

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6643764号
(P6643764)

(45) 発行日 令和2年2月12日(2020.2.12)

(24) 登録日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(51) Int. Cl.		F I
A 6 1 K 31/438	(2006.01)	A 6 1 K 31/438
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 D 221/20	(2006.01)	C 0 7 D 221/20

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2016-20586 (P2016-20586)	(73) 特許権者	304019399 国立大学法人岐阜大学 岐阜県岐阜市柳戸1番1
(22) 出願日	平成28年2月5日(2016.2.5)	(74) 代理人	100118706 弁理士 青山 陽
(65) 公開番号	特開2017-137270 (P2017-137270A)	(72) 発明者	桑田 一夫 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐 阜大学内
(43) 公開日	平成29年8月10日(2017.8.10)	(72) 発明者	アリ フェルダウシ 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐 阜大学内
審査請求日	平成31年1月27日(2019.1.27)	審査官	谷合 正光

最終頁に続く

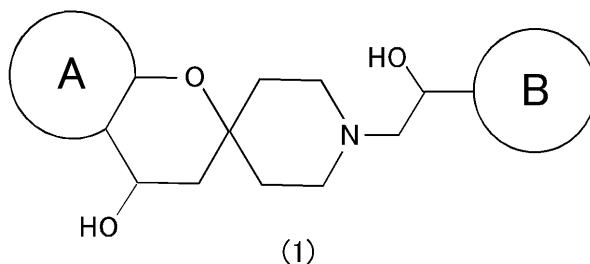
(54) 【発明の名称】 抗がん剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記化学式(1)で示される化合物(ただし、式中の置換基Aはハロゲン元素、及びアルキル基のいずれか1種以上で修飾されていてもよいフェニル基、又はナフチル基を示し、置換基Bはアルキル基又はアルコキシ基で修飾されていてもよい芳香族置換基を示す。)、又はその薬学上許容される塩、水和物、若しくは溶媒和物からなるピペリジン誘導体を有効成分として含む抗がん剤。

【化1】



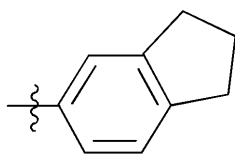
【請求項2】

前記置換基Aはフェニル基、クロロフェニル基、フルオロフェニル基、トリル基、クロロトリル基、キシリル基、及びナフチル基のいずれかである請求項1記載の抗がん剤。

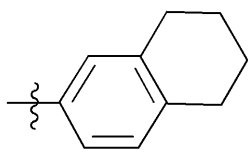
【請求項3】

前記置換基 B はフェニル基、アルキルフェニル基、アルコキシフェニル基、ナフチル基、並びに下記構造式 (a), (b), (c) 及び (d) で示される置換基のいずれかである請求項 1 又は 2 に記載の抗がん剤。

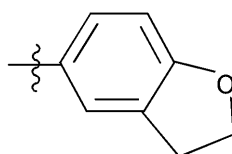
【化 2】



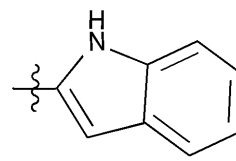
(a)



(b)



(c)



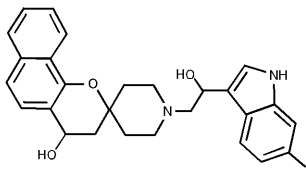
(d)

10

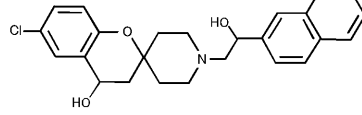
【請求項 4】

下記化学式 (2) ~ (18) のいずれかで示される化合物、又はその薬学上許容される塩、水和物、若しくは溶媒和物を有効成分として含む抗がん剤。

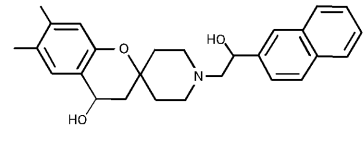
【化3】



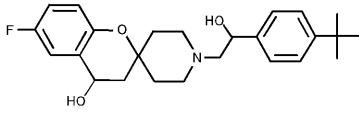
(2)



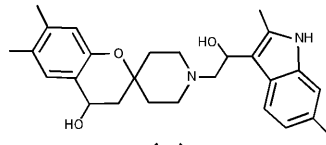
(3)



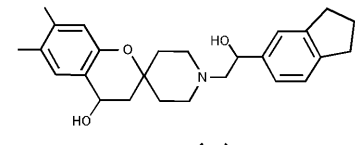
(4)



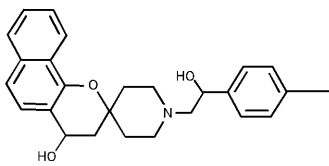
(5)



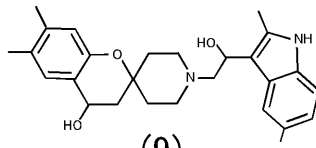
(6)



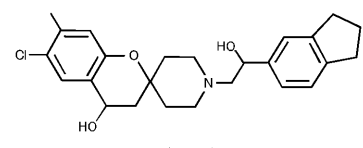
(7)



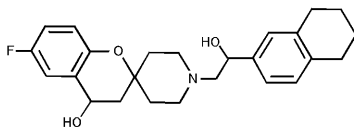
(8)



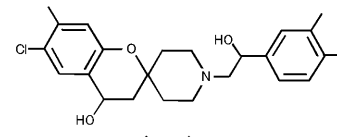
(9)



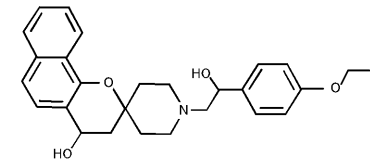
(10)



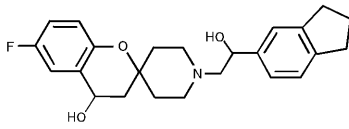
(11)



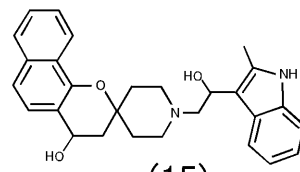
(12)



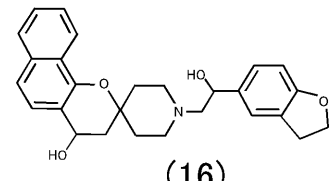
(13)



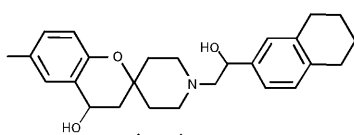
(14)



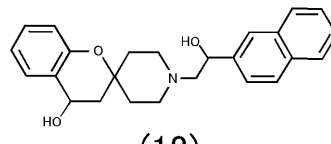
(15)



(16)



(17)



(18)

10

20

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん細胞の増殖を抑制する抗がん剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、分子レベルでの発がん機構の解明が進み、発がん機構に密接に関与しているシグナル伝達分子を標的とした、いわゆる分子標的薬剤の開発が盛んに行われている。シグナル伝達分子は、正常細胞では発現がほとんど認められないのに対して、がん細胞では発現が亢進しており、がん細胞の増殖過程において必須の役割を果たしていると言われてい

50

。この現象を利用し、シグナル伝達分子と強い相互作用を行う分子標的薬剤を見つけることにより、多くの抗がん剤が開発されてきた（例えば特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2011-16754

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、がん細胞の増殖を抑制することができる、新たな抗がん剤を提供することを解決すべき課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0005】

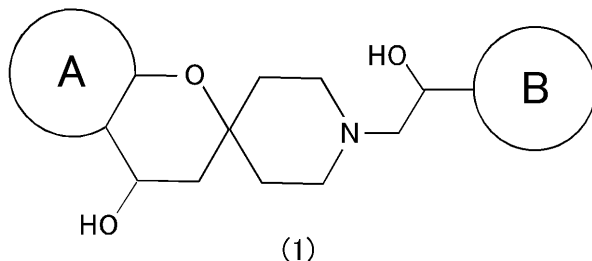
Pygopusファミリーは、ヒストンのメチル化修飾部位に特異的に結合したり、ヒストンメチル化酵素と結合してヒストンのメチル化を促したりするタンパク質である。したがって、クロマチン修飾の“読み込み”および“書き込み”を同時に行うタンパク質であり、遺伝子の再生において重要な役割を担っている。その中でもPygopus2 (Pygo2) は哺乳動物において機能的に重要な役割を果たしており、その全身性のノックアウトマウスは胎生致死である。またPygo2の発現レベルは正常細胞では低く、がん細胞では高い。これはPygo2が β -cateninを介して腫瘍形成を促進するためである。こうした事実から、本発明者らは、新たな抗がん剤を見出すための分子標的として、クロマチン制御タンパク質であるPygo2を選択し、その結合ポケットに焦点を当て、計算機によるドッキングシミュレーションにより多数の化合物の効果を調べた。その結果、Pygo2の結合ポケットに強く結合する、一連のピペリジン誘導体を見出した。そして、さらに、それらのピペリジン誘導体が、がん細胞に対する抗がん作用を示すことを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0006】

すなわち、本発明の抗がん剤は、下記化学式(1)で示される化合物（ただし、式中の置換基Aはハロゲン元素、及びアルキル基のいずれか1種以上で修飾されていてもよいフェニル基、又はナフチル基を示し、置換基Bはアルキル基で修飾されていてもよい芳香族置換基を示す。）、又はその薬学上許容される塩、水和物、若しくは溶媒和物からなるピペリジン誘導体を有効成分として含むことを特徴とする。ここで、下記化学式(1)で示される化合物は、この化学式(1)で表現される限りにおいて、ラセミ体のみならず光学異性体やその他の各種異性体も含む概念である。

【0007】

【化1】



【0008】

また、前記置換基Aとしては、フェニル基、クロロフェニル基、フルオロフェニル基、トリル基、クロロトリル基、キシリル基、及びナフチル基のいずれかとすることができる。

【0009】

さらに、前記置換基Bとしては、フェニル基、アルキルフェニル基、アルコキシフェニル基、ナフチル基、並びに下記構造式(a), (b), (c)及び(d)で示される置換基

10

20

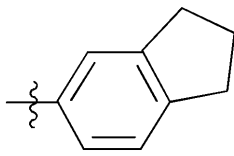
30

40

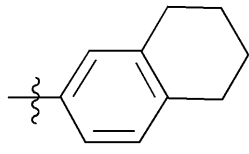
50

のいずれかとすることができる。

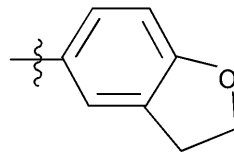
【化2】



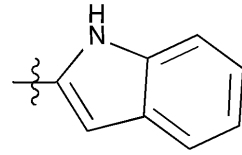
(a)



(b)



(c)



(d)

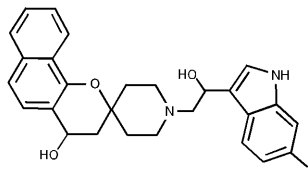
10

【0010】

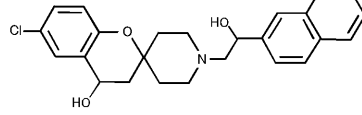
本発明において、好ましい抗がん剤は、下記化学式(2)～(18)のいずれかで示される化合物、又はその薬学上許容される塩、水和物、若しくは溶媒和物を有効成分として含む抗がん剤である。これらの中でも、さらに好ましいのは下記化学式(2)～(7)、(9)～(12)及び(17)(さらに、さらに好ましいのは下記化学式(2)、(3)、(5)、(10)、(11)及び(12))のいずれかで示される化合物、又はその薬学上許容される塩、水和物、若しくは溶媒和物を有効成分として含む抗がん剤である。特に化学式(2)で示される化合物は、ヒト由来の肺がん細胞やヒト由来の結腸がん細胞に対して優れた増殖抑制効果を奏しており、肺がんや結腸がんに対する抗がん剤として好適である。

20

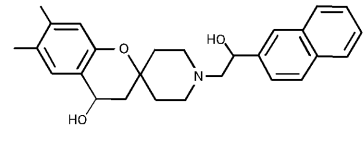
【化3】



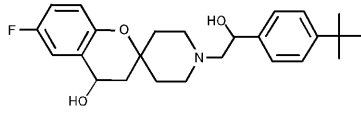
(2)



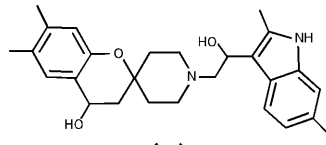
(3)



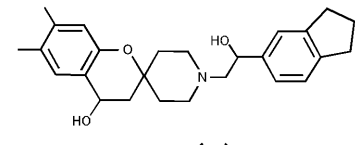
(4)



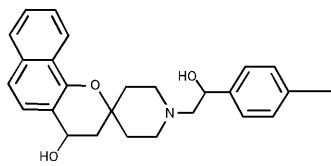
(5)



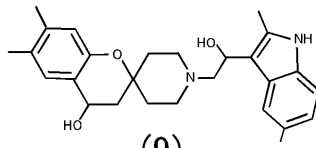
(6)



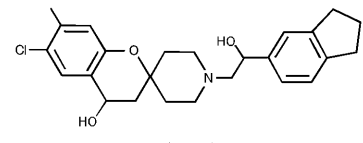
(7)



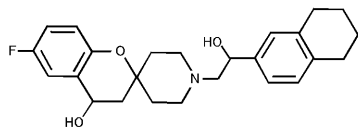
(8)



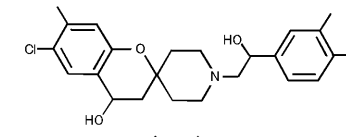
(9)



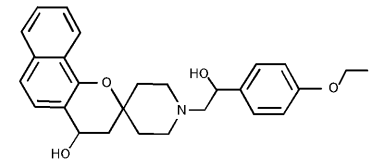
(10)



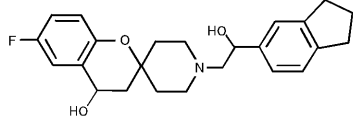
(11)



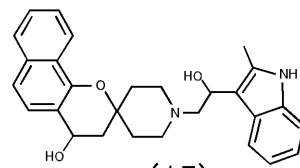
(12)



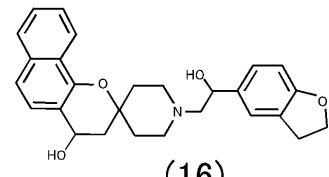
(13)



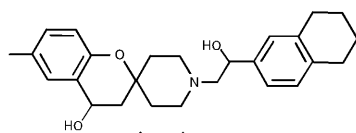
(14)



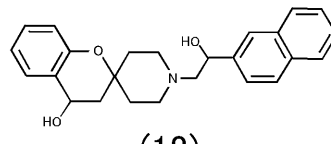
(15)



(16)



(17)



(18)

10

20

30

40

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明者らが、新たな抗がん剤を見出すための分子標的として選択したPygo2の立体構造を図1に示す。このPygo2において、ヒストンのメチル化修飾を制御しているのはPHD1ドメインであるため、この部位をターゲットとして、計算機によるドッキングシミュレーションにより多数の化合物の効果を調べた。計算を行うためのプログラムとしては、ドッキングシミュレーションプログラムであるAutoDock Vina、分子動力学計算プログラムであるAmber、量子化学計算プログラムであるPAICSを実装した、統合創薬プログラム「NAGARA」を用いた（どちらも岐阜大学人獣感染防御研究センターで開発されたプログラムである（MOLECULAR SCIENCE 5, NP0015 (2011)参照。）。「PAICS

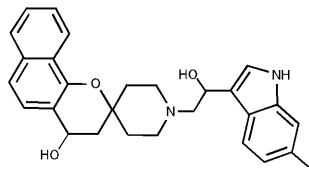
50

」ではフラグメント分子軌道 (FMO) 法を利用しており、これによりタンパク質のような巨大分子の量子化学計算を行うことができる。また、「NAGARA」では、粗視化モデル計算や分子動力学計算を用いてターゲットの座標を準備し、PAICSを使って量子化学計算を実行するという一連の作業を、それぞれのタスクを繋いでワークフローを構築するという形で、簡便かつ統一的に行うことができる。

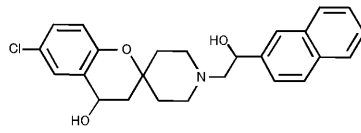
【 0 0 1 2 】

スクリーニングには *in silico* バイチャルリガンドスクリーニングシステムを用いた。検索するリガンドのデータベースとしては、LigandBoxデータベースのAsinexサブセット (データ蓄積量: 360,000種類の化合物) を用いた。Pygo2のPHDフィンガードメインを標的とし、2XB1 (PDBコード) のC鎖をドッキング部位として選択した。格子のサイズは36 angstrom × 35 angstrom × 33 angstrom、格子の中心は-17.5、-19.6、6.7とした。Auto Dock Vinaのパラメータは以下のように設定した: exhaustiveness=8、最大結合モード数=20、エネルギーレンジ=4 kcal/mol。その他のパラメータはデフォルト値に設定した。その結果、Pygo2のPHD1ドメインに結合する化合物として、下記の実施例1～実施例17のピペリジン誘導体が見出された。

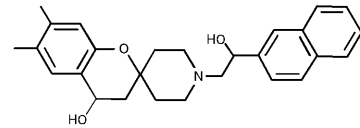
【化4】



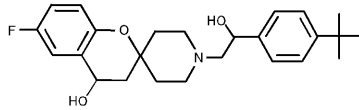
実施例1



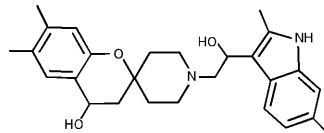
実施例2



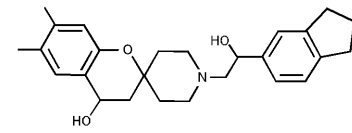
実施例3



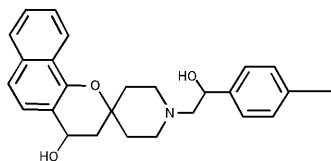
実施例4



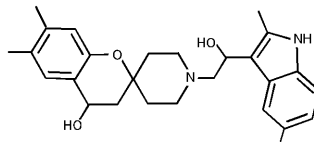
実施例5



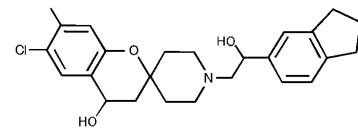
実施例6



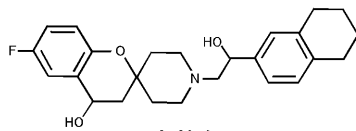
実施例7



実施例8



実施例9



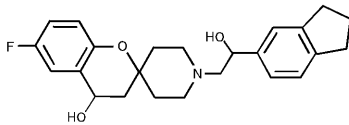
実施例10



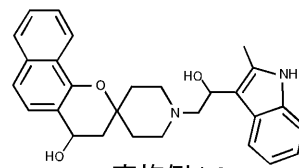
実施例11



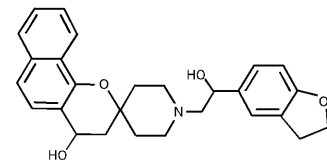
実施例12



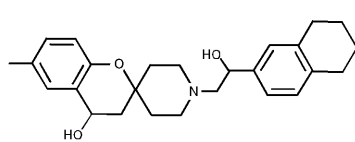
実施例13



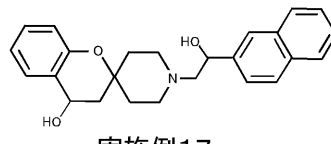
実施例14



実施例15



実施例16



実施例17

【0013】

<各ピペリジン誘導体の調製>

実施例1～実施例17のピペリジン誘導体は、ASINEX社の販売経路によって入手した市販品をそのまま用いた。

【0014】

- 評価 -

上記実施例1のピペリジン誘導体について、以下に示す「がん細胞を用いた増殖抑制試験」、「正常繊維芽細胞に対する細胞毒試験」及び「ヌードマウスを用いた異種移植試験」を行った。なお、「がん細胞を用いた増殖抑制試験」については、比較例1として「crizotinib」、比較例2として「ICG001」、比較例3として「staurosporine」の各抗がん

10

20

30

40

50

剤についても試験を行った。以下、詳述する。

【0015】

<がん細胞を用いた増殖抑制試験>

ヒト由来の肺がん細胞であるA549細胞を、10%ウシ胎児血清を加えたDulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地中、37℃、5%CO₂条件下で培養した。細胞は96ウェルプレートに播種し24時間前培養した。実施例1及び比較例1～3 (A549細胞では比較例1及び2、HCT116細胞では比較例2及び3)の各化合物を加え、72時間培養後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて細胞数を測定した。ネガティブコントロールとしてDimethyl sulfoxide (DMSO) を、ポジティブコントロールとしてStaurosporine、Crizotinib、ICG001を使用した。また、IC₅₀についてはGraph Pad Prism 6.0 for windows (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA., USA) を使用して計算した。

10

同様の試験をヒト由来の結腸がん細胞であるHCT116細胞についても行った。

【0016】

その結果、肺がん細胞A549に対する抗がん効果については、図2に示すように、IC₅₀については、市販の抗がん剤である比較例1 (crizotinib) では9.664、比較例2 (ICG001) では8.031であるのに対し、実施例1では4.868となり、優れた細胞増殖の抑制効果を奏することが分かった。また、結腸がん細胞HCT116に対する抗がん効果についても、図3に示すように、実施例1では2.345、比較例2 (ICG001) では3.812、比較例3 (staurosporine) では0.01631となり、優れた細胞増殖の抑制効果を奏することが分かった。なお、比較例3 (staurosporine) のIC₅₀は0.01631と極めて低い値であるが、IC₅₀以上の濃度においては増殖抑制効果がそれほど増大せず、実施例1のピペリジン誘導体の方が優れていた。

20

【0017】

<細胞毒性試験>

実施例1のピペリジン誘導体について正常細胞に対する毒性テストを行うために、線維芽細胞を用いた増殖抑制試験を行った。すなわち、ヒト繊維芽細胞 (2F0-C75) を、10%ウシ胎児血清を加えたDMEMで培養した。細胞を96ウェルプレートに播種し80%~90%コンフルエントになるまで前培養した。ここに実施例1のピペリジン誘導体を加え72時間培養後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて細胞数を測定した。

【0018】

その結果、図4に示すように、正常繊維芽細胞の増殖を抑制する効果は小さく、毒性は極めて低いことが分かった。このことから、実施例1のピペリジン誘導体の生体に対する安全性は高いことが示唆された。

30

【0019】

<ヌードマウスを用いた異種移植試験>

異種移植試験を行うために、6週齢のメスのBALB/cヌードマウス (日本エスエルシー株式会社) を使用した。マウスの腹側部に肺がん細胞であるA549細胞 (又は結腸がん細胞であるHCT116細胞) を接種し、腫瘍体積が平均230 mm³になったところで実施例1のピペリジン誘導体の投与を開始した。投与は1日1回、14日間行った。腫瘍の体積はtumor volume (mm³) = $\frac{1}{6}$ (length x height x width) として計算した。試験終了時にマウスを安楽殺し、腫瘍を摘出して病理組織標本を作成した。すべての試験は岐阜大学動物実験倫理審査委員会の許可のもとで行った。

40

また、比較例2 (ICG001) についても、同様の異種移植試験を行った。

【0020】

その結果、肺がん細胞A549を用いた異種移植試験では、図5に示すように、実施例1のピペリジン誘導体を投与した場合には、腫瘍の体積が顕著に小さくなった。これに対して比較例2 (ICG001) では、腫瘍の体積は当初は僅かに小さくなったものの、その後はほとんど変化がなかった。また、コントロールでは、腫瘍の体積が徐々に大きくなった。以上の結果から、実施例1のピペリジン誘導体は肺がんに対する抗がん剤として優れた効果を示すことが分かった。

50

【 0 0 2 1 】

一方、結腸がん細胞HCT116を用いた異種移植試験では、図6に示すように、実施例1のピペリジン誘導体及び比較例1（ICG001）を投与した場合には、腫瘍の体積はほとんど変わらず、結腸がん細胞HCT116の細胞増殖を抑制していることが分かった。これに対して、コントロールでは、腫瘍の体積が徐々に大きくなった。以上の結果から、実施例1のピペリジン誘導体は結腸がんに対する抗がん剤としても、比較例1（ICG001）と同程度の抗がん作用を奏することが示唆された。

【 0 0 2 2 】

< がん細胞を用いた増殖抑制試験 >

実施例2～17のピペリジン誘導体についても実施例1と同様の方法により、結腸がん細胞HCT116及び肺がん細胞A549を用いた増殖抑制試験を行った。増殖抑制試験の結果から得られた IC_{50} の値を実施例1の場合も含めて表1及び表2に示す。

10

【表1】

結腸がん細胞 HCT116 に対する IC_{50}

	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
実施例1	2.90	実施例1 1	15.02
実施例2	11.20	実施例1 2	30.66
実施例3	16.71	実施例1 3	37.47
実施例4	25.79	実施例1 4	48.94
実施例5	17.29	実施例1 5	35.14
実施例6	18.93	実施例1 6	15.72
実施例7	24.31	実施例1 7	42.92
実施例8	17.00		
実施例9	16.85		
実施例10	13.12		

20

30

【表 2】

肺がん細胞 A549 に対する IC₅₀

	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)		IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
実施例 1	3.40	実施例 1 1	20.45
実施例 2	11.20	実施例 1 2	24.52
実施例 3	18.47	実施例 1 3	20.36
実施例 4	9.83	実施例 1 4	52.30
実施例 5	33.30	実施例 1 5	45.03
実施例 6	35.14	実施例 1 6	36.02
実施例 7	48.94	実施例 1 7	65.02
実施例 8	30.66		
実施例 9	14.90		
実施例 1 0	37.15		

10

20

【0023】

上記表 1 から、実施例 1 ~ 1 7 のピペリジン誘導体は結腸がん細胞 HTC116 に対する増殖抑制効果を奏することが分かった。このなかでも高い増殖抑制効果を示したのは実施例 1 ~ 3、5、6、8 ~ 1 0 及び 1 5 のピペリジン誘導体であり、特に優れた増殖抑制効果を示したのは実施例 1、2、1 0 及び 1 1 であり、最も高い増殖抑制効果を示したのは、実施例 1 のピペリジン誘導体であった。

また、上記表 2 から、実施例 1 ~ 1 7 のピペリジン誘導体は肺がん細胞 A549 に対する増殖抑制効果も奏することが分かった。このなかでも高い増殖抑制効果を示したのは実施例 1、2 及び 4 のピペリジン誘導体であり、特に優れた増殖抑制効果を示したのは実施例 1 及び実施例 4 であり、最も高い増殖抑制効果を示したのは、実施例 1 のピペリジン誘導体

30

【0024】

この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】分子標的として選択した Pygo2 の立体構造を示す模式図である。

【図 2】肺がん細胞 A549 に対する抗がん効果を示すグラフである。

【図 3】結腸がん細胞 HCT116 に対する抗がん効果を示すグラフである。

40

【図 4】正常繊維芽細胞に対する実施例 1 の化合物の細胞毒性を示すグラフである。

【図 5】肺がん細胞 A549 のヌードマウスへの異種移植試験の結果を示すグラフである。

【図 6】結腸がん細胞 HCT116 のヌードマウスへの異種移植試験の結果を示すグラフである。

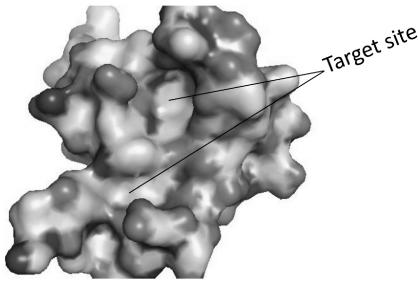
【産業上の利用可能性】

【0026】

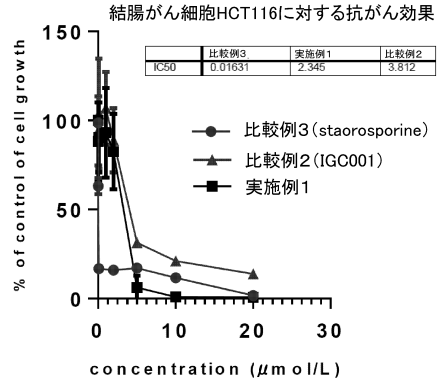
本発明の抗がん剤は、肺がん細胞 A549 や結腸がん細胞 HCT116 の増殖を抑制することから、抗がん剤あるいはそのリード化合物として利用できる。

【 図 1 】

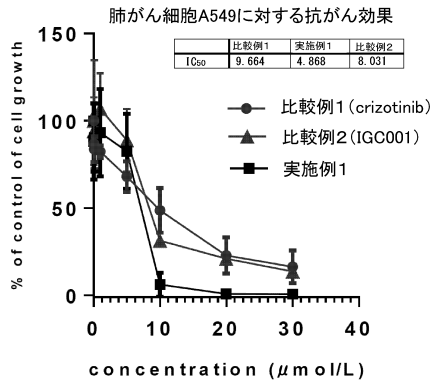
Pygopus2のPHD1ドメインの構造



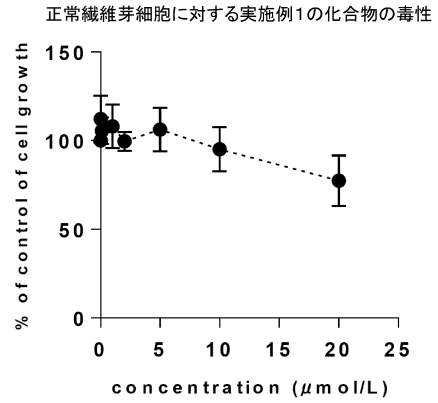
【 図 3 】



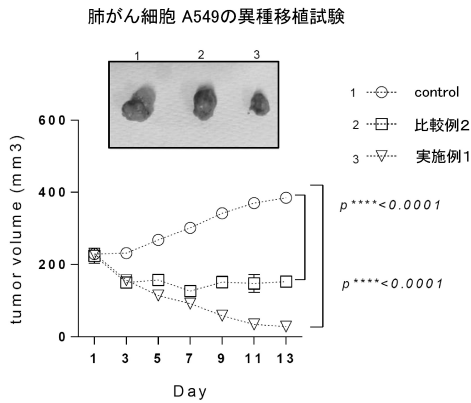
【 図 2 】



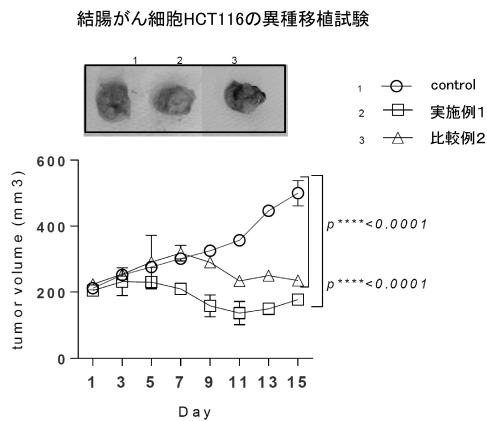
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2011-517317(JP,A)
特表2009-510073(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0310389(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/438
A61P 35/00
C07D 221/20
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MARPAT
/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)