

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 11 月 19 日(19.11.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/173970 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/06 (2006.01) A61K 31/54 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01) A61K 31/69 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/065163

(22) 国際出願日: 2014 年 6 月 7 日(07.06.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
1454362 2014 年 5 月 15 日(15.05.2014) FR

(71) 出願人: ジェイファーマ株式会社 (J-PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 番地 1 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 遠藤 仁(ENDOU, Hitoshi); 〒2520222 神奈川県相模原市中央区由野台 1-23-7 Kanagawa (JP). ウェンプ, マイケル エフ (WEMPE, Michael F.); 80013 コロラド州オーロラ、イースト マンスフィールド プレイス

2 1 4 9 7 Colorado (US). ペイロン, ジャン-フ
ランソワ (PEYRON, Jean-Francois); F-06340 カンタ
ロン リュ ドゥ リスクル 8 1 Cantaron
(FR). 安西 尚彦 (ANZAI, Naohiko); 〒1810013 東京
都三鷹市下連雀 8-5-5-604 Tokyo (JP).
ジュタバ, プロムスク (JUTABHA, Promsuk); 〒
3210204 栃木県下都賀郡壬生町緑町 4-1-2
5-D505 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 伊藤 温 (ITO, Atsushi); 〒1040045 東京
都中央区築地 4-1-1 東劇ビル 4 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

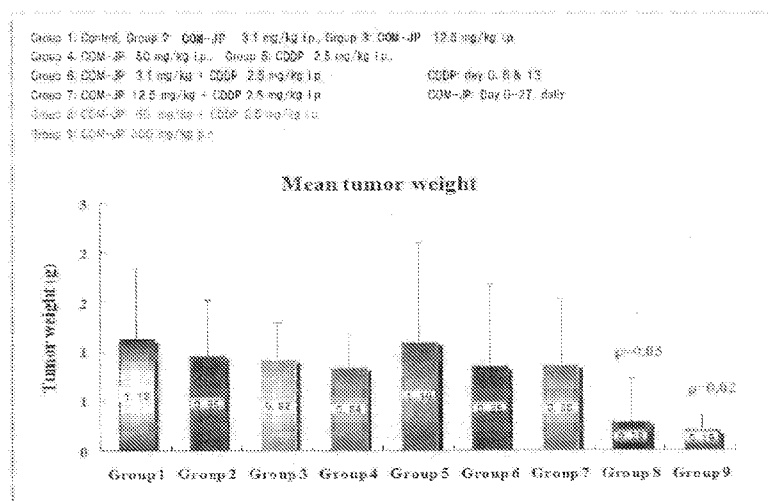
(54) Title: ANTI-MALIGNANT TUMOR AGENT COMPOSITION

(54) 発明の名称: 抗悪性腫瘍剤組成物

[図16]

[図16]

Efficacy of COM-JP: Inhibition of tumor growth in colon cancer SOI model
(SOI: surgical orthotopic implantation)



(57) Abstract: [Problem] To provide a novel anti-malignant tumor agent composition. [Solution] An anti-malignant tumor agent composition containing, as active ingredients, a LAT1 inhibitor and at least one substance selected from the group consisting of an alkylating agent, a platinum agent, an antimetabolite, a topoisomerase inhibitor, a microtubule polymerization inhibitor, an endocrine therapeutic agent, a microtubule depolymerization inhibitor, an antitumor antibiotic and a molecular targeted drug.

(57) 要約: 【課題】 新規抗悪性腫瘍剤組成物の提供 【解決手段】 LAT1阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物。



MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：抗悪性腫瘍剤組成物

技術分野

[0001] 本発明は、新規な抗悪性腫瘍剤組成物、例として、新規なT細胞急性リンパ性白血病／リンパ腫治療用医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] がん（悪性腫瘍）の増殖を確実に抑え、かつ副作用のほとんどない満足すべき抗悪性腫瘍剤組成物又は治療法は未だ見出されておらず、その開発が強く望まれている。

[0003] 一般に、がん細胞は急速に増殖を繰り返すため、細胞内代謝で産生できない必須アミノ酸の取り込みが異常に亢進している。本発明者らは、多くの必須アミノ酸を含む中性分枝鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸の細胞内取り込みに必要な膜タンパク質である癌特異性L型アミノ酸トランスポーターの分子クローニングに成功し、これをシステムLアミノ酸トランスポーター1（LAT1）と名づけた（Kanai Y. et al., Journal of Biological Chemistry, 273, 23629（1998））。そして、本発明者らは、LAT1及びLAT1遺伝子を選択的に阻害する剤組成物の研究を行ってきた。

[0004] がんの種類としては、例えば、肺がん、胃がん、膵がん、食道がん、乳がん、大腸がん、膀胱がん、前立腺がん、血液がん等を挙げることができるが、以下、血液がん、胃がん、膵がん、大腸がんを例に採り説明する。

[0005] 血液がん（造血器腫瘍）には白血病、リンパ腫、骨髄腫等がある。

[0006] 白血病は、4種類（急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病（Acute Lymphocytic Leukemia: ALL）、慢性リンパ性白血病）に分類される。急性白血病は、腫瘍化が造血幹細胞または造血前駆細胞でおこり、特定の細胞のみが白血病細胞として増殖す

る疾患である。

[0007] リンパ腫は、リンパ組織を構成する細胞に由来する腫瘍であり、主にリンパ球の腫瘍化によって引き起こされる造血器腫瘍である。悪性リンパ腫は、ホジキン病と非ホジキンリンパ腫に分けられる。

[0008] リンパ性白血病やリンパ腫は、リンパ球の主要構成細胞が腫瘍化したものであり、B細胞腫瘍とT細胞腫瘍に分けられる。T細胞腫瘍には、T細胞急性リンパ性白血病（T-ALL）、T細胞リンパ芽球性リンパ腫（T-Lymphoblastic Lymphoma: T-LL）、T細胞慢性リンパ性白血病（T-CLL）、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）等が含まれる。

[0009] リンパ芽球性リンパ腫（Lymphoblastic Lymphoma: LL）は、一般的なリンパ腫と比べ、より未熟な分化段階のリンパ球ががん化したものであり、がん細胞の本質は、急性リンパ性白血病と同じであると考えられる。そのため、WHO分類では「前駆TあるいはBリンパ芽球性白血病／リンパ腫」（Precursor T- or B-Lymphoblastic Leukemia／Lymphoma）として、一群の疾患に分類している。

[0010] T細胞リンパ芽球性リンパ腫（T-LL）およびT細胞急性リンパ性白血病（T-ALL）は、胸腺細胞の形質転換が分化の様々なステージでブロックされることから生じる、非常に高悪性度の疾患である（非特許文献1）。T-ALLは、それぞれ、全成人および小児期非ホジキンリンパ腫のおよそ15および30%に相当する。近年、T-ALL患者における、侵襲的な化学療法による治療は、成人において40%超および小児患者において80%超まで、治癒率を改善した（非特許文献2）が、難治性の再発が、すべての利用可能な薬物療法において起こることがよく知られている（非特許文献3）。結果的に、本発明者らは、T細胞悪性疾患の病因に関与する分子メカニズムに関するより多くの知識が、これらの治癒率を増強するための新規治療および／または併用治療（combinational treatment）

t) を同定するために実に重大であると考える。

[0011] 腫瘍化した細胞（癌細胞）は、それらが、継続的に増殖し、アポトーシスによる排除を回避し、広まり、かつ治療に抵抗するのを可能にする顕著な特性（hallmark property）（非特許文献4）を示すことがよく知られている。癌細胞は、それらの代謝が再プログラム化されており（非特許文献5）、これは、癌細胞が直ちに成長し、かつ活発に分裂するために、新しいタンパク質、脂質、およびDNAを産生するのに必要とされる栄養素を占有するように、それらの能力が増強された特性である。それらが、腫瘍形成性の増殖を促し、かつ分化を乱す、染色体転座などのような、様々な遺伝子障害を含むので、T-ALL/T-L細胞は、分子レベルで非常に不均質である（非特許文献1）。しかしながら、それらが、ホスファチジルイノシチド3-キナーゼ/プロテインキナーゼB；PKB（PI3K/Akt）経路の共通で本質的な活性化を有することが示された（非特許文献6）。PI3K/Aktは、ヒト癌において頻繁に不活性化される腫瘍抑制遺伝子PTEN（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10）によって抑圧される（非特許文献7）。PTEN脂質ホスファターゼ活性は、ホスファチジルイノシトール（3，4，5）-三リン酸（PIP3）を、Akt活性化および下流の増殖イベントを妨げるホスファチジルイノシトール4，5-ビスリン酸（PIP2）に転換することによって、細胞生存（つまり成長、増殖、細胞内輸送）に明白に関与するPI3Kの作用に対抗する。PTENの非存在下において、Aktは、十分に活性であり、癌性の形質転換に向けて細胞を刺激する（非特許文献8、9）。

[0012] T-ALL/T-Lの病因における分子レベルでのPTENの関与を調査するために、本発明者らは、コンディショナルT細胞特異的PTEN欠失（PTEN^{f/f} × lck-Cre）を示すマウスモデルを利用した（非特許文献10）。結果として生じる子孫（tPTEN^{-/-}マウス）は、高悪性度で侵襲性のT細胞性リンパ腫を直ちに発症し、6～20週間以内に

死滅する。t P T E N-/-リンパ腫形成を支持する無秩序な遺伝子を強調するために、S L C 7 A 5 遺伝子アップレギュレーションを同定したトランスクリプトーム（発現プロファイリング）分析を実行した。S L C 7 A 5 は、システムL アミノ酸トランスポーター1（L A T 1）をコードする。近年、かなりの発見により、多くの癌性および/または増殖細胞が、L A T 1 発現に強く関係することが実証されており（非特許文献11）；（非特許文献12）；（非特許文献13）；（非特許文献14）；（非特許文献15）；（非特許文献16）、L A T 1 の強力で選択的な阻害剤を開発するための活動が、進行中である（非特許文献17）。これまでのところ、4つのL A T タンパク質（つまりL A T 1~4）が、同定されており、L A T 1 およびL A T 3 は、腫瘍細胞において最も頻繁に過剰発現される2つのアイソフォームである（非特許文献18）。L A T タンパク質は、グルタミンとの交換で、ロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、およびチロシンなどのような大きな中性必須アミノ酸（L N E A A）を移入する。運搬が機能的となるように、L A T 1 は、1回膜貫通タンパク質4 F 2 細胞表面抗原重鎖（C D 9 8 h c / 4 F 2 h c ; S L C 3 A 2 遺伝子によってコードされる）に結合したジスルフィド結合を必要とする（非特許文献11）。それはまた、βインテグリンと相互作用することも知られている（非特許文献19）。t P T E N-/-およびT-A L L / T-L L 細胞表面で観察されたL A T 1 発現は、おそらく、より高度な必須アミノ酸取込みに一致し、それによって、T-A L L / T-L L 白血病細胞の成長および生存に対する要因となることが推測された。

[0013] したがって、本発明者らの研究の主なねらいは、強力で選択的なL A T 1 阻害剤であるC O M P O U N D - J P を利用することによって、L A T 1 のターゲティングについての有力な薬理学的役割（複数可）を調べるために、研究を実行することであった（非特許文献18）；（非特許文献17）；（非特許文献20）。

[0014] 非特許文献1: I. Aifantis, E. Raetz, S. Buonamici, Molecular pathogene

sis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature Reviews Immunology* 8, 380 (2008).

非特許文献2: C. Pui, M. Relling, D. Pharm, J. Downing, Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535 (2004).

非特許文献3: B. D. Cheson, Novel therapies for peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Opin Hematol* 16, 299 (Jul, 2009).

非特許文献4: D. Hanahan, R. Weinberg, Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell* 144, 646 (2011).

非特許文献5: A. Levine, A. Puzio-Kuter, The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340 (2010).

非特許文献6: W. L. Zhao, Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia* 24, 13 (Jan, 2010).

非特許文献7: P. Steck et al., Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15, 356 (1997).

非特許文献8: I. Sansal, W. Sellers, The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 22, 2954 (2004).

非特許文献9: L. Salmena, A. Carracedo, P. Pandolfi, Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133, 403 (2008).

非特許文献10: T. Hagenbeek, H. Spits, T-cell lymphomas in T-cell specific Pten-deficient mice originate in the thymus. *Leukemia* 22, 608 (2007).

非特許文献11: O. Yanagida et al., Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochem Biophys Acta* 1514, 291 (Oct 1, 2001).

非特許文献12: H. Ohkame, H. Masuda, Y. Ishii, Y. Kanai, Expression of

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *Journal of surgical oncology* 78, 265 (Dec, 2001).

非特許文献13 : H. Kobayashi, Y. Ishii, T. Takayama, Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. *Journal of surgical oncology* 90, 233 (Jun 15, 2005).

非特許文献14 : K. Nakanishi et al., LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 448, 142 (Feb, 2006).

非特許文献15 : K. Kaira et al., Fluorine-18-alpha-methyltyrosine positron emission tomography for diagnosis and staging of lung cancer: a clinicopathologic study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 6369 (Nov 1, 2007).

非特許文献16 : T. Sakata et al., L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathol Int* 59, 7 (Jan, 2009).

非特許文献17 : M. F. Wempe et al., Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter 1 (LAT1) selective compound. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 27, 155 (2012).

非特許文献18 : K. Oda et al., L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 101, 173 (Jan, 2010).

非特許文献19 : C. C. Feral et al., CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 355 (Jan 11, 2005).

非特許文献20 : J. Toyoshima, H. Kusuvara, M. F. Wempe, H. Endou, Y. Sugiyama, Investigation of the role of transporters on the hepatic elim

ination of an LAT1 selective inhibitor JPH203. Journal of pharmaceutical sciences 102, 3228 (Sep, 2013).

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0015] そこで、本発明は、がん（悪性腫瘍）の増殖を確実に抑え、かつ副作用のほとんどない満足すべき抗悪性腫瘍剤組成物を提供することを課題とし、例として、T-L-LおよびT-A-L-L患者の治癒率を増強するための新規医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0016] 再プログラム化された癌細胞は、それらの病的な成長および増殖速度を支持するために多くの栄養素の流入を必要とする。本発明者らによる鋭意研究の結果、システムLアミノ酸トランスポーター1（LAT1）をコードする遺伝子（SLC7A5）は、p t e n腫瘍サプレッサーをT細胞から欠失させることによって生成されるマウスリンパ腫細胞において、およびまた、ヒトT細胞急性リンパ性白血病（T-A-L-L）／リンパ腫（T-L-L）細胞においても過剰発現されることが示された。そして、本研究において、本発明者らは、ある種のLAT1選択的阻害剤（例えば、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3, 5-ジクロロ-L-チロシン又はその薬理学的に許容しうる塩、以下、「COMPOUND-JP」という）を利用した。COMPOUND-JPは、白血病性細胞の生存能力および増殖を減少させ、一過性の自食作用を誘発し、その後、アポトーシスが続く、そのうえ、COMPOUND-JPは、ヌードマウスの中に投与された異種移植ルシフェラーゼ発現tPTEN-／-細胞のインビボにおける成長を変化させることができた。対照的に、COMPOUND-JPは、正常マウス胸腺細胞およびヒト末梢血リンパ球に対して無毒であった。分子レベルで、COMPOUND-JPは、mTORC1およびAktの構成的な活性化を阻害した。COMPOUND-JPは、細胞死と関連するCHOP転写因子

によって媒介される変性タンパク質応答 (Unfolded Protein Response) (UPR) を引き起こした。興味深いことに、本発明者らはまた、CHOP誘発欠損のCOMPOUND-JP抵抗性tPTEN-ノックアウト細胞をも生成した。そのうえ、本発明者らは、COMPOUND-JPが、ラパマイシン、デキサメタゾン、ドキソルビシン、ベルケイド、およびL-アスパラギナーゼと相乗作用を示し、白血病性細胞の生存能力を変化させることができることを観察した。結果は、LAT1によって媒介される必須アミノ酸流入のターゲティングが、致命的なT細胞悪性疾患を治療するための効率的な広域性補助アプローチとなり得ることを実証する。

[0017] つまり、本発明者らの研究から得られた実験結果は、癌細胞が生存し、増殖するために、TALLおよびTLL細胞ならびにtPTEN-ノックアウト細胞が、LAT1によって媒介される高レベルのアミノ酸流入に依存しているという考えを支持する。COMPOUND-JPを使用するLAT1の阻害は、tPTEN-ノックアウト腫瘍細胞の生存を維持するmTOR経路の構成的な活性化に影響を与え、CHOP依存性の細胞死応答を引き起こし、興味深いインビトロにおける補助剤特性を示した。

[0018] さらに、ヒトの各種がん由来樹立培養細胞に発現する中性アミノ酸トランスポーター、LAT1及びLAT2遺伝子の定量結果によれば、LAT2は5種の細胞にのみ低い値を認めたが、46種類の細胞全部にLAT1 mRNAは発現しており、LAT1は、がんタイプのトランスポーターとすることができる。他方、LAT2はがん細胞での発現はゼロか極端に低値であり、正常タイプである、と理解できる。そして、ヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来Panc-1細胞の両細胞共にCOM-JPの用量依存的な増殖活性の低下が明らかに認められた。その他の多くのLAT1発現がん細胞においてもそれらのLAT1発現量に応じたCOM-JPの増殖抑制効果が期待される。

[0019] 次いで、胃がん、膵がん、大腸がんについて、COM-JPと他剤との併用効果についての本発明者らによる鋭意研究の結果を示す。まず、ヒトスキル

ス胃がん由来44As3-11細胞の増殖に及ぼすCOM-JPと他剤（Gemstabine並びにPaclitaxel）との併用効果について、併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、所謂相加効果を示した。次に、ヒト膵がん由来Panc-1細胞の増殖に及ぼすCOM-JPと他剤（Gemstabine並びにPaclitaxel）との併用効果について、Panc-1細胞における各併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、44As3-11細胞の場合と同様に所謂相加効果であった。続いて、ヒト大腸がん由来HT-29細胞播種ヌードマウスモデルでの腫瘍増殖に及ぼすCOM-JPと5-FUとの併用効果について、両者の併用により、各単独群の残存腫瘍増大は更に減少した。この併用効果は相加的であり、両薬物の作用機序が異なることに起因することが明らかにされた。このような併用による各単独の治療効果を更に増強できる薬効は臨床での大腸がん治療においても十分に期待される。最後に、ヒト大腸がん由来HT-29細胞の同所播種ヌードマウスモデル（SOI model）での腫瘍増殖に及ぼすCOM-JPとCDDPとの併用による相乗効果について、COM-JPとCDDPの単独投与では認められなかった各薬効は両者の併用で明確な薬効を認められた。この併用による薬効は両者の相乗効果と結論された。

[0020] そこで、本発明者らは、LAT1阻害剤及びLAT1阻害剤と他剤との併用が、前記抗悪性腫瘍剤組成物として有効であることを見出し、本発明を完成させるに至ったものである。

[0021] すなわち、本発明（1）は、LAT1阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物である。

[0022] 本発明（2）は、前記抗悪性腫瘍剤組成物が、T細胞急性リンパ性白血病／リンパ腫治療用医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物である、前記発明（1）に記載の組成

物である。

[0023] 本発明（３）は、前記LAT1阻害剤が、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3,5-ジクロロ-L-チロシン又はその薬理的に許容しうる塩である、前記発明（１）又は（２）に記載の組成物である。

[0024] 本発明（４）は、前記剤が、シスプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ゲムシタビン、L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）、パクリタキセル、デキサメサゾン、ドキソルビシンをはじめとするアントラサイクリン系抗生物質、ベルケイド（ボルテゾミブ）、ラパマイシン、KU0063794及びPI-103から選択される一以上の剤である、前記発明（１）～（３）のいずれかに記載の組成物である。

[0025] 本発明（５）は、LAT1阻害剤と、mTOR阻害剤、PI3K阻害剤及びAkt阻害剤から選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物である。

[0026] 本発明（６）は、前記抗悪性腫瘍剤組成物が、T細胞急性リンパ性白血病／リンパ腫治療用医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物である、前記発明（５）に記載の組成物である。

[0027] 本発明（７）は、前記LAT1阻害剤が、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3,5-ジクロロ-L-チロシン又はその薬理的に許容しうる塩である、前記発明（５）又は（６）に記載の組成物である。

[0028] 本発明（８）は、前記剤が、ラパマイシン、KU0063794及びPI-103から選択される一以上の剤である、前記発明（５）～（７）のいずれかに記載の組成物である。

[0029] 本発明において、各種用語の意味は下記の通りである。

[0030] （LAT1阻害剤）

「LAT1阻害剤」とは、システムLアミノ酸トランスポーター1（LA

T 1) 及び L A T 1 遺伝子を選択的に阻害する剤である限り特に限定されず、化合物及びその塩、抗 L A T 1 抗体、アプタマー、核酸医薬を含む。当該 L A T 1 阻害剤は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0031] (アルキル化薬)

「アルキル化薬」とは、DNA をアルキル化する薬剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意のアルキル化薬、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意のアルキル化薬を意味する。アルキル化薬は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0032] (白金製剤)

「白金製剤」とは、白金を含む抗悪性腫瘍剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意の白金製剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の白金製剤を意味する。白金製剤は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0033] (代謝拮抗剤)

「代謝拮抗剤」とは、癌細胞の代謝を阻害して、増殖を抑制する剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意の代謝拮抗剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の代謝拮抗剤を意味する。代謝拮抗剤は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0034] (トポイソメラーゼ阻害薬)

「トポイソメラーゼ阻害薬」とは、トポイソメラーゼと呼ばれる酵素の働

きを妨げる剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意のトポイソメラーゼ阻害薬、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意のトポイソメラーゼ阻害薬を意味する。トポイソメラーゼ阻害薬は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0035] (微小管重合阻害薬)

「微小管重合阻害薬」とは、微小管の形成を妨げる剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意の微小管重合阻害薬、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意の微小管重合阻害薬を意味する。微小管重合阻害薬は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0036] (内分泌療法剤)

「内分泌療法剤」とは、内分泌（ホルモン）の分泌又は作用を抑制する剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意の内分泌療法剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意の内分泌療法剤を意味する。内分泌療法剤は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0037] (微小管脱重合阻害薬)

「微小管脱重合阻害薬」とは、微小管重合を安定化させる剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意の微小管脱重合阻害薬、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後

に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の微小管脱重合阻害薬を意味する。微小管脱重合阻害薬は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0038] (抗腫瘍性抗生物質)

「抗腫瘍性抗生物質」とは、抗腫瘍剤として機能する、微生物の産生物に由来する物質であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意の抗腫瘍性抗生物質、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の抗腫瘍性抗生物質を意味する。抗腫瘍性抗生物質は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0039] (分子標的薬)

「分子標的薬」とは、腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移等に関わる分子を標的とする薬剤であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意の、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の分子標的薬を意味する。当該分子標的薬は、単独の剤であっても 2 種以上の剤の併用をも含む。

[0040] (抗悪性腫瘍剤)

「抗悪性腫瘍剤」とは、例えば、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、植物アルカロイド（トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、微小管脱重合阻害薬等）、内分泌療法剤、抗腫瘍性抗生物質、分子標的薬、生物学的応答調節剤及びその他の薬剤等を挙げることができ、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の 1 または複数の任意の抗悪性腫瘍剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう 1 または複数の任意の抗悪性腫瘍剤を意味する。当

該抗悪性腫瘍剤は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0041] 「類似体」とは、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3, 5-ジクロロ-L-チロシンと構造、機能において実質的に類似する分子を意味する。

[0042] （シスプラチン）

「シスプラチン」とは、白金製剤であるシスプラチン（CDDP）を意味し、シスプラチン、ならびに、シスプラチンと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0043] （5-フルオロウラシル（5-FU））

「5-フルオロウラシル（5-FU）」とは、代謝拮抗剤である5-フルオロウラシル（5-FU）を意味し、5-フルオロウラシル（5-FU）、ならびに、5-フルオロウラシル（5-FU）と同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0044] （ゲムシタビン）

「ゲムシタビン」とは、代謝拮抗剤であるゲムシタビンを意味し、ゲムシタビン、ならびに、ゲムシタビンと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0045] （L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ））

「L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）」とは、抗悪性腫瘍剤であるL-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）を意味し、L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）、ならびに、L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）と同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0046] （パクリタキセル）

「パクリタキセル」とは、微小管脱重合阻害薬であるパクリタキセル（タキソール）を意味し、パクリタキセル、ならびに、パクリタキセルと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0047] （デキサメタゾン）

「デキサメタゾン」とは、主な成分として副腎皮質ステロイドが含まれて

いる抗炎症作用や免疫抑制作用などをもつ薬物であるデキサメタゾンを意味し、デキサメタゾン、ならびに、デキサメタゾンと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0048] (ドキシソルビンをはじめとするアントラサイクリン系抗生物質)

「アントラサイクリン系抗生物質」とは、ストレプトマイセス属微生物に由来する抗腫瘍性抗生物質として用いられる薬剤の一群であれば特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意の、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意のアントラサイクリン系抗生物質を意味する。当該アントラサイクリン系抗生物質は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。「ドキシソルビン」とは、アントラサイクリン系抗生物質であるドキシソルビンを意味し、ドキシソルビン、ならびに、ドキシソルビンと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0049] (ベルケイド (ボルテゾミブ))

「ベルケイド (ボルテゾミブ) 」とは、分子標的薬であるベルケイド (ボルテゾミブ) を意味し、ベルケイド (ボルテゾミブ) 、ならびに、ベルケイド (ボルテゾミブ) と同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0050] (ラパマイシン)

「ラパマイシン」とは、分子標的薬であるラパマイシンを意味し、ラパマイシン、ならびに、ラパマイシンと同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0051] (KU0063794)

「KU0063794」とは、分子標的薬であるKU0063794を意味し、KU0063794、ならびに、KU0063794と同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0052] (P I - 1 0 3)

「P I - 1 0 3」とは、分子標的薬であるP I - 1 0 3を意味し、P I - 1 0 3、ならびに、P I - 1 0 3と同じ薬理学的特性を持つ、全ての類似体、誘導体および同属体を含む。

[0053] (m T O R 阻害剤)

「m T O R 阻害剤」とは、m T O R (m a m m a l i a n t a r g e t o f r a p a m y c i n) を直接的又は間接的に標的にする、若しくはm T O Rの活性／機能を低減又は阻害する薬剤である限り特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意のm T O R 阻害剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意のm T O R 阻害剤を意味する。当該m T O R 阻害剤は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0054] (P 1 3 K 阻害剤)

「P 1 3 K 阻害剤」とは、P 1 3 K (P 1 3 キナーゼ) を直接的又は間接的に標的にする、若しくはP 1 3 Kの活性／機能を低減又は阻害する薬剤である限り特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意のP 1 3 K 阻害剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意のP 1 3 K 阻害剤を意味する。当該P 1 3 K 阻害剤は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

[0055] (A k t 阻害剤)

「A k t 阻害剤」とは、A k t を直接的又は間接的に標的にする、若しくはA k tの活性／機能を低減又は阻害する薬剤である限り特に限定されず、例えば、政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意のA k t 阻害剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中である

かまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意のAkt阻害剤を意味する。当該Akt阻害剤は、単独の剤であっても2種以上の剤の併用をも含む。

図面の簡単な説明

[0056] [図1] 図1は、CD98を発現するレベルが上昇しているtPTEN-/-腫瘍、T-ALL/T-L細胞株、および初代サンプルについての図である。

[図1A] 図1Aは、PTEN-KO腫瘍（n=4）および正常マウス胸腺細胞（n=3）の間の遺伝子発現のヒートマップ分析を示した図である。倍数変化発現値（log2）をp値と一緒に示す。

[図1B-E] 図1B～Eは、抗マウスCD98ラットmAb染色、その後続く二次抗ラットFITC抗体による顕色の後の表面CD98レベルのフローサイトメトリ分析、特異的MFI/非特異的MFIの比を示した図である。

[図1B] 図1Bは、tPTEN-/-マウス（n=5）由来の初代腫瘍細胞を、正常WTマウス由来の胸腺細胞と比較した図である。P値は、95%の信頼水準で、ANOVAを使用し、その後、Dunnettの多重比較検定を続けることによって計算した。

[図1C] 図1Cは、静止またはPMA+イオノマイシン活性化（24時間）正常マウス胸腺細胞およびKO99L細胞の間のCD98発現レベルを示した図である。

[図1D] 図1Dは、初代T-ALLサンプル（n=3）、T-ALL/T-Lヒト細胞株、および正常静止PBLまたは活性化PBLにおけるCD98発現を示した図である。P値は、ANOVA-Dunnettを使用して計算した。

[図1E] 図1Eは、静止または24時間活性化ヒトPBLおよびT-ALLサンプル#1の間のCD98発現についてのFacsプロファイルを示した図である。

[図2]図2は、 $tPTEN-/-$ および $TALL/TLL$ 細胞モデルにおける $LA T-1$ 阻害の機能的効果についての図である。

[図2A]図2Aは、アミノ酸取込みの崩壊物 (*disruptor*) の存在下において $WST-1$ 細胞生存能力アッセイを使用する代謝活性についての分析を示した図である。細胞を、48時間、 $COMPOUND-JP$ 、 BCH 、または D -ロイシンと共にインキュベートした。 $COMPOUND-JP$ ：三通りの7回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM； p 値は、両側スチューデントの t 試験を使用して計算した； BCH 、 $D-Leu$ ：三通りの1回の実験。

[図2B]図2Bは、増殖を、 $BrdU$ 取込み $Elisa$ によって評価した図である。データは、四通り実行した2回の独立した実験の平均として示す（平均 $\pm$ SEM；スチューデントの t 試験）。

[図2C]図2Cは、細胞を、 $COMPOUND-JP$ により治療または治療せず、培地に、示される場合、非必須 (N) または必須 (E) アミノ酸を補足した図である。細胞生存能力は、48時間後に測定した（三通りの3回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM；スチューデントの t 試験）。

[図2D]図2Dは、細胞死を、治療の48時間後、 $DAPI$ 染色後にフローサイトメトリによって分析した図である（三通りの3回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM、スチューデントの t 試験）。

[図2E-G]図2E～Gにおいて、ヌードマウスに、 $KO99L-LUC$ 細胞を皮下に接種し、48時間後に $COMPOUND-JP$ (1.5 mg/マウス/日) により毎日治療した。腫瘍の測定は、18日後に行った；平均 $\pm$ SEM。生体発光は、 D -ルシフェリンの腹腔内注射後に $BioImager$ で記録した。

[図2E]図2Eは、腫瘍体積；スチューデントの t 試験を示した図である。

[図2F]図2Fは、全身マウスイメージングを示した図である。疑似カラー目盛は、ある期間にわたる相対的な生体発光変化を示す ($ph/s/r$ ：光子/秒/輝度 (*radiance*))。

[図2G]図2 Gは、腫瘍の生体発光定量化を示した図である。p 値は、両側M a n n - W h i t n e y 試験を使用して計算した。

[図2H]図2 Hは、示される用量のC O M P O U N D - J P の存在下における J u r k a t ヒト T - A L L 細胞の細胞生存能力の測定を示した図である。C O M P O U N D - J P は、T - A L L / T - L L モデルに影響を与える。

[図2I]図2 I は、同細胞増殖能力の測定を示した図である（3回の独立した実験の平均+/-SEM；スチューデントの t 試験）。

[図2J]図2 J は、ヒト T - A L L 初代サンプルの細胞生存能力に対する C O M P O U N D - J P の効果を示した図である（n = 5；1 回の実験、平均+/-SEM；p 値は、A N O V A、その後D u n n e t t の多重比較検定を使用して計算した；95%信頼水準）。

[図3]図3は、C O M P O U N D - J P が、カスパーゼ活性化、アポトーシス細胞死、および自食作用を誘発することについての図である。

[図3A]図3 A は、エフェクターによる48時間のインキュベーション期間、その後続くアネキシン-V-F I T C およびD A P I による染色の後のK O 9 9 L 細胞の代表的なサイトメトリプロットを示した図である。それぞれの状態における細胞の%を象限中に示す。データは、5 回の独立した実験を代表するものである。

[図3B]図3 B は、48時間のC O M P O U N D - J P によるK O 9 9 L 細胞の刺激の後に、ミトコンドリアの電位差を、T M R E 染色後にF a c s によって測定した図である。B 1、F a c s プロファイル；B 2、結果の定量化。2 回の独立した実験の代表。

[図3C]図3 C は、K O 9 9 L 細胞におけるカスパーゼ3 活性化の時間的経過ウェスタンブロッティング分析を示した図である。C 1 d C 3 = 切断されたカスパーゼ3（活性）。3 回の独立した実験の代表。

[図3D]図3 D は、D 1、R e d - D E V D - f m k 蛍光基質を使用する、48時間後のカスパーゼ3 活性化についてのF a c s プロファイルを示した図である。D 2、2 回の独立した実験を代表する結果の定量化。

[図3E]図3Eは、KO99L細胞におけるカスパーゼ3によるPARP切断の時間的経過ウェスタンブロッティング分析を示した図である。

[図3F]図3Fは、48時間の治療、その後続くPI染色およびFacs分析の後の、初代tPTEN-/-株におけるCOMPOUND-JPによる細胞死誘発を示した図である（n=5、平均+/-SEM、スチューデントのt試験）。

[図3G]図3Gは、初代tPTEN-/-腫瘍細胞におけるカスパーゼ3活性化およびPARP切断のウェスタンブロッティング分析を示した図である。

COMPOUND-JP 5.0 μ M (J5)、10.0 μ M (J10) ; PI 10.0 μ M (PI)、ラパマイシン (R: 10.0 nM)。

[図3H]図3Hは、KO99L細胞において、COMPOUND-JP (10.0 μ M) によって誘発されるLC3プロセッシングのウェスタンブロッティング分析を示した図である。

[図3I]図3Iは、KO99L細胞における、COMPOUND-JP誘発性のLC3プロセッシングおよびJNK活性化に対するカスパーゼ阻害の時間的経過効果を示した図である。QVD-OHは、20.0 μ Mで使用する。ウェスタンブロットデータはすべて、少なくとも3回の独立した実験を代表するものである。

[図4]図4は、LAT1機能のターゲティングが、mTORC1活性化にインビトロおよびインビボにおいて干渉することについての図である。

[図4A]図4Aは、示される用量のCOMPOUND-JPによるKO99L細胞に対する時間的経過実験を示した図である。総細胞溶解物は、特定の抗体によるウェスタンブロッティングによって分析した。データは、少なくとも3回の独立した実験を代表するものである。

[図4B]図4Bは、COMPOUND-JPにより治療（赤色／青色の線）（10 μ M）した、または未治療のT-ALL初代サンプル（n=2、二通り）（黒色の線）におけるホスホS6RP mAbによるホスホフロー染色を示した図である。アイソタイプコントロールは、グレーの線で示す（平均+/-

ーSEM)。未治療または治療サンプルの曲線を、ピークの高さに対して標準化した。イベント (10^4) をそれぞれのサンプルについて得た。条件について二通り実行した。

[図4C]図4Cは、未治療またはCOMPOUND-JPにより治療したマウス ($50\text{ mg/kg/day} = 1.5\text{ mg/マウス/day}$) における腫瘍内の壊死 (HES染色、左のパネル) およびmTORC1活性化 (ホスホS6Rレベル、右のパネル) についての免疫組織化学的検査分析を示した図である。倍率: $40\times$; スケールバー $50\mu\text{m}$ 。

[図4D]図4Dは、示される阻害剤によるKO99L細胞の刺激の後のc-mycレベルのウェスタンブロッティング分析を示した図である。COMPOUND-JP (JPH) ($10.0\mu\text{M}$)、ベルケイド (Vel) (15.0 nM)、ラパマイシン (Rapa) (100 nM)、KU0063794 (KU) ($10.0\mu\text{M}$)、MK2206 (MK; $5.0\mu\text{M}$)。データは、少なくとも3回の独立した実験を代表するものである。

[図5]図5は、COMPOUND-JPの作用に対する、誘発性のストレス応答の関与についての図である。

[図5A]図5Aは、KO99L細胞における、ウェスタンブロッティングによる、CHOPタンパク質レベルの分析を示した図である。COMPOUND-JP $10.0\mu\text{M}$ 、L-アスパラギナーゼ 2.5 U/ml (Lasp)、Erwinase 2.5 U/ml (Erw)。

[図5B]図5Bは、KO99L細胞における、ウェスタンブロッティングによる、CHOPタンパク質レベルの分析を示した図である。COMPOUND-JP $5.0\mu\text{M}$ (J5)、 $10.0\mu\text{M}$ (J10); ベルケイド 8.0 nM (V8)、 15.0 nM (J15)、ラパマイシン 10.0 nM (R)。

[図5C]図5Cは、シグナル経路に対するアミノ酸枯渇/補完の効果を示した図である。培地は、HBSSにより10%まで希釈し、回収およびウェスタンブロッティング分析の前に非必須 (NEAA) ($100\times$) または必須 (EAA) アミノ酸 ($50\times$) を補足した。

[図5D]図5Dでは、アミノ酸は、COMPOUND-JP (10 μ M) の存在下において完全培地に追加した。

[図5E]図5Eでは、細胞は、COMPOUND-JP (10 μ M) の追加の前に30分間、salubrinal (50 μ M) により治療した。

[図5F]図5Fは、salubrinalに対するCOMPOUND-JP効果についての反応性を示した図である。DAPI染色によって視覚化される細胞死（データは、三通り実行した3回の独立した実験を代表するものである；平均+/-SEM；スチューデントのt試験）。増殖は、BrdU Elisa

[図5G]図5Gは、salubrinalに対するCOMPOUND-JP効果についての反応性を示した図である。（三通り実行した1回の実験；平均+/-SEM；スチューデントのt試験）または細胞計数。

[図5H]図5Hは、salubrinalに対するCOMPOUND-JP効果についての反応性を示した図である。（データは、三通り実行した3回の独立した実験を代表するものである；平均+/-SEM；スチューデントのt試験）によって評価した。

[図6]図6は、COMPOUND-JPによって動員される、誘発性のストレス応答の分子の特徴付けについての図である。

[図6A-C]図6A～Cは、KO99L細胞のCOMPOUND-JP (10 μ M) の刺激に際してISR構成成分の時間的経過ウェスタンブロッティング分析を示した図である。

[図6D]図6Dは、KO99L細胞のCOMPOUND-JP (10 μ M) 刺激に際してのBcl2ファミリーメンバーの時間的経過ウェスタンブロッティング分析を示した図である。

[図6E]図6Eは、COMPOUND-JP誘発性のBcl2ファミリーメンバーに対するsalubrinalの効果を示した図である。Hsp90は、ローディングコントロールとして使用した。データはすべて、少なくとも3回の独立した実験を代表するものである。

[図7]図7は、COMPOUND-J P抵抗性の変異体の特徴付けについての図である。

[図7A-C]COMPOUND-J Pに対して感受性のKO99L細胞の親の細胞(KO99-S)を、薬剤の濃度を増加させながら、数か月間、インキュベートし、生存する抵抗性の細胞(KO99-RJ)が、得られた。

[図7A]図7Aは、COMPOUND-J Pの濃度を増加させながらの培養の48時間後の、WST-1アッセイによる細胞生存能力の分析を示した図である(四通り実行した5回の独立した実験の平均+/-SEM; スチューデントのt試験)。

[図7B]図7Bは、COMPOUND-J Pの濃度を増加させながらの培養の48時間後のPI染色による細胞死の分析を示した図である(四通り実行した少なくとも3回の独立した実験の平均; 平均+/-SEM、スチューデントのt試験)。

[図7C]図7Cは、親の細胞と比較した、抵抗性の変異体における、CHOP誘発およびS6RPリン酸化のウェスタンブロッティング分析を示した図である。データは、少なくとも3回の独立した実験を代表するものである。

[図8]図8は、COMPOUND-J Pおよび化学療法剤の間の組み合わせ研究についての図である。

[図8A-B]KO99L細胞は、ラパマイシン、PI-103、KU0063794、ドキソルビシン、デキサメタゾン(DXM)、ベルケイド、またはL-アスパラギナーゼ(L-aspar)と組み合わせた、最適以下の濃度のCOMPOUND-J Pと共にインキュベートされた。生存能力は、WST-1アッセイによって48時間後に測定した。結果は、3回の独立した実験の平均+/-s. e. mである。P値は、ANOVA、その後続くTukeyの多重比較検定を使用して計算した。

[図8A]図8Aは、組み合わせインデックス(CI)の発現についてのヒートマップを示した図である。薬剤の間の相乗作用は、Chou-Talalay法を使用して分析した。

[図8B]図8Bは、組み合わせ効果についてのアイソログラムを示した図である。右上の枠で囲んだ数は、生細胞の%を示す。

[図9-1.2]図9-1、2は、本発明に係る化合物の反応スキームを示した図である。

[図S1A]図S1Aは、COMPOUND-JPは、正常胸腺細胞ではなく、初代tPTEN-/-細胞の生存に干渉することを示した図である。tPTEN KO腫瘍（-/-）または正常胸腺細胞（+/+）由来の新鮮な初代細胞を、細胞生存能力についてのWST-1分析の前に、示される用量のCOMPOUND-JPと共にインキュベートした。

[図S1B-D]図S1B~Dは、COMPOUND-JPは、正常ヒト血球に対して毒性ではないことを示した図である。

[図S1B-C]図S1B、Cは、ヒト臍帯血単核細胞が、生きた細胞のDAPI染色およびFacs定量化の48時間前に、示される用量のCOMPOUND-JPと共にインキュベートした。健康なドナー由来の静止または抗CD3（48時間、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）活性化ヒト末梢血リンパ球の細胞死分析（B）および増殖応答（C）（ $n=3$ ）を示した図である。STS=スタウロsporin（ $1.0 \mu\text{M}$ ）は、細胞死のポジティブな誘発因子である。

[図S1D]図S1Dは、生きた細胞のDAPI染色およびFacs定量化後に分析したCOMPOUND-JP（48時間）の存在下における正常ヒト臍帯血細胞の生存能力を示した図である。

[図S2]図S2は、シグナル伝達阻害剤の効果を示した図である。特定の抗体によるウェスタンブロッティングによる分析の前のSDS-PAGEによって分離される総細胞溶解物を示した。示される用量のMK2206（ $5 \mu\text{M}$ ）、KU0063794（ $5 \mu\text{M}$ ）、ラパマイシン（ 10nM ）、Erwinase（ $2.5 \text{U}/\text{ml}$ ）、L-アスパラギナーゼ（ $2.5 \text{U}/\text{ml}$ ）、ベルケイド（ 15nM ）によるKO99L細胞に対する時間的経過実験。データは、3回の独立した実験を代表するものである。

[図S3-1.2]図S3-1、2は、組み合わせ研究を示した図である。KO99

L A T P T E N-/-細胞は、W S T 1 アッセイを使用する生存能力測定の前に、示される濃度で、48時間、他の薬剤と組み合わせたC O M P O U N D-J Pと共にインキュベートした。

[図S4]図S4は、C O M P O U N D-J PによるL A T 1 ターゲティングの分子イベントを示した図である。

[図10]図10は、ヒトの各種がん由来樹立培養細胞に発現する中性アミノ酸トランスポーター、L A T 1 及びL A T 2 遺伝子の定量結果を示した図である。単位R N A 当りのm R N A 量を縦軸に、使用したがん細胞名を横軸に、がん種別名を表中に記した。上段はL A T 1 を下段はL A T 2 を記した。

[図11]図11は、L A T 1 選択性阻害薬、C O M-J P のヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来P a n c-1細胞の増殖に及ぼす抑制効果を示した図である。各値は同一条件での4例の平均値をC O M-J P の非存在での活性を100%とした相対値として表示した。平均値と標準誤差並びに有意差検定のp値を図中に示した。

[図12]図12は、L A T 1 選択性阻害薬、C O M-J P と既存薬ゲムシタビン(G E M)とパクリタキセル(P a c)の単独並びに併用作用を示す実験手順を示した図である。

[図13]図13は、ヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞の増殖に及ぼすC O M-J P と他剤との併用効果を示した図である。ヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞の増殖に及ぼすG e m s t a b i n e 並びにP a c l i t a x e l を単独で2時間作用させた効果は各群カラムの左の棒グラフの値の差に相当する。各実験は同一条件の群を夫々3例測定し、平均値と標準誤差並びに有意差検定のp値を図中に示した。

[図14]図14は、ヒト膵がん由来P a n c-1細胞の増殖に及ぼすC O M-J P と他剤との併用効果を示した図である。ヒト膵がん由来P a n c-1細胞の増殖に及ぼすG e m s t a b i n e 並びにP a c l i t a x e l を単独で2時間作用させた効果は各群カラムの左の棒グラフの値の差に相当する。各実験は同一条件の群を夫々3例測定し、平均値と標準誤差並びに有意差検定の

p 値を図中に示した。

[図15] 図 1 5 は、ヒト大腸がん由来 H T - 2 9 細胞播種ヌードマウスモデルでの腫瘍増殖に及ぼす C O M - J P と 5 - F U との併用効果を示した図である。

[図16] 図 1 6 は、ヒト大腸がん由来 H T - 2 9 細胞の同所播種ヌードマウスモデル (S O I m o d e l) での腫瘍増殖に及ぼす C O M - J P と C D D P との併用による相乗効果を示した図である。図 1 6 には各処置グループでの腫瘍の大きさを棒グラフに示した。グループ 1 は対照群、2 ~ 4 は C O M - J P を夫々 3 . 1 , 1 2 . 5 , 5 0 m g / K g / 日体重を 4 週間連日腹腔内単独投与、グループ 5 は C D D P を 2 . 5 m g / K g / 日、0 , 6 , 1 3 日目の 3 回腹腔内単独投与、グループ 6 ~ 8 には同 2 ~ 4 と 5 の組み合わせでの併用投与、グループ 9 は C O M - J P を 3 0 0 m g / K g / 日を 4 週間連日経口投与を行った。

発明を実施するための形態

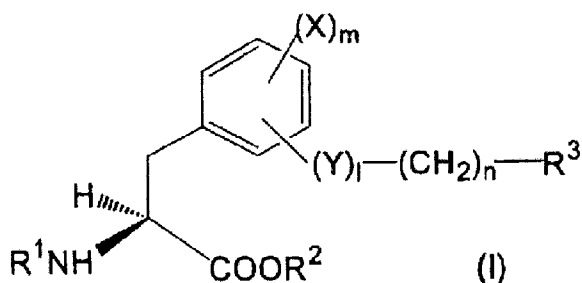
[0057] 《有効成分》

[0058] 本発明に係る L A T 1 阻害剤は、下記化合物 1 ~ 1 0 に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を有効成分として含む。

[0059] 化合物 1 は、

式 (I) :

【化 1】



[式中、X はハロゲン原子又はアルキル基もしくはアルコキシル基であり、
Y は O 又は N H であり、
l は 0 又は 1 であり、

mは0、1又は2であり、

nは0～5の整数であり、

R¹は、水素原子又はアミノ保護基であり、

R²は、水素原子もしくはアルキル、アラルキル又はアリアル基であり、

R³は、(1) ハロゲン原子；

(2) アミノ部分が低級アルキルで置換されていてもよいアロイルアミノ基；

(3) フェニル、フェノキシ、ピリジル、ピリミジニルもしくはキノリルで置換されたフェニル基（ここで、該フェニル基における各置換基は、ハロゲン原子、シアノ、ヒドロキシ、カルボキシ、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、フェニル、ジ低級アルキルアミノもしくはチオモルホリニルでさらに置換されていてもよい）；

(4) ナフチル基もしくはテトラヒドロナフチル基（ここで、該ナフチル基はヒドロキシ、低級アルコキシもしくはジ低級アルキルアミノで置換されていてもよく、ジ低級アルキルアミノはハロゲン原子もしくはヒドロキシでさらに置換されていてもよく、ナフチル基が置換されていないとき、nは0または2であり、ナフチル基がヒドロキシで置換されているとき、Xはクロル原子であり、mは0でない）；

(5) 低級アルキル、フェニル、ナフチルもしくはテトラヒドロキノリルで置換されたN、O及び／又はS含有の、不飽和の単環複素環式基（ここで、該単環複素環式基における各置換基はハロゲン原子、ヒドロキシもしくはフェニルでさらに置換されていてもよく、この場合、mは1又は2であり、lは1である）；または

(6) オキソ、カルボキシ、アミノ、低級アルキル、低級アルコキシ、シクロアルキル、ジ低級アルキルアミノ、低級アルコキシカルボニル、ジ低級アルキルカルバモイル、フェニル又はN、O及び／又はS含有の、飽和もしくは不飽和の単環複素環式基で置換されていてもよいN、O及び／又は

S含有の、不飽和又は部分的に飽和されていてもよい縮合複素環式基（ここで、該縮合複素環式基における各置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、低級アルキル、低級アルコキシ、フェニル、ジ低級アルキルアミノ、低級アルカノイルオキシ、ビス〔ハロ（低級）アルキル〕アミノもしくはN-低級アルキル-N-ヒドロキシ（低級）アルキルアミノでさらに置換されていてもよく、この場合、mは1又は2である）

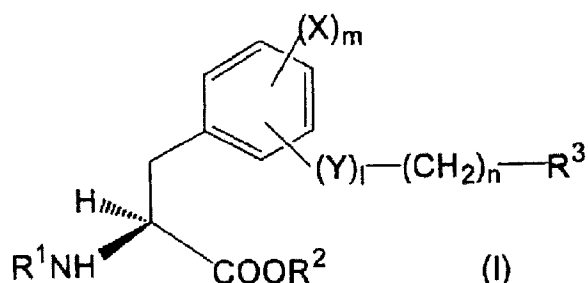
である]

で表される芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理的に許容しうる塩である。

[0060] 化合物2は、

式(1)：

【化2】



[式中、Xは塩素もしくはヨウ素原子又はアルキルもしくはアルコキシル基であり、

YはO又はNHであり、

lは0又は1であり、

mは0又は2であり、

nは0～5の整数であり、

R¹は、水素原子又はトリフルオロアセチルもしくはt-ブトキシカルボニル基であり、

R²は、水素原子もしくはアルキル基であり、

R³は、(1) 臭素原子；

(2) アミノ部分が低級アルキルで置換されていてもよいアロイルア

ミノ基；

(3) フェニル、フェノキシ、ピリジル、ピリミジニルもしくはキノリル基で置換されたフェニル基（ここで、該フェニル基における各置換基は、ハロゲン原子又はシアノ、ヒドロキシ、カルボキシ、低級アルコキシ、低級アルコシカルボニル、フェニル、ジ低級アルキルアミノもしくはチオモルホリニルでさらに置換されていてもよく、この場合、Xは塩素原子である）；

(4) ナフチル基もしくはテトラヒドロナフチル基（ここで、該ナフチル基はヒドロキシ、ジ（2-ヒドロキシエチル）アミノもしくはジ（2-クロロエチル）アミノ基で置換されていてもよく、ナフチル基が置換されていないとき、nは0または2であり、ナフチルがヒドロキシで置換されているとき、Xは塩素原子であり、mは2である）；または、

(5) フェニル、ナフチルもしくはテトラヒドロキノリルで置換されたN、O及び／又はS含有の、不飽和の単環複素環式基（ここで、該単環複素環式基における各置換基はハロゲン原子又はヒドロキシもしくはフェニルでさらに置換されていてもよく、この場合、Xは塩素原子であり、mは2であり、lは1である）である]

で表される芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0061] 化合物3は、

R³の(5)における不飽和の単環複素環式基が、N含有、N及びO含有又はN及びS含有の5員環又は6員複素環式基である化合物2に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0062] 化合物4は、

R³の(5)における不飽和の単環複素環式基が、ピリジル、オキサゾリル又はチアゾリルである化合物2または3に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0063] 化合物 5 は、

R¹が水素原子である化合物 2～4 のいずれか 1 つに記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0064] 化合物 6 は、

R¹がトリフルオロアセチル又は α -ブトキシカルボニル基である化合物 2～4 のいずれか 1 つに記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0065] 化合物 7 は、

R³が、(3) フェニル、フェノキシ、ピリジル、ピリミジニルもしくはキノリル基で置換されたフェニル基（ここで、該フェニル基における各置換基は、ハロゲン原子又はヒドロキシもしくはジ低級アルキルアミノ基でさらに置換されていてもよく、この場合、Xは塩素原子である）；

(4) ヒドロキシで置換されていてもよいナフチル基（ここで、ナフチルがヒドロキシで置換されているとき、Xは塩素原子であり、mは2である）；または

(5) フェニルもしくはナフチル基で置換されたN及びO含有の不飽和の単環複素環式基（ここで、該単環複素環式基における各置換基はヒドロキシ基でさらに置換されていてもよく、この場合、Xは塩素原子であり、mは2であり、lは1である）；

である、

化合物 2 に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩である。

[0066] 化合物 8 は、

R³が、(3) フェニルもしくはピリジル基で置換されたフェニル基（ここで、該フェニル基における各置換基は、ハロゲン原子もしくはジ低級アルキルアミノ基でさらに置換されていてもよく、この場合、Xは塩素原子である）；または

(4) ヒドロキシ基で置換されていてもよいナフチル基（ここで、

ナフチルがヒドロキシで置換されているとき、Xは塩素原子であり、mは2である)

である、

化合物2に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理的に許容しうる塩である。

[0067] 化合物9は、

R³が、(3)ジ低級アルキルアミノ基で置換されたピリジルで置換されたフェニル基(ここで、この場合、Xは塩素原子である)；

(4)ナフチル基(ここで、nは0または2である)；または

(5)ナフチル基で置換されたN及びO含有の不飽和単環複素環式基

である、

化合物2に記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理的に許容しうる塩である。

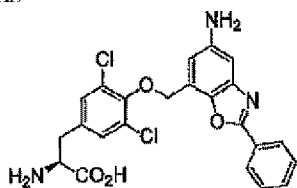
[0068] 化合物10は、

Xが塩素又はヨウ素原子である化合物2～9のいずれか1つに記載の芳香族アミノ酸誘導体又はその薬理的に許容しうる塩である。

[0069] また、本発明に係るLAT1阻害剤であるCOMPOUND-JPは、下記式(11)で示されるO-(5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル)メチル-3,5-ジクロロ-L-チロシン又はその薬理的に許容しうる塩である。この化合物11又はその薬理的に許容しうる塩は、本発明に係る抗悪性腫瘍剤組成物として、特に好適である。

[化11]

(11)



[0070] ここで、「薬理的に許容しうる塩」とは、例えばアルカリ金属塩(ナト

リウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩など）、アンモニウム塩、有機塩基（トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、ジシクロヘキシルアミン、ジベンジルエチレンジアミンなど）との塩、有機酸（酢酸、安息香酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、グルコン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ギ酸、p-トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸など）との塩、無機酸（塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸など）との塩、アミノ酸（アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸など）との塩が挙げられる。

[0071] また、当該化合物及びその塩は、水和物、エタノラートのような溶媒和物の形態であってもよい。加えて、水溶性を向上させるため、当該化合物又はその塩は、サイクロデキストリン（例えば、 β -サイクロデキストリン）の包接体であることが好適である。ここで、当該化合物又はその塩：サイクロデキストリン（質量比）は、好適には1：10～70、より好適には1：20～50、特に好適には1：25～35、である。

[0072] 本発明に係るLAT1阻害剤は、抗LAT1抗体を含む。抗LAT1抗体は、LAT1を特異的に認識できる抗体である限り特に限定されず、例えば、抗hLAT1モノクローナル抗体、抗マウスLAT1モノクローナル抗体、抗hLAT1ポリクローナル抗体、抗マウスLAT1ポリクローナル抗体を挙げることができる。

[0073] ここで、抗LAT1抗体は、LAT1を抗原とし、当該抗原に結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体等を適宜用いることができる。

[0074] また、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産

生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、例えば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。そして、抗LAT1モノクローナル抗体を作製する際には、LAT1若しくは当該タンパク質の断片を抗原として使用することができ、また、LAT1若しくは当該タンパク質の断片を発現する細胞を抗原として使用することができる。なお、LAT1若しくは当該タンパク質の断片は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1－3巻 Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載された方法に準じて、取得することができる。また、LAT1若しくは当該タンパク質の断片を発現する細胞も、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1－3巻 Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載された方法に準じて、取得することができる。

[0075] ポリクローナル抗体は、抗原を、市販のアジュバント（例えば、完全又は不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し（部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく）、最終免疫から約3～10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

[0076] 《投与方法》

本発明に係る抗悪性腫瘍剤組成物は、例えば、経口、経皮又は注射により投与することができる。

[0077] 経口投与用の錠剤、顆粒及びカプセル剤は、慣用の添加剤、例えば、結合剤（例えばシロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガント又はポリビニルピロリドン）；充填剤（例えば乳糖、砂糖、トウモロコシ澱粉、リン酸カルシウム、ソルビトール又はグリシン）；用滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール又はシリカ）；崩

壊剤（例えば馬鈴薯澱粉）又は湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）を含んでいてもよい。錠剤、顆粒及びカプセル剤は、通常の製剤の分野で公知の方法で被膜を形成してもよい。

[0078] 経口投与用の液体製剤は、例えば水性又は油性の懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ又はエリキシルの形態であってもよく、使用前に水又は他の適切な溶剤に溶解する凍結乾燥製剤としてもよい。液体製剤は通常の添加剤、例えば懸濁化剤（例えばソルビトール、シロップ、メチルセルロース、グルコースシロップ、ゼラチン水添加食用脂）；乳化剤（例えばレシチン、ソルビタンモノオレエート又はアラビアゴム）；非水性賦形剤（例えばアーモンド油、分画ココヤシ油又はグリセリン、プロピレングリコール又はエチルアルコールのような油性エステル）；保存剤（例えばメチル又はプロピル *p*-ヒドロキシ安息香酸塩又はソルビン酸）及び着香剤又は着色剤を含んでいてもよい。

[0079] 経皮投与する場合、有効成分はクリーム、ローション又は軟膏の形態をとっていてもよい。薬剤として用いることができるクリーム又は軟膏製剤は、当該分野で周知の方法により調製することができる。

[0080] また、注射剤は、当該化合物又はその塩を適当な媒体に懸濁又は溶解させることにより製造することができる。注射剤には、局所麻酔剤、保存剤及び緩衝剤のようなアジュバント等を含んでいてもよい。

[0081] <投与量>

本発明に係る抗悪性腫瘍剤組成物の投与量は、患者の年齢、体重、全身的な健康度、性別、投与時間、投与経路、疾患の重篤度を含む種々の要因によって適宜調整することができ、限定されないが、例えば、通常、成人1日あたり10～5000mg程度、好ましくは100～3000mg程度を、1～5回に分けて投与することが適当である。

[0082] 本発明に係るLAT1阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上

の剤の用量（質量比）についても、患者の年齢、体重、全身的な健康度、性別、投与時間、投与経路、疾患の重篤度を含む種々の要因によって適宜調整することができ、限定されないが、例えば、各々単独使用に係る成人1日あたりの通常用量を1とすると、通常、成人1日あたり、LAT1阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上の剤の質量比は、0.1 : 1 ~ 1 : 0.1が適当である。

実施例

[0083] 以下に、当該化合物の製造法を製造例により、また、前記医薬組成物としての作用等を試験例、その結果および考察により詳細に説明する。前記サイクロクロデキストリン包接体の製造例は、製造例32により説明する。

[0084] 《製造例》

（製造例1）

1) 28%アンモニア水（20ml）とテトラヒドロフラン（30ml）の混液中に、氷冷攪拌下、2-ナフトイルクロリド（5.70g, 29.9mmol）のテトラヒドロフラン（60ml）溶液を滴下し、室温で4時間攪拌した。反応液から溶媒を減圧留去して、残渣に水を加えて、析出物をろ取り、乾燥して2-カルバモイルナフタレン（2.68g, 52%）を無色固体として得た。

IR (Nujol) 3378, 3194, 1685, 1655 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 172 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2) 2-カルバモイルナフタレン（2.64g, 15.4mmol）と4-クロロアセト酢酸エチル（2.06g, 12.5mmol）の混合物を160℃で1時間攪拌後、室温にて酢酸エチル（200ml）で希釈して、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（n-ヘキサン／酢酸エチル=8~4）で精製して、[2-（2-ナフチル）-オキサゾール-

4-イル] 酢酸エチルエステル (459 mg, 13%) を黄色結晶として得た。

m. p. : 61.5~64°C、IR (Nujol) 1737, 1591 cm^{-1} 、 ^1H NMR (CDCl_3) : δ 1.31 (3H, t, $J=7.1$ Hz), 3.73 (2H, d, $J=1.1$ Hz), 4.24 (2H, q, $J=7.1$ Hz), 7.49–7.57 (2H, m), 7.76 (1H, t, $J=1.1$ Hz), 7.82–7.95 (3H, m), 8.11 (1H, dd, $J=1.7, 8.7$ Hz), 8.58 (1H, br d, $J=1.1$ Hz)、APCI-MS m/z : 282 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3) リチウムアルミニウムヒドライド (66 mg, 1.74 mmol) のテトラヒドロフラン (15 ml) 懸濁液に、氷冷攪拌下、[2-(2-ナフチル)-オキサゾール-4-イル] 酢酸エチルエステル (434 mg, 1.54 mmol) のテトラヒドロフラン (20 ml) 溶液を滴下し、同温度で2.5時間攪拌した。反応液に同温度で水 (0.1 ml)、15%水酸化ナトリウム水溶液 (0.1 ml)、水 (0.3 ml)、硫酸ナトリウム (3 g) を順に加え、不溶物をろ去し、ろ液から溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=2~1) で精製して、2-[2-(2-ナフチル)-オキサゾール-4-イル] エタノール (323 mg, 88%) を淡黄色結晶として得た。

m. p. : 96~98°C、IR (Nujol) 3466, 1591, 1543 cm^{-1} 、 ^1H NMR (CDCl_3) : δ 2.85–2.90 (2H, m), 2.93 (1H, t, $J=6.0$ Hz), 3.99 (2H, q, $J=6.0$ Hz), 7.50–7.57 (2H, m), 7.58 (1H, t, $J=1.0$ Hz), 7.82–7.96 (3H, m), 8.10 (1H, dd, $J=1.7, 8.6$ Hz), 8.52 (1H, br)、APCI-MS m/z : 240 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0085] (製造例2)

1) 3-アミノ-2-ヒドロキシ安息香酸メチルエステル塩酸塩 (2.0 g

, 12.0 mmol)、N, N'-ジメチルアニリン (3.04 ml, 24.0 mmol)、及びテトラヒドロフラン (20 ml) の混合物に氷冷攪拌下、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (2.34 g, 13.2 mmol)、トリエチルアミン (1.83 ml, 13.2 mmol)、及びテトラヒドロフラン (10 ml) の混合物を滴下し、同温度で2時間攪拌した。反応液を塩化メチレン (200 ml) で希釈し、水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して、溶媒を減圧留去した。残渣をアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロマトレックス (登録商標) NH) (n-ヘキサン/酢酸エチル=4 及びクロロホルム/酢酸エチル=1) で精製して、2-ヒドロキシ-3-イソニコチノイルアミノ安息香酸メチルエステル (2.37 g, 73%) を淡黄色結晶として得た。

m. p. : 157~158°C、IR (Nujol) 3423, 1669, 1555, 15

42 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 273 [M+H]⁺

2) 2-ヒドロキシ-3-イソニコチノイルアミノ安息香酸メチルエステル (500 mg, 1.84 mmol)、p-トルエンスルホン酸一水和物 (349 mg, 1.84 mmol) 及びキシレン (20 ml) の混合物を14時間加熱還流した後、p-トルエンスルホン酸一水和物 (349 mg, 1.84 mmol) を追加して、2時間加熱還流した。反応液を氷冷し、酢酸エチル、10%炭酸カリウム水溶液を加え、分液し、有機相を水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥した。溶媒を減圧留去して、残渣をn-ヘキサン/ジイソプロピルエーテル (4/1) 混液で粉碎し、ろ取後乾燥して、[2-(4-ピリジル)-ベンズオキサゾール-7-イル]カルボン酸メチルエステル (382 mg, 82%) を淡黄色結晶として得た。

m. p. : 149~151°C、IR (Nujol) 1725 cm⁻¹、APCI-MS

m/z : 255 [M+H]⁺

3) [2-(4-ピリジル)-ベンズオキサゾール-7-イル]カルボン酸

メチルエステル (360 mg, 1.42 mmol) のテトラヒドロフラン (15 ml) 溶液に氷冷攪拌下、リチウムアルミニウムハイドライド (53 mg, 1.42 mmol) を10分間かけ加え、同温度で0.5時間攪拌した。反応液に同温度で10%含水テトラヒドロフラン (2 ml)、30%水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 ml) を順に滴下し室温で2時間攪拌した。生じた不溶物をろ去し、ろ液の溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた結晶をn-ヘキサン/ジイソプロピルエーテル (1/1) 混液で粉碎し、ろ取後乾燥して、[2-(4-ピリジル)-ベンズオキサゾール-7-イル] メタノール (216 mg, 67%) を無色結晶として得た。

m. p. : 146~147°C、IR (Nujol) 3221, 1595, 1541 cm^{-1} 、 ^1H NMR (CDCl_3) : δ 2.35 (1H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 5.08 (2H, d, $J=5.9\text{ Hz}$), 7.38–7.51 (2H, m), 7.76 (1H, dd, $J=1.4, 7.8\text{ Hz}$), 8.07–8.09 (2H, m), 8.78–8.81 (2H, m)、APCI-MS m/z : 227 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0086] (製造例3)

1) 3-ヒドロキシベンズアルデヒド (1.72 g, 14.1 mmol)、4-メトキシフェニルボロン酸 (3.16 g, 20.8 mmol)、モレキュラーシーブス4A粉末 (1.95 g) 及び酢酸第二銅 (2.96 g, 16.3 mmol) の塩化メチレン (100 ml) 懸濁液に室温でトリエチルアミン (7.1 ml, 51 mmol) を滴下し、27.5時間攪拌した。反応液を酢酸エチル (200 ml) で希釈し、不溶物をろ去し、酢酸エチルで洗浄した。ろ洗液を10%塩酸、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=7) で精製して、3-[(4-メトキシ)フェノキシ]ベンズアルデヒド (596 mg, 19%) を淡褐色油状物として得た。

IR (Neat) 2835, 1699, 1584, 1504 cm^{-1} 、GC

ESI-MS m/z : 228 (M^+)

2) 3-[(4-メトキシ)フェノキシ]ベンズアルデヒド (573 mg, 2.51 mmol) のエタノール (10 ml) 溶液に氷冷攪拌下、水素化ほう素ナトリウム (158 mg, 4.18 mmol) を加え、室温で25分間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチルで希釈し、水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/酢酸エチル=20) で精製して、3-[(4-メトキシ)フェノキシ]ベンジルアルコール (469 mg, 81%) を無色油状物として得た。

IR (Neat) 3356, 1611, 1586, 1504 cm^{-1} , ^1H

NMR (CDCl_3): δ 1.67 (1H, t, $J=5.3\text{ Hz}$), 3.81 (3H, s), 4.65 (2H, br d, $J=4.6\text{ Hz}$), 6.84–6.91 (3H, m), 6.93–7.06 (4H, m), 7.28 (1H, t, $J=7.9\text{ Hz}$), GCESI-MS m/z : 230 (M^+)

[0087] (製造例4)

製造例3で得た3-[(4-メトキシ)フェノキシ]ベンジルアルコールを常法により脱メチル化して、3-[(4-ヒドロキシ)フェノキシ]ベンジルアルコールを淡黄色油状物として得た。

IR (Neat) 3350, 1603, 1585, 1505 cm^{-1} , ^1H

NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$): δ 3.57 (1H, t, $J=5.9\text{ Hz}$), 4.60 (2H, d, $J=5.5\text{ Hz}$), 6.79–6.90 (5H, m), 6.92–6.96 (1H, m), 6.98–7.04 (1H, m), 7.24 (1H, t, $J=7.8\text{ Hz}$), 8.49 (1H, s), ESI-MS m/z : 215 [$M-H$]

[0088] (製造例5)

2-ブロモ-6-メトキシナフタレン (3.0 g, 12.7 mmol) のテトラヒドロフラン (45 ml) 溶液に、アルゴン雰囲気下 -60°C で n -ブチルリチウムのヘキサン溶液 (1.5 M; 8.9 ml, 13.4 mmol)

を滴下し、同温度で70分間攪拌後、トリ-n-ブチルボレート（5.2 ml, 19.0 mmol）を加え同温度で1時間、5℃で1.5時間攪拌した。反応液に5℃で20%塩酸（13 ml）を滴下後、水を加え、室温にて酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル及びジエチルエーテルで粉碎後、ろ取り乾燥して、（2-メトキシ）-6-ナフタレンボロン酸（1.50 g, 59%）を無色固体として得た。

m. p. : 301~311℃、IR (Nujol) 3290, 1625 cm⁻¹、¹H NMR (DMSO-d₆) : δ 3.87 (3H, s), 7.14 (1H, dd, J=2.6, 9.0 Hz), 7.28 (1H, d, J=2.6 Hz), 7.74 (1H, d, J=8.2 Hz), 7.79-7.84 (2H, m), 8.06 (2H, s), 8.28 (1H, s)。

[0089] (製造例6)

[2-(3-メトキシフェニル)-ベンズオキサゾール-7-イル]メタノール（457 mg, 1.79 mmol）の塩化メチレン（10 ml）懸濁液に-78℃で三臭化ほう素の塩化メチレン溶液（1.0 M; 7 ml, 7 mmol）を滴下し、同温度で1時間攪拌後、冷却浴をはずして、室温で2.5時間攪拌した。反応液を氷水（50 ml）中に注ぎ込み、有機層を分取後、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（n-ヘキサン/酢酸エチル=3~1）で精製して、7-ブロモメチル-2-(3-ヒドロキシフェニル)-ベンズオキサゾール（535 mg, 98%）を褐色固体として得た。

m. p. : 225~228℃、IR (Nujol) 3147, 1602, 1559 cm⁻¹、¹H NMR (DMSO-d₆) : δ 5.02 (2H, s), 7.04 (1H, ddd, J=0.9, 2.4, 8.0 Hz), 7.36-7.54 (3H, m), 7.62-7.71 (2H, m), 7.78 (1H, dd, J=1.2, 8.0 Hz), 10.0 (1H, s)、APC

1-MS m/z : 304/306 [M+H]⁺

[0090] (製造例7)

5-ブロモベンゾ [b] フラン (1.0 g, 5.0 mmol) のテトラヒドロフラン (10 ml) 溶液に、アルゴン雰囲気下、-60℃でn-ブチルリチウムのヘキサン溶液 (1.5 M; 3.72 ml, 5.6 mmol) を滴下し、同温度で30分間攪拌後、トリメチルボレート (0.69 ml, 6.0 mmol) を加え4時間かけて室温まで昇温させた。反応液に5℃で水 (5 ml) を加え、テトラヒドロフランを減圧留去し、残渣に1 N塩酸を加えpH 1として、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣をn-ヘキサン/ジエチルエーテル混液で粉碎後、ろ取し、乾燥して、5-ベンゾ [b] フランボロン酸 (551 mg) を淡褐色固体として得た。

[0091] (製造例8)

1) 2-ブロモベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (572 mg, 2.00 mmol)、ピペリジン (5 ml) 及びエタノール (1 ml) の混合物を70~75℃で2.5時間攪拌した。反応液を室温としてジエチルエーテル (15 ml) を加え析出物をろ去し、ジエチルエーテルで洗浄した。ろ液と洗液を合わせて溶媒を減圧留去して、残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム) で精製して2-ピペリジノベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (526 mg, 90%) を微橙色結晶として得た。

m. p.: 88~89℃、IR (Nujol) 1791, 1595, 1541 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 291 [M+H]⁺

2) 2-ピペリジノベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (475 mg, 1.64 mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、2-ピペリジノベンゾチアゾール-7-メタノール (375 mg, 91%) を微黄色結晶として得た。

m. p.: 107~108℃、IR (Nujol) 3261, 3200, 1

595, 1541 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 249 $[\text{M}+\text{H}]^+$
[0092] (製造例9)

1) 2-ブロモベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (715 mg, 2.50 mmol) 及びフェニルボロン酸 (341 mg, 2.8 mmol) の脱気したジメトキシエタン (20 ml) 溶液にテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (144 mg, 0.125 mmol)、炭酸水素ナトリウム (630 mg, 7.50 mmol) の脱気水溶液 (10 ml) を順に加え 50℃ で 10 分間攪拌後、室温としてヨウ化第一銅 (24 mg, 0.125 mmol) を加え 4 時間加熱還流した。ジメトキシエタンを減圧留去して酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=10) で精製し 2-フェニルベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (500 mg, 70%) を無色結晶として得た。

m. p.: 86.5~87.5℃、IR (Nujol) 1716 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 284 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2) 2-フェニルベンゾチアゾール-7-カルボン酸エチルエステル (425 mg, 1.50 mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、2-フェニルベンゾチアゾール-7-メタノール (340 mg, 94%) を無色結晶として得た。

m. p.: 101~102℃、IR (Nujol) 3241, 1572, 1507 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 242 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0093] (製造例10)

1) 5-クロロ-3-ニトロサリチル酸メチルエステル (2.32 g, 10.0 mmol) の塩化メチレン (25 ml) 溶液に氷冷攪拌下 2,6-ルチジン (1.83 ml, 15.7 mmol)、無水トリフルオロメタンスルホン酸 (3.67 g, 13 mmol) を順に滴下し、氷冷で 0.5 時間攪拌した。反応液に塩化メチレン (20 ml) - 氷水 (30 ml) を加え分液し、水層を塩化メチレンで抽出した。有機層を合わせて水洗後乾燥して溶媒を減

圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン／酢酸エチル＝10）で精製して5-クロロ-2-トリフロロメタンスルホニルオキシ-3-ニトロ安息香酸メチルエステル（3.33g, 91%）を淡黄色油状物質として得た。

IR (Neat) 3088, 2961, 1742, 1603, 1552 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 381 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

2) 5-クロロ-2-トリフロロメタンスルホニルオキシ-3-ニトロ安息香酸メチルエステル（820mg, 2.25mmol）のジメチルスルホキシド（5ml）溶液に、トリエチルアミン（0.33ml, 2.37mmol）及びイソインドリン（0.27ml, 2.38mmol）を順に加え、室温で1時間攪拌した。反応液を氷冷して氷水（50ml）を加え攪拌後、析出物をろ取り水洗して乾燥した。得られた黄色結晶をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン／酢酸エチル＝15）で精製して5-クロロ-2-（1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリニオ）-3-ニトロ安息香酸メチルエステル（608mg, 81%）を黄色結晶として得た。

m. p.: 114~115°C、IR (Nujol) 1743, 1705, 1603, 1589, 1529, 1503 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 333 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3) 5-クロロ-2-（1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリニオ）-3-ニトロ安息香酸メチルエステル（590mg, 1.77mmol）のメタノール（6ml）-テトラヒドロフラン（9ml）溶液に、10%パラジウム炭素（水分51.7%, 190mg）を加え水素雰囲気下、室温で24時間攪拌した。触媒をろ去し、ろ液の溶媒を約5mlまで濃縮して、析出結晶をろ取した。ろ取した結晶に酢酸エチル（50ml）-水（30ml）を加え飽和炭酸水素ナトリウム水でpH8~9として、酢酸エチルで抽出した。抽出した有機層は、飽和食塩水で洗浄後乾燥して、溶媒を減圧留去することにより1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン[1, 2-a]ベンズイミダゾール-7-カルボン酸メチルエステル（96mg, 20%）を微黄色

結晶として得た。

m. p. : 152~153℃、IR (Nujol) 1710, 1627, 1611, 1589, 1579, 1551 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 265 [M+H]⁺

4) 1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン [1, 2-a] ベンズイミダゾール-7-カルボン酸メチルエステル (80 mg, 0.30 mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムヒドライドで還元して、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレン [1, 2-a] ベンズイミダゾール-7-メタノール (67 mg, crude 94%) を淡灰白色固体として得た。

IR (Nujol) 3170, 1615, 1547 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 237 [M+H]⁺

[0094] (製造例11)

1) 2-クロロニコチン酸エチルエステル (928 mg, 5.00 mmol) の脱気した1, 4-ジオキサン (25 ml) 溶液に及び3-ビフェニルフェニルボロン酸 (1089 mg, 5.50 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム (578 mg, 0.50 mmol)、炭酸カリウム (2.07 g, 15.0 mmol) を順に加え18時間加熱還流した。水を加え酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=5) で精製し、2-(3-ビフェニル)ニコチン酸エチルエステル (1.411 g, 93%) を無色油状物質として得た。

IR (Neat) 2981, 1722, 1716 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 304 [M+H]⁺

2) 2-(3-ビフェニル)ニコチン酸エチルエステル (1.38 g, 4.55 mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムヒドライドで還元して、2-(3-ビフェニル)ピリジン-3-メタノール (1.115 g, 94%) を無色結晶として得た。

m. p : 91~93°C、IR (Nujol) 3265, 1579, 1566
cm⁻¹、APCI-MS m/z : 262 [M+H]⁺

[0095] (製造例12)

1) 2-クロロニコチン酸エチルエステル (557mg, 3.0mmol) のテトラヒドロフラン (17ml) 溶液に1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン (0.49ml, 3.9mmol) 及びトリエチルアミン (0.47ml, 3.34mmol) を順に加え、18時間加熱還流した。反応液を室温として、析出物をろ去してろ液の溶媒を減圧留去した。残さを酢酸エチルに溶解し、水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥して溶媒を減圧留去した。残さをアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロマトレックス (登録商標) NH) (n-ヘキサン/酢酸エチル=19) で精製して2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリニオ)ニコチン酸エチルエステル (529mg, 62%) を無色油状物質として得た。

IR (Neat) 2979, 1711, 1584, 1555cm⁻¹、APCI-MS m/z : 283 [M+H]⁺

2) 2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリニオ)ニコチン酸エチルエステル (511mg, 1.81mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリニオ)ピリジン-3-メタノール (386mg, 89%) を無色結晶として得た。

m. p. : 95~97°C、IR (Nujol) 3184, 1595, 1575cm⁻¹、APCI-MS m/z : 241 [M+H]⁺

[0096] (製造例13)

1) 3-アミノサリチル酸メチルエステル塩酸塩及び2-メチルチオピリミジン-5-カルボン酸クロリド塩酸塩を原料にして製造例2に準じて、2-(2-メチルチオピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステルを微黄色結晶として得た。

m. p. : 190~191°C、IR (Nujol) 1719cm⁻¹、AP

CI-MS m/z : 302 [M+H]⁺

2) 2-(2-メチルチオピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル(400mg, 1.33mmol)のテトラヒドロフラン(10ml)の懸濁液に氷冷下77%メタクロル過安息香酸(476mg, 2.12mmol)を加え15分間攪拌後、さらに室温で3時間攪拌した。本反応液に室温で50%ジメチルアミン水溶液を滴下し、室温で1時間攪拌した。反応液を氷冷し、水(25ml)を加え15分間攪拌して酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/酢酸エチル=4)で精製して2-(2-ジメチルアミノピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル(328mg, 83%)を無色結晶として得た。

m.p.: 199~201°C、IR(Nujol) 1719, 1628, 1605 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 299 [M+H]⁺

3) 2-(2-ジメチルアミノピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル(480mg, 1.61mmol)を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムヒドライドで還元して、2-(2-ジメチルアミノピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-メタノール(234mg, 54%)を黄色結晶として得た。

m.p.: 212~215°C、IR(Nujol) 3283, 1617 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 271 [M+H]⁺

[0097] (製造例14)

1) 2-(2-メチルチオピリミジン-5-イル)ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル(400mg, 1.33mmol)を原料にして製造例13の2)に準じて、2-[2-[N-2-(ヒドロキシ)エチル-N-メチル]アミノピリミジン-5-イル]ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル(322mg, 74%)を無色結晶として合成した。

m. p. : 157~159°C、IR (Nujol) 3529, 1713, 1626, 1601 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 329 [M+H] + 2) 2-[2-[N-2-(ヒドロキシ)エチル-N-メチル]アミノピリミジン-5-イル]ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル (300 mg, 0.914 mmol) のヒドロキシ基を常法によりテトラヒドロピラン化して、2-[2-[N-2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エチル-N-メチル]アミノピリミジン-5-イル]ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル (286 mg, 69%) を無色結晶として得た。

m. p. : 126~128°C、IR (Nujol) 1717, 1625, 1601 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 413 [M+H] + 3) 2-[2-[N-2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エチル-N-メチル]アミノピリミジン-5-イル]ベンズオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル (275 mg, 0.667 mmol) を製造例2の3)と同様にリチウムアルミニウムヒドライドで還元して、2-[2-[N-2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エチル-N-メチル]アミノピリミジン-5-イル]ベンズオキサゾール-7-メタノール (128 mg, 50%) を無色結晶として得た。

m. p. : 110~112°C、IR (Nujol) 3287, 1622, 1603 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 385 [M+H] +

[0098] (製造例15)

1) 水素化ホウ素ナトリウム (422 mg, 11.14 mmol) のテトラヒドロフラン (30 ml) 懸濁液に、三フッ化ホウ素エーテル錯体 (1.83 ml, 14.86 mmol) を氷冷攪拌下10分間かけて滴下し、本反応液に (±)-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン-3-オン-8-カルボン酸 (500 mg, 1.86 mmol) のテトラヒドロフラン (6 ml) 溶液を加え同温で5分間、室温で1.5時間攪拌した。反応液を氷冷して水 (20 ml) を滴下し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和して酢酸エ

チルで抽出した。抽出した有機層は、水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥して、溶媒を減圧留去することにより (±)-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン-8-メタノール (397 mg, 89%) を微橙色油状物質として得た。

IR (Neat) 3375, 1607 cm^{-1}

2) (±)-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン-8-メタノール (600 mg, 2.49 mmol) のジエチルエーテル (22 ml) 溶液に、氷冷攪拌下炭酸ナトリウム (2.90 g, 27.35 mmol) を加えた後、無水トリフルオロ酢酸 (3.86 ml, 27.35 mmol) を滴下し、同温で15分間、室温で15分間攪拌した。反応液を氷冷して氷水中に注ぎ込み酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥して、溶媒を減圧留去した。残さにジイソプロピルエーテルを加えて粉碎し、ろ取して乾燥することにより (±)-4-トリフロロアセチル-8-トリフロロアセトキシメチル-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン (973 mg, 90%) を無色結晶として得た。

m. p. : 91~92°C、IR (Nujol) 1781, 1705 cm^{-1}

3) (±)-4-トリフロロアセチル-8-トリフロロアセトキシメチル-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン (953 mg, 2.20 mmol) のメタノール (19 ml) 溶液に、室温でグリシン緩衝液 (pH 10, 6.33 ml) を滴下し、30分間攪拌した。本反応液に水 (70 ml) を加え室温で20分間攪拌後、酢酸エチルで抽出した。抽出した有機層は、水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥して、溶媒を減圧留去することにより (±)-4-トリフロロアセチル-2-フェニル-1,4-ベンズオキサジン-8-メタノール (793 mg, 収率定量的) を微橙色油状物質として得た。

IR (Neat) 3400, 1704 cm^{-1}

[0099] (製造例16)

(5-メトキシ-2-フェニル)ベンゾ[b]フラン-7-カルボン酸を常法によりリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、(5-メトキシ-

2-フェニル) ベンゾ [b] フラン-7-メタノールを合成した。

m. p. : 150~151℃

[0100] (製造例 17)

3-ヒドロキシメチルフラボン-8-カルボン酸を常法によりヒドロキシ基をアセチル化後カルボキシル基を還元して、3-アセトキシメチルフラボン-8-メタノールを合成した。

m. p. : 204~206℃、IR (Nujol) 1739, 1616 cm⁻¹、ESI-MS m/z : 337 [M-H]⁻.

[0101] (製造例 18)

3-ボロモメチルフラボン-8-カルボン酸エチルエステルに常法によりジメチルアミンを反応させた後還元して、3-ジメチルアミノメチルフラボン-8-メタノールを合成した。

m. p. : 149.5~150.5℃、IR (Nujol) 3448, 1627 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 310 [M+H]⁺

[0102] (製造例 19)

1) 製造例 17 で合成した 3-アセトキシメチルフラボン-8-メタノールのヒドロキシ基を常法によりメトキシメチル化しアセチル基を除去後生成したアルコールを酸化して 8-メトキシメトキシメチルフラボン-3-カルボン酸を合成した。

m. p. : 142~143℃、IR (Nujol) 1731, 1621, 1606 cm⁻¹、ESI-MS m/z : 339 [M-H]⁻

2) 8-メトキシメトキシメチルフラボン-3-カルボン酸にアジ化ジフェニルホスホリル、t-ブタノールを順に反応させた後、塩酸水-ジオキサンで加水分解して 3-アミノフラボン-8-メタノールを合成した。

m. p. : 191.5~192.5℃、IR (Nujol) 3391, 3302, 1606 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 268 [M+H]⁺

[0103] (製造例 20)

(5-アミノ-2-フェニル) ベンゾ [b] フラン-7-カルボン酸メチル

エステルを常法によりアミノ基をジメチル化後エステル基をリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、（５-ジメチルアミノ-２-フェニル）ベンゾ[b]フラン-７-メタノールを合成した。

m. p. : 115~116℃、IR (Nujol) 3243, 1734, 1703 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 268 [M+H]⁺

[0104] (製造製21)

1) 2-アセトアミノ-3-ニトロ安息香酸メチルエステル (1.444 g, 6.06 mmol) 及び6N塩酸 (30 ml) の混合物を15分間加熱還流した。反応液を氷冷し、10%炭酸カリウム水溶液でpH8として酢酸エチルで抽出した。抽出した有機層は水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=1) で精製し、2-アミノ-3-ニトロ安息香酸メチルエステル (987 mg, 83%) を黄色結晶として得た。

m. p. : 94~96℃、APCI-MS m/z : 197 [M+H]⁺

2) 2-アミノ-3-ニトロ安息香酸メチルエステル (980 mg, 5.00 mmol) のメタノール (20 ml) -テトラヒドロフラン (10 ml) 溶液に10%パラジウム炭素 (水分51.7%, 250 mg) を加え、水素気流下室温で3時間攪拌した。触媒をろ去し、テトラヒドロフランで洗浄した。ろ液、洗液を合わせて溶媒を減圧留去することにより2,3-ジアミノ安息香酸メチルエステル (814 mg, 98%) を黄緑色固体として得た。

m. p. : 65~67℃、IR (Nujol) 3451, 3314, 1701, 1619 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 167 [M+H]⁺

3) 2,3-ジアミノ安息香酸メチルエステル (4.00 g, 24.07 mmol) 及びベンズアルデヒド (2.56 g, 24.07 mmol) のニトロベンゼン (60 ml) 溶液を155~160℃で3時間加熱攪拌した。反応液を室温としてそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=20及び4) で精製し、2-フェニルベンズイミダゾール-4-カルボン酸メチルエステル (3.89 g, 64%) を淡黄色結晶と

して得た。

m. p. : 125~127℃、IR (Nujol) 3364, 1709 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 253 [M+H]⁺

4) 60%水素化ナトリウム (32 mg, 0.793 mmol) をn-ヘキサンで洗浄後、2-フェニルベンズイミダゾール-4-カルボン酸メチルエステル (200 mg, 0.793 mmol) のDMF (1.2 ml) 溶液を室温で滴下し、1.5時間室温攪拌した。本反応液に2-(トリメチルシリル) エトキシメチルクロリド (0.15 ml, 0.841 mmol) を滴下し、室温で2時間攪拌後、氷冷して水を加え酢酸エチルで抽出した。抽出した有機層は水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=7及び2.5) で精製し、(溶出した順に) 1-[2-(トリメチルシリル) エトキシメチル]-2-フェニルベンズイミダゾール-4又は7-カルボン酸メチルエステル (113 mg, 37%) 及び1-[2-(トリメチルシリル) エトキシメチル]-2-フェニルベンズイミダゾール-4又は7-カルボン酸メチルエステル (133 mg, 44%) をそれぞれ無色油状物質として得た。溶出した化合物の順に物性を示す。

IR (Neat) 2952, 1722 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 383 [M+H]⁺、IR (Neat) 2951, 1723 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 383 [M+H]⁺

5) 1-[2-(トリメチルシリル) エトキシメチル]-2-フェニルベンズイミダゾール-4又は7-カルボン酸メチルエステル (120 mg, 0.314 mmol) (後から溶出した化合物) をリチウムアルミニウムハイドライドで還元して、1-[2-(トリメチルシリル) エトキシメチル]-2-フェニルベンズイミダゾール-4又は7-メタノール (94 mg, 85%) を無色結晶として得た。

m. p. : 96~100℃、IR (Nujol) 3181 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 355 [M+H]⁺

[0105] (製造例 2 2)

製造例 1 9 の 1) で得た 8-メトキシメトキシメチルフラボン-3-カルボン酸を常法によりアミド化し、塩酸水-メタノールでメトキシメチル基を除去した後、塩化チオニルで処理して 8-クロロメチル-3-ジメチルカルバモイルフラボンを合成した。

m. p. : 202~203℃、IR (Nujol) 1638, 1630, 1616 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 324 [M+H]⁺

[0106] (製造例 2 3)

製造例 1 9 の 1) で得た 8-メトキシメトキシメチルフラボン-3-カルボン酸を常法によりメチルエステル化し、塩酸水-メタノールでメトキシメチル基を除去した後、塩化チオニルで処理して 8-クロロメチル-3-メトキシカルボニルフラボンを合成した。

m. p. : 149.5~150.5℃、IR (Nujol) 1732, 1637 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 311 [M+H]⁺

[0107] (製造例 2 4)

製造例 1 9 の 1) で得た 8-メトキシメトキシメチルフラボン-3-カルボン酸を常法によりメトキシメチル基を除去し、カルボキシル基をジフェニルメチルエステルに変換した後、塩化チオニルで処理して 8-クロロメチル-3-ジフェニルメトキシカルボニルフラボンを合成した。

m. p. : 185.5~186℃、IR (Nujol) 1731, 1629 cm⁻¹、ESI-MS m/z : 485 [M+Na]⁺

[0108] (製造例 2 5)

8-ヒドロキシメチル-3-メチルフラボンを塩化チオニルで処理して 8-クロロメチル-3-メチルフラボンを合成した。

m. p. : 112.5~113.5℃、IR (Nujol) 1622, 1601 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 285 [M+H]⁺

[0109] (製造例 2 6)

1) 2, 6-ジブROMONAFタレン (2.20g, 7.70mmol) を原料

にして、パラジウム触媒を用いるアミノ化反応で2-[ビス-2-(ベンジルオキシ)エチル]アミノ-6-ブロモナフタレン(2.29g, 61%)を黄色油状物質として得た。

IR (Neat) 1625, 1585 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 490/492 [M+H]⁺

2) 2-[ビス-2-(ベンジルオキシ)エチル]アミノ-6-ブロモナフタレン(205mg, 0.42mmol)を原料にして、製造例5に準じて2-[ビス-2-(ベンジルオキシ)エチル]アミノ-ナフタレン-6-ボロン酸(124mg, 65%)を黄色油状物質として得た。

[0110] (製造例27)

1) 2-アミノ-5-ブロモピリジン(2.0g, 11.56mmol)のメタノール(465ml)溶液に、室温で37%ホルムアルデヒド水溶液(13.55ml, 180.3mmol)を滴下後、塩化亜鉛(3.94g, 28.90mmol)及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム(3.63g, 57.80mmol)のメタノール(155ml)溶液を滴下して室温で4時間攪拌した。反応液に5°Cで氷水(300ml)を加えた後、メタノールを減圧留去して酢酸エチル-テトラヒドロフラン(1/1)で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン/酢酸エチル=24及び5)で精製して5-ブロモ-2-ジメチルアミノピリジン(1.00g, 43%)を無色結晶として得た。

m. p. : 39~41°C、IR (Nujol) 1588 cm⁻¹、APCI-MS m/z : 201/203 [M+H]⁺

2) 5-ブロモ-2-ジメチルアミノピリジン(402mg, 2.00mmol)を原料にして、製造例5に準じて2-ジメチルアミノピリジン-5-ボロン酸(321mg, crude 97%)を微褐色粉末として得た。

[0111] (製造例28)

1) 5-ブロモ-2-クロロピリジン(600mg, 3.12mmol)及

びチオモルホリン（1.60 g, 15.59 mmol）の混合物を100°Cで16時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウムを加え酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で順に洗浄後乾燥し、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン／酢酸エチル＝50）で精製して5-ブロモ-2-チオモルホリノピリジン（465 mg, 58%）を無色油状物質として得た。

IR (Neat) 1581, 1481 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 259 / 261 $[M+H]^+$

2) 5-ブロモ-2-チオモルホリノピリジン（706 mg, 2.72 mmol）の脱気したトルエン（30 ml）-1,4-ジオキサン（30 ml）溶液に室温でトリエチルアミン（30 ml）、ビス（トリブチルスズ）（3.05 ml, 6.04 mmol）の及びテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（315 mg, 0.272 mmol）を順に加え脱気してアルゴン置換後、95-100°Cで14時間加熱攪拌した。反応液を室温とし溶媒を減圧留去した。残さをアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロマトレックス（登録商標）NH）（*n*-ヘキサン／酢酸エチル＝100）で精製し5-トリ-*n*-ブチルスタニル-2-チオモルホリノピリジン（467 mg, 37%）を無色油状物質として得た。

IR (Neat) 1575, 1535, 1483 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 467 / 469 / 471 $[M+H]^+$

[0112]（製造例29）

1) 5-ブロモ-2-クロロピリミジン（1.79 g, 10 mmol）に50%ジメチルアミン水溶液（30 ml）を加え、アルゴン雰囲気下、室温で5時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（15 ml）を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出層は、飽和食塩水で洗浄して乾燥後溶媒を減圧留去した。残さを40°Cで2時間減圧乾燥して5-ブロモ-2-ジメチルアミノピリミジン（1.83 g, 90%）を無色結晶として得た。

m. p. : 81~82°C、IR (Nujol) 1586, 1527 cm^{-1}

、APCIMS m/z : 202/204 [M+H]⁺
 2) 5-ブromo-2-ジメチルアミノピリミジン (1.75 g, 8.66 mmol) のテトラヒドロフラン (18 ml) 溶液にアルゴン雰囲気下、-78°Cでn-ブチルリチウム (1.5M n-ヘキサン溶液; 6.06 ml, 9.09 mmol) を15分間かけて滴下し、同温で2時間攪拌後、塩化トリ-n-ブチルスズ (2.5 ml) を滴下し、同温で0.5時間、室温で1時間攪拌した。反応液に10%フッ化カリウム水溶液 (50 ml)、酢酸エチル (50 ml) を順に加え、室温で0.5時間攪拌後、有機層を分取した。有機層は、水、飽和食塩水で順に洗浄して、乾燥後溶媒を減圧留去した。残さをアミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロマトレックス (登録商標) NH) (n-ヘキサン) で精製し、5-トリ-n-ブチルスタニル-2-ジメチルアミノピリミジン (2.65 g, 74%) を無色油状物質として得た。

IR (Neat) 2955, 2925, 2870, 2853, 1569, 1519 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 410/412/414 [M+H]⁺

[0113] (製造例30)

N-tert-ブトキシカルボニル-3, 5-ジヨード-L-チロシン メチルエステル (700 mg, 1.28 mmol) の脱気したN-メチルピロリドン (2.1 ml) 溶液にアルゴン雰囲気下、トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (37 mg, 0.04 mmol)、トリフェニルホスフィン (69 mg, 0.261 mmol) を順に加え50°Cで10分間加熱攪拌後、室温としてヨウ化第一銅 (24 mg, 0.125 mmol) を加えた。反応液を50°Cで10分間加熱攪拌後、室温としてテトラメチルスズ (0.39 ml, 2.82 mmol) を滴下して封管中65°Cで18時間攪拌した。反応液を氷冷して、水 (10 ml)、飽和フッ化ナトリウム水溶液を順に加え、酢酸エチルで抽出した。抽出層は、水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n

ーヘキサン／酢酸エチル＝5)で精製してN-tert-ブトキシカルボニル-3, 5-ジメチル-L-チロシン メチルエステル (230 mg, 56%)を褐色油状物質として得た。

IR (Neat) 3389, 1739, 1695 cm^{-1} 、APCI-MS m/z : 324 [M+H]⁺

[0114] (製造例31)

4-アミノ-N-トリフルオロアセチル-L-フェニルアラニン エチルエステル (9.30 g, 30.6 mmol) のジメチルホルムアミド (305 ml) 溶液にN-クロロコハク酸イミド (9.79 g, 73.32 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、55℃で2.5時間攪拌した。反応液に氷冷下、酢酸エチル及び水を加え飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でpH8として、酢酸エチルで抽出した。抽出層は、水、飽和食塩水で順に洗浄後、乾燥して、溶媒を減圧留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン／酢酸エチル＝6) で精製して4-アミノ-3, 5-ジクロロ-N-トリフルオロアセチル-L-フェニルアラニン エチルエステル (8.49 g, 74%) を無色結晶として得た。

m. p.: 124~125℃、IR (Nujol) 3300, 1742, 1707 cm^{-1} 、ESI-MS m/z : 371/373 [M-H]⁻

[0115] (製造例32)

図9-1、2の反応スキームに従って、本発明に係るO- (5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル) メチル-3, 5-ジクロロ-L-チロシン・二塩酸塩のβ-シクロデキストリン包接体を調製した。当該塩は、淡黄色結晶又は結晶性の粉末であり、融点が180~200℃ (分解) であった。

[0116] 1) ベンゾオキサゾール誘導体の合成

(2) の合成

3-ニトロサリチル酸 (1) (201 g, 1.09 mol) のメタノール (1600 ml) 溶液に室温で96%硫酸 (60.6 ml) を滴下し、その

後23時間還流した。反応液を約1/3になるまで減圧濃縮した後氷浴にて冷却した。生成した固体を濾取、冷メタノール(600ml)、冷水(600ml)にて洗浄、減圧下40℃にて乾燥することにより3-ニトロサリチル酸メチル(2)を209.7g(97%)黄色固体として得た。

(3)の合成

3-ニトロサリチル酸メチル(2)(108.2g、0.549mol)のTHF(1140ml)/MeOH(810ml)溶液に10%Pd-C(15.2g)を加え、水素1気圧下室温にて2時間接触還元した。触媒を濾別し、THFで洗浄した後溶媒留去した。残渣をジイソプロピルエーテルにて洗浄することにより3-アミノサリチル酸メチル(3)を166.7g(95%)褐色固体として得た。

(4)の合成

3-アミノサリチル酸メチル(3)(74.8g、0.447mol)のTHF(1130ml)溶液に5℃でN,N-ジメチルアニリン(108.7g、0.897mol)を40分で滴下した。反応液を15分間攪拌した後ベンゾイルクロリド(75.7g、0.538mol)のTHF(570ml)溶液を1時間かけて滴下した。同温で1時間攪拌した後、水(100ml)を加え、THFを留去した。残渣に水(900ml)を加え、酢酸エチルにて抽出し、有機層を10%塩酸、水、飽和食塩水で洗浄、亡硝にて乾燥し、溶媒を留去した。得られた粗結晶とアミノ体(3)(90.16g)より同様の操作で得られた結晶を合わせ酢酸エチルより再結晶することにより3-ベンゾイルアミノサリチル酸メチル(4)を247.1g(92%)無色固体として得た。

(5)の合成

3-ベンゾイルアミノサリチル酸メチル(4)(83.2g、0.296mol)の酢酸(1480ml)溶液に内温15℃で69%硝酸(d=1.42)(95ml、1.458mol)を滴下した。反応液を室温で3時間攪拌した後、氷水(300ml)に注ぎ10分間攪拌した。生成した固体を

濾過し、水（3回）、エーテルで洗浄した後風乾することにより3-ベンゾイルアミノ-5-ニトロサリチル酸メチル（5）を93.4 g（96%）黄色固体として得た。

（6）の合成

3-ベンゾイルアミノ-5-ニトロサリチル酸メチル（5）（72.2 g、0.260 mol）とPPSEの1,2-ジクロロベンゼン溶液（780 ml）の混合物を150℃で4時間攪拌した。反応液を氷冷し、析出した結晶を濾取、n-ヘキサン、冷メタノールで洗浄、減圧で乾燥することにより、5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル（6）を61.2 g（90%）淡黄色固体として得た。

（7）の合成

5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-カルボン酸メチルエステル（6）（59.2 g、0.198 mol）のメタノール（990 ml）懸濁液に1 M水酸化ナトリウム水溶液（297 ml、0.297 mol）を滴下し、その後室温にて19時間攪拌した。氷冷下に10%塩酸にて反応液を酸性とし数分間攪拌した。生成した固体を濾取、水、メタノールで洗浄した後減圧乾燥することにより5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-カルボン酸（7）を54.2 g（96%）無色固体として得た。

（9）の合成

5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-カルボン酸（7）（26.4 g、0.0931 mol）のTHF（470 ml）懸濁液にトリエチルアミン（15.57 ml、0.112 mol）を加え室温で30分間攪拌した。反応液を-10℃に冷却し、クロロ炭酸エチル（10.68 ml、0.112 mol）を加え同温で30分攪拌した。水素化ホウ素ナトリウム（8.84 g、233.7 mmol）を加え30分攪拌した後、THF／水（317 ml／64 ml）を3時間かけて-10～-6℃にて滴下した。反応液をさらに2時間攪拌し、その後に氷水を注ぎ、析出した固体を濾取、水で洗浄した。5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-カルボン

酸 (7) (14.6 g) より同様の操作により得られた固体を合わせ、THF (600 ml) / メタノール (600 ml) に懸濁し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (115 ml) を加えた後室温で4.5時間攪拌した。反応液を氷水にあげ、析出した固体を濾過した後風乾することにより7-ヒドロキシメチル-5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール (9) を24.4 g (63%) ほぼ無色の固体として得た。

(10) の合成

7-ヒドロキシメチル-5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール (9) (46.2 g、0.171 mol) のTHF (1150 ml) 懸濁液に氷冷下トリエチルアミン (34.9 ml、0.250 mol) を加えた。メタンスルホンクロリド (23.1 g、0.200 mol) を滴下し、氷冷下で30分その後室温にて3時間攪拌した。トリエチルアミン (4.55 ml、0.033 mol)、メタンスルホンクロリド (1.29 ml、0.017 mol) を追加しさらに30分攪拌した。反応液を氷水に注ぎ析出した固体を濾過した。得られた固体を水、ジイソプロピルエーテルで洗浄した後40℃で減圧乾燥することにより5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-イルメチルメタンスルホネート (10) を59.1 g (99%) 淡黄色固体として得た。

2) ジクロロチロシン誘導体の合成

(12) の合成

(S)-チロシンメチルエステル塩酸塩 (11) (60.15 g、0.26 mol) の酢酸 (294 ml) 懸濁液に室温にてスルフリルクロリド (52.22 ml、0.65 mol) を滴下し、その後3.5時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をエーテルにて十分に洗浄、乾燥することにより(S)-ジクロロチロシンメチルエステル塩酸塩 (12) を72.70 g (93%) 無色固体として得た。

(13) の合成

(S)-ジクロロチロシンメチルエステル塩酸塩 (12) (72.42 g

、0.24 mol)の水(1.4 l)懸濁液に氷冷下で2 M炭酸カリウム水溶液(120.5 ml)を滴下した。ジ-tert-ブチルジカーボネート(58.1 ml、0.25 mol)のジクロロメタン(1.4 l)溶液を加え氷冷下で1.5時間、室温にて40時間攪拌した。反応液をセライトを用いて濾過した後、濾液をクロロホルムで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄、亡硝乾燥し、溶媒を留去した。残渣をn-ヘキサンで洗浄することにより(S)-N-Boc-ジクロロチロシンメチルエステル(13)を76.95 g(88%)無色固体として得た。

3) 本発明に係る化合物塩の合成

(14) の合成

5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-イルメチルメタンスルホネート(10)(29.11 g、83.6 mmol)をTHF(820 ml)に溶解し、アセトン(820 ml)を加えた。(S)-N-Boc-ジクロロチロシンメチルエステル(13)(36.54 g、100 mmol)、ヨウ化ナトリウム(12.53 g、83.6 mmol)、炭酸カリウム(17.37 g、125 mmol)を加え、室温にて21時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を約1/2まで濃縮した。酢酸エチル、水を加え分液した後、有機層を水、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、亡硝乾燥溶媒留去した。5-ニトロ-2-フェニルベンゾオキサゾール-7-イルメチルメタンスルホネート(10)(30.06 g)、(S)-N-Boc-ジクロロチロシンメチルエステル(13)(37.66 g)より同様の操作によって得られた生成物を加え、計116.2 gの粗生成物をジイソプロピルエーテルにて洗浄した後乾燥することによりニトロ体(14)を98.43 g(94%)淡黄色固体として得た。

(15) の合成

ニトロ体(14)(57.04 g、92.5 mmol)をTHF(1340 ml)に溶解し、イソプロパノール(1340 ml)を加え内温60℃に加熱した。5 M塩化アンモニウム水溶液(278 ml、1.39 mol)、

続いて鉄粉（103.32 g、1.85 mol）を加え、60℃にて3時間攪拌した。反応液をセライトを用いて濾過し、濾液を約1/3まで濃縮した。セライト上の不要物は酢酸エチルにて3回洗浄し、濾液と合わせて水、飽和食塩水で洗浄した後亡硝にて乾燥した。溶媒を留去し、得られた固体をジイソプロピルエーテルにて洗浄、乾燥することによりアミノ体（15）を53.03 g（98%）黄色固体として得た。

（16）の合成

アミノ体（15）（86.91 g、0.148 mol）をTHF（1430 ml）に溶解し、内温が約10℃になるように氷浴で冷却しつつ0.5 M水酸化リチウム水溶液（444 ml、0.222 mol）を滴下し、さらに氷浴中で1時間攪拌した。反応液を約1/2になるまで濃縮し、水（600 ml）を加え、さらに10%クエン酸水溶液にてpHを約4とした後酢酸エチル-THF（10：1）にて抽出した。抽出液を水、飽和食塩水で洗浄し、亡硝乾燥、溶媒留去した。得られた残渣を酢酸エチル-THF（10：1）より再結晶し、ほぼ無色の固体（72.94 g、粗収率86%）を得た。この固体（10.03 g）をクロロホルム-メタノール（10：1）より再結晶し、カルボン酸（16）を8.63 g（回収率86%）ほぼ無色の固体として得た。

（17）本発明に係る化合物塩の合成

氷冷下カルボン酸（16）（85.23 g、0.149 mol）のTHF（750 ml）溶液に5～10℃で4 M塩化水素-ジオキサン（1117 ml、4.47 mol）を2時間かけて滴下した。反応液を同温で1時間攪拌した後、徐々に昇温し室温にて20時間攪拌した。ジイソプロピルエーテルを加え固体を濾取し、ジイソプロピルエーテルにて洗浄した。得られた固体を3ロットに分けてエタノール（計2300 ml）に溶解し、不溶物を濾別した。濾液を室温、減圧にて約1000 mlにまで濃縮し、得られた溶液を室温にて攪拌した。生成した結晶を濾過し、乾燥することにより本発明に係る化合物塩（17）を66.11 g（81%）淡黄色固体として得た。

4) サイクロデキストリン包接体の合成

(1) Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE-CDと略す：商品名Captisol) を1000 g秤量し、細胞培養用の無菌フード内で、5 Lの容器に取り、HPLC用グレードの純水1800 mlを加えて、一晩攪拌して澄んだ溶液を得た（約36 重量%となる）。

(2) 翌朝、水槽中で32-36°Cに加温し、この温度を保持して、本発明に係る化合物のHCl塩を45.5 g; free baseとして35.5 g相当に100 mlのエタノール、200 mlの純水、そして300 mlの上記SBE-CD溶液を添加し、化合物溶液を得た。この溶液のpHが3~4であることを確認した。

(3) 3.4 gの苛性ソーダを200 mlの純水に溶解し、上記溶液を攪拌しながらこの苛性ソーダ水を加えて、pHを6.5に調製した。

(4) この暖かい状態で、溶液を真空ポンプを用いて、0.4 μ mのフィルターで滅菌ろ過した。ろ液は滅菌済の5 Lの容器に取り、(1)で調製したSBE-CD溶液で希釈し、最終容量を2800 mlに調整した。

(5) 更に5分間攪拌後に、pHを測定し、 $\sim$ 6.5であることを確認した。滅菌分注器を用いて、30 mlバイアル瓶に各15 mlずつ分注した。最終化合物濃度は10 mg/mlとなった。各バイアルは1週間にわたり凍結乾燥機 (Lyostar3, FTS Systems SP Scientific) で処理された。

(6) 凍結乾燥後のバイアル瓶はゴム栓で密封し、金属ヒダ留めをし、冷蔵庫で保存した。

(7) 再溶液化には14.1 mlの注射用蒸留水を加えて5-10 分間のvortex mixerにより15 mlの淡黄色の溶液になった。

[0117] <<試験例>>

以下の材料および方法により、試験を行った。

[0118] (P t e n欠損マウス (t P T E N-/-))

動物実験は、ヘルシンキ宣言に従って行い、また、プロトコールは、施設内の倫理委員会 (2011~73) およびC I E P A L (N C E / 2011~33) によって承認された。マウスは、C3Mの動物飼育室施設で、特定

病原体除去条件下で維持した。P t e n 欠損マウス (t P T E N - / -) は、2つのP t e n f l o x 対立遺伝子を持つマウスを、近位l c k プロモーター- c r e トランスジェニックマウスと交雑させることによって生成した (参考文献53)。動物は、先に記載されるように (参考文献53)、P C R によって特徴付けた。

[0119] (トランスクリプトーム分析)

リンパ腫形成の臨床徴候が観察された場合 (たとえば毛の逆立ち (f u r r u f f l i n g)、丸まった姿勢、顔面浮腫、および/または表在呼吸)、マウスは、致命的なペントバルビタール注射により犠牲死させた。腫瘍を解剖し、70 μ m細胞ストレーナ (B D B i o s c i e n c e s) 上でP B S 中でホモジナイズし、全R N A を単離し、先に記載されるように (参考文献54)、c D N A に転写した。無関係な4つの腫瘍を分析し、2つの野生型マウス由来の胸腺細胞もまた、処理した。c D N A を、A f f y m e t r i x D N A チップ (A f f y m e t r i x - M o G e n e - 1 __ 0 - s t - v 1) にハイブリダイズさせ、遺伝子発現データを標準化し (G S E 39591)、25%の偽発見率を使用して、監視下の (s u p e r v i s e d) S A M (マイクロアレイの有意性分析 (S i g n i f i c a n c e A n a l y s i s o f M i c r o a r r a y s)) 分析にかけた。次いで、マイクロアレイ分析についての線形モデル (L I M M A) を、p 値 < 10⁻⁴ で、異なって発現されるプローブを同定するために使用した。これにより、a b s (l o g 倍数変化 (l o g F o l d C h a n g e)) > 0.5 を有する遺伝子選択がもたらされる。フェノタイプおよびアノテートされていない配列の間でより小さなp 値を有する複写物を除去した後、分析の組み合わせにより、腫瘍において、498のアップレギュレートされた遺伝子および279のダウンレギュレートされた遺伝子が同定された。

[0120] (細胞培養物)

無関係な t P T E N - / - 腫瘍から確立された K O 99 L、K O 1081 L、および K O 631 L として示されたマウス細胞株に加えて、ヒト K e 3

7、DND41、SiI-ALL、Peer、Molt-16、Jurkat (T-ALL)、およびSupT1 (T-LL) を、10または20% (SiI-ALLおよびマウス細胞株) ウシ胎児血清、ならびに50ユニット/ml ペニシリン、50mg/ml ストレプトマイシン、および1.0mM ピルビン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) を補足したRPMI 1640培地 (Invitrogen) において増殖させた。細胞培養物は、5%CO₂下で37℃で維持した。

[0121] (試薬)

本研究において使用した化学化合物：2-アミノビシクロ (2, 2, 1) -ヘプタン-2-カルボン酸 (BCH)、デキサメタゾン、塩酸ドキシルピシン、必須アミノ酸 (EAA; 50×溶液)、非必須アミノ酸 (NEAA; 100×溶液)、D-ロイシン、およびワートマニン (Sigma-Aldrich); KU0063794 (rel-5-[2-[(2R, 6S)-2, 6-ジメチル-4-モルホリニル]-4-(4-モルホリニル)ピリド[2, 3-d]ピリミジン-7-イル]-2-メトキシベンゼンメタノール)、PI-103塩酸塩 (3-[4-(4-モルホリニルピリド[3', 2': 4, 5]フロ[3, 2-d]ピリミジン-2-イル]フェノール塩酸塩)、およびラパマイシン (Tocris Bioscience); L-アスパラギナーゼ、Erwinase (登録商標) (クリサントスパーゼ) (EUSA-PHARMA)。Salubrinal (N-(2, 2, 2-トリクロロ-1-(3-(キノリン-8-イル)チオウレイド)エチル)シンナムアミド) (Enzo Life Science); Q-VD-OHP (MPBiomedicals)。

[0122] (患者)

インフォームドコンセントは、施設内のガイドラインに従って得た。ヘパリン処理した血液は、3人のT-ALL患者および2人の健康なドナーから得た。患者リンパ芽球は、ベンダー推奨の手順に従って、Ficoll-Plus密度勾配を使用して、収集後24時間以内に単離した (

GE Healthcare Life Sciences)。

[0123] (細胞生存能力、増殖、および細胞毒性アッセイ)

2つの異なるアッセイを用いた：i) 96ウェルプレートフォーマットにおいて、細胞（ウェル当たり $4.0 \pm 0.1 \times 10^4$ ； $100 \mu\text{L}$ ）を、エフェクターと共にインキュベートし（48時間、 37°C ；実験当たり $n=4$ ）、次いで、WST-1試薬（ $10 \mu\text{L}$ ；Roche Diagnostics）を、96ウェルプレートのそれぞれのウェルに追加し、インキュベートし、ホルマザン生成を 490 nm で測定した；およびii) 細胞（ウェル当たり $2.0 \pm 0.1 \times 10^4$ ； $100 \mu\text{L}$ ）を、エフェクターと共にインキュベートし（48時間、 37°C ；実験当たり $n=4$ ）、次いで、ブロモデオキシウリジン試薬（ $10 \mu\text{L}$ /ウェル；Roche Diagnostics）を、それぞれのウェルに追加し、インキュベートした（8時間、 37°C ）。次いで、細胞を、固定し、変性させ、ペルオキシダーゼ（POD）抗体とコンジュゲートされた抗BrdUとインキュベートした（ $100 \mu\text{L}$ /ウェル）。比色定量基質（TMB：テトラメチルーベンジジン； $100 \mu\text{L}$ /ウェル）を追加し、BrdUの取込みを、DNA合成および増殖細胞に対応する光学濃度測定（ 450 nm ）によって定量化した。

[0124] (ウェスタンブロッティング分析)

細胞抽出物を、細胞溶解バッファー（プロテアーゼ阻害剤のカクテルを補足した 50 mM HEPES、 $\text{pH} 7.4$ 、 150 mM NaCl、 20 mM EDTA、 100 mM NaF、 10 mM Na_3VO_4 、 0.5% ノニルフェノキシポリエトキシシランエタノール（NP40））を使用して調製した。SDS-PAGEによる分離およびニトロセルロースへの転写の後に、イムノブロッティングを、以下の抗体を使用して実行した：Akt（Cell Signaling Technologies、#9272）、CHOP（#2895）、切断されたカスパーゼ3（#9664）、c-Myc（#9402）、eIF2 α （#9721）、4EBP1（#9644）、LC3A/B（#12741）、PARP（#9542）、pJnk（T18

3/Y185) (#9251)、pSer235-236-S6RP (#4856)、pSer473-Akt (#9271)、pSer65-4EBP1 (#9451)、およびS6RP (#2217) ; Bax (Sigma-Aldrich、B8429) ; PUMA (Abcam、ab54288) ; Bak (Millipore、06536) ; ATF4 (Santa Cruz Biotechnologies、sc200)、GADD34 (sc8327)、Hsp60 (sc-1722)、Hsp90 (sc-13119)、およびXBP1 (sc-7160) ; ATF6 (Imgenex、IMG-273)。

[0125] (アネキシンV／PI染色アッセイ)

アポトーシス評価は、アネキシン-V-FITC (Invitrogen) によってホスファチジルセリン膜再分布を測定することによって実行した。細胞 (ウェル当たり $5.0 \pm 0.1 \times 10^5$; 2.0 mL) を、エフェクターと共にインキュベートし、染色溶液 (110 μ L ; アネキシン-V (1/10)) 中に再懸濁し、暗中 (15分間、RT) でインキュベートした。細胞をPBSにより洗浄し、プロピジウムヨージド染色溶液 (1.0 μ g/mL ; 2.0 mL) 中に再懸濁し、Mac s Quant Analyser (Miltenyi Biotech) でフローサイトメトリによって直ちに分析した。基底のアポトーシスおよび壊死は、コントロール未処理細胞に対して決定した。

[0126] (CD98表面発現の分析)

細胞を収集し、PBSにより洗浄した。回転させた後に、細胞 (10^6 ; PBS、EDTA 5.0 mM、0.1% BSA 中 1.0 mL) を、暗中で、4°Cで、30分間、ラット抗CD98抗体 (H202-141、5.0 μ g/mL、BD Pharmingen) と共にインキュベートした。細胞を、洗浄し、4°Cで、30分間、ヤギ抗ラットAlexaFluor (登録商標) -488二次抗体 (A11006、2 μ g/mL、Life Technologies) と共にインキュベートした。細胞を、遠心沈殿し、2回洗

浄し、Mac s Q u a n t A n a l y s e r (M i l t e n y i B i o t e c h)での分析まで1%PFAにより固定した。

[0127] (ミトコンドリア膜内外電位差の決定)

アポトーシスのイベントと関連したミトコンドリア膜内外電位差 (ψ_m) の変化を、テトラメチルローダミンエチルエステル過塩素酸塩アッセイ (T M R E ; M o l e c u l a r P r o b e s) を使用して測定した。マウスまたはヒト細胞 (ウェル当たり $5.0 \pm 0.1 \times 10^5$; 2.0 mL) を、24時間まで、様々な濃度のCOMPOUND-JPに曝露し、次いで、T M R E と共にインキュベートした ($1.0 \mu\text{M}$; 30分間、 37°C)。その後、細胞を、PBSにより2回洗浄し、次いで、DAPI (Sigma-Aldrich、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) により染色し、MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotech) により検査し、データを、FlowJoソフトウェアによって評価した。

[0128] (活性カスパーゼ3染色)

細胞 (ウェル当たり $1.0 \pm 0.1 \times 10^6$; 1.0 mL) を、カスパーゼ3阻害剤Qvd-OH ($20 \mu\text{M}$) ありまたはなしで、様々なCOMPOUND-JP用量により刺激した。次いで、細胞は、カスパーゼ3阻害剤コンジュゲート (RED-DEVD-FMK; Biovision) により染色し、インキュベートした (1.0時間、5%CO₂で 37°C)。細胞を、洗浄バッファーにより洗浄し、次いで、遠心分離し (3000 rpm 、5.0分間)、30分間、アネキシンV-FITC ($10 \mu\text{L}/\text{ml}$; Miltenyi Biotech) により染色し、DAPI ($1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$) を、Mac s Q u a n t A n a l y s e r による検査の前に追加した。

[0129] (細胞内フローサイトメトリ分析 (ホスホフロー))

細胞 (ウェル当たり $1.0 \pm 0.1 \times 10^6$; 1 mL) を、様々なエフェクター (24時間、 37°C) と共にインキュベートし、次いで、Cyt o f i x / C y t o p e r m バッファー ($100 \mu\text{L}$ 、30分間、 4°C) により透過処理し、次いで、PermWash (BD Biosciences) に

より洗浄し、ホスホ-Ser235/236-S6RP抗体により染色した（30分間、4℃）。さらなるPermWashの後に、細胞を、次いで、二次抗ウサギAlexaFluor 488（20μg/ml; Life Technologies）により染色した（30分間、4℃）。次いで、細胞を、PermWash中で洗浄し、染色バッファー（PBS+0.1%ウシ血清アルブミン+1.0%パラホルムアルデヒド）中に再懸濁し、MacsQuant Analyser（Miltenyi Biotec）でフローサイトメトリによって分析した。

[0130]（インビボ腫瘍増殖のモニタリング）

それぞれの実験群におけるマウスすべてに、レポータールシフェラーゼ遺伝子を安定して発現する99KOL-LUC Tリンパ腫細胞（200μL； $5.0 \pm 0.1 \times 10^6$ ）を皮下注射した。注射の2日後に、マウスに、食塩水（NaCl 0.9%）に薬粉を溶解し、混合することによって調製したCOMPOUND-JPを腹腔内投与した（50mg/kg/日/1週間当たり5日間）。体重および腫瘍体積を、5日ごとに測定した。腫瘍体積は、数式に従って計算した： $V = (L * W^2) / 2$ （L：長さ；W：幅）。生体発光イメージングを行うために、マウスに、D-ルシフェリン（Caliper Life Science）の腹腔内注射（150μL、30mg/mL）を受けさせ、吸入イソフルラン（2.0%）によって麻酔をかけた。生体発光シグナルは、高感度冷却CCDカメラを装備したPhoton imager（Biospace Lab）を使用してモニターし、画像はすべて、D-ルシフェリン注射の10分後に収集した。データは、腫瘍領域を覆う注目画像領域（ROI）に集中して、全光子束放射（total photon flux emission）（光子/秒（photons/second））を使用して分析した。

[0131]（免疫組織化学的検査）

解剖した腫瘍のパラフィンブロック中の切片（4μm）を、一次ウサギホスホS6RP抗体（#4858、Cell Signaling Tech

nology)により標識した。ペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートされた二次抗ウサギ抗体 (Signal Stain (登録商標)、#8114、Cell Signaling Technology) を、メーカーによって推奨されるように、ジアミノベンジジン (DAB) による顕色の前に、切片に追加した。壊死の評価のために、切片を、ヘマトキシリン／エオシン／サフラン (HES) により染色した。画像を分析し、壊死面積は、Image Jソフトウェア (NIH) を使用して定量化した。

[0132] (統計分析)

インビトロ実験についての統計分析は、95%の信頼水準で、両側スチューデントのt試験を使用して実行した、またはANOVAを使用し、その後、Dunnettの多重比較検定を続けることによって計算した。組み合わせについては、実験群の間の有意性を決定するために、ANOVA、その後続くTukey多重比較検定によって分析した。薬剤の間の相乗作用は、Chou-Talalay法を使用して分析した。インビボ実験については、統計分析は、両側Mann-Whitney順位和検定を使用して実行した。P値<0.05は、統計的に有意であるとして許容された (* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$)。分析は、GraphPad Prism 3.0ソフトウェアを使用して実行した。

[0133] (ヒトの各種がん由来樹立培養細胞に発現する中性アミノ酸トランスポーター、LAT1及びLAT2遺伝子の定量)

各細胞からRNAを抽出し、LAT1及びLAT2特異プライマーを用いて各mRNAを定量PCR法で測定した。

[0134] (LAT1選択性阻害薬、COM-JPのヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来Panc-1細胞の増殖に及ぼす抑制効果)

各がん細胞の培養液中にCOM-JPの非存在並びに異なる濃度のCOM-JPの存在下に5日間培養を継続した。各日の経過における細胞の増殖活性をMTT法で測定した。

[0135] (LAT1選択性阻害薬、COM-JPと既存薬ゲムシタビン (GEM) とパ

クリタキセル(P a c)の単独並びに併用作用を示す実験手順)

ヒトスキルス胃癌由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来P a n c-1細胞の2種のがん細胞をCOM-J Pの存在、非存在下に培養し、2日目にG E M及びP a cを添加して2時間培養継続の後に、培地を交換し、COM-J Pの存在、非存在下にさらに2日間培養を行った。最後に細胞を収集して、細胞の生存活性をMT T法により定量した。各実験は同一条件の群を夫々3例測定し、平均値と標準誤差並びに有意差検定のp値を図中に示した。

[0136] (ヒト大腸がん由来HT-29細胞播種ヌードマウスモデルでの腫瘍増殖に及ぼすCOM-J Pと5-F Uとの併用効果)

HT-29細胞をマウスの皮下に播種し、腫瘍の大きさが或る一定の大きさ以上に成長した状態から、COM-J P及び5-F Uの単独並びに併用による腫瘍塊の大きさの推移を経日的に測定した。

[0137] (ヒト大腸がん由来HT-29細胞の同所播種ヌードマウスモデル(S O I m o d e l)での腫瘍増殖に及ぼすCOM-J PとC D D Pとの併用による相乗効果)

ヒト大腸がん由来HT-29細胞に海ほたるルシフェリンを発現させて、マウスの大腸壁に移植したメタマウスを作出した。これにより腫瘍の大きさを発光強度で経日的に定量できる。図16には各処置グループでの腫瘍の大きさを棒グラフに示した。グループ1は対照群、2~4はCOM-J Pを夫々3.1, 12.5, 50mg/Kg/日体重を4週間連日腹腔内単独投与、グループ5はC D D Pを2.5mg/Kg/日、0, 6, 13日目の3回腹腔内単独投与、グループ6~8には同2~4と5の組み合わせでの併用投与、グループ9はCOM-J Pを300mg/Kg/日を4週間連日経口投与を行った。

[0138] <<結果>>

以上の試験の結果を以下に示す。

[0139] (t P T E N-/-腫瘍、ヒトT-A L L/T-L L細胞株、および初代細胞は、L A T 1/CD98hc(s l c 7 a 5/s l c 3 a 2)発現が増強

している)

マウス ($tPTEN^{-/-}$) は、高悪性度で侵襲性のリンパ腫を発症する。正常胸腺細胞および $tPTEN^{-/-}$ 胸腺腫瘍細胞の全体的な遺伝子発現は、全ゲノム (*pan-genomic*) *Affymetrix* マウス DNA チップを使用して確立した。データの標準化の後に、野生型胸腺細胞 ($n=3$) および $tPTEN^{-/-}$ 腫瘍細胞 ($n=4$) 由来の遺伝子発現プロファイル (GEP) を評価した。野生型と比較して、 $tPTEN^{-/-}$ 腫瘍細胞は、498 のアップレギュレートされた遺伝子を示した。図 1 A において示されるように、本発明者らは、LAT1 をコードする SLC7A 遺伝子が、正常細胞と比較して、 $tPTEN^{-/-}$ においてアップレギュレートされたことを観察した ($\log_2: 2.44$ 倍)。対照的に、CD98hc をコードする SLC3A2 の発現は、腫瘍においてほんのわずかに増強された (0.874 倍)。そのうえ、レファレンスとして扱うために、本発明者らはまた、これもまた $tPTEN^{-/-}$ 細胞において高度に発現された *c-myc* 遺伝子 (2.22 倍) の結果をも示すが、ハウスキーピング遺伝子である *marks* は、2つのカテゴリーの間で有意に異なっていなかった。定量的 PCR 分析により、悪性細胞において、SLC3A2 ではなく、LAT1 および *c-myc* の発現の増強が観察されるのを確認することができた。高度な LAT1 発現は、2つの初代 $tPTEN^{-/-}$ 腫瘍 (KO マウス #99、#631) において観察され、それぞれ、KO99L および KO631L と示される細胞株を確立するために使用した。序論において先に論じられたように、LAT1 は、運搬活性となるために、ジスルフィド結合によって連結された CD98hc を必要とする。そのため、本発明者らはまた、抗 CD98hc 抗体を使用して、フローサイトメトリ分析を実行することによって、その表面発現をも分析した。正常 (WT) 胸腺細胞と比較して (図 1 B)、5つの $tPTEN^{-/-}$ 腫瘍は、より高度な CD98 発現を示した。細胞活性化: (PMA + イオノマイシン) は、腫瘍胸腺細胞における 17 倍と比較して、2.8 倍の発現の増加をもたらした (図 1 D)。

[0140] 同様に、3つの初代ヒトT-A L Lサンプルは、健康なドナー由来の静止および活性化末梢血リンパ球（P B L）と比較して、より高度なC D 9 8レベルを示した（図1 D～E）。概して言えば、これらの結果は、C D 9 8発現が、活性化マウスおよびヒトT細胞において増強され、形質転換リンパ球において、さらに高度なレベルに到達したことを示す。

[0141] （薬理的C D 9 8／L A T 1ターゲティングは、インビトロにおけるt P T E N－／－細胞生存を減少させる）

本発明者らは、様々な濃度のB C H、D－ロイシン、およびC O M P O U N D－J Pの存在下において、細胞生存能力を調べるために、K O 9 9 Lと示される、確立されたt P T E N－／－腫瘍細胞株を使用した。B C Hは、古典的なシステムL阻害剤であるが、L A T 1選択性を欠く（非特許文献18）。図2 Aにおいて示されるように、B C HおよびD－ロイシンは、高用量濃度で高度な細胞生存能力を維持し、細胞生存能力は、それぞれ、10.0および30.0 mMで30%および60%であった；図2 A）。対照的に、L A T 1選択的阻害剤C O M P O U N D－J Pは、はるかに大きな程度までK O 9 9 L細胞生存能力に影響を及ぼし、半分の細胞を死滅させるのに、より低い薬剤濃度を示し、 $IC_{50}=2.4\ \mu M$ であった（図2 A）。10.0 μM で、C O M P O U N D－J Pは、48時間後に75%、細胞周期（増殖）を減少させた（図2 B）。濃度依存性の方式で、C O M P O U N D－J Pは、新たに単離されたt P T E N－／－腫瘍細胞の細胞生存能力に影響を及ぼしたが、正常マウス胸腺細胞において無毒であった（補足資料図S 1 A）。

[0142] （C O M P O U N D－J Pは、必須アミノ酸流入を阻害する）

L A T 1が、大きな中性アミノ酸の取込みを媒介することは、十分に確証されている（参考文献21）；（参考文献22）。図2 Cにおいて示されるように、C O M P O U N D－J P（2.5～10.0 μM ）とのK O 9 9 L細胞のインキュベートは、細胞生存能力の用量依存的な減少をもたらし、これは、必須アミノ酸（E A A）を培養培地に補足することによっていくぶんか逆転され得たのに対して、非必須アミノ酸（N E A A）は、救出効果を有し

ていなかった。並行して、図2Dにおいて要約されるように、COMPOUND-JPにより誘発された細胞死は、NEAAではなく、EAAの追加に際して、2.5倍減少した。これらのデータは、COMPOUND-JPが、EAAの取込みを変化させることによって機能することをさらに実証する。

[0143] (COMPOUND-JPは、インビボにおいてtPTEN-/-腫瘍増殖に干渉する)

ルシフェラーゼ発現ベクターを安定してトランスフェクトしたKO99L細胞を、ヌードマウスに皮下注射し、その後(2日目)、動物を、COMPOUND-JP(50mg/kg/日=1.5mg/マウス/日)により治療した。腫瘍関連性の生体発光および腫瘍体積データを5日ごとに収集した。毎日のCOMPOUND-JP治療は、ビヒクル治療群と比較して、18日目に、平均腫瘍体積を45%($p < 0.05$)減少させた(図2E)。腫瘍発光(図2F)もまた、COMPOUND-JP治療によって統計的に有意な減少(59%; $p < 0.05$)を示した(図2G)。腫瘍の免疫組織学分析は、JPH206治療が、腫瘍内で壊死性の応答をもたらしたことを示した(10.5+/-0.5%対4.6+/-0.5%; 図4C)。

[0144] (COMPOUND-JPは、ヒトT-ALL/T-LL細胞株および患者初代細胞を変化させる)

本発明者らは、COMPOUND-JPによるLAT1のターゲティングもまた、T-ALL/T-LL細胞株および初代腫瘍細胞に影響を与え得るかどうかを確認しようと試みた。ヒトJurkat T-ALL株は、COMPOUND-JPが、細胞生存(図2H)および増殖(図2I)を変化させ得ることを実証するために利用した。そのうえ、4人の異なる患者から単離された初代T-ALL細胞もまた、濃度依存性の様式で、COMPOUND-JP感受性(細胞生存能力)を示した(図2J)。大きく異なるが、COMPOUND-JPは、正常な静止または活性化ヒトPBL細胞において、細胞死を誘発しなかった(図S2B)。さらに、細胞増殖に強く影響を与えた、アポトーシス誘発剤であるスタウロスポリン(STS: 1.0 μ M)とは対照

的に、COMPOUND-JPは、PBL細胞増殖（1.0～50.0 μ M；図S2C）も、正常な臍帯血単核細胞（5.0および10.0 μ M；図S2D）も有意に変化させなかった。その知られているLAT1/LAT2阻害剤選択性と一致して、これらの実験結果は、COMPOUND-JPが、正常（健康、LAT2発現）T細胞と比較して、白血病性細胞（LAT1発現）に対して、優先的に作用することを実証する。

[0145]（COMPOUND-JPは、アポトーシスおよび自食作用を引き起こす）

KO99L細胞に対するCOMPOUND-JPの曝露は、アポトーシスを誘発した。コントロール（COMPOUND-JPなし）と比較して、48時間後のアネキシン-V+およびアネキシン-V+/DAPI+細胞分析（図3A）は、それぞれ、10.0および20.0 μ Mで、2.8および3.8倍高いレベルのアポトーシスを示した。COMPOUND-JPが、アポトーシスの細胞の量を著しく減少させた、カスパーゼ活性化を妨げる阻害剤であるQVD-OPH（20.0 μ M）と同時投与された場合に、これらの結果は、さらに確認されるものとなった。ミトコンドリア外膜透過性化（MOMP）は、ミトコンドリア膜内外電位差（ $\Delta\psi_m$ ）を歪める初期のアポトーシス細胞死イベントである（参考文献23）。テトラメチルローダミンエチルエステル過塩素酸塩染色アッセイ（TMRE）を使用すると、COMPOUND-JP（5.0および10.0 μ M）は、KO99L細胞においてMOMPを引き起こすことが示された（図3B1）。KO99L細胞において観察されたミトコンドリア脱分極は、COMPOUND-JP濃度依存性であることが分かり（2.5～20.0 μ M；48時間）、試験した最も高い濃度で70%に達した（図3B2）。本発明者らは、ウェスタンブロッティング法によって48時間の期間にわたってカスパーゼ3切断を検査することにより、カスパーゼ活性化をモニターした（図3C）。COMPOUND-JP追加（10.0 μ M）の4～6時間後、カスパーゼ3切断を観察することができた（図3C、レーン4および5）。48時間（レーン8）までに、本質的にすべての細胞カスパーゼ3が、プロセッシングされた。そのうえ、本発明者ら

はまた、よく知られているカスパーゼ基質である R e d - D E V D - f m k によって、細胞関連性の蛍光を増加させる、C O M P O U N D - J P の能力について調べ、結果は、Q v D - O P H (2 0 . 0 μ M ; 図 3 D 1) とのプレインキュベーションに際してベースラインに戻った。図 3 D 2 において示されるように、C O M P O U N D - J P の結果は、用量および時間依存的であり、Q v D - O P H との同時投与によって打ち消すことができた (図 3 D 1 、 2) 。カスパーゼ 3 基質である P A R P もまた、C O M P O U N D - J P (1 0 . 0 μ M ; 2 4 時間) の存在下において、完全に切断されることが観察され、細胞の H s p 6 0 レベルにおける観察可能な変動はなかった (図 3 E 、 レーン 4) 。C O M P O U N D - J P はまた、初代 t P T E N - / - 細胞に対しても有効であり、用量依存的な (2 . 5 ~ 2 0 . 0 μ M) 様式で、細胞死を誘発した (図 3 F ; データは、5 つの初代 t P T E N - / - 腫瘍の平均である) 。初代 K O # 7 3 2 細胞 (図 3 G) を使用して、アポトーシスを分子的に確認した。C O M P O U N D - J P は、カスパーゼ 3 プロセッシングおよび P A R P 切断を誘発した (1 8 . 0 時間 ; レーン 1 0 、 1 1) 。ラパマイシンは、効果を有していなかった (レーン 5 、 9 、 1 3) が、P 1 1 0 3 は、初期 (2 . 0 時間、レーン 4) のおよび効率的な細胞死誘発因子 (レーン 8 、 1 2) のように思われた。栄養素の不足の間に起こり得る保護応答として、自食作用が、アポトーシスの前に起こり得る。図 3 H において示されるように、C O M P O U N D - J P (1 0 . 0 μ M) の曝露は、L C 3 - I I の蓄積を刺激したが、L C 3 - I I は、L C 3 の自食形態であり、自食作用の第 1 のステップと関連する (参考文献 2 4) 。L C 3 - I I の蓄積は、6 . 0 時間でピークに達し (図 3 H 、 レーン 3) 、その後、減少した (レーン 4 ~ 6) 。図 3 I において示されるように、Q v D - O P H (2 0 . 0 μ M) の存在は、アポトーシスに対抗することができ、1 8 . 0 時間までの間、L C 3 - I I を維持することができた (レーン 7 と比較したレーン 5) 。オートファゴソーム形成関連性の A t g 5 レベルは、次第に増加して、6 . 0 時間で最大になり (レーン 6) 、1 8 . 0 時間でベースラインに戻った (レーン

7)。さらに、pJNKストレス経路活性化は、アポトーシスがブロックされた場合に検出された（レーン7と比較した5）。全体として、これらの実験結果は、COMPOUND-JPが、最初に、自食応答を引き起こし、アポトーシスが速やかにそれに続いたという考えを支持する。

[0146] (COMPOUND-JPによるLAT1阻害は、mTORC1活性化に干渉する)

KO99L細胞におけるpS6RP低下によって確立されるように（図4A）、本発明者らは、COMPOUND-JP（10.0 μ M）が、早くも2.0時間でmTORC1活性化に影響を与えることができ（レーン5）、6.0時間（レーン6）および24時間（レーン7）で、維持されたことを観察した。COMPOUND-JPのmTOR阻害効果はまた、2つの初代T-ALLサンプルに対するホスホフローサイトメトリによっても観察された（図4B）。さらに、pS6RP染色は、COMPOUND-JP治療マウス由来の腫瘍において劇的に減少し、化合物のインビボにおける阻害効果を実証した（図4C）。KO99L細胞において、COMPOUND-JPはまた、セリン473リン酸化によって測定されるように、Akt活性化にも干渉した（図4A）。対照的に、COMPOUND-JPは、4EBP1リン酸化に対して影響を示さず、COMPOUND-JPが、mTORC1活性化を部分的にのみ乱すことを実証する。Akt阻害剤であるMK-2206（5.0 μ M）およびAkt/mTOR2重阻害剤であるKU0063794（5.0 μ M）は、早くも2.0時間で、S6RP、4EBP1、およびAktリン酸化を完全にブロックすることが示された（図S2）。ラパマイシン（10.0 nM）は、COMPOUND-JP（10 μ M）で観察された作用に類似していたが、ラパマイシンは、mTORC2ではなくmTORC1阻害剤であり（参考文献25）、これは、4EBP1ではなく、S6RPリン酸化を完全に阻害した（図S2）。ラパマイシンはまた、COMPOUND-JP（図S2）と比較して、より後の時点で、Aktリン酸化／活性化に影響を与えた。LAT1が、細胞内グルタミンとの細胞外EAA交換体であるこ

とが確立されているので（参考文献26）、本発明者らは、様々なグルタミンレベルが、どのようにEAA流入およびmTORC1活性化に干渉し得るのかについて調べようと試みた。このために、本発明者らは、細胞外アスパラギンを分解することができ、かつグルタミナーゼ活性を持つ2つの酵素、L-アスパラギナーゼ（L-Asp）およびErwinase（Erw）を使用した。図S2において示されるように、L-AspおよびErw（2.5ユニット／ml）の両方が、S6RPリン酸化を変化させたが、Erwがより高いグルタミナーゼ活性を有するので、それはL-Aspよりも強力であった。コントロール（図S2；レーン15～17）と比較して、Erw（レーン18～20）およびL-Asp（レーン21～23）はまた、4EBP1リン酸化をも変化させたのに対して、それらは、Aktリン酸化に有意に影響を及ぼさなかった。プロテアソーム活性の阻害は、アミノ酸ホメオスタシスを妨害することが報告されている（参考文献27）。本発明者らのモデルにおいて、プロテアソーム阻害剤であるベルケイド（Vel；図S2）は、初期の時点（2.0および6.0時間；それぞれレーン24および25）ではなく、24時間（レーン26）で、S6RP、4EBP1、およびAktリン酸化を完全に消失させた。これらのすべての実験において、S6RP、4EBP1、Akt、およびHsp90の全体のレベルは、様々な薬剤によって有意に変化せず、リン酸化に対して観察された影響が、タンパク質の量における差異によるものではなかったことを実証する。

[0147]（LAT1阻害およびc-mycタンパク質レベル）

c-mycタンパク質は、ヒトリンパ腫およびtPTEN-/-腫瘍においてアップレギュレートされることが示された（参考文献28）。tPTEN-/-細胞において、c-mycは、SDS-PAGE（図4D；レーン1～4）において60kDaのあたりで三つ組として移動するように観察された。COMPOUND-JP（10.0μM）との細胞のインキュベーションに際して、全c-mycは、2.0時間で既に減少し（レーン5）、24時間まで維持され（レーン7）、特に、c-mycの2つの下位の移動形態

は、有意に減少した。ベルケイドとインキュベートした場合に、類似した観察がなされた（8 nM；24時間；レーン10）。KU0063794（10.0 μM）によるAkt/mTOR阻害もまた、2つの下位のバンドにわずかに影響を及ぼした（レーン15～17）。MK-2206（10.0 μM）媒介性のAkt阻害は、24時間以内に3つのc-mycアイソフォームすべての劇的な消失をもたらした（レーン18～20）。COMPOUND-JPと著しく異なって、ラパマイシン（100 nM）は、c-mycレベルに影響を与えず（レーン12～14）、結果としてアポトーシスを誘発を欠いた。これらの様々な実験を通じて、Hsp90レベル変動は、明確に観察することができず、それによって、様々な観察された、薬剤により引き起こされた結果が、全体的な細胞タンパク質含有量における有意な変化の結果ではなかったということを確認するのを支援する。さらに、本発明者らは、全体的なタンパク質合成に対するCOMPOUND-JPのいかなる干渉をも観察しなかった。まとめると、実験データは、COMPOUND-JPによってもたらされるc-mycダウンレギュレーションが、その抗白血病性の効果の重要な特質であるかもしれないという考えと一致している。

[0148]（COMPOUND-JPは、総合的ストレス応答（Integrated Stress Response）／変性タンパク質応答を活性化する）

タンパク質および／またはアミノ酸ホメオスタシス異常は、自食作用および細胞死に至り得る小胞体／総合的ストレス応答（ISR）／変性タンパク質応答（UPR）を引き起こすことが知られている（参考文献29）。「C／EBP相同タンパク質」（CHOP）として知られている転写因子の発現は、ERストレスの間に誘発性になり、ER媒介性のアポトーシスに参加する（参考文献30）。無秩序なCHOP活性は、細胞生存能力を損ない、CHOPを欠く細胞は、ERストレスの致命的な転帰から有意に保護される（参考文献31）。KO99L細胞においてイムノブロットングによって評価すると、COMPOUND-JP（10.0 μM）は、2.0時間（図5A、レーン5）までにCHOP発現を速やかに誘発し、これは、6.0時間（

レーン6)で最大となり、24時間(レーン7)で安定したままであった。COMPOUND-JPと比較して量が少なかったが、L-A sp (2.5 ユニット/ml)によるCHOPの誘発は、6.0時間(レーン9)および24時間(レーン10)で明らかであった。Erw (2.5 ユニット/ml)もまた、一過性の応答を誘発し、これは、6.0時間(レーン12)で最大となり、24時間(レーン13)までに基本レベルに戻った。図5Bにおいて実証されるように、CHOPは、著明な、COMPOUND-JP用量依存的な誘発を示し(5.0および10.0 μ M;それぞれレーン2および3)、CHOP誘発はまた、ベルケイドによっても(8.0および15.0 μ M;それぞれレーン7および8)、また、程度はより小さいが、L-A sp (2.5 ユニット/ml)およびラパマイシン(10.0 nM)、それぞれレーン4および9によっても強く誘発された。対照的に、AktおよびAkt/mTOR阻害剤であるMK-2206(10.0 μ M;レーン5)およびKU0063794(10.0 μ M;レーン6)は、CHOP誘発をもたらさず、これは、この経路が、PI3K/Akt/mTOR経路によって引き起こされないことを示唆する。

[0149] (COMPOUND-JP誘発性のUPRは、必須アミノ酸取込みのブロックに直接関係する)

本発明者らは、次に、tPTEN-/-細胞が、培地アミノ酸組成の修飾に対してどのように応答するかについて調査した。完全培地をHBSSにより10倍に希釈すると(図5C; 6.0および24時間、レーン4および5)、明らかな時間依存的なCHOP誘発が、観察された。NEAAを栄養欠損培地に補足しても(図5C;レーン6および7)、CHOP誘発を修飾しなかったが、EAA(レーン8および9)またはNEAA+EAA(レーン10および11)の組み合わせの追加は、CHOP出現を妨げた。S6RPリン酸化がCHOP発現と逆相関したことは、興味深く、培地におけるEAAの欠乏は、mTORC1ダウンレギュレーションに至る。そのうえ、本発明者らは、COMPOUND-JP媒介性のCHOPの誘発(図5D)が、細

胞外アミノ酸含有量によって調整されることを観察した。実際に、EAAの補足は、CHOP誘発を明確に妨げた（レーン8および9）。CHOPタンパク質が、6.0時間（レーン6）と比較して、24時間（レーン7）でほとんどを検出することができなかったので、NEAAは、応答を短くし、これに反して、EAA+NEAAの組み合わせは、中間の応答を示した（レーン10および11）。この実験結果は、COMPOUND-JPによって引き起こされるストレス応答が、細胞外EAA濃度を増加させることによって相殺され得ることを示し、COMPOUND-JPの作用が、EAA取込みの阻害によるものであることをさらに実証する。

[0150] (COMPOUND-JP誘発性のCHOPは、アポトーシスを引き起こした)

COMPOUND-JP (LAT1阻害) によって観察されるISR/UPRが、続くアポトーシスの原因となったかどうかについて検査するために、本発明者らは、eIF2 α 脱リン酸化を妨げ、ERストレスに対して細胞保護を誘発した阻害剤として確立されたsalubrinal化合物を使用した（参考文献32）。図5Eにおいて示されるように、salubrinal (50.0 μ M) は、COMPOUND-JP (10.0 μ M) によるCHOPの誘発を相殺することができた（レーン6および7と比較した8および9）。そのうえ、これらの結果には、カスパーゼ3切断の減少が伴った（中央のパネル）が、Hsp60レベルは、変わらなかった（下位のパネル）。さらに、サルブリナル (salubrinal) (50.0 μ M) は、COMPOUND-JPによって誘発された細胞死からKO99L細胞を救出し（図5F）、かつ、BrdU取込み（図5G）または細胞計数（図5H）によって評価される細胞増殖を回復させた。これらの結果は、COMPOUND-JPが、細胞死応答の間に、CHOP誘発を引き起こすことができることを実証する。

[0151] (COMPOUND-JPによって誘発される、UPR経路における分子イベント)

変性タンパク質応答 (UPR) は、i) イノシトール要求性酵素 1 アルファ (IRE1 α) ; ii) PKR 様 ER キナーゼ ; および iii) 活性化転写因子 (ATF6) ((参考文献 33) において概説される) を含む、複数の ER タンパク質の調和的な活性化によって特徴付けられる。活性化された IRE1 α は、chop の発現を誘発する転写因子 XBP-1 のアイソフォームをコードする mRNA の非通常性のスプライシングを開始する ((参考文献 30))。活性化された PKR 様 ER キナーゼは、eIF2 α (セリン 51A) をリン酸化し、ATF4 の翻訳の誘発をもたらす (参考文献 34) 。 ATF6 は、ER ストレスの間に切断され、そのサイトゾルドメイン [ATF6 (N)] は、核に移動し、転写を調節するであろう (参考文献 35) 。 XBP-1、ATF4、および ATF6 は、ER ストレスの間に chop を誘発することが知られている 3 つの転写因子である (参考文献 30) 。そのため、本発明者らは、COMPOUND-JP (10.0 μ M) との細胞のインキュベーションの後の ATF4、ATF6、および XBP-1 のステータスについて検査した。本発明者らは、ATF4 (6.0 時間) および ATF6 (18.0 時間) が誘発され、一方、完全長 XBP1 が、徐々に消失し (図 6A ; レーン 3 および 4) 、CHOP および GADD34 が、同時に発現した (図 6B ; レーン 3 および 4) のを観察した。eIF2 α の脱リン酸化は、GADD34 ホスファターゼの平行した発現と共に 24 時間で観察された (図 6C) 。 p38 ストレス経路は、2.0 時間で強く活性化された (図 6C ; レーン 2) 。

[0152] (COMPOUND-JP は、アポトーシス促進性および抗アポトーシス性 Bcl2 ファミリーメンバーを調整する)

COMPOUND-JP によるアポトーシス誘発を分子的に定義するために、本発明者らは、Bcl2 ファミリーメンバーを分析し、本発明者らは、ミトコンドリアおよび ER 膜レベルでアポトーシスの開始をコントロールすることが知られているメンバーを測定しようと試みた。6.0 時間から開始すると (図 6D) 、COMPOUND-JP (10.0 μ M) は、4 つのアポト

ーシス促進性メンバー：Bak（図6D；レーン2～4）、Bax（レーン4）、PUMA（レーン2～4）、ならびにBim（レーン3および4）のタンパク質レベルを増加させた。Bax、Bak、PUMA、およびBimの誘発は、salubrinalによるCHOPの阻害に対して感受性であった（図6E、レーン3および4）が、全Hsp90タンパク質レベルは、影響を与えられなかった。

[0153]（KO99RJ細胞：COMPOUND-JP抵抗性の変異体）

COMPOUND-JPの濃度を増加させながらKO99L細胞を定期的に培養することによって、本発明者らは、COMPOUND-JPの抗増殖およびアポトーシス効果に抵抗する、細胞の変異体を得ることができた。およそ4か月後に、本発明者らは、COMPOUND-JP（20.0 μ M）の存在下においてなお増殖することができるKO99-RJとして示される細胞株を得た。図7Aにおいて要約されるように、細胞生存能力における減少は、COMPOUND-JP用量依存的であり、変異細胞株（つまりKO99-RJ）と比較して、親の株（つまりKO99-S）においてはるかに有力であり、たとえば、40 μ M COMPOUND-JPで、細胞生存能力は、KO99-Sについて本質的に95～100%であったのに対して、KO99-RJにおいておよそ40%減少した。図7Bにおいて示されるように、COMPOUND-JPは、KO99-Sにおいて濃度依存性の細胞死を示したが、KO99-RJにおいてはるかに効率的でなかった。さらに、CHOP誘発の非存在によって確立されたように（図7C）、COMPOUND-JPが、KO99-RJ細胞において、総合的ストレス応答を引き起こさなかったことを観察することは興味深かった。これらのデータは、COMPOUND-JPによって誘発されるアポトーシス応答を引き起こすこの経路の重要な役割をさらに強調するものである。最後に、S6RPリン酸化における減少を観察することができなかったので（図7C）、COMPOUND-JPはまた、KO99-RJにおいて、mTORをも阻害できず、KO99-RJは、親の細胞と同等のレベルでCD98を発現する。

[0154] (COMPOUND-JPは、化学療法剤およびシグナル伝達阻害剤を強化する)

図8において示されるように、COMPOUND-JPを、様々な化学療法剤またはシグナル伝達阻害剤と組み合わせて試験した(インビトロにおいて)。本発明者らは、白血病治療の導入期の間に臨床的に使用される2つの化学療法剤であるデキサメタゾンおよびドキソルビシンについて、試験した(参考文献36)。これらの実験において、化合物はすべて、最適以下の濃度で使用し、これらの結果は、補足の資料の図S3-1、2において示す。算出された組み合わせインデックス(CI)値は、図8Aにおいて示す。COMPOUND-JPは、ラパマイシンと強く相乗作用を示すように思われ、全体的な代謝活性/細胞生存を減少させる。相乗効果または相加効果は、すべての化合物で観察され、特に、COMPOUND-JPは、デキサメタゾンおよびドキソルビシンと相乗作用を示した。LAT1阻害剤は、ベルケイドおよびL-アスパラギナーゼの効果を強化することができるが、PI103およびKU-0063794とはそれほど効率的でないように思われた。WST1から導き出したアイソボログラムは、試験した様々な組み合わせについての可能性をさらに示す(図8B)。全体として、データは、TALL細胞生存に干渉する他の分子と組み合わせた場合、COMPOUND-JPがポジティブな効果をもたらすことができることを示す。

[0155] (ヒトの各種がん由来樹立培養細胞に発現する中性アミノ酸トランスポーター、LAT1及びLAT2遺伝子の定量結果)

図10において、単位RNA当りのmRNA量を縦軸に、使用したがん細胞名を横軸に、がん種別名を表中に記した。5つの例外を除けば46種類の細胞全部にLAT1 mRNAは発現しており、がんタイプのトランスポーターとすることができる。他方、LAT2はがん細胞での発現はゼロか極端に低値であり、正常タイプである、と理解できる。

[0156] (LAT1選択性阻害薬、COM-JPのヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来Panc-1細胞の増殖に及ぼす抑制効果)

図 1 1 において、各値は同一条件での 4 例の平均値を COM-JP の非存在での活性を 100%とした相対値として表示した。平均値と標準誤差並びに有意差検定の p 値を図中に示した。がん細胞の種類による差異は認められるものの、両細胞共に COM-JP の用量依存的な増殖活性の低下が明らかに認められた。

[0157] (ヒトスキルス胃がん由来 44 As 3-11 細胞の増殖に及ぼす COM-JP と他剤との併用効果)

ヒトスキルス胃がん由来 44 As 3-11 細胞の増殖に及ぼす Gemstabin 並びに Paclitaxel を単独で 2 時間作用させた効果は各群カラムの左の棒グラフの値の差に相当する。各実験は同一条件の群を夫々 3 例測定し、平均値と標準誤差並びに有意差検定の p 値を図中に示した。両者共に用量依存性に細胞の増殖活性を低下させた。Gemstabin より Paclitaxel の抑制効果が強力であった。COM-JP (15 μ M) を前 2 日間処置した結果 (各群の真ん中の棒グラフ) よりも全期間存在させた方 (各群の右側の棒グラフ) の併用効果がより強力であった。併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、所謂相加効果を示した。

[0158] (ヒト膵がん由来 Panc-1 細胞の増殖に及ぼす COM-JP と他剤との併用効果)

ヒト膵がん由来 Panc-1 細胞の増殖に及ぼす Gemstabin 並びに Paclitaxel を単独で 2 時間作用させた効果は各群カラムの左の棒グラフの値の差に相当する。各実験は同一条件の群を夫々 3 例測定し、平均値と標準誤差並びに有意差検定の p 値を図中に示した。両者共に用量依存性に細胞の増殖活性を低下させた。Gemstabin より Paclitaxel の抑制効果が強力であった。しかし、Gemstabin の単独効果は極めて小さく、スキルス胃がん由来 44 As 3-11 細胞の増殖への作用よりも明らかに弱い作用であった。COM-JP (15 μ M) を前 2 日間処置した結果 (各群の真ん中の棒グラフ) よりも全期間存在させた方 (各群の右側の棒グラフ) の併用効果は僅かに抑制が見られたものの、その程度は

スキルス胃がん由来44As3-11細胞の増殖に比して明らかに低い抑制であった。Panc-1細胞における各併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、44As3-11細胞の場合と同様に所謂相加効果であった。

[0159] (ヒト大腸がん由来HT-29細胞播種ヌードマウスモデルでの腫瘍増殖に及ぼすCOM-JPと5-FUとの併用効果)

両薬物の単独投与では無処置の対照群に比して腫瘍の増大は夫々有意な減少を示した。両者の併用により、各単独群の残存腫瘍増大は更に減少した。この併用効果は相加的であり、両薬物の作用機序が異なることに起因することが明らかにされた。

[0160] (ヒト大腸がん由来HT-29細胞の同所播種ヌードマウスモデル (S.O.I. model) での腫瘍増殖に及ぼすCOM-JPとCDDPとの併用による相乗効果)

図16のグループ8と9では対照群に比して腫瘍の増大は有意に低下した。この結果より、COM-JPとCDDPの単独投与では認められなかった各薬効は両者の併用で明らかな薬効を認められた。この併用による薬効は両者の相乗効果と結論された。

[0161] 《考察》

上記の試験結果により、以下が明らかとなった。

[0162] 本研究は、必須アミノ酸 (EAA) トランスポーターであるLAT1 / SLC7A5の阻害が、ALL / T-LL細胞モデルにおける代謝および生存を変化させることができることを実証する。本発明者らは、初代細胞およびPTEN腫瘍抑制遺伝子のTリンパ球特異的不活性化の後に得られたT細胞性リンパ腫 (tPTEN-/-) マウスモデルに由来する細胞株を使用した。最初に、遺伝子発現プロファイリングは、tPTEN-/-細胞が、静止または活性化正常T細胞と比較して、SLC7A5レベルが上昇していることを確認した。腫瘍細胞はまた、正常細胞と比較して、それらの表面にCD98を過剰発現することも示された。これらの結果は、それらが、LAT1

／SLC7A5レベルが高いだけではなく、形質転換細胞が、機能的LAT1に必要とされる、SLC3A2遺伝子によってコードされる膜貫通タンパク質CD98hc／4F2を過剰発現することもまた検証するので、重要である（非特許文献11）。同様に、健康なドナーによる静止および活性化末梢血リンパ球（PBL）と比較して、初代ヒトT-ALLサンプルおよびT-ALL／T-LL細胞株もまた、CD98レベルの増強を示した。CD98の発現は、腺癌（参考文献37、38）または乳癌（参考文献39）などのような、いくつかの癌における予後不良と関連するよう思われ、その発現が、激しい増殖および攻撃性などのような重要な病的な特質と関係し得ることを示唆する。増殖速度（Ki-67）とポジティブに相関するCD98の高度な発現および胃がんにおける、より不良な予後（参考文献40）およびLAT1／CD98レベルの上昇は、原発性腫瘍と比較して、転移性の部位において観察された（参考文献41）。まとめると、これらのデータにより、本発明者らは必須アミノ酸LAT1媒介性の取込みを阻害する重要性ならびにT細胞リンパ芽球性リンパ腫／T細胞急性リンパ性白血病細胞増殖および生存を変化させるためのその能力について調査することにした。

- [0163] 本発明者らの研究は、最初に、初代tPTEN-/-細胞およびtPTEN-/-腫瘍に由来する細胞株に対して行った。本発明者らは、LAT1による中性アミノ酸移入と競合するように、BCH-きわめて典型的なシステムL阻害剤-およびD-ロイシンについて試験した。両方の分子は、tPTEN-/-細胞の生存に影響を与えることができたが、それらは、限られた効率しか示さず、高濃度（>1.0mM）を必要とし、類似する結果は、頭頸部扁平上皮癌細胞株で報告されている（参考文献42）。本発明者らは、次に、強力なLAT1選択的阻害剤、COMPOUND-JPについて検査した（参考文献43）。細胞培養培地に追加すると、COMPOUND-JPは、tPTEN-/-細胞の生存を有意に減少させた（IC₅₀=2.4μM）。そのうえ、COMPOUND-JPは、細胞増殖に対して、濃度依存性で、統計的に有意な効果を示した。培養培地に対するEAAの追加は、細胞生存

能力および細胞死を歪めるためのCOMPOUND-JPの能力を減少させ、COMPOUND-JPが、EAA流入に対して競合的なプロセスによっておそらく作用することを示す（参考文献21）。本発明者らは、次に、ルシフェラーゼを安定して発現するKO99L細胞をヌードマウスに注射することによって、インビボイメージング実験を実行した。COMPOUND-JPは、腫瘍体積における有意な減少をもたらした。COMPOUND-JPは、ヌードマウスに移植されたHT-29結腸癌細胞の増殖を低下させることが既に報告されている（参考文献43）が、本研究は、インビトロおよびインビボの両方における、LAT1阻害剤としてのCOMPOUND-JPの実用性をさらに示す。

[0164] 一度、本発明者らは、COMPOUND-JPが、tPTEN-/-細胞に対するインビトロおよびインビボにおける効果を媒介することを確認したら、本発明者らは、LAT1のターゲティングがまた、T-ALL/T-L細胞株および初代白血病性細胞をも変化させることができるかどうかを確認しようと試みた。最初に、本発明者らは、COMPOUND-JPが、インビトロにおける細胞生存および増殖に影響を及ぼしたことを示した、よく知られているヒトJurkat T-ALL細胞株を使用した。次に、本発明者らは、4つの様々なヒト患者由来の初代T-ALL細胞を単離し、それらもまた、細胞生存能力に対してCOMPOUND-JP用量依存的な効果を示した。Jurkat細胞および患者由来の細胞とは対照的に、COMPOUND-JPは、正常な静止または活性化ヒトPBL細胞において、細胞死を誘発せず、LAT1選択的阻害剤が、正常（LAT2発現）細胞と比較して、白血病（LAT1発現）に対して優先的な効果を有するという考えを支持した。

[0165] 分子レベルで、本発明者らは、COMPOUND-JPが、mTORC1活性化に部分的に干渉し得ることを観察した。COMPOUND-JPは、S6RPリン酸化をブロックするが、4EBP1のリン酸化に影響を与えなかった。COMPOUND-JPにより治療したマウスの異種移植tPTEN-/-

一腫瘍もまた、ホスホS6RPにおける大きな低下を示した。本発明者らはまた、2つの初代T-ALLサンプルに対するホスホフローサイトメトリを使用して、COMPOUND-JPによって引き起こされるこのmTOR阻害効果を観察することもできた。

[0166] COMPOUND-JPの重要な特異性は、総合的ストレス応答（ISR）／変性タンパク質応答（UPR）においてCHOP転写因子を誘発するためのその能力である。小胞体（ER）における、誤って折り畳まれたタンパク質の蓄積またはAAの不足によって引き起こされるこの応答は、細胞が、ERにおいてタンパク質恒常性を回復させるのを可能にする（参考文献44）。それらが衰えると、細胞のアポトーシスによる排除が、開始される。さらに、培地におけるAA含有量を変化させると、明らかな時間依存性のCHOP誘発がもたらされた。CHOPはまた、ベルケイドプロテアソーム阻害剤によっても、強度はより低い、アスパラギンおよびグルタミンのレベルに影響を与えるL-アスパラギナーゼおよびErwinaseによっても、ならびにラパマイシンによっても、強く誘発された。PI3K/Akt/mTORの阻害剤は、CHOPを誘発しなかった。COMPOUND-JP誘発性のCHOPは、細胞外EAAの追加によって調整され、COMPOUND-JPが、EAA取込みの阻害を通して作用することを実証した。さらに、eIF2 α 脱リン酸化を妨げ、ERストレスに対して細胞保護を誘発する阻害剤として確立された化合物であるsalubrinal（参考文献32）は、COMPOUND-JPにより引き起こされたCHOP誘発を相殺し、KO99L細胞死を救出し、細胞増殖を回復させることができた。UPRは、ATF6、IRE-1、およびPERKによる少なくとも3つの経路によって引き起こされ得る（参考文献44）。興味深いことには、COMPOUND-JPは、ATF6、IRE-1、およびPERKを通して3つの経路を動員することができ、それが、共通の上流のイベントに干渉し得ることを示唆した。

[0167] 分子的に、COMPOUND-JPは、4つのアポトーシス促進性Bcl-

2ファミリーメンバー：UPRとCHOPとの関与と関連するBax、Bak、Bim、およびPumaの発現を誘発した。BH3のみのタンパク質Pumaは、ERストレス誘発性のアポトーシスに対して抵抗性を示すPuma^{-/-}細胞により、ツニカマイシンによって誘発される（参考文献45）。さらに、CHOPは、Pumaプロモーター領域内でAP-1と相互作用し（参考文献46）、Bimプロモーターを直接調節する（参考文献47）。さらに、BaxおよびBakは、IRE1 α 活性化にとって不可欠な、IRE1 α のサイトゾルドメインとタンパク質複合体を形成することができる（参考文献48）。Bax、Bak、Bim、およびPumaの調整は、おそらく、ミトコンドリアおよびERレベルで、アポトーシスの誘発に関与する。たとえば、COMPOUND-JPは、カスパーゼ活性化を進める、tPTEN^{-/-}細胞における用量依存的なミトコンドリアの脱分極を示した。アポトーシスは、mTORC1に対するCOMPOUND-JPの阻害効果からおそらく結果として生じる初期の自食応答に続くことが分かった。

[0168] 本研究の他の興味深い側面は、KO99-RJとして示される、COMPOUND-JP抵抗性の細胞株の形成であった。COMPOUND-JPは、KO99-RJにおいて細胞死を誘発することができなかつただけではなく、CHOP誘発もまた、観察することができず、COMPOUND-JP誘発性の細胞死におけるCHOPの重要性を実証した。COMPOUND-JPの作用様式の暫定的なモデルは、補足図S4において示される。

[0169] COMPOUND-JPは、全体的なタンパク質合成に影響を与えなかったが、COMPOUND-JPは、EAA利用可能性における減少に対してc-mycを非常に感受性にする非常に短い半減期（15分）を有するc-mycの発現を変化させ、その継続的な再合成を妨げた。c-mycにおけるこの減少は、リンパ腫細胞の増殖および生存に対して劇的な転帰を招くであろう。実際に、正常T細胞において、LAT1/SLC7A5は、T細胞抗原受容体（TCR）のコントロール下にあり、その誘発は、免疫応答を適切に開始すること（mounting）およびT細胞代謝のその再プログラム化

(reprogramming) にとって重大である (参考文献 28)。
SLC7A5 において欠損を有する T 細胞は、TCR トリガリングに際して mTORC1 を刺激することができず、不完全な c-myc 発現を示す。
2 つのイベントが組み合わされると、結果として、代謝を活性化することも、再プログラム化することもできず、CD4+ および CD8+ エフェクター細胞の分化の欠損をもたらし、免疫応答を損なってしまう。興味深いことには、COMPOUND-JP による LAT1 阻害は、T 細胞活性化に干渉することが示された (参考文献 49)。

[0170] LAT1 および 4F2/CD98hc は、それぞれ、ヘテロ二量体 CD98 複合体の軽鎖および重鎖である。LAT1 は、大きな EAA を運搬するが、CD98hc は、 β インテグリンと相互作用する (非特許文献 19)。2 つの特性が機能的に関係しているかどうかはまだ明らかではない。ES 細胞における CD98hc の破壊は、インテグリンの機能に干渉し、接着ではなく、細胞の拡散および移動を破壊した (非特許文献 19)。軽鎖ではなく、インテグリンと相互作用する CD98hc 突然変異体によるヌル細胞の再構成は、インテグリンシグナル伝達を回復させたが、驚いたことに、Akt 活性化およびアポトーシスからの保護にとって必ずしも必要でなかった (非特許文献 19)。対照的に、CD98hc を過剰発現する腎臓の上皮細胞において、LAT1 依存性のアミノ酸運搬およびインテグリン相互作用は、両方とも増殖にとって重要である (参考文献 50)。また、マウス表皮において CD98hc の欠失は、皮膚ホメオスタシスおよび創傷治癒に影響を与え、EAA 取込みの障害は、src および RhoA の活性化に対して、ネガティブに影響を与えるのに関与することが示された (参考文献 51)。細胞の状況および依存性に依存して、インテグリンと相互作用する機能または AA 運搬は、重要な役割を果たし得る。本発明者らのモデルにおいて、本発明者らは、 β インテグリンの役割について調査しなかったが、LAT1 による EAA 流入は、白血病存続にとって重要であるように思われる。

[0171] 最後に、本発明者らはまた、様々な化学療法剤またはシグナル伝達阻害剤

と組み合わせたCOMPOUND-JPインビトロ実験を実行し、組み合わせインデックス(CI)値を算出した。相乗効果または相加効果は、試験した、すべての化合物により観察された。特に、COMPOUND-JPは、ラパマイシンと最も高度な相乗作用を示した。2つの薬剤が、両方ともSGRPリン酸化を阻害することができ、4EBP1のリン酸化に影響を与えることができないとしても、それらは、しかしながら、COMPOUND-JPが、増殖阻止およびアポトーシスを誘発することができ、ラパマイシンが、tPTEN-/-細胞において細胞増殖抑制性であるのみであるように、異なる作用様式を有する(参考文献52)。これは、COMPOUND-JPが、ラパマイシンと比較して、CHOPのより強い誘発因子であり、Akt活性化を阻害することができるという事実によるものとすることができる。COMPOUND-JPはまた、デキサメタゾン、ドキソルビシン、およびレーアスパラギナーゼの抗白血病性の効果を強化することもできる。癌細胞に対するプロテアソーム阻害剤ベルケイドの毒性作用は、細胞内AAプールの枯渇によるものであることが報告されている(参考文献27)。これは、COMPOUND-JPによって増幅される可能性が高く、細胞生存能力に対する、2つの分子の観察された相加効果を説明し得る。本発明者らは、COMPOUND-JPがまた、PI3K/Akt/mTOR経路に作用する2つの阻害剤、KU0063794およびPI-103の効果をもわずかに増加させたことを示す。

[0172] 概して言えば、本発明者らの結果は、T-ALL/T-LL癌細胞上のLAT1の過剰発現が、それらの再プログラム化された代謝を支持する、栄養素の取込みの増加ならびにmTORC1およびAktの活性化への、癌細胞の依存を反映することを示す。さらに、本発明者らの研究は、LAT1を通してのEAA取込みへの薬理的な干渉が、これらの致命的な造血悪性疾患を治療するための、興味深い、全体的な補助治療戦略に相当し得ることをインビトロにおいて実証している。

[0173] 最後に、他の癌への応用について以下に実証する。各細胞からRNAを抽

出し、LAT1及びLAT2特異プライマーを用いて各mRNAを定量PCR法で測定した。その結果を図10に示す。単位RNA当りのmRNA量を縦軸に、使用したがん細胞名を横軸に、がん種別名を表中に記した。上段はLAT1を下段はLAT2を記した。当該図より分かるように、46種類の細胞全部にLAT1 mRNAは発現しており、がんタイプのトランスポーターとすることができる。他方、LAT2はがん細胞での発現はゼロか極端に低値であり、正常タイプである、と理解できる。従って、上記結果を他の癌へ応用することができる。

[0174] そして、実際に、他の癌へ応用した実験結果の考察を以下に示す。

[0175] まず、図11において示されるように、がん細胞の種類による差異は認められるものの、ヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞とヒト膵がん由来Panc-1細胞の両細胞共にCOM-JPの用量依存的な増殖活性の低下が明らかに認められた。図10の結果で明らかなように、その他の多くのLAT1発現がん細胞においてもそれらのLAT1発現量に応じたCOM-JPの増殖抑制効果が期待される。

[0176] 次に、図13において示されるように、Gemstabine並びにPacclitaxelの両者共に用量依存性に細胞の増殖活性を低下させた。GemstabineよりはPacclitaxelの抑制効果が強力であった。ヒトスキルス胃がん由来44As3-11細胞の増殖に及ぼすCOM-JPと他剤との併用効果について、COM-JP (15 μ M) を前2日間処置した結果 (各群の真ん中の棒グラフ) よりも全期間存在させた方 (各群の右側の棒グラフ) の併用効果がより強力であった。併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、所謂相加効果を示した。

[0177] 続いて、図14において示されるように、Gemstabine並びにPacclitaxelの両者共に用量依存性に細胞の増殖活性を低下させた。GemstabineよりはPacclitaxelの抑制効果が強力であった。しかし、Gemstabineの単独効果は極めて小さく、スキルス胃がん由来44As3-11細胞の増殖への作用よりも明らかに弱い作用であっ

た。ヒト膵がん由来 P a n c - 1 細胞の増殖に及ぼす C O M - J P と他剤との併用効果について、C O M - J P (1 5 μ M) を前 2 日間処置した結果 (各群の真ん中の棒グラフ) よりも全期間存在させた方 (各群の右側の棒グラフ) の併用効果は僅かに抑制が見られたものの、その程度はスキルス胃がん由来 4 4 A s 3 - 1 1 細胞の増殖に比して明らかに低い抑制であった。P a n c - 1 細胞における各併用による抑制効果は各単独の作用を加算した結果であり、4 4 A s 3 - 1 1 細胞の場合と同様に所謂相加効果であった。

[0178] さらに、図 1 5 において示されるように、両薬物の単独投与では無処置の対照群に比して腫瘍の増大は夫々有意な減少を示した。ヒト大腸がん由来 H T - 2 9 細胞播種ヌードマウスモデルでの腫瘍増殖に及ぼす C O M - J P と 5 - F U との併用効果について、両者の併用により、各単独群の残存腫瘍増大は更に減少した。この併用効果は相加的であり、両薬物の作用機序が異なることに起因することが明らかにされた。このような併用による各単独の治療効果を更に増強できる薬効は臨床での大腸がん治療においても十分に期待される。

[0179] 最後に、ヒト大腸がん由来 H T - 2 9 細胞の同所播種ヌードマウスモデル (S O I m o d e l) での腫瘍増殖に及ぼす C O M - J P と C D D P との併用による相乗効果について、図 1 6 に示すように、図 1 6 のグループ 8 と 9 では対照群に比して腫瘍の増大は有意に低下した。この結果より、C O M - J P と C D D P の単独投与では認められなかった各薬効は両者の併用で明確な薬効を認められた。この併用による薬効は両者の相乗効果と結論された。

[0180] 以上のように、L A T 1 阻害剤と他剤との併用による相加効果や相乗効果が明らかとなり、他の癌についても、本発明に係る L A T 1 阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物が有効である。

[0181] 《参考文献》

(参考文献 2 1) H. Uchino et al., Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Molecular pharmacology* 61, 729 (Apr, 2002).

(参考文献 2 2) E. Morimoto et al., Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. *Journal of pharmacological sciences* 108, 505 (Dec, 2008).

(参考文献 2 3) L. Galluzzi, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer, Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4812 (Aug 7, 2006).

(参考文献 2 4) A. Puissant, G. Robert, P. Auberger, Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle* 9, 3470 (Sep 1, 2010).

(参考文献 2 5) M. R. Janes et al., Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nat Med* 16, 205 (Feb, 2010).

(参考文献 2 6) P. Nicklin et al., Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521 (Feb 6, 2009).

(参考文献 2 7) A. Suraweera, C. Munch, A. Hanssum, A. Bertolotti, Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Molecular cell* 48, 242 (Oct 26, 2012).

(参考文献 2 8) L. V. Sinclair et al., Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature immunology* 14, 500 (May, 2013).

(参考文献 2 9) I. Tabas, D. Ron, Integrating the mechanisms of apopt

osis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184 (Mar, 2011).

(参考文献30) S. Oyadomari, M. Mori, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation* 11, 381 (Apr, 2004).

(参考文献31) H. Zinszner et al., CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development* 12, 982 (Apr 1, 1998).

(参考文献32) M. Boyce et al., A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935 (Feb 11, 2005).

(参考文献33) P. Walter, D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081 (Nov 25, 2011).

(参考文献34) H. P. Harding et al., An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* 11, 619 (Mar, 2003).

(参考文献35) J. Ye et al., ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* 6, 1355 (Dec, 2000).

(参考文献36) C. H. Pui, W. E. Evans, Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166 (Jan 12, 2006).

(参考文献37) N. Yanagisawa et al., High expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 65, 1019 (Nov, 2012).

(参考文献38) H. Nawashiro et al., L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int J Cancer* 119, 484 (2006).

(参考文献39) M. Furuya, J. Horiguchi, H. Nakajima, Y. Kanai, T. Oyama, Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* 103, 382 (Feb, 2012).

(参考文献40) M. Ichinoe et al., High expression of L-type amino-acid transporter 1 (LAT1) in gastric carcinomas: comparison with non-cancerous lesions. *Pathol Int* 61, 281 (May, 2011).

(参考文献41) K. Kaira et al., L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci* 99, 2380 (Dec, 2008).

(参考文献42) K. Yamauchi et al., System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Cancer Lett* 276, 95 (Apr 8, 2009).

(参考文献43) K. Oda et al., L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 101, (2010).

(参考文献44) Y. P. Vandewynckel et al., The paradox of the unfolded protein response in cancer. *Anticancer Res* 33, 4683 (Nov, 2013).

(参考文献45) C. Reimertz, D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden, J. H. Prehn, Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *The Journal of cell biology* 162, 587 (Aug 18, 2003).

(参考文献46) S. C. Cazanave et al., CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 299, G236 (Jul, 2010).

(参考文献47) H. Puthalakath et al., ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337 (Jun 29, 2007).

(参考文献4 8) C. Hetz et al., Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572 (Apr 28, 2006).

(参考文献4 9) K. Hayashi, P. Jutabha, H. Endou, H. Sagara, N. Anzai, LAT1 is a critical transporter of essential amino acids for immune reactions in activated human T cells. *J Immunol* 191, 4080 (Oct 15, 2013).

(参考文献5 0) N. Bulus, C. Feral, A. Pozzi, R. Zent, CD98 increases renal epithelial cell proliferation by activating MAPKs. *PLoS One* 7, e40026 (2012).

(参考文献5 1) E. Boulter et al., CD98hc (SLC3A2) regulation of skin homeostasis wanes with age. *J Exp Med* 210, 173 (Jan 14, 2013).

(参考文献5 2) C. Rosilio et al., The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells. *Cancer Lett* 336, 114 (Aug 9, 2013).

(参考文献5 3) T. Hagenbeek et al., The loss of PTEN allows TCR alpha beta lineage thymocytes to bypass IL-7 and Pre-TCR-mediated signaling. *J Exp Med* 200, 883 (2004).

(参考文献5 4) N. Lounnas et al., Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell lymphomas. *Cancer Lett* 333, 76 (Jun 1, 2013).

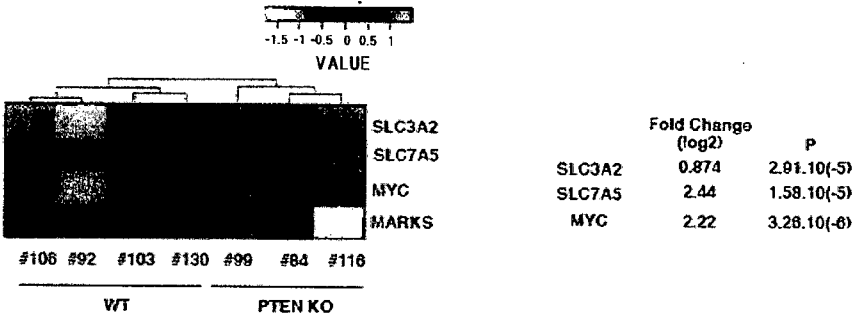
請求の範囲

- [請求項1] LAT1阻害剤と、アルキル化薬、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、内分泌療法剤、微小管脱重合阻害薬、抗腫瘍性抗生物質及び分子標的薬からなる群より選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物。
- [請求項2] 前記抗悪性腫瘍剤組成物が、T細胞急性リンパ性白血病／リンパ腫治療用医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記LAT1阻害剤が、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3, 5-ジクロロ-L-チロシン、その類似体又はそれらの薬理学的に許容しうる塩である、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記剤が、シスプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ゲムシタビン、L-アスパラギナーゼ（ロイナーゼ）、パクリタキセル、デキサメサゾン、ドキソルビシンをはじめとするアントラサイクリン系抗生物質、ベルケイド（ボルテゾミブ）、ラパマイシン、KUO063794及びPI-103から選択される一以上の剤である、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。
- [請求項5] LAT1阻害剤と、mTOR阻害剤、PI3K阻害剤及びAkt阻害剤から選択される一以上の剤と、を有効成分として含む抗悪性腫瘍剤組成物。
- [請求項6] 前記抗悪性腫瘍剤組成物が、T細胞急性リンパ性白血病／リンパ腫治療用医薬組成物、胃がん治療用医薬組成物、膵がん治療用医薬組成物又は大腸がん治療用医薬組成物である、請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 前記LAT1阻害剤が、O-（5-アミノ-2-フェニルベンズオキサゾール-7-イル）メチル-3, 5-ジクロロ-L-チロシン、その類似体又はそれらの薬理学的に許容しうる塩である、請求項5又は6に記載の組成物。

[請求項8] 前記剤が、ラパマイシン、KU0063794及びPI-103から選択される一以上の剤である、請求項5～7のいずれかに記載の組成物。

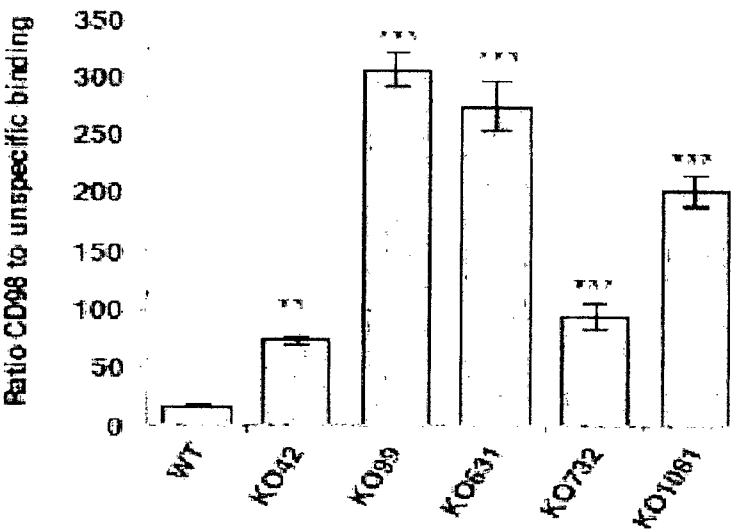
[図 1A]

【図 1 A】



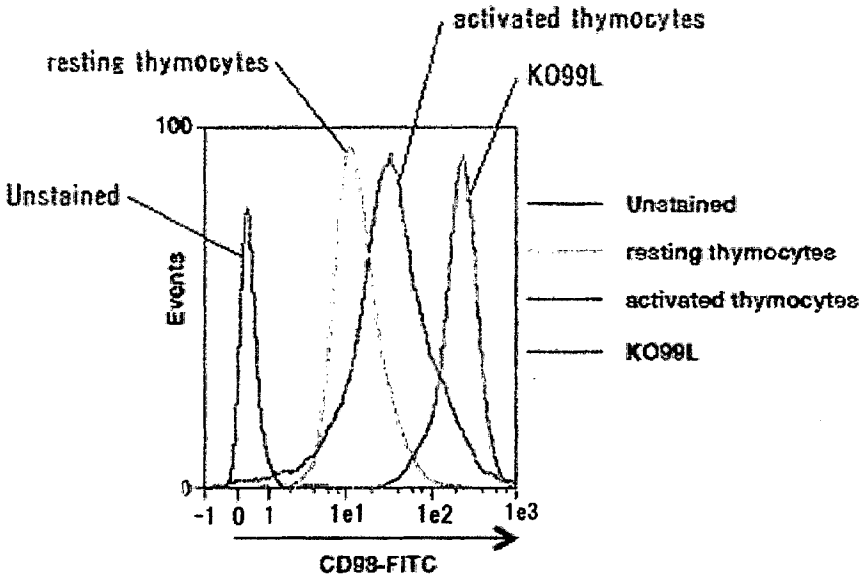
[図 1B]

【図 1 B】



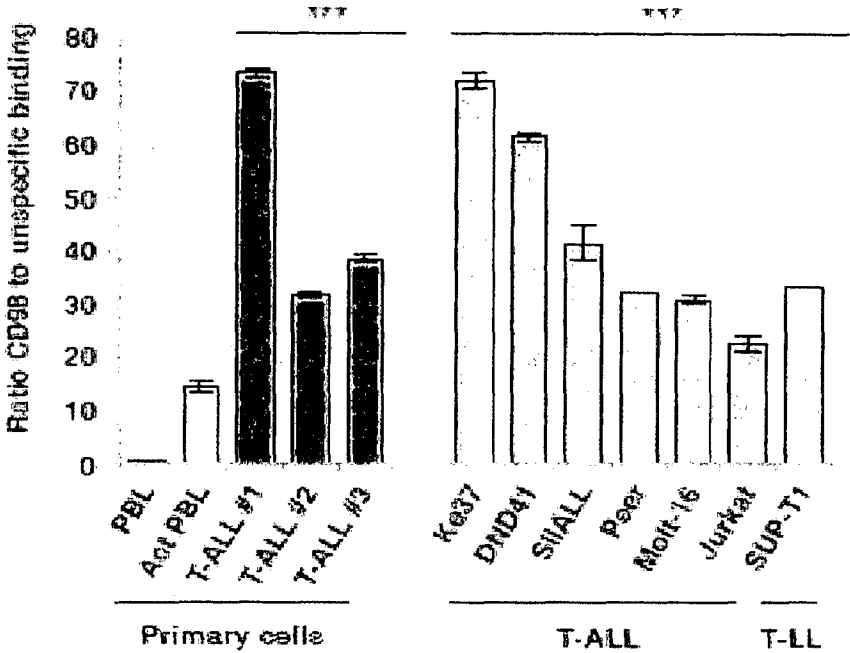
[図 1C]

【図 1 C】



[図 1D]

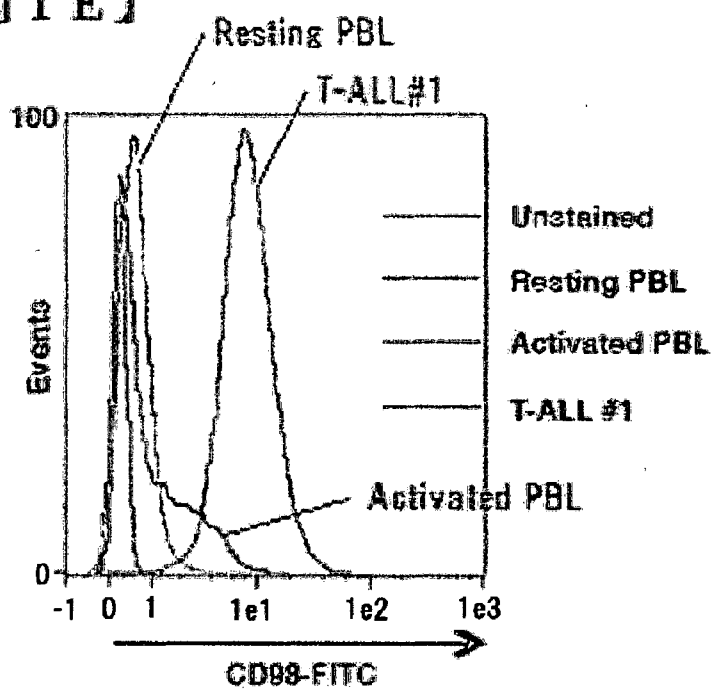
【図 1 D】



3/36

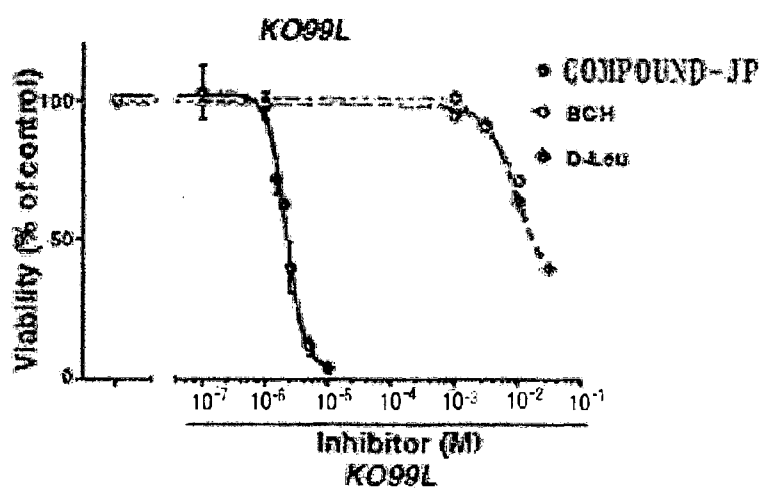
[図 1E]

【図 1 E】



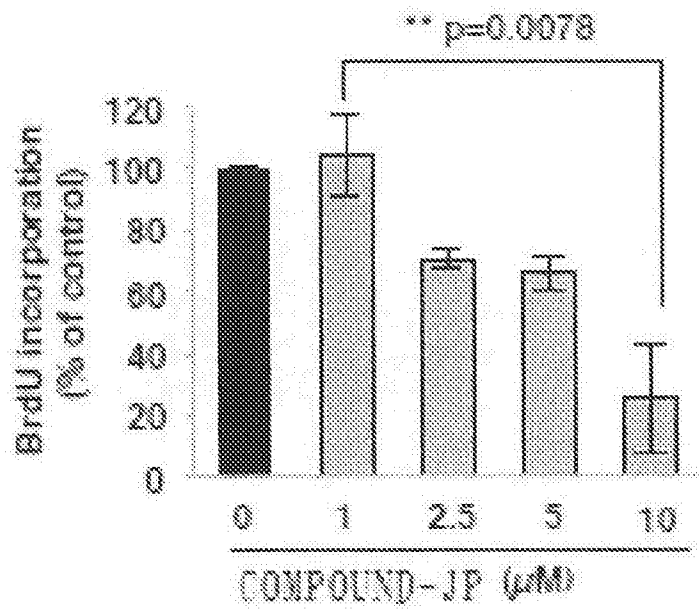
[図 2A]

【図 2 A】



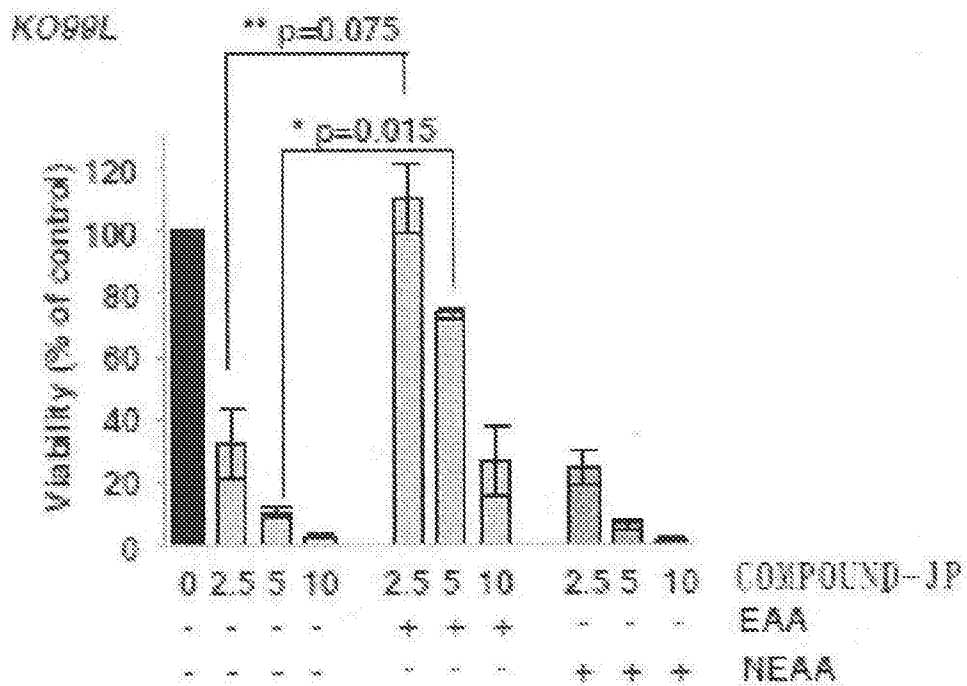
[図2B]

【図 2 B】



[図2C]

【図 2 C】

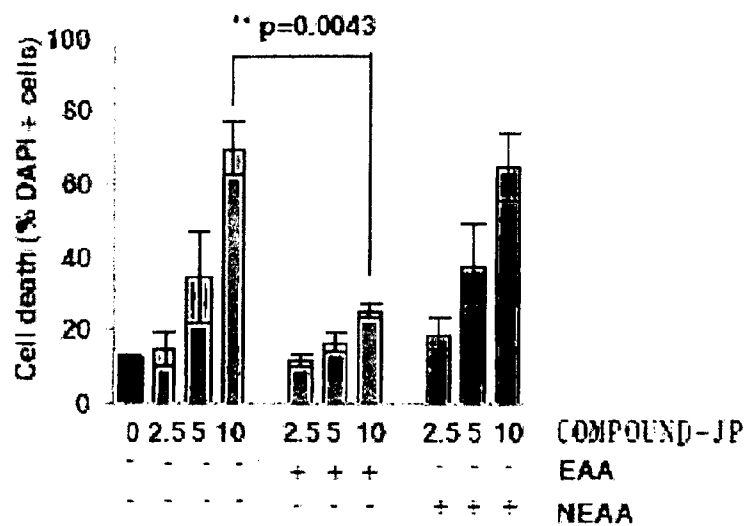


5/36

[図 2D]

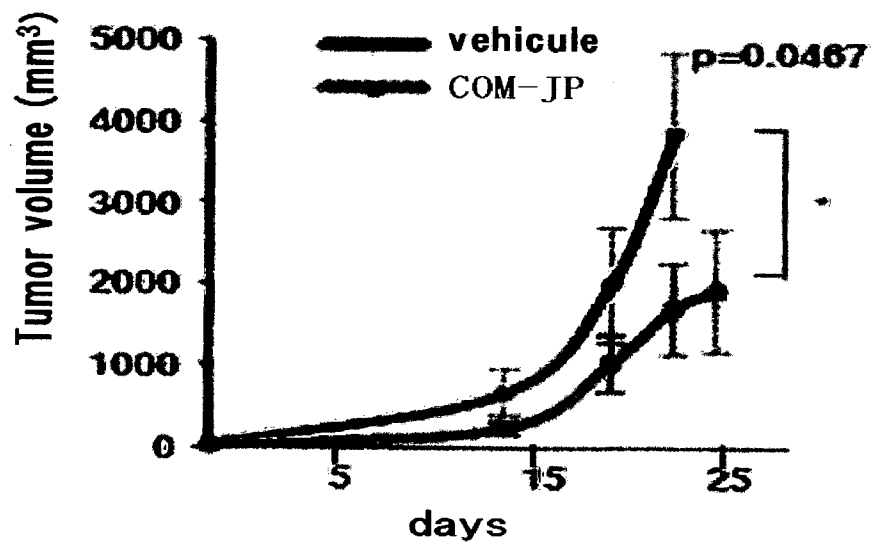
【図 2 D】

KO89L



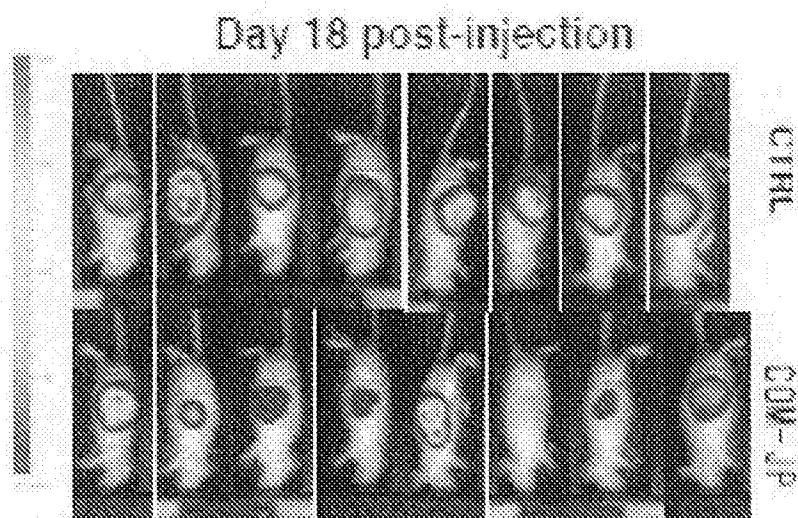
[図 2E]

【図 2 E】



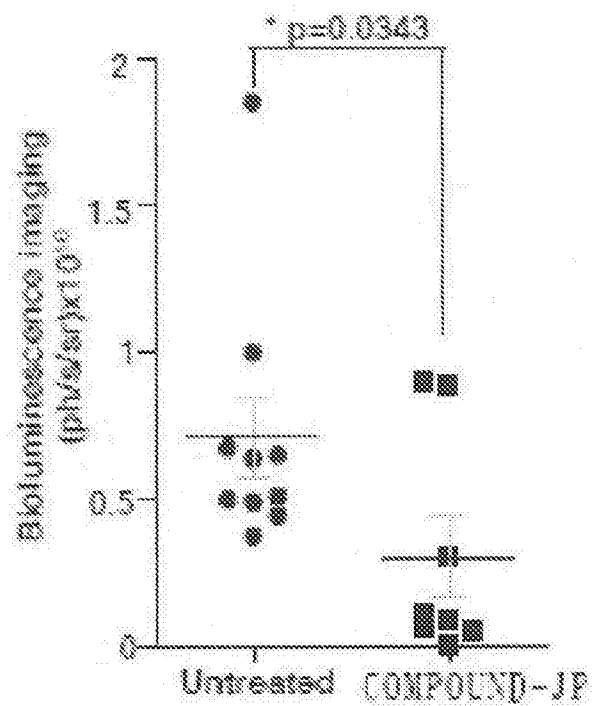
[図2F]

【図 2 F】



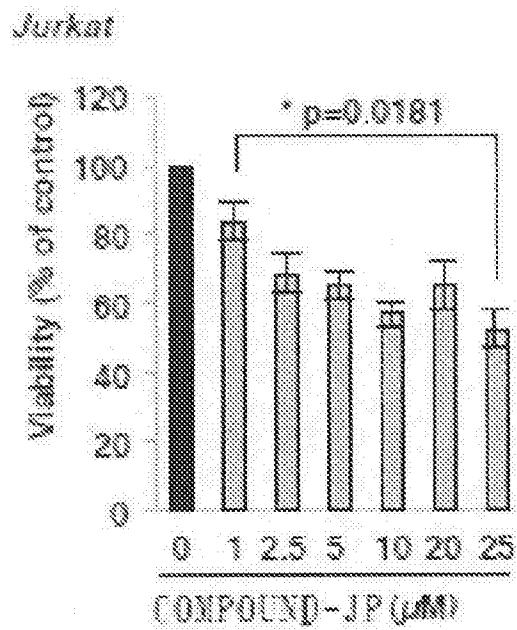
[図2G]

【図 2 G】



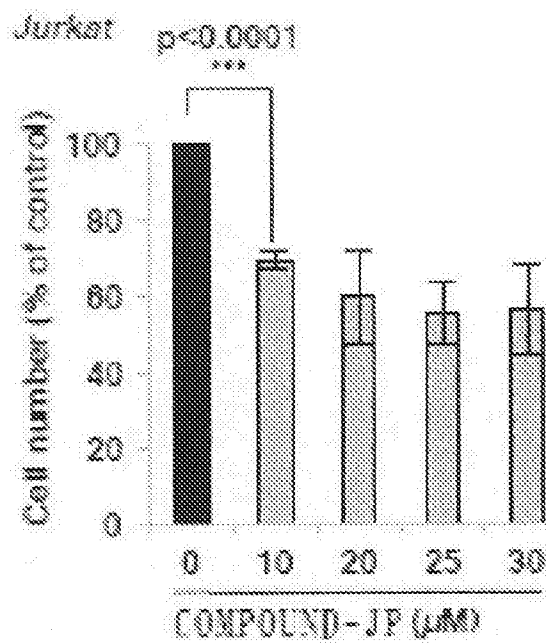
[図2H]

【図 2 H】



[図2I]

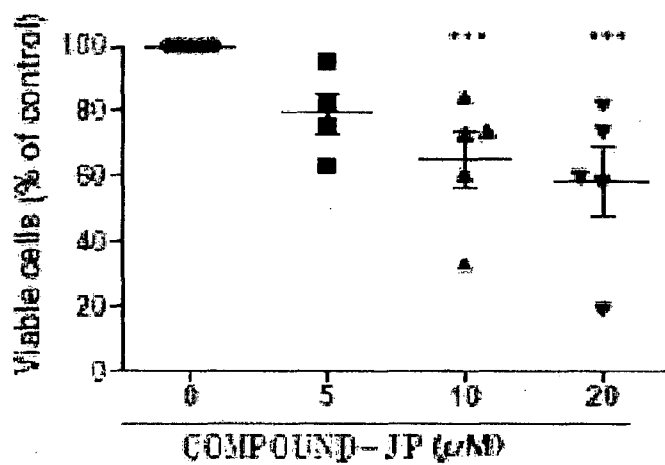
【図 2 I】



[図 2J]

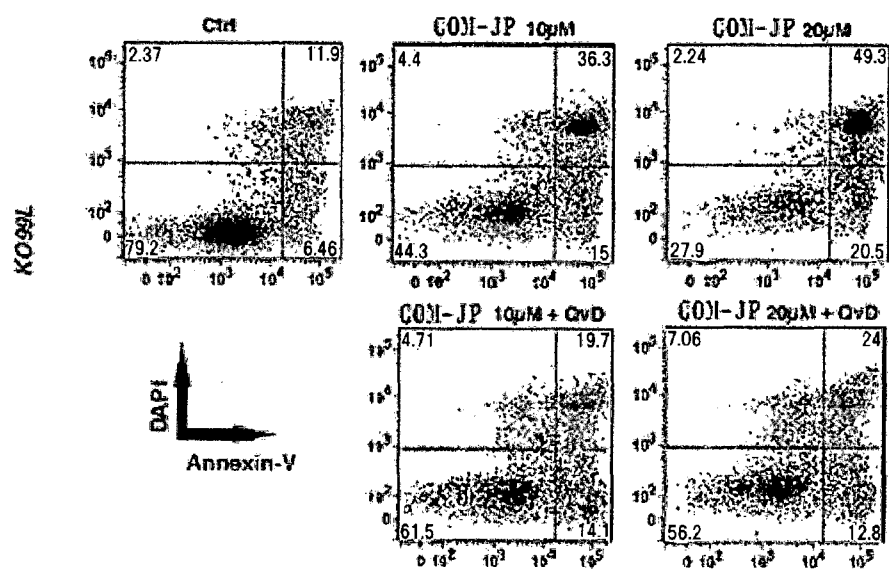
【図 2 J】

T-ALL patients



[図 3A]

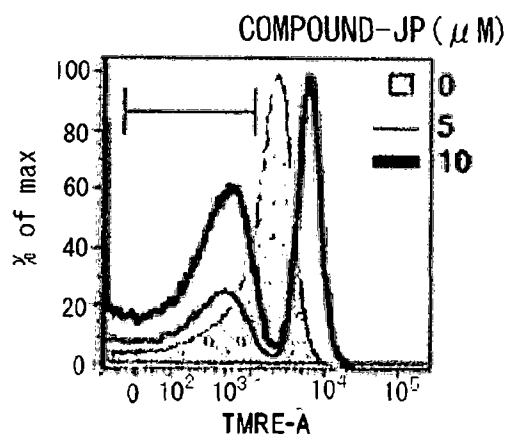
【図 3 A】



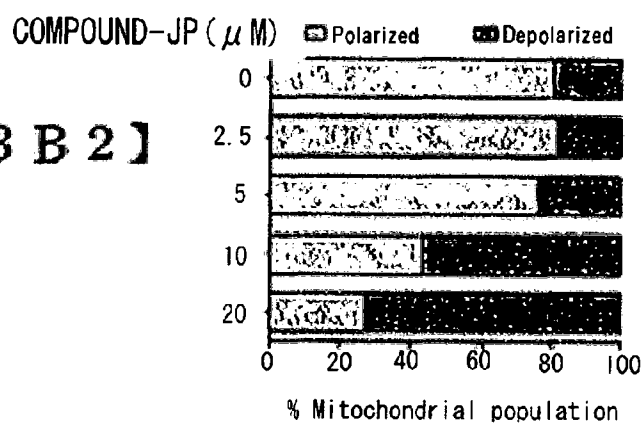
9/36

[図 3B]

【図 3 B 1】

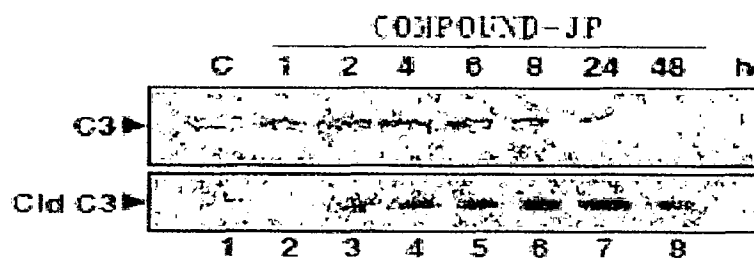


【図 3 B 2】



[図 3C]

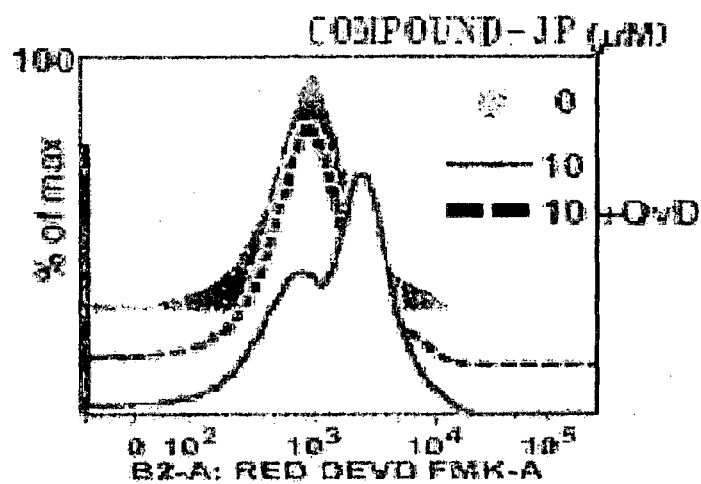
【図 3 C】



10/36

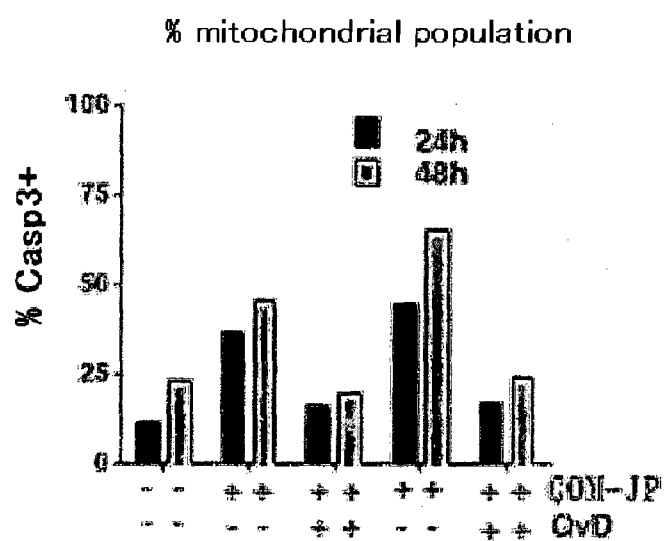
[図 3D1]

【図 3 D 1】



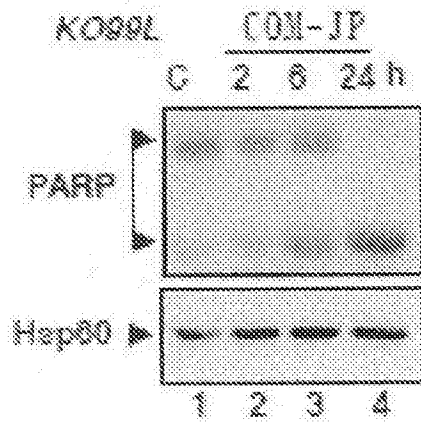
[図 3D2]

【図 3 D 2】



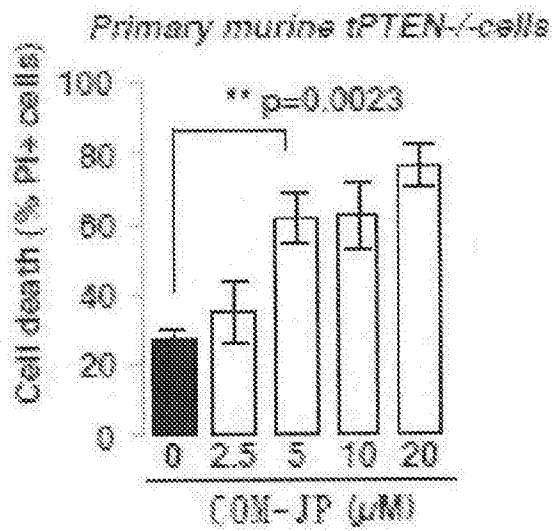
[図3E]

【図 3 E】



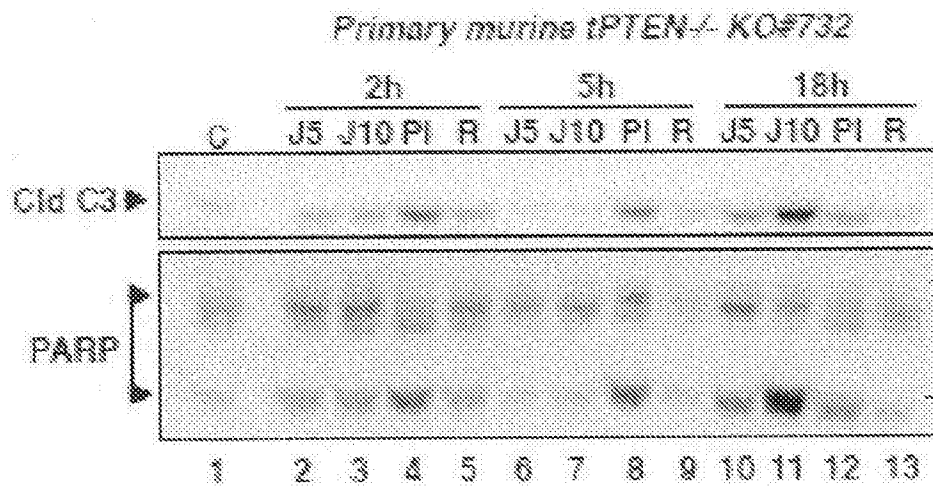
[図3F]

【図 3 F】



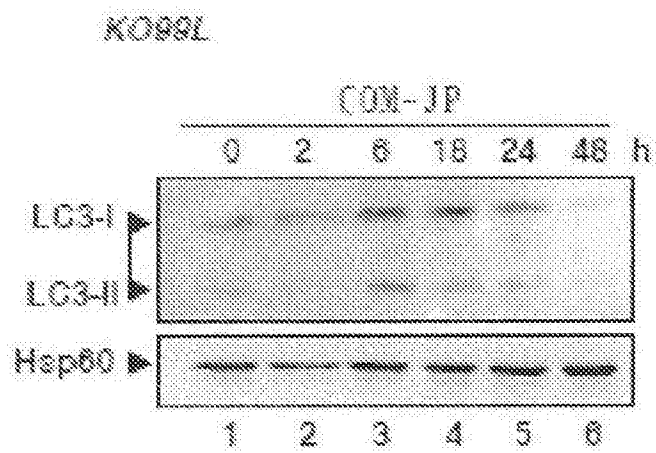
[図3G]

【図 3 G】



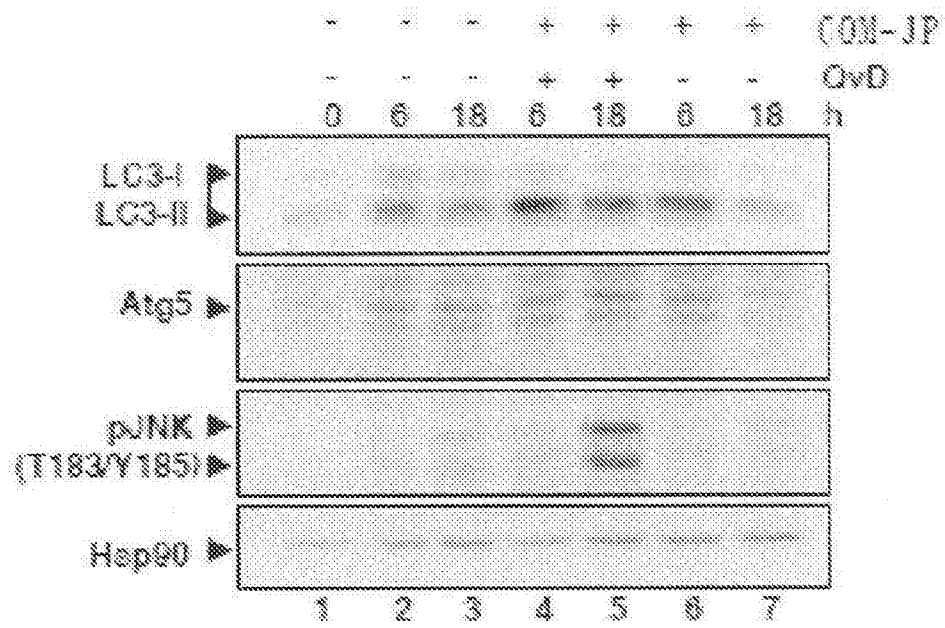
[図3H]

【図 3 H】



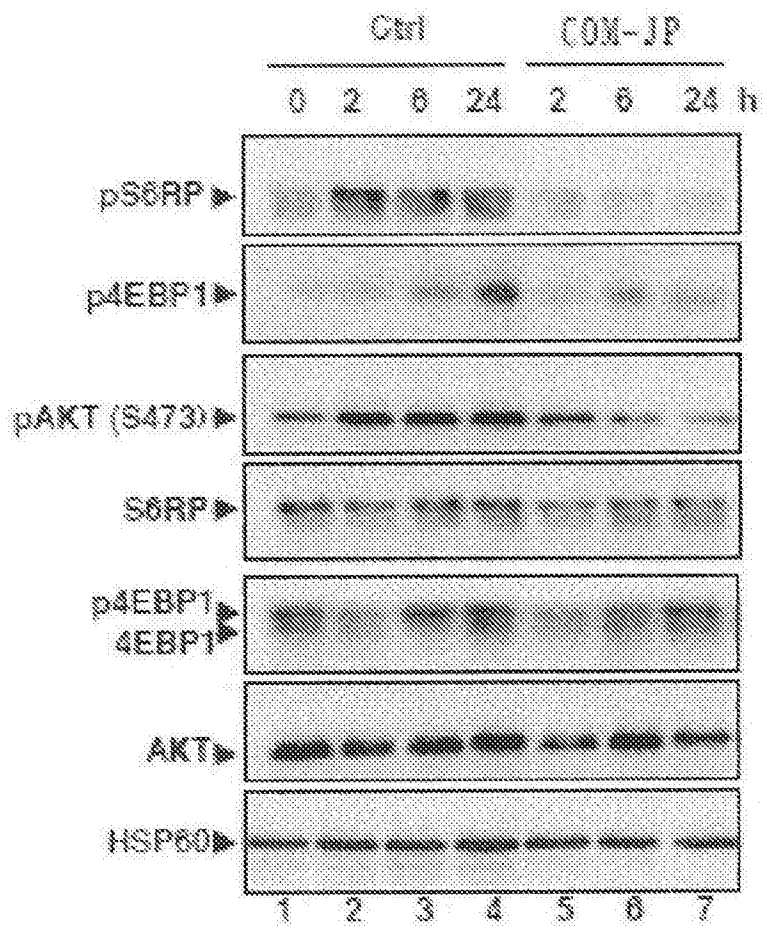
[図3I]

【図 3 I】



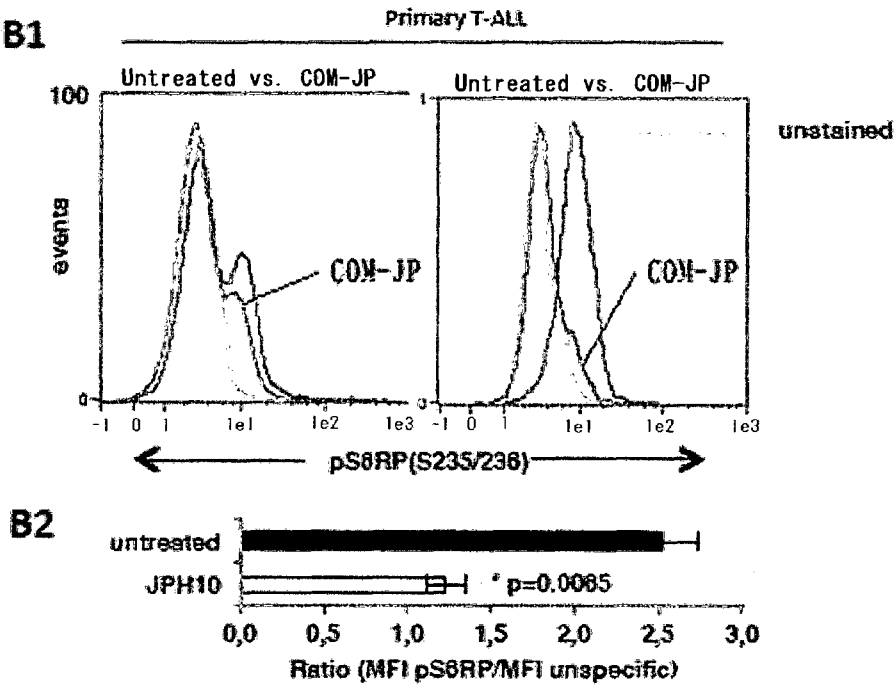
[図4A]

【図 4 A】



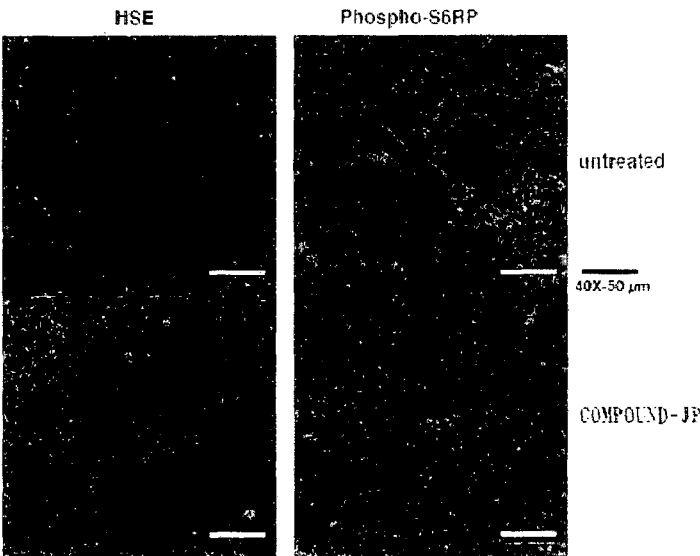
[図 4B]

【図 4 B】



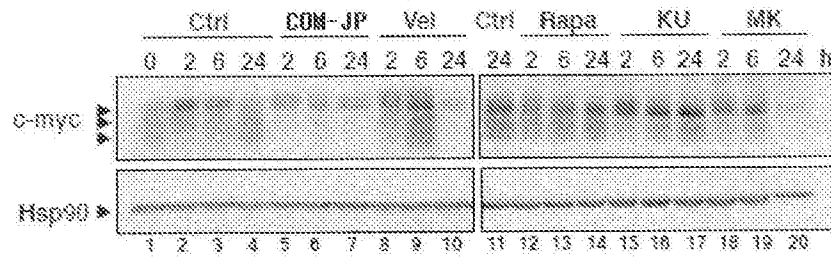
[図 4C]

【図 4 C】



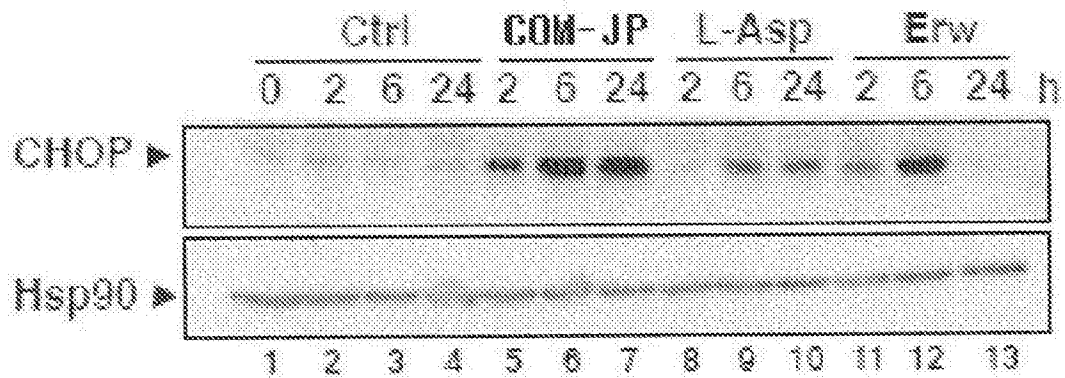
[図4D]

【図4D】



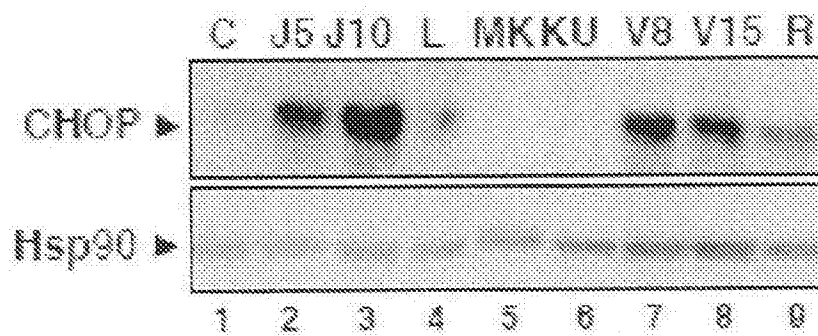
[図5A]

【図5A】



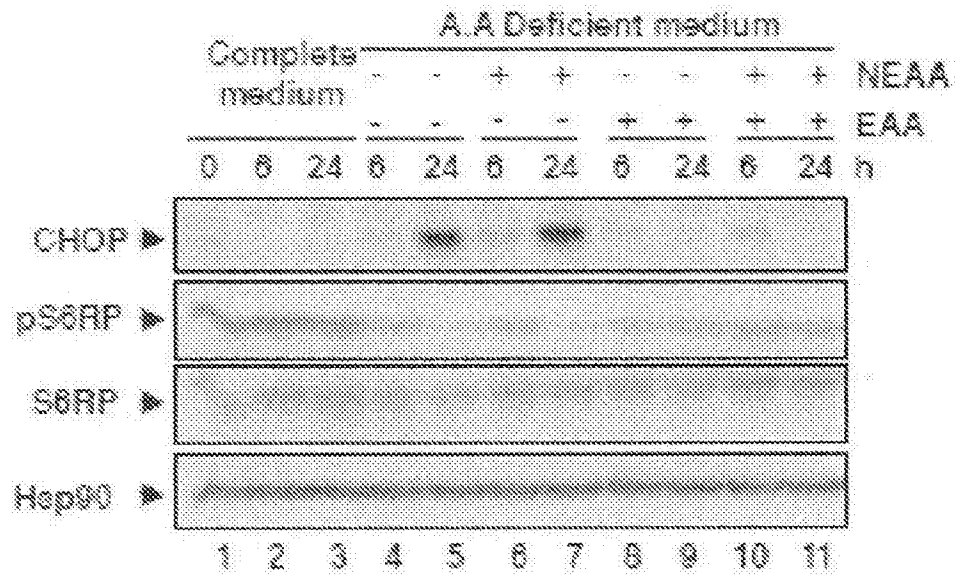
[図5B]

【図5B】



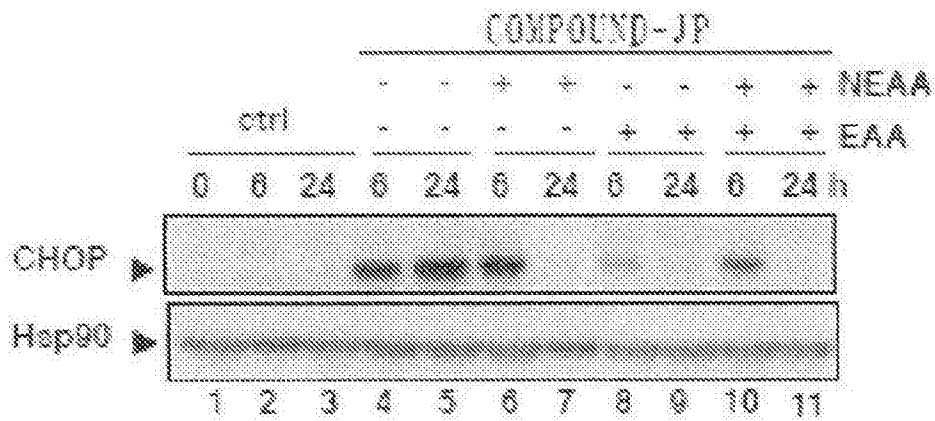
[図5C]

【図 5 C】



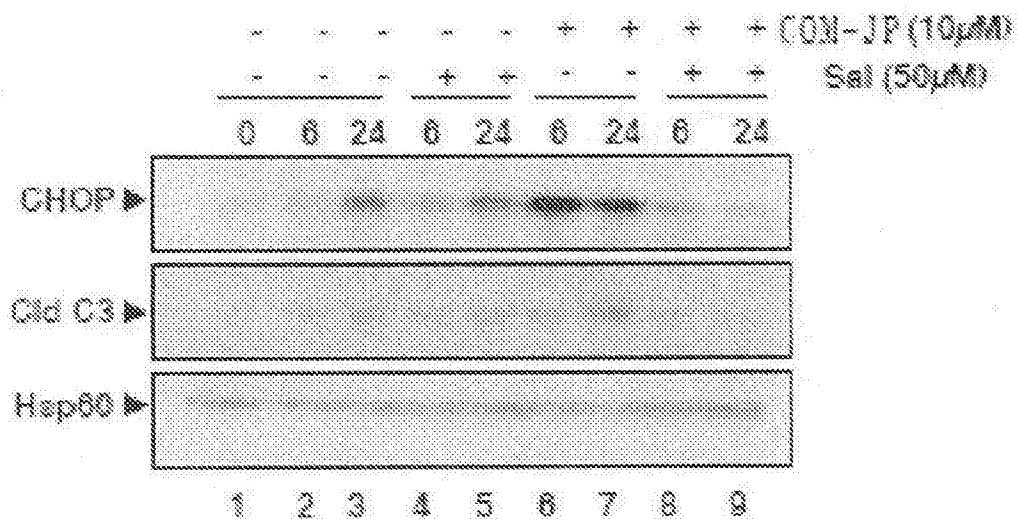
[図5D]

【図 5 D】



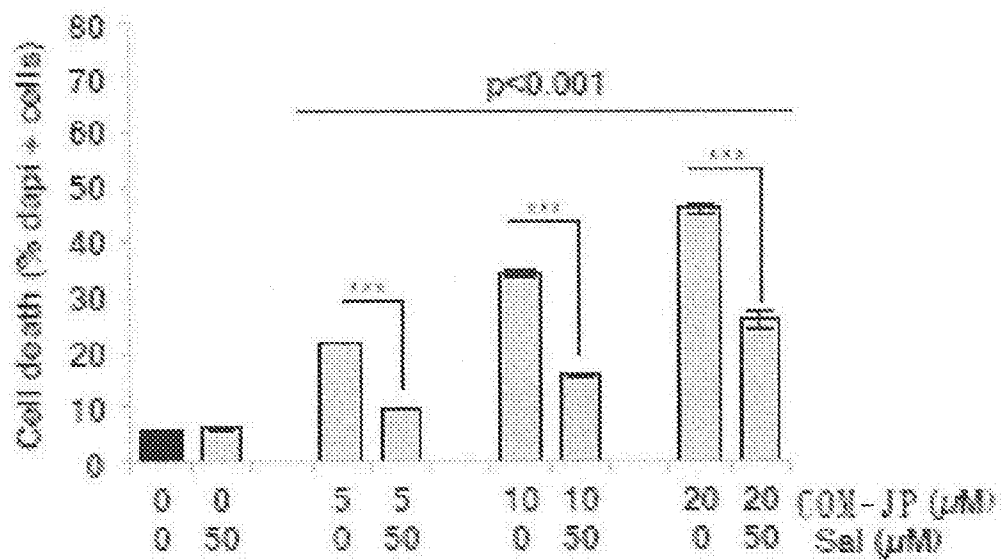
[図5E]

【図 5 E】



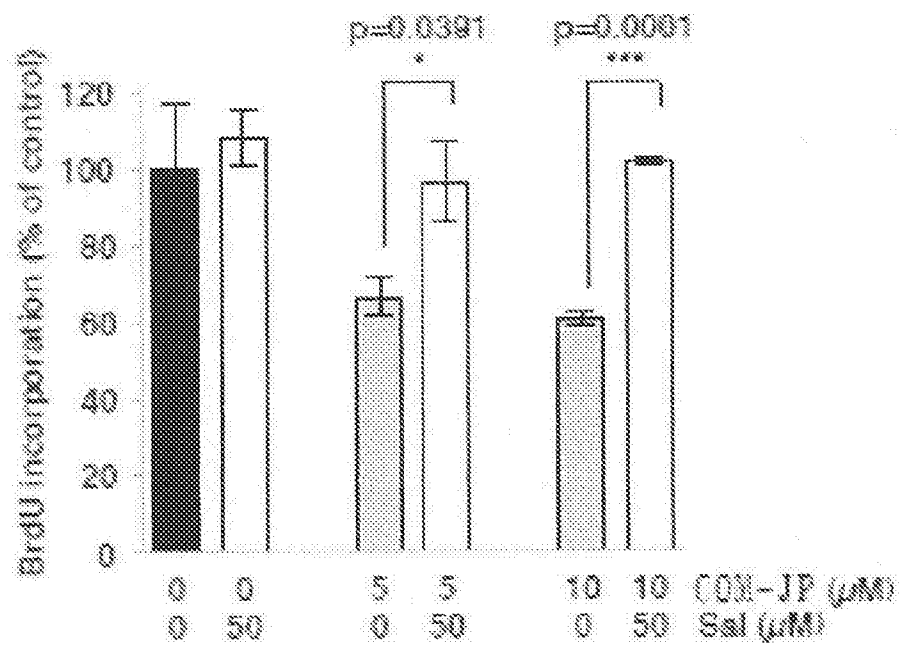
[図5F]

【図 5 F】



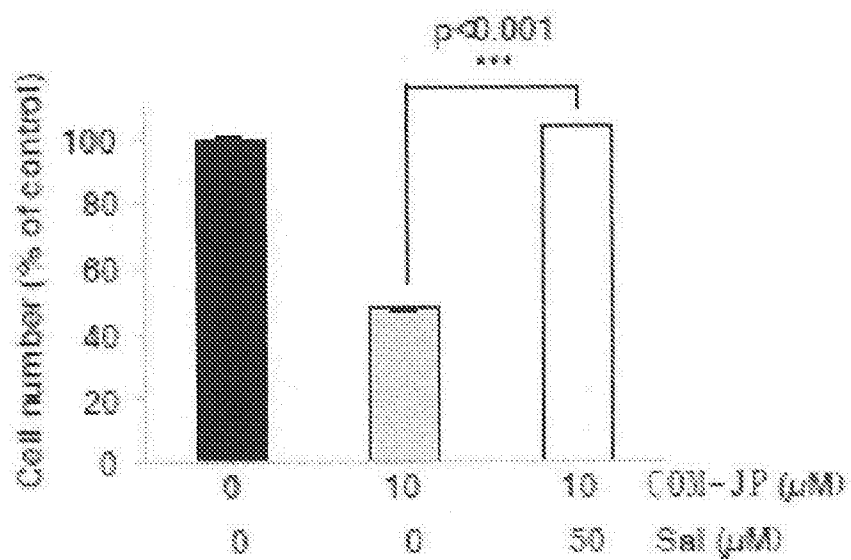
[図5G]

【図 5 G】



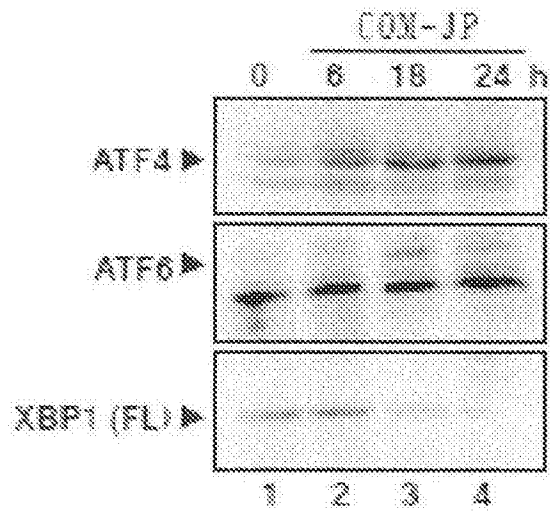
[図5H]

【図 5 H】



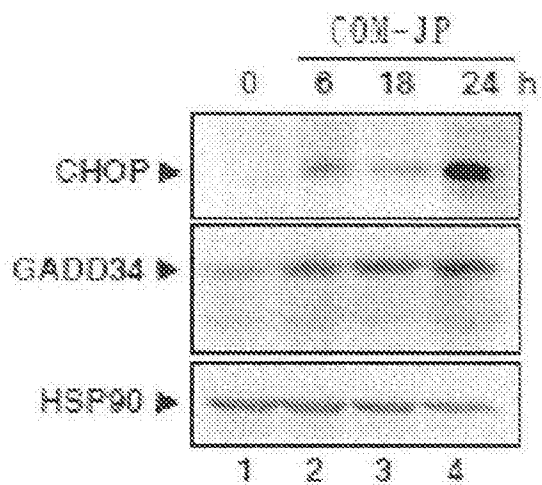
[図6A]

【図 6 A】



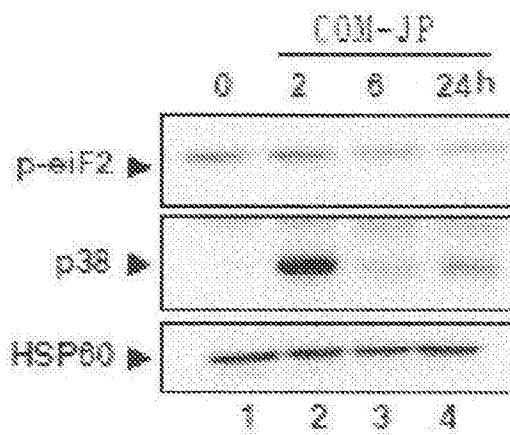
[図6B]

【図 6 B】



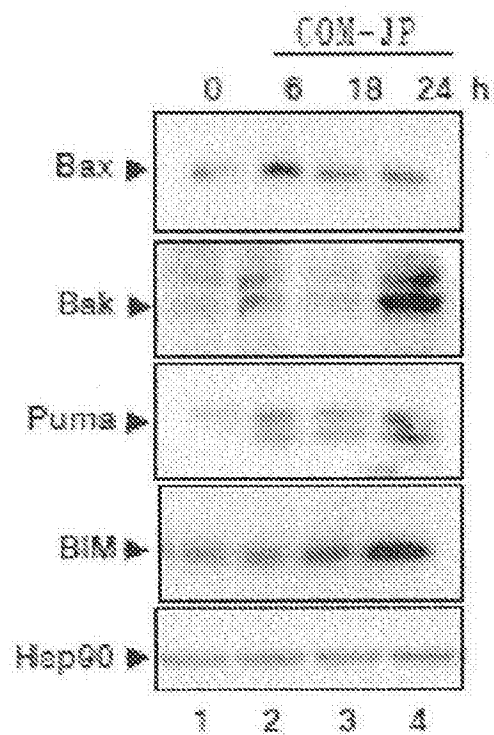
[図6C]

【図 6 C】



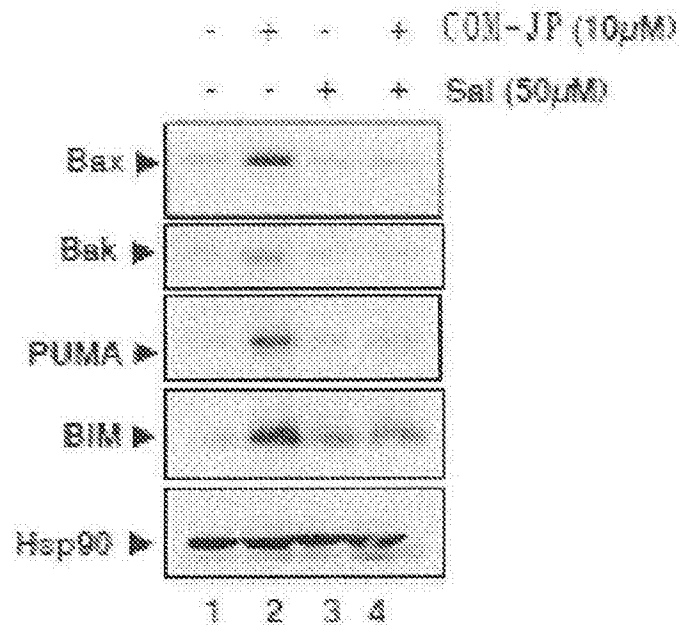
[図6D]

【図 6 D】



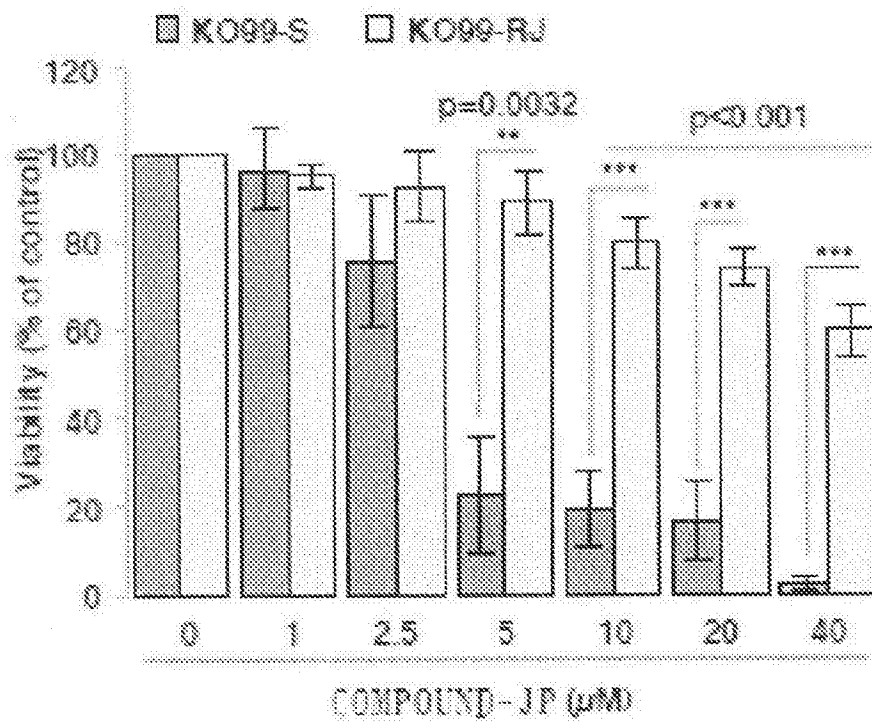
[図6E]

【図 6 E】



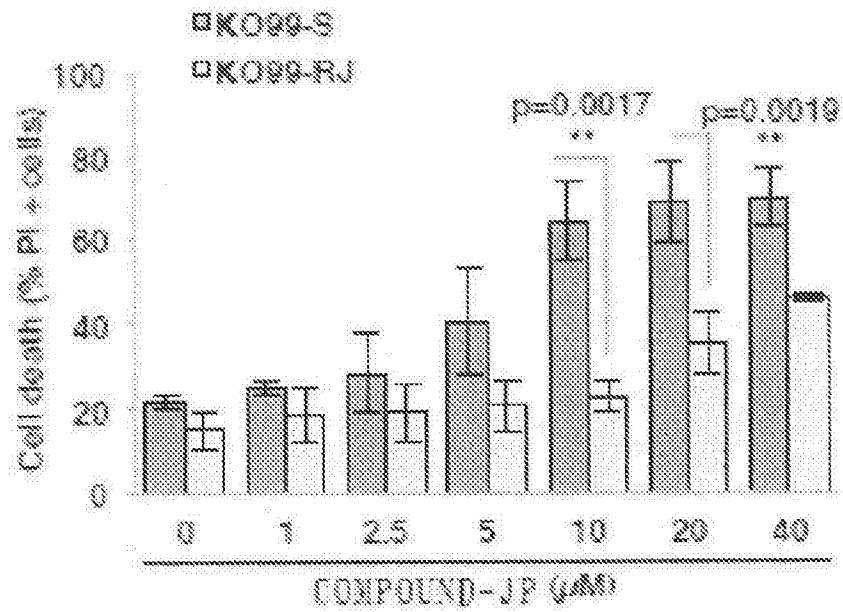
[図7A]

【図 7 A】



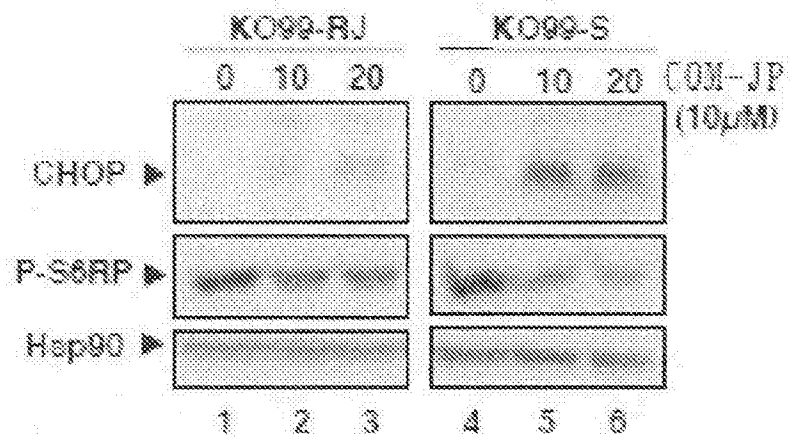
[図7B]

【図 7 B】



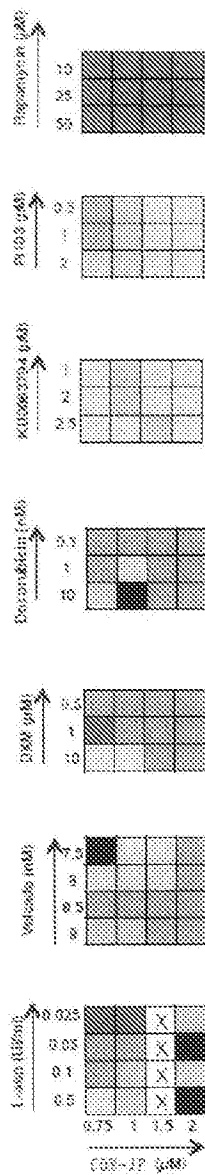
[図7C]

【図 7 C】



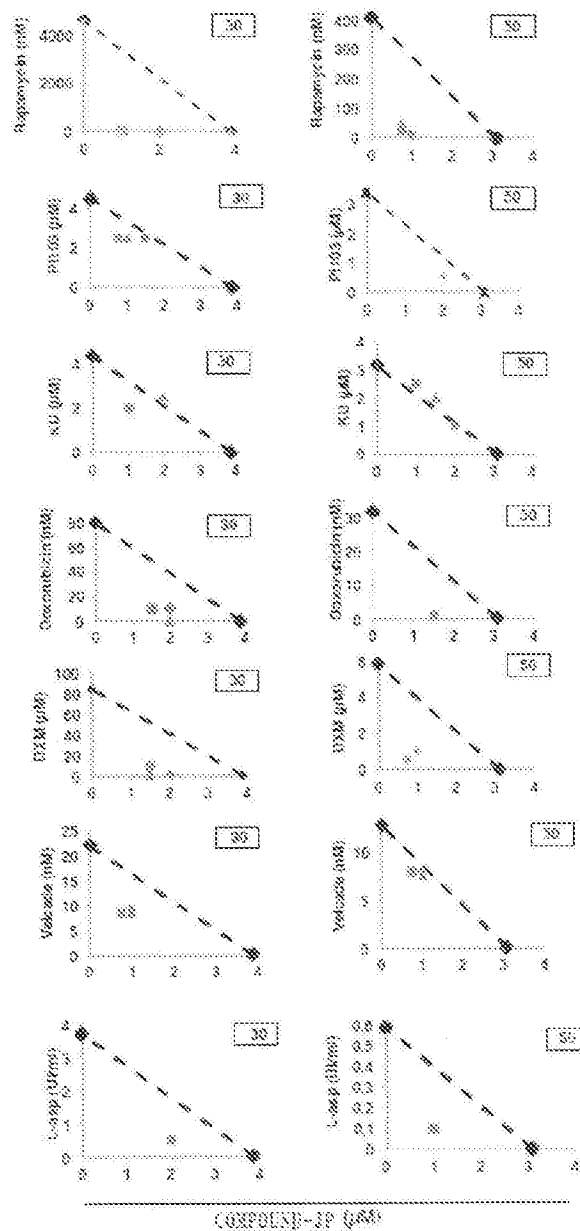
[図8]

[図 8 A]



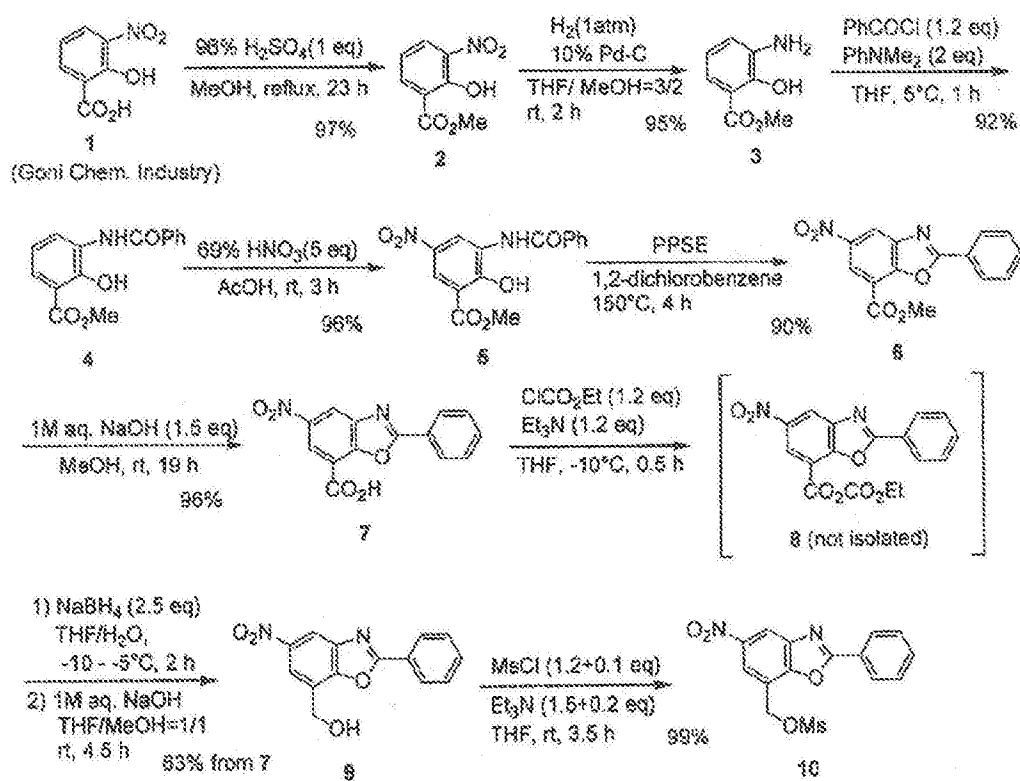
<0.5	Strong synergism
0.5-0.7	Synergism
0.7-0.9	Moderate synergism
0.9-1.2	ADDITIVE
>1.2	Antagonism

[図 8 B]



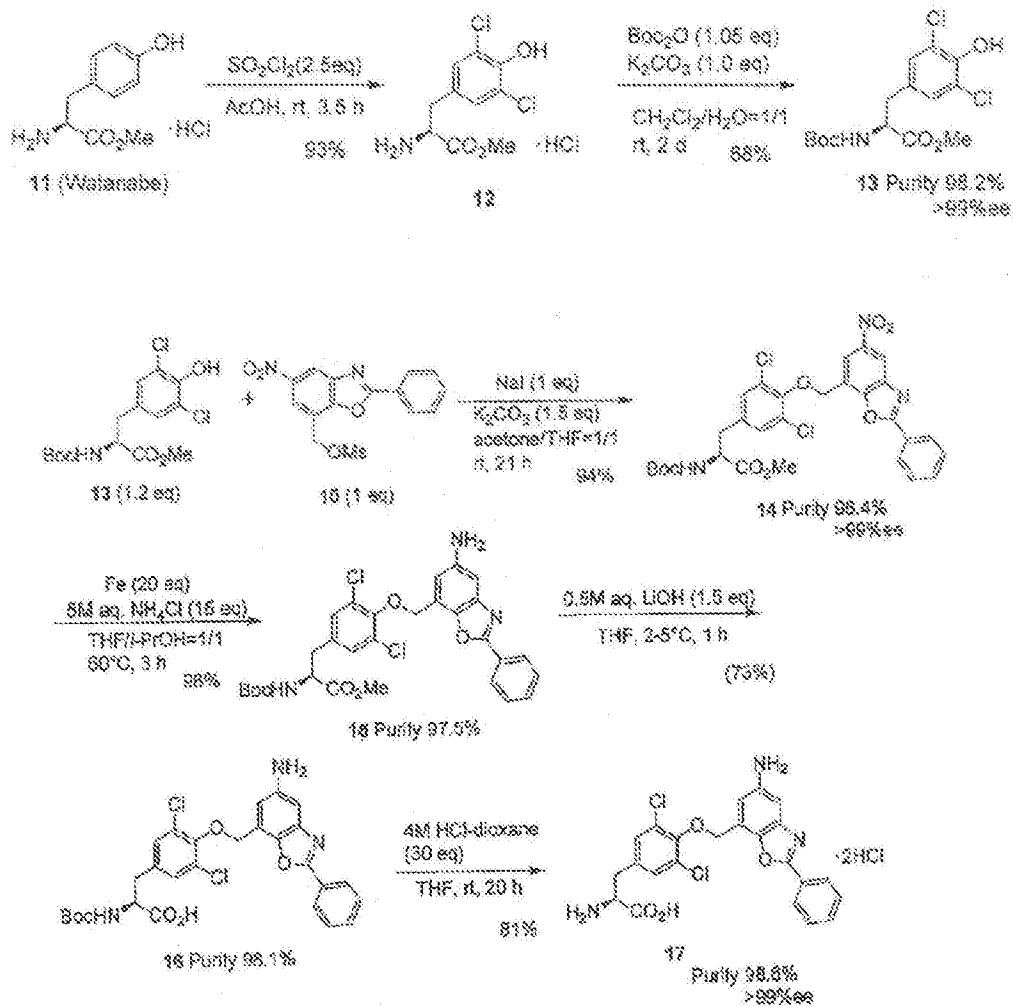
[図9-1]

【図9-1】



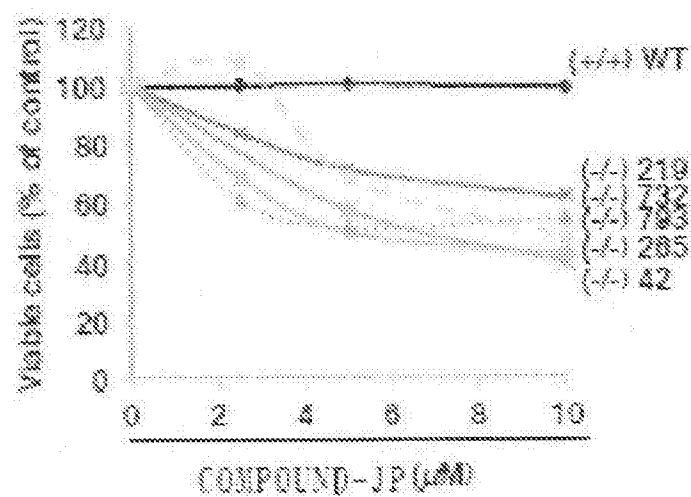
[9-2]

[9 - 2]



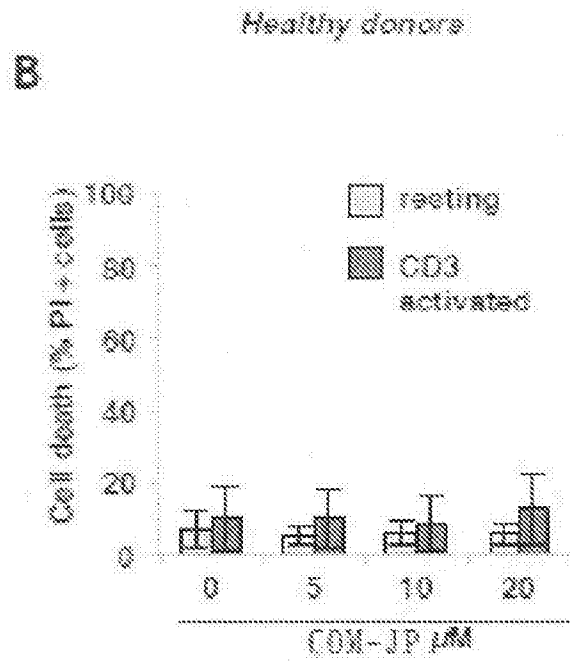
[S1A]

[S 1 A]



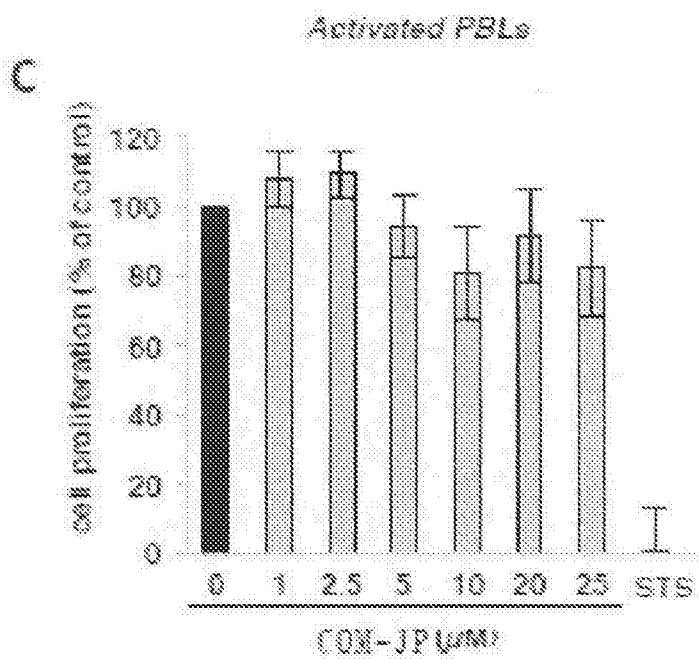
[S1B]

[S 1 B]



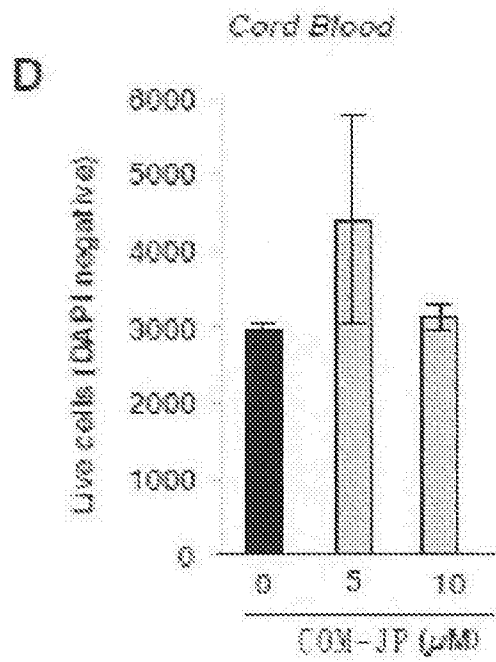
[S1C]

[S 1 C]



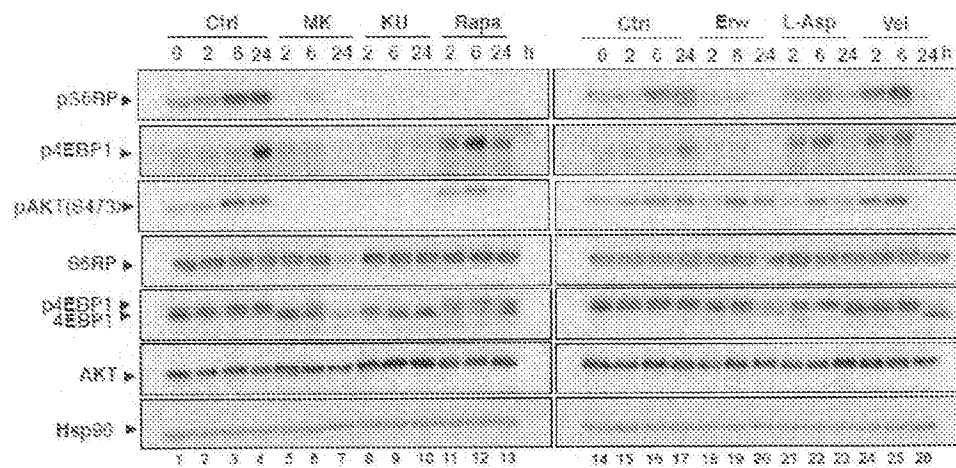
[S1D]

[S 1 D]



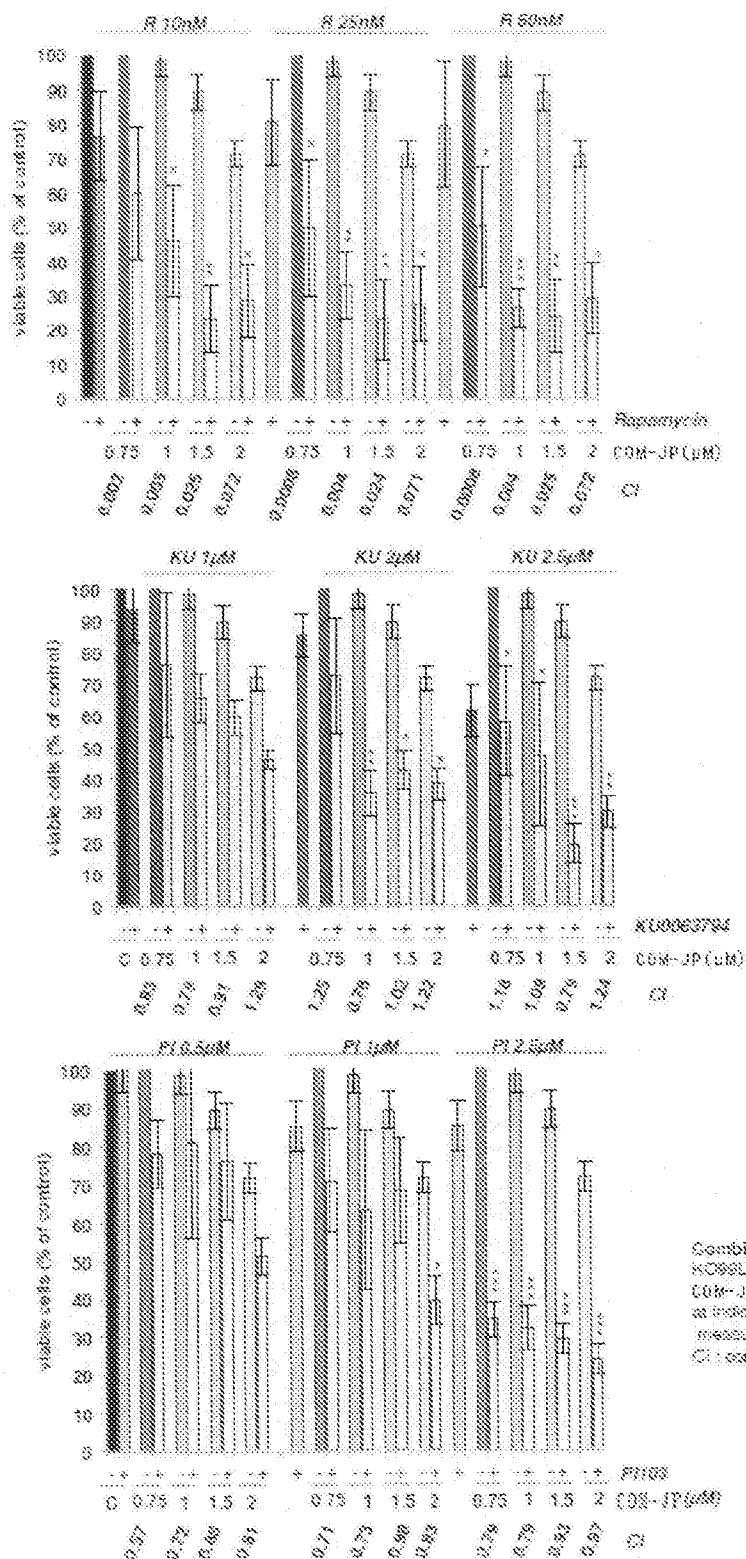
[S2]

[S 2]



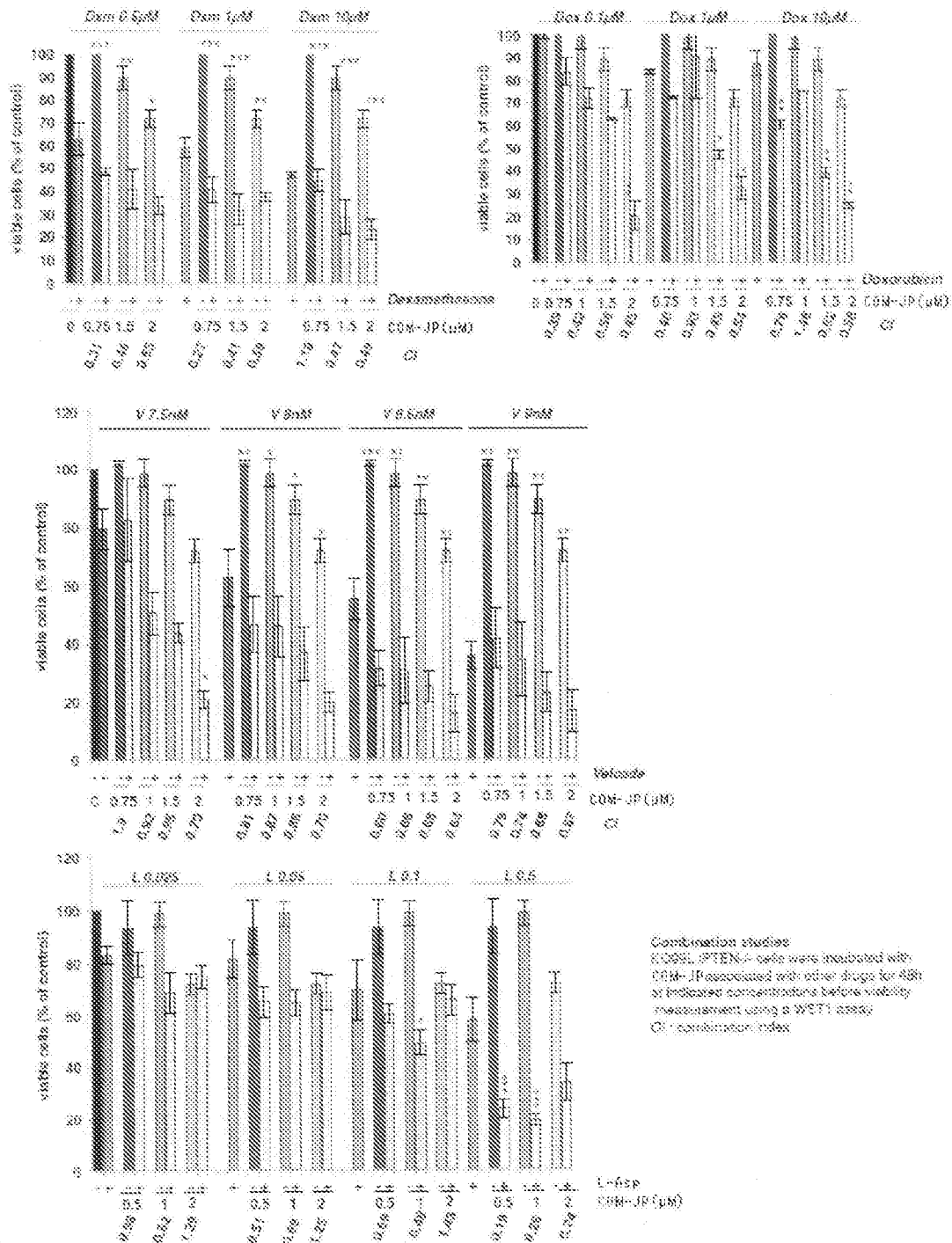
[S3-1]

[S 3 - 1]



[S3-2]

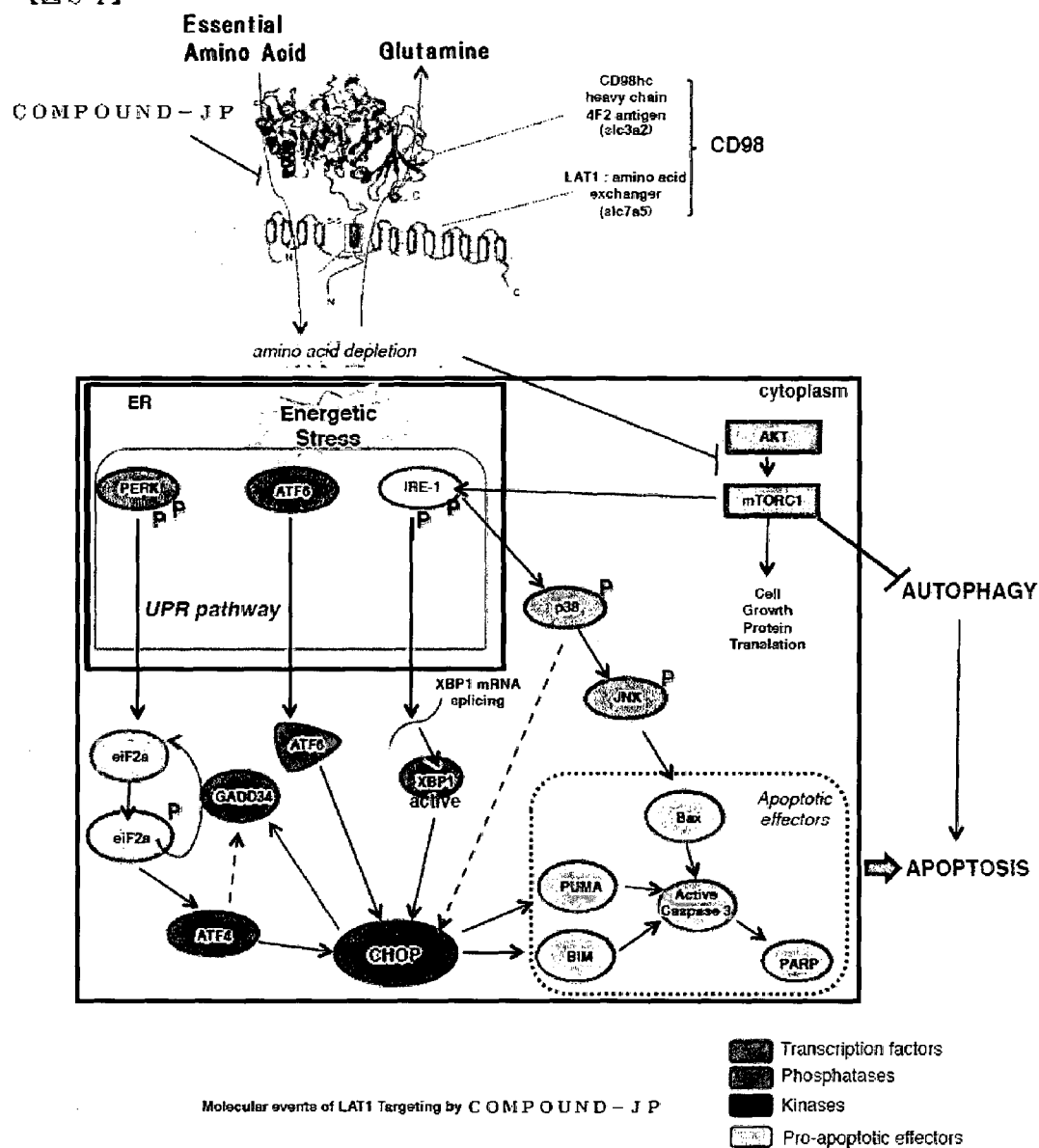
[S3-2]

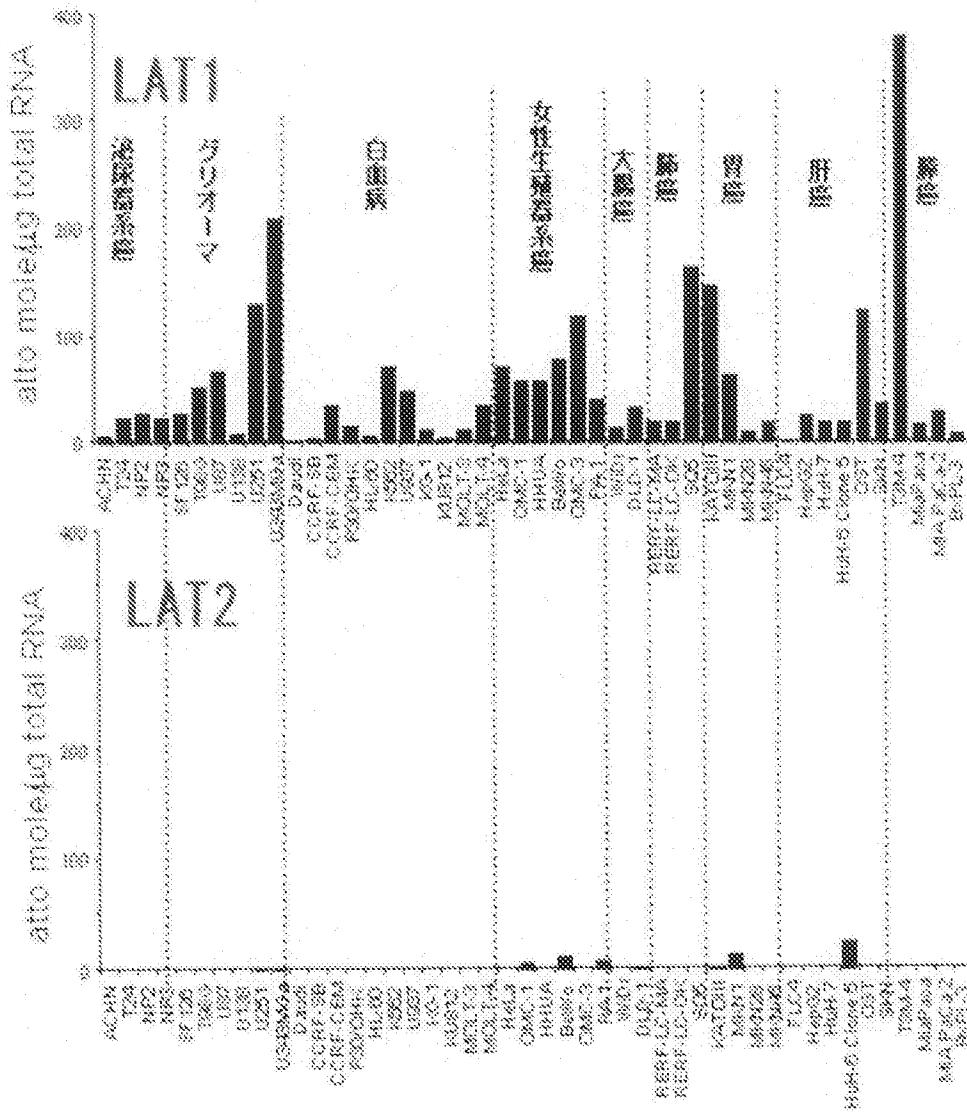


31/36

[図 S4]

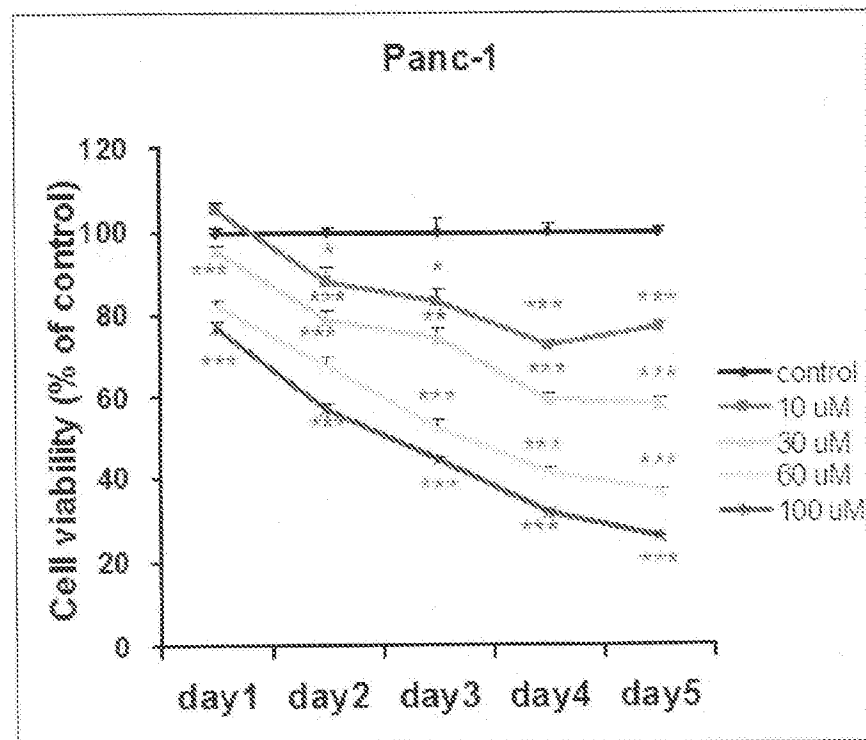
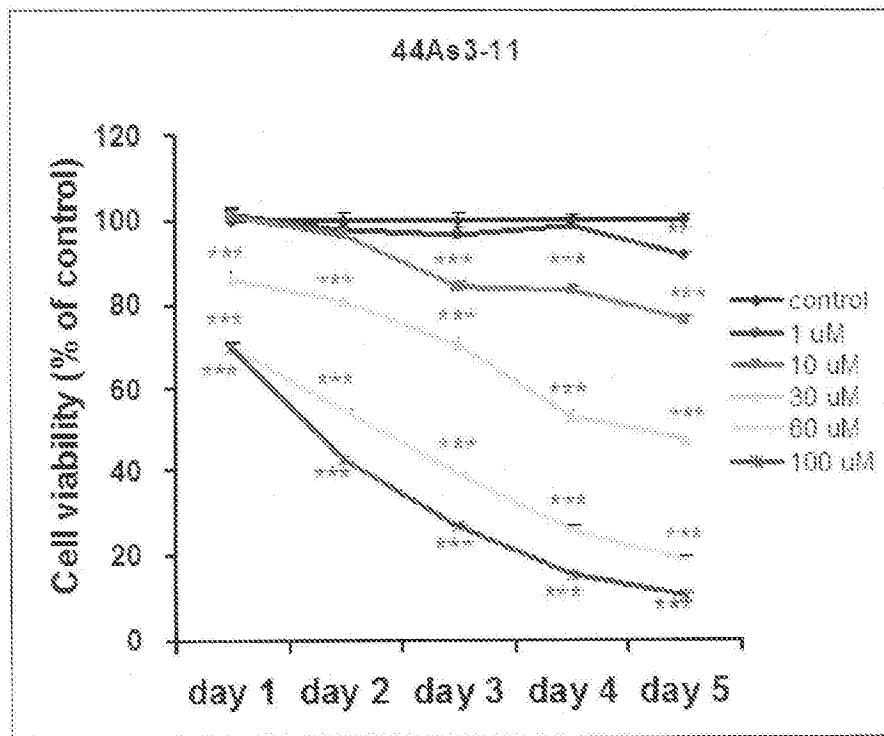
【図 S 4】





[図11]

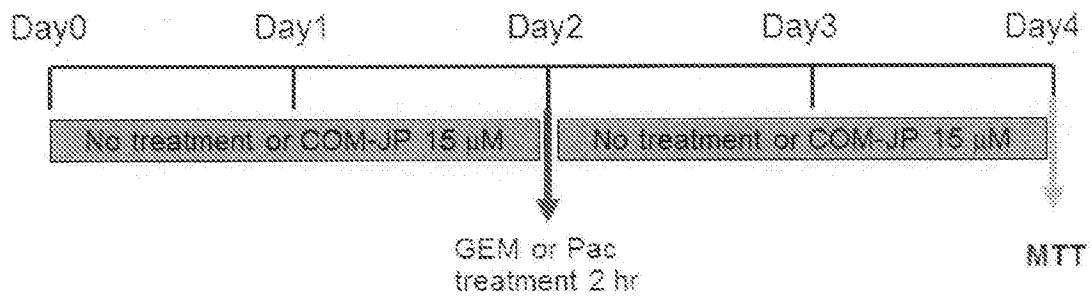
【図11】

Data are mean $\pm$ SE, n=4

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control

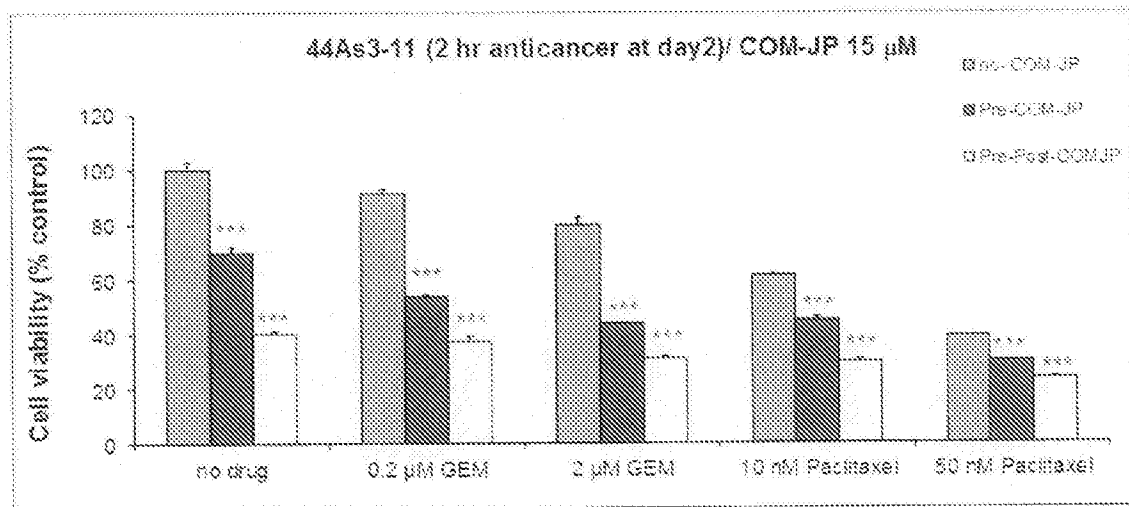
[図12]

【図12】



[図13]

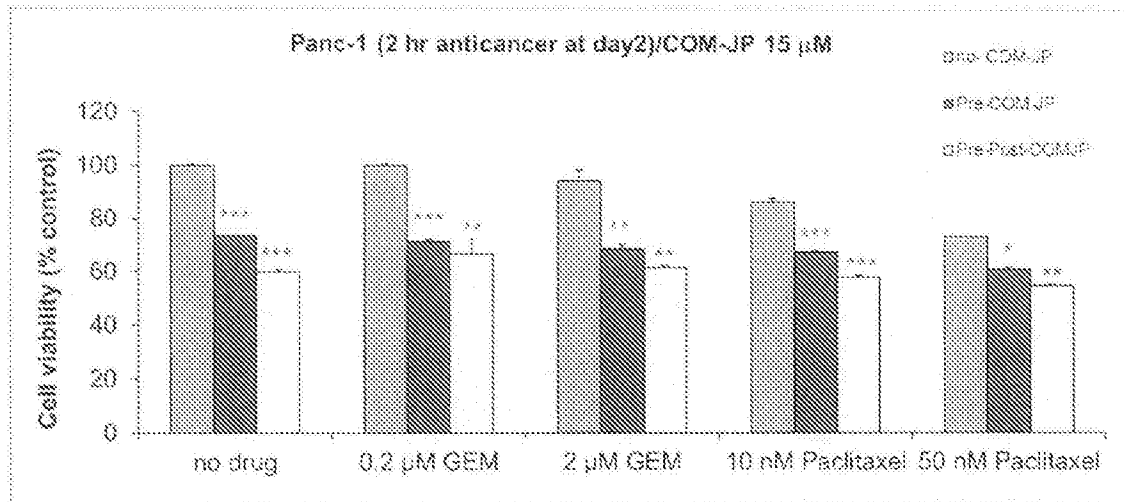
【図13】

Data are mean $\pm$ SE, n=3

***P<0.001 vs. control

[図14]

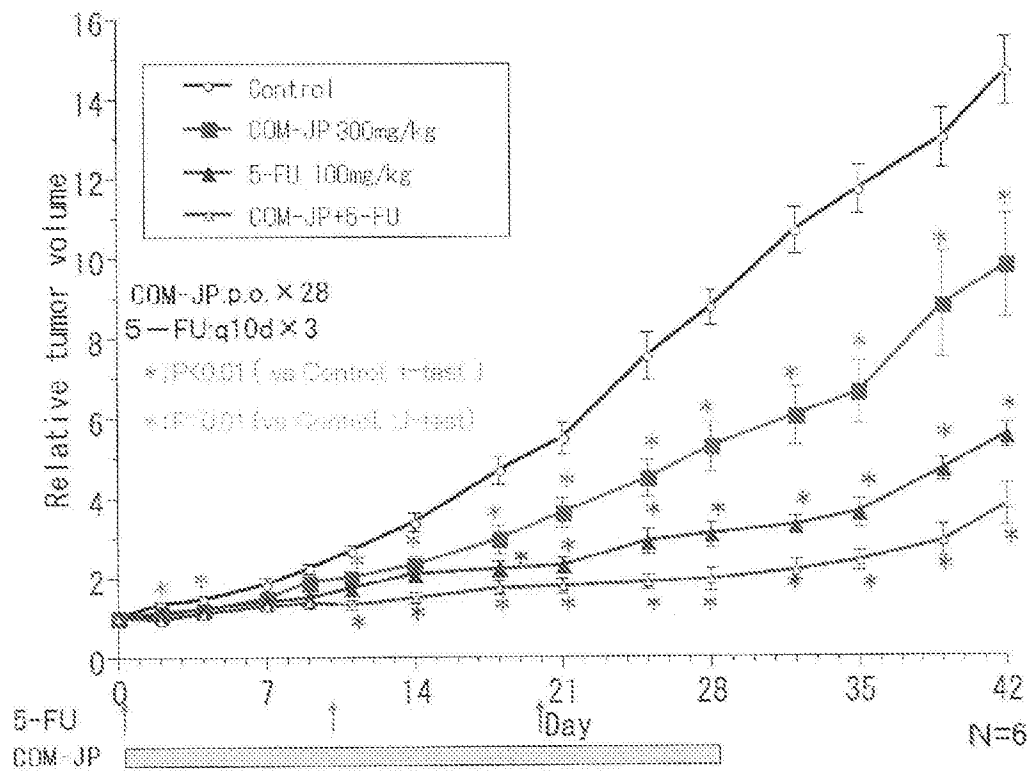
[図14]

Data are mean $\pm$ SE, n=3

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control

[図15]

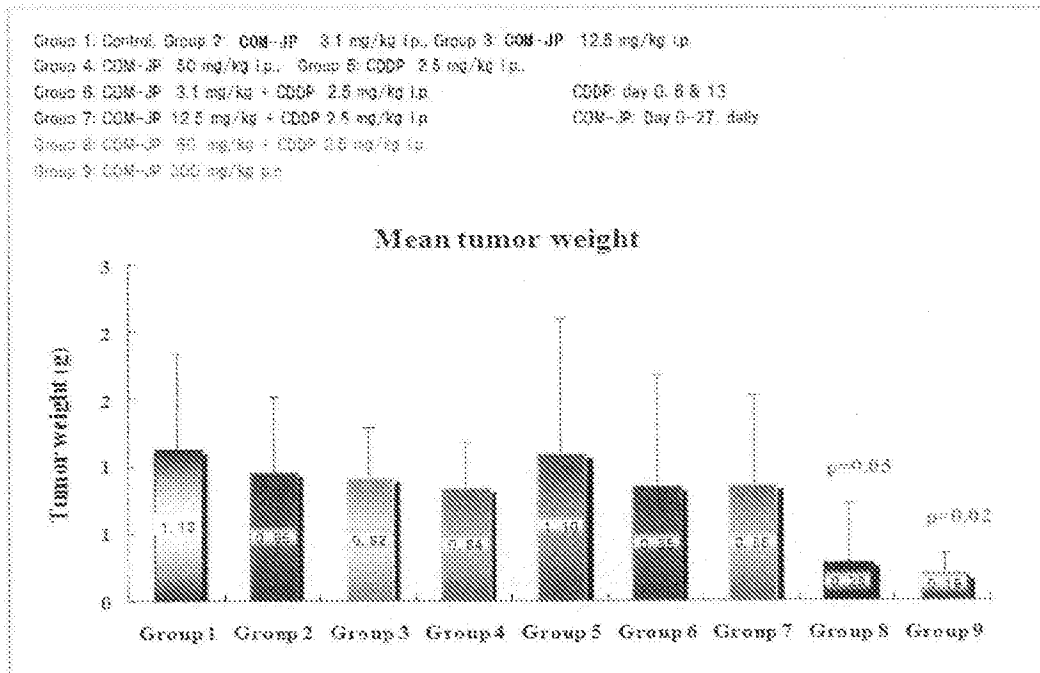
[図15]



[図16]

【図16】

Efficacy of COM-JP : Inhibition of tumor growth in colon cancer SOI model
(SOI: surgical orthotopic implantation)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/065163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/06(2006.01)i, A61K31/282(2006.01)i, A61K31/416(2006.01)i,
 A61K31/436(2006.01)i, A61K31/513(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i,
 A61K31/54(2006.01)i, A61K31/69(2006.01)i, A61K31/704(2006.01)i,
 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)

A61K45/06, A61K31/282, A61K31/416, A61K31/436, A61K31/513, A61K31/5377,
 A61K31/54, A61K31/69, A61K31/704, A61K31/7068, A61P35/00, A61P35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yamauchi K. et al., System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line., Cancer Letters, 2009, Vol.276, No.1, pages 95 to 101, ISSN: 0304-3835	1, 4 2, 3, 5-8
X Y	Fukumoto S. et al., A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, Vol.439, No.1, pages 103 to 108, ISSN: 0006-291X	1, 4 2, 3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 August, 2014 (06.08.14)

Date of mailing of the international search report

02 September, 2014 (02.09.14)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/065163

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Fukumoto S. et al., L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour., Veterinary Journal, 2013, Vol.198, No.1, pages 164 to 169, ISSN: 1090-0233	1, 4 2, 3
Y	Shi L. et al., Downregulation of L-type amino acid transporter 1 expression inhibits the growth, migration and invasion of gastric cancer cells., Oncology Letters, 2013, Vol.6, No.1, pages 106 to 112, ISSN: 1792-1074	2
Y	Hayashi K. et al., Role of c-Myc for regulation of LAT1 in cancer cells., Journal of Pharmacological Sciences, Vol.118, No.Suppl.1, 2012, page 120P, O3C1-1-2, ISSN: 1347-8613	2
Y	WO 2013/183786 A1 (Kinki University), 12 December 2013 (12.12.2013), entire text; particularly, paragraph [0062] (Family: none)	2, 4
Y	Yanagida O. et al., Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines., Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol.1514, No.2, pages 291 to 302, ISSN: 0006-3002	2
Y	Suguru HAYASE et al., Igaku Yogo Kaisetsu, LAT1, G.I. Research, vol.17, no.3, 2009, pages 268 to 270, ISSN: 0918-9408	3
Y	Yun D.W. et al., JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells., Journal of Pharmacological Sciences, 2014.02, Vol.124, No.2, pages 208 to 217, ISSN: 1347-8613	3, 4, 7, 8
Y	Oda K. et al., L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth., Cancer Science, 2010, Vol.101, No.1, pages 173 to 179, ISSN: 1347-9032	3, 4, 7, 8
Y	Yoshikatsu KANAI, "Cancer drug delivery targeting amino acid transporters", Drug Delivery System, 2012, vol.27, no.5, pages 342 to 349, ISSN: 0913-5006	3, 4, 7, 8
Y	WO 2008/081537 A1 (Human Cell Systems, Inc.), 10 July 2008 (10.07.2008), entire text; particularly, paragraphs [0067] to [0088]; fig. 2 to 14 (Family: none)	3, 7, 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/065163

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Vaage J. et al., Therapy of a xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes., International Journal of Cancer, 1999, Vol.80, No.1, pages 134 to 137, ISSN: 0020-7136	4
Y	Ayral-Kaloustian S. et al., Hybrid inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR): design, synthesis, and superior antitumor activity of novel wortmannin-rapamycin conjugates., Journal of Medicinal Chemistry, 2010, Vol.53, No.1, pages 452 to 459, ISSN: 0022-2623	5-8
Y	Huo H.Z. et al., Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014.01, Vol.443, No.2, pages 406 to 412, ISSN: 0006-291X	5-8
Y	Hisao IMAI et al., "L-gata Amino-san Transporter 1 (LAT1) Sogai ni yoru Hi Shosaibo Haigan Saibokabu deno Ko Shuyo Koka no Kento", Japanese Journal of Lung Cancer, 2011, vol.51, no.5, page 551, P-384, ISSN: 0386-9628	5-8
Y	Chairoungdua A. et al., Amino acid transporters in malignant tumors as a candidate target for anti-cancer therapy., Journal of Japanese Biochemical Society, 2003, Vol.75, No.8, page 744, 3S58-2, ISSN: 0037-1017	5-8
Y	Bressanin D. et al., Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels., Oncotarget, 2012, Vol.3, No.8, pages 811 to 823, ISSN: 1949-2553	8
Y	Kharas M.G. et al., Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells., Journal of Clinical Investigation, 2008, Vol.118, No.9, pages 3038 to 3050, ISSN: 0021-9738	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/065163

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61K31/7068(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K45/06(2006.01)i, A61K31/282(2006.01)i, A61K31/416(2006.01)i, A61K31/436(2006.01)i,
A61K31/513(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i, A61K31/54(2006.01)i, A61K31/69(2006.01)i,
A61K31/704(2006.01)i, A61K31/7068(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K45/06, A61K31/282, A61K31/416, A61K31/436, A61K31/513, A61K31/5377, A61K31/54, A61K31/69,
A61K31/704, A61K31/7068, A61P35/00, A61P35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X ----- Y	Yamauchi K. et al., System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line., Cancer Letters, 2009, Vol.276, No.1, pages 95 to 101, ISSN: 0304-3835	1, 4 ----- 2, 3, 5-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 8 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 9 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小森 潔

4 U

3 7 6 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X ----- Y	Fukumoto S. et al., A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, Vol.439, No.1, pages 103 to 108, ISSN: 0006-291X	1, 4 ----- 2, 3
X ----- Y	Fukumoto S. et al., L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour., Veterinary Journal, 2013, Vol.198, No.1, pages 164 to 169, ISSN: 1090-0233	1, 4 ----- 2, 3
Y	Shi L. et al., Downregulation of L-type amino acid transporter 1 expression inhibits the growth, migration and invasion of gastric cancer cells., Oncology Letters, 2013, Vol.6, No.1, pages 106 to 112, ISSN: 1792-1074	2
Y	Hayashi K. et al., Role of c-Myc for regulation of LAT1 in cancer cells., Journal of Pharmacological Sciences, Vol.118, No.Suppl.1, 2012, page 120P, 03C1-1-2, ISSN: 1347-8613	2
Y	WO 2013/183786 A1 (学校法人近畿大学) 2013.12.12, 文献全体、特に、[0062] (ファミリーなし)	2, 4
Y	Yanagida O. et al., Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines., Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol.1514, No.2, pages 291 to 302, ISSN: 0006-3002	2
Y	早瀬傑他, 医学用語解説 LAT1, G.I. Research, Vol.17, No.3, 2009, pages 268 to 270, ISSN: 0918-9408	3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Yun D.W. et al., JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells., Journal of Pharmacological Sciences, 2014.02, Vol.124, No.2, pages 208 to 217, ISSN: 1347-8613	3, 4, 7, 8
Y	Oda K. et al., L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth., Cancer Science, 2010, Vol.101, No.1, pages 173 to 179, ISSN: 1347-9032	3, 4, 7, 8
Y	金井好克, アミノ酸トランスポーターを標的とした癌デリバリー, Drug Delivery System, 2012, Vol.27, No.5, pages 342 to 349, ISSN: 0913-5006	3, 4, 7, 8
Y	WO 2008/081537 A1 (株式会社ヒューマンセルシステムズ) 2008.07.10, 文献全体、特に、[0067] ~ [0088]、図2 ~ 図14 (ファミリーなし)	3, 7, 8
Y	Vaage J. et al., Therapy of a xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes., International Journal of Cancer, 1999, Vol.80, No.1, pages 134 to 137, ISSN: 0020-7136	4
Y	Ayral-Kaloustian S. et al., Hybrid inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR): design, synthesis, and superior antitumor activity of novel wortmannin-rapamycin conjugates., Journal of Medicinal Chemistry, 2010, Vol.53, No.1, pages 452 to 459, ISSN: 0022-2623	5-8
Y	Huo H.Z. et al., Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014.01, Vol.443, No.2, pages 406 to 412, ISSN: 0006-291X	5-8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	今井久雄他, L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) 阻害による非小細胞肺癌細胞株での抗腫瘍効果の検討, 肺癌, 2011, Vol. 51, No. 5, page 551, P-384, ISSN: 0386-9628	5-8
Y	Chairoungdua A. et al., Amino acid transporters in malignant tumors as a candidate target for anti-cancer therapy., 生化学, 2003, Vol. 75, No. 8, page 744, 3S58-2, ISSN: 0037-1017	5-8
Y	Bressanin D. et al., Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels., Oncotarget, 2012, Vol. 3, No. 8, pages 811 to 823, ISSN: 1949-2553	8
Y	Kharas M.G. et al., Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells., Journal of Clinical Investigation, 2008, Vol. 118, No. 9, pages 3038 to 3050, ISSN: 0021-9738	8