

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和4年11月8日(2022.11.8)

【国際公開番号】WO2020/045653

【出願番号】特願2020-539644(P2020-539644)

【国際特許分類】

C 0 7 F 9/09(2006.01)

C 0 7 F 9/117(2006.01)

A 6 1 K 31/6615(2006.01)

10

A 6 1 P 3/06(2006.01)

A 6 1 P 3/10(2006.01)

A 6 1 P 9/00(2006.01)

A 6 1 P 13/04(2006.01)

A 6 1 P 13/12(2006.01)

A 6 1 P 17/00(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

A 6 1 P 35/04(2006.01)

A 6 1 P 37/04(2006.01)

20

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 8/55(2006.01)

A 6 1 Q 19/00(2006.01)

A 6 1 Q 19/08(2006.01)

【 F I 】

C 0 7 F 9/09 K

C 0 7 F 9/117 C S P

A 6 1 K 31/6615

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 3/10

30

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 13/04

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 43/00 1 2 3

40

A 6 1 K 8/55

A 6 1 Q 19/00

A 6 1 Q 19/08

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月28日(2022.10.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

50

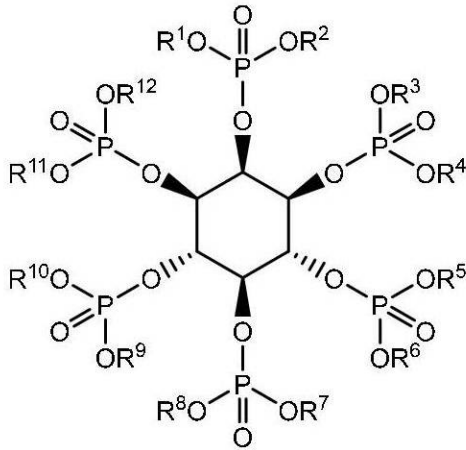
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 I の化合物。

【化 1】



10

20

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の全てが、ブチリルオキシメチルである。]

【請求項 2】

生体内で加水分解されて、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の一部または全てが H になる、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の式 I の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 4】

細胞増殖抑制、細胞傷害抑制、免疫力上昇、コレステロール低下、腎結石形成抑制、がん転移抑制、および繊維化抑制からなる群から選択される活性を有する、請求項 3 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 5】

がん、冠動脈疾患、糖尿病および結石症からなる群から選択される疾患を予防または処置するための請求項 3 または 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

がんが白血病、リンパ腫、骨髄腫からなる群から選択されるがんである、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

経口投与、経皮投与、腹腔内投与または静脈内投与される、請求項 4 - 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 8】

式 I の化合物が生体内で加水分解されて、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の一部または全てが H になる、請求項 4 - 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 または 2 に記載の式 I の化合物の医薬組成物の製造のための使用。

【請求項 10】

請求項 1 または 2 に記載の式 I の化合物を含む、化粧用組成物。

【請求項 11】

美白作用または美肌作用を有する請求項 10 に記載の化粧用組成物。

50

【請求項 1 2】

請求項 1 または 2 に記載の式 I の化合物を含む、研究用試薬。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

フィチン酸 (myo-イノシトール-1, 2, 3, 4, 5, 6 六リン酸、IP6) はヒト等の哺乳類の細胞内で生合成され、また種子など多くの植物組織にも存在するリンの主要な貯蔵形態である。穀物、豆類などの食物からも摂取される。その一部は吸収され、細胞にもピノサイトーシスなどにより取り込まれる。

10

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0003】

高濃度の IP6 をがん細胞に加えた場合に、細胞増殖抑制効果を示すことがよく研究され、注目されてきた。特開 2003-238414 は、イノシトールリン酸類 (イノシトール 6 リン酸を含む) を有効成分する抗腫瘍剤を開示している。また IP6 は、免疫力上昇、腎結石形成抑制、コレステロール低下、冠動脈疾患や糖尿病の発症リスク軽減などの多彩な活性を持つことが知られる。Vucenik I. et al., Nutrition and Cancer, 2006, 55, 109 は、抗酸化、免疫力上昇、抗炎症、Phase I 酵素および Phase II 酵素の修飾、がん遺伝子の制御、抗-血管新生作用、腫瘍転移抑制、アポトーシス誘導、細胞分化上昇、細胞増殖抑制などの多様な作用を IP6 が有することを記載している。

20

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明者らは上記問題解決のため鋭意研究に務めた結果、フィチン酸エステル誘導体を合成し、本発明を想到した。限定されるわけではないが、本発明は以下の態様を含む。

[態様 1]

以下の式 I の化合物。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

【化 4】



(式 IV 中、-CH₂-CH₂- は所望により 1 若しくは複数の置換基により置換されていてもよい)

40

50

からなるグループから選択される、

ただし、 $R^1 - R^{12}$ の全てがHである場合を除く。

[態様 2]

式 I I、式 I I I または式 I V において、置換若しくは未置換の C_{1-6} アルキル若しくはアリールが、置換若しくは未置換のメチル、置換若しくは未置換のエチルおよび置換若しくは未置換のブチルからなる群から選択される、態様 1 の化合物。

[態様 3]

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の 6 個以上が H ではない、態様 1 または 2 に記載の化合物。

[態様 4]

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の全てが H ではない、態様 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[態様 5]

C_{1-6} アルキル若しくはアリールが、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル、アミノ基、ニトロ基、フェニル基、ヒドロキシル基、チオール基、 C_{1-4} アシルおよびアリル基からなる群から選択される置換基で置換されている、態様 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[態様 6]

式 I I 中の $-CH_2-$ 、式 I I I 中の $-CH_2-C_6H_4-$ 、および式 I V 中の $-CH_2-CH_2-$ の 1 以上が、ハロゲン、 C_{1-4} アルキル、アミノ基、ニトロ基、フェニル基、ヒドロキシル基、チオール基、 C_{1-4} アシルおよびアリル基からなる群から選択される置換基で置換されている、態様 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[態様 7]

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の全てが、ブチリルオキシメチルまたはアセトキシメチルである、態様 1 に記載の化合物。

[態様 8]

生体内で加水分解されて、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の一部または全てが H になる、態様 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[態様 9]

態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の式 I の化合物を含む、医薬組成物。

[態様 10]

細胞増殖抑制、細胞傷害抑制、免疫力上昇、コレステロール低下、腎結石形成抑制、がん転移抑制、および繊維化抑制からなる群から選択される活性を有する、態様 9 に記載の医薬組成物。

[態様 11]

がん、冠動脈疾患、糖尿病および結石症からなる群から選択される疾患を予防または処置するための態様 9 または 10 に記載の医薬組成物。

[態様 12]

がんが白血病、リンパ腫、骨髄腫からなる群から選択されるがんである、態様 11 に記載の医薬組成物。

[態様 13]

経口投与、経皮投与、腹腔内投与または静脈内投与される、態様 9 - 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[態様 14]

式 I の化合物が生体内で加水分解されて、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} および R^{12} の一部または全てが H になる、態様 9 - 13 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[態様 15]

10

20

30

40

50

態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の式 I の化合物の医薬組成物の製造のための使用。

[態様 1 6]

態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の式 I の化合物を含む、化粧用組成物。

[態様 1 7]

美白作用または美肌作用を有する態様 1 6 に記載の化粧用組成物。

[態様 1 8]

態様 1 - 8 のいずれか 1 項に記載の式 I の化合物を含む、研究用試薬。

【 手続補正 6 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 2 4

10

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 2 4 】

置換若しくは未置換のアリールは、単純芳香環から誘導された芳香族炭化水素基および多環芳香族炭化水素基を含む。アリールは、好ましくは単純芳香環の芳香族炭化水素基、即ち、炭素数が 6 の C₆アリールである。置換若しくは未置換のアリールは、非限定的に、フェニル基、ベンジル基、トリル基、キシリル基、ナフチル基を含む。

【 手続補正 7 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 4 0

20

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 4 0 】

本明細書において、フィチン酸 (myo - イノシトール - 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6六リン酸、IP6) のエステル誘導体、即ち、式 I の化合物を総称して、あるいは、式 I に含まれる特定の化合物を「Pro - IP6」と呼称する場合がある。「Pro - IP6」の IP6 のプロドラッグ、との意味を有する。本明細書においては、「プロドラッグ」とは、生体内投与後に代謝される、あるいは化合物の生物学的、医薬的または治療的に活性化型に転換される化合物である。

【 手続補正 8 】

30

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 6 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 6 9 】

実施例 3 において Pro - IP6 は、正常細胞に対して毒性を示さないことが示された。式 I の化合物を含む組成物は生体に対して安全に使用でき、医薬組成物または化粧用組成物として有用である。

【 手続補正 9 】

【 補正対象書類名 】 明細書

40

【 補正対象項目名 】 0 0 8 5

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 8 5 】

メチレンジブチレート (1) の合成

酪酸 (2 . 6 5 g = 2 . 7 5 m l 、 3 0 . 1 m m o l) に 2 M NaOH 水溶液 (3 0 m l) を加え 3 0 分間攪拌した。その後、テトラブチルアンモニウム硫酸水素塩 (1 0 . 2 g 、 3 0 . 5 m m o l) を加え 3 0 分攪拌し、水層を CH₂Cl₂ (5 0 m l × 4) で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過して 2 日間 4 5 ° で還流した。CH₂Cl₂ を溜去することにより結果物を濃縮し、ヘキサン (6 0 m l) に溶かし 1 0 %

50

酢酸 (50 ml)、水 (50 ml × 2)、飽和食塩水 (50 ml) で分液して硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥後濾液をエバポレーターで濃縮し、無色液体の化合物、メチレンジブチレート (1) (1.354 g、96%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 0.96 (t, 6H, CH_3), : 1.66 (sext, 4H, CH_2CH_3), : 2.34 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), : 5.76 (s, 2H, OCH_2O)

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

10

【補正の内容】

【0090】

HeLa細胞 (5 × 10⁵ 細胞/ウェル、培養液 1 mL) を 3.5 cm ディッシュに播種し、24時間培養した。その後、DMSO (1%、富士フィルム和光純薬株式会社、IP6 (最終濃度: 10 μM, シグマアルドリッチ) の水溶液 (1%)、または、実施例1で合成したPro-IP6 (最終濃度: 10 μM) のDMSO溶液 (1%) を加え、さらに30分間培養した。ネガティブコントロールとして、IP6、Pro-IP6のいずれも加えずに培養したHeLa細胞に上記と同量のDMSOを加えたものを用いた。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

20

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

実施例3 MTTアッセイ

本実施例では、MTTアッセイにより、4種類の血液がん細胞株および健常者由来の細胞に対するPro-IP6の殺細胞効果を調べた。MTTアッセイは、MTT (3-(4,5-ジ-メチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) をホルマザン色素 (紫色) へ還元する酵素活性を測定する比色定量法である。MTTアッセイにより培養細胞の生存率を調べることが可能である。

30

がん細胞株 (1.74 × 10⁴ 細胞/ウェル、培養液 200 μL)

MT-2細胞 (HTLV形質転換ヒトT細胞白血病細胞)

M8166細胞 (ヒトT-リンパ芽球様細胞)

ジャーカット細胞 (ヒトT-リンパ球細胞株)

K562細胞 (慢性骨髄性白血病細胞)

健常者由来の細胞 (5.0 × 10⁵ 細胞/ウェル、培養液 200 μL)

PBMC (末梢血単核球細胞)

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

40

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

Jurkat細胞 (1 × 10⁵ 細胞/ウェル、培養液 500 μL) を 24 ウェルプレートに播種し、終夜培養した。その後、DMSO (1%、富士フィルム和光純薬株式会社)、IP6 (最終濃度: 10 μM、シグマアルドリッチ) の水溶液 (1%)、またはPro-IP6 (最終濃度: 1 μM または 10 μM) のDMSO溶液 (1%) を加え、8時間または24時間培養した。上清を取り除き、1 × PBS (-) で1回洗浄した後Laemmliサンプルバッファーを加えて1時間100 で煮沸して細胞を溶解した。これを電気泳動した後に膜 (Millipore) に転写し、anti-phospho-Akt (

50

Thr308)抗体(CST)、anti-PARP-1抗体(Merck)、Caspase-3抗体(CST)、または、anti- α -アクチン抗体(シグマアルトリッチ)を一次抗体として反応させた。検出はImmunoStar LD(富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて行った。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0104

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0104】

マウスへの投与薬剤は以下のように調製した。1日の投与量を20mg/kgとなるようにした。

1. DMSO 2 μ l + 生理食塩水 198 μ l

2. IP6 2 μ l + 生理食塩水 196 μ l + DMSO 2 μ l (終濃度 7.1 mg/kg : 11 μ mol/kg、DMSO 1%)

3. pro-IP6 2 μ l + 生理食塩水 198 μ l (終濃度 20 mg/kg : 11 μ mol/kg、DMSO 1%) 0.2 ml (DMSO 1%)

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0115

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0115】

Jurkat細胞(1 x 10⁵細胞/ウェル、培養液500 μ L)を24ウェルプレートに播種し、終夜培養した。その後、DMSO(1%、富士フィルム和光純薬株式会社)、IP6(最終濃度:10 μ M、シグマアルトリッチ)の水溶液(1%)、またはPro-IP6(最終濃度:1 μ Mまたは10 μ M)のDMSO溶液(1%)を加え、8時間または24時間培養した。上清を取り除き、1 x PBS(-)で1回洗浄した後Laemmliサンプルバッファーを加えて1時間100℃で煮沸して細胞を溶解した。これを電気泳動した後に膜(Millipore)に転写した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

式Iの化合物は細胞内に有意にとりこまれ、がん細胞等の悪性細胞に対する殺細胞効果、抗腫瘍効果等を含め、フィチン酸(IP6)と同様の作用効果を奏する。またPro-IP6は、正常細胞に対して毒性を示さない。式Iの化合物を含む医薬組成物および化粧用組成物は、IP6よりも効果の高かつ生体に安全な組成物として有用である。

10

20

30

40

50