(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4054057号
(P4054057)
(45)発行日　平成20年2月27日(2008.2.27)　(24)登録日　平成19年12月14日(2007.12.14)

(51)Int.Cl.　F I
C07D 473/18 (2006.01)　C07D 473/18
C07H 19/167 (2006.01)　C07H 19/167
A61K 31/522 (2006.01)　A61K 31/522
A61K 31/708 (2006.01)　A61K 31/708
A61P 35/00 (2006.01)　A61P 35/00

請求項の数 25　(全 46 頁)　最終頁に続く

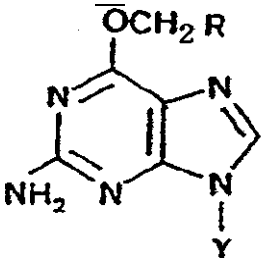
(21)出願番号　特願平7-501543
(86)(22)出願日　平成6年6月8日(1994.6.8)
(65)公表番号　特表平8-511773
(43)公表日　平成8年12月10日(1996.12.10)
(86)国際出願番号　PCT/IE1994/000031
(87)国際公開番号　WO1994/029312
(87)国際公開日　平成6年12月22日(1994.12.22)
審査請求日　平成13年6月5日(2001.6.5)
(31)優先権主張番号　930432
(32)優先日　平成5年6月8日(1993.6.8)
(33)優先権主張国　アイルランド(IE)
(31)優先権主張番号　9410421.3
(32)優先日　平成6年5月23日(1994.5.23)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者
キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド
イギリス国ロンドン　ダブリューシー２エイ・３エヌエル，サージニア・ストリート，サージニア・ハウス
(74)代理人
弁理士　社本　一夫
(74)代理人
弁理士　今井　庄亮
(74)代理人
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人
弁理士　栗田　忠彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｏ▲上６▼－置換グアニン誘導体、それらの製造方法および腫瘍細胞の処置におけるそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式ＩのＯ^{6}－アルキルグアニン誘導体：



(I)

［式中、
ＹはＨ、リボシル、またはデオキシリボシルであり；
Ｒは
（ｉ）ＯもしくはＳから選ばれる少なくとも１個の異種原子を有する５員複素環であって、該５員複素環は、
１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''（ここでＲ”はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－ＣＯＯＲ^{5}（ここでＲ^{5}はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよく、あるいは
ベンゼン環またはＯもしくはＳから選ばれる少なくとも１個の異種原子を有する複素環と

縮合していてもよく、該ベンゼン環または複素環は、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよい；または
（ii）１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよいナフチルである］
またはその薬剤学的に受容しうる塩。

【請求項２】
Ｒが
（ａ）５員複素環、または
（ｂ）そのベンゾ誘導体であり、O^6－アルキルグアニン部分が複素環またはベンゼン環のいずれかにおいてＲに結合しているもの、
であって、該５員複素環（ａ）またはベンゾ誘導体（ｂ）の該複素環またはベンゼン環は、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよい、請求項１に記載の化合物。

【請求項３】
Ｒが、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよい、少なくとも１個のＳ原子を含む複素環である、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項４】
Ｒが、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよい、少なくとも１個のＯ原子を含む複素環である、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項５】
Ｒが、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよいチオフェン環である、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項６】
Ｒが、ハロで置換されているチオフェン環である、請求項５に記載の化合物。

【請求項７】
ハロが、ヨード、ブロモ、クロロ、またはフルオロである、請求項６に記載の化合物。

【請求項８】
Ｒが、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR''''（ここでR''''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－$COOR^5$（ここでR^5はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよいフラン環である、請求項１または２に記載の化合物。

【請求項９】

Rが（ｉ）および（ｉｉ）の場合において、複素環およびベンゼン環のうちの少なくとも１つが、ハロ、C_{1-20}ハロアルキル、シアノ、SO_nR''（ここでR''はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、または－ＣＯＯＲ^5（ここでR^{5}はC_{1-20}アルキルである）で置換されている、請求項１に記載の化合物。

【請求項１０】

Rが（ｉ）および（ｉｉ）の場合において、少なくとも１つの複素環が、ハロ、シアノ、または－ＣＯＯＲ^5（ここでR^{5}はC_{1-20}アルキルである）により置換されている、請求項１に記載の化合物。

【請求項１１】

チオフェン環がハロもしくはシアノ基で置換されていてもよいＯ^6－テニルグアニンである、請求項１に記載の化合物。

【請求項１２】

チオフェン環がハロ基で置換されたＯ^6－テニルグアニンである、請求項１１に記載の化合物。

【請求項１３】

チオフェン環がブロモで置換されたＯ^6－テニルグアニンである、請求項１２に記載の化合物。

【請求項１４】

化合物がＯ^6－（５－ブロモテニル）グアニンである、請求項１に記載の化合物。

【請求項１５】

化合物が以下から選択される、請求項１に記載の化合物。

Ｏ^6－（３－チエニルメチル）グアニン；
Ｏ^6－ピペロニルグアニン；
Ｏ^6－フルフリルグアニン；
Ｏ^6－（３－フリルメチル）グアニン；
Ｏ^6－（２－ベンゾ［ｂ］チエニルメチル）グアニン；
Ｏ^6－（２－ベンゾフラニルメチル）グアニン；
Ｏ^6－（５－チアゾリルメチル）グアニン；
Ｏ^6－（５－メトキシカルボニルフルフリル）グアニン；
Ｏ^6－（５－シアノフルフリル）グアニン；
Ｏ^6－（２－ベンゾ［ｂ］チエニルメチル）グアノシン；および
Ｏ^6－（２－ナフチルメチル）グアニン。

【請求項１６】

宿主におけるＯ^6－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキルトランスフェラーゼ活性を枯渇させるための、請求項１～１５のいずれか１項に記載の化合物。

【請求項１７】

請求項１～１５のいずれか１項に記載の化合物および薬剤学的に受容しうる賦形剤を含む、腫瘍細胞の増殖を阻害するための薬剤組成物。

【請求項１８】

さらにアルキル化剤を含む、請求項１７に記載の薬剤組成物。

【請求項１９】

請求項１～１５のいずれか１項に記載の化合物および薬剤学的に受容しうる賦形剤を含む、腫瘍細胞におけるＯ^6－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキルトランスフェラーゼ活性を枯渇させるための薬剤組成物。

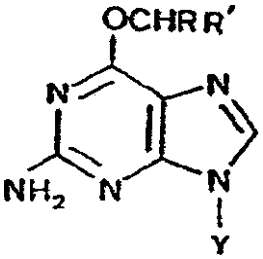
【請求項２０】

２つの部分からなる、腫瘍細胞の増殖を阻害するための薬剤組成物であって、一方が請求項１～１５のいずれか１項に記載の化合物を、そして他方がアルキル化剤を、それぞれ薬剤学的に受容しうる賦形剤とともに含有する、前記組成物。

【請求項２１】

請求項１～７および９～１４のいずれか１項に記載の化合物が、チオフェン環がハロ基で

置換されていてもよいO^6－テニルグアニンである、請求項１７または１９に記載の薬剤組成物。
【請求項２２】
請求項１～７および９～１４のいずれか１項に記載の化合物が、チオフェン環がハロ基で置換されていてもよいO^6－テニルグアニンである、請求項１８または２０に記載の薬剤組成物。
【請求項２３】
アルキル化剤が１，３－ビス（２－クロロエチル）－１－ニトロソ尿素（ＢＣＮＵ）およびテモゾロミドから選択される、請求項１８、２０または２２に記載の薬剤組成物。
【請求項２４】
式Ｉａの化合物：



（Ｉａ）

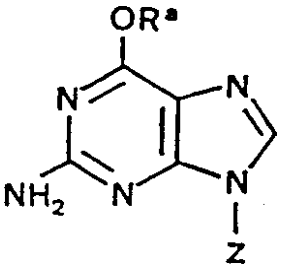
［式中、
YはH、リボシル、デオキシリボシル、またはＲ”ＸＣＨＲ”’（ここでXはOまたはＳであり、Ｒ”およびＲ”’はC_{1-20}アルキルである）であって、リボシル、デオキシリボシル、またはＲ”ＸＣＨＲ”’はヒドロキシ、C_{1-20}アルコキシ、アミノ、C_{1-20}アルキルアミノ、アミド、またはウレイドで置換されていてもよく；
Ｒ’はH、またはC_{1-20}アルキルもしくはC_{1-20}ヒドロキシアルキルであり；
Ｒは
（ｉ）O、N、もしくはＳから選ばれる少なくとも１個の異種原子を有する５員または６員複素環であって、該５員または６員複素環は、
１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR””（ここでＲ””はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－ＣＯＯＲ^5（ここでR^{5}はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよく、あるいは
ベンゼン環またはOもしくはＳから選ばれる少なくとも１個の異種原子を有する複素環と縮合していてもよく、該ベンゼン環または複素環は、１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR””（ここでＲ””はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－ＣＯＯＲ^5（ここでR^{5}はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよい；または
（ii）１個以上のC_{1-20}アルキル、C_{2-20}アルケニル、C_{2-20}アルキニル、C_{1-20}ハロアルキル、C_{1-20}ヒドロキシアルキル、ハロ、ニトロ、シアノ、SO_nR””（ここでＲ””はC_{1-20}アルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、カルボキシル、または－ＣＯＯＲ^5（ここでR^{5}はC_{1-20}アルキルである）で置換されていてもよいナフチルである］
の製造方法であって、水素化ナトリウムを有機溶媒中のＲＲ’ＣＨＯＨ（ここでＲおよびＲ’は上で定めたものである）の溶液と反応させ、２－アミノ－N，N，N－トリメチル－１H－プリン－６－アミニウムクロリドまたは２－アミノ－６－クロロプリンリボシドを添加し、弱酸およびエーテルで処理し、そして目的生成物を抽出する工程を含む、前記方法。
【請求項２５】
請求項１に記載の式Ｉの化合物を製造するための、請求項２４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野

本発明は、O^6－置換グアニン誘導体、それらの製造方法および腫瘍細胞の処置におけるそれらの使用に関するものである。特に本発明は、O^6－位にヘタリールアルキル（ｈｅｔａｒｙｌａｌｋｙｌ）またはナフチルアルキル置換基を有するグアニン誘導体に関するものであり、これらの化合物は腫瘍細胞においてO^6－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキルトランスフェラーゼ（ＡＴａｓｅ）活性を枯渇させる効力を示す。

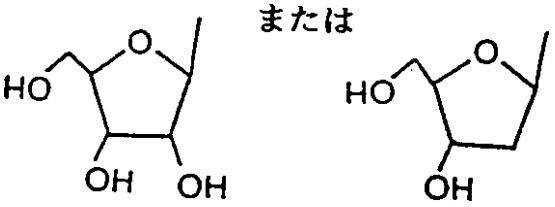
背景技術

腫瘍細胞を死滅させるために用いられる化学療法用アルキル化剤の有効性を高めるために、O^6－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキルトランスフェラーゼ枯渇活性を有するO^6－アルキルグアニン誘導体を使用することが示唆されている。哺乳動物細胞において、アルキル化剤の毒性作用および突然変異誘発作用は大部分がＤＮＡ中のグアニンのO^6－位におけるアルキル化の結果であるという証拠が増加している。O^6－アルキルグアニンの修復にはＡＴａｓｅが介在する。これは修復蛋白質であって、自己不活性化プロセスにおいて、アルキル基をこの修復蛋白質の活性部位にあるシステイン残基へ化学量論的に転移させることにより、O^6－アルキル化グアニン残基に対し作用する。アルキル化剤の生物学的作用に対して細胞を保護する際のＡＴａｓｅの重要性は、クローン化されたＡＴａｓｅ遺伝子またはｃＤＮＡをＡＴａｓｅ欠損細胞に導入し、発現させることによって極めて明瞭に証明されている：これは種々の物質、主としてＤＮＡをメチル化またはクロロエチル化するものに対する耐性を付与する。ＡＴａｓｅ欠損細胞におけるO^6－メチルグアニンによる細胞致死のメカニズムはまだ明らかではないが、O^6－クロロエチルグアニンによる致死は環状エタノグアニン中間体を経て対向鎖上のシトシン残基へＤＮＡ鎖間架橋が形成されることにより起こる。これはＡＴａｓｅが介在するクロロエチル基除去または複合体形成により阻止されるプロセスである。

ＡＴａｓｅ活性を枯渇させるためにO^6－メチルグアニンおよびO^6－ｎ－ブチルグアニンを使用することが研究されている（ドラン（Ｄｏｌａｎ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，（１９８６）４６，ｐｐ．４５００；ドラン（Ｄｏｌａｎ）ら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，（１９８９）２５，ｐｐ．１０３）。ＡＴａｓｅ発現細胞をクロロエチル化剤の細胞毒性作用に対してより感受性にするためにＡＴａｓｅ活性を枯渇させるのに、O^6－ベンジルグアニン誘導体が提示されている（モシェル（Ｍｏｓｃｈｅｌ）ら，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９２，３５，４４８６）。米国特許第５０９１　４３０号および国際特許出願公開ＷＯ９１／１３８９８号明細書（モシェルら）には、宿主内の腫瘍細胞におけるO^6－アルキルグアニン－ＤＮＡアルキルトランスフェラーゼ水準を枯渇させる方法であって、宿主に次式のO^6－ベンジル化グアニン誘導体を含有する有効量の組成物を投与することを含む方法が示されている：



式中のＺは水素または



であり、R^aはベンジル基または置換ベンジル基である。ベンジル基はオルト、メタ、パラ位において置換基、たとえばハロゲン、ニトロ、アリール、たとえばフェニルまたは置換フェニル、１－４個の炭素原子を有するアルキル、１－４個の炭素原子を有するアルコ

キシ、最高４個の炭素原子を有するアルケニル、最高４個の炭素原子を有するアルキニル、アミノ、モノアルキルアミノ、ジアルキルアミノ、トリフルオロメチル、ヒドロキシ、ヒドロキシメチル、およびSO_nR^b（ｎは０、１、２または３であり、R^bは水素、１－４個の炭素原子を有するアルキル、またはアリールである）で置換されていてもよい。ミーヤン・チェ（Ｍｉ－Ｙｏｕｎｇ　Ｃｈａｅ）ら，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９４，３７，３４２－３４７（本出願の優先日後に公表された）には、ベンゼン環上または９位に保有される置換基の嵩高さが漸増するO^6－ベンジルグアニン類似体についての試験が記載されている。そこに記載される化合物Ｎｏ．６はO^6－（２－ピリジルメチル）グアニンであり、これは本明細書においてO^6－（２－ピコリル）グアニンと呼ばれる。しかしチェらの報文の３４２－３４３頁の結果および考察においては、化合物Ｎｏ．６は重要なものとして注目されておらず、“中程度の活性を示した”“残りの化合物”に分類されている（本文の３４３頁１２－１５行）。その著者らは、グアニンの６位にあるアリルまたはベンジル置換基のみがＡＴａｓｅを効果的に不活性化したという彼らの以前の所見（Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９２，３５，４４８６）を確認している（本文の３４３頁２１－２３行）。

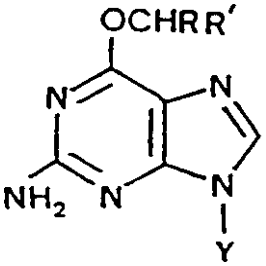
O^6－ベンジルグアニンにはＡＴａｓｅ不活性化剤としてのその使用に制限がある。それは希望するより安定であり、その結果、それが投与される動物における残留時間が長い。それは単独およびクロロエチル化剤との併用の両方において一定水準の潜在毒性をもち、これも望ましくなく、かつこれは残留時間に関連をもつであろう。

本出願の化合物はO^6－ベンジルグアニンとは異なるＡＴａｓｅ不活性化特性を示し、場合によりその活性は最高でO^6－ベンジルグアニンのものより８倍大きい。異なる半減期および毒性も観察されている。従って本発明の目的は、化学療法剤、たとえばクロロエチル化またはメチル化抗腫瘍薬の効果を高めるためにＡＴａｓｅ活性を枯渇させるのに有用な新規化合物を提供することである。

本発明の他の目的は、ＡＴａｓｅ活性を枯渇させるのに有用な化合物を含有する薬剤組成物を提供することである。本発明のさらに他の目的は、腫瘍細胞においてＡＴａｓｅ活性を枯渇させる方法を提供することである。本発明のさらに他の目的は、宿主内の腫瘍細胞を処置する方法を提供することである。

発明の開示

従って本発明は、式ＩのO^6－置換グアニン誘導体：



(I)

［式中の

ＹはＨ、リボシル、デオキシリボシル、またはＲ″ＸＣＨＲ″′（ここでＸはＯまたはＳであり、Ｒ″およびＲ″′はアルキルである）またはその置換誘導体であり；

Ｒ′はＨ、アルキルまたはヒドロキシアルキルであり；

Ｒは（ｉ）少なくとも１個の５員もしくは６員の複素環を有する環状基（所望によりこれに縮合した炭素環もしくは複素環を含み、この、もしくはそれぞれの複素環はＯ、Ｎもしくは Ｓから選ばれる少なくとも１個の異種原子を有する）もしくはその置換誘導体であり；または

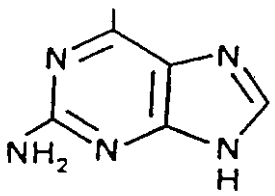
（ii）ナフチルもしくはその置換誘導体である］

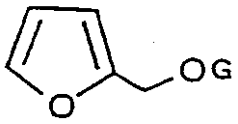
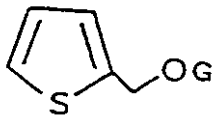
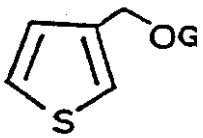
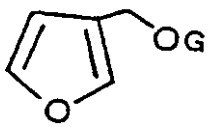
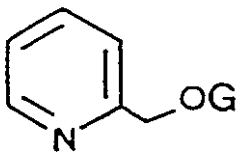
およびその薬剤学的に受容しうる塩類を提供する。

Ｒは５員もしくは６員の複素環またはそのベンゾ誘導体であることが適切であり、後者の場合O^6－アルキルグアニン部分は複素環またはベンゼン環のいずれにおいてＲに結合していてもよい。

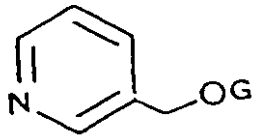
好ましい態様において、ＲはＳまたはＯを含む５員環であり、それに縮合した第２環を含むか、または含まない。
好ましくはＲは少なくとも１個のＳ原子を有する複素環であり；より好ましくはＲは少なくとも１個のＳ原子を有する５員の複素環であり；極めて好ましくはＲはチオフェン環またはその置換誘導体である。
あるいはＲは少なくとも１個のＯ原子を有する複素環、特に少なくとも１個のＯ原子を有する５員の複素環であってもよく；より具体的にはＲはフラン環またはその置換誘導体であってもよい。
他の態様としては、Ｒは少なくとも１個のＮ原子を有する複素環であってもよく、特にＲは少なくとも１個のＮ原子を有する６員の複素環であってもよく、殊にＲはピリジン環であってもよい。Ｙの定義において“置換誘導体”という語には、下記の１または２以上の基による置換が含まれる：ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、アミドまたはウレイド。
Ｒの定義において“置換誘導体”という語には、下記の１または２以上の基による複素環および／または炭素環の置換が含まれる：アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、ハロアルキル、ニトロ、シアノ、ヒドロキシアルキル、SO_nR'''（ここでR'''はアルキルであり、ｎ＝０、１または２である）、または式－ＣＯＯR^5のカルボキシルもしくはエステル基（式中のR^5はＨまたはアルキルである）。ハロ、ハロアルキル、シアノ、SO_nR'''（前記に定義）、および－ＣＯＯR^5（式中のR^5はアルキルである）が好ましい置換基である。
アルキル、アルケニルまたはアルキニル基は、好ましくは１－２０個、より好ましくは１－１０個、極めて好ましくは１－５個の炭素原子を含む。ハロにはヨード、ブロモ、クロロまたはフルオロが含まれる。
本発明化合物の例（ならびに本発明に包含されない化合物Ｂ．４２１４および４２１８）を表１に示す。

表1

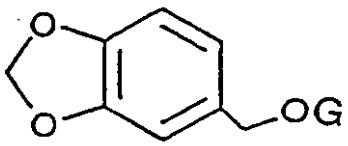
G = 

B. 4203	$\underline{O}^6$-フルフリルグアニン	
B. 4205	$\underline{O}^6$-テニルグアニン	
B. 4206	$\underline{O}^6$-(3-チエニルメチル)グアニン	
B. 4209	$\underline{O}^6$-(3-フリルメチル)グアニン	
B. 4210	$\underline{O}^6$-(2-ピコリル)グアニン	

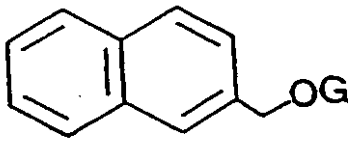
B. 4211 O^6-(3-ピコリル)グアニン



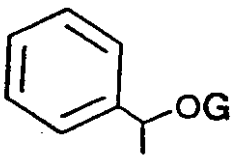
B. 4212 O^6-ピペロニルグアニン



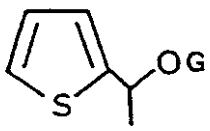
B. 4213 O^6-(2-ナフチルメチル)グアニン



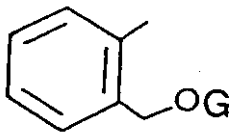
B. 4214 DL-O^6-(α-メチルベンジル)グアニン



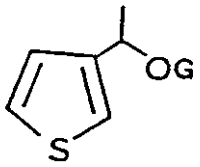
B. 4217 DL-O^6-(α-メチルテニル)グアニン



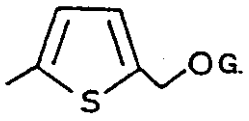
B.4218 O^6-(2-メチルベンジル)グアニン



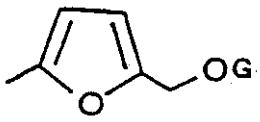
B.4219 DL-O^6-[1-(3-チエニル)エチル]グアニン



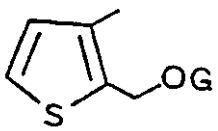
B.4220 O^6-(5-メチルテニル)グアニン



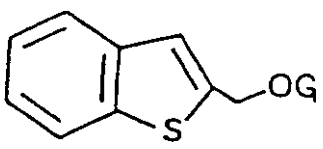
B.4221 O^6-(5-メチルフルフリル)グアニン



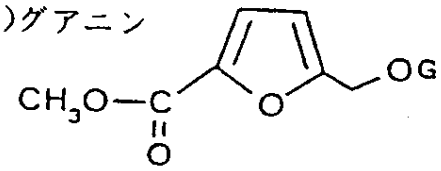
B.4222 O^6-(3-メチルテニル)グアニン



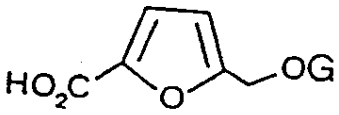
B.4226 O^6-(2-ベンゾ[b]チエニルメチル)グアニン



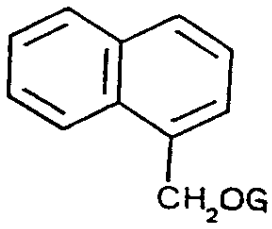
B. 4229 O^6-(5-メトキシカルボニルフルフリル)グアニン



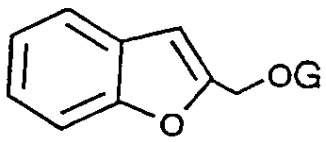
B. 4234 O^6-(5-カルボキシフルフリル)グアニン



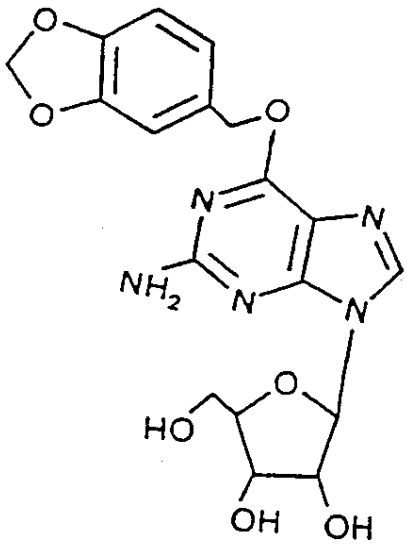
B. 4265 O^6-(1-ナフチルメチル)グアニン



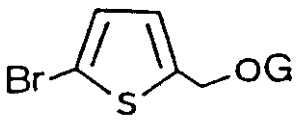
B. 4266 O^6-(2-ベンゾフラニルメチル)グアニン



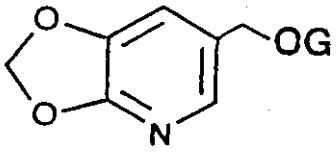
B. 4268 O^6-ピペロニルグアノシン



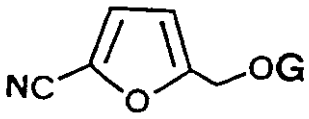
B. 4269 O^6-(5-ブロモテニル)グアニン



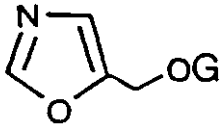
B. 4271 O^6-(5-アザピペロニル)グアニン



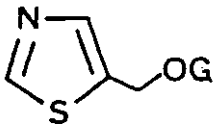
B. 4273 O^6-(5-シアノフルフリル)グアニン



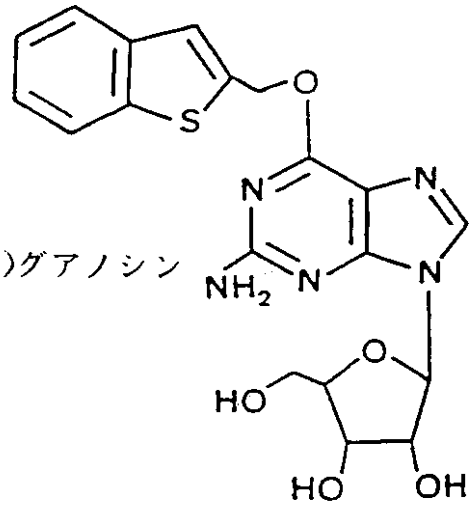
B. 4274 O^6-(5-オキサゾリルメチル)グアニン



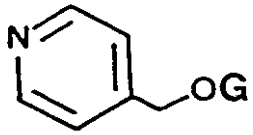
B. 4275 O^6-(5-チアゾリルメチル)グアニン



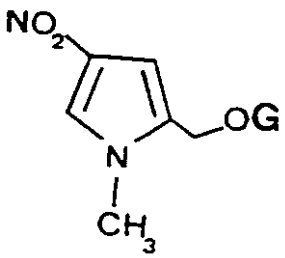
B.4276 O^6-(2-ベンゾ[b]チエニルメチル)グアノシン



B.4277 O^6-(4-ピコリル)グアニン



B.4278 O^6-(1-メチル-4-ニトロピロール-2-イルメチル)グアニン



B.4279 O^6-テニルグアノシン

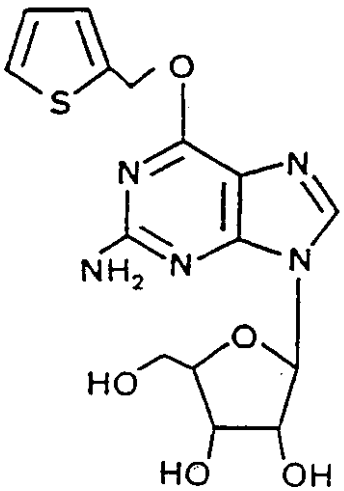


表１の化合物のうち化合物Ｂ．４２１４および４２１８は本発明の化合物ではない。化合物Ｂ．４２１０（Ｒが２－ピリジルであり、Ｒ′がＨであり、かつＹがＨである）は本発明の好ましい化合物ではない。

本発明の特に好ましい化合物には下記のもの：
B.4205　O^6-テニルグアニン
B.4206　O^6-（3-チエニルメチル）グアニン
B.4212　O^6-ピペロニルグアニン
B.4226　O^6-（2-ベンゾ[b]チエニルメチル）グアニン
B.4266　O^6-（2-ベンゾフラニルメチル）グアニン
B.4275　O^6-（5-チアゾリルメチル）グアニン
ならびにRの複素環においてハロ、シアノまたはエステル基で置換された、下記を含む化合物：
B.4229　O^6-（5-メトキシカルボニルフルフリル）グアニン
B.4269　O^6-（5-ブロモテニル）グアニン
B.4273　O^6-（5-シアノフルフリル）グアニン
が含まれる。
他の好ましい化合物には下記のものが含まれる：
B.4209　O^6-3-フリルメチルグアニン
B.4276　O^6-（2-ベンゾ[b]チエニルメチル）グアノシン
B.4277　O^6-（4-ピコリル）グアニン
本発明の極めて好ましい化合物は、インビトロで、および／または哺乳動物細胞および／または腫瘍異種移植片において、O^6－ベンジルグアニン（ＢｅＧ）より効果的にＡＴａｓｅを不活性化し、ニトロソ尿素および／またはメチル化剤の致死作用または増殖阻害作用に対して哺乳動物細胞および／または腫瘍異種移植片をＢｅＧより効果的に感作するものである。また好ましい化合物は、ＢｅＧと比較して、それらの薬剤と併用した場合に正常組織および／または生物全体に対して低い毒性をもつべきである。好ましい化合物は、ＡＴａｓｅを不活性化するのに必要な用量においてそれ自体が毒性であってはならず、または最小毒性以上を示すべきでなく、化学的に不安定な好ましい化合物のいかなる加水分解産物も毒性であってはならない。本発明はいかなる理論によっても限定されないが、好ましい化合物はＢｅＧより不安定であり、従ってＡＴａｓｅの最大不活性化を達成したのち直ちに自然に化学分解される必要があろう：これにより、その物質に作用して毒性化合物種を生成する可能性のある代謝プロセスの作用がいずれも最小限に抑えられる。好ましい化合物は、ヒトの骨髄その他の正常細胞をアルキル化剤の毒性作用に対して感作する可能性がより低く、従ってヒトの正常組織におけるこれらの物質の既知の毒性を高めず、または新たな毒性を生じないものでなければならない。
本発明の好ましい化合物には、本明細書の表４において比較的低いI_{50}値を有するもの（たとえば１．０μＭ未満、より具体的には０．０４μＭ未満）、ならびに／あるいは本明細書の表４において緩衝液Ｉ（インビトロアッセイの条件を表す）および／またはリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）（生理的媒質中の条件を表す）中で比較的短い半減期を有するもの（たとえば緩衝液Ｉ中では２０時間未満、またはＰＢＳ中では１６時間未満）が含まれる。
比較的短い半減期は、本発明化合物がＲＲ′ＣＨ－の反応性のためO^6－ベンジルグアニンより安定性が低く、生理的媒質中で加水分解により分解されやすいことの指標であるとみなすことができる。
式Ｉの化合物においてそれらがＡＴａｓｅ阻害物質として作用するのを可能にしている基ＲＲ′ＣＨ－の影響を、電子的、立体的および物理化学的因子により測定する。立体的因子はＡＴａｓｅのシステイン受容体部位の環境の性質に関連があると思われる。好ましくはＲ′はＨである。O^6に結合している第２炭素原子は（ＤＬ化合物であるＢ．４２１４またはＢ．４２１７の場合のように）不活性化活性を大幅に低下させることが見出された。これは恐らく置換基の嵩によるものであろう。
Ｒ中の環状基はビシナル位のメチル基（Ｂ．４２２２の場合のように）を含まないことが好ましい。ただしビシナル置換の影響は、Ｒが複素環である場合の方がナフチル異性体Ｂ．４２１３およびＢ．４２６５の場合より明らかにはるかに少ない。

物理化学的因子、たとえば安定性、溶解度、および水－脂質分配はインビボで使用するための化合物の選択に関係し、たとえば配合、吸収および輸送に影響する。化合物の選択は異なる組織中へのそれらの分布差によっても影響される。

本発明の１態様によれば、式Ｉの化合物（式中のＹ、ＲおよびＲ′は前記に定めるものである）またはその薬剤学的に受容しうる塩類、および薬剤学的に受容しうる賦形剤を含有する薬剤組成物が提供される。所望により本発明組成物はアルキル化剤、たとえばクロロエチル化剤またはメチル化剤をも含有しうる。

他の態様においては、本発明は宿主内のＡＴａｓｅ活性を枯渇させる方法であって、宿主に式Ｉの化合物（式中のＹ、ＲおよびＲ′は前記に定めるものである）またはその薬剤学的に受容しうる塩類を含有する組成物、より具体的には前記に定める薬剤組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。あるいは本方法は宿主内のＡＴａｓｅ仲介によるＤＮＡ修復活性を枯渇させる方法であると定めることができる。

本発明はさらに、宿主内の腫瘍細胞を処置する方法であって、宿主に式Ｉの化合物（式中のＹ、ＲおよびＲ′は前記に定めるものである）またはその薬剤学的に受容しうる塩類を含有する組成物、より具体的には前記に定める薬剤組成物の有効量を投与し、かつ宿主にアルキル化剤を含有する組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本方法は新生物の処置に利用することができ、これにはアルキル化剤の作用に対して感受性であることが知られているもの、たとえば黒色腫および神経膠腫、ならびにその他の、アルキル化剤単独による処置に対するそれらの耐性が本発明による不活性化剤の使用により克服されるものが含まれる。

本発明は、式Ｉの化合物の製造方法であって、水素化ナトリウムを、好ましくは室温以下で、有機溶媒中のＲＲ′ＣＨＯＨ（ここでＲおよびＲ′は前記に定めたものである）の溶液と反応させ；２－アミノ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－１Ｈ－プリン－６－アミニウムクロリドまたは２－アミノ－６－クロロプリンリボシドを添加し；反応混合物を弱酸およびエーテルで処理し；そして目的生成物を抽出する工程を含む方法をも提供する。

【図面の簡単な説明】

添付の図面を参照して本発明をより詳細に説明する：

図１は、種々の濃度の多様な不活性化剤と共にインキュベートしたのちの精製組換えヒトＡＴａｓｅの残留活性（％）のグラフである。各点は３回の測定の平均を示す。$Ｉ_{50}$値、すなわちＡＴａｓｅ活性の５０％低下を生じるのに必要な不活性化剤の濃度を計算するために、５０％残留活性の線を用いる。

図２は、アルキル化剤濃度（μｇ／ｍｌ）に対する細胞増殖率（％）の２つのグラフであり、$Ｏ^{6}$－ベンジルグアニン（ＢｅＧ）および$Ｏ^{6}$－テニルグアニン（Ｂ．４２０５）が２種類の異なる濃度（０．１および１．０μＭ）でＢＣＮＵに対するＲａｊｉ細胞の感作に及ぼす感作効果を示す。$Ｄ_{90}$値、すなわち非処理対照と比較して９０％の増殖、すなわち１０％の増殖阻害が生じたＢＣＮＵ用量を計算するために、９０％増殖の線を用いる。

図３は、アルキル化剤濃度（μＭ）に対する細胞増殖率（％）の２つのグラフであり、ＢｅＧおよびＢ．４２０５が４種類の異なる濃度（０．１、０．５、１．０および５．０μＭ）でテモゾロミド（ｔｅｍｏｚｏｌｏｍｉｄｅ）に対するＲａｊｉ細胞の感作に及ぼす効果を示す。

図４は、図３から外挿した、不活性化剤濃度（μＭ）に対する$Ｄ_{50}$（μＭ）の値（すなわち非処理対照と比較して５０％の増殖が認められたテモゾロミド用量）のグラフである。

図５は、不活性化剤濃度に対する細胞増殖率（％）の２つのグラフであり、$Ｏ^{6}$－フルフリルグアニン（Ｂ．４２０３）およびＢ．４２０５がチャイニーズハムスターＶ７９細胞（ＲＪＫＯ）およびその亜系（＋１２０）に及ぼす増殖阻害作用を示す。

図６は、不活性化剤濃度に対する細胞増殖率（％）の２つのグラフであり、Ｂ．４２０３およびＢ．４２０５が２つの色素性乾皮症（Ｘｅｒｏｄｅｒｍａ ｐｉｇｍｅｎｔｏｓｕｍ）サブクローンに及ぼす増殖阻害作用を示す。

図７は、不活性化剤濃度（μＭ）に対する細胞増殖率（％）の４つのグラフであり、不活性化剤Ｂ．４２０３、Ｂ．４２０５、Ｂ．４２１２（$Ｏ^{6}$－ピペロニルグアニン）および

Ｂ．４２２６（O^6－（２－ベンゾ［ｂ］チエニルメチル）グアニン）の分解産物がＲａｊｉ細胞増殖に及ぼす作用を示す。
図８は、時間（時）に対するＡＴａｓｅ活性（ｆｍ／ｍｇ）の図であり、非処理対照としてのヌードマウス、トウモロコシ油処理対照、ならびにＢｅＧ（３０ｍｇ／ｋｇ）およびＢ．４２０５（３０ｍｇ／ｋｇ）処理抽出物において、Ａ３７５異種移植片中のＡＴａｓｅ活性の枯渇を示す。
図９－１３は、異種移植片試験の結果のグラフである。各図において上側のグラフは、ＢＣＮＵ単独、ＢＣＮＵと併用したＢｅＧ、およびＢＣＮＵと併用したＢ．４２０５で処理したヌードマウスにおけるＡ３７５腫瘍異種移植片についての、時間（日）に対する腫瘍体積（％）を示す。各図において下側のグラフは、上側のグラフに示した処理後の時間（日）に対する各処理群中の生存マウスの数を示す。
各図の詳細は下記のとおりである：－

図	マウス	ＢＣＮＵ濃度（ｍｇ／ｋｇ）	不活性化剤（ｍｇ／ｋｇ）
９	ＡＳＵ	約１５	６０
１０	ＡＳＵ	２５	６０
１１	ＯＬＡＣ	１０	３０
１２	ＡＳＵ	１６	６０
１３	ＡＳＵ	１６	６０

図１４は、テモゾロミド濃度（μＭ）に対する生存率（％）の３つのグラフであり、漸増する用量のテモゾロミドと併用した不活性化剤（１０μＭ）またはＤＭＳＯ（対照）で処理したのちの骨髄細胞の生存率を示す。

発明の実施態様

ＡＴａｓｅ不活性化特性を有するO^6－ヘタリールアルキルグアニン誘導体は、下記に示す標準的な製法を適宜適用することにより合成することができる。
２－アミノ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－１Ｈ－プリン－６－アミニウムクロリドはキブリス（Ｋｉｂｕｒｉｓ）ら，Ｊ．Ｃｈｅｍ，Ｓｏｃ．（Ｃ），１９７１，３９４２が述べた方法に従って製造される。この第四塩とナトリウムベンジルオキシドとの反応（O^6－ベンジルグアニンを得る）のための条件の詳細－－マッコス、チェンおよびトルマン（ＭａｃＣｏｓｓ，Ｃｈｅｎ，Ｔｏｌｍａｎ），Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９８５，２６，１８１５に示されていない－－は、マッコス、トルマン、ワーグナーおよびハンナの欧州特許出願第１８４，４７３号明細書に示されたが、これらは比較的感受性の高い類似体の製造には不適切であり、本発明者らが下記の標準的製法を考案した。
O^6－ヘタリールアルキルグアニン（式Ｉ，ｙ＝Ｈ）の標準的製法
水素化ナトリウム（油中６０％；０．８ｇ，２０ｍｍｏｌ）をＤＭＳＯ（５ｍｌ）中のＲＲ′ＣＨＯＨ（５６ｍｍｏｌ，約５ｍｌ）の溶液に添加し、混合物を室温で１時間撹拌する。固体または高分子量アルコールについては、５ｍｌの代わりに最高１０ｍｌのＤＭＳＯを使用しうる。２－アミノ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－１Ｈ－プリン－６－アミニウムクロリド（２．２９ｇ，１０ｍｍｏｌ）を添加し、さらに１時間、撹拌を続ける。この時点でＵＶスペクトルの変化が完了し（λ_{max}３１２→２８４ｎｍ）、このほとんど透明な溶液を酢酸（１．７ｍｌ）で処理する。冷却し、エーテル（３００ｍｌ）で希釈したのち、混合物を放置し（２時間）、固体（Ａ）を採取する。水で摩砕処理して生成物を得る。エーテル－ＤＭＳＯ濾液を蒸発させ、残渣をエーテルおよび水で順次摩砕処理することにより第二の画分が得られる。あるいは固体（Ａ）から生成物を温アセトニトリルで抽出してもよい。再結晶した化合物はＴＬＣ（C_6H_6－ＭｅＯＨ，４：１）において単一スポッ

トを示し、分析およびそれらのＮＭＲスペクトルにより解明される。しばしばそれらは結晶溶媒を含有する。融点および分析データを表２に、ＵＶおよび^{1}Ｈ　ＮＭＲを表３に示す。ＮＭＲスペクトルはブルーカー（Ｂｒｕｋｅｒ）ＷＰ８０またはＭＳＬ　３００計測器により測定された。

この標準的製法を用いて（表２中に記号で示した変更を含む）、表２ａおよび３ａに挙げた化合物を製造した。化合物Ｂ．４２１７およびＢ．４２１９においてＲ′はメチルであり；残りの化合物においてはＲ′はＨである。後記の表４に挙げたO^{6}－ベンジルグアニンおよび化合物Ｂ．４２１４、Ｂ．４２１８およびＢ．４２３１も、比較試験のためにこの標準的製法により製造した。

表２中の記号により示される変更は下記のとおりである：

ａ　この化合物の製造に際しては、第四塩のｍｍｏｌ当たり５ｍｍｏｌの水素化ナトリウムを用いる。標準的な量（２ｍｍｏｌ）を用いる場合、４０％の第四塩を反応仕上げ処理に際して回収することができる。

ｂ　この化合物はメチルエステルＢ．４２２９（１４５ｍｇ，０．５ｍｍｏｌ）を２－メトキシエタノール（２．５ｍｌ）および水（２．５ｍｌ）中において２Ｍ－ＮａＯＨ（２．５ｍｌ）で４時間、室温で処理することによる加水分解することによって製造される。酢酸（０．３２ｍｌ，５．５ｍｍｏｌ）で中和し、緩和に蒸発させ、水（３ｍｌ）で摩砕処理し、濾過して、固体を得る。これを高温のメタノールで抽出すると酸Ｂ．４２３４が得られる。

ｃ　理論値は酸のナトリウム塩４部および酸３部の混合物の１水和物に基づくものである。理論値Ｎａ，４．３％。実測値：Ｎａ，４．４４％。

ｄ　第四塩のｍｍｏｌ当たり３ｍｍｏｌのアルコールRCH_2OHを、標準的な５．６ｍｍｏｌの代わりに用いる。

ｅ　ＤＭＳＯ中において室温で水素化ナトリウムに対して感受性が高すぎる４種類のアルコールについては、ＤＭＦ中でRCH_2ONaを調製する（－１０℃で２．５ｍｌ；３ｍｍｏｌのアルコールRCH_2OH；２ｍｍｏｌの水素化ナトリウム）。１５－２０分後に１ｍｍｏｌの第四塩を添加し、室温で２－３時間撹拌を続ける。

ｆ　生成物をアセトニトリルで抽出する。

リボシド（式Ｉ，Ｙ＝リボシル）の製造

前記の標準法で水素化ナトリウム（油中６０％；１２０ｍｇ，３ｍｍｏｌ）およびＲＲ′ＣＨＯＨ（４．６ｍｍｏｌ）から乾燥ＤＭＳＯ（２ｍｌ）中において１時間で製造されたアルコキシドの溶液を、２－アミノ－６－クロロプリンリボシド（３０２ｍｇ，１ｍｍｏｌ）で処理し、室温で５時間、次いで６０－６５℃で１５分間撹拌する。この時点でＵＶスペクトルの変化により示されるように（λ_{max}３１１→２８４ｎｍ）反応が完了している。冷却し、エーテル（１００＋１５ｍｌ）で十分に摩砕処理し、濾過すると固体が得られ、これを水（１０ｍｌ）で処理する。CO_2を短期間導通することによりｐＨを１１から８となす。濾過により無機物を除去し、乾燥残渣を室温でメタノール（１０ｍｌずつで４回、それぞれ１滴のピリジンを含有する）により抽出する。ほとんどすべてのメタノールを蒸発させ、少量のエーテルを添加すると、ＴＬＣ（C_6H_6－ＭｅＯＨ，４：１）によればほとんど純粋な生成物が得られる。これをメタノールおよび痕跡量のピリジンから再結晶し、溶解し、４０℃未満で濃縮し、場合により最後に少量のエーテルを添加する。

この方法を用いて表２ｂおよび３ｂに挙げた化合物を製造する。痕跡量の不純物を除去するのは困難であるが、ＮＭＲスペクトルはヌクレオシドが約９０％の純度であることを示す。収率は３０－４０％のオーダーである。

表　2 a

試験No.	O^6－置換基 RR^1CH-	収率%（溶媒和物基準）	再結晶溶媒	融点(分解)(℃)	化学式	分析	C	H	N
B.4203	フルフリル	85	MeOH	不定:185から	$C_{10}H_9N_5O_2.1/2\ H_2O$	実測値	50.14	4.00	29.24
						理論値	50.01	4.19	29.17
B.4205	テニル	72	EtOH	不定:160から徐々に	$C_{10}H_9N_5OS.1/3\ EtOH$	実測値	48.40	4.61	26.45
						理論値	48.78	4.22	26.63
B.4206	3 チエニルメチル	74	MeOH	205	$C_{10}H_9N_5OS.MeOH$	実測値	47.61	4.88	25.67
						理論値	47.3	4.69	25.07
B.4209	3 フリルメチル	61	EtOH	191	$C_{10}H_9N_5O_2$	実測値	52.07	4.16	30.25
						理論値	51.93	3.92	30.29
B.4210	2 ピコリル	71	MeOH	220-221	$C_{11}H_{10}N_6O.1/2\ H_2O$	実測値	52.85	4.73	32.79
						理論値	52.60	4.41	33.47
B.4211	3 ピコリル	53	MeOH	226-228	$C_{11}H_{10}N_6O.1/2\ H_2O$	実測値	52.53	4.78	32.50
						理論値	52.60	4.41	33.47
B.4212	ピペロニル	74	EtOH	195-197	$C_{13}H_{11}N_5O_3.3/4\ H_2O$	実測値	52.22	4.48	23.64
						理論値	52.25	4.22	23.44
B.4213	2 ナフチルメチル	74	EtOH	224-226	$C_{16}H_{13}N_5O$	実測値	65.91	4.58	23.99
						理論値	65.97	4.50	24.05
B.4217	α メチルテニル	27	MeCN	150 以上	$C_{11}H_{11}N_5OS$	実測値	50.39	4.40	26.96
						理論値	50.57	4.24	26.80
B.4219	1 (3 チエニル)エチル	57	MeCN	150 以上	$C_{11}H_{11}N_5OS$	実測値	50.59	4.33	27.10

表 2a(続)

試験No.	O^6-置換基 RR^1CH-	収率%(溶媒和物基準)	再結晶溶媒	融点(分解)(℃)	化学式		分析 C	分析 H	分析 N
B.4220	5-メチルテニル [f]	29	MeCN	140以上	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4221	5-メチルフルフリル [f]	38	MeCN	不定	$C_{11}H_{11}N_5O_2.0.5H_2O$	実測値 理論値	52.18 51.98	4.81 4.76	27.47 27.56
B.4222	3-メチルテニル	29	MeOH	不定	$C_{11}H_{11}N_5OS$				
B.4226	2-ベンゾ[b]チエニルメチル	66	MeOH	198-208	$C_{14}H_{11}N_5OS.MeOH$	実測値 理論値	53.93 54.69	4.49 4.59	21.47 21.26
B.4229	5-メトキシカルボニルフルフリル [a, f]	43	MeOH	120-130 (沸騰を伴う)	$C_{12}N_{11}N_5O_4.1.5H_2O$	実測値 理論値	45.88 45.57	4.21 4.46	21.86 22.14
B.4234	5-カルボキシフルフリル [b]	67	MeOH	210-260	$C_{11}H_9N_5O_4.H_2O$[g]	実測値 理論値	42.69 43.2	3.52 3.4	22.68 22.9
B.4265	1-ナフチルメチル	75	MeOH	210以上	$C_{16}H_{13}N_5O.0.5MeOH$	実測値 理論値	64.37 64.48	4.85 4.92	22.81 22.79
B.4266	2-ベンゾフラニルメチル	58	MeOH	196-198	$C_{14}H_{11}N_5O_2.MeOH$	実測値 理論値	57.31 57.50	4.78 4.83	22.53 22.35
B.4269	5-ブロモテニル [d, e, f]	14	EtOH	170-180	$C_{10}H_8BrN_5OS$	実測値 理論値	36.81 36.82	2.52 2.47	20.81 21.47
B.4271	5-アザピペロニル [d]	63	EtOH	230-240	$C_{12}H_{10}N_6O_3.0.25EtOH$	実測値 理論値	50.27 50.40	3.86 3.89	27.94 28.22

表　２ａ（続）

試験No.	O^6－置換基 RH'CH-	収率%（溶媒和物基準）	再結晶溶媒	融点（分解）（℃）	化学式	分析	C	H	N
B.4273	5-シアノフルフリル [d, f]	15	MeOH	91-100（沸騰を伴う）	$C_{11}H_8N_6O_2.H_2O$	実測値	48.25	3.70	29.82
						理論値	48.19	3.67	30.65
B.4274	5-オキサゾリルメチル [d, f]	32	MeOH	180-215	$C_9H_8N_6O_2.0.25H_2O$	実測値	45.58	3.70	35.50
						理論値	45.66	3.62	35.52
B.4275	5-チアゾリルメチル [d, f]	40	MeOH	190-220	$C_9H_8H_6OS.0.5H_2O$	実測値	42.14	3.73	32.43
						理論値	42.02	3.53	32.67
B.4277	4-ピコリル [d]	72	MeOH	230以上	$C_{11}H_{10}N_6O$	実測値	54.82	4.19	34.48
						理論値	54.55	4.16	34.71
B.4278	1-メチル-4-ニトロピロール-2-イルメチル [d, e]	22	MeOH	140-210	$C_{11}H_{11}N_7O_3.0.5H_2O$	実測値	44.17	4.17	32.49
						理論値	44.29	4.06	32.87

JP 4054057 B2 2008.2.27

表 2b

試験No.	O^6-置換基 RR^1CH-	収率%（溶媒和物基準）	再結晶溶媒	融点(分解)（℃）	化学式	分析	C	H	N
リボシド									
B.4268	ピペロニル		MeOH	from 150（沸騰を伴う）	$C_{18}H_{19}N_5O_7.2H_2O$	実測値	47.08	4.58	15.12
						理論値	47.69	5.11	15.45
B.4276	2-ベンゾ[b]チエニルメチル		MeOH-エーテル	140-155	$C_{19}H_{19}N_5O_5S.H_2O$	実測値	50.75	4.47	16.83
						理論値	50.98	4.73	15.65
B.4279	テニル		MeOH-エーテル	from 120（沸騰を伴う）	$C_{15}H_{17}N_5O_5S.0.5H_2O$	実測値	46.67	5.00	18.48
						理論値	46.39	4.67	18.03

表　3 a（続）

試験No.	O^6－置換基 RR^1CH-	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H [ppm from TMS;$(CD_3)_2SO$], J (Hz)
B.4203	フルフリル	243,285	5.43(s), 6.32(s), 6.49(dd,J 3.1,1.5), 6.66 (d,J 3.1), 7.71 (d,J 1.5),7.81 (s), 12.42(bs)
B.4205	テニル	243,284	5.67(s), 6.30(s), 7.04(dd,J 5.1, 3.5),7.31(dd, J 3.5,1.2), 7.56(dd, J 5.1, 1.2), 7.84(s), 12.47(bs)
B.4206	3-チエニルメチル	242,284	5.47(s), 6.27(s), 7.26(dd, J 4.8, 1.2),7.54 (dd, J 4.8, 2.9), 7.62(bs), 7.80(s), 12.40(bs)
B.4209	3-フリルメチル	245,284	5.34(s), 6.26(s), 6.65(d, J 1.4), 7.66 (l, J 1.4), 7.82(s), 7.83(bs),12.41(bs)
B.4210	2-ピコリル	247,262 269sh, 285	5.58(s), 6.27(s), 7.50(m), 7.84(s), 8.58(dd, J 4.8,1.2), 12.47(bs)
B.4211	3-ピコリル	245,263sh, 270sh,285	5.58(s), 6.36(s),7.49(dd,J 7.9, 4.8),7.87(s), 8.01(dt,J 7.9, 1.8), 8.62(dd, J 4.8, 1.8), 8.80(bs), 12.48(bs)
B.4212	ピペロニル	242,287	5.38(s), 6.02(s), 6.24(s), 6.95(m), 7.79(s), 12.37(bs)
B.4213	2-ナフチルメチル	244,282	5.67(s), 6.28(bs), 7.46-8.04(m), 12.47(bs)
B.4217	α-メチルテニル	243,284	1.74(d, J 6.6), 6.24(s), 6.74(q, J 6.6), 7.01(m), 7.24(m), 7.49(m), 7.81(s), 12.40(bs)
B.4219	1-(3-チエニル)エチル	242,283	1.67(d, J 6.5), 6.20(s), 6.54(q, J 6.5), 7.24(m) 7.50 (m), 7.82(s), 12.37(bs)
B.4220	5-メチルテニル	246,284	2.42 (d, J 3.4), 5.57(s), 6.25(s), 6.70(d, J 3.4), 7.08(d), 7.81 (s), 12.41(bs)
B.4221	5-メチルフルフリル	240,283	2.28(s), 5.37(s), 6.11(m), 6.27(s), 6.53(d, J 3.0), 7.81(s), 12.44(bs)
B.4222	3-メチルテニル	244,283	2.28(s), 5.60(s), 6.25(s), 6.91(d, J 5.0), 7.45 (d, J 5.0), 7.80(s), 12.44(bs)

表　3 a（続）

試験No.	O^6－置換基	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H [ppm from TMS;$(CD_3)_2SO$], J (Hz)
B.4226	2-ベンゾ[b]チエニルメチル	240,267,282 (RCH_2OH: 241, 262, 289w, 300w)	5.78(s), 6.38(s), 7.38(m), 7.60(s), 7.83(s), 7.85(m), 12.47(bs)
B.4229	5-メトキシカルボニル-フルフリル	251,280sh (RCH_2OH: 259)	3.82(s), 5.50(s), 6.39(s), 6.67 (d, J 3.4), 7.32(d, J 3.4), 7.83(s), 12.45(bs)
B.4234	5 カルボキシフルフリル	250,280 (RCH_2OH: 256)	5.43(s), 6.35(s), 6.68(d, J 3.3), 6.87 (d, J 3.3), 7.85(s), 12.53(bs)
B.4265	1-ナフチルメチル	244,283,293 sh	5.96(s), 6.36(s), 7.58(m), 7.72(d, J 6.8) 7.79 (s) 7.89(m), 8.11(m), 12.44(bs)
B.4266	2-ベンゾフラニルメチル	246,278,284 (RCH_2OH: 246, 275w, 283w)	5.62(s), 6.40(s), 7.13(s), 7.27 (dt, J 7.3, 1.1), 7.34(dt, J 7.3, 1.3), 7.65(m), 7.68 (m), 7.85 (s), 12.48 (bs)
B.4269	5-ブロモテニル	247,284 RCH_2OH: 246	5.62(s), 6.36(s), 7.17 (ABq, J 3.7) 7.85(s), 12.47(bs)
B.4271	5-アザピペロニル	241,290 (RCH_2OH: 234, 294)	5.40(s), 6.18(s), 6.39(s), 7.48 (d, J 1.8), 7.83(s), 12.46(bs)

表 3a

試験No.	O^6-置換基	λ_{max}(MeoH) (nm)	δ_H [ppm from TMS;$(CD_3)_2SO$], J (Hz)
B.4273	5-シアノフルフリル	248,286 (RCH_2OH: 248)	5.53(s), 6.42(s), 6.99(d, J 3.5), 7.67(d, J 3.5) 7.87(s), 12.52(bs)
B.4274	5-オキサゾリルメチル	243,286	5.56(s), 6.38(s), 7.44(s), 7.85(s), 8.45(s), 12.48(bs)
B.4275	5-チアゾリルメチル	244,286	5.76(s), 6.42(s), 7.85(s), 8.14(s), 9.13(s), 12.49(bs)
B.4277	4-ピコリル	244,265sh,286	5.58(s), 6.34(s), 7.47(d, J 5.7), 7.88(s), 8.60 (d, J 5.7), 12.51(bs)
B.4278	1-メチル-4-ニトロピロール-2-イルメチル	244,285,320sh (RCH_2OH: 280, 320)	3.78(s), 5.46(s), 6.40(s), 6.98(s), 7.84(s), 8.08(s), 12.49(bs)

表　３ｂ

試験No. リボシド	O^6－置換基	λ max(MeoH) (nm)	δ_H [ppm from TMS;$(CD_3)_2SO$], J (Hz)
B.4268	ピペロニル	246,287 (RCH_2OH 240,288)	3.53 and 3.62(2 x dd, J 11.9, 3.75), 3.89 (q, J 3.5), 4.10(dd, J 4.9, 3.5), 4.45 (t, J 5.5), 5.1 (bs), 5.38(s), 5.78 (d, J 6.0), 6.02(s), 6.51(s), 6.93(d, J 7.7), 7.00 (dd, J 7.7, 1.5), 7.10(d, J 1.5), 8.10(s)
B.4276	2-ベンゾ[b]チエニルメチル	241,252, 269,287 (RCH_2OH 241,262 289w, 300w)	3.57 and 3.67(2 x m), 3.91 (q, J 3.6), 4.12 (q, J 5.2), 5.18 (m), 5.45(d, J 6.2), 5.83 (s + m), 6.61(s), 7.40(m), 7.63(s), 7.88(m), 7.97(m), 8.16(s)
B.4279	テニル	246,285	3.57 and 3.64 (2 x m), 3.92(q, J 3.5), 4.13(m), 4.49 (q, J 5.2), 5.16(m), 5.45(m), 5.70(s), 5.81 (d, J 6.0), 6.57(s), 7.07(dd, J 5.1, 3.5), 7.34 (d, J 0.9), 7.60(d, J 1.3), 8.14(s), 12.40(bs)

出発アルコールＲＲ′ＣＨＯＨは通常は対応するアルデヒド（市販されている場合が多い）を水素化ホウ素ナトリウムで還元することにより製造された。エステルＢ．４２２９およびニトリルＢ．４２７３の前駆物質については、異なる方法を用いた。ショ糖を５－クロロメチルフルフラールを経て５－ヒドロキシメチルフルフラールに変換[1]した。このアルデヒドの酸化[2]によりカルボン酸が得られ、これをボッチ（Ｂｏｃｃｈｉ）ら[3]の方法によりエステル化して、Ｂ．４２２９に必要な５－（ヒドロキシメチル）フラン酸メチル[4]となした。上記アルデヒドのオキシム[5]をカロッチ（Ｃａｒｏｔｔｉ）ら[6]の方法により脱水し；粗製反応生成物をメタノール中の濃アンモニア水で処理したのち、ジクロロメタン中へ抽出した。蒸留により、Ｂ．４２７３に必要な５－シアノフルフリルアルコール[7]を得た。

Ｂ．４２６６についてはベンゾフランのビルスマイヤー（Ｖｉｌｓｍｅｉｅｒ）反応[8]により２－アルデヒドが得られ、これを必要なアルコール[9]に還元し、一方Ｂ．４２２６についてはリチウム化およびジメチルホルムアミドによる処理により２－アルデヒドが得られ、これから必要なアルコール[10]を得た。

Ｂ．４２７４については、酒石酸ジメチルを酸化[11]してグリオキシル酸メチルとなし、これをイソシアン化トシルメチルと反応[12]させて、オキサゾール－５－カルボン酸メチル[13]を得た。これをファラブ（Ｆａｌｌａｂ）[14]の方法により水素化アルミニウムリチウムで還元してアルコール[15]となした。
Ｂ．４２７５については、ブロモマロンアルデヒド[16]およびチオ尿素から２－アミノチアゾール－５－カルボキシアルデヒド[17]を得た。亜硝酸アミル[17]による脱アミノ化、次いで水素化ホウ素ナトリウム還元により５－ヒドロキシメチルチアゾール[14]を得た。
Ｂ．４２７１については、５－アザピペロニルアルコール（融点８２－８４℃；実測値，Ｃ，５４．６０；Ｈ，４．５８；Ｎ，９．０９；$C_7H_7NO_3$理論値，Ｃ，５４．９０；Ｈ，４．６１；Ｎ，９．１５％）を対応するアルデヒド[18]から製造した。
Ｂ．４２７８については、１－メチルピロール－２－カルボキシアルデヒドを硝酸化[19]し、水素化ホウ素ナトリウムで還元してアルコール[20]となした。
具体例として、O^6－テニルグアニン（Ｂ．４２０５）の製造につき以下に記載する：
O^6－テニルグアニンの製造
ＤＭＳＯ（３ｍｌ）中のテニルアルコール（３．１８ｍｌ，３３．６ｍｍｏｌ）の溶液を、まず慎重に撹拌しながら水素化ナトリウム（油中６０％；０．４８ｇ，１２ｍｍｏｌ）で処理した。１時間後に、２－アミノ－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチル－１Ｈ－プリン－６－アミニウムクロリド（１．３７ｇ，６ｍｍｏｌ）を添加し、さらに１時間、撹拌を続けた。酢酸（１．０ｍｌ）を添加し、短期間冷却し、混合物をエーテル（１８０ｍｌ）で希釈した。１－２時間後に固体（２．０９ｇ）を採取した。濾液からエーテルを蒸発させ、ＤＭＳＯおよび過剰のテニルアルコール（沸点４８－５７℃／０．２ｍｍ）を蒸留すると残渣が残り、これをエーテルで摩砕処理すると、第２の固体画分（０．３６ｇ）が得られた。固体を合わせて水（６ｍｌ）で摩擦（摩砕処理）して、生成物（１．３３５ｇ，９０％）を得た。これはＴＬＣ（C_6H_6－ＭｅＯＨ，４：１）において強いスポットを示し、痕跡量の不純物を含有するにすぎなかった。高温のエタノール（３０ｍｌ）に溶解し、セライトで濾過することにより澄明化し、回転蒸発器で濃縮（１０ｍｌに）して、Ｂ．４２０５（溶媒和物としてモル当たり１／３ＥｔＯＨを含む物質１．１２５ｇ，７１％）を得た。
式ＩにおいてＹがＲ″ＸＣＨＲ″′である化合物（ｓｅｃｏ－ヌクレオシド）は、O^6－ベンジルグアニンの反応と同様な製法により、α－クロロエーテルを用いて（マッコス（ＭａｃＣｏｓｓ）ら，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．；欧州特許出願第１８４，４７３号明細書，前記引用文中）、または臭化アルキルを用いて（たとえばケルベルク、リルジェンベルクおよびヨハンソン（Ｋｊｅｌｌｂｅｒｇ，Ｌｉｌｊｅｎｂｅｒｇ，Ｊｏｈａｎｓｓｏｎ），Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９８６，２７，８７７；モシェル、マクドーガル、ドラン、スタインおよびペグ（Ｍｏｓｃｈｅｌ，ＭｃＤｏｕｇａｌｌ，Ｄｏｌａｎ，Ｓｔｉｎｅ，Ｐｅｇｇ），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９９２，３５，４４８６）製造することができる。
Ｒ″ＸＣＨＲ″′に相当し、ｓｅｃｏ－ヌクレオシドを生成する代表的な“糖”成分は、たとえばマコーミックおよびマックエリネイ（ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，ＭｃＥｌｈｉｎｎｅｙ），Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１，１９８５，９３；ルセイ、マコーミックおよびマックエリネイ（Ｌｕｃｅｙ，ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，ＭｃＥｌｈｉｎｎｅｙ），Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１，１９９０，７９５に記載の方法により製造される。
式ＩにおいてＹがリボシルまたはデオキシリボシルである化合物（ヌクレオシド）は、O^6－ベンジルグアニンリボシドおよび２－デオキシリボシドの合成と同様な方法により製造することができる（モシェル（Ｍｏｓｃｈｅｌ）ら，１９９２；参考：ガオ、ファシ、ガフネイ（Ｇａｏ，Ｆａｔｈｉ，Ｇａｆｆｎｅｙ）ら，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，１９９２，５７，６９５４；モシェル、ハギンスおよびディップル（Ｍｏｓｃｈｅｌ，Ｈｕｄｇｉｎｓ，Ｄｉｐｐｌｅ），Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１９８１，１０３，５４８９）（前記リボシドの製造を参照されたい）。
産業上の有用性

本発明化合物の使用量は、腫瘍細胞を処置するのに必要な有効量に従って異なる。適切な用量は、処置すべき腫瘍細胞においてＡＴａｓｅ活性の枯渇を生じる本発明化合物濃度を生じるもの、たとえばアルキル化剤による化学療法の前に約１－２０００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは１－８００ｍｇ／ｋｇ、特に１－１２０ｍｇ／ｋｇである。

本発明の薬剤組成物は、たとえば国際特許出願公開ＷＯ９１／１３８９８号明細書－－その内容が本明細書に参考として含まれる－－に記載される一般的な賦形剤を含む一般的な形態で配合することができる。本組成物は本発明による不活性化剤をアルキル化剤と一緒に含有することができる；または本組成物は２部分、すなわち不活性化剤を含有する一方、およびアルキル化剤を含有する他方からなってもよい。本発明化合物を宿主に投与する方法は、たとえば国際特許出願公開ＷＯ９１／１３８９８号明細書に記載される一般的な方法であってもよい。本発明による不活性化剤を患者に投与するためには、薬剤組成物は不活性化剤を、静脈内注射用としては適切なビヒクル、たとえば食塩溶液中の４０％ポリエチレングリコール４００中に、または食塩水もしくは３％エタノール（食塩水中）中に、あるいは経口投与用としては適切なカプセル内に粉末状で含有することが適切であろう。

アルキル化剤は、たとえば、または好ましくは国際特許出願公開ＷＯ９１／１３８９８号明細書に記載される既知の方法に従って一般的な投与形態で、ＡＴａｓｅ不活性化剤の投与の直後またはその最高２４時間後、好ましくは約２時間後に１回量として、かつ標準的な処置方式において使用されるものより低い用量で投与することができる。不活性化剤は一般にアルキル化剤の毒性を高めると予想されるので、用量の低下は必要であろう。クロロエチル化剤の例には、１，３ビス（２－クロロエチル）－１－ニトロソ尿素（ＢＣＮＵ）、１－（２－クロロエチル）－３－シクロヘキシル－１－ニトロソ尿素（ＣＣＮＵ）、フォテムスチン（ｆｏｔｅｍｕｓｔｉｎｅ）、ミトゾロミド（ｍｉｔｏｚｏｌｏｍｉｄｅ）およびクロメゾン（ｃｌｏｍｅｓｏｎｅ）、ならびにマコーミック、マックエリネイ、マクマリーおよびマクスウェル（ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，ＭｃＥｌｈｉｎｎｅｙ，ＭｃＭｕｒｒｙ，Ｍａｘｗｅｌｌ），Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．１，１９９１，８７７、およびビビー、ダブル、マコーミック、マックエリネイ、ラダシック、プラテシおよびテュモン（Ｂｉｂｂｙ，Ｄｏｕｂｌｅ，ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ，ＭｃＥｌｈｉｎｎｅｙ，Ｒａｄａｃｉｃ，Ｐｒａｔｅｓｉ，Ｄｕｍｏｎｔ），Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ，１９９３，８，１１５に記載のものが含まれる。メチル化剤の例には、テモゾロミド（英国特許第ＧＢ ２ １０４ ５２２号明細書）ならびにダカルバジン、プロカルバジンおよびストレプトゾシンが含まれる。

方法

組換えＡＴａｓｅの精製

ヒトＡＴａｓｅのｃＤＮＡクローニングおよび過剰発現は以前に報告されている[23]。組換え蛋白質の精製は、ウィルキンソン（Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ）ら[25,26]が述べたＤＮＡ－セルロースカラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより、またはＤＥＡＥ－セルロースイオン交換クロマトグラフィーにより行われた。後者については、ＡＴａｓｅ蛋白質を硫酸アンモニウム沈殿法により部分精製し（３０－６０％）、１０ｍＭトリス－ＨＣｌ ｐＨ７．５，１ｍＭ ＤＴＴ，２ｍＭ ＥＤＴＡ，１０％グリセロールに対して透析したのち、ＤＥＡＥ－セルロースカラムに装填した。次いでＡＴａｓｅを０－０．１Ｍ ＮａＣｌ濃度勾配で溶離した。精製されたヒトＡＴａｓｅ蛋白質は、高濃度で－２０℃において緩衝液Ｉ［５０ｍＭ－トリス／ＨＣｌ（ｐＨ８．３）／３ｍＭ－ジチオトレイトール／１ｍＭ ＥＤＴＡ］中に保存した場合、１年以上活性を保持し、数回融解および再凍結しても活性の実質的損失は認められなかった。

不活性化剤とのインキュベーションおよびＡＴａｓｅアッセイ

被験化合物を最終濃度１０ｍＭでＤＭＳＯに溶解し、使用直前に１ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミンを含有する緩衝液Ｉ（ＩＢＳＡ）で希釈した。反応を基質制限条件下にではなく、ＡＴａｓｅ制限条件下に行うために、組換えＡＴａｓｅをＩＢＳＡ中に希釈し、滴下した。各アッセイにおいて一定量のＡＴａｓｅ（６５－７５ｆｍｏｌ）を種々の量のO^6－

ベンジルグアニンまたは被験化合物と共に、１０μｇのウシ胸腺ＤＮＡを含有する全容量２００μｌのＩＢＳＡ中において３７℃で１時間インキュベートした。［^{3}Ｈ］－メチル化－ＤＮＡ基質（６．７μｇのＤＮＡおよび１００ｆｍｏｌのO^{6}－メチルグアニンを含有する１００μｌ）を添加し、反応が完了するまで３７℃で１時間インキュベーションを続けた。先の記載[21]に従ってＤＮＡを酸加水分解したのち、［^{3}Ｈ］－メチル化蛋白質を回収し、液体シンチレーション計数により定量した。試料は一般に二重にアッセイされ、実験は数回反復された。I_{50}はＡＴａｓｅ活性の５０％低下を生じるのに要する不活性化剤濃度である。

細胞培養および抽出物の調製

哺乳動物細胞を標準条件下で培養した。たとえばＲａｊｉ（バーキット（Ｂｕｒｋｉｔｔ）リンパ腫からのヒトリンパ芽球腫様（ｌｙｍｐｈｏｂｌａｓｔｏｉｄ）細胞系）細胞を、１０％ウマ血清を補充したＲＰＭＩ培地中での懸濁培養により増殖させた。Ａ３７５Ｍ細胞はヒト黒色腫細胞であり、これからヌードマウスへの皮下注射後に下記の異種移植片を確立した：ＷｉＤｒ細胞はヒト結腸癌細胞系である：ハムスター＋１２０細胞は、ＲＪＫＯと呼ばれるチャイニーズハムスター肺繊維芽細胞Ｖ７９細胞系のミトゾロミド選択された亜系である：ヨシダ（Yoshida）細胞はラット癌肉腫細胞系であり、YR_{bus}はそのブスルファン耐性亜系である：ＸＰ細胞は色素性乾皮症患者（Xeroderma pigmentosum）の皮膚に由来するＳＶ４０形質転換された繊維芽細胞系であり、ｐＨＭＧｈＡＴ２ｂ細胞はヒトＡＴａｓｅ　ｃＤＮＡを含む哺乳動物発現ベクターでトランスフェクションされたこれらの細胞の１クローンであり、ｐＨＭＧ１ａ細胞はこの発現ベクターのみ（すなわちヒトＡＴａｓｅ　ｃＤＮＡを含まない）でトランスフェクションされたこれらの細胞の１クローンである。２μｇ／ｍｌのロイペプチンを含有する低温（４℃）緩衝液Ｉに細胞ペレットを再懸濁し、ピーク間距離１２μで１０秒間、音波処理した。氷中で冷却したのち、細胞を１８μでさらに１０秒間、音波処理した。音波処理の直後にエタノール中８．７ｍｇ／ｍｌフェニルメタンスルホニルフルオリドの０．０１容量を添加し、音波処理物を１５０００ｇで４℃において１０分間遠心分離して、細胞屑をペレット化した。上清をＡＴａｓｅ活性測定のために保存した（後記参照）。

３７℃における不活性化剤の安定性

不活性化剤（ＤＭＳＯ中１０ｍＭ）を、予熱および脱ガスした緩衝液Ｉ（１ｍＭ　ＥＤＴＡ，５０ｍＭ－トリス，ｐＨ８．３）またはＰＢＳ（ｐＨ７－７．２）中に０．１ｍＭに希釈した。ＰＢＳ（リン酸緩衝食塩水）は０．８％ＮａＣｌ，０．０２％ＫＣｌ，０．１５％$Na_2H_2PO_4$，０．０２％KH_2PO_4，ｐＨ７．２である。試料を直ちにＣＡＲＹ１３分光光度計（キュベットブロックを３７℃に保持）に移し、適宜な波長（化合物のスペクトル特性に従って）において３－１０分間隔で最高８０時間走査した。結果を時間に対する吸収変化率（％）、およびこれから外挿したＴ１／２値（半減期）として表した。

哺乳動物細胞におけるＡＴａｓｅ活性の不活性化

適宜な濃度の不活性化剤または等容量のベヒクル（ＤＭＳＯ）を含有する培養培地中に、細胞を10^{6}個／ｍｌに希釈した。３７℃で２時間のインキュベーション後に細胞を遠心分離により採取し、ＰＢＳで２回洗浄し、得られた細胞ペレット（$1-2\times10^{7}$個／ペレット）を－２０℃に保存した。前記に従ってＡＴａｓｅ活性を二重の音波処理細胞抽出物において測定し、非処理対照中に存在する活性（たとえばＲａｊｉ細胞においては３５０－４５０ｆｍ／ｍｇ）に対する残存活性の％として表した。このデータからI_{50}（すなわちＡＴａｓｅ活性を５０％低下させるのに要する不活性化剤の濃度）値を外挿した。

ＢＣＮＵおよびテモゾロミドに対するＲａｊｉおよびＡ３７５Ｍ細胞の感作

不活性化剤で２時間予備処理した後のＢＣＮＵおよびテモゾロミドの細胞毒性作用に対するＲａｊｉ細胞の感作を、ＸＴＴアッセイ[22]により分析した。要約すると、細胞を１０００個／ウェルで９６ウェルのプレートに接種し、３７℃で３０分間インキュベートしたのち、適宜な濃度の不活性化剤または等容量のベヒクルを含有する培地を添加した。３７℃で２時間のインキュベーション後に、漸増する量のＢＣＮＵ、テモゾロミドまたは等容量のベヒクルを含有する培地を添加し、細胞を６日間増殖させた。この時点でＸＴＴ溶液を

添加し、細胞を３７℃でさらに４時間インキュベートした。得られた赤／橙色のホルマザン反応生成物を、ミクロタイタープレート読み取り装置により４５０ｎｍにおける吸収を測定することによって定量した。

ＢＣＮＵの細胞毒性作用に対するＡ３７５Ｍ細胞の感作を、前記のＸＴＴアッセイと下記において異なるＭＴＴアッセイ[24]により分析した。Ａ３７５Ｍ細胞（１０００個／ウェル）を２４時間増殖させ、次いで不活性化剤で処理し、２時間後にＢＣＮＵで処理した。６日後にＭＴＴ溶液（４ｍｇ／ｍｌ）を添加し、細胞を３７℃で３時間インキュベートした。培地を吸引し、得られた紫色のホルマザン結晶をＤＭＳＯ（１２０μｌ）に可溶化し、ミクロタイタープレート読み取り装置で５４０ｎｍにおける吸収を測定することにより細胞生存率を定量した。

このデータから、一定範囲のＢＣＮＵまたはテモゾロミド用量につき、不活性化剤の存在下および不在下の両方において、対照ウェルにおける増殖に対する細胞増殖率を判定した。ＢＣＮＵに対するＲａｊｉ感作（D_{90}・^{C}／D_{90}・^{I}）は、ＢＣＮＵ単独使用に際してのデータに関して計算されたD_{90}（すなわち非処理対照に対し９０％の増殖、すなわち１０％の増殖阻害が生じた用量）（D_{90}・^{C}）をＢＣＮＵプラス不活性化剤に関してのもの（D_{90}・^{I}）で割ることにより判定された。従って１の値は不活性化剤による感作が無いことを示す。テモゾロミドに対するＲａｊｉ感作およびＢＣＮＵに対するＡ３７５Ｍ感作を、対応するD_{50}値（すなわち５０％の増殖阻害が生じた用量）により判定した。

不活性化剤またはそれらの加水分解産物に対する哺乳動物細胞の感受性

細胞増殖のみに対する作用を評価するために、色素性乾皮症細胞およびチャイニーズハムスターＶ７９細胞を、漸増する濃度（最高６００μＭ）の選ばれた不活性化剤に３７℃で２時間暴露した。場合により、不活性化剤の分解生成物が細胞増殖を阻害する程度を評価するために、不活性化剤を３７℃で２０時間加水分解し、次いでＲａｊｉ細胞に添加した。６日後に前記に従って細胞増殖の程度を判定した。

テモゾロミドに対する骨髄細胞の感作（ＧＭ－ＣＦＣアッセイ）

顆粒球／マクロファージコロニー形成細胞（ＧＭ－ＣＦＣ）アッセイのために、心臓胸郭手術を受けている患者から一次ヒト骨髄試料を入手した。試料から赤血球を除去したのち、１０μＭの不活性化剤または等容量のＤＭＳＯ、２０％のウシ胎児血清、１０％の５６３７調整培地（増殖因子の供給源）、および０．３％、寒天ノーブル（ｎｏｂｌｅ）を含有する３００ｍＯｓＭアイスコーブズ（Ｉｓｃｏｖｅｓ）培地中$1-2\times10^{5}$個／ｍｌで、適宜な用量のテモゾロミドを入れた１ｍｌのペトリ皿に接種し、３７℃で５％CO_2および９５％空気の雰囲気においてインキュベートした。９日後に５０個を越える細胞からなるコロニーを計数した。これらのコロニーは顆粒球／マクロファージ系統の前駆細胞（ｈｕＧＭ－ＣＦＣ）であった。生存率をゼロ用量のテモゾロミドにおけるコロニー数の％として表した。

異種移植片の研究

動物

体重２５－３５ｇのＢＡＬＢ－Ｃ由来の無胸腺症雄マウス（ｎｕ／ｎｕ無胸腺症）を、ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ（Paterson Institute for Cancer Research）、クリスティー・ホスピタルＮＨＳトラスト（Christie Hospital NHS Trsut）、英国マンチェスターＭ２０　９　ＢＸ、ウィルムスロー・ロード、の集団内交配（ｉｎ－ｈｏｕｓｅ　ｂｒｅｅｄｉｎｇ）コロニーから求めた（ＡＳＵマウス）。動物は実験に必要になるまで無菌環境に収容された。１実験においてはマウスをハーラン－オラック、ハーランＵＫリミティッド、ショーズ・ファーム、英国オクソンＯＸ６ＯＰＴ、ブラックソーン、バイセスター、から求めた（ＯＬＡＣマウス）。これらのマウスは体重１７－２３ｇであり、併用（不活性化剤とＢＣＮＵ）処置の毒性作用に対して、より感受性であることがその後見出された。このため、より低い用量を投与した。

細胞

Ａ３７５Ｍ（ヒト黒色腫）細胞を１０％ウシ胎児血清を含有するＤＭＥＭ中で増殖させた。細胞を０．０１％トリプシンと共にインキュベートすることにより、インビボ接種用に

調製した。

腫瘍

１００μｌのＰＢＳ中の細胞（１０^{6}）を８－１０週齢のｎｕ／ｎｕ無胸腺症マウスの右側腹部に皮下注射した。これらの細胞を実験動物内へ継代するために、３－４週間、腫瘍に発達させた。２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍの大きさの腫瘍塊を右側腹部に皮下移植した。これらの動物は７－１０日で不活性化剤実験に使用しうる状態となった。

薬物処理

ｎｕ／ｎｕマウスを、１０－２５ｍｇ／ｋｇのＢＣＮＵ（腹腔内）の６０－９０分前に、３０または６０ｍｇ／ｋｇのＯ^{6}－ベンジルグアニンまたはＢ．４２０５、および適宜なベヒクル対照（腹腔内）で処置した。Ｏ^{6}－ベンジルグアニンおよびＢ．４２０５はトウモロコシ油中の５ｍｇ／ｋｇ溶液として、またＢＣＮＵ（２ｍｇ／ｍｌ）はＰＢＳ＋３％エタノール中に調製された。

腫瘍の測定

異種移植片腫瘍の測定は１－２日目毎にデジタルのぎすを用いて作業員により行われた。式（ｈ×ｗ×ｌ）π／６により腫瘍の体積を計算した。実験動物も１－２日目毎に秤量された。対照動物の腫瘍が最大許容体積（すなわち１ｃｍ×１ｃｍ×１ｃｍ）に達するまで測定を継続した。

結果

表４、５および６は不活性化剤それぞれについての物理的、生化学的およびインビボデータを示す。挙げられた試験は方法の節に説明されている。

表　4

不活性化剤	M.Wt	I_{50}(μM)	T1/2(h) 緩衝液I中	Raji I_{50} (μM)	T1/2(h) PBS中	Raji 感作 O.1μM	(D_{90}.C/D_{90}.I) 0.5μM	1.0μM
O^6-ベンジルグアニン	241	0.04	>64	0.10	>16	*1.9±0.7	*2.0±0.4	*3.8±1.8
O^6-アリルグアニン B.4203	191	22	>64					
O^6-フルフリルグアニン・1/2H_2O B.4205	240	0.08	0.3	0.04	0.17	2.6		5.7
O^6-テニルグアニン・1/3EtOH B.4206	262	0.018	1.2	0.02	0.6	8.4		8.0
O^6-3-チエニルメチルグアニン・1MeOH B.4209	279	0.03	>80	0.06	>16	1.6		6.0
O^6-3-フリルメチルグアニン B.4212	231	0.15		0.15	>16	1.5	1.4	2.8
O^6-ピペロニルグアニン3/4H_2O B.4213	299	0.02	1.3	0.05	0.72	2.7		10.7
O^6-(2-ナフチルメチル)グアニン	291	0.15		0.03	>16	1.2	2.1	2.9

★ 8回の別個の実験の平均

JP 4054057 B2 2008.2.27

表　4（続）

不活性化剤	M.Wt	I_{50}(μM)	T1/2(h) 緩衝液I中	Raji I_{50} (μM)	T1/2(h) PBS中	Raji 感作 O.1μM	(D_{90}.C/D_{90}.I) 0.5μM	1.0μM
B.4214								
DL-O^6-(α-メチルベンジル)グアニン	255	>60						
B.4218								
O^6-(2-メチルベンジル)グアニン	255	58						
B.4220								
O^6-(5-メチルテニル)グアニン	261	9		>1.0	>16	1.0	1.0	1.0
B.4221								
O^6-(5-メチルフルフリル)グアニン・1/2H_2O	254	10		>1.0	>16	1.0	1.0	1.0
B.4222								
O^6-(3-メチルテニル)グアニン	260	0.65		0.47	>16	1.4	1.9	2.1
B.4226								
O^6-(2-ベンゾ[b]チエニルメチル) グアニン・1MeOH	329	0.03	9.7	0.06	6.7	1.6	1.6	10.0
B.4229								
O^6-(5-メトキシカルボニルフルフリル) グアニン・1.5H_2O	316	0.09		0.25	>16	1.2	2.1	2.5

JP 4054057 B2 2008.2.27

表　4（続）

不活性化剤	M.Wt	I_{50}(μM)	T1/2(h) 緩衝液I中	Rajl I_{50} (μM)	T1/2(h) PBS中	Rajl O.1μM	感作	(D_{90}.C/D_{90}.I) 0.5μM	1.0μM
B.4231									
O^6-(2-メトキシベンジル)グアニン・1/2H_2O	280	60							
B.4234									
O^6-(5-カルボキシフルフリル)グアニン	306	60		>1.0	>16	1.0		1.0	1.0
B.4265									
O^6-(1-ナフチルメチル)グアニン・1/2MeOH	307	95	60						
B.4266									
O^6-(2-ベンゾフラニルメチル)グアニン・1MeOH	313	0.035			>16				
B.4268									
O^6-ピペロニルグアノシン・2H_2O	453	0.75			8				
B.4269									
O^6-(5-ブロモテニル)グアニン	326	0.0045		0.006					
B.4271									
O^6-(5-アザピペロニル)グアニン・1/4EtOH	298	0.23			>16				
B.4273									
O^6-(5-シアノフルフリル)グアニン・H_2O	256	0.006							
B.4274									
O^6-(5-オキサゾリルメチル)グアニン・1/4H_2O	274	0.34							

表　4（続）

不活性化剤	M.Wt	I_{50}(μM)	T1/2(h) 緩衝液I中	Raji I_{50} (μM)	T1/2(h) PBS中	Raji：感作 O.1μM	$(D_{90}.^{C}/D_{90}.^{I})$ 0.5μM	1.0μM
B. 1275 O^6（5 チアゾリルメチル）グアニン・1/2H_2O	257	0.033						
B. 1276 O^6-(2 ベンゾ[b]チエニルメチル) グアノシン・H_2O	464	0.35						
B. 1279 O^6-テニルグアノシン・1/2H_2O	388	0.9						

表５　哺乳動物細胞におけるＡＴａｓｅの不活性化　I_{50}（μＭ）

	細胞系				
	ハムスター	ラット	ヒト	ヒト	ヒト
不活性化剤	+１２０	ヨシダ	ＸＰ	Ｒａｊｉ	ＷｉＤｒ
O^6-ベンジルグアニン	0.20	0.14	0.07	0.10	>0.09
Ｂ．４２０３	0.12	0.06	0.06	0.04	0.08
Ｂ．４２０５	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02

表６　Ａ３７５Ｍ感作（D_{50}・^{c}／D_{50}・^{i}）

不活性化剤	0.5uM	1.0uM	5.0uM
O^6-ベンジルグアニン	3.1	2.3	4.2
O^6-アリルグアニン	1.3		1.9
B.4203	2.0		2.5
B.4205	2.8	2.3	3.5
B.4206	3.3		4.6
B.4209		2.5	
B.4212	2.3		2.5
B.4213		2.0	
B.4220		1.3	
B.4221		1.0	
B.4222		1.4	
B.4226	3.8		4.5
B.4229		1.8	
B.4234		0.8	
B.4266	6.3		6.3

図１は、４種類の化合物を用いたインビトロＡＴａｓｅ不活性化アッセイの結果を示す。Ｂ．４２０６はＢｅＧより若干有効であったが、Ｂ．４２１２およびＢ．４２０５は採用したアッセイ条件下ではかなり良好であった。Ｂ．４２０３はＢｅＧほど有効ではなかった。

図２は、０．１μＭの不活性化剤ではＢ．４２０５がＢＣＮＵの増殖阻害作用に対するＲａｊｉ細胞の感作においてＢｅＧより有効であったことを示す：１．０μＭの不活性化剤

では、この点においてＢ．４２０５とＢｅＧは効果が等しかった。
図３は、０．１μＭの不活性化剤では、Ｂ．４２０５の方がテモゾロミドの増殖阻害作用に対するＲａｊｉ細胞の感作においてＢｅＧより有効であったが、不活性化剤の用量が増加するのに伴ってＢｅＧによる感作はより有効になり、一方Ｂ．４２０５による感作は同じであったことを示す。ＢｅＧについては明瞭な用量応答が見られるが、Ｂ．４２０５についてはこの用量応答が欠如することは、図４にいっそう明瞭に示される。
図５は、１００μＭ以上の用量のＢ．４２０３（すなわちこの化合物のI_{50}用量より少なくとも１００倍高い）によりＶ７９細胞の増殖阻害が若干生じたが、Ｂ．４２０５については使用した最大濃度に及ぶまでこのような作用は見られなかったことを示す。
図６は、ＸＰ細胞がＢ．４２０３の増殖阻害作用に対して感受性であるが、これらの細胞はＢ．４２０５の作用に対してはＶ７９細胞より感受性が高かったことを示す。しかし増殖阻害に要した用量はＡＴａｓｅ不活性化に要したものより少なくとも１００倍高かった。これらの不活性化剤の固有の増殖阻害作用はアルキル化剤の増殖阻害作用に対する細胞の感作に、検出可能なほどには関与しないと結論することができる。
図７は、提示した化合物が加水分解されたのち（方法を参照されたい）、アルキル化剤をさらに添加せずに細胞に添加された場合、Ｒａｊｉ細胞において実質的な増殖阻害作用を生じなかったことを示す。従ってこれらの実験条件下では、これらの物質とアルキル化剤を併用した際に見られる増殖阻害に対してこれらの物質の分解産物は関与しないと予想される。
図８－１３は、異種移植片試験の結果をより詳細に示す。O^6－ベンジルグアニンまたはＢ．４２０５に暴露したのちのＡＴａｓｅ活性の枯渇および回復を、不活性化剤投与の２または２４時間後に屠殺した動物の組織から調製したＡ３７５腫瘍異種移植片（図８）抽出物において測定した。図９－１３は、方法の節に記載したようにＢＣＮＵと併用したO^6－ベンジルグアニンまたはＢ．４２０５に対する、ヌードマウスにおけるＡ３７５腫瘍異種移植片の感作を示す。各図において上側のグラフは、実験経過時間にわたる腫瘍体積の増加率を示す。下側のグラフは、各処理群の動物数、および処理後の生存数を示す。これらのグラフは、腫瘍体積の縮小においてＢ．４２０５がO^6－ベンジルグアニン（ＢｅＧ）に匹敵し、かつＢＣＮＵと併用した際にＢＣＮＵと併用したＢｅＧより実質的に毒性が低いことを示す。ヒトの患者においては、特に米国では皮膚悪性黒色腫をＢＣＮＵで治療するので（バルチ、ハフトン、ペーターズ（Ｂａｌｃｈ，Ｃ．Ｍ．，Ｈｏｕｇｈｔｏｎ，Ａ．，Ｐｅｔｅｒｓ，Ｌ．）（１９８９）“皮膚黒色腫”；Ｃａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｓｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，デビタ、ヘルマン、ローゼンバーグ（Ｄｅ Ｖｉｔａ，Ｖ．Ｔ．，Ｈｅｌｍａｎ，Ｓ．，Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．）（編者）ｐｐ１４９９－１５４２，リピンコット：フィラデルフィア）、ヌードマウスにおいて増殖させたヒト黒色腫異種移植片は臨床的に関連の高い動物モデル系である。
図１４は、前記の方法の節に記載したように、テモゾロミドに対するヒト骨髄細胞の感作についての試験結果を示す。骨髄細胞はそれぞれＣ、ＤおよびＥと表示される３人の患者から得られた。提示した生存曲線は不活性化剤／テモゾロミド併用処置の細胞毒性作用に関連する。この作用は低下させるべきである。患者ＣおよびＥは、Ｂ．４２０５がO^6－ベンジルグアニン（O^6ＢｅＧ）より小さな感作作用をもつことを示す；患者Ｄについては、差がなかったが、この結果はヒト材料についての科学的試験においては妥当な変異であるとみなされる。
表７は５人の患者Ａ－Ｅ（図１７の場合と同じ患者Ｃ－Ｅを含む）から得た骨髄細胞に対する不活性化剤単独の毒性作用を示す。Ｂ．４２０５についての結果はO^6－ベンジルグアニンについての結果に匹敵するものである。患者Ｂの細胞は他の試料と比較してＢｅＧおよびＢ．４２０５の両方に対してほぼ２倍の感受性であったことを留意されたい。

表７　骨髄細胞における不活性化剤（１０μＭ）の毒性

患者	実験の日付	コロニー数 対照(すなわち不活性化剤なし)の%として O^6-ベンジルグアニン	B.4205
A	05/02/93	95	91
B	25/03/93	46	46
C	17/05/93	88	97
D	05/05/93	88	118
E	05/05/93	89	89

所見の概要

１）すべての化合物をそれらがインビトロアッセイにおいて標準条件下で組換えヒトＡＴａｓｅを不活性化する効力につき試験した。これらの条件下では２種類の化合物（Ｂ．４２１４およびＢ．４２１７）は使用した最高濃度までＡＴａｓｅを不活性化しなかったが、これらはＲ′がメチルの化合物であった。残りの化合物は０．００４５－９５μＭのＩ$_{50}$値でＡＴａｓｅを不活性化した。８種類の化合物（Ｂ．４２０５、Ｂ．４２０６、Ｂ．４２１２、Ｂ．４２２６、Ｂ．４２６６、Ｂ．４２６９、Ｂ．４２７３、Ｂ．４２７５）はＢｅＧより低いＩ$_{50}$値をもっていた（表４）。

２）不活性化剤は水溶液中において種々の速度で加水分解を受けた（半減期０．１７ないし＞８０時間）が、これはＡＴａｓｅ不活性化剤としてのそれらの効率に関係がなかった（表４）。

３）インビトロでＡＴａｓｅの不活性化に有効であった化合物（Ｉ$_{50}$＜１．０μＭ）は、ヒト細胞においてもインビトロアッセイにおいて組換え蛋白質を用いて見られたものより一般にわずかに（平均で約１．５倍）高いＩ$_{50}$値でＡＴａｓｅを不活性化した（表４）。

４）Ｂ．４２０５はヒト、ラットおよびチャイニーズハムスター細胞において同様な有効性でＡＴａｓｅを不活性化した（Ｉ$_{50}$値０．０２－０．０３）。Ｂ．４２０３についてはこの範囲は０．０４－０．１２であった。使用した細胞系においては、Ｂ．４２０５およびＢ．４２０３はＢｅＧより最高７倍有効であった（表５）。

５）Ｂ．４２０３およびＢ．４２０５は試験したＸＰ細胞に対して毒性であり、かつＢ．４２０３は試験したＶ７９細胞に対して毒性であったが、ただしＢＣＮＵに対する感作が観察されたものより少なくとも１００倍高い濃度においてのみであった（図５および６）。

６）ＡＴａｓｅの不活性化についてインビトロで有効であった化合物（Ｉ$_{50}$＜１．０μＭ）およびＲａｊｉ細胞において有効であった化合物（Ｉ$_{50}$＜１．０μＭ）は、これを試験したＢＣＮＵの増殖阻害作用に対してもＲａｊｉおよびＡ３７５Ｍ細胞を感作した（表４）。

７）不活性化剤濃度０．１μＭで、Ｂ．４２０５はテモゾロミドの増殖阻害作用に対するＲａｊｉ細胞の感作において、ＢｅＧより有効であった（図３）。

８）インビトロアッセイを利用して、どの化合物がＢＣＮＵおよび関連の細胞毒性物質の増殖阻害作用に対する哺乳動物細胞の最も有効な感作物質であると思われるかを予想することができる。

９）Ｂ．４２０５は、ヌードマウス内で増殖したヒト黒色腫異種移植片をＢＣＮＵの増殖阻害作用に対して感作することにおいて、ＢｅＧと同様またはそれよりわずかに有効であった（図９－１３）。

１０）Ｂ．４２０５は、ヌードマウス内で増殖したヒト黒色腫異種移植片のＡＴａｓｅを不活性化することにおいて、ＢｅＧと同様に有効であった（図８）。
１１）インビトロアッセイおよび／または異種移植片ＡＴａｓｅ枯渇アッセイを利用して、どの化合物がＢＣＮＵおよび関連の細胞毒性物質の増殖阻害作用に対する黒色腫異種移植片の最も有効な感作物質となる可能性があるかを予想することができる。
１２）処置した動物の最高７０％までを死亡させたＢｅＧと対照的に、Ｂ．４２０５は採用した条件下でＢＣＮＵの急性毒性作用に対する、ヒト黒色腫異種移植片を保有するヌードマウスの感受性にほとんど影響を及ぼさなかった（図９－１３）。
１３）ＢｅＧは試験した３つのヒト骨髄試料においてＧＭ－ＣＦＣをテモゾロミドの毒性作用に対して感作したが、これらの試料のうち２つにおいてはＢ．４２０５はほとんど、または全く感作を生じなかった。従ってこのアッセイは、臨床においてＢＣＮＵおよび関連物質と併用した場合に起こる可能性のあるＡＴａｓｅ不活性化剤の骨髄抑制作用を予想するために利用することができる（図１４）。

参考文献

1. ハワースおよびジョーンズ
W.N. Haworth and W.G.M. Jones, J.Chem.Soc., 1944, 667

2. ライヒスタイン
T. Reichstein, Helv.Chim.Acta, 9, 1926, 1066.

3. ボッチ、カスナチ、ドセナおよびマーシェリ
V. Bocchi, G. Casnati, A. Dossena and R. Marchelli, Synthesis, 1979, 961.

4. フィナン P.A. Finan, J.Chem.Soc., 1963, 3917;
ムーアおよびケリー J.A. Moore and J.E. Kelly, J. Polym.Sci., Polym.Chem.Ed., 22, 1984, 863.

5. キールマイヤー
J. Kiermayer, Chemiker-Zeitung, 19, 1895, 1004.

6. カロッチ、カンパーナおよびバリニ
A. Carotti, F. Campagna and R. Ballini, Synthesis, 1979, 56.

7. フロイド、キンスマン、ロシャン-アリおよびブラウン
A.J. Floyd, R.G. Kinsman, Y. Roshan-Ali and D.W. Brown, Tetrahedron, 39, 1983, 3881

8. スー、ブー-ホワおよびソン
V.T. Suu, N.P. Buu-Hoi and N.D. Xuong, Bull.Soc.Chim.France, 1962, 1875.

9. ライヒスタインおよびライヒスタイン
T. Reichstein and L. Reichstein Helv.Chim.Acta, 13, 1930, 1275.

10. タケシタ、マメツカおよびモトムラ
H. Takeshita, H. Mametsuka and H. Motomura. J. Heterocycl.Chim., 23, 1986, 1211.

11. ウォルフおよびウェイラード
F.J. Wolf and J. Weijlard, Org.Synth.,Coll.Vol.4, 1963, 124.

12. バン・ロイセン、ホーゲンブームおよびシデリウス
A.M. van Leusen, B.E. Hoogenboom and H. Siderius, Tetrahedron Lett., 1972, 2369.

13. マケスティア、フラマングおよびアブデラウアハブ
A. Maquestiau, R. Flammang and F.B. Abdelouahab, Heterocycles, 29, 1989, 103.

14. ファラブ
S. Fallab, Helv.Chim.Acta, 35, 1952, 215
15. ケンデ、カワムラおよびデビタ
A.S. Kende, K. Kawamura and R.J. DeVita, J.Amer.Chem.Soc., 112, 1990, 4070.
16. トロフィメンコ
S. Trofimenko, J.Org.Chem., 28, 1963, 3243.
17. ソーニーおよびウィルソン(シェル・インタナショナーレ)、欧州特許第395,174号明細書,1989 (Chem.Abs., 114, 143410s).
18. ダラッカー、フェヒターおよびミューズ
F. Dallacker, P. Fechter and V. Mues, Z. Naturforsch., 34b, 1979, 1729.
19. フールナリ
P. Fournari, Bull.Soc.Chim.France, 1963, 488.
20. グレーン
L. Grehn, Chem.Scr., 16, 1980, 72.
21. モルテンおよびマージソン
Morten, J.E.N. & Margison, G.P. (1988) Carcinogenesis 9, 45-49
22. スクディエロ、シューメーカー、パウル、モンクス、ティエルネー、ノフツィガー、カレンス、セニフおよびボイド
Scudiero, D.A., Shoemaker R.J., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D, & Boyd M.R. (1988), Cancer Research 48, 4827-4833
23. ファン、ポッター、ラファーティー、ワトソン、コークウェル、シール、オコンネルおよびマージソン
Fan, C.-Y., Potter, P.M., Rafferty, J.A., Watson, A.J., Cawkwell, L., Searle, P.F., O'Connor, P.J. and Margison, G.P. (1991) Nucleic Acids Res. 18, 5723-5727
24. カーミシェル、デグラフ、ガツダー、ミンナ、ミッチェル。テトラゾリウムに基づく半自動化比色アッセイの評価:化学的感受性試験の評価。
Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47 : 936-942.
25. ウィルキンソン、ポッター、コークウェル、ジョージアディス、ペイテル、スワン

およびマージソン

Wilkinson, M.C., Potter, P.M., Cawkwell, L., Georgiadis, P., Patel, D., Swann, P.F. and Margison, G.P. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 8475-8484.

26. ウィルキンソン、クーパー、サウザン、ポッターおよびマージソン

Wilkinson, M.C., Cooper, D.P., Southan, C., Potter, P.M. & Margison, G.P. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 13-16.

本明細書中において略号“１ｈ”または“２ｈ”などは、“１時間”、“２時間”などを意味する。

【図１】

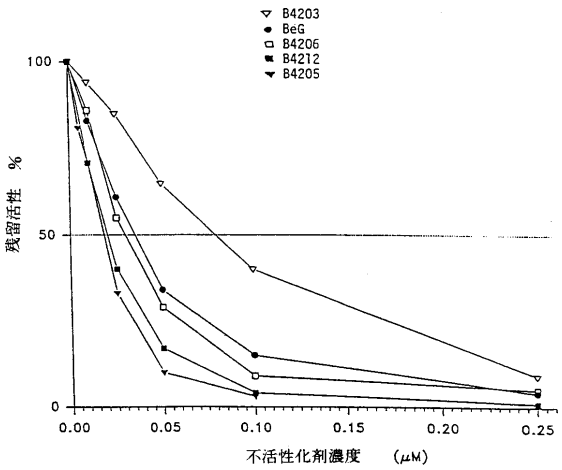


Fig. 1

【図２】

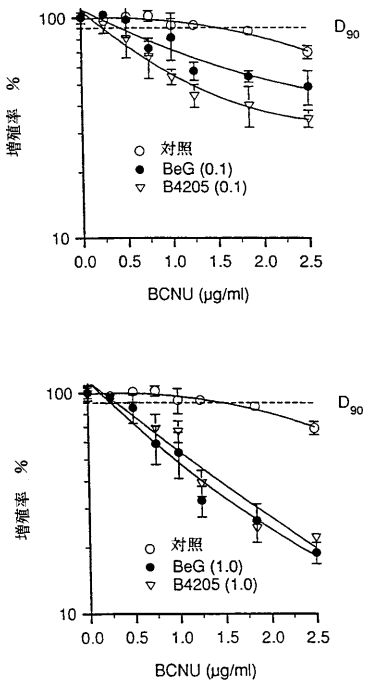


Fig. 2

【図３】

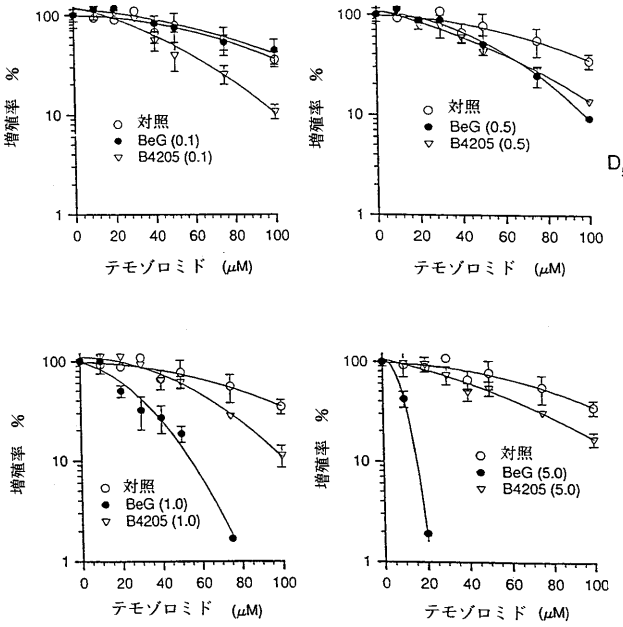


Fig. 3

【図４】

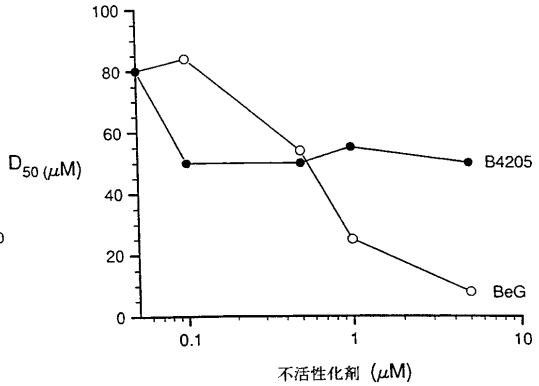


Fig. 4

【図５】

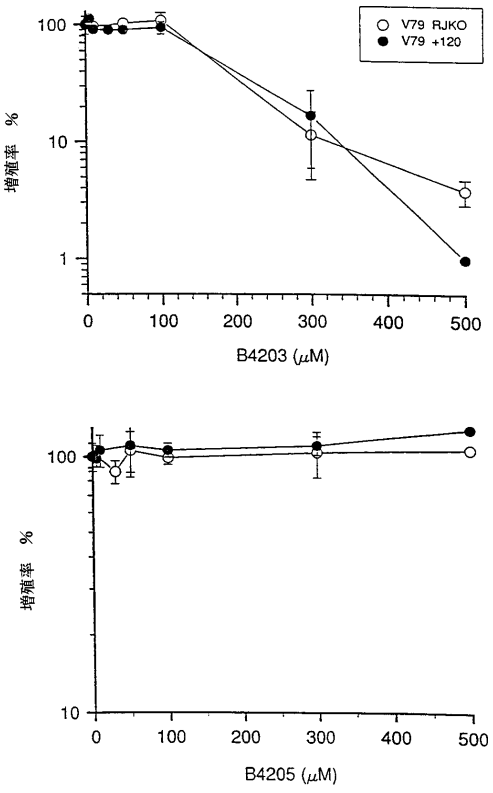


Fig. 5

【図６】

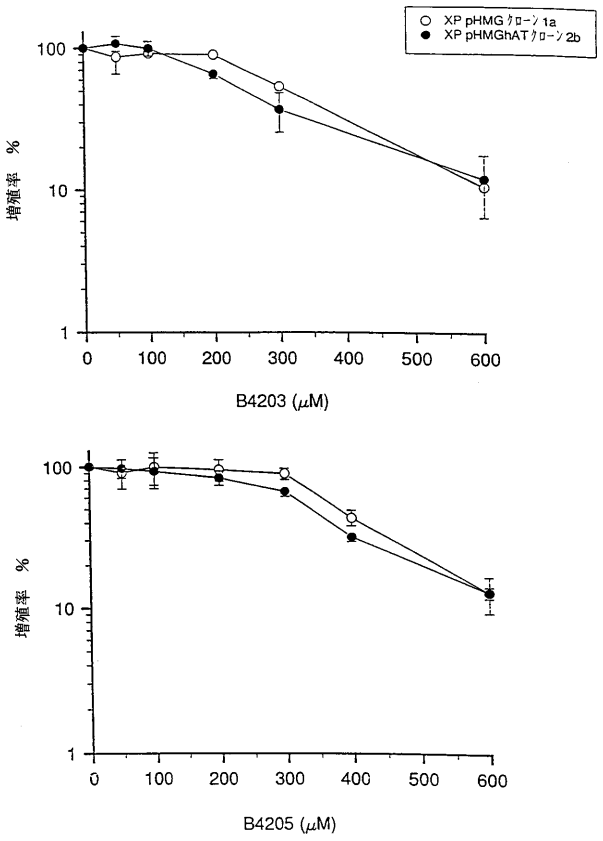


Fig. 6

【図７】

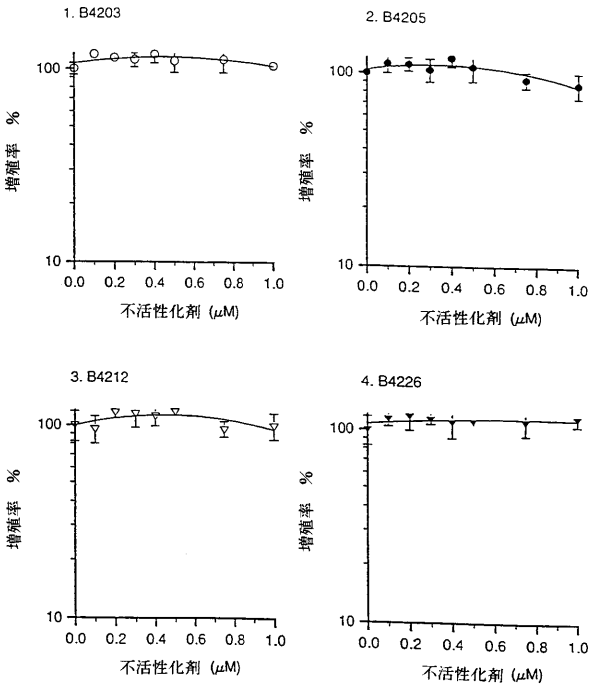


Fig. 7

【図８】

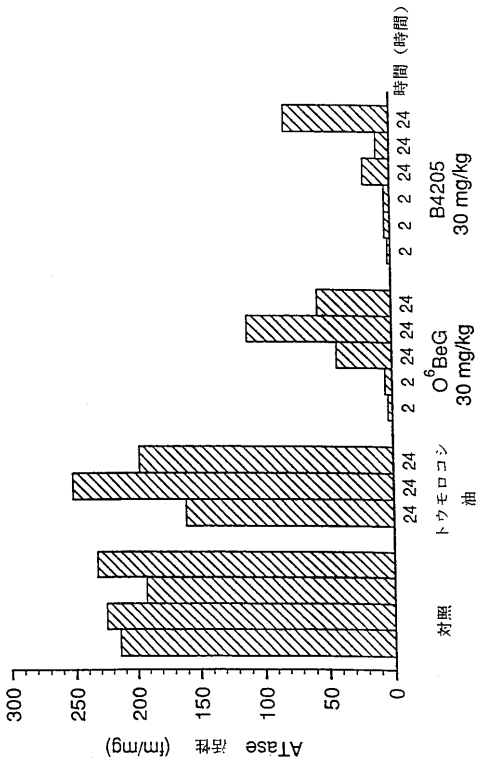


Fig. 8

【図９】

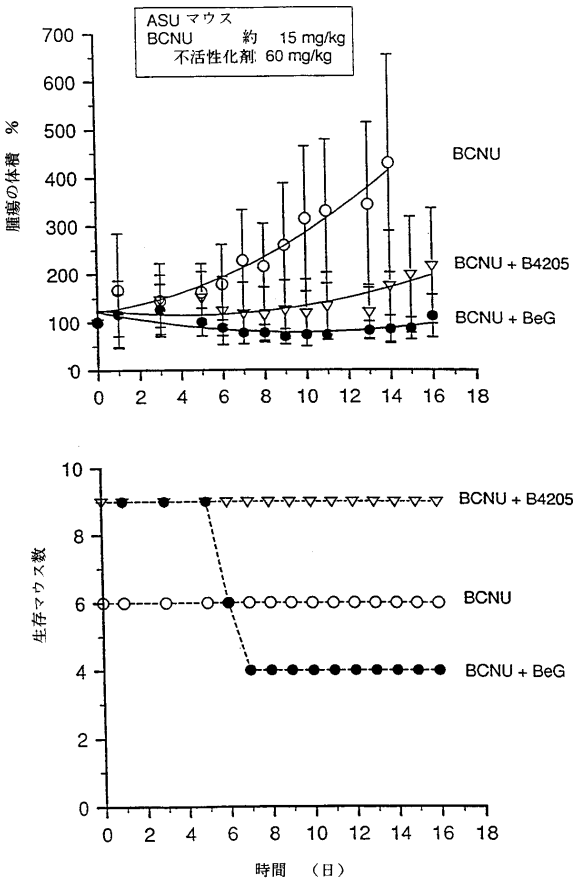


Fig. 9

【図１０】

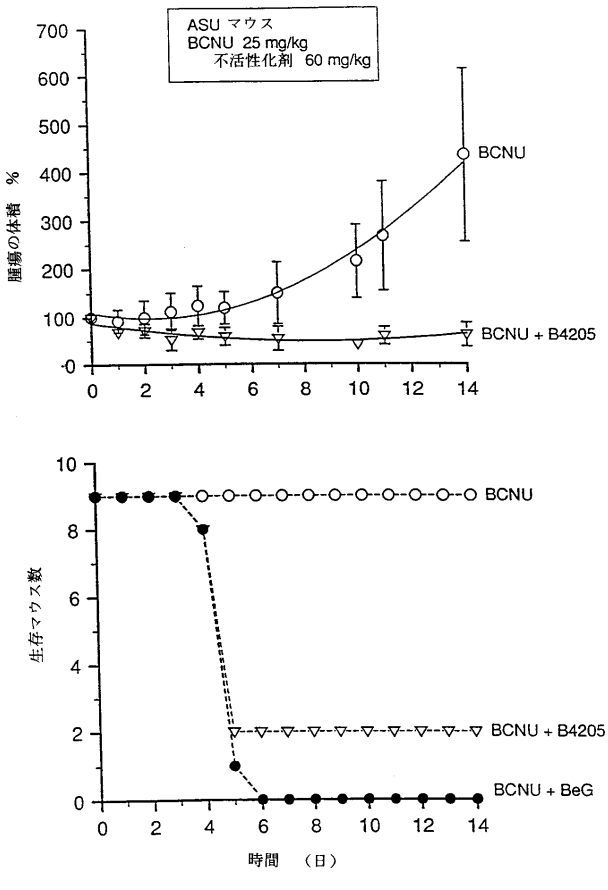


Fig. 10

【図１１】

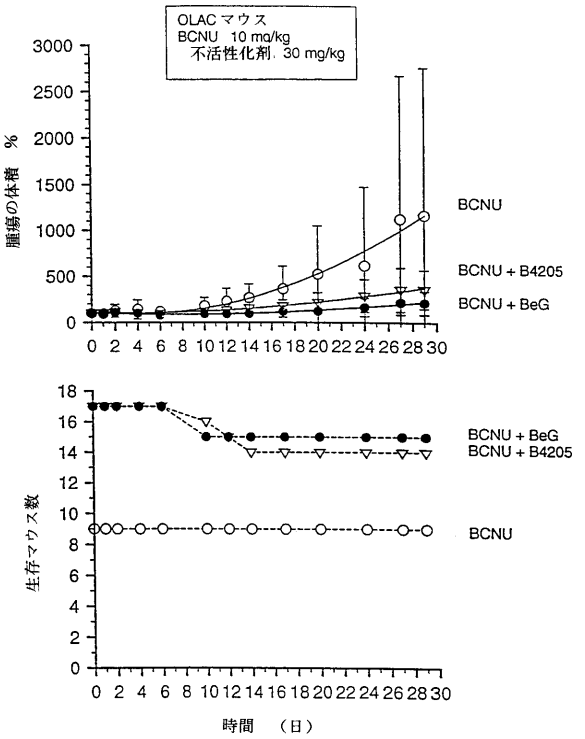


Fig. 11

【図１２】

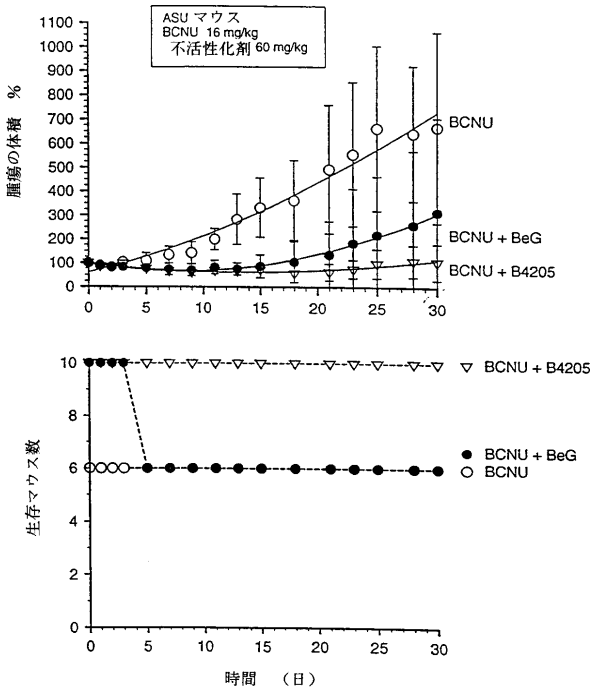


Fig. 12

【図１３】

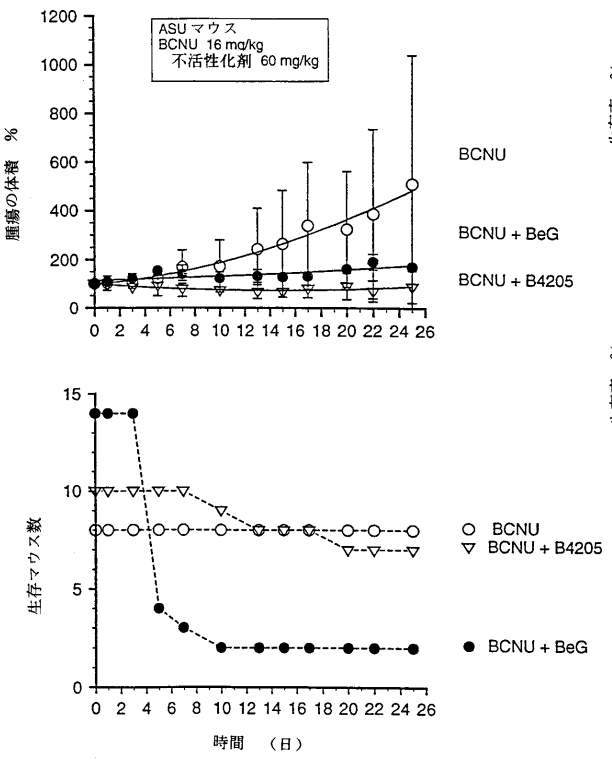


Fig. 13

【図１４】

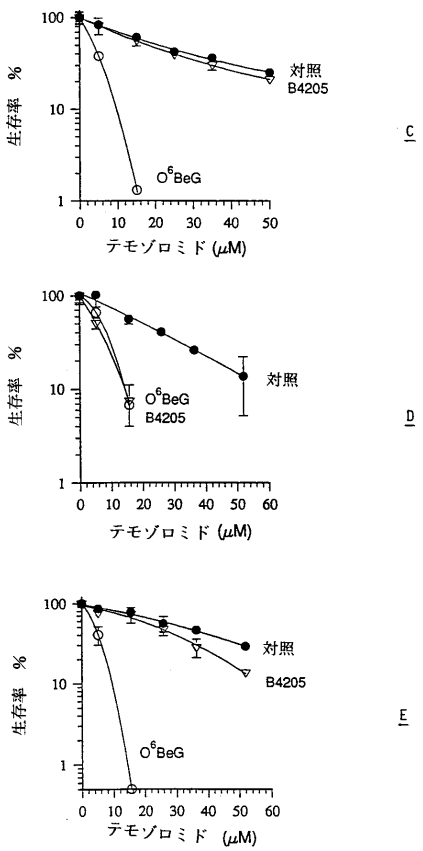


Fig. 14

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 43/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 43/00 １１１

(74)代理人
弁理士 小林 泰
(74)代理人
弁理士 富田 博行
(72)発明者 マクマリー，トーマス・ブライアン・ハミルトン
アイルランド国ダブリン ２，トリニティ・カレッジ，ザ・ユニバーシティ・ケミカル・ラボラトリー内
(72)発明者 マクエルヒニー，ロバート・スタンレイ
アイルランド国ダブリン ２，トリニティ・カレッジ，ザ・ユニバーシティ・ケミカル・ラボラトリー内
(72)発明者 マコーミック，ジョアン・エリザベス
アイルランド国ダブリン ２，トリニティ・カレッジ，ザ・ユニバーシティ・ケミカル・ラボラトリー内
(72)発明者 エルダー，ローデリック・ヒュー
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内
(72)発明者 ケリー，ジェーン
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内
(72)発明者 マージソン，ジョフリー・ポール
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内
(72)発明者 ラファーティ，ジョセフ・アンソニー
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内
(72)発明者 ワトソン，アマンダ・ジーン
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内
(72)発明者 ウィリントン，マーク・アンドリュー
イギリス国マンチェスター エム２０・９ビーエックス，ウィルムスロー・ロード（番地なし），クリスティ・ホスピタル，ペーターソン・インスティチュート・フォー・キャンサー・リサーチ，シーアールシー・デパートメント・オブ・カーシノジェネシス内

審査官 大野 晃

(56)参考文献 米国特許第０５０９１４３０（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07D473/18
A61K 31/522

A61K 31/708
CA(STN)
REGISTRY(STN)