

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年1月24日(24.01.2013)



(10) 国際公開番号

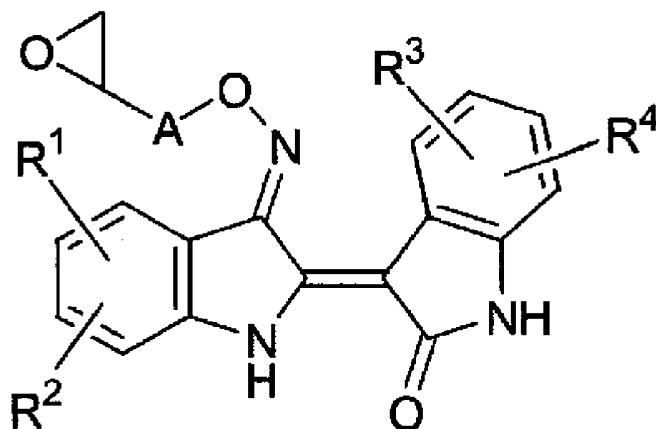
WO 2013/011841 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 405/14 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/067153
- (22) 国際出願日: 2012年7月5日(05.07.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-156299 2011年7月15日(15.07.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 鈴木 孝(SUZUKI, Takashi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 宮入 伸一(MIYAIRI, Shinichi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 齋藤 弘明(SAITO, Hiroaki) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大
- 学内 Tokyo (JP). 田畑 恵市(TABATA, Keiichi) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: INDIRUBIN DERIVATIVE HAVING HIGHLY SELECTIVE CYTOTOXICITY FOR MALIGNANT TUMORS

(54) 発明の名称: 悪性腫瘍に対する高選択的細胞毒性を有するインディルビン誘導体



(1)

(57) Abstract: Provided is a therapeutic agent for malignant tumors based on a novel mechanism of action. An indirubin derivative represented by general formula (1) (in the formula, A represents an alkylene group having 1-4 carbon atoms, R¹-R⁴ each independently represent a hydrogen atom, halogen atom, hydroxy group, or alkoxy group) or a salt thereof.

(57) 要約: 新たな作用機序に基づく悪性腫瘍治療薬を提供する。一般式(1)(式中、Aは炭素数1~4のアルキレン基を示し、R¹~R⁴はそれぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基又はアルコキシ基を示す)で表されるインディルビン誘導体又はその塩。

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

悪性腫瘍に対する高選択的細胞毒性を有するインディルビン誘導体

技術分野

[0001] 本発明は、新規なインディルビン誘導体又はその塩及びこれを含有する医薬に関する。

背景技術

[0002] がん（悪性腫瘍）は死亡原因の一位を占める疾患であり、新たな治療法が求められている。現在の悪性腫瘍治療法としては、外科療法、放射線療法、化学療法（抗悪性腫瘍剤）があるが、通常これらを組み合わせて治療が行なわれる。抗がん剤には、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド系抗がん剤、抗生物質抗がん剤、白金製剤、分子標的薬等が用いられているが、これら抗がん剤の治療効果は未だ十分とは言えず、また副作用の発生頻度が高いという問題がある。

[0003] 一方、インディルビンは、ヒト尿中から単離されたインドール系化合物であり、環境ホルモンの一種である2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（TCDD）よりもアрилヒドロカーボン受容体（AhR）に高い親和性を有することが知られている。従って、インディルビンはAhRの内因性リガンドの可能性が指摘されている（非特許文献1）。また、インディルビンは、サイクリン依存性キナーゼ（CDKs）、さらにグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β （GSK-3 β ）に作用して、細胞周期、細胞分化、神経細胞の極性形成などに影響を与えることが報告されている（非特許文献2）。これらのインディルビンの標的タンパク質は、細胞増殖に高度に関連しており、GSK-3 β は最近のがん治療分子標的薬のターゲットであるチロシンキナーゼの一種である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Adachi, J. ; Mori, Y. ; Matsui, S. ; Takigami, H. ; Fujino, J. ; Kitagawa, H. ; Miller III, C. A. ; Kato, T. ; Saeki, K. ; Matsuda, T. J. Biol. Chem. 2001, 276, 31475.

非特許文献2: Damiens, E. ; Baratte, B. ; Marie, D. ; Eisenbrand, G. ; Meijer, L. Oncogene, 2001, 20, 3786.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、新たな作用機序に基づく悪性腫瘍治療薬を提供することにある。

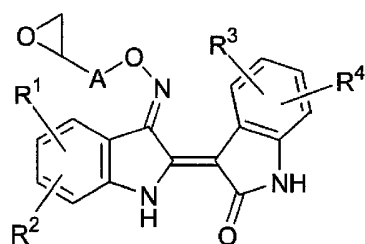
課題を解決するための手段

[0006] そこで本発明者は、がん治療の分子標的薬のターゲットであるチロシンキナーゼの一種であるGSK-3 β やCDKsに作用することが知られているインディルビンに着目し、種々の誘導体を合成し、その癌細胞増殖抑制作用を検討してきたところ、インディルビンの3位をオキシム化し、さらにここにエポキシ基を導入したところ、該化合物が、従来から強い悪性腫瘍治療薬として知られているシスプラチンよりも強力な癌細胞増殖抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、一般式(1)

[0008]

[化1]



(1)

[0009] (式中、Aは炭素数1～4のアルキレン基を示し、R¹～R⁴はそれぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基又はアルコキシ基を示す)で表されるインディルビン誘導体又はその塩を提供するものである。

[0010] また本発明は、上記インディルビン誘導体又はその塩を有効成分とする医薬、特に悪性腫瘍治療剤、アポトーシス誘導剤を提供するものである。

また本発明は、上記インディルビン誘導体又はその塩、及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物を提供するものである。

また本発明は、上記インディルビン誘導体又はその塩の、医薬、特に悪性腫瘍治療剤、アポトーシス誘導剤製造のための使用を提供するものである。

また本発明は、悪性腫瘍治療又はアポトーシス誘導のための、上記インディルビン誘導体又はその塩を提供するものである。

また本発明は、上記インディルビン誘導体又はその塩の有効量を投与することを特徴とする悪性腫瘍治療方法又はアポトーシス誘導方法を提供するものである。

発明の効果

[0011] 本発明のインディルビン誘導体(1)は、悪性腫瘍細胞の増殖を強力に抑制し、悪性腫瘍治療剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]神経芽腫細胞であるIMR-32、SK-N-SH、LA-N-1、NB-39に対する本発明化合物(HS-2)の細胞傷害活性を示す図である

。(図中、横軸は化合物濃度、縦軸は細胞生存率を示す。)

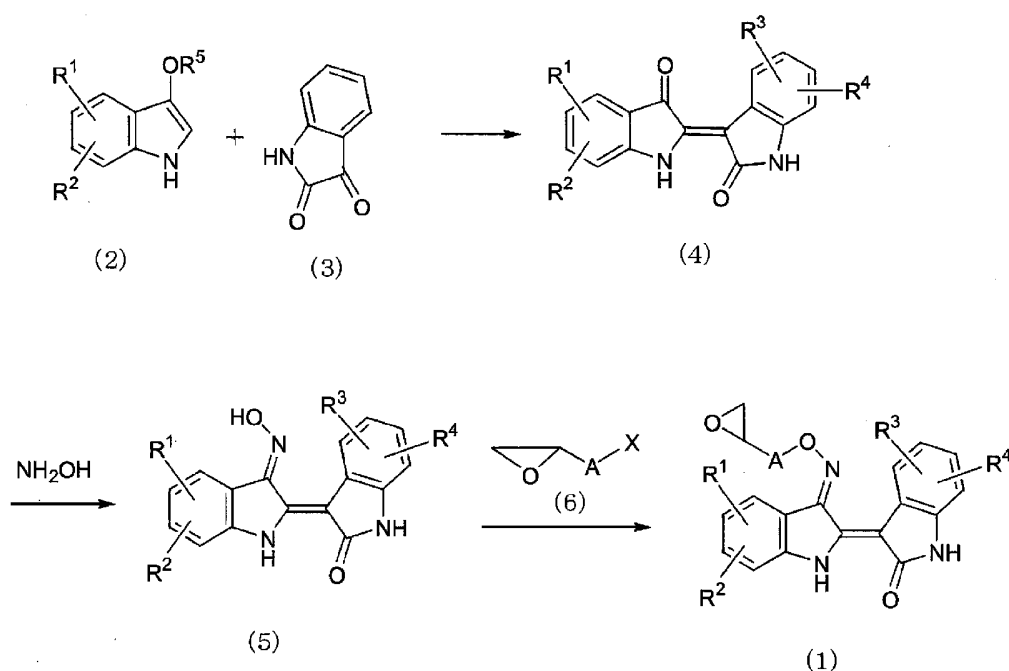
[図2]神経芽腫細胞であるIMR-32に対する本発明化合物(HS-2)のアポトーシス誘導を示す図である。

[図3]神経芽腫細胞であるIMR-32に対する本発明化合物(HS-2)のアポトーシス誘導を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0013] 本発明のインディルビン誘導体は、一般式(1)で表される。一般式(1)中、Aは炭素数1~4のアルキレン基を示すが、当該アルキレン基としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、ブチレン基等の直鎖又は分岐鎖のアルキレン基が挙げられ、このうち、メチレン基、エチレン基がより好ましく、メチレン基が特に好ましい。
- [0014] $R^1 \sim R^4$ は、それぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基又はアルコキシ基を示す。ここでハロゲン原子としては、塩素原子、フッ素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。アルコキシ基としては、炭素数1~6のアルコキシ基が挙げられ、そのうちメトキシ基、エトキシ基、イソプロピルオキシ基、*n*-プロピルオキシ基、*n*-ブチルオキシ基等の炭素数1~4のアルコキシ基がより好ましく、メトキシ基、エトキシ基が特に好ましい。
- [0015] また、 $R^1 \sim R^4$ としては、水素原子又はアルコキシ基が好ましく、特に水素原子が好ましい。
- [0016] インディルビン誘導体(1)の塩としては、塩酸塩、硝酸塩、硫酸塩等の無機塩、酢酸塩、フマル酸塩等の有機酸塩が挙げられる。また、本発明のインディルビン誘導体(1)が不斉炭素原子を有する場合には、光学活性体及びラセミ体のいずれも含まれる。さらに、本発明化合物は、水和物等の溶媒和物の形態で存在してもよい。
- [0017] インディルビン誘導体(1)は、例えば次の反応式に従って製造することができる。
- [0018]

[化2]



[0019] (式中、 R^5 はアルカノイル基を示し、 X はハロゲン原子を示し、 A 、 $R^1 \sim R^4$ は前記と同じ)

[0020] すなわち、カルボン酸インドキシル類 (2) 及びイサチン類 (3) を塩基の存在下に縮合させてインディルビン類 (4) を得、これにヒドロキシルアミン又はその塩を反応させてインディルビン-3'-オキシム (5) を得、次いでこれにハロアルキルオキシラン類 (6) を反応させることにより、インディルビン誘導体 (1) が得られる。

[0021] 反応式中、 R^5 で示されるアルカノイル基としては、アセチル基、プロピオニル基等が挙げられる。また、 X で示されるハロゲン原子としては、塩素原子、臭素原子等が挙げられる。

[0022] 化合物 (2) と化合物 (3) との反応に用いられる塩基としては炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム等が挙げられる。この反応に用いられる溶媒としては、メタノール、エタノール等のアルコール系溶媒が挙げられる。反応は、室温で行うことができ、反応時間は10~24時間でよい。

- [0023] 化合物（４）にヒドロキシルアミン又はその塩を反応させて、オキシム体（５）を得る。この反応は、ピリジン、トルエン等の溶媒中加熱還流下に行うのが好ましい。
- [0024] オキシム体（５）に反応させるハロヒドリン類（６）としては、エピプロモヒドリン、エピクロルヒドリン等が用いられる。この反応は、トリエチルアミン、DBU、DABCO等の第三級アミンの存在下、ジメチルホルムアミド等の非プロトン性極性溶媒下、室温で行うことができる。
- [0025] かくして得られるインディルビン誘導体（１）は、後記実施例に示すように、強力な悪性腫瘍細胞増殖抑制作用を有し、また悪性腫瘍細胞に対してアポトーシス誘導能を示すことから、悪性腫瘍治療剤として有用である。
- [0026] 本発明の悪性腫瘍治療剤は、ヒトを含む哺乳類の、多岐にわたる悪性腫瘍に対して有効であり、例えば咽頭癌、喉頭癌、舌癌、肺癌、乳癌、食道癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、肝臓癌、膵臓癌、胆嚢癌、腎臓癌、前立腺癌、悪性黒色腫、甲状腺癌などの上皮がん；骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、繊維肉腫、白血病や悪性リンパ腫、骨髄腫などの非上皮がんが挙げられる。
- [0027] 本発明の悪性腫瘍治療剤は、当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、顆粒化、錠剤化、乳化、カプセル封入、凍結乾燥等により、製剤化することができる。
- [0028] 経口投与用には、インディルビン誘導体（１）を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、錠剤、丸剤、糖衣剤、軟カプセル、硬カプセル、溶液、懸濁液、乳剤、ゲル、シロップ、スラリー等の剤形に製剤化することができる。
- [0029] 非経口投与用には、インディルビン誘導体（１）を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、注射用溶液、懸濁液、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、吸入剤、坐剤等の剤形に製剤化することができる。注射用の処方においては、本発明の治療剤を水性溶液、好ましくはハanks溶液、リンゲル溶液、又は生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の

緩衝液中に溶解することができる。さらに、組成物は、油性又は水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、又は乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、インディルビン誘導体（1）を粉体の形態で製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液又は懸濁液を調製してもよい。吸入による投与用には、インディルビン誘導体（1）を粉末化し、ラクトース又はデンプン等の適当な基剤とともに粉末混合物とすることができる。坐剤処方は、インディルビン誘導体（1）をカカオバター等の慣用の坐剤基剤と混合することにより製造することができる。さらに、本発明の治療剤は、ポリマーマトリクス等に封入して、持続放出用製剤として処方することができる。

[0030] インディルビン誘導体（1）の投与量は、患者の症状、投与経路、体重、年齢等によっても異なるが、例えば成人1日あたり1mg～500mgであるのが好ましい。

[0031] 本発明の悪性腫瘍治療剤は、通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、特に限定されず、経口投与でもよい。

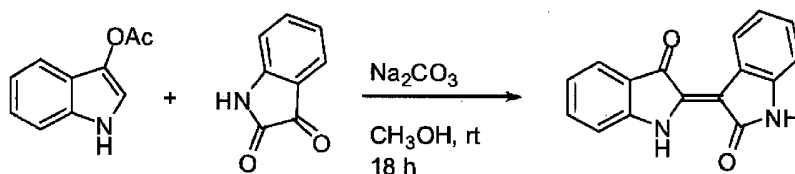
実施例

[0032] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

[0033] 実施例 1

(1) インディルビンの製造

[0034] [化3]



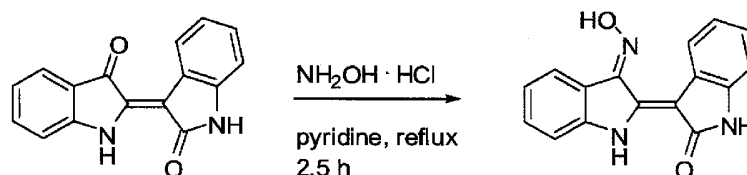
[0035] 酢酸インドキシル（1.75g, 10mmol）及びイサチン（1.47g, 10mmol）の脱水メタノール（20mL）懸濁液にアルゴンガスを5分間吹き込んだ。反応液に炭酸ナトリウム（2.12g, 20mmol）

を加え、室温にて18時間攪拌した後、反応液を水(1L)に注いだ。析出した粗結晶を吸引ろ取し、粗結晶を得た。この粗結晶を1,4-ジオキサン/ヘキサンから再結晶し、インディルビン(1.81g, 69%)を紫色針状晶として得た。

[0036] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ 6.91 (1H, d, $J=7.3$ Hz, 7-H), 7.02 (2H, m, 5-H and 5'-H), 7.26 (1H, dt, $J=7.3, 1.2$ Hz, 6-H), 7.42 (1H, d, $J=8.1$ Hz, 7'-H), 7.58 (1H, dt, $J=8.1, 1.2$ Hz, 6'-H), 7.66 (1H, dd, $J=7.1, 1.2$ Hz, 4'-H), 8.77 (1H, dd, $J=7.8, 1.2$ Hz, 4-H), 10.90 (1H, s, 1-H), 11.02 (1H, s, 1'-H).
LRMS (EI) : 262 ($[\text{M}]^+$). HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$: 262.0742, found : 262.0740.

[0037] (2) インディルビン-3'-オキシムの製造

[0038] [化4]



[0039] インディルビン(0.64g, 2.4mmol)を脱水ピリジン(25mL)に溶解し、塩化ヒドロキシルアンモニウム(1.67g, 24mmol)を加えた。反応液を2.5時間加熱還流した後、室温に戻した。反応液を水(100mL)に注ぎ、析出した粗結晶を吸引ろ取した。得られた粗結晶をメタノール/水から再結晶し、インディルビン3'-オキシム(0.60g, 89%)を赤色針状晶として得た。

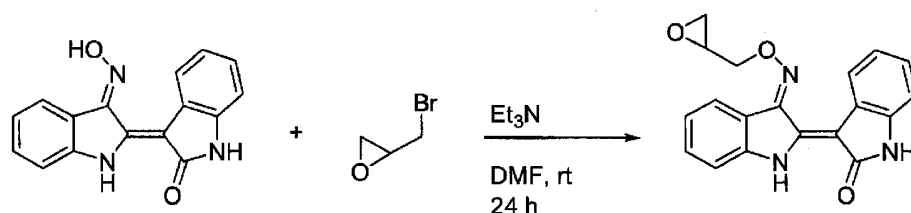
[0040] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) : δ 6.89 (1H, d, $J=7.8$ Hz, 7-H), 6.95 (1H, dt, $J=7.8, 0.9$ Hz, 5-H), 7.03 (1H, m, 5'-H), 7.13 (1H, dt, $J=7.8, 0$

. 9 Hz, 6-H), 7.40 (2H, m, 6' - and 7' -H), 8.24 (1H, d, J=6.9 Hz, 4' -H), 8.65 (1H, d, J=7.8 Hz, 4-H), 10.71 (1H, s, 1-H), 11.75 (1H, s, 1' -H), 13.48 (1H, s, NOH).

LRMS (EI) : 277 ([M]⁺). HRMS calcd for C₁₆H₁₁N₃O₂: 277.0851, found: 277.0848.

[0041] (3) インディルビン3' - (O-オキシラン-2-イルメチル) オキシム (HS-2) の製造

[0042] [化5]



[0043] インディルビン3' -オキシム (100 mg, 0.36 mmol) を脱水 DMF (5 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.1 mL) 及びエピプロモヒドリン (0.5 g, 3.6 mmol) を順次加えた。室温にて24時間攪拌し、水 (50 mL) に注ぎ、吸引ろ取することで標題化合物 (HS-2) (95 mg, 79%) を得た。本品はTLC, NMRにおいて純品である。

[0044] ¹H NMR (DMSO-d₆) : δ 2.84 (1H, dd, J=4.9, 2.6 Hz, one of CH(O)CH₂), 2.98 (1H, t, J=4.9 Hz, one of CH(O)CH₂), 3.52 (1H, m, CH(O)CH₂), 4.55 (1H, dd, J=12.4, 6.1 Hz, one of NOCH₂CH), 4.82 (1H, dd, J=12.4, 3.5 Hz, one of NOCH₂CH), 6.97 (1H, d, J=7.2 Hz, 7-H), 7.01 (1H, d, J=7.8 Hz, 7' -H), 7.03 (1H, t, J=7.8 Hz, 5-H), 7.09 (1H, dt, J=7.

8, 1.2 Hz, 5' -H), 7.20 (1H, dt, J=7.8, 1.2 Hz, 6-H), 7.39 (1H, dt, J=7.8, 1.2 Hz, 6' -H), 7.70 (1H, s, 1-H), 8.23 (1H, d, J=7.7 Hz, 4' -H), 8.69 (1H, d, J=7.8 Hz, 4-H), 11.56 (1H, s, 1' -H).

LRMS (EI) : 333 ([M]⁺). HRMS calcd for C₁₉H₁₅N₃O₃ : 333.1113, found : 333.1113.

[0045] 実施例2 (抗腫瘍活性 (1))

抗腫瘍活性は、MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム ブロミド) 法により測定した。

96-wellプレートにRPMI 1640培地に懸濁した腫瘍細胞 (1×10⁴ cells/well) を100 μL播き、24時間培養 (5% CO₂, 37°C, 飽湿条件下) した。その後、被験化合物 (終濃度1×10⁻⁵~1×10⁻⁸M) 及びコントロールとしてDMSOを0.2 μLずつそれぞれ添加し、48時間腫瘍細胞に作用させた。次に、0.5% MTT液を10 μL加え、3時間後に反応停止液 (0.04 N HCl / イソプロパノール) を100 μL加え反応を停止させた。よくピペティングをした後、マイクロプレートリーダーにより570 nm (top) 及び655 nm (bottom) における吸光度を測定した。各検体の各濃度における細胞生存率は、コントロール群に対する百分率により求め、そこからEC₅₀値を算出した。腫瘍細胞としては、ヒト神経芽腫細胞であるIMR-32、SK-N-SH、LA-N-1、NB-39ならびにヒト肝がん細胞HepG-2を用いた。また、非腫瘍細胞であるヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。

[0046] 本発明化合物 (HS-2) の抗腫瘍活性を図1及び表1に示す。図1及び表1より、本発明化合物は、強力な抗腫瘍活性を有し、その抗腫瘍活性はシスプラチン (CDDP) の50~100倍強いことが判明した。

[0047]

[表1]

| | IC ₅₀ (μM) | |
|---------|-----------------------|------|
| | HS-2 | CDDP |
| IMR-32 | 0.329 | 28.2 |
| SK-N-SH | 0.325 | 12.1 |
| NB-39 | 0.550 | 2.04 |
| LA-N-1 | 0.139 | 1.63 |
| HepG-2 | 1.00 | 10.0 |
| NHDF | 61.4 | >100 |
| HUVEC | 1.75 | 69.8 |

[0048] 実施例3 (抗腫瘍活性 (2))

(1) 培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma社) にウシ胎児血清 (FBS) を終濃度10%となるように加え、さらにPenicillin-Streptomycin溶液 (GIBCO) を0.1mg/mLとなるように加えた。

(2) 試薬

Alamar Blue液は和光純薬工業製を用いた。

(3) 操作

ヒト肝癌細胞株HepG2細胞をDMEM培地に懸濁し (1.0×10⁵個/mL)、96well culture plateに100μLずつ分注した。37°C、5%CO₂飽湿条件下にて培養してplateに付着させた。24時間培養後培地を吸引除去し、被験化合物を含む培地 (1%DMSO含有) 100μLを添加し、37°C、5%CO₂飽湿条件下にて培養した。24時間培養後培地を吸引除去し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) で洗浄した。培地で10倍希釈したAlamar Blue試液 (100μL) を各wellに添加して先と同様の条件下にて培養した。1時間後、励起波長577nm、検出波長612nmの蛍光強度を測定した。なお細胞生存率はvehicl

e (1% DMSO含有) 添加wellの値を100%として算出した。

[0049] (4) 結果

ヒト肝癌細胞株 HepG2 に対する細胞傷害活性 (IC_{50} : 50%傷害濃度) は、HS-2が1.0 μ Mであり、シスプラチン (CDDP) が10 μ Mであった。

[0050] 実施例4 (アポトーシス誘導能: Hoechst 33342染色法)

アポトーシス誘導能は、Hoechst 33342染色法で核染色することにより試験した。

6-WellプレートにRPMI 1640培地に懸濁した細胞 (IMR-32: 1×10^5 cells/well) を2 mL播き、24時間培養 (5% CO_2 , 37°C、飽湿条件下) した。その後、被験化合物 (終濃度 1×10^{-5} M ~ 1×10^{-7} M) 及びコントロールとしてDMSOを4 μ Lずつそれぞれに添加し、24時間細胞に作用させた。次に、0.02% Hoechst 33342溶液を100 μ L加え、15分後に蛍光顕微鏡にて位相差像及び蛍光像を撮影し、細胞の形態変化を観察した。その結果、図2に示すように、本発明化合物 (HS-2) は、0.1 μ Mで、核の凝集化及び断片化が認められることから、IMR-32細胞に対する細胞傷害活性はアポトーシス誘導によるものであることが判明した。

[0051] 実施例5 (アポトーシス誘導能: フローサイトメトリー法)

本発明化合物 (HS-2) について、ヒト神経芽腫細胞であるIMR-32細胞に対するアポトーシス誘導能をフローサイトメトリーにより検出した。すなわち、6-WellプレートにRPMI 1640培地に懸濁した細胞 (IMR-32: 1×10^6 cells/well) を2 mL播き、24時間培養 (5% CO_2 , 37°C、飽湿条件下) した。その後、化合物 (HS-2) を終濃度 1×10^{-5} M ~ 1×10^{-7} Mとなるように加え、37°C、5% CO_2 条件下で24時間インキュベーションした。細胞をトリプシンで剥離してPBSで洗浄した後、アネキシンV-FITC及びヨウ化プロピジウム (PI) を加え、フローサイトメトリーを行った。この方法によれば、アポトーシス

の初期段階の細胞はアネキシンV-FITCの蛍光のみが観察され、アポトーシスの後期段階の細胞はアネキシンVとPIの両方の蛍光が観察される。

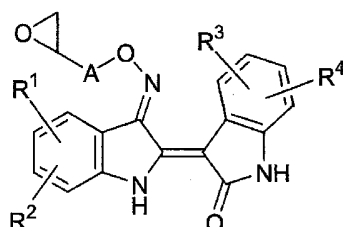
その結果、化合物(HS-2)は濃度依存的なアポトーシス誘導能が認められ、 $10\ \mu\text{M}$ で顕著なアポトーシス誘導効果が示された。この結果を図3に示す。

[0052] その結果、本発明化合物は、 10^{-7}M という低い濃度から強力な抗腫瘍活性を有していた。正常細胞と比較して腫瘍細胞に活性の選択性が認められ(正常細胞における IC_{50} 値は、HUVEC： $1.75\ \mu\text{M}$ NHDF： $61.4\ \mu\text{M}$)、この機構にはアポトーシスが関与することが示された。

請求の範囲

[請求項1] 一般式 (1)

[化1]



(1)

(式中、Aは炭素数1～4のアルキレン基を示し、R¹～R⁴はそれぞれ独立して水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ基又はアルコキシ基を示す)

で表されるインディルビン誘導体又はその塩。

[請求項2] Aがメチレン基である請求項1記載のインディルビン誘導体又はその塩。

[請求項3] R¹～R⁴がそれぞれ独立して水素原子又はアルコキシ基である請求項1又は2記載のインディルビン誘導体又はその塩。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩を有効成分とする医薬。

[請求項5] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩を有効成分とする悪性腫瘍治療剤。

[請求項6] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩を有効成分とするアポトーシス誘導剤。

[請求項7] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩、及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

[請求項8] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩の、悪性腫瘍治療剤製造のための使用。

[請求項9] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその

塩の、アポトーシス誘導剤製造のための使用。

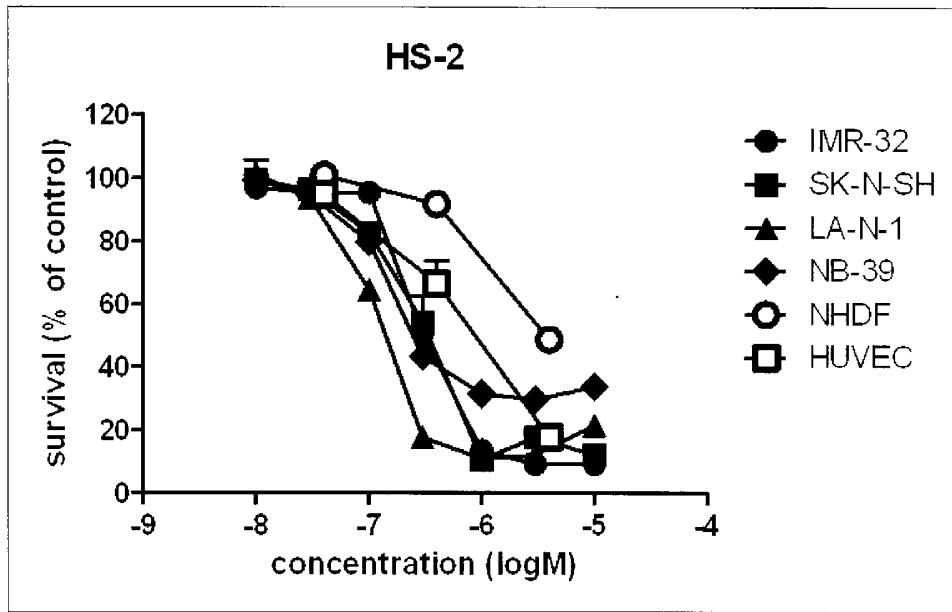
[請求項10] 悪性腫瘍治療のための、請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩。

[請求項11] アポトーシスを誘導するための、請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩。

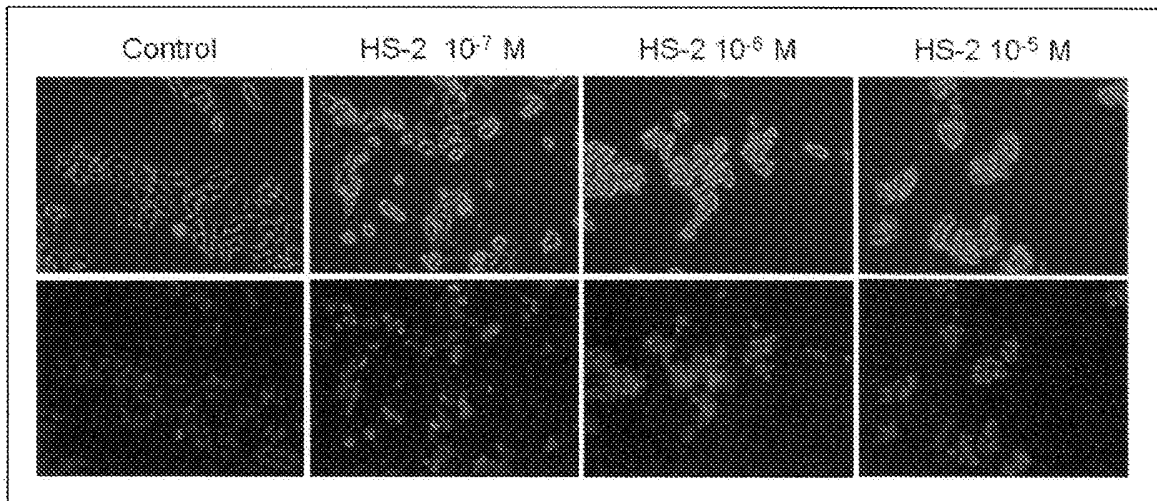
[請求項12] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩の有効量を投与することを特徴とする悪性腫瘍の治療方法。

[請求項13] 請求項1～3のいずれか1項記載のインディルビン誘導体又はその塩の有効量を投与することを特徴とするアポトーシス誘導方法。

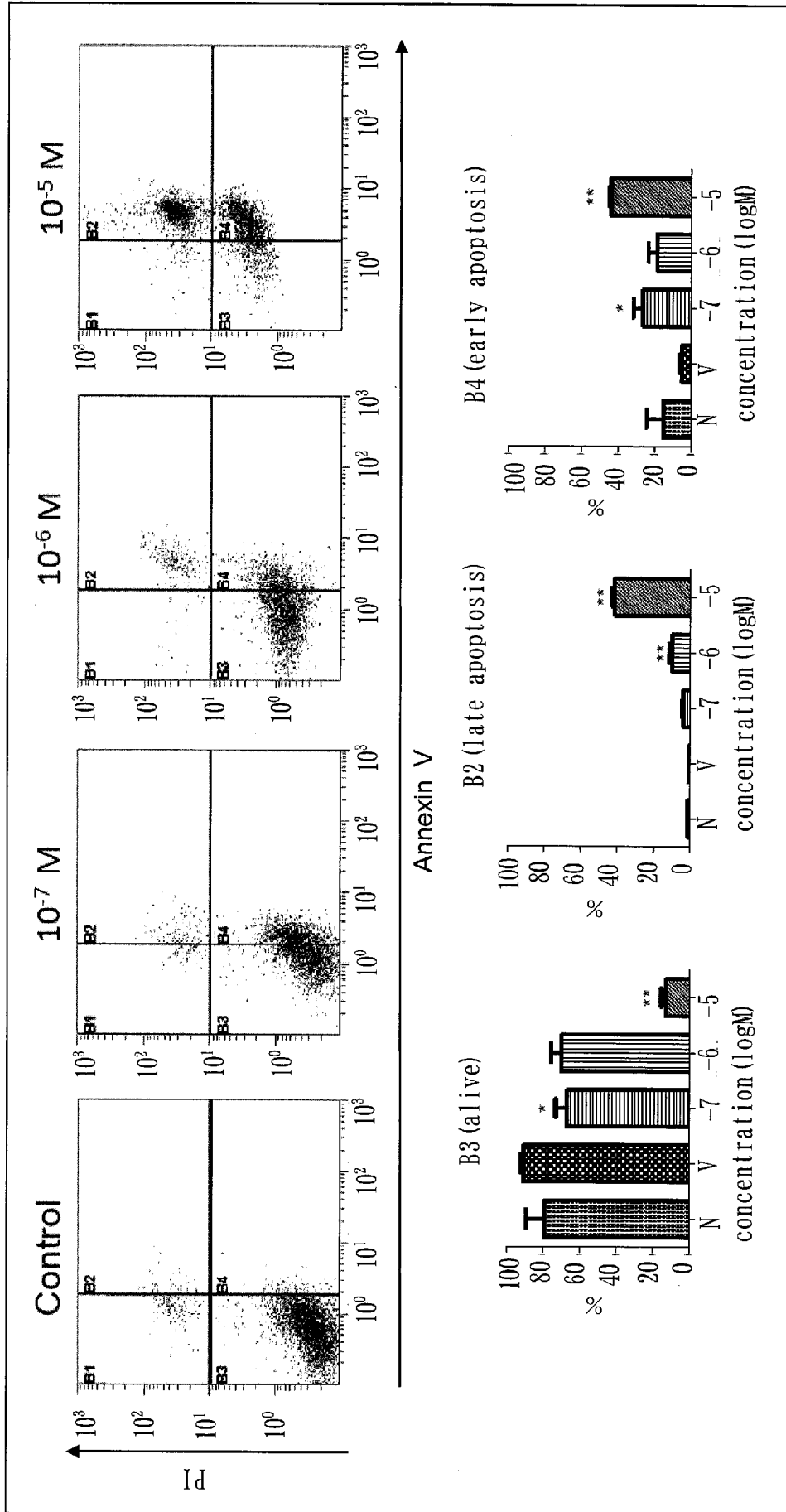
[圖1]



[圖2]



[圖3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/067153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D405/14(2006.01) i, A61K31/404(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i,
A61P35/02(2006.01) i, A61P43/00(2006.01) i

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)

C07D405/14, A61K31/404, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00

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

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2012 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2012 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2012 |

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO 2002/100401 A1 (SCHERING AG.), 19 December 2002 (19.12.2002), entire text & DE 10129028 A1 | 1-11 |
| A | WO 2005/041954 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY), 12 May 2005 (12.05.2005), entire text & US 20070276025 A1 & EP 1686988 A1 | 1-11 |
| A | WO 2007/117262 A2 (ATHERSYS, INC.), 18 October 2007 (18.10.2007), entire text & US 2008/0194024 A1 | 1-11 |

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

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent 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
18 July, 2012 (18.07.12)

Date of mailing of the international search report
31 July, 2012 (31.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/067153

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Jun ADACHI, et al, Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine, The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276 No.34, p. 31475-31478 | 1-11 |
| A | EVE D., et al., Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest, Oncogene, 2001, Vol.20, p.3786-3797 | 1-11 |
| A | US 2009/0111987 A1 (Kaohsiung Medical University), 30 August 2009 (30.08.2009), entire text (particularly, page 19, compound 6y) & TW 918061 A | 1-11 |
| A | DALLAVALLE, S. et al, Novel 7-Oxyiminomethyl Derivatives of Camptothecin with Potent in Vitro and in Vivo Antitumor Activity, Journal of Medicinal Chemistry, 2001, Vol.44, No.20, p. 3264-3274 | 1-11 |
| A | MLOCHOWSKI, J. et al, Derivatives of 1,10- and 4,7-phenanthrolinaldehydes and di(N,N-diethylamino)ethoxyphenanthrolines as potential antitumor agents, Journal fuer Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung, 1993, Vol.335, No.7, p.623-627 | 1-11 |
| A | MLOCHOWSKI, J. et al, Synthesis of 2,7-fluorenone bisglycidyl ether and related compounds as potential cytostatics, Journal fuer Praktische Chemie, 1990, Vol.332, No.1, p.5-14 | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/067153

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 12, 13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/067153

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

The inventions set forth in claims 12 and 13 involve "methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy" and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provision of PCT Rule 67.1(iv) that PCT Rule 43*bis*.1(b) applies *mutatis mutandis*.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07D405/14(2006.01)i, A61K31/404(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07D405/14, A61K31/404, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年
 日本国登録実用新案公報 1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/REGISTRY(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|-----------------|--|----------------|
| A | WO 2002/100401 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 2002.12.19, 全文 & DE 10129028 A1 | 1-11 |
| A | WO 2005/041954 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 2005.05.12, 全文 & US 20070276025 A1 & EP 1686988 A1 | 1-11 |
| A | WO 2007/117262 A2 (ATHERSYS, INC.) 2007.10.18, 全文 & US 2008/0194024 A1 | 1-11 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| 国際調査を完了した日 18.07.2012 | 国際調査報告の発送日 31.07.2012 |
|--------------------------|--------------------------|

| | | | |
|---|---|-----|------|
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 寛 電話番号 03-3581-1101 内線 3492 | 4 P | 4151 |
|---|---|-----|------|

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| A | Jun ADACHI, et al, Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine, The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol.276 No.34, p.31475-31478 | 1-11 |
| A | EVE D., et al., Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest, Oncogene, 2001, Vol.20, p.3786-3797 | 1-11 |
| A | US 2009/0111987 A1 (Kaohsiung Medical University) 2009.08.30, 全文 (特に、第19ページの化合物6y) & TW 918061 A | 1-11 |
| A | DALLAVALLE, S. et al, Novel 7-Oxyiminomethyl Derivatives of Camptothecin with Potent in Vitro and in Vivo Antitumor Activity, Journal of Medicinal Chemistry, 2001, Vol.44, No.20, p.3264-3274 | 1-11 |
| A | MLOCHOWSKI, J. et al, Derivatives of 1,10- and 4,7-phenanthrolinaldehydes and di(N,N-di-ethylamino)ethoxyphenanthrolines as potential antitumor agents, Journal fuer Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung, 1993, Vol.335, No.7, p.623-627 | 1-11 |
| A | MLOCHOWSKI, J. et al, Synthesis of 2,7-fluorenone bisglycidyl ether and related compounds as potential cytostatics, Journal fuer Praktische Chemie, 1990, Vol.332, No.1, p.5-14 | 1-11 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 12, 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項12, 13に係る発明は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものであって、PCT規則43の2.1(b)において準用する同規則67.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。