

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/047509

発行日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)

(43) 国際公開日 平成25年4月4日 (2013. 4. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 11/02 (2006.01)	C 0 7 K 11/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

出願番号 特願2013-536294 (P2013-536294)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2012/074542
 (22) 国際出願日 平成24年9月25日 (2012. 9. 25)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-217378 (P2011-217378)
 (32) 優先日 平成23年9月30日 (2011. 9. 30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504157024
 国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 (74) 代理人 100113402
 弁理士 前 直美
 (72) 発明者 西條 憲
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内
 (72) 発明者 石岡 千加史
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内
 (72) 発明者 加藤 正
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内

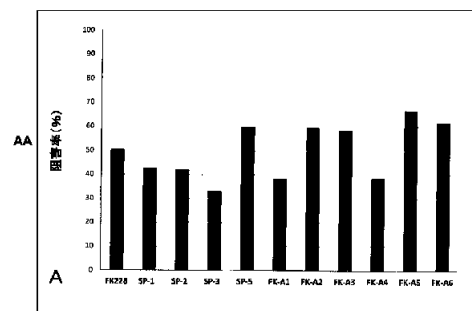
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害剤及び医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、新規の P I 3 K 阻害剤を提供することを目的とする。さらに、本発明は、P I 3 K 阻害作用と H D A C 阻害作用とを併せ持つ物質を提供することを目的とする。最終的に、本発明は、これらの物質を含有する新規抗がん用医薬組成物、特に難治性がんに対しても有効な抗がん用医薬組成物を提供する。

本発明の一つの態様は、式1で示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩からなるホスファチジルイノシトール3キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤である。



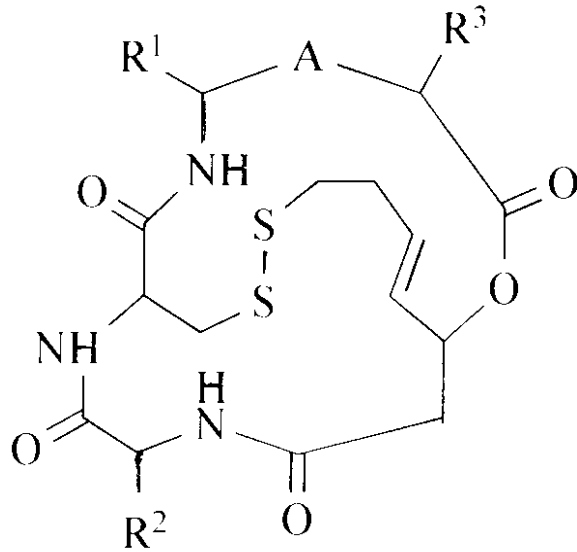
AA INHIBITION RATE (%)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 1 で示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩からなるホスファチジルイノシール 3 キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤。

【化 1】



10

20

式 1

(式中、 A は、 - C O N H - 又は - C H (O H) - を表し、 R ¹、 R ² 及び R ³ は、同一又は異なって、水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基、置換もしくは無置換のアリール基又は置換もしくは無置換のアラルキル基を表す。)

【請求項 2】

式 1 において、 R ³ が水素原子である、請求項 1 記載の P I 3 K 阻害剤。

30

【請求項 3】

式 1 において、 R ¹ が置換もしくは無置換のアラルキル基である、請求項 1 又は 2 記載の P I 3 K 阻害剤。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の P I 3 K 阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、難治性がんの治療用医薬組成物。

【請求項 5】

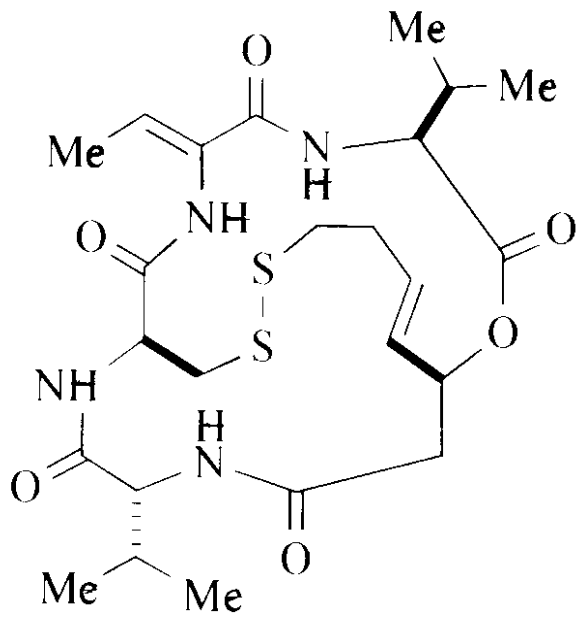
前記 P I 3 K 阻害剤が体重 1 kg あたり約 1 mg / 日 ~ 1 0 , 0 0 0 mg / 日の投与用量で投与されることを特徴とする、請求項 4 記載の難治性がんの治療用医薬組成物。

【請求項 6】

前記 P I 3 K 阻害剤が、以下の式 2 ~ 2 0 のいずれかで示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩である、請求項 4 又は 5 記載の難治性がんの治療用医薬組成物。

40

【化 2】

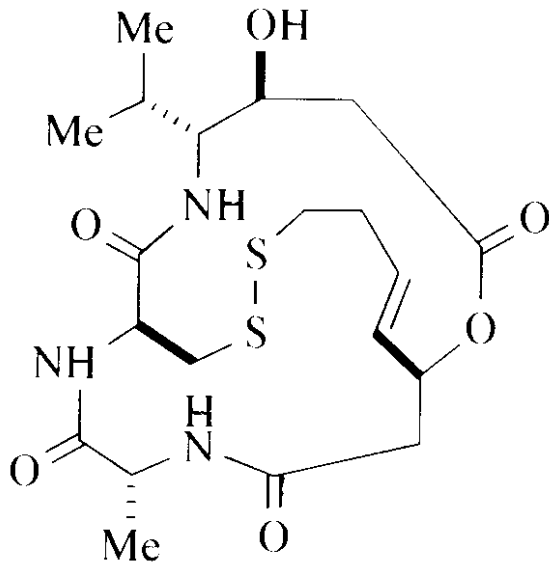


10

式 2

20

【化 3】

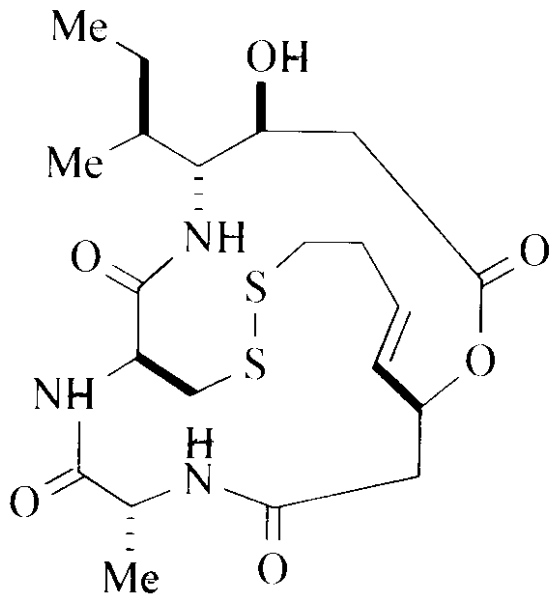


30

式 3

40

【化 4】

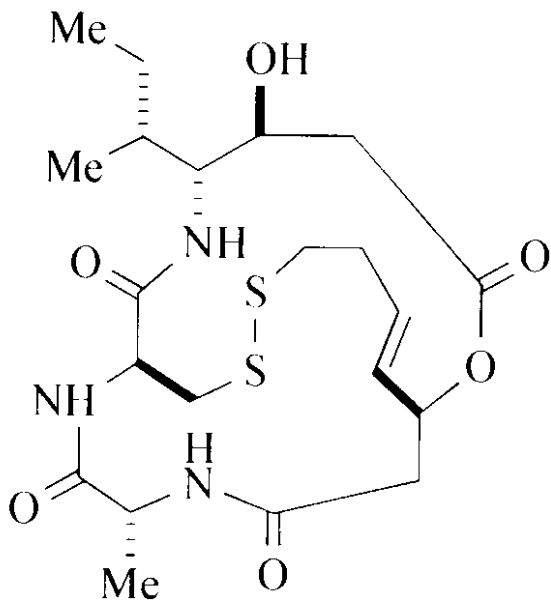


10

式 4

20

【化 5】

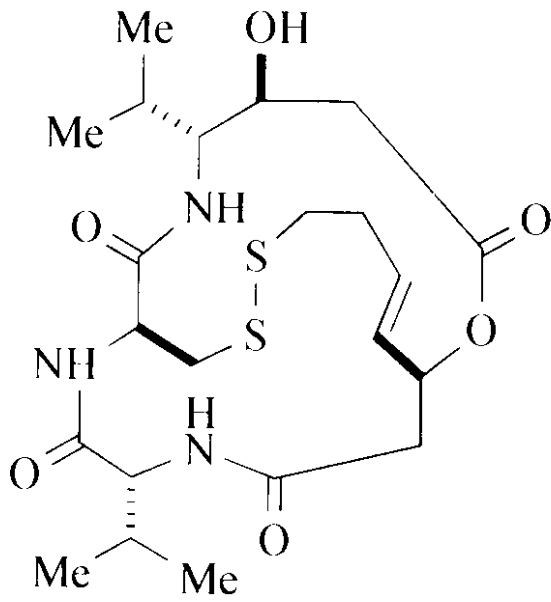


30

40

式 5

【化 6】

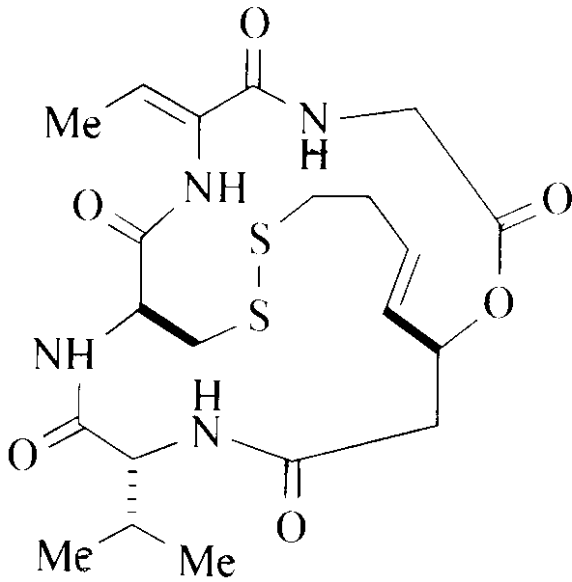


10

20

式 6

【化 7】

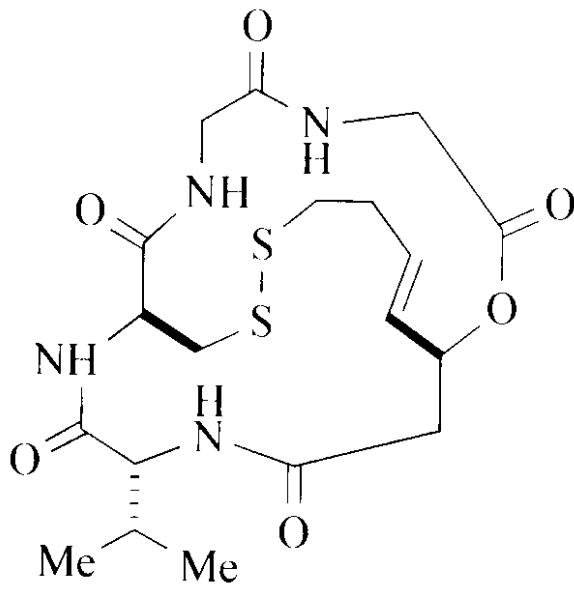


30

40

式 7

【化 8】

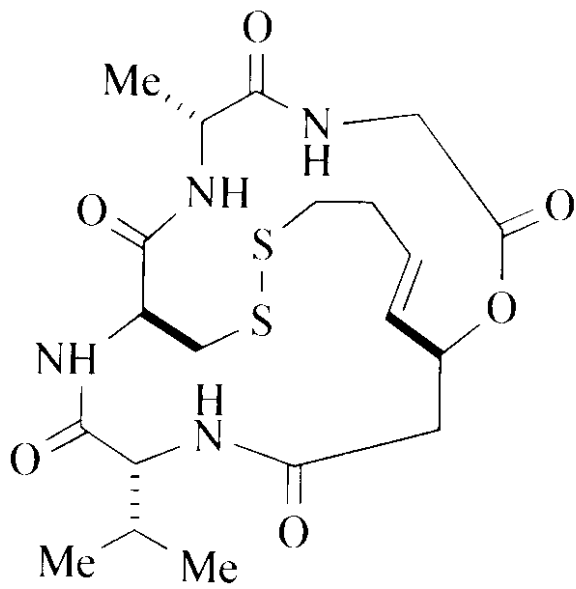


10

20

式 8

【化 9】

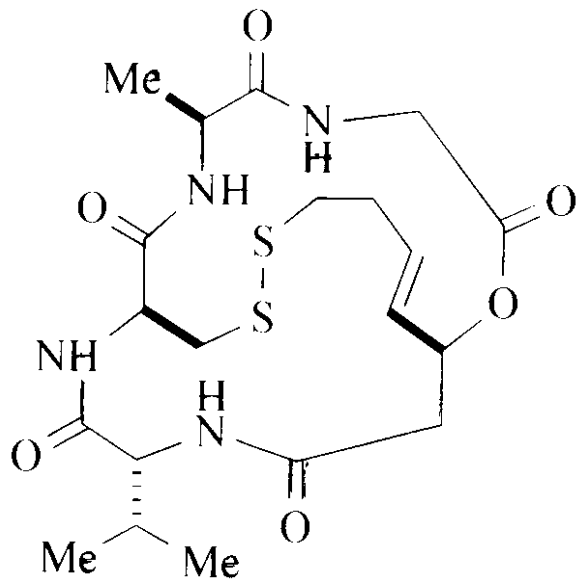


30

40

式 9

【化 1 0】

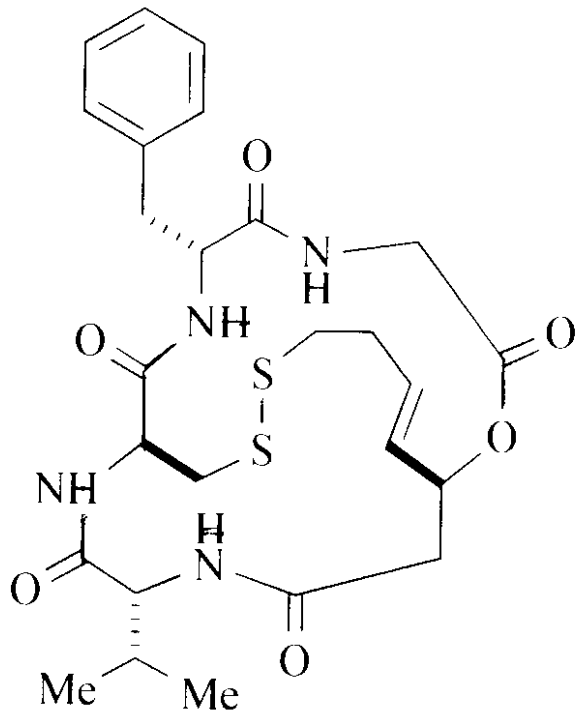


10

式 1 0

20

【化 1 1】

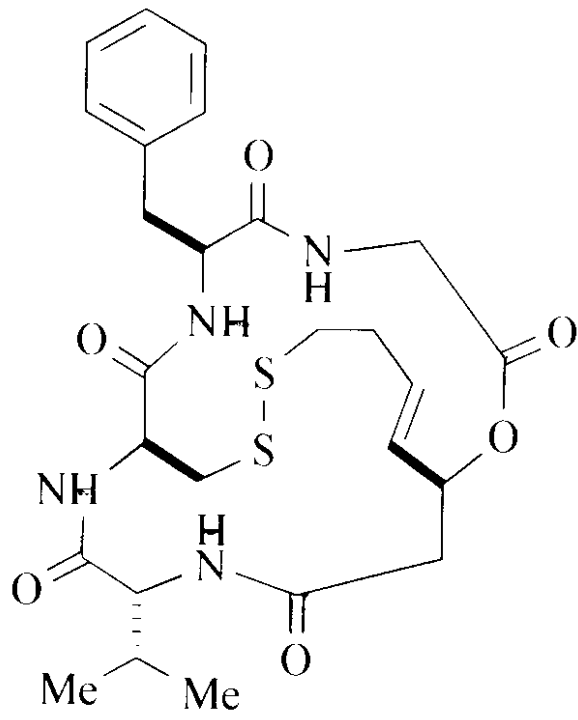


30

40

式 1 1

【化 1 2】

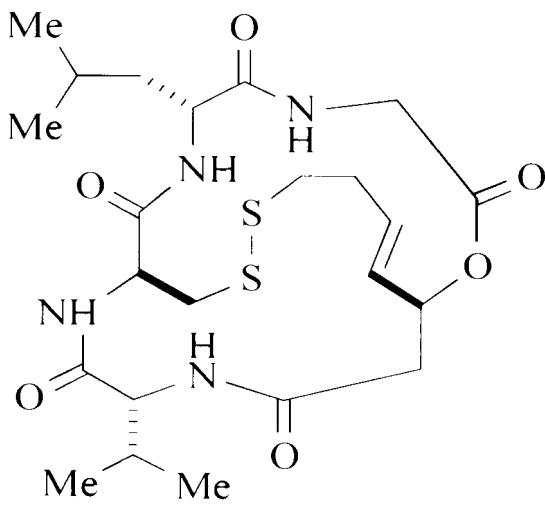


10

20

式 1 2

【化 1 3】

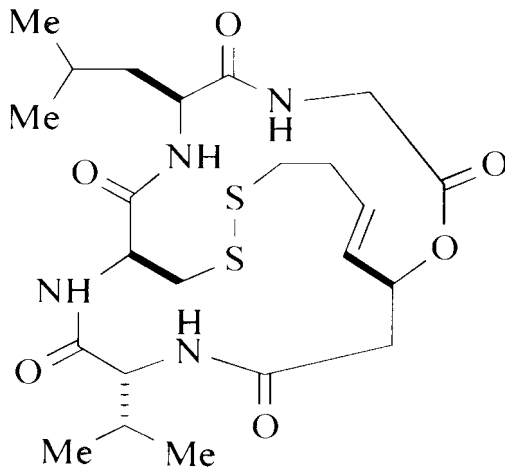


30

40

式 1 3

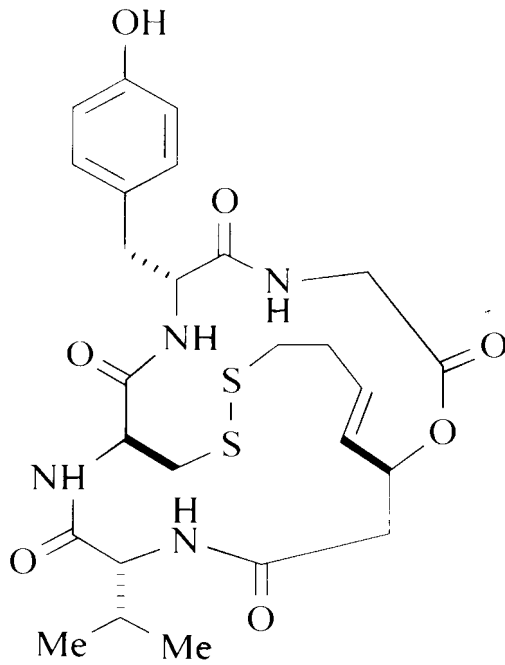
【化 1 4】



10

式 1 4

【化 1 5】

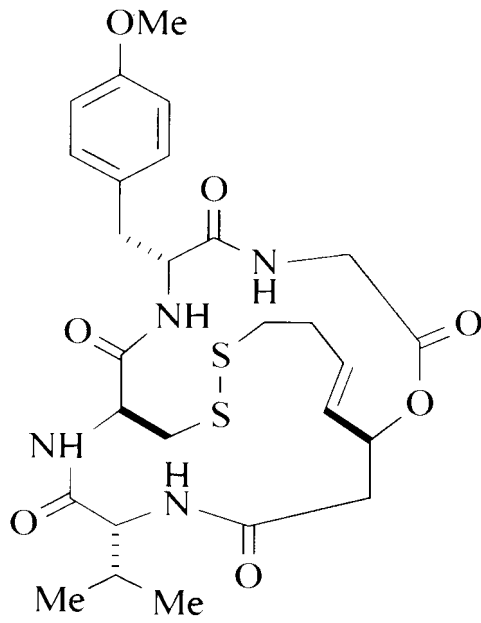


30

40

式 1 5

【化 1 6】

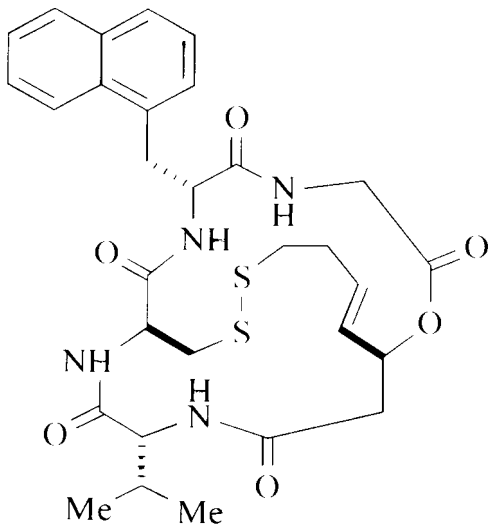


10

20

式 1 6

【化 1 7】

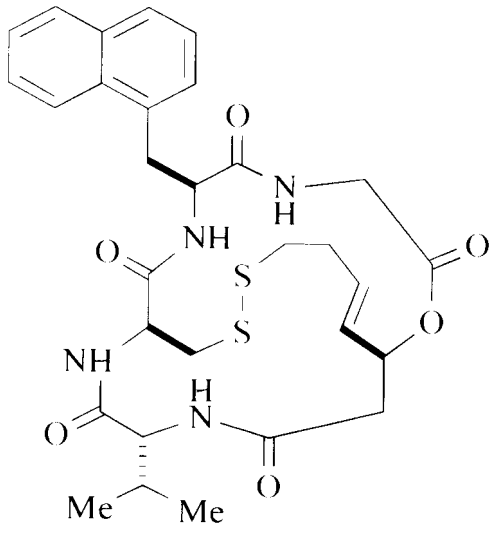


30

40

式 1 7

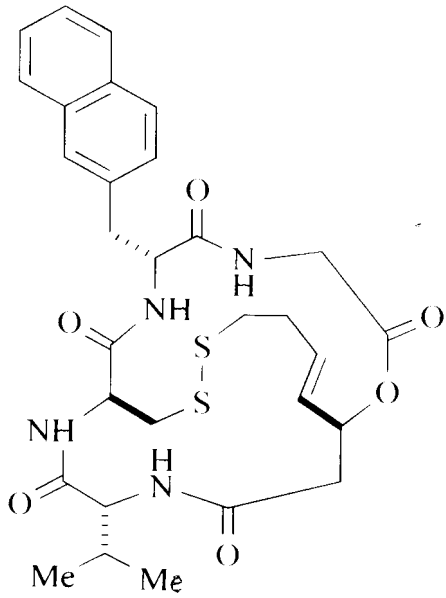
【化 1 8】



10

式 1 8

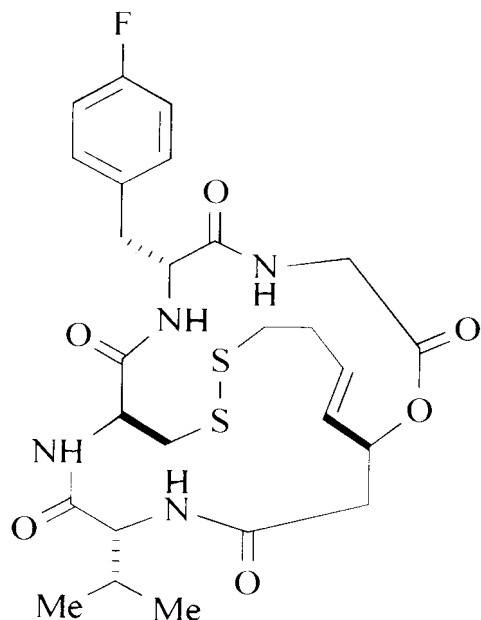
【化 1 9】



30

式 1 9

【化 2 0】



10

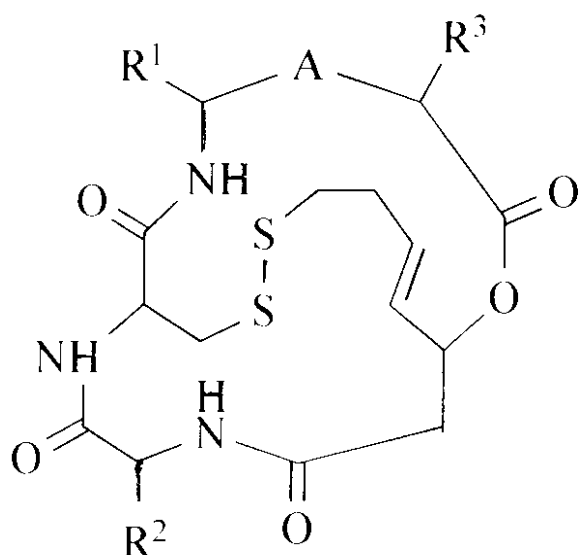
式 2 0

20

【請求項 7】

以下の式 1 で示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩。

【化 2 1】



30

40

式 1

(式中、Aは、 $-\text{CONH}-$ 又は $-\text{CH}(\text{OH})-$ を表し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基、置換もしくは無置換のアリール基又は置換もしくは無置換のアラルキル基を表す；但し、A、 R^1 、 R^2 及び R^3 の組合せが、A = $-\text{CONH}-$ かつ R^1 = エチリデン基かつ $\text{R}^2 = \text{R}^3$ = イソプロピル基、A = $-\text{CH}(\text{OH})-$ かつ R^1 = イソプロピル基かつ R^2 = メチル基かつ R^3 = 水素原子、A = $-\text{CH}(\text{OH})-$ かつ R^1 = sec-ブチル基かつ R^2 = メチル基かつ R^3 = 水素原子、A = $-\text{CH}(\text{OH})-$ かつ $\text{R}^1 = \text{R}^2$ = イソプロピル基かつ R^3 = 水素原子、A = $-\text{CONH}-$

50

かつ $R^1 =$ エチリデン基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、 $A = -CONH-$
 かつ $R^1 = R^3 =$ 水素原子かつ $R^2 =$ イソプロピル基、 $A = -CONH-$ かつ $R^1 =$ メチル
 基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、及び、 $A = -CONH-$ かつ $R^1 =$ ベン
 ジル基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、のいずれかである化合物を除く)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規のホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害剤及びこれを含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

がんの薬物療法は、分子標的薬の登場により目覚ましい進歩を遂げているが、未だ克服できない難治性がんは数多く存在する。そのため、より治療効果の高い、新しいがん分子標的薬の開発が望まれている。

【0003】

ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase; 以下「PI3K」という) は、細胞膜上に存在するリン脂質ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート (PIP₂) のイノシトール環の3位リン酸基をリン酸化してホスファチジルイノシトール3,4,5-トリホスフェート (PIP₃) を生成する酵素であり (非特許文献1: Fruman et al., Annual Rev Biochem 67, 481-507, doi:10.1146/annurev.biochem. 67.1.481 (1998))、様々な増殖因子受容体チロシンキナーゼにより活性化され、下流のAKTの活性化を介して、細胞の生存及び増殖を促進するように作用する (非特許文献2: Cantley, L. C. Science 296, 1655-1657, doi:10.1126/science. 296.5573.1655 (2002))。PI3Kは、がんに関連していることがわかっている。

【0004】

PI3Kは、触媒サブユニット (catalytic subunit) と調節サブユニット (regulatory subunit) とからなるヘテロダイマーを形成している。PIK3CA遺伝子は、クラスIA PI3Kの触媒サブユニットであるp110をコードする。このPIK3CA遺伝子については、乳がんや大腸がん等の様々ながん種において、高頻度の遺伝子増幅や機能獲得型の点突然変異が報告されている (非特許文献3: Samuels et al. Science 304, 554 (2004); 非特許文献4: Ikenoue et al. Cancer Res 65, 4562 (2005); 非特許文献5: Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 802 (2005))。

また、PI3Kとは逆反応を触媒する脱リン酸化酵素であるPTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) は、シグナルメッセンジャーであるPIP₃を減少させることによって細胞の増殖を抑制する (非特許文献6: Maehama et al., J. Biol. Chem. 273, 13375-13378 (1998))。PTEN遺伝子については、子宮内膜がんや悪性黒色腫など多くのがん種で欠失や点突然変異が見られ (非特許文献7: Salmena et al., Cell 133, 403-414 (2008))、その点突然変異のほとんどで脱リン酸化酵素活性が低下していることが報告されている (非特許文献8: Han et al. Cancer Res 60, 3147 (2000))。

これらの変異の結果、PI3K/AKT経路の異常な恒常的活性化が生じ、がん細胞の生存シグナルが伝達されると考えられている。

【0005】

そのため、PI3Kは、がん治療における有力な標的分子として注目されており、近年、PI3K阻害剤の開発が盛んに行われている。いくつかの低分子PI3K阻害剤は臨床試験の段階に入っているが、未だ医薬品化されるに至ったものはない (非特許文献9: Kong & Yamori, Current Medicinal Chemistry 16, 2839-2854 (2009))。

【0006】

一方、がんの発生にはエピジェネティックスの異常が深く関わっていることが明らかにされている。ヒストンアセチル化はエピジェネティックス制御の重要なメカニズムの一つ

10

20

30

40

50

であり（非特許文献10：Carew et al., Giles, Cancer Let 269, 7-17 (2008)）、そのアセチル化を解除するヒストンデアセチラーゼ（以下「HDAC」という）の阻害により、遺伝子発現変化が生じ、それに伴って細胞分化やアポトーシスが引き起こされることがわかっている。このため、HDAC阻害剤は、新しいがん分子標的薬として注目を集めている。

【0007】

デブシペプチド類化合物（特許文献1～4）は、1つ以上のアミド結合（-CONHR-）がエステル結合（-COOR）に置換されたペプチドの総称である。デブシペプチド類化合物の中でも、FK228（FR901228、ロミデブシンとも呼ばれている）は、クロモバクテリウム・ピオラセウムから発酵産物として単離された化合物であり（非特許文献11：Ueda et al. J. Antibiotics 47, 301 (1994)）、クラスI HDACを選択的に阻害する強力なHDAC阻害剤である（非特許文献12：Furumai et al. Cancer Res 62, 4916 (2002)）。FK228は、このHDAC阻害活性に基づいて抗がん剤として臨床試験が進められ、同じくHDAC阻害剤であるスペロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA）とともに、皮膚T細胞リンパ腫に対する治療薬として米国FDAの認可を受けている。

10

なお、用語「デブシペプチド」は、狭義ではFK228を指すが、本明細書においては上記の意義を有する用語として使用する。

【0008】

ヒトがん細胞株において、PI3K阻害剤とHDAC阻害剤の併用は、殺細胞効果の増強や相乗作用をもたらすことが報告されている（非特許文献13：Wozniak et al. Haematologica 95, 613 (2010)）。

20

HDAC阻害剤がそれ自体でPI3K/AKT経路に影響するか否かに関しては議論がある（非特許文献14：Hanker et al., J Molecular Signaling 4, 5 (2009);非特許文献15：Graham et al. Clinical Cancer Res 12, 223 (2006)）。古典的なHDAC阻害剤であるトリコスタチンA（trichostatin A; TSA）は、プロテインホスファターゼ1（protein phosphatase 1）を介してリン酸化AKTを抑えることが報告されている（非特許文献16：Chen et al., J Biol Chem 280, 38879 (2005)）。

【0009】

FK228に関しても、細胞選択的にリン酸化AKTの発現を抑制するとした報告がある（非特許文献17：Kodani et al., Oncology Reports 13, 477-483 (2005)）。しかし、その機序については明らかにされておらず、FK228のキナーゼ阻害活性を検討した文献もない。さらに、デブシペプチド類化合物がPI3K阻害活性を有することについては報告されていない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開平2-85296号公報

【特許文献2】特開平4-79892号公報

【特許文献3】特表2008-542347号公報

【特許文献4】特表2009-519224号公報

40

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Fruman, D. A., Meyers, R. E. & Cantley, L. C. Annual Review of Biochemistry 67, 481-507, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.481 (1998)

【非特許文献2】Cantley, L. C. Science 296, 1655-1657, doi:10.1126/science.296.5573.1655 (2002)

【非特許文献3】Samuels, Y. et al. Science 304, 554 (2004)

【非特許文献4】Ikenoue, T. et al. Cancer Research 65, 4562 (2005)

【非特許文献5】Kang, S., Bader, A. G. & Vogt, P. K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

50

102, 802 (2005)

【非特許文献 6】Maehama, T. & Dixon, J. E. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 13375-13378 (1998)

【非特許文献 7】Salmena, L., Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. *Cell* 133, 403-414 (2008)

【非特許文献 8】Han, S. Y. et al. *Cancer Research* 60, 3147 (2000)

【非特許文献 9】Kong, D. & Yamori, T. *Current Medicinal Chemistry* 16, 2839-2854 (2009)

【非特許文献 10】Carew, J. S., Giles, F. J. & Nawrocki, S. T. *Cancer Letters* 269, 7-17 (2008)

10

【非特許文献 11】Ueda, H. et al. *The Journal of Antibiotics* 47, 301 (1994)

【非特許文献 12】Furumai, R. et al. *Cancer Research* 62, 4916 (2002)

【非特許文献 13】Wozniak, M. B. et al. *Haematologica* 95, 613 (2010)

【非特許文献 14】Hanker, A. B., Healy, K. D., Nichols, J. & Der, C. J.. *Journal of Molecular Signaling* 4, 5 (2009)

【非特許文献 15】Graham, C. et al. *Clinical Cancer Research* 12, 223 (2006).

【非特許文献 16】Chen, C. S., Weng, S. C., Tseng, P. H. & Lin, H. P. *Journal of Biological Chemistry* 280, 38879 (2005)

【非特許文献 17】Kodani, M. et al. *Oncology reports* 13, 477-483 (2005)

【非特許文献 18】Tugendreich, S. et al. *Genome Research* 11, 1899 (2001)

20

【非特許文献 19】Rodriguez-Escudero, I. et al. *Biochemical Journal* 390, 613 (2005)

【非特許文献 20】Cid, V. et al. *Oncogene* 27, 5431-5442 (2008)

【非特許文献 21】日本がん分子標的学会 第15回学術集会 抄録 2011年5月31日発行 演題番号 P10-5 「出芽酵母をスクリーニングツールとした新規 PI3K 阻害剤の探索」

【非特許文献 22】Narita, K. et al. *Chemistry-A European Journal* 15, 11174-11186 (2009)

【非特許文献 23】Takizawa et al. *Chemical Communication*, 1677-1679 (2008)

【非特許文献 24】Takizawa et al. *Heterocycles* 76, 275-290 (2008)

30

【非特許文献 25】Rogers, B. et al. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 3, 207-214 (2001)

【非特許文献 26】Alani, E., Cao, L. & Kleckner, N. *Genetics* 116, 541 (1987)

【非特許文献 27】Walker, E. H. et al. *Molecular Cell* 6, 909-919 (2000)

【非特許文献 28】Grunwald, V. et al. *Cancer Research* 62, 6141 (2002)

【非特許文献 29】Roper, S. et al. *Nature* 200, 6

【非特許文献 30】Hanigan, C. L. et al. *Gastroenterology* 135, 1654-1664. e1652 (2008)

【非特許文献 31】Ree, A. H., Folkvord, S. & Flatmark, K. *Nature Genetics* 40, 812-813 (2008)

40

【非特許文献 32】Xu, W., Parmigiani, R. & Marks, P. *Oncogene* 26, 5541-5552 (2007)

【非特許文献 33】Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A. & Marks, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10014 (2000)

【非特許文献 34】Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M. & Horinouchi, S. *Experimental Cell Research* 241, 126-133 (1998)

【非特許文献 35】Kumagai, T. et al. *International Journal of Cancer* 121, 656-665 (2007)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 1 2 】

本発明は、新規の P I 3 K 阻害剤を提供することを目的とする。さらに、P I 3 K と H D A C とをともに阻害する薬剤の開発は、難治性がんの克服に多大な貢献をするものと考えられる。したがって、本発明は、P I 3 K 阻害作用と H D A C 阻害作用とを併せ持つ物質を提供することを目的とする。最終的に、本発明は、これらの物質を含有する新規抗がん用医薬組成物、特に難治性がんに対しても有効な抗がん用医薬組成物を提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明者は、上記の課題を解決するために、まず、新規の P I 3 K 阻害剤を見出すべく、スクリーニングを行った。具体的には、出芽酵母にヒトの p 1 1 0 を発現させると細胞増殖障害を生じるが、P I 3 K 阻害剤を作用させると細胞増殖障害が回避される事象（非特許文献 1 8 : Tugendreich et al., Genome Research 11, 1899 (2001) ; 非特許文献 1 9 : Rodriguez-Escudero et al. Biochemical Journal 390, 613 (2005) ; 非特許文献 2 0 : Cid et al. Oncogene 27, 5431-5442 (2008)) を利用したスクリーニング系（非特許文献 1 9 ; 非特許文献 2 1 : 日本がん分子標的学会 第 1 5 回 学術集会 抄録 2 0 1 1 年 5 月 3 1 日 発行 演題番号 P 1 0 - 5 「出芽酵母をスクリーニングツールとした新規 P I 3 K 阻害剤の探索」）を用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、H D A C 阻害剤であるデブシペプチド類化合物、すなわち F K 2 2 8 及びその類縁体を候補物質として選択した。

10

20

【 0 0 1 4 】

本発明者らは、インビトロで P I 3 K 阻害活性の評価を行い、これらの化合物が μ M オーダーの濃度で P I 3 K の直接阻害活性をもつことを確認した。また、ヒト培養細胞を用いたウェスタンブロット解析において、これらの化合物がリン酸化 A K T と A K T 経路の下流分子を抑制することを見出した。さらに、M T T アッセイの結果から、これらの化合物が特定の濃度範囲で H D A C 阻害剤に抵抗性の細胞に対しても強い殺細胞効果を発揮することを見出した。そして、その細胞死がアポトーシスであること、さらに、そのアポトーシスが、デブシペプチド類化合物の H D A C / P I 3 K 二重阻害活性により誘導されることを確認し、本発明を完成した。

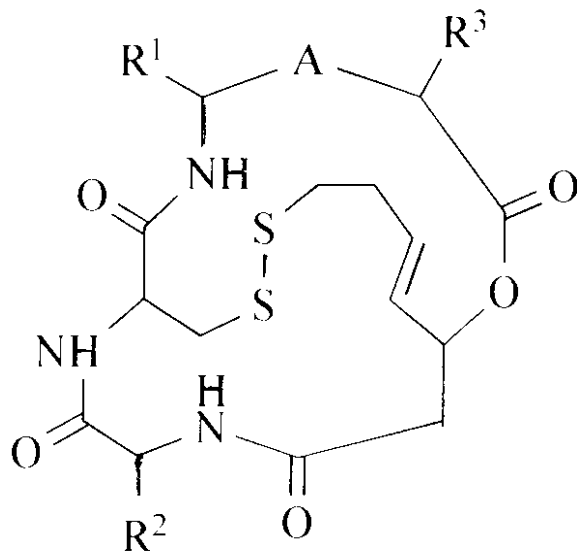
【 0 0 1 5 】

したがって、本発明によれば、

(1) 以下の式 1 で示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩からなるホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤

30

【化 1】



10

式 1

20

(式中、Aは、 $-\text{CONH}-$ 又は $-\text{CH}(\text{OH})-$ を表し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基、置換もしくは無置換のアリール基又は置換もしくは無置換のアラルキル基を表す。);

〔2〕 式1において、 R^3 が水素原子である、前記〔1〕記載のPI3K阻害剤;

〔3〕 式1において、 R^1 が置換もしくは無置換のアラルキル基である、前記〔1〕又は〔2〕記載のPI3K阻害剤;

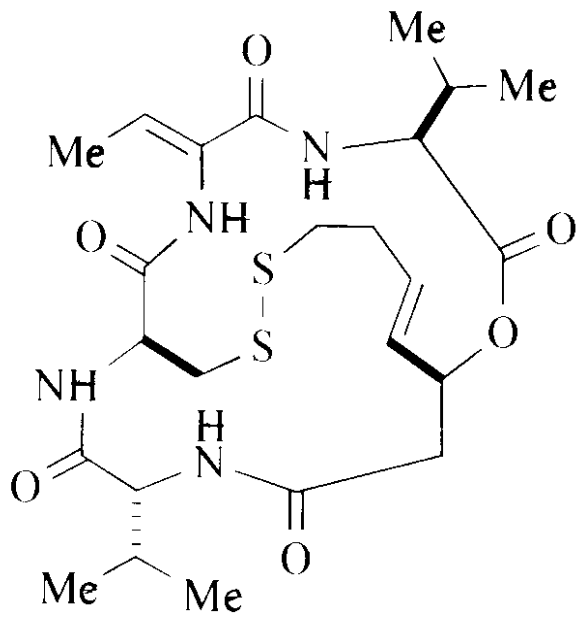
〔4〕 前記〔1〕～〔3〕のいずれか1項記載のPI3K阻害剤を有効成分として含有することを特徴とする、難治性がんの治療用医薬組成物;

〔5〕 前記PI3K阻害剤が体重1kgあたり約1mg/日～10,000mg/日の投与用量で投与されることを特徴とする、前記〔4〕記載の難治性がんの治療用医薬組成物;

30

〔6〕 前記PI3K阻害剤が、以下の式2～20のいずれかで示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩である、前記〔4〕又は〔5〕記載の難治性がんの治療用医薬組成物

【化 2】

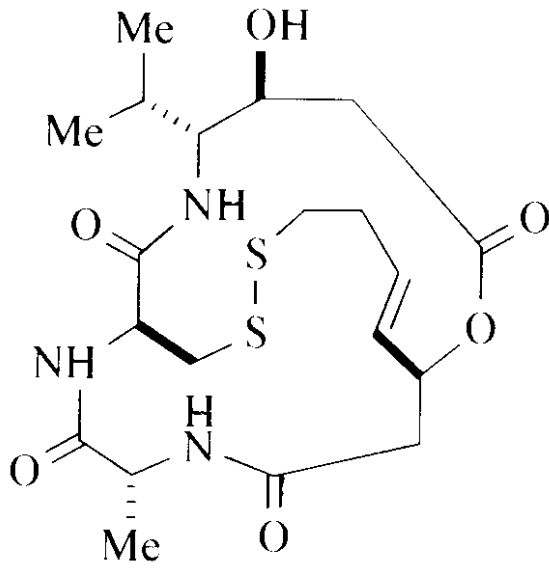


10

式 2

20

【化 3】

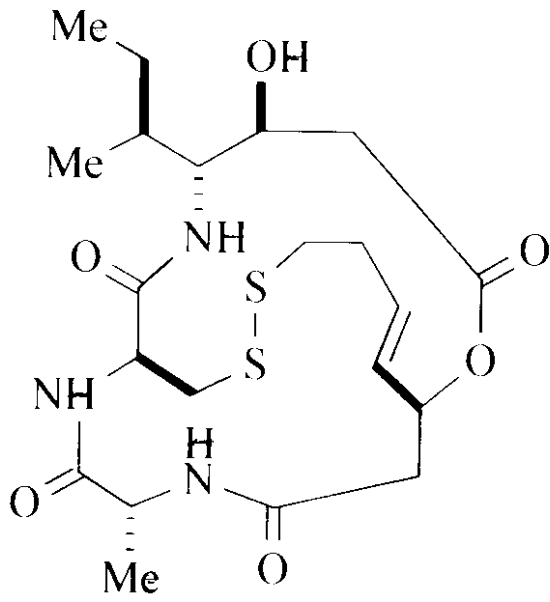


30

式 3

40

【化 4】

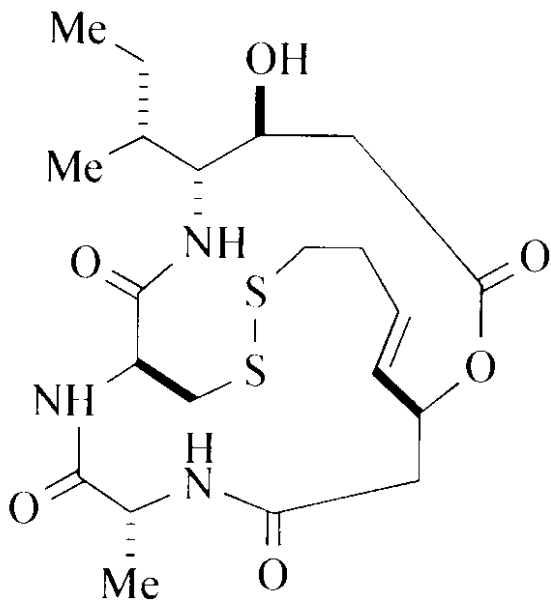


10

式 4

20

【化 5】

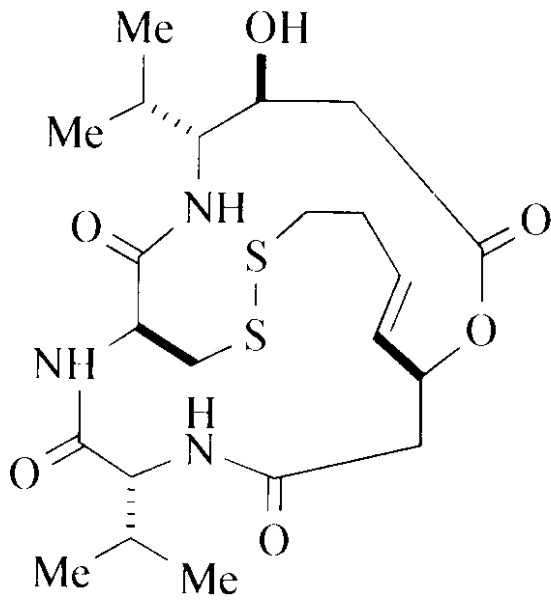


30

40

式 5

【化 6】

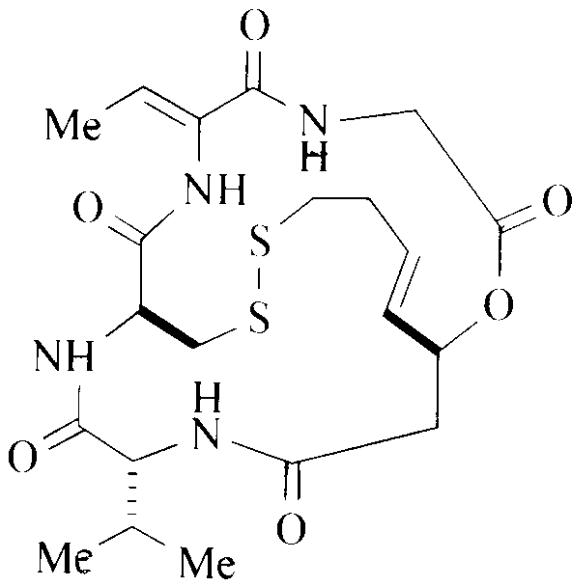


10

20

式 6

【化 7】

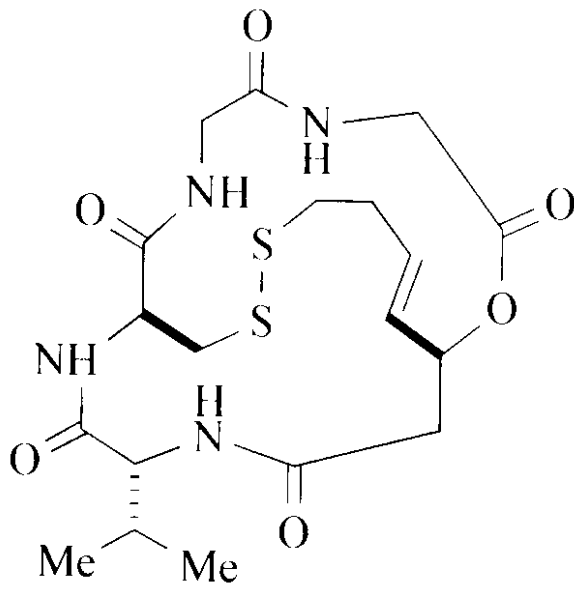


30

40

式 7

【化 8】

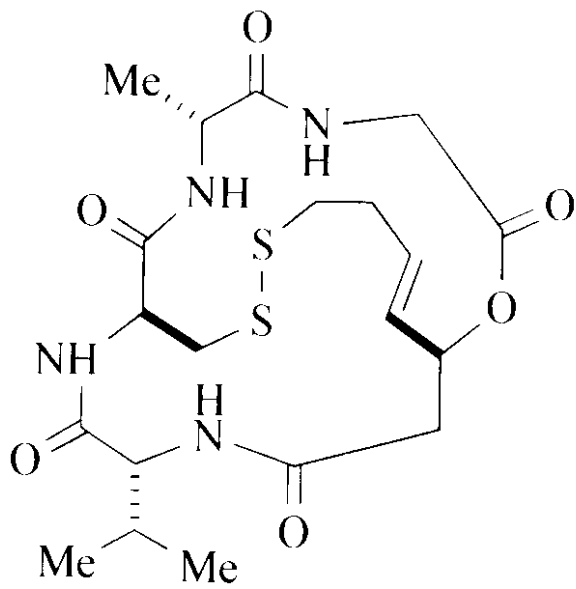


10

20

式 8

【化 9】

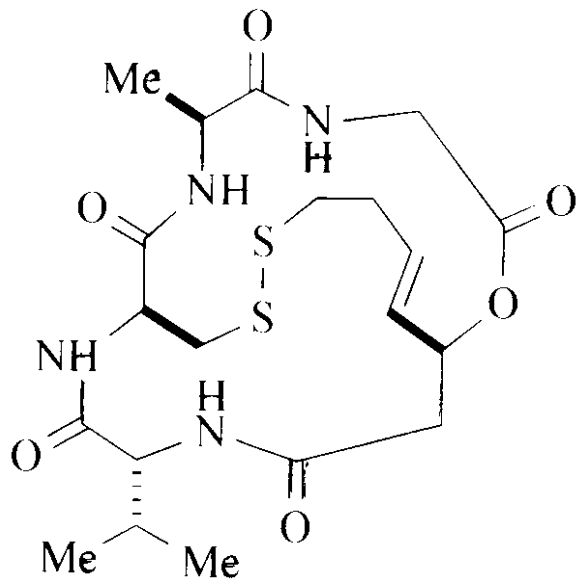


30

40

式 9

【化 1 0】

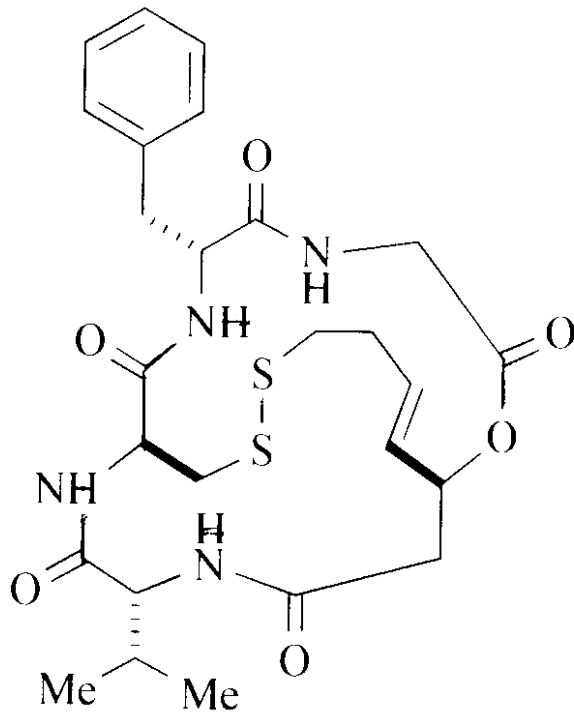


10

式 1 0

20

【化 1 1】

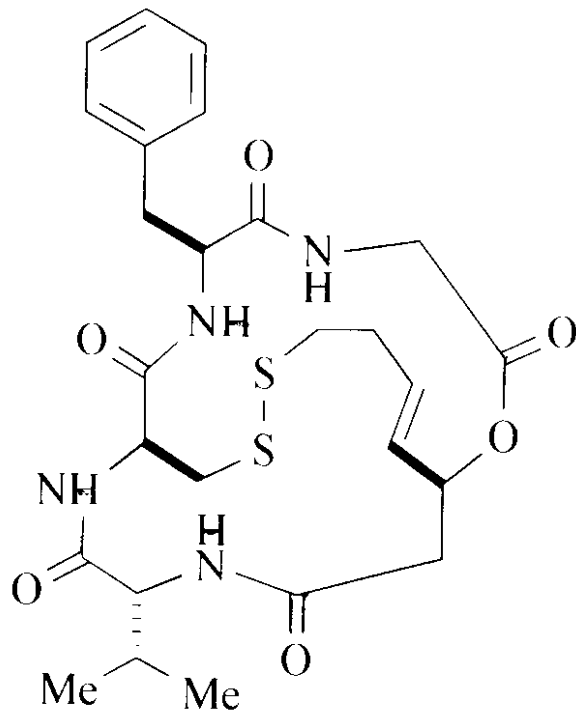


30

40

式 1 1

【化 1 2】

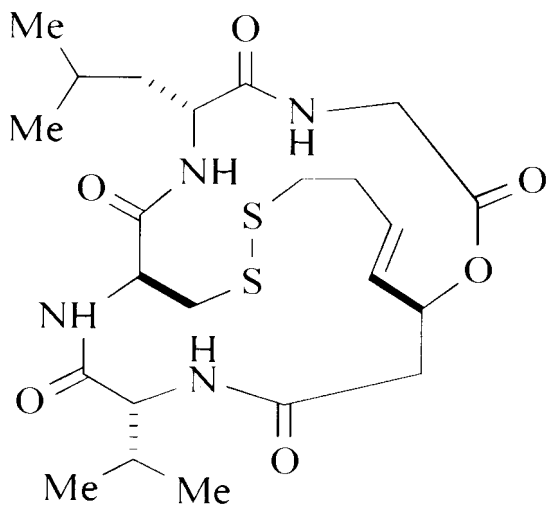


10

20

式 1 2

【化 1 3】

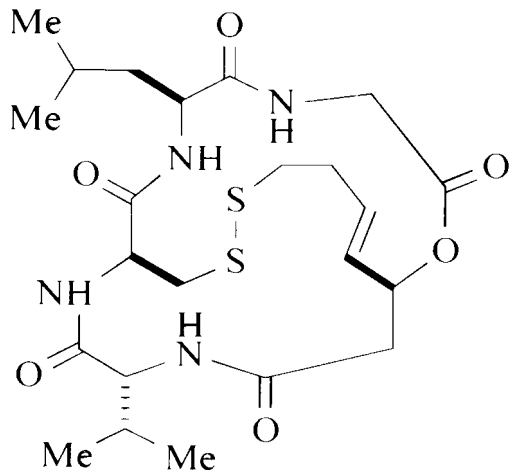


30

40

式 1 3

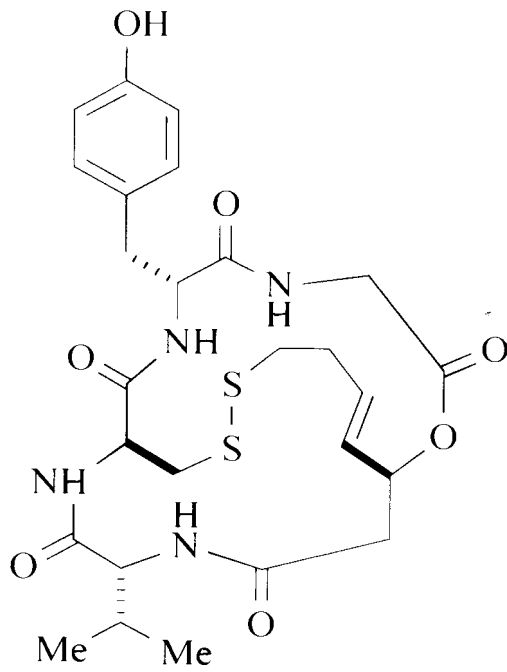
【化 1 4】



10

式 1 4

【化 1 5】

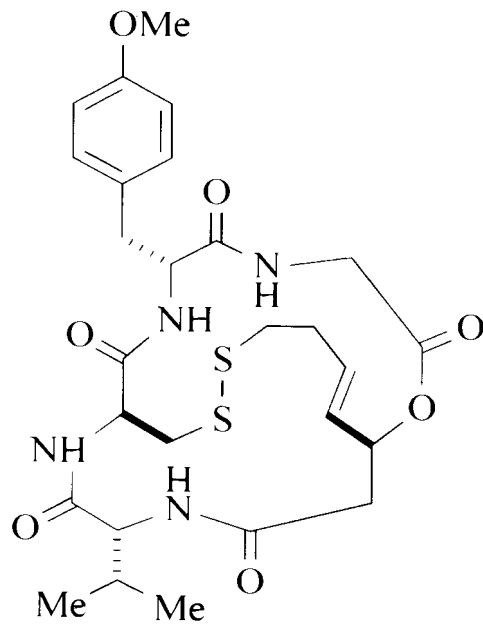


30

式 1 5

40

【化 1 6】

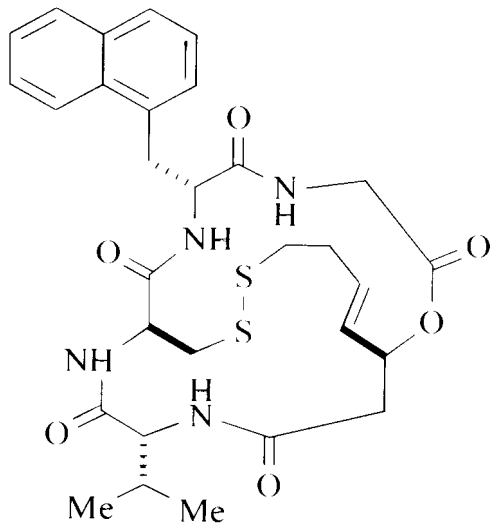


10

20

式 1 6

【化 1 7】

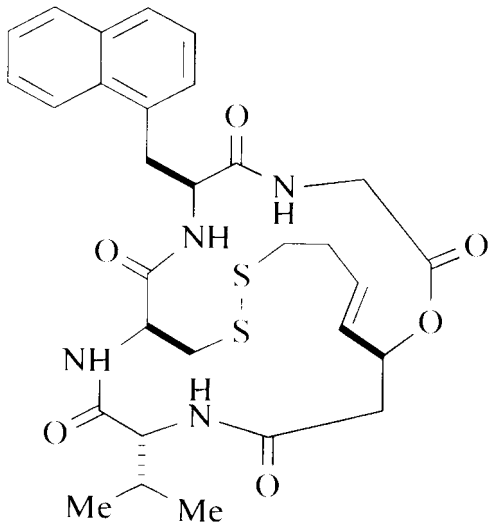


30

40

式 1 7

【化 1 8】

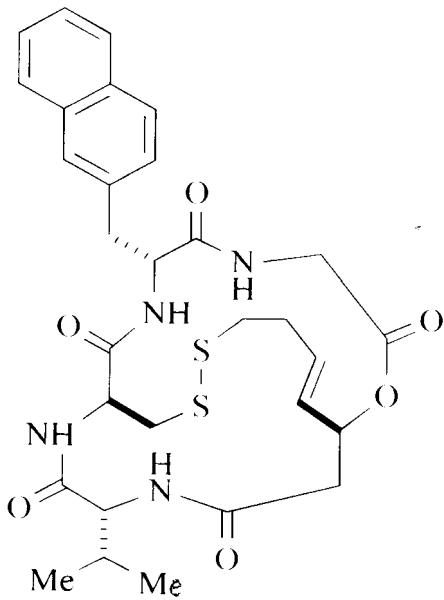


10

式 1 8

20

【化 1 9】

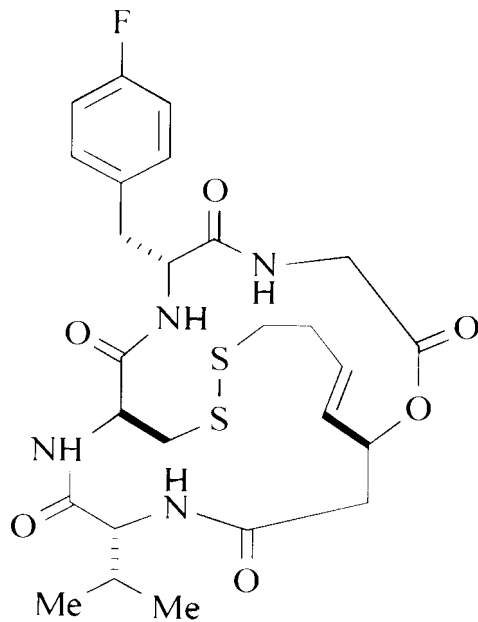


30

式 1 9

40

【化 2 0】

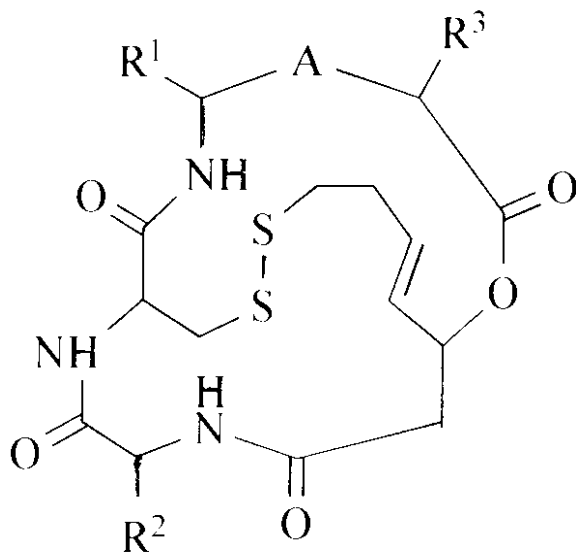


10

20

式 2 0

〔 7 〕 以下の式 1 で示されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩
【化 2 1】



30

40

式 1

(式中、Aは、 $-\text{CONH}-$ 又は $-\text{CH}(\text{OH})-$ を表し、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基、置換もしくは無置換のアリール基又は置換もしくは無置換のアラルキル基を表す；但し、A、 R^1 、 R^2 及び R^3 の組合せが、 $\text{A} = -\text{CONH}-$ かつ $\text{R}^1 = \text{エチリデン基}$ かつ $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{イソプロピル基}$ 、 $\text{A} = -\text{CH}(\text{OH})-$ かつ $\text{R}^1 = \text{イソプロピル基}$ かつ $\text{R}^2 = \text{メチル基}$ かつ $\text{R}^3 = \text{水素原子}$ 、 $\text{A} = -\text{CH}(\text{OH})-$ かつ $\text{R}^1 = \text{sec-ブチル基}$ かつ $\text{R}^2 = \text{メチル基}$ かつ $\text{R}^3 = \text{水素原子}$ 、 $\text{A} =$

50

- C H (O H) - かつ $R^1 = R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、 $A = - C O N H -$ かつ $R^1 =$ エチリデン基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、 $A = - C O N H -$ かつ $R^1 = R^3 =$ 水素原子かつ $R^2 =$ イソプロピル基、 $A = - C O N H -$ かつ $R^1 =$ メチル基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、及び、 $A = - C O N H -$ かつ $R^1 =$ ベンジル基かつ $R^2 =$ イソプロピル基かつ $R^3 =$ 水素原子、のいずれかである化合物を除く) ; が提供される。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、新規な P I 3 K 阻害剤が提供される。この新規な P I 3 K 阻害剤は、従来公知の P I 3 K 阻害剤とは全く異なる構造を有する化合物である。本発明の P I 3 K 阻害剤は、H D A C 阻害活性をも有し、H D A C 阻害剤としても作用しうが、特定の濃度で用いた場合には、H D A C 阻害剤抵抗性のがん細胞に対しても、アポトーシスを誘導することにより殺細胞活性を発揮する。したがって、本発明の P I 3 K 阻害剤は、H D A C 阻害剤を含む従来の抗がん剤には耐性のがん細胞に対して有効な医薬組成物を提供することができる。

10

本発明の P I 3 K 阻害剤は、H D A C 阻害活性のほか、他のキナーゼをも阻害する可能性を有していることが見出され、がん細胞を制御する上で有利に働くことが推測される多分子標的の薬剤である可能性がある。

また、本発明の P I 3 K 阻害剤は、がん特異的に作用する分子標的薬として使用されるものであるから、がん細胞以外の細胞や組織に与える影響は比較的少ないと考えられ、実際、F K 2 2 8 については、長期投与によっても何ら副作用を生じない例や、何らかの副作用を生じた場合であっても比較的軽く、これを抑える薬剤との併用によって抑えることが可能であることがわかっている。F K 2 2 8 の類縁体については、後述するように F K 2 2 8 よりも副作用が低いと考えられ、したがって、本発明の医薬組成物は、生体に対して高用量で使用しても重篤な副作用が起こる可能性が低い。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、本発明の化合物の合成経路を表す図である。「B o c」= tert - ブトキシカルボニル (tert-butoxycarbonyl)、 「 T B S 」 = tert - ブチルジメチルシリル (tert-butyl dimethylsilyl)、 「 T r 」 = トリチル (trityl)、 「 P M B 」 = p - メトキシベンジル (p-methoxybenzyl) をそれぞれ表す。

30

【図2A】図2Aは、F K 2 2 8 及びその類縁体の P I 3 K 阻害活性の測定を表す図である。20 μ Mでの F K 2 2 8 及びその類縁体 (S P - 1、S P - 2、S P - 3、S P - 5、F K 2 2 8、F K - A 1、F K - A 2、F K - A 3、F K - A 4、F K - A 5、F K - A 6) の P I 3 K 阻害活性を、P I 3 K 活性の阻害率として示す。

【図2B】図2Bは、同様に測定した L Y 2 9 4 0 0 2 の P I 3 K 阻害曲線を示す。縦軸は、P I 3 K 活性に対する阻害率を示す。

【図2C】図2Cは、同様に測定した F K 2 2 8 の P I 3 K 阻害曲線を示す。縦軸は、P I 3 K 活性に対する阻害率を示す。

【図2D】図2Dは、同様に測定した F K - A 5 の P I 3 K 阻害曲線を示す。縦軸は、P I 3 K 活性に対する阻害率を示す。

40

【図2E】図2Eは、異なる A T P 濃度条件下で同様に測定した F K 2 2 8 の P I 3 K 阻害曲線を示す。縦軸は、P I 3 K 活性に対する阻害率を示す。実線は A T P 濃度 50 μ M、点線は A T P 濃度 500 μ Mでの結果を示す。

【図3】図3は、ウェスタンブロッティングによる A K T 経路の抑制の評価を表す図である。パネル A は、化合物処理の時間経過によるリン酸化 A K T の変化を表す。P C 3 細胞にそれぞれ 10 μ M の L Y 2 9 4 0 0 2、F K 2 2 8 又は F K - A 5 を、5分、30分又は 180分作用させ、細胞を回収してウェスタンブロッティングによりリン酸化 (p -) A K T 及び A K T を検出した結果を表す。パネル B は、F K 2 2 8、F K - A 5 の濃度変化による A K T 経路の抑制を表す。P C 3 細胞を、図に示した濃度 (μ M) の F K 2

50

28、FK-A5で180分処理し、回収したサンプルを用いて、リン酸化AKT (Ser-473、Thr-308) 及びAKT、リン酸化GSK-3 (Ser-9)、リン酸化mTOR (Ser-2448)、リン酸化p70S6K (Thr-389)、リン酸化4E-BP1 (Thr-37/46)、リン酸化MEK1/2 (Ser-217/221)、リン酸化ERK1/2 (Thr-202/Tyr-204) の発現レベルを検出したウェスタンブロット解析の結果である。

【図4A】図4Aは、HCT116細胞、RKO細胞、CO115細胞におけるHDAC2、HDAC1の発現をウェスタンブロットにて確認した結果を表す図である。

【図4B】図4Bは、HCT116細胞におけるFK228及びFK-A5の殺細胞効果の評価を表す図である。LY294002 (50 µM)、SAHA (2.5 µM)、同濃度のLY294002 (50 µM) 及びSAHA (2.5 µM) の併用 (SAHA + LY)、及び図に示した濃度のFK228、FK-A5、FK228又はFK-A5とLY294002との併用の存在下で24時間培養した後、MTTアッセイを行い、生細胞数を測定することにより殺細胞効果を検討した結果である。グラフの縦軸はDMSO添加時の吸光度に対する比を示す。

【図4C】図4Cは、図4Bと同様に測定した、RKO細胞におけるFK228及びFK-A5の殺細胞効果の評価を表す図である。

【図4D】図4Dは、図4Aと同様に測定した、CO115細胞におけるFK228及びFK-A5の殺細胞効果の評価を表す図である。

【図5A】図5Aは、図に示した濃度のFK228又FK228及びLY294002 (50 µM) の存在下で24時間培養したHCT116細胞についてのFACS解析の結果を示す図である。上段は、比較のための50 µM LY294002、2.5 µM SAHA、同濃度のLY294002 (50 µM) 及びSAHA (2.5 µM) で同様に処理した結果である。

【図5B】図5Bは、FK228の代わりにFK-A5を用いて図5Aと同様に行った解析の結果を示す図である。

【図5C】図5Cは、FK-A5についての図5Bの結果を解析し、G2/M、S、G1/G0、subG1分画のパーセンテージを算出した結果を示す図である。

【図5D】図5Dは、HCT116細胞を図に示した濃度のSAHA、FK-228で24時間処理し、PARP、cleaved PARP、リン酸化AKT (S473)、AKT、アセチル化ヒストンH3、アセチル化ヒストンH4の発現についてウェスタンブロット解析を行った結果を表す図である。

【図6】図6は、図3パネルBに示した実験と同様にして行ったウェスタンブロットティングによるAKT経路の抑制の評価を表す図である。左から、FK-A11、FK-A5、FK228の濃度変化によるAKT経路の抑制を表す。PC3細胞を、図に示した濃度 (µM) の各化合物で180分処理し、回収したサンプルを用いて、リン酸化AKT (Ser-473、Thr-308) 及びAKTの発現レベルを検出したウェスタンブロット解析の結果である。

【図7A】図7Aは、HCT116細胞におけるFK-A11の殺細胞効果の評価を表す図である。LY294002 (「LY」; 50 µM)、SAHA (2.5 µM)、同濃度のLY294002 (50 µM) 及びSAHA (2.5 µM) の併用 (SAHA + LY)、及び図に示した濃度のFK-A11の存在下で24時間培養した後、MTTアッセイを行い、生細胞数を測定することにより殺細胞効果を検討した結果である。グラフの縦軸はDMSO添加時の吸光度に対する比を示す。

【図7B】図7Bは、図7Aと同様に測定した、RKO細胞におけるFK-A11の殺細胞効果の評価を表す図である。

【図7C】図7Cは、図7Aと同様に測定した、CO115細胞におけるFK-A11の殺細胞効果の評価を表す図である。

【図7D】図7Dは、図7Aと同様に測定した、正常細胞KMST6細胞 (非腫瘍性、線維芽細胞) におけるFK-A11の殺細胞効果の評価を表す図である。

10

20

30

40

50

【図 8 A】図 8 A は、図 7 A と同様に測定した、HCT 116 細胞における FK 228、FK-5、FK-A11 の殺細胞効果の比較を表す図である。横線を付したバーはコントロール (DMSO、SAHA、LY、又は SAHA+LY)、斜線を付したバーは FK 228、黒塗りのバーは FK-5、白塗りのバーは FK-A11 をそれぞれ示す。

【図 8 B】図 8 B は、図 7 A と同様に測定した、RKO 細胞における FK 228、FK-5、FK-A11 の殺細胞効果の評価を表す図である。横線を付したバーはコントロール (DMSO、SAHA、LY、又は SAHA+LY)、斜線を付したバーは FK 228、黒塗りのバーは FK-5、白塗りのバーは FK-A11 をそれぞれ示す。

【図 8 C】図 8 C は、図 7 A と同様に測定した、CO115 細胞における FK 228、FK-5、FK-A11 の殺細胞効果の評価を表す図である。横線を付したバーはコントロール (DMSO、SAHA、LY、又は SAHA+LY)、斜線を付したバーは FK 228、黒塗りのバーは FK-5、白塗りのバーは FK-A11 をそれぞれ示す。

10

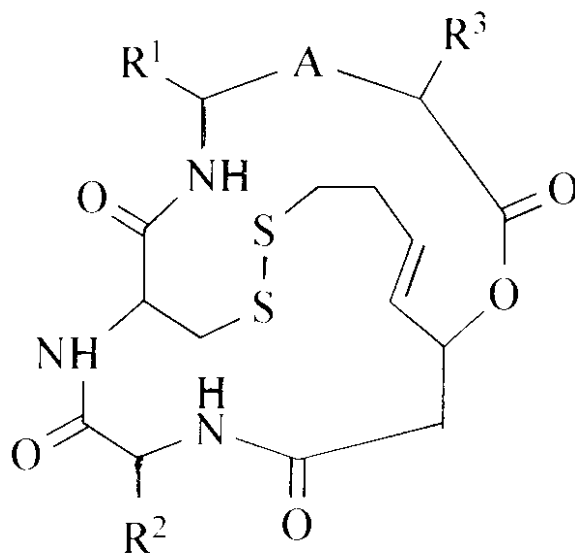
【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の PI3K 阻害剤は、以下の式 1 で表されるデブシペプチド類化合物又は生理学的に許容可能なその塩からなることを特徴とする。

【0019】

【化 2 2】



20

30

式 1

【0020】

(式中、A は、-CONH- 又は -CH(OH)- を表し、R¹、R² 及び R³ は、同一又は異なって、水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基、置換もしくは無置換のアリール基又は置換もしくは無置換のアラルキル基を表す。)

40

【0021】

好ましくは、R¹ は水素原子、低級アルキル基、低級アルキリデン基又は置換もしくは無置換のアラルキル基であり、R² は低級アルキル基であり、R³ は水素原子又は低級アルキル基である。本発明において、「低級アルキル基」としては、メチル、エチル、n プロピル、i プロピル、シクロプロピル、n ブチル、s ブチル、t ブチル、シクロブチル、n ペンチル、i ペンチル、2-メチルブチル、シクロペンチル、n ヘキシル、シクロヘキシル等の直鎖もしくは分枝した炭素数 1~6 のアルキル基が挙げられる。「低級アルキリデン基」としては、メチレン、エチリデン、プロピリデン、シクロプロピリデン、ブチリデン、ペンチリデン、ヘキシリデン等の直鎖もしくは分枝した炭素数 1~

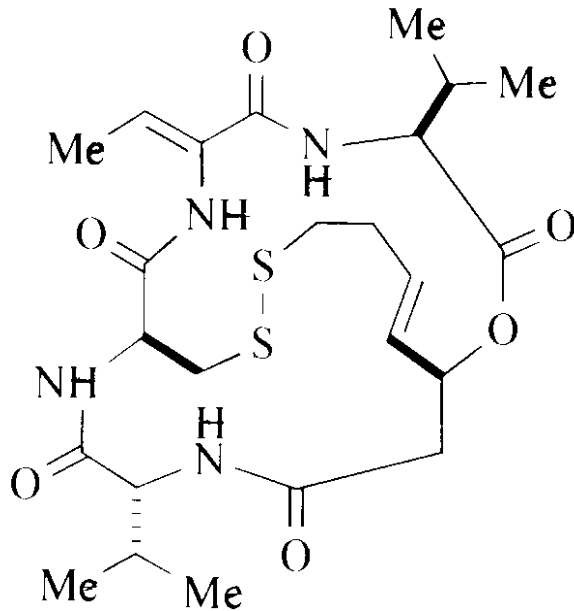
50

C6のアルキリデン基が挙げられる。「アリール基」としては、フェニル、ナフチル、ピリジニル、フラニル等が挙げられ、その置換基としては水酸基、保護基で保護された水酸基、アミノ基及び保護基で保護されたアミノ基等が挙げられる。「アラルキル基」としては、ベンジル、1-フェニルエチル、ナフチルメチル、ピリジニルメチル等が挙げられ、その置換基としては水酸基、保護基で保護された水酸基、アミノ基及び保護基で保護されたアミノ基等が挙げられる。

【0022】

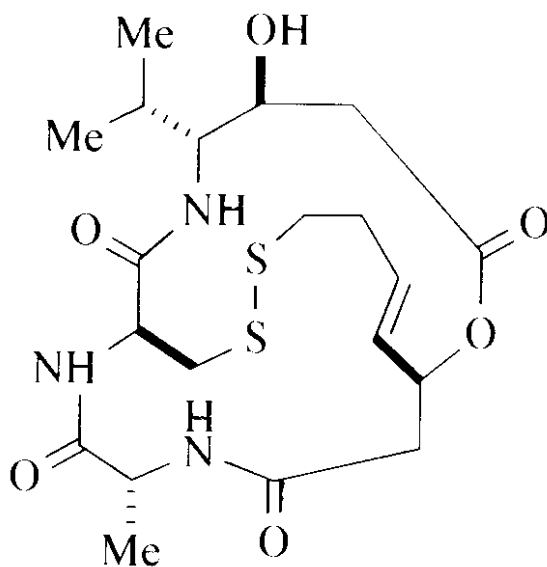
特に好ましい化合物としては、以下の化合物が挙げられる。

【化23】



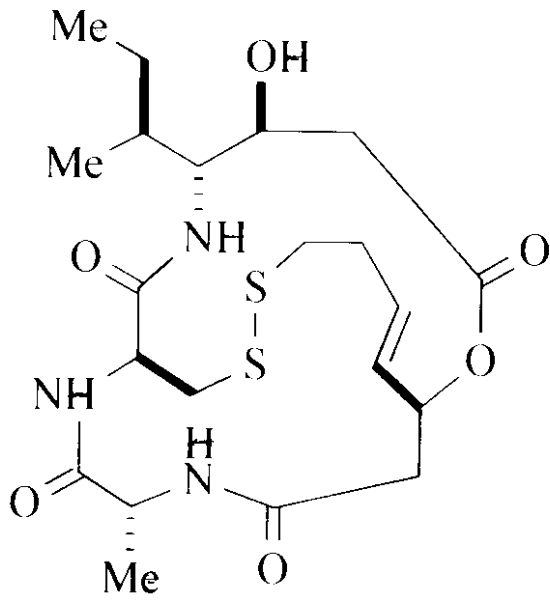
FK 228

【化24】



SP - 1

【化 2 5】

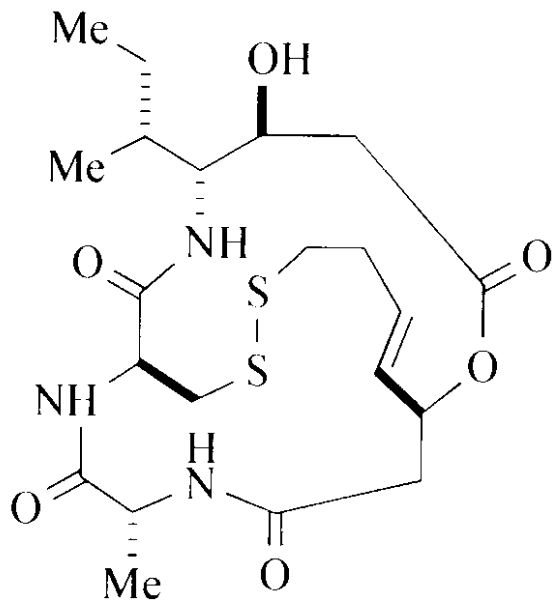


10

S P - 2

20

【化 2 6】

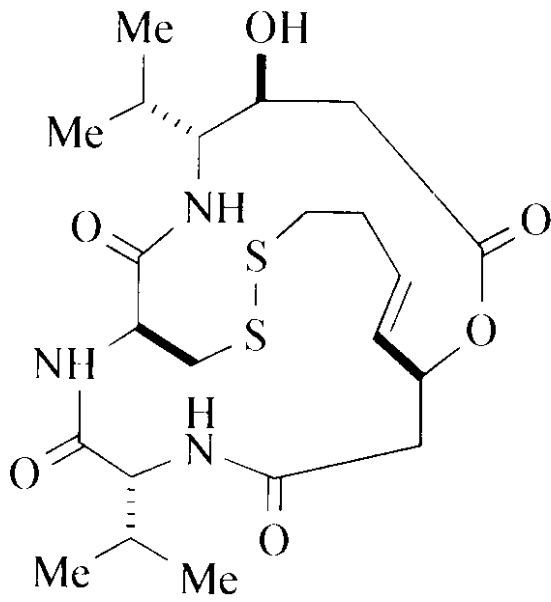


30

40

S P - 3

【化 2 7】

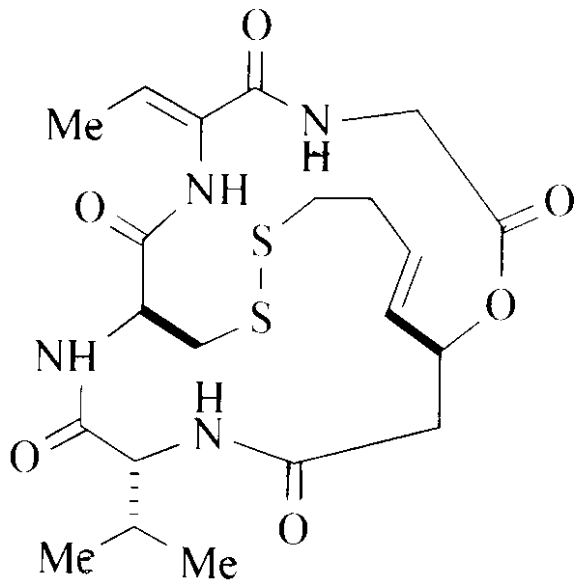


10

20

S P - 5

【化 2 8】

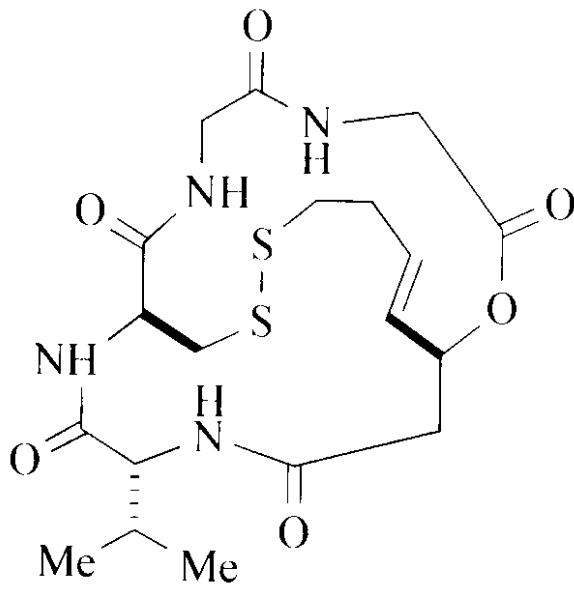


30

40

F K - A 1

【化 2 9】

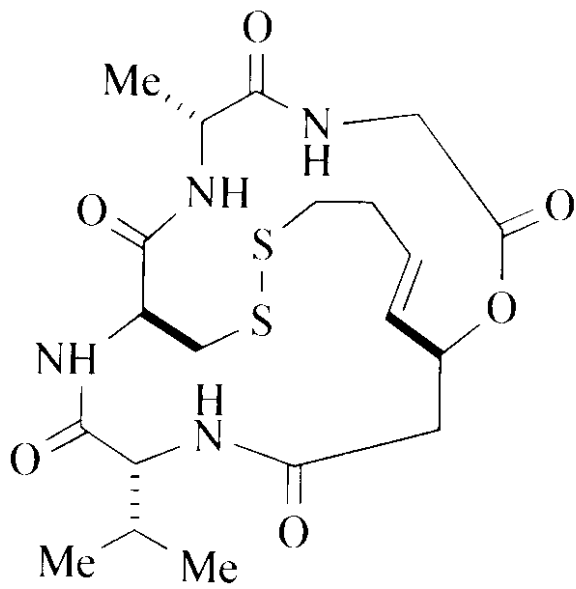


10

20

F K - A 2

【化 3 0】

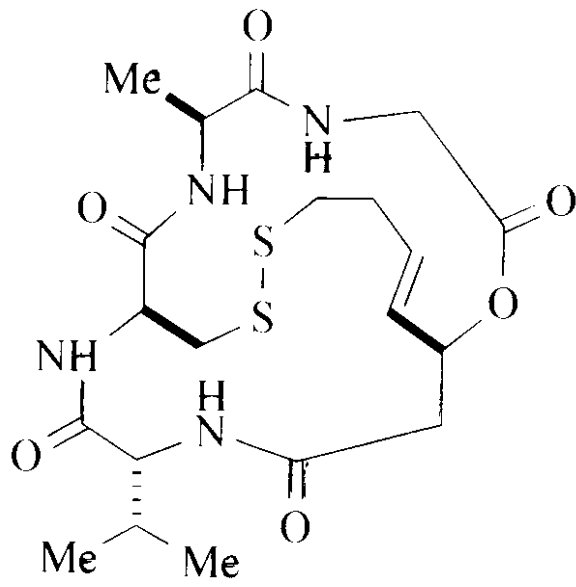


30

40

F K - A 3

【化 3 1】

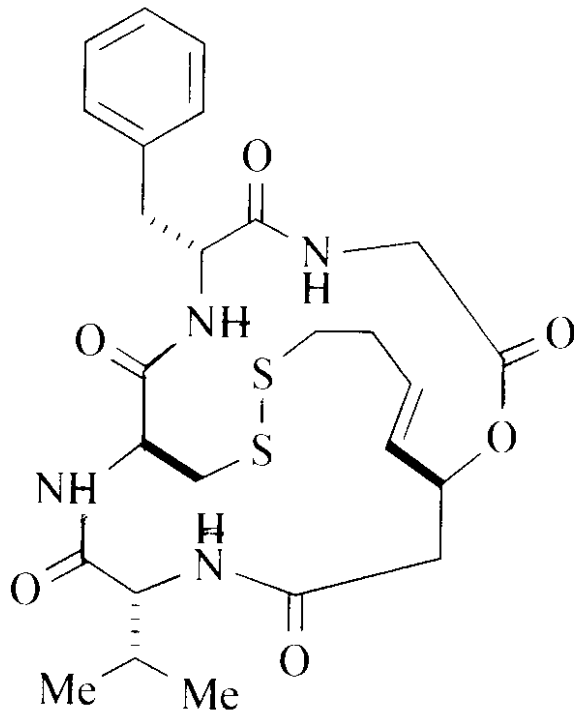


10

F K - A 4

20

【化 3 2】

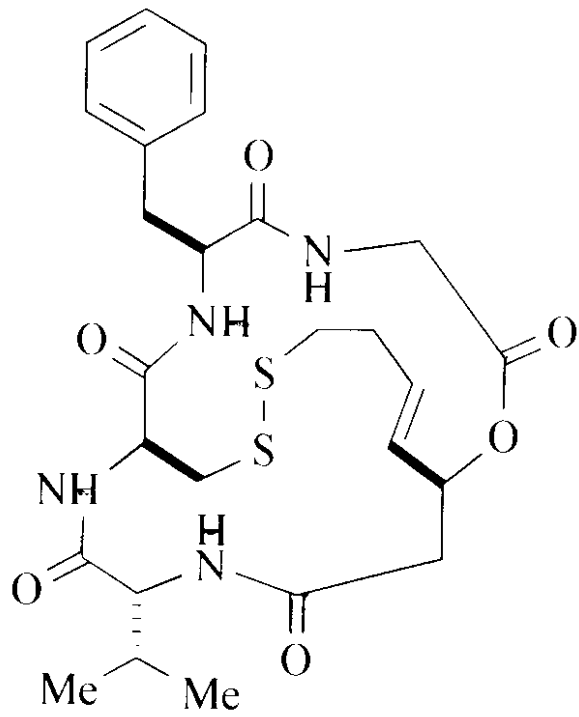


30

40

F K - A 5

【化 3 3】

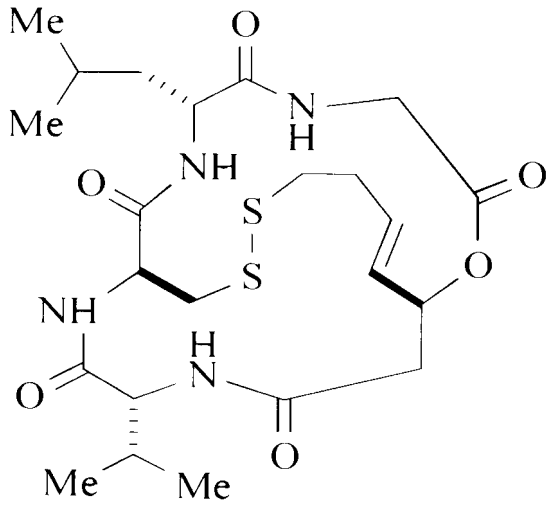


10

20

F K - A 6

【化 3 4】

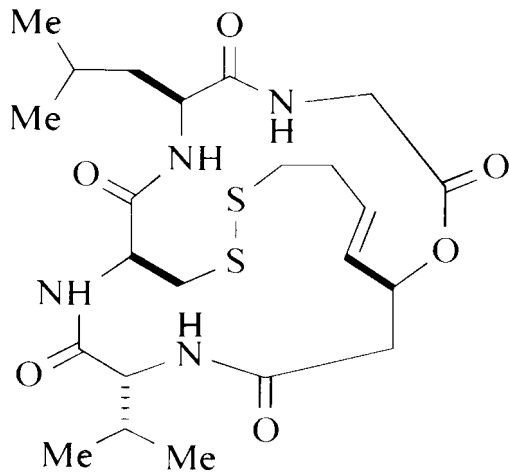


30

40

F K - A 7

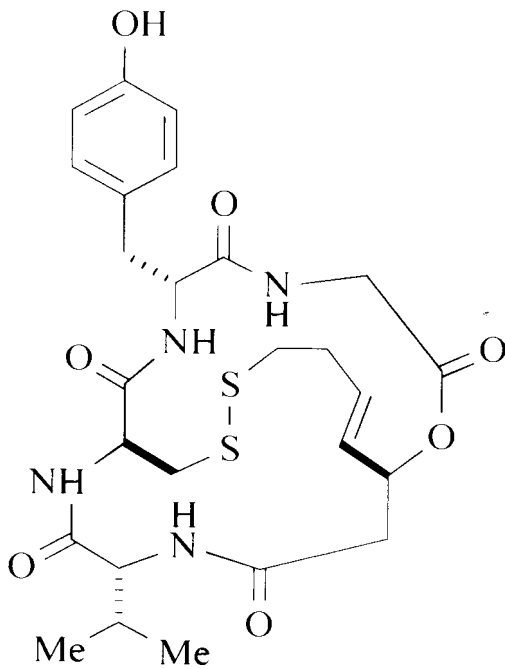
【化 3 5】



10

F K - A 8

【化 3 6】



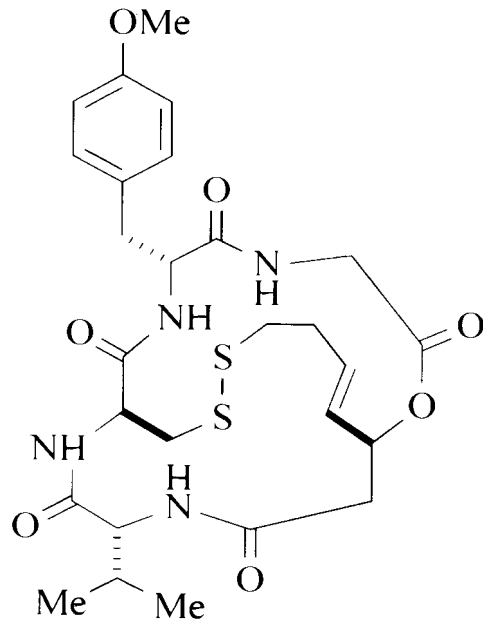
20

30

F K - A 9

40

【化 3 7】

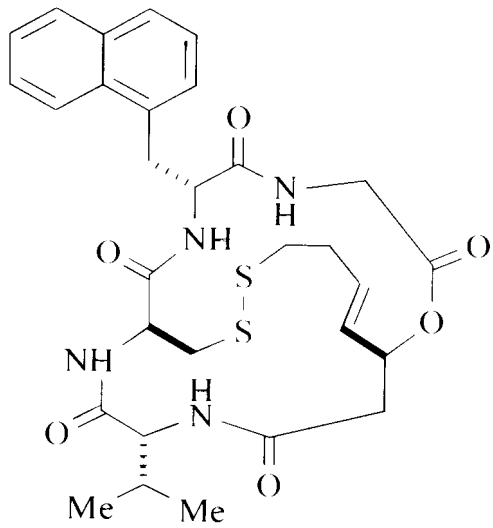


10

20

FK - A 1 0

【化 3 8】

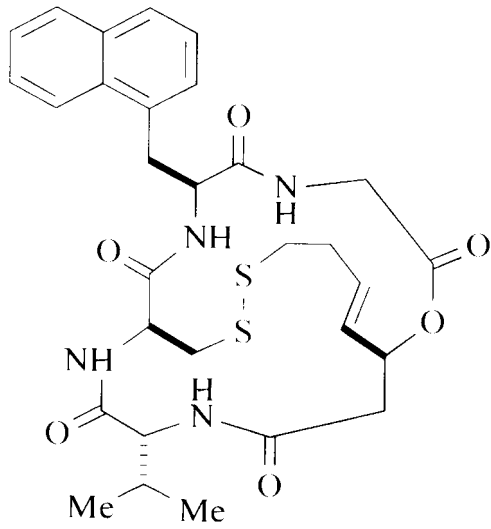


30

40

FK - A 1 1

【化 3 9】

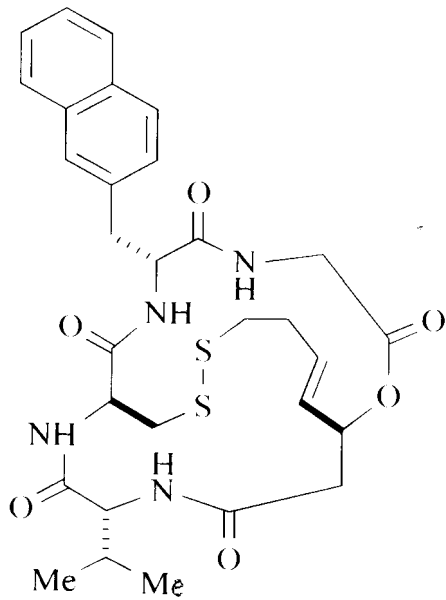


10

F K - A 1 2

20

【化 4 0】

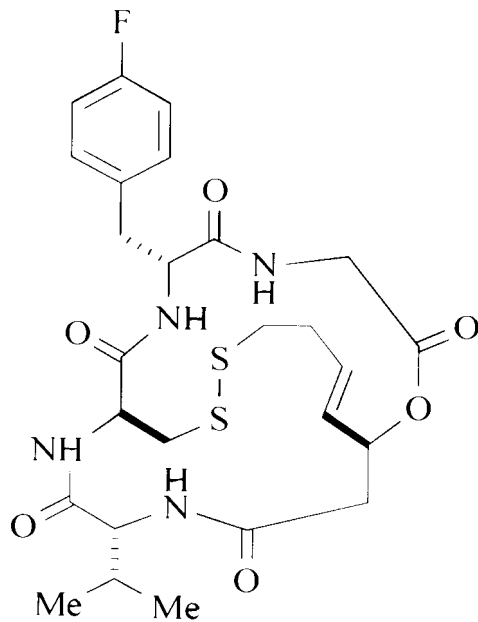


30

F K - A 1 3

40

【化 4 1】



10

20

F K - A 1 7

R^3 が水素原子のもの、及び/又は R^1 が置換もしくは無置換のアラルキル基のものがさらに好ましい。

【0023】

また、本発明のPI3K阻害剤において、生理学的に許容可能な塩としては、具体的には、例えば、無機塩（ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩；カルシウム塩、マグネシウム塩；アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩；アンモニウム塩等）をはじめとして、各種の有機塩、ハロゲン化水素酸塩、無機酸塩、有機酸塩及びアミノ酸塩等が挙げられる。

30

【0024】

本発明においては、これらのデブシペプチド類化合物又は塩の1種又は2種以上を適宜選択して用いることができる。

【0025】

本発明に係るデブシペプチド類化合物、すなわちFK228及び類縁体の製造方法は、公知である。FK228は、微生物によって産生された天然物を単離精製して得てもよく、従来公知の方法で半合成又は全合成により製造してもよい。具体的には、本発明の化合物の合成については、例えば、Narita et al. Chemistry-A European Journal 15, 11174-11186 (2009) (非特許文献22)；Takizawa et al. Chemical Communication, 1677-1679 (2008) (非特許文献23)；Takizawa et al. Heterocycles 76, 275-290 (2008) (非特許文献24)に記載された方法にしたがって行うことができる。

40

【0026】

本発明の医薬組成物が治療する対象のがんは、FK228について有効性が知られている各種のがんであり、中でも特に難治性のがんである。具体的には、皮膚がん、中皮腫、肺がん、胃がん、肝がん、大腸がん、乳がん、食道がん、膵臓がん、子宮がん（頸がん、内膜がん）、卵巣がん、皮膚がん、泌尿器がん、頭頸部がん、原発不明がん、造血器腫瘍（白血病、リンパ腫）、骨軟部肉腫等のがんであって、他の治療による効果が認められない又は低いものが挙げられる。さらに、PIK3CA遺伝子に高頻度で変異が報告されている、乳がん、子宮内膜がん、泌尿器がん、大腸がん、卵巣がん、頭頸部がん、肺がん等（非特許文献3）には、特に本薬剤の有効性が期待される。

50

【 0 0 2 7 】

本発明の医薬組成物は、本発明の P I 3 K 阻害剤と製薬業界で公知の種々の添加剤等とを用いて、当該技術分野で公知の方法により適宜製造することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明の医薬組成物の投与経路は、公知の経路、例えば経口、経鼻、舌下、点眼、経皮、注射、経腸、直腸内等から任意の経路を選択することができる。好ましくは経口又は注射である。

【 0 0 2 9 】

したがって、本発明の医薬組成物は、経口剤（錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤等）、注射剤のほか、座剤、貼付剤、点滴剤、含嗽剤、点眼剤、トローチ等の剤型で使用に供することができる。このような各種製剤の製造方法は、当業者には充分公知である。

10

【 0 0 3 0 】

所望の剤型に応じて、添加剤として、製薬業界において使用されている各種の賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、流動性促進剤、着色剤、香料等を、適宜本発明の医薬組成物の製造において用いることができる。

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明の医薬組成物には、公知の他の薬学的有効成分をも含有させることができる。例えば、制吐剤、消化剤、及び他の抗がん剤等が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

さらに、本発明の医薬組成物は、公知のドラッグデリバリーシステムと組み合わせることができる。例えば、リポソーム、無機ナノ粒子、無機 - 有機ハイブリッドナノ粒子、インプラント等が挙げられる。

20

【 0 0 3 3 】

これらの他の有効成分をさらに含有させることによって、あるいは本発明の医薬組成物を他の薬剤と組み合わせて使用することによって、一層の治療効果を期待できる。

【 0 0 3 4 】

本発明の医薬組成物の投与量及び投与剤型は、個別に、治療対象のがん、投与方法、投与される患者の年齢、体重、病態等に応じて定めることができる。

一般的には、有効成分として体重 1 kgあたり約 1 mg/日 ~ 1 0 , 0 0 0 mg/日、より好ましくは約 1 0 mg/日 ~ 約 5 , 0 0 0 mg/日、さらに好ましくは約 2 0 mg/日 ~ 約 5 , 0 0 0 mg/日、最も好ましくは約 5 0 mg/日 ~ 約 5 , 0 0 0 mg/日を 1 日 1 回あるいは 1 日 2 ~ 3 回に分割して、本発明の医薬組成物による治療が必要とされている患者に投与することができる。

30

【 実施例 】

【 0 0 3 5 】

1 . 出芽酵母による P I 3 K 阻害剤スクリーニング

本発明において用いたスクリーニング系は、出芽酵母にヒトの p 1 1 0 を発現させることにより生じる細胞増殖障害に基づいており、基本的に、Rodriguez-Escuderoらの方法（非特許文献 1 9 : Biochemical Journal 390, 613 (2005)）に記載された方法にしたがってスクリーニングを行った。ただし、このスクリーニングにおいては、出芽酵母として、一般的に使用されている野生型株 Y P H 4 9 9 の代わりに、7つの A B C トランスポーター遺伝子及び A B C トランスポーターの活性化に關与する 2 つの転写因子の遺伝子をノックアウトした薬剤感受性株 A D 1 - 9 (MAT alpha, yor1, snq2, pdr5, pdr10, pdr11, ycf1, pdr3, pdr15, pdr1, his1, ura3) を用いた（非特許文献 2 5 : Rogers et al. J. of Mol. Microbiol. Biotechnol. 3, 207-214 (2001)）。A D 1 - 9 株は、Nader Nourizad (Stanford Genome Technology Center Stanford University, CA, USA) より入手可能である。

40

【 0 0 3 6 】

本発明者らは、A D 1 - 9 に栄養要求性のマーカーを追加するため、h i s G - U r a 3 - h i s G カセットを使った手法（非特許文献 2 6 : Alani et al., Genetics 116, 54

50

1 (1987)) で、L E U 2 遺伝子破壊 A D 1 - 9 株を作製して用いた。

【 0 0 3 7 】

形質転換した A D 1 - 9 株は、ウラシル及びロイシン不含最少完全培地 S C - U - L 又は 2 % グルコースを 2 % ガラクトースで置き換えた S G a l - U - L にて 3 0 で培養した。

【 0 0 3 8 】

これらの酵母株について、公知の P I 3 K 阻害剤である L Y 2 9 4 0 0 2 (Cayman Chemical Company より購入) に対する感受性の違いを評価したところ、細胞増殖障害の回復が、Y P H 4 9 9 においては L Y 2 9 4 0 0 2 濃度 5 0 μ M でみられるのに対して、スクリーニングに使用した A D 1 - 9 では 5 μ M でみられた。すなわち、スクリーニングに使用した A D 1 - 9 は、Y P H 4 9 9 に比べ、L Y 2 9 4 0 0 2 に対して約 1 0 倍感受性が高いことが確認された。

10

【 0 0 3 9 】

上記の系を用いて、文部科学省がん特定領域研究・統合がん化学療法基盤情報支援班より供与を受けた化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。各化合物を、濃度が 0 . 5 μ M、5 μ M になるように S G a l - U - L 液体培地に添加し、A D 1 - 9 の形質転換体を 2 4 時間振盪培養し、A₆₀₀ を測定した。コントロールとして D M S O、L Y 2 9 4 0 0 2 を同様のスクリーニングに供した。独立した 3 回の繰り返し実験を行い、A₆₀₀ の平均値を算出し、その値の降順に羅列し、上位となった化合物を、p 1 1 0 による細胞増殖障害を回復させる化合物として選択した。

20

【 0 0 4 0 】

0 . 5 μ M の化合物濃度では、D M S O よりも A₆₀₀ が高値になる化合物は認められなかった。5 μ M の濃度では、いくつかの化合物で L Y 2 9 4 0 0 2 と同程度の細胞増殖障害の回復が認められた。表 1 に、各化合物のライブラリー内での I D、化合物名、A₆₀₀ 値を表す。

【 0 0 4 1 】

表 1 : 化合物ライブラリーのスクリーニング結果

【表 1】

ID	化合物	A600
LY294002	LY294002	0.482
2-1G	SP-3	0.464
2-1F	SP-2	0.457
3-8B	FK-A5	0.449
2-1E	SP-1	0.412
2-1H	FK228	0.385
2-2C	FK-A3	0.380
2-2A	FK-A1	0.364
1-11B	*	0.363
1-2A	*	0.355
1-1C	*	0.351
3-3A	*	0.350
1-11C	*	0.347
1-6A	*	0.346
1-2C	*	0.345
1-1A	DMSO	0.298

* 未公開化合物

【0042】

p 1 1 0 を発現させた形質転換体において A₆₀₀ が高値となった上位の化合物は、い
ずれも、FK 2 2 8 及びその類縁体であった。

【0043】

本スクリーニングにおいて P I 3 K 阻害活性をもつ可能性が示唆された FK 2 2 8 及び
その類縁体の構造式、及び文部科学省がん特定領域研究・統合がん化学療法基盤情報支援
班により評価された HDAC 1、HDAC 6 に対する 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を表 2 に
示す。

【0044】

表 2 : FK 2 2 8 及びその類縁体の構造式及び HDAC 1、HDAC 6 に対する 50
% 阻害濃度 (IC₅₀)

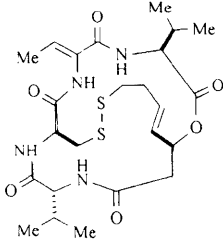
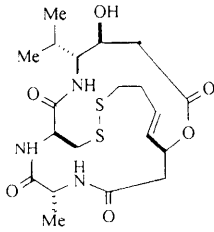
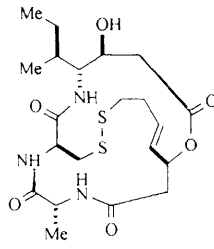
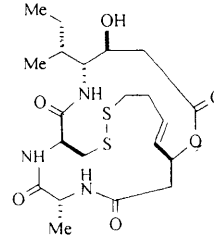
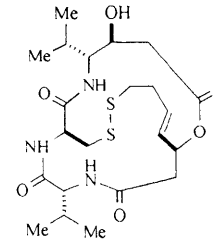
10

20

30

40

【表 2 - 1】

化合物	構造式	HDAC1 IC50	HDAC6 IC50
FK228 $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$ MW:540.70		0.0036 μM	0.39 μM
SP-1 (spiruchostatin A) $C_{20}H_{31}N_3O_6S_2$ MW:473.61		0.0033 μM	1.6 μM
SP-2 (spiruchostatin B) $C_{21}H_{33}N_3O_6S_2$ MW:487.63		0.0022 μM	1.4 μM
SP-3 (5''-epi-spiruchostatin B) $C_{21}H_{33}N_3O_6S_2$ MW:487.63		0.0024 μM	3.9 μM
SP-5 (spiruchostatin D) $C_{22}H_{35}N_3O_6S_2$ MW:501.66		未評価	未評価

10

20

30

40

【表 2 - 2】

化合物	構造式	HDAC1 IC50	HDAC6 IC50
FK-A1 $C_{21}H_{30}N_4O_6S_2$ MW:498.62		0.0078 μM	3.2 μM
FK-A2 $C_{19}H_{26}N_4O_6S_2$ MW:472.58		0.045 μM	4.8 μM
FK-A3 $C_{20}H_{30}N_4O_6S_2$ MW:486.61		0.0042 μM	3.2 μM
FK-A4 $C_{20}H_{30}N_4O_6S_2$ MW:486.61		0.34 μM	2.1 μM
FK-A5 $C_{26}H_{34}N_4O_6S_2$ MW:562.70		0.0025 μM	1.6 μM
FK-A6 $C_{26}H_{34}N_4O_6S_2$ MW:562.70		0.019 μM	2.9 μM

10

20

30

40

H D A C 1 及び H D A C 6 に対する IC_{50} の比は、心臓に対する影響を起こすリスクと関連があると考えられている。いずれの類縁体も、F K 2 2 8 と比較して、そのようなリスクが低いことが期待される。

【 0 0 4 6 】

2. デブシペプチド類化合物の合成

その後の実験に使用した F K 2 2 8 及び F K 2 2 8 類縁体は、全て、本発明者の東北薬科大学医薬合成教室の加藤正教授のグループによって公知の技術にしたがって合成されたものを D M S O に溶解して用いた。

各化合物の合成経路及び詳しい合成方法は、図 1 及び Narita et al. Chemistry-A European Journal 15, 11174-11186 (2009) (非特許文献 2 2) ; Takizawa et al. Chemical Communication, 1677-1679 (2008) (非特許文献 2 3) ; Takizawa et al. Heterocycles 76, 275-290 (2008) (非特許文献 2 4) に記載のとおりである。

【 0 0 4 7 】

図 1 を参照して説明すると、まず、段階 (A) において、側鎖 R^1 を有するアルデヒド誘導体に酢酸エチルを反応させて、付加体を得た。段階 (B) において、その付加体の水酸基の保護、アミノ基の脱保護及びエステル交換を順次行い、アミノエステル誘導体を生じさせた。段階 (C) において、そのアミノエステル誘導体とシステインから調製したカルボン酸誘導体を縮合させて、ペプチド誘導体 (I) を得た。

段階 (D) において、文献既知のカルボン酸誘導体と側鎖 R^2 を有するアミノ酸エステル誘導体を縮合させて、ペプチド誘導体 (II) を得た。

段階 (E) において、上記で得られた 2 種類のペプチド誘導体 (I) 及び (II) を縮合させて、トリペプチド誘導体を得た。段階 (F) において、分子内ラクトン化、ジスルフィド結合形成、水酸基の脱保護を順次行い、デブシペプチド類化合物の合成を行った。

一方、段階 (G) において、従来を経路を用いて調製可能な側鎖 R^1 及び R^3 を有するトリペプチド誘導体とカルボン酸誘導体 (II) を縮合させて、テトラペプチド誘導体を生じさせた。段階 (H) において、分子内ラクトン化、ジスルフィド結合形成、水酸基の脱保護を順次行い、デブシペプチド類化合物の合成を完了した。

【 0 0 4 8 】

3. F K 2 2 8 及び類縁体のインビトロでの P I 3 K 阻害活性の評価

F K 2 2 8、S P - 1、S P - 2、S P - 3、F K - A 1、F K - A 2、F K - A 3、F K - A 4、F K - A 5、F K - A 6 及び S P - 5 の計 1 1 種類の化合物について、2 0 μ M の濃度における P I 3 K 阻害活性の評価を行った。

【 0 0 4 9 】

P I 3 K (p 1 1 0 / p 8 5) 阻害活性は、カルナバイオサイエンス社 (神戸) に委託し、基質とリン酸化基質をキャピラリー中の移動度で分離・定量するモビリティ シフト アッセイ法で評価した (<https://www.carnabio.com/japanese/product/search.cgi?mode=profiling>)。各化合物を、2 1 nM P I 3 K、1 0 0 0 nM ホスファチジルイノシトール、5 0 μ M A T P、5 mM M g C l ₂ とともにアッセイバッファー (2 0 mM H E P E S、2 mM D T T、2 5 μ M コール酸ナトリウム (sodium cholate)、7 5 mM N a C l、2 0 μ M カンタリジン (cantharidine)) に混和し、室温で 5 時間反応させた後、モビリティ シフト アッセイを行った。試験は 2 回繰り返して行った。

阻害率は、以下のようにして計算した：

コントロールとして、キナーゼ反応を M S A (モビリティ シフト アッセイ) で算出された産生物 / 基質 + 産生物の値で評価し、それを 0 % 阻害率とした。そこに薬剤が添加された場合の産生物 / 基質 + 産生物の値を同様に算出し、コントロール値との差から阻害率を算出した。

【 0 0 5 0 】

その結果を図 2 A に表す。いずれの化合物についても P I 3 K に対する直接阻害活性が認められた。その中で、S P - 5、F K - A 1、F K - A 2、F K - A 3、F K - A 5、F K - A 6 については、F K 2 2 8 よりも高い阻害率が示され、最も強い阻害活性が認め

られた F K - A 5 では、66.8%の P I 3 K 活性阻害率であった。

【0051】

次に、最も阻害活性の強かった F K - A 5 及び元の化合物である F K 2 2 8 について、P I 3 K に対する 50% 阻害濃度 (I C₅₀) を測定し、L Y 2 9 4 0 0 2 と比較した。結果を図 2 B、C 及び D に示す。

【0052】

F K 2 2 8 及び F K - A 5 は、濃度依存性に P I 3 K 活性を阻害した。L Y 2 9 4 0 0 2、F K 2 2 8、F K - A 5 の I C₅₀ は、それぞれ 0.7 μM、57.1 μM、26.2 μM であった。F K 2 2 8 は 5 ~ 500 μM、F K - A 5 は 1 ~ 300 μM の範囲で阻害活性が観察された。また、F K - A 5 の方が F K 2 2 8 よりも強く P I 3 K を阻害することがわかった。

10

なお、F K 2 2 8 の P I 3 K の阻害曲線において 10 μM での阻害率は 6.5% であった (図 2 C)。

【0053】

これらの結果から、類縁体の間でその阻害活性に差があるものの、F K 2 2 8 及びそのすべての類縁体について、P I 3 K 阻害活性が示された。

【0054】

上記のとおり、F K 2 2 8 及びその類縁体において、最も P I 3 K 阻害活性が強かったのが F K - A 5、次が F K - A 6 であった (図 2 B)。F K - A 5 と F K - A 6 とは立体異性体であり、7 位にベンジル (フェニルメチル) 基が付いている特徴的な構造をもつ (表 2)。この特徴が、F K 2 2 8 と比べ、F K - A 5 と F K - A 6 とが高い阻害活性をもたらすことに寄与している可能性がある。

20

【0055】

4. P I 3 K - F K 2 2 8 ドッキングシュミレーション

従来の P I 3 K 阻害剤は、すべて p 1 1 0 触媒サブユニットの A T P 結合部位に結合するとされている (非特許文献 27: Walker et al. Molecular Cell 6, 909-919 (2000))。F K 2 2 8 も同じように A T P 結合部位に結合するかを検証した。

【0056】

ドッキングシュミレーションは、シュミレーションソフトウェアとして商品名「e H i T S」(Simulated Biomolecular Systems) を使い、鑄型となる P I 3 K の立体構造として P I 3 K (p 1 1 0 H 1 0 4 7 R / p 8 5) - w o r t m a n n i n の複合体の結晶構造データ (Protein Data Bank Identification Code: 3HHM) を利用して行われた。F K 2 2 8 は、細胞内に取り込まれた後、細胞内の還元作用によりジスルフィド結合が切断され、その結果生成したチオール基が H D A C の活性中心の垂鉛と配位して H D A C 阻害作用を発揮することが明らかにされている (非特許文献 12: Furumai et al. Cancer Res 62, 4916 (2002))。したがって、細胞内で P I 3 K を阻害する場合においても F K 2 2 8 は還元型であると予測し、P I 3 K とのドッキングモデルにおいても還元型の F K 2 2 8 の構造を用いた。ドッキングモデルは候補モデルのうち、ソフトウェア上で構造の妥当性を評価するスコアが最も高いものを採用した。

30

【0057】

その結果、還元型の F K 2 2 8 は、p 1 1 0 の A T P 結合部位に深く入りこみ、チオールやイソプロピルをポケットの奥に差し込む形で結合するものと予測された。

このことは、上記 3. に記載した実験において、異なる A T P 濃度条件下 (50 μM 及び 500 μM) で F K 2 2 8 の P I 3 K 阻害活性を測定することにより確認された。結果を図 2 E に示す。F K 2 2 8 の P I 3 K 阻害活性は、高濃度の A T P 存在下で低減した。標準的 A T P 濃度 (50 μM) 及び高 A T P 濃度 (500 μM) での I C₅₀ 値は、それぞれ 57.2 μM 及び 125.0 μM であった。これらの結果は、F K 2 2 8 が A T P 競合的な P I 3 K 阻害剤であること、すなわち A T P 結合部位に結合することを示唆する。

40

【0058】

5. ウェスタンブロッティングによる A K T 経路の抑制の評価

50

P T E N が欠失しており、P I 3 K の下流の A K T が恒常的に活性化している P C 3 (前立腺がん) 細胞を用いて (非特許文献 28 : Grunwald et al. Cancer Res 62, 6141 (2002))、F K 2 2 8 及び F K - A 5 による A K T のリン酸化の抑制を評価した。

【0059】

P C 3 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより入手した。細胞は、非働化したウシ胎児血清を 10% の濃度で含んだ R P M I 1 6 4 0 培地を用いて、5% C O₂ 存在下、37℃ で培養した。

【0060】

ウェスタンブロットリングは、以下のようにして行った。各化合物で処理を行った各種の細胞を回収後、リシスバッファー (Lysis buffer : 500mM T r i s - H C l pH 7 . 5、100mM N a C l、2mM E D T A、1mM オルトバナジン酸ナトリウム (sodium orthovanadate)、1% N P - 4 0、1% プロテアーゼインヒビターカクテル (Protease Inhibitor cocktail、SIGMA-ALDRICH社製) で溶解し、遠心後上清を回収した。サンプルを 12.5% のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、P V D F 膜 (Immobilon-FL, millipore) に転写した。

【0061】

一次抗体として以下のものを用いた。抗 A K T 抗体 (「total A K T」又は「A K T」)、抗リン酸化 A K T (S e r - 4 7 3) 抗体 (「p - A K T (S 4 7 3)」)、抗リン酸化 A K T (T h r - 3 0 8) 抗体 (「p - A K T (T 3 0 8)」)、抗リン酸化 G S K - 3 (S e r - 9) 抗体 (「p - G S K - 3」)、抗リン酸化 m T O R (S e r - 2 4 4 8) 抗体 (「p - m T O R」)、抗リン酸化 p 7 0 S 6 K (T h r - 3 8 9) 抗体 (「p - p 7 0 S 6 K」)、抗リン酸化 4 E - B P 1 (T h r - 3 7 / 4 6) 抗体 (「p - 4 E B P 1」)、抗リン酸化 M E K 1 / 2 (S e r - 2 1 7 / 2 2 1) 抗体 (「p - M E K 1 / 2」)、抗リン酸化 E R K 1 / 2 (T h r - 2 0 2 / T y r - 2 0 4) 抗体 (「p - E R K 1 / 2」) (以上、すべてポリクローナル抗体、Cell Signaling Technology)、抗 α -アクチンモノクローナル抗体 (Sigma Aldrich)。

二次抗体としては、商品名「Alexa Fluor680IgG」(Invitrogen)を用いた。商品名「Odyssey Infrared Imaging system」(LI-COR)を用いて目的とするタンパク質の発現を検出した。

【0062】

まず、化合物を作用させてからの時間経過によるリン酸化 A K T の変化を検討した。結果を図 3、パネル A に示す。

L Y 2 9 4 0 0 2 と同様に、F K 2 2 8、F K - A 5 とともに 5 分から 1 8 0 分という短時間で、全 A K T の発現レベルは変化させずに、リン酸化 A K T (S e r - 4 7 3、T h r - 3 0 8) の発現レベルを減少させた。

【0063】

次に、F K 2 2 8、F K - A 5 の濃度の変化による A K T 及び A K T 経路の下流分子のリン酸化の変化を検討した。化合物の作用時間は 1 8 0 分とした。結果を図 3、パネル B に示す。

【0064】

F K 2 2 8、F K - A 5 とともに、濃度依存的にリン酸化 A K T (S e r - 4 7 3、T h r - 3 0 8)、さらにそのシグナル伝達経路の下流の、リン酸化 G S K - 3 (S e r - 9)、リン酸化 m T O R (S e r - 2 4 4 8)、リン酸化 p 7 0 S 6 K (T h r - 3 8 9)、リン酸化 4 E - B P 1 (T h r - 3 7 / 4 6) の発現レベルを抑制した。また、R A S - M A P 経路のリン酸化 M E K 1 / 2 は抑制されなかったが、リン酸化 E R K 1 / 2 はやや抑制された。

【0065】

また、この結果においては、10 μ M の濃度で、リン酸化 A K T (S 4 7 3)、(T 3 0 8) の発現レベルは、コントロールと比べてそれぞれ 66% 又は 86% 減少している。これは、図 2 A のデータが過小評価されている可能性があることを示すものである。すな

10

20

30

40

50

わち、インビトロのPI3K阻害活性の評価系においては、還元剤を含んでいたものの、細胞内での還元力には及ばず、活性をもつ還元型FK228の割合が少なかった可能性が考えられる。

【0066】

以上から、FK228、FK-A5がPI3Kの阻害を介してAKT経路を抑制することが示された。また、リン酸化ERK1/2を阻害することから、これらの化合物が、PI3K以外に、他のキナーゼに対する阻害活性をも有するか、又は他のタンパク質の作用を介してERK1/2を阻害する可能性が示唆された。

【0067】

6. FK228及びFK-A5の殺細胞効果の評価

FK228は、HDAC1に対して1.6~3.6nMのIC₅₀をもつ強力なHDAC阻害剤であり(非特許文献12:Furumai et al. Cancer Res 62, 4916 (2002); 非特許文献22:Narita et al. Chemistry-A European Journal 15, 11174-11186 (2009))、多くのヒトがん細胞株に対してnMの範囲で50%成長阻害を發揮することが示されている。ここまでの実験結果より、FK228及びFK-A5がPI3K阻害活性を示すのはμMの範囲であるため、HDAC阻害剤に抵抗性の細胞を用いてFK228及びFK-A5の殺細胞効果を検討した。

【0068】

用いたヒト培養細胞は、大腸がん(HCT116、CO115、RKO)の細胞株であった。HCT116及びRKOは、American Type Culture Collection(ATCC)より、それぞれ入手した。CO115は、John M. Mariadason(Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia)より入手した。細胞は、非働化したウシ胎児血清を10%の濃度で含んだRPMI1640培地を用いて、5%CO₂存在下、37℃で培養した。

【0069】

HCT116、RKO、CO115はいずれもマイクロサテライト不安定性(microsatellite instability; MSI)陽性の細胞であり、HCT116はHDAC阻害剤感受性であるが、RKO及びCO115はHDAC阻害剤に抵抗性である。RKO及びCO115については、HDAC2両対立遺伝子のエクソン1にあるA₉(アデニンの9回繰り返し)配列にフレームシフト変異が生じた結果、HDAC2タンパクが欠失しており、HDAC2の機能喪失によってアポトーシスプロテアーゼ活性化因子1(apoptotic protease-activating factor 1; APAF1)発現レベルの上昇をもたらされ、それによりアポトーシス制御異常が生じるため、HDAC阻害剤であるTSA、SAHAに抵抗性になっていることが報告されている(非特許文献29:Ropero et al. Nature 200, 6; 非特許文献30:Hanigan et al. Gastroenterology 135, 1654-1664. e1652 (2008))。そこで、まず、ウェスタンブロットによってこれらの細胞におけるHDACの発現レベルを確認した。

【0070】

一次抗体として抗HDAC2モノクローナル抗体(Cell Signaling Technology)(「HDAC2」)又は抗HDAC1ポリクローナル抗体(Santa Cruz)(「HDAC1」)を使用したこと以外は、基本的に上記と同様にしてウェスタンブロットティングを行った。

【0071】

その結果を図4Aに示す。従来報告と異なり、RKO、CO115においてもHDAC2の弱い発現が認められた。RKOについては、HDAC2の発現にバリエーションがあることが報告されている(非特許文献31:Ree et al., Nature Genetics 40, 812-813 (2008))。HDAC1はいずれの細胞においても発現が認められたが、CO115での発現レベルはやや低かった。

【0072】

次に、HCT116、RKO、CO115細胞を用いて、MTTアッセイにより殺細胞効果を検討した。

10

20

30

40

50

【0073】

各種の細胞を 8×10^3 cells/well の密度で 96 穴プレートに播き、24 時間の前培養の後、LY294002 (50 μ M)、SAHA (Cayman Chemical Company より購入; 2.5 μ M)、LY294002 (50 μ M) + SAHA (2.5 μ M) の併用、FK228 又は FK-A5 (それぞれ 5 nM、50 nM、500 nM、5 μ M 又は 50 μ M)、FK228 又は FK-A5 (それぞれ 5 nM、50 nM 又は 500 nM) + LY294002 (50 μ M) の併用を含んだ培地に置き換えてさらに培養した。

【0074】

24 時間後に商品名「Cell counting kit-8」(同仁化学研究所)を用いて生細胞数を評価した。このキットは、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を発色試薬として用いており、WST-8 は細胞内脱水素酵素によりホルマゼンを生じる。ホルマゼン色素量と生細胞数は比例関係にあり、ホルマゼンの 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(商品名「SpectraMax M2e」、Molecular devices)で測定し、生細胞数を計測した。

10

【0075】

結果を図 4 B, C 及び D に示す。

HDA C 阻害剤に感受性である HCT 116 細胞では、SAHA、低濃度(5 nM ~ 500 nM 程度のレベル)の FK228、FK-A5 により約 50% (43 ~ 70%) の細胞死を生じた。これに対し、RKO、CO115 細胞においては、HDA C 2 の弱発現が認められたものの、SAHA、50 nM 程度までの FK228 及び FK-A5 に対して抵抗性(6 ~ 15% の細胞死)であった。LY294002 に対してはいずれの細胞も感受性(50 ~ 60% の細胞死)であったが、SAHA と LY294002 との併用に対しては、HCT 116、RKO では殺細胞効果の増強(相加効果)が認められた一方、CO115 の場合は増強が認められなかった。

20

PI3K 阻害活性が発揮される高濃度(μ M レベル)の FK228 及び FK-A5 は、いずれの細胞においても極めて強く細胞数を減少させた。

【0076】

また、低濃度の FK228 又は FK-A5 と LY294002 との併用については、RKO 及び CO115 細胞では相乗効果が認められたが、高濃度(5 μ M)の単独の FK228 及び FK-A5 よりは低い殺細胞効果であった(図 4 B)。

【0077】

これらの結果から、HDA C 阻害剤に抵抗性の細胞に対しても、高濃度(μ M レベル)の FK228 及び FK-A5 は極めて強い殺細胞効果を示し、高濃度において発揮される PI3K 阻害活性が殺細胞効果を増強している可能性が示唆された。

30

【0078】

7. FK228 及び FK-A5 による細胞死の解析及びアポトーシス誘導に関する評価
FK228 及び FK-A5 の投与による細胞死の特徴を解析するため、まず、細胞周期解析として FACS 解析(fluorescence-activated cell sorting analysis)を行った。

HCT 116 細胞を 6 穴プレートに 2×10^5 個ずつ播き、24 時間の前培養後、各薬剤存在下でさらに 24 時間培養し、SAHA、LY294002、FK228、FK-A5 を上記 6. に記載した実験と同条件で作用させた。細胞を回収し、エタノールで固定後、ヨウ化プロピジウム / PBS 溶液で染色し、商品名「Cytomics FC500 Flow Cytometry System」(Beckman Coulter)を用いて解析した。細胞周期分画は商品名「Multicycle software」(Phenix Flow Systems)を用いて算出した。

40

【0079】

結果を図 5 A、B 及び C に示す。HDA C 阻害剤は、p21^{WAF1} の発現の上昇を介して細胞周期停止を誘導するが(非特許文献 32: Xu et al. Oncogene 26, 5541-5552 (2007))、HDA C 阻害剤の濃度や細胞の種類の違いにより G1/S 期と G2/M 期のどちらを優位に停止させるかについてはさまざまな報告がある(非特許文献 33: Richon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 10014 (2000); 非特許文献 34: Nakajima et al. Exp. Cell Res. 241, 126-133 (1998); 非特許文献 35: Kumagai et al. Int. J. of Cancer 1

50

21, 656-665 (2007))。

【 0 0 8 0 】

本実験においては、S A H A は H C T 1 1 6 細胞に対して著明な G 2 / M 期の停止を誘導した。低濃度の F K 2 2 8 及び F K - A 5 も、S A H A と同様に G 2 / M 期優位の細胞周期の停止を誘導した (図 5 A ~ C)。

【 0 0 8 1 】

一方、L Y 2 9 4 0 0 2 については、G 0 / G 1 期の停止を引き起こし、アポトーシス誘導は弱いことが示されているが、本実験においても L Y 2 9 4 0 0 2 は H C T 1 1 6 細胞に対して G 0 / G 1 期での停止を誘導した (図 5 A ~ C)。S A H A + L Y 2 9 4 0 0 2 の併用、低濃度の F K 2 2 8 及び F K - A 5 + L Y 2 9 4 0 0 2 の併用については、s u b G 1 分画が 2 0 ~ 4 0 % と著明に増加し、強いアポトーシスが誘導された (図 5 A ~ C)。

10

【 0 0 8 2 】

これに対し、高濃度 (5 μ M) の F K 2 2 8 及び F K - A 5 は、単独で強いアポトーシス (s u b G 1 分画 3 6 ~ 3 7 %) を誘導し、D N A ヒストグラムは、S A H A + L Y 2 9 4 0 0 2 の併用、低濃度の F K 2 2 8、F K - A 5 + L Y 2 9 4 0 0 2 の併用の場合と類似の結果を示した (図 5 A 及び B)。細胞周期分画の解析においても、高濃度の F K - A 5 の場合は、S A H A や低濃度の F K - A 5 + L Y 2 9 4 0 0 2 の併用の場合の分画と類似していた (図 5 C)。

【 0 0 8 3 】

以上から、高濃度 (μ M レベル) の F K 2 2 8 及び F K - A 5 が細胞周期に与える影響及び誘導されるアポトーシスは、H D A C 阻害剤と P I 3 K 阻害剤とを併用した場合に類似することが示された。

20

【 0 0 8 4 】

また、F K 2 2 8 による細胞死がアポトーシス誘導によるものであることをさらに確認するために、S A H A (2 . 5 μ M)、図に示した濃度の F K 2 2 8 で処理したサンプルを用い、一次抗体として抗 P A R P - 1 / 2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) (「 P A R P 」)、抗リン酸化 (p) A K T 抗体 (S 4 7 3) (Cell signaling) (「 p A K T S 4 7 3 」)、抗 A K T 抗体 (「 t o t a l A K T 」)、抗アセチル化ヒストン H 3 抗体 (Upstate) (「 A c e t y l a t e d H 3 」)、抗アセチル化ヒストン H 4 抗体 (Upstate) (「 A c e t y l a t e d H 4 」) を使用したこと以外は、基本的に上記と同様にしてウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロットでは、H C T 1 1 6 細胞を所定濃度の S A H A、F K - 2 2 8 で 2 4 時間処理し、P A R P、c l e a v e d P A R P、リン酸化 A K T (S 4 7 3)、A K T、アセチル化ヒストン H 3、アセチル化ヒストン H 4 の発現について解析した。

30

【 0 0 8 5 】

結果を図 5 D に示す。F K 2 2 8 によるアポトーシス誘導は、H C T 1 1 6 細胞における C l e a v e d P A R P の増加によって裏付けられた。F C A S 解析の結果と同様、C l e a v e d P A R P は高濃度の F K 2 2 8 (5 μ M) で最も増加し、強いアポトーシス誘導が示された。また、このとき同時に、高濃度の F K 2 2 8 (5 μ M) はリン酸化 A K T を抑制し、アセチル化ヒストンの発現を増加させていたことも判明した。

40

【 0 0 8 6 】

以上より、高濃度 (μ M レベル) の F K 2 2 8 及び F K - A 5 は、強力にアポトーシスを誘導し、その際には H D A C と P I 3 K の二重阻害剤としての活性を発揮していることが示された。

【 0 0 8 7 】

8 . デブシペプチド類化合物の合成 (2)

上記 2 . と同様にして、さらにデブシペプチド類化合物 F K - A 7 ~ A 1 3 及び F K - A 1 7 を合成し、特性を調べた。表 3 に、それらの化合物の構造式、及び上記 3 . と同様にして測定した P I 3 K (p 1 1 0 / p 8 5) に対する 5 0 % 阻害濃度 (I C ₅₀) を

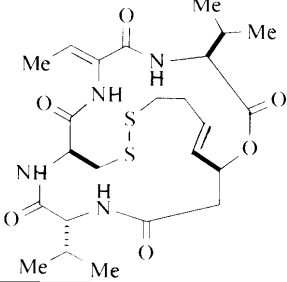
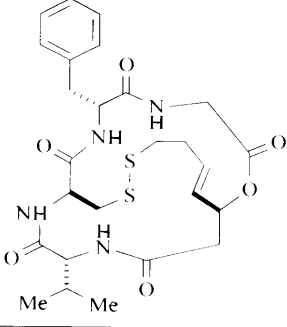
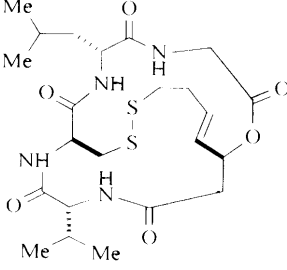
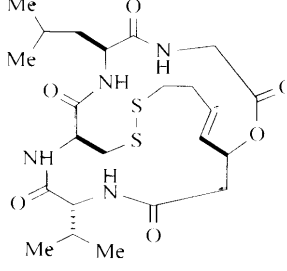
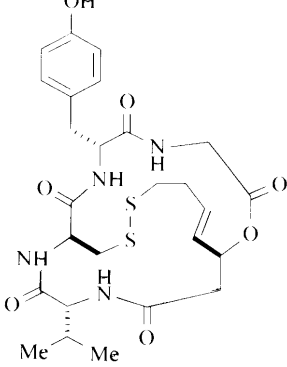
50

、比較のためFK228、SAHA、LY294002とともに示す。表3中、FK228、SAHAのHDAC1に対する50%阻害濃度(IC₅₀)は、文部科学省がん特定領域研究・統合がん化学療法基盤情報支援班により評価された。

【0088】

表3： FK-A7～A13、A17の構造式及びPI3K、HDAC1に対する50%阻害濃度(IC₅₀)

【表 3 - 1】

化合物	構造式	PI3K IC50	HDAC1 IC50
FK228		57.1 μ M	3.6 nM
FK-A5		27.3 μ M	2.5 nM
FK-A7		32.2 μ M	未評価
FK-A8		44.7 μ M	未評価
FK-A9		14.1 μ M	未評価

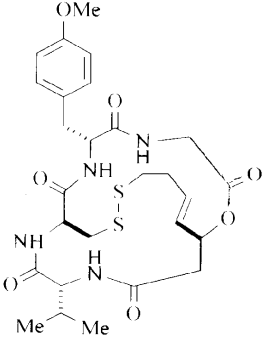
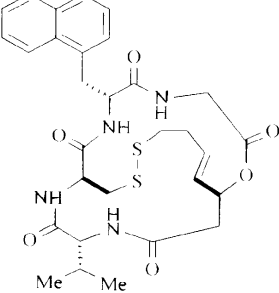
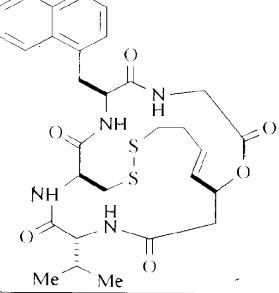
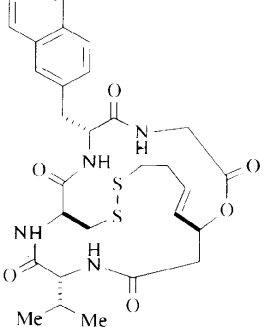
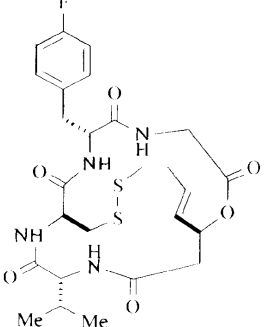
10

20

30

40

【表 3 - 2】

化合物	構造式	PI3K IC50	HDAC1 IC50
FK-A10		26.7 μ M	未評価
FK-A11		6.7 μ M	未評価
FK-A12		7.2 μ M	未評価
FK-A13		8.5 μ M	未評価
FK-A17		20.2 μ M	未評価

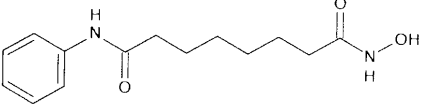
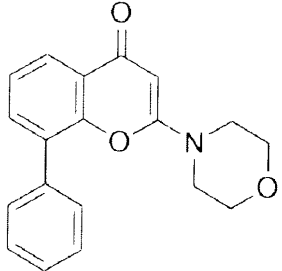
10

20

30

40

【表 3 - 3】

化合物	構造式	PI3K IC50	HDAC1 IC50
SAHA		未評価	221nM
LY294002		0.7 μM	未評価

10

20

【0089】

9. FK-A11 についての、ウェスタンブロッティングによる AKT 経路の抑制の評価

上記 5. と同様にして、FK-A11 による AKT のリン酸化の抑制を評価し、FK-A5、FK228 と比較した。ただし、作用時間は 180 分とし、一次抗体としては、抗リン酸化 AKT (Ser-473) 抗体 (「p-AKT (S473)」)、抗リン酸化 AKT (Thr-308) 抗体 (「p-AKT (T308)」)、抗 AKT 抗体 (「AKT」)、抗 - アクチンモノクローナル抗体 (「B-actin」) を使用した。

【0090】

結果を、図 6 に示す。FK-A11 については、FK228、FK-A5 よりも低濃度で、AKT のリン酸化を抑制することが示された。

30

【0091】

10. FK-A11 の殺細胞効果の評価

上記 6. と同様にして、MTT アッセイにより FK-A11 の殺細胞効果を検討した。ただし、ヒト培養細胞としては、大腸がん (HCT116、CO115、RKO) の細胞株、及び正常細胞として非腫瘍性線維芽細胞株 KMST6 を使用し、FK-A11 は、5 nM、50 nM、500 nM、5 μM 又は 50 μM で使用した。

【0092】

結果を図 7 A ~ D に示す。

HCT116、RKO 細胞では、低濃度 (5 nM ~ 500 nM 程度のレベル) の FK-A11 により顕著な細胞死を生じた。これに対し、HDAC 阻害剤に対して抵抗性である CO115 細胞においては、50 nM 程度までの FK-A11 に対して抵抗性であったが、PI3K 阻害活性が発揮されると推測される 500 nM からは強い細胞死を生じた。一方、その濃度においては、非がん細胞である KMST6 は顕著な細胞死を生じなかった。

40

【0093】

FK228、FK-A5、FK-A11 の結果の比較を図 8 A ~ C に示す。

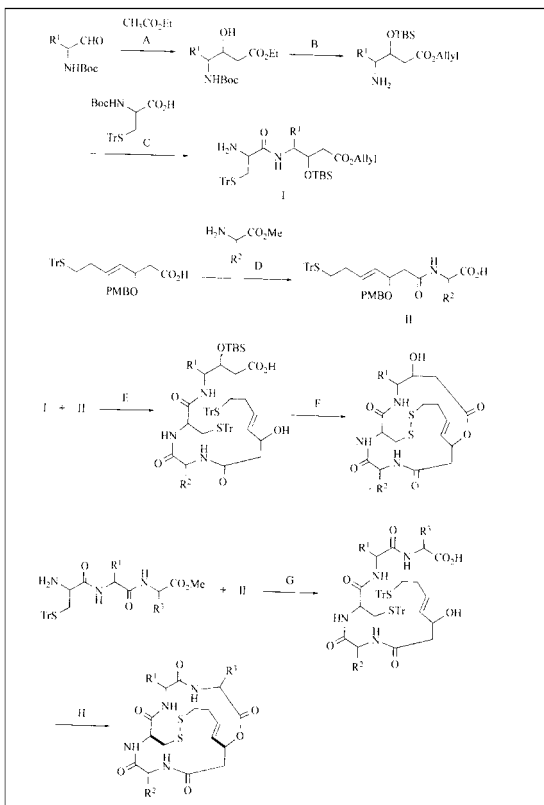
これらの結果から、p110 に対する阻害活性が非常に強い FK-A11 は、いずれのがん細胞株に対しても、FK228、FK-A5 よりも強力な細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

【0094】

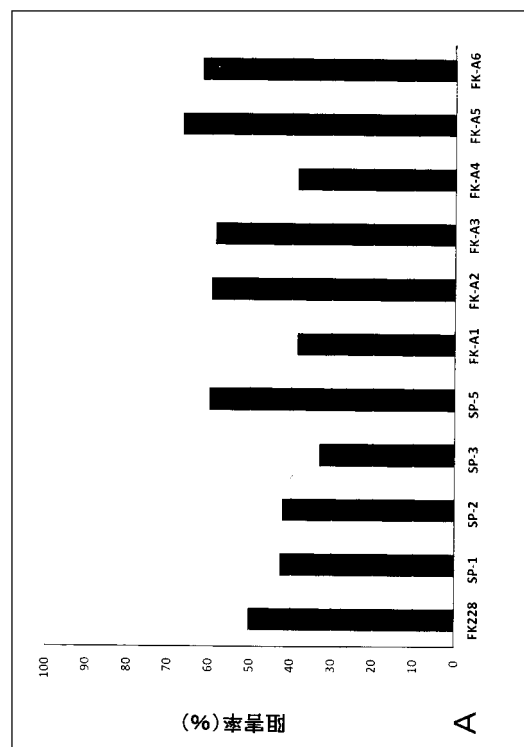
50

この出願は、平成23年9月30日出願の日本特許出願、特願2011-217378に基づくものであり、特願2011-217378の明細書及び特許請求の範囲に記載された内容は、すべてこの出願明細書に包含される。

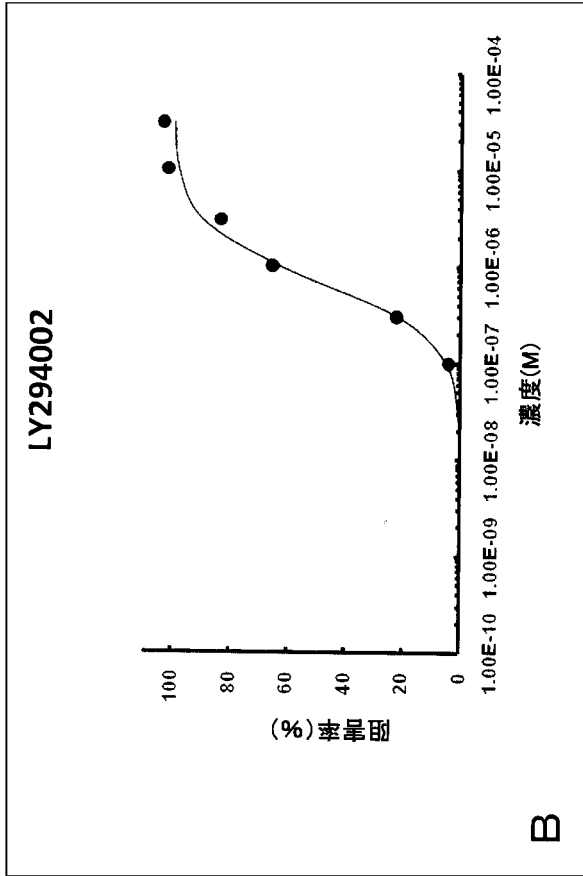
【図1】



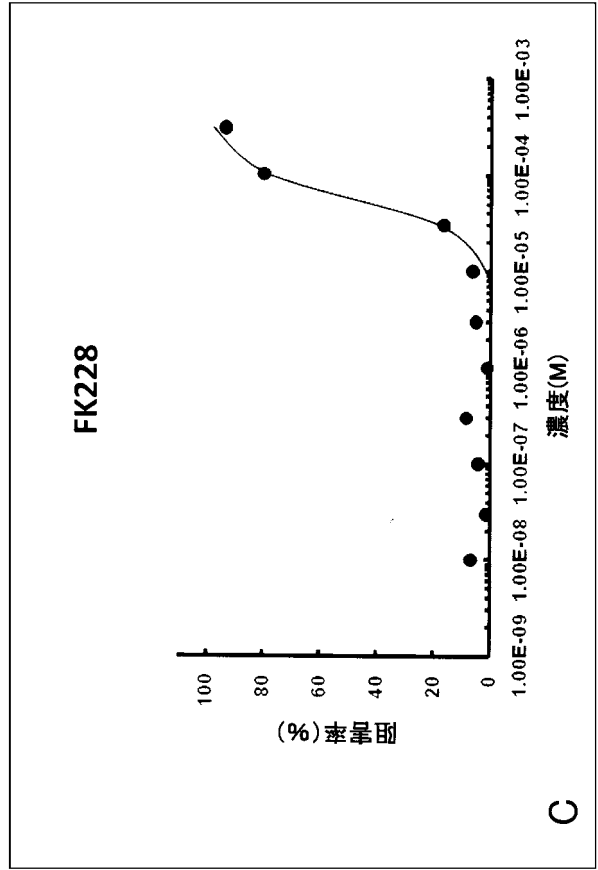
【図2A】



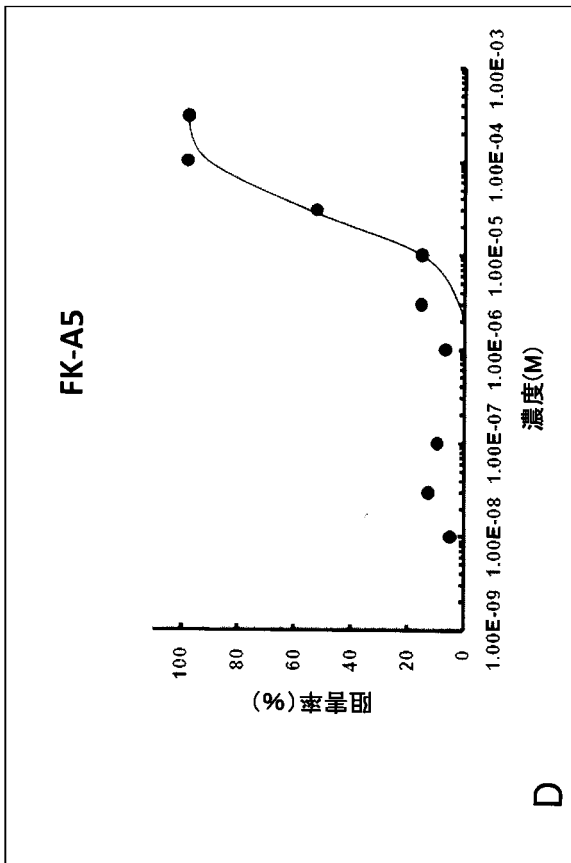
【 図 2 B 】



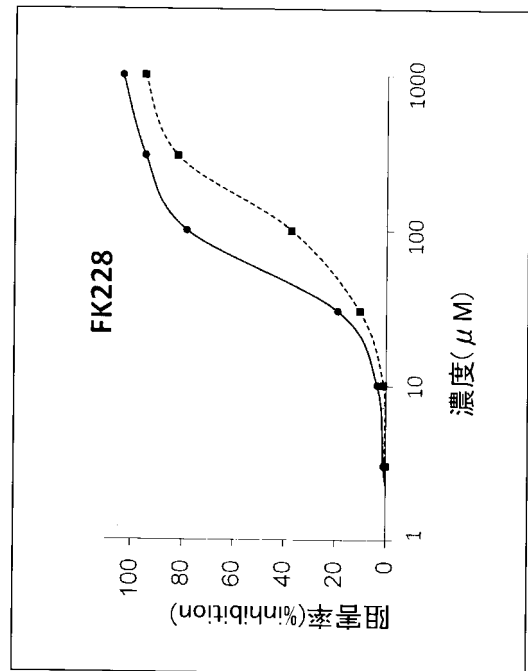
【 図 2 C 】



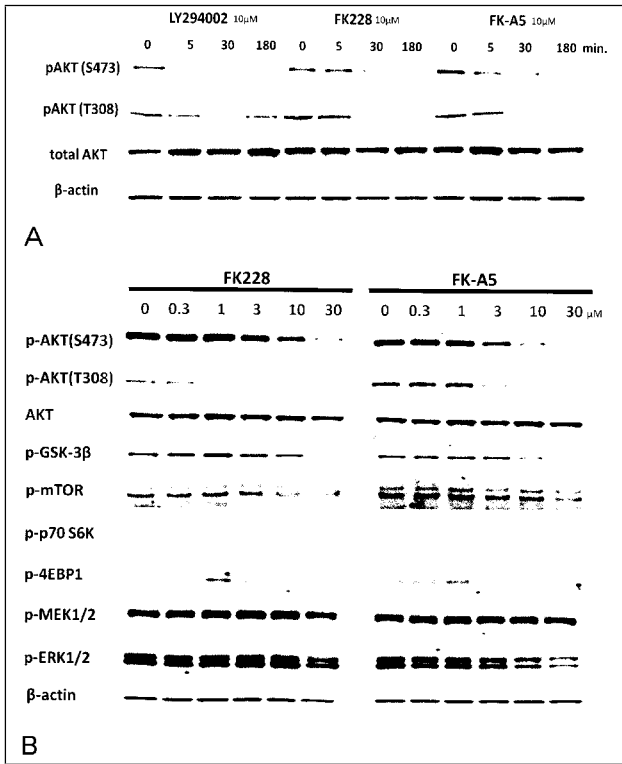
【 図 2 D 】



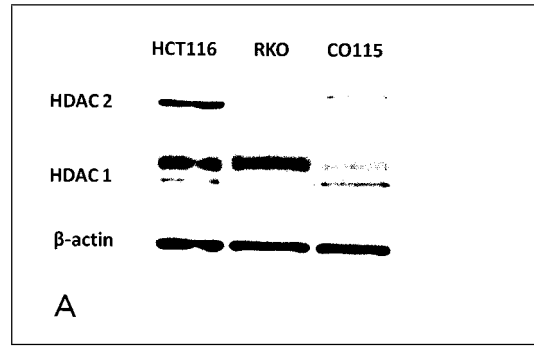
【 図 2 E 】



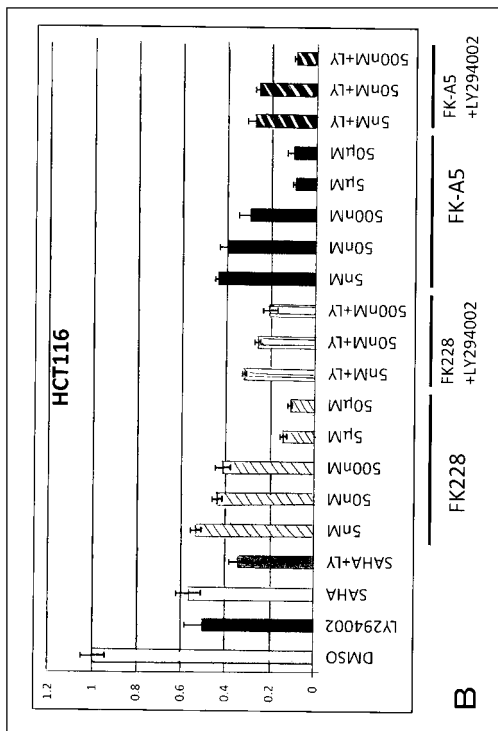
【 図 3 】



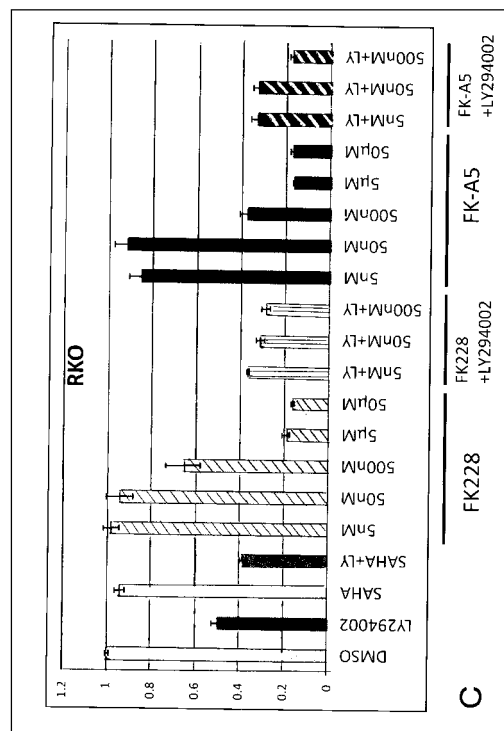
【 図 4 A 】



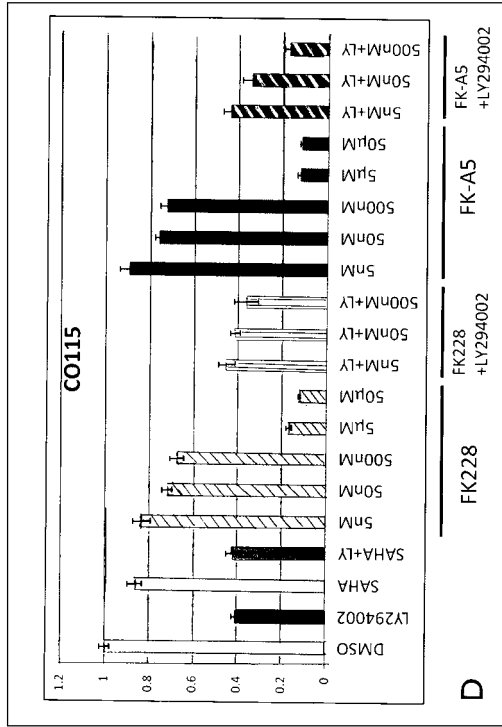
【 図 4 B 】



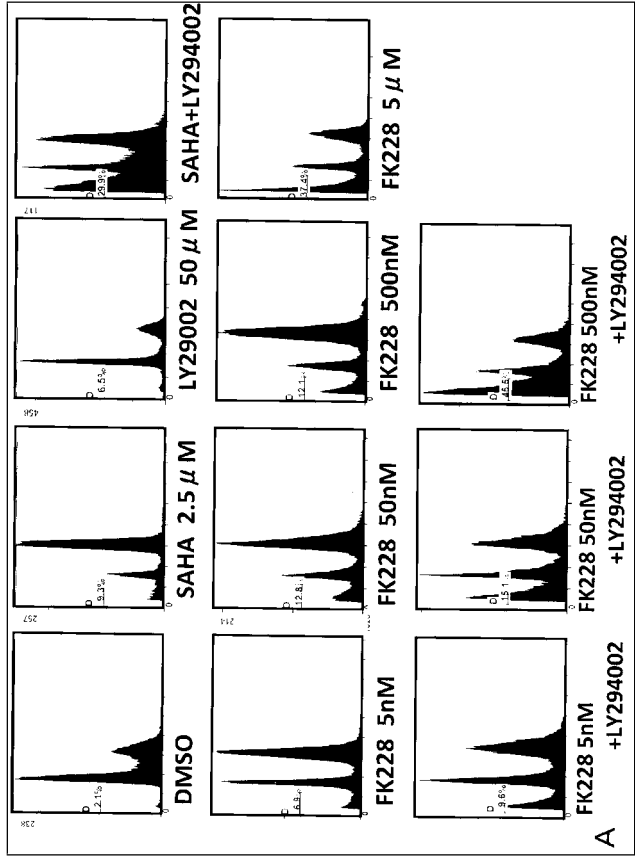
【 図 4 C 】



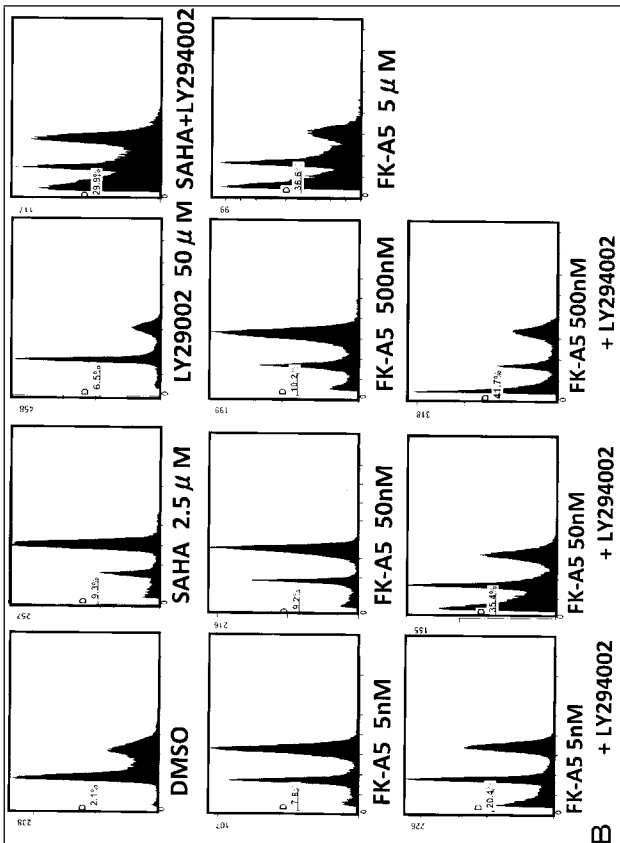
【 図 4 D 】



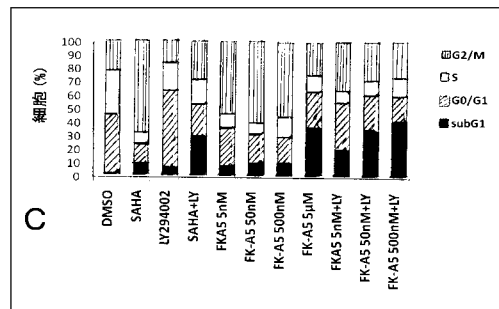
【 図 5 A 】



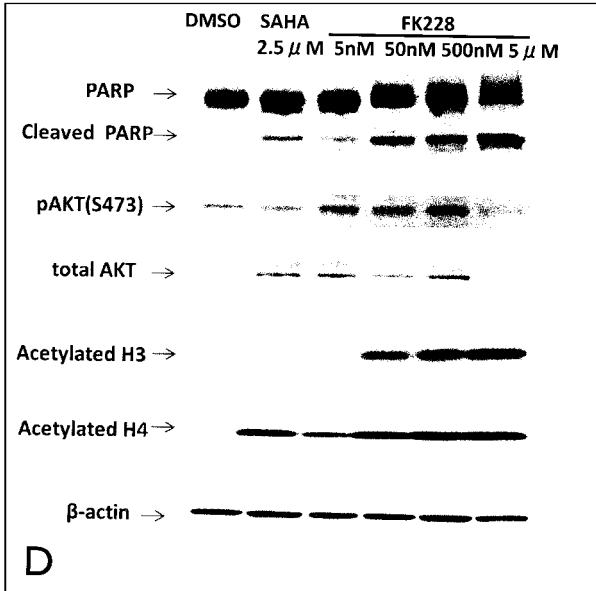
【 図 5 B 】



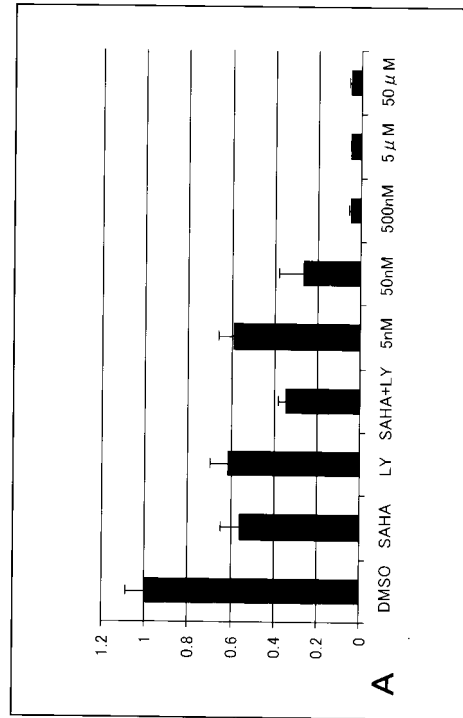
【 図 5 C 】



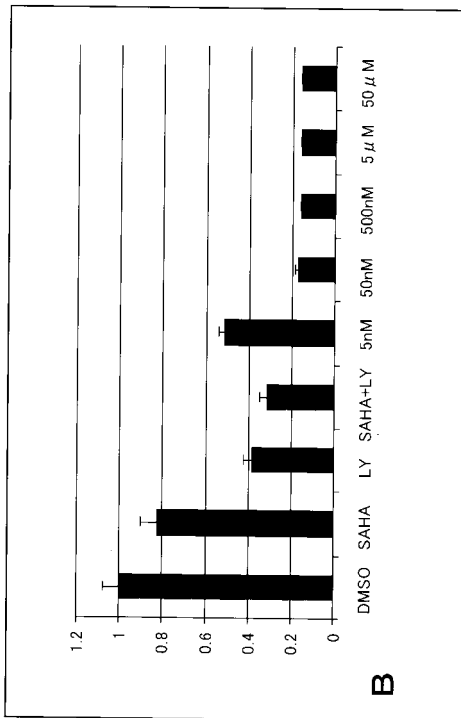
【 図 5 D 】



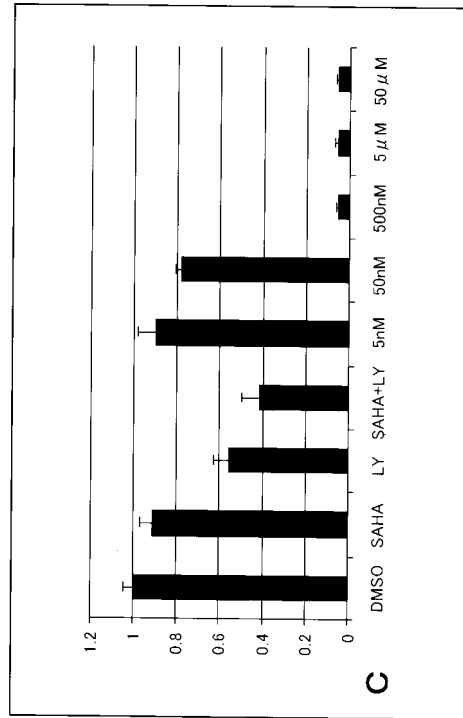
【 図 7 A 】



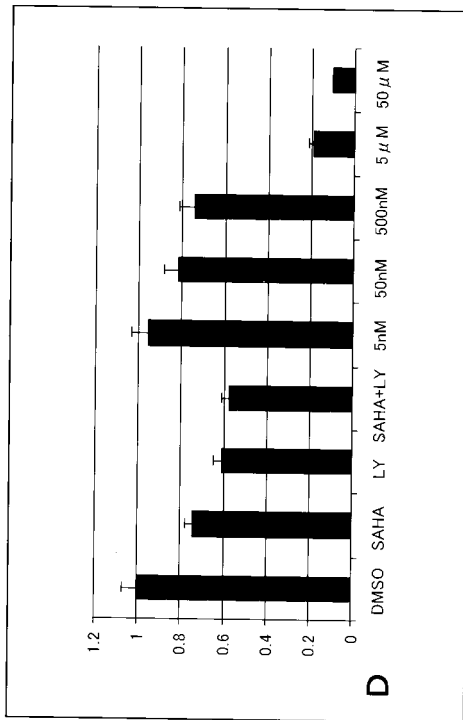
【 図 7 B 】



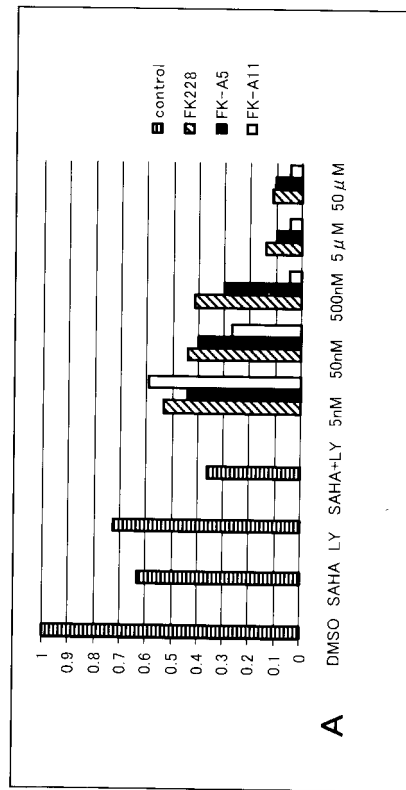
【 図 7 C 】



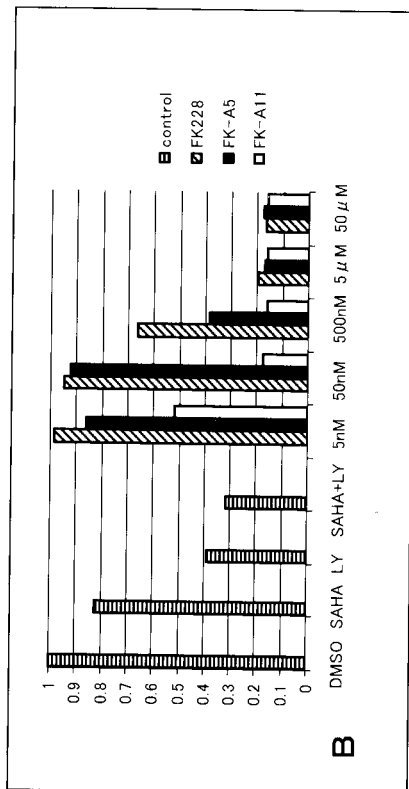
【 7 D 】



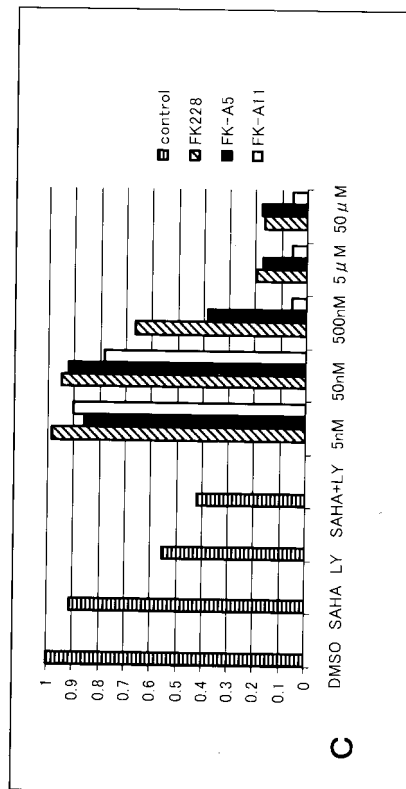
【 8 A 】



【 8 B 】



【 8 C 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/074542
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K38/00(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) A61K38/00, 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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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.
X	Hirokawa Y. et al., Signal therapy of NF1-deficient tumor xenograft in mice by the anti-PAK1 drug FK228., Cancer Biology & Therapy, Vol.4, No.4, 2005, pages 379 to 381, ISSN: 1538-4047	1, 4-6
X	Hiroshi MARUTA et al., "Kazokusei Shuyo to Genome Shinkei Sen'ishusho (NF) no Signal Ryoho", Genome Medicine, 2004, vol.4, no.2, pages 185 to 192, ISSN: 1346-4671	1, 4-6
X	JP 2008-542347 A (University of Southampton), 27 November 2008 (27.11.2008), entire text; particularly, paragraph [0259] & WO 2006/129105 A1 & EP 1888097 A1 & US 2009/0131390 A1	4-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 05 November, 2012 (05.11.12)		Date of mailing of the international search report 20 November, 2012 (20.11.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/074542

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Wang C. et al., Thailandepsins: bacterial products with potent histone deacetylase inhibitory activities and broad-spectrum antiproliferative activities., Journal of Natural Products, [online] doi:10.1021/np200324x, 2011.07.27, Retrieved from the internet: < http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200324x > (Vol.74, No.10, pages 2031 to 2038)	4-7
X	JP 2003-516418 A (Xcyte Therapies, Inc.), 13 May 2003 (13.05.2003), paragraphs [0023] to [0031] & WO 2001/042282 A1 & EP 1246839 A1 & US 2002/0045575 A1	7
A	JP 2010-510300 A (Karus Therapeutics Ltd.), 02 April 2010 (02.04.2010), & WO 2008/062201 A1 & EP 2089415 A1 & US 2010/0056435 A1	1-7
A	Masahiro KOTANI et al., "Haisengan Baiyo Saibokabu ni Okeru FK228 (FR901228) no Akt Yokusei Sayo to amrubicin tonu Sojo Koka", Japanese Journal of Lung Cancer, 2003, vol.43, no.5, page 581, P-389	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 4 5 4 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K38/00(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. A61K38/00, 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				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
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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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									
X	Hirokawa Y. et al., Signal therapy of NF1-deficient tumor xenograft in mice by the anti-PAK1 drug FK228., Cancer Biology & Therapy, Vol.4, No.4, 2005, pages 379 to 381, ISSN: 1538-4047	1, 4-6									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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		の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 05.11.2012		国際調査報告の発送日 20.11.2012									
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) 小森 潔	4U 3762								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3439									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 4 5 4 2
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
X	丸田浩他, 家族性腫瘍とゲノム 神経線維腫症 (NF) のシグナル療法, ゲノム医学, 2004, Vol.4, No.2, pages 185 to 192, ISSN: 1346-4671	1,4-6
X	JP 2008-542347 A (ユニバーシティ、オブ、サウサンプトン) 2008.11.27, 文献全体、特に、【0259】 & WO 2006/129105 A1 & EP 1888097 A1 & US 2009/0131390 A1	4-7
X	Wang C. et al., Thailandepsins: bacterial products with potent histone deacetylase inhibitory activities and broad-spectrum antiproliferative activities., Journal of Natural Products, [online] doi:10.1021/np200324x, 2011.07.27, Retrieved from the internet: < http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np200324x > (Vol.74, No.10, pages 2031 to 2038)	4-7
X	JP 2003-516418 A (エクサイト セラピーズ, インコーポレイテッド) 2003.05.13, 【0023】～【0031】 & WO 2001/042282 A1 & EP 1246839 A1 & US 2002/0045575 A1	7
A	JP 2010-510300 A (カルス セラピューティクス リミテッド) 2010.04.02, & WO 2008/062201 A1 & EP 2089415 A1 & US 2010/0056435 A1	1-7
A	小谷昌広他, 肺腺癌培養細胞株における FK228 (FR901228) の Akt 抑制作用と amrubicin との相乗効果, 肺癌, 2003, Vol.43, No.5, page 581, P-389	1-7

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, PA, 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

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA16 BA26 BA27 CA59 MA31 MA32
 MA35 MA36 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA57 MA58 MA59
 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB262 ZB272 ZC202
 4H045 AA10 AA30 BA32 EA20 FA20

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。