

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-322610

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

A 6 1 K 31/52

識別記号

A E D

A D U

A D V

F I

A 6 1 K 31/52

A E D

A D U

A D V

// C 0 7 D 4/3/16

C 0 7 D 473/16

審査請求 有 請求項の数6 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号

特願平10-123281

(22) 出願日

平成10年(1998)5月6日

特許法第30条第1項適用申請有り 1997年11月6日~11月7日 開催の「I B Cの細胞サイクル治療に関する第2回国際会議」において文書をもって発表

(71) 出願人 598059000

サイクラセル・リミテッド

Cyclacel Limited

イギリス、エスタブリュー1ワイ・6エヌ

ワイ、ロンドン、ジャーミン・ストリート

67-68番、マーキス・ハウス

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイクリン依存性キナーゼ阻害剤

(57) 【要約】

【課題】 白血病や癌の細胞の増殖を阻害し、該疾患を処置するために、サイクリン依存性キナーゼを創生する。

【解決手段】 化合物2-[ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ ] -6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩を創生し、白血病または癌の患者に投与する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる白血病患者の処置方法。

【請求項2】 2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる癌患者の処置方法。

【請求項3】 白血病または癌がp53非依存性である、請求項1または2の方法。

【請求項4】 2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたは2-([ (1-エチル-2-ヒドロキシエチル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与によりcdk4および/またはcdk7酵素を阻害することを含んでなる癌性または白血病の増殖性疾患を処置する方法。

【請求項5】 2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたは2-([ (1-エチル-2-ヒドロキシエチル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与を含んでなる増殖細胞における細胞死を起こす方法。

【請求項6】 増殖細胞が癌または白血病の細胞である、請求項4または5の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンおよびその薬学的に許容される塩の医療上の用途に関する。

【0002】この化合物は、癌や白血病などの増殖性疾患の処置に特定の利点を有することが分かった。下記するように、特定の利点をもたらす、以前には報告されていない作用メカニズムをこの化合物が有していることが認められた。例えば、このものは、遺伝子転写における変化を引き起こさないで細胞増殖を阻害する、すなわち遺伝子発現の制御に関与しない細胞サイクル制御コントロールシステムのレベルで機能することが認められた。

## 【0003】

【従来の技術】先行技術に、サイクリン依存性キナーゼを阻害することにより細胞サイクルを制御し得るいくつかの化合物が記載されている。これらの化合物には、ブチロラクトン、フラボピリドールおよび2-([ (2-ヒドロキシエチル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-メチルプリン(オロムチン)がある。オロムチンおよび関連化合物はcdc2の阻害剤として知られている。cdc

2(cdk1とも言う)は細胞サイクル制御に関するサイクリン依存性キナーゼのファミリーの触媒性サブユニットである。

【0004】これらのキナーゼは、少なくとも2種のサブユニット、すなわち触媒性サブユニット(cdc2がそのプロトタイプ)および制御性サブユニット(サイクリン)を含む。cdk類は、サイクリンファミリーであるサイクリンA(cdc2, cdk2)、サイクリンB1-B3(cdc2)、サイクリンC(cdk8)、サイクリンD1-D3(cdk2-cdk4-cdk5-cdk6)、サイクリンE(cdk2)、サイクリンH(cdk7)の一つとの一過性結合によって制御される。

【0005】これらの複合体の各々が細胞サイクル相に関与する。cdk活性は、翻訳後修飾、他のタンパク質との一過性結合および細胞内局在の修飾によって制御される。cdk制御剤はアクチベーター(サイクリン、cdk7/サイクリンH、cdc25ホスファターゼ)、p9<sup>cks</sup>およびp15<sup>cdk-BP</sup>サブユニットならびに阻害タンパク質(p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, p18, p27<sup>Kip1</sup>)を含む。

【0006】cdk類およびその制御タンパク質がヒト腫瘍の生長に顕著な役割を演じているとの仮説について、文献上かなりの支持がある。多くの腫瘍において、サイクリン依存性キナーゼの一時的異常発現およびタンパク質阻害剤の主な不制御化(変異、欠失)が認められている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、cdk類の阻害剤を見出し、その化合物により白血病や癌の細胞の増殖を阻害し、該疾患を処置することを課題とする。

【0008】化合物、2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリン(ボヘミン)がcdk2, cdk4およびcdk7の強力なインビボ阻害剤であることを見出した。この特性は、この化合物が増殖組織の細胞増殖を阻害し、健康組織ではそうでなく、そしてさらに増殖細胞におけるアポトーシス(計画された細胞死)をもたらし得るという大きい利点を提供する。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる白血病患者の処置方法に関する。

【0010】さらに本発明は、2-([ (3-ヒドロキシプロピル) アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる癌患者の処置方法に関する。

【0011】さらに実施態様において、本発明は2-  
（〔（3-ヒドロキシプロピル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリンまたは2-  
（〔（1-エチル-2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリン（レスコビチン）またはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与によりcdk4および／またはcdk7酵素を阻害することを含んでなる癌性または白血病の増殖性疾患を処置する方法に関する。

【0012】さらなる実施態様において、本発明は、2-  
（〔（3-ヒドロキシプロピル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリンまたは2-  
（〔（1-エチル-2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与を含んでなる増殖細胞における細胞死を起こす方法に関する。

【0013】2-〔1-エチル-2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリンは投与時に注射部位の周りに組織壊死を起こすのがみられた。この点においてボヘミンはこのような壊死を起こさないで優れている。

【0014】これらの観点および実施態様において、増殖細胞は癌または白血病の細胞であり、癌および白血病は好ましくはp53非依存性である。

【0015】本発明の化合物は塩、特に薬学的に許容される塩として存在し得る。これらの塩は、強力な無機酸、例えば硫酸、リン酸またはヒドロハリック酸ならびに強力な有機カルボン酸、例えばハロゲンなどでの置換または非置換1-4炭素原子のアルカンカルボン酸、例えば酢酸あるいは飽和または不飽和ジカルボン酸、例えばシュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、テレフタル酸あるいはヒドロキシカルボン酸、例えばアスコルビン酸、グリコール酸、乳酸、リンゴ酸、クエン酸あるいはアミノ酸、例えばアスパルギン酸、グルタミン酸あるいは安息香酸ならびに有機スルホン酸、例えばハロゲンなどでの置換または非置換（C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>）アルキルまたはアリールスルホン酸、例えばメタン-またはトリエン-スルホン酸によって生成される。

【0016】本発明はまた、2-（〔（3-ヒドロキシプロピル）アミノ〕-6-ベンジルアミノ）-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩と少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤TOを含む医薬組成物に関する。

【0017】本発明の医薬組成物は、経口、直腸、膣、非経口、筋肉内、腹腔内、皮下、静脈内、鼻または口腔の経路で投与される。

【0018】経口投与について、特定の使用法は、打錠剤、丸剤、錠剤、ゲル剤、滴剤、カプセル剤でなされ

る。これらの組成物において、1回当たりの有効成分の量として1-100mgおよび好ましくは10-40mgを含有する。

【0019】投与の他の形態は、静脈、皮下または筋肉内に投与することができ、かつ無菌または無菌になし得る溶液から製造される液剤である。他の形態として、坐剤、ペッサリー、懸濁液、エマルジョン、ローション、軟膏、クリーム、ゲルおよびスプレーがある。

【0020】注射形態は、1回当たりの有効成分を1-50mg、好ましくは10-30mg含有する。

【0021】組成物は、単位用量形態に、すなわち単位用量または単位用量の多もしくはサブ単位を含有する個別分量の形態に製剤することができる。

【0022】例えば、ヒトに用いられる量には次に対応する。例えば、腫瘍の処置のために10-50mg/日を1回以上患者に投与する。

【0023】

【発明の実施の形態】実施例1：2-〔（3-ヒドロキシプロピルアミノ）-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリン（ボヘミン）の製造

材料および方法

融点をKofierブロックで測定し、修正しなかった。ジメチルスルホキシドおよびアミン類の場合、蒸発を水流ポンプ減圧または回転油性ポンプの下に回転蒸発器で行った。Varian VXR-400（400MHz）またはVarian Unity200（200MHz）で、<sup>1</sup>H NMRスペクトル（ $\delta$ , ppm; J, Hz）を測定した。内標準としてテトラメチルシランを用いて、25℃ですべてのスペクトルを取った。電子衝撃マスマスペクトル（m/z, rel%）は、VG 7070E.スペクトルメーター（70eV, 200℃、直接挿入）、Finnigan MAT 90スペクトルメーター（70eV, 250℃、直接挿入）またはJeol JMS-D100（80eV, 200℃、直接挿入）で測定した。高解像測定は、標準としてUltramarck 1600F（PCR Inc., FL, USA）を用いてピークマッチング法により実施した。機器は解像8,000（10% valley definition）に調整した。赤外スペクトルはKBrディスクとしてFTIR Nicolet 205器に記録した。Merck silica gel Kieselgel 60（230-400mesh）をカラムクロマトグラフィーに用いた。TLCをMerck DC Alufolien Kieselgel 60 F254プレートで実施した。

【0024】6-ベンジルアミノ-2-クロロ-9-イソプロピルプリン（2）

6-ベンジルアミノ-2-クロロプリン（1）（1.32g, 5.08mmol）、炭酸カルシウム（4.3g, 31mmol）およびイソプロピルブロマイド（5.5ml, 58mmol）の乾燥ジメチルスルホキシド35ml中の混合物を一夜激しく攪拌した。反応混合物を減圧で蒸発し、水とエチルアセテートに分配した。有機相

を乾燥し(硫酸ナトリウム)、蒸発せしめた。メタノールから結晶化すると産物2が1.305 g (85%) 得られた。融点181-182℃。

C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>Cl (301.78) について、計算値: 59.70% C, 5.34% H, 23.21% N, 1.75% Cl;

実測値: 59.52% C, 5.36% H, 23.01% N

FTIRスペクトル (cm<sup>-1</sup>): 1713, 1626, 1572, 1537, 1497, 1471, 1456, 1425, 1398, 1355, 1314, 1292, 1255, 1228, 1202.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO): 1.48 d (6H, J=6.8, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 4.57 m (1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.66 bd (2H, J=6.1, CH<sub>2</sub>); 7.19 ft, (1H, J=7.2, J=1.7, H-p); 7.27 dd (2H, J=7.2, H-m); 7.34 dd (2H, J=7.2, J=1.7, H-o); 7.69 s (1H, H-C<sup>8</sup>)

【0025】2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリン(3)

2-クロロ誘導体(2) (0.5 mmol) および3-アミノプロパノール3 mlを160℃に3時間加熱した(密封アンブル)。過剰のアミンを70℃以下の温度で蒸発し、残渣をカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>中、段階的に0; 1; 2% MeOH)で精製し、ジエチルエーテルから結晶化すると82%の収率で産物が得られた。融点98-101℃。

C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O (340.43) について、計算値 63.51% C, 7.11% H, 24.69% N; 実測値: 63.43% C, 7.05% H, 24.60% N。

マスペクトル (Finnigan MAT 90): 341 (21), 340.21 1 0 (M<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O, calc, 340.2012, 100%), 339 (4), 310 (9), 309 (33), 297 (11), 296 (28), 295 (38), 282 (9), 253 (6), 251 (4), 239 (4), 191 (6), 134 (6), 106 (8), 92 (4), 91 (44), 43 (9), 41 (7)。

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1.53 d (6H, J=7, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH); 1.68-1.81 m (2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3.55-3.71 m (4H, CH<sub>2</sub>N + CH<sub>2</sub>O); 4.62 hept (1H, J=7, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.76 bd (2H, J=4.5, CH<sub>2</sub>Ph); 4.96 bt (1H, NHC<sub>2</sub>); 5.10 bs (OH or NH); 6.00 bs (NH, or OH), 7.22-7.38

m (5H, Ph), 7.47 s (1H, H-C<sup>8</sup>)。

【0026】他の合成すなわち6-ベンジルアミノ-2-クロロ-9-イソプロピルプリン(2):

2, 6-ジクロロ-9-イソプロピルプリン

2, 6-ジクロロプリン1 g (5.3 mmol) および粉末炭酸カルシウム2 g (14 mmol) の混合物をDMF 35 ml中で激しく攪拌した。イソプロピルイオダイド3 ml (30 mmol) を5分割して10時間内に加えた。TLC (EtOAc/ヘプタン: 1/1) で反応を監視し、反応がほぼ完了したことを確認した。主な産物をクロマトグラフィーによりヘプタン中、段階的20, 30, 40% EtOAcで単離した。結晶化EtOAc/ペンタン: 収量0.54 g (44%); 融点148-150℃。

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>として、計算値: C, 41.58; H, 3.49; N, 24.25; Cl 30.68。実測値: C, 41.29; H, 3.71, N, 24.01。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1.67 (6H, d, J=6.8, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 4.93 (1H, mt, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 8.67 (1H, s, H-C<sup>8</sup>)。

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 22.74 Qq d (J=128.0, J=4.6, J=4.6), 50.79 Dsep (J=143.4, J=4.4), 132.41 d (J=11.6) 147.67 Dd (J=214.0, J=4.4), 152.24 s, 153.91 s, 154.75 br mt。

【0027】6-ベンジルアミノ-2-クロロ-9-イソプロピルプリン(2)

2, 6-ジクロロ-9-イソプロピルプリン (1 mmol) およびベンジルアミン (3.5 mmol) をn-ブタノール3 ml中攪拌しながら加熱した(3時間、110℃)。反応混合物(n-ブタノールを蒸発した後)を上記と同様に処理して、化合物2を85-90%の収率で得た。

【0028】引用文献

1. Hocart C.H., Letham D.S., Parker C.W.: Phytochemistry 30, 2477 (1991)

【0029】実施例2: 2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンの生物学的活性

2.1 ボヘミンのインビトロ細胞毒性活性

インビトロMTT-アッセイ

概説

比色定量検定を基礎として使用されるパラメーターの1つは、代謝活性である。例えば、現在、テトラゾリウム塩MTTを使用するマイクロタイター検定が細胞増殖および細胞毒性を定量するのに広く使用されている。例えば、この検定は薬剤スクリーニングプログラムおよび化学感受性試験に使用されている。テトラゾリウム塩は代

謝的に活性な細胞によってのみ分解されるので、これらの検定は専ら生存可能細胞を検出するものである。MTT検定の場合、黄色の可溶性テトラゾリウム塩を着色された水不溶性ホルマザン塩へと還元する。それを可溶化した後、生じたホルマザンは、容易かつ迅速に常用のELISA平板リーダーにて570nmで定量できる。還元ホルマザン量は、培養中の生存細胞数に相当する。

#### 【0030】材料

化合物の定型スクリーニングには、ヒトT-リンパ芽球性白血病細胞系列CEM、前骨髄球性白血病HL-60、ヒト乳癌細胞系列MCF-7、子宮頸癌細胞HEL A、マウス繊維芽細胞NIH3T3、マウス不死化骨髄マクロファージB2.4およびB10A.4、P388D1およびL1210白血病、B16およびB16F10黒色腫を使用した。細胞をNunc/Corning 80cm<sup>2</sup>プラスチック組織培養フラスコ内で維持し、細胞培養培地(5g/lグルコース、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清および炭酸水素ナトリウムを含むDMEM)にて培養した。化合物レスコボチン、2-[(1-エチル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンは、WO97/20842に記載のようにして製造した。上記のようにして製造した化合物2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンは、以後、ボヘミンと称する。

#### 【0031】方法

特定の細胞種および予想標的細胞密度(細胞増殖特性に基づき、1ウェル当たり2,500~30,000細胞)に従い製造および希釈した細胞懸濁液をピペット(80μl)にて96ウェルのマイクロタイタープレートに添加した。これを37℃および5%CO<sub>2</sub>で24時間ブレインキュベーションして安定化させた。目的の試験濃縮物の4倍希釈液をゼロ時点で20μlずつマイクロタイタープレートウェルに加えた。普通、試験化合物は6つの4倍希釈液で評価された。定型試験では、最高ウェル濃度は266.7μMであったが、これは薬剤に合わせて変更できる。全ての薬剤濃縮物を2回ずつ試験した。細胞を試験化合物と共に5%CO<sub>2</sub>雰囲気中37℃および湿度100%でインキュベーションすることを72時間続けた。インキュベーション期間が終了すると、細胞をMTTで検定した。MTTストック溶液10マイクロリットルをピペットで各ウェルに加え、更に1~4時間インキュベーションした。このインキュベーション期間後、水中10%SDSの100μl/ウェル(pH=5.5)を添加し、更に37℃で一晩インキュベーションすることにより、ホルマザンを可溶化した。光学密度(OD)は540nmでLabsystem iEMSリーダーMF(UK)を用いて測定した。腫瘍細胞残存率(TCS)は次の式を用いて計算した：TCS=(薬剤にさらしたウェルの

OD/対照ウェルの平均OD)×100%。腫瘍細胞の50%を致死させる薬剤濃度であるTCS<sub>50</sub>値は、得られた用量-反応曲線から計算した。

【0032】2.2ボヘミンのインビボ抗腫瘍活性  
サイトカニン誘導体の移植腫瘍に対する作用を分析するために、腹膜内移植P388D1白血病および皮下接種B16黒色腫のモデルを適用した。

#### 【0033】1.マウス黒色腫B16

マウス黒色腫細胞B16を5g/lグルコース、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清および炭酸水素ナトリウムを含むDMEMにて集密度(コンフルエンス)80%まで増殖させた。細胞をトリプシン処理し、PBSで洗浄し、0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSに懸濁した。この懸濁液由来の細胞50万個を皮下的にC57BL-10マウスに与えた。1日後、各動物を媒体または次の化合物：イソペンテニルアデニン(IP)、オロマウシン(OC)、ボヘミン(BOH)、レスコビチン(ROSC)で処理した。各化合物(1mg)を毎日4回、7日間皮下的に与えた。中間残存時間(MST)は図1に示したとおり、全ての実験グループについて評価した。

#### 【0034】1.ネズミ白血病P388D1

マウス白血病P388D1を5g/lグルコース、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清および炭酸水素ナトリウムを含むDMEMにて集密度(コンフルエンス)80%まで増殖させた。細胞をかき集め、PBSで洗浄し、0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSに懸濁した。この懸濁液由来の細胞50万個をDBA-2マウスの腹膜内に与えた。1日後、各動物を媒体または次の化合物：イソペンテニルアデニン(IP)、オロマウシン(OC)、ボヘミン(BOH)、レスコビチン(ROSC)で処理した。各化合物(1mg)を毎日4回、7日間皮下的に与えた。残存率(%)は図1に示したとおり、全ての実験グループについて評価した。

#### 【0035】調剤材料

インビトロ細胞毒性/抗増殖検定：10%ジメチルスルホキシド(DMSO)、生理的食塩水(0.9%w/v塩化ナトリウム)中80mM HCl。

インビボ抗癌活性検定：水不溶性化合物：50%DMSO、食塩水中10mM HCl。

#### 【0036】結果

2.1ボヘミンのインビトロ細胞毒性活性  
IP、OC、BOHおよびROSCの抗癌活性を評価するために、これらの化合物の毒性を異なる組織発生学および種類起源の細胞系列のパネルにて試験した(表1)。

#### 【表1】

IC50 (μM)													
	CEM	HL-60	B16	B16F10	MCF7	HLA	B10#4	B2#4	U937	L1210	P388D1	NIH3T3	リンパ球
IP	168.9	157.41	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7	266.7
OC	20.68	28.9	50.4	20.6	30.53	100.4	20.26	8.1	63.8	23.3	14.5	266.7	266.7
BOH	6.16	16.7	22.6	4.3	17.0	11.1	8.3	6.4	20.1	12.8	6.3	266.7	266.7
ROSC	4.3	11.7	15.8	4.0	5.27	7.55	15.9	6.9	19.4	8.7	5.8	266.7	266.7

【0037】我々は、試験した全ての腫瘍細胞系列において等しい活性が見られたが、非悪性細胞、例えば、NI63T3繊維芽細胞および正常ヒトリンパ球は合成CDKI誘導毒性に対して耐性であったことをここに示す。表1に示したように、IPは有意な毒性を示さず、OCは適度に有効であったのに対し、BOHおよびROSCは腫瘍細胞を濃度10~20μM近くまで死滅させた。

【0038】2,2ボヘミンのインビボ抗腫瘍活性  
しかしながら、インビトロ検定とは反対に、オロマウシンおよびボヘミンのみがマウスP388D1白血病およびB16黒色腫モデルの両方において有意なインビボ活性を示した(図1)。イソペンテニルアデニンはインビボではなんの活性も毒性も示さなかったのに対し、レスコビチンは不活性であり、更には、これを皮下/腹膜内に与えた結果、その後、深刻な皮膚/腹膜壊死病変を引き起こした。これらの結果は、CDKIが酵素阻害活性およびインビトロ細胞毒性を持つからといって、自動的に抗癌活性も持つとは言えないことを示している。

【0039】実施例3:インビトロおよびインビボ条件下でのcdk4およびcdk7活性における合成CDKI由来のオロマウシンの効果  
導入

サイクリン依存性キナーゼは、その活性のためにサイクリンとの関係およびThr 160/161のリン酸化を必要とする。cdk7は先にこの活性化リン酸化に必要な酵素として同定された。オロマウシン由来合成CDKIにおける最初の実験は、これらの化合物が細胞サイクル進行を後期G1相で阻害することを、示した。cdk4/cdk6キナーゼの活性化には癌細胞がG1制限点を通過することを必要とするため、我々は、我々の化合物がcdk4キナーゼをインビトロおよびインビボ条件の両方で阻害する能力を試験した。以前の観察に合致してcdk4はオロマウシン誘導体をインビトロで阻害するが(IC50>250μM)、同物質で処理した細胞から免疫沈降したcdk4の活性は急速に減少した。一つの可能な説明は、サイトキニン由来CDKIがcdk7の活性を下方制御し、このように、Thr161における活性化リン酸化からcdk4を防御する。本明細書は、化合物2-([(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ)-9-イソプロピルプリンがインビトロおよびインビボ条件の両方でcdk7の有効な阻害剤であ

るが、cdk4の阻害もまた観察されることを記載した最初であり、より一般的に、本発明はこれらの化合物ファミリーをcdk7および/またはcdk4活性が増加した癌の処理に適応することを含む。

【0040】タンパク質試薬

バキュロウイルスコードヒトcdc2およびサイクリンB1(David Lane博士から譲渡)は、他のものに記載のようにSf9細胞内で発現した。cdk2およびcdk4(Jiri Bartek博士から譲渡)のための多重リン酸化部位を含むグルタチオンS-トランスフェラーゼ-カルボキシ末端網膜芽細胞腫タンパク質(GST-Rb)はE. coli内で発現し、アフィニティー精製した。

【0041】cdk7活性実験に関して、cdc2/サイクリンB1複合体を基質として使用した。その自己触媒活性は、ATPアナログ5-γ-フルオロスルホニルベンゾイルアデノシン(FSBA)の、キナーゼのATP結合部位への共有結合により阻害された。簡単に、共発現cdc2/サイクリンB1を含むバキュロウイルス融解物200μlを50 NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mg/ml卵白アルブミン、10% DMSO、50mM カリウム-HEPES緩衝液とプロテアーゼ阻害剤1800μlで希釈し、20mM FSBAを含むDMSO 200μlを添加し、混合物を室温で30分インキュベートした。インキュベーション時間に続き、混合物をEB緩衝液(MgCl<sub>2</sub> 15mM、カリウムEGTA 20mM、ジチオスレイトール10mM、グリセロール-2-ホスフェート80mmol、pH7.3、パナジン酸ナトリウム1mM、NaF 1mM、フェニルホスフェート1mM、ロイペプチン10μg/ml、アプロチニン10μg/ml、ダイズトリプシン阻害剤10μg/ml、ベンズアミド100μmol)に対して、一晚、4℃の室内でマイクロ透析した。不活性cdc2/サイクリンB1の溶液を濃縮し、限外濾過により最終量200μlとし、-80℃で使用するまで貯蔵した。

【0042】cdk4活性

cdk4タンパク質は対数増殖期細胞から、抗cdk4モノクローナル抗体およびProtein-Gセファロースを使用して、他のものに記載されているように免疫沈降したが、一つだけ変え、例えば、二回の最終洗浄を、RIPA緩衝液の代わりに、キナーゼ緩衝液(グリセロール-2-ホスフェート60mmol、p-ニトロフェニルホスフェート15mmol、MOPS 125mmol、pH7.2、

EGTA 5mmol、EGTA 15mmol、 $MgCl_2$  15mmol、ジチオスレイトール 1mmol、バナジン酸ナトリウム 1mmol、NaF 1mM、フェニルホスフェート 1mmol、ロイペプチン  $10\mu g/ml$ 、アプロチニン  $10\mu g/ml$ 、ダイズトリプシン阻害剤  $10\mu g/ml$ 、ベンズアミド  $100\mu mol$ で行った。最終洗浄に続いて、キナーゼ緩衝液中で、 $10^6$ 細胞と同等の免疫沈降cdk4タンパク質を、氷上で、全量  $30\mu l$ 中、 $1\mu l$  ( $10mg/ml$ ) Rb-GSTタンパク質、 $15\mu mol/\gamma-^{32}P/ATP$  ( $3000\mu Ci/mmole$ 、 $1mCi/ml$ )、DMSOまたは適当な濃度で試験化合物を溶解したDMSO  $0.3\mu l$ と混合した。キナーゼ反応は  $30^\circ C$ で15分行い、 $7\mu l$ の5×SDS-PAGEサンプル緩衝液の添加により中断させた。これらのサンプルのアリコート ( $25\mu l$ )を10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフし、および濃度計測により定量した。

#### 【0043】cdk7活性

cdk7タンパク質は、対数増殖期CEM細胞から、抗cdk7モノクローナル抗体およびProtein-Gセファロースを使用して、他のものに記載されているように免疫沈降したが、一つだけ変え、例えば、二回の最終洗浄を、RIPA緩衝液の代わりに、EB緩衝液で行った。最終洗浄に続いて、 $10^6$ 細胞と同等の免疫沈降cdk7タンパク質を、氷上で、それぞれ全量  $100\mu l$ のEB緩衝液中、FSBA不活性化cdc2/サイクリンB1複合体  $10\mu l$ を基質として、 $1M MgCl_2$   $3\mu l$ 、 $15\mu mol/\gamma-^{32}P/ATP$  ( $3000\mu Ci/mmole$ 、 $1mCi/ml$ )、およびDMSOおよび/または適当な濃度で試験化合物を溶解したDMSO  $1\mu l$ と混合した。この反応混合物を  $30^\circ C$ でインキュベートし、30分後に  $20\mu l$ の5×SDS-PAGEサンプル緩衝液の添加により反応を停止させた。これらのサンプルの  $25\mu l$ アリコートを12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフしおよび濃度計測により定量した。

#### 【0044】結果

我々の結果によると、サイトキニン誘導体がcdk4活性をインビボで阻害するのが判明し、同化合物はインビトロ条件下で完全に不活性であった(図2)。この観察はTyr15脱リン酸化工程の異常制御により説明できるが、我々はcdk7の阻害がインビボcdk4活性の減少によるものであることを証明した(図2)。これは、OC由来合成CDKIについて、インビトロおよびインビボ条件の両方でcdk7キナーゼを阻害できる能力を証明した、最初である。

#### 【0045】実施例4：FACSによるアポトーシスおよび細胞サイクル分析

試験化合物 ( $70\mu M$ 濃度)を加えるか、または加えずに、細胞 ( $1 \times 10^6/ml$ )を6ウェルプレートに、 $37^\circ C$ および5%CO<sub>2</sub>で3-24時間培養した。インキュベーション後、細胞をペレットで採取し、Hank's緩衝液で洗い、次いで96%エタノール中に一夜  $-20^\circ C$ で固定した。低分子量のアポトーシス性DNAをクエン酸緩衝液に抽出し、RNase ( $50mg/ml$ )を用いて、RNAを分割した。DNAをエチジウム・ブロマイドで着色し、次いで488nmシングルビーム・レーザー (Coulter)を用いてFACSで細胞を分析した。結果：位相差顕微鏡および追跡電子顕微鏡によって、オロマウシン、レスコビチンおよびボヘミン処置細胞のEMについてアポトーシスが生じていること(参照、図3)を確認した。CEM細胞中のDNA含有物のフローサイトメトリー分析でも同様の結果を示した。レスコビチンおよびボヘミン処置細胞において広範なアポトーシスが認められた(参照、図4)。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 化合物のインビボ活性を示す図である。

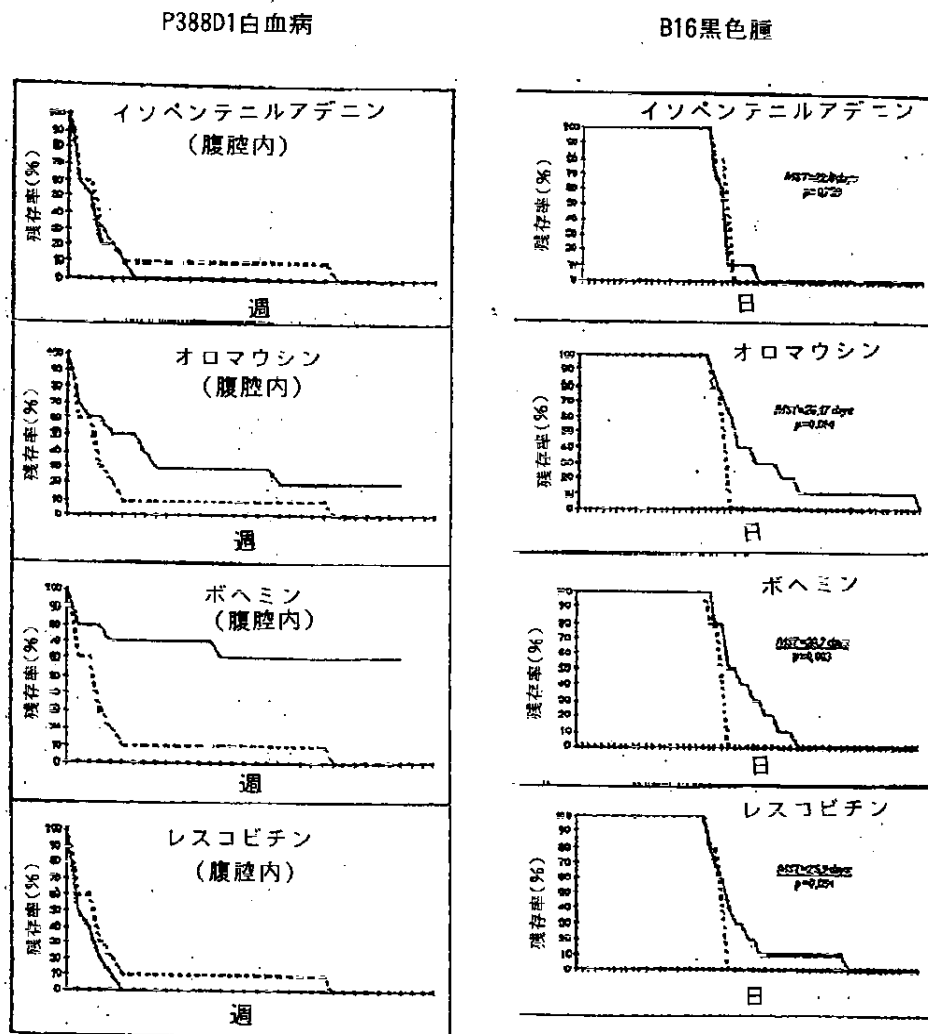
【図2】 化合物の濃度とインビトロおよびインビボ活性を示す図である。

【図3】 顕微鏡によるアポトーシスを示す図である。

【図4】 フローサイトメトリーによるアポトーシスを示す図である。

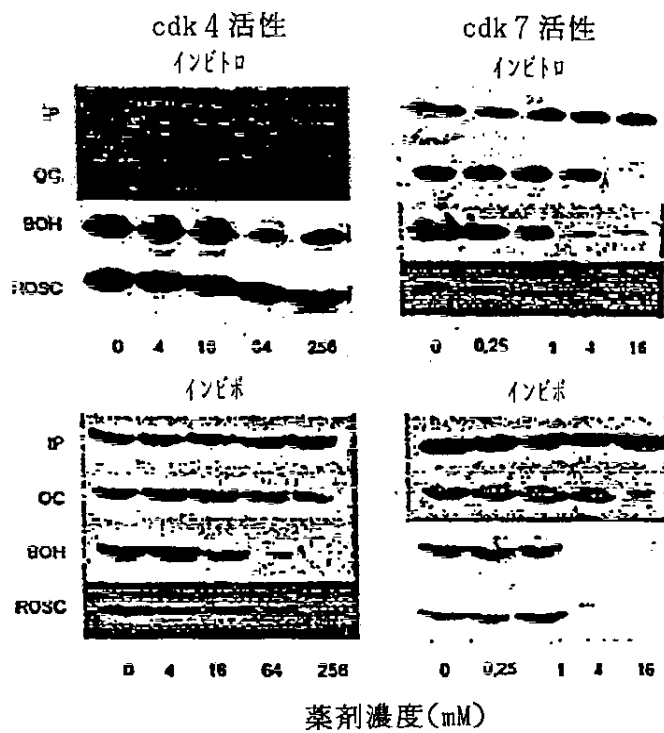
【図1】

P333D1白血病およびB16黒色腫モデルで解析された合成CDK I 類のインビボ効果





【図2】



【図3】

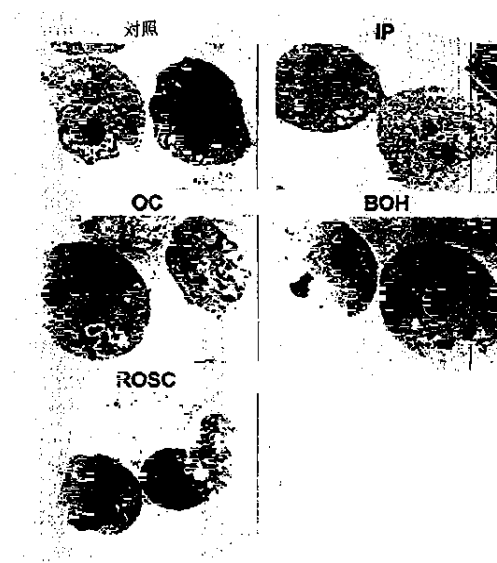


図3：CEM細胞は効果的な合成cdkIs (IP-イソペンテニルアデニン、OC-オロマウシン、BOH-ボヘミン、ROSC-レスコピン) に対する発現後にアポトーシスを誘発する。白血病細胞をOC誘導体 (50  $\mu$ m) で8時間培養し、電子顕微鏡で調べた。OC/BOH/ROSC処置細胞において典型的アポトーシスがみられる。クロマチン縮合、核分裂および細胞質変化。

【図4】

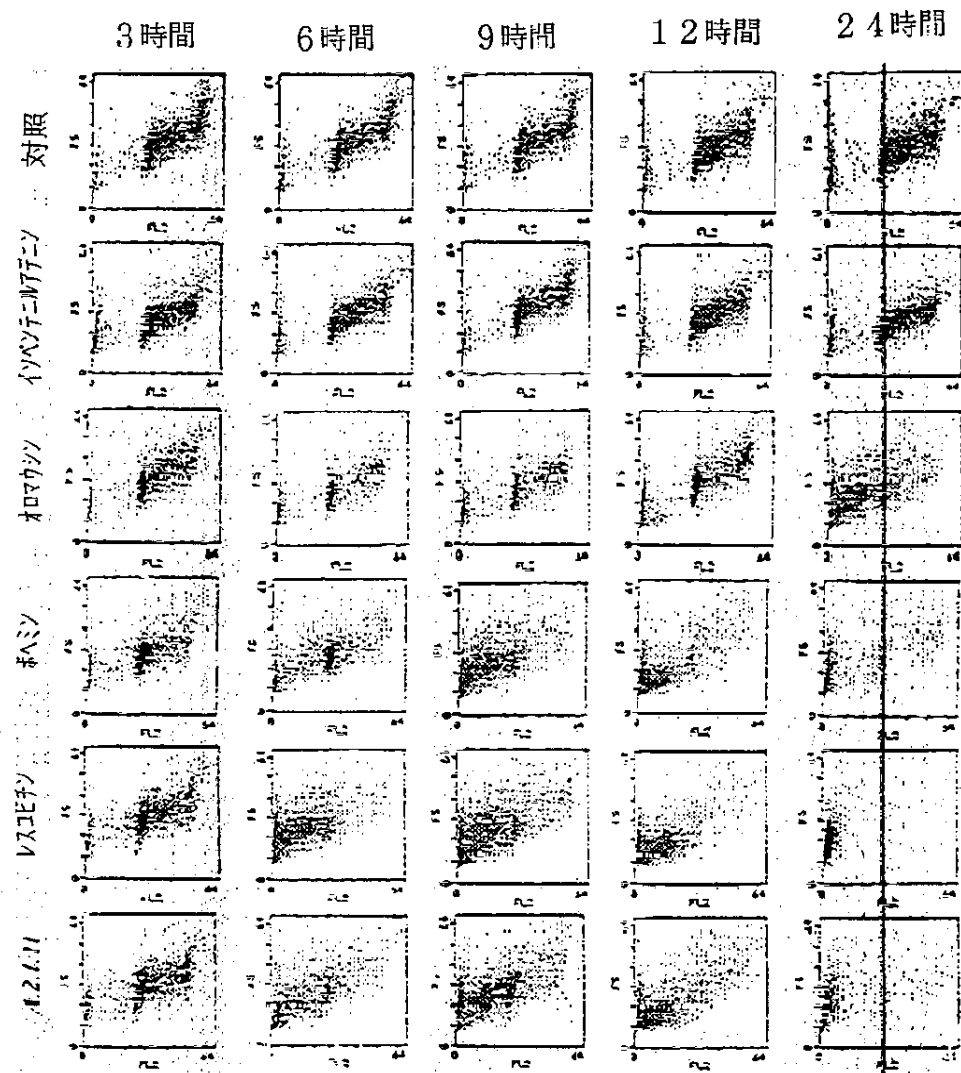


図4：種々のサイトキニン誘導体（ $50 \mu\text{m}$ ）での処置または非処置CEM細胞における細胞サイズ（FS）対DNA内容物（FL2）のフローサイトメトリー分析。G1/S阻止に続いて効果の高いcdk阻害剤の場合において広範なアポトーシスが起きることをデータは示唆している。

## 【手続補正書】

【提出日】平成10年9月30日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を含んでなる白血病の処置のための医薬組成物。

【請求項2】 2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を含んでなる白血病の処置のための医薬組成物。

でなる癌の処置のための医薬組成物。

【請求項3】 白血病または癌がp53非依存性である、請求項1または2の医薬組成物。

【請求項4】 2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたは2-[(1-エチル-2-ヒドロキエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を含んでなる癌性または白血病の増殖性疾患の処置のための医薬組成物。

【請求項5】 2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたは2-[(1-エチル-2-ヒドロキエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を含んでなる増殖細胞における細胞死を起こすための医薬組成物。

【請求項6】 増殖細胞が癌または白血病の細胞である、請求項5の医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンおよびその薬学的に許容される塩の医療上の用途に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正内容】

【0003】

【従来の技術】先行技術に、サイクリン依存性キナーゼを阻害することにより細胞サイクルを制御し得るいくつかの化合物が記載されている。これらの化合物には、ブチロラクトン、フラボピリドールおよび2-(2-ヒドロキエチルアミノ)-6-ベンジルアミノ-9-メチルプリン(オロマウシン)がある。オロマウシンおよび関連化合物はcdc2の阻害剤として知られている。cdc2(cdk1とも言う)は細胞サイクル制御に関与するサイクリン依存性キナーゼのファミリーの触媒性サブユニットである。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】化合物、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリン(ボヘミン)がcdk2, cdk4およびcdk7の強力なインビボ阻害剤であることを見出した。この特性は、この化合物が増殖組織の細胞増殖を阻害し、健康組織ではそうでなく、そしてさらに増殖細胞におけるアポトーシス(計画された細胞死)をもたらし得るという大きい利点を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる白血病患者の処置方法に関する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】さらに本発明は、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量を投与することを含んでなる癌患者の処置方法に関する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】さらに実施態様において、本発明は2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたは2-[(1-エチル-2-ヒドロキエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリン(レスコビチン)またはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与によりcdk4および/またはcdk7酵素を阻害することを含んでなる癌性または白血病の増殖性疾患を処置する方法に関する。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】さらなる実施態様において、本発明は、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジ

ルアミノ-9-イソプロピルプリンまたは2-[(1-エチル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩の医療上の有効量の投与を含んでなる増殖細胞における細胞死を起こす方法に関する。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】2-[(1-エチル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンは投与時に注射部位の周りに組織壊死を起こすのがみられた。この点においてボヘミンはこのような壊死を起こさないで優れている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】本発明はまた、2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩と少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤TOを含む医薬組成物に関する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】材料

化合物の定型スクリーニングには、ヒトT-リンパ芽球性白血病細胞系列CEM、前骨髄球性白血病HL-60、ヒト乳癌細胞系列MCF-7、子宮頸癌細胞HEL A、マウス繊維芽細胞NIH3T3、マウス不死化骨髄マクロファージB2.4およびB10A.4、P388D1およびL1210白血病、B16およびB16F10黒色腫を使用した。細胞をNunc/Corning 80cm<sup>2</sup>プラスチック組織培養フラスコ内で維持し、細胞培養培地(5g/lグルコース、2mMグルタミン、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清および炭酸水素ナトリウムを含むDMEM)にて培養した。化合物レスコビチン、2-[(1-エチル-2-ヒドロキシエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-

-イソプロピルプリンは、WO97/20842に記載のようにして製造した。上記のようにして製造した化合物2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンは、以後、ボヘミンと称する。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正内容】

【0039】実施例3：インビトロおよびインビボ条件下でのcdk4およびcdk7活性におけるオロマウシン由来合成CDKI(CDK阻害剤)の効果導入

サイクリン依存性キナーゼは、その活性のためにサイクリンとの関係およびThr 160/161のリン酸化を必要とする。cdk7は先にこの活性化リン酸化に必要な酵素として同定された。オロマウシン由来合成CDKIにおける最初の実験は、これらの化合物が細胞サイクル進行を後期G1相で阻害することを、示した。cdk4/cdk6キナーゼの活性化には癌細胞がG1制限点を通過することを必要とするため、我々は、我々の化合物がcdk4キナーゼをインビトロおよびインビボ条件の両方で阻害する能力を試験した。以前の観察に合致してcdk4はオロマウシン誘導体によりインビトロで阻害されないが(IC50>250μM)(参照WO97/20842)、同物質で処理した細胞から免疫沈降したcdk4の活性は急速に減少した。一つの可能な説明は、サイトキニン由来CDKIがcdk7の活性を下方制御し、このように、Thr161における活性化リン酸化からcdk4を防御する。本明細書は、化合物2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンがインビトロおよびインビボ条件の両方でcdk7の有効な阻害剤であるが、cdk4の阻害もまた観察されることを記載した最初であり、より一般的に、本発明はこれらの化合物ファミリーをcdk7および/またはcdk4活性が増加した癌の処理に適応することを含む。

【手続補正13】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】

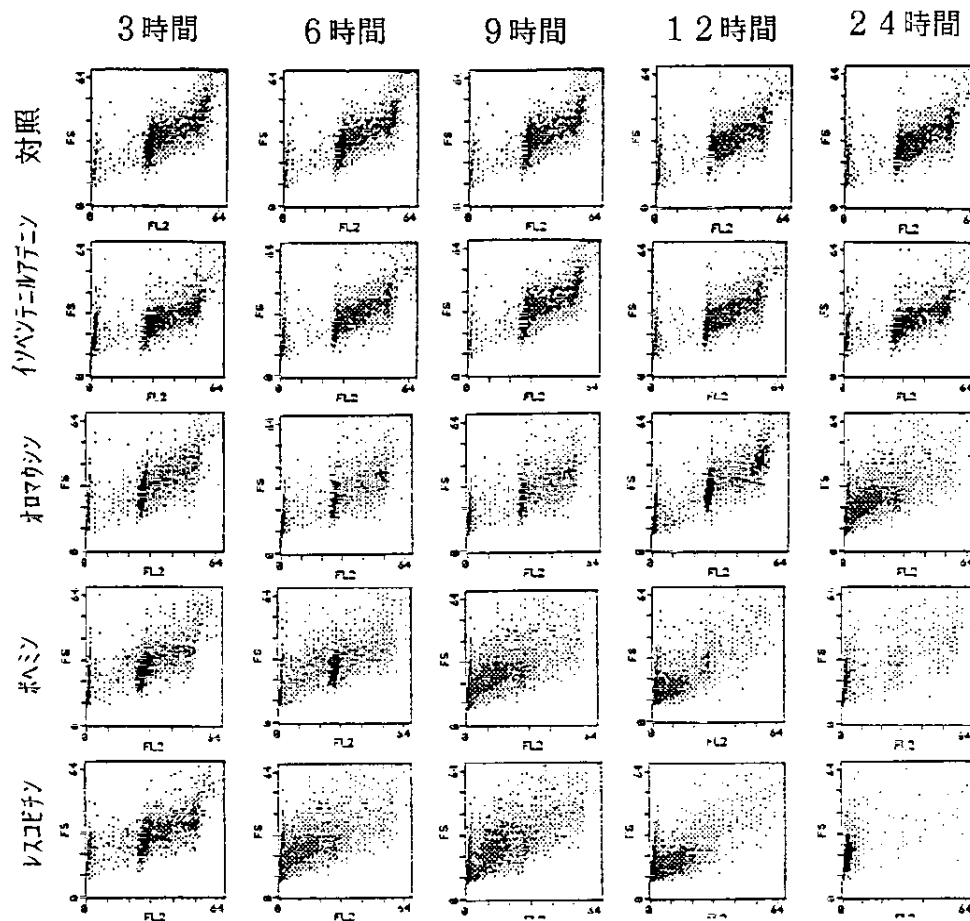


図4：種々のサイトキニン誘導体（50  $\mu$ m）での処置または非処置CEM細胞における細胞サイズ（FS）対DNA内容物（FL2）のフローサイトメトリー分析。G1/S阻止に続いて効果の高いcdk阻害剤の場合において広範なアポトーシスが起きることをデータは示唆している。

【手続補正書】

【提出日】平成11年8月23日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】化合物2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたは2-[(1-エチル-2-ヒドロキエチル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはそれらの薬学的に許容される塩の医療上の有効

量を含み、癌性または白血病性増殖疾患の処置においてcdk4および/またはcdk7を阻害するための医薬組成物。

【請求項2】化合物が増殖細胞において細胞死をもたらす、請求項1の医薬組成物。

【請求項3】増殖細胞が癌または白血病の細胞である、請求項2の医薬組成物。

【請求項4】化合物が2-[(3-ヒドロキシプロピル)アミノ]-6-ベンジルアミノ-9-イソプロピルプリンまたはその薬学的に許容される塩である、請求項1の医薬組成物。

## フロントページの続き

(72)発明者 リボル・ハヴリチェク  
チェッコ78371オロモウツ、スレフティテ  
ル11番、ラボラトリー・オブ・グロース  
レギュレーターズ、デパートメント・オ  
ブ・ボタニー、ザ・パラッキー・ユニバー  
シティ・アンド・インスティテュート・オ  
ブ・エクスペリメンタル・ボタニー・エイ  
エス・シーアール

(72)発明者 ミロスラフ・ストルナド  
チェッコ78371オロモウツ、スレフティテ  
ル11番、ラボラトリー・オブ・グロース  
レギュレーターズ、デパートメント・オ  
ブ・ボタニー、ザ・パラッキー・ユニバー  
シティ・アンド・インスティテュート・オ  
ブ・エクスペリメンタル・ボタニー・エイ  
エス・シーアール

(72)発明者 マリアン・ハイドウフ  
チェッコ77520オロモウツ、パスキノヴァ  
6番、ラボラトリー・オブ・エクスペリメ  
ンタル・メディシン、デパートメント・オ  
ブ・ピーディアトリクス、ファカルティ  
オブ・メディシン、パラッキー・ユニバー  
シティ・アンド・ファカルティ・ホスピタ  
ル・オロモウツ