

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02019/151439**

発行日 令和3年1月28日(2021.1.28)

(43) 国際公開日 **令和1年8月8日(2019.8.8)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 11/02 (2006.01)</b>	C O 7 K 11/02	Z N A 4 C O 8 4
<b>A61K 38/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 38/12	4 H O 4 5
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A61P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
<b>A61P 35/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

出願番号 特願2019-569581 (P2019-569581)	(71) 出願人 504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(21) 国際出願番号 PCT/JP2019/003482	
(22) 国際出願日 平成31年1月31日(2019.1.31)	
(31) 優先権主張番号 特願2018-15606 (P2018-15606)	(71) 出願人 505210115 国立大学法人旭川医科大学 北海道旭川市緑が丘東二条一丁目1番1号
(32) 優先日 平成30年1月31日(2018.1.31)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(74) 代理人 230104019 弁護士 大野 聖二
	(74) 代理人 100119183 弁理士 松任谷 優子
	(74) 代理人 100149076 弁理士 梅田 慎介
	(74) 代理人 100173185 弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド系抗腫瘍薬の創製

## (57) 【要約】

本発明は、エキノマイシンと同等又はそれ以上の抗がん活性を有するエキノマイシン誘導体ならびにその化学的な手法に基づく製造方法を提供することを目的とする。

式(I)で表されるエキノマイシン誘導体ならびにその化学的な手法に基づく製造方法

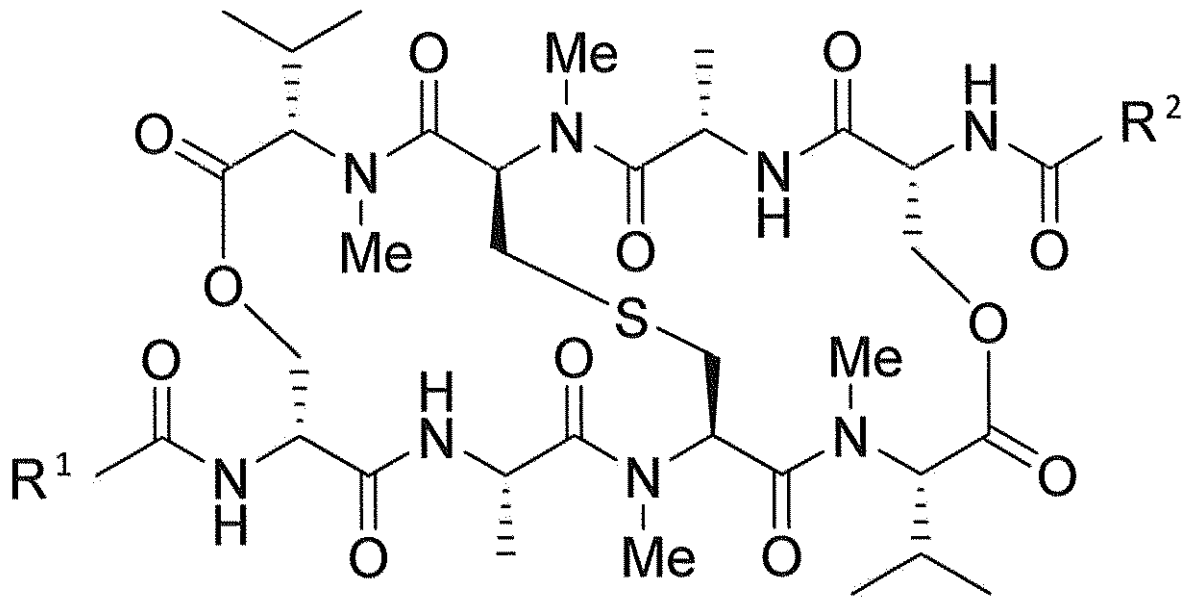
。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 ( I ) :

【化 1】



10

20

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、一又は複数の置換基で置換されていてもよい、芳香族炭化水素基、飽和もしくは不飽和の複素環式基、アントラキノ基、又はベンゾフェノン基を示す)で表される化合物又はその塩。

【請求項 2】

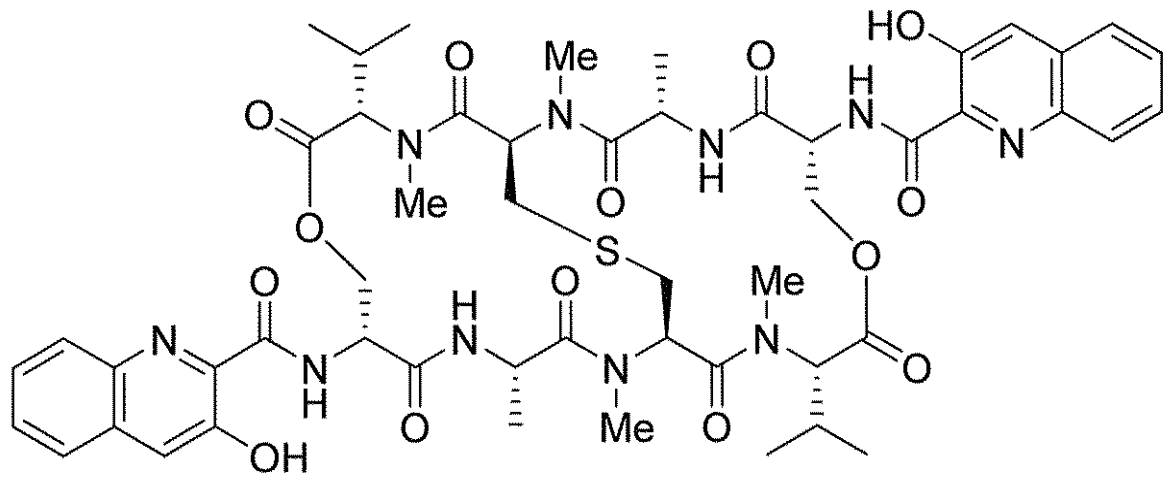
R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数 1 ~ 6 のアルキル基からなる群から選択される一又は複数の置換基で置換されていてもよい、キノリル基、イソキノリル基、キナゾリニル基、キノキサリル基、シンノリル基、インドリル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾチオフェン基、ピラジル基、アントラキノ基、ベンゾフェノン基より選択される基である、請求項 1 に記載の化合物又はその塩。

30

【請求項 3】

以下の式 ( II ) :

【化 2】

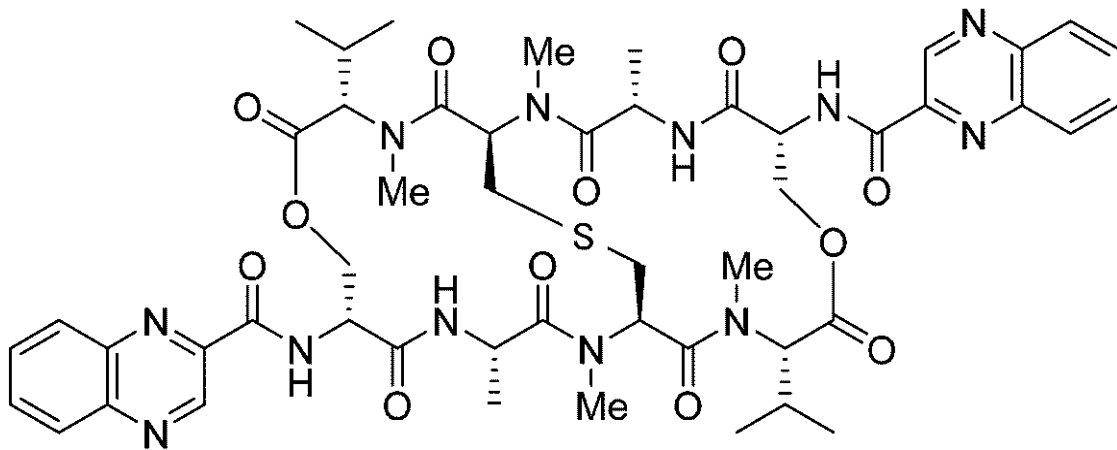


10

又は

以下の式 ( I I I ) :

【化 3】



30

で表される、請求項 1 又は 2 に記載の化合物又はその塩。

【請求項 4】

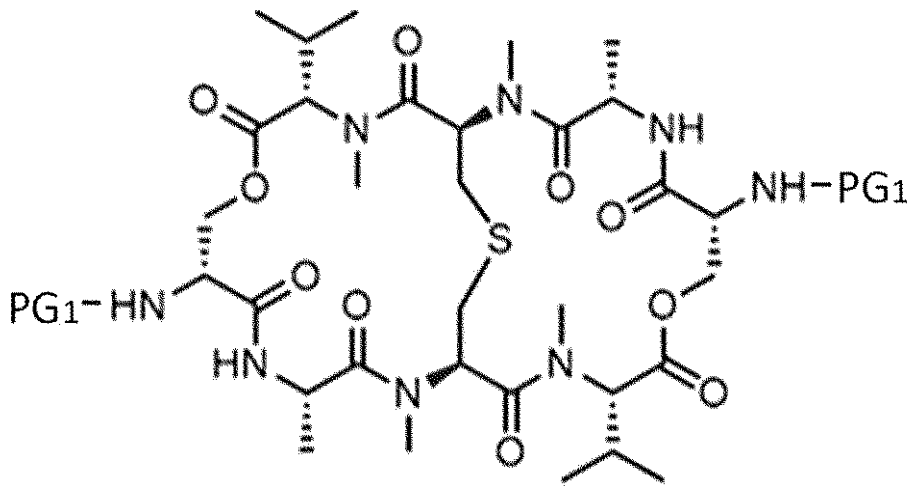
請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物又はその塩を含む、がんを治療するための医薬組成物。

40

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物の製造方法であって、下記式 ( 6 ) :

【化4】

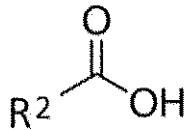
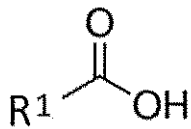


10

(式6)

20

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示す)で表される化合物と下記式(7)：  
【化5】



30

(式7)

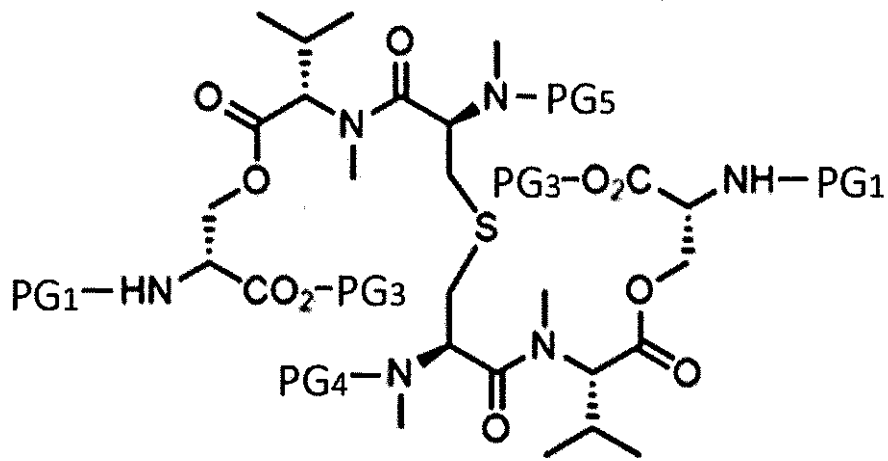
(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、一又は複数の置換基で置換されていてもよい、芳香族炭化水素基、飽和もしくは不飽和の複素環式基、アントラキノン基、又はベンゾフェノン基を示す)で表される化合物より、式(I)で表される化合物を製造する工程を含む、方法。

40

【請求項6】

前記式(6)で表わされる化合物が、下記式(3)：

【化6】



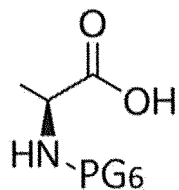
10

(式3)

20

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示し、  
PG<sub>3</sub>はカルボキシル基の保護基を示し、  
PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよく、PG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の  
保護基を示す)で表される化合物を、下記式(4)：

【化7】

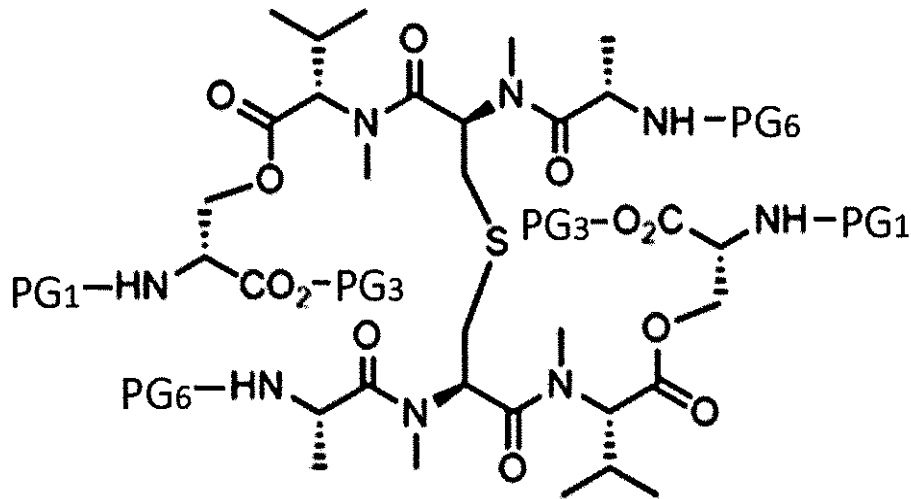


30

(式4)

(式中、PG<sub>6</sub>はPG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の保護基を示す)  
で表される化合物と反応させ、下記式(5)：

【化 8】



10

(式5)

20

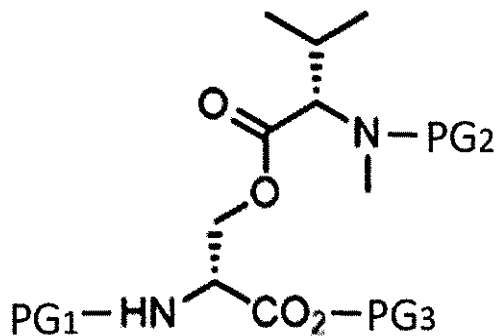
(式中、PG<sub>1</sub>、PG<sub>6</sub>、PG<sub>3</sub>は前記定義のとおりである)

で表される化合物を製造し、得られた式(5)で表される化合物より製造される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記式(3)で表わされる化合物が、下記式(1)：

【化9】



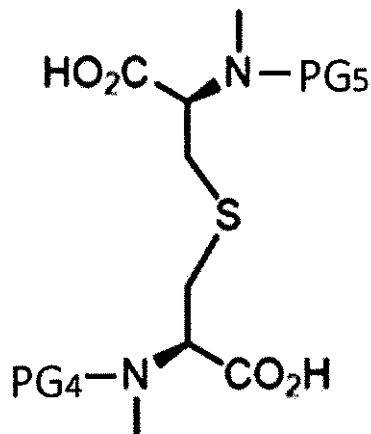
30

(式1)

40

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示し、  
PG<sub>2</sub>はPG<sub>1</sub>とは異なる、アミノ基の保護基を示し、  
PG<sub>3</sub>はカルボキシル基の保護基を示す)  
で表される化合物と、下記式(2)：

【化 1 0】



(式2)

10

(式中、PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよく、PG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の保護基を示す)

20

で表される化合物より製造される、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エキノマイシン誘導体及びその製造方法、ならびにエキノマイシン誘導体を有効成分として含有するがんを治療するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは昭和56年より今日まで、日本人の死因の第一位となっており、常に新たな治療法が求められている。がんの治療法としては、外科療法、放射線療法、化学療法(抗がん剤)等が挙げられ、なかでも抗がん剤は、他の治療法とも併用され広く用いられている。抗がん剤としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド系抗がん剤、抗生物質抗がん剤、白金製剤等が用いられているが、その治療効果は未だ十分とはいえず、また副作用の発生頻度が高いという問題もあり、より優れた抗がん剤の開発が望まれている。

30

【0003】

エキノマイシン(Echinomycin)は、1957年に放線菌であるストレプトマイセス・エキナタス(*Streptomyces echinatus*)から単離された環状ペプチド系天然物である。エキノマイシンは、*in vitro*及び*in vivo*において強力な抗がん活性を有することが確認されている。米国においては、エキノマイシンを有効成分とする抗がん剤の第2相臨床試験が実施されたが(非特許文献1)、毒性が認められたためその後の臨床開発は中止された。

40

【0004】

しかしながら、近年、エキノマイシンがHIF-1 $\alpha$ 阻害活性を有することが明らかとなり(非特許文献2)、また、エキノマイシンを低用量で投与した場合にはがん幹細胞選択的に細胞増殖抑制活性を示し、すい臓がんや急性骨髄性白血病等の治療に有効であることが報告されている(非特許文献3、非特許文献4)。このため、エキノマイシンは再び注目されており、投与量をコントロールする事で臨床試験を再開する事も検討されている。

【0005】

50

一方、エキノマイシンの製造は、微生物の生合成に基づく手法に依存しており、化学的な製造法は開発されていない。また、微生物より得られたエキノマイシンを、化学修飾する方法が知られているが、これまでに合成されたエキノマイシン誘導体は、エキノマイシンと比べて抗がん活性が低下したもののばかりであった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Cancer Chemother. Pharmacol. 1994, 34, 266-269.

【非特許文献2】Cancer Res. 2005, 19, 99047-9055.

10

【非特許文献3】Oncotarget. 2016 Jan 19; 7(3): 3217-32.

【非特許文献4】Blood. 2014 Aug 14; 124(7): 1127-1135.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、エキノマイシンと同等又はそれ以上の抗がん活性を有するエキノマイシン誘導体ならびにその化学的な手法に基づく製造方法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】

20

【0008】

本発明者らは、エキノマイシンの化学構造において、チオアセタール部位は抗がん活性の発現に必要とされず、また当該部位を除いたエキノマイシン誘導体は化学的な手法に基づいて容易に製造できることを見出した。また、このようにして得られたエキノマイシン誘導体は、エキノマイシンと同等又はそれ以上の抗がん活性を有することを見出した。

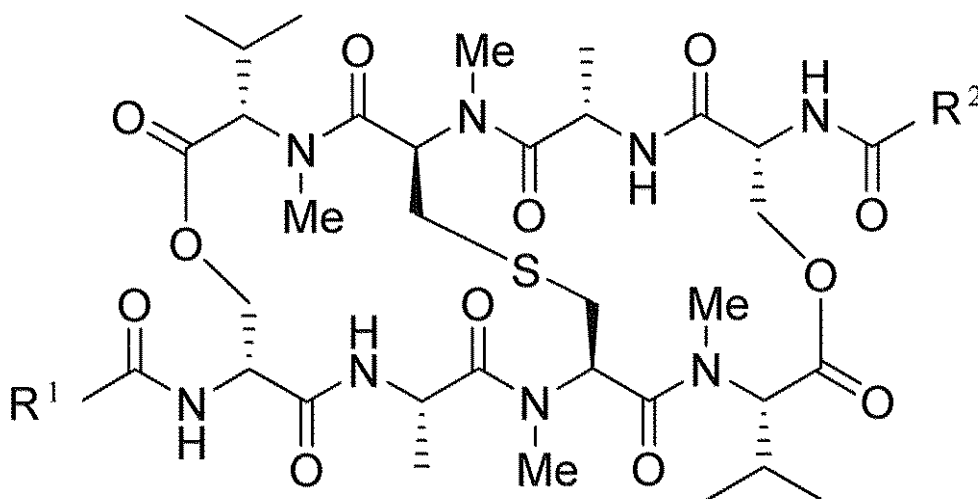
本発明はこれらの知見に基づくものであり、以下の発明を包含する。

【0009】

[1] 以下の式(I)：

【化1】

30



40

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、一又は複数の置換基で置換されていてもよい、芳香族炭化水素基、飽和もしくは不飽和の複素環式基、アントラキノン基、又はベンゾフェノン基を示す)で表される化合物又はその塩。

[2] R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、水素

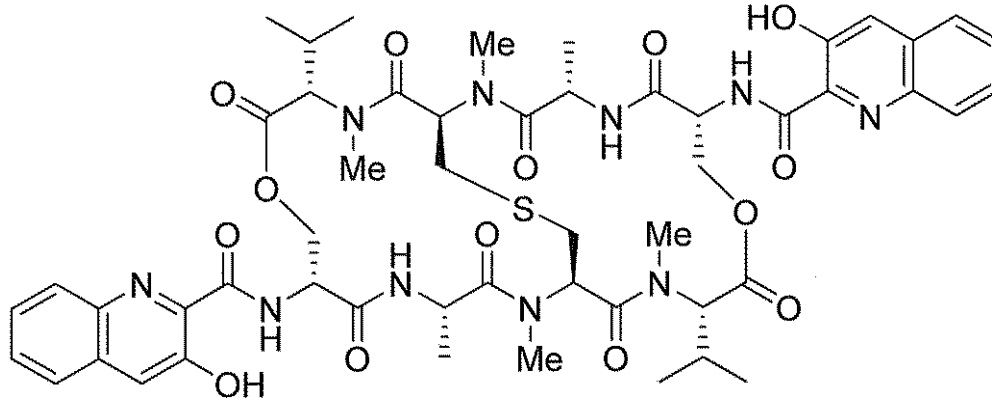
50



原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数 1 ~ 6 のアルキル基からなる群から選択される一又は複数の置換基で置換されていてもよい、キノリル基、イソキノリル基、キノゾリニル基、キノキサリル基、シンノリル基、インドリル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾチオフエン基、ピラジル基、アントラキノン基、ベンゾフェノン基より選択される基である、[ 1 ] の化合物又はその塩。

[ 3 ] 以下の式 ( I I ) :

【化 2】



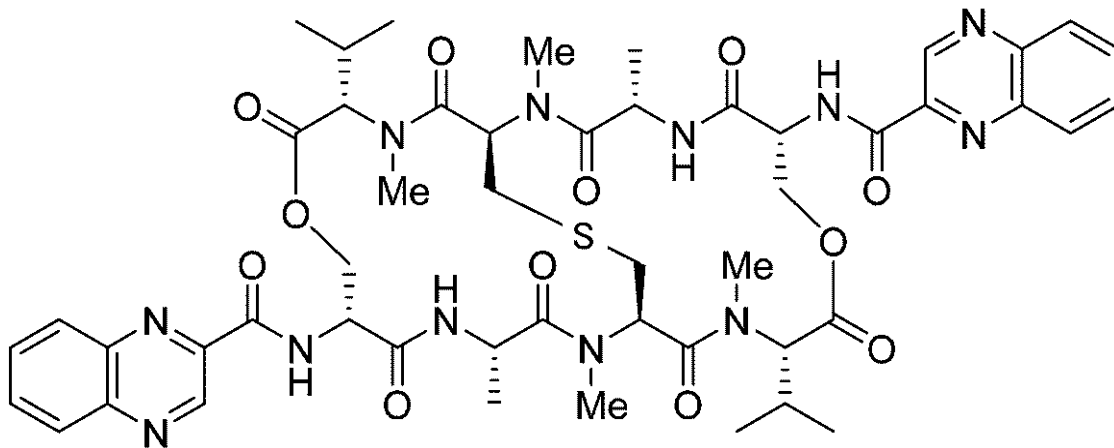
10

20

又は

以下の式 ( I I I ) :

【化 3】



30

で表される、[ 1 ] 又は [ 2 ] の化合物又はその塩。

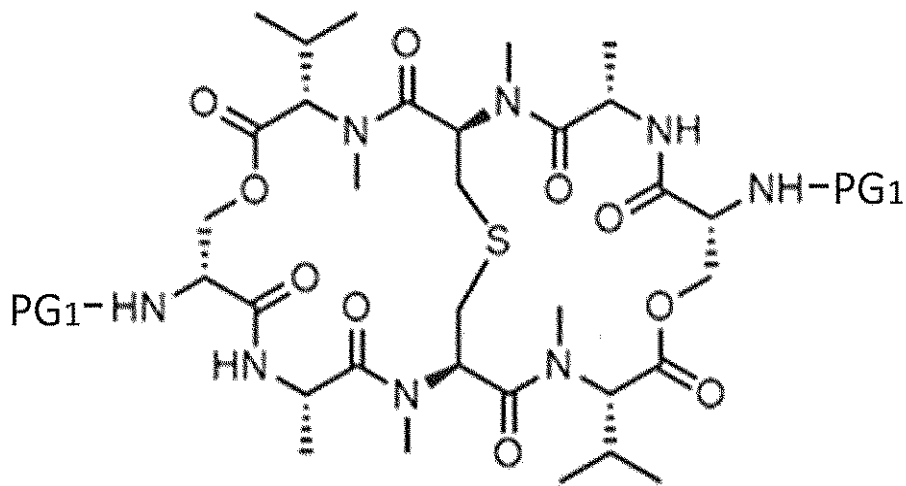
[ 4 ] [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれか一項に記載の化合物又はその塩を含む、がんを治療するための医薬組成物。

40

【 0 0 1 0 】

[ 5 ] [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかの化合物の製造方法であって、下記式 ( 6 ) :

【化4】



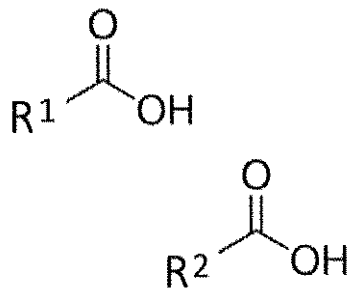
10

(式6)

20

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示す)で表される化合物と下記式(7)：

【化5】



30

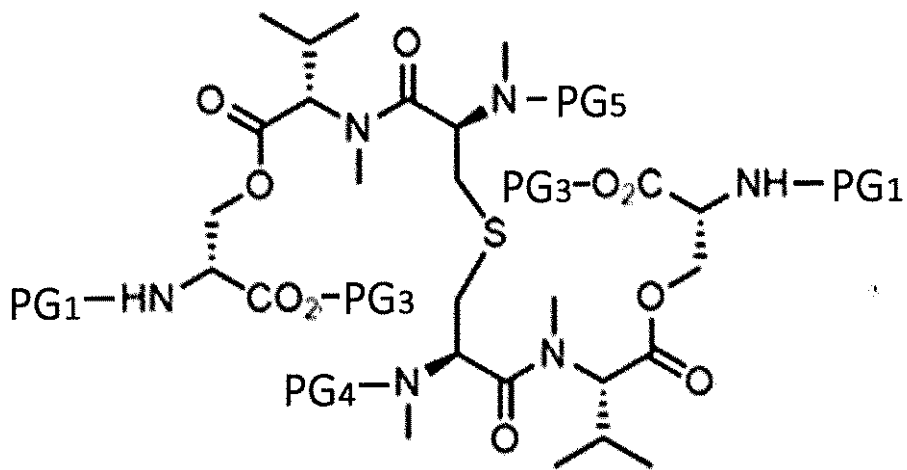
(式7)

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、一又は複数の置換基で置換されていてもよい、芳香族炭化水素基、飽和もしくは不飽和の複素環式基、アントラキノン基、又はベンゾフェノン基を示す)で表される化合物より、式(I)で表される化合物を製造する工程を含む、方法。

40

[6] 前記式(6)で表わされる化合物が、下記式(3)：

【化6】



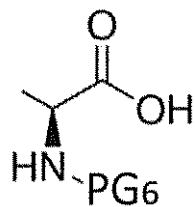
10

(式3)

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示し、  
PG<sub>3</sub>はカルボキシル基の保護基を示し、  
PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよく、PG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の  
保護基を示す)で表される化合物を、下記式(4)：

20

【化7】

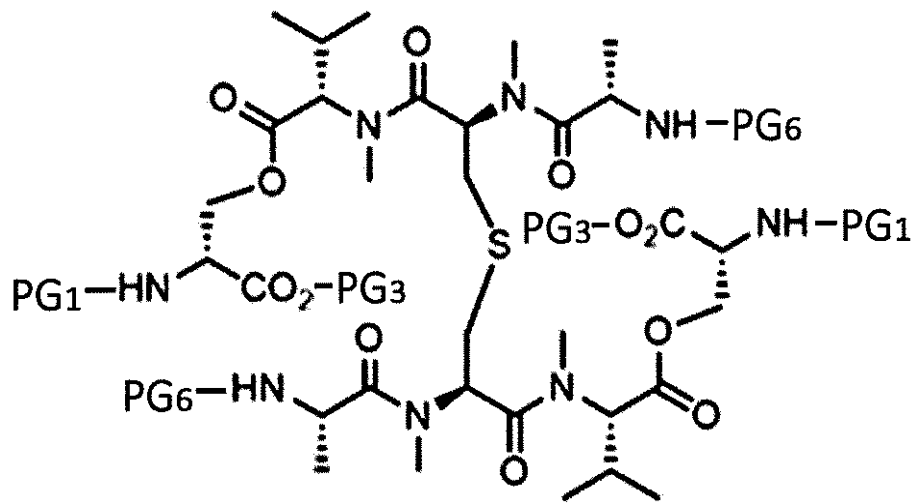


30

(式4)

(式中、PG<sub>6</sub>はPG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の保護基を示す)で表される化合物と反応させ、下記式(5)：

【化 8】



10

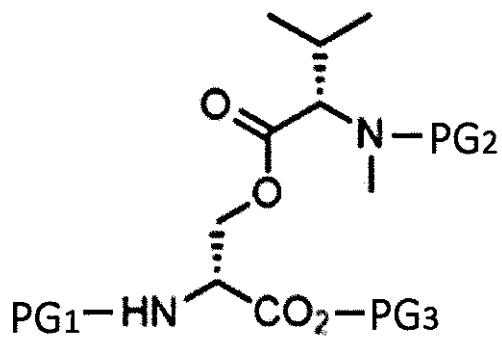
(式5)

20

(式中、PG<sub>1</sub>、PG<sub>6</sub>、PG<sub>3</sub>は前記定義のとおりである)  
 で表される化合物を製造し、得られた式(5)で表される化合物より製造される、[5]  
 の方法。

[7] 前記式(3)で表わされる化合物が、下記式(1)：

【化 9】



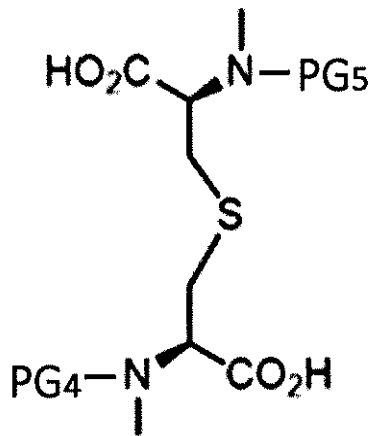
30

(式1)

40

(式中、PG<sub>1</sub>はアミノ基の保護基を示し、  
 PG<sub>2</sub>はPG<sub>1</sub>とは異なる、アミノ基の保護基を示し、  
 PG<sub>3</sub>はカルボキシル基の保護基を示す)  
 で表される化合物と、下記式(2)：

【化 1 0】



(式2)

10

20

30

40

50

(式中、PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、同一であっても異なってもよく、PG<sub>1</sub>とは異なるアミノ基の保護基を示す)

で表される化合物より製造される、[6]の方法。

【0011】

[8] [1]～[3]のいずれかの化合物又はその塩をがん患者に投与することを含む、がんを治療するための方法。

[9] がんを治療する方法において使用するための、[1]～[3]のいずれかの化合物又はその塩。

[10] がんを治療するための医薬の製造における、[1]～[3]のいずれかの化合物又はその塩の使用。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2018-015606号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、エキノマイシンと同等又はそれ以上の抗がん活性を有するエキノマイシン誘導体ならびにその化学的な手法に基づく製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1-1】図1-1は、本発明の化合物が有する抗がん活性を、膵臓がん細胞(MIAPaCa-2細胞)株を用いたSRBアッセイにより評価した結果を示すグラフ図である。\* : p < 0.05 (vs 対照、スチューデントのt検定)

【図1-2】図1-2は、本発明の化合物が有する抗がん活性を、膵臓がん細胞(SUIT-2細胞)株を用いたSRBアッセイにより評価した結果を示すグラフ図である。\* : p < 0.05 (vs 対照、スチューデントのt検定)

【図1-3】図1-3は、本発明の化合物が有する抗がん活性を、大腸がん細胞(SW620細胞)株を用いたSRBアッセイにより評価した結果を示すグラフ図である。\* : p < 0.05 (vs 対照、スチューデントのt検定)

【図2-1】図2-1は、本発明の化合物が有する抗がん活性を、膵臓がん細胞(MIAPaCa-2細胞)株を移植した動物モデルを用いたin vivoアッセイにより評価した結果を示すグラフ図である。(A)移植したがん細胞の表面積(mm<sup>2</sup>)の経時的



キル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基等を示す)を意味する。

【0018】

「ハロゲン原子」とは、塩素原子、フッ素原子、臭素原子、ヨウ素原子等を意味する。

【0019】

「アルキル基」とは、直鎖状もしくは分枝状のアルキル基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等を挙げることができる。

【0020】

「アルケニル基」とは、炭素-炭素間の二重結合を少なくとも一つ含む直鎖状もしくは分枝状のアルケニル基を意味し、例えば、ビニル基、アリル基、メチルビニル基、プロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基等を挙げることができる。

10

【0021】

「アルキニル基」とは、炭素-炭素間の三重結合を少なくとも一つ含む直鎖状もしくは分枝状のアルキニル基を意味し、例えば、エチニル基、2-プロピニル基等を挙げることができる。

【0022】

「ハロアルキル基」とは、アルキル基における水素原子の一もしくは複数個又は全てがハロゲン原子で置換されたものを意味する。例えば、モノフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、1-フルオロエチル基、2-フルオロエチル基、1,1-ジフルオロエチル基、1,2-ジフルオロエチル基、2,2-ジフルオロエチル基等を挙げることができる。

20

【0023】

「アルコキシ基」とは、アルキル基が結合したオキシ基を意味し、例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、イソプロポキシ基、*n*-ブトキシ基、イソブトキシ基、*tert*-ブトキシ基等を挙げることができる。

【0024】

「シクロアルキル基」とは、単環式又は多環式のアルキル基を意味する。例えば、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、デカリル基、アダマンチル基等を挙げることができる。

【0025】

「芳香族炭化水素基」とは、単環式もしくは多環式の芳香族炭化水素基を意味し、一部の環のみが芳香族性を示す基であってもよい。このような芳香族炭化水素基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基、テトラヒドロナフチル基等を挙げることができる。

30

【0026】

「飽和複素環式基」とは、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む単環式もしくは多環式の飽和複素環式基を意味する。このような飽和複素環式基としては、例えば、ピロリジニル基、ピペリジニル基、ピペラジニル基、ヘキサメチレンイミノ基、モルホリノ基、チオモルホリノ基、ホモピペラジニル基、オキセタニル基、テトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基等を挙げることができる。

40

【0027】

「不飽和複素環式基」とは、窒素、酸素及び硫黄からなる群から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む単環式もしくは多環式の、完全不飽和もしくは部分不飽和の複素環式基を意味する。このような不飽和複素環式基としては、例えば、キノリル基、イソキノリル基、キナゾリル基、キノキサリル基、シンノリル基、イミダゾリル基、チエニル基、フリル基、ピロリル基、オキサゾリル基、イソキサゾリル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、チアジアゾリル基、ピラゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、ピリジル基、ピラジル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、インドリル基、イソインドリル基、インダゾリル基、トリアゾロピリジル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾチエニル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチオフェ

50

ン基、プリニル基、メチレンジオキシフェニル基、エチレンジオキシフェニル基、ジヒドロベンゾフラニル基等が挙げられる。

【0028】

好ましくは、本発明の式(I)で表される化合物において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、一又は複数の置換基で置換されていてもよい、不飽和複素環式基、アントラキノン基、又はベンゾフェノン基である。例えば、本発明の式(I)で表される化合物において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して選択することができ同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数1~6のアルキル基からなる群より選択される一又は複数の置換基で置換されていてもよい、キノリル基、イソキノリル基、キナゾリニル基、キノキサリル基、シンノリル基、インドリル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、ベンゾチオフェン基、ピラジル基、アントラキノン基、ベンゾフェノン基等が挙げられる。

10

【0029】

具体的には、本発明の式(I)で表される化合物において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数1~6のアルキル基からなる群より選択される一又は複数の置換基で置換されていてもよい、2-、3-、4-、5-、6-、もしくは7-インドリル基、2-ベンゾフラニル基、2-、もしくは3-ベンゾチオフェン基、5-、もしくは6-ベンゾオキサゾリル基、6-ベンゾチアゾリル基、6-ピラジル基、2-アントラキノン基、4-ベンゾフェノン基である。

20

【0030】

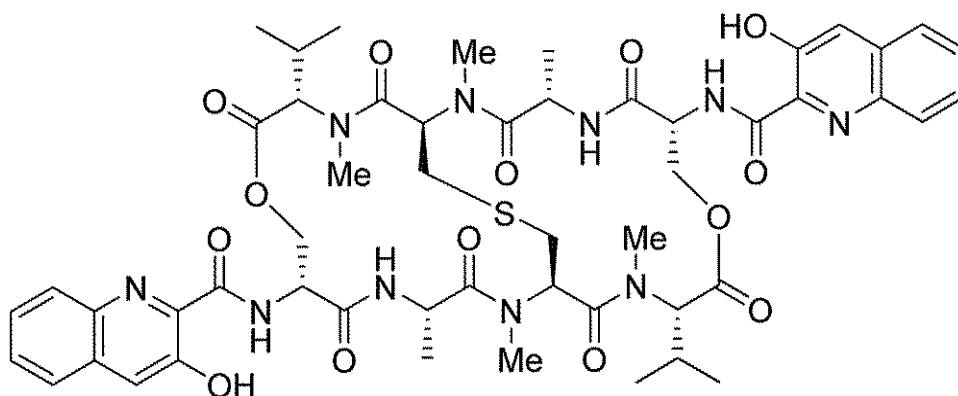
あるいは、本発明の式(I)で表される化合物において、 $R^1$ 及び $R^2$ は、同一又は異なって、2-キノリル基ならびにその3位、4位、5位、6位、7位、又は8位にハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数1~6のアルキル基から選択される置換基を一つ有する2-キノリル基、ならびに、2-キノキサリル基、ならびにその3位、4位、5位、6位、7位、及び8位から選択される2か所に、同一又は異なって、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、及び炭素数1~6のアルキル基からなる群から選択される置換基をそれぞれ一つ有する。好ましくは、 $R^1$ 及び $R^2$ は3位に前記置換基を一つ有する2-キノリル基であるか、3位及び4位に前記置換基をそれぞれ一つ有する2-キノキサリル基である。

30

【0031】

特に好ましくは、本発明の化合物は以下の式(II)：

【化12】



40

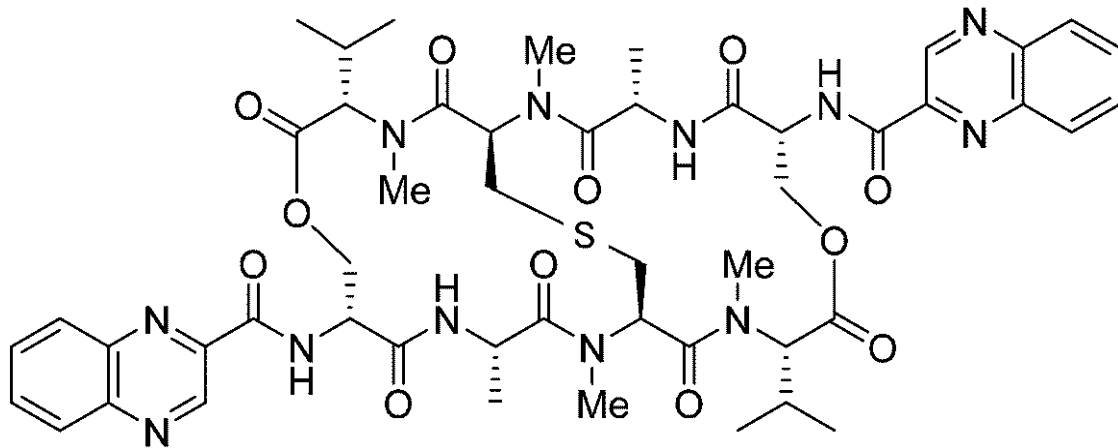
又は

【0032】

以下の式(III)：



## 【化 1 3】



10

で表される。

## 【0033】

本発明の化合物が、光学異性体、立体異性体、位置異性体、回転異性体、互変異性体等の異性体を有する場合には、いずれかの異性体も混合物も本発明の化合物に包含される。例えば、本発明の化合物に光学異性体が存在する場合には、ラセミ体から分割された光学異性体も本発明の化合物に包含される。

20

## 【0034】

本発明の化合物の塩とは、薬学的に許容される塩であればよく、有機化学の分野で一般的に用いられるもの包含し、塩基付加塩や酸付加塩等を挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩、有機アミン塩（トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、プロカイン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩等）が挙げられる。また、酸付加塩としては、例えば、無機酸塩（塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、過塩素酸塩等）、有機酸塩（酢酸塩、ギ酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、トリフルオロ酢酸塩等）、スルホン酸塩（メタンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等）が挙げられる。

30

## 【0035】

本発明化合物又はその塩は、結晶の形態であってもよい。結晶形は、単一であっても多形混合物であってもよく、従来公知の結晶化法を用いて製造することができる。また、本発明の化合物又はその塩は、溶媒和物（例えば、水和物等）の形態であってもよいし、無溶媒和物の形態であってもよい。また、本発明化合物又はその塩は、同位元素（例えば、重水素、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 等）等で標識されていてもよい。

40

## 【0036】

## 2. 製造方法

本発明の式(I)で表される化合物は、例えば、下記の製造法又は実施例に示す方法等により製造することができる。ただし、本発明の式(I)で表される化合物の製造法はこれら反応例に限定されるものではない。

## 【0037】

下記化合物の製造法において、「アミノ基の保護基」とは、Boc基、ベンジルオキシカルボニル基、4-メトキシベンジル基、2,4,6-トリメトキシベンジル基、2,4-ジメトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基等が挙げられるがこれらに限定はされない。

50

## 【0038】

下記化合物の製造法において、「カルボキシ基の保護基」とは、アリル基、アルキル基、シクロアルキル基、*t*-ブチル基、ベンジル基、メトキシベンジル基、ニトロベンジル基、トリクロロエチル基、フェナシル基挙げられるがこれらに限定はされない。

## 【0039】

下記化合物の製造法において、「保護基の除去(脱保護)」は、公知の手法により行うことができ、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸、塩酸、硫酸、酢酸、蟻酸、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、イソプロパノール、*tert*-ブチルアルコール、トルエン、ベンゼン、塩化メチレン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリジノン、ジメチルスルホキシド等を溶媒として用いることができ、選択される除去対象の保護基(及び除去対象でない保護基)の種類に応じて適宜選択することができる。反応には、必要に応じて、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール、Pd触媒、液体アンモニアを添加することができる。反応は溶媒中にて-78 ~ 200、好ましくは25 ~ 100、より好ましくは、30 ~ 50にて、10分~24時間、より好ましくは30分~12時間、反応させることにより行うことができる。

10

## 【0040】

下記化合物の製造法において、「縮合反応」は、公知の手法により行うことができ、縮合剤を添加した溶媒中にて、-78 ~ 200、好ましくは25 ~ 100、より好ましくは、30 ~ 50にて、10分~3日間、好ましくは1時間~24時間、より好ましくは3~15時間、反応させることにより行うことができる。

20

## 【0041】

縮合剤としては、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの組み合わせ、ジフェニルリン酸アジド、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリスジメチルアミノホスホニウム塩、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロライド、*O*-(7-アザベンゾトリアゾ-1-イル)-*N,N,N',N'*-テトラメチルヘキサウロニウムヘキサフルオロホスフェート、3*H*-1,2,3-トリアゾロ[4,5-*b*]ピリジン-3-オール等を用いることができる。

30

## 【0042】

縮合反応の溶媒としては、例えば、ジメチルホルムアミド、イソプロパノール、*tert*-ブチルアルコール、トルエン、ベンゼン、塩化メチレン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリジノン、ジメチルスルホキシド及びその混合溶媒等を用いることができる。

## 【0043】

縮合反応において溶媒にはさらに塩基を添加することができる。塩基としては、無機塩基(例えば、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、水酸化ナトリウム、水素化ナトリウム等)や有機塩基(例えば、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-ジメチルアミノピリジン、カリウム-*tert*-ブチラート、ナトリウム-*tert*-ブチラート、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、リチウムヘキサメチルジシラジド、ナトリウムヘキサメチルジシラジド、カリウムヘキサメチルジシラジド、ブチルリチウム等)を用いることができる。

40

## 【0044】

下記化合物の製造法において、各工程において得られる化合物は、化合物の分離手段を用いて単離精製することができる。「化合物の分離手段」としては、化合物の単離精製に

50

通常用いられている手段を利用することが可能であり、例えば溶媒抽出、再結晶、分取用逆相高速液体クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、分取薄層クロマトグラフィー等を挙げることができる。

【0045】

本発明の式(I)で表される化合物は、下記の工程1～工程3を含む方法により製造することができる。

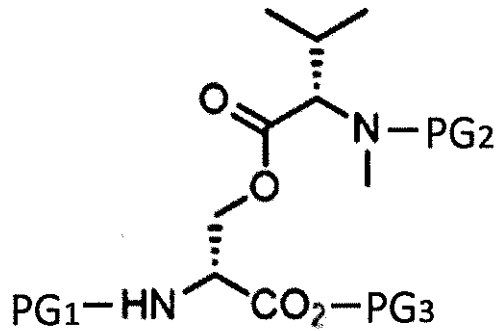
【0046】

(工程1)

本工程は、下記式(1)：

【化14】

10



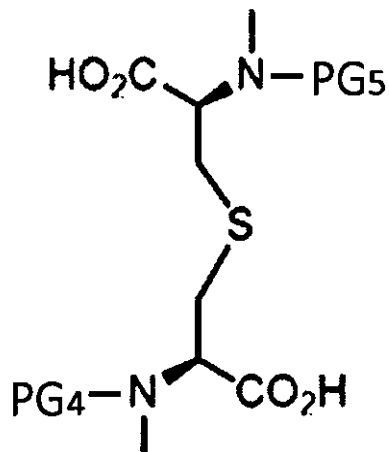
20

(式1)

で表される化合物と、下記式(2)：

【0047】

【化15】



30

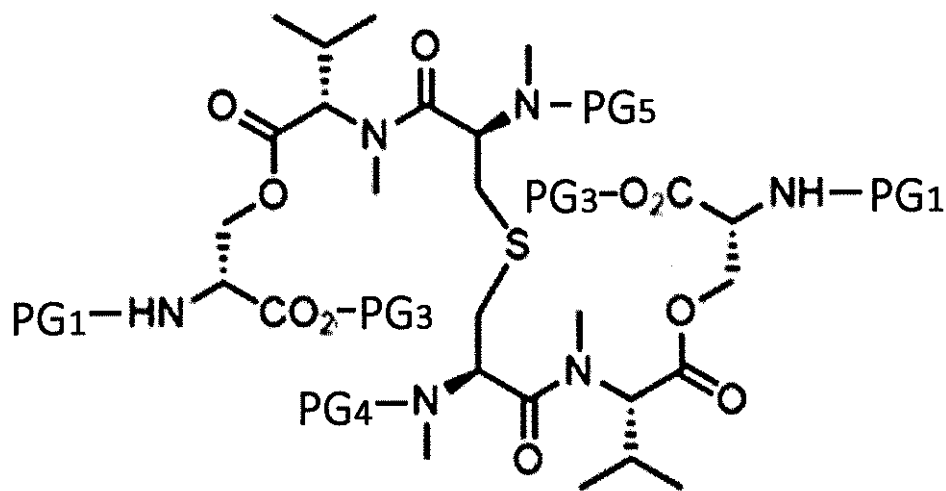
(式2)

40

で表される化合物より、下記式(3)：

【0048】

【化16】



10

(式3)

で表される化合物を製造する工程である。

20

【0049】

上記式中、PG<sub>1</sub>は慣用されるアミノ基の保護基を示し、好ましくは、ベンジルオキシカルボニル基である。

【0050】

上記式中、PG<sub>2</sub>は、PG<sub>1</sub>とは異なる慣用されるアミノ基の保護基を示し、好ましくはBoc基である。

【0051】

上記式中、PG<sub>3</sub>は、慣用されるカルボキシル基の保護基を示し、好ましくは、PG<sub>3</sub>はアリル基である。

【0052】

上記式中、PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、PG<sub>1</sub>とは異なる慣用されるアミノ基の保護基を示し、PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一であり、Boc基である。

30

【0053】

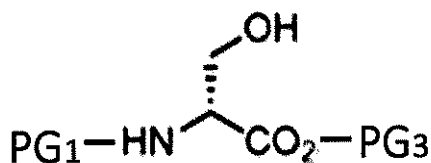
本工程において、式(1)で表される化合物はPG<sub>2</sub>で表される基の脱保護反応に付す。次いで、得られた脱保護された化合物と式(2)で表される化合物との縮合反応により、式(3)で表される化合物を得ることができる。

【0054】

原料となる式(1)で表される化合物は、下記式(1a)：

【化17】

40



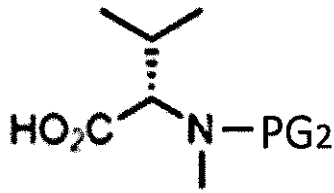
(式1a)

50

で表される化合物と下記式 ( 1 b ) :

【 0 0 5 5 】

【 化 1 8 】



(式1b)

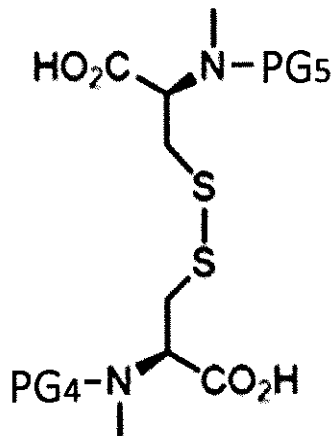
10

で表される化合物より、公知の手法 ( Nagasawa, H. et al. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 2090. ) に基づいて製造することができる。

【 0 0 5 6 】

また、原料となる式 ( 2 ) で表される化合物は、下記式 ( 2 a ) :

【 化 1 9 】



(式2a)

20

30

で表される化合物より製造することができ、式 ( 2 a ) で表される化合物のカルボキシル基を保護した後、3価のリン化合物で処理して硫黄原子を一つ取り出し、その後カルボキシル基の保護基を脱保護することにより得ることができる。3価のリン化合物としては、例えばトリス(ジメチルアミノ)ホスフィンを利用することができる。

40

【 0 0 5 7 】

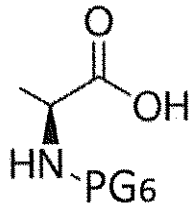
式 ( 1 a )、( 1 b ) 及び式 ( 2 a ) において、PG<sub>1</sub>、PG<sub>2</sub>、PG<sub>3</sub>、PG<sub>4</sub> 及び PG<sub>5</sub> は、上記定義のとおりである。

【 0 0 5 8 】

( 工程 2 )

本工程は、上記式 ( 3 ) で表される化合物を、下記式 ( 4 ) :

【化20】



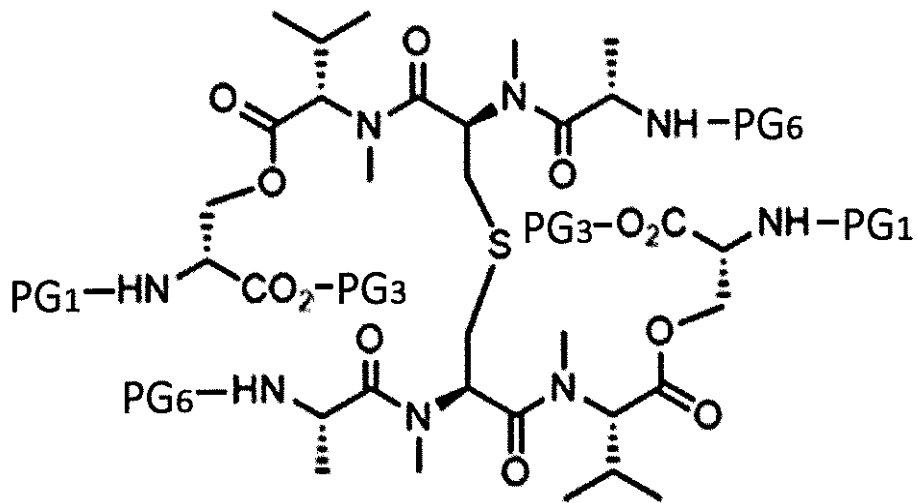
10

(式4)

で表される化合物と反応させ、下記式(5) :

【0059】

【化21】



20

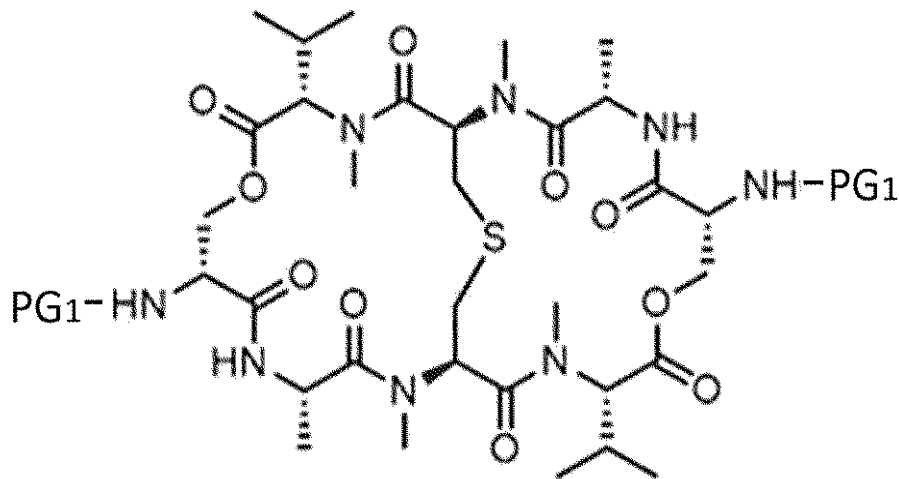
30

(式5)

で表される化合物を製造し、次いで式(5)で表される化合物より、下記式(6) :

【0060】

【化 2 2】



10

(式6)

で表される化合物を製造する工程である。

20

【0061】

上記式中、PG<sub>6</sub>は、PG<sub>1</sub>とは異なる慣用されるアミノ基の保護基を示し、好ましくはBoc基である。好ましくは式(4)で表される化合物として、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-アラニンを利用することができる。

【0062】

PG<sub>1</sub>、PG<sub>3</sub>、PG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>は、上記定義のとおりである。

【0063】

式(3)で表される化合物はPG<sub>4</sub>及びPG<sub>5</sub>で表される基の脱保護反応に付す。得られた脱保護された化合物と式(4)で表される化合物との縮合反応により、式(5)で表される化合物を得ることができる。

30

【0064】

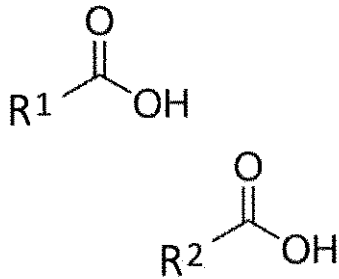
次いで、式(5)で表される化合物は、PG<sub>3</sub>及びPG<sub>6</sub>で表される基の脱保護反応に付す。得られた脱保護された化合物を縮合反応に付し、式(6)で表される化合物を得ることができる。

【0065】

(工程3)

本工程は、式(6)で表される化合物と下記式(7)：

【化 2 3】



(式7)

10

で表される化合物より、目的とする式 ( I ) で表される化合物を製造する工程である。

【 0 0 6 6 】

上記式中、 $R^1$  及び  $R^2$  は、上記  $R^1$  及び  $R^2$  と同義である。 $R^1$  と  $R^2$  とが同一である場合には、これらは同一の化合物である。

20

【 0 0 6 7 】

本工程において、式 ( 6 ) で表される化合物を、 $PG_1$  で表される基の脱保護反応に付す。得られた脱保護された化合物と式 ( 7 ) で表される化合物との縮合反応により、式 ( I ) で表される目的の化合物を得ることができる。

【 0 0 6 8 】

### 3. 用途

本発明の化合物又はその塩は、がんを治療するための医薬組成物 ( 以下、「本発明の医薬組成物」と記載する ) における有効成分として利用することができる。

【 0 0 6 9 】

本発明において「がん」とは、固形がん及び血液がん ( 例えば、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等 ) が含まれるが、好ましくは固形がんである。固形がんには血液がんを除く全ての固形がん ( すなわち、上皮細胞がん及び非上皮細胞がん ) が含まれる。このような固形がんとしては、脳腫瘍・神経膠腫、下垂体腺腫、聴神経鞘腫、ぶどう膜悪性黒色腫、髄膜腫、咽頭がん、喉頭がん、舌がん、甲状腺がん、乳がん、肺がん、胸腺腫、胸腺がん、中皮腫、食道がん、胃がん、大腸がん、肝細胞がん、胆管がん、膵臓がん、腎細胞がん、膀胱がん、前立腺がん、腎盂・尿管がん、陰茎がん、精巣 ( 辜丸 ) 腫瘍、子宮がん、卵巣がん、外陰がん、皮膚がん、悪性黒色腫 ( 皮膚 )、基底細胞がん、皮膚がん前駆症、表皮内がん、有棘細胞がん、菌状息肉症、悪性骨腫瘍 ( 骨肉腫 )、軟部肉腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球種、ならびに、これらの転移癌等が挙げられるが、これらに限定はされない。

30

【 0 0 7 0 】

また、本発明において「治療」とは、がんが完全に消失した状態を意味するだけでなく、一時的あるいは永続的に、がんが縮小又は消失している状態やがんが進行 ( 増悪 ) せず安定している状態も意味するものである。例えば、本発明におけるがんの「治療」には、本発明の化合物又はその塩の投与又は摂取前と比べて、患者におけるがんサイズの低下、がんマーカーレベルの低下、がんに伴う症状の改善、全生存期間、無増悪生存期間、生存期間中央値等の尺度の延長等の一以上が含まれる。

40

【 0 0 7 1 】

本発明の医薬組成物には、本発明の化合物又はその塩に加えて、医薬の製造において通常用いられている、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を含めることができ、企図される用法・用量に適した剤型として製造することができる。

50



## 【0072】

賦形剤としては、例えば、糖（単糖、二糖類、シクロデキストリン及びアルギン酸等の多糖類）、金属塩、カオリン、ケイ酸、ポリエチレングリコール及びこれらの混合物等が挙げられる。

## 【0073】

結合剤としては、例えば、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、及びこれらの混合物等が挙げられる。

## 【0074】

崩壊剤としては、例えば、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖及びこれらの混合物等が挙げられる。

10

## 【0075】

滑沢剤としては、例えば、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール及びこれらの混合物等が挙げられる。

## 【0076】

必要に応じて、さらに医薬の製造において通常用いられている希釈剤、安定化剤、等張化剤、pH調整剤、緩衝剤、溶解補助剤、懸濁化剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、コーティング剤、保存剤、防腐剤、抗酸化剤等も適宜含めることができる。

20

## 【0077】

例えば、経口投与に適した剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、粉剤、シロップ剤、懸濁剤等が挙げられる。固形の剤形を有するものは、必要に応じてコーティングを施すことができる（例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠等）。

## 【0078】

また、非経口投与に適した剤形として、注射剤や点滴剤等が挙げられる。これらの剤形は、凍結乾燥化し保存し得る状態で提供され、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用されるものであってもよい。あるいは、坐剤、軟膏剤、吸入剤、貼付剤等の剤形としてもよい。

30

## 【0079】

本発明の医薬組成物には、本発明の化合物又はその塩をプロドラッグの形態を含めてもよい。「プロドラッグ」とは、生体内における生理条件下で酵素や胃酸等による反応により本発明の化合物又はその塩に変換する化合物、即ち酵素的に酸化、還元、加水分解等を起こして本発明の化合物又はその塩に変化する化合物、胃酸等により加水分解等を起こして本発明の化合物又はその塩に変化する化合物を意味する。また、本発明の化合物又はその塩のプロドラッグとは、広川書店1990年刊「医薬品の開発」第7巻分子設計163頁から198頁に記載されているような生理的条件下で本発明の化合物又はその塩へと変化するものであってもよい。

## 【0080】

本発明の医薬組成物の投与量は、患者におけるがんの種類や重篤度、ならびに患者の症状、体重、年齢、性別等の要因によって変化し得、一概には決定できないが、例えば成人（体重50kg）1日あたり、本発明の化合物又はその塩の量にして約0.05～5000mg、好ましくは0.1～10000mgから選択される量を、1日1回又は2～3回程度に分けて投与することができる。

40

## 【0081】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【0082】

50

## 実施例 1 : 化合物の合成

## (核磁気共鳴)

核磁気共鳴 (以下、 $^1\text{H}$ -NMR) スペクトルは、JEOL JMM-ECS-400、JEOL JNM-ECX-400P、JEOL JNM-ECA-500 (日本電子株式会社) を用いて測定した。

## 【0083】

$^1\text{H}$ -NMRの化学シフトは、テトラメチルシランを内部標準としたときの値をppmで、スピン結合定数J値をHzでそれぞれ表示した。

## 【0084】

シグナルの多重度は、s : 一重線、d : 二重線、t : 三重線、q : 四重線、m : 多重線、br : ブロードの略号を用いて示した。

10

## 【0085】

## (室温)

室温は、20 ~ 25 程度の範囲を指し、特に記載のない限り非水性反応はアルゴン雰囲気下で行った。

## 【0086】

## (質量分析)

質量分析はSQ Detector 2 (日本ウォーターズ株式会社) を用いて、ESI (Electron Spray Ionization) 法により行った。

## 【0087】

20

## (反応溶媒)

反応溶媒として用いた塩化メチレンは五酸化ニリンより、N,N-ジメチルホルムアミドは水素化カルシウムより、ベンゼンは金属ナトリウムより蒸留したものをを用いた。水は脱イオン水をMillipore Millia-Q (登録商標) Advantage A10 (登録商標) 超純水製造装置で精製したものをを用いた。その他の試薬及び溶媒については特に記載のない限り市販のものをを用いた。

## 【0088】

## (クロマトグラフィー)

Analytical thin layer chromatography (TLC) は、Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには充填剤としてWakogel 60N (63 ~ 212 μm)、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーには充填剤としてKanto Chemical Silica Gel 60N (spherical, neutral, 40 ~ 50 μm)、ハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーには充填剤としてCHROMATOREX PSQ60Bをそれぞれ用いた。重金属除去用SHシリカゲルは、Fuji Silysia Chemical LTD. Scavenger SH Silicaを用いた。

30

## 【0089】

本発明の化合物の合成は以下のとおり行った。

## (化合物1の合成)

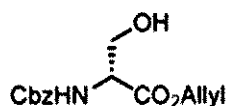
40

D-Ser (10.0 g, 95.2 mmol) を出発物質とし、公知の手法 (Kohn, H. et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 4815. Kunz, H.; Friedrich-Bochnitschek, S. J. Org. Chem. 1989, 54, 751.) と同様の条件によって、下記化合物1 (19.5 g, 69.8 mmol, 73%, 2工程) を無色油状物質として得た。

## 【0090】

## 【化24】

## 化合物1



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.34-7.29 (m, 5H, Ar), 5.93-5.84 (m, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.80 (d, 1H, Ser-NH,  $J_{\text{Ser-NH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 6.8$  Hz), 5.33 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 17.6$  Hz), 5.25 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{cis}} = 10.5$  Hz), 5.12 (s, 2H, Bn), 4.66 (d, 2H, Allyl,  $J = 5.0$  Hz), 4.46 (dd, 1H, Ser- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Ser-}\alpha\text{-CH, Ser-}\beta\text{-CH}} = 4.7$ ,  $J_{\text{Ser-}\alpha\text{-CH, Ser-}\beta'\text{-CH}} = 3.7$  Hz), 3.99 (dd, Ser- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 11.2$ ,  $J_{\text{Ser-}\beta\text{-CH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 3.7$  Hz), 3.91 (dd, 2H, Ser- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 11.2$ ,  $J_{\text{Ser-}\beta\text{-CH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 4.7$  Hz), 2.56 (d, 1H, Ser-OH,  $J_{\text{Ser-OH, Ser-}\beta\text{-CH}} = 5.5$  Hz)

ESIMS-LR  $m/z$  302.24 [(M+Na) $^+$ ]

10

## 【0091】

(化合物2の合成)

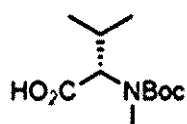
Boc-L-Val-OH (15.0 g, 69.0 mmol) を出発物質とし、公知の手法 (Nagasawa, H. et al. 上掲) と同様の条件によって、下記化合物2 (15.1 g, 65.3 mmol, 95%) を淡黄色油状物質として得た。

20

## 【0092】

## 【化25】

## 化合物2



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, selected data for a rotamer)  $\delta$  3.99 (d, 1H, Val- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Val-}\alpha\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 11.0$  Hz), 2.88 (s, 3H, Val-N-CH), 2.37-2.31 (m, 1H, Val- $\beta$ -CH), 1.47 (s, 9H, Boc), 1.02 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 0.92 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz)

ESIMS-LR  $m/z$  254.17 [(M+Na) $^+$ ]

30

## 【0093】

(化合物3の合成)

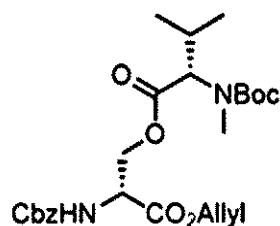
化合物1 (5.78 g, 20.7 mmol) 及び化合物2 (4.79 g, 20.7 mmol) より公知の手法 (Nagasawa, H. et al. 上掲) と同様の条件によって、下記化合物3 (6.48 g, 13.2 mmol, 64%) を無色油状物質として得た。

40

## 【0094】

## 【化 2 6】

化合物 3



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, selected data for a rotamer)  $\delta$  7.90 (d, 1H, Ser-NH,  $J_{\text{Ser-NH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 8.2$  Hz), 7.39-7.32 (m, 5H, Ar), 5.87 (ddt, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 17.4$ ,  $J_{\text{cis}} = 11.0$ ,  $J = 5.5$  Hz), 5.31 (d, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 17.4$  Hz), 5.22 (d, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{cis}} = 11.0$  Hz), 5.05 (s, 2H, Bn), 4.60 (d, 2H, Allyl,  $J = 5.5$  Hz), 4.49 (br s, 1H, Ser- $\alpha$ -CH), 4.32-4.27 (m, 2H, Ser- $\beta$ -CH), 4.01 (d, 1H, Val- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Val-}\alpha\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 10.1$  Hz), 2.72 (s, 3H, Val-N-CH), 2.12 (br s, 1H, Val- $\beta$ -CH), 1.38 (s, 9H, Boc), 0.88 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.4$  Hz), 0.79 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.4$  Hz)

ESIMS-LR  $m/z$  493.42 [(M + H) $^+$ ]

10

20

## 【0095】

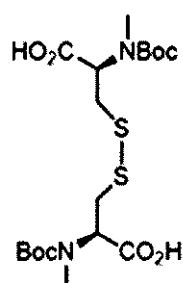
(化合物 4 の合成)

(R) - チアゾリジンカルボン酸 (50.0 g, 375 mmol) を出発物質とし、公知の手法 (US 20140187546) と同様の条件によって、下記化合物 4 (24.6 g, 52.5 mmol, 28%, 3工程) を白色泡状物質として得た。

## 【0096】

## 【化 2 7】

化合物 4



$^1\text{H NMR}$  (CDCl $_3$ , 400 MHz)  $\delta$  4.88-4.72 (m, 2H, Cys- $\alpha$ -CH), 3.32 (dd, 2H, Cys- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 14.2$ ,  $J_{\text{Cys-}\beta\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 4.6$  Hz), 3.00-2.92 (m, 8H, Cys- $\beta$ -H, Cys-N-CH), 1.47-1.43 (m, 18H, Boc)

ESIMS-LR  $m/z$  469.21 [(M + H) $^+$ ]

30

40

## 【0097】

(化合物 5 の合成)

化合物 4 (25.4 g, 54.2 mmol) 及び炭酸カリウム (16.4 g, 119 mmol) のジメチルホルムアミド (180 mL) 懸濁液に、ヨウ化メチル (7.41 mL, 119 mmol) を氷冷下にて加え、1.5時間攪拌した。さらに、ヨウ化メチル (0.74 mL, 11.9 mmol) を加え、1.5時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希

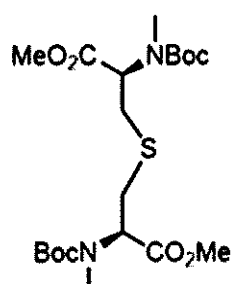
50

釈し、水、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をベンゼン（42 mL）に溶解し、トリスジメチルアミノホスフィン（11.8 mL, 65.0 mmol）を加え、室温で24時間撹拌した。反応液を減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（6.5 × 25 cm、ヘキサン/酢酸エチル：11/3 11/7）にて精製することで、下記化合物5（22.7 g, 48.8 mmol, 90%, 2工程）を淡黄色油状物質として得た。

【0098】

【化28】

化合物5



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, selected data for a rotamer)  $\delta$  4.74 (dd, 2H, Cys- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta\text{-CH}} = 10.7, 5.3$  Hz), 3.73 (s, 6H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.13 (dd, 2H, Cys- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 10.5, J_{\text{Cys-}\beta\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 5.3$  Hz), 3.00-2.82 (m, 8H, Cys- $\beta$ -CH, Cys-N-CH), 1.46 (s, 18H, Boc)  
ESIMS-LR  $m/z$  465.24 [(M+H) $^+$ ]

10

20

【0099】

（化合物6の合成）

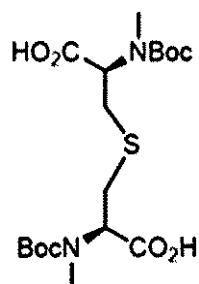
化合物5（23.9 g, 51.4 mmol）のテトラヒドロフラン（150 mL）、メタノール（50 mL）、及び水（50 mL）の混合溶媒に、水酸化リチウム水和物（4.74 g, 113 mmol）の水（100 mL）溶液を氷冷下にて加え、1時間撹拌した。水酸化リチウム水和物（474 mg, 11.3 mmol）の水（10 mL）溶液を氷冷下にて加え、30分撹拌した。反応液を減圧下溶媒を留去することでおよそ150 mLに濃縮して得られた残渣に、1 M塩酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去することで、下記化合物6（22.4 g, 51.3 mmol, 定量的収率）を白色泡状物質として得た。

30

【0100】

## 【化 2 9】

化合物 6



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  4.66-4.31 (m, 2H, Cys- $\alpha$ -CH), 3.10-2.81 (m, 4H, Cys- $\beta$ -CH), 2.76-2.71(m, 6H, Cys-N-CH), 1.44-1.36 (m, 18H, Boc)

ESIMS-LR  $m/z$  437.21 [(M+H) $^+$ ]

10

## 【 0 1 0 1】

(化合物 7 の合成)

化合物 3 (25.4 g, 69.0 mmol) に 4 M 塩化水素 / ジオキサン 溶液 (100 mL, 400 mmol) を加え、室温で 1 時間 攪拌した。減圧下 溶媒を 留去して 得られた 残渣に、ジオキサンを加えて 減圧下 溶媒を 留去することで 白色固体を得た。この白色固体、化合物 6 (16.0 g, 34.5 mmol)、及び HOAt (12.2 g, 89.7 mmol) の 塩化メチレン (130 mL) 懸濁液に ジイソプロピルエチルアミン (17.0 mL, 100 mmol)、及び EDCI (17.2 g, 89.7 mmol) を 氷冷下にて 加え、室温で 19 時間 攪拌した。反応液を 酢酸エチルで 希釈し、1 M 塩酸水溶液、飽和重曹水、及び 飽和食塩水で 順次 洗浄後、無水硫酸ナトリウムで 乾燥した。減圧下 溶媒を 留去し、得られた 残渣を フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (6.5 x 15 cm、ヘキサン / 酢酸エチル : 5 / 3 5 / 6) にて 精製することで、下記化合物 7 (30.6 g, 25.8 mmol, 74%, 2 工程) を 白色泡状物質として 得た。

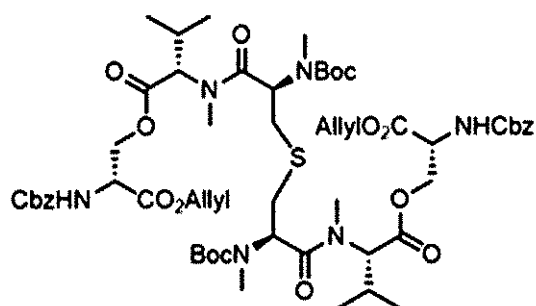
20

## 【 0 1 0 2】

30

## 【化 3 0】

化合物 7



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  7.94-7.80 (m, 2H, Ser-NH), 7.38-7.31 (m, 10H, Ar), 5.88 (ddt, 1H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 17.4$ ,  $J_{\text{cis}} = 10.5$ ,  $J = 5.2$  Hz), 5.31 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 17.4$  Hz), 5.21 (d, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $J_{\text{cis}} = 10.5$  Hz), 5.05 (s, 4H, Bn), 5.05-4.82 (m, 2H, Cys- $\alpha$ -CH), 4.71-3.95 (m, 12H, Allyl, Val- $\alpha$ -CH, Ser- $\alpha$ -CH, Ser- $\beta$ -CH), 2.96-2.45 (m, 16H, Cys- $\beta$ -CH, Val-N-CH, Cys-N-CH), 1.40 (s, 18H, Boc), 0.94-0.69 (m, 12H, Val- $\gamma$ -CH)

ESIMS-LR  $m/z$  1185.90 [(M + H) $^+$ ]

10

20

## 【 0 1 0 3】

(化合物 8 の合成)

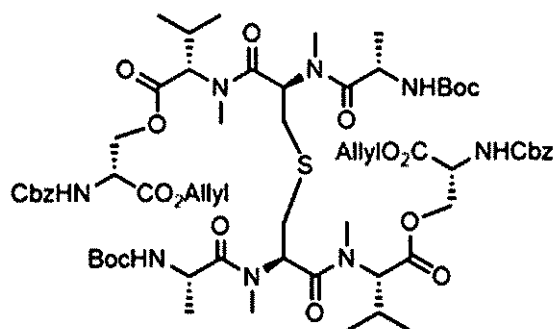
化合物 7 (21.1 g, 17.8 mmol) の塩化メチレン (20 mL) 溶液に 4 M 塩化水素 / ジオキサン溶液 (50 mL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去して得られた残渣に、ジオキサンを加えて減圧下溶媒を留去することで白色固体を得た。この白色固体、Boc-Ala-OH (10.1 g, 53.4 mmol)、HOAt (9.69 g, 71.2 mmol) のジメチルホルムアミド (23 mL)、及び塩化メチレン (117 mL) の懸濁液に、炭酸水素ナトリウム (7.78 g, 92.6 mmol) を室温で、及び EDCI (13.6 g, 71.2 mmol) を氷冷下にて加え、室温で 14 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、1 M 塩酸水溶液、飽和重曹水、及び飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (4 × 15 cm、ヘキサン / 酢酸エチル : 3 / 1 1 / 1) にて精製することで、下記化合物 8 (16.5 g, 12.5 mmol, 70%, 2 工程) を白色泡状物質として得た。

30

## 【 0 1 0 4】

## 【化 3 1】

化合物 8



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)  $\delta$  7.95-7.80 (m, 2H, Ser-NH), 7.35-7.31 (m, 10H, Ar), 7.08-6.85 (m, 2H, Ala-NH), 5.89 (ddt, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 16.9$ ,  $J_{\text{cis}} = 11.0$ ,  $J = 5.5$  Hz), 5.53-5.38 (m, 2H, Cys- $\alpha$ -CH), 5.31 (d, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{trans}} = 16.9$  Hz), 5.21 (d, 1H, CH=CH $_2$ ,  $J_{\text{cis}} = 11.0$  Hz), 5.05 (m, 4H, Bn), 4.59 (m, 4H, Allyl), 4.54-4.17 (m, 10H, Val- $\alpha$ -CH, Ser- $\alpha$ -CH, Ala- $\alpha$ -CH, Ser- $\beta$ -CH), 3.00-2.91 (m, 2H, Cys- $\beta$ -CH), 2.84-2.40 (m, 14H, Cys-N-CH, Val-N-CH, Cys- $\beta$ -CH), 2.16 (m, 2H, Val- $\beta$ -CH), 1.36 (s, 18H, Boc), 1.19-1.06 (m, 6H, Ala- $\beta$ -CH), 0.92-0.65 (m, 12H, Val- $\gamma$ -CH), ESIMS-IR  $m/z$  1327.99 [(M + H) $^+$ ]

## 【 0 1 0 5 】

(化合物 9 の合成)

化合物 8 (22.3 g, 16.8 mmol) のテトラヒドロフラン (110 mL) 溶液にモルホリン (5.12 mL, 58.8 mmol)、及びテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (38.9 mg, 33.6  $\mu\text{mol}$ ) を氷冷下にて加え、4 時間撹拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、1 M 塩酸水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣を上部に重金属除去用 SH シリカゲルを含むシリカゲルカラムクロマトグラフィー (4  $\times$  2 cm、クロロホルム/メタノール/酢酸: 100/0/0 98/0/2 95/3/2) にて粗精製することで淡黄色泡状化合物を得た。この残渣に 4 M 塩化水素/ジオキサン溶液 (100 mL) を加え、室温で 1 時間撹拌した。減圧下溶媒を留去して得られた残渣にジオキサンを加えて溶媒置換を行った後、ジエチルエーテルで洗浄することで、下記化合物 9 (17.9 g, 16.0 mmol, 95%, 2 工程) を得た。

## 【 0 1 0 6 】

10

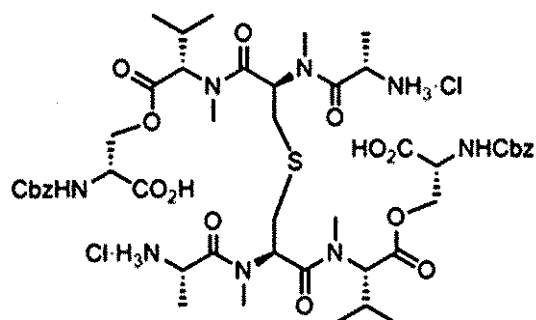
20

30



## 【化 3 2】

## 化合物 9



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  8.50 (br s, 6H, Ala-NH), 7.81-7.70 (m, 2H, Ser-NH), 7.35 (m, 10H, Ar), 5.51-5.31 (m, 2H, Cys- $\alpha$ -CH), 5.03 (s, 4H, Bn), 4.66-4.11 (m, 10H, Val- $\alpha$ -CH, Ser- $\alpha$ -CH, Ala- $\alpha$ -CH, Ser- $\beta$ -CH), 3.16-2.60 (m, 16H, Cys- $\beta$ -CH, Cys-N-CH, Val-N-CH), 2.18 (m, 2H, Val- $\beta$ -CH), 1.33-1.21 (m, 6H, Ala- $\beta$ -CH), 0.98-0.71 (m, 12H, Val- $\gamma$ -CH)

ESIMS-LR  $m/z$  1047.76 [(M+H) $^+$ ]

10

20

## 【 0 1 0 7 】

(化合物 10 の合成)

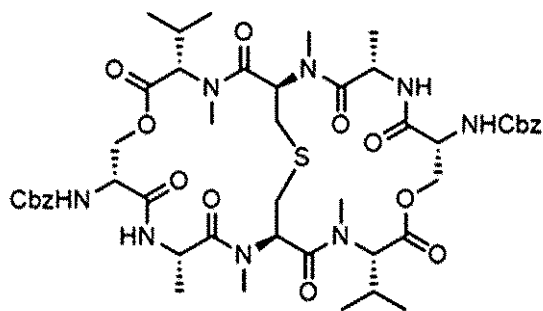
化合物 9 (2.69 g, 2.40 mmol) のジメチルホルムアミド (1.2 L) 溶液に、ジフェニルホスホリルアジド (5.16 mL, 24.0 mmol)、及び N-メチルモルホリン (3.69 mL, 33.6 mmol) を氷冷下にて加え、室温で 72 時間撹拌した。反応液を、減圧下溶媒を留去することでおよそ (10 mL) に濃縮した。この残渣を酢酸エチル/混合溶媒で希釈し、水、1 M 塩酸水溶液、飽和重曹水、及び飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (3 × 15 cm、クロロホルム/メタノール: 100 / 0 99.5 / 0.5 99 / 1 98.5 / 1.5 98 / 2) にて精製することで、下記化合物 10 (676 mg, 0.669 mmol, 28%) を白色固体として得た。

30

## 【 0 1 0 8 】

## 【化 3 3】

## 化合物 1 0



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  7.62 (d, 2H, Ala-NH,  $J_{\text{Ala-NH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 5.2$  Hz), 7.56 (d, 2H, Ser-NH,  $J_{\text{Ser-NH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 5.2$  Hz), 7.39-7.33 (m, 10H, Ar), 6.22 (t, 2H, Cys- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta\text{-CH}} = 6.6$  Hz), 5.12 (d, 2H, Bn,  $J_{\text{gem}} = 12.6$  Hz), 5.06 (d, 2H, Bn,  $J_{\text{gem}} = 12.6$  Hz), 4.68 (d, 2H, Val- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Val-}\alpha\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 10.9$  Hz), 4.53 (qd, 2H, Ala- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Ala-}\alpha\text{-CH, Ala-}\beta\text{-CH}} = 6.3$ ,  $J_{\text{Ala-}\alpha\text{-CH, Ala-NH}} = 5.2$  Hz), 4.24-4.21 (m, 6H, Ser- $\alpha$ -CH, Ser- $\beta$ -CH), 3.01 (overlap, 2H, Cys- $\beta$ -CH), 3.01, 2.76 (s, each 3H, Cys-N-CH, Val-N-CH), 2.38 (m, 2H, Cys- $\beta$ -CH), 2.24 (m, 2H, Val- $\beta$ -CH), 1.23 (d, 6H, Ala- $\beta$ -CH,  $J_{\text{Ala-}\beta\text{-CH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 6.3$  Hz), 0.98 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.3$  Hz), 0.75 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz),

ESIMS-LR  $m/z$  1011.87 [(M + H) $^+$ ]

## 【 0 1 0 9 】

(化合物 1 1 の合成)

化合物 1 0 (70.0 mg, 69.2  $\mu\text{mol}$ )、及びメチルフェニルスルフィド (324  $\mu\text{L}$ , 2.77 mmol) にトリフルオロ酢酸 (6.9 mL) を加え、40 で 15 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮して得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄することで淡黄色の固体を得た。この固体を、キノキサリン - 2 - カルボン酸 (48.2 mg, 0.277 mmol)、HOAt (47.1 mg, 0.346 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (70.6  $\mu\text{L}$ , 0.415 mmol)、及び EDCI (66.3 mg, 0.346 mmol) のジメチルホルムアミド (1 mL) の懸濁液に氷冷下にて加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、1 M 塩酸水溶液、飽和重曹水、及び飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1  $\times$  15 cm, クロロホルム/メタノール: 100/0 99/1 98/2 97/3) にて精製することで、下記化合物 1 1 (30.0 mg, 28.4  $\mu\text{mol}$ , 41%, 2 工程) を無色固体として得た。

## 【 0 1 1 0 】

10

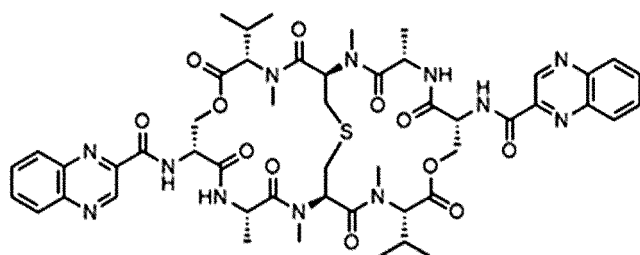
20

30

40

## 【化 3 4】

## 化合物 1 1



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  9.61 (s, 2H, Ar), 8.69 (d, 2H, Ser-NH,  $J_{\text{Ser-NH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 7.4$  Hz), 8.19-8.17 (m, 2H, Ar), 7.86-7.82 (m, 4H, Ar), 7.78-7.74 (m, 2H, Ar), 6.88 (d, 2H, Ala-NH,  $J_{\text{Ala-NH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 7.3$  Hz), 6.28 (dd, 2H, Cys- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta'\text{-CH}} = 6.9$ ,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta\text{-CH}} = 6.5$  Hz), 5.15 (d, 2H, Val- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Val-}\alpha\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 10.6$  Hz), 4.92-4.88 (m, 2H, Ser- $\alpha$ -CH), 4.84-4.79 (m, 4H, Ser- $\beta$ -CH, Ala- $\alpha$ -CH), 4.68 (dd, 2H, Ser- $\beta'$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 11.3$ ,  $J_{\text{Ser-}\beta'\text{-CH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 1.4$  Hz), 3.39 (dd, 2H, Cys- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 15.1$ ,  $J_{\text{Cys-}\beta\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 6.5$  Hz), 3.17, 2.96 (s, each 6H, Cys-N-CH or Val-N-CH), 2.52 (dd, 2H, Cys- $\beta'$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 15.1$ ,  $J_{\text{Cys-}\beta'\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 2.38-2.28 (m, 2H, Val- $\beta$ -CH), 1.37 (d, 6H, Ala- $\beta$ -CH,  $J_{\text{Ala-}\beta\text{-CH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 1.10 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 1.06 (d, 6H, Val- $\gamma'$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma'\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz),

ESIMS-LR  $m/z$  1055.93 [(M+H) $^+$ ]

## 【 0 1 1 1 】

(化合物 1 2 の合成)

化合物 1 0 (30.0 mg, 29.7  $\mu\text{mol}$ )、及びメチルフェニルスルフィド (139  $\mu\text{L}$ , 1.19 mmol) にトリフルオロ酢酸 (3.0 mL) を加え、40 で 15 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮して得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄することで淡黄色の固体を得た。この固体を、3-ヒドロキシキノリン-2-カルボン酸 (16.9 mg, 89.1  $\mu\text{mol}$ )、HOAt (12.1 mg, 89.1  $\mu\text{mol}$ )、炭酸水素ナトリウム (20.0 mg, 238  $\mu\text{mol}$ )、及び EDCI (17.1 mg, 89.1  $\mu\text{mol}$ ) のジメチルホルムアミド (0.3 mL) 懸濁液に氷冷下にて加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、1 M 塩酸水溶液、飽和重曹水、及び飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1  $\times$  15 cm, クロロホルム/メタノール: 100/0 99/1 98/2 97/3) にて精製することで、下記化合物 1 2 (9.6 mg, 8.8  $\mu\text{mol}$ , 30%, 2 工程) を無色固体として得た。

## 【 0 1 1 2 】

10

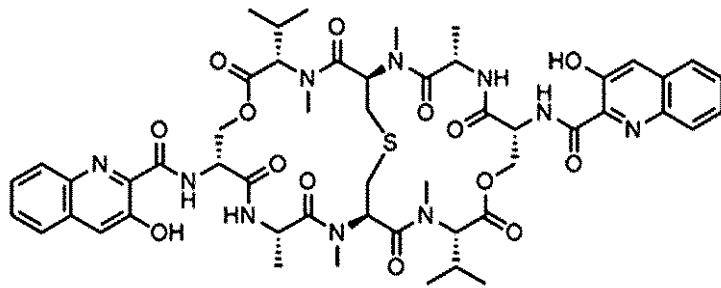
20

30

40

## 【化 3 5】

## 化合物 1 2



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  11.2 (s, 2H, Ar-OH), 9.10 (d, 2H, Ser-NH,  $J_{\text{Ser-NH, Ser-}\alpha\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 7.75-7.67 (m, 4H, Ar), 7.65 (s, 2H, Ar), 7.51-7.47 (m, 4H, Ar), 6.79 (d, 2H, Ala-NH,  $J_{\text{Ala-NH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 7.3$  Hz), 6.28 (dd, 2H, Cys- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta\text{-CH}} = 7.3$ ,  $J_{\text{Cys-}\alpha\text{-CH, Cys-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 5.13 (d, 2H, Val- $\alpha$ -CH,  $J_{\text{Val-}\alpha\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 10.5$  Hz), 4.86-4.79 (m, 6H, Ser- $\alpha$ -CH, Ala- $\alpha$ -CH, Ser- $\beta$ -CH), 4.68-4.64 (m, 2H, Ser- $\beta'$ -CH), 3.38 (dd, 2H, Cys- $\beta$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 15.1$ ,  $J_{\text{Cys-}\beta\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 6.9$  Hz), 3.19, 2.95 (s, each 6H, Cys-N-CH or Val-N-CH), 2.51 (dd, 2H, Cys- $\beta'$ -CH,  $J_{\text{gem}} = 15.1$ ,  $J_{\text{Cys-}\beta'\text{-CH, Cys-}\alpha\text{-CH}} = 7.3$  Hz), 2.39-2.32 (m, 2H, Val- $\beta$ -CH), 1.37 (d, 6H, Ala- $\beta$ -CH,  $J_{\text{Ala-}\beta\text{-CH, Ala-}\alpha\text{-CH}} = 7.3$  Hz), 1.11 (d, 6H, Val- $\gamma$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.4$  Hz), 1.06 (d, 6H, Val- $\gamma'$ -CH,  $J_{\text{Val-}\gamma'\text{-CH, Val-}\beta\text{-CH}} = 6.9$  Hz), ESIMS-LR  $m/z$  1085.58 [(M+H) $^+$ ]

10

20

## 【 0 1 1 3 】

実施例 2 : 抗がん活性の測定

## ( 1 ) 実験方法

(細胞株及びその培養)

細胞は、大腸がん細胞株である SW 6 2 0 細胞株 (ATCC)、膵臓がん細胞株である M I A P a C a - 2 細胞株 (ATCC) 及び S u i t 2 細胞株 (ヒューマンサイエンス資源バンク) を用いた。

30

## 【 0 1 1 4 】

M I A P a C a - 2 細胞株及び S u i t 2 細胞株の培養は、10% FBS、2 mM の L - グルタミン、50 U / mL のペニシリン及び 50  $\mu$  g / mL のストレプトマイシンを添加した DMEM 培地を用いて行った。SW 6 2 0 細胞株の培養は、10% FBS、2 mM の L - グルタミン、50 U / mL のペニシリン及び 50  $\mu$  g / mL のストレプトマイシンを添加した RPMI 1640 を用いて行った。

## 【 0 1 1 5 】

(SRB アッセイ)

96 穴プレートに  $1.0 \times 10^4$  個 / ウェルとなるように分注した被験細胞を 24 時間培養した後、上記化合物 1 1 又は化合物 1 2 を終濃度 1 ng / mL、10 ng / mL、100 ng / mL、又は 1000 ng / mL となるように培養液に添加してインキュベーションを開始し、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間後にプレートを回収した (各  $n = 5$ )。

40

## 【 0 1 1 6 】

回収したプレートの各ウェルに 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を 100  $\mu$  L 添加して 4 で 1 時間静置し、純水で 4 回洗浄した。室温でプレートを乾燥させ、0.057% のスルホローダミン B 水溶液 100  $\mu$  L を各ウェルに加えて細胞を染色し、0.1% 酢酸で 4 回洗浄してから乾燥させた。染色された細胞を 10 mM の Tris 緩衝液に溶解したときの 510 nm における OD を測定することで、各インキュベーション時間における細胞

50

密度を測定した。対照群には化合物を添加せず、エキノマイシン投与群には、エキノマイシンの終濃度が1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、又は1000 ng/mLとなるように添加して、同様に操作した。

#### 【0117】

(細胞死誘導能)

##### 1. TUNEL法

4ウェルガラスチャンバースライドに $5.0 \times 10^4$ 個/ウェルとなるように分注したSW620細胞株を24時間培養した後、上記化合物12を終濃度10 ng/mLとなるように培養液に添加してインキュベーションを開始し、48時間後にスライドを回収した。

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を利用する市販の細胞死検出キット (In Situ Cell Death Detection Kit and TMR red (Roche Diagnostic)) を製造元のプロトコルに従って使用し、TUNEL染色された細胞 (すなわち、細胞死を起こした細胞) を検出・カウントした。対照群には化合物を添加せず、エキノマイシン投与群には、エキノマイシンの終濃度が10 ng/mLとなるように添加して、同様に操作した。

対照群、エキノマイシン投与群、及び化合物12投与群はそれぞれn = 4にて実施した。

#### 【0118】

##### 2. 活性化型カスパーゼ-3の検出 (ウエスタン・ブロッティング法)

6穴プレートに $2.0 \times 10^5$ 個/ウェルとなるように分注したSW620細胞株を24時間培養した後、上記化合物12を終濃度10 ng/mLとなるように培養液に添加してインキュベーションを開始し、48時間後にプレートを回収した。

市販のタンパク回収キット (mammalian cell extraction kit (BioVision)) を製造元のプロトコルに従って使用してタンパク質を回収し、cleaved caspase-3に対する特異抗体 (Cell Signaling) を用いたウエスタン・ブロッティング法により活性化型カスパーゼ-3を定量した。内在性コントロールにはアクチンを用いた。対照群には化合物を添加せず、エキノマイシン投与群には、エキノマイシンの終濃度が10 ng/mLとなるように添加して、同様に操作した。

対照群、エキノマイシン投与群、及び化合物12投与群はそれぞれn = 4にて実施した。

#### 【0119】

(腫瘍細胞移植動物モデルアッセイ1 - 移植した腫瘍サイズの評価)

BALB/cヌードマウスに抗アジアロGM1 (ウサギ) (和光純薬工業株式会社) を腹腔内投与し、室温にて2時間飼育した。 $2 \times 10^6$ 個の被験細胞を、BALB/cヌードマウスの背部皮下に注射して移植した。SW620細胞株を移植したマウスには移植の翌日から、MIA PaCa-2細胞株を移植したマウスには移植の一週間後から、化合物11又は化合物12を一匹あたり50 ng又は500 ng、あるいは40 ng又は400 ngの用量で毎日腹腔内に投与し、各移植部位における腫瘍塊の成長を観察した。対照群には化合物を投与せず、エキノマイシン投与群には、エキノマイシンを一匹あたり40 ng又は400 ngの用量で毎日腹腔内に投与した。

対照群、エキノマイシン投与群、化合物11投与群、及び化合物12投与群は、それぞれn = 5にて実施した。

#### 【0120】

(腫瘍細胞移植動物モデルアッセイ2 - 体重変化の評価)

BALB/cヌードマウスに抗アジアロGM1 (ウサギ) (和光純薬工業株式会社) を腹腔内投与し、室温にて2時間飼育した。 $2 \times 10^6$ 個のMIA PaCa-2細胞株を、BALB/cヌードマウスの背部皮下に注射して移植した。移植の翌日から、化合物1

10

20

30

40

50

1又は化合物12を一匹あたり500ngの用量で毎日腹腔内に投与し、毎日体重を計測した(各n=5)。対照群には化合物を投与せず、エキノマイシン投与群には、エキノマイシンを一匹あたり400ngの用量で毎日腹腔内に投与し、屠殺日に体重を計測した(各n=5)。

#### 【0121】

##### (2)結果

##### (SRBアッセイ)

SRBアッセイの結果を、図1-1~図1-3に示す。

化合物12については、100ng/mL以上の添加により、いずれの細胞株においても、対照における吸光度との間に有意な差が認められ、当該化合物ががん細胞の増殖を抑制する活性を有することが確認された(図1-1~図1-3)。また、低濃度(10ng/mL)における当該活性は、エキノマイシンよりも高いものであることが、MIA PaCa-2細胞株及びSW620細胞株において確認された。

10

#### 【0122】

##### (腫瘍細胞移植動物モデルアッセイ1-移植した腫瘍サイズの評価)

腫瘍細胞移植動物モデルアッセイ1-移植した腫瘍サイズの評価の結果を、図2-1~図2-2に示す。

化合物11については、500ngの投与により、移植した腫瘍サイズの縮小が認められた(図2-1)。この活性は、400ngのエキノマイシンを投与した場合に匹敵することが確認された。

20

#### 【0123】

一方、化合物12については、いずれの細胞株及びいずれの添加量においても、移植した腫瘍サイズの縮小が認められた(図2-1、図2-2)。特に、40ngの化合物12を投与した場合の効果は、400ngのエキノマイシンを投与した場合に匹敵することが確認された。

#### 【0124】

##### (細胞死誘導能)

TUNEL法による、細胞死を起こした細胞数の測定結果を図3に示す。

化合物12の投与により誘導された細胞死を起こした細胞の数は、対照群やエキノマイシン投与群のそれと比べて有意に高いことが確認された(\*:p<0.05(vs対照、スチューデントのt検定))。

30

また、ウエスタン・ブロッティング法による活性化型カスパーゼ-3の定量結果を図4に示す。

化合物12投与群における活性化型カスパーゼ-3の量は\*1107±273であり、対照群(100±45)及びエキノマイシン投与群(\*362±176)の値と比べて高いことが確認された(\*:p<0.05(vs対照、スチューデントのt検定))。化合物12投与群及びエキノマイシン投与群における各数値は、対照群の数値に対する相対値にて示す。

これらの結果は、化合物12がエキノマイシンと比べて、腫瘍に対する高い細胞死誘導活性、すなわち抗がん活性を有することを示す。

40

#### 【0125】

##### (腫瘍細胞移植動物モデルアッセイ2-体重変化の評価)

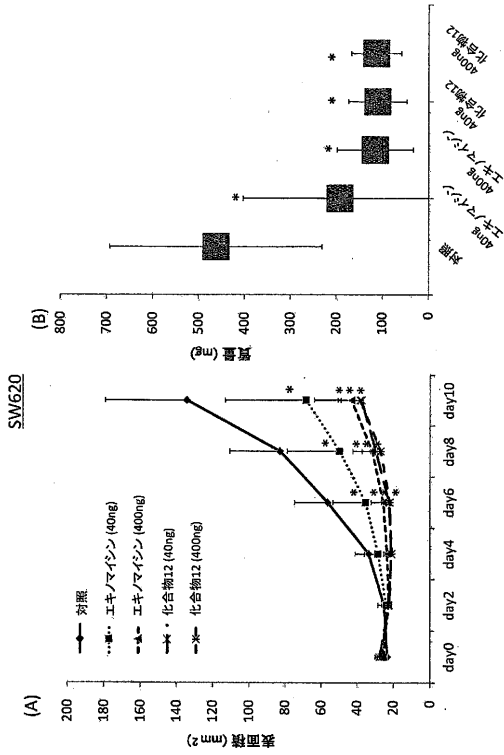
各群における投与28日目の体重を図5に示す。化合物11及び化合物12のいずれの投与群についても、対照群及びエキノマイシン投与群と同様に、大きな体重減少は認められなかった。この結果は、本発明の化合物の毒性が低いことを示す。

#### 【0126】

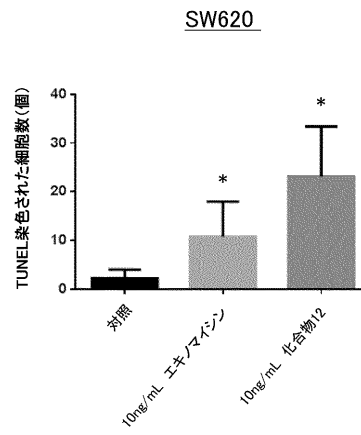
以上の結果より、本発明の化合物は化学合成の手法により製造することが可能であり、かつエキノマイシンに匹敵する、またエキノマイシンよりも高い抗がん活性を有することが明らかとなった。



【 図 2 - 2 】



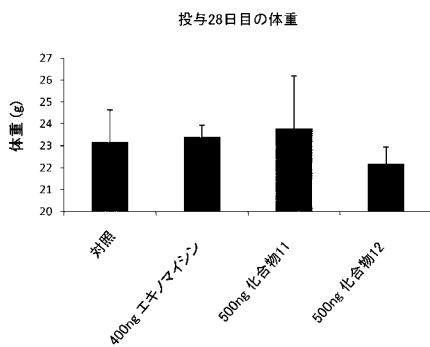
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】





## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/003482
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C07K11/02 (2006.01) i, A61K38/12 (2006.01) i, A61P35/00 (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) Int.Cl. C07K11/02, A61K38/12, A61P35/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
<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	KIM, Y. B. et al., Synthesis and biological activity of new quinoxaline antibiotics of echinomycin analogues, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, vol. 14, pp. 541-544, fig. 1, schemes 1, 2	1-7
A	HATTORI, Kozo et al., Solution-phase synthesis and biological evaluation of triostin A and its analogues, Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, vol. 14, no. 6, pp. 2090-2111, schemes 1, 2	1-7
<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 14.02.2019		Date of mailing of the international search report 26.02.2019
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/003482

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0053769 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 26 February 2009, scheme 1 (Family: none)	1-7

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 0 3 4 8 2													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K11/02(2006,01)i, A61K38/12(2006,01)i, A61P35/00(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. C07K11/02, A61K38/12, A61P35/00															
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>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019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	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2019年														
日本国実用新案登録公報	1996-2019年														
日本国登録実用新案公報	1994-2019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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)															
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	KIM Yun Bong, et al., Synthesis and biological activity of new quinoxaline antibiotics of echinomycin analogues, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, Vol. 14, p. 541-544, Figure 1, Scheme 1, 2	1-7													
A	HATTORI Kozo, et al., Solution-Phase Synthesis and Biological Evaluation of Triostin A and its Analogues, Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, Vol. 14, No. 6, p. 2090-2111, Scheme 1, 2	1-7													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 14.02.2019		国際調査報告の発送日 26.02.2019													
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) 吉森 晃	4 N 3 6 3 3												
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488												

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2019/003482

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	US 2009/0053769 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 2009.02.26, Scheme 1 (ファミリーなし)	1-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 0 3 4 8 2

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
    - 附属書C/ST. 25テキストファイル形式
    - 紙形式又はイメージファイル形式
  - b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST. 25テキストファイル形式の配列表
  - c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
    - 附属書C/ST. 25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
    - 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：  
配列表は提出されていないが、請求項に記載された環状ペプチド ([化1] - [化3]) について調査を行った。

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 市川 聡

北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

(72)発明者 小嶋 啓太

北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

(72)発明者 藤谷 幹浩

北海道旭川市緑が丘東二条一丁目1番1号 国立大学法人旭川医科大学内

(72)発明者 小西 弘晃

北海道旭川市緑が丘東二条一丁目1番1号 国立大学法人旭川医科大学内

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA17 BA26 BA27 BA32 CA59

NA14 NA20 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272

4H045 AA10 AA20 BA15 BA32 EA20 FA50

(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。