

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-516979

(P2006-516979A)

(43) 公表日 平成18年7月13日(2006.7.13)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------|----------------------|-------------|
| C07D 213/53 (2006.01) | C O 7 D 213/53 C S P | 4 C O 5 5 |
| A61K 31/4402 (2006.01) | A 6 1 K 31/4402 | 4 C O 8 6 |
| A61P 3/00 (2006.01) | A 6 1 P 3/00 | |
| A61P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 I O 5 | |
| A61P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2006-501349 (P2006-501349) | (71) 出願人 | 505295374 |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年2月5日 (2004.2.5) | | ニューサウス イノベーションズ ピーテ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成17年10月4日 (2005.10.4) | | ィーワイ リミテッド |
| (86) 国際出願番号 | PCT/AU2004/000132 | | オーストラリア国、2052 エヌエスタ |
| (87) 国際公開番号 | W02004/069801 | | ブリュー、シドニー、バーカー ストリー |
| (87) 国際公開日 | 平成16年8月19日 (2004.8.19) | | ト、14 ゲート、ルパート マイアズ |
| (31) 優先権主張番号 | 2003900495 | | ビルディング、ザ ユニヴァーシティー |
| (32) 優先日 | 平成15年2月5日 (2003.2.5) | | オブ ニュー サウス ウェールズ |
| (33) 優先権主張国 | オーストラリア (AU) | (74) 代理人 | 100105647 |
| (31) 優先権主張番号 | 2003900922 | | 弁理士 小栗 昌平 |
| (32) 優先日 | 平成15年2月11日 (2003.2.11) | (74) 代理人 | 100105474 |
| (33) 優先権主張国 | オーストラリア (AU) | | 弁理士 本多 弘徳 |
| | | (74) 代理人 | 100108589 |
| | | | 弁理士 市川 利光 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 金属イオンキレート化剤およびその治療的使用

(57) 【要約】

【課題】鉄キレート化剤を含め、細胞膜を透過しかつ細胞内のFeをキレート化することが可能な、治療上許容される金属イオンキレート化剤が必要とされている。また、抗増殖活性を有する臨床上有用な鉄キレート化剤も必要である。

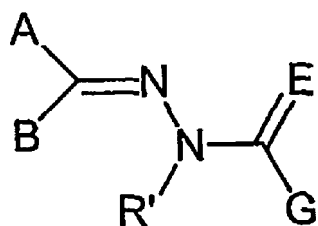
【解決手段】本発明は、金属イオンをキレート化することが可能な化合物に関する。特に、本発明は、鉄イオンを含めた金属イオンをキレート化することが可能な(チオ)セミカルバゾン化合物および(チオ)ヒドラジン化合物に関する。また、かかる化合物および/またはそれらの金属イオン錯体の、細胞増殖に関連する疾病の治療法を含めた治療的使用も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 1、

【化 1】



式 1

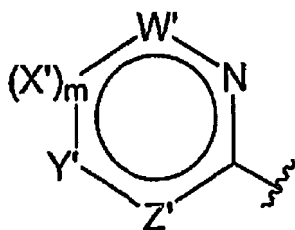
10

[式中、

E は O または S であり；

A は

【化 2】



20

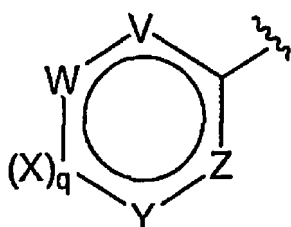
であって、Z'、Y'、X'、および W' は独立して CR_4 、 NR_8 、S、および O から選ばれ、A におけるヘテロ原子の総数は 1、2、または 3 であり、

m は 0 または 1 であり、

30

B は

【化 3】



であって、Z、Y、X、W、および V は独立して CR_4 、 NR_8 、S、および O から選ばれ；さらに B におけるヘテロ原子の総数は 0、1、2、または 3 であり；

40

q は 0 または 1 であり；

各 R_4 は独立して水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ；

各 R_8 は独立して水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、および $-C(O)-$ アルケニル、ベンジル、ベンジルカルバメートから選ばれ；

R' は H、または金属イオンキレート化を妨害しない基であり；

- G は NR_2R_3 または $CR_2R_3R_5$ であって、

50

CとR₅の間の結合は単結合、二重結合、または三重結合でよく；CとR₅の間の結合が二重結合である場合は、R₂およびR₃の一方がなく、CとR₅の間の結合が三重結合である場合は、R₂およびR₃の双方がなく；

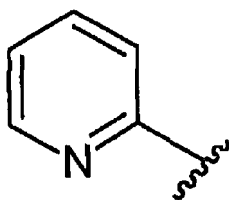
R₅は水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基からなる群より選ばれ；

R₂およびR₃は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基から選ばれ；

あるいは-Gは任意に置換された複素芳香族基、任意に置換された二環基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基；任意に置換されたシクロアルキル基、または任意に置換されたヘテロシクロアルキル基であって；

(i) EがOであり、AおよびBが各々

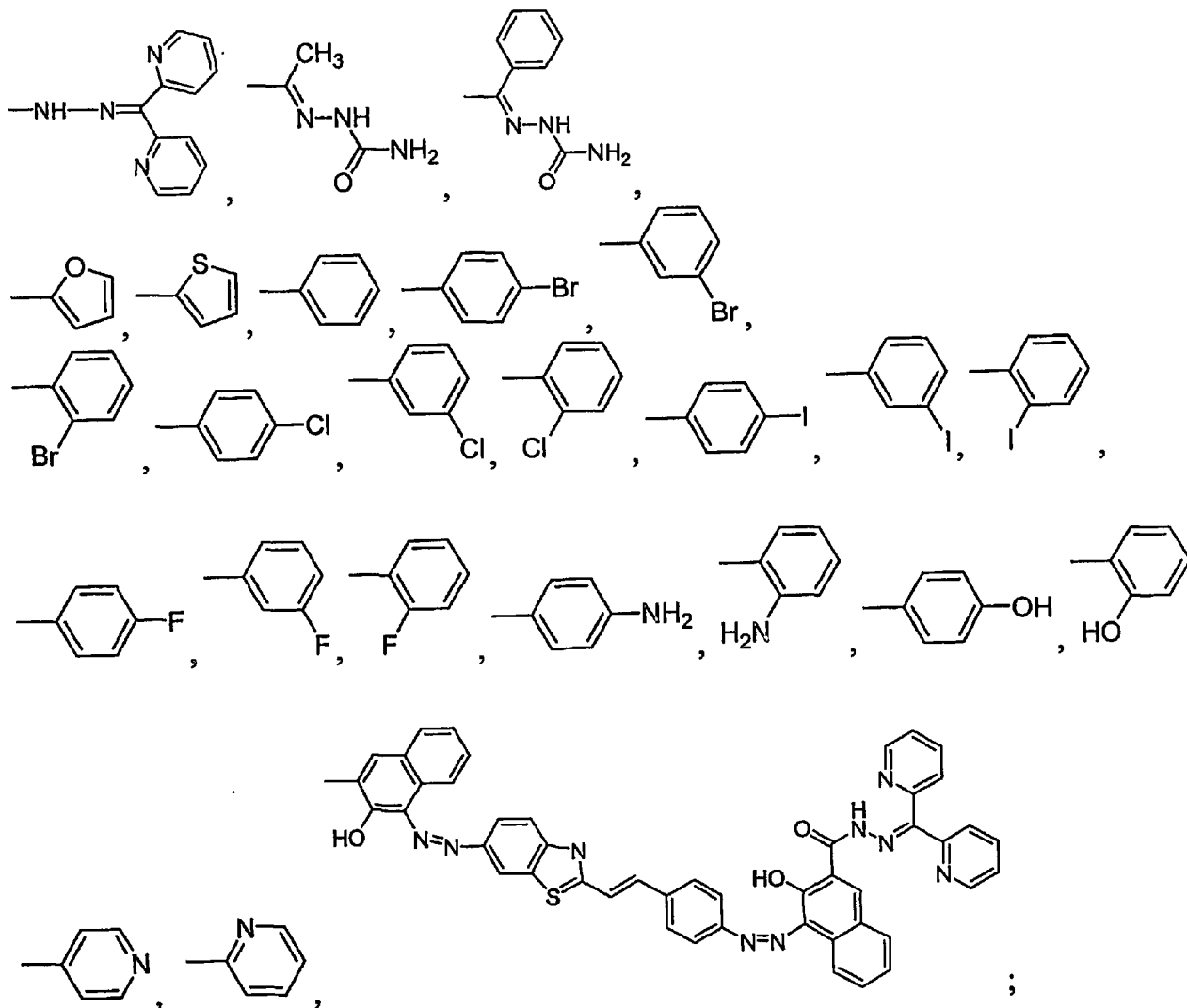
【化4】



である場合には、

-Gは、-NH₂、-CH₂Cl、

【化5】



10

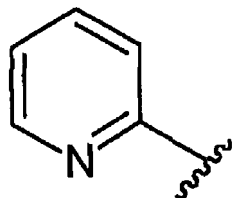
20

30

ではなく；かつ

(ii) EがSであり、AおよびBが各々

【化6】

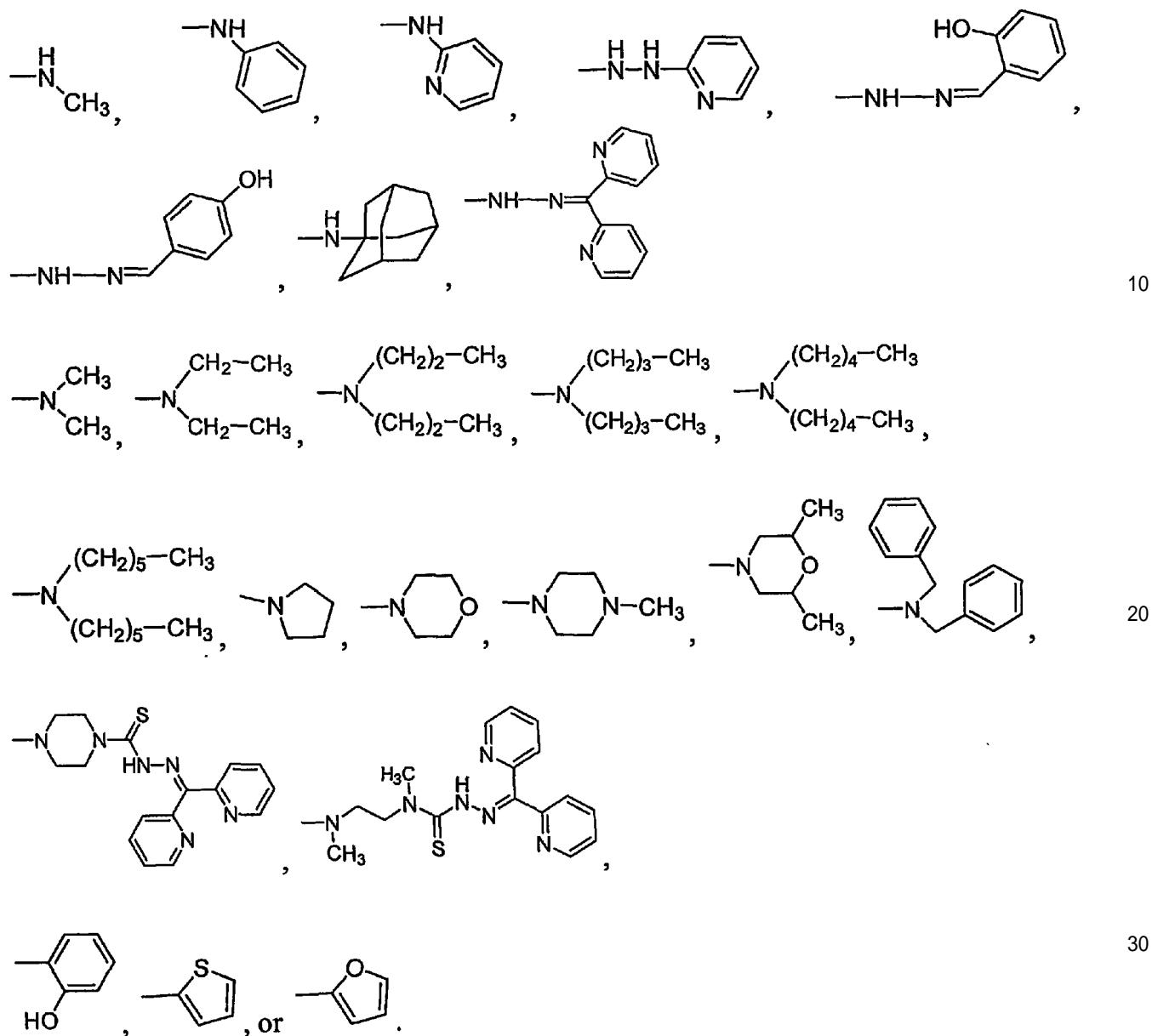


である場合には、

- Gは、- NH₂、

40

【化 7】



10

20

30

40

50

ではないという条件つきである]の化合物。

【請求項 2】

R' が水素である、請求項 1 の化合物。

【請求項 3】

A および B が同じである、請求項 1 の化合物。

【請求項 4】

A および B が異なっている、請求項 1 の化合物。

【請求項 5】

A が、任意に置換されたピリジル、任意に置換されたピリミジニル、任意に置換されたトリアジニル、任意に置換されたオキサゾリル、および任意に置換されたピロリルから選ばれる、請求項 1 の化合物。

【請求項 6】

B が、任意に置換された 5 - または 6 - 員の芳香環、および任意に置換された 5 - または 6 - 員の複素芳香環から選ばれる、請求項 1 の化合物。

【請求項 7】

B が、任意に置換されたフェニル、任意に置換されたナフチル、任意に置換されたピリジル、任意に置換されたピリミジニル、任意に置換されたトリアジニル、任意に置換され

たオキサゾリル、任意に置換されたピロリル、および任意に置換されたフラニル基から選ばれる、請求項 6 の化合物。

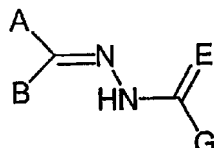
【請求項 8】

前記任意の置換基の各々が、独立して C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{6-10} アリール、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、 O -アルキル、 S -アルキル、ニトロ、シアノ、 $C(O)$ -アルキル、 $C(O)$ - O -アルキル、 $C(O)NH$ (アルキル)、および $C(O)N$ (アルキル)₂ から選ばれる、請求項 6 または 7 の化合物。

【請求項 9】

式 2 :

【化 8】



式 2

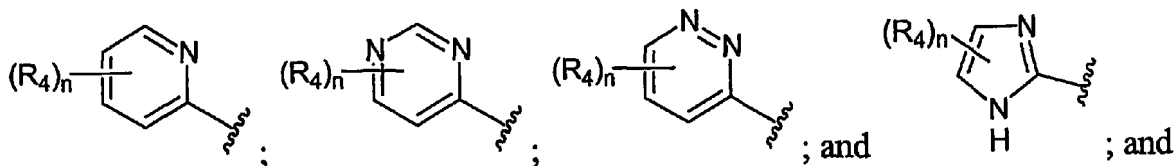
10

[式中、

A は

20

【化 9】



から選られ、

各 R_4 は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O$ -アルキル、 $-S$ -アルキル、 $-C(O)$ -アルキル、 $-C(O)$ -アルケニル、 $-C(O)$ - O -アルキル、ニトロ、およびシアノから選られ、

30

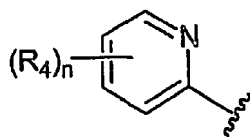
n は 0、1、2、3、または 4 であり；さらに

B、E、および G は、条件 (i) および (ii) を含めて式 1 に定義された通りである] の化合物。

【請求項 10】

A が

【化 10】



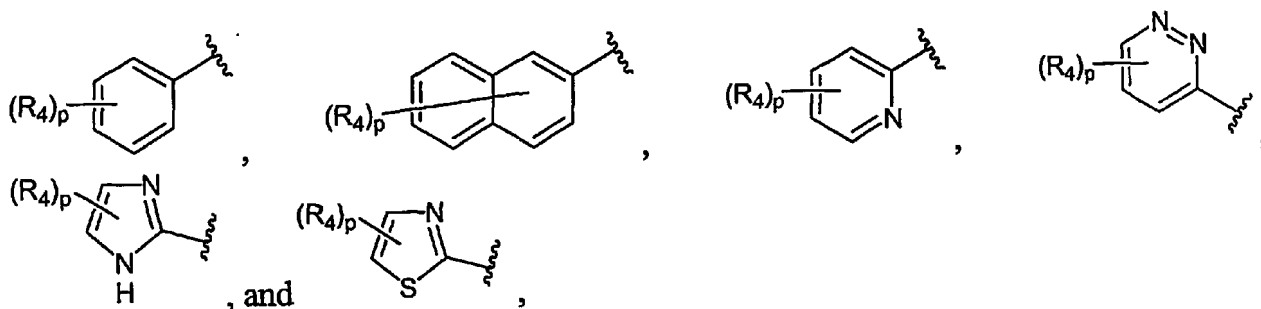
40

であって、 R_4 および n が請求項 9 に定義された通りである化合物。

【請求項 11】

B が、

【化 1 1】



10

から選ばれ、各 R_4 は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

p は 0 から 7 までの整数であり、かつ

A、E、および G は、条件 (i) および (ii) を含めて式 1 に定義された通りである、請求項 1 の化合物。

【請求項 1 2】

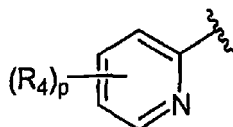
p が 0、1、2、3、または 4 である、請求項 1 1 の化合物。

【請求項 1 3】

B が、

20

【化 1 2】

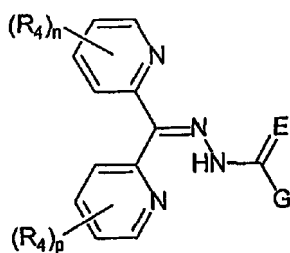


であり、 R_4 が請求項 1 1 に定義された通りであり、かつ p が 0、1、2、3、または 4 である、請求項 1 1 の化合物。

【請求項 1 4】

式 3 :

【化 1 3】



式3

30

[式中、

E は O または S であり；

n は 0、1、2、3、または 4 であり、

p は 0、1、2、3、または 4 であり、さらに

各 R_4 は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、さらに

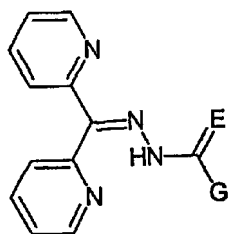
$-G$ は、条件 (i) および (ii) を含めて式 1 に定義された通りである] の化合物。

40

【請求項 1 5】

式 4 :

【化 1 4】



式4

10

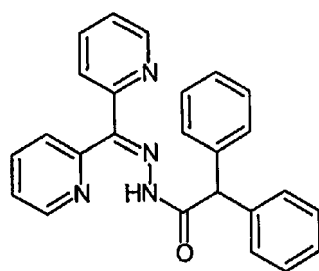
[式中、

E は O または S であり ; かつ

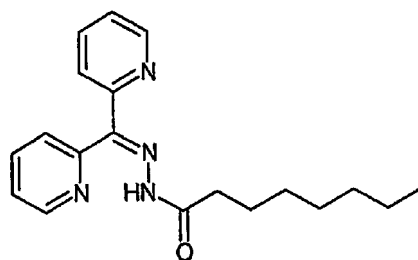
- G は、条件 (i) および (i i) を含めて式 1 に定義された通りである] の化合物。

【請求項 1 6】

【化 1 5】



and

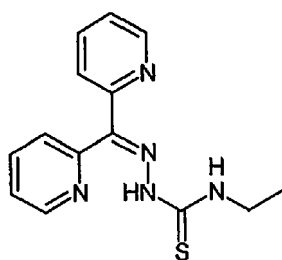


20

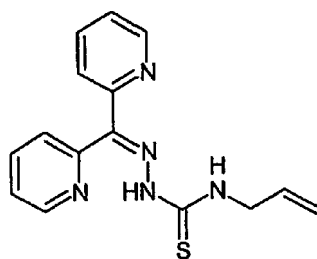
から選ばれる化合物。

【請求項 1 7】

【化 1 6】



and



30

から選ばれる化合物。

【請求項 1 8】

製薬上許容される希釈剤または担体および、請求項 1、9、14、15、16、および 17 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物が、またはその金属イオン錯体を含む製薬組成物。

【請求項 1 9】

製薬上許容される希釈剤または担体および、請求項 1、9、14、15、16、および 17 の任意の一つによる化合物の少なくとも一つの金属イオン錯体を含んでおり、前記金属イオンが鉄 (II)、鉄 (III)、銅 (II)、亜鉛 (II)、パラジウム (II)、白金 (II)、およびガリウム (III) から選ばれる製薬組成物。

40

【請求項 2 0】

前記金属イオンが、鉄 (II) および鉄 (III) から選ばれる、請求項 1 9 の組成物。

【請求項 2 1】

条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない、治療上有効な量の、式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物が、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物を製薬上許容さ

50

れる希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む、哺乳類における鉄キレート化療法。

【請求項 2 2】

治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む、哺乳類における鉄過剰症の治療方法。

【請求項 2 3】

前記鉄過剰症が - サラセミア (thalassaemia) である、請求項 2 2 の方法。

10

【請求項 2 4】

細胞増殖を阻害する方法であって、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と、細胞を接触させることを含む方法。

【請求項 2 5】

哺乳類において細胞増殖を阻害する方法であって、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と、哺乳類細胞を接触させることを含む方法。

20

【請求項 2 6】

哺乳類において増殖性疾患を治療する方法であって、治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法。

30

【請求項 2 7】

前記増殖性疾患が、血管新生依存性疾患、細胞増殖性疾患、および癌から選ばれる、請求項 2 6 の方法。

【請求項 2 8】

前記癌が、悪性腫瘍か、または良性腫瘍である、請求項 2 7 の方法。

【請求項 2 9】

前記癌が、固形腫瘍か、または非固形腫瘍である、請求項 2 7 の方法。

【請求項 3 0】

細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と接触させることを含む方法。

40

【請求項 3 1】

細胞増殖を阻害し、かつ細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化

50

合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 3 2】

哺乳類においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記哺乳類に、治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体が、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 3 3】

哺乳類においてアポトーシスを誘導しかつ細胞増殖を阻害する方法であって、前記哺乳類に、治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体が、あるいは条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 3 4】

前記金属イオンが、鉄、銅、亜鉛、パラジウム、白金、およびガリウムから選ばれる遷移金属イオンである、請求項 2 4 ~ 3 3 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 5】

前記金属イオンが、鉄 (I I) および鉄 (I I I) から選ばれる、請求項 2 4 ~ 3 4 のいずれか 1 項の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、金属イオンをキレート化することが可能な化合物に関する。特に、本発明は、鉄イオンを含めた金属イオンをキレート化することが可能な (チオ) セミカルバゾン化合物および (チオ) ヒドラジン化合物に関する。本発明はまた、かかる化合物および / またはそれらの金属イオン錯体の、細胞増殖に関連する疾病の治療法を含めた治療的使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

鉄 (F e) は、基本的に多くの重要な細胞プロセスに関与している。たとえば、F e 含有タンパク質は、エネルギー代謝、呼吸、および D N A 合成に関係する鍵反応を触媒する。細胞の F e 奪取は、結果として G₁ / S 停止およびアポトーシスを生じる^{1, 2}。腫瘍細胞は、おそらくはその増大した増殖速度のため、正常細胞よりも鉄の枯渇に対してはるかに感受性である。腫瘍細胞の増大した鉄要求は、血清の F e 輸送タンパク質、トランスフェリン (T f) と結合するトランスフェリン受容体 1 の増大した発現に反映される。新生細胞もまた、より高いレベルの F e 含有酵素、リボヌクレオチド還元酵素、を発現しており、そのことは D N A 合成の重要な律速段階である。細胞の鉄プールはそれゆえ重要な治療標的であり、鉄をキレート化することが可能な化合物は、鉄関連性の疾患および障害の治療における有用な治療薬、ならびに潜在的な抗腫瘍剤であってよい。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

デスフェリオキサミン (D F O) は、鉄過剰症の治療のために現在使用されている鉄キレート化剤である。しかしながら、抗癌剤としての D F O の使用は、そのあまり大きくはない抗増殖活性によって制限されている。

【0 0 0 4】

鉄キレート化剤を含め、細胞膜を透過しかつ細胞内の F e をキレート化することが可能

10

20

30

40

50

な、治療上許容される金属イオンキレート化剤が必要とされている。また、抗増殖活性を有する臨床上有用な鉄キレート化剤も必要である。

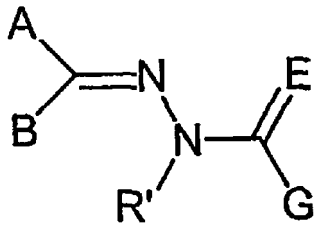
【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第1の観点によれば、式1

【0006】

【化17】



10

式1

【0007】

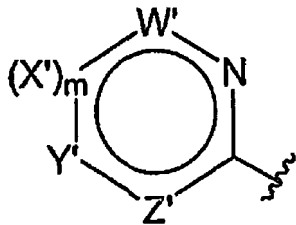
[式中、

EはOまたはSであり；

Aは

【0008】

【化18】



30

【0009】

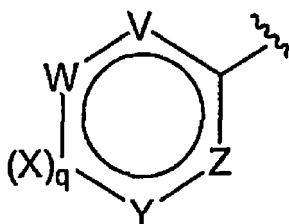
であって、Z'、Y'、X'、およびW'は独立してCR₄、NR₈、S、およびOから選ばれ、Aにおけるヘテロ原子の総数は1、2、または3であり、

mは0または1であり、

Bは

【0010】

【化19】



40

【0011】

であって、Z、Y、X、W、およびVは独立してCR₄、NR₈、S、およびOから選ばれ；さらにBにおけるヘテロ原子の総数は0、1、2、または3であり；

qは0または1であり；

50

各 R_4 は独立して水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ；

各 R_8 は独立して水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、および $-C(O)-$ アルケニル、ベンジル、ベンジルカルバメートから選ばれ；

R' は水素、または金属イオンキレート化を妨害しない基であり；

$-G$ は NR_2R_3 または $CR_2R_3R_5$ であって、

C と R_5 の間の結合は単結合、二重結合、または三重結合でよく； C と R_5 の間の結合が二重結合である場合は、 R_2 および R_3 の一方がなく、 C と R_5 の間の結合が三重結合である場合は、 R_2 および R_3 の双方がなく；

R_5 は水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基からなる群より選ばれ；

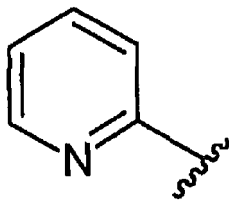
R_2 および R_3 は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基から選ばれ；

あるいは $-G$ は任意に置換された複素芳香族基、任意に置換された二環基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基；任意に置換されたシクロアルキル基、または任意に置換されたヘテロシクロアルキル基であって；

(i) E が O であり、 A および B が各々

【0012】

【化20】



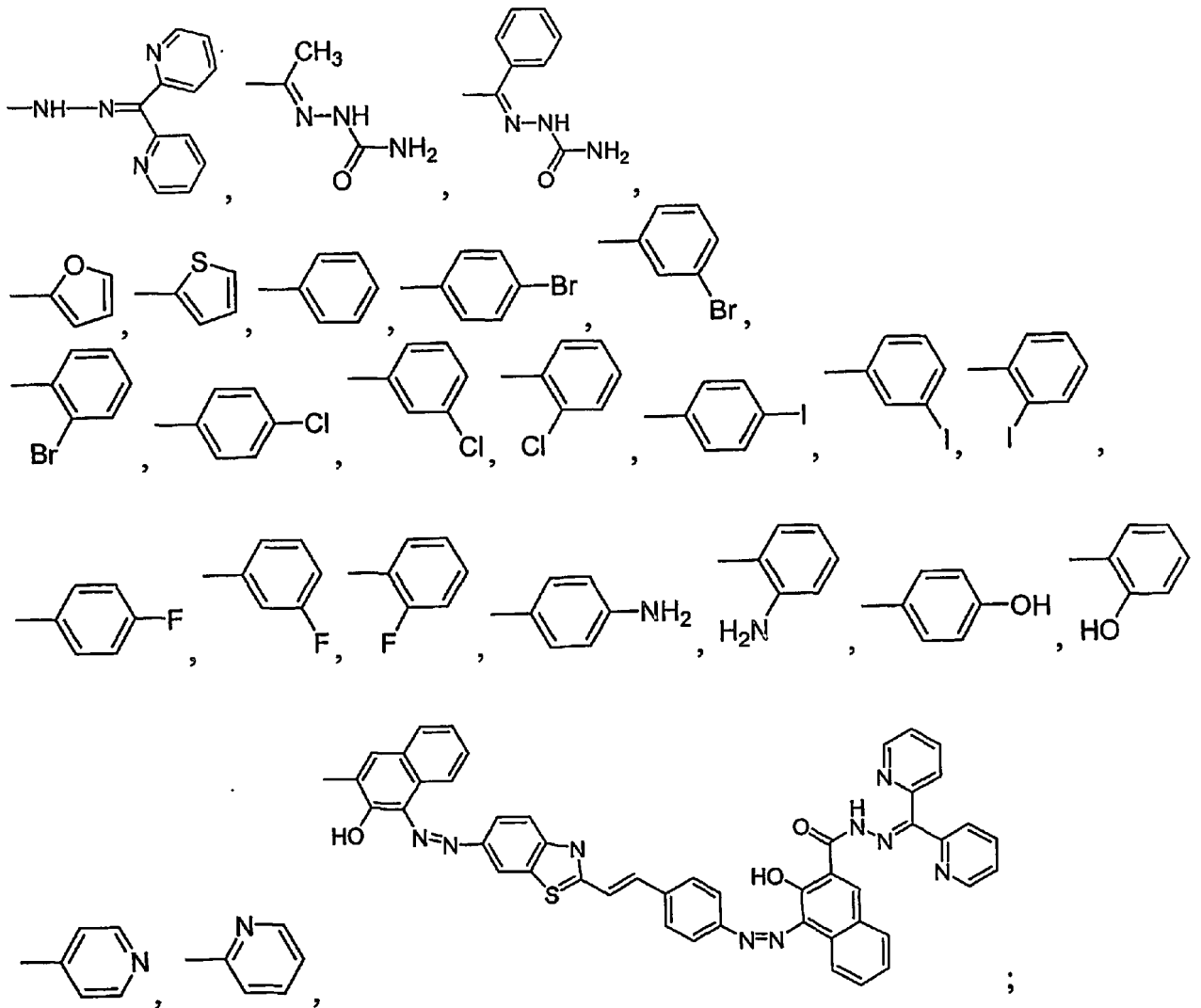
【0013】

である場合には、

$-G$ は、 $-NH_2$ 、 $-CH_2Cl$ 、

【0014】

【化21】



10

20

30

40

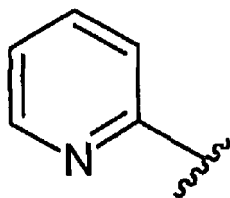
【0015】

ではなく；かつ

(ii) EがSであり、AおよびBが各々

【0016】

【化22】



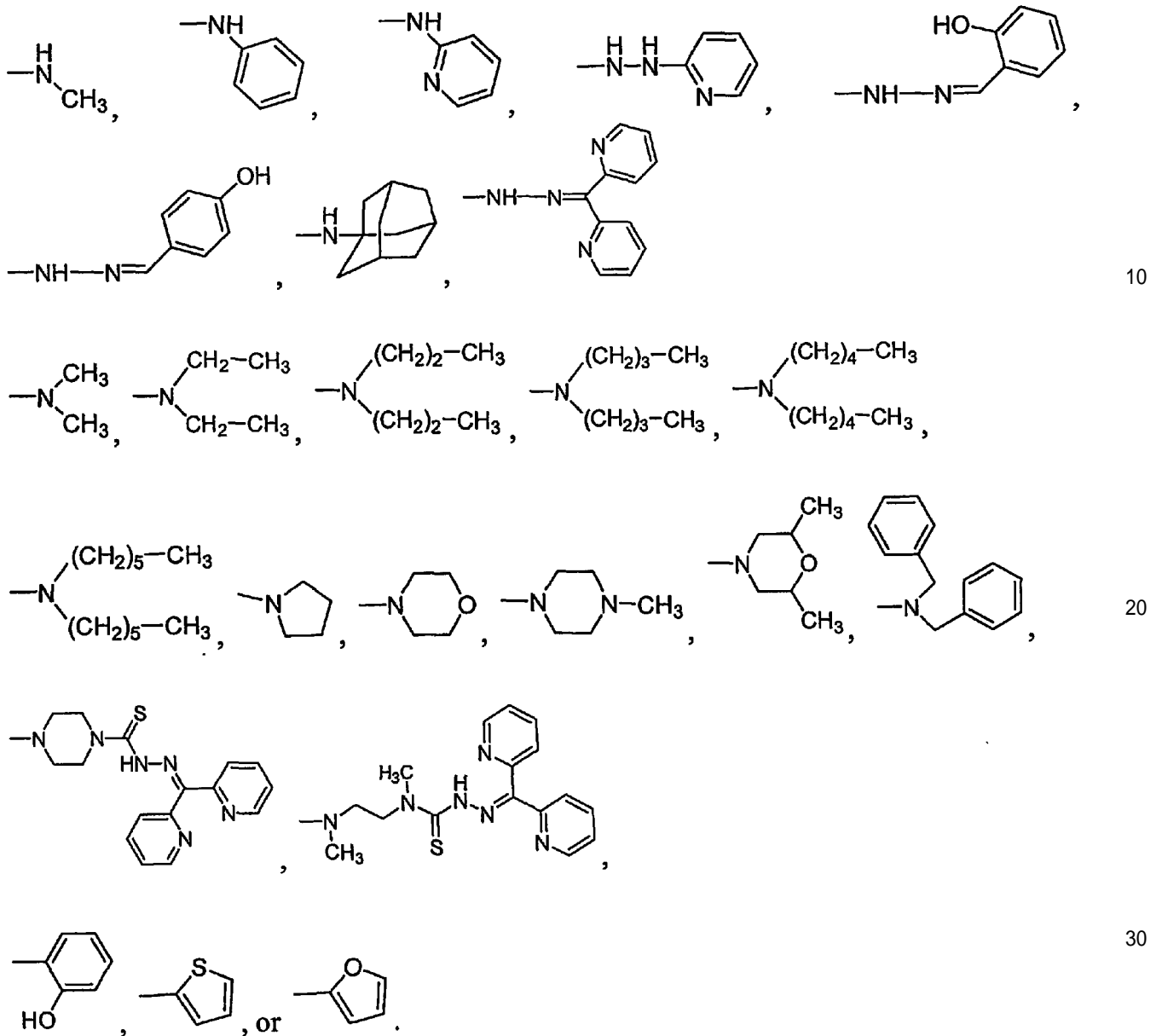
【0017】

である場合には、

- Gは、- NH₂、

【0018】

【化 2 3】



10

20

30

40

50

【0019】

ではないという条件つきである]の化合物が提供される。

【0020】

本発明の第1の観点に関しては、AおよびBは同じかまたは異なってよい。一つの態様においては、AおよびBは同じである。もう一つの態様においては、AおよびBは異なっている。

【0021】

いくつかの態様においては、Aは任意に置換されたピリジル、任意に置換されたピリミジニル、任意に置換されたトリアジニル、任意に置換されたオキサゾリル、および任意に置換されたピロリルから選ばれてよい。

【0022】

別の態様においては、Bは任意に置換された5-または6-員の芳香環、および任意に置換された5-または6-員の複素芳香環から選ばれてよい。たとえば、Bは任意に置換されたフェニル、ナフチル、ピリジル、ピリミジニル、トリアジニル、オキサゾリル、ピロリル、およびフラニル基から選ばれてよい。任意の置換基は、電子吸引基および電子供与基を含んでよい。任意の置換基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、C₆₋₁₀ア

リール、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、O - アルキル、S - アルキル、ニトロ、シアノ、C (O) - アルキル、C (O) - O - アルキル、C (O) - NH (アルキル)、および C (O) - N (アルキル)₂ を含んでよい。

【 0 0 2 3 】

一つの態様においては、R' は水素である。

【 0 0 2 4 】

別の態様においては、E が O である場合、- G は、任意に置換された - C₁₋₈ - アルキル、C₁₋₈ - アルケニル、アリール、ヘテロアリール、- CH₂ (アリール)、および - CH (アリール)₂ から選ばれる。他の態様においては、E が S である場合、- G は、任意に置換された - C₁₋₈ - アルキル、C₁₋₈ - アルケニル、- CH₂ (アリール)、- CH (アリール)₂、およびヘテロアリールから選ばれる。さらなる態様においては、E が S である場合、- G は、任意に置換された - NH (C₁₋₆ - アルケニル) および - N (アリール)₂ から選ばれる。

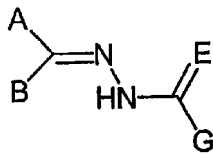
10

【 0 0 2 5 】

本発明の第 2 の観点によれば、式 2 :

【 0 0 2 6 】

【 化 2 4 】



20

式 2

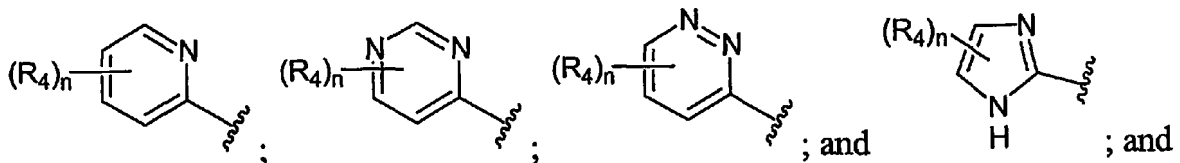
【 0 0 2 7 】

[式中、

A は

【 0 0 2 8 】

【 化 2 5 】



30

【 0 0 2 9 】

から選ばれ、

各 R₄ は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、- O - アルキル、- S - アルキル、- C (O) - アルキル、- C (O) - アルケニル、- C (O) - O - アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

40

n は 0、1、2、3、または 4 であり ; さらに

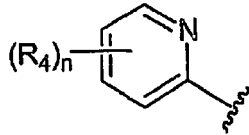
B、E、および G は、条件 (i) および (i i) を含めて式 1 に定義された通りである] の化合物が提供される。

【 0 0 3 0 】

一つの態様においては、A は

【 0 0 3 1 】

【化 2 6】



【0032】

であって、各 R_4 は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、さらに n は 0、1、2、3、または 4 である。

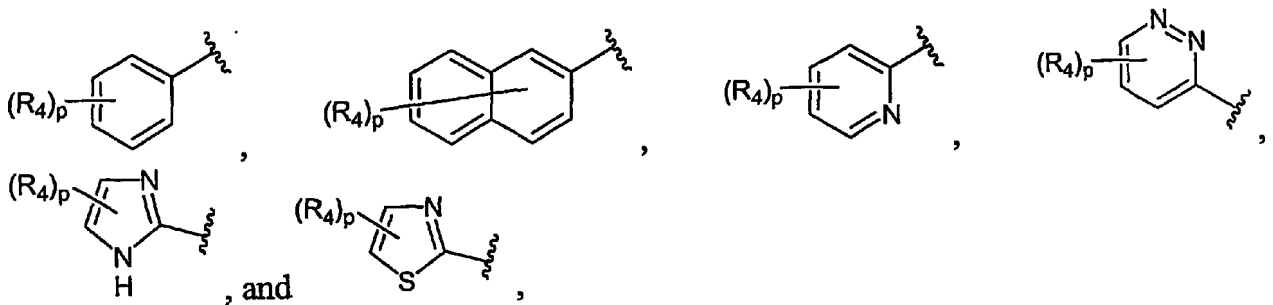
10

【0033】

一つの態様においては、 B は

【0034】

【化 2 7】



20

【0035】

から選ばれ、各 R_4 は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、さらに p は 0 から 7 までの整数であり、

A 、 E 、および G は、条件 (i) および (ii) を含めて式 1 に定義された通りである

30

【0036】

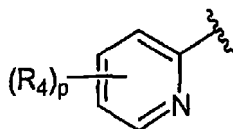
一つの態様においては、 p は 0、1、2、3、または 4 である。

【0037】

一つの態様においては、 B は

【0038】

【化 2 8】



40

【0039】

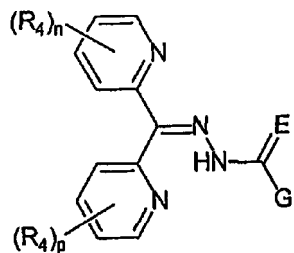
である。

【0040】

本発明の第 3 の観点によれば、式 3 :

【0041】

【化29】



式3

10

【0042】

[式中、

EはOまたはSであり；

nは0、1、2、3、または4であり、

pは0、1、2、3、または4であり、さらに

各R₄は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、-O-アルキル、-S-アルキル、-C(O)-アルキル、-C(O)-アルケニル、-C(O)-O-アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、さらに

-Gは、条件(i)および(ii)を含めて式1に定義された通りである]の化合物が提供される。

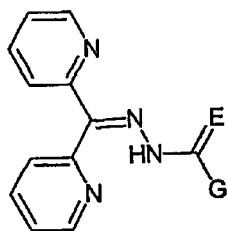
20

【0043】

本発明の第4の観点によれば、式4：

【0044】

【化30】



式4

30

【0045】

[式中、

EはOまたはSであり；かつ

-Gは、条件(i)および(ii)を含めて式1に定義された通りである]の化合物が提供される。

【0046】

本発明の一つの態様においては、EがOである場合、式4の化合物はジ-2-ピリジルケトン4，4-ジフェニルセミカルバゾン(PK44pHと略記)である。もう一つの態様においては、EがOである場合、式4の化合物はジ-2-ピリジルケトン・オクタノック・ヒドラゾン(PKoctHと略記)である。

40

【0047】

本発明のさらなる態様においては、EがSである場合、式4の化合物はジ-2-ピリジルケトン4-エチル-3-チオセミカルバゾン(Dp4eTと略記)である。もう一つの態様においては、EがSである場合、式4の化合物はジ-2-ピリジルケトン4-アリル-3-チオセミカルバゾン(Dp4aTと略記)である。

【0048】

式1、2、3、または4の化合物は、金属イオンをキレート化することが可能でよい。

50

したがって、本発明のもう一つの観点においては、条件(i)および(ii)を含めるかまたは除外して、本発明の第1～第4の観点の任意の一つにおいて定義された式1、2、3、または4の化合物の金属イオン錯体が提供される。

【0049】

一つの態様においては、式1、2、3、または4の化合物の金属イオン錯体は、銅、鉄、亜鉛、パラジウム、白金、またはガリウムイオン錯体のような、遷移金属イオン錯体でよい。一つの態様においては、金属イオンは鉄(II)である。もう一つの態様においては、金属イオンは鉄(III)である。

【0050】

一つの態様においては、式1、2、3、または4の化合物は、三座配位子として機能してよい。一つの態様においては、式1、2、3、または4の二つの化合物は、金属イオン、たとえば、鉄(II)または鉄(III)と六配位錯体を形成してもよい。

10

【0051】

本発明の第5の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物と一緒に、製薬上許容される希釈剤、補助剤、または担体を含む製薬組成物が提供される。

【0052】

一つの態様においては、本発明の製薬組成物は、条件(i)および(ii)を含めて、本発明の第1～第4の観点の任意の一つによる式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物を含む。

20

【0053】

本発明のいくつかの態様においては、製薬組成物は式1、2、3、または4の化合物の、一以上の金属イオン錯体を含んでもよい。適切な金属イオンは遷移金属イオンを含むたとえば、金属イオンは鉄(II)、鉄(III)、銅(II)、亜鉛(II)、パラジウム(II)、白金(II)、またはガリウム(III)でよい。

【0054】

条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、および4の化合物、およびそれらの組成物は、インビトロまたはインビボの金属イオンキレート化に使用されてよい。一つの態様においては、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、および4の化合物、およびそれらの組成物は、鉄のキレート化に使用されてよい。したがって、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、および4の化合物、およびそれらの組成物は、鉄キレート化療法または、鉄過剰症の治療に適してよい。条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、および4の化合物、およびそれらの組成物は、細胞増殖を阻害するためおよび/またはアポトーシスを誘導するために使用されてよい。条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、および4の化合物、およびそれらの組成物はまた、鉄濃度に感受性のある遺伝子の発現を修飾するためにも使用されてよい。かかる遺伝子の実例は、WAF1、GADD45、およびNdr g Iを含む。

30

40

【0055】

本発明による製薬組成物は、皮下または静脈内注射、経口投与、吸入、経皮適用、または直腸内適用に向けて製剤されてよい。本発明の一つの態様においては、組成物は静脈内投与用に製剤される。もう一つの態様においては、組成物は経口投与用に製剤される。

【0056】

本発明の第6の観点によれば、哺乳類における鉄キレート化剤療法であって、治療上有効な量の、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物か、あるいは条件(i)および(ii)

50

)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法が提供される。

【0057】

本発明の第7の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物の、鉄キレート治療用の薬物の調製のための用途が提供される。

【0058】

本発明の第8の観点によれば、哺乳類における鉄過剰症の治療法であって、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに治療上有効な量の、本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物が、あるいは条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法が提供される。

10

【0059】

本発明の第9の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物の、鉄過剰症の治療用薬物の製造のための用途が提供される。

【0060】

本発明の第8および第9の観点に関して、一つの態様においては、鉄過剰症は サラセミア (thalassaemia) である。

20

【0061】

本発明の第10の観点によれば、細胞増殖を阻害する方法であって、有効な量の、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体が、あるいは条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物に対し、細胞を暴露することを含む方法が提供される。

【0062】

本発明の第10の観点に関して、一つの態様においては、式1、2、3、および4の化合物またはその金属イオン錯体が、または前記化合物またはその金属イオン錯体を含む組成物は、インビトロの細胞増殖を阻害するべく用いられてよい。もう一つの態様においては、式1、2、3、および4の化合物またはその金属イオン錯体が、または前記化合物またはその金属イオン錯体を含む組成物は、インビボの細胞増殖、たとえば、哺乳類における細胞増殖を阻害するべく用いられてよい。

30

【0063】

本発明の第11の観点によれば、哺乳類における細胞増殖性疾患を治療する方法であって、治療上有効な量の、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体が、あるいは条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法が提供される。

40

【0064】

本発明の第12の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体の、細胞増殖を阻害するための薬物製造のための用途が提供される。

【0065】

本発明の第13の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに

50

本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体の、増殖性疾患の治療用の薬物を製造するための用途が提供される。

【0066】

本発明の第 11 または第 13 の観点に関して、増殖性疾患は血管新生依存性疾患、細胞増殖性疾患（乾癬、IBD、悪性疾患、再狭窄のような）、炎症性疾患、自己免疫性疾患、血管疾患、血栓症、癌から選ばれてよい。増殖性疾患は関節炎であってよい。癌は悪性腫瘍かまたは良性腫瘍でよい。悪性腫瘍は転移性であってよい。癌は固形腫瘍かまたは非固形腫瘍でよい。たとえば、癌は白血病かまたはリンパ腫であってよい。

【0067】

一つの態様においては、本発明の化合物または組成物が唯一の活性物質として投与される場合、哺乳類の白血球数は変化する結果となり、特に、化合物または組成物の投与の後に、高々 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% まで低減される。同様に、一つの態様においては、本発明の化合物または組成物が唯一の活性物質として投与される場合、哺乳類の赤血球数は変化する結果となり、特に、化合物または組成物の投与の後に、高々 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% まで低減される。

【0068】

本発明の第 14 の観点によれば、細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と接触させることを含む方法が提供される。

【0069】

本発明の第 15 の観点によれば、細胞増殖を阻害し、かつ細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物と接触させることを含む方法が提供される。

【0070】

本発明の第 16 の観点によれば、哺乳類においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記哺乳類に、治療上有効な量の、条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【0071】

本発明の第 17 の観点によれば、哺乳類においてアポトーシスを誘導しかつ細胞増殖を阻害する方法であって、前記哺乳類に、治療上有効な量の、条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、あるいは条件 (i) および (ii) を用いるかまたは用いずに本文において定義された式 1、2、3、または 4 の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0072】

本発明の第18の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体の、アポトーシスの誘導用の薬物製造のための用途が提供される。

【0073】

本発明の第19の観点によれば、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体の、アポトーシスを誘導しかつ細胞増殖を阻害するための薬物製造のための用途が提供される。

【0074】

本発明の第20の観点によれば、細胞増殖を阻害すること、増殖性疾患を治療すること、癌を治療すること、アポトーシスを誘導すること、イオンキレート療法、または鉄過剰症を治療することの、任意の一以上のために使用される場合に、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体、あるいは条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物が提供される。

10

【0075】

本発明の第21の観点によれば、増殖性疾患、癌、鉄過剰症からなる群より選ばれる症状を哺乳類において治療または阻害するか、哺乳類においてアポトーシスを誘導するか、または哺乳類においてアポトーシスを誘導しかつ細胞増殖を阻害する方法であって、治療上有効な量の、条件(i)および(ii)を用いるかまたは用いずに本文において定義された式1、2、3、または4の少なくとも一つの化合物またはその金属イオン錯体か、または前記化合物または錯体を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む組成物を前記哺乳類へ投与することを含んでおり、結果として得られる白および/または赤血球数は哺乳類において変化し、特に、前記哺乳類への化合物または組成物の投与の後に、各々、高々1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%まで低減される方法が提供される。

20

30

【0076】

本発明の第5と第10～第21の観点の任意の一つについては、金属イオンは遷移金属イオンでよい。たとえば、金属イオンは鉄、銅、亜鉛、パラジウム、白金、およびガリウムから選ばれてよい。一つの態様においては、金属イオンは鉄(II)である。もう一つの態様においては、金属イオンは鉄(III)である。

【0077】

本発明の第6、第8、第10、第11、第16、第17、および第21の観点の任意の一つについては、哺乳類はヒト、非ヒト霊長類、ネズミ、ウシ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、鳥類、ネコ、ブタ、またはイヌでよい。一つの態様においては、哺乳類はヒトである。

40

【0078】

本発明の第22の観点によれば、抗増殖化合物を同定するためのプロセスであって：
一以上の細胞周期阻害剤をコードしている遺伝子を有する細胞または細胞抽出物を、鉄をキレート化することの可能な化合物と接触させること、
前記遺伝子の発現レベルを測定すること、
前記遺伝子の発現レベルが、前記化合物なしの前記遺伝子の発現に比較して異なるかどうかを測定すること；
および、それにより前記化合物が抗増殖活性を有するかどうかを測定すること、
を含むプロセスが提供される。

【0079】

50

本発明の第23の観点によれば、一以上の抗増殖化合物を同定するべく多数の化合物をスクリーニングするためのプロセスであって：

一以上の細胞周期阻害剤をコードしている遺伝子を有する細胞または細胞抽出物を、鉄をキレート化することの可能な多数の化合物と接触させること、

任意の前記化合物が前記核酸の発現レベルを修飾するかどうかを測定すること、および、もしそうであれば、前記遺伝子の発現レベルを各化合物について別々に測定すること、前記発現レベルが、各々の前記化合物の不在下での前記発現レベルの比較と異なるかどうかを測定すること；

および、それにより各々の前記化合物が抗増殖活性を有するかどうかを測定すること、を含むプロセスが提供される。

10

【0080】

本発明の第22および第23の観点に関連して、一つの態様においては、遺伝子の発現はアップレギュレートされる。もう一つの態様においては、遺伝子の発現はダウンレギュレートされる。一つの態様においては、細胞周期阻害剤を発現する遺伝子はWAF1でよい。もう一つの態様においては、細胞周期阻害剤を発現する遺伝子はGADD45でよい。さらなる態様においては、遺伝子はNdr1である。

【0081】

本発明の第22および第23の観点に関連して、前記化合物の不在下における遺伝子の発現（たとえばmRNA、タンパク質）は、前記化合物の存在下における前記遺伝子の発現の測定の前または後に、別個に測定されてよい。

20

【0082】

本発明の第22および第23の観点に関連して、一つの態様においては、前記化合物または多数の化合物は、金属イオンをキレート化することが可能である。もう一つの態様においては、前記化合物または多数の化合物は、鉄をキレート化することが可能である。さらなる態様においては、化合物は、条件(i)および(ii)を用いるかまたは除外して、本文において定義された式1、2、3、または4の化合物である。

【0083】

本発明の第1～第23の観点の任意の一つに関しては、一つの態様において、式1、2、3、または4の前記化合物の各々は、条件(i)および(ii)を含めて、本発明の第1～第4の観点の任意の一つにおいて定義された通りである。

30

【0084】

本発明はその範囲内に、式1、2、3、および4の化合物およびその金属イオン錯体の、すべての異性体の形状を含む。適切な例として、本発明は、化合物および/またはその金属錯体の、すべての可能なエナンチオマー、ジアステリオマー(diastereomers)、ラセミ体、シス異性体、トランス異性体、(R)、(S)、(+), (-)、および異性体を含む。

(定義)

【0085】

以下は、本発明の記載の理解に役立つかもしれないいくつかの定義である。これらは一般的な定義として意図されたものであり、決して本発明の範囲をこのような用語のみに制限するものではないが、以下の記述のより良き理解のために提案されている。

40

【0086】

本文において単数の整数、段階、または要素として列挙された本発明の整数、段階、または要素は、状況が他を必要としないかまたは特にそれと反対に述べない限り、明らかに、単数および複数の双方の、列挙された整数、段階、または要素を含む。

【0087】

本明細書を通して、用語「含む(comprise)」または、「含む(comprises)」または「含んでいる(comprising)」のような変形は、状況が他に必要としない限り、整数または段階または要素、あるいは整数または段階または要素の集団を含意するが、何ら他の整数または段階または要素、あるいは整数または要素の集団を排除することを意味しないこと

50

が理解されるであろう。したがって、本明細書の状況においては、用語「含んでいる」は、「主として含んでいるが、必ずしも単独ではない」ことを意味する。

【0088】

当業者は、本文に記述された本発明が、具体的に記述されたもの以外の変形および修飾を受けることが可能であることを認識するであろう。本発明がかかる変形および修飾のすべてを包含することが理解されるべきである。本発明はまた、本明細書において言及または表示されたすべての段階、特徴、組成物、および化合物を個別的または集合的に、かつ前記段階または特徴の任意およびすべての組み合わせか、または任意の二以上を含む。

【0089】

本出願において引用された参考文献は、その記載全体が参考として本明細書に明確に含まれる。

10

【0090】

本文において用いられる場合、用語「アルキル基」は、その意味の中に、1から10までの炭素原子、たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖の飽和脂肪族基か、3から8までの炭素原子、たとえば3、4、5、6、7、または8個の炭素原子を有する環式飽和脂肪族基、または7、8、9、または10個の炭素原子を有する二環式飽和脂肪族基を含む。たとえば、用語アルキルは、メチル、エチル、1-プロピル、イソプロピル、1-ブチル、2-ブチル、t-ブチル、アミル、1,2-ジメチルプロピル、1,1-ジメチルプロピル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシル、4-メチルペンチル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-

20

30

【0091】

用語「アルケニル基」は、その意味の中に、2から8までの炭素原子、たとえば、2、3、4、5、6、7、または8個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖の不飽和脂肪族炭化水素基か、3から8の炭素原子、たとえば、3、4、5、6、7、または8個の炭素原子を有する環式不飽和脂肪族炭化水素基、および、該当する場合にはEまたはZのいずれかの、少なくとも一つの二重結合を有するそれらの組合せを含む。アルケニル基の実例は、エテニル、ビニル、アリル、1-メチルビニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテンチル(butenyl)、1,3-ブタジエニル、1-ペンテニル、2-ペンテンチル(pentenyl)、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1,3-ペンタジエニル、2,4-

40

【0092】

用語「アルキニル基」は、本文において用いられる場合、その意味の中に、2から8までの炭素原子、たとえば、2、3、4、5、6、7、または8個の炭素原子を有しており、かつ少なくとも一つの三重結合を有する、直鎖または分枝鎖の不飽和脂肪族炭化水素基を含む。アルキニル基の実例は、エチニル、1-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-メチル-2-ブチニル、3-メチル-1-ブチニル、1-ペンチニル、1-ヘキ

50

シニル、メチルペンチニル、1 - ヘプチニル、2 - ヘプチニル、1 - オクチニル、2 - オクチニルなどを含むが、それに制限されない。

【0093】

用語「ヘテロ原子」は、本文において用いられる場合、炭素または水素以外の、たとえば酸素、窒素、および硫黄を含めた任意の原子を指す。

【0094】

用語「ハロゲン化物」または「ハロ原子」は、本文において用いられる場合、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを指す。

【0095】

用語「アミノ基」または「アミノ」のような変形は、本文において用いられる場合、 $-NR_6R_7$ の形状の基を指し、 R_6 および R_7 は独立して水素、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、および任意に置換されたアリール基を含む群から選ばれるが、それに制限されない。

10

【0096】

用語「芳香族基」または「アリール」のような変形は、本文において用いられる場合、6 から 14 の炭素原子、たとえば、6、7、8、9、10、11、12、13、または 14 個の炭素原子を有する芳香族炭化水素の、単一の、多核の、共役した、および縮合した残基を指す。かかる基の実例は、フェニル、トリル、ピフェニル、ナフチル、フェナントリルなどを含む。

【0097】

用語「複素芳香族基」または「ヘテロアリール」のような変形は、本文において用いられる場合、その意味の中に、1、2、3、または4個のヘテロ原子を有する任意の 5 ~ 16 員、たとえば 5 -、6 -、7 -、8 -、9 -、10 -、11 -、12 -、13 -、14 -、15 -、または 16 - 員の、単環か、二環、または三環の芳香族基を含む。実例は、ピロリル、ピリジル、フェナントリル、キノリル、イソキノリル、イミダゾリル、チオフェニル、フラニル、プリニル、インドリル、イソインドリル、フェナントリジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、ベンゾフラニルなどを含むが、それに制限されない。

20

【0098】

用語「ヘテロシクロアルキル基」は、本文において用いられる場合、その意味の中に、1、2、または3のヘテロ原子を有する任意の 3 ~ 10 - 員の飽和または不飽和の、単環または二環系を含む。実例は、ピペリジニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピロリル、モルフォリニル、テトラヒドロチエニルなどを含むが、それに制限されない。

30

【0099】

用語「任意に置換された」は、本文において用いられる場合、この用語が指している基が、未置換か、または、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、シアノ、シアネート、イソシアネート、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、ニトロ、アミノ、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NH$ (アルキル)、 $-C(O)N$ (アルキル) $_2$ 、および $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキルから独立して選ばれ、一以上の基によって置換されてよいことを意味する。

40

【0100】

用語「治療上有効な量」は、その意味の中に、本発明の化合物または組成物の、非毒性の、しかし所望の治療効果を提供するべく十分な量を含むことが意図されている。化合物または組成物の正確な治療上有効な量は、動物の疾患のタイプ、動物の年齢、性別、および体重、投与の様式、および、化合物または組成物の、細胞膜を透過しかつ、鉄のような金属イオンを動物の細胞においてキレート化する能力といった因子によって変わるであろう。投与レジマ (regima) は、最適の治療応答を提供するべく調整されることが可能である。たとえば、いくつかの分割量が毎日投与されることが可能であり、あるいは用量は、

50

治療状況の危急性によって示される通りに比例して低減されることが可能である。

【0101】

本文において用いられる場合、用語「治療」は、疾病の状態または症状を直すか、疾病の成立を予防するか、または、疾病または他の望ましくない症状の進行を、いかなる任意の方法においても防止するか、妨げるか、遅らせるか、逆戻りさせる、任意のおよびすべての使用を含む。

【0102】

略号

| | | |
|----------|--|----|
| DFO - | デスフェリオキサミン | |
| EDTA - | エチレンジアミン四酢酸 | 10 |
| MTT - | [3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニル・テトラゾリウム] | |
| Tf - | トランスフェリン | |
| 「311」 - | 2 - ヒドロキシ - 1 - ナフチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン | |
| 「311m」 - | 2 - ヒドロキシ - 1 - ナフチルアルデヒド・ニコチノイル・ヒドラゾン | |
| DpT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 3 - チオセミカルバゾン | |
| Dp2mT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 2 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン | |
| Dp4mT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - メチル - 3 - チオセミカルバゾン | |
| Dp44mT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4, 4 - ジメチル - 3 - チオセミカルバゾン | 20 |
| Dp4eT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - エチル - 3 - チオセミカルバゾン | |
| Dp4aT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - アリル - 3 - チオセミカルバゾン | |
| Dp4pT - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - フェニル - 3 - チオセミカルバゾン | |
| PCBH - | 2 - ピリジルケトン・ベンゾイル・ヒドラゾン | |
| PCBBH - | 2 - ピリジルケトン 3 - プロモベンゾイル・ヒドラゾン | |
| CAH - | 2 - ピリジルケトン 4 - アミノベンゾイル・ヒドラゾン | |
| CHH - | 2 - ピリジルケトン 4 - ヒドロキシベンゾイル・ヒドラゾン | |
| CIH - | 2 - ピリジルケトン・イソニコチノイル・ヒドラゾン | |
| CTH - | 2 - ピリジルケトン 2 - チオフエンカルボキサルデヒド・ヒドラゾン | |
| KIH - | ジ - 2 - ピリジルケトン・イソニコチノイル・ヒドラゾン | 30 |
| KBH - | ジ - 2 - ピリジルケトン・ベンゾイル・ヒドラゾン | |
| KHH - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - ヒドロキシベンゾイル・ヒドラゾン | |
| KBBH - | ジ - 2 - ピリジルケトン 3 - プロモベンゾイル・ヒドラゾン | |
| KAH - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4 - アミノベンゾイル・ヒドラゾン | |
| KTH - | ジ - 2 - ピリジルケトン 2 - チオフエンカルボキサルデヒド・ヒドラゾン | |
| K44pH - | ジ - 2 - ピリジルケトン 4, 4 - ジフェニルカルボキサルデヒド・セミカルバゾン | |
| KoctH - | ジ - 2 - ピリジルケトン・オクタノイック・ヒドラゾン | |
| CIH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン | |
| CTH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド 2 - チオフエンカルボキサルデヒド・ヒドラゾン | 40 |
| CBH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド・ベンゾイル・ヒドラゾン | |
| CBBH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド 3 - プロモベンゾノイル・ヒドラゾン | |
| CAH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド 4 - アミノベンゾノイル・ヒドラゾン | |
| CHH - | 2 - キノリンカルボキサルデヒド 4 - ヒドロキシベンゾノイル・ヒドラゾン | |

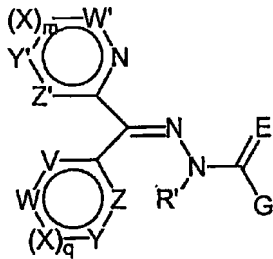
【発明を実施するための最良の形態】

【0103】

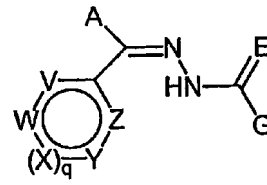
本発明は、金属イオンをキレート化することの可能な化合物に関する。特に、本発明は式 1、2、3、および 4 :

【0104】

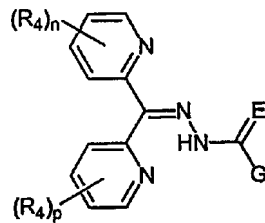
【化31】



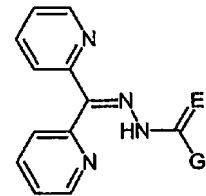
式1



式2



式3



式4

10

and

【0105】

[式中、E、A、Z、Y、X、W、V、Z'、Y'、X'、W'、m、n、p、q、およびGは、条件(i)および(ii)を含めて、前文に定義されている]の、(チオ)セミカルバゾンおよび(チオ)ヒドラゾン化合物に関する。

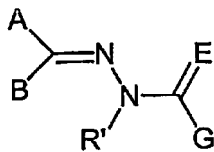
20

【0106】

本発明はまた、条件(i)および(ii)を含めて、または除外して、本分において定義された式1、2、3、および4の化合物の用途にも関係する。したがって、本発明は以下の式1a、2a、3a、および4a：

【0107】

【化32】



式1a

30

【0108】

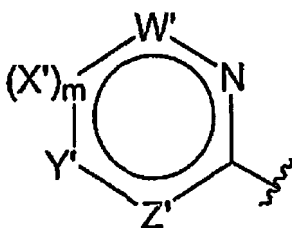
[式中、

EはOまたはSであり；

Aは、

【0109】

【化33】



【0110】

であって、Z'、Y'、X'、およびW'は、独立してCR₄、NR₈、S、およびOか

50

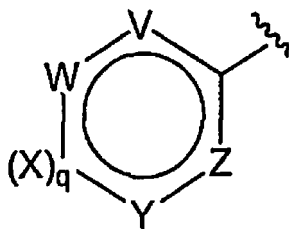
ら選ばれ、Aにおけるヘテロ原子の総数は1、2、または3であり、

mは0または1であり、

Bは、

【0 1 1 1】

【化3 4】



10

【0 1 1 2】

であって、Z、Y、X、およびWは、独立して CR_4 、 NR_8 、S、およびOから選ばれ；かつBにおけるヘテロ原子の総数は0、1、2、または3であり；

qは0または1であり；

各 R_4 は、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、-O-アルキル、-S-アルキル、-C(O)-アルキル、-C(O)-アルケニル、-C(O)-O-アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ；

各 R_8 は、独立して水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、ヒドロキシル、-O-アルキル、-S-アルキル、-C(O)-アルキル、および-C(O)-アルケニル、ベンジル、ベンジルカルバメートから選ばれ；

20

R' は水素、または金属イオンキレート化を妨害しない基であり；

-Gは NR_2R_3 または $CR_2R_3R_5$ であって、

Cと R_5 の間の結合は単結合、二重結合、または三重結合でよく；Cと R_5 の間の結合が二重結合である場合は、 R_2 および R_3 の一方がなく、Cと R_5 の間の結合が三重結合である場合は、 R_2 および R_3 の双方がなく；

R_5 は水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基からなる群より選ばれ；

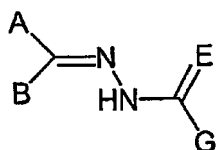
30

R_2 および R_3 は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基から選ばれ；

あるいは-Gは、任意に置換された複素芳香族基、任意に置換された二環基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基；任意に置換されたシクロアルキル基、または任意に置換されたヘテロシクロアルキル基であり]；

【0 1 1 3】

【化3 5】



式2a

40

【0 1 1 4】

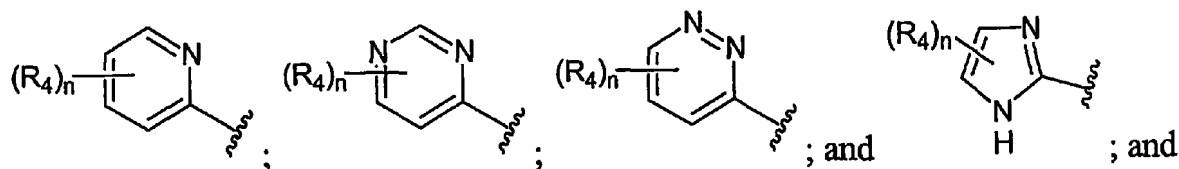
[式中、

Aは：

【0 1 1 5】

50

【化36】



【0116】

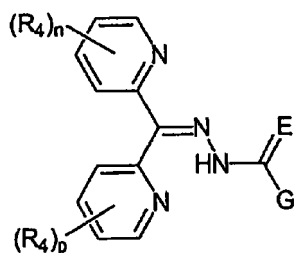
から選ばれ、各 R_4 は、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)$ 10
 $-O-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ；

n は0、1、2、3、または4であり；さらに

B、E、およびGは式1aについて定義された通りであり；

【0117】

【化37】



式3a

20

【0118】

[式中、

EはOまたはSであり；

n は0、1、2、3、または4であり、

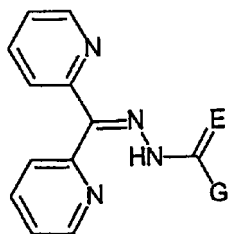
p は0、1、2、3、または4であり、さらに

各 R_4 は、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒド 30
 ロキシル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

さらに、 $-G$ は式1aについて定義された通りであり；および

【0119】

【化38】



式4a

40

【0120】

[式中、

EはOまたはSであり；かつ

$-G$ は式1aについて定義された通りである]の化合物の用途を含む。

【0121】

50

したがって、「条件(i)および(ii)を満たす若しくは満たさない式1、2、3、および/または4の化合物」、および「条件(i)および(ii)を含むかまたは除外した式1、2、3、および/または4の化合物」という表現は、式1、2、3、および4、ならびに式1a、2a、3a、および4aの化合物を含むことと理解されるべきである。

【0122】

本文において用いられる場合、総称「(チオ)セミカルバゾン」はその範囲の中に、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、およびそれらの誘導体または関連する類似体を含む。同様に、本文において用いられる場合、総称「(チオ)ヒドラゾン」はその範囲の中に、ヒドラゾン、チオヒドラゾン、およびそれらの誘導体または関連する類似体を含む。

【0123】

式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aに関して、EがOである場合には、化合物は時に本文において「PKIH類似体」または「PKIHシリーズ」と呼ばれ、EがSである場合には、化合物は時に本文において「DpT類似体」または「DpTシリーズ」と呼ばれる。

【0124】

式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物は、金属イオンをキレートして金属イオン錯体を形成してよい。式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物と金属イオン錯体を形成することの可能な金属イオンの実例は、たとえば、鉄、銅、亜鉛、パラジウム、白金、およびガリウムイオンといった遷移金属イオンを含む。一つの態様においては、金属イオンは鉄(III)である。もう一つの態様においては、金属イオンは鉄(II)である。さらなる態様においては、金属イオンは亜鉛(II)である。

【0125】

本発明はまた、条件(i)および(ii)を用いるかまたは含めて本文において定義された式1、2、3、および/または4の少なくとも一つの化合物、および/または各々の前記化合物の金属イオン錯体を含む製薬製剤を包含する。本発明はまた、条件(i)および(ii)を含むかまたは除外して本文において定義された式1、2、3、および4の化合物か、またはかかる化合物および/またはそれらの金属イオン錯体を含む組成物の治療的使用に関係する。

【0126】

式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物は、(チオ)セミカルバゾンまたは(チオ)ヒドラゾン骨格を含む。基AおよびBの少なくとも一つは、金属イオンのキレート化に関係することが可能なヘテロ原子を含む。一つの態様においては、式1、2、3、および4の化合物は、三座配位子として機能する。一つの態様においては、AおよびBの少なくとも一つは、2-ピリジル基であり、ピリジル基の窒素、イミノ基(C=N)の窒素、およびカルボニル(C=O)またはチオカルボニル(C=S)基は、各々適当な金属イオンと配位結合するための配位原子として役立つ。当業者は、AおよびBが同じでない場合、C=Nの二重結合についてシス/トランス立体異性化があってもよい。したがって、一つの態様においては、AおよびBが同じではない任意に置換された複素芳香環である場合、式1の化合物は、シス/トランス立体化学に依存して、環Aまたは環Bのヘテロ原子を通して、金属イオン錯体を形成することができてよい。このことは、以下に図式的に説明されており、これにおいてMは適当な金属イオンである：

【0127】

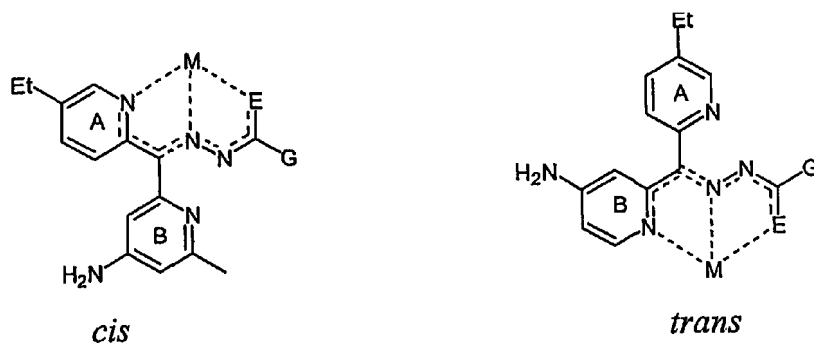
10

20

30

40

【化39】



10

【0128】

式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物は、三座配位子として機能してよく、二つの化合物は適当な金属イオン、たとえば、八面体型錯体を形成することが可能な金属イオンと六配位金属イオン錯体を形成してよい。

【0129】

式1、2、3、および4の化合物を合成するための適当な方法は、当業者に周知であり、いくつかは、たとえば、マーチ(J. March)著、「アドバンスド・オーガニック・ケミストリー(Advanced Organic Chemistry)」第4版(ジョン・ウィリー&サンズ(John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1992年)；および「フォーゲルズ・テキストブック・オブ・プラクティカル・オーガニック・ケミストリー(Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry)」第5版(ジョン・ウィリー&サンズ、ニューヨーク、1989年)に記述されている。

20

【0130】

本発明の式1、2、3、および4の化合物は、シッフ塩基縮合反応によって調製されてよく、それにおいてケトンまたはアルデヒドは、酸ヒドラジドまたは酸チオセミカルバジドのいずれか一方と縮合され、所望の置換パターンを有する式1、2、3、または4の、対応する(チオ)セミカルバゾンまたは(チオ)ヒドラゾン化合物を生成する。

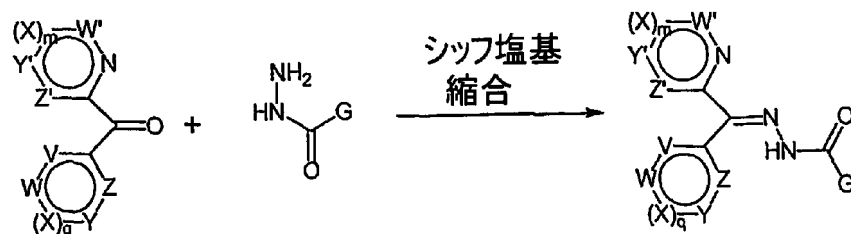
【0131】

(チオ)セミカルバゾンおよび(チオ)ヒドラゾン化合物の適当な合成法は、たとえば、バッキ(Bacchi)ら(1996年)により記述されている。式1、2、3、および4のPKIH類似体を調製するための一般的な合成経路の典型的な実例は、以下の反応機構に代表される：

30

【0132】

【化40】



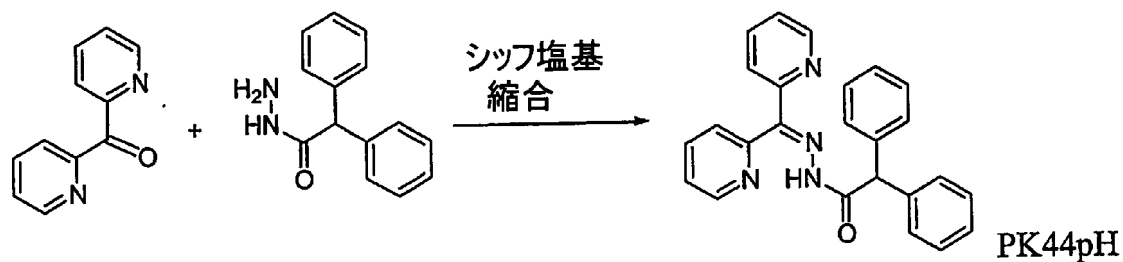
40

【0133】

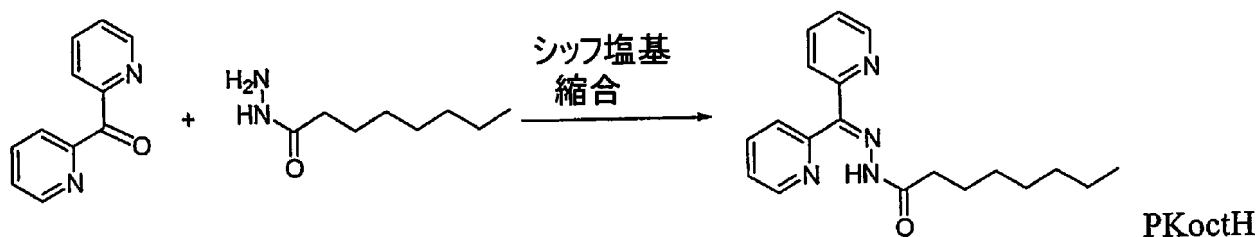
式4のPKIH類似体の調製のための合成経路の実例は、化合物PK44pHおよびPKoctHについて以下に例示される：

【0134】

【化41】



10



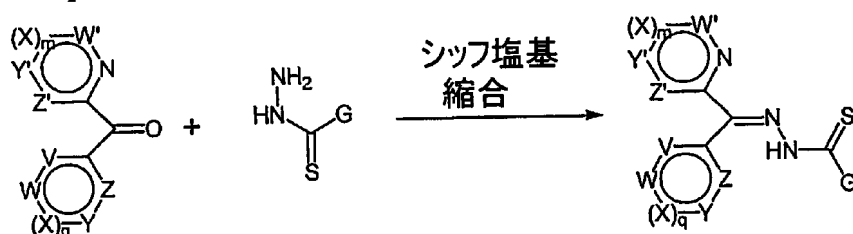
【0135】

DpTを調製するための適当な方法は、ジョンソン（Johnson）ら（1982年）によって記述されている。本文において定義された式1、2、3、および4のDpT類似体を調製するための一般的な合成経路の実例は、以下の一般的な反応機構に代表される：

20

【0136】

【化42】



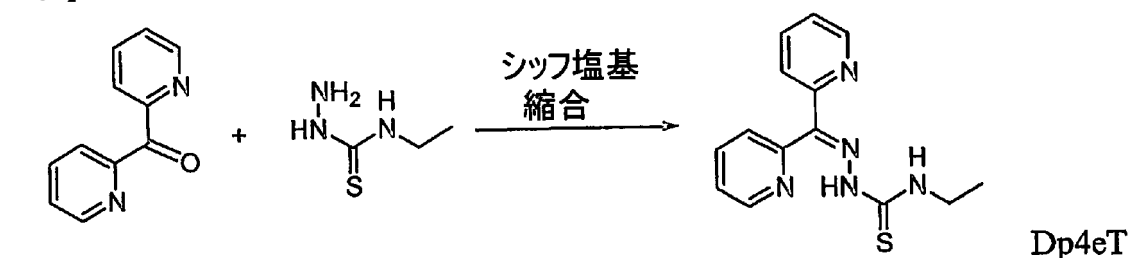
【0137】

本文において定義された式4のDpT類似体を調製するための合成経路の実例は、以下にDp4eTおよびDp4aTについて例示される：

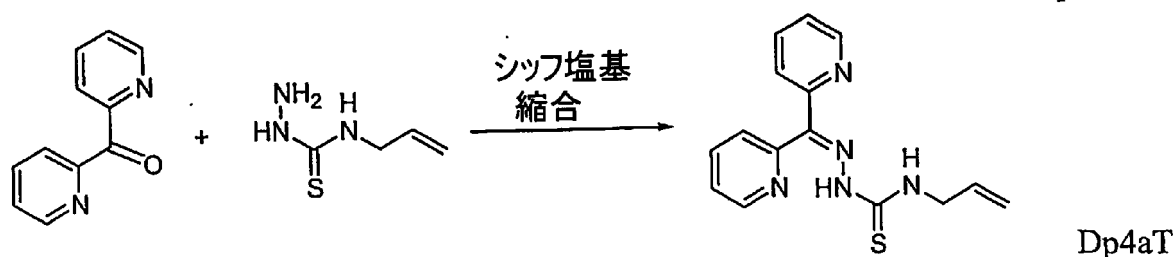
30

【0138】

【化43】



40



【0139】

前文に示された縮合反応は、当業者に周知の条件下に行なわれてよい。たとえば、適当

50

な溶媒系はエタノール、メタノール、エタノール/水、メタノール/水、または他のアセトン、ベンゼン、トルエンといった一般的な有機溶媒を含む。式 1、2、3、および 4 の化合物は、適当な溶媒からの再結晶化およびカラムクロマトグラフィーを含めた、標準的な技術を用いて精製されてよい。

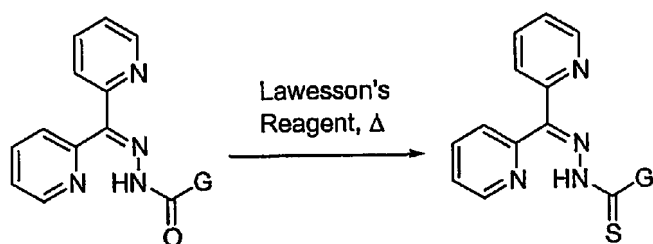
【0140】

別の合成においては、チオセミカルバゾンおよびチオヒドラゾン、対応するセミカルバゾンおよびヒドラゾン化合物から、丁重に、当業者に周知の方法を用いて調製されてよい。たとえば C=O 基は、標準的な条件下に、ロウエッソン (Lawesson) の試薬を用いて C=S 基へ転換されてよい。たとえば、式 1、2、3、または 4 のセミカルバゾンまたはヒドラゾン化合物は、トルエンまたはベンゼンといった適当な溶媒中で、ロウエッソン (Lawesson) の試薬とともに灌流下で加熱されてよく、対応するチオ-化合物を産生する。式 4 の化合物の調製は、以下の一般式に例示される：

10

【0141】

【化 4 4】



20

【0142】

当業者には、本発明に従って化合物を合成する工程において、必要に応じ、あるいは適宜、保護基が用いられることが可能であることが理解されよう。適当な保護基は、当業者には周知である。たとえば、一般的な N-保護基は、t-ブチルカルバメートおよびベンジルカルバメートといった、ベンジルおよびカルバメートを含む。保護基は、グリーン & ウーツ (Theodora W. Greene & Peter G. M. Wuts) 共著、「プロテクティブ・グループ・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis)」第 2 版、ジョン・ウィリー & サンズ、インク (1991 年) に記述されており、その内容は参考文献として本文に取入れられている。

30

【0143】

本発明による使用に適した (チオ)セミカルバゾンおよび (チオ)ヒドラゾン誘導体の実例は、以下を含む：ジ-2-ピリジルケトン・イソニコチノイル・ヒドラゾン

(「PKIH」)；ジ-2-ピリジルケトン・ベンゾイル・ヒドラゾン(「PKBH」)

；

ジ-2-ピリジルケトン4-ヒドロキシベンゾイル・ヒドラゾン(「PKHH」)；

ジ-2-ピリジルケトン3-プロモベンゾイル・ヒドラゾン(「PBBH」)；2-ピリ

ジルケトン4-アミノベンゾイル・ヒドラゾン(「PKAH」)；ジ-2-ピリジルケト

ン2-チオフエンカルボキサルデヒド・ヒドラゾン(「PKTH」)；ジ-2-ピリジル

ケトン4, 4-ジフェニルカルボキサルデヒド・セミカルバゾン(「PK44pH」)；

ジ-2-ピリジルケトン・オクタノック・ヒドラゾン(「PKoCTH」)；ジ-2-

ピリジルケトン4-メチル-3-チオセミカルバゾン(「Dp4mT」)；ジ-2-ピリ

ジルケトン2-4, 4-ジメチル-3-チオセミカルバゾン(「Dp44mT」)；ジ-2-

ピリジルケトン4-エチル-3-チオセミカルバゾン(「Dp4eT」)；ジ-2-ピ

リジルケトン4-アリル-3-チオセミカルバゾン(「Dp4aT」)；ジ-2-ピリ

ジルケトン4-フェニル-3-チオセミカルバゾン(「Dp4pT」)。

40

【0144】

また、構造的には PKIH 類似体に相当するが、C=O の代わりに C=S を有するチオヒドラゾン類似体も本文において開示される。かかる化合物は、ジ-2-ピリジルケトン

50

・イソニコチノイル・チオヒドラゾン(「PKITH」);ジ-2-ピリジルケトン・ベンゾイル・チオヒドラゾン(「PKBTH」);ジ-2-ピリジルケトン4-ヒドロキシベンゾイル・チオヒドラゾン(「PKHTH」);ジ-2-ピリジルケトン3-プロモベンゾイル・チオヒドラゾン(「PBBTH」);ジ-2-ピリジルケトン4-アミノベンゾイル・チオヒドラゾン(「PKATH」);ジ-2-ピリジルケトン2-チオフエンカルボキサルデヒド・チオヒドラゾン(「PKTTH」);ジ-2-ピリジルケトン4,4-ジフェニルカルボキサルデヒド・チオセミカルバゾン(「PK44pTH」);ジ-2-ピリジルケトン・オクタノック・チオヒドラゾン(「PKoctTH」)を含む。

【0145】

本発明による鉄錯体は、 $Fe[PKIH]_2$ 、 $Fe[PKBH]_2$ 、 $Fe[PKHH]_2$ 、 $Fe[PBBH]_2$ 、 $Fe[PKAH]_2$ 、 $Fe[PKTH]_2$ 、 $Fe[PK44pH]_2$ 、 $Fe[PKoctH]_2$ 、 $Fe[Dp4mT]_2$ 、 $Fe[Dp44mT]_2$ 、 $Fe[Dp4eT]_2$ 、 $Fe[Dp4aT]_2$ 、および $Fe[Dp4pT]_2$ を含む。鉄イオンは $Fe(II)$ または $Fe(III)$ でよい。

【0146】

本発明の式1、2、3、および4のPKIHおよびDpT類似体の金属イオン錯体は、当業者に周知の技術および試薬を用いて容易に調製されてよい。たとえば、適当な金属イオン塩は、金属ハロゲン化物、硝酸塩、硫酸塩、過塩素酸塩、酢酸塩、およびトリフラートを含むが、それに制限されない。鉄錯体の形成に適した鉄塩、 $FeCl_3$ 、 $Fe(NO_3)_3$ 、 $FeSO_4$ 、 $Fe(OAc)_3$ 、および $Fe(ClO_4)_3$ ³を含むが、それに制限されない。

【0147】

式1の定義においては、基R'は「水素または、化合物が金属イオンをキレート化するのを妨げない基」として定義される。R'がメチルである場合、Feキレート化は妨害される。

【0148】

式1、2、3、および4の化合物の1-位における二つの有機基の存在(すなわち、芳香族および/または複素芳香族基AおよびB)は、その位置に二つのかかる基のない化合物に比較して、一般に化合物の親油性を増大する。式1、2、3、および4のPKIH、およびDpT類似体は、細胞膜を透過することが可能であってよい。

【0149】

PCIH、QCIH(図1C)、PKIH、およびDpTシリーズの化合物の構造活性関連は、このような種類の化合物がたとえ類似した金属結合部位を有するよう見えても、個々の種類の親油性、金属イオンキレート化効力、および抗増殖活性は、実質的に異なっておりよいことを示している。

【0150】

本発明による式1、2、3、および4の(チオ)セミカルバゾンおよび(チオ)ヒドラゾン化合物は、金属イオン錯体を形成することの可能な三座配位子として機能してよい。鉄錯体の一般的な実例は、以下に式1の化合物について表される。

【0151】

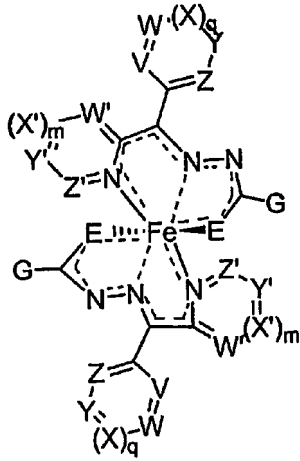
10

20

30

40

【化 4 5】



10

【 0 1 5 2】

[式中、E は O または S である]。

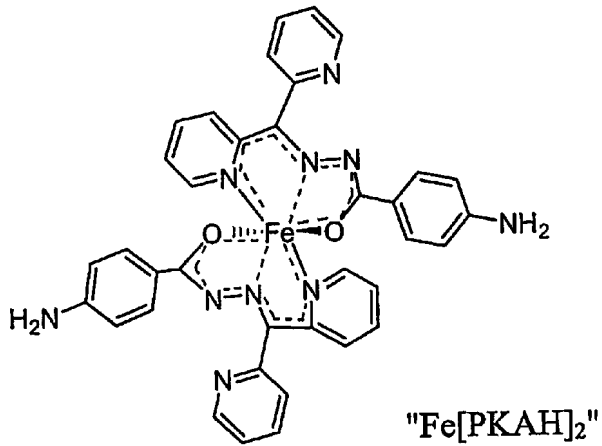
【 0 1 5 3】

さらなる実例として、配位子 P K A H の鉄錯体は、以下に例示される。

【 0 1 5 4】

20

【化 4 6】



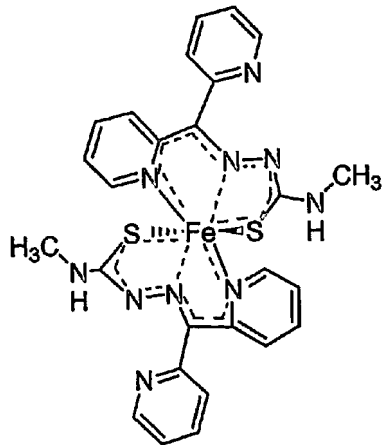
30

【 0 1 5 5】

また、配位子 D p 4 m T の鉄錯体は、以下に例示される。

【 0 1 5 6】

【化 4 7】

"Fe[Dp4mT]₂"

10

【0157】

本発明によれば、D p TまたはP K I H配位子の鉄イオン錯体は、中性かまたは荷電してもよい。

【0158】

また本文においては、抗増殖性化合物を同定するためのプロセスであって、一以上の細胞周期阻害剤をコードしている遺伝子を有する細胞または細胞抽出物を、鉄をキレート化することの可能な化合物で暴露すること（たとえば、接触させること、またはインキュベートすること）、遺伝子の発現レベルを測定すること、前記化合物の不在下での遺伝子の発現と比較して、遺伝子の発現レベルが異なるかどうかを測定すること；および、それにより前記化合物が抗増殖活性を有するかどうかを測定すること、を含むプロセスが開示される。

20

【0159】

同様のプロセスは、一以上の抗増殖性化合物を同定するべく多数の化合物を査定するために使用されてよく、該プロセスは、一以上の細胞周期阻害剤をコードしている遺伝子を有する細胞または細胞抽出物を、鉄をキレート化することの可能な多数の化合物で暴露すること（たとえば、接触させること、インキュベートすること）、任意の前記化合物が前記遺伝子の発現レベルを修飾するかどうかを測定すること、および、もしそうであれば、前記遺伝子の発現レベルを各化合物について別々に測定すること、前記発現レベルを、各々の前記化合物の不在下での前記遺伝子の発現レベルと比較して異なるかどうかを測定すること；および、それにより各々の前記化合物が抗増殖活性を有するかどうかを測定することを含む。

30

【0160】

遺伝子は、細胞の鉄濃度に感受性であってよい。遺伝子の発現は、Feの枯渇に反応してアップレギュレートされるか、またはダウンレギュレートされてよい。遺伝子の実例は、W A F 1、G A D D 4 5、およびN d r g 1を含む。化合物の不在下における遺伝子の発現（たとえばm R N A、タンパク質）は、該化合物の存在下における該遺伝子の発現の測定の前または後に、別個に測定されてよい。

40

（細胞機能の修飾）

【0161】

細胞の鉄をキレート化することが可能な化合物は、細胞機能を、たとえば酵素阻害、遺伝子発現の修飾（アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションを含めて）、翻訳の阻害（たとえば、p 2 1を含めたタンパク質の）、活性酸素種（R O S）の発生などを介して修飾することが可能であり、細胞増殖を阻害するため、および/またはアポトーシスを誘導するため、治療上有用であってよい。たとえば、細胞の鉄の枯渇は、リボヌクレオチド還元酵素のような、鉄依存性酵素の活性を修飾してよい。鉄の奪取はまた、G₁-S細胞停止およびアポトーシスも誘導することが可能である。

50

【0162】

遺伝子WAF1およびGADD45は、G₁-S停止に必須の細胞周期阻害剤（p21^{CIP1}/WAF1のようなサイクリン依存性キナーゼ阻害剤を含めて）をコードする³⁰。このような遺伝子の、たとえば鉄枯渇を介したアップレギュレーションは、細胞周期停止を誘導してよい。遺伝子Ndr g 1（N-mycのダウンレギュレートされた遺伝子1）は、細胞の鉄濃度に感受性である。たとえば、細胞の鉄枯渇に反応したNdr g 1の過剰発現は、結果としてG₁-S細胞停止を生じてよい。Ndr g 1の過剰発現はまた、腫瘍細胞の増殖を遅らせ、腫瘍細胞の転移を阻害することが示されている⁴⁻⁷。

【0163】

本発明による式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物は、鉄イオンを含め、細胞の金属イオンをキレート化することが可能である。したがって、式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物は、リボヌクレオチド還元酵素の阻害により、DNA合成を阻害することが可能であってよい。リボヌクレオチド還元酵素は、DNA合成の律速段階であり、新生細胞では正常細胞に比較してより高いレベルで発現される。式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aの化合物はまた、結果としてWAF1、GADD45、およびNdr g 1のような、Fe感受性遺伝子の過剰発現を生じてよく、それゆえ細胞増殖を阻害するために有用であってよい。WAF1、GADD45、およびNdr g 1のようなFe感受性遺伝子の過剰発現は、mRNAレベルで起きてよい。WAF1、GADD45、およびNdr g 1の発現をモニタリングすることは、Feを含めた金属イオンをキレート化する化合物の抗増殖ポテンシャルについて、有用な指標を提供してよい。

【0164】

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、細胞のターンオーバーにおいて不可欠な役割を果たす。アポトーシスは、細胞の鉄枯渇に反応して誘導されることが可能である。カスパーゼ酵素は、アポトーシスの共通した実行者である^{8、9}。アポトーシスを調節する二つのカスパーゼ活性化カスケードが記述されており、その一つは死受容体（たとえば、CD95）を通して開始されるのに対し、他はミトコンドリアの完全性における変化によってトリガーされる^{8、10}。前者においては、死受容体とそのリガンド（たとえば、CD95）によってふさがれることが、死を誘導するシグナリング複合体の形成をもたらす⁸。活性化された死受容体はカスパーゼ8を補充および活性化し、そのことがカスパーゼ3を含めた「実行者」カスパーゼを起動する。ミトコンドリア依存性のアポトーシスにおいては、ホロ-チトクロームc（h-cyt c）のサイトゾルへの放出が、結果として、h-cyt c、Apaf-1、およびプロ-カスパーゼ-9を含有する「アポトソーム」の形成を生じる^{8、9}。アポトソームにおいては、プロセス-カスパーゼ-9は活性化されるようになり、実行者カスパーゼをトリガーし、そのことが、死受容体経路によって誘導されるものと重複する末端事象を開始する^{8、9}。アポトーシスのミトコンドリア経路の主要なモジュレーターは、Bcl-2/Bax遺伝子ファミリーを含む^{8、11、12}。Bcl-2群のタンパク質は、ミトコンドリア外膜において見出され、その安定性に役割を果たしている^{8、11}。対照的に、Baxタンパク質はサイトゾルの分子であり、アポトーシスシグナルを受取るとミトコンドリアへ移動し、そこでそれらは膜透過性遷移孔に結合する^{8、12}。Bcl-2およびBaxの不均衡は選択的なイオン透過性の喪失を誘導し、結果としてh-cyt cの放出を生じ、そのことがアポトーシスの原因となるカスパーゼカスケードを開始する^{8、12}。式1、2、3、および4の化合物による、鉄およびおそらくは亜鉛といった細胞の金属イオンのキレート化は、カスパーゼカスケードを開始してよく、アポトーシスを誘導する。

【0165】

細胞の鉄の枯渇を含め、細胞の金属イオンの枯渇は、アポトーシスをもたらしてよい。アポトーシスはまた、ミトコンドリアからのh-cyt cの放出およびBcl-2/Bax発現の不均衡をもたらすことが可能な酸化ストレスに応答して誘導されてもよい。式1

10

20

30

40

50

、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aの化合物の、Fe錯体を含めた金属イオン錯体は、活性酸素種の発生を介してアポトーシスを誘導することができてよい。したがって、式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aの化合物、ならびに式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aの化合物の金属イオン錯体（鉄錯体を含めて）は、たとえば抗腫瘍剤として、治療上有用であってよい。

（疾病の治療および/または予防）

【0166】

本文において開示された式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aのD p TおよびPKIH化合物は、脊椎動物における種々の障害および疾患の治療において有用であってよい。障害および疾患の実例は、以下を含む幅広いカテゴリーに分類されてよい：血管新生依存性疾患、細胞増殖性疾患（乾癬、IBD、悪性疾患、再狭窄のような）、癌。

10

【0167】

癌は、癌性腫瘍および、結腸-直腸癌、乳癌、肺癌、頭頸部腫瘍、肝癌、膵臓癌、卵巣癌、胃癌、脳腫瘍、膀胱癌、前立腺癌、および、尿/生殖管癌といった上皮起源の腫瘍；肉腫のような間葉性腫瘍；およびB細胞リンパ腫のような造血性腫瘍を含むが、それに制限されない。たとえば、癌は血液学的腫瘍、固形腫瘍、非固形腫瘍、（たとえば、白血病、リンパ腫）でよい。

【0168】

本文において開示された式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aのD p TおよびPKIH類似体は、化学療法および放射線療法を含め、外科手術および/または治療薬といった、他の既知の治療と併用して用いられてよい。たとえば、固形腫瘍の治療において使用される場合、本発明の化合物は：アドリアマイシン、タキソール、フルオロウリシル（fluorouracil）、メルファラン、シスプラチン、アルファ-インタフェロン、COM P（シクロホスファミド、ピンクリスチン、メトトレキサート、およびプレジニソン）、エトポシド、mBACOD（メトトレキサート、プレオマイシン、ドクソルビシン、シクロホスファミド、ピンクリスチン、およびデキサメサタン）PROMACE/MOPP（プレドニソン、メトトレキサート（w/リユーコピン・レスキュー（leucovin rescue））、ドクソルビシン、シクロホスファミド、タキソール、エトポシド/メクロレタミン、ピンクリスチン、プレドニソン、およびプロカルバジン）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、アンジオインヒビン、TNP-470、ポリ硫酸ペントサン、血小板因子4、

20

30

アンギオスタチン、LM-609、SU-101、CM-101、テクガラン（Techgalan）、サリドマイド、SP-PGなどのような化学治療薬とともに投与されてよい。他の化学療法薬は、メクロエタミン（mechloethamine）、メルファン、クロランブシル、シクロホスファミド、およびイフォスファミドを含めたナイトロジェンマスタード；カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、およびストレプトゾシンを含めたニトロソウレア；ブサルファンを含めたアルキルスルホネート；ダカルバジンを含めたトリアジン；チオテパおよびヘキサメチルメラミンを含めたエチエニミン（ethylenimine）；メトトレキサートを含めた葉酸類似体；5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシドを含めたピリジジン類似体；6-メルカプトプリンおよび6-チオグアニンを含めたプリン類似体；アクチノマイシンDを含めた抗腫瘍抗生物質；ドクソルビシン、プレオマイシン、マイトマイシンC、およびミトラマイシンを含めたアンスラサイクリン；タモキシフェン、およびコルチコステロイドを含めたホルモンおよびホルモン類似体、および、シスプラチンおよびブレキナー（brequinar）を含めたその他の薬剤といった、アルキル化剤を含む。

40

【0169】

本発明によって治療されるべき生理的系（たとえば、肝臓系、膵臓系）は、式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および4 aの一以上の化合物の投与に先立ち、外科手術によるかまたはその間に単離されてよい。

（製薬および/または治療用の製剤）

【0170】

本発明によれば、疾病の治療に使用される場合、式1、1 a、2、2 a、3、3 a、4

50

、および 4 a の化合物は単独で投与されてよい。別法として、化合物は、式 1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および 4 a の少なくとも一つの化合物、および / またはその金属イオン錯体を含む製薬製剤として投与されてよい。式 1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および 4 a の化合物はまた、製薬上許容される塩として存在してもよい。

【0171】

製薬上許容される塩により、確実に根拠のある医学的判断の範囲内において、不適当な毒性、刺激、アレルギー反応などなしに、ヒトおよび、より下等な動物の組織と接触した使用に適しており、かつ妥当な損益比にふさわしい塩が意味される。製薬上許容される塩は、この技術において周知である。

【0172】

たとえば、本発明による PKIH および DpT 類似体の、適当な製薬上許容される塩は、塩酸、硫酸、メタンスルホン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、安息香酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、炭酸、酒石酸、またはクエン酸といった製薬上許容される酸を、本発明の化合物と混合することにより調製されてよい。適当な製薬上許容される本発明の化合物の塩は、それゆえ酸付加塩を含む。

【0173】

たとえば、ベルジェ (S. M. Berge) らは、ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・サイエンス (J. Pharmaceutical Sciences)、1977年、第66巻、p. 1 - 19において、製薬上許容される塩を詳細に記述している。塩は、本発明の化合物の最終的な単離および精製の間インシトゥにおいて、または遊離の塩基性官能基を適当な有機酸と反応させることにより別個に調製されることが可能である。代表的な酸付加塩は、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、りんご酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチニン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などを含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなど、ならびに、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどを含むがそれに制限されない非毒性のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンカチオンを含む。

【0174】

便利な投与様式は、注射 (皮下、静脈内など)、経口投与、吸入、経皮適用、または直腸内適用を含む。投与の経路に依存して、酵素の作用、酸、および他の、類似体の治療活性を不活性化する天然の条件から類似体を保護するべく、類似体は物質でコートされてよい。化合物はまた、非経口的に、または腹腔内へ投与されてもよい。

【0175】

式 1、1 a、2、2 a、3、3 a、4、および 4 a の化合物の分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中に、および油中に調製されてよい。通常貯蔵および使用の条件下では、製薬組成物は、微生物の増殖を防止するべく保存料を含有してよい。

【0176】

注射に適した製薬組成物は、無菌の水溶液 (水溶性の場合) または分散液、および無菌の注射可能な溶液または分散液の即時調合製剤のための無菌粉末を含む。理想的には、組

10

20

30

40

50

成物は製造および貯蔵の条件下に安定していて、細菌および真菌類のような微生物の汚染作用に対して組成物を安定化するべく、保存料を含有してもよい。

【0177】

好ましい態様においては、化合物は、たとえば不活性な希釈剤か、または同化可能な食用の担体とともに経口投与される。化合物および他の成分はまた、ハードまたはソフトシエルのゼラチンカプセルに封入されるか、錠剤に圧縮されるか、または個人の食事へ直接取込まれてもよい。経口の治療用投与には、類似体は賦形剤とともに取込まれてよく、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、カシエ剤などの形状で使用される。適切には、かかる組成物および製剤は少なくとも1重量%の活性化化合物を含有してよい。製薬組成物および製剤中の、式1、1a、2、2a、3、3a、4、および4aのPKIHまたはDpT類似体のパーセントは、もちろん変更されることが可能であり、たとえば、単位用量の重量の約2%から約90%まで、約5%から約80%まで、約10%から約75%まで、約15%から約65%まで；約20%から約60%まで、約25%から約50%まで、約30%から約45%まで、または約35%から約45%まで、便利に変動することが可能である。治療上有用な組成物中の類似体の量は、適当な容量が得られるようにする。

10

【0178】

用語「製薬上許容される担体」は、溶媒、分散媒、コーティング剤抗菌および抗真菌剤、等張、および吸収遅延剤などを含むことが意図される。製薬上の作用物質のための、かかる媒体および薬剤は、この技術において周知である。任意の通常の媒体または薬剤が類似体と不適合である場合を除いて、治療用組成物および治療法においてそれらを使用することが検討される。本発明によると補助的な活性化化合物が組成物に組み込まれていてもよい。用量単位の子非経口組成物を、投与しやすさおよび用量の均一性のため、用量単位の形状に製剤することは特に有利である。本文において使用される用量単位の形状は、治療されるべき固体のための単一の用量として適した、物理的に別個化された単位を指し；あらかじめ決められた量の類似体を含有する各単位は、必要な薬剤担体と共同して所望の治療効果を生じるべく計算される。本発明の新規な用量単位の形状についての表示（指定、仕様、規格、明確化）は、(a)類似体の特有の性質および特に達成されるべき治療効果、および(b)かかる類似体を、固体における増殖性疾患、鉄関連性の症状、または鉄過剰症の治療のために調剤する技術における固有の限界に、規定されかつ直接的に依存する。主要な類似体は、許容される用量単位において、適当な製薬上許容される担体とともに有効な量で、便利で効果的な投与のために調剤される。補助的に活性をもつ成分を含有する組成物の場合には、用量は、前記成分の通常の用量および投与の方式を参照することにより決定される。

20

30

【0179】

一つの態様においては、担体は経口投与可能な担体である。もう一つの態様においては、担体は静脈内投与に適している。

【0180】

製薬組成物の一つの適当な形状は、経口投与に適した腸溶性の顆粒、錠剤、またはカプセルとして製剤された用量形状である。

40

【0181】

注射可能な溶液の場合には、担体は、たとえば水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適当な混合物、および植物油を含有する、溶媒または分散媒であることが可能である。適切な流動性は、たとえば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散の場合には必要な粒子サイズに維持により、および界面活性剤の使用により、維持されることが可能である。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌および/または抗真菌剤を含有することで達成されることが可能である。適当な薬剤は、当業者には周知であり、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ベンジルアルコール、アスコルビン酸、チメロサルなどを含む。多くの場合、等張剤、たとえば、糖や、マンニトール、ソルビトール

50

ルといったポリアルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含有することが好ましいかもしれない。注射可能な組成物の持続性の吸収は、吸収を遅らせる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを、組成物中に含めることによりもたらされることが可能である。

【0182】

無菌の注射可能な溶液は、濾過による滅菌の後、必要であれば前文に列挙された成分の一つまたは組み合わせとともに、必要な量の類似体を、適当な溶媒中に取込むことによって調製されることが可能である。一般に分散液は、基本的な分散媒と、前文に列挙されたものからの必要な他の成分を含有する無菌の媒体中へ取込むことにより調製される。

【0183】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセルなどはまた、以下のものを含有することが可能である：グラガカント (gragacanth) ガム、アラビアゴム、コーンスターチ、またはゼラチンのような結合剤；リン酸ニカルシウムのような賦形剤；コーンスター、パレイショデンブ、アルギン酸などといった崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；およびスクロース、ラクトースまたはサッカリンのような甘味料、またはペパーミント、ウィンターグリーン油、またはチェリーフレーバーのような着香料。容量単位の形状がカプセルである場合、上記のタイプの物質に加えて、液体担体を含むことが可能である。様々な他の物質が、コーティングとして、あるいは容量単位の物理的形狀を他の状態に修飾するべく、存在することが可能である。たとえば、錠剤、丸薬、またはカプセルは、シエラック、糖、または双方でコートされることが可能である。シロップまたはエリキシルは、類似体、甘味料としてのスクロース、保存料としてのメチルおよびプロピルパラベン、チェリーまたはオレンジフレーバーのような色素および香料を含むことが可能である。もちろん、任意の用量単位の形状の調製において使用される任意の物質は、製薬上純粋かつ使用される量において実質的に非毒性でなければならない。さらに、式1、2、3、および4の化合物は、徐放性製剤および配合物へ取込まれてよい。

【0184】

製薬組成物はさらに、酸加水分解を最少化するべく、適当な緩衝剤を含有してよい。適当な緩衝剤は当業者には周知であり、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩、およびそれらの混合物を含むが、それに制限されない。

【0185】

本発明による製薬組成物の、単回または多回の投与が行なわれてよい。当業者は、日常の実験により、本発明の化合物および/または組成物の効果的な非毒性の用量レベルと、化合物および組成物がそれに対して適用可能な、障害および疾患の治療に適するような投与パターンとを測定することができるであろう。

【0186】

さらに、当業者には、定められた日数について、一日あたりに与えられる本発明の化合物または組成物の用量数といった最適な治療コースが、通常の治療決定試験のコースを用いて確認されることが可能であることが明らかであろう。

【0187】

一般に、24時間当たりの効果的な用量は、kg体重当たり約0.0001mg～約1000mg；適切には、kg体重当たり約0.001mg～約750mg；kg体重当たり約0.01mg～約500mg；kg体重当たり約0.1mg～約500mg；kg体重当たり約0.1mg～約250mg；またはkg体重当たり約1.0mg～約250mgの範囲内でよい。さらに適切には、24時間当たりの効果的な用量は、kg体重当たり約1.0mg～約200mg；kg体重当たり約1.0mg～約100mg；kg体重当たり約1.0mg～約50mg；kg体重当たり約1.0mg～約25mg；kg体重当たり約5.0mg～約50mg；kg体重当たり約5.0mg～約20mg；またはkg体重当たり約5.0mg～約15mgの範囲内でよい。

【0188】

別法として、効果的な用量は約500mg/m²まででよい。一般に、効果的な用量は

10

20

30

40

50

、約 25 ~ 約 500 mg / m²、約 25 ~ 約 350 mg / m²、約 25 ~ 約 300 mg / m²、約 25 ~ 約 250 mg / m²、約 50 ~ 約 250 mg / m²、または約 75 ~ 約 150 mg / m² の範囲内であり。

【0189】

単なる例として、本発明の適当な容量形状は、以下のものを含む：

【0190】

【表1】

錠剤

| | | |
|-----------------|-----------------------|----|
| 式1、2、3、および4の化合物 | 0.01~20mg、一般に0.1~10mg | |
| デンプン | 10~20mg | 10 |
| ラクトース | 100~250mg | |
| ゼラチン | 0~5mg | |
| ステアリン酸マグネシウム | 0~5mg | |

注射可能な溶液

| | | |
|---------------------|-----------------------|----|
| 式1、2、3、および4の化合物 | 0.01~20mg、一般に0.1~10mg | |
| 塩化ナトリウム | 8.5mg | |
| 塩化カリウム | 3mg | |
| 塩化カルシウム | 4.8mg | |
| 注射用の水、適量を加えて10mlとする | | 20 |

【0191】

当業者には、幅広く記述された本発明の精神または範囲からはずれることなく、特定の態様において示された本発明に対し、多くの変形および/または修飾がなされてよいことが認識されるであろう。本態様は、それゆえ、すべての点において例証的なものであり、制限的なものではないと見なされるべきである。

【0192】

本発明は次に、いかなる方法においても本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない具体的な実施例を参照して、さらに詳細に記述される。

【実施例】

30

【0193】

実施例1 - 化合物の合成

本文において「P C I H」および「Q C I H」類似体と呼ばれる比較用の2 - ピリジル - およびキノリル - アロイルヒドラゾン類似体は、各々、2 - ピリジルカルボキサリデヒドまたは2 - キノリンカルボキサリデヒドと、適当な酸ヒドラジンとのシッフ塩基縮合により合成された。

【0194】

比較化合物、ピリドキサル・イソニコチノイル・ヒドラゾン (P I H) および2 - ヒドロキシ - 1 - ナフチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン (3 1 1) は、リチャードソン & バーンハート (Richardson & Bernhardt) (1993年) の方法により合成された³。

40

【0195】

P C I H、Q C I Hアロイルヒドラゾンシリーズの化合物、および「3 1 1」の代表的な構造は、図1 Bおよび1 Cに提供されている。

【0196】

(実施例1 a - P K I H類似体の合成)

代表的なP K I H類似体は、バックキ (Bacchi) ら (1996) の方法に従って、2 - ジ - ピリジルケトンと適当な酸ヒドラジンと縮合することにより合成された¹³。適当な溶媒は、エタノール、メタノール、エタノール/水、メタノール/水、アセトン、ベンゼン、トルエンを含む。代表的なP K I H類似体は、図2 Bに示されている。

50

【0197】

P K A HのX線結晶構造は、図9に提供されている。X線結晶学的データは、以下に提供される。

結晶データコレクション：

C A D - 4ソフトウェア (エンラフ - ノニウス (Enraf - Nonius)、1989年) ; セルリファインメント : C A D - 4ソフトウェアのS E T 4 ; データリダクション : X t a l (ホール (Hall) ら、1992年) ; 構造解明に使用されたプログラム : S H E L X 8 6 (シェルドリック (Sheldrick)、1990年) ; 構造精密化に使用されたプログラム : S H E L X L 9 7 (シェルドリック、1997年) ; 分子グラフィック : P L A T O N (スペック (Spek)、1990年 ; 結晶学的データを生み出すために使用されたソフトウェア : S H E L X L 9 7。 10

【0198】

データコレクションは、リチャードソン、ベッカー、およびバーンハート (D. R. Richardson, E. Becker and P. V. Bernhardt) (1999年) によって記述されたものと同様の一般条件下に得られた。

【0199】

結晶データおよび構造決定の詳細 : P K A H (C 1 8 H 1 6 N 5 O) P - 1 (2) Z = 2

結晶データ

実験式 : C 1 8 H 1 6 N 5 O , O 20

式量 334.36

結晶系 三斜晶系

空間群 P - 1 (N o . 2)

a , b , c [オングストローム] 8 . 6 6 7 (2) 9 . 9 7 7 (2) 1 1 . 1 9 7 (2)

アルファ、ベータ、ガンマ [度] 9 1 . 0 1 0 (1 0) 1 0 9 . 2 0 (2) 1 0 9 . 6 3 (2)

V [A n g * * 3] 8 5 2 . 2 (3)

Z 2

D (c a l c) [g / c m * * 3] 1 . 3 0 3 30

F (0 0 0) 3 5 0

M u (M o K a) [/ m m] 0 . 1

P K a H (C 1 8 H 1 6 N 5 O) P - 1 (2) Z = 2 についての最終的な構造因子の計算
1 . s . パラメータ総数 = 2 4 0 最大ベクトル長 = 5 1 1 必要メモリ = 2 3 8 0 / 2 2 9 9 5

w R 2 = 0 . 1 7 6 7 サイクル 2 1 前の 2 9 8 5 データおよび 0 / 2 4 0 パラメータについて

G o o F = S = 0 . 9 8 7 ; 制止 G o o F = 0 . 9 8 7 0 制止について

重量 = 1 / [シグマ ^ 2 (F o ^ 2) + (0 . 1 0 0 0 * P) ^ 2 + 0 . 0 0 * P] 式中 40

P = (最大 (F o ^ 2 , 0) + 2 * F c ^ 2) / 3

R 1 = 0 . 0 5 0 3 1 4 9 7 F o > 4 s i g (F o) について、および 0 . 1 2 6 5

全 2 9 8 5 データについて

w R 2 = 0 . 1 7 6 7、G o o F = S = 0 . 9 8 7、制止 G o o F = 0 . 9 8 7 全データについて

非対称単位の占有合計 = 2 5 . 0 0 非水素について、および 1 6 . 0 0 水素原子について

【0200】

結合の長さおよび角度

| | | | | | |
|-------|--------|----------|--------|--------|---------------|
| C 1 - | 距離 | 角度 | | | |
| N 1 | 1.3378 | (0.0036) | | | |
| C 2 | 1.3775 | (0.0042) | 122.49 | (0.27) | |
| C 6 | 1.4967 | (0.0038) | 116.20 | (0.26) | 121.26 (0.27) |
| | C 1 - | N 1 | C 2 | | |
| C 2 - | 距離 | 角度 | | | |
| C 3 | 1.3738 | (0.0042) | | | 10 |
| C 1 | 1.3775 | (0.0041) | 119.20 | (0.31) | |
| | C 2 - | C 3 | | | |
| C 3 - | 距離 | 角度 | | | |
| C 4 | 1.3623 | (0.0049) | | | |
| C 2 | 1.3738 | (0.0042) | 118.91 | (0.33) | |
| | C 3 - | C 4 | | | |
| C 4 - | 距離 | 角度 | | | |
| C 3 | 1.3623 | (0.0049) | | | 20 |
| C 5 | 1.3668 | (0.0047) | 118.81 | (0.31) | |
| | C 4 - | C 3 | | | |
| C 5 - | 距離 | 角度 | | | |
| N 1 | 1.3420 | (0.0038) | | | |
| C 4 | 1.3668 | (0.0047) | 123.65 | (0.32) | |
| | C 5 - | N 1 | | | |
| C 6 - | 距離 | 角度 | | | |
| N 3 | 1.2972 | (0.0033) | | | 30 |
| C 7 | 1.4777 | (0.0039) | 128.71 | (0.25) | |
| C 1 | 1.4967 | (0.0038) | 111.31 | (0.24) | 119.98 (0.24) |
| | C 6 - | N 3 | C 7 | | |
| C 7 - | 距離 | 角度 | | | |
| N 2 | 1.3265 | (0.0037) | | | |
| C 8 | 1.3871 | (0.0040) | 121.37 | (0.28) | |
| C 6 | 1.4777 | (0.0039) | 117.66 | (0.25) | 120.96 (0.27) |
| | C 7 - | N 2 | C 8 | | 40 |
| C 8 - | 距離 | 角度 | | | |
| C 9 | 1.3698 | (0.0044) | | | |
| C 7 | 1.3871 | (0.0040) | 119.81 | (0.31) | |
| | C 8 - | C 9 | | | |
| C 9 - | 距離 | 角度 | | | |
| C 10 | 1.3489 | (0.0050) | | | |
| C 8 | 1.3698 | (0.0044) | 119.27 | (0.33) | 50 |

C 9 - C 1 0

C 1 0 - 距離 角度
 C 9 1 . 3 4 8 9 (0 . 0 0 5 0)
 C 1 1 1 . 3 6 4 1 (0 . 0 0 5 2) 1 1 7 . 9 7 (0 . 3 5)
 C 1 0 - C 9

C 1 1 - 距離 角度
 N 2 1 . 3 4 2 3 (0 . 0 0 4 1)
 C 1 0 1 . 3 6 4 1 (0 . 0 0 5 2) 1 2 4 . 5 4 (0 . 3 6)
 C 1 1 - N 2

C 1 2 - 距離 角度
 O 1 1 . 2 2 0 2 (0 . 0 0 3 2)
 N 4 1 . 3 6 9 0 (0 . 0 0 3 4) 1 2 0 . 5 4 (0 . 2 7)
 C 1 3 1 . 4 6 4 9 (0 . 0 0 3 9) 1 2 2 . 8 0 (0 . 2 6) 1 1 6 . 5 6 (0 . 2
 5)
 C 1 2 - O 1 N 4

C 1 3 - 距離 角度
 C 1 4 1 . 3 9 1 3 (0 . 0 0 3 8)
 C 1 8 1 . 3 9 2 7 (0 . 0 0 3 8) 1 1 6 . 6 5 (0 . 2 6)
 C 1 2 1 . 4 6 4 9 (0 . 0 0 3 9) 1 2 4 . 9 1 (0 . 2 5) 1 1 8 . 4 2 (0 . 2
 6)
 C 1 3 - C 1 4 C 1 8

C 1 4 - 距離 角度
 C 1 5 1 . 3 7 9 4 (0 . 0 0 3 9)
 C 1 3 1 . 3 9 1 3 (0 . 0 0 3 8) 1 2 1 . 5 2 (0 . 2 6)
 C 1 4 - C 1 5

C 1 5 - 距離 角度
 C 1 4 1 . 3 7 9 4 (0 . 0 0 3 9)
 C 1 6 1 . 3 8 7 8 (0 . 0 0 4 0) 1 2 0 . 8 0 (0 . 2 8)
 C 1 5 - C 1 4

C 1 6 - 距離 角度
 N 5 1 . 3 6 7 7 (0 . 0 0 3 5)
 C 1 5 1 . 3 8 7 8 (0 . 0 0 4 0) 1 2 1 . 4 9 (0 . 2 8)
 C 1 7 1 . 3 9 3 9 (0 . 0 0 4 0) 1 2 0 . 6 0 (0 . 2 7) 1 1 7 . 9 0 (0 . 2
 7)
 C 1 6 - N 5 C 1 5

C 1 7 - 距離 角度
 C 1 8 1 . 3 5 9 2 (0 . 0 0 4 0)
 C 1 6 1 . 3 9 3 9 (0 . 0 0 4 0) 1 2 0 . 7 1 (0 . 2 7)
 C 1 7 - C 1 8

C 1 8 - 距離 角度
 C 1 7 1 . 3 5 9 2 (0 . 0 0 4 0)

10

20

30

40

50

C 1 3 1 . 3 9 2 7 (0 . 0 0 3 8) 1 2 2 . 4 0 (0 . 2 7)
 C 1 8 - C 1 7

N 1 - 距離 角度
 C 1 1 . 3 3 7 8 (0 . 0 0 3 6)
 C 5 1 . 3 4 2 0 (0 . 0 0 3 8) 1 1 6 . 8 7 (0 . 2 8)
 N 1 - C 1

N 2 - 距離 角度
 C 7 1 . 3 2 6 5 (0 . 0 0 3 7)
 C 1 1 1 . 3 4 2 3 (0 . 0 0 4 2) 1 1 7 . 0 2 (0 . 2 8)
 N 2 - C 7

N 3 - 距離 角度
 C 6 1 . 2 9 7 2 (0 . 0 0 3 3)
 N 4 1 . 3 6 3 9 (0 . 0 0 3 0) 1 1 9 . 6 4 (0 . 2 3)
 N 3 - C 6

N 4 - 距離 角度
 N 3 1 . 3 6 3 9 (0 . 0 0 3 0)
 C 1 2 1 . 3 6 9 0 (0 . 0 0 3 4) 1 1 8 . 1 0 (0 . 2 3)
 N 4 - N 3

N 5 - 距離 角度
 C 1 6 1 . 3 6 7 7 (0 . 0 0 3 5)
 N 5 -

O 1 - 距離 角度
 C 1 2 1 . 2 2 0 2 (0 . 0 0 3 2)
 O 1 -

【 0 2 0 1 】

非水素原子の最終座標および等価等方性原子変位パラメータ：P K A H (C 1 8 H 1 6 N
 5 O) P - 1 (2) Z = 2

【 0 2 0 2 】

10

20

30

【表 2】

| 原子 | x | y | z | U(eq)[Ang ²] |
|-----|---------|---------|----------|--------------------------|
| O1 | 1.04785 | 0.75127 | 0.33347 | 0.0701 |
| N1 | 0.49528 | 0.32443 | -0.06396 | 0.0535 |
| N2 | 0.58397 | 0.30148 | 0.32830 | 0.0725 |
| N3 | 0.80911 | 0.49927 | 0.21355 | 0.0479 |
| N4 | 0.84496 | 0.54222 | 0.33916 | 0.0501 |
| N5 | 1.03285 | 0.90464 | 0.88111 | 0.0752 |
| C1 | 0.65900 | 0.35466 | 0.01770 | 0.0462 |
| C2 | 0.79735 | 9.37032 | -0.02257 | 0.0553 |
| C3 | 0.76880 | 0.36059 | -0.15113 | 0.0668 |
| C4 | 0.60365 | 0.33400 | -0.23528 | 0.0672 |
| C5 | 0.47153 | 0.31568 | -0.18890 | 0.0628 |
| C6 | 0.68602 | 0.37702 | 0.15670 | 0.0462 |
| C7 | 0.57670 | 0.26672 | 0.21116 | 0.0511 |
| C8 | 0.47317 | 0.13076 | 0.14286 | 0.0639 |
| C9 | 0.37451 | 0.02995 | 0.19607 | 0.0772 |
| C10 | 0.38249 | 0.06372 | 0.31568 | 0.0877 |
| C11 | 0.48770 | 0.19900 | 0.37791 | 0.0969 |
| C12 | 0.96466 | 0.67714 | 0.39312 | 0.0484 |
| C13 | 0.97835 | 0.72880 | 0.52083 | 0.0444 |
| C14 | 0.88621 | 0.64856 | 0.59243 | 0.0544 |
| C15 | 0.90329 | 0.70590 | 0.71113 | 0.0582 |
| C16 | 1.01258 | 0.84689 | 0.76276 | 0.0541 |
| C17 | 1.10477 | 0.92790 | 0.69123 | 0.0615 |
| C18 | 1.08799 | 0.86970 | 0.57489 | 0.0577 |
| O2 | 0.85377 | 0.76504 | 0.05842 | 0.0756 |

10

20

30

U(eq) = 直交化されたUテンソルのトレースの1/3

【0203】

(実施例 1 b - D p T 類似体の調製)

D p T 類似体は、2 - ジ - ピリジルケトンと、各々のチオセミカルバジドまたは酸ヒドラジドとのシッフ塩基縮合により、標準的な方法 (ジョンソン (Johnson) ら、1982年)¹⁻⁴ を用いて合成された。反応を行なうための適当溶媒は、エタノール、メタノール、エタノール/水、メタノール/水、アセトン、ベンゼン、トルエンを含む。

【0204】

代表的な D p T 類似体の構造は、図 2 A に示されている。

40

【0205】

(実施例 1 c - 鉄錯体の調製)

P K I H 類似体の鉄錯体は、リチャードソン & バーンハート (Richardson & Bernhardt)、1999年³ により記述された技術を用いて調製された。一般に、1モル当量の Fe (III) 塩は、2モル当量の P K I H 類似体とともに、熱エタノール中で1時間灌流された。暗緑/黒色の錯体の固体が形成され、減圧下の濾過により母液から単離された。その錯体はそれからエタノールで洗われ、空気乾燥された。

【0206】

D p T 類似体の鉄錯体は、類似の方法で調製された。

50

【0207】

実施例2 - P C I H、Q C I H、およびP K I H類似体の親油性および活性の比較

親油性は、平均log P値(n-オクタノール-水の分配計数)として、すべてのキレート化剤について測定された。log P値は、プロートの方法(プロート(Broto)ら、1984年)¹⁵、クリッペンのフラグメンテーション法(ゴース&クリッペン(Ghose & Crippen)、1987年)¹⁶、またはビシュバナダハンのフラグメンテーション法(ビシュバナダハン(Viswanadhan)ら、1987年)¹⁷に従って、Chem Draw Pro(v.4.5、ケンブリッジ・ソフトウェア(Cambridge Software)、1997年)を用いて概算された(表1)。これらの値の平均値(平均log P計算値;表1)は、次にIC₅₀値か、またはキレート化剤が⁵⁹Feの動員を誘導するかまたは⁵⁹Feの取込みを妨げる能力の、いずれかに対してプロットされた。これらのプロットは、親油性と、試験化合物の抗増殖活性またはFeキレート化効率との間に強い相関関係がないことを示している(すべての相関:r<0.52)(データは示さず)。

10

【0208】

【表3】

表1 計算されたn-オクタノールの分配計数(logP_{calc})

| | クリッペンのフラ グメンテーション | ビシュバナダハンのフ ラグメンテーション | プロートの方法 | 平均logP _{calc} |
|-------|----------------------|-------------------------|---------|------------------------|
| PIH | 0.43 | 0.63 | -0.16 | 0.30 |
| 311 | 2.63 | 2.83 | 2.17 | 2.54 |
| PCIH | 1.11 | 1.20 | 0.56 | 0.96 |
| PCTH | 2.43 | 2.54 | * | ** |
| PCBH | 2.45 | 2.51 | 1.68 | 2.21 |
| PCBBH | 3.28 | 3.30 | 2.56 | 3.05 |
| PCAH | 1.65 | 1.73 | 0.86 | 1.41 |
| PCHH | 2.06 | 2.23 | 1.29 | 1.86 |
| PKIH | 1.66 | 1.83 | 0.93 | 1.47 |
| PKTH | 2.98 | 3.17 | * | ** |
| PKBH | 3.00 | 3.15 | 2.05 | 2.73 |
| PKBBH | 3.83 | 3.94 | 2.93 | 3.57 |
| PKAH | 2.20 | 2.36 | 1.23 | 1.93 |
| PKHH | 2.61 | 2.86 | 1.66 | 2.38 |
| QCIH | 2.11 | 2.20 | 1.68 | 2.00 |
| QCTH | 3.43 | 3.54 | * | ** |
| QCBH | 3.45 | 3.52 | 2.80 | 3.26 |
| QCBBH | 4.28 | 4.31 | 3.68 | 4.09 |
| QCAH | 2.65 | 2.73 | 1.98 | 2.45 |
| QCHH | 3.06 | 3.23 | 2.41 | 2.90 |

20

30

*プロート法による計算不能

40

**計算不能

logP_{calc}値は、プログラムChem Draw Pro V4.5を用いて計算された。

【0209】

比較用のQ C I H類似体は、単一のキノリン環の存在のため、調べられた化合物の中で最も親油性であった(表1)。しかしながら、Q C I Hシリーズの鉄キレート化効率および抗増殖活性は非常に低い(実施例3 a、3 b、および4 a参照)。

(インビボおよびインビトロの研究)

【0210】

(実施例3~10の一般方法論)

50

D F O はノバルティス (Novartis) (スイス、バーゼル) から購入された。

3 1 1 は標準的な方法³に従って調製された。

T r i a p i n e (登録商標) (3 - アミノピリジン - 2 - カルボキサリドヒド・チオセミカルバゾン; 図 1 B) は、パイオン・ファーマスーティカルズ (Vion Pharmaceuticals) 米国、ニュージャージー州、からの寄贈であった。

【0211】

化合物の提示

化合物はすべて、実験の直前に 1 0 m M の保存溶液としてジメチルスルホキシド (D M S O) 中に溶解され、次いで 1 0 % ウシ胎児血清 (F C S ; コモンウェルス・シーラム・ラボラトリーズ (Commonwealth Serum Laboratories)、オーストラリア、メルボルン) 中に、最終 D M S O 濃度が 0 . 5 % (v / v) 以下になるように希釈された。

10

【0212】

細胞培養物の調製

ヒト S K - N - M C 神経上皮細胞腫細胞系、S K - M e 1 - 2 8 メラノーマ細胞、および M C F - 7 乳癌細胞は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (A T C C)、米国、メリ・ランド州、ロックビル、から購入された。正常な細胞タイプ、M R C - 5 線維芽細胞および L 8 ラット骨格筋細胞もまた、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C)、米国、メリ・ランド州、ロックビル、から購入された。細胞は、1 0 % F C S (コモンウェルス・ラボラトリーズ、オーストラリア、メルボルン)、1 % (v / v) 非必須アミノ酸 (ギブコ (Gibco))、2 m M L - グルタミン (シグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co.)、米国、ミズーリ州、セントルイス)、1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン (ギブコ)、1 0 0 U / m l のペニシリン (ギブコ)、および 0 . 2 8 μ g / m l のフンギゾン (スクイブ・ファーマスーティカルズ (Squibb Pharmaceuticals)、カナダ、モントリオール) を含有するイーグル変法最少必須培地 (M E M ; ギブコ B R L、オーストラリア、シドニー) 中で増殖された。この増殖培地は、後に「完全培地」と呼ばれる。細胞はインキュベーター (フォーマ・サイエンティフィック (Forma Scientific)、米国、オハイオ州) 中で、3 7 °C において、5 % C O₂ / 9 5 % 空気の加湿雰囲気中で増殖され、継代培養された。細胞の増殖および生存率は、位相差顕微鏡およびトリパンブルー染色を用いて慎重に査定された。

20

30

【0213】

M T T 細胞増殖アッセイ

細胞増殖は、M T T (3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウム) アッセイを用いて、本質的には先に記述されたものと同様の方法で調べられた^{1 8}。細胞は 9 6 穴マイクロタイタープレート中に、上記の 2 . 2 節において記述されたようなすべての補足物 (完全培地) および 1 . 2 5 μ M のヒトのジフェリクトランスフェリンも含有する 0 . 1 m L の M E M 培地中に、1 5 0 0 0 細胞 / ウエルに播種された。この播種濃度は、細胞の指数増殖をアッセイの期間にわたって生じる結果となる。細胞は一晚増殖され、次いで、試験されるべき化合物が、1 . 2 5 μ M のジフェリクトランスフェリンを含有する 0 . 1 m L の完全培地において添加された。化合物の最終濃度は 0 . 3 9 ~ 5 0 μ M であった。対照サンプルは、完全培地および 1 . 2 5 μ M のジフェリクト f を含んでいた。細胞は、化合物とともに、9 5 % 空気および 5 % C O₂ を含有する加湿雰囲気中で、3 7 °C において 9 0 時間インキュベートされた。このインキュベーションの後、0 . 0 1 m L の M T T が各ウエルに添加され、プレートは 3 7 °C において 2 時間インキュベートされた。細胞は次いで、0 . 1 m L の、0 . 0 1 M H C l 中の 1 0 % S D S - 5 0 % イソブタノールの添加により可溶化され、プレートは次に、走査型マルチウエル分光光度計 (タイターテック・マルチスキャン (Titertek Multiscan) ; ベックマン・インスツルメンツ・インク (Beckman Instruments Inc)、カリフォルニア州) で、5 7 0 n m において読取られた。M T T の発色は、生細胞の数に正比例していた。M T T アッセイの結果は、対照値のパーセントとして表される。

40

50

【0214】

統計学

実験データは、スチューデントのペアード t 検定を用いて比較された。結果は、 $p < 0.05$ であるとき、統計学的に有意であると見なされた。結果は、2 ~ 5 の別個の実験についての平均 ± 標準偏差 (SD) として表される。

【0215】

実施例 3 - 鉄の動員 / 取込み実験

 ^{59}Fe を用いたトランスフェリンの標識化

アポトランスフェリン (シグマ・ケミカル社、米国、セントルイス) が用意され、 ^{59}Fe (0.1 M HCl 中の塩化第二鉄として、デュポン (Dupont) NEN、米国、マサチューセッツ州) を用いて、リチャードソン & ベーカー (Richardson & Baker)、1992 年、により記述された標準的な方法を用いて標識化され、 ^{59}Fe -トランスフェリン ($^{59}\text{Fe-Tf}$) を生成した。

【0216】

(実施例 3 a - プレラベルされた SK-N-MC 神経上皮細胞腫細胞からの鉄の動員に対する PCIH、QCIH、および PKIH 類似体の影響の比較)

方法論：鉄動員アッセイ

プレラベルされた細胞からの ^{59}Fe の放出に対するキレート化剤の影響は、標準的な方法を用いて研究された¹⁸。細胞は ^{59}Fe -トランスフェリン ($0.75\ \mu\text{M}$) を用いて、37 °C において 3 時間にわたってプレラベルされた。次いで細胞は氷上に置かれ、氷冷された BSS で 4 回洗浄され、次に培地のみ (対照) か、あるいは DFO ($100\ \mu\text{M}$) または他の化合物 ($50\ \mu\text{M}$) を含有する培地の存在下に、37 °C において 3 時間にわたって再びインキュベートされた。次いで重層された培地は除去され、 β -計数管に入れられた。細胞は、プラスチックパチュラを用いてペトリ皿から 1 ml の BSS 中に除去され、別のセットの β -計数管へ移された。

【0217】

QCIH および PKIH 類似体の Fe キレート化効率は、それらの活性を DFO および対応する PCIH 類似体に対して比較することによって調べられた。SK-N-MC 神経上皮細胞腫細胞から ^{59}Fe を動員する化合物の能力は、 $^{59}\text{Fe-Tf}$ ($0.75\ \mu\text{M}$) との、37 °C における 3 時間の標識時間の後に査定された。細胞は次いで洗浄され、内部標準 DFO ($100\ \mu\text{M}$) または他の $50\ \mu\text{M}$ のキレート化剤 (図 3 および図 4) の存在下および不在下に、37 °C において 3 時間にわたり再度インキュベートされた。DFO は、このキレート化剤の、細胞からの ^{59}Fe の動員および $^{59}\text{Fe-Tf}$ からの ^{59}Fe の取込みの防止における低い効率のため、 $100\ \mu\text{M}$ の濃度において使用された。

【0218】

一般に、PKIH シリーズは、対応する PCIH 対照化合物以上の、プレラベルされた細胞からの ^{59}Fe の動員能を示した (図 3 A)。PKIH および PCIH 群の間の活性の最大の相違は、これらのシリーズ (表 1 参照) から、より親水性の化合物、すなわち PCAH と PKAH、または PCHH と PKHH が比較された場合に見られる。

【0219】

一般に、比較用の QCIH 類似体は、PCIH または PKIH 類似体と同様の様式では拳動せず、 ^{59}Fe 動員の誘導の観点からいえば、ほとんど活性を示さなかった (図 3 B)。QCIH シリーズのうちで最も効果的なキレート化剤は、親化合物 QCIH であり、PCIH に匹敵する細胞の ^{59}Fe 動員を示した (図 3 B)。

【0220】

これらの三群の化合物に関する ^{59}Fe 動員データについての分析は、PKIH シリーズのジピリジル置換基が、ヒドラジド置換に関係なく、キレート化剤に高い Fe キレート化活性を与えるように見えることを示唆した (図 3 A)。対照的に、比較用 QCIH シリーズの化合物における単一のキノリン環の存在は、結果として低い Fe キレート化活性を生じるように見える (図 3 B)。

10

20

30

40

50

【0221】

(実施例3b - ^{59}Fe 標識トランスフェリンからの細胞の鉄取込みに対するPCIH、QCIH、およびPKIHキレート化剤の影響の比較)

方法論：鉄取込みアッセイ

PKIH類似体の、 ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの、細胞の取込みを阻害する能力が、標準的な方法を用いて調べられた¹⁸。SK-N-MC細胞は、 ^{59}Fe -Tf (0.75 μM) および、DFO (100 μM) か、またはPCIH、QCIH、またはPKIHシリーズ (50 μM) のうちの (のうちの) 一つの化合物のいずれかを含有する培地中で、37 °Cにおいて3時間インキュベートされた。細胞は次に氷上に置かれ、氷冷されたハンクスの平衡塩類溶液 (BSS) で4回洗浄され、非特異的に結合した ^{59}Fe -Tfを除去した。次に細胞は一般的なタンパク質分解酵素、プロナーゼ (1 mg/ml) とともに4 °Cにおいて30分間インキュベートされ、膜結合性の ^{59}Fe およびTfを除去した。

10

【0222】

PKIH類似体はすべて、 ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの阻害において非常に効果的であった (図4A)。特に、PKAHおよびPKHH配位子は著しい活性を示したが、一方、対照のPCIH類似体、PCAHおよびPCHHは、ほとんど効果を示さなかった (図4A)。一般に、QCIH配位子は、PCIHおよびPKIH類似体よりも、 ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの防止において効力が低い (図4B)。

【0223】

(実施例3c - 細胞の鉄動員およびトランスフェリンからの鉄取込みに対するPKIH類似体濃度の影響)

方法論：鉄動員アッセイ

^{59}Fe 動員に対するPKIH類似体の効力が、化合物濃度の関数として査定された (図5A)。細胞は、 ^{59}Fe -Tf (0.75 μM) を用いて、37 °Cにおいて3時間にわたってプレラベルされ、洗浄され、次いで濃度範囲 (0.5 ~ 50 μM) のPKIH化合物と、37 °Cで3時間、再度インキュベートされた。

20

【0224】

同様に、 ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みに対するキレート化剤濃度の影響は、PKIH類似体 (0.5 ~ 50 μM) を、 ^{59}Fe -Tf (0.75 μM) とともに37 °Cにおいて3時間インキュベートすること、および次いで細胞が洗浄されることによって査定された (図5B)。PCTHは、内部対照として使用された。

30

【0225】

PKIH、PCTH、およびPKBHは、10 μM 未満の濃度では、細胞の ^{59}Fe の動員において、PCTHよりもさらに有効であった (図5A)。たとえば、1 μM の濃度では、PKIHが細胞の ^{59}Fe の26%を放出するのに対し、PCTHは10%を放出するに過ぎなかった (図5A)。同様に、PKIH、PKBH、およびPCTHは、 ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの防止において、対照PCTHよりも高い効力を有していた (図5B)。より親水性の配位子、PKAHおよびPKHH (表1) は、 ^{59}Fe 取込みおよび ^{59}Fe 動員アッセイにおいて、より低い効力を示した。

40

【0226】

(実施例3d - プララベルされたSK-N-MC神経上皮腫細胞からの鉄動員に対するDpT類似体の影響)

方法論：鉄動員アッセイ

アボトランスフェリン (シグマ) は、 ^{59}Fe (デュポン - NEN、米国、マサチューセッツ州) により、標準的な方法を用いて標識化され¹⁸、 ^{59}Fe トランスフェリン (^{59}Fe -Tf) を産生した。細胞は ^{59}Fe -Tf (0.75 μM) を用いて、37 °Cにおいて3時間にわたってプレラベルされ、洗浄され、次いでキレート化剤 (25 μM ; 図11A) とともに、37 °Cにおいて3時間、再度インキュベートされた。DFOおよび311は、内部標準として使用された。

50

【0227】

DpT類似体の、SK-N-MC細胞から ^{59}Fe を直接的に動員する能力が調べられた(図11A)。DpTおよびDp2mTは、結果として全細胞 ^{59}Fe の6~7%の流出を生じたが、一方、培地のみと再度インキュベートされた対照細胞は、 ^{59}Fe の5%を放出した(図11A)。化合物Dp2mTは、チオセミカルバゾンの2位におけるメチル基の存在が鉄キレート化を妨げるため、ネガティブ対照として作用する。DFOは、結果として細胞 ^{59}Fe の11%の動員を生じるにすぎない(図11A)。調べられた他のDpT化合物は、 ^{59}Fe の動員において、DFOよりも有意に($p < 0.0001$)より有効であり、結果として細胞 ^{59}Fe の37~47%の放出を生じた(図11)。Dp44mTは、最も効率的であり、 ^{59}Fe の47%の放出を生じた(図11)。 ^{59}Fe 流出を誘導することにおけるDpT類似体の効力は、それらの抗腫瘍活性と十分に相互関係があった(実施例4d、表3)。

10

【0228】

(実施例3e - SK-N-MC神経上皮腫細胞による ^{59}Fe 標識されたトランスフェリンからの細胞の鉄取込みに対するDpT類似体の影響)

方法論：鉄取込みアッセイ

DpT類似体の、 ^{59}Fe -Tfからの細胞の ^{59}Fe の取込みを阻害する能力は、標準的な方法¹⁸を用いて調べられた。細胞によって内在化される(internalized) ^{59}Fe の量は、一般的なタンパク質分解酵素プロナーゼ(1mg/ml)とともに4において30分間インキュベートして膜結合性の ^{59}Fe およびTfを除去することにより測定された。

20

【0229】

DpT類似体の、SK-N-MC細胞による ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みを阻害する能力は、ある範囲のDpT類似体(25 μM)の不在または存在下に、37において3時間にわたって調べられた(図11B)。 ^{59}Fe を動員するその低い能力と一致して、DpTおよびD2mTは、 ^{59}Fe 取込みにおいてほとんど効果がない。311およびDp44mTを含めて、試験された最も効率的な化合物は、対象の5~9%まで ^{59}Fe 取込みを制限し、その活性はDFOよりも有意に大きかった($p < 0.0001$)(図11B)。これらの結果は、これらの配位子が細胞 ^{59}Fe を動員する能力と一致する(図11A)。調べられたすべてのDpT類似体(DpTおよびDp2mTを除いて)は、細胞による ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みを防止することにおいて、DFOよりもはるかに大きい効力を示した(図11B)。

30

【0230】

腫瘍細胞増殖を阻害するDpTの能力(表3)は、 ^{59}Fe 放出を誘導し(図11A)かつ ^{59}Fe 取込みを防止する(図11B)それらの効力と相関することが示された。Dp44mT、Dp4mT、Dp4eT、Dp4aT、およびDp4pTの Fe キレート化活性は、DFOにより仲介されるものよりはるかに大きかった。

【0231】

(実施例3f - Tfからの鉄取込みおよびM109細胞からの鉄動員に対するDp44mTの影響)

40

マウスのM109肺癌細胞の増殖を阻害する、化合物Dp44mTの能力が査定された。研究は、培養にあるM109癌細胞を用いて行なわれ、これらの細胞から ^{59}Fe を動員すること(図11C)および ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みを阻害すること(図11D)に対するDp44mTの影響を測定した。内部対照として、細胞はDFOおよび311とともにインキュベートされた。M109細胞から ^{59}Fe 動員を増大することに対する化合物濃度の影響は、細胞を ^{59}Fe -Tf(0.75mM)で37において3時間標識化すること、続いて洗浄すること、および各々の化合物(0.2~25 μM)とともに、37で3時間再度インキュベートすることにより調べられた(図11C)。DFOは調べた化合物の中で最も効力がなく、25 μM において、細胞からわずか $12 \pm 1\%$ の ^{59}Fe を放出したに過ぎず、一方対照培地は、 $8 \pm 1\%$ を放出した(図11C)。

50

対照的に、311は細胞の ^{59}Fe 放出を、 $8 \pm 1\%$ (対照培地) から、 $5 \mu\text{M}$ において $60 \pm 1\%$ まで増大させた (図11C)。Dp44mTに関しては、 ^{59}Fe 放出は $2 \mu\text{M}$ において横ばい状態になり、結果として $48 \pm 2\%$ の ^{59}Fe の流出を生じた (図11C)。

【0232】

化合物311は、M109細胞による $^{59}\text{Fe}-\text{Tf}$ ($0.75 \mu\text{M}$) からの、細胞の ^{59}Fe 取込みの阻害において、調べたうちで最も活性のある化合物であった (図11D)。 $1 \mu\text{M}$ において、311は ^{59}Fe 取込みを対照の $40 \pm 4\%$ まで減少させた。対照的に、DFOはほとんど影響がなかった。Dp44mTは $5 \mu\text{M}$ の濃度までは311と同様の活性を有していたが、そこで ^{59}Fe 取込みを、対照の $30 \pm 1\%$ まで低減させた (図11D)。

【0233】

実施例4 - インビトロにおける細胞増殖の阻害

【0234】

(実施例4a - SK-N-MC神経上皮腫細胞に対するPKIH類似体の影響)

方法論：細胞増殖アッセイ

PCIH、QCIH、およびPKIHシリーズの化合物の、SK-N-MC神経上皮腫細胞系の増殖に対する影響が研究された (表2)。SK-N-MC神経上皮腫細胞の増殖に対する化合物の影響は、MTTアッセイ (前文に記述) を用いて調べられた。MTT発色は、トリパンブルー染色によって測定された生細胞の数に正比例した。すべての実験において、化合物311およびDFOは、関連する内部対照として使用された。

【0235】

【表4】

表2 MTTアッセイを用いたSK-N-MC神経上皮腫細胞の増殖に対する Fe キレート化剤PCIH、QCIH、およびPKIHシリーズの化合物の影響

| キレート化剤の IC_{50} 値 (μM) | | | | | |
|--|-------------|---------|------------|---------|-------------|
| PCIH類似体 | | QCIH類似体 | | PKIH類似体 | |
| DFO | >50 | DFO | >50 | DFO | >50 |
| 311 | 3 ± 2 | 311 | 3 ± 2 | 311 | 3 ± 2 |
| PCIH | >50 | QCIH | 49 ± 3 | PKIH | 2 ± 1 |
| PCTH | 48 ± 4 | QCTH | >50 | PKTH | 3 ± 1 |
| PCBH | 46 ± 7 | QCBH | 50 ± 1 | PKBH | 3 ± 1 |
| PCBBH | 40 ± 12 | QCBBH | 49 ± 3 | PKBBH | 1 ± 1 |
| PCAH | >50 | QCAH | >50 | PKAH | 42 ± 9 |
| PCHH | >50 | QCHH | >50 | PKHH | 38 ± 10 |

データは4つの実験からの平均値 \pm SDで表されている。

【0236】

PKIHの細胞毒性は、細胞の形態学的外観および細胞数の著しい減少から明らかであった。PKIH類似体は、非常に低いキレート化剤濃度においても、非常に高い抗増殖活性を示した (表2)。化合物、PKIH、PKTH、PKBH、およびPKBBHは、311に非常に類似した抗増殖活性を示した (表2)。

【0237】

PKIH類似体とは対照的に、PCIHおよびQCIH類似体は、細胞増殖に対してほとんど影響がなかった (表2)。PCIHおよびQCIHシリーズのすべての化合物は、 $40 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ を超える IC_{50} 値を有していた。これらの結果は、位相差顕微鏡およびトリパンブルー染色による細胞形態学の検査と強く一致しており、そのことはPCIHおよびQCIHシリーズの化合物がほとんど細胞毒性を示さないことを証明した。

【0238】

10

20

30

40

50

(実施例 4 b - S K - N - M C 神経上皮細胞腫細胞の増殖に対する P K I H 類似体の F e (I I I) 錯体の影響)

実験は、P K I H 類似体が F e (I I I) と複合した場合、S K - N - M C 細胞の増殖の阻害において有効であるかどうかを測定するべく行なわれた。キレート化剤対 F e のモル比 1 : 1 および 2 : 1 において、すべての P K I H - F e 錯体は、遊離の配位子に関して見られたものと同様のレベルの抗増殖活性を示した(データは示されず)。同一の研究における関連の対照として、3 1 1 の F e 錯体のための 1 : 1 および 2 : 1 の化合物もまた調製され、査定された。3 1 1 の F e 錯体は、5 0 μ M までの濃度において、増殖に対し何ら有意の影響をもたなかった(データは示されず)。

【0 2 3 9】

(実施例 4 c - 線維芽細胞および S K - N - M C 神経上皮腫細胞の増殖に対する P K I H 類似体の影響の比較)

S K - N - M C 神経上皮腫細胞および M R C - 5 線維芽細胞の増殖に対する P K I H、P K T H、P K B H、および P K B B H の影響が調べられた(図 6)。M R C - 5 細胞タイプは、正常なヒト肺線維芽細胞の細胞系であり、インビトロでの多数の継代の後は致死性および老化性である S K - N - M C 神経上皮腫細胞タイプは不死である。増殖を阻害することにおける P K I H 類似体の影響は、線維芽細胞よりも S K - N - M C 細胞において増大した。たとえば P K I H 類似体は、S K - N - M C 細胞では 1 ~ 3 μ M の I C₅₀ 値を有していたのに対し、線維芽細胞における I C₅₀ 値は、P K B B H、P K B H、P K T H、および P K I H について各々 8、1 1、1 6、および > 2 5 μ M であった。

【0 2 4 0】

(実施例 4 d - S K - N - M C 神経上皮腫細胞の増殖に対する D p T 類似体の影響)

D p T 類似体(図 2 A)の、S K - N - M C 神経上皮腫細胞増殖を阻害する能力が査定された(図 1 0)。化合物(0 ~ 2 5 μ M)は、細胞とともに 7 2 時間インキュベートされ、このインキュベーション期間の終わりに、上述のように細胞密度が M T T アッセイにより測定された。D p 2 m T はネガティブ対照として役割を果たした。M T T アッセイを用いて得られたデータは、光学顕微鏡によって概算された細胞数と正比例した。

【0 2 4 1】

D p 4 4 m T、D p 4 e T、D p 4 a T、および D p 4 p T は、非常に高い抗増殖活性を示した(I C₅₀ = 0 . 0 3 ~ 0 . 0 6 μ M ; 表 3)。これらの D p T 類似体は、D F O (I C₅₀ = 5 μ M) よりも有意に (p < 0 . 0 0 0 1)、より活性があり、3 1 1 (I C₅₀ = 0 . 3 μ M ; 表 3) のような他の F e キレート化剤よりも大きい効力があった。確立された細胞毒性物質、S K - N - M C 細胞におけるドキソルビシンの抗増殖活性(I C₅₀ = 0 . 0 2 μ M ; 表 3) に比較して、D p 4 4 m T、D p 4 e T、D p 4 a T、および D p 4 p T は類似した効力を有する。鉄キレート化、T r i a p i n e (登録商標)(図 1 B) は、上記の D p T 類似体よりも低い活性(I C₅₀ = 0 . 2 6 μ M ; 表 3) を有していた。D p 4 m T もまた S K - N - M C 細胞に対してかなりの活性を見せており、0 . 1 9 μ M の I C₅₀ 値を有して、T r i a p i n e (登録商標) に匹敵するものであった(表 3)。

【0 2 4 2】

10

20

30

40

【表5】

表3 腫瘍および正常細胞の細胞増殖に対するFe-キレート化剤の影響

| IC ₅₀ (μM) | | | | |
|-----------------------|------------------|--------------------|-------------|----------------|
| | 腫瘍細胞 | | | 正常細胞 |
| | SK-N-MC 神経上皮腫 | SK-Mel-28 メラノーマ | MCF-7 乳癌 | MRC-5 繊維芽細胞 |
| DFO | 5±2 | 15±7 | 14±9 | >25 |
| 311 | 0.30±0.2 | 0.9±0.5 | * | >25 |
| 311m | 0.80±0.2 | 1.4±0.4 | 0.9±0.4 | >25 |
| Dp311 | 0.6±0.04 | 1.1±0.5 | 1.6±0.1 | >25 |
| DpT | >25 | >25 | >25 | >25 |
| Dp2mT | >25 | >25 | >25 | >25 |
| Dp4mT | 0.19±0.1 | 0.6±0.5 | 0.3±0.2 | >25 |
| Dp44mT | 0.03±0.01 | 0.06±0.03 | 0.06±0.01 | >25 |
| Dp4eT | 0.06±0.01 | 0.90±0.06 | 0.08±0.01 | >25 |
| Dp4aT | 0.06±0.01 | 0.10±0.06 | 0.07±0.01 | >25 |
| Dp4pT | 0.05±0.006 | 0.09±0.05 | 0.07±0.01 | >25 |
| Triapine | 0.26±0.01 | 2.6±0.6 | 3.0±1.5 | * |
| DOX | 0.02±0.01 | 0.35±0.09 | 0.6±0.2 | * |

結果は平均値±SD(少なくとも5つの実験の)である。

* データ取得不能

【0243】

DpT類似体はまた、SK-Mel-28メラノーマおよびMCF-7乳癌細胞系に対しても査定された(表3)。Dp2mTは、2位のメチル基がFeキレート化を妨害することから、ネガティブ対照としての役割を果たした。化合物Dp4mT、Dp44mT、Dp4eT、Dp4aT、およびDp4pTは、SK-Mel-28メラノーマおよびMCF-7乳癌細胞の増殖を阻害することにおいて、各々、DFOよりも活性があった($p < 0.0001$) (表3)。これらの細胞系に対し、Dp44mT、Dp4eT、Dp4aT、およびDp4pTは最も活性があり($IC_{50} = 0.06 \sim 0.10 \mu M$; 表3)、Dp44mTはすべての腫瘍細胞タイプを査定して、最も効果的な抗増殖剤であった。全体的に、活性のあるDpT類似体の効力は、311およびTriapine(登録商標)のそれよりも大きく、またドキソルビシンに関して見られたものよりも良好であった(表3)。意義深いことに、不死の腫瘍細胞に対するDp44mT、Dp4eT、Dp4aT、およびDp4pTの著しい抗増殖活性とは対照的に、これらの化合物は致死性のMRC-5繊維芽細胞の増殖に対しては、驚くほど低い影響を示した(IC_{50} 値 $> 25 \mu M$) (図10および表3)。

【0244】

(実施例4e-ある範囲の細胞型に関する増殖阻害の比較)

化合物311、DFO、DOX、PKIH、PKTH、Dp44mT、Dp4eT、Dp4pT(0~50μM)は、細胞とともに72時間インキュベートされた。インキュベーション時間の最後に、細胞密度がMTTアッセイ(上記)により測定された。結果は表4に示されている。

【0245】

【表 6】

表4 H69AR肺癌、IMR-32神経芽細胞腫、HEP G2肝癌、DU 145前立腺癌、およびNCI H2452中皮腫細胞系を含む範囲の腫瘍細胞の細胞増殖に対するFe-キレート化剤の影響

| IC ₅₀ (μM) | | | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------|--------------|
| | H69AR [^] | IMR-32 [^] | HEP G2 [^] | DU145 * | NCI H 2452 # |
| | 肺癌 | 神経芽細胞腫 | 肝癌 | 前立腺癌 | 中皮腫 |
| 311 | 0.97 | 0.30 | 1.18 | 1.94 | 0.47 |
| DFO | >50 | 9.38 | 18.7 | 15.75 | 32.3 |
| DOX | 0.39 | 0.01 | 2.61 | 0.09 | 0.17 |
| PKIH | -- | 0.38 | 1.41 | 0.45 | 0.86 |
| PKTH | 0.78 | 0.30 | 1.17 | 1.43 | 0.73 |
| Dp44mT | 0.05 | 0.01 | 1.36 | 0.06 | 0.01 |
| Dp4eT | -- | 0.01 | 0.02 | -- | 1.17 |
| Dp4pT | 0.97 | 0.01 | 0.08 | 0.53 | 0.01 |

[^] 1実験: * 2つの実験の平均値±SD; # 3つの実験の平均±SD

【0246】

いくつかの非常に攻撃的な癌に由来するある範囲の腫瘍細胞系に対する、より有効な化合物の抗増殖活性が査定された。これらの実験においては、DFOおよび311は適当な標準として用いられた。さらに、これらの研究は、現在の臨床的使用において最も有効な抗腫瘍剤の一つである、細胞毒性物質、ドキソルビシン(DOX)を含んでいた。調べられた最も有効性の少ないキレート化剤は、内部標準、DFOであり、鉄過剰症の治療のための臨床的使用において現行の薬物である。調べられた最も有効な化合物は、三つのDpT類似体、すなわちDp44mT、Dp4eT、およびDp4pTを含んでいた。特に、いくつかの癌細胞系におけるこれらのDpT類似体の活性は、DOXのものよりもさらに顕著であった。たとえば、肝癌細胞系、HepG2においては、Dp4eTのIC₅₀は0.02 μMであり、DOXについて見出されたもの(2.61 μM)より10倍を超えて低かった。PKIH類似体、PKIHおよびPKTHの活性もまた印象的であり、311に類似しており、かつDOXよりもわずかに有効性が低かった。重要なことには、DpTおよびPKIH類似体はDOXに対して非常に異なる作用機構によって作用しており、DOXに抵抗性の癌細胞タイプでは、あるいは有用であってもよい。

【0247】

実施例5 - M109肺癌の増殖についてのインビボの用量依存性阻害
一般方法論

CD21ハイブリッドマウスにおける最大耐量の測定

BALB/cおよびDBA/2マウスは、アニマル・リソース・センター(Animal Resources Center)(ニューサウスウェールズ大学(UNSW)、オーストラリア、シドニー)から入手され、交配されてCD2F1動物を生じた(用いたすべての方法は、動物倫理委員会(Animal Ethics Committee, UNSW)により承認された)。8匹の雌のCD2F1マウス(8~10週齢)の群は、自由に餌および水が与えられ、2週間にわたり毎週5日、6時間間隔で一日2回、0.9%の無菌食塩水中の30%プロピレングリゴール中の調査される化合物を用いて、尾静脈から注射された。最大耐量(MTD)は、コホート(同齡集団)の30%が死んだかまたは10%を超えて体重が減少した用量として定義された¹⁹。

【0248】

インビボの鉄キレート化によるM109肺癌細胞増殖の阻害

8~10週齢の雌のCD2F1マウスは、1x10⁵個のM109細胞が皮下移植された。腫瘍細胞は、腫瘍からブライを調製すること、およびそれを皮下に注射することにより、CD2F1マウスにおいて継代された²⁰。Dp44mTは、食塩水中の30%(v/v)

10

20

30

40

50

v) プロピレングリコール中に溶解され、腫瘍移植の4日後に、一日2回、5日間にわたって静注され、その後に動物が注射されない2日間の「休止期間」が続けられた。腫瘍移植後12日目に、マウスはメトキシフルオランを用いて犠牲にされ、心臓穿刺が行なわれた。血球数および赤血球指数は、シスメックス・ブラッド・カウンタ (Sysmex Blood Counter) (プリンス・オブ・ウェールズ病院 (Prince of Wales Hospital)、オーストラリア、シドニー) を用いて測定された。処置期間の間のマウスの体重変化が記録された。腫瘍は秤量され、組織学検査用に固定された。実験群は、対照および各処置についてマウス8匹で構成された (表5)。

【0249】

図12Aは、4日から連続5日にわたり一日2回静脈内注射された後の、腫瘍増殖に対する0.15、0.3、および0.4 mg/kgのDp44mT (MTD = 0.4 mg/kg) の影響を示している。関連するポジティブ対照として、動物はTriapine (登録商標) を、そのMTD (6 mg/kg) において投与された。腫瘍重量は、腫瘍細胞移植後12日目に測定された。

【0250】

【表7】

表5 媒体のみ(対照)、Dp44mT(0.15、0.3、および0.4 mg/kg)、またはTriapine®(6 mg/kg)で処理された動物からのマウスの体重減少および血液学的指数

| | 対照 | Dp44mT(mg/kg) | | | Triapine® (6mg/kg) |
|--------------------------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------------------|
| | | 0.15 | 0.3 | 0.4 | |
| 体重減少(g) | 0.83±0.3 | 1.4±0.2 | 1.3±0.3 | 1.1±0.2 | 5.3±0.4 |
| WBC(10 ⁹ /L) | 4.4±0.4 | 4.2±0.8 | 4.2±0.4 | 3.9±0.6 | 1.4±0.3 |
| RBC(10 ¹² /L) | 9.1±0.2 | 9.4±0.1 | 8.9±0.4 | 8.0±0.6 | 6.1±0.4 |
| ヘモグロビン (g/dL) | 13.7±0.2 | 14.0±0.2 | 13.3±0.5 | 11.8±0.8 | 8.6±0.5 |
| ヘマトクリット | 0.46±0.01 | 0.46±0.01 | 0.40±0.03 | 0.40±0.01 | 0.28±0.01 |
| 血小板(10 ⁹ /L) | 788±47 | 1047±42 | 1019±87 | 636±88 | 976±171 |

結果は平均値±SEM(別個の3つの実験)。実験群は対照および各処置について8匹のマウスからなる。

【0251】

Dp44mTの投与は、腫瘍増殖を用量依存性の様式で阻害し(図12A)、0.4 mg/kgにおいて、腫瘍重量を対照値の47%まで($p < 0.01$)低減させた。対照群では、Dp44mTで処理された動物に比較して、マウスの体重減少または白血球数には何ら有意差はなかった(表5)。しかしながら、対照に比較して、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球および血小板数におけるわずかな($p < 0.05$)減少が、Dp44mTを用いて、そのMTD(0.4 mg/kg)において処理された動物では観察されたが、より低い用量では観察されなかった(表5)。Dp44mTの、0.15および0.3 mg/kgにおける投与は、血小板数を増大した(表5)。Triapine(登録商標)はDp44mTよりも有効であり、腫瘍重量を対照の10%まで有意に($p < 0.001$)低減した(図12A)。しかしながら、Dp44mTとは対照的に、Triapine(登録商標)はそのMTD(6 mg/kg)において著しく、かつ有意に($p < 0.0001$)、動物の重さ、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、赤血球および白血球数を低減し(表5)、このような条件下ではTriapine(登録商標)が全身的毒性であることを示唆している。

【0252】

実施例6 - ³H-チミジン、³H-ロイシン、および³H-ウリジンの取込みに対するPKIH類似体の影響

方法論：³H-チミジン、³H-ロイシン、および³H-ウリジンの取込みアッセイ

SK-N-MC細胞の、類似体の選択物との20時間のインキュベーションの後、³H

10

20

30

40

50

- チミジン、³H-ロイシン、および³H-ウリジン(1 μCi/ml)が、37において2時間にわたり添加された。細胞は、Ca(II)/Mg(II)なしのPBS中の1 mM EDTAを用いて96穴プレートから剥離され、セル・ハーベスタ(トムテック・ハーベスタ(Tomtec Harvester)96、リンブルック、オーストラリア、クイーンズランド)を用いて収集および洗浄された。放射能は、シンチレーションカウンタ(LKBウォレス(Wallace)、フィンランド、トゥールク(Turku))で測定された。

【0253】

(実施例6a - ³H-チミジン取込みに対するPCIH、QCIH、およびPKIHシリーズの化合物の影響)

³H-チミジン取込みに対するPKIHシリーズの化合物の影響は、対応するPCIHおよびQCIH類似体と、また関連する対照としてDFOおよび311とも比較された(表6)。

【0254】

【表8】

表6 SK-N-MC神経上皮腫細胞による³H-チミジン取込みに対するPCIH、QCIH、およびPKIHシリーズの化合物の影響

| ³ H-チミジンの取込み(%対照) | | | | | |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| PCIH類似体 | | QCIH類似体 | | PKIH類似体 | |
| 対照 | 100±7 | 対照 | 100±7 | 対照 | 100±7 |
| DFO | 29±13 | DFO | 29±13 | DFO | 29±13 |
| 311 | 0.1±0.1 | 311 | 0.1±0.1 | 311 | 0.1±0.1 |
| PCIH | 43±1 | QCIH | 77±9.5 | PKIH | 0.06±0.02 |
| PCTH | 64±14 | QCTH | 83±6 | PKTH | 0.04±0.01 |
| PCBH | 72±16 | QCBH | 64±5 | PKBH | 0.03±0.01 |
| PCBBH | 33±6 | QCBBH | 81±10 | PKBBH | 0.02±0.01 |
| PCAH | 12±1 | QCAH | 43±2 | PKAH | 23±10 |
| PCHH | 11±1 | QCHH | 41±2 | PKHH | 25±4 |

データは4つの実験からの平均値±SDとして表されている。

【0255】

PKIH、PKTH、PKBH、およびPKBBHは、³H-チミジン取込みを阻害するそれらの能力の観点からいえば、調べられた最も有効な化合物であり、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤、311と同じかまたはわずかに高い活性を示した(表6)。実際、PKIH類似体で処理された細胞では、³H-チミジンはほとんど検出不能のレベルであった。たとえば、PKBBHは³H-チミジンの取込みを、対照の0.02%まで低減した(表6)。いくつかの、より親水性のPKIH類似体、すなわちPKAH、およびPKHH(表1)は、有意に(p<0.0001)低い活性を示し、³H-チミジンの取込みを、各々対照の23%および25%まで阻害した。しかしながら、これら後者の化合物の、³H-チミジン取込みの阻害における比較的低い効力は、このシリーズの最も親水性の類似体(PKIH;表1)が非常に高い活性を持つことから(表6)、ただ単にそれらの親水性のみに帰されることはできない。

【0256】

311およびPKIH類似体との比較において、QCIH類似体は³H-チミジン取込みの阻害においてかなり低い活性を示しており、対照の41~83%まで取込みを低減した(表6)。

【0257】

(実施例6b - ³H-ロイシンおよび³H-ウリジンの取込みに対するPCIHおよびPKIHシリーズの化合物の比較)

³H-チミジン取込みに対するPKIH群の類似体の著しい効果を考慮して、これら

の化合物の、³H-ロイシン(表7)および³H-ウリジン(表8)の取込みに対する影響も査定された。得られた結果は、高いFeキレート化活性を示すが、低い抗増殖効果を示すPCIHシリーズの類似体と比較された。

【0258】

【表9】

表7 SK-N-MC神経上皮腫細胞による³H-ロイシン取込みに対するPCIHおよびPKIH配位子の影響

| ³ H-ロイシンの取込み(%対照) | | | |
|------------------------------|-------|---------|--------|
| PCIH類似体 | | PKIH類似体 | |
| 対照 | 100±7 | 対照 | 100±7 |
| DFO | 9±1 | DFO | 9±1 |
| 311 | 2±1 | 311 | 2±1 |
| PCIH | 74±7 | PKIH | 26±1 |
| PCTH | 21±6 | PKTH | 19±8 |
| PCBH | 30±13 | PKBH | 21±2 |
| PCBBH | 16±5 | PKBBH | 8±1 |
| PCAH | 76±2 | PKAH | 25±2 |
| PCHH | 80±10 | PKHH | 22±0.5 |

データは4つの実験からの平均値±SDとして表されている。

【0259】

【表10】

表8 SK-N-MC神経上皮腫細胞による³H-ウリジン取込みに対するPCIHおよびPKIH配位子の影響

| ³ H-ウリジンの取込み(%対照) | | | |
|------------------------------|-------|---------|--------|
| PCIH類似体 | | PKIH類似体 | |
| 対照 | 100±2 | 対照 | 100±2 |
| DFO | 34±5 | DFO | 34±5 |
| 311 | 5±2 | 311 | 5±2 |
| PCIH | 50±8 | PKIH | 19±1 |
| PCTH | 43±2 | PKTH | 5±1 |
| PCBH | 31±9 | PKBH | 5±1 |
| PCBBH | 47±2 | PKBBH | 3±1 |
| PCAH | 40±9 | PKAH | 28±1.5 |
| PCHH | 41±11 | PKHH | 21±1.5 |

データは3つの実験からの平均値±SDとして表されている。

【0260】

³H-チミジン取込みの阻害という観点から最も活性のあるPKIH類似体、すなわちPKIH、PKTH、PKBH、およびPKBBHは、³H-ロイシンおよび³H-ウリジンの、各タンパク質およびRNAへの取込みの阻害において(表7および8)、有意に(p<0.0001)効力が低かった。さらに、これらのPKIH類似体は、³H-ロイシンの取込みに対し、311よりも有意に(p<0.001)低い効果を有していた(表7)。全般的にPKIH類似体は、³H-ロイシンまたは³H-ウリジンの取込みの阻害において、PCIH類似体よりも有効であった(表7および8)。PKBBHは、³H-ロイシンまたは³H-ウリジンの取込みの阻害において、最大の効力を示した。

【0261】

実施例7-WAF1およびGADD45 mRNAの発現に対するPKIH類似体の影響

10

20

30

40

50

方法論：ノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析は、トータルRNAアイソレーション・リエイジェント (Total RNA Isolation Reagent) (アドバンスド・バイオテクノロジー社 (Advanced Biotechnologies Ltd)、英国、サリー) を用いて全RNAを単離することによって行なわれた。膜は、ヒトWAF1、GADD45、および β -アクチンに特異的なプローブとハイブリダイズされた。WAF1プローブは、pSXVからの1 kbフラグメントから構成された (ATCC; Cat. No. 79928)。GADD45プローブは、pHu145B2 (アルバート・フォルナーチェ (Albert Fornace) 博士、国立癌研究所、NIH、メリーランド州、のご厚意により提供された) ヘクローニングされた、ヒトGADD45 cDNAからの760 bpのフラグメントから構成された。 β -アクチンプローブは、pBluescript SK-ヘクローニングされた、ヒト β -アクチン cDNAからの1.4 kbフラグメントから構成された (ATCC; Cat. No. 37997)。

【0262】

G₁ - S停止に必須の細胞周期阻害剤をコードしている遺伝子、WAF1およびGADD45の発現に対するPKIH類似体の影響が査定された。内部対照DFO、PCBBH、および311は、GADD45およびWAF1のmRNA発現のアップレギュレーションを引き起こしたが、一方PCBHおよびPCIHはほとんど効果を示さなかった (図7)。PKIH、PKTH、PKBH、およびPKBBHは、それらの著しい抗増殖活性と良好に相関して顕著な効果があり、対照と比較して、GADD45およびWAF1 mRNAレベルを有意に ($p < 0.0001$) 増大した。PKIH類似体は、WAF1およびGADD45 mRNA発現の誘導において、有意に ($p < 0.01$) 311よりもさらに効力があった (図7)。

【0263】

実施例8 - Ndr g 1 mRNA発現の誘導

MCF-7細胞は、ある範囲の金属イオンキレート化剤とともに24時間インキュベートされた。細胞膜不透過性のキレート化剤、EDTA (250 μ M) は、抗増殖活性を示さず ($IC_{50} > 250 \mu$ M)、より透過性のある、各々低いおよび高い抗増殖活性を示すキレート化剤と比較された。MCF-7細胞において低い抗増殖活性をもつ化合物は、DFO ($IC_{50} = 20 \mu$ M)、L1 (デフェリプロン、 $IC_{50} = 180 \mu$ M)、およびジピリジル ($IC_{50} > 250 \mu$ M) を含んでおり、これらは25および250 μ Mにおいて査定された。化合物311およびdp44mTは、MCF-7細胞に対して高い抗腫瘍活性を示し ($IC_{50} =$ 各々0.6 μ Mおよび0.1 μ M)、25 μ Mにおいて査定された (図16) ペニシラミンは周知の銅キレート化剤であり、比較のため査定された。Dp2mTは、ネガティブ対照として用いられた。

【0264】

濃度25 μ Mにおいては、DFO、ペニシラミン (PEN)、dp2mT、EDTA、ジピリジル、およびL1は、Ndr g 1のアップレギュレーションにおいて何ら影響がなかった (図16)。対照的に、311およびdp44mTは、著しくNdr g 1レベルを増大した (図16)。

【0265】

実施例9 - 鉄調節タンパク質RNA結合活性に対するPKIH類似体の影響

方法論：ゲル遅延アッセイ

ゲル遅延アッセイは、鉄調節タンパク質 (IRP) と鉄反応エレメント (IRE) の間の相互作用を測定するべく、確立された技術^{2,1}を用いて使用された。細胞はDFO (100 μ M)、FAC (100 μ g/ml)、およびPKIH類似体 (25 μ M) とともに、37°Cにおいて20時間インキュベートされ、細胞ライゼートが調製された。次いでIRP-RNA-結合活性が、ゲル遅延アッセイにより査定された。細胞ライゼートの、2 μ gのタンパク質を含有するアリコートは、³²P-標識された0.1 ng (約 1×10^5 cpm) のリボプローブとともに、室温において30分間インキュベートされた。このプロトコールを用いる場合、添加されたRNAレベルは飽和していた。保護されていな

いプローブは、1 UのRNアーゼT1との、室温で10分間のインキュベーションにより分解された。次いでヘパリン(5 mg/ml)がさらに10分間にわたって添加され、非特異的な結合が除外された。IRE-タンパク質複合体は、6%の未変性ポリアクリルアミドゲルで分析された。平行実験では、サンプルはIREプローブの添加に先立ち、フェリシアニド(FeCN、5 mM)および5% -メルカプトエタノール(-ME)で処理された。この方法はIRP1を、自発性に活性があるか否かにかかわらず、活性のあるIRE-結合型へ転換する結果を生じる^{2, 2}。

【0266】

IRP-IRE機構は、Feキレート化に応答する、細胞のFeホメオスタシスの主要なレギュレータである。それゆえ、IRP-RNA結合活性に対するPKIH類似体の影響が測定された(図8)。SK-N-MC細胞は、キレート化剤(25 mM)とともに37°Cにおいて20時間インキュベートされた。Feキレート化剤DFO(100 μM)、311(25 mM)、またはFe供与体クエン酸アンモニウム鉄(FAC; 100 μg/ml)は、対応する対照としてすべての実験に用いられた^{3, 2, 3}。PCHは、IRP-RNA-結合活性を低減することが知られている^{2, 4}ことから、さらなる対照として使用された。

10

【0267】

DFOおよび311とインキュベートされた細胞では、IRP-RNA結合に有意な($p < 0.005$)増加を生じたが、一方FACおよびPCHは有意に($p < 0.001$)RNA結合を減少させた(図8)。PKIHシリーズを用いた細胞の処理の後には、対照と比較して、IRP-RNA結合活性に有意な($p < 0.01$)増加があり(図8)、細胞のFeプールに結合するそれらの能力を反映していた。細胞ライゼートへの-メルカプトエタノールおよびFeCNの添加は、すべてのキレート化剤とのインキュベーション後のIRP-RNA結合活性の全量に、何ら変化を生じないことを証明した(データは示されず)。

20

【0268】

実施例10 - アポトーシスの誘導

(実施例10a - マウスからのDp44mT処理された腫瘍サンプルにおける増大したアポトーシス細胞と、Dp44mTとのインキュベーション後の培養M109細胞におけるアポトーシスの検査)

30

フローサイトメトリーを用いたアポトーシスアッセイ

アポトーシス細胞は、フルオレセイン・イソチシアネート(FITC)標識されたアネキシン(Annexin)Vの、トランスロケートした形質膜ホスファチジルセリン(PS)への結合を用いて^{2, 3}、フローサイトメーター(FACSCalibur、ベクトン・ディッキンソン(Becton Dickinson)、米国、カリフォルニア州)により検出された。ヨウ化プロピオジウム(PI)が添加され、細胞膜の完全性の低下が確認されたが、それは壊死細胞の指標である。

【0269】

DNA切断は、ターミナルトランスフェラーゼ介在性のdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)反応に^{2, 6}より査定された。インシトゥのTUNELアッセイを用いて、Dp44mT(0.4 mg/ml)(図12B(ii))で処理された動物からの腫瘍試料は、媒体処理された対照(図12B(i))と比較して、増大したアポトーシス細胞死の明らかな証拠を示した。Dp44mTにより誘導されたアポトーシス経路をさらに調査するため、培養M109細胞はDp44mTとともに24時間インキュベートされ、アポトーシスおよび細胞死について、各々アネキシンV-FITCおよびPI染色を用いて分析された。Dp44mT処理の後、アポトーシスおよび死細胞のパーセントにおいて、用量依存性の増加があった(図13A)。1 μMのDp44mTに対する細胞の暴露は、アポトーシスおよび死細胞の有意な($p < 0.05$)増加を引き起こした。この増加は、100 μMのDp44mT濃度において最大となり、その結果として $40 \pm 7\%$ のアポトーシス細胞および $27 \pm 3\%$ の死細胞からなる集団となった(図13A)。250 μM

40

50

における D p 4 4 m T とのインキュベーションの後、アポトーシス細胞の数は $20 \pm 2\%$ まで減少し、また死細胞集団は $42 \pm 6\%$ まで増加しており、用量依存性の細胞毒性を示唆していた。

【0270】

D p 4 4 m T ($1 \mu\text{M}$) によるアポトーシスの誘導もまた、時間依存性であった (図 1 3 B) 。 $1 \mu\text{M}$ の D p 4 4 m T との 1 2 時間のインキュベーションの後、アポトーシス細胞における有為な ($p < 0.001$) 増加が検出された。したがって、 $1 \mu\text{M}$ において、D p 4 4 m T は ^{59}Fe 放出を著しく促進し (図 1 1 A 、 C) 、 ^{59}Fe 取込みを阻害し (図 1 1 B 、 D) 、かつアポトーシス細胞死を誘導した (図 1 3 B) 。

【0271】

(実施例 1 0 b - D p 4 4 m T とのインキュベーション後の M 1 0 9 細胞におけるカスパーゼ - 3 、 8 、 および 9 のタンパク質レベルおよび活性)

全般的な方法論

抗体

ウサギ抗活性カスパーゼ - 3 抗体、ウサギ抗活性カスパーゼ - 8 抗体、およびアネキシン V フルオレセイン・イソチオシアネート (F I T C) は、B D ファーミンジェン (Ph a r M i n g e n) (サンディエゴ、米国、カリフォルニア州) からであった。抗 h - c y t c M o A b は、R & D システムズ (米国、ミネソタ州、ミネアポリス) からであった。ウサギ抗活性カスパーゼ - 9 抗体、マウス抗 B c l - 2 、 およびマウス抗 B a x 抗体は、サンタクルズ (S a n t a C r u z) (米国、カリフォルニア州、サンタクルズ) から入手された。マウス抗マウス - アクチン抗体、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗ウサギ、および抗マウス I g G は、シグマ・ケミカル社 (S i g m a C h e m i c a l C o .) (米国、ミズーリ州、セントルイス) からであった。

【0272】

カスパーゼ活性化および活性アッセイ

培養 M 1 0 9 細胞は、D p 4 4 m T ($1 \mu\text{M}$) を用いて、または用いずに、37 °C において 0 ~ 4 8 時間処理された。細胞は溶解され ^{27}P 、カスパーゼ活性は、B D A p o l e r t ^{T M} カスパーゼ・アッセイ・プレート (B D バイオサンエンセズ (B i o s c i e n c e s) 、米国、カリフォルニア州) を用いて測定された。細胞透過性のパン - カスパーゼ - 3 、 - 8 、 および - 9 阻害剤 (B D バイオサンエンセズ) は、阻害性の対照として含まれた。

【0273】

M 1 0 9 細胞における D p 4 4 m T 誘導性のアポトーシスにおけるカスパーゼ活性化の役割を決定するため、活性カスパーゼ - 3 、 - 8 、 および - 9 のタンパク質レベル (図 1 4 A 、 B) およびそれらの酵素活性 (図 1 4 C 、 D) が調べられた。D p 4 4 m T ($1 \mu\text{M}$) との 2 時間の短いインキュベーションは、カスパーゼ - 3 および - 9 のタンパク質レベルを、各々対照の 1 6 8 および 1 7 1 % まで増大したが、カスパーゼ - 8 は増大されなかった。

【0274】

M 1 0 9 細胞の、D p 4 4 m T ($1 \mu\text{M}$) との 6 時間にわたるインキュベーションは、結果として対照の 4 0 0 % までのカスパーゼ - 3 の顕著な増加を生じたが、カスパーゼ - 9 およびカスパーゼ - 8 における増加はそれほど顕著ではなく、各々対照の 2 8 0 % および 1 5 0 % まで高められた。 (図 1 4 A 、 B) D p 4 4 m T との 1 2 時間のインキュベーションは、結果として対照の 4 0 0 % までの、カスパーゼ - 8 タンパク質レベル増加を生じたが、一方カスパーゼ - 3 および - 9 のそれは、6 時間において見られたものとほぼ同じレベルのままであった (すなわち、各々対照の 3 8 0 % および 2 8 0 %) 。 D p 4 4 m T との 2 4 時間のインキュベーションは、すべてのカスパーゼのタンパク質レベルを、対照細胞の約 4 倍まで増大したが、一方 4 8 時間後では、カスパーゼ - 3 、 - 8 、 および - 9 レベルは、対照細胞のその 5 . 5 - 、 3 . 4 倍、および 1 0 倍を超える (図 1 4 A 、 B) であった。

【0275】

10

20

30

40

50

カスパーゼ - 3 活性は、6 時間後に最も著しく増大しており、これは、48 時間後の対照について見られたものの 29 倍まで、時間依存の様式で起きていた (図 14 C)。カスパーゼ - 8 および - 9 の活性は、Dp 44 mT との 12 時間のインキュベーションの後では、対照の 299% および 354% まで、はるかに少なく増加していた (図 14 C)。これら後者の酵素の活性は、24 時間後に対照の約 400 ~ 600% において横ばい状態になった (図 14 C)。各カスパーゼの膜透過性の阻害剤は、Dp 44 mT (1 μ M) とともにインキュベートされた場合、それらの活性化を逆転させ、観察された活性の特異性を証明した (図 14 D)。

【0276】

これらの結果は、Dp 44 mT がカスパーゼ - 3 および - 9 のタンパク質レベルを 2 時間以内に増大したのに対し、カスパーゼ - 8 のタンパク質レベルは、4 時間または 6 時間後でも、わずかに増加したにすぎなかったことを示している (図 14 A、B)。酵素活性における最も著しい増加は、カスパーゼ - 3 について観察され、Dp 44 mT との 48 時間のインキュベーションの後に、対照と比較して 300 倍まで増大した (図 14 C)。

【0277】

(実施例 10 c - Dp 44 mT とのインキュベーション後の M109 細胞のミトコンドリアからサイトゾルへのホロ - チトクローム c (h - c y t c) の放出)

アポトーシスの誘導時の、ミトコンドリアからの h - c y t c 放出の重要性のため⁸、このプロセスにおける Dp 44 mT の影響についてさらに研究調査された (図 15 A)。サイトゾルおよびミトコンドリア分画の調製、およびウェスタンブロッティングは、標準的な技術を用いて行なわれた^{2 7}。対照の M109 細胞 (すなわち、0 時間) のサイトゾル分画においては、h - c y t c の発現は非常にわずかであり、最大量の h - c y t c は、この時間にはミトコンドリア中に見出された (図 15 A)。しかしながら、Dp 44 mT (1 μ M) への 2 時間の暴露の後、h - c y t c は M109 細胞のサイトゾル分画中に見出され、一方ミトコンドリアの h - c y t c レベルには、随伴する減少があった (図 15 A)。サイトゾルへの h - c y t c の放出は、Dp 44 mT との 4 時間のインキュベーションの後に横ばい状態となり、次いで 24 および 48 時間後に対照細胞において見られるものまで減少した。サイトゾルの h - c y t c におけるこの増加は、ミトコンドリアからの消失と相関していた (図 15 A)。24 および 48 時間における h - c y t c の、サイトゾルからのほぼ完全な消失は、細胞からのその放出か、またはその分解によるのかもしれない^{2 8} (図 15 A)。

【0278】

Dp 44 mT とのわずか 2 時間のインキュベーションは、結果としてミトコンドリアからの h - c y t c 放出を生じ (図 15 A)、このことは、カスパーゼ - 3、- 8、および - 9 の活性化と同様の時間か、または先立って起きた (図 14 A - C)。特定の作用機序に制限されることを意図した (note) とはいえ、この観察は、Dp 44 mT がアポトーシスのミトコンドリア経路を誘導し、かつ少なくとも一部は、カスパーゼの著しい活性化の原因となることと一致している。

【0279】

(実施例 10 d - Dp 44 mT とのインキュベーション後の M109 細胞における Bcl - 2 および Bax の発現)

アポトーシスのミトコンドリア経路における Bcl - 2 および Bax の役割、および h - c y t c 放出におけるそれらの役割を考慮して^{8、11、12}、これらの分子のタンパク質レベルに対する Dp 44 mT (1 μ M) の影響が査定された (図 15 B)。Dp 44 mT (1 μ M) とのインキュベーション後、抗アポトーシス分子、Bcl - 2 は時間の関数として徐々に減少し、2 および 48 時間のインキュベーションの後では、各々 0 時間の時点での 69% および 37% まで減少した (図 15 B)。反対に、Bax 発現は、Dp 44 mT との 48 時間のインキュベーションの後にのみ著しく増加し、0 時間の時点で見られるものの 500% に達した (図 15 B)。

【0280】

10

20

30

40

50

2時間以内に観察されたh-cyt cの放出(図15A)は、ミトコンドリアからのh-cyt c放出を妨げることに関係づけられる⁸、ミトコンドリアのBcl-2発現における減少と合致していた(図15B)。しかしながら、h-cyt c放出およびカスパーゼ活性化に役割を果たす⁸ Baxの発現の著しい増加は、48時間後に見られたにすぎない(図15B)⁸。Bcl-2およびBax発現の不均衡は、結果として、別の条件下に見出されるような、ミトコンドリアのh-cyt c放出を生じたのかもしれない⁸。ミトコンドリアからのh-cyt c流出を考慮すれば、先の研究は、オキシダントストレスが、その放出、ならびにBcl-2のダウンレギュレーション、プロアポトーシスタンパク質(たとえば、Bax)のアップレギュレーション、およびカスパーゼ活性化の強力な誘導物質であることを証明している^{2,7}。

10

【0281】

(実施例10e-Dp44mTとのインキュベーション後の細胞内のロス発生の増加)
細胞内の活性酸素種(ROS)アッセイ

細胞内のROS発生は、細胞透過性色素、2',7'-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート(DCF-DA)(シグマ)を用いて査定された。DCF-DAは容易に細胞内へ拡散し、 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 、または $OH\cdot$ によって酸化されると高度に蛍光性になる^{2,9}。細胞の蛍光強度は、細胞内ROSのレベルに正比例する^{2,9}。M109細胞(1×10^5 細胞/ウエル)は、 $1 \mu M$ のDp44mTを用いるかまたは用いずに0~48時間にわたり、あるいは $50 \mu M$ の H_2O_2 (ポジティブ対照)とともに37°Cにおいて10分間インキュベートされた。細胞は次に、DCF-DA($5 \mu M$)とともに37°Cにおいて20分間インキュベートされ、2回洗浄され、培養プレートから剥離された。細胞内で酸化されたDCFの蛍光は、フローサイトメトリーを用いて測定された^{2,9}。

20

【0282】

ミトコンドリアからのh-cyt c放出の誘導(図15A)およびBcl-2/Bax発現の不均衡(図15B)が、ROSの存在によるものであったかどうかを調べるため、 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 、または $OH\cdot$ によって酸化されると蛍光性になるDCFH-DAプローブを用いたフローサイトメトリーにより、細胞内のROSが測定された^{2,9}。M109細胞の、Dp44mT($1 \mu M$)とのインキュベーションは、酸化されたプローブのレベルを時間の関数として増加した。2時間後、酸化されたDCFH-DAの蛍光において、0時間の時点に比較して $25 \pm 10\%$ の増加が見られ、これは48時間後に $486 \pm 96\%$ まで増加した(図15C)。比較用には、ポジティブ対照、 H_2O_2 ($50 \mu M$)との10分間のインキュベーションが、0時間の時点の $1312 \pm 46\%$ まで蛍光を増大した(図15C)。

30

【0283】

本研究では、ROSの増加はDp44mTとの2時間のインキュベーションの後に検出されており(図15C)、このことはh-cyt c放出と合致する(図15A)。このような観察は、h-cyt c放出の誘導におけるROSの役割と一致するが、他の機構を除外することはできない。

【0284】

引用文献

1. ブラット(Blatt J.)、スタイトリー(Stitely S.)著、「キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)」、1987年、第47巻、p. 1749-1750。
2. チャストン(Chaston TB)、ラブジョイ(Lovejoy DB)、ワッツ(Watts RN)、リチャードソン(Richardson DR)著、「クリニカル・キャンサー・リサーチ(Clin. Cancer Res.)」、2003年、第9巻、p. 402-414。
3. リチャードソン(Richardson, D. R.) & バーンハート(Bernhardt, P.)「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・インオーガニック・ケミストリー(J. Biol. Inorg. Chem.)」、1999年、第4巻、p. 266-273。
4. サルニコウ(Salnikow, K.)、スー(Su, W.)、ブラゴスクロニー(Blagosklonny, M. V.)、およびコスタ(Costa, M.)著、「キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)」

40

50

、2000年、第60巻、p. 3375 - 3378。

5. カーディスタニ (Kurdistani, S. K.)、アリズチ (Arizti, P.)、レイマー (Reimer, C. L.)、スーグラー (Sugrue, M. M.)、アーロンソン (Aaronson, S. A.)、およびリー (Lee, S. W.) 著、「*キャンサー・リサーチ (Cancer Res.)*」、1998年、第58巻、p. 4439 - 4444。

6. バンディオパディアイ (Bandyopadhyay S)、パイ (Pai SK)、グロス (Gross SC)、ヒロタ (Hirota S)、ホソベ (Hosobe S)、ミウラ (Miura K)、サイトウ (Saito K)、コメス (Commes T)、ハヤシ (Hayashi S)、ワタベ (Watabe M)、ワタベ (Watabe K) 著、「*キャンサー・リサーチ (Cancer Res.)*」、2003年、第63巻、p. 1731 - 6。

10

7. シモノ (Shimono, A.)、オクダ (Okuda, T.)、コンドー (Kondho, H.) 著、「*メカニズムズ・オブ・ディベロプメント (Mech Devel.)*」、1999年、第83巻、p. 39 - 52。

8. リム (Lim MLR)、ラム (Lum M-G)、ハンセン (Hansen TM)、ロウコウ (Roucou X)、ナグリー (Nagley) 著、「*ジャーナル・オブ・バイオメディカル・サイエンス (J Biomed Sci.)*」、2002年、第9巻、p. 488 - 506。

9. コーエン (Cohen GM.) 著、「*バイケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)*」、1997年、第326巻、p. 1 - 16。

10. バディハージョ (Budihardjo I)、オリバー (Oliver H)、ラター (Lutter M)、ルオ (Luo X)、ワン (Wang X) 著、「*アニュアル・レビュー・オブ・セル・ディベロップメンタル・バイオロジー (Annu Rev Cell Dev Biol.)*」、1999年、第15巻、p. 269 - 290。

20

11. クラック (Kluck RM)、ボシイ - ウェツェル (Bossy-Wetzel E)、グリーン (Green DR)、ニューメイヤー (Newmeyer DD) 著、「*サイエンス (Science)*」、1997年、第275巻、p. 1132 - 1136。

12. ジャゲンスマイア (Jurgensmeier JM)、シエ (Xie Z)、デヴロー (Deveraux Q)、エレビー (Ellerby L.)、ブレデセン (Bredesen D)、リード (Reed JC) 著、「*プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc Natl Acad Sci USA)*」、1998年、第95巻、p. 4997 - 5002。

13. バッキ (Bacchi, A.)、カーセリ (Carcelli M.)、コスタ (Costa, M.)、ペラガッティ (Pelagatti P.)、ペリッツィ (Pelizzi C.)、ペリッツィ (Pelizzi G.) 著、「*ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティ・ダルトン・トランス (J. Chem. Soc. Dalton Trans.)*」、1996年、第22巻、p. 4239 - 4244。

30

14. ジョンソン (Johnson, D. K.)、マーフィ (Murphy, T. B.)、ローズ (Rose NJ)、グッドウィン (Goodwin WH)、ピッカート (Pickart L.) 著、「*インオーガニク・ケミ (Inorg Chim Acta)*」、1982年、第67巻、p. 159 - 162。

15. プロート (Broto, P.)、モロー (Moreau, G.)、& ヴァンダイク (Vandycke, C.) 著、「*ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ケミストリー・キミカ・テオレティカ (Eur. J. Med. Chem. Chim. Theor.)*」、1984年、第19巻、p. 71 - 78。

16. ゴース (Ghose, A. K.) & クリッペン (Crippen, G. M.) 著、「*ジャーナル・オブ・ケミカル・インフォメーション・アンド・コンピュータ・サイエンス (J. Chem. Inf. Comput. Sci.)*」、1987年、第27巻、p. 21 - 35。

40

17. ビシュバナダハン (Viswanadhan V. N.)、チョーズ (Chose, A. K.)、レイバンカー (Revankar, G. R.) & ロビンス (Robins, R. K.) 著、「*ジャーナル・オブ・ケミカル・インフォメーション・アンド・コンピュータ・サイエンス (J. Chem. Inf. Comput. Sci.)*」、1987年、第29巻、p. 163 - 172。

18. リチャードソン (Richardson, D. R.)、トラン (Tran, E.) & ポンカ (Ponka, P.) 著、「*ブラッド (Blood)*」、1995年、第86巻、p. 4295 - 4306。

19. シーリグ (Selig RA)、ホワイト (White L)、グラマシヨ (Gramacho C)、スターリングレビス (Sterlinglevis K)、フラスター (Fraster IW)、ネドー (Naidoo D

50

- 著、「*Cancer Res.*」、1998年、第58巻、p. 473 - 478。
20. フィンチ (Finch RA)、リウ (Liu M-C)、グリル (Grill SP) 著、「*Biochem Pharmacol.*」、2000年、第59巻、p. 983 - 991。
21. ミュルナー (Mullner, E. W.)、ニューパート (Neupert, B.)、キューン (Kuhn, L. C.) 著、「*Cell*」、1989年、第58巻、p. 373 - 382。
22. アブード (Abboud, S.) & ハイル (Haile, D. J.) 著、「*J. Biol. Chem.*」、2000年、第275巻、p. 19906 - 19912。 10
23. ダーネル (Darnell, G.) & リチャードソン (Richardson, D. R.) 著、「*Blood*」、1999年、第94巻、p. 781 - 791。
24. ベッカー (Becker) & リチャードソン (Richardson, D. R.) 著、「*J. Lab. Clin. Med.*」、1999年、第134巻、p. 510 - 521。
25. ヴァームズ (Vermes I)、ハーネン (Haanen C)、ステッフエンズ・ナッケン (Steffens-Nakken H)、ロイトリングシュベルガー (Reutelingsperger C) 著、「*J Immunol Methods*」、1995年、第184巻、p. 39 - 51。
26. ガブリエリ (Gavrieli Y)、シャーマン (Sherman Y)、ベン・セイソン (Ben-Sasson SA) 著、「*J Cell Biol.*」、1992年、第119巻、p. 493 - 501。 20
27. ユアン (Yuan J)、マレル (Murrell GA)、トリケット (Trickett A)、ワン (Wang MX) 著、「*Biochim Biophys Acta*」、2003年、第1641巻、p. 35 - 41。
28. ジェマーソン (Jemmerson R)、ラプランテ (LaPlante B)、トゥリーフル (Treful A) 著、「*Cell Death & Differentiation*」、2002年、第9巻、p. 538 - 548。
29. ワン (Wang M)、ウェイ (Wei AQ)、ユアン (Yuan J)、トリケット (Trickett A)、クノープス (Knoops B)、マレル (Murrell GAC) 著、「*FEBS Lett.*」、2002年、第532巻、p. 359 - 362。 30
30. エルダイリー (El-Deiry, W. S.)、トキノ (Tokino TI)、ヴェルカレスク (Veruculescu V. E.)、レヴィ (Levy, D. B.)、パーソンズ (Parsons, R.)、トレント (Trent, J. M.)、リン (Lin, D.)、マーサー (Mercer, W. E.)、キンズラー (Kinzler, K. W.)、フォージェルスタイン (Vogelstein, B) 著、「*Cell*」、1993年、第75巻、p. 817 - 825。

【図面の簡単な説明】

【0285】

【図1】(A) 使用された番号づけ方法を示している一般的な化合物の構造である。(B) DFO、311、および Triapine (登録商標) の構造；(c) 比較用 PCIH および QCIH 化合物の一般構造。 40

【図2】(A) 代表的な DpT 類似体の構造；DpT、Dp2mT、Dp4mT、Dp44mT、Dp4eT、Dp4aT、および Dp4pT を含む。(B) 代表的な PKIH 類似体の構造；PKIH、PKTH、PKPH、PKAH、PKHH、PKBH、PK44pH、および PKoctH を含む。

【図3】プレラベルされた SK-N-MC 神経上皮腫細胞からの ^{59}Fe 動員に対するキレート化剤の影響についての棒グラフである。(A) PKIH および PCIH 類似体の比較；(B) QCIH および PCIH 類似体の比較。結果は、行なわれた二つの実験のうちの一つの典型的な一つの実験における3つの反復測定の前平均値 \pm SD として表されている。

【図4】SK-N-MC 神経上皮腫細胞による ^{59}Fe -トランスフェリン (^{59}Fe - 50

Tf)からの ^{59}Fe 取込みに対するキレート化剤の影響の棒グラフである。(A)PKIHおよびPCIH類似体の比較; (B)QCIHおよびPCIH類似体の比較。結果は、行なわれた二つの実験のうちの典型的な一つの実験における3つの反復測定の平均値 \pm SDとして表されている。

【図5】(A)細胞の ^{59}Fe 動員および(B) ^{59}Fe -トランスフェリン(^{59}Fe -Tf)からの内在化された ^{59}Fe 取込み、についてPCTHに対して比較されたPKIH類似体の濃度の影響の線グラフである。結果は、行なわれた二つの実験のうちの典型的な一つの実験における3つの反復測定の前平均値 \pm SDとして表されている。

【図6】MRC-5線維芽細胞(F)に対して比較したSK-N-MC神経上皮腫細胞(N)の増殖に対する各PKIH類似体、デスフェリオキサミン(DFO)、および2-ヒドロキシ-1-ナフチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン(311)の影響の線グラフである。各データポイントは、各実験における二つの反復測定を用いた、3つの別個の実験の平均値を表す。

【図7】RKIHシリーズのFeキレート化剤のメンバーは、SK-N-MC神経上皮腫細胞種におけるWAF1およびGADD45のmRNA発現を著しく増大する。PKIH類似体の影響が、DFO、311、およびPCIHシリーズのいくつかのキレート化剤に対し比較されている。(A)(i)アガロースゲルのエチジウムブロマイド染色、(ii)GADD45、(iii)WAF1、および(iv)-アクチンmRNAレベル; (B)-アクチンの負荷対照に対しノーマライズされた(A)の結果のデンシトメトリー分析。全RNAは、培地のみ(対照)か、またはDFO(100 μM)または他のキレート化剤(25 μM)を含有する培地を用いた、37 $^{\circ}\text{C}$ における20時間のインキュベーションの後細胞から抽出された。ノーザンブロッティングは、標準的な方法(実施例6参照)を用いて行なわれた。例示された結果は、行なわれた3つの実験からの典型的な一つの実験である。

【図8】PKIH類似体は、SK-N-MC神経上皮腫細胞における鉄調節タンパク質(IRP)-RNA結合活性を増大する。(A)活発なIRP-RNA結合活性; (B)(A)の結果のデンシトメトリー分析。PKIH類似体の影響は、内部対照(すなわち、DFO、311、PCBBH、およびPCH)として作用するいくつかのキレート化剤、およびFe供与体、クエン酸アンモニウム鉄(FAC)に対しても比較された。細胞はDFO(100 μM)、FAC(100 $\mu\text{g/ml}$)、および残りのキレート化剤(25 μM)とともに37 $^{\circ}\text{C}$ において20時間インキュベートされた。IRP-RNA結合能は、次にゲル遅延アッセイにより、通常の技術を用いて査定された。例示された結果は、行なわれた3つの実験からの典型的な一つの実験である。

【図9】X線結晶学により測定されたPKIHの結晶構造であり、30%の熱振動楕円体および水の溶媒和を示している。

【図10】DpTおよび311(内部対照)は、正常でないMRC-5線維芽細胞(F)に比較して、正常なSK-N-MC神経上皮腫細胞(S)に対し、選択的な抗増殖活性を示す。細胞は化合物(0~25 μM)の存在または非存在下に、37 $^{\circ}\text{C}$ において72時間インキュベートされた。このインキュベーションの後、MTTアッセイを用いて細胞密度が測定された。各データポイントは、行なわれた少なくとも3~5実験のうちの典型的な一つの実験の平均値を表す。

【図11】DFOおよび311に対して比較されたDpT類似体の、SK-N-MC神経上皮腫細胞およびM109細胞における ^{59}Fe -トランスフェリン(^{59}Fe -Tf)からの ^{59}Fe 動員および細胞の ^{59}Fe 取込みに対する影響。(A)プレラベルされたSK-N-MC神経上皮腫細胞からの ^{59}Fe 動員に対するキレート化剤の影響。(B)SK-N-MCによる ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの防止におけるキレート化剤の影響。(C)プレラベルされたM109細胞からの ^{59}Fe 動員に対するキレート化剤の、キレート化剤濃度の関数としての影響。(D)M109細胞による ^{59}Fe -Tfからの ^{59}Fe 取込みの防止におけるキレート化剤の、キレート化剤濃度の関数としての影響。結果は、行なわれた3つの実験のうちの典型的な一つの実験における3つの反復測定

10

20

30

40

50

の平均値 \pm S Dとして表されている。

【図12】(A) D p 4 4 m T および、かなりの程度に T r i a p i n e (登録商標) は、5日間の治療レジメンの後、マウスの M 1 0 9 肺癌の増殖を著しく低減しており、また (B) は、T U N E L アッセイにより判定された (i) 媒体対照または (i i) D p 4 4 m T の注射後の腫瘍におけるアポトーシスの誘導である。

【図13】(A) キレート化剤濃度および (B) インキュベーション時間の関数としての、M 1 0 9 細胞のアポトーシスまたは壊死 / 後期アポトーシスに対する D p 4 4 m T の影響。(A) M 1 0 9 細胞は、0 ~ 2 5 0 μ M の D p 4 4 m T とともに 3 7 において 2 4 時間インキュベートされた。細胞のアポトーシスまたは壊死 / 後期アポトーシスは、各々 アネキシン V - F I T C および P I 染色により測定された (詳細は材料および方法を参照)。(B) M 1 0 9 細胞は、様々なインキュベーション時間 (0 ~ 4 8 時間) にわたり、D p 4 4 m T (1 μ M) で処理された。細胞のアポトーシスおよび壊死 / 後期アポトーシスは (A) に記述されたように測定された。データプロットは、3つの別個の実験の平均 \pm E S M である。

10

【図14】細胞透過性カスパーゼ阻害剤の不在下 (C) および存在下 (D) における培養 M 1 0 9 細胞における、(A、B) 活性カスパーゼ - 3、- 8、および - 9 のタンパク質レベル、および (C、D) カスパーゼ - 3、- 8、および - 9 の活性に対する D p 4 4 m T (1 μ M) の影響。(A) ウェスタンブロッティングにより検出された、D p 4 4 m T 処理後の示された時間におけるカスパーゼ - 3、- 8、および - 9 のレベル (上部パネル)。(B) α -アクチン抗体は、等しいタンパク質の負荷を確認するべく用いられた (下部パネル)。(C) α -アクチンに対してノーマライズされた、時間の関数としてのカスパーゼ - 3、- 8、および - 9 発現についてのデンシトメトリー分析 (C) 0 ~ 4 8 時間の、D p 4 4 m T (1 μ M) により誘導されたカスパーゼ活性は、0 時間の時点のパーセントとして表された。(D) カスパーゼ - 3、- 8、および - 9 の、1 μ M の細胞透過性阻害剤は、D p 4 4 m T (1 μ M) と 4 8 時間インキュベートされた場合、これらの酵素の活性化を防止した。結果は、別個の 3 つの実験の平均値 \pm S E M である。

20

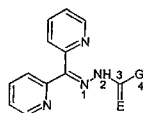
【図15】培養 M 1 0 9 細胞における D p 4 4 m T (1 μ M) の：(A) サイトゾルおよびストロマのミトコンドリア膜 (S M M) 分画中のホロチトクローム c (h - c y t c) レベル；(B) B c l - 2 および B a x のミトコンドリアタンパク質レベル；(C) 細胞内 R O S 産生、に対する影響。

30

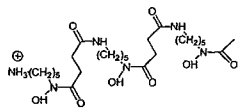
【図16】2 5 μ M において調べられた場合、膜透過性キレート化剤 3 1 1 および高い抗増殖活性および F e キレート化効力をもつ D p 4 4 m T のみが、N d r g 1 タンパク質発現を増大する。M C F - 7 細胞は、2 5 μ M の D F O、3 1 1、ペニシラミン、d p 4 4 m T、d p 2 m T、ジピリジル、L 1、または E D T A とともに、3 7 において 2 4 時間インキュベートされた。N d r g 1 の発現および α -アクチンのタンパク質レベルは、ウェスタンブロッティングにより査定された。結果は、行なわれた 3 つの実験からの典型的な一つの実験である。

【 図 1 】

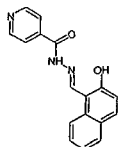
A



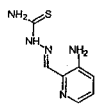
B



DFO

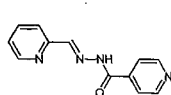


311

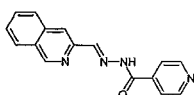


Triapine®

C



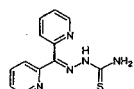
PCIH



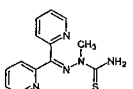
QCIH

【 図 2 】

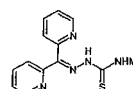
A



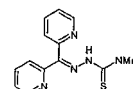
DpT



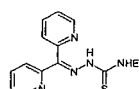
Dp2mT



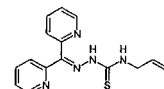
Dp4mT



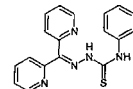
Dp44mT



Dp4eT

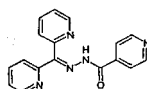


Dp4aT

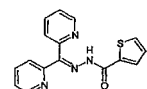


Dp4pT

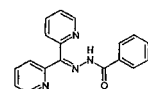
B



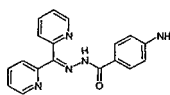
PKIH



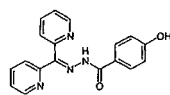
PKTH



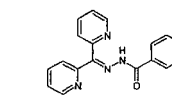
PKPH



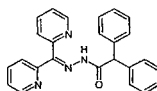
PKAH



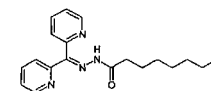
PKHH



PKBH



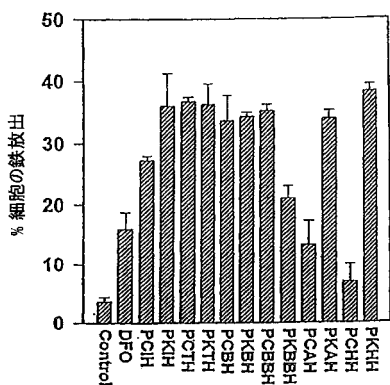
PK44pH



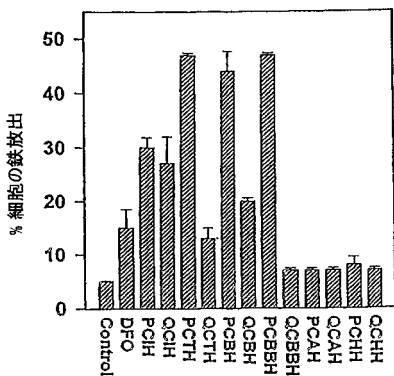
PkocTH

【 図 3 】

A

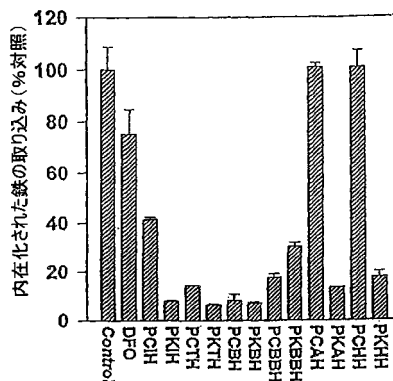


B

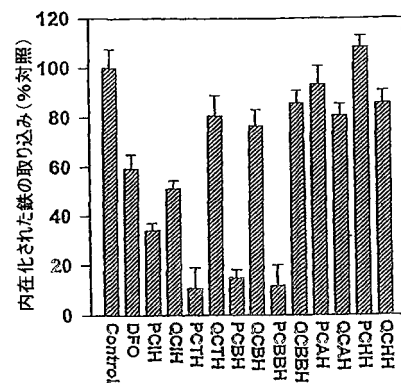


【 図 4 】

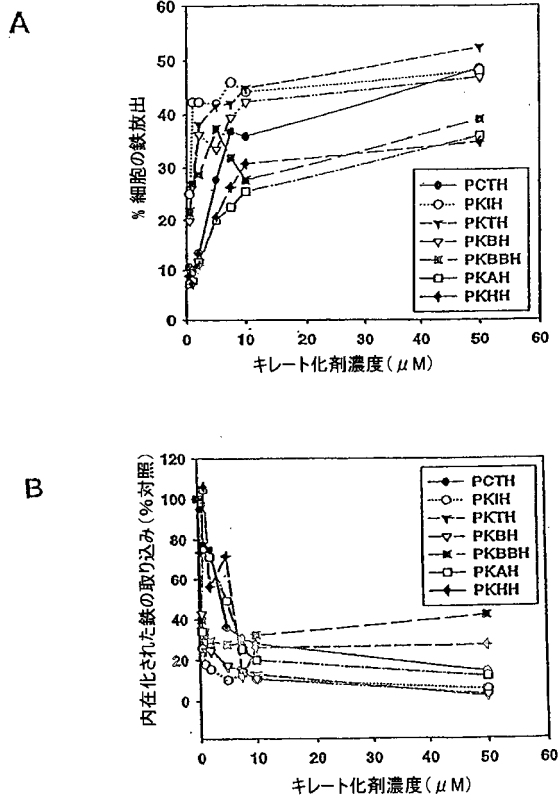
A



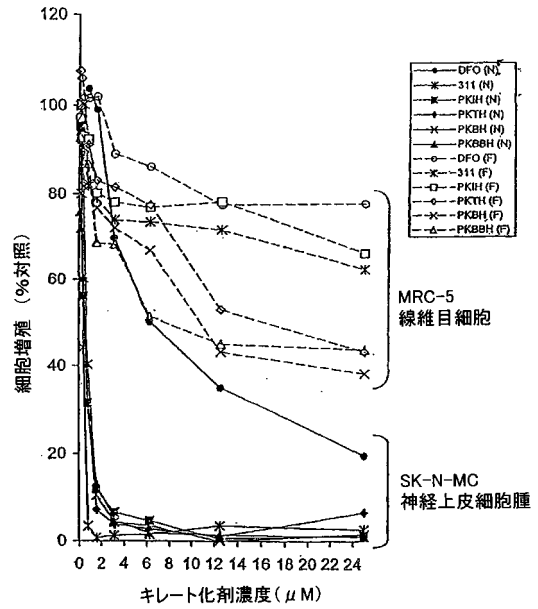
B



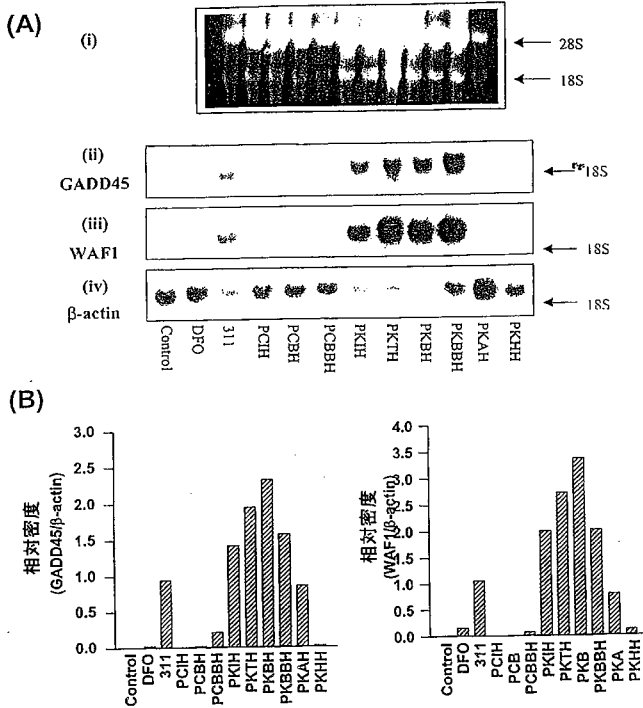
【 図 5 】



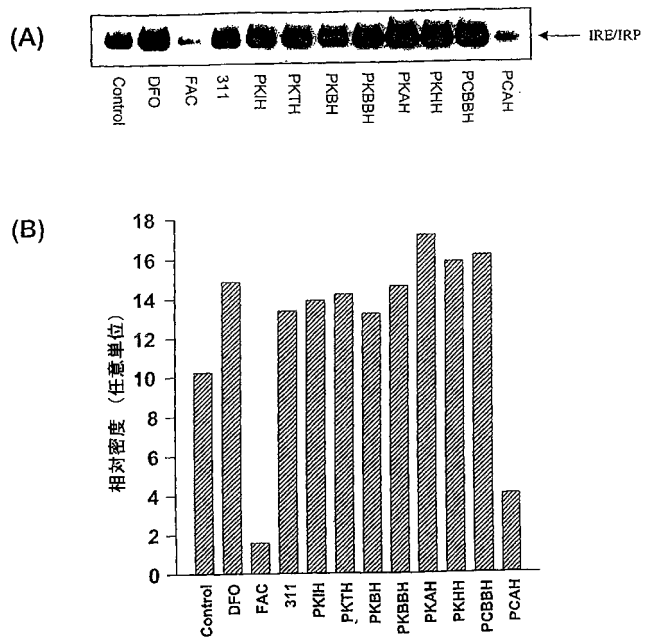
【 図 6 】



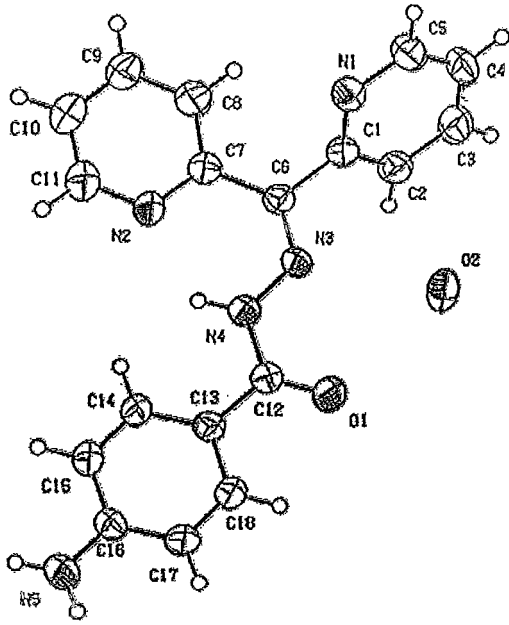
【 図 7 】



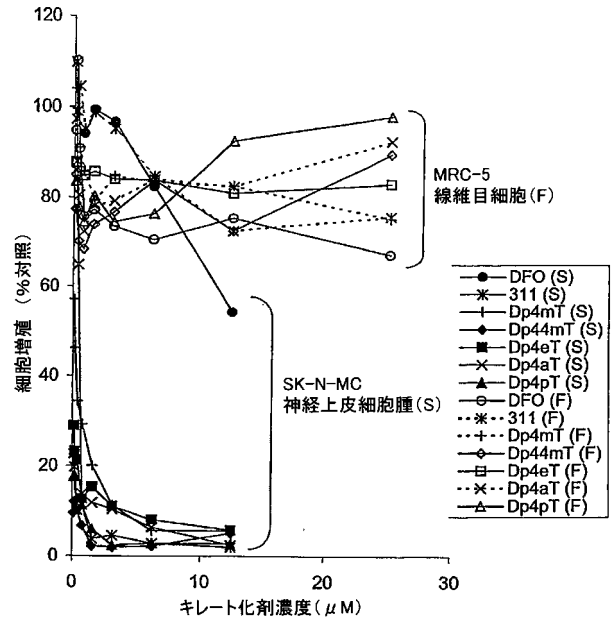
【 図 8 】



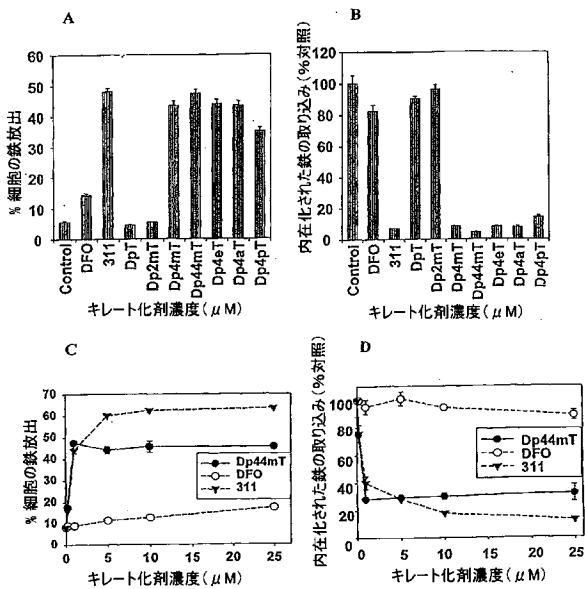
【 図 9 】



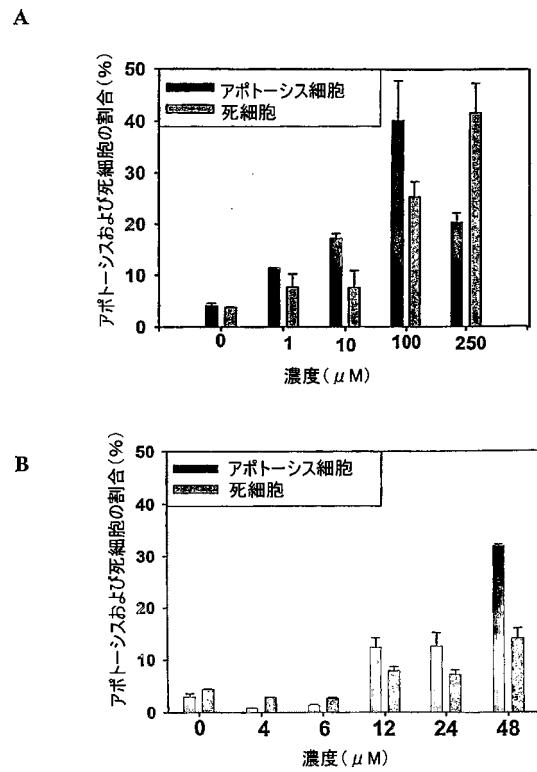
【 図 10 】



【 図 11 】

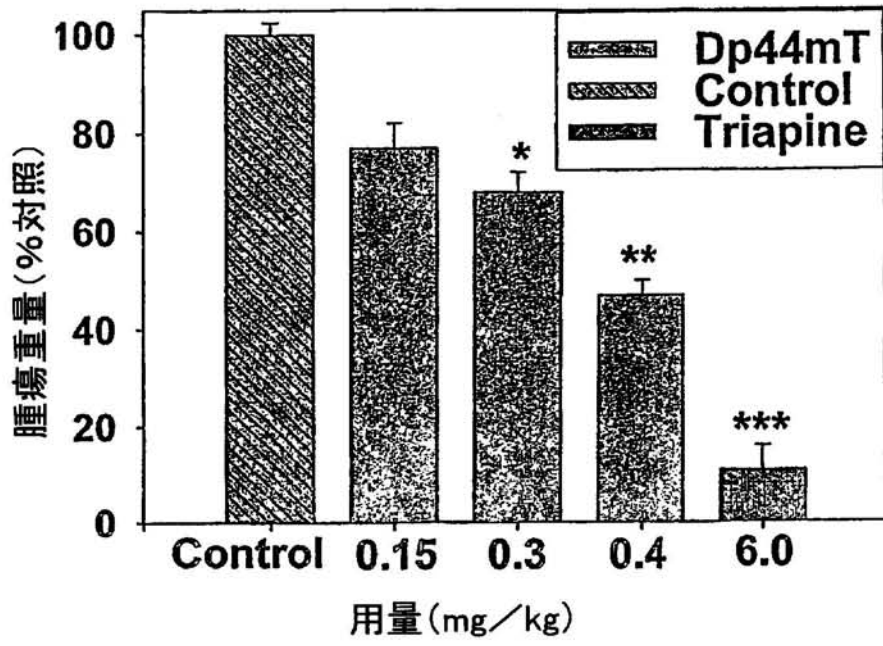


【 図 13 】

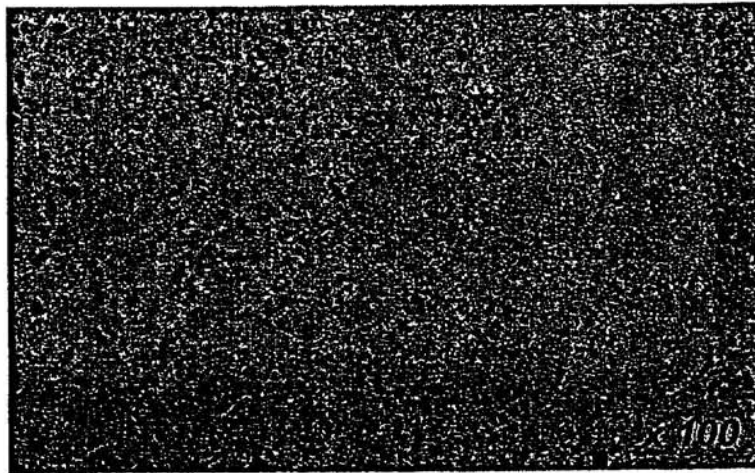


【 図 1 2 】

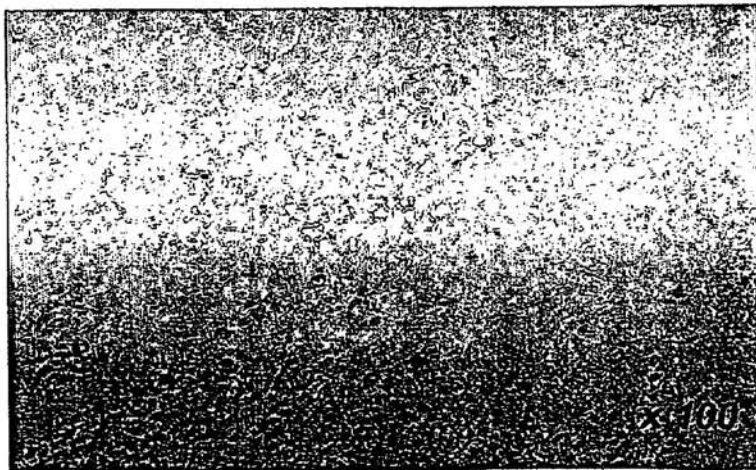
A



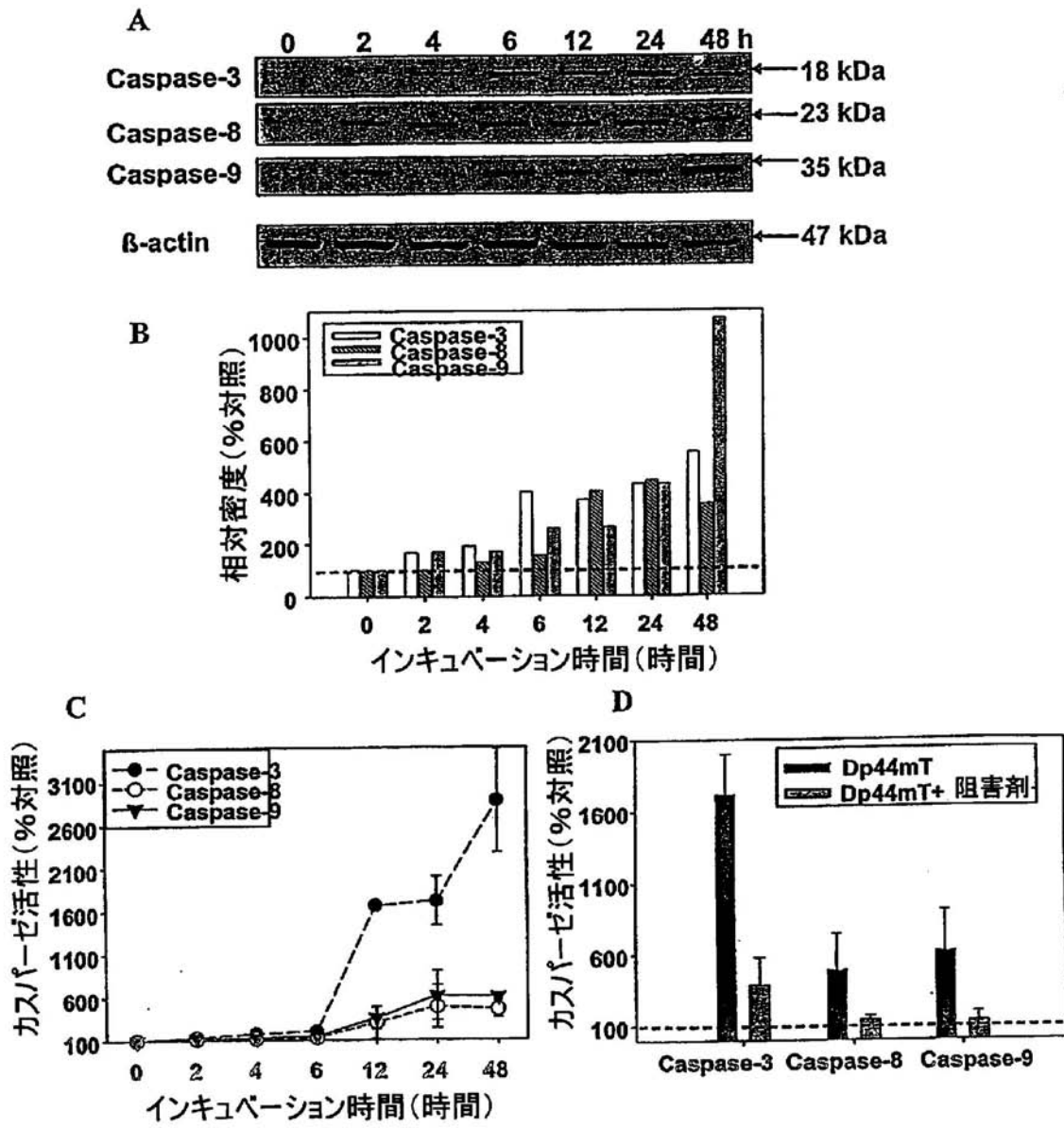
B (i)



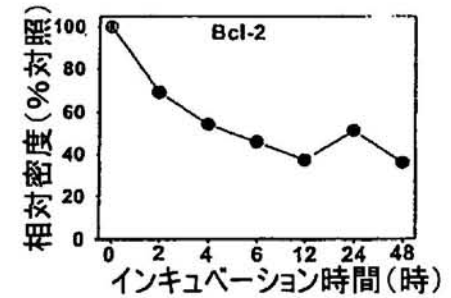
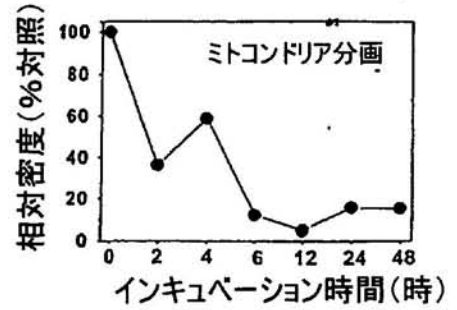
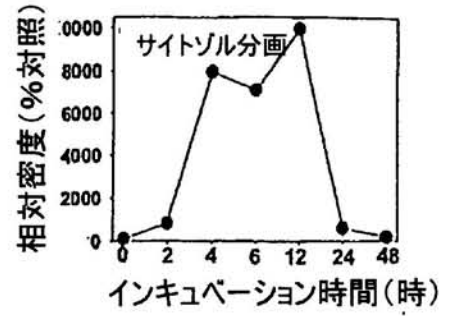
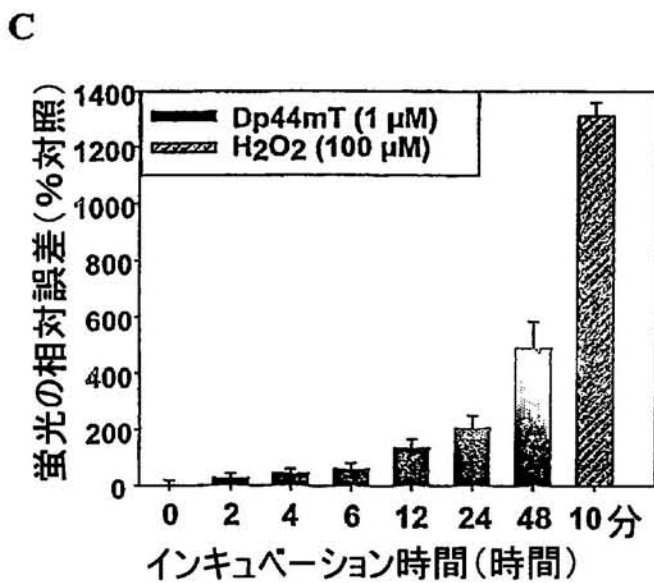
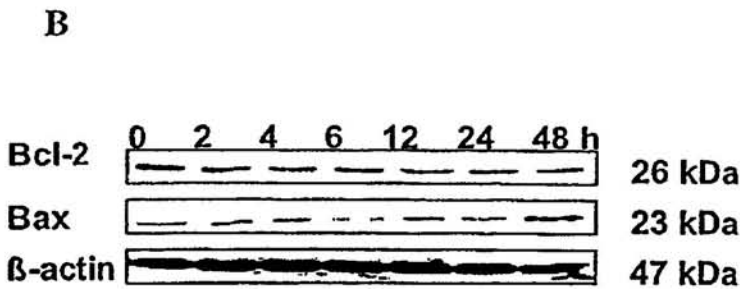
B (ii)



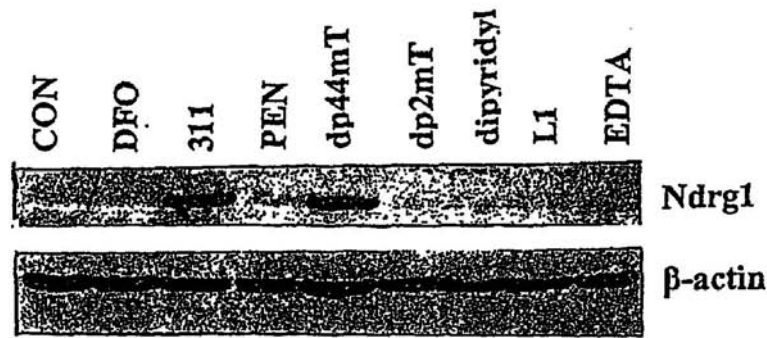
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【図 16】



【手続補正書】

【提出日】平成16年12月6日(2004.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

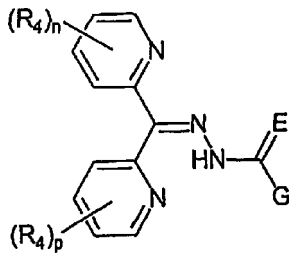
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

式3:

【化1】



式3

[式中、

EはOまたはSであり；

nは0、1、2、3、または4であり、

pは0、1、2、3、または4であり、さらに

各R₄は独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、-O-アルキル、-S-アルキル、-C(O)-アルキル、-C(O)-アルケニル、-C(O)-O-アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれ、さらに

-GはNR₂R₃またはCR₂R₃R₅であって、

CとR₅の間の結合は単結合、二重結合、または三重結合でよく；CとR₅の間の結合が二重結合である場合は、R₂およびR₃の一方がなく、CとR₅の間の結合が三重結合である場合は、R₂およびR₃の双方がなく；

R₂およびR₃は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基から選ばれ；

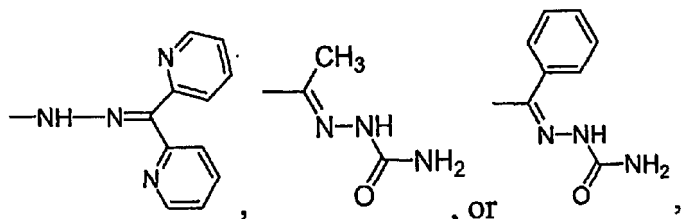
R₅は水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された複素芳香族、任意に置換された二環基、および任意に置換された芳香族基からなる群より選ばれ；

あるいは - G は、任意に置換された複素芳香族基、任意に置換された二環基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基；任意に置換されたシクロアルキル基、または任意に置換されたヘテロシクロアルキル基であって；

(i) E が O であり、n が 0 であり、かつ p が 0 のとき、

- G は、- NH₂；- CH₂Cl；2 - フラニル；2 - チオフェニル；フェニル；2 - ハロフェニル；3 - ハロフェニル；4 - ハロフェニル；これにおいてハロゲン は F、Cl、Br、または I であり；2 - アミノフェニル；4 - アミノフェニル；2 - ヒドロキシフェニル；4 - ヒドロキシフェニル；2 - ピリジル；4 - ピリジル；

【化 2】

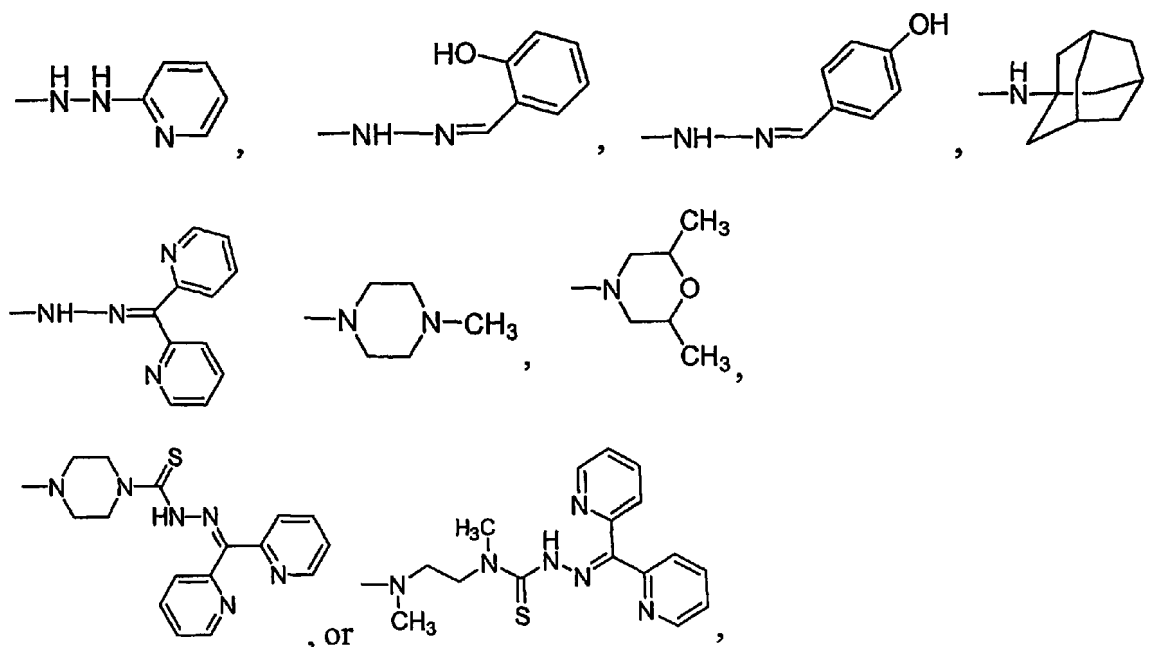


ではなく；かつ

(ii) E が S であり、n が 0 であり、かつ p が 0 のとき、

- G は、- NH₂、- NHCH₃；- NHフェニル；- NH(ベンジル)；- NH(ベンジル)₂；- NH(2 - ピリジル)；- NH - CH₂ - (2 - ピリジル)；- N(C₁₋₆アルキル)₂；- N - ピロリジニル；- N - ピペリジニル；- N - モルフォリニル；2 - チオフェニル；2 - フラニル；2 - ヒドロキシフェニル；

【化 3】



ではないという条件つきである] の化合物。

【請求項 2】

n が 1 または 2 であり、各 R₄ が独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、任意に置換されたアミノ、ヒドロキシル、- O - アルキル、- S - アルキル、ニトロ、およびシアノから選ばれる、請求項 1 の化合物。

【請求項 3】

E が S であり；- G が、任意に置換された複素芳香族基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基；および NR₂、R₃ から選ばれ、R₂ および R₃ は同じかまたは異なってよく、独立して水素、アルキル、アルケニル、および任意に置換された芳香

族基から選ばれる、請求項 1 の化合物。

【請求項 4】

E が O であり；かつ G が、任意に置換された 5 - または 6 - 員の複素芳香族基、任意に置換された芳香族基、任意に置換されたアルキル基、任意に置換されたヘテロシクロアルキル基、および NR_2 、 R_3 から選ばれ、 R_2 および R_3 は同じかまたは異なってよく、独立して水素、アルキル、アルケニル、および任意に置換された芳香族基から選ばれる、請求項 1 の化合物。

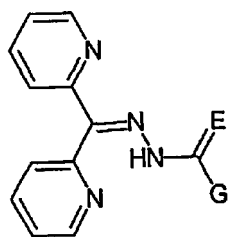
【請求項 5】

前記任意の置換基の各々が、独立して C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{2-6} アルキニル、 C_{6-10} アリール、ハロゲン、アミノ、ヒドロキシル、O - アルキル、S - アルキル、ニトロ、シアノ、 $\text{C}(\text{O})$ - アルキル、 $\text{C}(\text{O})$ - O - (C_{1-6} アルキル)、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{C}_{1-6}$ アルキル)、および $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ から選ばれる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項の化合物。

【請求項 6】

前記化合物が、式 4：

【化 4】



式 4

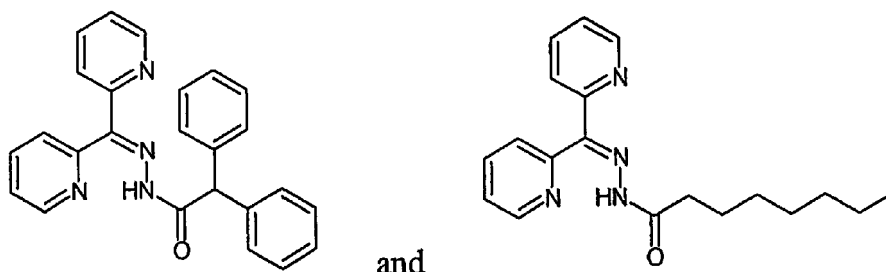
[式中、

E は O または S であり；かつ

G は、条件 (i) および (i i) を含めて請求項 1 に定義された通りである] の化合物である、請求項 1 の化合物。

【請求項 7】

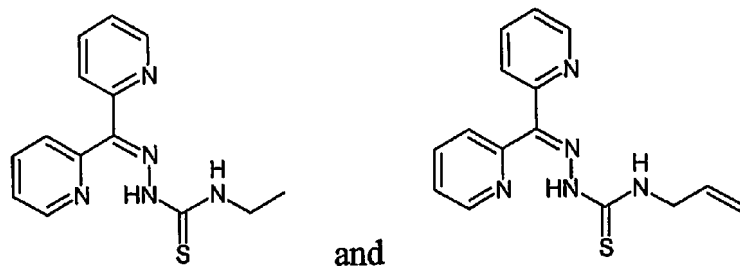
【化 5】



から選ばれる化合物。

【請求項 8】

【化6】



から選ばれる化合物。

【請求項9】

前記金属イオンが、鉄、銅、亜鉛、パラジウム、白金、およびガリウムから選ばれる、条件(i)および(ii)を満たす若しくは満たさない、請求項1～8のいずれか1項の化合物の金属イオン錯体。

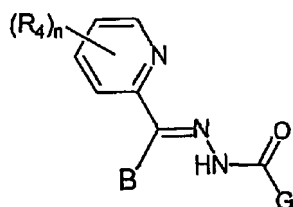
【請求項10】

前記金属イオンが、鉄(III)および鉄(II)から選ばれる、請求項9の金属イオン錯体。

【請求項11】

式

【化7】

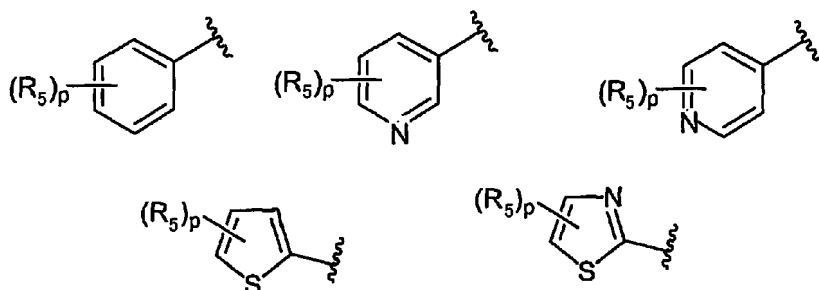


[式中、

n は0、1、2、3および4から選ばれる整数であり；

B は、

【化8】



からなる群より選ばれ、かつ、

各 R_4 および R_5 は同じかまたは異なってよく、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、-O-アルキル、-S-アルキル、-C(O)-アルキル、-C(O)-アルケニル、-C(O)-O-アルキル、任意に置換されたアミノ、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

p は0、1、2、3、4、および5から選ばれる整数であり；

G は、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテ

ロアリール、および NR_2 、 R_3 からなる群より選ばれ；

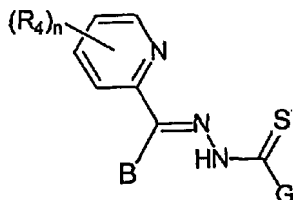
R_2 および R_3 は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換された芳香族基、および任意に置換された複素芳香族基から選ばれる] を有する

化合物。

【請求項 1 2】

式

【化 9】

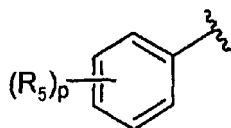


[式中、

n は 0、1、2、3 および 4 から選ばれる整数であり；

B は、

【化 1 0】



であり、

各 R_4 および R_5 は同じかまたは異なってよく、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、 $-\text{O}-$ アルキル、 $-\text{S}-$ アルキル、 $-\text{C}(\text{O})-$ アルキル、 $-\text{C}(\text{O})-$ アルケニル、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ アルキル、任意に置換されたアミノ、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

p は 0、1、2、3、4、および 5 から選ばれる整数であり；

G は、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、および NR_2 、 R_3 からなる群より選ばれ；

R_2 は、水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、およびヘテロアリールからなる群より選ばれ、

R_3 は、アルケニル、シクロアルケニル、またはアルキニルであり；

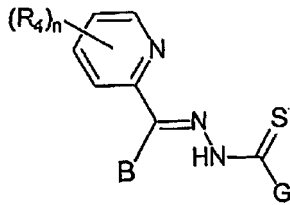
p が 0 であり、 G が NR_2 、 R_3 であり、かつ R_2 が H であるとき、 R_3 は、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、または置換または未置換のシクロヘキセニルではなく；かつ

G がヘテロシクロアルキルまたはヘテロアリールであるとき、ヘテロシクロアルキル基またはヘテロアリール基は N -ヘテロ原子を介して $\text{C}=\text{S}$ に付着されない、という条件つきである] を有する化合物。

【請求項 1 3】

式

【化11】

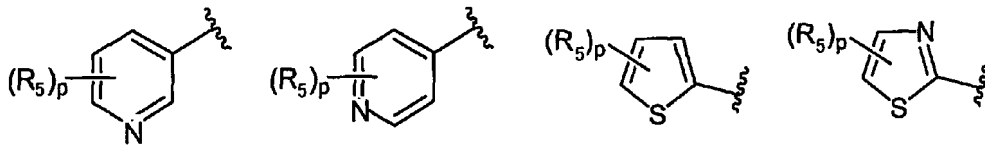


[式中、

n は 0、1、2、3 および 4 から選ばれる整数であり；

B は、

【化12】



から選ばれ、

各 R_4 および R_5 は同じかまたは異なってよく、独立してハロゲン、アルキル、アルケニル、 $-O-$ アルキル、 $-S-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルキル、 $-C(O)-$ アルケニル、 $-C(O)-O-$ アルキル、任意に置換されたアミノ、ニトロ、およびシアノから選ばれ、

p は 0、1、2、3、4、および 5 から選ばれる整数であり；

G は、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたヘテロシクロアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、および NR_2 、 R_3 からなる群より選ばれ；

R_2 および R_3 は同じかまたは異なってよく、独立して水素、ハロゲン、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたシクロアルキル、任意に置換されたシクロアルケニル、任意に置換されたアミノ、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリールから選ばれ；

(i) B が 3-ピリジルまたは 4-ピリジルであり、 $n = 0$ および $p = 0$ であるとき、G は $NHMe$ または NMe_2 ではなく；かつ

(ii) B が 2-チアゾリニルであり、 $n = 0$ および $p = 0$ であるとき、G は NMe_2 、 NH ブチル、

【化13】

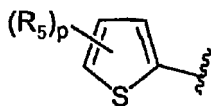


ではない、という条件つきである] を有する化合物。

【請求項14】

B が、

【化 1 4】



である、請求項 1 3 の化合物。

【請求項 1 5】

前記金属イオンが、鉄、銅、亜鉛、パラジウム、白金、およびガリウムから選ばれる、条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項の化合物の金属イオン錯体。

【請求項 1 6】

前記金属イオンが、鉄 (III) および鉄 (II) から選ばれる、請求項 1 5 の金属イオン錯体。

【請求項 1 7】

製薬上許容される希釈剤または担体および、請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物含む製薬組成物。

【請求項 1 8】

製薬上許容される希釈剤または担体および、請求項 9、10、15、または 16 の任意の 1 項による少なくとも一つの金属イオン錯体を含む製薬組成物。

【請求項 1 9】

哺乳類における鉄キレート化療法であって、条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない、治療上有効な量の、請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物が、あるいは条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法。

【請求項 2 0】

哺乳類における鉄過剰症を治療する方法であって、条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない、治療上有効な量の、請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物が、あるいは条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物を製薬上許容される希釈剤、補助剤、または賦形剤と一緒に含む製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法。

【請求項 2 1】

前記鉄過剰症が - サラセミアである、請求項 2 0 の方法。

【請求項 2 2】

細胞増殖を阻害する方法であって、有効な量の、条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない、請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物が、または請求項 9、10、15、または 16 の任意の 1 項による金属イオン錯体が、または、化合物ビス(2-ピリジル)ケトン・チオセミカルバゾンを除いた、請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物と、細胞を接触させることを含む方法。

【請求項 2 3】

哺乳類において増殖性疾患を治療する方法であって、治療上有効な量の、条件 (i) および (ii) を満たす若しくは満たさない、請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による、少なくとも一つの化合物が、または請求項 9、10、15、または 16 の任意の 1 項による金属イオン錯体が、または、化合物ビス(2-ピリジル)ケトン・チオセミカルバゾンを除いた、請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物を、前記哺乳類へ投与することを含む方法。

【請求項 2 4】

前記増殖性疾患が、血管新生依存性疾患、細胞増殖性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、血管疾患、血栓症、および癌から選ばれる、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

前記癌が、悪性腫瘍か、または良性腫瘍である、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 6】

前記癌が、固形腫瘍か、または非固形腫瘍である、請求項 2 4 の方法。

【請求項 2 7】

細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物か、または請求項 9、1 0、1 5、または 1 6 の任意の 1 項による金属イオン錯体か、または請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 2 8】

細胞増殖を阻害し、かつ細胞においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記細胞を、有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物か、または請求項 9、1 0、1 5、または 1 6 の任意の 1 項による金属イオン錯体か、または請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 2 9】

哺乳類においてアポトーシスを誘導する方法であって、前記哺乳類へ、治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物か、または請求項 9、1 0、1 5、または 1 6 の任意の 1 項による金属イオン錯体か、または請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 3 0】

哺乳類においてアポトーシスを誘導しかつ細胞増殖を阻害する方法であって、前記哺乳類へ、治療上有効な量の、条件 (i) および (i i) を満たす若しくは満たさない請求項 1 ~ 8 または 1 1 ~ 1 4 の任意の 1 項による少なくとも一つの化合物か、または請求項 9、1 0、1 5、または 1 6 の任意の 1 項による金属イオン錯体か、または請求項 1 7 または 1 8 の製薬組成物を投与することを含む方法。

【請求項 3 1】

前記鉄錯体が、鉄 (I I) 錯体である、請求項 2 2 ~ 3 0 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 3 2】

前記鉄錯体が、鉄 (I I I) 錯体である、請求項 2 2 ~ 3 0 のいずれか 1 項の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2004/000132

| | |
|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | |
| Int. Cl. ⁷ : C07D 213/53, A61K 31/444 | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | |
| B. FIELDS SEARCHED | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) ELECTRONIC DATABASES SEE BELOW | |
| 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) Chemical Abstracts CAS Online: Restricted Substructure Search Based on Formula 1 and examples | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages |
| X | DE 4207400 A1 (BAYER AG). 16 September 1993. See whole document. |
| X | JP 11-209352 A (NIPPON BAYER AGRICHEM CO LTD). 3 August 1999. See whole document. |
| X | EP 0571857 A1 (BAYER AG). 1 December 1993. See whole document, especially compounds 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59. |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex | |
| * Special categories of cited documents: | "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 |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family |
| "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 | |
| Date of the actual completion of the international search 9 March 2004 | Date of mailing of the international search report 26 MAR 2004 |
| Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929 | Authorized officer STUART BARROW Telephone No : (02) 6283 2284 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2004/000132

| C (Continuation). | | DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|-------------------|--|-------------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | LIBERTA, A. E and WEST, D. X. Antifungal and Antitumor Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones and their Metal Complexes: Current Status. <i>BioMetals</i> . 1992, vol. 5, pages 121-126. See compound HBz4M. | 1, 2, 4-12, 18-34 |
| X | MILLER III, M. C et al. The Cytotoxicity of Copper(II) Complexes of 2-Acetyl-Pyridyl- ⁴ N-Substituted Thiosemicarbazones. <i>Anticancer Res.</i> 1998, vol. 18, pages 4131-4140. See compounds 4-6, 18-22 and 46-61. | 1, 2, 4-12, 18-34 |
| X | FRENCH, F. A. and BLANZ, E. J. The Carcinostatic Activity of Thiosemicarbazones of Formyl Heteroaromatic Compounds. III. Primary Correlation. <i>J. Med. Chem.</i> 1966, vol. 9, pages 585-589. See Table I, entry 5. | 1-15, 18-35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2004/000132

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-13, 18-35
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
A search of the claimed subject matter raised a very large number of potential citations. Therefore, the search was restricted in part to the case where the group A is 2-pyridyl, in keeping with the examples. The search was further restricted to the alleged activity of the compounds. Please note that the list of cited documents is not considered exhaustive.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2004/000132

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent Document Cited in Search Report | | Patent Family Member | | | | | |
|---|----------|----------------------|---------|----|---------|----|---------|
| DE | 4207400 | | | | | | |
| JP | 11209352 | | | | | | |
| EP | 0571857 | BR | 9302091 | DE | 4217723 | JP | 6056779 |
| END OF ANNEX | | | | | | | |

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 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100115107
 弁理士 高松 猛

(74) 代理人 100090343
 弁理士 濱田 百合子

(72) 発明者 リチャードソン、デシ、レイモンド
 オーストラリア国、2171 エヌエスダブリュー、ウェストホクストン、グリーンウェイ パーク、ウェインライト アヴェニュー 575

(72) 発明者 ラブジョイ、デイヴィッド、ベン
 オーストラリア国、2042 エヌエスダブリュー、ニュータウン、アリス ストリート 18 / 104

F ターム(参考) 4C055 AA01 BA02 BA30 BB17 CA01 DA01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC17 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26
 ZC21 ZC37