

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529642

(P2004-529642A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N	15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/198		A 6 1 K	31/198		4 B O 2 4
A 6 1 K 31/205		A 6 1 K	31/205		4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K	47/48		4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K	48/00		4 C O 8 4
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 125 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-580865 (P2002-580865)	(71) 出願人	503375603
(86) (22) 出願日	平成14年4月12日 (2002. 4. 12)		メディカル カレッジ オブ ジョージア
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月14日 (2003. 10. 14)		リサーチ インスティテュート インコ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/003678		ーポレーテッド
(87) 国際公開番号	W02002/083060		アメリカ合衆国 ジョージア州 オーガス
(87) 国際公開日	平成14年10月24日 (2002. 10. 24)		タ メディカル カレッジ オブ ジョー
(31) 優先権主張番号	60/283, 326		ジア シージェイ-2 2 1 1
(32) 優先日	平成13年4月13日 (2001. 4. 13)	(71) 出願人	000003311
(33) 優先権主張国	米国 (US)		中外製薬株式会社
(31) 優先権主張番号	60/306, 168		東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号
(32) 優先日	平成13年7月19日 (2001. 7. 19)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物およびプロドラッグの送達系としてのアミノ酸輸送体 A T B O, + の利用

(57) 【要約】

本発明は、ATB^{0,+}によって輸送可能な化合物を明らかにした。これらの化合物に関する情報に基づき、ATB^{0,+}によって輸送可能な薬物を設計し、産生し、かつスクリーニングすることができる。そのような薬物は、NOS、フェニルグリシン、カルニチン、D-アミノ酸が関与する疾患を治療および/または予防するために役立つ可能性がある。ATB^{0,+}遺伝子は、上記のような疾患の遺伝子治療に用いるために患者に投与されうる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する薬物またはプロドラッグのスクリーニング方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を選択する段階；
- (b)選択された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階；ならびに
- (c)段階(b)により疾患と関連づけられた化合物を選択する段階。

【請求項 2】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンもしくはD-アミノ酸、または、それらの誘導体、およびアミノ酸に基づくプロドラッグである、請求項1記載の方法。 10

【請求項 3】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の設計方法であって、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸ならびにそれらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計することを提供する方法。

【請求項 4】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：
(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階；ならびに 20
(b)設計された化合物を合成する段階。

【請求項 5】

合成された化合物がATB^{0,+}による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：
(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階； 30
(b)設計された化合物を合成する段階；ならびに
(c)合成された化合物がATB^{0,+}による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階。

【請求項 7】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：
(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階； 40
(b)設計された化合物を合成する段階；ならびに
(c)合成された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階。

【請求項 8】

ATB^{0,+}を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物である方法。

【請求項 9】

ATB^{0,+}を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づ 50

くプロドラッグからなる群より選択される化合物であり、該化合物が放射性物質で標識されたまたはトキシン付加された、方法。

【請求項 10】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、および、オルニチンの誘導体である、請求項2から9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

ATB^{0,+}遺伝子を有効成分として含有する、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の治療薬。

【請求項 12】

ATB^{0,+}遺伝子を投与する段階を含む、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の遺伝子治療。

【請求項 13】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、癌治療薬。

【請求項 14】

癌がiNOS発現性癌である、請求項13記載の治療薬。

【請求項 15】

癌が乳癌または肝癌である、請求項13記載の治療薬。

【請求項 16】

化合物がNOS阻害剤である、請求項13記載の治療薬。

【請求項 17】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を投与する段階を含む、癌を治療する方法。

【請求項 18】

癌がiNOS発現性癌である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

癌が乳癌または肝癌である、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

化合物がNOS阻害剤である、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

癌治療薬の製造のための、ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の使用。

【請求項 22】

癌がiNOS発現性癌である、請求項21記載の使用。

【請求項 23】

癌が乳癌または肝癌である、請求項21記載の使用。

【請求項 24】

化合物がNOS阻害剤である、請求項21記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、薬物およびプロドラッグの送達系としてアミノ酸輸送体ATB^{0,+}を利用することに関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術

一酸化窒素（NO）は、様々な生理的プロセスに関与した重要な調節分子である（Moncada, S., J.R.Soc.Med., 92, 164-169 (1999)、Martin, E.ら、Sem.Perinatol., 24, 2-6 (2000)、Bredt, D.S., Free Rad.Res. 31, 577-596 (1999))。この分子は、L-アルギニンから一酸化窒素合成酵素（NOS）により生成される。NOSについては、3種の個別のアイソフォー

10

20

30

40

50

ムが同定されている:ニューロン性NOS (nNOSまたはNOS I)、誘導性NOS (iNOSまたはNOS II)、および内皮性NOS (eNOSまたはNOS III)(Knowles,R.G.およびMoncada,S., Biochem.J., 298, 249-258 (1994)、Stuehr,D.J., Biochim.Biophys.Acta, 1411, 217-230 (1999))。NOは多くの生理的プロセスにおいて必須の役割を果たすにもかかわらず、NOの過剰生成は、炎症、肺血症性ショック、糖尿病、および神経変性を含む多数の病態に関連している (Miller,M.J.S.およびGrisham,M.B., Mediators Inflammation, 4, 387-396 (1995)、Symeonides,S.およびBalk,R.A., Infect.Dis.Clin.N.Amer., 13, 449-463 (1999)、Mandrup-Poulsen,T., Diabetologia, 39, 1005-1029 (1996)、Jenner,P.およびOlanow,C.W., Neurology, 47, S161-S170 (1996))。従って、NOSを阻害することによるNO生成の妨害は、これらの病態の治療につながる可能性がある。異なる病態にはNOSの異なるアイソフォームが関連しているので、特異的NOSアイソフォームの選択的阻害が、これらの疾患の様々な治療法の治療適用を強化する上で必要となると考えられる。異なるNOSアイソフォームに対し選択性のあるいくつかの阻害剤が同定されている (Southan,G.J.およびSzabo,C., Biochem.Pharmacol., 51, 383-394 (1996)、Bryk,R.およびWolff,D.J., Pharmacol.Ther., 84, 157-178 (1999))。これらの阻害剤の使用は、ヒトおよび実験動物におけるNOの過剰生成に関連した多様な病態の治療において有用であることが示されている (Moncada,S.およびHiggs,E.A., FASEB J., 9, 1319-1330 (1995)、Hobbs,A.J.ら, Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 39, 191-220 (1999))。

10

【0003】

NOS阻害剤の治療的有効性は、これらの阻害剤のNOSとの相互作用のための標的細胞への取込み効率により、著しい影響を受けると予想される。さらに、小腸におけるこれらの阻害剤の輸送は、それらの経口的生体利用率(バイオアベイラビリティ)に影響を及ぼすと考えられる。従ってNOS阻害剤の細胞取込み機構に関する情報は、それらの治療的可能性を評価する上で重要である。ほとんどのNOS阻害剤は、構造上アルギニン、リジン、シトルリン、およびオルニチンと関連している (Southan,G.J.およびSzabo,C., Biochem.Pharmacol., 51, 383-394 (1996)、Bryk,R.およびWolff,D.J., Pharmacol.Ther., 84, 157-178 (1999))。その結果、NOS阻害剤の細胞取込みにおいて、アミノ酸輸送システムが重要な役割を果たすこととなる。哺乳動物細胞において、複数の輸送システムが、アミノ酸輸送を媒介するように機能し、かつこれらの輸送システムは、基質特異性、基質親和性、駆動力、および組織発現パターンが著しく異なっている (Christensen,H.N., Methods Enzymol., 173, 576-616 (1989))。これらの輸送システムの多くが、最近クローニングされ、かつ機能的に特徴決定されている (Palacin,M.ら, Physiol.Rev., 78, 969-1054 (1998)、Genapathy,V.ら, Intestinal transport of peptides and amino acids. In Current Topics in Membranes., Barrett,K.E.およびDonowitz,M.編, Vol.50, pp.379-412, Academic Press. (2001))。過去に、NOS阻害剤の取込みを媒介するアミノ酸輸送システムの同定を目的としたいくつかの研究がある (Schmidt,K.ら, Mol.Pharmacol., 44, 615-621 (1993)、Schmidt,K.ら, Biochem.J., 301, 313-316 (1994)、Baydoun,A.R.およびMann,G.E., Biochem.Biophys.Res.Comm., 200, 726-731 (1994)、Schmidt,K.ら, J.Neurochem., 64, 1469-1475 (1995)、Raghavendra Rao,V.L.およびButterworth,R.F., J.Neurochem., 67, 1275-1281 (1996))。これまでにNOS阻害剤の細胞取込みに関与しているアミノ酸輸送システムが2種類同定されている。これらは、システムy⁺およびシステムLである。両システム共、Na⁺とは無関係の輸送システムであり、したがって、細胞内のNOS阻害剤を含むそれらの基質を濃縮する能力はごく弱いものである。本発明者らの知るところでは、その他のアミノ酸輸送システムでNOS阻害剤の輸送にかかわるものは示されていない。

20

30

40

【0004】

カルニチン(β-ヒドロキシ-γ-トリメチルアミノブチレート)は、長鎖の脂肪酸のβ酸化には必須である。これは、ヒトに関しては、肝および腎において内因性に合成される (Carter,A.L.ら, Journal of Child Neurology, 10 (別冊2), S3-S7 (1995))。食物供給源に由来するものはまた、腸管内でも吸収される (Rebouche,C.J., FASEB Journal, 6, 3379-3386 (1992))。この分子の生物学的重要性は、様々な遺伝性疾患や後天性疾患において

50

発症するカルニチン欠損症の臨床的結果から明らかである (Kerner, J. および Hoppel, C., Annual Review of Nutrition, 18, 179-206 (1998))。カルニチン欠損症の症状は、骨格筋ミオパシー、心筋ミオパシー、脳障害、および成長障害がある (Kerner, J. および Hoppel, C., Annual Review of Nutrition, 18, 179-206 (1998); Treem, W.R. ら, New England Journal of Medicine, 319, 1331-1336 (1988))。心筋や骨格筋を含むほとんどの組織において、細胞内カルニチンレベルは、血漿レベルよりも数倍高く、その理由は Na^+ 依存型高親和性カルニチン輸送システムが存在するからである (Bremer, J., Physiological Reviews, 63, 1420-1480 (1983))。同一の輸送システムはまた、尿細管上皮細胞の刷子縁膜にも存在し、ここではカルニチンの再吸収に関与している (Rebouche, C.J. および Mack, D. L., Archives of Biochemistry and Biophysics, 235, 393-402 (1984); Huang, W. ら, Biochemical Pharmacology, 58, 1361-1370 (1999))。この輸送システムの遺伝子欠損は、カルニチンの過剰な尿中排泄をもたらし、これが全身のカルニチン欠損症を起因する。この輸送システムは、心筋や骨格筋のような組織におけるカルニチンの能動蓄積にも寄与しているので、この遺伝子欠損は、これらの組織中の細胞内カルニチンレベルの劇的低下に関連している。原発性カルニチン欠損症とも称されるこの欠損症の主な臨床症状は、骨格筋および心筋のミオパシーであり、これは細胞内カルニチンレベルの低下に起因した脂肪酸酸化によるエネルギー産生が損なわれた結果もたらされる。最近、この輸送体がクローニングされた (Wu, X. ら, Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595 (1998); Tamai, I. ら, Journal of Biological Chemistry, 273, 20378-20382 (1998))。興味深いことに、この輸送体はいくつかの有機カチオンも輸送する (Wu, X. ら, Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595 (1998); Wu, X. ら, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290, 1482-1492 (1999))。さらにこれは、その一次構造を基に、有機カチオン輸送体遺伝子ファミリーに属している (Wu, X. ら, Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595 (1998))。従って、この輸送体は OCTN2 (新規有機カチオン輸送体2) と称されている。

【0005】

D-アミノ酸は一般的に、哺乳動物における代謝経路に対して異物であると見なされる。特にD-アミノ酸オキシダーゼを除いて、ほとんど全ての哺乳動物の酵素はL-アミノ酸に対して選択的である。D-アミノ酸は血漿中に見出されるが、食物または腸内微生物叢に由来すると考えられている。ほとんどのD-アミノ酸の血清中レベルは、微生物を含まない実験動物では顕著に減少しており、これにより腸内微生物が血清中に存在するD-アミノ酸に有意に関与していることが示されている (J.J. Corrigan, Science, 164, 142 (1969), M. Friedman, J. Agric. Food Chem., 47, 3457 (1999))。食物も同様に、食品の調製および加工の際にL-エナンチオマーから生成されたD-アミノ酸を含む (E.H. Man および J.L. Bada, Annu. Rev. Nutr., 7, 209 (1987))。

【0006】

D-アミノ酸は哺乳動物における代謝経路に関与しないことから、これらのアミノ酸の生物学的重要性にはまだ疑問が残る。しかし、特定のD-アミノ酸が有用な作用を有する証拠がある (M. Friedman, J. Agric. Food Chem., 47, 3457 (1999), E.H. Man および J.L. Bada, Annu. Rev. Nutr., 7, 209 (1987))。D-フェニルアラニンおよびD-ロイシンは鎮痛性であることが示されており、難治性疼痛の管理において薬理的に用いられている (R.S. S. Cheng および B. Pomeranz, Brain Res., 177, 583 (1979), K. Budd, Adv. Pain Res. Ther., 5, 305 (1983))。同様に、最近の研究により、D-セリンを統合失調症患者に投与すると、認識機能および動作が改善する可能性があることが示された (G. Tsai ら, Biol. Psychiatry, 44, 1081 (1998))。また、グルタミン酸作動性神経伝達の調節にD-セリンが生理的機能を有する証拠も存在する (T. Matsui ら, J. Neurochem., 65, 454 (1995), J.P. Mothet ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4926 (2000))。このアミノ酸はN-メチル-D-アスパラギン酸受容体上のグリシン部位に結合するが、この結合は、グルタミン酸による受容体関連 Ca^{2+} チャンネル機能の活性化にとって不可欠である。興味深いことに、このD-アミノ酸は、セリンラセマーゼによって媒介されるL-セリンのラセミ化によっ

て脳において内因性に産生される (H. Woloskerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、96、721 (1999))。この酵素は、脳から最近クローニングされて、NMDA受容体と同時局在することが判明している (H. Woloskerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、96、13409 (1999))。

【0007】

D-アミノ酸は、細菌中に豊富に存在し (M. Friedman、J. Agric. Food Chem.、47、3457 (1999))、したがって、生理的条件下で細菌コロニー形成が多い結腸および回腸中に有意な量存在すると予想される。先に述べたように、食物も同様にD-アミノ酸を含む。いくつかのD-アミノ酸は、重要な生理的および薬理的な機能を有することが現在知られていることから、細菌由来のおよび食物性のD-アミノ酸の腸管吸収は重要な問題点となる。管腔のD-アミノ酸が血液に流入するために腸管内に有効な機構が存在すれば、外因性D-アミノ酸が生物学的作用を発揮することがおそらく可能であろう。アミノ酸の腸管吸収を媒介するいくつかの輸送体が最近クローニングされた (V. Ganapathyら、Current Topics in Membranes、50、379 (2001))。今日まで、有意な程度までD-アミノ酸を輸送することが示されているアミノ酸輸送体は2個に過ぎない (Y. Kanaiら、J. Biol. Chem.、273、23629 (1998)、Y. Fukasawaら、J. Biol. Chem.、275、9690 (2000))。それらは、システムL1およびシステムasc1である。いずれも、細胞質膜を介したアミノ酸交換を媒介する促進性輸送体である。輸送機能が如何なる推進力にも連動していないために、それらは活性ではない。システムL1およびシステムasc1は、脳からクローニングされており、これらの輸送体の転写物は腸管において検出可能である。興味深いことにこれらの輸送体はヘテロ二量体であり、どちらも4F2細胞表面抗原の重鎖 (4F2hc) を共通のサブユニットとして含む。4F2hcは、腸管粘膜細胞の側底膜のみに局在するため、システムL1およびシステムasc1は、細胞から血液へのアミノ酸の流出に関与する可能性がある。現在のところ、管腔から細胞へのD-アミノ酸の流入を媒介する腸上皮細胞の刷子縁膜に輸送システムが存在するか否かはわかっていない。

【0008】

ATB^{0,+}として知られている輸送体は、小腸、肺および乳腺において発現されるアミノ酸輸送体である。機能的には、ATB^{0,+}は、中性および塩基性のアミノ酸のためのNa⁺およびCl⁻連動型輸送システムである。これは、腸管におけるアミノ酸の吸収において重要な役割を果たしている (Ganapathy, V.ら、Intestinal transport of peptides and amino acids. In, Current Topics in Membranes (Barrett, K.E.およびDonowitz, M.編)、Vol.50、pp.379-412、Academic Press (2001))。ヒトATB^{0,+}のクローニングが最近報告されている (Sloan, J.L.およびMager, S.、Journal of Biological Chemistry、274、23740-23745 (1999))。現時点で、ATB^{0,+}の輸送機能は、基質としてのアミノ酸についてのみ研究されている。その輸送機能は集積力が強く、Na⁺およびCl⁻の膜内外勾配ならびに膜電位によりエネルギー供給されている。ATB^{0,+}は、アミノ酸 (例えば、グリシンおよびプロリン)、神経伝達物質 (例えば、モノアミンおよびγ-アミノブチレート)、ならびに浸透圧調節物質 (osmolyte) (例えば、タウリンおよびベタイン) のような様々な化合物に関する、Na⁺およびCl⁻連動型輸送体の遺伝子ファミリーに属する。構造的に、ATB^{0,+}は、γ-アミノブチレート輸送体およびベタイン輸送体に非常に密に関連している。

【発明の開示】

【0009】

発明の開示

本発明者らは、マウスの結腸から得たNa⁺およびCl⁻連動型のアミノ酸輸送体であるATB^{0,+}をクローニングし、かつそのNOS阻害剤輸送能について調べた。ATB^{0,+}が哺乳動物細胞で発現された場合、これはNa⁺およびCl⁻に運動した方法で様々な中性および塩基性のアミノ酸を輸送することができる。本発明者らは、いくつかのNOS阻害剤を、ATB^{0,+}を介したグリシン取込みを阻害する能力について調べ、それらは全て取込み過程においてグリシンと競合することを発見した。^[3H]-N^ω-ニトロ-L-アルギニンを用いて、本発明者らは、このATB^{0,+}を介したNOS阻害剤のNa⁺およびCl⁻連動型の輸送を直接明らかにした。本発明者ら

はその後、アフリカツメガエル (*X. laevis*) の卵母細胞系を用い、広範な種類のNOS阻害剤のATB^{0,+}を介した輸送について調べた。これは、クローニングされたATB^{0,+}を発現している卵母細胞において、電圧固定条件下で、NOS阻害剤が誘導した内向き電流を評価することにより達成された。これらの研究は、ATB^{0,+}は、広い範囲の双性イオン性に加え陽イオン性のNOS阻害剤を輸送することができることを示した。これらのデータは、腸管内におけるNOS阻害剤に関するイオン勾配駆動性集積性輸送システム (concentrative transport system) を初めて同定したことを示している。

【0010】

本発明者らは、輸送体によるカルニチンおよびそのアシルエステルの相互作用を調べるために、輸送体をマウス結腸からクローニングし、かつ哺乳動物細胞およびアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞において機能的に発現させた。 10

【0011】

クローニングされたATB^{0,+}は、哺乳動物細胞において発現された場合、カルニチン、プロピオニルカルニチン、およびアセチルカルニチンを輸送することができた。この輸送プロセスは、Na⁺およびCl⁻依存性であった。カルニチンのミカエリス定数は、0.83±0.08mMであり、Na⁺活性化のヒル係数は1.6±0.1であった。

【0012】

クローニングされたATB^{0,+}は、*Xenopus laevis*卵母細胞で発現された場合、電圧固定条件下、カルニチンおよびプロピオニルカルニチンが存在する中で、内向き電流を誘導することができた。アセチルカルニチンの存在する中では、電流は検出されなかった。カルニチン誘導電流は、強制的にNa⁺およびCl⁻の存在に左右された。この電流は、カルニチンで可飽和であり、かつミカエリス定数は1.8±0.4mMであった。Na⁺およびCl⁻の活性化動力学的分析は、2個のNa⁺および1個のCl⁻が、この輸送体によるカルニチンの輸送に関連していることを明らかにした。 20

【0013】

これらの研究により、アミノ酸輸送体ATB^{0,+}の新規機能の同定が説明されている。この輸送体は、腸管、肺、および乳腺において発現されているので、これらの組織におけるカルニチンの活用において重要な役割を果たす可能性がある。

【0014】

カルニチンのNa⁺依存型輸送システムについては既に説明されている。この輸送体は、OCT N2 (新規有機カチオン輸送体2) としても知られており、これはほとんどの組織において発現され、かつ高い親和性によりカルニチンを輸送する。しかしこれは、Na⁺勾配と膜電位によってのみエネルギー供与される。対照的に、ATB^{0,+}は、カルニチン低親和性輸送体であるが、そのエネルギー供与はNa⁺勾配、Cl⁻勾配、および膜電位によるので、OCTN2よりもかなり高い凝集力を示す。 30

【0015】

また、本発明者らは、ATB^{0,+}のD-アミノ酸の輸送能につき検討を行なった。現在のところ、腸内管腔側にある輸送体でD-アミノ酸を輸送するものは知られていない。本発明者らは、ATB^{0,+}がD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファンを輸送することを明らかにした。さらに、本発明者らは、生体内での重要性が解明されているD-セリンにつき、ATB^{0,+}と他の輸送体の輸送能の比較を行なった。その結果、ATB^{0,+}は他の多くの輸送体よりも高いD-セリン輸送能を有することが判明した。 40

【0016】

さらに、本発明者らは、フェニルグリシニンが、その他の必須アミノ酸よりも高親和性でATB^{0,+}により輸送されることも見出した。さらにまた、本発明者らは、(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシンのようなL-フェニルグリシン誘導体NOS阻害剤がATB^{0,+}によって特異的に輸送されることも発見した。

【0017】

さらに、本発明者らは、HRPE細胞に発現させたマウスATB^{0,+}を介した輸送プロセスに関してアスパラギン酸およびグルタミン酸に基づくプロドラッグの能力を評価した。その結果 50

、アスパラギン酸およびグルタミン酸のメチルおよびベンジルエステルは、グリシン輸送の強力な阻害剤であることが判明した。本発明者らはまた、アシクロビルのL-グルタミン酸 γ -エステルがATB^{0,+}によって輸送されることも発見した。さらに、本発明者らは、アシクロビルのL-バリン α -エステルさえもATB^{0,+}によって輸送されることを証明した。

【0018】

さらに、本発明者らは、炎症状態の腸管におけるATB^{0,+}の発現を評価した。その結果、炎症状態によって、回腸および結腸におけるATB^{0,+}発現が顕著に増加することが判明した。本発明者らはまた、乳腺腫瘍のような腫瘍、ならびに乳癌および肝臓癌のような癌細胞株においてもATB^{0,+}の発現が上昇することを発見した。

【0019】

ATB^{0,+}は、他の主要アミノ酸輸送体と異なり、Na⁺勾配、Cl⁻勾配、および膜電位の3つの駆動力に依存性であり、したがってATB^{0,+}は集積力が高いため、効果的な薬物送達系になりうる。また、その組織分布またはその発現が、消化管（回腸および結腸）、肺、乳腺に特異的に偏っており、その様な組織特異的な疾病への効果的な送達系となりうる。さらに、その発現は例えば腸炎、敗血症および乳癌などの病態により誘導されるため、そのような病巣への効果的な送達系となりうる。さらに、基質認識性が広いため、アミノ酸構造を持つプロドラッグの送達に有用な可能性がある。

【0020】

したがって、本発明の目的は、薬物およびプロドラッグの送達系としてのアミノ酸輸送体ATB^{0,+}の使用を提供することである。本発明の好ましい態様において、ATB^{0,+}によって輸送される薬物はNOS阻害剤、フェニルグリシン誘導体、カルニチン、D-アミノ酸もしくははその誘導体、またはアミノ酸構造を有するプロドラッグである。

【0021】

本発明のもう一つの目的は、ATB^{0,+}によって輸送されるのに適した薬物のスクリーニング法を提供すること、およびスクリーニングによって得られた薬物を提供することである。

【0022】

本発明のさらなる目的は、ATB^{0,+}によって輸送されるのに適した薬物またはプロドラッグを設計する方法を提供することである。本発明の好ましい態様において、薬物はフェニルグリシン骨格を有し、プロドラッグは一部分としてチロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、および3-カルボキシフェニルグリシンまたは4-カルボキシフェニルグリシンを有する。

【0023】

即ち、本発明は、薬物およびプロドラッグの送達系としてのアミノ酸輸送体ATB^{0,+}の使用に関し、より詳細には、本発明は以下を提供する：

(1)ATB^{0,+}による被輸送能を有する薬物またはプロドラッグのスクリーニング方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を選択する段階、

(b)選択された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階、ならびに

(c)段階(b)により疾患と関連づけられた化合物を選択する段階；

(2)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンもしくはD-アミノ酸、または、それらの誘導体、およびアミノ酸に基づくプロドラッグである、(1)に記載の方法；

(3)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の設計方法であって、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸ならびにそれらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計することを提供する方法；

(4)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階、ならびに

10

20

30

40

50

(b)設計された化合物を合成する段階；

(5)合成された化合物が $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階をさらに含む、(4)に記載の方法；

(6) $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法；

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階、

(b)設計された化合物を合成する段階、ならびに

(c)合成された化合物が $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階；

(7) $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法；

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する段階、

(b)設計された化合物を合成する段階、ならびに

(c)合成された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階；

(8) $ATB^{0,+}$ を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物である方法；

(9) $ATB^{0,+}$ を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物であり、該化合物が放射性物質で標識されたまたはトキシン付加された、方法；

(10)NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、および、オルニチンの誘導体である、(2)～(9)のいずれかに記載の方法；

(11) $ATB^{0,+}$ 遺伝子を有効成分として含有する、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の治療薬；

(12) $ATB^{0,+}$ 遺伝子を投与する段階を含む、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の遺伝子治療；

(13) $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、癌治療薬；

(14)癌がiNOS発現性癌である、(13)に記載の治療薬；

(15)癌が乳癌または肝癌である、(13)に記載の治療薬；

(16)化合物がNOS阻害剤である、(13)に記載の治療薬；

(17) $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を投与する段階を含む、癌を治療する方法；

(18)癌がiNOS発現性癌である、(17)に記載の方法；

(19)癌が乳癌または肝癌である、(17)に記載の方法；

(20)化合物がNOS阻害剤である、(17)に記載の方法；

(21)癌治療薬の製造のための、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物の使用；

(22)癌がiNOS発現性癌である、(21)に記載の使用；

(23)癌が乳癌または肝癌である、(21)に記載の使用；

(24)化合物がNOS阻害剤である、(21)に記載の使用。

【0024】

本発明は、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する薬物またはプロドラッグのスクリーニング方法を提供する。本発明において、 $ATB^{0,+}$ とは、中性および塩基性のアミノ酸に対する Na^+ および Cl^- 連動型輸送システムである。これは、腸管内でのアミノ酸吸収における重要な役

10

20

30

40

50

割を果たす。

【0025】

本発明における化合物としては、これらに制限されるわけではないが、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチド等の単一化合物、ならびに、化合物ライブラリ、遺伝子ライブラリの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物由来の産物、海洋生物由来の細胞抽出物、植物抽出物、原核細胞抽出物、真核細胞抽出物もしくは動物細胞抽出物、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンもしくはD-アミノ酸、または、それらの誘導体、およびアミノ酸に基づくプロドラッグ等を挙げることができる。

【0026】

本発明において、NOS阻害剤とは、好ましくは中性および塩基性のL- α -アミノ酸の構造に基づくNOS阻害剤であり、より好ましくはL-アルギニン、L-リジン、L-シトルリン、L-オルニチンの構造に基づくNOS阻害剤であり、さらに好ましくはGCAを除いた表2記載のNOS阻害剤である。 10

【0027】

本発明において、L-フェニルグリシン誘導体とは、好ましくはフェニルグリシン構造を有する薬物およびプロドラッグであり、より好ましくは、生理学的pHにおいて遊離 α -アミノ基および α -カルボキシル基を有しかつR基に酸性基を有さないフェニルグリシン誘導性薬物、または、3-カルボキシルフェニルグリシンもしくは4-カルボキシルフェニルグリシンを有する3-カルボキシルエステルプロドラッグもしくは4-カルボキシルエステルプロドラッグである。ただし、親薬物 (parent drug) は生理学的pHにおいて酸性であるべきではない。 20

【0028】

本発明において、カルニチンとは、好ましくはカルニチンおよびその誘導体、ならびにカルニチンおよびそのアシルエステル、より好ましくはカルニチン、アセチルカルニチン、プロピオニルカルニチンである。

【0029】

本発明において、D-アミノ酸とは、好ましくはD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファン、D-トレオニン、D-ヒスチジン、D-フェニルアラニン、D-グルタミン、およびそれらの誘導体であり、より好ましくはD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、D-トリプトファンおよびそれらの誘導体であり、さらにより好ましくはD-アラニン、D-セリン、D-メチオニン、D-ロイシン、およびD-トリプトファンである。 30

【0030】

本発明において、アミノ酸に基づくプロドラッグとは、好ましくは (D-アミノ酸およびL-アミノ酸を含む) アミノ酸部分を有する。アスパラギン酸およびグルタミン酸については、 β -カルボキシルエステルプロドラッグおよび γ -カルボキシルエステルプロドラッグがそれぞれ好ましい。中性および塩基性のアミノ酸については、 α -カルボキシルエステルプロドラッグが好ましい。

【0031】

本発明において、上記化合物を必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識としては、例えば、放射標識および蛍光標識等を挙げることができる。 40

【0032】

本発明において、化合物が $ATB^{0,+}$ により輸送されるか否かを判定する方法としては、これらに制限されるわけではないが、例えば、実施例に記載の方法によって行うことができる。

【0033】

本発明のスクリーニング方法においては、次いで、選沢された化合物と、本化合物が治療および/または予防し得る疾患との関係を調べる。選択された化合物との関連を検証する疾患は特に制限はされないが、例えば、選択された化合物がNOS阻害剤であれば、以下の疾患との関連を検証する。敗血症性ショック/低血圧 (Titheradge MA、Biochim Biophys 50

Acta、1999 1411(2-3):437-55)、抗炎症性、炎症性腸疾患 (Kubes P、McCafferty DM.、Am J Med 2000 ; 109(2):150-8)、リウマチ様関節炎 (Salerno Lら、Curr Pharm Des 2002、8(3):177-200)、腎炎 (Cattell V.、Kidney Int 2002 61(3):816-821)、アルツハイマー病および卒中 (Heneka MTおよびFeinstein DL、J Neuroimmunol 2001 114:8-18)、癌 (Thomsen LL、Cancer Metastasis Rev 1998 17(1):107-18)、HIVおよびHCV感染 (Lake-Bakkar Gら、Dig Dis Sci 2001 46(5):1072-6)、多発性硬化症 (Liu JSら、Am J Pathol 2001 158(6):2057-66)、喘息 (Redington AEら、Thorax 2001 56(5):351-7)、骨関節炎 (Abramson SBら、Curr Rheumatol Rep 2001 3(6):535-41)、心筋炎 (Gluck Bら、Herz 2000 25(3):255-60)、緑内障 (Chiou GC、J Ocul Pharmacol Ther 2001 17(2):189-98)、遅延型出血性ショック (Szabo C.、New Horiz 1995 3(1):2-32)、持続性疼痛 (Meller STら、Neuropharmacology 1994、33(11):1471-8)、臓器移植術 (Trajkovic V.、Curr Drug Metab 2001、2(3):315-29)、およびパーキンソン病 (Knott,C.ら、Mol Cell Neurosci 2000 ; 16(6):724-39)。選択された化合物がL-フェニルグリシン誘導体であれば、以下の疾患を試験することができる：NOS阻害剤に関して記載された疾患、抗インフルエンザウイルス (Kati,WM.ら、Antimicrob Agents Chemother 2001、45(9):2563-70)、脳疾患ならびに虚血および分裂病などの疾患 (Pellicciari RおよびCostantinoG、Curr Opin Chem Biol 1999 3(4):433-40 ; Conway SJら、Bioorg Med Chem Lett. 2001、11(6):777-80 ; Roberts PJ.、Neuropharmacology 1995、34(8):813-9) ならびに心筋虚血 (Blackburn KJら、Br. J. Pharmacol. 1979 66:443-444)。

【0034】

選択された化合物がカルニチンであれば、以下の疾患を試験することができる：骨格筋ミオパシー、心筋ミオパシー、脳障害、および成長障害 (Kerner,J.およびHoppel,C.、Annual Review of Nutrition、18、179-206 (1998) ; Treem,W.R.ら、New England Journal of Medicine、319、1331-1336 (1988)) を含むカルニチン疾患。

【0035】

選択された化合物がD-アミノ酸であれば、以下の疾患を試験することができる：D-セリンおよびその誘導体による統合失調症 (Heresco-Levy,U.、Int.J.Neuropsychopharmacol. 2000 3(3):243-258.、Krystal,JH.およびD'Souza,DC.、Biol.Psychiatry.1998 44(11):1075-76)。

【0036】

選択された化合物がアミノ酸に基づくプロドラッグであれば、プロドラッグの親薬物に関する疾患を試験することができる。

【0037】

本発明のスクリーニング方法における次の段階では、疾患と関連づけられた化合物を選択する。

【0038】

本発明のスクリーニング方法においては、選択された化合物と、薬剤学的に許容される担体とを混合してもよい。選択された化合物の誘導体を合成し、本誘導体と薬剤学的に許容される担体とを混合してもよい。

【0039】

本発明は、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物の設計方法であって、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計することを特徴とする方法を提供する。本方法は、これら化合物の基本骨格をもとに新たな化合物を設計する方法である。化合物の設計に関しては、当業者であれば周知の方法によって実施することができる。

【0040】

また、本発明は、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物の製造方法を提供する。本方法においては、まず、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される

10

20

30

40

50

化合物を設計する。次いで、設計された化合物を合成する。本方法は、合成された化合物が $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有するか否かを判定し、 $ATB^{0,+}$ により輸送される化合物を選択する段階をさらに含む。このようにして製造された化合物の中には、薬理活性を有するものがあると考えられる。

【0041】

また、本発明は、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法を提供する。本方法の第一段階においては、まず、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物を設計する。第二段階において、設計された化合物を合成する。第三段階において、合成された化合物と、本化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づけてもよいし、まずは、合成された化合物が $ATB^{0,+}$ により輸送されるか否かを判定し、輸送される化合物を選択し、その後、合成された化合物と本化合物が治療および/または予防し得る疾患の間の関係を決定してもよい。本方法においては、さらに、疾患と関連づけられた化合物を選択し、得られた化合物と、薬剤学的に許容される担体とを混合してもよい。また、選択された化合物の誘導体を合成し、本誘導体と薬剤学的に許容される担体とを混合してもよい。

10

【0042】

また、本発明は、 $ATB^{0,+}$ を介して化合物を輸送する方法であって、本化合物がNOS阻害剤、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物である方法を提供する。本方法においては、化合物を標識してもよい。標識は、これらに制限されるわけではないが、例えば、放射性物質およびトキシンなどが例示できる。

20

【0043】

本発明はさらに、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチン、およびD-アミノ酸、ならびにその誘導体からなる群より選択される化合物によって治療および/または予防可能な疾患に関する $ATB^{0,+}$ 遺伝子の治療的使用を提供する。そのような使用には、例えば、活性成分として $ATB^{0,+}$ 遺伝子を含む治療薬が含まれ、これは $ATB^{0,+}$ 遺伝子を投与する段階を含む上述の疾患に対する遺伝子治療を提供する。当業者は、既知の方法を用いて遺伝子治療を行うと考えられる。本発明の遺伝子治療のために用いられるベクターは、如何なる特定のベクターにも限定されない。

30

【0044】

本発明はまた、癌（好ましくは、iNOS発現癌、より好ましくは乳癌および肝臓癌）の治療のために $ATB^{0,+}$ によって輸送されることができ化合物、例えばNOS阻害剤の使用を提供する。そのような使用には、例えば、 $ATB^{0,+}$ によって輸送されることができ、NOS阻害剤などの化合物を活性成分として含む癌治療薬、 $ATB^{0,+}$ によって輸送されることができ、NOS阻害剤などの化合物を投与する段階を含む癌治療、および、 $ATB^{0,+}$ によって輸送されることができ、NOS阻害剤などの化合物を癌治療薬産生のために用いることが含まれる。

【0045】

発明を実施するための最良の形態

40

以下の実施例は、本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。

【0046】

1. アミノ酸輸送体 $ATB^{0,+}$ を介した一酸化窒素合成酵素阻害剤の Na^+ および Cl^- 連動型能動輸送

方法

材料

[^3H]-グリシンは、Moravek社（Brea, CA）から購入し、[^3H]-L-NNAは、Amersham Pharmacia Biotech社（Piscataway, NJ）から購入した。その他の放射標識したアミノ酸は全て、Dupont-New England Nuclear社（Boston, MA）またはAmerican Radiolabeled Chemicals

50

社 (St. Louis, MO) のいずれかから入手した。NOS阻害剤は、Sigma社またはCalbiochem社のいずれかから入手した。

【0047】

マウスATB^{0/+}のクローニング

以前に記載されたように、SuperScriptプラスミドシステム (Life Technologies社)を用いて、マウスの結腸から単離されたpoly(A)⁺RNAにより、一方向cDNAライブラリを構築した (Sugawara, Mら、J. Biol. Chem. 275, 16473-16477 (2000)、Fei, Y. J. ら、J. Biol. Chem. 275, 23707-23717 (2000)、Wang, H. ら、Am. J. Physiol., 278, C1019-C1030 (2000))。ライブラリスクリーニングのためのプローブを、GenBank (アクセッション番号AF161714) に報告されたマウスのATB^{0/+}cDNAに特異的なプライマーを用いるRT-PCRにより調製した。これらのプライマーは、5'-GTT GGC TAT GCA GTG GGA TT-3' (センス) および5'-GAG GCC AAG GAG AAA CAA AA-3' (アンチセンス) であり、これらはcDNA配列における396位~415位および1606位~1625位のヌクレオチドに対応している。RT-PCRは、マウスの結腸から調製したpoly(A)⁺RNAを用いて行った。得られた産物は、サイズが~1.2kbpであり、その同一性の確認のためにサブクローニングおよび配列決定された。このcDNAを、ランダムプライミングにより [α -³²P]dCTPで標識し、かつマウス結腸のcDNAライブラリのスクリーニングのためのプローブとして使用した。配列決定は、自動式Perkin-Elmer Applied Biosystems社の377 Prism DNAシーケンサーを用いて行った。最長の陽性クローン (~3kbp) を機能試験に用いた。

【0048】

ノーザンブロット

マウス腸管の長軸に沿ったATB^{0/+}mRNAの発現パターンを、ノーザンブロット分析により調べた。小腸全体を、4個の同等のセグメントに分割し、最近位の小腸を第一のセグメント、最遠位の小腸を第四のセグメントとした。これら4種のセグメントおよび盲腸、結腸からpoly(A)⁺mRNAを単離し、ノーザンブロット分析に使用した。ブロットを、高ストリンジェントな条件下で、順にマウスのATB^{0/+}、マウスPEPT1およびマウス β -アクチンに特異的な [³²P]標識したcDNAプローブでハイブリダイズした。

【0049】

HRPE細胞におけるATB^{0/+}の機能発現

これは、ワクシニアウイルス発現系を用いて行った (Sugawara, Mら、J. Biol. Chem. 275, 16473-16477 (2000)、Fei, Y. J. ら、J. Biol. Chem., 275, 23707-23717 (2000)、Wang, H. ら、Am. J. Physiol., 278, C1019-C1030 (2000))。輸送の測定は、基質として放射標識したアミノ酸またはNOS阻害剤を用い、37°Cで15分間行った。輸送用緩衝液は、140mM NaCl、5.4mM KCl、1.8mM CaCl₂、0.8mM MgSO₄、および5mMグルコースを含有する25mM Hepes/Tris (pH7.5) であった。ベクター単独をトランスフェクションされた細胞を用いて、常に並行して内因性輸送活性を測定した。基質として大部分の実験で使用されたグリシンにより、内因性輸送は、cDNAをトランスフェクションされた細胞内で測定された輸送の<5%を占めた。cDNA特異的輸送は、内因性活性について補正することにより計算した。動力学的パラメータであるミカエリス定数 (K_t) と最大速度 (V_{max}) を、cDNA特異的輸送のデータを、単一の可飽和輸送システムを説明するミカエリス-メンテンの式に当てはめることにより算出した。Na⁺およびCl⁻活性化動力学は、cDNA特異的輸送データを、ヒル式に当てはめ、ヒル係数を算出することにより分析した。

【0050】

X. laevis卵母細胞におけるATB^{0/+}の機能発現

クローニングされたマウスATB^{0/+}cDNAからキャップ形成したcRNAを、mMESSAGE mMACHINE (商標) キット (Ambion社) を用いて合成した。X. laevisの成熟卵母細胞を、コラゲナーゼA処理 (1.6g/ml) により単離し、手で卵胞を除去し (defolliculate)、かつゲンタマイシン10mg/mlを補充した改変Barth培地中において18°Cで維持した (Sugawara, Mら、J. Biol. Chem. 275, 16473-16477 (2000)、Fei, Y. J. ら、J. Biol. Chem., 275, 23707-23717 (2000)、Wang, H. ら、Am. J. Physiol., 278, C1019-C1030 (2000))。翌日、卵母細胞に50ng cR

NAを注入した。未注入の卵母細胞を対照として用いた。これらの卵母細胞を用いて、cRNA注入後6日目に電気生理学的試験を行った。電気生理学的試験は、二微小電極（two-micro electrode）電圧固定法を用いて行った（Sugawara,Mら、J.Biol.Chem. 275、16473-16477（2000）、Fei,Y.J.ら、J.Biol.Chem.、275、23707-23717（2000）、Wang,H.ら、Am.J.Physiol.、278、C1019-C1030（2000））。卵母細胞を、NaCl含有緩衝液（100mM NaCl、2mM KCl、1mM MgCl₂、1mM CaCl₂、3mM Hepes、3mM Mes、および3mM Tris、pH7.5）で灌流し、引き続き異なるNOS阻害剤またはアミノ酸を含有する同じ緩衝液で灌流した。膜電位は-50mVに固定した。増分20mVで電圧パルスを+50から-150mVへ100ms期間で印加し、かつ定常電流を測定した。基質存在下および非存在下で測定された定常電流間の差異を、基質誘導電流とみなした。基質の可飽和輸送に関する動力学的パラメータ $K_{0.5}$ （すなわち、最大電流の半分の誘導に必要な基質濃度）を、ミカエリス-メンテンの式に基質誘導電流値を当てはめることにより算出した。これらの実験は、2個の異なるバッチから得た少なくとも3個の異なる卵母細胞について繰り返した。

10

【0051】

結果

マウスATB^{0,+}の構造的特徴

結腸mRNA由来のクローニングマウスATB^{0,+}cDNAは、長さ3,007bpであり（GenBankアクセッション番号AF320226）、かつ638個のアミノ酸のタンパク質をコードしている。マウスATB^{0,+}の一次構造は、最近クローニングされたヒトATB^{0,+}（Sloan,J.L.およびMager,S.、J.Biol.Chem.、274、23740-23745（1999））と高度に相同性を有する。これら2種のタンパク質間のアミノ酸配列の同一性は88%である。

20

【0052】

マウス腸管におけるATB^{0,+}mRNAの発現パターン

腸管の長軸に沿ったATB^{0,+}の発現パターンを決定するために、本発明者らは、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより、マウス小腸の別々の領域におけるATB^{0,+}mRNAの定常状態レベルを分析した（図1）。ATB^{0,+}mRNAは、小腸の最初の3個のセグメントにおいては検出されなかった。しかし小腸の第四セグメント、盲腸および結腸において、mRNAの発現は明らかであった。このmRNAレベルは、遠位小腸よりも、結腸および盲腸においてより豊富であった。対照的に、小腸ペプチドのH⁺連動型輸送体であるPEPT1のmRNAは、4種全ての小腸セグメントにおいて検出されたが、盲腸と結腸では検出されなかった。これらのデータは、ATB^{0,+}mRNAの発現は、マウス小腸の遠位領域に制限されていることを示している。

30

【0053】

マウスATB^{0,+}の機能的特徴

クローニングされたマウスATB^{0,+}cDNAの機能的同一性を、最初に、哺乳動物細胞においてクローンを異種発現し、その輸送機能を試験することにより確立した。本発明者らは、クローニングされたマウスATB^{0,+}を発現しているHRPE細胞における数種の中性および塩基性のアミノ酸の輸送を研究した。さらに内因性輸送活性の対照として利用するためベクター単独をトランスフェクションされた細胞において、これらのアミノ酸の輸送を、同一条件下で測定した。試験した13種のアミノ酸全ての輸送活性（Gly、Ala、Ser、Thr、Pro、His、Gln、Asn、Leu、Ile、Phe、Trp、およびArg）は、ベクターをトランスフェクションされた細胞においてよりも、マウスのATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞において有意に高いことがわかった（データは示さず）。輸送活性におけるcDNA誘導性の増加は、グリシン以外の全てのアミノ酸について16%～190%の間を変動した。グリシンの輸送は、cDNAをトランスフェクションされた細胞において格別に高かった。これは、ベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送活性と比べて38倍増加していた。

40

【0054】

マウスATB^{0,+}を介したグリシンの輸送は他のアミノ酸輸送と比べて顕著に高かったので、本発明者らはクローニングした輸送体のさらなる特徴決定のための基質としてグリシンを用いた。図2に示した結果は、内因性輸送活性を補正した後の、ATB^{0,+}特異的輸送活性の

50

みを示している。ATB^{0,+}を介したグリシン輸送は、Na⁺およびCl⁻の存在によって強制的に左右されている。マウスATB^{0,+}を介したグリシン輸送は可飽和であり、ミカエリス-メンテン定数 (K_t) は $210 \pm 18 \mu\text{M}$ であった。次に輸送プロセスに関連したNa⁺およびCl⁻イオンの量を、Na⁺活性化動力学およびCl⁻活性化動力学により分析した。マウスATB^{0,+}の輸送活性は、Na⁺濃度にS字相関しており、かつNa⁺活性化プロセスのヒル係数は、 2.0 ± 0.1 であった。対照的に、マウスATB^{0,+}の輸送活性は、Cl⁻濃度と双曲的關係を示した。Cl⁻活性化プロセスのヒル係数は、 0.7 ± 0.1 であった。これらの結果は、Na⁺:Cl⁻:グリシンの化学量比が2:1:1であることを示している。Na⁺およびCl⁻の $K_{0.5}$ 値 (すなわち、最大輸送活性の半分を誘導するのに必要なこれらのイオンの濃度) は、各々、 $25 \pm 1\text{mM}$ および $18 \pm 8\text{mM}$ であった。

10

【0055】

次に、クローニングされた輸送体を介した輸送プロセスに関して様々なアミノ酸が [³H]-グリシン (60nM) と競合する能力を評価することにより、マウスATB^{0,+}のアミノ酸特異性を試験した (表1)。

【0056】

(表1) マウスATB^{0,+}のアミノ酸基質特異性

非標識 アミノ酸	mATB ^{0,+} 特異的 [³ H]-グリシン輸送
	pmol/細胞10 ⁶ 個/15分 %
対照	37.27 ± 1.20 100
グリシン	1.88 ± 0.06 5
アラニン	1.04 ± 0.05 3
システイン	1.11 ± 0.20 3
セリン	1.99 ± 0.09 5
トレオニン	3.91 ± 0.30 11
プロリン	9.97 ± 0.57 27
ヒスチジン	1.31 ± 0.10 4
グルタミン	2.39 ± 0.18 6
アスパラギン	3.25 ± 0.23 9
ロイシン	0.27 ± 0.03 1
イソロイシン	0.27 ± 0.02 1
フェニルアラニン	0.56 ± 0.03 2
トリプトファン	0.37 ± 0.06 1
アルギニン	7.14 ± 0.35 19
リジン	3.52 ± 0.28 9
アスパラギン酸	32.01 ± 1.29 86
グルタミン酸	33.47 ± 0.91 90
MeAIB	36.21 ± 4.80 97

20

30

40

【0057】

50

[³H]-グリシン (60 nM) の輸送を、ベクターをトランスフェクションされたHRPE細胞およびmATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされたHRPE細胞において、NaClの存在下 (pH 7.5) で37°Cで15分間測定した。非標識アミノ酸は濃度2.5 mMで用いた。cDNA特異的輸送を、mATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞における輸送からベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送を差し引くことによって計算した。データ (4回の別々の測定の平均値±SEM) は、cDNA特異的輸送のみを表す。

【0058】

濃度2.5mMにおいて、試験した全ての中性および塩基性のアミノ酸が、マウスATB^{0,+}を介した[³H]-グリシンの輸送を阻害した。阻害は、70%から100%まで変動した。対照的に、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびNメチル化された中性アミノ酸MeAIBは、有意な阻害を示さなかった。これらのデータは、クローニングされたマウスATB^{0,+}が、Na⁺およびCl⁻に連動した様式で中性および塩基性のアミノ酸の輸送を媒介できることを示している。

【0059】

ATB^{0,+}を介したNOS阻害剤の輸送

次に本発明者らは、HRPE細胞においてマウスATB^{0,+}を介した輸送プロセスについて、NOS阻害剤およびそれらの親アミノ酸 (アルギニン、リジン、オルニチン、およびシトルリン) が、濃度2.5mMで[³H]-グリシン (10 μM) と競合する能力について評価した (表2)。

【0060】

(表2) マウスATB^{0,+}を介したNOS阻害剤の輸送

非標識	HRPE細胞における		<i>X. laevis</i> 卵母細胞
アミノ酸または	mATB ^{0,+} 特異的		における電流
NOS 阻害剤	[³ H]-グリシン輸送		
	nmol/細胞10 ⁶ 個/15分		nA
対照	7.29 ± 0.08	(100)	
アルギニン	2.21 ± 0.05	(30)	382 ± 57
リジン	1.48 ± 0.02	(20)	545 ± 95
シトルリン	1.10 ± 0.01	(15)	498 ± 114
オルニチン	3.28 ± 0.01	(45)	131 ± 27
L-NNA	1.54 ± 0.03	(21)	200 ± 92
L-NAME	5.25 ± 0.10	(72)	11 ± 2
L-NMMHA	5.21 ± 0.06	(72)	33 ± 6
L-NDMA	4.25 ± 0.10	(58)	85 ± 15
L-NMEA	3.77 ± 0.17	(52)	138 ± 16
L-NMMA	2.60 ± 0.06	(36)	411 ± 76
L-NABE	4.93 ± 0.19	(67)	16 ± 2
L-NIL	4.77 ± 0.73	(65)	89 ± 18
L-TC	1.05 ± 0.06	(15)	497 ± 104
L-MTC	2.03 ± 0.09	(28)	118 ± 34
L-NIO	4.17 ± 0.10	(57)	71 ± 16
L-カナバリン	1.75 ± 0.03	(24)	269 ± 73
GGA	4.22 ± 0.09	(58)	7 ± 1

【0061】

[³H]-グリシン (10 μM) の輸送は、ベクターをトランスフェクションされたHRPE細胞およびmATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされたHRPE細胞において、NaClの存在下 (pH 7.5) で37°Cで15分間測定した。非標識アミノ酸およびNOS阻害剤は濃度2.5 mMで用いた。cDNA特異的輸送は、mATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞における輸送からベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送を差し引くことによって計算した。括弧内の数値は対照輸送に対する割合 (%) である。データ (4回の別々の測定の平均値 ± SEM) は、cDNA特異的輸送のみを表す。mATB^{0,+}はまた、mATB^{0,+}cRNAを注射することによって*X. laevis*卵母細胞において発現させ、アミノ酸およびNOS阻害剤 (1 mM) によって誘導された内向き電流を、二微小電極電圧固定法を用いて測定した。灌流液はNaCl (pH 7.5) を含んだ。データは、卵母細胞の三つの異なるロットからの平均値 ± SEMを表す。

【0062】

親アミノ酸の4種全てが、マウスATB^{0,+}を介したグリシン輸送の著しい阻害を引き起こした。この阻害は55%~85%の間で変動した。同様に試験した全てのNOS阻害剤も、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送を阻害した。アルギニンに基づくNOS阻害剤であるL-NNA、L-NAME、L-NMHA、L-NDMA、L-NMEA、L-NMMA、およびL-NABEによって引き起こされた阻害は、30%~80%の範囲内であった。リジンに基づくNOS阻害剤であるL-NILは、35%の阻害を引き起こした。L-TCおよびL-MTCはシトルリンに基づくNOS阻害剤であるが、これらはATB^{0,+}を介したグリシン輸送の阻害剤として非常に強力であり、その阻害は70%~85%の範囲内であった。オルニチン誘導体であるL-NIOは40%阻害を引き起こした。L-カナバニンおよびL-GAは両方共グアニジノ誘導体であるが、これらも効果的阻害剤であり、それぞれ75%および40%の阻害を引き起こした。

【0063】

図3は、6種のNOS阻害剤による、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送阻害の用量反応相関を示している。阻害強度は下記の順であった：L-TC>L-NNA>L-MTC=L-NMMA>L-NIO=L-NIL。IC₅₀値 (すなわち、50%阻害を引き起こすのに必要な化合物の濃度) を下記に示す：L-TC (0.21±0.03mM)、L-NNA (0.56±0.04mM)、L-MTC (0.73±0.09mM)、L-NMMA (0.77±0.12mM)、L-NIO (2.65±0.25mM)、およびL-NIL (2.60±0.29mM)。

【0064】

これらの結果は、試験した全てのNOS阻害剤が、クローニングされたマウスATB^{0,+}の基質結合部位と相互作用することを示している。しかし、これらのデータは、これらのNOS阻害剤が輸送体にとって輸送可能な基質であることを示唆しているが、それを証明しているわけではない。いくつかの化合物は、それ自身が膜を越えて輸送されることなく、基質結合部位への結合の際にグリシンと競合することにより、輸送を遮断している可能性がある。これらの阻害剤が実際に輸送体の輸送可能基質であるかどうかを決定するために、これらの阻害剤のATB^{0,+}を介した輸送を直接測定しなければならなかった。この目的のためにATB^{0,+}の基質として[³H]-L-NNAを用い、かつクローニングされた輸送体を発現しているHRPE細胞におけるその輸送を調べた (図4)。ATB^{0,+}を発現している細胞におけるL-NNAの輸送は、ベクターをトランスフェクションされた細胞におけるものよりも4倍高く、このことは、L-NNAが実際にこの輸送体の輸送可能な基質であることを示している。この結論は、さらに、この輸送体の基質であるグリシン、セリンおよびアルギニンによるATB^{0,+}特異的L-NNA輸送の阻害によっても裏付けられた。対照的に、この輸送体の基質でないMeAIBおよびグルタミン酸は、ATB^{0,+}特異的L-NNA輸送を阻害しなかった。このATB^{0,+}特異的L-NNA輸送は可飽和であり、ミカエリス定数は0.75±0.10mMであった。

【0065】

哺乳動物発現系では、市販の放射標識型NOS阻害剤の入手に限界があるので、ATB^{0,+}を介した広範な種類のNOS阻害剤の輸送を研究するためには理想的ではない。従って本発明者らは、ATB^{0,+}を介した多数のNOS阻害剤の輸送を直接測定するために、別の方法を試みねばならなかった。本発明者らは、この目的のために*X. laevis*卵母細胞系を用いた。cRNAを注入することにより、クローニングされたマウスATB^{0,+}をこれらの卵母細胞において機

能的に発現させ、次にこの輸送体を介したNOS阻害剤（1mM）の輸送を、二微小電極電圧固定技術を用い、これらの阻害剤により誘導された内向き電流でモニタリングした。この手法は、 $ATB^{0,+}$ の起電性のために実行可能である。電圧固定条件下で、 $ATB^{0,+}$ 発現卵母細胞の被験化合物への曝露時の内向き電流誘導は、卵母細胞への化合物の輸送の結果生じる膜の脱分極を示すと考えられた。これらの実験において、未注入の卵母細胞を陰性対照として用いた。これらの卵母細胞の実験結果を表2に示している。試験したNOS阻害剤の中でL-NAME、L-NABEおよびL-GGA以外は全て、クローニングされた $ATB^{0,+}$ を発現させた卵母細胞において、顕著な内向き電流を誘導した。電流は、30nA～500nAの範囲内で変動した。これとは対照的に、L-NAME、L-NABEおよびL-GGAは、非常に小さい電流しか誘導しなかった（10nA～15nA）。アルギニン、リジン、シトルリン、およびオルニチンのアミノ酸類は、10 30nA～550nAの範囲の電流を誘導した。

【0066】

卵母細胞発現系における $ATB^{0,+}$ を介したNOS阻害剤輸送をより詳細に分析するために、本発明者らは、3種のNOS阻害剤、すなわちL-NIL、L-MTC、およびL-NIOを選択した。本発明者らは、個別のNOSアイソフォームに対する選択性を基に、これらの化合物を選んだ：NOS IIについてL-NIL、NOS IについてL-MTC、およびNOS IIIについてL-NIO。図5は、L-NILおよびL-MTCによって誘導された内向き電流のイオン依存性を示している。NaClが存在する場合、濃度1mMのL-NILは、 82 ± 18 nAの内向き電流を誘導した。しかしNMDG塩化物が存在する場合、この化合物への卵母細胞の曝露時に、測定可能な内向き電流は存在せず、このことは、L-NIL誘導性電流は、 Na^+ の存在に強制的に依存することを示している。この化合物は、グルコン酸ナトリウムの存在下において（すなわち塩素不在下）、小さいが有意な電流を（～10nA）誘導した。しかし、この実験に使用したL-NILは塩素塩であったので、少量の塩素がこれらの実験条件下で存在していた。これにより、観察されたような電流の誘導がもたらされた。このことは、塩素非存在型で入手可能なL-MTCにより得たデータにより裏付けられた。NaClが存在する場合、L-MTCは濃度1mMで、内向き電流 116 ± 34 nAを誘導した。しかし、 Na^+ か Cl^- のいずれかが存在しない場合には、測定可能な電流は存在せず、このことは、L-MTC誘導性内向き電流が絶対的に Na^+ および Cl^- の両方の存在に依存していることを示している。 Na^+ および Cl^- の存在時にL-NILおよびL-MTCにより誘導されたこれらの電流の強制的依存性は、アルギニンについて得られたデータに類似していた。アルギニンは、塩素非含有塩として使用した場合に、 382 ± 57 nAの内向き電流を誘導した。 Na^+ か Cl^- のいずれかが存在しない場合は、アルギニンでは、測定可能な電流は認められなかった。

【0067】

次に本発明者らは、卵母細胞発現系における $ATB^{0,+}$ を介したL-MTC、およびL-NIOの輸送の飽和動力学を、それらの輸送の測定値として対応する阻害剤により誘導された内向き電流を用いて分析した。これらの実験の結果を図6に示しているが、これは3種全ての化合物の $ATB^{0,+}$ を介した輸送が可飽和であることを示している。膜電位-50mVで算出した $K_{0.5}$ 値（最大電流の半分を誘導するのに必要な化合物の濃度）は、L-MTC、L-NIL、およびL-NIOについて、各々、 1.36 ± 0.08 mM、 2.27 ± 0.29 mM、および 2.24 ± 0.35 mMであった。しかし $K_{0.5}$ 値は、3種全ての化合物について膜電位により影響を受けた。この値は、膜の過分極に伴い低下し、かつ膜の脱分極に伴い増加していった。

【0068】

考察

本明細書において、本発明者らは、 Na^+ および Cl^- 連動型のアミノ酸輸送体 $ATB^{0,+}$ を介したNOS阻害剤の輸送に関する証拠を示した。本発明により、これらの有効な治療的物質の、イオン勾配駆動性集積的輸送システムが初めて同定された。NOS阻害剤の $ATB^{0,+}$ を介した輸送を裏付ける証拠は、マウス結腸からクローニングされた $ATB^{0,+}$ により得られた。クローニングされた $ATB^{0,+}$ の輸送機能は、哺乳動物細胞と*X. laevis*卵母細胞における異種発現により試験された。この手法により本発明者らは、広範なNOS阻害剤のこの輸送体を介した輸送を直接研究することが可能になった。NOS阻害剤は、本質的に陽イオン性または

双性イオン性のいずれかの性質であることができる。先行する研究は、陽イオン性NOS阻害剤はシステム y^+ により輸送されるが、双性イオン性NOS阻害剤はシステムLにより輸送されることを示している (Schmidt, K.ら、Mol. Pharmacol., 44, 615-621 (1993)、Schmidt, K.ら、Biochem. J., 301, 313-316 (1994)、Baydoun, A.R.およびMann, G.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 726-731 (1994)、Schmidt, K.ら、J. Neurochem., 64, 1469-1475 (1995)、Raghavendra Rao, V.L.およびButterworth, R.F., J. Neurochem., 67, 1275-1281 (1996))。システム y^+ は双性イオン性NOS阻害剤と相互作用せず、かつシステムLは陽イオン性NOS阻害剤と相互作用しない。本研究において本発明者らにより、 $ATB^{0,+}$ は、陽イオン性に加え双性イオン性の両方のNOS阻害剤を輸送することができることが示された。これは、この輸送体の基質特異性によるものである。 $ATB^{0,+}$ は、塩基性アミノ酸に加え中性アミノ酸を基質として認識する。 $ATB^{0,+}$ のアミノ酸基質の中で、アルギニン、リジン、シトルリン、およびオルニチンのアミノ酸類がどのようにして輸送体により処理されるかということが本研究に直接関係しているが、これは、現在研究に使用されるほとんどのNOS阻害剤はこれら4種のアミノ酸に構造的に関連しているからである。アルギニン、リジン、およびオルニチンは塩基性でありかつシトルリンは中性であるが、本研究は、これら4種のアミノ酸は全て、 $ATB^{0,+}$ にとって輸送可能な基質であることを示している。同様に、塩基性または中性であるかを問わずこれらの4種のアミノ酸に構造的に関連したほとんどのNOS阻害剤は、 $ATB^{0,+}$ を介して輸送される。

10

【0069】

これまでに基質としてNOS阻害剤を認識することがわかっている3種のアミノ酸輸送体の中で、 $ATB^{0,+}$ が最も集積力が強い。この輸送体は、 Na^+ および Cl^- の膜内外勾配と膜電位の組合せによりエネルギー供与される。対照的に、システム y^+ は膜電位のみにより駆動されており、かつシステムLは駆動力のない促進核酸輸送系である可能性が高い。従って、 $ATB^{0,+}$ を発現している細胞へのNOS阻害剤の輸送は、集積性が高い可能性がある。これらの細胞におけるNOS阻害剤の細胞内濃度は、細胞外濃度の数倍に達する可能性がある。

20

【0070】

本発明者らは、哺乳動物細胞の発現系における $ATB^{0,+}$ に対する6種のNOS阻害剤の親和性を、輸送プロセスにおいてアミノ酸基質と競合するそれらの能力から決定した。これらは、L-NNAおよびL-NMMA (両者共構造的にアルギニンに関連)、L-NIL (構造的にリジンに関連)、L-TCおよびL-MTC (両者共構造的にシトルリンに関連)、ならびにL-NIO (構造的にオルニチンに関連) である。これら6種の化合物の IC_{50} 値は、0.2~2.7mMの範囲を変動した。L-NNAについてさらに本発明者らは、同じ哺乳動物細胞の発現系において、 $ATB^{0,+}$ を介したその輸送から直接親和性を決定した。輸送の直接測定値から計算されたミカエリス定数 (K_t) は、競合阻害試験から算出された IC_{50} 値に近似していることがわかった (0.75 ± 0.10 mMに対して 0.56 ± 0.04 mM)。別の3種のNOS阻害剤 (L-MTC、L-NIL、およびL-NIO) についても、本発明者らは、*X. laevis*卵母細胞の発現系を用いて、 $ATB^{0,+}$ を介したそれらの輸送のミカエリス定数を算出した。これらの実験から算出された K_t 値は、哺乳動物細胞発現系を用いる競合阻害試験から決定された、対応する IC_{50} 値に類似していることが見出された (L-MTCについて、 1.36 ± 0.08 mMに対して 0.73 ± 0.09 mM、L-NILについて、 2.72 ± 0.29 mMに対して 2.60 ± 0.29 mM、L-NIOについて、 2.24 ± 0.35 mMに対して 2.65 ± 0.25 mM)。

30

40

【0071】

$ATB^{0,+}$ を介したNOS阻害剤の輸送は、薬学や臨床と重要な関連性を有する。このことは、 $ATB^{0,+}$ が、NOS阻害剤の薬物送達系として使用できる可能性があることを示唆している。本発明者らは、マウス結腸から $ATB^{0,+}$ をクローニングした。しかし、結腸のみではなく遠位小腸においてもこの輸送システムの発現に関する十分な証拠がある (Ganapathy, V.ら、Intestinal transport of peptides and amino acids. In Current Topics in Membranes. Barrett, K.E.およびDonowitz, M.編、Vol.50, pp.379-412, Academic Press. (2001)、Munck, L.K., Biochim. Biophys. Acta, 1241, 195-213 (1995))。この輸送機能は、回腸粘膜細胞の刷子縁膜に存在することが示されている (Ganapathy, V.ら、Intestinal transport of peptides and amino acids. In Current Topics in Membranes. Barrett, K.E.およびDo

50

nowitz, M.編、Vol.50、pp.379-412、Academic Press. (2001)、Munck, L.K.、Biochim. Biophys. Acta、1241、195-213 (1995))。ATB^{0,+}mRNAは、本試験において、腸管の遠位領域（回腸、盲腸および結腸）においてのみ検出可能であった。腸管の長軸に沿ったATB^{0,+}mRNA発現パターンは興味深いものであり、かつこれはこの輸送体がNOS阻害剤送達系としての用途の可能性があることに関連している。本発明者らの知る限り、遠位腸管に制限されたATB^{0,+}の発現は、アミノ酸輸送体の中で独特なものである。食物タンパク質に由来したアミノ酸は、大部分が近位小腸において吸収されるので、腸管の遠位領域におけるアミノ酸濃度は低い。結果として、NOS阻害剤とATB^{0,+}を介した輸送に関する内因性アミノ酸との間で、競合はほとんどないと考えられる。これにより、NOS阻害剤の小腸での吸収効率が増大すると考えられる。

10

【0072】

小腸の刷子縁膜には、小腸管腔からのNOS阻害剤の取込みに寄与し得る2種の別のアミノ酸輸送システムがある。これらはシステムy⁺およびシステムb^{0,+}である。システムy⁺の陽イオン性NOS阻害剤を輸送する能力は、十分定義されている。対照的に、システムb^{0,+}のNOS阻害剤を輸送する能力についてはほとんど情報がない。この輸送システムは、中性アミノ酸に加え塩基性アミノ酸と相互作用することができるので、本発明者らは、このシステムは双性イオン性および陽イオン性のNOS阻害剤を活用できると推定した。本発明者らの最近の研究により、実際に、システムb^{0,+}が、少なくとも部分的に双性イオン性NOS阻害剤L-NNAの小腸刷子縁膜を越えた取込みに寄与していることが示されている (Hatanaka, T.ら、Pharmaceut. Res., 16、1770-1774 (1990))。しかし、システムy⁺およびシステムb^{0,+}の両システム共、イオン勾配によっては駆動されない。従って本発明者らは、Na⁺およびCl⁻の膜内外勾配とエネルギー的に連動しているATB^{0,+}は、これは管腔から小腸および結腸の吸収細胞へのNOS阻害剤の取込みにおいて、おそらくシステムy⁺およびシステムb^{0,+}よりもずっと効果的である可能性が高いと推測する。

20

【0073】

NOS阻害剤の経口生体利用率は、これらの化合物の小腸および結腸の刷子縁膜への侵入経路の存在のみではなく、側底細胞膜の排出経路の存在によっても左右されると考えられる。腸管の側底細胞膜には、2種のアミノ酸輸送システムが存在し、これらは小腸および結腸の吸収細胞から血液へのNOS阻害剤の排出に関連している。これらは、システムLおよびシステムy⁺Lである (Ganapathy, V.ら、Intestinal transport of peptides and amino acids. In Current Topics in Membranes. Barrett, K.E.およびDonowitz, M.編、Vol.50、pp.379-412、Academic Press. (2001))。ATB^{0,+}、システムy⁺、およびシステムb^{0,+}を介して小腸および結腸の上皮細胞へ吸収されるNOS阻害剤は、システムLおよびシステムy⁺Lを介して側底細胞膜を越えてこれらの細胞から排出することができる。

30

【0074】

本研究は、さらにNOS阻害剤を使った小腸および結腸の炎症の管理にも臨床的に関連している。炎症時の小腸および結腸の上皮細胞中のNOS II誘導に関する説得力のある証拠がある (Tepperman, B.L.ら、Am. J. Physiol., 265、G214-G218 (1993)、Singer, I.I.ら、1996、Gastroenterology、111、871-875 (1996))。一酸化窒素は、腸管の正常な生理的機能に加え、細菌性肺血症および炎症性大腸疾患のような病態においても重要な役割を果たしている (Stensen, W.F.、Gastrointestinal inflammation. In, Textbook of Gastroenterology (Yamada, T.編)、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia、pp.123-140 (1999))。炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎およびクローン病が、主に結腸および/または回腸に関連し、腸管のこれらの部位においてATB^{0,+}が特に発現されているという指摘は興味深い。NOS阻害剤の送達系としてATB^{0,+}を使用するという考えは、特に小腸および結腸の上皮細胞中にNOS IIの誘導がある炎症性腸疾患の臨床管理の点で、いくつかの理由により魅力的である。ATB^{0,+}は集積性の高い輸送体であり、したがってNOS阻害剤は、小腸および結腸の上皮細胞に非常に効率的に吸収され、かつ細胞内部に高濃度で蓄積されると考えられる。このことは、これらの細胞におけるNOS II阻害の効果的手段をもたらすと考えられる。さらに、小腸管腔内のNOS阻害剤は、ATB^{0,+}を介した細胞への輸送に関してNOS IIの基質

40

50

であるアルギニンと競合し、したがってNOS II活性のためのアルギニンの利用可能性を減少させると考えられる。従ってATB^{0,+}は、NOS阻害剤をアルギニンの代わりに細胞へ送ることを可能にすると考えられる。このことは、NOS IIの基質であるアルギニンの利用可能性の低下、および細胞内NOS阻害剤濃度の上昇の両方により、非常に効果的なNOS II活性の阻害が生じる。

【0075】

2. アミノ酸輸送体ATB^{0,+}によるカルニチンのNa⁺およびCl⁻連動型能動輸送

方法

哺乳動物細胞の発現系におけるマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送

本発明者らは、マウス結腸のcDNAライブラリ（GenBankアクセッション番号AF320226）から完全長の機能的ATB^{0,+}をクローニングした。クローニングされた輸送体は、ワクシニアウイルス発現法により、ヒト網膜色素上皮（HRPE）細胞において機能的に発現された（Wu, X.ら、Biochemical and Biophysical Research Communications、246、589-595（1998）、Wu, X.ら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、290、1482-1492（1999））。HRPE細胞におけるマウスATB^{0,+}とのカルニチンの相互作用についての最初の試験は、ATB^{0,+}を介した輸送についてグリシンと競合するカルニチンの能力を評価することにより行われた。その後の試験は[³H]-カルニチンを用いて行い、ATB^{0,+}を介したカルニチン輸送を直接評価した。輸送の測定は、ベクターをトランスフェクションされた細胞と、マウスATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞において、並行して、24ウェル培養プレートを用いて行った。細胞の放射標識基質とのインキュベーションは、37°Cで15分間行った。輸送用緩衝液の組成は、140mM NaCl、5.4mM KCl、1.8mM CaCl₂、0.8mM MgSO₄、および5mMグルコースを含有する、25mM Hepes/Tris（pH7.5）であった。cDNA特異的輸送は、ベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送について調節し算出した。[³H]-グリシン、[³H]-カルニチン、アセチル-[³H]-カルニチンおよびプロピオニル-[³H]-カルニチンは、Moravek Biochemicals社（Brea, CA, USA）から購入した。

【0076】

X. laevis卵母細胞発現系におけるマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送

X. laevis由来の成熟卵母細胞を、コラゲナーゼA（1.6mg/ml）処理により単離した。卵母細胞は、手で卵胞を除去され、その後マウスATB^{0,+}のcRNAまたは水を注入するのに用いられた（Fei, Y.J.ら、Journal of Biological Chemistry、275、23707-23717（2000））。cRNAは、mMESSAGE mMACHINE（商標）キット（Ambion、Austin, TX, USA）を用いて合成した。卵母細胞におけるマウスのATB^{0,+}を介したカルニチン輸送を、二微小電極電圧固定法を用い電気生理学的にモニタリングした（Fei, Y.J.ら、Journal of Biological Chemistry、275、23707-23717（2000））。膜電位は-50mVに固定した。卵母細胞をカルニチンで灌流し、かつ誘導された電流をモニタリングした。誘導電流を、輸送速度（transport rate）の測定値とした。灌流用緩衝液の組成は、100mM NaCl、2mM KCl、1mM MgCl₂、1mM CaCl₂を含有する10mM Hepes/Tris（pH7.5）であった。

【0077】

データ分析

実験は少なくとも3回繰り返した。結果は、平均±S.E.で示した。動力学的パラメータであるミカエリス定数（K_t）および最大速度（V_{max}）は、単一の可飽和輸送システムを説明しているミカエリス-メンテン式にATB^{0,+}特異的輸送データを当てはめ算出した。Na⁺およびCl⁻活性化動力学は、Na⁺およびCl⁻のK_{0.5}値（最大活性化の半分に必要なNa⁺またはCl⁻濃度）およびヒル係数（n^{1/1}、活性化プロセスに関連したNa⁺またはCl⁻イオンの数）を決定するために、ヒル式にATB^{0,+}特異的輸送データを当てはめ分析した。

【0078】

結果

哺乳動物細胞の発現系におけるマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送の分析

カルニチンとγ-アミノブチレートの間、さらにはカルニチンとベタインの間には、顕著な構造的類似性がある。カルニチンは、β炭素位にヒドロキシル基が付加され、かつアミ

10

20

30

40

50

ノ基がトリメチルアミノ基と置換された、 γ -アミノブチレートの誘導体である。末端炭素原子位置にトリメチルアミノ基が存在するために、カルニチンは、構造的にベタインにも類似している。ATB^{0,+}の一次構造は、 γ -アミノブチレート輸送体およびベタイン輸送体の構造に似ているので、本発明者らは、ATB^{0,+}が γ -アミノブチレートおよびベタインと相互作用することが可能であるかどうかを調べた。同じ実験において、本発明者らは、ATB^{0,+}が、カルニチンならびにそのアセチルおよびプロピオニルエステルと相互作用する能力についても試験した。これらの研究において、ATB^{0,+}の輸送機能は、クローニングされたマウスATB^{0,+}を発現しているHRPE細胞におけるグリシンの輸送を測定することによりモニタリングした。これらの細胞におけるATB^{0,+}の発現は、グリシン輸送を30倍まで増大させた(図8A)。この輸送体の被験化合物との相互作用は、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送を阻害する能力を評価することにより調べた(図8B)。これらの研究は、興味深い、かなり意外な結果をもたらした。 γ -アミノブチレートおよびベタインは、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送に対する作用を、全くまたはほとんど示さなかった。対照的に、カルニチンおよびプロピオニルカルニチンは、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送を顕著に阻害した。カルニチンおよびプロピオニルカルニチンのIC₅₀値(50%阻害した化合物の濃度)は、各々、 0.6 ± 0.1 mMおよび 0.9 ± 0.1 mMであった。アセチルカルニチンも、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送を阻害することができるが、驚くべきことにこのエステルの阻害効力は、カルニチンおよびそのプロピオニルエステルの効力よりもずっと低かった(アセチルカルニチンのIC₅₀値は 15 ± 3 mM)。

10

【0079】

本発明者らは、カルニチンとそのエステル類がATB^{0,+}を輸送することができる基質であるかどうかを決定するために、ベクターをトランスフェクションされた細胞とATB^{0,+} cDNAをトランスフェクションされた細胞の間で、[³H]-カルニチンおよびそのエステルの輸送を比較した(図9A)。HRPE細胞におけるATB^{0,+}発現は、ベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送と比べて増大したカルニチン(16倍)およびプロピオニルカルニチン(6倍)の輸送を誘導した。アセチルカルニチンの輸送も、ATB^{0,+}発現により増大されたが、これは非常に小さい程度であった(2倍)。これらのデータは、ATB^{0,+}が、輸送可能な基質としてカルニチン、プロピオニルカルニチン、およびアセチルカルニチンを認識することを示している。ATB^{0,+}は、Na⁺およびCl⁻連動型の輸送体遺伝子ファミリーの一員であるので、これら2種のイオン性ATB^{0,+}を介したカルニチン輸送に対する影響について本発明者らは調べた(図2B)。この輸送は、取込み用緩衝液中のNa⁺がN-メチル-D-グルカミンで交換された場合に、完全に破壊された。グルコネートとの交換により取込み用緩衝液からCl⁻を除去すると、輸送は~60%に低下した。これらの結果は、ATB^{0,+}を介したカルニチン輸送は、Na⁺およびCl⁻の両方に連動していることを示している。Cl⁻の除去は、この輸送を完全に破壊することはなかったが、その理由は、輸送測定時に細胞からCl⁻が放出される可能性があるからである。輸送体はCl⁻と高親和性で相互作用し、したがって輸送体は、Cl⁻が低濃度であったとしても、有意に活性がある。

20

30

【0080】

ATB^{0,+}を介したカルニチンの輸送は可飽和である(図10A)。動力的パラメータK_tおよびV_{max}の値は、 0.83 ± 0.08 mMおよび 72 ± 2 nmol/10⁶細胞/15分間であった。ATB^{0,+}を介したカルニチン輸送とNa⁺濃度の関係は、S字状であった(図10B)。Na⁺のK_{0.5}は、 54 ± 4 mMであり、ヒル係数(n^H)は 1.6 ± 0.1 であった。この発現系において、実験時に細胞からのCl⁻の著しい量の流出があったので、Cl⁻活性化動力学は調べなかった。

40

【0081】

X. laevis卵母細胞発現系におけるマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送の分析
ATB^{0,+}を介したアミノ酸基質の輸送は、電気発生的である(Sloan, J.L.およびMager, S., Journal of Biological Chemistry, 274, 23740-23745 (1999))。ATB^{0,+}を介したカルニチン輸送の起電性を調べるために、本発明者らは、X. laevis卵母細胞発現系を用いた。マウスATB^{0,+}を発現している卵母細胞をカルニチンで灌流した場合、二微小電極電圧固定技術により、顕著な内向き電流が検出可能であった(10 mMカルニチンで~300 nA)(データ

50

は示さず)。同様の条件下で、プロピオニルカルニチンは $\sim 200\text{nA}$ の電流を誘導した。対照的に、アセチルカルニチンは、検出可能な電流を誘導することができなかった。カルニチンとプロピオニルカルニチンにより誘導された電流は、 Na^+ に加え Cl^- の存在に完全に依存していた。これら2種のイオンのいずれかをとり除くと、電流は完全に遮断された。

【0082】

本発明者らは、輸送体機能の測定値としてカルニチンが誘導した内向き電流を用いて、 $\text{ATB}^{0,+}$ を介したカルニチン輸送の動力学的パラメータを分析した。この電流は、カルニチン濃度の上昇により可飽和である(図11A)。カルニチンの $K_{0.5}$ は $1.8 \pm 0.4\text{mM}$ であった。カルニチン誘導電流の Na^+ 活性化動力学は、S字相関を示した(図11B)。 Na^+ の $K_{0.5}$ は、 $25 \pm 4\text{mM}$ であり、ヒル係数(n^H)は 1.9 ± 0.5 であった。 Cl^- の除去は、カルニチン誘導電流を完全に遮断したので、実験条件下では明らかに卵母細胞からの Cl^- の流出はなかった。従って、本発明者らはこの発現系を用いて、 Cl^- 活性化動力学を分析した。カルニチン誘導電流と Cl^- 濃度の間の関係は、双曲線状であった(図11C)。 Cl^- の $K_{0.5}$ は $15 \pm 5\text{mM}$ であり、かつヒル係数(n^H)は 0.9 ± 0.2 であった。これらのデータは、 $\text{ATB}^{0,+}$ を介した輸送プロセスに関して、 $\text{Na}^+ : \text{Cl}^- : \text{カルニチン}$ の化学量論的比が2:1:1であることを示している。

10

【0083】

考察

現時点で、OCTN2のみが、イオン勾配連動型方法におけるカルニチン輸送が示された輸送体である(Wu,X.ら、Biochemical and Biophysical Research Communications、246、589-595 (1998)、Wu,X.ら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、290、1482-1492 (1999)、Tamai,I.ら、Journal of Biological Chemistry、273、20378-20382 (1998))。OCTN2の輸送機能は、 Na^+ の存在により左右される。 Cl^- は、この輸送体の機能において何ら役割を持たない。しかしカルニチンが中性的性質であることおよび輸送プロセスが Na^+ 共輸送と連動することにより、輸送体は電気発生的である可能性がある。従ってOCTN2を介したカルニチン輸送は、膜内外 Na^+ 勾配および膜電位によりエネルギー供与される。本研究では、第二のイオン勾配連動型カルニチン輸送体の同定を説明している。 $\text{ATB}^{0,+}$ は、 Na^+ および Cl^- と連動した方法で、カルニチンを輸送する。この輸送プロセスは電気発生的である。従って $\text{ATB}^{0,+}$ を介したカルニチン輸送は、 Na^+ および Cl^- の膜内外勾配に加え、膜電位によりエネルギー供給される。カルニチンのための $\text{ATB}^{0,+}$ の集積的な能力は、OCTN2のものよりもはるかに大きい。しかし $\text{ATB}^{0,+}$ は、カルニチンの低親和性輸送体である($K_t=1\text{mM} \sim 2\text{mM}$)。対照的に、OCTN2は、カルニチンの高親和性輸送体である($K_t=5\mu\text{M} \sim 15\mu\text{M}$)(Tamai,I.ら、Journal of Biological Chemistry、273、20378-20382 (1998)、Wu,X.ら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、290、1482-1492 (1999))。血液中のカルニチン濃度は $30\mu\text{M} \sim 50\mu\text{M}$ の範囲内であり、従ってOCTN2は、生理的条件下でのほとんどの組織におけるカルニチンの細胞取込みにとって $\text{ATB}^{0,+}$ よりもずっと重要である。興味深いことに、これら2種の輸送体の組織分布はかなり異なっている。OCTN2はほとんどの組織において発現されるのに対して、 $\text{ATB}^{0,+}$ は主に乳腺、肺、および腸管において発現される。 $\text{ATB}^{0,+}$ が発現される組織において、 $\text{ATB}^{0,+}$ は重要な役割を果たしている可能性がある。OCTN2輸送機能を遺伝的に欠損しているJVSマウスを用いた最近の研究により、カルニチンの小腸での吸収が、欠損のためにわずかに約50%に低下していることが示された(Yokogawa,K.ら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289、224-230 (1999))。OCTN2機能の欠損は小腸での吸収を完全には排除しないという知見により、小腸でのカルニチン吸収に関する、これまで同定されていなかったいくつかのさらなる輸送体の関与が示唆されている。 $\text{ATB}^{0,+}$ は腸管において発現されるので、この輸送体が、OCTN2と共に、カルニチンの小腸での吸収に参加することは可能である。さらに $\text{ATB}^{0,+}$ は小腸においてのみではなく結腸においても発現される。本研究は、マウス結腸からクロニングした $\text{ATB}^{0,+}$ についても行った。微生物叢は、カルニチンを炭素供給源として利用する(Rebouche,C.J.およびSeim,H.、Annual Review of Nutrition、18、39-61 (1998))。従って本発明者らは、結腸の $\text{ATB}^{0,+}$ は、カルニチンの吸収に役割を果たしうり、その結果管腔におけるカルニチンに関する結腸の微生物と競合すると推定した。同様に、

20

30

40

50

乳腺のATB^{0,+}は、乳汁へのカルニチン分泌に関与しうる。加えてATB^{0,+}を介したカルニチン輸送はおそらく、OCTN2が遺伝子欠損した患者におけるカルニチンの恒常性に密接に関連している可能性がある。

【0084】

OCTN2とATB^{0,+}は、それらの親和性および駆動力が異なるのみではなく、それらの基質特異性も異なる。OCTN2は、カルニチン、アセチルカルニチンおよびプロピオニルカルニチンを同等の親和性で輸送する (Wu, X.ら、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、290、1482-1492 (1999))。対照的に、ATB^{0,+}は、カルニチンおよびプロピオニルカルニチンのみを輸送する。この輸送体は、アセチルカルニチンに対して非常に低い親和性を示している。アセチルカルニチンが、細胞内や循環血流中では主要なアシルカルニチンエステルである。これは、代謝の同化および異化経路における重要な中間体である。OCTN2およびATB^{0,+}のアセチルカルニチンに対する親和性の差は、生理的意味を持つ可能性がある。

10

【0085】

3. アミノ酸輸送体ATB^{0,+}によるD-アミノ酸のNa⁺およびCl⁻連動型能動輸送

方法

方法を表3および図面の簡単な説明 (図11) に簡単に示す。

【0086】

結果および考察

本発明者らは、異種発現系におけるD-セリンの輸送に関して、別々のアミノ酸輸送体クローン10個の機能を評価した (図11)。これらの輸送体は全て、腸管において発現される。被験輸送体の一覧には、三つのエネルギー非依存的ヘテロ二量体促進拡散輸送体 (L1、L2、およびb^{0,+})、Na⁺連動型システムA (ATA1、ATA2、およびATA3) の三つのサブタイプ、Na⁺およびH⁺連動型システムNの二つのサブタイプ (SN1およびSN2)、Na⁺連動型システムA TB⁰、ならびにNa⁺およびCl⁻連動型システムATB^{0,+}が含まれる。促進性輸送体の中で、システムL1 (LAT1/4F2hc) およびb^{0,+} (b^{0,+}AT/4F2hc) は、有意なD-セリン輸送能を示した。LAT2/4F2hcおよびb^{0,+}AT/rBAT複合体は、検出可能なD-セリン輸送活性を示さなかった。システムAのサブタイプの中で、ATA1およびATA2はD-セリン輸送活性を示したが、ATA3は示さなかった。SN1およびSN2は、D-セリンを輸送しなかった。ATB⁰は、D-セリンを顕著な程度まで輸送することができ、その輸送活性は、システムL1、システムb^{0,+}、システムATA1、およびシステムATA2のそれより高い。D-セリンの輸送能は、Na⁺およびCl⁻連動型輸送体ATB^{0,+}が最高であった。ATB^{0,+}は、多数の推進力、すなわちNa⁺勾配、Cl⁻勾配、および膜電位によってその輸送機能がエネルギー付与される神経伝達物質輸送体の遺伝子ファミリーに属する。ATB⁰およびATB^{0,+}の機能的活性は、腸上皮細胞の刷子縁膜において証明されており、したがって、これらの二つの輸送体は、管腔から粘膜細胞へのD-セリンの能動的吸収を媒介する可能性がある。これらの二つの輸送系のエネルギー論に基づいて、ATB^{0,+}は、このプロセスにおいて主要な役割を果たすと予想される。

20

30

【0087】

ATB^{0,+}が他のD-アミノ酸を輸送することができるか否かを調べるために、異なる二つのアプローチを用いた (表3)。

40

【0088】

(表3) ATB^{0,+}によるD-アミノ酸に対するL-アミノ酸の輸送

アミノ酸	HRPE 細胞における		<i>X. laevis</i> 卵母細胞	
	mATB ^{0,+} 特異的		における電流	
	[³ H]-グリシン輸送（%対照）		（nA）	
	細胞10 ⁶ 個/15分			
	L-異性体	D-異性体	L-異性体	D-異性体
対照	100 ± 6	100 ± 6		
アラニン	6 ± 1	10 ± 1	650 ± 86	402 ± 39
セリン	10 ± 1	14 ± 1	470 ± 42	267 ± 23
メチオニン	3 ± 0	14 ± 1	278 ± 26	213 ± 15
ロイシン	3 ± 1	13 ± 1	187 ± 14	161 ± 25
トリプトファン	4 ± 1	7 ± 1	112 ± 4	157 ± 23
トレオニン	19 ± 2	47 ± 3	233 ± 12	41 ± 5
ヒスチジン	9 ± 1	35 ± 2	410 ± 64	29 ± 6
フェニルアラニン	3 ± 0	26 ± 2	275 ± 58	24 ± 24
グルタミン	13 ± 1	77 ± 4	453 ± 53	16 ± 11
アスパラギン	15 ± 1	95 ± 7	394 ± 67	3 ± 2
リジン	18 ± 1	86 ± 5	321 ± 34	9 ± 9
アルギニン	25 ± 1	93 ± 6	339 ± 35	6 ± 1
バリン	7 ± 1	87 ± 4	310 ± 24	4 ± 3
イソロイシン	4 ± 1	85 ± 5	117 ± 16	4 ± 4

10

20

30

40

50

【0089】

[³H]-グリシン (10 μM) の輸送を、ベクターをトランスフェクションされたHRPE細胞およびmATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされたHRPE細胞において測定した。非標識アミノ酸を、濃度2.5 mMで用いた。cDNA特異的輸送を、mATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞における輸送からベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送を差し引くことによって計算した。値は対照輸送の割合 (%) である。データ (4回の別々の測定の平均値±SEM) は、cDNA特異的輸送のみを表す。また、mATB^{0,+}cRNAを注入することによって*X. laevis*卵母細胞においてmATB^{0,+}を発現させ、アミノ酸 (1 mM) によって誘導された内向き電流を、二微小電極電圧固定法を用いて測定した。灌流液はNaCl (pH 7.5) を含んだ。データは、卵母細胞の三つの異なるロットからの平均値±SEMを表す。

【0090】

第一のアプローチにおいて、ATB^{0,+}の輸送機能を、基質としてグリシンを用いる哺乳動物細胞異種発現系において測定し、様々なアミノ酸のL-エナンチオマーおよびD-エナンチオマーがこの輸送機能を阻害する能力を比較した。試験した全ての中性アミノ酸および塩基性アミノ酸は、L-エナンチオマーとして存在する場合、ATB^{0,+}を介したグリシン輸送の強力な阻害剤であった。D-エナンチオマーの場合、アラニン、セリン、メチオニン、ロイシンおよびトリプトファンのみが強力な阻害剤であった。阻害の程度は、これらのアミノ酸5個に関してL-エナンチオマーとD-エナンチオマーのあいだで同等であった。対照的に、

トレオニン、ヒスチジン、フェニルアラニンおよびグルタミンのD-エナンチオマーは、対応するL-エナンチオマーよりも、阻害剤としての有効性がかなり低かった。アスパラギン、リジン、アルギニン、バリン、およびイソロイシンは、対応するL-エナンチオマーが強力な阻害剤であるのに対し、D-エナンチオマーとして存在する場合、阻害剤としてほぼ完全に無効であった。阻害とは、阻害剤が輸送体によって膜を介して転位することを必ずしも意味しないため、これらのアミノ酸のL-エナンチオマーおよびD-エナンチオマー型の輸送を、異種性ATB^{0,+}を発現する*Xenopus laevis*卵母細胞において直接評価した。これは、二微小電極電圧固定法を用いて、アミノ酸誘導型内向き電流をモニタリングすることによって行われた。全被験アミノ酸のL-エナンチオマーは内向き電流を誘導し、これによりATB^{0,+}によってそれらが輸送されたことが示される。D-エナンチオマーの場合、アラニン、セリン、メチオニン、ロイシン、およびトリプトファンのみが電流を誘導した。トレオニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、およびグルタミンは、小さいが有意な電流を生じたのに対し、残りのアミノ酸は電流を生じなかった。*X.laevis*卵母細胞発現系によるこれらの結果は、哺乳動物細胞発現系による結果の確証となる。これらのデータは、ATB^{0,+}が、L-エナンチオマーとして存在する全ての中性アミノ酸および塩基性アミノ酸を輸送することができることを示している。しかし、輸送体は、輸送可能な基質としてD-エナンチオマー型のアラニン、セリン、メチオニン、ロイシン、およびトリプトファンのみを認識する。

10

【0091】

4. アミノ酸輸送体ATB^{0,+}によるフェニルグリシンおよびその誘導体のNa⁺およびCl⁻連動型能動輸送

20

方法

材料

[³H]-グリシンは、Moravek (Brea, CA) から購入されたものであり、[¹⁴C]-L-フェニルグリシンは、American Radiolabeled Chemicals, Inc (St.Louis, MO) から購入されたものである。[³H]-L-グルタミンおよび[³H]-L-アラニンは、Dupont-New England Nuclear (Boston, MA) およびAmersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) からそれぞれ得た。

【0092】

HRPE細胞におけるATB^{0,+}、ATB⁰、およびb^{0,+}ATの機能的発現

これは、ワクシニアウイルス発現系を用いて行った。輸送の測定は、基質として放射標識アミノ酸を用いて37°Cで15分間行った。輸送緩衝液は、140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.8 mM MgSO₄、および5 mMグルコースを含む25 mM Hepes/Tris (pH 7.5) であった。内因性の輸送活性は常に、ベクターのみをトランスフェクションされた細胞を用いて同時に測定した。cDNA特異的輸送は、内因性活性を補正することによって計算された。

30

【0093】

*X.laevis*卵母細胞発現系におけるATB^{0,+}の機能的発現

*X.laevis*由来の成熟卵母細胞を、コラゲナーゼA (1.6 mg/ml) による処置によって単離した。卵母細胞の卵胞を手で除去して (defolliculate) からマウスATB^{0,+}cRNAまたは水の注射用に用いた (Fei, Y.J.ら、Journal of Biological Chemistry、275、23707~23717 (2000))。cRNAを、mMESSAGE mMACHINE (商標) キット (Ambion、Austin、TX、USA) を用いて合成した。卵母細胞におけるマウスATB^{0,+}による化合物の輸送を、二微小電極電圧固定法を用いて電気生理的にモニタリングした (Fei, Y.J.ら、Journal of Biological Chemistry、275、23707~23717 (2000))。膜電位を、-50 mVで一定に維持した。卵母細胞を各化合物で灌流して、誘導電流をモニタリングした。誘導電流は輸送速度の測定値として得た。灌流緩衝液の組成は、100 mM NaCl、2 mM KCl、1 mM MgCl₂、および1 mM CaCl₂を含む10 mM Hepes/Tris (pH 7.5) であった。

40

【0094】

(S)-2-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノフェニル)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ酢酸tert-ブチルエステルの合成 (図14実施例1)

(S)-2-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノフェニル)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ

50

酢酸 (1.0 g)、tert-ブチル2,2,2-トリクロロアセチミデート (1.0 g) およびBF₃-Et₂O (1滴) のCH₂Cl₂ (30 ml) 混合液を室温で一晩攪拌した。反応混合物を真空中で濃縮して、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (3:1ヘキサン:EtOAc) によって精製すると、表題化合物 (800 mg) が得られた。

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.33 (m, 9H), 5.59 (brn, 1H), 5.19 (s, 2H), 5.18

(brn, 1H), 1.42 (m, 18H)

【0095】

(S)-2-(3-アミノフェニル)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ酢酸tert-ブチルエステルの合成 (図14実施例2)

10

(S)-2-(3-ベンジルオキシカルボニルアミノフェニル)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ酢酸tert-ブチルエステル (800 mg) および10% Pd-Cのエタノール混合液をH₂下で攪拌した。混合物を濾過して触媒を除去し、濾液を真空中で濃縮して表題化合物 (650 mg) を得た。

¹H NMR

(CDCl₃, 400MHz) δ 7.12-7.08 (m, 1H), 6.73-6.59 (m, 3H), 5.48 (m, 1H), 5.08 (d, J=7.6Hz, 1H),

3.67 (brs, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (s, 9H)

【0096】

20

(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸tert-ブチルエステルの合成 (図14実施例3)

(S)-2-(3-アミノフェニル)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ酢酸tert-ブチルエステル (2.6 g)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (2.2 g) およびEt₃N-AcOH/MeCN (1 M、8.0 ml) のMeCN (50 ml) 混合液を気密容器において50°Cで3日間攪拌した。反応混合液を真空中で濃縮して、粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2:1ヘキサン:EtOAcおよび15:1 CHCl₃:MeOH) によって精製すると、表題化合物 (900 mg) が得られた。

¹H NMR (CDCl₃,

400MHz) δ 9.90 (brs, 1H), 7.48-7.27 (m, 4H), 5.80 (d, J=6.4Hz, 1H), 5.19 (d, J=6.4Hz, 1H), 1.40 (s,

18H)

30

【0097】

(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸塩酸塩の合成 (図14実施例4)

(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸tert-ブチルエステル (800 mg) およびH₂O (1 ml) のHCl/ジオキサン (4 M、5 ml) 混合液を室温で一晩攪拌した。混合物を真空中で濃縮して、H₂O (5 ml) に溶解して、5 ml固相抽出器 (WatersODS) の中を通過させ、凍結乾燥して、表題化合物 (550 mg) を得た。得られた化合物をH₂O (5 ml) に溶解して、DOWEX 50W X8イオン交換樹脂 (Na⁺型) 15mlを予め充填したクロマトグラフィーカラムに適用した。カラムを水で洗浄して、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸が確実に完全に溶出するように2%アンモニア水によって濯いだ。アンモニア溶出液を凍結乾燥して、得られた残渣をH₂O (10 ml) に再度溶解した。(-)-10-カンフルスルホン酸 (460 mg) を溶液に加えて、50°Cに加熱した。均一な混合物を4°Cまで冷却して、同じ温度で一晩放置した。混合物を濾過して、沈殿した固体を除去し、DOWEX 50W X8イオン交換樹脂 (Na⁺型) 15 mlを予め充填したクロマトグラフィーカラムに濾液を適用した。カラムを水によって洗浄して、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸が確実に完全に溶出するように、2%アンモニア水によって濯いだ。アンモニア溶出液を凍結乾燥した。残渣に1 M HCl (2 ml) およびH₂O (10 ml) を加えて、混合物を凍結乾燥すると、表題化合物 (350 mg、98% ee) が得られた。

40

¹H NMR (DMSO-d₆,**400MHz) δ 10.15 (s, 1H), 8.86 (m, 3H), 8.41 (brs, 2H), 7.43-7.17 (m, 4H), 5.07 (m, 1H)****【 0 0 9 8 】**結果および考察

ATB^{0,+}のアミノ酸特異性を、クローニングされた輸送体を介した輸送のプロセスに関して、L-フェニルグリシンを含む多様なアミノ酸が [³H]-グリシン (60 nM) と競合する能力を評価することによって試験した (表4)。

【 0 0 9 9 】(表4) マウスATB^{0,+}のアミノ酸基質特異性

10

非標識 アミノ酸	mATB ⁰⁺ 特異的 [³ H]-グリシン輸送
	pmol/細胞10 ⁶ 個/15分
	%
対照	37.27 ± 1.20
グリシン	1.88 ± 0.06
アラニン	1.04 ± 0.05
システイン	1.11 ± 0.20
セリン	1.99 ± 0.09
トレオニン	3.91 ± 0.30
プロリン	9.97 ± 0.57
ヒスチジン	1.31 ± 0.10
グルタミン	2.39 ± 0.18
アスパラギン	3.25 ± 0.23
ロイシン	0.27 ± 0.03
イソロイシン	0.27 ± 0.02
フェニルアラニン	0.56 ± 0.03
トリプトファン	0.37 ± 0.06
アルギニン	7.14 ± 0.35
リジン	3.52 ± 0.28
アスパラギン酸	32.01 ± 1.29
グルタミン酸	33.47 ± 0.91
MeAIB	36.21 ± 4.80
フェニルグリシン	0.03 ± 0.02

20

30

40

【 0 1 0 0 】

[³H]-グリシン (60 nM) の輸送は、ベクターをトランスフェクションされたHRPE細胞およびmATB^{0,+} cDNAをトランスフェクションされたHRPE細胞において、NaClの存在下 (pH 7.5) で37℃で15分間測定された。非標識アミノ酸を、濃度2.5 mMで用いた。cDNA特異的輸送は、mATB^{0,+} cDNAをトランスフェクションされた細胞における輸送からベクターをトラン

50

スフェクションされた細胞における輸送を差し引くことによって計算された。データ（4回の別々の測定の平均値±SEM）は、cDNA特異的輸送のみを表す。

【0101】

2.5 mMの濃度で、試験した中性アミノ酸および塩基性アミノ酸は全て、ATB^{0,+}を介した[³H]-グリシンの輸送を阻害した（70%～99%）。L-フェニルグリシンは、ATB^{0,+}を介した[³H]-グリシンの輸送を完全に（100%）阻害した。これは、ATB^{0,+}に対するL-フェニルグリシンの親和性が全必須アミノ酸の親和性よりも高いことを示している。

【0102】

L-フェニルグリシンと必須アミノ酸とのあいだのATB^{0,+}の親和性の差を定量するために、本発明者らは、ATB^{0,+}を介した[³H]-グリシンの輸送の、L-フェニルグリシン、L-アラニン、およびL-フェニルアラニンを用いた阻害に関する用量反応相関を比較した（図12）。これらの試験から計算したIC₅₀値（すなわち、50%阻害を引き起こすアミノ酸濃度）を表5に示す。これらの競合において用いた[³H]-グリシンの濃度が57 nMであることから、これらのIC₅₀値は実験条件下ではK_i値（すなわち阻害定数）にほぼ等しいが、この値はほとんどのアミノ酸に関してATB^{0,+}の既知のK_i値（>6 μM）よりもずっと少ない。これらの値の比較から、L-フェニルグリシンに対するATB^{0,+}の親和性は、グリシンおよびフェニルアラニンに関して対応する親和性よりも、それぞれ19倍および13倍高いことが示される。

【0103】

腸内刷子縁膜（BBM）において、少なくとも三つの輸送体がL-フェニルグリシンを輸送すると考えられる；ATB^{0,+}、ATB⁰およびb^{0,+}AT。L-フェニルグリシンが腸内BBMにおいてATB^{0,+}に対する特異的基質であることを証明するために、本発明者らは、ATB⁰およびb^{0,+}ATを介した[³H]-アラニンおよび[³H]-グルタミンの輸送のL-フェニルグリシン、L-アラニン、およびL-フェニルアラニンによる阻害に関する用量反応相関を比較した。その上、本発明者らは、これらの結果からIC₅₀値を計算した（表5）。

【0104】

（表5）mATB^{0,+}、hATB⁰、およびmb^{0,+}AT rBAT複合体を介した輸送の阻害に関するK_i値の比較

アミノ酸	K _i 値		
	mATB ^{0,+}	hATB ⁰	mb ^{0,+} AT rBAT 複合体
L-フェニルグリシン	5.3 ± 0.4	19.0 ± 5.5	283.3 ± 84.4
L-アラニン	101.4 ± 14.2	22.5 ± 4.2	803.7 ± 142.5
L-フェニルアラニン	68.6 ± 2.4	4229 ± 999	586.5 ± 215.4

【0105】

取込みの測定を、非標識アミノ酸の濃度範囲にわたって阻害を評価した点を除き、表1に記載したように行った。K_i値は、mATB^{0,+}に対して特異的な57 nM[³H]-グリシン、hATB⁰に対して特異的な32 nM[³H]-アラニン、およびmb^{0,+}AT rBAT複合体に対して特異的な36 nM[³H]-アルギニンの取込みの阻害に関する用量反応相関から計算した。

【0106】

L-フェニルグリシンに関して、ATB^{0,+}の親和性は、ATB⁰およびb^{0,+}ATの対応する親和性よりも、それぞれ4倍および53倍高い。

【0107】

これらの結果は、L-フェニルグリシンが、クローニングされたマウスATB^{0,+}の基質結合部位と高い親和性で相互作用することを示している。しかし、これらのデータは、フェニルグリシンが輸送体に関する輸送可能な基質であることを示唆しているが証明していない。いくつかの化合物は、それ自身が膜を越えて輸送されることなく、基質結合部位との結合

の際にグリシンと競合することによって輸送を遮断する可能性がある。これらの阻害剤が実際に輸送体の輸送可能な基質であるか否かを決定するためには、これらの阻害剤の $ATB^{0,+}$ を介した輸送の直接測定を行わなければならない。この目的のため、本発明者らは、 $[^14C]$ -L-フェニルグリシンを $ATB^{0,+}$ の基質として用いて、クローニングした輸送体を発現するHRPE細胞におけるその輸送を試験した（図13）。 $ATB^{0,+}$ 発現細胞内のL-フェニルグリシンの輸送は、ベクターをトランスフェクションされた細胞内よりも3倍高く、これは、L-フェニルグリシンが実際にこの輸送体に関する輸送可能な基質であることを証明している。その上、 $ATB^{0,+}$ によるcDNA特異的L-フェニルグリシン輸送は、 ATB^0 および $mb^{0,+}$ ATによるcDNA特異的輸送より10倍高かった。

【0108】

併せて考慮すると、これらの結果は、L-フェニルグリシンが、試験した全てにおいて $ATB^{0,+}$ の最も特異的な基質であることを示している。フェニルグリシン誘導体薬物は、腸管から効率的に吸収されて、結腸、肺、および乳腺など、 $ATB^{0,+}$ を豊富に発現する組織に輸送される可能性が高い。

【0109】

その上、本発明者らは、L-フェニルグリシン誘導体の例として(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシンを合成した（図14）。この化合物は、強力なNOS阻害剤であるL-NNAの誘導体でもあるため、NOS阻害剤として有効であると考えられる。本発明者らは、この化合物の輸送を調べるために*X.laavis*卵母細胞発現系を用いた。この化合物の輸送を、様々な濃度のこの化合物によって誘導された内向き電流によってモニタリングした（図15A）。本発明者らはまた、双方の化合物の親和性を比較するためにL-NNAの電流もモニタリングした（図15B）。(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシンおよびL-NNAの K_m 値はそれぞれ、 $106 \pm 1 \mu M$ および $348 \pm 5 \mu M$ である。これらのデータは、L-NNA化学構造のフェニルグリシン誘導体化学構造への改変が $ATB^{0,+}$ に対する輸送親和性を増加させることを示している。本発明者らが実施例6において示すように、 $ATB^{0,+}$ は、iNOSと同様に、炎症状態において誘導可能である。併せて考慮すると、(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシンのようなL-フェニルグリシン誘導体NOS阻害剤は、結腸、肺、および乳腺など、 $ATB^{0,+}$ を豊富に発現する組織の炎症に対して有効となるはずである。

【0110】

5. アミノ酸に基づくプロドラッグの送達系としての $ATB^{0,+}$ の利用可能性に関する証拠方法

輸送試験

方法を、表6および図面の簡単な説明（図16）に簡単に示す。

【0111】

アシクロビルのL-グルタミン酸 γ -エステルの合成

アシクロビルおよび酢酸アンモニウムはSigma (St.Louis, MO) から購入した。N- α -CBZ-L-グルタミン酸 γ -ベンジルエステル (Z-Glu-OBzl) は、Nova biochem (San Diego, CA) から購入した。1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC)、10重量%パラジウム/活性炭素 (Pd/C)、4-ジメチルアミノピリジン (DMAP)、ジメチルホルムアミド (DMF)、およびジクロロメタン (CH_2Cl_2) はAldrich (Milwaukee, WI) から購入した。メタノール (MeOH) およびHPLC等級のアセトニトリルは、EM Science (Gibbstown, NJ) から購入した。エタノール (EtOH) は、AAPER alcohol and chemical company (Shelbyville, KY) から購入した。アシクロビル (0.888 mmol) およびZ-Glu-OBzl (2.22 mmol) をDMF (6 ml) に溶解して、EDC (426 mmol) およびDMAP (2.22 mmol) を溶液に加えた。溶液を室温で18時間攪拌した。DMFを真空下で除去して、残渣をNHシリカゲル (Chromatorex DM-1020, Fuji Silysia Chemical LTD, 日本) 上で、溶出液として1:10~1:5 MeOH- CH_2Cl_2 を用いてクロマトグラフィーを行って、アシクロビルZ-Glu-OBzl γ エステルを生成した。

【0112】

アシクロビルZ-Glu-OBzl γ エステルをEtOH (1 ml)、MeOH (1 ml)、および CH_2Cl_2 (1 ml)

10

20

30

40

50

）に溶解して、10% Pd/C (20 mg) を加えた。混合物を水素下で3日間攪拌した。混合物を濾過して触媒を除去し、溶媒を真空下で除去した。生成物は白色の非結晶固体 (120 mg) であった。全体的な収率：38%。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.00 (2H, m, CH_2),

3.14-4.10 (7H, m, $3 \times \text{CH}_2 + \text{CH}$), 5.34 (2H, m, CH_2), 6.78 (2H, bs, NH_2), 7.97 (1H, s, 芳香族 H),

7.39 (3H, bs), 10.96 (1H, bs, NH); ESI-MS m/z 計算値 555.1, 実測値 555.0 (MH) $^+$

【0113】

最終生成物の純度は、分析カラム (Cyclobond I 2000、 4.6×100 mm、Advanced Separation Technologies Inc、Whippany、NJ) を備えたDionex分析HPLCシステム (Dionex corporation、Sunnyvale、CA) を用いたRP-HPLCにより確認した。分析RP-HPLCの勾配は、以下の通りであった：(溶媒A) 10% 5 mM酢酸アンモニウム水溶液のアセトニトリル溶液、(溶媒B) 90% 5 mM酢酸アンモニウム水溶液のアセトニトリル溶液、100：0～90：10 (溶媒A：溶媒B) を1 ml/分で3分間。保持時間は1.42分間、純度は96%であった。化合物の分子量は、ESI-MSによって決定した (Finnigan Mat LC-Q、Finnigan Corporation、San Jose、CA)。値はMH $^+$ として表記する。

【0114】

結果および考察

アスパラギン酸およびグルタミン酸はATB $^{0,+}$ の基質ではないが、アスパラギンおよびグルタミンは基質であるため、本発明者らは、その側鎖におけるカルボキシル基が別々の化学基で置換されているアスパラギン酸およびグルタミン酸の誘導体は、輸送体の基質となると考えられるという仮説を立てた。この仮説を調べるため、本発明者らは、そのようないくつかの誘導体が、ATB $^{0,+}$ による輸送に関してグリシンと競合する能力を評価した (表6)。本発明者らは、アスパラギン酸およびグルタミン酸のメチルおよびベンジルエステルが、グリシン輸送の強力な阻害剤であることを発見した。これらの誘導体は濃度1 mMにおいて80%～100%の阻害を引き起こし、これは、これらの誘導体がATB $^{0,+}$ によって認識されることを示している。ヒドロキサメート (hydroxamate)、アニリド、およびナフチルアミド誘導体も同様に、ATB $^{0,+}$ による輸送に関して、グリシンと中等度に効率的に競合する。図16Aは、アスパラギン酸、アスパラギン、およびアスパラギン酸- β -ベンジルエステルの用量反応相関を記述し、図16Bは、グルタミン酸、グルタミン、およびグルタミン酸- γ -ベンジルエステルの用量反応相関を記述する。予想されるように、アスパラギン酸およびグルタミン酸は、ATB $^{0,+}$ を介したグリシン輸送の有効な阻害剤ではない。しかし、アミド誘導体 (アスパラギンおよびグルタミン) およびベンジルエステル誘導体は強力な阻害剤である。興味深いことに、アスパラギン酸のベンジルエステル (IC_{50} 値、 70 ± 8 μM) は、グルタミン酸のベンジルエステル (IC_{50} 値、 156 ± 12 μM) より約2倍強力であり、これは、対応するグルタミン酸誘導体よりも良好に、ATB $^{0,+}$ がアスパラギン酸誘導体と相互作用しうること示唆している。したがって、本発明者らは、治療薬が β -カルボキシル基においてアスパラギン酸に連結できれば、得られた誘導体は、ATB $^{0,+}$ の優れた基質となる可能性があるかと推測する。

【0115】

(表6)

【化1】

10

20

30

40

化合物 (1 mM)	ATB ⁰⁺ 特異的 グリシン輸送 (%対照)
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COO}- \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン酸	86±3
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}_2 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン	22±0
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COOCH}_3 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン酸β-メチルエステル	8±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{CONHOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン酸β-ヒドロキサメート	39±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン酸β-ベンジルエステル	2±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_2\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-アスパラギン酸 β-(7-アミド-4-メチルクマリン)	*92±5
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-\text{CH}(\text{COOCH}_3)-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \quad \text{H}_2 \end{array}$ NβL-アスパルチル-L-フェニルアラニン メチルエステル	62±3

* 0.25 mM

【化 2】

10

20

30

Compound (1 mM)	ATB ^{0,+} -specific glycine transport (% control)
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COO}- \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-Glutamate	82±2
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-Glutamine	21±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \end{array}$ L-Glutamate γ-benzyl ester	13±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ DL-Glutamate γ-anilide	49±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ L-Glutamate γ-(α-naphthylamide)	97±2
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CONH}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$ L-Glutamate γ-(β-naphthylamide)	*79±4

10

20

30

* 0.25 mM

【0116】

HRPE細胞にバクテラ単独またはマウスATB^{0,+}cDNAのいずれかをトランスフェクションして、ワクシニアウイルス技術によって機能的発現を行った。³Hグリシン (10 μM) の輸送を、アスパラギン酸およびグルタミン酸の様々な誘導体 (1 mM) の存在下および非存在下で測定した。データは、cDNA特異的輸送のみを表す。結果は、阻害剤の非存在下で測定した対照輸送の%として示す。

【0117】

これらのプロドラッグの親薬物は真の薬物ではない。本発明者らは、ウイルス感染用の市販薬であるアシクロビルのL-グルタミン酸-γ-エステルを合成し、これらの案の実用性を試験した。この試験を評価するために、本発明者らは、X.laevis卵母細胞発現系を用いた。このプロドラッグの輸送を、このプロドラッグの様々な濃度によって誘導された内向き電流によってモニタリングした (図17)。これらのデータにより、ATB^{0,+}によるアシクロビルのL-グルタミン酸-γ-エステルの飽和可能な輸送を直接示している。

40

【0118】

その上、本発明者らは、アミノ酸に基づくプロドラッグの基質認識の拡大の可能性を調べるために、アシクロビルのL-バリン-α-エステル (パラシクロビル) の輸送を評価した。本発明者らは、マウスATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされたHRPE細胞における[8-³H]-パラシクロビル輸送を試験した (図18)。その結果、ATB^{0,+}発現細胞における[8-³H]-パラシクロビルの輸送は、バクテラをトランスフェクションされた細胞より3倍高く、これ

50

は、パラシクロビルが実際にこの輸送体に対する輸送可能基質であることを証明している。

【0119】

6. 炎症状態での腸管におけるATB^{0/+}発現の上昇

方法

方法は、図面の簡単な説明（図19）に簡単に示す。

【0120】

結果および考察

D-セリンは、グルタミン酸神経伝達の重要な調節物質でありかつ他のD-アミノ酸も同様に有意な生物作用を有しうするため、D-アミノ酸の腸管吸収が変化する可能性がある病態が存在するか否かを知ることは臨床的に重要である。したがって本発明者らは、腸機能に影響を及ぼすことが知られている炎症状態の腸管におけるATB^{0/+}発現を評価した。本発明者らは、この目的のために二つの異なる動物モデルを用いた。第一に、本発明者らは、細菌性リポ多糖類の注射によってマウスに敗血症を生じる敗血症の動物モデルを用いた。この動物モデルは、腸の形態および機能に及ぼす敗血症の影響を調べるために広く用いられている。第二に、本発明者らは、慢性炎症のモデルとしてインターロイキン-2ノックアウトマウスを用いた。IL-2^{-/-}マウスは、生後5週間～6週間以内に重度の潰瘍性大腸炎を発症する。第一のモデルにおいて、生理食塩液を注射したマウスを対照とした。第二のモデルにおいて、IL-2^{+/+}マウスを対照とした。ATB^{0/+}mRNAの定常状態レベルを、空腸、回腸、および結腸における半定量的RT-PCRによって試験した。グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素（GAPDH）mRNAを細菌敗血症モデルの内部対照として用いた。しかし、GAPDH mRNAは、IL-2^{+/+}マウスと比較してIL-2^{-/-}マウスでは数倍上昇しているため、このmRNAは潰瘍性大腸炎モデルに関する内部対照として好適ではなかった。したがって、本発明者らは、この動物モデルの内部対照としてシクロフィリンC mRNAを用いた。それぞれの内部対照に関して補正した後、ATB^{0/+}mRNAが、生理食塩液処置マウスと比較してリポ多糖類処置マウスの回腸において7倍、および結腸において2倍増加していることが判明した（図19）。同様に、ATB^{0/+}mRNAレベルは、IL-2^{+/+}マウスと比較してIL-2^{-/-}マウスでは回腸において12倍、および結腸において5倍増加した（図19）。これらのデータは、炎症状態によって、回腸および結腸におけるATB^{0/+}発現の顕著な増加が起ることを示している。ATB^{0/+}mRNAは、どのマウスの空腸においても検出されなかった。本発明者らは、細菌由来のD-セリンおよび他のD-アミノ酸の腸管吸収が、これらの炎症状態では有意に増加しうると推測する。

【0121】

7. 腫瘍組織におけるATB^{0/+}発現の上昇

本発明者らは、腫瘍組織におけるATB^{0/+}発現を評価した。本発明者らは、105日齢のFvB野生型ポリオーマミドル（middle）T抗原雌性マウスの乳腺腫瘍および対照マウスの対応する乳腺腫瘍からのmRNAを用いた。腫瘍のmRNA試料はマウス2匹から採取した。対照乳腺をマウス3匹から採取してRNA調製のためにプールしたが、その理由は、乳腺組織が小さすぎて各マウスに関するmRNAを調製できなかったからである。定常状態のATB^{0/+}mRNAを、乳腺腫瘍および対応する対照において半定量的RT-PCRによって試験した（図20）。ATB^{0/+}は対照乳腺には検出されなかったが、一方で両腫瘍試料においてRT-PCRによってATB^{0/+}が検出された。本発明者らは、サザンブロットによる半定量的RT-PCRによって腫瘍におけるATB^{0/+}の誘導レベルを定量した。ATB^{0/+}は、約58倍および88倍増加した。本発明者らはまた、iNOSの誘導レベルも定量した。iNOSはまた、両腫瘍試料において約33倍および134倍増加した。多くの腫瘍におけるiNOS発現がより高いことは周知であり、iNOSは、腫瘍発生および腫瘍の増殖において重要な役割を果たす可能性がある（Jaiswal, M.ら、Am. J. Physiol. 281, G626～G634（2001）、Thomsen, L.L.ら、Cancer Research, 57: 3300～3304、（1997））。本発明者らはまた、ヒト乳癌細胞株MCF-7およびヒト肝癌細胞株Hep-G2におけるATB^{0/+}の発現がより高いことを発見した。

【0122】

産業上の利用可能性

10

20

30

40

50

本発明によって、 $ATB^{0,+}$ により輸送可能な化合物が明らかにされた。この化合物情報に基づけば、 $ATB^{0,+}$ により輸送可能な薬物の設計、製造およびスクリーニングが可能である。これら薬物は、NOS、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸等が関与する疾患の治療および/または予防に役立つ。また、 $ATB^{0,+}$ 遺伝子を患者に投与することによって、上記疾患の遺伝子治療を行うことも考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】マウス腸管の長軸に沿った $ATB^{0,+}$ mRNAノーザンブロット分析の結果を示す写真を示す。小腸は、小腸の最も近位領域を示す第一セグメントから最も遠位領域を示す第四セグメントまでの4個の同等のセグメントに分けた。ブロットは、順にマウス $ATB^{0,+}$ 、マウスPEPT1およびマウス β -アクチンに特異的な $[^{32}P]$ 標識cDNAプローブと、高ストリンジェント条件下でハイブリダイズした。

10

【図2】基質としてグリシンを用いた哺乳動物細胞の発現系におけるマウス $ATB^{0,+}$ の機能的特徴を示す。結果は、 $ATB^{0,+}$ 特異的輸送活性についてのみ示し、これはcDNAをトランスフェクションされた細胞における輸送から、ベクターをトランスフェクションされた細胞における輸送を差し引いて算出した。A. $ATB^{0,+}$ を介したグリシン（60nM）輸送のイオン依存性。B. $ATB^{0,+}$ を介したグリシン輸送の飽和動力学。C. $ATB^{0,+}$ を介したグリシン（60nM）輸送の Na^+ 活性化動力学。D. $ATB^{0,+}$ を介したグリシン（60nM）輸送の Cl^- 活性化動力学。

【図3】クローニングされたマウス $ATB^{0,+}$ を発現しているHRPE細胞におけるNOS阻害剤による $ATB^{0,+}$ 特異的グリシン（10 μ M）輸送の阻害の用量反応相関を示す。

20

【図4】 $ATB^{0,+}$ を介したL-NNA輸送の特徴を示す。クローニングされたマウス $ATB^{0,+}$ はHRPE細胞において発現されており、 $[^3H]$ -L-NNA（10 μ M）の輸送が試験された。結果は $ATB^{0,+}$ 特異的輸送についてのみ示した。A. ベクターをトランスフェクションされた細胞および $ATB^{0,+}$ cDNAをトランスフェクションされた細胞におけるL-NNAの輸送。B. アミノ酸（5mM）による $ATB^{0,+}$ 特異的L-NNA輸送の阻害。C. $ATB^{0,+}$ を介したL-NNA輸送の飽和動力学。

【図5】クローニングされたマウス $ATB^{0,+}$ を発現しているX. laevis卵母細胞におけるL-アルギニン、L-NIL、およびL-MTCにより誘導された内向き電流のイオン依存性を示す。卵母細胞は、NaCl、グルコン酸ナトリウム、またはNMDG塩化物を含有する緩衝液中で、1mM基質で灌流された。

30

【図6】X. laevis卵母細胞発現系における $ATB^{0,+}$ を介した輸送に関するNOS阻害剤の飽和動力学を示す。クローニングされたマウス $ATB^{0,+}$ を発現している卵母細胞を、濃度漸増するL-MTC、L-NIL、およびL-NIOで灌流し、かつ内向き電流を電圧固定条件下で測定した。上側パネルは、-50mVでの基質濃度と内向き電流の関係を示している。下側パネルは、 $K_{0.5}$ 値と膜電位の間の関係を示している。

【図7】HRPE細胞におけるカルニチンおよびそのアシルエステルによるマウス $ATB^{0,+}$ を介したグリシン輸送の阻害を示す。A. ベクターをトランスフェクションされた細胞およびマウス $ATB^{0,+}$ cDNA（ $mATB^{0,+}$ ）をトランスフェクションされた細胞における、グリシン（10 μ M）輸送。B. γ -アミノブチレート（GABA）、ベタイン、カルニチン、アセチルカルニチン、およびプロピオニルカルニチンによる $ATB^{0,+}$ を介したグリシン（10 μ M）輸送の阻害。阻害剤が存在しない場合の輸送を100%とする。

40

【図8】HRPE細胞におけるマウス $ATB^{0,+}$ によるカルニチンおよびそのアシルエステルの輸送、ならびにこのプロセスのイオン依存性を示す。A. ベクターをトランスフェクションされた細胞およびマウス $ATB^{0,+}$ cDNAをトランスフェクションされた細胞における、カルニチン（25 μ M）、プロピオニルカルニチン（25 μ M）、およびアセチルカルニチン（25 μ M）の輸送。B. ベクターをトランスフェクションされた細胞およびマウス $ATB^{0,+}$ cDNAをトランスフェクションされた細胞における、NaCl存在下、 Na^+ 存在および Cl^- 非存在（グルコン酸Na）下、ならびに Cl^- 存在および Na^+ 非存在（NMDG-Cl）下での、カルニチン（15 μ M）輸送。

【図9】HRPE細胞におけるマウス $ATB^{0,+}$ を介したカルニチン輸送の飽和動力学および Na^+

50

活性化動力学を示す。A. カルニチン濃度0.1mM~5mMの範囲内のマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送（挿入図、Eadie-Hofsteeプロット；V、カルニチン輸送、nmol/10⁶細胞/15分；S、カルニチン濃度、mM）。B. Na⁺濃度2.5mM~140mMの範囲内のマウスATB^{0,+}を介したカルニチン（15μM）輸送。

【図10】*Xenopus laevis*卵母細胞におけるマウスATB^{0,+}を介したカルニチン輸送の特徴を示す。A. マウスATB^{0,+}を発現している卵母細胞におけるカルニチン誘導電流の飽和動力学（挿入図、Eadie-Hofsteeプロット；I、カルニチン誘導電流；S、カルニチン濃度、mM）。B. マウスATB^{0,+}を発現している卵母細胞におけるカルニチン（1mM）誘導電流のNa⁺依存性（挿入図、ヒルプロット；I、カルニチン誘導電流；I_{max}、カルニチン1mMで誘導された最大電流）。C. マウスATB^{0,+}を発現している卵母細胞におけるカルニチン（1mM）誘導電流のCl⁻依存性（挿入図、ヒルプロット；I、カルニチン誘導電流；I_{max}、カルニチン1mMで誘導された最大電流）。 10

【図11】腸管において発現される10個の異なるアミノ酸輸送体によるD-セリンの輸送を示す。それぞれの輸送体のcDNAをトランスフェクションされた細胞HRPE細胞において、D-[³H]-セリン（5 μM）の輸送を測定した。

【図12】マウスATB^{0,+}を介した[³H]グリシン（57 nM）取込みの阻害に関する用量反応相関を示す。

【図13】ベクターをトランスフェクションされた細胞、ならびに、マウスATB^{0,+}、ヒトATB⁰、およびマウスb^{0,+}AT/rBAT cDNAをトランスフェクションされた細胞におけるL-フェニルグリシンの輸送を示す。クローニングした輸送体をHRPE細胞において発現させ、[¹⁴C]フェニルグリシン（10 μM）の輸送をNa⁺の存在下または非存在下において試験した。 20

【図14】(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシン合成のプロセスを示す。

【図15】クローニングしたマウスATB^{0,+}を発現する*X.laevis*卵母細胞における(S)-(3-(2-ニトログアニジル)フェニル)グリシン（A）およびL-NNA（B）によって誘導される内向き電流の用量反応相関を示す。

【図16】アミノ酸輸送体ATB^{0,+}によるアスパラギン酸およびグルタミン酸骨格のプロドラッグのNa⁺およびCl⁻連動型能動輸送を示す。マウスATB^{0,+}cDNA特異的なグリシン輸送（10 μM）を、cDNAの異種発現後にHRPE細胞において測定した。アスパラギン酸誘導体（A）およびグルタミン酸誘導体（B）の濃度を表記のように変動させた。結果を、阻害剤非存在下で測定した対照輸送に対する割合（%）として示す。 30

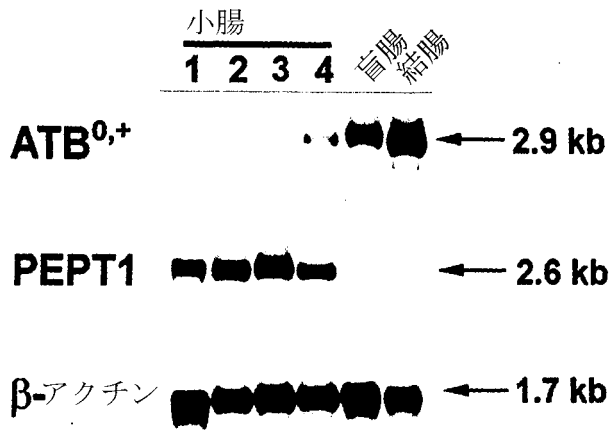
【図17】クローニングしたマウスATB^{0,+}を発現するアフリカツメガエル（*X.laevis*）卵母細胞におけるアシクロビルのL-グルタミン酸γ-エステルによって誘導された内向き電流の用量反応相関を示す。

【図18】ベクターをトランスフェクションされた細胞およびマウスATB^{0,+}cDNAをトランスフェクションされた細胞における[8-³H]-バラシクロビルの輸送を示す。クローニングされた輸送体をHRPE細胞において発現させ、[8-³H]-バラシクロビル（1.25 μM）の輸送を試験した。

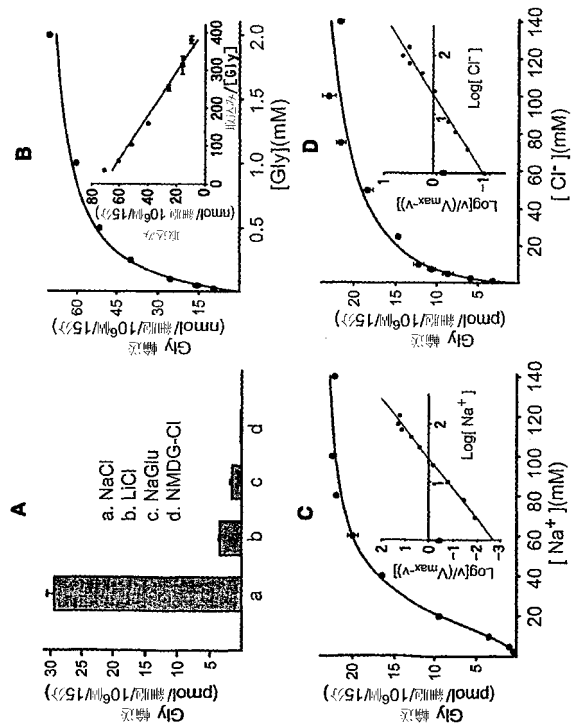
【図19】炎症状態の腸管におけるATB^{0,+}発現の上昇を示す写真である。マウスに、生理食塩液（対照）、または細菌のリポ多糖類（5 mg/kg体重）のいずれかを腹腔内注射した。注射から16時間後、マウスを屠殺して、mRNAを単離するために腸の様々な部分（J、空腸；I、回腸；C、結腸）を採取した。5週齢のIL2^{+/+}マウスおよびIL2^{-/-}マウスを屠殺して、mRNAを単離するために腸の様々な部分を採取した。マウスATB^{0,+}、マウスグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素（GAPDH）、およびマウスシクロフィリンC（CypC）に対して特異的なプライマー対を用いて、PCRサイクル数の少ない半定量的RT-PCRを行い、RT-PCR産物をサザンハイブリダイゼーションによって検出してシグナルを定量した。 40

【図20】マウス乳腺腫瘍におけるATB^{0,+}およびiNOS発現の上昇を示す写真である。

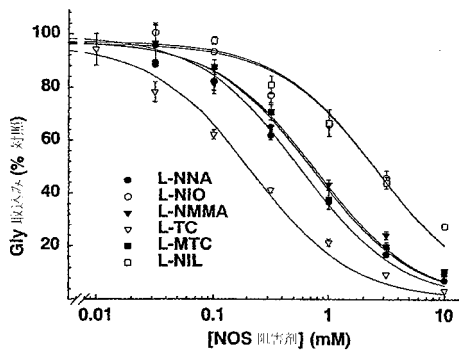
【図 1】



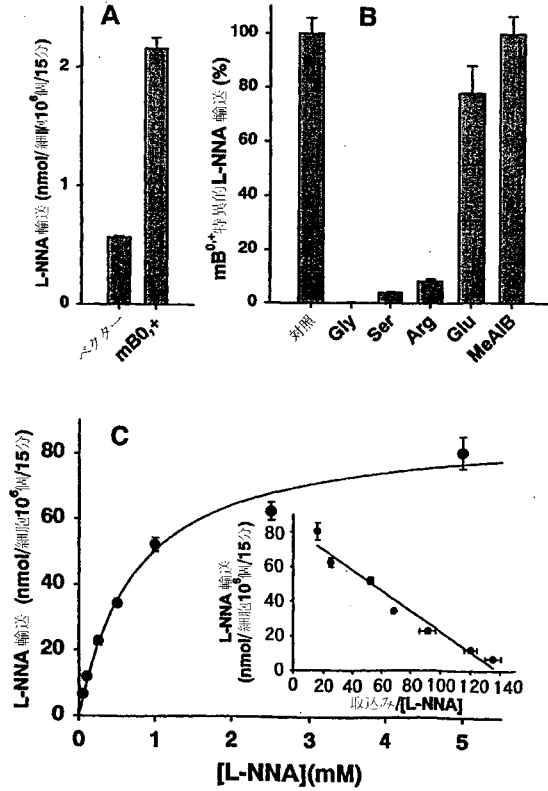
【図 2】



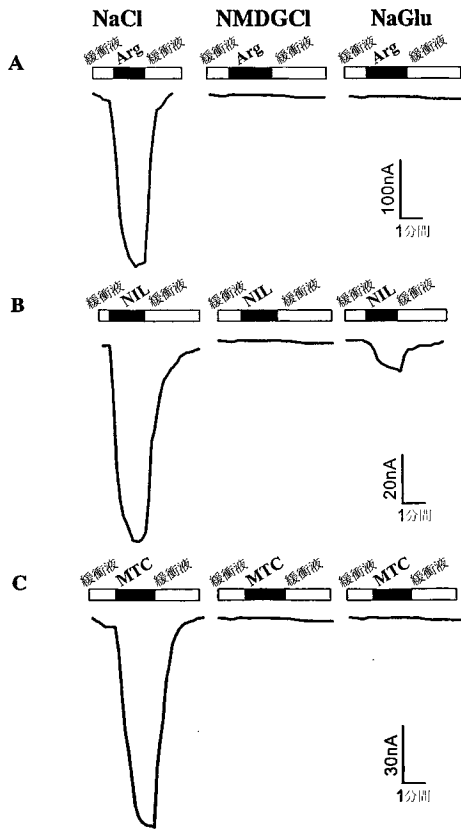
【図 3】



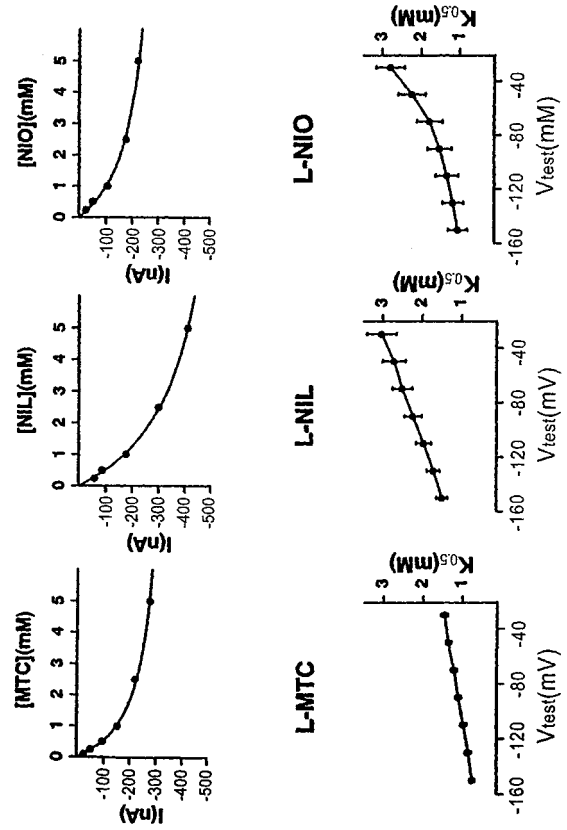
【図 4】



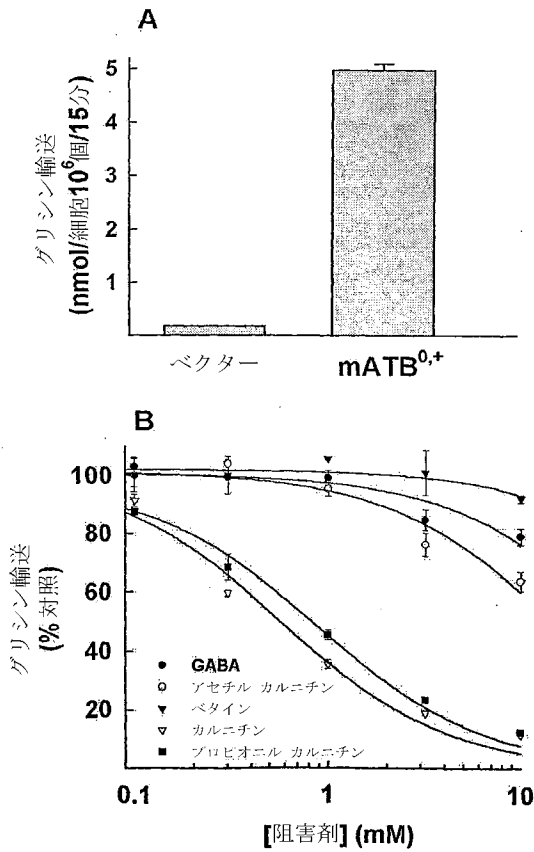
【図 5】



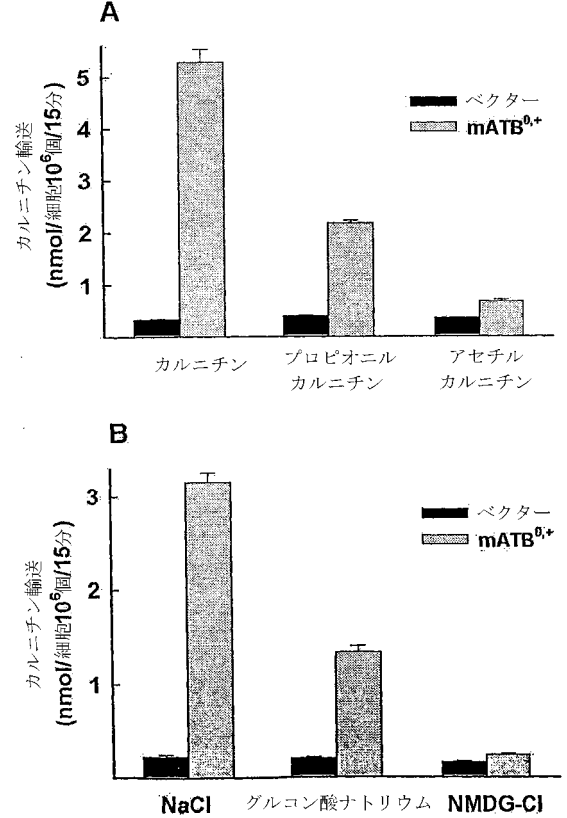
【図 6】



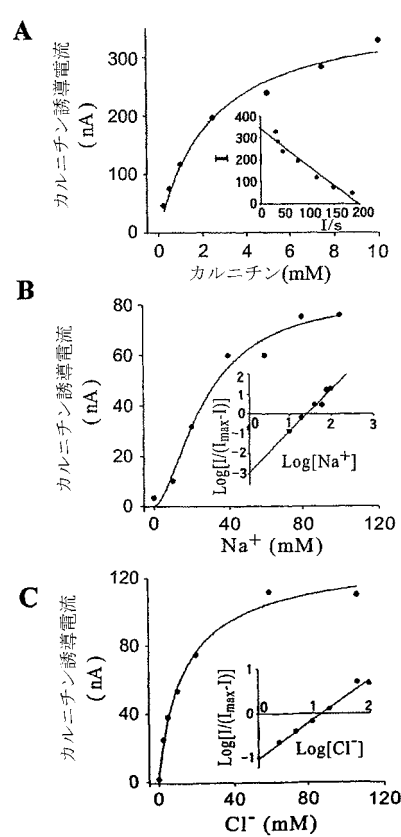
【図 7】



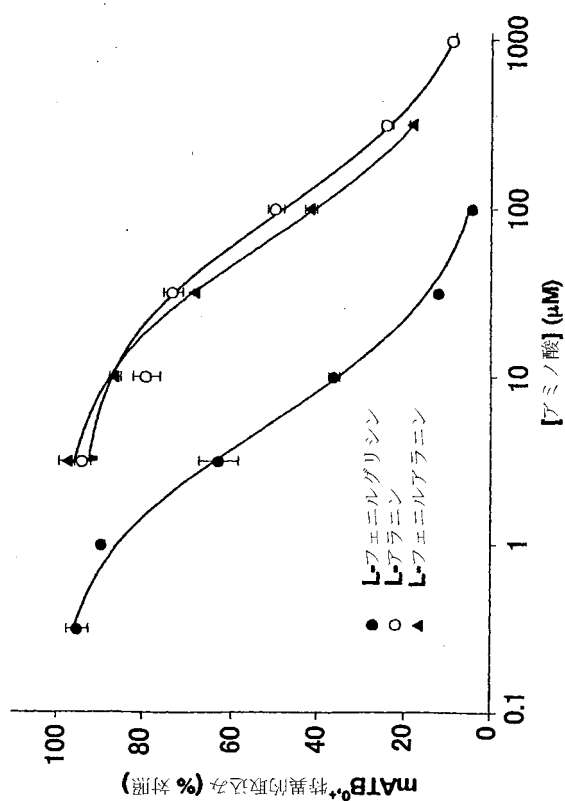
【図 8】



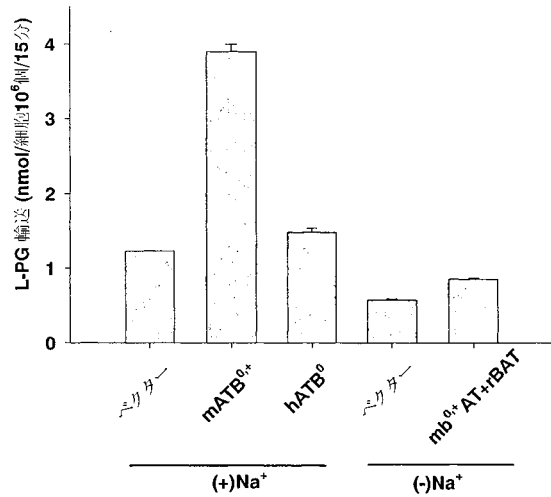
【図 10】



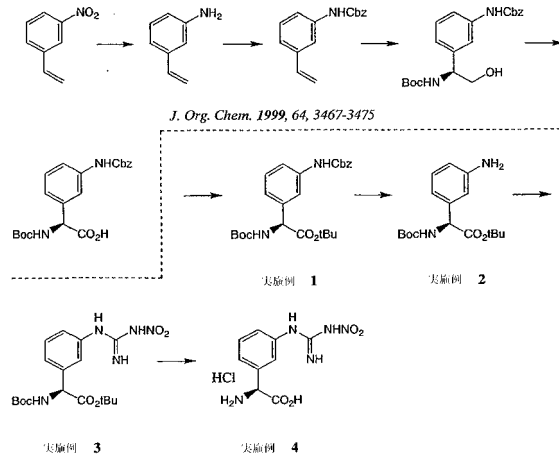
【図 12】



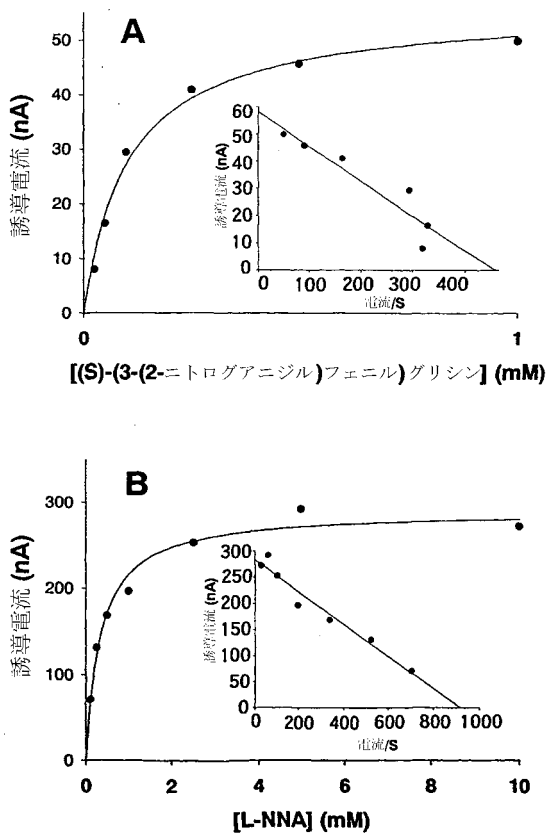
【図 13】



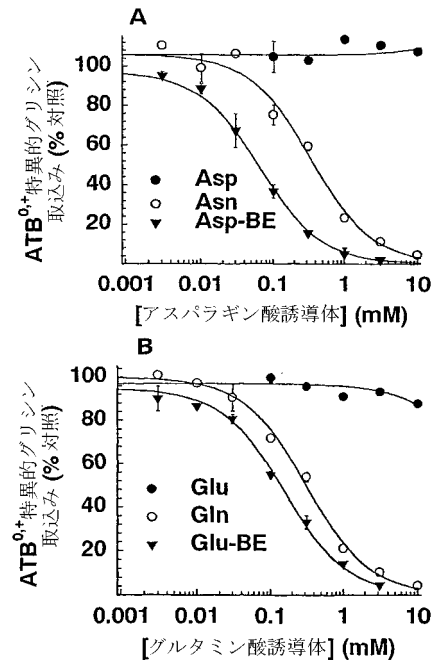
【図 14】



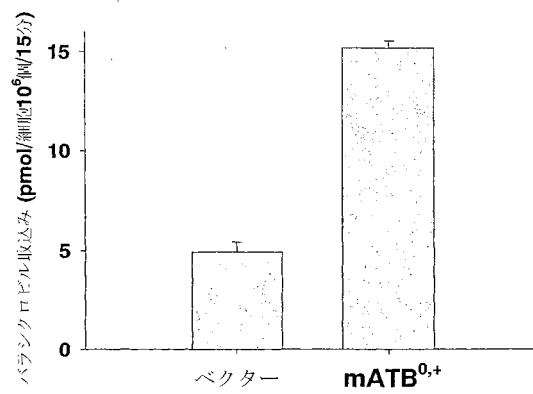
【図 15】



【図 16】



【 図 1 8 】



对照				LPS			
	J	I	C	J	I	C	
ATB0,+			+			++	
GAPDH	+	+	+	+	+	+	

IL2+/+				IL2-/-			
	J	I	C	J	I	C	
ATB0,+						++	
CypC	+	+	+	+	+	+	

Western blot analysis showing the expression of ATB^{0,+}, ATB^{0,+} (SB), iNOS (SB), and CypC in tumor (腫瘍) and control (対照) tissues. The blot shows bands for each protein across the lanes. ATB^{0,+} and ATB^{0,+} (SB) are only present in the tumor lane. iNOS (SB) is present in both tumor and control lanes. CypC is present in all lanes.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083060 A2

- (51) International Patent Classification: A61K (74) Agents: SHIMIZU, Hatsushi et al.; Kamietsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroschi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 (JP).
- (21) International Application Number: PCT/JP02/03678
- (22) International Filing Date: 12 April 2002 (12.04.2002) (81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/283,326 13 April 2001 (13.04.2001) US
60/306,168 19 July 2001 (19.07.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC. [US/US]; 312-2211, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912-4810 (US); CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA [JP/JP]; 5-1, Utsunomiya 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 (JP).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GANAPATHY, Vadivel [US/US]; 3810 Shaul Creek Court, Martinez, GA 30907 (US); HATANAKA, Takahiro [JP/JP]; c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 (JP).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/083060 A2

(54) Title: USE OF AMINO ACID TRANSPORTER ATB^{B+} AS A DELIVERY SYSTEM FOR DRUGS AND PRODRUGS

(57) Abstract: The present invention has revealed the compounds transportable by ATB^{B+}. Based on the information about these compounds, drugs transportable by ATB^{B+} may be designed, produced and screened. Such drugs may serve to treat and/or prevent the diseases in which NOS, phenylglycine, carnitine, D-amino NOS, phenylglycine, carnitine. The ATB^{B+} gene may be administered to patients to be used for gene therapy of the diseases as described above.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

1

DESCRIPTION

Use of amino acid transporter ATB⁰⁺¹ as a delivery system for drugs and prodrugs

Technical Field

The present invention relates to the use of amino acid transporter ATB⁰⁺¹ as a delivery system for drugs and prodrugs.

Background Art

Nitric oxide (NO) is an important regulatory molecule involved in a variety of physiological processes (Moncada,S., J.R.Soc.Med., 92, 164-169, (1999), Martin,E. et al., Sem.Perinatol., 24, 2-6, (2000), Bredt,D.S., Free Rad.Res. 31, 577-596, (1999)). This molecule is generated from L-arginine by nitric oxide synthases (NOS). Three distinct isoforms of NOS have been identified: neuronal NOS (nNOS or NOS I), inducible NOS (iNOS or NOS II), and endothelial NOS (eNOS or NOS III) (Knowles,R.G., and Moncada,S. Biochem.J., 298, 249-258, (1994), Stuehr,D.J., Biochim.Biophys.Acta, 1411, 217-230, (1999)). Even though NO plays an essential role in many physiological processes, overproduction of NO is associated with a multitude of pathological conditions including inflammation, septic shock, diabetes, and neurodegeneration (Miller,M.J.S. and Grisham,M.B., Mediators Inflammation, 4, 387-396, (1995), Symeonides,S. and Balk,R.A., Infect.Dis.Clin.N.Amer., 13, 449-463, (1999), Mandrup-Poulsen,T., Diabetologia, 39, 1005-1029, (1996), Jenner,P. and Olanow,C.W., Neurology, 47, S161-S170, (1996)). Blockade of NO production by inhibition of NOS may therefore have potential in the treatment of these pathological conditions. Since different isoforms of NOS are involved in different pathological conditions, selective inhibition of specific isoforms of NOS will become necessary to enhance the therapeutic use of this approach for differential treatment of these disorders. Several inhibitors have been identified that are selective for different NOS isoforms (Southan,G.J. and Szabo,C., Biochem.Pharmacol., 51, 383-394, (1996), Bryk,R. and Wolff,D.J., Pharmacol.Ther., 84, 157-178, (1999)). Use of these inhibitors has been shown to be beneficial in the treatment of diverse conditions associated with overproduction of NO in humans and in experimental animals (Moncada,S. and Higgs,E.A., FASEB J., 9, 1319-1330, (1995), Hobbs,A.J. et al., Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 39, 191-220, (1999)).

The therapeutic efficacy of NOS inhibitors is expected to be influenced markedly by the efficiency with which these inhibitors are taken up into the target cells for interaction with NOS. Furthermore, transport of these inhibitors in the intestine will influence their oral bioavailability. Therefore, information on the mechanisms of cellular uptake of NOS inhibitors is critical to assess

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

2

their therapeutic potential. Most NOS inhibitors are structurally related to arginine, lysine, citrulline, and ornithine (Southan,G.J. and Szabo,C., *Biochem.Pharmacol.*, 51, 383-394, (1996), Bryk,R. and Wolff,D.J., *Pharmacol.Ther.*, 84, 157-178, (1999)). Consequently, amino acid transport systems play a critical role in the cellular uptake of NOS inhibitors. Multiple systems operate in mammalian cells to mediate the transport of amino acids and these transport systems differ markedly in substrate specificity, substrate affinity, driving forces, and tissue expression pattern (Christensen,H.N., *Methods Enzymol.*, 173, 576-616, (1989)). Many of these transport systems have been recently cloned and functionally characterized (Palacin,M. et al., *Physiol.Rev.*, 78, 969-1054, (1998), Ganapathy,V. et al., Intestinal transport of peptides and amino acids. In *Current Topics in Membranes*. Ed. Barrett,K.E. and Donowitz,M., Vol.50, pp.379-412. Academic Press. (2001)). There have been several studies in the past aimed at identifying the amino acid transport systems that mediate the uptake of NOS inhibitors (Schmidt,K. et al., *Mol.Pharmacol.*, 44, 615-621, (1993), Schmidt,K. et al., *Biochem.J.*, 301, 313-316, (1994), Baydoun,A.R. and Mann,G.E., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 200, 726-731, (1994), Schmidt,K. et al., *J.Neurochem.*, 64, 1469-1475, (1995), Raghavendra Rao,V.L. and Butterworth,R.F., *J.Neurochem.*, 67, 1275-1281, (1996)). Two amino acid transport systems have so far been identified that are involved in the cellular uptake of NOS inhibitors. These are system y⁺ and system L. Both are Na⁺-independent transport systems and therefore exhibit only a weak capacity to concentrate their substrates including the NOS inhibitors inside the cells. To our knowledge, no other amino acid transport system has been shown to be involved in the transport of NOS inhibitors.

Carnitine (β-hydroxy-γ-trimethylaminobutyrate) is an obligate requirement for β-oxidation of long-chain fatty acids. It is synthesized endogenously in humans in the liver and kidney (Carter,A.L. et al., *Journal of Child Neurology*, 10 (supplement 2), S3-S7, (1995)). It is also absorbed in the intestinal tract from dietary sources (Rebouche,C.J., *FASEB Journal*, 6, 3379-3386, (1992)). The biological importance of this molecule is evident from the clinical consequences of carnitine deficiency encountered in a variety of genetic and acquired diseases (Kerner,J. and Hoppel,C., *Annual Review of Nutrition*, 18, 179-206, (1998)). The symptoms of carnitine deficiency include skeletal myopathy, cardiomyopathy, encephalopathy and failure to thrive (Kerner,J. and Hoppel,C., *Annual Review of Nutrition*, 18, 179-206, (1998); Treem,W.R. et al., *New England Journal of Medicine*, 319, 1331-1336, (1988)). Most tissues, including the cardiac and skeletal muscle, contain intracellular carnitine levels several-fold higher than plasma levels due to the presence of a Na⁺-dependent high-affinity carnitine transport system (Bremer,J., *Physiological Reviews*, 63, 1420-1480, (1983)). This transport system also exists in the brush border membrane of renal tubular epithelial cells where it plays a role in the reabsorption of carnitine (Rebouche,C.J. and Mack,D.L., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235, 393-402, (1984); Huang,W. et al., *Biochemical*

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

3

Pharmacology, 58, 1361-1370, (1999)). A genetic defect in this transport system results in excessive urinary loss of carnitine, causing systemic carnitine deficiency. Since the same transport system is also responsible for active accumulation of carnitine in tissues such as the heart and skeletal muscle, the genetic defect is associated with drastically reduced intracellular levels of carnitine in these tissues. The major clinical symptoms of this defect, known as primary carnitine deficiency, are skeletal and cardiac myopathy, resulting from impaired energy production from fatty acid oxidation as a consequence of reduced intracellular levels of carnitine. Recently, this transporter has been cloned (Wu,X. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595, (1998), Tamai,I. et al., Journal of Biological Chemistry, 273, 20378-20382, (1998)). Interestingly, this transporter also transports several organic cations (Wu,X. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595, (1998), Wu,X., et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290, 1482-1492, (1999)). Furthermore, it belongs to the organic cation transporter gene family on the basis of its primary structure (Wu,X. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595, (1998)). Therefore, the transporter is named OCTN2 (novel organic cation transporter 2).

D-Amino acids are generally considered foreign to metabolic pathways in mammals. Almost all mammalian enzymes are selective for L-amino acids with the notable exception of D-amino acid oxidase. D-Amino acids are found in the plasma, but they are believed to originate from the diet or from the intestinal microbial flora. The serum levels of most D-amino acids are reduced markedly in germ-free laboratory animals, indicating that intestinal microorganisms do contribute significantly to D-amino acids present in the serum (J.J.Corrigan, Science, 164, 142 (1969), M.Friedman, J.Agric.Food Chem., 47, 3457 (1999)). Diet also contains D-amino acids that are produced from the L-enantiomers during food preparation and processing (E.H.Man, and J.L.Bada, Annu.Rev.Nutr., 7, 209 (1987)).

Since D-amino acids do not participate in metabolic pathways in mammals, the biological significance of these amino acids has remained questionable. There is evidence however for beneficial effects of certain D-amino acids (M.Friedman, J.Agric.Food Chem., 47, 3457 (1999), E.H.Man, and J.L.Bada, Annu.Rev.Nutr., 7, 209 (1987)). D-Phenylalanine and D-leucine have been shown to be analgesic and have been used pharmacologically in the management of intractable pain (R.S.S.Cheng, and B.Pomeranz, Brain Res., 177, 583 (1979), K.Budd, Adv.Pain Res.Ther., 5, 305 (1983)). Similarly, a recent study has shown that administration of D-serine to schizophrenic patients may improve the cognitive function and performance (G.Tsai, et al., Biol.Psychiatry, 44, 1081 (1998)). There is also evidence of a physiological function for D-serine in the modulation of glutamatergic neurotransmission (T.Matsui, et al., J.Neurochem., 65, 454 (1995), J.-P.Mothes, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 97, 4926 (2000)). This amino acid binds to the glycine site on the

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

4

N-methyl-D-aspartate receptor and this binding is obligatory for the activation of the receptor-associated Ca^{2+} -channel function by glutamate. Interestingly, this D-amino acid is generated endogenously in the brain by racemization of L-serine mediated by serine racemase (H.Wolosker, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 721 (1999)). This enzyme has been cloned recently from the brain and is found to colocalize with the NMDA receptor (H.Wolosker, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 13409 (1999)).

D-Amino acids are abundant in bacteria (M.Friedman, J.Agric.Food Chem., 47, 3457 (1999)) and therefore are expected to be present in significant quantities in the colon and ileum where bacterial colonization is prevalent under physiological conditions. As mentioned earlier, diet also contains D-amino acids. Since some of the D-amino acids are now known to possess important physiological and pharmacological functions, the issue of intestinal absorption of bacteria-derived and dietary D-amino acids becomes important. If there are effective mechanisms in the intestinal tract for the entry of luminal D-amino acids into blood, it is potentially possible for exogenous D-amino acids to exert biological effects. Several transporters that mediate the intestinal absorption of amino acids have been recently cloned (V.Ganapathy, et al., Current Topics in Membranes, 50, 379 (2001)). To date, only two amino acid transporters have thus far been shown to transport D-amino acids to any significant extent (Y.Kanai, et al., J.Biol.Chem., 273, 23629 (1998), Y. Fukasawa, et al., J.Biol.Chem., 275, 9690 (2000)). They are system L1 and system asc1. Both are facilitative transporters that mediate amino acid exchange across the plasma membrane. They are not active because their transport function is not coupled to any driving force. System L1 and system asc1 have been cloned from the brain, and transcripts for these transporters are detectable in the intestinal tract. Interestingly, these transporters are heterodimeric, both containing the heavy chain of the 4F2 cell surface antigen (4F2hc) as a common subunit. Since 4F2hc is localized exclusively to the basolateral membrane of the mucosal cells of the intestinal tract, system L1 and system asc1 are likely to participate in the efflux of amino acids from the cells into the blood. It is not known at present if there are transport systems in the brush border membrane of the intestinal epithelial cells that might mediate the entry of D-amino acids from the lumen into the cells.

The transporter, known as $\text{ATB}^{0,+}$, is an amino acid transporter expressed in the intestine, lung, and mammary gland. Functionally, $\text{ATB}^{0,+}$ is a Na^{+} - and Cl^{-} -coupled transport system for neutral and cationic amino acids. It plays an important role in the absorption of amino acids in the intestinal tract (Ganapathy, V. et al., Intestinal transport of peptides and amino acids. In, Current Topics in Membranes (eds. Barrett, K.E. and Donowitz, M.), Vol.50, pp.379-412. Academic Press., (2001)). The cloning of human $\text{ATB}^{0,+}$ has been recently reported (Sloan, J.L. and Mager, S., Journal of Biological Chemistry, 274, 23740-23745, (1999)). To date, the transport function of $\text{ATB}^{0,+}$ has been studied only with amino acids as substrates. Its transport function is highly concentrative,

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

5

energized by transmembrane gradients of Na^+ and Cl^- and membrane potential. $\text{ATB}^{0,+}$ belongs to the gene family of Na^+ - and Cl^- coupled transporters for a variety of compounds such as amino acids (e.g., glycine and proline), neurotransmitters (e.g., monoamines and γ -aminobutyrate), and osmolytes (e.g., taurine and betaine). Structurally, $\text{ATB}^{0,+}$ is very closely related to γ -aminobutyrate transporters and betaine transporter.

Disclose of Invention

The present inventors have cloned the Na^+ - and Cl^- -coupled amino acid transporter $\text{ATB}^{0,+}$ from mouse colon and investigated its ability to transport NOS inhibitors. When expressed in mammalian cells, $\text{ATB}^{0,+}$ is able to transport a variety of zwitterionic and cationic amino acids in a Na^+ - and Cl^- -coupled manner. The present inventors tested several NOS inhibitors for their ability to inhibit $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated uptake of glycine and found all of them to compete with glycine for the uptake process. With [^3H]-N ^{G} -nitro-L-arginine, the present inventors have demonstrated directly the Na^+ - and Cl^- -coupled transport of this NOS inhibitor via $\text{ATB}^{0,+}$. We then studied the $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated transport of a wide variety of NOS inhibitors using the *X. laevis* oocyte system. This was done by assessing the NOS inhibitor-induced inward currents under voltage clamp conditions in oocytes expressing the cloned $\text{ATB}^{0,+}$. These studies showed that $\text{ATB}^{0,+}$ is able to transport a broad range of zwitterionic as well as cationic NOS inhibitors. These data represent the first identification of an ion gradient-driven concentrative transport system for NOS inhibitors in the intestinal tract.

The present inventors cloned this transporter from mouse colon and expressed functionally in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes to investigate the interaction of carnitine and its acyl esters with the transporter.

When expressed in mammalian cells, the cloned $\text{ATB}^{0,+}$ was able to transport carnitine, propionylcarnitine, and acetylcarnitine. The transport process was Na^+ - and Cl^- -dependent. The Michaelis-Menten constant for carnitine was 0.83 ± 0.08 mM and the Hill coefficient for Na^+ activation was 1.6 ± 0.1 .

When expressed in *Xenopus laevis* oocytes, the cloned $\text{ATB}^{0,+}$ was able to induce inward currents in the presence of carnitine and propionylcarnitine under voltage-clamped conditions. There was no detectable current in the presence of acetylcarnitine. Carnitine-induced currents were obligatorily dependent on the presence of Na^+ and Cl^- . The currents were saturable with carnitine and the Michaelis-Menten constant was 1.8 ± 0.4 mM. The analysis of Na^+ - and Cl^- -activation kinetics revealed that 2 Na^+ and 1 Cl^- were involved in the transport of carnitine via the transporter.

These studies describe the identification of a novel function for the amino acid transporter $\text{ATB}^{0,+}$. Since this transporter is expressed in the intestinal tract, lung, and mammary gland, it is

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

6

likely to play a significant role in the handling of carnitine in these tissues.

A Na^+ -dependent transport system for carnitine has already been described. This transporter, known as OCTN2 (novel organic cation transporter 2), is expressed in most tissues and transports carnitine with high affinity. It is energized however only by a Na^+ gradient and membrane potential. In contrast, $\text{ATB}^{0,+}$ is a low-affinity transporter for carnitine, but exhibits much higher concentrative capacity than OCTN2 because of its energization by a Na^+ gradient, a Cl^- gradient, and membrane potential.

In addition, the present inventors tested transport ability of $\text{ATB}^{0,+}$ for D-amino acids. So far, no transporter on the intestinal lumen side that transports D-amino acids is known. The present inventors have revealed that $\text{ATB}^{0,+}$ transports D-alanine, D-serine, D-methionine, D-leucine, and D-tryptophan. Moreover, the present inventors compared the transport ability of $\text{ATB}^{0,+}$ for D-serine, whose importance in a living body was unraveled, with that of other transporters. As a result, it has been revealed that the transport ability of $\text{ATB}^{0,+}$ for D-serine is higher than that of other many transporters.

In addition, the present inventors have discovered that phenylglycine is transported by $\text{ATB}^{0,+}$ with higher affinity than other essential amino acids. Moreover, the present inventors also discovered a L-phenylglycine-derivative NOS inhibitor, such as (S)-(3-(2-nitroguanydy)phenyl)glycine, is transported by $\text{ATB}^{0,+}$ specifically.

In addition, the present inventors assessed the ability of aspartate- and glutamate-based prodrugs for the transport process mediated by mouse $\text{ATB}^{0,+}$ in HRPE cells. As a result, it has been revealed that the methyl and benzyl esters of aspartate and glutamate are potent inhibitors of glycine transport. The present inventors also discovered L-glutamate γ -ester of acyclovir is transported by $\text{ATB}^{0,+}$. Furthermore, the present inventors demonstrated that even L-valine α -ester of acyclovir is transported by $\text{ATB}^{0,+}$.

Furthermore, the present inventors assessed the expression of $\text{ATB}^{0,+}$ in the intestinal tract under inflammatory conditions. As a result, it has been revealed that inflammatory conditions lead to a marked increase in the expression of $\text{ATB}^{0,+}$ in the ileum and colon. The present inventors also discovered up-regulation of $\text{ATB}^{0,+}$ in tumor, such as breast tumor, and cancer cell lines, such as breast and hepatic cancers.

$\text{ATB}^{0,+}$ can be an effective drug delivery system because, unlike other main amino acid transporters, it depends on three driving forces, Na^+ gradient, Cl^- gradient, and membrane potential, therefore $\text{ATB}^{0,+}$ is highly concentrative. In addition, because its tissue distribution or its expression is biased specifically to gastrointestinal tract (ileum and colon), lung, and mammary gland, it can be an effective delivery system for diseases specific to such tissues. Moreover, its expression is induced by pathology of, for example, enteritis, sepsis, and breast cancer; it can be an effective delivery

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

7

system for the nidus of such pathology. Furthermore, it can be useful for delivery of prodrugs with amino acid structures because its substrate recognition is broad.

Therefore, an object of the present invention is to provide the use of amino acid transporter $ATB^{0,+}$ as a delivery system for drugs and prodrugs. In a preferred embodiment of the present invention, drugs which are transported by $ATB^{0,+}$ are NOS inhibitors, phenylglycine derivatives, carnitine, D-amino acids or derivatives thereof, or prodrugs with amino acid structures.

Another object of the present invention is to provide a method for screening of drugs which are suitable for being transported by $ATB^{0,+}$, and to provide the drugs obtained by the screening.

A further object of the present invention is to provide a method for designing of drugs or prodrugs which are suitable for being transported by $ATB^{0,+}$. In a preferred embodiment of the present invention, the drugs have phenylglycine skeleton and the prodrugs have tyrosine, aspartic acid, glutamic acid, and 3- or 4- carboxyl phenylglycine as a moiety.

Thus, the present invention relates to use of amino acid transporter $ATB^{0,+}$ as a delivery system for drugs and prodrugs. More specifically, the present invention provides:

- (1) a method for screening for a drug or prodrug having ability to be transported by $ATB^{0,+}$, comprising the steps of:
 - (a) selecting compounds having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$;
 - (b) relating the selected compounds to a disease that can be treated and/or prevented with said compounds; and
 - (c) selecting a compound that is related to a disease in step (b);
- (2) the method according to (1), wherein said compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ is an NOS inhibitor, phenylglycine, carnitine or a D-amino acid, or a derivative thereof, and an amino acid-based prodrug;
- (3) a method for designing a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$, wherein said method is provided for designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid based prodrugs;
- (4) a method for producing a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$, comprising the steps of:
 - (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs; and
 - (b) synthesizing the designed compound;
- (5) the method according to (4), further comprising the step of determining whether the synthesized compound has the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ to select a compound to be transported;
- (6) a method for producing a drug containing, as an active ingredient, a compound with the ability to be transported by $ATB^{0,+}$, wherein said method comprises the steps of:

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

8

- (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs;
- (b) synthesizing the designed compound; and
- (c) determining whether the synthesized compound has the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ and selecting a compound to be transported;
- (7) a method for producing a drug having, as an active ingredient, a compound with the ability to be transported by $ATB^{0,+}$, wherein said method comprises the steps of:
- (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs;
- (b) synthesizing the designed compound; and
- (c) relating the synthesized compound to a disease that can be treated and/or prevented with said compound;
- (8) a method for transport of a compound mediated by $ATB^{0,+}$, wherein said compound is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs;
- (9) a method for transport of a compound mediated by $ATB^{0,+}$, wherein said compound is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs, wherein said compound is labeled with a radioactive substance or conjugated with toxin;
- (10) the method according to any one of (2) to (9), wherein said NOS inhibitor is a derivative of arginine, lysine, citrulline and ornithine;
- (11) a therapeutic drug for a disease that can be treated and/or prevented with a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, wherein said therapeutic drug comprises the $ATB^{0,+}$ gene as an active ingredient;
- (12) a gene therapy for a disease that can be treated and/or prevented with a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, wherein said method comprises the step of administering the $ATB^{0,+}$ gene;
- (13) a therapeutic drug for cancer, comprising a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ as an active ingredient;
- (14) the therapeutic drug according to (13), wherein said cancer is iNOS expressed cancer;
- (15) the therapeutic drug according to (13), wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer;
- (16) the therapeutic drug according to (13), wherein said compound is a NOS inhibitor;
- (17) a method for treating cancer, comprising the step of administering a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$;
- (18) the method according to (17), wherein said cancer is iNOS expressed cancer;

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

9

- (19) the method according to (17), wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer;
(20) the method according to (17), wherein said compound is a NOS inhibitor;
(21) use of a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} for producing a therapeutic drug for cancer;
(22) the use according to (21), wherein said cancer is iNOS expressed cancer;
(23) the use according to (21), wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer;
(24) the use according to (21), wherein said compound is a NOS inhibitor.

The present invention provides a method for screening for a drug or prodrug having ability to be transported by ATB^{0+} . In the present invention, ATB^{0+} is a Na^+ - and Cl^- -coupled transport system for neutral and cationic amino acids. It plays an important role in the absorption of amino acids in the intestinal tract.

The compounds of the present invention include, but are not limited to, naturally occurring compounds, organic compounds, inorganic compounds, proteins, single compounds, such as peptides, and compound libraries, expression products from a gene library, cell extracts, supernatants from cell cultures, products from fermentation microorganisms, cell extracts from marine organisms, plant extracts, prokaryotic cell extracts, eukaryotic cell extracts, or animal cell extracts, NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine or D-amino acids, or derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs.

In the present invention, the NOS inhibitors are preferably the NOS inhibitors based on the structure of neutral and basic L- α -amino acids, more preferably, the NOS inhibitors based on the structure of L-arginine, L-lysine, L-citrulline, L-ornithine, even more preferably, the NOS inhibitors in Table 2 except for GGA.

In the present invention, L-phenylglycine derivatives are drugs and prodrugs with phenylglycine structure, more preferably, phenylglycine-derivative drug with free α -amino and α -carboxyl groups and no acidic group in the R group at physiological pH, or 3- or 4-carboxyl ester prodrug with 3- or 4- carboxyl phenylglycine. However, the parent drug should not be acidic at physiological pH.

In the present invention, carnitine is preferably carnitine and its derivatives, and carnitine and its acyl esters, and more preferably, carnitine, acetylcarnitine and propionylcarnitine.

In the present invention, D-amino acids are preferably D-alanine, D-serine, D-methionine, D-leucine, D-tryptophan, D-threonine, D-histidine, D-phenylalanine, D-glutamine and their derivatives, more preferably, D-alanine, D-serine, D-methionine, D-leucine, D-tryptophan and their derivatives, and even more preferably D-alanine, D-serine, D-methionine, D-leucine and D-tryptophan.

In the present invention, amino acid-based prodrugs preferably have an amino acid moiety

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

10

(including D- and L- amino acids). For aspartate and glutamate, β - carboxyl ester prodrugs and γ -carboxyl ester prodrugs are preferred, respectively. For neutral and basic amino acids, α -carboxyl ester prodrugs are preferred.

In the present invention, the compounds described above may be adequately labeled and then used if necessary. Labels includes, for example, radioactive and fluorescent labels.

In the present invention, the methods for determining whether a compound is transported by $ATB^{0,+}$ include, but are not limited to, those described in the working examples.

The screening method of the present invention subsequently investigates the relationship between the selected compound and the diseases that may be treated and/or prevented with the compound. The diseases to be tested for their relationship with the selected compound include, but are not limited to, those described below, if the selected compound is a NOS inhibitor: septic shock/hypotension (Titheradge MA, Biochim Biophys Acta, 1999 1411(2-3): 437-55), anti-inflammatory, inflammatory bowel disease (Kubes P, McCafferty DM., Am J Med 2000; 109(2): 150-8), rheumatoid arthritis (Salerno L et.al., Curr Pharm Des 2002, 8(3):177-200), glomerulonephritis (Cattell V., Kidney Int 2002 61(3):816-821), alzheimer's disease and stroke (Heneka MT and Feinstein DL, J Neuroimmunol 2001 114:8-18), cancer (Thomsen LL, Cancer Metastasis Rev 1998 17(1):107-18), HIV and HCV infection (Lake-Bakaar G et al., Dig Dis Sci 2001 46(5):1072-6), multiple sclerosis (Liu JS et al., Am J Pathol 2001 158(6):2057-66), asthma (Redington AE et al., Thorax 2001 56(5):351-7), osteoarthritis (Abramson SB et al., Curr Rheumatol Rep 2001 3(6):535-41), myocarditis (Gluck B et al., Herz 2000 25(3):255-60), glaucoma (Chiou GC, J Ocul Pharmacol Ther 2001 17(2):189-98), delayed hemorrhagic shock (Szabo C., New Horiz 1995 3(1):2-32), persistent pain (Meller ST et al., Neuropharmacology 1994, 33(11):1471-8), organ transplantation (Trajkovic V., Curr Drug Metab 2001, 2(3):315-29), and Parkinson's disease (Knott, C. et al., Mol Cell Neurosci 2000; 16(6):724-39). The following diseases may be tested if the selected compound is an L-phenylglycine derivative: the diseases described for NOS inhibitors, anti-influenza virus (Kati, WM. et al., Antimicrob Agents Chemother 2001, 45(9):2563-70), brain disorders and diseases such as ischemia and schizophrenia (Pellicciari R and Costantino G, Curr Opin Chem Biol 1999 3(4):433-40; Conway SJ et al., Bioorg Med Chem Lett. 2001, 11(6):777-80; Roberts PJ., Neuropharmacology 1995, 34(8):813-9), and myocardial ischaemia (Blackburn KJ et al., Br. J. Pharmacol. 1979 66:443-444).

If the selected compound is carnitine, the following diseases may be tested: carnitine deficiencies including skeletal myopathy, cardiomyopathy, encephalopathy and failure to thrive (Kerner, J. and Hoppel, C., Annual Review of Nutrition, 18, 179-206, (1998); Treem, W.R. et al., New England Journal of Medicine, 319, 1331-1336, (1988)).

If the selected compound is a D-amino acid the following diseases may be tested:

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

11

schizophrenia for D-serine and its derivatives (Heresco-Levy, U., Int. J. Neuropsychopharmacol.2000 3(3): 243-258., Krystal, JH. and D'Souza, DC., Biol. Psychiatry. 1998 44(11): 1075-76.).

If the selected compound is an amino acid-based prodrug, diseases related with a parent drug of the prodrug may be tested.

In the next step of the screening method of the present invention, a compound that has been related to a disease may be selected.

In the screening method of the present invention, the selected compound may be mixed with pharmaceutically acceptable carriers. A derivative of the selected compound may be synthesized and then mixed with pharmaceutically acceptable carriers.

The present invention provides a method for designing a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$, in which a compound is designed which is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs. Based on the fundamental structures of these compounds, novel compounds are designed in the method. For designing compounds, one skilled in the art may use any known methods.

The present invention also provides a method for producing a compound having the ability to be transported by $ATB^{0,+}$. In the method, initially, a compound is designed which is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs. In the next step, the designed compound is synthesized. The method further comprises the step of determining whether the synthesized compound has the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ to select a compound to be transported by $ATB^{0,+}$. Some of the compounds thus produced are thought to be pharmacologically active.

The present invention also provides a method for producing a drug containing, as an active ingredient, a compound with the ability to be transported by $ATB^{0,+}$. In the first step of the method, a compound is designed which is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs. In the second step, the designed compound is synthesized. In the third step, the synthesized compound may be related to a disease that can be treated and/or prevented with the compound, or the synthesized compound may be subjected to the determination whether it has the ability to be transported by $ATB^{0,+}$ to be selected for the transport, followed by determination of the relationship between the synthesized compound and a disease that can be treated and/or prevented with the compound. In the method, a disease-related compound may further be selected and mixed with pharmaceutically acceptable carriers. A derivative of the selected compound may be synthesized and mixed with pharmaceutically acceptable carriers.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

12

The present invention also provides a method for transport of a compound mediated by $ATB^{0/+}$, in which the compound is selected from a group consisting of NOS inhibitors, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs. In the method, the compound may be labeled. The labels include, but are not limited to, radioactive substances and toxins.

The present invention further provides for therapeutic use of the $ATB^{0/+}$ gene for a disease that can be treated and/or prevented with a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof. Such use includes, for example, therapeutic drugs containing the $ATB^{0/+}$ gene as an active ingredient, which provides gene therapy for the diseases described above which comprises the step of administering the $ATB^{0/+}$ gene. One skilled in the art would carry out the gene therapy, using a known method. The vectors used for the gene therapy of the present invention are not limited to any particular vectors.

The present invention also provides for use of a compound having the ability to be transported by $ATB^{0/+}$, e.g. NOS inhibitor, for treatment of cancer (preferably, iNOS expressed cancer, more preferably breast cancer and hepatic cancer). Such use includes, for example, a therapeutic for cancer comprising a compound having the ability to be transported by $ATB^{0/+}$, e.g. NOS inhibitor, as an active ingredient, cancer therapy comprising the step of administering a compound having the ability to be transported by $ATB^{0/+}$, e.g. NOS inhibitor, and use of a compound having the ability to be transported by $ATB^{0/+}$, e.g. NOS inhibitor, for production of therapeutics for cancer.

Brief Description of Drawings

Fig.1 shows a photograph indicating the result of Northern blot analysis of $ATB^{0/+}$ mRNA along the longitudinal axis of the mouse intestinal tract. The small intestine was divided into four equal segments, the first segment representing the most proximal region and the fourth segment representing the most distal region of the small intestine. The blot was hybridized sequentially under high stringency conditions with [^{32} P]-labeled cDNA probes specific for mouse $ATB^{0/+}$, mouse PEPT1 and mouse β -actin.

Fig. 2 shows functional characteristics of mouse $ATB^{0/+}$ in a mammalian cell expression system with glycine as the substrate. Results represent only $ATB^{0/+}$ -specific transport activity which was calculated by subtracting the transport in vector-transfected cells from the transport in cDNA-transfected cells. A. Ion-dependence of $ATB^{0/+}$ -mediated glycine (60 nM) transport. B. Saturation kinetics of $ATB^{0/+}$ -mediated glycine transport. C. Na^+ -activation kinetics of $ATB^{0/+}$ -mediated glycine (60 nM) transport. D. Cl^- -activation kinetics of $ATB^{0/+}$ -mediated glycine (60 nM) transport.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

13

Fig. 3 shows the dose-response relationship for the inhibition of $ATB^{0/+}$ -specific glycine (10 μ M) transport by NOS inhibitors in HRPE cells expressing the cloned mouse $ATB^{0/+}$.

Fig. 4 shows characteristics of L-NNA transport via $ATB^{0/+}$. The cloned mouse $ATB^{0/+}$ was expressed in HRPE cells and the transport of [^{3} H]-L-NNA (10 μ M) was studied. Results represent only $ATB^{0/+}$ -specific transport. A. Transport of L-NNA in vector-transfected cells and in $ATB^{0/+}$ cDNA-transfected cells. B. Inhibition of $ATB^{0/+}$ -specific L-NNA transport by amino acids (5 mM). C. Saturation kinetics of L-NNA transport via $ATB^{0/+}$.

Fig. 5 shows ion-dependence of inward currents induced by L-arginine, L-NIL, and L-MTC in *X. laevis* oocytes expressing the cloned mouse $ATB^{0/+}$. Oocytes were perfused with 1 mM substrates in buffers containing NaCl, sodium gluconate, or NMDG chloride.

Fig. 6 shows saturation kinetics for NOS inhibitors for transport via $ATB^{0/+}$ in *X. laevis* oocyte expression system. Oocytes expressing the cloned mouse $ATB^{0/+}$ were perfused with increasing concentrations of L-MTC, L-NIL, and L-NIO and the inward currents were measured under voltage clamp conditions. Upper panels represent the relationship between substrate concentration and inward current at -50 mV. Lower panels represent the relationship between $K_{0.5}$ values and membrane potential.

Fig. 7 shows inhibition of mouse $ATB^{0/+}$ -mediated glycine transport by carnitine and its acyl esters in HRPE cells. A. transport of glycine (10 μ M) in vector-transfected cells and in cells transfected with mouse $ATB^{0/+}$ cDNA (m $ATB^{0/+}$). B. inhibition of $ATB^{0/+}$ -mediated glycine (10 μ M) transport by γ -aminobutyrate (GABA), betaine, carnitine, acetylcarnitine, and propionylcarnitine. Transport in the absence of inhibitors was taken as 100%.

Fig. 8 shows transport of carnitine and its acyl esters by mouse $ATB^{0/+}$ and the ion-dependence of the process in HRPE cells. A. transport of carnitine (25 μ M), propionylcarnitine (25 μ M), and acetylcarnitine (25 μ M) in vector-transfected cells and in cells transfected with mouse $ATB^{0/+}$ cDNA. B. transport of carnitine (15 μ M) in vector-transfected cells and in cells transfected with mouse $ATB^{0/+}$ cDNA in the presence of NaCl, in the presence of Na⁺ but in the absence of Cl⁻ (Na gluconate), and in the presence of Cl⁻ but in the absence of Na⁺ (NMDG-Cl).

Fig. 9 shows saturation kinetics and Na⁺-activation kinetics of mouse $ATB^{0/+}$ -mediated carnitine transport HRPE cells. A. transport of carnitine via mouse $ATB^{0/+}$ over a carnitine concentration range of 0.1 – 5 mM (inset, Eadie-Hofstee plot; V, carnitine transport in nmol/10⁶ cells/15 min; S, carnitine concentration in mM). B. transport of carnitine (15 μ M) via mouse $ATB^{0/+}$ over a Na⁺ concentration range of 2.5 – 140 mM.

Fig. 10 shows characteristics of carnitine transport mediated by mouse $ATB^{0/+}$ in *Xenopus laevis* oocytes. A. saturation kinetics for carnitine-induced current in oocytes expressing mouse $ATB^{0/+}$ (inset, Eadie-Hofstee plot; I, carnitine-induced current; S, carnitine concentration in mM). B.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

14

Na⁺-dependence of carnitine (1 mM)-induced current in oocytes expressing mouse ATB^{0/+} (inset, Hill plot; I, carnitine-induced current; I_{max}, maximal current induced by 1 mM carnitine). C, Cl⁻-dependence of carnitine (1 mM)-induced current in oocytes expressing mouse ATB^{0/+} (inset, Hill plot; I, carnitine-induced current; I_{max}, maximal current induced by 1 mM carnitine).

Fig. 11 shows D-serine transport by 10 different amino acid transporters which are expressed in the intestinal tract. Transport of D-[³H]-serine (5 μM) was measured in HPRE cells transfected with cDNA of each transporter.

Fig. 12 shows dose-response relationship for the inhibition of mouse ATB^{0/+}-mediated [³H]glycine (57nM) uptake.

Fig. 13 shows transport of L-phenylglycine in vector-transfected cells and mouse ATB^{0/+}, human ATB⁰, and mouse b^{0,+}AT/rBAT cDNA-transfected cells. The cloned transporters were expressed in HPRE cells and the transport of [¹⁴C]phenylglycine (10 μM) was studied with or without Na⁺.

Fig. 14 shows the process of the (S)-(3-(2-nitroguanydy)phenyl)glycine synthesis.

Fig. 15 shows dose-response relationship of inward currents induced by (S)-(3-(2-nitroguanydy)phenyl)glycine (A) and L-NNA (B) in *X. laevis* oocytes expressing the cloned mouse ATB^{0/+}.

Fig. 16 shows Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of aspartate- and glutamate- based prodrugs by the amino acid transporter ATB^{0/+}. Mouse ATB^{0/+} cDNA-specific transport of glycine (10 μM) was measured in HPRE cells following heterologous expression of the cDNA. The concentration of aspartate derivatives (A) and glutamate derivatives (B) was varied as indicated. Results are given as % of control transport measured in the absence of inhibitors.

Fig. 17 shows dose-response relationship of inward currents induced by L-glutamate γ-ester of acyclovir in *X. laevis* oocytes expressing the cloned mouse ATB^{0/+}.

Fig. 18 shows transport of [8-³H]-valacyclovir in vector-transfected cells and mouse ATB^{0/+} cDNA-transfected cells. The cloned transporters were expressed in HPRE cells and the transport of [8-³H]-valacyclovir (1.25 μM) was studied.

Fig. 19 shows photographs indicating up-regulation of ATB^{0/+} expression in the intestinal tract under inflammatory conditions. Mice were injected i.p. with either saline (control) or bacterial lipopolysaccharide (5 mg/kg body wt). 16 h following injection, mice were killed and the various segments of the intestine (J, jejunum; I, ileum; C, colon) were collected for mRNA isolation. Five-week-old IL2^{+/+} and IL2^{-/-} mice were killed and the various segments of the intestine were collected for mRNA isolation. Semiquantitative RT-PCR with low number of PCR cycles was carried out with primer pairs specific for mouse ATB^{0/+}, mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and mouse cyclophilin C (CypC) and the RT-PCR products were detected

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

15

by Southern hybridization and the signals were quantified.

Fig.20 shows a photograph indicating up-regulation of $ATB^{0/+}$ and iNOS expression in the mouse breast tumor.

Best Mode for Carrying Out the Invention

The following examples illustrate the present invention in more detail, but are not to be construed to limit the scope of the present invention.

1. Na^+ - and Cl^- -coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via the amino acid transporter $ATB^{0/+}$

Methods

Materials.

[^3H]-Glycine was purchased from Moravsek (Brea, CA) and [^3H]-L-NNA was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). All other radiolabeled amino acids were obtained from either Dupont-New England Nuclear (Boston, MA) or American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO). NOS inhibitors were obtained from either Sigma or Calbiochem.

Cloning of mouse $ATB^{0/+}$.

The SuperScript plasmid system (Life Technologies, Inc.) was used to establish a unidirectional cDNA library with poly(A)⁺ RNA isolated from mouse colon as described previously (Sugawara, M. et al., J.Biol.Chem. 275, 16473-16477, (2000), Fei, Y.J. et al., J.Biol.Chem., 275, 23707-23717, (2000), Wang, H. et al., Am.J.Physiol., 278, C1019-C1030, (2000)). The probe for library screening was prepared by RT-PCR using primers specific for mouse $ATB^{0/+}$ cDNA reported in the GenBank (accession no. AF161714). The primers were 5'-GTT GGC TAT GCA GTG GGA TT-3' (sense) and 5'-GAG GCC AAG GAG AAA CAA AA-3' (antisense) which corresponded to the nucleotide positions 396-415 and 1606-1625 in the cDNA sequence. RT-PCR was done using the poly(A)⁺ RNA prepared from mouse colon and the resulting product, ~1.2 kbp in size, was subcloned and sequenced to confirm its identity. This cDNA was labeled with [α - ^{32}P]dCTP by random priming and used as a probe for screening the mouse colon cDNA library. Sequencing was done using an automated Perkin-Elmer Applied Biosystems 377 Prism DNA sequencer. The longest positive clone (~3 kbp) was used for functional studies.

Northern blot.

The expression pattern of $ATB^{0/+}$ mRNA along the longitudinal axis of the mouse intestinal tract was investigated by Northern blot analysis. The entire small intestine was divided into four

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

16

equal segments, the first segment representing the most proximal small intestine and the fourth segment representing the most distal small intestine. Poly(A)⁺ mRNA was isolated from these four segments as well as from the cecum and colon and used for Northern blot analysis. The blot was hybridized sequentially under high stringency conditions with [³²P]-labeled cDNA probes specific for mouse ATB⁰⁺, mouse PEPT1 and mouse β -actin.

Functional expression ATB⁰⁺ in HRPE cells.

This was done using the vaccinia virus expression system (Sugawara, M. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 16473-16477, (2000), Fei, Y.J. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 23707-23717, (2000), Wang, H. et al., *Am. J. Physiol.*, 278, C1019-C1030, (2000)). Transport measurements were made at 37° C for 15 min with radiolabeled amino acids or NOS inhibitors as substrates. The transport buffer was 25 mM Hepes/Tris (pH 7.5) containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, and 5 mM glucose. Endogenous transport activity was always determined in parallel using cells transfected with vector alone. With glycine as the substrate which was used in most of the experiments, the endogenous transport accounted for <5% of the transport measured in cells that were transfected with the cDNA. cDNA-specific transport was calculated by adjusting for the endogenous activity. The kinetic parameters, Michaelis-Menten constant (K_i) and maximal velocity (V_{max}), were calculated by fitting the cDNA-specific transport data to the Michaelis-Menten equation describing a single saturable transport system. The Na⁺- and Cl⁻ activation kinetics were analyzed by fitting the cDNA-specific transport data to the Hill equation, and the Hill coefficient was calculated.

Functional expression ATB⁰⁺ in *X. laevis* oocytes.

Capped cRNA from the cloned mouse ATB⁰⁺ cDNA was synthesized using the mMESSAGE mMACHINETM kit (Ambion). Mature oocytes from *X. laevis* were isolated by treatment with collagenase A (1.6 mg/ml), manually defolliculated, and maintained at 18° C in modified Barth's medium supplemented with 10 mg/ml gentamycin (Sugawara, M. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 16473-16477, (2000), Fei, Y.J. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 23707-23717, (2000), Wang, H. et al., *Am. J. Physiol.*, 278, C1019-C1030, (2000)). On the following day, oocytes were injected with 50 ng cRNA. Uninjected oocytes served as controls. The oocytes were used for electrophysiological studies 6 days after cRNA injection. Electrophysiological studies were done by the two-microelectrode voltage-clamp method (Sugawara, M. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 16473-16477, (2000), Fei, Y.J. et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 23707-23717, (2000), Wang, H. et al., *Am. J. Physiol.*, 278, C1019-C1030, (2000)). Oocytes were perfused with a NaCl-containing buffer (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 3 mM Hepes, 3 mM Mes, and 3 mM Tris, pH 7.5), followed by the same buffer containing different NOS inhibitors or amino acids. The membrane potential was

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

17

clamped at -50 mV. Voltage pulses between $+50$ and -150 mV, in 20 -mV increments, were applied for 100 -ms durations and steady-state currents were measured. The differences between the steady-state currents measured in the presence and absence of substrates were considered as the substrate-induced currents. The kinetic parameter $K_{0.5}$ (i.e., the substrate concentration necessary for the induction of half-maximal current) for the saturable transport of substrates was calculated by fitting the values of the substrate-induced currents to the Michaelis-Menten equation. The experiments were repeated with at least three different oocytes from two different batches.

Results

Structural features of mouse ATB^{0+} .

The cloned mouse ATB^{0+} cDNA obtained from colon mRNA is $3,007$ bp-long (GenBank accession no. AF320226) and codes for a protein of 638 amino acids. The primary structure of mouse ATB^{0+} is highly homologous to the recently cloned human ATB^{0+} (Sloan, J.L. and Mager, S. J.Biol.Chem., 274, 23740-23745, (1999)). The identity of amino acid sequence between the two proteins is 88% .

Expression pattern of ATB^{0+} mRNA in the mouse intestinal tract.

To determine the expression pattern of ATB^{0+} along the longitudinal axis of the intestinal tract, we analyzed the steady-state levels of ATB^{0+} mRNA in different regions of the mouse intestine by Northern blot hybridization (Fig. 1). ATB^{0+} mRNA was not detectable in the first three segments of the small intestine. The expression of the mRNA was however evident in the fourth segment of the small intestine, cecum, and colon. The mRNA levels were more abundant in the colon and cecum than in the distal small intestine. In contrast, mRNA for PEPT1, a H^+ -coupled transporter for small peptides, was detectable in all four segments of the small intestine but not in the cecum and colon. These data show that the expression of ATB^{0+} mRNA is restricted to the distal region of the mouse intestinal tract.

Functional features of mouse ATB^{0+} .

The functional identity of the cloned mouse ATB^{0+} cDNA was established first by expressing the clone in mammalian cells heterologously and studying its transport function. We studied the transport of several zwitterionic and cationic amino acids in HRPE cells expressing the cloned mouse ATB^{0+} . The transport of these amino acids was also measured under identical conditions in cells transfected with vector alone to serve as a control for endogenous transport activity. The transport activity of all 13 amino acids tested (Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, His, Gln, Asn, Leu, Ile, Phe, Trp, and Arg) was found to be significantly higher in mouse ATB^{0+} cDNA-transfected

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

18

cells than in vector-transfected cells (data not shown). The cDNA-induced increase in transport activity varied between 16-190% for all amino acids, except for glycine. The transport of glycine was exceptionally high in cDNA-transfected cells. The increase was 38-fold compared to transport activity in vector-transfected cells.

Since the transport of glycine via mouse ATB^{0+} was markedly higher compared to the transport of other amino acids, we used glycine as the substrate for further characterization of the cloned transporter. The results given in Fig. 2 represent only the ATB^{0+} -specific transport activity after correcting for the endogenous transport activity. The ATB^{0+} -mediated glycine transport was obligatorily dependent on the presence of Na^+ and Cl^- . The transport of glycine via mouse ATB^{0+} was saturable with a Michaelis-Menten constant (K_m) of $210 \pm 18 \mu M$. The number of Na^+ and Cl^- ions involved in the transport process was then analyzed by the Na^+ -activation kinetics and the Cl^- -activation kinetics. The transport activity of mouse ATB^{0+} was sigmoidally related to the concentration of Na^+ and the Hill coefficient for the activation process for Na^+ was 2.0 ± 0.1 . In contrast, the transport activity of mouse ATB^{0+} showed a hyperbolic relationship with the concentration of Cl^- . The Hill coefficient for the activation process for Cl^- was 0.7 ± 0.1 . These results show that the $Na^+ : Cl^-$: glycine stoichiometry is $2 : 1 : 1$. The $K_{0.5}$ values for Na^+ and Cl^- (i.e., the concentrations of these ions needed for inducing half-maximal transport activity) were 25 ± 1 and 18 ± 8 mM, respectively.

The amino acid specificity of mouse ATB^{0+} was then studied by assessing the ability of a variety of amino acids to compete with [^3H]-glycine (60 nM) for the transport process mediated by the cloned transporter (Table 1).

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

19

Table 1. Amino Acid Substrate Specificity of Mouse ATB^{0/+}

Unlabeled Amino Acid	mATB ^{0/+} -Specific [³ H]-Glycine Transport	
	pmol/10 ⁶ cells/15 min	%
Control	37.27 ± 1.20	100
Glycine	1.88 ± 0.06	5
Alanine	1.04 ± 0.05	3
Cysteine	1.11 ± 0.20	3
Serine	1.99 ± 0.09	5
Threonine	3.91 ± 0.30	11
Proline	9.97 ± 0.57	27
Histidine	1.31 ± 0.10	4
Glutamine	2.39 ± 0.18	6
Asparagine	3.25 ± 0.23	9
Leucine	0.27 ± 0.03	1
Isoleucine	0.27 ± 0.02	1
Phenylalanine	0.56 ± 0.03	2
Tryptophan	0.37 ± 0.06	1
Arginine	7.14 ± 0.35	19
Lysine	3.52 ± 0.28	9
Aspartate	32.01 ± 1.29	86
Glutamate	33.47 ± 0.91	90
MeAIB	36.21 ± 4.80	97

Transport of [³H]-glycine (60 nM) was measured in vector-transfected HRPE cells and in mATB^{0/+} cDNA-transfected HRPE cells at 37 °C for 15 min in the presence of NaCl (pH 7.5). Unlabeled amino acids were used at a concentration of 2.5 mM. cDNA-specific transport was calculated by subtracting the transport in vector-transfected cells from the transport in mATB^{0/+} cDNA-transfected cells. Data (means ± SEM from four separate determinations) represent only cDNA-specific transport.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

20

At a concentration of 2.5 mM, all zwitterionic and cationic amino acids tested inhibited the transport of [^3H]-glycine mediated by mouse $\text{ATB}^{\text{0+}}$. The inhibition varied from 70 to 100%. In contrast, the anionic amino acid aspartate and the zwitterionic N-methylated amino acid, MeAIB, did not show any significant inhibition. These data show that the cloned mouse $\text{ATB}^{\text{0+}}$ is capable of mediating the transport of anionic and cationic amino acids in a Na^+ - and Cl^- -coupled manner.

Transport of NOS inhibitors via $\text{ATB}^{\text{0+}}$.

The present inventors then assessed the ability of NOS inhibitors and their parent amino acids (arginine, lysine, ornithine, and citrulline) at a concentration of 2.5 mM to compete with [^3H]-glycine (10 μM) for the transport process mediated by mouse $\text{ATB}^{\text{0+}}$ in HRPE cells (Table 2).

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

21

Table2. Transport of NOS Inhibitors via Mouse ATB^{0+}

Unlabeled Amino Acid or NOS Inhibitor	mATB ⁰⁺ -Specific [³ H]-Glycine Transport in HRPE cells	Current in <i>X. laevis</i> oocytes
	nmol/10 ⁶ cells/15 min	nA
Control	7.29 ± 0.08 (100)	
Arginine	2.21 ± 0.05 (30)	382 ± 57
Lysine	1.48 ± 0.02 (20)	545 ± 95
Citrulline	1.10 ± 0.01 (15)	498 ± 114
Ornithine	3.28 ± 0.01 (45)	131 ± 27
L-NNA	1.54 ± 0.03 (21)	200 ± 92
L-NAME	5.25 ± 0.10 (72)	11 ± 2
L-NMMA	5.21 ± 0.06 (72)	33 ± 6
L-NDMA	4.25 ± 0.10 (58)	85 ± 15
L-NMEA	3.77 ± 0.17 (52)	138 ± 16
L-NMMA	2.60 ± 0.06 (36)	411 ± 76
L-NABE	4.93 ± 0.19 (67)	16 ± 2
L-NIL	4.77 ± 0.73 (65)	89 ± 18
L-TC	1.05 ± 0.06 (15)	497 ± 104
L-MTC	2.03 ± 0.09 (28)	118 ± 34
L-NIO	4.17 ± 0.10 (57)	71 ± 16
L-Canavanine	1.75 ± 0.03 (24)	269 ± 73
GGA	4.22 ± 0.09 (58)	7 ± 1

Transport of [³H]-glycine (10 μM) was measured in vector-transfected HRPE cells and in mATB⁰⁺ cDNA-transfected HRPE cells at 37 °C for 15 min in the presence of NaCl (pH 7.5). Unlabeled amino acids and NOS inhibitors were used at a concentration of 2.5 mM. cDNA-specific transport was calculated by subtracting the transport in vector-transfected cells from the transport in mATB⁰⁺ cDNA-transfected cells. Values in parenthesis are percent of control transport. Data (means ± SEM from four separate determinations) represent only cDNA-specific transport. mATB⁰⁺ was also expressed in *X. laevis* oocytes by injecting mATB⁰⁺ cRNA, and the inward currents induced by amino acids and NOS inhibitors (1 mM) were measured using the two-microelectrode voltage clamp technique. The perfusion medium contained NaCl (pH 7.5). Data represent means ± SEM from three different batches of oocytes.

All four parent amino acids caused marked inhibition of glycine transport via mouse ATB^{0+} . The inhibition varied between 55-85%. Similarly, all NOS inhibitors that were tested also inhibited ATB^{0+} -mediated glycine transport. The inhibition caused by the arginine-based NOS inhibitors L-NNA, L-NAME, L-NMMA, L-NDMA, L-NMEA, L-NMMA, and L-NABE was in the range of 30-80%. The lysine-based NOS inhibitor L-NIL caused 35% inhibition. L-TC and L-MTC, the citrulline-based NOS inhibitors, were very potent as inhibitors of ATB^{0+} -mediated glycine transport, the inhibition being in the range of 70-85%. The ornithine derivative L-NIO caused 40% inhibition. L-Canavanine and L-GGA, both being guanidino derivatives, were also effective inhibitors, causing 75 and 40% inhibition, respectively.

Fig. 3 describes the dose-response relationship for the inhibition of ATB^{0+} -mediated glycine transport by six of the NOS inhibitors. The inhibitory potency was in the following order: L-TC > L-NNA > L-MTC > L-NMMA > L-NIO > L-NIL. The IC_{50} values (i.e., the concentration of the compound necessary to cause 50% inhibition) were as follows: L-TC (0.21 ± 0.03 mM), L-NNA (0.56 ± 0.04 mM), L-MTC (0.73 ± 0.09 mM), L-NMMA (0.77 ± 0.12 mM), L-NIO (2.65 ± 0.25 mM), and L-NIL (2.60 ± 0.29 mM).

These results show that all NOS inhibitors tested interact with the substrate-binding site of the cloned mouse ATB^{0+} . However, these data suggest but do not prove that these NOS inhibitors are transportable substrates for the transporter. It is possible that some compounds may block the transport by competing with glycine for binding to the substrate-binding site without itself being transported across the membrane. To determine whether or not these inhibitors are actually transportable substrates of the transporter, direct measurements of ATB^{0+} -mediated transport of these inhibitors have to be carried out. Towards this goal, we used [^3H]-L-NNA as a substrate for ATB^{0+} and studied its transport in HRPE cells expressing the cloned transporter (Fig. 4). The transport of L-NNA in ATB^{0+} -expressing cells was 4-fold higher than in vector-transfected cells, demonstrating that L-NNA is indeed a transportable substrate for this transporter. This conclusion is supported further by the inhibition of ATB^{0+} -specific L-NNA transport by glycine, serine and arginine that are substrates for the transporter. In contrast, MeAIB and glutamate that are not substrates for the transporter did not inhibit ATB^{0+} -specific L-NNA transport. The ATB^{0+} -specific L-NNA transport was saturable with a Michaelis-Menten constant of 0.75 ± 0.10 mM.

The mammalian expression system is not ideal to investigate the transport of a broad spectrum of NOS inhibitors via ATB^{0+} because of the limited availability of NOS inhibitors commercially in radiolabeled form. Therefore, the present inventors had to use an alternative method for direct measurement of the transport of a large number of NOS inhibitors via ATB^{0+} . The present inventors used the *X. laevis* oocyte expression system for this purpose. The cloned mouse ATB^{0+} was functionally expressed in these oocytes by injection of cRNA and the transport of NOS

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

23

inhibitors (1 mM) via the transporter was then monitored by inward currents induced by these inhibitors using the two-microelectrode voltage clamp technique. This approach was feasible because of the electrogenic nature of $ATB^{0,+}$. Induction of an inward current upon exposure of the $ATB^{0,+}$ -expressing oocyte to a test compound under voltage-clamped conditions would indicate depolarization of the membrane as a result of transport of the compound into the oocyte. Uninjected oocytes served as negative controls in these experiments. The results of these oocyte experiments are given in Table II. All of the NOS inhibitors tested, except for L-NAME, L-NABE, and L-GGA, induced marked inward currents in oocytes expressing the cloned $ATB^{0,+}$. The currents varied in the range of 30-500 nA. Comparatively, L-NAME, L-NABE, and L-GGA induced very little currents (10-15 nA). The amino acids arginine, lysine, citrulline, and ornithine induced currents in the range of 130-550 nA.

For further detailed analysis of the transport of NOS inhibitors via $ATB^{0,+}$ in the oocyte expression system, the present inventors selected three NOS inhibitors, namely L-NIL, L-MTC, and L-NIO. The present inventors chose these compounds on the basis of their selectivity towards distinct NOS isoforms: L-NIL for NOS II, L-MTC for NOS I and L-NIO for NOS III. Fig. 5 describes the ion-dependence of the inward currents induced by L-NIL and L-MTC. In the presence of NaCl, L-NIL at a concentration of 1 mM induced 82 ± 18 nA inward currents. However, when measured in the presence of NMDG chloride, there was no measurable inward current upon exposure of the oocytes to this compound, indicating that the L-NIL-induced currents were obligatorily dependent on the presence of Na^+ . This compound did induce a small, but significant, current (~ 10 nA) in the presence of sodium gluconate (i.e., in the absence of chloride). However, since L-NIL used in this experiment was a chloride salt, a small amount of chloride was present under these experimental conditions. This resulted in the induction of the observed current. This is supported by the data obtained with L-MTC which is available in a chloride-free form. In the presence of NaCl, L-MTC at a concentration of 1 mM induced 116 ± 34 nA inward currents. But, there were no measurable currents when either Na^+ or Cl^- was absent, showing that the L-MTC-induced inward current was absolutely dependent on the presence of both Na^+ and Cl^- . The obligatory dependence of the currents induced by L-NIL and L-MTC on the presence of Na^+ and Cl^- was similar to the data obtained with arginine. When used as a chloride-free salt, arginine induced 382 ± 57 nA inward current. No measurable current was observed with arginine in the absence of either Na^+ or Cl^- .

The present inventors then analyzed the saturation kinetics of the transport of L-MTC, L-NIL, and L-NIO via $ATB^{0,+}$ in the oocyte expression system using the inward currents induced by the corresponding inhibitors as the measure of their transport. The results of these experiments, shown in Fig. 6, demonstrate that $ATB^{0,+}$ -mediated transport of all three compounds was saturable. The $K_{0.5}$ values (the concentration of the compound necessary to induce half-maximal current),

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

24

calculated at membrane potential -50 mV, were 1.36 ± 0.08 mM, 2.72 ± 0.29 mM, and 2.24 ± 0.35 mM for L-MTC, L-NIL, and L-NIO, respectively. The $K_{0.5}$ values were however influenced by the membrane potential for all three compounds. The values decreased with hyperpolarization of the membrane and increased with depolarization of the membrane.

Discussion

The present inventors present evidence for the transport of NOS inhibitors via the Na^+ - and Cl^- -coupled amino acid transporter $\text{ATB}^{0,+}$. The present invention represents the first identification of an ion gradient-driven concentrative transport system for these potential therapeutic agents. The evidence in support of $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated transport of NOS inhibitors was obtained with $\text{ATB}^{0,+}$ cloned from the mouse colon. The transport function of the cloned $\text{ATB}^{0,+}$ was studied by heterologous expression in mammalian cells as well as in *X. laevis* oocytes. This approach enabled us to investigate directly the transport of a wide variety of NOS inhibitors via the transporter. NOS inhibitors can be either cationic or zwitterionic in nature. Previous studies have shown that cationic NOS inhibitors are transported by system y^+ whereas zwitterionic NOS inhibitors are transported by system L (Schmidt, K. et al., *Mol. Pharmacol.*, 44, 615-621, (1993), Schmidt, K. et al., *Biochem. J.*, 301, 313-316, (1994), Baydoun, A.R. and Mann, G.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200, 726-731, (1994), Schmidt, K. et al., *J. Neurochem.*, 64, 1469-1475, (1995), Raghavendra Rao, V.L. and Butterworth, R.F., *J. Neurochem.*, 67, 1275-1281, (1996)). System y^+ does not interact with zwitterionic NOS inhibitors and system L does not interact with cationic NOS inhibitors. Our present studies show that $\text{ATB}^{0,+}$ is able to transport both cationic as well as zwitterionic NOS inhibitors. This is in accordance with the substrate specificity of this transporter. $\text{ATB}^{0,+}$ recognizes cationic amino acids as well as zwitterionic amino acids as substrates. Among the amino acid substrates of $\text{ATB}^{0,+}$, how the amino acids arginine, lysine, citrulline, and ornithine are handled by the transporter is directly relevant to the present study because most of the NOS inhibitors that are currently in investigational use are structurally related to these four amino acids. Even though arginine, lysine, and ornithine are cationic and citrulline is zwitterionic, our present studies show that all of these four amino acids are transportable substrates for $\text{ATB}^{0,+}$. Similarly, most NOS inhibitors, whether cationic or zwitterionic, that are structurally related to the four amino acids are transported via $\text{ATB}^{0,+}$.

Among the three amino acid transporters that are known thus far to recognize NOS inhibitors as substrates, $\text{ATB}^{0,+}$ is the most concentrative. This transporter is energized by the combined transmembrane gradients of Na^+ and Cl^- as well as membrane potential. In contrast, system y^+ is driven only by membrane potential and system L is most likely facilitative with no known driving force. Therefore, the transport of NOS inhibitors into cells that express $\text{ATB}^{0,+}$ is likely to be highly concentrative. The intracellular concentration of the NOS inhibitors in these cells can

potentially reach several-fold higher than the extracellular concentration.

The present inventors determined the affinity of six NOS inhibitors for $ATB^{a,+}$ in the mammalian cell expression system from their ability to compete with an amino acid substrate for the transport process. These are L-NNA and L-NMMA (both of these structurally related to arginine), L-NIL (structurally related to lysine), L-TC and L-MTC (both of these structurally related to citrulline) and L-NIO (structurally related to ornithine). The IC_{50} values for these six compounds varied within the range of 0.2–2.7 mM. In the case of L-NNA, the present inventors also determined the affinity directly from its transport via $ATB^{a,+}$ in the same mammalian cell expression system. The Michaelis-Menten constant (K_m) calculated from the direct measurement of transport was found to be very similar to the IC_{50} value calculated from the competitive inhibition studies (0.75 ± 0.10 mM versus 0.56 ± 0.04 mM). For three other NOS inhibitors (L-MTC, L-NIL, and L-NIO), the present inventors determined the Michaelis-Menten constant for their transport via $ATB^{a,+}$ using the *X. laevis* oocyte expression system. The K_m values calculated from these experiments were found to be similar to the corresponding IC_{50} values determined from the competitive inhibition studies using the mammalian cell expression system (1.36 ± 0.08 mM versus 0.73 ± 0.09 mM for L-MTC, 2.72 ± 0.29 mM versus 2.60 ± 0.29 mM for L-NIL, and 2.24 ± 0.35 mM versus 2.65 ± 0.25 mM for L-NIO).

The transport of NOS inhibitors via $ATB^{a,+}$ is of significant pharmacological and clinical relevance. This suggests that $ATB^{a,+}$ has the potential for use as a drug delivery system for NOS inhibitors. The present inventors cloned $ATB^{a,+}$ from the mouse colon. But, there is ample evidence for the expression of this transport system not only in the colon but also in the distal small intestine (Ganapathy, V. et al., *Intestinal transport of peptides and amino acids*. In *Current Topics in Membranes*. Ed. Barrett, K.E. and Donowitz, M., Vol. 50, pp. 379-412. Academic Press. (2001), Munck, L.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1241, 195-213, (1995)). The transport function has been shown to be present in the brush border membrane of the mucosal cells in the ileum (Ganapathy, V. et al., *Intestinal transport of peptides and amino acids*. In *Current Topics in Membranes*. Ed. Barrett, K.E. and Donowitz, M., Vol. 50, pp. 379-412. Academic Press. (2001), Munck, L.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1241, 195-213, (1995)). $ATB^{a,+}$ mRNA is detectable in the present study only in the distal regions of the intestinal tract (ileum, cecum, and colon). The expression pattern of $ATB^{a,+}$ mRNA along the longitudinal axis of the intestinal tract is interesting and of relevance to the potential use of this transporter as a delivery system for NOS inhibitors. To our knowledge, the restricted expression of $ATB^{a,+}$ in the distal intestinal tract is unique among the amino acid transporters. Amino acids derived from the dietary proteins are absorbed mostly in the proximal small intestine and consequently the concentrations of amino acids in the distal regions of the intestinal tract are low. As a result, there will be little competition between NOS inhibitors and endogenous amino acids for transport via $ATB^{a,+}$. This will enhance the efficiency of intestinal

absorption of NOS inhibitors.

There are two other amino acid transport systems in the intestinal brush border membrane which may participate in the uptake of NOS inhibitors from the intestinal lumen. These are system y^+ and system $b^{0,+}$. The ability of system y^+ to transport cationic NOS inhibitors has been well established. In contrast, there is very little information available on the ability of system $b^{0,+}$ to transport NOS inhibitors. Since this transport system is able to interact with zwitterionic as well as cationic amino acids, the present inventors predict that this system can handle zwitterionic as well as cationic NOS inhibitors. Our recent studies have indeed demonstrated that system $b^{0,+}$ is at least partly responsible for the uptake of the zwitterionic NOS inhibitor L-NNA across the intestinal brush border membrane (Hatanaka, T. et al., *Pharmaceut. Res.*, 16, 1770-1774, (1999)). However, both system y^+ and system $b^{0,+}$ are not driven by any ion gradient. Therefore, the present inventors speculate that $ATB^{0,+}$, with its energetic coupling to transmembrane gradients of Na^+ and Cl^- , is likely to be much more efficient than system y^+ and system $b^{0,+}$ in the uptake of NOS inhibitors from the lumen into the intestinal and colonic absorptive cells.

The oral bioavailability of NOS inhibitors will depend not only on the existence of entry routes for these compounds in the intestinal and colonic brush border membrane but also on the existence of exit routes in the basolateral membrane. There are two amino acid transport systems in the basolateral membrane of the intestinal tract that may be of relevance to the exit of NOS inhibitors from the intestinal and colonic absorptive cells into the blood. These are system L and system y^+L (Ganapathy, V. et al., *Intestinal transport of peptides and amino acids. In Current Topics in Membranes*, Ed. Barrett, K.E. and Donowitz, M., Vol. 50, pp. 379-412. Academic Press. (2001)). The NOS inhibitors that are absorbed into the intestinal and colonic epithelial cells via $ATB^{0,+}$, system y^+ , and system $b^{0,+}$, can exit these cells across the basolateral membrane via systems L and y^+L .

The present studies may also be of clinical relevance to the management of intestinal and colonic inflammation with NOS inhibitors. There is convincing evidence for the induction of NOS II in the intestinal and colonic epithelial cells during inflammation (Tepperman, B.L. et al., *Am. J. Physiol.*, 265, G214-G218, (1993); Singer, I.I. et al., 1996. *Gastroenterology*, 111, 871-875, (1996)). Nitric oxide plays an important role in the normal physiological function of the intestinal tract and also in pathological conditions such as bacterial sepsis and inflammatory bowel disease (Stensen, W.F., *Gastrointestinal inflammation. In, Textbook of Gastroenterology* (ed. Yamada, T.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 123-140, (1999)). It is of interest to note that the inflammatory bowel diseases ulcerative colitis and Crohn's disease involve primarily colon and/or ileum, the sites at which $ATB^{0,+}$ is principally expressed in the intestinal tract. The idea of using $ATB^{0,+}$ as the delivery system for NOS inhibitors is particularly appealing for several reasons with respect to the clinical management of inflammatory bowel disease in which there is an induction of

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

27

NOS II in the intestinal and colonic epithelial cells. $ATB^{0,+}$ is a highly concentrative transporter and therefore the NOS inhibitors will be absorbed very effectively into the intestinal and colonic epithelial cells and accumulated inside the cells at high concentrations. This will result in an effective means of inhibiting NOS II in these cells. Furthermore, NOS inhibitors in the intestinal lumen will compete with arginine, the substrate for NOS II, for transport into the cells via $ATB^{0,+}$ and thus reduce the availability of arginine for NOS II activity. Thus, $ATB^{0,+}$ will allow NOS inhibitors to get into the cells in place of arginine. This will result in a very effective inhibition of NOS II activity, both by reducing the availability of arginine, the NOS II substrate, and by increasing the intracellular concentration of NOS inhibitors.

2. Na^+ - and Cl^- -coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter $ATB^{0,+}$

Methods

Carnitine transport via mouse $ATB^{0,+}$ in a mammalian cell expression system.

The present inventors cloned a full-length functional $ATB^{0,+}$ from a mouse colon cDNA library (GenBank accession no. AF320226). The cloned transporter was functionally expressed in human retinal pigment epithelial (HRPE) cells using the vaccinia virus expression technique (Wu, X. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 246, 589-595, (1998), Wu, X., et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290, 1482-1492, (1999)). Initial studies of the interaction of carnitine with mouse $ATB^{0,+}$ in HRPE cells were done by assessing the ability of carnitine to compete with glycine for transport via $ATB^{0,+}$. Subsequent studies were carried out using [^3H]-carnitine to assess directly the transport of carnitine via $ATB^{0,+}$. Transport measurements were made in vector-transfected cells and in mouse $ATB^{0,+}$ cDNA-transfected cells in parallel using 24-well culture plates. Incubations of the cells with radiolabeled substrates were carried out at 37° C for 15 min. The composition of the transport buffer was 25 mM Hepes/Tris (pH 7.5), containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, and 5 mM glucose. cDNA-specific transport was calculated by adjusting for the transport in vector-transfected cells. [^3H]-Glycine, [^3H]-carnitine, acetyl- [^3H]-carnitine and propionyl- [^3H]-carnitine were purchased from Moravsek Biochemicals (Brea, CA, USA).

Carnitine transport via mouse $ATB^{0,+}$ in the X. laevis oocyte expression system.

Mature oocytes from X. laevis were isolated by treatment with collagenase A (1.6 mg/ml). Oocytes were manually defolliculated and then used for injection with mouse $ATB^{0,+}$ cRNA or water (Fei, Y.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 275, 23707-23717, (2000)). cRNA was synthesized using the mMESSAGE mMACHINE™ kit (Ambion, Austin, TX, USA). The transport of carnitine via mouse $ATB^{0,+}$ in oocytes was monitored electrophysiologically using the two-microelectrode

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

28

voltage-clamp technique (Fei, Y.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 275, 23707-23717, (2000)). The membrane potential was held steady at -50 mV. Oocytes were perfused with carnitine and the induced current was monitored. The induced current was taken as the measure of transport rate. The composition of the perfusion buffer was 10 mM Hepes/Tris (pH 7.5), containing 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 and 1 mM CaCl_2 .

Data analysis.

Experiments were repeated at least three times. Results are given as means $\pm$ S. E. The kinetic parameters, Michaelis-Menten constant (K_m) and maximal velocity (V_{max}), were calculated by fitting the $\text{ATB}^{0,+}$ -specific transport data to the Michaelis-Menten equation describing a single saturable transport system. Na^+ - and Cl^- -activation kinetics were analyzed by fitting the $\text{ATB}^{0,+}$ -specific transport data to the Hill equation for the determination of $K_{0.5}$ values for Na^+ and Cl^- (concentration of Na^+ or Cl^- necessary for half-maximal activation) and the Hill coefficient (n^H , number of Na^+ or Cl^- ions involved in the activation process).

Results

Analysis of carnitine transport via mouse $\text{ATB}^{0,+}$ in the mammalian cell expression system.

There is a significant structural similarity between carnitine and γ -aminobutyrate as well as between carnitine and betaine. Carnitine is a derivative of γ -aminobutyrate with an addition of a hydroxyl group at the β carbon and the substitution of the amino group with the trimethylamino group. Because of the presence of the trimethylamino group at the terminal carbon atom, carnitine is also structurally similar to betaine. Since the primary structure of $\text{ATB}^{0,+}$ is closely related to that of γ -aminobutyrate transporters and betaine transporter, the present inventors investigated whether $\text{ATB}^{0,+}$ is capable of interacting with γ -aminobutyrate and betaine. In the same experiment, the present inventors also tested the ability of $\text{ATB}^{0,+}$ to interact with carnitine and its acetyl and propionyl esters. In these studies, the transport function of $\text{ATB}^{0,+}$ was monitored by measuring the transport of glycine in HRPE cells expressing the cloned mouse $\text{ATB}^{0,+}$. The expression of $\text{ATB}^{0,+}$ in these cells increased the transport of glycine by 30-fold (Fig. 8A). The interaction of the transporter with the test compounds was investigated by assessing their ability to inhibit $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated glycine transport (Fig. 8B). These studies produced interesting, but quite unexpected, results. γ -Aminobutyrate and betaine showed little or no effect on $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated glycine transport. In contrast, carnitine and propionylcarnitine inhibited $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated glycine transport markedly. The IC_{50} values (concentration of the compound at which the inhibition was 50%) for carnitine and propionylcarnitine were 0.6 ± 0.1 and 0.9 ± 0.1 mM, respectively. Acetylcarnitine was also able to inhibit $\text{ATB}^{0,+}$ -mediated glycine transport, but surprisingly the inhibitory potency of this ester was

much less than that of carnitine and its propionyl ester (IC_{50} for acetylcarnitine was 15 ± 3 mM).

To determine whether or not carnitine and its esters are transportable substrates for ATB^{0+} , the present inventors compared the transport of [^3H]-carnitine and its esters between vector-transfected cells and ATB^{0+} cDNA-transfected cells (Fig. 9A). Expression of ATB^{0+} in HRPE cells induced the transport of carnitine (16-fold) and propionylcarnitine (6-fold) compared to transport in vector-transfected cells. The transport of acetylcarnitine was also increased by ATB^{0+} expression but to a much smaller extent (2-fold). These data show that ATB^{0+} recognizes carnitine, propionylcarnitine, and acetylcarnitine as transportable substrates. Since ATB^{0+} is a member of the Na^+ - and Cl^- -coupled transporter gene family, we investigated the influence of these two ions on the transport of carnitine mediated by ATB^{0+} (Fig. 9B). The transport was completely abolished when Na^+ in the uptake buffer was substituted with N-methyl-D-glucamine. Removal of Cl^- from the uptake buffer by substituting with gluconate reduced the transport by ~60%. These results show that ATB^{0+} -mediated carnitine transport is coupled to both Na^+ and Cl^- . The removal of Cl^- did not abolish the transport completely because of the possible release of Cl^- from the cells during transport measurements. The transporter interacts with Cl^- with high affinity and therefore the transporter is significantly active even at low concentrations of Cl^- .

The transport of carnitine mediated by ATB^{0+} was saturable (Fig. 10A). The values for the kinetic parameters K_i and V_{max} were 0.83 ± 0.08 mM and 72 ± 2 nmol/ 10^6 cells/15 min. The relationship between ATB^{0+} -mediated carnitine transport and Na^+ concentration was sigmoidal (Fig. 10B). The $K_{0.5}$ for Na^+ was 54 ± 4 mM and the Hill coefficient (n_H) was 1.6 ± 0.1 . The Cl^- -activation kinetics were not investigated in this expression system because of the efflux of significant amounts of Cl^- from the cells during the experiment.

Analysis of carnitine transport via mouse ATB^{0+} in the *X. laevis* oocyte expression system.

Transport of amino acid substrates via ATB^{0+} is electrogenic (Sloan, J.L. and Mager, S., *Journal of Biological Chemistry*, 274, 23740-23745, (1999)). To investigate the electrogenic nature of ATB^{0+} -mediated carnitine transport, the present inventors employed the *X. laevis* oocyte expression system. When oocytes expressing the mouse ATB^{0+} were perfused with carnitine, marked inward currents were detectable by the two-microelectrode voltage-clamp technique (~300 nA at 10 mM carnitine) (data not shown). Under similar conditions, propionylcarnitine induced ~200 nA currents. In contrast, acetylcarnitine was unable to induce any detectable currents. With carnitine and propionylcarnitine, the induced currents were absolutely dependent on the presence of Na^+ as well as Cl^- . Removal of either of the two ions abolished the currents completely.

We analyzed the kinetic parameters of ATB^{0+} -mediated carnitine transport using the carnitine-induced inward currents as the measure of the transporter function. The currents were

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

30

saturable with increasing concentrations of carnitine (Fig. 11A). The $K_{0.5}$ for carnitine was 1.8 ± 0.4 mM. The Na^+ -activation kinetics of carnitine-induced currents showed a sigmoidal relationship (Fig. 11B). The $K_{0.5}$ for Na^+ was 25 ± 4 mM and the Hill coefficient (n^H) was 1.9 ± 0.5 . Since the removal of Cl^- abolished completely the carnitine-induced currents, there was apparently no efflux of Cl^- from the oocytes under the experimental conditions. Therefore, we used this expression system to analyze the Cl^- -activation kinetics. The relationship between carnitine-induced currents and Cl^- concentration was hyperbolic (Fig. 11C). The $K_{0.5}$ for Cl^- was 15 ± 5 mM and the Hill coefficient (n^H) was 0.9 ± 0.2 . These data show that the $\text{Na}^+ : \text{Cl}^- : \text{carnitine}$ stoichiometry for the ATB^{Na^+} -mediated transport process was 2 : 1 : 1.

Discussion

To date, OCTN2 is the only transporter that has been shown to transport carnitine in an ion gradient-coupled manner (Wu, X. et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246, 589-595, (1998), Wu, X., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, 1482-1492, (1999), Tamai, I. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20378-20382, (1998)). The transport function of OCTN2 is dependent on the presence of Na^+ . Cl^- does not have any role in the function of this transporter. The transporter is however likely to be electrogenic due to the zwitterionic nature of carnitine and the coupling of the transport process with Na^+ cotransport. OCTN2-mediated transport of carnitine is therefore energized by transmembrane Na^+ gradient and membrane potential. The present studies describe the identification of a second ion gradient-coupled transporter for carnitine. ATB^{Na^+} transports carnitine in a Na^+ - and Cl^- -coupled manner. The transport process is electrogenic. Thus, the transport of carnitine via ATB^{Na^+} is energized by transmembrane gradients of Na^+ and Cl^- as well as membrane potential. The concentrative capacity of ATB^{Na^+} for carnitine is much greater than that of OCTN2. However, ATB^{Na^+} is a low-affinity transporter for carnitine ($K_t = 1-2$ mM). In contrast, OCTN2 is a high-affinity transporter for carnitine ($K_t \approx 5-15$ μM) (Tamai, I. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 273, 20378-20382, (1998), Wu, X., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, 1482-1492, (1999)). The concentrations of carnitine in blood are in the range of 30-50 μM and therefore OCTN2 is more important than ATB^{Na^+} for cellular uptake of carnitine in most tissues under physiological conditions. Interestingly, the tissue distribution of the two transporters is quite different. OCTN2 is expressed in most tissues whereas ATB^{Na^+} is expressed primarily in the mammary gland, lung, and intestinal tract. ATB^{Na^+} is likely to play a significant role in tissues in which it is expressed. Recent studies with JVS mice, which have a genetic defect in OCTN2 transport function, have shown that the intestinal absorption of carnitine is reduced only about 50% due to the defect (Yokogawa, K. et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 224-230, (1999)). The findings that defects in

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

31

OCTN2 function do not eliminate intestinal absorption completely suggest that some additional, hitherto unidentified, transporters participate in the intestinal absorption of carnitine. Since ATB^{0+} is expressed in the intestinal tract, it is possible that this transporter, along with OCTN2, participates in the intestinal absorption of carnitine. Furthermore, ATB^{0+} is expressed not only in the small intestine but also in the colon. The present studies were done with ATB^{0+} cloned from mouse colon. Microbial flora utilize carnitine as a carbon source (Rebouche, C.J. and Seim, H., Annual Review of Nutrition, 18, 39-61, (1998)). Therefore, the present inventors speculate that ATB^{0+} in the colon may play a role in the absorption of carnitine and thus compete with colonic bacteria for carnitine in the lumen. Similarly, ATB^{0+} in the mammary gland may participate in the secretion of carnitine into milk. In addition, the transport of carnitine via ATB^{0+} is likely to be very relevant to carnitine homeostasis in patients with genetic defects in OCTN2.

OCTN2 and ATB^{0+} differ not only in their affinity and driving forces but also in their substrate specificity. OCTN2 transports carnitine, acetylcarnitine and propionylcarnitine with comparable affinity (Wu, X., et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 290, 1482-1492, (1999)). In contrast, ATB^{0+} transports only carnitine and propionylcarnitine. The transporter shows very low affinity for acetylcarnitine. Acetylcarnitine is the predominant acylcarnitine ester inside the cell as well as in the circulation. It is a key intermediate in anabolic and catabolic pathways of metabolism. The differential affinity of OCTN2 and ATB^{0+} for acetylcarnitine may have physiological implications.

3. Na^{+} - and Cl^{-} -coupled active transport of D-amino acids by the amino acid transporter ATB^{0+}

Methods

Methods are shown in table 3 and BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS (Fig. 11) briefly.

Results & discussion

The present inventors evaluated the function of 10 different amino acid transporter clones with respect to transport of D-serine in heterologous expression systems (Fig. 11). All of these transporters are expressed in the intestinal tract. The list of the transporters tested include three energy-independent, heterodimeric facilitative transporters (L1, L2, and b^{0+}), three subtypes of the Na^{+} -coupled system A (ATA1, ATA2, and ATA3), two subtypes of the Na^{+} - and H^{+} -coupled system N (SN1 and SN2), the Na^{+} -coupled system ATB^0 , and the Na^{+} - and Cl^{-} -coupled system ATB^{0+} . Among the facilitative transporters, system L1 (LAT1/4F2hc) and b^{0+} (b^{0+} AT/4F2hc) showed significant ability to transport D-serine. The LAT2/4F2hc and b^{0+} AT/rBAT complexes did not exhibit detectable D-serine transport activity. Among the subtypes of system A, ATA1 and ATA2

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

32

showed D-serine transport activity, but ATA3 did not. SN1 and SN2 did not transport D-serine. ATB^0 was able to transport D-serine to a marked extent, its transport activity being much higher than that of systems LI , b^{0+} , ATA1, and ATA2. The ability to transport D-serine was the highest for the Na^+ - and Cl^- -coupled transporter ATB^{0+} . ATB^{0+} belongs to the gene family of neurotransmitter transporters whose transport function is energized by multiple driving forces, namely a Na^+ gradient, a Cl^- gradient, and membrane potential. The functional activities of ATB^0 and ATB^{0+} have been demonstrated in the brush border membrane of the intestinal epithelial cells, and therefore it is likely that these two transporters mediate the active absorption of D-serine from the lumen into the mucosal cells. Based on the energetics of these two transport systems, ATB^{0+} is expected to play the leading role in this process.

To determine whether ATB^{0+} is capable of transporting other D-amino acids, two different approaches were used (Table 3).

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

33

Table 3. Transport of L-amino acids versus D-amino acids via ATB⁰⁺

Amino Acid	mATB ⁰⁺ -Specific [³ H]-Glycine Transport in HRPE cells (% control)		Current in <i>X. laevis</i> oocytes (nA)	
	L-isomer	D-isomer	L-isomer	D-isomer
Control	100 ± 6	100 ± 6		
Alanine	6 ± 1	10 ± 1	650 ± 86	402 ± 39
Serine	10 ± 1	14 ± 1	470 ± 42	267 ± 23
Methionine	3 ± 0	14 ± 1	278 ± 26	213 ± 15
Leucine	3 ± 1	13 ± 1	187 ± 14	161 ± 25
Tryptophan	4 ± 1	7 ± 1	112 ± 4	157 ± 23
Threonine	19 ± 2	47 ± 3	233 ± 12	41 ± 5
Histidine	9 ± 1	35 ± 2	410 ± 64	29 ± 6
Phenylalanine	3 ± 0	26 ± 2	275 ± 58	24 ± 24
Glutamine	13 ± 1	77 ± 4	453 ± 53	16 ± 11
Asparagine	15 ± 1	95 ± 7	394 ± 67	3 ± 2
Lysine	18 ± 1	86 ± 5	321 ± 34	9 ± 9
Arginine	25 ± 1	93 ± 6	339 ± 35	6 ± 1
Valine	7 ± 1	87 ± 4	310 ± 24	4 ± 3
Isoleucine	4 ± 1	85 ± 5	117 ± 16	4 ± 4

Transport of [³H]-glycine (10 μM) was measured in vector-transfected HRPE cells and in mATB⁰⁺ cDNA-transfected HRPE cells. Unlabeled amino acids were used at a concentration of 2.5 mM. cDNA-specific transport was calculated by subtracting the transport in vector-transfected cells from the transport in mATB⁰⁺ cDNA-transfected cells. Values are percent of control transport. Data (means ± SEM from four separate determinations) represent only cDNA-specific transport. mATB⁰⁺ was also expressed in *X. laevis* oocytes by injecting mATB⁰⁺ cRNA, and the inward currents induced by amino acids (1 mM) were measured using the two-microelectrode voltage clamp technique. The perfusion medium contained NaCl (pH 7.5). Data represent means ± SEM from three different batches of oocytes.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

34

In the first approach, the transport function of ATB^{0+} was measured in a mammalian cell heterologous expression system using glycine as the substrate and the ability of L- and D-enantiomers of various amino acids to inhibit this transport function was compared. All neutral and cationic amino acids tested were potent inhibitors of ATB^{0+} -mediated glycine transport when present as L-enantiomers. In the case of D-enantiomers, only alanine, serine, methionine, leucine and tryptophan were potent inhibitors. The extent of inhibition was comparable between L-enantiomers and D-enantiomers for these five amino acids. In contrast, the D-enantiomers of threonine, histidine, phenylalanine, and glutamine were much less effective than the corresponding L-enantiomers as inhibitors. Asparagine, lysine, arginine, valine, and isoleucine were almost totally ineffective as inhibitors when present as D-enantiomers even though the corresponding L-enantiomers were potent inhibitors. Since the inhibition does not necessarily mean that the inhibitors are translocated across the membrane via the transporter, the transport of L- and D-enantiomeric forms of these amino acids was assessed directly in *Xenopus laevis* oocytes expressing ATB^{0+} heterologously. This was done using the two-microelectrode voltage-clamp technique and monitoring the amino acid-induced inward currents. The L-enantiomers of all amino acids tested induced inward currents, indicating their transport via ATB^{0+} . In the case of D-enantiomers, only alanine, serine, methionine, leucine, and tryptophan induced currents. Threonine, histidine, phenylalanine, and glutamine produced small but significant currents whereas the remaining amino acids did not produce currents. These results with the *X. laevis* oocyte expression system corroborate the results with the mammalian cell expression system. These data show that ATB^{0+} is capable of transporting all neutral and cationic amino acids when presented as the L-enantiomers. But, the transporter recognizes only alanine, serine, methionine, leucine, and tryptophan in their D-enantiomeric form as transportable substrates.

4. Na^+ - and Cl^- -coupled active transport of phenylglycine and its derivative by the amino acid transporter ATB^{0+}

Methods

Materials.

[^3H]-Glycine was purchased from Moravek (Brea, CA) and [^{14}C]-L-phenylglycine was purchased from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO). [^3H]-L-Glutamine and [^3H]-L-alanine were obtained from Dupont-New England Nuclear (Boston, MA) and Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), respectively.

Functional expression of ATB^{0+} , ATB^0 and b^0+ AT in HRPE cells.

This was done using the vaccinia virus expression system. Transport measurements were

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

35

made at 37° C for 15 min with radiolabeled amino acids as substrates. The transport buffer was 25 mM Hepes/Tris (pH 7.5) containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, and 5 mM glucose. Endogenous transport activity was always determined in parallel using cells transfected with vector alone. cDNA-specific transport was calculated by adjusting for the endogenous activity.

Functional expression of ATB^{As+} in the *X. laevis* oocyte expression system.

Mature oocytes from *X. laevis* were isolated by treatment with collagenase A (1.6 mg/ml). Oocytes were manually defolliculated and then used for injection with mouse ATB^{As+} cRNA or water (Fei, Y.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 275, 23707-23717, (2000)). cRNA was synthesized using the mMESSAGE mMACHINETM kit (Ambion, Austin, TX, USA). The transport of compounds via mouse ATB^{As+} in oocytes was monitored electrophysiologically using the two-microelectrode voltage-clamp technique (Fei, Y.J. et al., Journal of Biological Chemistry, 275, 23707-23717, (2000)). The membrane potential was held steady at -50 mV. Oocytes were perfused with each compound and the induced current was monitored. The induced current was taken as the measure of transport rate. The composition of the perfusion buffer was 10 mM Hepes/Tris (pH 7.5), containing 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mM CaCl₂.

Synthesis of (S)-2-(3-Benzoyloxycarbonylamino-phenyl)-2-tert-butoxycarbonylaminoacetic acid tert-butyl ester (Fig.14 Example 1).

A mixture of (S)-2-(3-Benzoyloxycarbonylamino-phenyl)-2-tert-butoxycarbonyl-aminoacetic acid (1.0g), tert-Butyl 2, 2, 2-trichloroacetimidate (1.0g) and BF₃·Et₂O (a drop) in CH₂Cl₂ (30mL) was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the crude product was purified by column chromatography (3:1 hexane:EtOAc) to afford the titled compound (800mg). ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.33 (m, 9H), 5.59 (brn, 1H), 5.19 (s, 2H), 5.18 (brn, 1H), 1.42 (m, 18H)

Synthesis of (S)-2-(3-Amino-phenyl)-2-tert-butoxycarbonylaminoacetic acid tert-butyl ester (Fig.14 Example 2).

A mixture of (S)-2-(3-Benzoyloxycarbonylamino-phenyl)-2-tert-butoxycarbonyl-aminoacetic acid tert-butyl ester (800mg) and 10% Pd-C in EtOH (30mL) was stirred under H₂. The mixture was filtered to remove the catalyst, and the filtrate was concentrated in vacuo to give the titled compound (650mg). ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.12-7.08 (m, 1H), 6.73-6.59 (m, 3H), 5.48 (m, 1H), 5.08 (d, J=7.6Hz, 1H), 3.67 (brs, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.39 (s, 9H)

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

36

Synthesis of (S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-2-(3-(N'-nitroguanidino)phenyl)acetic acid tert-butyl ester (Fig.14 Example 3).

A mixture of (S)-2-(3-Aminophenyl)-2-tert-butoxycarbonylaminoacetic acid tert-butyl ester (2.6g), N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (2.2g) and Et₃N-AcOH/MeCN (1M, 8.0mL) in MeCN (50mL) was stirred at 50°C for 3days in an airtight container. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the crude product was purified by column chromatography (2:1 hexane:EtOAc and 15:1 CHCl₃:MeOH) to afford the titled compound (900mg). ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 9.90 (brs, 1H), 7.48-7.27 (m, 4H), 5.80 (d, J=6.4Hz, 1H), 5.19 (d, J=6.4Hz, 1H), 1.40 (s, 18H)

Synthesis of (S)-2-Amino-2-(3-(N'-nitroguanidino)phenyl)acetic acid hydrochloride (Fig.14 Example 4).

A mixture of (S)-2-tert-Butoxycarbonylamino-2-(3-(N'-nitroguanidino)phenyl)acetic acid tert-butyl ester (800mg) and H₂O (1mL) in HCl/dioxane (4M, 5mL) was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated in vacuo, dissolved in H₂O (5mL), passed through a 5mL solid-phase extractor (Waters ODS), and lyophilized to yield the titled compound (550mg). The obtained compound was dissolved in H₂O (5mL) and was applied to a chromatography column preapplied with 15mL DOWEX 50W X8 ion-exchange resin (Na⁺ form). The column was washed with water and rinsed with 2% aqueous ammonia to ensure complete elution of (S)-2-Amino-2-(3-(N'-nitroguanidino)phenyl)acetic acid. The ammonia eluent was lyophilized and the resulting residue was dissolved in H₂O (10mL) again. (-)-10-Camphorsulfonic acid (460mg) was added to the solution and was heated to 50°C. The homogeneous mixture was cooled to 4°C and was stood overnight at the same temperature. The mixture was filtered to remove precipitated solid, and the filtrate was applied to a chromatography column preapplied with 15mL DOWEX 50W X8 ion-exchange resin (Na⁺ form). The column was washed with water and rinsed with 2% aqueous ammonia to ensure complete elution of (S)-2-Amino-2-(3-(N'-nitroguanidino)phenyl)acetic acid. The ammonia eluent was lyophilized. 1M HCl (2mL) and H₂O (10mL) were added to the residue and the mixture was lyophilized to yield the titled compound (350mg, 98%ee). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ 10.15 (s, 1H), 8.86 (m, 3H), 8.41 (brs, 2H), 7.43-7.17 (m, 4H), 5.07 (m, 1H)

Results and discussion

The amino acid specificity of ATB^{B+} was studied by assessing the ability of a variety of amino acids including L-phenylglycine to compete with [³H]-glycine (60 nM) for the transport process mediated by the cloned transporter (table 4).

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

37

Table 4. Amino Acid Substrate Specificity of Mouse $ATB^{0/+}$

Unlabeled Amino Acid	mATB ^{0/+} -Specific [³ H]-Glycine Transport	
	pmol/10 ⁶ cells/15 min	%
Control	37.27 ± 1.20	100
Glycine	1.88 ± 0.06	5
Alanine	1.04 ± 0.05	3
Cysteine	1.11 ± 0.20	3
Serine	1.99 ± 0.09	5
Threonine	3.91 ± 0.30	11
Proline	9.97 ± 0.57	27
Histidine	1.31 ± 0.10	4
Glutamine	2.39 ± 0.18	6
Asparagine	3.25 ± 0.23	9
Leucine	0.27 ± 0.03	1
Isoleucine	0.27 ± 0.02	1
Phenylalanine	0.56 ± 0.03	2
Tryptophan	0.37 ± 0.06	1
Arginine	7.14 ± 0.35	19
Lysine	3.52 ± 0.28	9
Aspartate	32.01 ± 1.29	86
Glutamate	33.47 ± 0.91	90
MeAIB	36.21 ± 4.80	97
Phenylglycine	0.03 ± 0.02	0

Transport of [³H]-glycine (60 nM) was measured in vector-transfected HRPE cells and in mATB^{0/+}-cDNA-transfected HRPE cells at 37 °C for 15 min in the presence of NaCl (pH 7.5). Unlabeled amino acids were used at a concentration of 2.5 mM. cDNA-specific transport was calculated by subtracting the transport in vector-transfected cells from the transport in mATB^{0/+}-cDNA-transfected cells. Data (means ± SEM from four separate determinations) represent only cDNA-specific transport.

At a concentration of 2.5 mM, all zwitterionic and cationic amino acids tested inhibited the transport of [^3H]-glycine mediated by $\text{ATB}^{0,+}$ (70 to 99%). L-Phenylglycine inhibited the transport of [^3H]-glycine mediated by $\text{ATB}^{0,+}$ completely (100 %). This shows that L-phenylglycine has higher affinity against $\text{ATB}^{0,+}$ than all the essential amino acids.

To quantify the difference of affinity for $\text{ATB}^{0,+}$ between L-phenylglycine and essential amino acids, we compared the dose-response relationship for the inhibition of the transport of [^3H]-glycine mediated by $\text{ATB}^{0,+}$ with L-phenylglycine, L-alanine and L-phenylalanine (Fig. 12). The IC_{50} values (i.e. concentration of the amino acid causing 50 % inhibition) calculated from these studies are given in Table 5. These IC_{50} values are almost equal to K_i values (i.e. inhibition constant) under the experimental conditions because the concentration of [^3H]-glycine used in these competition is 57 nM, a value much lower than the known K_i values ($> 6 \mu\text{M}$) of $\text{ATB}^{0,+}$ for most amino acids. A comparison of these values indicates that the affinity of $\text{ATB}^{0,+}$ for L-phenylglycine is 19 times and 13 times higher than the corresponding affinities for glycine and phenylalanine, respectively.

On intestinal brush border membranes (BBM), at least three transporters are supposed to transport L-phenylglycine; $\text{ATB}^{0,+}$, ATB^0 and $\text{b}^{0,+}\text{AT}$. To prove that L-phenylglycine is the specific substrate for $\text{ATB}^{0,+}$ in intestinal BBM, we compared the dose-response relationship for the inhibition of the transport of [^3H]-alanine and [^3H]-glutamine mediated by ATB^0 and $\text{b}^{0,+}\text{AT}$, respectively, with L-phenylglycine, L-alanine and L-phenylalanine. Moreover, we calculated IC_{50} values from these results (table 5).

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

39

Table 5. Comparison of K_i values for the inhibition of transport mediated by mATB⁰⁺, hATB⁰ and mb⁰⁺ AT rBAT complex.

Amino Acid	K_i values		
	mATB ⁰⁺	hATB ⁰	mb ⁰⁺ AT rBAT complex
L-Phenylglycine	5.3 ± 0.4	19.0 ± 5.5	283.3 ± 84.4
L-Alanine	101.4 ± 14.2	22.5 ± 4.2	803.7 ± 142.5
L-Phenylalanine	68.6 ± 2.4	4229 ± 999	586.5 ± 215.4

Uptake measurement were made as described in Table 1, except that the inhibition was assessed over a range of concentrations of unlabeled amino acids. K_i values were calculated from the dose-response relationship for the inhibition of the uptake of 57 nM [³H]-glycine that was specific to mATB⁰⁺, 32 nM [³H]-Alanine that was specific to hATB⁰ and 36 nM [³H]-Arginine that was specific to the mb⁰⁺ AT rBAT complex.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

40

For L-phenylglycine, affinity of ATB^{0+} is 4 times and 53 times higher than the corresponding affinities of ATB^0 and $b^{0+}AT$, respectively.

These results show that L-phenylglycine interacts with the substrate-binding site of the cloned mouse ATB^{0+} with high affinity. However, these data suggest but do not prove that phenylglycine are transportable substrates for the transporter. It is possible that some compounds may block the transport by competing with glycine for binding to the substrate-binding site without itself being transported across the membrane. To determine whether or not these inhibitors are actually transportable substrates of the transporter, direct measurements of ATB^{0+} -mediated transport of these inhibitors have to be carried out. Towards this goal, we used [^{14}C]-L-phenylglycine as a substrate for ATB^{0+} and studied its transport in HRPE cells expressing the cloned transporter (Fig. 13). The transport of L-phenylglycine in ATB^{0+} -expressing cells was three times higher than in vector-transfected cells, demonstrating that L-phenylglycine is indeed a transportable substrate for this transporter. Moreover, cDNA-specific L-phenylglycine transport by ATB^{0+} was ten times higher than the cDNA-specific transport by ATB^0 and $mb^{0+}AT$.

Taken together, these results show that L-phenylglycine is the most specific substrate for ATB^{0+} among all we have tested. Phenylglycine-derivative drugs should be efficiently absorbed from intestine and delivered into the tissues expressing ATB^{0+} abundantly, such as, colon, lung and mammal gland.

Moreover, the present inventors have synthesized the (S)-(3-(2-nitroguanydyl)phenyl)glycine as an example of L-phenylglycine derivatives (Fig. 14). This compound is supposed to be effective as a NOS inhibitor, because it is also a derivative of L-NNA, a potent NOS inhibitor. The present inventors used the *X. laevis* oocyte expression system to study the transport of this compound. Transport of this compound was monitored by inward currents induced by this compound at the various concentrations (Fig. 15A). The present inventors also monitored the currents of L-NNA to compare the affinities of both compounds (Fig. 15B). The K_m values for (S)-(3-(2-nitroguanydyl)phenyl)glycine and L-NNA are 106 ± 1 and 348 ± 5 μM , respectively. These data show the modification of chemical structure of L-NNA to the phenylglycine derivative increases the transport affinity to ATB^{0+} . As the present inventors show in example 6, ATB^{0+} is inducible in inflammatory condition, similar to iNOS. Taken together, the L-phenylglycine derivative NOS inhibitor, such as (S)-(3-(2-nitroguanydyl)phenyl)glycine should be effective for inflammation of the tissues expressing ATB^{0+} abundantly, such as, colon, lung and mammal gland.

5. Evidence for the potential use of ATB^{0+} as a delivery system for amino acid-based prodrugs

Methods

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

41

Transport study

Methods are shown in table 6 and BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS (Fig. 16) briefly.

Synthesis of L-glutamate γ -ester of acyclovir

Acyclovir and ammonium acetate were purchased from Sigma (St. Louis, MO). N- α -CBZ-L-glutamic acid γ -benzyl ester (Z-Glu-OBzl) was purchased from Nova biochem (San Diego, CA). 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), palladium 10 wt. % on activated carbon (Pd/C), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), dimethylformamide (DMF), and dichloromethane (CH_2Cl_2) were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Methanol (MeOH), and HPLC grade acetonitrile were from EM science (Gibbstown, NJ). Ethanol (EtOH) was from AAPEER alcohol and chemical company (Shelbyville, KY). Acyclovir (0.888 mmol) and Z-Glu-OBzl (2.22 mmol) were dissolved in DMF (6 ml), and EDC (426 mmol) and DMAP (2.22 mmol) were added to the solution. The solution was stirred for 18 h at room temperature. DMF was removed *in vacuo*, and the residue was chromatographed on NH silica gel (Chromatorex DM-1020, Fuji Silysia Chemical LTD., Japan) using 1:10 to 1:5 MeOH- CH_2Cl_2 as the eluent to generate Acyclovir Z-Glu-OBzl γ ester.

Acyclovir Z-Glu-OBzl γ ester was dissolved in EtOH (1ml), MeOH (1ml), and CH_2Cl_2 (1ml), and added 10 % Pd/C (20mg). The mixture was stirred under hydrogen for 3 days. The mixture was filtered to remove the catalyst, and the solvent was removed *in vacuo*. The product was a white amorphous solid (120 mg). Overall yield: 38 %. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2.00 (2H, m, CH_2), 3.14-4.10 (7H, m, $3 \times \text{CH}_2 + \text{CH}$), 5.34 (2H, m, CH_2), 6.78 (2H, bs, NH_2), 7.97 (1H, s, aromatic-H), 7.39 (3H, bs), 10.96 (1H, bs, NH); ESI-MS m/z calcd. 555.1, found 555.0 (MH) $^+$.

The purity of the final product was confirmed by RP-HPLC using a Dionex analytical HPLC system (Dionex corporation, Sunnyvale, CA) with an analytical column (Cyclobond I 2000, 4.6 x 100 mm, Advanced Separation Technologies Inc., Whippany, NJ). The gradient for analytical RP-HPLC was as follows: (solvent A) 10 % 5 mM aqueous ammonium acetate in acetonitrile, (solvent B) 90 % 5 mM aqueous ammonium acetate in acetonitrile, 100:0 to 90:10 (solvent A : solvent B) over 3 min at 1 ml/min. Retention time was 1.42 min. with 96 % purity. The molecular weight of the compound was determined by ESI-MS (Finnigan Mat LC-Q, Finnigan Corporation, San Jose, CA). The values are expressed as MH $^+$.

Results and discussion

Since aspartate and glutamate are not substrates for ATB ^{0,4} but asparagine and glutamine are, the present inventors hypothesized that derivatives of aspartate and glutamate in which the

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

42

carboxyl group in their side chains is substituted with different chemical moieties will become substrates for the transporter. To test this hypothesis, the present inventors assessed the ability of several such derivatives to compete with glycine for transport via ATB^{0+} (Table 6). The present inventors found that the methyl and benzyl esters of aspartate and glutamate are potent inhibitors of glycine transport. At a concentration of 1 mM, these derivatives caused 80-100% inhibition, indicating that these derivatives are recognized by ATB^{0+} . The hydroxamate, anilide, and naphthylamide derivatives are also moderately effective competing with glycine for transport via ATB^{0+} . Fig. 16A describes the dose-response relationship for aspartate, asparagine, and the aspartate- β -benzyl ester and Fig. 16B describes the dose-response relationship for glutamate, glutamine, and glutamate- γ -benzyl ester. As expected, aspartate and glutamate are not effective inhibitors of ATB^{0+} -mediated glycine transport. However, the amide derivatives (asparagine and glutamine) and the benzyl ester derivatives are potent inhibitors. Interestingly, the benzyl ester of aspartate (IC_{50} value, $70 \pm 8 \mu M$) is about 2-fold more potent than the benzyl ester of glutamate (IC_{50} value, $156 \pm 12 \mu M$), suggesting that ATB^{0+} may interact with aspartate derivatives much better than with corresponding glutamate derivatives. Therefore, the present inventors speculate that if therapeutic drugs can be coupled to aspartate at the β -carboxyl group, the resultant derivatives may become excellent substrates for ATB^{0+} .

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

43

Table 6.

Compound (1 mM)	ATP ^{Na+} -specific glycine transport (% control)
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COO}- \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Aspartate	86±3
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Asparagine	22±0
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Aspartate β-methyl ester	8±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONHOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Aspartate β-hydroxamate	39±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Aspartate β-benzyl ester	2±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{O})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$ L-Aspartate β-(7-amido-4-methylcoumarin)	*92±5
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}(\text{COOCH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H} \end{array}$ NβL-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester	62±3

*0.25 mM

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

44

Compound (1 mM)	ATB ⁰⁺ -specific glycine transport (% control)
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ L-Glutamate	82±2
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ L-Glutamine	21±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COO}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ L-Glutamate γ-benzyl ester	13±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ DL-Glutamate γ-anilide	49±1
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ L-Glutamate γ-(α-naphthylamide)	97±2
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COO}^- \end{array}$ L-Glutamate γ-(β-naphthylamide)	*79±4

*0.25 mM

HRPE cells were transfected with either vector alone or mouse ATB⁰⁺ cDNA and the functional expression was carried out by the vaccinia virus technique. Transport of [³H] glycine (10 μM) was measured in the presence and absence of various derivatives of aspartate and glutamate (1 mM). Data represent only cDNA-specific transport. Results are given as % of control transport measured in the absence of inhibitors.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

45

The parent drugs of these prodrugs are not real drugs. The present inventors have synthesized the L-glutamate γ -ester of acyclovir, a commercially available drug for virus infection, to study the practicality of these ideas. To assess this study, the present inventors used the *X.laevis* oocyte expression system. Transport of this prodrug was monitored by inward currents induced by this prodrug at the various concentration (Fig.17). These data show the saturable transport of L-glutamate γ -ester of acyclovir by ATB^{0+} directly.

Moreover, the present inventors assessed the transport of L-valine α -ester of acyclovir (valacyclovir) to study the possibility of expansion of the substrate recognition of amino acid-based prodrugs. The present inventors studied [$8\text{-}^3\text{H}$]-valacyclovir transport in HRPE cells transfected with mouse ATB^{0+} cDNA (Fig. 18). As a result, the transport of [$8\text{-}^3\text{H}$]-valacyclovir in ATB^{0+} -expressing cells was three times higher than in vector-transfected cells, demonstrating that valacyclovir is indeed a transportable substrate for this transporter.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

46

6. Up-regulation of $ATB^{0/+}$ expression in the intestinal tract under inflammatory conditionsMethods

Methods are shown in BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS (Fig.19) briefly.

Results and discussion

Since D-serine is an important modulator of glutamatergic neurotransmission and other D-amino acids may also have significant biological effects, it is of clinical relevance to know if there are any pathological conditions in which the intestinal absorption of D-amino acids may be altered. Therefore, the present inventors assessed the expression of $ATB^{0/+}$ in the intestinal tract under inflammatory conditions that are known to affect intestinal function. The present inventors used two different animal models for this purpose. First, the present inventors used an animal model of sepsis in which sepsis was produced in mice by injection of bacterial lipopolysaccharide. This animal model has been used widely to study the influence of sepsis on intestinal morphology and function. Second, the present inventors used the interleukin-2 knockout mice as a model for colonic inflammation. $IL-2^{-/-}$ mice develop severe ulcerative colitis within five to six weeks after birth. In the first model, mice injected with saline served as the control. In the second model, $IL-2^{+/+}$ mice served as the control. The steady-state levels of $ATB^{0/+}$ mRNA were examined by a semi-quantitative RT-PCR in the jejunum, ileum, and colon. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as an internal control for the bacterial sepsis model. This mRNA was not unsuitable however as an internal control for the ulcerative colitis model because GAPDH mRNA was elevated several-fold in $IL-2^{-/-}$ mice compared to $IL-2^{+/+}$ mice. Therefore, the present inventors used cyclophilin C mRNA as an internal control for this animal model. After adjusting for the respective internal control, $ATB^{0/+}$ mRNA was found to be increased 7-fold in the ileum and 2-fold in the colon in lipopolysaccharide-treated mice compared to saline-treated mice (Fig. 19). Similarly, the $ATB^{0/+}$ mRNA levels increased 12-fold in the ileum and 5-fold in the colon in $IL-2^{-/-}$ mice compared to $IL-2^{+/+}$ mice (Fig. 19). These data show that inflammatory conditions lead to a marked increase in the expression of $ATB^{0/+}$ in the ileum and colon. $ATB^{0/+}$ mRNA was not detectable in the jejunum in any of the mice. The present inventors speculate that the intestinal absorption of bacteria-derived D-serine and other D-amino acids may be increased significantly under these inflammatory conditions.

7. Up-regulation of $ATB^{0/+}$ expression in the tumor tissues

The present inventors assessed the expression of $ATB^{0/+}$ in the tumor tissues. The present inventors used the mRNA from the mammary gland tumors of 105-day old FvB wild type polyoma

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

47

Middle T antigen female mice and corresponding mammary gland from the control mice. The tumor mRNA samples were collected from two mice. The control mammary glands were collected from three mice and pooled for RNA preparation, because their mammary glands were too small to prepare mRNA for each mouse. The steady-state levels of ATB^{b+} mRNA were examined by a semi-quantitative RT-PCR in the mammary gland tumor and the corresponding control (Fig. 20). ATB^{b+} was not detected in control mammary gland, while in both tumor samples ATB^{b+} was detected by RT-PCR. The present inventors quantified the induction level of ATB^{b+} in tumor by semi-quantitative RT-PCR with southern blot. ATB^{b+} increased approximately 58 times and 88 times. The present inventors also quantified the induction level of iNOS. iNOS also increased approximately 33 times and 134 times in both tumor samples. It is well known that many tumors have higher expression of iNOS, and iNOS may be playing an important role in oncogenesis and tumor growth (Jaiswal, M. et al., Am. J. Physiol., 281, G626-G634, (2001), Thomsen, L.L. et al., Cancer Research, 57: 3300-3304, (1997)). The present inventors also found the higher expression of ATB^{b+} in a human breast cancer cell line, MCF-7, and a human hepatocarcinoma cell line, Hep-G2.

Industrial Applicability

The present invention has revealed the compounds transportable by ATB^{b+} . Based on the information about these compounds, drugs transportable by ATB^{b+} may be designed, produced and screened. Such drugs may serve to treat and/or prevent the diseases in which NOS, phenylglycine, carnitine, D-amino acids and so forth are involved. The ATB^{b+} gene may be administered to patients to be used for gene therapy of the diseases as described above.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

48

CLAIMS

1. A method for screening for a drug or prodrug having ability to be transported by ATB^{0+} , comprising the steps of:
 - (a) selecting compounds having the ability to be transported by ATB^{0+} ;
 - (b) relating the selected compounds to a disease that can be treated and/or prevented with said compounds; and
 - (c) selecting a compound that is related to a disease in step (b).
2. The method according to claim 1, wherein said compound having the ability to be transported by ATB^{0+} is an NOS inhibitor, phenylglycine, carnitine or a D-amino acid, or a derivative thereof, and an amino acid-based prodrug.
3. A method for designing a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} , wherein said method is provided for designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and an amino acid-based prodrug.
4. A method for producing a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} , comprising the steps of:
 - (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs; and
 - (b) synthesizing the designed compound.
5. The method according to claim 4, further comprising the step of determining whether the synthesized compound has the ability to be transported by ATB^{0+} to select a compound to be transported.
6. A method for producing a drug containing, as an active ingredient, a compound with the ability to be transported by ATB^{0+} , wherein said method comprises the steps of:
 - (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs;
 - (b) synthesizing the designed compound; and
 - (c) determining whether the synthesized compound has the ability to be transported by ATB^{0+} and selecting a compound to be transported.
7. A method for producing a drug having, as an active ingredient, a compound with the ability to be transported by ATB^{0+} , wherein said method comprises the steps of:
 - (a) designing a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs;
 - (b) synthesizing the designed compound; and

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

49

(c) relating the synthesized compound to a disease that can be treated and/or prevented with said compound.

8. A method for transport of a compound mediated by ATB^{0+} , wherein said compound is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs.

9. A method for transport of a compound mediated by ATB^{0+} , wherein said compound is selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, and amino acid-based prodrugs, wherein said compound is labeled with a radioactive substance or conjugated with toxin.

10. The method according to any one of claim 2 to 9, wherein said NOS inhibitor is a derivative of arginine, lysine, citrulline and ornithine.

11. A therapeutic drug for a disease that can be treated and/or prevented with a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, wherein said therapeutic drug comprises the ATB^{0+} gene as an active ingredient.

12. A gene therapy for a disease that can be treated and/or prevented with a compound selected from a group consisting of NOS inhibitors, phenylglycine, carnitine and D-amino acids, and derivatives thereof, wherein said method comprises the step of administering the ATB^{0+} gene.

13. A therapeutic drug for cancer, comprising a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} as an active ingredient.

14. The therapeutic drug according to claim 13, wherein said cancer is iNOS expressed cancer.

15. The therapeutic drug according to claim 13, wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer.

16. The therapeutic drug according to claim 13, wherein said compound is a NOS inhibitor.

17. A method for treating cancer, comprising the step of administering a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} .

18. The method according to claim 17, wherein said cancer is iNOS expressed cancer.

19. The method according to claim 17, wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer.

20. The method according to claim 17, wherein said compound is a NOS inhibitor.

21. Use of a compound having the ability to be transported by ATB^{0+} for producing a therapeutic drug for cancer.

22. The use according to claim 21, wherein said cancer is iNOS expressed cancer.

23. The use according to claim 21, wherein said cancer is breast cancer or hepatic cancer.

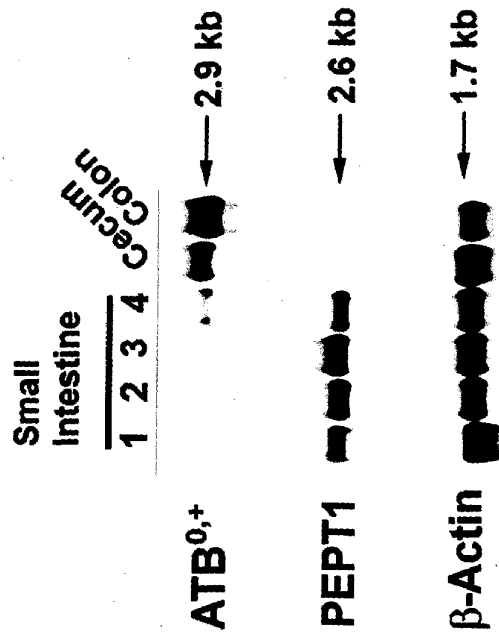
24. The use according to claim 21, wherein said compound is a NOS inhibitor.

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

1/20

Fig. 1

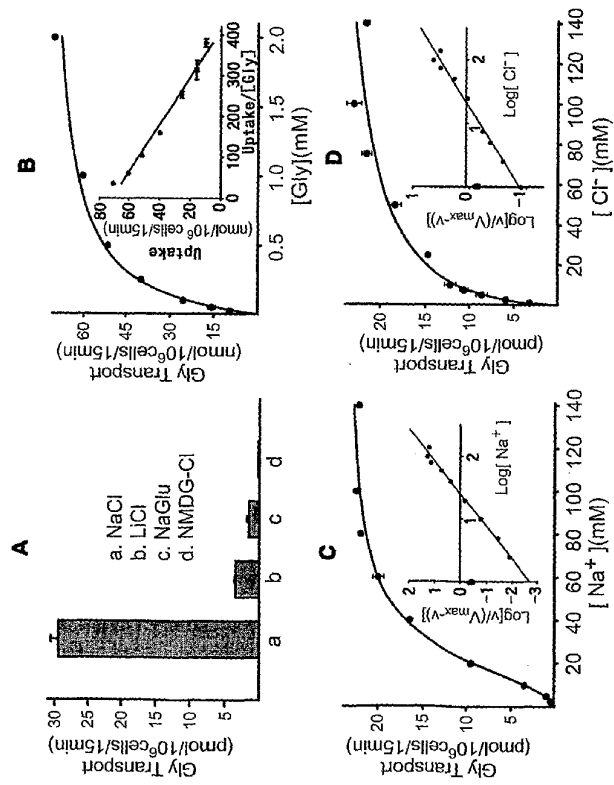


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

2/20

Fig. 2



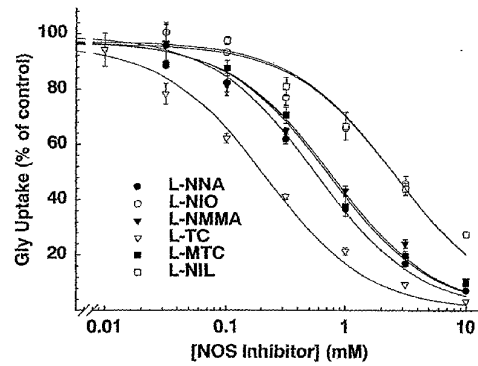
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

3/20

Fig. 3

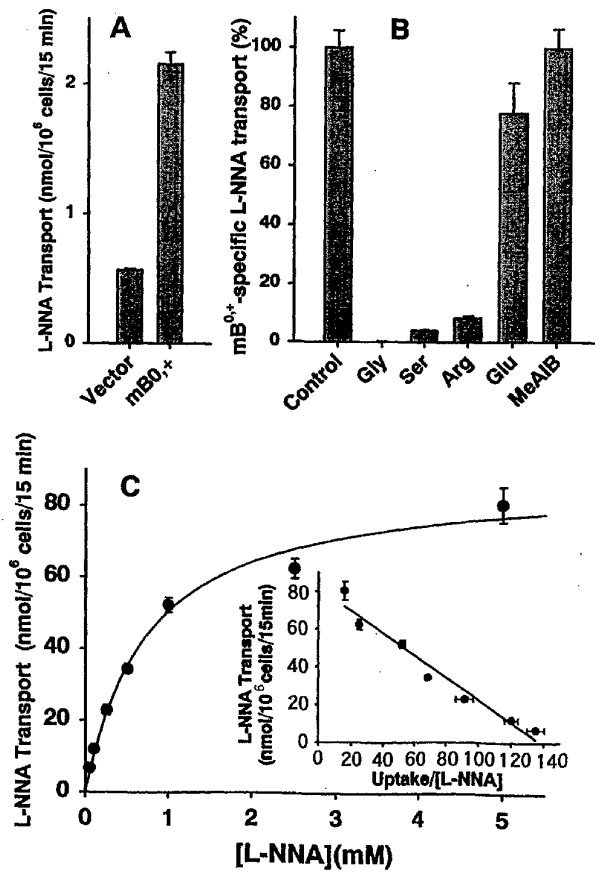


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

4/20

Fig. 4

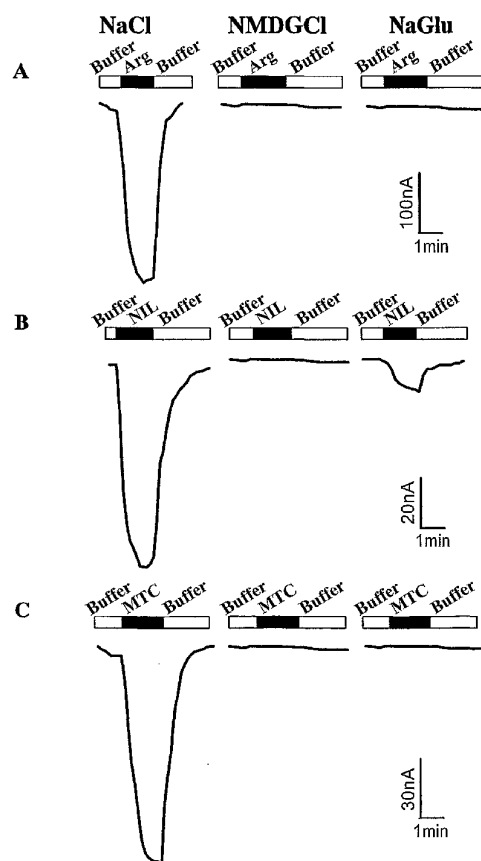


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

5/20

Fig. 5



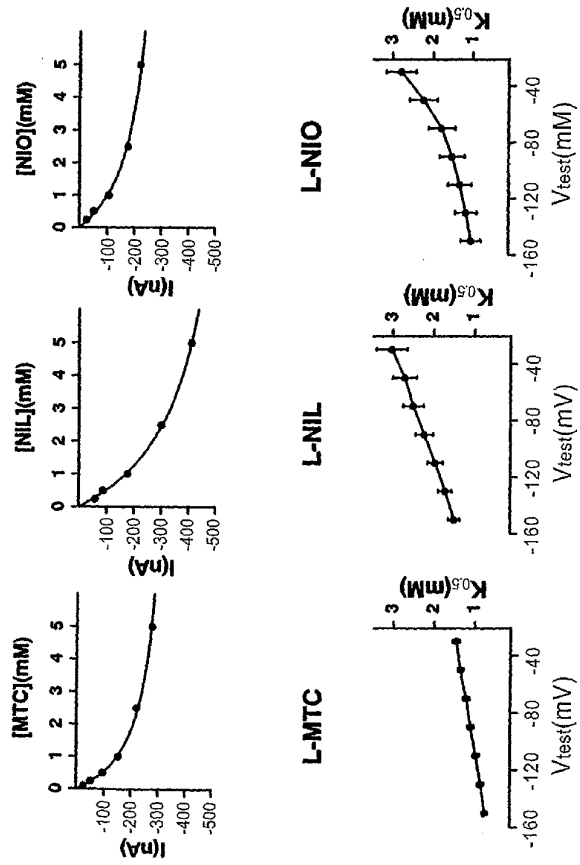
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

6 / 20

Fig. 6



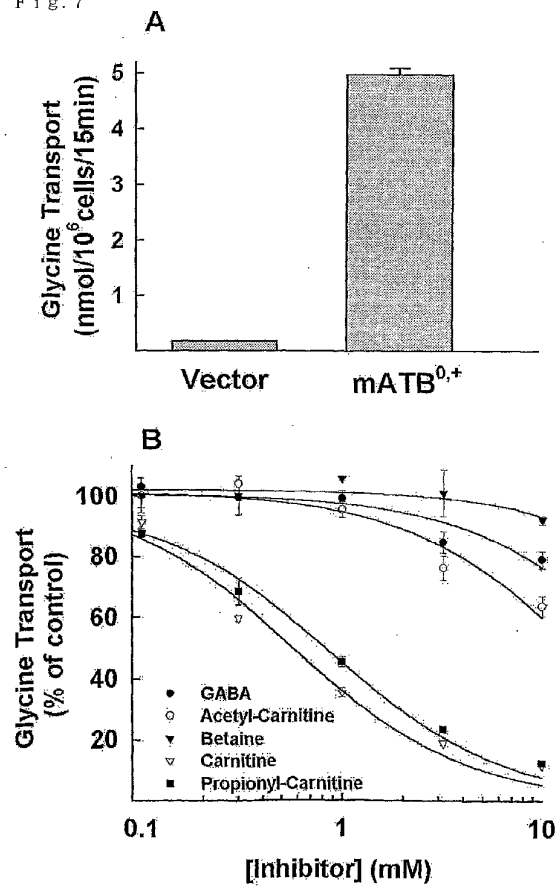
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

7/20

Fig. 7

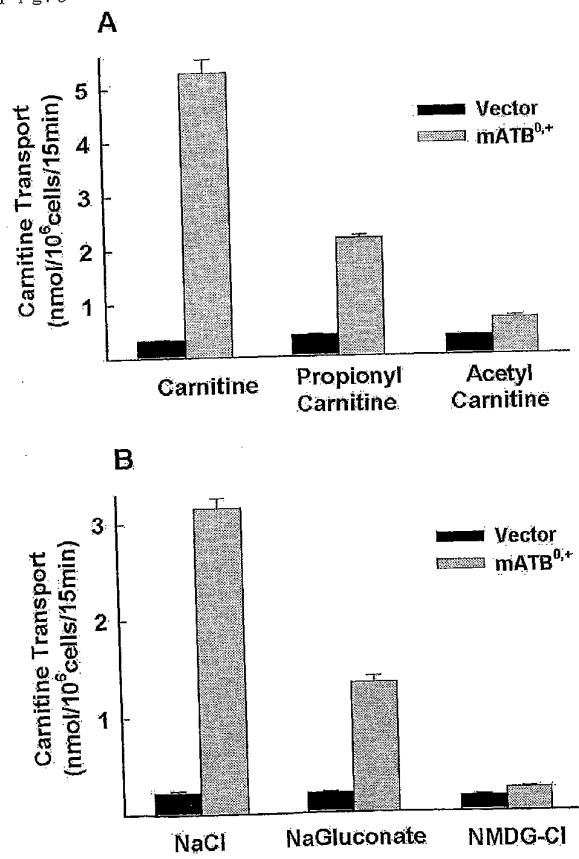


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

8/20

Fig. 8

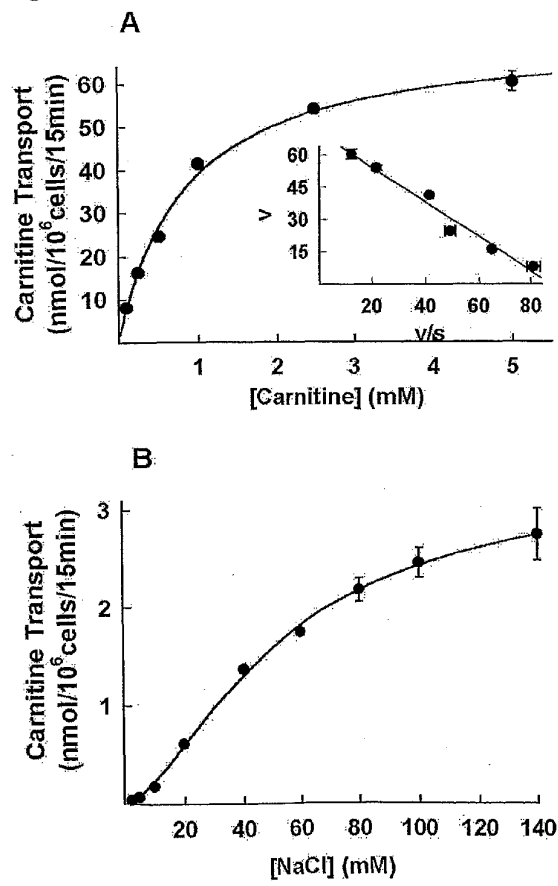


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

9/20

Fig. 9

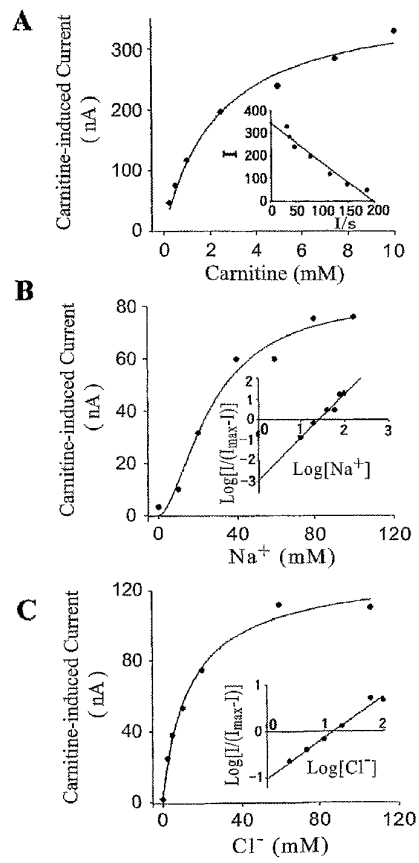


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

10/20

Fig. 10



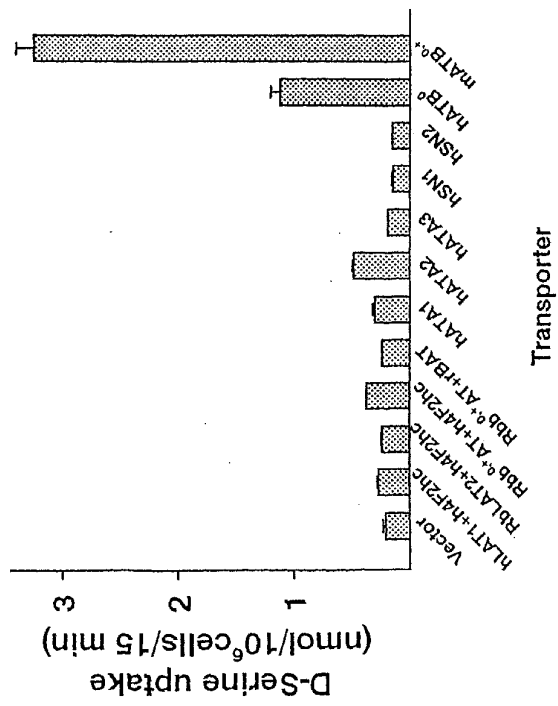
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/083060

PCT/JP02/03678

11/20

Fig. 11

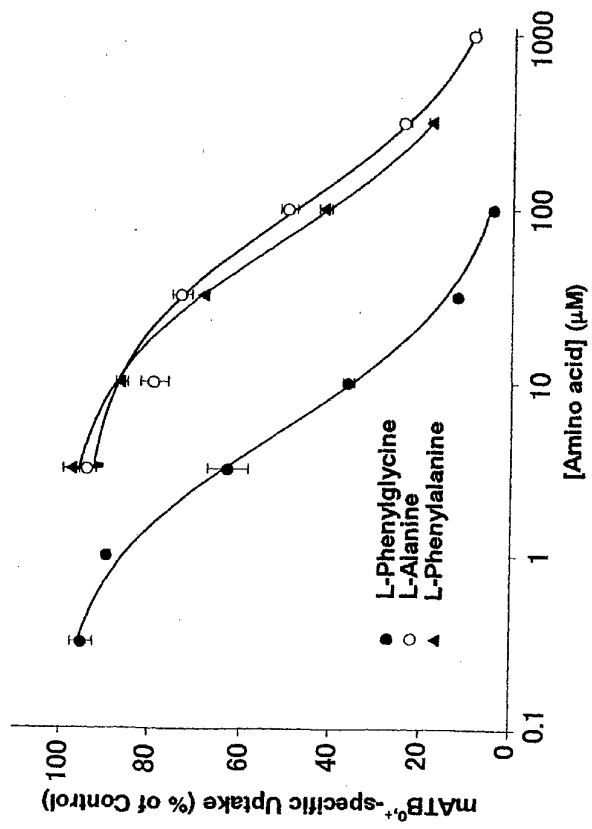


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

12/20

Fig. 12



WO 02/083060

PCT/JP02/03678

13/20

Fig. 13

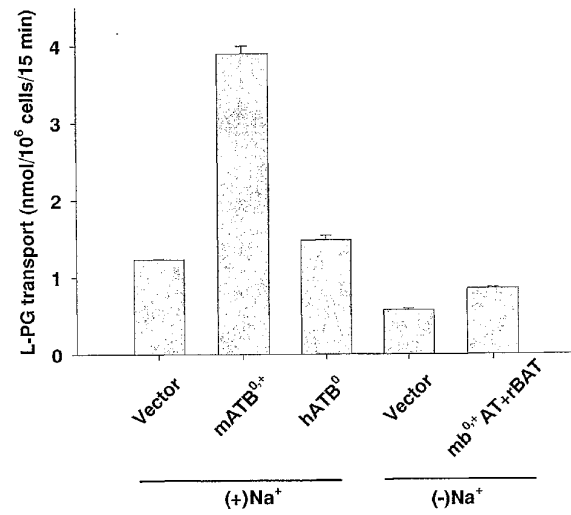
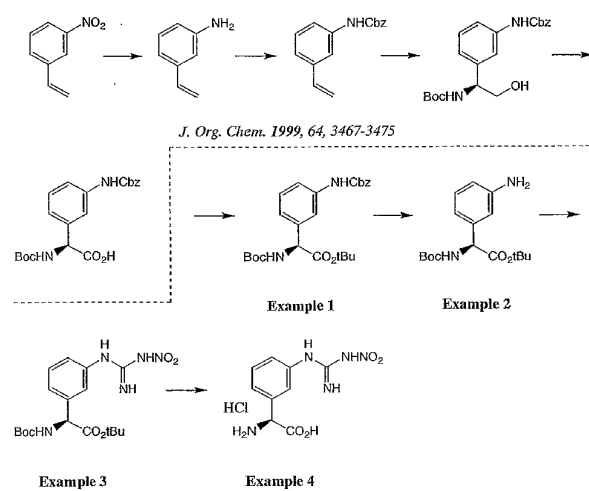


Fig. 14

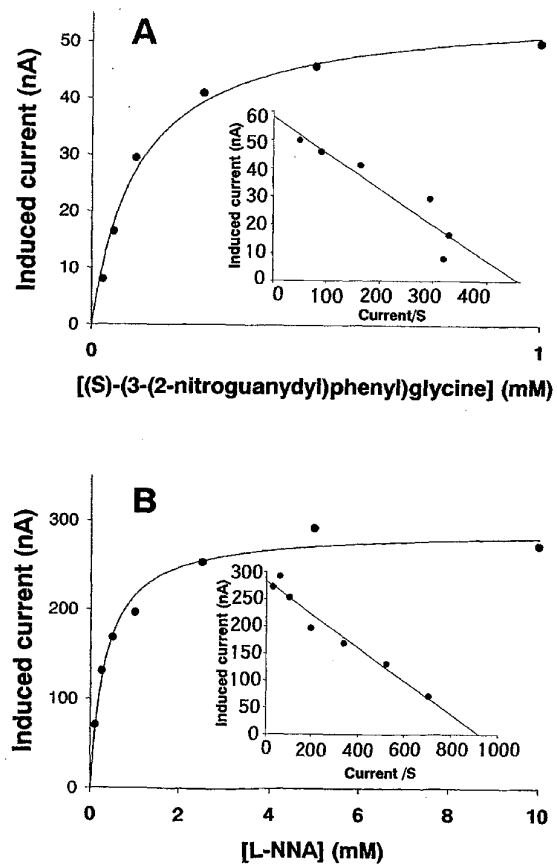


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

15/20

Fig. 15

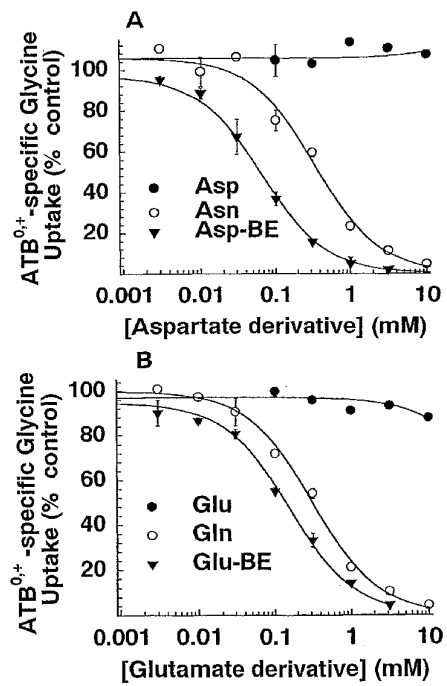


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

16/20

Fig. 16

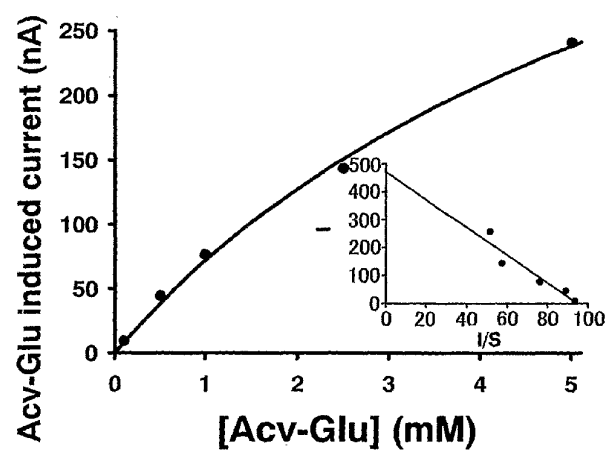


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

17/20

Fig. 17

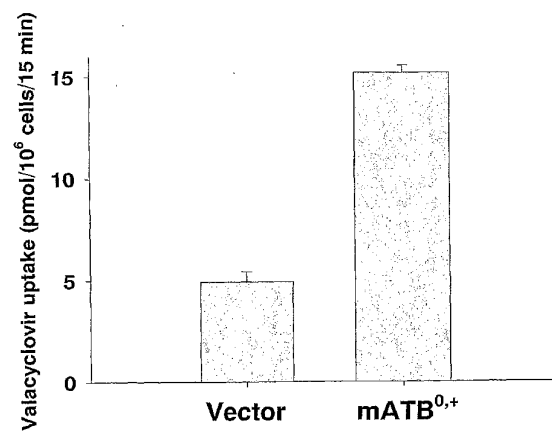


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

18/20

Fig. 18

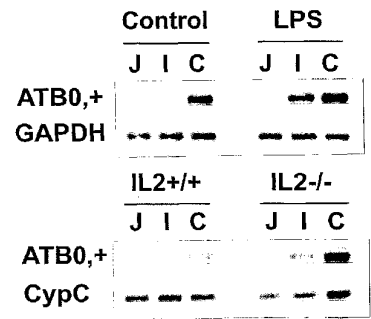


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

19/20

Fig. 19

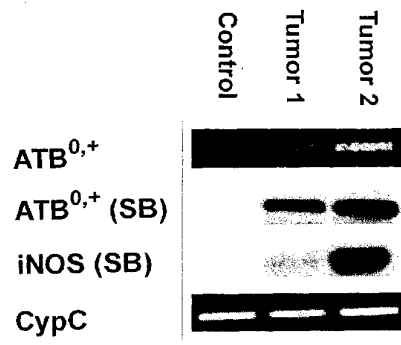


WO 02/083060

PCT/JP02/03678

20/20

Fig. 20



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083060 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, 33/50, A61K 38/17, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/JP02/03678
- (22) International Filing Date: 12 April 2002 (12.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/283,325 13 April 2001 (13.04.2001) US
60/306,168 19 July 2001 (19.07.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE, INC. [US/US]; C/J-2211, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30912-4810 (US). CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA [JP/JP]; 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 (JP).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): GANAPATHY, Vadivel [US/US]; 3810 Shoal Creek Court, Martinez, GA 30907 (US). HATANAKA, Takahiro [JP/JP]; c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 (JP).
- (74) Agents: SHIMIZU, Hatsushi et al.; Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 (JP).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 10 July 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/083060 A3

(54) Title: USE OF AMINO ACID TRANSPORTER ATB⁶⁺ AS A DELIVERY SYSTEM FOR DRUGS AND PRODRUGS

(57) Abstract: The present invention has revealed the compounds transportable by ATB⁶⁺. Based on the information about these compounds, drugs transportable by ATB⁶⁺ may be designed, produced and screened. Such drugs may serve to treat and/or prevent the diseases in which NOS, phenylglycine, carnitine, D-amino NOS, phenylglycine, carnitine. The ATB⁶⁺ gene may be administered to patients to be used for gene therapy of the diseases as described above.

【手続補正書】

【提出日】平成15年6月12日(2003.6.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する薬物またはプロドラッグのスクリーニング方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を選択する段階；

(b)選択された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階；ならびに

(c)段階(b)により疾患と関連づけられた化合物を選択する段階。

【請求項2】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンもしくはD-アミノ酸、または、それらの誘導体、およびアミノ酸に基づくプロドラッグである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物のデザイン方法であって、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸ならびにそれらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物をデザインすることを提供する方法。

【請求項4】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物をデザインする段階；ならびに

(b)デザインされた化合物を合成する段階。

【請求項5】

合成された化合物がATB^{0,+}による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物をデザインする段階；

(b)デザインされた化合物を合成する段階；ならびに

(c)合成された化合物がATB^{0,+}による被輸送能を有するか否かを判定し、輸送される化合物を選択する段階。

【請求項7】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、薬物の製造方法であって、以下の段階を含む方法：

(a)NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物をデザインする段階；

(b)デザインされた化合物を合成する段階；ならびに

(c)合成された化合物と、該化合物が治療および/または予防し得る疾患とを関連づける段階。

【請求項 8】

ATB^{0,+}を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物である方法。

【請求項 9】

ATB^{0,+}を介して化合物を輸送する方法であって、該化合物がNOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体、ならびにアミノ酸に基づくプロドラッグからなる群より選択される化合物であり、該化合物が放射性物質で標識されたまたはトキシシン付加された、方法。

【請求項 10】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、および、オルニチンの誘導体である、請求項2から9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項2から9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

ATB^{0,+}遺伝子を有効成分として含有する、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の治療薬。

【請求項 13】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項12記載の治療薬。

【請求項 14】

ATB^{0,+}遺伝子を投与する段階を含む、NOS阻害剤、フェニルグリシン、カルニチンおよびD-アミノ酸、ならびに、それらの誘導体からなる群より選択される化合物により治療および/または予防しうる疾患の遺伝子治療。

【請求項 15】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項14記載の遺伝子治療。

【請求項 16】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、癌治療薬。

【請求項 17】

癌がiNOS発現性癌である、請求項16記載の治療薬。

【請求項 18】

癌が乳癌または肝癌である、請求項16記載の治療薬。

【請求項 19】

化合物がNOS阻害剤である、請求項16記載の治療薬。

【請求項 20】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項19記載の治療薬。

【請求項 21】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項20記載の治療薬。

【請求項 22】

ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物を投与する段階を含む、癌を治療する方法。

【請求項 23】

癌がiNOS発現性癌である、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

癌が乳癌または肝癌である、請求項22記載の方法。

【請求項 25】

化合物がNOS阻害剤である、請求項22記載の方法。

【請求項26】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

癌治療薬の製造のための、 $ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物の使用。

【請求項29】

癌がiNOS発現性癌である、請求項28記載の使用。

【請求項30】

癌が乳癌または肝癌である、請求項28記載の使用。

【請求項31】

化合物がNOS阻害剤である、請求項28記載の使用。

【請求項32】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項31記載の方法。

【請求項33】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項32記載の方法。

【請求項34】

$ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を有効成分として含有する、炎症治療薬。

【請求項35】

炎症が敗血症である、請求項34記載の治療薬。

【請求項36】

炎症が炎症性腸疾患である、請求項34記載の治療薬。

【請求項37】

化合物がNOS阻害剤である、請求項34記載の治療薬。

【請求項38】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項37記載の治療薬。

【請求項39】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項38記載の治療薬。

【請求項40】

$ATB^{0,+}$ による被輸送能を有する化合物を投与する段階を含む、炎症治療方法。

【請求項41】

炎症が敗血症である、請求項40記載の方法。

【請求項42】

炎症が炎症性腸疾患である、請求項40記載の方法。

【請求項43】

化合物がNOS阻害剤である、請求項40記載の方法。

【請求項44】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項43記載の方法。

【請求項45】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項44記載の方法。

【請求項46】

炎症治療薬の製造のための、ATB^{0,+}による被輸送能を有する化合物の使用。

【請求項 47】

炎症が敗血症である、請求項46記載の使用。

【請求項 48】

炎症が炎症性腸疾患である、請求項46記載の使用。

【請求項 49】

化合物がNOS阻害剤である、請求項46記載の使用。

【請求項 50】

NOS阻害剤が、アルギニン、リジン、シトルリン、オルニチン、およびフェニルグリシンの誘導体である、請求項49記載の方法。

【請求項 51】

フェニルグリシン誘導体が、(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸である、請求項50記載の方法。

【請求項 52】

(S)-2-tert-ブトキシカルボニルアミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸tert-ブチルエステル。

【請求項 53】

(S)-2-アミノ-2-(3-(N'-ニトログアニジノ)フェニル)酢酸。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No PCT/JP 02/03678
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/50 A61K38/17 A61P35/00		
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) IPC 7 G01N A61K		
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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANAPATHY VADIVEL ET AL: "Na ⁺ and Cl ⁻ -coupled transport of carnitine by the amino acid transporter ATB0,+" FASEB JOURNAL, vol. 15, no. 4, 7 March 2001 (2001-03-07), page A435 XP009008012 Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology on Experimental Biology 2001; Orlando, Florida, USA; March 31-April 04, 2001 ISSN: 0892-6638 the whole document --- -/--	1-24
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *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 **I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2003		Date of mailing of the international search report 04/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstrasse 2 NL-2200 RB The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Thumb, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 02/03678

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	NAKANISHI TAKEO ET AL: "Na ⁺ and Cl ⁻ -coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB0 ⁺ from mouse colon expressed in HRPE cells and Xenopus oocytes." JOURNAL OF PHYSIOLOGY (CAMBRIDGE), vol. 532, no. 2, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 297-304, XP002235441 ISSN: 0022-3751 the whole document	1-24
A	OHASHI RIKIYA ET AL: "Na ⁺ -dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): Its pharmacological and toxicological relevance." JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 291, no. 2, November 1999 (1999-11), pages 778-784, XP002235442 ISSN: 0022-3565 abstract	1-24
X	HATANAKA TAKAHIRO ET AL: "Transport of NG-nitro-L-arginine across intestinal brush border membranes by Na ⁺ -dependent and Na ⁺ -independent amino acid transporters." PHARMACEUTICAL RESEARCH (NEW YORK), vol. 16, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 1770-1774, XP009007970 ISSN: 0724-8741 abstract page 1771, column 2, paragraph 3 -page 1773, column 2, paragraph 2 page 1774, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 1	1-24
P,X	HATANAKA TAKAHIRO ET AL: "Na ⁺ and Cl ⁻ -coupled active transport of nitric oxide synthase inhibitors via amino acid transport system BO ⁺ ." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 107, no. 8, 15 April 2001 (2001-04-15), pages 1035-1043, XP002235443 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 02/03678

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLOSS ELLEN I ET AL: "Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carriers hCAT-2B." NITRIC OXIDE, vol. 1, no. 1, February 1997 (1997-02), pages 65-73, XP002235444 ISSN: 1089-8603 the whole document	1-24
A	HOWARD D P J ET AL: "L-arginine effects on Na+ transport in M-1 mouse cortical collecting duct cells: A cationic amino acid absorbing epithelium." JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY, vol. 180, no. 2, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 111-121, XP002235445 ISSN: 0022-2631 abstract	1-24
P,X	HATANAKA TAKAHIRO ET AL: "A study of the substrate specificity of Na+-dependent and Na+-independent neutral amino acid transport systems in dog intestinal brush-border membrane vesicles using L-alanine analogues." JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY, vol. 54, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 549-554, XP009008016 April, 2002 ISSN: 0022-3573 the whole document	1-24
P,X	HATANAKA TAKAHIRO ET AL: "Transport of D-serine via the amino acid transporter AT80+ expressed in the colon." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 291, no. 2, 22 February 2002 (2002-02-22), pages 291-295, XP002235446 February 22, 2002 ISSN: 0006-291X the whole document	1-24
	-/-	

Form PCT/ISA/E10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No.

PCT/JP 02/03678

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKASAMA YOSHIKI ET AL: "Identification and characterization of a Na ⁺ -independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 13, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 9690-9698, XP002235447 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-24
A	RAJAN D P ET AL: "Cloning and functional characterization of a Na ⁺ -independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1463, no. 1, 15 January 2000 (2000-01-15), pages 6-14, XP004273120 ISSN: 0005-2736 the whole document	1-24
A	SLOAN J L ET AL: "CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A HUMAN NA ⁺ AND CL ⁻ -DEPENDENT NEUTRAL AND CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER BO ⁺ " JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 34, 20 August 1999 (1999-08-20), pages 23740-23745, XP000863071 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP 02/03678
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 12, 17-20 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2.	☒ Claims Nos.: 1, 2, 7-10, 13-24 (all partially); 3, 4 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional 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.:	
Remarks on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/JP 02 03678

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 12 and 17-20 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 12, 17-20

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 2, 7-10, 13-24 (all partially), 3, 4

Claims 1, 2 and 7 relate to a method for screening for a drug or a method for producing a drug having the ability to be transported by ATB0,+, comprising the step of relating the selected compound to a disease that can be treated and/or prevented with said compound. Said definition is completely unclear within the meaning of Article 6 PCT and can be only seen as being an invitation to perform research. Identifying a disease which can be cured by a compound identified in a screening assay does in no way represent any routine practice which can be performed by a skilled artisan without undue burden.

Claims 8-10 refer to a "method for transport", without defining any technical features of the method or giving any hint on the applicability of said method. The claims are thus unclear within the meaning of Article 6 PCT.

Claims 17-20 refer to a method for treating cancer comprising the step of administering a compound having the ability to be transported by ATB0,+. Present claims 17-20 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds defined as being NOS inhibitors.

Present claims 13-16 and 21-24 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the

International Application No. PCT/JP 02 03678

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

compounds/products/apparatus/methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds listed in table 2, to carnitine, to phenylglycine, and to the D-enantiomers of alanine, serine, methionine, leucine and tryptophan.

Claims 3 and 4 refer to a method for designing a compound having the ability to be transported by ATB0,+ without giving any technical features as to how said compounds are designed. The complete lack of technical features renders claim 3 so unclear within the meaning of Article 6 PCT that no search can be performed.

Due to the multiple objections under Articles 5 and 6 PCT, the search has been limited to the underlying principle of the application, namely the identification of further substrates for the amino acid transporter B<0,+>, except where stated otherwise in the preceeding paragraphs.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/JP 02 03678

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-24 (part)

Methods for drug screening, production/identification of compounds, and use of compounds identified by such methods, wherein said methods are based on the transport of NOS inhibitors by ATB0,+

2. Claims: 1-24 (part)

Methods for drug screening, production/identification of compounds, and use of compounds identified by such methods, wherein said methods are based on the transport of phenylglycine by ATB0,+

3. Claims: 1-24 (part)

Methods for drug screening, production/identification of compounds, and use of compounds identified by such methods, wherein said methods are based on the transport of carnitine by ATB0,+

4. Claims: 1-24 (part)

Methods for drug screening, production/identification of compounds, and use of compounds identified by such methods, wherein said methods are based on the transport of D-amino acids by ATB0,+

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/04	4 C 2 0 6
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 2 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 ギャナパシー バディベル

アメリカ合衆国 ジョージア州 マーチネス ショール クリーク コート 3 8 1 0

(72)発明者 畠中 貴弘

静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA40 BB50 BB51 CB01 DA14 DA35 FB02 FB05 FB06
 FB08 GC20
 4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 HA17
 4B063 QA18 QQ80 QR80 QX07
 4C076 AA95 BB11 CC03 CC16 CC26 CC27 CC41 CC42 EE41 EE59
 FF68
 4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA25 AA27 BA31 BA41 BA42 BA44
 DC50 NA05 NA10 NA11 NA13 NA14 NA15 ZA681 ZB111 ZB211
 ZB212 ZB261 ZC411
 4C206 AA01 AA02 FA53 FA59 MA01 MA02 MA04 NA05 NA10 NA11
 NA13 NA14 NA15 ZA68 ZB11 ZB21 ZB26 ZC41