド基の例である。

【0109】

「非置換 C_n -アルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが非置換 C_n -アルキルである構造-SRを有する基を指す。基-SCH₃は非置換アルキルチオ基の例である。

【0110】

「置換 C_n -アルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -ア

10

20

30

40

50

ルキルである構造-SRを有する基を指す。

【0111】

「非置換 C_n -アルケニルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが非置換 C_n -アルケニルである構造-SRを有する基を指す。

【0112】

「置換 C_n -アルケニルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -アルケニルである構造-SRを有する基を指す。

【0113】

「非置換 C_n -アルキニルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが非置換 C_n -アルキニルである構造-SRを有する基を指す。

【0114】

「置換 C_n -アルケニルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Rが置換 C_n -アルキニルである構造-SRを有する基を指す。

【0115】

「非置換 C_n -アリールチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -アリールである構造-SArを有する基を指す。基- SC_6H_5 は非置換アリールチオ基の例である。

【0116】

「置換 C_n -アリールチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -アリールである構造-SArを有する基を指す。

【0117】

「非置換 C_n -アラルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -アラルキルである構造-SArを有する基を指す。基- $SCH_2C_6H_5$ は非置換アラルキル基の例である。

【0118】

「置換 C_n -アラルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -アラルキルである構造-SArを有する基を指す。

【0119】

「非置換 C_n -ヘテロアリールチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -ヘテロアリールである構造-SArを有する基を指す。

【0120】

「置換 C_n -ヘテロアリールチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -ヘテロアリールである構造-SArを有する基を指す。

【0121】

「非置換 C_n -ヘテロアラルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが非置換 C_n -ヘテロアラルキルである構造-SArを有する基を指す。

【0122】

「置換 C_n -ヘテロアラルキルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Arが置換 C_n -ヘテロアラルキルである構造-SArを有する基を指す。

【0123】

「非置換 C_n -アシルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Acが非置換 C_n -アシルである構造-SAcを有する基を指す。基- $SCOCH_3$ は非置換アシルチオ基の例である。

【0124】

「置換 C_n -アシルチオ」という用語は、上記で定義されているように、Acが置換 C_n -アシルである構造-SAcを有する基を指す。

【0125】

「非置換 C_n -アルキルシリル」という用語は、付着点として1個のケイ素原子を有し、さらにケイ素原子に付着した1、2、または3個の飽和炭素原子を有し、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、全体でその全てが非芳香族であるn個の炭素原子、5個またはそれ以上の水素原子、全体で1個のケイ素原子を含有し、さらなるヘテロ原子を

10

20

30

40

50

含有しないラジカルを指す。たとえば、非置換 C_1-C_{10} アルキルシリルは、炭素原子1~10個を有する。アルキルシリル基の例には、ジアルキルアミノ基が含まれる。基-Si(CH₃)₃および-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃は非置換アルキルシリル基の例である。

【0126】

「置換 C_n -アルキルシリル」という用語は、付着点として1個のケイ素原子を有し、さらにケイ素原子に付着した1、2、または3個の飽和炭素原子を有し、炭素-炭素二重結合または3重結合を有しない、さらに直鎖状または分岐、環状または非環状構造を有し、さらに全体で、その全てが非芳香族である n 個の炭素原子、0、1、または複数の水素原子、および付着点としてのケイ素原子のほかに少なくとも1個のさらなるヘテロ原子を有し、それぞれのさらなるヘテロ原子がN、O、F、Cl、Br、I、Si、P、およびSからなる群より独立して選択されるラジカルを指す。たとえば、置換 C_1-C_{10} -アルキルシリルは炭素原子1~10個を有する。

10

【0127】

本明細書において用いられる「薬学的に許容される塩」という用語は、生きている生物に対して実質的に非毒性である本発明の化合物の塩を指す。典型的に薬学的に許容される塩には、本発明の化合物に存在する置換基に応じて、本発明の化合物と無機もしくは有機酸との反応、または有機塩基との反応によって調製された塩が含まれる。

【0128】

薬学的に許容される塩を調製するために用いてもよい無機酸の例には：塩酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸等が含まれる。薬学的に許容される塩を調製するために用いてもよい有機酸の例には：シュウ酸、炭酸、クエン酸、コハク酸、フェニル置換アルカン酸、脂肪族および芳香族硫酸等のようなモノおよびジカルボン酸が含まれる。無機または有機酸から調製された薬学的に許容される塩には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、ヨウ化水素酸塩、フッ化水素酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、ギ酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、マレイン酸塩等が含まれる。他の適した塩は当業者に公知である。

20

【0129】

適した薬学的に許容される塩はまた、本発明の物質を、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン、リジン、オルニチン等のような有機塩基に反応させることによって形成されてもよい。

30

【0130】

薬学的に許容される塩には、本発明の化合物のいくつかにおいて見いだされるカルボキシレートまたはスルホネート基によって形成された塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、またはカルシウムのような無機陽イオン、またはイソプロピルアンモニウム、トリメチルアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、およびイミダゾリウムのような有機陽イオンによって形成された塩が含まれる。

【0131】

本発明の任意の塩の一部を形成する特定の陰イオンまたは陽イオンは、塩が全体として薬理的に許容される限り、および陰イオンまたは陽イオンが望ましくない品質または効果に寄与しない限り、重要ではないことを理解すべきである。さらに、さらなる薬学的に許容される塩は当業者に公知であり、本発明の範囲内で用いられてもよい。薬学的に許容される塩ならびにその調製および使用法に関するさらなる例は、参照により本明細書に組み入れられる、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use - A Handbook, by C. G. Wermuth and P. H. Stahl, Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002において紹介される。

40

【0132】

III. 治療化合物の投与および製剤化

さらなる態様において、本発明は、単独でまたは1つもしくは複数の第二の物質もしくは

50

は第二の治療と併用して、細胞、組織、動物、または患者に投与するための薬学的に許容される溶液におけるオンクラシン化合物組成物の製剤化に関する。

【0133】

本発明の水溶性薬学的組成物は、関心対象の標的タンパク質および/またはその関連する生物機能または活性を調節する化合物の有効量を有するであろう。そのような組成物は一般的に、薬学的に許容される溶媒、担体、または水性媒体において溶解または分散せられるであろう。治療目的のための「有効量」は、対象の状態における臨床的に測定可能な差を引き起こすその量であると定義される。この量は、条件、物質、患者の状態、処置のタイプ等に応じて変化するであろう。

【0134】

「薬学的」または「薬理学的に許容される」という句は、動物またはヒトに投与した場合に、有意な有害、アレルギー、または他の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散培地、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質に関してそのような培地および物質を用いることは当技術分野において周知である。任意の通常の培地または物質が活性成分と適合性である限り、治療組成物におけるその使用が企図される。他の治療物質のような補助活性成分も同様に組成物に組み入れることができる。

【0135】

静脈内または筋肉内注射のための化合物のような非経口投与のために製剤化される化合物のほかに、他の薬学的に許容される剤形には、たとえば経口投与のための錠剤または他の固体；遅延放出型カプセル剤；およびクリーム、ローション、吸入剤等を含む現在用いられる他の任意の剤形が含まれる。

【0136】

本発明の活性化化合物は、非経口投与のために製剤化されうる、たとえば静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内経路による注射のために製剤化されうる。オンクラシン化合物を単独で、または活性成分として第二の治療物質と併用して含む組成物の調製は、本開示に照らして当業者に公知であろう。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁剤のいずれかとして注射剤として調製されうる；注射前に液体を加えて溶液または懸濁液を調製するために用いるために適した固体剤形も同様に調製することができ；調製物はまた乳

【0137】

遊離の塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合した水において調製することができる。分散剤はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物、ならびに油において調製されうる。通常の保存および使用条件で、これらの調製物は、微生物の成育を防止するために保存剤を含む。

【0138】

注射に適した薬学的剤形には、滅菌水溶液または分散液；脂質、ゴマ油、ピーナッツ油、またはプロピレングリコール水溶液を含む製剤；および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。多くの場合において、剤形は無菌的でなければならない。これは製造および保存条件で安定でなければならない。これは製造および保存条件で安定でなければならない。細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。

【0139】

活性化化合物は、中性または塩の形で組成物へと製剤化されてもよい。薬学的に許容される塩には、たとえば塩酸塩もしくはリン酸塩のような無機酸によってまたは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等のような有機酸によって形成された酸付加塩が含まれる。形成された塩はまた、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリエチルアミン、ヒスチジ

10

20

30

40

50

ン、プロカイン等のような有機塩基に由来しうる。

【0140】

担体はまた、たとえば水、エタノール、DMSO、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）を含む溶媒または分散媒体となりうる。適切な流動性は、たとえばレシチンのようなコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持することができる。微生物の作用の予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされうる。多くの場合において、等張剤、たとえば糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物において用いることによってもたらされうる。

10

【0141】

滅菌注射溶液は、先に列挙した様々な他の成分と共に適当な溶媒において必要な量を活性化化合物に組み入れて、必要に応じて濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散剤は、基礎分散培地と上記で列挙した必要な他の成分とを含有する滅菌媒体に様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、予め濾過滅菌したその溶液からの活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0142】

製剤化において、溶液は、投与製剤と適合性であるように、治療的に有効な量で投与されるであろう。製剤は、先に記述した注射溶液のタイプのような様々な投与剤形で容易に投与され、薬物放出カプセルおよび類似の剤形を使用することができる。

20

【0143】

水性または液体溶液における非経口投与の場合、たとえば溶液は、必要であれば適切に緩衝作用を有するべきであり、液体希釈液は十分な生理食塩液またはグルコースによって等張にされなければならない。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与のために特に適している。これに関連して、使用することができる滅菌水性培地は、本開示に照らして当業者に公知であろう。たとえば、1つの用量を等張NaCl溶液1 mlに溶解して、皮下注入液1000 mlに加えるか、または提唱される注入部位で注入してもよい（たとえば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい）。そのような用量の変化は、処置される対象の状態に応じて必然的に起こるであろう。投与の責任者は最終的に、個々の対象に関して適当な用量を決定するであろう。

30

【0144】

本発明の特定の局面において、治療組成物を投与する経路は非経口投与によって行ってもよい。非経口投与は静脈内注射、皮下注射、筋肉内、または腫瘍内注射、摂取、またはそれらの組み合わせであってもよい。オンクラシン化合物を含む組成物は、そのあいだの整数およびそれに由来する範囲を含む、用量あたり約0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0、2、3、4、5、6、7、8、9から約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100 ngまたは $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で投与される。特定の局面において、オンクラシン化合物を含む組成物は、用量あたり約1~約5 ngまたは $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で投与される。特定の局面において、オンクラシン化合物を含む組成物は、約1.2~約2.4 ngまたは $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で投与される。特定の局面において、用量あたり投与されるオンクラシン化合物の量は、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9、約2.0、約2.1、約2.2、約2.3、約2.4、約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4、約5.5、約5.6、約5.7、約5.8、約5.9、約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、

40

50

約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9、約8.0、約8.1、約8.2、約8.3、約8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9、約9.0、約9.1、約9.2、約9.3、約9.4、約9.5、約9.6、約9.7、約9.8、約9.9～約10.0、またはそれ以上ng/kg体重、 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、またはmg/kg体重であってもよい。

【0145】

薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は、たとえば経口、非経口、静脈内、鼻腔内、および筋肉内の投与および製剤を含む多様な処置療法において本明細書に記述の特定の組成物を用いるための適した用量および処置療法の開発と同様に、当業者に周知である。

【0146】

A. 栄養による送達

「栄養による送達」という用語は、対象または患者に直接またはそうでなければ消化管の一部に直接投与することを指す。「消化管」という用語は、食物の摂取および吸収、ならびに食物残留物の排泄において機能し、口から肛門まで通っている管状の通路、およびその一部またはセグメントの任意および全て、たとえば口腔、食道、胃、小腸および大腸ならびに結腸と共に、たとえば胃腸管のようなその混合部分を指す。「栄養による送達」という用語は、経口、直腸、内視鏡および舌下/口腔内投与が含まれるがこれらに限定されるわけではないいくつかの投与経路を含む。これらの投与様式に関する共通の必要条件は、消化管のいくつかの部分または全てに対する吸収およびそのように投与された核酸の効率的な粘膜浸透の必要性である。

【0147】

1. 経口送達

特定の用途において、本明細書に開示の薬学的組成物は、動物またはヒトに対する経口投与によって送達されてもよい。そのため、これらの組成物は不活性希釈剤もしくは同化可能な食用担体と共に製剤化されてもよく、それらを硬もしくは軟ゼラチンカプセルに封入してもよく、それらを錠剤に圧縮してもよく、またはそれらは食事の食物と共に直接取り込まれてもよい。

【0148】

活性化合物は、摂取可能な錠剤、口腔内錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウェーハ等の剤形で投与されてもよい（その全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる、Matbiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; 米国特許第5,641,515号; 同第5,580,579号および同第5,792,451号）。錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤等はまた、以下を含んでもよい：トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンのような結合剤；リン酸二カルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；および蔗糖、乳糖、もしくはサッカリンのような甘味料を加えてもよく、またはペパーミント、冬緑油、もしくはサクランボ香料のような香料を加えてもよい。投与単位剤形がカプセル剤である場合、これは上記のタイプの材料のほかに、液体担体を含んでもよい。様々な他の材料がコーティングとして、または投与単位の物理的形状を改変するために存在してもよい。たとえば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤を、シェラック、糖、またはその双方によってコーティングしてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物、甘味料としての蔗糖、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素、ならびにサクランボまたはオレンジ香料のような着香料を含んでもよい。当然のこととして、任意の単位投与剤形を調製するために用いられるいかなる材料も、薬学的に純粋で、使用される量において実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物は、徐放性調製物および製剤に組み入れてもよい。

【0149】

典型的に、これらの製剤は、少なくとも約0.1%またはそれより多くの活性化合物を含んでもよいが、活性成分（複数）の百分率は当然、変化してもよく、簡便に、製剤全体の重量または体積の約1または2%～約60%または70%またはそれより多くてもよい。天然に

10

20

30

40

50

、それぞれの治療的に有用な組成物における活性化合物（複数）の量は、適した用量が化合物の任意の所定の単位用量において得られるように調製されてもよい。溶解度、生物学的利用率、生物学的半減期、投与経路、製品有効期間のような要因と共に、他の薬理的検討が、そのような薬学的製剤を調製する当業者によって企図され、そのために多様な投与および治療計画が望ましい場合がある。

【0150】

2. 内視鏡による投与

消化管の内部部分への直接治療的送達のために内視鏡を用いることができる。たとえば内視鏡的逆行性胆管膵管造影（ERCP）は、拡大胃鏡検査を利用して、胆管および膵管への選択的アクセスを可能にする（Hirahata et al, 1992）。しかし、技法は患者にとって不快であり、非常に熟練の高い人員を必要とする。

10

【0151】

3. 直腸内投与

経口経路によって投与される治療物質はしばしば、代わりに、下位経腸経路によって、すなわち肛門を通して直腸または下位腸管の中に投与することができる。直腸内坐剤、保持浣腸、または直腸カテーテルをこの目的のために用いることができ、そうでなければ患者のコンプライアンスが達成するために困難である場合（たとえば、小児および老人での適用、または患者が嘔吐するまたは意識がない場合）に好ましい可能性がある。直腸内投与によって、経口経路より迅速かつ高い血液レベルが得られ、その逆も同様に当てはまる可能性がある（Remington's Pharmaceutical Sciences, 711, 1990）。直腸から吸収される治療物質の約50%は肝臓を迂回することから、この経路による投与は、初回通過代謝の可能性を有意に低減させる（Benet et al., 1996）。

20

【0152】

B. 注射による送達

特定の状況において、本明細書に開示の薬学的組成物は、米国特許第5,543,158号；同第5,641,515号、および同第5,399,363号（そのそれぞれの全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる）において記述されるように、非経口、静脈内、筋肉内、または腹腔内に送達することが望ましいであろう。遊離の塩基または薬理的に許容される塩としての活性化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合した水において調製してもよい。分散液も同様に、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物、ならびに油において調製してもよい。通常の保存および使用条件において、これらの調製物は微生物の育成を防止するために保存剤を含む。

30

【0153】

注射剤としての使用に適した薬学的剤形には、滅菌水溶液または分散液ならびに滅菌注射溶液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる（その全内容物が参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,466,468号）。全ての場合において、製剤は無菌的でなければならず、シリンジを容易に使用できる程度に流動性でなければならない。

【0154】

水溶液での非経口投与に関して、溶液は必要であれば適切に緩衝作用を有しなればならず、液体希釈剤はまず、十分な生理食塩液またはグルコースによって等張にされなければならない。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与にとって特に適している（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい）。用量における何らかの変動は、処置される対象の状態に応じて必然的に起こる可能性がある。投与の責任者はいずれにせよ、個々の対象に関する適当な用量を決定するであろう。その上、ヒトでの投与に関して、調製物は、政府の規則および基準によって必要とされる滅菌性、発熱物質、ならびに全般的安全性および純度の基準を満たさなければならない。

40

【0155】

「非経口送達」という用語は、消化管を通して以外の方法で動物に本発明の治療物質の投与を指す。非経口薬学的組成物を調製および投与する方法は、当技術分野において公知

50

である（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, pages 1545-1569, 1990を参照されたい）。

【0156】

C. 管内投与

治療物質を、管状器官または組織（たとえば、動脈、静脈、尿管または尿道）の単離された部分に直接送達するための管内投与は、そのような臓器または組織の内腔に罹患する疾患または状態を有する患者の処置にとって望ましい可能性がある。この投与様式を行うために、適当な手段によってカテーテルまたはカニューレを外科的に導入する。処置が求められる管状臓器または組織の一部を単離した後、本発明の治療物質を含む組成物をカニューレまたはカテーテルを通して注入する。約1～約120分インキュベートして、その間に治療物質が血管の内腔の細胞に取り込まれる、または細胞に接触した後、注入カニューレまたはカテーテルを除去して、そのセグメントの単離を行う結紮糸を除去することによって管状臓器または組織内の流動を回復する（Morishita et al., 1993）。本発明の治療組成物はまた、ハイドロゲル材料のような生体適合性のマトリクスと混合して、インビボで血管組織に直接適用してもよい。

【0157】

D. 鼻腔内送達

特定の態様において、薬学的組成物は、鼻腔内スプレー、吸入、および/または他のエアロゾル送達媒体によって送達してもよい。遺伝子、核酸、およびペプチド組成物を鼻腔内エアロゾルスプレーを通して肺に直接送達するための方法は、たとえば米国特許第5,756,353号および同第5,804,212号（それぞれの全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる）において記述されている。同様に、鼻腔内微粒子樹脂（Takenaga et al., 1998）およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物（その全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる米国特許第5,725,871号）を用いる薬物の送達も同様に薬学技術分野において周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン支持マトリクスの形状での経粘膜送達は、米国特許第5,780,045号（その全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる）において記述される。

【0158】

E. 表皮および経皮送達

治療物質を含有する薬学的組成物が局所適用される表皮および経皮送達を用いて、局所皮膚に吸収される、またはその下の組織によってそれぞれ、さらに浸透および吸収させるために薬物を投与することができる。薬剤を調製して局所投与する手段は当技術分野において公知である（たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1596-1609, 1990を参照されたい）。

【0159】

F. リポソーム、ナノカプセル、および微粒子媒介送達

特定の態様において、本発明者らは、適した宿主細胞または処置を必要とする対象に本発明の組成物を導入するために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、小胞等を用いることを企図する。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、またはナノ粒子等に封入された送達のために製剤化されてもよい。

【0160】

そのような製剤は、本明細書に開示のオンクラシン化合物の薬学的に許容される製剤の導入にとって好ましい可能性がある。製剤化およびリポソームの使用は一般的に当業者に公知である（以下を参照されたい、ならびにたとえば、細胞内細菌感染症および疾患のための標的化抗生物質治療におけるリポソームおよびナノカプセルの使用を記述する、Couvreur et al., 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998を参照されたい）。最近、血清安定性および循環中の半減期が改善されたりポソームが開発された（そのそれぞれの全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられるGabizon and Papahadjopoulos, 1988; Allen and Chonn, 1987; 米国特許第5,741,516号）。さらに、可能性がある薬物担体として

10

20

30

40

50

のリポソームおよびリポソーム様調製物の様々な方法が論評されている（そのそれぞれの全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられるTakakura, 1998 ; Chandran et al., 1997 ; Margalit, 1995 ; 米国特許第5,567,434号 ; 同第5,552,157号 ; 同第5,565,213号 ; 同第5,738,868号 ; および同第5,795,587号）。

【0161】

リポソームは、水性媒体に分散され、マルチラメラ同心円二重層小胞を自然に形成するリン脂質から形成される（マルチラメラ小胞（MLV）とも呼ばれる）。MLVは一般的に直径25 nm ~ 4 μmを有する。MLVsの超音波処理によって、コアにおいて水溶液を含む直径200 ~ 500 の範囲の小さいユニラメラ小胞（SUV）が形成される。

【0162】

静脈内に注射されたリポソームの運命および処分は、大きさ、流動性、および表面荷電のようなその物理的特性に依存する。それらは、組織において数時間または数日間持続する可能性があり、血液中での半減期は、数分から数時間に及ぶ。MLVおよびLUVのようなより大きいリポソームは、細網内皮系の貪食細胞によって速やかに取り込まれるが、循環系の生理学により、ほとんどの部位でそのような大きい種の出口が制限される。それらは、肝臓または脾臓の洞様毛細血管のような毛細管内皮細胞に大きい開口部または孔が存在する場合に限って外に出ることができる。このように、これらの臓器は主な取り込み部位である。一方、SUVはより広い組織分布を示すが、それでもなお肝臓および脾臓において高度に隔離されている。一般的に、このインビボ挙動により、リポソームをターゲティングする可能性は、その大きい大きさに近づくことが可能なそれらの臓器および組織のみに制限される。これらには、血液、肝臓、脾臓、骨髄、およびリンパ様臓器が含まれる。

【0163】

または、本発明は、本発明の組成物の薬学的に許容されるナノカプセル製剤を提供する。ナノカプセルは一般的に化合物を安定かつ再現可能に捕らえることができる（Henry-Michelland et al., 1987 ; Quintanar-Guerrero et al., 1998）。これらの必要条件を満たす生体分解性のポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子が、本発明において用いるために企図される。そのような粒子は、記述されるように（その全内容物が参照により具体的に本明細書に組み入れられる、Couvreur et al., 1980 ; 1988 ; zur Muhlen et al., 1998 ; Zambaux et al., 1998 ; Pinto-Alphandary et al., 1995および米国特許第5,145,684号）容易に作成される可能性がある。

【0164】

G. 脂質製剤

本発明には、オンクラシン化合物または最適化薬物、および先に例示したものを含む当技術分野において公知の任意のタイプの脂質組成物またはリポソームを含むリポソーム薬物製剤が含まれる。本明細書において用いられるように、リポソームは水溶性の内部を封入した脂質含有膜を有する構造である。リポソームは1つまたは複数の脂質膜を有してもよい。本発明には、ユニラメラと呼ばれる単層リポソームと、マルチラメラと呼ばれる多層リポソームの双方が含まれる。さらなる局面において、脂質組成物は、オンクラシン化合物の送達が進められる限り、有意なレベルの構造を含む必要はない。

【0165】

1. リポソーム / 脂質組成物

本発明の脂質組成物には、たとえば両親媒性、中性、陽イオン、および陰イオン脂質を含む多様な任意の異なる脂質が含まれてもよい。そのような脂質は単独または併用して用いることができ、同様に、コレステロール、二重層安定化成分、たとえばポリアミドオリゴマー（米国特許第6,320,017号を参照されたい）、ペプチド、タンパク質、洗浄剤、およびホスファチジルエタノールアミンに共役させたPEGおよびセラミドに共役させたPEGのような脂質誘導體（米国特許第5,885,613号を参照されたい）のようなさらなる成分が含まれる。

【0166】

多数の態様において、両親媒性脂質には、本発明のリポソームに含まれる。「両親媒性

10

20

30

40

50

脂質」は、脂質材料の疎水性部分が疎水性の相の方向に向き、親水性部分が水相の方向を向く、任意の適した材料を指す。そのような化合物には、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が含まれるがこれらに限定されるわけではない。代表的なリン脂質には、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、またはジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれる。スフィンゴリピッド、グリコスフィンゴリピッドファミリー、ジアシルグリセロール、およびt3-アシルオキシ酸のような他のリン欠損化合物も同様に用いることができる。さらに、そのような両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールのような他の脂質と容易に混合されうる。

10

【0167】

たとえば、ジアシホスファチジルコリン (diacylphosphatidylcholine)、ジアシルホスファチジエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、ジアシルグリセロール、およびステロールが含まれる、生理的pHで非荷電または中性の両性イオン型のいずれかで存在しうる任意の数の脂質種を指す、任意の数の中性脂質を含めることができる。

【0168】

生理的pHで真の陽電荷を有する陽イオン脂質を、本発明において用いるためにリポソームに容易に組み入れることができる。そのような脂質には、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODAC」); N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリエチルアンモニウムクロリド(「DOTMA」); N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(「DDAB」); N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(「DOTAP」); 313-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル)コレステロール(「DC-Chol」); N-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-2-(スベルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオアセテート(「DOSPA」); ジオクタデシルアミドグリシルカルボキサミド(「DOGS」); 1,2-ジオレイル-sn-3-ホスホエタノールアミン(「DOPE」); 1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン(「t1DODAP」); およびN-(1,2-ジミリスチルオキシプロプ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド(「DMRIE」)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。さらに、たとえば、LIPOFECTIN (GIBCO/BRLから入手可能なDOTMAおよびDOPEを含む)、およびLIPOFECTAMINE (GIBCO/BRLから入手可能なDOSPAおよびDOPEを含む)のような市販の多くの陽イオン脂質調製物を用いることができる。

20

30

【0169】

本発明において用いるために適した陰イオン脂質には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、および中性脂質に接合した他の陰イオン修飾基が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

40

【0170】

1つの態様において、ポリアミドオリゴマー共役体およびPEG-脂質共役体のような、宿主、免疫系によるリポソームの消失を低減させる偽装物質も同様に本発明のリポソームに含めることができる(米国特許第5,820,873号、同第5,534,499号、および同第5,885,613号を参照されたい)。

【0171】

同様に、プログラム可能な融合脂質製剤も本発明に含まれるのに適している。そのような製剤は、細胞膜に融合して所定のシグナル事象が起こるまでその負荷を送達する傾向をほとんど有しない。これによって、生物または疾患部位に注射後それが細胞と融合し始め

50

る前に、脂質製剤をより均一に分配させることができる。シグナル事象はたとえばpH、温度、イオン環境、または時間の変化となりうる。後者の場合、PEG-脂質共役体のような融合遅延または「偽装」成分は単純に経時的なリポソームから交換することができる。製剤が体に適切に分配される時間までに、リポソームは融合性となるのに十分な偽装物質を失った。他のシグナル事象によって、炎症部位での温度の上昇のような疾患部位または標的細胞に関連するシグナルを選択することが望ましい。

【0172】

特定の態様において、本発明のリポソームはスフィンゴミエリン(SM)を含む。本明細書において用いられるように、一般用語スフィンゴミエリン(SM)には、任意の鎖長の塩基または脂肪酸鎖を有するSMが含まれる。天然に存在するSMは、長鎖塩基の炭素1上のヒドロキシル基に連結されたホスホコリン頭部を有し、長鎖塩基上の炭素2上のアミド基に連結した長い飽和アシル鎖を有する(Barenholz (1984)において論評)。培養細胞において、SMの約90~95%がスフィンゴシン(1,3-ジヒドロキシ-2-アミノ-4-オクタデセン)を含み、これは長鎖塩基としてC4とC5のあいだにトランス二重結合を含有するが、残りのほとんどは塩基としてスフィンゴアニン(1,3-ジヒドロキシ-2-アミノ-4-オクタデカン)を有し、長鎖塩基の炭素4と5のあいだのトランス二重結合を欠損する。後者のSMはジヒドロスフィンゴミエリン(DHSM)と呼ばれる。DHSMは、脂肪酸鎖において1つまたは複数のシス二重結合を含有してもよい。1つの態様において、DHSMは完全に飽和された脂肪酸鎖と飽和した長い塩基鎖の双方を含む。SM、または具体的にDHSMを含むリポソームは、米国特許仮出願第60/571,712号においてさらに詳細に記述されている。

【0173】

特定の態様において、細胞タイプまたは組織に対して特異的であるターゲティング部分を用いて本発明のリポソームをターゲティングすることが望ましい。リガンド、細胞表面受容体、糖タンパク質、ビタミン(たとえば、リボフラビン)、およびモノクローナル抗体のような多様なターゲティング部分を用いるリポソームのターゲティングが既に記述されている(たとえば、米国特許第4,957,773号および同第4,603,044号を参照されたい)。ターゲティング部分は、完全なタンパク質またはその断片を含みうる。多様な異なるターゲティング物質および方法が当技術分野において、たとえばSapra and Allen (2003);およびAbra et al. (2002)において記述されている。

【0174】

ターゲティングのために、ポリエチレングリコール(PEG)鎖のような親水性ポリマー鎖の表面コーティングを有するリポソームを用いることが提唱されている(Allen, et al., 1995; Blume, et al., 1993; Klibanov, et al., 1992; Woodle, 1991; Zalipsky, 1993; Zalipsky, 1994; Zalipsky, 1995)。1つのアプローチにおいて、リポソームをターゲティングするために抗体のようなリガンドを、リポソームを形成する脂質の極性頭部に連結させる。もう1つのアプローチにおいて、親水性ポリマーコーティングを形成するPEG鎖の遠位末端にターゲティングリガンドを付着させる(Klibanov et al., 1992)。

【0175】

標的物質を共役させるための標準的な方法を用いることができる。たとえば、標的物質を付着させるために活性化されうるホスファチジルエタノールアミン、または脂質誘導体化プレオマイシンのような誘導体化脂質親和性化合物を用いることができる(Renneisen, et al, J. Bio. Chem., 265:16337-16342 (1990)およびLeonetti, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87:2448-2451 (1990)を参照されたい)。抗体共役の他の例は、米国特許第6,027,726号において開示されている。ターゲティング部分の例にはまた、新生物または腫瘍に関連する抗原を含む、細胞成分に対して特異的な他のタンパク質が含まれる。ターゲティング部分として用いられるタンパク質を、共有結合によってリポソームに付着させることができる(Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)を参照されたい)。他のターゲティング法には、ピオチン-アビジン系が含まれる。

【0176】

2. 調製法

たとえば、Szoka, et al., (1980); 米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、同第4,946,787号; PCT公開番号WO 91/1 7424; Deamer and Banghatm (1976); Fraley, et al., (1979); Hope, et al. (1985); Mayer et al. (1986); Williams et al. (1988); Ostro (1983); Hope et al (1986); および Torchilin et al. (2003)、ならびにその中で引用されている参考文献において記述される方法を含む、リポソームを調製するための多様な方法が当技術分野において公知である。適した方法には、その全てが当技術分野において周知である、超音波処理、押し出し、高圧/ホモジナイゼーション、微小流動化、洗浄剤透析、小さいリポソーム小胞のカルシウム誘導性融合、およびエーテル注入法が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

【0177】

リポソームを調製するもう1つの方法も同様に利用可能である。たとえば、脂質粒子の洗浄剤透析に基づく自己アセンブリを伴う方法は、米国特許第5,976,567号において開示および請求されている。連続流水和を用いてリポソームを調製するさらなる方法が開発中であり、これも最も効果的な大規模製造プロセスを提供しうる。

【0178】

ユニラメラ小胞は超音波または押し出しによって調製されうる。超音波は一般的に氷浴中でBransonチップ超音波装置のようなチップ超音波装置によって行われる。典型的に、懸濁液を不連続な超音波サイクルに供する。

20

【0179】

押し出しは、Lipex Biomembrane Extruderのような生体膜押し出し装置によって行ってもよい。押し出しフィルターにおける既定の孔径によって、特定の大きさのユニラメラリポソーム小胞が生成される可能性がある。リポソームはまた、Norton Company, Worcester MAから販売されているCeraflow Microfilterのような非対称セラミックフィルターを通しての押し出しによって形成してもよい。

【0180】

ユニラメラ小胞はまた、エタノールにリン脂質を溶解した後、脂質を緩衝液に注入して、それによって脂質が自然にユニラメラ小胞を形成することによって作製してもよい。同様に、リン脂質は洗浄剤、たとえばコール酸塩、トライトンX、またはn-アルキルグルコシドに溶解することができる。溶解した脂質-洗浄剤ミセルに薬物を加えた後、透析、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー、遠心、および超遠心を含む多くの可能性がある任意の方法によって洗浄剤を除去する。

30

【0181】

リポソームの調製後、形成の際に一定の大きさに形成されなかったリポソームを所望の大きさの範囲で、比較的狭いリポソームの大きさの分布が得られる大きさに形成する。約0.2~0.4ミクロンの大きさの範囲であれば、リポソーム懸濁液を通常のフィルターを通して濾過滅菌することができる。

【0182】

濾過滅菌法はリポソームの大きさを約0.2~0.4ミクロンまで小さくすればハイスルーブットに基づいて行うことができる。

40

【0183】

リポソームを望ましい大きさに形成するためにいくつかの技術が利用可能である。リポソームの大きさを一定にするための一般的な方法には、米国特許第4,737,323号において記述される方法を含む、超音波浴もしくは超音波プローブによる超音波、またはホモジナイゼーションが含まれる。リポソーム懸濁液を超音波浴または超音波プローブによって超音波処理すると、大きさが約0.05ミクロンより小さいユニラメラ小胞まで進行的な大きさの低減が起こる。ホモジナイゼーションは、大きいリポソームを小さいリポソームに断片化するために剪断エネルギーに依存するもう1つの方法である。典型的なホモジナイゼーション技法において、標準的な乳剤ホモジナイザーを通して、選択されるリポソームの大

50

きさ、典型的に約0.1~0.5ミクロンが観察されるまで、ユニラメラ小胞を再循環させる。リポソーム小胞の大きさは、参照により本明細書に組み入れられるBloomfield(1981)において記述されるように準電気光散乱(QELS)によって決定されてもよい。本発明に従って任意の大きさのリポソームを用いてもよい。特定の態様において、本発明のリポソームは直径約0.05ミクロン~約0.45ミクロン、約0.05~約0.2ミクロン、または0.08~0.12ミクロンの範囲の大きさを有する。他の態様において、本発明のリポソームは約0.45ミクロン~約3.0ミクロン、約1.0~約2.5ミクロン、約1.5~約2.5ミクロン、および約2.0ミクロンである。

【0184】

IV. 併用療法

10

本発明の状況において、オンクラシン療法は、癌またはウイルス感染症をより有効に処置するためにさらなる治療物質と併用して用いてもよい。オンクラシン治療と併用して用いることが企図されるさらなる治療物質には、従来の抗癌治療が含まれる。そのような抗癌治療には、放射線療法、化学療法、遺伝子治療、ホルモン療法、または癌/腫瘍細胞を標的とする免疫療法が含まれるがこれらに限定されるわけではなく、これらは以下に詳細に記述される。

【0185】

本発明の方法および組成物を用いて、細胞を殺すため、細胞周期の停止を誘導するため、遊走を阻害するため、転移を阻害するため、生存を阻害するため、増殖を阻害するため、またはそうでなければ癌細胞の悪性の表現型を逆転もしくは低減するために、一般的に、細胞をさらなる治療と併用してオンクラシン治療に接触させるであろう。組成物/治療は、癌またはウイルス感染症を阻害するために有効な併用量で提供されるであろう。このプロセスは、同時にさらなる治療物質または方法と併用して、オンクラシン治療に癌細胞または腫瘍を接触させる段階を必然的に伴う。これは、細胞/腫瘍を1つの組成物もしくは方法に接触させることによって、1つがオンクラシン治療を含み、もう1つがさらなる物質を含む異なる2つの組成物または方法に細胞を同時に接触させることによって行ってもよい。

20

【0186】

またはオンクラシン治療による処置は、数分~数週間の範囲の間隔をあけてさらなる処置の前または後に行ってもよい。さらなる治療が細胞に個別に適用される場合、一般的に治療/物質がなおも細胞/腫瘍に対して有利な併用効果を発揮することができるように、それぞれの送達または処置時間のあいだに有意な時間が経過しないように確保するであろう。そのような状況において、互いに約12~24時間以内に、より好ましくは互いに約6~12時間以内に双方の様相に細胞/腫瘍を接触させると企図され、遅延期間は約12時間のみであることが最も好ましい。このようにして、薬物の治療レベルが維持されるであろう。いくつかの状況において、処置期間を有意に延長させることが望ましいかも知れない(たとえば、毒性を低減させるため)。このように、それぞれの投与のあいだに数日(2、3、4、5、6、または7日)から数週間(1、2、3、4、5、6、7、または8)が経過してもよい。

30

【0187】

同様に、さらなる抗癌物質と併用したオンクラシン治療の複数回の投与が望ましいであろうと想像される。様々な併用を使用してもよく、この場合以下に例示されるようにオンクラシン治療は「A」であり、さらなる治療物質は「B」である。

40

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

【0188】

他の併用が企図される。この場合も治療効果を得るために、双方の物質/処置は、所望

50

の効果達成するために有効な併用量で細胞に送達される。

【0189】

V. 治療標的

A. 癌

本発明の態様は、癌またはウイルス感染症のような多様な疾患または病態を標的とするために用いることができる。本発明の方法および組成物によって評価される可能性がある癌には、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳腺、結腸、食道、胃腸管、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、膵臓、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または子宮からの細胞および癌細胞が含まれる癌細胞が含まれる。さらに、癌は具体的に以下の組織型の癌であつてもよいが、これらに限定されない：悪性新生物；癌腫；未分化癌；巨細胞および紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛質性上皮癌；移行細胞癌；乳頭移行細胞癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；混合型肝細胞癌胆管癌；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫様ポリープにおける腺癌；大腸家族性ポリポーシス腺癌；固形癌；悪性カルチノイド腫瘍；鰓-肺胞腺癌；乳頭腺癌；色素嫌性癌；好酸性癌；酸親和性腺癌；好塩基球癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；小胞状腺癌；乳頭小胞状腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質細胞癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘液性類表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭嚢胞腺癌；乳頭漿液嚢胞腺癌；ムチン嚢胞腺癌；ムチン腺癌；環状体細胞癌；浸潤性管癌；髄質癌；小葉癌；炎症性癌；乳腺ページェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平化生を伴う腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜腫；悪性顆粒層細胞腫瘍；悪性男性胚細胞腫；セルトリ細胞癌；悪性ライディヒ細胞腫瘍；悪性脂質細胞腫瘍；悪性パラガングリオーマ；悪性乳腺外パラガングリオーマ；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表層進展性黒色腫；巨大色素性母斑における悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミユラー混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽細胞腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カボジ肉腫；悪性血管周囲細胞腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；皮質近接部骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉軟骨肉腫；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル上皮線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；グリア芽細胞腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；始原神経外胚葉；小脳肉腫；節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；大細胞びまん性悪性リンパ腫；小胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；他の明記された非ホジキンリンパ腫；悪性組織球腫；悪性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；プラズマ細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基球性破白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄肉腫；およびヘアリーセル白血病。その上、化生、異形成、および過形成のような前癌状態においてRNAを評価することができる。

【0190】

B. ウイルス感染症

ウイルス感染症は、社会全般に罹患する伝染病による病気の主因である。これらの中で、A型およびB型を含むインフルエンザウイルスは、呼吸器症状と共に全身性の倦怠感を引き起こすことに関与する有意な要因である；他の呼吸器ウイルスには、パラインフルエンザ1、2、3、および4型、RSウイルス、およびアデノウイルスが含まれる。インフルエンザウイルスは、株の急速な変異を受けて、様々な程度のビルレンスおよび症状の重症度を有する病原体を産生する。

【0191】

10

20

30

40

50

本発明の化合物および関連する方法はまた、他のウイルス感染症を処置するために用いてもよい。ウイルス複製を阻害するためにオンクラシンを含む製剤を投与することができる。ウイルス感染症はRNAウイルスまたはDNAウイルスが原因となりうる。オンクラシンの投与によって処置される可能性がある特定のウイルス疾患の例には、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、非A型肝炎、非B型肝炎、非C型肝炎、エプスタイン-バーウイルス感染症、HIV感染症、ヘルペスウイルス（EB、CML、単純ヘルペス）、乳糖腫、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、HTLV I、HTLV II、およびヒトロタウイルスが含まれるがこれらに限定されるわけではない。患者を、第二の抗ウイルス剤によって同時処置してもよい。

【0192】

10

VI. RASターゲティング化合物のスクリーニング

腫瘍細胞を特異的に殺すことができるがその正常相対細胞、たとえばT29、T29Kt1およびT29Ht1細胞は殺さない化合物をスクリーニングすることができる。細胞を多様な化学ライブラリの化合物と同時に処置することができる。たとえば、T29細胞は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットおよびSV40初期ゲノム領域によって不死化された正常なヒト卵巣表面上皮細胞である（Liu et al., 2004）。T29Kt1およびT29Ht1細胞はそれぞれ、腫瘍形成性H-RasおよびK-Rasを安定にトランスフェクトしたT29細胞から確立された腫瘍に由来し（Liu et al., 2004）、非常に腫瘍形成性である。細胞を播種して、次に試験物質によって処置する。細胞周期の状態、細胞死、または細胞成長の阻害を検出するアッセイを用いることによって致死効果を決定する。50%を超える標的細胞を殺すが非標的細胞を殺さないことが見いだされた化合物を、知見を確認するためにさらなる分析に供する。選択された化合物のさらなる分析には、化合物に対するこれらの細胞の用量反応および化合物の抗腫瘍効果が含まれる。

20

【0193】

VII. 実施例

以下の実施例は、本発明の様々な態様を例示する目的で与えられ、本発明をいかなるようにも制限することを意味しない。当業者は本発明が、目的を行うためならびに言及された結果および長所と共に、本明細書において固有のそれらの目的、結果および長所を得るために十分に適合されることを容易に認識するであろう。本実施例は、現在好ましい態様の代表である本明細書に記述の方法と共に、例示的であり、本発明の範囲に対する制限であると解釈されない。その変更および他の用途が当業者に思い浮かぶであろうが、それらも特許請求の範囲によって定義された本発明の趣旨に含まれる。

30

【0194】

実施例1

オンクラシンファミリー化合物の同定および特徴付け

腫瘍形成性のRas-ターゲティング化合物のライブラリスクリーニング

腫瘍細胞を特異的に殺すことができるがその正常相対細胞を殺さない化合物をスクリーニングするために、T29、T29Kt1およびT29Ht1細胞をChembridge Corporationから得た多様な化学ライブラリにおける化合物と同時に処置した。T29細胞は、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットおよびSV40初期ゲノム領域によって不死化された正常なヒト卵巣表面上皮細胞である（Liu et al., 2004）。T29Ht1およびT29Kt1細胞はそれぞれ、腫瘍形成性H-RasおよびK-Rasを安定にトランスフェクトしたT29細胞から確立された腫瘍に由来し（Liu et al., 2004）、非常に腫瘍形成性である。96ウェルプレートに播種した細胞を、それぞれの化合物によって最終濃度約5 µg/ml（約20~30 µM）で処置した。溶媒（ジメチルスルホキシド、DMSO）を処置した細胞を対照として用いた。処置後4日目にスルホローダミンB（SRB）アッセイにおいて、致死効果を決定した（Rubinstein et al., 1990）。50%を超えるT29Kt1またはT29Ht1細胞を殺すがT29細胞は殺さないことが見いだされた化合物を、SRBアッセイ知見を確認するために、さらに2回の試験に供した。化合物10,000個のスクリーニングにおいて、T29Kt1またはT29Ht1細胞のいずれかにおいて細胞障害性効果を誘導したが、親T29細胞では誘導しなかった化合物6個を同定した。

40

50

【 0 1 9 5 】

T29Kt1またはT29Ht1細胞を選択的に殺した化合物の効果をさらに調べるために、化合物6個に対するこれらの細胞の用量反応を決定した(図1A)。化合物4は、腫瘍選択的細胞障害性を誘導することがこれまでに同定された(Wu et al., 2003; Zhu et al., 2004)。それにもかかわらず、用量反応試験により、オンクラシン-1のみが広範囲の用量でT29Kt1細胞に対して非常に選択的であることが示され、他は、限られた選択性を示したかまたは狭い選択的用量幅を示した(図1B)。本発明者らは、この化合物の抗腫瘍効果の分析に重点を置いた。オンクラシン-1は、T29Kt1細胞細胞において IC_{50} 2.5 μ Mで用量依存的な細胞障害性を誘導した。対照的に、T29またはT29Ht1では、調べた最高濃度である100 μ Mまで検出可能な細胞障害性を示さなかった。経時的アッセイにより、オンクラシン-1がT29Kt1細胞において時間依存的毒性を誘導するが、T29またはT29Ht1細胞では誘導しないことが示された(図1C)。

10

【 0 1 9 6 】

ヒト癌細胞におけるオンクラシンの抗腫瘍活性

本来のヒト癌細胞に及ぼすオンクラシン-1の効果を調べるために、ヒト肺癌細胞8個の細胞生存率を、オンクラシン-1の様々な用量による処置後に評価した。結果は、オンクラシン-1がK-Ras変異体H460細胞(IC_{50} = 0.25 μ M)、H2122(IC_{50} = 0.79)、およびA549細胞(IC_{50} = 1.58 μ M)(FIG. 2)を有効に殺すことができることを示した。これらの3つの細胞株は、K-Ras遺伝子においてそれぞれ、Q61H、G12C、およびG12S変異を含む。オンクラシン-1はまた、Ras遺伝子の状態が不明であるH226B細胞を有効に殺す(IC_{50} = 1.2 μ M)。しかし、オンクラシン-1は野生型Ras遺伝子を有するH322およびH1395細胞に対して最小の効果を有し、変異体N-Ras遺伝子を保有するH1299およびH2087細胞に対して最小の効果を有する。この結果は、オンクラシン-1が変異体K-Ras遺伝子を有する卵巣癌細胞に対して有効であるのみならず、変異体K-Ras遺伝子を有する肺癌細胞に対しても有効であることを示唆している。同様に、変異体K-Ras遺伝子を有するいくつかの膵臓癌細胞株および結腸癌細胞株は、オンクラシン-1処置に対して感受性があることが見いだされた。たとえば、膵臓癌細胞AsPC-1(K-Ras G12D変異)およびCapanc-1(K-Ras G12V変異)におけるオンクラシン-1の IC_{50} はそれぞれ、0.04および0.42 μ Mであった。結腸癌細胞株HCT116(K-RasにおいてG13D変異を有する)に関する IC_{50} は3.1 μ Mである。それらの結果は、オンクラシンがK-Ras変異を有する多様な肺、結腸、および膵臓癌細胞に対して有効であることを示唆した。

20

30

【 0 1 9 7 】

オンクラシンによるアポトーシスの誘導

多くの抗腫瘍治療は、腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することによって作用する(Fisher, 1994; Thompson, 1995)。オンクラシン-1の抗腫瘍活性が細胞増殖の抑制または殺細胞によるものであるか否かを決定するために、T29、T29Kt1、およびH460細胞を、30 μ M(T29またはT29Kt1細胞に関して)または3 μ M(H460細胞に関して)オンクラシン-1による処置後にアネキシンV/ヨウ化プロピジウム(PI)によって染色した。12~24時間後、H460およびT29Kt1細胞の70%~90%がアネキシンV、PI、または双方による染色を示し(図3A)、細胞のほとんどがオンクラシン-1によって殺されることを示した。対照的に、DMSOによって処置した対照H460およびT29Kt1細胞およびオンクラシン-1によって処置したT29細胞の10%未満がアネキシンVまたはPIによって染色された。この結果は、オンクラシン-1がT29Kt1およびH460細胞において殺細胞を有効に誘導できることを示した。ウェスタンブロット分析から、1 μ Mオンクラシン-1によるH460細胞の処置が、カスパーゼ-3およびカスパーゼ-8を有効に活性化することが示され(図3B)、癌細胞におけるその細胞障害性効果はそのアポトーシスの誘導によるものであることを示している。

40

【 0 1 9 8 】

K-Rasノックダウンはオンクラシン誘導性アポトーシスを阻害した

オンクラシン誘導性細胞死におけるK-Ras遺伝子の役割をさらに調べるために、H460細胞を200 pM K-Ras特異的siRNAまたは対照siRNAによって24時間処置した。次に、細胞をDM

50

SOまたは1 μ Mオンクラシン-1によって処置した。さらに12時間後、細胞を蛍光活性化サイトメトリーアッセイによるアポトーシス検出のために採取した。細胞溶解物も同様に用いて、K-Ras遺伝子発現を検出した。結果は、K-Ras特異的siRNAがH460細胞においてK-Ras発現を抑制したが対照siRNAは抑制しなかったことを示した。対照siRNAによって処置した細胞では、オンクラシン-1による処置によって、DMSO細胞と比較してアポトーシス細胞の劇的な増加が起こった。対照的に、K-Ras siRNA処置細胞では、オンクラシン-1による処置は、DMSO処置細胞と類似のレベルのアポトーシスを有する(図4)。この結果は、K-Ras活性が実際にH460細胞においてオンクラシン-1誘導性アポトーシスにとって必要であることを証明した。

【0199】

10

Rasシグナル伝達経路とオンクラシン-誘導性アポトーシスの分子メカニズム

オンクラシン化合物によるアポトーシス誘導の分子メカニズムを研究するために、Bax、Bik、Bcl2、Bcl-XL、Raf-1、B-Raf、Akt、Mst1、ならびに異型タンパク質キナーゼC(aPKC) およびPKC を含む、アポトーシスに関係するおよび/またはRasシグナル伝達経路に関係するいくつかのタンパク質のレベルを決定した。どの分子がオンクラシン処置によって影響を受けるかを調べるために、T29、T29Kt1、およびH460細胞を、T29Kt1およびH460細胞に関する IC_{60} ~ IC_{80} 付近の最適な濃度のオンクラシン-1によって処置した。細胞溶解物を処置後12時間目に回収して、ウェスタンブロット分析に供した。結果から、オンクラシン-1による処置によって、Bax、Bik、Bcl-2、Bcl-XL、Mst1、B-Raf、PKC およびPKC レベルに認識可能な変化が起こらないことが示された。オンクラシン-1による処置によって、H460細胞におけるRaf-1およびAktのダウンレギュレーションが起こったが、T29およびT29K細胞では起こらなかった。興味深いことに、オンクラシン-1による処置によって、オンクラシン-1感受性細胞であるH460およびT29Kの双方においてリン酸化PKC の増加が起こったが、オンクラシン-1抵抗性T29細胞では起こらなかった(図5)。

20

【0200】

PKC の細胞下局在に及ぼす効果

ウェスタンブロット分析は、オンクラシン誘導性アポトーシスのメカニズムに関して明確な情報を提供しなかった。オンクラシン作用の分子メカニズムをさらに研究するために、Rasおよび他のタンパク質の機能がその細胞下局在に直接関連していることから、本発明者らは、Ras-シグナル伝達経路に関係するいくつかの分子の細胞下局在を調べた。この目的に関して、T29Kt1またはH460細胞をカバーガラスに播種してDMSOまたはオンクラシン-1によって12時間処置した。次に、細胞をパラホルムアルデヒドによって固定して、トライトンX-100によって透過性にした後、免疫組織化学試験のために様々な抗体によって染色した。オンクラシン処置は、Raf-1、Akt、PKC、PKC、およびp53の細胞下局在において明白な変化を誘導しなかった。それにもかかわらず、実質的な細胞下局在の変化が、オンクラシン-1処置後にPKC に関して検出された(図6)。H460およびT29Kt1細胞の双方において、PKC およびPKC はいずれも核における細胞膜上で高濃度で細胞において散在性に分布しており、このことは、aPKCが核局在シグナル(NLS)および核輸送シグナル(NES)の双方を含有し、細胞質と核のあいだを規則的に往復して、これは分子内コンフォメーションの変化、リン酸化、または増殖因子による処置によって調節されるというこれまでの報告と一致する(Perander et al., 2001; White et al., 2002; Neri et al., 1999)。PBSまたはDMSOによる処置によって、aPKC細胞下分布に明白な変化が起こらなかった。オンクラシン-1による処置によっても、PKC の細胞下局在に明白な変化は起こらなかった。興味深いことに、オンクラシン-1による処置によって、T29Kt1細胞およびH460細胞の双方において核におけるより大きい巣状塊へのPKC の凝集が起こった。PKC のそのような凝集は、オンクラシン抵抗性のT29およびH1299細胞では観察されなかった。次に、本発明者らは、核におけるPKC の凝集が5-フルオロウラシル(5-FU)およびパクリタキセルのような他の化学療法剤によって誘導されるか否かを試験した。結果は、オンクラシン-1と類似の殺細胞が起こる用量での化学療法剤5-FU、タキソール、または放射線によるT29Kt1の処置が、核におけるPKC の凝集を誘導しないことを示した。PI3K阻害剤であるL

30

40

50

Y294003 64による処置もまた、PKC 凝集を誘導せず、核におけるPKC 凝集が死につつある細胞において起こる一般的な現象ではないことを示唆した。

【0201】

RNAスプライセオソームに及ぼす効果

核におけるこのPKC 凝集物の性質を調べるために、RNAスプライシングおよびスプレオソームのアセンブリにとって必要なタンパク質であるSC35 (Fu et al., 1992; Vellard et al., 1992)、およびDNA修復に関係する相同なDNAリコンビナーゼであるRad51 (Benson et al., 1994; Baumann et al., 1996) に及ぼすオンクラシン-1の効果調べた。RNAプロセッシングおよびDNA修復は、核において実行される2つの重要な機能である。無処置またはDMSO処置細胞において、SC35は、核において散在性に分布する、または顆粒クラスタとして濃縮されたスペックルとして局在するが (Mistele et al., 1997)、Rad51は核内部により均一に分布した。T29Kt1細胞をオンクラシン-1によって処置すると、いくつかの巣状塊へのSC35の凝集が起こり、この現象はPKC に関して認められたものと類似であった (図8)。SC35のこの凝集は、オンクラシン-1による処置の際にオンクラシン抵抗性T29細胞において観察されなかった。一方、放射線 (10 gray) による処置によって、SC35に対して顕著な効果を及ぼすことなく、核においてRad51の小さい巣状塊が形成された。それにもかかわらず、オンクラシン-1による処置は、Rad51に関して明白な効果を有しなかった。PKC およびSC35の免疫組織化学同時染色により、オンクラシン-1の処置時に、PKC およびSC35がメガスプレオソームに同時局在することが示された。この結果は、共焦点顕微鏡における検査によって確認された (図8B)。もう1つのスプレオソームタンパク質、選択的スプライシング因子/スプライシング因子2 (ASF/SF2) に及ぼすオンクラシンの効果を調べた (Krainer et al., 1991)。SC35と同様に、オンクラシン-1による処置は、感受性があるT29Kt1細胞における核内部でPKC と重なり合うASF/SF2凝集を誘導した。しかし、抵抗性のT29細胞では、そのような凝集は観察されない (図8C)。

【0202】

SC35およびASF/SF2のようなスプライシング因子は、哺乳動物細胞の核においてスペックルと呼ばれる区画に高濃度で存在する。電子顕微鏡下で、スペックルは、形態学的に異なる2つの部分からなる：(1) 転写に関して不活性であり、スプライシング因子の貯蔵プールとして役立つ、染色質間顆粒クラスタ (IGC) と呼ばれる、より大きくより濃縮された領域；(2) 新生転写物および活性スプレオソームを含有する、染色質周囲の原線維に対応するIGCの末梢領域でより散在性に分布したスプライシング因子 (Spector et al., 1993; Fakan et al., 1978)。スプレオソームスペックルの形態は、IGCと染色質周囲の原線維のあいだで動的に変化して、これはRNAポリメラーゼII媒介転写によって影響を受けるプロセスである (Misteli et al., 1997)。アンチセンスオリゴまたは抗体 (O'Keefe et al., 1994) によるRNAポリメラーゼII転写 (Camo-Fonseca et al., 1992; Zeng et al., 1997) またはプレ-mRNAスプライシングの阻害によって、スプライシング因子は再分布して好ましくは染色質間顆粒クラスタに局在して、これは形状がより大きくより均一となるか、またはメガスプレオソームスペックルとなる。このように、SC35およびASF/SF2のメガ巣状塊へのオンクラシン媒介凝集は、オンクラシン化合物がRNA転写またはスプライシングのいずれかを抑制する可能性があることを示唆した。併せて、上記の結果は、オンクラシン化合物がDNA損傷物質ではないが、RNAプロセッシング、転写、スプライシング、またはその双方を中断する物質である可能性があることを示している。

【0203】

PKC のノックダウンはオンクラシン媒介アポトーシスおよび細胞障害性を抑制した

オンクラシン媒介細胞障害性におけるPKC の推定される役割を調査するために、オリゴリボヌクレオチドを用いてH460細胞においてPKC をノックダウンした。H460細胞を200 pM PKC siRNAによって24時間処置した後、DMSOまたは1 μMオンクラシンによってさらに12時間処置した。その後、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) によるアポトーシスの分析のために、およびウェスタンブロット分析によるPKC の発現のために細胞を採取した。結果は、siRNAによるPKC のノックダウンも同様に、H460細胞においてオンクラシン誘

導性アポトーシスを劇的に抑制することを示した(図9A)。オンクラシン誘導性細胞障害性における異型PKCの効果をさらに調べるために、本発明者らは、Origene CorporationからPKC およびPKC siRNAをコードするプラスミドを得て、安定なPKC およびPKC ノックダウンT29Kt1細胞を作製した。図6Cにおいて示されるように、T29Kt1細胞におけるPKC の安定なノックダウンにより、核におけるPKC の巣状塊への凝集が消失した。細胞生存率分析により、T29Kt1細胞におけるsiRNA構築物によるPKC の安定なノックダウンによってオンクラシン-1に対するほぼ完全な抵抗性が得られることが示された。PKC ノックダウンT29Kt1細胞におけるIC₅₀は親T29K細胞より100倍高かった。この値は、オンクラシン抵抗性T29細胞の値と同等である。対照的に、同じベクター系によるPKC のノックダウンによって、オンクラシンに対するT29Kt1細胞の感受性は変化しなかった。それらの結果は、オンクラシン媒介細胞障害性がまたRas誘導性腫瘍形成にとって必要であると報告されているPKC 活性にも関連することを示している(Murray et al., 2004)。最近、PKC 遺伝子は卵巣癌の約44%において増幅されること(Zhang et al., 2006)、ならびにPKC の過剰発現が肺癌および卵巣癌患者における生存不良を予測すること(Regala et al., 2005; eder et al., 2005)が見いだされた。このように、PKC の合成致死を有する化合物は、それらの癌の処置にとって有用である可能性がある。

【0204】

オンクラシン-1によるRaf-1発現の抑制

図5に示されるウェスタンブロット分析は、Raf-1発現がオンクラシン-1による処置後のH460細胞においてダウンレギュレートされたことを示している。オンクラシン誘導性アポトーシスにおけるRaf-1の役割を解明するために、本発明者らは、異なる濃度のオンクラシン-1による処置後のH460細胞におけるRaf-1発現を評価した。ウェスタンブロット分析から、オンクラシン-1によるH460細胞の処置によって、Raf-1産生が劇的に低減したことが示された(図10A)。逆転写酵素共役ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析はさらに、Raf-1 mRNAレベルがオンクラシン-1処置後に用量および時間依存的に減少することを示し(図10B)、Raf-1のダウンレギュレーションがRNAレベルで起こることを示唆した。H460細胞におけるRaf-1のこのダウンレギュレーションがRNAプロセシングの中断またはメガスベックルの形成に相関したか否かは明確ではない。しかし、ERKのリン酸化が同じ試料で増加したことから、Raf-1のダウンレギュレーションによって、ERKの抑制は起こらなかった。Raf-1は多様な経路によって抗アポトーシス機能を発揮する。本発明は、Raf-1のダウンレギュレーションが、野生型Raf-1、構成的に活性なRaf-1、およびドミナントネガティブRaf-1を安定にトランスフェクトしたH460細胞によるオンクラシン-1誘導性アポトーシスに關与するか否かを調べ、オンクラシン-1に対する反応に及ぼすその効果を調べた。用いたプラスミド構築物はイントロンを含有しないことから、それらの構築物の発現はRNAスプライシングによって影響を受けない可能性があった。それらの安定にトランスフェクトした細胞に関する試験から、野生型または構成的に活性なRaf-1をトランスフェクトしたH460細胞が親H460細胞よりオンクラシン-1に対する感受性が低いことが示された。しかし、オンクラシン-1に対する抵抗性は、野生型Raf-1をトランスフェクトした細胞より、構成的に活性なRaf-1をトランスフェクトした細胞においてより顕著であった(図10Cおよび10D)。対照的に、ドミナントネガティブ型のRaf-1のトランスフェクションにより、H460細胞はオンクラシン-1に対してより感受性となった。この結果は、Raf-1の細胞状態がオンクラシン化合物に対する反応に劇的に影響を及ぼしうることを証明した。

【0205】

NF- κ Bの抑制

異なる試験において、NF- κ B活性に及ぼすオンクラシン化合物の効果を査定した。核因子- κ B(NF- κ B)/Relは、慢性および急性炎症疾患、自己免疫疾患および様々なタイプの癌において重要な役割を果たす構造的に関連する、進化的に保存された転写因子の群を表す(Karin and Neriah, 2000; Karin and Karin, 2006; Barnes et al., 1997)。非刺激細胞において、ほとんどのNF- κ B/Rel二量体はI κ Bsに結合して、細胞質に保持される。様々な刺激下ではI κ Bsはリン酸化されて、急激に分解されてNF- κ Bを放出した後、核に

10

20

30

40

50

入り転写機能を実行する。炎症疾患および癌の発生におけるその重要な役割のために、NF- κ B経路はそれらの疾患の処置における重要な標的である (Karin et al., 2004)。スリダクおよびアスピリンのようないくつかの非ステロイド性抗炎症薬は、NF- κ B活性化を阻害することができる (Yamamoto et al., 1999; Yin et al., 1998)。オンクラシン化合物は、スリダクと何らかの構造類似性を有することから、T29Kt1細胞における腫瘍壊死因子 (TNF) 媒介NF- κ B活性化に及ぼすオンクラシン-1とスリダクの効果を比較した。T29Kt1細胞に、NF- κ Bコンセンサス配列の4つのタンデムコピーおよびTATA様配列を含有する合成プロモーターからのルシフェラーゼを発現するプラスミドpNF- κ B-Luc (Clontech Corp. San Diego, CAから) をトランスフェクトした。CMV-LacZを発現するプラスミドをトランスフェクションの対照として用いた。トランスフェクションの24時間後、細胞を、10 μ Mオンクラシン-1または10 μ Mスリダクの存在下または非存在下でTNF (1 ng/ml) によって処置した。細胞を処置後8時間目に回収した。ルシフェラーゼ活性を決定して、 β -ガラクトシダーゼ活性によってトランスフェクションに関して標準化した。結果は、オンクラシン-1がTNF誘導性NF- κ B活性化の抑制においてスリダクより活性であることを示した (図11A)。NF- κ B活性化に及ぼすオンクラシン-1の効果をさらに試験するために、H460およびT29Kt1細胞を、1 ng/ml TNFの存在下または非存在下でDMSOまたは様々な濃度のオンクラシン-1によって処置した。20時間後、細胞溶解物を回収して、既に記述されたように (Zhu et al., 2005) 核抽出物および電気泳動移動度シフトアッセイ (EMSA) に供した。結果は1 μ Mまたはそれより上の濃度でオンクラシン-1は、H460およびT29Kt1細胞の双方においてTNF媒介NF- κ B活性化を有効に抑制できることを示した (図11B)。NF- κ Bは癌の発達および進行において重要な役割を果たすのみならず、他の抗癌剤によるアポトーシス誘導に対する細胞の抵抗性においても重要な要因であることから (Karin and Karin, 2006)、NF- κ B活性化に及ぼす抑制効果は、オンクラシン-1が、他の抗癌剤との併用療法にとって、または疼痛および悪液質の待機的処置にとって有用となりうることを示している。

【0206】

実施例2

オンクラシンおよびオンクラシン類似体

本発明者らは、様々な組織または臓器に由来する癌細胞株60個のパネルにおいて試験するために、2つの化合物、オンクラシン-27とオンクラシン-60を米国国立癌センター (NCI) に提出した。NCIにおいて行われた試験から、オンクラシン-27とオンクラシン-60は類似の抗癌スペクトルを有し、白血病、非小細胞肺癌、結腸癌、黒色腫、卵巣癌、腎臓癌および乳癌に由来する多数の癌細胞株において活性であることが示された (表3Aおよび3Bを参照されたい)。たとえば、調べた癌細胞株54個の中で、オンクラシン-60に関する50%成長阻害 (GI_{50}) 濃度の中央値は1.12 μ Mである。細胞株17個 (31%) は、 $GI_{50} < 1 \mu$ Mを有し; 細胞株12個 (22%) は0.1 μ Mより低い GI_{50} を有し; 細胞株5個 (9.3%) は $GI_{50} < 10$ nMを有する。それらの結果は、オンクラシン化合物が高い効力で様々な癌に対して有効となりうることを証明した。NCIの60個の癌細胞株に関する遺伝子変異データに従って (sanger.ac.uk/genetics/CGP/NCI60/)、本発明者らは感受性および抵抗性細胞株における遺伝子変異を比較した。結果は、感受性細胞株の35%がK-Ras変異を有するのに対し、抵抗性細胞株では14%であることを示した。感受性細胞の24%がPI3K触媒サブユニット (PIK3CA) に変異を含むのに対し、抵抗性細胞では8%である。p53、p16、およびPTEN遺伝子において変異を含有する細胞株の百分率は、感受性および抵抗性細胞において同等である (表4Aおよび4B)。このように、それらのデータはまた、オンクラシン化合物がK-RasまたはPI3K変異を含む癌の処置にとって有用となる可能性があることを示唆した。同様に、感受性癌細胞の65%が野生型K-Ras遺伝子を有することも興味深い。それらの細胞がRas活性の増加またはPKC活性の増加を有するか否かはなお明確ではない。それにもかかわらず、結果は、オンクラシン化合物が、たとえそれらがK-Ras遺伝子変異を有していなくてもいくつかの癌に対して有効であることを示している。

【0207】

(表 3 A) オンクラシン60

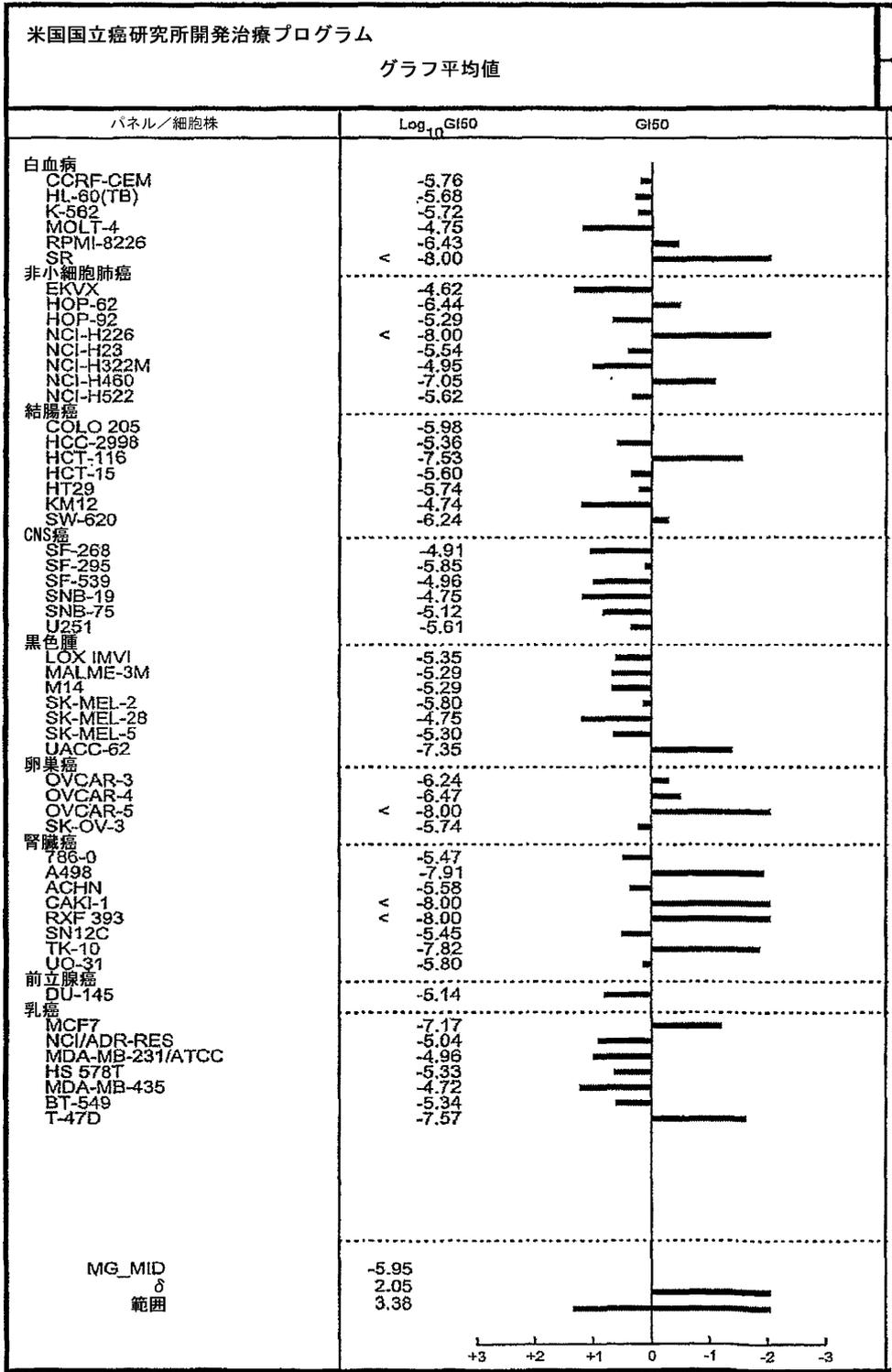
米国国立癌研究所開発治療プログラム インビトロ試験結果															
NSC : D741909 / 1				実験ID : 0606RS75				試験タイプ : 08			単位 : モル濃度				
報告日 : 2006年10月03日				試験日 : 2006年6月26日				QNS :			MC :				
CQMI : FL-K60 (48727)				染色試薬 : SRB Dual-Pass Related				SSPL : OPNH							
		時間		平均吸光度				Log 10濃度			生育%				
パネル/細胞株		Xpro	Ctrl	-0.0	-1.0	-5.0	-10.0	-5.0	-10.0	-15.0	-10.0	-5.0	GI50	TDI	LC50
白血病															
CGRF-CEM															
HL-60(TB)															
K-562															
MOLT-4															
RPMI-8226															
SR															
非小細胞肺癌															
EKVX															
HOP-02															
HOP-92															
H460															
NCI-H23															
NCI-H322M															
NCI-H460															
NCI-H827															
結腸癌															
COLO 205															
HCC-T98R															
HCT-116															
HCT-15															
HT29															
KM12															
SW-620															
CNS癌															
SF-268															
SF-295															
SF-539															
SNB-19															
SNB-75															
U251															
黒色腫															
LOX IMVI															
MALME-3M															
M14															
SK-MEL-2															
SK-MEL-28															
SK-MEL-5															
UACC-62															
卵巣癌															
OVCAR-3															
OVCAR-4															
OVCAR-5															
SK-OV-3															
腎臓癌															
785-D															
A498															
A691															
CAKI-1															
RFX 939															
SN12C															
TK-10															
UO-319															
前立腺癌															
DU-145															
乳癌															
MCF7															
NCIADR-RES															
MDA-MB-231/ATCC															
HS 578T															
MDA-MB-435															
BT-549															
T-47D															

10

20

30

(表 3 B) オンクラシン60



(表 4 A) オンクラシン27

10

20

30

40

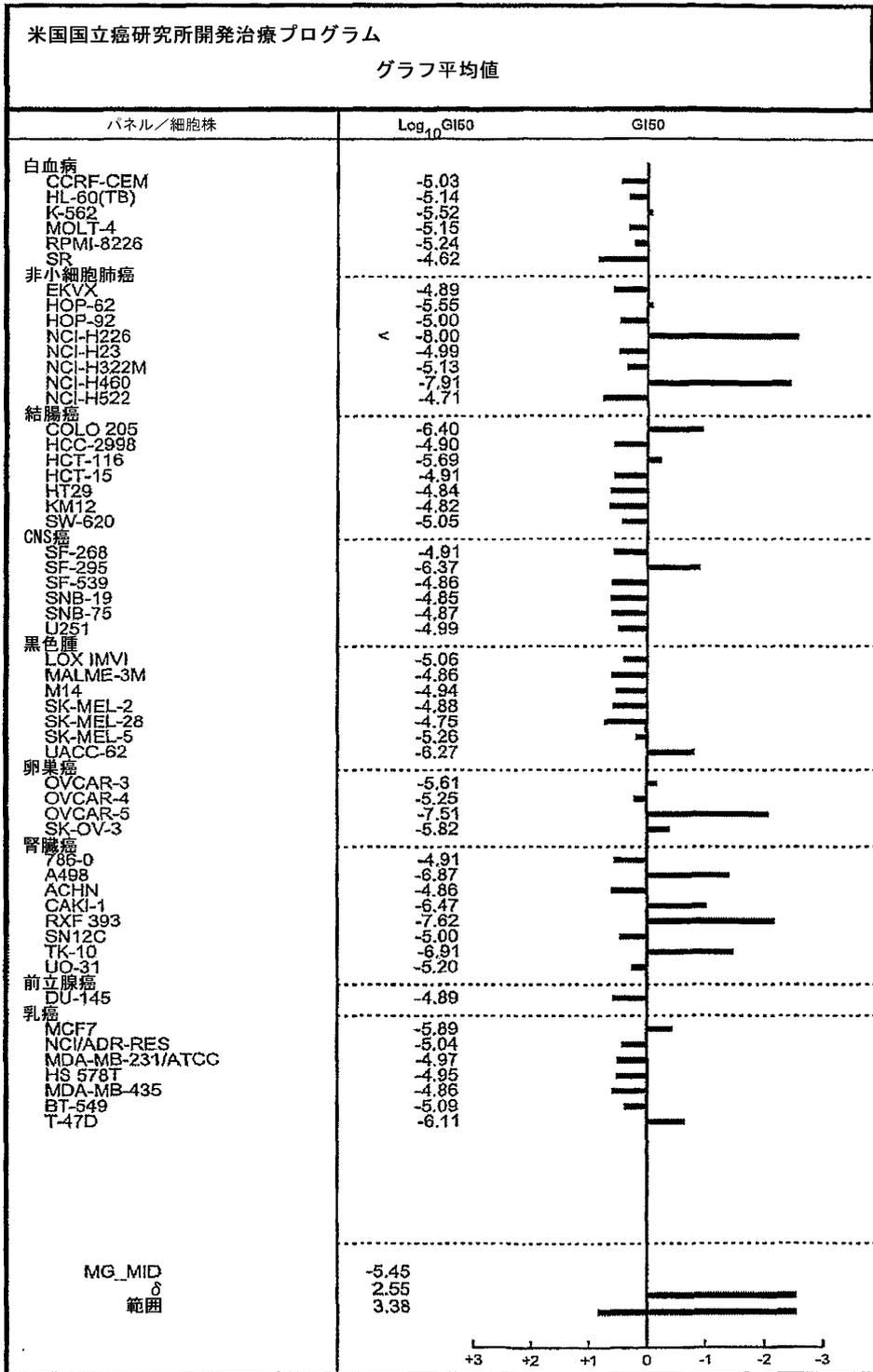
米国国立癌研究所開発治療プログラム インビトロ試験結果															
NSC : D741909 / 1				実験ID : 0606RS75				試験タイプ: 08				単位 : モル濃度			
報告日 : 2006年10月03日				試験日 : 2006年6月26日				QNS :				MC :			
COMI : FL-K60 (48727)				染色試薬 : SRB Dual-Pass Related				SSPL : 0PNH							
時間	平均吸光度			Log 10濃度								G50	TGI	LC50	
	Zeta	Chi	-R.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-3.0	-2.0	-1.0	0				
パネル/細胞株															
白血病															
CCRF-CEM	0.349	1.848	1.946	1.900	1.841	0.187	0.116	100	97	87	-47	-67	1.74E-6	4.31E-5	1.48E-5
HL-60(1B)	0.381	1.182	1.135	1.057	0.916	0.402	0.072	95	85	89	9	-78	2.10E-6	1.29E-5	4.81E-5
K562	0.092	0.841	0.717	0.640	0.456	0.135	0.022	114	100	87	8	-71	1.92E-6	1.28E-5	5.45E-5
MOLT-4	0.471	1.801	1.892	1.827	1.821	1.630	0.177	114	102	109	87	-82	1.77E-5	3.82E-5	8.25E-5
RPMI-8226	0.379	1.513	1.733	1.341	0.849	0.200	0.248	119	85	24	-23	-35	3.72E-7	3.19E-6	1.00E-4
SR	0.575	1.138	0.818	0.429	0.168	0.474	0.187	43	-25	-71	-18	-71	< 1.00E-3	4.26E-8	.
非小細胞肺癌															
EV9X	0.609	1.662	1.611	1.628	1.852	1.525	0.476	103	105	107	84	-22	2.40E-5	8.47E-5	> 1.00E-4
HOP-92	0.494	1.250	1.012	0.925	0.736	0.539	0.200	91	87	38	15	-37	3.60E-7	1.93E-5	> 1.00E-4
HOP-92	0.441	0.825	0.616	0.763	0.786	0.573	0.175	97	84	89	34	-80	6.17E-6	2.30E-6	7.78E-5
NCI-H228	0.478	0.935	0.864	0.376	0.182	0.161	0.168	40	-22	-62	-69	-65	< 1.00E-8	4.46E-8	5.01E-7
NCI-H23	0.380	1.101	1.059	0.879	0.565	0.607	0.141	84	82	87	31	-64	2.98E-6	2.10E-6	7.11E-5
NCI-H2294	0.581	1.147	1.258	1.252	1.358	0.870	0.418	113	117	109	54	-23	1.10E-5	5.05E-5	> 1.00E-4
NCI-H460	0.321	2.282	1.647	1.219	0.698	0.483	0.201	79	48	20	13	-9	8.88E-8	3.78E-5	> 1.00E-4
NCI-H622	0.711	1.541	1.465	1.392	1.344	0.773	0.187	91	82	76	7	-74	2.41E-6	1.24E-6	5.10E-6
結腸癌															
COLO 205	0.188	0.891	0.873	0.838	0.533	0.295	0.047	88	93	51	18	-72	1.05E-6	1.58E-6	5.59E-6
HCC-2998	0.388	1.189	1.162	1.098	0.887	0.740	0.012	85	66	62	43	-97	4.38E-6	2.04E-5	4.62E-5
HCT-116	0.263	2.129	1.626	0.825	0.448	0.286	0.095	68	30	10	2	-84	2.94E-8	1.06E-5	6.08E-5
HCT-15	0.398	1.856	1.336	1.514	1.338	0.597	0.218	83	90	89	21	-31	2.63E-5	2.53E-5	> 1.00E-4
H128	0.266	1.880	1.810	1.533	1.183	0.725	0.090	103	79	58	28	-88	1.83E-6	2.01E-6	8.78E-6
KM12	0.400	1.365	1.441	1.495	1.387	1.238	0.188	108	113	102	87	-54	1.88E-5	4.15E-5	9.44E-5
SW-620	0.216	1.524	1.444	1.298	0.732	0.423	0.116	84	83	39	16	-46	6.71E-7	1.80E-5	> 1.00E-4
CNS癌															
SF-265	0.338	1.237	1.294	1.216	1.179	0.669	0.236	106	88	84	58	-30	1.24E-6	4.58E-5	> 1.00E-4
SF-285	0.711	2.308	2.064	1.884	1.603	0.991	0.608	104	60	85	18	-15	1.43E-6	3.52E-5	> 1.00E-4
SF-539	0.420	1.452	1.634	1.569	1.486	0.887	0.118	108	118	104	55	-73	1.09E-5	2.70E-6	6.70E-5
SNB-19	0.508	1.853	1.682	1.518	1.483	1.287	0.400	103	87	91	74	-24	1.76E-5	5.89E-5	> 1.00E-4
SNB-75	0.640	1.132	1.223	1.227	1.180	0.846	0.171	118	119	112	42	-73	7.64E-6	2.81E-5	6.28E-6
U871	0.384	1.765	1.673	1.686	1.299	0.737	0.239	99	84	68	25	-35	2.46E-6	2.63E-5	> 1.00E-4
黒色腫															
LOX IMVI	0.386	2.687	2.124	2.007	2.024	0.814	0.653	102	85	86	25	-88	4.48E-6	1.68E-5	4.72E-5
MALME-3M	0.517	0.731	0.742	0.780	0.764	0.592	0.217	106	114	88	36	-68	6.17E-6	2.37E-5	8.20E-6
M14	0.424	1.382	1.333	1.327	1.259	0.760	0.090	95	94	87	39	-79	3.18E-5	2.03E-5	5.58E-5
SK-MEL-2	0.787	1.353	1.341	1.285	1.172	0.840	0.287	88	84	67	-20	-64	1.58E-6	5.84E-6	4.82E-5
SK-MEL-28	0.294	0.794	0.794	0.790	0.762	0.590	0.113	83	69	83	82	-45	1.60E-5	4.44E-5	> 1.00E-4
SK-MEL-5	0.295	1.709	1.633	1.602	1.399	0.855	0.010	95	82	74	40	-87	4.97E-5	1.95E-5	4.55E-5
UACC-62	0.727	2.197	1.885	1.238	0.715	0.363	0.041	79	35	-2	-47	-94	4.51E-6	8.97E-7	1.14E-6
卵巣癌															
OVCAR-3	0.391	1.398	1.349	1.164	0.807	0.389	0.158	85	77	41	1	-80	5.69E-7	1.03E-5	6.91E-6
OVCAR-4	0.411	1.180	1.136	0.958	0.568	0.487	0.284	94	71	31	10	-29	3.40E-7	1.80E-5	> 1.00E-4
OVCAR-5	0.387	0.975	0.828	0.828	0.340	0.288	0.185	43	10	-7	-23	-60	< 1.00E-8	3.72E-7	> 1.00E-4
SK-OV-3	0.585	1.118	1.094	1.035	0.904	0.645	0.465	88	85	62	18	-48	1.82E-6	2.56E-5	> 1.00E-4
腎臓癌															
785-O	0.481	1.840	1.923	1.758	1.580	0.870	0.232	89	88	70	27	-52	3.40E-6	2.19E-5	8.47E-5
A498	0.523	1.892	1.394	0.468	0.120	0.049	0.056	61	-66	-87	-95	-94	1.24E-8	8.80E-8	8.80E-8
ACHN	0.488	1.601	1.589	1.516	1.323	0.688	0.345	89	82	75	16	-30	2.60E-6	2.25E-5	> 1.00E-4
CAKI-1	0.428	0.801	0.831	0.416	0.337	0.225	0.433	1	-3	-21	-47	1	< 1.00E-8	.	> 1.00E-4
RXF 983	0.288	0.830	0.980	0.295	0.287	0.188	0.041	31	7	-12	-30	-85	< 1.00E-8	2.44E-7	2.32E-5
SN12C	0.806	2.138	2.103	2.047	1.874	1.234	0.308	97	80	79	27	-68	3.58E-6	1.94E-5	6.72E-5
TK-10	0.827	1.348	1.074	0.807	0.585	0.274	0.514	62	3	-10	-8	-48	1.50E-6	8.84E-8	> 1.00E-4
UD-31	0.507	1.373	1.690	1.200	0.626	0.534	0.282	50	80	60	10	-42	1.58E-6	1.52E-5	> 1.00E-4
前立腺癌															
DU-145	0.211	0.836	0.888	0.888	0.821	0.475	0.198	108	108	88	42	-63	7.25E-6	2.78E-5	9.33E-5
乳癌															
MCF7	0.377	2.090	1.653	1.148	0.551	0.509	0.340	78	45	10	8	-10	6.73E-8	2.75E-5	> 1.00E-4
NCIADR-R55	0.347	1.182	1.191	1.117	1.045	0.744	0.182	103	84	86	48	-45	8.28E-6	3.32E-6	> 1.00E-4
MDA-MB-231(ATCC)	0.552	1.205	1.237	1.332	1.255	0.904	0.280	105	120	109	33	-52	1.10E-5	4.23E-5	> 1.00E-4
HS 578T	0.425	0.996	1.023	0.884	0.945	0.595	0.288	105	88	81	30	-36	4.88E-6	2.75E-5	> 1.00E-4
MDA-MB-436	0.418	1.789	1.811	1.793	1.739	1.635	0.287	102	100	98	81	-20	1.93E-6	5.47E-5	> 1.00E-4
BT-549	0.426	0.784	0.831	0.659	0.782	0.524	0.068	112	118	87	28	-85	4.82E-6	1.73E-5	4.88E-5
T-47D	0.537	1.284	1.078	0.884	0.474	0.453	0.485	73	20	-12	-16	-14	2.67E-8	4.23E-7	> 1.00E-4

(表 4 B) オンクラシン27

10

20

30



10

20

30

【 0 2 0 8 】

40

実施例3

オンクラシン化合物のインビボ活性

本発明者らは、いずれも比較的大規模で入手可能なオンクラシン-1およびオンクラシン-27のようなオンクラシン化合物のインビボ抗腫瘍活性を研究した。H460細胞 1.5×10^6 個を各マウスの背側脇腹に接種することによって、4~6週齢の雌性ヌードマウス (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, MA) において皮下腫瘍を確立した。腫瘍が直径5 mmまで成長した後、マウスを、用量100 mg/kg注射の用量でオンクラシン-1 (10日間) もしくはオンクラシン-27 (3日間、化合物の入手が限られているため) の毎日腹腔内注射によって処置するか (物質を10% DMSO、10% Cremophor EL、および10% エタノールを含有する溶媒0.5 mlに溶解した)、またはそれらに溶媒単独の腹腔内注射を行った。式 $a \times b^2 \times 0$

50

.5を用いて腫瘍の体積を計算し、式中aおよびbはそれぞれ長径および短径を表す (Gu et al., 2000 ; Terashi et al., 2005)。腫瘍が直径1.5 cmまで成長すると、マウスを屠殺した。処置の毒性を評価するために、処置前、および最後の処置の2日後に尾静脈から血液試料を採取して、血清アラニントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼおよびクレアチニンレベルを他所で記述されているように決定した (Gu et al., 2000 ; Terashi et al., 2005)。造血毒性は赤血球、白血球、および血小板を計数することによってモニターした (Gu et al., 2000 ; Terashi et al., 2005)。マウスを屠殺した後、肺、心臓、肝臓、腸管、脾臓、および腎臓を採取して、これらの臓器に及ぼす双方の化合物の毒性効果を試験した。M.D. Anderson癌センターの獣医内科および外科の組織学研究室において組織病理分析を行った。結果は、オンクラシン-1およびオンクラシン-27が腫瘍の成長を有意に抑制することを示した。溶媒と比較すると、オンクラシン-1およびオンクラシン-27は、腫瘍体積の成長をそれぞれ、75.4%および76.3%抑制した (図14A)。2つの物質は、生存期間も延ばした (図14B)。溶媒、オンクラシン-1およびオンクラシン-27を処置したマウスの平均生存期間はそれぞれ、24、32、および34日であった。溶媒、オンクラシン-1、またはオンクラシン-27を処置したマウスの体重に差は観察されなかった。さらに血球計算は群において同じであり、全て正常範囲内であった。血清アラニアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、およびクレアチニンレベルは、投与した処置によらず、調べた全てのマウスにおいて正常範囲内であった (図15)。組織病理学検査はさらに、調べたいかなるマウスまたはいかなる臓器 (すなわち、肺、心臓、胃、小腸、肝臓、脾臓、膵臓、および腎臓) においても有意な病変を認めないことを示し、観察可能な毒性なくインビボ抗腫瘍活性が達成されうること示唆した。データはオンクラシン化合物が癌の処置にとって有用となる可能性があることを証明した。

【 0 2 0 9 】

実施例4

RNAプロセシングの調節

SC35およびASF/SF2の細胞内分布に及ぼす試験は、オンクラシン化合物がスプライシング因子の凝集を誘導できることを示し、このことはオンクラシンがRNAスプライシング、転写、スプライシング、またはその双方に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。オンクラシン媒介抗腫瘍活性におけるRNA転写およびスプライシングの役割をさらに調べるために、RNAポリメラーゼIIの最大のサブユニットのリン酸化およびスプライシング因子を分析した。T29、T29Kt1、およびH460細胞を、T29Kt1およびH460細胞に関する IC_{60} ~ IC_{80} 付近の最適な濃度のオンクラシン-1によって処置した。処置後12時間目に細胞溶解物を採取して、リン酸化RNAポリメラーゼII (H5, Covance Research Products, Inc., Berkeley, CA) およびSRタンパク質 (1H4, Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CAから得た) に対して特異的な抗体によるウェスタンブロット分析に供した。結果は、オンクラシン-1による処置によって、リン酸化RNAポリメラーゼIIおよび特定のSRタンパク質の劇的な抑制が起こることを示し (図16Aを参照されたい)、オンクラシンによる処置が実際にRNAプロセシングを破壊することを証明する。しかし、興味深いことに、HeLa核抽出物 (Promega, Madison, Wisconsin) によるインビトロ転写アッセイから、RNAポリメラーゼII阻害剤、5,6-ジクロロ-1-β-D-リボフラノシルベンズイミダゾール (DRB) (Chodosh et al., 1989 ; Zandomeni et al., 1984) とは異なり、オンクラシン-1がインビトロRNA転写を直接阻害しないことが示され (図16B)、RNAポリメラーゼIIリン酸化に及ぼす効果が間接的となりうること示唆している。

【 0 2 1 0 】

セリン-アルギニンに富む (SR) タンパク質は、スプライシングの操作および調節の双方にとって必須であるSC35およびASF/SF2が含まれる約1ダースのポリペプチドファミリーを構成する。SRタンパク質の特異的リン酸化は、スプライシング事象を調節するための重要な決定因子の1つである。SRタンパク質キナーゼSRPK-1およびSRPK-2 (Wang et al., 1998)、CLK/STY (Colwill et al., 1996)、およびDNAトポイソメラーゼI (Rossi et al.,

1996)を含む、SRタンパク質リン酸化に関与するいくつかのキナーゼが同定され特徴付けがなされている。過剰なおよび過少なリン酸化はいずれもSRタンパク質のスプライシング活性を阻害することが報告された(Prasad et al., 1999)。より最近、SRPK阻害剤は、HIV産生および伝搬を有効に阻害できることが報告された(Fukuhara et al., 2006)。

【0211】

真核細胞RNAポリメラーゼIIの最大のサブユニットのC-末端ドメイン(CTD)は、酵母CTDにおいて26、および哺乳動物CTDにおいて52の配列YSPTSPSの多数のヘプタペプチド反復を含む(Oelgeschlager and Oelgeschlager, 2002)。CTDにおけるセリンおよびトレオニンは多様にリン酸化されて、これによってインビボでのRNAポリメラーゼIIの2つの型、すなわちIIaと呼ばれる過剰リン酸化型とIIoと呼ばれる過少リン酸化型が得られる。3つの主要なサイクリン依存的タンパク質キナーゼであるCDK7/サイクリンH(TFIIH)(Iarochelle et al., 2001; Shiekhattar et al., 1995)、CDK8/サイクリンC(Akoulitchev et al., 2000; Leclerc et al., 2000)およびCDK9/サイクリンT(P-TEFb)(Kim et al., 2002)は、CTDをリン酸化することが知られている。CDKのほかに、DNA依存的タンパク質キナーゼ(DNA-PK)(Peterson et al., 1995)、細胞外調節キナーゼ(ERK)(Bonnet et al., 1999)、およびc-ablチロシンキナーゼ(Baskaran et al., 1996; Baskaran et al., 1993)が含まれる、CTDを効率よくリン酸化する他のタンパク質キナーゼが存在する。CTDのリン酸化は、効率的な転写の伸長にとって、ならびにRNA転写物の効率的なプロセシングのために必要なキャッピング酵素およびスプライシング因子が含まれるmRNAプロセシング因子の動員にとって必要である(McCracken et al., 1997; Misteli et al., 1999; Mortillaro et al., 1996)。Pol IIは、そのCTD非リン酸化型(IIa型)との集合転写複合体に入る。CDK7およびCDK9によるCTDのリン酸化は、Pol IIをIIo型に変換して、効率的なRNA伸長およびプロセシングを可能にする(McCracken et al., 1997; Misteli et al., 1999)。転写サイクルの最後に、ポリメラーゼIIはホスファターゼFCP1によって脱リン酸化される(Kamenski et al., 2004; Achambault et al., 1997)。FCP1は、イニシエーションコンピテントRNAポリメラーゼIIの再生にとって必要であり、同様に前イニシエーション複合体へのその動員の前にポリメラーゼIIのリン酸化によって転写を阻害するCDK8の作用に拮抗する可能性がある(Hengartner et al., 1998)。

【0212】

形質転換細胞が、腫瘍遺伝子誘導性アポトーシスに抵抗するためにはRNAポリメラーゼIIの持続的活性を必要とすることはまた、証拠によって示された(Koumenis et al., 1997)。非形質転換細胞におけるポリメラーゼIIの阻害によって、アポトーシスではなくて成長の停止が起こった。対照的にc-Mycによって細胞を形質転換すると、5,6-ジクロロ-1-Dリボフラノシルベンズイミダゾール(DRB)に対する感受性をが劇的に増加して、RNAポリメラーゼII機能の阻害後のアポトーシスが腫瘍遺伝子の発現によって大きく増強されることを示している。CTDのリン酸化はまた、HIV(Wei et al., 1998)、および肝炎ウイルス(Yamaguchi et al., 2001)の複製においても役割を果たす。最近の研究により、ヒトCDK7およびCDK9が、新生転写物上でTat、ヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)トランス活性化タンパク質によってトランス活性化反応(TAR)と呼ばれるシス作用型の要素を通してHIV-1プロモーターに動員されて、CTDを過剰リン酸化することが示された。Tatは、ウイルスの長末端反復(LTR)におけるTAR RNAステムループに結合して、RNAポリメラーゼII(Pol II)による転写の伸長速度を増加させる(Kim et al., 2002; Cujec et al., 1997)。DRBのようなRNAポリメラーゼII阻害剤(Chodosh et al., 1989; Zandomeni et al., 1984)は、インビトロおよびインビボにおいてHIV LTRからの長い転写物の産生を阻害するが(Critchfield et al., 1997; Marciniak et al., 1991)、基礎転写およびHTV LTRからの短い転写物の産生はCTDとは無関係である。

【0213】

併せて、オンクラシン化合物によるRNAポリメラーゼIIおよびSRタンパク質のリン酸化の阻害は、それらが癌および/またはAIDSおよびD型肝炎のような特定のウイルス疾患の処置にとって有用となりうることを示している。

【 0 2 1 4 】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載の内容に対して補足的な、例示的な技法または他の詳細を提供する程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

米国特許第4,837,028号	
米国特許第4,186,183号	
米国特許第4,217,344号	
米国特許第4,235,871号	
米国特許第4,261,975号	
米国特許第4,485,054号	10
米国特許第4,501,728号	
米国特許第4,603,044号	
米国特許第4,737,323号	
米国特許第4,946,787号	
米国特許第4,957,773号	
米国特許第5,795,587号	
米国特許第5,145,684号	
米国特許第5,399,363号	
米国特許第5,466,468号	
米国特許第5,534,499号	20
米国特許第5,543,158号	
米国特許第5,552,157号	
米国特許第5,565,213号	
米国特許第5,567,434号	
米国特許第5,580,579号	
米国特許第5,641,515号	
米国特許第5,641,515号	
米国特許第5,725,871号	
米国特許第5,738,868号	
米国特許第5,741,516号	30
米国特許第5,756,353号	
米国特許第5,780,045号	
米国特許第5,792,451号	
米国特許第5,804,212号	
米国特許第5,820,873号	
米国特許第5,885,613号	
米国特許第5,976,567号	
米国特許第6,027,726号	
米国特許第6,320,017号	
米国仮出願第60/571,712号	40

- Abra *et al.*, *J. Liposome Res.*, 12:1-3, 2002.
- Akoulitchev *et al.*, *Nature*, 407:102-106, 2000.
- Alessi *et al.*, *Current Biology*, 7:776-789, 1997.
- Algarra *et al.*, *Invasion and Metastasis*, 18: 261-270, 1998.
- Allen and Chonn, *FEBS Lett.*, 223(1):42-46, 1987.
- Allen *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1237(2):99-108, 1995.
- Archambault *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:14300-14305, 1997.
- Barenholz, In: *Physiology of Membrane Fluidity*, Shinitzky (Ed.), CRC Press, FL. (1):131-174, 1984. 10
- Barnes *et al.*, *NE J. Medicine*, 336:1066-1071, 1997.
- Bar-Sagi and Hall, *STKE*, RE13, 2004.
- Baskaran *et al.*, *Molec. Cell. Biol.*, 16:3361-3369, 1996.
- Baskaran *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11167-11171, 1993.
- Baum and Kirschmeier, *Current Oncology Reports*, 5:99-107, 2003.
- Baumann *et al.*, *Cell*, 87:757-766, 1996.
- Benson *et al.*, *EMBO J.*, 13:5764-5771, 1994. 20
- Bergo *et al.*, *J. Clinical Investigation*, 113:539-550, 2004.
- Bernards and Settleman, *Trends in Cell Biology*, 14:377-385, 2004.
- Bernhard *et al.*, *Cancer Res.*, 60: 6597-6600, 2000.
- Berra *et al.*, *Cell*, 74:555-563, 1993.
- Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:421-450, 1981.

- Blume *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 1146(2):157-168, 1993.
- Bonnet *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 27:4399-4404, 1999.
- Bos *et al.*, *Nature*, 327: 293-297, 1987.
- Bos, *Cancer Res.*, 49: 4682-4689, 1989.
- Brignall, *Alternative Medicine Review*, 6: 580-589, 2001.
- Cadwallader *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 14: 4722-4730, 1994.
- Carmo-Fonseca *et al.*, *J. Cell Biology*, 117: 1-14, 1992. 10
- Chandran *et al.*, *Indian J. Exp. Biol.*, 35(8):801-809., 1997.
- Chinni *et al.*, *Oncogene*, 20: 2927-2936, 2001.
- Chodosh *et al.*, *J. Biological Chemistry*, 264: 2250-2257, 1989.
- Coleman *et al.*, *Carcinogenesis*, 15: 1005-1012, 1994.
- Colwill *et al.*, *EMBO J.*, 15: 265-275, 1996.
- Couvreur *et al.*, *FEBS Lett.*, 84(2):323-326, 1977.
- Couvreur, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5(1):1-20, 1988.
- Critchfield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6110-6115, 1997. 20
- Cujec *et al.*, *Genes and Development*, 11: 2645-2657, 1997.
- Davies *et al.*, *Nature*, 417: 949-954, 2002.
- Deamer and Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, 443:629-634, 1976.
- Diaz-Meco *et al.*, *J. Biological Chemistry*, 269: 31706-31710, 1994.
- Eder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 12519-12524, 2005.
- Ehrhardt *et al.*, *Molecular & Cellular Biology*, 24: 6311-6323, 2004.
- Fakan *et al.*, *Experimental Cell Research*, 113: 327-337, 1978. 30
- Fedorov *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 22: 1140-1149, 2002.
- Filmus *et al.*, *Cancer Res.*, 45: 4468-4472, 1985.
- Fiorucci and Hall, *Biochimica et Biophysica Acta*, 950: 81-83, 1988.
- Fisher, *Cell*, 78: 539-42, 1994.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Fu *et al.*, *Science*, 256: 535-538, 1992.
- Fukuhara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 11329-11333, 2006.
- Gabizon and Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(18):6949-6953, 1988. 40
- Galiana *et al.*, *Molecular Carcinogenesis*, 14: 286-293, 1995.

- Garnett and Marais, *Cancer Cell*, 6: 313-319, 2004.
- Gu *et al.*, *Cancer Res.*, 60: 5359-5364, 2000.
- Gu *et al.*, *Gene Ther.*, 9: 30-37, 2002.
- Guerrero *et al.*, *Cancer Res.*, 60: 6750-6756, 2000.
- Hancock *et al.*, *Cell*, 63: 133-139, 1990.
- Hancock, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 373-384, 2003.
- Heath, In: *Methods in Enzymology*, (149):111-119, Academic Press, Inc. 1987.
- Hengartner *et al.*, *Molecular Cell*, 2: 43-53, 1998. 10
- Hirahata *et al.*, *Gan To Kagaku Ryoho.*, 19(10 Suppl):1591-1594, 1992.
- Hoa *et al.*, *Cancer Res.*, 62: 7154-7156, 2002.
- Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 812:55-65, 1985.
- Hope *et al.*, *Chem. Phys. Lip.*, 40:89, 1986.
- Hwang *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 15(3):243-284, 1998.
- James *et al.*, *J. Biological Chemistry*, 270: 6221-6226, 1995.
- James *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4454-4458, 1996.
- Jun *et al.*, Science's *STKE* [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environment, 20
1999: E1, 1999.
- Kaelin, *Nature Reviews Cancer*, 5: 689-698, 2005.
- Kamenski *et al.*, *Molecular Cell*, 15: 399-407, 2004.
- Karin and Ben Neriah, *Annual Review of Immunology*, 18: 621-663, 2000.
- Karin and Karin, *Nature*, 441: 431-436, 2006.
- Karin *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery*. 3: 17-26, 2004.
- Kelloff *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry - Supplement*, 26: 1-28, 1996.
- Kim *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 22: 4622-4637, 2002. 30
- Klibanov *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 672, 1992.
- Koumenis *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 17: 7306-7316, 1997.
- Kraimer *et al.*, *Cell*, 66: 383-394, 1991.
- Larochelle *et al.*, *EMBO Journal*, 20: 3749-3759, 2001.
- Lasic, *Trends Biotechnol.*, 16(7):307-321, 1998.
- Le Good *et al.*, *Science*, 281: 2042-2045, 1998.
- Leclerc *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 7: 505-513, 1996.

- Leonetti *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2448-2451, 1990.
- Liu *et al.*, *Cancer Res.*, 64: 1655-1663, 2004.
- Marciniak *et al.*, *EMBO Journal*, 10: 4189-4196, 1991.
- Mathiowitz *et al.*, *Nature*, 386(6623):410-414, 1997.
- Mayer *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168, 1986.
- McCracken *et al.*, *Nature*, 385: 357-361, 1997.
- Mills *et al.*, *Cancer Res.*, 55: 1444-1447, 1995. 10
- Misteli *et al.*, *Molecular Cell*, 3: 697-705, 1999.
- Misteli *et al.*, *Nature*, 387: 523-527, 1997.
- Morishita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8474, 1993.
- Mortillaro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 8253-8257, 1996.
- Murray *et al.*, *Journal of Cell Biology*, 164: 797-802, 2004.
- Nakanishi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 268: 13-16, 1993.
- Nemunaitis *et al.*, *American Journal of Clinical Oncology*, 20: 527-529, 1997.
- Neri *et al.*, *FASEB Journal*, 13: 2299-2310, 1999. 20
- Oelgeschlager and Oelgeschlager, *Journal of Cellular Physiology*, 190: 160-169, 2002.
- O'Keefe *et al.*, *Journal of Cell Biology*, 124: 249-260, 1994.
- Oltvai *et al.*, *Cell*, 74: 609-19, 1993.
- O'Neill *et al.*, *Science*, 306: 2267-2270, 2004.
- Ostro, In: *Liposomes*, Marcel Dekker, Inc., Chap. 1, NY, 1983.
- Pacold *et al.*, *Cell*, 103: 931-943, 2000.
- Papaldo *et al.*, *Journal of Clinical Oncology*, 21: 3462-3468, 2003. 30
- PCT Appln. WO 91/1 7424
- Pellegata *et al.*, *Cancer Res.*, 54: 1556-1560, 1994.
- Pells *et al.*, *Oncogene*, 15: 1781-1786, 1997.
- Perander *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 276: 13015-13024, 2001.
- Peterson *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 270: 1449-1454, 1995.
- Pinto-alphandary *et al.*, *J. Drug Target*, 3(2):167-169, 1995.
- Prasad *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 19: 6991-7000, 1999.
- Pullen *et al.*, *Science*, 279: 707-710, 1998. 40
- Quintanar-Guerrero *et al.*, *Pharm. Res.*, 15(7):1056-1062, 1998.

- Ravagnan *et al.*, *Oncogene*, 18: 2537-2546, 1999.
- Regala *et al.*, *Cancer Res.*, 65: 8905-8911, 2005.
- Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580, 1990.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 1035-1038 and 1570-1580
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, pp. 1289-1329, 1990.
- Renneisen *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342, 1990.
- Rodriguez-Viciano *et al.*, *Nature*, 370: 527-532, 1994.
- Rossi *et al.*, *Nature*, 381: 80-82, 1996. 10
- Rossmann *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 167-180, 2005.
- Rowley and Van Ness, *Oncogene*, 21: 8769-8775, 2002.
- Rubinstein *et al.*, *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 1113-1118, 1990.
- Sapra and Allen, *Prog. Lipid Res.*, 42(5):439-462, 2003.
- Sebti and Adjei, *Seminars in Oncology*, 31: 28-39, 2004.
- Shiekhhattar *et al.*, *Nature*, 374: 283-287, 1995.
- Spector and Spector, *Annual Review of Cell Biology*, 9: 265-315, 1993.
- Stephens *et al.*, *Science*, 279: 710-714, 1998. 20
- Sun *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 8: 3100-3104, 2002.
- Szoka *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467, 1980.
- Takakura, *Nippon Rinsho.*, 56(3):691-695, 1998.
- Takenaga *et al.*, *J. Control Release*, 52(1-2):81-87, 1998.
- Taylor *et al.*, *Cancer Res.*, 60: 6607-6610, 2000.
- Teraishi *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314: 355-362, 2005.
- Thompson, *Science*, 267: 1456-62, 1995.
- Torchilin *et al.*, In: *Liposomes: A Practical Approach*, Oxford University Press, 2003. 30
- Vellard *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89: 2511-2515, 1992.
- Vivanco and Sawyers, *Nature Reviews, Cancer*. 2: 489-501, 2002.
- Vlahos *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 269: 5241-5248, 1994.
- Vogelstein *et al.*, *New England Journal of Medicine*, 319: 525-532, 1988.
- von Gise *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 21: 2324-2336, 2001.
- Wang *et al.*, *Cell*, 87: 629-638, 1996.
- Wang *et al.*, *Journal of Cell Biology*, 140: 737-750, 1998.

Wei *et al.*, *Cell*, 92: 451-462, 1998.

Wellbrock *et al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 875-885, 2004.

White *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 85: 42-53, 2002.

Whyte *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 272: 14459-14464, 1997.

Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:242-246, 1988.

Winter-Vann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 4336-4341, 2005.

Woodle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(24):11460-11464, 1991.

Wu *et al.*, *Cancer Res.*, 64: 1110-1113, 2003.

Yamaguchi *et al.*, *Science*, 293: 124-127, 2001.

Yamamoto *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 274: 27307-27314, 1999.

Yin *et al.*, *Nature*, 396: 77-80, 1998.

Zalipsky *et al.*, *FEBS Lett.*, 353(1):71-74, 1994.

Zalipsky, *Bioconj. Chem.*, 4(4):296-299, 1993.

Zalipsky, *Bioconj. Chem.*, 6(6):705-708, 1995.

Zambaux *et al.*, *J. Control Release*, 50(1-3):31-40, 1998.

Zandomeni *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 259: 14804-14811, 1984.

Zeng *et al.*, *EMBO Journal*, 16: 1401-1412, 1997.

Zhang *et al.*, *Cancer Res.*, 66: 4627-4635, 2006.

Zhang *et al.*, *Science*, 290: 989-992, 2000.

Zhu *et al.*, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 4: 1428-1435, 2003.

Zhu *et al.*, *Oncogene*, 23: 4984-4992, 2004.

Zhu *et al.*, *Oncogene*, 24: 4993-4999, 2005.

zur Muhlen *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45(2):149-155, 1998.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 1 5 】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示した特定の態様の詳細な説明と共に、これらの図面の1つまたは複数を参照することによってよりよく理解されうる。

【図1】(図1A)用量反応に関して試験した化合物6個の化学構造。(図1B) T29、T29Ht1、およびT29Kt1細胞に及ぼすいくつかの化合物の用量効果。細胞を、Aにおいて記載される化合物の様々な濃度(0.1 μM ~ 33 μM)によって処置した。細胞生存率はSRBアッセイによって決定した。対照細胞を溶媒(DMSO)によって処置して、その値を1に設定した。(図1C) T29、T29Kt1およびT29Ht1細胞の、濃度33 μMの化合物1による処置後の時間経過。SRBアッセイによって細胞生存率を決定した。示した値は、1試料あたり4個ずつ行われた2回のアッセイの平均値 ± SDである。

【図2】ヒト肺癌細胞に及ぼすオンクラシン-1の効果。(図2A)腫瘍形成性Ras遺伝子の様々な状態を有するヒト肺癌細胞株を、様々な濃度のオンクラシン1によって処置した。示した値は1試料あたり4個ずつ行われた2回のアッセイの平均値 ± SDである。(図2B) Ras遺伝子変異の状態。

【図3】(図3A)オンクラシン-1によるアポトーシスの誘導。T29、T29Kt1およびH460細胞を、30 μM (T29またはT29Kt1に関して)または3 μM (H460に関して)のオンクラシン-1によって処置した後、12または24時間後に回収した。細胞死は、PIおよびアネキシンV染

10

20

30

40

50

色によって検出した。H460およびT29Kt1細胞の70%~90%が、アネキシンV、PI、またはその双方によって染色された。(図3B)ウェスタンブロット分析。図のように、様々な時間、1 μ Mオンクラシン-1によって処置したH460細胞。カスパーゼ-3およびカスパーゼ-8の活性化は、処置後12~24時間でウェスタンブロット分析によって検出した。

【図4】K-Rasノックダウンは、オンクラシン媒介アポトーシスを阻害した。(図4A)ヒト肺癌細胞H460を対照siRNAまたはK-Ras siRNAのいずれかによって処置した後、DMSOまたはオンクラシン-1(1 μ M)によって12時間処置した。オンクラシン誘導性アポトーシス細胞をFACS分析によって決定して、DMSO処置細胞に対して標準化した。値は2回の実験のそれぞれを表す。(図4B)siRNA媒介K-Rasノックダウンのウェスタンブロット分析。

【図5】耐性または感受性細胞における分子の変化。T29、T29Kt1、およびH460細胞を10 μ M(T29およびT29Kt1に関して)または1 μ M(H460に関して)オンクラシン-1によって処置した。12時間後、細胞を、パネルの右に示される分子に関するウェスタンブロット分析のために回収した。DMSOを処置した細胞を対照(C)として用いた。T、オンクラシン-1によって処置した細胞。

【図6】PKC(PKCI)のオンクラシン誘導性凝集。細胞をDMSOまたはオンクラシン-1によって12時間処置して、H460(図6A)およびT29Kt1(図6B)細胞におけるPKCおよびPKCを試験するために免疫組織化学染色を行った。(図6C)T29Kt1、T29、およびT29Kt1ノックダウン細胞におけるPKCIの比較。

【図7】異なる抗癌剤によって処置したT29Kt1細胞におけるPKCの細胞下局在。

【図8】オンクラシン-1によるメガ-スプライセオソームスペックルの誘導。(図8A)T29Kt1細胞をオンクラシン-1または放射線によって処置して、SC35およびRad51の細胞下局在を抗体染色によって決定した。(図8B)通常の蛍光顕微鏡および(図8C)共焦点顕微鏡下で決定されたPKCおよびSC35の同時局在。(図8D)T29Kt1およびT29細胞をDMSOまたはオンクラシン-1によって処置した後、ASF/SF2抗体によって染色した。

【図9】オンクラシン誘導性細胞障害性におけるPKCの効果。(図9A)H460細胞におけるPKCの一過性のノックダウン。(図9B)T29Kt1細胞におけるPKCの安定なノックダウン。PKC siRNAベクターを対照として用いた。アポトーシス誘導および細胞生存率を、オンクラシン-1処置を行った場合のノックダウンおよび対照細胞において比較した。

【図10】Raf-1発現に及ぼすオンクラシン-1の効果。(図10A)H460細胞を様々な濃度のオンクラシン-1によって処置して、ウェスタンブロット分析のために24時間後に回収した。(図10B)逆転写に基づくポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)アッセイ。図のように、様々な時間または様々な濃度で1 μ Mオンクラシン-1によって24時間処置したH460細胞。(+)、(-)、陽性および陰性対照)。(図10C)ウェスタンブロット分析は、DMSOまたはオンクラシン-1(10 μ M)による処置後24時間で細胞におけるRaf-1発現が変化したことを示した。(図10D)Raf-1プラスミドをトランスフェクトした安定な細胞株に及ぼすオンクラシン-1の用量効果。親H460細胞および野生型Raf-1(Raf-1)、構成的Raf-1(Raf-1 C)、またはドミナントネガティブRaf-1(Raf-1/DN)をトランスフェクトしたH460細胞を、オンクラシン-1の様々な濃度によって処置して、細胞生存率をSRBアッセイによって決定した。

【図11】TNF α 誘導性NF κ B活性化の抑制。NK β レポータープラスミドアッセイ。T29K細胞にpNF κ B-LucおよびpCMV-lacZをトランスフェクトした。12時間後、細胞を、オンクラシン-1(10 μ M)(図11A)またはスリンダク(10 μ M)(図11B)の存在下または非存在下でTNF α (1 ng/ml)によって処置した。処置後8時間目にルシフェラーゼ活性を決定して、-gal活性によって標準化した。(図11C)図のように、H460およびT29K細胞を、TNF α (1 ng/ml)の存在下または非存在下でDMSOまたは異なる濃度のオンクラシン-1によって12時間処置した。NF κ B活性をEMSAによって分析した。

【図12】オンクラシン類似体の合成経路。化合物構築ブロックA(インドールを含む)およびB(ハロゲン化ベンジル)を、触媒としてNaHを用いて反応させた。

【図13】(図13A)合成および精製後のオンクラシン-27のHPLC-MS分析。(図13B)オンクラシン-27のNMR試験。

【図14】インビボでの抗腫瘍効果。(図14A)インビボでのH460腫瘍成長の抑制。H460

10

20

30

40

50

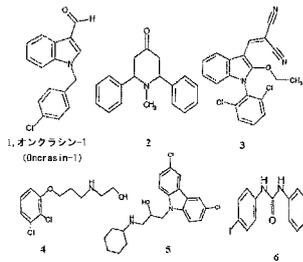
細胞に由来する皮下腫瘍を有するマウスを、図のようにオンクラシン-1またはオンクラシン-27によって処置した。腫瘍の体積を処置後経時的にモニターした。値は、1群あたりマウス5匹からのデータの平均値 ± SDを表す。オンクラシン-1またはオンクラシン-27単独を処置したマウスにおける平均腫瘍体積は、溶媒処置マウスの体積とは有意に異なった ($p < 0.05$)。 (図14B) 平均生存日数。溶媒、オンクラシン-1、およびオンクラシン-27を処置したマウスにおける平均生存日数はそれぞれ、24、32、および34日であった。

【図15】インビボ毒性アッセイ。最後の処置後2日目に図14に記述される動物から血液を採取して、(図15B) 血清ALT、AST、および(図15A) クレアチニンレベルを決定した。値は動物3匹の平均値を表す。

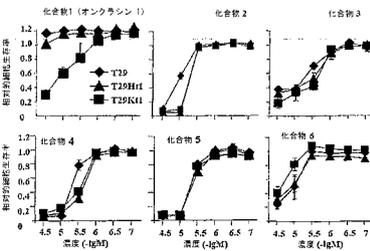
【図16】RNAプロセッシング機構に及ぼす効果。(図16A) T29、T29Kt1、およびH460細胞を10 μMオンクラシン-1 (T29およびT29Kt1) または1 μMオンクラシン-1 (H460) によって処置した。12時間後、細胞をRNAポリメラーゼIIおよびSRタンパク質のリン酸化に関するウェスタンブロット分析のために回収した。DMSOを処置した細胞を対照 (C) として用いた。(T) オンクラシン-1を処置した細胞。矢印はポリメラーゼII (pPolII) およびSRタンパク質 (pSR) のリン酸化の低減を示す。(図16B) HeLa細胞核抽出物 (Promega) によるインビトロ転写アッセイ。アッセイは、製造元の説明書に従って行った。用いた濃度はパネルの上部に示される。DRBは転写阻害のための陽性対照として用いた。

10

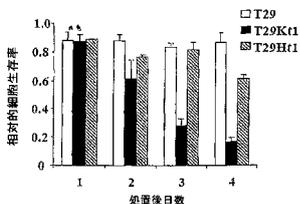
【図1A】



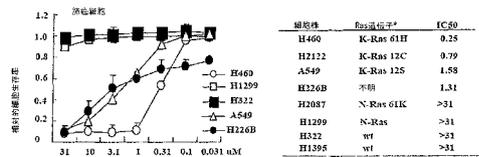
【図1B】



【図1C】



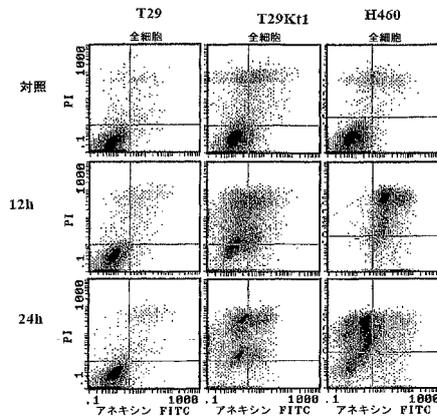
【図2】



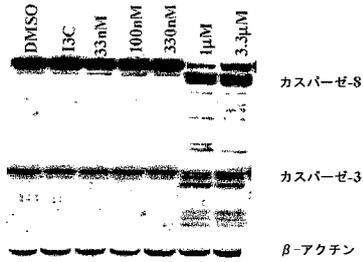
* 公表されたデータおよびGenBankデータベース (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/>) に基づく

A B

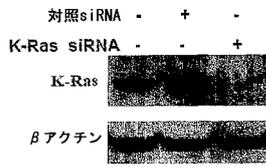
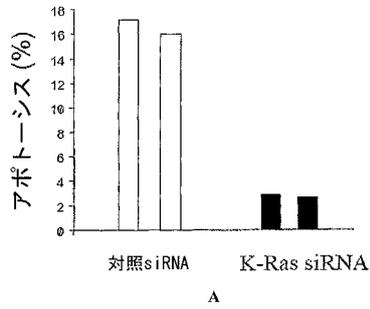
【図3A】



【 図 3 B 】

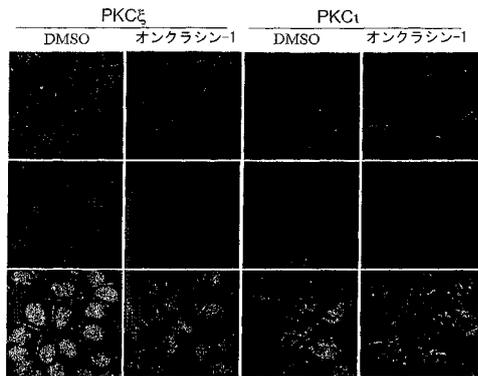


【 図 4 】

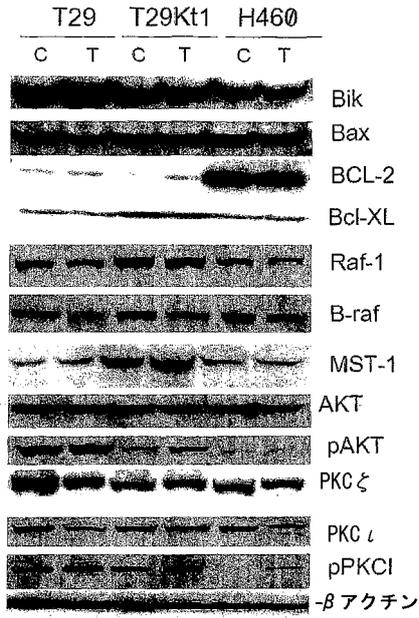


【 図 6 A 】

H460細胞におけるaPKC

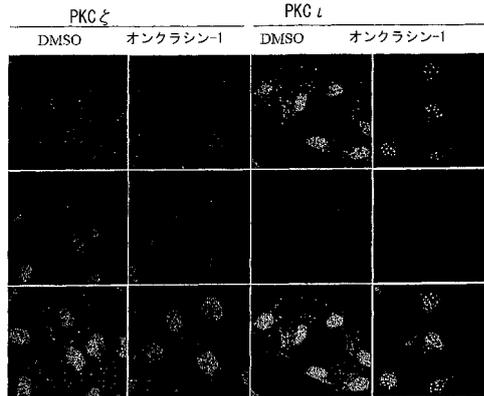


【 図 5 】

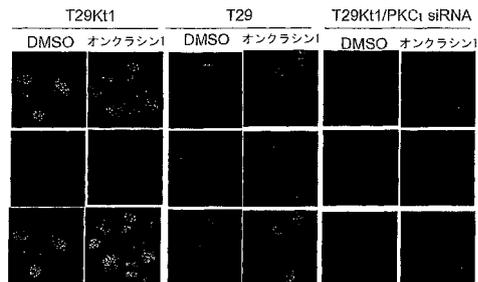


【 図 6 B 】

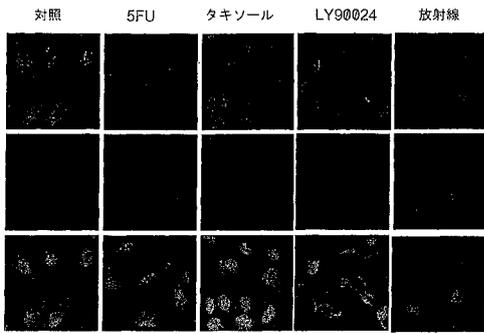
T29Kt1細胞におけるaPKC



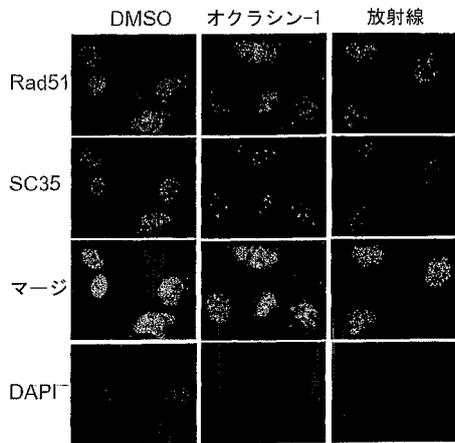
【 図 6 C 】



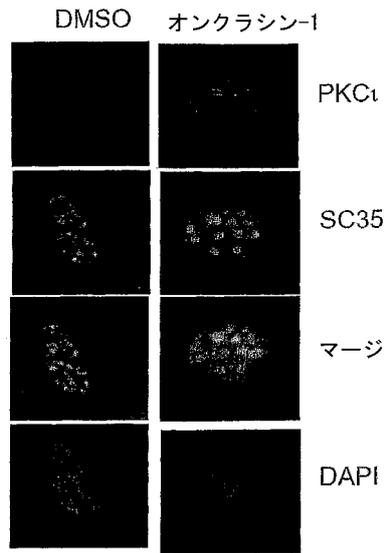
【図 7】



【図 8 A】



【図 8 B】

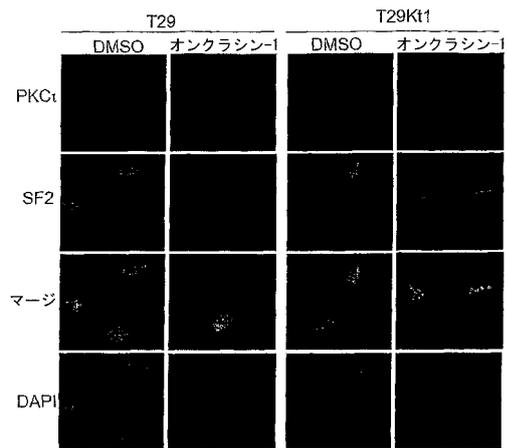


【図 8 C】

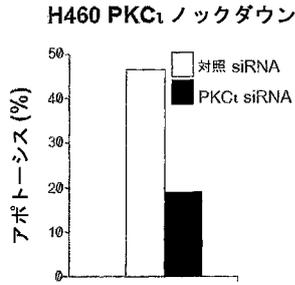
共焦点検査



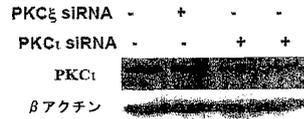
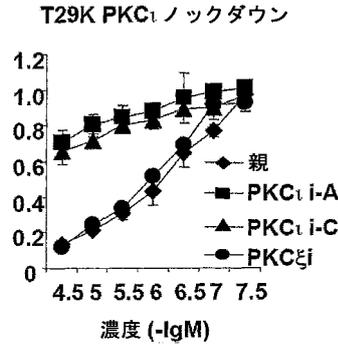
【図 8 D】



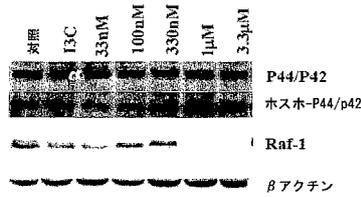
【 図 9 A 】



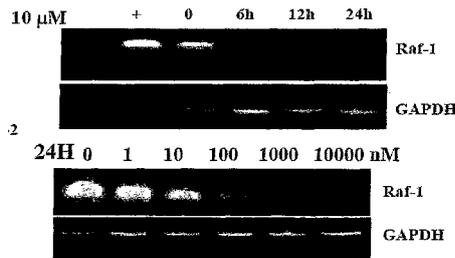
【 図 9 B 】



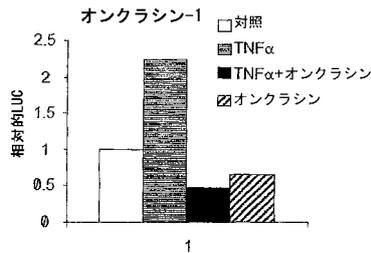
【 図 10 A 】



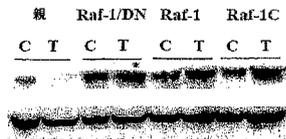
【 図 10 B 】



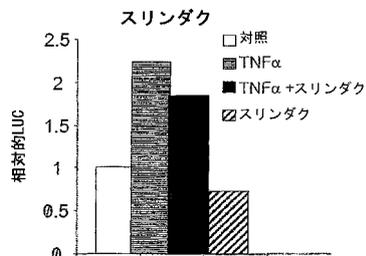
【 図 11 A 】



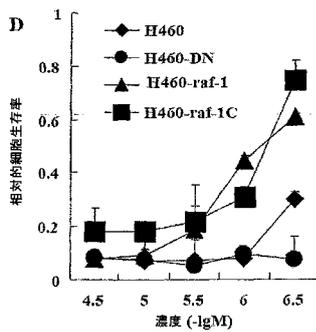
【 図 10 C 】



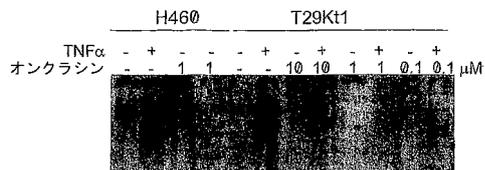
【 図 11 B 】



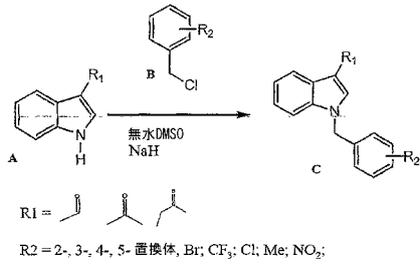
【 図 10 D 】



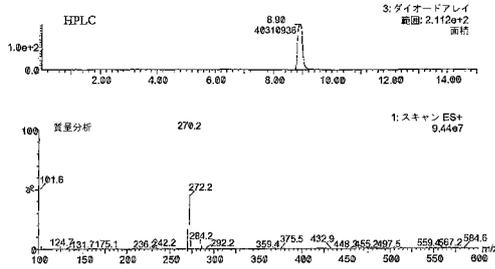
【 図 11 C 】



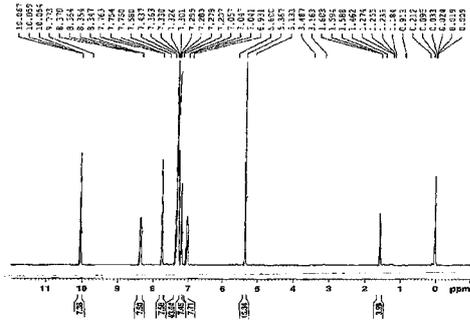
【 図 1 2 】



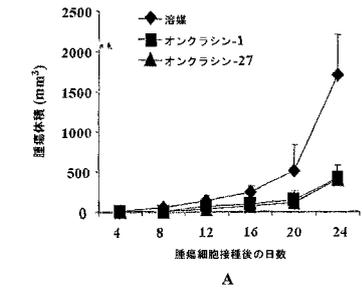
【 図 1 3 A 】



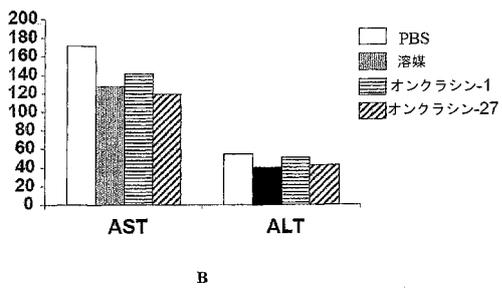
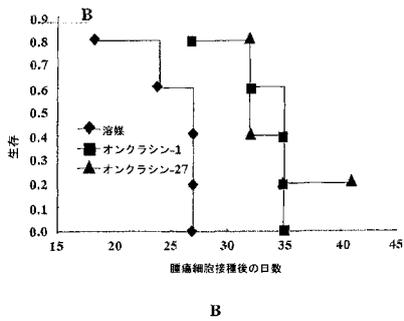
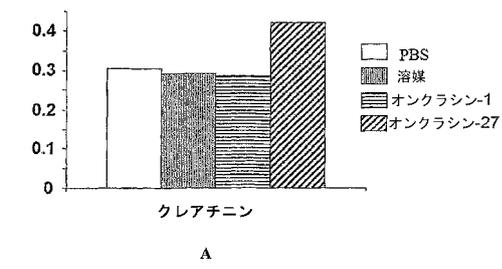
【 図 1 3 B 】



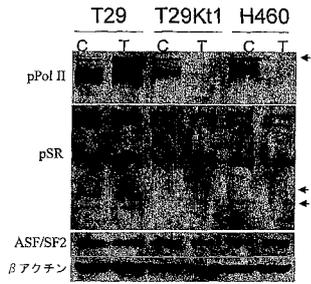
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 16 】



A

DRB	100	-	-	-	-	μ M
オンクラシン	-	-	1000	100	10	μ M



B

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 0 7 D 209/12 (2006.01) C 0 7 D 209/12
 C 0 7 D 417/06 (2006.01) C 0 7 D 417/06
- (74)代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (72)発明者 ファンゲ ビンリン
 アメリカ合衆国 テキサス州 ペアランド サンダウン ドライブ 9 4 1 2
- (72)発明者 リュー ジンソン
 アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ラスキン ストリート 4 1 4 4
- (72)発明者 クオ ウェイ
 アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ケンブリッジ 7 9 0 0 アpartment 2 4 -
 2 エー
- (72)発明者 ウー シューホン
 アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ペン ヒル レーン 1 5 2 1 5

審査官 關 政立

- (56)参考文献 特表2005-504789(JP,A)
 Arch Pharm, 1984年, Vol.317, pp.847-51

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
 A 6 1 P 3 1 / 1 2
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 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)