

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4294217号
(P4294217)

(45) 発行日 平成21年7月8日 (2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月17日 (2009.4.17)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 317/02 (2006.01)

C O 7 C 317/02

A 6 1 K 31/10 (2006.01)

A 6 1 K 31/10

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C O 7 C 317/14 (2006.01)

C O 7 C 317/14

請求項の数 4 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2000-514880 (P2000-514880)
 (86) (22) 出願日 平成10年10月1日 (1998.10.1)
 (65) 公表番号 特表2001-519326 (P2001-519326A)
 (43) 公表日 平成13年10月23日 (2001.10.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/020580
 (87) 国際公開番号 WO1999/018068
 (87) 国際公開日 平成11年4月15日 (1999.4.15)
 審査請求日 平成17年9月30日 (2005.9.30)
 (31) 優先権主張番号 60/060, 933
 (32) 優先日 平成9年10月3日 (1997.10.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591135163
 テンプル・ユニバーシティーオブ・ザ・コ
 モンウェルス・システム・オブ・ハイアー
 ・エデュケーション
 TEMPLE UNIVERSITY-O
 F THE COMMONWEALTH
 SYSTEM OF HIGHER ED
 UCATION
 アメリカ合衆国19126ペンシルベニア
 州フィラデルフィア、ブロード・ストリー
 ト・アンド・モントゴメリ・アベニュー
 (番地なし)
 (74) 代理人 100075638
 弁理士 倉橋 暎

最終頁に続く

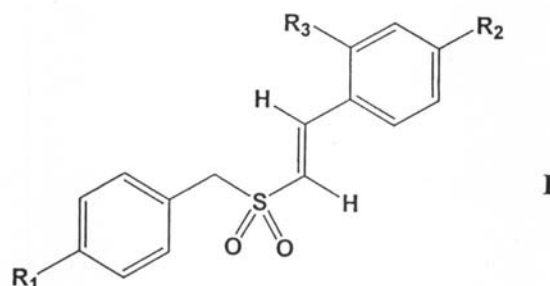
(54) 【発明の名称】 スチリルスルホン抗癌剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I

【化 1】



I

10

(式中、 R_1 及び R_2 は、独立して塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択され；及び
 R_3 は、水素及びフッ素から成る群から選択され；
 R_1 及び R_2 は、 R_3 が水素であるとき両方塩素であってはならず；
 R_1 は、同一化合物中で R_2 がフッ素であり R_3 が水素であるとき塩素であっては
 ならない)
 の化合物。

【請求項 2】

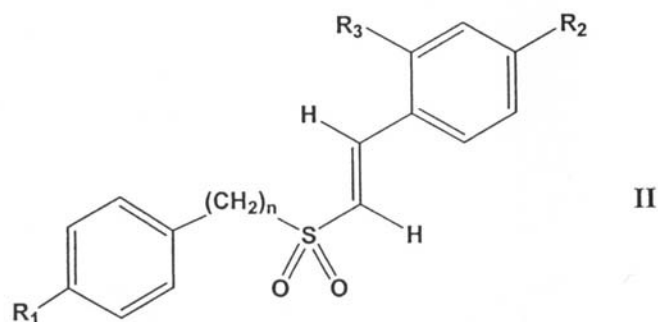
20

前記化合物は、E - 4 - フルオロスチリル - 4 - フルオロベンジルスルホン、E - 2 , 4 - ジフルオロスチリル - 4 - フルオロベンジルスルホン、E - 4 - フルオロスチリル - 4 - ブロモベンジルスルホン、E - 4 - ブロモスチリル - 4 - ブロモベンジルスルホン、E - 4 - クロロスチリル - 4 - ブロモベンジルスルホン、E - 4 - ブロモスチリル - 4 - クロロベンジルスルホン、及びE - 4 - ブロモスチリル - 4 - フルオロベンジルスルホンから成る群から選択される請求項1の化合物。

【請求項3】

医薬上許容しうるキャリアと、式II

【化2】



(式中、nは、0又は1であり；

R₁は、水素、塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択され；

R₂は、水素、塩素、フッ素、臭素、メチル及びメトキシから成る群から選択され；及び

R₃は水素、塩素及びフッ素から成る群から選択され；

ここで、R₂は、R₁及びR₃の両方が水素でありnが0又は1であるときメチル又はメトキシであってはならず；及び

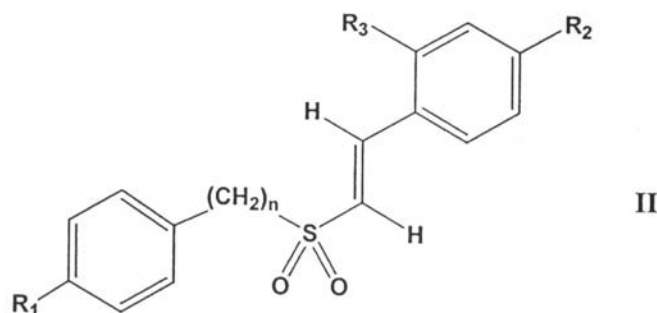
R₁、R₂及びR₃は、nが1であるとき全てが水素であってはならないことを条件とする)

の化合物と、を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項4】

式II

【化5】



(式中、nは、0又は1であり；

R₁は、水素、塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択され；

R₂は、水素、塩素、フッ素、臭素、メチル及びメトキシから成る群から選択され；及び

R₃は水素、塩素及びフッ素から成る群から選択され；

ここで、R₂は、R₁及びR₃の両方が水素でありnが0又は1であるときメチル又はメトキシであってはならず；及び

R₁、R₂及びR₃は、nが1であるとき全てが水素であってはならないことを条

件とする)

の癌の処置用の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、癌、特に胸部癌及び前立腺癌の処置のための組成物及び方法に関する。

【0002】

発明の背景

トランスメンブランレセプターにて受容される細胞外シグナルは、シグナル変換経路によって細胞内に伝達され(ペレック(Pelech)ら、Science 257:1335(1992))、これは、例えば細胞の増殖、分化又はアポトーシスの誘導など、広範な生理学的プロセスに結びつけられてきた(デイビス(Davis)ら、J. Biol. Chem. 268:14553(1993))。マイトジェン(分裂誘発因子)活性化プロテインキナーゼ(MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase)カスケードは、主要なシグナル系であり、これにより細胞外(extracellular)の刺激を細胞内(intracellular)の応答に変換する(ニシダ(Nishida)ら、Trends Biochem. Sci. 18:128(1993);ブルマー(Blumer)ら、Trends Biochem. Sci. 19:236(1994))。このカスケードの多くのステップは、異なる種にて発見されたMAPキナーゼに対して保存されており、又相同である。

【0003】

哺乳動物細胞において、細胞外シグナル調節キナーゼ類(E RK: Extracellular-Signal-Regulated Kinase)、E RK - 1及びE RK - 2は、典型的、且つ独特の特性を有するMAPKファミリーの最も良く研究されたメンバーであり、その全てが上流二重特異性キナーゼ(upstream dual specificity kinase)によってトレオニン及びチロシン残基におけるリン酸化で活性化される(ボサダ(Posada)ら、Science 255:212(1992);ビッグス(Biggs III)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6295(1992);ガーナー(Garner)ら、Genes Dev. 6:1280(1992))。

【0004】

最近の研究によって、c - J u n NH₂-末端キナーゼ1及び2(JNK - 1及びJNK - 2))として知られる、MAPK類の更なるサブグループが同定され、これは異なる基質特異性を有し、又これらは異なる刺激により調節される(ヒビ(Hibi)ら、Genes Dev. 7:2135(1993))。JNK類はストレス活性化プロテインキナーゼ類(SPK: stress-activated protein kinase)のメンバーである。JNK類はUV照射、前炎症性サイトカイン及び環境ストレスでの細胞の処理によって活性化されることが示されてきた(デリジャルド(Derijard)ら、Cell 1025(1994))。活性化されたJNKは、c - J u n蛋白質のアミノ末端に結合し、これをser 63及びser 73においてリン酸化することによって、蛋白質の転写活性を増加する(アドラー(Adler)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5341(1992);クウォック(Kwok)ら、Nature 370:223(1994))。

【0005】

推定されたJNK類の一次シーケンスの分析は、これらがE RK類と遠い関係にあることを示す(デイビス(Davis)、Trends Biochem. Sci. 19:470(1994))。E RK類とJNK類の双方は、外部刺激に応答するなかでT y r及びT h rにおいてリン酸化され、その結果活性化する(デイビス(Davis)、Trends Biochem. Sci. 19:470(1994))。このリン酸化(T h r及びT y r)位置は、それらの活性化において臨界的な役割を演じ、E RK類とJNK類の間で保存されている(デイビス(Davis)、Trends Biochem. Sci. 19:470(1994))。しかし、これらのリン酸化の位置は、別個の二重リン酸化モチーフの中に位置している: T h r - P r o - T y r (JNK)及びT h r - G l u - T y r (E RK)。MAPK類及びJNK類の外部シグナルによるリン酸化は、幾つかの成長因子レセプター類及び他のシグナル変換分子類を包含する蛋白質

の多くのファミリーを構成する、蛋白質チロシンキナーゼ類（P T K : protein tyrosine kinase）の活性化を含むことが多い。

【 0 0 0 6 】

蛋白質チロシンキナーゼ類は、良く定義された化学反応、即ち、チロシン残基のリン酸化を触媒する酵素である（ハンター（Hunter）ら、Annu Rev Biochem 5 4 : 8 9 7 (1 9 8 5) ）。特にレセプターチロシンキナーゼ類は、これらキナーゼ類の基質ドメインに対する遮断薬（ブロッカー）類が、効果的且つ選択的な抗増殖作用物質（剤）を産するのに適当であることから、薬剤設計の魅力的なターゲットである。抗増殖作用物質としての蛋白質チロシンキナーゼブロッカー類の使用可能性は、クエルセチンがP T Kブロッカーとして示唆された1981年という早い時期に認識された（グラジアニ（Graziani）ら、Eur. J. Biochem. 1 3 5 : 5 8 3 - 5 8 9 (1 9 8 3) ）。 10

【 0 0 0 7 】

最も良く理解されたMAPK経路は、細胞外シグナル調節キナーゼ類を含み、R a s / R a f / M E K / E R Kキナーゼカスケードを構成する（ボーデウィジン（Boudewijn）ら、Trends Biochem. Sci. 2 0 , 1 8 (1 9 9 5) ）。一度この経路が異なる刺激によって活性化されると、MAPKは、核の中に移動して遺伝子転写を活性化する幾つかの転写因子を含む種々の蛋白質をリン酸化する。この経路のネガティブ調節は、おそらくこれら事象のカスケードを阻止できる。

【 0 0 0 8 】

レセプターチロシンキナーゼ類をターゲットとし、又、R a s / R a f / M E K / E R Kキナーゼカスケードを阻止する、新規な抗癌化学療法作用物質が必要とされている。一般にオンコプロテイン類（oncoprotein）、及び特にシグナル変換蛋白質は、その活性が細胞増殖にとって基本的なものである蛋白質のサブクラスを代表し、又その活性が増殖性疾患（proliferative disease）において大きく増幅されることから、化学療法のより選択的なターゲットに適当である。 20

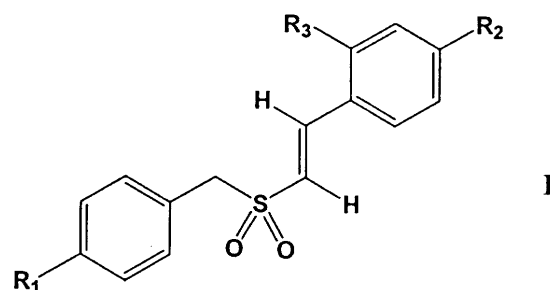
【 0 0 0 9 】

発明の要約

本発明の一実施態様によると、式 I

【 0 0 1 0 】

【 化 6 】



I

（式中、 R_1 及び R_2 は、独立して塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択され；及び R_3 は、水素及びフッ素から成る群から選択され； R_1 及び R_2 は、 R_3 が水素であるとき両方塩素であってはならず； R_1 は、同一化合物中で R_2 がフッ素であり R_3 が水素であるとき塩素であってはならない）

の新規な化合物が提供される。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の実施態様によると、医薬上許容しうるキャリアと、式 I I

【 0 0 1 2 】

【 化 7 】

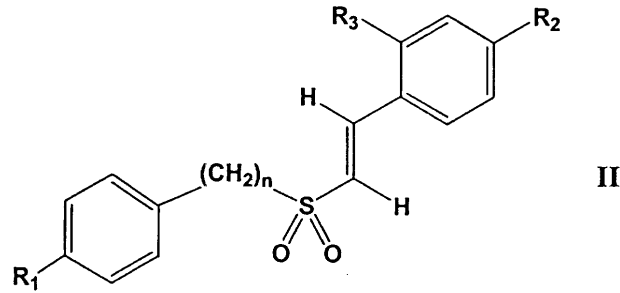
10

20

30

40

50



10

(式中、 n は、0又は1であり；

R_1 は、水素、塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択され；

R_2 は、水素、塩素、フッ素、臭素、メチル及びメトキシから成る群から選択され；及び

R_3 は水素、塩素及びフッ素から成る群から選択され；

ここで、 R_2 は、 R_1 及び R_3 の両方が水素であり n が0又は1であるときメチル又はメトキシであってはならず；及び

R_1 、 R_2 及び R_3 は、 n が1であるとき全てが水素であってはならないことを条件とする)

の化合物と、を含むことを特徴とする医薬組成物が提供される。

20

【0013】

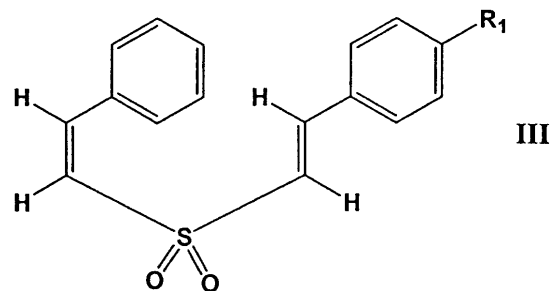
本発明の好ましい実施態様によると、医薬組成物は、医薬上許容しうるキャリアと、式II(式中、 R_3 は水素、又 R_1 及び R_2 は独立して塩素、フッ素及び臭素を含む群から選択される)の化合物と、を含む。

【0014】

本発明の他の実施態様によると、医薬上許容しうるキャリアと、式II I

【0015】

【化8】



30

(式中、 R_1 は、水素、塩素、フッ素及び臭素から成る群から選択される)

の化合物と、を含むことを特徴とする医薬組成物が提供される。

40

【0016】

本発明の他の実施態様によると、胸部又は前立腺癌のために個体を処置する方法であって、前記個体に有効量の式II又は式IIIの化合物を、単独又は医薬上許容しうるキャリアと組み合わせて投与することを含むことを特徴とする方法が提供される。他の実施態様によると、胸部又は前立腺癌に罹患する個体中の胸部又は前立腺腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、前記個体に有効量の式IIIの化合物を、単独又は医薬上許容しうるキャリアと組み合わせて投与することを含むことを特徴とする方法が提供される。更に、胸部又は前立腺癌に罹患する個体中の胸部又は前立腺腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する方法であって、前記個体に有効量の式IIIの化合物を、単独又は医薬上許容しうるキャリアと組み合わせて投与することを含むことを特徴とする方法が提供される。

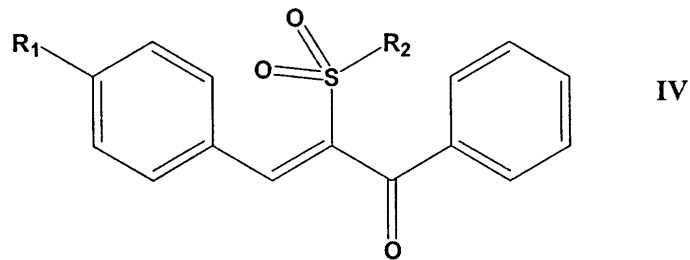
50

【 0 0 1 7 】

本発明は又、前記化合物が、式 I V

【 0 0 1 8 】

【 化 9 】



10

(式中、 R_1 は、フッ素及び臭素から成る群から選択され；及び

R_2 は、2 - クロロフェニル、4 - クロロフェニル、4 - フルオロフェニル及び2 - ニトロフェニルから成る群から選択される)

の化合物である、医薬組成物及び上述のような治療的方法に関する。

【 0 0 1 9 】

発明の詳細な説明

本発明に従って、ある種のスチリルスルホン誘導体類は、MAPKシグナル変換経路に作用し、それによって腫瘍細胞の成長及び生育力に作用する。その化合物は、胸部腫瘍及び前立腺腫瘍細胞の成長及び増殖を、正常細胞の成長に作用することなく、用量依存型にて阻害する。この細胞成長阻害は、ERK及びJNKタイプのMAPKの調節と関係付けられる。スチリルスルホン類の、これらMAPK類を調節する能力、及び細胞成長阻害を誘導する能力は、この化合物中に存在する官能基の性質及び位置によって指示される。

20

【 0 0 2 0 】

本発明のスチリルスルホン化合物類による胸部腫瘍及び前立腺腫瘍細胞の処理は、細胞増殖の阻害及びアポトーシス細胞死 (apoptotic cell death) の誘導を導く。この効果は、試験された胸部癌細胞ライン (系) である細胞ライン 361 が一度スチリルスルホン類に対してかなりの耐性を示しはしたが、エストロジェンレセプター (ER) 陽性、並びにエストロジェンレセプター陰性細胞に対して観察された。又、細胞増殖の阻害及びアポトーシス細胞死の誘導は、アンドロジェン依存、並びにアンドロジェン非依存前立腺腫瘍細胞に対しても観察されたが、前者の方がかなりスチリルスルホン類に対して敏感であった。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の化合物類で処理された腫瘍細胞は、細胞サイクルのG2 / M相に蓄積する。この細胞は、G2 / M相を出る時にアポトーシスを経るらしい。スチリルスルホン類での正常細胞の処理では、細胞サイクルの進行に同様の効果を生起できなかった。正常細胞は、スチリルスルホン薬剤の存在及び非存在下で、正常な細胞サイクルの進行を示した。

【 0 0 2 2 】

本発明のスチリルスルホン化合物類で処理された細胞と処理されていない細胞の双方は、同様の細胞内ERK - 2レベルを示す。しかし、ERK - 2の生化学的活性は、その基質ミエリン塩基性蛋白質 (MBP : myelin basic protein) をリン酸化する能力から判断して、薬剤処理された細胞では処理されない細胞と比較してかなり減少される。前立腺腫瘍細胞において、本発明の好ましい化合物FR - 20は、MBPのリン酸化ステータスを、模擬 (mock) 処理された細胞に比べて80%以上まで減少させた。この薬剤処理及び模擬処理された細胞溶解物の、ERK - 2抗体を用いたウエスタンブロット分析では、両溶解物において同じ蛋白質量を示した。これは、模擬処理された細胞中におけるリン酸化されたMBPのより高いレベルが、この溶解物中のERK - 2蛋白質が等量でないことによるものでないことを示している。これらの結果は、本発明のスチリルスルホン類がERK

40

50

- 2 のリン酸化能力をブロックすることを示唆する。

【 0 0 2 3 】

本発明のステチリルスルホン類は、JNK が c - J u n 蛋白質をリン酸化する能力を、模擬処理された細胞に比べて増強する。如何なる理論によっても制限されることを意図するものではないが、この結果は、ステチリルスルホン類が、前炎症性サイトカイン又はUV光のように振る舞ってJNK経路を活性化し、順次、細胞成長阻害及びアポトーシスの原因となる遺伝子のスイッチをオンとすることを示唆する。

【 0 0 2 4 】

ステチリルスルホン類の合成

本発明の化合物類は、1つ以上の二重結合が存在することによる *c i s - t r a n s* 異性によって特徴付けられる。この化合物類は、カーン - インゴルド - プレログ法 (Cahn - Ingold - Prelog system) [(有機化学命名法 (Nomenclature of Organic chemistry)、ペルガモン、エルムスフォード、ニューヨーク州、1979 (ブルーブック (Blue Book))) の (IUPAC 1974 推奨 (Recommendations)、セクション E : 立体化学 (Stereochemistry))] に従って命名する。又、マーチ (March)、先端有機化学 (Advanced Organic Chemistry) [ジョン・ウィリー アンド サンズ インコーポレイテッド (John Wiley & Sons, Inc.)、ニューヨーク、ニューヨーク州、第4版、1992、p. 127 ~ 138] をも参照されたい。二重結合の周囲の立体 (ステアリン) の関係は、「Z」又は「E」として指示する。

【 0 0 2 5 】

(E) - ステチリル及びベンジルスルホン類は、芳香族アルデヒド類と、アリール、ベンジル、ステチリルスルホニル酢酸類、フェナシルアリールスルホン類及びスルホニルアセト酢酸などの活性メチレン分子類とのクネベナゲル縮合によって調製される。その手順は、レディー (Reddy) ら [レディーら、*Acta. Chim. Hung.* 115 : 269 (1984) ; レディーら、*Sulfur Letters* 13 : 83 (1991) ; レディーら、*Synthesis* 322 (1984) ; 及びレディーら、*Sulfur Letters* 7 : 43 (1987)] によって記述されている。これら全開示を、参照により本明細書に援用する。(Z) - ベンジル及び(Z) - ステチリルスルホン類は、芳香族及び脂肪族チオール類のフェニルアセチレンへの求核付加、及び続くその生成物の30%過酸化水素による酸化によって合成される。

【 0 0 2 6 】

ベンジルスルホニル及びアリールスルホニル酢酸類の調製

アリール及びベンジルスルホニル酢酸類は、(E) - ステチリルアリール及び(E) - ステチリルベンジルスルホン類の合成のための出発化合物である。アリールスルホニル酢酸類は、アリールスルフィン酸ナトリウムとクロロ酢酸とのアルカリ性pHでの縮合によって調製しうる。同化合物類の合成の別法としては、ナトリウムアリールチオレート (sodium arylthiolate) とクロロ酢酸との縮合によって得られた生成物を酸化することが含まれる。

【 0 0 2 7 】

ベンジルスルホニル酢酸類は、塩化ベンジル類とチオグリコール酸ナトリウムとの縮合の縮合生成物の、30%過酸化水素酸化によって合成しうる。別法として、ベンジルスルホニル酢酸類は、ベンジルチオール類のナトリウム塩とクロロ酢酸類との縮合の生成物の、30%過酸化水素酸化によって合成しうる。

【 0 0 2 8 】

(E) - ステチリルアリール及び(E) - ベンジルスルホン類の合成

(E) - ステチリルベンジル及び(E) - ステチリルベンジルスルホン類を調製するために、適当なスルホニル酢酸 (例えば、10 mmol)、芳香族アルデヒド (例えば10 mmol) 及び触媒量の酢酸中ベンジルアミン (例えば15 ml) の混合物を2 ~ 3時間還流した。冷却した後、脱水エーテル (ドライエーテル) を加え、又反応混合物を一晩冷却した。このエーテルの溶液は、連続的に炭酸水素ナトリウム、亜硫酸水素 (重亜硫酸) ナトリウムの飽和溶液、希塩酸及び最終的に水で洗浄する。硫酸ナトリウム脱水エーテル溶液

をエバポレーション（気化）して、（E）-スチリルアリール又はベンジルスルホン類の固体生成物を得、これを2-プロパノール又は95%エタノールで再結晶させることができる。

【0029】

（Z）-スチリルアリール及び（Z）-スチリルベンジルスルホン類の合成

（Z）-スチリルアリール及び（Z）-スチリルベンジルスルホン類は、適当なチオール（例えば10mmol）及び水酸化ナトリウム（例えば20mmol）から調製されたナトリウムアリールチオレート又はベンジルチオレートを、新たに蒸留された、メタノール中のフェニルアセチレンに加えることによって調製しうる。混合物を24時間還流し、粉碎氷上に注ぐ。この（Z）-スチリルアリール及び（Z）-スチリルベンジルスルフィド類を、30%過酸化水素で酸化し、それぞれ（Z）-スチリルアリール及び（Z）-スチリルベンジルスルホン類を得る。

10

【0030】

（E），（E）-及び（E），（Z）-ビス（スチリル）スルホン類の合成

（E），（E）-ビス（スチリル）スルホン類は、スルホニルアセト酢酸と芳香族アルデヒド類とを、触媒としてのベンジルアミンの存在下で縮合することによって調製しうる。反応混合物を氷酢酸中で2時間還流する。冷却した後、無水エーテル（absolute ether）を反応混合物に加え、これを連続的に重炭酸ナトリウム、亜硫酸水素（亜重硫酸）の飽和溶液、希塩酸及び水で洗浄する。脱水エーテル層をエバポレーションし、（E），（E）-ビス（スチリル）スルホン類を得る。

20

【0031】

（Z），（E）-ビス（スチリル）スルホン類は、氷酢酸中の（Z）-スチリルスルホニル酢酸とアルアルデヒド及びベンジルアミンとの溶液を混合することによって調製しうる。反応混合物を冷却し、脱水エーテルを加える。分離した如何なる生成物も濾過する。この濾過物（濾液）を、更なるエーテルで希釈し、又炭酸水素ナトリウム、亜硫酸水素（重亜硫酸）ナトリウムの飽和溶液、希塩酸及び水で洗浄する。このエーテル層を分離して脱水し、又エバポレーションして（Z），（E）-ビス（スチリル）スルホン類を得る。

【0032】

治療的投与

本発明のスチリルスルホン類は、医薬上許容しうるキャリアとの組み合わせにおいて医薬組成物の形態で投与しうる。そのような処方中、活性成分は0.1~99.99重量%含んで良い。「医薬上許容しうるキャリア」とは、その処方中の他の成分及び受容者（レシピエント）への有毒性に適合する如何なるキャリア、希釈剤若しくは賦形剤をも意味する。

30

【0033】

本発明の化合物類は、胸部癌又は前立腺癌に罹患する個体（動物及びヒトを含む哺乳動物）に投与しうる。この化合物類は、経口及び非経口投与を含む如何なるルートによっても投与しうる。非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、鼻腔内、直腸、又は皮下投与を含む。活性作用物質は、好ましくは、選択された投与ルート及び標準的な医薬慣例に基づいて選択される医薬上許容しうるキャリアと共に投与される。

40

【0034】

活性作用物質は、医薬調整の分野にて標準的な慣例に従った投薬型に処方される。ジェナーロ・アルフォンソ（Gennaro Alphonso）編、レミントン医薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、第18版（1990）[マックパブリッシングコーポレーション（Mack Publishing Co.）、イーストン、ペンシルバニア州]を参照されたい。好適な投薬型は、例えば、錠剤（タブレット）、カプセル、溶液、非経口溶液、トローチ、坐剤、又は懸濁液を含む。

【0035】

非経口投与のために、活性作用物質は、例えば水、油、塩溶液、水性デキストロース（グルコース）及び関連する糖溶液、又はプロピレングリコール若しくはポリエチレングリ

50

コールなどの適当なキャリア又は希釈剤と混合しうる。非経口投与のための溶液類は、好ましくは、活性作用物質の水溶性塩を含む。安定化剤、抗酸化剤及び保存剤も又含みうる。好適な抗酸化剤は、亜硫酸、アスコルビン酸、クエン酸及びその塩、及びEDTAナトリウムを含む。好適な保存剤は、塩化ベンザルコニウム、メチル - 又はプロピル - パラベン、及びクロルブタノールを含む。

【0036】

経口投与のために活性作用物質は、錠剤、カプセル、又は他の適当な経口投薬型の調製のための1つ以上の個体不活性成分と組み合わせうる。例えば、活性作用物質は、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ステアリン酸マグネシウム、マニトール及び澱粉と組み合わせることができ、そして、伝統的な錠剤加工方法 (tableting method) によって錠剤に形成することができる。

10

【0037】

治療的利点を得るための、本発明に従った特定の化合物用量は、勿論患者の大きさ、重さ、年齢、性別、疾患の性質及び段階、疾患の攻撃性、及び投与ルートを含む、個々の患者の特定の状況によって決定される。例えば、日々の用量として、約0.05～約50mg/kg・日を利用しうる。より高い又はより低い用量もまた意図される。

【0038】

本発明の実施態様を以下の非制限的な例によって説明する。

【0039】

手順1

スチリル及びベンジルアリアルスルホン類合成の一般手順

メタノール (200ml) 中の水酸化ナトリウム溶液 (8g、0.2mol) に、適当なチオフェノール又はベンジルメルカプタン (0.1mol) をゆっくりと加える。その後、各部分にクロロ酢酸 (0.1mol) を加え、反応混合物を2～3時間還流する。冷却された内容物を破砕氷上に注ぎ、希塩酸 (200ml) で中和する。生成したアリアル及びベンジルチオ酢酸類 (0.1mol) を、1～2時間の還流によって、氷酢酸 (25ml) 中の30%過酸化水素 (0.12mol) で酸化する。内容物を冷却した後破砕氷上に注ぐ。分離した固体を温水 (熱水) から再結晶し、純粋なアリアル及びベンジルスルホン酢酸類を得る。

20

【0040】

氷酢酸 (15ml) 中の、適当なアリアル又はベンジルスルホン酢酸 (0.001mol)、芳香族アルデヒド (0.001mol) 及びベンジルアミン (1ml) を2～3時間還流する。内容物を冷却し、脱水エーテル (50ml) で処理する。分離した如何なる生成物も濾過によって集める。この濾液を更なるエーテルで希釈し、連続的に重炭酸ナトリウム (20ml)、亜硫酸水素 (重亜硫酸) ナトリウム (20ml) の飽和溶液、希塩酸 (20ml) 及び最終的に水 (35ml) で洗浄する。脱水エーテル層をエバポレーションすると、多くの場合固体を得る。しかし、幾つかの場合には、シロップ状物質分離物を与えることもあり、これは2-プロパノールにて処理することで固体化する。この化合物類の純度は、TLC (シリカゲルBDH、ヘキサン/エチル酢酸塩3:1) によって確認した。

30

40

【0041】

手順2

(E)(E)-及び(E)(Z)-ビス(スチリル)スルホン類合成の一般手順

新たに蒸留されたフェニルアセチレン (51.07g、0.5mol) に、メタノール (250ml) 中で、チオグリコール酸 (46g、0.5mol) 及び水酸化ナトリウム (40g、1mol) から調製されたチオグリコール酸ナトリウムを加える。この混合物を24時間還流し、冷却した後破砕氷 (500ml) 上に注ぐ。希塩酸 (250ml) で中和した後に形成するスチリルチオ酢酸を濾過し脱水する。収量88g (90%); m.p. 84～86。

【0042】

50

その後、このスチリルチオ酢酸を、次のようにしてスチリルスルホニル酢酸へと酸化する。氷酢酸（35 ml）中のスチリルチオ酢酸（5 g、25 mmol）及び30%過酸化水素（15 ml）の混合物を60分間の還流の下に加熱し、この混合物を冷却した後破砕氷（200 ml）上に注ぐ。分離した化合物を濾過し、温水から再結晶させて、（Z）-スチリルスルホニル酢酸の白色結晶性薄片を得る。収量2.4 g（41%）；m.p. 150～51。

【0043】

氷酢酸（6 ml）中の（Z）-スチリルスルホニル酢酸溶液（2.263 g、10 mmol）を芳香族アルデヒド（10 mmol）及びベンジルアミン（0.2 ml）と混合し、3時間還流する。反応混合物を冷却し、脱水エーテル（50 ml）で処理し、分離した如何なる生成物も濾過によって集める。濾液を更なるエーテルで希釈し、連続的に炭酸水素ナトリウム（15 ml）、亜硫酸水素（重亜硫酸）ナトリウム（15 ml）の飽和溶液、希塩酸（20 ml）及び最終的に水（30 ml）で洗浄する。脱水エーテル層をエバポレーションし、（E）（Z）-ビス（スチリル）スルホン類を得る。

【0044】

（E），（E）-ビス（スチリル）スルホン類は、（Z）-スチリルスルホニル酢酸の代わりにスルホニルアセト酢酸が用いられ、又2倍の量の芳香族アルデヒド（20 mmol）が用いられることを除いて、上述と同様の手順に従って調製する。

【0045】

手順3

2-（アリールスルホニル）-1-フェニル-3-アリール-2-プロペン-1-オン（one）類合成の一般手順

これらの化合物類は、異なる反応条件、溶媒及び触媒を採用する2つの方法によって合成される。

【0046】

方法1：フェナシルアリールスルホン類は、無水エタノール（200 ml）中で - プロモアセトフェノン類（0.05 mol）及びアリールスルフィン酸ナトリウム類（0.05 mol）を6～8時間還流することによって作成される。冷却によって分離した生成物を濾過し、水で数回洗浄し、臭化ナトリウムを除去する。その後、この生成物をエタノールから再結晶させる：フェナシル-フェニルスルホン、m.p. 90～91；フェナシル-p-フルオロフェニルスルホン、m.p. 148～149；フェナシル-p-プロモフェニルスルホン、m.p. 121～122；フェナシル-p-メトキシフェニルスルホン、m.p. 104～105；p-ニトロフェナシル-フェニルスルホン、m.p. 136～137。

【0047】

酢酸（10 ml）中のフェナシルアリールスルホン溶液（0.01 mol）を、アルアルデヒド（0.01 mol）及びベンジルアミン（0.02 ml）と混合し、3時間還流する。その溶液を冷却し、脱水エーテル（50 ml）を加える。このエーテル溶液を、連続的に希塩酸、水性10% NaOH、飽和 NaHSO₃ 溶液及び水で洗浄する。脱水エーテル層をエバポレーションして固体生成物を得、これを再結晶によって精製する。

【0048】

方法2：脱水テトラヒドロフラン（200 ml）を、窒素にてさっと流した500 mlのコニカルフラスコに採る。これに、無水四塩化炭素中の塩化チタン（IV）（11 ml、0.01 mol）を、連続攪拌しながら滴下して加える。フラスコの内容物は、この添加過程を通して - 20 に維持する。フェナシルアリールスルホン（0.01 mol）及び芳香族アルデヒド（0.01 mol）の混合物を反応混合物に加え、テトラヒドロフラン（8 ml）中のピリジン（4 ml、0.04 mol）を1時間以上かけてゆっくりと加える。内容物を10～12時間攪拌し、水（50 ml）で処理し、その後エーテル（50 ml）を加える。このエーテル層を分離し、10%水酸化ナトリウム、亜硫酸水素（重亜硫酸）ナトリウム及び塩水（ブライン）の飽和溶液15 mlで洗浄する。この脱水エー

ル層をエバポレーションし、2 - (アリールスルホニル) - 1 - フェニル - 3 - アリール - 2 プロペン - 1 - オン類を得る。

【0049】

例 1

E - スチリルフェニルスルホン

フェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及びベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 68 ~ 72 % の収率にて得られた。

【0050】

例 2

E - 4 - クロロスチリルフェニルスルホン

フェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 78 ~ 80 % の収率にて得られた。

【0051】

例 3

E - 2, 4 - ジクロロスチリルフェニルスルホン

フェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 2, 4 - ジクロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 60 ~ 65 % の収率で得られた。

【0052】

例 4

E - 4 - ブロモスチリルフェニルスルホン

フェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 78 ~ 80 % の収率で得られた。

【0053】

例 5

E - 4 - クロロスチリル 4 - クロロフェニルスルホン

4 - クロロフェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 70 ~ 72 % の収率で得られた。

【0054】

例 6

E - 4 - メチルスチリル 4 - クロロフェニルスルホン

4 - クロロフェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - メチルベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 60 ~ 64 % の収率で得られた。

【0055】

例 7

E - 4 - メトキシスチリル 4 - クロロフェニルスルホン

4 - クロロフェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - メトキシベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 68 ~ 70 % の収率で得られた。

【0056】

例 8

E - 4 - ブロモスチリル 4 - クロロフェニルスルホン

4 - クロロフェニルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 80 % の収率で得られた。

【0057】

例 9

E - 2 - クロロスチリルベンジルスルホン

ベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 2 - クロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 80 % の収率で得られた。

10

20

30

40

50

1 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 72% の収率で得られた。

【0058】

例 10

E - 4 - クロロスチリルベンジルスルホン

ベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 78% の収率で得られた。

【0059】

例 11

E - 4 - フルオロスチリル 4 - クロロベンジルスルホン

4 - クロロベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - フルオロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 72% の収率で得られた。

【0060】

例 12

E - 4 - クロロスチリル 4 - クロロベンジルスルホン

4 - クロロベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 80% の収率で得られた。

【0061】

例 13

E - 4 - フルオロスチリル 4 - フルオロベンジルスルホン

4 - フルオロベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - フルオロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 73% の収率で得られた。

【0062】

例 14

E - 2, 4 - ジフルオロスチリル 4 - フルオロベンジルスルホン

4 - フルオロベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 2, 4 - ジフルオロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 68% の収率で得られた。

【0063】

例 15

E - 4 - フルオロスチリル 4 - ブロモベンジルスルホン

4 - ブロモベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - フルオロベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 82% の収率で得られた。

【0064】

例 16

E - 4 - ブロモスチリル 4 - ブロモベンジルスルホン

4 - ブロモベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 88% の収率で得られた。

【0065】

例 17

E - 4 - ブロモスチリル 4 - フルオロベンジルスルホン

4 - フルオロベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0.01 mol) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 82% の収率で得られた。

【0066】

例 18

E - 4 - クロロスチリル 4 - ブロモベンジルスルホン

4 - ブロモベンジルスルホニル酢酸 (0.01 mol) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド

(0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 8 8 % の収率で得られた。

【 0 0 6 7 】

例 1 9

E - 4 - ブロモスチリル 4 - クロロベンジルスルホン

4 - クロロベンジルスルホニル酢酸 (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 1 に供した。表題化合物は 9 2 % の収率で得られた。

【 0 0 6 8 】

例 2 0

(Z) - スチリル - (E) - 4 - フルオロスチリルスルホン

(Z) - スチリルスルホニル酢酸 (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - 4 - フルオロベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 2 に供した。表題化合物は 6 8 % の収率で得られた。

10

【 0 0 6 9 】

例 2 1

(Z) - スチリル - (E) - 4 - ブロモスチリルスルホン

(Z) - スチリルスルホニル酢酸 (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 2 に供した。表題化合物は 7 0 % の収率で得られた。

【 0 0 7 0 】

例 2 2

(Z) - スチリル - (E) - 4 - クロロスチリルスルホン

(Z) - スチリルスルホニル酢酸 (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - クロロベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 2 に供した。表題化合物は 6 4 % の収率で得られた。

20

【 0 0 7 1 】

例 2 3

2 - [(4 - フルオロフェニル) スルホニル] - 1 - フェニル - 3 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - プロペン - 1 - オン

フェナシル - 4 - フルオロフェニルスルホン (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - フルオロベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 3 の方法 1 に供した。表題化合物は 6 3 % の収率で得られた。

【 0 0 7 2 】

例 2 4

2 - [(2 - クロロフェニル) - スルホニル] - 1 - フェニル - 3 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - プロペン - 1 - オン

フェナシル - 2 - クロロフェニルスルホン (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - フルオロベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 3 の方法 1 に供した。表題化合物は 5 8 % の収率で得られた。

30

【 0 0 7 3 】

例 2 5

2 - [(2 - クロロフェニル) スルホニル] - 1 - フェニル - 3 - (4 - ブロモフェニル) - 2 - プロペン - 1 - オン

フェナシル - 2 - クロロフェニルスルホン (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 3 の方法 1 に供した。表題化合物は 6 6 % の収率で得られた。

40

【 0 0 7 4 】

例 2 6

2 - [(4 - クロロフェニル) スルフォニル] - 1 - フェニル - 3 - (4 - ブロモフェニル) - 2 - プロペン - 1 - オン

フェナシル - 4 - クロロフェニルスルホン (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 3 の方法 1 に供した。表題化合物は 6 0 % の収率で得られた。

50

【 0 0 7 5 】

例 2 7

2 - [(2 - ニトロフェニル) スルホニル] - 1 - フェニル - 3 - (4 - ブロモフェニル) - 2 - プロペン - 1 - オン

フェナシル - 2 - ニトロフェニルスルホン (0 . 0 1 m o l) 及び 4 - ブロモベンズアルデヒド (0 . 0 1 m o l) の溶液を手順 3 の方法 1 に供した。表題化合物は 5 6 % の収率で得られた。

【 0 0 7 6 】

例 2 8

スチリルスルホン類による腫瘍細胞成長阻害

10

A . 細胞

胸部及び前立腺の正常細胞及び腫瘍細胞の成長へのスチリルスルホンの効果を、4つの細胞ライン(系)、NIH3T3、MCF-7、BT-20及びLnCapを利用して試験した。NIH3T3細胞は正常な線維芽細胞を代表し、一方LnCapはアンドロジェン依存前立腺腫瘍細胞ラインである。MCF-7はエストロジェン応答性胸部腫瘍細胞ラインであり、一方BT-20はエストロジェン非応答性胸部腫瘍細胞ラインである。MCF-7及びBT-20は、ペニシリン及びストレプトマイシンを補足した10%胎児牛(bovine)血清を含む、ダルベッコ(Dulbecco's)修飾イーグル(Eagle's)の培地(DMEM)中で成長させた。LnCapはペニシリン及びストレプトマイシンを含む10%胎児牛血清を伴ったRPMI中で培養した。NIH3T3細胞は、ペニシリン及びストレプトマイシンを補足した10%子牛(calf)血清を含むDMEM中で成長させた。全ての細胞培養を、5%CO₂の加湿雰囲気中で37℃に維持した。

20

【 0 0 7 7 】

B . スチリルスルホン類による処理及び生育力検定

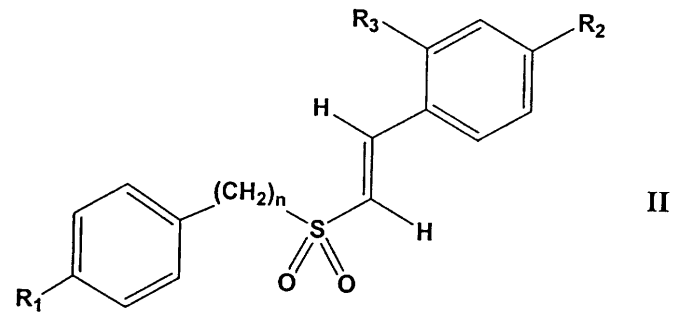
細胞は、2.5 µM又は5.0 µM濃度の試験化合物で処理し、細胞生育力を48時間後にトリパンブルー排除法(Trypan blue exclusion method)によって決定した。表1、2及び3に示される化合物類は、様々な程度で細胞成長を阻害し、又細胞死を誘導した。これら各表は、5.0 µMの化合物で処理されたLnCap及びMCF-7細胞の生存%(percent viable)を列举する。

【 0 0 7 8 】

30

【表 1】

表 1

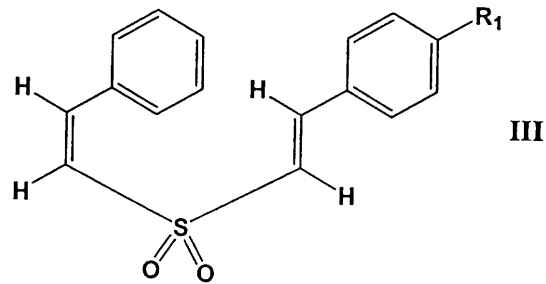


例	n	R ₁	R ₂	R ₃	L n C a P 及び M C F - 7 細胞生存%
1	0	H	H	H	89
2	0	H	Cl	H	90
3	0	H	Cl	Cl	88
4	0	H	Br	H	68
5	0	Cl	Cl	H	64
6	0	Cl	CH ₃	H	92
7	0	Cl	OCH ₃	H	90
8	0	Cl	Br	H	69
9	1	H	H	Cl	94
10	1	H	Cl	H	87
11	1	Cl	F	H	6
12	1	Cl	Cl	H	49
13	1	F	F	H	43
14	1	F	F	F	56
15	1	Br	F	H	7
16	1	Br	Br	H	51
17	1	F	Br	H	42
18	1	Br	Cl	H	7
19	1	Cl	Br	H	20

【 0 0 7 9 】

【 表 2 】

表 2

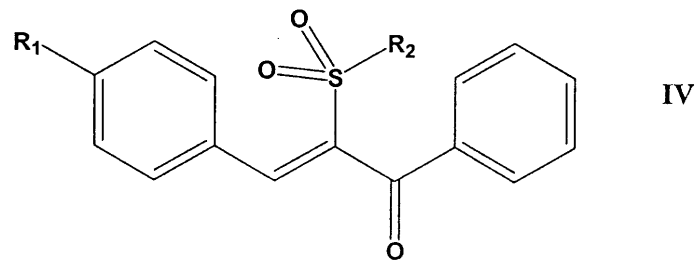


例	R ₁	LnCaP及び MCF-7細胞生存%
20	F	76
21	Br	68
22	Cl	72

【 0 0 8 0 】

【 表 3 】

表 3



例	R ₁	R ₂	LnCaP及び MCF-7細胞生存%
23	F	4-フルオロフェニル	76
24	F	2-クロロフェニル	64
25	Br	2-クロロフェニル	72
26	Br	4-クロロフェニル	58
27	Br	2-ニトロフェニル	74

最も高い活性を示した、より活性の強い5つの化合物類を、F R I - 2 (E - 2 , 4 - ジフルオロスチリル - 4 - フルオロベンジルスルホン)、F R I - 6 (E - 4 - フルオロスチリル 4 - プロモベンジルスルホン)、F R I - 7 (E - 4 - プロモスチリル 4 - フルオロベンジルスルホン)、F R I - 2 0 (E - 4 - フルオロスチリル 4 - クロロベンジルスルホン) 及び F R I - 2 2 (E - 4 - クロロスチリル 4 - クロロベンジルスルホン) として指定する。これらの化合物類は、実質的に L n C a P、B T - 2 0 及び M C F - 7 細胞の成長を、2 . 5 m M (図 1 A) 及び 5 . 0 m M (図 1 B) にて、この化合物類での処理の 4 8 時間後に阻害し、又死を誘導することが見出された。同一条件下で、4 8 時間のインキュベーションの後、8 0 % 以上の N I H 3 T 3 細胞が生存可能であった (図 1 A 及び 1 B)。E - 4 - クロロスチリル 4 - プロモベンジルスルホン及び E - 4 - プロモスチリル 4 - クロロベンジルスルホンもまた活性が高かった。

10

C . 用量依存検定

スチリルスルホン類の用量依存を、5つの最も活性な化合物中の1つである F R I - 2 0 で細胞を処理することによって確認した。N I H 3 T 3、M C F - 7、B T - 2 0 及び L n C a P 細胞を、D M S O 中に 2 5 0 n M、5 0 0 n M、1 μ M、2 . 5 μ M 及び 5 μ M の濃度で溶解した F R I - 2 0 にて処理し、それらの 4 8 時間後の増殖及び生育力について試験した (図 2 A)。生存細胞のパーセンテージを、トリパンブルー排除によって決定した。対照細胞は D M S O で処理し、細胞への溶媒の影響を決定した。2 5 0 n M の濃度にて、4 8 時間後に、処理されていない細胞と比較して、M C F - 7、B T - 2 0 及び L n C a P 細胞中に約 1 0 % の細胞死、及び 1 5 ~ 2 0 % の細胞分裂の阻害があった。5 0 0 n M の濃度で、L n C a p、B T - 2 0 及び M C F - 7 中には、3 0 ~ 5 0 % の細胞増殖の阻害、及び 2 5 ~ 3 0 % の細胞死があった。これらの条件下で、N I H 3 T 3 細胞は、ほんの 2 ~ 3 % だけが両方の濃度で生存不可能であった。L n C a P、B T - 2 0 及び M C F - 7 細胞の成長は、1 μ M 濃度の F R I - 2 0 によって、細胞の生育力の低下を付随して強く阻害された。4 8 時間のインキュベーションの後、L n C a P、B T - 2 0 及び M C F - 7 細胞の 6 0 ~ 7 5 % が 2 . 5 m M の F R I - 2 0 濃度で死滅し、一方 N I H 3 T 3 細胞の 9 0 % 以上が生存可能であった (図 2 A)。5 μ M の F R I - 2 0 で処理した L a C a p、B T - 2 0 及び M C F 7 細胞 (図 2 A) は、9 0 % 近い細胞死を示した。N I H 3 T 3 は、5 μ M 濃度の F R I - 2、- 6、- 7、- 2 0 又は - 2 2 の存在下で、その成長能力の変質が殆ど無いか若しくは無く、又 > 8 0 % の生育力を維持した。

20

30

【 0 0 8 1 】

D . 経時検定

F R I - 2 0 の活性の時間経過は次のようにして明らかにされた。N I H / 3 T 3、M C F - 7、B T - 2 0 及び L n C a p を 2 . 5 μ M にて F R I - 2 0 で処理し、生存細胞の数を 1 2、2 4、4 8 及び 7 2 時間においてトリパンブルー排除によって決定した。3 回の独立した実験の平均を図 2 B に示す。時間経過の研究は、M C F - 7、L n C a P 及び B T - 2 0 細胞の 9 5 % 以上が、2 . 5 μ M での F R I - 2 0 による処理の 7 2 時間後に死滅することを明らかにした (図 2 B)。

【 0 0 8 2 】

例 2 9

40

F R I - 2 0 による腫瘍細胞成長阻害

A . 細胞

正常細胞と、胸部及び前立腺の腫瘍細胞との成長への F R - 2 0 の効果を、9つの細胞ライン：N I H / 3 T 3 及び H F L (正常線維芽細胞ライン)；M C F - 7 及び 3 6 1 (エストロジェンレセプター陰性胸部腫瘍細胞ライン)；B T - 2 0、4 3 5 及び S K B R - 3 (エストロジェンレセプター陽性胸部腫瘍細胞ライン)；L n C a P (アンドロジェン感受性前立腺腫瘍細胞ライン)；P C - 3 及び D U - 1 4 5 (アンドロジェン非感受性前立腺腫瘍細胞ライン)、を利用して試験した。

【 0 0 8 3 】

B . F R I - 2 0 での処理及び生育力検定

50

細胞を例 2 2 . A のようにして成長させた。F R I - 2 0 を D M S O 中に溶解し、2 . 5 μ M 及び 5 . 0 μ M の濃度にて細胞に加えた。対照細胞には、D M S O を、化合物中最も高い濃度にて存在する溶媒 (D M S O) の容量に等しくなるように加えた。化合物の活性を、4 8 時間後にトリパンブルー排除によって評価した。N I H 3 T 3 及び H F L 細胞は、2 . 5 及び 5 . 0 μ M の濃度にて 8 5 ~ 9 0 % の生存 % を維持していることが分かった。F R I - 2 0 化合物で処理された 7 つの胸部腫瘍細胞ライン、M C F - 7、H T B 1 2 6、T 4 7 0 及び 4 3 5 細胞は、2 . 5 及び 5 . 0 μ M の薬剤濃度にて、生存が 2 5 % 及び 1 0 % という、非常に高い致死率を示した (図 3 A)。S K B R - 3 及び B T - 2 0 細胞の 5 0 % 近くが 2 . 5 μ M 濃度、又 7 5 % 近くが 5 . 0 μ M 濃度の化合物で死滅した。一方、3 6 1 胸部腫瘍細胞ラインは、2 . 5 及び 5 . 0 μ M の濃度にて 5 0 ~ 7 5 % の細胞が生存可能という、F R I - 2 0 に対するかなりの耐性を示した。F R I - 2 0 は、アンドロジェン非依存 D U - 1 4 5 及び P C - 3 前立腺細胞ラインと比較して、アンドロジェン依存 L n C a P 前立腺腫瘍細胞ラインの生育力に強い作用を有していた。2 . 5 m M の F R I - 2 0 で、L n C a P の 8 0 %、P C - 3 の 4 0 %、及び D U - 1 4 5 細胞の 2 0 % が死滅した。5 . 0 m M の F R I - 2 0 で、L n C a P の 7 2 %、P C - 3 の 4 7 %、及び D U - 1 4 5 の 4 0 % が死滅した (図 3 B)。

【 0 0 8 4 】

例 3 0

F R I - 2 0 の細胞サイクル調節への効果

アンドロジェン依存前立腺腫瘍細胞ライン L n C a P を例 2 2 . A のようにして成長させ、D M S O 中に溶解した 2 . 0 μ M の F R I - 2 0 又は等量 (1 0 m l) の D M S O のみで処理した。細胞は、処理後 6、1 2、2 4 及び 4 8 時間で集め、ヨウ化プロピジウムで染色し、D N A 成分 (含有量) の分析のためにフローサイトメトリー (F A C S : f l o w c y t o m e t r y) に供した。図 4 に示すように、F R I - 2 0 の培養培地への添加に結果、細胞は細胞サイクルの G 2 / M 相に蓄積し、又細胞が細胞サイクルのこの相を出る時、それらはアポトーシスを受けるようである。D M S O のみで処理された細胞は、細胞サイクルの G 2 / M 相におけるこのような阻止を示さず、この効果は F R I - 2 0 添加に関係付けられることを示唆する。F R I - 2 0 での正常細胞ライン N I H 3 T 3 又は H F L の処理では、細胞サイクルの進行に同様の効果を生起することはできなかった。N I H 3 T 3 及び H F L は、薬剤の存在下及び非存在下で、正常な細胞サイクルの進行を示した。

【 0 0 8 5 】

例 3 1

F R I - 2 0 の M P K 経路への効果

A . 免疫複合体 E R K - 2 検定

F R I - 2 0 の M A P K 経路への効果を試験するために、N I H 3 T 3、L n C a P 及び M C F - 7 細胞を、F R I - 2 0 と共に 2 . 5 m M の濃度にて 4 8 時間インキュベーションした。細胞を F R I - 2 0 の存在下及び非存在下でインキュベーションした後、細胞を、2 0 m M の H E P E S (p H 7 . 4)、5 0 m M の - グリセロリン酸塩、0 . 5 % の T r i t o n X - 1 0 0、2 m M の M g C l ₂、1 m M の E G T A、1 m M のジチオトレイトール、2 μ g / m l のロイペプチン、2 μ g / m l のアプロチニン、1 0 0 μ M のフッ化フェニルメチルスルホニル及び 1 m M のベンズアミジンを含む E R K 溶解緩衝液を用いて溶解した。1 0 0 m g の細胞溶解物中の E R K - 2 は、溶解物蛋白質を 1 m g の E R K - 2 ポリクロナール抗体 (E R K 2 に対する抗体 s c - 1 5 4 は、サンタ クルス バイオテクノロジー インコーポレイテッド (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) から) と共に 1 時間インキュベーションし、その後 2 0 μ l のプロテイン A - セファロース (ファルマシア (Pharmacia) と共に更に 1 時間追加のインキュベーションをすることによって免疫沈降させた。免疫複合体が結合したプロテイン A セファロースビーズは、溶解緩衝液で 2 度、又 2 0 m M の H E P E S (p H 7 . 4)、5 0 m M の - グリセロリン酸塩、1 0 m M の M g C l ₂、1 m M の E G T A、1 m M のジチオトレイトール及び 1 0 0 m M の N a ₃ V O ₄ を含む E R K / M A P K 緩衝液で 2 度洗浄した。

【0086】

その後、免疫沈降物を、MAPキナーゼ活性に関して、ERK-2の基質としてミエリン塩基性蛋白質(MBP)を[γ - ^{32}P]ATPの存在下で利用した、インビトロ(生体外: *in vitro*)検定によって試験した。従って、ピーズは100 μM の[γ - ^{32}P]ATP(5000 cpm/pmol)を含むMAPK緩衝液の40 μl に再懸濁し、キナーゼ検定を、基質として5 μg のMBPを用いて20分間30℃にて実施した。反応は、ラエムリ(Laemmli's)緩衝液を添加し、続いて試料を3分間煮沸することによって停止した。蛋白質は、12%SDS-PAGE上で分離し、ゲルを乾燥させ、そしてオートラジオグラムを現像した。その結果は、薬剤処理された細胞及び処理されていない細胞の両方とも、同様レベルの細胞内ERK-2を示すことを明らかにした。しかし、ERK-2の生化学的活性は、そのMBPをリン酸化する能力から判断するに、DMSOのみで処理された細胞と比較して薬剤処理された細胞においてかなり減少された。前立腺腫瘍細胞において、FRI-20は、MBPのリン酸化ステータスを、模擬処理された細胞(mock-treated cell)と比べて80%以上まで減少させた(図5)。

10

【0087】

B. ウェスタンブロット分析

FRI-20処理された細胞の細胞溶解物を、ウェスタンブロット分析のために次のようにして調製した。NIH3T3、LnCaP又はMCF-7細胞を、 2×10^5 細胞/ウェルの密度にて6ウェルプレートに接種し、24時間成長させた。新鮮な培地を、FRI-20での処理の2時間前に各ウェルに加えた。化合物をDMSOに溶解して2 mMのストック溶液を作成し、培地に加えて(2 ml)終濃度2.5及び5.0 μM を得た。37℃にて48時間後、細胞を10 mlの氷冷リン酸緩衝塩液で2回洗浄し、又、25 mMのHEPES(pH 7.6)、0.1%のTriton X-100、300 mMのNaCl、1.5 mMのMgCl₂、20 mMのβ-グリセロリン酸塩、100 μM のNa₃VO₄、0.2 mMのEDTA、0.5 mMのジチオトレイトール、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニン、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン、100 μM の塩化フェニルメチルスルホニル及び1 mMのベンズアミジンを含む溶解緩衝液400 μl 中に集めた。細胞溶解物を氷上に30分間保持し、そしてマイクロ遠心分離(16000 $\times g$)にて10分間遠心分離した。細胞溶解物を破片から分離し、蛋白質含有量で正規化した。

20

【0088】

ウェスタンブロット分析は、薬剤処理及び模擬処理された細胞溶解物について、ERK-2抗体を用いて実施した。等総蛋白質量(100 μg)をSDS-PAGEゲル(10~12%)の各レーンに装填し、イモビロン-P(Immobilon-P)(ミリポア(Milipore)、アメリカ合衆国)に転写した。転写に続いて、膜を3%ミルク中でブロックし、次いでERK-2及びJNK-1ウサギポリクロナール抗体(サンタクルスバイオテクノロジー・インコーポレイテッド(Santa Cruz Biotechnology Inc.)、サンタクルス、カリフォルニア州)でプローブし、その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギIgG二次抗体(アマーシャム(Amersham)(1:10000希釈)でプローブした。この抗体はECLウェスタンブロットティング分析キット(アマーシャム(Amersham))を用い、製造者の指示書に従って検出した。薬剤処理及び模擬処理された細胞溶解物の、ERK-2抗体でのウェスタンブロット分析は、両溶解物中で同量の蛋白質を示し(図6)、模擬処理された細胞における高いレベルのMBPリン酸化が、溶解物中のERK-2蛋白質の量が等しくないことによるものではないことを示した。これらの結果は、FRI-20がERK-2のリン酸化能力をブロックすることを示唆する。

30

40

【0089】

例32

FRI-20のストレス活性化蛋白質活性への効果

更に、JNKがそのメンバーであるところの、ストレス活性化プロテインキナーゼ類(SAPK)の活性がFRI-20の存在下で弱められるか否かを確かめるために、細胞(NIH3T3、MCF-7又はLnCaP)をDMSO中に溶解したFRI-20又はD

50

M S Oのみで処理した。48時間後、細胞をキナーゼ緩衝液で溶解し、この溶解物を、J N Kポリクロナール抗体を用いたウェスタンブロット分析により各溶解物中に存在するJ N Kの量を評価するために用いた。又、F R I - 20処理及び模擬処理された細胞の溶解物に存在するJ N Kの生化学的活性をも、J N Kを免疫沈降させ、その後J N Kの基質としてのG S T - c - J u n蛋白質と共に、[- ³²P] A T Pの存在下でインキュベーションすることによって決定した。

【0090】

従って、100mgの細胞抽出物中のJ N K - 1は、溶解物を1mgのJ N K - 1ポリクロナール抗体（分泌成分（s c）はサンタクルスバイオテクノロジー（Santa Cruz Biotechnology）から）と共に1時間インキュベーションし、その後20μlのプロテインA - セファロース（ファルマシア（Pharmacia））と共に更に1時間追加インキュベーションすることによって免疫沈降させた。ビーズを（上述のような）J N K溶解緩衝液で2回洗浄し、その後J N K反応緩衝液で2回洗浄した。ビーズを20mMの[- ³²P] A T P（5000cpm/pmol）を含むJ N K緩衝液40μl中に再懸濁し、キナーゼ反応を、基質として3μgの精製G S T - c - J u n（1-79）を用いて30にて20分間実施した。反応を停止し、リン酸化されたG S T - c - J u n蛋白質中の放射能を定量した。その結果は、F R I - 20処理によってJ N Kが組換えG S T - c - J u n蛋白質をリン酸化する能力を、模擬処理された細胞に比べて60～80%まで増強することを示した（図7）。

【0091】

J N Kは、UV照射、前炎症性サイトカイン及び環境ストレスによる細胞処理で活性化されることが示されてきた（デリジャルド（Derijard）ら、Cell 1025（1994））。活性化されたJ N Kはc - j u nのアミノ末端に結合し、s e r 63及びs e r 73にてリン酸化することによって、その転写活性を増加させる（アドラー（Adler）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：5341（1992）；クウォック（Kwok）ら、Nature 370：223（1994））。如何なる理論にも束縛されることを意図するものではないが、ここに示されたこの結果は、F R I - 20がJ N K経路の活性化において前炎症性サイトカイン又はUV光のように働き、細胞成長阻害及びアポトーシスの原因となる遺伝子のスイッチを順次オンと示唆すること示唆する。

【0092】

例33

F R I - 20とシスプラチンの比較

抗腫瘍活性

アンドロジェン感受性（L n C a P）及びアンドロジェン非感受性（D U 145）前立腺腫瘍細胞へのF R - 20の致死効果を、抗前立腺癌作用物質として広く用いられているシスプラチン（c i s - ジアミンジクロロプラチニウムII（cis-diamminedichloroplatinum II））の効果と比較した。細胞を例26のようにして成長させた。F R I - 20又はシスプラチンをD M S O中に溶解し、種々の濃度にて細胞に加えた。生育力を72時間後にトリパンブルー排除法によって決定した。L n C a P及びD U 145細胞を完全に死滅させるために必要なF R I - 20の濃度は、それぞれ2.5μM及び5.0μMであった。同一条件下で、シスプラチンにより完全にL n C a P及びD U 145細胞を死滅させるためには、それぞれ25μM及び15μMの濃度を必要とした。このように、F R I - 20は、ホルモン依存及びホルモン非依存前立腺腫瘍細胞の双方の致死において、少なくとも10倍、シスプラチンより活性である。

【0093】

合成、調製及び分析の手順に関して引用した全ての参考文献は、参照によって本明細書に援用する。

【0094】

本発明は、本発明の精神又は基本的な特質から逸脱することなく、他の特定の態様にて実施することができる。従って、本発明の範囲を示すためには、上述の詳細な説明より寧

10

20

30

40

50

る添付の特許請求の範囲を参照されたい。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A及び図1Bは、化合物類E-2, 4-ジフルオロスチリル-4-フルオロベンジルスルホン(FRI-2)、E-4-フルオロスチリル4-プロモベンジルスルホン(FRI-6)、E-4-プロモスチリル4-フルオロベンジルスルホン(FRI-7)、E-4-フルオロスチリル4-クロロベンジルスルホン(FRI-20)及びE-4-クロロスチリル4-クロロベンジルスルホン(FRI-22)の、NIH3T3、MCF7、BT-20及びLnCaP細胞への効果の棒グラフである。細胞は2.5 µM(図1A)又は5.0 µM(図1B)の濃度の化合物にて処理し、又細胞の生育力は、48時間後にトリパンプルー排除法により決定した。それぞれのデータポイントは、3回の独立した実験の平均を表す。標準偏差は10%を越えなかった。

10

【図2】 図2Aは、MCF7、BT20、LnCaP及びNIH3T3細胞の、FRI-20での処理による濃度依存阻害の棒グラフである。細胞は、0.250 nM、500 nM、1 µM、2.5 µM及び5.0 µMのFRI-20で48時間処理した。生存細胞のパーセンテージは、トリパンプルー排除によって決定した。3回の独立した実験の平均を示す。

図2Bは、MCF7、BT20、LnCaP及びNIH3T3細胞の、異なる時間間隔における生育力の棒グラフである。全ての細胞は2.5 µMのFRI-20で処理し、生存細胞の数は12、24、48、及び72時間において、トリパンプルー排除によって決定した。3回の独立した実験の平均を示す。

20

【図3】 図3Aは、化合物FRI-20の、正常細胞ラインNIH3T3、HeLa及びHFL;エストロゲンレセプター陽性胸部腫瘍細胞ラインMCF-7及び361;エストロゲンレセプター陰性胸部腫瘍細胞ラインSKBR-3、435及びBT-20に対する活性のプロットである。図3Bは、処理された細胞がアンドロゲン非依存前立腺細胞ラインLnCaP、及びアンドロゲン依存前立腺細胞ラインDU-145及びPC-3を含むこと以外は、図3Aと同様である。全ての細胞は2.5及び5.0 µM濃度のFRI-20で処理し、細胞生育力について48時間後にトリパンプルー排除によって検定した。3実験の平均を示す。分散は10%を越えなかった。

【図4】 図4[図4(1/2)及び図4(2/2)]は、FRI-20処理、又は対照処理されたLnCaP細胞の、細胞サイクル分析の一群のプロットを含む。LnCaP細胞は、120 mlのDMSO(対照細胞)又は10 mlのDMSO中の2.5 µMのFRI-20で処理した。細胞は、処理後6、12、24及び48時間で集め、ヨウ化プロピデュームにて染色し、フローサイトメトリーに供した。

30

【図5】 図5は、FRI-20のERK/MAPK活性への効果のSDS-PAGEオートラジオグラフである。FRI-20処理されたLnCaP、MCF-7及びNIH3T3細胞を、DMSO処理された細胞(対照)と共に、ミエリン塩基性蛋白質(MBP)を用いたERK/MAPK免疫複合体キナーゼ試験のために処理した。その後、MBPに対するERK-2の活性を、[³²P]ATPの存在下で検定した。リン酸化されたMBPを12%SDS-PAGE上で分離し、オートラジオグラフィーによって可視化した。

40

【図6】 図6は、ERK-2及びJNK/SAPK蛋白質のNIH3T3、LnCaP及びMCF-7細胞中の分布のプロットである。100 mgの蛋白質を含む培養細胞の溶解物を1レーン毎に装填した。電気泳動及びポリビニリデン膜への転移の後、蛋白質をERK-2及びJNK-2ポリクロナール抗体に対してプロットし、化学ルミネセンスによって可視した。

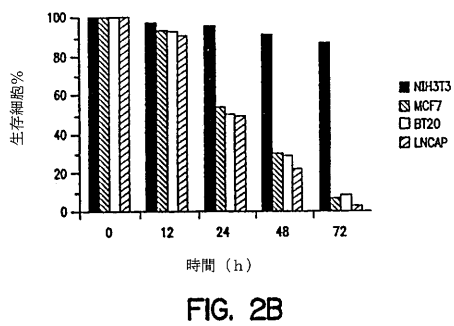
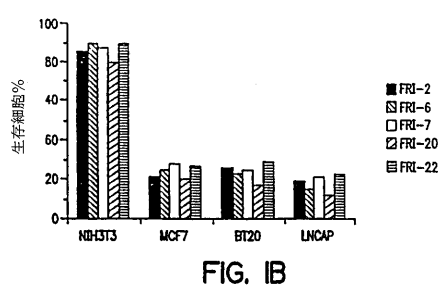
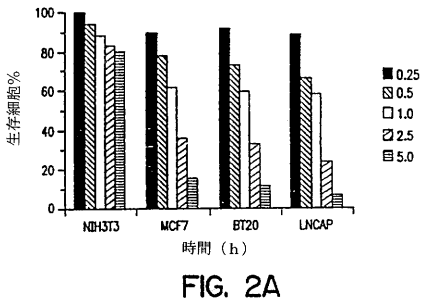
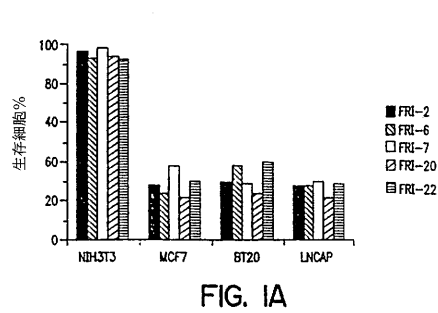
【図7】 図7は、FRI-20の、JNK/SAPK活性への効果のSDS-PAGEオートラジオグラフである。JNKは、JNKポリクロナール抗体で100 mgの培養細胞溶解物から免疫沈降し、又基質としてGST-c-Jun(1-79)を用いて免疫複合体キナーゼ検定を行った。リン酸化された蛋白質は、SDS-PAGEによって分離し、オートラジオグラフィーによって可視化した。実験は3回繰り返され、同様の結果を得

50

た。

【図 1】

【図 2】



【図 3】

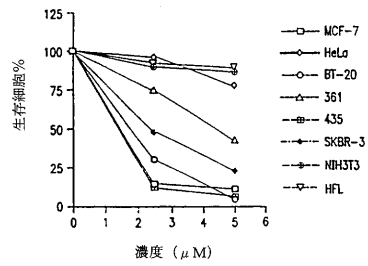


FIG. 3A

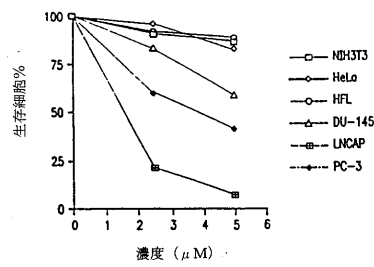


FIG. 3B

【図 4】

図4(1/2)

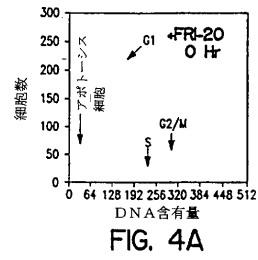


FIG. 4A

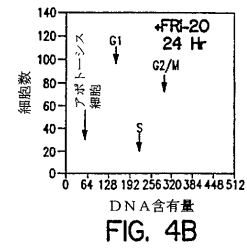


FIG. 4B

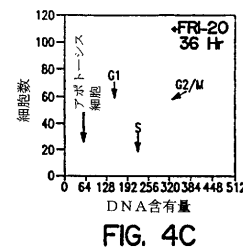


FIG. 4C

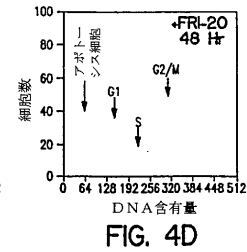


FIG. 4D

図4(2/2)

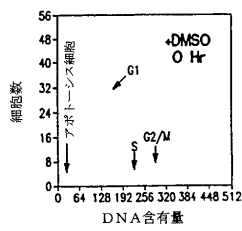


FIG. 4E

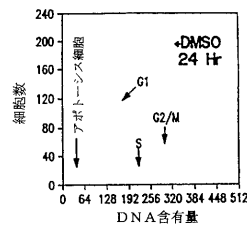


FIG. 4F

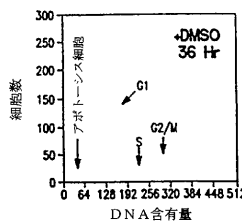


FIG. 4G

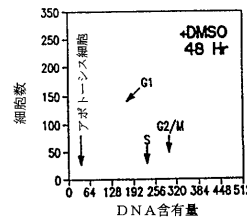


FIG. 4H

【図 5】

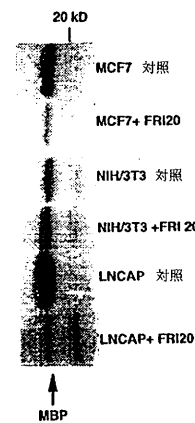


FIG. 5

【 図 6 】

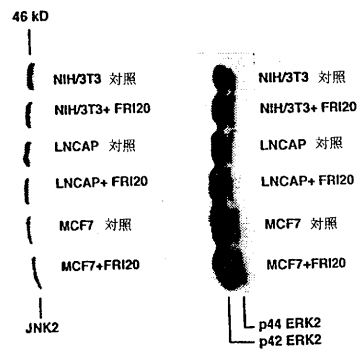


FIG. 6

【 図 7 】

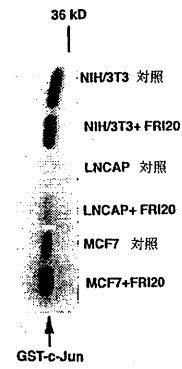


FIG. 7

フロントページの続き

- (72)発明者 レディー, プレムクマー イー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19085 ヴィラノバ アタベリー ロード 547
- (72)発明者 レディー, ラマナ エム ブイ
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19082 アッパー ダービー ビバリー ブールバード
354ビー

審査官 前田 憲彦

- (56)参考文献 特開平06-041054(JP, A)
特開平04-140728(JP, A)
特開昭53-108183(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07C 317/00
A61K 31/00
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)