

(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2012-508194

(P2012-508194A)

(43) 公表日 平成24年4月5日(2012.4.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 209/56 (2006.01)	C07D 209/56	4C063
C08B 37/16 (2006.01)	C08B 37/16	4C086
C07D 417/04 (2006.01)	C07D 417/04 C S P	4C090
C07D 409/12 (2006.01)	C07D 409/12	4C204
A61K 31/541 (2006.01)	A61K 31/541	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-534990 (P2011-534990)	(71) 出願人	510262769 大連理工大学 中華人民共和国 116024 遼寧省大連市甘井子区凌工路2号
(86) (22) 出願日	平成21年10月25日 (2009.10.25)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(85) 翻訳文提出日	平成23年7月11日 (2011.7.11)	(74) 代理人	100148596 弁理士 山口 和弘
(86) 国際出願番号	PCT/CN2009/074602	(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(87) 国際公開番号	W02010/054575	(72) 発明者	張 志超 中華人民共和国遼寧省大連市甘井子区凌工路2号
(87) 国際公開日	平成22年5月20日 (2010.5.20)		
(31) 優先権主張番号	200810228746.2		
(32) 優先日	平成20年11月11日 (2008.11.11)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセナフトヘテロ環式化合物、そのシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体、並びにそれらがBH3タンパク質類似体、Bcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造

(57) 【要約】

本発明は、アセナフトヘテロ環式化合物、そのシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体、並びにBH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造におけるそれらの使用に関する。アセナフトヘテロ環式化合物は、8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルの3位、4位、及び6位においてオキソ-、チオ-、カルボニル、エステル、又はアシルを導入すること、或いは9-シアノをカルボキシル、エステル、又はアミドでさらに置換することによって得られる。化合物は、インビトロ又は細胞内でBcl-2、Bcl-X_L、及びMcl-1タンパク質と競合的に結合し、拮抗するBH3-onlyタンパク質のシミュレーションをして、細胞のアポトーシスを誘導することができる。シクロデキストリン包接化合物及び複合体は効果を改善することができる。したがって、これらはすべて、抗癌性化合物の製造において使用することができる。

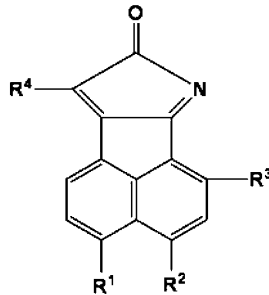
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造式を有するアセナフトヘテロ環式化合物。

【化 1】



10

[式中、

(I) $R^1 = X R^5$ 、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ、又はチオモルホリニル、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = H$ 、 $R^4 = CN$ 、 $COOH$ 、 $COOR^6$ 又は $CONHR^7$ 、

(II) $R^1 = H$ 、 $R^2 = X R^5$ 、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ、又はチオモルホリニル、 $R^3 = H$ 、 $R^4 = CN$ 、 $COOH$ 、 $COOR^6$ 又は $CONHR^7$ 、

(III) $R^1 = H$ 、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = H$ 、 $X R^5$ 、テトラヒドロピラン - 4 - オキシ - 、テトラヒドロチアピラン - 4 - オキシ - 、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ、又はチオモルホリニル、 $R^4 = CN$ 、

20

(IV) $R^1 = X R^5$ 、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = X R^5$ 、 $R^4 = CN$

であり、

式中、

$X = O$ 、 S 、カルボニル、エステル又はアミド、

$R^5 = a : (CH_2)_n Ar - (o, m, p) Y$ ($Y = CH_3$ 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 又は NH_2 、 $n = 0 \sim 4$)、

b : テトラヒドロピラン又はテトラヒドロチアピラン、

$R^6 = CH_3$ 又は C_2H_5 、

30

$R^7 = CH_3$ 、 C_2H_5 又は Ar

である]

【請求項 2】

以下の方法で調製される、請求項 1 に記載のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物：

(1) 所定量のシクロデキストリンを計量し、水に添加し、次いで加熱攪拌し、飽和溶液を生成させるステップ (ここで、シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、 δ -シクロデキストリン、 ϵ -シクロデキストリン、又はヒドロキシプロピル - β -シクロデキストリンである)、

(2) 所定量の包接用アセナフトヘテロ環式化合物を計量するステップ (ここで、化合物とシクロデキストリンのモル比は 1 : 3 ~ 10 である)、

40

(3) 包接用アセナフトヘテロ環式化合物を、5 ~ 10 mg / mL の濃度でアセトンに溶解し、得られた溶液をシクロデキストリンの水溶液に線状に滴下し、次いで沈澱が析出するまで、40 ~ 65 の温度で 1 ~ 6 日加熱攪拌するステップ、

(4) 上記の溶液を濾過し、濾過ケーキを少量の蒸留水で洗浄し、次いで遊離状態の化合物を少量のアセトンで洗い流し、50 ~ 70 の温度で 24 ~ 48 時間真空乾燥した後、前記アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物を得るステップ。

【請求項 3】

以下の方法で調製される、請求項 1 に記載のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン複合体：

50

(1) 乾燥シクロデキストリン及び複合体用アセナフトヘテロ環式化合物を計量するステップ(ここで、シクロデキストリンとアセナフトヘテロ環式化合物のモル比は1:1.5~3であり、シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、又はヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンである)、

(2) 複合体用アセナフトヘテロ環式化合物をN,N'-カルボニルジイミダゾールと1:1~2のモル比で混合し、次いで複合体用アセナフトヘテロ環式化合物のDMSO溶液中の濃度が0.2~0.5 mmol/mLとなるまでDMSOに溶解させ、次いで室温で30~60分間攪拌するステップ、

(3) ステップ(1)で計量したシクロデキストリン及び0.1~0.3 mmol/mLのトリエタノールアミンをDMSO溶液に添加し、室温で18~24時間反応させるステップ、

(4) 0.50~1.0 mg/mLのアセトンをステップ(3)の反応系に添加し、減圧条件下で反応系から析出物を分離させるステップ、

(5) 濾過し、精製して、前記アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン複合体を得るステップ。

【請求項4】

BH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造における請求項1に記載のアセナフトヘテロ環式化合物の使用。

【請求項5】

BH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造における請求項2に記載のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物の使用。

【請求項6】

BH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造における請求項3に記載のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン複合体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新しいタイプのアセナフトヘテロ環式化合物、及びナノテクノロジーを用いて調製されるそのシクロデキストリン包接化合物又はシクロデキストリン複合体に関し、また、これらの化合物が、インビトロ及びインビボでBH3-onlyタンパク質を模倣して、Bcl-2、Bcl-xL及びMcl-1タンパク質に競合的に結合し、拮抗し、それによって細胞のアポトーシスを誘導し、抗癌性化合物としての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

分子標的抗腫瘍薬は、細胞毒性類抗腫瘍薬に続き新薬研究開発及び製品化の新世代製品となりつつある。Bcl-2タンパク質は、悪性腫瘍の不死性に拮抗し、不死性を覆すのに最も重要な分子標的である。したがって、Bcl-2タンパク質に特異的に拮抗する薬物は、腫瘍細胞のみにおいてアポトーシスを誘導することによって、高選択性、安全性、高性能、及び低苦痛の抗癌療法という目標を実現できるものである。Bcl-2阻害剤のうちで、BH3類似体(BH3模倣体)は、最も著しい抗腫瘍効果、最良の薬力学的活性、及び最小の毒性副作用を示す。さらに、このような阻害剤は、Bcl-2ファミリーの抗アポトーシス性メンバー(Bcl-2、Bcl-xL、及びMcl-1タンパク質を含む)に関して広域スペクトルの拮抗能力も所有しなければならない。

【0003】

しかし、今のところ、Bcl-2を標的とする抗腫瘍製品はまだ市販されていない。既存の19種の前臨床段階のBcl-2阻害剤のうちで、3種の最適な製品がそれぞれ、第I相、第II相、及び第III相臨床試験の段階にある。これらは、Abbott Laboratories、Illinois、USAで研究開発されたABT-737、Gemini Xで研究開発されたオバトクラックス(Obatoclax)(GX15-0

10

20

30

40

50

70)、及び米国の Ascenda で研究開発された AT-101 である。これらはすべて、BH3 類似体である。競合的結合定数は、Bcl-2 タンパク質について nM オーダーであり、他の 15 個の同様の分子より遥かに高い。しかし、これらはすべて、ゴシポール (Gossypol) 及びオパトクラックスの BH3 類似レベルは不十分であり、これらは絶対的 BH3 類似体ではないという欠点を有する。言い換えれば、これらは、BAX / BAK とは無関係の細胞毒性を有する。これは、他の標的点が存在し、したがってこれらは毒性副作用を有することを示す。この欠点のため、オパトクラックスは、淘汰される危機に直面している。ABT-737 は絶対的 BH3 類似体であるが、Mcl-1 と反応することができず、且つ広域スペクトルで Bcl-2 ファミリータンパク質を阻害することができず、それによってその用途範囲が大幅に制限される。

10

【0004】

本発明者らは、8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルのアセナフトヘテロ環式化合物を開示し、これらの化合物は、細胞のアポトーシスを誘導することにより腫瘍増殖を阻害する活性を有することを開示した(中国特許、授權公告 CN 1304370C)。しかし、アポトーシスに基づく有望な抗腫瘍薬として、その研究開発は、同様の薬物と同じ困難である、アポトーシスシグナルのゲートウェイの複雑さ、潜在的及び強い細胞毒性、並びに必然的に薬品の盲目的な適用を引き起こす。これらはすべて、同様のこのような薬物の開発における失敗の重大な理由である。したがって、薬物の標的指向性効果は、研究の過程において顕著に強調されるべきである。

20

【0005】

一方、薬物の物理化学的特性は、薬理効果の発現に影響を及ぼす重要な因子であり、薬物の開発時において薬理効果の正確な評価にも影響を及ぼすことがある。このような問題は初期の研究期間に認められた。従来の研究におけるこれらの化合物は、水溶性が比較的悪く、したがってその研究及び使用をより大幅に制限された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、より強い標的指向性を有し、BH3 類似体である Bcl-2 ファミリータンパク質 (Bcl-2、Bcl-xL、及び Mcl-1 タンパク質を含む) の阻害剤として使用することができるアセナフトヘテロ環式化合物を提供し、それに基づいて、現代のナノテクノロジーと組み合わせることによって、シクロデキストリン包接体又はシクロデキストリン複合体の形成により、水溶性及びバイオアベイラビリティを改善して、標的指向性抗腫瘍性製剤としてのその使用を十分に展開することを目的とする。

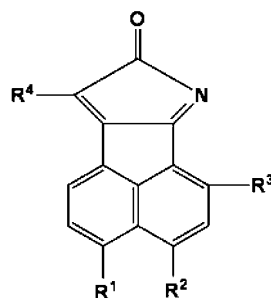
30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明のアセナフトヘテロ環式化合物は、以下の構造式を有する。

【化1】



40

R¹、R²、R³、及び R⁴ はそれぞれ、3 位、4 位、6 位、及び 9 位における置換基である。

式中、

50

(I) $R^1 = XR^5$ 、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ又はチオモルホリニル、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = H$ 、 $R^4 = CN$ 、 $COOH$ 、 $COOR^6$ 又は $CONHR^7$ 、

(II) $R^1 = H$ 、 $R^2 = XR^5$ 、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ又はチオモルホリニル、 $R^3 = H$ 、 $R^4 = CN$ 、 $COOH$ 、 $COOR^6$ 又は $CONHR^7$ 、

(III) $R^1 = H$ 、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = H$ 、 XR^5 、テトラヒドロピラン-4-オキシ-、テトラヒドロチアピラン-4-オキシ-、チオフェンメトキシル、チオフェンメチルアミノ又はチオモルホリニル、 $R^4 = CN$ 、

(IV) $R^1 = XR^5$ 、 $R^2 = H$ 、 $R^3 = XR^5$ 、 $R^4 = CN$

であり、

式中、

$X = O$ 、 S 、カルボニル、エステル又はアミド、

$R^5 = a : (CH_2)_n Ar - (o, m, p) Y$ ($Y = CH_3$ 、 NO_2 、 Ph 、 F 、 Cl 、 Br 、 CF_3 、 OCH_3 、 SCH_3 又は NH_2 、 $n = 0 \sim 4$)、

b : テトラヒドロピラン又はテトラヒドロチアピラン、

$R^6 = CH_3$ 又は C_2H_5 、

$R^7 = CH_3$ 、 C_2H_5 又は Ar

である。

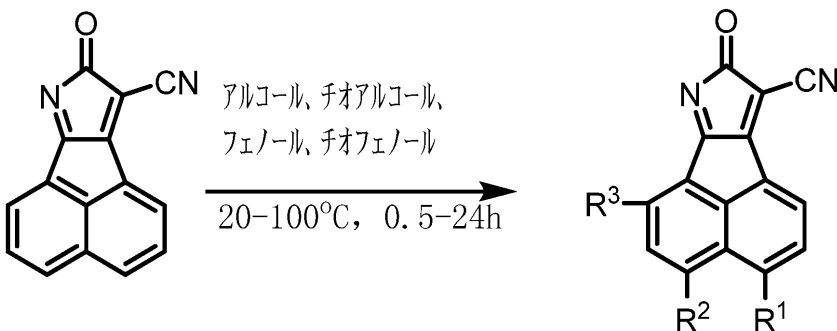
【0008】

本発明の化合物は、以下の2つの経路で合成することができる。

【0009】

第1の経路では、優れた剛性、共平面性、及び強い電子欠損性を有する原材料の8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルは、アルコール、チオアルコール、フェノール又はチオフェノールなどの求核試薬を用いた芳香族水素求核置換反応を経て、3位、4位又は6位置換8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを生じる。カルボニトリルの加水分解、エステル化、及びアミド化を行った後、対応する酸、エステル、及びアミドが得られる。化学反応式は以下の通りである。

【化2】



【0010】

溶媒(テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン、ジメチルホルムアミド又はジメチルスルホキシド)中の8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを、20~100の温度で適正な量のアルコール、チオアルコール、フェノール又はチオフェノールなどの求核試薬と0.5~24時間反応させる。冷却後、溶媒の一部を減圧条件下で蒸発させる。次いで、濾過又は直接カラムクロマトグラフィーにより、生成物の3位又は6位置換8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを得ることができる。

【0011】

濃硫酸の存在下で、3位又は6位置換8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを加水分解して、対応する酸を得ることができ、次いで対応

10

20

30

40

50

するアルコール及びアミンと反応させることにより、対応するエステル又はアミド化合物を得ることができる。

【0012】

第2の経路では、原材料のアセナフテンキニーネ及び溶媒の濃硫酸を液体臭素に添加し、2時間還流して、プロモアセナフテンキニーネを得る。得られたプロモアセナフテンキニーネをアルコール、チオアルコール、フェノール又はチオフェノールと反応させて、対応する置換アセナフテンキニーネを得る。得られた置換アセナフテンキニーネを、シリカゲルなどの弱酸条件下でアセトニトリルと反応させて、3-(2-オキシ-2H-アセナフテン)-マロノニトリルを得る。その後、反応生成物に K_2CO_3 を触媒として使用し、アセトニトリルを加えて0.5~6時間還流する。次いで、冷却し、溶媒の一部を減圧条件下で蒸発させる。濾過又は直接カラムクロマトグラフィーにより、対応する3位又は4位置換オキシ-8-オキシ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルが得られる。その後の加水分解、エステル化、アミド化の条件は、第1の経路のものと同じである。

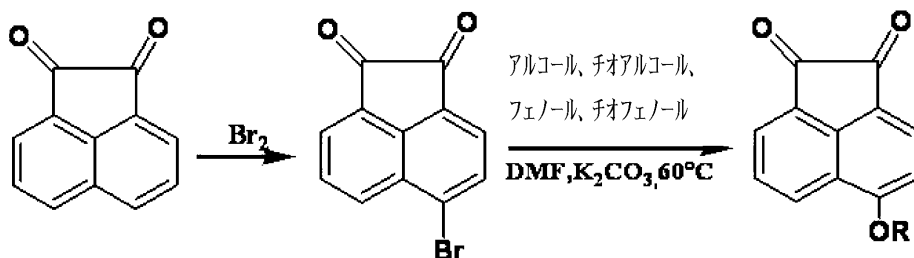
10

【0013】

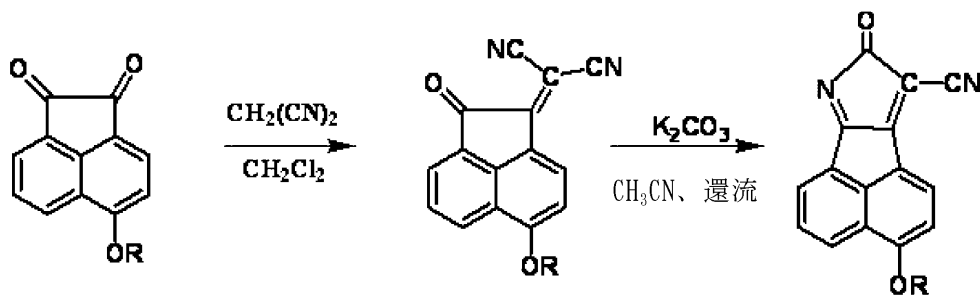
第1の経路と第2の経路の違いは、置換が輪状構造形成前に行われることであり、こうして3位、6位ではなく3位、4位における2つの異性体を得ることができる。化学反応式は以下の通りである。

【化3】

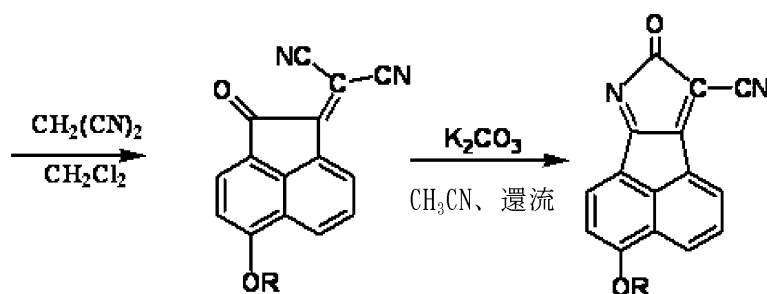
20



30



40



【0014】

多くの方法を使用して、上記の経路で得られた化合物のBH3類似レベル並びにMc1-1及びBc1-2に対する阻害が検出された。その結果から、上記のアセナフトヘテロ環式化合物は極めて高いBH3類似レベルを有し、Mc1-1及びBc1-2タンパク質

50

を有効に阻害できることが実証されている。このような属性のため、この化合物を使用して、BH₃類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤を調製することができ、さらに、この化合物を使用して、標的指向性の高い抗腫瘍薬を調製することができる。

【0015】

アセナフトヘテロ環式化合物の研究過程において、水溶性の低化は、最も顕著な問題であり、化合物の研究及び応用を大幅に制限することもわかった。Modern Technique of Drug Preparation (Cyclodextrin Chemistry - preparation and application, Chemical Industry Press, 2009、- Cyclodextrin Inclusion Technique and Application, Medicine Innovation Research, 2006, 3(3): 31-33、Chem. Pharm. Bull, 2006, 54(1)26-32)を参照のこと。本発明の別の態様は、このような化合物をシクロデキストリンで包接又はシクロデキストリン複合体形成させることによって、包接化合物又は複合体を形成し、それによって水溶性を改善し、バイオアベイラビリティを向上させることである。

10

【0016】

本発明によれば、上記のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物は、以下の方法で調製することができる。

(1) 所定量のシクロデキストリンを計量し、シクロデキストリンを水に添加し、次いで加熱攪拌し、飽和溶液を生成させるステップ(ここで、シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、又はヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンである)、

20

(2) 所定量の包接用アセナフトヘテロ環式化合物を計量するステップ(ここで、化合物とシクロデキストリンのモル比は1:3~10である)、

(3) 包接用アセナフトヘテロ環式化合物を、5~10mg/mLの濃度でアセトンに溶解させ、得られた溶液をシクロデキストリンの水溶液に線状に滴下し、次いで沈澱が析出するまで、40~65の温度で1~6日加熱攪拌するステップ、

(4) 上記の溶液を濾過し、濾過ケーキを少量の蒸留水で洗浄し、次いで遊離した状態の化合物を少量のアセトンで洗い流し、50~70の温度で24~48時間真空乾燥した後、上記アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物を得るステップ。

30

【0017】

本発明によれば、上記のアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン複合体は、以下の方法で調製することができる。

(1) 乾燥シクロデキストリン及び複合体用アセナフトヘテロ環式化合物を計量するステップ(ここで、シクロデキストリンとアセナフトヘテロ環式化合物のモル比は1:1.5~3であり、シクロデキストリンは、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン、メチル- β -シクロデキストリン、又はヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンである)、

40

(2) 複合体用アセナフトヘテロ環式化合物をN,N'-カルボニルジイミダゾールと1:1~2のモル比で混合し、次いで複合体用アセナフトヘテロ環式化合物のDMSO溶液中の濃度が0.2~0.5mmol/mLとなるまでDMSOに溶解させ、次いで室温で30~60分間攪拌するステップ、

(3) ステップ(1)で計量したシクロデキストリン及び0.1~0.3mmol/mLのトリエタノールアミンをDMSO溶液に添加し、室温で18~24時間反応させるステップ、

(4) 0.50~1.0mg/mLのアセトンをステップ(3)の反応系に添加し、減圧条件下で反応系から析出物を分離させるステップ、

(5) 濾過し、精製して、上記アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン複合

50

体を得るステップ。

【0018】

精製は、イオン交換カラムによって実施することができる。条件は、吸着剤としてダイアイオン(DIAION)(商標)HP-20イオン交換樹脂、及び分割にメタノールと水との混合溶媒を採用することである。混合溶媒中のメタノールの量を徐々に増加させ、薄層クロマトグラフィーを使用して、溶離プロセスを試験する。溶離剤の水中のメタノールの量が40~55%に到達すると、いくつかの複合体が溶離によって得られる。得られた溶離液中のメタノールを減圧下で遠心脱水した後、残留溶液を凍結乾燥して、複合体を得る。

【0019】

本発明によれば、得られたアセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物又はシクロデキストリン複合体は、相溶解度法、蛍光分光法、円二色性分光法、赤外分光光度法、熱重量分析、走査電子顕微鏡、及びH核磁気共鳴、質量分析法、単結晶X線回折法などの特性決定技法で特性決定を行い、包接体又は複合体形成の前及び後のアセナフトヘテロ環式化合物の溶解度、Mcl-1及びBcl-2に対する阻害が比較のために検出される。その結果から、シクロデキストリンを使用することによる処理方法は、アセナフトヘテロ環式化合物の水への溶解度を大幅に増大させ、Bcl-2及びMcl-1タンパク質に対する阻害能力をある程度強化することが実証される。製剤を使用して、BH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤を調製することもでき、さらには標的指向性の高い抗腫瘍薬を調製することができる。

【0020】

したがって、本発明の別の目的は、BH3類似体であるBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤の製造における上記のアセナフトヘテロ環式化合物、そのシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体の使用を実現することである。

【0021】

上記のBcl-2ファミリータンパク質の阻害剤又は対応する抗腫瘍薬は、単一化合物の製剤、化合物のシクロデキストリン包接化合物又はシクロデキストリン複合体の製剤、或いは有効用量のアセナフトヘテロ環式化合物、又はそのシクロデキストリン包接化合物、複合体と、適量の医薬品添加剤とを含む組成物とすることができ、医薬の需要及び従来の医薬製剤方法に従って所望の製剤に作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

本発明においては、14の図面がある。

【図1】Bcl-2タンパク質に競合的に結合する化合物及びFAM-Bidペプチドの蛍光偏光法で検出された動態曲線である。

【図2】化合物(種々の濃度)によって干渉された、Bcl-2とBaxとの細胞レベルでの相互作用を示す図である。

【図3】化合物によって(種々の作用時間)干渉された、Bcl-2とBaxとの細胞レベルでの相互作用を示す図である。

【図4】Baxタンパク質とコンドリオソームの共局在で検出される、化合物のBH3類似性のポジティブな結果を示す図である。

【図5】Baxタンパク質とコンドリオソームの共局在で検出される、化合物のBH3類似性のネガティブな結果を示す図である。

【図6】BAX/BAKに応じた、化合物の細胞毒性の結果を示す図である(ゴシポールは非特異的比較である)。

【図7】化合物のMcl-1に対する阻害を示すウェスタンブロットティング電気泳動図である。

【図8】化合物のBcl-2に対する阻害を示すウェスタンブロットティング電気泳動図である。

【図9】化合物3-チオモルホリン-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロ

10

20

30

40

50

ール - 9 - カルボニトリルの M c l - 1 タンパク質に対する阻害を示す半定量曲線である。

【図 10】化合物 3 - チオモルホリン - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの B c l - 2 タンパク質に対する阻害を示す半定量曲線である。

【図 11】アセナフトヘテロ環式化合物並びにそのシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体の M c l - 1 及び B c l - 2 に対する阻害を示すウェスタンブロットティング電気泳動図である。

【図 12】化合物 3 - チオモルホリン - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及びその包接化合物の M c l - 1 タンパク質に対する阻害を示す半定量曲線である。

【図 13】化合物 3 - チオモルホリン - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及びその包接化合物の B c l - 2 タンパク質に対する阻害を示す半定量曲線である。

【図 14】インビボ腫瘍モデルにおける化合物及びその包接化合物の M c l - 1 に対する阻害を示すウェスタンブロットティング電気泳動図である（図中、1 はブランク対照群、2 は対照群（1）、3 は対照群（2）、4 は実験群（1）、5 は実験群（2）、6 は実験群（3）、7 は実験群（4））。

【発明を実施するための形態】

【0023】

次に、添付図面を引用しながら、本発明の様々な実施形態をさらに詳細に説明する。

【0024】

パート I : アセナフトヘテロ環式化合物の調製及び特性決定

【0025】

実施例 1 : 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの合成及び特性決定

500 mL の一口フラスコに、0.1 mol のアセナフテンキノン、0.11 mol のマロニトリル、及び 150 mL のアセトニトリルを順に添加した。反応混合物を、不透明な淡黄色から透明な橙赤色に変色するまで 4 時間加熱還流した。反応混合物を室温に冷却した後、濾過し、橙赤色の濾過ケーキを回収して、1 - ジシアノメチレン - 2 - オキソ - アセナフテンを得た。500 mL の一口フラスコに、0.05 mol の 1 - ジシアノメチレン - 2 - オキソ - アセナフテン、1 g の K_2CO_3 、及び 200 mL のアセトニトリルを順に添加、反応混合物を 4 時間加熱還流した。大量の黄土固体が析出した。濾過し、濾過ケーキを回収し、大量の温水で洗浄し、次いで乾燥し、計量した。収率は 95% であった。

【0026】

融点 275 ~ 277 ; 1H NMR (400 M, DMSO) : 8.705 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H)、8.662 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)、8.631 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H)、8.411 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H)、8.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H)、7.984 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H)。

【0027】

実施例 2 : 3 - (4 - メチルフェノキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの合成及び特性決定

1 g の 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及び 0.47 g の p - メチルフェノールを、50 mL のアセトニトリルに添加した。混合物を 3 時間還流攪拌した。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率 40% で生成物 3 - (4 - メチルフェノキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルが得られた。

【0028】

構造決定結果 : 融点 232 ~ 233 ; 1H NMR (400 M, CDCl₃) :

10

20

30

40

50

8.916 (dd, J = 8.8 Hz, 1H)、8.623 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、
 8.447 (d, J = 6.4 Hz, 1H)、7.859 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、
 8.324 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.101 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、
 7.016 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、3.256 (s, 3H)。

【0029】

実施例3：3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(A)及び4-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(B)の合成及び特性決定

0.93gのフェノキシアセナフテンキノン及び0.3gのマロノニトリルを計量し、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。赤色固体が重量10.1g及び収率92%で得られた。0.08gの K_2CO_3 及び20mLのアセトニトリルを、0.6gの3-フェノキシ-(2-オキソ-2H-アセナフテン)-マロノニトリルに添加した。混合物を3時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム(CH_2Cl_2 :石油エーテル=2:1)で分離して、橙赤色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で試験して1:0.3であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2つの異性体を得た。

10

【0030】

第1の成分A：融点265~267 ; 1H NMR (400M, $CDCl_3$) :
 8.927 (d, J = 8.0 Hz, 1H)、8.630 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、
 8.450 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、7.876 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、
 7.754 (t, J = 8.0 Hz, 2H)、7.392 (t, J = 7.6 Hz, 1H)、
 7.233 (d, J = 7.6 Hz, 2H)、7.028 (d, J = 8.4 Hz, 1H)。

20

【0031】

第2の成分B：融点282~283 ; 1H NMR (400M, $CDCl_3$) :
 9.047 (dd, J = 8.0 Hz, 1H)、8.850 (dd, J = 7.6 Hz, 1H)、
 8.213 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.999 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、
 7.561 (t, J = 8.0 Hz, 2H)、7.410 (t, J = 7.0 Hz, 1H)、
 7.251 (d, J = 8.8 Hz, 2H)、6.899 (d, J = 8.4 Hz, 1H)。

30

【0032】

実施例4：3-(p-メチルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(A)及び4-(p-メチルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(B)の合成及び特性決定

1gのp-メチルフェノキシアセナフテンキノン及び0.3gのマロノニトリルを、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。赤色固体が重量11.2g及び収率93%で得られた。0.08gの K_2CO_3 及び20mLのアセトニトリルを、0.7gの3-フェノキシ-(2-オキソ-2H-アセナフテン)-マロノニトリルに添加した。混合物を4時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム(CH_2Cl_2 :石油エーテル=1:1)で分離して、橙赤色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で試験して1:0.4であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2つの異性体を得た。

40

【0033】

第1の成分A：融点232~233 ; 1H NMR (400M, $CDCl_3$) :
 8.916 (dd, J = 8.8 Hz, 1H)、8.623 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、
 8.447 (d, J = 6.4 Hz, 1H)、7.859 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、
 8.324 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.101 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、
 7.016 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、2.351 (s, 3H)。

50

【0034】

第2の成分B：融点258～260；¹H NMR (400M, CDCl₃)：8.987 (dd, J = 8.8 Hz, 1H)、8.858 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.208 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、7.986 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、8.333 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.112 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.889 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、2.349 (s, 3H)。

【0035】

実施例5：3-(m-メチルフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(A)及び4-(m-メチルフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(B)の合成及び特性決定

1gのm-メチルフェニルチオアセナフテンキノン及び0.3gのマロノニトリルを、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。赤色固体が重量12.2g及び収率91%で得られた。0.08gのK₂CO₃及び20mLのアセトニトリルを、0.7gの2-フェニルチオ-(2-オキソ-2H-アセナフテン)-マロノニトリルに添加した。混合物を4時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム(CH₂Cl₂：石油エーテル=1：1)で分離して、赤色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で検査して1：0.25であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2つの異性体を得た。

【0036】

第1の成分A：融点255～257；¹H NMR (400M, CDCl₃)：8.826 (dd, J = 8.8 Hz, 1H)、8.513 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.327 (d, J = 6.4 Hz, 1H)、7.659 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、8.014 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.901 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.896 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、2.353 (s, 3H)。

【0037】

第2の成分B：融点269～271；¹H NMR (400M, CDCl₃)：8.877 (dd, J = 8.8 Hz, 1H)、8.748 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.108 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、7.856 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、8.123 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.892 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.679 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、2.355 (s, 3H)。

【0038】

実施例6：6-(チエニル-2-メトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリルの合成及び特性決定

1gの8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル及び0.5gのチエニルメタノールを、50mLのアセトニトリルに添加した。混合物を3時間還流撹拌した。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率45%で生成物6-(2-チエニルメトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリルが得られた。

【0039】

融点241～243；¹H NMR (400M, CDCl₃)：8.685 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、8.433 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、8.014 (d, J = 6.4 Hz, 1H)、7.75 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、7.251 (t, J = 8.4 Hz, 1H)、7.181 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、6.985 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、6.232 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、3.454 (s, 2H)。

【0040】

実施例7：3-(3-フルオロフェニルホルミル)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル(A)及び4-(3-フルオロフェニルホル

10

20

30

40

50

ミル) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル (B) の合成及び特性決定

1 g の m - フルオロフェニルカルボニルアセナフテンキノン及び 0 . 4 g のマロノニトリルを、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。緋色固体が重量 10 . 5 g 及び収率 85 % で得られた。0 . 08 g の K_2CO_3 及び 20 mL のアセトニトリルを、0 . 8 g の 2 - フルオロカルボニル - (2 - オキソ - 2 H - アセナフテン) - マロノニトリルに添加し、混合物を 3 時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム (CH_2Cl_2 : 石油エーテル = 2 : 1) で分離して、緋色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で検査して 1 : 0 . 2 であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2 つの異性体を得た。

10

【 0041 】

第 1 の成分 A : 融点 285 ~ 287 ; 1H NMR (400 M , $CDCl_3$) :
8 . 726 (dd , $J = 8 . 8$ Hz , 1 H)、8 . 423 (d , $J = 8 . 8$ Hz , 1 H)
、8 . 015 (d , $J = 6 . 4$ Hz , 1 H)、7 . 598 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)
、8 . 003 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 2 H)、6 . 853 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 2 H)
、6 . 756 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 1 H)。

【 0042 】

第 2 の成分 B : 融点 269 ~ 271 ; 1H NMR (400 M , $CDCl_3$) :
8 . 568 (dd , $J = 8 . 8$ Hz , 1 H)、8 . 478 (d , $J = 8 . 8$ Hz , 1 H)
、8 . 006 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 1 H)、7 . 568 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)
、8 . 045 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 2 H)、6 . 908 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 2 H)
、6 . 596 (d , $J = 8 . 4$ Hz , 1 H)。

20

【 0043 】

実施例 8 : 3 - (N - フェニルホルミル) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル (A) 及び 4 - (N - フェニルホルミル) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル (B) の合成及び特性決定

1 g のフェニルアミドアセナフテンキノン及び 0 . 4 g のマロノニトリルを、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。緋色固体が重量 11 . 2 g 及び収率 86 % で得られた。0 . 08 g の K_2CO_3 及び 20 mL のアセトニトリルを、0 . 8 g のフェニルアミド - (2 - オキソ - 2 H - アセナフテン) - マロノニトリルに添加した。混合物を 3 時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム (CH_2Cl_2 : 石油エーテル = 2 : 1) で分離して、緋色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で検査して 1 : 0 . 4 であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2 つの異性体を得た。

30

【 0044 】

第 1 の成分 A : 融点 281 ~ 283 ; 1H NMR (400 M , $CDCl_3$) :
9 . 112 (d , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)、8 . 945 (d , $J = 8 . 8$ Hz , 1 H)、
8 . 682 (d , $J = 7 . 2$ Hz , 1 H)、8 . 452 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)、
8 . 312 (s , 1 H)、7 . 986 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 2 H)、7 . 627 (t ,
 $J = 7 . 6$ Hz , 1 H)、7 . 433 (d , $J = 7 . 6$ Hz , 2 H)、7 . 241 (d ,
 $J = 8 . 4$ Hz , 1 H)。

40

【 0045 】

第 2 の成分 B : 融点 293 ~ 294 ; 1H NMR (400 M , $CDCl_3$) :
9 . 213 (dd , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)、9 . 012 (dd , $J = 7 . 6$ Hz , 1 H)
、8 . 685 (d , $J = 8 . 2$ Hz , 1 H)、8 . 428 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 1 H)
、8 . 320 (s , 1 H)、7 . 896 (t , $J = 8 . 0$ Hz , 2 H)、7 . 675 (t ,
 $J = 7 . 0$ Hz , 1 H)、7 . 531 (d , $J = 8 . 8$ Hz , 2 H)、7 . 015 (

50

d, J = 8.4 Hz, 1H)。

【0046】

実施例9：3-(テトラヒドロ-2H-ピラニル-4-オキソ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル(A)及び4-(テトラヒドロ-2H-ピラニル-4-オキソ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル(B)の合成及び特性決定

1.0gのテトラヒドロピラニルオキシルアセナフテンキノン及び0.4gのマロノニトリルを、ジクロロメタンに溶解した。混合物をシリカゲルカラムに加え、急速に溶離した。混合物をすべて通過させた後、カラムを遠心脱水した。緋色固体が重量11.2g及び収率86%で得られた。0.08gのK₂CO₃及び20mLのアセトニトリルを、0.8gの4-テトラヒドロピラニル-(2-オキソ-2H-アセナフテン)-マロノニトリルに添加した。混合物を9時間加熱還流した。反応が終了した後、反応溶液を遠心脱水し、クロマトグラフカラム(CH₂Cl₂:石油エーテル=2:1)で分離して、深紅色固体を得た。異性体比は、核磁気共鳴で検査して1:0.4であった。得られた異性体を液相分離で分離して、2つの異性体を得た。

【0047】

第1の成分A：融点230~231 ; ¹H NMR(400M, CDCl₃):

8.601(d, J = 8.0 Hz, 1H)、8.134(d, J = 8.8 Hz, 1H)、7.945(dd, J = 8.0 Hz, 1H)、7.452(d, J = 8.4 Hz, 1H)、3.822(t, J = 4.8 Hz, 4H)、3.815(t, J = 5.0 Hz, 4H)、3.766(t, J = 5.2 Hz, 1H)。

【0048】

第2の成分B：融点242~244 ; ¹H NMR(400M, CDCl₃):

8.568(d, J = 8.0 Hz, 1H)、8.115(d, J = 8.8 Hz, 1H)、7.856(dd, J = 8.0 Hz, 1H)、7.326(d, J = 8.4 Hz, 1H)、3.796(t, J = 4.8 Hz, 4H)、3.807(t, J = 5.0 Hz, 4H)、3.791(t, J = 5.2 Hz, 1H)。

【0049】

実施例10：3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸の合成及び特性決定

50mlの一口フラスコに、60mLの濃硫酸又は25mLの発煙硫酸を添加した。それに、0.05molの3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを、0~5の温度でバッチごとに1時間以内で添加した。その後、反応を、室温でさらに16時間実施した。得られた反応混合物は、粘性で深茶褐色であった。次いで、得られた混合物を碎氷に徐々に滴下し、激しく攪拌した。その後、混合物を静置し、濾過した。濾過ケーキが中性になるまで、大量の水で洗浄した。濾過ケーキを乾燥して、濃黄色生成物を収率96%で得た。

【0050】

融点248 ; ¹H NMR(400M, CDCl₃): 11.42(s, 1H)、8.965(dd, J = 8.0 Hz, 1H)、8.750(dd, J = 7.8 Hz, 1H)、8.313(d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.999(t, J = 8.2 Hz, 1H)、7.561(t, J = 8.2 Hz, 2H)、7.410(t, J = 7.0 Hz, 1H)、7.251(d, J = 8.8 Hz, 2H)、6.963(d, J = 8.4 Hz, 1H)。

【0051】

実施例11：3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボキシラートの合成及び特性決定

100mlの一口フラスコに、0.01molの3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル、溶媒として50mlのアセトニトリル、脱酸試薬として0.02mmolのK₂CO₃、及び10倍を越すヨードメタ

10

20

30

40

50

ンを順に添加した。窒素保護下で、混合物を40℃まで加熱し、反応を15時間続けた。アセトニトリルを減圧条件下で蒸発させ、ジクロロメタンを添加することによって、反応物質を完全に溶解した。濾過した後、濾液を遠心脱水して、黄褐色粗生成物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフ分離（展開剤：ジクロロメタン-メタノール=40:1）により、濃黄色生成物が得られた。収率は92%であった。

【0052】

融点213℃；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 9.102 (d, J = 7.2 Hz, 1H)、8.965 (dd, J = 8.0 Hz, 1H)、8.850 (dd, J = 7.8 Hz, 1H)、8.233 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.856 (t, J = 8.2 Hz, 1H)、7.453 (t, J = 8.2 Hz, 2H)、7.350 (t, J = 7.2 Hz, 1H)、7.325 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、3.213 (s, 3H)。

10

【0053】

実施例12：3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-N-tert-ブチルアミドの合成及び特性決定

100 mLの一口フラスコに、0.01 molの3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸、溶媒として50 mLのDMF、0.02 mmolのトリエチルアミン、0.01 mmolの(EtO)₂P(=O)CN、及び10倍を超えるtert-ブチルアミドを順に添加し、室温で1時間反応させた。次いで、反応が終了した後、黄色固体が得られた。収率は85%であった。融点237℃；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.746 (dd, J = 8.0 Hz, 1H)、8.650 (dd, J = 7.8 Hz, 1H)、8.213 (d, J = 8.2 Hz, 1H)、7.846 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、7.352 (t, J = 8.0 Hz, 2H)、7.210 (t, J = 7.4 Hz, 1H)、7.051 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、6.963 (d, J = 8.4 Hz, 1H)、3.721 (s, 3H)、3.113 (m, 2H)、1.568 (dd, J = 5.6 Hz, 2H)、1.421 (m, J = 5.7 Hz, 2H)、0.968 (t, J = 6.2 Hz, 3H)。

20

【0054】

実施例13：3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルの合成及び特性決定

1 gの8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル及び3.2 gの4-プロモチオフェノールを、50 mLのアセトニトリルに添加し、室温で2時間反応させた。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率40%で化合物3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルが得られた。

30

【0055】

融点262~263℃；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.852 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.813 (d, J = 8.8 Hz, 1H)、8.015 (d, J = 6.4 Hz, 1H)、7.945 (t, J = 8.0 Hz, 1H)、7.560 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.096 (d, J = 8.4 Hz, 2H)、7.006 (d, J = 8.4 Hz, 1H)。

40

【0056】

実施例14：3,6-ジ(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルの合成及び特性決定

1 gの8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル及び6.5 gの4-プロモチオフェノールを、50 mLのアセトニトリルに添加し、室温で36時間反応させた。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率20%で化合物3,6-ジ(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルが得られた。

【0057】

50

融点 262 ~ 263 ; $^1\text{H NMR}$ (400M, CDCl_3) : 8.815 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、8.671 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、7.881 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H)、7.551 (q, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H)、7.215 (q, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 4H)、6.472 (s, 1H)。

【0058】

実施例 15 : 6 - (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの合成及び特性決定

1 g の 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及び 2.5 g の 4 - アミノチオフェノールを、50 mL のアセトニトリルに添加し、室温で 2 時間反応させた。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率 30 % で化合物 6 - (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルが得られた。融点 255 ~ 257 ; $^1\text{H NMR}$ (400M, CDCl_3) : 8.832 (dd, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、8.801 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、7.985 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H)、7.925 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H)、7.570 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H)、6.997 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H)、7.006 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H)、6.271 (s, 2H)。

【0059】

実施例 16 : 3 , 6 - ジ (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの合成及び特性決定

1 g の 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及び 5.0 g の 4 - アミノチオフェノールを、50 mL のアセトニトリルに添加し、室温で 30 時間反応させた。溶媒の一部を蒸発させた。クロマトグラフカラムにより、収率 25 % で化合物 3 , 6 - ジ (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルが得られた。融点 288 ~ 290 ; $^1\text{H NMR}$ (400M, CDCl_3) : 8.835 (dd, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、8.682 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H)、7.973 (t, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H)、7.581 (q, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H)、7.234 (q, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 4H)、6.651 (s, 1H)、6.269 (s, 4H)。

【0060】

パート II : アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体の調製及び特性決定

【0061】

このパートは、アセナフトヘテロ環式化合物のシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体の調製及び特性決定を含む。用いた特性決定方法には、紫外分光法、蛍光分光法、円二色性分光法、赤外分光法、熱重量分析、及び SEM が含まれる。特別な説明のない限り、このパートにおける装置及び検出方法については以下の資料を参照のこと。

相溶解度図 : *J. Agric. Food Chem.*、2007年、55巻(9号)、3535 ~ 3539 頁に記載の方法に従って作図。

紫外分光法 : *HP 8453* (米国)、検出方法については、*Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 173巻(2005年)、319 ~ 327 頁を参照のこと。

蛍光分光法 : *PTI - 700* (米国)、検出方法については、*J. Fluoresc* (2008年)、18巻 : 1103 ~ 1114 頁を参照のこと。

円二色性分光法 : *J - 810* (日本)、検出方法については、*J. Phys. Chem. B*、2006年、110巻(13号)、7044 ~ 7048 頁を参照のこと。

赤外分光法 : *FT/IR - 430* (日本)、検出方法については、*Mol. Pharmaceutics*、2008年、5巻(2号)、358 ~ 363 頁を参照のこと。

熱重量分析 : *TGA/SDT 851e* (スイス)、検出方法については、*Mol. P*

10

20

30

40

50

h a r m a c e u t i c s、2008年、5巻(2号)、358~363頁を参照のこと。

S E M : J S M - 5 6 0 0 L V (日本)、検出方法については、J . M e d . C h e m . 2003年、46巻、4634~4637頁を参照のこと。

H N M R : ブルーカーアバンス (Bruker Avance) I I 4 0 0 M (スイス)、検出条件は、(溶媒 C D C l 3、400M)である。

質量分析 : G C - T o f M S (英国)、検出方法については、J . O r g . C h e m . 2000年、65巻、9013~9021頁を参照のこと。

単結晶 X 線回折 : X D - 3 A (日本)、検出方法については、J . O r g . C h e m . 2008年、73巻、8305~8316頁、8305を参照のこと。

実施例 17 : 3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの β - シクロデキストリン包接化合物の調製及び特性決定

【0062】

最初に、二次再結晶し、完全に乾燥させた β - シクロデキストリン 1.85 g (1.63 mmol) を水 100 mL に添加し、次いで完全に溶解するまで加熱撹拌した。検出対象化合物 0.179 g (0.54 mmol) をアセトン 35 mL で溶解させた後、 β - シクロデキストリンの水溶液に線状に滴下した。混合物を 60 °C の温度で3日間加熱撹拌した。その結果、若干の析出物がそれから分離した。濾過し、濾過ケーキを少量の蒸留水で洗浄した。遊離した状態の化合物を少量のアセトンで洗い出した。50 °C の温度で24時間真空乾燥した後、藤色固体が得られた。

【0063】

紫外分光法を用いた検出結果は、 β - シクロデキストリンの濃度の増大と共に、化合物の紫外吸収及び溶解度が増大することを示した。このことから、対応する包接化合物が形成されたことがわかる。

【0064】

相溶解度図の結果から、化合物の溶解度が 0.21 μ M から 0.36 μ M に 1.5 倍増大したことを知ることができる。

【0065】

蛍光分光法を用いた検出結果は、検出対象化合物の濃度が一定不変に維持される条件下で、 β - シクロデキストリンの濃度の増大と共に、蛍光スペクトルの値が増大することを示した。蛍光発光波長は変化しなかったが、化合物がシクロデキストリンの空洞に入り込んだ後、空洞における環境変化が、励起状態の化合物分子を大量の分子及び消光剤との接触から保護したので、強度は増大した。蛍光スペクトルの変化は、化合物と β - シクロデキストリンが対応する包接化合物を形成したことを示唆した。

【0066】

円二色性分光法を用いた検出結果は、 β - シクロデキストリンの存在下で、検出対象化合物の誘導円二色性が、260 nm ~ 375 nm において強い正のコットン効果を示し、400 nm ~ 500 nm において弱い正のコットン効果を示すことを示した。これは、化合物が β - シクロデキストリンのキラルな空洞に入り込んだ後に誘導円二色性効果が生じたことを示唆し、このことから、包接化合物が形成されたことが示された。

【0067】

赤外分光法を用いた検出結果は、 β - シクロデキストリンが 3410.18 及び 1029.22 cm^{-1} において強い吸収帯を示し、指紋領域の 579 ~ 911 cm^{-1} において一連の特性吸収帯を示すことを示した。化合物は、2218.55 cm^{-1} 及び 1625.08 cm^{-1} において鋭い特性吸収帯を 2 本示した。赤外スペクトルでは、2219.13 cm^{-1} 及び 1625.48 cm^{-1} における特性吸収ピークの強度が低下し、わずかな変位が生じた。一方では、1706 cm^{-1} に新しい鋭いピークが現れ、このことから、包接化合物が形成されたことが示された。

【0068】

熱重量分析を用いた検出結果は、 β - シクロデキストリンが 298 °C において変曲点を

10

20

30

40

50

示し、分解し始めることを示した。しかし、 β -シクロデキストリンとは異なり、包接化合物は269で変曲点を示し、分解し始めた。これによって、包接化合物が形成されたことが示された。シクロデキストリン含有量は73.1%であった。したがって、包接モデルは1:1であった。

【0069】

SEMの結果から、3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルは針状の外観を有し、 β -シクロデキストリンはより大きい四角形の外観を有することがわかった。化合物と β -シクロデキストリンとの混合物のSEM図は、針と四角形の外観が混合したものであった。しかし、 β -シクロデキストリン包接化合物は、規則正しいダイヤモンド状の外観を有し、上記の3種類とは明らかに異なるものであった。外観が明らかに異なることから、包接化合物が形成されたことを知ることができる。

10

【0070】

他の包接化合物の調製及び特性決定：

実施例17と同様にして、同じ一連の他の化合物を様々な種類のシクロデキストリンで包接させた。これらの生成物についても、包接化合物の形成を証明するために紫外分光法、蛍光分光法、円二色性分光法、赤外分光法、熱重量分析、及びSEMで特性決定を行った。相溶解度実験により、化合物及びその包接化合物について包接前及び後の溶解度の変化を比較のために検出した。詳細な結果を表1に示した。

【0071】

20

表1から、様々な種類のシクロデキストリンで包接されたアセナフトヘテロ環式化合物の溶解度は、化合物自体の溶解度と比較すると大幅に増大したことがわかる。

【表 1】

表1

包接用のアセナフトヘテロ環式化合物	シクロデキストリン	化合物の溶解度 (μM)	包接化合物の溶解度 (μM)
3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.21	0.36
3-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.25	0.60
4-(チエニル-2-メトキシル)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.28	0.52
4-(チエニル-2-メチルアミノ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.39	0.81
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.18	0.62
8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.12	0.41
3, 6-ジ(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	β -シクロデキストリン	0.16	0.63
3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.21	0.78
3-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.25	0.70
4-(チエニル-2-メトキシル)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.28	0.62
4-(チエニル-2-メチルアミノ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.39	0.92
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.18	0.80
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.28	0.70
3, 6-ジ(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	γ -シクロデキストリン	0.31	0.95
3-(p-メチルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.25	0.96
3-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.25	0.90
3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボキシラート	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.15	0.62
3-(4-メトキシフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.32	0.92
4-(4-イソプロピルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.12	0.60
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.18	0.91
6-(チエニル-2-メトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.35	0.52
6-(テトラヒドロ-2H-ピラニル-4-オキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.25	0.58
6-(チエニル-2-メチルアミノ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.37	0.78
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.18	0.35
3-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.25	0.61
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	メチル- β -シクロデキストリン	0.28	0.85
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.18	0.72
3-フェニルチオ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.22	0.58
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.39	0.98
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.18	0.48
3-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.25	0.81
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.28	0.96

10

20

30

40

50

【0072】

実施例18：3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸の β -シクロデキストリン複合体の調製及び特性決定

3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸(0.263g、0.75mmol)及びN,N'-カルボニルジイミダゾール(0.179g)を、3mLのDMSOに溶解した。混合物を室温で30分間攪拌した後、 β -シクロデキストリン(0.6485g、0.5mmol)及び4mLのトリエタノールアミンを混合物に添加した。反応を室温で18時間続けた。反応が終了した後、約200mLのアセトンを試薬に添加した。減圧下で、析出物が分離した。得られた析出物をイオン交換カラムで精製し、得られた生成物をメタノールと水の混合溶媒で洗浄し、次いで溶液を凍結乾燥した後、0.42gの3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸/ β -シクロデキストリンの複合体が収率25%で得られた。

10

【0073】

H核磁気共鳴及び質量スペクトルによる検出結果は、下記を示した。 $^1\text{H NMR}$ (400M, $\text{D}_2\text{O}-d_6$) (ppm) 8.87(d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 8.58~8.55(m, 2H), 7.91(t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 7.39(d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 5.03(m, 8H), 3.83(m, 8H), 3.80(m, 8H), 3.74(m, 8H), 3.72~3.70(m, 3-N(CH₂*)₂(CH₂)₂S, 4H), 3.59(m, 8H), 3.52(m, 8H), 2.98~2.96(m, 3-N(CH₂)₂(CH₂)₂*S, 4H); (ESI) m/z (M+H) - (1629 m/z)。

20

【0074】

単結晶X線回折で特性決定を行った結果から、 β -シクロデキストリンは12°及び15~23°において一連の鋭いピークを示したが、化合物3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸は11°及び7°において鋭いピークを示しただけであることがわかった。しかし、複合体では、6°において新しい鋭いピークが現れ、11°における鋭いピークは消失し、同時に複合体は、14~18°及び20~25°において一連の鋭いピークを示した。複合体は、化合物及び β -シクロデキストリンに比べて、新しい鋭いピークを有するものであった。これによって、複合体が形成されたことが示された。

30

【0075】

化合物3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸は、 β -シクロデキストリンで複合体形成された後、水に対する溶解度が明らかに増大した。相溶解度曲線の当てはめ式は、 $Y=0.68+0.14 \times X$ であった。化合物3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸の水に対する溶解度は、元の0.68 μM から11.2 μM に16.5倍増大した。

【0076】

他の複合体の調製及び特性決定：

実施例18と同様にして、同じ一連の他の化合物を様々な種類の β -シクロデキストリンで複合体形成した。これらの生成物についても、複合体の形成を証明するために紫外分光法、蛍光分光法、円二色性分光法、赤外分光法、熱重量分析、及びSEMで特性決定を行った。相溶解度実験により、化合物及びその複合体について複合体形成前及び後の溶解度の変化を比較のために検出した。詳細な結果を表2に示した。

40

【0077】

表2から、様々な種類の β -シクロデキストリンで複合体形成されたアセナフトヘテロ環式化合物の溶解度は、化合物自体の溶解度と比較すると大幅に増大したことがわかる。

【表 2】

表2

複合体形成用のアセナフトヘテロ環式化合物	シクロデキストリン	化合物の溶解度 (μM)	複合体の溶解度 (μM)
3-(p-メチルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボキサミド	γ -シクロデキストリン	0.58	4.32
3-(4-ブromoフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボン酸	γ -シクロデキストリン	0.55	8.63
3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボキサミド	γ -シクロデキストリン	0.65	9.85
3-(p-メチルフェノキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボキサミド	2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	0.58	4.90
3-(4-ブromoフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボン酸	メチル- β -シクロデキストリン	0.55	4.80
3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボキサミド	ヒドロキシプロピル- γ -シクロデキストリン	0.65	10.20

10

20

【0078】

パートIII：アセナフトヘテロ環式化合物、そのシクロデキストリン包接化合物及び複合体の物理化学的特性の検出

【0079】

実施例19：蛍光偏光アッセイによる化合物のBH3類似度の検出

21個のアミノ酸を有するBid-BH3ペプチド(アミノ酸：79~99：QEDII RN I A R H L A Q V G D S M D R)を合成し、6-カルボキシフルオレセインN-スクシンイミジルエステル(FAM)を蛍光性タグ(FAM-Bid)としてN末端において標識した。競合的結合実験で使用される反応系は、GST-Bcl-2タンパク質(40nM)又はMcl-1タンパク質であった。これを、FAM-Bidポリペプチド(5nM)と共に反応緩衝液(100mM K₃PO₄、pH 7.5、100 μ g/ml ウシアルブミン、0.02%アジ化ナトリウム)に溶解した。96ウェルプレートにおいて、100 μ Lの反応系を各ウェルに添加した。次いでそこに、DMSOに溶解させた異なる濃度の検出対象である3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリル母液1 μ Lを、最終濃度が実験計画の要件を満たすまで添加した。一方、2つの対照群を設置した。反応系を含む一群は、Bcl-2又はMcl-1及びFAM-Bidを含有するだけであり(阻害率0%に相当)、反応系を含む他群は、FAM-Bidペプチドを含有するだけである。インキュベーションを4時間行った後、96ウェルプレートを酵素標識計器で検出した。530nmの波長によって励起され、発生させた発光波長485nmにおいて、蛍光偏光値(mP)を試験した。Ki値を、計算式に従って演繹した。実験結果を図1に示した。化合物とBcl-2との競合的結合定数は310nMであった。

30

40

【0080】

上述された実験方法で、他の9種の化合物のBH3類似度を検出した。それらの化合物とBcl-2及びMcl-1タンパク質との結合定数もnMレベルであった。詳細な結果を表3に示した。

50

【表 3】

表3

化合物	結合定数 (nM)
8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	0.3
3-(4-ブロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	17.0
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	20.0
3, 6-ジ (4-ブロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	5.0
3, 6-ジ (4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	7.0
3-(テトラヒドロ-2H-ピラニル-4-オキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	600.0
4-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	890.0
6-(チエニル-2-メトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	560.0
3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボキシラート	790.0

10

20

【 0 0 8 1 】

実施例 20 : 細胞内蛍光偏光エネルギー移動 (F R E T) による化合物の B H 3 類似度の検出

2 μ g の B c 1 - 2 - C F P 及び B a x - Y F P プラスミドを、リン酸カルシウム共沈法で H e 1 a 細胞に別々に又は同時にトランスフェクトし、24 時間後、細胞を 6 ウェルプレートに播種し (2×10^5 細胞 / ウェル)、そこに、D M S O に溶解させた検出対象化合物 3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルを、最終濃度 (2 , 5 , 10 , 及び 15 μ M) が実現されるまで添加した。24 時間後 (図 2 を参照のこと)、細胞を P B S で 3 回洗浄した。蛍光値は、G E N I O S 蛍光酵素標識計器 (T E C A N , スイス) で検出された。時間依存的な実験において、トランスフェクトされた細胞を 6 ウェルプレートに播種し、その後、40 μ M の化合物をそれに添加した。3、6 及び 24 時間後 (図 3)、蛍光強度をプレートリーダーで検出した。B c 1 - 2 - C F P プラスミドだけをトランスフェクトさせた細胞群に関して、475 nm の発光波長及び 433 nm の励起波長における値を記録した。B a x - Y F P プラスミドのみをトランスフェクトさせた細胞群に関して、527 nm の発光波長及び 505 nm の励起波長における値を記録した。B c 1 - 2 - C F P と B a x - Y F P プラスミドを共トランスフェクトさせた細胞群に関して、527 nm 及び 475 の発光波長並びに 433 nm の励起波長における値を記録した。527 nm と 475 nm の発光波長における蛍光強度の比が F R E T であった。プラスミドを単独でトランスフェクトさせた対照群の F R E T を 1 . 0 と設定した。これは、2 つのタンパク質に関して蛍光偏光エネルギー移動が生じないことを意味した。共トランスフェクトされた細胞では、B c 1 - 2 タンパク質と B a x タンパク質との相互作用により、F R E T は 2 . 0 まで増大したが、2 つのタンパク質間の相互作用への干渉が増大すると、F R E T は、薬物濃度の増大及び時間と共に低減した。細胞生存能力を M T T 法で検出した。実験結果を図 2 及び 3 に示した

30

40

50

。化合物の濃度が2 μ Mに到達すると、B c l - 2とB a xの相互作用は3時間後に干渉を受けるおそれがあり、その結果は濃度 - 時間依存的傾向を示した。

【 0 0 8 2 】

他の7種の化合物も、上述された方法と同じ実験方法で検出され、化合物はすべて、細胞においてB H 3 - o n l yタンパク質を刺激する機能を有し、様々な濃度及び時間の条件下でB c l - 2とB a xの相互作用に明らかに干渉することができることが実験的に証明された。詳細な結果を表4に示した。

【 0 0 8 3 】

ここで、濃度及び時間とは、検出された化合物が、その濃度でその時間、B c l - 2とB a xの相互作用に干渉したことを意味する。

【表4】

表4

化合物	濃度 (μ M)	時間 (時間)
8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	0.1	2
3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	0.5	2
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	0.2	2
3, 6-ジ (4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	1.0	2
3, 6-ジ (4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	1.0	2
3-(3-フルオロフェニルホルミル)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	10.0	6
4-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	10.0	6
6-(チエニル-2-メトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリル	10.0	6
3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボキシラート	10.0	6

【 0 0 8 4 】

実施例21：B a xタンパク質とコンドリオソームとの間の共局在性による化合物のB H 3類似度の検出

リン酸カルシウム共沈法で、5 μ gのB a x - Y F PプラスミドをM C F - 7細胞にトランスフェクトし、24時間後、細胞を6ウェルプレートに播種し(0.2 \times 10⁶細胞/ウェル)、10 μ Mの検出対象化合物3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト [1, 2-b] ピロール-9-カルボニトリルをそれに添加した。6時間後、細胞をP B Sで洗浄し、光を避けて50 nMのM i t o T r a c k e r R e d C M X R o s (コンドリオソーム特異的プローブ、赤色)で10分間インキュベートした。次いで、細胞をP B Sで3回洗浄し、ラジアンズ (R a d i a n c e) 2000レーザー共焦点顕微鏡 (B i o - R a d、米国)を用いて、蛍光像を走査した。一方、二波長走査を実施した。1つの波長は、B a x - Y F Pの緑色蛍光を走査するのに使用し、もう1つの波長は、コンドリオソームを示唆するためのC M X R o sプローブの赤色蛍光を走査するのに使用した。二波長像を重ね合わせることによって、共局在の状況が示された。B a xタンパク質がコンドリオソームに局在すると、図4に示すように緑色と赤色の蛍光が重なり合っ

て、オレンジ色になった。比較のための図5から、BAXをコンドリオソームに移動させるようにすることはできず、すなわち共局在化は成功しなかったことがわかった。

【0085】

他の8種の化合物を、上述された方法と同じ実験方法で検出した。その結果から、これらの化合物はすべて、BAXをコンドリオソームに移動させるようにする機能を有することがわかった。これによって、これらの化合物はすべて、細胞においてBH3-onlyタンパク質を刺激する機能を有することが示された。詳細な結果を表5に示した。ここで、濃度及び時間とは、検出された化合物が、その濃度及びその時間で、BH3-onlyタンパク質をシミュレーションし、BAXをコンドリオソームに移動させるようにすることを意味する。

10

【0086】

【表5】

表5

化合物	濃度 (μ M)	時間 (時間)
8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	1.0	3
3-(4-ブromoフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	1.0	6
6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	5.0	6
3,6-ジ(4-ブromoフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	5.0	6
3,6-ジ(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	5.0	6
4-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	10.0	6
6-(チエニル-2-メトキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリル	10.0	6
3-フェノキシ-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボン酸	10.0	6

20

30

【0087】

実施例22：BAX/BAKに応じた化合物の細胞毒性によるBH3類似体の特性に関する実験的試験

リン酸カルシウム共沈法で、 $3\mu\text{g}$ のBAX/BAK干渉プラスミドをMCF-7細胞にトランスフェクトし、24時間後、細胞を回収した。BAX及びBAKタンパク質がRNAを干渉した後の発現をウェスタン法で検出し、プラスミドをトランスフェクトしていない細胞群を同様に処理し、対照群と設定した。トランスフェクトされた細胞を96ウェルプレートに播種し(1×10^5 細胞/ウェル)、プラスミドをトランスフェクトしていない細胞群の対照実験を並行して実施した。それに、検出対象化合物3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルを、実験前に設計された濃度勾配に従って添加した。48時間後、細胞生存能力をMTTで検出した。実験結果を図6に示した。並行して、ゴシポールを非特異的BH3類似体として処理した。その結果から、3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト[1,2-b]ピロール-9-カルボニトリルは、BAX/BAKに対して絶対的に依存する細胞毒性を有することがわかった。

40

50

【0088】

他の8種の化合物(化合物(1)~(8)と称する)も、上述された方法と同じ実験方法で検出した。その結果から、検出された化合物も、BAX/BAKに対する絶対的依存性という特性を有することがわかった。これらの化合物は、以下の通りである。

- (1) 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (2) 3 - (4 - ブロモフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (3) 6 - (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (4) 3 , 6 - ジ (4 - ブロモフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (5) 3 , 6 - ジ (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (6) 3 - (3 - フルオロフェニルホルミル) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (7) 6 - (チエニル - 2 - メトキシ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (8) 3 - フェノキシ - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボン酸。

10

【0089】

20

実施例23：ウェスタンブロッティングによる化合物のMc1-1及びBc1-2に対する阻害の検出

細胞試料を回収し、低温において $1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$ の細胞溶解液(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、50 mM DTT、0.01% ブロムフェノールブルー)で粉碎し、次いで溶液を遠心し、タンパク質上澄液を回収した。試料を100 で5分間煮沸し、次いでSDS-PAGE(12%)電気泳動で分離し、移動させた。対象のタンパク質を対応する抗体で検出した。細胞中における対象のタンパク質の発現は、ECL着色法と組み合わせて西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体で検出した。検出対象化合物3-チオモルホリニル-8-オキシ-8H-アセナフト[1, 2-b]ピロール-9-カルボニトリルのMc1-1及びBc1-2に対する阻害を別々に、図7及び図8に示した。これらの図から、検出対象化合物が腫瘍細胞に対して作用する時間が経過するにつれて、Bc1-2及びMc1-1タンパク質の帯が次第に明るくなったことを知ることができる。このことは、化合物がこれらの2つのタンパク質に対する阻害を有することを意味した。ウェスタン像のタンパク質帯の濃度について、半定量分析、及びコダックゲルロジック(KODAK Gel Logic)1500画像処理システムソフトウェアを用いた規格化処理を実施した。タンパク質帯の濃度を図9及び図10に示した。

30

【0090】

以下の8種の化合物も、上述された方法と同じ方法で検出した。これらの化合物はすべて、Bc1-2及びMc1-1タンパク質に対して阻害したことを知ることができる。これらの化合物は下記を含む。

40

- (1) 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (2) 3 - (4 - ブロモフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (3) 6 - (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (4) 3 , 6 - ジ (4 - ブロモフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、
- (5) 3 , 6 - ジ (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキシ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、

50

(6) 3 - フェノキシ - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - N - tert - ブチルアミド、

(7) 6 - (チエニル - 2 - メトキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、

(8) 4 - (テトラヒドロ - 2 H - ピラニル - 4 - オキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル。

【 0 0 9 1 】

半定量分析によるこれらの化合物に関する M c l - 1 タンパク質及び B c l - 2 タンパク質の減少結果をそれぞれ、表 6 及び表 7 に示した。

【表 6】

表6:半定量分析による、化合物(1)～(8)についてのMcl-1タンパク質の減少結果

化合物	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
対照	1	1	1	1	1	1	1	1
6時間	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
12時間	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
18時間	0.48	0.64	0.55	0.70	0.68	0.78	0.54	0.61
24時間	0.21	0.31	0.27	0.57	0.33	0.51	0.33	0.29

10

20

【表 7】

表7:半定量分析による化合物(1)～(8)に対するBcl-2タンパク質の減少結果

化合物	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
対照	1	1	1	1	1	1	1	1
2時間	0.78	0.66	0.79	0.68	0.72	0.80	0.69	0.71
6時間	0.69	0.35	0.49	0.49	0.43	0.56	0.40	0.38

30

【 0 0 9 2 】

実施例 2 4 : ウェスタンブロッティングによるアセナフトヘテロ環式化合物並びにそのシクロデキストリン包接化合物及び複合体の M c l - 1 及び B c l - 2 に対する阻害の比較

細胞を 6 ウェルプレートに播種した (2×10^5 細胞 / ウェル) 。化合物群では、化合物 3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルを、最終濃度が $10 \mu\text{M}$ に到達するまで DMSO に溶解した。包接群では、水に溶解させておいた $10 \mu\text{M}$ の化合物に相当する β - シクロデキストリン包接体を細胞に添加した。24 時間後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、次いで細胞試料を回収し、低温において $1 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$ の細胞溶解液 (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、50 mM DTT、0.01% ブロムフェノールブルー) で粉碎し、次いで溶液を遠心し、タンパク質上澄液を回収した。試料を 100 で 5 分間煮沸し、次いで SDS - PAGE (12%) 電気泳動で分離し、移動させた。対象のタンパク質を対応する抗体で検出した。細胞における対象のタンパク質の発現は、ECL 着色法と組み合わせて西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体で検出した。検出結果を図 1 1 に示した。この図から、3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの β - シクロデキストリン包接化合

40

50

物の B c l - 2 及び M c l - 1 タンパク質に対する阻害は、化合物自体の阻害より明らかに高いことを知ることができる。すなわち、 α -シクロデキストリン包接化合物は、B c l - 2 及び M c l - 1 タンパク質に対する阻害能力を明らかに増大させた。

【 0 0 9 3 】

ウェスタン図のタンパク質帯の濃度について、半定量分析、及びコダックゲルロジック 1 5 0 0 画像処理システムソフトウェアを用いた規格化処理を実施した。タンパク質帯の濃度を図 1 2 及び図 1 3 に示した。

【 0 0 9 4 】

この例においては、 α -シクロデキストリン、2-ヒドロキシプロピル- α -シクロデキストリン、メチル- α -シクロデキストリン、及びヒドロキシプロピル- α -シクロデキストリンで包接された 3-チオモルホリニル-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、並びに以下の化合物を、上述された方法と同じ方法で検出した。その結果から、細胞において B c l - 2 及び M c l - 1 タンパク質に対する包接された化合物の阻害能力は、化合物自体の阻害能力より高いことがわかった。

- (1) 8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、
- (2) 3-(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、
- (3) 6-(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、
- (4) 3,6-ジ(4-プロモフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、
- (5) 3,6-ジ(4-アミノフェニルチオ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル、
- (6) 4-(テトラヒドロ-2H-ピラニル-4-オキシ)-8-オキソ-8H-アセナフト [1 , 2 - b] ピロール-9-カルボニトリル。

【 0 0 9 5 】

半定量分析によるこれらの化合物及びその包接化合物に関する M c l - 1 タンパク質及び B c l - 2 タンパク質の減少結果をそれぞれ、表 8 及び表 9 に示した。

【表 8】

表8:半定量分析による化合物(1)～(6)及びその包接化合物に関するMcl-1タンパク質の減少結果

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
対照	1	1	1	1	1	1
化合物	0.77	0.69	0.70	0.69	0.75	0.80
包接化合物	0.63	0.35	0.49	0.57	0.60	0.66

【表 9】

表9:半定量分析による化合物(1)～(6)及びその包接化合物に関するBcl-2タンパク質の減少結果

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
対照	1	1	1	1	1	1
化合物	0.69	0.67	0.74	0.69	0.75	0.77
包接化合物	0.53	0.55	0.59	0.55	0.57	0.66

10

20

30

40

50

【0096】

- シクロデキストリン、2 - ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン、メチル
 - シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル - シクロデキストリンで複合体形
 成された3 - (p - メチルフェノキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b]
 ピロール - 9 - カルボキサミド、3 - (4 - ブロモフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H -
 アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボン酸、3 - チオモルホリニル - 8 - オキ
 ソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボキサミドなど、同じ種類の他
 の化合物を、この実施例において上述された方法と同じ方法で検出した。実験結果から、
 細胞において、これらの化合物のシクロデキストリン複合体の B c 1 - 2 及び M c 1 - 1
 タンパク質に対する阻害能力は、化合物自体の阻害能力より高いことがわかった。

10

【0097】

実施例 25 : ウェスタンブロットニングによる、腫瘍モデルにおける化合物と包接化合
 物の M c 1 - 1 及び B c 1 - 2 に対する阻害のインビボ比較

昆明マウス (中国) をランダムに群に割付け、各群 10 匹のマウスとした。培養された
 肝ガン細胞 H 2 2 を、マウスの腋下に 200 μ L / マウスで皮下接種した。癌細胞を 5 日
 間担持した後、皮下腫瘍が形成された。次いで、化合物 3 - チオモルホリニル - 8 - オキ
 ソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル及びその - シクロ
 デキストリン包接化合物を腹膜注射で投与し、 - シクロデキストリンで包接された検出
 対象化合物を経口投与した。検出条件は下記を含む。

20

ブランク対照群 : 担癌後、マウスにはいかなる処置も施さなかった、

対照群 (1) : 担癌後、マウスに D M S O 溶液を 1 日おきに全部で 10 日間腹膜注射し
 た、

対照群 (2) : 担癌後、マウスにシクロデキストリン溶液を 1 日おきに全部で 10 日間
 腹膜注射した、

実験群 (1) : 担癌後、マウスに、0 . 03 m g / k g の B W 化合物に相当する D M S
 O 溶液を 1 日おきに全部で 10 日間腹膜注射した、

実験群 (2) : 担癌後、マウスに、0 . 3 m g / k g の B W 化合物に相当する D M S O
 溶液を 1 日おきに全部で 10 日間腹膜注射した、

実験群 (3) : 担癌後、マウスに、0 . 3 m g / k g の B W 化合物に相当する包接化合
 物水溶液を 1 日おきに全部で 10 日間腹膜注射した、

30

実験群 (4) : 担癌後、マウスに、0 . 3 m g / k g の B W 化合物に相当する包接化合
 物水溶液を 1 日おきに全部で 10 日間胃内投与した。

【0098】

実験期間中、腫瘍の長径 (a) 及び長径と直角を成す短径 (b) を、毎週 2 回検出した
 。肉眼的腫瘍体積を、式 : $1 / 2 a b^2$ に従って決定した。動物の生存期間を観察した。
 40 日目に、腫瘍阻害率を腫瘍体積によって算出した。結果を下記に示した。

実験群 (2) (化合物の D M S O 溶液注射群) : 腫瘍阻害率は 22 . 3 % であった、

実験群 (3) (包接化合物注射群) : 腫瘍阻害率は 61 . 5 % であった、

実験群 (4) (包接化合物の経口投与群) : 腫瘍阻害率は 43 . 7 % であった。

40

【0099】

対照群における動物の平均生存期間は 28 ± 2.1 日であり、化合物群における動物の
 平均寿命は 33 ± 3.1 日であり、包接化合物の注射群における動物の平均生存期間は 48 ± 5.1
 日であり、包接化合物の経口投与群における動物の平均生存期間は 42 ± 1.1
 日であった。統計処理の結果から、 $P < 0.05$ であることがわかった。

【0100】

マウスが死亡又は屠殺した後、皮下腫瘍を取り出した。体積 1 : 3 の生理食塩水を使用
 して、細胞懸濁液調製用の組織ホモジネートを作製した。腫瘍細胞における B c 1 - 2、
 M c 1 - 1 タンパク質の発現を、実施例 24 に記載の方法と同じウェスタン検出方法で検
 出した。その結果を図 14 に示した。ここで、電気泳動パス 6 におけるタンパク質帯は、
 電気泳動パス 5 におけるタンパク質帯より明るい。これは、インビボにおいて包接化合物

50

の B c 1 - 2、M c 1 - 1 に対する阻害能力が、化合物自体の阻害能力より高いことを示唆した。

【 0 1 0 1 】

- シクロデキストリン、2 - ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリン、メチル - - シクロデキストリン、及びヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンで包接された 3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリル、並びに以下の化合物は、下記を含む同じ抗腫瘍効果をインビボで有した。

(1) 実験群 (2) と同じ条件下で、8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 6 0 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、 - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 1 の腫瘍阻害率は約 8 0 % であった、

10

(2) 実験群 (2) と同じ条件下で、3 - (4 - プロモフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 4 0 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、2 - ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 2 の腫瘍阻害率は約 6 0 % であった、

(3) 実験群 (2) と同じ条件下で、6 - (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 3 0 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、 - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 3 の腫瘍阻害率は約 4 0 % であった、

20

(4) 実験群 (2) と同じ条件下で、3 , 6 - ジ (4 - プロモフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 7 8 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、メチル - - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 4 の腫瘍阻害率は約 8 5 % であった、

(5) 実験群 (2) と同じ条件下で、3 , 6 - ジ (4 - アミノフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 5 0 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、 - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 5 の腫瘍阻害率は約 6 0 % であった、

(6) 実験群 (2) と同じ条件下で、4 - (テトラヒドロ - 2 H - ピラニル - 4 - オキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボニトリルの腫瘍阻害率は約 4 0 % であった、実験群 (3) と同じ条件下で、 - シクロデキストリンで包接された化合物 2 9 - 6 の腫瘍阻害率は約 5 5 % であった。

30

【 0 1 0 2 】

他の化合物の腫瘍阻害率は 3 0 % ~ 5 0 % であった。シクロデキストリン包接化合物の腫瘍阻害率は、化合物自体の腫瘍阻害率より一般に高い (P < 0 . 0 5) 。

【 0 1 0 3 】

- シクロデキストリン、2 - ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリン、メチル - - シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンで複合体形成された以下の化合物も化合物自体より、B c 1 - 2 及び M c 1 - 1 に対する阻害能力が強く、腫瘍阻害率が高いものであった。

40

ここで、

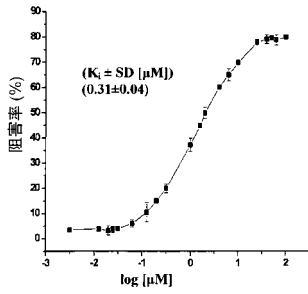
3 - (p - メチルフェノキシ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボキサミドの腫瘍阻害率は 3 0 % であり、メチル - - シクロデキストリンで複合体形成されたとき、腫瘍阻害率は約 3 8 % に到達した、

3 - (4 - プロモフェニルチオ) - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボン酸の腫瘍阻害率は 4 5 % であり、ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンで複合体形成されたとき、腫瘍阻害率は 5 5 % に到達した、

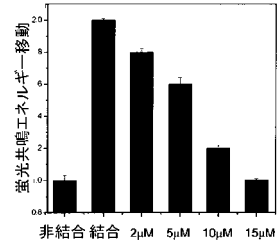
3 - チオモルホリニル - 8 - オキソ - 8 H - アセナフト [1 , 2 - b] ピロール - 9 - カルボキサミドの腫瘍阻害率は 4 5 % であり、2 - ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリンで複合体形成されたとき、腫瘍阻害率は 6 0 % に到達した。

50

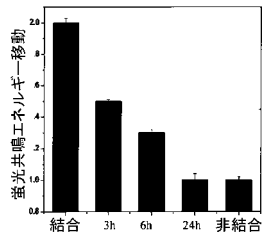
【 図 1 】



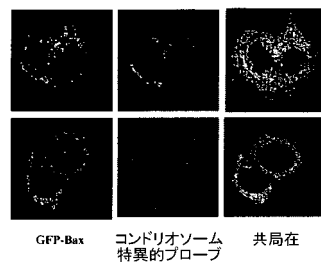
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

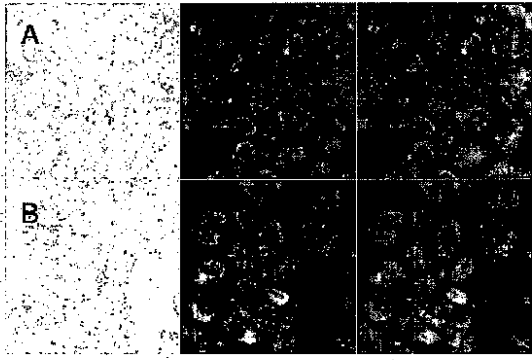
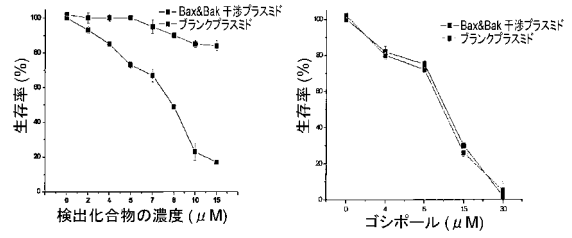
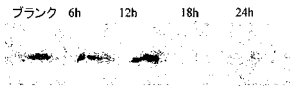


図 5

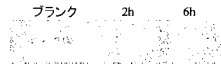
【 図 6 】



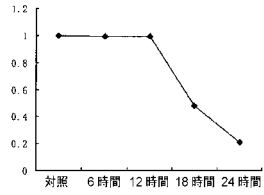
【 図 7 】



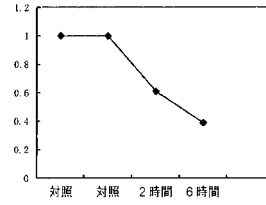
【 図 8 】



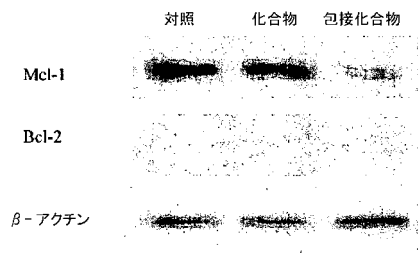
【 図 9 】



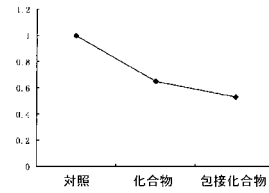
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2009/074602
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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: C07DA61KA61PC08B		
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 practicable, search terms used)		
CNPAR, CNKI; WPI; EPODOC; STN (REG CAplus): acenaphth+; PYRROL+; APOPTOSIS; +CANC+; +TUMOR+; BCL; INHIBITOR?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1931840 A (UNIV EAST-CHINA SCI & ENG) 21 March 2007 (21.03.2007) Examples 1, 6-8, 12	1, 4
X	LIU, Fengyu et al. Design, synthesis, and antitumor evaluation of novel acenaphtho[1,2-b]pyrrole-carboxylic acid esters with amino chain substitution. Bioorg. Med. Chem. 01 July 2006, vol.14, No.13, pages 4639-4644, ISSN 0968-0896 Compounds 1, 4a, 4e	1, 4
X	ZHANG, Zhichao et al. Novel Bel-2 inhibitors: discovery and mechanism study of small organic apoptosis-inducing agents. ChemBioChem 02 January 2007, vol. 8, No. 1, pages 113-121, ISSN 1439-4227 Page 119, Synthesis of S1, S2 and S3	1, 4
A	The whole document	2-3, 5-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>	
Date of the actual completion of the international search 13 January 2010 (13.01.2010)		Date of mailing of the international search report 04 Feb. 2010 (04.02.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer SHA, Lei Telephone No. (86-10)62084375

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074602

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, Zhichao et al. Intercalation, cytotoxicity, and molecular modeling of acenaphtho[1,2-b]pyrrole chromophores as a new family of antitumor agents. CHEM. RES. CHINESE UNIVERSITIES July 2008, vol. 24, No. 4, pages 449-453, ISSN 1005-9040 Compound 1	1, 4
X	CN 1616428 A (UNIV DALIAN SCI & ENG) 18 May 2005 (18.05.2005) Example 3	1, 4
P, X	XIE, Lijuan Synthesis and study on the antitumor activity of nitro-containing fused heterocyclic compounds. Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database Medicine and Health Sciences (UNIV DALIAN SCI & ENG DOCTORAL DISSERTATION) 15 May 2009, No. 5, ISSN 1674-022X Page 85, compound 5i	1, 4
P, X	CN 101423491 A (UNIV DALIAN SCI & ENG) 06 May 2009 (06.05.2009) The whole document, especially claims and examples	1, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/CN2009/074602

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1931840 A	21.03.2007	None	
CN 1616428 A	18.05.2005	CN 1304370 C	14.03.2007
CN 101423491 A	06.05.2009	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/074602

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 405/12 (2006.01) i

C07D 409/12 (2006.01) n

C07D 209/70 (2006.01) n

A61K 31/403 (2006.01) n

A61K 31/54 (2006.01) n

A61P 43/00 (2006.01) n

C08B 37/16 (2006.01) n

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2009/074602
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07D A61K A61P C08B		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAC; CNKI; WPI; EPODOC; STN (REG CAPUS); 苌并; 吡咯; 细胞凋亡; 癌; 肿瘤; Bcl; 抑制剂; acenaphtho+; PYRROL+; APOPTOSIS; +CANC+; +TUMOR+; BCL; INHIBITOR?		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1931840 A (华东理工大学) 21.3 月 2007 (21.03.2007) 实施例 1、6-8、12	1、4
X	LIU, Fengyu 等 Design, synthesis, and antitumor evaluation of novel acenaphtho[1,2-b]pyrrole-carboxylic acid esters with amino chain substitution. Bioorg. Med. Chem. 01.7 月 2006, 14 卷, 第 13 期, 第 4639-4644 页, ISSN 0968-0896 化合物 1、4a、4e	1、4
X	ZHANG, Zhichao 等 Novel Bcl-2 inhibitors: discovery and mechanism study of small organic apoptosis-inducing agents. ChemBioChem 02.1 月 2007, 8 卷, 第 1 期, 第 113-121 页, ISSN 1439-4227 第 119 页 S1、S2 和 S3 的合成	1、4
A	全文	2-3、5-6
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 13.1 月 2010 (13.01.2010)		国际检索报告邮寄日期 04.2 月 2010 (04.02.2010)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 沙磊 电话号码: (86-10) 62084375

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2009/074602

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	ZHANG, Zhichao 等 Intercalation, cytotoxicity, and molecular modeling of acenaphtho[1,2-b]pyrrole chromophores as a new family of antitumor agents. CHEM. RES. CHINESE UNIVERSITIES 7月2008, 24卷, 第4期, 第449-453页, ISSN 1005-9040 化合物 1	1、4
X	CN 1616428 A (大连理工大学) 18.5月2005 (18.05.2005) 实施例 3	1、4
P, X	解丽娟 含氮稠杂环化合物合成及抗肿瘤细胞活性研究. 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 (大连理工大学博士学位论文) 15.5月2009, 第5期, ISSN 1674-022X 第85页, 化合物 5i	1、4
P, X	CN 101423491 A (大连理工大学) 06.5月2009 (06.05.2009) 全文, 特别是权利要求和实施例	1、4

国际检索报告
关于同族专利的信息国际申请号
PCT/CN2009/074602

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1931840 A	21.03.2007	无	
CN 1616428 A	18.05.2005	CN 1304370 C	14.03.2007
CN 101423491 A	06.05.2009	无	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(2009年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2009/074602

主题的分类

C07D 405/12 (2006.01) i
C07D 409/12 (2006.01) n
C07D 209/70 (2006.01) n
A61K 31/403 (2006.01) n
A61K 31/54 (2006.01) n
A61P 43/00 (2006.01) n
C08B 37/16 (2006.01) n

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 31/403 (2006.01)	A 6 1 K 31/403	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/724 (2006.01)	A 6 1 K 31/724	
C 0 7 D 405/12 (2006.01)	C 0 7 D 405/12	

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

(72) 発明者 吳 桂葉
中華人民共和国遼寧省大連市甘井子区凌工路 2 号

(72) 発明者 宋 ティン
中華人民共和国遼寧省大連市甘井子区凌工路 2 号

(72) 発明者 謝 飛博
中華人民共和国遼寧省大連市甘井子区凌工路 2 号

F ターム(参考) 4C063 AA01 BB01 BB08 CC64 CC78 CC94 DD08 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 BC10 BC88 GA02 GA03 GA07 GA10 MA01
MA04 NA14 ZB26 ZC41
4C090 AA09 BA09 BB12 BB33 BB36 BB52 DA23
4C204 BB01 CB30 DB27 DB30 EB03 GB25 GB29 GB32

(54) 【発明の名称】アセナフトヘテロ環式化合物、そのシクロデキストリン包接化合物及びシクロデキストリン複合体、並びにそれらが B H 3 タンパク質類似体、B c 1 - 2 ファミリータンパク質の阻害剤の製造における使用