

(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2006-511534

(P2006-511534A)

(43) 公表日 平成18年4月6日(2006.4.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 401/14 (2006.01)	C07D 401/14	4C063
C07D 403/06 (2006.01)	C07D 403/06	4C086
C07D 405/14 (2006.01)	C07D 405/14	
C07D 409/14 (2006.01)	C07D 409/14	
C07D 403/14 (2006.01)	C07D 403/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 136 頁) 最終頁に続く

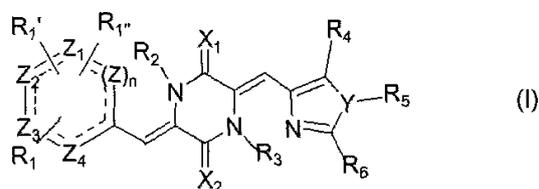
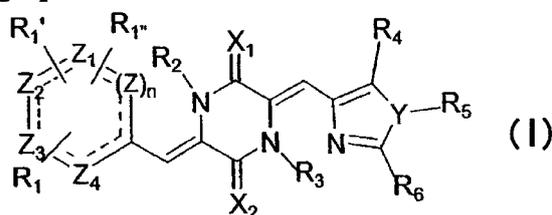
(21) 出願番号	特願2004-560278 (P2004-560278)	(71) 出願人	505041656
(86) (22) 出願日	平成15年8月1日 (2003.8.1)		ネレアス ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月1日 (2005.4.1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121 サン ディエゴ ウォータリッジ サークル 10480
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/024232	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開番号	W02004/054498		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開日	平成16年7月1日 (2004.7.1)	(74) 代理人	100090516
(31) 優先権主張番号	60/401,074		弁理士 松倉 秀実
(32) 優先日	平成14年8月2日 (2002.8.2)	(74) 代理人	100098268
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 永田 豊
(31) 優先権主張番号	60/411,128	(74) 代理人	100089244
(32) 優先日	平成14年9月16日 (2002.9.16)		弁理士 遠山 勉
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/450,063		
(32) 優先日	平成15年2月24日 (2003.2.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デヒドロフェニラヒスチンおよびそれらの類似体、ならびにデヒドロフェニラヒスチンおよびそれらの類似体の合成

(57) 【要約】

【化1】



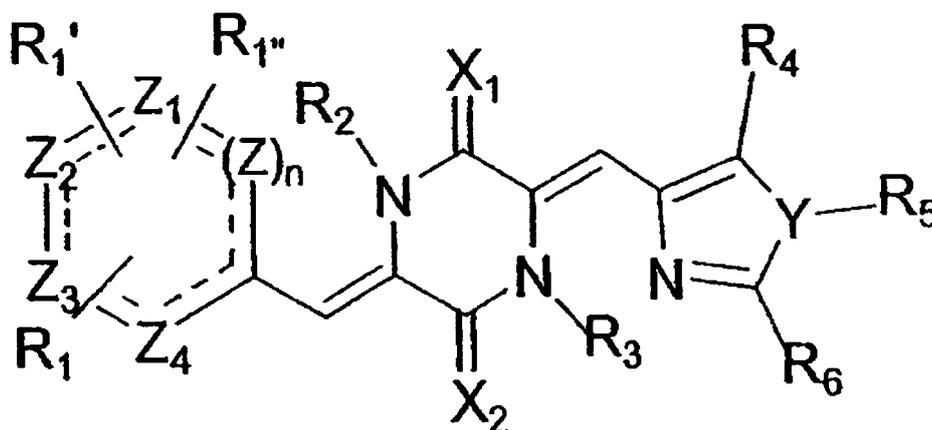
構造 (I) で表される化合物、ならびにかかる化合物を製造する方法を開示する。ここで、上記方法は、ジアシルジケトピペラジンを第1のアルデヒドと反応させて、中間体化合物を生じさせること、上記中間体を第2のアルデヒドと反応させて、上記一般構造を有する化合物種を生じさせることとを含み、上記第1のアルデヒドおよび上記第2のアルデヒドは、オキサゾールカルボキサリド、イミダゾールカルボキサリド、ベンズアルデヒド、イミダゾールカルボキサリド誘導体、およびベンズアルデヒド誘導体からなる群から選択され、それにより上記化合物 (式中、 R_1 、 R_1' 、 R_1'' 、 R_2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I) :

【化 1】



10

(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

20

30

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

40

R_1 、 R_1' および R_1'' は、互いに共有結合されるか、または互いに共有結合されず、 R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Y は、窒素原子、 R_5 で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メ

50

チレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

n は、0、1または2に等しい整数であり、

それぞれ別個の n (0でない場合) に関する Z 、ならびに Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得る)

の構造を有する化合物の合成的製造方法であって、以下の：

ジアシルジケトピペラジンを第1のアルデヒドと反応させて、中間体を生じさせること

、
前記中間体を第2のアルデヒドと反応させて、前記化合物を生じさせること
とを含み、前記第1のアルデヒドおよび前記第2のアルデヒドは、オキサゾールカルボキ
サルデヒド、イミダゾールカルボキサルデヒド、ベンズアルデヒド、イミダゾールカルボ
キサルデヒド誘導体、およびベンズアルデヒド誘導体からなる群から選択され、それによ
り前記化合物を製造する方法。 10

【請求項2】

前記第1のアルデヒドは、イミダゾールカルボキサルデヒドである、請求項1に記載の
方法。

【請求項3】

前記第2のアルデヒドは、ベンズアルデヒドである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

R_2 、 R_3 、 R_5 および R_6 はそれぞれ、水素原子である、請求項1に記載の方法。 20

【請求項5】

X_1 および X_2 はそれぞれ、酸素原子である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

R_4 は、飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルは、第三ブチル基である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

R_1 は、置換フェニルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記置換フェニル基は、メトキシベンゼンである、請求項8に記載の方法。 30

【請求項10】

前記第1のアルデヒドは、ベンズアルデヒドである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記第2のアルデヒドは、イミダゾールカルボキサルデヒドである、請求項1に記載の
方法。

【請求項12】

n は、0または1に等しい、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

n は、1に等しい、請求項1に記載の方法。

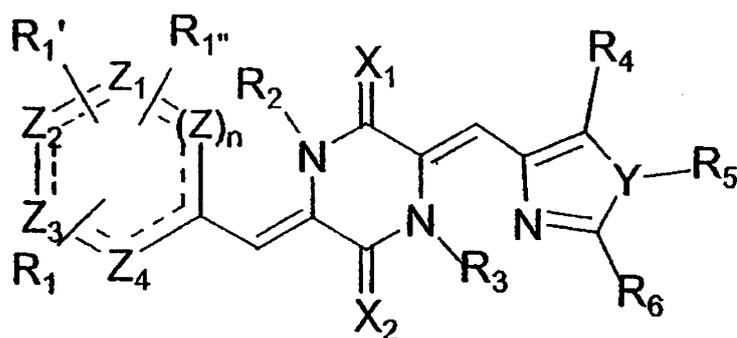
【請求項14】

n は、1に等しく、 Z 、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 はそれぞれ、炭素原子である、請求項
1に記載の方法。 40

【請求項15】

下記式 (I) :

【化2】



(II)

(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

20

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

30

R_1 、 R_1' および R_1'' は、互いに共有結合されるか、または互いに共有結合されず、

40

R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Yは、窒素原子、 R_5 で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

nは、0、1または2に等しい整数であり、

50

それぞれ別個の n (0でない場合) に関する Z 、ならびに Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得るが、

但し、特定の化合物では、 R_1 、 R_1' 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 がそれぞれ水素原子である場合、 X_1 および X_2 はそれぞれ酸素原子であり、かつ R_6 は 3, 3 - ジメチルブチル - 1 - エンまたは水素原子のいずれかであることは当てはまらない)

の構造を有する化合物。

【請求項 16】

R_2 、 R_3 、 R_5 および R_6 はそれぞれ、水素原子である、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 17】

X_1 および X_2 はそれぞれ、酸素原子である、請求項 15 に記載の化合物。

10

【請求項 18】

R_4 は、飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 19】

前記飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルは、第三ブチル基である、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 20】

R_1 は、置換フェニル基である、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 21】

前記置換フェニル基は、メトキシベンゼンである、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 22】

n は、0 または 1 に等しい、請求項 15 に記載の化合物。

20

【請求項 23】

n は、1 に等しい、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 24】

n は、1 に等しく、 Z 、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 はそれぞれ、炭素原子である、請求項 15 に記載の化合物。

【請求項 25】

前記化合物は、KPU - 2、KPU - 11、KPU - 35、KPU - 66、KPU - 80、KPU - 81、KPU - 90、および *t* - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 15 に記載の化合物。

30

【請求項 26】

請求項 15 に記載の化合物、および薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物。

【請求項 27】

前記化合物は、KPU - 11、KPU - 80、KPU - 81、および KPU - 90 からなる群から選択される、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

前記化合物は、細胞障害活性を有する、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 29】

前記化合物は、細胞周期阻害剤である、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 30】

哺乳類における疾患状態の治療方法であって、前記哺乳類に、薬学的に有効な量で請求項 26 に記載の組成物を投与することを含む方法。

40

【請求項 31】

前記疾患状態は、腫瘍性である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記疾患状態は、真菌感染である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

真菌感染を治療または防止するための薬学的組成物であって、抗真菌に有効な量で請求項 15 に記載の化合物を、該化合物に関する薬学的に許容可能な担体と一緒に含む薬学的組成物。

50

【請求項 34】

前記化合物は、K P U - 2、K P U - 11、K P U - 35、K P U - 66、K P U - 80、K P U - 81、K P U - 90、および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

少なくとも 1 つの真菌感染に罹患した哺乳類において少なくとも 1 つの真菌感染を治療および / または防止する方法であって、該治療または防止に十分な抗真菌的に有効な量で請求項 15 に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 36】

前記化合物は、K P U - 2、K P U - 11、K P U - 35、K P U - 66、K P U - 80、K P U - 81、K P U - 90、および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 37】

腫瘍を治療または防止するための薬学的組成物であって、薬学的に有効な量の請求項 15 に記載の化合物を、該化合物に関する薬学的に許容可能な担体と一緒に含む薬学的組成物。

【請求項 38】

前記化合物は、K P U - 2、K P U - 11、K P U - 35、K P U - 66、K P U - 80、K P U - 81、K P U - 90、および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 37 に記載の方法。

20

【請求項 39】

癌に罹患した哺乳類において癌を治療および / または防止する方法であって、該治療または防止に十分な抗腫瘍量の請求項 15 に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 40】

前記化合物は、K P U - 2、K P U - 11、K P U - 35、K P U - 66、K P U - 80、K P U - 81、K P U - 90、および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、化学および医学の分野における化合物および合成的製造方法に関する。より具体的には、本発明は、癌の治療および真菌感染の治療において有用な化合物および化合物を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

単一の普遍的細胞メカニズムが真核生物の細胞周期プロセスの調節を制御すると考えられている。例えば、ハートウェル, L. H. 等 (Hartwell, L.H. et al.), サイエンス (Science) (1989), 246:629-43を参照されたい。細胞周期の制御メカニズムで異常が生じると、癌または免疫障害が起こり得ることも既知である。したがって、同様に既知であるように、抗腫瘍剤および免疫抑制剤は、細胞周期を調節する物質の中の 1 つであり得る。したがって、真核生物の細胞周期抑制剤を製造する新規方法は、抗腫瘍化合物および免疫増強化合物として必要とされ、また化学療法剤、抗腫瘍剤としてヒトの癌治療において有用であるべきである。例えば、ロバージ, M. 等 (Roberge, M. et al.), Cancer Res. (1994), 54, 6115-21を参照されたい。

40

【0003】

真菌類、特に病原性の真菌類およびその関連感染は、より一層の臨床的課題を示す。現存する抗真菌剤に関して、有効性および毒性と、現在入手可能であるか、または開発中の薬物に耐性である病原性の真菌の株の開発および / または発見は限られている。例えば、ヒトに対して病原性である真菌類としては、特に、C. アルビカンス (C. albicans)、C. トロピカリス (C. tropicalis)、C. ケフィア (C. Kefyr)、C. クルセイ (C. Krusei) お

50

よび *C. glabrata* (C. glabrata) を含むカンジダ (*Candida*) 種、*A. fumigatus* および *A. Flavus* を含むアスペルギルス (*Aspergillus*) 種、クリプトコックス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ブラストミセス・デルマティティディス (*Blastomyces dermatitidis*) を含むブラストミセス (*Blastomyces*) 種、ニューモシスティス・カリーニー (*Pneumocystis carinii*)、コクシジオイデス・イムミティス (*Coccidioides immitis*)、バシディオボールス・ラナルム (*Basidiobolus ranarum*)、コニジオボールス (*Conidiobolus*) 種、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、*R. oryzae* (*R. oryzae*) および *R. microsporus* (*R. microsporus*) を含むリゾプス (*Rhizopus*) 種、クニングハメラ (*Cunninghamella*) 種、リゾムコア (*Rhizomucor*) 種、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレシエリア・ボイジイ (*Pseudallescheria boydii*)、リノスポリジウム・シーベリ (*Rhinosporidium seeberi*)、およびスポロトリクス・シェンクキイ (*Sporothrix schenckii*) が挙げられる (クオン・チュン, K. J. とベネット, J. E. (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E.) 1992 医学真菌学 (Medical Mycology), リーとフィバイガー (Lea and Feibiger), マルバーン, ペンシルバニア) (Malvern, PA).

10

【0004】

近年、トリプロスタチン A および B (これらは、プロリンおよびイソプレニル化トリプトファン残基から構成されるジケトピペラジンである)、ならびに 5 つの他の構造的に関連したジケトピペラジンが、M 期にて細胞周期の進行を阻害し (キュイ, C. 等 (Cui, C. et al.), 1996 J Antibiotics 49:527-33、キュイ, C. 等 (Cui, C. et al.) 1996 J Antibiotics 49:534-40 を参照)、これらの化合物はまた、微小管構築にも影響を及ぼす (ウスイ, T. 等 (Usui, T. et al.) 1998 Biochem J 333:543-48、コンドン, M. (Kondon, M. et al.) 1998 J Antibiotics 51: 801-04 を参照) ことが報告されている。さらにチューブリン (これは、2 つの 50 kDa のサブユニット (および チューブリン) から構成される高分子であり、微小管の主要構成成分である) のコルヒチン結合部位 (CLC 部位) に結合することにより、有糸分裂を阻害し、したがって真核生物細胞周期を阻害する天然化合物および合成化合物が報告されている。例えば、イワサキ, S. (Iwasaki, S.), 1993 Med Res Rev 13:183-198、ハメル, E. (Hamel, E.) 1996 Med Res Rev 16:207-31、ヴァイゼンベルグ, R. C. 等 (Weisenberg, R.C. et al.), 1969 生化学 (Biochemistry) 7:4466-79 を参照されたい。微小管は、軸索輸送、細胞運動および細胞形態の決定のような幾つかの必須の細胞機能に関与すると考えられている。したがって、微小管機能の阻害剤は、広範囲の生物活性を有し得るものであり、医療目的および農芸化学的目的に適用可能である。また、CLC、ステガナシン (クプチェン, S. M. 等 (Kupchen, S.M. et al.), 1973 J Am Chem Soc 95: 1335-36 を参照)、ポドフィロトキシシン (サケット, D. L. (Sackett, D.L.), 1993 Pharmacol Ther 59: 163-228 を参照)、およびコンプレタスタチン (ペティット, G. R. 等 (Pettit, G.R. et al.), 1995 J Med Chem 38 166-67) のようなコルヒチン (CLC) 部位リガンドは、真核生物の細胞周期阻害剤として有用であることを証明することができ、したがって化学療法剤として有用であり得る可能性がある。

20

30

【0005】

ジケトピペラジン型代謝産物は、マイコトキシシンとして (ホラーク, R. M. 等 (Hork R.M. et al.), 1981 JCS Chem Comm 1265-67、アリ, M. 等 (Ali M. et al.), 1898 毒性学レター (Toxicology Letters) 48:235-41 を参照)、あるいは二次代謝産物 (スmezガード, J. 等 (Smedsgaard J et al.), 1996 J Microbiol Meth 25:5-17 を参照) として様々な真菌類から単離されたが、ジケトピペラジン型代謝産物またはそれらの誘導体の特定の構造、ならびに特に、それらの *in vivo* での抗腫瘍活性についてはほとんど知られていない。これらの化合物は、マイコトキシシンとして単離されているだけでなく、ジケトピペラジン型代謝産物の 1 つのタイプであるフェニラヒスチンの化学合成が、J. Org. Chem. (2000) 65, 8402 頁においてハヤシ (Hayashi) 等により記載されている。当該技術分野では、係るジケトピペラジン型代謝産物誘導体の 1 つであるデヒドロフ

40

50

フェニラヒスチンは、その親フェニラヒスチンの酵素作用による脱水素により製造されている。癌の発生の増大に伴い、動物細胞特異的増殖阻害活性 (animal cell-specific proliferation-inhibiting activity) ならびに高い抗腫瘍活性および選択性を有する実質的に精製されたジケトピペラジン型代謝産物誘導体種を化学的に生じさせることが特に必要とされている。したがって、実質的に精製され、かつ構造的および生物学的に特性化されたジケトピペラジン型代謝産物誘導体を合成的に製造する効率的な方法が特に必要とされている。

【0006】

同様に、PCT公報WO/0153290号(2001年7月26日)は、フェニラヒスチンまたは特定のフェニラヒスチン類似体を、ストレプトミセス・アルブルス (*Streptomyces albulus*) から得られる脱水素酵素に曝すことにより、デヒドロフェニラヒスチンを製造する非合成的方法について記載している。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

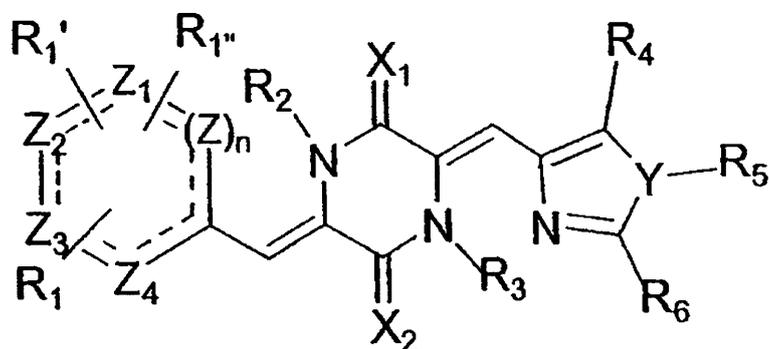
【0007】

下記式(I)の構造を有する化合物種に関して、化合物および化合物の合成的製造方法が開示される。

【0008】

【化1】

20



(I)

30

【0009】

開示する化合物は、式(I)

(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

40

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロア

50

リール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル（ポリハロゲン化アルキルを含む）、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ （ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される）からなる群から選択され、

R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Yは、窒素原子、上述の R_5 基で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

nは、0、1または2に等しい整数であり、

それぞれ別個のn（0でない場合）に関するZ、ならびに Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得るが、

但し、特定の化合物では、 R_1 、 R_1' 、 R_2 、 R_3 、 R_4 および R_5 がそれぞれ水素原子である場合、 X_1 および X_2 はそれぞれ酸素原子であり、かつ R_6 は3，3-ジメチルブチル-1-エンまたは水素原子のいずれかであることは当てはまらない）

の構造を有する。

【0010】

本方法は、

ジアシルジケトピペラジンを第1のアルデヒドと反応させて、中間体化合物を生じさせる工程と、

上記中間体化合物を第2のアルデヒドと反応させて、上記の一般構造を有する上記の化合物を生じさせる工程と

を含み、

上記第1のアルデヒドおよび上記第2のアルデヒドは、オキサゾールカルボキサリド、イミダゾールカルボキサリド、ベンズアルデヒド、イミダゾールカルボキサリド誘導体、およびベンズアルデヒド誘導体からなる群から選択され、それにより化合物を製造する。

【0011】

開示される化合物は、式(I)の構造を有し、式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル（ポリハロゲン化アルキルを含む）、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ （ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される）からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C_1

10

20

30

40

50

~ C₂₄アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、-CO-O-R₇、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル（ポリハロゲン化アルキルを含む）、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル-COO-R₇（ここで、R₇は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₂₄アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される）からなる群から選択され、

10

R₂、R₃およびR₅は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₁₂アルキル、不飽和 C₁ ~ C₁₂アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X₁およびX₂は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するようなR₅基で置換され、

Yは、窒素原子、上述のR₅基で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

nは、0、1または2に等しい整数であり、

20

それぞれ別個のn（0でない場合）に関するZ、ならびにZ₁、Z₂、Z₃およびZ₄は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得る。

【0012】

本発明の化合物および方法の好ましい実施形態では、イミダゾールカルボキサリドは、5-(1,1-ジメチル-2-エチル)イミダゾール-4-カルボキサリドであり、ベンズアルデヒドは、単一のメトキシ基を含む。本明細書中に記載する化合物のさらなる好ましい実施形態は、t-ブチル基、ジメトキシ基、クロロ基およびメチルチオフェン基を有する化合物、およびかかる化合物を製造する方法、ならびに表2、表3および表4に記載する化合物、およびかかる化合物を製造する方法を包含する。

30

【0013】

同様に、腫瘍性組織を治療するか、あるいは癌または病原性の真菌による感染を防止するための方法および物質を開示する。これらの方法および物質は、哺乳類の被験体、より具体的にはヒトの治療に特によく適しており、被験体にデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与することを包含する。本方法は、被験体に、抗腫瘍または抗真菌に関して有効な量のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与することを包含する。

【0014】

<好ましい実施形態の詳細な説明>

本明細書中で引用する米国特許を含む、本明細書中で引用する参照文献はそれぞれ、法に則って差し支えない最大限度にまで、本明細書中にその全体が参照により援用するとみなされる。

40

【0015】

本開示は、デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチン類似体を含む新規化合物を含む化合物の合成的製造方法を提供し、また比較的高収率で、薬学的に許容可能な細胞周期阻害剤、抗腫瘍剤および抗真菌剤を製造する方法を提供し、ここで前記化合物および/またはそれらの誘導体は、これらの細胞周期阻害剤、抗腫瘍剤および抗真菌剤中の有効成分の中の1つである。他の目的として、現在利用可能な非合成的方法により得ることができない新規化合物を提供することを包含する。同様に、腫瘍成長の阻害に有効な量の新規抗腫瘍化合物類のメンバーを投与する工程を含む、癌、特にヒトの癌を治療する方法を提供することが目的である。本発明はまた、被験体における病原性の真菌を防止また

50

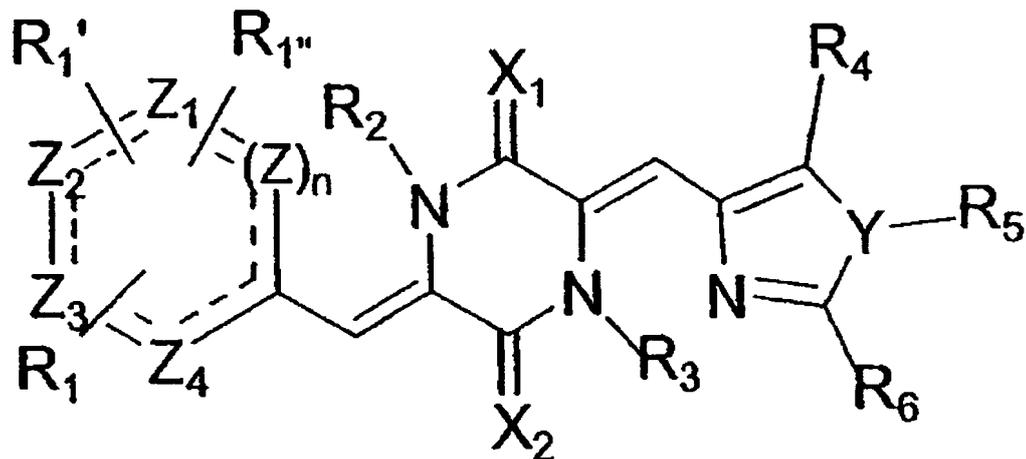
は治療する方法であって、上記被験体に、抗真菌に有効な量の新規抗新規化合物類のメジャーを投与すること、例えば、対象となる抗真菌効果を提供する量および様式で、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与することを含む。本明細書中に開示する化合物ならびにかかる化合物を製造する方法および使用する方法、の好ましい実施形態では、必ずしも本発明の実施形態のすべてではないが、これらの目的は達成している。

【0016】

本明細書中には、化合物、および化合物種を製造する方法が開示され、当該化合物は、下記式(I)：

【0017】

【化2】



(I)

【0018】

式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ポリハロゲン化アルキルを含むハロゲン化アルキル、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル- $CCO-R_7$ であって、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択されるカルボニル- $CCO-R_7$ からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ポリハロゲン化アルキルを含むハロゲン化アルキル、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル- $CCO-R_7$ であって、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シ

10

20

30

40

50

クロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択されるカルボニル - CCO - R₇ からなる群から選択され、

R₁、R₁' および R₁" は、互いに共有結合されるか、または互いに共有結合されず、R₂、R₃ および R₅ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₁₂ アルキル、不飽和 C₁ ~ C₁₂ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X₁ および X₂ は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に記載したような R₅ 基で置換され、

Y は、窒素原子、上記の R₅ 基で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

n は、0、1 または 2 に等しい整数であり、

それぞれ別個の n (0 でない場合) に関する Z、ならびに Z₁、Z₂、Z₃ および Z₄ は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであって良い。

【0019】

本方法は、

ジアシルジケトピペラジンを第 1 のアルデヒドと反応させて、中間体化合物を生じさせる工程と、

上記中間体化合物を第 2 のアルデヒドと反応させて、上記一般構造を有する上記化合物を生じさせる工程とにより式 (I) の化合物を生じさせる方法を含み、

上記第 1 のアルデヒドおよび上記第 2 のアルデヒドは、オキサゾールカルボキサリド、イミダゾールカルボキサリド、ベンズアルデヒド、イミダゾールカルボキサリド誘導体、およびベンズアルデヒド誘導体からなる群から選択され、それにより式 (I) (式中、

R₁、R₄ および R₆ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₂₄ アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、-CO-O-R₇、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル - CCO - R₇ (ここで、R₇ は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₂₄ アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

R₁' および R₁" は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₂₄ アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、-CO-O-R₇、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル - CCO - R₇ (ここで、R₇ は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁ ~ C₂₄ アルキル、不飽和 C₁ ~ C₂₄ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、置換ヘテロアリアル、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

R₂、R₃ および R₅ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 C₁

~ C₁₂アルキル、不飽和 C₁~C₁₂アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X₁およびX₂は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、

Yは、窒素原子、上述のR₅基で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

それぞれ別個のn(0でない場合)に関するZ、ならびにZ₁、Z₂、Z₃およびZ₄は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得る)
を有する化合物を製造する。

【0020】

また、式(I)および式(II)で表される化合物の薬学的に許容可能な塩およびプロドラッグエステルを提供し、本明細書中に開示する方法によりかかる化合物を合成する方法を提供する。

【0021】

「プロドラッグエステル」という用語は、特に本明細書中に開示する方法により合成される式(I)の化合物のプロドラッグエステルを指す場合、例えば血中でのまたは組織の内部での加水分解により、*in vivo*で迅速に転換されて、本発明の化合物を生じる化合物の化学的誘導体を指す。「プロドラッグエステル」という用語は、生理学的条件下で加水分解される幾つかのエステル形成基のいずれかが付加することにより形成される本明細書中に開示する化合物の誘導体を指す。プロドラッグエステル基の例としては、ピバロイルオキシメチル、アセトキシメチル、フタリジル、インダニルおよびメトキシメチル、ならびに(5-R-2-オキソ-1,3-ジオキソレン-4-イル(yI))メチル基を含む当該技術分野で既知の他基が挙げられる。プロドラッグエステルの他の例は、例えば、T.ヒグチおよびV.ステラ(T. Higuchi and V. Stella), 「新規輸送システムとしてのプロドラッグ」"Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. シンポジウムシリーズ(Symposium Series), アメリカンケイミカルソサアティ(American Chemical Society)(1975)、および「製薬デザインにおけるバイオリバーシブルな担体:理論と応用」"Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", E. B. ローチェ(E. B. Roche)編, ペルガモンプレス(Pergamon Press): ニューヨーク(New York), 14-21 (1987)(カルボキシル基を含有する化合物のためのプロドラッグとして有用なエステルの例を提供する)に見出され得る。

【0022】

本明細書中で使用する場合、「プロドラッグエステル」という用語はまた、例えば血中での加水分解により、*in vivo*で迅速に転換されて、本発明の化合物を生じる化合物の化学的誘導体を指す。「プロドラッグエステル」という用語は、生理学的条件下で加水分解される幾つかのエステル形成基のいずれかが付加することにより形成される本明細書中に開示する化合物の誘導体を指す。プロドラッグエステルの例としては、ピバロイルオキシメチル、アセトキシメチル、フタリジル、インダニルおよびメトキシメチル、ならびに(5-R-2-オキソ-1,3-ジオキソレン-4-イル(yI))メチル基を含む当該技術分野で既知の他の基が挙げられる。プロドラッグエステルの他の例は、例えば、T.ヒグチおよびV.ステラ(T. Higuchi and V. Stella), 「新規な輸送システムとしてのプロドラッグ」("Pro-drugs as Novel Delivery Systems"), Vol. 14, A.C.S. シンポジウムシリーズ(Symposium Series), アメリカンケイミカルソサイアティ(American Chemical Society)(1975)、および「製薬デザインにおけるバイオリバーシブルな担体:理論と応用」("Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application") E. B. ローチェ(E. B. Roche)編, ペルガモンプレス(Pergamon Press): ニューヨーク(New York), 14-21 (1987)(カルボキシル基を含有する化合物のためのプロドラッグ

10

20

30

40

50

として有用なエステル(I)の例を提供する)に見出される。

【 0 0 2 3 】

「薬学的に許容可能な塩」という用語は、特に本明細書中に開示する方法により合成される式 (I) で表される化合物の薬学的に許容可能な塩を指す場合、化合物の任意の薬学的に許容可能な塩を指し、好ましくは、化合物の酸付加塩を指す。薬学的に許容可能な塩の好ましい例は、アルカリ金属塩 (ナトリウムまたはカリウム)、アルカリ土類金属塩 (カルシウムまたはマグネシウム)、あるいはアンモニアまたは薬学的に許容可能な有機アミン、例えば、 $C_1 \sim C_7$ アルキルアミン、シクロヘキシルアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミンまたはトリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタンにより得られるアンモニウム塩である。塩基性アミンである上記方法により合成される化合物に関して、薬学的に許容可能な塩の好ましい例は、薬学的に許容可能な無機酸または有機酸、例えば、ハロゲン化水素酸、硫酸、リン酸、あるいは脂肪族もしくは芳香族のカルボン酸またはスルホン酸、例えば酢酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、メタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸またはナフタレンスルホン酸の酸付加塩である。

10

【 0 0 2 4 】

本明細書中で使用する場合、「薬学的に許容可能な塩」という用語はまた、化合物の任意の薬学的に許容可能な塩を指し、好ましくは、化合物の酸付加塩を指す。薬学的に許容可能な塩の好ましい例は、アルカリ金属塩 (ナトリウムまたはカリウム)、アルカリ土類金属塩 (カルシウムまたはマグネシウム)、あるいはアンモニアまたは薬学的に許容可能な有機アミン、例えば、 $C_1 \sim C_7$ アルキルアミン、シクロヘキシルアミン、トリエタノールアミン、エチレンジアミンまたはトリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタンにより得られるアンモニウム塩である。塩基性アミンである上記方法により合成される化合物に関して、薬学的に許容可能な塩の好ましい例は、薬学的に許容可能な無機酸または有機酸、例えば、ハロゲン化水素酸、硫酸、リン酸、あるいは脂肪族もしくは芳香族のカルボン酸またはスルホン酸、例えば酢酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、メタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸またはナフタレンスルホン酸の酸付加塩である。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書中に開示される好ましい薬学的組成物は、本明細書中に開示する方法により合成される式 (I) の化合物の薬学的に許容可能な塩およびプロドラッグエステルを含む。したがって、薬学的配合物の製造は、薬学的な賦形剤および塩の形態の有効成分を緊密に混合することを含む場合、非塩基性の薬学的賦形剤、すなわち酸性の賦形剤または中性の賦形剤のいずれかを使用することが好ましい。

30

【 0 0 2 6 】

本明細書中に開示する化合物の方法の好ましい実施形態では、比較的強固な平面状の疑似三環構造が形成され得る。かかる比較的強固な平面状の偽性三環構造を安定化するために、 R_3 は、好ましくはハロゲンであるように選択されても良い。

【 0 0 2 7 】

本明細書中に記載する化合物および方法の他の好適な実施形態では、 n は、0または1に等しく、より好適には1であり、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、酸素原子、窒素原子および炭素原子から選択され、より好適には、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 の少なくとも1つは炭素原子であり、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 の少なくとも2つが炭素原子であることが最も好適である。 Z は同時に全てが炭素原子であっても良い。

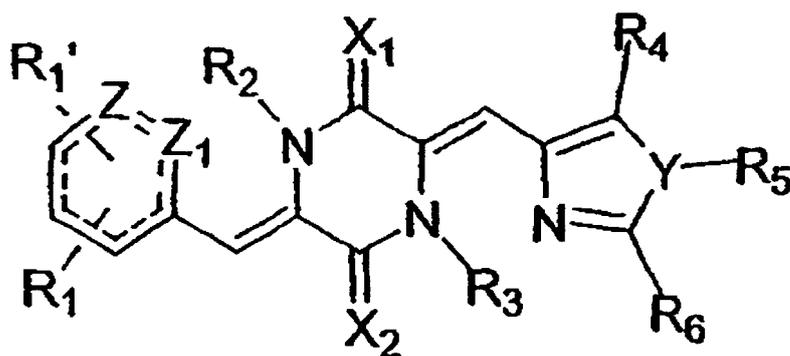
40

【 0 0 2 8 】

本明細書中に開示する方法および組成物の他の好ましいさらなる実施形態は、以下の式 (I a) および式 (I b) であって：

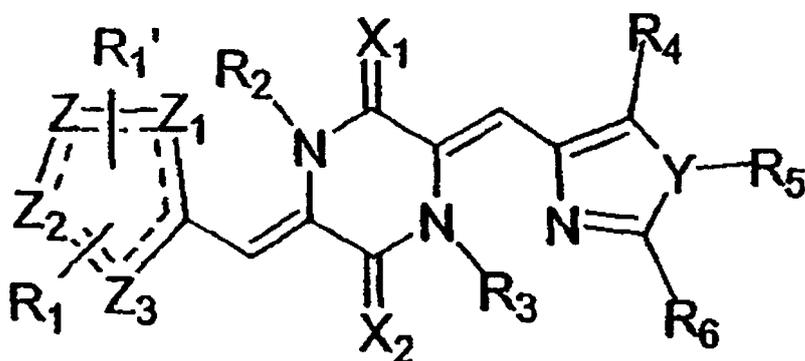
【 0 0 2 9 】

【化3】



10

(Ia)



20

(Ib)

30

【0030】

式中、可変の基は、本明細書中に定義する通りである。
構造を有する化合物を包含する。

【0031】

本明細書中で使用する場合、「ハロゲン原子」という用語は、元素周期表の第7列の放射性安定原子のいずれか1つ、すなわち、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味し、フッ素および塩素が好ましい。

【0032】

本明細書中で使用する場合、「アルキル」という用語は、任意の未分岐状もしくは分岐状の置換または無置換の飽和炭化水素を意味し、 $C_1 \sim C_6$ の未分岐の飽和無置換炭化水素が好ましく、メチル、エチル、イソブチルおよび第三ブチルが最も好ましい。置換飽和炭化水素の中では、 $C_1 \sim C_6$ モノおよびジおよびペルハロゲン置換飽和炭化水素およびアミノ置換炭化水素が好ましく、ペルフルオロメチル、ペルクロロメチル、ペルフルオロ-第三ブチル、およびペルクロロ-第三ブチルが最も好ましい。「置換」という用語は、関連技術の現行の多数の特許に見られるように、その通常の意味を有する。例えば、米国特許第6,583,143号、同第6,509,331号、同第6,506,787号、同第6,500,825号、同第5,922,683号、同第5,886,210号、同第5,874,443号、および同第6,350,759号を参照されたい。具体的に、置換

40

50

の定義は、米国特許第 6, 583, 143 号に提供されるものと同程度の幅があり、該特許は、置換という用語を、アルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、複素環および複素環アルキルのような任意の基として定義しており、ここで少なくとも 1 つの水素原子が置換基で置換される。「置換」という用語はまた、米国特許第 6, 509, 331 号に提供される定義と同程度の幅があり、該特許は、「置換アルキル」という用語を、該用語が、アルキル基、好ましくは、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロアルケニル、置換シクロアルケニル、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アミノ、置換アミノ、アミノアシル、アミノアシルオキシ、オキシアシルアミノ、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシルアルキル、ケト、チオケト、チオール、チオアルコキシ、置換チオアルコキシ、アリール、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ、複素環、ヘテロシクロオキシ、ヒドロキシアミノ、アルコキシアミノ、ニトロ、-SO-アルキル、-SO-置換アルキル、-SO-アリール、-SO-ヘテロアリール、-SO₂-アルキル、-SO₂-置換アルキル、-SO₂-アリール、および -SO₂-ヘテロアリールからなる群から選択される、1~5 個の置換基、好ましくは 1~3 個の置換基を有する 1~10 個の炭素原子を有するアルキル基を指すように定義している。上述の他の特許もまた、当業者に十分理解される「置換」という用語に関する標準的な定義を提供している。「シクロアルキル」という用語は、好ましくは 5~12 個の原子を有する芳香族炭化水素環でない任意の環を指す。「アシル」という用語は、オキソ酸に由来するアルキル基またはアリール基を指し、アセチル基が好ましい。

10

20

【0033】

本明細書中で使用する場合、「アルケニル」という用語は、任意の未分岐状もしくは分岐状の置換または無置換の多不飽和炭化水素を含む不飽和炭化水素を意味し、C₁~C₆の未分岐状の一不飽和および二不飽和の無置換炭化水素が好ましく、一不飽和のジハロゲン置換炭化水素が最も好ましい。構造(I)の化合物の R₁および R₄の位置では、z-イソプレニル部分が特に好ましい。「シクロアルケニル」という用語は、好ましくは 5~12 個の原子を有する芳香族炭化水素環でない任意の環を指す。

【0034】

本明細書で使用する場合、「アリール」、「置換アリール」、「ヘテロアリール」および「置換ヘテロアリール」は、環を構成する好ましくは 5 個、6 個または 7 個の原子、最も好ましくは 6 個の原子を有する芳香族炭化水素環を指す。「ヘテロアリール」および「置換ヘテロアリール」は、少なくとも 1 つのヘテロ原子、例えば酸素、硫黄または窒素原子が、少なくとも 1 つの炭素原子と一緒に環中に存在する芳香族炭化水素環を指す。

30

【0035】

「アルコキシ」という用語は、任意の未分岐状もしくは分岐状の置換または無置換の飽和あるいは不飽和エーテルを指し、C₁~C₆未分岐状の飽和无置換エーテルが好ましく、メトキシが好ましく、またジメチル、ジエチル、メチル-イソブチルおよびメチル-t-ブチルエーテルもまた好ましい。「シクロアルコキシ」という用語は、好ましくは環を構成する 5~12 個の原子を有する芳香族炭化水素環でない任意の環を指す。

40

【0036】

本明細書中で使用する場合、「精製された」、「実質的に精製された」および「単離された」という用語は、化合物がその自然状態で通常付随する他の異なる化合物を含まない化合物を指し、したがって本発明の化合物は、所定の試料の少なくとも 0.5 重量%、1 重量%、5 重量%、10 重量%または 20 重量%、最も好ましくは少なくとも 50 重量%または 75 重量%の質量を含む。

【0037】

式(I)の化合物は、当該技術分野で既知であり、かつ入手可能な試薬から化学的に合成または製造され得る。例えば、ジアシルジケトピペラジン(ジアセチルジケトピペラジン)の修飾は、例えばロウリン等(Loughlin et al.), 2000 Bioorg Med Chem Lett 10: 91により、あるいはブロッキニ等(Brocchini et al.)により WO 95 / 21832 号に

50

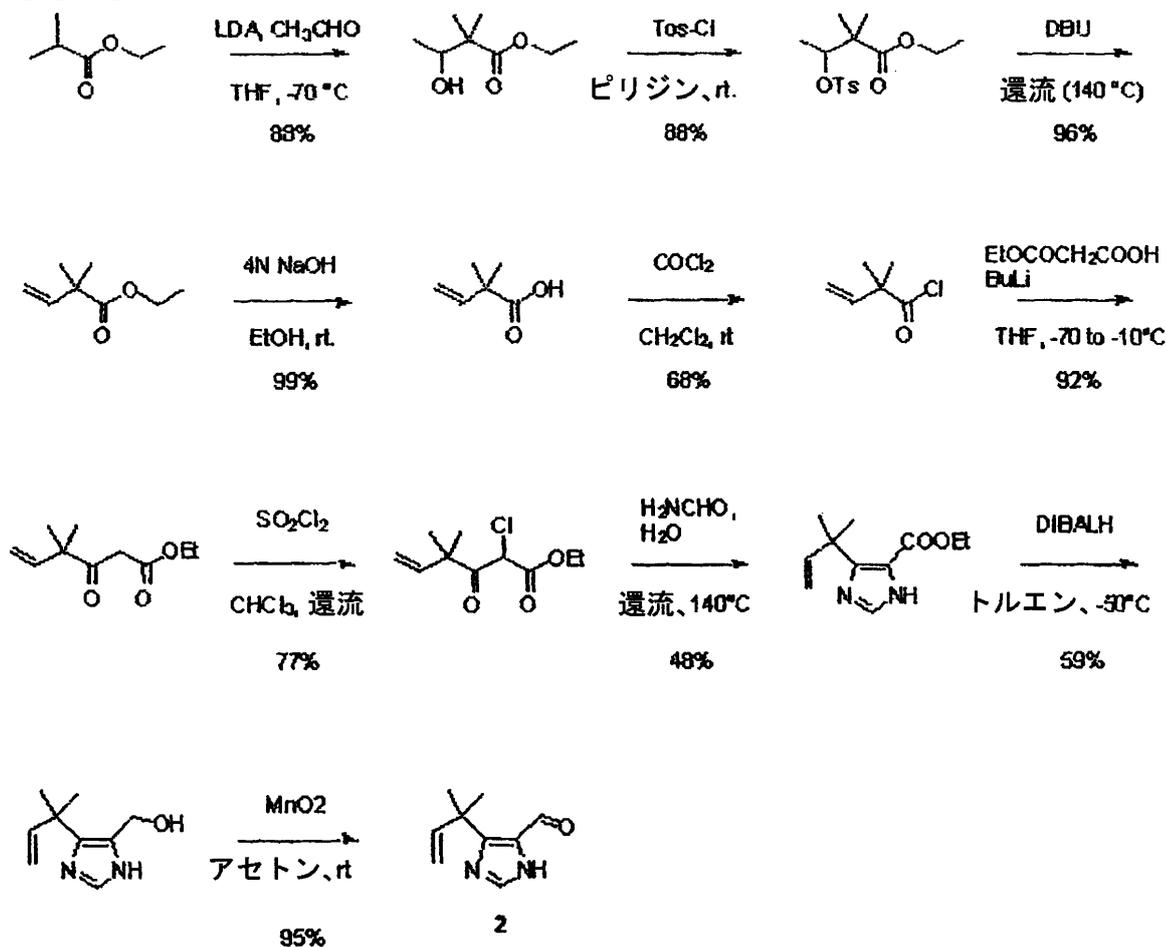
記載されている。ジアシルジケトピペラジン（ジアセチルジケトピペラジン）は、例えば、酢酸ナトリウムおよび無水酢酸ナトリウムによる、安価な 2, 5 - ピペラジンジオン（TCIカタログ番号 G 0 1 0 0、25 g）のジアセチル化により製造され得る。活性化されたジケトピペラジンのジアセチル構造は、Boc（t-ブトキシカルボニル）、Z（ベンゾイルオキシカルボニル）のようなカーバメートを含むように他のアシル基で置換することができる。

【0038】

イミダゾールカルボキサリドは、以下に示すように、例えば、ハヤシ等（Hayashi et al.）, 2000 J Organic Chem 65:8402に開示する手順に従って製造され得る：

【0039】

【化4】



10

20

30

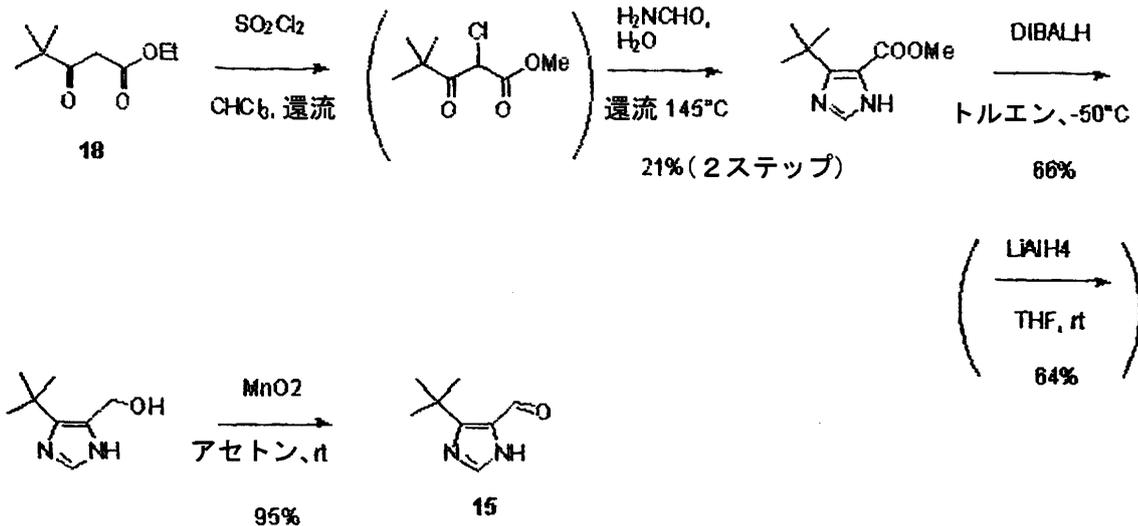
【0040】

イミダゾールカルボキサリド誘導体の別の例は、下記経路により、例えば市販のベータ-ケトエステル18（TCIカタログ番号 P 1 0 3 1、25 mL）から生じさせることができるイミダゾール-4-カルボキサリド15誘導体である：

【0041】

40

【化5】



10

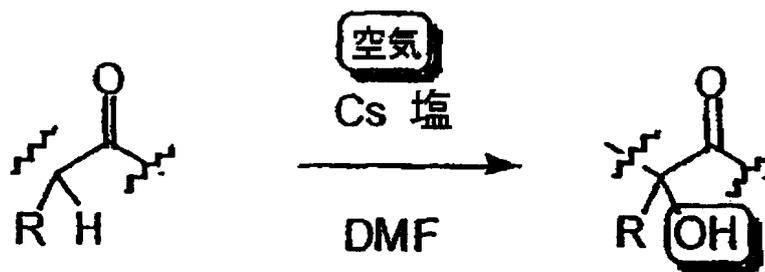
【0042】

本明細書中に開示する合成方法は、好ましくはDMF中でかつ脱酸素雰囲気下で、塩基として炭酸セシウムの存在下で実施されて良い。不活性な雰囲気は、例えば、ワタナベ等 (Watanabe et al.), 第18回複素環化学国際会議 横浜, 日本 (2001年7月30日) (18th International Congress of Heterocyclic Chemistry in Yokohama, Japan (30 July 2001)), 要旨集, 225頁により報告されたように、炭酸セシウムによる処理中に起こり得るジケトピペラジン環の活性アルファ-炭素原子の酸化 (以下を参照) を防ぐ。

20

【0043】

【化6】



30

セシウム塩による活性カルボニル化合物の空気酸化

【0044】

合成方法の他の実施形態は、式(I)により表される化合物の合成において使用され、あるいは他の方法で関与する化合物の修飾を包含する。かかる誘導体は、フェニル環への修飾、他の芳香族環構造の導入、芳香族環の部位、イミダゾール環構造への変更および/またはイミダゾール環の5位へのさらなる修飾を含んでも良い。かかる修飾の例は、例えば実施例4に記述される。かかる修飾の結果は、フェニル環の窒素含有量の増加および/または化合物の溶解性を増加し得る化合物を含む。他の修飾は、既知のチューブリン阻害剤の誘導体を取り入れてもよく、それによりチューブリン阻害剤の活性を模倣する。他の修飾は、本明細書中に開示する方法で使用するイミダゾールカルボキサリドの製造に関与するベータ-ケトエステルの合成を単純化し得る。

40

【0045】

< 薬学的組成物 >

本発明は、保管およびその後の投与用に製造される薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物の中の、任意におよび好適に本明細書に開示する方法により製造される、本明細書中に開示される化合物を包含し、薬学的に許容可能な担体または希釈剤の中に薬学的に

50

有効な量で上記に開示する生成物を有する。治療用途のための許容可能な担体または希釈剤は、薬学技術分野で既知であり、例えば、レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack Publishing Co. (A. R. ゲナーロ編 (A.R. Gennaro). 1985) に記載されている。防腐剤、安定剤、色素、さらには香味剤を薬学的組成物に供給してもよい。例えば、安息香酸ナトリウム、アスコルビン酸および p - ヒドロキシ安息香酸のエステルを防腐剤として添加してもよい。さらに、酸化防止剤および懸濁化剤を使用してもよい。

【0046】

デヒドロフェニラヒスチンまたはデヒドロフェニラヒスチン類似体は、経口投与用の錠剤、カプセルまたはエリキシル剤、直腸投与用の坐剤、注射可能な投与のための滅菌溶液、懸濁液、経皮投与用のパッチ、および皮下沈積物等として配合および使用されても良い。注射可能な物質は、液体溶液または懸濁液として、注射もしくは注入の前に液体中で溶液または懸濁液となる適切な固体形態として、あるいはエマルジョンとして、などの従来の形態で製造することができる。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、塩酸システイン、ヒト血清アルブミン等である。さらに、所望される場合には、注射可能な薬学的組成物は、少量の無毒性の助剤、例えば湿潤剤、pH緩衝剤等を含ってもよい。所望される場合には、吸収を増強する製造物 (例えば、リポソーム) を利用してもよい。

10

【0047】

非経口投与用の薬学的配合物としては、水溶性の形態の活性化合物の水溶液が挙げられる。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として製造されても良い。適切な親油性溶媒または媒質としては、ゴマ油のような脂肪油、またはダイズ油、グレープフルーツ油もしくは扁桃油のような他の有機油、あるいはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、あるいはリポソームが挙げられる。水性注射懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランのような懸濁液の粘度を増加させる物質を含ってもよい。任意に、懸濁液はまた、高度に濃縮された溶液の製造を可能にするために、適切な安定剤または化合物の溶解度を増加する作用物質を含ってもよい。

20

【0048】

経口用途用の薬学的製造物は、活性化合物を固体賦形剤と組み合わせること、得られた混合物を任意に粉砕すること、および所望される場合には、錠剤または糖衣錠コアを得るために適切な助剤を添加した後に顆粒の混合物を加工処理することにより得てもよい。適切な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールなどを含む糖のような充填剤、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、および/またはポリビニルピロリドン (PVP) のようなセルロース製造物である。所望される場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくは例えばアルギン酸ナトリウムなどのその塩のような崩壊剤を添加してもよい。糖衣錠コアには、適切なコーティングが施される。この目的で、濃縮糖溶液を使用してもよく、それは任意に、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含ってもよい。活性化合物の用量の識別のために、あるいは活性化合物の用量の種々の組合せを特徴付けるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加してもよい。この目的で、濃縮糖溶液を使用してもよく、それは任意に、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を含ってもよい。活性化合物の用量の識別のために、あるいは活性化合物の用量の種々の組合せを特徴付けるために、染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに添加してもよい。かかる配合物は、当該技術分野で既知の方法を用いて製造することができる (例えば、米国特許第 5, 733

30

40

50

、888号(注射可能な組成物)、同第5,726,181号(難水溶性化合物)、同第5,707,641号(治療上活性なタンパク質またはペプチド)、同第5,667,809号(親油性作用物質)、同第5,576,012号(可溶化高分子作用物質)、同第5,707,615号(抗ウイルス配合物)、同第5,683,676号(粒子状薬剤)、同第5,654,286号(局所配合物)、同第5,688,529号(経口懸濁液)、同第5,445,829号(徐放性配合物)、同第5,653,987号(液体配合物)、同第5,641,515号(制御放出性配合物)および同第5,601,845号(球状配合物)を参照)。

【0049】

さらに、眼内、鼻内および耳介内の送達を含む用途のための薬学技術分野で既知の様々な薬学的組成物を本明細書中に開示する。薬学的配合物としては、点眼薬のような水溶性形態での、あるいはゲランガム(シェッデン等(Shedden et al.), 2001 Clin Ther 23(3):440-50)またはヒドロゲル(メイヤー等(Mayer et al.), 1996 Ophthalmologica 210:101-3)中の活性化化合物の水溶性眼用溶液、眼用軟膏、眼用懸濁液(例えば、微粒子、液体担体媒質中に懸濁する薬物含有高分子小粒子(ジョシ, A. (Joshi, A.), 1994 J Ocul Pharmacol 10:29-45)、脂質溶解性配合物(アルム等(Alm et al.), 1989 Prog Clin Biol Res 312:447-58)、およびマイクロスフェア(モルデンティ(Mordenti), 1999 Toxicol Sci 52:101-6)、および眼挿入物が挙げられる。かかる適切な薬学的配合物は、ほとんどの場合、および好ましくは、安定性および快適さのために滅菌され、等張性であり、かつ緩衝化されるように配合される。薬学的組成物はまた、正常な繊毛作用の維持を確実にするために、多くの場合、多くの点で鼻分泌を刺激するように製造されるドロップおよびスプレーを包含しても良い。レミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(Mack Publishing, 第18版)に開示されるように、また当業者に既知であるように、適切な配合物は、ほとんどの場合、および好ましくは、等張性であり、pH 5.5~6.5を維持するようにわずかに緩衝化され、またほとんどの場合、および好ましくは、抗菌防腐剤および適切な薬物安定剤を含む。耳介内送達用の薬学的配合物としては、耳の中での局所塗布のための懸濁液および軟膏が挙げられる。かかる耳用配合物のための通常の溶媒としては、グリセリンおよび水が挙げられる。

【0050】

細胞周期阻害剤、腫瘍成長阻害剤または真菌成長阻害化合物として使用する場合、式(I)の化合物は、経口または非経口経路のいずれかにより投与することができる。経口投与する場合、式(I)の化合物は、カプセル、錠剤、顆粒、スプレー、シロップまたはかかる形態で投与することができる。非経口投与する場合、式(I)の化合物は、注射または注入により、皮下的に、腹腔内に、静脈内に、筋内に、などで投与する場合、水性懸濁液、油性製造物等として、あるいは点滴、坐剤、軟膏剤、軟膏等として投与することができる。同様に、式(I)の化合物は、化合物を腫瘍と最適に接触させ、そして腫瘍の成長を阻害するために、当業者が適切であると考えられる場合には、局所的、直腸的、または腔的に投与してもよい。腫瘍の部位での局部投与はまた、制御放出性配合物(controlled release formulations)、持続性配合物および注入ポンプ送達であるように、腫瘍の切除前または切除後のいずれかで意図される。

【0051】

<投与方法>

本発明はまた、開示する化学化合物および開示する薬学的組成物を製造する方法および投与する方法を包含する。かかる開示する方法は、特に、(a)カプセル、錠剤、顆粒、スプレー、シロップ、または他のかかる形態での投与を含む経口経路による投与、(b)水性懸濁液、油性製造物等として、あるいは点滴、坐剤、軟膏剤、軟膏等としての投与、注射または注入により、皮下的に、腹腔内に、静脈内に、筋内に、などによる投与を含む非経口経路による投与、ならびに化合物を生存組織と最適に接触させるために、当業者が適切であると考えられる場合には、(c)局所投与、(d)直腸投与、あるいは(e)腔投与、および(f)制御放出性配合物、持続性配合物および注入ポンプ送達による投与が挙げ

10

20

30

40

50

られる。かかる投与様式のさらなる例として、および投与様式のさらなる開示として、眼内、鼻内および耳介内経路による投与の様式を含む開示する化学化合物および薬学的組成物の様々な投与方法を本明細書中に開示する。

【0052】

用量として必要とされるデヒドロフェニラヒスチンまたはデヒドロフェニラヒスチン類似体組成物の薬学的に有効な量は、投与経路、治療されるヒトを含む動物のタイプ、および対象とする特定の動物の身体特性に応じる。用量は、所望の効果を達成するように合わせて調製できるが、体重、食事、同時投薬等の因子、および医療技術分野の当業者が認識する他の因子に依存する。

【0053】

上記方法を実施する際、生成物または組成物は、単独で、または互いに組み合わせて、あるいは他の治療剤または診断用薬と組み合わせて使用することができる。例えば、本明細書中に開示するように、本明細書中に開示する化合物は、他の活性物、具体的には、他の化学療法剤、例えば生物製剤および特定の化学療法剤であるCPT-11、タキソテン（ドカタキセル）およびパクリタキセルと併用する場合、癌の治療に有効である。本明細書中に開示する化合物はまた、Erbitux（イムコーン/ブリストルマイヤーズ（Imcane/bristol-Myers））およびIressa（アストラゼネカ（AstraZeneca））の様な抗血管剤、抗血管新生剤、他のVEGF阻害剤および生物製剤、より具体的には、少なくとも1つの抗VEGF抗体、特にDC101を含むVEGF受容体に対するモノクローナル抗体、マウスVEGF受容体2を阻害するラットモノクローナル抗体（flk-1）と併用する場合、癌の治療に有効である。かかる組合せは、通常哺乳類において、好ましくはヒトにおいて、*in vivo*で、あるいは*in vitro*で利用され得る。かかる組合せを*in vivo*で使用する場合、単独で、あるいは他の化学療法剤または他の生物製剤製品と併用する本発明で開示する化合物は、各種の投与形態を使用して、非経口的、静脈内、注入または注射により、皮下的に、筋内に、結腸的に、直腸的に、腔的に、鼻的に、または腹腔内への投与を含む各種の方法で哺乳類に投与されて良い。このような方法は、*in vivo*での化学活性の試験にも適用することができる。

10

20

【0054】

当業者に容易に明らかであるように、投与されるべき有用な*in vivo*での投与量、および投与の特定の様式は、年齢、体重および治療される哺乳類の種、使用する特定の化合物、ならびにこれらの化合物が使用される特定用途に依存して様々である。有効投与量レベル、すなわち所望の結果を達成するのに必要な投与量レベルの決定は、日常的な薬理学的方法を使用する技術分野の当業者により成されて良い。通常、製品のヒトへの臨床適用は、より低い投与量レベルから始め、所望の効果が達成されるまで投与量レベルを増加させる。あるいは、許容可能な*in vitro*研究を使用して、確立された薬理学的方法を用いるこの方法により確認される組成物の有用な用量および投与経路を確立することができる。

30

【0055】

ヒトでない動物の研究では、潜在的な製品の適用は、より高い投与量レベルで始め、所望の効果がもはや達成されないか、または不都合な副作用が消滅するまで、投与量を減少させる。投与量は、所望の影響および治療の徴候に応じて、広範囲に及ぶことがある。通常、投与量は、約10マイクログラム/kg～100mg/kg（体重）、好ましくは約100マイクログラム/kg～10mg/kg（体重）であり得る。あるいは、投与量は、当業者に理解されるように、患者の表面積に基づいて算出してもよい。投与は、2日おきに、1日おきに、毎日、一日二度、あるいは一日三度を基準にする経口投与であって良い。

40

【0056】

正確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して、個々の医師により選択され得る。例えば、フィングル等（Fingl et al.），治療の薬理学的基礎（The Pharmacological Basis of Therapeutics），1975を参照されたい。主治医は、毒性または臓器機

50

能障害に応じて投与を終結、中断または調節する方法および時期を理解することに留意すべきである。逆に、主治医はまた、臨床反応が適正でない場合に、より高レベルに治療を調節することも理解する（毒性を排除する）。所定の障害の管理における投与用量の規模は、治療されるべき症状の重篤性および投与経路により様々である。症状の重篤性は、例えば、部分的に標準的な予後評価方法により評価され得る。さらに、用量、およびおそらく用量頻度もまた、個々の患者の年齢、体重および反応に従って様々である。上記事項と同程度のプログラムを、獣医学で使用してもよい。

【0057】

治療されるべき特定の症状に応じて、かかる作用物質は、全身的に、あるいは局所的に配合および投与され得る。配合および投与に関する各種技法は、レミントン(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第18版、Mack Publishing Co.、イーストン(Easton)、ペンシルベニア（1990）に見受けられる。適切な投与経路としては、経口、直腸、経皮、腔、経粘膜または腸投与、筋内、皮下、脊髄内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内へ、静脈内、注入による、腹腔内、鼻内または眼内注射を含む非経口送達を挙げられ得る。

10

【0058】

注射または注入に関して、作用物質は、水溶液中、例えばハックス溶液、リングル溶液または生理食塩水緩衝液のような生理学的に適合する緩衝液中に配合しても良い。かかる経粘膜投与用に、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が配合物中で使用される。かかる浸透剤は、一般に当該技術分野で既知である。全身投与に適した投薬にあたり、本発明の実施のために本明細書中に開示する化合物を配合するための薬学的に許容可能な担体の使用は、本発明の範囲内である。担体の適正な選択および適切な製造の実施によって、本明細書中に開示する組成物、特に溶液として配合する組成物は、例えば静脈内注射または注入により、非経口的に投与されて良い。本発明の化合物は、経口投与に適した投薬にあたり、当該技術分野で既知の薬学的に許容可能な担体を用いて容易に配合することができる。かかる担体により、治療されるべき患者の経口摂取用に、化合物を錠剤、丸剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤等に配合することが可能となる。

20

【0059】

細胞内投与されるように意図される作用物質は、当業者に既知の技法を用いて投与されても良い。例えば、かかる作用物質は、リポソームに封入された後、上述のように投与されてもよい。リポソーム形成の時点で水溶液中に存在する分子はすべて、水性内部に取り込まれる。リポソームの内容物はともに、外部の微視的環境から保護され、リポソームが細胞膜と融合するため、細胞質へ効率的に送達される。さらに、リポソームの疎水性に起因して、小有機分子を細胞内に直接投与してもよい。

30

【0060】

有効量の決定は、特に本明細書中に提供する詳細な開示を鑑みて、十分に当業者の能力内にある。有効成分に加えて、これらの薬学的組成物は、薬学的に使用することができる製造物への活性化合物の加工処理を容易とする賦形剤および助剤を含む適切な薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。経口投与用に配合される製造物は、錠剤、糖衣錠、カプセルまたは溶液の形態であって良い。薬学的組成物は、例えば、従来(conventional)の混合、溶解、粒状化、糖衣錠作製、浮揚化、乳化、カプセル化、取り込み、または凍結乾燥プロセスにより、それ自体既知の様式で製造されても良い。

40

【0061】

本明細書中に開示する化合物は、既知の方法を用いて、有効性および毒性に関して評価することができる。例えば、ある特定の化学部分を共有する特定の化合物、または化合物のサブセットの毒性学は、哺乳類の細胞系、好ましくはヒト細胞系のような細胞系に対して *in vitro* で毒性を決定することにより確立され得る。かかる研究の結果は、多くの場合、哺乳類、より具体的にはヒトのような動物における毒性の予想に役立つ。あるいは、マウス、ラット、ウサギ、またはサルのような動物モデルにおける特定の化合物の毒性は、既知の方法を用いて決定され得る。特定の化合物の有効性は、*in vitro*

50

の方法、動物モデル、またはヒト臨床試験のような幾つかの当該技術分野で理解される方法を用いて確立されて良い。当該技術分野で理解される *in vitro* モデルは、癌、心血管疾患および様々な真菌感染を含む本明細書中に開示する化合物により軽減される症状を含むほぼすべての種類の症状に関して存在する。同様に、許容可能な動物モデルを使用して、かかる症状を治療するための化学物質の有効性を確立してもよい。有効性を決定するためにモデルを選択する場合、当業者は、適切なモデル、用量、および投与経路、ならびに投与計画を選択するように現在の技術水準により誘導され得る。当然のことながら、ヒトの臨床試験もまた、ヒトにおける化合物の有効性を決定するのに使用することができる。

【0062】

抗癌剤、または腫瘍成長阻害化合物として使用する場合、本明細書中に開示する化合物は、経口経路または非経口経路のいずれかにより投与され得る。経口投与される場合、本明細書中に開示する化合物は、カプセル、錠剤、顆粒、スプレー、シロップまたは他のかかる形態で投与することができる。非経口投与する場合、本明細書中に開示する化合物は、水性懸濁液、油性製造物等として、あるいは点滴、坐剤、軟膏剤、軟膏等として投与することができる。注射または注入による場合、皮下的に、腹腔内で、静脈内で、筋内で、皮内でなどにより投与することができる。同様に、本明細書中に開示する化合物は、化合物を腫瘍と最適に接触させ、そして腫瘍の成長を阻害するために、当業者が適切であると考えられる場合には、局所的、直腸的、または腔的に投与してもよい。腫瘍の部位または他の疾患状態での局部投与はまた、腫瘍切除前または後のいずれかで、あるいは疾患状態の当該技術分野で理解される治療の一部として意図される。制御放出性配合物、持続性配合物および注入ポンプ送達も同様に意図される。

【0063】

抗癌剤または抗腫瘍剤として使用する場合、約 0.0007 mg / 日 ~ 約 7,000 mg / 日の有効成分、より好ましくは約 0.07 mg / 日 ~ 約 70 mg / 日の有効成分の量で、好ましくは 1 日につき 1 回、あるいはあまり好ましくはないが、1 日につき 2 回 ~ 約 10 回で、ヒト患者に経口または非経口投与しても良い。あるいは、および同様に好ましくは、化合物は、例えば静脈内点滴により連続的に規定量で好ましく投与しても良い。したがって、70 キログラムの体重の患者に関して、有効な抗腫瘍成分の好ましい日用量は、約 0.0007 mg / kg / 日 ~ 約 35 mg / kg / 日 (1.0 mg / kg / 日および 0.5 mg / kg / 日を含む)、より好適には 0.007 mg / kg / 日 ~ 約 0.050 mg / kg / 日 (0.035 mg / kg / 日を含む) である。それにもかかわらず、当業者に理解されるように、ある特定の状況では、特に進行した腫瘍または致死的な腫瘍を効果的かつ積極的に治療するために、上述の好ましい投与量範囲を超える、または場合によってははるかに超える量で抗腫瘍化合物を投与する必要がある場合がある。

【0064】

抗真菌剤として使用する場合、特定の真菌病原体の治療または防止に有効なデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の好適な量は、真菌の特徴および感染の程度に幾分応じ、標準的な臨床技法により決定することができる。 *in vitro* または *in vivo* アッセイを任意に使用して、最適な投与量範囲を確認する手助けとしてもよい。有効な用量は、 *in vitro* 分析、あるいは好ましくは動物モデルから得られる用量反応曲線から外挿してもよい。正確な投与量レベルは、主治医または他の医療提供者により決定されるべきであり、投与経路、ならびに個体の年齢、体重、性別および全身の健康状態、感染の性質、重篤性および臨床病期、併用治療の使用（もしくは使用せず）を含む既知の因子に応じる。

【0065】

デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の有効な用量は、通常、1 日当たり約 0.01 ~ 約 50 mg / kg、好ましくは約 0.1 ~ 約 10 mg / kg (哺乳類体重) の範囲であり、単回用量または複数回で投与される。概して、化合物は、患者 1 人当たり約 1 ~ 約 2000 mg の日用量範囲で、かかる治療を必要とする患者に投与しても良い。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

腫瘍成長阻害化合物として本明細書中に開示する化合物を含む投与量を配合するために、既知の界面活性剤、賦形剤、滑化剤、懸濁剤、ならびに薬学的に許容可能な膜形成物質およびコーティング助剤等を使用してもよい。好ましくは、アルコール、エステル、硫酸化した脂肪族アルコール等を界面活性剤として使用してもよく、スクロース、グルコース、ラクトース、デンプン、結晶セルロース、マンニトール、軽質無水ケイ酸塩、アルミン酸マグネシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルシウムカルボキシメチルセルロース等を賦形剤として使用してもよく、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を滑化剤として使用してもよく、ヤシ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、ダイズ等を懸濁剤または潤滑剤として使用してもよく、セルロースもしくは糖のような炭水化物の誘導体としての酢酸フタル酸セルロース、またはポリビニルの誘導体としての酢酸メチル-メタクリル樹脂共重合体を懸濁剤として使用してもよく、フタル酸エステルのような可塑剤等を懸濁剤として使用してもよい。上述の好ましい成分のほかに、特に化合物が経口投与される場合に、甘味剤、芳香剤、着色剤、防腐剤等を化合物の投与配合物に添加してもよい。

10

【 0 0 6 7 】

薬学的組成物における本明細書中に開示する組成物はまた、薬学的に許容可能な担体を含んでもよい。かかる組成物は、保管用およびその後の投与用に製造されても良い。治療用途のための許容可能なキャリアまたは希釈剤は、薬学技術分野で既知であり、例えば、レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack Publishing Co. (A. R. ゲナーロ編 (A.R. Gennaro). 1985)に記載されている。例えば、かかる組成物は、経口投与用の錠剤、カプセルまたは溶液、直腸または膣投与用の坐剤、注射投与用の滅菌溶液または懸濁液として配合および使用しても良い。注射可能物質は、液体溶液または懸濁液、注射もしくは注入の前に液体中で溶液または懸濁液になるのに適切な固体の形態として、あるいはエマルジョン形態など従来の形態として製造することができる。適切な賦形剤としては、生理食塩水、デキストロース、マンニトール、ラクトース、レシチン、アルブミン、グルタミン酸ナトリウム、塩酸システイン等が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、望ましい場合、注射可能な薬学的組成物は、少量の無毒性助剤物質、例えば湿潤剤、pH緩衝剤等を含んでもよい。所望される場合、吸収増強製造物(例えば、リボソーム)を利用してよい。

20

30

【 0 0 6 8 】

用量として必要とされる組成物の薬学的に有効な量は、投与経路、治療される動物のタイプ、および対象とする特定の動物の身体特性に応じる。用量は、所望の効果を達成するように合わせることができるが、体重、食事、併用投薬、および医療技術分野の当業者が認識する他の因子に応じる。

【 0 0 6 9 】

上述のような生成物または組成物は、単独で、または互いに組み合わせて、あるいは他の治療剤または診断用薬と組み合わせて使用することができる。具体的には、本明細書中に開示する化合物生成物は、癌の治療のために、単独で、または他の化学療法剤または生物製剤(抗体を含む)と組み合わせて、あるいは、真菌感染の治療のために、他の抗感染物質と組み合わせて使用しても良い。これらの生成物または組成物は、*in vivo*で、あるいは*in vitro*で利用され得る。有用な投与量および最も有用な投与様式は、年齢、体重および治療される動物、使用する特定の化合物、およびこれらの組成物(単数または複数)を使用する特定の用途に応じて様々に変化する。特定の疾病のための管理または治療における用量の規模は、治療されるべき症状の重篤性および投与経路により様々であり、疾患状態およびそれらの重篤性に応じて、組成物は、全身的に、あるいは局部的に配合および投与され得る。配合および投与に関する各種技法は、レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 第18版, Mack Publishing Co., イーストン (Easton), ペンシルベニア (PA) (1990)に見受けられる。

40

50

【0070】

細胞周期阻害剤、腫瘍成長阻害剤、または抗真菌化合物として、好ましくは本明細書中に開示する方法により合成的に製造される式(I)の化合物を配合するために、既知の界面活性剤、賦形剤、滑化剤、懸濁剤、ならびに薬学的に許容可能な膜形成物質およびコーティング助剤等を使用してもよい。好ましくは、アルコール、エステル、硫酸化された脂肪族アルコール等を界面活性剤として使用してもよく、スクロース、グルコース、ラクトース、デンプン、結晶セルロース、マンニトール、軽質無水ケイ酸塩、アルミン酸マグネシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルシウムカルボキシメチルセルロース等を賦形剤として使用してもよく、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を滑化剤として使用してもよく、ヤシ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、ダイズ等を懸濁剤または潤滑剤として使用してもよく、セルロースもしくは糖のような炭水化物の誘導体としての酢酸フタル酸セルロース、またはポリビニルの誘導体としての酢酸メチル-メタクリル樹脂共重合体を懸濁剤として使用してもよく、フタル酸エステルのような可塑剤等を懸濁剤として使用してもよい。上述の好ましい成分のほかに、特に化合物が経口投与される場合に、甘味剤、芳香剤、着色剤、防腐剤等を、上記方法により製造される化合物の投与配合物に添加してもよい。

【0071】

上記方法により製造され得る細胞周期阻害剤、抗腫瘍剤および抗真菌剤は、約0.0001mg/kg/日~約10,000mg/kg/日の有効成分、より好ましくは約0.1mg/kg/日~約100mg/kg/日の有効成分の量で、好ましくは周期的に2日おきに1回、1日おきに1回、1日につき1回、1日につき2回、あるいはあまり好ましくはないが、1日につき2回~約10回で、ヒト患者に経口または非経口投与しても良い。あるいは、および同様に好ましくは、上記方法により製造される化合物は、例えば静脈内点滴により連続的に規定量で好ましく投与され得る。したがって、70キログラムの体重の患者に関して、活性な抗腫瘍成分の好ましい日用量は、約0.07mg/日~約700グラム/日、より好適には7mg/日~約7グラム/日である。それにもかかわらず、当業者に理解されるように、ある特定の状況では、特に進行した腫瘍または致死的な腫瘍を効果的かつ積極的に治療するために、上述の好ましい投与量範囲を超える、または場合によってははるかに超える量で、上記方法により製造される抗腫瘍化合物を投与する必要がある場合がある。

【0072】

生化学試験試薬として上記方法により製造される細胞周期阻害剤を使用する場合、本発明の方法により製造される化合物は、有機溶媒または含水有機溶媒中に溶解し、かつ様々な培養細胞系のいずれかに直接適用される場合、細胞周期の進行を阻害する。使用可能な有機溶媒としては、例えば、メタノール、メチルスルホキシド等が挙げられる。配合物は、例えば、粉末、顆粒または他の固体阻害剤、あるいは有機溶媒または含水有機溶媒を用いて製造される液体阻害剤であっても良い。細胞周期阻害剤として使用するための本発明の方法により製造される化合物の好ましい濃度は、概して約1~約100μg/mlであるが、最も適切な使用量は、当業者に理解されるように、培養細胞系のタイプおよび使用の目的に応じて様々に変化する。同様に、ある特定の用途では、上述の範囲外の量を使用することが、当業者にとって必要であるか、または好ましい場合がある。

【0073】

薬学的展望から、ある特定の実施形態は、被験体における真菌感染および/または病原性の真菌を防止または治療する方法を提供し、上記被験体に、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を含む組成物を投与すること、例えば、目的とする抗真菌効果を提供するための量と様式で、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与することを含む。

【0074】

他の実施形態は、上述のまたは以下に参照する真菌のような病原性の真菌による感染患

者の治療または防止を包含する。

【0075】

別の実施形態は、1つ以上の他の抗真菌剤、特にデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体以外の作用物質（例えば、アンホテリシンBまたはそれらの類似体もしくは誘導体（14(s)-ヒドロキシアンホテリシンBメチルエステル、1-アミノ-4-メチルピペラジンのアンホテリシンBのヒドラジド、および他の誘導体を含む）を含む）、または他のポリエンマクロライド系抗生物質（例えば、ナイスタチン、カンジシジン、ピマリシンおよびナタマイシン、フルシトシン、グリセオフルビン、エキノカンジンまたはオーレオバシジン（天然に存在する類似体および半合成類似体を含む）、デヒドロベンゾ[a]ナフタセンキノン、ヌクレオシドペプチド抗真菌物質（ポリオキシシンおよびニッコーマイシン、ナフチフィンおよび他のスクワレンエポキシダーゼ阻害剤のようなアリルアミン、ならびに例えばクロトリマゾール、ミコナゾール、ケトコナゾール、エコナゾール、ブトコナゾール、オキシコナゾール、テルコナゾール、イトラコナゾールまたはフルコナゾール等のようなアゾール、イミダゾールおよびトリアゾールを含む）に耐性である病原性の真菌による感染患者の治療または防止に関する。従来の慣例のさらなる抗真菌剤および開発中の新規作用物質に関しては、例えば、ターナーとロドリゲス（Turner and Rodriguez），1996 最新薬学デザイン（Current Pharmaceutical Design），2:209-224を参照されたい。別の実施形態は、患者が1つ以上の他の抗真菌剤にアレルギー性であるか、またはそうでなければ過敏性である、あるいは無反応である場合に、あるいは他の抗真菌剤の使用が他の場合では禁忌を示す人において、病原性の真菌による感染患者の治療または防止を包含する。これらの他の真菌剤としては、特に、上記に開示する抗真菌剤および本明細書中の他の箇所に開示する抗真菌剤が挙げられる。

10

20

【0076】

上述の治療または防止方法において、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、有効な抗真菌量で被験体に投与される。

【0077】

別の実施形態は、例えば、上述の作用物質または作用物質のタイプのいずれかを含む、1つ以上の他の抗真菌剤の投与と併用して（例えば、好ましくは脂質またはリポソーム配合物中のアンホテリシンB、フルコナゾールのようなアゾールまたはトリアゾール、例えばオーレオバシジン、ジヒドロベンゾ[a]ナフタセンキノン、あるいはエキノカルジンによる治療と組み合わせた）、ならびに異なるデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を用いて、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の投与による病原性の真菌による感染患者の治療または防止に関する。

30

【0078】

デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、他の抗真菌剤が投与される前に、後に、あるいは同時に投与しても良い。ある特定の実施形態では、併用療法により、単独で使用される場合に使用する量に対して、抗真菌剤の一方または両方を減少させた量で使用することが可能となる。

【0079】

さらに別の実施形態は、病原性の真菌による感染の治療または防止のための、被験体へのデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の投与に関し、ここで上記被験体は、例えば、遺伝病、糖尿病のような疾患、あるいはHIVまたは他の感染、癌もしくは他の疾患のための化学療法または放射線治療、あるいは組織もしくは臓器移植または自己免疫障害の治療に関連して薬剤または他のものに誘導される免疫抑制の結果として、免疫抑制されるか、または免疫無防備状態である。患者が、例えば組織または臓器移植と同時に、免疫抑制剤により治療中であるか、または治療される場合、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、免疫抑制剤（複数可）とともに同時投与しても良く、病原性の真菌感染を治療または防止し得る。

40

【0080】

本発明の別の態様は、1つ以上の抗HIV治療薬（例えば、HIVプロテアーゼ阻害剤

50

、逆転写酵素阻害剤、または抗ウイルス剤を含む)の投与と一緒に、抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の投与による、HIVに感染しているか、または感染していることが疑われる患者における病原性の真菌による感染の治療または防止である。デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、抗HIV剤(複数可)の投与前に、後に、あるいは同時に投与しても良い。

【0081】

本発明の別の態様は、好ましくは細菌感染を治療または防止するための有効量およびレジメンでの、1つ以上の抗生物質化合物、特に1つ以上の抗菌剤の投与と一緒に、抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の投与による、病原性の真菌による感染患者の治療または防止である。同様に、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、他の作用物質(複数可)の投与前に、後に、あるいは同時に投与しても良い。

10

【0082】

開示する方法により治療または防止され得る病原性の真菌感染としては、特に、アスペルギルス症(侵入性肺アスペルギルス症を含む)、プラストミセス症(中枢神経系における顕著なまたは急速進行性の感染およびプラストミセス症を含む)、カンジダ症(例えば腎臓結石、尿路閉塞、腎移植または抑制の乏しい真性糖尿病の患者における尿路の逆行性カンジダ症を含む)、コクシジオイデス真菌症(他の化学療法に十分に応答しない慢性疾患を含む)、クリプトコックス症、ヒストプラズマ症、ムコール菌症(例えば、頭蓋顔面ムコール菌症およびムコール肺炎を含む)、パラコクシジオイデス症およびスポロトリクム症が挙げられる。抗真菌量の1つ以上のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を含む組成物の投与は、真菌が1つ以上の他の抗真菌療法に耐性であるか、あるいは1つ以上の他の抗真菌療法が、例えば上述のように禁忌を示す哺乳類被験体における病原性の真菌感染を治療または防止するのに特に有用であり得ることに留意すべきである。

20

【0083】

開示する方法を実施する際に使用するための、少なくとも1つの抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を含む抗真菌薬学的組成物もまた提供される。これらの薬学的組成物は、特にそれらの抗真菌的な使用に関する使用法および情報を含む適切な添付文書と一緒に包装しても良い。第2の抗真菌剤と一緒に1つ以上のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を含む薬学的組成物もまた提供する。

【0084】

<真菌感染を治療する方法>

本明細書中に開示するある特定の実施形態は、例えば、アスペルギルス症(侵入性肺アスペルギルス症を含む)、プラストミセス症(中枢神経系における顕著なまたは急速進行性の感染およびプラストミセス症を含む)、カンジダ症(例えば腎臓結石、尿路閉塞、腎移植または抑制の乏しい真性糖尿病の患者における尿路の逆行性カンジダ症を含む)、コクシジオイデス真菌症(他の化学療法に十分に応答しない慢性疾患を含む)、クリプトコックス症、ヒストプラズマ症、ムコール菌症(例えば、頭蓋顔面ムコール菌症およびムコール肺炎を含む)、パラコクシジオイデス症およびスポロトリクム症を含む病原性の真菌感染を治療または防止する方法に関する。上記方法は、真菌感染を治療または防止するように、上述のような少なくとも1つの抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体をヒト被験体に投与することを包含しても良い。ある特定の実施形態では、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、アンホテリシンB、あるいは上述したようなイミダゾールまたはチアゾール作用物質のような1つ以上の非デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体抗真菌剤の投与と併用して投与しても良い。

30

40

【0085】

病原性の真菌感染は、例えば生物の中でも特に、カンジダ属(Candida)、白癬菌属(Trichophyton)、小孢子菌属(Microsporum)または表皮菌属(Epidermophyton)の種により引き起こされる局所性であることもあり、あるいは例えば、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)により引き起こされる粘膜性である場合もある(例えば、鰐口瘡および腔カンジダ症)。感染は、例えばカンジダ・アルビカンス(Candida albicans)、クリプトコックス

50

・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*)、コクシジオイデス属(*Coccidioides*)、パラコクシジオイデス属(*Paracoccidioides*)、ヒストプラスマ属(*Histoplasma*)またはブラストミセス属(*Blastomyces*)種により引き起こされる全身性である場合もある。感染はまた、真菌性菌腫、クロモブラストミコーシス、クリプトコックス髄膜炎またはフィコミコーシスを包含し得る。

【0086】

さらなる実施形態は、カンジダ(*Candida*)種(*C. アルビカンス*(*C. albicans*)、*C. トロピカリス*(*C. tropicalis*)、*C. ケフィア*(*C. Kefyr*)、*C. クルセイ*(*C. Krusei*)および*C. グラブラタ*(*C. glabrata*)を含む)、アスペルギルス(*Aspergillus*)種(*A. フミガーツス*(*A. fumigatus*)および*A. フラプス*(*A. Flavus*)を含む)、クリプトコックス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、ブラストミセス(*Blastomyces*)種(*ブラストミセス・デルマティティディス*(*Blastomyces dermatitidis*)を含む)、ニューモシステイス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、コクシジオイデス・イムミティス(*Coccidioides immitis*)、バシディオボールス・ラナルム(*Basidiobolus ranarum*)、コニジオボールス(*Conidiobolus*)種、ヒストプラスマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、リゾープス(*Rhizopus*)種(*R. オリザエ*(*R. oryzae*)および*R. ミクロスポールス*(*R. microsporus*)を含む)、クニングハメラ(*Cunninghamella*)種、リゾムコール(*Rhizomucor*)種、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス(*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレシェリア・ボイジイ(*Pseudallescheria boydii*)、リノスポリジウム・シーベリ(*Rhinosporidium seeberi*)、およびスポロトリクス・シェンクキイ(*Sporothrix schenckii*)からなる群から選択される病原性の真菌感染を治療または防止する方法に関する。同様に、上記方法は、不都合な免疫抑制効果を誘導することなく、真菌感染が治療または防止されるように、非免疫抑制性抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を、それを必要とする患者に投与することを包含しても良い。

10

20

【0087】

さらなる実施形態は、本明細書中の他の箇所而言及する1つ以上の抗真菌剤(例えば、アンホテリシンB、フルシトシン、イミダゾールおよびトリアゾールのうちの1つ(例えば、フルコナゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾール、および他の上述の例を含む)を含む)に耐性である病原性の真菌感染を含む、他の抗真菌療法に耐性である病原性の真菌感染を治療または防止する方法に関する。上記方法は、被験体における別の抗真菌療法に耐性である真菌感染が治療または防止されるような量と投薬レジメンで、患者に1つ以上の抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与しても良い。

30

【0088】

さらなる実施形態は、別の抗真菌療法にアレルギー性であるか、不耐性であるか、または応答性でない患者において、あるいは本明細書中の他の箇所而言及する1つ以上の他の抗真菌剤(例えば、アンホテリシンB、フルシトシン、イミダゾールおよびトリアゾールのうちの1つ(例えば、フルコナゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾール、および他の上述の例を含む)を含む)を含む他の抗真菌剤の使用が他の場合では禁忌を示す人において、病原性の真菌感染を治療または防止する方法に関する。上記方法は真菌感染が治療または防止されるような量で、かかる患者に1つ以上の抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を投与することを包含しても良い。

40

【0089】

<包装されたデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体>

ある特定の実施形態は、包装されたデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体、好ましくは包装された非免疫抑制性の抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体に関し、この用語は、ヒト被験体内で不都合な免疫抑制効果を引き起こすことなく、抗真菌剤としてデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体(複数可)を投与するための指示書とともに包装された、上述のような少なくとも1つのデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体を包含するものと意図される。幾つかの実施形態では、非免疫抑制性の抗真菌デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、上述の化合物の好ましいサブセットの1つの成

50

員である。デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体は、指示書と一緒に包装され得るか、または別のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体、ラパマイシンまたは別の成分もしくは添加剤、例えば上記薬学的組成物の成分の1つ以上とともに包装しても良い。パッケージは、上記薬学的組成物の成分の1つ以上を充填した1つ以上の容器を含有しても良い。任意に、薬学的または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する行政機関により定められた形態の注意書きをかかせる容器（複数可）に添付することができ、この注意書きは、ヒト投与に関する製造、使用または販売の機関による承認を示す。

【0090】

以下の非限定的な実施例は、ある特定の好ましい実施形態を用いて、好ましい方法を記載すると意味する。使用する特定の方法の詳細における変動および得られる正確な化学的組成物における変動は、明らかに当業者に理解されよう。

10

【実施例1】

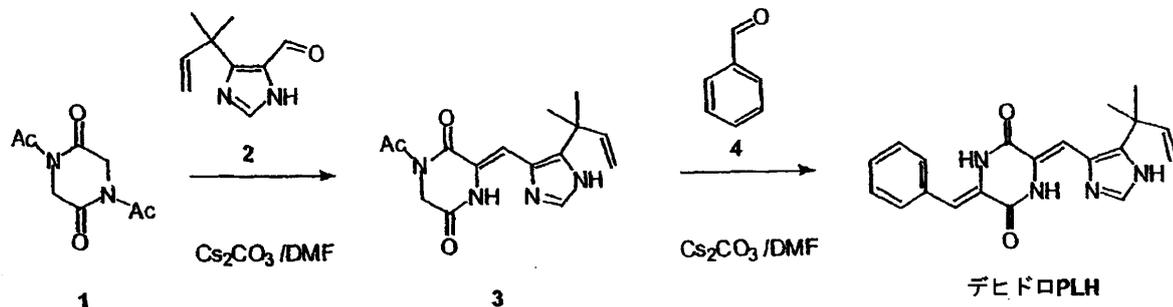
【0091】

< A . > デヒドロフェニラヒスチンの合成

図1に示すように、以下の基本的な反応スキームに従って、デヒドロフェニラヒスチンを縮合により合成した：

【0092】

【化7】



20

【0093】

N, N' - ジアセチル - 2, 5 - ピペラジンジオン

無水酢酸 (Ac_2O) 100 mL 中の完全な 2, 5 - ピペラジンジオン 1 [2, 5 - ピペラジンジオン (アルドリッチ (Aldrich) G 6 4 0 - 6)、25.0 g、0.0218 mol] 25.0 g を、酢酸ナトリウム (NaOAc) (17.96 g、0.218 mol) と混合した。Ar 雰囲気下で二重コイル状の冷却管を用いて、混合物を 110 で 8 時間加熱した。蒸発により Ac_2O を除去した後、残渣を EtOAc 中に溶解して、10% クエン酸、10% NaHCO_3 および飽和 NaCl (それぞれ 3 回) で洗浄して、 Na_2SO_4 により脱水し、真空中で濃縮した。エーテルを用いて残渣を粉砕して、固体を形成させた。この固体を、エーテル - ヘキサンを用いて EtOAc から再結晶させて、N, N' - ジアセチル - 2, 5 - ピペラジンジオン 1 26.4 g (61%) を得た。

30

【0094】

1 - アセチル - 3 - { (Z) - 1 - [5 - (1, 1 - ジメチル - 2 - プロペニル) - 1 H - 4 - イミダゾリル] メチリデン } - 2, 5 - ピペラジンジオン 2

DMF (2 mL) 中の 5 - (1, 1 - ジメチル - 2 - プロペニル) イミダゾール - 4 - カルボキサリデヒド (100 mg、0.609 mmol) の溶液に、化合物 1 (241 mg、1.22 mmol) を添加して、溶液を短期間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (198 mg、0.609 mmol) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc および 10% Na_2CO_3 の混合物中に溶解し、有機相を 10% Na_2CO_3 でもう 1 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。溶離液 CHCl_3 - MeOH (100 : 0 から 50 : 1 へ) を用いてシリカ上でカラムクロマトグラフィーにより、残存油状物質を精製し

40

50

て、淡黄色固体 260 mg (33%) を得た。

【0095】

デヒドロフェニラヒスチン

DMF (0.8 mL) 中の 2 (30 mg, 0.099 mmol) の溶液に、ベンズアルデヒド (51 μ L, 0.496 mmol, 5 当量) を添加して、溶液を短期間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 当量) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を 80 で 2.5 時間加熱した。(温度は徐々に増加しなくてはならない。迅速な加熱は、ベンジリデン部分での E 異性体の産生を増加させる)。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc 中に溶解し、水で 2 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。 CHCl_3 - MeOH (10 : 1) を用いた TLC 上で、365 nm の UV で鮮緑黄色の発光を伴うスポットを観察することができる。この粗製生成物の純度は、HPLC 分析から 75% 以上であった。得られた残渣を 90% MeOH 水中に溶解して、逆相 HPLC カラム (YMC-Pack, ODS-AM, 20 \times 250 mm) にかけて、水中の 70% MeOH から 74% MeOH への線形勾配を用いて、流速 12 mL / 分で 16 分かけて溶出させ、所望の画分を収集し、蒸発により濃縮して、黄色のデヒドロフェニラヒスチン 19.7 mg (60%) を得た。合成粗製デヒドロフェニラヒスチンの HPLC プロフィールを図 2 に表す。

10

【0096】

図 4 に示すように、デヒドロフェニラヒスチンの精製では、主要ピークは、デヒドロフェニラヒスチンの所望の Z 型化合物であった。E 異性体の形成は、微量構成成分として観察され (約 10%)、これは、Z 異性体よりも極性の高いピークとして溶出した。他の微量ピークとして、デヒドロフェニラヒスチンのジメチルアシル部分が還元された還元型の Z および E 化合物も観察された。これらの還元化合物の形成は、還元不純物を伴うアルデヒド 2 に起因し、これは、DIBAL-H による還元中に産生し、その後のプロセスで分離されなかった。

20

【0097】

これらの微量化合物は、分取用の HPLC による精製により除去することができ、純度 95% 以上で、収率 60% でベンジリデン部分にて Z 立体配置を有するデヒドロフェニラヒスチンを得ることがきる (2 工程で収率 20%)。ジケトピペラジン環のイミダゾール側鎖で E 立体配置を有する化合物は、この HPLC チャートでは観察されず、図 1 中の化合物 1 ~ 3 からの第 1 の反応は Z 選択的であることを示唆する。

30

【0098】

< B . > 化学特性 :

上記デヒドロフェニラヒスチン化合物は、淡黄色固体である。その構造は、標準的な NMR 分析により確認される。

【実施例 2】

【0099】

tBu - デヒドロフェニラヒスチン誘導体の合成および物理特性

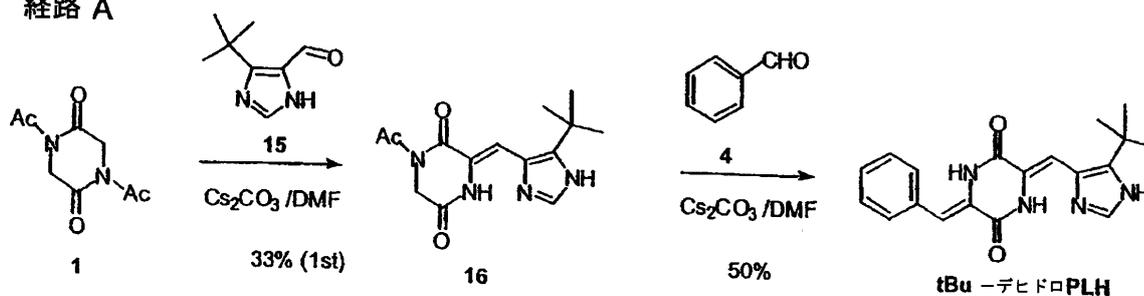
デヒドロフェニラヒスチンの構造誘導体を、以下の反応スキームに従って合成して、tBu - デヒドロフェニラヒスチンを合成した。経路 A による合成 (図 1 を参照) は、ある特定の点で、実施例 1 と同様に合成されるデヒドロフェニラヒスチンの合成に類似する。

40

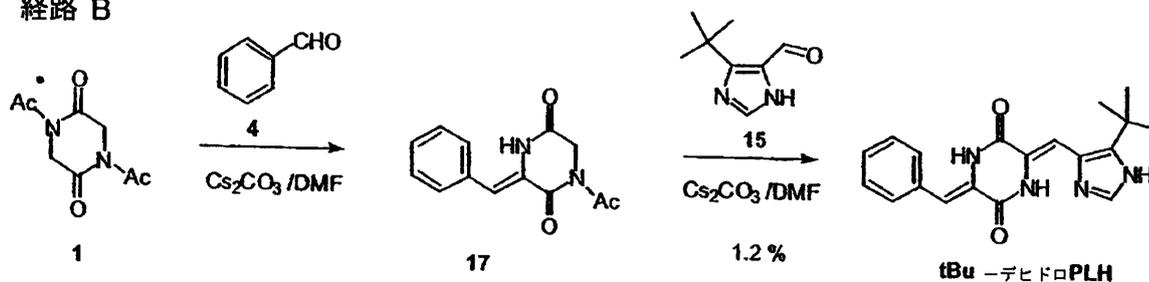
【0100】

【化8】

経路 A



経路 B



10

【0101】

経路 A :

N, N' - ジアセチル - 2, 5 - ピペラジンジオン 1 は、実施例 1 と同様に調製した。

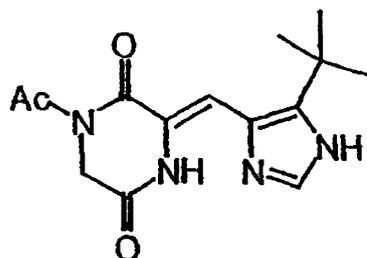
20

【0102】

1) 1 - アセチル - 3 - { (Z) - 1 - [5 - 第三ブチル - 1 H - 4 - イミダゾリル] メチリデン } - 2, 5 - ピペラジンジオン (16)

【0103】

【化9】



30

【0104】

DMF (30 mL) 中の 5 - 第三ブチルイミダゾール - 4 - カルボキサルデヒド 15 (3.02 g, 19.8 mmol) 溶液に、化合物 1 (5.89 g, 29.72 mmol) を添加して、溶液を短時間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (9.7 g, 29.72 mmol) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc および 10% Na_2CO_3 の混合物中に溶解し、有機相を 10% Na_2CO_3 でもう 1 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。溶離液 CHCl_3 - MeOH (100 : 0 から 50 : 1 へ) を用いてシリカ上でカラムクロマトグラフィーにより、残存油状物質を精製して、淡黄色固体 16 1.90 g (33%) を得た。 ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) 12.14 (d, br - s, 1H)、9.22 (br - s, 1H)、7.57 (s, 1H)、7.18 (s, 1H)、4.47 (s, 2H)、2.65 (s, 3H)、1.47 (s, 9H)。

40

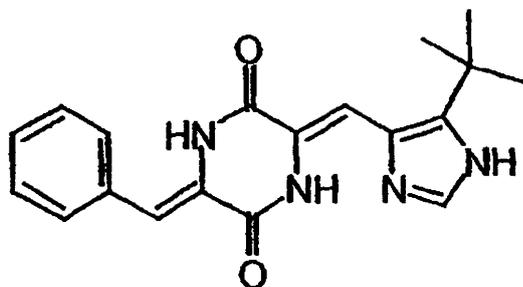
【0105】

2) t - Bu - デヒドロフェニラヒスチン

50

【0106】

【化10】



10

【0107】

DMF (1.0 mL) 中の 1 - アセチル - 3 - { (Z) - 1 - [5 - 第三ブチル - 1 H - 4 - イミダゾリル] メチリデン } - 2 , 5 - ピペラジンジオン (16) (11 mg、0.038 mmol) の溶液に、ベンズアルデヒド (19 μ L、0.19 mmol、5 当量) を添加して、溶液を短時間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (43 mg、0.132 mmol、3.5 当量) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を 80 で 2.5 時間加熱した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc 中に溶解し、水で 2 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。得られた残渣を 90% MeOH 水中に溶解して、逆相 HPLC カラム (YMC-Pack、ODS-AM、20 \times 250 mm) にかけて、水中の 70% MeOH から 74% MeOH への線形勾配を用いて、流速 1.2 mL / 分で 16 分かけて溶出させ、所望の画分を収集し、蒸発により濃縮して、黄色の第三ブチル - デヒドロフェニラヒスチン 6.4 mg (50%) を得た。 ^1H NMR (270 MHz、 CDCl_3) 1.234 (br - s、1 H)、9.18 (br - s、1 H)、8.09 (s、1 H)、7.59 (s、1 H)、7.31 ~ 7.49 (m、5 H)、7.01 (s、2 H)、1.46 (s、9 H)。

20

【0108】

tBu - デヒドロフェニラヒスチンを生じさせるためのデヒドロフェニラヒスチン反応は、実施例 1 と同一である。

30

【0109】

回収した tBu - デヒドロフェニラヒスチンの総収率は 16.5% であった。

【0110】

経路 B :

N, N' - ジアセチル - 2, 5 - ピペラジンジオン 1 は、実施例 1 と同様に調製した。

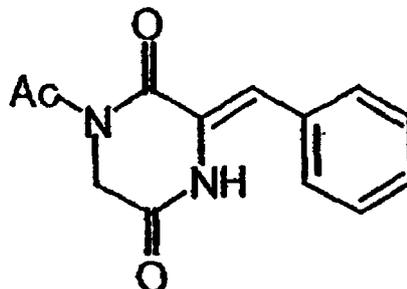
【0111】

1) 1 - アセチル - 3 - [(Z) - ベンジリデン 1] - 2, 5 - ピペラジンジオン (17)

【0112】

【化11】

40



【0113】

50

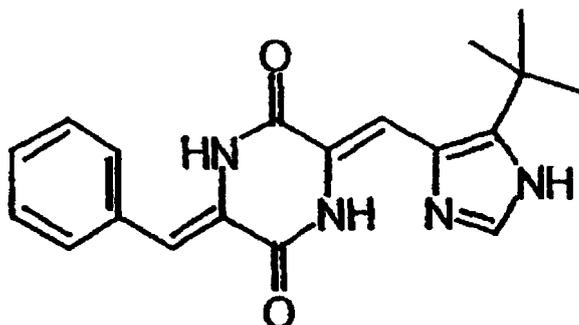
DMF (5 mL) 中のベンズアルデヒド 4 (0.54 g、5.05 mmol) 溶液に、化合物 1 (2.0 g、10.1 mmol) を添加して、溶液を短時間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (1.65 g、5.05 mmol) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を室温で 3.5 時間攪拌した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc および 10% Na_2CO_3 の混合物中に溶解し、有機相を 10% Na_2CO_3 でもう 1 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。残存固体を、MeOH - エーテルから再結晶させて、17 の灰色がかった白色固体を得た：収量 1.95 g (79%)。

【0114】

2) t-Bu - デヒドロフェニラヒスチン

【0115】

【化12】



【0116】

DMF (1.0 mL) 中の 1 - アセチル - 3 - [(Z) - ベンジリデン 1] - 2, 5 - ピペラジンジオン (17) (48 mg、0.197 mmol) の溶液に、5 - 第三ブチルイミダゾール - 4 - カルボキサリド 15 (30 mg、0.197 mmol) を添加して、溶液を短時間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて Cs_2CO_3 (96 mg、0.296 mmol) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を 80 で 14 時間加熱した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc 中に溶解し、水で 2 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。得られた残渣を 90% MeOH 水中に溶解して、逆相 HPLC カラム (YMC-Pack、ODS - AM、20 x 250 mm) にかけて、水中の 70% MeOH から 74% MeOH への線形勾配を用いて、流速 12 mL / 分で 16 分かけて溶出させ、所望の画分を収集し、蒸発により濃縮して、黄色の t - ブチル - デヒドロフェニラヒスチン 0.8 mg (1.2%) を得た。

【0117】

回収した t Bu - デヒドロフェニラヒスチンの総収率は 0.9% であった。

【0118】

経路 A および経路 B からの合成粗製 t Bu - デヒドロフェニラヒスチンの HPLC プロフィールを図 4 に示す。

【0119】

2 つの他の t Bu - デヒドロフェニラヒスチン誘導体を経路 A の方法に従って合成した。さらなる t Bu - デヒドロフェニラヒスチン誘導体の合成では、ベンズアルデヒド化合物 4 に対する修飾を行った。

【0120】

図 4 は、実施例 1 の合成デヒドロフェニラヒスチン (図 2) と上述に例示した経路 A により製造される t Bu - デヒドロフェニラヒスチン化合物の HPLC プロフィール (カラム：YMC-Pack ODS - AM (20 x 250 mm)、勾配：20 分間でメタノール - 水系で 65% から 75% へ、続いて 100% メタノール系で 10 分、流速：12 mL / 分、O

10

20

30

40

50

. D . 2 3 0 n m) の類似性を示す。

【 0 1 2 1 】

アルデヒドの導入順序は、収率に関係があり、したがって、合成の局面である。デヒドロフェニラヒスチンの類似体を、対照またはモデルとして合成し、ここでは、イミダゾール環の5位で、ジメチルアリル基を、類似の立体障害を有する t - ブチル基に変更させた。

【 0 1 2 2 】

「経路 A」を用いたこの「第三ブチル (t B u) - デヒドロフェニラヒスチン」の合成は、上述に示す通りであった。特に、アルデヒドの導入順序は、正確にデヒドロフェニラヒスチン合成に追従し、 t B u - デヒドロフェニラヒスチン 1 6 . 5 % の総収率を示した。この収率は、デヒドロフェニラヒスチンの収率 (2 0 %) に類似していた。アルデヒドの導入順序が、デヒドロフェニラヒスチン合成に関して「経路 A」と逆の順序である「経路 B」を使用すると、総収率 0 . 9 % でほんの微量の所望の t B u - デヒドロ P L H が得られたが、第 1 のベンズアルデヒド 4 の導入では、収率 7 6 % の中間体化合物 1 7 が得られた。この結果は、イミダゾール環における隣接する 5 位上に四級炭素原子を有する置換基を有する非常に嵩高いイミダゾール - 4 - カルボキサリド 1 5 を、中間体化合物 1 7 に導入することは困難であり得ることを示し、アルデヒドの導入に関する順序が、本明細書中に開示する合成を用いて、高収率のデヒドロフェニラヒスチンまたはデヒドロフェニラヒスチンの類似体を得るためには重要な局面であることを示唆した。

10

【 0 1 2 3 】

図 4 に示すように、最終粗製生成物の H P L C 分析から、経路 A の粗製試料中では、非常に高含有量の t B u - デヒドロフェニラヒスチンおよび少量の副生成物の形成が観察された (左) 。しかしながら、経路 B を用いて得られた試料では、比較的少量の所望の t B u - デヒドロフェニラヒスチンおよび幾つか他の副生成物が観察された (右) 。

20

【 実施例 3 】

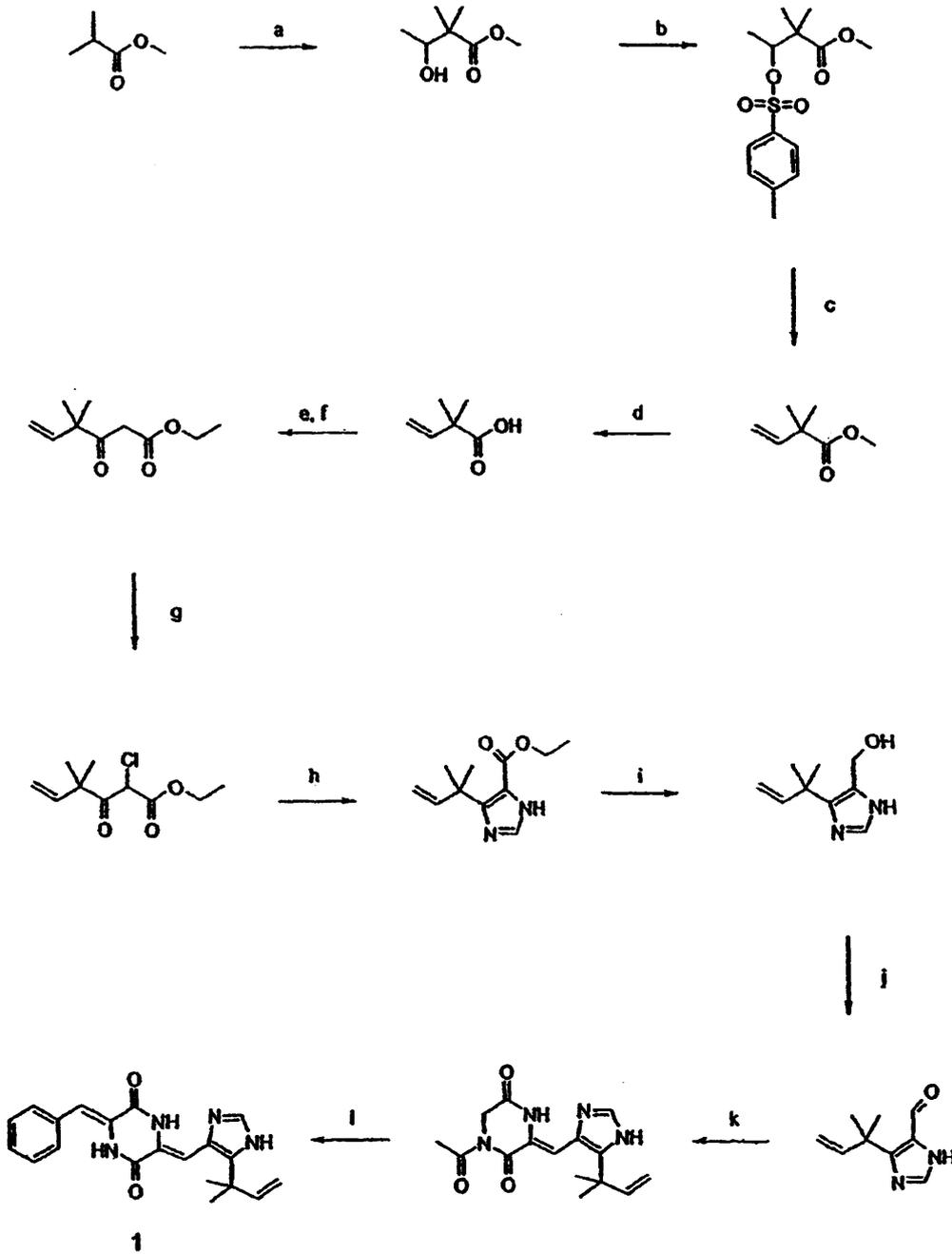
【 0 1 2 4 】

デヒドロフェニラヒスチンおよび類似体の代替的でより大量のスケールでの合成
3 - Z - ベンジリデン - 6 - [5 " - (1 , 1 - ジメチルアリル) - 1 H - イミダゾール - 4 " - Z - イルメチレン] - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン [デヒドロフェニラヒスチン] (1) の合成

30

【 0 1 2 5 】

【化 1 3】



10

20

30

40

【0126】

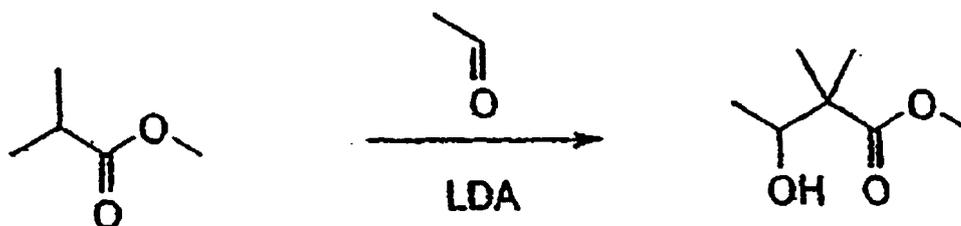
試薬：a) LDA、 CH_3CHO 、b) Tos-Cl、ピリジン、c) DBU、d) NaOH、e) $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ 、f) $\text{KOOCCH}_2\text{COOEt}$ 、BuLi、g) SO_2Cl_2 、h) H_2NCHO 、 H_2O 、i) LiAlH_4 、j) MnO_2 、k) 1,4-ジアセチル-ピペラジン-2,5-ジオン、 Cs_2CO_3 、l) ベンズアルデヒド、 Cs_2CO_3

【0127】

3-ヒドロキシ-2,2-ジメチル-酪酸メチルエステル

【0128】

【化14】



【0129】

ヘプタン/THF/エチルベンゼン中のLDA(2M、196ml、0.39mol)の溶液を、アルゴン下で-60℃にて、THF(270ml)中のイソ酪酸メチル(45ml、0.39mol)の溶液に添加して、得られた混合物を30分間攪拌した。-60℃に予冷したTHF(45ml)中のアセトアルデヒド(27ml、0.48mol)の溶液を徐々に添加して、得られた溶液をさらに30分間攪拌した。飽和塩化アンモニウム(50ml)を添加して、溶液を室温に加温した。反応混合物を酢酸エチルで抽出して、抽出物をHCl(2M)、炭酸水素ナトリウム、続いて食塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムにより脱水し、濾過した後、蒸発させて、透明な油状物質(52.6g)を得た。蒸留76~82℃/30mmHgにより、純粋な3-ヒドロキシ-2,2-ジメチル酪酸メチルエステル(42.3g、74%)が得られた。(バーク等(Burk et al.), J. Am. Chem. Soc., 117:4423-4424(1995))。

10

20

【0130】

^1H NMR(400 MHz、 CDCl_3) 1.15(d、 $J=6.2$ Hz、3H); 1.17(s、6H); 2.66(d、 $J=6.2$ Hz、1H、-OH); 3.71(s、3H、-OMe); 3.87(app quintet、 $J=6.4$ Hz、1H、H3)。

【0131】

2,2-ジメチル-3-(トルエン-4-スルホニルオキシ)-酪酸メチルエステル

【0132】

【化15】



30

40

【0133】

ピリジン(100ml)中の3-ヒドロキシ-2,2-ジメチル酪酸メチルエステル(52.0g、0.36mol)の冷却(0℃)溶液に、塩化p-トルエンスルホニル(69.0g、0.36mol)を徐々に添加した。混合物を室温に加温して、60時間攪拌した。反応を再び氷中で冷却して、HCl(2M)を添加することにより酸性化した。得られた溶液を酢酸エチルで抽出して、抽出物をHCl、続いて食塩水で洗浄して、脱水し、蒸発させて、油状物質を得て、これは、静置すると白色沈殿物を形成した。この混合物を最小限量の酢酸エチル中に溶解し、続いて軽油を添加して、白色沈殿物を得て、これを収集して、さらなる量の軽油で洗浄した。濾液をある程度に蒸発させて、結晶の第2の

50

産物を収集し、第1の産物に加えて、2, 2-ジメチル-3-(トルエン-4-スルホニルオキシ)-酪酸メチルエステル(81.2 g、76%)を得た。

【0134】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.12 (s, 3H); 1.13 (s, 3H); 1.24 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H); 2.45 (s, 3H, -PhMe); 3.58 (s, 3H, -OMe); 4.94 (カルテット (quartet), $J = 6.4$ Hz, 1H, H3), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)。

【0135】

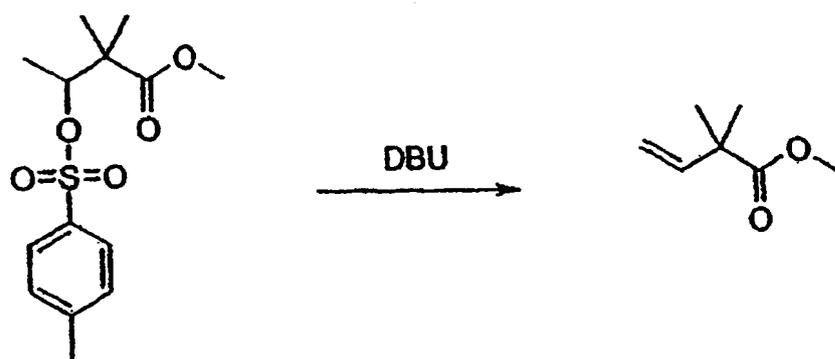
最終濾液の蒸発により、さらなる粗製2, 2-ジメチル-3-(トルエン-4-スルホニルオキシ)-酪酸メチルエステル(19.0 g、18%)が得られた。

【0136】

2, 2-ジメチル-ブタ (but) - 3 - エノン酸メチルエステル

【0137】

【化16】



20

【0138】

DBU (15 ml) 中の2, 2-ジメチル-3-(トルエン-4-スルホニルオキシ)-酪酸メチルエステル(18.06 g、0.06 mol)の溶液を140~160 で3.5時間加熱した。混合物を室温に冷却した後、エーテルで希釈した。混合物をHCl (1 M)、炭酸水素ナトリウム、続いて食塩水で洗浄した。エーテル層を脱水し、ある程度に蒸発させて、2, 2-ジメチル-ブタ-3-エノン酸メチルエステルの濃縮溶液(10 g)を得た。(サヴとカトツエネレンボーゲン (Savu and Katzenellenbogen), J. Org. Chem, 46:239-250 (1981))。生成物の揮発性 (bp 102) により、さらなる蒸発は回避した。(ツアコナス等 (Tsaconas et al.), Aust. J. Chem., 53:435-437 (2000))。

30

【0139】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.31 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 5.06 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H, -CH=CH₂); 5.11 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, -CH=CH₂); 6.03 (dd, $J = 17.1, 10.7$ Hz, 1H, -CH=CH₂)。

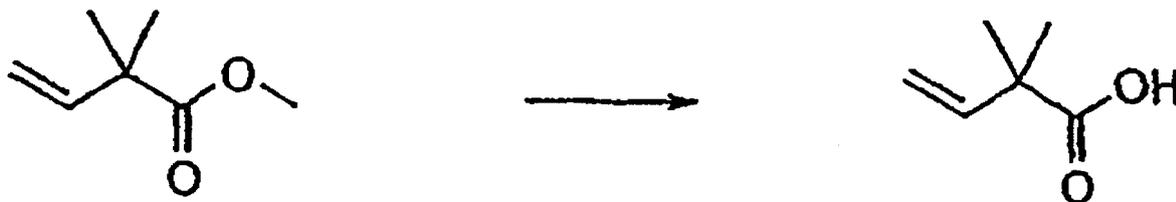
40

【0140】

2, 2-ジメチル-ブタ (but) - 3 - エノン酸

【0141】

【化17】



【0142】

上述の2,2-ジメチル-ブタ-3-エノン酸メチルエステルのエーテル溶液(10g)をエタノール(25ml)で希釈して、水酸化ナトリウム(4M、22ml)を添加して、混合物を一晩攪拌した。溶液をある程度に蒸発させて、エタノールを除去し、得られた混合物をHCl(1M、100ml)に添加した。生成物を酢酸エチルで抽出して、抽出物を脱水し、蒸発させて、2,2-ジメチル-ブタ-3-エノン酸(6.01g、88% 2工程)を得た。(ハヤシ等(Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。 10

【0143】

^1H NMR(400 MHz、 CDCl_3) 1.33(s、6H); 5.11(d、 $J=10.8$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.15(d、 $J=17.2$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.05(dd、 $J=17.2、10.8$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。 20

【0144】

マロン酸水素モノエチル(ウィーレンガとスクルニク(Wierenga and Skulnick), 「マロン酸モノエチルからの脂肪族および芳香族 ケトエステル: 2-ブチリル酢酸エチル("Aliphatic and Aromatic α -keto Esters from Monoethyl Malonate: Ethyl 2-butyrylacetate")」, 有機合成(Organic Syntheses) Collective Volume 7, 213)。

【0145】

【化18】



30

【0146】

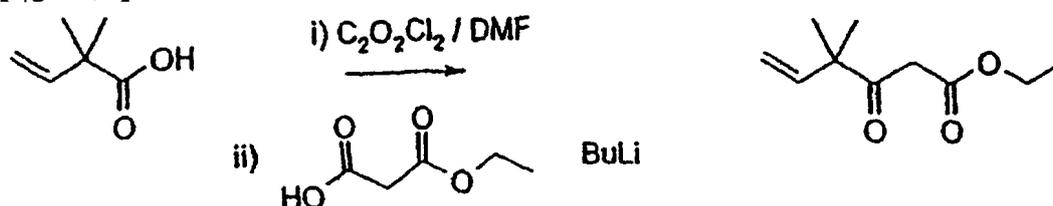
マロン酸カリウムエチル(25.0g、0.15mol)を水(15.6ml)中に懸濁させて、氷浴中で冷却した。濃HCl(12.5ml)を30分かけて滴下した後、混合物をさらに10分間攪拌した。沈殿物を濾過した後、エーテルで2度洗浄した。濾液を分離して、水相をエーテルで抽出した。合わせたエーテル溶液を脱水し(MgSO_4)、蒸発させて、マロン酸水素モノエチル(19.2g、99%)を油状物質として得て、これを使用前に一晩真空下で(または50 / 1mmで1時間)脱水した。 40

【0147】

4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ(hex)-5-エノン酸エチルエステル

【0148】

【化19】



50

【0149】

塩化オキサリル(3.83 ml、43.9 mmol)を、無水ジクロロメタン(25 ml)中の2,2-ジメチル-ブタ-3-エノン酸(5.0 g、43.9 mmol)およびDMF(1滴)の冷却(0)溶液に滴下した。混合物を0で1時間、続いて室温で16時間攪拌した。分別蒸留(121 / 760 mmHg)により、塩化2,2-ジメチル-ブタ(but)-3-エノイル(4.1 g、71%)が得られた。

【0150】

マロン酸水素モノエチル(7.2 g、0.05 mol)およびピピリジル(数ミリグラム)をTHF(90 ml)中に溶解し、系に窒素を流し込んだ。溶液を-70に冷却した後、BuLi(ヘキサン中2.5 M、37 ml、0.09 mol)を添加した。わずか~10 mlのBuLiを添加した後、溶液はピンク色になり、磁気攪拌を可能にするのにさらなるTHF(15 ml)を必要とした。冷却浴を取り外して、残りのBuLiを添加して、温度を-10に到達させ、この時点で、溶液は無色となった。混合物を再び-60に冷却して、THF(12 ml)中の塩化2,2-ジメチル-ブタ-3-エノイル(4.1 g、0.03 mol)の溶液を滴下した。添加が完了した後、混合物を0に加熱して、3時間攪拌し、続いてそれをエーテル/1 M HClの1:1の混合物(260 ml)に0で添加し、さらに1.5時間攪拌した。有機層を取り出し、HCl(1 M)、炭酸水素ナトリウム溶液、食塩水で洗浄した後、脱水し、蒸発させて、4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ(hex)-5-エノン酸エチルエステル(5.6 g、98%)を得た。(ハヤシ等(Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。クーゲルローアオープンを用いた蒸留(160 / 1 mmHg)により、純粋な物質が得られた。

【0151】

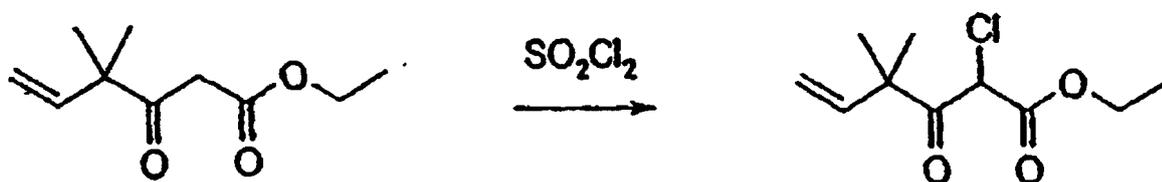
^1H NMR(400 MHz、 CDCl_3) 1.26(s、6H); 1.27(t、 $J=6.9$ Hz、3H、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3.51(s、2H); 4.18(q、 $J=6.9$ Hz、2H、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5.20(d、 $J=17.7$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.21(d、 $J=9.6$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.89(dd、 $J=17.7、9.6$ Hz、1H、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。

【0152】

2-クロロ-4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ-5-エノン酸エチルエステル

【0153】

【化20】



【0154】

塩化スルフリル(0.84 ml、10.4 mmol)を、クロロホルム(7 ml)中の4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ-5-エノン酸エチルエステル(1.83 g、9.93 mmol)の冷却(0)溶液に添加した。得られた混合物を室温に加熱して、30分間攪拌し、その後、それを還流下で2時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物をクロロホルムで希釈して、続いて炭酸水素ナトリウム、水、続いて食塩水で洗浄した。有機相を脱水し、蒸発させて、2-クロロ-4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ-5-エノン酸エチルエステル(2.01 g、93%)を褐色油状物質として得た。(ハヤシ等(Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。

【0155】

^1H NMR(400 MHz、 CDCl_3) 1.28(t、 $J=7.0$ Hz、3H、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.33(s、3H); 1.34(s、3H); 4.24(q、 $J=7.0$ Hz、2H、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5.19(s、1H); 5.28(d、 $J=16.$

9 Hz、1 H、-CH=CH₂) ; 5.29 (d、J = 10.9 Hz、1 H、-CH=CH₂) ; 5.96 (dd、J = 16.9、10.9 Hz、1 H、-CH=CH₂)。

【0156】

LC/MS t_R = 8.45 (219.3 [M(CI³⁷) + H]⁺) 分。

【0157】

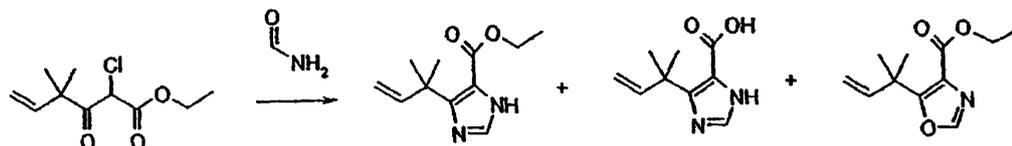
この物質は、さらに精製せずに反応させた。

【0158】

5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボン酸エチルエステル

【0159】

【化21】



【0160】

ホルムアミド (36.8 ml) 中の 2-クロロ-4,4-ジメチル-3-オキソ-ヘキサ-5-エノン酸エチルエステル (19.4 g、0.09 mol) および水 (1.94 ml、0.11 mol) の懸濁液を少しの間振とうした後、15 × 18 ml のバイアルに分配した。バイアルを密封して、150 で 5 時間加熱した。室温に冷却した後、バイアルの内容物を合わせて、クロロホルムで完全に抽出した。抽出物を脱水し、蒸発させて、濃縮ホルムアミド溶液 (14.7 g) を得た。これを、クロロホルムに 1% MeOH / 1% Et₃N が含まれるシリカカラム (直径 7 cm、高さ 11 cm) に添加した。この混合液を 2 L、続く 2% MeOH / 1% Et₃N を含むクロロホルム 2 L によるカラムの溶出により、初期の画分中に、5-(1,1-ジメチル-アリル)-オキサゾール-4-カルボン酸エチルエステルであると思われる化合物 (1.23 g、7%) が得られた。

【0161】

HPLC (214 nm) t_R = 8.68 (50.4%) 分。

【0162】

¹H NMR (400 MHz、CDCl₃) 1.40 (t、J = 7.2 Hz、3 H、-CH₂CH₃) ; 1.54 (s、6 H) ; 4.38 (t、J = 7.2 Hz、2 H、-CH₂CH₃) ; 5.03 (d、J = 17.4 Hz、1 H、-CH=CH₂) ; 5.02 (d、J = 10.4 Hz、1 H、-CH=CH₂) ; 6.26 (dd、J = 17.4、10.4 Hz、1 H、-CH=CH₂)、7.83 (s、1 H)。

【0163】

LC/MS t_R = 8.00 (210.1 [M+H]⁺、361.1 [2M+H]⁺) 分。

【0164】

所望の 5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボン酸エチルエステルは、より後方の分画から回収された (3.13 g、17%)。(ハヤシ等 (Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。

【0165】

HPLC (214 nm) t_R = 5.52 (96.0%) 分。

【0166】

¹H NMR (400 MHz、CDCl₃) 1.38 (t、J = 7.0 Hz、3 H) ; 1.57 (s、6 H) ; 4.35 (q、J = 7.0 Hz、2 H) ; 5.04 - 5.14 (m、2 H、-CH=CH₂) ; 6.28 (dd、J = 18.0、10.4 Hz、1 H、-CH=CH₂) ; 7.52 (s、1 H)。

【0167】

10

20

30

40

50

LC/MS $t_R = 5.30$ ($209.1 [M+H]^+$ 、 $417.2 [2M+H]^+$) 分

【0168】

さらなる5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボン酸エチルエステルもカラムから回収され(3.59 g、19%)、それはより純度が低い、さらなる反応には依然として十分であった。

【0169】

5% MeOH / 1% Et₃Nを含むクロロホルムによるカラムのさらなる溶出により類似の反応(より小スケール)から単離された別の副生成物は、5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボン酸であると思われる化合物であった(0.27 g、9%)。 10

【0170】

HPLC (245 nm) $t_R = 5.14$ (68.9%) 分。

【0171】

¹H NMR (400 MHz、CD₃OD) 1.45 (s、6H); 4.97 (d、J = 10.6 Hz、1H、-CH=CH₂); 5.01 (d、J = 17.7 Hz、1H、-CH=CH₂); 6.28 (dd、J = 17.7、10.6 Hz、1H、-CH=CH₂)、7.68 (s、1H)。

【0172】

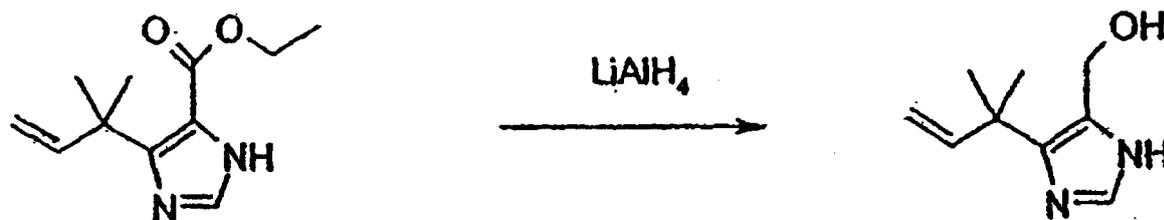
LCMS $t_R = 4.72$ ($181.0 [M+H]^+$ 、 $361.1 [2M+H]^+$) 分。 20

【0173】

[5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-イル(yI)]-メタノール

【0174】

【化22】



30

【0175】

THF (60 ml) 中の5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボン酸エチルエステル(3.13 g、15.0 mmol)の溶液を、THF (40 ml) 中の水素化リチウムアルミニウムの懸濁液(95%懸濁液、1.00 g、25.0 mmol)に滴下して、混合物を室温で4時間攪拌した。ガスの発生が終わるまで、水を添加し、混合物を10分間攪拌した後、焼結漏斗に通して濾過した。沈殿物をTHFで、続いてメタノールで洗浄し、濾液および洗浄液を合わせて、蒸発させた後、凍結乾燥させて、[5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-イル]-メタノール(2.56 g、102%)を得た。残留水は、さらなる反応の前に、クロロホルムで共沸させることにより除去した。(ハヤシ等(Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。 40

【0176】

HPLC (240 nm) $t_R = 3.94$ (56.8%) 分。

【0177】

¹H NMR (400 MHz、CD₃OD) 1.43 (s、6H); 4.57 (s、2H); 5.01 (d、J = 10.5 Hz、1H、-CH=CH₂); 5.03 (d、J = 17.7 Hz、1H、-CH=CH₂); 6.10 (dd、J = 17.7、10. 50

5 Hz、1 H、-CH=CH₂）、7.46 (s、1 H)。

【0178】

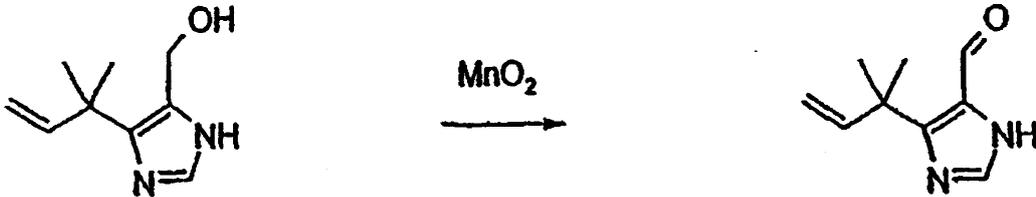
LC/MS t_R = 3.77 (167.3 [M+H]⁺) 分。

【0179】

5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボアルデヒド

【0180】

【化23】



10

【0181】

二酸化マンガン (20 g、0.23 mol) を、アセトン (300 ml) 中の [5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-イル]-メタノール (2.56 g、0.02 mol) の溶液に添加して、得られた混合物を室温で5時間攪拌した。混合物を濾紙に通して濾過して、残渣をアセトンで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせて、蒸発させて、5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボアルデヒド (1.82 g、51%) を得た。(ハヤシ等 (Hayashi et al.), J. Org. Chem., 65:8402-8405 (2000))。

20

【0182】

HPLC (240 nm) t_R = 4.08 (91.5%) 分。

【0183】

¹H NMR (400 MHz、CDCl₃) 1.56 (s、6 H)；5.16 (d、J = 10.6 Hz、1 H、-CH=CH₂)；5.19 (d、J = 17.3 Hz、1 H、CH=CH₂)；6.22 (dd、J = 17.3、10.6 Hz、1 H、-CH=CH₂)、7.75 (s、1 H)；10.02 (s、1 H、HCO)。

【0184】

LC/MS t_R = 3.75 (165.2 [M+H]⁺) 分。

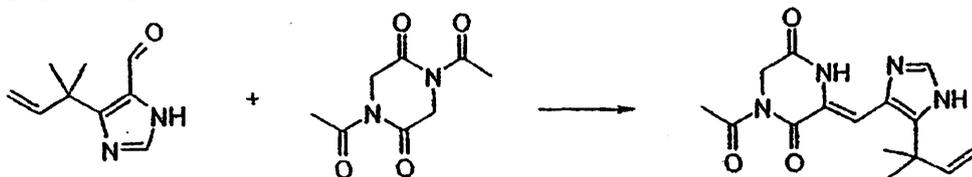
30

【0185】

1-アセチル-3-[5'-(1,1-ジメチル-アリル)-1H-イミダゾール-4'-Z-イルメチレン (ylmethylene)]-ピペラジン-2,5-ジオン

【0186】

【化24】



40

【0187】

DMF (35 ml) 中の 5-(1,1-ジメチル-アリル)-3H-イミダゾール-4-カルボアルデヒド (1.78 g、0.01 mol) の溶液に、1,4-ジアセチル-ピペラジン-2,5-ジオン (8.59 g、0.04 mol) を添加して、混合物を排気させた後、アルゴンを流し込んだ。排気-流し込みのプロセスをさらに2回繰り返した後、炭酸セシウム (3.53 g、0.01 mol) を添加した。排気-流し込みのプロセスをさらに3回繰り返した後、得られた混合物を45℃で5時間加熱した。少量となるまで、反応混合物をある程度に蒸発させて (高真空下で加熱)、得られた溶液を氷水 (50 ml) に滴下した。黄色の沈殿物を収集し、水で洗浄した後、凍結乾燥させて、1-アセチル-3-[5'-(1,1-ジメチル-アリル)-1H-イミダゾール-4'-Z-イルメ

50

チレン(ylmethylene)] - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン (1 . 1 8 g , 3 6 %) を得た。(ハヤシ (Hayashi) , 私信 (2001)) 。

【 0 1 8 8 】

H P L C (2 1 4 n m) $t_R = 6 . 0 1 (7 2 . 6 \%)$ 分。

【 0 1 8 9 】

^1H N M R (4 0 0 M H z , C D C l ₃) 1 . 5 3 (s , 6 H) ; 2 . 6 4 (s , 3 H) ; 4 . 4 7 (s , 2 H) ; 5 . 1 9 (d , J = 1 7 . 3 H z , 1 H , - C H = C H ₂) ; 5 . 2 3 (d , J = 1 0 . 7 H z , 1 H , - C H = C H ₂) ; 6 . 0 6 (d d , J = 1 7 . 3 , 1 0 . 7 H z , 1 H , - C H = C H ₂) , 7 . 1 6 (s , 1 H) , 7 . 5 9 (s , 1 H) , 9 . 4 7 (b s , 1 H) ; 1 2 . 1 1 (b s , 1 H) [1 , 4 - ジアセチル - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン混入汚染物 2 . 5 9 (s , 6 H) ; 4 . 6 0 (s , 4 H) が ~ 2 % 観察された。]

【 0 1 9 0 】

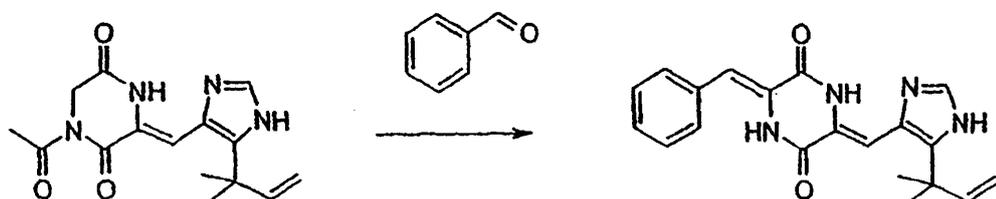
L C / M S $t_R = 6 . 6 5 (3 0 3 . 3 [M + H]^+ , 6 0 5 . 5 [2 M + H]^+)$ 分。(異なる系を使用することに注意)。

【 0 1 9 1 】

3 - Z - ベンジリデン - 6 - [5 " - (1 , 1 - ジメチルアリル) - 1 H - イミダゾール - 4 " - Z - イルメチレン(ylmethylene)] - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン

【 0 1 9 2 】

【 化 2 5 】



【 0 1 9 3 】

D M F (7 0 m l) 中の 1 - アセチル - 3 - [5 ' - (1 , 1 - ジメチル - アリル) - 1 H - イミダゾール - 4 ' - イルメチレン(ylmethylene)] - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン (2 . 9 1 g , 9 . 6 2 m m o l) の溶液に、ベンズアルデヒド (4 . 8 9 m l , 4 8 . 1 m m o l) を添加して、溶液を排気させて、アルゴンを流し込んだ。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 2 回繰り返した後、炭酸セシウム (4 . 7 0 g , 1 4 . 4 m o l) を添加した。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 3 回繰り返した後、得られた混合物を以下に示すような温度勾配下で加熱した。

【 0 1 9 4 】

総時間 5 時間後に、反応を室温に冷却して、混合物を氷冷水 (5 0 0 m l) に添加した。沈殿物を収集し、水 (3 0 0 m l) で洗浄した後、凍結乾燥させて、黄色の固体 (2 . 8 0 g) を得た。この物質をクロロホルム (2 5 0 m l) 中に溶解して、濾紙に通して濾過して、共沸させて、残存水を蒸発させた。残留黄色沈殿物 (2 . 7 0 g , H P L C (2 1 4 n m) $t_R = 7 . 2 6 (9 3 . 6 \%)$ 分) をクロロホルム (2 0 m l) 中にある程度溶解させて、懸濁液を 5 分間超音波処理した後、固体を収集して、風乾させて、3 - Z - ベンジリデン - 6 - [5 " - (1 , 1 - ジメチルアリル) - 1 H - イミダゾール - 4 " - Z - イルメチレン] - ピペラジン - 2 , 5 - ジオン (1 . 8 2 g , 5 4 %) を得た。(ハヤシ (Hayashi) , 私信 (2001)) 。 m . p . 2 3 9 ~ 2 4 0 (d e c .) 。

【 0 1 9 5 】

H P L C (2 1 4 n m) $t_R = 6 . 8 0 (1 . 9 2)$ 分、 7 . 3 3 (9 5 . 0 1 %) 。

【 0 1 9 6 】

^1H N M R (4 0 0 M H z , C D C l ₃) 1 . 5 3 (s , 6 H) ; 5 . 1 8 (d , J = 1 7 . 6 H z , 1 H , - C H = C H ₂) ; 5 . 2 1 (d , J = 1 1 . 0 H z , 1 H , - C H = C H ₂) ; 6 . 0 6 (d d , J = 1 7 . 6 , 1 1 . 0 H z , 1 H , -

CH=CH₂), 6.99 (s, 1H, -C-C=CH); 7.00 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30-7.50 (m, 5 x ArH), 7.60 (s, H²"); 8.07 (bs, NH); 9.31 (bs, NH); 12.30 (bs, NH)。

【0197】

LC/MS t_R = 6.22 (349.3 [M+H]⁺, E異性体), 6.73 (349.5 [M+H]⁺, 697.4 [2M+H]⁺, Z異性体)分。

【0198】

ESMS m/z 349.5 [M+H]⁺, 390.3 [M+CH₄CN]⁺。

【0199】

クロロホルム溶液の蒸発により、さらなる3-Z-ベンジリデン-6-[5"- (1, 1-ジメチルアリル)-1H-イミダゾール-4"-Z-イルメチレン]-ピペラジン-2,5-ジオン(0.76g, 29%)が得られた。 10

【0200】

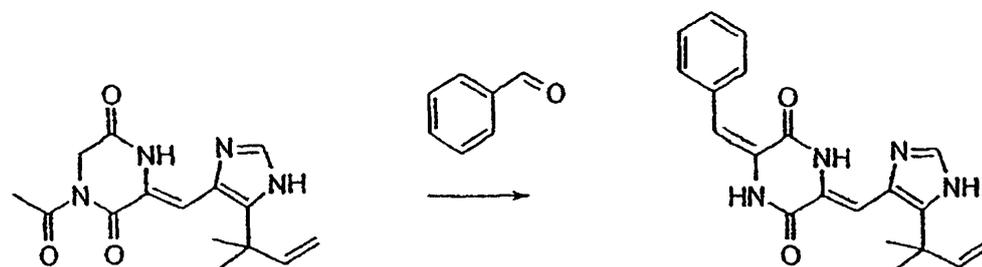
HPLC (214nm) t_R = 7.29 (84.5%)分。

【0201】

3-E-ベンジリデン-6-[5"- (1, 1-ジメチルアリル)-1H-イミダゾール-4"-Z-イルメチレン]-ピペラジン-2,5-ジオン

【0202】

【化26】



20

【0203】

上述のように合成される物質の粗製試料の分取用HPLCによる精製により、幾何異性体3-E-ベンジリデン-6-[5"- (1, 1-ジメチルアリル)-1H-イミダゾール-4"-Z-イルメチレン]-ピペラジン-2,5-ジオン(1.7mg)が得られた。 30

【0204】

HPLC (214nm) t_R = 6.75 (87.79)分。

【0205】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 1.52 (s, 6H); 5.19 (d, J = 20.8 Hz, 1H, CH=CH₂); 5.22 (d, J = 14.0 Hz, 1H, CH=CH₂); 6.05 (dd, J = 18.0, 10.4 Hz, 1H, CH=CH₂); 6.33 (s, 1H, C-C=CH); 6.90-7.65 (m, 7H)。

【0206】

ESMS m/z 349.5 [M+H]⁺, 390.4 [M+CH₄CN]⁺。

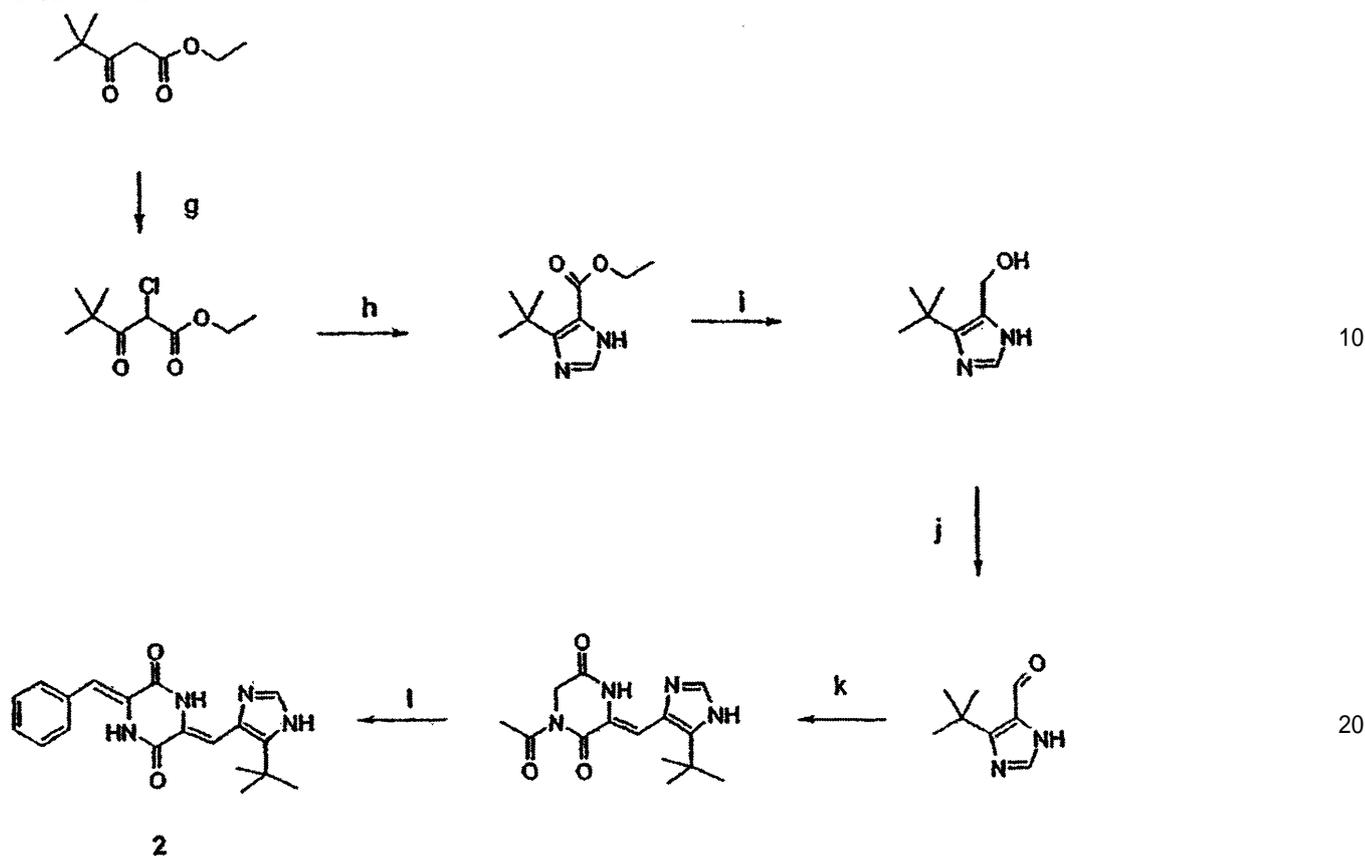
40

【0207】

3-Z-ベンジリデン-6-(5"-第三ブチル-1H-イミダゾール-4"-Z-イルメチレン)-ピペラジン-2,5-ジオン(2)の合成

【0208】

【化 27】



【0209】

試薬：g) SO_2Cl_2 、h) H_2NCHO 、 H_2O 、i) LiAlH_4 、j) MnO_2 、k) 1, 4 - ジアセチル - ピペラジン - 2, 5 - ジオン、 Cs_2CO_3 、l) ベンズアルデヒド、 Cs_2CO_3

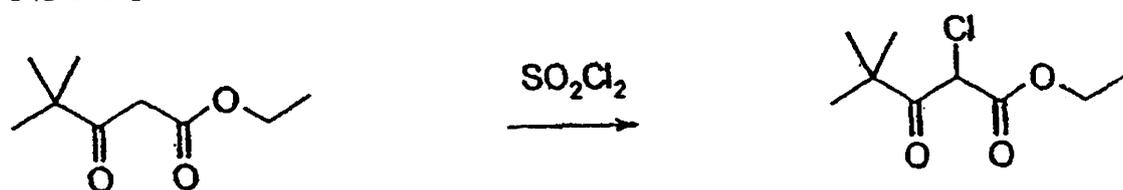
【0210】

2 - クロロ - 4, 4 - ジメチル - 3 - オキソ - ペンタン酸エチルエステル

30

【0211】

【化 28】



【0212】

塩化スルフリル (14.0 ml、0.17 mol) を、クロロホルム (100 ml) 中のピバロイル酢酸エチル (27.17 g、0.16 mol) の冷却 (0) 溶液に添加した。得られた混合物を室温に加温して、30 分間攪拌し、その後、それを還流下で 2.5 時間加熱した。室温に冷却した後、反応混合物をクロロホルムで希釈して、続いて炭酸水素ナトリウム、水、続いて食塩水で洗浄した。

40

【0213】

有機相を脱水し、蒸発させて、2 - クロロ - 4, 4 - ジメチル - 3 - オキソ - ペンタン酸エチルエステル (33.1 g、102%) を無色油状物質として得た。(デュラント等 (Durant et al.), 「アミノアルキルイミダゾールおよびそれらの製造プロセス」 ("Ami noalkylimidazoles and Process for their Production")、特許番号 GB 1341375 号 (英国、1973年))。

50

【0214】

HPLC (214 nm) $t_R = 8.80$ (92.9%) 分。

【0215】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.27 (s, 9H); 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); 4.27 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H); 5.22 (s, 1H)。

【0216】

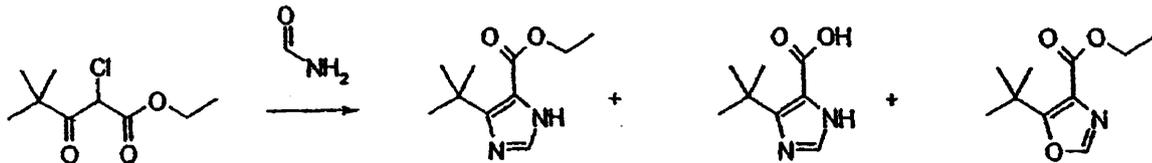
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 13.8、26.3、45.1、54.5、62.9、165.1、203.6。

【0217】

5 - 第三ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - カルボン酸エチルエステル

【0218】

【化29】



【0219】

ホルムアミド (47.5 ml) および水 (2.5 ml) 中の 2 - クロロ - 4 , 4 - ジメチル - 3 - オキソ - ペンタン酸エチルエステル (25.0 g、0.12 mol) の溶液を振とうした後、15 × 8 ml のバイアルに分配した。バイアルすべてを密封して、続いて 150 で 3.5 時間加熱した。バイアルを室温に冷却した後、水 (20 ml) を添加して、混合物をクロロホルムで完全に抽出した。クロロホルムを除去して、濃縮ホルムアミド溶液 (22.2 g) を得て、これを、1% MeOH / 1% Et₃N を含むクロロホルムの詰め込まれたフラッシュシリカカラム (直径 6 cm、高さ 12 cm) に添加した。この混合物 2.5 L、続いて 2% MeOH / 1% Et₃N を含むクロロホルム 1 L によりカラムを溶出させ、初期の画分中に、5 - 第三ブチル - オキサゾール - 4 - カルボン酸エチルエステルであると思われる生成物 (6.3 g、26%) が得られた。

【0220】

HPLC (214 nm) $t_R = 8.77$ 分。

【0221】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); 1.43 (s, 9H); 4.40 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H); 7.81 (s, 1H)。

【0222】

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 14.1、28.8、32.5、61.3、136.9、149.9、156.4、158.3。

【0223】

ESMS m/z 198.3 [$\text{M} + \text{H}$]⁺、239.3 [$\text{M} + \text{CH}_4\text{CN}$]⁺。

【0224】

LC/MS $t_R = 7.97$ (198.1 [$\text{M} + \text{H}$]⁺) 分。

【0225】

5 - 第三ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - カルボン酸エチルエステルは、より後方の画分から回収された (6.20 g、26%)。(デュラント等 (Durant et al.), 「アミノアルキルイミダゾールおよびそれらの製造プロセス」 ("Aminoalkylimidazoles and Process for their Production")、特許番号 GB 1341375 号 (英国、1973年))。

【0226】

HPLC (214 nm) $t_R = 5.41$ (93.7%) 分。

10

20

30

40

50

【0227】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.38 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H); 1.47 (s, 9 H); 4.36 (q, $J = 7.2$ Hz, 2 H); 7.54 (s, 1 H)。

【0228】

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 13.7、28.8、32.0、59.8、124.2、133.3、149.2、162.6。

【0229】

ESMS m/z 197.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、238.3 $[\text{M} + \text{CH}_4\text{CN}]^+$ 。

【0230】

5% MeOH / 1% Et_3N 1 L によるカラムのさらなる溶出により、5 - 第三ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - カルボン酸であると思われる化合物が得られた (0.50 g, 2%)。

【0231】

HPLC (245 nm) $t_R = 4.68$ (83.1%) 分。

【0232】

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 1.36 (s, 9 H); 7.69 (s, 1 H)。

【0233】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.37 (s, 9 H); 7.74 (s, 1 H)。

【0234】

^1H NMR (400 MHz, CD_3SO) 1.28 (s, 9 H); 7.68 (s, 1 H)。

【0235】

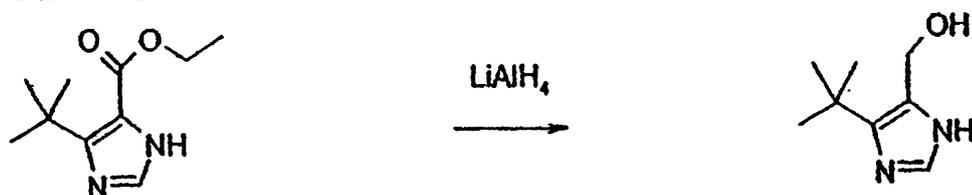
ESMS m/z 169.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 、210.4 $[\text{M} + \text{CH}_4\text{CN}]^+$ 。

【0236】

(5 - 第三ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル) - メタノール

【0237】

【化30】



【0238】

THF (60 ml) 中の 5 - 第三ブチル - 3 - イミダゾール - 4 - カルボン酸エチルエステル (3.30 g, 16.8 mmol) の溶液を、THF (40 ml) 中の水素化リチウムアルミニウムの懸濁液 (95% 懸濁液、0.89 g, 22.2 mmol) に滴下して、混合物を室温で 3 時間攪拌した。ガスの発生が終わるまで、水を添加し、混合物を 10 分間攪拌した後、焼結漏斗に通して濾過した。沈殿物を THF で、続いてメタノールで洗浄し、濾液および洗浄液を合わせて、蒸発させた。残渣を一晚凍結乾燥させて、(5 - 第三ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル) - メタノール (2.71 g, 105%) を白色固体として得た。(デュラント等 (Durant et al.), 「アミノアルキルイミダゾールおよびそれらの製造プロセス」 ("Aminoalkylimidazoles and Process for their Production"), 特許番号 GB 1341375 号 (英国、1973年))。

【0239】

HPLC (240 nm) $t_R = 3.70$ (67.4%) 分。

【0240】

10

20

30

40

50

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 1.36 (s, 9H); 4.62 (s, 2H); 7.43 (s, 1H)。

【0241】

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) 31.1、33.0、57.9、131.4、133.9、140.8。

【0242】

LC/MS $t_R = 3.41$ (155.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$) 分。

【0243】

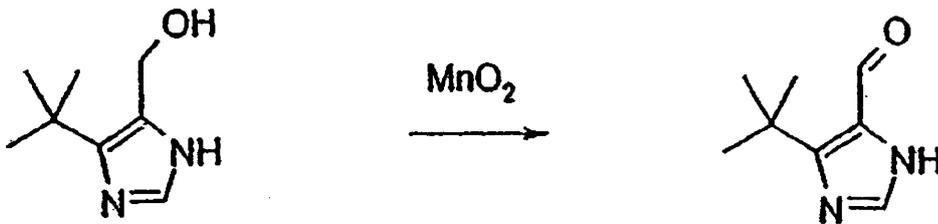
この物質は、さらに精製せずに使用した。

【0244】

5 - 第三ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - カルボアルデヒド

【0245】

【化31】



10

20

【0246】

二酸化マンガン (30 g、0.35 mol) を、アセトン (700 ml) 中の (5 - 第三ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - イル) - メタノール (4.97 g、0.03 mol) の不均一溶液に添加して、得られた混合物を室温で4時間攪拌した。混合物をセライトパッドに通して濾過して、パッドをアセトンで洗浄した。濾液および洗浄液を合わせて、蒸発させた。残渣をエーテルで粉碎して、5 - 第三ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - カルボアルデヒド (2.50 g、51%) を無色固体として得た。(ハヤシ (Hayashi), 私信 (2000))。

【0247】

HPLC (240 nm) $t_R = 3.71$ (89.3%) 分。

30

【0248】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.48 (s, 9H); 7.67 (s, 1H); 10.06 (s, 1H)。

【0249】

LC/MS $t_R = 3.38$ (153.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$) 分。

【0250】

粉碎由来の濾液の蒸発により、さらなる5 - t - ブチル - 3H - イミダゾール - 4 - カルボアルデヒド (1.88 g、38%) が得られた。

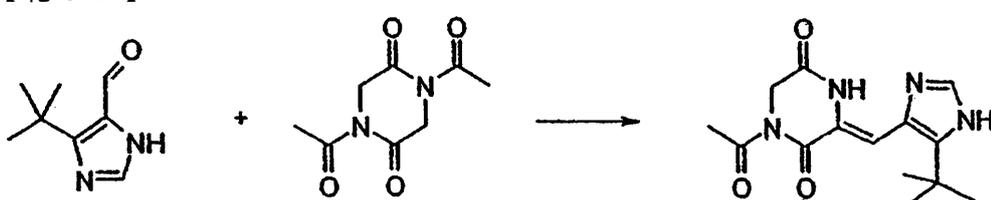
【0251】

1 - アセチル - 3 - (5' - 第三ブチル - 1H - イミダゾール - 4' - Z - イルメチレン) - ピペラジン - 2, 5 - ジオン

40

【0252】

【化32】



【0253】

50

DMF (50 ml) 中の 5 - 第三ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - カルボアルデヒド (2.50 g、16.4 mmol) の溶液に、1, 4 - ジアセチル - ピペラジン - 2, 5 - ジオン (6.50 g、32.8 mmol) を添加して、混合物を排気させた後、アルゴンを流し込んだ。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 2 回繰り返した後、炭酸セシウム (5.35 g、16.4 mmol) を添加した。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 3 回繰り返した後、得られた混合物を室温で 5 時間攪拌した。少量となるまで、反応混合物をある程度まで蒸発させて (高真空下で加熱)、得られた溶液を水 (100 ml) に滴下した。黄色い沈殿物を収集した後、凍結乾燥させて、1 - アセチル - 3 - (5' - 第三ブチル - 1 H - イミダゾール - 4' - Z - イルメチレン) - ピペラジン - 2, 5 - ジオン (2.24 g、47%) を得た。(ハヤシ (Hayashi), 私信 (2000)).

10

【0254】

HPLC (214 nm) $t_R = 5.54$ (94.4%) 分。

【0255】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.47 (s, 9H); 2.65 (s, 3H); 4.47 (s, 2H), 7.19 (s, 1H); 7.57 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 12.14 (s, 1H)。

【0256】

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) 27.3, 30.8, 32.1, 46.5, 110.0, 123.2, 131.4, 133.2, 141.7, 160.7, 162.8, 173.0

20

【0257】

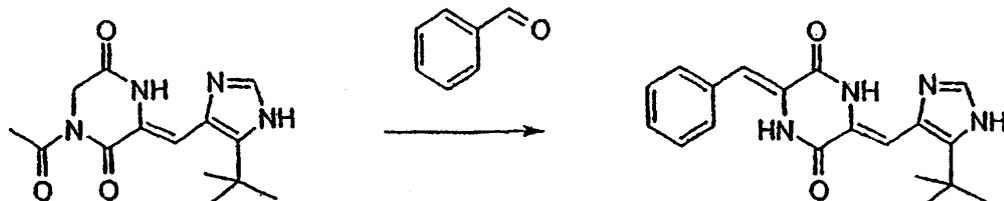
LC/MS $t_R = 5.16$ (291.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 581.6 $[2\text{M} + \text{H}]^+$) 分。

【0258】

3 - Z - ベンジリデン - 6 - [5' - 第三ブチル - 1 H - イミダゾール - 4' - Z - イルメチレン] - ピペラジン - 2, 5 - ジオン

【0259】

【化33】



30

【0260】

DMF (55 ml) 中の 1 - アセチル - 3 - (5' - 第三ブチル - 1 H - イミダゾール - 4' - Z - イルメチレン) - ピペラジン - 2, 5 - ジオン (2.43 g、8.37 mmol) の溶液に、ベンズアルデヒド (4.26 ml、41.9 mmol) を添加して、溶液を排気させて、アルゴンを流し込んだ。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 2 回繰り返した後、炭酸セシウム (4.09 g、12.6 mol) を添加した。排気 - 流し込みのプロセスをさらに 3 回繰り返した後、得られた混合物を以下に示すような温度勾配下で加熱した。総時間 5 時間後に、反応を室温に冷却して、混合物を氷冷水 (400 ml) に添加した。沈殿物を収集し、水で洗浄した後、凍結乾燥させて、黄色の固体 (2.57 g、HPLC (214 nm) $t_R = 6.83$ (83.1%) 分) を得た。この物質をクロロホルム (100 ml) 中に溶解して、残存水を共沸により蒸発させて、褐色油状物質が生じた。これをクロロホルム (20 ml) 中に溶解して、氷中で冷却した。90 分後に、黄色い沈殿物を収集して、風乾させて、3 - Z - ベンジリデン - 6 - [5' - 第三ブチル - 1 H - イミダゾール - 4' - Z - イルメチレン] - ピペラジン - 2, 5 - ジオン (1.59 g、56%) を得た。(ハヤシ (Hayashi), 私信 (2000)).

40

【0261】

50

HPLC (214 nm) $t_R = 6.38$ (2.1%) 分、 6.80 (95.2) 分。

【0262】

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.46 (s, 9H); 7.01 (s, 1H, -C-C=CH); 7.03 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30 - 7.50 (m, 5H, Ar); 7.60 (s, 1H); 8.09 (bs, NH); 9.51 (bs, NH); 12.40 (bs, NH)。

【0263】

LC/MS $t_R = 5.84$ (337.4 [M+H]⁺, E異性体)、 6.25 (337.4 [M+H]⁺, 673.4 [2M+H]⁺, Z異性体) 分。

【0264】

ESMS m/z 337.3 [M+H]⁺, 378.1 [M+CH₄CN]⁺。

【0265】

クロロホルム溶液の蒸発により、さらなる3-Z-ベンジリデン-6-[5"-第三ブチル-1H-イミダゾール-4"-Z-イルメチレン]-ピペラジン-2,5-ジオン(0.82 g, 29%) が得られた。HPLC (214 nm) $t_R = 6.82$ (70.6%) 分。

【0266】

< 全般的な実験 >

炭酸水素ナトリウムは、5% 溶液を指す。

【0267】

有機溶媒は、別記しない限り、硫酸ナトリウムにより脱水した。

【0268】

< 分析条件 >

NMR 条件

^1H NMR (400 MHz) 分析は、ヴァリアン・イノヴァ・ユニティ (Varian Inova Unity) 400 MHz NMR マシンで実施した。試料は、0.1% TMS を含有する重水素化クロロホルム中で測定した (別記しない限り)。ケミカルシフト (ppm) は、TMS (0.00 ppm)、あるいは CD_3OD 中で測定する試料に関しては CH_3OH の 3.30 ppm を対照とした。カップリング定数は、ヘルツ (Hz) で表される。

【0269】

分析用 HPLC 条件

システム 6 条件:

RP-HPLC は、Rainin Microsorb-MV C18 (5 μm , 100) 50 x 4.6 mm カラムで実施した。

緩衝液 A: 0.1% 水性 TFA

緩衝液 B: 0.1% TFA を含む 90% MeCN 水

勾配: 11 分かけて緩衝液 B を 0% から 100% へ

流速: 1.5 mL / 分

【0270】

LCMS 条件

LCMS は、Perkin-Elmer Sciex API-100 機器で実施した。

LC 条件:

逆相 HPLC 分析

カラム: Monitor 5 μm C18 50 x 4.6 mm

溶媒 A: 0.1% TFA 水

溶媒 B: 0.085% TFA を含む 90% MeCN 水

勾配: 11.0 分かけて B を 0% から 100% へ

流速: 1.5 mL / 分

10

20

30

40

50

波長：214 nm

MS条件：

イオン源：イオンスプレー

検出：イオン計数

質量分析計に対する流速：カラムから分割した後、300 μL / 分 (1.5 mL / 分)

。

【0271】

ESMS条件

ESMSは、エレクトロスプレーインレットを用いて、Perkin Elmer / Sciex - API III LC / MS / MSで実施した。

10

溶媒：0.1% AcOHを含む60% MeCN水

流速：25 μL / 分

イオンスプレー：5000 V

オリフィスプレート：55 V

収集時間：2.30分

スキャン範囲：100 ~ 1000 amu / z

スキャンステップサイズ：0.2 amu / z

【0272】

分取用RP-HPLC精製条件

逆相HPLC精製は、以下の条件を用いて、ウォーターズ (Waters) Xterra MSカラム (19 x 50 mm、5 μm、C18) によりNebulaを用いて実施した

20

：

溶媒A：0.1% TFA水

溶媒B：0.1% TFAを含む90% MeCN水

勾配：4分かけてBを5%から95%へ

流速：20 mL / 分

波長：214 nm

【0273】

略記は以下の通りである：brs：ブロードシングレット、BuLi：n-ブチルリチウム、d：ダブルット、DBU：1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ(undec)-7-エン、ESMS：エレクトロスプレー質量分析、HCl：塩酸、HPLC：高速液体クロマトグラフィー、LCMS：液体クロマトグラフィー質量分析、LD：リチウムジイソプロピルアミド、M+：分子イオン、m：マルチプレット、MeCN：アセトニトリル、M：質量分析、MW：分子量、NMR：核磁気共鳴、q：カルテット、s：シングレット、t：トリプレット、t_R：保持時間、TFA：トリフルオロ酢酸、THF：テトラヒドロフラン

30

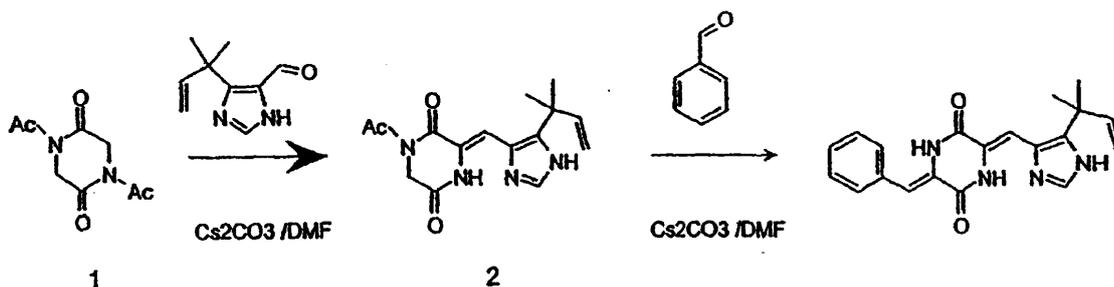
【0274】

デヒドロフェニラヒスチンの合成に関する詳細な手順

【0275】

【化34】

40



【0276】

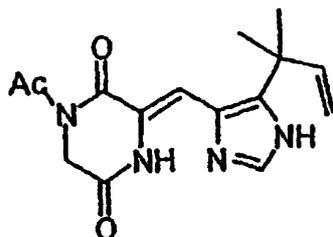
1 - アセチル - 3 - { (Z) - 1 - [5 - (1 , 1 - ジメチル - 2 - プロペニル) - 1 H

50

- 4 - イミダゾリル]メチリデン} - 2, 5 - ピペラジンジオン (2)

【 0 2 7 7 】

【 化 3 5 】



10

【 0 2 7 8 】

DMF (2 mL) 中の 5 - (1, 1 - ジメチル - 2 - プロペニル) イミダゾール - 4 - カルボキサリド (100 mg, 0.609 mmol) の溶液に、化合物 1 (241 mg, 1.22 mmol) を添加して、溶液を短期間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて CS_2CO_3 (198 mg, 0.609 mmol) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。酸素の除去は、かかる除去がジケトピペラジン環の 6 位にある炭素の酸化を減少させると考えられることから好ましい。得られた混合物を室温で 5 時間攪拌した。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc および 10% Na_2CO_3 の混合物中に溶解し、有機相を 10% Na_2CO_3 でもう 1 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2CO_3 により脱水して、真空中で濃縮した。溶離液として C

20

【 0 2 7 9 】

デヒドロフェニラヒスチン

DMF (0.8 mL) 中の 2 (30 mg, 0.099 mmol) の溶液に、ベンズアルデヒド (51 μ L, 0.496 mmol, 5 当量) を添加して、溶液を短期間で繰り返し排気させて、酸素を除去し、Ar を流し込み、続いて CS_2CO_3 (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 当量) を添加して、排気 - 流し込みのプロセスを再び繰り返した。得られた混合物を 80 で 2.5 時間加熱した。(温度は徐々に増加しなくてはならない。迅速な加熱は、ベンジリデン部分での E 異性体の産生を増加させる)。溶媒を蒸発により除去した後、残渣を EtOAc 中に溶解し、水で 2 回および飽和 NaCl で 3 回洗浄し、 Na_2SO_4 により脱水して、真空中で濃縮した。CHCl₃ - MeOH (10 : 1) を用いた TLC 上で、365 nm の UV で鮮緑黄色の発光を伴うスポットを観察することができる。この粗製生成物の純度は、HPLC 分析から 75% 以上であった。得られた残渣を 90% MeOH 水中に溶解して、逆相 HPLC カラム (YMC-Pack, ODS - AM, 20 x 250 mm) にかけて、水中の 70% MeOH から 74% MeOH への線形勾配を用いて、流速 1.2 mL / 分で 16 分かけて溶出して、所望の画分を収集し、蒸発により濃縮して、黄色のデヒドロフェニラヒスチン 19.7 mg (60%) を得たが、収率は各工程に関して最適化されていない。

30

【 実施例 4 】

40

【 0 2 8 0 】

デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチン類似体の生物学的特性

< A . > 生物学的評価

合成した tBu - デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチンの生物学的特性を、HT29 ヒト結腸細胞および PC - 3 前立腺癌細胞の両方で評価した。

【 0 2 8 1 】

HT - 29 (ATCC HTB - 38)、すなわちヒト結腸直腸腺癌を、McCoy の完全培地 (10% FBS, 1 mM ピルビン酸 Na, 1 x NEAA, 2 mM L - グルタミンならびに 100 IU / ml および 100 μ g / ml の Pen / Strept をそれぞれ補充した、L - グルタミンを有する McCoy の 5A 培地ならびに 25 mM HEPES

50

)中に維持した。PC-3(ATCC CRL-1435)、すなわちヒト前立腺腺癌を、F12K完全培地(10% FBS、2mM グルタミン、1% HEPES、ならびに100IU/mlおよび100μg/mlのPen/Strepをそれぞれ補充したF12K培地)中に維持した。細胞系は、95%加湿インキュベータ中で37、5%CO₂で培養した。

【0282】

腫瘍細胞毒性アッセイに関して、HT-29またはPC-3細胞を、Corning 3904黒壁付き透明底組織培養プレート(clear-bottom culture plate)に、完全培地90μl中、5,000個の細胞/ウェルで播種し、プレートを一晚インキュベートして、細胞を樹立させて、対数増殖期に入らせた。デヒドロフェニラヒスチンおよびtBu-デヒドロフェニラヒスチンの20mMストック溶液を100% DMSO中に調製して、-20で保管した。2つの化合物の10倍濃度連続希釈を、 $2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 2.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ の範囲の最終濃度となる、適切な培地中で調製した。10回の連続希釈の10μl容量を、三重反復で試験ウェルに添加して、プレートを48時間インキュベータに戻した。DMSOの最終濃度は、試料すべてにおいて0.25%であった。

【0283】

薬物暴露の48時間後に、Mg²⁺、Ca²⁺を含まないPBS中の0.2mg/ml レサズリン(シグマ-アルドリッチ化学株式会社(Sigma-Aldrich Chemical Co.)から入手)10μlを各ウェルに添加して、プレートを3~4時間、インキュベータに戻した。プレートを取り出して、Fusion 蛍光分析計(パッカード機器(Packard Instruments))において530nm励起および590nm発光フィルタを用いて、レサズリン蛍光を測定した。細胞なしのレサズリン色素を用いて、バックグラウンドを決定し、これを実験ウェルすべてに関するデータから差し引いた。データは、Prismソフトウェア(グラフパッドソフトウェア(GraphPad Software))を用いて解析した。データは、培地のみで処理した細胞(100%細胞成長)の平均に対して正規化し、標準的なS字状用量反応曲線フィッティングアルゴリズムを用いて、EC₅₀値を決定した。

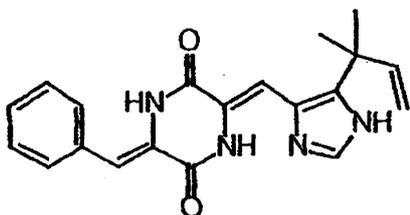
【0284】

以下の表1に示すように、tBu-デヒドロフェニラヒスチンは、デヒドロフェニラヒスチンと比較して、約4倍大きい細胞毒性活性を示す。

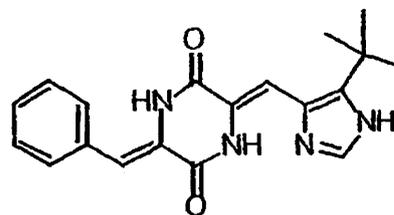
【0285】

【化36】

デヒドロフェニラヒスチンおよび誘導体の細胞毒性効果



デヒドロフェニラヒスチン



tBu-デヒドロフェニラヒスチン

10

20

30

40

【表 1】

細胞	EC ₅₀ (nM)	
	ΔPLH	tBu-ΔPLH
HT29	48	13
PC-3	5.4	1.0

10

【0286】

< B . > デヒドロフェニラヒスチン誘導体の構造および活性研究

フェニラヒスチン、デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチンの各種誘導体の細胞毒性効果を、P388マウス白血病細胞、HT-29ヒト結腸細胞、およびPC-3前立腺癌細胞で検査した。

【0287】

上記で説明したように、HT-29、すなわちヒト結腸直腸腺癌を、McCoyの完全培地(10%FBS、1mMピルビン酸Na、1×NEAA、2mML-グルタミンならびに100IU/mlおよび100μg/mlのPen/Strepをそれぞれ補充した、L-グルタミンを有するMcCoyの5A培地ならびに25mMHEPES)中に維持した。PC-3、すなわちヒト前立腺癌を、F12K完全培地(10%FBS、2mMグルタミン、1%HEPES、ならびにそれぞれ100IU/mlおよび100μg/mlのPen/Strepを補充したF12K培地)中に維持した。細胞系は、95%加湿インキュベータ中で37℃、5%CO₂で培養した。

20

【0288】

腫瘍細胞毒性アッセイに関して、HT-29またはPC-3細胞を、Corning3904黒壁付き透明底組織培養プレート(clear-bottom tissue culture plate)に、完全培地90μl中、5,000個の細胞/ウェルで播種し、プレートを一晚インキュベータとして、細胞を樹立させて、対数増殖期に入らせた。デヒドロフェニラヒスチンおよびtBu-デヒドロフェニラヒスチンの20mMストック溶液を100%DMSO中に調製して、-20℃で保管した。2つの化合物の10倍濃度連続希釈を、20×10⁻⁵M~20×10⁻¹⁰Mの範囲の最終濃度となる、適切な培地中で調製した。10倍連続希釈の10μl容量を、三重反復で試験ウェルに添加して、プレートを48時間インキュベータに戻した。DMSOの最終濃度は、試料すべてにおいて0.25%であった。

30

【0289】

薬物暴露の48時間後に、Mg²⁺、Ca²⁺を含まないPBS中の0.2mg/mlレサズリン(シグマ-アルドリッチ化学株式会社(Sigma-Aldrich Chemical Co.)から入手)10μlを各ウェルに添加して、プレートを3~4時間、インキュベータに戻した。プレートを取り出して、Fusion蛍光分析計(パッカード機器(Packard Instruments))において530nm励起および590nm発光フィルタを用いて、レサズリン蛍光を測定した。細胞なしのレサズリン色素を用いて、バックグラウンドを決定し、これを実験ウェルすべてに関するデータから差し引いた。データは、Prismソフトウェア(グラフパッドソフトウェア(GraphPad Software))を用いて解析した。データは、培地のみで処理した細胞(100%細胞成長)の平均に対して正規化し、標準的なS字状用量反応曲線フィッティングアルゴリズムを用いて、EC₅₀値を決定した。

40

【0290】

フェニラヒスチン、デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチン誘導体のEC₅₀およびIC₅₀値を、以下の表2に概要する。

50

【 0 2 9 1 】

【 表 2 - 1 】

フェニラヒスチンまたはデヒドロフェニラヒスチン、およびデヒドロフェニラヒスチン誘導体のSAR研究

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-) -フェニラヒスチン		1600	n.t.	833 ± 153 (n=5)
KPU-1 PLH		48	4.7	36 ± 12.8 (n=5)
KPU-2 tBu-PLH		13	1	31.8 ± 5.0 (n=5)
KPU-6 tBu-PLH-OMe		>2000	n.t.	9333 ± 5457 (n=3)

10

20

30

【 表 2 - 2 】

KPU-8 tBu-PLH-o-OMe		89		315 ± 137 (n=4)
KPU-9 tBu-PLH-m-OMe		31		20.8 ± 68 (n=4)
コルヒチン	—			208 ± 68 (n=4)

40

【 0 2 9 2 】

フェニル環に対する修飾は、細胞毒性活性の有意な効果を有する。tBu-デヒドロフェニラヒスチン(6)の活性と比較すると、メタ位にあるメトキシ基(KPU-9)の

50

活性は、P388細胞において、 $IC_{50} = 20.8 \pm 3.3 \text{ nM}$ で、他の誘導体よりも最高の活性を示した。KPU-9誘導体はまた、HT-29細胞においても細胞毒性を示した($EC_{50} = 31 \text{ nM}$)。デヒドロフェニラヒスチン、tBu-デヒドロフェニラヒスチン(KPU-2)およびKPU-9誘導体はすべて、P388細胞において細胞毒性を示した。

【0293】

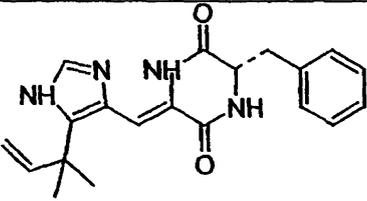
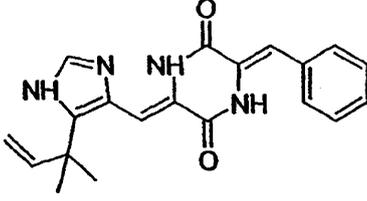
<C.>さらなるデヒドロフェニラヒスチン誘導体の構造および活性研究

フェニラヒスチン、デヒドロフェニラヒスチンおよびデヒドロフェニラヒスチンの各種誘導体の細胞毒性効果を、上述の方法論を用いて、HT-29ヒト結腸細胞、およびPC-3前立腺癌細胞で検査した。

【0294】

【表3-1】

フェニラヒスチン、デヒドロフェニラヒスチンおよびさらなるデヒドロフェニラヒスチン誘導体のSAR研究

化合物	構造	塩形態	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
(-)-フェニラヒスチン		-	350.41	1600	n.t.
KPU-1 PLH		-	348.40	48	4.7

【表 3 - 2】

化合物	構造	塩形態	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-2 tBu-PLH		-	336.39	13	1
KPU-6 tBu-PLH-p-OMe		-	366.41	>2000	n.t.
KPU-8 tBu-PLH-o-OMe		-	366.41	89	
KPU-9 tBu-PLH-OMe		-	366.41	31	
KPU-14 tBu-PLH-2,3ジOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	610	96%
KPU-12 tBu-PLH-2,4ジOMe		-	396.44	4980	
KPU-10 tBu-PLH-2,5ジOMe		-	396.44	1350	

10

20

30

40

【表 3 - 3】

化合物	構造	塩形態	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-15 tBu-PLH-2, 6-ジOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu-PLH-3, 4-ジOMe		-	396.44	2130	
KPU-16 tBu-PLH-3, 5-ジOMe		-	396.44	42	82%
KPU-11 tBu-PLH-3, 4, 5-トリOMe		-	426.47	> 20 μM	
KPU-17 tBu-PLH-2, 3, 4-トリOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu-PLH-o-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	42	100%
KPU-19 tBU-PLH-m-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	20	98%

10

20

30

40

【表 3 - 4】

化合物	構造	塩形態	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-20 tBu-PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-PLH-2Cl-5-NO ₂		TFA	415.83 529.85 (+TFA)	51	100%
KPU-22 tBu-PLH-3, 4- メチレンジオキシ		TFA	380.40 494.42 (+TFA)	82	95%
KPU-23 tBu-PLH-2-OH-3- OMe (o-バニリン)		TFA	382.41 496.44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-PLH-環式-3- MeO		TFA	364.40 487.42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-PLH-4-ピリジル		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	544	98%
KPU-28 tBu-PLH-2-ピリジル		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	> 20 μM	99%

10

20

30

【表 3 - 5】

化合物	構造	塩形態	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-26 tBu-PLH-2-フリル		TFA	326.35 440.37 (+TFA)	600	88%
KPU-27 tBu-PLH-5-Me-2- チエニル		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	80	97%
KPU-29 tBu-PLH-3-Me-2- チエニル		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	44	81%

10

20

【実施例 5】

【0295】

他のデヒドロフェニラヒスチン類似体

< A . > デヒドロフェニラヒスチン誘導体の合成に関する修飾

デヒドロフェニラヒスチンの他の誘導体は、上述の技法を単独で使用して、あるいは他の既知の有機合成技法と併用して合成される。

【0296】

合成方法に関するジアシルジケートピペラジンならびに第1のアルデヒドおよび第2のアルデヒドに対する修飾は、産生する所望の誘導体に従って様々である。以下を施す誘導体が合成される：

30

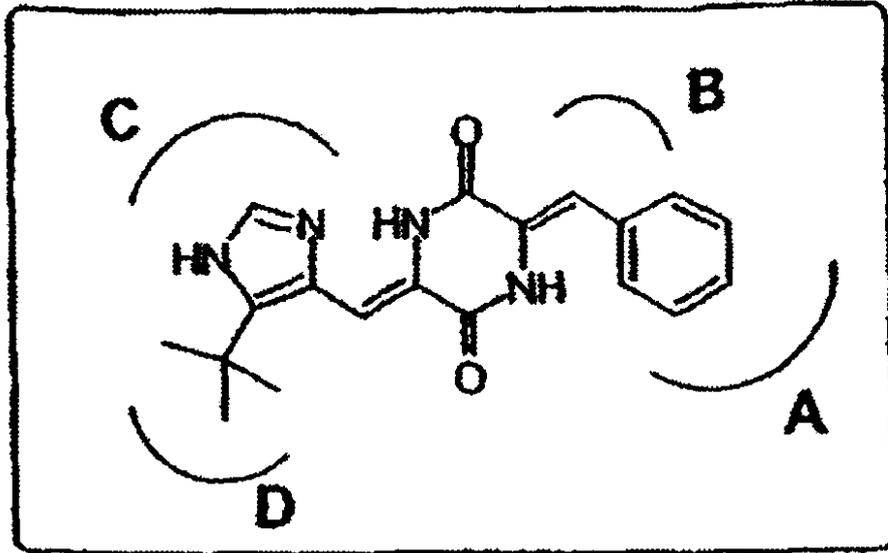
- A) フェニル環を修飾し、かつ/または他の芳香族環構造を導入すること、
- B) 芳香族環の位置を変更すること、
- C) イミダゾール芳香族環構造を変更すること、および/または
- D) イミダゾール環上の5位を修飾すること。

【0297】

下記の図は、デヒドロフェニラヒスチンの誘導体を産生するように修飾されるデヒドロフェニラヒスチン化合物の領域を表す。修飾の非限定的な例を開示しており、この開示に基づいて、当業者には理解されよう。

【0298】

【化37】



10

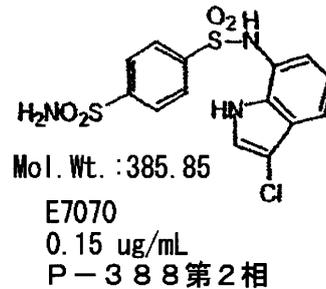
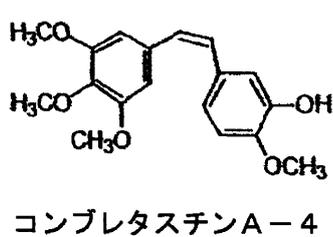
【0299】

A 1) 既知の抗チューブリン化合物の構造に基づくフェニル環への修飾
アルキル、ハロゲン、アルコキシ、アセチル、スルホンアミド、アミノ、ヒドロキシ、
ニトロ等。

20

【0300】

【化38】



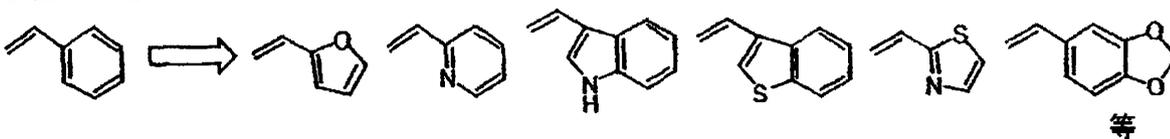
30

【0301】

2) 他の芳香族環構造への導入

【0302】

【化39】



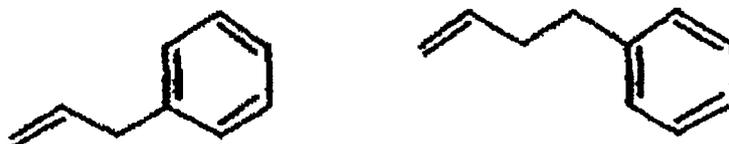
40

【0303】

B 芳香族環の位置

【0304】

【化40】



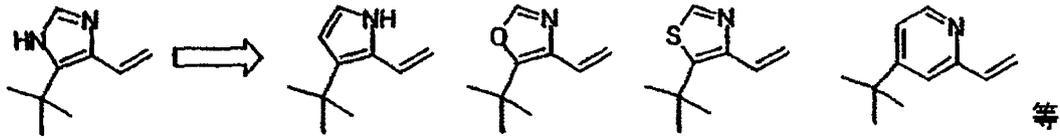
【0305】

50

C 他の環構造への変更

【0306】

【化41】

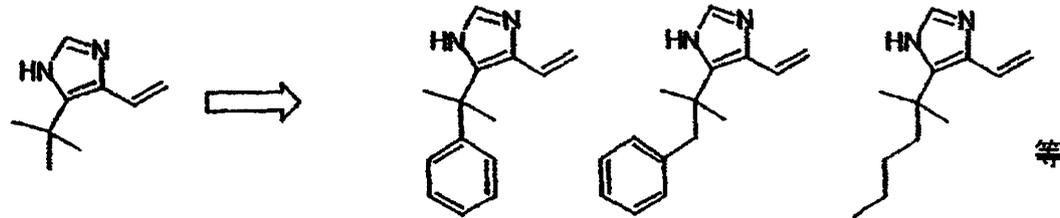


【0307】

D イミダゾール環上の5位のさらなる修飾

【0308】

【化42】



10

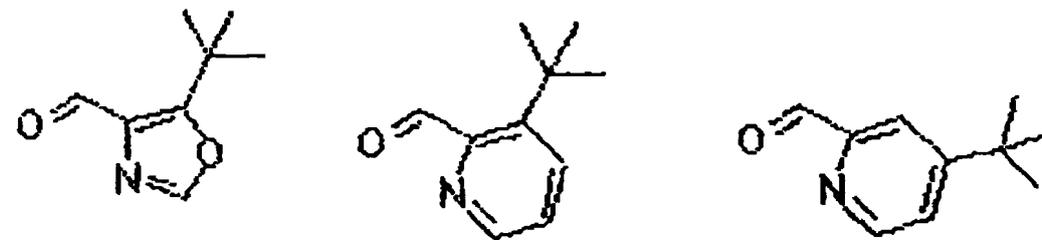
【0309】

デヒドロフェニラヒスチン化合物への上記修飾を発展させて、化合物の誘導体は、フェニル環での以下の置換基 (A) : $-CF_3$ 、 $-SO_2NH_2$ ($-SO_2NR_1R_2$)、 $-SO_3H$ 、 $-CONH_2$ ($-CONR_1R_2$)、 $-COOH$ 等を含んでもよい。他の環構造 (C) はまた、下記を含んでもよい：

20

【0310】

【化43】



30

【0311】

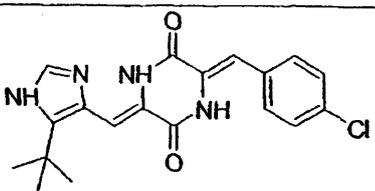
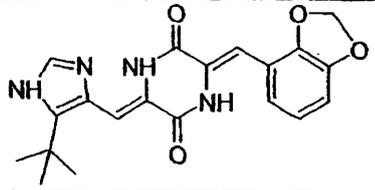
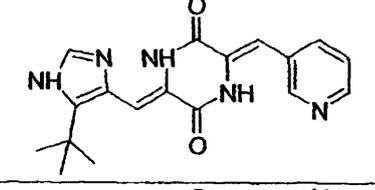
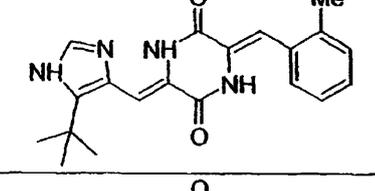
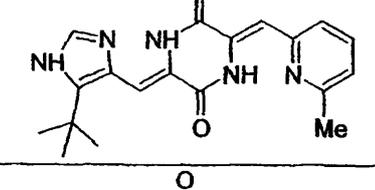
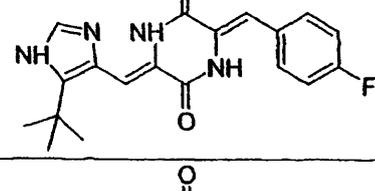
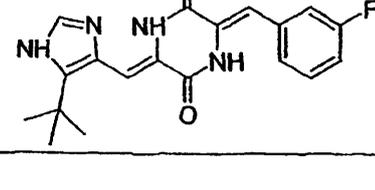
< B . > 合成したデヒドロフェニラヒスチン誘導体の例

合成したデヒドロフェニラヒスチン誘導体のさらなる例を表4に開示する。

【0312】

【表 4 - 1】

さらなる合成したデヒドロフェニラヒスチンの誘導体

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-20 tBu-PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)
KPU-30 t-Bu-PLH-2, 3-メチレンジオキシ		TFA	380.40 494.42 (+TFA)
KPU-31 tBu-PLH-3-ピリジル		2TFA	337.38 565.42 (+2TFA)
KPU-32 tBu-PLH-o-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-33 tBu-PLH-3-Me-2-ピリジル		2TFA	351.40 579.45 (+2TFA)
KPU-34 tBu-PLH-4-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-35 tBu-PLH-m-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)

10

20

30

40

【表 4 - 2】

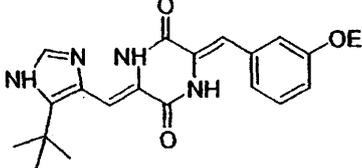
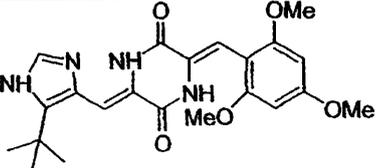
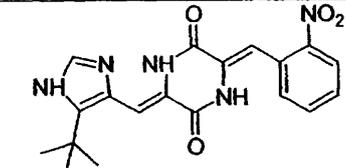
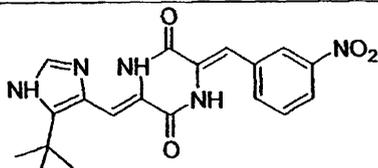
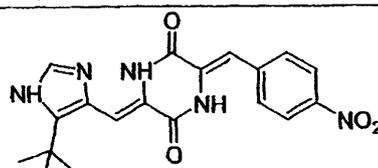
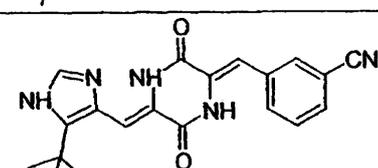
化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-36 tBu-PLH-5-4-im		2TFA	356.42 584.47 (+2TFA)
KPU-37 tBu-PLH-o-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-38 tBu-PLH-m-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-39 tBu-PLH-p-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-40 tBu-PLH-p-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-41 tBu-PLH-m-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-42 tBu-PLH-3-チエニル		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

10

20

30

【表 4 - 3】

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-43 tBu-PLH-p-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-44 tBu-PLH-m-EtO		TFA	380.44 494.46 (+TFA)
KPU-45 tBu-PLH-2, 4, 6-トリ OMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)
KPU-46 tBu-PLH-o-NO2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-47 tBu-PLH-m-NO2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-48 tBu-PLH-p-NO2		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-49 tBu-PLH-m-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)

10

20

30

【表 4 - 4】

化合物	構造	塩形態	M.W.
LPU-50 tBu-PLH-o-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-51 tBu-PLH-m-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-52 tBu-PLH-2-NO2-5-Cl		TFA	415.83 529.85 (+TFA)
KPU-53 tBu-PLH-o-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-54 tBu-PLH-2-OH-5-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-55 tBu-PLH-3-フラニル		TFA	326.35 440.37 (+TFA)
KPU-56 tBu-PLH-2-OH-5-Br		TFA	431.28 545.31 (+TFA)

10

20

30

【表 4 - 5】

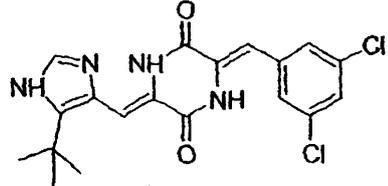
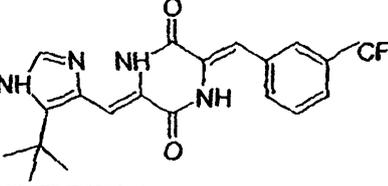
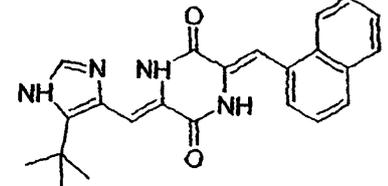
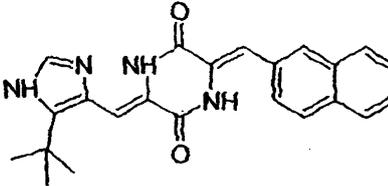
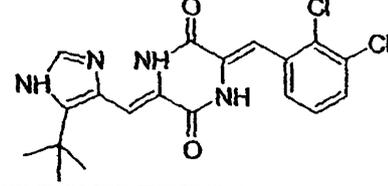
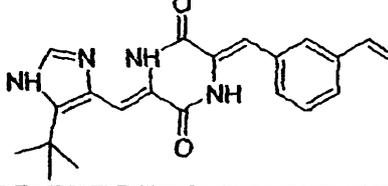
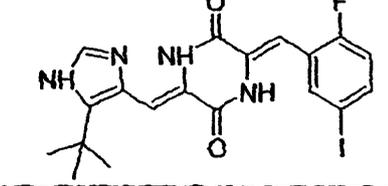
化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-57 tBu-PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-58 tBu-PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-59 tBu-PLH-2-OH-Cl		TFA	386.83 (+TFA) 500.86
KPU-60 tBu-PLH-5-Me-2-フラニル		TFA	340.38 454.40 (+TFA)
KPU-61 tBu-PLH-5-Cl-2-チオニル		TFA	376.86 490.88 (+TFA)
KPU-62 tBu-PLH-2-チオニル		TFA	342.42 456.44 (+TFA)
KPU-63 tBu-PLH-N-Me-2-ピロール		TFA	339.39 453.42 (+TFA)

10

20

30

【表 4 - 6】

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-64 tBu-PLH-3, 5-ジCl		TFA	405.27
KPU-65 tBu-PLH-m-CF ₃		TFA	404.39
KPU-66 tBu-PLH-1- ナフタレン		TFA	386.44
KPU-67 tBu-PLH-2- ナフタレン		TFA	386.44
KPU-68 tBu-PLH-2, 3-ジCl		TFA	405.27
KPU-69 tBu-PLH-m- ビニル		TFA	362.42
KPU-77 tBu-PLH-2-5-I		TFA	480.28

10

20

30

40

【表 4 - 7】

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-79 tBu-PLH-2- (メチルチオ)		TFA	368.45
KPU-80 tBu-PLH-m-OCF ₃		TFA	420.38
KPU-81 tBu-PLH-2-F-5-OMe		TFA	384.38
KPU-82 tBu-PLH-4-F-3-OMe		TFA	384.38
KPU-83 tBu-PLH-2-OH-5-tBu		TFA	408.39
KPU-84 tBu-PLH-シクロヘキサン		TFA	341.39
KPU-86 tBu-PLH-2-Me-3-F		TFA	368.39

10

20

30

40

【表 4 - 8】

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-87 tBu-PLH-2-F-5-Me		TFA	368.39
KPU-88 tBu-PLH-2-Cl-6-F		TFA	388.83
KPU-89 tBu-PLH-2, 5-ジF		TFA	372.38
KPU-90 tBu-PLH-2, 3-ジMe		TFA	364.38
KPU-91 tBu-PLH-2, 6-ジMe		TFA	364.38
KPU-92 tBu-PLH-2-NO2-3-OMe		TFA	411.39
KPU-93 tBu-PLH-2, 5-ジMe		TFA	364.38

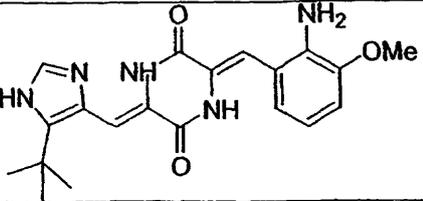
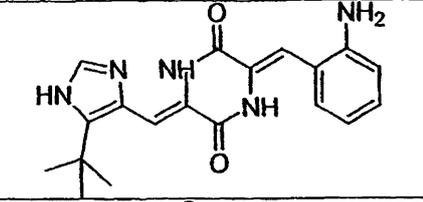
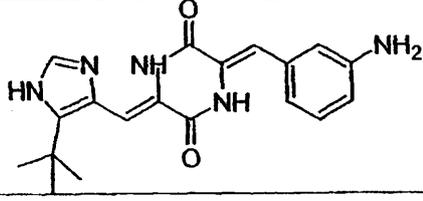
10

20

30

40

【表 4 - 9】

化合物	構造	塩形態	M.W.
KPU-94 tBu-PLH-2-NH ₂ -3-OMe		TFA	381.399
KPU-96 tBu-PLH-2-NH ₂		TFA	351.41
KPU-97 tBu-PLH-m-NH ₂		TFA	351.41

10

20

【0313】

< C . > デヒドロフェニラヒスチン誘導体の評価

上述の誘導体の評価は、実施例3に記載した方法に従って評価される。誘導体のさらなる評価は、細胞増殖に対する阻害効果、特定の細胞メカニズム（すなわち、微小管機能）に対する効果、細胞周期の進行に対する効果の決定、癌細胞系に対する *in vitro* 抗腫瘍活性の評価等のような特定の活性にまで拡大される。幾つかの評価方法プロトコルを以下に示す。

【0314】

1) デヒドロフェニラヒスチンおよびその類似体の細胞増殖阻害効果

96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに、ヒト肺癌に由来する A - 549 細胞に対して抗腫瘍効果を有する MEM 培地 (ニッセイセイヤク株式会社 (Nissui Seiyaku Co., Ltd.)) に、10% ウシ胎児血清を添加することにより得られる培地中に 10^5 個の細胞 / ml に調製したヒト肺癌に由来する A - 549 細胞 $100 \mu\text{l}$ を入れる。上述の実施例により得られる誘導体のメタノール溶液を、最上列のウェルに添加して、検体を片対数希釈方法により希釈して、添加し、プレートを、二酸化炭素ガスインキュベータ中で、 37°C で 48 時間インキュベートする。得られたものを、MTT 試薬 (3 - (4, 5 - ジメチル - 2 - チアゾール) - 2, 5 - ジフェニル - 2 H - テトラプロミド ($1 \text{ mg} / \text{ml} \cdot \text{PBS}$)) を有する $10 \mu\text{l}$ のロットに添加した後、二酸化炭素ガスインキュベータ中で、 37°C で 6 時間インキュベートする。培地を廃棄して、細胞中で産生される結晶をジメチルスルホキシド $100 \mu\text{l}$ / ウェル中に溶解する。続いて、 595 nm の光の吸収をマイクロプレート読取り機で測定する。未処理の細胞の吸収を、既知の濃度の検体で処理した細胞の吸収と比較することにより、細胞増殖 50% を阻害した検体濃度 (IC_{50}) を算出する。

30

40

【0315】

2) デヒドロフェニラヒスチンおよびその類似体の細胞周期阻害活性

細胞株 A 431 は、ヒト肺癌に由来する。10% ウシ胎児血清および 1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (シグマ (SIGMA) M2025) を含有する MEM 培地を用いて、A 431 細胞を、5% 二酸化炭素ガスおよび水蒸気で飽和させたインキュベータ中で 37°C でインキュベートする。上記方法により得られるデヒドロフェニラヒスチンの精製検体を、対数増殖期の細胞に添加し、細胞周期の進行を、フローサイトメトリーおよび顕微鏡観察により分

50

析する。

【実施例 6】

【0316】

合成したデヒドロフェニラヒスチン(デヒドロPLH)誘導体の構造活性相関

1) 誘導体合成の概要

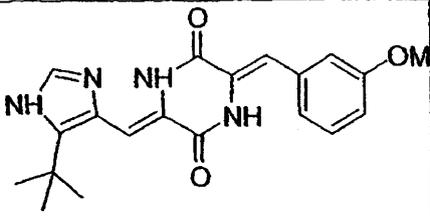
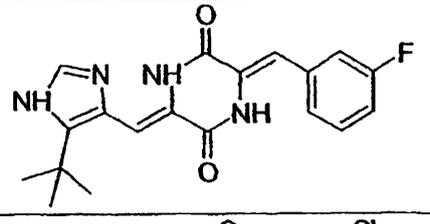
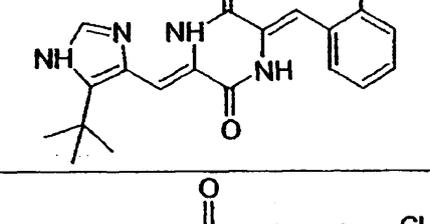
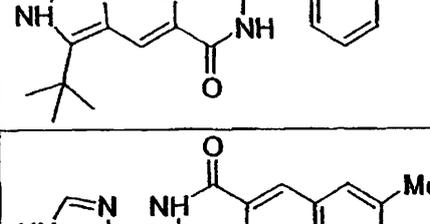
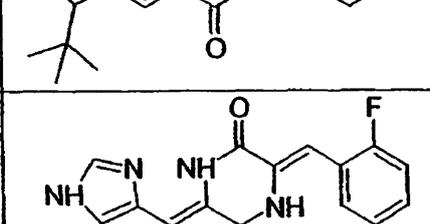
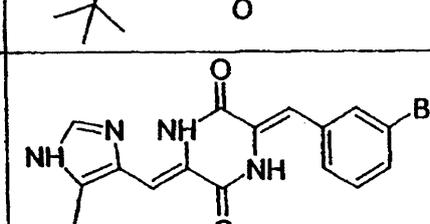
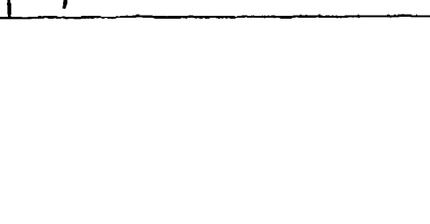
本明細書中に開示するデヒドロPLHの誘導体の多く(しかし、すべてではない)は、フェニル環に1つ、2つまたは3つの修飾を含む(以下の表5)。誘導体は、上述の方法により合成した。表5に示すように、ある特定の化合物は、デヒドロPLHおよびtBu-デヒドロPLHよりも強力な細胞毒性活性を示した。3nMのEC₅₀値を示す最も強力な化合物は、KPU-90であった。この値は、それぞれ、デヒドロPLHおよびtBu-デヒドロPLHの値よりも16倍および4倍高かった。これらの誘導体は、フェニル環のoまたはm位で、フッ素および塩素原子のようなハロゲン原子あるいはメチル、ビニルまたはメトキシ基による一置換を有する。ナフタレン、チオフエンおよびフラン環のようなヘテロアリアル構造に対する置換を伴う誘導体もまた強力な活性を誘発した。KPU-35、42、69、80および81もまた、tBu-デヒドロPLHよりも高い活性を示した。

10

【0317】

【表 5 - 1】

合成的強力なデヒドロPLH誘導体

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21
KPU-41		31

10

20

30

40

【表 5 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-29		44
KPU-16		42
KPU-32		42
KPU-42		54
KPU-46		44
KPU-44		43
tBu-PLH (KPU-2)		13

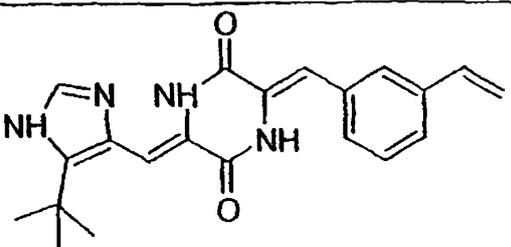
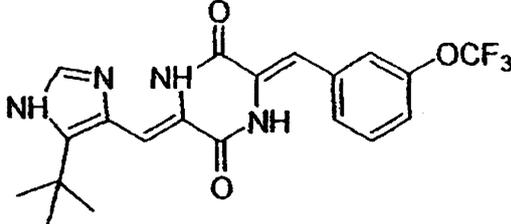
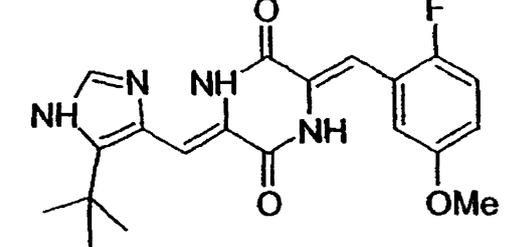
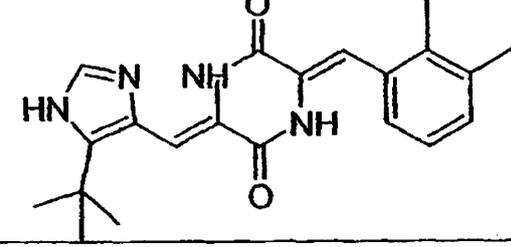
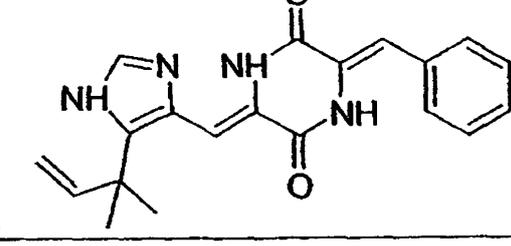
10

20

30

40

【表 5 - 3】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-69		16
KPU-80		13
KPU-81		19
KPU-90		3
デヒドロ PLH (KPU-1)		48

10

20

30

【0318】

2) フェニル環に対するメトキシ基の導入

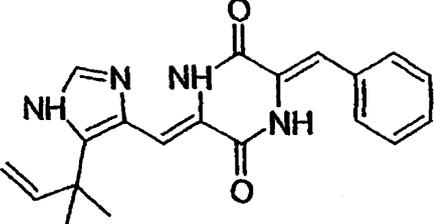
コルヒチンは、PLHと同様に - チューブリン上の同じ結合部位を認識する。コルヒチンは、そのA環およびB間上に4つの特徴的なメトキシ基を有する。単一または複数のメトキシ基による一連の置換を実施して、細胞毒性活性の結果を表6に示す。

40

【0319】

【表 6 - 1】

HT-29細胞の増殖に対する、メトキシ基置換の効果

化合物	構造	EC50 (nM)
デヒドロ PLH (KPU-1)		48

【表 6 - 2】

化合物	構造	EC50 (nM)
tBu PLH (KPU-2)		13
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980
KPU-13		2130

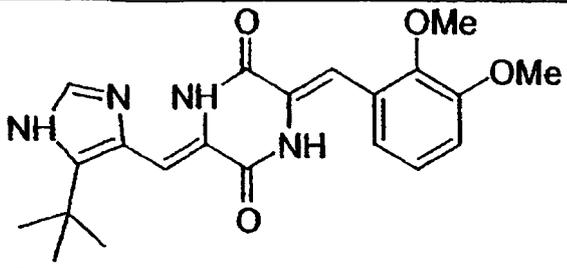
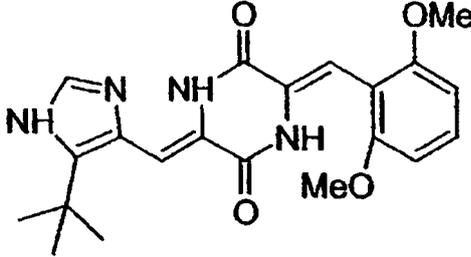
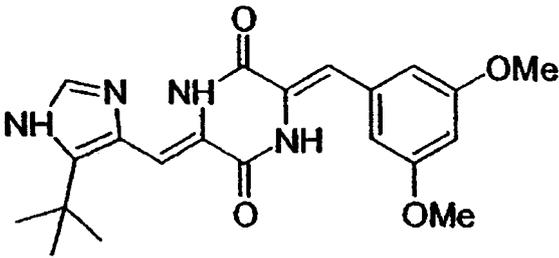
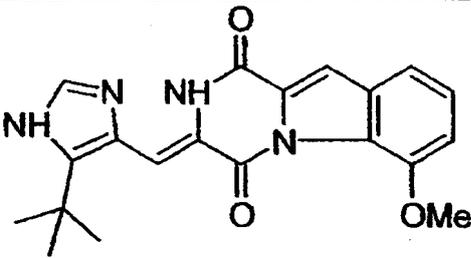
10

20

30

40

【表 6 - 3】

化合物	構造	EC50 (nM)
KPU-14		610
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

10

20

30

【0320】

結果は、mまたはo位での置換が、HT-29細胞に対する細胞毒性活性を増大させることを示した。KPU-9および16は、高い活性を示した。三重置換を伴うメトキシ誘導体(KPU-11、17および45)もまた活性を示した。KPU-24の構造は、質量分析により確認した。

【0321】

3) 電子求引性基による修飾

フェニル環上のより拡張された構造活性相関を研究するために、電子求引性基および電子供与性基の両方を含む一連の種々の官能基を導入した。HT-29細胞に対する細胞毒性の結果を、それぞれ表7および表8に示す。

40

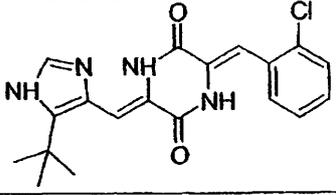
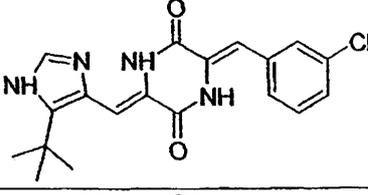
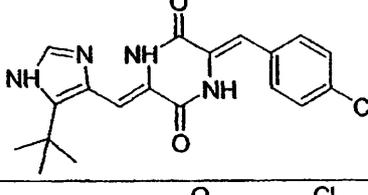
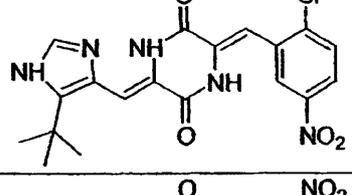
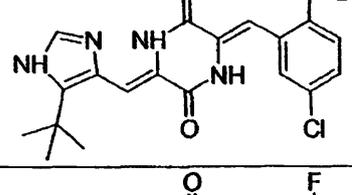
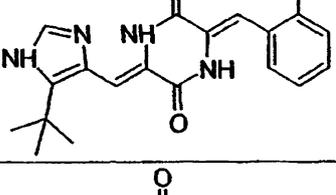
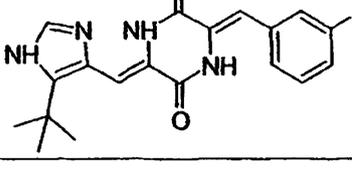
【0322】

oまたはm位での置換は、効果的に活性を増大させた。これらの結果は、メトキシ基の場合とよく一致した。

【0323】

【表 7 - 1】

HT-29細胞の増殖に対する、電子求引性基の効果

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545
KPU-21		51
KPU-52		110
KPU-37		21
KPU-35		10

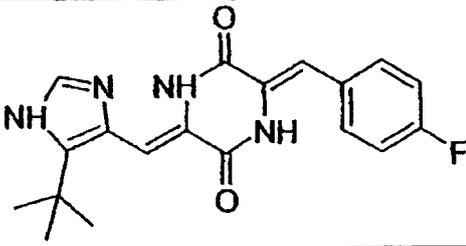
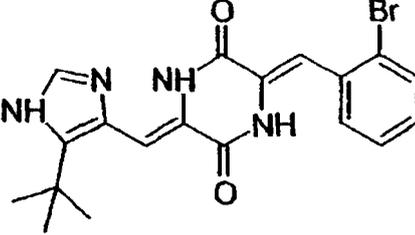
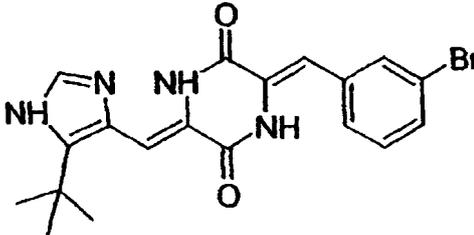
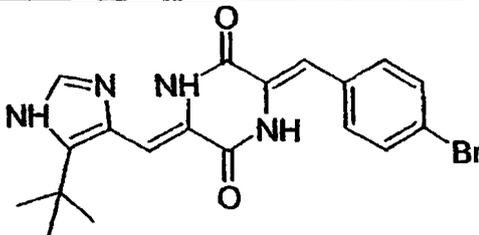
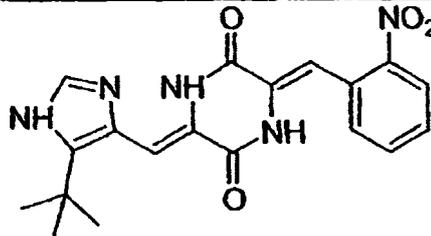
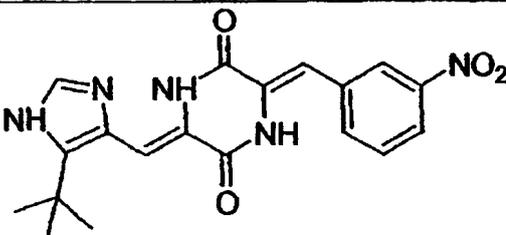
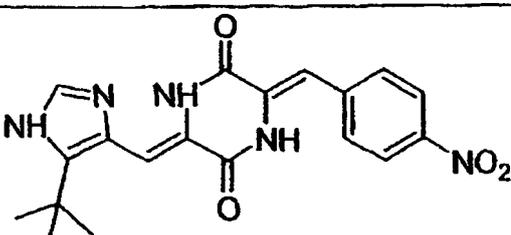
10

20

30

40

【表 7 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31
KPU-40		623
KPU-46		44
KPU-47		40
KPU-48		> 20 μM

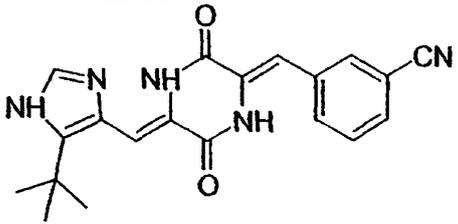
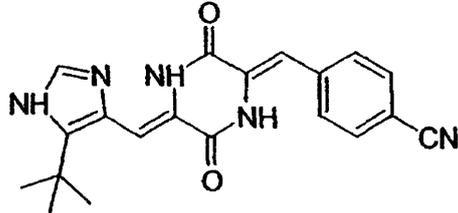
10

20

30

40

【表 7 - 3】

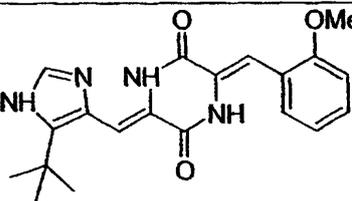
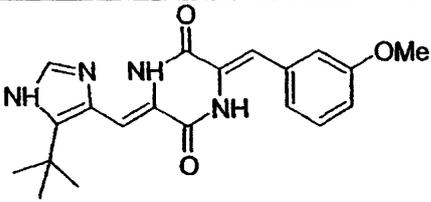
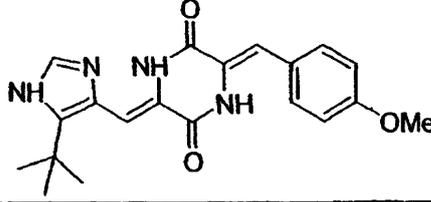
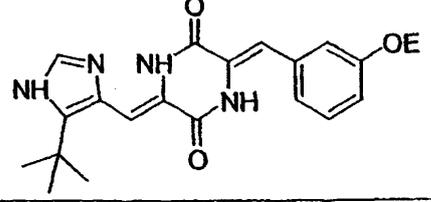
化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-49		28
KPU-43		> 20 μM

10

【 0 3 2 4 】

【表 8 - 1】

HT-29細胞の増殖に対する、電子供与性基の効果

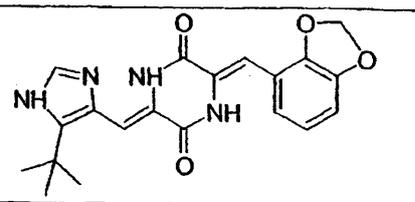
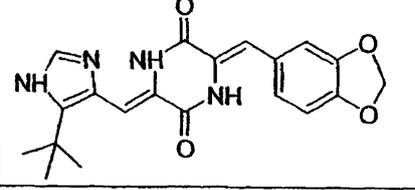
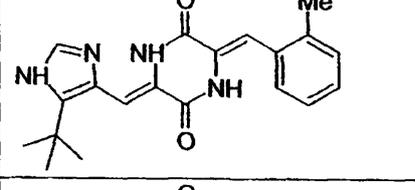
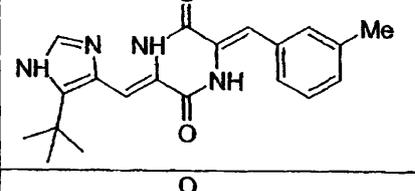
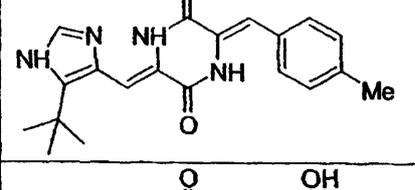
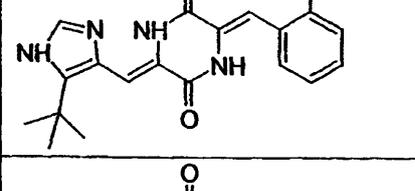
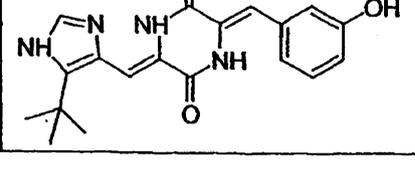
化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-44		43

20

30

40

【表 8 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-30		477
KPU-22		82
KPU-32		42
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 μM
KPU-51		617

10

20

30

【表 8 - 3】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-23		5870
KPU-58		>20 nM
KPU-54		> 20 μM
KPU-57		> 20 μM

10

20

【0325】

本開示は、任意の特定の科学的理論に拘束または限定されない。それにもかかわらず、当業者は、本明細書中に提示する結果を、立体障害にあまり影響を及ぼさない比較的小さな官能基がより強力な活性を誘発するのに好ましい場合があるということ、またエトキシ基（メトキシ基と比較した場合）またはBr原子（Cl原子と比較した場合）のようなわずかに大きな基は、例えばチュープリン結合部位との相互作用に好ましくない立体障害に影響を及ぼし得ることを示唆するものと解釈してもよいことが理解されよう。さらに、これらの置換基の電気特性は活性に影響を及ぼさなかったことから、これらの比較的小さな置換基は、チュープリンの結合部位と直接相互作用はしないが、結合に適切なデヒドロPLHのコンホメーションを制限することが示唆される。あるいは、別の考え得る仮説としては、水素供与体として水素結合を形成することができる親水性水酸基の導入は、活性を劇的に減少させるため、疎水性の特性は、チュープリン上のoまたはm位の結合部位でより重要な要素であり得る。

30

【0326】

表9に示すように、o位での細胞毒性活性における置換基の効果を、表10に示すようなm位の場合と同様に順序付けても良い。tBu-デヒドロPLHよりも高い活性を示した有効な官能基を有する化合物はまた、さらに修飾されてもよい。また、可視光照射下でZからEへの立体化学の移行が観察されたため、共役二重結合における電子密度を減少させる置換基は、光によるZからEへの移行の減少に寄与する場合があります。物理化学的により安定な構造を生じる。温度もまた、この移行をもたらす得る。

40

【0327】

環の2つの部位での修飾は、強力であるが、同様に生物学的に安定な化合物の開発に所望されることがある。フェニラヒスチンのフェニル環は、チトクロームP-450により酸化される。したがって、フェニル環の電子密度を減少させる二重の修飾は、P-450酸化を回避するのに有効である場合がある。したがって、-OMe、-Me、-Cl、-

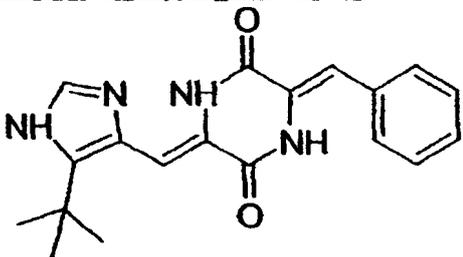
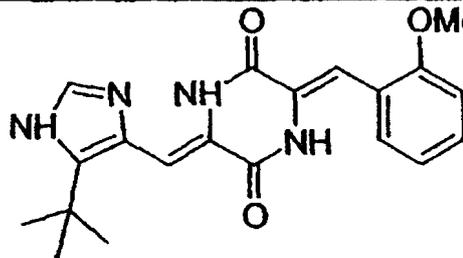
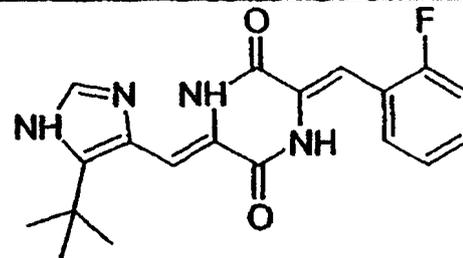
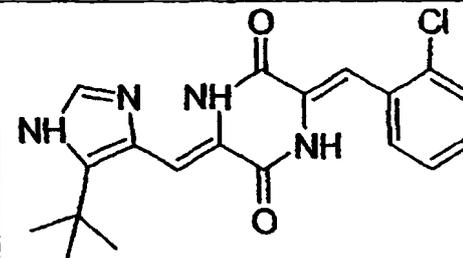
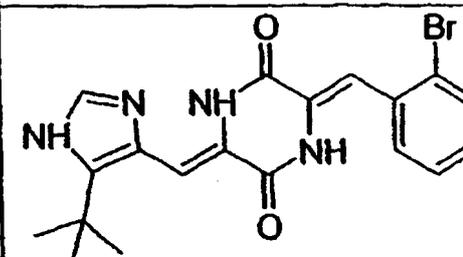
50

FおよびBrのような活性を増大させることができる要素に対するフッ素原子のような小さな電子求引性基の組合せは、より強力かつ生物学的に安定な薬物化合物を産生し得る。

【0328】

【表9-1】

o位での修飾の概要

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89
KPU-37		21
KPU-18		42
KPU-50		38

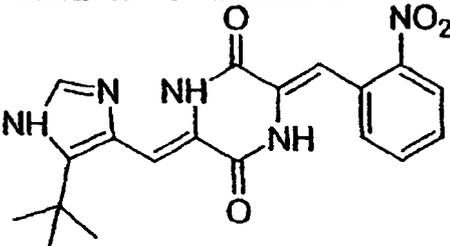
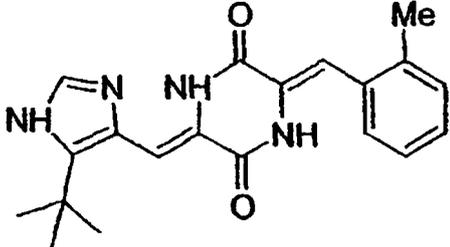
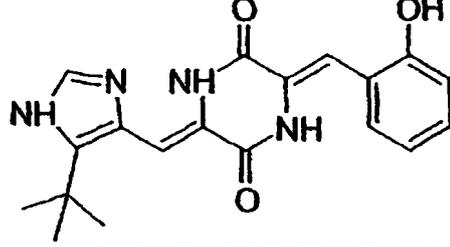
10

20

30

40

【表 9 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-46		44
KPU-32		42
KPU-53		> 20 μM

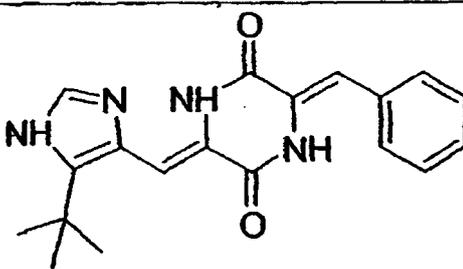
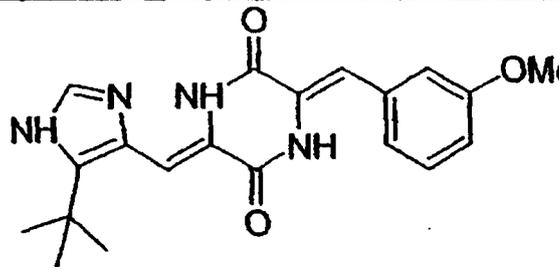
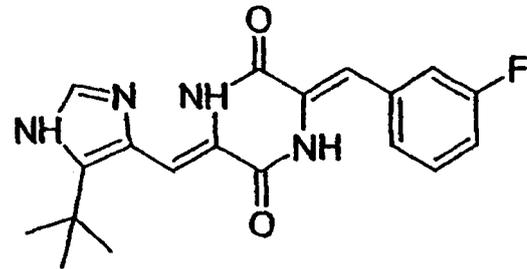
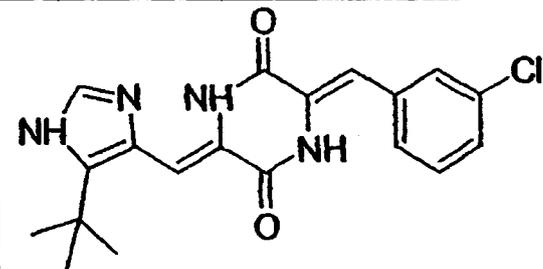
10

20

【 0 3 2 9 】

【表 10 - 1】

m位での修飾の概要

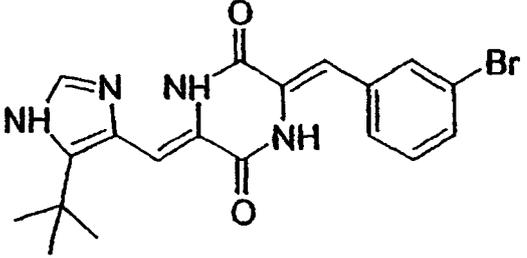
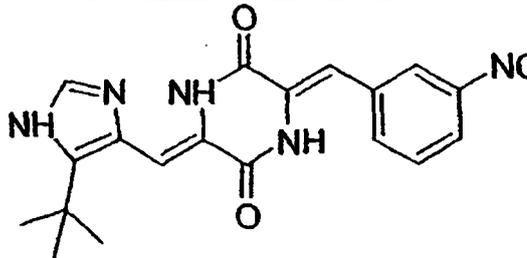
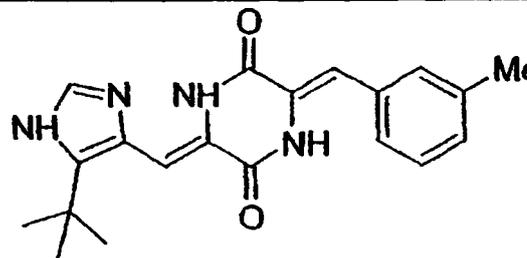
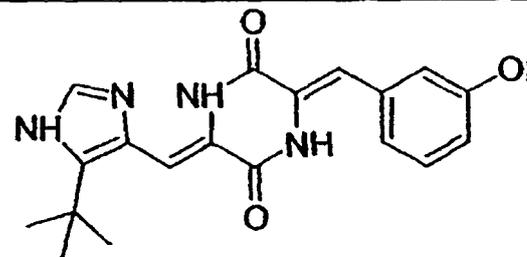
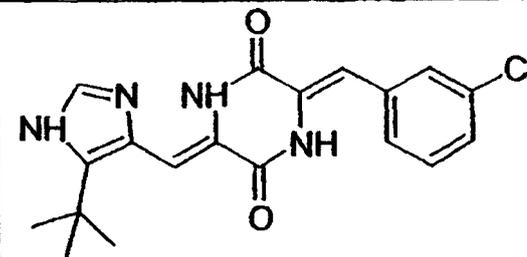
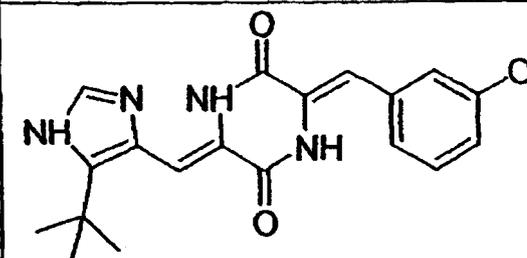
化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-2		48
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-19		20

10

20

30

【表 10 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45
KPU-51		617
KPU-49		28
KPU-44		43

【0330】

4) アリール複素環へのフェニル環の置換

フェニル環はまた、ヘテロアリール基で置き換えてもよい。細胞毒性活性に関するかか

る置き換えの結果を表 1 1 に示す。アリール窒素原子は、ジケトピペラジン環の NH 基と水素結合を形成し、ピリジンとジケトピペラジン環との間での分子のコンホメーションを一平面状に制限し得るため、デヒドロ PLH の活性コンホメーションは、ジケトピペラジン環のアミド水素原子とフェニル環の *o*-水素原子との間での立体反発により形成されるある特定レベルの二平面を要する (図 6)。

【 0 3 3 1 】

【 表 1 1 - 1 】

HT-29 細胞の増殖に対する、ヘテロアリール環による置き換えの効果

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-28		>20 nM
KPU-31		96
KPU-25		544
KPU-33		>20 nM
KPU-26		600
KPU-60		71
KPU-42		54

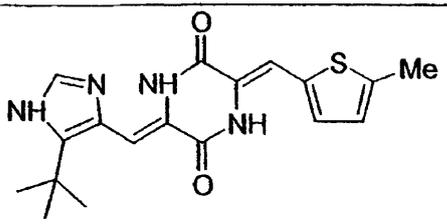
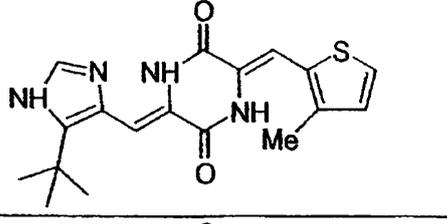
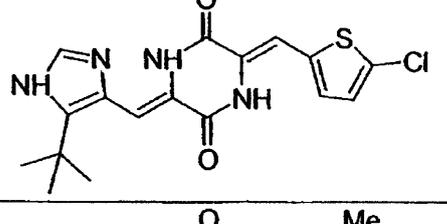
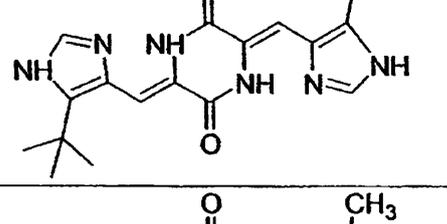
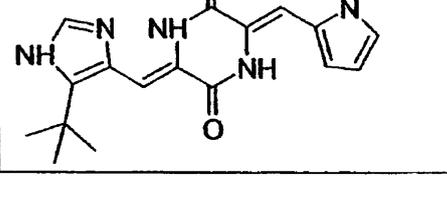
10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

化合物	構造	EC ₅₀ (nM)
KPU-27		80
KPU-29		44
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

10

20

30

【0332】

より小さなフランまたはチオフェン環によるフェニル環の置き換え、例えばKPU-29または42は、活性を示した。フェニル環は、強力な活性を維持しつつ、他の芳香族構造に変更させることできる。

【0333】

5) フェニラヒスチンの代謝

最近の彼の研究では、(±)-フェニラヒスチンを、ラット肝ミクロソームまたはヒト肝P450で処理した。ヒトの場合では、少なくとも7つの代謝産物が検出され、それらの中の2つ、すなわちP1およびP3が、主要な代謝産物であり、回収された代謝産物の60%以上に相当した。

40

【0334】

tBu-デヒドロPLHではエキソオレフィン構造が存在しないため、この合成した誘導体は、P1およびP4のような酸化をもたない。しかしながら、P3およびP5のような酸化は、肝代謝中に形成される。かかる代謝を防止する様々な誘導体は、フェニル環でのP450酸化を回避するのに有効である。イミダゾール環もまた、好ましくない酸化を回避するように修飾することができる。

【0335】

50

6) デヒドロPLHの物理化学的安定性

物理化学的安定性は、デヒドロPLHの好ましくない問題の1つである。フェニラヒスチンでは、ベンジル部分に付加的なオレフィン構造が存在しないため、かかる問題は存在しない。しかしながら、デヒドロPLHでは、ベンジリデン部分は、おそらく可視光で容易に活性化することができ、二重結合のより長い共役の存在に起因して、ZからEへの移行が頻繁に起きる。この移行は、標準的な室内照明下でさえも起きた。細胞毒性アッセイでは、幾つかの化合物が、インキュベーション中に、E体へと移行するが、この移行は、デヒドロPLHの場合では、おそらく1:1の比で平衡となる。この移行は制御することができる。このZ体からE体への移行はまた、チューブリン阻害剤と同じタイプであるコンプレタスタチンAでも既知であり、この問題を改善するための研究が幾つか報告された。

【0336】

7) プロドラッグ合成

E体はまた、デヒドロPLH、あるいは1つまたは複数のその類似体(本明細書中に記載する類似体を含む)のプロドラッグとして使用されても良い。抗チューブリン薬剤の望ましくない特性の1つは、腫瘍と無傷組織との間での低い選択性を含むが、これらの薬剤は、分子標的療法の1つに属する。これは、望ましくない副作用を引き起こす。しかしながら、化合物が、腫瘍組織のみで選択的に機能する場合、抗チューブリン薬剤のマイナスの副作用を低減させることができる。デヒドロPLH(Z体)は、可視光照射によりそのE異性体から産生することができるため、E体を投与して、腫瘍部位のみで光照射を実施すると、腫瘍のみが、光により産生するZ体により損傷を受け、無傷組織に対する不都合な影響は低減する。

【0337】

E体は、嵩高いが、生分解性のアシル基の付加により化学的に保護することができ、このアシル基は、プロドラッグとしてジケトピペラジン環に導入される。このアシル基は、体内でプロテアーゼにより切断することができる。したがって、アシル化したE化合物を投与前に維持し、続いて投与後に、それを真のE体に変更させて、それを局所的な光照射により生理活性なZ体へ移行させることができる。

【0338】

tBu-デヒドロPLHのこのアシルE体の合成スキームを図9に概要する。

【実施例7】

【0339】

合成したデヒドロフェニラヒスチンの薬学的配合物

1) 点滴、注射、注入等により静脈内に投与される配合物

粉末グルコース5gを含有するバイアルそれぞれに、上記方法により合成される化合物10mgを無菌で添加し、密封する。窒素、ヘリウムまたは他の不活性ガスを満たした後、バイアルを冷暗所に保管する。使用前に、内容物をエタノール中に溶解して、0.85%生理食塩水溶液100mlに添加する。得られた溶液を、癌性腫瘍の成長を阻害する方法として、かかる腫瘍を有すると診断されたヒトにおいて、およそ10ml/日~およそ1000ml/日で、当業者により適切と思われる通りに、点滴により静脈内に、あるいは皮下または腹腔内注射により投与する。

【0340】

2) 経口投与されるべき配合物等

上記方法により合成される化合物1g、ラクトース98gおよびヒドロキシプロピルセルロース1gを完全に混合することにより得られる混合物を、任意の従来の方法により顆粒として成形する。顆粒を完全に乾燥させて、ふるいにかけて、ピンの中のあるいはヒートシーリングによるパッケージングに適した顆粒製造物を得る。得られた顆粒製造物を、ヒトにおける癌性腫瘍を治療する技術分野の当業者により適切であると思われる通りに、症状に応じて、およそ100ml/日~およそ1000ml/日で経口投与される。

【0341】

3) 局所的に投与されるべき配合物

有効量の化合物の個体への投与はまた、個体の皮膚の患部に直接化合物（複数可）を投与することにより局所的に達成することができる。この目的では、投与されるか、または塗布される化合物は、ジェル、軟膏、ローションまたはクリームのような薬理的に許容可能な局所担体（これは、水、グリセロール、アルコール、プロピレングリコール、脂肪アルコール、トリグリセリド、脂肪酸エステル、または鉱物油のような担体を含むが、これらに限定されない）を含む組成物の形態である。他の局所担体としては、鉱油、パルミチン酸イソプロピル、ポリエチレングリコール、エタノール（95%）、水中のモノラウリン酸ポリオキシエチレン（5%）、または水中のラウリル硫酸ナトリウム（5%）が挙げられる。酸化防止剤、湿潤剤、粘性安定剤、および類似の作用物質のような他の物質を、必要に応じて添加してもよい。アゾン（Azone）のような経皮浸透増強剤もまた包含してもよい。さらに、ある特定の状況では、化合物は、皮膚上、皮膚中または皮膚下に置かれるデバイス内に配置させてもよいことが予測される。かかるデバイスとしては、パッチ、インプラント、および受動または能動放出メカニズムのいずれかによる化合物を皮膚へ放出する注射が挙げられる。

【実施例 8】

【0342】

KPU-2、KPU-35 および t-ブチルフェニラヒスチンの *in vitro* での薬理学

KPU-2、KPU-35 および t-ブチルフェニラヒスチンを用いて実施した *in vitro* での有効性研究としては、A) 6つの腫瘍細胞系のパネル、B) 多剤耐性腫瘍細胞における研究、および C) 作用メカニズムを決定するための研究が挙げられる。

【0343】

A) 6つの腫瘍細胞系のパネルにおける KPU-2、KPU-35 および t-ブチルフェニラヒスチンの研究

以下の細胞系（括弧中には源）を使用した：HT29（ヒト結腸腫瘍、ATCC、HTB-38）、PC3（ヒト前立腺腫瘍、ATCC、CRL-1435）、MDA-MB-231（ヒト胸部腫瘍、ATCC、HTB-26）、NCI-H292（ヒト非小細胞肺癌腫瘍、ATCC、CRL-1848）、OVCAR-3（ヒト卵巣腫瘍、ATCC、HTB-161）、B16-F10（マウス黒色腫、ATCC、CRL-6475）および CCD-27sk（正常なヒト線維芽細胞、ATCC、CRL-1475）。細胞を、それらの各々の培地中に半密集的な密度以下で維持した。

【0344】

細胞毒性アッセイは、細胞生存度の指標としてレサズリン蛍光を用いて、実施例 4 において上述したように実施した。

【0345】

開示する化合物は、各種および別個の腫瘍細胞系に対して有効な作用物質である。具体的には、例えば、KPU-2 および KPU-35 は効力（低ナノモル範囲で活性を示す）および有効性（最大細胞毒性効果に関して最も応答性を示す）の両方に関して、HT-29 腫瘍細胞系に対して最も有効的であった。t-ブチル-フェニラヒスチンは、PC-3 腫瘍細胞系に対してその最大の効力を示したが、最大の有効性は、HT-29 細胞系に対して示された。KPU-2 および KPU-35 は、t-ブチル-フェニラヒスチンよりも概して 10~40 倍強力であったのに対して、有効性は、種々の腫瘍細胞系において 3つの化合物すべてに関して同様であった。HT-29、PC-3、MDA-MB-231 および NCI-H292 腫瘍細胞系はすべて、NPI 化合物に対して同様に反応したのに対して、B16-F10 は、いくらか感受性が弱いようであった。t-ブチル-フェニラヒスチンは、OVCAR-3 細胞系を除いて、>20~>100 の範囲の比で、正常な線維芽細胞と腫瘍細胞系との間で顕著な差異を示した。

【0346】

【表 1 2】

腫瘍パネラスクリーンにおけるKPU-2、KPU-35およびt-ブチルフェニラヒスチンの活性

細胞系	KPU-2			KPU-35			t-ブチルフェニラヒスチン		
	平均	SD	n	平均	SD	n	平均	SD	n
HT-29結腸									
IC50nM	9.8	2.4	4	8.2	2.0	4	420	473	3
%細胞毒性	82.5	5.3	4	81.3	4.0	4	88	0.2	3
PC-3前立腺									
IC50nM	13.4	0.7	4	13.2	2.5	4	174	-	2
%細胞毒性	60.3	2.1	4	56.8	1.0	4	59.5	-	2
MDA-MB-231胸部									
IC50nM	13.8	1.9	3	9.7	4.2	4	387	-	2
%細胞毒性	56.7	7.2	3	59.3	5.6	4	65.5	-	2
NCI-H292肺									
IC50nM	17.5	1.1	4	15.9	1.1	4	384	194	3
%細胞毒性	70.5	2.9	4	68.5	2.9	4	65	5	3
OVCAR-3卵巢									
IC50nM	>20,000	-	4	>20,000	-	4	>20,000	-	2
%細胞毒性	45.8	3.0	4	39	2.2	4	37	-	2
B16-F10黒色腫									
IC50nM	37.1	26.3	4	32.3	19.9	4	736	650	3
%細胞毒性	71.8	2.5	4	72.0	2.2	4	74	2	3
CCD-27sk線維芽細胞									
IC50nM	9.2	2.9	4	7.4	2.6	4	>20,000	-	2
%細胞毒性	64.3	2.4	4	60.8	1.9	4	45	-	2

【0347】

10

20

30

40

50

B) 薬物耐性細胞系における研究

臨床腫瘍学における化学療法剤の使用における主な挑戦の1つは、腫瘍細胞による薬剤効果に対する耐性の発達である。耐性の発達に関しては幾つかのメカニズムが存在し、そのそれぞれが、化学療法薬物に対して異なる効果を有する。これらのメカニズムとしては、MDR1によりコードされるP-糖タンパク質またはMPR1によりコードされる多剤耐性関連タンパク質1のようなATP依存性流出ポンプの発現の増大が挙げられる。薬剤摂取の減少、薬剤の標的の変更、薬物誘導性DNA損傷の修復の増大、アポトーシス経路の変更、およびチトクロームP450酵素の活性化は、癌細胞が抗癌薬物に対して耐性となるメカニズムの他の例である。選択した化合物を、耐性の異なる2つのメカニズム：P-糖タンパク質の過剰発現およびトポイソメラーゼII活性の変更を示す異なる3つの細胞系で研究した。 10

【0348】

1) ヒト子宮肉腫腫瘍細胞系ペア：MES-SA (タキソール感受性) およびMES-SA-DX (タキソール耐性)

この細胞系は、上昇したmdr-1 mRNAおよびP-糖タンパク質(放出ポンプメカニズム)を発現する。シクロスポリンA(CsA)による前処理は、P-糖タンパク質を阻害し、耐性が上昇したP-糖タンパク質に起因する化合物に関して耐性細胞系において活性を回復させる。

【0349】

表13からわかるように、KPU-2およびKPU-35は、感受性の系と同様に耐性細胞系において同じ効力を有し、t-ブチル-フェニラヒスチンの効力は、ほんのわずかに減少した。シクロスポリンA(CsA)前処理は、選択した化合物の効力を変えなかった。対比して、タキソールは、MES-SA-DX耐性細胞系において事実上不活性であったのに対して、この化合物は、感受性細胞系では非常に強力であった。CsA処理は、MES-SA-DX細胞系のタキソールに対する感受性を回復させた。MES-SA-DX細胞系はまた、エトポシド(60倍)、ドキソルビシン(34倍)およびミトザントロン(20倍)に対して減少した感受性を示した。 20

【0350】

これらのデータは、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの効果は、この細胞系ではタキソール関連の耐性メカニズム(p-糖タンパク質)に影響を受けにくく、またタキソール由来の交差耐性は、このモデルではこれらの選択した化合物には起こらないことを示す。 30

【0351】

【 0 3 5 2 】
 MES-S-A タキソール感受性およびMES-S-A DX タキソール耐性ヒト子宮肉腫腫瘍細胞系におけるKPU-2、KPU-35、
 t
 らブチルフェニラヒスチンおよびタキソールの活性
 【 1 3 】

化合物研究	MES-S-A 感受性				MES-S-A DX 耐性			
	CsAなし		CsA前処理		CsAなし		CsA前処理	
	IC50nM	IC50nM	CsAなし比	CsAなし	IC50nM	IC50nM	CsAなし比	CsAなし
KPU-2 研究1 研究2	8.5	-	-	10.5	1.2	-	-	-
	19.4	27.4	1.4	21.7	1.1	37.8	1.74	-
KPU-35 研究1 研究3	6.6	-	-	5.2	0.8	-	-	-
	3.9	2.0	0.5	2.5	0.6	6.7	2.7	-
t ラブチル フェニラ ヒスチン	144	-	-	825	5.7	-	-	-
	122	162	1.3	694	4.3	622	0.9	-
タキソール 研究1 研究2 研究3	4.4	-	-	>20,000	>455	-	-	-
	13.3	7.6	0.6	>>100	>>8	40	<<0.25	<<0.001
	7.3	2.8	0.4	>24,000	>3000	2.0	<<0.001	<<0.001

10

20

30

40

50

2) ヒト急性前骨髄球性白血病細胞系ペア：HL-60 (ミトキサントロン感受性) および HL-60/MX-2 (ミトキサントロン耐性)

この細胞系は、P-糖タンパク質の過剰発現なしで変更されたトポイソメラーゼ II 触媒活性を有する非定型的な薬物耐性特性を有するとみなされる。

【0353】

表14でわかるように、これらの結果は、選択した新規化合物の効力が、感受性および耐性HL-60細胞系で非常に類似することを示す。対比して、ミトキサントロンは、耐性HL-60/MX-2細胞系において24倍有効性を失う。

【0354】

したがって、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンは、この細胞系では、ミトキサントロンと同じ耐性メカニズムに影響を受けにくく、このモデルではこれらの選択した新規化合物に対するミトキサントロン由来の交差耐性は存在しない。

【0355】

【表14】

HL-60 ヒト急性前骨髄球性白血病腫瘍感受性および耐性細胞系ペアにおけるKPU-2、KPU-35、t-ブチル-フェニラヒスチンおよびミトキサントロンの活性

化合物	HL-60 感受性	HL-60 耐性	
	IC50 nM	IC50 nM	感受性に対する比
KPU-2	6.4	8.17	1.28
KPU-35	9.2	7.3	0.79
t-ブチル-フェニラヒスチン	255	175	0.69
ミトキサントロン	202	4870	24.1

【0356】

3) ヒト胸部癌腫細胞系ペア：MCF-7 (タキソール感受性) および MCF-7/ADR (タキソール耐性)

この研究は、タキソールと比較してKPU-2を含む。KPU-2は、この細胞系ペアの感受性成分および耐性成分の両方で、類似の効力を示した。対比して、タキソールは、耐性細胞系では事実上不活性であったのに対して、感受性細胞系では低ナノモルの効力が存在した(表15)。

【0357】

これらの研究により、種々のヒト腫瘍細胞系において、タキソール耐性はKPU-2に移行しないことを確認する。

【0358】

【表15】

MCF-7 ヒト胸部癌腫感受性および耐性細胞系ペアにおけるKPU-2ならびにタキソールの活性

化合物	MCF-7 感受性	MCF-7/ADR 耐性	
	IC50 nM	IC50 nM	感受性に対する比
KPU-2	39.6	27.4	0.69
タキソール	2.6	>> 100	>> 38

【0359】

C) 作用メカニズムの研究

1) 微小管機能に対する作用

- チューブリンの染色により、チューブリンに対する、コルヒチンおよびタキソールと比較した場合の K P U - 2 および t - ブチル - フェニラヒスチンの効果を評価するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Cambrexからの H u V E C) をこの研究において使用した。

【 0 3 6 0 】

K P U - 2、t - ブチル - フェニラヒスチンまたはコルヒチンへの 30 分の暴露 (すべて 2 μ M で) は、H u V E C 細胞において、D M S O 対照で観察されるのとは対比して、無傷の微小管構造の欠如、および細胞膜小胞形成 (アポトーシスの明らかな指標) により示される微小管脱重合を誘導したのに対して、タキソールは、これらの条件下では、微小管脱重合を誘導しなかった。コルヒチンは、既知の微小管脱重合剤であるのに対して、タキソールは、チューブリン安定剤である。C C D - 2 7 s k 細胞を K P U - 2 またはコルヒチンに暴露させた場合に、同様の結果が得られた。

10

【 0 3 6 1 】

2) アポトーシスの誘導

アポトーシスおよびその調節障害は、腫瘍学において重要な役割を果たす。腫瘍細胞におけるプログラム細胞死周期の選択的な誘導は、多くの化学療法薬発見プログラムの目標である。このアポトーシスの誘導は、特徴的な細胞膜小胞形成、D N A 断片化、抗アポトーシス因子 B c l - 2 の過剰リン酸化、カスパーゼカスケード (caspase cascade) の活性化およびポリ (A D P リボース) ポリメラーゼ (P A R P) の切断を含む種々の方法により証明することができる。

20

【 0 3 6 2 】

アポトーシス細胞死の特徴的な徴候としては、細胞膜小胞形成、核の崩壊、細胞収縮および凝縮、ならびに最終的にはネクローシス細胞死と非常に示差的な細胞死が挙げられる。K P U - 2 は、ヒト前立腺腫瘍細胞において、アポトーシスの初期段階と関連した典型的な形態学的変化を誘導した。同様の見解がまた、K P U - 2 による H u V E C 細胞の処理で明らかであった。

【 0 3 6 3 】

3) D N A 断片化

ゲル電気泳動により可視化することができる特有のラダーパターンを生じるヌクレオソーム間の D N A 切断は、アポトーシスの最終段階の特徴である。このアプローチを用いて、ハリミド (halimide) およびデヒドロフェニラヒスチン (K P U - 1) と比較して、ジャーカット (Jurkat) 細胞 (ヒト T 細胞白血病系) における D N A ラダーリングに対する K P U - 2 の効果を研究した。K P U - 2 は、1 n M 濃度で D N A ラダーリングを誘導したのに対して、ハリミドおよび K P U - 1 は、相当低い効力であった。

30

【 0 3 6 4 】

4) カスパーゼカスケードの活性化

カスパーゼ - 3、カスパーゼ - 8 およびカスパーゼ - 9 を含むカスパーゼカスケードにおける幾つかの酵素は、アポトーシス中に活性化される。カスパーゼ - 3 の活性を、K P U - 2、K P U - 3 5 および t - ブチル - フェニラヒスチンによる処理後に、ジャーカット細胞でモニタリングした。

40

【 0 3 6 5 】

カスパーゼ - 3 は、ハリミドと同様の様式で、3 つの化合物すべてによる処理により、用量依存的な様式で活性化されたことが、結果により示される。カスパーゼ - 3 の活性化は、ジャーカット細胞系における細胞毒性の I C 5 0 に関して、同様の濃度範囲にわたって起こった (表 1 6)

【 0 3 6 6 】

【表 16】

ジャーカット細胞における K P U - 2、K P U - 3 5 および t -
ブチルフェニラヒスチンの細胞毒性

N P I 化合物	細胞毒性	
	効力 I C 5 0 n M	有効性 細胞死 %
K P U - 2	1 1	9 4
K P U - 3 5	5	9 3
t - ブチル - フェニラ ヒスチン	1 6 5	9 3
ミトキサントロン	4 1	9 9

10

【 0 3 6 7 】

5) ジャーカット細胞におけるポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ (P A R P) の切断

ジャーカット細胞において、これらの化合物がアポトーシスを誘導する能力を評価するために、ポリ (A D P - リボース) ポリメラーゼ (P A R P) の切断をモニタリングした。P A R P は、カスパーゼ - 3 の主要な細胞内標的の 1 つである 1 1 6 k D a の核タンパク質である。P A R P の切断は、8 9 k D a の安定な生成物を生成し、このプロセスは、ウェスタンブロット法により容易にモニタリングすることができる。カスパーゼによる P A R P の切断は、アポトーシスの特質の 1 つであり、したがって、このプロセスにとって優れたマーカーとして役立つ。1 0 0 n M の K P U - 2 は、化合物への細胞の暴露の 1 0 時間後に、ジャーカット細胞における P A R P の切断を誘導した。K P U - 2 は、ハリミドまたは K P U - 1 のいずれよりも活性であるようであった。

20

【 0 3 6 8 】

6) H u V E C 細胞における血管透過性の増強

微小管を脱重合する化合物 (例えば、コンプレタスタチン A - 4 リン酸塩、Z D 6 1 2 6) は、i n v i v o の腫瘍において、血管虚脱を誘導することが示されている。この血管虚脱は、初期には電解質への、次いで直後の巨大分子への血管細胞透過性の迅速な誘導に先行する。蛍光標識したデキストランに対する H u V E C 細胞の透過性の増強を、血管虚脱に関する代用アッセイとして使用する。

30

【 0 3 6 9 】

K P U - 2、K P U - 3 5 および t - ブチル - フェニラヒスチンはすべて迅速に (1 時間以内)、コルヒチンと同様の程度に、有意な H u V E C 単層透過性を誘導した。微小管安定剤であるタキソールは、このアッセイでは不活性であった (図 1 2)。

【 0 3 7 0 】

7) 広範囲のキナーゼスクリーンにおけるプロフィール

K P U - 2 を、6 0 個の異なるキナーゼのパネル中で、1 0 μ M の濃度で初めにスクリーニングした。A T P 濃度は、1 0 μ M であった。4 つのキナーゼは、一次スクリーニングでは 5 0 % 以上が阻害され、二次スクリーニングで決定した I C 5 0 を表 1 7 に提示する。I C 5 0 値はすべて、低マイクロモル範囲内であり、それは、これらのキナーゼの阻害が腫瘍細胞の細胞毒性に関して観察される低ナノモル活性に関連しないことを示す。

40

【 0 3 7 1 】

【表 17】

選択したキナーゼに対する K P U - 2 の活性

キナーゼ	I C 5 0 (μ M)
C D K 1 / サイクリン B (ヒト)	1 0 . 1
c - R A F (ヒト)	8 . 9
J N K 3 (ラット)	6 . 8
L y n (マウス)	1 1 . 1

【実施例 9】

【0372】

i n v i v o 薬理学

K P U - 2 による予備研究を、マウスにおいて M X - 1 (胸部) および H T - 2 9 (結腸) 異種移植片モデルならびに P - 3 8 8 マウス白血病腫瘍モデルを用いて実施した。i n v i t r o 腫瘍パネルにおいて活性に基づき選択される他の腫瘍モデルは、D U - 1 4 5 (前立腺)、M C F - 7 (胸部)、および A 5 4 9 (肺) 細胞系であった。ヒト膵臓腫瘍 (M i a P a C a - 2) もまた含まれた。新規化合物を、単一療法として、および臨床的に使用する化学療法剤と併用して研究した。選択した新規化合物の用量は、急性忍容性試験により決定し (最大許容用量、M T D)、各研究中に必要であれば調節した。臨床的に使用する化学療法剤の用量は、歴史上の (historical) 研究に基づいて選択した。

【0373】

K P U - 2 は、これらの 5 つの腫瘍モデルにおいて研究されるべき第 1 の化合物であった。この研究の初期の結果に続いて、3 つの化合物すべてを、H T - 2 9 ヒト結腸腫瘍、D U - 1 4 5 ヒト前立腺および M C F - 7 ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおいて比較した。

【0374】

上述のモデルはすべて、皮下異種移植片移植技法 (subcutaneous xenograft implantation technique) を使用し、拡大された (または明らかな) 抗腫瘍活性をもたらす皮下の脈管構造に対する化合物の選択的効果を潜在的に受けやすい。この可能性を防ぐために、他の 2 つの腫瘍モデルを研究に取り入れてきた。これらのうちの一方は、B 1 6 - F 1 0 マウス黒色腫瘍細胞の静脈内注射に続く、肺転移の観察である。他方のモデルは、マウス乳房脂肪体における M D A - 2 3 1 ヒト胸部腫瘍細胞の移植である。この後者のモデルは異種移植片モデルであるものの、皮下の脈管構造は関与しない。

【0375】

方法

1) 異種移植片モデル

使用した動物は (例外は、個々の研究に対して示してある)、5 ~ 6 週齢の雌ヌードマウス (n u / n u) (~ 2 0 g、ハーラン (Harlan)) であった。群の大きさは、別記しない限り、1 群当たり 9 ~ 1 0 匹のマウスであった。

【0376】

腫瘍移植に使用される細胞系は、H T - 2 9 ヒト結腸腫瘍、M C F - 3 7 ヒト胸部腫瘍、A 5 4 9 ヒト非小細胞肺腫瘍、M i a P a C a - 2 ヒト膵臓腫瘍、D U - 1 4 5 ヒト前立腺腫瘍であった。

【0377】

選択した新規化合物は、個々の研究に対して示した用量で、腹腔内 (i . p .) 経路により単一療法として投与された。併用研究に関して、選択した参照化学療法剤 (reference chemotherapy agents) は、化合物の 1 5 ~ 3 0 分前に注射した。

【0378】

これらの研究で使用した担体は、選択した新規化合物に関しては、D M S O 1 2 . 5 %、クレマフォー (C r e m a p h o r) 5 % およびピーナツ油 8 2 . 5 % であり、タキソテールに関しては、(1 : 3) ポリソルベート 8 0 : 1 3 % エタノールであり、パクリ

10

20

30

40

50

タキセルに関しては、(1:1)クレマフォー(Cremaphor):エタノールであり、CPT-11に関しては、溶液1mL当たり、塩酸イリノテカン20mg、ソルビトールNF粉末45mg、および乳酸0.9mgを含む担体であった(pHは、NaOHまたはHClで7.4に調節される)。生理食塩水希釈物を用いて、参照化合物に使用する注射濃度を達成する。

【0379】

HT-29ヒト結腸腫瘍モデル

ヌードマウス宿主において皮下で成長中の腫瘍から収集したHT-29腫瘍の断片を、トロカールにより皮下的に(s.c.)動物に移植した。腫瘍サイズが5mm×5mmに到達した際(約10~17日)、動物を処理群および対照群に組み合わせた。1日目から始めて、1週間に二度マウスを秤量し、1週間に二度カリパスを用いて、腫瘍測定を行った。腫瘍測定は、式($W^2 \times L$)/2を用いて、推定腫瘍重量mgに変換した。対照群の推定腫瘍重量が平均1000mgに達した際に、マウスを秤量して、屠殺して、腫瘍を取り出した。腫瘍を秤量して、1群当たりの平均腫瘍重量を算出して、腫瘍成長阻害(TGI)を各群に対して決定した(100%-平均処理腫瘍重量の変化/平均対照腫瘍重量の変化×100)。

10

【0380】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、選択した新規化合物に、3日毎に15日間[1、4、8、11および15(q3d×5)]、腹腔内注射した。CPT-11は、1日目、8日目および15日目に(qw×3)腹腔内投与した。

20

【0381】

MCF-7ヒト胸部腫瘍モデル

雌ヌードマウス(~20g)に、21日放出性の(21-day release)エストロゲン(0.25mg)ペレットを皮下移植した24時間後に、MCF-7腫瘍断片(ヌードマウス宿主において皮下腫瘍から収集される)を皮下的に移植した。続いて、標準的な化学療法剤としてタキソテルを使用して、HT-29モデルに記載したように、研究を進めた。

【0382】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、新規化合物は、1日目~5日目に毎日(1日目および5日目を含む(qd×5))、腹腔内経路により注射した。タキソテルは、1日目、3日目および5日目に(qod×3)、静脈内投与した。

30

【0383】

A549ヒト肺腫瘍モデル

ヌードマウス宿主の皮下で成長中の腫瘍から収集されるA549腫瘍の断片を、トロカールにより皮下的に(s.c.)動物に移植した。腫瘍サイズが5mm×5mmに到達した際(約10~17日)、動物を処理群および対照群に組み合わせた。研究の残部は、標準的な化学療法剤としてタキソテルおよびCPT-11を使用して、HT-29モデルに記載したように進めた。

【0384】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、試験化合物は、CPT-11併用に関してはq3d×5の用量スケジュールで、あるいはタキソテルとの併用に関してはqd×5用量レジメンで、腹腔内経路により投与した。CPT-11は、qw×3スケジュールで、腹腔内経路により投与した。タキソテルは、qod×3用量レジメンで、静脈内投与した。

40

【0385】

MiaPaCa-2ヒト膵臓腫瘍モデル

ヌードマウス宿主の皮下で成長中の腫瘍から収集されるMiaPaCa-2腫瘍の断片を、トロカールにより皮下的に(s.c.)動物に移植した。腫瘍サイズが5mm×5mmに到達した際(約10~17日)、動物を処理群および対照群に組み合わせた。研究の残部は、標準的な化学療法剤としてゲムシタピンを使用して、HT-29モデルに記載したように進めた。

50

【0386】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、試験化合物は、3日毎に1日目、4日目、7日目、10日目および15日目に（q 3 d × 5）、腹腔内経路により投与した。ゲムシタピンは、1日目、4日目、7日目および10日目に（q 3 d × 4）、腹腔内経路により投与した。

【0387】

DU - 145 ヒト前立腺腫瘍モデル

雄のヌードマウス宿主の皮下で成長中の腫瘍から収集されるDU - 145腫瘍の断片を、トロカールにより皮下的に（s . c .）雄マウスに移植した。腫瘍がおよそ5 mm × 5 mmに到達した際（約13 ~ 17日）、動物を処理群および対照群に組み合わせた。研究の残部は、標準的な化学療法剤としてタキソテルを使用して、HT - 29モデルに記載したように進めた。

10

【0388】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、試験化合物は、1日目、3日目、5日目、8日目および11日目に（q 3 d × 5）、腹腔内経路により投与した。タキソテルは、1日目、3日目および5日目に（q 2 d × 3）、静脈内投与した。

【0389】

2) 非皮下移植腫瘍モデル

使用した動物は、5 ~ 6週齢の雌ヌードマウス（nu / nu）（MDA - 231研究）またはB6D2F1マウス（B16 - F10研究）（~ 20 g、ハーラン（Harlan））であった。群の大きさは、別記しない限り、1群当たり10匹のマウスであった。

20

【0390】

使用した細胞系は、MDA - MB - 231ヒト胸部腫瘍およびB16 - F10マウス黒色腫細胞であった。

【0391】

NPI化合物は、個々の研究に対して示した用量で、腹腔内経路により単一療法として投与された。併用研究に関して、選択した参照化学療法剤は、NPI化合物の15 ~ 30分前に注射した。

【0392】

MDA - 231 ヒト胸部腫瘍

*in vitro*細胞培養から収集した 2×10^6 個のMDA - 231細胞を、乳房脂肪体中で、雌ヌードマウスに注射した。腫瘍サイズが5 mm × 5 mmに到達した際（約14 ~ 28日）、動物を処理群および対照群に組み合わせた。続いて、研究は、標準的な化学療法剤としてパクリタキセルを使用して、HT - 29モデルに記載したように進めた。

30

【0393】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、試験化合物は、1日目、4日目、8日目、11日目および15日目に（q 3 d × 5）、腹腔内経路により投与した。パクリタキセルは、1日目 ~ 5日目に（q d × 5）、腹腔内経路により投与した。

【0394】

B16 - F10 転移性マウス黒色腫モデル

0日目に、*iv*経路により、マウスに、B16 - F10細胞（B16 - F10細胞の*in vitro*細胞培養から調製される）を施した。1日目に、マウスを処理群および対照群に無作為に抽出して、処理を開始した。1日目から始めて、1週間に二度マウスを秤量した。マウスすべてを16日目に屠殺して、肺を取り出し、秤量し、表面コロニーを計数した。結果は、（処理マウスの平均コロニー / 対照マウスの平均コロニー（T / C）× 100%）として表す。転移成長阻害（MGI）は、この数字を100%から差し引いたものである。パクリタキセルは、この研究で使用される標準的な化学療法剤であった。

40

【0395】

このモデルでは、個々の研究に対して別記しない限り、試験化合物は、1日目 ~ 5日目に（q d × 5）、腹腔内経路により投与した。パクリタキセルは、1日目 ~ 5日目に（q

50

d × 5)、静脈内投与した。

【0396】

適切である場合 (n = 3)、結果を平均 ± SEMとして表記する。別記しない限り、幾つかの群を有する研究の統計学的解析を、ANOVAを用いてニューマン・クルス(Neuman-Keuls)事後試験により実施した。片側 t 検定もまた、化合物または薬剤、あるいはその組合せが腫瘍成長を低減させるという仮定に基づいて使用された。

【0397】

結果

HT - 29 ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルの研究

1. HT - 29 ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける K P U - 2 + / - C P T - 1 1 の *in vivo* 評価 10

この研究は、HT - 29 モデルにおいて、K P U - 2 単独に関して、および関連化学療法薬 C P T - 1 1 と併用して、投与量強度および投薬レジメンにおける変化を評価した。

【0398】

K P U - 2 は、7.5 mg / kg の用量で 5 日間毎日 (q d × 5) *ip* により、3.75 mg / kg の用量で 5 日間 1 日 2 度 *ip* により、7.5 mg / kg の用量で 1 日おきに 10 日間 (q o d × 5) *ip* により、および 7.5 mg / kg の用量で 2 日おきに 15 日間 (q 3 d × 5) *ip* により投与した。7.5 mg / kg の用量で q 3 d × 5 で *ip* による N P I - 2 3 5 8 と C T P - 1 1 の併用は、一方の化合物単独よりも相当大きな効果をもたらし、それは研究の継続期間中持続した (図 13)。研究の生存中の部分中でのこれらの観察は、解剖時の群平均最終腫瘍重量により確認され、それに関して、併用群は、対照よりも統計学的に有意に低い腫瘍重量を示した。さらに、併用療法群の平均腫瘍重量と C P T - 1 1 単一療法群の平均腫瘍重量との間の差は、統計学的に有意であった (図 14)。解剖時の個々の最終腫瘍重量を検査すると、同時療法におけるより大きな効果が明らかである (図 14)。同時療法の T G I は、C P T - 1 1 単独に関する 38.9% と比較して、78% であった。併用療法群に関する T G I は、肯定的な結果に関する 58% の N C I 基準を上回る。 20

【0399】

2. 5 つのヒト腫瘍異種移植片モデルに対する K P U - 2 + / - の標準的な化学療法の研究 30

この研究は、5 つの異なるアームから構成され、各々それ自身のプロトコル、タイミング、投薬レジメンおよび参照化合物を有する。各アームは、特定の腫瘍モデルの提示内で考慮される。

【0400】

HT - 29 アームの研究の目的は、上述の研究で使用されるものと比較した場合に、HT - 29 ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける K P U - 2 のわずかに高い用量 (10 mg / kg、*ip*、q 3 d × 5) を研究することであり、ここでは、K P U - 2 (7.5 mg / kg、*ip*、q 3 d × 5) と C P T - 1 1 (100 mg / kg、*ip*、q w × 3) との間で顕著な相乗効果が観察された。

【0401】

図 15 で観察することができるように、このモデルにおける K P U - 2 と C P T - 1 1 の併用は、腫瘍成長の阻害において、顕著な相乗効果をもたらし、腫瘍成長は、併用療法群において、処理 29 日目までほぼ完全に阻害された。併用療法は、有効性を維持し、この群に関する推定腫瘍成長は、一方の単一療法群よりも有意に低かった。したがって、K P U - 2 および C P T - 1 1 の投与は、腫瘍成長を阻害し、有効な抗腫瘍処理である。 40

【0402】

研究の生存中の部分の観察 (推定腫瘍成長、図 15) は、解剖時に切除された腫瘍の重量の測定により支持される (図 16)。併用群に関する腫瘍重量は、C P T - 1 1 単独に関する腫瘍重量と同様に ($p < 0.05$)、対照よりも有意に低かった ($p < 0.01$)。 50

【 0 4 0 3 】

個々の最終腫瘍重量が考慮される場合(図16)、併用群に関する腫瘍サイズは、他の処理群または対照群よりも非常に小さかった。併用群のTGIは65.8%であり、NCI基準により正の効果を示したのに対して、単一療法は、TGI > 58%のNCI基準に達しなかった。

【 0 4 0 4 】

3. HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片(HT-29 Human Colon Tumor Xenograft)研究におけるKPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの活性の研究

この研究の結果を、図17および表18に提示する。併用療法群はすべて、新規化合物とCPT-11との間に顕著な相乗効果を示した。個々の腫瘍重量は、同時療法処理の有効性を実証する(図18)。各場合において、併用群に関するTGIは、正の効果に関するNCI基準を上回るのに対して、CPT-11単一療法に関するTGIは、このレベルに達しなかった。

10

【 0 4 0 5 】

【 表 1 8 】

HT-29ヒト結腸腫瘍モデルで実施した研究の概要

研究の叙述 番号状況	NPI化合物		化学療法剤		併用		コメント	
	番号、 mg/kg	ip	名称、 容量	結果 TGI%	結果 TGI%	併用 NCI基準 (TGI ≥58%) を超える		
2164	TGI	KPU-2	7.5 qd x 5	7.5 q 3d x 5	CPT-11 100 ip q w x 3	39*	78 **, # 併用	相乗効果
2288	TGI	KPU-2	10 → 7.5	q 3d x 5	CPT-11 100 ip q w x 3	36.5*	65.8 ** 併用	相乗効果 本文を参照
2139	TGI	KPU-2	7.5	q 3d x 5	CPT-11 100 ip q w x 3	32.7	80.7 **, # 併用	相乗効果
2139	TGI	KPU-35	10 → 7.5	q 3d x 5	CPT-11 100 ip q w x 3	32.7	83.3 **, # 併用	相乗効果 1+13日目 1+27日目
2139	TGI	トープチルーフエ ニラヒスチン	30	q 3d x 5	CPT-11 100 ip q w x 3	32.7	77.7 *, # 併用	相乗効果

*対照に対して $p < 0.05$; **対照に対して $p < 0.01$; #CPT-11単独に対して $p < 0.05$; #CPT-11単独に対して $p < 0.01$; + = 死亡数

【 0 4 0 6 】

4. HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおけるCPT-11と併用したKPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの効果の概要

CPT-11と併用した場合、KPU-2は、標準的な化学療法剤であるCPT-11の効果、正の効果に関するTGI 58%のNCI基準を十分に超過したレベルにまで高めた。3つの研究により得られた結果は、生存中の観察(図19)および解剖時に切除した腫瘍の重量(図20)の両方に非常に類似している。

【0407】

DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおける研究

このモデルを用いて、2つの研究を完結させた：第1の研究は、KPU-2単独およびタキソテールとの併用を包含し、第2の研究は、単独およびタキソテールと併用して、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンを比較した。

10

【0408】

1. DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおけるタキソテールと併用したKPU-2の効果

この研究の生存中の部分中で得られるデータからわかるように(図21)、DU-145ヒト前立腺腫瘍の最も有効な処理は、KPU-2+タキソテールの併用療法であった。処理効果は、研究の初期に最も顕著であり、研究が進行するにつれ減少するようであった。20日目~27日目の処理から、併用療法は、NCI基準(TGI 58%)を上回る明白なTGIを提供し、併用療法の推定腫瘍重量は、一方の単一療法よりも有意に低かった。

20

【0409】

2. DU-145ヒト前立腺異種移植片モデルにおける、単独でのまたはタキソテールとの併用による、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの活性

上述の研究におけるタキソテールと併用したKPU-2で得られたデータに基づいて、単独およびタキソテールと併用して、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンを比較する第2の研究を開始した。

【0410】

この研究の生存中の部分中で行われる観察により、KPU-2またはKPU-35のいずれかとタキソテールとの併用は、タキソテール単独よりも腫瘍成長に関して大きく減少させることが示される(図22)。腫瘍成長は、タキソテールと併用したKPU-35によりほぼ完全に阻止された。

30

【0411】

解剖時に切除された腫瘍重量により、研究の生存中の区分で行われた観察を確認した。KPU-2(図23)またはKPU-15(図24)のいずれかとタキソテールとの併用は、腫瘍成長を阻止する際に、タキソテール単独よりも有意に有効であった。KPU-35の場合では、10匹のうち3匹のマウスが、腫瘍の収縮に関する徴候を示した。腫瘍成長阻害指数は、KPU-2に関して腫瘍成長の顕著な阻害(群平均=74.1%)、またKPU-35に関してほぼ全部の阻止(群平均=92.5%)を示した。タキソテール単独では、正の効果に関するNCIで確立された基準(TGI 58%)に達しなかった。

40

【0412】

5. MCF-7ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおける研究

この研究は、MCF-7ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおけるKPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を比較した。化合物の用量は、1日目、2日目、3日目、4日目および7日目に投与した。タキソテールは、1日目、3日目および7日目に投与した。

【0413】

選択した新規化合物は、このモデルにおいてタキソテールと併用して使用する場合、初期段階で統計学的に有意な効果が見られ、推定腫瘍成長を明らかにほぼ完全に阻止する(図25)。3つの化合物のうち、KPU-2が最も効果的であるようであり、t-ブチル-フェニラヒスチンもまた、タキソテールの有意な増強作用を示した。

50

【0414】

6. A549ヒト非小細胞肺腫瘍異種移植片モデルにおける研究

この研究における生存中の観察(図26)により、KPU-2(7.5mg/kg、ip、qd×5)とタキソテルとの併用は、対照群または一方の単一療法群と比較した場合に、腫瘍成長の顕著な阻害をもたらすことが示された。これは、解剖時の腫瘍重量により確認され、同時療法群の平均が、タキソテル単独または対照群の平均よりも有意に低かった(図27)。同時療法群の腫瘍重量は、低腫瘍重量のクラスターを形成し、効果の一貫性を示す。

【0415】

腫瘍成長指数を算出すると、同時療法群は、対照群と比較した場合に、正の効果に関するNCI基準(TGI 58%)を十分に超過して、74.4%のTGIを有した。タキソテル単独は26.1%のTGIを有した。

10

【0416】

7. MDA-231ヒト胸部腫瘍同所異種移植片モデルにおける研究

このモデルは、自然環境の代用であるマウス乳房脂肪体へのヒト腫瘍組織の配置を包含する。この様式では、皮下血管床における特定の作用に起因する正の効果の可能性が回避される。この研究は、単独およびパクリタキセル(16mg/kg、ip、qd×5)と併用して用いた、KPU-2(7.5mg/kg、ip、qd×5)の効果と比較した。

【0417】

研究の3週目に入って、併用療法群で、非常に有意な効果である腫瘍成長の有意な阻害が見られた。この効果は、タキソテル単独よりも顕著であるようであった(図28)。

20

【0418】

8. マウス黒色腫B16F10転移腫瘍モデルにおける研究

この研究では、マウスへのB16F10黒色腫細胞の静脈内注射の16日後に、肺の表面上に出現してくる転移の数に対する、単独およびパクリタキセルと併用して用いた、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を検査した。このモデルは、異種移植片モデルではないが、腫瘍塊への高度な血管化は含まない。

【0419】

このモデルでは、最も有効な治療は、パクリタキセルに関する平均転移計数よりも約10%低い平均転移計数を示すKPU-2単独であった(それぞれ、41.6%および35.0%のMGI)(図29)。この研究はそれ自体、併用療法が単一療法より有効であることを確立しないものの、KPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンが、高度に血管化された腫瘍において最も有効であることを示す。

30

【実施例10】

【0420】

病原性の真菌類に対する活性に関するアッセイ

デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体のAF/IS値を決定する際に使用するための、上述の既知の抗真菌化合物に対する、病原性の真菌に対するデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体の比較活性は、例えばDiagn Micro and Infect Diseases 21:129-133 (1995)に記載されているNCCLSプロスマクロ希釈法のマイクロタイタープレート

の適応により、真菌生物に対して直接測定される。抗真菌活性はまた、真菌感染の全動物モデルにおいて決定することができる。例えば、ムコール肺炎のステロイド処理されたマウスモデルを使用してもよい(ゴルダイル, L.Z.とシュガー, A.M. (Goldaill, L.Z. & Sugar, A.M.) 1994 J Antimicrob Chemother 33:369-372)。実例として、かかる研究では、多数の動物に、真菌の感染の前に、感染時に、または感染後に始まって、それぞれ、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体が投与されないか、各種用量のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体(および/または1つまたは複数の他の真菌剤との組合せ)が投与されるか、あるいは陽性対照(例えば、アンホテリシンB)が投与される。動物は、24時間に1度、選択用量のデヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体、陽性対照、

40

50

あるいは担体のみで処理してもよい。処理は、例えば最大10日までの既定日数の間続けられる。動物は、処理期間後のある期間（例えば、合計3週間）観察され、死亡率を毎日評価する。モデルは、感染しやすいヒト被験体を模倣するように設計された、他の処理（例えば、ステロイドによる処理）ありまたはなしの、全身性、肺、膈および他の感染モデルを包含し得る。

【0421】

さらに説明するために、*in vivo*での治療効率（例えば、デヒドロフェニラヒスチンまたはその類似体（mg）/被験体（kg）で表されるED₅₀）を決定する一方法は、げっ歯類モデル系である。例えば、マウスを、病原体の50%致死用量のおよそ10倍で、例えば静脈内感染により、真菌病原体に感染させる（10⁶個C. Albicans）細胞/マウス）。真菌感染直後に、デヒドロフェニラヒスチン化合物を、既定投薬容量でマウスに投与する。ED₅₀は、感染後20日目に記録される生存率から、ファンデルウェーデン（Van der Waerden）の方法（Arch Exp Pathol Pharmacol 195:389-412, 1940）により算出される。一般的に、未処理の対照動物は感染後7日～13日目に死亡する。

10

【0422】

別の実例的实施形態では、サブローデキストロース寒天（SDA）斜面培地で28で48時間成長させたC. Albicans・ Wisconsin (C. Albicans Wisconsin) (C43) およびC. tropicalis (C. tropicalis) (C112) を生理食塩水中に懸濁させて、分光光度計にて550nmで透過46%に調節する。接種材料は、血球計によりさらに調節され、プレート計数により、およそ1または5×10⁷ CFU/mlであることが確認される。CF-1マウスを、尾静脈への1または5×10⁶ CFUの注射により感染させる。感染の4時間後、およびそれ以降では3または4日以上の間、1日1回、エタノール：水（10：90）中の抗真菌剤を、静脈内または皮下投与する。毎日、生存をモニタリングする。ED₅₀は、マウスの50%生存を可能にする用量と定義することができる。

20

【実施例11】

【0423】

抗糸状菌活性の評価

ベンズイミダゾールおよびグリセオフルピンは、真菌微小管に結合することが可能な抗チューブリン剤である。いったん結合すると、これらの化合物は、感受性生物において細胞分裂および細胞内輸送を妨害し、細胞死をもたらす。商業的に、ベンズイミダゾールは、獣医学用医薬および植物疾病制御において殺菌剤として使用される。ボトリチス・シネレア (Botrytis cinerea)、ベアウベリア・バッシアナ (Beauveria bassiana)、ヘルミントスポリウム・ソラニ (Helminthosporium solani)、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) およびアスペルギルス属 (Aspergillus) を含む多種多様の真菌種は、これらの分子の影響を受けやすい。しかしながら、毒性の問題および高まっていく薬物耐性は、それらの使用をマイナスに影響を与えている。グリセオフルピンは、白癬菌属 (Trichophyton) 種、小孢子菌属 (Microsporium) 種および表皮糸状菌フルコッサム (Epidermophyton floccosum) により引き起こされる皮膚、毛髪および爪の白癬感染を治療するために臨床的に使用される。しかしながら、その抗真菌範囲は、この種の真菌生物に制限される。遺伝毒性もまた大きな副作用である。テルピナフィン、代替的な第一選択治療であるが、より費用がかかる。さらに、臨床耐性が、紅色白癬菌 (Trichophyton rubrum) (すべての皮膚糸状菌感染に関する主な原因病原因子) で近年観察されている。

30

40

【0424】

カンジダ・アルビカンス (Candida albicans) では、細胞が微小管阻害剤であるノコダゾールおよびクロロプロファミンに暴露される場合に、微小管/微小繊維形成に影響を受ける。これらの結果はさらに、有効な抗糸状菌剤として細胞骨格阻害剤の探索を確証する。したがって、本明細書中に開示する化合物の幾つかは、抗糸状菌活性に関して評価した。

【0425】

具体的には、開示する化合物を、市販の微小管阻害剤ならびに公認の抗真菌剤と一緒に

50

評価した。この研究で使用する試験化合物および対照：(-) - フェニラヒスチン、K P U - 1、K P U - 2、K P U - 11およびK P U - 17、K P U - 35、t - ブチルフェニラヒスチン、コルヒチン(3つのカンジダ属(*Candida*)単離菌に対して試験した市販の微小管阻害剤)、ベノミル(3つのカンジダ属(*Candida*)単離菌に対して試験した市販の微小管阻害剤)、グリセオフルビン(6つの皮膚糸状菌の単離菌に対する試験に関する市販の微小管阻害および抗生物質対照(antibiotic control))、アンホテリシンB(3つのカンジダ属(*Candida*)単離菌に対して試験するための抗生物質対照)、イトラコナゾール(2つのアスペルギルス属(*Aspergillus*)単離菌に対して試験するための抗生物質対照)。

【0426】

これらの化合物を試験した微生物には、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)、アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*)、紅色白癬菌(*Trichophyton rubrum*)、毛癬白癬菌(*Trichophyton mentagrophytes*)、表皮糸状菌フルコッサム(*Epidermophyton floccosum*)を含めた。カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)(1つの単離菌)を除いて、各種の2つの単離菌を試験した。

10

【0427】

抗真菌感受性試験は、臨床研究所規格委員会(National Committee for Clinical Laboratory Standards), M38-A「分生孢子形成糸状真菌のプロス希釈抗真菌感受性試験に関する参照方法：認証基準(Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standards)」に概要される方法に従って行った。これは、グルタミンを有し、かつ炭酸水素塩を有さないR P M I - 1640中での試験、接種材料サイズ0.4~5×10⁴および30または35で48時間のインキュベーションを含む。最小阻害濃度(MIC)は、薬物を含まない対照チューブと比較した場合に、混濁度の80%減少をもたらした最低濃度として定義した。薬物濃度は、研究化合物に関して0.03~16μg/ml、イトラコナゾールおよびグリセオフルビンに関して0.015~8μg/mlであった。

20

【0428】

化合物が標的微生物の成長を防止した最小阻害濃度(MIC)は、NCCLSプロトコルの修正バージョンに従って評価した。最小阻害濃度(MIC)は、最初の24時間間隔で決定し、ここで薬物を含まない対照チューブで成長を測定することができる。定義したMICは、成長対照(growth control)と比較した場合に、混濁度の80%減少を示す最低濃度であった。最小致死濃度(MLC)は、MIC濃度およびMICを超える各濃度から0.1μlを平板培養することにより決定した。MLCは、99.95%の死滅を示す真菌成長の5個以下のコロニーを示す最初の濃度と呼ばれていた。MICが得られた場合、最小殺菌濃度(MFC)を決定して、化合物の静真菌性/殺菌性を評価した。この手順は、薬物処理細胞試料(MIC濃度で、およびMICを超えた濃度で化合物を含有する試験ウェルから取り出した)を、阻害濃度より有意に低い化合物濃度に希釈すること、およびそれらを寒天プレートに沈着させることとを伴う。化合物は、細胞が成長を回復させることが可能である場合に静真菌性としてスコア付けされ、また化合物が生物を死滅させてしまったために再成長が不可能である場合に殺真菌性としてスコア付けされた。

30

【0429】

本明細書中に開示する化合物は、2つの白癬菌属(*Trichophyton*)種に対して有効であることがわかった。紅色白癬菌(*T. rubrum*)は、ヒト皮膚糸状菌感染に関する根本的な原因因子であり、臨床剤の開発における注目すべき重要な生物である。

40

【0430】

化合物K P U - 2、K P U - 11およびK P U - 17、K P U - 35およびt - ブチルフェニラヒスチンは、皮膚糸状菌感染を治療するのに使用される現在の標準的な薬剤であるグリセオフルビンと効力において同等であったか、あるいは場合によってはそれよりも強力であった。

【0431】

化合物(-) - フェニラヒスチンおよびK P U - 1は、紅色白癬菌(*T. rubrum*)に対し

50

て試験した場合、他の化合物よりも有意に強力ではなく、感受性毛癬白癬菌 (*T. mentagrophytes*) 単離菌に対しては弱く、他のものより同等であった。

【 0 4 3 2 】

MFCを決定することができる場合には、結果は、これらの化合物が事実上静真菌性であることを示す（表19および表20を参照）。

【 0 4 3 3 】

【表 19】

デヒドロフェニラヒスチンおよびそれらの類似体の抗真菌活性

化合物	MICおよびMFC、 $\mu\text{g}/\text{ml}$											
	C. アルビカンス (T. albicans) 90028		C. アルビカンス (T. albicans) 10231		C. グラブラタ (C. Glabrata)		A. フミガーツス (A. fumigatus) 単離物#1		A. フミガーツス (A. fumigatus) 単離物#2			
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC		
(-) -フェニラヒスチン	>70	ND**	>70*	ND	>70	ND	>16	ND	>16	ND		
KPU-1	>68*	ND	>68	ND	>68	ND	>16	ND	>16	ND		
KPU-2	>82	ND	>32	ND	>82	ND	>16	ND	>16	ND		
KPU-11とKPU-17	>82	ND	>32	ND	>82	ND	>16	ND	0.06	>16		
KPU-35	>82	ND	>32	ND	>82	ND	>16	ND	<0.03	0.125		
t-ブチルフェニラヒスチン	>82	ND	>32	ND	>82	ND	>16	ND	<0.03	0.125		
アンホテリシンB	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	ND	ND	ND	ND		
グリセオフルビン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	ND		
イトラコナゾール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND		
コルヒチン	>128	ND	>128	ND	>128	ND	ND	ND	ND	ND		
ベノミル	64	>512	64	>512	64	>512	ND	ND	ND	ND		

【0434】

10

20

30

40

【表 2 0】

デヒドロフェニラヒスチンおよびそれらの類縁体の抗真菌活性

化合物	MICおよびMFC、 $\mu\text{g}/\text{ml}$											
	紅色白癬菌 (<i>T. rubrum</i>) 単離物 # 1		紅色白癬菌 (<i>T. rubrum</i>) 単離物 # 2		毛癬白癬菌 (<i>T. mentagrophytes</i>) 単離物 # 1		毛癬白癬菌 (<i>T. mentagrophytes</i>) 単離物 # 2		E.フルコッサム (<i>E. floccosum</i>) 単離物 # 1		E.フルコッサム (<i>E. floccosum</i>) 単離物 # 2	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
NP I 2 3 5 0	>16	ND	0.16	>16	16	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
NP I 2 3 5 2	>16	ND	0.25	>16	4	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
NP I 2 3 5 8	>16	ND	<0.03	0.125	2	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
NP I 2 3 6 2	0.06	>16	<0.03	<0.03	1	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
NP I 2 3 8 6	<0.03	0.125	<0.03	0.06	1	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
NP I 2 4 6 0	<0.03	0.125	<0.03	<0.03	4	>16	>16	ND	>16	>16	>16	ND
アンホテリシンB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
グリセオフルビン	0.5	ND	<0.015	ND	1	ND	2	ND	2	ND	4	ND
イトラコナゾール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
コルヒチン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ベノミル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

上述の例は、単に本発明の理解を助長するために記載する。したがって、開示する方法および化合物は、デヒドロフェニラヒスチンのさらなる誘導体を包含し、また別の場合はそれらを提供することが当業者には理解されよう。

【0436】

本発明は、例えば、言及した目的および利点、ならびに他の固有の事項を獲得するために十分に適応していることが当業者には容易に理解されよう。本明細書中に記載する方法および手順は、現在の好ましい実施形態の代表であり、例示であり、本発明の範囲に対する限定として意図されない。本明細書中の変更および他の使用は、当業者に網羅され、それは本発明の精神に包含される。

【0437】

本発明の範囲および精神から逸脱せずに、本明細書で開示した本発明に対し様々な代替および修正を行うことができることは、当業者には容易に理解されるであろう。

【0438】

上述のように、明細書中で言及する特許および刊行物はすべて、本発明が関係する技術分野における当業者の水準を示す。特許および刊行物はすべて、合法である程度に、参照により本明細書に援用され、したがって個々の特許および刊行物はそれぞれ、参照に援用されるように具体的かつ個々に示されるものとして扱われ得る。

【0439】

本明細書中に例証的に適切に記載される本発明は、本明細書中に具体的に開示されない任意の要素（単数または複数）、限定（単数または複数）の非存在下で実施されてもよい。使用してきた用語および表現は、説明の用語として使用され、限定の用語としては使用されず、かかる用語および表現の使用において、示され、かつ記載される特徴またはその一部の等価物の排除を示す意図はない。様々な修正が本発明の範囲内で可能であることが理解される。したがって、本発明を、好ましい実施形態および任意の図により具体的に開示してきたが、本明細書中に開示する概念の修正および変更は当業者によりなされてもよく、かかる修正および変更は、本発明の範囲の範疇であるとみなされることが理解されるべきである。

【0440】

添付の図面は、明細書中に援用され、かつその一部を形成し、本発明の特定の好ましい実施形態を単に説明するに過ぎない。明細書の残部と一緒に、添付の図面は、当業者に、本発明の特定の化合物を製造する好ましい様式を説明するのに役立つことが意図される。

【0441】

ある特定の図中では、化合物は、代替的な記号表示を用いて識別される。これらの代替的な記号表示を変換するための完全なチャートは以下の通りである：

【0442】

【表21】

代替的な記号表記	本明細書で使用した記号表記
NPI-2350	(-)-phenylahistin
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05
NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-02
NPI-2359	KPU-08

10

20

30

40

50

【表 2 2】

NPI-2360	KPU-09
NPI-2361	KPU-10
NPI-2362	KPU-11
NPI-2363	KPU-12
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14
NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34
NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43
NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55

10

20

30

40

【表 2 3】

NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77
NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96
NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98
NPI-2460	ト-ブチルフェニラヒスチン

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

50

【0443】

【図1】ジアシルジケトピペラジン1を、イミダゾールカルボキサリド2と反応させて、中間体化合物3を得て、それをベンズアルデヒド4と反応させて、デヒドロフェニラヒスチンを生成させることにより、デヒドロフェニラヒスチンを生じさせる反応スキームを示す図である。

【図2】合成粗製デヒドロフェニラヒスチンのHPLCプロフィールを表す図である。

【図3】ジアシルジケトピペラジン1を、ベンズアルデヒド4と反応させて、中間体化合物17を得て、それをイミダゾールカルボキサリド15と反応させて、デヒドロフェニラヒスチンを生成させることにより、デヒドロフェニラヒスチンを生じさせる反応スキームを示す図である。

【図4】経路Aおよび経路Bから製造された粗製合成tBu-デヒドロフェニラヒスチンのHPLCプロフィールを表す図である。

【図5】強力な細胞障害活性のためのデヒドロPLHに関する2つの修飾方法を示す図である。

【図6】フェニル部分でのデヒドロPLHの想定される活性コンホメーションを表す図である。

【図7】フェニラヒスチンのチトクロームP450代謝を表す図である。

【図8】tBu-デヒドロPLHのZ-E転位を示す図である。

【図9】アシルE-tBu-デヒドロPLHの合成およびプロドラッグイメージを表す図である。

【図10】3-Z-ベンジリデン-6-[5''-(1,1-ジメチルアリル)-1H-イミダゾール-4''-Z-イルメチレン]-ピペラジン-2,5-ジオンの温度勾配を表す図である。

【図11】3-Z-ベンジリデン-6-(5''-第三ブチル-1H-イミダゾール-4''-Z-イルメチレン)-ピペラジン-2,5-ジオンの温度勾配を表す図である。

【図12】FITC-デキストランへのHuVEC単層透過性に対する、コルヒチンおよびタキソールと比較したKPU-2、KPU-35およびt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

【図13】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図14】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける、個々のマウスにおいて解剖時に切除した腫瘍の重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図15】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図16】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける、個々のマウスにおいて解剖時に切除した腫瘍の重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図17A】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図17B】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-35の効果を表す図である。

【図17C】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

【図18A】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける、個々のマウスにおいて解剖時に切除した腫瘍の重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図18B】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける、個々のマウスにおいて解剖時に切除した腫瘍の重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU

10

20

30

40

50

- 35の効果を表す図である。

【図18C】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける、個々のマウスにおいて解剖時に切除した腫瘍の重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

【図19】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける腫瘍成長に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である(3つの研究の比較)。

【図20】HT-29ヒト結腸腫瘍異種移植片モデルにおける最終腫瘍重量に対する、単独のおよびCPT-11と組み合わせたKPU-2の効果を表す図である(3つの研究の比較)。

【図21】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図22A】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルの生存中の部分中になされた観察に基づいた推定腫瘍成長に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図22B】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルの生存中の部分中になされた観察に基づいた推定腫瘍成長に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-35の効果を表す図である。

【図22C】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルの生存中の部分中になされた観察に基づいた推定腫瘍成長に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

【図23】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおける、解剖時に切除した個々の腫瘍重量に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図24】DU-145ヒト前立腺腫瘍異種移植片モデルにおける、解剖時に切除した個々の腫瘍重量に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-35の効果を表す図である。

【図25A】MCF-7ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおける、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図25B】MCF-7ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおける、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-35の効果を表す図である。

【図25C】MCF-7ヒト胸部腫瘍異種移植片モデルにおける、単独のおよびタキソテルと組み合わせたt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

【図26】A549ヒト肺腫瘍異種移植片モデルにおける推定腫瘍成長に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図27】A549ヒト肺腫瘍異種移植片モデルにおける、解剖時に切除した腫瘍重量に対する、単独のおよびタキソテルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図28】マウス乳房脂肪体に移植したMDA-231ヒト胸部腫瘍モデルにおける推定腫瘍重量に対する、単独のおよびパクリタキセルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図29A】マウス黒色腫B16 F10転移性腫瘍モデルにおける、単独のおよびパクリタキセルと組み合わせたKPU-2の効果を表す図である。

【図29B】マウス黒色腫B16 F10転移性腫瘍モデルにおける、単独のおよびパクリタキセルと組み合わせたKPU-35の効果を表す図である。

【図29C】マウス黒色腫B16 F10転移性腫瘍モデルにおける、単独のおよびパクリタキセルと組み合わせたt-ブチル-フェニラヒスチンの効果を表す図である。

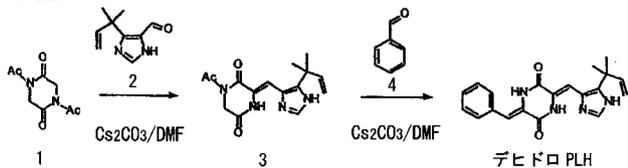
10

20

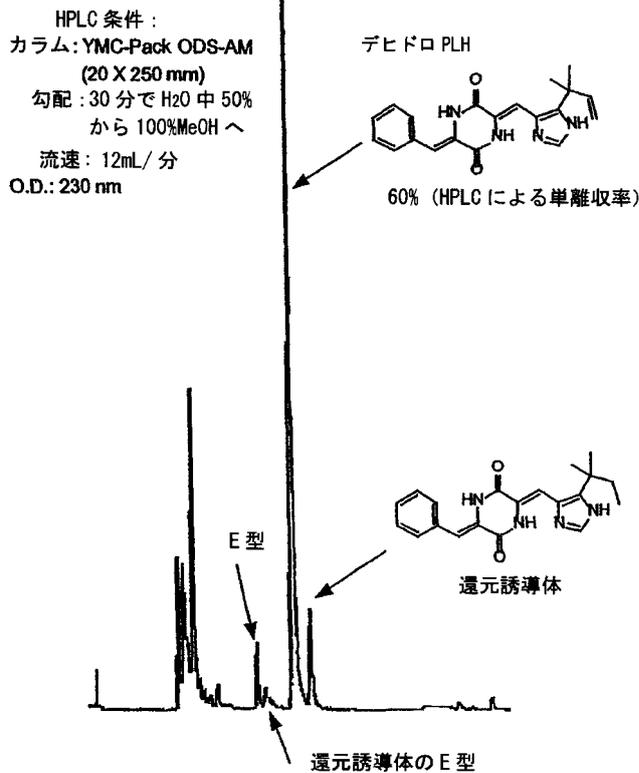
30

40

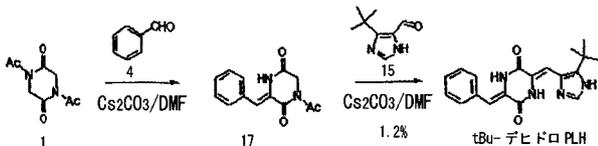
【 図 1 】



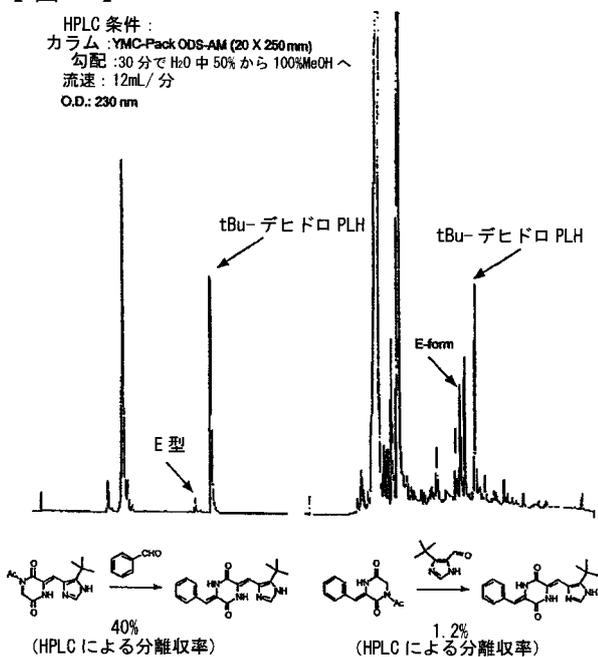
【 図 2 】



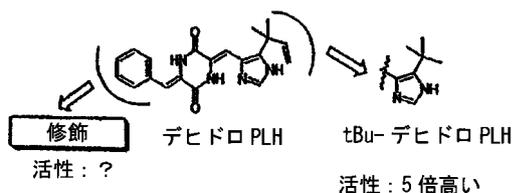
【 図 3 】



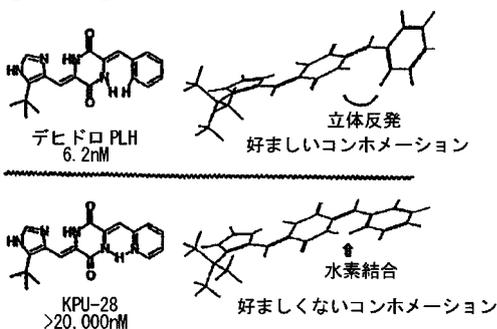
【 図 4 】



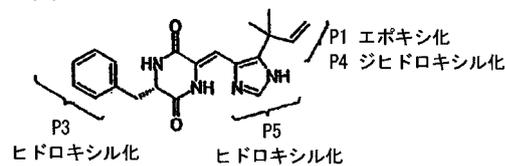
【 図 5 】



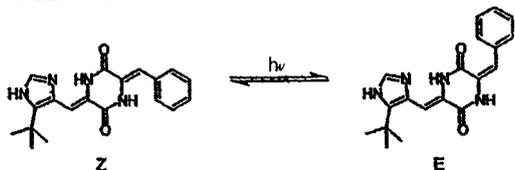
【 図 6 】



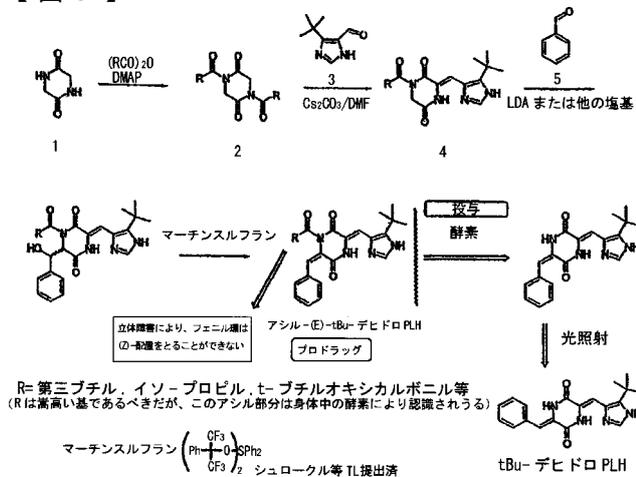
【 図 7 】



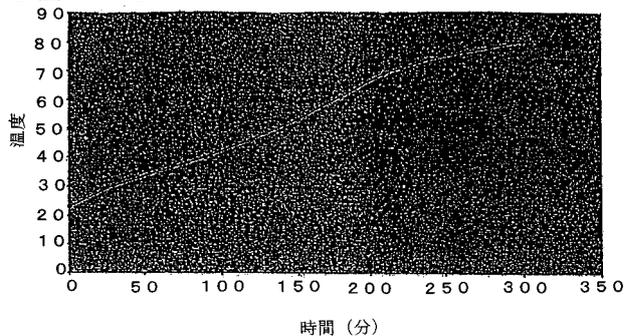
【 図 8 】



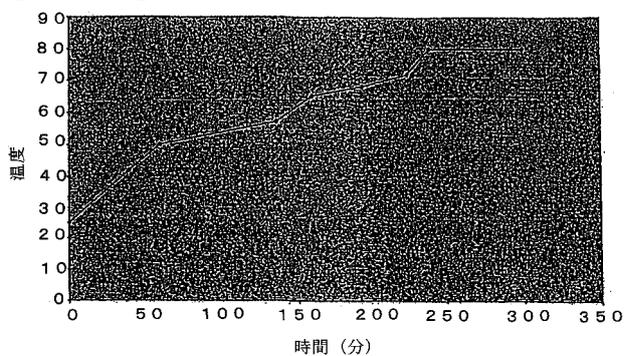
【 図 9 】



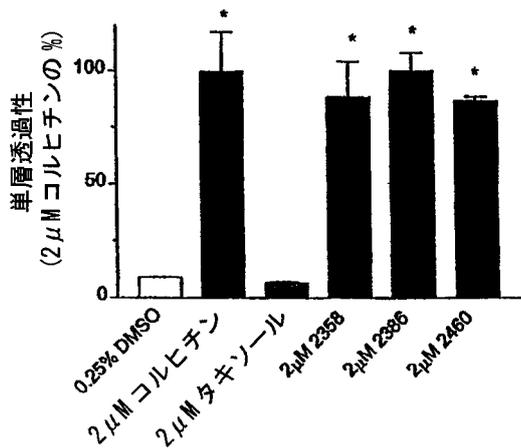
【 図 10 】



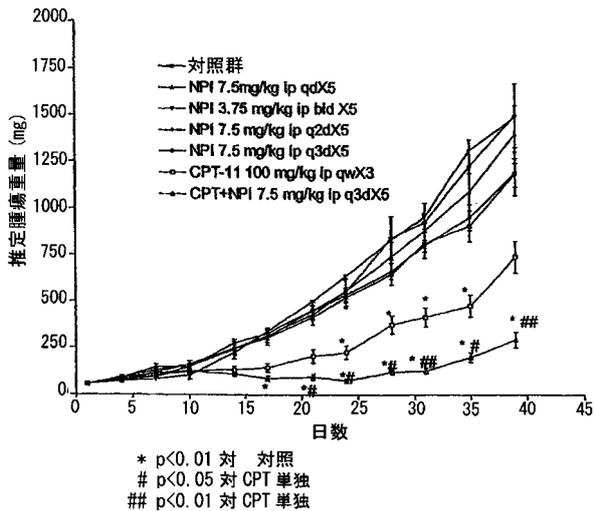
【 図 11 】



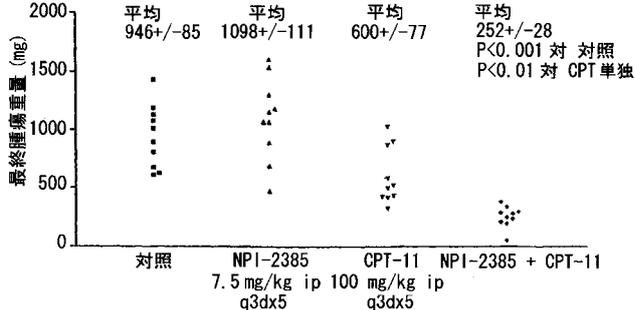
【 図 12 】



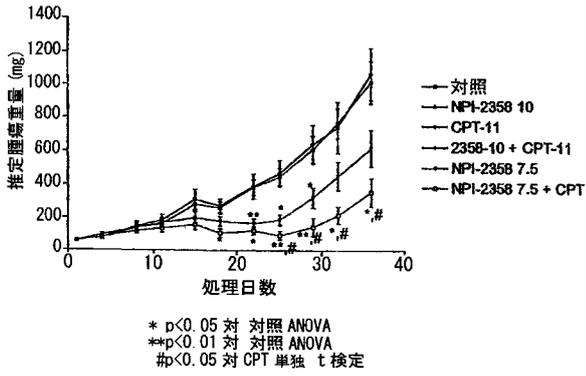
【 図 13 】



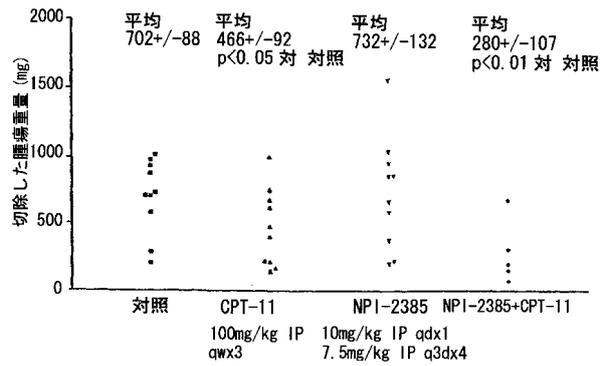
【 図 14 】



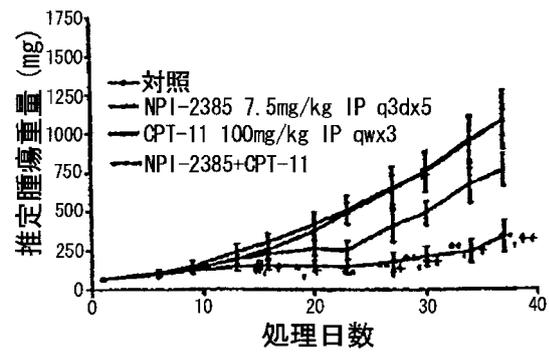
【 图 1 5 】



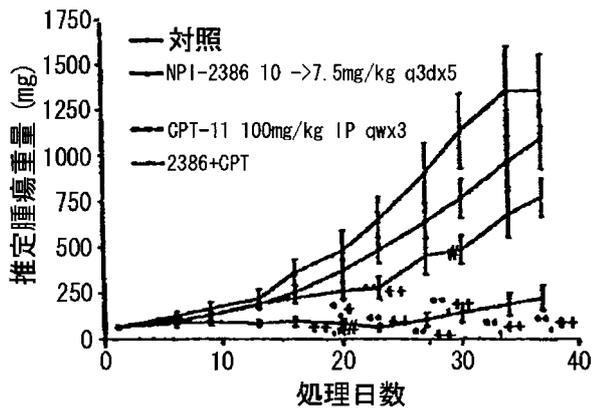
【 图 1 6 】



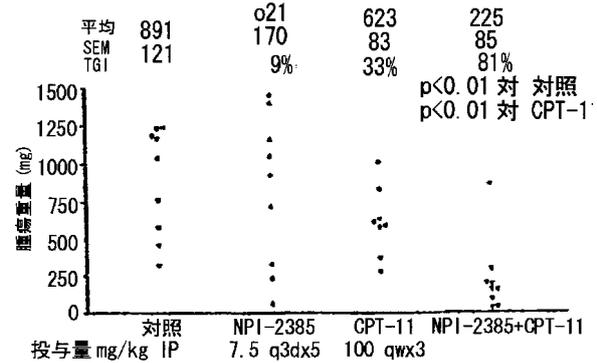
【 图 1 7 A 】



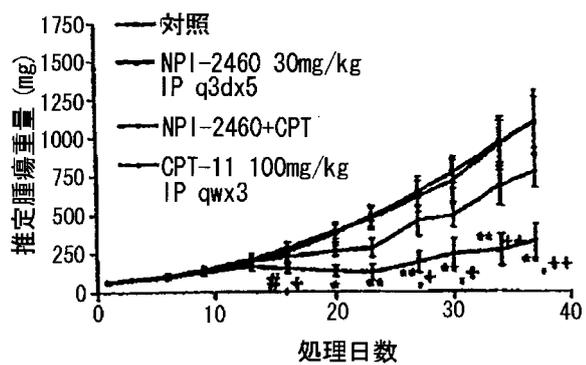
【 图 1 7 B 】



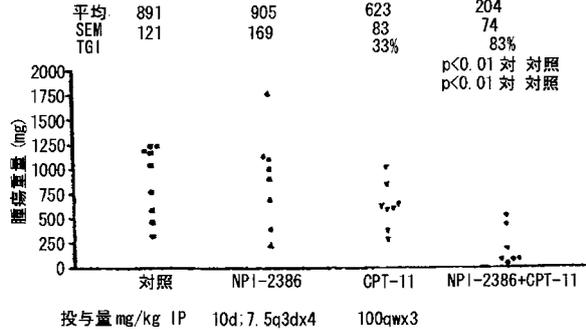
【 图 1 8 A 】



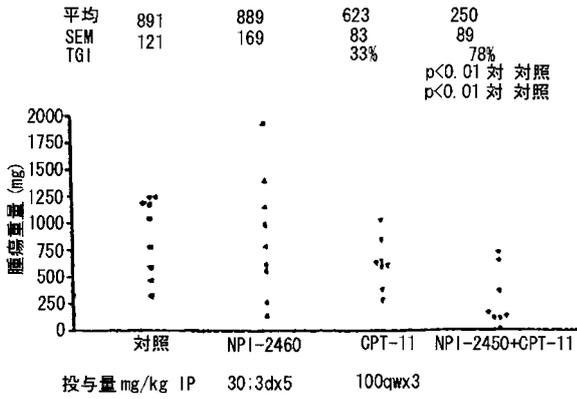
【 图 1 7 C 】



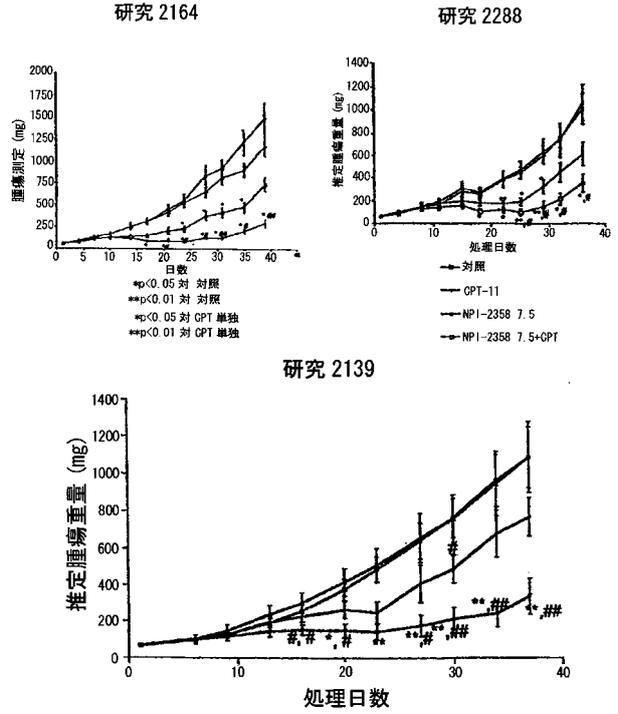
【 图 1 8 B 】



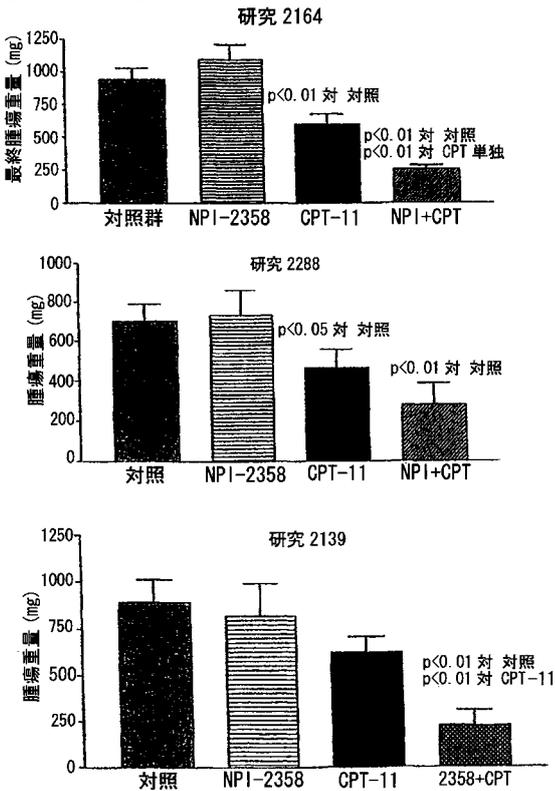
【 図 1 8 C 】



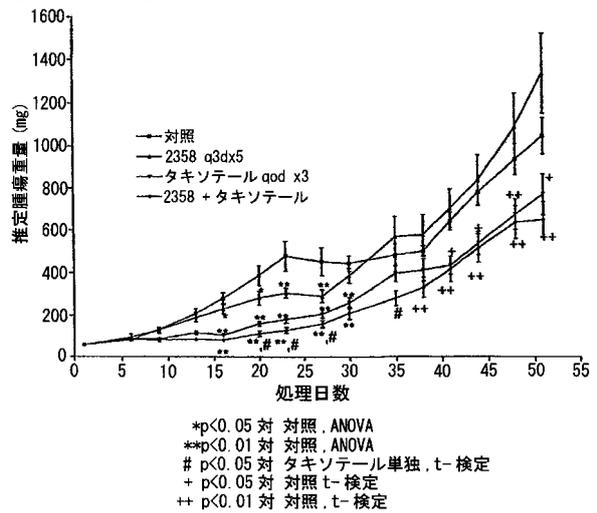
【 図 1 9 】



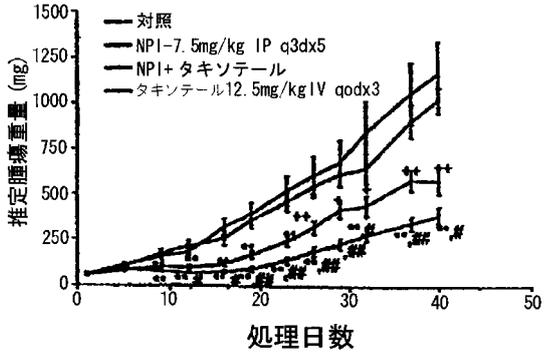
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

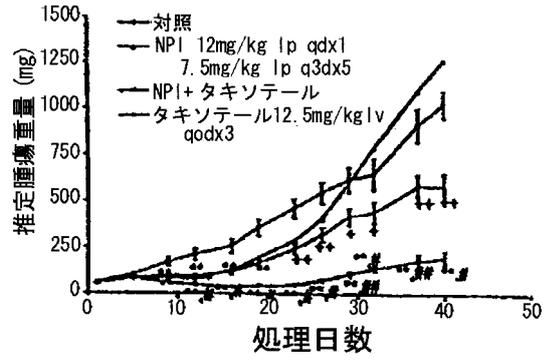


【図 2 2 A】



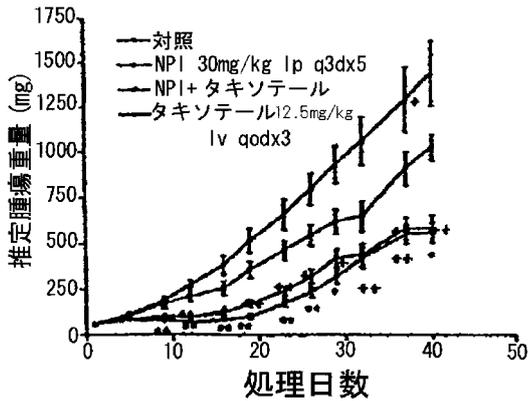
* p<0.05 対 対照 ANOVA
** p<0.01 対 対照 ANOVA
+ p<0.05 対 対照 t-検定
++ p<0.01 対 対照 t-検定
p<0.05 対 タキソテール t-検定
p<0.01 対 タキソテール t-検定

【図 2 2 B】



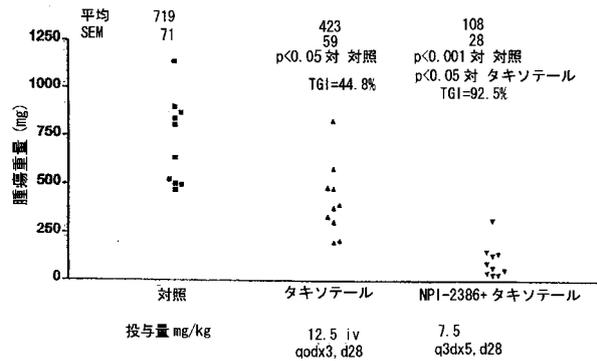
* p<0.05 対 対照 ANOVA
** p<0.01 対 対照 ANOVA
+ p<0.05 対 対照 t-検定
++ p<0.01 対 対照 t-検定
p<0.05 対 タキソテール t-検定
p<0.01 対 タキソテール t-検定

【図 2 2 C】

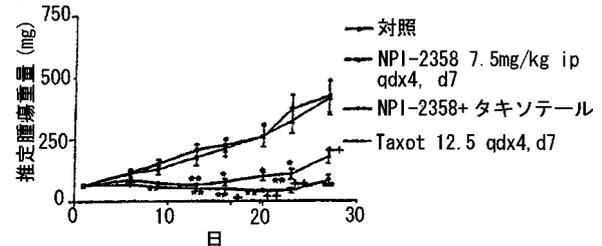


* p<0.05 対 対照 ANOVA
** p<0.01 対 対照 ANOVA
+ p<0.05 対 対照 t-検定
++ p<0.01 対 対照 t-検定
p<0.05 対 タキソテール t-検定
p<0.01 対 タキソテール t-検定

【図 2 4】

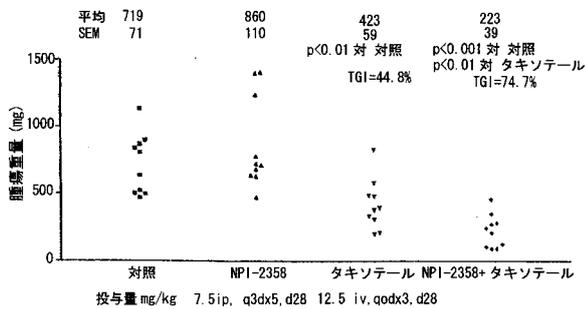


【図 2 5 A】

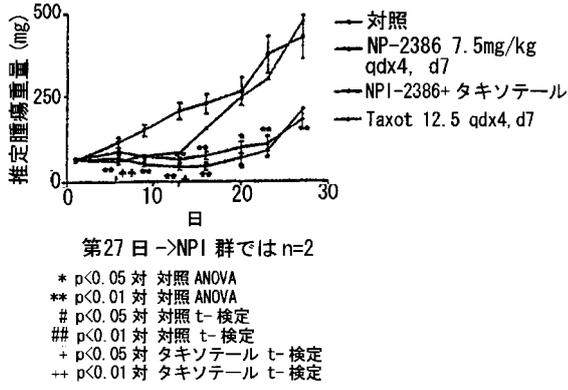


* p<0.05 対 対照 ANOVA
** p<0.01 対 対照 ANOVA
p<0.05 対 対照 t-検定
p<0.01 対 対照 t-検定
+ p<0.05 対 タキソテール t-検定
++ p<0.01 対 タキソテール t-検定

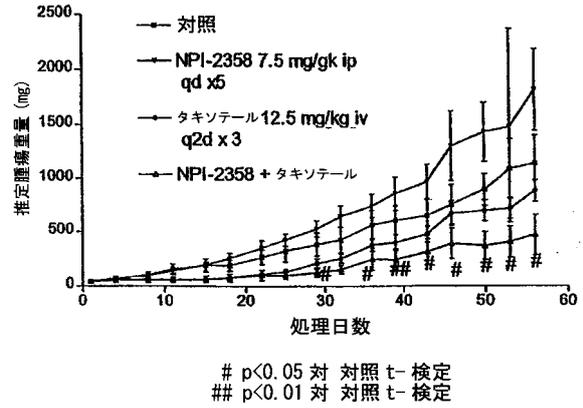
【図 2 3】



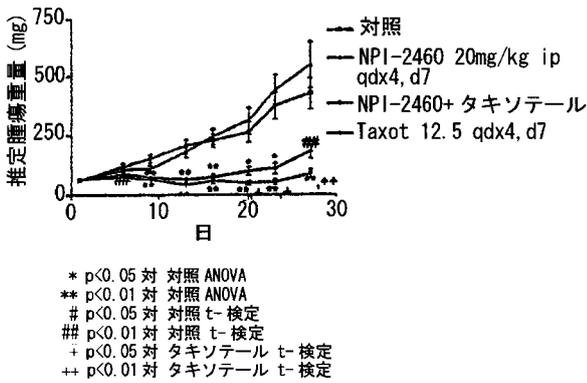
【 図 2 5 B 】



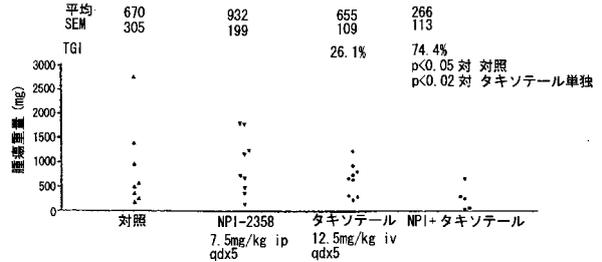
【 図 2 6 】



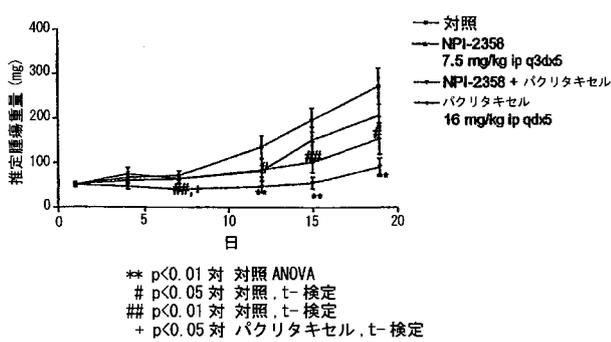
【 図 2 5 C 】



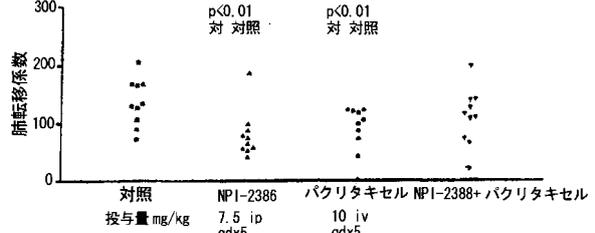
【 図 2 7 】



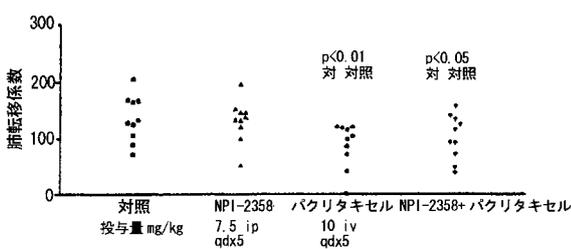
【 図 2 8 】



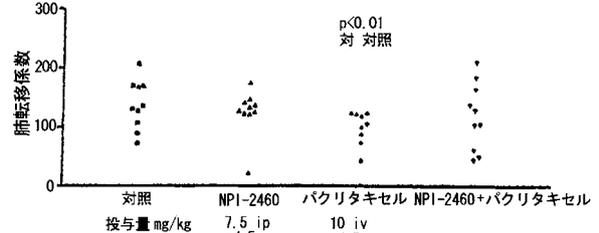
【 図 2 9 B 】



【 図 2 9 A 】



【 図 2 9 C 】



【手続補正書】

【提出日】平成17年1月26日(2005.1.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

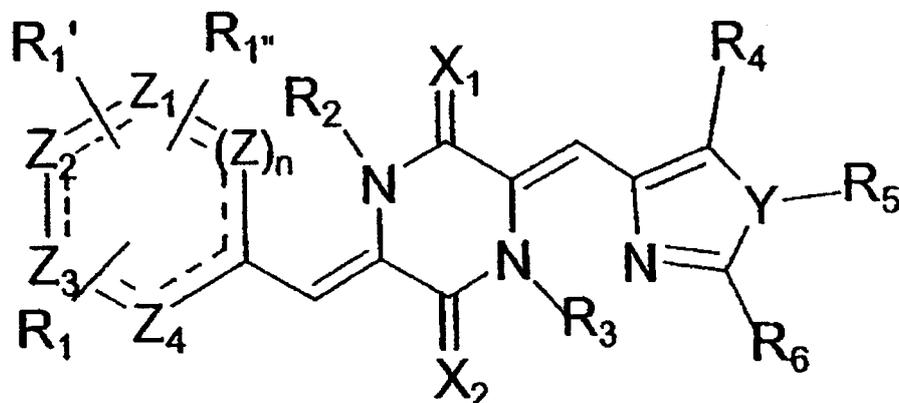
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(I)：

【化1】



(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、環を形成するために互いに共有結合されるか、または互いに共有結合されず、

R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ア

ミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

R_2 は、環を形成するように n が 0 でない場合、 Z に任意で結合し、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Y は、窒素原子、 R_5 で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

n は、0、1 または 2 に等しい整数であり、

それぞれ別個の n (0 でない場合) に関する Z 、ならびに Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得る)

の構造を有する化合物の合成的製造方法であって、以下の：

ジアシルジケトピペラジンを第 1 のアルデヒドと反応させて、中間体を生じさせること

、
前記中間体を第 2 のアルデヒドと反応させて、前記化合物を生じさせること
とを含み、前記第 1 のアルデヒドおよび前記第 2 のアルデヒドは、オキサゾールカルボキサルデヒド、イミダゾールカルボキサルデヒド、ベンズアルデヒド、イミダゾールカルボキサルデヒド誘導体、およびベンズアルデヒド誘導体からなる群から選択され、それにより前記化合物を製造する方法。

【請求項 2】

前記第 1 のアルデヒドは、イミダゾールカルボキサルデヒドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 2 のアルデヒドは、ベンズアルデヒドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

R_2 、 R_3 、 R_5 および R_6 はそれぞれ、水素原子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

X_1 および X_2 はそれぞれ、酸素原子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

R_4 は、飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルは、第三ブチル基である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

R_1 は、置換フェニルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記置換フェニル基は、メトキシベンゼンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 のアルデヒドは、ベンズアルデヒドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 2 のアルデヒドは、イミダゾールカルボキサルデヒドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

n は、0 または 1 に等しい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

n は、1 に等しい、請求項 1 に記載の方法。

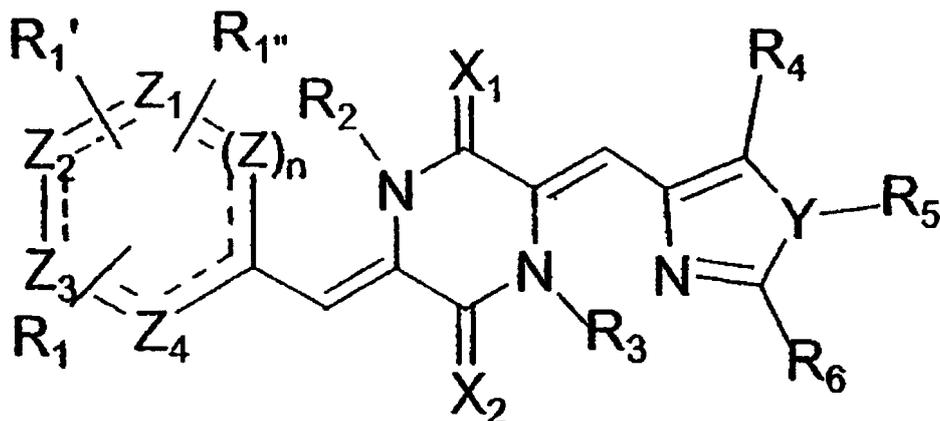
【請求項 14】

n は、1 に等しく、 Z 、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 はそれぞれ、炭素原子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

下記式 (I)：

【化2】



(I)

(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、オキソ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル(ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される)からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、環を形成するために互いに共有結合されるか、または互いに共有結合されず、

R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

R_2 は、環を形成するようにnが0でない場合、Zに任意で結合し、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Yは、窒素原子、R₅で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

nは、0、1または2に等しい整数であり、

それぞれ別個のn(0でない場合)に関するZ、ならびにZ₁、Z₂、Z₃およびZ₄は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得るが、

但し、特定の化合物では、R₁、R₁'、R₂、R₃、R₄およびR₅がそれぞれ水素原子である場合、X₁およびX₂はそれぞれ酸素原子であり、かつR₆は3,3-ジメチルブチル-1-エンまたは水素原子のいずれかであることは当てはまらない)

の構造を有する化合物。

【請求項16】

R₂、R₃、R₅およびR₆はそれぞれ、水素原子である、請求項15に記載の化合物。

【請求項17】

X₁およびX₂はそれぞれ、酸素原子である、請求項15に記載の化合物。

【請求項18】

R₄は、飽和C₁~C₁₂アルキルである、請求項15に記載の化合物。

【請求項19】

前記飽和C₁~C₁₂アルキルは、第三ブチル基である、請求項15に記載の化合物。

【請求項20】

R₁は、置換フェニル基である、請求項15に記載の化合物。

【請求項21】

前記置換フェニル基は、メトキシベンゼンである、請求項20に記載の化合物。

【請求項22】

nは、0または1に等しい、請求項15に記載の化合物。

【請求項23】

nは、1に等しい、請求項15に記載の化合物。

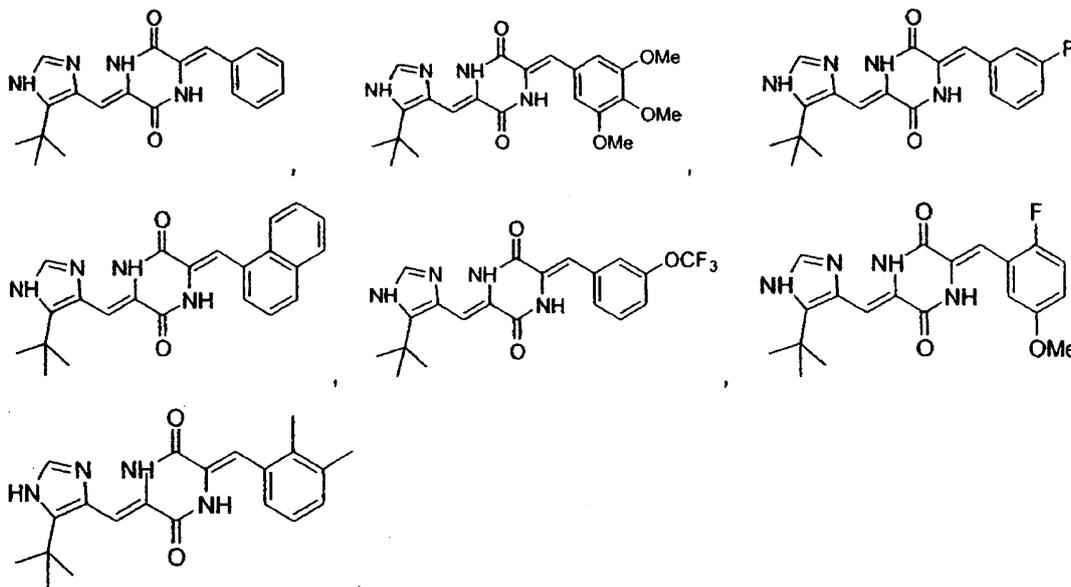
【請求項24】

nは、1に等しく、Z、Z₁、Z₂、Z₃およびZ₄はそれぞれ、炭素原子である、請求項15に記載の化合物。

【請求項25】

前記化合物は、下記式、

【化3】



およびt-ブチル-フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項15に記載の化合物。

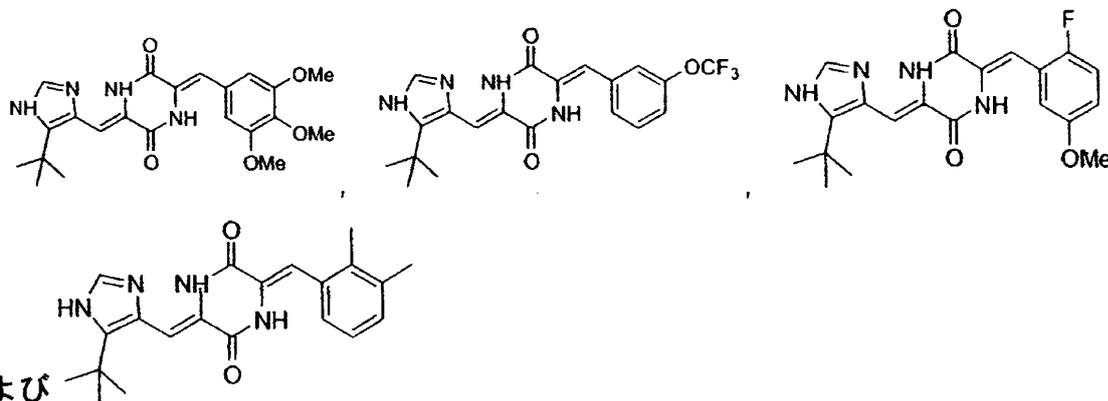
【請求項 26】

請求項 15 に記載の化合物、および薬学的に許容可能な担体を含む薬学的組成物。

【請求項 27】

前記化合物は、下記式、

【化 4】



からなる群から選択される、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

前記化合物は、細胞障害活性を有する、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 29】

前記化合物は、細胞周期阻害剤である、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

【請求項 30】

哺乳類における疾患状態の治療方法であって、前記哺乳類に、薬学的に有効な量で請求項 26 に記載の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 31】

前記疾患状態は、腫瘍性である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記疾患状態は、真菌感染である、請求項 30 に記載の方法。

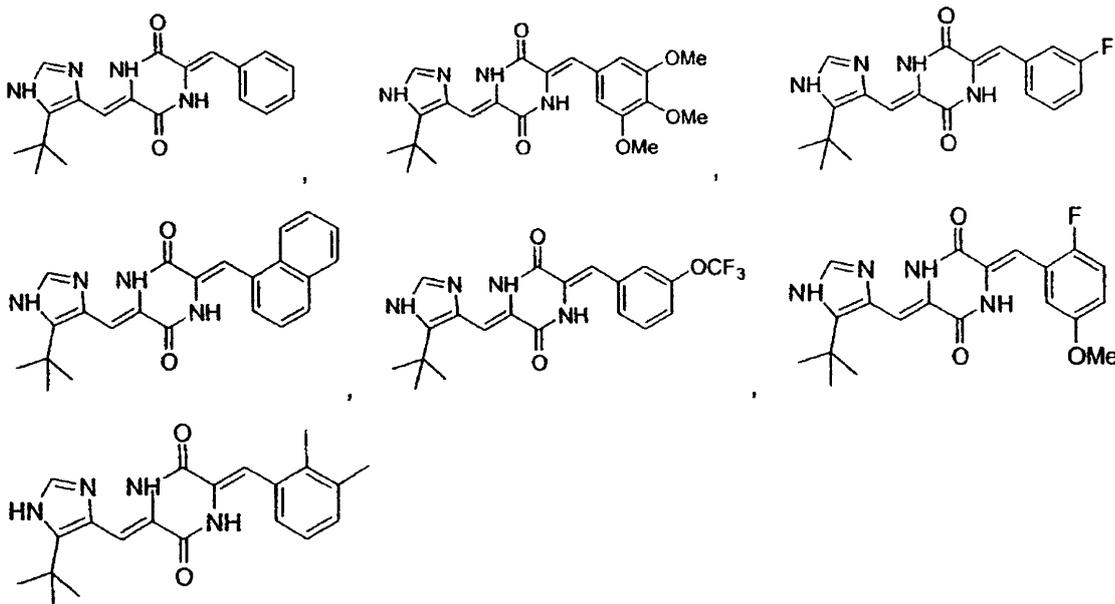
【請求項 33】

真菌感染を治療または防止するための薬学的組成物であって、抗真菌に有効な量で請求項 15 に記載の化合物を、該化合物に関する薬学的に許容可能な担体と一緒に含む薬学的組成物。

【請求項 34】

前記化合物は、下記式、

【化 5】



および *t*-ブチル-フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の組成物。

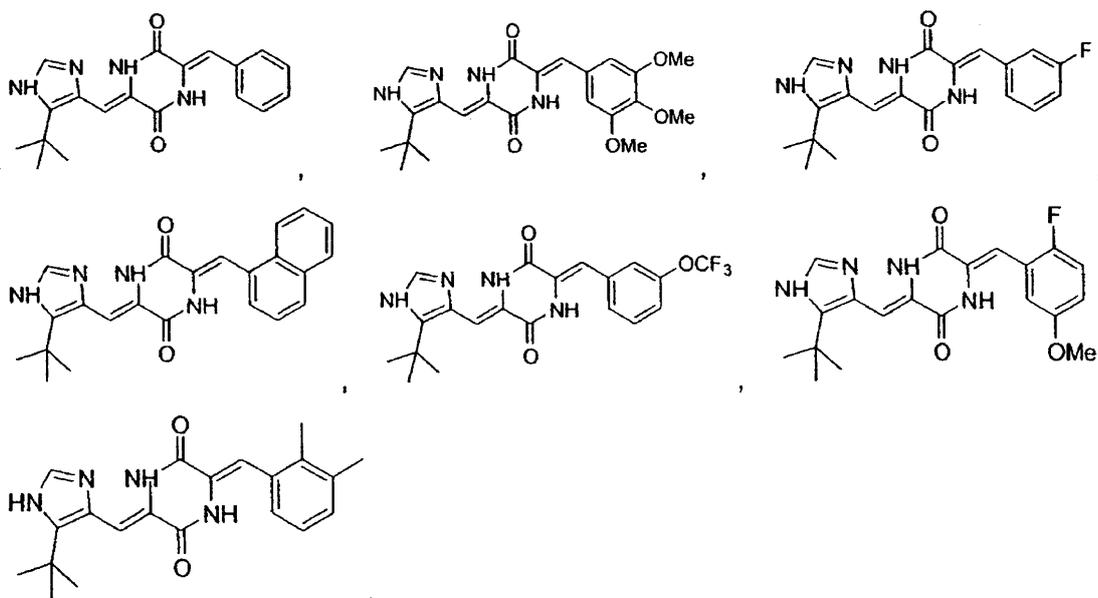
【請求項 3 5】

少なくとも 1 つの真菌感染に罹患した哺乳類において少なくとも 1 つの真菌感染を治療および/または防止する方法であって、該治療または防止に十分な抗真菌的に有効な量で請求項 1 5 に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 3 6】

前記化合物は、下記式、

【化 6】



および *t*-ブチル-フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

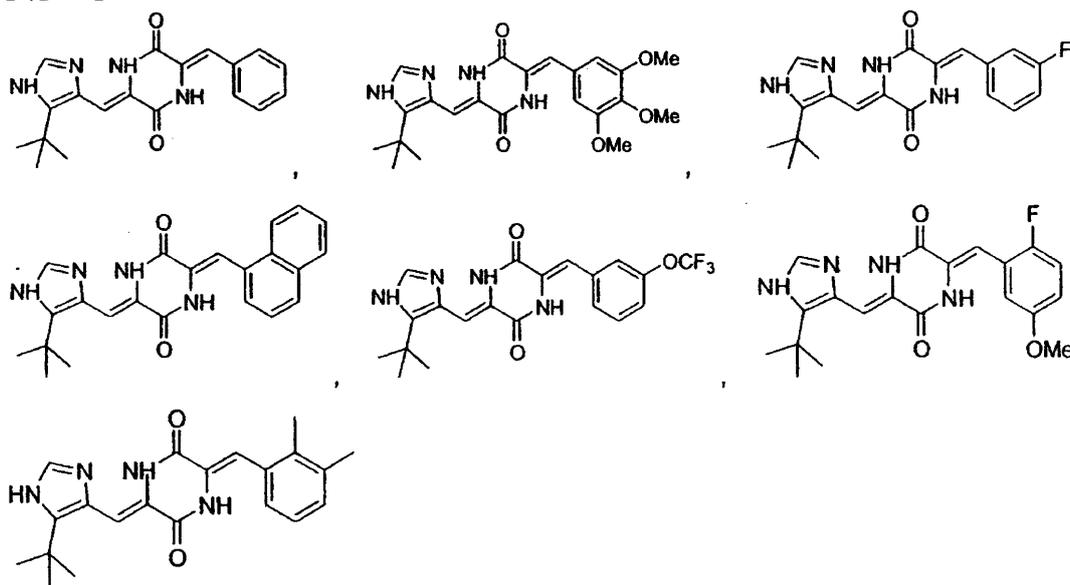
【請求項 3 7】

腫瘍を治療または防止するための薬学的組成物であって、薬学的に有効な量の請求項 1 5 に記載の化合物を、該化合物に関する薬学的に許容可能な担体と一緒に含む薬学的組成物。

【請求項 3 8】

前記化合物は、下記式、

【化 7】



および *t*-ブチル-フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 37 に記載の薬学的組成物。

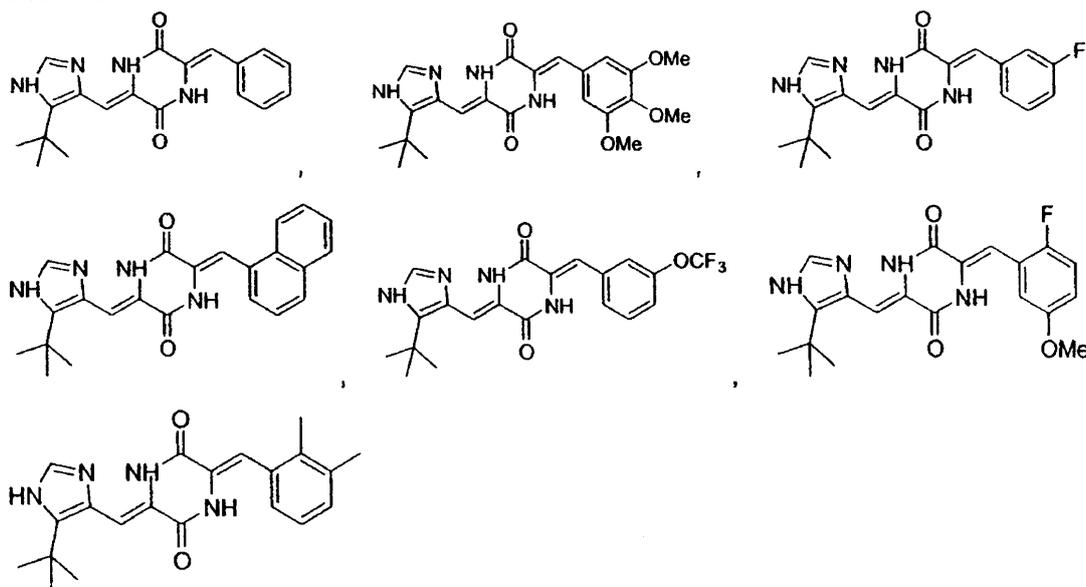
【請求項 39】

癌に罹患した哺乳類において癌を治療および/または防止する方法であって、該治療または防止に十分な抗腫瘍量の請求項 15 に記載の化合物を投与することを含む方法。

【請求項 40】

前記化合物は、下記式、

【化 8】



および *t*-ブチル-フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

哺乳類における疾患状態の治療のための薬剤の製造における、請求項 26 に記載の組成物の使用。

【請求項 42】

前記疾患状態は腫瘍性である、請求項 41 に記載の使用。

【請求項 43】

前記疾患状態は真菌感染である、請求項 4 1 に記載の使用。

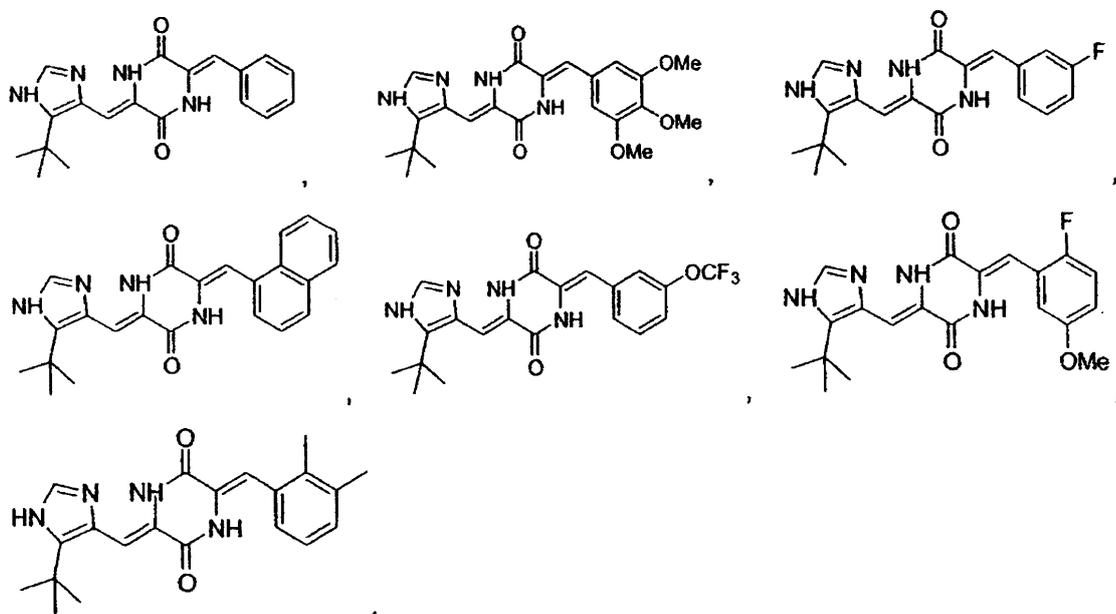
【請求項 4 4】

少なくとも 1 つの真菌感染に罹患した哺乳類において少なくとも 1 つの真菌感染を治療および / または防止するための薬剤の製造における、請求項 1 5 に記載の化合物の使用。

【請求項 4 5】

前記化合物は、下記式、

【化 9】



および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 4 4 に記載の使用。

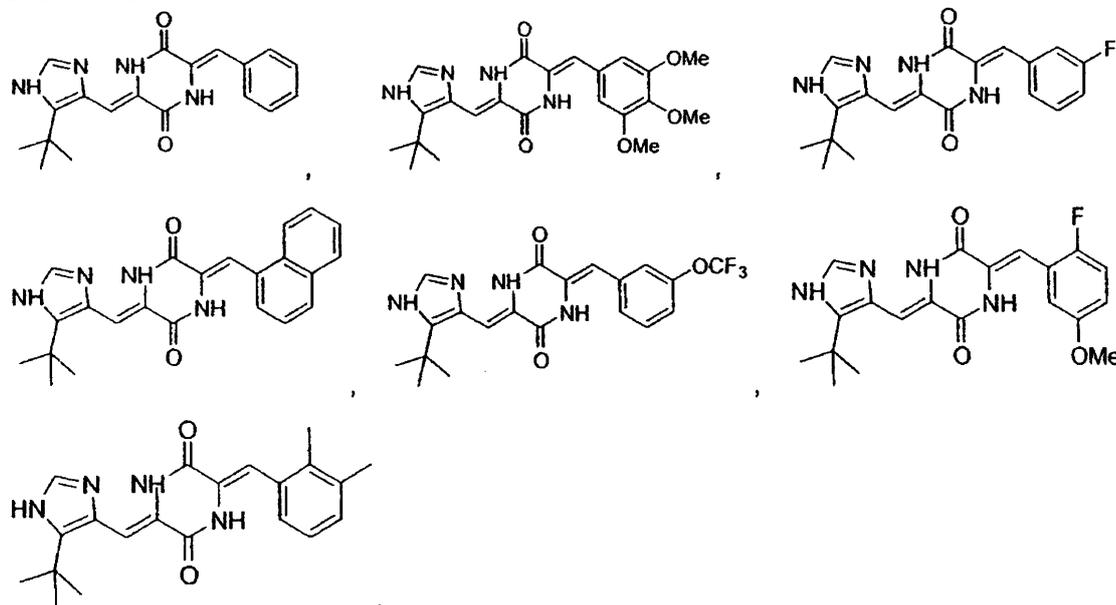
【請求項 4 6】

癌に罹患した哺乳類において癌を治療および / または防止するための薬剤の製造における、請求項 1 5 に記載の化合物の使用。

【請求項 4 7】

前記化合物は、下記式、

【化 1 0】



および t - ブチル - フェニラヒスチンからなる群から選択される、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 48】

薬剤として使用する請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 49】

薬剤として使用する請求項 15 に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

開示する化合物は、式 (I)

(式中、

R_1 、 R_4 および R_6 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

R_1' および R_1'' は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基、ヒドロキシ、カルボキシ、 $-CO-O-R_7$ 、シアノ、アルキルチオ、ハロゲン化アルキル (ポリハロゲン化アルキルを含む)、ハロゲン化カルボニル、およびカルボニル $-CCO-R_7$ (ここで、 R_7 は、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、アジド、置換ニトロ、フェニル、および置換フェニル基から選択される) からなる群から選択され、

R_2 、 R_3 および R_5 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、ならびに飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、不飽和 $C_1 \sim C_{12}$ アルケニル、アシル、シクロアルキル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、置換アリール、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、アミノ、置換アミノ、ニトロ、および置換ニトロ基、スルホニル基および置換スルホニル基からなる群から選択され、

X_1 および X_2 は、独立して、酸素原子、窒素原子、および硫黄原子からなる群から選択され、それぞれ無置換であるか、または上述に定義するような R_5 基で置換され、

Y は、窒素原子、上述の R_5 基で置換された窒素原子、酸素原子、硫黄原子、酸化硫黄原子、メチレン基および置換メチレン基からなる群から選択され、

n は、0、1 または 2 に等しい整数であり、

それぞれ別個の n (0 でない場合) に関する Z 、ならびに Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、炭素原子、硫黄原子、窒素原子または酸素原子から選択され、

破線の結合は、単結合または二重結合のいずれかであり得るが、

但し、特定の化合物では、 R_1 、 R_1' 、 R_2 、 R_3 、 R_5 および R_6 がそれぞれ水素原子である場合、 X_1 および X_2 はそれぞれ酸素原子であり、かつ R_4 は 3, 3 - ジメチルブチル - 1 - エンまたは水素原子のいずれかであることは当てはまらない)

の構造を有する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

< 好ましい実施形態の詳細な説明 >

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0436

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0436】

本発明は、例えば、言及した目的および利点、ならびに他の固有の事項を獲得するために十分に適応していることが当業者には容易に理解されよう。本明細書中に記載する方法および手順は、現在の好ましい実施形態の代表であり、例示である。本明細書中の変更および他の使用は、当業者に網羅され、それは本発明の精神に包含される。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0437

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0437】

本発明の範囲および精神から逸脱せずに、本明細書で開示した実施例に対し様々な代替および修正を行うことができることは、当業者には容易に理解されるであろう。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0438

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0438】

上述のように、明細書中で言及する特許および刊行物はすべて、本発明が関係する技術分野における当業者の水準を示す。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0439

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0439】

本明細書中に例証的に適切に記載される本発明は、本明細書中に具体的に開示されない任意の要素（単数または複数）、限定（単数または複数）の非存在下で実施されてもよい。使用してきた用語および表現は、説明の用語として使用され、限定の用語としては使用されず、かかる用語および表現の使用において、示され、かつ記載される特徴またはその一部の等価物の排除を示す意図はない。様々な修正が本発明の範囲内で可能であることが理解される。したがって、本発明を、好ましい実施形態および任意の図により具体的に開示してきたが、本明細書中に開示する概念の修正および変更は当業者によりなされてもよく、かかる修正および変更は、本発明の範囲の範疇であるとみなされることが理解されるべきである。本発明の範囲を、単に以下の請求項により定義する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 03/24232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D403/06 C07D405/12 C07D401/12 C07D409/12 C07D403/12 C07D487/04 A61K31/496 A61P31/00 A61P35/00		
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) IPC 7 C07D A61K A61P		
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, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P A	EP 1 264 831 A (KANZAKI HIROSHI ; NIPPON STEEL CHEMICAL CO (JP); NEREUS PHARMACEUTICAL) 11 December 2002 (2002-12-11) the whole document & WO 01/53290 A (NEREUS PAHRMACEUTICAL) 26 July 2001 (2001-07-26) cited in the application the whole document ----- -/--	1 1, 15, 26-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 documents, 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	Date of mailing of the international search report	
27 September 2004	13/10/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bosma, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 03/24232

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Y. HAYAH I ET AL.: "Total synthesis of anti-microtubule diketopiperazine derivatives: Phenylahistin and Aurantiamine." JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 65, no. 24, 2000, pages 8402-8405, XP002298001 AJC cited in the application the whole document	1, 15, 26-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 03/24232**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 30-32, 35, 36, 38-40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 03/24232

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1264831	A	11-12-2002	AU 7451100 A	31-07-2001
			BR 0017067 A	22-10-2002
			CA 2403790 A1	26-07-2001
			EP 1264831 A1	11-12-2002
			NZ 519989 A	28-05-2004
			WO 0153290 A1	26-07-2001
			ZA 200206576 A	12-05-2003
WO 0153290	A	26-07-2001	AU 7451100 A	31-07-2001
			BR 0017067 A	22-10-2002
			CA 2403790 A1	26-07-2001
			EP 1264831 A1	11-12-2002
			WO 0153290 A1	26-07-2001
			NZ 519989 A	28-05-2004
			ZA 200206576 A	12-05-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/497 (2006.01)	A 6 1 K 31/497	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	

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

(72) 発明者 林 良雄

日本国滋賀県栗太郡栗東町縷 3 - 9 - 1 8 - 3 0 1

(72) 発明者 グロドバーク, ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 カールスバット カレ デル サー 3 4 5 9

(72) 発明者 パラディノ, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 オリヴァンヘイン フォーチュナ ランチ ロード 3 3 5 7

F ターム(参考) 4C063 AA01 AA03 BB03 CC34 CC75 CC81 CC92 DD12 DD25 DD34
EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC48 GA02 GA04 GA07 GA08 MA01
MA04 NA14 ZB21 ZB26 ZB35

【要約の続き】

、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 、 X_1 および X_2 、 Y 、 Z 、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 および Z_4 は、それぞれ独立して、添付の説明と一致した様式で定義され得る)を製造する。癌および真菌感染を治療するための組成物および方法もまた開示する。