

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/091664 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00,
48/00, 31/7105, 31/711, 31/4439, A61P 35/00 // C12N
9/99, 15/09, C07D 401/12, 209/30

くば市東光台 5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研
究所内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005557

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒
1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タ
ワー23階TMI総合法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 19 日 (19.04.2004)

(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:
60/463,728 2003 年 4 月 18 日 (18.04.2003) US

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザ
イ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東
京都文京区小石川 4-6-1 O Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大和 隆志 (OWA,
Takashi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台
5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki
(JP). 佐藤 俊孝 (SATO, Toshitaka) [JP/JP]; 〒3002635
茨城県つくば市東光台 5-1-3 エーザイ株式会社
筑波研究所内 Ibaraki (JP). 小田 吉哉 (ODA, Yoshiya)
[JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台 5-1-3
エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 黒光 淳
郎 (KUROMITSU, Junro) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つ

(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, LS, MW, MZ, SD, SI,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CYTOPLASMIC MALATE DEHYDROGENASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: 細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤

(57) Abstract: It is intended to establish a screening method for a cytoplasmic malate dehydrogenase inhibitor using high-perfor-
mance liquid chromatography. By using this screening method, it is disclosed that a sulfonamide derivative or a sulfonic acid ester
derivative showing a potent anticancer activity serves as a cytoplasmic malate dehydrogenase inhibitor. Moreover, a double-stranded
RNA (more specifically speaking, shRNA) inhibiting a gene encoding cytoplasmic malate dehydrogenase is provided by RNAi and
it is confirmed that proliferation of cancer cells can be thus prevented *in vivo*.

(57) 要約: 本発明は、高速液体クロマトグラフィーを用いた細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害のスクリーニング法
を確立する。また、本発明は、かかるスクリーニング法を用いて、強い抗癌活性を示すスルホンアミド誘導体また
はスルホン酸エステル誘導体が、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害剤であることを開示する。さらに、本発明で
は、RNAiにより、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子を阻害する二本鎖RNA、具体的にはshRNAを提供
し、*in vivo*で、癌細胞の増殖を抑制されることを確認した。

WO 2004/091664 A1

明細書

細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤

5 技術分野

本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）の阻害剤に関する。

背景技術

正常細胞の癌細胞への転換は、一連の遺伝的、生化学的、構造的変化を伴う。

- 10 その際に生じる分子レベルの違いを標的とする癌分子標的治療は、癌細胞の増悪、進展をより高い選択をもって抑制する治療手段として期待される。代表的な分子標的薬として、近年開発された慢性骨髄性白血病治療薬グリベック（bcr-abl 遺伝子から発現する p210 タンパク質キナーゼを標的とする）や肺癌治療薬イレッサ（上皮細胞成長因子の受容体型チロシンキナーゼを標的とする）などが挙げら
- 15 れる。

- 細胞の癌化に伴う生化学的な変化という点で、正常細胞と癌細胞のエネルギー代謝に本質的な差異があることが古くから知られている（たとえば、非特許文献 1 および 2 参照）。ある種の癌細胞は正常細胞に比べて高い解糖速度を示するため、宿主のエネルギーを奪い衰弱させる。エネルギー代謝の亢進した癌細胞では、
- 20 ATP の需要が酸化的リン酸化による供給を超えるためにアデニンヌクレオチドの存在比率（ATP/ADP）が変わり、解糖系の律速酵素に阻害がかからなくなる。その際、解糖によるピルビン酸生産速度がクエン酸サイクルによる処理速度を上回ると、好気条件で多量の乳酸が生産される。乳酸は、ATP を消費しながら解糖系を逆行する糖新生系の主要な基質であり、転移を伴う癌患者において、この
- 25 乳酸からの糖新生系の亢進がエネルギー消費量の増加と体重の減少に関連していることが指摘されている（たとえば、非特許文献 3 参照）。

さらに、解糖系においてグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素が触媒する反応段階で生成する NADH は、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルなどのシャトル系を介して細胞質からミトコンドリア内の電子伝達系に供給され、酸化リン酸化の効率上昇に寄与している。解糖系の亢進したある種の癌細胞では、この NADH の輸送系が活発に機能しており、酸化リン酸化で生じる全 ATP 量の約 3 分の 1 がリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルで運ばれる NADH に由来するという報告がある（たとえば、非特許文献 4 参照）。本シャトル系に関与する酵素として、リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）とアスパラギン酸アミノ基転移酵素（それぞれ、細胞質型とミトコンドリア型の 2 種類がある）が知られており、癌細胞における活性の変化が指摘されている（たとえば、非特許文献 5 参照）。

以上の知見から、糖新生やリンゴ酸-アスパラギン酸シャトル、およびそれらと同調しているクエン酸サイクル、有機酸代謝、アミノ酸代謝などを制御している代謝酵素群の中には、有効な新規抗癌療法の分子標的となりうるものが含まれていると考えられる。事実、アスパラギン酸アミノ基転移酵素を阻害する L-glutamic acid γ -monohydroxamate が *in vitro* ならびに *in vivo* で癌細胞（L1210 マウス白血病細胞、B16 マウスメラノーマ細胞）の増殖を抑制すること（たとえば、非特許文献 6 および 7 参照）、サイクリン依存型キナーゼ（CDK）およびグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3（GSK-3）の阻害剤として、既に見出されていた抗腫瘍性天然化合物 paullone 類の別の新たな細胞内標的がリンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）のミトコンドリア型アイソフォームであること（たとえば、非特許文献 8 参照）、リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）を含めて数多くの脱水素酵素の活性を非選択的に阻害する天然化合物 gossypol が強い癌細胞増殖抑制活性を有すること（たとえば、非特許文献 9 参照）、などが報告されている。

リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）は、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルのみならず、糖新生、クエン酸サイクル、アミノ酸代謝等にも関与しており、細胞質型とミトコンドリア型の 2 種類のアイソフォームが同定されている。両アイソ

フォームとともに NAD/NADH をコファクターとし、リンゴ酸からオキザロ酢酸への変換過程を可逆的に触媒する。両アイソフォーム間のアミノ酸配列の相同性は約 20~25%程度と低い(たとえば、非特許文献 10 参照)、立体構造には高い類似性が認められている(たとえば、非特許文献 11 参照)。本酵素のミトコン

5 ドリア型アイソフォームについて生化学的な機能解析が精力的に行われてきた一方で、細胞質型アイソフォームに関しては、機能的に未解明の部分が依然として残されている。癌遺伝子 src の遺伝子産物のリン酸化基質が本細胞質型アイソフォームであることを示唆する論文が発表されたが(たとえば、非特許文献 12 参照)、生理的意義についての報告はその後一切ない。

- 10 最近、本細胞質型アイソフォームが核酸類選択的な細胞膜チャネル (nucleic acid-conducting channel) の調節サブユニットであることが同定され、この酵素の機能に関して全く新たな一面が明らかとなった(たとえば、非特許文献 13 参照)。

- 細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) を阻害する物質の活性を評価する
- 15 手段としては、従来から、本酵素によってオキザロ酢酸がリンゴ酸に還元される際に認められる NADH 由来の吸光度 (340 nm 付近) の減少を分光光度計によってモニターする方法が用いられてきた。検出感度の問題から、この評価系では数十 μM から数 mM 程度の濃度の NADH が通常必要とされる。本方法により、上記の天然化合物 gossypol が NADH 競合的に K_i 値 3.0 μM で本酵素を阻害するこ
- 20 とが示されている(たとえば、非特許文献 14 参照)。

[非特許文献 1] Lehninger A. L., *Biochemistry, second edition published by Worth Publishers, Inc.* 1975

[非特許文献 2] Voet D. et al, *Biochemistry, second edition published by John Wiley & Sons, Inc.* 1995

- 25 [非特許文献 3] Holroyde C. P. et al, *Cancer Res.*, 1975, 35, 3710-3714

[非特許文献 4] Greenhouse W. V. et al, *Cancer Res.*, 1977, 37, 4173-4181

- [非特許文献 5] Mazurek S. *et al*, *J. Cell. Physiol.*, 1999, 181, 136-146
- [非特許文献 6] Vila J. *et al*, *Int. J. Cancer*, 1990, 45, 737-743
- [非特許文献 7] Thomasset N. *et al*, *Int. J. Cancer*, 1992, 51, 329-332
- [非特許文献 8] Knockart M. *et al*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 25493-25501
- 5 [非特許文献 9] Liu S. *et al*, *Anticancer Res.*, 2002, 22 (Suppl. 1A), 33-38
- [非特許文献 10] Joh T. *et al*, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 15127-15131
- [非特許文献 11] Birktoft J. J. *et al*, *Biochemistry*, 1989, 28, 6065-6081
- [非特許文献 12] Rübsamen H. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 228-232
- 10 [非特許文献 13] Hanss B. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 1707-1712
- [非特許文献 14] Burgos C. *et al*, *Biochem. Pharmacol.*, 1986, 35, 801-804

発明の開示

- 15 前述のように、ミトコンドリアリンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の阻害剤である paullone 類が癌細胞の増殖を抑制するという報告 (Knockart M. *et al*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 25493-25501, Schults C. *et al*, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2909-2919 and Zaharevitz D. *et al*, *Cancer Res.*, 1999, 59, 2566-2569)、ならびに、様々な脱水素酵素を非選択的に阻害する化合物である gossypol が癌細胞に
- 20 対する増殖抑制剤として働くという報告 (Liu S. *et al*, *Anticancer Res.*, 2002, 22 (Suppl. 1A), 33-38) がある。しかしながら、これまで、細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の活性を選択的に阻害する物質、または本酵素の活性阻害を主たる作用機序とする抗癌物質については一切報告がない。

- 一方、最近、Cos7 細胞内の非結合型 (フリー体) NADH の濃度が生理条件下
- 25 で 110~130 nM と見積られ、報告されている (Zhang Q. *et al*, *Science*, 2002, 295, 1895-1897)。そのため、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害する物質 (特

に、酵素への結合に関して NAD/NADH と競合するタイプの化合物) をより正確にスクリーニングするためには、従来よりもかなり低濃度の、すなわち百～数百 nM 程度の NADH または NAD をモニターできる高い検出感度の評価系を構築して用いることが望まれる。

- 5 本発明の目的は、抗癌療法にも利用可能な、細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の酵素活性の阻害剤を提供することである。

本発明者らは、細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の活性を阻害する物質を効率的に見出すため、従前の分光光度計に代えて、高速液体クロマトグラフィー (以下、「HPLC」という。) を用いる新規評価系を構築した。本評価系は、

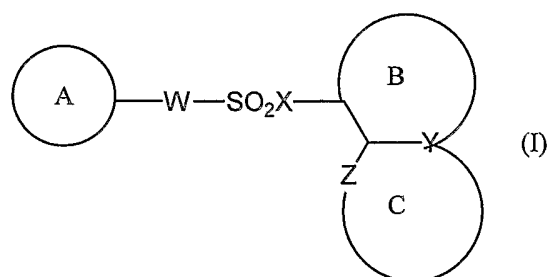
- 10 数百 nM 程度の NADH または NAD のモニターを可能にしたので、特に、本酵素への結合に関して NAD/NADH と競合するタイプの化合物をより正確にスクリーニングするのに適している。

そこで、本発明では、HPLC を用いたスクリーニング法を用いて、鋭意検討した結果、N- (3-クロロ-1H-インドール-7-イル) -4-スルファモイ

- 15 ルベンゼンスルホンアミド (以下、単に「E7070」ということもある。) を代表とするスルホンアミド類が、NAD/NADH 競合的に細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) を阻害することを明らかにし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、抗癌作用を有する化合物を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を提供する。具体的には、本発明は、

- 20 下記式 (I)



(式中、A環は、置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を示し、

B環は、置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を示し、

C環は、置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環を示し、

5 Wは、単結合または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、

Xは、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ または酸素原子を示し、

Yは、炭素原子または窒素原子を示し、

Zは、 $-\text{N}(\text{R}^2)-$ または窒素原子を示し、

R¹ および R² は、同一または異なって水素原子またはC₁～C₆アルキル基を示す。) で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を提供する。

本発明の細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤の好ましい態様によれば、上記式(I)において、A環が置換基を有していてもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、
15 B環が置換基を有していてもよいベンゼンであり、C環が置換基を有していてもよいピロールであり、Wが単結合であり、XおよびZがいずれも $-\text{NH}-$ である。

本発明の細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤のより好ましい態様によれば、前記阻害剤は、N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンゼンスルホンアミド、N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-[2-(メタンスルホンアミド)エチル]ベンゼンスルホンアミド、4-アミノ-N-(3-クロロ-4-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド、6-アミノ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-3-ピリジンスルホンアミド、3-クロロ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-2-メチルベンゼンスルホンアミド、4-シアノ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド、N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-(2-スルファモイルエチ

20

25

ル) ベンゼンスルホンアミド、N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-5-メチル-3-ピリジンスルホンアミド、5-ブロモ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-2-ピリジンスルホンアミド、4-アミノ-N-(5-ブロモ-3-シアノ-1H-インドール-7-イル) ベンゼンスル
5 ホンアミド、N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-(N-メチルアセトアミド) ベンゼンスルホンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の化合物またはその薬理学的な塩を有効成分として含むことを特徴とする。

また、本発明は、抗癌作用を有する化合物の有効量を患者に投与する工程を含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法、上記式(I)で表されるスルホンア
10 ミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの塩の有効量を患者に投与する工程を含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法、特定の構造式を有するスルホンアミド類またはその薬理学的に許容な塩の有効量を、患者に投与する細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法を提供する。

また、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、抗癌作
15 用を有する化合物、具体的には、上記式(I)で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容な塩や、特定の構造式を有するスルホンアミド類またはその薬理学的に許容な塩の使用を提供する。

さらに、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する、アンチセンス核酸またはリボザイムを提供する。

20 さらにまた、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する、二本鎖 RNA を提供する。具体的には、前記二本鎖 RNA は、18~30の塩基長をする二本鎖 RNA または二本鎖 RNA-DNA キメラ分子である。

別の態様では、本発明は、前記二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターを提供する。

25 そして、本発明は、前述したアンチセンス核酸、リボザイム、二本鎖 RNA、もしくは前記発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩を有効成分とし

て含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を提供する。

本発明は、前述したアンチセンス核酸、リボザイム、二本鎖 RNA、もしくは前記発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩を有効成分として含む、癌の予防および/または治療用組成物を提供する。そして、前記癌は、膵臓癌、

5 胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍を含む。

また、本発明は、前述したアンチセンス核酸、リボザイム、二本鎖 RNA、もしくは前記発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩の有効量を、患者
10 に投与する工程を含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法、並びに癌の予防および/または治療方法を提供する。そして、前記癌は、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍を含む。

15 さらに、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤および癌の予防および/または治療用組成物を製造するための、前述したアンチセンス核酸、リボザイム、二本鎖 RNA、もしくは前記発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩の使用を提供する。そして、前記癌は、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵
20 巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍を含む。

くわえて、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素を準備する工程と、被検化合物と前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素とを接触させる工程と、前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素により変換される NADH または NAD の量を検出することにより、前記細胞質脱水素酵素の活性阻害の程度を測定する工程と、含む抗癌剤のスクリー
25 ニング方法であって、前記 NADH または NAD の濃度が 100~1000 nM であるスクリーニング方法と、該方法を実施するためのスクリーニング用キットを提供

する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のスクリーニング法において、被検化合物を添加しない反応液
5 を、254 nmにて検出した際のHPLCクロマトグラムを示す。

図 2 は、本発明のスクリーニング法において、被検化合物を添加しない反応液
を、338 nmにて検出した際のHPLCクロマトグラムを示す。

図 3 は、本発明のスクリーニング法における、gossypolの細胞質リンゴ酸脱水
素酵素活性への影響を示すHPLCクロマトグラムを示す。なお、HPLCにおける
10 検出は、254 nmにて行った。

図 4 は、本発明のスクリーニング法における、被検化合物としてE7070による、
細胞質リンゴ酸脱水素酵素活性への影響を示すHPLCクロマトグラムを示す。な
お、HPLCにおける検出は、254 nmにて行った。

図 5 は、本発明のスクリーニング法における、N-（3-クロロ-1 H-イン
15 ドール-7-イル）-4-スルファモイルベンズアミド（以下、単に「ER-
203805」ということもある。）による細胞質リンゴ酸脱水素酵素活性への影響を
示すHPLCクロマトグラムを示す。なお、HPLCにおける検出は、254 nmにて行
った。

図 6 は、本発明の各種スルホンアミド類による、細胞質リンゴ酸脱水素酵素活
20 性を、E7070 を 1 とした場合の比活性の値を示す。

図 7 は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の塩基配列情報をもとに、本発明において
用いた、siRNA のターゲット配列として選定した配列を示す。

図 8 は、本発明による RNAi に利用する、shRNA の配列を示す。

図 9 は、本発明による RNAi に使用した各種プラスミドにより、細胞質リンゴ
25 酸脱水素酵素の mRNA の発現の、コントロールに対する割合の結果を示す。

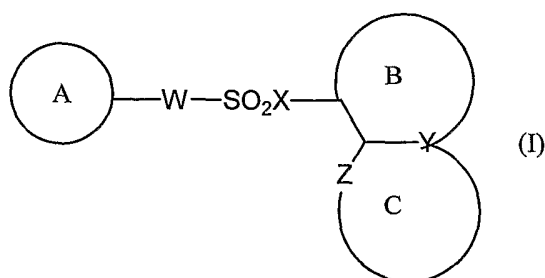
発明を実施するための最良の形態

以下に、本願明細書において記載する用語等の意義、本発明の実施の形態等を示して、本発明を詳細に説明する。

本願明細書において用いる用語「抗癌作用を有する化合物」とは、腫瘍、特に
5 悪性腫瘍の成長を抑制または停止させる作用を有する化合物をいう。

本願明細書において用いる用語「阻害剤」とは、酵素の活性を阻害する物質をいう。

本発明の有効成分であるスルホンアミド誘導体またはスルホンエステル誘導体は、下記式 (I) により表され、たとえば、特開平 7-165708 号に記載の
10 方法に従い、製造することができる。



(式中、A環は、置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を示し、

B環は、置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を示し、

15 C環は、置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環を示し、

Wは、単結合または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、

Xは、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ または酸素原子を示し、

Yは、炭素原子または窒素原子を示し、

20 Zは、 $-\text{N}(\text{R}^2)-$ または窒素原子を示し、

R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子または C_1-C_6 アルキル基を示す。)

ここで、上記一般式 (I) において、A 環の意味する「置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環」とは、芳香族炭化水素、または窒素原子、酸素原子、および硫黄原子のうち少なくとも 1 個を含む芳香族ヘテロ環であり、当該環上には置換基 1～3 個があってもよい。A 環に含まれる芳香環を例示すると、

- 5 ピロール、ピラゾール、イミダゾール、チオフェン、フラン、チアゾール、オキサゾール、ベンゼン、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジン、ナフタレン、キノリン、イソキノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、インドール、イソインドール、インドリジン、インダゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、ベンゾオキサゾール、ベンズイミダゾール、
10 ル、ベンゾピラゾール、ベンゾチアゾール等が挙げられる。本発明における A 環に含まれる芳香環としては、ベンゼンまたはピリジンが好ましい。

- 上記芳香環は置換基 1～3 個を有してもよく、置換基が複数個ある場合には、同一または異なってもよい。A 環の意味する「置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環」の「置換基」としては、 C_1-C_6 アルキル基、または C_3-C_6 シクロアルキル基で置換されていてもよいアミノ基、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、水酸基、ニトロ基、メルカプト基、シアノ基、 C_1-C_6 アルキルチオ基、ハロゲン基、式 $-a-b$ [式中、 a は単結合、
15 $-(CH_2)_k-$ 、 $-O-(CH_2)_k-$ 、 $-S-(CH_2)_k-$ または $-N(R^3)-(CH_2)_k-$ を、 k は 1～5 の整数を、 R^3 は水素原子または C_1-C_6 アルキル基を、 b は $-CH_2-d$ (式中、 d は C_1-C_6 アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、ハロゲン基、水酸基、 C_1-C_6 アルキルチオ基、シアノ基または C_1-C_6 アルコキシ基を意味する) を意味する] で示される基、式 $-a-e-f$ [式中、 a は前記と同じ意味を、 e は $-S(O)-$ または $-S(O)_2-$ を、 f は C_1-C_6 アルキル基または C_1-C_6 アルコキシ基で置換されてい
20 もよいアミノ基、 C_1-C_6 アルキル基、トリフルオロメチル基、 $-(CH_2)_m-b$ または $-N(R^4)-(CH_2)_m-b$ (式中、 b は前記と同じ意味を示し、

1 2

R^4 は水素原子または C_1-C_6 アルキル基を、 m は1～5の整数を意味する)を意味する]で示される基、式 $-a-g-h$ [式中、 a は前記と同じ意味を示し、 g は $-C(O)-$ または $-C(S)-$ を、 h は C_1-C_6 アルキル基で置換されてもよいアミノ基、水酸基、 C_1-C_6 アルキル基、 C_1-C_6 アルコキシ基、
 5 $(CH_2)_n-b$ または $-N(R^5)-(CH_2)_n-b$ (式中、 b は前記と同じ意味を示し、 R^6 は水素原子または C_1-C_6 アルキル基を、 n は1～5の整数を意味する)を意味する]で示される基、式 $-a-N(R^6)-g-i$ [式中、 a および g は前記と同じ意味を示し、 R^6 は水素原子または C_1-C_6 アルキル基を、 i は水素原子、 C_1-C_6 アルコキシ基または f (f は前記と同じ意味を示す)
 10 を意味する]で示される基、式 $-a-N(R^7)-e-f$ (式中、 a 、 e および f は前記と同じ意味を示し、 R^7 は水素原子または C_1-C_6 アルキル基を意味する)で示される基、または式 $-(CH_2)_p-j-(CH_2)_q-b$ (式中、 j は酸素原子または硫黄原子を意味し、 b は前記と同じ意味を示し、 p および q は同一または異なって1～5の整数を意味する)で示される基などを挙げることがで
 15 きる。

上記置換基例において、アミノ基が2個のアルキル基で置換されている場合には、これらのアルキル基が結合して5または6員環を形成していてもよい。また、A環が水素基またはメルカプト基を有する含窒素ヘテロ環である場合には、これらの基が共鳴構造をとることにより、オキシ基またはチオキシ基の形になってい
 20 てもよい。

B環の意味する「置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環」とは、一部が水素化されていてもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、当該環上に置換基1または2個を有してもよく、置換基が2個ある場合には、同一または異なっている。

25 い。

C環の意味する「置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5

員ヘテロ環」とは、一部が水素化されていてもよい、ピロール、ピラゾール、イミダゾールであり、当該環上に置換基1または2個を有してもいてもよく、置換基2個ある場合には、同一または異なってもよい。

- B環およびC環が有していてもよい置換基としては、ハロゲン基、シアノ基、
- 5 C₁－C₆アルキル基、C₁－C₆アルコキシ基、水酸基、オキシ基、式－C(O)－r（式中、rは水素原子、C₁－C₆アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、C₁－C₆アルキル基、C₁－C₆アルコキシ基または水酸基を意味する）、C₁－C₆アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、トリフルオロメチル基等を挙げることができる。
- 10 上記式（I）において、R¹、R²およびA環、B環、C環が有してもよい置換基の定義中のC₁－C₆アルキル基としては、炭素数1～6の直鎖もしくは分岐状のアルキル基、たとえば、メチル基、エチル基、n－プロピル基、イソプロピル基、n－ブチル基、イソブチル基、sec－ブチル基、tert－ブチル基、n－ペンチル基（アミル基）、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert－ペンチル基、
- 15 1－メチルブチル基、2－メチルブチル基、1,2－ジメチルプロピル基、n－ヘキシル基、イソヘキシル基、1－メチルペンチル基、2－メチルペンチル基、3－メチルペンチル基、1,1－ジメチルブチル基、1,2－ジメチルブチル基、2,2－ジメチルブチル基、1,3－ジメチルブチル基、2,3－ジメチルブチル基、3,3－ジメチルブチル基、1－エチルブチル基、2－エチルブチル基、1,1,2
- 20 ートリメチルプロピル基、1,2,2－トリメチルプロピル基、1－エチルー1－メチルプロピル基、1－エチルー2－メチルプロピル基などを意味する。これらのうち、好ましい基としては、メチル基、エチル基、n－プロピル基、イソプロピル基、n－ブチル基、イソブチル基などを挙げることができる。これらのうち、最も好ましい基としては、メチル基、エチル基、n－プロピル基、イソプロピル
- 25 基を挙げることができる。

A環が有していてもよい置換基の定義中のC₃－C₆シクロアルキル基として

は、シクロプロピル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などを挙げる
ことができる。

A環、B環およびC環が有してもよい置換基の定義中のC₁－C₆アルコキシ
基としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、
5 n-ブトキシ基、イソブトキシ基、tert-ブトキシ基など上記のC₁－C₆アルキ
ル基から誘導されるC₁－C₆アルコキシ基を意味するが、これらのうち最も好
ましい基としては、メトキシ基、エトキシ基を挙げる
ことができる。また、A環、
B環およびC環が有してもよい置換基の定義中のハロゲン原子としては、フッ素
原子、塩素原子、臭素原子等を挙げる
ことができる。

- 10 本発明の有効成分としては、好適には、N－（3－クロロ－1 H－インドール
－7－イル）－4－スルファモイルベンゼンスルホンアミド、N－（3－クロロ
－1 H－インドール－7－イル）－4－[2－（メタンスルホンアミド）エチル]ベ
ンゼンスルホンアミド、4－アミノ－N－（3－クロロ－4－シアノ－1 H－イ
ンドール－7－イル）ベンゼンスルホンアミド、6－アミノ－N－（3－シアノ
15 －1 H－インドール－7－イル）－3－ピリジンスルホンアミド、3－クロロ－
N－（3－シアノ－1 H－インドール－7－イル）－2－メチルベンゼンスルホ
ンアミド、4－シアノ－N－（3－シアノ－1 H－インドール－7－イル）ベン
ゼンスルホンアミド、N－（3－クロロ－1 H－インドール－7－イル）－4－
（2－スルファモイルエチル）ベンゼンスルホンアミド、N－（3－シアノ－1
20 H－インドール－7－イル）－5－メチル－3－ピリジンスルホンアミド、5－
ブromo－N－（3－シアノ－1 H－インドール－7－イル）－2－ピリジンスル
ホンアミド、4－アミノ－N－（5－ブromo－3－シアノ－1 H－インドール－
7－イル）ベンゼンスルホンアミド、N－（3－クロロ－1 H－インドール－7
－イル）－4－（N－メチルアセトアミド）ベンゼンスルホンアミド等の化合物
25 を挙げる
ことができる。

また、本発明の有効成分の構造式は、便宜上一定の異性体を表すことがあるが、

本発明の有効成分である化合物は、この便宜上の式の記載に限定されるものではなく、構造上生ずる総べての幾何異性体、不斉炭素に基づく光学異性体、回轉異性体、立体異性体、互変異性体等の異性体や該異性体混合物が含まれる。また、前記化合物には結晶多形が存在することもあるが、同様に、特定の結晶形に限定

5 されず、いずれかの結晶形が単一または結晶形混合物であってもよい。

また、本発明の有効成分は、抗腫瘍作用を示すが、生体内で酸化、還元、加水分解、抱合などの代謝を受けて抗腫瘍作用を有する上記化合物の誘導体をも包含する。

本願明細書において用いる用語「塩」とは、本発明の有効成分である化合物の
10 アミノ基のような塩基性の基を有する場合には酸との反応により、また、カルボキシル基のような酸性基を有する場合には塩基との反応により、生成する塩をいう。具体的には、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、酸性または塩基性アミノ酸との塩などが挙げられ、中でも薬理学的に許容される塩が好ましい。

15 無機酸との塩の好ましい例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等との塩が挙げられ、有機酸との塩の好ましい例としては、例えば、酢酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、ステアリン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。

20 無機塩基との塩の好ましい例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好ましい例としては、例えば、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、メグルミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

25 また、本発明において、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現の阻害は、アンチセンス核酸を利用することも可能である。本発明によるアンチ

センス核酸は、前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の塩基配列に相補的な、あるいは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該遺伝子の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス核酸であってもよいが、アンチセンス DNA が好ましい。

- 5 本願明細書において用いる用語「細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子に実質的に相補的な塩基配列」とは、たとえば、本発明に用いる配列番号：1にて記載される塩基配列に相補的な塩基配列の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列、またはその一部分を有する
- 10 塩基配列をいう。本発明に用いるアンチセンス核酸は、通例、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。なお、配列番号：2には、細胞質リンゴ酸脱水素酵素のアミノ酸配列を記載する。

- ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、たとえば、ホスホ
- 15 チオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンス核酸は、公知の DNA 合成装置などを用いて製造することができる。

- 本発明によるアンチセンス核酸は、RNA、DNA あるいは修飾された RNA または DNA を含む。修飾された核酸の具体例としては、以下のものに限定される
- 20 わけではないが、核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体や、ポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性のある核酸等が挙げられる。さらに、本発明によるアンチセンス核酸は、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、仮に毒性があるならアンチ
- 25 センス核酸の毒性をより小さなものにするように修飾することも可能である。かかる修飾は、当該技術分野では公知であり、たとえば、J. Kawakami et al., Pharm

Tech Japan, Vol. 8, pp247, 1992; Vol. 8, pp395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 等に記載されている。さらにまた、本発明によるアンチセンス核酸は、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたりすることができる。

- 5 さらに、本発明において、細胞質リボソーム脱水素酵素をコードする遺伝子の発現の阻害は、リボザイムを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有する RNA 分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、特に RNA を切断する酵素としてのリボザイムを利用することができる。リボザイムには、高分子量リボザイムと低分子量リボザイムとに大別されるが、双方とも本発明によるリボザイムに包含される。高分子量リボザイムには、グループ I イントロン型や RNase P のような 400ヌクレオチド以上のものがある。一方、低分子量リボザイムには、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピン型リボザイムや HDV リボザイムと称される 40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものがある。ハンマーヘッド型リボザイムは、三つのステムから構成され、触媒領域がハンマーヘッド形をしており、標的 RNA を Mg^{2+} イオン存在下で NU(A,C,U)、特に CUC 配列の直ぐ後で切断する。ヘアピン型リボザイムは4つのヘリックスと2つのループからなり、基質 RNA ループの $A_{-1}G_{+1}$ 間のホスホジエステル結合を特異的に切断する。HDV リボザイムは、4つのステムからなり、ホルムアミドや尿素などの RNA 変性剤で活性化される。
- 10 標的遺伝子を切断できるように設計されたリボザイムは、該リボザイムをコードする遺伝子を、細胞中で転写されるように、プロモーター配列および転写終結配列に連結して発現させることができる。本発明に用いられるプロモーター配列には、発現させたい遺伝子の種類や宿主等により公知のプロモーターから適宜選択して用いることができる。たとえば、サイトメガロウイルス (CMV) 由来プロモーター、EF-1 α プロモーター、 β アクチンプロモーター、SV40 プロモーター、TK プロモーター、PL プロモーター、SR α プロモーター、RNA1.8 プロモ-
- 15
- 20
- 25

ター等が挙げられる。

さらにまた、本発明において、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現の阻害は、二本鎖 RNA を用いた RNA interference (RNAi) によっても行うことができる。ここで、本願明細書において用いる用語「二本鎖 RNA」とは、

- 5 細胞内における細胞質リンゴ酸脱水素酵素の発現を抑制する。この二本鎖 RNA は、二本鎖 RNA 分子だけでなく、二本鎖 RNA-DNA キメラ分子を含み、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を抑制する作用を有する限りにおいて限定されず、short interfering RNA (siRNA) や short hairpin RNA (shRNA) をも含む。本発明による二本鎖 RNA は、好ましくは 18～30 塩基長を有する
- 10 二本鎖 RNA 分子または二本鎖 RNA-DNA キメラ分子であり、より好ましくは 20～28 塩基長を有する二本鎖 RNA 分子または二本鎖 RNA-DNA キメラ分子である。

- 15 本発明では、具体的には、以下の塩基配列を標的遺伝子配列とする二本鎖 RNA 分子が挙げられ、かかる RNA 分子は、二本鎖のうち一方を以下のいずれかの DNA 塩基配列をセンス鎖とし、他方はその相補鎖、すなわち、該センス配列に対するアンチセンス鎖である。なお、二本鎖 RNA に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相同性の配列を有する。

- 20 (1) 5'-CTCTGATGGCAACTCCTATGGTGTT-3' (配列番号：3)
- (2) 5'-TCAGGGACATCTGGTTTGGAAACCCAG-3' (配列番号：4)
- (3) 5'-ACAACCGAGCTAAAGCTCAAATTGC-3' (配列番号：5)
- (4) 5'-TGGATCTTACTGCAAAGGAACTGAC-3' (配列番号：6)
- (5) 5'-CAAGGAAAGGAAGTTGGTGTTTATG-3' (配列番号：7)

- 25 二本鎖 RNA を細胞に作用させる方法としては、該二本鎖 RNA を直接細胞に導入する方法のみならず、プロモーターと、当該プロモーターと機能的に結合し

た標的遺伝子と、を含む遺伝子発現カセットを挿入した発現ベクターを細胞に導入し、細胞内で該二本鎖 RNA を発現させる方法をも挙げることができる。なお、本願明細書で用いる用語「機能的に結合した」とは、プロモーターと結合することにより、下流側の遺伝子の転写が開始するように、上流側のプロモーターと遺

5 伝子が結合することを意味する。

具体的には、本発明では、対象とする酵素をコードする遺伝子の塩基配列情報をもとに、前述のような数種類の配列を、siRNA のターゲット配列として選定する。次に、上記配列を標的とする siRNA へと変換される shRNA を発現するよ

- 10 前記配列番号 3 ないし 7 のうち何れか一つの配列を包含する発現カセットを作製し、市販のプラスミド、ファージ等のベクターに挿入する。本発明では、プロモーターとしては、以下のもの限定されるわけではないが、RNA Polymerase III 系の U6 プロモーターや H1 プロモーター等を挙げることができる。本発明に用いるプラスミドとしては、大腸菌 (pBR322、pBR325、pUC12、pUC13 など) など
- 15 のグラム陰性菌由来、枯草菌 (pUB110、pTP5 や pC194 など) などのグラム陽性菌由来、Staphylococcus 由来、酵母由来 (pSH19 や pSH15 など) のものなどがあり、宿主に適合するように選択される。また、発現ベクターには、所望により、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、薬剤耐性遺伝子や栄養要求性を有する遺伝子などの選択マーカーなどを含有させて用いること
- 20 もできる。

- ベクターの細胞への導入方法としては、宿主が大腸菌である場合には塩化カルシウム法、枯草菌を宿主とする場合には、コンピテントセル法や酢酸リチウム法、枯草菌、放射菌、酵母などにはプロトプラスト法、動植物細胞、酵母、細菌などに広く用いられる方法としてリン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション
- 25 法、DEAE-デキストランやポリブレンなどのポリマーと複合体を形成させる方法などから適宜選択することができる。また、カチオン性脂質のリポソームと複合

体を形成させるリポフェクトアミン (Invitrogen 社) を用いることもできる。

さらには、標的配列、ループ配列および制限酵素配列を含むヌクレオチドを、
U6 プロモーターを含む発現ベクターである、市販の pGE-1 shRNA expression
vector、pGE-1-negative control vector、pGE-1-shluc control vector、pCMV-Luc
5 control vector、SCS-1host strain (以上は、フナコシ(株)製)や、piGENE™ tRNA
シリーズの SV309、SV310、SV311、SV312 (以上は、(株)iGENE 製) など
を利用することも可能である。

そして、本発明による、配列番号：3～7にて記載される標的遺伝子を含むプ
ラスミド等の発現ベクターを用いて、細胞をトランスフェクションさせ、RNAi
10 の作用により細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害させる
ことができる。

RNAi の機構の詳細は明らかではないが、本発明による二本鎖 RNA は、標的
遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖 RNA 分子または二本鎖
RNA-DNA キメラ分子を細胞、組織あるいは個体内に導入すると、その配列に相
15 同性を持つ mRNA の分解を促進し、結果的に mRNA の鋳型となる遺伝子の発現
を阻害する。

本発明において利用する siRNA を発現させる系は、タンデムタイプと、ステ
ムタイプ (あるいはヘアピンタイプ) とに大別される。タンデムタイプは、二つ
のプロモーター、たとえば、U6 プロモーターを有し、それぞれ独立にセンス
20 RNA とアンチセンス RNA を転写する。転写されたセンスおよびアンチセンス
RNA は細胞内で二本鎖 RNA を形成し、siRNA として働く。一方、ステムタイプ
は一つのプロモーター、たとえば、U6 プロモーターを有し、その下流にセンス
鎖とアンチセンス鎖をループでつないだ構造を有する。このステムループ RNA
構造をもった RNA、いわゆる shRNA は、ダイサーなどにより、加水分解等のプ
25 ロセッシングを受け、siRNA が産出される。

次に、本発明によるスクリーニング方法について説明する。本発明によるスク

リーニング方法は、被検化合物による細胞質リンゴ酸脱水素酵素の活性阻害の程度を、前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素により変換される NADH または NAD の量を監視することにより評価する。そして、本発明では、本発明の有効成分が抗癌作用を有する化合物として公知であり（特開平 7-165708 号）、細胞質
5 リンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害する知見を得たことから、かかる阻害を監視することにより、抗癌剤のスクリーニング方法を提供できる。

本発明のスクリーニング方法に使用する細胞質リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）は、（i）配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、を意味する。また、細胞質リンゴ酸脱水素酵素には、（i i）配列番号 2 で表
10 れるアミノ酸配列を含むポリペプチドと機能的に等価な改変ポリペプチド、（i i i）配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドのアミノ酸配列に関して 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる相同ポリペプチドが含まれる。なお、前記ポリペプチドには、ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。

15 ここで、機能的に等価な改変ポリペプチド（以下、「改変ポリペプチド」と称する）とは、そのアミノ酸配列が、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含むポリペプチドにおいて 1 または複数個（好ましくは 1 または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列であって、しかも細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチドを意味する。こ
20 こで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば 1～30 個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個、特に好ましくは 1～2 個である。なお、前記改変ポリペプチドには、改変ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記改変ポ
25 リペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物〔例えば非ヒト哺乳動物（例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど）、鳥類、爬

虫類、両生類、魚類、昆虫類など] 由来の細胞質リンゴ酸脱水素酵素もしくはその変異体が含まれる。

- 上述の相同ポリペプチドとは、細胞質リンゴ酸脱水素酵素のアミノ酸配列に関して70%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる限り、特に限定されるものではないが、細胞質リンゴ酸脱水素酵素に関して、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるアミノ酸配列であって、しかも細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチドを意味する。ここで、
- 10 「相同性」の数値はいずれも、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であればよく、たとえば、全米バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の相同性アルゴリズム BLAST (Basic local alignment search tool) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてデフォルト (初期設定) のパラメーターを用いることにより、算出することができる。なお、前記相同ポリペプチド
- 15 には、相同ポリペプチドの塩が含まれ、さらには糖鎖を有しないものと糖鎖を有するものとの両方が含まれる。従って、これらの条件を満たす限り、前記相同ポリペプチドの起源は、ヒトに限定されない。例えばヒト以外の生物 [例えば非ヒト哺乳動物 (例えばマウス、ラット、ハムスター、ブタ、イヌなど)、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫類など] 由来の細胞質リンゴ酸脱水素酵素もしくはそ
- 20 の変異体が含まれる。

なお、変異体とは、「variation」、すなわち、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

- これら本発明に使用する細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (すなわち、細胞質リンゴ酸脱水素酵素、改変ポリペプチド、相同ポリペプチド) は、種々の公知の方法、
- 25 例えば遺伝子工学的手法、合成法などによって得ることができる。具体的には、遺伝子工学的手法の場合、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオ

チドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することによって調製することができる。また別の態様として、合成法の場合は、液相法、固相法など常法に従い合成することが可能であり、通常、自動合成機を利用することができる。化学修飾物の合成は常法により行なうことができる。さらに別の態様によれば、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の部分ポリペプチドは、細胞質リンゴ酸脱水素酵素を適当なタンパク質分解酵素で切断することによって調製することができる。

以下、遺伝子工学的手法について、より具体的には細胞質リンゴ酸脱水素酵素を使用する場合について詳述するが、その部分ポリペプチドについても後述のスクリーニング方法に使用可能であれば特に限定されない。細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体から発現可能な条件下で培養し、発現タンパク質の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精製することにより調製することができる。

前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドは、本発明に使用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではない。

なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA および RNA の両方が含まれる。本発明に使用するポリヌクレオチドには、具体的には下記の (a) ～ (e) からなる群より選択されるものが挙げられる。

- (a) 配列番号：1 で表される塩基配列からなる、ポリヌクレオチド；
- (b) 「配列番号：2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；
- (c) 「配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポ

リヌクレオチド；

(d)「配列番号：2で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチド；および

(e)「配列番号：1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードする、ポリヌクレオチドに関する。

本発明の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列の1または複数個（好ましくは1または数個）の箇所において、1または複数個（好ましくは1または数個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、しかも、前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。ここで、欠失、置換、挿入および／または付加されてもよいアミノ酸の数は、例えば1～30個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1～2個である。

本発明の別の一つの態様によれば、本発明に使用するポリヌクレオチドは、「配列番号1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、しかも、前記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素と実質的に同じ活性を有するポリペプチド」をコードしてなるものである。

ここで、ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとは、具体的には、FASTA、BLAST、Smith-Waterman [Meth. Enzym., 164, 765 (1998)]等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルト（初期設定）のパラメーターを用いて計算したときに、配列番号：1で表される塩基配列と少なくとも70%以

上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上、そして最も好ましくは99%以上の相同性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

また、「ストリンジェントな条件下」とは、当業者が通常使用し得るハイブリダイゼーション緩衝液中で、温度が40～70℃、好ましくは60～65℃などで反応を行い、塩濃度が15～300 mmol/L、好ましくは15～60 mmol/Lなどの洗浄液中で洗浄する方法に従って行なうことができる。温度、塩濃度は使用するプローブの長さに応じて適宜調整することが可能である。

本発明に使用するポリヌクレオチドは、たとえば、天然由来のものであることもできるし、または全合成したものであることもできる。さらには、天然由来のものの一部を利用して合成を行なったものであることもできる。本発明に使用するポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、たとえば、市販のライブラリーまたは cDNA ライブラリーから、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列（例えば配列番号：2で表されるアミノ酸配列）の情報を基にして作成した適当な DNA プローブを用いてスクリーニングを行う方法などを挙げることができる。

本発明に使用するポリヌクレオチドとしては、配列番号：1で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドが好ましい。

前記形質転換に使用されるプラスミドは、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、当該ポリヌクレオチドを挿入することにより得られるプラスミドを挙げることができる。

また、前記形質転換体も、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、たとえば当該ポリヌクレオチドが宿主細胞の染色体に組み込まれた形質転換体であることもできるし、あるいは、当該ポリヌクレオチドを含むプラスミドの形で含有する形質転換体であるこ

ともできるし、あるいは、細胞質リンゴ酸脱水素酵素を発現していない形質転換体であることもできる。当該形質転換体は、たとえば前記プラスミドにより、あるいは、前記ポリヌクレオチドそれ自体により、所望の宿主細胞を形質転換することにより得ることができる。

- 5 前記宿主細胞としては、たとえば通常使用される公知の微生物、たとえば大腸菌（たとえば、*Escherichia coli* JM109E 株）または酵母（たとえば、*Saccharomyces cerevisiae* W303 株）、あるいは、公知の培養細胞、たとえば動物細胞（たとえばCHO 細胞、HEK-293 細胞、またはCOS 細胞）または昆虫細胞（たとえば、BmN4 細胞）などを挙げることもできる。
- 10 また、公知の前記発現ベクターとしては、たとえば大腸菌に対しては、pUC、pTV、pGEX、pKK、またはpTrcHisを；酵母に対しては、pEMBLYまたはpYES2を；CHO 細胞、HEK-293 細胞およびCOS 細胞に対しては、pcDNA3、pMAMneoまたはpBabe Puroを；BmN4 細胞に対しては、カイコ核多角体ウイルス（BmNPV）のポリヘドリンプロモーターを有するベクター（たとえば、
- 15 pBK283）を挙げることもできる。

- 細胞質リンゴ酸脱水素酵素を含有する細胞は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素を発現している限り、特に限定されるものではなく、たとえば前記形質転換体（すなわち、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドで形質転換された細胞）を、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の発現が可能な条件下
- 20 で培養することにより得ることもできるし、あるいは、適当な細胞に、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードするRNAを注入し、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の発現が可能な条件下で培養することにより得ることもできる。

- 前記の発現タンパク質（細胞質リンゴ酸脱水素酵素）の分離および精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から所望のポリペプチドを分離および精
- 25 製することにより調製することができる。前記の分離および精製方法としては、たとえば硫酸塩析、イオン交換セルロースを用いるイオン交換カラムクロマトグ

ラフィー、分子篩ゲルを用いる分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインA結合多糖類を用いる親和性カラムクロマトグラフィー、透析、または凍結乾燥等を挙げることができる。

また、本発明の好ましい態様として、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする
5 cDNA を導入したバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞を培養することにより、該細胞でリコンビナント細胞質リンゴ酸脱水素酵素を大量発現させて、単離・精製し、酵素阻害のスクリーニング法に用いることができる。

次いで、所定の濃度の Tris-HCl (pH 7.4)－NaCl あるいは HEPES－KOH (pH 6.8)－牛血清アルブミン等の反応バッファーに、前記リコンビナントタンパク質
10 を加え、被検化合物を添加し、所望の時間インキュベーションしたのち、所定の濃度の NADH およびオキザロ酢酸を添加する。その後、酵素活性の指標としての NADH または NAD の量を、HPLC にて測定し、酵素活性の阻害の程度を評価する。

本発明によるスクリーニング方法では、特に NADH または NAD の量が、100
15 ～ 1000 nM、より好ましくは、200 ～ 800 nM、さらに好ましくは、300 ～ 600 nM という低濃度で測定できる。

本発明に用いられるスクリーニング用キットは、高感度な前記スクリーニング方法を行うためのキットであって、細胞質リンゴ酸脱水素酵素、バッファー等の試薬類を含む。そして、本発明によるスクリーニング用キットは、前記酵素の活
20 性の阻害の程度を検出するための HPLC にて測定を行う。本発明では、かかる HPLC を利用することにより、nM レベルの NADH 濃度での検出を可能とするスクリーニング系が構築される。

本発明に係るスクリーニング方法が対象とする癌には、以下のものに限定されるわけではないが、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、
25 胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌また血液腫瘍等が挙げられる。

本発明の抗癌作用を有する化合物、すなわち、前記一般式（I）で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス核酸、前記リボザイムもしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させるベクターあるいはそれらの薬理学的に許容される塩を、有効成分として含む細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を提供する。前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤は、適宜、賦形剤、希釈剤等と混合し、たとえば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤もしくはシロップ剤等による、経口的または注射剤もしくは坐剤による非経口的に投与することもできる。

- 10 また、本発明は、抗癌作用を有する化合物、すなわち、前記一般式（I）で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくはその二本鎖 RNA を発現させるベクターまたはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を、患者に投与する工程を含む、
- 15 細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法を提供する。

さらに、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、抗癌作用を有する化合物、すなわち、前記一般式（I）で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理学的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくはその二本鎖 RNA を発現させるベクターまたはそれらの薬理学的に許容される塩の使用を提供する。かかる化合物、アンチセンス核酸、リボザイム、二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターは、前記したように、合成、作製することができる。

- 25 本発明に係る細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤、または細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法は、ヒトまたはヒト以外の哺乳類（たとえば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル等）の癌疾患、特に、ヒトの癌疾患の予

防および/または治療に有用である。

本発明が対象とする癌には、特に限定されるわけではないが、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌また血液腫

5 瘍等が挙げられる。

本発明の別の態様では、本発明の細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する化合物、すなわち、前記一般式 (I) で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくは
10 その二本鎖 RNA を発現させるベクターまたはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含む、癌の予防および/または治療用組成物を提供する。癌の予防および/または治療用組成物として使用する場合、前記化合物もしくはその薬理的に許容される塩、または前記組成物は、適宜、賦形剤、希釈剤等と混合し、たとえば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤もしくはシロップ剤等による経
15 口的または注射剤もしくは坐剤による非経口的に投与することもできる。

また、本発明は、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害を有する化合物、すなわち、前記一般式 (I) で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくはその二本鎖 RNA
20 を発現させるベクターまたはそれらの薬理的に許容される塩の有効量を投与する工程を含む、癌の予防および/または治療方法を提供する。

さらに、本発明は、癌の予防および/または治療用組成物を製造するために、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する化合物、すなわち、前記一般式 (I) で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理的に許容される塩、あるいは、前記アンチセンス
25 核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくはその二本鎖 RNA を発現させ

るベクターまたはそれらの薬理学的に許容される塩の使用を提供する。かかる化合物、アンチセンス核酸、リボザイム、もしくは二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターは、前記したように、合成、作製することができる。

- 5 本発明に係る癌の予防および/または治療用組成物、癌の予防および/または治療方法は、ヒトまたはヒト以外の哺乳類（たとえば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル等）の癌疾患、特に、ヒトの癌疾患の予防および/または治療に有用である。

- 本発明が対象とする癌には、特に限定されるわけではないが、膵臓癌、胃癌、
10 肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌また血液腫瘍等が挙げられる。

- 投与量は、投与対象、投与ルート、年齢、体重等の条件により適宜定められるが、経口投与の場合、成人一日あたり、0.01 mg ~ 1000 mg、好ましくは 0.1 mg
15 ~ 1000 mg、より好ましくは、0.1 mg ~ 100 mg を、静脈内投与の場合、成人一日あたり、0.01 mg ~ 500 mg、好ましくは 0.1 mg ~ 500 mg、より好ましくは 0.1 mg ~ 100 mg を、症状に応じて、一日あたり 1 ないし 5 回に分けて投与することができる。

- 前記製剤は、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤
20 等の添加剤を用いて周知の方法で製造できる。

- 賦形剤の具体例としては、乳糖、白糖、ぶどう糖、トウモロコシ澱粉、馬鈴薯澱粉、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム、デキストリン；プルランのような有機系賦形剤：
および、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アル
25 ミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；リン酸水素カルシウムのようなリン酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系

賦形剤等を挙げることができる。

滑沢剤の具体例としては、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイダルシリカ；ビーガム、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；脂肪酸ナトリウム塩；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；および上記澱粉誘導体を挙げることができる。

結合剤の具体例としては、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、および前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。

崩壊剤の具体例としては、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾された澱粉、セルロース類等を挙げることができる。

安定剤の具体例としては、メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；およびソルビン酸等を挙げることができる。

矯味矯臭剤の具体例としては、通例、製剤に使用される甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。

また、本発明による抗癌作用を有する、前記式（I）で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容な塩を細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤として使用する場合には、さらには、本発明による

前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、前記二本鎖 RNA もしくはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターまたはそれらの薬理的に許容される塩を、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤として使用する場合、他の抗癌剤と組み合わせることもできる。他の抗癌剤としては、以下のものに限定されるわけではないが、

- 5 塩酸イリノテカン、マイトマイシン C、5-フルオロウラシルおよびそのプロドラッグ、シスプラチン、塩酸ゲムシタビン、ドキソルビシン、タキソール等を挙げることができる。

- なお、本発明による抗癌作用を有する化合物またはその薬理的に許容される塩や、本発明による前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、もしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターあるいはそれらの薬理的に許容される塩を、他の抗癌剤と組み合わせて併用する場合、同時に投与することも、順次に投与することもできる。同時に投与する場合には、単一の組成物中に、本発明による細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する化合物またはその薬理的に許容な塩、または前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、もしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターあるいはそれらの薬理的に許容される塩と、前記他の抗癌剤が含まれていてもよい。
- 10
- 15

- また、本発明による細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する、前記一般式 (I) で表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体である化合物またはそれらの薬理的に許容される塩を、癌の予防および/または治療用組成物として使用する場合、さらには、本発明による前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、もしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベクターあるいはそれらの薬理的に許容される塩を、癌の予防および/または治療用組成物として使用する場合、他の抗癌剤と組み合わせることもである。他の抗癌剤としては、以下のものに限定されるわけではないが、塩酸イリノ
- 20
- 25
- テカン、マイトマイシン C、5-フルオロウラシルおよびそのプロドラッグ、シスプラチン、塩酸ゲムシタビン、ドキソルビシン、タキソール等を挙げることが

できる。

- なお、本発明による細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する化合物またはその薬理的に許容される塩や、本発明による前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、もしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発現させる発現ベ
- 5 クターあるいはそれらの薬理的に許容される塩を、他の抗癌剤と組み合わせて併用する場合、同時に投与することも、順次に投与することもできる。同時に投与する場合には、単一の組成物中に、本発明による細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害作用を有する化合物またはその薬理的に許容な塩、または前記アンチセンス核酸、前記リボザイム、もしくは前記二本鎖 RNA またはその二本鎖 RNA を発
- 10 現させる発現ベクターあるいはそれらの薬理的に許容される塩と、前記他の抗癌剤が含まれていてもよい。

[実施例 1]

- 以下に、本発明の有利な効果を示すため、実施例、参考例を示すが、これらは
- 15 例示的なものであつて、本発明はいかなる場合にも、以下の具体例に制限されるものではない。当業者は、以下に示す実施例に記載の条件を適宜変更して本発明を実施することができ、かかる変更は本願特許請求の範囲に包含される。

- 本発明に利用される抗腫瘍物質の細胞質リンゴ酸脱水素酵素の酵素活性に対する阻害効果について、以下に示すような実験を行った。すなわち、まず、細胞質
- 20 リンゴ酸脱水素酵素活性に対する評価系としてのスクリーニング法の確立し、次いで、かかるスクリーニング法を利用して、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害剤の評価を行った。

(実験材料)

- 25 (1) 細胞質リンゴ酸脱水素酵素 [cytosolic malate dehydrogenase, NAD (soluble) /malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)/MDH1, NAD (soluble)/L-malate: NAD

oxidoreductase, cytosolic (soluble)/EC number: EC 1.1.1.37]

定法に従い (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press)、配列番号: 1 に示す細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) 遺伝子 (cDNA) をクローニングし、本酵素のN末端を
5 His-tag で標識した融合タンパク質をバキュロウィルスシステム (BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expression Systems, Instruction Manual, INVITROGEN) を用いて発現させた。精製は Ni-NTA resin (Ni-NTA Super Flow, QIAGEN) を用いて行い、その後、酵素阻害実験に供した。

(2) E7070 [N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンゼンスルホンアミド]
10

文献記載の方法により合成した (Owa T. *et al. J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3789-3799)。

(3) ER-203805 [N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンズアミド]

文献記載の方法により合成した (Owa T. *et al. J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4913-4922)。

15 (4) Gossypol、NADH、オキザロ酢酸、牛血清アルブミン

全て SIGMA より購入した。カタログ番号はそれぞれ、G8761、N8129、O4126、A0281 である。

(実験条件)

20 (1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の測定条件

[カラム] YMC ODS-AQ 内径 4.6 x 長さ 150 mm, S-5 (粒子径 5 μm), カタログ番号 AQ-302 (W), YMC 社製 (京都市)

[移動相] A 液 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液、B 液 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液/アセトニトリル(1/1, v/v)

25 [移動相の時間プログラム]

0 分 A 液 100%, B 液 0%

1 分 A 液 100%, B 液 0%

11 分 A 液 70%, B 液 30%

12 分 A 液 0%, B 液 100%

13 分 A 液 0%, B 液 100%

5 13.1 分 A 液 100%, B 液 0%

20 分 終了

[流速] 毎分 1 mL

[検出] UV 254 nm および 338 nm (二波長同時計測)

[温度] 室温 (20~25℃)

10 (2) 試料と反応条件

10 μ M の被験化合物を含む反応バッファ (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)–0.15 M NaCl あるいは 0.1 M HEPES–KOH (pH 6.8)–1%牛血清アルブミン) の 1mL 中に、上記の細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) リコンビナントタンパク質 20 pmole を加え、10 分から 5 時間室温でプレインキュベーションした。そこに 500
15 nM (final concentration) の NADH と 5 μ M (final concentration) のオキザロ酢酸を加えてさらに 10 分間室温でインキュベーションを続けた。そして、その反応液のうち 200 μ l を上記 HPLC システムに注入し、補酵素である NADH が NAD に変換される量を測定した。

(3) 254 nm で検出した場合のクロマトグラムを図 1 に示す (試験化合物なし
20 の場合)。約 7.3 分付近に溶出するピークが NAD、約 8 分付近に溶出するピークが NADH である。

一方、約 2 ~ 3 分にかけて溶出しているなだらかなピークがオキザロ酢酸で、3 ~ 4 分に溶出しているピークが還元生成物のリンゴ酸に相当するが、夾雑物の影響やピーク形状が悪いため、これらは定量性に乏しい。

25 (4) 338 nm で検出したときのクロマトグラムを図 2 に示す (試験化合物なしの場合)。

本測定は上記と同時に行っている。この波長では NADH のピークのみが特異的に観測される（約 8 分付近）。

（3）および（4）より、254 nm、338 nm のいずれの検出波長においても NADH が検出されていることが分った。よって、以後のクロマトグラムとして

5 は 254 nm にて検出したものを示す。

実験結果

（参考例）

Gossypol の細胞質リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）活性への影響

細胞質リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）を含め、広範な脱水素酵素の活性を
10 阻害することが報告されている gossypol に関して（Burgos C. *et al*, *Biochem. Pharmacol.*, **1986**, 35, 801-804）、我々の調製した上記リコンビナントタンパク質の酵素活性に与える影響を調べた。10 mM Tris-HCl(pH 7.4)–0.15M NaCl 中で本酵素タンパク質と gossypol (10 μ M) をあらかじめ 10 分間室温でインキュベーションし、その後 500 nM NADH–5 μ M オキザロ酢酸を加えてさらに 10 分後に酵
15 素活性を測定した。その結果を図 3 に示す。gossypol 存在下では NAD のピークが僅かしか認めらず、gossypol による酵素活性の阻害が観察された。この結果により、我々の用いている評価系の妥当性（上記文献との一致）が示された。

（実施例）

E7070 および ER-203805 の細胞質リンゴ酸脱水素酵素（EC 1.1.1.37）活性への

20 影響

上記リコンビナントタンパク質を、0.1M HEPES–KOH (pH 6.8)–1%牛血清アルブミン溶液中で E7070 (10 μ M) あるいは ER-203805 (10 μ M) とあらかじめ 5 時間室温でインキュベーションした。その後 500 nM NADH–5 μ M オキザロ酢酸を加えてさらに 10 分後に酵素活性を測定した。E7070 およびの ER-203805 結果を
25 それぞれ図 4 および図 5 に示す。

上記と同様にして、下記の化合物について本酵素活性への影響を調べた。各化合物は、特開平7-165708号に従って合成した。活性の評価に際しては、クロマトグラムのパターン（NAD/NADH の比）から、E7070 の阻害活性を1とした時の各化合物の比活性を算出した。結果を図6に示す。

5

化合物1：特開平7-165708号の実施例62

N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-[2-(メタンスルホンアミド)エチル]ベンゼンスルホンアミド

化合物2：特開平7-165708号の実施例32

10 4-アミノ-N-(3-クロロ-4-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド

化合物3：特開平7-165708号の実施例37

6-アミノ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-3-ピリジンスルホンアミド

15 化合物4：特開平7-165708号の実施例45

3-クロロ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-2-メチルベンゼンスルホンアミド

化合物5：特開平7-165708号の実施例28

20 4-シアノ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド

化合物6：特開平7-165708号の実施例35

N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-(2-スルファモイルエチル)ベンゼンスルホンアミド

化合物7：特開平7-165708号の実施例60

25 N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-5-メチル-3-ピリジンスルホンアミド

化合物8：特開平7-165708号の実施例65

5-ブromo-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-2-ピリジン
スルホンアミド

化合物9：特開平7-165708号の実施例68

5 4-アミノ-N-(5-ブromo-3-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベン
ゼンスルホンアミド

化合物10：特開平7-165708号の実施例79

N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-(N-メチルアセトア
ミド)ベンゼンスルホンアミド

10

以上の実験結果より、強い抗腫瘍活性を有する化合物である E7070 とその類
縁化合物が細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.37) の阻害剤であることが示
された。一方、E7070 と構造類似であるものの有意な抗腫瘍活性を示さない ER-
203805 においては、本酵素の阻害活性が認められなかった。さらに、10 μ M の
15 NADH を用いて同様に実験を行った場合、本酵素に対する有意な阻害活性が
E7070 とその類縁化合物に認められなかったことから、これらの化合物の酵素阻
害様式が NAD/NADH 競合的だと考えられた。

[実施例2]

20 細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (cytosolic malate dehydrogenase, cMDH) 遺伝子に
対する RNA 干渉法 (RNA interference, RNAi) の実施例

(1) RNAi の作製

配列番号：1 で記される細胞質リンゴ酸脱水素酵素 (cMDH) の塩基配列
(cDNA) に、図7に示す5つの配列を、short interfering RNA (siRNA) のター
25 ゲット配列として選定した。

次いで、細胞内で上記配列を標的とする siRNA に変換される short hairpin RNA

(shRNA) を発現するようなプラスミドを、RNA polymerase III 系プロモーターに属する U6 プロモーターを含んで作製した。なお、プラスミドの配列を、配列番号：8 で表し、配列番号：8 中の…nnn…は、認識配列とループ配列を表し、配列番号：9～13 で記載される配列を有するものを、実際に作製した。

- 5 図8は、本発明による RNAi に利用する、shRNA の配列を示す。図8に示配列を有するプラスミドについて、RNAi による細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子発現阻害の効果を評価した。

- 具体的には、12-ウェルマイクロプレートに、HCT116-C9 ヒト大腸癌細胞を播き込み、約50%の細胞密度に達した時点で、図8に掲載するプラスミド
- 10 1.6 µg に対して、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen 社製) 4.0 µl を用いてトランスフェクションを行った。48 時間後、Rneasy 96 kit (Qiagen 社製) を用いて、全 RNA を回収し、QuantiTect SYBR Green RT-PCR System (Quiagen 社製) により、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の mRNA (以下、「cMDH mRNA」という。) の発現レベルを定量した。定量のためのコントロールには、細胞内にルシフェラーゼ遺
- 15 伝子に対する siRNA へと変換される shRNA を発現するプラスミド (hU6-Luc.) を導入したものを採用した。そして、図8に示すプラスミドのトランスフェクションによる cMDH mRNA 発現の割合を、コントロールに対して補正し、算出した。

- 図9には、本発明に使用した各種プラスミドの RNAi 効果を、コントロールに
- 20 対する cMDH mRNA の発現レベルの割合として示す。図9に示す結果から、hu6-3F4 プラスミドのトランスフェクションにより、コントロールの約10%まで、cMDH mRNA の発現が抑制された。

以上の結果から、cMDH に対する RNAi 効果の最も強かった hU6-3F4 プラスミドを用いてトランスフェクションを行い、癌細胞の増殖への影響を調べた。

- 25 コントロールには、癌細胞に、hU6-Luc. プラスミドを導入したものを利用し、このコントロールの細胞数を基準に、癌細胞の増殖を評価した。

40

本実験では、ヒト白血病細胞 MOLT-4 を、24-ウェルマイクロプレートに、 3.0×10^4 細胞数/ウェルの割合で巻き込み、プラスミド 800 ng に対して、FuGENE 6 (ロッシュ社製) 2.0 μ l を用いてトランスフェクションを行った。初回のトランスフェクション以降、72 時間毎に、回収・播き込み (3.0×10^4 細胞数
5 /ウェル) とトランスフェクションを繰り返す操作を 3 度行い、4 回目のトランスフェクションから 72 時間後に生細胞の数をカウントした。その結果、hU6-3F4 プラスミドで処理された MOLT-4 細胞は、hU6-Luc. プラスミドで処理されたコントロールに比して、56% の細胞数であった。つまり、癌細胞の増殖抑制率は 44% であった。

- 10 以上のことから、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現が、*in vitro* で、RNA 干渉法により阻害され、もって癌細胞の増殖が抑制されることが判明した。

産業上の利用可能性

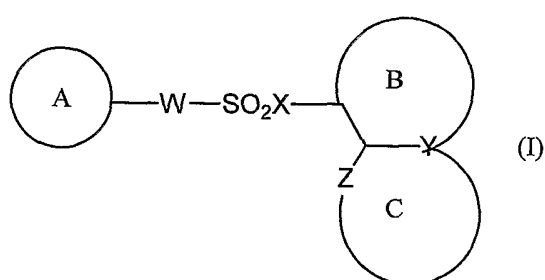
- 15 本発明によれば、抗癌作用を有する化合物を有効成分として含む、脱水素酵素活性を阻害剤が提供される。具体的には、本発明では、強い抗癌活性を示す N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンゼンスルホンアミド (E7070) に代表されるスルホンアミド誘導体もしくはスルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩が細胞質リンゴ酸脱水素
20 酵素の阻害剤を開示する。

また、本発明によれば、RNAi による、細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する shRNA が開示され、かかる shRNA が、*in vivo* で、癌細胞の増殖抑制を示し、癌細胞への新たな予防および/または治療方法が提供される。

請求の範囲

1. 抗癌作用を有する化合物を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤。

5 2. 下記式 (I)



(式中、A環は、置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を示し、

B環は、置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を示し、

10 C環は、置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環を示し、

Wは、単結合または $-CH=CH-$ を示し、

Xは、 $-N(R^1)-$ または酸素原子を示し、

Yは、炭素原子または窒素原子を示し、

15 Zは、 $-N(R^2)-$ または窒素原子を示し、

R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子または $C_1 \sim C_6$ アルキル基を示す。) で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤。

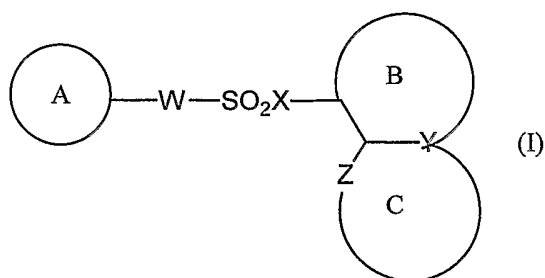
20 3. A環が置換基を有していてもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、B環が置換基を有していてもよいベンゼンであり、C環が置換基を有していてもよいピロールであり、Wが単結合であり、XおよびZがいずれも $-NH-$ である、請求項2に記載の細

胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤。

4. N- (3-クロロ-1H-インドール-7-イル) -4-スルファモイルベンゼンスルホンアミド、N- (3-クロロ-1H-インドール-7-イル) -4-[2-(メタンスルホンアミド)エチル]ベンゼンスルホンアミド、4-アミノ-
- 5 N- (3-クロロ-4-シアノ-1H-インドール-7-イル) ベンゼンスルホンアミド、6-アミノ-N- (3-シアノ-1H-インドール-7-イル) -3-ピリジンスルホンアミド、3-クロロ-N- (3-シアノ-1H-インドール-7-イル) -2-メチルベンゼンスルホンアミド、4-シアノ-N- (3-シアノ-1H-インドール-7-イル) ベンゼンスルホンアミド、N- (3-クロ-
- 10 ロー1H-インドール-7-イル) -4- (2-スルファモイルエチル) ベンゼンスルホンアミド、N- (3-シアノ-1H-インドール-7-イル) -5-メチル-3-ピリジンスルホンアミド、5-ブロモ-N- (3-シアノ-1H-インドール-7-イル) -2-ピリジンスルホンアミド、4-アミノ-N- (5-ブロモ-3-シアノ-1H-インドール-7-イル) ベンゼンスルホンアミド、
- 15 N- (3-クロロ-1H-インドール-7-イル) -4- (N-メチルアセトアミド) ベンゼンスルホンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の化合物またはその薬理学的な塩を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤。

5. 抗癌作用を有する化合物の有効量を患者に投与する工程を含む、細胞質リン
- 20 ゴ酸脱水素酵素の阻害方法。

6. 下記式 (I)



(式中、A環は、置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を示し、
B環は、置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を示し、

5 C環は、置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環を示し、

Wは、単結合または $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示し、

Xは、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ または酸素原子を示し、

Yは、炭素原子または窒素原子を示し、

10 Zは、 $-\text{N}(\text{R}^2)-$ または窒素原子を示し、

R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子または $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基を示す。) で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を患者に投与する工程を含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法。

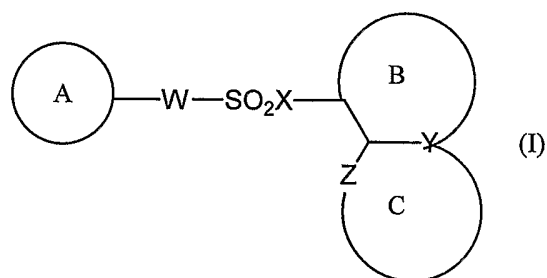
15 7. A環が置換基を有してもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、B環が置換基を有してもよいベンゼンであり、C環が置換基を有してもよいピロールであり、Wが単結合であり、XおよびZがいずれも $-\text{NH}-$ である、請求項6に記載の細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法。

8. $\text{N}-(3\text{-クロロ-1H-インドール-7-イル})-4\text{-スルファモイルベ}$
20 ンゼンスルホンアミド 、 $\text{N}-(3\text{-クロロ-1H-インドール-7-イル})-4\text{-}$
 $2\text{-[2-(メタンスルホンアミド)エチル]ベンゼンスルホンアミド}$ 、 4-アミノ-
 $\text{N}-(3\text{-クロロ-4-シアノ-1H-インドール-7-イル})\text{ベンゼンスルホンアミド}$ 、 $6\text{-アミノ-N}-(3\text{-シアノ-1H-インドール-7-イル})-3\text{-}$
 3-ピリジンスルホンアミド 、 $3\text{-クロロ-N}-(3\text{-シアノ-1H-インドール-7-イル})-2\text{-}$
25 2-メチルベンゼンスルホンアミド 、 $4\text{-シアノ-N}-(3\text{-シアノ-1H-インドール-7-イル})\text{ベンゼンスルホンアミド}$ 、 $\text{N}-(3\text{-クロ}$

ロー 1 H-インドール-7-イル) - 4 - (2-スルファモイルエチル) ベンゼ
 ンスルホンアミド、N- (3-シアノ-1 H-インドール-7-イル) - 5-メ
 チル-3-ピリジンスルホンアミド、5-ブromo-N- (3-シアノ-1 H-イ
 ンドール-7-イル) - 2-ピリジンスルホンアミド、4-アミノ-N- (5-
 5 ブromo-3-シアノ-1 H-インドール-7-イル) ベンゼンスルホンアミド、
 N- (3-クロロ-1 H-インドール-7-イル) - 4 - (N-メチルアセトア
 ミド) ベンゼンスルホンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の化合
 物またはその薬理学的な塩の有効量を、患者に投与する工程を含む、細胞質リン
 ゴ酸脱水素酵素の阻害方法。

10 9. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、抗癌作用を有する化合
 物の使用。

10. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、
 下記式 (I)



15

(式中、A環は、置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を示し、
 B環は、置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原
 子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を示し、

C環は、置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ
 20 環を示し、

Wは、単結合または-CH=CH-を示し、

Xは、-N (R¹) -または酸素原子を示し、

Yは、炭素原子または窒素原子を示し、

Zは、 $-N(R^2)-$ または窒素原子を示し、

R¹ および R² は、同一または異なって水素原子または C₁ ~ C₆ アルキル基を示す。) で表されるスルホンアミド誘導体、スルホン酸エステル誘導体またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

11. A環が置換基を有してもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、B環が置換基を有してもよいベンゼンであり、C環が置換基を有してもよいピロールであり、Wが単結合であり、XおよびZがいずれも $-NH-$ である、請求項10に記載の使用。

- 10 12. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、
N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンゼン
スルホンアミド、N-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-[2-(メタン
スルホンアミド)エチル]ベンゼンスルホンアミド、4-アミノ-N-
-(3-クロロ-4-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホン
15 アミド、6-アミノ-N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-3-
ピリジンスルホンアミド、3-クロロ-N-(3-シアノ-1H-インドール-
7-イル)-2-メチルベンゼンスルホンアミド、4-シアノ-N-(3-シア
ノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド、N-(3-クロ
ロ-1H-インドール-7-イル)-4-(2-スルファモイルエチル)ベンゼン
20 スルホンアミド、N-(3-シアノ-1H-インドール-7-イル)-5-メチ
ル-3-ピリジンスルホンアミド、5-ブromo-N-(3-シアノ-1H-イン
ドール-7-イル)-2-ピリジンスルホンアミド、4-アミノ-N-(5-ブ
ロモ-3-シアノ-1H-インドール-7-イル)ベンゼンスルホンアミド、N-
-(3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-4-(N-メチルアセトアミ
25 ド)ベンゼンスルホンアミドからなる群から選択される少なくとも1種の化合物
またはその薬理学的な塩の使用。

13. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する、アンチセンス核酸またはリボザイム。

14. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素をコードする遺伝子の発現を阻害する、二本鎖 RNA。

5 15. 18～30の塩基長をする二本鎖 RNA または二本鎖 RNA-DNA キメラ分子である、請求項14に記載の二本鎖 RNA。

16. 請求項14または15に記載の二本鎖 RNA を発現させる発現ベクター。

17. 請求項13に記載のアンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理的に許容な塩を有効成分として含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤。
10

18. 請求項13に記載のアンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理的に許容な塩を有効成分として含む、癌の予防および/または治療用組成物。
15

19. 前記癌が、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍である、請求項18に記載の組成物。

20. 請求項13に記載のアンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理的に許容な塩の有効量を、患者に投与する工程を含む、細胞質リンゴ酸脱水素酵素の阻害方法。

21. 請求項13に記載のアンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理的に許容な塩の有効量を、患者に投与する工程を含む、癌の予防および/または治療方法。
25

47

22. 前記癌が、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍である、請求項21に記載の方法。

23. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤を製造するための、請求項13に記載の
5 アンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩の使用。

24. 癌の予防および/または治療用組成物を製造するための、請求項13に記載のアンチセンス核酸もしくはリボザイム、請求項14もしくは15に記載の二
10 本鎖 RNA、請求項16に記載の発現ベクター、またはそれらの薬理学的に許容な塩の使用。

25. 前記癌が、膵臓癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、大腸癌、腎癌、乳癌、食道癌、胆道癌、脾臓癌、前立腺癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌または血液腫瘍である、請求項24に記載の使用。

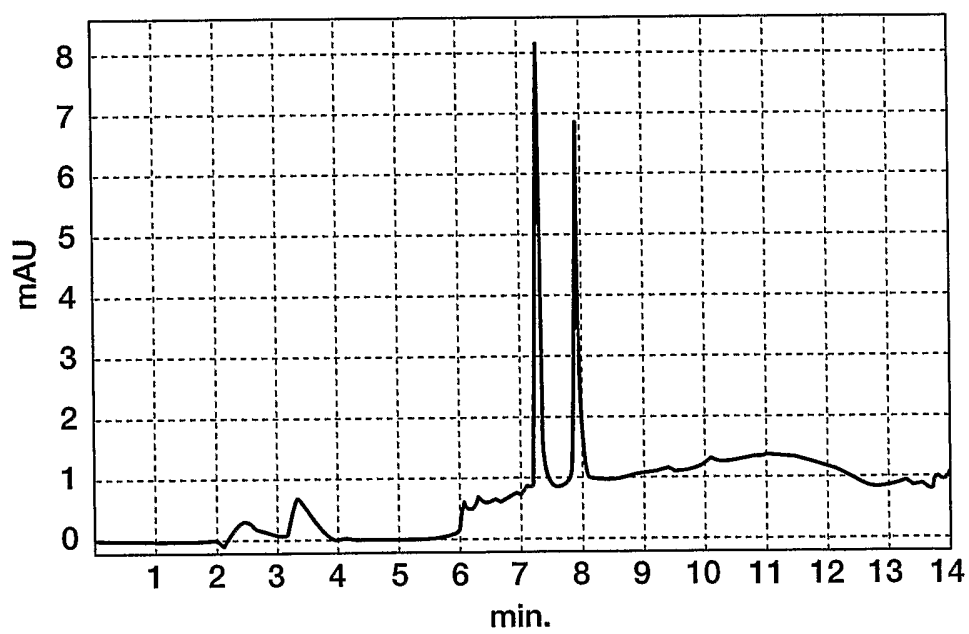
15 26. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素を準備する工程と、
被検化合物と前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素とを接触させる工程と、
前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素により変換される NADH または NAD の量を
検出することにより、前記細胞質脱水素酵素の活性阻害の程度を測定する工程と、
含む抗癌剤のスクリーニング方法であって、

20 前記 NADH または NAD の濃度が、100 ~ 1000 nM である、スクリーニング方法。

27. 細胞質リンゴ酸脱水素酵素を含む抗癌剤のスクリーニング用キットであって、前記細胞質リンゴ酸脱水素酵素により変換される NADH または NAD の濃度を、100 ~ 1000 nM の範囲で検出可能とするスクリーニング用キット。

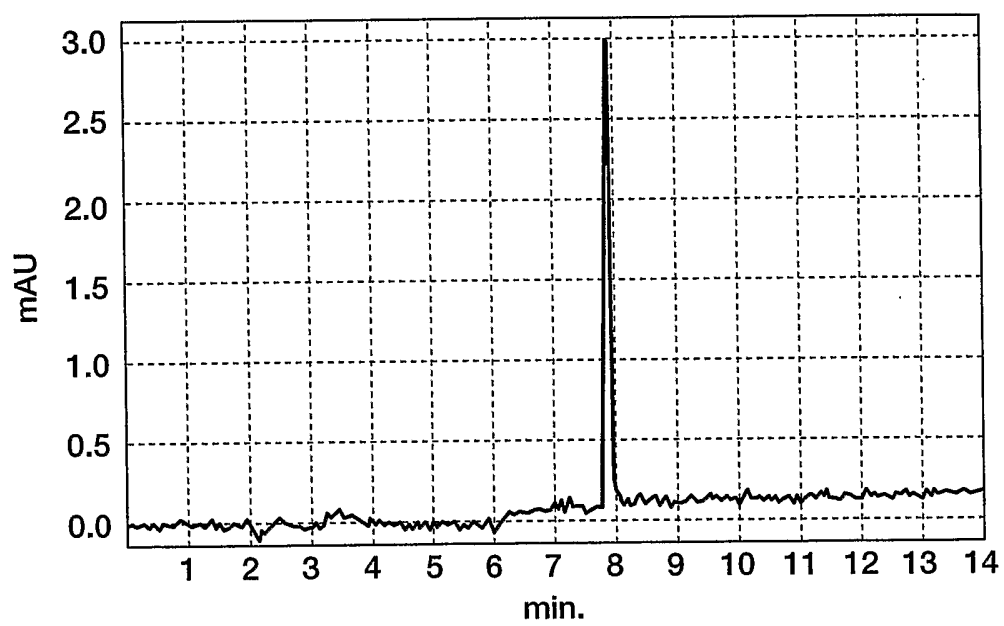
1/9

図1



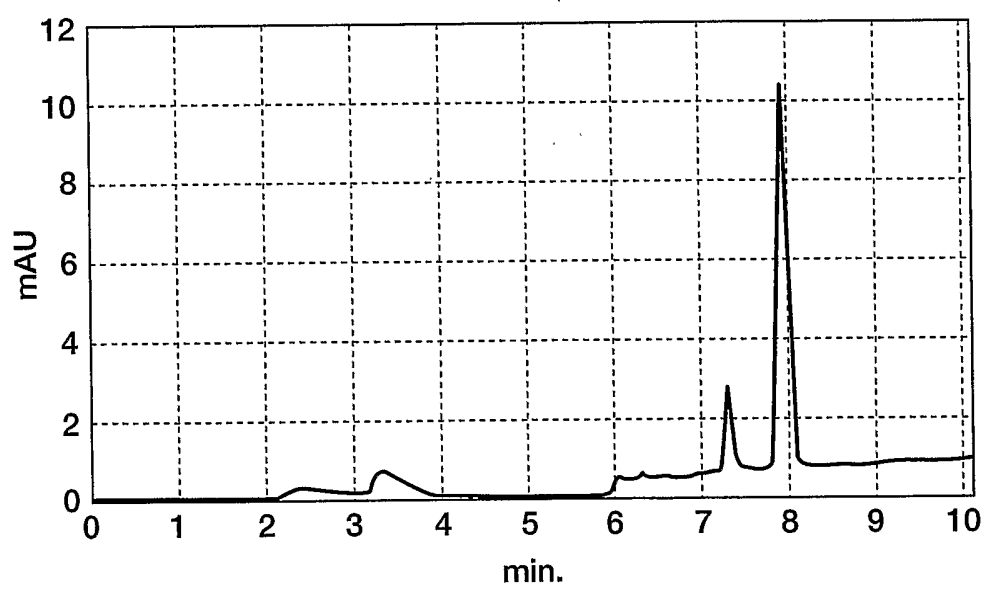
2/9

図2



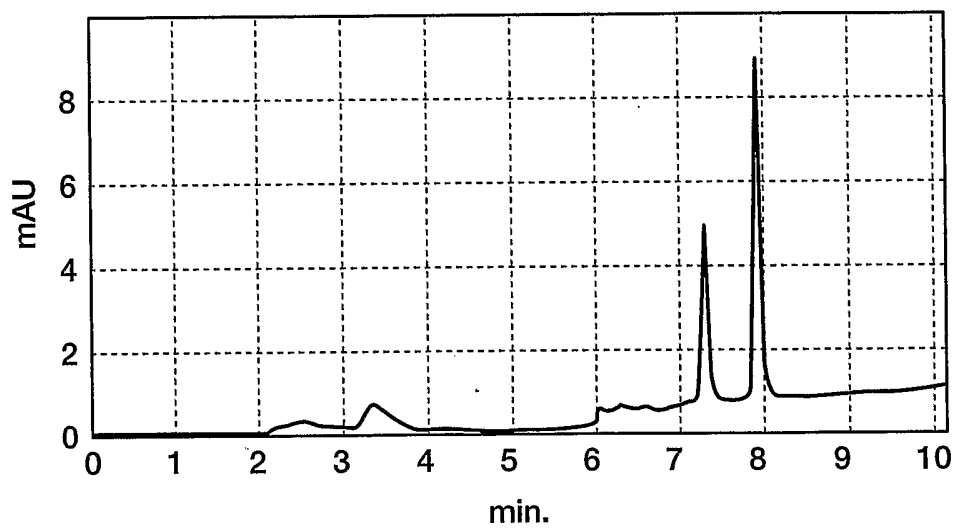
3/9

図3



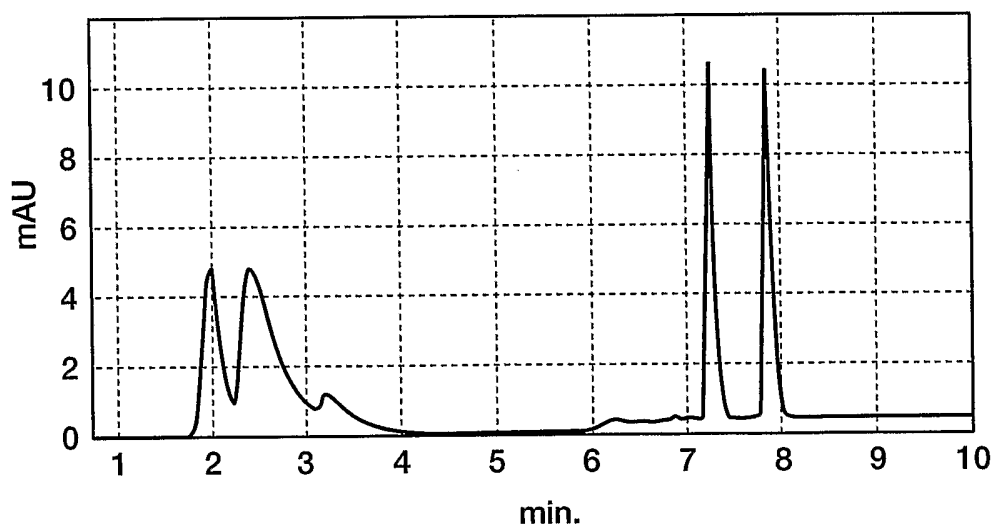
4/9

図4



5/9

図5



6/9

図6

化合物番号	比活性
E7070	1.00
1	0.94
2	1.02
3	1.08
4	0.71
5	0.95
6	0.94
7	1.05
8	0.89
9	0.85
10	1.10

7/9

図7

クローン番号	配列
2A9	CTCTGATGGCAACTCCTATGGTGTT
2C2	TCAGGGACATCTGGTTTGGAACCCCAG
2C8	ACAACCGAGCTAAAGCTCAAATTGC
3D5	TGGATCTTACTGCAAAGGAACTGAC
3F4	CAAGGAAAGGAAGTTGGTGTTTATG

図8

プラスミド番号	配列
hU6-2A9	CTCTGATGGCAACTCCTATATGGTGT GAAAA AACACCATAGGAGTTGCCATCAGAG (配列番号:9)
hU6-2C2	CTGGGGTTCCAAACCAGATGTCCCTGA GAAAA TCAGGGACATCTGTGTTTGGAAACCCAG (配列番号:10)
hU6-2C8	GCAATTTGAGCTTTAGCTCGGTTGT GAAAA ACAACCGAGCTAAAGCTCAAAATTGC (配列番号:11)
hU6-3D5	GTCAGTTCCCTTTCAGTAAGATCCA GAAAA TGGATCTTACTGCAAGGAACTGAC (配列番号:12)
hU6-3F4	CATAACACCAACTTCCTTTCCTTG GAAAA CAAGGAAAGGAAGTTGGTGTTTATG (配列番号:13)

9/9

図9

プラスミド番号	cMDH mRNAの発現 (コントロールに対する割合)
hU6-2A9	20.7
hU6-2C2	15.1
hU6-2C8	15.5
hU6-3D5	14.3
hU6-3F4	11.0

1 / 1

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> CYTOSOLIC MALATE DEHYDROGENASE INHIBITOR

<130> E0006 SF01W

<150> US 60/463,728

<151> 2003-04-18

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1267

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (56)..(1267)

<223> open reading frame coding cytosolic malate dehydrogenase, cMDH

<400> 1

tgactctctg aggcctcattt tgcagttgtt gaaattgtcc cgcagtttt caatcatgtc 60

tgaaccaatc agagtccctg tgactggagc agctgggtcaa attgcatatt cactgctgta 120

cagtattgga aatggatctg tctttggtaa agatcagcct ataattcttg tgctgttgga 180

tatcaccccc atgatgggtg tcttggaagg tgcctaatg gaactgcaag actgtgcct 240

tcccctcctg aaagatgtca tcgcaacaga taaagaagac gttgccttca aagacctgga 300

2 / 11

tgtggccatt cttgtgggct ccatgccaag aaggggaaggc atggagagaa aagatttact 360
 gaaagcaaatt gtgaaaatct tcaaatccca ggggtgcagcc ttagataaat acgccaagaa 420
 gtcagttaag gttattgttg tgggtaatcc agccaatacc aactgcctga ctgcttccaa 480
 gtcagctcca tccatcccca aggagaactt cagttgcttg actcgtttgg atcacaaccg 540
 agctaaagct caaatgtctc ttaaacttgg tgtgactgct aatgatgtaa agaatgtcat 600
 tatctgggga aaccattcct cgactcagta tccagatgtc aaccatgcca aggtgaaatt 660
 gcaaggaaag gaagttgggt tttatgaagc tctgaaagat gacagctggc tcaagggaga 720
 atttgtcagc actgtgcagc agcgtggcgc tgctgtcatc aaggctcgaa aactatccag 780
 tgccatgtct gctgcaaaag ccactctgtga ccacgtcagg gacatctggt ttggaacccc 840
 agagggagag tttgtgtcca tgggtgttat ctctgatggc aactcctatg gtgttccctga 900
 tgatctgtct tactcattcc ctgttgtaat caagaataag aactggaagt ttgttgaagg 960
 tctccctatt aatgatttct cactgagaa gatggatctt actgcaaagg aactgacaga 1020
 agaaaaagaa agtgcctttg aatttcttct ctctgcctga ctagacaatg atgttactaa 1080
 atgcttcaaa gctgaagaat ctaaattgtc tctttgactc aagtacaaa taataataat 1140
 gctatactta aattacttgt gaaaaacaac acattttaaa gattacgtgc ttcttgggtac 1200
 aggtttgtga atgacagttt atcgtcatgc tgtagtgtg cattctaaat aaatatatat 1260
 tcaaatg 1267

<210> 2

<211> 334

3 / 11

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Ser Glu Pro Ile Arg Val Leu Val Thr Gly Ala Ala Gly Gln Ile
 1 5 10 15

Ala Tyr Ser Leu Leu Tyr Ser Ile Gly Asn Gly Ser Val Phe Gly Lys
 20 25 30

Asp Gln Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Asp Ile Thr Pro Met Met Gly
 35 40 45

Val Leu Asp Gly Val Leu Met Glu Leu Gln Asp Cys Ala Leu Pro Leu
 50 55 60

Leu Lys Asp Val Ile Ala Thr Asp Lys Glu Asp Val Ala Phe Lys Asp
 65 70 75 80

Leu Asp Val Ala Ile Leu Val Gly Ser Met Pro Arg Arg Glu Gly Met
 85 90 95

Glu Arg Lys Asp Leu Leu Lys Ala Asn Val Lys Ile Phe Lys Ser Gln
 100 105 110

Gly Ala Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Lys Lys Ser Val Lys Val Ile Val
 115 120 125

4 / 11

Val Gly Asn Pro Ala Asn Thr Asn Cys Leu Thr Ala Ser Lys Ser Ala
130 135 140

Pro Ser Ile Pro Lys Glu Asn Phe Ser Cys Leu Thr Arg Leu Asp His
145 150 155 160

Asn Arg Ala Lys Ala Gln Ile Ala Leu Lys Leu Gly Val Thr Ala Asn
165 170 175

Asp Val Lys Asn Val Ile Ile Trp Gly Asn His Ser Ser Thr Gln Tyr
180 185 190

Pro Asp Val Asn His Ala Lys Val Lys Leu Gln Gly Lys Glu Val Gly
195 200 205

Val Tyr Glu Ala Leu Lys Asp Asp Ser Trp Leu Lys Gly Glu Phe Val
210 215 220

Thr Thr Val Gln Gln Arg Gly Ala Ala Val Ile Lys Ala Arg Lys Leu
225 230 235 240

Ser Ser Ala Met Ser Ala Ala Lys Ala Ile Cys Asp His Val Arg Asp
245 250 255

Ile Trp Phe Gly Thr Pro Glu Gly Glu Phe Val Ser Met Gly Val Ile
260 265 270

Ser Asp Gly Asn Ser Tyr Gly Val Pro Asp Asp Leu Leu Tyr Ser Phe

5 / 11

275

280

285

Pro Val Val Ile Lys Asn Lys Thr Trp Lys Phe Val Glu Gly Leu Pro
 290 295 300

Ile Asn Asp Phe Ser Arg Glu Lys Met Asp Leu Thr Ala Lys Glu Leu
 305 310 315 320

Thr Glu Glu Lys Glu Ser Ala Phe Glu Phe Leu Ser Ser Ala
 325 330

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> DNA for RNAi

<400> 3

ctctgatggc aactoctatg gtgtt

25

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> DNA for RNAi

<400> 4

tcagggacat ctggtttgga accccag

27

6 / 11

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> DNA for RNAi

<400> 5

acaaccgagc taaagctcaa attgc

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> DNA for RNAi

<400> 6

tggatottac tgcaaaggaa ctgac

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Human

<220>

<223> DNA for RNAi

<400> 7

caaggaaagg aagttggtgt ttatg

25

7 / 11

<210> 8

<211> 2982

<212> DNA

<213> Human for RNAi

<220>

<223> Vector to express siRNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (666)..(720)

<223> n stands for one base sequence selected from the group consisting of SEQ Nos. 9-13

<400> 8

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggccc tottcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt	360
ttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt caaggtcggg caggaagagg	420
gcctatittc catgattcct tcatatattgc atatacgata caaggctgtt agagagataa	480
ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt	540
aataatttct tgggtagttt gcagttttta aattatgttt taaaatggac tatcatatgc	600

8 / 11

ttaccgtaac	ttgaaagtat	ttcgatttct	tggttttata	tatcttgtgg	aaaggacgaa	660
acaccnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
tttttatctc	gaggcgggat	gcaagcttgg	cgtaatcatg	gtcatagctg	tttcctgtgt	780
gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag	840
cctggggtgc	ctaattgagt	agctaactca	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgcct	900
tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	960
gcggtttgcg	tattgggcgc	tcttcgcgtt	cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggctg	1020
ttcggtcgcg	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcggc	aatacggtta	tccacagaat	1080
caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	1140
aaaaggccgc	gttgctggcg	tttttcata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	1200
atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	1260
cccttggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttccgacctt	gccgcttacc	ggataacctgt	1320
ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	1380
gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccg	1440
accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgct	ttgagtcgaa	cccggtaaga	cacgacttat	1500
cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcgggtgcta	1560
cagagttctt	gaagtgggtg	cctaactacg	gctacactag	aagaacagta	tttggtatct	1620
gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	tagctottga	tccggcaaac	1680
aaaccaccgc	tggtagcggt	ggtttttttg	tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	1740

aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 1800

actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 1860

taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca 1920

gttaccaatg cttaatcagt gaggcacctt tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca 1980

tagttgcctg actccccgtc ggttagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 2040

ccagtctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 2100

accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 2160

agtcatttaa ttgtgcgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 2220

acgttgttgc cattgttaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtogtttggg atggcttcat 2280

tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaaag 2340

cggtagctc ctccggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 2400

tcattgttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgtttt 2460

ctgtgactgg tgagtactca accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 2520

gtctttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 2580

tcattcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 2640

ccagttcgat gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca 2700

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca 2760

cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 2820

10 / 11

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 2880

ttccggcgac atttccggga aaagtggcac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga 2940

cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggcctttcg tc 2982

<210> 9

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized DNA to express siRNA

<400> 9

ctctgatggc aactoctatg gtgttgaaaa aacaccatag gatttgccat cagag 55

<210> 10

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized DNA to express siRNA

<400> 10

ctggggttcc aaaccagatg tccctgagaa aatcagggac atctggtttg gaaccccag 59

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

11 / 11

<223> Artificially synthesized DNA to express siRNA

<400> 11

gcaatttgag ctttagctcg gttgtgaaaa acaaccgagc taaagctcaa attgc 55

<210> 12

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized DNA to express siRNA

<400> 12

gtcagttcct ttgcagtaag atccagaaaa tggatcttac tgcaaaggaa ctgac 55

<210> 13

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificially synthesized DNA to express siRNA

<400> 13

cataaacacc aacttccttt ccttggaata caaggaaagg aagttggtgt ttatg 55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7105, 31/711, 31/4439, A61P35/00//C12N9/99,
15/09, C07D401/12, 209/30

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)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7105, 31/711, 31/4439, A61P35/00//C12N9/99,
15/09, C07D401/12, 209/30

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

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

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-165708 A (Eisai Co., Ltd.), 27 June, 1995 (27.06.95), Claims & WO 95/07276 A1 & EP 673937 A1	1-4, 9-12
X	JP 8-231505 A (Eisai Co., Ltd.), 10 September, 1996 (10.09.96), Claims (Family: none)	1-4, 9-12
X	JP 2000-247949 A (Eisai Co., Ltd.), 12 September, 2000 (12.09.00), Claims & WO 00/50395 A1 & EP 1074542 A1	1-4, 9-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 July, 2004 (20.07.04)

Date of mailing of the international search report
10 August, 2004 (10.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005557

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-309534 A (Eisai Co., Ltd.), 07 November, 2000 (07.11.00), Claims (Family: none)	1-4, 9-12
X	JP 2002-167376 A (Mercian Corp.), 11 June, 2002 (11.06.02), Claims (Family: none)	1-4, 9-12
X	OWA, T. et al., Synthesis and biological evaluation of N-(7-indolyl)-3-pyridinesul fonamide derivatives as potent antitumor agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, Vol.12, No.16, pages 2097 to 2100	1-4, 9-12
X	OWA, T. et al., A focused compound library of novel N-(7-indolyl) benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhi bitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, No.11, pages 1223 to 1226	1-4, 9-12
X	ROY, K. et al., QSAR of antineoplastics V: Exploration of receptor interaction sites of antitumor N-(7-indolyl)benzenesulfonamides targeting G1 phase using electrotopological state atom index, Drug Design and Discovery, 2001, Vol.17, No.3, pages 207 to 218	1-4, 9-12
X	LIU, S. et al., The (-)-Enantiomer of Gossypol Possesses Higher Anticancer Potency than Gossy pol in Human Breast Cancer, ANTICANCER RESEARCH, 2002, Vol.22, pages 33 to 38	1, 9
X Y	COATS, E.A. et al., 4-Hydroxyquinoline-3-carbox ylic acids as inhibitors of cell respiration. 2. Quantitative structure-activity relationship of dehydrogenase enzyme and Ehrlich ascites tumor cell inhibitions, Journal of Medicinal Chemistry, 1982, Vol.25, No.1, pages 57 to 63	1, 9 13-19, 23-25
Y	TANAKA, T. et al., Molecular Cloning and Mapping of a Human cDNA for Cytosolic Malate Dehydrogen ase (MDH1), GENOMICS, 1996, No.32, pages 128 to 130	13-19, 23-25
X Y	RUBSAMEN, H. et al., Cytosolic malic dehydro genase activity is associated with a putative substrate for the transforming gene product of Rous sarcoma virus, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1982, Vol.79, pages 228 to 232	26, 27 13-19, 23-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005557

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 5-8, 20-22

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

Claims 5 to 8 and 20 to 22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

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

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

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

The inventions according to claims 1 to 4 and 9 to 12 are inventions having a technical feature of using compounds represented by the structure of the formula (1) or the like and having an anticancer effect as cytoplasmic malate dehydrogenase inhibitors; the inventions according to claims 13 to 19 and 23 to 25 are inventions having a technical feature of inhibiting the expression of a gene of the above enzyme by iRNA, etc.; and the inventions according to claims 26 and 27 are inventions having a technical feature of measuring the effect of inhibiting the activity of the above enzyme in screening an anticancer agent.

Although the matter common to all of (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005557

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

the groups of inventions resides in cytoplasmic malate dehydrogenase, this enzyme is not novel and thus falls within the prior art. Therefore, it cannot be regarded as a special technical feature.

Such being the case, these groups of inventions have no special technical matter exceeding prior art in common and are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Even though the statement in the description is examined, it remains unclear what specific compounds other than those described in EXAMPLES are involved in the scope of the term "cytoplasmic malate dehydrogenase" and what are not, which makes the claims of the present case unclear.

Such being the case, claims 1, 29, 10, 13 to 19 and 23 to 25 and the description

do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

In this international search report, therefore, prior art documents were examined based on the compounds specifically presented in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7105, 31/711, 31/4439,
 A61P35/00//C12N9/99, 15/09, C07D401/12, 209/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K45/00, 48/00, 31/7105, 31/711, 31/4439,
 A61P35/00//C12N9/99, 15/09, C07D401/12, 209/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, REGISTRY/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 7-165708 A (エーザイ株式会社) 1995. 06. 27, 【特許請求の範囲】 & WO 95/07276 A1 & EP 673937 A1	1-4, 9-12
X	JP 8-231505 A (エーザイ株式会社) 1996. 09. 10, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4, 9-12
X	JP 2000-247949 A (エーザイ株式会社) 2000. 09. 12, 【特許請求の範囲】 & WO 00/50395 A1 & EP 1074542 A1	1-4, 9-12

☒ 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

20. 07. 2004

国際調査報告の発送日

10. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

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 請求の範囲の番号
X	J P 2000-309534 A (エーザイ株式会社) 2000. 11. 07, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4, 9-12
X	J P 2002-167376 A (メルシヤン株式会社) 2002. 06. 11, 【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-4, 9-12
X	OWA, T. et al., Synthesis and biological evaluation of N-(7-indolyl)- 3-pyridinesulfonamide derivatives as potent antitumor agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, Vol.12, No.16, pp.2097-2100	1-4, 9-12
X	OWA, T. et al., A focused compound library of novel N-(7-indolyl) benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, No.11, pp.1223-1226	1-4, 9-12
X	ROY, K. et al., QSAR of antineoplastics V: Exploration of receptor interaction sites of antitumor N-(7-indolyl)benzenesulfonamides targeting G1 phase using electrotopological state atom index, Drug Design and Discovery, 2001, Vol.17, No.3, pp.207-218	1-4, 9-12
X	LIU, S. et al., The (-)-Enantiomer of Gossypol Possesses Higher Anticancer Potency than Gossypol in Human Breast Cancer, ANTICANCER RESEARCH, 2002, Vol.22, pp.33-38	1, 9
X Y	COATS, E. A. et al., 4-Hydroxyquinoline-3-carboxylic acids as inhibitors of cell respiration. 2. Quantitative structure-activity relationship of dehydrogenase enzyme and Ehrlich ascites tumor cell inhibitions, Journal of Medicinal Chemistry, 1982, Vol.25, No.1, pp.57-63	1, 9 13-19, 23-25
Y	TANAKA, T. et al., Molecular Cloning and Mapping of a Human cDNA for Cytosolic Malate Dehydrogenase (MDH1), GENOMICS, 1996, No.32, pp.128-130	13-19, 23-25
X Y	RUBSAMEN, H. et al., Cytosolic malic dehydrogenase activity is associated with a putative substrate for the transforming gene product of Rous sarcoma virus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, Vol.79, pp.228-232	26, 27 13-19, 23-25

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 5-8, 20-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲5-8、20-22は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-4、9-12に係る発明は式(1)等の構造で示される抗癌作用を有する化合物を細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤として使用することを技術的特徴とする発明群であり、請求の範囲13-19、23-25に係る発明はiRNA等による前記酵素の遺伝子の発現阻害を技術的特徴とする発明群であり、また、請求の範囲26、27に係る発明は抗癌剤のスクリーニングの際に前記酵素の活性阻害作用を測定することを特別な技術的特徴とする発明群である。

全発明群に共通の事項は細胞質リンゴ酸脱水素酵素であるが、当該酵素は新規のものではないところ、先行技術の域を出ないから特別な技術的特徴にはなり得ない。

してみると、全発明群は先行技術を越える特別な技術的特徴を共有する関係になく、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲に記載された「細胞質リンゴ酸脱水素酵素阻害剤」なる文言は、明細書の記載を検討しても、実施例に記載の化合物以外に、具体的にいかなる化合物を包含し、また、包含しないか明確であるとはいえないから、本願発明の範囲を不明確にするものである。

したがって、請求の範囲1、29、10、13-19、23-25及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、明細書に具体的に記載された化合物に基づいて先行技術文献調査を行った。