

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3979662号

(P3979662)

(45) 発行日 平成19年9月19日(2007.9.19)

(24) 登録日 平成19年7月6日(2007.7.6)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 405/04 (2006.01)

C O 7 D 405/04

A 6 1 K 31/505 (2006.01)

A 6 1 K 31/505

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 18 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願平8-509705
 (86) (22) 出願日 平成7年9月5日(1995.9.5)
 (65) 公表番号 特表平10-506385
 (43) 公表日 平成10年6月23日(1998.6.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/011464
 (87) 国際公開番号 W01996/007413
 (87) 国際公開日 平成8年3月14日(1996.3.14)
 審査請求日 平成14年8月9日(2002.8.9)
 (31) 優先権主張番号 08/301, 298
 (32) 優先日 平成6年9月6日(1994.9.6)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/390, 633
 (32) 優先日 平成7年2月17日(1995.2.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ユニヴァーシティ・オヴ・ジョージア・リ
 サーチ・ファンデーション, インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国、30602-7411
 ジョージア、アセンズ、ボイド・グラデュ
 エイト・スタディーズ・リサーチ・センタ
 ー

(73) 特許権者

エール・ユニヴァーシティ
 アメリカ合衆国、06520 コネチカッ
 ト、ニュー・ヘイヴン、カレッジ・ストリ
 ート 451

(74) 代理人

弁理士 奥山 尚男

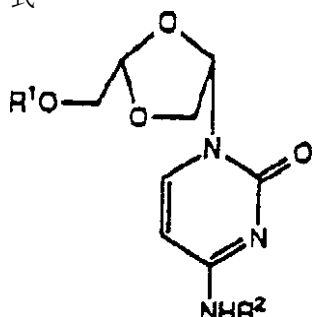
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんを治療するための化合物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式

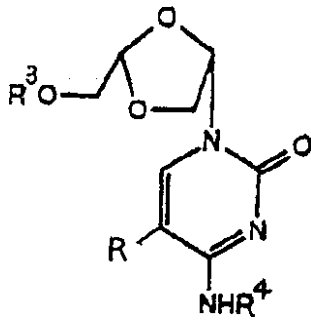


(式中、 R^1 および R^2 は、水素、アシル及び $C_1 \sim C_{18}$ のアルキルからなる群から選択される)

の β -L-ヌクレオシド化合物又はその薬理学的に許容可能なその塩の抗腫瘍有効量を薬理学的に許容可能な担体中に含む、宿主の腫瘍の治療のための医薬組成物。

【請求項2】

式



(式中、RはH、C₁、F、-CH₃、-C(H)=CH₂、-C=CH、または-C≡N、-Br、-NO₂からなる群から選択され、R³及びR⁴は水素、アルキル、アシル、モノ

10

フosphate、ジフosphate及びトリフosphateからなる群から選択される)
 の化合物、またはその薬理学的に許容可能なその塩の有効量を、任意に薬理学的に許容可能な担体中に含む、宿主の腫瘍の治療のための医薬組成物。

【請求項3】

R¹及びR²が水素である請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

Rがフッ素であり、R³及びR⁴が水素である請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

アルキル基が、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、t-ブチル、及びイソペンチルからなる群から選択される請求項1又は2に記載の医薬組成物。

20

【請求項6】

アシル基が-C(O)R'であり、R'がC₁~C₅のアルキル基、フェニル、又はベンジルである請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項7】

腫瘍ががん性であり、がんが、前立腺がん、白血病、結腸がん、膀胱がん、肝細胞がん、乳がん、肺がん、鼻咽頭がん、すい臓がん、卵巣がん、リンパ腫からなる群から選択される請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項8】

宿主動物がヒトである請求項1又は2に記載の医薬組成物。

30

【請求項9】

担体が経口送達に適している請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項10】

担体が静脈内送達に適している請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項11】

担体が局所送達又は経皮送達に適している請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項12】

担体がカプセルを含む請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項13】

担体が錠剤の形である請求項1又は2に記載の医薬組成物。

40

【請求項14】

非経口投与に適した請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項15】

(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシン及びその5'又はN⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類、又はその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物及びその5'又はN⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類を含む、がん性腫瘍を含む腫瘍を治療又は予防するための薬剤。

【請求項16】

がん性腫瘍を含む腫瘍を治療するための薬剤の製造における(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒド

50

ロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類、又はその (+) 鏡像異性体又はラセミ混合物及び 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類の使用。

【請求項 17】

(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類、又はその (+) 鏡像異性体又はラセミ混合物及びその 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類を含む、細胞の異常増殖又は望ましくない増殖を治療又は予防するための薬剤。

【請求項 18】

細胞の異常増殖又は望ましくない増殖を治療するための薬剤の製造における、 (-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類、又はその (+) 鏡像異性体類又はラセミ混合物及びその 5' 又は N⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体及び塩類の使用。 10

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は医化学の分野にあり、詳細には (-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン ((-) - O d d Cとも呼ばれる) 又はその誘導体、ならびにヒトを含む動物のがんの治療にそれを使用することである。

発明の背景

腫瘍は細胞成長の統制されていない、無秩序な増殖である。腫瘍に侵襲性及び転移性がある場合、腫瘍は悪性、又はがん性である。侵襲性とは、腫瘍が周囲組織に侵入して、組織の境界を明確に定める基底層を突破し、その結果、しばしば身体の循環系に進入する傾向のことをいう。転移性とは、腫瘍が身体の他の領域に移動し、最初に出現した部位から離れた部位に増殖領域を確立する傾向のことをいう。 20

がんは現在、米国における第2位の死因である。米国では8,000,000名以上ががんと診断されており、1994年には1,208,000例が新たに診断されたと予測される。米国では今世紀には年間500,000例以上ががんで死亡する。

がんは分子レベルで十分に理解されていない。ある種のウイルス、ある種の化学物質、又は放射線などの発がん物質に細胞を曝露すると、「抑制」遺伝子を不活化したり「がん遺伝子」を活性化するDNAの変化を招く。抑制遺伝子は増殖調節遺伝子であり、突然変異が起こると、もはや細胞増殖を調節できない。がん遺伝子は、最初は正常な遺伝子で（原がん遺伝子と呼ばれる）、突然変異や発現事情の変化によってトランスフォーミング遺伝子になる。トランスフォーミング遺伝子の産物は不適切な細胞成長を引き起こす。20以上の異なる正常細胞遺伝子が、遺伝子の変化によってがん遺伝子になる可能性がある。トランスフォーム細胞は、細胞形態学、細胞と細胞の相互作用、膜内容物、細胞骨格構造、タンパク質分泌、遺伝子発現、死亡率（トランスフォーム細胞は無限に成長することができる）を含め、多くの点で正常細胞と異なる。 30

身体の種々の細胞型はすべて、良性腫瘍細胞又は悪性腫瘍細胞にトランスフォームされる可能性がある。腫瘍の好発部位は肺であり、結腸直腸、乳房、前立腺、膀胱、膵臓、卵巣が続く。その他のがんの優勢型としては、白血病、脳腫瘍をはじめとする中枢神経系のがん、黒色腫、リンパ腫、赤白血病、子宮がん、及び頭頸部がんが含まれる。 40

現在、がんは基本的に外科手術、放射線、及び化学療法の3種類の治療法のうちの1つ又は組み合わせで治療が行われる。外科手術では、疾病組織の大量除去が行われる。外科手術は、たとえば乳房、結腸、皮膚など、ある部位に存在する腫瘍の除去に有効な場合もあるが、背骨など、他の領域に存在する腫瘍の治療にも、白血病などの播種性新生物性の病気の治療にも使用することができない。

化学療法では、細胞複製又は細胞代謝の崩壊が行われる。白血病、ならびに乳がん、肺がん及び精巣がんの治療では、化学療法が最も頻繁に使用される。

現在がんの治療に使用されている化学療法剤は、天然産物及びその誘導体、アントラサイクリン類、アルキル化薬、抗増殖薬（代謝拮抗物質とも呼ばれる）、ホルモン剤の主要 5 50

クラスである。化学療法剤はしばしば抗新生物薬と呼ばれる。

アルキル化薬は、DNAのグアニン及びたぶん他の塩基をアルキル化して架橋し、細胞分裂を停止することによって作用すると考えらる。代表的なアルキル化薬としては、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、アルキル硫酸、シスプラチン、及び種々のニトロソウレアなどがある。このような化合物の短所は、悪性細胞を攻撃するばかりでなく、骨髄、皮膚、胃腸粘膜、胎児組織など、自然に分裂している他の細胞も攻撃することである。

代謝拮抗物質は、一般に可逆的酵素阻害剤又は不可逆的酵素阻害剤であるか、さもなければ核酸の複製、翻訳又は転写を妨害する化合物である。

抗がん作用を示す幾つかの合成ヌクレオシドが同定されている。抗がん活性を有する有名なヌクレオシド誘導体は、5-フルオロウラシルである。5-フルオロウラシルは、たとえばがん腫、肉腫、皮膚がん、消化器系のがん、及び乳がんを含め、悪性腫瘍の治療に臨床使用されている。しかし、5-フルオロウラシルは、悪心、脱毛、下痢、口内炎、白血球性血小板減少症、食欲不振、色素沈着、水腫などの重大な有害反応を引き起こす。抗がん作用を有する5-フルオロウラシルの誘導体は、米国特許第4,336,381号及び日本特許公告公報昭50-50383号、昭50-50384号、昭50-64281号、昭51-146482号及び昭53-84981号に記載されている。

米国特許第4,000,137号では、メタノール又はエタノールを用いたイノシン、アデノシン又はシチジンの過酸化酸化生成物はリンパ性白血病に対する活性を有することが開示されている。

シトシンアラビノシド（シタラビン、araC、Cytosarとも呼ばれる）は、デオキシシチジンのヌクレオシド類似体であり、1950年に初めて合成されて、1963年に臨床医学に導入された。シトシンアラビノシドは現在、急性骨髄性白血病の治療に重要な薬剤である。シトシンアラビノシドは急性リンパ性白血病に対しても活性であり、それ程ではないが、慢性骨髄性白血病及び非ホジキンリンパ腫に有用である。araCの主な作用は核のDNA生合成の阻害である。Handschumacher, R. and Cheng, Y., Purine and Pyrimidine Anti-metabolites, "Cancer Medicine, Chapter XV-1," 第3版、J. Hollandら編、Lea and Febigol出版社。

5-アザシチジンは主として急性骨髄性白血病及び脊髄形成異常症候群の治療に使用されるシチジン類似体である。

2-フルオロアデノシン-5'-ホスフェート（Fludara、FaraAとも呼ばれる）は、慢性リンパ性白血病の治療で最も活性な薬剤である。この化合物はDNA合成を阻害することによって作用する。細胞をF-araAで処理すると、G1/S期境界及びS期に細胞が蓄積するため、F-araAはS期特異的薬剤である。活性代謝物であるF-araATPを組み込むと、DNA鎖伸長が遅滞する。F-araAは、dATPの形成を分担する重要な酵素であるリボヌクレオチドレダクターゼの強力な阻害剤でもある。

2-クロロデオキシアデノシンは、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、毛様細胞白血病などの低級B細胞の新生物治療に有用である。活性スペクトルはフルダラ（Fludara）と類似している。この化合物は増殖中の細胞でのDNA生合成を阻害し、休止細胞でのDNA修復を阻害する。

多数の化学療法剤が同定され、がんの治療に現在使用されているものの、効験があり、しかも健康な細胞に対して低毒性を示す新しい薬剤が求められている。

したがって、本発明の目的は抗腫瘍作用、特に抗がん作用を示す化合物を提供することにある。

本発明のまた他の目的は、がんを治療するための医薬組成物を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、がんを治療する方法を提供することである。

発明の概要

薬理学的に許容できる担体中に適宜含ませた(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキサラン-4-yl)シトシン((-)-O d d C、L-O d d C、又は(-)-L-O d d Cとも呼ばれる)、又は5'又はN⁴アルキル化誘導体又はアシル化誘導体を含め、その

10

20

30

40

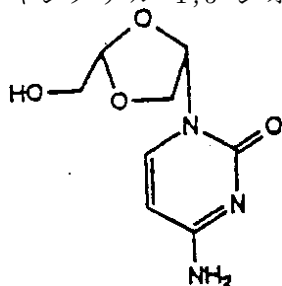
50

薬理学上許容できる誘導体、あるいはその薬理的に許容できる塩類の有効量を投与することを含む、ヒト及び他の宿主動物の腫瘍、特にがんを治療するための方法及び組成物を開示する。

他の実施態様では、本明細書で開示される化合物を使用して、病気、詳細には腫瘍やがん以外の、細胞の異常増殖や望ましくない増殖を含む病気を治療することができる。例としては角質増殖症（魚鱗癬、角皮症、扁平苔癬、及び乾癬）、性器イボを含むイボ、及び疱疹などの皮膚疾患、ならびにメトトレキサートで治療することができる細胞の異常増殖や望ましくない細胞増殖などがある。本明細書で開示される活性化合物を使用して、流産を誘導又は促進することができる。

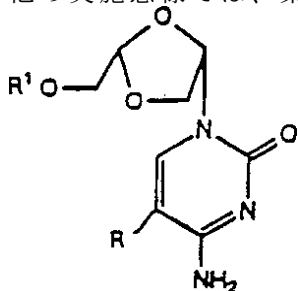
好ましい実施態様で、(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシンは指示された鏡像異性体（L型異性体として）として、しかも実質的に対応する鏡像異性体がない（すなわち、鏡像異性体的に純粋な形を含め、鏡像異性体的に濃縮した）状態で提供される。

(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシンは、抗腫瘍活性を示す「L」ヌクレオシドの最初の例と考えられる。(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシンは、式Iに示される構造を有する。



(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシンは、がん細胞に対して著明な活性を示し、宿主の健康な細胞に対して低毒性を示すことが判明している。この化合物で治療することができるがんの例としては、肺、結腸直腸、乳房、前立腺、膀胱、鼻咽頭、膵臓、卵巣、白血病、リンパ腫、頭頸部がん、中枢神経系がん（脳腫瘍を含む）、子宮頸がん、黒色腫、肝細胞がんなどがあるがこれに限定しない。

他の実施態様では、薬理的に許容できる担体中に適宜含ませた、下記の式



（式中、RはF、Cl、 $-CH_3$ 、 $-C(H)=CH_2$ 、 $-Br$ 、 $-NO_2$ 、 $-C=CH$ 、又は $-C\equiv N$ であり、 R^1 は水素、アルキル、アシル、モノフォスフェート、ジフォスフェート、又はトリフォスフェートである）

のL-OddCの誘導体、又はその薬理的に許容できる誘導体の有効量を、好ましくは鏡像異性体的に濃縮された形で投与することを含む、ヒト及び他の宿主動物における腫瘍、特にがん、又はその他の細胞の異常増殖又は望ましくない増殖を治療するための方法及び組成物が開示されている。

本発明の好ましい実施態様は、活性化合物又はその誘導体類又はその塩類を非天然の配置（L配置）で使用するものであるが、その代わりに、本明細書に開示されている化合物又はその誘導体類又は塩類を天然の配置（D配置）又はラセミ混合物として投与することもできる。

本明細書に開示されている腫瘍治療用化合物はいずれも、治療効果を高めるために他の抗

腫瘍医薬と併用して、あるいは交互に投与することができる。例としては、天然産物類又はその誘導体、アントラサイクリン類、アルキル化薬（代謝拮抗物質）、及びホルモン薬などがある。詳細には、薬剤としては、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、硫酸アルキル類、シスプラチン、ニトロソウレア類、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、5-アザシチジン、2-フルオロアデノシン-5'-ホスフェート、2-クロロデオキシアデノシン、タモキシフェン、アクチノマイシン、アマサクリン、ブレオマイシン、カルボプラチン、カルムスチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、インターロイキン、ロムスチン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、チオグアニン、ビンブラスチン、GCSF、GMCSF、及び血小板増殖因子を含む増殖因子、アドリアマイシン、WP-16、ヒドロキシウレア、エトポシド、 α インターフェロン、 β インターフェロン、 γ インターフェロン、ビンクリスチンなどがあるが、これに制限されるものではない。上記の薬剤の有効量を投与する方法は容易に決定されるか、たとえば、Medical Economics Data Production Company発行のPhysician's Desk Reference、最終版や、Pharmaceutical Press発行のMartindale, The Extra Pharmacopoeia、最終版に記載されている。これらの方法は、併用療法及び代替療法の効果を最適化するために日常的に適宜修正することができる。

【図面の簡単な説明】

図1は、(-)-O d d C及び(-)-O d d C+THU（テトラヒドロウリジン、シチジンデアミナーゼの阻害剤）の組み合わせの結腸細胞に対する ID_{50} を示す図である。グラフは、増殖阻害を対照実験に対する増殖率と濃度（ μM ）によりプロットしてある。グラフでは、(-)-O d d C単独のデータを（●）で表し、(-)-O d d C+THUのデータを（--▲--）で表している。

図2は、25mg/kgbidの投与量で(-)-O d d Cを1日2回投与したマウスがん腫（Colon 38）腫瘍成長重量のグラフである。グラフは、最初の腫瘍重量に対する割合と日数により腫瘍成長をプロットしてある。マウスへの投与は第1日、第2日、第3日、第4日及び第5日に行われた。グラフでは、対照実験（(-)-O d d C非投与）のデータを（●）で表し、(-)-O d d Cのデータを（--▲--）で表している。

図3は、(-)-O d d Cを投与していたp388白血病マウスの生存率を示す図である。グラフは、生存率と投与日によりプロットしてある。マウスへの投与は第1日、第2日、第3日、第4日及び第5日に行われた。グラフでは、対照（(-)-O d d C非投与）の生存率を（●）で表し、25mg/kgbidの投与量で(-)-O d d Cを1日2回投与したマウス（(-)-O d d Cの生存率を（--△--）で表し、50mg/kgbidの投与量で(-)-O d d Cを1日1回投与したマウスの生存率を（○）で表している。

図4は、 GI_{50} に基づいた、あるがん細胞系の(-)-O d d Cに対する相対的感受性のプロットである。右に伸びる棒は、試験した全ての細胞系の平均感受性を超えた細胞系の(-)-O d d Cに対する感受性を示す。棒の目盛りが対数であるため、右に2単位の棒は、その細胞系では、全細胞系に必要な平均濃度の100分の1の濃度でその化合物が GI_{50} に達したことを意味し、したがってその細胞系は(-)-O d d Cに対して異常に敏感なことを意味する。対応する左に伸びる棒は平均未満の感受性を意味する。

図5は、（●）-O d d Cによるヒト腫瘍成長抑制のグラフである。3週齢から6週齢のNcrヌードマウスの各側腹部に 2×10^6 のHepG2細胞又はDU-145細胞を皮下接種した。腫瘍が進行した成長段階にあるときに投与を開始した。第0日から第4日まで1日に2回ずつ薬剤を投与し、指示された日に腫瘍サイズを測定した。曲線A及び曲線Bは、薬剤がそれぞれHepG2腫瘍及びDU-145腫瘍に及ぼす作用を示す（—○—対照、—●—AraC 25mg/kg 腹腔内、—□—(-)-O d d C 25mg/kg 経口、—■—25mg/kg 腹腔内）。各データポイントは、グラフAでは10腫瘍の平均±標準偏差を表し、グラフBでは6腫瘍の平均±標準偏差を表す。

発明の詳細な説明

本明細書に開示されている発明は、薬理学的に許容できる担体中に適宜含ませた、(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキサラン-4-yl)シトシン、5-置換又は5

10

20

30

40

50

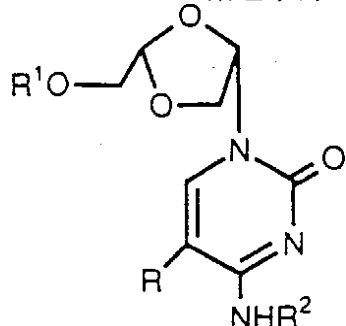
、又は N^4 アルキル化誘導体又はアシル化誘導体を含め、本明細書でさらに明確にされている化合物の誘導体、あるいはその生理学的に許容できる塩の有効量の投与を含む、ヒト又は他の宿主動物の腫瘍、特にがんを治療するための方法及び組成物である。

(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシンは、「L」ヌクレオシドと呼ばれる。ジオキソラン環の2位及び5位の炭素はキラルであるため、非水素置換基（それぞれ CH_2OH 及びシトシン塩基）は、ジオキソラン環系に関してシス（同じ側）であることもトランス（反対側）であることも可能である。したがって、（水平面のジオキサン部分を3位の酸素が前にあるように向けた時）4種類の光学異性体は次の配置で表される。シス（両基とも「上向き」、「D」ヌクレオシドと呼ばれる天然のヌクレオシドの配置に相当する）、シス（両基とも「下向き」、「L」ヌクレオシドと呼ばれる非天然のヌクレオシドの配置に相当する）、トランス（C2置換基が「上向き」で、しかもC5置換基が「下向き」）、トランス（C2置換基が「下向き」で、しかもC5置換基が「上向き」）。(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン又はその誘導体は、抗腫瘍活性を示す「L」ヌクレオシドの最初の例と考えられる。この「L」ヌクレオシド配置は自然界に存在しないことを考慮すると、意外である。

本明細書で使用される「鏡像的に濃縮した」という語は、ヌクレオシドの1つの鏡像異性体を少なくともほぼ95%、好ましくはほぼ97%、98%、99%、又は100%含むヌクレオシド組成物のことをいう。好ましい実施態様で、(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン又はその誘導体又は塩は、本質的に1つの鏡像異性体からなるヌクレオシド組成物の状態で提供される。すなわち、指示された鏡像異性体（L鏡像異性体）として、しかも実質的に対応するD鏡像異性体がない（すなわち、鏡像異性体的に純粋な形を含め、鏡像異性体的に濃縮した）状態で提供される。

被検対象に投与すると直ちに親化合物 (-) - L - O d d C、又は本明細書に別に定義されている5-置換誘導体を直接的又は間接的に提供することができる任意の誘導体として、あるいはそれ自身が活性を示す任意の誘導体として、活性化化合物を投与することができる。例として、(-) - O d d Cの薬理的に許容できる塩類（又は「生理学的に許容される塩類」と呼ばれる）、上記5-誘導体、活性化化合物の5'及び N^4 アシル化誘導体又はアルキル化誘導体（又は「生理学的に活性な誘導体」と呼ばれる）が挙げられるが、これに限定されない。ある実施態様で、アシル基はエステル基の非カルボニル部分が直鎖、分岐、又は環状のアルキル（典型的には $C_1 \sim C_{18}$ 、さらに典型的には $C_1 \sim C_5$ ）、アルカリル、アラルキル、メトキシメチルを含むアルコキシアルキル、ベンジル、アルキル又は $C_1 \sim C_4$ アルコキシを含むアラルキル、アルキルや、メタンスルホニルを含むアラルキルスルホニル、モノホスフェートエステル、ジホスフェートエステル、トリホスフェートエステル、トリチル、モノメトキシトリチル、置換ベンジル、トリアルキルシリル（たとえば、ジメチルー t -ブチルシリル）又はジフェニルメチルシリルから選択されるカルボン酸エステル（ $-C(O)R$ ）である。エステルのアリール基はフェニル基を適宜含む。

L - O d d Cの薬理的に許容できる誘導体は、



（式中、RはF、Cl、 $-CH_3$ 、 $-C(H)=CH_2$ 、 $-C=CH$ 、又は $-C \equiv N$ 、 $-Br$ 、 $-NO_2$ であり、 R^1 及び R^2 は水素、具体的にはメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、t-ブチル、イソペンチ

ル、アミル、t-ペンチル、3-メチルブチリル、コハク酸水素、3-クロロベンゾエート、シクロペンチル、シクロヘキシル、ベンゾイル、アセチル、ピバロイル、メシレート、プロピノイル、ブチリル、バレリル、カプロイック、カプリリック、カプリック、ラウリック、ミリスチック、パルミチック、ステアリック、オレイックを含むがこれに制限されないアルキル及びアシル、及びアラニル、バリニル、ロイシニル、イソロイシニル、プロリニル、フェニルアラニニル、トリプトファニル、メチオニニル、グリシニル、セリニル、トレオニニル、システイニル、チロシニル、アスパラギニル、グルタミニル、アスパルトイル、グルタオイル、リジニル、アルギニニル、及びヒスチジニルを含むがこれに制限されないアミノ酸からなるグループから独立に選択される)

を含むが、これに制限されない。好ましい実施態様では、誘導体はL鏡像異性体で、しかも実質的にその対応する鏡像異性体がない(すなわち鏡像異性体的に純粋な形を含め、鏡像異性体的に濃縮された)状態で提供される。

L-O d d C又はその誘導体は、薬理学的に許容できる塩類の形で提供することができる。本明細書で使用される薬理学的に許容できる塩類又は複合体という語は、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、あるとしても、最小限の望ましくない毒性学的作用を示すL-O d d C又はその誘導体の塩類及び複合体類のことをいう。このような塩類の例として、(a)無機酸(たとえば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸など)とで形成された酸付加塩、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パモイック酸(pamoic acid)、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などの有機酸とで形成された塩類、

(b)亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、ナトリウム、カリウムなどの多価金属陽イオンと、又はN,N-ジベンジルエチレンジアミン、アンモニウム、あるいはエチレンジアミンから形成される有機陽イオンとで形成された塩基付加塩類、あるいは(c)上記(a)と上記(b)の組み合わせ、たとえばタンニン酸亜鉛などがあげられるが、これに限定されない。

活性化化合物の修飾、具体的にはN⁴及び5'-0位の修飾は、溶解度、生体利用度及び活性種の代謝率に影響を及ぼす可能性があり、したがって、活性種の送達を調節することになる。さらに、修飾すると化合物の抗がん作用に影響を及ぼす可能性があり、親化合物と比較して活性が上昇する場合もある。これは、本明細書に記載されている方法、又は当業者に周知の方法にしたがって誘導体を調製し、その抗がん活性を試験することにより容易に評価することができる。

要約すると、本発明には以下の特徴が含まれる。

(a) (-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその誘導体類及び塩類。

(b) (+) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその誘導体類及び塩類。

(c) (-/+) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその誘導体類及び塩類。

(d) たとえば、がん性腫瘍を含む腫瘍を治療又は予防するための医療に使用する、(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及びその誘導体類及び塩類、又はその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物、及び薬理学的に許容できる誘導体及び塩類。

(e) がん性腫瘍を含む腫瘍治療用の薬剤の製造に、(-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及び薬理学的に許容できるその誘導体類及び塩類、又はその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物、及び薬理学的に許容できるその誘導体類及び塩の使用。

(f) (-) - (2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン及び薬理学的に許容できるその誘導体類及び塩類、又はその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物、及び薬理学的に許容できるその誘導体類及び塩を、薬理学的に許容できる担体と一緒に

10

20

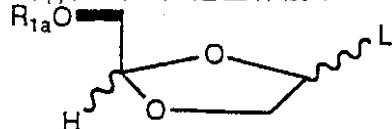
30

40

50

を含む医薬製剤。

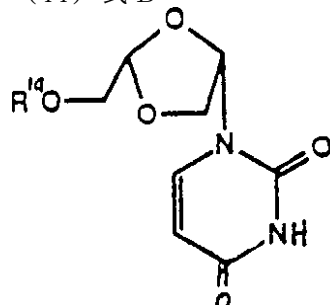
(g) (i) 適宜保護したシトシンを、式A



A

(式中、 R_{1a} は水素、又はアシル基を含むヒドロキシ保護基であり、Lは離脱基である) の1,3-ジオキソランと反応させ、任意のヒドロキシ保護基を適宜はずす工程

(ii) 式B



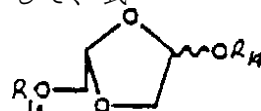
B

(式中、 R_{1a} は上記の通りである)

の化合物を、ウラシル環の4位のオキソ基をアミノ基に変換するのに役立つ薬剤と反応させ、残りの任意の保護基が外れて所望の生成物を生成する工程を含む、(2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシンを調製する方法。

(h) (−) 鏡像異性体と(+) 鏡像異性体の混合物の形で(2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシン又はその誘導体(たとえば、5'-エステル)を、鏡像異性体の分離に役立つか、結果として生じた誘導体を必要に応じて親化合物に変換する諸条件にさらす工程、あるいは、試薬(たとえば適切な酵素)と反応させる工程を含む、(2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシンの(−)又は(+) 鏡像異性体を調製する方法。代わりに、この種の鏡像異性体を分するキラル液体クロマトグラフィーカラムの中を(−) 鏡像異性体と(+) 鏡像異性体の混合物を通過させることもできる。

(i) トリメチルシリルトリフレートなどの、生成物をラセミ化させないルイス酸を使用して、式



の保護された1,3-ジオキソランを、5位で適宜置換されてる保護されたシトシン塩基と反応させる工程を含む、(2S,4S) -1- (2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl) シトシンを調製する方法。

上記方法(g) (i) に関して、ヒドロキシ保護基としては、アシル(たとえば、アセチル)、アリールアシル(たとえば、ベンゾイル又は置換ベンゾイル)、トリチル又はモノメトキシトリチル、ベンジル又は置換ベンジル、トリアルキルシリル(たとえば、ジメチル-*t*-ブチルシリル)やジフェニルメチルシリルを含む3置換シリルを含む、以下に詳述する保護基が含まれる。シトシン化合物は、3置換シリル基で適宜保護することができる。保護基は、従来の方法ではずすことができる。離脱基Lは、ヌクレオシド化学の技術では周知のものを代表する離脱基であり、たとえば、塩素、フッ素、トシル、メシル、トリフレート、臭素などのハロゲン、メトキシやエトキシなどのアルコキシ、アセチルやベンゾイルなどのアシルである。

上記方法(g) (i) の反応は、 $SnCl_4$ 、塩化チタンチウム、トリメチルシリルトリフレートなどのルイス酸の存在下、有機溶媒(たとえば、1,2-ジクロロエタン又はアセトニトリル)中で実施することができる。

式Aの化合物(式中、Lはアセチル基などのアシル基を表す)は、式C

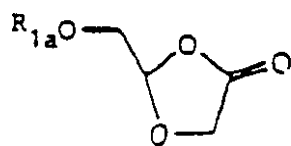
10

20

30

40

50



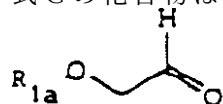
C

(式中、 R^{1a} は上記の通り)

の化合物を還元剤、たとえば水素化リチウムアルミニウムと反応させ、続いて所望の中間体に適当な従来の試薬、たとえば、アシル化には無水酢酸などの無水カルボン酸、ハロゲン化には塩素化剤や臭素化剤、あるいはアルキル化試薬で処理することによって得ることができる。

式Cの化合物は、式D

10



E

の化合物を $HOCH_2CO_2H$ と、昇温しながら反応させることによって調製することが可能である。

アリルエーテル又は式 $CH_2=CH-CH_2-OR$ を有するエステル、又は式 $ROCH_2-CH=CH-CH_2OR$ (式中Rはアルキル基、シリル基、又はアシル基などの保護基である) を有する2-ブテン-1,3-ジオールのジエーテル又はジエステルのオゾン分解によって式Eの化合物を調製することができる。

上記方法 (g) (ii) に関して、式Cの化合物を1,2,4-トリアゾール及び4-クロロフェニルジクロロホスフェートで処理して、対応する4-(1,2,4-トリアジリル)化合物を形成し、たとえばメタノールと反応させることによって所望の4-アミノ(シチジン)化合物に変換することができる。

20

たとえば、適切な(適宜保護された)塩基と式Aの化合物とを、方法g) i) に記述した方法と類似した方法で反応させることによって、式B及び式Cの出発物質を調製することができる。ウラシル及びシトシンは、Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI 53233, USAから購入できる。

L-O d d C又はその誘導体は、適切なエステル化剤、たとえば酸ハロゲン化物や酸無水物と反応させることによって、薬理的に許容できるエステルに変換することができる。

L-O d d C又はその薬理的に許容できる誘導体は、従来の方法、たとえば適切な塩基で処理することによって、薬理的に許容できるその塩に変換することができる。エステル又は塩は、たとえば、加水分解によって親化合物に変換することができる。

30

他の実施態様では、本明細書に開示されている化合物を使用して病気、詳細には腫瘍やがん以外の、細胞の異常増殖や望ましくない増殖を含む病気を治療することができる。例としては角質増殖症(魚鱗癬、角皮症、扁平苔癬、及び乾癬)、性器イボを含むイボ、疱疹などの皮膚疾患、ならびにメトトレキサートで治療することができる細胞の異常増殖や望ましくない細胞増殖などがある。本明細書で開示される活性化合物を使用して、流産を誘導又は促進することができる。

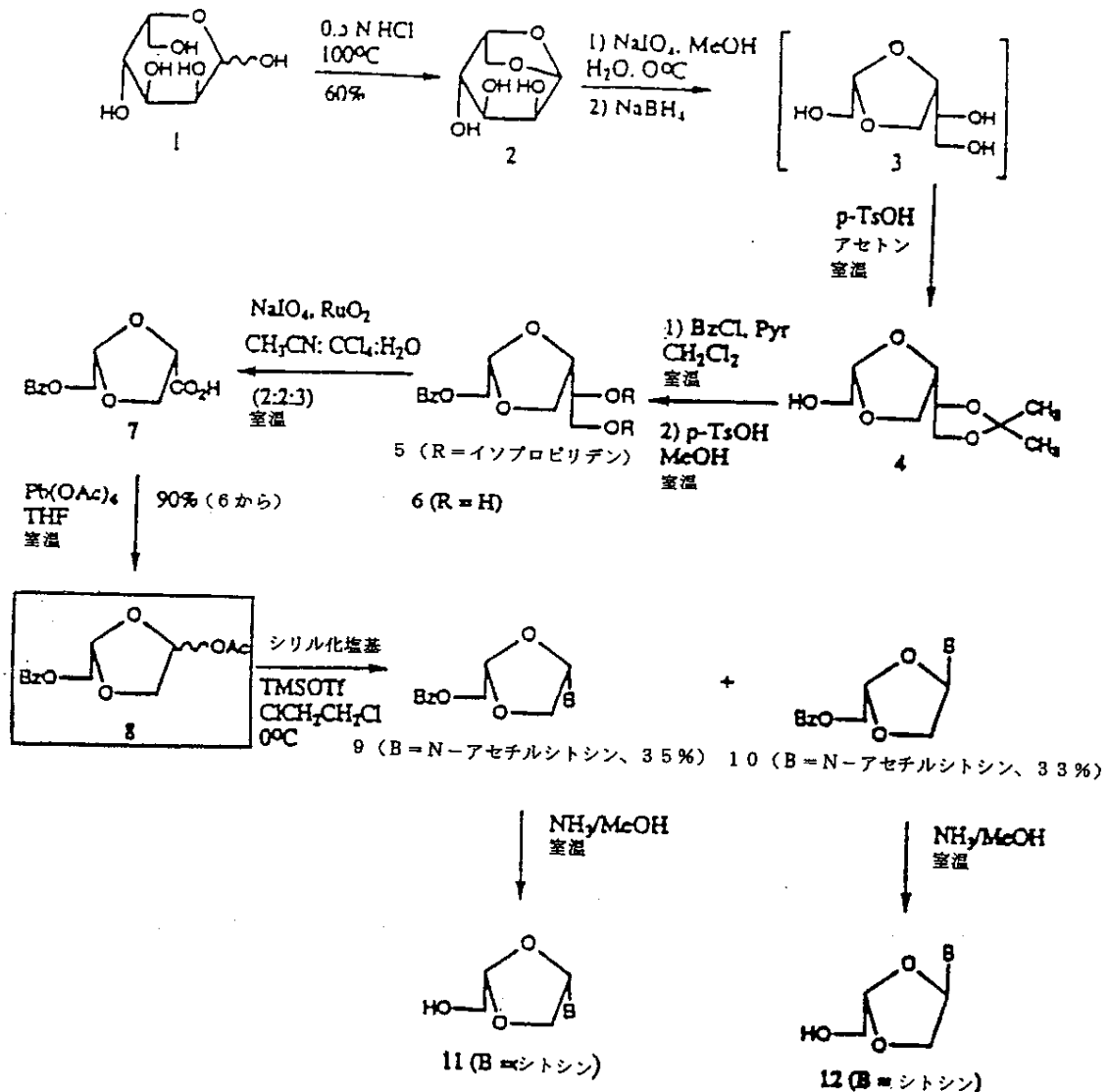
したがって、本発明には医療用、たとえば細胞の異常な増殖又は望ましくない増殖の治療又は予防に使用するための、(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシン及びその誘導体類及び塩類、又はその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物、及びその薬理的に許容できる誘導体及び塩類、ならびに細胞の異常な増殖又は望ましくない増殖を治療するための医薬品の製造に、(-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシン及び薬理的に許容できるその誘導体及び塩類、あるいはその(+)鏡像異性体又はラセミ混合物の使用も含む。

40

II. 活性化合物の調製

1992年10月29日に公開されたPCT国際公告No.W092/18517に従って、図解1及び以下に示す例1~7で開示される方法又は当業者に周知の他の方法によって、上記(-)-L-O d d C及びその誘導体を調製することができる。これらの方法、又は他の周知の方法を、例示したL-O d d Cの誘導体の調製に適するように改変することができる。

50



図解1 (一) -Odds Cの合成

例1 6-アンヒドロ-L-グルコースの調製

L-グルコースを酸、たとえば、0.5 NのHClで処理することにより、L-グルコースから1段階で6-アンヒドロ-L-グルコースを調製した。その収率は60%であった。(Evans, M.E., et al., *Carbohydr. Res.* (1973), 28, 359)。以前に行ったのと同様に (Jeong, L.S. et al. *Tetrahedron Lett.* (1992), 33, 595及びBeach, J.W. et al. *J. Org. Chem.* (1992, 印刷中)、選択的保護をせずに、(2)をNaIO₄で酸化し、つづいてNaBH₄で還元してジオキソラントリオール(3)に直接変換し、これを単離せずに、NaBH₄で還元して、イソプロピリデン誘導体(4)に変換した。ベンゾイル化して(5)に変換し、(6)に保護解除し、ジオール(6)を酸化すると酸(7)を生じた。乾燥THF中のPb(OAc)₄で(7)を酸化的脱炭酸すると、重要な中間体である酢酸エステル(8)が高収率で得られた。TMSOTfの存在下で所望のピリミジン類(たとえば、シリル化チミンやN-アセチルシトシン)で酢酸エステルを濃縮すると、α, β-混合物を生じ、これをシリカゲルカラムで分離して個々の異性体(9及び10)を得た。メタノリックアンモニアで脱ベンゾイル化すると所望の(-)-Odds C(11)を生じた。

例2: (-)-1,6-アンヒドロ-α-L-グルコピラノース(2)の調製

L-グルコース(1) (33 g、0.127モル)と0.5 NのHCl (330 mL、0.165モル)の混合物を20分間還流した。混合物を冷却して樹脂(ダウエックスDowex-2、HCO₃型)及び通気によりpH 6に中和した。10%のHCl、水、メタノール、水

及び NaHCO_3 飽和溶液で洗浄することにより、樹脂を再循環させた。反応混合物を濾過し、樹脂を水 (500 mL) で洗浄した。乾燥するまで混合濾液を濃縮し、一晚真空乾燥させた。残留物をカラム (深さ 5 cm、シリカゲル、メッシュ、 $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ 、10 : 1) で精製すると淡黄色の固体を生じ、これを無水アルコールから再結晶させると無色の固体 (2) を生じた [$R_f = 0.43$ ($\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ 、5 : 1)、7.3 g、35.32%]。得られた L-グルコース ($R_f = 0.07$ 、11 g) を再循環させると (2) (5 g、総収率 60%) を生じた。融点 142.5 ~ 145 °C、 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 3.22 ~ 3.68 (m、4 H、H-2、-3、-4 及び -6 a)、3.83 (d、 $J_{6b,6a} = 7.25$ Hz、1 H、 H_b-6)、4.22 (疑似 t、 $J_{5,6a} = 4.61$ 及び 4.18 Hz、H、H-5)、4.46 (d、 $J_{2-OH,2} = 6.59$ Hz、1 H、2-OH、 D_2O と交換可能)、4.62 (d、 $J_{3-OH,3} = 5.28$ Hz、1 H、3-OH、 D_2O と交換可能)、5.07 (d、 $J_{4-OH,4} = 4.84$ Hz、1 H、4-OH、 D_2O と交換可能)、5.20 (d、 $J_{1,2} = 2.19$ Hz、1 H、H-1)。 $[\alpha]_D^{25} = -50.011$ (c, 1.61, CH_3OH)。

例 3 : (-) - (1'S,2S,4S) -4- (1,2-ジヒドロキシエチル-1,2-O-イソプロピリデン) -2-ヒドロキシメチル) -ジオキソラン (4) の調製

水 (300 mL) 中の NaIO_4 (22.36 g、0.1 モル) 溶液を、0 °C に冷却したメタノール (350 mL) 中の (2) (11.3 g、0.07 モル) の溶液に、10 分かけて滴下によって加えた。混合液を機械的に 15 分間攪拌した。 NaBH_4 (7.91 g、0.12 モル) をこの混合液に加え、反応混合物を 0 °C で 10 分間攪拌した。白色の固体を濾過し、その固体をメタノール (300 mL) で洗浄した。混合濾液を 0.5 N の HCl (~200 mL) で中和し、乾燥するまで濃縮した。残留物を、一晚真空乾燥させた。機械的スターラーを使用して (5 時間)、シロップ様の残留物をメタノール-アセトン (1 : 5、1200 mL) で粉末にし、白色の固体 (第 1) を濾過した。濾液を乾燥するまで濃縮し、残留物をアセトン (500 mL) に溶解し、続いて p-トルエンスルホン酸 (6.63 g、0.035 モル) に溶解した。混合物を 6 時間攪拌した後、トリエチルアミンで中和し、固体 (第 2) を濾過し、濾液を乾燥するまで濃縮した。残留物を酢酸エチル (350 mL) に溶解し、水 (50 mL × 2) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、濾過し、蒸発させると黄色みがかかったシロップとして粗生成物 (4) (3.6 g) を生じた。水層を乾燥するまで濃縮し、真空乾燥した。得られた固体 (第 1 及び第 2) を乾燥させた水層と混合し、10% メタノール-アセトン (900 mL) 及 p-トルエンスルホン酸 (16 g、0.084 モル) 中で 1 時間攪拌することによって再循環させると、粗生成物 (4) (5.6 g) を生じた。粗生成物 (4) をシリカゲルドライカラム ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ 、1% ~ 5%) で精製すると (4) [$R_f = 0.82$ ($\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$ 、10 : 1)、8.8 g、61.84%] を無色の油として生じた。 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.26 及び 1.32 (2 × s、2 × 3 H、イソプロピリデン)、3.41 (dd、 $J_{\text{CH}_2\text{OH},\text{OH}} = 6.04$ Hz、 $J_{\text{CH}_2\text{OH},2} = 3.96$ Hz、2 H、 CH_2OH)、3.56 ~ 4.16 (m、6 H、H-4、-5、-1' 及び -2')、4.82 (t、 $J_{\text{OH},\text{CH}_2} = 6.0$ Hz、1 H、 CH_2OH 、 D_2O と交換可能)、4.85 (t、 $J_{2\text{OH},\text{CH}_2\text{OH}} = 3.96$ Hz、1 H、H-2)。 $[\alpha]_D^{25} = -12.48$ (c, 1.11, CHCl_3)、 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$ の計算上の分析値 : C, 52.93; H, 7.90。測定値 : C, 52.95; H, 7.86。

例 4 : (+) - (1'S,2S,4S,) -4- (1,2-ジヒドロキシメチル-1,2-O-イソプロピリジン) -2- (0-ベンゾイルオキシメチル) -ジオキソラン (5)

塩化ベンジル (6.5 mL、0.056 モル) を、0 °C のピリジン- CH_2Cl_2 (1 : 2、120 mL) 中の (4) (8.5 g、0.042 モル) の溶液に滴下によって加え、温度を室温まで上昇させた。2 時間攪拌した後、メタノール (10 mL) で反応を消失させ、混合物を真空中で乾燥するまで真空中で濃縮した。残留物を CH_2Cl_2 (300 mL) に溶解して水 (100 mL) で洗浄し、塩水につけ、乾燥し (MgSO_4)、濾過し、蒸発させると黄色みがかかったシロップを生じ、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル-ヘキサン、4% - 30%) で精製すると (5) [$R_f = 0.45$ (ヘキサン-酢酸エチル

10

20

30

40

50

、3:1)、10.7 g、83.4%] を無色の油として生じた。 ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.35 及び 1.44 (2×s、2×3H、イソプロピリデン) 3.3~4.35 (m 6H、H-4、-5、-1'、及び-2')、4.44 (d、J=3.96 Hz、2H、 $\text{CH}_2\text{-OBz}$)、5.29 (t、J=3.74 Hz、1H、H-2)、7.3~7.64、8.02~8.18 (m、3H、2H、-OBz)。 $[\alpha]_D^{25} + 10.73$ (c、1.75、 CH_3OH)。C₁₆H₂₀O₆の計算上の分析値：C,62.33;H,6.54。測定値：C,62.39;H,6.54。

例5：(+) - (1'S,2S,4S) -4- (1,2-ジヒドロキシエチル) -2- (0-ベンゾイルオキシメチル) -ジオキソラン (6) の調製

メタノール (70 mL) 中の (5) (5.7 g、0.018 モル) と p-トルエンスルホン酸 (1.05 g、0.0055 モル) の混合物を室温で2時間攪拌した。反応は完了していないので、溶媒を最初の体積の半分まで蒸発させて、メタノール (50 mL) 及び p-トルエンスルホン酸 (0.7 g、3.68 モル) を追加した。さらに1時間攪拌した後、反応混合物をトリエチルアミンで中和し、乾燥するまで溶媒を蒸発させた。

残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル、10%~33%) で精製すると (6) [$R_f = 0.15$ (ヘキサン-酢酸エチル、1:1)、4.92 g、99.2%] を無色のシロップとして生じた。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.43 (m、2H、H-2')、3.67-4.1 (m、4H、H-4、-5 及び -1')、4.32 (d、J=3.73 Hz、2H、 $\text{CH}_2\text{-OBz}$)、4.60 (t、J=5.72 Hz、2'-OH、D₂Oと交換可能)、5.23 (t、J=3.96 Hz、1H、H-2)、7.45-7.7、7.93-8.04 (m、3H、2H、-OBz)、 $[\alpha]_D^{25} + 9.16$ (c、1.01、 CHCl_3)、C₁₃H₁₆O₆の計算分析値：C,58.20、H,6.01。測定値：C,58.02、H,6.04。

例6：(-) - (2S,4S) 及び (2S,4R) -4-アセトキシ-2- (0-ベンゾイルオキシメチル) -ジオキソラン (8) の調製

水 (120 mL) 中の NaIO₄ (10.18 g、0.048 モル) 溶液を、 CCl_4 : CH_3CN (1:1、160 mL) 中の (6) (3.04 g、0.011 モル) の溶液に加え、続いて RuO₂ ハイドレート (0.02 g) を加えた。反応混合物を5時間攪拌した後、セライト (Celite) 濾過で固体を除去し、濾液を1/3の体積まで蒸発させた。残留物を CH_2Cl_2 (100 mL) に溶解し、水層を CH_2Cl_2 (100 mL×2) で抽出した。混合有機層を塩水 (50 mL) で洗浄し、乾燥し (MgSO₄)、濾過し、乾燥するまで蒸発させて16時間真空乾燥すると粗生成物 (7) (2.6 g、91%) を生じた。

N₂雰囲気下で、ドライ THF (60 mL) 中の粗生成物 (7) (2.6、0.01 モル) の溶液に Pb(OAc)₄ (5.48 g、0.0124 モル) 及びピリジン (0.83 mL、0.0103 モル) を加えた。N₂条件下で混合物を45分間攪拌し、濾過により固体を除去した。固体を酢酸エチル (60 mL) で洗浄し、乾燥するまで混合有機層を蒸発させた。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル、2:1) で精製すると (8) [$R_f = 0.73$ 及び 0.79 (ヘキサン-酢酸エチル、2:1)、1.9 g、69.34%] を無色の油として生じた。 ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.998、2.11 (2×s、3H、-OAc)、3.93~4.33 (m、2H、H-5)、4.43、4.48 (2×d、J=3.73、3.74 Hz、2H、 CH_2OBz)、5.46、5.55 (2×t、J=4.18、3.63 Hz、1H、H-2)、6.42 (m、1H、H-4)、7.33~7.59、8.00-8.15 (m、3H、2H、OBz)。 $[\alpha]_D^{25} - 12.53$ (c、1.11、 CHCl_3)、C₁₃H₁₄O₆の計算分析値：C,58.64、H,5.30。測定値：C,58.78、H,5.34。

例7：(-) - (2S,4S) -1- [2- (ベンゾイル) -1,3-ジオキソラン-4-yl] シトシン (9) 及び (+) - (2S,4R) -1- [2- (ベンゾイルオキシ) -1,3-ジオキソラン-4-yl] シトシン (10) の調製

乾燥ジクロロエタン (20 mL) 中の N⁴-アセチルシトシン (1.24 g、7.52 モル)、ヘキサメチルジシラザン (15 mL) 及び硫酸アンモニウム (触媒量) を窒素雰囲気下

10

20

30

40

50

で4時間還流させた。結果として生じる澄明な溶液を室温まで冷却した。このシリル化アセチルシトシンに、ドライジクロロエタン(10 mL)中の(8)(1.0 g、3.76モル)の溶液及びTMSOTf(1.46 mL 7.55モル)を加えた。混合物を6時間攪拌した。飽和NaHCO₃(10 mL)を加えて混合物をさらに15分間攪拌し、セライトパッドを通過させて濾過した。濾液を蒸発させ、固体を酢酸エチルに溶解し、水と塩水で洗浄し、乾燥し、濾過して蒸発させると粗生成物を生じた。この粗生成物をシリカカラム(5%CH₃OH/CHCl₃)で精製すると純粋な(9)と(10)のα、β混合物(0.40 g、30%)及び(13)と(14)のα、β混合物(0.48 g、40%)が得られた。(14)の混合物を分離のために再結晶させると、長いシリカカラム(3%CH₃OH/CHCl₃)によりα、β混合物が分離されて(9)(0.414 g、30.7%)及び(10)(0.481 g、35.6%)が泡として得られた。この泡をCH₃OHで粉末にすると白色の固体が得られた。9:UV(CH₃OH) λ_{max} 298nm、分析(C₁₇H₁₇N₃O₈) C、H、N。10:UV(CH₃OH) λ_{max} 298nm。

例8: (-)-(2S,4S)-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキソラン-4-yl)シトシン(11)の調製

CH₃OH/NH₃(50 mL、0℃で飽和)中の(9)(0.29 g、0.827)の溶液を室温で10時間攪拌した。溶媒を蒸発させ、粗生成物(11)をシリカ予備プレート(20% CH₃OH/CHCl₃)で精製すると油を生じた。これをCH₂Cl₂/ヘキサンから再結晶させると(11)(0.136 g、77.7%)を白色固体として生じた。UV λ_{max} 278.0nm (ε 11967) (pH2)、270.0nm (ε 774) (pH7)、269.0nm (ε 8379) (pH 11); 分析(C₈H₁₁N₃O₄) C、H、N。

II. 医薬組成物

薬理学的に許容できる担体中又は希釈剤中に適宜含ませた、(-)-OddC、又はその誘導体又はその薬理学的に許容できる塩の有効量を、単独で、又は他の既知の抗がん薬又は医薬品と組み合わせて患者に投与することによって、腫瘍、特にがん罹患しているヒト、ウマ、イヌ、ウシ及び他の動物、特に哺乳類を治療することができる。この治療は、放射線治療や外科手術など、従来の他のがん治療法と併用することができる。

この化合物は、液体、クリーム、ゲル、又は固体剤形、あるいはエアゾル剤形で、任意の適切な経路、たとえば、経口、非経口、静脈内、皮内、皮下、あるいは局所的に投与することができる。

この活性化化合物は、治療患者で重大な毒作用を引き起こすことなく、所望の指示に適した治療上有効な量を患者に送達するのに十分な量で、薬理学的に許容できる担体又は希釈剤に含まれる。本明細書に記載の病気のすべてに対して好ましい本化合物の用量は、約10 ng/kgから300 mg/kgの範囲であり、好ましくは1日当たり0.1~100 mg/kgであり、さらに一般的には1日当たり被検対象のkg体重当たり0.5~約25 mg/である。代表的な局所用量は適切な担体中に0.01~3%w/wの範囲になる。

本化合物は、単位剤形あたり1~3000 mg、好ましくは5~500 mgの有効成分を含む単位剤形を含む任意の適切な単位剤形で便利に投与されるが、この範囲に限定されない。通常、25~250 mgの経口投与が便利である。

約0.00001~30 mM、好ましくは約0.1~30 μMの活性化化合物ピーク血漿濃度が得られるように、有効成分が投与されることが好ましい。これは、たとえば、適宜生理食塩水中に含ませた、有効成分の溶液又は製剤の静脈内注射、又は有効成分のポーラスとして投与された水性媒体によって達成することが可能である。

薬剤組成物中の活性化化合物の濃度は、薬剤の吸収、分布、不活化、及び排出率ならびに当業者に周知の他の因子に左右される。投与量は、緩和させる病気の重症度とともに変化することになることに留意されたい。個々の必要量、及び組成物を投与する人物又は組成物の投与を監督する人物の専門的判断に従って、あらゆる個々の被験者に対して具体的で明確な投与方式を経時的に調節しなければならないこと、また本明細書に記載の濃度範囲は例示にすぎなく、特許請求の組成物の範囲や実施を制限するものではないことを更に理解されたい。有効成分は、一度に投与してもよく、より少量ずつ数回に分割して様々な時間

10

20

30

40

50

間隔で投与してもよい。

経口組成物は一般に不活性希釈剤又は摂食可能な担体を含有する。それらは、ゼラチンカプセルに封入することも可能であり、錠剤に圧縮することも可能である。経口治療的投与のためには、活性化合物又はそのプロドラッグ誘導体を賦形剤と一緒に混合し、錠剤、トローチ、又はカプセルの形で使用することができる。薬理学的に適合する結合剤、又は補助材料、又はその両者を、組成物の一部として含めることもできる。

錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、以下に示す諸成分、又は類似した性質の化合物類のいずれも含めることができる：微結晶性セルロース、トラガカントゴムなどの結合剤、デンプンやラクトースのような賦形剤、アルギン酸、プリモゲル (Primogel)、又はコーンスターチなどの分散助剤、ステアリン酸マグネシウムやステロート (Sterotes) などの滑剤、コロイド状二酸化珪素などのグリダント (glidant)、スクロースやサッカリンなどの甘味料、又はペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ調味料などの調味料。投与単位剤形がカプセルの場合、上記種類の材料のほかにも、脂肪油などの液体担体を含めることができる。さらに、投与単位剤形は、たとえば、砂糖、セラック又は腸溶剤のコーティングなど投与単位の物理的形状を変更する他の様々な材料を含むことができる。

活性化合物、又はその薬理学的に許容できる塩類を、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、オブラート剤、チューインガムなどの成分として投与することができる。シロップは、活性成分のほかにも、甘味料としてのスクロースやある種の保存料、色素や着色料、及び風味を含めることが可能である。

活性化合物又は薬理学的に許容できるその塩類は、所望の作用を損なわない他の活性材料、又は他の抗がん薬類、抗生物質類、抗真菌薬類、抗炎症薬類、又は抗ウイルス化合物類など、所望の作用を補足する材料と混合することもできる。

非経口、皮内、皮下、又は局所塗布に使用される溶液又は懸濁液は、以下の成分を含めることができる：注射用水、生理食塩水、非揮発性油、ポリエチレングリコール類、グリセリン、ポリピレングリコール又は他の合成溶剤、ベンジルアルコールやメチルパラベン類などの抗菌薬、アスコルビン酸や亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化薬、エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝液及び塩化ナトリウムやデキストロースなどの張度調節用の薬剤。非経口製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器又は多回投与バイアルに封入することができる。

静脈内投与をする場合、好ましい担体は生理食塩水又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) である。

1つの実施態様で、インプラントやマイクロカプセル封入送達システムをはじめとする除放製剤など、活性化合物が身体から急速に消失するのを防止する担体を使用して調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物類、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類、ポリ酢酸などの、生物分解性の生体適合ポリマを使用することができる。このような製剤を調製する方法は、当業者に明白であろう。

リポソーム懸濁液も薬理学的に許容できる担体と考えられる。これらは、当業者に周知の方法、たとえば、米国特許第4,522,811号（この文献は引用することによって本明細書にそのまま組み込むものとする）に記載の方法で調製することが可能である。たとえば、リポソーム製剤は、適切な脂質（類）（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ステアロイルホスファチジル塩素、アラカドイルホスファチジル塩素、コレステロールなど）を無機溶媒に溶解し、次にこれを蒸発させ、容器の表面の乾燥した脂質の薄膜を残す。活性化合物の水溶液を容器に導入する。容器を手で回転させて、容器の側面から脂質材料をはずし、脂質凝集体を分散させるとリポソームの懸濁液が生成する。

III. 生物学的活性

種々様々な生物学的検定法を使用して化合物の抗がん作用が評価され、当業者に受け入れられてきた。これらの方法のうちのいずれを使用しても本明細書に記載の化合物の活性を評価することができる。

活性の評価によく使用される1つの方法は、国立がん研究所 (NCI) のがん細胞系テストパネルを使用する方法である。このテストでは、個々の化合物の *in vitro* での抗がん活

10

20

30

40

50

性を評価し、被験化合物のin vivoでの使用に関する予測データを提供する。他の検定法には、ヌードマウスに内植するか移植したヒト腫瘍細胞又はネズミ腫瘍細胞に及ぼす化合物の作用のin vivoにおける評価が含まれる。p 3 8 8 白血病細胞系及びC 3 8 結腸がん細胞系に対する(-)-O d d Cの抗がん作用をin vivoで試験した。例 9 及び例 1 0 は、これらの試験の実験データ及び結果を提供するものである。

例 9 (-)-O d d C による白血病 p 3 8 8 細胞系のin vivoでの治療

10^6 の白血病 p 3 8 8 細胞系を、Southern Research Institute, Alabamaから入手したB D F 1 マウスに腹腔内移植した。腫瘍細胞移植後1日に開始して5日間、1日に2回ずつ(-)-O d d Cを腹腔内投与した。このプロトコルを使用して、7 5 mg/kg/投与はマウスに有毒であることが証明された。

図 3 及び表 1 は、これらの試験結果を示す。図 3 で、(●)は対照(非投与動物)のデータを表し、(--△--)は2 5 mg/kgbidの(-)-O d d Cを1日2回投与したマウスの生存率を表し、(○)は5 0 mg/kgbidの(-)-O d d Cを1日1回投与したマウスの生存率を表す。2 5 mg/kg/投与の(-)-O d d Cを投与したマウス6匹のうち1匹が長期生存者であり、残り5匹の寿命は1 0 3 %増加した。

表 1

グループ	投与量 ^a (mg/kg)	投与方法	平均生存期間 (日)	ILS ^b (%)	死亡までの時間 (日)	治療個体数 ^c /全体数
対照	--	--	13.3	--	11, 12, 13 13, 13, 18	0/6
-Oddc	25x2x5	腹腔内	27	103	18, 20, 22, 25, 33, 45	1/6

接種：10⁶個のP388細胞を第0日に各マウスの腹腔内に接種した

a：処理は第1～5日に1日2回行われた

b：対照と較べた寿命増加率

c：寿命が45日以上生存個体

例10 (-)-Oddcによる結腸38腫細胞系のin vivoでの治療

結腸38腫瘍細胞をBDF1マウスに皮下移植した。25mg/kg/投与の(-)-Oddcを1日2回ずつ5日間、マウスに投与した。図2からわかるように、結腸腫瘍細胞の成長は遅滞した。図2で、(●)は対照動物のデータを表し、(▲)は(-)-Oddc投与マウスのデータを表す。

例11 (-)-Oddcのin vitroでの試験

NICのがんスクリーニングプログラムで(-)-Oddcを評価した。試験では、種々の濃度の(-)-Oddcでの種々のがん細胞系の抑制を測定した。試験した細胞系を表2に記載する。

表2は、被験細胞系でGI50及びTGIが確認された濃度も示す。GI50、TGI及びLC50は、以下に定義するPG(成長抑制率)がそれぞれ+50、0、及び-50である濃度を表す値である。これらの値はPG対log₁₀(-)-Oddc濃度の関数としてプロットして確立した各細胞系の用量応答曲線から内挿して求めた。

PGは(-)-Oddcが細胞系に及ぼす作用の正確な測定値であり、次の2つの表現のい

10

20

30

40

50

ずれかに従って算出した：

$$\begin{aligned} & (\text{平均 } OD_{\text{test}} - \text{平均 } OD_{\text{tzero}}) \geq 0. \text{ であれば、} \\ PG &= 100 \times (\text{平均 } OD_{\text{test}} - \text{平均 } OD_{\text{tzero}}) / \\ & (\text{平均 } OD_{\text{ctrl}} - \text{平均 } OD_{\text{tzero}}) \\ & (\text{平均 } OD_{\text{test}} - \text{平均 } OD_{\text{tzero}}) < 0. \text{ であれば、} \\ PG &= 100 \times (\text{平均 } OD_{\text{test}} - \text{平均 } OD_{\text{tzero}}) / (\text{平均 } OD_{\text{tzero}}) \end{aligned}$$

式中、

平均 OD_{tzero} = 細胞を被験化合物に曝露する直前の S R B 由来の色の光学密度測定値の平均。

平均 OD_{test} = 細胞を被験化合物に曝露した 48 時間後の S R B 由来の色の光学密度測定値。 10

平均 OD_{ctrl} = 細胞を被験化合物に曝露しない 48 時間後の S R B 由来の色の光学密度測定値。

表 2 で、最初の 2 つの列は、(-) - O d d C を投与したサブパネル（たとえば、白血病）と細胞系（たとえば、CCRF-CEM）が記載されている。第 3 列は G I 5 0 が現れた $\log_{10}$ を示し、第 4 列は T G I が現れた $\log_{10}$ を示す。これらの応答パラメーターを内挿で得ることができなかった場合、各応答パラメータに与えられた値は、試験した最高濃度であり、「>」の符合を前につけた。たとえば、特定の細胞系に投与した (-) - O d d C のすべての濃度で、すべての P G が + 5 0 を超えた場合、このパラメータは内挿によって得ることはできない。 20

表 2

パネル	細胞系	Log ₁₀ GI50	Log ₁₀ TGI
白血病	CCRF-CEM	-6.64	> -4.00
	RL-60(TB)	-6.28	> -4.00
	K-562	-4.59	> -4.00
	BSOLT-4	-6.66	-4.39
	RPMI-2.26	-4.03	> -4.00
	SR	-5.95	> -4.00
非小細胞 肺がん	A549/ATCC	-6.01	> -4.00
	BKVX	> -4.00	> -4.00
	HOP-62	-6.23	-4.71
	NCI-H23	-4.92	> -4.00
	NCI-H322M	> -4.00	> -4.00
	NCI-H460	-4.32	> -4.00
	NCI-H522	-6.06	> -4.00
結腸がん	COLO205	-4.03	> -4.00
	HCT-116	-5.23	> -4.00
	HCT-15	-5.39	> -4.00
	HT29	> -4.00	> -4.00
	K2112	> -4.00	> -4.00
中枢神経系がん	SP-268	-5.18	> -4.00
	SP-295	-6.24	> -4.00
	SNB-19	-5.71	> -4.00
	U251	-4.91	> -4.00
黒色腫	LOX D6VI	-6.39	> -4.00
	MALME-3M	-4.51	> -4.00
	M14	-6.27	-5.07
	SK-MEL-28	-4.31	> -4.00
	SK-MEL-5	-4.91	> -4.00
パネル	細胞系	LOG ₁₀ GI50	LOG ₁₀ TGI
	UACC-257	> -4.00	> -4.00
	UACC-62	-5.53	> -4.00

10

20

30

40

卵巣がん	OROV1	-4.03	> -4.00
	OVCAR-3	-4.44	> -4.00
	OVCAR-4	> -4.00	> -4.00
	OVCAR-5	-4.41	> -4.00
	OVCAR-8	-5.82	> -4.00
	SK-OV-3	-5.35	> -4.00
腎臓がん	785-4	-5.36	> -4.00
	ACHN	-6.46	> -4.00
	CAKI-1	-6.65	-4.87
	RXF-393	-6.17	> -4.00
	SN12C	-6.27	> -4.00
	TK-30	> -4.00	> -4.00
	UO-31	-5.60	> -4.00
前立腺がん	PC-3	-6.29	> -4.00
	DU-145	-6.97	> -4.00
乳がん	MCF7	-5.95	> -4.00
	MCF7/ADR-RES	-4.97	> -4.00
	MDA-MB-231/ATCC	> -4.00	> -4.00
	HS578T	> -4.00	> -4.00
	MDA-MB-435	-4.62	> -4.00
	MDA-N	-4.33	> -4.00
	BT-549	-4.59	> -4.00
	T-47D	> -4.00	> -4.00

図4は、特定の細胞系での(-)-O d d Cの相対的選択性を表すグラフである。右に伸びる棒は、試験した全細胞系の平均感受性を超えた細胞系の(-)-O d d Cに対する感受性を示す。棒の目盛りが対数であるため、右に2単位の棒は、その細胞系では、すべての細胞系に対して必要な平均濃度の100分の1の濃度でその化合物がGI₅₀を示したことを意味し、したがってその細胞系は(-)-O d d Cに対して異常に敏感なことを意味する。対応する左に伸びる棒は平均未満の感受性を意味する。log₁₀濃度には「>」を前につけるため、このような細胞系は表2から容易に決定することができる。

試験したがん細胞の各タイプのうち少なくとも1つの細胞系が(-)-O d d Cに感受性を示したことが図4からわかる。ある種の前立腺がん細胞系、白血病細胞系、及び結腸細胞系が(-)-O d d Cに対して極端な感受性を示す。

例12 (-)-O d d CとA r a Cの比較

発明の背景で検討した通り、シトシンアラビノシド(シタラビン、araC、Cytosarとも呼ばれる)は、急性骨髄性白血病の治療に使用されるデオキシシチジンのヌクレオシド類似

10

20

30

40

50

体である。シトシンアラビノシドは急性リンパ性白血病に対しても活性であり、それ程はないが、慢性骨髄性白血病及び非ホジキンリンパ腫にも有用である。araCの主要な作用は核DNA合成の阻害である。(－)-O d d CとAraCの腫瘍細胞に対する毒性を比較することは興味深い。

対数増殖期にある細胞を5000細胞/mL/ウェルの密度で24ウェルプレートにプレーティングした。異なる投与量で薬剤を細胞に加え、培養を3世代の期間、維持した。この期間の最後に、メチレンブルー検定を実施するか、又は細胞数を直接数えるか、又はその両者を実施した。メチレンブルーは化学量論的方式で生育可能な細胞のタンパク質に結合する色素であるため、細胞数の間接的測定に使用することができる(Finlay、1984年)。I C₅₀値は、プロットしたデータの内挿によって求めた。各値は、各データポイントで二重に実施した5実験の平均値±標準偏差である。

10

試験した腫瘍細胞系のすべてで、(－)-O d d CはAraCよりも細胞傷害性であった。KB鼻咽頭がん細胞系及び2種類の前立腺がん腫株DU-145及びPC-3では、(－)-O d d CはAraCより有意に有効であった。He p G 2細胞は肝細胞がん腫が起源であり2.2.15株は、B型肝炎ウイルスゲノムのコピーをトランスフェクトしたHe p G 2細胞に由来する。CEM細胞は急性リンパ芽球性白血病に由来する。(－)-O d d Cを脱アミノ化すると生成する化合物(－)-O d d Uは、試験した細胞系のいずれでも毒性ではなかった。AraCは脱アミノ化を受けやすいために臨床効果が大きく減少するが、(－)-O d d CはAraと違ってデアミナーゼの基質ではないことが酵素試験でわかる。

(－)-O d d Cは、in vivoでモノフォスフェートヌクレオチド、ジフォスフェートヌクレオチド、トリフォスフェートヌクレオチドにリン酸化されることがすでに決定されている。化合物をリン酸化することができない細胞は化合物に対する感受性はるかに低いため、(－)-O d d Cはリン酸化された形で、その細胞毒性を示すと考えられる。そのリン酸化を分担する最初の酵素はヒトのデオキシシチジンキナーゼである。この酵素によって(－)-O d d Cがリン酸化されることが、in vitroでの酵素試験でわかる。

20

(－)-O d d CはAraCと違ってシチジンデアミナーゼによる脱アミノ化を受けない。固形腫瘍組織中にシチジンデアミナーゼが存在することが、固形腫瘍でaraCの活性がみられないことの重要な原因因子と考えられる。これによって、(－)-O d d CはヌードマウスのHe p G 2細胞に対して活性であるが、araCは不活性である理由が部分的に説明されるであろう。(－)-O d d CがaraCと異なる抗腫瘍活性スペクトルを示すことにも説明がつく。さらに、araCを経口的に服用することができないのは、消化管にシチジンデアミナーゼが存在することが主な原因と考えられる。

30

(-) -OddCの生化学的研究
*in vitro*でのAraC、(-) -OddC、(-) -OddUの細胞障害性

細胞系	AraC	ID ₅₀ (μM) (-) -OddC	(-) -OddU
KB	0.152 ± .010	0.048 ± .021	>30
DU-145	0.170 ± .035	0.024 ± .020	>30
PC-3	0.200 ± .078	0.056 ± .039	>30
HepG2	0.125 ± .013	0.110 ± .050	>30
2.2.15	0.145 ± .007	0.110 ± .011	>30
CEM	0.030 ± .010	0.025 ± .030	>30

例12 *in vivo*での試験

3～6週齢のNcrヌードマウス (Taconic Immunodeficient Mice and Rats) の各側腹に 2×10^6 のHepG2細胞又はDU-145細胞を皮下接種して、腫瘍細胞を成長させた。カリパス測定で測定し、式

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = \text{長さ (mm)} \times \text{幅 (mm}^2\text{)} \div 2$$

に従って算出して、腫瘍が100～250mgのときに投与を開始した。

第0～4日に、指示された用量で薬剤を投与し、数日ごとに腫瘍サイズを測定した。Bellら、Cancer (phila.) 36:2437-2440 (1975年) に記載されている腫瘍成長曲線を作成し、これを図5(a)及び図5(b)に示す。

体重の変化によって毒性を評価した。

AraCの*in vitro*での毒性は(L) -OddCと類似していたが、AraCはこの動物モデルでは無効であった。これはdCD活性上昇又はdCK活性低下によるものではなく、dCDレベルが高い肝臓でAraCが徹底的に代謝される結果であったと考えられることが腫瘍抽出物の酵素分析で示された。(L) -OddCはAraCと違ってHepG2異種移植片でもDU-145異種移植片でも有効であった。HepG2腫瘍の計算上の正味の細胞死滅(10

10

20

30

40

50

g₁₀)は、腹腔内投与及び経口投与で、それぞれ0.67及び0.87であった。DU-145腫瘍はサイズが小さくなり、その半数は第15日までに完全に退行していた。最終投与後約25日に腫瘍が出現しはじめたが、第47日以降に成長が再び止まった。第60日に動物を屠殺して腫瘍を摘出した。腫瘍には壊死性形態が認められ、トリパンプルーを除外することができる細胞は極めて少なかった。さらに、この組織でいかなる酵素活性も検出することはできなかった。動物の体重減少からわかるように、投与したAraC及び(L)-O d d Cの用量は等しい毒性であり、連続5日投与の場合、25 mg/kgずつ1日2回投与が最大耐容量であることが予備的毒性実験から示唆される。薬剤を間欠ベースで投与するプロトコルが好ましいと考えられる。

(L)-O d d Cは著明な抗がん活性を示し、現在使用できるデオキシシチジン類似体より多くの点ですぐれていることが、本明細書に示すin vitroでのデータ及びin vivoデータで証明される。(L)-O d d Cは抗がん作用があることが証明された最初のL-ヌクレオシド類似体であるばかりではなく、腫瘍成長を抑制することができる最初の真の鎖終結因子である。(L)-O d d Cの立体化学が非天然であるために、(L)-O d d Cが代謝酵素によって不活化されたりDNAに組み込まれたりすることは妨害されないが、非天然の立体化学によって、この化合物がd C Dにより分解されないように保護される。(L)-O d d Cは、通常はヌクレオシド類似体療法に対して応答しない固形腫瘍で活性な点でも独特である。固形腫瘍の治療用に現在臨床評価を受けている薬剤2',2'-ジフルオロデオキシシチジン(ゲムシチビン(gemcitabine))は、やはりd C Dによる不活化を受けやすい(16)。d C Dレベルの上昇は、A r a Cなどのd C y d類似体に対して細胞が耐性になる機序であるため(17)、(L)-O d d Cはこれらの薬剤に応答しなくなった患者の治療に有効かもしれない。

IV. オリゴヌクレオチドテクノロジー及びアンチセンステクノロジーにおける(-)-O d d Cの使用

アンチセンステクノロジーは、転写又は複製を阻害する(標的配列がDNAの場合)、翻訳を阻害する(標的配列がRNAの場合)、あるいはプロセッシングを阻害する(標的配列がプレRNAの場合)ために、相補的な核酸配列に対して合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成させるプロセスによる遺伝子発現の調節のことを一般にいう。この技術を使用して、種々様々な細胞活性を調節することができる。簡単な例としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドをmRNAに結合させることによるタンパク質生合成の阻害がある。またの実施態様では、二本鎖の特異的な遺伝子配列に対して合成オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成させ、その遺伝子配列の発現を阻害する三本鎖複合体(三重らせん)を形成する。アンチセンス・オリゴヌクレオチドを使用して、天然のリプレッサーの生合成を抑制することにより遺伝子発現を間接的に活性化することや、転写の終結を減少させることにより直接的に活性化することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド療法(AOT)を使用して、良性又は悪性の腫瘍細胞の非抑制成長に関係している遺伝子や、HIVやHBVを含め、ウイルスの複製に関与する遺伝子を含めむ病原性遺伝子の発現を抑制することができる。

ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの安定性は、in vivoでの応用の重要な因子である。血清での非修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド分解のほとんどを、3'エキソヌクレアーゼが分担していることが判明している。Vlassov, V.V., Yakubov, L.A., in Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancers and AIDS, 1991, 243-266, Wiley-Liss, Inc., New York; Nucleic Acid Res., 1993, 21, 145.

オリゴヌクレオチドの3'末端でヌクレオチドを(-)-O d d C又はその誘導体と置換すると、オリゴヌクレオチドは3'-エキソヌクレアーゼの分解に対して安定化する。または、あるいはそれに加えて、内部ヌクレオチドを(-)-O d d C又はその誘導体と置換するとエンドヌクレアーゼによるオリゴヌクレオチドの分解に耐性を持つことができる。

本明細書が開示されれば、普通の熟練技術の1つにより、(-)-O d d C又はその誘導体を使用して、アンチセンスオリゴヌクレオチド療法に使用されるオリゴヌクレオシドを含め、広範囲のオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼとエンドヌクレアーゼの両者に対

して安定化させることができるであろう。これらの実施態様は本発明の範囲に属すると考えられる。例13は、3'エキソヌクレアーゼの活性に耐性を持たせるために(-)-O d d Cを使用する例の一つであるが、此の例に限定するものではない。

例13 (-)-O d d Cによる3'エキソヌクレアーゼ活性に対する耐性

ヒトH9 (T型リンパ性白血病細胞)由来のヒト細胞質ゾルエキソヌクレアーゼ活性を、配列決定ゲルアッセイで決定した。簡単に記述すると、次の配列を持つ20又は23塩基長のDNAプライマーから3'末端基質を調製した。

3'-CAATTTTGAATTTCCTTAAGTCC-5'

24

1

10

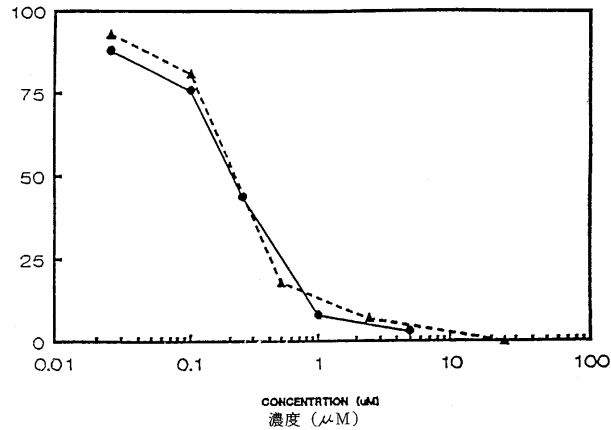
プライマーの5'末端を $[\gamma - ^{32}\text{P}] \text{ATP}$ で標識して、相補的RNA鋳型にアニーリングし、HIV-1 RTで触媒したスタンディングスタート反応で、dTTP (20mer) dCTP (23mer) 又は(-)-O d d C (23mer)で3'末端を終結させた。この条件で、20merはdTTP (A)で終結し、23merはdCMP (B) 又は(-)-O-d d CMP (C)で終結した。これらの1本鎖DNA基質を使用して、細胞質エキソヌクレアーゼに対する感受性を検定した。50 mMのTris-HCl (pH 8.0)、1 mMの MgCl_2 、1 mMのジチオトレイトール、0.1 mg/mlのウシ血清アルブミン、0.18 $\mu\text{Ci/ml}$ の3'末端基質及び2 μl のエキソヌクレアーゼ(0.03単位)を含有する10 μl 反応物で検定を実施した。反応物を37°Cで指示された時間保温し、4 μl の98%ホルムアミド、10 mMのEDTA及び0.25%ブロモフェノールブルーを加えて反応を停止させた。20

サンプルを100°Cで5分間変性させ、続いて水で急冷した。15%ポリアクリルアミド/尿素配列決定ゲルで未反応材料ならびに反応生成物を分離させ、オートラジオグラフィで可視化した。3'-末端に(-)-O d d Cを持つオリゴヌクレオチドは、3'エキソヌクレアーゼに対して、他のオリゴヌクレオチドより少なくとも5倍抵抗性である。

がんの治療における本発明の修飾及び変更は、本発明の前記詳細な説明から当業者に明白である。このような修飾及び変更は、この後に続く特許請求の範囲内に包含されるものである。

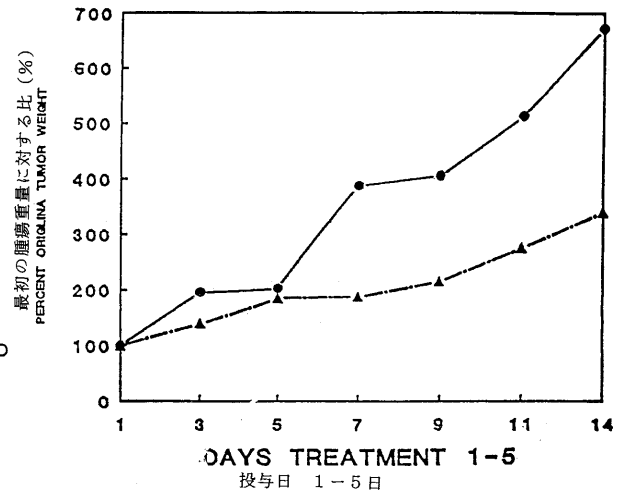
【図 1】

FIGURE 1



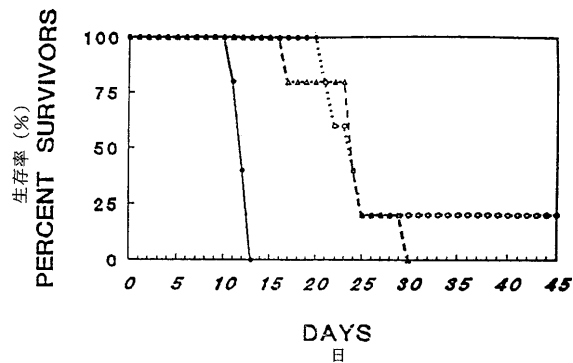
【図 2】

FIGURE 2



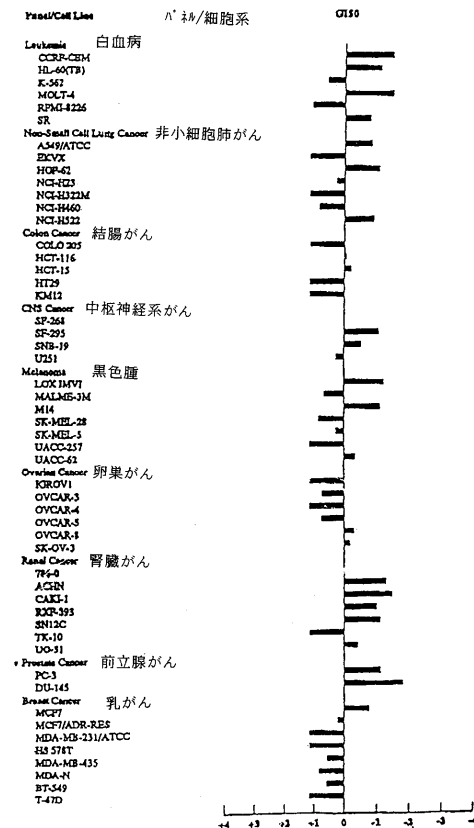
【図 3】

FIGURE 3



【図 4】

FIGURE 4



【図 5】

FIGURE 5A

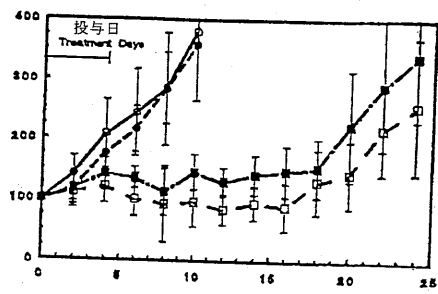
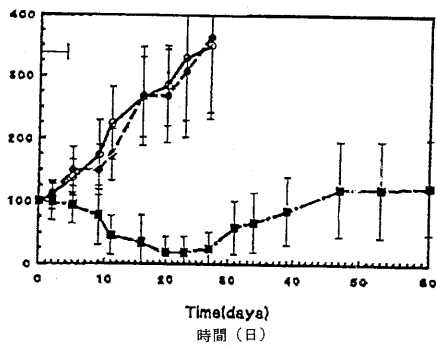


FIGURE 5B



% Original Tumor Weight
最初の腫瘍重量に対する比 (%)

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 秋山 暢利

(74)代理人

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人

弁理士 有原 幸一

(72)発明者 チュー, チュン・ケイ

アメリカ合衆国、30605 ジョージア、アセズ、オーチャード・ノブ・レイン 120

(72)発明者 チェン, ユン・チー

アメリカ合衆国、06525 コネチカット、ウッドブリッジ、ボールドウィン・ロード 961

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 国際公開第92/018517 (WO, A1)

特開平01-316375 (JP, A)

Hea 0. Kim, Tetrahedron Letters, 1992年, Vol.33, No.46, Pages 6899-6902

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D405/04

A61K 31/505

CA(STN)

REGISTRY(STN)