

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6170908号  
(P6170908)

(45) 発行日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 0 7 D 4 9 3 / 2 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	C O 7 D	4 9 3 / 2 0	C S P
<b>A 6 1 K 3 1 / 3 6 5</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 K	3 1 / 3 6 5	
<b>A 6 1 P 3 5 / 0 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 P	3 5 / 0 0	
<b>A 6 1 P 4 3 / 0 0</b>	<b>( 2 0 0 6 . 0 1 )</b>	A 6 1 P	4 3 / 0 0	1 1 1

請求項の数 3 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2014-511223 (P2014-511223)  
 (86) (22) 出願日 平成25年4月16日 (2013.4.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/061333  
 (87) 国際公開番号 W02013/157555  
 (87) 国際公開日 平成25年10月24日 (2013.10.24)  
 審査請求日 平成28年4月12日 (2016.4.12)  
 (31) 優先権主張番号 特願2012-92842 (P2012-92842)  
 (32) 優先日 平成24年4月16日 (2012.4.16)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 504132272  
 国立大学法人京都大学  
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1  
 (74) 代理人 100130498  
 弁理士 佐野 禎哉  
 (72) 発明者 入江 一浩  
 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学  
 院農学研究科内  
 (72) 発明者 菊森 将之  
 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学  
 院農学研究科内  
 (72) 発明者 蒲池 弘明  
 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学  
 院農学研究科内

最終頁に続く

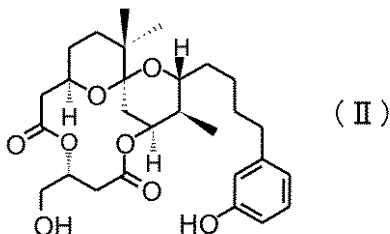
(54) 【発明の名称】 新規アブリシアトキシン誘導体及びそれを含有する抗がん剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式 ( I I )

【化2】

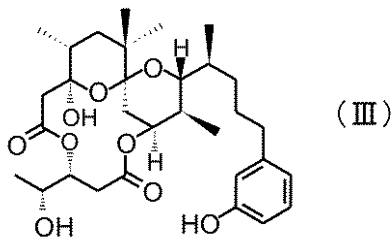


で表される新規アブリシアトキシン誘導体、又はその医薬上許容される塩。

【請求項2】

式 ( I I I )

## 【化3】



10

で表される新規アプリアトキシン誘導体、又はその医薬上許容される塩。

## 【請求項3】

請求項1又は2の何れかに記載の新規アプリアトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩のうち何れか1種又は複数種を有効成分として含有する抗がん剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、発がんプロモーターとして知られる海洋生物由来のアプリアトキシンの骨格構造を利用した単純化アナログから開発され、プロテインキナーゼCアイソザイム活性化能とヒトがん細胞増殖抑制活性を有しつつ、発がん促進作用を持たない、新規アプリアトキシン誘導体に関するものである。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

プロテインキナーゼC (PKC) は、細胞内伝達物質の鍵酵素であり、発がん、アルツハイマー病、エイズ等の難治性疾患の治療薬の標的酵素として注目されている。同時に、ホルボールエステルなどの発がん促進物質 (発がんプロモーター) の主要なターゲットでもある。

## 【0003】

発がんプロモーターは、発がん物質 (イニシエーター) により遺伝子レベルで障害を受けた潜在的腫瘍細胞をクローナルに増殖させ、最終的にがん細胞へと誘導する (発がん促進作用を有する) 化学物質の総称である。天然に存在する発がんプロモーターとしては、トウダイグサ科の植物由来のTPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) に代表されるホルボールエステル類、インゲノール-3-ベンゾエート (ingenol 3-benzoate) に代表されるインゲノールエステル類、放線菌由来のテレオシジンB-4 (teleocidine B-4) に代表されるテレオシジン類、海洋生物であるアメフラシの消化管から単離されたアプリアトキシン (aplysiatoxin, 以下「ATX」) とその脱臭素体であるデブromoアプリアトキシン (debromo-ATX, 以下「DAT」) 等が知られている。発がんプロモーターは、PKCのC1ドメインにナノモルオーダーで結合することによって強力に活性化することが知られており、PKCの異常活性化は発がんプロモーションと密接に関係している。

30

40

## 【0004】

一方、プリオスタチン (Bryostatin, 以下「Bryo」) 類は、複雑な20員環ラクトン構造を有する天然物群であり、現在までに20種類が発見され、そのうちBryo-1~18, 20の合計19種類が同定されており、中でも1982年にPettitらによってフサコケムシ (bugula neritina) から単離・構造決定されたBryo-1は、発がん促進活性を持たないPKC活性化剤であることから、抗がん剤としてphase Iの臨床試験が米国で行われている。現在のところ、発がんプロモーション活性が低いPKCリガンドとして天然物由来のものは、Bryo類のみが知られている。しかしながら、Bryo類は、天然からの単離収率が $10^{-4} \sim 10^{-7}$ %と極めて低く、フサコケム

50

シの大量養殖が試みられているものの未だ実用化には至っていない。また、Bryo-1の生合成遺伝子の単離も試みられているが成功例は報告されていない。さらに、Bryo-1は上述のように複雑な構造を有しており、全合成に40段階程度と多段階を要し、しかも高度な技術を要する合成段階が多いことから、その作用機構の解析や抗がん剤としての構造最適化の研究はあまり進んでいない。

【0005】

本発明者らは、Bryo-1よりも構造がシンプルなPKCリガンドであるATXの骨格を利用して、合成が容易であり大量供給が可能なBryo-1の代替化合物を開発する試みを行ってきている。開発に際して指標としたのは、がん細胞のアポトーシスに関わるPKCアイソザイムの一種であるPKCの2つのC1ドメイン(C1A, C1B)に対する結合選択性である。これまで本発明者らは、Bryo-1がPKCのC1A及びC1Bの両方に結合するのに対して、TPAに代表される発がんプロモーターは、C1Bに選択的に結合することを見出してきた(非特許文献1参照)。そこで、PKCのC1ドメイン選択性を指標とした天然発がんプロモーターのスクリーニングを行ったところ、ATXが、Bryo-1と同様にC1Aドメインに比較的強く結合することを明らかにしている。

10

【0006】

一般に、TPAのような分子疎水性の高いPKCリガンド(ClogP:6以上)は、強力な発がんプロモーター活性を示す。一方、Bryo-1の分子疎水性度は、発がんプロモーターと比べて低い(ClogP:2.4)値を示し、ATXも天然発がんプロモーターの中で比較的分子疎水性度が低く(ClogP:4.2)、且つマクロラクトン構造を有する点でBryo-1に類似している。また、ATXの脱臭素体であるDAT(ClogP:3.0)は、ATXと同等のPKC結合能を示す一方、発がん促進活性がATXよりも明らかに低いことが分かっている(非特許文献2,3参照)。これらの知見から、分子疎水性度の低いATXアナログが、Bryo-1特有の生理活性を示すPKCリガンドとなる可能性が高いと考えられた。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nakagawa, Y. et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, p. 7573 - 7579

30

【非特許文献2】Shimomura, M. et al., Science, 1983, 222, p. 1242 - 1244

【非特許文献3】Suganuma, M. et al., Carcinogenesis, 1984, 5, p. 315 - 318

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

また本発明者らは、前掲非特許文献1において、ATXの単純化アナログである化合物Aplog-1を始めとする数種の誘導体を合成し、このAplog-1等のATX誘導体が弱いヒトがん細胞増殖抑制活性を示すことを報告している。しかしながら、これまでに得られたAplog-1等のATX誘導体は、PKCアイソザイム、特に発がんの抑制に関わるPKCに対する結合能(結合阻害定数 $K_i$ )が7~10nM程度と低く、ヒトがん細胞増殖抑制活性もBryo-1と同程度であって、さほど高いといえるものではなかった。ATXをリード化合物として、抗がん剤を開発するうえで問題となるのは、PKCへの結合活性を高く維持したまま、如何にして発がんプロモーション活性を消失させるかということであるが、ATXの発がんプロモーション作用が、ATXの構造のどの部分に起因しているのかは不明であった。

40

【0009】

そこで本発明者らは、ATXの単純化アナログの新規創出を鋭意進め、PKCに対す

50

る結合能やヒトがん細胞増殖抑制活性がBryo-1と同等以上に高く、しかもBryo-1よりも合成の容易なATXの単純化アナログを見出し、ひいては抗がん剤を始めとする医薬の創成に繋げることを目的として、本発明に至ったものである。

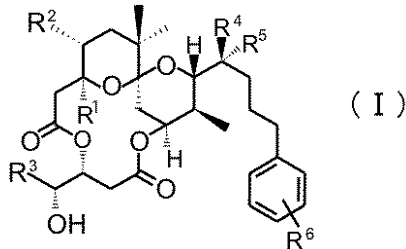
【課題を解決するための手段】

【0010】

すなわち本発明のアプリシトキシン誘導体は、次の構造式(I)で示される新規アプリシトキシン誘導体を基礎としたものである。

【0011】

【化1】



【0012】

ただし、構造式(I)中、R<sup>1</sup>は、水素原子又は水酸基、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>はそれぞれ独立して水素原子又はメチル基、R<sup>6</sup>は水素原子、ハロゲン原子、アセチルアミノ基、水酸基、又は置換基を有していてもよい炭素数1~5のアルキル基で、それぞれ表される。R<sup>6</sup>がアルキル基で表される場合、炭素数が6を超えるアルキル基では水溶性が極めて低くなるためあまり有用とはいえず、炭素数は1~5のアルキル基(メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、1-メチルブチル、ネオペンチル、1,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピルの何れか)であることが望ましい。また、R<sup>6</sup>がアルキル基である場合に適した置換基としては、カルボキシル基又はアミノ基を挙げることができるが、その他、塩を形成できる一般的な置換基とすることも可能である。構造式(I)の化合物と形成し得る塩としては、酸性基が存在する場合には、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等の金属塩、又はアンモニウム塩、メチルアンモニウム塩、ジメチルアンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩、ジシクロヘキシルアンモニウム塩等のアンモニウム塩を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。塩基性基が存在する場合には、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の鉱酸塩、あるいはメタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、マンデル酸塩、ケイ皮酸塩、乳酸塩等の有機酸塩を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。以下、塩について言及する場合は、上記と同様である。本発明を医薬として用いる場合には、これらのうち薬理的又は製薬的に許容される塩を用いるのが好適である。本明細書では、構造式(I)中、側鎖の芳香環部分を除く母核及び側鎖部分を本発明では「10-Me-Aplog」と称することとする。

【0013】

これらのうち、本発明は構造式(I)中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>が全て水素原子で表され、R<sup>6</sup>がメタ位の水酸基で表される次の構造式(II)で示される新規アプリシトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩である。

【0014】

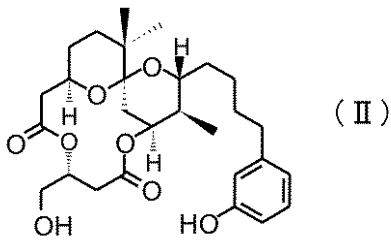
10

20

30

40

## 【化2】



10

## 【0015】

構造式(ⅠⅠ)で示したATX誘導体は、前述したATX誘導体Aplong-1(後述)における10位のCにメチル基を導入した構造と同等であるので、以下、本明細書においては「10-Me-Aplong-1」と称する。

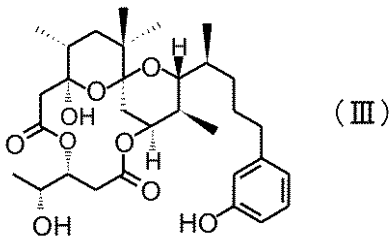
## 【0016】

また本発明は、構造式(Ⅰ)中、R<sup>1</sup>が水酸基、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>がメチル基、R<sup>5</sup>が水素原子、R<sup>6</sup>がメタ位の水酸基で表される次の構造式(ⅠⅠⅠ)で示される新規アリシアトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩である。

## 【0017】

20

## 【化3】



30

## 【0018】

構造式(ⅠⅠⅠ)で示したATX誘導体は、前述したATX脱臭素体(デプロモアリシアトキシン, DAT)における15位のCに結合したメトキシ基を除去した構造と同等であるので、以下、本明細書においては「De-OMe-DAT」と称する(Meはメチル基を示す)。

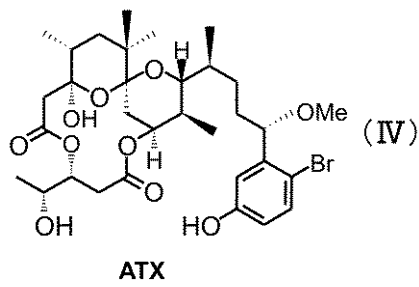
## 【0019】

ここで化合物(Ⅰ), (ⅠⅠ), (ⅠⅠⅠ)との比較のために、以下に、ATX(ⅠⅤ)、DAT(ⅠⅥ)、Aplong-1(ⅠⅦ)の構造式を示す。

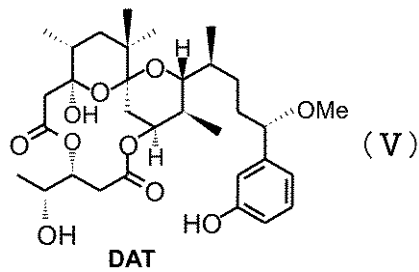
## 【0020】

40

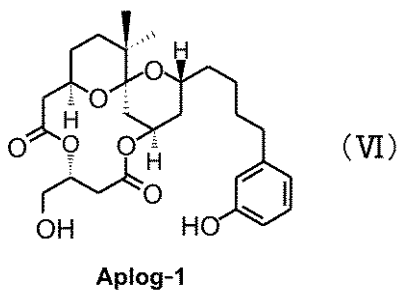
## 【化4】



10



20



30

## 【0021】

試験の結果、後段で詳述するように、10-Me-Aplog-1は、PKCへの結合能がAplog-1よりも約20倍高く（結合阻害定数 $K_i = 0.4 \text{ nM}$ ）、Bryo-1と同等であることが分かった。さらに、10-Me-Aplog-1は、Bryo-1よりも高いがん細胞増殖抑制活性を有していることが分かった。また、De-OMe-DATは、PKCへの結合能がDATや10-Me-Aplog-1と同程度であることも分かった。さらに、予備的な試験では、De-OMe-DATは、発がん促進活性がDATよりも顕著に低い一方で、がん細胞増殖抑制活性が顕著に高いことも見出している。さらにまた、これら新規アブリシアトキシン誘導体のうち10-Me-Aplog-1は、比較的難易度の低い合成反応のみからなる25段階以下のステップで全合成可能であることから、Bryo-1よりも全合成による入手が容易であるといえる。

40

## 【0022】

以上の事実とこれまでに合成した各種ATX誘導体の生理活性試験の結果から、Aplog-1の10位にメチル基を導入することで、アポトーシスに關与しているPKCに極めて高い結合能を示し、Bryo-1よりも顕著に高いがん細胞増殖抑制活性を示す一方で、発がん促進活性を殆ど示さないことを見出した。また、ATXから臭素原子と15位のメトキシ基を除去することにより発がん促進活性が顕著に低下する一方で、がん細胞増殖抑制活性が顕著に増大することも見出した。以上のことから、10-Me-Aplog-1とDe-OMe-DAT、並びに構造式(I)で示したATX誘導体は、その生理活性から、特に10-Me-Aplog-1はBryo-1と比較した場合の合成の容易

50

さから、B r y o - 1 に代わる新しく優れた抗がん剤リードとなり、また抗がん剤のみならず抗エイズ剤や抗アルツハイマー病薬のリードとして期待できるものである。

【発明の効果】

【0023】

上述した新規 A T X 誘導体 (一般式 ( I ) )、10 - M e - A p l o g - 1 (構造式 ( I I ) )、及び D e - O M e - D A T (構造式 ( I I I ) ) は、P K C に対する結合能やヒトがん細胞増殖抑制活性が B r y o - 1 よりも高い一方で、発がんプロモーション活性が極めて低く、しかも B r y o - 1 よりも工程数及び各反応の容易性から全合成の容易な化合物であることから入手が容易である。したがって、B r y o - 1 に代わる新しい抗がん剤リードとして十分期待できる程度に有用であり、また抗エイズ剤や抗アルツハイマー病薬のリードとしても有用なものとなり得る。

10

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下に、本発明に係る新規 A T X 誘導体の合成例及び生理活性試験例を、他の A T X 誘導体の試験例と比較して示す。

【0025】

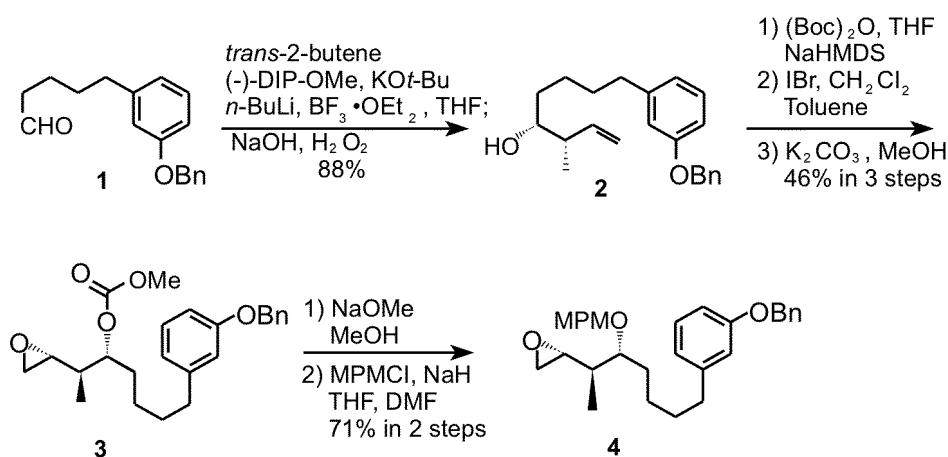
< 10 - M e - A p l o g - 1 の合成例 >

構造式 ( I I ) で示された 10 - M e - A p l o g - 1 の全合成について、下記のスキームを参照して説明する。まず、既知のアルデヒド 1 に対し、B r o w n の不斉クロチル化反応を行いホモアリルアルコール 2 へと誘導した。<sup>1</sup> H N M R より、ジアステレオ選択性は 90% 以上であることを確認した。また、ホモアリルアルコール 2 の 2 級水酸基の絶対的立体はモッシャー法により確認し、エナンチオ選択性も 90% 以上であることを確認した。続いて、ホモアリルアルコール 2 の 2 級水酸基を B o c 化し、S m i t h らの方法によりヨードカーボネートへと誘導した後、アルカリメタノール分解を行いエポキシド 3 とした。このエポキシド 3 について、N a O M e 処理によりカーボネートを除去した後、2 級水酸基を M P M で保護し、エポキシド 4 を得た。以上の工程を、次式スキーム 1 - 1 として示す。

20

【0026】

【化 5】



30

Scheme 1-1 Synthesis of epoxide 4.

40

【0027】

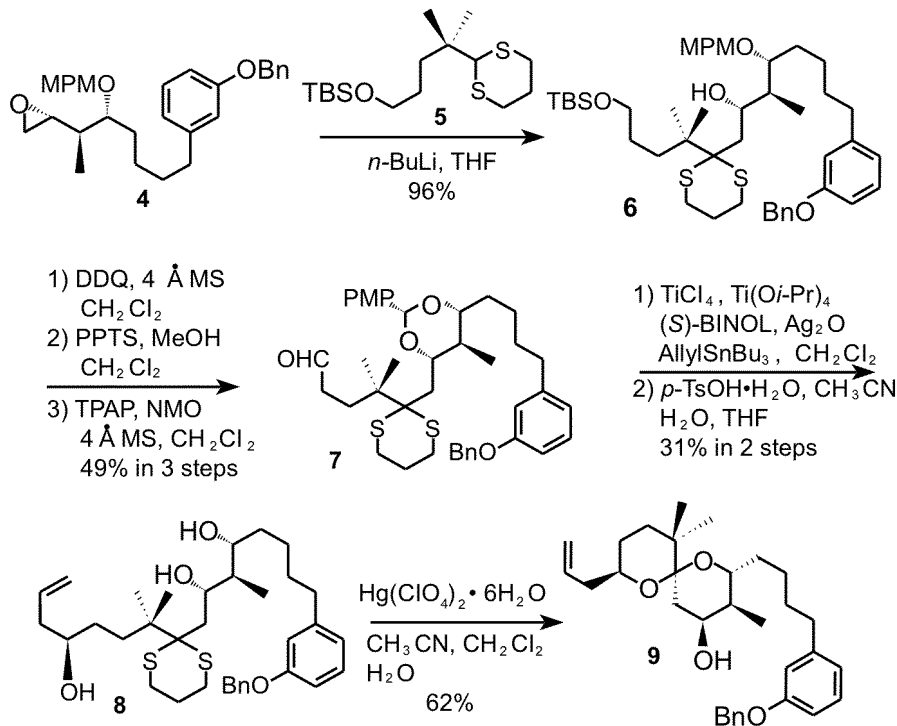
続いて、エポキシド 4 とジチアン 5 のカップリングを行ったところ、反応が効率よく進行しカップリング体 6 が得られた。次にカップリング体 6 に対し脱水条件下で D D Q 処理し、ベンジリデンアセタールを形成した後、T B S 基を脱保護し、1 級水酸基を酸化して

50

アルデヒド7とした。このアルデヒド7に対し、丸岡の不斉アリル化反応を行った後、ベンジリデンアセタールを酸加水分解し、トリオール8へと誘導した。続いて、ジチアンの加水分解を行い、望むスピロケタール9を単離精製した。スピロケタール9の異性体の生成は極少量であったため、異性体の単離は行っていない。11位の不斉メチル基が *equatorial* に位置することがスピロケタールの形成に有利であるため、望むスピロケタール9が優先的に生成したと考えられる。なお、スピロケタール9の立体配置についてはNOEにより確認した。以上の工程を、次式スキーム1-2として示す。

【0028】

【化6】



Scheme1-2 Synthesis of spiroketal 9.

【0029】

スピロケタール9と別途調製したカルボン酸10（前掲、非特許文献1参照）とのエステル縮合は山口法により効率よく行うことができた。得られたエステル縮合体11のMPM基をTES基に付け替えた後、オレフィンの酸化開裂を行い、カルボン酸12を得た。最後に、TES基の脱保護、山口法によるマクロラクトン化、2つのBn基の脱保護を行い、目的とする10-Me-Aplog-1を得た。以上の工程を、次式スキーム1-3として示す。10-Me-Aplog-1は、アルデヒド1を出発物質として、リニアで

【0030】

10

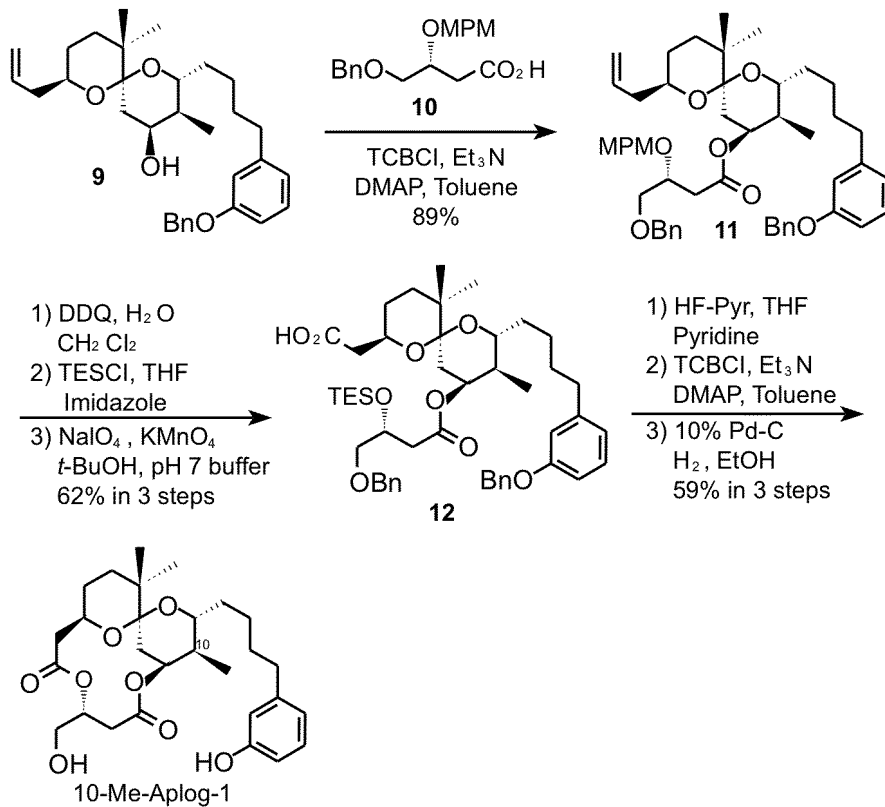
20

30

40



## 【化7】



Scheme 1-3 Synthesis of 10-Me-Aplog-1

## 【0031】

10-Me-Aplog-1の化学分析結果は下表1の通りである。

## 【0032】

## 【表1】

10-Me-Aplog-1

R<sub>f</sub>: (silica, EtOAc/hexane =1:1)=0.27.

<sup>1</sup>H NMR: (500MHz, 294.9K, CDCl<sub>3</sub>, 0.009M) δ 0.77(3H, d, *J*=7.0Hz), 0.87(3H, s), 0.96(3H, s), 1.27-1.37(2H, m), 1.37-1.48(3H, m), 1.48-1.61(5H, m), 1.73(1H, dd, *J*=15.5, 4.1Hz), 1.75(1H, m), 2.31(1H, br.s), 2.43(1H, dd, *J*=13.3, 10.8Hz), 2.52(1H, dd, *J*=15.5, 2.3Hz), 2.55(2H, m), 2.58(1H, dd, *J*=13.3, 2.6Hz), 2.79(1H, dd, *J*=16.8, 4.5Hz), 2.84(1H, dd, *J*=16.8, 10.1Hz), 3.81(2H, m), 3.92(1H, tt, *J*=11.0, 2.9Hz), 3.98(1H, dt, *J*=10.3, 2.1Hz), 5.03(1H, dd, *J*=6.1, 3.4Hz), 5.18(1H, m), 6.35(1H, br.s), 6.6(1H, dd, *J*=8.0, 2.5Hz), 6.73(1H, d, *J*=7.6Hz), 6.87(1H, t, *J*=1.9Hz), 7.13(1H, t, *J*=7.8Hz) ppm.

<sup>13</sup>C NMR: (125MHz, 295.2K, CDCl<sub>3</sub>, 0.009M) δ 13.11, 21.35, 24.00, 25.97, 26.51, 27.27, 29.18, 31.58, 34.57, 35.29, 36.75, 36.98, 37.57, 42.84, 64.09, 67.22, 70.64, 72.43, 72.93, 100.01, 112.55, 115.00, 120.66, 129.31, 144.81, 156.26, 169.71, 172.87 ppm.

HRMS-FAB-MS (matrix: *m*-nitrobenzyl alcohol): *m/z*=505.2828([M+H]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>O<sub>8</sub> 505.2801).

[α]<sub>D</sub>: +76.2° (*c* = 0.28, CHCl<sub>3</sub>, 29.8°C).

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 3 】

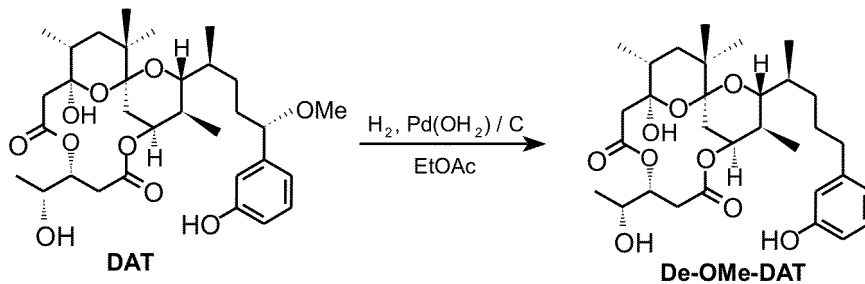
< De - OMe - DATの合成例 >

構造式 ( I I I ) で示された De - OMe - DATの合成について、下記のスキーム 2 を参照して説明する。De - OMe - DATは、全合成には複雑で多数の工程が必要であるため、天然物である DATから 1 ステップで合成した。すなわち、DATを酢酸エチルに溶解し、攪拌しつつ水酸化パラジウム - 炭素と水素雰囲気下で接触させ、減圧下で濾過し、HPLC (column: AM-323(YMC); solvent: 80% MeCN/H<sub>2</sub>O; flow rate 3.0 mL/min; UV detector: 254nm; retention time: 17.1 min) にて分取することで、DATから 15 位のメトキシ基を除去した De - OMe - DATを単離精製した。

## 【 0 0 3 4 】

【化 8】

10



Scheme 2 Synthesis of De-OMe-DAT

20

## 【 0 0 3 5 】

De - OMe - DATの化学分析結果は下表 2 の通りである。

## 【 0 0 3 6 】

【表 2】

30

De-OMe-DAT

R<sub>f</sub>: (silica, EtOAc/hexane =1:1)=0.45.

<sup>1</sup>H NMR: (500MHz, 295.3K, acetone-d<sub>6</sub>, 0.0075M) δ 0.75(3H, d, J=6.9Hz), 0.81(3H, d, J=6.7Hz), 0.86(3H, s), 0.87(3H, s), 0.89(3H, d, J=5.6Hz), 1.08(1H, dd, J=13.4, 3.7Hz), 1.14(3H, d, J=6.5Hz), 1.21(1H, m), 1.47-1.62 (3H, m), 1.64(1H, dd, J=13.1, 13.1Hz), 1.74(1H, dd, J=14.5, 3.6Hz), 1.75 (1H, m), 1.85-1.94(2H, m), 2.50(1H, m), 2.58(1H, dd, J=12.6Hz), 2.60 (1H, m), 2.72(1H, dd, J=14.6, 3.0Hz), 2.81(1H, overlapped H<sub>2</sub>O), 2.89 (1H, dd, J=18.1, 3.1Hz), 2.95(1H, dd, J=18.1, 10.8Hz), 4.00(1H, dd, J=10.8, 2.2Hz), 4.07(1H, m), 4.21(1H, d, J=5.3Hz, 30-OH), 4.31(1H, d, J=1.8Hz, 3-OH), 5.26(2H, m), 6.62(1H, m), 6.76(1H, d, J=7.6Hz), 6.80 (1H, m), 7.06(1H, d, J=7.8Hz), 8.06(1H, s, 18-OH) ppm.

<sup>13</sup>C NMR: (125MHz, 295.8K, acetone-d<sub>6</sub>, 0.0075M) δ 13.04, 13.21, 16.39, 17.71, 23.53, 26.70, 29.15, 33.60, 33.88, 34.58, 34.70, 35.43, 35.71, 37.07, 38.96, 41.09, 47.14, 67.07, 70.12, 73.29, 74.41, 98.81, 100.89, 113.26, 116.51, 120.79, 129.75, 145.44, 158.16, 169.32, 170.27 ppm.

HRMS-FAB-MS : m/z=569.3314([M+Li]<sup>+</sup>). calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>9</sub>Li 569.3302.

[α]<sub>D</sub>: +71.0° (c = 0.44, acetone, 30.6 °C).

40

## 【 0 0 3 7 】

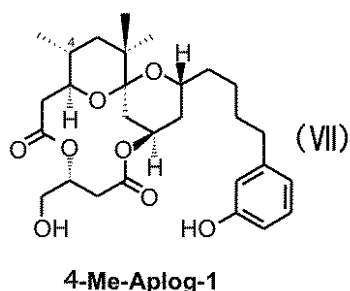
10 - Me - Apl og - 1 及び De - OMe - DATの生理活性試験との比較のため、前述した化合物 Bry o - 1、ATX、DAT、Apl og - 1 の他、Apl og - 1

50

の4位のCに不斉メチル基を導入した次の構造式(VII)で表す化合物4-Me-Aplog-1、並びに後述するその他の化合物を利用した。

【0038】

【化9】



10

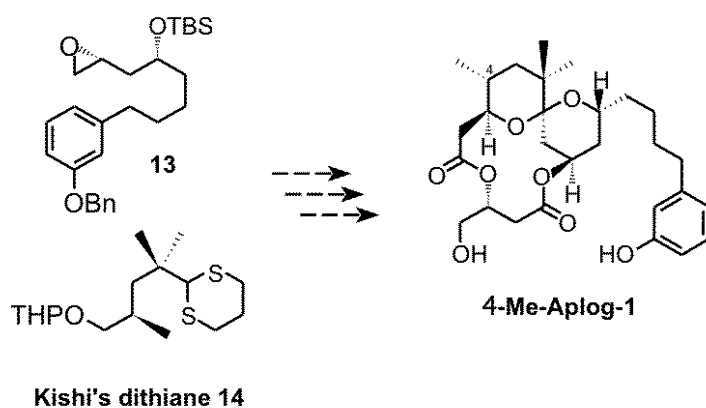
【0039】

4-Me-Aplog-1は、既知のエポキシド13と、岸らのATXの全合成において実績のある不斉メチル基を有する既知のジチアン14とを用い、詳述しないが次式のスキームの通り15段階、収率2.4%で得たものである。4-Me-Aplog-1は、10-Me-Aplog-1と不斉メチル基の位置が異なっている。

20

【0040】

【化10】



30

【0041】

<がん細胞増殖抑制活性試験>

10-Me-Aplog-1及びDe-OMe-DATについて、Bryo-1、DAT、Aplog-1及び4-Me-Aplog-1と比較して、矢守によって確立された39種類のヒトがん細胞パネルを用いた増殖抑制活性試験(Yamori, T. et al., Cancer. Res., 1999, 59, p. 4042-4049)を行った。下記表3は、そのうち5種類のがん細胞(乳がん細胞2種類、結腸がん細胞1種類、肺がん細胞2種類)に対する結果について抜粋して示したものである。表中、GI<sub>50</sub>値は、コントロールと比べて細胞増殖を50%阻害する薬剤の濃度を示している。

40

【0042】

【表 3】

Growth inhibition of Aplogs against several human cancer cell lines.

Cell lines	log GI <sub>50</sub> (log M)					
	Bryo-1	DAT	Aplog-1	4-Me-Aplog-1	10-Me-Aplog-1	De-OMe-DAT
HBC-4 (breast)	NT	-6.47	-6.33	-6.56	-7.48	<-8.00
MDA-MB-231 (breast)	-5.10	-6.03	-5.61	-5.81	-6.90	-7.31
HCC2998 (colon)	-5.30	-6.09	-5.43	-5.39	-6.47	-7.16
NCI-H460 (lung)	-5.60	-6.46	-5.60	-5.90	-7.07	-8.00
A549 (lung)	-5.20	-5.94	-5.32	-5.13	-6.01	-6.84

10

## 【0043】

上記表3の結果から、ほとんどのがん細胞において、Aplog-1と4-Me-Aplog-1の増殖抑制活性はほとんど変わらず、Bryo-1と同程度であったのに対し、10-Me-Aplog-1はAplog-1と比較して、数種のがん細胞に対して1オーダー高い増殖抑制活性を示し、DATと同程度若しくはそれ以上であった。4-Me-Aplog-1と10-Me-Aplog-1の分子疎水性度は同等であることから、ATXの単純化アナログ類のがん細胞増殖抑制活性は、単に分子疎水性度のみに依存するのではないことが明らかとなった。また、10位の不斉メチル基は、がん細胞増殖抑制活性に重要であることが判明した。さらに、De-OMe-DATについては、10-Me-Aplog-1と同程度ないし若干強い増殖抑制活性を示した。

20

## 【0044】

< 発がんプロモーション活性及び抗発がんプロモーション活性試験 >  
10-Me-Aplog-1について、TPA、Bryo-1、DAT、Aplog-1及び4-Me-Aplog-1と比較して、発がんプロモーション活性及び抗発がんプロモーション活性を、in vitro評価系の1つであるEpstein-Barr virus早期抗原(EBV-EA)誘導試験を行い評価した(TPAについては発がんプロモーション活性試験のみにおいて比較のために用いた)。下記表4は、発がんプロモーション活性試験の結果を示し、下記表5は抗発がんプロモーション活性試験の結果を示している。

30

## 【0045】

## 【表 4】

EBV-EA-inducing ability of Aplogs.

Concentration	% activation (% viability)					
	TPA	DAT	Bryo-1	Aplog-1	4-Me-Aplog-1	10-Me-Aplog-1
10 <sup>-7</sup> M	29.4%±0.5 (60%)	25.3%±1.1 (50%)	1.4%±1.1 (60%)	9.6%±1.2 (60%)	7.0%±1.0 (60%)	8.1%±1.0 (60%)
10 <sup>-6</sup> M	31.5%±0.8 (50%)	25.9%±0.9 (40%)	2.0%±0.7 (40%)	10.4%±1.3 (60%)	9.2%±0.9 (60%)	9.8%±0.6 (60%)
10 <sup>-5</sup> M	31.9%±0.6 (50%)	26.8%±0.7 (40%)	2.0%±0.2 (40%)	10.7%±1.3 (60%)	9.6%±1.0 (60%)	11.6%±0.5 (50%)

10

## 【 0 0 4 6 】

## 【表 5】

Inhibitory effects of Aplogs against EBV-EA activation by 10<sup>-7.5</sup>M TPA.

20

Concentration	% activation (% viability)				
	DAT	Bryo-1	Aplog-1	4-Me-Aplog-1	10-Me-Aplog-1
10 <sup>-7</sup> M	25.3%±0.4 (50%)	6.8%±1.1 (60%)	10.0%±1.0 (60%)	8.5%±1.1 (60%)	12.2%±1.1 (60%)
10 <sup>-6</sup> M	21.2%±0.7 (40%)	5.0%±0.6 (40%)	8.0%±0.5 (60%)	6.1%±0.9 (60%)	8.6%±0.8 (60%)
10 <sup>-5</sup> M	20.7%±0.5 (40%)	4.1%±0.5 (40%)	5.9%±0.6 (60%)	4.3%±0.7 (60%)	6.2%±0.5 (50%)

TPA 10<sup>-7.5</sup>M : 30.0% ±0.6 %

30

## 【 0 0 4 7 】

発がんプロモーション活性については、発がんプロモーターであるTPAとDATは、100 nM ~ 10 μMにおいてEAを顕著に誘導するのに対し(25 ~ 30%)、Bryo-1とAplog-1はこれらの濃度域においてもEAをほとんど誘導しないことが既に明らかになっている。発がんプロモーション活性試験では、4-Me-Aplog-1と10-Me-Aplog-1は、Bryo-1及びAplog-1と同様にEA誘導をほとんど示さなかった。また、抗発がんプロモーション活性については、DATはTPAによるEA誘導をほとんど抑制しないのに対し、4-Me-Aplog-1と10-Me-Aplog-1は、TPAによるEA誘導をBryo-1及びAplog-1と同様に顕著に抑制した。これらの結果より、4位と10位の不斉メチル基は発がんプロモーション活性に関与しない可能性が示唆された。

40

## 【 0 0 4 8 】

より強いがん細胞増殖抑制活性を示した10-Me-Aplog-1について、予備的に10匹のICRマウスを用いて皮膚発がん2段階試験を行っている。試験では、ICRマウスの背中に100 μgの発がん剤(DMBA)を投与後、週2回、10-Me-Aplog-1を塗布した。TPAあるいはDATを1.7 nmolずつ塗布したものでは、顕著に腫瘍が形成された。100%のマウスに腫瘍を発生させるTPA量の5倍量である8.5 nmolの10-Me-Aplog-1を塗布したところ、塗布後20週目におい

50

ても全く腫瘍を発生させなかった。この結果より、特に10-Me-Aplog-1は、ATXの骨格を有しているが発がんプロモーション活性が殆どないことから、抗がん剤として大いに期待できるものであるといえる。

#### 【0049】

##### < PKCアイソザイム結合選択性試験 >

以上のような生理活性発現機構に関する知見を得るため、10-Me-Aplog-1及びDe-OMe-DATについて、DAT、Bryo-1、Aplog-1、4-Me-Aplog-1を比較対象として、PKC C1ドメインに対する結合能をPKC C1ペプチドに対する $[^3\text{H}]$ phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) 結合阻害試験により、結合阻害定数 $K_i$ 値を求めることで評価した。PKC C1ペプチドは、PKCアイソザイムのC1ドメインを化学合成し、亜鉛を用いてフォールディングさせたものである。これらのペプチドは全長のPKCと同様の強さで発がんプロモーターと結合することが既に確認されている。 $K_i$ 値の算出には、実験により求めた $[^3\text{H}]$ PDBuの特異的結合を50%阻害する濃度( $\text{IC}_{50}$ )、並びに進藤らにより報告されている各PKC C1ペプチドに対する $[^3\text{H}]$ PDBuの解離定数( $K_d$ )を用いた(Shindo, M. et al., Bioorg. Med. Chem., 2001, 9, p. 2073-2081)。試験結果を下記表6に示す。

10

#### 【0050】

##### 【表6】

20

$K_i$  values for inhibition of  $[^3\text{H}]$  PDBu's binding by Aplogs.

PKC C1 peptides	$K_i$ (nM)						$K_d$ (nM) $[^3\text{H}]$ PDBu
	DAT	Bryo-1	Aplog-1	4-Me-Aplog-1	10-Me-Aplog-1	De-OMe-DAT	
$\alpha$ -C1A	0.26	7.4	63	15	4.7	1.0	1.1
$\beta$ -C1A	0.17	13	89	15	12	1.5	1.3
$\gamma$ -C1A	0.38	3.4	39	12	5.5	0.69	1.5
$\delta$ -C1B	0.20	0.60	7.4	3.3	0.46	0.32	0.53
$\epsilon$ -C1B	0.63	16	25	17	2.0	1.3	0.81
$\eta$ -C1B	0.11	2.1	4.4	5.9	0.45	0.18	0.45
$\theta$ -C1B	0.11	1.4	4.0	2.9	0.54	0.20	0.72

30

#### 【0051】

PKCアイソザイム結合選択性試験の結果、発がんプロモーターであるPDBu及びDATは、conventional PKC (cPKC) アイソザイム( , , )及びnovel PKC (nPKC) アイソザイム( , , , )の両方に同程度の強さで結合した。それに対して、10-Me-Aplog-1とDe-OMe-DATは、Bryo-1とAplog-1と同様に、nPKCアイソザイムに対する結合選択性を示し、それらの結合能は、全てのPKCアイソザイムにおいてAplog-1より約10倍若しくはそれ以上高かった。一方、4-Me-Aplog-1は、nPKCアイソザイムに対する結合選択性がAplog-1よりも低かった。以上の結果より、Aplog-1と10-Me-Aplog-1及びDe-OMe-DATにおいては、構造の単純化によって、発がんプロモーションに関わるcPKCに対する結合能が弱められたことにより、特異な生理活性を発現している可能性が示唆された。さらに、10-Me-Aplog-1及びDe-OMe-DATのPKCへの結合能はBryo-1と同等であるにも関わらず、Bryo-1よりも高いがん増殖抑制活性を示したことは、10-Me-Aplog-1及びDe-OMe-DATのがん細胞増殖抑制機構にPKC以外の標的分子が関与し

40

50

ていることを示唆している。

【 0 0 5 2 】

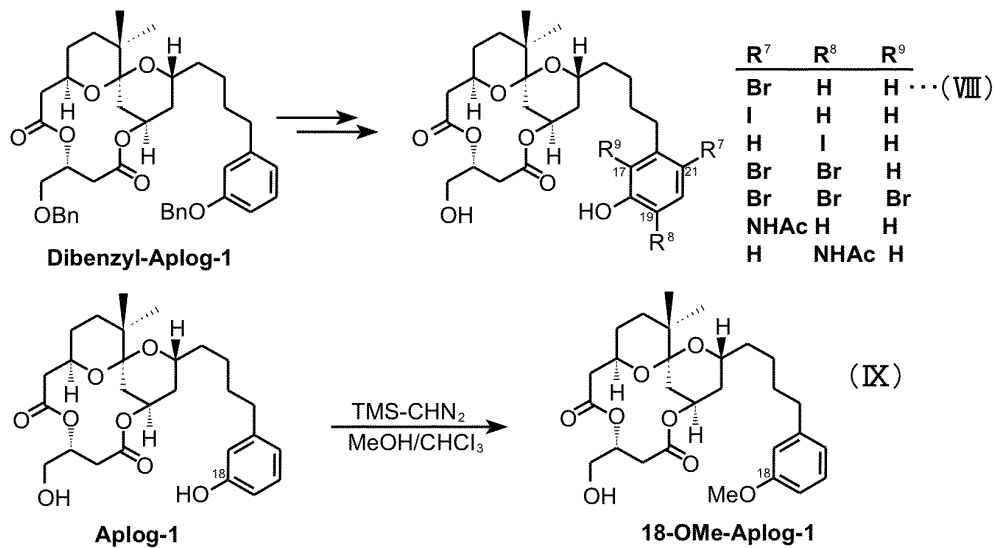
< A p l o g - 1 の側鎖の誘導体化と生理活性 >

構造式 ( I ) の A T X 誘導体、 A T X 、 D A T 、 A p l o g - 1 に共通のフェノール環部分の修飾による生理活性の変化を調べるため、 A p l o g - 1 のフェノール環部分について、下式のように 1 7 位、 1 9 位及び 2 1 位に様々な置換基を導入した。また、 1 8 位のフェノール性水酸基のメチル化は、下式のように T M S ジアゾメタンを用いて行った。

【 0 0 5 3 】

【化 1 1】

### Derivatization of the phenol moiety of Aplog-1



10

20

【 0 0 5 4 】

代表例として、上記式中、 2 1 位に臭素原子を導入した化合物 2 1 - B r - A p l o g - 1 (上記構造式 ( V I I I ) ) の P K C - C 1 ドメイン結合選択性試験結果を下表 7 に、抗発がんプロモーション活性試験結果を下表 8 に、細胞増殖抑制活性試験結果を下表 9 に示す。各試験方法は、 1 0 - M e - A p l o g - 1 に関する各試験方法と同様である。

【 0 0 5 5 】

【表 7】

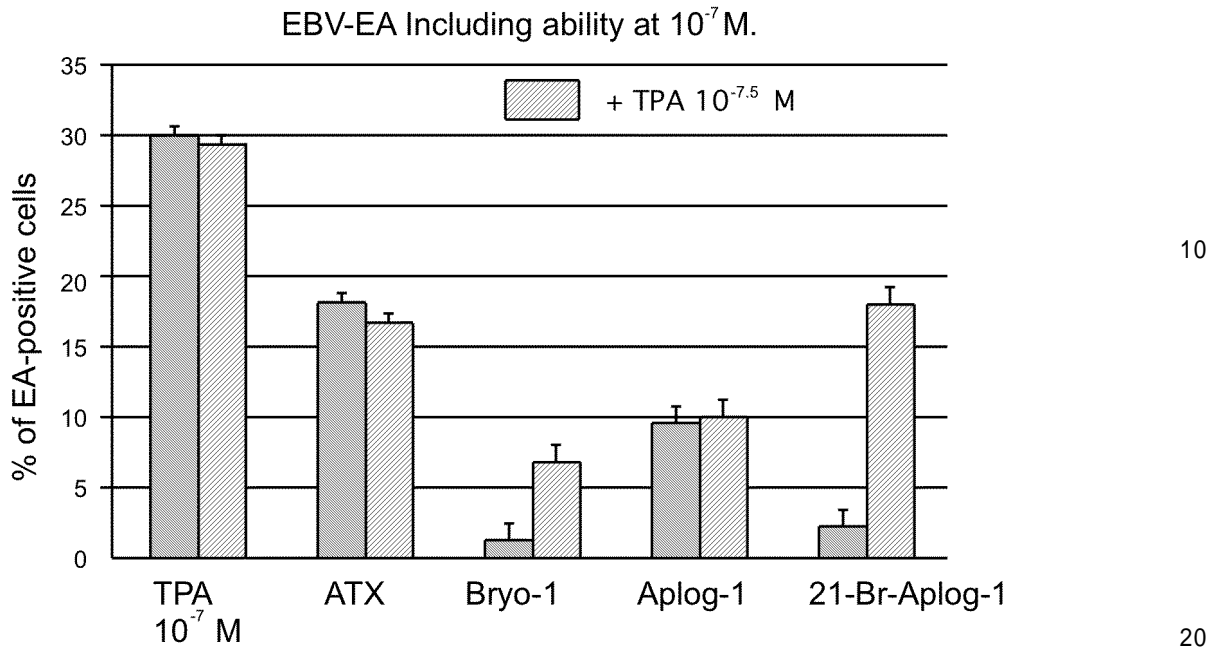
$K_i$  values for inhibition of [<sup>3</sup>H] PDBu binding.

	PDBu	Bryo-1	ATX	Aplog-1	21-Br-Aplog-1
δ-C1A	110	5.0	12.3	140	66
δ-C1B	1.0	0.57	0.41	7.4	3.5
Ratio	110	8.8	29.3	18.9	18.9

40

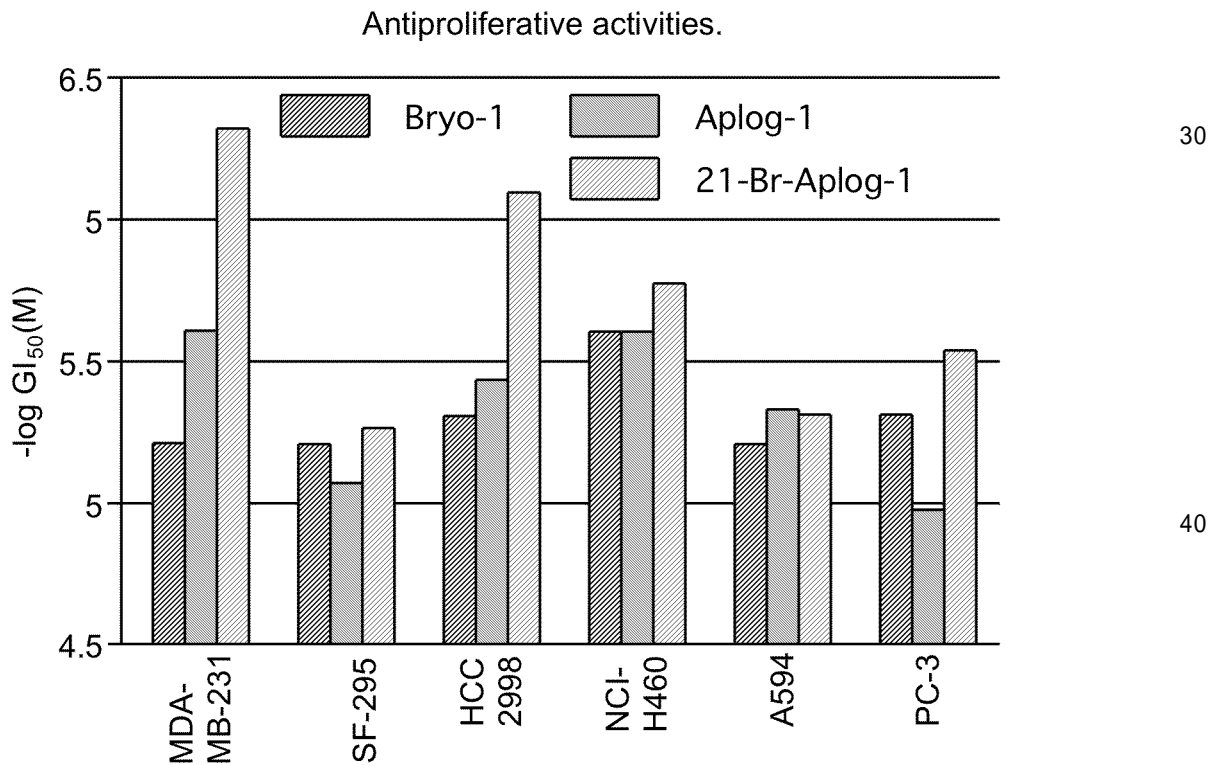
【 0 0 5 6 】

【表 8】



【 0 0 5 7 】

【表 9】



【 0 0 5 8 】

Aplog-1の21位への臭素原子の導入により、21-Br-Aplog-1は、



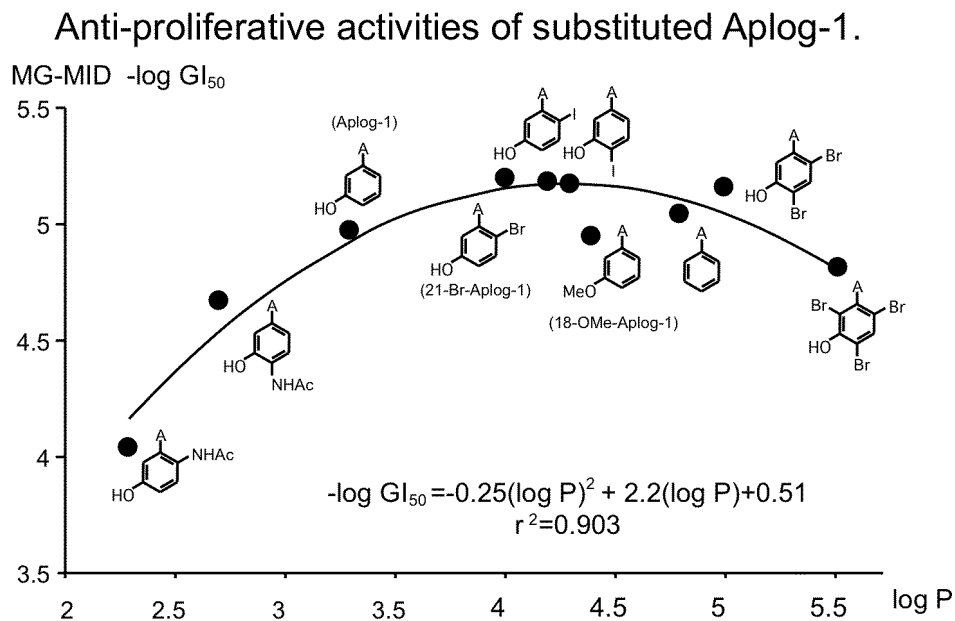
A p l o g - 1 と比べて約 2 倍高い P K C 結合能を示し、A p l o g - 1 よりもがん細胞増殖抑制活性が増強した（図 9：縦軸の G I <sub>50</sub> 値は、コントロールと比べて細胞増殖を 50 % 阻害する薬剤の濃度を示している）。一方で、21 - B r - A p l o g - 1 の i n v i t r o での発がん促進活性は A p l o g - 1 よりも低かった。ただし、抗発がん促進活性は A p l o g - 1 と比較して低下した（図 8：縦軸は早期抗原を誘導した細胞の割合%を示す）。さらに、21 - B r - A p l o g - 1 は、i n v i v o でも発がん促進活性を示さないことを、10 匹の I C R マウスを用いた発がん 2 段階試験で確認している（T P A の 5 倍量塗布）。

【 0 0 5 9 】

また、A p l o g - 1 のフェノール環部分における各種置換体のがん細胞増殖抑制活性をまとめたものを下表 10 に示す。下表の縦軸は、39 種類のヒトがん細胞に対する増殖抑制活性 - l o g I G <sub>50</sub> 値の平均値を示しており、横軸は、各化合物の分子疎水性度の実測値（逆相系 H P L C を用いた保持時間より決定）を示している。

【 0 0 6 0 】

【表 10】

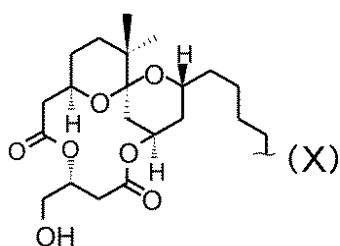


【 0 0 6 1 】

上記表中、各化合物に共通の A 部は、A p l o g - 1 の側鎖フェノール環部分以外と同じ構造であり、次式 ( X ) で表される。換言すれば、前述した構造式 ( I ) の母核及び側鎖部分からなる 10 - M e - A p l o g において、R <sup>1</sup>、R <sup>2</sup>、R <sup>3</sup>、R <sup>4</sup>、R <sup>5</sup> が全て水素原子、R <sup>6</sup> がメタ位の水酸基で、さらに 10 位のメチル基を除去したものと同等の構造である。

【 0 0 6 2 】

## 【化 1 2】



10

## 【 0 0 6 3】

この結果は、A p l o g - 1 のがん細胞増殖抑制活性は、分子疎水性度の変化に支配されていることを示しており、L o g P 値 4 前後が活性の最大値であった。このことから、A p l o g - 1 の活性はほぼ飽和しており、さらに活性を挙げるためには、ジオリド部分の構造変換が必要であることが明らかとなった。

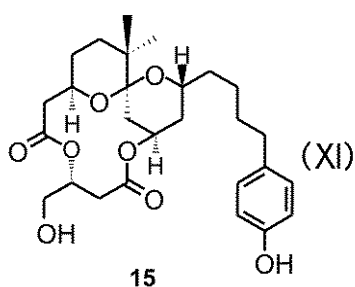
## 【 0 0 6 4】

さらに、上式 ( X ) で示した A 部の側鎖に結合するベンゼン環に関し、フェノール性水酸基が結合する位置の相違による生理活性の変化について調べた。用いた化合物は、ベンゼン環のメタ位に水酸基が結合した化合物として A p l o g - 1、パラ位に水酸基が結合した化合物として下式 ( X I ) で示される化合物 1 5 である。A p l o g - 1 と化合物 1 5 の P K C アイソザイム結合選択性試験結果を下表 1 1 に、ヒトがん細胞増殖抑制活性試験結果を下表 1 2 に示す。下表に示される各試験は、何れも上述した同様の試験と同じ方法により行っている。また、表 1 2 では、3 9 種類のヒトがん細胞について行ったヒトがん細胞増殖抑制活性試験のうち、上述した 5 種類のがん細胞 ( 乳がん細胞 2 種類、結腸がん細胞 1 種類、肺がん細胞 2 種類 ) に加えて、3 種類のがん細胞 ( 黒色腫 1 種類、胃がん 2 種類 ) についての結果を示している。

20

## 【 0 0 6 5】

## 【化 1 3】



30

## 【 0 0 6 6】

40

【表 1 1】

$K_i$  values for Inhibition of [ $^3\text{H}$ ] PDBu's Binding.

PKC C1 Peptides	$K_i$ (nM)		
	Aplog-1	Compound 15	ATX
$\alpha$ -C1A	63	58	0.40
$\delta$ -C1A	140	170	12
$\delta$ -C1B	7.4	6.6	0.41

10

【 0 0 6 7 】

【表 1 2】

Growth inhibition of Aplogs against several human cancer cell lines.

Cancer type	Cell Line	Log GI <sub>50</sub>	
		Aplog-1	Compound 15
Breast	HBC-4	-6.33	-6.32
	MDA-MB-231	-5.61	-5.16
Colon	HCC2998	-5.43	-5.26
Lung	NCI-H460	-5.60	-5.81
	A549	-5.31	-5.12
Melanoma	LOX-IMVI	-5.74	-4.97
Stomach	St-4	-5.55	-5.12
	MKN45	-5.33	-5.14

20

【 0 0 6 8 】

表 1 1 及び表 1 2 から明らかなように、Aplog-1 と化合物 15 の PKC 結合能はほとんど同等であり、またがん細胞の種類を問わず増殖抑制活性はほとんど同等であることが分かった。このことから、式 (X) で示した A 部の側鎖に結合するベンゼン環に対するフェノール性水酸基の位置は、これらの生理活性にはほぼ影響しないという結果が得られた。

【 0 0 6 9 】

以上の諸結果より、PKC に対する選択的結合能が高く、発がんプロモーション活性が極めて低いにも関わらず、ヒトがん細胞増殖抑制活性が高いという条件を満たす化合物 ATX 誘導体においては、構造式 (I) で示される化合物中、10 位に不斉メチル基が導入されること、15 位にメトキシ基が結合しないことが必須の条件であり、母核において R<sup>1</sup> は水素原子又は水酸基の何れでもよく、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> はそれぞれ水素原子又はメチル基の何れでもよく、側鎖において R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup> は水素原子又はメチル基の何れでもよく、ベンゼン環において R<sup>6</sup> は、水素原子、ハロゲン原子、アセチルアミノ基、水酸基、又は置換基を有していてもよい炭素数 1 ~ 5 のアルキル基の何れかであり、という構造が導かれた。特に R<sup>6</sup> が水酸基の場合は、ベンゼン環のうちの炭素に水酸基が結合していてもよい、ということも明らかとなった。このような新規 ATX 誘導体の中でも特に、10-Me-Aplog-1 と De-OMe-DAT は、顕著に優れた生理活性を示した。さらに、本発明の構造式 (I) で示される ATX 誘導体又はその塩、すなわち 10-Me-Aplog-1 とその塩は、比較的容易な 20 程度の工程で全合成することができる。よって

30

40

50

本発明は、B r y o - 1 に代わる新しい抗がん剤となり得るものであり、抗エイズ剤や抗アルツハイマー病薬のシーズとしても有用なものとなり得る。

【 0 0 7 0 】

本発明の A T X 誘導体を抗がん剤として投与する場合には、例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、粉末剤、顆粒剤、液剤等として経口投与することができる可能性があり、また、注射剤、座剤、塗布剤等として非経口投与することができる可能性があり、これらの製剤は、本発明の A T X 又はその薬学上許容し得る塩を用い、常法に従って調製することができる。この場合、一般的な補形薬、賦形剤、添加剤並びに通常の製剤担体を調剤に用いることができる。

【 産 業 上 の 利 用 可 能 性 】

10

【 0 0 7 1 】

本発明の新規 A T X 誘導体は、B r y o - 1 に代わる新たな抗がん剤、抗エイズ剤、抗アルツハイマー薬等のシーズとして極めて有益なものとなり得る。

## フロントページの続き

- (72)発明者 柳田 亮  
京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学研究科内
- (72)発明者 中川 優  
京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学研究科内

審査官 谷尾 忍

- (56)参考文献 Yu NAKAGAWA et al , A Simple Analogue of Tumor-Promoting Aplysiatoxin Is an Antineoplastic Agent Rather Than a Tumor Promoter: Development of a Synthetically Accessible Protein Kinase C Activator with Bryostatin-like Activity , J. AM. CHEM. SOC. , 2009年 5月18日 , vol.131, no.22 , p.7573-7579 , 文献全体、特に、図1及び2の「ATX」及び化合物1、並びに表1参照
- Masami SUGANUMA et al , Estimation of tumor promoting activity and structure-function relationships of aplysiatoxins , CARCINOGENESIS , 1984年 3月 , vol.5, no.3 , p.315-318 , 文献全体、特に、表Iの「デブロモアプリアトキシン」参照
- Robert E. IRELAND et al , An Approach to the Total Synthesis of Aplysiatoxin , J. AM. CHEM. SOC. , 1988年 , vol.110, no.17 , p.5768-5779 , 文献全体
- Hiroaki KAMACHI et al , Structure-activity studies on the side chain of a simplified analog of aplysiatoxin(aplog-1) with anti-proliferative activity , BIOORG. MED. CHEM. , 2013年 3月25日 , vol.21, no.10 , p.2695-2702 , 文献全体、特に、図1の化合物「10-Me-Aplog-1」及び表3参照
- Masayuki KIKUMORI et al , Structure-Activity Studies on the Spiroketal Moiety of a Simplified Analogue of Debromoaplysiatoxin with Antiproliferative Activity , J. MED. CHEM. , 2012年 5月24日 , vol.55, no.11 , p.5614-5626 , 文献全体、特に、要約欄の化合物5、及び表1参照

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07D 493/20

A61K 31/365

CAplus/REGISTRY(STN)