

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/157555

発行日 平成27年12月21日 (2015.12.21)

(43) 国際公開日 平成25年10月24日 (2013.10.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)	
<b>C07D 493/20 (2006.01)</b>	C07D 493/20	CSP	4C071
<b>A61K 31/365 (2006.01)</b>	A61K 31/365		4C086
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00		
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A61P 43/00	111	
<b>A61P 31/18 (2006.01)</b>	A61P 31/18		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

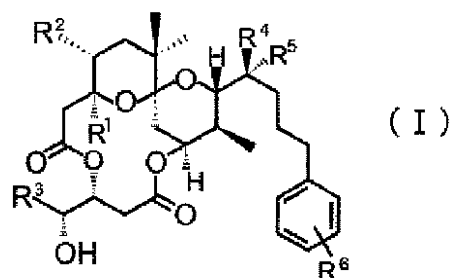
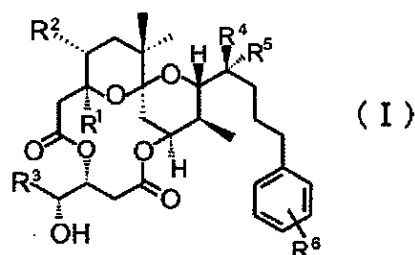
出願番号	特願2014-511223 (P2014-511223)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/061333	(74) 代理人	100130498 弁理士 佐野 禎哉
(22) 国際出願日	平成25年4月16日 (2013.4.16)	(72) 発明者	入江 一浩 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学 院農学研究科内
(31) 優先権主張番号	特願2012-92842 (P2012-92842)	(72) 発明者	菊森 将之 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学 院農学研究科内
(32) 優先日	平成24年4月16日 (2012.4.16)	(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
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

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

## (57) 【要約】

本願発明は、発がん促進活性を持たないPKC活性化剤であり、抗がん剤として使用し得る新規化合物として、Bryo-1の代替となり得る式(I)で表されるアプリアトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩を提供する。



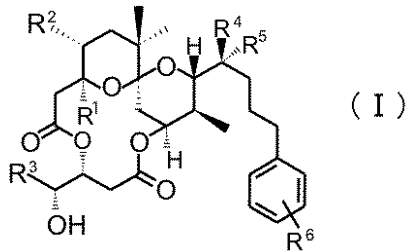
(式(I)中、R<sup>1</sup>は水素原子又は水酸基、R<sup>2</sup>は水素原子又はメチル基、R<sup>3</sup>は水素原子又はメチル基、R<sup>4</sup>は水素原子又はメチル基、R<sup>5</sup>は水素原子又はメチル基、R<sup>6</sup>は水素原子、ハロゲン原子、アセチルアミノ基、水酸基、又は置換基を有していてもよい炭素数1~5の

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

式 ( I )

## 【化 1】



10

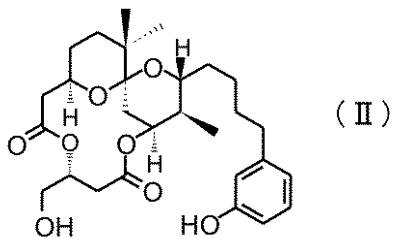
(ただし、構造式 ( I ) 中、 $R^1$  は水素原子又は水酸基、 $R^2$  は水素原子又はメチル基、 $R^3$  は水素原子又はメチル基、 $R^4$  は水素原子又はメチル基、 $R^5$  は水素原子又はメチル基、 $R^6$  は水素原子、ハロゲン原子、アセチルアミノ基、水酸基、又は置換基を有していてもよい炭素数 1 ~ 5 のアルキル基の何れかから選択される置換基で表される。) で表される新規アプリシアトキシン誘導体、又はその医薬上許容される塩。

20

## 【請求項 2】

前記式 ( I ) 中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  が全て水素原子であり、 $R^6$  がメタ位の水酸基である式 ( I I )

## 【化 2】



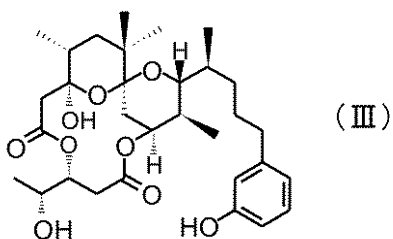
30

で表される新規アプ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 3】

前記式 ( I ) 中、 $R^1$  が水酸基、 $R^2$ 、 $R^3$  及び  $R^4$  がそれぞれメチル基、 $R^5$  が水素原子、 $R^6$  がメタ位の水酸基である式 ( I I I )

## 【化 3】



40

で表される新規アプリシアトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩。

50

## 【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 に記載の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ブリシ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、新規アブリシアトキシン誘導体に関するものである。

10

## 【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ブリシアトキシン (aplysiatoxin, 以下「ATX」) とその脱臭素体であるデブロモアブリシアトキシン (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的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。

20

## 【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、その中でも 1982 年に Pettit らによってフサコケムシ (bugula nertina) 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。

30

40

## 【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た。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

50

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きている。

#### 【0006】

一般に、TPAのような分子疎水性の高いPKCリガンド（Cl<sub>o</sub>gP：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（Cl<sub>o</sub>gP：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（Cl<sub>o</sub>gP：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（Cl<sub>o</sub>gP：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。

#### 【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

【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<sub>i</sub>）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。

#### 【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アトキシン誘導体は、次の構造式（I）で示される新規アプリシアトキシン誘導体、又はその医薬上許容される塩である。

#### 【0011】

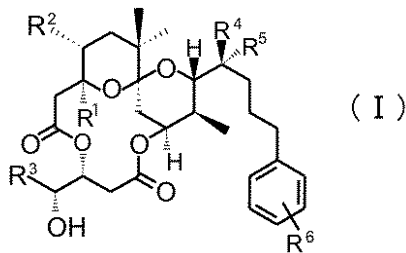
10

20

30

40

## 【化 1】



10

## 【 0 0 1 2 】

ただし、構造式 ( I ) 中、 $R^1$  は、水素原子又は水酸基、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  はそれぞれ独立して水素原子又はメチル基、 $R^6$  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。 $R^6$  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、 $R^6$  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-Apl og」と称することとする。

20

30

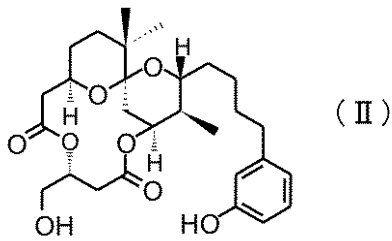
## 【 0 0 1 3 】

本発明はさらに、構造式 ( I ) 中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  及び  $R^5$  が全て水素原子で表され、 $R^6$  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アトキシン誘導体又はその医薬上許容される塩である。

40

## 【 0 0 1 4 】

## 【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 Apl og - 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 - Apl og - 1」と称する。

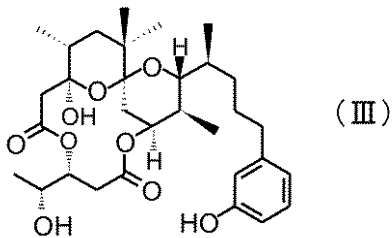
## 【0016】

また本発明は、構造式 (I) 中、構造式 (I) 中、 $R^1$  が水酸基、 $R^2$ 、 $R^3$  及び  $R^4$  がメチル基、 $R^5$  が水素原子、 $R^6$  がメタ位の水酸基で表される次の構造式 (III) で示される新規アプリシアトキシ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 (デプロモアプリシアトキシシン, 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)。

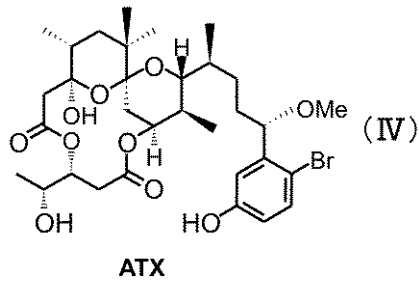
## 【0019】

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

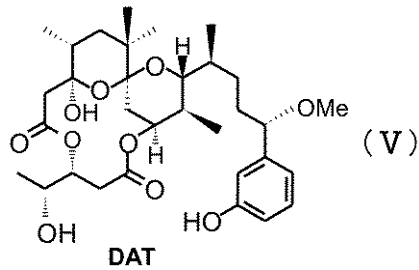
## 【0020】

40

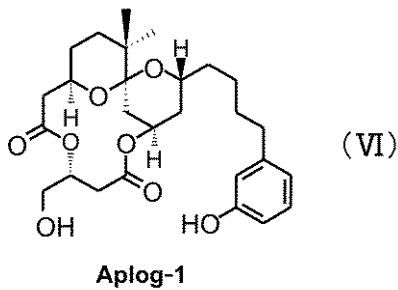
## 【化4】



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、これら新規アプリ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を見出した。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、Bryo-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ATX誘導体（一般式(I)）、10-Me-Aplog-1（構造式(II)）、及びDe-OMe-DAT（構造式(III)）は、PKCに対する結合能やヒトがん細胞増殖抑制活性がBryo-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Bryo-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、Bryo-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ATX誘導体の合成例及び生理活性試験例を、他のATX誘導体の試験例と比較して示す。

【0025】

<10-Me-Aplog-1の合成例>

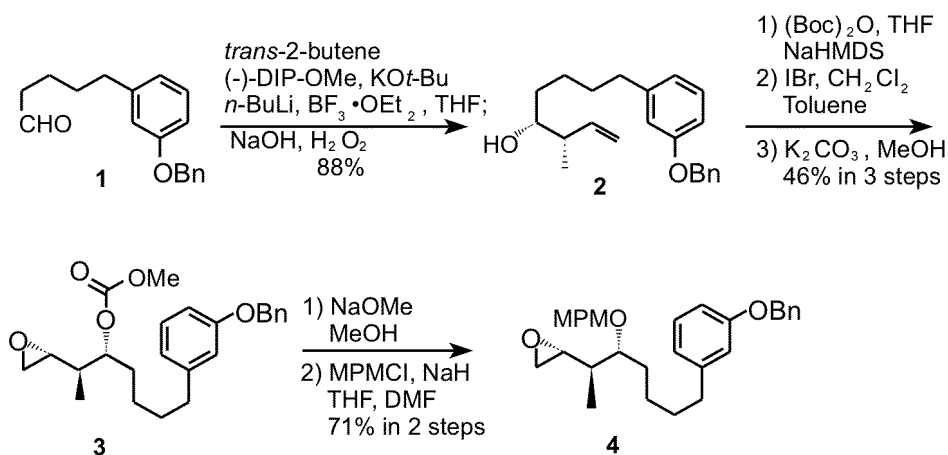
構造式(II)で示された10-Me-Aplog-1の全合成について、下記のスキームを参照して説明する。まず、既知のアルデヒド1に対し、Brownの不斉クロチル化反応を行いホモアリルアルコール2へと誘導した。<sup>1</sup>H NMRより、ジアステレオ選択性は90%以上であることを確認した。また、ホモアリルアルコール2の2級水酸基の絶対的立体はモッシャー法により確認し、エナンチオ選択性も90%以上であることを確認した。続いて、ホモアリルアルコール2の2級水酸基をBoc化し、Smithらの方法によりヨードカーボネートへと誘導した後、アルカリメタノール分解を行いエポキシド3とした。このエポキシド3について、NaOMe処理によりカーボネートを除去した後、2級水酸基をMPM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



40

Scheme 1-1 Synthesis of epoxide 4.

【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DDQ処理し、ベンジリデンアセタールを形成した後、TBS基を脱保護し、1級水酸基を酸化して

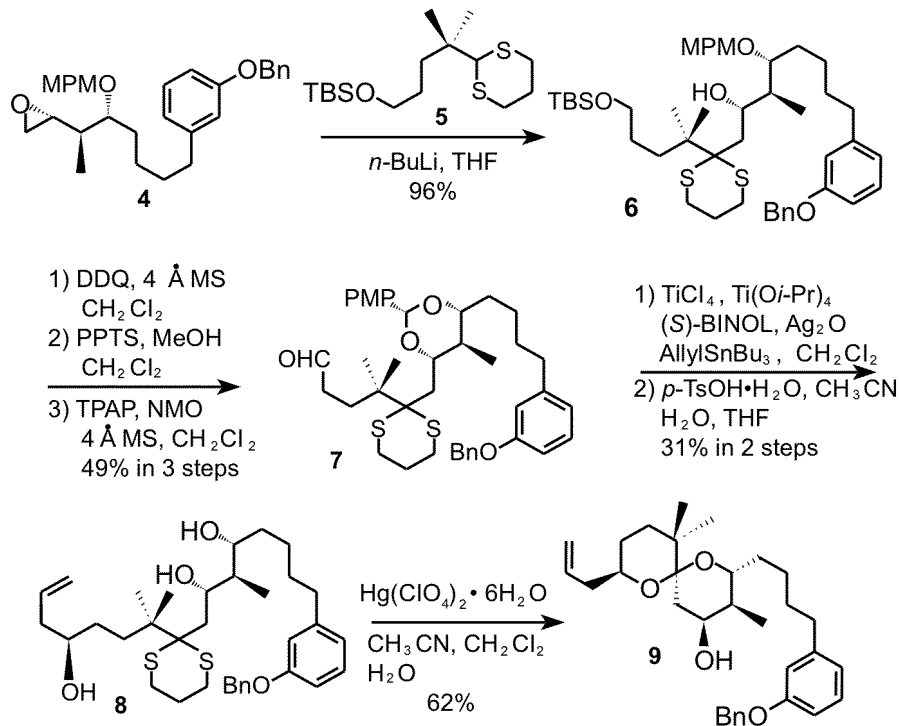
50



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20段階、0.85%の収率で得られた。

【0030】

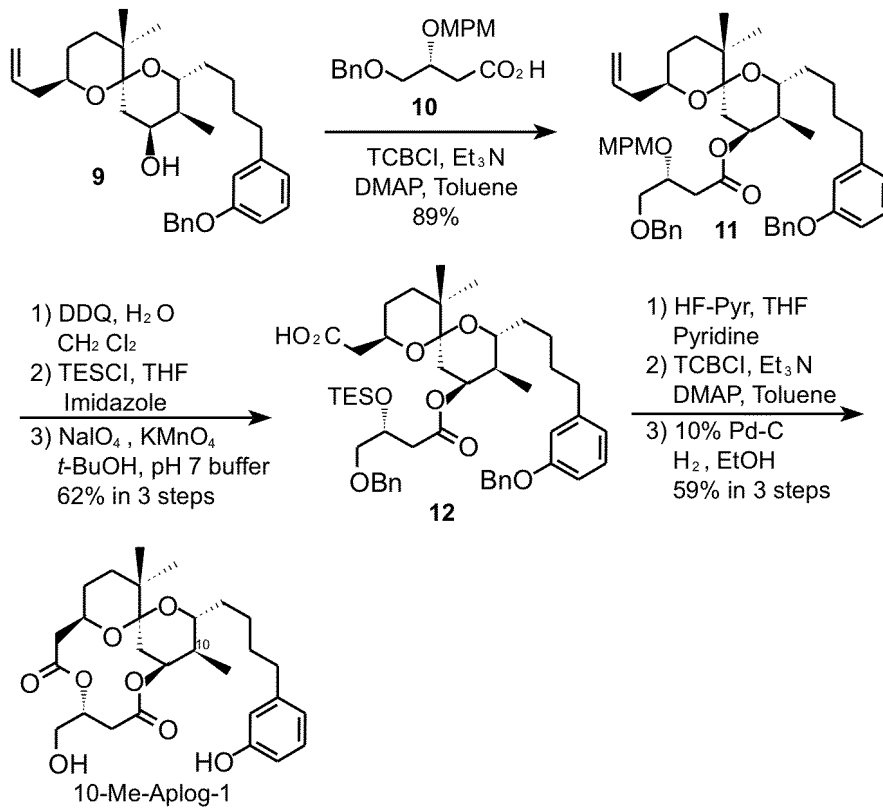
10

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 】

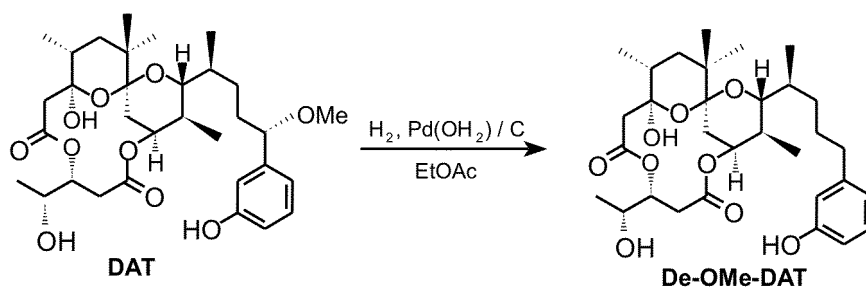
< D e - O M e - D A T の 合 成 例 >

構造式 ( I I I ) で示された D e - O M e - D A T の合成について、下記のスキーム 2 を参照して説明する。D e - O M e - D A T 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 D A T から 1 ステップで合成した。すなわち、D A T 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、H P L C ( 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、D A T から 1 5 位のメトキシ基を除去した D e - O M e - D A T を単離精製した。

## 【 0 0 3 4 】

10

## 【 化 8 】



Scheme 2 Synthesis of De-OMe-DAT

20

## 【 0 0 3 5 】

D e - O M e - D A T 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/EtOAc = 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.

40

<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> 569.3302.

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

## 【 0 0 3 7 】

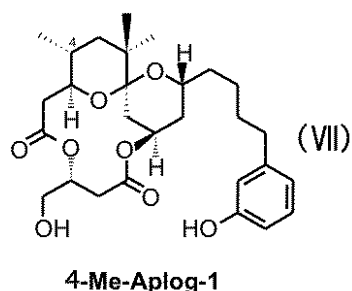
1 0 - M e - A p l o g - 1 及び D e - O M e - D A T の生理活性試験との比較のため、前述した化合物 B r y o - 1、A T X、D A T、A p l o g - 1 の他、A p l o g - 1

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

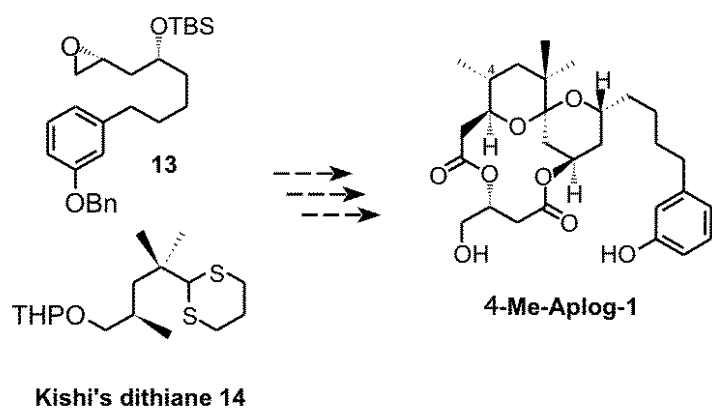
【0039】

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

【0046】

【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

【0047】

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、100nM～10μM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

【0048】

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100μg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1.7nmol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8.5nmol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[<sup>3</sup>H]phorbol 12,13-butyrate (PDBu)結合阻害試験により、結合阻害定数K<sub>i</sub>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<sub>i</sub>値の算出には、実験により求めた[<sup>3</sup>H]PDBuの特異的結合を50%阻害する濃度(IC<sub>50</sub>)、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[<sup>3</sup>H]PDBuの解離定数(K<sub>d</sub>)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<sub>i</sub> values for inhibition of [<sup>3</sup>H]PDBu's binding by Aplogs.

PKC C1 peptides	K <sub>i</sub> (nM)						K <sub>d</sub> (nM) [ <sup>3</sup> H]PDBu
	DAT	Bryo-1	Aplog-1	4-Me-Aplog-1	10-Me-Aplog-1	De-OMe-DAT	
α-C1A	0.26	7.4	63	15	4.7	1.0	1.1
β-C1A	0.17	13	89	15	12	1.5	1.3
γ-C1A	0.38	3.4	39	12	5.5	0.69	1.5
δ-C1B	0.20	0.60	7.4	3.3	0.46	0.32	0.53
ε-C1B	0.63	16	25	17	2.0	1.3	0.81
η-C1B	0.11	2.1	4.4	5.9	0.45	0.18	0.45
θ-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(α, β, γ)及び novel PKC (nPKC)アイソザイム(δ, ε, η, θ)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ていることを示唆している。

40

50

## 【 0 0 5 2 】

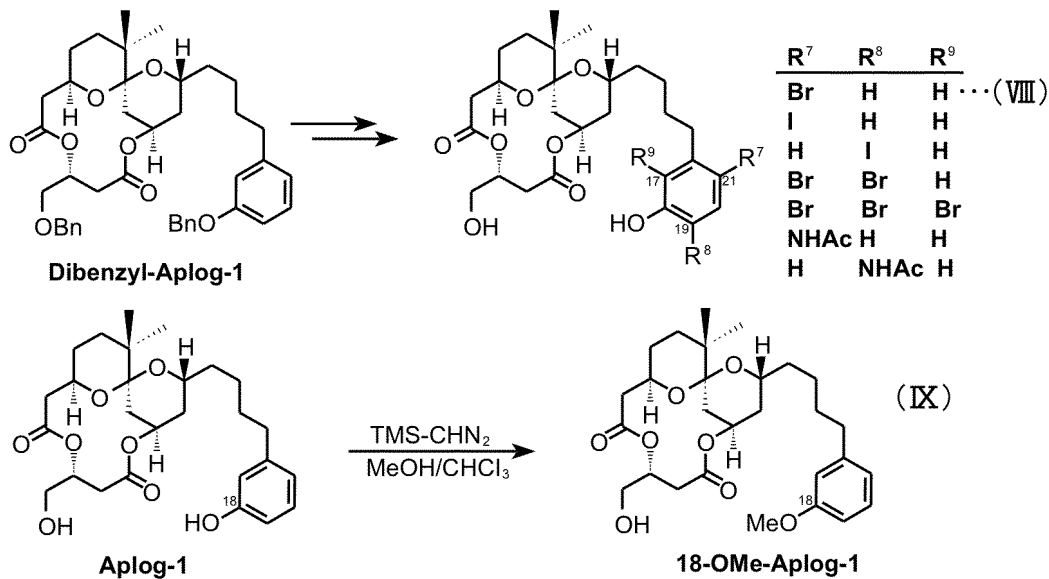
< A p l o g - 1 の側鎖の誘導体化と生理活性 >

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。

30

## 【 0 0 5 5 】

## 【 表 7 】

*K<sub>i</sub>* values for inhibition of [<sup>3</sup>H] PDBu binding.

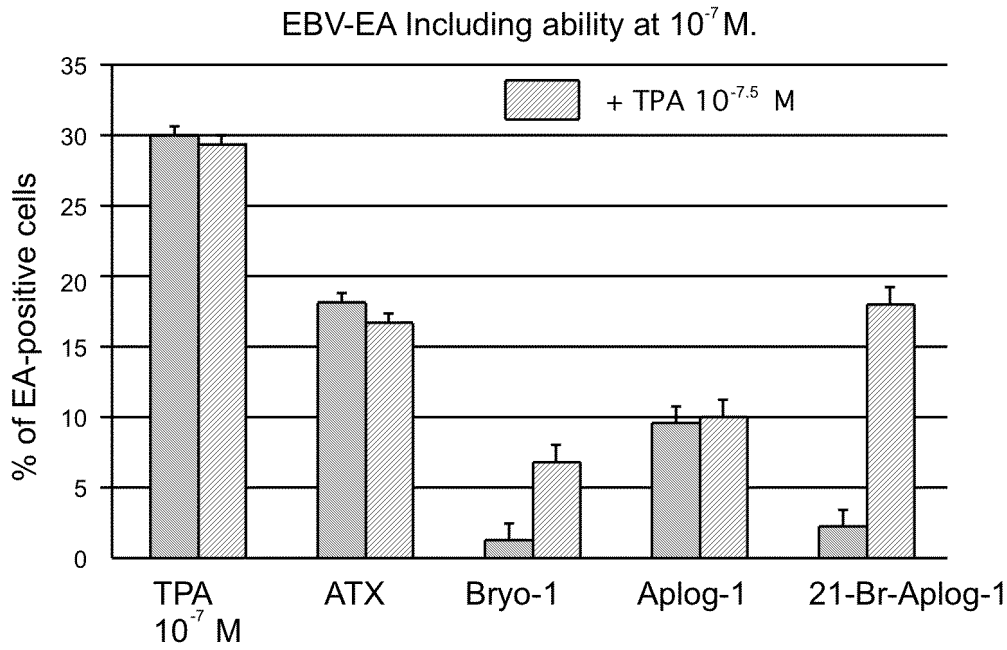
	PDBu	Bryo-1	ATX	Aplog-1	21-Br-Aplog-1
δ-C1A	110	5.0	12.3	140	66
δ-C1B	1.0	0.57	0.41	7.4	3.5
Ratio	110	8.8	29.3	18.9	18.9

40

## 【 0 0 5 6 】



【表 8】

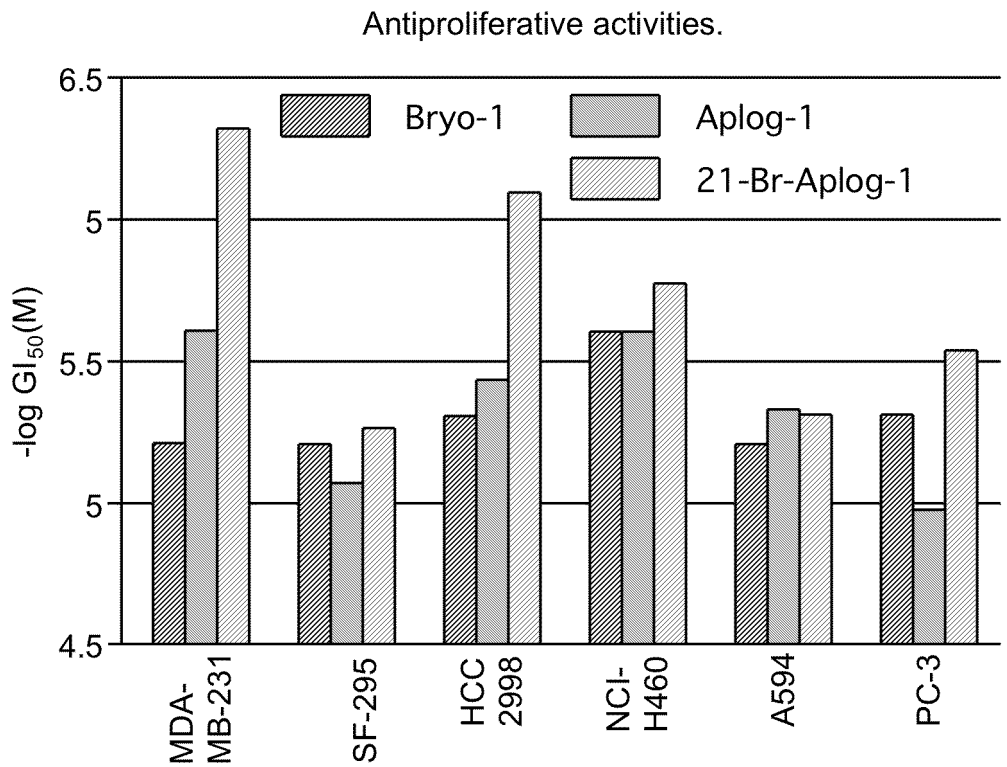


10

20

【 0 0 5 7 】

【表 9】



30

40

【 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、

50

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-Br-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-Br-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 】

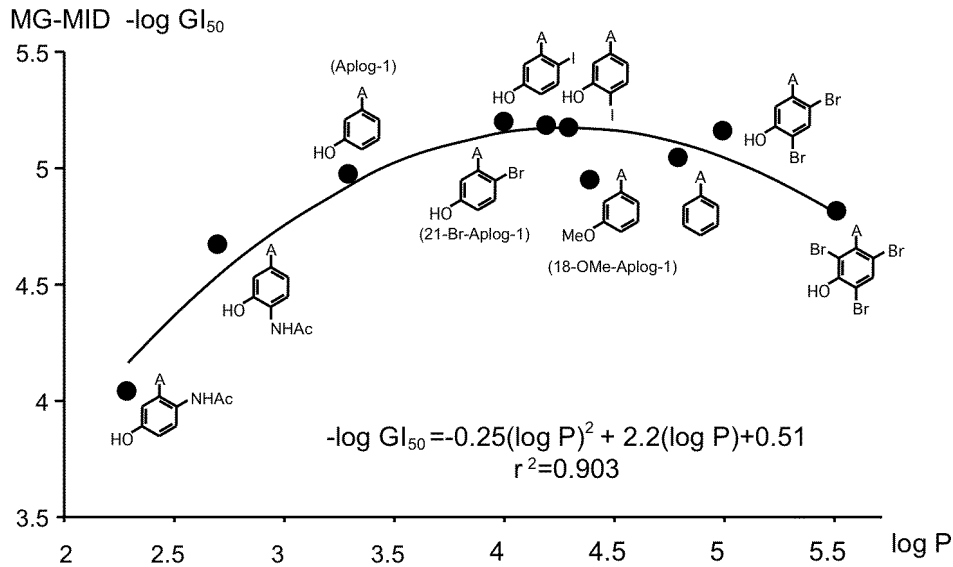
また、A p l o g - 1 のフェノール環部分における各種置換体のがん細胞増殖抑制活性をまとめたものを下表 10 に示す。下表の縦軸は、39 種類のヒトがん細胞に対する増殖抑制活性 - l o g I G<sub>50</sub> 値の平均値を示しており、横軸は、各化合物の分子疎水性度の実測値（逆相系 H P L C を用いた保持時間より決定）を示している。

10

【 0 0 6 0 】

【表 10】

### Anti-proliferative activities of substituted Aplog-1.



20

30

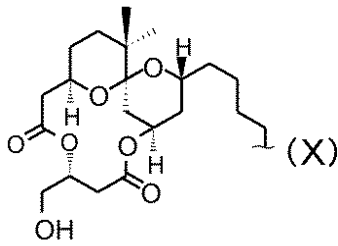
【 0 0 6 1 】

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。

40

【 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】

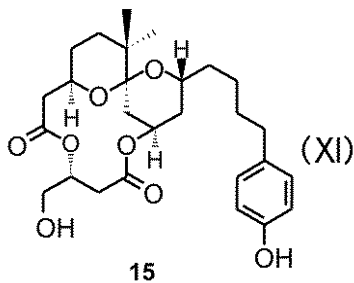
さらに、上式 ( X ) で示した A 部の側鎖に結合するベンゼン環に関し、フェノール性水酸基が結合する位置の相違による生理活性の変化について調べた。用いた化合物は、ベンゼン環のメタ位に水酸基が結合した化合物として A p l o g - 1、パラ位に水酸基が結合した化合物として下式 ( X I ) で示される化合物 1 5 である。A p l o g - 1 と化合物 1 5 の P K C アイソザイム結合選択性試験結果を下表 1 1 に、ヒトがん細胞増殖抑制活性試験結果を下表 1 2 に示す。下表に示される各試験は、何れも上述した同様の試験と同じ方法により行っている。また、表 1 2 で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



40

## 【 0 0 6 6】

【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 $GI_{50}$	
		Aplog-1	Compound 15
Breast	HBC-4	-6.33	-6.32
	MDA-MB-231	-5.61	-5.16
Colon	HCC2998	-5.43	-5.26
	NCI-H460	-5.60	-5.81
Lung	A549	-5.31	-5.12
	LOX-IMVI	-5.74	-4.97
Stomach	St-4	-5.55	-5.12
	MKN45	-5.33	-5.14

20

30

【 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  $R^1$  は水素原子又は水酸基の何れでもよく、 $R^2$  及び  $R^3$  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  $R^4$ 、 $R^5$  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  $R^6$  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よい、という構造が導かれた。特に  $R^6$  が水酸基の場合は、ベンゼン環のうちど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

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。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/061333
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07D493/20(2006.01)i, A61K31/365(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D493/20, A61K31/365  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	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., 2009.05.18, vol.131, no.22, p.7573-7579, entire text, particularly, fig. 1, 2, 'ATX', compound 1, table 1	1-4
A	Masami SUGANUMA et al, Estimation of tumor promoting activity and structure-function relationships of aplysiatoxins, CARCINOGENESIS, 1984.03, vol.5, no.3, p.315-318, entire text, particularly, table I, 'debromoaplysiatoxin'	1-4
<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 06 June, 2013 (06.06.13)		Date of mailing of the international search report 18 June, 2013 (18.06.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/061333

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Robert E. IRELAND et al, An Approach to the Total Synthesis of Aplysiatoxin, J. AM. CHEM. SOC., 1988, vol.110, no.17, p.5768-5779	1-4
P,X	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., 2013.03.25, vol.21, no.10, p.2695-2702, entire text, particularly, fig. 1, compound '10-Me-Aplog-1', table 3	1-4
P,X	Masayuki KIKUMORI et al, Structure-Activity Studies on the Spiroketal Moiety of a Simplified Analogue of Debromoaplysiatoxin with Antiproliferative Activity, J. MED. CHEM., 2012.05.24, vol.55, no.11, p.5614-5626, entire Text, particularly, abstract, compound 5, table 1	1-4

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 1 3 3 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D493/20(2006.01)i, A61K31/365(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(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. C07D493/20, A61K31/365			
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			
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) CAplus/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
A	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., 2009.05.18, 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	1-4	
<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 06.06.2013		国際調査報告の発送日 18.06.2013	
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) 谷尾 忍	4 P 9550
		電話番号 03-3581-1101	内線 3492



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 1 3 3 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Masami SUGANUMA et al, Estimation of tumor promoting activity and structure-function relationships of aplysiatoxins, CARCINOGENESIS, 1984.03, vol.5, no.3, p.315-318, 文献全体、特に、表 I の「デブロモアプリシアトキシン」参照	1-4
A	Robert E. IRELAND et al, An Approach to the Total Synthesis of Aplysiatoxin, J. AM. CHEM. SOC., 1988, vol.110, no.17, p.5768-5779	1-4
P X	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., 2013.03.25, 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	1-4
P X	Masayuki KIKUMORI et al, Structure-Activity Studies on the Spiroketal Moiety of a Simplified Analogue of Debromoaplysiatoxin with Antiproliferative Activity, J. MED. CHEM., 2012.05.24, vol.55, no.11, p.5614-5626, 文献全体、特に、要約の化合物5及び表1参照	1-4

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード ( 参考 )  
**A 6 1 P 25/28 (2006.01)** A 6 1 P 25/28

(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

(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

F ターム ( 参考 ) 4C071 AA04 BB02 CC14 EE07 FF06 GG03 HH09 JJ01 KK01 LL01  
 4C086 AA01 AA02 AA03 CA01 MA01 MA04 NA14 ZA16 ZB26 ZB33  
 ZC19 ZC20 ZC55

## 【要約の続き】

アルキル基の何れかから選択される置換基で表される。)

( 注 ) この公表は、国際事務局 ( W I P O ) 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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 ( 実用新案法第 4 8 条の 1 3 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。