

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-506565

(P2014-506565A)

(43) 公表日 平成26年3月17日 (2014.3.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 D 239/91 (2006.01)	C 0 7 D 239/91 C S P	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

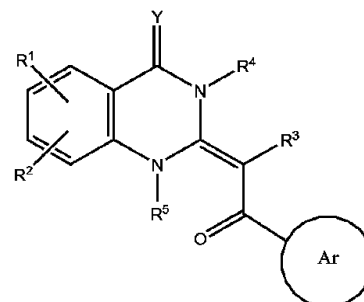
(21) 出願番号	特願2013-550547 (P2013-550547)	(71) 出願人	513182787
(86) (22) 出願日	平成24年1月18日 (2012.1.18)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月19日 (2013.9.19)		ザ リーランド スタンフォード ジュ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/021639		ニア ユニバーシティ
(87) 国際公開番号	W02012/099916		The Board of Truste
(87) 国際公開日	平成24年7月26日 (2012.7.26)		es of the Leland St
(31) 優先権主張番号	61/434, 545		anford Junior Unive
(32) 優先日	平成23年1月20日 (2011.1.20)		rsity
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
			306, パロ アルト, エル カミノ リ
			アル 1705
		(74) 代理人	100090251
			弁理士 森田 憲一
		(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイニンのキナゾリノン阻害剤

(57) 【要約】

R³ が、水素原子、シアノ基、ニトロ基、アセチル基及び -C(=O)NH₂ から選択され、Ar が、場合により置換されていることのある単環式又は二環式アリール基又はヘテロアリール基である式 (1) で表される化合物は、抗腫瘍剤として有用である。

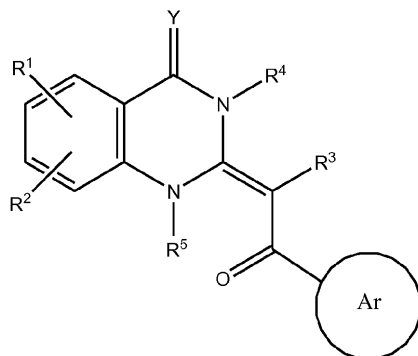


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

【化 1】



10

〔式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ、独立して、水素原子、ハロゲン原子、 $(C_1 \sim C_{10})$ 炭化水素基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、ジ $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシルアミノ基、及び $-A-R^{10}$ から選択され、ここで、 A は、 $(C_1 \sim C_6)$ 炭化水素基であり、 R^{10} は、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、ジ $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基及び $(C_1 \sim C_6)$ アシルアミノ基から選択され；

20

R^3 は、水素原子、シアノ基、ニトロ基、アセチル基及び $-C(=O)NH_2$ から選択され；

R^4 及び R^5 は、それぞれ、独立して、水素原子及びメチル基から選択され；

30

Y は、 O 又は NR^8 であり；

R^8 は、水素原子及び $(C_1 \sim C_7)$ 炭化水素基から選択され、

Ar は、場合により置換されていることのある単環式又は二環式アリール基又はヘテロアリール基であり；

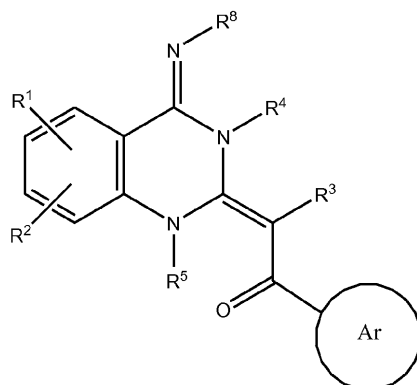
Y が O である場合には、 Ar は、2, 4 - ジクロロフェニルであり、 R^1 、 R^2 、 R^4 及び R^5 が水素原子であり、 R^3 がシアノ基ではないものとする]

で表される化合物。

【請求項 2】

式：

【化 2】



40

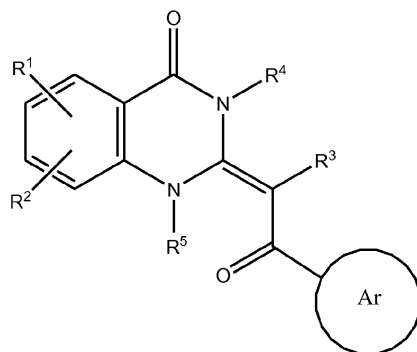
50

で表される請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

式：

【化 3】



10

で表される請求項 1 記載の化合物。

【請求項 4】

Ar が、フェニル基、ナフチル基、チオフェニル基、フラニル基、ピロリル基及びピリジニル基から選択され、それらのうちのいくつかは場合により置換基がハロゲン原子、(C₁ ~ C₁₀) 炭化水素基、フルオロ(C₁ ~ C₆) アルキル基、-O-(C₁ ~ C₆) フルオロアルキル基、-CN、ニトロ基、(C₁ ~ C₆) アルコキシカルボニル基及び(C₁ ~ C₆) アシル基から独立して選択された置換基 1 ~ 3 個で置換されていることができる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 5】

Ar が、ハロゲン原子 1 ~ 3 個で置換されたフェニル基である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

Ar が、2, 4 - ジクロロフェニル又は 3, 4 - ジクロロフェニルである、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

R⁴ 及び R⁵ が、水素原子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

R³ が、H 又は CN である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 9】

R² が、H であり、R¹ が、H、ハロゲン原子、メトキシ基、アミノプロパルギル基及びアセトアミドプロパルギル基から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 10】

R¹ が、H 又はハロゲン原子である請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

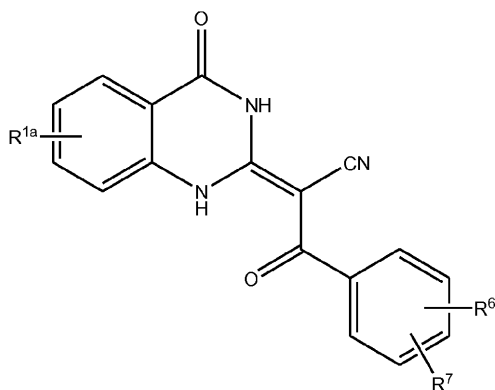
R³ が、CN であり；R²、R⁴ 及び R⁵ が、H であり；R¹ が、H 及びハロゲン原子から選択される、請求項 6 に記載の化合物。

40

【請求項 12】

式：

【化 4】



10

(式中、

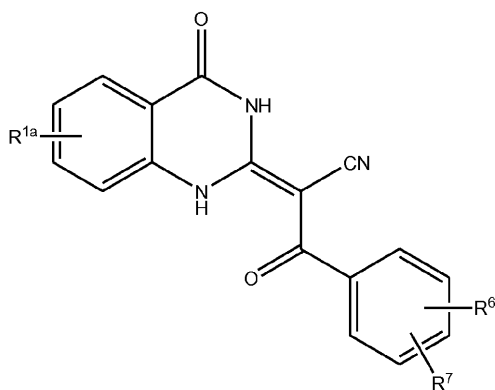
R^{1 a} は、水素又はハロゲン原子であり；R⁶ 及び R⁷ は、ハロゲン原子である)

で表される化合物をダイニンに接触させることを含むダイニンを阻害する方法。

【請求項 1 3】

式：

【化 5】



20

(式中、

R^{1 a} は、水素又はハロゲン原子であり；R⁶ 及び R⁷ は、ハロゲン原子である)

で表される化合物を、繊毛の少なくとも一つを有する細胞に接触させることを含む繊毛の逆行性輸送を阻害する方法。

【請求項 1 4】

前記阻害方法が、インピトロにおける方法である、請求項 1 2 又は 1 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 5】

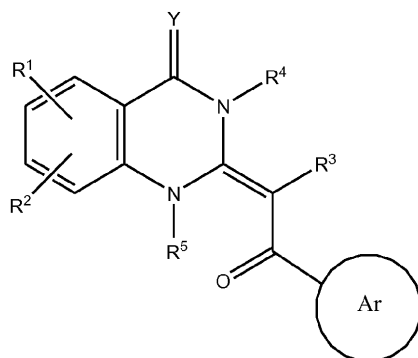
前記阻害方法が、インピボにおける方法である、請求項 1 2 又は 1 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 6】

式：

40

【化 6】



10

〔式中、

R¹ 及び R² は、それぞれ、独立して、水素原子、ハロゲン原子、(C₁ ~ C₁₀) 炭化水素基、-O-(C₁ ~ C₆) アルキル基、フルオロ(C₁ ~ C₆) アルキル基、-O-(C₁ ~ C₆) フルオロアルキル基、水酸基、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、-CN、ニトロ基、-S-(C₁ ~ C₆) アルキル基、(C₁ ~ C₆) アルコキシカルボニル基、(C₁ ~ C₆) アシル基、アミノ基、(C₁ ~ C₆) アルキルアミノ基、ジ(C₁ ~ C₆) アルキルアミノ基、(C₁ ~ C₆) アシルアミノ基、及び -A-R¹⁰ から選択され、ここで、A は(C₁ ~ C₆) 炭化水素基であり、R¹⁰ は -O-(C₁ ~ C₆) アルキル基、フルオロ(C₁ ~ C₆) アルキル基、-O-(C₁ ~ C₆) フルオロアルキル基、水酸基、-CN、ニトロ基、-S-(C₁ ~ C₆) アルキル基、(C₁ ~ C₆) アルコキシカルボニル基、(C₁ ~ C₆) アシル基、アミノ基、(C₁ ~ C₆) アルキルアミノ基、ジ(C₁ ~ C₆) アルキルアミノ基及び(C₁ ~ C₆) アシルアミノ基から選択され；

20

R³ は、水素原子、シアノ基、ニトロ基、アセチル基及び -C(=O)NH₂ から選択され；

R⁴ 及び R⁵ は、それぞれ、独立して、水素原子及びメチル基から選択され；

Y は、O 又は NR⁸ であり；

R⁸ は、水素原子及び(C₁ ~ C₇) 炭化水素から選択され、

Ar は、場合により置換されていることのある単環式又は二環式アリール基又はヘテロアリール基であり；

30

Y が O である場合には、Ar が 2, 4 - ジクロロフェニルであり、R¹、R²、R⁴ 及び R⁵ が水素原子であり、R³ がシアノ基ではないものとする〕

で表される化合物を固形腫瘍に接触させることを含む、固形腫瘍の成長を阻害する方法。

【請求項 17】

前記固形腫瘍が、基底細胞癌、悪性腫瘍及び髄芽腫から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願に関する相互参照】

【0001】

40

本出願は、米国仮出願第 61/434545 号(2011 年 1 月 20 日出願)の優先権を主張する。前記出願の全開示は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0002】

《連邦政府による資金提供を受けた研究》

以下の発明は、米国国立がん研究所及び国立衛生研究所によって授与された契約番号 R01-CA136574、R01-GM71772、及び R01-GM65933 の下で、米国政府支援によりなされたものである。米国政府は、この発明において一定の権利を有する。

【0003】

《発明の分野》

50

本発明は、 $AAA^+ATPase$ ファミリーのメンバーの選択的阻害剤である4-オキソ-3,4-ジヒドロキナゾリン-2(1H)-イリデン誘導体に関する。本化合物は、抗腫瘍剤として、そしてダイニンに依存するシステムの機能のプロープとして有用である。

【0004】

《発明の背景》

AAA^+ ファミリー（多様な細胞の活動に関係する $ATPase$ ）に属する酵素は、 ATP の加水分解によって、原核生物と真核生物の生物学上の多様な側面を調節するための機械的な力を発生させる。これらの複合タンパク質は、一般的にはリングの形状をし、中心孔を有する6量体を形成しており、これらの分子機械を増加させる ATP 依存性配座転移は、DNAの複製、オルガネラの発生及び小胞輸送の間の膜融合複合体の分解、微小管に沿った細胞内物質の運搬、及びタンパク質分解のためのタンパク質アンフォールディングの促進を行うことができる。 $AAA^+ATPase$ ファミリーのサブクラスの一つは、ダイニン1及びダイニン2を含む。細胞質ダイニン1は、ダイナクチン及び核タンパク質であるNuMAと複合体を形成し、有糸分裂の紡錘体の内部に微小管のマイナス末端を集中させるという働きを行う。これらの働きが、紡錘状の形状を形成し、 γ -チューブリン及び微小管と核の複合体を紡錘体極へ局在させる。抗体のブロック又はドミナントネガティブ構築を原因とする細胞質内ダイニン1の阻害は、有糸分裂を攪乱し、 γ -チューブリンの漸増が止まり、微小管末端の規則正しさが失われる結果となる。ダイニン2は、一次繊毛内のタンパク質輸送メカニズムに不可欠であり、一次繊毛において軸系に沿った高分子の動きに関係している。繊毛内の逆行性輸送に、細胞質ダイニン2とIFTA複合体が利用されている。小分子 $AAA^+ATPase$ 阻害剤は、迅速かつ可逆的に作用することができるものが、ダイニンの機能のプロープとしても、将来的な抗腫瘍剤としても特に必要とされている。

10

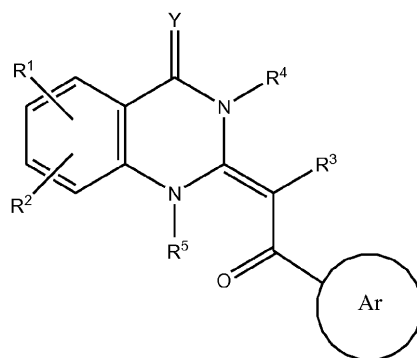
20

【0005】

《発明の要約》

或る観点においては、本発明は、式I：

【化1】



I

30

40

[式中、

R^1 及び R^2 は、それぞれ、独立して、水素原子、ハロゲン原子、 $(C_1 \sim C_{10})$ 炭化水素基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、ジ $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシルアミノ基、及び $-A-R^{10}$ から選択され；ここで、 A は、 $(C_1 \sim C_6)$ 炭化水素であり、 R^{10} は、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ ア

50

ルキルアミノ基、ジ(C₁ ~ C₆)アルキルアミノ基及び(C₁ ~ C₆)アシルアミノ基から選択され；

R³は、水素原子、シアノ基、ニトロ基、アセチル基及び-C(=O)NH₂から選択され；

R⁴及びR⁵は、それぞれ、独立して、水素原子及びメチル基から選択され；

Yは、O又はNR⁸であり；

R⁸は、水素原子及び(C₁ ~ C₇)炭化水素から選択され、

Arは、場合により置換されていることのある単環式又は二環式アリール基又はヘテロアリール基である]

で表される化合物に関する。

10

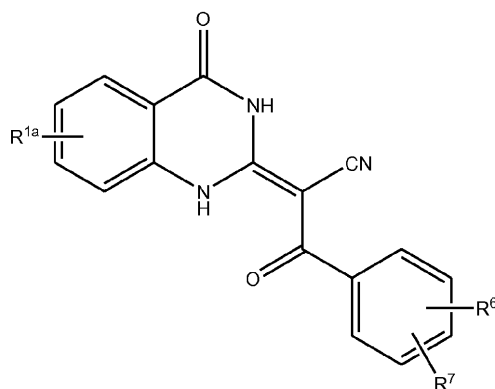
【0006】

別の観点においては、本発明は固形腫瘍に式(I)で表される化合物を接触させることを含む、固形腫瘍の成長を阻害する方法に関する。

【0007】

別の観点においては、本発明はダイニンに式(II)

【化2】



20

II

(式中、

R^{1a}は、水素原子又はハロゲン原子であり；

30

R⁶及びR⁷は、ハロゲン原子である)

で表される化合物を接触させることを含むダイニンを阻害する方法に関する。

【0008】

別の観点においては、繊毛の少なくとも一つを有する細胞に式(II)で表される化合物を接触させることを含む繊毛の逆行性輸送を阻害する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

図1は、本発明の2つの実施例に関して、薬剤濃度の関数として、繊毛サイズを表した棒グラフである。

【0010】

40

《発明の詳細な説明》

本発明による抗腫瘍性化合物は、2つの主要な種類に分類される：一般式(1)で表される化合物は、ヘッジホッグシグナル伝達を阻害することにより、腫瘍の成長を阻害する。亜属(II)は、ダイニンを選択的に阻害し、腫瘍の成長も阻害するが、異なったメカニズムを有する。ヘッジホッグシグナル伝達の阻害は、インビボにおける固形腫瘍、特に基底細胞癌、悪性腫瘍及び髄芽腫の治療に有効であることが示されてきた。例えば、Rudin et al. [N. Engl. J. Med. 361, 1173-1178 (2009)]が示すところによると、ヘッジホッグ経路の小分子阻害剤であるGDC-0449を患者に投与すると、髄芽腫が退縮する結果となる。同様に、Von Hoff et al. [N. Engl. J. Med. 361, 1164-1172 (2009)]は、基

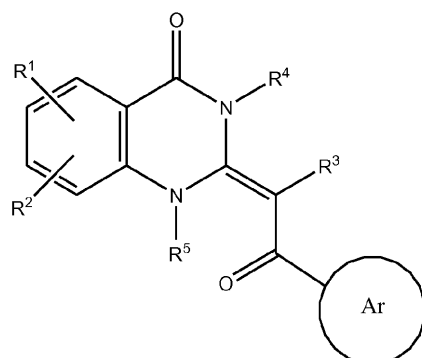
50

底細胞癌を有する 33 名のヒト患者に GDC - 0449 を投与して、臨床的に有意な応答を観察した。

【0011】

或る観点においては、本発明は式 (I) で表される化合物に関する。

【化 3】



(I)

10

【0012】

これらの化合物では R^1 及び R^2 は、それぞれ、独立して、水素原子、ハロゲン原子、 $(C_1 \sim C_{10})$ 炭化水素基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、メチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、ジ $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシルアミノ基、及び $-A-R^{10}$ から選択され；ここで、 A は、 $(C_1 \sim C_6)$ 炭化水素であり、 R^{10} は、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、フルオロ $(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $-O-(C_1 \sim C_6)$ フルオロアルキル基、水酸基、 $-CN$ 、ニトロ基、 $-S-(C_1 \sim C_6)$ アルキル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルコキシカルボニル基、 $(C_1 \sim C_6)$ アシル基、アミノ基、 $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基、ジ $(C_1 \sim C_6)$ アルキルアミノ基及び $(C_1 \sim C_6)$ アシルアミノ基から選択される。いくつかの実施態様においては、 R^2 は、 H であり、そして、 R^1 は、 H 、ハロゲン原子、メトキシ基、アミノプロパルギル基及びアセトアミドプロパルギル基から選択される。いくつかの実施態様においては、 R^1 は、水素原子又はハロゲン原子である。

20

30

【0013】

属 (I) の化合物では、 R^3 は、水素原子、シアノ基、ニトロ基、アセチル基又は $-C(=O)NH_2$ であることができる。いくつかの実施態様においては、 R^3 は、シアノ基である。

【0014】

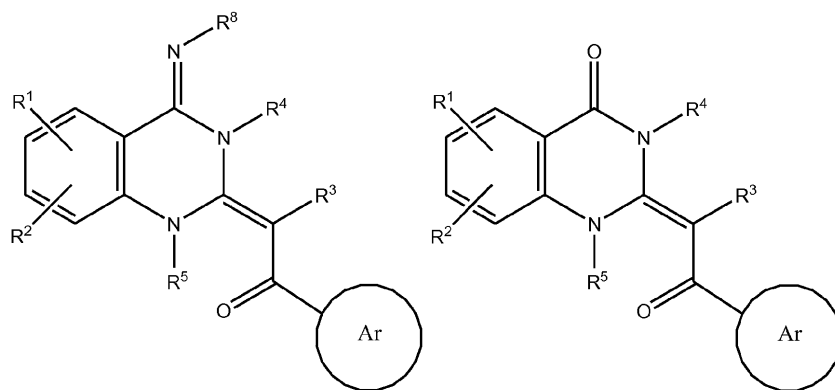
属 (I) の化合物では、 R^4 及び R^5 は、水素原子又はメチル基であることができ；そして、多くの実施態様においては、ともに水素原子である。

【0015】

式 (I) で表される化合物は、 Y の値により二種類の亜属に分類することができ、一方の亜属では、 Y は NR^8 であり；もう一方の亜属においては、 Y は O である。

40

【化 4】



Ia

Ib

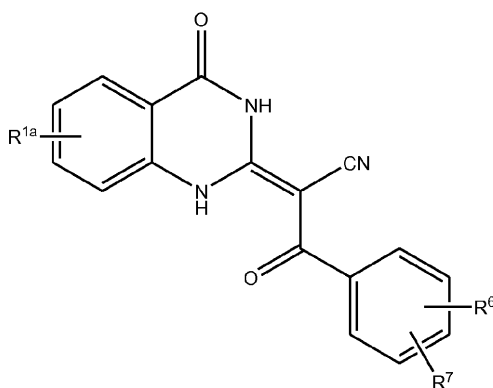
【 0 0 1 6 】

属 (I) の化合物 [例えば、構造式 (I a) 及び (I b)] では、Ar は、場合により置換されていることのある単環式若しくは二環式アリール基又は単環式若しくは二環式ヘテロアリール基から選択される。場合により置換されていることのあるアリール基やヘテロアリール基の例としては、例えば、フェニル基、ナフチル基、イミダゾール、ピリジン、インドール、チオフェン、ベンゾピラノン、チアゾール、フラン、ベンゾイミダゾール、キノリン、イソキノリン、キノキサリン、ピリミジン、ピラジン、テトラゾール及びピラゾールがある。いくつかの実施態様においては、Ar はフェニル基、ナフチル基、チオフェニル基、フラニル基、ピロリル基、ピリジニル基から選択され、それらのうちのいくつかは、場合により、置換基がハロゲン原子、(C₁ ~ C₁₀) 炭化水素基、フルオロ (C₁ ~ C₆) アルキル基、- O - (C₁ ~ C₆) フルオロアルキル基、- C N、ニトロ基、(C₁ ~ C₆) アルコキシカルボニル基及び (C₁ ~ C₆) アシル基から独立して選択された置換基 1 ~ 3 個で置換されたものであることができる。いくつかの実施態様においては、Ar は、ハロゲン原子 1 ~ 3 個で置換されたフェニル基であることができる。いくつかの実施態様においては、Ar は、2, 4 - ジクロロフェニル又は 3, 4 - ジクロロフェニルである。(4) では、いくつかの実施態様においては、R⁸ は水素原子又はメチル基である。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施態様においては、R³ は、C N であり；R²、R⁴ 及び R⁵ は、H であり；R¹ は、H 及びハロゲン原子から選択される。いくつかの実施態様においては、R³ は、C N であり；R²、R⁴ 及び R⁵ は、H であり；R¹ は、H 及びハロゲン原子から選択され、そして、Ar は、ハロゲン原子 1 ~ 3 個で置換されたフェニル基である。これらの中でも、式 (II)

【化 5】



II

(式中、R^{1 a} は、水素原子又はハロゲン原子であり；そして R⁶ 及び R⁷ がハロゲン原

子である)

で表される化合物は、ダイニン阻害に関して選択的である。

【0018】

前述の親属及びその亜属を含む全ての化合物は、ヘッジホッグ経路及び/又はダイニンのモジュレーターとして有用である。しかし、全ての化合物が新規であるわけではない。特に、文献調査によると、Arが、2,4-ジクロロフェニルであり、R¹、R²、R⁴及びR⁵が、水素原子である場合は、R³が、シアノ基である化合物は、権利を請求することができない[PCT WO2009/102864, 53ページ, 構造式18参照]。審査の結果、本明細書で除外されていない追加の種や亜属が、本件発明者に対して特許可能でないことが見出されるかもしれない。この場合において、その結果生じた出願人の特許請求の範囲からの種や亜属の除外は、特許審査手続の人為的結果であり、本件発明者の発明に対する概念や記載を反映したものと見なされるべきではない。本発明は、構成物の態様において、公共の所有物であるものを除き、式(I)で表される全ての化合物を包含する。

10

【0019】

《定義》

この明細書の全体にわたり、用語及び置換基は、その定義を保持する。

【0020】

アルキル基は、直鎖状、分岐状、又は環状炭化水素構造及びその組み合わせを含むことを意味する。組み合わせは、例えば、シクロプロピルメチル基であろう。全ての炭素が必ずsp³であり、sp²又はspである炭素が一つもない全ての炭化水素基は、アルキル基であるとみなされる。完全に明確にするために述べると、置換基が(C₁~C₆)アルキル基であるとする場合、これは、直鎖(例えばメチル又はエチル)、分子鎖(例えばt-ブチル)、シクロアルキル(例えばシクロプロピル又はシクロブチル)又はこれらの組み合わせ(例えばメチルシクロプロピル)であることを意味する。しかしながら、置換基をより具体的に説明する場合には、以下の定義となる;例えば、シクロアルキル基との記載は、環状アルキル基を示し、直鎖状アルキル基又はこれらの組み合わせを含まない。低級アルキル基との記載は、炭素原子1~6個のアルキル基を示す。低級アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、ブチル基、s-及びt-ブチル基、及びシクロブチル基などが挙げられる。好ましいアルキル基は、C₂₀又はそれ未満のアルキル基である。シクロアルキル基はアルキル基の下位集合であり、シクロアルキル基としては炭素原子3~8個の環状炭化水素基が挙げられる。シクロアルキル基の例としては、c-プロピル基、c-ブチル基、c-ペンチル基、及びノルボルニル基、アダマンチル基などが挙げられる。

20

30

【0021】

アルコキシ基又はアルコキシル基は、親構造に酸素原子を介して結合している炭素原子1~8個の直鎖状、分岐状、又は環状構造及びその組み合わせのアルキル基を指す。例としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、シクロプロピルオキシ基、及びシクロヘキシルオキシ基などが挙げられる。低級アルコキシ基は、1~4個の炭素原子を含有する基を指す。

40

【0022】

アリール基及びヘテロアリール基は、5若しくは6員の芳香環基又はO、N、若しくはSから選択されるヘテロ原子を0~3個含有する5若しくは6員の芳香族複素環基;二環式9若しくは10員の芳香環系基又はO、N、若しくはSから選択されるヘテロ原子を0~3個含有する二環式9若しくは10員の芳香族複素環系基;あるいは、三環式13若しくは14員の芳香環系基又はO、N、若しくはSから選択されるヘテロ原子を0~3個含有する三環式13若しくは14員の芳香族複素環系基を意味する。芳香族6~14員の炭素環式環としては、例えば、ベンゼン、ナフタレン、インダン、テトラリン、及びフルオレンが挙げられ、5~10員の芳香族複素環式環としては、例えば、イミダゾール、ピリジン、インドール、チオフェン、ベンゾピラノン、チアゾール、フラン、ベンゾイミダゾ

50

ール、キノリン、イソキノリン、キノキサリン、ピリミジン、ピラジン、テトラゾール及びピラゾールが挙げられる。本明細書で使用されるアリール基及びヘテロアリール基は、1以上の環が芳香族であるが、全てが芳香族である必要はない残基を指す。

【0023】

アリールアルキル基は、アルキル残基と結合したアリール環を意味し、親構造体への結合地点がアルキルを介したものである。例としては、ベンジル、フェネチルなどが挙げられる。ヘテロアリールアルキル基は、アルキル残基を介して親構造体に結合したヘテロアリール環を意味する。例としては、例えば、ピリジニルメチル基、ピリジニルエチル基などが挙げられる。

【0024】

C₁ ~ C₁₀ 炭化水素基は、元素構成としては水素原子及び炭素原子のみからなる直鎖状、分岐状又は環状の残基を意味し、アルキル基、シクロアルキル基、ポリシクロアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基及びその組み合わせが挙げられる。例としては、ベンジル基、フェネチル基、シクロヘキシルメチル基、シクロプロピルメチル基、シクロブチルメチル基、アリール基及びカンホリル基が挙げられる。

【0025】

特に説明のない限り、用語「炭素環」は、環原子が全て炭素であるが、任意の酸化状態となる環系を含むことを意味する。このように、(C₃ ~ C₁₀)炭素環とは、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、ベンゼン、シクロヘキセン及びシクロヘキサジエンなどの系統を含む非芳香族及び芳香族の両方を意味し；(C₈ ~ C₁₂)多炭素環とは、ノルボルナン、デカリン、インダン、アダマンタン及びナフタレンなどの系統を意味する。炭素環は、他の方法で制限されない限りは、単環、二環及び多環を意味する。

【0026】

複素環基は、1 ~ 3個の炭素原子が、酸素原子、窒素原子若しくは硫黄原子などのヘテロ原子により置き換えられているシクロアルキル又はアリール残基を意味する。ヘテロアリール基は、複素環基の下位集合を形成する。複素環の例としては、ピロリジン、ピラゾール、ピロール、イミダゾール、インドール、キノリン、イソキノリン、テトラヒドロイソキノリン、ベンゾフラン、ベンゾジオキサソール、ベンゾジオキサソール（置換基として存在するときは、一般にメチレンジオキシフェニル基という）、テトラゾール、モルホリン、チアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、チオフェン、フラン、オキサゾール、オキサゾリン、イソオキサゾール、ジオキサソール、及びテトラヒドロフランなどが挙げられる。

【0027】

本明細書で用いる用語「場合により置換されていることのある」とは、「置換された又は置換されていない」のどちらでも用いることができる。用語「置換された」は、特定の基の水素原子の1以上が、特定の遊離基に置換されることを意味する。例えば、置換されたアルキル基、アリール基、シクロアルキル基、そして、ヘテロシクリル基などは、アルキル基、アリール基、シクロアルキル基又はヘテロシクリル基の中の各残基中の水素原子の1以上が、ハロゲン原子、ハロアルキル基、アルキル基、アシル基、アルコキシアルキル基、ヒドロキシ低級アルキル基、カルボニル基、フェニル基、ヘテロアリール基、ベンゼンスルホニル基、水酸基、低級アルコキシ基、ハロアルコキシ基、オキサアルキル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基[- C(=O)O - アルキル基]、アルコキシカルボニルアミノ基[HNC(=O)O - アルキル基]、カルボキシアミド基[- C(=O)O - NH₂]、アルキルアミノカルボニル基[- C(=O)NH - アルキル基]、シアノ基、アセトキシ基、ニトロ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、(アルキル)(アリール)アミノアルカリ基、アルキルアミノアルキル基(シクロアルキルアミノアルキル基を含む)、ジアルキルアミノアルキル基、ジアルキルアミノアルコキシ基、ヘテロシクリルアルコキシ基、メルカプト基、アルキルチオ基、スルホキシド基、スルホン基、スルホニルアミノ基、アルキルサルフィニル基、アルキルサルフォニル基、

10

20

30

40

50

アシルアミノアルキル基、アシルアミノアルコキシ基、アシルアミノ基、アミジノ基、アリール基、ベンジル基、ヘテロシクリル基、ヘテロシクリルアルキル基、フェノキシ基、ベンジロキシ基、ヘテロアリールオキシ基、ヒドロキシイミノ基、アルコキシイミノ基、オキサアルキル基、アミノスルホニル基、トリチル基、アミジノ基、グアニジノ基、ウレイド基、ベンジロキシフェニル基、そして、ベンジロキシ基に置換されたものを意味する。「オキシ」はまた、「場合により置換されていることのある」を意味する置換基の中に含まれる；オキシは、2価の遊離基であるので、置換基（例えばフェニル基）としては適切ではない状況があることを当業者は理解するであろう。「場合により置換されていることのある」残基の大抵のケースは、水素原子の1, 2又は3個が、特定の遊離基に置き換えられているものであるが、フルオロアルキル残基のケースにおいては、水素原子の3個以上がフッ素に置換されることができ；加えて、全ての利用可能な水素原子が、フッ素に置換されることができる、例えばペルフルオロプロピルである。

10

【0028】

本明細書に記載の化合物は、側鎖に1以上の不斉中心を含有し、従って、絶対立体化学の観点から(R) - 又は(S) - と定義することのできる鏡像異性体、ジアステレオマー、及びその他の立体異性体を生じる可能性がある。本発明は、全てのそのような可能な異性体、並びにそれらのラセミ体及び光学的に純粋な形態を含むことを意味する。光学的に活性な(R) - 、及び(S) - 異性体は、キラルシントロン又はキラル試薬を使用して調整することができ、又は従来技術を用いて分割することができる。本明細書に記載する化合物が、オレフィン二重結合又は他の幾何学的不斉中心を含む場合は、特に説明のない限り、その化合物は、E及びZの両方の幾何異性体を含むことを意味する。同様に、全ての互変異性体もまた含まれることを意味する。

20

【0029】

本明細書で用いている「化合物」の記載は、明示的にさらに限定しない限りは、その化合物の塩を含むことを意味することを、当業者は理解するであろう。特定の実施形態では、用語「式(I)で表される化合物」は、化合物又はその化合物の薬学的に許容される塩を意味する。

【0030】

本発明の化合物は、放射性同位体で標識された形で存在することができるものと理解されたい。すなわち、本発明の化合物は、通常天然で見出される原子量若しくは原子番号と異なる原子量若しくは原子番号を含む原子を1以上含むことができる。あるいは、単一構造の多くの分子は、天然で見出される同位体比とは異なる同位体比で発生する少なくとも1つの原子を含むことができる。水素、炭素、リン、フッ素、塩素及びヨウ素には、例えば、 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I が含まれる。これらの放射性同位体及び/又は他の原子の他の同位元素を含む化合物は、本発明の範囲内である。 ^3H 、 ^{14}C 及びヨウ素の放射性同位体を含む化合物は、それらの調整及び検出の容易さから、特に好ましい。 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 及び ^{18}F の同位体を含む化合物は、ポジトロン断層法に大変適している。本発明の式(I)及び式(II)で表される放射標識化合物は、一般的に、当業者にとって周知の方法によって調製することができる。容易に、入手可能な放射標識された試薬を放射標識されていない試薬に代えて使用することで、そのような放射標識化合物は、開示された実施例及びスキームの手順を行うことにより、簡便に調整することができる。

30

40

【0031】

本発明は、多くの異なる形態にある実施態様になり得るが、本発明の好ましい実施態様を説明する。しかしながら、この開示は本発明の原理の例示とみなされるべきであり、説明される実施態様の説明に本発明を限定することを意図していないことは理解されるべきである。

【0032】

インビボにおいて、式(I)及び式(II)で表される化合物が、抗腫瘍薬として用いられる場合に、それは未加工の化学物質として投与されるが、医薬組成物としてそれらを提

50

供することが好ましい。更なる実施態様においては、本発明は、式（Ⅰ）若しくは式（Ⅱ）で表される化合物、又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物、薬学的に許容可能な担体の１又はそれ以上、及び場合によっては、他の治療成分の１又はそれ以上を含む医薬組成物を提供する。担体は、製剤の他成分と適合し、その受容者にとって有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。組成物は、経口、局所又は非経口投与用に製剤化することができる。例えば、静脈内、動脈内、皮下、そして、直接、中枢神経系・髄腔内若しくは脳室内のどちらかに投与されてもよい。

【００３３】

製剤は、経口又は非経口（皮下、皮内、筋肉内、静脈内及び関節内を含む）に適したものの、直腸又は局所（皮膚類、舌下及び眼内を含む）投与に適したものを含む。化合物は、好ましくは経口で又は注射（静脈又は皮下）で投与される。患者への正確な投与量は、主治医が権限を有する。しかしながら、用いられる投与量は、患者の年齢及び性別、治療されている正確な疾患及び重症度など多くの要因に依存する。また、投与経路は、その重症度の状態に応じて変わる可能性がある。製剤は、便利なことに単位剤形で提供され、薬学の分野についての当業者にとって周知な方法で調整される。一般的には、活性成分を液体担体又は微粉個体担体と均一かつ十分に混合することにより製剤を製造し、次いで、必要であれば、望ましい製剤に形成する。

10

【００３４】

本発明の経口投与に適した製剤は、それぞれが活性成分の規定量を含むカプセル剤、カシェ剤、又は錠剤のように分離した単位で、又は水中油型液体エマルジョン若しくは油中水型液体エマルジョンとして提供することができる；粉末又は顆粒として提供でき；水性液体若しくは非水性液体中の液剤又は懸濁液として提供することができる；活性成分は、ポーラス、舐剤又はペーストとしても提供することができる。

20

【００３５】

錠剤は、場合により、補助成分の１つ以上とともに、圧縮又は成形によって作製することができる。圧縮錠は、場合により、結合剤、潤沢剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤若しくは分散剤と混合された流動型の粉剤又は顆粒剤を、適切な機械で圧縮することにより調整することができる。成形錠剤は、粉末化した化合物を不活性液体希釈剤で湿らせ、適切な機械において成形することにより調整することができる。錠剤は、場合により、その中の活性成分の放徐又は制御放出のために、コーティングし、又は割線を入れることができる。

30

【００３６】

非経口投与用製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤及び意図されたレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含むことができる水性及び非水性の滅菌注射剤、並びに、沈殿防止剤や増粘剤を含むことができる水性及び非水性の滅菌懸濁液を含むことができる。製剤は、単位用量又は複数回用量容器、例えば、密封アンプル及びバイアルに入れてもよく、滅菌液体担体、例えば、生理食塩液、リン酸緩衝水溶液（PBS）などを使用直前に加えるだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存してもよい。即時調合注射溶液及び懸濁液は、前述の種類の無菌の粉末、顆粒及び錠剤から調製してもよい。

40

【００３７】

直腸投与用製剤には、カカオバター又はポリエチレングリコールのような標準的な担体を含む坐剤を含むことができる。

【００３８】

口内への、例えば口腔内又は舌下への局所投与用製剤には、ショ糖及びアカシア又はトラガカントのような着香基剤に活性成分を含むトローチ剤、並びにゼラチンとグリセリン又はショ糖とアカシアのような基剤に活性成分を含む香錠が含まれる。

【００３９】

好ましい単位投与製剤は、下記に引用するように、活性成分の有効量又はその適当な分画を含む製剤である。

【００４０】

50

上記で特に言及した成分の他に、本発明の製剤には、当該製剤のタイプに関して当技術分野において通常の他の薬剤が含まれてもよいと理解すべきであり、例えば経口投与に適した製剤は、着色料を含んでもよい。

【0041】

本明細書中で使用される用語「治療すること」若しくは「治療」、又は「緩和すること」又は「改善すること」は、有益な又は望んだ結果を獲得するためのアプローチを意味しており、治療効果や予防効果に限られるものではない。治療効果によってとは、治療されている基礎疾患の根絶又は改善を意味する。また、改善が患者において観察されるような基礎疾患に関連付けられた生理学的システムのうちの1以上の根絶又は回復で、治療効果が達成される。それにもかかわらず、患者は基礎疾患に苦しむことになる可能性がある。この疾患の診断がなされていない場合でも、予防効果のために、組成物は、特定の疾患を発症するリスクのある患者に、又は疾患の生理学的なシステムの1つ以上を報告する患者に投与することができる。

10

【0042】

《略語》

【0043】

以下の略語及び用語は、全体にわたり指示された意味を有する：

A c	=	アセチル	
B o c	=	t - ブチルオキシカルボニル	
B O P	=	ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ)	20
		ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート	
B u	=	ブチル	
B S A	=	ウシ血清アルブミン	
c -	=	シクロ	
D C M	=	ジクロロメタン = 塩化メチレン = CH_2Cl_2	
D I E A	=	ジイソプロピルエチルアミン	
D M E M	=	ダルベッコ変法イーグル培地	
D M F	=	N, N - ジメチルホルムアミド	
D M S O	=	ジメチルスルホキシド	
D T T	=	ジチオトレイトール	30
E t O H	=	エタノール	
G C	=	ガスクロマトグラフィー	
H O A c	=	酢酸	
M e	=	メチル	
M T B E	=	メチル t - ブチルエーテル	
P B S	=	リン酸緩衝水溶液	
P E G	=	ポリエチレングリコール	
P M S F	=	フッ化フェニルメタンスルホニル	
P h	=	フェニル	
P h O H	=	フェノール	40
P V D F	=	ポリフッ化ビニリデン	
r t	=	室温	
s a t ' d	=	飽和	
s -	=	第二級	
S D S	=	ドデシル硫酸ナトリウム	
t - 又は t e r t -	=	第三級	
T B D M S	=	t - ブチルジメチルシリル	
T F A	=	トリフルオロ酢酸	
T H F	=	テトラヒドロフラン	
T M S	=	トリメチルシリル	50

t o s y l = p - トルエンシルホニル

【 0 0 4 4 】

A A A ⁺ A T P a s e による、化学ポテンシャルエネルギーの機械的な力への変換は、背景の部分で述べたように、無数の細胞プロセスに不可欠である。このタンパク質ファミリーの動的な機能の調査は、小分子モジュレーターに利するであろうが、これらの複合体、オリゴマーの機械酵素の阻害剤は、とらえどころのないままである。本出願では、A A A ⁺ A T P a s e ファミリーの一部の選択的阻害剤として働く 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1 H) - イリデン誘導体について述べる。モータータンパク質である細胞質ダイニンの選択的阻害剤である、発明者が「シリオブレビン (c i l i o b r e v i n s) 」と呼ぶ亜属についても述べる。シリオブレビンは、一次繊毛内の輸送を攪乱させ、これが繊毛の形成異常とヘッジホッグ経路の調節のような繊毛に依存した機能を抑止させることを、我々は開示する。シリオブレビンはまた、有糸分裂における紡錘体極への微小管の集中や、黒色細胞中のメラノソーム凝集を阻害する。これらの細胞表現型は、細胞質ダイニン 1 及び 2 の薬学的阻害と一貫しており、本明細書では、インビトロにおけるダイニンに依存した微小管上滑走運動を選択的に阻害するシリオブレビンの能力について述べる。それらは、インビトロにおける抗腫瘍剤として有用である他、シリオブレビンは、この微小管のマイナス末端方向への分子モーターを用いて細胞プロセスを研究するための有用な試薬であり、そしてそれが、さらなる A A A ⁺ A T P a s e ファミリー阻害剤の開発につながる可能性がある。

10

【 0 0 4 5 】

20

セルベースの小分子の表現型スクリーニングは、複雑な細胞機能の小分子モジュレーターを発見するための効果的なテクニックである。胚発生、幹細胞の自己複製及び腫瘍形成の鍵となる媒介物であるヘッジホッグ経路 (H h) 阻害剤のためのハイスループットスクリーニングは、G タンパク質結合受容体様 H h シグナルトランスデューサーである S M o o t h e n e d (S m o) の下流で作用する化合物を特定するために設計されており、多くのジヒドロキナゾリノンが、H h 標的遺伝子発現を誘導する G l i 転写因子の負調節因子である S u p p r e s s o r o f F u s e d (S u f u) を欠いた細胞内で H h 経路活性を遮断することを確認した。

【 0 0 4 6 】

30

《 合成 》

実施例 2 4 のベンゾイルジヒドロキナゾリノンは、C h e m b r i d g e から購入し；他の全ての構造誘導体は、下記の方法によって合成された。有機合成に使用された全ての化学物質は、S i g m a - A l d r i c h 又は A c r o s から購入し、さらに精製をせずに使用された。無水条件は、シュレンクライン技術とオープン乾燥ガラスを用いて、窒素条件下で維持された。¹ H N M R スペクトルは、V a r i a n I n o v a 3 0 0 、 4 0 0 及び 5 0 0 スペクトラメーターを用いて、重溶媒として D M S O - d ₆ を使用して得られた。化学シフトは、溶媒である D M S O のピークのダウンフィールドとして、百万分率 (p p m) 単位で報告された。高分解能質量分析 (H R M S) データは、スタンフォード大学の質量分析施設において、M i c r o m a s s の Q - T O F 型ハイブリッド四重極液体クロマトグラフィー質量分析装置により得られた。

40

【 0 0 4 7 】

実施例 1 : 3 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) - 3 - オキソ - 2 - (4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1 H) - イリデン) プロパンニトリル [シリオブレビン A]

【 0 0 4 8 】

2 - シアノエタンチオアミド (1 . 0 0 g , 1 0 . 0 m m o l) とプロモエタン (8 2 1 μ L , 1 1 . 0 m m o l) に、ナトリウムエトキシドのエタノール溶液 (1 1 . 5 m m o l , 5 . 3 m L) が添加された。得られた混合物は、6 時間攪拌され、2 - アミノ安息香酸 (1 . 5 0 g , 1 0 . 9 m m o l) を添加され、攪拌しながら一晚還流された。反応混合物の冷却時に混合形成された固体沈殿物は、真空濾過により回収され、エタノール、水、エタノール、及びジエチルエーテルで順次洗浄された。固体は、次いで、2 - (4 -

50

オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (872 mg , 47 %) を得るために乾燥された。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) σ ppm 4 . 17 (s , 2 H) 、 7 . 53 (t , $J = 7 . 5 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 68 (d , $J = 7 . 9 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 83 (t , $J = 7 . 8 \text{ Hz}$, 1 H) 、 8 . 10 (dd , $J_1 = 7 . 9 \text{ Hz}$, $J_2 = 1 . 2 \text{ Hz}$, 1 H) 。

【 0049 】

ジオキサン (8 mL) 中に 2 - (4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (202 mg , 1 . 09 mmol) 及びトリエチルアミン (167 μL , 1 . 20 mmol) を含む溶液に、塩化 2 . 4 - ジクロロベンゾイル (152 μL , 1 . 09 mmol) を加え、得られた混合物を、攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物は、真空濾過により回収され、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄された。固体を次いで、シリオブレピン A (1) (213 mg , 53 %) を得るために乾燥させた。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) σ ppm 7 . 46 - 7 . 50 (m , 1 H) 、 7 . 52 (d , $J = 8 . 2 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 56 (dd , $J_1 = 8 . 2$, $J_2 = 1 . 9 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 77 (d , $J = 2 . 0 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 83 - 7 . 88 (m , 2 H) 、 8 . 07 (d , $J = 8 . 1 \text{ Hz}$, 1 H) 。 $^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) σ ppm 71 . 74 、 117 . 43 、 117 . 54 、 118 . 71 、 125 . 92 、 126 . 68 、 127 . 66 、 129 . 21 , 129 . 66 、 130 . 49 、 134 . 85 、 135 . 85 、 138 . 15 、 139 . 25 、 155 . 01 、 158 . 3 、 188 . 75 。 HRMS (m/z) : [$M + \text{理論値 } C_{17}H_9N_3O_2Cl_2Na$, 379 . 9970 ; 実測値 379 . 9967 。

【 0050 】

実施例 2 : 3 - (4 - クロロフェニル) - 3 - オキソ - 2 - (4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1 H) - イリデン) プロパンニトリル

【 0051 】

ジオキサン (7 mL) 中に 2 - (4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (54 . 2 mg , 293 μmol) 及びトリエチルアミン (49 . 0 μL , 351 μmol) を含む溶液に、塩化 4 - クロロベンゾイル (45 . 1 μL , 351 mmol) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物は、真空濾過により回収され、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄された。固体を次いで、類似体 (8) (59 . 9 mg , 63 %) を得るために乾燥させた。 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) σ ppm 7 . 47 (t , $J = 7 . 6 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 57 - 7 . 60 (m , 2 H) 、 7 . 72 - 7 . 75 (m , 2 H) 、 7 . 84 (t , $J = 7 . 8 \text{ Hz}$, 1 H) 、 7 . 89 (d , $J = 8 . 2 \text{ Hz}$, 1 H) 8 . 06 (d , $J = 8 . 1 \text{ Hz}$, 1 H) 。 $^{13}\text{C NMR}$ (500 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) σ ppm 69 . 44 、 117 . 31 、 118 . 68 、 118 . 73 、 125 . 73 、 126 . 65 、 128 . 29 、 129 . 54 , 135 . 79 、 135 . 88 、 137 . 96 、 156 . 02 、 158 . 37 、 189 . 76 。 HRMS (m/z) : [$M + Na$] $^+$ 理論値 $C_{17}H_{10}N_3O_2ClNa$, 346 . 0359 ; 実測値 346 . 0359 。

【 0052 】

実施例 10 : 3 - (2 - クロロフェニル) - 3 - オキソ - 2 - (4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1 H) - イリデン) プロパンニトリル

【 0053 】

ジオキサン (3 mL) 中に 2 - (4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (22 . 0 mg , 119 μmol) 及びトリエチルアミン (18 . 2 μL , 131 μmol) を含む溶液に、塩化 2 - クロロベンゾイル (20 . 8 μL , 164 mmol) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、類似体 (6) (12 . 5 mg , 33 %) を得

るために乾燥させた。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 7.43 - 7.52 (m, 4H)、7.52 - 7.57 (m, 1H)、7.81 - 7.87 (m, 2H)、8.06 (d, J = 8.1 Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 71.7、117.41、117.62、118.73、125.81、126.68、127.33、128.22、129.18、129.57、131.1、135.81、139.33、155.12、158.36、189.89。HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 理論値 $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{ClNa}$, 346.0359; 実測値 346.0373。

【0054】

実施例 16: 3 - オキソ - 2 - (4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1H) - イリデン) - 3 - フェニルプロパンニトリル

10

【0055】

ジオキササン (4 mL) 中に 2 - (4 - オキソ - 1, 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (42.8 mg, 231 μmol) 及びトリエチルアミン (38.7 μL , 277 μmol) を含む溶液に、塩化ベンゾイル (32.2 μL , 277 μmol) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、類似体 (2) (36.4 mg, 54%) を得るために乾燥させた。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 7.47 (t, J = 7.5 Hz, 1H)、7.49 - 7.53 (m, 2H)、7.54 - 7.58 (m, 1H)、7.70 - 7.73 (m, 2H)、7.84 (td, J_1 = 7.7 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H)、7.89 (br. d, J = 8.1 Hz, 1H)、8.06 (dd, J_1 = 8.1, J_2 = 1.5 Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 69.3、117.26、118.57、118.81、125.65、126.65、127.59、128.14、131.22、135.77、139.26、139.33、156.12、158.39、191.18。HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 理論値 $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$, 312.0749; 実測値 312.0735。

20

【0056】

実施例 17: 3 - (3 - クロロフェニル) - 3 - オキソ - 2 - (4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1H) - イリデン) プロパンニトリル

30

【0057】

ジオキササン (10 mL) 中に 2 - (4 - オキソ - 1, 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (152 mg, 0.820 mmol) 及びトリエチルアミン (126 μL , 0.904 mmol) を含む溶液に、塩化 3 - クロロベンゾイル (116.3 μL , 0.904 mmol) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、類似体 (7) (172 mg, 65%) を得るために乾燥させた。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 7.48 (t, J = 7.5 Hz, 1H)、7.55 (t, J = 7.8 Hz, 1H)、7.61 - 7.87 (m, 3H)、7.85 (t, J = 7.6 Hz, 1H)、7.90 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、8.07 (d, J = 8.2 Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6) σ ppm 69.62, 117.34, 118.62, 118.73, 25.78, 126.23, 26.65, 127.28, 130.22, 130.9, 132.88, 135.81, 141.15, 155.96, 158.36, 189.3。HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 理論値 $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{ClNa}$, 346.0359; 実測値 346.0368。

40

【0058】

実施例 25: 2 - (5 - クロロ - 4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1H) - イリデン) - 3 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 3 - オキソ - プロパンニトリル [シ

50

リオブレピン B]

【 0 0 5 9 】

2 - シアノエタンチオアミド (3 0 0 m g , 3 . 0 0 m m o l) とプロモエタン (2 6 1 μ L , 3 . 5 0 m m o l) を、ナトリウムエトキシドのエタノール溶液 (3 . 5 0 m m o l , 2 . 5 m L) に添加した。得られた混合物を 6 時間攪拌し、6 - クロロアントラニル酸 (5 0 0 m g , 2 . 9 1 m m o l) を添加し、反応物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に混合形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、エタノール、水、エタノール、及びジエチルエーテルで順次洗浄した。固体を次いで、2 - (5 - クロロ - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (1 4 8 m g , 2 2 %) を得るために乾燥させた。¹ H N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) σ p p m 4 . 1 5 (s , 2 H) 、 7 . 5 4 (d d , J ₁ = 7 . 8 H z , J ₂ = 1 . 1 H z , 1 H) 、 7 . 6 1 (d d , J ₁ = 8 . 2 H z , J ₂ = 1 . 1 H z , 1 H) 、 7 . 7 4 (t , J = 8 . 0 H z , 1 H) 。

10

【 0 0 6 0 】

ジオキサン (4 m L) 中に 2 - (5 - クロロ - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (2 6 . 4 m g , 1 2 0 μ m o l) 及びトリエチルアミン (1 8 . 4 μ L , 1 3 2 μ m o l) を含む溶液に、塩化 2 , 4 - ジクロロベンゾイル (1 1 6 . 3 μ L , 0 . 9 0 4 m m o l) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、シクロブレピン B (3) (1 2 . 8 m g , 2 7 %) を得るために乾燥させた。¹ H N M R (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) σ p p m 7 . 4 6 (d d , J ₁ = 7 . 5 H z , J ₂ = 1 . 4 H z , 1 H) 、 7 . 5 0 (d , J = 8 . 2 H z , 1 H) 、 7 . 5 5 (d d , J ₁ = 8 . 2 H z , J ₂ = 1 . 9 H z , 1 H) 7 . 6 8 - 7 . 7 9 (m , 3 H) 。 ¹ ³ C N M R (5 0 0 M H z , D M S O - d ₆) σ p p m 7 1 . 6 9 、 1 1 4 . 6 、 1 1 7 . 6 3 、 1 1 8 . 4 5 、 1 2 7 . 6 5 、 1 2 8 . 1 、 1 2 9 . 2 、 1 2 9 . 6 5 、 1 3 0 . 4 9 、 1 3 3 . 3 5 、 1 3 4 . 8 、 1 3 5 . 4 7 、 1 3 8 . 2 、 1 5 4 . 8 1 、 1 5 6 . 4 8 、 1 8 8 . 7 1 。 H R M S (m / z) : [M + N a] ⁺ 理論値 C ₁₇ H ₈ N ₃ O ₂ C l ₃ N a , 4 1 3 . 9 5 8 0 ; 実測値 4 1 3 . 9 5 8 2 。

20

【 0 0 6 1 】

実施例 2 7 : 2 - (6 - クロロ - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 (1 H) - イリデン) - 3 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) - 3 - オキソプロパンニトリル [シリオブレピン C]

30

【 0 0 6 2 】

2 - シアノエタンチオアミド (5 0 1 m g , 5 . 0 0 m m o l) とプロモエタン (4 4 8 μ L , 6 . 0 0 m m o l) に、ナトリウムエトキシドのエタノール溶液 (6 . 0 0 m m o l , 3 . 0 m L) を添加した。得られた混合物を 6 時間攪拌し、5 - クロロアントラニル酸 (8 5 8 m g , 5 . 0 0 m m o l) を添加し、反応物を攪拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に混合形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、エタノール、水、エタノール、及びジエチルエーテルで順次洗浄した。固体を次いで、2 - (6 - クロロ - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (3 1 4 m g , 2 9 %) を得るために乾燥させた。¹ H N M R (5 0 0 M H z , D M S O - d ₆) σ p p m 4 . 1 8 (s , 2 H) 、 7 . 7 0 (d , J = 8 . 8 H z , 1 H) 、 7 . 8 5 (d d , J ₁ = 8 . 7 H z , J ₂ = 2 . 0 H z , 1 H) 8 . 0 3 (d , J = 2 . 4 H z , 1 H) 。

40

【 0 0 6 3 】

ジオキサン (4 m L) 中に 2 - (6 - クロロ - 4 - オキソ - 1 , 4 - ジヒドロキナゾリン - 2 - イル) アセトニトリル (5 2 . 0 m g , 2 3 7 μ m o l) 及びトリエチルアミン (3 6 . 3 μ L , 2 6 0 μ m o l) を含む溶液に、塩化 2 , 4 - ジクロロベンゾイル (3 3 . 1 μ L , 2 3 7 μ m o l) を加え、得られた混合物を攪拌しながら一晩還流した。反

50

応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、シクロブレピン C (4) (6.4 mg, 7%) を得るために乾燥させた。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) σ ppm 7.50 (d, J₁ = 8.3 Hz, 1H)、7.56 (dd, J₁ = 8.3 Hz, J₂ = 1.9 Hz, 1H)、7.77 (d, J = 1.9 Hz, 1H)、7.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、7.88 (dd, J₁ = 8.9 Hz, J₂ = 2.3 Hz, 1H)、8.00 (d, J₂ = 2.4 Hz, 1H)。¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆) σ ppm 72.1, 117.52, 118.98, 121.22, 125.61, 127.67, 129.22, 129.66, 129.99, 130.49, 134.88, 135.64, 38.11, 138.58, 155.05, 157.52, 188.76。HRMS (m/z): [M + Na]⁺ 理論値 C₁₇H₈N₃O₂Cl₃Na, 413.9580; 実測値 413.9583。

10

【0064】

実施例 31: 2-(7-クロロ-4-オキソ-3,4-ジヒドロキナゾリン-2(1H)-イリデン)-3-(2,4-ジクロロフェニル)-3-オキソ-プロパンニトリル [シリオブレピン D]

【0065】

2-シアノエタンチオアミド (300 mg, 3.00 mmol) とプロモエタン (299 μL, 4.00 mmol) に、ナトリウムエトキシドのエタノール溶液 (4.00 mmol, 3 mL) を添加した。得られた混合物を 6 時間撹拌し、4-クロロアントラニル酸 (500 mg, 2.91 mmol) を添加し、反応物を撹拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に混合形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、エタノール、水、エタノール、及びジエチルエーテルで順次洗浄した。固体を次いで、2-(7-クロロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキナゾリン-2-イル)アセトニトリル (118 mg, 18%) を得るために乾燥させた。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) σ ppm 4.19 (s, 2H)、7.57 (dd, J₁ = 8.5 Hz, J₂ = 2.1 Hz, 1H)、7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H)、8.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H)。

20

【0066】

ジオキサン (4 mL) 中に 2-(7-クロロ-4-オキソ-1,4-ジヒドロキナゾリン-2-イル)アセトニトリル (24.9 mg, 113 μmol) 及びトリエチルアミン (17.4 μL, 125 μmol) を含む溶液に、塩化 2,4-ジクロロベンゾイル (15.9 μL, 113 μmol) を加え、得られた混合物を撹拌しながら一晩還流した。反応混合物の冷却時に形成された固体沈殿物を真空濾過により回収し、メタノール、水、メタノール、及びジクロロメタンで順次洗浄した。固体を次いで、シクロブレピン D (5) (11.4 mg, 26%) を得るために乾燥させた。¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) σ ppm 7.47-7.52 (m, 2H)、7.56 (dd, J₁ = 8.2 Hz, J₂ = 1.8 Hz, 1H)、7.77 (d, J₁ = 1.8 Hz, 1H)、7.90 (br s, 1H)、8.04 (d, J = 8.5 Hz, 1H)。¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆) σ ppm 72.44, 116.56, 118.79, 118.85, 125.74, 127.65, 128.66, 129.2, 129.65, 130.49, 134.81, 138.21, 140.03, 155.62, 157.98, 188.6。HRMS (m/z): [M + Na]⁺ 理論値 C₁₇H₈N₃O₂Cl₃Na, 413.9580; 実測値, 413.9583。

30

40

【0067】

同様に下記の表 1 記載の他の化合物が合成された。

【0068】

アッセイ

【0069】

Hh 経路活性の Shh-LIGHT 2 アッセイ

【0070】

50

Shh - N - 馴化培地が、Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 14071 (2002) に示された方法で調整された。Shh - LIGHT2 細胞 [J. Taipale et al., Nature 406, 1005 (2000)] は、Gli 応答性ホタルルシフェラーゼレポーター及び構成的なチミジンキナーゼプロモーターにより活性化される Renilla ルシフェラーゼ発現コンストラクト (pRLTK, Promega) を安定的に組み込まれた NIH - 3T3 を基にした細胞株であり、10% コウシ血清、100 U/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含有する DMEM 内で培養された。細胞は、30000 細胞/ウエルの濃度になるよう 96 穴ウエルプレートに注入され、翌日に、0.5% コウシ血清、10% Shh 馴化培地及び上記の抗体を含む DMEM とともに、それぞれの化合物又は DMSO を処理された。さらに 24 時間の培養の後、細胞は溶解され、それらのホタル及び Renilla ルシフェラーゼ活性は、デュアルルシフェラーゼレポーターキット (Promega) 及びマイクロプレートルミノメーター (Veritas) によって測定された。3 サンプルからのホタルルシフェラーゼ活性と Renilla ルシフェラーゼ活性の比を表す平均値が、各化合物の用量反応図を構築するために用いられた。3 つの別々の実験からの用量反応データは、独立して、Prism ソフトウェアを使用して、可変勾配、シグモイド曲線、用量反応アルゴリズムとして描かれ、得られた IC50 値は、各化合物の IC50 平均値を測定するために使用された。

10

【0071】

繊毛形成の定量的評価

20

【0072】

Shh - EGFP 細胞 [J. Hyman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (2009)] は、Gli 応答性 green fluorescent protein レポーターを安定的に組み込まれた NIH - 3T3 を基にした細胞株であり、10% コウシ血清、100 U/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含有する DMEM 内で維持された。細胞は、30000 細胞/ウエルの濃度になるようポリ - D - リジンでコーティングされた 12 mm のカバーガラスを含む 24 穴ウエルプレートに注入され、36 時間培養された。細胞は、0.5% コウシ血清及び上記抗体を含む DMEM 内に、それぞれの化合物が、30 μ M 又は 0.3% DMSO となるように移された。さらに 24 時間の培養の後、細胞は、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて室温で 10 分間固定され、PBS を用いて 5 分間 3 回洗浄され、0.3% Triton - X - 100 を含む PBS に 5 分間浸漬され、5% 正常ヤギ血清、0.1% Triton - X - 100 及び 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS を用いて、4 で一晩ブロックされた。カバーガラスは、次いで、ウサギポリクローナル抗 Arl13b 抗体 (1:3000 希釈) を含むブロッキング緩衝液とともに、室温で 90 分間インキュベートされ、0.1% Triton - X - 100 を含む PBS を用いて 5 分間 4 回洗浄され、Alexa Fluor 488 で標識されたヤギポリクローナル抗ウサギ IgG 抗体 (1:300 希釈; Invitrogen, A-11034) を含むブロッキングバッファとともに、室温で 60 分間インキュベートされた。二次抗体のインキュベーションの後、核は、0.1% Triton - X - 100 及び 0.51 Ag/mL 4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole (DAPI) を含む PBS とともに、10 分間 2 回インキュベーションされた後に、PBS を用いて 5 分間 2 回洗浄することによって染色された。その後、カバーガラスは、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) を使用したスライドに固定され、Photomeric Cool SNAP HQ CCD カメラ及び Metamorph ソフトウェアを搭載したライカ DMI 6000 B 複合顕微鏡 HC Plan Apochromat CS 20x/0.70 NA 油浸対物レンズを用いて画像化された。DMSO 処理された Arl13b の画像を、繊毛染色強度の最小閾値を確立するために手動で検討した。次いで ImageJ ソフトウェアが、個々の画像内の閾値以上の信号強度を有する 2 以上の隣接する画素から構成されるオブジェクトを定義するために使用され、それぞれの画像内の総

30

40

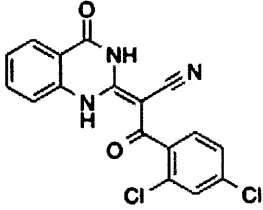
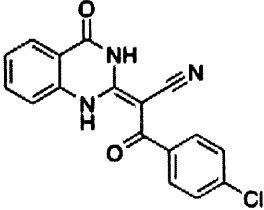
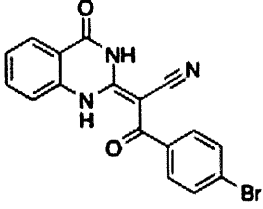
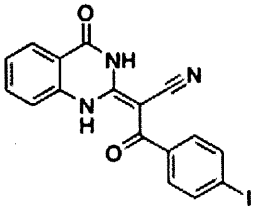
50

被写体領域が、一次繊毛の全画素面積を推定するために使用された。D A P I 染色の対応する画像は、各画像あたりの核の数を確認するための C e l l P r o f i l e r ソフトウェアを使用して、並行して処理された。各画像内の細胞あたりの平均繊毛サイズは、次いで、核の数で合計繊毛画素領域を割ることによって決定された。約 1 5 0 の細胞を含む 1 0 の各画像が、それぞれの実験条件での平均繊毛サイズを決定するために使用された。

【 0 0 7 3 】

これらの研究の代表的な結果を表 1 において概説する。

【 表 1 】

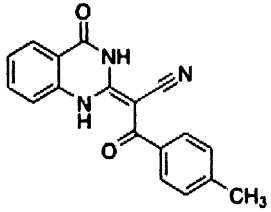
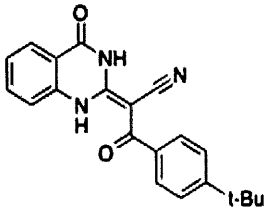
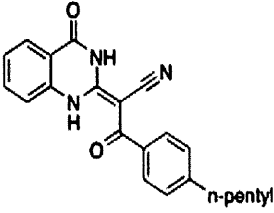
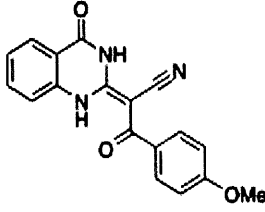
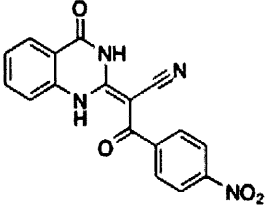
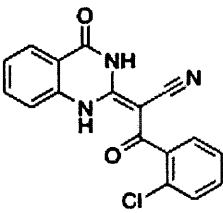
実施例 番号	構造	Shh-LIGHT2 アッセイの IC ₅₀	1 次繊毛サイズ (30 μ M 投与に おける DMSO コントロールの 百分率)
1		9.9 μ M	27
2		5.2 μ M	74
3		5 μ M	
4		4.5 μ M	

10

20

30

40

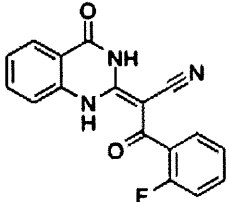
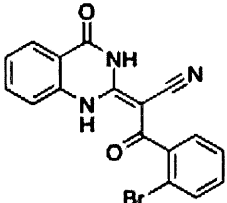
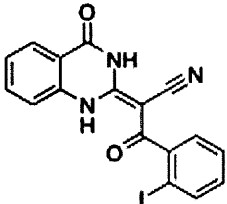
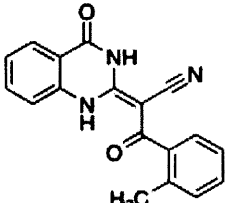
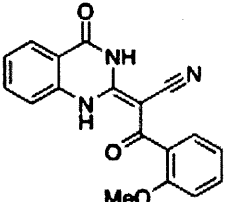
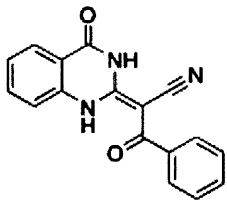
5	 <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	15 μ M	
6	 <chem>CC(C)(C)C1=CC=C(C=C1)C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	6.5 μ M	
7	 <chem>CCCCCc1ccc(cc1)C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	5.5 μ M	
8	 <chem>COc1ccc(cc1)C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	30 μ M	
9	 <chem>[O-][N+](=O)c1ccc(cc1)C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	25 μ M	
10	 <chem>Clc1ccccc1C(=O)C2=C(C#N)NC(=O)Nc3ccccc32</chem>	25 μ M	93

10

20

30

40

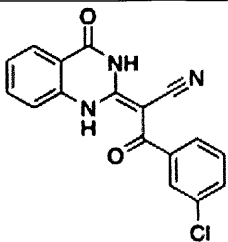
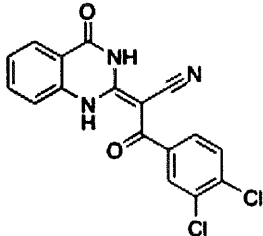
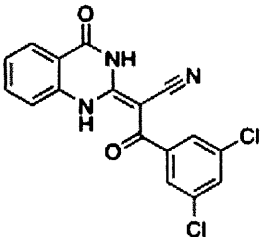
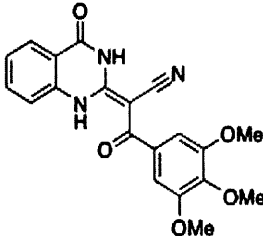
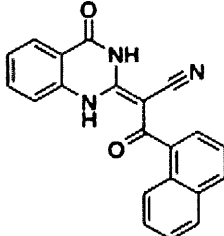
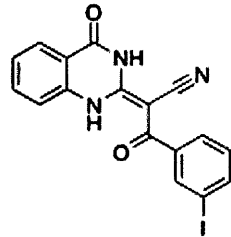
11	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3F</chem>	30 μ M	
12	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3Br</chem>	15 μ M	
13	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3I</chem>	20 μ M	
14	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3C</chem>	30 μ M	
15	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3OC</chem>	> 30 μ M	
16	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1)C(=O)c3ccccc3</chem>	23 μ M	95

10

20

30

40

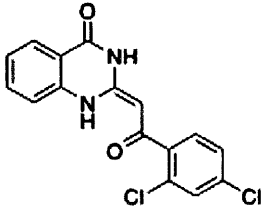
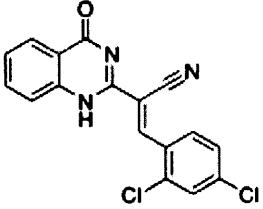
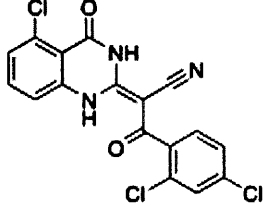
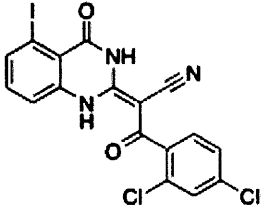
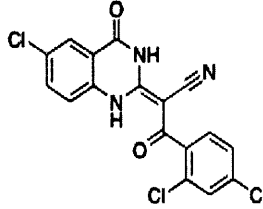
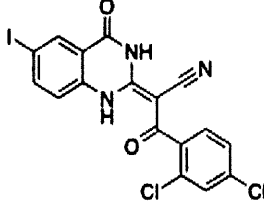
17	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3ccc(Cl)cc3)c4ccccc4</chem>	5.5 μ M	68
18	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3cc(Cl)cc(Cl)c3)c4ccccc4</chem>	3 μ M	16
19	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3cc(Cl)cc(Cl)c3)c4ccccc4</chem>	3 μ M	65
20	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3cc(OC)c(OC)c(OC)c3)c4ccccc4</chem>	> 30 μ M	
21	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3c4ccccc4cc5ccccc35)c6ccccc6</chem>	20 μ M	
22	 <chem>N#CC(=C1NC(=O)c2ccccc2N1C(=O)c3ccc(I)cc3)c4ccccc4</chem>	5 μ M	

10

20

30

40

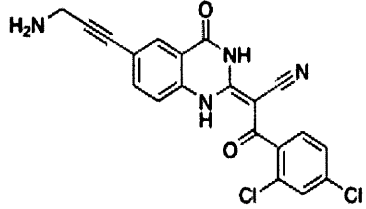
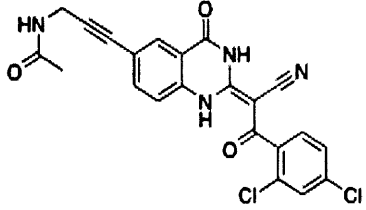
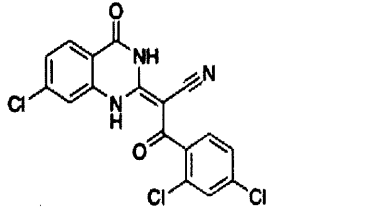
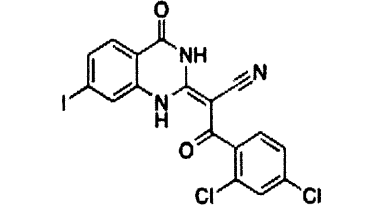
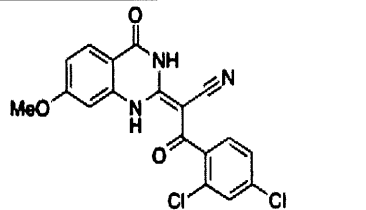
23		4.4 μM	70
24		> 50 μM	104
25		11 μM	32
26		10 μM	
27		6.1 μM	11
28		6 μM	

10

20

30

40

29		20 μ M	
30		30 μ M	
31		15 μ M	7
32		12 μ M	
33		15 μ M	

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

Hhシグナル伝達は主に、転写因子であるGli2及びGli3により媒介され、基本条件の下で、これらのタンパク質は、プロテアソーム及び繊毛依存的にN末端リプレッサー（Gli2/3R）を発生させるために、部分的に分解される。Hhリガンドと膜結合型受容体であるPatched1（Ptch1）との結合は、Smoの活性化及びGliのタンパク質分解過程阻害へと導く；次いで全長Gli2及びGli3（Gli2/3FL）は、SuFuから分離し、転写活性因子（Gli2/3A）へと変換される。Gli2/3処理のように、Gli2/3A形成は一次繊毛を必要とする。

【 0 0 7 5 】

Hhリガンドに依存したGli3処理の量的評価

【 0 0 7 6 】

S h h - E G F P 細胞は、10% コウシ血清、100 U / m L ペニシリン及び 0.1 m g / m L ストレプトマイシンを含有する D M E M を含む 12 穴 ウエルプレートに、300 細胞 / ウエルの濃度になるよう注入された。24 時間の培養の後、細胞は、0.5% コウシ血清、10% S h h 条件培地、上記抗体、及び各化合物又は D M S O を含む D M E M に移された。細胞は、さらに 16 時間培養され、P B S で洗浄され、8% グリセロール、20 m M T r i s - H C l、p H 6.8 2% S D S、100 m M D T T、1 m M P M S F、20 m M フッ化ナトリウム、2 m M オルトバナジン酸ナトリウム及び E D T A フリープロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e) からなる S D S - P A G E ローディング緩衝液と氷上でインキュベートすることによって溶解させた。溶解させたサンプルは、100 で 7 分間加熱され、3 - 8% C r i t e r i o n X T T r i s アセートボリアクリルアミドゲル (B i o - R a d) にロードされ、X T トリシン緩衝液内で電気泳動され、P V D E メンブレン上に移された。メンブレンは、メタノールで脱水され、4% 無脂肪粉乳及び 0.1% T w e e n - 20 (イムノプロットブロッキング緩衝液) を含む P B S において、4 でヤギポリクローナル抗 G l i 3 抗体 (0.4 μ g / m L : R & D S y s t e m s , A F 3690) をプローブとして反応させ、次いで、プロットを P B S で 1 分間 4 回洗浄され、イムノプロットブロッキング緩衝液内で、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ウシポリクローナル抗ヤギ I g G 抗体 (0.04 μ g / m L , J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , 805 - 035 - 180) とともに、室温で 1 時間インキュベートされた。メンブレンは、次いで、P B S で 1 分間 4 回洗浄され、S u p e r S i g n a l W e s t D u r a E x t e n d e d D u r a t i o n s u b s t r a t e (T h e r m o S c i e n t i f i c) 及び C h e m i D o c X R S i m a g i n g s y s t e m (B i o - R a d) を用いて可視化された。Q u a n t i t y O n e ソフトウェア (B i o - R a d) を用いて定量化した G l i 3 F L 及び G l i 3 R バンド強度、及び 5 回の独立した実験が、各化合物の G l i 3 F L / G l i 3 R 率の平均を決定するために用いられた。シリオブレピン (実施例 1 , 25 , 27 及び 31 の化合物) は、S m o 阻害剤であるシクロパミンと同様に、S o n i c H e d g e h o g (S h h - N) の N 末端ドメインで刺激された細胞内の G l i 3 F L / G l i 3 R 率を変化させた。S h h - N 依存性 G l i 3 F L のリン酸化もまたこれらの化合物によって減少するか、あるいは、G l i 3 A の損失を反映している。試験された他の類似体は G l i 3 F L / G l i 3 R 率又は G l i 3 F L のリン酸化状態に有意な影響を示さなかった。

【 0 0 7 7 】

H h リガンド依存性 G l i 2 輸送の定量的評価

【 0 0 7 8 】

上述の薬学的な結果は、一次繊毛の機能、G l i プロセッシング及び G l i 活性をつなぎ合わせて確認された遺伝学的な結果と一致する。H h 経路活性化は、一次繊毛の遠端における G l i 2 局在化と一致しているので、我々は、シリオブレピンが、どのようにして繊毛を攪乱するのかについての理解をさらに深めるため、試験化合物の G l i 2 局在化の影響を調査した。

【 0 0 7 9 】

S h h - E G F P 細胞は、ポリ - D - リジンでコーティングされた 12 m m のカバーガラスを含む 24 穴 ウエルプレートに、65000 細胞 / ウエルの濃度になるよう注入され、10% コウシ血清、100 U / m L ペニシリン及び 0.1 m g / m L ストレプトマイシンを含有する D M E M 内で 24 時間培養された。次いで、細胞は、一次繊毛形成を促進するために、0.5% コウシ血清及び上記抗体を含む D M E M 内に移され、16 時間保持された。次いで、24 時間の培養の後、細胞は、0.5% コウシ血清、抗体、及び 30 μ M 濃度の各化合物又は 0.3% D M S O を含む D M E M に移された。各化合物又はコントロールの処理は、それぞれ、10% S h h - N - 馴化培地が存在又は欠乏している状態で行われ、これらの条件で細胞は、4 時間培養された。次いで、細胞は、4% パラホルムアルデヒドを含む P B S を用いて室温で 10 分間固定され、50 m M グリシンを含む P B S を用いて 5 分間 3 回洗浄され、0.3% T r i t o n - X - 100 を含む P B S に 5 分間浸

漬され、次いで、5%正常口バ血清、0.1%Triton-X-100及び0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いて、4で一晩ブロックされた。ブロッキングが完了した後、次いで、ウサギポリクローナル抗Arl13b抗体(1:3000希釈)、ヤギポリクローナル抗Gli2抗体(1:50希釈; R&D Systems, AF3635)及びマウスモノクローナル抗 γ チューブリン(1:200希釈; Sigma-Aldrich, T5326)を含むブロッキング緩衝液内で、カバーガラスは、室温で90分間インキュベートされた。次いで、0.1%Triton-X-100を含むPBSで、細胞は、5分間4回洗浄され、DyLight488標識口バポリクローナル抗ヤギIgG抗体(3 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch, 705-485-147)、DyLight594標識口バポリクローナル抗マウスIgG抗体(3 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch, 715-515-151)及びDyLight649標識口バポリクローナル抗マウスIgG抗体(3 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch, 711-495-152)を含むブロッキング緩衝液とともに、60分間インキュベートされた。二次抗体のインキュベーションの後、核は、0.1%Triton-X-100及び0.5 μ g/mL DAPIを含むPBSとともに10分間2回インキュベーションされた後に、PBSを用いて5分間2回洗浄することによって染色された。次いで、カバーガラスは、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)を使用したスライドに固定され、LSM700共焦点レーザー走査ヘッドを搭載したZeiss AxioImager Z1正立顕微鏡Plan APOCHMAT 63x/1.4NA油浸対物レンズを用いて画像化された。軸系の遠端においての直径0.69 μ mの範囲内で総画素強度を決定し、同等の大きさの隣接領域での背景の蛍光を差し引くことによって、繊毛のGli2レベルを定量化した。少なくとも25の繊毛を、各実験条件での繊毛の平均Gli2レベルを決定するために分析した。基底培地及びShh-N-誘導培地において、繊毛形成を有意に攪乱しない誘導体(16及び2)によっては、繊毛のGli2レベルの変化はなかった。一方、化合物1及び31は、Shh-Nによって誘導されたものと比較して、シグナリング細胞小器官における基本培地のGli2濃度が上昇した。

【0080】

IFT88輸送の定量的評価

【0081】

シリオブレピンがHhリガンド非依存的に繊毛のGli2レベルを増加させる能力は、これらの化合物が一次繊毛内タンパク質輸送メカニズムを標的にする可能性があることを示唆している。微小管依存性コンパートメントとして、繊毛は、その軸系に沿って高分子を移動させるために、特定のモータータンパク質を活用している。貨物の繊毛内輸送(IFT)は、プラス末端方向へのキネシン2モーター及びIFTBマルチサブユニット複合体を必要とする順行性輸送、そして、マイナス末端方向への細胞質ダイニン2モーター及びIFTAを活用する逆行性輸送として説明できる。キネシン2、細胞質ダイニン2、又はIFT複合体サブユニットのそれぞれの遺伝子を破壊した場合には、繊毛が欠失し、Hhシグナル伝達の攪乱が誘導されることが見出された。例えば、マウス胚発生において、一次繊毛特有のcytoplasmic dynein 2 heavy chain(Dync2h1)の欠失が、繊毛の形態を変化させ、Hh標的遺伝子発現を減少させることが示されている。また、Dync2h1の機能を失っている細胞は、Hh経路活性化の非存在下において、繊毛Gli2レベルの増加を示す。シリオブレピンがHh経路特有のプロセスよりもむしろ一般的な繊毛輸送を標的とすることを確かめるために、IFTBの構成要素であり、繊毛の基底小体に戻るための細胞性ダイニン2に依存した逆行性輸送に必要となるIFT88の、細胞レベル下においての局在に対するシリオブレピンの影響を検証した。

【0082】

Shh-EGFP細胞は、ポリ-D-リジンでコーティングされた12mmのカバーガラスを含む24穴ウエルプレートに、30000細胞/ウエルの濃度になるよう注入され

、10%コウシ血清、100 U/mL ペニシリン及び0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含有するDMEM内で24時間培養された。次いで、細胞は、一次繊毛形成を促進するために、0.5%ウシ血清及び上記抗体を含むDMEM内に移され、16時間保持された。細胞は、次に、0.5%コウシ血清、抗体、及び50 µM濃度の各化合物又は0.25% DMSOを含むDMEMに移され、1時間保持された。各化合物又はコントロールの処理は、それぞれ、10% Shh - N - 馴化培地が存在又は欠乏している状態で行い、これらの条件で細胞を4時間培養した。次いで、細胞は、4%パラホルムアルデヒドを含むPBSを用いて室温で10分間固定され、50 mMグリシンを含むPBSを用いて5分間3回洗浄され、0.3% Triton - X - 100を含むPBSに5分間浸漬され、次いで、5%正常ヤギ血清、0.1% Triton - X - 100及び0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いて、4で一晩ブロックされた。ブロッキングが完了した後、細胞は、次いで、マウスモノクローナル抗アセチル化チューブリン(1:4000希釈; Sigma - Aldrich, T6793)、ウサギポリクローナル抗IFT88抗体(1:70希釈; Protein Tech Group, 13967-1-AP)及びマウスモノクローナル抗γチューブリン(1:200希釈; Sigma - Aldrich, T5326)を含むブロッキング緩衝液内で、カバーガラスを室温で90分間インキュベートされた。次いで、細胞は、0.1% Triton - X - 100を含むPBSで、5分間4回洗浄され、Alexa Fluor 488 標識ヤギポリクローナル抗ウサギIgG抗体(1:300希釈; Invitrogen, A-11034)及びAlexa Fluor 647 標識ヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体(1:300希釈; Invitrogen, A-21235)を含むブロッキング緩衝液でインキュベートされた。二次抗体のインキュベーションの後、核は、0.1% Triton - X - 100及び0.5 µg/mL DAPIを含むPBSとともに10分間2回インキュベーションされた後に、PBSを用いて5分間2回洗浄することによって染色された。次いで、カバーガラスは、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)を使用したスライドに固定され、LSM700共焦点レーザー走査ヘッドを搭載したZeiss AxioImager Z1正立顕微鏡Plan APOCHomat 63x/1.4 NA油浸対物レンズを用いて画像化された。背景を差し引かなかったものの、Gli2で記載したように繊毛のIFTレベルは、本質的に定量化された。少なくとも25の繊毛を、各実験条件での繊毛の平均IFT88レベルを決定するために分析した。シクロプラビンD(実施例31)を用いて細胞を1時間処理することにより、DMSO又は化合物16を用いた場合と比較して、一次繊毛の遠端においてIFT88レベルの有意な増加が生じた。これは、シリオブレビンが細胞質ダイニン2の機能を阻害することのさらなる証拠となる。

【0083】

紡錘体形成の画像化

【0084】

一次繊毛外への小分子輸送に加えて、細胞質ダイニン複合体は、異なった細胞機能を有している。例えば、細胞質ダイニン1は、ダイナクチン及び核タンパク質であるNuMAと複合体を形成し、有糸分裂の紡錘体の内部に微小管のマイナス末端を集中させるという働きを行う。これらの働きが紡錘状の形状を形成し、γ-チューブリン及び微小管と核の複合体を紡錘体極へ局在させる。抗体のブロック又はドミナントネガティブ構築を原因とする細胞質内ダイニン1の阻害は、有糸分裂を攪乱し、γ-チューブリンの漸増が止まり、微小管末端の規則正しさが失われる結果となる。シクロブレビンがこれらの表現型を再現することができるかどうかを決定するために、有糸分裂中期の細胞を多く含むNIH-3T3細胞を、実施例31又は実施例2で50 µM濃度で一時間処理し、有糸分裂の構造を共焦点免疫蛍光顕微鏡によって検証した。

【0085】

Shh - EGFP細胞は、密集度約70%に至るまで培養され、ポリ-D-リジンでコーティングされた12 mmのカバーガラスを含む24穴ウエルプレートに1:5となるよ

10

20

30

40

50

う分割され、10%コウシ血清、100 U/mL ペニシリン及び0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含有するDMEM内で24時間培養された。これらの条件で一晩培養された後、細胞は、15 μ M MG132を含む増殖培地で90分間培養され、続いて、0.5%コウシ血清、15 μ M MG132、及び50 μ Mのそれぞれの化合物又は同量のDMSO溶媒のいずれかを含むDMEMとともに、60分間インキュベートされた。細胞は、-20℃に冷やされたメタノールとともに、氷上でインキュベーションされることにより固定され、PBSで5分間3回洗浄され、次いで、5%正常ヤギ血清、0.1% Triton-X-100及び0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いて室温で、一晩ブロックされた。ブロッキング完了後、カバーガラスは、マウスモノクローナル抗 α -チューブリン抗体(1:2000希釈; Sigma-Aldrich, T6199)、ウサギポリクローナル抗 γ -チューブリン抗体(1:500希釈; Sigma-Aldrich, T3559)を含むブロッキング緩衝液内で、室温で90分間インキュベートされた。細胞は、0.1% Triton-X-100を含むPBSで5分間4回洗浄され、Alexa Fluor 488標識ヤギポリクローナル抗ウサギIgG抗体(1:300希釈; Invitrogen, A-11034)及びAlexa Fluor 594標識ヤギポリクローナル抗マウスIgG抗体(1:300希釈; Invitrogen, A-11032)を含むブロッキング緩衝液で60分間インキュベートされた。

10

【0086】

二次抗体のインキュベーションの後、核は、0.1% Triton-X-100及び0.5 μ g/mL DAPIを含むPBSとともに10分間2回インキュベーションされた後に、PBSを用いて5分間2回洗浄することによって染色された。次いで、カバーガラスは、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen)を使用したスライドに固定され、LSM700共焦点レーザー走査ヘッドを搭載したZeiss AxioImager Z1正立顕微鏡Plan ApoChlomat 63x/1.4 NA油浸対物レンズを用いて画像化された。細胞質ダイニン1の薬理的な阻害と一致して、実施例31で処理された細胞は、 γ -チューブリン-陽性極と紡錘体を形成することができなかった。実施例16又は溶媒のみで処理された細胞は、通常の紡錘体形成を示した。

20

【0087】

メラノソーム凝集アッセイ

30

【0088】

もう一つの細胞質ダイニン1に依存したプロセスは、色素細胞内のメラニンを含む小胞の凝集である。そのメカニズムは、特定の生物が環境的な合図にตอบสนองして、配色を適応させるものである。例えば、細胞質ダイニン1は、小分子メラトニンで刺激したXenopusの黒色素胞の中心に向けてメラノソームを輸送する。これは、キネシン-2及びミオシン-5によって活性化されるメラニン細胞刺激ホルモン(MSH)にตอบสนองしての細胞の周縁部に対する色素顆粒の分散と平衡する。メラノソーム輸送がシリオブレピンに対して敏感であるかどうかを決定する目的で、我々は、メラノソームを均等に分散させるために、Xenopus黒色素胞をMSHとともに培養し、次いで、それらをメラトニン及び様々な濃度の試験化合物で処理した。

40

【0089】

不死化したXenopus黒色素胞は、10%ウシ胎児血清、30 mg/L L-グルタミン、及び5 mg/L インスリンを追加した0.7x L15培地で培養された。メラノソーム凝集アッセイの前に、細胞は、ポリ-D-リジンでコーティングされた12 mmのカバーガラスを含む12穴ウエルプレートで、12時間から24時間培養された。実験の日に、黒色素胞は、30分間無血清培地で培養され、メラノソームを均等に分散させるため、100 nM MSHで刺激され、次いで、それぞれの化合物又はDMSOのいずれかを含む培地とともに、10分間インキュベートされた。メラノソーム凝集は、次いで、試験化合物存在下において、10 nMメラトニンで細胞を処理することにより誘導された。黒色素胞は、経時的顕微鏡検査法又は4%パラホルムアルデヒドを含む0.7x PB

50

Sによる30分間処理のいずれかにより、直ちに画像化された。

【0090】

シリオブレビンの可逆性を実証するため、黒色素胞は、30分間無血清培地で培養され、メラノソームを均等に分散させるため、100 nMメラニン細胞刺激ホルモン(MSH)で刺激され、次いで、それぞれの化合物及び10 nMメラトニンを含む培地とともに、30分間インキュベートされた。細胞は、次いで、メラトニンのみを含む培地で数回洗浄され、画像化された。実施例31が、10 nM濃度で、有意にメラノソーム凝集を阻害する一方、纖毛を攪乱しなかった実施例16は、40 µMを超えても効果を認識することができなかった。シリオブレビンD(実施例31)の効果は、黒色素胞が、最初に実施例31及びメラトニンで処理され、次いで、メラトニンのみを含む培地で培養されたウオッシュアウト実験によって実証され、完全に可逆的であった。全てをまとめると、これらの結果は、シクロブレビンは、纖毛形成、纖毛輸送、紡錘体形成、及びメラノソームの輸送を含む異種の細胞質ダイニンの依存するプロセス特異的な可逆的阻害剤であることを示している。

10

【0091】

微小管表面滑走アッセイ

【0092】

シクロブレビンが作用する多様な細胞コンテキストは、このマルチサブユニットモータータンパク質を収束するための上流のシグナル伝達よりもむしろ、標的の細胞質ダイニンそれ自体を標的とすることを強く示唆している。細胞質ダイニンがシクロブレビンの直接の標的であるかどうかを、より直接的に調べるために、我々は、インビトロにおけるダイニン依存性微小管滑走へのそれらの影響を評価した。細胞質ダイニンは、ウシの脳組織から精製され、スライドガラス上に吸着され、蛍光標識された微小管及びATPとともに、これらの化合物の存在下又は非存在下のいずれかの条件においてインキュベートされた。我々は、次いで、落射蛍光顕微鏡を用いて微小管滑走速度の結果を画像化し、定量化した。

20

【0093】

細胞質ダイニンは、Bingham et al., [Methods Enzymol. 298, 171 (1998)]により示された方法で、ウシの脳組織から精製された。C末端Hisタグを有するヒトキネシン(kinesin-1)の560アミノ酸残基からなるN末端断片であるK560は細菌内で発現され、Woehlke et al., [Cell 90, 207 (1997)]で示されたように精製された。運動性アッセイは、Zeiss 100x/1.45 NA α-Plan-Fluar対物レンズを搭載したZeiss Axiovert 200M広視野顕微鏡上で行われた。データは、0.3秒の露光時間及び0.5/秒のフレームレートで、EM-CCDカメラ(iXon DU-897, Andor Technology)に捉えられた。微小管表面滑走アッセイは、Kapoor and Mitchison [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 9106 (1999)]により示された方法に、修正をいくつか加えて行われた。約6 µLのフローチャンバーは、モータータンパク質(100 µg/mLダイニン又は50 µg/mL K560)を含むモーター希釈緩衝液(80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 50 µM ATP, 水酸化カリウムでpH 6.8に調整)で満たされた。2分間のインキュベーションの後、余分なタンパク質は、20 µL PEM80緩衝液(80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 水酸化カリウムでpH 6.8に調整)で洗い落とされ、チャンバーをブロッキングタンパク質(0.5 mg/mLダイニン実験用α-カゼイン及び1 mg/mL K560実験用BSA)を含むモーター希釈タンパク質で満たすことによって、表面は非特異的な微小管結合に対してブロックされた。チャンバーは、2分後に18 µLの反応混合物[PEM80, 40 mM KCl, ブロッキングタンパク質(1 mg/mLダイニン実験用α-カゼイン; 1 mg/mL K560実験用BSA), 2 mM MgATP, 20 µMタキソール, 0.1 µMローダミン標識微小管, 酸素欠乏システム

30

40

50

(4 mM DTT, 2 mM グルコース, 40 μ g/mL グルコースオキシダーゼ, 35 μ g/mL カタラーゼ), 2.5% DMSO, 適切な試験化合物]で灌流された。フローチャンバーは、次いで、パラップ (valap) により密閉された。微小管を表面に5分間結合させた後、滑走微小管は経時的顕微鏡法によって可視化された。速度は、MetaMorphソフトウェア (Molecular Devices) を用いたキモグラフィによって計測され、それぞれの微小管の速度は観測時間中における合計距離から決定された。

【0094】

ウォッシュアウト実験のために、阻害剤を含む最初の反応混合物が加えられた後、チャンバーは、密封ではない状態にされた。微小管を表面に5分間結合させた後、次いで、微速度撮影動画が得られた。阻害剤は、次いで、追加の微小管又は阻害剤なしの新しい反応混合物 (PEM80, 40 mM KCl, 1 mg/mL α -カゼイン, 2 mM MgATP, 20 μ M タキソール, 酸素欠乏システム, 2.5% DMSO) を流し込むことにより、チャンバー外へ洗い落とされた。チャンバーは密封され、追加の微速度撮影動画が得られた。

10

【0095】

全ての化合物は、最初に、このアッセイにおいて微小管の動きを妨害する濃度の少なくとも5倍の濃度のシクロプレビンA及びシクロプレビンD (実施例1及び31) とともに100 μ Mで調査された; 我々のセルベースアッセイにおいて、細胞質ダイニン依存的なプロセスを阻害しなかった類似体 (実施例2及び16) では、この濃度でも、極小の影響しか及ぼさなかった。Xenopus小胞細胞におけるメラノソーム凝集と同様に、シリオブレビンによる微小管滑走阻害は、30 μ M及び40 μ MのIC50値を示す2つの化合物のそれぞれにおいて、可逆的であり、用量依存性であった。いずれのシリオブレビンも、インビトロにおいて、100 μ M濃度でK560/キネシン-1依存性微小管滑走に対して有意な影響を及ぼさなかった。このように、これらのジヒドロキナゾリノンは、特異的に細胞質ダイニンを標的とし、ATP依存性微小管運動の包括的な拮抗物質ではなかった。

20

【0096】

纖毛形成の定量的評価

【0097】

Shh-EGFP細胞は、Gli応答性green fluorescent proteinレポーターを安定的に組み込まれたNIH-3T3を基にした細胞株であり、10% (v/v) コウシ血清、100 U/mL ペニシリン及び0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含むDMEM内で維持された。細胞は、30000細胞/ウエルの濃度になるようポリ-D-リジンでコーティングされた12 mmのカバーガラスを含む24穴ウエルプレートに注入され、36時間培養された。細胞は、0.5% (v/v) コウシ血清及び上記抗体を含むDMEM内に、それぞれのジヒドロキナゾリノンが30 μ M又は等量のDMSO溶媒 (0.3%, v/v) となるように移された。さらに24時間の培養の後、細胞は、4% (w/v) パラホルムアルデヒドを含むPBSを用いて室温で10分間固定され、PBSを用いて5分間3回洗浄され、0.3% (v/v) Triton-X-100を含むPBSに5分間浸漬され、5% (v/v) 正常ヤギ血清、0.1% (v/v) Triton-X-100及び0.05% (w/v) アジ化ナトリウムを含むPBSを用いて、4で一晩ブロックされた。カバーガラスは、次いで、ウサギポリクローナルanti-Arl13b抗体 (1:3000希釈) を含むブロッキング緩衝液とともに、室温で90分間インキュベートされ、0.1% Triton (v/v) X-100を含むPBSを用いて5分間4回洗浄され、Alexa Fluor 488で標識ヤギポリクローナル抗ウサギIgG抗体 (1:300希釈; Invitrogen, A-11034) を含むブロッキングバッファとともに、室温で60分間インキュベートされた。二次抗体のインキュベーションの後、核は、0.1% (v/v) Triton-X-100及び0.5 μ M/mL 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含

30

40

50

むPBSとともに、10分間2回インキュベーションされた後に、PBSを用いて5分間2回洗浄することによって染色された。その後、カバーガラスは、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) を使用したスライドに固定され、Photometric Cool SNAP HQ CCDカメラ及びMetaMorphソフトウェア (Molecular Devices) を搭載したライカDMI 6000B複合顕微鏡HC Plan Apochromat CS 20x/0.70 NA油浸対物レンズを用いて画像化された。DMSO処理されたArl 13bの画像は、纖毛染色強度の最小閾値を確立するために手動で検討された。次いで、ImageJソフトウェアが、個々の画像内の閾値以上の信号強度を有する2以上の隣接する画素から構成されるオブジェクトを定義するために使用され、それぞれの画像内の総被写体領域が、一次纖毛の全画素面積を推定するために使用された。DAPI染色の対応する画像が、各画像あたりの核の数を確認するためのCellProfilerソフトウェアを使用して、並行して処理された。各画像内の細胞あたりの平均纖毛サイズは、次いで、核の数で合計纖毛画素領域を割ることによって決定された。約150の細胞を含む10の各画像が、それぞれの実験条件での平均纖毛サイズを決定するために使用された。結果は、図1に示されている。纖毛サイズには、実施例1の化合物の濃度上昇に反応して、用量依存的な減少が見られ、ヘッジホッグシグナル伝達を阻害するがダイニンの阻害剤ではない実施例16の化合物では、濃度上昇に反応した纖毛サイズの用量依存的な減少は見られなかった。

10

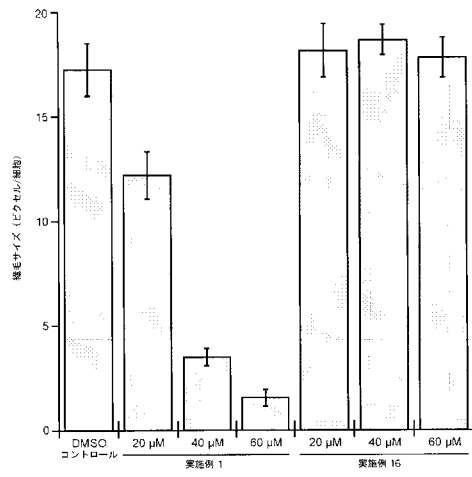
【0098】

本明細書により開示される化合物は、インビトロ及び生細胞における細胞質ダイニンの特異的な阻害剤である最初の小分子である。ATPの類似体であるエリトロ-9[3-(2-ヒドロキシノニル)]アデニン及び抗酸化ノルジヒドログアイヤレチン酸は、以前からダイニンの機能を抑制すると報告されており、これらの化合物は、様々な酵素の拮抗物質である。天然産物プレアリン (purealin) は、インビトロでダイニンモータードメインのATPase活性を部分的に阻害することができるが、細胞質ダイニン依存的細胞プロセスをブロックする能力が実証されていない。上述の調査は、シクロプレビンが細胞質ダイニン1及び2の両方を阻害することができることを示し、従って、本化合物がEg5の抑制剤であるモナストロール (monastrol)、及びミオシンIIの拮抗物質であるプレビスタチン (blebbistatin) のようなモータータンパク質の他の小分子モジュレーターを補完し、ダイニン依存的プロセスに広く応用できるプローブになるであろう。

20

30

【図 1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/021639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D239/91 A61K31/517 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/102864 A1 (UNIV STANFORD [US]; CHEN JAMES K [US]; HYMAN JOEL M [US]; OCASIO CORY) 20 August 2009 (2009-08-20) cited in the application claim 4; compound 18 -----	1-11,16, 17
X	D. V. DAR'IN ET AL: "Cyclocondensation of [alpha]-acylacetamides with esters of 2-fluoro-5-nitrobenzoic and 4-chloro-2-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acids", CHEMISTRY OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS, vol. 44, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 461-465, XP55022729, ISSN: 0009-3122, DOI: 10.1007/s10593-008-0064-y page 462; compound 9 ----- -/-	1,3,4,7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international
filing date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or
which is cited to establish the publication date of another
citation or other special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or
other means"P" document published prior to the international filing date but
later than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date
or priority date and not in conflict with the application but
cited to understand the principle or theory underlying the
invention"X" document of particular relevance; the claimed invention
cannot be considered novel or cannot be considered to
involve an inventive step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention
cannot be considered to involve an inventive step when the
document is combined with one or more other such docu-
ments, such combination being obvious to a person skilled
in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2012

Date of mailing of the international search report

24/04/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gettins, Marc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/021639

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HANKA HABER ET AL: "Heterocyclensynthesen mit 5-Phenyl-isoxazoliumsalzen; Synthese und Eigenschaften von 2-Phenacyliden-chinazolin-4-onen", ZEITSCHRIFT FÜR CHEMIE, vol. 27, no. 9, 1 September 1987 (1987-09-01), pages 336-337, XP55022733, DOI: 10.1002/zfch.19870270911 page 336; compounds 4a,4b -----	1,3,4, 8-10
X	A. D. PILLAI ET AL: "A Cell-Based High-Throughput Screen Validates the Plasmodial Surface Anion Channel As an Antimalarial Target", MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 77, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 724-733, XP55022753, ISSN: 0026-895X, DOI: 10.1124/mol.109.062711 table 1; compound 6 -----	1,3,4, 7-11
X	J. M. HYMAN ET AL: "Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 33, 18 August 2009 (2009-08-18), pages 14132-14137, XP55022754, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0907134106 HPI-4 on page 14133 -----	1-11,16, 17
X	US 2005/080138 A1 (GUICHERIT OIVIN M [US] ET AL) 14 April 2005 (2005-04-14) claim 2 -----	1-11,16, 17
X	YULIAN M. VOLOVENKO ET AL: "2-(3,4-Dihydro-4-oxo-2-quinazolinyl)aceto nitriles in the Synthesis of New Condensed Pyrimidines", SYNTHESIS, vol. 2004, no. 16, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 2659-2664, XP55022756, ISSN: 0039-7881, DOI: 10.1055/s-2004-834860 examples 6a-8d; table 1 ----- -/--	1,3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/021639

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"A Facile Method for the Synthesis of Novel Quinazolinone Compounds", SYNTHETIC COMMUNICATIONS, vol. 26, no. 3, 21 August 2006 (2006-08-21), pages 475-482, XP009157822, DOI: 10.1080/00397919608003638 page 477; compounds 3d-3g -----	1,3,4, 7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/021639

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009102864	A1	20-08-2009	EP 2249818 A1 17-11-2010 US 2011015201 A1 20-01-2011 WO 2009102864 A1 20-08-2009
US 2005080138	A1	14-04-2005	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(72)発明者 チェン ジェームズ ケー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94943, マウンテン ビュー, ミドルフィールド ロード 2040

(72)発明者 カプーア タルン エム .

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10021, ニューヨーク, 63 ストリート 430 イースト, アpartment 8 J

(72)発明者 ファイアストン アリ ジェー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94403, サンマテオ, 28 アベニュー 35, アpartment 209

(72)発明者 ワインガー ジョシュア エス .

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10065, ニューヨーク, 63 ストリート 500 イースト, アpartment 26A

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 BC46 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC20