

【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】平成20年9月4日(2008.9.4)

【公表番号】特表2004-501983(P2004-501983A)

【公表日】平成16年1月22日(2004.1.22)

【年通号数】公開・登録公報2004-003

【出願番号】特願2002-507818(P2002-507818)

【国際特許分類】

C 07 D 407/12	(2006.01)
A 61 K 31/343	(2006.01)
A 61 P 1/02	(2006.01)
A 61 P 9/10	(2006.01)
A 61 P 17/06	(2006.01)
A 61 P 19/02	(2006.01)
A 61 P 29/00	(2006.01)
A 61 P 31/12	(2006.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
A 61 P 35/02	(2006.01)

【F I】

C 07 D 407/12	
A 61 K 31/343	
A 61 P 1/02	
A 61 P 9/10	
A 61 P 9/10	1 0 1
A 61 P 17/06	
A 61 P 19/02	
A 61 P 29/00	1 0 1
A 61 P 31/12	
A 61 P 35/00	
A 61 P 35/02	

【誤訳訂正書】

【提出日】平成20年7月17日(2008.7.17)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】治療化合物および方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】次のNMRスペクトル特性を有する化合物またはその塩、誘導体またはプロドラッグ：

<sup>1</sup>H NMR(CDC13)(ppm)  
 3.49、s、3H；3.56、dd、11.7、2Hz、1H；3.61、m、1H、  
 3.61、2H；3.65、s、3H；3.71、s、3H；3.87、s、3H；3.  
 89、dd、14.2、6.7Hz、1H；4.13、t、11.2Hz；4.23、b  
 rt、11.3Hz、1H；4.28、d、14.2Hz、1H；4.59、s、1H；  
 5.03、d、6.7Hz、1Hz；5.28、s、1H；6.28、d、2Hz、1H

; 6 . 4 3、d、2 H z、1 H ; 6 . 6 8、b r d、9 H z、2 H ; 6 . 8 4、m、2 H  
; 7 . 0 6、m、2 H ; 7 . 0 6、m、1 H ; 7 . 1 0、b r d、9 H z、2 H  
<sup>1</sup><sup>3</sup> C N M R ( C D C l <sub>3</sub> ) ( p p m )  
5 0 . 0 3、5 2 . 0 6、5 5 . 0 3、5 5 . 0 5、5 5 . 1、5 5 . 9、5 9、6 3 .  
3、6 8 . 3、7 0 . 6、7 9 . 6、9 2 . 8、9 3 . 4、9 3 . 9、9 4、9 5 . 2、  
1 0 1 . 9、1 0 9 . 6、1 1 2 . 7、1 2 6 . 2、1 2 6 . 6、1 2 7 . 8、1 2 7 .  
8、1 2 8 . 9、1 3 6 . 7、1 5 7 . 1、1 5 8 . 8、1 6 0、1 6 0 . 6、1 7 0 .  
6。

【請求項 2】 次のN M R 特性を有する化合物またはその塩、誘導体またはプロドラッグ：

<sup>1</sup> H N M R ( C D C l <sub>3</sub> ) ( p p m )  
3 . 5、s、3 H ; 3 . 6 1、d d、1 0 . 4、4 . 4 H z、1 H ; 3 . 6 6、m、1 H  
; 3 . 6 6、s、3 H ; 3 . 7 2、m ; 3 . 7 2、s、3 H ; 3 . 7 8、d d、1 1 . 7  
、2 . 4 H z、1 H ; 3 . 8 6、s、3 H ; 3 . 9、d d、1 4、6 . 8 H z、1 H ; 4  
. 0 2、t、1 1 . 2 H z、1 H ; 4 . 1 2、d d d、1 1、6 . 8、2 - 8 H z、1 H  
; 4 . 2 8、d、1 4 H z、1 H ; 4 . 6 0、S、1 H ; 5 . 0 4、d、6 . 8 H z、1  
H ; 5 . 2 6、S、1 H ; 6 . 2 9、d、2 H z、1 H ; 6 . 4 5、d、2 H z、1 H ;  
6 . 6 9、b r d、9 H z、2 H ; 6 . 8 6、m、2 H ; 7 . 0 6、m、2 H ; 7 . 0 6  
、m、1 H ; 7 . 1 0、b r d、9 H z、2 H ;  
<sup>1</sup><sup>3</sup> C N M R ( C D C l <sub>3</sub> ) ( p p m )  
5 0、5 2、5 5、5 5、5 5、5 5 . 8、5 9 . 6、6 2 . 5、6 7 . 6、7 1 . 4、  
7 9 . 6、9 2 . 8、9 3 . 4、9 4 . 3、9 5 . 2、1 0 1 . 8、1 0 9 . 4、1 1 2  
. 8、1 2 6 . 2、1 2 6 . 6、1 2 7 . 5、1 2 7 . 5、1 2 8 . 9、1 3 6 . 6、1  
5 7 . 1、1 5 8 . 8、1 5 9 . 8、1 6 0 . 2、1 7 0 . 7。

【請求項 3】 プロドラッグまたは誘導体がグリコシド、アルキルオキシ、アリールオキシまたはアシリルオキシ誘導体である請求項 1 または 2 記載の化合物。

【請求項 4】 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の化合物を、医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物。

【請求項 5】 治療的に有効量の請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の化合物を投与することを含む、癌または癌性状態を治療する方法。

【請求項 6】 癌または癌性状態の治療用医薬の製造における請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載化合物の使用。

【請求項 7】 癌または癌性状態が、白血病、乳癌、結腸癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、肺癌、卵巣癌、皮膚癌、肝癌および腸癌および胃癌、腫瘍および黒色種から選択される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】 癌または癌性状態が、白血病、乳癌、結腸癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、肺癌、卵巣癌、皮膚癌、肝癌および腸癌および胃癌、腫瘍および黒色種から選択される、請求項 6 記載の使用。

【請求項 9】 細胞増殖過多に付随する病態または状態を治療するための方法であって、治療的に有効量の請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の化合物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

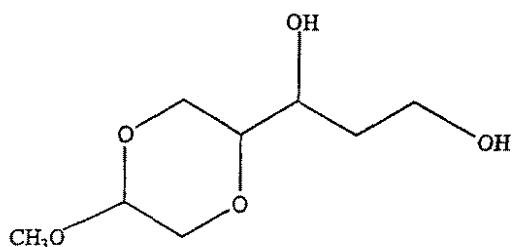
【請求項 10】 細胞増殖過多に付随する病態または状態を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の化合物の使用。

【請求項 11】 病態または状態が、アテローム性動脈硬化症、再発狭窄症、慢性関節リウマチ、骨関節症、炎症性関節炎、乾癬、歯周病またはウイルスにより誘発される細胞増殖過多である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 12】 病態または状態が、アテローム性動脈硬化症、再発狭窄症、慢性関節リウマチ、骨関節症、炎症性関節炎、乾癬、歯周病またはウイルスにより誘発される細胞増殖過多である、請求項 10 記載の使用。

【請求項 13】 式：

## 【化1】



を有する化合物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は一般に、シクロペニタベンゾフランコアを有する化合物に関する。より詳細には、本発明はシクロペニタベンゾフランコアがジオキサニルオキシ基により置換されているシクロペニタベンゾフラン化合物に関する。本発明はさらに療法におけるこれらの化合物の使用および前記化合物を含む組成物にも関する。

## 【0002】

## (発明の背景)

*Aglaia* は、インド - マレーシアおよび西太平洋領域における 100 を越える（ほとんどは大木）種を含むセンダン (*Meliaceae*) 科の大きな属である。用途としては、熱、骨折、出産および炎症の治療が挙げられる。抽出物はさらに、殺虫剤、殺虫剤、香水、収斂剤、強壮剤、清涼剤として (Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases) および腹部腫瘍の治療のために (Pannell, ら、1992, Kew Bull., (16) 273-283) 用いられる。

最近、多くの 1H-シクロペニタ [b] ベンゾフランリグナンが *Aglaia* 種から単離されている（たとえば、WO 97/08161; JP 97171356; Ohse, ら、J Nat Prod, 1996, 59 (7) : 650-52; Lee ら、Chem. Biol. Interact., 1998, 115 (3) : 215-28; Wu ら、J. Natl. Prod., 1997, 60 (6) : 606-08; Bohnenstengel ら、Z. Naturforsch., 1999, 54c (12) : 55-60 および Bohnenstengel ら、Z. Naturforsch., 1999, 54c (12) : 1075-83, Xu, Y. J. ら、2000, J. Nat. Prod., 63, 4732-76 (これらの内容をすべて出典明示により本発明の一部とする) 参照）。これらの化合物の多くは、その殺虫活性に関して注目されている (Janprasert, ら、1993, Phytochemistry, 32 (1), 67-69; Ishibashi ら、1993, Phytochemistry, 32 (2), 307-310; Hiort, ら、1999, J. Nat. Prod., 62 (12), 1632-1635)。密接に関連したコア構造を有する殺虫化合物は *Aglaia robusta* から単離され、WO 9604284 において農薬における活性成分としての使用に関して記載されている。

## 【0003】

今回、シクロペニタ [b] ベンゾフランコアに結合したジオキサニルオキシ基を特に有する新規化合物（本明細書に記載の化合物 A および B）が *Aglaia leptantha*、Miq. (*Meliaceae*) から単離された。化合物 A および B は癌細胞増殖および生存力に対する強力な細胞毒性および細胞増殖抑制作用を示すことが証明されており、従って本発明の化合物は癌および癌性状態または細胞増殖過多に関連する他の病気の治療において治療薬として有用である。

## 【0004】

## (発明の概要)

本明細書および請求の範囲全体を通して、前後関係から他の方法が必要とされない限り、「含む」なる用語、およびその語尾変化は記載されている整数または段階または整数または段階の群を含むが、他の整数または段階あるいは整数または段階の群は含まないことを意味する。

第一の態様において、本発明は化合物AおよびBおよびその塩、誘導体およびプロド  
ラッグに関する。

#### 【0005】

もう一つの態様において、本発明は、化合物AまたはB、またはその塩、誘導体または  
プロドラッグを、医薬的に許容される担体、賦形剤または希釈剤と合わせて含む組成物を  
提供する。

さらにもう一つの態様において、本発明は癌または癌性状態を治療するための方法であ  
って、治療有効量の化合物AまたはB、またはその塩、誘導体またはプロドラッグを、そ  
れを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

本発明はさらに、化合物AまたはB、またはその塩、誘導体またはプロドラッグの、癌  
または癌性状態の治療用医薬の製造における使用に関する。

#### 【0006】

(図面の簡単な記載)

図1：化合物AはTHP-1白血病性細胞の分化を促進する。

THP-1細胞を4日間、表示したように10nMの化合物Aの存在下または不在下で培養した。表示されている場合は、細胞を化合物Aの存在下または不在下でIFN(100ng/ml)(3日)またはPMA(0.1μM)(4日)でも処理した。画像は位相差顕微鏡(倍率×200)で可視化した細胞のものである。

図2：細胞周期進行およびTHP-1細胞の生存力に対する化合物Aの作用。

THP-1細胞を表示された濃度の化合物Aまたは1000nMのパクリタクセル(paclitaxel)とともに2日間培養し、その後集め、プロピジウムヨージドでの染色の前に70%エタノール中で固定し、DNA含量をフローサイトメトリーにより測定した。数値は、2N DNA含量を有するすべての細胞に対する様々な細胞周期の時期における細胞の割合(%)を示し、また培養期間中に起こるマーカー(垂直線)の左側の死滅細胞の割合(%) (すなわち、サブジプロイド(subdiploid) 2N細胞)を示す。

#### 【0007】

図3：A549細胞の増殖に対する化合物Aの作用

A549細胞を~10000細胞/ウェルで接種し、表示された濃度の化合物Aまたはパクリタクセルの存在下で培養した。細胞を集め、様々な時点でトリパンブルー染色された細胞を血球計で計測することにより生存細胞数を測定した。結果は三重複培養の平均±SEMである。

図4：細胞周期進行およびA549細胞の生存力に対する化合物Aの作用。

A549細胞を6日間表示された濃度の化合物Aまたは1μMのパクリタクセルとともに培養し、次に集め、プロピジウムヨージドでの染色する前に70%エタノール中で固定し、DNA含量をフローサイトメトリーにより測定した。数値は2DNA含量を有する全細胞に対するさまざまな細胞周期時期における細胞の割合(%)を示し、培養期間中に起こるマーカーに左側の死滅細胞の割合(%) (すなわち、サブジプロイド 2N細胞)も示す。

#### 【0008】

図5：化合物AおよびBはK562白血病性細胞のG2/M期蓄積を誘発する。

K562細胞を3日間表示された濃度の化合物AまたはBとともに培養し、次に集め、プロピジウムヨージドでの染色する前に70%エタノール中で固定し、DNA含量をフローサイトメトリーにより測定した。数値は2N DNA含量を有する全細胞に対するそれぞれ細胞周期のG0/G1、SおよびG2/M期における細胞の割合(%)を示す。

図6：A549細胞に対する化合物の細胞増殖抑制作用は可逆的である。

A549細胞を~10000細胞/ウェルで接種し、表示された濃度の化合物Aまたはパクリタクセルの存在下で培養し、生存細胞数を様々な時点でトリパンブルー染色された細胞を血球計で計測することにより測定した。5日に、細胞の一部を洗浄し、様々な処置をしていない新鮮な培地中に再懸濁させ、計測前にさらに4日間培養した。

## 【0009】

図7：化合物AはA549細胞のカンプトテシン-およびパクリタクセル-誘発性細胞毒性を抑制する。

96ウェルプレート中A549細胞を3日間10nMの化合物Aの存在下または不在下で、表示された濃度の(A)カンプトテシンまたは(B)パクリタクセルとともに培養した。次に蛍光DNA-結合色素YOYO-1を添加することにより膜統合性の損失を評価し、細胞死に伴う蛍光の増大を、蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

図8：化合物Aは抗癌剤により誘発される細胞周期停止および細胞死を抑制するが、スタウロスボリンによっては抑制されない。

6ウェルプレート中A549細胞を3日間10nMの化合物Aの存在下または不在下で、表示するように0.1μMのカンプトテシン、10μMのビンプラスチン、1μMのパクリタクセルまたは1μMのスタウロスボリンとともに培養した。細胞を次に集め、プロピジウムヨージドで染色する前に70%エタノール中で固定し、DNA含量をフローサイトメトリーにより測定した。数値は2N DNA含量を有するすべての細胞に対する様々な細胞周期の時期における細胞の割合(%)を示し、また培養期間中に起こるマーカーの左側の死滅細胞の割合(%)（すなわち、サブジブロイド2N細胞）も示す。

## 【0010】

図9：化合物AはA549細胞において老化-関連-ガラクトシダーゼ活性を誘発しない。

A549細胞を10000細胞/ウェルで6ウェルプレート中、様々な濃度の化合物A(10~50nM)または250nMのドキソルビシンの存在下または不在下で10日間接種した後、すでに記載されているようにして処理し、老化関連-ガラクトシダーゼ活性について一夜染色した(Dimriら、1995, Proc Natl Acad Sci USA 1995;92(20):9363-7)。化合物Aについて、10nM処置だけを示すが、試験した他のどの濃度でも検出可能なSA-gal活性はなかった。PC、位相差顕微鏡。BF、明視野顕微鏡。倍率200倍。

図10：化合物Aはマウス異種移植片モデルにおいてヒト腫瘍細胞の増殖を抑制する。

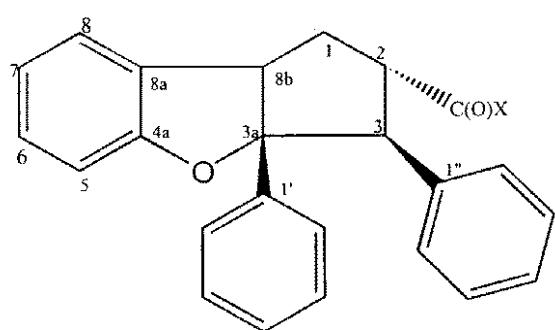
無胸腺Balb/cヌードマウス(Rygaard and Povlsen, 1969, Acta Pathol Microbiol Scand, 77:758)に $2 \times 10^6$ PC3細胞を背側腹部に皮下的に接種した。腫瘍が触知できるようになっていた8日後に化合物Aを1週間に3回腹膜組織内注射により投与した(3mg/kg)。化合物Aをまずエタノール中に可溶化し、次にcremaphoreと1:1で混合し、注射用に塩溶液中で希釈した。対照動物を同様の方法で同じビヒクルであるが、化合物Aを含まないもので処置した。(A)化合物Aの平均腫瘍体積に対する作用。表示された時間でマイクロメーターカリパスを用いて腫瘍体積を測定した。データは平均腫瘍体積±SEMを表す。(B)平均腫瘍重量に対する化合物Aの作用。実験の最後に(PC3細胞の接種後29日)、マウスを屠殺し、腫瘍を摘出し、その後秤量した。データは平均腫瘍重量±SEMを表す。

## 【0011】

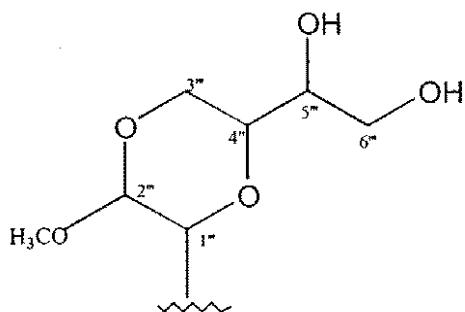
(発明の詳細な記載)

いくつかのシクロペンタ[b]ベンゾフランは以前に報告されている(Gregerら、2001, Phytochemistry, 57, (1);57-64)。本発明の化合物AおよびBは、シクロペンタ[b]ベンゾフランコア(i)に結合したジオキサンイル基(ii)を有する。

【化2】



(i)



(ii)

## 【0012】

式(i)のジオキサニル基は以前に天然源からは報告されていなかった。本発明を理論により拘束することを意図しないが、立体的に嵩高い基、すなわち、メトキシ基よりも空間的に大きな基が存在することは、シクロペンタ[b]ベンゾフランコアを有する化合物に細胞毒性および細胞増殖抑制特性の両方を賦与する。

本発明はその範囲内に化合物AおよびBの医薬的に許容される塩、誘導体またはプロドラッグを含む。

## 【0013】

「塩」または「プロドラッグ」なる用語は、任意の医薬的に許容される塩、エステル、グリコシド、溶媒和物、水和物または受容患者に投与することにより本明細書に記載する本発明の化合物を提供（直接または間接的に）できる任意の他の化合物を包含する。

適当な医薬的に許容される塩としては、医薬的に許容される無機酸、例えば、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、炭酸、ホウ酸、スルファミン酸、および臭化水素酸の塩、あるいは医薬的に許容される有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、酪酸、酒石酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フマル酸、クエン酸、乳酸、粘液酸、グルコン酸、安息香酸、コハク酸、シュウ酸、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、サリチル酸、スルファニル酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、エデト酸、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パントテン酸、タンニン酸、アスコルビン酸および吉草酸の塩が挙げられる。塩基塩としては、これらに限定されないが、医薬的に許容されるカチオン、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムおよびアルキルアンモニウムと形成されるものが挙げられる。

## 【0014】

塩の調製は当業界において公知の方法により行うことができる。医薬的に許容されない塩も医薬的に許容される塩の調製において中間体として有用であるので、本発明の範囲内に含まれると考えられる。

本発明の化合物は、結晶形態であってもよいし、溶媒和物（例えば水和物）であってもよい。溶解の方法は、当業者に公知である。

化合物AまたはBのプロドラッグも本発明の範囲に含まれる。「プロドラッグ」なる用語は、本発明の化合物にインビボで変換される誘導体を包含し、例えば、遊離ヒドロキシ基のエステル、アセテートおよびグリコシド誘導体を包含する。

## 【0015】

化合物AおよびBのヒドロキシリ基の誘導体化を、ヒドロキシ基のアルキル化、アリール化またはアシリル化について当該分野で公知の方法、例えば、Protective Groups in Organic Synthesis T.W. Greene and P.G.M. Wutz, (1999) Wiley Interscience, New York, and Advanced Organic Chemistry, J. March, (4<sup>th</sup> Edition), Wiley-Interscience（その全体を出典明示により本発明の一部とする）に記載されている方法により行うこと

ができる。例えば、ヒドロキシ基は、ハロゲン化アルキル、例えば、ヨウ化メチルまたは硫酸ジアルキル、例えば、硫酸ジメチルおよびジエチルを用いてアルキル化することができる。アシル化は、塩基またはカップリング剤の存在下で、適当なカルボン酸、酸ハロゲン化物および酸無水物での処理により行うことができる。ベンジル化は、ハロゲン化ベンジル化合物、例えば臭化、塩化、またはヨウ化ベンジルでの処理により行うことができる。メチルエステルの脱エステル化は、エステルを水性塩基で処理することにより行うことができる。カルボン酸のエステル化は、酸の存在下での適当なアルコールでの処理、または硫酸アルキルまたはハロゲン化アルキルでの処理を含む慣用の手段により達成することができる。

#### 【0016】

本明細書において使用する場合、「アルキル」なる用語は、単独または「アリールアルキル」などの複合語において用いられる場合、直鎖、分岐または環状炭化水素基、好ましくは、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>、例えば、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>を意味する。「C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」なる用語は、1~6個の炭素原子を有する直鎖、分岐または環状アルキル基を意味する。「C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル」の例としては、メチル、エチル、iso-プロピル、n-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、2,2-ジメチルプロピル、n-ヘキシリ、2-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、3-メチルペンチルおよび2,3-ジメチルブチルが挙げられる。環状C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルの例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシリが挙げられる。アルキルの他の例としては：ヘプチル、5-メチルヘキシリ、1-メチルヘキシリ、2,2-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルペンチル、4,4-ジメチルペンチル、1,2-ジメチルペンチル、1,3-ジメチルペンチル、1,4-ジメチルペンチル、1,2,3-トリメチルブチル、1,1,2-トリメチルブチル、1,1,3-トリメチルブチル、オクチル、6-メチルヘプチル、1-メチルヘプチル、1,1,3,3-テトラメチルブチル、ノニル、1-、2-、3-、4-、5-、6-または7-メチルオクチル、1-、2-、3-、4-または5-エチルヘプチル、1-、2-または3-プロピルヘキシリ、デシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-および8-メチルノニル、1-、2-、3-、4-、5-または6-エチルオクチル、1-、2-、3-または4-プロピルヘプチル、ウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-または9-メチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-または7-エチルノニル、1-、2-、3-、4-または5-プロピルオクチル、1-、2-または3-ブチルヘプチル、1-ペニチルヘキシリ、ドデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-または10-メチルウンデシル、1-、2-、3-、4-、5-、6-、7-または8-エチルデシル、1-、2-、3-、4-、5-または6-プロピルノニル、1-、2-、3-または4-ブチルオクチル、1-2-ペニチルヘプチルなどが挙げられる。アルキル基は、所望により本明細書において定義する1以上の任意の置換基で置換されていてもよい。所望により、直鎖、分岐または環状炭化水素基（少なくとも2個の炭素原子を有する）は1、2またはそれ以上の不飽和度を含み、アルケニルまたはアルキニル基、好ましくはC<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルケニル、より好ましくはC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニル、またはC<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>アルキニル、より好ましくはC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニル基が形成される。その例は、1または2以上の二重結合、または1または2以上の三重結合を含む炭化水素残基を含む。従って、「アルキル」はアルケニルおよびアルキニルを包含すると見なされる。

#### 【0017】

「アリール」なる用語は、単独または「アリールアルキル」などの複合語において用いられる場合、芳香族炭化水素または芳香族複素環（ヘテロアリール）系の单一、多核、接合または融合残基を意味し、ここにおいて、環状炭化水素残基の1以上の炭素原子は複素原子で置換されて、芳香族残基が得られる。2以上の炭素原子が置換されている場合、これは2以上の同じ複素原子により置換されていてもよいし、異なる複素原子により置換されていてもよい。適当な複素原子としては、O、N、SおよびSeが挙げられる。

「アリール」の例としては、フェニル、ビフェニル、ターフェニル、クオーターフェニ

ル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、アントラセニル、ジヒドロアントラセニル、ベンズアントラセニル、ジベンズアントラセニル、フェナントレニル、フルオレニル、ピレニル、イデニル、アズレニル、クリセニル、ピリジル、4 - フェニルピリジル、3 - フェニルピリジル、チエニル、フリル、ピロリル、インドリル、ピリダジニル、ピラゾリル、ピラジニル、チアゾリル、ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ブリニル、キナゾリニル、フェナジニル、アクリジニル、ベノキサゾリル、ベンゾチアゾリルなどが挙げられる。好ましい炭化水素アリール基としては、フェニルおよびナフチルが挙げられる。好ましい複素環式アリール基としては、ピリジル、チエニル、フリル、ピロリルが挙げられる。アリール基は、所望により本明細書に定義される1以上の所望の置換基により置換されていてもよい。

## 【0018】

「アシル」なる用語は、- C (O) - R 基（式中、R はアルキルまたはアリール基である）を意味する。アシルの例としては、直鎖または分岐アルカノイル、例えば、アセチル、プロパノイル、ブタノイル、2 - メチルプロパノイル、ペンタノイル、2, 2 - ジメチルプロパノイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル、トリデカノイル、テトラデカノイル、ペンタデカノイル、ヘキサデカノイル、ヘプタデカノイル、オクタデカノイル、ノナデカノイルおよびイソサノイル；シクロアルキルカルボニル、例えば、シクロプロピルカルボニル、シクロブチルカルボニル、シクロペンチルカルボニルおよびシクロヘキシリカルボニル；アロイル、例えば、ベンゾイル、トルオイルおよびナフトイル；アラルカノイル、例えば、フェニルアルカノイル（例えば、フェニルアセチル、フェニルプロパノイル、フェニルブタノイル、フェニルイソブチリル、フェニルペンタノイルおよびフェニルヘキサノイル）およびナフチルアルカノイル（例えば、ナフチルアセチル、ナフチルプロパノイルおよびナフチルブタノイル）が挙げられる。R 基は所望により前記のように置換されていてもよいので、「アシル」は所望により置換されていてもよいアシルを意味する。

## 【0019】

アルキル、アリールまたはアシルの任意の置換基としては、ハロ（プロモ、フルオロ、クロロ、ヨード）、ヒドロキシ、C<sub>1</sub> - 6 アルキル（例えば、メチル、エチル、プロピル（n - および i - 体）、C<sub>1</sub> - 6 アルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ（n - および i - 体）、ブトキシ（n - , s e c - および t - 体）、ニトロ、アミノ、C<sub>1</sub> - 6 アルキルアミノ（例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピル（n - および i - 体）アミノ）、C<sub>1</sub> - 6 ジアルキルアミノ（例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジイソプロピルアミノ）、ハロメチル（例えば、トリフルオロメチル、トリブロモメチル、トリクロロメチル）、ハロメトキシ（例えば、トリフルオロメトキシ、トリブロモメトキシ、トリクロロメトキシ）およびアセチルが挙げられる。

## 【0020】

アルキル基は、アリールまたは環状アルキル基で置換（好ましくは末端で）されていてもよい。アシル基は、アシルまたは環状アルキル基で置換（例えば、末端で置換）されていてもよい。

## 【0021】

グリコシド形成は、化学的に、例えば、出発化合物を保護された糖化合物（C - 1 はヒドロキシルまたはカルボキシル基でのカップリングのためにハロゲン化により活性化され、糖ヒドロキシルは保護基によりブロックされている）と反応させることにより行うことができる。別法として、グリコシド形成は適当なグリコシルトランスフェラーゼ、例えば、UDP - ガラクトース依存ガラクトシルトランスフェラーゼおよび UDP - グルコース依存グリコシルトランスフェラーゼ（SIGMA）を用いて酵素により行うことができる。

好ましい C - 1 結合糖は、式（I）において示す主鎖骨格に糖の 1 - 炭素（慣用の化学的ナンバリング）を介して結合して、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、または R<sub>7</sub> の任意の位置でアセタール結合または R<sub>8</sub> でエステル結合あるいは R<sub>9</sub> または R<sub>10</sub> 位で

アミド結合を形成するフラノースまたはピラノースサッカライド(糖)置換基である。サッカライド基の例としては、還元糖、例えばグルコース、リボース、アラビノース、キシロース、マンノースおよびガラクトースが挙げられ、それぞれは式(I)の構造の酸素原子にサッカライド基のC-1炭素を介して結合する。

当業者は、選択的に1以上の本明細書に定義される誘導体基を組み入れるためには、シクロペンタベンゾフランコアの1以上のオキシおよび/またはカルボキシ基の適切な保護および/または脱保護が必要であることを認識するであろう。1以上のヒドロキシまたはカルボキシ基の選択的誘導体化は、慣例の技術により、適当な条件下で様々な程度の安定性を有する保護基の使用により行うことができる。

#### 【0022】

カルボン酸またはエステル基をアミドへ転化する方法は、当業者に公知であり、カップリング試薬、例えばDCCの存在下でカルボン酸を適当なアミンで処理すること、または酸ハロゲン化物を適当なアミンで処理することを含む。他の適当な方法は、Larock, R.E., Comprehensive Organic Transformations pp963-995, VCH Publishers (1989)に記載されている。

本明細書において用いられる場合、「保護基」なる用語は、特定の官能基、例えばヒドロキシまたはカルボン酸を、該基が他の方法では活性である条件下で一時的に不活性にすることができる導入された官能基を意味する。適当な保護基は当業者に公知であり、例えば、Protective Groups in Organic Synthesis(前出)に記載されている。ヒドロキシの適当な保護基としては、アルキル(例えば、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル)、アシリル(例えば、C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル、ベンゾイルなど)、ベンジル、およびシリル基(例えば、トリメチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルなど)が挙げられる。ヒドロキシ置換基およびカルボキシ置換基の他の適当な基(酸、アミドなど)は、Greene(前出)に見出すことができる。ある条件下での様々な基の安定性は当業者には理解され、さらにProtective Groups in Organic Synthesis(前出)に例示されている。

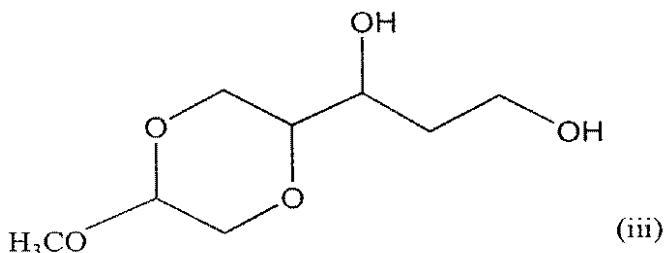
#### 【0023】

式(iii)のジオキサン基は不斉中心を有し、従って、1以上の立体異性体の形態において存在できると認識される。本発明は従って、ジオキサン基の1またはそれ以上の不斉(キラル)中心で実質的に純粋な異性体形態、例えば約90%ee以上、例えば約95%または97%ee、好ましくは99%以上の化合物、ならびにそのラセミ混合物を含む混合物にも関する。かかる異性体は慣例の方法、例えば、クロマトグラフィー、または分割剤の使用により分割できる。本発明は従って、化合物AおよびBを提供する。

#### 【0024】

公知方法を用いてジオキサン基をシクロペンタベンゾフランコアから開裂させることができ、式(iii)のジオキサン化合物を得る。結果として得られるジオキサン化合物は、他の化合物、例えば、オキシ置換化合物、または本明細書の引例に記載されているような他のシクロペンタベンゾフラン化合物上の他のオキシ位を置換するために用いることができる。

#### 【化3】



#### 【0025】

メトキシまたはヒドロキシ置換基を有するシクロペンタベンゾフラン化合物、例えば、本明細書に記載されている文献(出典明示により本発明の一部とする)に記載されてい

るもの、例えば参考化合物1～3（実施例3に記載）は、適當ならば、—脱メチル化され、結果として得られる—ヒドロキシ基は適當なY前駆体と反応して—OY基を形成することも理解されるであろう。その方法は当該分野において公知であり、例えば、一方法は—OH基をY-ハロゲン化合物（ただし、ハロゲンは、Cl、BrおよびIを包含する）と反応させることを含む。かかる—OY化合物は本発明のさらにもう一つの態様を形成する。

#### 【0026】

本発明の化合物は、患者における癌性状態、または細胞の増殖過多に関連する他の状態の治療において有用である。本発明の化合物により治療される患者としては、哺乳動物、例えば、ヒト、霊長類、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ）、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット）、実験室試験用動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ウサギ、霊長類）または捕獲された野生動物が挙げられる。ヒトが治療される患者であるのが最も好ましい。

本明細書において用いられる場合、「治療」なる用語は、癌、腫瘍または増殖過多細胞の成長の予防、遅延化、妨害または停止、あるいは標的とされる細胞の数（または成長塊の大きさ）の減少または前記細胞の全体的破壊を包含することが意図され、ここにおいて前記細胞とは癌、腫瘍または増殖過多細胞である。

#### 【0027】

本発明の化合物により治療される癌性状態は、癌または腫瘍が単純（モノクローナル、すなわち、単一の新生細胞種からなる）、混合（ポリクローナル、すなわち、1以上の新生細胞種からなる）または化合物（すなわち、1以上の新生細胞種からなり、1以上の胚葉から由来する）であってもよい状態を包含し、良性および悪性腫瘍形成／過形成を包含しうる。本発明により治療される癌性状態のいくつかの例としては、白血病および乳癌、結腸癌、子宮癌、前立腺癌、肺癌、卵巣癌、脳腫瘍、皮膚癌、肝臓癌、大腸癌および胃癌、腫瘍および黒色種が挙げられる。良性過形成の例は、血管（例えば、血管種）、前立腺、腎臓、副腎、肝臓、結腸（例えば、結腸陰窩）、副甲状腺および他の組織を包含する。

本発明の化合物は、細胞増殖抑制ならびに細胞毒性特性を有するので、これらは、たとえば細胞増殖過多に関連する状態または症状などの癌または腫瘍細胞以外の細胞の標的集団の成長の抑制においても治療薬として潜在的な用途を有する。かかる状態は、アテローム性動脈硬化症および再発狭窄症（新脈管内膜過形成）および炎症性応答によるかまたは付随する増殖過多、例えば、関節炎（慢性関節リウマチ、骨関節炎および炎症性関節炎を包含する）、乾癬および歯周病、あるいはヒト乳頭種ウイルスなどの細胞のウイルス感染による細胞性増殖過多を包含する。

#### 【0028】

本発明の化合物、例えば、化合物AおよびBは、他の治療化合物、例えば、パクリタクセル、カンプトテシン、ビンプラスチンおよびドキソルビシンを含む抗癌化合物と組み合わせて療法において用いることができる。

従って、本発明のもう一つの態様は、癌または癌性状態を治療する方法であって、有効量の式（I）の化合物およびさらなる治療薬をそれを必要とする患者に投与することを含む方法、前記化合物の他の治療薬との組み合わせにおいて使用される医薬の製造における使用に関する。

本発明の化合物およびさらなる治療薬は、同時に、单一組成物としてまたは別個の組成物として投与してもよいし、あるいは別々に、すなわち診断する医師により決定された適当な間隔で順次投与してもよい。従って、本発明は式（I）の化合物をさらにもう一つの治療薬と合わせて含むキットも提供する。

#### 【0029】

本明細書において用いる場合、化合物の「有効量」とは、所望の投与レジメに従って投与された場合に所望の治療活性を提供する化合物の量である。投与は、数分、数時間、数日、数週間、数ヶ月または数年の間隔で、あるいはこれらの期間のいずれかにわたって連続的に行うことができる。適当な投与量は、投与量により、体重1kgあたり約0.1n

g～体重1kgあたり1gの範囲にある。投与量は、好ましくは投与量により、体重1kgあたり1μg～1g、例えば、投与により体重1kgあたり1mg～1gの範囲である。一例において、投与量は、投与につき体重1kgあたり1mg～500mgの範囲である。もう一つの例において、投与量は、投与につき体重1kgあたり1mg～250mgの範囲である。さらにもう一つの例において、投与量は投与につき体重1kgあたり1μg～100mgの範囲であり、例えば、投与につき体重1kgあたり50mgまでである。各患者についての投与レジメは、患者の年齢、体重、健康状態および医学的履歴および治療される状態の程度および進行に依存し、診断する医師が決定できる。

活性成分は一回の投与または連続投与において投与することができる。活性成分を単独で投与することもできるが、組成物、好ましくは医薬組成物とすることが好ましい。

### 【0030】

担体は、組成物の他の成分と適合性であるという意味で医薬的に許容されなければならず、また患者に対して有害であってはならない。組成物は、経口、経直腸、経鼻、局所(口内および舌下を含む)、経膣または非経口(皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含む)投与に適したものと含む。組成物は便宜的に単位投与形態にすることができる、また調剤分野において周知の方法により調製することができる。かかる方法は、活性成分を1以上の補助成分を構成する担体と会合させる段階を含む。一般に、組成物は、活性成分を液体担体または微粉碎された固体担体または両者と均一かつ密接に会合させ、その後、必要ならば成形して製品にすることにより調製される。

経口投与に適した本発明の組成物は、カプセル、サシェまたは錠剤(それぞれが所定量の活性成分を含む)などの独立単位；散剤または顆粒剤；水性または非水性液体中溶液または懸濁液；あるいは水中油液体乳液または油中水液体エマルジョンとして提供することができる。活性成分は、ボーラス、舐剤またはペーストとして提供することもできる。

### 【0031】

錠剤は、所望により1以上の補助成分とともに圧縮または成形することにより調製することができる。圧縮錠剤は、適当な機械で所望により結合剤(例えば、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤、例えば、グリコール酸デンプンナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム)、界面活性剤または分散剤と混合してもよい粉末または顆粒などの易流動形態における活性成分を圧縮することにより調製できる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化された化合物の混合物を適当な機械で成形することにより調製できる。錠剤は、所望によりコートしてもよいし、あるいはスコアをつけてもよく、例えば、様々な割合のヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いてその中に含まれる活性成分の放出を遅延化または制御して、所望の放出特性を提供するために処方することができる。錠剤は、所望により腸溶コーティングを施して、一部が胃ではなく腸で放出されるようにすることができる。

### 【0032】

口腔局所投与に適した組成物は、フレーバーを添加したベース、通常シュークロースおよびアカシアまたはトラガカントガム中活性成分を含むロゼンジ；ゼラチンおよびグリセリン、またはシュークロースおよびアラビアゴムなどの不活性基剤中活性成分を含む香錠；および適当な液体担体中活性成分を含む洗口剤を包含する。

経直腸投与に適した組成物は、例えば、カカオ脂、ゼラチン、ポリエチレングリコールなどを含む適当な基剤を用いて坐剤として提供することができる。

経膣投与に適した組成物は、活性成分に加えて、当該分野において適当であることが知られている担体を含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー処方として提供することができる。

非経口投与に適した組成物は、酸化防止剤、緩衝剤、殺菌剤および組成物を意図される受容体の血液と等張にする溶質を含む水性および非水性等張滅菌注射溶液；および懸濁化剤および増粘剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液を包含する。組成物は、単位用量または多剤滅菌容器、例えば、アンプルおよびバイアル中に提示することができ、また使用前に注射用に例えば水などの滅菌液体担体を添加するだけでよいフリーズドライ(

凍結乾燥) 条件において貯蔵することができる。即席注射溶液および懸濁液は、すでに記載された種類の滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

### 【 0 0 3 3 】

好みしい単位剤形組成物は、本明細書においてすでに記載した活性成分の1日用量または単位用量、1日準用量、またはその適当なフラクションを含むものである。

活性成分、特に前記のものに加えて、本発明の組成物は、問題となる組成物の種類に関して慣用の他の薬剤を含むことができると理解され、例えば、経口投与に適したものは結合剤、甘味料、増粘剤、矯味矯臭剤、崩壊剤、コーティング剤、保存料、滑剤および/または時間遅延剤などのさらなる薬剤を含むことができる。適当な甘味料としては、シュークロース、ラクトース、グルコース、アスパルテームまたはサッカリンが挙げられる。適当な崩壊剤としては、コーンスターク、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、キサンタンガム、ベントナイト、アルギン酸または寒天が挙げられる。適当な矯味矯臭剤としては、ペパーミント油、冬緑油、チェリー、オレンジまたはラズベリーフレーバーが挙げられる。適当なコーティング剤としては、アクリル酸および/またはメタクリル酸および/またはそのエステルのポリマーまたはコポリマー、ワックス、脂肪族アルコール、ゼイン、シェラックまたはグルテンが挙げられる。適当な保存料としては、安息香酸ナトリウム、ビタミンE、アルファ-トコフェロール、アスコルビン酸、メチルパラベン、プロピルパラベンまたは亜硫酸水素ナトリウムが挙げられる。適当な滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、オレイン酸ナトリウム、塩化ナトリウムまたはタルクが挙げられる。適当な時間遅延剤としては、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートが挙げられる。

### 【 0 0 3 4 】

本発明の1以上の態様は、癌性状態または細胞の増殖過多に関連する状態の化学療法において用いられる公知方法、組成物、薬剤または化合物よりも優れた利点を有する(またはこれらに関連する欠点を回避する)方法、組成物、薬剤または化合物も提供する。かかる利点としては: 増大した治療活性、軽減された副作用、非癌性または非増殖過多細胞に対する軽減された細胞毒性、向上した安定性あるいはより簡単で、安価でまたは高収率の合成または単離プロセスによる前記化合物を得るためのより容易に利用可能な手段が挙げられる。

当業者らは本明細書に記載された本発明は具体的に記載された以外の変更および修正が可能であることを理解するであろう。本発明は精神および範囲内のかかる変更および修正をすべて包含すると理解される。本発明はさらに、本明細書において言及されているか、または表示されたすべての工程、特性、組成物および化合物も、個別にまたは包括的に、前記工程または特性の任意の2またはそれ以上の任意またはすべての組み合わせを包含する。

本明細書における先行技術の記載は、先行技術がオーストラリアにおける一般常識を形成することを認めまたは示唆すると理解されるべきではない。

本発明を、本発明を説明する目的で包含され、前記の概論を制限すると解釈されるべきではない以下の実施例を参照して説明する。

### 【 0 0 3 5 】

(実施例)

実施例1

*Aglaia leptantha*からの化合物AおよびBの単離

化合物AおよびBを次の手順を用いて単離した:

(a) 樹木種の*Aglaia leptantha*からの粉碎された樹皮のサンプルをメタノールで処理する。

(b) 抽出物を濾過し、結果として得られた溶液を真空下で濃縮する。

(c) 抽出物をC-18 Varian抽出カラム(10g)上固相抽出(0.1%アセトニトリル/水中ギ酸を使用、アセトニトリル濃度を増大させる)により分別する。

(d) 7:20の比のアセトニトリル/水溶出液を用いて得られる溶出液を集める。化合

物AおよびBは200、273nmで最大のUV吸収を有し(アセトニトリル/水/0.1%ギ酸)、次の条件下で約30.67分(化合物A)および31.05分(化合物B)のHPLC保持時間を有する:

C-8対称カラム(WATERS)、 $4.6 \times 250\text{ mm}$ 、 $5\mu\text{m}$  1ml/分、0%から90%水中アセトニトリル直線勾配(40分)、0.1%ギ酸を使用。

(e)工程(d)で得られるフラクションを濃縮する。

(f)工程(e)で得られる濃縮物をC-18分取カラム(WATERS, Nova-Pak C-18、6ミクロン、 $2.5 \times 25\text{ cm}$ )上20ml/分の流量で、25%から45%の水中アセトニトリル(30分)の直線勾配、0.1%ギ酸を用いてクロマトグラフィーにかける。

(g)約22分で工程(d)において概要を記載したクロマトグラフィーおよび分光特性を有する溶出液を集め、濃縮する。

(h)(g)で得られる各溶出液をSephadex LH20カラム上、溶媒としてメタノールを使用してクロマトグラフにかける。(d)に概要を記載したスペクトル特性を有するフラクションを集め、濃縮する。

(i)工程(b)、(c)および(d)の代わりに、(a)で得られるメタノール抽出物を等体積の水およびジクロロメタンで分配してもよい。ジクロロメタン相を次に工程(e)～(h)に従って処理する。

#### 【0036】

このようにして得られた化合物は次の分光および物理的特性を有する;

UV/VIS吸収最大: 223、275nm(MeCN/H<sub>2</sub>O、0.1%HCOOH中)。

MS: 陽イオンモードにおいてESIソースを用いてFinnigan LCQイオントラップ質量分析計で質量スペクトルを得た。サンプルを0.1%MeOH中FA中に溶解させ、シリングポンプを用いて3μL/分の速度で注入することによりソース中に導入した。化合物Aについて、シグナルをm/z 677 [M+Na]<sup>+</sup>で観察し; MS<sup>2</sup>はm/z 659 [M+Na-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>; MS<sup>3</sup>はm/z 627 (32amuの損失); MS<sup>4</sup>はm/z 595 (さらに32amu損失)およびm/z 451 (176amuの損失、ジオキサン側鎖と等しい)であった。化合物Bについて、陽イオンモードにおいてm/z 77.2 [M+Na]<sup>+</sup>でシグナルが観察され、MS<sup>2</sup>はm/z 627.2およびm/z 659.2で娘イオンを生じた。シグナルをm/z 627.2でさらにフラグメント化すると、m/z 595.3で娘イオンが生じた。

#### 【0037】

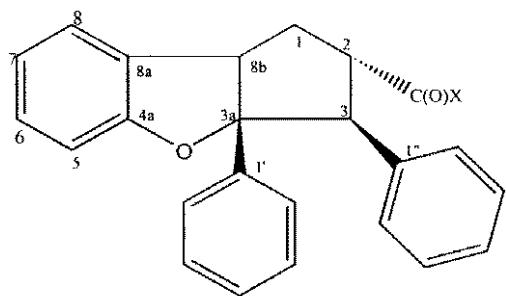
分析エレクトロスプレーソース(ESI)を備えたBruker 47eフーリエ変換-イオンサイクロトロン共鳴質量分析計(FTMS)で化合物Aの正確な質量スペクトルを得た。サンプルをMeOH中に溶解させ、シリングポンプを用いて60μL/分の速度で直接注入することによりソース中に導入した。ソースを100Vのキャピラリー電圧で操作した。m/z 677.2194 [M+Na]<sup>+</sup>測定値で1つのシグナルが観察された; C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>1</sub>Na<sup>+</sup>は677.2204を要する。

#### 【0038】

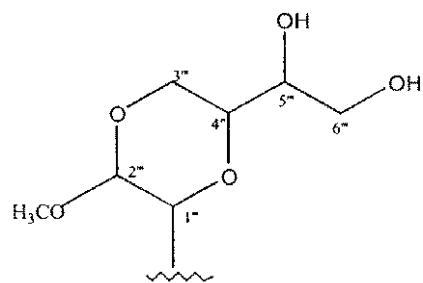
#### NMR

400および500MHz Varian INOVA NMR分光計で、それぞれCD<sub>3</sub>ODおよびCDCl<sub>3</sub>中、化合物AおよびBのNMRスペクトルを得た。次の実験を行った:<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C、DEPT、HMQC、HMBC、COSY。<sup>1</sup>H NMR化学シフト(CDCl<sub>3</sub>中で得る)および<sup>13</sup>C NMR化学シフトを表1に記載する。

#### 【化4】



(i)



(ii)

【表 1】

位置	属性	化合物A		化合物B	
		<sup>1</sup> H NMR (ppm)	<sup>13</sup> C NMR (ppm)	<sup>1</sup> H NMR (ppm)	<sup>13</sup> C NMR (ppm)
1	CH	5.03, d, 6.7 Hz, 1H	79.6	5.04, d, 6.8 Hz, 1H	79.6
2	CH	3.89, dd, 14.2, 6.7 Hz, 1H	50.03	3.9, dd, 14, 6.8 Hz, 1H	50
	COOCH <sub>3</sub>		170.6		170.7
	COOCH <sub>3</sub>	3.65, s, 3H	52.06	3.66, s, 3H	52
3	CH	4.28, d, 14.2 Hz, 1H	55.03	4.28, d, 14 Hz, 1H	55
3a	C		101.9		101.8
4a	C		160.6		160.2
5	CH	6.43, d, 2 Hz, 1H	92.8	6.45, d, 2 Hz, 1H	92.8
—	C		157.1		157.1
—	OCH <sub>3</sub>	3.87, s, 3H	55.9	3.86, s, 3H	55.8
7	CH	6.28 d, 2 Hz, 1H	93.9	6.29 d, 2 Hz, 1H	94.3
—	C		160		159.8
8a	C		109.6		109.4
8b	C		93.4		
1'	C		126.2		126.2
2', 6'	2xCH	7.10, br d, 9 Hz, 2H	128.9	7.10, br d, 9 Hz, 2H	128.9
3', 5'	2xCH	6.68, br d, 9 Hz, 2H	112.7	6.69, br d, 9 Hz, 2H	112.8
4'	C		158.8		158.8
	OCH <sub>3</sub>	3.71, s, 3H	55.05	3.72, s, 3H	55
1"	C		136.7		136.6
2", 6"	2xCH	6.84, m, 2H	127.8	6.86, m, 2H	127.5
3", 5"	2xCH	7.06, m, 2H	127.8	7.06, m, 2H	127.5
4"	CH	7.06, m, 1H	126.6	7.06, m, 1H	126.6
1'''	CH	5.28, s, 1H	94	5.26, s, 1H	93.4
2'''	CH	4.59, s, 1H	95.2	4.60, s, 1H	95.2
	OCH <sub>3</sub>	3.49, s, 3H	55.1	3.5, s, 3H	55
		4.13, t, 11.2 Hz, 1H		4.02, t, 11.2 Hz, 1H	
3'''	CH <sub>2</sub>	3.56, dd, 11.7, 2 Hz, 1H	59	3.78, dd, 11.7, 2.4 Hz, 1H	59.6
4'''	CH	4.23, br t, 11.3 Hz, 1H	68.3	4.12, ddd, 11, 6.8, 2.8 Hz, 1H	67.6
5'''	CH	3.61, m, 1H	70.6	3.66, m, 1H	71.4
6'''	CH <sub>2</sub>	3.61, m, 2H	63.3	3.61, dd, 10.4, 4.4 Hz, 1H	62.5
				3.72, m, 1H	

## 【 0 0 3 9 】

## 実施例 2

化合物 A および B はヒト腫瘍細胞系について細胞増殖抑制性および細胞毒性である。

化合物 A および B を *Algaia leptantha* の樹皮サンプルから、リポボリ多糖 (LPS) で活性化された THP - 1 ヒト前单球白血病性細胞 (Tsuchiya, ら、Int. J. Cancer, 1980, 26 (2) : 171-6) により、腫瘍壊死因子 - (TNF - ) の產生を抑制するその能力により同定した。表 2 は化合物 A および B の TNF - 產生の抑制についての活性を、THP - 1 細胞についての WST - 1 還元、DNA 合成およびタンパク質合成分析を用い

て測定した一般的細胞代謝に対するその影響と比較した結果をまとめた。化合物AおよびBは、WST-1還元、DNAおよびタンパク質合成分析において活性である様々な類似した濃度でTNF- $\alpha$ 産生を強力に抑制した。比較のために、化合物AおよびBのA549肺上皮癌細胞に対する作用(Leiberら、Int. J. Cancer, 1976, 17(1) : 62-70)も測定し、該データも表2に記載されている。化合物AおよびBはA549細胞によるインターロイキン-1(IL-1)誘発細胞内接着分子-1(ICAM-1)発現の抑制について、これらの細胞においてタンパク質およびDNA合成抑制がTHP-1細胞についてのように様々な類似の濃度で起こる場合でも著しく効力が低い。

## 【0040】

表2：THP-1およびA549細胞における化合物AおよびBの作用の比較

DMSO中に溶解させた精製化合物AおよびBをTHP-1およびA549細胞の両方において様々な分析において抑制活性について一定範囲の濃度にわたり同時に試験した。関連する応答の50%抑制に至る濃度( $IC_{50}$ )を示す。THP-1細胞によるTNF- $\alpha$ の産生を、次のマウス抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体(捕捉抗体、MAB610；検出抗体、ビオチニル化MAB210；両方ともR&D Systems, Minneapolis MN, USAから入手)を用いてサンドイッチ酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により18時間にわたり培養上清中に放出される際に測定した。A549細胞によるICAM-1の表面発現を、ヨーロピウム標識されたマウス抗ICAM-1モノクローナル抗体(R&D Systems Cat No.BBA3)を用いて直接抗体結合により培養の24時間後に分析し、Defilia分析(EG&G Wallac, Turku, Finland)を用いて時間分解蛍光により測定した。THP-1細胞によるWST-1(Roche, Cat. No.1644807)の還元を製造業者のインストラクションに従って培養した18時間後に測定した。THP-1細胞について48時間後に、10%の通常のL-ロイシン濃度(5mg/mL)を含む増殖培地(RPMI-1640、10%FBS)中で培養したA549細胞について72時間後に、 [ $^{14}C$ ]-ロイシンの吸収としてタンパク質合成を測定した。正常増殖培地中THP-1細胞については48時間後に、A549細胞については72時間後に、 [ $^{14}C$ ]-チミジン(0.5 $\mu$ Ci/mL)の吸収としてDNA合成を測定した。

## 【表2】

化合物	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)						
	THP-1細胞				A549細胞		
	TNF- $\alpha$ 産生	WST-1還元	蛋白合成	DNA合成	ICAM-1産生	蛋白合成	DNA合成
化合物A	0.06	0.03	0.06	0.015	2	0.02	0.007
化合物B	0.015	0.04	0.003	0.003	5	0.01	0.004

## 【0041】

化合物Aを、THP-1およびA549細胞に加えて様々なヒト腫瘍タイプに由来する細胞系のパネルに対する細胞毒性および細胞増殖抑制活性について評価した(表3)。これらは、K562白血病性細胞(Lozzio and Lozzio, 1975, Blood 45 : 321-34)、PC3前立腺腫瘍細胞(Kaighnら、1979, Invest. Urol. 17 : 16-23)およびSF268グリア芽細胞腫細胞(Westphalら、1985, Biochem. Biophys. Res. Commun., 132 : 284-9)を含んでいた。化合物Aは試験したほぼすべての細胞系において強力な細胞増殖抑制活性を示し、 $GI_{50}$ 値は1~7nMの範囲であった。化合物Aはさらに、様々な腫瘍細胞系に対して強力な細胞毒性効果を示した。興味深いことに、THP-1およびPC3細胞は、3または6日培養した後に得られるLC<sub>50</sub>値がほとんど差がなく最も迅速に殺されることが

判明した。しかしながら、化合物Aの細胞毒性効力はK562、A549およびSF268細胞について6日培養した後に劇的に増加した。細胞増殖を抑制するために必要とされる化合物Aの濃度は、細胞毒性応答を惹起するために必要とされるものよりも著しく低いことに注意すべきである。従って、化合物Aの細胞増殖抑制効果は、細胞死を誘発するその能力と生化学的に区別できる。表4は、化合物Bが様々な腫瘍細胞系に対して化合物Aについて観察されるものと匹敵する効力で細胞毒性効果を示すことを示す。

## 【0042】

表3：化合物Aはインビトロで様々なヒト腫瘍細胞系において強力な細胞増殖抑制および細胞毒性活性を有する。

精製された化合物Aを、表示されたさまざまヒト腫瘍タイプ由来の細胞系のパネルに対する細胞増殖抑制および細胞毒性活性について最大 $1 \times 10^{-6}$ M(1000nM)までの濃度の範囲にわたって試験した。GI<sub>50</sub>値は、3日培養した後に細胞数の増加(未処理細胞と比較して)を50%抑制する化合物の濃度を表す。相対的な細胞数は、細胞をジギトニン(Beckerら、Anal Biochem, 1994, 221(1):78-84)で溶解させた後、蛍光DNA-結合色素(YOYO-1)を用いて細胞DNAを測定することにより決定した。LC<sub>50</sub>値は細胞の50%を殺す化合物の濃度を表す。プロピジウムヨージド(Nicolett iら、J. Immunol. Methods, 1991, 139:271-79)で染色した後フローサイトメトリーにより測定されるサブジプロイドDNAを示す死滅細胞の割合として、細胞死を測定した。

## 【表3】

腫瘍源	腫瘍細胞系	化合物A		
		GI <sub>50</sub> (nM) (3日培養)	LC <sub>50</sub> (nM) (3日培養)	LC <sub>50</sub> (nM) (6日培養)
白血病	THP-1	—	36	24
	K562	1	>1000	10
肺	A549	7	914	21
前立腺	PC3	5	18	12
脳	SF268	3	461	29

## 【0043】

表4：化合物AおよびBは類似した細胞毒性活性を示す

化合物AおよびBの細胞毒性活性を表3に記載するさまざまな腫瘍細胞系について比較した。

## 【表4】

腫瘍源	腫瘍細胞系	LC <sub>50</sub> (nM) (6日培養)	
		化合物A	化合物B
白血病	THP-1	11	15
	K562	12	15
肺	A549	15	12
前立腺	PC3	12	12
脳	SF268	12	22

## 【0044】

## 実施例3

化合物Aの細胞毒性活性は新規ジオキサン二ルオキシ置換を含まない他の公知の関連した化合物により共有されない。

表5は、化合物Aの細胞増殖抑制および細胞毒性作用を新規ジオキサン二ルオキシ基を含まない3つの以前に同定された1H-シクロペント[b]ベンゾフランリグナンと比較する。参考化合物は次の通りである：ロカグラオール(参考化合物1)(Ohseら、J Nat Prod, 1996, 59(7):650-52)；4'-デメトキシ-3',4'-メチレンジオキシロ

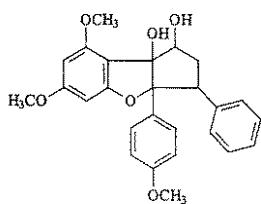
カグラオール(参考化合物2)；メチル4'-デメトキシ-3',4'-メチレンジオキシロカグレート(参考化合物3)(Leeら、Chem Biol Interact, 1998, 115(3):215-28)。すべての4種の化合物はA549細胞において検出可能な細胞毒性活性を示し、化合物Aが最も有効であり、ついで次第に低くなる順でそれぞれ参考化合物3、2および1であった。重要なことに、試験した化合物のうち、化合物A以外ではどれも3日間の分析にわたって5000nMまでの量でTHP-1またはA549細胞のいずれかにおいて感知できる細胞毒性を示さなかった。本発明を理論により制限することを意図しないが、新規ジオキサニルオキシ置換は化合物Aにより示される細胞毒性活性について重要であり、これを他の以前に同定された1H-シクロペンタ[b]ベンゾフランリグナンと区別する。

#### 【0045】

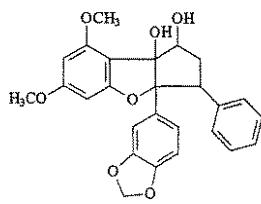
表5：新規ジオキサニルオキシ側鎖を有さない関連する1H-シクロペンタ[b]ベンゾフランリグナンは細胞毒性活性を示さない。

様々な化合物の濃度を最大 $5 \times 10^{-6}$ M(5000nM)まで増大させて、A549およびTHP-1細胞を試験し、細胞増殖および細胞生存性に対する作用を3日間培養した後に測定した。表3について記載したYOYO-1を用いて細胞数における相対的变化を測定することによりGI<sub>50</sub>値を測定した。YOYO-1吸収を用いて膜完全性の損失の関数として細胞死を測定することにより、LC<sub>50</sub>値を測定した(Beckerら、Anal Biochem, 1994, 221(1):78-84)。参考化合物の構造も示す。

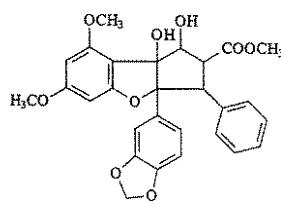
#### 【化5】



参考化合物1



参考化合物2



参考化合物3

#### 【表5】

化合物	A549 細胞		THP-1細胞 LC <sub>50</sub> (nM)
	GI <sub>50</sub> (nM)	LC <sub>50</sub> (nM)	
化合物A	13	514	15
参考化合物1	3980	>5000	>5000
参考化合物2	389	>5000	>5000
参考化合物3	56	>5000	>5000

#### 【0046】

##### 実施例4

化合物Aは急性タンパク質合成抑制活性を有する。

化合物Aをさらに、一般的タンパク質生合成を急速に抑制できるかどうかを決定するために試験した。一般的タンパク質生合成分析として[<sup>14</sup>C]ロイシンの不溶性細胞物質中への取り込みを用いて、表6は化合物AがTHP-1細胞の添加後3時間以内に明らかな抑制効果を有し、IC<sub>50</sub>が~30nMであることを示す。同じ時間にわたって測定したDNA合成も抑制されたが、効力は低く(IC<sub>50</sub>~70nm)、タンパク質合成抑制によって二次的に生じるのかもしれない。シクロヘキシミドは公知のタンパク質合成抑制物質であるが(Obrigら、1971, J. Biol. Chem. 246(1), 174-181)、これもタンパク質およびDNA合成の両方を抑制し、化合物Aはその効果においてシクロヘキシミドよりも著しく有効であった。表6は、化合物AがA549細胞における一般的タンパク質合成を抑制したことを示し、IC<sub>50</sub>は~30nMであり、これはTHP-1細胞において観

察されるものと類似している。

【0047】

表6：化合物Aは一般的タンパク質生合成を抑制する。

THP-1細胞およびA549細胞を、(1 $\mu$ Ci/mL) [ $^{14}$ C]ロイシン(タンパク質合成)または[ $^{14}$ C]チミジン(DNA合成)をさらに2時間添加する前に表示された濃度の化合物Aで1時間前処理した。IC<sub>50</sub>値は未処理対照細胞培養物と比較して放射性同位元素の取り込みを50%抑制するために必要な化合物Aの濃度を表す。

【表6】

化合物	IC <sub>50</sub> (nM)		
	THP-1細胞		A549細胞
	蛋白合成	DNA合成	蛋白合成
化合物A	27	72	32
シクロヘキシミド	263	303	238

【0048】

実施例5

化合物Aはヒト白血病性細胞系の分化を誘発する。

通常懸濁液中に結合せずに増殖するTHP-1単球白血病性細胞についての実験において、本発明者らは細胞の10nM化合物Aへの暴露を延長すると、細胞が蓄積してプラスチックに付着し、さまざまな仮足を示した(図1)。これは成熟マクロファージに非常に特徴的な形態であり、インターフェロン-(IFN)またはホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)を含む他の公知のマクロファージ分化の誘発因子で細胞を処理した場合に同様の形態的影響が観察された。これを調査するために、さらに、HL60ヒト前骨髄球白血病性細胞(Collinsら、Nature, 1977, 270: 347-9)に対する化合物Aのこの影響を調べた(表7)。この広く用いられる細胞系は、ヒト前骨髄球分化のモデルとしてよく特徴づけられている(Colling, Blooc, 1987, 70(5): 1233-44)。この実験において、フローサイトメトリー分析によりCD14表面抗原発現を測定することにより、単球分化を定量化した。LPS-結合タンパク質であるCD14は、骨髄単球の細胞の表面上に発現し、通常、未分化HL60細胞において非常に低レベルで発現される(Ferreroら、Blood, 1983, 61(1): 171-9)。前記のTHP-1データと一致して、表7は、10nMより高い用量で化合物Aが培養の4日後に残存する生存HL60細胞においてCD14発現を著しく増大させたことを示す。これらのデータを合わせると、化合物Aはヒト白血病性細胞系の分化を誘発する能力を有することが強く指摘される。

【0049】

表7：化合物AはHL60白血病性細胞の単球分化を促進する。

HL60細胞を4日間表示した濃度の化合物Aとともに培養し、その後集め、70%エタノール中に固定した。細胞を次にマウスモノクローナル抗CD14抗体(OKM1)で染色し、FITC-接合ヤギ抗マウスIgGを二次抗体として用いてこれを測定した。染色された細胞をフローサイトメトリーにより可視化し、分析をその前方および側方光散乱特性に基づいて固体の時間で可視と判断された細胞に限定した。二次抗体のみでインキュベートすることにより細胞の非特異的染色を調節した。

【表7】

化合物A濃度(nM)	CD14を発現する細胞 %
0	1.3 %
5	3.3 %
10	5.7 %
25	46.0 %
50	43.0 %

## 【 0 0 5 0 】

## 実施例 6

化合物 A の細胞毒性活性は、 A 5 4 9 細胞における細胞周期の進行の一般的抑制と関連する。

様々な濃度の化合物 A で処理された T H P - 1 細胞の D N A 含量分析（図 2）により、 1 0 n M でわずかに細胞毒性（死滅細胞の蓄積が 7 % から 1 7 % に増大）であることが示され、これらの条件下で細胞を細胞周期の G 0 / G 1 層において蓄積させた。このことは、化合物 A も T H P - 1 細胞における細胞毒性活性を有することを示す。比較のために、図 2 は、薬剤パクリタクセルを不安定にする微小管（Sorgerら、 Curr Opin Cell Biol, 1997, 9 (6) : 807-14 ）が、 T H P - 1 細胞死も誘発したが、細胞を細胞周期の G 2 / M 期において蓄積させたことを示す。

化合物 A の A 5 4 9 細胞の増殖に対する細胞増殖抑制効果は、 9 日の期間にわたって間隔を置いて細胞の数を直接係数することにより確認した（図 3）。未処理細胞と比較した場合、 1 0 n M の化合物 A は細胞数の増加を 9 5 % 以上防止し、この時点で観察された死滅細胞は 1 0 % よりも少なかった（トリパンブルー排除により測定）。従って、これらの条件下で、減少した細胞数は、増加した細胞死によって単純に説明することはできない。細胞数の顕著な抑制は、 2 日以内に見られ、このことは化合物 A が迅速に作用することを示した。 5 0 n M および 2 5 0 n M の高濃度で、化合物 A は細胞毒性効果を有し、 9 日後に細胞死をそれぞれ 8 6 % および 1 0 0 % まで増大させ、この時点でその出発数より低いレベルまで細胞数を減少させた。 1 0 n M の非細胞毒性濃度で、化合物 A は A 5 4 9 細胞に対して迅速で有効な細胞増殖抑制効果を有する。

## 【 0 0 5 1 】

化合物 A の作用の有力なメカニズムの同定を助けるために、細胞周期のどこにおいてその働きをするかを確認するために D N A 含量分析を行った（図 4）。 6 日間化合物 A で処理された A 5 4 9 細胞の細胞周期分析により、顕著な細胞毒性が明らかでない 1 0 n M で、細胞周期の G 0 / G 1 期において細胞の割合がわずかに減少し、同時に G 2 / M 期において細胞が増大することが分かった。前記図 3 の成長曲線データとあわせて、これらのデータは 1 0 n M の化合物 A が細胞周期のすべての期を全般的に延長し、おそらく G 2 / M 期の延長がわずかにより顕著であることを示す。これは、細胞周期の G 2 / M 期で選択的に作用することがしられている薬剤であるパクリタクセルの作用と対照的である（図 4）。化合物 A の濃度が増加し、その細胞毒性作用が顕著になると、 5 および G 2 / M 期の細胞割合が減少し、それに対応して、 G 0 / G 1 期における細胞が増加した。 5 0 n M と 2 5 0 n M の死滅細胞の数の間にはほとんど差がないが、さらに高い量では細胞周期の G 0 / G 1 期において細胞の蓄積が大きかった。従って、 T H P - 1 細胞（図 2）と比較して、 A 5 4 9 細胞における細胞周期の G 0 / G 1 期全体にわたって進行を抑制するために高濃度の化合物 A が必要とされる。

1 0 ~ 1 5 n M の化合物 A または B で処理した K 5 6 2 白血病細胞は、細胞周期の G 2 / M 期において特徴的な細胞蓄積を示した（図 5）。 5 ~ 8 n M 未満または 2 5 n M 以上の化合物 A または B は G 2 / M 期蓄積を引き起こさなかつたので、これは狭い濃度範囲で起つた。これらのデータは、種々の細胞系が細胞周期の期特異的効果について、化合物 A および B に対する感受性および応答において異なることがあることを示す。

## 【 0 0 5 2 】

**実施例 7**

化合物 A の細胞増殖抑制作用は A 5 4 9 細胞において可逆的である。

化合物 A の作用の可逆性を確認した。このために、A 5 4 9 細胞は未処理のままにするか、あるいは様々な濃度の化合物 A またはパクリタクセルの存在下で 5 日間培養した後、該化合物を除去し、細胞をさらに 4 日間培養した後、細胞数を測定した(図 6)。10 nM の化合物 A は著しい細胞毒性なしに 9 日まで細胞数の増加を有意に抑制した。しかしながら、これらの培養のために、化合物 A が 5 日後に除去された場合、その後の 4 日の培養にわたって細胞数が 5 倍を越えて増大し、2 ~ 3 の集団が倍加することを示した。細胞に對して致命的な処理、例えば高濃度の化合物 A またはパクリタクセルの存在の作用は、これらを除去することにより逆転しなかった。

**【 0 0 5 3 】****実施例 8**

化合物 A は様々な抗癌剤により惹起される細胞周期依存性細胞毒性を抑制する。

化合物の細胞周期作用をさらに調べるために、細胞増殖抑制濃度のこの化合物を細胞周期の特定の地点で作用することがしらされている他の抗癌剤と組み合わせて、化合物 A がその細胞周期依存性作用を乱すかどうかを調べた。蛍光 DNA - 結合色素 YOYO-1 の排除を測定することにより細胞生存性を 3 日後に分析した(Beckerら、Anal Biochem, 1994, 221(1) : 78-84)。A 5 4 9 細胞を、カンプトテシンおよびパクリタクセルの存在下でその濃度を増大させながら、10 nM の非細胞毒性量の化合物 A で処理した。カンプトテシンは、DNA 複製に必要とされる酵素である DNA トポイソメラーゼ 1 の抑制物質であり、細胞周期の S 期を乱し、S 期チェックポイントの活性化のためにその後細胞を死滅させる(Darzynkiewiczら、Ann NY Acad Sci, 1996, 803 : 93-100)。パクリタクセルは、すでに記載したように、有糸分裂紡錘体の形成に必要とされる微小管機能を抑制し、これにより M 期チェックポイントを活性化させ、その後細胞を死滅させる(Sorgerら、Curr Opin Cell Biol, 1997 9 (6) : 807-14)。図 7 は、10 nM 化合物 A がカンプトテシンおよびパクリタクセル両方の細胞毒性作用を、これらの薬剤が 2000 倍過剰に添加された場合でも著しく減少させたことを示す。化合物 A は、優先的にカンプトテシンおよびパクリタクセルの細胞周期依存性細胞毒性効果を防止する。

**【 0 0 5 4 】**

これを、DNA 含量分析を用いてより詳細に調査して、細胞周期進行および細胞死を明確に測定した。この実験において、カンプトテシンおよびパクリタクセルの他に、細胞をビンプラスチン(もう一つの微小管抑制物質)(Sorgerら、1997、前出)およびスタウロスボリン(キナーゼ抑制物質)でも処理した(Gescher, Crit Rev Oncol Hematol., 2000, 34 (2) : 127-35)。すでに判明しているように、10 nM の化合物 A で処理された A 5 4 9 細胞は G0 / G1 において細胞がわずかに減少し、G2 / M 期細胞がわずかに増加し、3 日にわたる培養で細胞死の増加は検出できなかった(図 8)。公知の作用メカニズムと一致して、カンプトテシンは細胞周期の S 期において細胞蓄積をもたらし、サブジプロイド DNA 含量を有するものとして検出される死滅細胞のレベルも増大させた。予想されるように、ビンプラスチンおよびパクリタクセルは両方とも細胞周期の G2 / M 期において細胞の大部分の停止をもたらし、サブジプロイド死滅細胞の出現を増大させた。しかしながら、これらの薬剤のすべてについて、10 nM の化合物 A の存在がその特徴的な細胞周期阻止を防止し、著しくその細胞毒性効果を抑制し、その結果、サブジプロイド死滅細胞の出現を劇的に減少させた。対照的に、化合物 A は、細胞周期のあらゆる活性期で細胞を殺すことができるらしい薬剤であるスタウロスボリンの細胞毒性効果に対してほとんど影響を及ぼさなかつた。

**【 0 0 5 5 】****実施例 9**

化合物 A の細胞増殖抑制効果は複製老化のバイオマーカーと相關しない。

10 nM の化合物 A の存在下で培養した A 5 4 9 細胞の成長速度が劇的に減少するので(図 3)、この化合物がこれらの不死腫瘍細胞の複製老化を誘発している可能性を考察す

ことになった。これらの条件下でのこの可能性と一致して、老化表現型を大いに連想させる形態を有する A 5 4 9 細胞がしばしば観察され、その通常の外観と比較して、非常に扁平になっており、表面積が大きくなっている（例えば図 9 サブパネル a および b を比較）。さらに、ヒト細胞の老化とよく相關することがすでに記載されているバイオマーカーである老化 - 関連 - ガラクトシダーゼ ( S A - - g a l ) 活性を測定することにより、これを評価した (Dimriら、Proc. Natl Acad Sci USA 1995 92 (20) : 9363-7)。最近、ドキソルビシン、シスプラチニン、シタラビン、エトポシドおよびパクリタクセルを含む様々なメカニズムにより作用するいくつかの抗癌剤はすべて様々な腫瘍細胞系において S A - - g a l 活性を誘発することができることが分かった (Chang et al., Cancer Res 1999, 59 (15) : 3761-7)。従って、化合物 A の他に、A 5 4 9 細胞を実験対照としてドキソルビシンでも処理した。この薬剤は、DNA / トポイソメラーゼ I I 複合体を安定化し、これにより DNA 損傷を引き起こすことにより作用し、その後 S 期細胞周期停止および / または細胞死に至る (Froeligh-Ammon and Osheroff, 1995, J. Biol. Chem. 270 (37) : 21429-21432)。図 9 は、先の報告と一致して、250 nM のドキソルビシンで処理された A 5 4 9 細胞が扁平化して大きくなった老化細胞の表現型を示し、S A - - g a l 活性を示したことを見た。対照的に、10 ~ 50 nM のさまざまな用量の化合物 A は、細胞が扁平化した大きな形態を示す場合でも S A - - g a l 活性を誘発できなかった。従って、様々な他の抗癌剤と対照的に、化合物 A の細胞増殖抑制作用は細胞老化のこの特定のマーカーと関連しない。

## 【 0 0 5 6 】

## 実施例 1 0

化合物 A は細胞増殖を抑制するが、細胞の大きさの増大を抑制しない。

個々の細胞の大きさの増大を反映した細胞増殖および細胞成長は生化学的に別個のプロセスであることはよくしられている (Pardee, Science, 1989, 246 : 602-8)。ある濃度で化合物 A は明らかな細胞毒性なしに細胞増殖を抑制できるが、化合物 A が細胞成長にも影響を及ぼすかどうかを評価した。これらの実験のために A 5 4 9 細胞を 10 nMまでの様々な非細胞毒性量の化合物 A で処理し、相対的な細胞の大きさを、6 日培養した後、フローサイトメーターを用いて前方光散乱を測定することによって決定した。表 8 に示したデータは、化合物 A の存在下で、A 5 4 9 細胞が 20 % を越える平均前方散乱の増加を示したことを示す。これは、該細胞型に対する細胞増殖抑制濃度での場合にだけ起こった。

表 8 : 示される様々な非細胞毒性濃度の化合物 A と共に 6 日間培養した A 5 4 9 細胞を、フローサイトメトリーによって、細胞の大きさに直接関連する前方光散乱特性について調べた。平均細胞体積の増加 (%) は、未処理細胞集団に対する処理細胞集団の平均前方散乱値の相対的变化を表す。

## 【 表 8 】

化合物 A 濃度(nM)	平均細胞体積の増加%
0	-
2.5	10.4 %
5.0	10.7 %
10.0	22.4 %

## 【 0 0 5 7 】

## 実施例 1 1

化合物 A は、マウス異種移植腫瘍モデルにおいてヒト腫瘍細胞系の成長を抑制する。

化合物 A のインビボでヒト腫瘍細胞の成長を抑制する能力を、 $2 \times 10^6$  P C 3 ヒト前立腺腫瘍細胞を背側腹部領域に皮下注射したオス無胸腺マウスを用いて評価した。一旦 P C 3 腫瘍が触知できるようになった 8 日後に化合物 A を腹膜内注射により投与すること（

3 mg / kg) を開始し、腫瘍細胞の初回接種の 29 日後まで 1 週間に 3 回続けた。この時点ですべてのマウスを屠殺し、腫瘍を摘出し、秤量した。図 10 A はビヒクル単独で処理された対照動物と比較して、化合物 A で処理されたマウスでは実験の過程全体にわたって平均腫瘍体積の増加が大きく減少したこと<sup>を示す</sup>。これは、実験の最後で腫瘍を摘出し、秤量した際に確認され、化合物 A 処理は、平均腫瘍重量を ~ 60 % 減少させたことが判明した(図 10 B)。体重は対照および処理群のいずれについても影響を受けず、実験期間にわたって平均体重における同様の ~ 12 % の減少を示した。従って化合物 A はインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図 1】 化合物 A の THP - 1 白血病性細胞の分化促進能を示す。

【図 2】 細胞周期進行および THP - 1 細胞の生存力に対する化合物 A の作用を示す。

【図 3】 A549 細胞の増殖に対する化合物 A の作用を示す。

【図 4】 細胞周期進行および A549 細胞の生存力に対する化合物 A の作用を示す。

【図 5】 化合物 A および B の、 K562 白血病性細胞の G2 / M 期蓄積誘発能を示す。

【図 6】 A549 細胞に対する化合物の可逆的な細胞増殖抑制作用を示す。

【図 7】 化合物 A の、 A549 細胞のカンプトテシン - およびパクリタクセル - 誘発性細胞毒性の抑制能を示す。

【図 8】 化合物 A およびスタウロスポリンによる、抗癌剤により誘発される細胞周期停止および細胞死の抑制能を示す。

【図 9】 化合物 A の、 A549 細胞における老化 - 関連 - ガラクトシダーゼ活性の誘発能を示す。

【図 10】 化合物 A の、マウス異種移植片モデルにおけるヒト腫瘍の増殖抑制能を示す。