

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7617674号

(P7617674)

(45)発行日 令和7年1月20日(2025.1.20)

(24)登録日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H 23/00 (2006.01)

C 0 7 H 23/00

C S P

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/7135(2006.01)

A 6 1 K 31/7135

A 6 1 K 33/242(2019.01)

A 6 1 K 33/242

請求項の数 5 (全24頁)

(21)出願番号 特願2023-552873(P2023-552873)

(86)(22)出願日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(86)国際出願番号 PCT/JP2022/037001

(87)国際公開番号 WO2023/058608

(87)国際公開日 令和5年4月13日(2023.4.13)

審査請求日 令和6年3月28日(2024.3.28)

(31)優先権主張番号 特願2021-165100(P2021-165100)

(32)優先日 令和3年10月6日(2021.10.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

早期審査対象出願

(73)特許権者 520115923

オルバイオ株式会社

京都府京都市上京区河原町通今出川下る

梶井町448番地5 クリエイション・

コア京都御車

(74)代理人 100106002

弁理士 正林 真之

(74)代理人 100131705

弁理士 新山 雄一

(74)代理人 100141759

弁理士 阿部 亮敦

(72)発明者 山口 栄一

東京都文京区白山五丁目20番10号

(72)発明者 山田 勝也

青森県弘前市文京町1番地 国立大学法
最終頁に続く

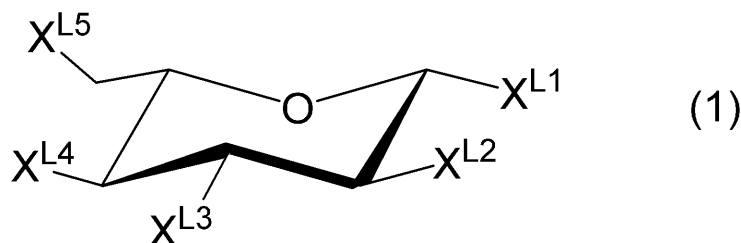
(54)【発明の名称】 グルコース誘導体及びそれを用いた抗がん剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

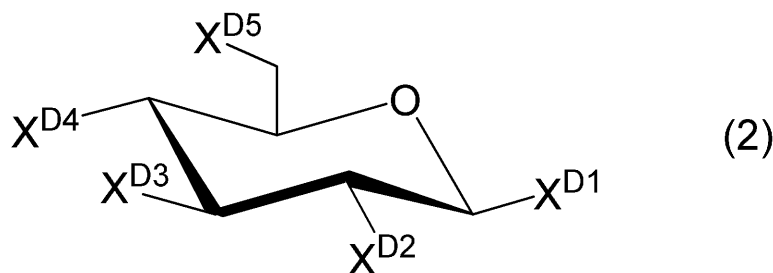
下記一般式(1)で表されるL-グルコース誘導体及び下記一般式(2)で表されるD-グルコース誘導体からなる群より選択されるグルコース誘導体。

【化1】



[式(1)中、 X^{L2} は $-SAuR^{L2}$ 基を示し、 X^{L1} 、 X^{L3} 、 X^{L4} 、及び X^{L5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{L1}$ 基、 $-NH_2$ 基、又はフッ素原子を示す。 R^{L2} は配位子を示し、 R^{L1} は水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、又はアシル基を示す。]

【化 2】



〔式 (2) 中、 X^{D2} は $-SAuR^{D2}$ 基を示し、 X^{D1} 、 X^{D3} 、 X^{D4} 、及び X^{D5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{D1}$ 基、 $-NH_2$ 基、又はフッ素原子を示す。 R^{D2} は配位子を示し、 R^{D1} は水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、又はアシル基を示す。〕

【請求項 2】

X^{L1} 、 X^{L3} 、 X^{L4} 、及び X^{L5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{L1}$ 基であり、 X^{D1} 、 X^{D3} 、 X^{D4} 、及び X^{D5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{D1}$ 基である請求項 1 に記載のグルコース誘導体。

【請求項 3】

R^{L2} 及び R^{D2} は、それぞれ独立に、トリアルキルホスフィン配位子である請求項 1 又は 2 に記載のグルコース誘導体。

【請求項 4】

前記 L-グルコース誘導体である請求項 1 または 2 に記載のグルコース誘導体。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載のグルコース誘導体の少なくとも 1 種からなる抗がん剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルコース誘導体及びそれを用いた抗がん剤に関する。

【背景技術】

【0002】

がんの一般的な治療法の一つとして、抗がん剤を用いる方法が知られている。一般に抗がん剤は、がん細胞のみならず、正常細胞にも作用し、結果として強い副作用が現れる。この副作用をどのように低減させるかががんの治療における課題となってきた。これに対して、がん細胞が特異的に発現している分子を把握して、がん細胞の増殖や転移を抑える分子標的薬が注目を集めている。分子標的薬によれば、古典的な抗がん剤による副作用の抑制が期待される。しかしながら、実際にはがん細胞が特異的に発現すると称する分子は正常細胞にも発現しており、また分子標的薬は想定とは異なる分子にも作用する等、副作用は少なからず発生する。言うまでもなくヒトの体は細胞の集合である。細胞である限り、その活動のエネルギー源や増殖には炭素源を必要とする。そこで、我々の生体内にある特定の蛋白や分子を標的とするのではなく、細胞に取り込まれる側の分子を標識することによりがんを識別する方法が、近年再注目されている（非特許文献 1）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】Ono K. et al., Cancers, 12: 850, 2020

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、新規なグルコース誘導体を提供することを目的とする。また、本発明は、上

記新規なグルコース誘導体を用いた抗がん剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

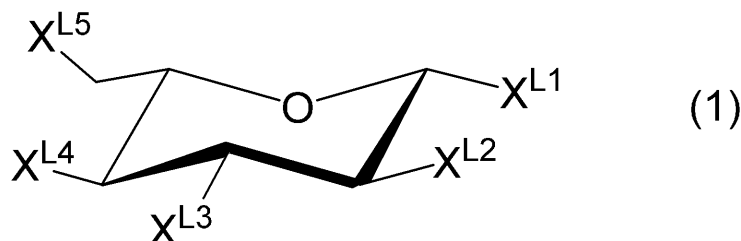
【0005】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた。その結果、がん細胞に取り込まれ、がん細胞に毒性を呈する新規なグルコース誘導体を見出し、本発明を完成するに至った。具体的には、本発明は以下のものを提供する。

【0006】

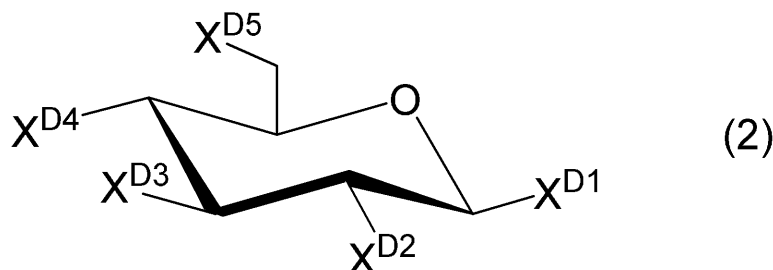
本発明の第一の態様は、下記一般式（1）で表されるL-グルコース誘導体及び下記一般式（2）で表されるD-グルコース誘導体からなる群より選択されるグルコース誘導体である。

【化1】



〔式（1）中、 X^{L2} は $-SAuR^{L2}$ 基を示し、 X^{L1} 、 X^{L3} 、 X^{L4} 、及び X^{L5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{L1}$ 基、 $-NH_2$ 基、又はフッ素原子を示す。 R^{L2} は配位子を示し、 R^{L1} は水素原子又は有機基を示す。〕

【化2】



〔式（2）中、 X^{D2} は $-SAuR^{D2}$ 基を示し、 X^{D1} 、 X^{D3} 、 X^{D4} 、及び X^{D5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{D1}$ 基、 $-NH_2$ 基、又はフッ素原子を示す。 R^{D2} は配位子を示し、 R^{D1} は水素原子又は有機基を示す。〕

【0007】

本発明の第一の態様に係るグルコース誘導体は、分子中に金原子（Au）を含むため、がん細胞中に取り込まれた際に、金原子ががん細胞に対して顕著な毒性を呈する可能性がある。

【0008】

本発明の第二の態様は、本発明の第一の態様に係るグルコース誘導体の少なくとも1種からなる抗がん剤である。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、新規なグルコース誘導体及びそれを用いた抗がん剤を提供することができる。当該グルコース誘導体は、がん細胞に取り込まれ、がん細胞に毒性を呈する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、培養日数5DIV（days in vitro）のマウスインスリノーマMIN6細胞（Miyazaki J. et al., Endocrinology

10

20

30

40

50

127: 126-132, 1990) に対して、1000 μ M の濃度で E2-ADG 又は E2-ALG を 10 分間又は 30 分間投与した際の生細胞の活性を、蛍光マーカー Calcein (カルセイン) の蛍光強度で評価した結果を示す図である。Error bar は標準偏差を示す。* は全て $p < 0.001$ (Bonferroni-Dunn test) を表す。

【図 2】図 2 は、グルコースの 1 位の OH 基の水素原子を -SAuP (C₂H₅)₃ 基に置換した D-グルコース類縁体 DGG 及び L-グルコース類縁体 LGG を 5 DIV の MIN6 細胞に 1000 μ M の濃度で 10 分間又は 30 分間投与し、死細胞マーカー Propidium Iodide (以下、「PI」という。) 陽性信号の強度で細胞死の発生を評価した結果を示す図である。横軸は個々の細胞の直径を示す。

10

【図 3】図 3 は、培養日数 11 DIV の MIN6 細胞に対して、150 μ M のフロレチン (phloretin. 以下、「PHT」という。) 存在下又は PHT 非存在下、1000 μ M の濃度で E2-ADG 又は E2-ALG を 90 分間投与した際の死細胞数の割合を PI 値で示す図である。Error bar は標準偏差を示す。* は全て $p < 0.001$ (Bonferroni-Dunn test) を表す。

【図 4】図 4 は、培養日数 4 DIV の MIN6 細胞に対して、表記の濃度で M2-ADG 又は M2-ALG を 30 分間投与した際の生細胞の活性を、蛍光マーカー Calcein (カルセイン) の蛍光強度で評価した結果を示す図である。Error bar は標準偏差を示す。* は全て $p < 0.001$ (Bonferroni-Dunn test) を表す。

20

【図 5】図 5 は、培養日数 4 DIV の MIN6 細胞に対して、表記の濃度で M2-ADG 又は M2-ALG を 30 分間投与した際の死細胞数の割合を PI 値で示す図である。Error bar は標準偏差を示す。* は全て $p < 0.001$ (Bonferroni-Dunn test) を表す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。なお、実施例を含め、本明細書中で使用した略語と化合物名との関係を以下に示す。

30

Ac: アセチル基

Ac₂O: 無水酢酸

AcONa: 酢酸ナトリウム

DBU: ジアザビシクロウンデセン

DCM: ジクロロメタン

DMF: N, N-ジメチルホルミアミド

Et: エチル基

Et₃PAuCl: クロロ (トリエチルホスフィン) 金 (I)

HClO₄: 過塩素酸

HOBt: 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

IPE: ジイソプロピルエーテル

40

KSAc: チオ酢酸 S-カリウム

Me: メチル基

MeCN: アセトニトリル

MeOH: メタノール

Me₃PAuCl: クロロ (トリメチルホスフィン) 金 (I)

NaOMe: ナトリウムメトキシド

NIS: N-ヨードスクシンイミド

PBr₃: 三臭化リン

Piv: ピバロイル基

PivCl: 塩化ピバロイル

50

TCEP・HCl：トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩

Tf：トリフルオロメチルスルホニル基

Tf₂O：トリフルオロメタンスルホン酸無水物

Trt：トリチル基

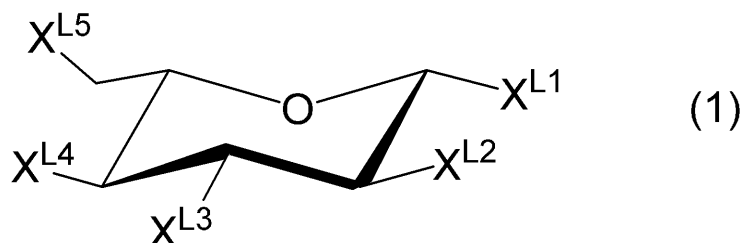
TrtCl：塩化トリチル

【0012】

本実施形態のグルコース誘導体は、下記一般式（１）で表される構造又は下記一般式（２）で表される構造を有する。

【0013】

【化３】

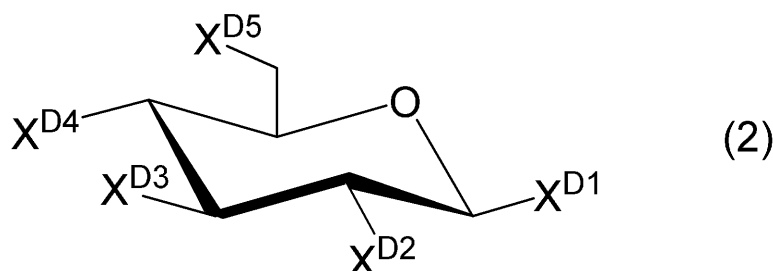


【0014】

式（１）中、X^{L2}は－SAuR^{L1}基を示し、X^{L1}、X^{L3}、X^{L4}、及びX^{L5}は、それぞれ独立に、－OR^{L1}基、－NH₂基、又はフッ素原子を示す。R^{L2}は配位子を示し、R^{L1}は水素原子又は有機基を示す。

【0015】

【化４】



【0016】

式（２）中、X^{D2}は－SAuR^{D2}基を示し、X^{D1}、X^{D3}、X^{D4}、及びX^{D5}は、それぞれ独立に、－OR^{D1}基、－NH₂基、又はフッ素原子を示す。R^{D2}は配位子を示し、R^{D1}は水素原子又は有機基を示す。

【0017】

グルコース誘導体にはD体及びL体が存在するが、一般式（１）で表される構造はL体のグルコース誘導体であり、一般式（２）で表される構造はD体のグルコース誘導体である。また、グルコース誘導体には、アノマー異性体、即ち、X^{L1}又はX^{D1}がエカトリアル方向に向いているアノマーとX^{L1}又はX^{D1}がアキシアル方向に向いているアノマーが存在し得るが、本実施形態のL－グルコース誘導体又はD－グルコース誘導体はこれらの混合物であってもよい。

【0018】

R^{L2}又はR^{D2}における配位子としては、例えば、ホスフィン配位子、チオレート配位子、オレフィン配位子等が挙げられる。R^{L2}又はR^{D2}は、ホスフィン配位子であることが好ましく、トリアルキルホスフィン配位子であることがより好ましく、トリメチルホスフィン配位子又はトリエチルホスフィン配位子であることが更に好ましく、トリエチルホスフィン配位子であることが特に好ましい。

10

20

30

40

50

【0019】

R^{L1} 又は R^{D1} における有機基としては、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、アシル基等が挙げられる。これらの基は更に別の置換基を有していてもよい。有機基の炭素数は、例えば、1～10でよく、1～5であることが好ましく、1～3であることがより好ましい。

【0020】

R^{L1} 又は R^{D1} は、水素原子、アルキル基、又はアシル基であることが好ましく、水素原子又はアシル基であることがより好ましく、水素原子又はアセチル基であることが更に好ましい。

【0021】

X^{L1} 、 X^{L3} 、 X^{L4} 、 X^{L5} 、 X^{D1} 、 X^{D3} 、 X^{D4} 、又は X^{D5} におけるフッ素原子の同位体としては、特に限定されず、例えば、放射性同位体である ^{18}F 、安定同位体である ^{19}F 等が挙げられる。前記フッ素原子の同位体が ^{18}F であると、本実施形態のグルコース誘導体は、例えば、PET試薬として、好適に用いることができる。前記フッ素原子の同位体が ^{19}F であると、本実施形態のグルコース誘導体は、例えば、がん治療薬として、好適に用いることができる。上述のPET試薬用途又はがん治療薬用途をより好適なものとし得る観点等から、一般式(1)においては、 X^{L4} 又は X^{L5} がフッ素原子であることが好ましく、一般式(2)においては、 X^{D4} 又は X^{D5} がフッ素原子であることが好ましい。

【0022】

合成の容易さ又はグルコース誘導体の活性等の観点から、 X^{L1} 、 X^{L3} 、 X^{L4} 、及び X^{L5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{L1}$ 基であることが好ましく、 X^{D1} 、 X^{D3} 、 X^{D4} 、及び X^{D5} は、それぞれ独立に、 $-OR^{D1}$ 基であることが好ましい。

【0023】

一般式(1)で表されるL-グルコース誘導体は、例えば、L体の糖又はその誘導体から合成することができる。一般式(2)で表されるD-グルコース誘導体は、例えば、D体の糖又はその誘導体から合成することができる。L体の糖又はその誘導体の具体例としては、L-グルコース、L-マンノース、L-ガラクトース、1,2:5,6-ジ- α -イソプロピリデン-L-グルコフラノース等が挙げられる。D体の糖又はその誘導体の具体例としては、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、1,2:5,6-ジ- α -イソプロピリデン-D-グルコフラノース等が挙げられる。

【0024】

L体の糖又はその誘導体から一般式(1)で表されるL-グルコース誘導体を合成する方法、及び、D体の糖又はその誘導体から一般式(2)で表されるD-グルコース誘導体を合成する方法としては、例えば、実施例に記載の方法等が挙げられる。実施例に記載の方法の各工程を適宜組み合わせたり、従来公知の方法で置換基を導入したりすることにより、種々の誘導体を合成することができる。

【0025】

実施例に記載の方法以外の方法としては、特に限定されず、例えば、下記に示す方法が挙げられる。

【0026】

X^{L2} が $-SAuP(C_2H_5)_3$ 基を示し、 X^{L1} 、 X^{L3} 、及び X^{L4} が $-OH$ 基を示し、 X^{L5} がフッ素原子を示す一般式(1)で表される構造を有するグルコース誘導体は、L-マンノースを出発原料として、以下の反応式に従って、化合物11として合成することができる。化合物11において、グルコースの6位の $-OH$ 基はフッ素原子で置換されている。

10

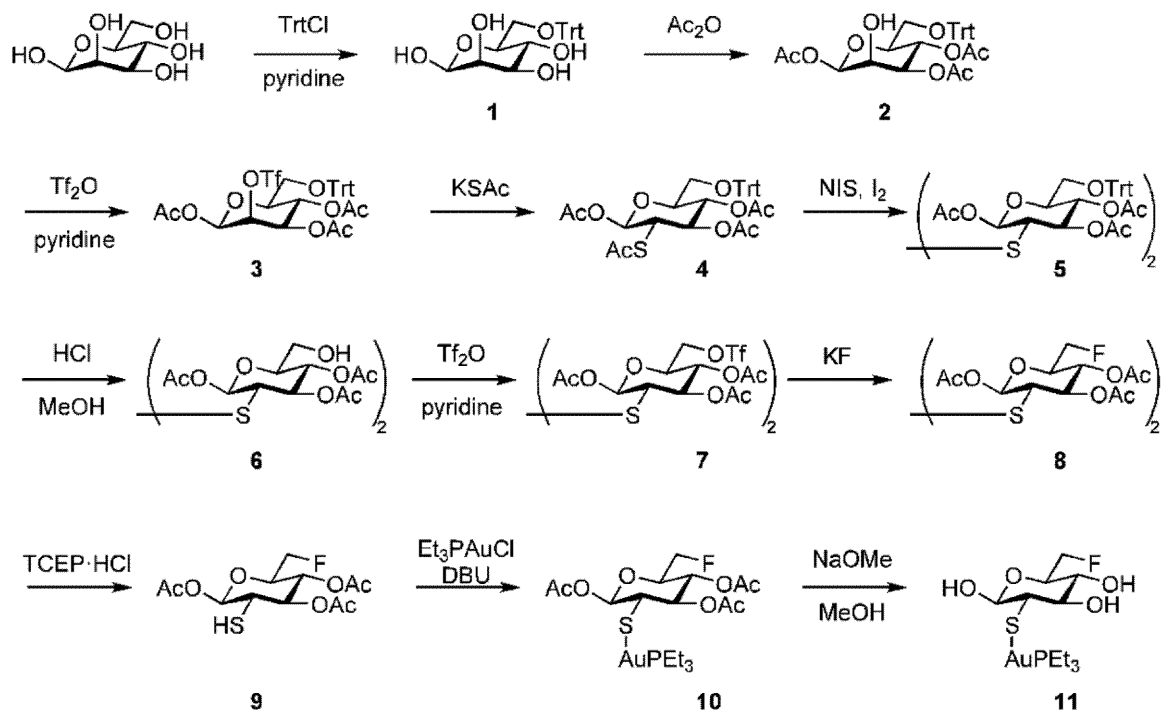
20

30

40

50

【化 5】



【0027】

X^{L2} が $-\text{SAuP}(\text{CH}_3)_3$ 基を示し、 X^{L1} 、 X^{L3} 、及び X^{L4} が $-\text{OH}$ 基を示し、 X^{L5} がフッ素原子を示す一般式 (1) で表される構造を有するグルコース誘導体は、化合物 9 から化合物 11 までの反応において Et を Me に置き換えた上記反応式に従って、合成することができる。

【0028】

X^{L2} が $-\text{SAuP}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ 基を示し、 X^{L1} 、 X^{L3} 、及び X^{L5} が $-\text{OH}$ 基を示し、 X^{L4} がフッ素原子を示す一般式 (1) で表される構造を有するグルコース誘導体は、化合物 12 を出発原料として、以下の反応式に従って、化合物 20 として合成することができる。化合物 20 において、グルコースの 4 位の OH 基はフッ素原子で置換されている。なお、化合物 12 は、後述の実施例における化合物 5 L である。

【0029】

10

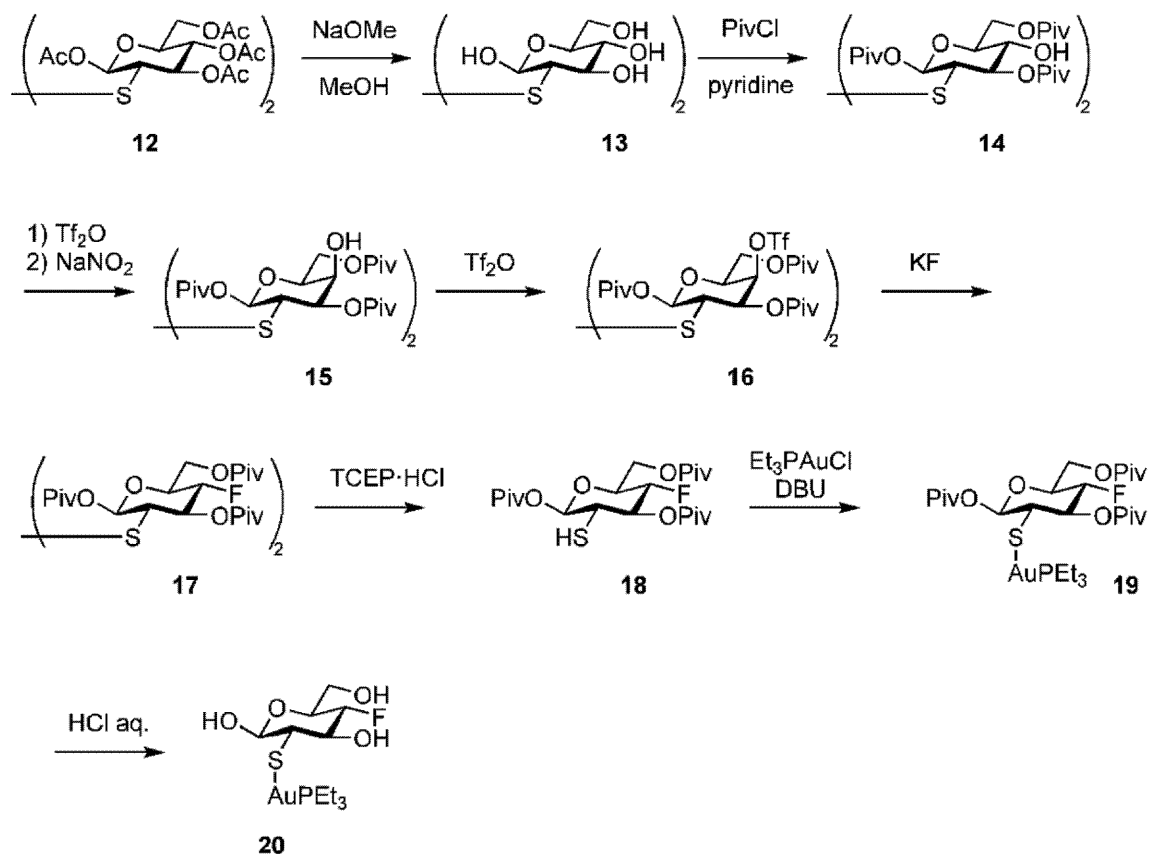
20

30

40

50

【化 6】



【0030】

X^{L2}が-SAuP(CH₃)₃基を示し、X^{L1}、X^{L3}、及びX^{L5}が-OH基を示し、X^{L4}がフッ素原子を示す一般式(1)で表される構造を有するグルコース誘導体は、化合物18から化合物20までの反応においてEtをMeに置き換えた上記反応式に従って、合成することができる。

【0031】

本実施形態のグルコース誘導体を用いることにより、がんの治療、特に膵臓がん、脳腫瘍、乳がん、胃がん、胃食道接合部がん、口腔内がん、胆道がん、肺がん、卵巣がん、子宮体がん等の腺がん、及び肉腫等の種々のがんの治療を有効に行い得る。よって、本実施形態のグルコース誘導体は、抗がん剤として好適に用いることができる。

【0032】

本実施形態の抗がん剤は、本実施形態のグルコース誘導体の少なくとも1種からなる。上記抗がん剤の適用対象としては、特に限定されず、例えば、膵臓がん、脳腫瘍、乳がん、胃がん、胃食道接合部がん、口腔内がん、胆道がん、肺がん、卵巣がん、子宮体がん等の腺がん、及び肉腫等の種々のがんが挙げられる。

【0033】

本実施形態のグルコース誘導体又は本実施形態の抗がん剤は、例えば、経口剤(錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤等)、舌下錠、若しくは注射剤(静脈内投与用、筋肉内投与用、皮下投与用、腹腔内投与用、関節内投与用、硬膜外投与用等)の形で、又は、子宮頸部、口腔内、皮膚等の局所に直接適用する形で投与することができる。

【実施例】

【0034】

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は実施例に何ら限定されるものではない。なお、合成した化合物の構造は、UPLC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR等を用いて同定した。また、各実施例における比旋光度の値としては、比

旋光度測定用サンプルについて、セル長 100 mm のセルを用いて、20.00 °C で、比旋光度を 5 回測定し、5 個の測定結果について計算した平均値を採用した。

【0035】

トリアルキルホスフィン金が結合した、2-チオ-α-D-グルコース誘導体を 4 種合成した。第 1 に、糖部が D-グルコースであり、2 位のチオール基にトリメチルホスフィン金が結合した化合物 A (M2-ADG)、第 2 に、糖部が D-グルコースであり、2 位のチオール基にトリエチルホスフィン金が結合した化合物 B (E2-ADG)、第 3 に、糖部が L-グルコースであり、2 位のチオール基にトリメチルホスフィン金が結合した化合物 C (M2-ALG)、第 4 に、糖部が L-グルコースであり、2 位のチオール基にトリエチルホスフィン金が結合した化合物 D (E2-ALG) の合計 4 種の化合物である。

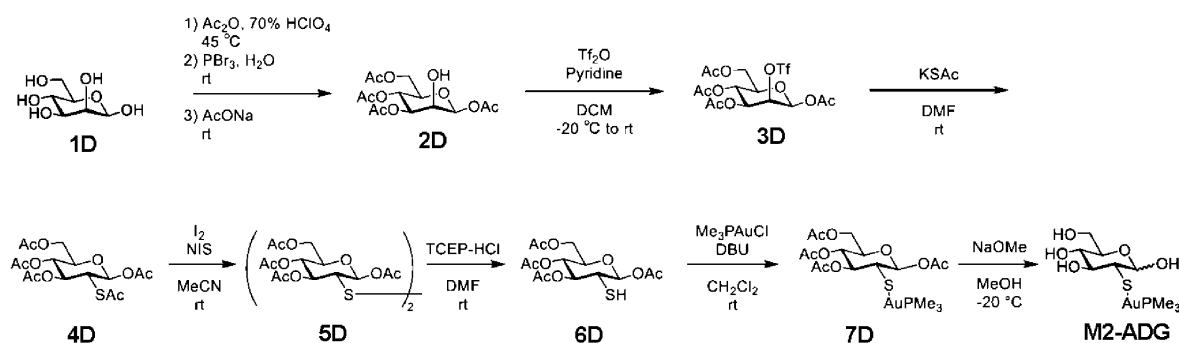
【0036】

【実施例 1】

・化合物 A (M2-ADG)

D-マンノース (化合物 1D) を出発原料として、以下の反応式に従って、化合物 A (M2-ADG) を合成した。

【化 7】



【0037】

・化合物 1D から化合物 4D までの合成

論文 (J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 7405-7417) で報告された処方に従い、化合物 4D を得た。

【0038】

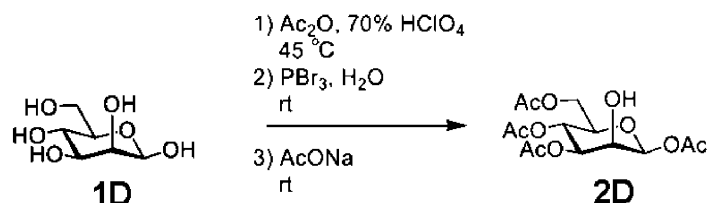
・化合物 6D の合成

化合物 4D から化合物 5D を経由して化合物 6D を得る過程は、論文 (J. Org. Chem. 2017, 82, 12613-12623) を参考にして、酸化反応によりジスルフィド二量体 5D を形成後、還元することで、S-アセチル基を選択的に除去して化合物 6D を得た。

【0039】

・化合物 2D の合成

【化 8】



【0040】

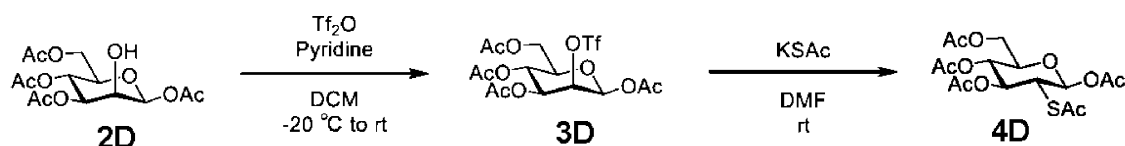
1 L コルベンにて、無水酢酸 (95 mL, 1.0 mol)、D-マンノース (化合物 1D) 50 mg、70 質量% HClO₄ (0.50 mL) を添加し 40 °C に昇温した。続い

て同温度で残りのD-マンノース(24.95g, 138.5mmol)を分割投入し、室温で終夜撹拌した。次いで反応容器を氷浴内で冷却し、PBr₃(19.8mL, 139mmol)を滴下後、27℃以下で冷水(13.6mL)を滴下した。滴下終了後、反応溶液を室温に戻し1時間撹拌した。再び氷浴にて冷却し、酢酸ナトリウム(45.6g, 556mmol)と水(57mL)の水溶液を滴下した。室温で1時間撹拌した後に冷水83mL中に反応溶液を注加し、ジクロロメタンで2回抽出を行った。続いて冷飽和重曹水で2回洗浄した後にジクロロメタンで再抽出を行い、Na₂SO₄で乾燥した。乾燥剤をろ別し、減圧濃縮を行った後の2Dを含む粗体にジエチルエーテル(225mL)を加え、白色固体を析出させた。固体をろ取し、冷ジエチルエーテルで洗浄することで2Dを8.4g(収率17%)得た。

【0041】

・化合物4Dの合成

【化9】



【0042】

アルゴン雰囲気下、500mLコルベンにて2D(8.4g, 24.1mmol)、脱水ジクロロメタン(252mL)、脱水ピリジン(4.3mL, 53.1mmol)を加え内温が-20℃になるよう冷却を行った。続いてTf₂O(8.7mL, 53.1mmol)を内温が-20℃を超えないように加え、同温度で撹拌を行った。反応終了後、冷水中に反応液を注加した後に冷飽和重曹水(340mL)で洗浄、Na₂SO₄で乾燥、ろ過、濃縮を行い褐色オイル状の3Dの粗体を得た。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

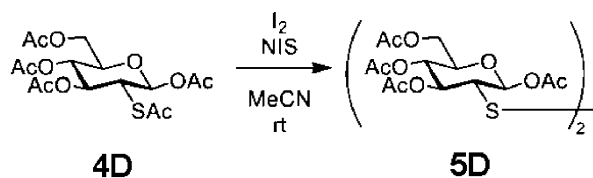
【0043】

アルゴン雰囲気下、1Lコルベンにて3D(11.6g, 24.1mmol)、DMF(440mL)、KSac(27.6g, 241mmol)を加え、室温下で撹拌を行った。反応終了後、水/ジクロロメタン(体積比：1/3)で抽出を行い、brineで洗浄、減圧濃縮した。得られた4Dを含む残渣をシリカゲル(216g)で精製した。展開溶媒に酢酸エチル/ヘプタン(体積比：1/3)を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、4Dの粗体を9.4g得た。この粗体を酢酸エチル/ヘプタン(体積比：1/2)で再結晶することで、4Dを5.8g(収率66%)得た。

【0044】

・化合物5Dの合成

【化10】



【0045】

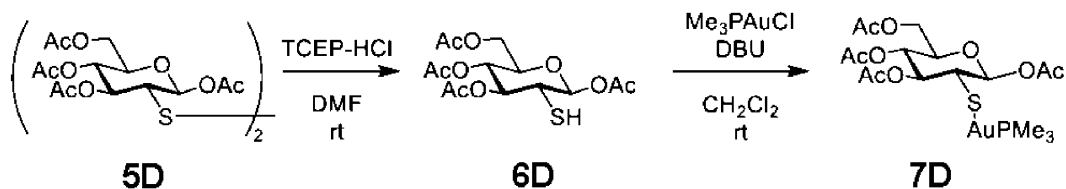
本反応は4つにバッチを分けて実施した。アルゴン雰囲気下、4D(1.0g, 2.5mmol)、脱水アセトニトリル(15mL)、ヨウ素(1.6g, 6.2mmol)、NIS(1.4g, 6.2mmol)を加え室温下で5時間撹拌を行った。(同操作を1.0gの4Dを用いて更に3バッチ行った。)その後反応溶液を水/ジクロロメタン(体積比：1/3)に注加し、有機層を5質量%チオ硫酸ナトリウム水溶液、brineで洗

浄、 Na_2SO_4 で乾燥、ろ過、減圧濃縮した。得られた5Dを含む残渣をシリカゲル（106g）で精製した。展開溶媒に酢酸エチル／ヘプタン（体積比：1／2）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、5Dの粗体を1.7g得た。続いて得られた粗体に対して室温下でジイソプロピルエーテルIPE（34mL）を加え、固体を析出させた。固体をろ取、乾燥を行うことで5Dを1.5g（収率41%）得た。

【0046】

・化合物7Dの合成

【化11】



【0047】

アルゴン雰囲気下、20mLナスフラスコにて、5D（371mg，511 μmol ）、DMF（3.7mL）、TCEP・HCl（192mg，766 μmol ）を加えた。室温で1時間攪拌後、水／ジクロロメタン（体積比：1／3）を用いて抽出、brineで洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥、ろ過、減圧濃縮を行った。更にトルエンを用いて共沸を行い、6Dの粗体を得た。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

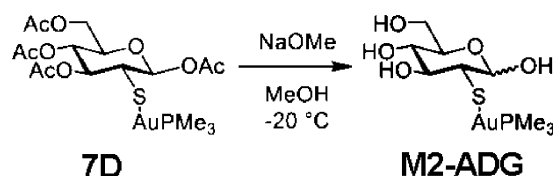
【0048】

アルゴン雰囲気下、20mLナスフラスコにて、6D、脱水ジクロロメタン（3.7mL）、 Me_3PAuCl （283mg，916 μmol ）を加えた。続いてDBU（182 μL ，1.2mmol）を脱水ジクロロメタン（927 μL ）に溶解させ、反応溶液に滴下した。反応終了を確認後、セライト濾過、減圧濃縮した。得られた7Dを含む残渣をNHシリカゲル（20g）を用いて精製した。展開溶媒に酢酸エチル／ヘプタン（体積比：1／1）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、7Dを367mg（収率56%）得た。

【0049】

・化合物A（M2-ADG）の合成

【化12】



【0050】

アルゴン雰囲気下、20mLナスフラスコにて7D（360mg，566 μmol ）、メタノール（5.5mL）を加え、内温が -20°C になるように冷却を行った。その後5M NaOMeメタノール溶液（136 μL ，679 μmol ）を滴下し、同温度で攪拌を行った。反応終了を確認後、Amberlite IR120（ H^+ フォーム）を加えpH6～7にした後にろ過、減圧濃縮した。得られたM2-ADGを含む残渣をDIOLシリカゲル（15g）で精製した。展開溶媒にクロロホルム／メタノール（体積比：100／0→98／2→96／4）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し凍結乾燥を行うことで、M2-ADGを127mg（収率47%）得た。

【0051】

・比旋光度測定

化合物 A (M2-ADG) を水に溶かし、濃度を 0.9408 (g/dL) として、比旋光度測定用サンプルを得た。比旋光度は +30.41 度であった。

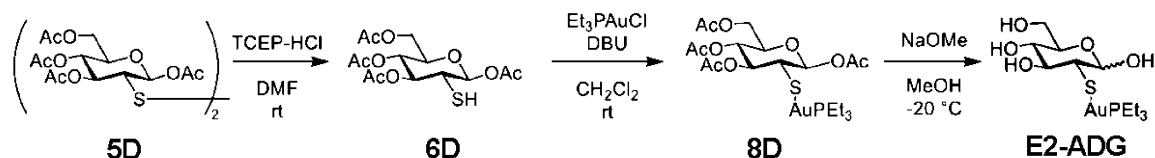
【0052】

【実施例 2】

・化合物 B (E2-ADG)

実施例 1 の化合物 5D を出発原料として、以下の反応式に従って、化合物 B (E2-ADG) を合成した。

【化 13】

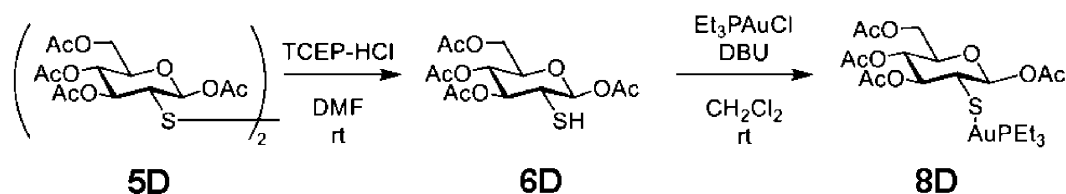


10

【0053】

・化合物 8D の合成

【化 14】



20

【0054】

アルゴン雰囲気下、30 mL ナスフラスコにて、5D (1.0 g, 1.4 mmol)、DMF (10.4 mL)、TCEP・HCl (540 mg, 2.1 mmol) を加えた。室温で 1 時間攪拌後、水/ジクロロメタン (体積比: 1/3) を用いて抽出、brine で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥、ろ過、減圧濃縮を行った。更にトルエンを用いて共沸を行い、6D の粗体を得た。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

30

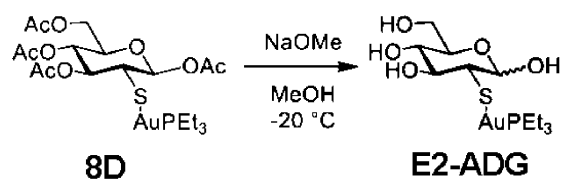
【0055】

アルゴン雰囲気下、50 mL コルベンにて 6D、脱水ジクロロメタン (10.4 mL)、Et₃PAuCl (900 mg, 2.6 mmol) を加えた。続いて DBU (512 μL, 3.4 mmol) を脱水ジクロロメタン (2.6 mL) に溶解させ、反応溶液に滴下した。反応終了を確認後、減圧濃縮した。得られた 8D を含む残渣を NH シリカゲル (62 g) を用いて精製した。展開溶媒に酢酸エチル/ヘプタン (体積比: 1/1) を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、8D を 1.6 g (収率 85%) 得た。

【0056】

・化合物 B (E2-ADG) の合成

【化 15】



40

【0057】

アルゴン雰囲気下、100 mL コルベンにて 8D (1.63 g, 2.4 mmol)、メタノール (24 mL) を加え、内温が -20 °C になるように冷却を行った。その後 5 M

50

NaOMeメタノール溶液（577 μ L, 2.8 mmol）を滴下し、同温度で攪拌を行った。反応終了を確認後、Amberlite IR120（H⁺フォーム）を加えpH 6～7にした後にろ過、減圧濃縮した。得られたE2-ADGを含む残渣をDIOシリカゲル（15 g）を用いて精製した。展開溶媒にクロロホルム／メタノール（体積比：100／0→98／2→96／4）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し凍結乾燥を行うことで、E2-ADGを136 mg（収率11%）得た。

【0058】

・比旋光度測定

化合物B（E2-ADG）を水に溶かし、濃度を0.9410（g／dL）として、比旋光度測定用サンプルを得た。比旋光度は+34.01度であった。

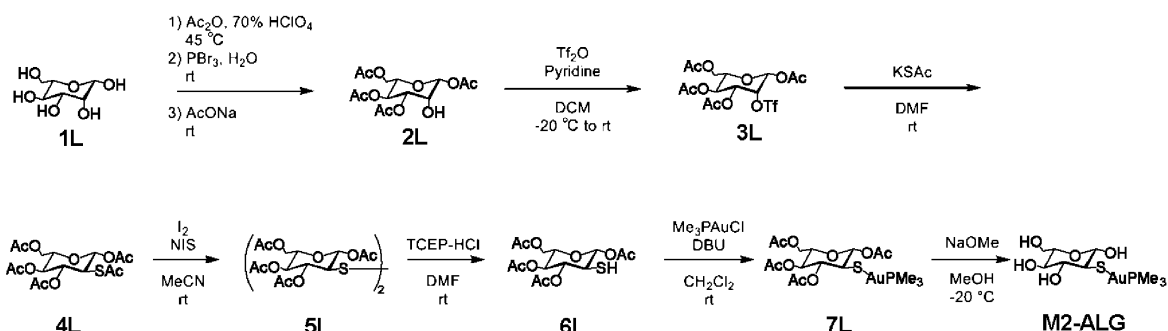
【0059】

【実施例3】

・化合物C（M2-ALG）

L-マンノース（化合物1L）を出発原料として、以下の反応式に従って、化合物C（M2-ALG）を合成した。

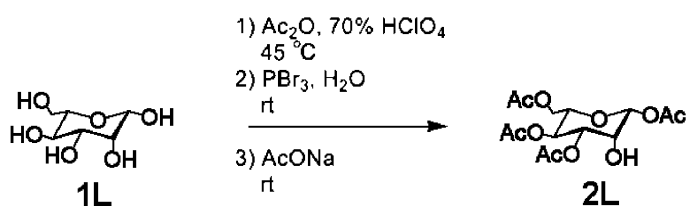
【化16】



【0060】

・化合物2Lの合成

【化17】



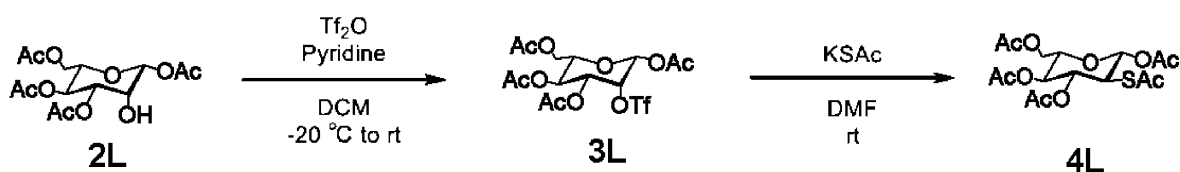
【0061】

1Lコルベンにて、無水酢酸（62 g, 0.60 mol）、L-マンノース（化合物1L）50 mg、70質量% HClO₄（0.30 mL）を添加し40°Cに昇温した。続いて同温度で残りのL-マンノース（14.95 g, 83 mmol）を分割投入し、室温で17 h攪拌した。続いて反応容器を氷浴で冷却し、PBr₃（22.5 g, 83 mmol）を滴下後、27°C以下で冷水（13.6 mL）を滴下した。滴下終了後、反応溶液を室温に戻し1.5時間攪拌した。TLCにて反応進捗を確認した後に再び氷浴にて冷却し、酢酸ナトリウム（27.3 g, 333 mmol）と水（34 mL）の水溶液を滴下した。室温下20分攪拌した後に氷浴50 mL中に反応溶液を注加し、ジクロロメタンで2回抽出を行った。続いて冷飽和重曹水で2回洗浄した後にジクロロメタンで再抽出を行い、Na₂SO₄で乾燥した。乾燥剤をろ別し、減圧濃縮を行った後にジエチルエーテル150 mLを加え、白色固体を析出させた。固体をろ取、冷ジエチルエーテルで洗浄することで2Lを6.5 g（収率23%）得た。

【0062】

・化合物 4 L の合成

【化 1 8】



【0063】

アルゴン雰囲気下、500 mL コルベンにて 2 L (18.8 g, 2.6 mmol)、脱水ピリジン (3.33 mL, 41.2 mmol)、脱水ジクロロメタン 196 mL を加え内温が -20°C になるよう冷却を行った。続いて TF_2O (6.76 mL, 41.2 mmol) を内温が -20°C を超えないように加え同温度で撹拌を行った。反応終了後、冷水中に反応液を注加した後に冷飽和重曹水 (150 mL) で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥、ろ過、濃縮を行い褐色オイルの 3 L の粗体を 10.1 g 得た。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

10

【0064】

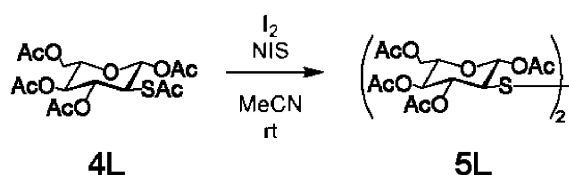
アルゴン雰囲気下、1 L コルベンにて 3 L (9.0 g, 18.7 mmol)、DMF (342 mL)、KSAc (21.4 g, 187 mmol) を加え、室温下で撹拌を行った。反応終了後、水/酢酸エチル (体積比: 1/3) で抽出を行い、brine で洗浄、減圧濃縮した。得られた 4 L を含む残渣をシリカゲル (272 g) で精製した。展開溶媒に酢酸エチル/ヘプタン (体積比: 1/3) を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、4 L の粗体を 7.8 g 得た。この粗体を酢酸エチル/ヘプタン (体積比: 1/2) で再結晶することで、4 L を 5.0 g (収率 66%) 得た。

20

【0065】

・化合物 5 L の合成

【化 1 9】



30

【0066】

本反応は 2 つにバッチを分けて実施した。アルゴン雰囲気下、4 L (1.5 g, 3.7 mmol)、脱水アセトニトリル (30 mL)、ヨウ素 (2.3 g, 9.2 mmol)、NIS (2.1 g, 9.2 mmol) を加え室温下で 6 時間撹拌を行った。(同操作を 1.5 g の 4 L を用いてもう 1 バッチ行った。) その後反応溶液を水/ジクロロメタン (体積比: 1/3) に注加し、有機層を 5 質量% チオ硫酸ナトリウム水溶液、brine で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥、ろ過、減圧濃縮した。得られた 5 L を含む残渣をシリカゲル (55 g) を用いて精製した。展開溶媒に酢酸エチル/ヘプタン (体積比: 1/1) を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、5 L の粗体を 1.5 g 得た。続いて得られた粗体に対して室温下でジイソプロピルエーテル IPE (15 mL) を加え、固体を析出させた。固体をろ取、乾燥を行うことで 5 L を 993 mg (収率 31%) 得た。

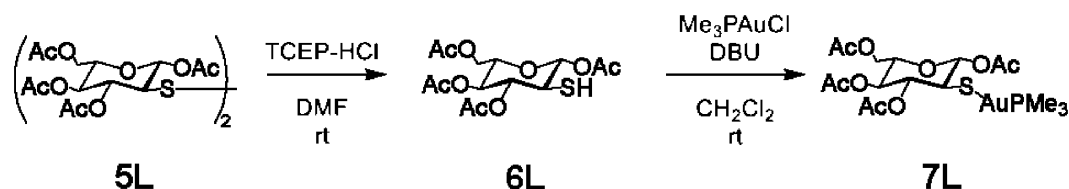
40

【0067】

・化合物 7 L の合成

50

【化20】



【0068】

アルゴン雰囲気下、30 mL コルベンにて、5 L (335 mg, 0.461 mmol)、DMF (3.3 mL)、TCEP・HCl (198 mg, 0.690 mmol) を加えた。室温で2時間攪拌後、水／ジクロロメタン（体積比：1／3）を用いて抽出、brine で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥、ろ過、減圧濃縮を行った。更にトルエンを用いて共沸を行い、6 L の粗体を得た（淡黄色オイル）。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

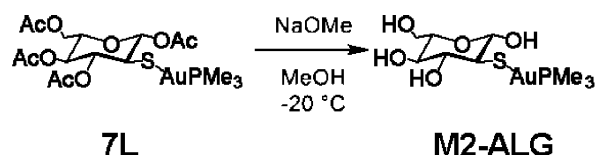
【0069】

アルゴン雰囲気下、10 mL コルベンにて、6 L、脱水ジクロロメタン (3.4 mL)、Me₃PAuCl (281 mg, 0.910 mmol) を加えた。続いてDBU (168 mg, 1.10 mmol) を脱水ジクロロメタン (0.84 mL) に溶解させ、反応溶液に滴下した。反応終了を確認後、セライト濾過、減圧濃縮した。得られた7 Lを含む残渣をNHシリカゲル (1.8 g) を用いて精製した。展開溶媒に酢酸エチル／ヘプタン（体積比：1／1）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、7 Lを430 mg（収率73%）得た。

【0070】

・化合物M2-ALGの合成

【化21】



【0071】

アルゴン雰囲気下、10 mL コルベンにて7 L (373 mg, 0.59 mmol)、メタノール (5.6 mL) を加え、内温が-20 °Cになるように冷却を行った。その後5 M NaOMeメタノール溶液 (0.14 mL, 0.70 mmol) を滴下し、同温度で攪拌を行った。反応終了を確認後、Amberlite IR120 (H⁺フォーム) を加えpH 6～7にした後にろ過、減圧濃縮した。得られたM2-ALGを含む残渣をDIOLシリカゲル (10 g) で精製した。展開溶媒にクロロホルム／メタノール（体積比：100／0→98／2→96／4）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し凍結乾燥を行うことで、M2-ALGを136 mg（収率50%）得た。

【0072】

・比旋光度測定

化合物C (M2-ALG) を水に溶かし、濃度を0.6224 (g/dL) として、比旋光度測定用サンプルを得た。比旋光度は-31.65度であった。

【0073】

[実施例4]

・化合物D (E2-ALG)

実施例3の化合物5 Lを出発原料として、以下の反応式に従って、化合物D (E2-ALG) を合成した。

10

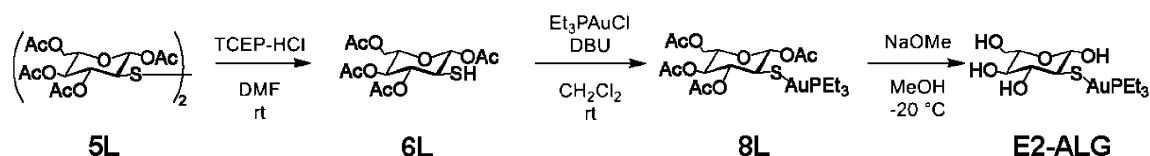
20

30

40

50

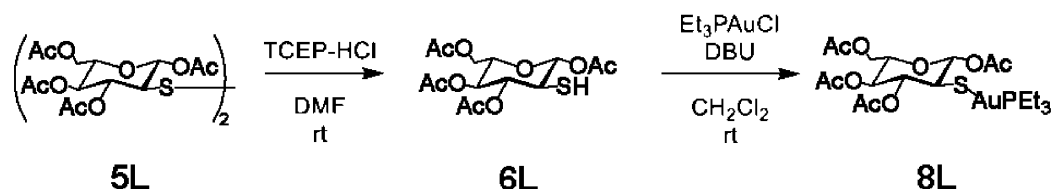
【化 2 2】



【 0 0 7 4】

・化合物 8 L の合成

【化 2 3】



【 0 0 7 5】

アルゴン雰囲気下、30 mL コルベンにて、5 L (444 mg, 0.61 mmol)、DMF (4.4 mL)、TCEP・HCl (263 mg, 0.92 mmol) を加えた。室温で2時間攪拌後、水／ジクロロメタン（体積比：1／3）を用いて抽出、brine で洗浄、Na₂SO₄で乾燥、ろ過、減圧濃縮を行った。更にトルエンを用いて共沸を行い、6 L の粗体を得た。これ以上の精製を行わず次工程へ進めた。

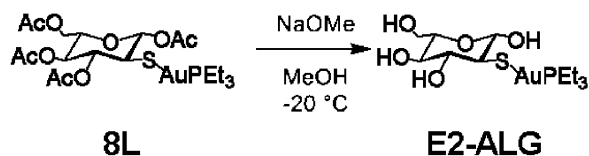
【 0 0 7 6】

アルゴン雰囲気下、100 mL ナスフラスコにて6 L、脱水ジクロロメタン (4.4 mL)、Et₃PAuCl (423 mg, 1.21 mmol) を加えた。続いてDBU (223 mg, 1.5 mmol) 脱水ジクロロメタン (1.0 mL) に溶解させ、反応溶液に滴下した。反応終了を確認後、減圧濃縮した。得られた8 Lを含む残渣をNHシリカゲル (24.4 g) を用いて精製した。展開溶媒に酢酸エチル／ヘプタン（体積比：1／1）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し、8 Lを541 mg（収率65%）得た。

【 0 0 7 7】

・化合物 E 2 - A L G の合成

【化 2 4】



【 0 0 7 8】

アルゴン雰囲気下、30 mL コルベンにて8 L (541 mg, 0.797 mmol)、メタノール (8.1 mL) を加え、内温が-20 °Cになるように冷却を行った。その後5 M NaOMeメタノール溶液 (0.19 mL, 0.96 mmol) を滴下し、同温度で攪拌を行った。反応終了を確認後、Amberlite IR120 (H⁺フォーム) を加えpH 6～7にした後にろ過、減圧濃縮した。得られたE2-ALGを含む残渣をDIOシリカゲル (10 g) を用いて精製した。展開溶媒にクロロホルム／メタノール（体積比：100／0→98／2→96／4）を使用した。目的物を含むフラクションを濃縮し凍結乾燥を行うことで、E2-ALGを185 mg（収率46%）得た。

【 0 0 7 9】

・比旋光度測定

化合物 D (E2-ALG) を水に溶かし、濃度を0.6430 (g/dL) として、比

旋光度測定用サンプルを得た。比旋光度は -32.12 度であった。

【0080】

＜E2-ADG又はE2-ALGを用いた投与試験＞

〔実施例5-1〕 培養開始後早期のMIN6細胞への投与

E2-ADG（実施例2において合成）及びE2-ALG（実施例4において合成）が細胞増殖に与える影響を検討した。細胞には、マウス膵臓由来膵β細胞株（インスリノーマ）MIN6（Miyazaki J. et al., Endocrinology 127: 126-132, 1990）を用い、全て継代数10（Passage number 10）以下のearly passageの細胞で実験を行った。

【0081】

MIN6細胞は、インスリン分泌を行う膵臓ランゲルハンス氏島の正常膵β細胞株として、世界で広く使用されている信頼性の高い細胞の一つであり（Miyazaki J. et al., Endocrinology 127: 126-132, 1990）、培養を開始してからおおそ6DIVまでの時期には、蛍光D-グルコース2-NBDGの細胞内への取り込みは主にグルコーストランスポーターGLUTを介する（Yamada, K. et al., J. Biol. Chem. 275: 22278-83, 2000; Yamada, K. Nature Protocols 2: 753-62, 2007; Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45）。

【0082】

これまでの研究において、Passage number 10以下のMIN6細胞に対し、培養日数6DIVより若い時期に蛍光D-グルコース2-NBDGを適用するとGLUTを介した取り込みを認めるのに対し、蛍光L-グルコース2-NBDLGの取り込みはたまたまに僅かに認められるものの全体としては非常に弱いこと；培養日数7DIVをすぎるとごく一部のMIN6細胞が2-NBDLGの細胞内への取り込みを明瞭に示すようになること；培養日数9DIVを過ぎる頃から2-NBDLGのMIN6細胞内への取り込みが明らかとなり、10DIV-15DIVにおいて最大の2-NBDLGの取り込みを示すことが判明している（Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45）。また、この10DIV-15DIVのMIN6細胞内への2-NBDLGの取り込みは、GLUTのようなグルコーストランスポーターを介さず、「D-グルコースとL-グルコースを区別しないチャネル様の輸送機構」を介すること（Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45）；更に、この「D-グルコースとL-グルコースを区別しないチャネル様の輸送機構」は、 $150\mu\text{M}$ のPhloretinにより選択的に阻害され、この濃度のPhloretin存在下では、MIN6細胞内への取り込みがほぼ消失することがこれまでに報告されている（Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45）。

【0083】

以上の知見に基づいて、2-NBDLGを適用した場合と同様に、もしもE2-ALGがGLUTを通過せず、かつ上記したチャネル様の輸送機構を介してMIN6細胞内に取り込まれるのであれば、培養を開始してから6DIVまでのMIN6細胞にはE2-ALGがほとんど取り込まれず、E2-ALGの細胞増殖に対する効果も極小になると予想した。

【0084】

実験は、96穴プレートの各ウェルに、1ウェルあたり約3000個のMIN6細胞を播種した上、培養開始から5DIV経過した時点で、E2-ALGを投与するウェルと、E2-ADGを投与するウェルとを同一プレート内に外的擾乱が極力ないように配置し、既に樹立した方法（Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45）に従い、投与を実施した。E2-ALGは、濃度が $1000\mu\text{M}$ となるようにバッファーに溶解し、MIN6細胞に10分間又は30分間投与した後、

E2-ALGを含まないバッファー溶液で洗い流した。一方、E2-ADGを1000 μ Mの濃度で同じように投与した。HemichannelやGap Junctionを経由する取り込みを除外する目的で、Carbenoxoloneをbuffer溶液中にあらかじめ溶解して用いた(Sasaki, A. et al., Human Cell 2016, 29, 37-45)。

【0085】

細胞活性(cellular activity)の変化は、生細胞マーカーCalcein-AMを用いて評価した。Calcein-AMは細胞膜透過性であり、細胞内に侵入したのち、細胞のもつエステラーゼ活性によりAM体が切られて生じるCalceinが緑色蛍光を発する。常法に従ってMIN6細胞にCalcein-AMを適用し、細胞の発する緑色蛍光をYokogawaの共焦点定量イメージサイトメーターCellVoyager CQ1を用いて定量計測し、CQ1の付属ソフトウェアを用いて画像解析を実施した上、E2-ALG投与群とE2-ADG投与群の違いをStat View 5.0により統計学的に比較した。統計比較には、Bonferroni-Dunn testを用いた。また、E2-ALGやE2-ADGを含まないKrebs-Ringerバッファー(KRB)溶液中における同時期のMIN6細胞の示す値を陰性対照に用いた。

【0086】

細胞死の発生の程度は、細胞膜不透過性の赤色色素であるPropidium Iodide(PI)を用いて評価した。PIはCalcein-AMと同時にMIN6細胞に適用した。PIによる細胞死の評価の原理は以下の通りである。PIは健全な細胞膜を有する細胞においては、細胞内に侵入せず、蛍光を発しない。しかし、細胞状態の悪化により細胞膜のintegrityが破綻(loss of integrity)することにより、PIが細胞内に非特異的に侵入すると、細胞の核にPIが結合することにより、核が赤色の蛍光を発する。この赤色蛍光の程度を、CellVoyager CQ1を用いて定量計測し、CQ1の付属ソフトウェアを用いて画像解析を実施した上、対照群と投与群との間で、又は、E2-ALG投与群とE2-ADG投与群との間で、統計学的に比較することにより、細胞死の発生の程度を評価した。

【0087】

まず、5DIVのMIN6細胞に対するE2-ALGの効果と、細胞活性を示すCalceinの緑色蛍光を用いて調べた。実験の結果、E2-ALGを10分間投与した場合は、細胞活性の平均値は陰性対照群よりわずかに低下したが、統計学的には陰性対照との間に有意な違いを認めなかった(図1)。E2-ALGを30分間投与した場合は、細胞活性が陰性対照より明らかに下がり、この減少は統計学的にも有意であった(図1)。

【0088】

同時に実施した死細胞マーカーPropidium Iodide(PI)による細胞死発生の評価は、平均値は陰性対照であるKRB中での値より大きかったが、ばらつきも大きく、10分間投与及び30分間投与のいずれの場合においても、陰性対照群とE2-ALGとの間、陰性対照群とE2-ADGとの間、及びE2-ALGとE2-ADGとの間に統計学的な有意差を認めなかった(図示せず)。

【0089】

ところが、E2-ADGを、5DIVのMIN6細胞に対して10分間投与した際の細胞毒性を、E2-ALGを同様に10分間投与した際の細胞毒性と比較すると、予想に反し、Calceinの強度で示した細胞活性の平均値は、E2-ADGの場合において、E2-ALGの場合より若干低いものの、両者の間に統計学的な有意差を認めなかった(図1)。30分間の投与においても、同様の結果であった(図1)。これらの結果は全く予期しないものであった。

【0090】

実際、以上の実験結果は、グルコースの2位OH基の水素原子の代わりに、1位OH基の水素原子を、本発明と同じ-SAUP(C₂H₅)₃基に置換したD-グルコース類縁体DGG及びL-グルコース類縁体LGG(Yamaguchi E. et al., P

10

20

30

40

50

C T / J P 2 0 2 1 / 0 1 3 8 5 7) を、本発明と同じ 5 D I V の M I N 6 細胞に 1 0 0 0 μ M の濃度で 3 0 分間投与した際、D G G が明瞭な P I 陽性細胞死を引き起こし、L G G は陰性対照群とほぼ同程度の P I 陽性細胞死しか示さなかったこと (図 2) と全く異なる。1 0 0 0 μ M, 1 0 分間の投与においても、D G G は陰性対照を上回る P I 陽性細胞死を引き起こしたのに対して、L G G の示す P I 陽性細胞死は陰性対照群と同程度であった (図 2)。

【0091】

D G G 又は L G G を投与した結果は、D G G が、核異型等の、悪性腫瘍細胞の特徴を示す細胞が少ない時期の M I N 6 細胞にグルコーストランスポーターのような D - グルコースと選択的に相互作用するタンパクを介して侵入することにより細胞毒性を示し、グルコーストランスポーターを通過し得ない L G G がこれらの細胞に対し、同一条件では細胞毒性を示さない様子を表している。これらの結果は、本発明において E 2 - A D G のみならず E 2 - A L G が同じ 5 D I V の M I N 6 細胞に対して上記と同一濃度かつ同一時間の投与で、いずれも細胞活性の明瞭な低下をもたらし、かつ、D 型と L 型との間で統計学的に有意な違いを示さなかった結果と明瞭に異なる。

【0092】

E 2 - A D G 又は E 2 - A L G を、1 0 0 0 μ M の濃度で 5 D I V の M I N 6 細胞に対して 1 0 分間又は 3 0 分間投与したこれらの結果は、「E 2 - A L G のみならず、E 2 - A D G も、5 D I V の M I N 6 細胞に発現するグルコーストランスポーター G L U T を通過できない」が、5 D I V の M I N 6 細胞においてもごくわずかに発現する「D - グルコースと L - グルコースを区別しないチャネル様の輸送機構」を介して E 2 - A D G 及び E 2 - A L G の両者が細胞内に強烈に侵入し、P I 陽性細胞で評価される細胞死を一貫して引き起こすには至らないながらも、侵入した細胞の活性を明瞭に低下させたと仮定すると説明できる可能性がある。そこで、この仮説を検証するため、以下の実験を更に行った。

【0093】

【実施例 5 - 2】 培養開始から 1 0 D I V 以降の M I N 6 細胞への投与

継代数 1 0 回以下の M I N 6 細胞を使用し、直径 1 0 0 μ m 以上のスフェロイドが通常形成される時期である培養日数 1 1 D I V において、E 2 - A L G 又は E 2 - A D G を 1 0 0 0 μ M の濃度で 9 0 分間、当該 M I N 6 細胞に適用した。具体的には、9 6 穴プレートの各ウェルに、1 ウェルあたり約 1 0 0 0 個の M I N 6 細胞を播種した上、1 1 D I V において、濃度が 1 0 μ M 又は 1 0 0 0 μ M となるように E 2 - A L G をバッファーに溶解して M I N 6 細胞に 9 0 分間投与した後、E 2 - A L G を含まないバッファー溶液で速やかに洗い流した。同様に、同一プレート内の別のウェルに、E 2 - A D G を同時に適用した。細胞死マーカー P I を用いて、対照群と投与群との間で、又は、E 2 - A L G 投与群と E 2 - A D G 投与群との間で、統計学的に比較した (図 3)。

【0094】

実験の結果、E 2 - A L G 及び E 2 - A D G は、E 2 - A L G も E 2 - A D G も加えない K R B 溶液のみの陰性対照と比較して、いずれも、1 1 D I V の M I N 6 細胞に、P I 値で示した死細胞数の割合の著しい増加を引き起こし、強い細胞障害をもたらした (図 3)。また、細胞への影響の程度は、平均値としては E 2 - A L G の方が E 2 - A D G と比べてわずかに低かったものの、両者間には統計学的な有意差を認めなかった (図 3)。濃度が 1 0 μ M の場合、E 2 - A L G 又は E 2 - A D G の細胞への影響は、K R B 溶液のみの陰性対照と比較して、平均値としては大きいものの有意差はなく、E 2 - A L G と E 2 - A D G との間にも有意差がなかった (図示せず)。

【0095】

これまで本発明者らは、2 - N B D L G や C L G のような蛍光 L - グルコースが、核の大小不同等の悪性の特徴を示すマウス脾臓腫瘍細胞やヒト骨肉腫細胞内に、りんごの果皮や種、あるいは桜の葉等の、バラ科植物の一部を含むポリフェノールフロリジン (P h l o r i z i n) のアグリコンである P H T により阻害される特異的な輸送機構を介して取り込まれることを報告してきた (H u m a n C e l l 2 9 : 3 7 - 4 5, 2 0 1 6

10

20

30

40

50

； Human Cell 34： 634-643， 2021； Org. Lett. 18： 1338-1341， 2016参照）。また、本発明者らのこれまでの実験結果は、これら蛍光L-グルコースの細胞内への輸送機構が、D-グルコース誘導体とL-グルコース誘導体を区別しない非トランスポーター型のおそらくチャネル様の機構であることを示唆している（Human Cell 29： 37-45， 2016）。このようなチャネル様の機構は、難治性がんの患者に見出される悪性腫瘍細胞の細胞膜に特異的に発現している可能性があり、実際、正常細胞や良性の特徴を示す腫瘍細胞には、2-NBDLG（Human Cell 29： 37-45， 2016）やCLGのような蛍光L-グルコースがほとんど取り込まれない（US10001487B2、US10509041B2、EP3130596B1、特許第6566348号、ZL201580030346.9）。そこで、以下の実験を更に行った。

10

【0096】

E2-ALG及びE2-ADGがMIN6細胞にもたらした細胞死が、PHTにより阻害される特異的な輸送機構を介したものであるかを同一プレート上で解析した。具体的には、150 μ MのPHT存在下又はPHT非存在下で、1000 μ MのE2-ALGをMIN6細胞に90分間適用し、E2-ALGのもたらす細胞毒性、即ち、PI値で示した死細胞数の割合がPHTにより有意に減少するかを統計学的に検定した。E2-ADGについても、同一プレート上で同様の実験を同時に行い、両者を対照と比較した。

【0097】

実験の結果、E2-ALG及びE2-ADGにより、11DIVのMIN6細胞、即ち、悪性腫瘍の特徴を示す細胞が増えた時期のMIN6細胞に対する細胞毒性のおよそ75%がPHTにより消失した（図3）。90分間という臨床現場で適用される現実的な投与時間において、E2-ALG及びE2-ADGの腫瘍細胞内への取り込みがPHTによって阻害されるというこのような高い特異性を示したことは全く予想しえない結果であった。本発明は、これまでに構築されてきた蛍光標識D-グルコースによる常識を覆した。

20

【0098】

発明者らの知る限り、E2-ALG及びE2-ADGは、互いに鏡像異性体をなす一組のグルコース誘導体であって、そのうちD型がグルコーストランスポーターに対して強い好性（preference）をもたず、かつ、Phloretinにより特異的に阻害される非グルコーストランスポーター経路を介して、悪性腫瘍細胞の特徴を示す腫瘍細胞に選択的に取り込まれ、これらの細胞に選択的に著しい細胞死をもたらす初めての分子の例である。

30

【0099】

【考察】

以上の結果は、PHTにより阻害される特異的な機構を介して、E2-ALG及びE2-ADGが悪性腫瘍の特徴を示す細胞に選択的に取り込まれ、かつ、90分間で強力な細胞死を引き起こしたことを示す。90分間の投与に比し、30分間の投与では、細胞に対する影響が小さかった。また、投与濃度と効果との関係を見ると、今回の短時間単回投与では、100～1000 μ Mの間で細胞障害機構が顕在化してきたが、長時間の観察を行えばより低濃度で細胞障害効果が惹起される可能性がある。

40

【0100】

E2-ALG及びE2-ADGにおいて、L-及びD-グルコースの2位に結合した-SAuP(C₂H₅)₃基は、抗リウマチ薬としてFDA承認されているAuranofinにおいて、D-グルコースの1位に結合された基（group）である。Auranofinは、更に、グルコースのOH基における水素原子がいずれもアセチル基で置換された構造を有する。Auranofinは副作用が比較的小さく、卵巣がん、乳がん、非小細胞肺癌、急性リンパ性白血病、骨肉腫、その他様々ながんに対して抗がん作用が報告されている。しかし、Mechanism of Actionに不明の点が多く、Drug repositioningとして臨床試験も繰り返されている。最近では栄養欠乏状態の膵臓がん細胞で有効性を示すとする研究報告もあるほか（Onodera，

50

T. et al., J. Biol. Chem. 295, 16678-16690, 2020)、結腸がん細胞に対して、 Et_3PAuCl 単独で細胞毒性を示すという報告もある (ACS Med. Chem. Lett. 8: 997-1001, 2017)。

【0101】

本発明者らの知る限り、これまでD-グルコースの2位とL-グルコースの2位を、細胞毒性を示す同じ置換基で同じように置換した互いに鏡像異性の関係にあるグルコース類縁体分子を哺乳動物細胞に適用し、グルコーストランスポーター及びチャネル様輸送機構(非グルコーストランスポーター型)の通過特性を比較した上、2位置換したD-グルコース類縁体とその鏡像異性体であるL-グルコース類縁体と細胞死の程度において統計学上有意な違いを示さず、かつ当該D-グルコース類縁体がグルコーストランスポーターを通過せず、これらD-グルコース類縁体とL-グルコース類縁体の両者が共にチャネル様輸送機構を通過して細胞毒性を示すと論じた実験も報告もない。言い換えると、E2-ADG及びその鏡像異性体であるE2-ALGは、共にチャネル様輸送機構を同じように通過して細胞毒性を示し、かつ正常細胞に広く発現するグルコーストランスポーターを共に通過しないことによって非がん細胞への毒性を最小限とし得る可能性をもつこれまでにないタイプのグルコース類縁体として期待される。特に、D-グルコース類縁体であるE2-ADGは、ほぼ全身の正常細胞に広く発現するGLUTを通過しないとすれば、GLUTを通過するD-グルコース類縁体と比較して、正常細胞への副作用をはるかに小さくでき、かつ、D-グルコース類縁体であるがゆえに比較的安価に供給できる可能性があり、医療経済上の利点が期待される。一方、D-グルコース結合部位を有する膜タンパクに結合しないL-グルコースの類縁体であるE2-ALGは、D-グルコース類縁体より高濃度で使用した場合にも、より高い安全性を担保し、がんを効果的に縮小できる可能性がある。

【0102】

<M2-ADG又はM2-ALGを用いた投与試験>

〔実施例6-1〕培養開始後早期のMIN6細胞への投与

実施例5-1において、E2-ADGの代わりにM2-ADG(実施例1において合成)を用い、E2-ALGの代わりにM2-ALG(実施例3において合成)を用いて、実施例5-1と同様に、投与試験を行った。但し、M2-ADG又はM2-ALGは、培養開始から4DIV経過した時点で30分間投与し、M2-ADG又はM2-ALGの濃度は、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、又は $1000\mu\text{M}$ とした。

【0103】

その結果、まず、Calceinで評価した細胞活性については、実施例5-1同様、M2-ADG投与群とM2-ALG投与群との間で、いずれの濃度においても統計学的な有意差は認められなかった(図4)。特に、濃度が $10\mu\text{M}$ 又は $100\mu\text{M}$ である場合には、M2-ADG及びM2-ALGのいずれを投与しても、KRBのみの陰性対照と比較して、細胞活性は平均値がわずかに低下するのみで陰性対照との間に有意差はなく、M2-ADGとM2-ALGとの間にも細胞活性に有意差がなかった。しかし、 $1000\mu\text{M}$ の濃度では、M2-ADG及びM2-ALGのいずれを投与した場合にも有意な細胞活性の低下が観察され、両投与群の細胞活性低下効果の間には有意差がなかった(図4)。

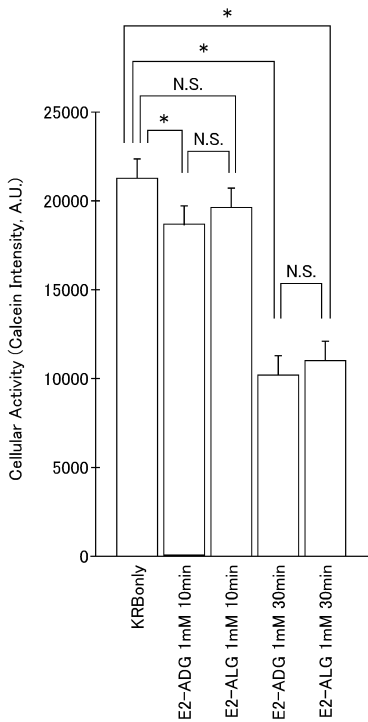
【0104】

一方、M2-ADG又はM2-ALGのMIN6細胞への投与による細胞死の発生を死細胞マーカーPIで評価した結果を図5に示す。M2-ADG及びM2-ALGのいずれの投与群においても、投与濃度が $10\mu\text{M}$ である場合には、陰性対照と比較して細胞死の程度に差がなかった(図5)。投与濃度が $100\mu\text{M}$ の場合、平均値が上昇したが、陰性対照との間に依然顕著な差は認められなかった(図5)。しかし、 $1000\mu\text{M}$ の濃度では、図5から分かるように明らかな細胞死が観察された。これらの結果は、E2-ALG又はE2-ADGを同じ30分間投与した場合の結果(実施例5-1)と明確に異なる。以上のいずれの投与濃度においても、M2-ADG投与群とM2-ALG投与群との間に

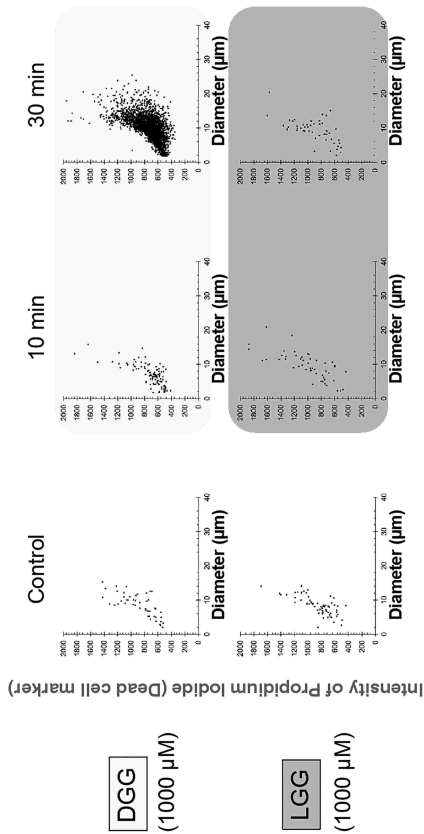
は統計学的な有意差が一切認められなかった（図5）。

【図面】

【図1】



【図2】



10

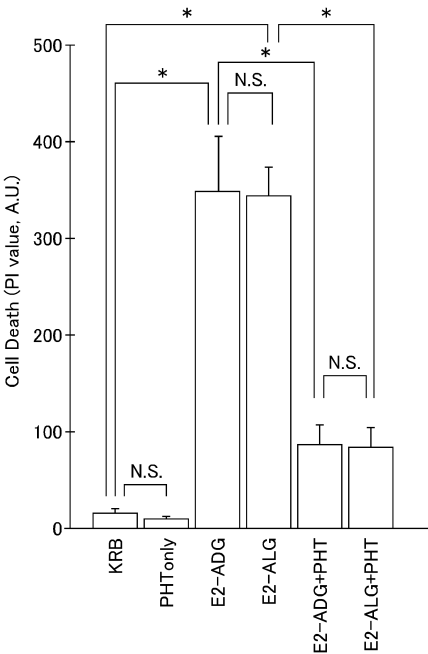
20

30

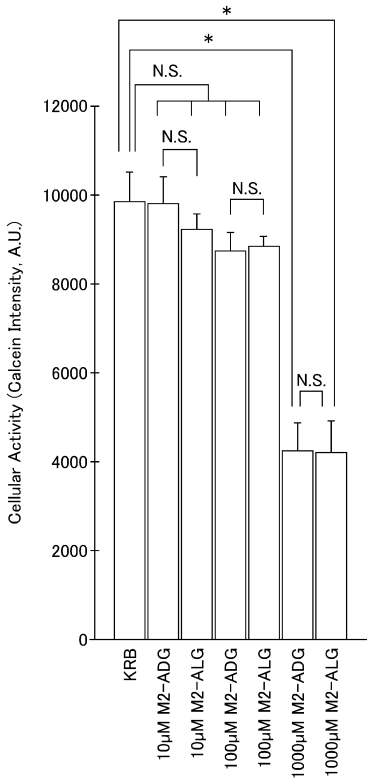
40

50

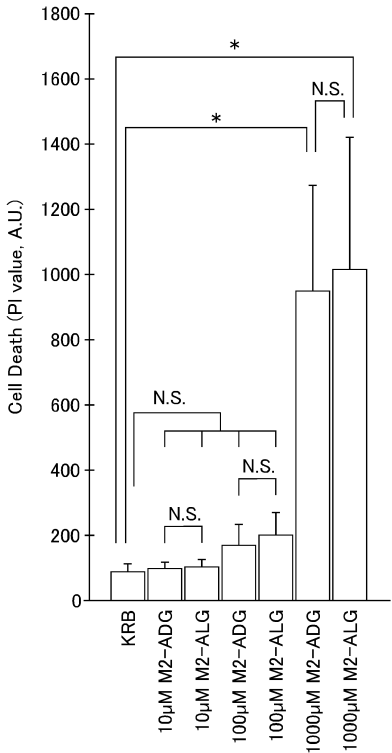
【図 3】



【図 4】



【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 人弘前大学内
(72)発明者 小野 幸輝
青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内
(72)発明者 田中 皓大
青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内
(72)発明者 飯嶋 秀樹
滋賀県大津市浜大津三丁目10-1-1303
審査官 伊佐地 公美
(56)参考文献 国際公開第2012/133688 (WO, A1)
米国特許第05624908 (US, A)
特開2011-236140 (JP, A)
中国特許出願公開第112538099 (CN, A)
FUDICKAR, W. et al., Chemistry: A European Journal, 2017年, Vol. 23, pp. 8685-8693
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07H
A61P
A61K
Caplus/REGISTRY (STN)