(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 3 月 12 日(12.03.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/034038 A1

(51) 国際特許分類:
C07H 19/073 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01) *C07H 19/10* (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01) *C07H 19/11* (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01) *C07H 19/20* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/073456

(22) 国際出願日: 2014 年 9 月 5 日(05.09.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-185327 2013 年 9 月 6 日(06.09.2013) JP

(71) 出願人: 学校法人早稲田大学(WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町１丁目１０４番地 Tokyo (JP). 株式会社フロンティア(FRONTIER COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1690051 東京都新宿区西早稲田１－１０－７ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 菊田敏輝(KIKUTA, Toshiteru); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町１丁目１０４番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 並木秀男(NAMIKI, Hideo); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町１丁目１０４番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 牛木 護(USHIKI, Mamoru); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目１４番１号 郵政福祉琴平ビル３階 Tokyo (JP).

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

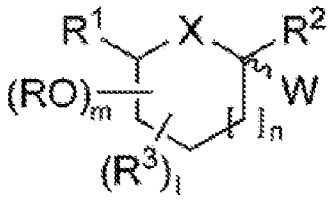
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: COMPOUND HAVING CELL PROLIFERATION-INHIBITING ACTIVITY, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, AND SCREENING METHOD

(54) 発明の名称 : 細胞増殖抑制活性を有する化合物、医薬組成物及びスクリーニング方法



（１）

(57) **Abstract**: [Problem] The purpose of the present invention is to develop a pharmaceutical composition that is for malignant tumor treatment and/or prevention and that by using a compound that is normally present *in vivo* and affects a cellular signal transduction system, is capable of inhibiting proliferation or of killing only tumor cells while having little effect on normal cells, tissue and organs and that has no side effects and is highly safe. [Solution] Provided is a pharmaceutical composition that is for malignant tumor treatment and/or prevention and that contains the effective dose of the compound represented by formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof. In formula 1, X is O or S, n is 0, 1, or 2, m is an integer of 0 to 5, l is 0, 1 or 2, R is H and the like, R1 is H and the like, R2 is H and the like, R3 is F and the like, and W is a heterocycle or derivative thereof.

(57) 要約: 【課題】生体内に常在し、細胞情報伝達系に影響する化合物を利用することにより、正常な細胞、組織及び器官への影響が小さく、腫瘍細胞のみを増殖抑制又は死滅可能であり、副作用がなく安全性の高い、悪性腫瘍の治療及び ／又は予防のための医薬組成物を開発すること。 【解決手段】下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩の有効量を含む、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物を提供する。 前記式１において、 Ｘは、Ｏ又はＳ、 ｎは０、１又は２、 ｍは０ないし５の整数、 ｌは０、１又は２ ＲはＨ等、 Ｒ１はＨ等、 Ｒ２はＨ等、 Ｒ３はＦ等、及び、 Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

WO 2015/034038 A1

明　細　書

発明の名称 ：

細胞増殖抑制活性を有する化合物、医薬組成物及びスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、腫瘍細胞への細胞増殖抑制活性の選択性の高いヌクレオシド誘導体化合物、及び該化合物を有効成分として含有する腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物に関する。また、本発明は、腫瘍細胞の細胞膜上に存在する酵素及び／又は腫瘍細胞から細胞外に分泌される酵素により代謝されることにより、細胞内に取り込まれ、細胞増殖抑制作用を発現する化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、我が国における死因の第一位は、悪性腫瘍であり、悪性腫瘍に対する治療及び／又は予防のために多くの抗腫瘍剤が開発されている。そして、これらの抗腫瘍剤として、多くのヌクレオシド誘導体が開発されている。

[0003] ヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、チミジン、ウリジン、及び、シチジン）のリン酸化エステル誘導体であるヌクレオチドは、遺伝情報の保存や発現をつかさどるＤＮＡやＲＮＡの構成成分として生体内に豊富に存在し、種々の生命現象で重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、アデノシン５’－三リン酸は、高エネルギー物質として生体内のエネルギー代謝に関与している。また、環状リン酸エステル誘導体であるｃＡＭＰ及びｃＧＭＰは細胞内でセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達に関与している。

[0004] また、ヌクレオシドのプリン塩基やピリミジン塩基の構造の一部を修飾した誘導体、糖部分の水酸基を置換又は修飾した誘導体、及び、糖部分を伴わないプリン塩基やピリミジン塩基自体の誘導体が、前記ヌクレオチドの疑似化合物として生体内で作用する特性を利用して、抗腫瘍剤として使用されている。具体的には、前記抗腫瘍剤としてシタラビン（Ａｒａ－Ｃ）、ゲムシ

タビン、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）等をはじめとした多くの化合物が腫瘍治療の化学療法で使用されている（特許文献１～３）。

[0005] しかし、一般的にこれらの薬剤を用いる化学療法では、副作用が深刻な問題となる。例えば、シタラビンはＤＮＡポリメラーゼを阻害し（非特許文献１）、ゲムシタビンはＤＮＡ合成を直接的及び間接的に阻害し（非特許文献２）、５－フルオロウラシルは、チミジル酸合成を阻害して腫瘍細胞の増殖を抑制することを目的とする（非特許文献３）が、これらの薬物は生体内の腫瘍細胞以外の細胞に作用し、副作用を発現するとの問題を有する。

[0006] 一方、細胞には、ＤＮＡ損傷修復に代表される自己修復・自己治癒機能が存在し、個々の細胞が生きていくために必要とされる能力である。これにより、細胞内で問題が生じた場合でも、ある程度までは自己修復・自己治癒することが可能である。これは組織や器官レベルにおいても同様であり、外傷が治癒したり、手術で一部摘出された肝臓が元の大きさに回復したりする現象がよく知られている。

[0007] このような自己修復・自己治癒機能は、腫瘍形成に対しても発揮されると考えられ、正常細胞から腫瘍細胞への何らかの情報伝達が存在すると予想された。そして、５’－ヌクレオチダーゼは、腫瘍患者の血清濃度の上昇が認められるところから（非特許文献４）、この情報伝達を担う化合物として、遺伝情報の保存や発現に関与し、生体内に常在するヌクレオシド誘導体が利用されると予想された。すなわち、ヌクレオシド誘導体は、腫瘍化した細胞に対してその活動を停止させる何らかの特性を有すると考えられた。また、この特性を有する化合物を利用することにより、腫瘍細胞への選択的作用の向上との従来の抗腫瘍剤にない優れた特性を有する抗腫瘍剤又は腫瘍治療用医薬組成物の創製が期待された。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開昭５５－００２６０１号公報

特許文献2：特開昭６１－１４８１９３号公報

特許文献3：特開昭５２－０７８８８７号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｈｉｇａｓｈｉｇａｗａ　Ｍ．ら、Ｍｅｄ．Ｏｎｃｏｌ．　＆　Ｔｕｍｏｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒ．、７、２２３（１９９０）

非特許文献2：Ｐｌｕｎｋｅｔｔ，Ｗ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、５１、６１１０（１９９１）

非特許文献3：Ｈａｒｔｍａｎｎ　Ｋ．Ｕ．ら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２３６、３００６（１９６１）

非特許文献4：Ｓｃｈｗａｒｔｚ　ＭＫら、Ｃａｎｃｅｒ、１８：８８６（１９６５）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

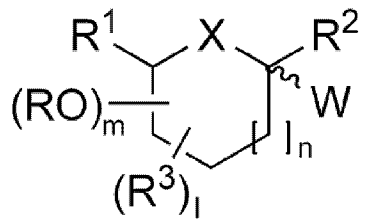
[0010] 本発明の課題は、生体内に常在し、正常な細胞、組織及び器官への影響が小さく、腫瘍細胞のみを増殖抑制又は死滅可能な、副作用がなく安全性の高い化合物を有効成分として含有する腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物、及び、前記化合物のスクリーニング方法を開発することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、正常細胞が腫瘍細胞に対して細胞増殖候補化合物として、生体内に常在する化合物であり、かつ、腫瘍患者でその代謝系酵素の活性が亢進している化合物であるヌクレオシド誘導体、特にヌクレオチド誘導体を選択した。そして、本発明者らは、生体内常在性化合物の腫瘍細胞に対する抑制効果を評価し、チミジン誘導体が、正常細胞に影響しない濃度で腫瘍細胞に選択的に細胞増殖抑制作用及び細胞死惹起作用を有することを見出し、その構造活性相関を明らかにすることにより本発明を完成させた。

[0012] 具体的には、本発明は、下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物を提供する。

[化1]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎは０、１又は２、

ｍは０ないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＨ、

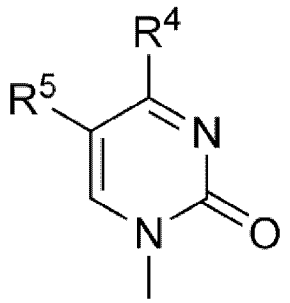
Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

[0013] 本発明の前記化合物において、前記Ｗは、ピリミジン基又はその誘導体の場合がある。

[0014] 本発明の前記化合物において、前記Ｗは、下記式２で表される場合がある。

[化2]



（式２）

前記式２において、R^4及びR^5は、独立して、Ｈ、－ＯＨ、－NH_2、－CH_3、－CH_2CH_3、－CH_2OH、－$NHCOCH_3$、－$OCOCH_3$又は－CH_2OCOCH_3を表す。

[0015] 本発明の前記化合物において、前記式２のR^4はアミノ基の場合がある。

[0016] 本発明の前記化合物において、

前記式１の、

ＸはＯ、

ｎは１、

ｍは１、

ｌは０、

ＲはＨ、

R^1は－CH_2OH、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、及び、

R^2はＨの場合がある。

[0017] 本発明の前記化合物において、前記式１では、２－デオキシ－Ｄ－リボース及び２－ヒドロキシ－Ｄ－リボース、又は、その５’－－リン酸エステル体がＷに結合する場合がある。

[0018] 本発明の前記化合物において、前記式１で表される化合物は、腫瘍細胞の細胞膜上の又は細胞外へ分泌されたヌクレオチダーゼでチミジンに代謝され、細胞に取り込まれる場合がある。

[0019] 本発明は、本発明の前記化合物及び／又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物を含有する医薬を提供する。

[0020] 本発明は、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための前記式１若しくは前記式２の化合物を提供する。

[0021] 本発明は、前記式１若しくは前記式２の化合物又はそれらの薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物の有効量を含有することを特徴とする、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物を提供する。

[0022] 本発明は、前記式１で表される化合物に、さらに、細胞増殖抑制活性を有する他の化合物を含有する、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物を提供する。

[0023] 本発明の前記医薬組成物において、前記抗腫瘍活性を有する他の化合物は、パクリタキセル、タキサジエン、バッカチンＩＩＩ、ドセタキセル、タクスチニンＡ、ブレビフォリオール、タキサスパインＤ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、シスプラチン、ムスチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、マイトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ミトラマイシン、ブレオマイシン、プロカルバジン、メトトレキサート、エトポシド、イリノテカン、タモキシフェン、イマチニブ、アフィディコリン、オファツムマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、イブリツモマブ　チウキセタン、トラスツズマブ、パニツムマブ、モガムリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、及び、リツキシマブからなる群から選択される１種以上の化合物の場合がある。

[0024] 本発明は、培養細胞の細胞膜上に存在する酵素及び／又は培養細胞から細胞外に分泌される酵素により代謝されることにより、細胞内に取り込まれ、細胞増殖抑制作用を発揮する化合物のスクリーニング方法を提供する。

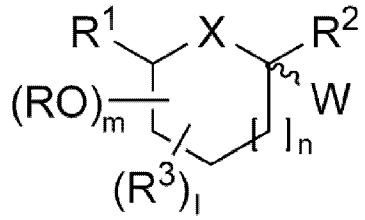
[0025] 本発明の前記スクリーニング方法において、前記培養細胞は、腫瘍細胞の場合がある。

[0026] 本発明の前記スクリーニング方法において、前記酵素は、ヌクレオチダー

ゼの場合がある。

[0027] 本発明の前記スクリーニング方法において、前記化合物は、下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物の場合がある。

[化3]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎは０、１又は２、

ｍは０ないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＨ、

Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

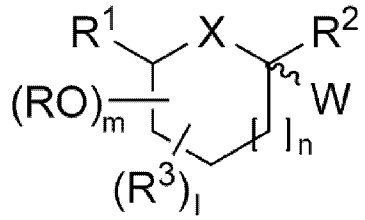
Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

[0028] 本発明は、本発明の化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物の有効量を、これを必要とする患者に投与することを含む、悪性腫瘍の治療、進行予防及び／又は予防方法を提供する。

[0029] 本発明の治療、進行予防及び／又は予防方法において、前記医薬組成物は

、下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩の有効量を含む場合がある。

[化4]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎは０、１又は２、

ｍは０ないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＨ、

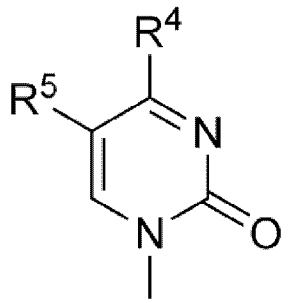
Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

[0030] 本発明の前記方法において、前記Ｗは、ピリミジン基又はその誘導体の場合がある。

[0031] 本発明の前記方法において、前記Ｗは、下記式２で表される場合がある。

[化5]



（式２）

前記式２において、R^4及びR^5は、独立して、Ｈ、－ＯＨ、－NH_2、－CH_3、－CH_2CH_3、－CH_2OH、－$NHCOCH_3$、－$OCOCH_3$又は－CH_2OCOCH_3を表す。

[0032] 本発明の前記方法において、前記式２のR^4はアミノ基の場合がある。

[0033] 本発明の前記方法の前記式１において、

Ｘは Ｏ、

ｎは１、

ｍは１、

ｌは０、

ＲはＨ、

R^1は－CH_2OH、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、及び、

R^2はＨの場合がある。

[0034] 本発明の前記方法において、前記式１では、２－デオキシ－Ｄ－リボース及び２－ヒドロキシ－Ｄ－リボース、又は、その５’－－リン酸エステル体がＷに結合する場合がある。

[0035] 本発明の前記方法において、前記式１で表される化合物は、腫瘍細胞の細胞膜上又は腫瘍細胞から分泌されたヌクレオチダーゼでチミジンに代謝され、細胞に取り込まれる場合がある。

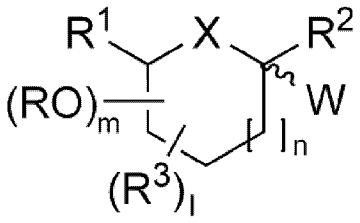
[0036] 本発明は、前記式１で表される化合物に、さらに、抗腫瘍活性を有する他

の化合物及び薬学的に許容可能な添加物を併せて、悪性腫瘍の治療、進行予防及び／又は予防のためにその有効量を、これらを必要とする患者に投与することを含む、悪性腫瘍の治療、進行予防及び／又は予防方法を提供する。

[0037] 本発明の治療、進行予防及び／又は予防方法において、前記抗腫瘍活性を有する他の化合物は、パクリタキセル、タキサジエン、バッカチンＩＩＩ、ドセタキセル、タクスチニンＡ、ブレビフォリオール、タキサスパインＤ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、シスプラチン、ムスチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、マイトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ミトラマイシン、ブレオマイシン、プロカルバジン、メトトレキサート、エトポシド、イリノテカン、タモキシフェン、イマチニブ、アフィディコリン、オファツムマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、イブリツモマブ　チウキセタン、トラスツズマブ、パニツムマブ、モガムリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、及び、リツキシマブからなる群から選択される１種以上の化合物の場合がある。

[0038] 本発明は、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬を製造するための下記式１で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、及び、それらの溶媒和物の使用を提供する。

[化6]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎは０、１又は２、

ｍは０ないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$、又は、－ＣＨ$_2$ＯＨ、

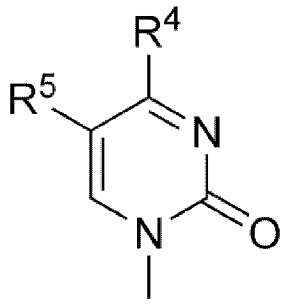
Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

[0039] 本発明の前記使用において、前記Ｗは、ピリミジン基又はその誘導体の場合がある。

[0040] 前記Ｗは、下記式２で表される場合がある。

[化7]



（式２）

前記式２において、Ｒ^{4}及びＲ^{5}は、独立して、Ｈ、－ＯＨ、－ＮＨ$_2$、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、－ＮＨＣＯＣＨ$_3$、－ＯＣＯＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＣＯＣＨ$_3$を表す。

[0041] 本発明の前記使用において、前記式２のＲ^{4}はアミノ基の場合がある。

[0042] 本発明の前記使用における前記式１において、

ＸはＯ、

ｎは１、

ｍは１、

ＩはＯ、

ＲはＨ、

R^1は－CH_2OH、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、及び、

R^2はＨの場合がある。

[0043] 本発明の前記使用における前記式１において、２－デオキシ－Ｄ－リボース及び２－ヒドロキシ－Ｄ－リボース、又は、その５’－－リン酸エステル体がＷに結合する場合がある。

[0044] 本発明の前記使用において、前記式１で表される化合物は、腫瘍細胞の細胞膜上の、又は腫瘍細胞から分泌されたヌクレオチダーゼでチミジンに代謝され、細胞に取り込まれる場合がある。

[0045] 本発明は、さらに、細胞増殖抑制活性を有する他の化合物を含有する悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬を製造するための下記式１で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、及び、それらの溶媒和物の使用を提供する。

[0046] 本発明の前記使用において、前記抗腫瘍活性を有する他の化合物は、パクリタキセル、タキサジエン、バッカチンＩＩＩ、ドセタキセル、タクスチニンＡ、ブレビフォリオール、タキサスパインＤ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、シスプラチン、ムスチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、マイトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ミトラマイシン、ブレオマイシン、プロカルバジン、メトトレキサート、エトポシド、イリノテカン、タモキシフェン、イマチニブ、アフィディコリン、オファツムマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、イブリツモマブ　チウキセタン、トラスツズマブ、パニツムマブ、モガムリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、及び、リツキシマブからなる群から選択される１種以上の化合物の場合がある。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＮＨＤＦ細胞の顕微鏡写真。図１のＡないしＩは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：対照、Ｂ：１ｍＭ　ＡＭＰ、Ｃ：１ｍＭ　ＧＭＰ、Ｄ：１ｍＭ　ＴＭＰ、Ｅ：１ｍＭ　ＣＭＰ、Ｆ：１０ｍＭ　ＡＭＰ、Ｇ：１０ｍＭ　ＧＭＰ、Ｈ：１０ｍＭ　ＴＭＰ、Ｉ：１０ｍＭ　ＣＭＰ。

[図2A]１ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＮＨＤＦ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図２Ａのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、△：１ｍＭ　ＡＭＰ、▽：１ｍＭ　ＧＭＰ、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１ｍＭ　ＣＭＰ。

[図2B]１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＮＨＤＦ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図２Ｂのプロットは、それぞれ、以下の培養条件の実験群を示す。○：対照、△：１０ｍＭ　ＡＭＰ、▽：１０ｍＭ　ＧＭＰ、□：１０ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１０ｍＭ　ＣＭＰ。

[図3]１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件で９日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真。図３のＡないしＪは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：対照、Ｂ：１ｍＭ　ＡＭＰ、Ｃ：１ｍＭ　ＧＭＰ、Ｄ：１ｍＭ　ＴＭＰ、Ｅ：１ｍＭ　ＣＭＰ、Ｆ：１０ｍＭ　ＡＭＰ、Ｇ：１０ｍＭ　ＧＭＰ、Ｈ：１０ｍＭ　ＴＭＰ、Ｉ：１０ｍＭ　ＣＭＰ、Ｊ：対照。

[図4A]１ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図４Ａのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、△：１ｍＭ　ＡＭＰ、▽：１ｍＭ　ＧＭＰ、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１ｍＭ　ＣＭＰ。

[図4B]１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図２Ｂのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、△：１０ｍＭ　ＡＭＰ、▽：１０ｍＭ　ＧＭＰ、□：１０ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１０ｍＭ　ＣＭＰ。

[図5]１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＨＬ６０細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図５のプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、△：１０ｍＭ　ＡＭＰ、▽：１０ｍＭ　ＧＭＰ、□：１０ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１０ｍＭ　ＣＭＰ。

[図6]コンフルエントな状態のＮＨＤＦ細胞に１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＮＨＤＦ細胞の顕微鏡写真。図６のＡないしＪは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：対照（非培地交換）、Ｂ：１ｍＭ　ＡＭＰ、Ｃ：１ｍＭ　ＧＭＰ、Ｄ：１ｍＭ　ＴＭＰ、Ｅ：１ｍＭ　ＣＭＰ、Ｆ：１０ｍＭ　ＡＭＰ、Ｇ：１０ｍＭ　ＧＭＰ、Ｈ：１０ｍＭ　ＴＭＰ、Ｉ：１０ｍＭ　ＣＭＰ、Ｊ：対照（培地交換）。

[図7A]１ｍＭのＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン又はチミンが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図７Ａのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、△：１ｍＭ　ＴＴＰ、▽：１ｍＭ　ＴＤＰ、◇：１ｍＭ　チミジン、×：１ｍＭ　チミン。

[図7B]１ｍＭのチミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、チミン＋２－デオキシ－Ｄ－リボース、ＴＭＰ、又は、チミジンが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図７Ｂのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、×：１ｍＭ　チミン、●：１ｍＭ　２－デオ

キシ－Ｄ－リボース、▲：１ｍＭ　チミン＋１ｍＭ　２－デオキシ－Ｄ－リボース、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、◇：１ｍＭ　チミジン。

[図8A]１ｍＭのＴＭＰ、ｃＴＭＰ、ＵＭＰ、３’－ＴＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図８Ａのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、△：１ｍＭ　ｃＴＭＰ、◇：１ｍＭ　ＵＭＰ、▽：１ｍＭ　３’－ＴＭＰ、×：１ｍＭ　ｒＴＭＰ。

[図8B]１ｍＭのＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフ。図８Ｂのプロットは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。○：対照、□：１ｍＭ　ＴＭＰ、●：１ｍＭ　ｄＵＭＰ、◇：１ｍＭ　ＵＭＰ、×：１ｍＭ　ｒＴＭＰ。

[図9]１ｍＭ又は１０ｍＭのＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真。図９のＡないしＩは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：対照、Ｂ：１ｍＭ　ＴＭＰ、Ｃ：１ｍＭ　ｄＵＭＰ、Ｄ：１ｍＭ　ＵＭＰ、Ｅ：１ｍＭ　ｒＴＭＰ、Ｆ：１０ｍＭ　ＴＭＰ、Ｇ：１０ｍＭ　ｄＵＭＰ、Ｈ：１０ｍＭ　ＵＭＰ、Ｉ：１０ｍＭ　ｒＴＭＰ。

[図10]１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ又は１０ｍＭのＴＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真。図１０のＡないしＨは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：１０ｍＭ　ＴＭＰ、Ｂ：５ｍＭ　ＴＭＰ、Ｃ：２ｍＭ　ＴＭＰ、Ｄ：１ｍＭ　ＴＭＰ、Ｅ：１０ｍＭ　ｒＴＭＰ、Ｆ：５ｍＭ　ｒＴＭＰ、Ｇ：２ｍＭ　ｒＴＭＰ、Ｈ：１ｍＭ　ｒＴＭＰ。

[図11]２４時間ごとに培地交換しながら７日間培養したＨｅＬａ細胞、及び、培地交換せずに７日培養したＨｅＬａ細胞に対するＴＭＰの影響を示す顕微鏡写真。図１１のＡないしＦは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養

条件の実験群を示す。Ａ：対照（非培地交換）、Ｂ：１ｍＭ　ＴＭＰ（非培地交換）、Ｃ：１０ｍＭ　ＴＭＰ（非培地交換）、Ｄ：対照（培地交換）、Ｅ：１ｍＭ　ＴＭＰ（培地交換）、Ｆ：１０ｍＭ　ＴＭＰ（培地交換）。

[図12]２４時間ごとに培地交換しながら７日間培養したＨｅＬａ細胞、及び、培地交換せずに７日培養したＨｅＬａ細胞に対するチミジン又はＴＭＰの影響を示す顕微鏡写真。図１２のＡないしＨは、それぞれ、以下の被験化合物を含む培養条件の実験群を示す。Ａ：対照（非培地交換）、Ｂ：１ｍＭ　チミジン（非培地交換）、Ｃ：１０ｍＭ　チミジン（非培地交換）、Ｄ：１ｍＭ　ＴＭＰ（非培地交換）、Ｅ：対照（培地交換）、Ｆ：１ｍＭ　チミジン（培地交換）、Ｇ：１０ｍＭ　チミジン（培地交換）、Ｈ：１ｍＭ　ＴＭＰ（培地交換）。

[図13]種々の濃度のＴＭＰ及び／又は抗腫瘍剤が添加された培養条件で３日間又は７日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真。図１３のＡないしＪは、それぞれ、以下の培養条件の実験群を示す。Ａ：１μＭ　シスプラチン（３日間）、Ｂ：１０μＭ　シスプラチン（３日間）、Ｃ：対照（３日間）、Ｄ：０．０１μｇ／ｍＬ　マイトマイシンＣ（３日間）、Ｅ：０．１μｇ／ｍＬ　マイトマイシンＣ（３日間）、Ｆ：１ｍＭ　ＴＭＰ（３日間）、Ｇ：１０ｎＭ　パクリタキセル（３日間）、Ｈ：１００ｎＭ　パクリタキセル（３日間）、Ｉ：１ｍＭ　ＴＭＰ（７日間）、Ｊ：対照（７日間）。

発明を実施するための形態

[0048] 本明細書において、ヌクレオシド誘導体とは、ヌクレオシドが化学的に修飾された化合物であって、生体内で代謝され、細胞増殖抑制作用及び／又は細胞死惹起作用を発揮する化合物及びその塩をいう。前記ヌクレオシドは、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン及びビタミンＢ２を含むが、これらに限定されない。前記ヌクレオシド誘導体は、リン酸エステル誘導体を含む。前記ヌクレオシド誘導体は、アデノシン５’－一リン酸、アデノシン５’－二リン酸、アデノシン５’－三リン酸、グアノシン５’－一リン酸、グアノシン５’－二リン酸、グアノシン５’－三リン酸、チミ

ジン５’－一リン酸、チミジン５’－二リン酸、チミジン５’－三リン酸、ウリジン５’－一リン酸、ウリジン５’－二リン酸、ウリジン５’－三リン酸、シチジン５’－一リン酸、シチジン５’－二リン酸、シチジン５’－三リン酸、デオキシアデノシン５’－一リン酸、デオキシアデノシン５’－二リン酸、デオキシアデノシン５’－三リン酸、デオキシグアノシン５’－一リン酸、デオキシグアノシン５’－二リン酸、デオキシグアノシン５’－三リン酸、２’－ヒドロキシチミジン５’－一リン酸、２’－ヒドロキシチミジン５’－二リン酸、２’－ヒドロキシチミジン５’－三リン酸、デオキシウリジン５’－一リン酸、デオキシウリジン５’－二リン酸、デオキシウリジン５’－三リン酸、デオキシシチジン５’－一リン酸、デオキシシチジン５’－二リン酸、デオキシシチジン５’－三リン酸、２’－デオキシチミジン３’－一リン酸、チミジン３’，５’－環状一リン酸、シタラビン（Ａｒａ－Ｃ）、ゲムシタビン、２’３’－ジデオキシチミジン５’－三リン酸、ブチルフェニルデオキシグアノシン三リン酸、カペシタビン、塩酸アンシタビン、ネララビン、ペントスタチン、及び、ブロクスウリジンを含むが、これらに限定されない。

[0049] 本明細書において、ヌクレオシド誘導体は、エナンチオマー、ジアステレオマー、及び／又は、それらの混合物を含む。

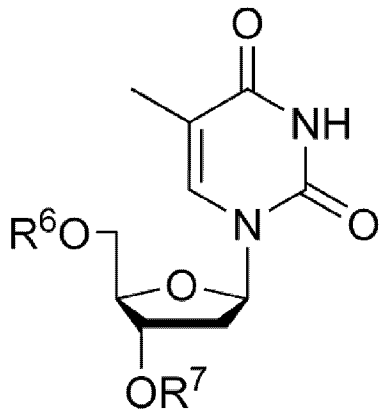
[0050] 本明細書において、リン酸エステル誘導体は脱リン酸化され、腫瘍細胞に対して特異的な抗腫瘍活性を発揮する場合がある。前記リン酸エステル誘導体は、ヌクレオチダーゼによって脱リン酸化される場合がある。前記ヌクレオチダーゼはホスホジエステル結合を加水分解できる。

[0051] 前記リン酸エステル誘導体に誘導化されることにより、腫瘍細胞膜上の、又は腫瘍細胞から分泌されたヌクレオチダーゼで脱リン酸化され、腫瘍細胞に特異的な増殖抑制活性を発揮するヌクレオチド誘導体として、チミジン、シタラビン、カペシタビン、塩酸アンシタビン、ネララビン、ペントスタチン及びブロクスウリジンのリン酸化エステル誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

[0052] これらのヌクレオチド誘導体は、例えば、特開昭５５－００２６０１号公報等に記載の方法や定法に基づき、チミジン、シタラビン、ジドブジン、アドリアマイシン（ドキソルビシン）、カペシタビン、塩酸アンシタビン、ゲムシタビン、ネララビン、クロファラビン、ペントスタチン及びブロクスウリジンをリン酸エステル化又はその誘導体とすることにより、合成することができるが、これらに限定されない。

[0053] 好ましくは、前記ヌクレオチド誘導体は、下記式３で表される化合物、その薬学的に許容可能な塩、及び、それらの溶媒和物である。

[化8]



（式３）

式３において、R^6は－Ｈもしくは－ＣＯR^8（R^8は、置換基を有していてもよいC_1～C_3のアルキル基）、R^7は－（PO_2－Ｏ）$_n$$R^9$（ｎは、１ないし３の整数、$R^9$は－Ｈもしくは－ＣＯ$R^{10}$、$R^{10}$は置換基を有していてもよい$C_1$～$C_3$のアルキル基）を表し、又は、$R^6$と$R^7$はこれらが結合する原子と一緒になってＰを含むヘテロ環を形成してもよい。

[0054] 好ましくは、前記ヌクレオシド誘導体はチミジン誘導体であり、該チミジン誘導体は、チミジン５’－一リン酸、チミジン５’－二リン酸、チミジン５’－三リン酸、チミジン３’，５’－リン酸及びその薬学的に許容可能な塩を含むが、これらに限定されない。チミジン５’－二リン酸、チミジン５’－三リン酸、及び、チミジン３’，５’－リン酸は、腫瘍細胞膜上の、又は腫瘍細胞から分泌されたヌクレオチダーゼにより速やかにリン酸エステル

が加水分解され、チミジン５’－一リン酸に代謝される。好ましくは、前記チミジン誘導体はチミジン５’－一リン酸である。チミジン５’－一リン酸は、チミジンに代謝される場合がある。

[0055] 前記式１の化合物は定法により薬学的に許容可能な塩にすることができる。薬学的に許容可能な塩は、酢酸塩、マロン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩等を含むが、これらに限定されない。

[0056] また、リン酸基を有するヌクレオシド誘導体は定法により種々のアルカリ金属、アルカリ土類金属又はアミノ酸との塩にすることができる。具体的には、式１の化合物の塩は薬学的に許容可能な塩であり、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アスパラギン塩、グルタミン塩等の場合があるが、これらに限定されない。

[0057] さらに、式１の化合物は、水和物又は薬学的に許容可能な各種溶媒和物も形成でき、本発明に含まれる。

[0058] 本発明の医薬組成物は、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤若しくは内用液剤等の経口製剤、又は、注射剤（静脈内、筋肉内等）、坐剤、軟膏剤、経皮用貼付剤等の非経口投与製剤のいずれの形態であってもよいが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物は、製剤として、当分野において通常用いられている薬剤用担体、賦形剤等を含む。

[0059] 前記経口製剤において、有効成分は、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、クロスカルメロースナトリウム、デンプン、軽質無水ケイ酸、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等の少なくとも１つの希釈剤と混合されてもよい。

[0060] 本発明の医薬組成物は、前記希釈剤以外の添加剤、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒプロメロース若しくはマクロゴール６０００のような結合剤、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム若しくはタルクのような滑沢剤、クロスポピドンのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸又はアスパラギ

ン酸のような溶解補助剤、ツイーン８０のような可塑剤、酸化チタン若しくはカルナウバロウのような光沢剤、マクロゴール６０００のような被覆剤、又は、三二酸化鉄のような着色剤を含有してもよい。

[0061] 錠剤又は丸剤は、必要により、ショ糖、ゼラチン若しくは寒天などの糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜されてもよい。

[0062] 経口投与のための内用液剤は、薬学的に許容可能なシロップ剤、懸濁シロップ剤、ドライシロップ、乳剤、懸濁剤、リモナーデ剤又はエリキシル剤等を含む。また、前記内用液剤は、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水及びエタノールを含むが、これらに限定されない溶剤で調整できる。さらに、前記内用液剤は、不活性な希釈剤以外に可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤又は防腐剤等を含有してもよい。

[0063] 非経口投与製剤としての注射剤は、無菌の水性又は非水性の溶液性注射剤、懸濁性注射剤又は乳濁性注射剤を含むが、これらに限定されない。水性の溶液剤又は懸濁剤には、例えば注射用蒸留水及び生理食塩液等が含まれる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類、又はポリソルベート８０（局方名）、トロメタモール等が含まれる。これらの注射剤は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらの注射剤は、例えば定法の濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらの注射剤は、予め製造された無菌の固体組成物を、使用時に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用されてもよい。

[0064] 前記医薬品添加剤は、前記例示された医薬品添加剤以外の公知の化合物を、公知の用法及び用量（例えば、医薬品添加物辞典２００７（日本医薬品添加剤協会編、薬事日報社、東京、２００７）に記載）で使用できる。本発明の医薬組成物の製造は、好ましくは、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規範に適合した条件（ｇｏｏｄ　ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　ｐ

ｒａｃｔｉｃｅ、ＧＭＰ基準）で実施される。

[0065] 本発明の経口用製剤及び非経口用製剤の好ましい処方例は、以下の処方例を含むが、これらに限定されない。例えば、前記経口用製剤の好ましい処方例は、１錠（重量０．６ｇ）中、チミジン５’－－リン酸３００ｍｇに、カルナウバロウ、クロスカルメロースナトリウム、軽質無水ケイ酸、酸化チタン、ステアリン酸マグネシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒプロメロース（置換度タイプ：２９１０）、マクロゴール６０００、Ｄ－マンニトールなどを添加し、打錠した後に、フィルムコーティングした錠剤である。例えば、前記非経口用製剤の好ましい処方例は、トロメタモール１６９４ｍｇを含む精製水２０ｍＬにチミジン５’－－リン酸１ｇを溶解し、ｐＨ調整剤と等張化剤で、ｐＨ８．２～８．６、浸透圧比：約４に調整した注射剤である。

[0066] 本明細書において「増殖抑制」とは、細胞増殖を抑制する作用をいい、腫瘍細胞の増殖を抑制すること、及び、腫瘍細胞の細胞死を惹起又は腫瘍細胞を死滅すること、腫瘍形成を抑制すること、腫瘍の成長を抑制すること、並びに、腫瘍、悪性腫瘍、がん又は癌の治療又は予防を行うことを含む。治療は、根治的治療及び予防的治療を含み、予防は、発症予防、進行予防、転移予防及び再発予防を含むが、これらに限定されない。

[0067] 本明細書における「腫瘍」は、エイズ関連カポジ肉腫、悪性リンパ腫（非ホジキンリンパ腫、細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病）、悪性骨・軟部腫瘍、肝臓がん、急性白血病、結腸・直腸がん、骨肉腫、子宮頸がん、小細胞肺がん、白血病（急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、及び悪性リンパ腫等）、小児悪性固形腫瘍（ユーイング肉腫ファミリー腫瘍，横紋筋肉腫，神経芽腫，網膜芽腫，肝芽腫その他肝原発悪性腫瘍，腎芽腫その他腎原発悪性腫瘍等）、消化器がん（胃がん、胆のう・胆管がん、膵臓がん、肝がん、結腸がん、直腸がん等）、食道がん、腎腫瘍、成人急性非リンパ性白血病骨髄異形成症候群（Ｍｙｅｌｏｄｙｓｐｌａｓｔｉｃ　Ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、前立腺がん、多発性骨髄腫、胆管がん・胆道がん、乳がん、尿路上皮がん、

肺がん、肺小細胞がん、非小細胞肺がん、有棘細胞がん、卵黄嚢腫瘍、卵管がん、卵巣がん、睾丸腫瘍、絨毛がん、胚細胞腫瘍（精巣腫瘍，卵巣腫瘍，性腺外腫瘍）、膀胱がん、膵がん、顆粒膜細胞腫、脳腫瘍を含むが、これらに限定されない。好ましくは、前記腫瘍は、子宮頸がん、ならびに、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病及び悪性リンパ腫などの白血病を含む。

[0068] 本明細書における「患者」は、前記腫瘍を有する動物である。前記動物は、サル、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ウシ、ネコ及びイヌ等、特に限定されないが、好ましくはヒトである。

[0069] 本明細書における「有効量」は、前記患者体内で本発明の効果を発揮するために必要な下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩の投与量であって、薬物作用を生じる最小有効量から、薬物作用を生じ、かつ、中毒作用を生じない最大有効量までの間をいう。

[0070] 前記ヌクレオシド誘導体又はその薬学的に許容可能な塩及び／又はその溶媒和物の投与量（１日量）は、疾患の症状、投与対象の年齢、人種、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定され、単回投与（１日１回投与）又は１日複数回投与される。

[0071] 前記ヌクレオシド誘導体は又はその薬学的に許容可能な塩及び／又はその溶媒和物の投与量は、通常、成人１人あたり約１日量０．０１～２０ｇ、好ましくは１日量０．１～１０．０ｇである。そして、前記投与量が１日１～４回に分けて経口又は非経口投与される。

[0072] 本発明のスクリーニング方法において、ヌクレオシド誘導体として、微生物、菌類、植物及び動物から調製される化合物、化学的に合成される化合物等が評価できる。これらの化合物は、定法に従い調製又は合成できる。例えば、特開昭５５－００２６０１号公報等に記載の方法により市販の原料より合成できるが、これらに記載の方法に限定されない。本発明のスクリーニング方法において、培養細胞は、当業者に標準的な方法で調製し、培養できる。培養方法及び培養条件は、培養する細胞の種類によって適切に選択される

。前記培養細胞は、ヒト、実験動物から採取され、培養された細胞、及び、細胞株を含むが、これらに限定されない。好ましくは、前記培養細胞は、腫瘍細胞である。前記培養細胞の由来は、サル、マウス及びラット等、特に限定されないが、好ましくはヒトである。ヒトの腫瘍細胞株は、例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）や理化学研究所バイオリソースセンターの細胞バンクから入手可能であり、例えば、Ｈｅｐ　Ｇ２細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＨｅＬａ細胞、Ｊｕｒｋａｔ細胞、ＨＬ－６０細胞を含むが、これらに限定されない。本発明のスクリーニング方法において、細胞増殖抑制作用は、被験化合物（ヌクレオシド誘導体）を添加した実験群の細胞数、ＤＮＡ量、ｍＲＮＡ量又はタンパク質量を、被験化合物を添加していない対照群の細胞数、ＤＮＡ量、ｍＲＮＡ量又はタンパク質量と比較して評価される場合がある。前記実験群及び対照群の細胞数、ＤＮＡ量、ｍＲＮＡ量及びタンパク質量の測定値は、定法により標準化した後に比較される場合がある。細胞数、ＤＮＡ量、ｍＲＮＡ量又はタンパク質量は、定法により測定できる。例えば、細胞数は、顕微鏡観察、セルソーター、ＦＡＣＳ等によって測定できる。例えば、ＤＮＡ量は、ＰＣＲ、サザンブロット等によって測定できる。例えば、ｍＲＮＡ量は、ＲＴ?ＰＣＲ、ノザンブロット等によって測定できる。例えば、タンパク質量は、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、免疫沈降法、免疫比濁法等によって測定できる。本発明のスクリーニング方法において、スクリーニング条件（例えば、被験化合物以外の化合物の種類、濃度や、培養の温度、時間や、エンドポイント等）が変更される場合がある。なお、本発明のスクリーニング方法において、培養細胞の代わりに、実験動物個体（例えば、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、腫瘍細胞を移植されたヌードマウス等）、又はこれらの動物から摘出した腫瘍組織を用いて、ヌクレオシド誘導体の細胞増殖抑制作用、細胞死惹起作用、副作用等が評価されてもよい。

[0073] 以下に説明する本発明を実施するための形態及び実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は

特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の主旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

[0074] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

実施例 1

[0075] ＮＨＤＦ細胞の増殖に対するヌクレオシド誘導体（ヌクレオチド）の影響

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製

被験化合物として、市販のアデノシン５’－－リン酸二ナトリウム（以下ＡＭＰと記載）（３０６－５０７４１、和光純薬工業株式会社）、グアノシン５’－－リン酸二ナトリウム（以下ＧＭＰと記載）（０７８－０４３６１、和光純薬工業株式会社）、チミジン５’－－リン酸二ナトリウム（以下ＴＭＰと記載）（Ｔ７００４、シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）、及び、シチジン５’－－リン酸二ナトリウム（以下ＣＭＰと記載）（０３０－０５３６３、和光純薬工業株式会社）が使用された。基本培地として、１０％ＦＢＳ（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を含むＤＭＥＭ（１，０００ｍｇ／Ｌ　Ｄ－グルコース、Ｌ－グルタミン、５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液、及び、１１０ｍｇ／Ｌ　ピルビン酸ナトリウム）（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）が使用された。前記ＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ及びＣＭＰは、それぞれ、１ｍＭ又は１０ｍＭとなるように前記基本培地（ＤＭＥＭ、１０％ＦＢＳ、抗生物質不含）に添加され、被験化合物含有培地が調製された。

[0076] 細胞培養

市販のＮＨＤＦ細胞（ヒト正常皮膚線維芽細胞：Ｌｏｎｚａ　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，　Ｉｎｃ．，　Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ，　ＵＳＡ）が、６５００細胞個／ｃｍ^{2}となるように１２穴プレート（旭硝子、東京）に播種された（各群ｎ＝６）。その後、前記ＮＨＤＦ細胞は、前記被験化

合物含有培地（１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰ）で培養された。対照として、前記ＮＨＤＦ細胞は、前記被験化合物を含まない基本培地で培養された。

[0077] 観察

前記ＮＨＤＦ細胞の変化が、ヌクレオチド存在下０、１、３、５、７及び９日後に倒立位相差顕微鏡(ライカマイクロシステムズ株式会社　ＤＭ　ＩＬ　ＬＥＤ)で経時的に観察された。

[0078] 細胞数の測定

観察後、各ウェルの細胞が０．２５％トリプシン溶液（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）で剥離され、生存細胞数が血球計算盤を用いて細胞数を測定することにより求められた。

[0079] 統計解析

各実験群と対照群とについて、ポストホックな双方向性の繰り返しのある分散分析（ｔｗｏ－ｗａｙ　ｒｅｐｅａｔｅｄ　ＡＮＯＶＡ　ｗｉｔｈ　ｐｏｓｔ－ｈｏｃ　ａｎａｌｙｓｉｓ）が行われた。ポストホック分析には、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ　ｔｅｓｔが使用された。

[0080] 結果

図１は、１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＮＨＤＦ細胞の顕微鏡写真である。図２Ａは、１ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが存在する培養条件におけるＮＨＤＦ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。１ｍＭのＡＭＰ実験群及び１ｍＭのＣＭＰ実験群では、細胞は対照群と変わらずに増殖した。１ｍＭのＧＭＰ実験群では、細胞は、対照群、１ｍＭのＡＭＰ実験群、及び、１ｍＭのＣＭＰ実験群よりも底面に広がって接着し、細胞数の増加は少なかった。１ｍＭのＴＭＰ実験群では、細胞形態は、対照群、１ｍＭのＡＭＰ実験群、及び、１ｍＭのＣＭＰ実験群と変わらないが、全体的に密度が低いままコンフルエントになった。また、１ｍＭのＴＭＰ実験群の細胞数は、対照群、１ｍＭのＡＭＰ実験群、及び、

１ｍＭのＣＭＰ実験群に比べて少なかった（図１、図２Ａ）。細胞数について、対照群と比較して、１ｍＭのＡＭＰ実験群及び１ｍＭのＣＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められなかったが、１ｍＭのＧＭＰ実験群及び１ｍＭのＴＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められた（ｐ＜０．０００１）。すなわち、１ｍＭのＡＭＰ及びＣＭＰはＮＨＤＦ細胞に作用しなかった。また、１ｍＭのＧＭＰ及びＴＭＰは細胞増殖を抑制したが、細胞死を惹起しなかった。

[0081] 図２Ｂは、１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＮＨＤＦ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。１０ｍＭのＡＭＰ実験群では、細胞は培養開始後５日まで対照群と比較すると低速に増殖したが、細胞死が培養後７日に惹起された。１０ｍＭのＧＭＰ実験群では、細胞は培養後３日まで殆ど増殖せず、細胞死が培養後５日に惹起された。１０ｍＭのＴＭＰ実験群では、細胞は培養後７日までは対照群より密度が低い状態で増殖し、培養後９日で全体的に網状の形態であった。細胞数は培養後９日まで緩やかに増加した（図１、図２Ｂ）。１０ｍＭのＣＭＰ実験群では、細胞は培養後５日まで低速で増加したが、細胞死が培養後７日に惹起された。細胞数について、対照群と比較して、１０ｍＭの４群全は統計学的な有意差が認められた（ｐ＜０．０００１）。

[0082] 以上の結果から、１ｍＭのＡＭＰ実験群及び１ｍＭのＣＭＰ実験群では正常細胞の増殖への影響が認められなかった。ＩｍＭのＧＭＰ実験群では、対照群を含む他群と相違して、細胞は底面に大きく広がって接着したため、一定面積あたりの細胞数は減少した。しかし、細胞密度の増加は認められず、細胞間隙を認めた。本結果は、細胞同士のコンタクトインヒビションによる増殖阻害の可能性を示すものである。

[0083] 一方、１ｍＭのＴＭＰ実験群では、ＮＨＤＦ細胞は細胞密度が低い状態でコンフルエントになった。本結果は、細胞がお互いにより強固に接着し、細胞そのものが他群よりも大きくなった可能性、若しくはコンタクトインヒビ

ションにより細胞数が少なくなった可能性を示すものである。

[0084] １０ｍＭのＡＭＰ実験群、１０ｍＭのＧＭＰ実験群及び１０ｍＭのＣＭＰ実験群それぞれで細胞が死滅した。一方、１０ｍＭのＴＭＰ実験群では観察期間中に細胞死が惹起されなかった。また、培養後９日では細胞密度が不均一になったが、細胞死は惹起されなかった。ＴＭＰは他のヌクレオチド（ＡＭＰ、ＧＭＰ及びＣＭＰ）と比較して高濃度においてもＮＨＤＦ細胞に対して細胞死を惹起しなかった。すなわち、１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ及びＣＭＰはＮＨＤＦ細胞を死滅するため、ＡＭＰ、ＧＭＰ及びＣＭＰは、腫瘍細胞以外の正常細胞に細胞死を惹起することが認められた。１０ｍＭのＴＭＰは、ＮＨＤＦ細胞を死滅しないため、正常細胞に対して細胞死を惹起しないことが認められた。

実施例 2

[0085] ＨｅＬａ細胞の増殖に対するヌクレオシド誘導体（ヌクレオチド）の影響

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製、細胞培養、観察、細胞数の測定、及び、統計解析は、原則として実施例１と同様に行われた。前記細胞培養では、ＨｅＬａ細胞（ヒト子宮頸がん細胞）（ＪＣＲＢ細胞バンク、大阪）が７，０００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレート（旭硝子、東京）に播種された（各群ｎ＝６）。

[0086] 結果

図３は、１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件で９日間培養されたＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真である。図４Ａは、１ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが存在する培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。１ｍＭのＡＭＰ実験群、１ｍＭのＧＭＰ実験群、及び、１ｍＭのＣＭＰ実験群では、細胞は対照群と同様に増殖した。１ｍＭのＴＭＰ実験群では他の実験群に比べて細胞増殖が抑制された。細胞数について、対照群と比較して、１ｍＭのＡＭＰ実験群、１ｍＭのＧＭＰ実験群、及び

、１ｍＭのＣＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められなかったが、１ｍＭのＴＭＰ実験群のみ統計学的な有意差が認められた（Ｐ＜０．０００１）（図３、図４Ａ）。すなわち、１ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ及びＣＭＰはＨｅＬａ細胞に作用せず、１ｍＭのＴＭＰのみが細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

[0087] 図４Ｂは、１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。対照群では細胞は培養後９日まで急速に増殖した。ＡＭＰ実験群では細胞増殖が抑制され、細胞は、対照群と比較して培養後９日まで低速で増殖した。ＧＭＰ実験群では細胞は殆ど増殖しなかったが、細胞形状の変化が培養後３日に現れ、細胞死が培養後５日に惹起された。ＴＭＰ実験群では細胞は培養後５日までＡＭＰ実験群とほぼ同じ速度で増殖したが、細胞死が培養後７日に惹起された。ＣＭＰ実験群では細胞の増殖速度は培養後５日まで対照群とほぼ同じであったが、それ以降は対照群に比べて遅かった。細胞数について、対照群と比較して、ＡＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）、ＧＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）、ＴＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）、及び、ＣＭＰ群（ｐ＝０．００１）は統計学的な有意差が認められた（図３及び図４Ｂ）。すなわち、１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ及びＴＭＰは腫瘍細胞のＨｅＬａ細胞を死滅し、ＣＭＰは増殖をわずかに抑制することが明らかとなった。

[0088] 実施例１及び２の結果から、ＴＭＰ及びＣＭＰに対する感受性が、正常細胞と、腫瘍細胞とでは異なることが明らかとなった。ここで、ＴＭＰは、生体に常在する化合物である。したがって、これらの結果は、正常細胞を死滅させず、腫瘍細胞を死滅させるＴＭＰは、副作用の少ない抗腫瘍剤として有用であることを示すものである。

実施例 3

[0089] ＨＬ６０細胞の増殖に対するヌクレオシド誘導体（ヌクレオチド）の影響

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製

被験化合物として、市販のＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ及びＣＭＰが使用された。浮遊培養用基本培地として、市販のＰＲＭＩ１６４０（Ｌ－グルタミン、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液）（ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京）が使用された。前記ＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ及びＣＭＰは、それぞれ、１０ｍＭとなるように浮遊培養用基本培地（ＰＲＭＩ１６４０、１０％ＦＢＳ、抗生物質不含）に添加され、被験化合物含有培地が調製された。

[0090] 細胞培養

ＨＬ６０細胞（ヒト前骨髄性白血病細胞）（ＪＣＲＢ細胞バンク、大阪）が、１６０,０００細胞個／ｍｌで浮遊培養用１２穴プレート（ＢＤ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ＵＳＡ）に播種された（各群ｎ＝６）。その後、前記ＨＬ６０細胞は、前記被験化合物含有培地（１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰ）で培養された。対照として、前記ＨＬ６０細胞は、前記被験化合物を含まない基本培地で培養された。

[0091] 観察

前記ＨＬ６０細胞の変化が、０、１、３、５、７、９及び１４日後に経時的に観察された。

[0092] 細胞数の測定

培地中に浮遊している細胞が培地中に均一に分布するように懸濁された後、細胞数が血球計算盤を用いて測定することにより求められた。

[0093] 統計解析

各実験群と対照群とについて、ポストホックな双方向性の繰り返しのある分散分析（Ｔｗｏ－ｗａｙ　ｒｅｐｅａｔｅｄ　ＡＮＯＶＡ　ｗｉｔｈ　ｐｏｓｔ－ｈｏｃ　ａｎａｌｙｓｉｓ）が行われた。ポストホック分析には、Ｔｕｋｅｙ　ＨＳＤ　ｔｅｓｔが使用された。

[0094] 結果

図５は、１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰが添加された培養条件におけるＨＬ６０細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の

経時変化を表すグラフである。細胞数について、対照群と比較して、ＣＭＰ実験群では統計学的な有意差が認められなかったが、ＡＭＰ実験群、ＧＭＰ実験群及びＴＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められた（３群ともにｐ＜０．０００１）。つまり、ＡＭＰ、ＧＭＰ及びＴＭＰは、ＨｅＬａ細胞に対してと同様に、ＨＬ６０細胞に対して増殖抑制効果を有するが、ＣＭＰは増殖抑制効果を有さなかった。

[0095] 以上の結果から、生体内常在性のヌクレオチド化合物による影響が、細胞の種類で、特に正常細胞と腫瘍細胞との間で異なること、及び、１０ｍＭのＴＭＰは、腫瘍細胞を死滅し、１ｍＭのＴＭＰは、腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、ＴＭＰの細胞増殖抑制効果は、ＨｅＬａ細胞及びＨＬ６０細胞で類似することが示された。

実施例 4

[0096] コンフルエント状態の正常細胞に対するヌクレオシド誘導体（ヌクレオチド）の影響

本実施例では、ＮＨＤＦ細胞のコンフルエント状態を正常組織のモデルとした。そして、ＮＨＤＦ細胞が密集している状態で高濃度ヌクレオシド誘導体（ヌクレオチド）の影響が評価された。

[0097] 材料及び方法

被験化合物含有培地の調製、細胞培養、観察、細胞数の測定、及び、統計解析は、原則として実施例１と同様に行われた。ＮＨＤＦ細胞（ヒト正常皮膚線維芽細胞）は６，５００細胞個／ｃｍ^{2}となるように１２穴プレート（旭硝子、東京）に播種され、コンフルエントになるまで基本培地で培養された（各群ｎ＝６）。その後、前記ＮＨＤＦ細胞はＰＢＳ（カルシウム／マグネシウム　フリー、ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京）で２回洗浄され、細胞培養培地が、培養後７日に基本培地から被験化合物含有培地に切り換えられた。前記ＮＨＤＦ細胞は、前記被験化合物含有培地（１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰ）で培養され、ＮＨＤＦ細胞の変化が、培地交換０、１、３、５、７、９及び１４日後に経時的に観察

された。

[0098] 結果

図６は、１ｍＭ又は１０ｍＭのＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ又はＣＭＰの培養条件で７日間培養されたＮＨＤＦ細胞の顕微鏡写真である。１ｍＭのＡＭＰ実験群、１ｍＭのＧＭＰ実験群、１ｍＭのＴＭＰ実験群、１ｍＭのＣＭＰ実験群、非培地交換対照群、及び、培地交換対照群では、明確な変化はなく、線維芽細胞に典型的なコンフルエント状態が維持された。

[0099] １０ｍＭのＡＭＰ実験群の細胞の状態は、培地交換後１日まで非培地交換対照群と培地交換対照群と同様であった。しかし、培地交換後３日から接着が弱化し、培地交換後５日以降は徐々に接着細胞数が減少し、細胞間が疎密になった。培地交換後１４日では細胞が配向性を持たない網状に並んだ。

[0100] １０ｍＭのＧＭＰ実験群では、コンフルエント状態から、培地交換３日後に細胞が存在しない空白エリアが出現した。同エリアは徐々に大きくなり、細胞がやがて死滅した（培地交換１４日後）。

[0101] １０ｍＭのＴＭＰ実験群の細胞の状態は両対照群と同様であったが、培地交換７日後から細胞間間隙が認められた。

[0102] １０ｍＭのＣＭＰ実験群では細胞が存在しない空白エリアは培地交換７日後には認めなかった。しかし、前記空白エリアは培地交換９日後に出現し、培地交換１４日後まで拡大した。

[0103] 以上の結果から、１ｍＭのヌクレオチドのいずれも細胞の形態の変化を認めず、本濃度では密集した正常細胞、すなわち正常組織には影響しないことが示された。１０ｍＭの４種のヌクレオチドの全てで、コンフルエント状態から何らかの形態変化があった。ヌクレオチドの種類によって形態は異なったが、１０ｍＭのヌクレオチドは正常組織に影響を与える可能性があることが示された。また、細胞間に十分な間隔がある状態で被験化合物含有培地で培養を開始した場合と、コンフルエント状態から被験化合物含有培地で培養を開始した場合とで、ヌクレオチドの細胞への影響が異なることが明らかとなった。

実施例 5

[0104] 腫瘍細胞の増殖に対するチミジン関連分子の影響

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製

被験化合物として、市販のＴＭＰ、チミジン５’－三リン酸ナトリウム（以下ＴＴＰと記載）（Ｔ０２５１、シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）、チミジン５’－二リン酸三ナトリウム（以下ＴＤＰと記載）（１５２１３９、和光純薬工業株式会社）、チミジン（２０５－０８０９１、和光純薬工業株式会社）、チミン（２０５－０１３９１、和光純薬工業株式会社）、２－デオキシ－Ｄ－リボース（０４５－００４７３、和光純薬工業株式会社）、５－メチル－ウリジン５’－一リン酸二ナトリウム（以下ｒＴＭＰと記載）（Ｈｏｎｇｅｎｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、上海）、2’－デオキシチミジン３’－一リン酸二ナトリウム（以下３’－ＴＭＰと記載）（Ｈｏｎｇｅｎｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、上海）、ウリジン５’－一リン酸二ナトリウム（以下ＵＭＰと記載）（２１４－００２８４、和光純薬工業株式会社）、チミジン３’，５’－環状一リン酸ナトリウム（以下ｃＴＭＰと記載）（Ｔ６７５４、シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）、及び、2’－デオキシウリジン５’－一リン酸二ナトリウム（以下ｄＵＭＰと記載）（Ｄ３８７６、シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）が使用された。基本培地として、１０％ＦＢＳ（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）を含むＤＭＥＭ（１，０００ｍｇ／Ｌ　Ｄ－グルコース、Ｌ－グルタミン、５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ緩衝液、及び、１１０ｍｇ／Ｌ　ピルビン酸ナトリウム）（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）が使用された。前記ＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン、チミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、ｒＴＭＰ、3’－ＴＭＰ、ＵＭＰ、ｃＴＭＰ及び／又はｄＵＭＰは、それぞれ、１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ又は１０ｍＭとなるように前記基本培地（ＤＭＥＭ、１０％ＦＢＳ、抗生物質不含）に添加され、被験化合物含有培地が調製された。

[0105] 細胞培養

細胞培養は、原則として実施例２と同様に行われた。ＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン及びチミンの曝露実験（図７Ａ）の細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が７，８００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。ＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン及びチミンは、それぞれ、１ｍＭの最終濃度で使用された。チミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、チミン＋２－デオキシ－Ｄ－リボース、ＴＭＰ、及び、チミジンの曝露実験（図７Ｂ）の細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が９，０００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。チミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、チミン（１ｍＭ）＋２－デオキシ－Ｄ－リボース（１ｍＭ）、ＴＭＰ、及び、チミジンは、それぞれ、１ｍＭの最終濃度で使用された。ＴＭＰ、ｃＴＭＰ、ＵＭＰ、３’－ＴＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験（図８Ａ）の細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が１３，０００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。ＴＭＰ、ｃＴＭＰ、ＵＭＰ、３’－ＴＭＰ及びｒＴＭＰは、それぞれ、１ｍＭの最終濃度で使用された。ＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験（図８Ｂ、図９）の細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が７，０００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。ＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ及びｒＴＭＰは、それぞれ、１ｍＭ又は１０ｍＭの最終濃度で使用された。ＴＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験（図１０）の細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が６，５００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。ＴＭＰ及びｒＴＭＰは、それぞれ、１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ及び１０ｍＭの最終濃度で使用された。

[0106] 観察、細胞数の測定、及び、統計解析は、実施例２と同様に行われた。

[0107] 結果

ＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン及びチミンの曝露実験

図７Ａは、１ｍＭのＴＭＰ、ＴＴＰ、ＴＤＰ、チミジン又はチミンが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。細胞数について、対照群と比較して、ＴＭＰ実験群、ＴＤＰ実験群、ＴＴＰ実験群、及び、チミジン実験群は

統計学的有意な細胞増殖抑制作用が認められ（４実験群ともにｐ＜０．０００１）、チミン実験群は統計学的な有意差が認められなかった。また、ＴＭＰ実験群と比較して、ＴＴＰ実験群、ＴＤＰ実験群、及び、チミジン実験群は統計学的有意な作用が認められなかった。

[0108] チミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、チミン＋２－デオキシ－Ｄ－リボース、ＴＭＰ、及び、チミジンの曝露実験

図７Ｂは、１ｍＭのチミン、２－デオキシ－Ｄ－リボース、チミン＋２－デオキシ－Ｄ－リボース、ＴＭＰ、又は、チミジンが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。細胞数について、対照群と比較して、ＴＭＰ実験群、及び、チミジン実験群は統計学的な有意差が認められ（２実験群ともにｐ＜０．０００１）、チミン実験群、２－デオキシ－Ｄ－リボース実験群、チミン＋２－デオキシ－Ｄ－リボース実験群は統計学的有意な作用が認められなかった。

[0109] ＴＭＰ、ｃＴＭＰ、ＵＭＰ、３’－ＴＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験

図８Ａは、１ｍＭのＴＭＰ、ｃＴＭＰ、ＵＭＰ、３’－ＴＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。細胞数について、対照群と比較して、ＴＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）、３’－ＴＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）、及び、ｃＴＭＰ実験群（ｐ＝０．０００４）は統計学的有意な細胞増殖抑制作用が認められた。ｃＴＭＰ実験群では細胞増殖は、培養開始後５日まで対照群と同様であった。その後、細胞数が減少し、細胞数は培養開始後９日でＴＭＰ実験群と同程度になった。ｒＴＭＰ実験群及びＵＭＰ実験群は対照群と比較して統計学的な有意差が認められなかった。ＴＭＰ実験群と比較して、３’－ＴＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められずＴＭＰ実験群と同様の細胞増殖抑制作用が認められた。

[0110] ＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験

図８Ｂは、１ｍＭのＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ又はｒＴＭＰが添加された

培養条件におけるＨｅＬａ細胞の生存細胞数（平均値±標準誤差、各ｎ＝６）の経時変化を表すグラフである。細胞数について、対照群と比較して、ＴＭＰ実験群（ｐ＜０．０００１）のみで統計学的有意な細胞増殖抑制作用が認められた。ｄＵＭＰ実験群では細胞増殖が培養開始後５日からわずかに抑制されたが、対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。対照群と比較して、ＵＭＰ実験群及びｒＴＭＰ実験群は統計学的な有意差が認められなかった。

[0111] 図９は、１ｍＭ又は１０ｍＭのＴＭＰ、ｄＵＭＰ、ＵＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真である。１０ｍＭのｒＴＭＰ実験群及びＴＭＰ実験群では、細胞が死滅した。１０ｍＭのｄＵＭＰ実験群では、細胞は１ｍＭのｄＵＭＰ実験群と同程度に増殖抑制されたが、死滅しなかった。１０ｍＭのＵＭＰ実験群では、細胞は対照群と同程度に増殖した。

[0112] ＴＭＰ及びｒＴＭＰの曝露実験

図１０は、１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ又は１０ｍＭのＴＭＰ又はｒＴＭＰが添加された培養条件で７日間培養したＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真である。５ｍＭ及び１０ｍＭのＴＭＰ実験群では細胞が培養開始後７日に死滅し始めた。１ｍＭ及び２ｍＭのＴＭＰ実験群では、細胞は増殖抑制されたが、死滅しなかった。５ｍＭ及び１０ｍＭのｒＴＭＰ実験群では、細胞が培養開始後５日に死滅し始め、培養開始後７日にほぼ死滅した。２ｍＭのｒＴＭＰ実験群では、細胞は増殖抑制されたが、死滅しなかった。１ｍＭのｒＴＭＰ実験群では、細胞は増殖抑制されず、対照群と同程度に増殖した。

[0113] 以上の結果から、細胞増殖は、チミン実験群及び対照群で相違が認められず、チミンは細胞増殖抑制作用を有しないことが示された。したがって、細胞増殖抑制作用の発現には、チミジン型のヌクレオチド構造が必要であり、糖部分に結合したリン酸基の数は細胞増殖抑制効果に関係しないことが明らかとなった。１ｍＭのｃＴＭＰ実験群では、ＨｅＬａ細胞は培養開始後５日まで対照群と同様に増加した後、細胞数が減少した。この結果は、ｃＴＭＰ

はＴＭＰと比較して細胞内への取込又は活性型への変換に時間を要するためである。また、ｒＴＭＰも同様の理由により、細胞増殖抑制効果を発揮するまでに時間を要するため、培養開始後７日において、１ｍＭのｒＴＭＰ実験群では細胞増殖が抑制されず、１０ｍＭのｒＴＭＰ実験群では細胞増殖が抑制された。そして、これらの結果は、ｃＴＭＰ及びｒＴＭＰはプロドラッグとして使用できることを示すものである。

実施例 6

[0114] 腫瘍細胞の増殖に対する培地交換の影響（１）

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製、細胞培養、及び、観察は、原則として実施例２と同様に行われた。細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が６，５００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。その後、前記ＨｅＬａ細胞は、前記被験化合物含有培地（１ｍＭ又は１０ｍＭのＴＭＰ）で培養された。１つの実験群は２４時間ごとに新鮮な被験化合物含有培地に交換された（培地交換実験群）。別の実験群は新鮮な被験化合物含有培地に交換せずに、同一の培地で培養した（非培地交換実験群）。

[0115] 結果

図１１は、培地交換して７日間培養したＨｅＬａ細胞、及び、培地交換せずに７日間培養したＨｅＬａ細胞に対するＴＭＰの影響を示す顕微鏡写真である。培地交換実験群では、実施例２の結果と同様に、細胞死が１０ｍＭのＴＭＰで培養後７日に惹起された。また、１ｍＭのＴＭＰは細胞増殖を抑制した。非培地交換実験群では、細胞死は１ｍＭ及び１０ｍＭのいずれの濃度のＴＭＰにおいても培養後７日に惹起されず、細胞は非培地交換対照群と同程度に増殖した。

実施例 7

[0116] 腫瘍細胞の増殖に対する培地交換の影響（２）

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製、細胞培養、及び、観察は、原則として実施例

６と同様に行われた。細胞培養では、ＨｅＬａ細胞が６，５００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。その後、前記ＨｅＬａ細胞は、前記被験化合物含有培地（１ｍＭ又は１０ｍＭのチミジン、又は、１ｍＭのＴＭＰ）で培養された。１つの実験群は２４時間ごとに新鮮な被験化合物含有培地に交換された（培地交換実験群）。別の実験群は新鮮な被験化合物含有培地に交換せずに、同一の培地で培養した（非培地交換実験群）。また、前記細胞培養では、２４時間ごとに新鮮な基本培地に交換された対照群（培地交換対照群）と、新鮮な基本培地に交換されなかった対照群（非培地交換対照群）とが使用された。

[0117] 結果

図１２は、培地交換して７日間培養したＨｅＬａ細胞、及び、培地交換せずに７日間培養したＨｅＬａ細胞に対するチミジン又はＴＭＰの影響を示す顕微鏡写真である。チミジン培地交換実験群（１ｍＭ及び１０ｍＭ）では、チミジン非培地交換実験群（１ｍＭ及び１０ｍＭ）の結果と同様に、腫瘍細胞の増殖が抑制され、チミジンの腫瘍細胞抑制効果は濃度依存的であった。チミジン非培地交換実験群では、細胞死が１０ｍＭのチミジンで培養後５日に惹起された。また、チミジン培地交換実験群（１ｍＭ）、チミジン非培地交換実験群（１ｍＭ）、及び、ＴＭＰ培地交換実験群（１ｍＭ）では、腫瘍細胞の増殖抑制効果は、ほぼ同一であった。さらに、培地交換対照群、非培地交換対照群、及び、ＴＭＰ非培地交換実験群（１ｍＭ）では、細胞死は惹起されなかった。

[0118] 前記のとおり、悪性腫瘍患者では、健常者と比較して、血中のヌクレオチダーゼ濃度が高いことが知られている。そこで、腫瘍細胞であるＨｅＬａ細胞もヌクレオチダーゼを細胞外に放出しており、ヌクレオシド誘導体、特にＴＭＰ、ＴＤＰ及びＴＴＰは、前記ヌクレオチダーゼによってチミジンに代謝（例えば、脱リン酸化）されるために、チミジン、ＴＭＰ、ＴＤＰ及びＴＴＰはいずれも腫瘍細胞を死滅及び／又は増殖抑制を示したものと考えられる（図７参照）。そして、培地交換実験群では、ヌクレオチダーゼ自体並び

にＴＭＰ、ＴＤＰ及びＴＴＰ添加培地交換実験群ではチミジンが除去されるために、腫瘍細胞の死滅及び／又は増殖抑制が惹起されない（図１１及び１２参照）。したがって、ヌクレオシドを化学的に修飾し（例えば、リン酸化）、腫瘍組織でその上昇を認めるヌクレオチダーゼにより代謝されることによって、腫瘍細胞に対する高い選択毒性を有するヌクレオシド誘導体の抗腫瘍剤を開発することができる。

実施例 8

[0119] 腫瘍細胞の形態に対する抗腫瘍剤及びＴＭＰの影響

材料及び方法

被験化合物含有培地の調製、細胞培養、及び、観察は、原則として実施例２と同様に行われた。前記被験化合物として、ＴＭＰ（１ｍＭ）、シス－ジアンミン白金（ＩＩ）ジクロリド（以下シスプラチンと記載）（シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）（１μＭ及び１０μＭ）、マイトマイシンＣ（シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）（０．０１μｇ／ｍＬ及び０．１μｇ／ｍＬ）、又は、パクリタキセル（シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）（１０ｎＭ及び１００ｎＭ）が培養培地に添加された。前記細胞培養において、ＴＭＰ実験群、シスプラチン実験群及びマイトマイシンＣ実験群では、ＨｅＬａ細胞が７，８００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。また、パクリタキセル実験群ではＨｅＬａ細胞が７，０００細胞個／ｃｍ^{2}で１２穴プレートに播種された。

[0120] 結果

図１３は、種々の濃度のＴＭＰ及び／又は抗腫瘍剤が添加された培養条件で３日間又は７日間培養されたＨｅＬａ細胞の顕微鏡写真である。対照群と比較して、１０μＭのシスプラチン実験群及び０．１μｇ／ｍＬのマイトマイシンＣ実験群では、扁平で大きく広がった形態の細胞が培養後３日に出現した。同様に、１ｍＭのＴＭＰ実験群では、扁平で大きく広がった形態の細胞が培養後７日に出現した。

[0121] シスプラチン実験群、マイトマイシンＣ実験群では、これらの化合物を添

加して増殖抑制した細胞で典型的に観察される、扁平で大きく広がった形態の細胞が出現した。したがって、ＴＭＰ実験群では、ヌクレオチダーゼにより代謝された後、シスプラチンやマイトマイシンＣと同様の作用機序（ＤＮＡの複製及び／又は転写の阻害）で、腫瘍細胞の増殖が抑制されることを示すものである。

[0122] まとめ

以上の結果より、以下の点が明らかとなった。

（１）高濃度ヌクレオチド処理による細胞への影響は、細胞増殖及び細胞死惹起作用を指標とした場合、正常細胞と腫瘍細胞とで異なる。

（２）これらの細胞への影響に対して、ＡＭＰ、ＧＭＰ、ＴＭＰ、及び、ＣＭＰとで各々影響が異なる。

（３）ＴＭＰ及びその誘導体は、他のヌクレオチドと相違し、正常細胞に影響しない濃度で、腫瘍細胞に対して細胞増殖抑制作用、及び、細胞死惹起作用が認められる。

（４）さらに、ＴＭＰ及びその誘導体は、正常組織モデルである密集正常細胞には１ｍＭの濃度では作用しない。

（５）ＴＭＰ及びその誘導体（ＴＤＰ、ＴＴＰ、ｃＴＭＰ、ｒＴＭＰ等）による腫瘍細胞に選択性の高い増殖抑制作用の発現には、リボース又はデオキシリボースの糖とチミンとを有するヌクレオシドであることが必要であり、リン酸エステルのリン酸基の数は影響しない。

（６）ＴＭＰ及びその誘導体による腫瘍細胞の増殖抑制作用の発現には、ＴＭＰ等が代謝される必要があり、この代謝酵素は、腫瘍組織で濃度が上昇しているヌクレオチダーゼであることが示された。

（７）ＴＭＰ及びその誘導体による正常細胞と比較した場合の腫瘍細胞への増殖抑制作用の発現は、腫瘍組織で上昇したヌクレオチダーゼによる活性発現体への代謝が関与する。

[0123] これらの結果から、腫瘍治療及び／又は予防用医薬組成物の有効成分としてのＴＭＰの有用性が明らかとなった。即ち、正常組織には作用せず腫瘍細

胞のみに細胞死を惹起出来れば、患者に負荷をかけずに治療することが可能である。

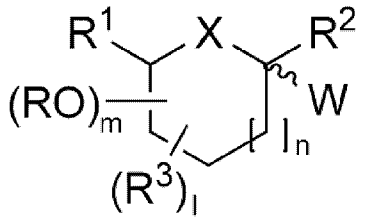
[0124] 生体内、特に細胞内に豊富に存在するヌクレオチドは、副作用がなく安全性が高い。前記結果は、生体内常在性のＴＭＰ、もしくは、腫瘍細胞膜上の、又は細胞外でヌクレオチダーゼにより代謝されるＴＤＰ、ＴＴＰ、ｃＴＭＰ、又は、これらの塩及び／又は溶媒和物を有効成分として含有する医薬組成物を用いれば、正常な細胞、組織及び器官には影響を与えずに腫瘍細胞のみを死滅させることができることを示すものである。

[0125] また、本結果は、腫瘍細胞の細胞膜上の、又は腫瘍細胞から分泌されたヌクレオチダーゼによる脱リン酸化により活性体に代謝され、抗腫瘍活性を発現するヌクレオシド類似構造を有する抗腫瘍剤のリン酸エステル誘導体、又は、これら化合物の塩及び／又は溶媒和物も、プロドラッグとして、正常な細胞、組織及び器官には影響を与えずに腫瘍細胞のみを死滅させることができることを示すものである。

請求の範囲

[請求項1] 下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物。

[化1]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎは０、１又は２、

ｍは０ないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＨ、

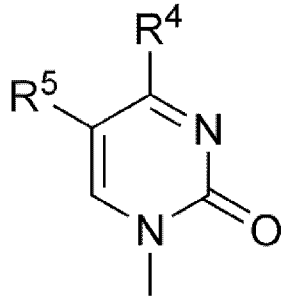
Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

[請求項2] 前記Ｗは、ピリミジン基又はその誘導体であることを特徴とする、請求項１に記載の化合物。

[請求項3] 前記Wは、下記式２で表されることを特徴とする、請求項１又は２に記載の化合物。

[化2]



（式２）

前記式２において、R^4及びR^5は、独立して、H、－OH、－NH_2、－CH_3、－CH_2CH_3、－CH_2OH、－$NHCOCH_3$、－$OCOCH_3$又は－CH_2OCOCH_3を表す。

[請求項4] 前記式２において、R^4はアミノ基であることを特徴とする、請求項１ないし３に記載の化合物。

[請求項5] 前記式１において、

Xは O、

ｎは１、

ｍは１、

ｌは０、

RはH、

R^1は－CH_2OH、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Rのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、及び、

R^2はHであることを特徴とする、請求項１ないし４に記載の化合物。

[請求項6] 前記式１において、２－デオキシ－Ｄ－リボース及び２－ヒドロキシ－Ｄ－リボース、又は、その５’－－リン酸エステル体がＷに結合することを特徴とする、請求項１ないし５に記載の化合物。

[請求項7] 前記式１で表される化合物は、腫瘍細胞の細胞膜上の、又は細胞外に分泌されたヌクレオチダーゼによりチミジンに代謝され、細胞に取り込まれることを特徴とする、請求項１に記載の化合物。

[請求項8] 請求項１ないし７に記載の化合物及び／又は薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物を含有することを特徴とする、医薬。

[請求項9] 請求項１ないし７に記載の化合物及び／又は薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物を含有することを特徴とする、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

[請求項10] 前記式１で表される化合物に、さらに、細胞増殖抑制活性を有する他の化合物を含有することを特徴とする、悪性腫瘍の治療及び／又は予防のための医薬組成物。

[請求項11] 前記抗腫瘍活性を有する他の化合物は、パクリタキセル、タキサジエン、バッカチンＩＩＩ、ドセタキセル、タクスチニンＡ、ブレビフォリオール、タキサスパインＤ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、シスプラチン、ムスチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、マイトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ミトラマイシン、ブレオマイシン、プロカルバジン、メトトレキサート、エトポシド、イリノテカン、タモキシフェン、イマチニ

ブ、アフィディコリン、オファツムマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、イブリツモマブ　チウキセタン、トラスツズマブ、パニツムマブ、モガムリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、及び、リツキシマブからなる群から選択される１種以上の化合物であることを特徴とする、請求項１０の医薬組成物。

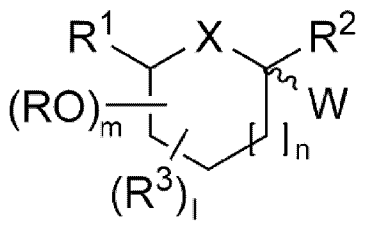
[請求項12]　培養細胞の細胞膜上に存在する酵素及び／又は培養細胞から細胞外に分泌される酵素により代謝されることにより、細胞内に取り込まれ、細胞増殖抑制作用を発揮することを特徴とする化合物のスクリーニング方法。

[請求項13]　前記培養細胞は、腫瘍細胞であることを特徴とする、請求項１２に記載の方法。

[請求項14]　前記酵素は、ヌクレオチダーゼであることを特徴とする、請求項１２又は１３に記載の方法。

[請求項15]　前記化合物は、下記式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩であることを特徴とする、請求項１２ないし１４に記載の方法。

[化3]



（式１）

前記式１において、

Ｘは、Ｏ又はＳ、

ｎはＯ、１又は２、

ｍはＯないし５の整数、

Ｉは０、１又は２

ＲはＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又はＲ^{1}のリン酸基と共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

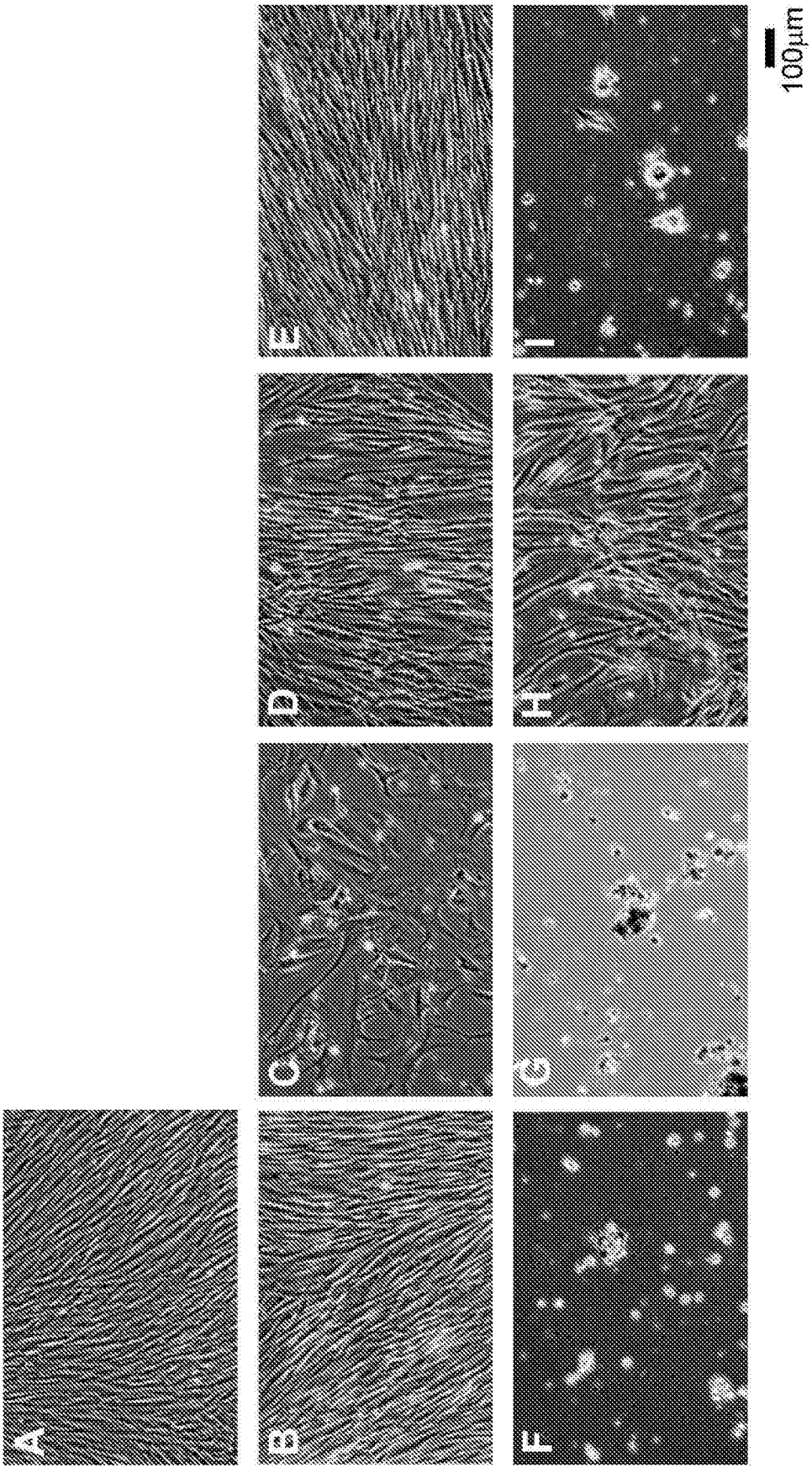
Ｒ^{1}はＨ、－ＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$ＯＨ、リン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、又は、前記Ｒのリン酸基を共有するリン酸基でエステル化されたヒドロキシメチル基、

Ｒ^{2}はＨ、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＯＨ、

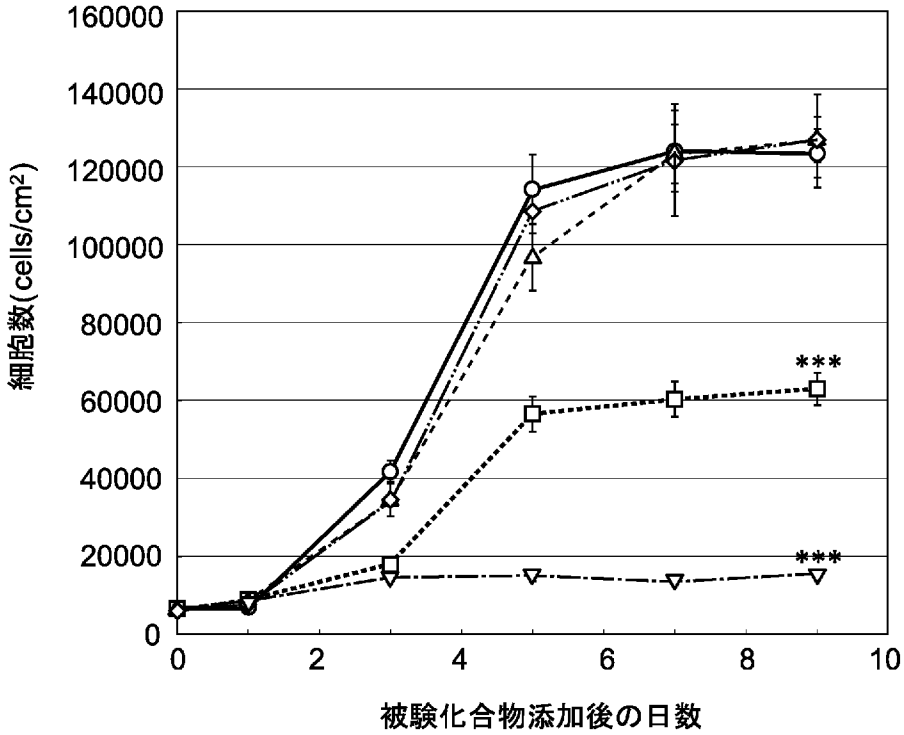
Ｒ^{3}はＦ、－ＮＨ$_2$又はＮ$_3$、及び、

Ｗは複素環及びその誘導体を表す。

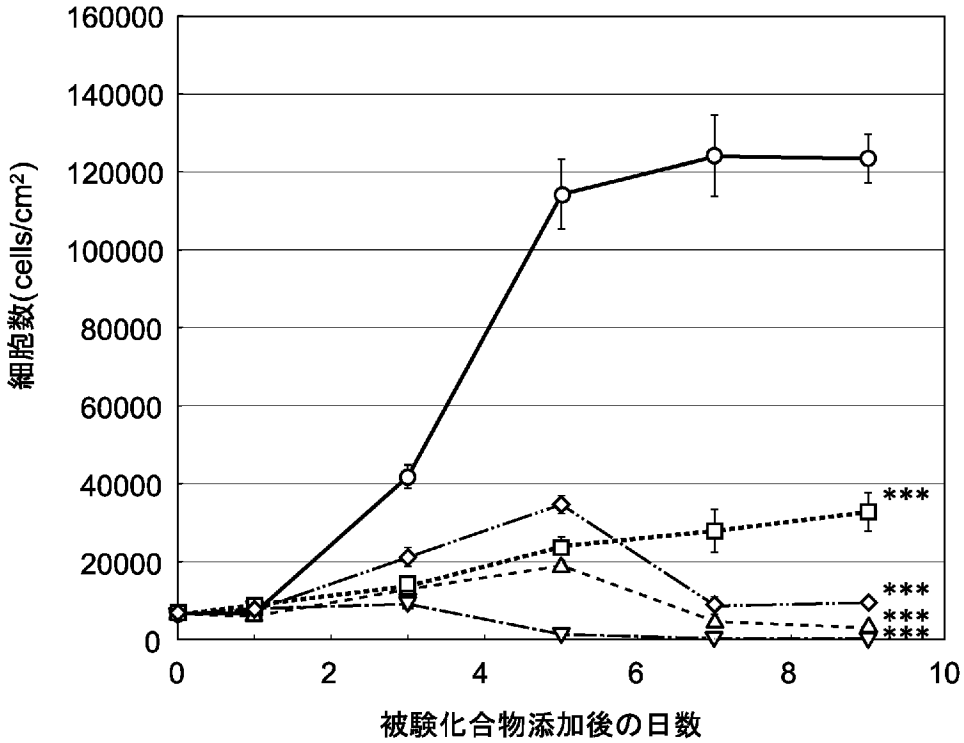
[図1]



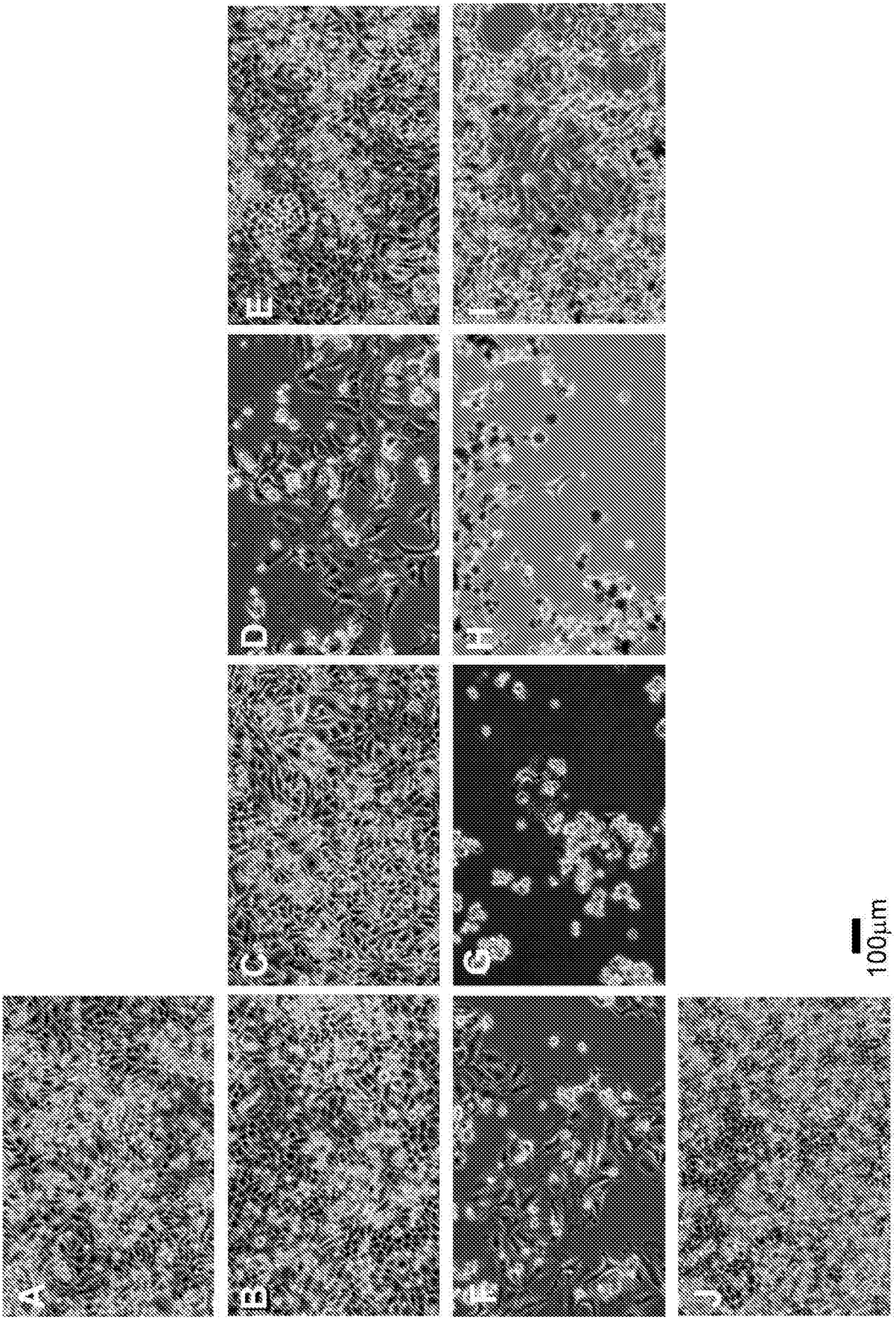
[図2A]


160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数
***
***

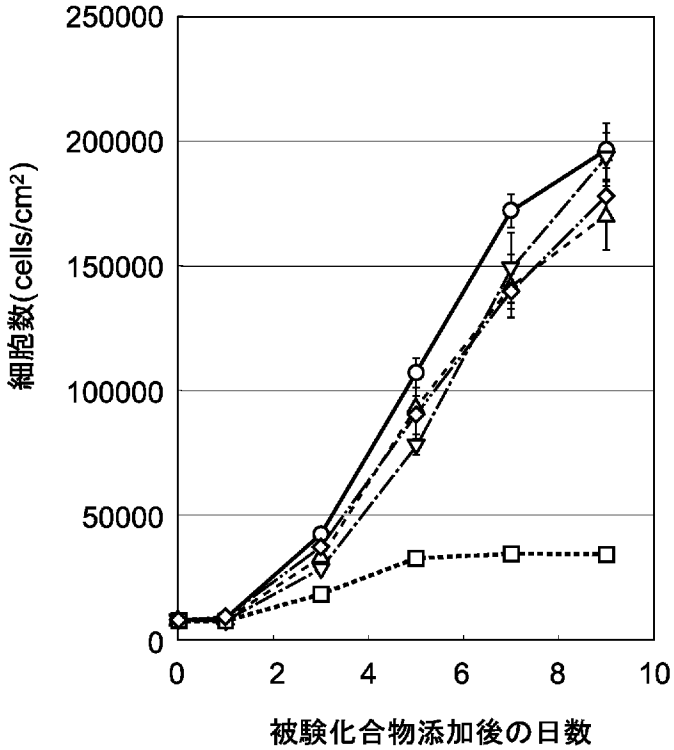
[図2B]


160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数
***
***
***
***

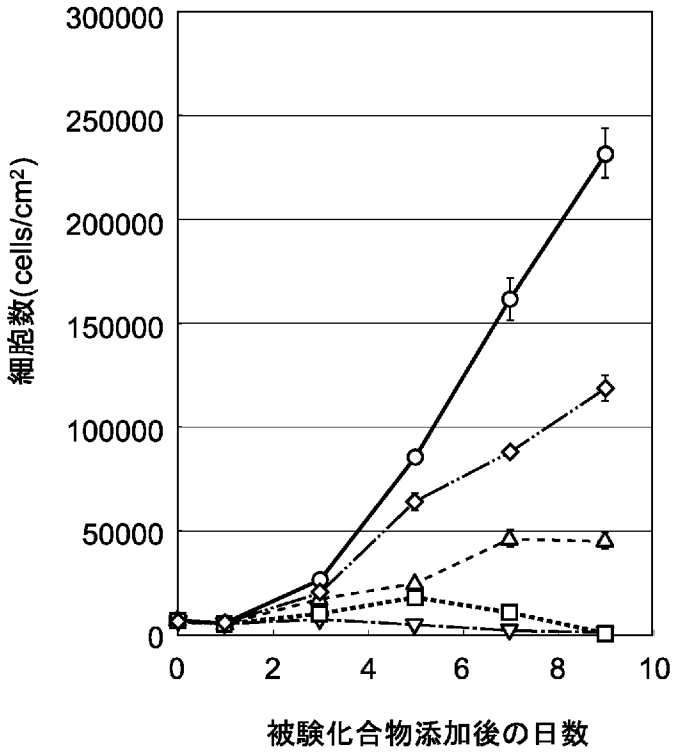
[図3]



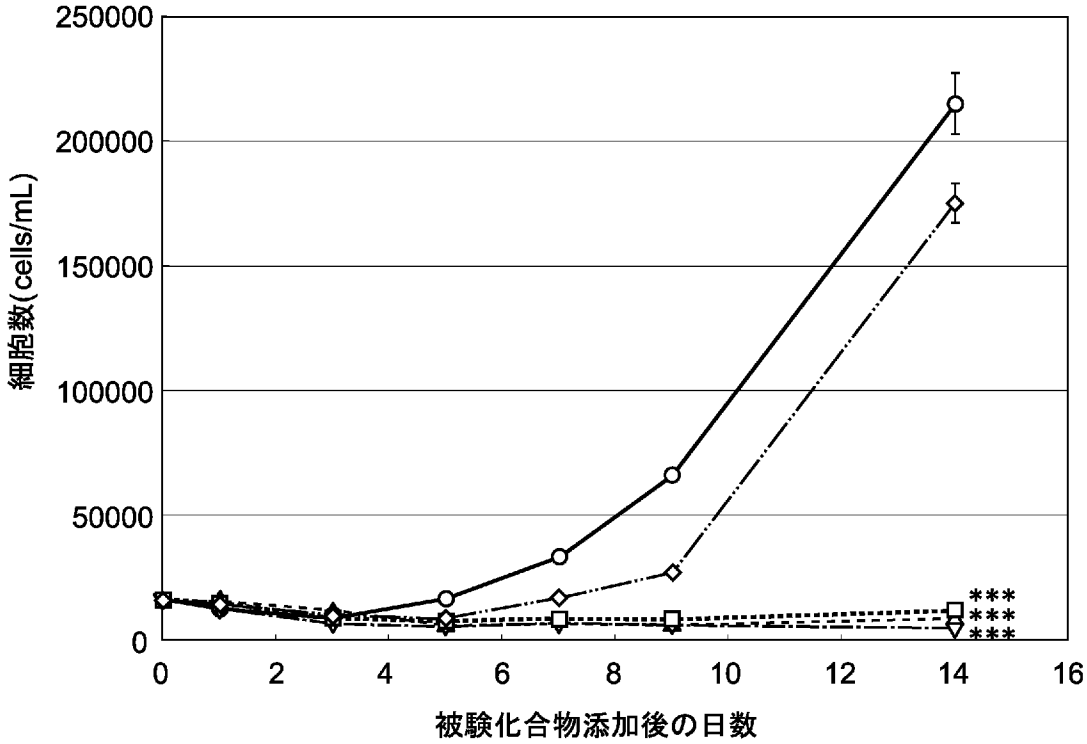
[図4A]


250000
200000
150000
100000
50000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

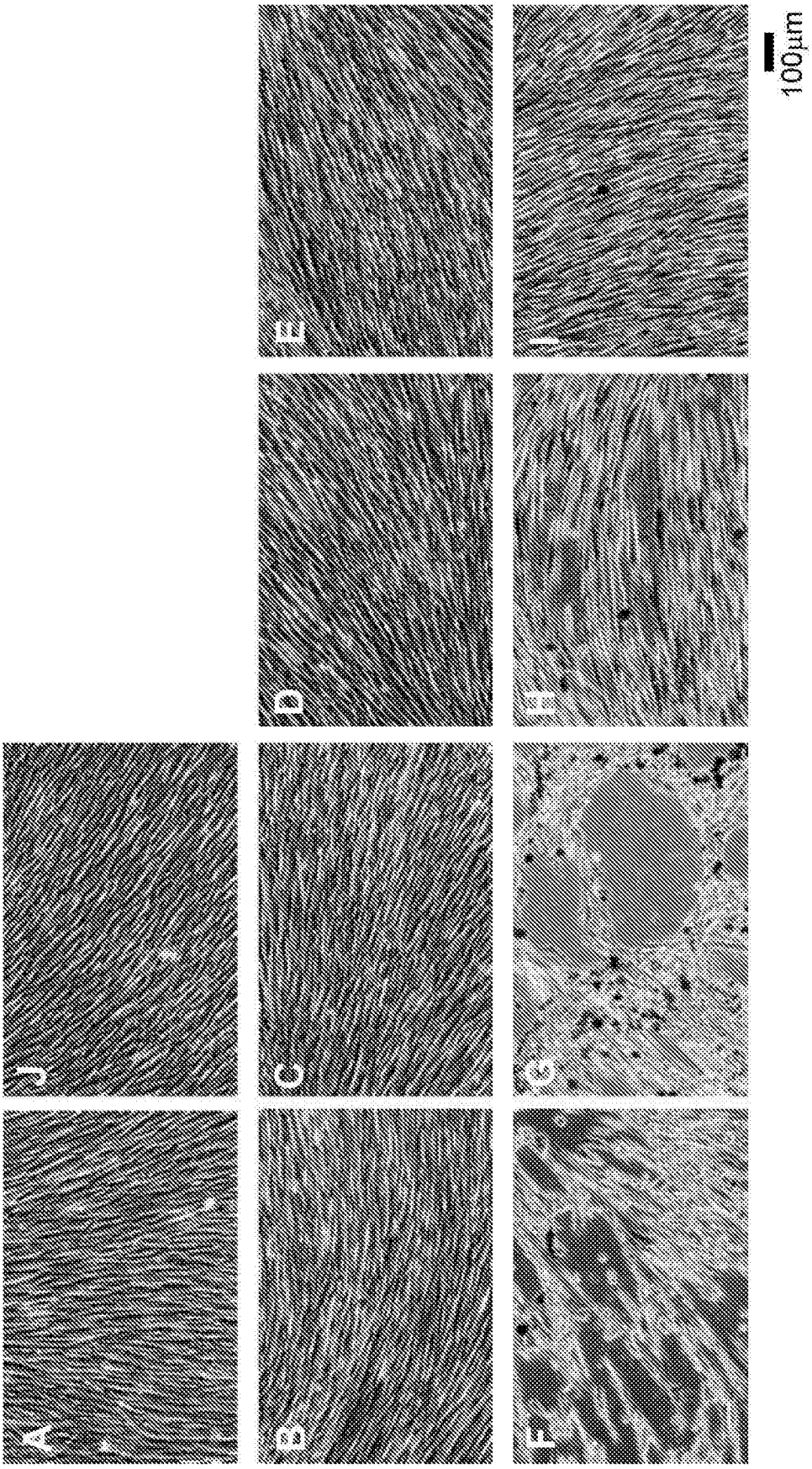
[図4B]


300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

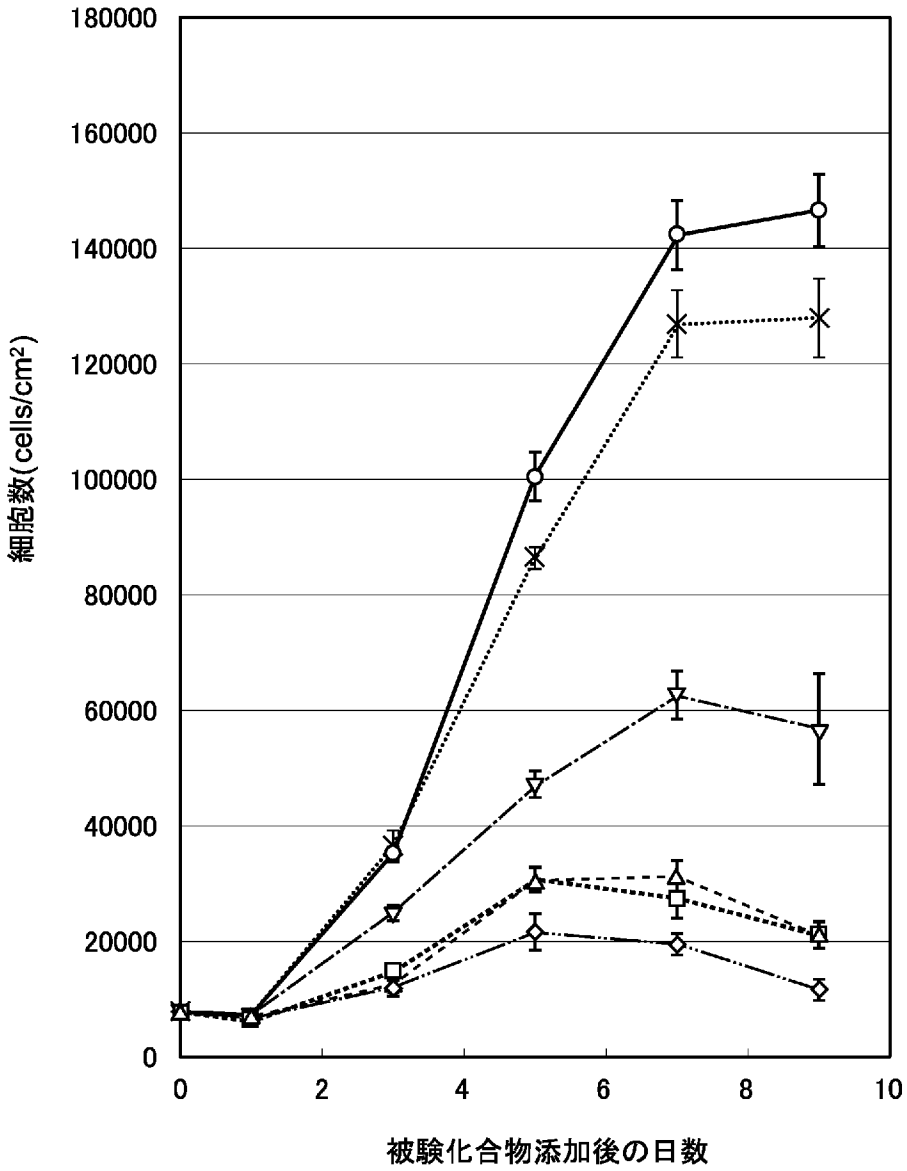
[図5]


250000
200000
150000
100000
50000
0
細胞数(cells/mL)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
被験化合物添加後の日数
***
***
***

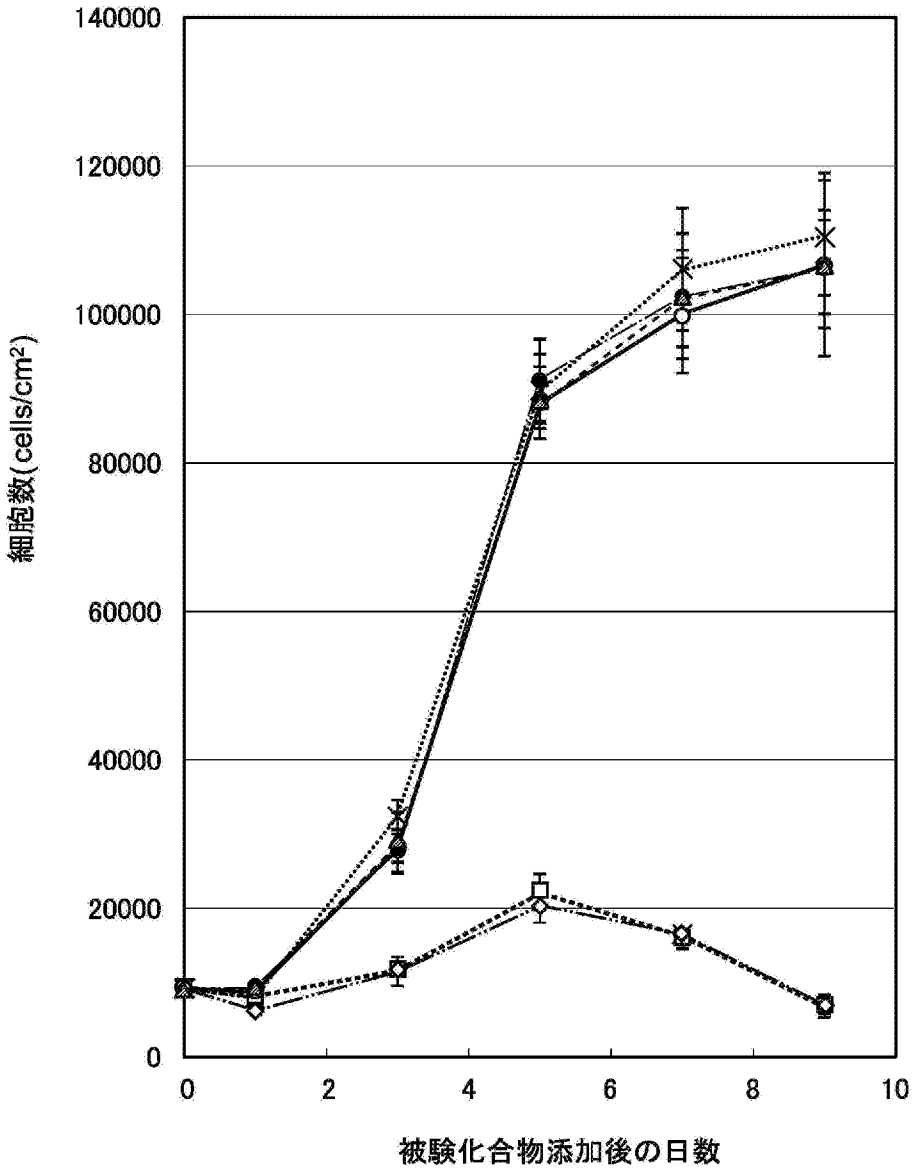
[図6]



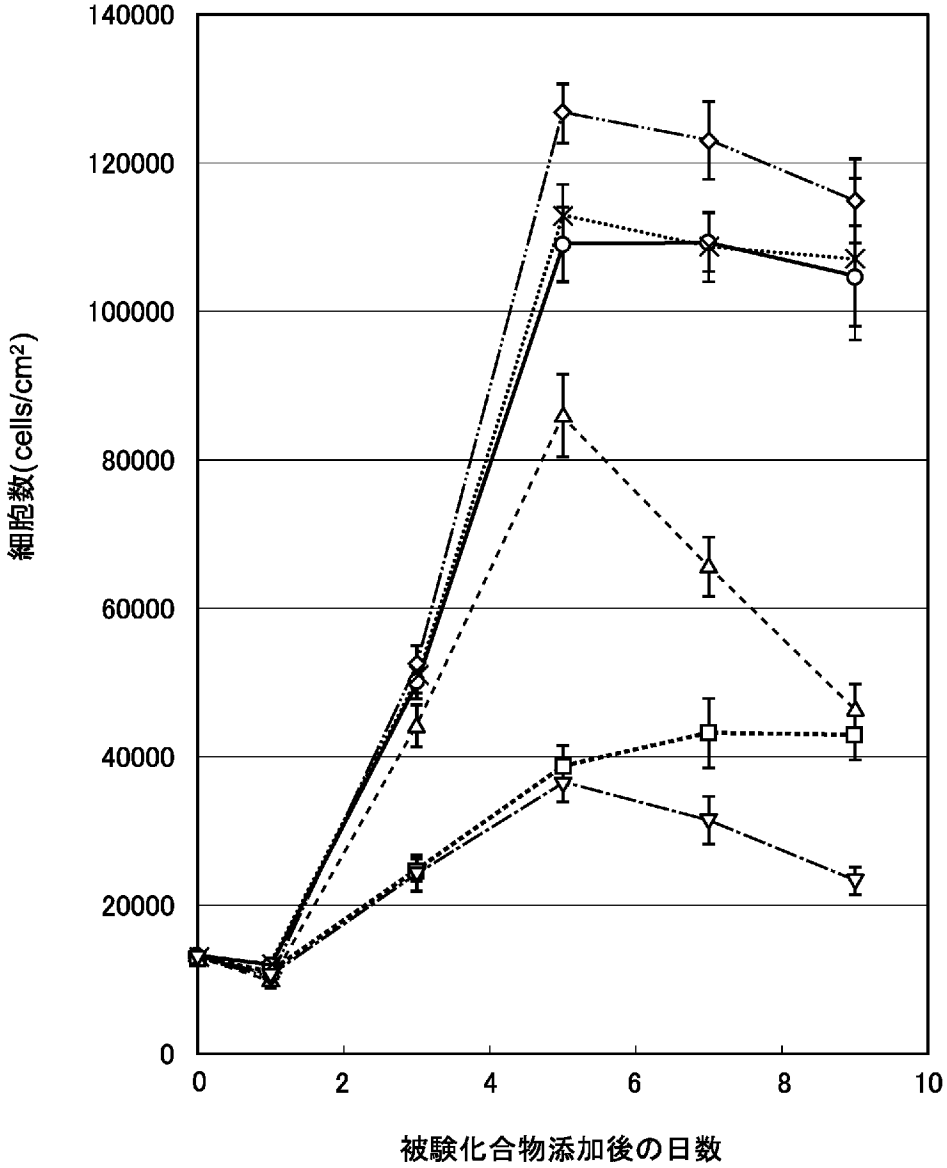
[図7A]


180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

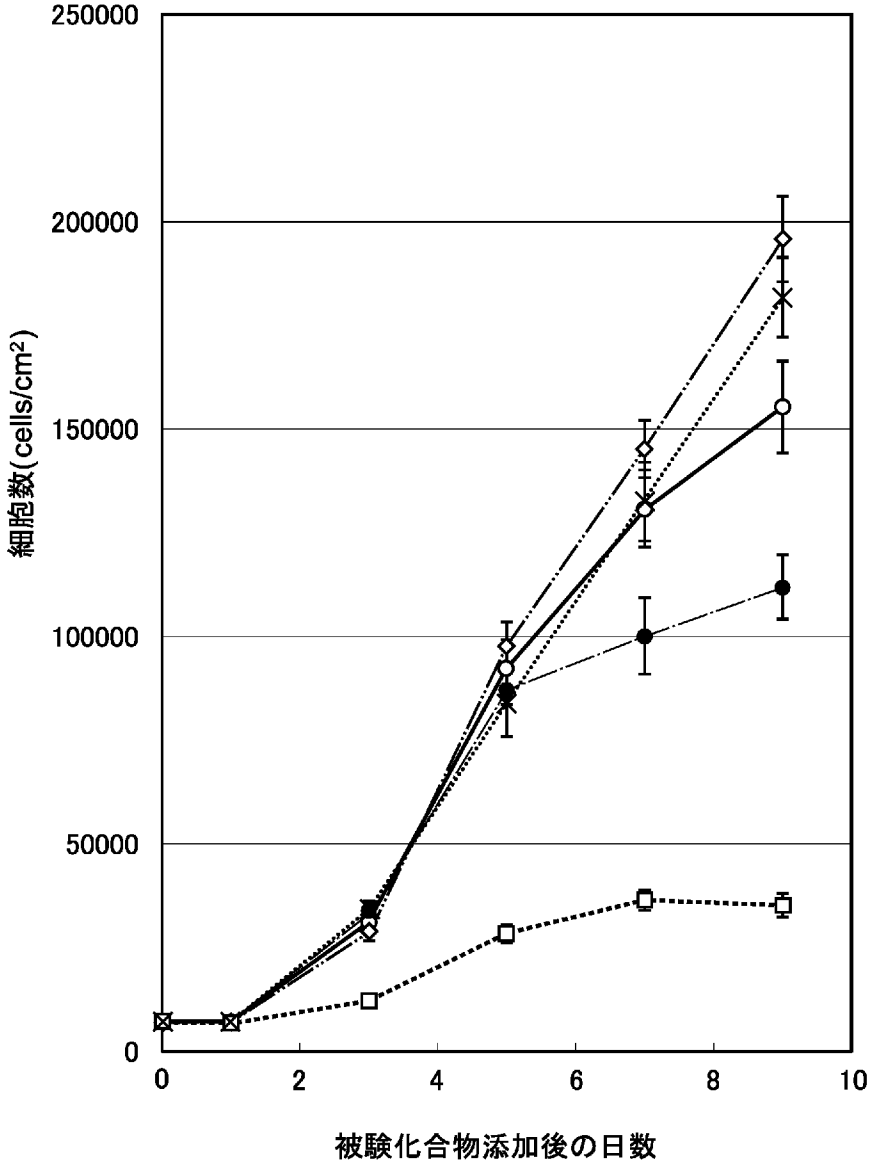
[図7B]


140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

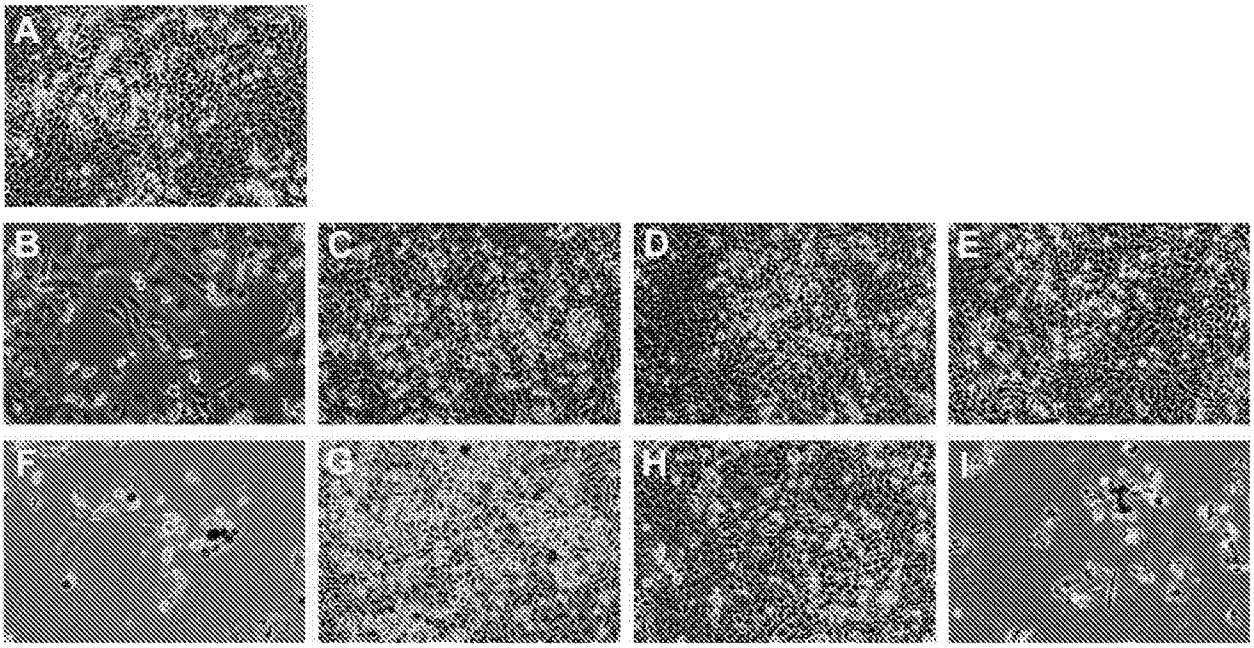
[図8A]


140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

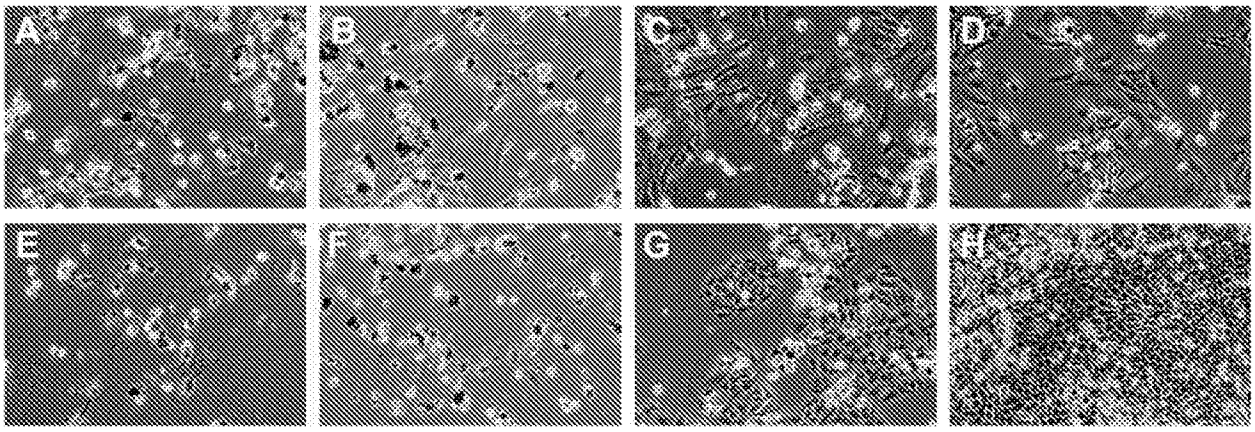
[図8B]


250000
200000
150000
100000
50000
0
細胞数(cells/cm²)
0
2
4
6
8
10
被験化合物添加後の日数

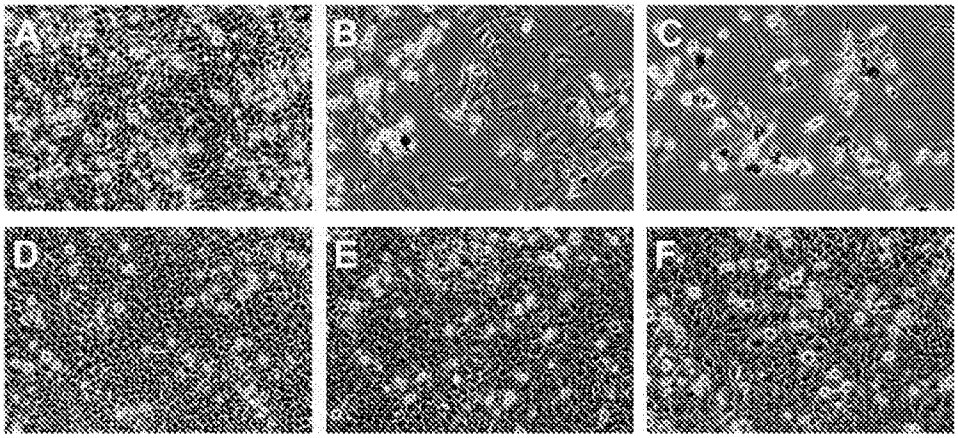
[図9]


A
B
C
D
E
F
G
H
I

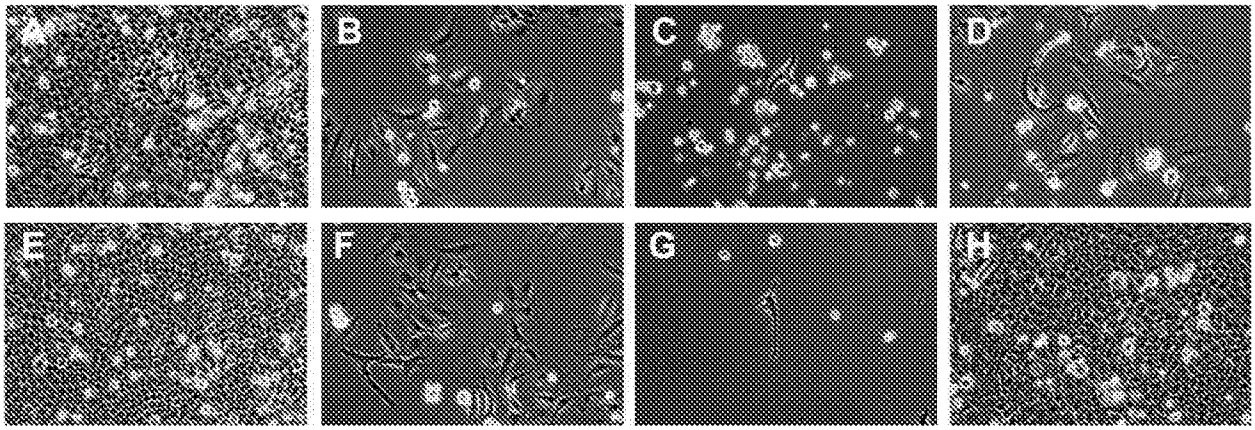
[図10]



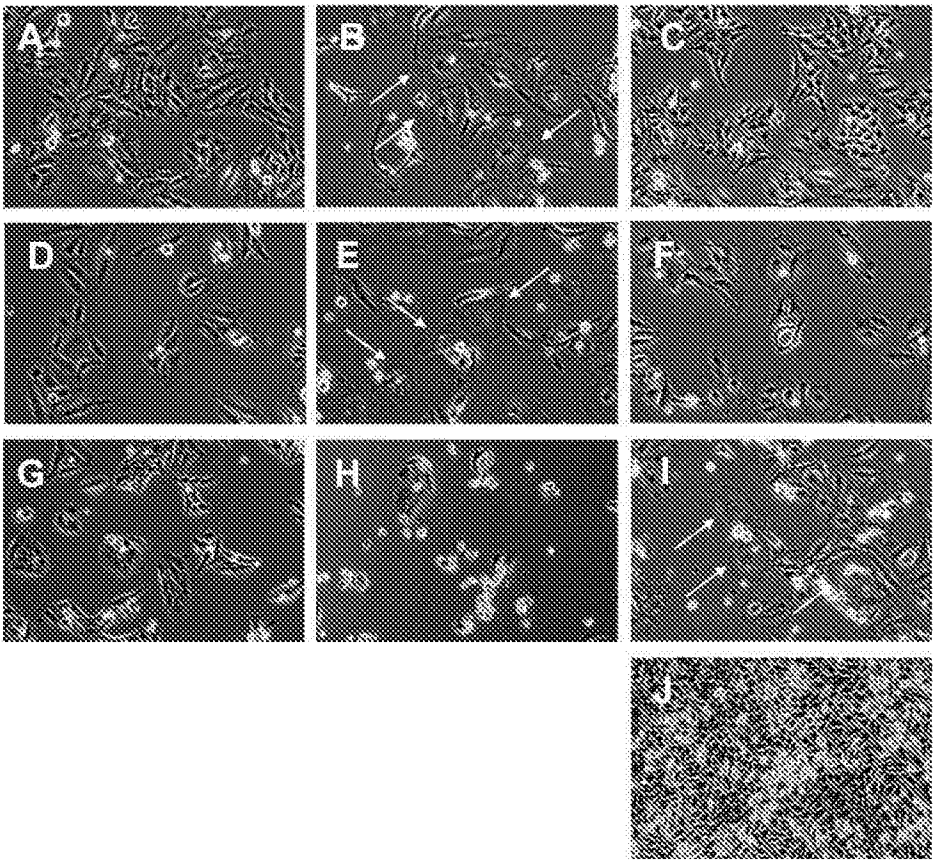
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/073456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07H19/073(2006.01)i, *A61K31/475*(2006.01)i, *A61K31/7068*(2006.01)i, *A61K31/7072*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07H19/10*(2006.01)i, *C07H19/11*(2006.01)i, *C07H19/20*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H19/073, A61K31/475, A61K31/7068, A61K31/7072, A61K45/00, A61P35/00, C07H19/10, C07H19/11, C07H19/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CN 102125579 A (GUANGZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICINE AND HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 20 July 2011 (20.07.2011), claims & CN 102125579 B	1-9,15 10-11
X Y	WO 2003/013488 A2 (PANGENE CORP.), 20 February 2003 (20.02.2003), claims; page 5, lines 12 to 15 & AU 2001283226 A	1-9,15 10-11
X Y	BERES, J. et al., Synthesis and cytostatic and antiviral activities of 1-β-D-ribofuranosyl-5-alkylcytosine (5-alkylcytidine) cyclic 3',5'-monophosphates, Journal of Medicinal Chemistry, 1989, Vol.32, pp.224-228	1-6,8-9,15 10-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 November, 2014 (17.11.14)	02 December, 2014 (02.12.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/073456

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	RODRIGUEZ, R. et al., Thymidine selectively enhances growth suppressive effects of camptothecin/irinotecan in MSI+ cells and tumors containing a mutation of MRE11, Clinical Cancer Research, 2008, Vol.14, pp.5476-5483	1-3,5-11,15 10-11
X Y	PIVAZYAN, A. D. et al., Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine, Biochemical Pharmacology, 1992, Vol.44, No.5, pp.947-953	1-3,5-9,15 10-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/073456

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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

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

There is no special technical feature common to a compound represented by formula 1 or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof set forth in claims 1 to 11 and 15 and a method for screening a compound, which is metabolized by an enzyme present on the cell membrane of a cultured cell and/or an enzyme secreted out from the cultured cell and thus incorporated into the cell and then exerts a cell proliferation-suppressing effect, set forth in claims 12 to 14.

Consequently, claims 1-15 are not so linked as to form a single general inventive concept.

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:
1-11 and 15

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０７３４５６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07H19/073(2006.01)i, A61K31/475(2006.01)i, A61K31/7068(2006.01)i, A61K31/7072(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07H19/10(2006.01)i, C07H19/11(2006.01)i, C07H19/20(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07H19/073, A61K31/475, A61K31/7068, A61K31/7072, A61K45/00, A61P35/00, C07H19/10, C07H19/11, C07H19/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

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

REGISTRY (STN)
CAplus (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	CN 102125579 A (GUANGZHOU INSTITUTE OF BIOMEDICINE AND HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2011.07.20, 請求の範囲 & CN 102125579 B	1-9, 15 10-11
X Y	WO 2003/013488 A2 (PANGENE CORPORATION) 2003.02.20, 請求の範囲、第５頁第12-15行 & AU 2001283226 A	1-9, 15 10-11

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１７．１１．２０１４	０２．１２．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｐ　４０４８
江間　正起
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	BERES, J. et al., Synthesis and cytostatic and antiviral activities of 1-β-D-ribofuranosyl-5-alkylcytosine (5-alkylcytidine) cyclic 3',5'-monophosphates, Journal of Medicinal Chemistry, 1989, Vol.32, pp.224-228	1-6, 8-9, 15 10-11
X Y	RODRIGUEZ, R. et al., Thymidine selectively enhances growth suppressive effects of camptothecin/irinotecan in MSI+ cells and tumors containing a mutation of MRE11, Clinical Cancer Research, 2008, Vol.14, pp.5476-5483	1-3, 5-11, 15 10-11
X Y	PIVAZYAN, A. D. et al., Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine, Biochemical Pharmacology, 1992, Vol.44, No.5, pp.947-953	1-3, 5-9, 15 10-11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０７３４５６

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

請求項１－１１、１５に記載された式１で表される化合物又はその薬学的に許容可能な塩若しくは溶媒和物と、請求項１２－１４に記載された培養細胞の細胞膜上に存在する酵素及び／又は培養細胞から細胞外に分泌される酵素により代謝されることにより、細胞内に取り込まれ、細胞増殖抑制作用を発揮する化合物のスクリーニング方法は、共通の特別な技術的特徴を有するものではない。

したがって、請求項１－１５は、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものではない。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☑ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

１－１１、１５

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。