(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3583776号
(P3583776)
(45)発行日　平成16年11月4日(2004.11.4)　(24)登録日　平成16年8月6日(2004.8.6)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
A61K 31/56	A61K 31/56	
A61P 35/00	A61P 35/00	
C07J 51/00	C07J 51/00	
C12N 9/16	C12N 9/16	Z

請求項の数 11　(全 17 頁)

(21)出願番号	特願平5-505031
(86)(22)出願日	平成4年8月28日(1992.8.28)
(65)公表番号	特表平7-501514
(43)公表日	平成7年2月16日(1995.2.16)
(86)国際出願番号	PCT/GB1992/001586
(87)国際公開番号	WO1993/005063
(87)国際公開日	平成5年3月18日(1993.3.18)
審査請求日	平成11年7月13日(1999.7.13)
審判番号	不服2002-17439(P2002-17439/J1)
審判請求日	平成14年9月9日(2002.9.9)
(31)優先権主張番号	9118465,5
(32)優先日	平成3年8月29日(1991.8.29)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　500232695
ステリックス　リミテッド
イギリス国　オーエックス４　４ジーエイ　オックスフォード，　ザ　オックスフォード　サイエンス　パーク，　ロバート　ロビンソン　アベニュー　（番地なし），　ザ　マグダレン　センター
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

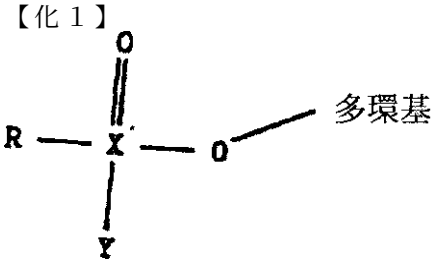
(54)【発明の名称】ステロイドスルファターゼインヒビター

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ステロイドスルファターゼ活性を阻害するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、下式のスルホネートエステルまたはホスホネートエステルを含み：

【化１】



ここで、Ｒは、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、およびアリールから選択され；

ＸはＰまたはＳであり；

Ｙは、ＸがＰであるときOHであり、そしてＸがＳであるときＯであり；そして

－Ｏ－多環が多環式アルコールの残基であり；ここで、該多環状アルコールは、ステロールまたは置換ステロールであり；ここで、該多環式アルコールは、

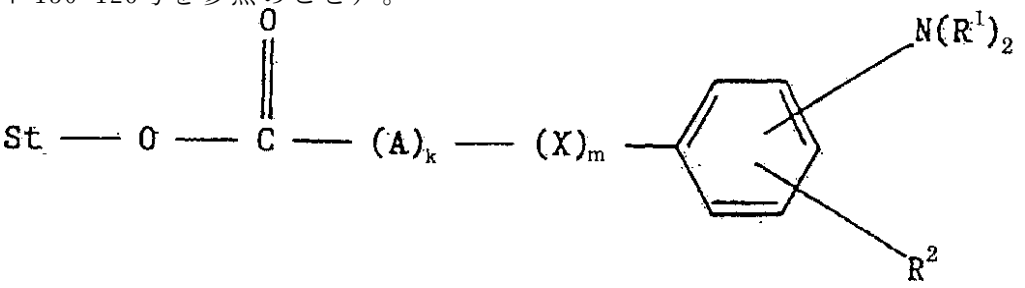
該多環式アルコール上の該スルホネート基またはホスホネート基が、スルフェート多環式アルコールを形成するためにスルフェート基と置換され、そしてpH7.4および37℃にてステロイドスルファターゼ酵素（E.C. 3.1.6.2）とインキュベートされた場合、50μＭ未満

のK_m値を提供する、
薬学的組成物。
【請求項２】
前記ステロールが３－ステロールまたは置換３－ステロールである、請求項１に記載の薬学的組成物。
【請求項３】
前記ステロールが、エストロン、デヒドロエピアンドロステロン、置換エストロン、および置換デヒドロエピアンドロステロンからなる群より選択される、請求項２に記載の薬学的組成物。
【請求項４】
前記Ｒが、Ｈ、または10炭素原子までを含む、アルキル、シクロアルキルもしくはアリールである、請求項１～３のいずれか１つに記載の薬学的組成物。
【請求項５】
前記Ｒが、Ｈ、C_1－C_5アルキル、フェニルまたはトリルである、請求項４に記載の薬学的組成物。
【請求項６】
前記Ｒが、ＨまたはメチルでＨる、請求項５に記載の薬学的組成物。
【請求項７】
前記ステロールが１つ以上のアルキルまたはアルコキシで置換されている、請求項１～６のいずれか１項に記載の薬学的組成物。
【請求項８】
前記アルキルは、メチルまたはエチルである、請求項７に記載の薬学的組成物。
【請求項９】
前記アルコキシはメトキシである、請求項７に記載の薬学的組成物。
【請求項１０】
前記エステルがエストロン－３－スルホネート、エストロン－３－メチルスルホネート、エストロン－３－エチルスルホネート、エストロン－３－ｎ－ブチルスルホネート、エストロン－３－ｐ－トリルスルホネート、エストロン－３－カムホリルスルホネート、エストロン－３－ホスホネート、エストロン－３－フェニルホスホネート、エストロン－３－メチルホスホネート、またはエストロン－３－エチルホスホネートである請求項１～９のいずれか１つに記載の薬学的組成物。
【請求項１１】
前記エステルは、２－メトキシエストロン、２－メトキシ－17β－エストラジオールおよび２－メトキシエストリオールのいずれか１つである、請求項１～９のいずれか１つに記載の薬学的組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、ステロイドスルファターゼインヒビターとして用いられる新規化合物、および該化合物を含有する薬学的組成物に関する。
背景および先行技術
ステロイド核の３－位にスルフェート基を有するステロイド前駆体、またはプロホルモン（本明細書中で以後ステロイドスルフェートという）は、ヒト体内におけるステロイド代謝の中間体として重要な役割を果たすことが知られている。例えば、エストロンスルフェートおよびデヒドロエピアンドロステロン（DHA）スルフェートは、体内においてエストロンおよびエストラジオールのようなエストロゲンの生成における中間体として重要な役割を果たすことが知られている。例えば、エストロンスルフェートは、特に、閉経後の女性に特有な主要な循環エストロゲン前駆体の一つを表し、そして乳房の腫瘍におけるエストロンスルファターゼ活性は、エストロゲン形成に関わる他の酵素より100～1000倍大きい（Jamesら,Steroids,50,269－279（1987））。
これだけでなく、エストロンおよびエストラジオールのようなエストロゲン、特にそれら

の過剰生成は、乳ガンのような悪性状態に強く関係しており（Breast Cancer,Treatment and Prognosis:R.A.Stoll編,pp.156－172,Blackwell Scientific Publications（1986）を参照のこと）、そしてエストロゲン生成のコントロールは、多くの抗癌治療、例えば、化学療法および手術（例えば、卵巣摘出および副腎摘出）の特定の標的である。内分泌治療に関心が持たれる限りは、これまでの努力は、アロマターゼインヒビターに集中する傾向があった。すなわち、このアロマターゼインヒビターはアロマターゼ活性を阻害する化合物であり、この活性は、添付のエストロゲン代謝経路図（図１）に示すように、アンドロゲンの変換、例えば、アンドロステンジオンおよびテストステロンからエストロンおよびエストラジオールへのそれぞれの変換に関わっている。

最近出版された国際出願第WO91/13083号では、エストロゲン代謝経路で異なる箇所、というよりはむしろ、２つの異なる箇所を標的とすることが提案されてきた。すなわち、ステロイドスルファターゼ活性により、そしてステロイドスルファターゼインヒビターとしての３－モノアルキルチオホスホネート、より詳細には、エストロン－３－モノメチルチオホスホネートを用いて、DHAスルフェートおよびエストロンスルフェートのそれぞれDHAおよびエストロンへの変換の箇所を標的とすることが提案されてきた。

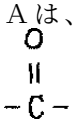
次式のステロイドエノールエステルもまた、抗腫瘍剤として提案されている（米国特許第4 150 126号を参照のこと）。



ここで、R^1は、（C_2－C_4）β－またはγ－ハロアルキルであり；

R^2は、H、低級アルキル、低級アルコキシまたはハロゲンであり；

Aは、



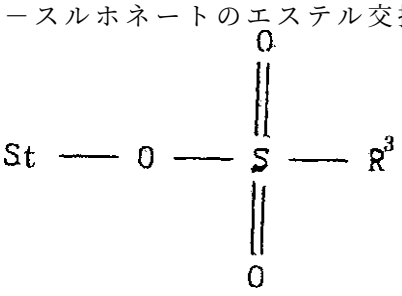
とXの間にC_1－C_4炭化水素鎖を提供し；

Xは、OまたはSであり；

kおよびm＝０または１、ただしm＝１のとき、k＝１であり；そして

Stは、エステル基が３－位に結合し、そしてこのステロイドA環に二重結合が隣接するステロイド骨格である。

しかしながら、これらの化合物の抗腫瘍活性に対して、メカニズムの説明は行われていない。この開示では、そのようなステロイドおよびエステルは、特に次式のステロイド－３－スルホネートのエステル交換により調製され得ることが簡単に述べられている。



ここで、Stは、上記で定義されたステロイド核であり、そしてR^3は、クロロまたはフルオロ置換基を必要に応じて含有する低級アルキル、またはクロロ、フルオロまたは低級アルキルで必要に応じて置換されるフェニルである。しかしながら、本特許に記載のステロイドエノールエステルの調製において、そのようなステロイド－３－スルホネートを中間体

として使用する例は全く提供されておらず、さらに、そのようなステロイド－３－スルホネート自身がステロイドスルファターゼ活性を阻害し得、それゆえエストロゲン依存性腫瘍の治療において潜在的に価値があることは、何の示唆もされていない。

本発明の目的

本発明の第１の目的は、インビトロおよびインビボでステロイドスルファターゼ活性を阻害し得る新規化合物を提供することである。

本発明の第２の目的は、インビトロおよびインビボの両方でステロイドスルファターゼインヒビターとして改善された活性を有する新規化合物を提供することである。

本発明の第３の目的は、エステロゲン依存性腫瘍の治療において有効な薬学的組成物を提供することである。

本発明の第４の目的は、乳ガンの治療において有効な薬学的組成物を提供することである。

本発明の第５の目的は、哺乳動物、特にヒトのエステロゲン依存性腫瘍を治療する方法を提供することである。

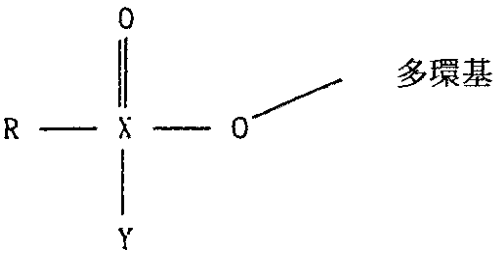
本発明の第６の目的は、哺乳動物、特に女性の乳ガンを治療する方法を提供することである。

発明の要旨

本発明は、ステロイドスルファターゼ阻害活性を有する新規化合物の発見に基づいている。これらの化合物は、多環式アルコールのスルホネートエステルおよびホスホネートエステルであり、多環式アルコールのスルフェートはステロイドスルファターゼ活性を有する酵素の基質である。

広く言えば、本発明の新規化合物は、式（Ｉ）の化合物およびそれらの薬学的に受容可能な塩であり：

式 (I)

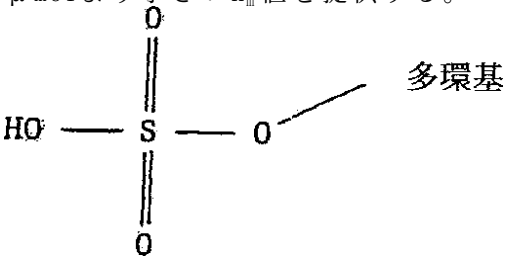


ここで、Ｒは、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アルケニルおよびアリールから選択され；

Ｘは、ＰまたはＳであり；

ＸがＰであるとき、Ｙは－ＯＨであり、そしてＸがＳであるとき、Ｙは＝Ｏである；そしてＯ－多環基は多環式アルコールの残基を表し、そのスルフェートは、ステロイドスルファターゼ活性をする酵素の基質である。

本明細書中で用いられるとき、そのスルフェートがステロイドスルファターゼ活性を有する酵素の基質である多環式アルコールとは、そのスルフェートが、以下のものである多環式アルコールに言及している。すなわち、そのスルフェートは、次式の誘導体であり、ステロイドスルファターゼEC3.1.6.2とpH7.4および37℃でインキュベートされるときに、50μmolより小さいK_m値を提供する。



【図面の簡単な説明】

図１は、代謝経路、酵素およびインビボでのエストラジオールの生成に関連するステロイド中間体を示す図式化した図である。

ステロイドスルファターゼインヒビターとしての本化合物の活性は添付の図面に示されている：

図２は、インビトロでヒトMCF－７細胞のステロイドスルファターゼ活性に関するエストロン－３－ホスホネートの阻害効果を示すヒストグラムである。

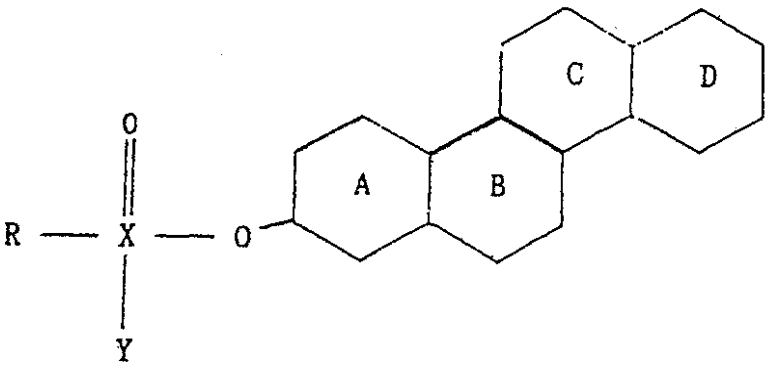
図３は、インビトロでヒトMCF－７細胞のステロイドスルファターゼ活性に関するエストロン－３－スルホネートの阻害効果を示すヒストグラムである。

詳細な説明

１つの局面では、本発明は、新規化合物として、多環式アルコールのスルホン酸エステルおよびホスホン酸エステルを提供し、その多環式アルコールは、そのスルフェートが、既に与えられた定義に従って、ステロイドスルファターゼ活性を有する酵素の基質である多環式アルコールである。これらの化合物は上記で示された式Ｉである。

好ましくは、この多環基は、最大約40個の炭素原子、より通常には約30個以下の炭素原子を含む全ての置換基を含有する。好ましい多環式化合物は、ステロイド環構造、すなわち、シクロペンタノフェナントレン骨格を含有する化合物である。好ましくは、このホスホネート基またはスルホネート基または置換ホスホネート基または置換スルホネート基は、その骨格の３－位に結合され、すなわち、式IIの化合物である。

式 (II)



ここで、Ｒ、ＸおよびＹは、上記で定義されたものであり、そしてこの環系ABCDは、置換または非置換、飽和または不飽和のステロイド核を表し、好適には、エストロンまたはデヒドロエピアンドロステロンを表す。

他の適切なステロイド環系は以下の通りである：

置換エストロン、すなわち：

２－OH－エストロン

２－メトキシ－エストロン

４－OH－エストロン

６α－OH－エストロン

７α－OH－エストロン

16α－OH－エストロン

16β－OH－エストロン

エストラジオールおよび置換エストラジオール、すなわち：

２－OH－17β－エストラジオール

２－メトキシ－17β－エストラジオール

４－OH－17β－エストラジオール

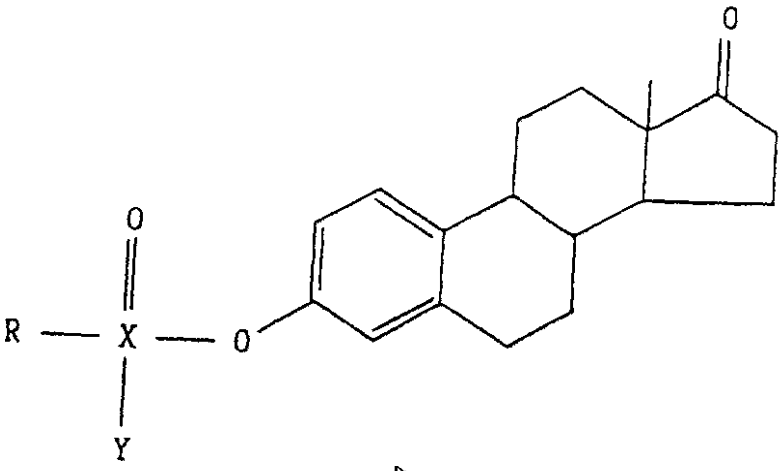
６α－OH－17βエストラジオール

７α－OH－17βエストラジオール

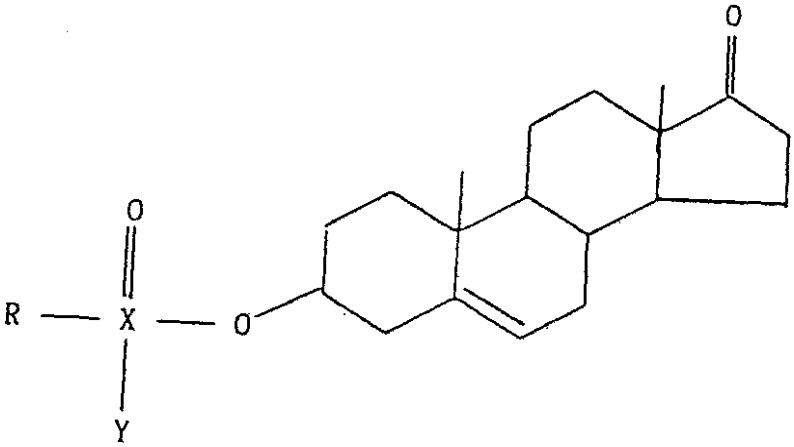
16α－OH－17α－エストラジオール

16β－OH－17α－エストラジオール
16β－OH－17β－エストラジオール
17α－エストラジオール
17β－エストラジオール
17α－エチニル－17β－エストラジオール
エストリオールおよび置換エストリオール、すなわち：
エストリオール
２－OH－エストリオール
２－メトキシ－エストリオール
４－OH－エストリオール
６α－OH－エストリオール
７α－OH－エストリオール
置換デヒドロエピアンドロステロン、すなわち：
６α－OH－デヒドロエピアンドロステロン
７α－OH－デヒドロエピアンドロステロン
16α－OH－デヒドロエピアンドロステロン
16β－OH－デヒドロエピアンドロステロン
一般的な用語では、ステロイド環系ABCDは、種々の非妨害性置換基を含有し得る。特に、この環系ABCDは、１つまたはそれ以上の以下の置換基を含有し得る：ヒドロキシ、アルキル、特に低級（C_1－C_6）アルキル、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、sec－ブチル、tert－ブチル、ｎ－ペンチルおよび他のペンチル異性体、およびｎ－ヘキシルおよび他のヘキシル異性体、アルコキシ、特に低級（C_1－C_6）アルコキシ、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシなど、アルキニル、例えば、エチニル、またはハロゲン、例えばフルオロである。
適切な非ステロイド環系は、ジエチルスチルボエストロール、スチルボエストロールおよびステロイドスルファターゼEC3.1.6.2を用いて50μmolより小さいK_m値を有するスルフェートを提供する他の環系を包含する。
本発明の化合物では、Ｒは、好ましくは、最大10個の炭素原子を含有する。Ｒがアルキルであるとき、好ましいのは、１～５個の炭素原子を包含する低級アルキル基、すなわち、メチル、エチル、プロピルなどである。Ｒは、好ましくは、Ｈまたはメチルである。Ｒがアリールであるとき、代表的なのは、フェニルまたはトリル（ｐ－$PhCH_3$）である。
これらのアルキル、シクロアルキルおよびアリールの中では、置換アルキル、置換シクロアルキルおよび置換アリール、すなわち、当該化合物のスルファターゼ阻害活性を妨害しない１つまたはそれ以上の置換基を含有するアルキル、シクロアルキルまたはアリールが挙げられる。非妨害性置換基の例としては、ヒドロキシ、カルボキシ、ケト、アミノ、ハロ、アルコキシ、アルキルおよびアリールが挙げられる。Ｒに適切な置換シクロアルキル基の例は、カンフォリル（camphoryl）である。
それら化合物の薬学的に受容可能な塩、例えば、ＹがOHである場合の塩、例えば、非毒性金属塩、アンモニウム塩およびアミン塩もまた、本発明の範囲内に包含される。
最も好ましくは、式IIIおよびIVの化合物である：

式 (III)



式 (IV)

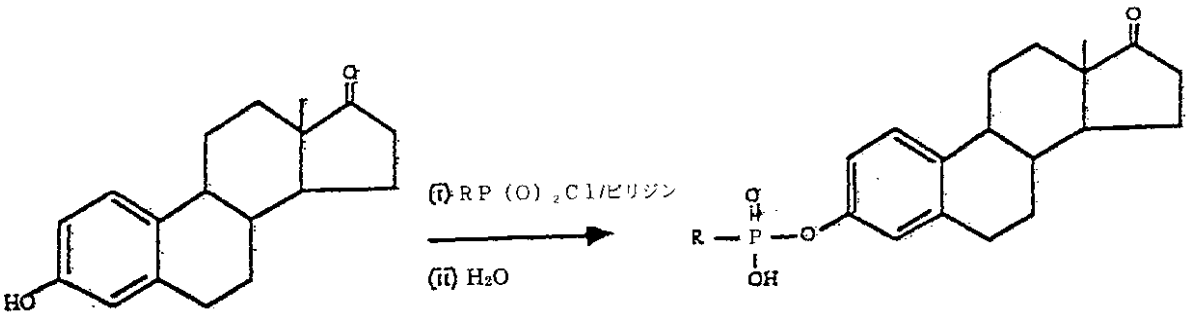


ここで、Ｒは、Ｈ、C_1－C_5アルキル、またはアリール、例えば、フェニルまたはトリルであり、すなわち、エストロン－３－スルホネートおよびエストロン－３－ホスホネートおよびデヒドロエピアンドロステロン－３－スルホネートおよびデヒドロエピアンドロステロン－３－ホスホネートであり、そして特に、Ｒが、Ｈ、メチル、エチルまたはフェニルであり、ＸがＰであり、そしてＹが－ＯＨである化合物であり、そしてＲがメチル、エチル、フェニルまたはトリルであり、ＸがＳであり、そしてＹが＝Ｏである化合物である。

本発明の化合物は、対応する多環式アルコール（ステロール）のエステル化を含み、そして可能ならば、１つまたはそれ以上の予備工程でもって、この多環式アルコール内の他の官能基を保護するのに適切な保護基を導入し、そして反応終了時に保護基が除去されることを含む種々の異なる反応により得られ得る。

ホスホネートの場合には、広く言えば、２つの調製経路がある。その経路の１つは、式（II）のＲがアルキルまたはアリールである場合のホスホネートの合成に適しており、アルキルまたはアリールホスホン酸クロライドまたはジクロライドなどの五価リン含有試薬を用いている。例えば、反応スキームＩ:

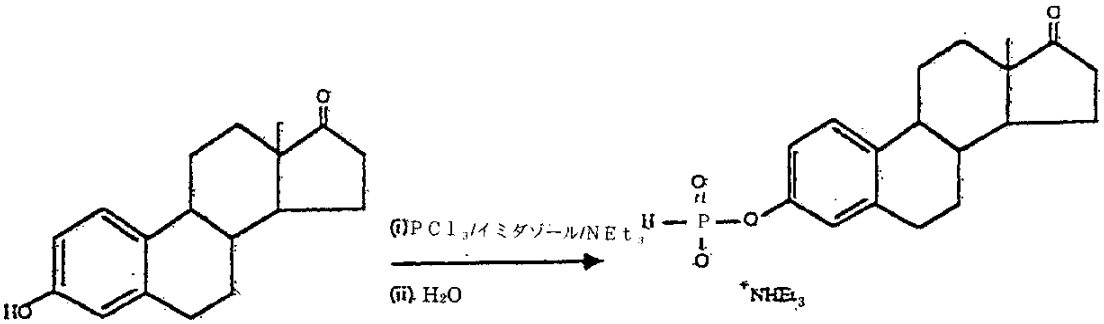
反応スキームＩ



エストロン　　エストロン－3－ホスホネート

であり、そして他の経路としては、三価リン試薬を用いて、Ｒ＝Ｈの場合の合成に適している。例えば、反応スキームII:

反応スキームⅡ

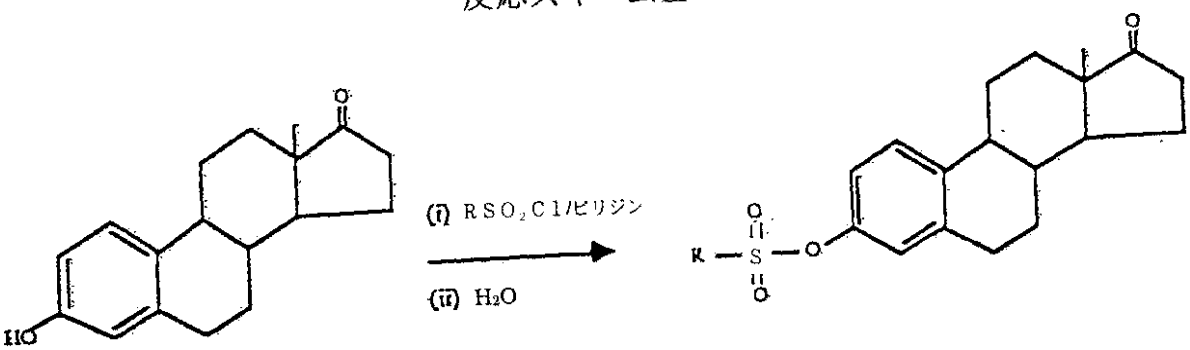


エストロン　　エストロン－3－ヒドロゲン－ホスホネート
のトリエチルアミン 塩

である。

スルホネートは、この場合、以下の反応スキームIIIに従って、多環式アルコール（ステロール）をアルキルまたはアリールスルホニルクロライドRSO_2Clと反応させること以外は、反応スキームＩと類似の方法で得られる。

反応スキームⅢ



エストロン　　エストロン－3－スルホネート

反応スキームＩを行うための条件は以下の通りである：

ホスホン酸ジクロライドを０℃でエストロンの無水ピリジン溶液に攪拌しながら滴下して加える。次に、反応液を室温まで加温し、そしてさらに24時間攪拌し続ける。反応混合物を氷に注ぎ、得られた水溶液を酢酸エチルで抽出する。併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$上で乾燥する。濾過後、溶媒を減圧下蒸発させ、そしてトルエンと共蒸発させてガム状粗生成物が得られる。この残渣にK_2HPO_4を加え、この混合物をゆっくりと暖めて白濁した溶液を得る。水溶液を酢酸エチルで洗浄し、そして2Mの塩酸（水）溶液を加えて酸性にする。

そうすると、溶液からに固形物が沈澱し、これを吸引濾過で集める。次に生成物を乾燥し、そして最後に再結晶により精製する。
反応スキームIIを行うための条件は以下の通りである：
イミダゾールを乾燥アセトニトリルに溶解し、そして氷浴中で０℃まで冷却する。三塩化リンをこの溶液に加え、そして混合物を15分間攪拌する。トリエチルアミンをこの反応液に加え、次いでさらに15分間攪拌したままにする。最後に、エストロンの乾燥アセトニトリルの懸濁液を加え、そして反応混合物を室温まで加温し、さらに20時間攪拌し続ける。次に、この反応液に蒸留水を０℃で注意深く加え、そして溶液を室温で１時間攪拌したままにする。その後、この混合物をまずトリメチルアミンと、次いでトルエンと共蒸発させて、油状残渣が得られ、この残渣は放置して固体となる。この残渣をクロロホルムに溶解し、そして水で洗浄する。次に、この水層をクロクホルムで再抽出し、併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$上で乾燥する。溶媒を減圧下蒸発させて、白色でガラス状の固形物が得られる。この固形物をフラッシュクロマトグラフィーにより精製して、無色の粘性油として所望の化合物を得る。
反応スキームIIIを行うための条件は以下の通りである：
スルホニルクロライドを０℃でエストロンの無水ピリジン溶液に攪拌しながら滴下して加える。次に、反応液を室温まで加温し、そしてさらに24時間攪拌し続ける。反応混合物を氷に注ぎ、得られた水溶液を酢酸エチルで抽出する。併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$上で乾燥する。濾過後、溶媒を減圧下蒸発させ、さらにトルエンと共蒸発させて粗結晶物質を得、これは再結晶により精製される。
必要な場合には、多環式アルコール（ステロール）内の官能基は、周知の方法で保護され得、そしてその保護基または保護基群は反応終了時に除去される。
本発明のステロイドスルファターゼインヒビターは、薬剤として投与するために、従来の薬学的製剤技術および薬学的担体、賦形剤、希釈剤などを用いて、通常、非経口投与に適切ないかなる方法でも製剤化され得る。有効なおよその投与量は、当該化合物のそれぞれの活性に依存して、平均体重（70kg）の患者に対して、100～800mg/日の範囲内である。好適でより活性な化合物に対するより通常の投与量は、200～800mg/日、さらに好ましくは、200～500mg/日、最も好ましくは、200～250mg/日の範囲内である。それらは、１回投与レジメ、分割投与レジメおよび／または数日間にわたる多回投与レジメで投与され得る。経口投与には、それらは、単位投与量当たり100～500mgの化合物を含有する錠剤、カプセル、溶液または懸濁液として製剤化され得る。あるいは、そして好ましくは、これらの化合物は、適切な非経口投与可能な担体内に非経口投与用に製剤化され、そして１日投与量を200～800mg、好ましくは200～500mg、より好ましくは200～250mgの範囲で提供するために製剤化される。しかしながら、そのような有効な１日投与量は、活性成分の固有の活性および患者の体重に依存して変わり、そのような変化は、医者の技術と判断の範囲内にある。
特定の用途としては、本発明のステロイドスルファターゼインヒビターは、別のスルファターゼインヒビターと、または、例えば、４－ヒドロキシアンドロステンジオン（４－OHA）のようなアロマターゼインヒビターとの組合せのいずれかとの併用治療に用いられ得る。
以下の調製の実施例および試験データにより本発明を例示する。
実施例１
エストロン－３－ヒドロゲンホスホネートの調製
イミダゾール（1.79g;26.34mmol）を乾燥アセトニトリル（17ml）に溶解し、氷浴中で０℃まで冷却した。三塩化リン（0.60ml;7.95mmol）をこの溶液に加え、そして混合物を15分間攪拌した。トリエチルアミン（3.88ml;27.84mmol）をこの反応液に加え、その後さらに15分間攪拌したままにした。最後に、エストロンの乾燥アセトニトリル（17ml）の懸濁液（0.5g;1.85mmol）を加え、そして反応混合物を室温まで加温し、さらに20時間攪拌し続けた。
次に、０℃で反応液に蒸留水（12.5ml）を注意深く加え、そしてその溶液を室温で１時間

攪拌したままにした。次に、この混合物を、まずトリエチルアミン（50ml）と、次いでトルエン（３×30ml）と共蒸発させ、油状残渣を得、これは放置して固体となる。。この残渣をクロロホルム（20ml）に溶解し、そして水（20ml）で洗浄した。次に、水層をクロロホルム（３×20ml）で再抽出し、そして併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$上で乾燥した。溶媒を減圧下蒸発させて、白色でガラス状の固形物を得た。この固形物をフラッシュクロマトグラフィー（89:10:1、クロロホルム：メタノール：トリエチルアミン）により精製して、無色の粘性油として所望の化合物（0.55g;68%）を得た。この生成物の分析結果は以下の通りであった：

融点:208－210℃

δ^{1}H nmr（270MHz;CD_3OD）:0.88（s,3H,C_{18}－Me）,1.29（t,9H,J＝7.33Hz,3 x －CH_3 of NEt_3）,1.30－2.60（一連のm、15H）,3.14（q,6H,J＝7.33Hz,3 x －CH_3 of NEt_3）,6.88（br d,2H）,7.21（br d,1H）.

δ^{13}C nmr（67.8MHz;CD_3OD）:9.47（q,－$NCH_2\underline{CH_3}$）,14.59（q,C_{18}－Me）,22.74（ｔ）,27.24（ｔ）,27.76（ｔ）,30.68（ｔ）,33.02（ｔ）,36.98（ｔ）,39.83（ｄ）,45.51（ｄ）,47.78（t,－$N\underline{CH_2}CH_3$）,51.73（ｄ）,79.85（s,C_{18}）,119.43（ｄ）,122.30（ｄ）,127.70（ｄ）,136.60（ｓ）,139.37（ｓ）,152.00（ｓ）,223.45（s,C＝Ｏ）.

δ^{31}P nmr（109.37MHz;CD_1OD）［^{1}H－脱カップリング］:2.882および－2.82（d,J＝630.4Hz）.

m/z FAB^{+}:436（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

m/z FAB^{-}:333（Ｍ－NEt_3－Ｈ）$^{-}$

実施例２

エストロン－３－エチルホスホネートの調製

エチルホスホニルジクロライド（３当量）を０℃でエストロン（１当量）の無水ピリジン溶液に攪拌しながら滴下して加えた。次に、この反応液を室温まで加温し、そしてさらに24時間攪拌し続けた。

反応混合物を氷に注ぎ、得られた水溶液を酢酸エチルで抽出した。併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$上で乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下蒸発させ、そしてトルエンと共蒸発させて、ガム状粗生成物が得られた。

この残渣にK_2HPO_4緩衝液（0.25M;pH8.69）を加え、この混合物をゆっくり暖めて白色で濁った溶液が得られた。水溶液を酢酸エチルで洗浄し、そして2Mの塩酸（水）溶液を加えることにより酸性（pH2）にした。そうすると、溶液から固形物が沈澱し、これを吸引濾過で集めた。次に、生成物を乾燥し、そして最後に再結晶により精製した。この生成物の分析結果は以下の通りであった：

融点:208－210℃

δ^{1}H nmr（270MHz;$CDCl_3$）:0.89（s,3H,C_{18}－Me）,1.00－2.60（一連のm,18H）,2.86（m,2H）,6.90（m,2H）,7.19（d,1H,J＝8.43Hz）,9.73（br s,交換可能,1H,－OH）.

δ^{13}C nmr（67.8MHz;$CDCl_3$）:6.21（q,－Ph_2CH_3）,13.80（q,C_{18}－Me）,17.76 and 19.88（dt,J＝144.30Hz,－Ph_2CH_3）,21.55（ｔ）,25.75（ｔ）,26.34（ｔ）,29.35（ｔ）,31.54（ｔ）,35.81（ｔ）,38.05（ｄ）,44.05（ｄ）,47.91（s,C_{18}）,50.42（ｄ）,177.93（ｄ）,120.67（ｄ）,126.48（ｄ）,136.36（ｓ）,138.16（ｓ）,148.04（ｓ）,220.66（s,C＝Ｏ）.

δ^{31}P nmr（109.37MHz;$CDCl_3$）［^{1}H－脱カップリング］:33.71.

m/z FAB^{+}:363.1（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$

m/z FAB^{-}:361.1（Ｍ－Ｈ）$^{-}$

微量分析：

	Ｃ	Ｈ	Ｎ
期待値：	63.90%	7.64%	0.0%
実測値：	63.70%	7.35%	0.0%

実施例３

エストロン－３－メチルスルホネート（エストロン－３－メシレート）の調製

メチルスルホニルクロライド（２当量）を０℃でエストロン（１当量）の無水ピリジン溶液に攪拌しながら滴下して加えた。次に、この反応液を室温までに加温し、そしてさらに24時間攪拌し続けた。
反応混合物を氷に注ぎ、得られた水溶液を酢酸エチルで抽出した。併せた有機抽出物を無水$MgSO_4$で乾燥した。濾過後、溶媒を減圧下蒸発させ、そしてトルエンと共蒸発させて粗結晶物質を得た。この物質を再結晶により精製した。この生成物の分析結果は以下の通りであった：
融点:152－154℃
δ^{1}H nmr（270MHz;$CDCl_3$）:0.92（s,3H,C_{18}－Me）,1.40－1.75（m,5H）,2.00－2.60（一連のm,6H）,2.95（m,2H）,3.14（s,3H,－$SO_2\underline{CH_3}$）,7.03（m,2H）,7.30（m,1H）.
δ^{13}C nmr（67.8MHz;$CDCl_3$）:13.74（q,C_{18}－Me）,21.50（ｔ）,25.66（ｔ）,26.11（ｔ）,29.32（ｔ）,31.43（ｔ）,35.76（ｔ）,37.23（q,－$SO_2\underline{CH_3}$）,37.80（ｄ）,44.05（ｄ）,47.83（s,C_{18}）,50.31（ｄ）,118.94（ｄ）,121.94（ｄ）,126.87（ｄ）,138.81（ｓ）,139.11（ｓ）,147.09（ｓ）,220.53（s,C＝Ｏ）.
m/z（%）:348（100）（ｍ）,291（23）,213（29）,97（26）,65（46）,57（51）,41（53）,29（23）.
微量分析：

	C	H	N
期待値：	65.49%	6.94%	0.0%
実測値：	65.20%	6.98%	0.0%

実施例４
MCF－７細胞におけるエストロン－３－ホスホネートによるステロイドスルファターゼ活性の阻害
ステロイドスルファターゼは、ステリルスルファターゼEC3.1.6.2として定義されている。
活性MCF－７ヒト乳ガン細胞を用いてインビトロでステロイドスルファターゼ活性を測定する。このホルモン依存性細胞系は、ヒト乳ガン細胞の成長のコントロールを研究するために広く使用されている。その細胞は、著しいステロイドスルファターゼ活性を有し（MacIndoeら,Endocrinology,123,1281－1287（1988）;Purohit & Reed,Int.J.Cancer,50,901－905（1992））、そして米国では、アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection（ATCC））により、および英国では、例えば、インペリアルキャンサーリサーチファンド（The Imperial Cancer Research Fund）により入手可能である。20mM HEPES,5%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、非必須アミノ酸および0.075%重炭酸ナトリウムを含有する最小必須培地（MEM）（Flow Laboratories,Irvine,Scotland）中で細胞を維持した。30個までのレプリケートの25cm^2組織培養フラスコに上記培地を用いてフラスコ１個当り約１×10^5個の細胞を接種した。細胞を80%集密度まで生育させ、そして培地を３日目毎に交換した。
トリプリケートの25cm^2組織培養フラスコ中のMCF－７細胞の無損傷の単層をイーグルの平衡塩類溶液（Earle's Balanced Salt Solution）（EBSS、ICN Flow製,High Wycombe,U.K.）で洗浄し、そして無血清MEN（2.5ml）において5pmol（７×10^5dpm）の［6,7－^{3}H］エストロン－３－スルフェート（New England Nuclear,Boston,Mass.,U.S.Aから市販され、比活性60Ci/mmolである）および10μＭの以下の４つのエストロン－３－ホスホネートのそれぞれとを一緒に37℃で３－４時間インキュベートした。
略語

エストロン－３－ヒドロゲンホスホネート	E_1－３－HP
エストロン－３－メチルホスホネート	E_1－３－MeP
エストロン－３－エチルホスホネート	E_1－３－EtP
エストロン－３－フェニルホスホネート	E_1－３－PhP

インキュベートした後、各フラスコを冷却し、そして培地（1ml）を［^{14}C］エストロン（７×10^3dpm）（Amersham International Radiochemical Centre,Amersham,U.K.から市販され、比活性97Ci/mmolである）を含有する別々の試験管にピペットで移した。この混合物をトルエン（5ml）と共に30秒間充分に振盪した。実験は、この処理により90%より多い［^{14}C］エストロンおよび0.1%より少ない［^{3}H］エストロン－３－スルフェートが水相から除去されることを示した。有機相の一部（2ml）を除去し、蒸発させて、そして残渣の^{3}Hおよび^{14}H含有量をシンチレーション分光計で測定した。得られた^{3}Hのカウント数（用いられた培地および有機相の容量、および加えられた［^{14}C］エストロンの回収量に対して補正された）および基質の比活性から、加水分解されたエストロン－３－スルフェートの量を計算した。実験の各バッチには、スルファターゼ陽性のヒト胎盤から調製されたミクロソーム（陽性コントロール）および（基質の見かけの非酵素的加水分解を評価するために）細胞のないフラスコのインキュベーションが含まれた。細胞単層をザポニン（Zaponin）で処理した後、コウルターカウンター（Coulter Counter）を用いてフラスコ１個当りの細胞核数を測定した。トリパンブルー排除法（Trypan Blue exclusion method）（Phillips,H.J.（1973）著:Tissue culture and applications.［Kruse,D.F.& Patterson,M.K.編］;pp.406－408;Academic Press,New York）を用いて、細胞膜状態および生存率を評価するために、各バッチにおいて１個のフラスコを使用した。

エストロン－３－ホスホネートに関する結果を表Ｉおよび図２に示す。結果は、10^6個の細胞に対しては、インキュベーション期間（20時間）中に形成された全生成物（エストロン＋エストラジオール）の計算された平均±1S.D.として表され、そして統計的有意を示す値に対しては、エストロン－３－ホスホネートを含まないインキュベーションに対する減少（阻害）の百分率で表される。結果の統計的有意を検定するために、対応のないスチューデントのｔ－検定（unpaired Student's t－test）を用いた。

表Ｉ

エストロン－3－ホスホネートの存在下
MCF－7細胞におけるステロイドスルファターゼ活性

エストロン－3－ホスホネート	濃度	ステロイドスルファターゼ活性 (fmol/20 hr/10^6 細胞)	コントロールからの減少% (阻害%)
(コントロール)	0	¶46.5 ± 2.3	-
E_1-3-MeP	10μM	¶17.6 ± 1.7***	62.2%
E_1-3-EtP	10μM	¶18.4 ± 2.8***	60.4%
E_1-3-PhP	10μM	¶13.8 ± 0.7***	70.3%
(コントロール)	0	§71.3	-
E_1-3-HP	10μM	§14.2	80.1%

¶ 平均 ± 1 S.D. n=3　§ ２つの値の平均　*** p≦0.001

実施例５

MCF－７細胞におけるエストロン－３－スルホネートによるステロイドスルファターゼ活性の阻害

インキュベーションが、エストロン－３－ホスホネートの代わりに以下の５つのエストロン－３－スルホネートのそれぞれを含むこと以外は、実施例４に記載の同一の実験プロトコールを用いてエストロン－３－スルホネートに関する実験を得た。

略語

エストロン－３－メチル
スルホネート　E_1－３－MeS
エストロン－３－エチル
スルホネート　E_1－３－EtS
エストロン－３－ｎ－ブチル
スルホネート　E_1－３－BuS
エストロン－３－カンフォリル
スルホネート　E_1－３－CamS
エストロン－３－ｐ－トルエン
スルホネート　E_1－３－MePhS

エストロン－３－スルホネートに関する結果は、表IIおよび図３に示され、そして表Ｉおよび図２と同じ方法によりそれぞれ表される。

表Ⅱ

エストロン－3－スルホネートの存在下
MCF－7細胞におけるステロイドスルファターゼ活性

エストロン－3－スルホネート	濃度	ステロイドスルファターゼ活性 (fmol/20 hr/10^6 細胞)	コントロールからの減少％（阻害％）
(コントロール)	0	¶80.1 ± 3.3	-
E_1-3-EtS	10μM	¶58.4 ± 1.9**	27.1%
E_1-3-BuS	10μM	¶66.8 ± 3.3*	16.6%
E_1-3-CamS	10μM	¶62.7 ± 2.8**	21.7%
(コントロール)	0	¶46.5 ± 2.3	-
E_1-3-MeS	10μM	¶21.3 ± 3.5**	54.2%
(コントロール)	0	§71.3	-
E_1-3-MePhS	10μM	§6.8	90.5%

¶ 平均 ± 1 S.D. n=3　§ ２つの値の平均　* $p \leq 0.05$　** $p \leq 0.01$

実施例６

胎盤ミクロソームにおけるエストロン－３－ホスホネートによるステロイドスルファターゼ活性の阻害

正常妊娠期のスルファターゼ陽性のヒト胎盤（Obstetric Ward,St.Mary's Hospital,London）をはさみで充分に切り刻み、そして冷リン酸緩衝液（pH7.4,50mM）で一回洗浄し、次いで冷リン酸緩衝液（5ml/g組織）に再懸濁させた。氷中に２分間の冷却時間によって分離された３つの10秒バースト（burst）を用いて、Ultra－Turraxホモゲナイザーによってホモゲナイゼーションを行った。核および細胞破片を30分間、2000g回転で遠心分離（４℃）することにより除去し、そして上清の部分（2ml）を－20℃で保存した。この上清のタンパク濃度をBradfordの方法（Anal.Biochem.,72,248－254（1976））によって測定した。

100μg/mlのタンパク濃度、20μＭ［6,7－^{3}H］エストロン－３－スルフェート（New England Nuclear,Boston,Mass.,U.S.A.から市販され、比活性60Ci/mmolである）の基質濃度を用いて37℃で20分間のインキュベーション時間によりインキュベーション（1ml）を行っ

た。以下のエストロン－３－ホスホネートを50%阻害レベルに及ぶように各々調節された濃度範囲で別々のサンプルに加えた。

略語

エストロン－３－ヒドロゲン
－ホスホネート　E_1－３－HP
エストロン－３－メチルホスホネート　E_1－３－MeP
エストロン－３－エチルホスホネート　E_1－３－EtP
エストロン－３－フェニル
ホスホネート　E_1－３－PhP

インキュベーション後、各サンプルを冷却し、そして培地（1ml）を［^{14}C］エストロン（７×10^3dpm）（Amersham International Radiochemical Centre,Amersham,U.K.から市販され、比活性97Ci/mmolである）を含有する別々の試験管にピペットで移した。この混合物をトルエン（5ml）と共に30秒間充分に振盪した。実験は、この処理により、90%より多い［^{14}C］エストロンおよび0.1%より少ない［^{3}H］エストロン－３－スルフェートが水相から除去されることを示した。有機相の一部（2ml）を除去し、蒸発させて、そして残渣の^{3}Hおよび^{14}C含有量をシンチレーション分光計で測定した。得られた^{3}Hのカウント数（用いられた培地および有機相の容量、および加えられた［^{14}C］エストロンの回収量に対して補正された）および基質の比活性から、加水分解されたエストロン－３－スルファターゼの量を計算した。

ステロイドスルファターゼ活性に関する結果は、IC_{50}の計算値として表IIIに（すなわち、コントロールに対して50%阻害を生じるエストロン－３－ホスホネート濃度）で表される。

表Ⅲ

エストロン－3－ホスホネートの存在下
胎盤ミクロソームにおけるステロイドスルファターゼ活性

エストロン－3－ホスホネート	ステロイドスルファターゼ活性 (IC_{50} mol/l)
E_1-3-HP	5.0×10^{-5}
E_1-3-MeP	8.5×10^{-5}
E_1-3-PhP	9.4×10^{-5}
E_1-3-EtP	9.5×10^{-5}

実施例７

胎盤ミクロソームにおけるエストロン－３－スルホネートによるステロイドスルファターゼ活性の阻害

インキュベーションが、エストロン－３－ホスホネートの代わりに以下の２種の代表的エストロン－３－スルホネートを含むこと以外は、実施例６の記載と同一の実験プロトコールを用いてエストロン－３－スルホネートに関する結果を得た。

略語

エストロン－３－メチル
スルホネート　E_1－３－MeS
エストロン－３－ｐ－トルエン
スルホネート　E_1－３－MePhS

ステロイドスルファターゼ活性に関する結果は、IC_{50}の計算値として表IV（すなわち、コントロールに対して50%阻害を生じるエストロン－３－スルホネート濃度）で表される。

表Ⅳ

エストロン－3－スルホネートの存在下
胎盤ミクロソームにおけるステロイドスルファターゼ活性

エストロン－3－スルホネート	ステロイドスルファターゼ活性 (IC_{50} mol/l)
E_1-3-MePhS	1.30×10^{-4}
E_1-3-MeS	2.05×10^{-4}

実施例８

本明細書中、実施例４～７で既に言及され、そしてステロイドスルファターゼ活性を阻害することが示される次の化合物を実施例２の一般的方法により調製した。

エストロン－３－トシレート（エストロン－３－ｐ－トルエンスルホネート）

分析データ：

δ^1H nmr（270MHz;$CDCl_3$）:0.91（s,3H,C_{18}－Me）,1.40－1.80（m,6H）,1.80－2.60（一連のm,7H）,2.46（s,3H,Me－C_6H_4）,2.84（m,2H）,6.75（dm,2H）,7.20（m,1H）,7.35（d,2H,J＝8.24Hz）,7.78（d,2H,J＝8.06Hz）.

m/z FAB$^-$:424（M＋）

微量分析：

	C	H	N
期待値：	70.90%	6.65%	0.0%
実測値：	70.80%	6.77%	0.0%

エストロン－３－フェニルホスホネート

分析データ：

δ^1H nmr（270MHz;$CDCl_3$）:0.88（s,3H,C_{18}－Me）,1.47（m,6H）,1.90－2.60（一連のm,7H）,2.78（br d,2H）,6.86（d,2H,J＝8.06Hz）,7.43－7.87（一連のm,5H）,9.62（broad s,1H,－OH）.

δ^{31}P nmr（109.37MHz;$CDCl_3$）［^{1}H－脱カップリング］:17.16.

m/z FAB$^+$:411（M＋H）$^+$

m/z FAB$^-$:409（M－H）$^-$

微量分析:$C_{24}H_{27}O_4P.1/2H_2O$として

	C	H	N
期待値：	68.72%	6.73%	0.0%
実測値：	68.70%	6.54%	0.0%

エストロン－３－メチルホスホネート

分析データ：

δ^1H nmr（270MHz;$(CD_3)_2SO$）:0.84（s,3H,C_{18}－Me）,1.35－2.50（一連のm,13H）,1.44（d,3H,J＝17.22Hz,P－Me）,2.84（m,2H）,6.91（br d,2H,J＝12.82Hz）,7.26（br d,1H,J＝8.25Hz）.

δ^{31}P nmr（109.37MHz;$(CD_3)_2SO$）［^{1}H－脱カップリング］:24.47.

m/z FAB$^+$:349（M＋H）$^+$

m/z FAB$^-$:347（M－H）$^-$

微量分析：

	C	H	N
期待値：	65.50%	7.23%	0.0%
実測値：	65.10%	7.17%	0.1%

【図１】

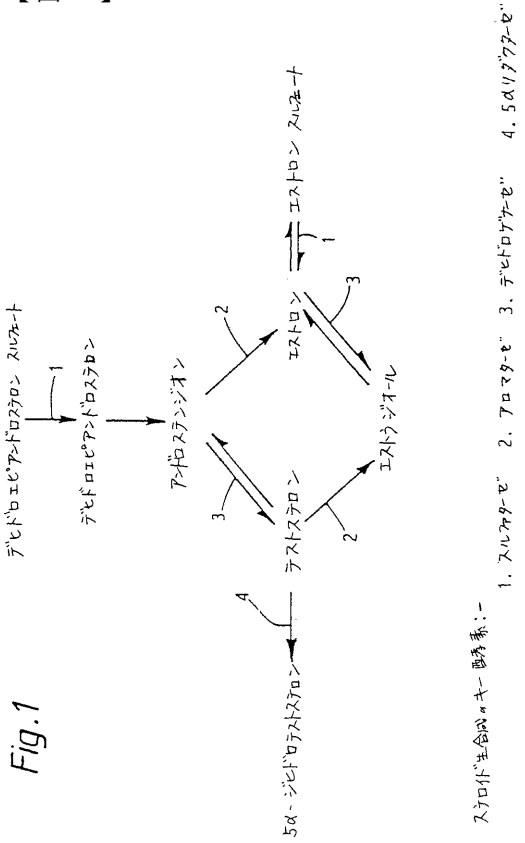


Fig.1

【図２】

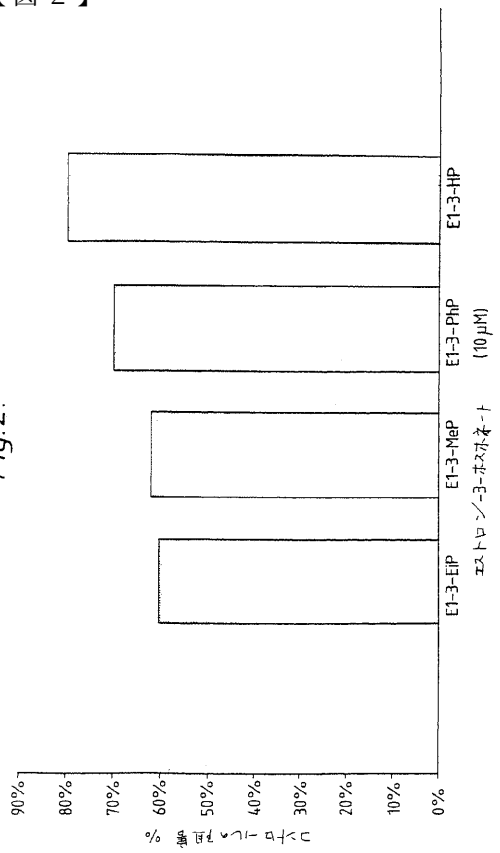


Fig.2.

【図３】

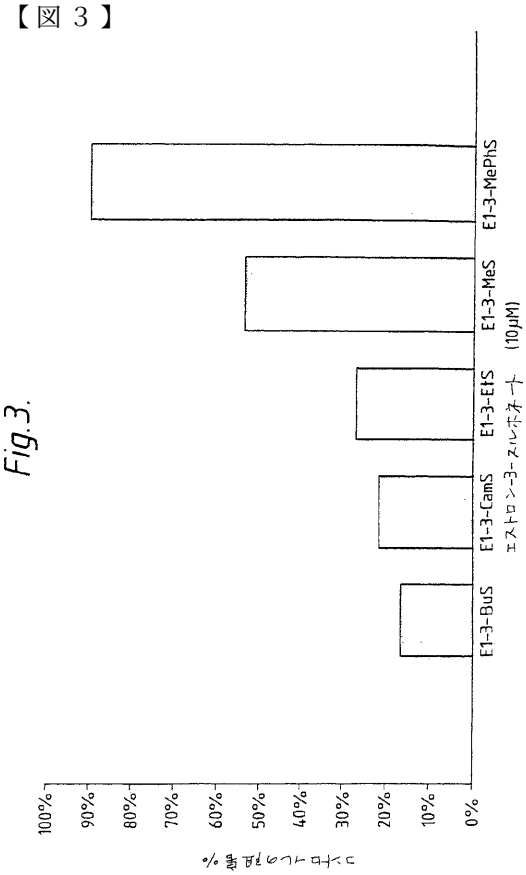


Fig.3.

フロントページの続き

(72)発明者 リード，マイケル ジョン
イギリス国 ロンドン ダブリュー１３ ８ビーゼット，ウィンボーン ガーデンズ ４２
(72)発明者 ポッター，バリー ビクター ロイド
イギリス国 エイボン ビーエイ１ ７ユーイー，バース，バースフォード，ドーバーズ パーク ９５

合議体
審判長 竹林 則幸
審判官 谷口 博
審判官 深津 弘

(56)参考文献 英国特許第１３９８０２６（ＧＢ，Ｂ）
英国特許第１２２９７３２（ＧＢ，Ｂ）
Pharmazie,30(1),1975,P.17-21
Chemical Abstracts 63:8441

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
A61K 31/56 ～ 31/585