

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4982019号  
(P4982019)

(45) 発行日 平成24年7月25日(2012.7.25)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C07H</b>	<b>19/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H 19/10 C S P
<b>A61K</b>	<b>31/7072</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7072
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
<b>A61P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 O 5
<b>C07H</b>	<b>19/073</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H 19/073

請求項の数 37 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-512538 (P2001-512538)  
 (86) (22) 出願日 平成12年7月21日(2000.7.21)  
 (65) 公表番号 特表2003-505466 (P2003-505466A)  
 (43) 公表日 平成15年2月12日(2003.2.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/020008  
 (87) 国際公開番号 W02001/007454  
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日(2001.2.1)  
 審査請求日 平成19年6月21日(2007.6.21)  
 (31) 優先権主張番号 60/145,356  
 (32) 優先日 平成11年7月22日(1999.7.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/145,437  
 (32) 優先日 平成11年7月23日(1999.7.23)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500060294  
 セルメド オンコロジー (ユーエスエイ),  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921  
 21-3829, サン ディエゴ,  
 ディレクターズ プレイス 4939  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (72) 発明者 シェパード, エイチ. マイケル  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920  
 67, エンシニタス, クアイル ガー  
 デンズ コート 1256

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素によって触媒される治療活性化

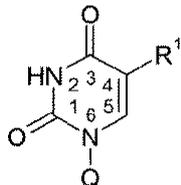
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化合物であって、

(i) 以下の構造:

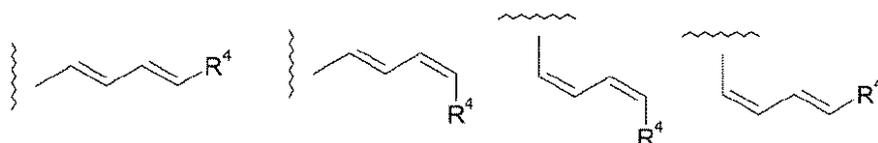
【化1】



で表される化合物であって、ここで:

R<sup>1</sup> は、

【化2】

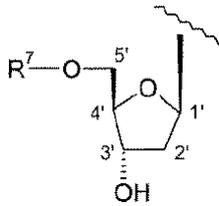


から選択される基であり;

R<sup>4</sup> は、C l、B r または I であり;

Q は、

## 【化3】



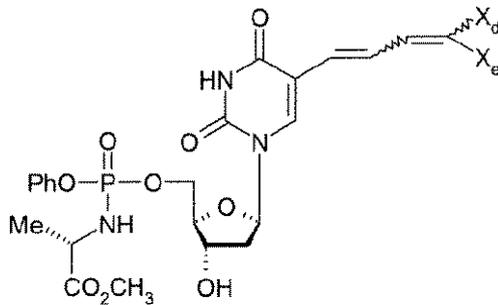
であり；そして

R<sup>7</sup> は、Q の 5' 位で Q に結合しており、そして - H、リン酸基、ホスホジエステル基またはホスホルアミデート基である、化合物；

10

( i i ) 以下の構造：

## 【化4】



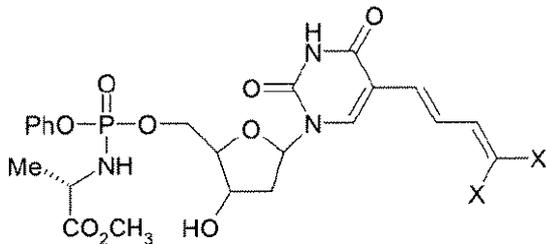
20

で表される化合物であって、ここで：

X<sub>d</sub> および X<sub>e</sub> は独立して、同じであるかまたは異なっており、そして C l、B r および I から選択される、化合物；

( i i i ) 以下の構造：

## 【化5】



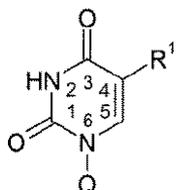
30

で表される化合物であって、ここで各 X は、C l、B r および I から選択される、化合物；ならびにそれらの塩から選択される、化合物。

## 【請求項2】

以下の構造：

## 【化6】



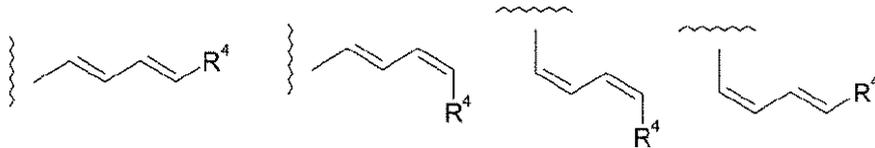
40

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項1に記載の化合物であって、

ここで、

R<sup>1</sup> は、

## 【化 7】

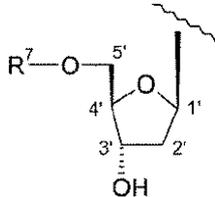


から選択され、

$R^4$  は、Cl、Br または I であり；

Q は、

## 【化 8】



10

であり、そして

$R^7$  は、Q の 5' 位で Q に結合しており、そして -H、リン酸基、ホスホジエステル基またはホスホルアミデート基である、化合物。

## 【請求項 3】

$R^7$  が、-H である、請求項 2 に記載の化合物。

20

## 【請求項 4】

$R^7$  が、アミノ酸から誘導されたホスホルアミデート基である、請求項 2 に記載の化合物。

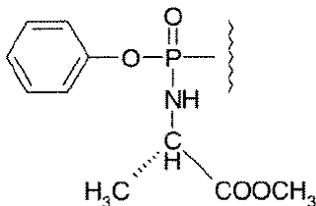
## 【請求項 5】

$R^7$  が、アラニンから誘導されたホスホルアミデート基である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

$R^7$  が、以下：

## 【化 9】



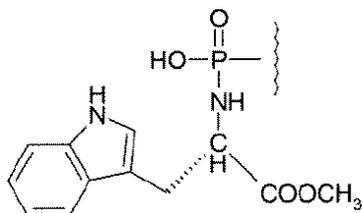
30

である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

$R^7$  が、以下：

## 【化 10】



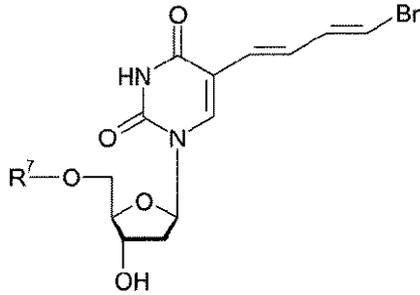
40

である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

以下の構造：

## 【化 1 1】

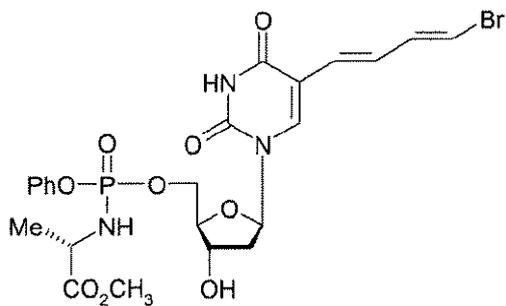


で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 2 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。 10

## 【請求項 9】

以下の構造：

## 【化 1 2】



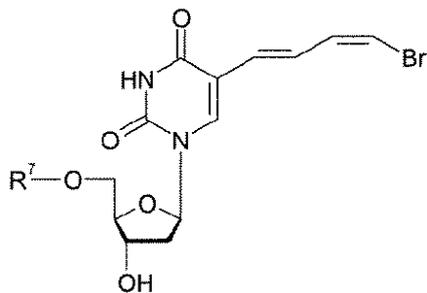
20

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 10】

以下の構造：

## 【化 1 3】



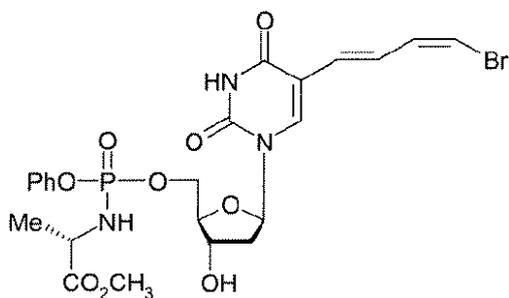
30

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 2 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

## 【請求項 11】

以下の構造：

## 【化 1 4】



40

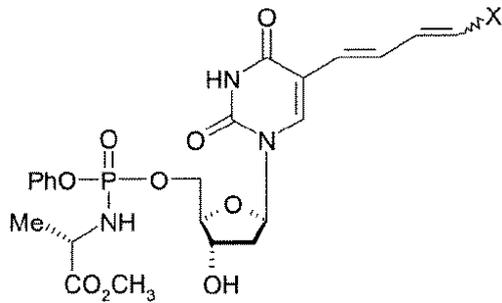
で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 12】

50

以下の構造：

【化 1 5】



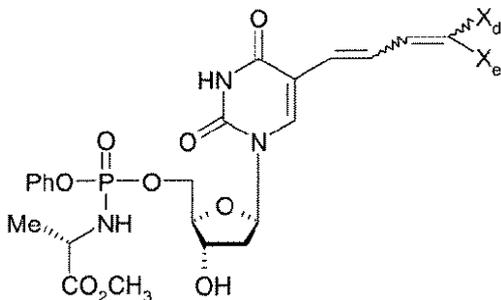
10

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 2 に記載の化合物であって、ここで X は、C l および B r から選択される、化合物。

【請求項 1 3】

以下の構造：

【化 1 6】



20

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 1 に記載の化合物であって、ここで、X<sub>d</sub> および X<sub>e</sub> が独立して、同じであるかまたは異なっており、そして C l、B r および I から選択される、化合物。

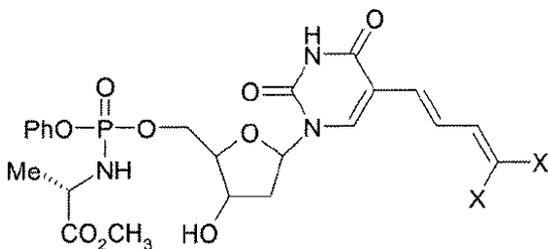
【請求項 1 4】

X<sub>d</sub> が C l または B r であり、そして X<sub>e</sub> が H である、請求項 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 5】

以下の構造：

【化 1 7】



30

で表される化合物、およびそれらの塩から選択される、請求項 1 に記載の化合物であって、ここで各 X が、C l、B r および I から選択される、化合物。

40

【請求項 1 6】

X が、C l または B r である、請求項 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

X が B r である、請求項 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

【請求項 1 9】

ヒトまたは動物の身体の処置方法において使用するための、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む医薬組成物。

50

## 【請求項 20】

病理学的細胞の増殖を処置または阻害するための薬の調製のための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

## 【請求項 21】

被験体における標的細胞の増殖によって特徴付けられる病状を処置するための薬の調製のための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

## 【請求項 22】

前記病理学的細胞または標的細胞が、化学療法薬物に対して耐性である、請求項 20 または請求項 21 に記載の使用。

## 【請求項 23】

前記処置または阻害が前記化学療法薬物を用いた処置をさらに含む、請求項 22 に記載の使用。

## 【請求項 24】

前記病理学的細胞または標的細胞が、化学療法によるインビボでの選択の結果として増幅される標的酵素を発現する、請求項 20 ~ 請求項 23 のいずれか 1 項に記載の使用。

## 【請求項 25】

前記標的酵素が、前記病理学的細胞または前記標的細胞において過剰発現される内因性細胞内酵素である、請求項 24 に記載の使用。

## 【請求項 26】

前記酵素が、チミジル酸シンターゼである、請求項 24 に記載の使用。

## 【請求項 27】

治療剤についてのスクリーニング方法であって、以下の工程：

(a) 標的細胞を含むサンプルを、請求項 1 ~ 請求項 17 のいずれか 1 項に記載の化合物と接触させる工程；

(b) 該標的細胞の別のサンプルを、潜在的治療剤と接触させる工程；および

(c) 該サンプルを、細胞増殖の阻害または細胞殺傷について比較する工程を包含する、方法。

## 【請求項 28】

前記標的細胞が、化学療法薬物に対して耐性と特徴付けられる、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記標的細胞が、化学療法によるインビボでの選択の結果として増幅される標的酵素を発現すると特徴付けられる、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記標的酵素が、前記標的細胞において過剰発現される内因性細胞内酵素である、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 31】

病理学的細胞の増殖を処置または阻害するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む医薬組成物。

## 【請求項 32】

被験体における標的細胞の増殖によって特徴付けられる病状を処置するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む医薬組成物。

## 【請求項 33】

前記病理学的細胞または標的細胞が、化学療法薬物に対して耐性である、請求項 31 または請求項 32 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 34】

前記化学療法薬物と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 33 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 35】

前記病理学的細胞または標的細胞が、化学療法によるインビボでの選択の結果として増

10

20

30

40

50

幅される標的酵素を発現する、請求項 3 1 ~ 請求項 3 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

前記標的酵素が、前記病理学的細胞または前記標的細胞において過剰発現される内因性細胞内酵素である、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

前記標的酵素が、チミジル酸シンターゼである、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願の引用)

本出願は、以下の米国特許仮出願、米国特許仮出願第 6 0 / 1 4 5 , 3 5 6 号 ; 同第 6 0 / 1 4 5 , 4 3 7 号 ; および同第 6 0 / 1 9 1 , 3 1 5 号 (それぞれ 1 9 9 9 年 7 月 2 2 日 ; 1 9 9 9 年 7 月 2 3 日 および 2 0 0 0 年 3 月 2 1 日に出願された) に対して、3 5 U . S . C . § 1 1 9 ( e ) 下における優先権を主張し、これらの内容は、本開示の中へ本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、薬物の発見および具体的には、病理学的細胞で過剰発現される内因性細胞内酵素に対する基質であるプロドラッグの設計の分野に関する。

【0003】

(発明の背景)

本開示全体および本開示内で、種々の刊行物が、最初の著者および日付、特許番号または公開番号によって参照される。各々の参考文献に対する完全な図書目録的引用は、本明細書中または本出願の最後 (特許請求の範囲の後) に見出され得る。これらの刊行物の開示は、本開示の中へ本明細書中に参考として援用されて、本発明が関連する分野の技術水準をより完全に記載する。

【0004】

癌は、世界で最も一般的な致命的ヒト疾患の一つである。抗癌剤を用いる処置は、特に、手術で治療可能な状態を過ぎてしまった全身性悪性腫瘍または転移性癌に対して、重要性をどんどん増している選択肢の一つである。残念ながら、現在の治療処置を実行可能なヒト癌型のサブセットは、まだかなり小さく (Haskell, C. M. (1995))、毎年およそ 6 0 0 , 0 0 0 人が亡くなっている。Cancer Fact & Figures, 1999 American Cancer Society を参照のこと。ヒト癌を治療し得る薬物開発の進歩は遅く、成功は、数種の血液学的悪性腫瘍およびより少数の固形腫瘍型に限られている (Dorr および Van Hoff (1994))。疾患機構に基づく治療法を発見する際の進歩は、今後の成功のための機会を提供する。(Cobleigh, M. A. ら (1999); および Roth, J. A. ら (1999))。

【0005】

遺伝学、生物学および生化学に関する悪性腫瘍の不均一性ならびに治療に対する原発性耐性または処置誘導性耐性は、治療処置を妨げる。さらに、多くの抗癌剤は、低い程度の選択性しか示さず、しばしば重篤なもしくは生命さえ脅かす有毒の副作用を引き起こし、それゆえ全ての癌細胞を殺傷するのに十分な高用量の適用を妨げている。従って、処置耐性病理学的悪性細胞に対して改善された選択性を有する抗腫瘍剤を探し出すことは、依然として薬物開発のための中心課題である。

【0006】

癌細胞は、非制御増殖、脱分化および遺伝子不安定性によって特徴付けられている。不安定性は、それ自体が、異常染色体数、染色体欠失、再配列、喪失または正常二倍体数を超える複製として表れる (Wilson, J. D. ら、(1991))。このゲノム不安定性は、いくつかの因子により引き起こされ得る。最も良く特徴付けられている因子のうちの 1 つは、腫瘍抑制遺伝子機能の喪失に対して生じる増強されたゲノム形成性である (

10

20

30

40

50

例えば、Almasan, Aら、(1995a)およびAlmasan, Aら、(1995b))。ゲノム形成性は、環境の変化に対する腫瘍細胞の順応性に役に立ち、そしてより頻繁な変異、遺伝子の増幅、および染色体外因子の形成を可能にし得る(Smith, K.Aら、(1995)およびWilson, J.Dら、(1991))。これらの特徴は、より攻撃的な悪性腫瘍を生じる機構を提供する。なぜなら、それは、腫瘍が、天然の宿主防御機構、生物学的治療(Wilson, J.Dら、(1991)およびShepard, H.Mら、(1988)を参照のこと)ならびに化学療法(Almasan, Aら、(1995a); およびAlmasan, Aら(1995b)を参照のこと)に対する耐性を迅速に発達させることを可能にするからである。

【0007】

さらに、化学療法剤の臨床的有用性は、その薬剤に対する悪性細胞耐性の出現によって厳密に制限され得る。おそらく、多数の細胞性機構(例えば、薬物の変更された代謝、活性化合物に対する細胞の不浸透性もしくは細胞からの促進された薬物除去、阻害された酵素の変更された特異性、標的分子の増加した産生、細胞傷害性病変の増加した修復、または代替の生化学経路による阻害された反応のバイパス形成)が、薬物耐性に関与する。いくつかの場合において、ある薬物に対する耐性は、他の、生化学的に異なる薬物に対する耐性を与え得る。癌化学療法に対する耐性の代替機構は、腫瘍抑制遺伝子の機能的喪失を介して生じる。これらのなかで最も特徴付けられているものは、p53、RBおよびp16である。(Funk, J.O. 1999; およびTeh, B.T. (1999))。これらの遺伝子産物の機能の喪失は、抗癌剤により一般的に標的化される酵素(例えば、5-フルオロウリジル(「5FU」)/チミジル酸シンターゼおよびメトトレキサート/ジヒドロ葉酸レダクターゼ)の抑制された発現に導く。(Lee, Vら、(1997); Lenz, H.J.ら、(1998); およびFan, J. およびBertino, J. (1987))。特定遺伝子の増幅は、生物学的および化学療法に対する耐性に関与する。ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする遺伝子の増幅がメトトレキサートに対する耐性に関する一方で、チミジル酸シンターゼをコードする遺伝子の過剰発現/増幅が5-フルオロピリミジンを用いる処置に対する耐性に関する。(Smith, K.A.ら、(1995))。表1は、生物学的および化学療法に対する耐性におけるいくつかの重要な酵素を要約している。

【0008】

【表1】

10

20

30

表1  
癌化学療法に対する耐性において過剰発現された酵素

酵素	生物学的または化学療法	参考文献(例)
チミジル酸シンターゼ	ウラシルベース ホレートベース キナゾリンベース	Lonn, U. ら (1996) Kobayashi, H. ら (1995) Jackman, A. L. ら (1995a)
ジヒドロ葉酸レダクターゼ	ホレートベース	Banerjee, D. ら (1995) Bertino, J. R. ら (1996)
チロシンキナーゼ	TNF- $\alpha$ 多剤耐性	Hudziak, R. M. ら (1988) Stühlinger, M. ら (1994)
MDR関連タンパク質 (ABC P-gpタンパク質)	多剤耐性	Simon, S. M. およびSchindler, M. (1994) Gottesman, M. M. ら (1995)
CAD**	PALLA**	Smith, K. A. ら, (1995) Dorr, R. T. およびVon Hoff, D. D., 編 (1994)
トポイソメラーゼI (結腸癌および前立腺癌)	カンプトセシン	Husain ら, (1994)
リボヌクレオチドレダクターゼ	ヒドロキシ尿素	Wettergren, Y. ら, (1994) Yen, Y. ら, (1994)
*CAD=カルバミルPシンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ、ジヒドロオロターゼ		
**PALA=N-(ホスホンアセチル) -Lアスパルテート		

10

20

抗癌剤の乏しい選択性が長い間認識されており、そして選択性を改善し、なおかつより多くの用量が投与されることを可能にする試みが非常にたくさん存在する。一つのアプローチは、プロドラッグの開発である。プロドラッグは、毒物学上害はないが、インビボで治療的に活性な産物に転換され得る化合物である。いくつかの場合において、活性化は、抗体により標的細胞へ送達される非内因性酵素の作用(「ADEPT」すなわち抗体依存性酵素プロドラッグ治療(米国特許第4,975,278号))すなわち遺伝子標的化(「GDEPT」または遺伝子依存性酵素プロドラッグ治療(Melton, R. G. およびSherwood, R. E. (1996))を介して生じる。これらの技術は、血液から出て、そして腫瘍に浸透するそれらの能力に関して厳しい制限を有する。Connors, T. A. およびKnox, R. J. (1995)を参照のこと。

30

## 【0009】

多数のヌクレオチドアナログおよびヌクレオシドアナログが、抗腫瘍剤および抗ウイルス剤の両方として開発および試験されてきた。例えば、5-フルオロウラシル(flourouracil)(5FU)および5-フルオロデオキシウリジン(5FdR)が、チミジル酸シンターゼ(TS)酵素のインヒビターに細胞内で転換されるその能力に基づく化学療法剤として広範に使用されてきた。多くの他の酵素阻害性化学療法剤の場合と同様に、5FUを使用する癌治療は、この薬物を用いるさらなる処置に対して抵抗性のある攻撃的薬物耐性腫瘍細胞についての選択へしばしば導く。(Aschele, C. ら, (1994); Mader, R. M. ら, (1998); Lonn, U. ら, (1996); Paradiso, A. ら, (2000); およびEdler, D. ら, (2000))。

40

## 【0010】

また、ハロゲン化ヌクレオシドアナログ(例えば、(E)-5-(2-プロモビニル)-2'-デオキシウリジン(BVdU))に対して特別な注意が払われてきた。これらの型の化合物は、それらが、細胞傷害性応答を誘発するためにモノホスフェートヌクレオチド形態へのリン酸化を必要とし、そしてこのリン酸化が、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)酵素により優先的に達成されるという観察に基づく抗ウイルス剤として最初に開発された。BVdUおよび関連化合物は、正常哺乳動物細胞に対する限られた毒性を一貫して示してきたが、それらの化合物は、ウイルス感染した細胞を殺傷する際に効果的

50

である (De Clerq, Eら、(1997))。

【0011】

抗ウイルス剤および抗癌剤としてのヌクレオシドアナログ (例えば、BVDU) の広範な試験全体にわたって、それらのヌクレオシドアナログは、正常細胞および癌細胞の両方に対して最小毒性を有することが一貫して報告されてきた。これらの観察は、ウイルスチミジンキナーゼ酵素によるそのような化合物の優先的なリン酸化を実証する結果によって支持されており、これは、哺乳動物細胞に対するこれらの化合物の低毒性を説明する。従って、BVDUおよび関連ヌクレオシドアナログは、抗癌治療剤としては開発されていなかった。(De Clerq, Eら、(1997))。

【0012】

(発明の開示)

本発明は、病理学的細胞 (例えば、生物学的薬剤および化学療法剤に対する耐性を付与する標的酵素を内因的に過剰発現する病理学的細胞) の増殖を選択的に阻害する新規な化合物を提供する。この酵素は、本発明のプロドラッグ化合物に対して作用して、1) 本発明のプロドラッグ化合物を細胞毒素へと変換し、そして/または2) 毒性副生成物を放出させる。本発明の別の局面では、耐性酵素との最初の反応の生成物はその後、普通の細胞酵素 (例えば、アシラーゼ、ホスファターゼまたは他の「ハウスキーピング」酵素 (Voetら (1995))) または普通の細胞成分 (例えば、水) によって十分に活性化されて、このプロドラッグから毒性副生成物を放出する。

【0013】

1つの実施形態では、標的酵素の活性は、腫瘍抑制機能の喪失および/または化学療法への以前の曝露から生じた選択の結果として、標的細胞において大いに増強されている。別の実施形態では、病理学的細胞は、細胞における感染性因子の発現産物である標的酵素を含む。この発現産物は、抗生物質耐性を付与し得る。

【0014】

本発明の別の局面は、標的酵素によって活性化され得る新たなプロドラッグについてスクリーニングするためのアッセイを含む。アッセイを完了し、そしてその結果を分析するために必要とされる試薬および使用説明書を備える、このようなアッセイを実施するためのキットもまた本発明によって提供される。

【0015】

本発明によってさらに提供されるのは、被験体に、本明細書中に記載されるようなプロドラッグを送達することによって被験体を処置するための方法である。本発明のプロドラッグは、単独で、または他の化学療法剤もしくは代替的抗癌治療 (例えば、照射) と組み合わせ用いられ得る。

【0016】

本発明のさらなる局面は、標的酵素を発現する細胞によって特徴付けられる病状を患う被験体の処置において使用するための薬の調製である。

【0017】

本発明のなおさらなる局面は、被験体について最適な治療を同定するための方法であり、この方法は、標的酵素を発現する細胞を単離すること、およびこの細胞を、本発明のプロドラッグの少なくとも1つと接触させること、次いで、1以上のプロドラッグのうちのどれがこの細胞の増殖を阻害するかまたはこの細胞を殺傷するかを同定し、それによってこの被験体に最適な治療を同定することによる。

【0018】

本発明のプロドラッグは、以下の構造:

【0019】

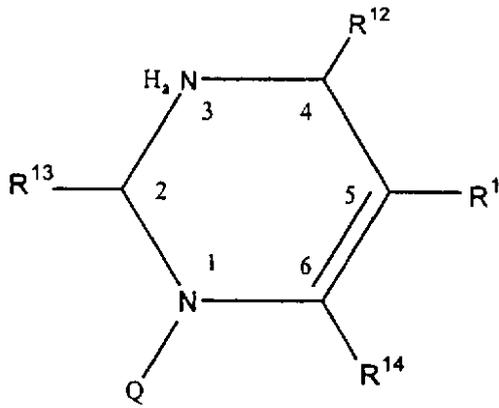
【化32】

10

20

30

40



10

を有するかまたはその互変異性体であり；

ここで、 $R^{12}$ または $R^{13}$ は、同じであっても異なってもよく、そしてオキソ、OHまたは $\text{NHNH}_2$ からなる群より選択され；

ここで、 $a$ が0または1である場合、 $a$ が0であり、かつ $R^{13}$ がオキソであるとの条件下では、二重結合が3位と4位との間に存在し、そして $R^{12}$ が $\text{NHNH}_2$ であるか、

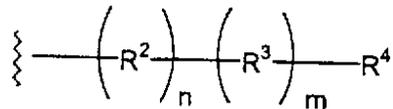
または $a$ が0であり $R^{12}$ がオキソである場合、二重結合が2位と3位との間に存在し、そして $R^{13}$ が $\text{NHNH}_2$ であるか；または

$a$ が1である場合、 $R^{12}$ および $R^{13}$ は両方ともオキソであり；

ここで、 $R^1$ は、以下の式：

【0020】

【化33】



を有する置換基であり、

ここで、 $R^2$ および $R^3$ は独立して、不飽和または飽和のヒドロカルビル基であり；

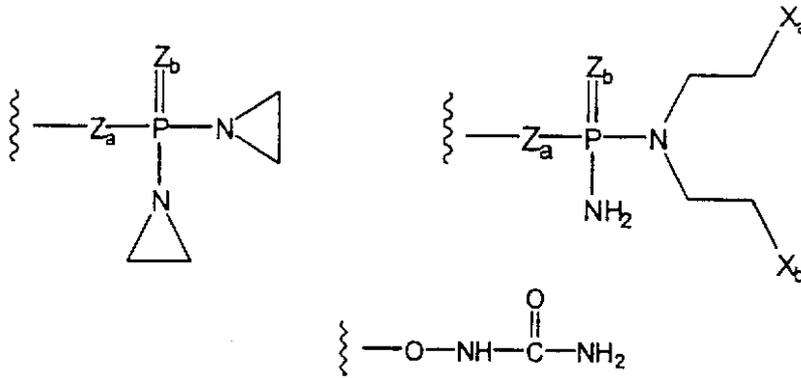
ここで、 $n$ は0または1~10の整数であり、そして $m$ は0または1であり；そして

ここで、 $R^4$ は、F、Cl、Br、I、CN、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{SI}(\text{CH}_3)_3$ 、CHO、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CCl}_3$ 、 $\text{CH}=\text{C}(\text{R}^{15})_2$ または以下の構造：

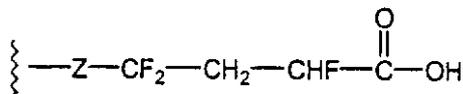
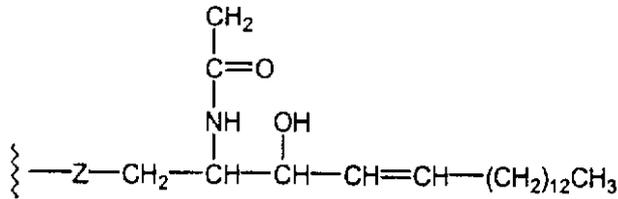
【0021】

【化34】

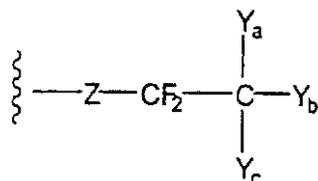
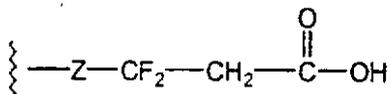
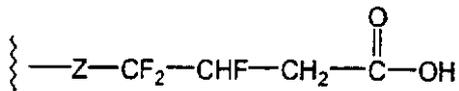
30



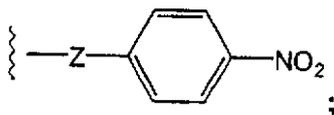
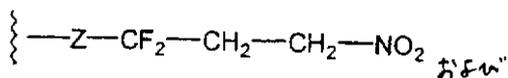
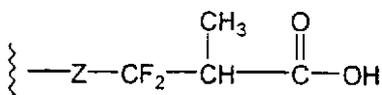
10



20



30



40

を有する置換基からなる群より選択され、

ここで、 $X_a$  および  $X_b$  は独立して、同じであるかまたは異なっており、そして Cl、Br、I、および強力な脱離基からなる群より選択され；

ここで、 $Y_a$ 、 $Y_b$  または  $Y_c$  は独立して、同じであるかまたは異なっており、そして H または F であり；

ここで、Z、 $Z_a$  および  $Z_b$  は独立して、同じであるかまたは異なっており、そして O および S であり；そして

ここで、 $R^{1-4}$  は H または F であり、ただし、 $R^{1-4}$  が F である場合、a は 1 であり、

50

そして $R^{12}$ および $R^{13}$ は両方ともオキソであり；そして

ここで、Qは、糖化合物、炭素環式化合物、および非環式化合物、またはそれらのマスクされたリン酸誘導体もしくはホスホルアミデート誘導体からなる群より選択される。

【0022】

(発明を実施するための形態)

本発明の実施は、他に示さない限り、当該分野の範囲内である、分子生物学、微生物学、細胞生物学、有機化学、医薬化学および組換えDNAの従来技術を使用する。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版(1989)；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, F. M. Ausubelら編(1987)；METHODS IN ENZYMOLOGY シリーズ(Academic Press, Inc.)；PCR 2: A PRACTICAL APPROACH, M. J. MacPhersonら編(1995)；Spector, D. L.ら(1998) CELLS: A LABORATORY MANUAL, 第I~III巻, Cold Spring Harbor Press；およびANIMAL Cell CULTURE, R. I. Freshney編(1987)を参照のこと。

10

【0023】

本明細書および特許請求の範囲において用いる場合、単数形、「1つの(aまたはan)」、および「その、この(the)」は、文脈が明白に他を示すのでない限り、複数の言及を含む。例えば、用語「細胞(a cell)」は、複数の細胞を含み、これはその混合物を含む。

20

【0024】

本明細書において用いる場合、用語「含む、包含する(comprising)」は、この組成物および方法が、言及された要素(エレメント)を含むが、他のものを除外するわけではないことを意味することを意図する。組成物および方法を規定するために用いる場合、「本質的に以下からなる(consisting essentially of)」とは、この組合せに対する何らかの本質的意義の他の要素を排除することを意味するものとする。従って、本明細書に規定される要素から本質的に構成される組成物は、単離および精製の方法由来の微量混入物、ならびに薬学的に受容可能なキャリア(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、保存剤など)を除かない。「からなる(consisting of)」とは、他の成分および本発明の組成物を投与するための実質的な方法のステップのわずかでない要素を除外することを意味するものとする。これらの移行部の用語のそれぞれにより規定される実施形態は、本発明の範囲内である。

30

【0025】

用語、「過剰発現」は、正常レベルまたは正常細胞もしくは非病理的細胞から測定されるレベルの、少なくとも2倍、好ましくは3倍、そしてより好ましくは4倍、そして最も好ましくは5倍以上の発現を意味するものとする。

【0026】

「組成物」とは、活性な因子、および不活性(例えば、検出可能因子もしくは標識)または活性な、別の化合物または組成物(例えば、アジュバント)の組合せを意味することを意図する。

40

【0027】

「薬学的組成物」とは、組成物をインビトロ、インビボ、またはエキソビボで、診断または治療用途に適切にする不活性なまたは活性なキャリアと活性因子との組合せを含むことを意図する。

【0028】

本明細書において用いる場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、任意の標準的な薬学的キャリア(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、水、およびエマルジョン(例えば、水中油型エマルジョンまたは油中水型エマルジョン))、ならびに種々の型の湿潤剤)を包含する。組成物は安定剤および保存剤も含み得る。キャリア、安定剤およびアジュ

50

バントの例としては、Martin REMINGTON'S PHARM, SCI., 第15版(Mack Publ. Co., Easton(1975))を参照のこと。

【0029】

「有効量(effective amount)」は、有利な結果または所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、1つ以上の投与、適用または投薬量で投与され得る。

【0030】

「標的」細胞または「病理学的(pathological)」細胞としては、脱分化した、不死化された、新生物の、悪性の、転移のまたは形質転換した、高増殖性細胞が挙げられる。例としては、肉腫細胞、白血病細胞、癌腫細胞、または腺癌細胞のような癌細胞が挙げられるがこれらに限定されない。特定された癌としては、乳癌細胞、肝細胞腫細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌腫細胞、食道癌腫細胞、膀胱癌細胞、胃腸癌細胞、卵巣癌細胞、皮膚癌細胞、前立腺癌細胞、および胃癌細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0031】

標的細胞または病理細胞は、腫瘍抑制遺伝子産物機能、薬物耐性、または遺伝子不安定性のいずれかの損失に関する細胞内酵素を過剰発現する。あるいは、1つの薬物に対する耐性は、他の生化学的に異なる薬物に対する耐性を付与し得る。内因性の、細胞内酵素のより強力なインヒビターを作製することに関する先行技術の治療と異なり、本発明は、正常な細胞および組織に対して、治療に抵抗性の疾患の細胞および組織に関連した、より高い酵素活性を開発し、そして酵素の阻害に依存しない。用語、「標的酵素」は、上記の特徴の1つ以上を有する酵素を規定するために本明細書において用いられる。

20

【0032】

活性化されたかまたは過剰発現され、そして薬物耐性に関連する、遺伝子産物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：チミジル酸シンターゼ(TS)(Loenn, Uら(1996); Kobayashi, Hら(1995); およびJackman, A.L.ら(1995b)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(Banerjee, D.ら(1995)およびBertino, J.R.ら(1996))、チロシンキナーゼ(TNF-, Hudziak, R.M.ら(1988))および多剤耐性(Stuehlinger, M.ら(1994)); Akdas, A.ら(1996); および(Tannock, I.F.(1996)); およびATP依存性多剤耐性関連タンパク質(Simon, S.M.およびSchindler, M(1994))ならびに、結腸癌および前立腺癌を含むいくつかの疾患では、トポイソメラーゼI(Husainら(1994))。

30

【0033】

ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の増幅は、メトトレキサートに対する耐性に関するが、チミジル酸シンターゼをコードする遺伝子の増幅は、5-フルオロピリミジンでの腫瘍処置に対する耐性に関する。薬物耐性に関連する遺伝子の増幅は、Kashini-Sabetら(1988)、米国特許第5,085,983号または本明細書に記載の方法に記載のように、改変ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で検出およびモニターされ得る。得られた薬物耐性は、細胞遺伝的異常(例えば、相同染色体染色領域および二重微小染色体(その両方が遺伝子増幅に関する))の検出によりモニターされ得る。別のアッセイとしては、直接的または間接的酵素活性アッセイが挙げられ、そしてこのそれぞれは、遺伝子増幅(例えば、CarrerasおよびSanti(1995)); 他の方法論(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、Houze, T.A.ら(1997))または免疫組織化学(Johnson, P.G.ら(1997))に関連する。

40

【0034】

酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼは、いくつかのヒト腫瘍において時折、上昇することが示されている(Morgan, A.S.ら(1998))。しかしそれにもかかわらず、本明細書において用いられる「標的酵素」からは除外される。なぜなら、グルタチオン-S-トランスフェラーゼは、重複する特異性を有する酵素をコードする遺伝子ファミリーのメンバーであるからである。

50

## 【0035】

まとめると、本発明のプロドラッグは、本発明の標的酵素が、正常細胞に対して、病理学的細胞において、通常、過剰発現されるか、過剰蓄積されるか、または活性化されることに基いて、従来の治療剤とは区別され得る。本発明を他のアプローチと識別する最も重要な原理は、以下である：

(1) 本発明は、チミジル酸シンターゼのような酵素についての基質の合成を記載する。過剰発現された酵素は、疾患の細胞において優先的に、プロドラッグを毒素に変換する。以前のアプローチは、これらの酵素のインヒビターにほとんど依存していた。このインヒビターは、酵素の発現の増幅および処置に対する引き続く耐性を導く（例えば、Loenn U.ら、(1996)；Paradiso, Aら(2000)；およびEdler、D.(2000)を参照のこと）。

10

## 【0036】

(2) 現在のアプローチはまた、他の「基質 - プロドラッグ」アプローチ（例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ酵素）から識別可能である（例えば、Morgan、A.S.ら(1998)を参照のこと）。GSTファミリーの酵素は、細胞に対する毒性インサルト(insult)に応答して上昇したレベルで発現される。酵素のGSTファミリーは、重複する基質特性を有する。この特性は、癌細胞における発現上昇を伴う酵素のうち1種のみ反応性の基質を設計することを困難にする(Morgan, A.S.ら(1998))。本発明の標的酵素（例えば、チミジル酸シンターゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼおよびチミジンキナーゼ）は、その構造および基質特異性に関して特有であるので、特有の基質を設計することが容易である。チミジル酸シンターゼの基質のいくつかの例を、以下に提供する。

20

## 【0037】

(3) いくつかの場合、標的酵素（例えば、チミジル酸シンターゼ）をコードする遺伝子が、変異を受け、インヒビターに対する耐性を獲得し得る(Barbour, K.W.ら(1992)およびDickens A.P.ら(1993))が、インヒビターでない基質プロドラッグとの反応をなお実行し得る。

## 【0038】

(4) このアプローチの利点は、腫瘍抑制機能の喪失が、悪性腫瘍の発達に重要であることである。大部分の腫瘍細胞は、p53、RBまたはp16腫瘍抑制機能の1つを喪失している。(Funk, J.O.(1999)；Banerjee, D.(1998)；およびTeh, B.T.ら(1999))。このような喪失は、化学療法に対する以前の曝露とは独立した、耐性酵素（例えば、チミジル酸シンターゼ）の発現上昇を生じる。本明細書に記載されるプロドラッグは、悪性腫瘍の早期段階、および化学療法で以前に処置された疾患の処置において有用である。GSTのような酵素の基質は、化学療法に関係しない多くの化合物を含む。(WhalenおよびBoyer(1998))。

30

## 【0039】

上記に記載の概念は、チミジル酸シンターゼ酵素および化合物NB1011<sup>T M</sup>の例を用いて、図1Aおよび1Bに図として示されている。

## 【0040】

別の実施形態において、標的細胞は、癌に関係のない薬物または化合物に対するその耐性によって規定される。この場合、この細胞は、抗生物質（例えば、ラクタマーゼ）に対する耐性を付与する微生物で感染される。生物体としては、細菌、酵母および寄生物（例えば、トリパノソーマ）が挙げられる。表2は、感染性疾患において、このアプローチにより標的される酵素のリストを提供する。

40

## 【0041】

## 【表2】

表2 感染性疾患において過剰発現され、そして薬物耐性に寄与する酵素	
酵素	以下に対する増加した耐性を提供する：
$\beta$ -ラクタマーゼ	ペニシリンおよび他の $\beta$ -ラクタム含有抗生物質
アミノグリコシダーゼまたはアミノグリコシド修飾酵素	アミノグリコシド抗生物質（例えば、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）
クロラムフェニコールトランスアセチラーゼ	クロラムフェニコール
ジヒドロ葉酸レダクターゼ	トリメトプリム
参考文献：Mechanisms of Microbial Disease, 第2版, M. Schaechter, G. Medloff, B. I. Eisenstein, TS Satterfield編, Publ. Williams and Wilkins, 973頁(1993).	

10

本発明のプロドラッグは、以下の構造：

【0042】

【化35】

I.

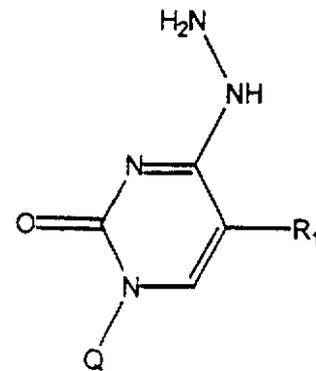
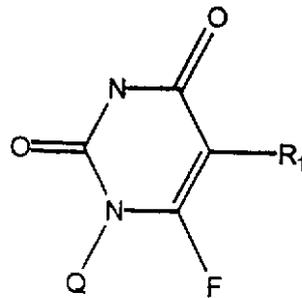
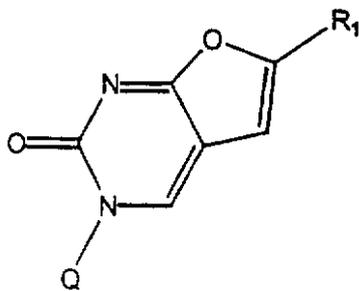
または

II.

または

III.

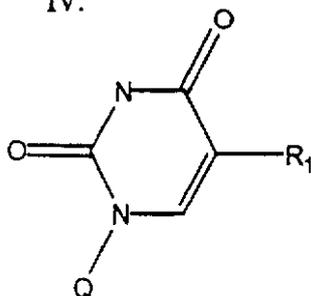
20



30

または

IV.



40

を有する化合物のL異性体およびD異性体からなる群より選択され、

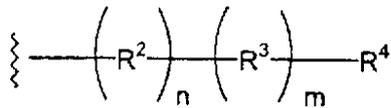
ここで：

$R^1$  は、以下の式の部分であるが、ただし、化合物Iにおいて、 $n$ は0であり得る：

【0043】

【化36】

50

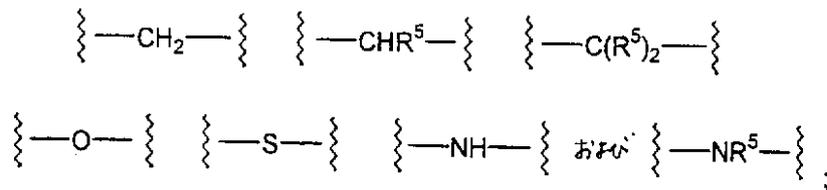


R<sup>2</sup> は、不飽和ヒドロカルビル基；1以上の不飽和ヒドロカルビル基を含む芳香族ヒドロカルビル基；および1以上の不飽和ヒドロカルビル基を含むヘテロ芳香族基からなる群より選択される二価の電子コンジット (electron conduit) 部分であり；

R<sup>3</sup> は、以下：

【0044】

【化37】



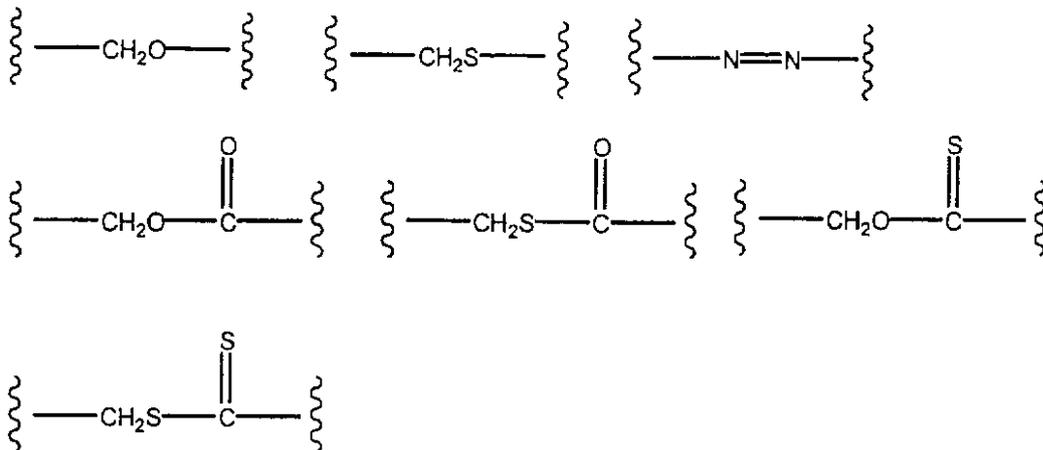
からなる群より選択され；

R<sup>5</sup> は、同じであっても異なってもよく、そして独立して、1個～10個の炭素原子を有する、直鎖もしくは分枝鎖のアルキル基、または3個～10個の炭素原子を有するシクロアルキル基、またはハロゲン（例えば、F、Cl、Br、I）；

または以下の基：

【0045】

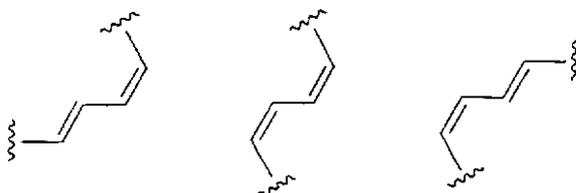
【化38】



または以下の基：

【0046】

【化39】



10

20

30

40

50

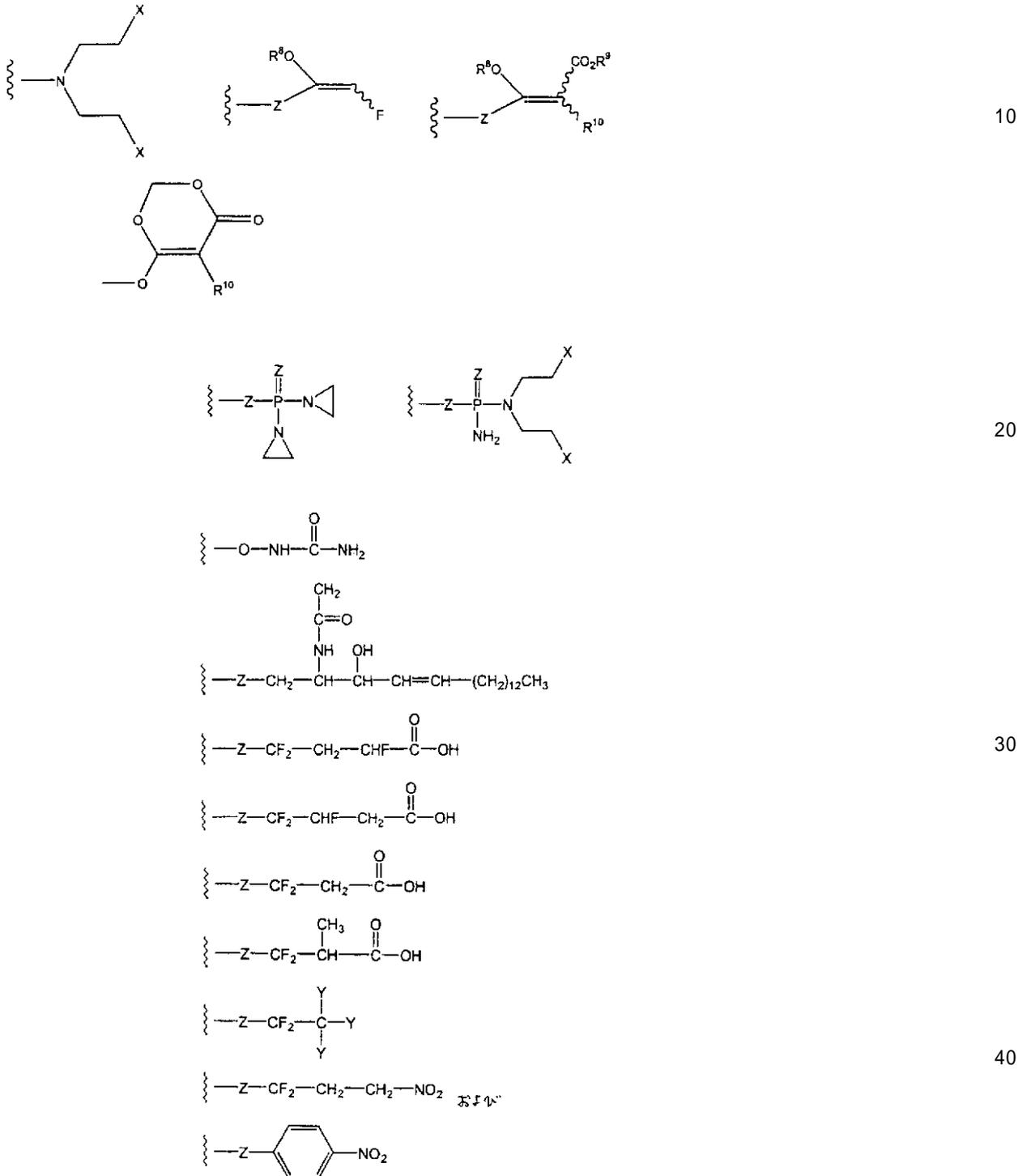
であり；

ここで、 $n$ は0または1～10の整数であり、そして $m$ は0または1であり；

ここで、 $R^4$ は、以下：

【0047】

【化40】



からなる群より選択される置換基であり得；

ここで、 $R^8$ および $R^9$ は、低級アルキルであり、そして $R^{10}$ は、Hまたは $CH_3$ であり、そして各X置換基は独立して同じであるかまたは他方と異なっており、そして-C1、-Br、-Iまたは他の強力な脱離基であるが、但し、 $R^7$ が-Hであり、かつ $m$ が0である場合、 $R^4$ はハロゲンではなく、また、 $m$ が0であり、かつ $n$ が0である場合、

$R^4$  はハロゲンではない；

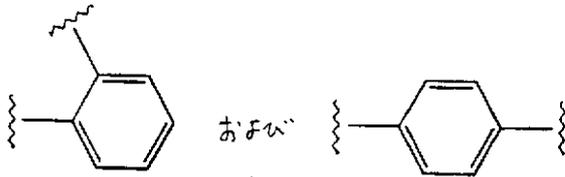
ここで、各 Y 置換基は独立して同じであるかまたは他方と異なっており、そして独立して、-H または -F であり、そして各 Z 置換基は独立して同じであるかまたは他方と異なっており、そして -O- または -S- である。

【0048】

1つの局面では、m は 0 であり、そして  $R^2$  は、以下からなる群より選択される芳香族ヒドロカルビル基である：

【0049】

【化41】

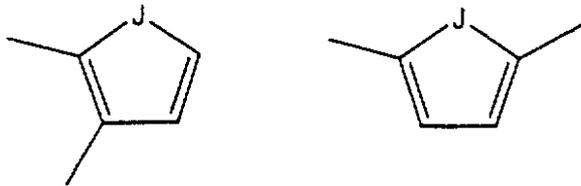


10

代替的な局面では、m は 0 であり、そして  $R^2$  は、以下：

【0050】

【化42】



20

からなる群より選択されるヘテロ芳香族基であり、

ここで、J は、-O-、-S-、-Se-、-NH- および  $-NR^{A L K}$  からなる群より選択され、そしてここで、 $R^{A L K}$  は、1個～10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖のアルキルまたは3個～10個の炭素原子を有するシクロアルキル基である。

30

【0051】

1つの特定の局面では、 $R^4$  は、以下からなる群より選択される：

【0052】

【化43】

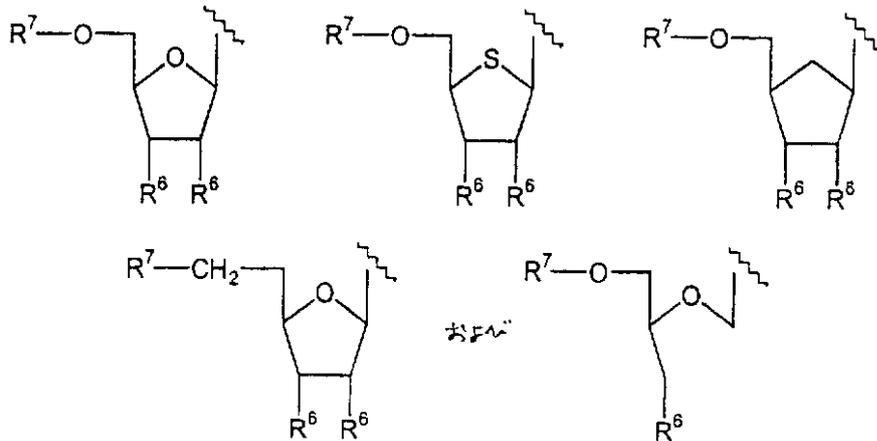


40

Q は、糖化合物、炭素環式化合物、非環式化合物、またはそれらのマスクされたリン酸誘導体もしくはホスホルアミデート誘導体からなる群より選択される。マスクされたリン酸誘導部 (derivation) またはホスホルアミデート誘導部は、以下でより詳細に示すようにこの化合物の 5' 位で Q に結合される。例えば、Q は、以下：

【0053】

【化44】



10

からなる群より選択される部分であり；

ここで、各 R<sup>6</sup> は独立して同じであるかまたは他方と異なっており、そして - H、- O H、- O C ( = O ) C H<sub>3</sub>、F および他の保護されたヒドロキシル基からなる群より選択され；そして

R<sup>7</sup> は、5' 位で Q に結合した、水素、リン酸基、ホスホジエステル基、またはホスホルアミデート基である。

20

【 0 0 5 4 】

明確 ( e x p l i c i t e l y ) には言及されていないが、本発明のプロドラッグのいずれもが、任意の鏡像異性体形態、ジアステレオマー ( d i a s t e r i o m e r i c ) 形態または立体異性体の形態 ( D 体、L 体、 $\alpha$ -アノマー形態および  $\beta$ -アノマー形態を含む ) であり得ることが理解されるべきである。

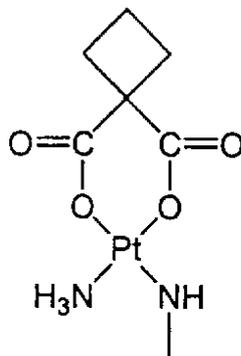
【 0 0 5 5 】

1 つの実施形態では、R<sup>4</sup> は、以下からなる群より選択される化学的実体であるかまたはこの化学的実体を含む：- B r、- I、- O - アルキル、- O - アリール、O - ヘテロアリール、- S - アルキル、- S - アリール、- S - ヘテロアリール、- C N、- O C N、- S C N、- N H<sub>2</sub>、- N H - アルキル、- N ( アルキル )<sub>2</sub>、- N H C H O、- N H O H、- N H O - アルキル、N H<sub>2</sub> C O N H O -、N H N H<sub>2</sub>、- N<sub>3</sub>、およびシスプラチンの誘導体 ( 例えば、以下 )

30

【 0 0 5 6 】

【 化 4 5 】

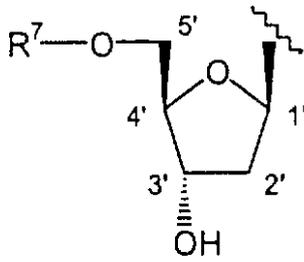


40

1 つの実施形態では、Q は、以下：

【 0 0 5 7 】

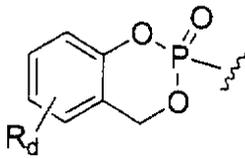
【 化 4 6 】



であり、ここで、 $R^7$  は上記の通りであるか、またはより詳細には、以下のような構造：

【0058】

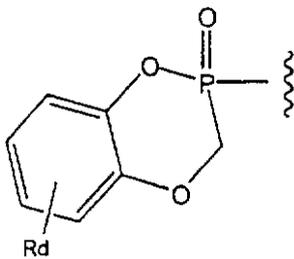
【化47】



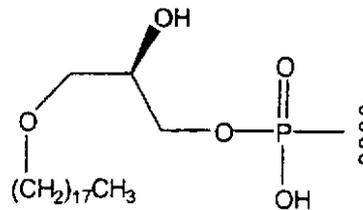
または以下の構造：

【0059】

【化48】



おなじみ



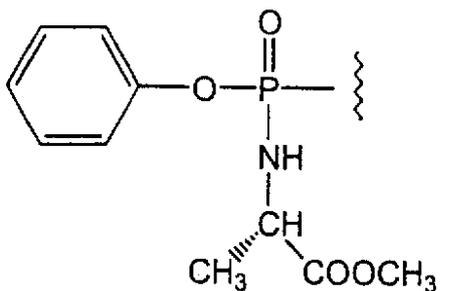
を有する化合物であり、ここで、 $R_d$  は、芳香族置換基である。

【0060】

代替の実施形態では、 $R^7$  は、アミノ酸（例えば、天然に存在する20個のアミノ酸を含む）から誘導されたホスホルアミデート基である。1つの実施形態では、 $R^7$  は、アラニンから誘導されたホスホルアミデート基である。1つの実施形態では、 $R^7$  は、以下の構造を有する基であるかまたはこの基を含む：

【0061】

【化49】



上記の基およびその調製方法は、McGuiganら（1993）およびMcGuiganら（1996）に記載される。

【0062】

本発明はまた、以下の構造を有する化合物のL異性体もしくはD異性体またはその互変

10

20

30

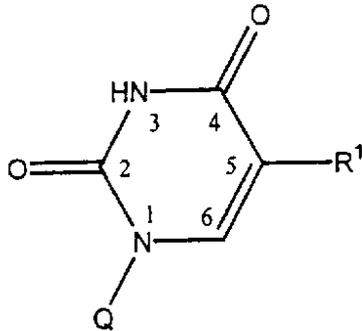
40

50

異性体を提供し：

【 0 0 6 3 】

【 化 5 0 】

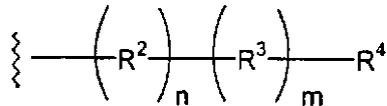


10

ここで、 $R^1$  は、以下の式：

【 0 0 6 4 】

【 化 5 1 】



20

を有する置換基であり、

ここで、 $R^2$  および  $R^3$  は、同じであるかまたは異なっており、そして独立して、不飽和または飽和のヒドロカルビル基であり；ここで、 $R^4$  は、F、Cl、Br、I、CN、 $\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{CO}_2\text{H}$ 、 $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{SI}(\text{CH}_3)_3$ 、CHO、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CCl}_3$ 、 $\text{C}(\text{R}^5)_2$  からなる群より選択され；ここで、 $R^5$  は、F、Cl、Br および I からなる群より選択され；ここで、 $n$  は 0 または 1 ~ 10 の整数であり、そして  $m$  は 0 または 1 であり；そして  $Q$  は上記の通りである。

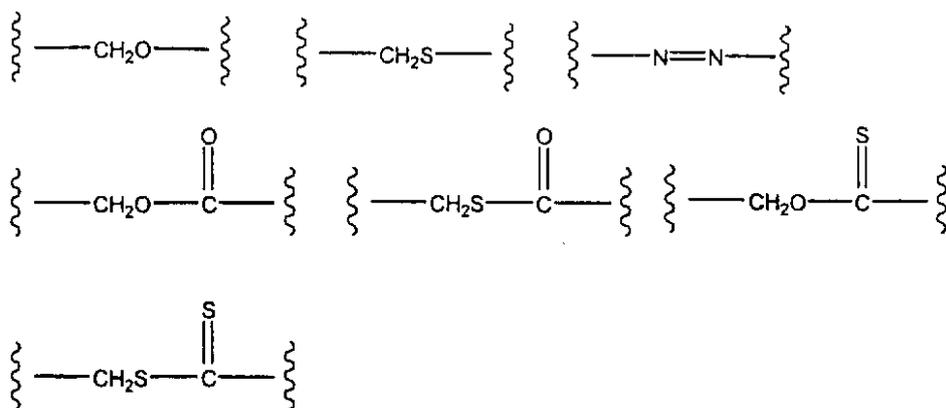
30

【 0 0 6 5 】

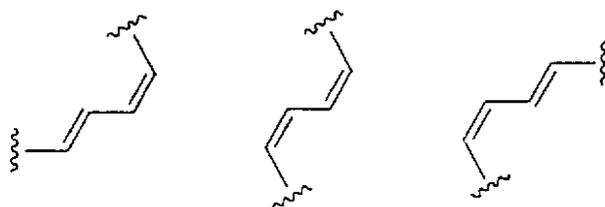
1 つの局面では、 $m$  は 0 であり、そして  $R^2$  は、以下：

【 0 0 6 6 】

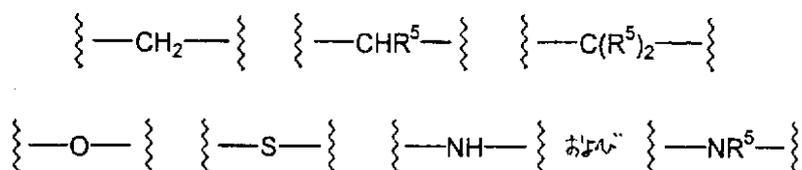
【 化 5 2 】



10



20



からなる群より選択され、

ここで、 $R^5$  は独立して、同じであるかまたは異なっており、そして1個～10個の炭素原子を有する、直鎖もしくは分枝鎖のアルキル基、3個～10個の炭素原子を有するシクロアルキル基、CNおよびハロゲンからなる群より選択される。

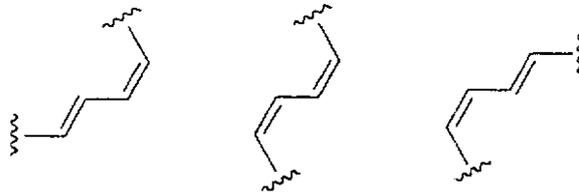
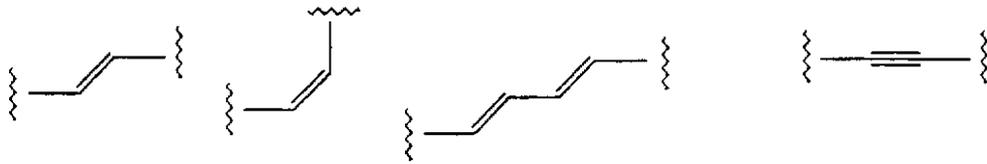
30

【0067】

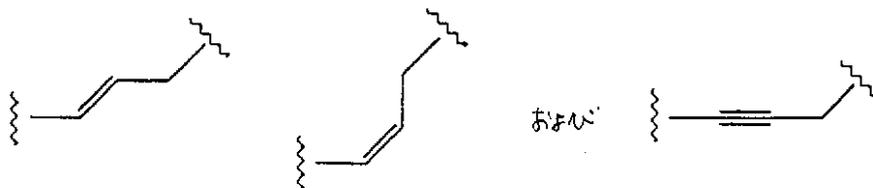
別の局面では、一緒になった $R^2$ と $R^3$ とは、アルケニルまたはアルキニルであり、そして以下からなる群より選択される：

【0068】

【化53】



10



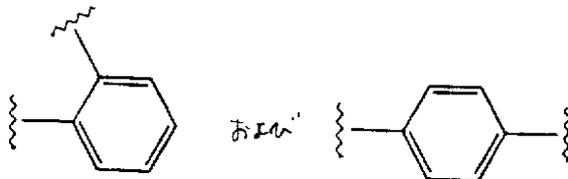
および

20

別の局面では、mは0であり、そしてR<sup>2</sup>は、以下からなる群より選択される芳香族ヒドロカルビル基である：

【0069】

【化54】



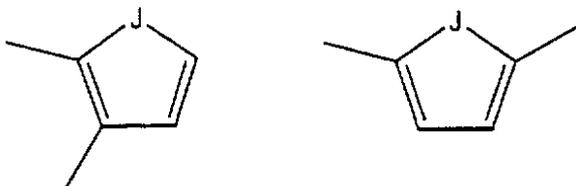
および

30

さらなる局面では、mは0であり、そしてR<sup>2</sup>は、以下からなる群より選択されるヘテロ芳香族基であり：

【0070】

【化55】



40

ここで、Jは、-O-、-S-、-Se-、-NH-および-NR<sup>A L K</sup>-からなる群より選択され、そしてここで、R<sup>A L K</sup>は、1個~10個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖のアルキルまたは3個~10個の炭素原子を有するシクロアルキル基である。

【0071】

これらの実施形態について、R<sup>7</sup>は上記の通りである。

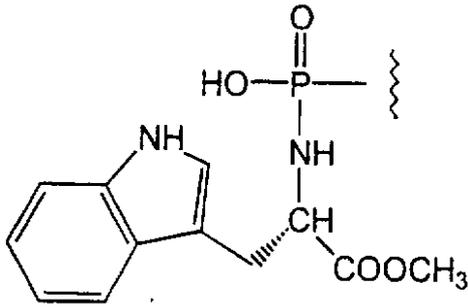
【0072】

50

特定の実施形態では、 $R^7$  は以下である：

【0073】

【化56】



10

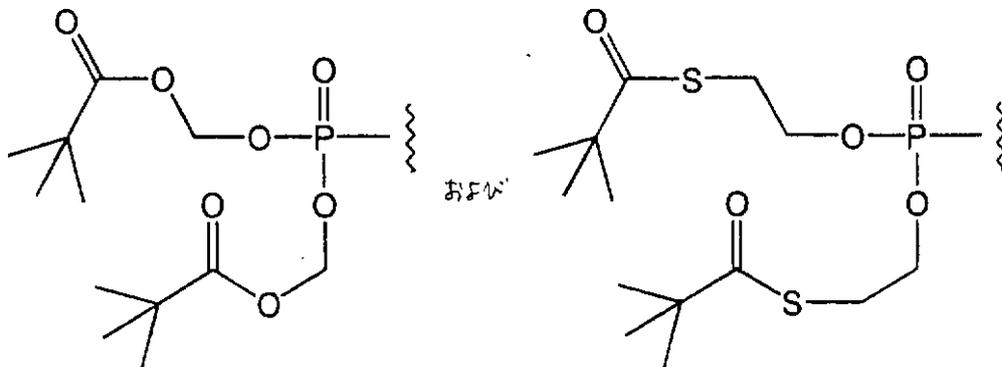
上記の基およびその調製方法は、Abrahamら(1996)に記載される。

【0074】

1つの実施形態では、 $R^7$  は、リン酸基であるか、または以下からなる群より選択される構造を有する基であるか、またはこの基を含む：

【0075】

【化57】



20

30

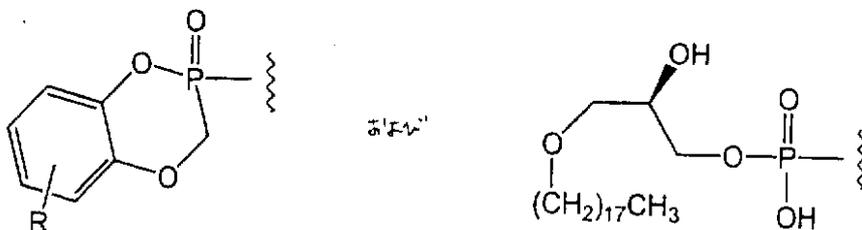
2つの上記の基のうちの最初のもの、およびその調製方法は、Freedら(1989)；Sastryら(1992)；Farquharら(1994)およびFarquharら(1995)に記載される。2つの上記の基のうちの2番目のもの、およびその調製方法は、Valetteら(1996)；およびBenzariaら(1996)に記載される。

【0076】

1つの実施形態では、 $R^7$  は、以下からなる群より選択される構造を有する基であるか、またはこの基を含み：

【0077】

【化58】



40

ここで、 $R$  は、芳香族置換基であり、2つの上記の基のうちの最初のもの、およびその

50

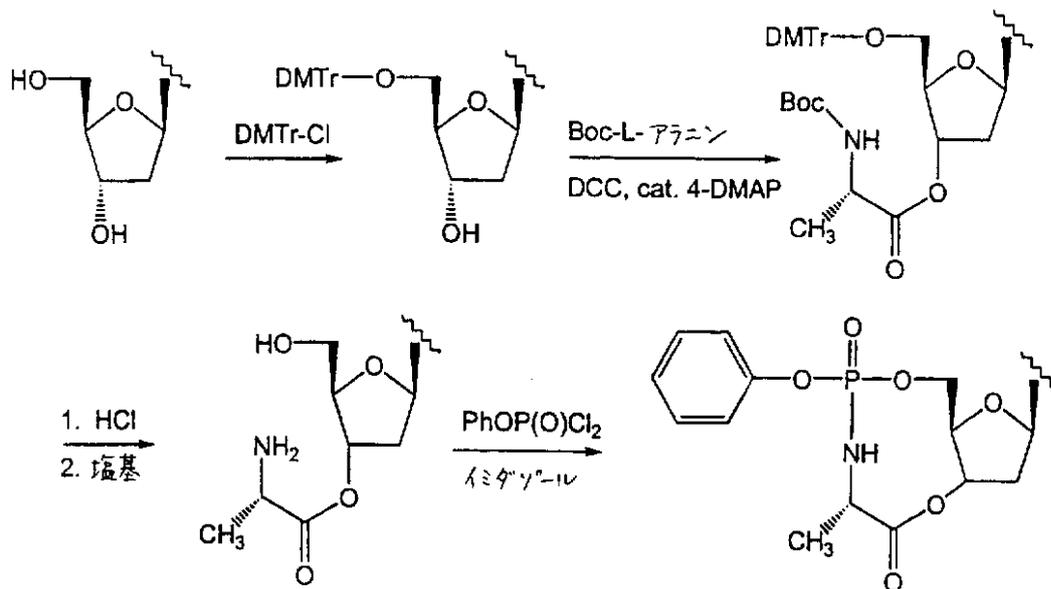
調製方法は、Meierら(1997)に記載される。2つの上記の基のうちの2番目のもの、およびその調製方法は、Hostetlerら(1997);およびHostetlerら、公開された国際特許出願第WO 96/40088号(1996)に記載される。

【0078】

1つの実施形態では、R<sup>7</sup>は、Q内に環式基を形成する。1つのこのような実施形態、およびその調製方法は、以下に示される(ここで、DMTrは、4,4'-ジメトキシトリチルであり、Bocはt-ブチルオキシカルボニルであり、DCCは1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、そして4-DMAPは4-ジメチルアミノピリジンである):

【0079】

【化59】



1つの実施形態では、この化合物は、塩の形態であってもよいし、保護された形態もしくはプロドラッグの形態であってもよいし、それらの組み合わせであってもよい(例えば、塩、エーテルまたはエステルのような)。

【0080】

別の実施形態では、上記の構造は、以下に記載される方法を用いてさらに変更されて、ホスホジアリジン基の代わりにチオホスホジアリジンを有する。

【0081】

上記の5-置換ピリミジン誘導体の合成は、当該分野で周知である方法によって達成され得る。例えば、Li<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>の存在下でのハロアルキル化合物、ハロアセテートまたはアロアルケンでの5-クロロ水銀-2'-デオキシウリジンの処理はそれぞれ、有機パラジウム中間体を通しての、5-アルキル誘導体、5-アセチル誘導体または5-アルケン誘導体の形成をもたらす。Watayaら(1979)およびBergstromら(1981)。ピリミジンヌクレオシドおよびピリミジンヌクレオチドのC5-変更の別の例は、酢酸第二水銀を用いた、保護されていないヌクレオチドの処理、続いてLi<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>の存在下でのスチレンまたは環置換スチレンの添加によるC5-トランス-スチリル誘導体の形成である。Biggeら(1980)。

【0082】

ピリミジンデオキシリボヌクレオシド三リン酸を、酢酸緩衝液中の酢酸水銀(II)で、3時間50℃で処理することによって、ピリミジン環の5位を水銀で誘導体化した(Daleら(1973))。このような処理はまた、一リン酸の改変のために有効であると

10

20

30

40

50

期待され；あるいは、例えば、アルカリホスファターゼで制御処理し、その後一リン酸を精製することによって、改変した三リン酸を改変した一リン酸に酵素学的に変換し得る。水銀と同様の分子特性を有するが、好ましい薬理的な特性を有する他の部分（有機または無機）で置換し得る。置換したピリミジンの合成のための一般的な方法については、例えば、米国特許第4,247,544号；同第4,267,171号；および同第4,948,882号；ならびにBergstromら（1981）を参照のこと。上記方法はまた、リボースもしくは2'-デオキシリボース以外の糖（例えば、2'-3'-ジデオキシリボース、アラビノース、フラノース、リキソース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、およびピラノース）を含む5-置換ピリミジンヌクレオシドおよびヌクレオチドの誘導体の合成に適用され得る。5位置換基の例は、ハロビニル基（例えば、E-5-(2-プロモビニル)-2'-デオキシウリジレート）である（Barr, P. J.ら（1983））。

10

#### 【0083】

あるいは、5-プロモデオキシウリジン、5-ヨードデオキシウリジン、およびそれらの一リン酸誘導体は、Glen Research, Sterling, VA (USA), Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO (USA), Moravsek Biochemicals, Inc., Brea, CA (USA), ICN, Costa Mesa, CA (USA) および New England Nuclear, Boston, MA (USA) から市販されている。Glen Research, Sterling, VA (USA) および ICN, Costa Mesa, CA (USA) から市販されている試薬を使用するキナーゼ酵素の作用を介して、化学的また酵素学的のいずれかで、市販の5-プロモデオキシウリジンおよび5-ヨードデオキシウリジンを、それらの一リン酸に変換し得る。これらのハロゲン誘導体は、新規でかつより強力な代謝拮抗物質を生成するために、他の置換基と組み合わせられ得る。

20

#### 【0084】

ウラシルの5位の構造は、つなぎ鎖（tether）として言及される。なぜならば、つなぎ鎖は、提案された脱離基（発毒団）を複素環に接続するからである。ヒトの酵素（例えば、TS）の活性部位のCys残基と反応することによって複素環を活性化する際に、負の電荷が、ウラシルの6位からつなぎ鎖に導かれる。Barr, P. J.ら（1983）による（E）-5-(プロモビニル)-2'-デオキシウリジン（BVdU）の5'-一リン酸化改変体およびWataya,ら（1979）, Santi（1980）；およびBergstrom,ら（1984）による（E）-5-(3,3,3-トリフルオロ-1-プロペニル)-2'-デオキシウリジン（TFPe-dUrd）の5'-一リン酸化改変体について、このメカニズムが記載されている。

30

#### 【0085】

TS-Cys-スルフヒドリルの攻撃により供給される毒素不安定化負電荷を導き得るように、毒素とdNMPとの間のつなぎ鎖「スペーサ」は不飽和でなければならない。この目的のために利用可能な多くの不飽和有機官能基の中で、ビニル、アリル、およびプロパルギルユニットが、単純で、小さく、そして容易に合成可能である。このビニルおよびアリルユニットは、2つの相互変換不可能な幾何異性体のいずれかで調製され得るという利点を有している。従って、これらは、酵素活性部位によるプロドラック収容のための「プローブ」として使用され得る。一方、プロパルギルユニットは、円柱状に対称である利点を有し、その結果、この型のつなぎ鎖から放出される酵素触媒毒素は、ビニル分子およびアリル分子の場合のように、dUMPウラシル環に関する配向に依存しない。

40

#### 【0086】

2つの異なるアプローチが、本発明のヌクレオチドベースのプロドラックのいくつかの設計に用いられている。一つは、BVdU一リン酸の構造に基づいており、そしてdUMPのC5で（ポリ）ビニル置換基の末端に直接結合される脱離基/毒素の特徴を有する。これは、ビニルつなぎ鎖アプローチである。他方は、TFPe-dUMPの構造に基づいており、そして一つ目と同じだが、脱離基/毒素を分離するメチレンユニットおよび不飽

50

和ユニットを有し、従って、アリルユニットまたはプロパルギルユニットを含む。これは、アリルつなぎ鎖アプローチである。

【0087】

アリルつなぎ鎖アプローチのプロパルギル改変体の活性化のメカニズムは、TSとの5-エチニル-2'-デオキシウリジン5'-リン酸(EdUMP)および5-(3-ヒドロキシ-1-プロピニル)-2'-デオキシウリジン5'-リン酸(HOPdUMP)の両方の相互作用において先例を有する(Barrら(1981); BarrおよびRobins(1983))。EdUMPは、TSの強力なインヒビター( $K_i = 0.1$  TM)であり、活性部位においてアレンベース種を形成するようである。HOPdUMP( $K_i = 3.0$  TM)は、活性部位でカムレンベース種の形成に起因し得る異常な阻害速度論を示す。

10

【0088】

ビニルおよびアリルつなぎ鎖アプローチ機構の両方に共通している中間体と構造的に類似している5-アルキリデン化(alkylidenated)5,6-ジヒドロウラシルが、最近、合成された(Angladaら(1996))。これらは、高い求電子性であることが示された。エタノールとそれらが容易に反応して5-(エトキシメチル)ウラシルを生成することは、触媒的に適切なTSを再生する水の添加についての先例である。さらに最近になって、TSによって生成されるロングエリュースイブ(long-elusive)C5メチレン中間体の存在を、捕獲研究によって実証した(Barrettら(1998))。

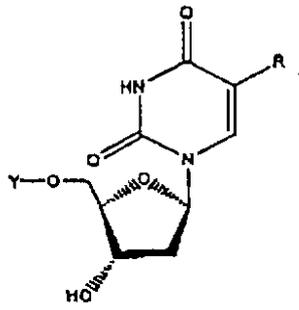
20

【0089】

特定の実施形態としては、以下に示されるLまたはD構造を有する化合物が挙げられる。化合物は、構造および数値による表示により同定される。

【0090】

【化60】



10

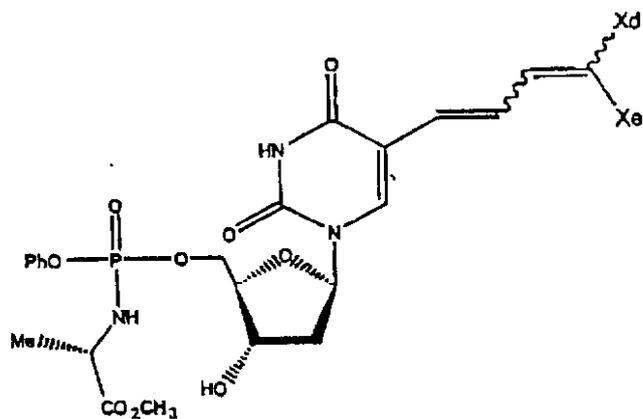
R	Y =		Y-H	
	NB1011		NB1015 (BvdU)	
	NB1012		-	20
	NB1013		NB1020	
	NB1014		NB1027	
	NB1016		NB1021	
	NB1017		NB1024	30
	NB1018		NB1022	
	NB1019		NB1023	
	-		NB102	
-H	NB1025		NB1028	40
-C <sub>2</sub> H <sub>17</sub>	-		NB102	

好ましい実施形態を、以下に示す：

以下の構造：

【0091】

【化61】



10

を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、 $X_d$  および  $X_e$  は、独立して、同じかまたは異なり、そして、Cl、Br、I、およびCNからなる群から選択される。より好ましい局面において、 $X_d$  は、ClまたはBrであり、そして $X_e$  は、Hである。

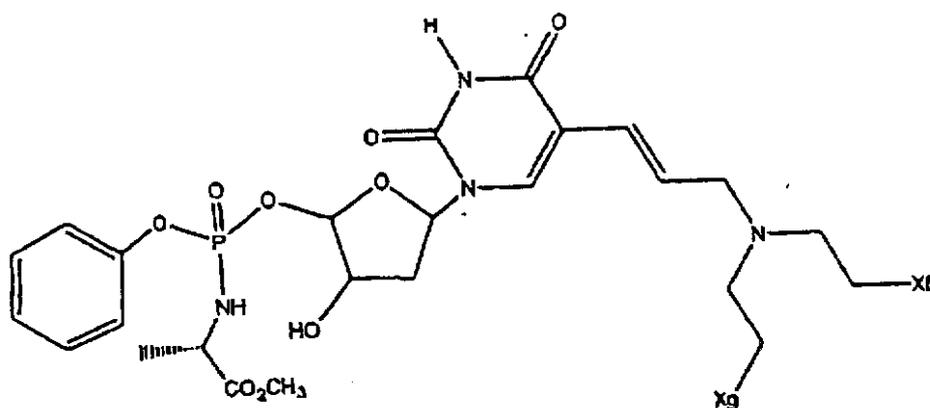
【0092】

以下の構造：

【0093】

【化62】

20



30

を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、 $X_f$  および  $X_g$  は、独立して、同じかまたは異なり、そして、Cl、Br、I、およびCNからなる群から選択される。より好ましい実施形態において、 $X_f$  および  $X_g$  は、同じであり、そして各々が、ClまたはBrである。

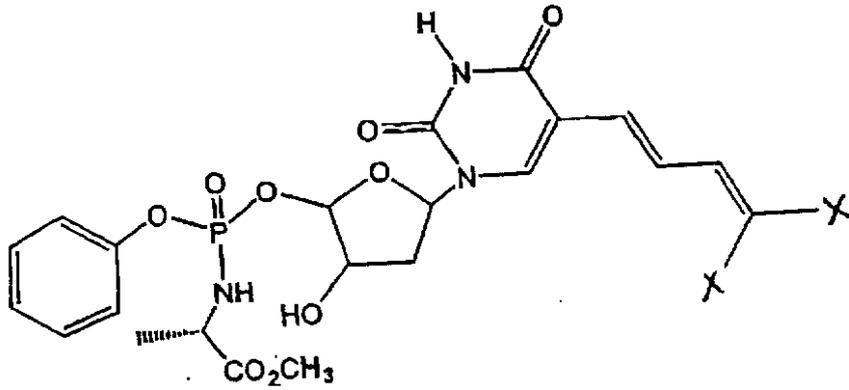
【0094】

以下の式の構造：

【0095】

【化63】

40



10

を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、各Xは、Cl、Br、I、およびCNからなる群から選択される。好ましい実施形態において、Xは、ClまたはBrであり、より好ましい実施形態において、XはBrである。

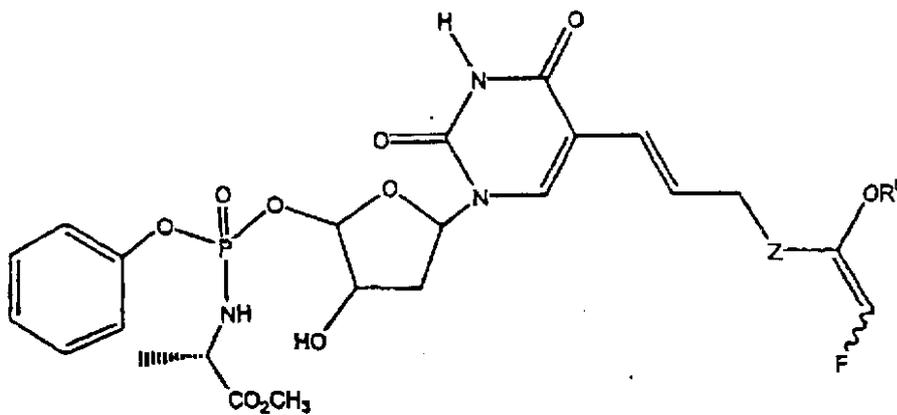
【0096】

以下の構造：

【0097】

【化64】

20



30

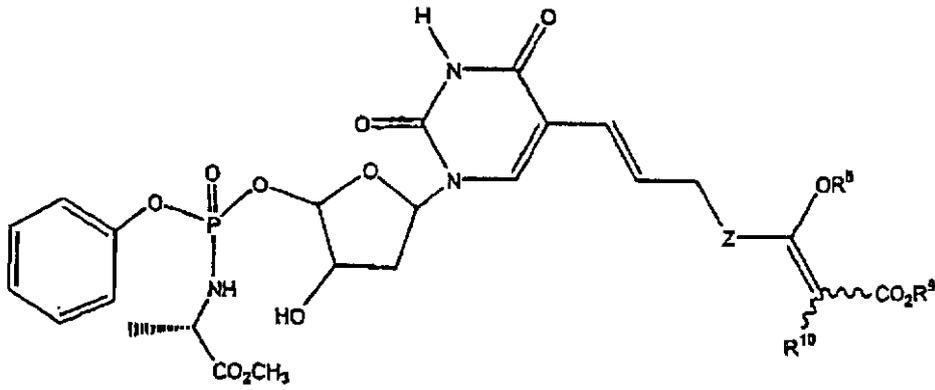
を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、R<sup>8</sup>は、直鎖または分枝鎖の低級アルキルである。

【0098】

以下の構造：

【0099】

【化65】



10

を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、 $R^8$  および  $R^9$  は、直鎖または分枝鎖の低級アルキルであり、そして  $R^{10}$  は、H または  $CH_3$  である。

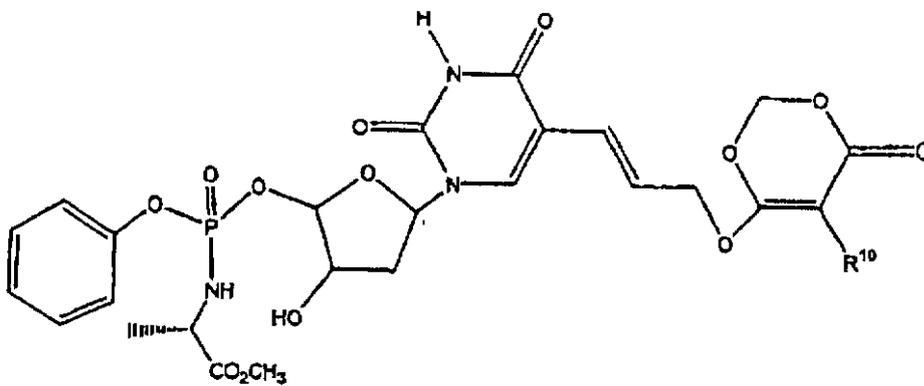
【0100】

以下の構造：

【0101】

【化66】

20



30

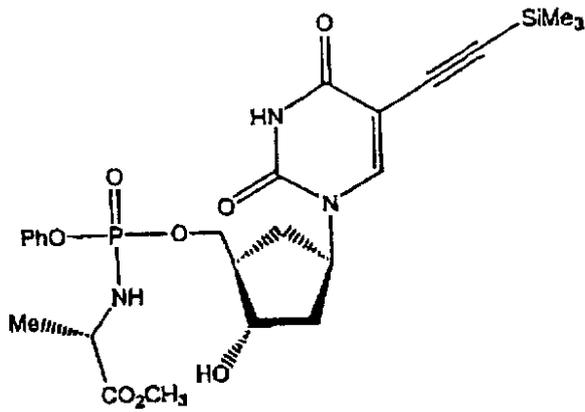
を有する化合物またはそれらのヌクレオシドアナログ。ここで、 $R^{10}$  は、H または  $CH_3$  である。

【0102】

以下の構造：

【0103】

【化67】



10

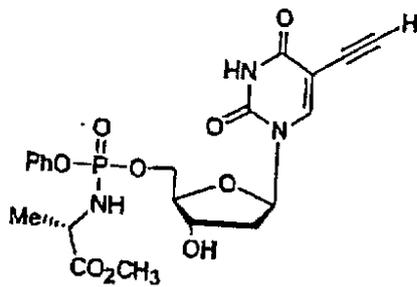
を有する化合物。

【0104】

以下の構造：

【0105】

【化68】



20

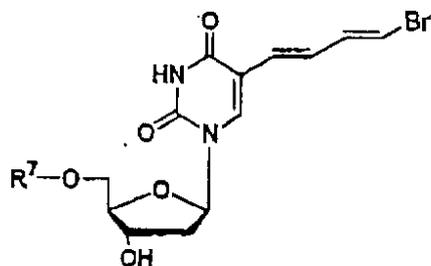
を有する化合物またはそのヌクレオシドアナログ。

【0106】

本明細書中に記載されるような化合物であって、ここで、この化合物は、以下の構造：

【0107】

【化69】

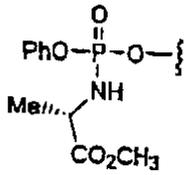


40

を有する。一つの局面において、 $R^7 = H$ である。別の局面において、 $R^7$ は、以下の構造：

【0108】

【化70】



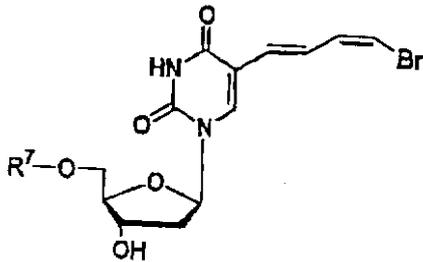
を有する置換基である。

【 0 1 0 9 】

本明細書中に記載されるような化合物であって、ここで、この化合物は、以下の構造

【 0 1 1 0 】

【 化 7 1 】

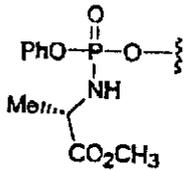


20

を有する。ここで、 $R^7 = H$ であるか、または $R^7$ は、以下の構造：

【 0 1 1 1 】

【 化 7 2 】



30

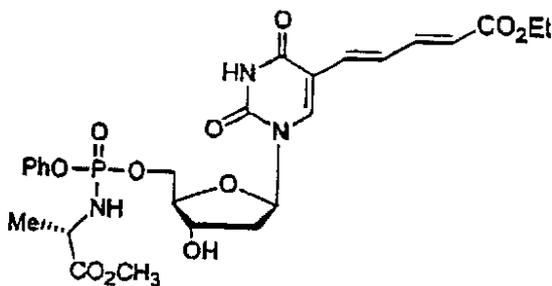
を有する置換基である。

【 0 1 1 2 】

以下の構造：

【 0 1 1 3 】

【 化 7 3 】



40

を有する化合物。

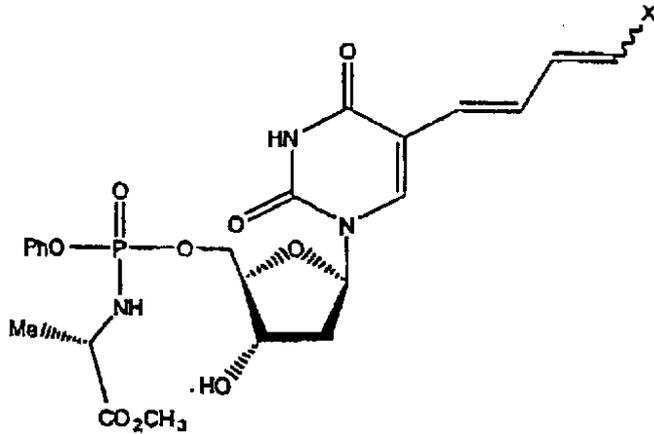
【 0 1 1 4 】

以下の構造：

50

【 0 1 1 5 】

【 化 7 4 】



10

を有する化合物またはそのヌクレオシドアナログ。ここで、各 X は、 $\text{CO}_2\text{Et}$ 、 $\text{Cl}$ 、および  $\text{Br}$  からなる群から選択される。

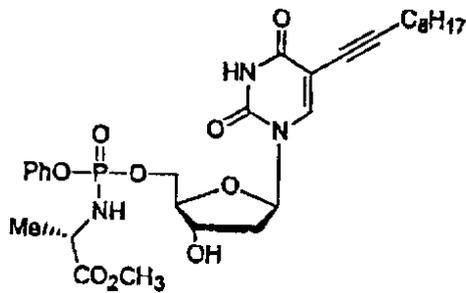
【 0 1 1 6 】

以下の構造：

20

【 0 1 1 7 】

【 化 7 5 】



30

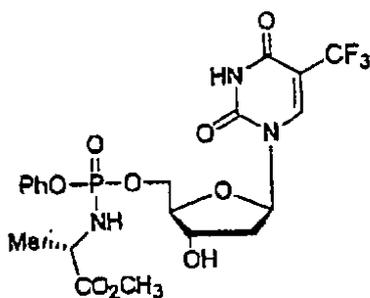
を有する化合物またはそのヌクレオシドアナログ。

【 0 1 1 8 】

以下の構造：

【 0 1 1 9 】

【 化 7 6 】



40

を有する化合物またはそのヌクレオシドアナログ。

【 0 1 2 0 】

このプロドラックは、インビトロおよびインビボでの使用のために、キャリア（例えば

50

、薬学的に受容可能なキャリア)と組合せられ得る。

【0121】

本発明はまた、少なくともいくつかの所望の特性を有する新規な化合物の最初の同定を可能にする、迅速でかつ単純なスクリーニングアッセイを提供する(図2Aおよび2Bを参照のこと)。このアッセイは、少なくとも2つの細胞型を必要とし、第1は、標的酵素が発現されないか、または低レベルで発現されるコントロール細胞(例えば、正常細胞)である。第2の細胞型は、標的酵素が検出可能なレベル(例えば、高レベル)で発現する試験細胞である。この細胞は、標的酵素の増強レベルについて選択される腫瘍細胞株であり得る。あるいは、標的酵素または酵素(標的酵素の適切な種を含む)を差動的に発現するために遺伝学的に改変された細胞を使用し得る。標的細胞をコードするポリヌクレオチドでの宿主細胞のトランスフェクションは、当業者に周知およびChen, L.ら(1996); Hudziak, R. M.ら(1988); またはCarter, P.ら(1992)および以下の実験の部分に記載される手順を使用する一過性または持続性のいずれかである。この細胞は、原核生物(例えば、E. coliのようなバクテリア)または真核生物のものであり得る。この細胞は、哺乳動物の細胞または非哺乳動物の細胞(例えば、マウスの細胞、ラットの細胞、ヒトの細胞、真菌(例えば、酵母))または疾患を引き起こす寄生生物(例えば、PneumocystisまたはLeishmania)であり得る。

10

【0122】

cDNAの挿入のための適切なベクターは、Stratagene, La Jolla, CAおよび他の販売者から市販されている。発現の量は、細胞に導入される発現カセットのコピーの数によって、またはプロモーターの用法を変えることによって調節され得る。各トランスフェクトされた細胞株中での酵素の発現のレベルを、免疫検出用の酵素に対して先に挙げたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用して、細胞溶解物中でイムノブロットおよび酵素アッセイによってモニターし得る(Chen, L.ら(1996))。発現した酵素の量を検出するための酵素アッセイをまた、Carreras, C. W.およびSanti, D. V. (1995)、または以下の実験の部分に記載される方法によって総括されるように実施し得る。

20

【0123】

さらなる局面において、1種より多くの酵素を、別個の宿主細胞を別個に形質転換するために使用し得、その結果、標的酵素に対する候補薬剤の効果を、別の酵素または別の種からの対応する酵素の効果と同時に比較し得る。

30

【0124】

別の実施形態において、第3の標的細胞が、コントロールとして使用される。なぜならば、第3の標的細胞が、本発明の有効量のプロドラッグ化合物を受容するからである。この実施形態は、チミジル酸シンターゼによって活性化される新規な薬剤をスクリーニングするために特に有用である。なおさらなる局面において、少なくとも一つのさらなる試験細胞系を、公知の治療または薬剤と組合せた試験治療剤の相乗作用の可能性を試験するために設定する。

【0125】

本発明の目的のために、首尾良い候補薬剤は、この試験細胞型の増殖を遮断するか、またはこの試験細胞型を殺傷するが、このコントロール細胞型は無傷のままである。増殖アッセイを、Miller(1992); Sugarman, B. J.ら(1985)およびSpector, D. L.ら(1998)に記載される標準的な方法によって、または以下の実験の部分に記載される方法を用いて実施し得る。

40

【0126】

このスクリーニングを、抗生物質の発見のために広範に適用し得ることは、当業者によって理解される。例えば、酵母由来のチミジル酸シンターゼを、ヒトのチミジル酸シンターゼ酵素またはこの酵素のE. coli形態に置換し得る。このことは、酵母に関連する病原体を標的とする特異的な抗真菌性抗生物質の発見を可能にする。さらに、他の酵素を

50

、この処理に供し得る。例えば、感染性因子（例えば、Pneumocystis carinii）のジヒドロ葉酸リダクターゼ活性を特異的に標的とするプロドラックが、選択され得た。この薬剤を、標的酵素に対する特異性について選択し、そして本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイを使用することによって、天然の宿主の酵素を活性化しないことを示すことができる。このコントロール細胞の構築物は、正常なヒトの酵素のみが存在する場合、毒性の欠如を示すために、対応する正常なヒトの酵素を含む。

【0127】

図2Aおよび2Bは、本発明のこの局面の少なくとも1つの実施形態をどのように行い得るかを示す。外来遺伝子（例えば、TSをコードするヒトの遺伝子）は、ヒトのTSが発現されるように宿主細胞の中に挿入される。この「コントロール細胞」は、標的酵素を発現しない。いくつかの実施形態において、標的酵素のタンパク質産物で培養培地を補充することが、必要であり得る。

【0128】

候補プロドラックは、細胞培養培地に直接的に添加され得、次いで、標的細胞または培養培地は、プロドラックが検出可能な標識を含有する場合、候補プロドラックから放出される標識の量についてアッセイされる。あるいは、細胞の取り込みは、Lasica, D. (1996)に記載の方法を使用して、プロドラックをリポソームにパッケージングすることによって増強され得るか、またはLewis, J. G.ら(1996)に記載されるようにサイトフェクチン(cytofectin)と組合せられ得る。

【0129】

腫瘍細胞中でのTS過剰発現を利用したプロドラックについての代替の実施形態は、治療用放射性核種と結合した、デオキシウリジンホスホルアミデート、または他の改変体（本明細書中に記載される）である。治療用放射性核種の例は、レニウム188である。アイソトープは、Callahan, ら(1989)によって記載されるように、本質的に合成され得る。あるいは、これは、例えば、Mallicrodt Medical BV, The Netherlandsから市販されて入手され得る。治療用放射性核種は、例えば、Lin, W. Y.ら(1997)によって記載される標準的な方法によって、デオキシウリジン、もしくはデオキシウリジン5'-ホスホルアミデート、または他の誘導体と結合され得る。放射性核種を含むデオキシウリジンホスホルアミデートは、チミジル酸シンターゼを過剰発現する腫瘍細胞のDNAに優先的に取り込まれ、そして放射および放射の集中発光を介してそれらを死なせる。代替の放射性核種は、レニウム186など(Troutner, D. A. (1987))を含む。

【0130】

処理されるべき細胞を含有するサンプルにプロドラックを送達し、そして細胞死または細胞増殖の阻害についてアッセイすることによって、本発明のプロドラックによって被験体が適切に処置されるかどうかを予想するのに、この化合物は有用である。出願人は、病理学的細胞または患者が本発明の少なくとも一つのプロドラックおよび使用のための装置を提供することによって、この治療により適切に処理されるかどうかを決定するためのキットを提供する。

【0131】

本発明はまた、本発明のプロドラックの有効量を細胞に送達することによって、インビトロまたはインビボで病理学的細胞または標的細胞の増殖を阻害するための方法を提供する。インビボで実施される場合、本発明の有効量のプロドラックを被験体に送達することによって、被験体の標的細胞によって特徴付けされる病状を処置するのに、この方法は有用である。

【0132】

標的細胞が化学療法剤に対して耐性である場合、細胞が耐性を有する、有効量の薬剤を細胞または患者と接触させるか、または投与することによって、この方法は、さらに改変され得る。本発明のプロドラックは、前治療に対する耐性を取り消し得るので、本発明のプロドラックでの首尾良い処置後に、予備治療の投与により腫瘍の増殖または転移をさら

10

20

30

40

50

に阻害し得る。このことが起こり得る例としては、標的細胞が化学療法によってインビボでの選択の結果として増殖される酵素を発現する場合、または標的酵素が標的細胞中で過剰増殖される内因性細胞内酵素である場合が挙げられるが、これらに限定されない。このような酵素の例は、前化学療法の結果として過剰発現されることが示されているチミジル酸シンターゼであり、前薬剤に対して細胞で薬剤耐性表現型を与える。

【0133】

本発明のプロドラックはまた、他の公知の治療と組合せて、以前の治療のいずれかもしくは両方の治療効果またはプロドラックの治療効果を増強または相乗作用を与え得る。このような前治療としては、腫瘍化学療法、放射線治療および外科手術が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0134】

動物に送達される場合、本方法がまた、プロドラックの効果をさらに与えるために有用である。動物モデルの例として、ヌードマウスのグループ(Balb/c NCR nu/nu 雌, Simonsen, Gilroy, CA)が、約 $10^5$ ~約 $10^9$ の過剰増殖の癌または標的細胞(本明細書中に記載される)で各々皮下で播種される。腫瘍が確立される場合、プロドラックは、例えば、腹腔内経路または静脈内経路によって投与される。腫瘍のサイズの減少を決定するための腫瘍の測定は、週に2度、ベニアカリパス(venier caliper)を使用して2次元でなされる。他の動物モデルを適切に使用し得る(Lovejoyら(1997); Clarke, R.(1996);およびPegram, M.D.ら(1997))。

20

【0135】

インビボでの投与は、処置の過程を通じて連続的または断続的に1回の用量で達成され得る。最も有効な手段および投与用量を決定する方法は、当業者に周知であり、そして治療のために使用される組成物、治療の目的、処理される標的細胞、および処理される被験体で変化する。単一または複数の投与は、担当医によって選択される用量レベルおよびパターンで実施され得る。適切な用量処方物および薬剤の投与方法は、以下に見出され得る。

【0136】

プロドラック、薬剤の組合せ、またはいずれかを含む組成物は、従来の手順に従って投与することによってヒトおよび他の動物処置のための薬(例えば、薬学的組成物中の活性成分)の製造のために使用され得る。

30

【0137】

薬学的組成物は、経口的、鼻腔内、非経口的、または吸入療法によって投与され得、そして錠剤、ロゼンジ剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、アンプル、坐薬の形態またはエアロゾル形態をとり得る。これらはまた、水性または非水性の希釈剤中の活性成分の懸濁液、溶液および乳濁液、シロップ、顆粒剤または散剤の形態をとり得る。本発明の化合物に加えて、薬学的組成物はまた、他の薬学的に活性な化合物または本発明の複数の化合物を含み得る。

【0138】

より詳細には、本明細書中で活性成分としても言及される本発明の式の化合物が、経口、直腸、鼻腔内、局所(経皮、エアロゾル、粘膜および舌下を含む)、腔、非経口(皮下、筋内、静脈内および皮内を含む)ならびに肺を含む任意の適切な経路によって治療のために投与され得る。好ましい経路がレシピエントの状態および年齢、ならびに処置される疾患とともに変化することもまた理解される。

40

【0139】

一般的に、上で挙げられた化合物のそれぞれについての適切な用量は、1日当たりレシピエントの体重1キログラムにつき約1~約100mgの範囲、好ましくは1日当たり体重1キログラムにつき約1~約50mgの範囲、そしてもっと好ましくは1日当たり体重1キログラムにつき約1~約25mgの範囲である。他に示されないかぎり、全ての活性成分の重量は、塩またはエステルに対して、本発明の式の親化合物として計算され、その

50

重量は、比例して増加する。所望の用量は、好ましくは、その日を通して適切な間隔で投与される2、3、4、5、6またはそれより多くの部分用量として提供される。これらの部分用量は、単位投薬形態で投与され得、例えば、単位投薬形態当たり約1～約100mg、好ましくは、約1～約25mgより多く、そして最も好ましくは約5～約25mgより多くの活性成分を含む。本発明の化合物および組成物の適切な投薬量は、疾患のタイプおよび重症度および段階に依存し得、患者間で異なり得ることが理解される。最適な投薬量の決定は、一般的に、本発明の処置の危険または有害な副作用に対する治療的利益のレベルのバランスをとることを含む。

#### 【0140】

理想的には、プロドラッグは、疾患の部位において活性化合物のピーク濃度を達成するように投与されるべきである。これは、例えば、プロドラッグの静脈注射（必要に応じて生理食塩水中で）によって達成され得るか、あるいは例えば、活性成分を含む錠剤、カプセル剤またはシロップ剤として経口的に投与され得る。プロドラッグの所望の血液レベルは、疾患組織内に活性成分の治療量を提供するために連続注入によって維持され得る。効力のある組み合わせの使用は、それぞれ個々の治療化合物または薬剤が単独で使用される場合に必要とされ得るよりも低い合計の投薬量のそれぞれの成分の抗ウイルス剤を必要とする治療的組み合わせを提供することが意図され、これによって有害な効果を減少する。

10

#### 【0141】

プロドラッグ成分が単独で投与されることが可能であるが、1つ以上の薬学的に受容可能なキャリアおよび必要に応じて他の治療剤とともに、上で定義されるように少なくとも1つの活性成分を含む薬学的処方物としてそのプロドラッグ成分を提供することが好ましい。それぞれのキャリアは、処方物の他の成分と適合性であり、患者に対して有害でないという意味で「受容可能」でなければならない。

20

#### 【0142】

経口投与に適切な本発明の処方物は、カプセル剤、カシエ剤または錠剤のような（それぞれが所定の量の活性成分を含む）別個の単位として；散剤または顆粒剤として；水性液体または非水性液体中の溶液または懸濁液として；または水中油の液体乳濁液または油中水の液体乳濁液として提供され得る。活性成分はまた、ポーラス、舐剤またはペーストで提供され得る。

30

#### 【0143】

錠剤は、必要に応じて一つ以上の補助成分を伴って圧縮または鋳型成形によって作製され得る。圧縮される錠剤は、必要に応じて結合剤（例えば、ポビドン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈物、保存剤、崩壊剤（例えば、ナトリウムデンプングリコレート、架橋ポビドン、架橋ナトリウムカルボキシメチルセルロース）、界面活性剤または分散剤とともに混合されて、粉末または顆粒のような自由流動形態の活性成分を適切な機械中で圧縮することによって調製され得る。鋳型成形される錠剤は、不活性な液体希釈剤で湿らされた粉末状の化合物の混合物を適切な機械中で鋳型成形することによって作製され得る。錠剤は、必要に応じて、被覆され得るかまたは刻み目を付けられ得、そして所望の放出プロフィールを提供するために種々の割合で、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロースを使用してその中の活性成分のゆっくりしたまたは制御された放出を提供するように処方され得る。錠剤は、必要に応じて、胃ではなく腸の部分での放出を提供するために、腸溶性コーティングで提供され得る。

40

#### 【0144】

口での局所投与に適切な処方物には、芳香性のベース（通常、ショ糖およびアカシアまたはトラガカント）中に活性成分を含むロゼンジ；不活性なベース（例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアカシア）中に活性成分を含む香錠；ならびに適切な液体キャリア中で活性成分を含むうがい薬が挙げられる。

#### 【0145】

本発明に従う局所投与のための薬学的組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション

50

、散剤、溶液、ペースト ( p a s t )、ゲル、スプレー、エアロゾルまたは油状物として処方され得る。あるいは、処方物は、活性成分および必要に応じて1つ以上の賦形剤または希釈剤で含浸される包帯 ( b a n d a g e ) または接着性硬膏のようなパッチまたは包帯 ( d r e s s i n g ) を含み得る。

【 0 1 4 6 】

目または他の外部組織 ( 例えば、口および皮膚 ) の疾患について、この処方物は、好ましくは、局所軟膏またはクリームとして適用され、例えば、約 0 . 0 7 5 ~ 約 2 0 % w / w、好ましくは約 0 . 2 ~ 約 2 5 % w / w、そして最も好ましくは約 0 . 5 ~ 約 1 0 % w / w の量で活性成分を含む。軟膏で処方される場合、プロドラッグは、パラフィン性または水混和性性の軟膏ベースのいずれかとともに使用され得る。あるいは、プロドラッグ成分は、水中油クリームベースでクリーム中で処方され得る。

10

【 0 1 4 7 】

所望の場合、クリームベースの水性相は、例えば、少なくとも約 3 0 % w / w の多価アルコール ( すなわち、プロピレングリコール、ブタジエン - 1 , 3 - ジオール、マンニトール、ソルビトール、グリセロールおよびポリエチレングリコールならびにこれらの混合物のような2つ以上のヒドロキシ基を有するアルコール ) を含み得る。局所処方物は、望ましくは、皮膚または他の冒された領域を通るプロドラッグ成分の吸収または浸透を高める化合物を含み得る。このような皮膚浸透エンハンサーの例としては、ジメチルスルホキシドおよび関連したアナログが挙げられる。

【 0 1 4 8 】

20

本発明の乳濁液の油性相は、公知の方法で公知の成分から構成され得る。この相が乳化剤 ( そうでなければ、エマルジェント ( e m u l g e n t ) として知られる ) のみを含み得るが、この相は、望ましくは、脂肪または油とともにかまたは脂肪と油の両方とともに少なくとも一つの乳化剤の混合物を含む。好ましくは、親水性乳化剤は、安定化剤として作用する親油性乳化剤とともに含まれる。油と脂肪の両方を含むことがまた好ましい。一緒に、安定化剤を含むかまたは含まない乳化剤は、いわゆる乳化ワックスを構成し、そして油および/または脂肪とともにワックスは、いわゆる乳化軟膏ベース ( クリーム処方物の油分散相を形成する ) を構成する。

【 0 1 4 9 】

本発明の処方物における使用に適切なエマルジェントおよび乳化安定剤には、T w e e n 6 0、S p a n 8 0、セトステアリルアルコール、ミリスチルアルコール、グリセリルモノステアレートおよびラウリル硫酸ナトリウムが挙げられる。

30

【 0 1 5 0 】

処方物について適切な油または脂肪の選択は、所望の美容性質を達成することに基づく。なぜなら薬学的乳濁処方物中で使用されそうな大部分の油中の活性成分の溶解性は、非常に低いからである。従って、クリームは、好ましくは、脂っこくなく、非染色性で、かつチューブまたは他の容器からの漏れを避けるために適切な粘度を有する洗浄可能な製品であるべきである。ジソアジピン酸エステル、ステアリン酸イソセチル、ココナッツ脂肪酸のプロピレングリコールジエステル、ミリスチン酸イソプロピル、オレイン酸デシル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、パルミチン酸 2 - エチルヘキシルまたは C r o d a m o l C A P として公知の分枝鎖エステルのブレンドのような直鎖または分枝鎖の一塩基性または二塩基性アルキルエステルが使用され得、最後の3つが好ましいエステルである。これらは、必要な性質に基づいて単独でまたは組み合わせて使用され得る。あるいは、白色ワセリンおよび/または流動パラフィンのような高融点脂質あるいは他の鉱油が使用され得る。

40

【 0 1 5 1 】

目への局所投与に適切な処方物には、点眼剤が挙げられ、ここでは活性成分が適切なキャリア中で ( 特にプロドラッグ成分に対して水性溶媒で ) 溶解させられるかまたは懸濁させられる。プロドラッグ成分は、好ましくは、約 0 . 5 ~ 約 2 0 %、有利には約 0 . 5 ~ 約 1 0 %、特に約 1 . 5 % w / w の濃度でこのような処方物中で提供される。

50

## 【0152】

直腸投与のための処方物は、例えば、ココアバターまたはサリチレートを含む適切なベ-ースを伴って坐薬として提供され得る。

## 【0153】

膣投与に適切な処方物は、プロドラッグ成分に加えて当該分野において適切であることが公知のようなキャリアを含む坐薬、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、泡状剤またはスプレー処方物として提供され得る。

## 【0154】

鼻腔内投与に適切な処方物（キャリアが固体である）には、鼻から吸う（suff）ことが行われる様式（すなわち、鼻の近くに保持された散剤の容器から鼻の経路を通して迅速に吸入されることによる）で投与される、例えば約20～約500ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗い粉末が挙げられる。例えば、鼻腔内スプレー、鼻腔内ドロップのような投与、または噴霧器によるエアロゾル投与による投与のためにキャリアが液体である適切な処方物には、プロドラッグ成分の水性または油性溶液が挙げられる。

## 【0155】

非経口投与に適切な処方物には、水性および非水性等張性滅菌注射溶液が挙げられ、これは、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤および溶質（処方物を意図するレシピエントの血液と等張性にする）；ならびに水性および非水性の滅菌懸濁液（懸濁剤および増粘剤を含み得る）、ならびにリポソームまたは他の微粒子系（血液成分または一つ以上の器官に対してこの化合物を標的化するように設計される）が含まれ得る。この処方物は、単位用量または複数用量で密封された容器（例えば、アンプルおよびバイアル）で提供され得、そして使用の直前に滅菌液体キャリア（例えば注射用水）の添加のみを必要とする凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilizes））状態で保存され得る。即時注射溶液および懸濁液は、以前に記載された種類の滅菌散剤、顆粒剤、および錠剤から調製され得る。

## 【0156】

上で特に言及された成分に加えて、本発明の処方物は、問題の処方物のタイプに関して当該分野で従来の他の薬剤を含み得、例えば、経口投与に適切な薬剤は、例えば、甘味料、増粘剤および矯味矯臭剤をさらに含み得ることが理解されるべきである。

## 【0157】

本発明の式のプロドラッグおよび組成物はまた、獣医学的処方物の形態での使用のために提供され得、これは、当該分野で従来の方法によって調製され得る。

## 【0158】

以下の実施例は、本発明の例示を意図するが、本発明を限定しない。

## 【0159】

（材料および方法）

（ヌクレオシドECTA化合物の合成）

上記5 - 置換ピリミジンヌクレオシドの合成は、当該分野で周知であり、そして手短に上記された方法によって達成され得る。

## 【0160】

一つの実施形態において、本発明は、4つのクラスの化合物を含む。それぞれのクラスは、存在するウリシル（uricil）塩基または改変ウリシル塩基の構造によって規定される。これらのクラスは、1）塩基が、ウラシルのフラノ - ピリミジノン誘導体である；2）塩基が、6 - フルオロウラシルである；3）塩基が、4 - ヒドラゾン置換ウラシル誘導体である；4）塩基がウラシルである、ECTA化合物である。ウラシルまたは改変ウラシル誘導体塩基を使用して、5位において毒性脱離基で置換され、この5位において電子コンジットつなぎ鎖によって接続され、そして電子コンジットつなぎ鎖と毒性脱離基との間に適切なスペーサー部分を含む化合物を合成する。ECTA化合物は、以下に記載されるように、非リン酸化され得、5'モノリン酸誘導体、5'ホスホジエステル誘導体、または5'保護（「マスク」）デオキシウリジンまたは代替の炭水化物部分の匹敵する

10

20

30

40

50

誘導体であり得る。保護5-置換デオキシウリジンモノリン酸誘導体は、リン酸部分が適切な化学保護基の結合によってブロックされている誘導体である。5-置換デオキシウリジンモノリン酸誘導体の保護は、溶解性を改善し、細胞浸透を容易にし、血液脳関門を横切る通過を容易にし、そして細胞または細胞外ホスファターゼの作用を妨げ得る（これは、そうでないと、リン酸基を失い得る）。別の実施形態において、5-置換ウラシルまたはウリジン誘導体は、ヌクレオシドキナーゼ活性を含む細胞に投与され、ここで、5-置換ウラシル/ウリジン誘導体は、5-置換ウリジンモノリン酸誘導体に変換される。ウリジン誘導体はまた、それらの溶解性、細胞浸透性、および/または血液脳関門を横切る能力を増加させるために改変され得る。

#### 【0161】

5-置換ウリジンモノリン酸誘導体についてのチミジル酸シンターゼの作用は、ピリミジン環の5位（「脱離基」）に結合する置換基を放出し得る。次いで、放出された置換基は、固有にまたは別の細胞成分との反応に続いてのいずれかで、毒素または細胞増殖のインヒビターとして作用し得る。

#### 【0162】

（プロパルギルつなぎ鎖を有するECTA化合物の合成）

プロパルギルアルコールまたはアリルアルコールを有する2'-デオキシウリジンの合成は、簡単である。これらの化合物およびこれらの化合物の近縁の誘導体の多くは、文献において報告され、そしていくつかはTSと関連して研究されてきた。例えば、5-アルキニル-dUMP（5-（3-メトキシ-1-プロピニル）-dUMPおよび5-（3-ヒドロキシ-1-プロピニル）-dUMPを含む）は、TSインヒビターとして試験され（BarrおよびRobins（1981））、そしてこれらのうちのいくつかは、TS欠乏性癌細胞のDNAに組み込まれるようになることが示された（Balzarini, J.ら（1985））。

#### 【0163】

5-水銀ウリジン（Ruth, J. L.ら（1978））および5-ヨードウリジン（Robins, M. J.ら（1981））の両方は、パラジウム触媒の存在下で容易にアルケンおよびアルキンと縮合し、C5つなぎ鎖を有するウリジンを与える。後者の経路は、より頻繁に使用される（Robins, M. J.ら（1982）、Asakura, J.ら（1988）および（1990））。保護5-ヨード-2'-デオキシウリジンとt-ブチルジメチルシリルプロパルギルエーテル（Grahamら（1998）；De Clercqら（1983））、メチルプロパルギルエーテル（Tolstikovら（1997））との高収率の縮合が達成され、そしてプロパルギルアルコール自体（Chaudhuriら（1995））およびGoodwinら（1993））との高収率の縮合さえ達成されてきた。後者の反応によって導入される3-ヒドロキシ-1-プロピニル置換基はまた、メタクリレート基のDIBAL-H還元によってアクセスされ得（Cho, Y. M.ら（1994））、それ自体BVdUの合成において使用される同じHeck反応から生じる。これらのパラジウム触媒反応は非常に汎用性があるので、非常に長くかつ精巧に官能化されたプロパルギルに基づくつなぎ鎖を5-ヨード-2'-デオキシウリジンへ縮合するために使用され得る（Livakら（1992））およびHobbs（1989））。（Z）-アリルに基づくつなぎ鎖は、プロパルギル前駆体をUndiar触媒上で部分水素化することによって生成され（Robins, M. J.ら（1983））、一方（E）-アリルに基づくつなぎ鎖は、（E）-トリブチルスズ化エチレンのHeckカップリングによって最も良好に調製される（Crisp（1989））。

#### 【0164】

文献の手順にしっかりと従って、t-ブチルジメチルシリルプロパルギルエーテルを有する3',5'-ジ-O-保護2'-デオキシウリジン（Grahamら（1998））およびDe Clercqら（1983））が調製され、そしてその一部（対応する（Z）-アリルエーテルに変換される（RobinsおよびBarr（1983）））は、還元される。TBDMs基のTBAF-媒介除去は、インサイチュで官能化され得るオキシア

10

20

30

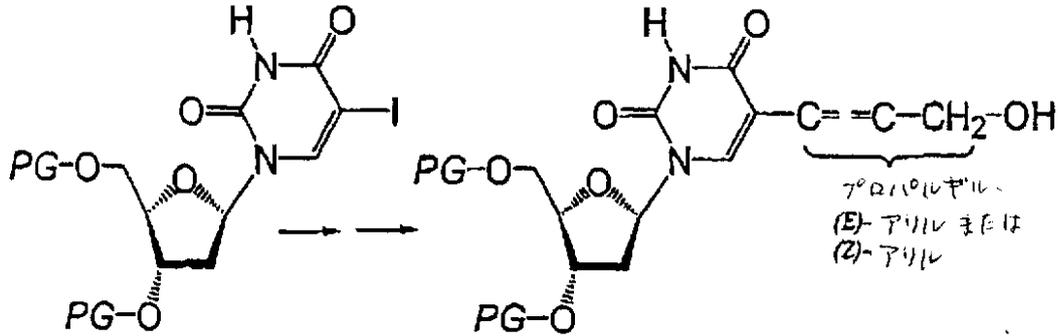
40

50

ニオンを生成するので、これらのTBDMS保護プロパルギルヌクレオシドおよび(Z)-アシルつなぎ鎖を有するヌクレオシドは、トキソホア(toxophore)を有する標的のいくつかに対する簡便な前駆体として役立つ。(E)-アシルアルコールを有するヌクレオシドについては、公知のO-テトラヒドロピラニルエーテル誘導体は、(E)-トリブチルスズ化エチレンの文献記載のHeckカップリングによって調製される(Crisp(1989))。

【0165】

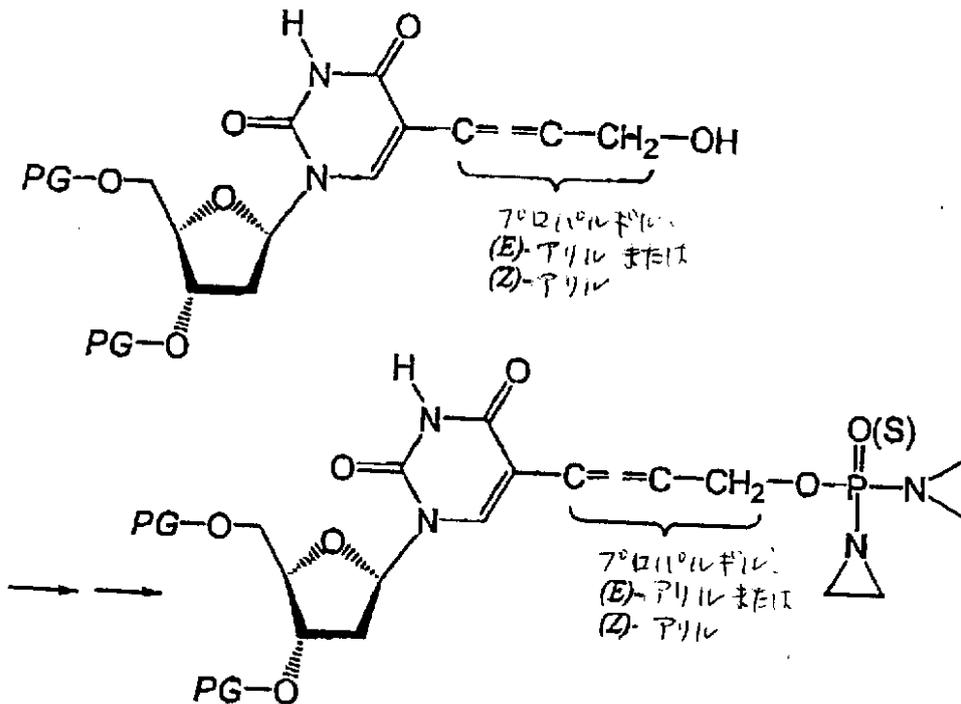
【化77】



2工程の文献記載のプロトコル(Phelpsら(1980)ならびにHsiaoおよびBardos(1981))を使用することにより、プロパルギルアルコールならびに(E)-アシルアルコールおよび(Z)-アシルアルコールは、それらの対応するビス-アジリジニルホスホルアミデートまたはトリホスホルアミデートに変換され、その結果5'-モノヌクレオチドバージョンのTSプロセッシングは、細胞増殖抑制薬TEPAまたはThioTEPAの活性な代謝産物をそれぞれ放出する(Dirvenら(1995))。

【0166】

【化78】



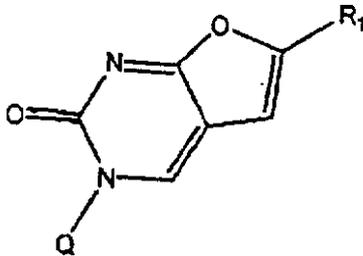
(フラノ-ピリミジノンの合成)

フラノ-ピリミジノンの合成は、C5プロパルギルアルコールを有する2'-デオキシ

ウリジンの合成から始まる。次いで、フラノ-ピリミジノン化合物は、上記のO-テトラヒドロピラニルエーテル誘導体から形成される。合成は、プロパルギル結合の第2炭素とピリミジン環のC4位に結合した酸素との反応によって進み、蛍光フラノ-ピリミジノン（これは、反応混合物から容易に単離され得る）を生じる。このような化合物は、特定の電子コンジット（conduit）、スペーサーおよび毒性脱離基の種々の組み合わせを介するECTA化合物の合成のためのさらなる基礎を提供する。

【0167】

【化79】



10

フロ[2,3-d]ピリミジノンヌクレオシドは、2',3'-ジ-O-p-トルオイルまたは2',3'-ジ-O-アセチル-5-ヨード-2'-デオキシウリジンを1-(テトラヒドロピラニルオキシ)-2-プロピンとこれらの蛍光化合物の形成を促進する公知の条件下（Robins, M. J. ら（1983））で縮合することによって調製された（「New methods of synthesis of -aminoethyl pyrazoles」Jones, R. G. およびMann, M. J.（1953））。炭水化物保護基の塩基触媒除去は、6-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシメチル)置換二環式ヌクレオシドを与え、これは、標準的な酸性THP基加水分解（CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中のTFA）に供されたか、またはBVdU-PAおよび5FUdR-PAを調製するために使用される手順と同じ手順によって、位置選択的に5'-ホスホルアミデート化されたかのいずれかである。図4に示されるように、ホスホルアミデート化の後、THP基は、酸性加水分解によって除去され得た。

20

【0168】

（フラノ-ピリミジノンに基づくTS ECTA化合物）

毒性R<sup>4</sup>脱離基は、上記のTEPAおよびThioTEPA誘導体の合成を用いて説明されるような、毒性脱離基をC5プロパルギルウリジン化合物上のヒドロキシルに結合するために使用される方法と同様の方法を用いて、フラン-2-メチルアルコールに結合され得る。当業者に明らかである種々の代替の毒性脱離基が想定される。さらに、R<sup>2</sup>電子コンジット成分の長さおよび組成、ならびにR<sup>3</sup>スペーサ要素の組成に対する改変がまた、想定される。

30

【0169】

フラノ-ピリミジノンに基づくTS ECTA化合物はまた、種々の改変された「Q」部分からなり得る。多くの5-置換2'-デオキシウリジンは、ヒトTKのための基質ではないが、興味深いことに、5-(4-ヒドロキシ-1-ブチニル)-2'-デオキシウリジンは、例外であることが見出された（Barr, P. J. ら（1981））。ECTA化合物は、代替の炭水化物基に結合した遊離の5'ヒドロキシル基、5'モノリン酸基、または5'ホスホルアミデート基を有し得る。このようなホスホルアミデート化合物の合成のための新規な方法は、HClスカベンジャーの存在下で、2-デオキシ3'-ヒドロキシ、5'-ヒドロキシ非保護ヌクレオチドをホスホクロリデートと反応させることによって達成される。好ましい実施形態においては、ホスホクロリデートは、アラニンのようなアミノ酸から誘導される亜リン酸置換基を含む。例えば、ホスホクロリデートは、フェニル-L-メトキシアラニンホスホクロリデートであり得る。

40

【0170】

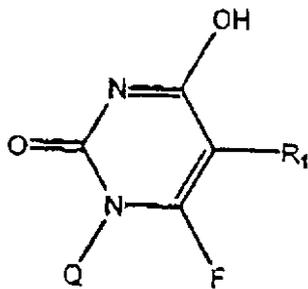
50

(C6フルオロウリジンおよびC4ヒドラゾン(hydrozone)に基づく化合物)  
 プリミジンC5-C6二重結合への中性チオール付加は、dUMPとの通常のTS反応  
 において、発熱反応(3~9 kcal/mol; Les, A.ら(1998)による総説  
 を参照のこと)として進む。6位におけるTS反応性水素(これは、活性ヒトTSシステ  
 イン(L. caseiのcys-198を有するホモログ)を介した、酵素とのスルフィ  
 ドリル結合の形成を促進し得る)に対する代替の置換基としては、フッ素が挙げられる。  
 プリミジン環の他の位置におけるこのような置換基はまた、基質とTSとの間の反応を容  
 易にし得る。例えば、ウラシル上の4-ヒドラゾン置換(Les, A.ら(1998)に  
 よって記載されるような)は、TSを用いたチオールの形成を容易にする。得られるヌク  
 レオチド-チオール(TS)中間体が、改変されたヌクレオチドを放出するような方法(これは加水分解を介して受動的に達成され得る)で再構成することが重要である。

10

【0171】

【化80】



20

C6位におけるフッ素の導入は、以前に報告されていなかったが、Krajewska  
 sおよびShugar(1982)の合成的記載(これは、多くの6置換ウラシルおよび  
 ウリジンアナログの合成を記載する)に従って合成され得る。

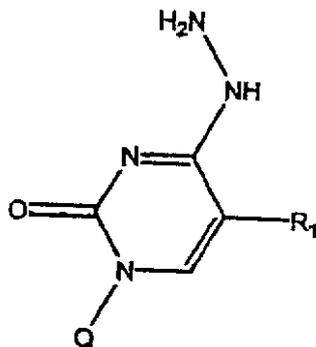
【0172】

プリミジン塩基のC4位における化学的促進(chemistry facilitating)置換基は、当業者に周知である。文献の記載の例としては、Wallisら(1999)、Negishiら(1996)、Barbatorら(1991)、Barbatorら(1989)およびHolyら(1999)が挙げられる。これらの合成技術は  
 また、置換基の組み合わせ(例えばプリミジン環のC4位およびC5位(Plutar(1999))またはプリミジン環のC2位およびC4位(Zeidら(1999)))を可能にする。

30

【0173】

【化81】



40

本発明の別の実施形態においては、ECTA化合物は、代替の電子コンジット、スペーサー部分および毒性脱離基の、C6フルオロ-ウリジン塩基またはC4ヒドラゾン修飾プリミジンのいずれかへの付加によって合成される。2(デオキシウリジンに基づくECTA化合物)の合成のための上記の方法は、このような分子の合成のために再び使用され得

50

る。

【0174】

(ヌクレオシドフェニルメトキシアラニルホスホルアミデートの合成)

ホスホルアミデートの、ヌクレオチドについてのホスフェートプロドラッグとしての使用は、McGuigan, C.ら(1993)およびMcGuigan, C.ら(1994)によって最初に報告された。これらの著者は、抗ウイルス性2',3'-ジデオキシヌクレオシド誘導体のホスホルアミデート誘導体(例えば、d4T)が、チミジンキナーゼ欠損細胞においてそれらの抗ウイルス活性を保持することを示した。さらなる研究は、ホスホルアミデート基が細胞の内側でリン酸基へと加水分解されることを示した(McGuigan, C.ら(1996); Balzarini, J.ら(1996); およびSabolardら(1999))。ホスホルアミデートは、2',3'-ジデオキシヌクレオシドをフェニルメトキシアラニルホスホクロリデート(PMPC)と反応させることによって合成された。

10

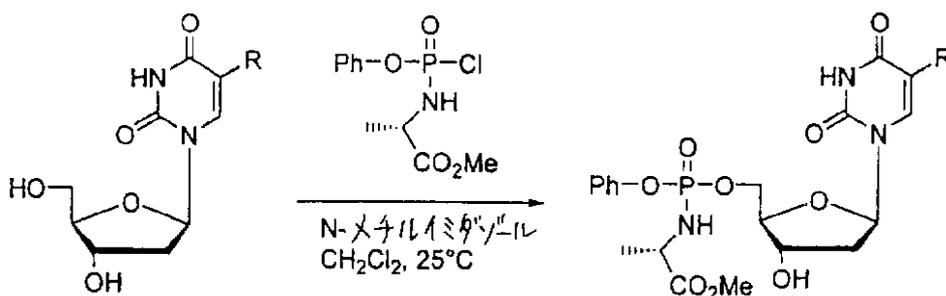
【0175】

ヒドロキシル基は1つしか存在しないので、これらの反応は通常、滞りなく進行する。1より多くのヒドロキシル基が存在する化合物では、適切に保護されたヌクレオシドが必要とされ得る。2'-デオキシヌクレオシドの5'-OH基は3'-OH基よりはずっと立体障害がないので、注意深く制御された条件下ではPMPCを用いた選択的ホスホルアミド化(phosphoramidation)が可能である。BVdUおよび5FUdRは両方とも無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中のN-メチルイミダゾールの存在下でPMPCと縮合して、対応するホスホルアミデートを与えた。いずれの場合も、所望の生成物は、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィーを用いて出発材料から容易に分離され得た。合成スキームを以下にまとめる。

20

【0176】

【化82】



30

以下の実施例は、本発明を例示することを意図するが、本発明を限定しない。

【0177】

(実施例1および2)

(プロパルギルつなぎ鎖を用いたECTA化合物の合成)

上記の一般的合成手順を用いて、ビス-アジリジン-1-イル-ホスフィン酸3-[2-デオキシウリジン-5-イル]-プロパ-2-イニルエステルを合成し、そして<sup>1</sup>H NMRによって分析して以下の結果を得た：<sup>1</sup>H NMR((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)は、ノイズに起因して複雑化した。顕著な特徴：8.28(d、1、H6)、6.10(擬-t、1、H1')、5.26(m、D<sub>2</sub>Oに交換、1、3'-OH)、5.13(m、D<sub>2</sub>Oに交換、1、5'-OH)、4.81(qまたはdd、2、プロパルギル-CH<sub>2</sub>)、4.24(m、1、H3')、3.57(m、2、5'-CH<sub>2</sub>)、2.15~2.0(m、8、アジリジン-CH<sub>2</sub>)。

40

【0178】

ビス-アジリジン-1-イル-ホスフィン酸3-[2-デオキシウリジン-5-イ

50

ル] - プロブ - 2 - イニルエステルをまた合成し、そして  $^1\text{H}$  NMR によって分析して以下の結果を得た： $^1\text{H}$  NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) は、ノイズに起因して複雑化した。顕著な特徴： $8.29$  (d、1、 $\text{H}_6$ )、 $6.10$  (擬 - t、1、 $\text{H}_{1'}$ )、 $5.22$  (m、 $\text{D}_2\text{O}$  に交換、1、 $3' - \text{OH}$ )、 $5.10$  (m、 $\text{D}_2\text{O}$  に交換、1、 $5' - \text{OH}$ )、 $4.88$  (q または dd、2、プロパルギル -  $\text{CH}_2$ )、 $4.31$  (m、1、 $\text{H}_{3'}$ )、 $3.52$  (m、2、 $5' - \text{CH}_2$ )、 $2.15 \sim 2.0$  (m、8、アジリジン -  $\text{CH}_2$ )。

## 【0179】

(実施例 3 ~ 8)

(フラノ - ピリミジノンの合成)

上記の一般的合成手順を用いて、以下の化合物を調製した。

## 【0180】

(実施例 3)

3 - (2 - デオキシ - - D - リボフラノシル) - 6 - (テトラヒドロピラン - 2 - イルオキシメチル) フロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 (3H) - オン。  $^1\text{H}$  NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $8.80$  (s、1、 $\text{H}_4$ )、 $6.74$  (s、1、 $\text{H}_5$ )、 $6.16$  (擬 - t、1、 $\text{H}_{1'}$ )、 $5.27$  (d、 $\text{D}_2\text{O}$  に交換、1、 $3' - \text{OH}$ )、 $5.12$  (t、 $\text{D}_2\text{O}$  に交換、1、 $5' - \text{OH}$ )、 $4.72$  (m、1、THP -  $\text{H}_2$ )、 $4.56$  (q、2、 $\text{CH}_2\text{OTHP}$ )、 $3.92$  (m、1、 $\text{H}_{4'}$ )、 $3.64$  (m、2、 $5' - \text{CH}_2$ )、 $2.40$  (m、1、 $\text{H}_{2'a}$ )、 $2.03$  (m、1、 $\text{H}_{2'b}$ )、 $1.68$  および  $1.50$  (m、8、THP)。ビス - TMS 誘導体について低分解能質量スペクトル (DCI -  $\text{NH}_3$ )、 $m/z$   $323$  ( $\text{B} + \text{TMS} + \text{H}^+$ )、 $511$  ( $\text{MH}^+$ )、 $583$  ( $\text{M} + \text{TMS}^+$ )。

## 【0181】

(実施例 4)

3 - (2 - デオキシ - - D - リボフラノシル) - 6 - (ヒドロキシメチル) フロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 (3H) - オン。  $^1\text{H}$  NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $12.0$  (bs、1、OH)、 $8.24$  (s、1、 $\text{H}_4$ )、 $6.53$  (s、1、 $\text{H}_5$ )、 $5.51$  (擬 - t、1、 $\text{H}_{1'}$ )、 $4.42$  (m、2、 $\text{CH}_2\text{OH}$ )。低分解能質量スペクトル (DCI -  $\text{NH}_3$ )、 $m/z$   $167$  ( $\text{B} + 2\text{H}^+$ )、 $184$  ( $\text{B} + \text{NH}_4^+$ )。

## 【0182】

(実施例 5)

1 - [ 6 - (テトラヒドロピラン - 2 - イルオキシメチル) フロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 (3H) - オン - 3 - イル ] - 2 - デオキシ - - D - リボフラノース - 5 - イルフェニルメトキシ - L - アラニルホスホルアミデート。  $^1\text{H}$  NMR ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) は、ジアステレオマーの存在に起因して複雑化した。顕著な特徴： $8.62$  および  $8.59$  (各 s、各 1、 $\text{H}_4$ )、 $7.4 \sim 7.1$  (m、5、PhO)、 $6.61$  および  $6.60$  (各 s、各 1、 $\text{H}_5$ )、 $6.25$  (m、1、 $\text{H}_{1'}$ )、 $4.56$  (q、2、プロパルギル -  $\text{CH}_2$ )、 $3.56$  および  $3.54$  (各 s、各 3、 $\text{CO}_2\text{Me}$ )、 $2.0$  (m、1、 $\text{H}_{2'b}$ )、 $1.22$  (m、3、アラニル - - Me)。低分解能質量スペクトル (DCI -  $\text{NH}_3$ )、 $m/z$   $167$  ( $\text{B} + 2\text{H}^+$ )、 $184$  ( $\text{B} + \text{H}^+ + \text{NH}_4 + \text{THP}$ )。

## 【0183】

(実施例 6)

1 - [ 6 - (ヒドロキシメチル) フロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 (3H) - オン - 3 - イル ] - 2 - デオキシ - - D - リボフラノース - 5 - イルフェニルメトキシ - L - アラニルホスホルアミデート。  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) は、ジアステレオマーの存在に起因して複雑化した。顕著な特徴： $8.5$  (s、1、 $\text{H}_4$ )、 $7.4 \sim 7.1$  (m、5、PhO)、 $6.36$  および  $6.30$  (各 s、各 1、 $\text{H}_5$ )、 $6.23$  (m、1、 $\text{H}_{1'}$ )、 $3.67$  および  $3.65$  (各 s、各 3、 $\text{CO}_2\text{Me}$ )、 $2.69$  (m、1、 $\text{H}_2$ )

10

20

30

40

50

' a )、2.10 ( m、1、H 2 ' b )、1.35 ( m、3、アラニニル - Me )。低分解能質量スペクトル ( D C I - N H <sub>3</sub> )、m / z 525 ( M H <sup>+</sup> )、595 ( M N H <sub>4</sub> <sup>+</sup> )。

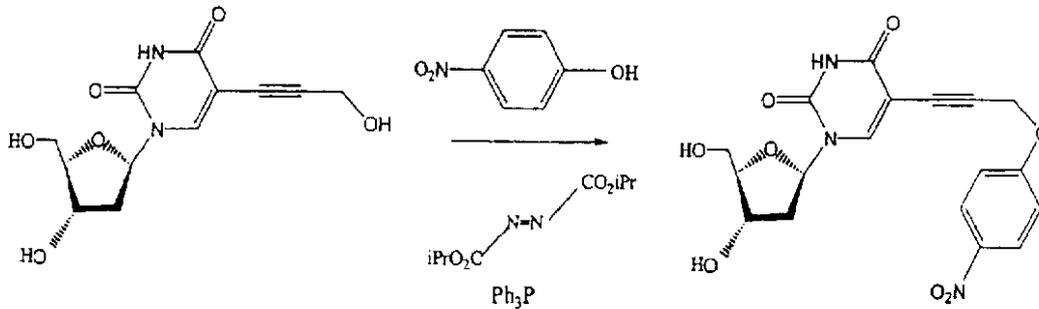
【 0 1 8 4 】

( 実施例 7 )

5 - ( 3 - ヒドロキシ - 1 - プロピニル ) - 2 ' - デオキシウリジンの 4 - ニトロフェニルエーテル誘導体を、以下に示される通りの標準的なエーテル合成に従って調製した。

【 0 1 8 5 】

【 化 8 3 】



10

20

( 実施例 8 )

5 - [ 3 - ( 4 - ニトロフェノキシ ) - 1 - プロピニル ] - 2 ' - デオキシウリジン。40 mL の無水 T H F 中の予め乾燥した 5 - ( 3 - ヒドロキシ - 1 - プロピニル ) - 2 ' - デオキシウリジン ( R o b i n s , M . J . ら ( 1 9 8 3 ) ) ( 5 6 5 m g、2 m m o l ) のアルゴン下の溶液を、4 - ニトロフェノール ( 6 9 6 m g、5 m m o l )、トリフェニルホスフィン ( 7 8 7 m g、3 m m o l )、およびジイソプロピルアゾジカルボキレート ( 5 9 0 L、3 m m o l ) で処理し、そしてこの反応混合物を溶液が透明になるまで 6 0 ° で加熱し、次いでさらに 1 時間加熱した。この混合物を 2 3 ° まで冷まし、次いでこれを S i O <sub>2</sub> 上でエバポレートし、そして溶離液として M e O H / C H <sub>2</sub> C l <sub>2</sub> を用いたクロマトグラフィーによって精製して 1 0 7 m g ( 1 3 % ) の所望のエーテル生成物を得た：m p 1 1 2 ~ 1 1 8 °。 <sup>1</sup> H N M R ( ( C D <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S O ) 1 1 . 6 5 ( s、D <sub>2</sub> O に交換、1、N H )、8 . 2 9 ( s、1、H 6 )、8 . 2 4 ( d、J = 9 . 3 H z、2、m - A r H )、7 . 2 3 ( d、J = 9 . 3 H z、2、o - A r H )、6 . 0 9 ( 擬 - t、1、H 1 ' )、5 . 1 7 ( s、2、プロパルギル - C H <sub>2</sub> )、4 . 2 2 ( m、1、H 3 ' )、3 . 8 0 ( m、1、H 4 ' )、3 . 5 9 ( m、2、5 ' - C H <sub>2</sub> )、2 . 1 3 ( 擬 - t、2、2 ' - C H <sub>2</sub> )。ペルトリメチルシリル化合物についての低分解能質量スペクトル ( D C I - N H <sub>3</sub> )、m / z 547 [ M ( T M S ) <sub>2</sub> H <sup>+</sup> ]、565 [ M ( T M S ) <sub>2</sub> N H <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]、620 [ M ( T M S ) <sub>3</sub> H <sup>+</sup> ]。

30

【 0 1 8 6 】

( 実施例 9 )

( 5 - ( 4 - カルボトキシ - 1 , 3 - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン ( d e x o y u r i d i n e ) )

( ( a ) 5 - ( カルボメトキシビニル ) - 2 ' - デオキシウリジン - 3 ' , 5 ' - ビス ( テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 2 - イル ) エーテル ( I ) )

ジメチルホルムアミド ( D M F、5 m L ) 中の 5 - ( カルボメトキシビニル ) - 2 ' - デオキシウリジン ( 3 . 0 g、9 . 6 m m o l )、3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - ピラン ( 2 2 m L、2 1 . 3 m m o l ) およびピリジニウム - p - トルエンシルホネート ( P P T S、0 . 2 4 2 g、0 . 9 6 m m o l ) のスラリーを、5 0 ° で 1 8 時間攪拌した。得られた溶液を減圧下 ( 浴温度 4 5 ° ) で濃縮して濃く淡黄色のオイルを得た。このオイルを、E t O A c 中に溶解し、そして固体を濾過した。この溶液を再度濃縮した。得られたオイ

40

50

ルを、50%～75%のEtOAc/ヘキサンを溶離液として用いた、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによって精製して、3.81g(85%)の純粋な生成物を無色のオイルとして得た。

## 【0187】

((b) 5-(3-ヒドロキシプロピ-1-エニル)-2'-デオキシウリジン-3', 5'-ビス(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)エーテル(II))

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(14mL)中の(I)(3.5g、7.27mmol)の溶液を、ドライアイス/アセトン浴中で-78℃まで冷却した。トルエン(1.0M、24mL、24.0mmol)中の水素化ジイソブチルアルミニウム(DIBAL-H)を、温度を-78℃に維持しながら、2時間かけて滴下した。この溶液を-78℃でさらに2時間攪拌し、そしてMeOH(2.5mL)を滴下して全ての過剰のDIBAL-Hを破壊した。この反応混合物を30%クエン酸溶液(50mL)、氷(25g)およびEtOAc(30mL)の混合物中に約20分間かけてカニューレ挿入した。相を分離し、そして水相をEtOAc(25mLで2回)で抽出した。合わせた有機相を飽和NaHCO<sub>3</sub>(20mL)およびブライン(20mL)で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥し、そして濃縮して3.28g(100%)の無色のオイルを得た。

10

## 【0188】

((c) 5-(3-オキソプロピ-1-エニル)-2'-デオキシ(dexoy)ウリジン-3', 5'-ビス(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)エーテル(III))

20

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(9mL)中の上記から得た粗(II)(1.988g、4.4mmol)の溶液に、水で冷やししながら、固体ピリジニウムジクロメート(PDC; 1.82g、4.8mmol)を添加した。酢酸(0.4mL)を滴下しながら懸濁物を攪拌した。水浴を除去し、そして反応物を室温で1時間攪拌した。粗生成物をフロリジル(florisil)のパッド(2×2.5cm)を通して濾過し、そしてフロリジルを35mL EtOAcで洗浄した。得られた褐色の溶液を別のフロリジルカラム(3.5cm直径×2.5cm高さ)を通して濾過した。濾液を濃縮して1.273g(64%収率)の非常に淡褐色のオイルを得た。

## 【0189】

((d) 5-(4-カルベトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン-3', 5'-ビス(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)エーテル(IV))

30

(カルベトキシメチレン)トリフェニルホスホラン(triphenyl phosphorane)(0.32mg、0.92mmol)をこの粗アルデヒド(III)(0.344g、0.77mmol)の溶液に添加した。この溶液の色が濃くなり、錆色になった(darkened and turned rust color)。1時間後、薄層クロマトグラフィーによって判断したところ、(III)は完全に消費されていた。溶媒をエバポレートし、そして粗生成物を、35%～45%のEtOAc/ヘキサンを溶離液として用いた、シリカゲルでのカラムクロマトグラフィーによって精製した。純粋な生成物(0.310g、78%収率)が無色オイルとして得られた。

## 【0190】

40

((e) 5-(4-カルベトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシ(dexoy)ウリジン(V))

5-(4-カルベトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシ(dexoy)ウリジン-3', 5'-ビス(テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)エーテル(IV)(0.637g、1.22mmol)をMeOH(1.5mL)に溶解し、そしてPPT5(0.049g、0.16mmol)を添加した。この溶液を50℃にて7.5時間攪拌し、そして室温にて一晩放置した。白色の沈殿物が形成された。この反応混合物を0℃に冷却し、そして濾過して純粋な(V)を白色固体(0.188g)として得た。濾液を濃縮し、そして50%～100%のEtOAc/ヘキサンを溶離液として用いた、シリカゲルでのクロマトグラフィーにかけて、さらに0.180gの生成物を得た。この生成物

50

の総収量は、0.368 g (86%)であった。

【0191】

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 1.22 (3H, t,  $J = 7\text{ Hz}$ ), 2.17 (2H, br t,  $J = 5.5\text{ Hz}$ ), 3.55 ~ 3.75 (2H, m), 3.81 (1H, m), 4.12 (2H, q,  $J = 7\text{ Hz}$ ), 4.25 ~ 4.28 (1H, m), 5.19 (1H, t,  $J = 4.8\text{ Hz}$ ), 5.27 (1H, d,  $J = 4.1\text{ Hz}$ ), 5.98 (1H, d,  $J = 14.5\text{ Hz}$ ), 6.14 (1H, t,  $J = 6.3\text{ Hz}$ ), 6.75 (1H, d,  $J = 14.5\text{ Hz}$ ), 7.18 ~ 7.30 (2H, m), 8.30 (1H, s), 11.56 (1H, s)。

【0192】

(実施例10)

(5-(4-カルボメトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(Va))

ジオキサン(12 mL)中のトリエチルアミン(3.9 mL, 28.2 mmol)の溶液を、15分間にわたって窒素を吹き込むことによって脱アリアル化(deareate)した。酢酸パラジウム(0.60 g, 0.26 mmol)およびトリフェニルホスフィン(0.183 g, 0.70 mmol)を添加し、そしてこの溶液を70℃にて20分間加熱して、暗褐色の溶液を得た。5-ヨード-3'-デオキシウリジン(5.0 g, 14.1 mmol)およびメチル2,4-ペンタジエノエート(2.5 g, 22.3 mmol)を添加し、そしてこの混合物を還流下で15時間にわたって加熱した。溶媒および揮発性成分を減圧下でエバポレートし、そして残渣を水(15 mL)とEtOAc(15 mL)との間で分配した。相を分離し、そして水相をEtOAc(各10 mL)で2回抽出した。合わせた有機相をラインで洗浄し、そして濃縮した。残渣をMeOH(15 mL)中に溶解し、そして室温まで冷ました。形成された固体を濾過によって収集し、少量のMeOHで洗浄し、そして減圧下で乾燥して0.38 gの褐色粉末を得た。

【0193】

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 2.17 (2H, t,  $J = 6.4\text{ Hz}$ ), 3.55 ~ 3.70 (2H, m), 3.66 (3H, s), 3.82 (1H, q,  $J = 3.6\text{ Hz}$ ), 4.27 (1H, m), 5.18 (1H, t,  $J = 4.9\text{ Hz}$ ), 5.26 (1H, d,  $J = 4.5\text{ Hz}$ ), 5.99 (1H, d,  $J = 14.4\text{ Hz}$ ), 6.14 (1H, d,  $J = 6.4\text{ Hz}$ ), 6.74 (1H, d,  $J = 14.8\text{ Hz}$ ), 7.20 ~ 7.35 (2H, m), 8.30 (1H, s), 11.56 (1H, s)。

【0194】

上記からの濾液を濃縮し、そして60%~100%のEtOAc/ヘキサンを溶離液として用いた、シリカゲルでのクロマトグラフィーにかけて、さらに0.70 gの生成物を褐色の泡状物として得た。合わせた収量は、1.08 g (22.6%)であった。

【0195】

(実施例11)

(5-(4-カルボキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシ(dexoy)ウリジン(VI))

(方法I)

5-(4-カルベトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシ(dexoy)ウリジン(V, 実施例1から)(0.449 g, 1.28 mmol)を、2N NaOH(3 mL)に溶解し、そして25℃にて攪拌した。20分後、沈殿物が形成され、そしてTLCは、出発物質が完全に消費されたことを示した。この混合物を0℃に冷却し、そして2N HClを用いてpH1まで酸性化した。得られたオフホワイトの固体を濾別し、水で洗浄し、そして減圧下で乾燥して0.225 g (54%)の生成物を得た。

【0196】

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 2.12 ~ 2.19 (2H, m), 3.50 ~ 3.70 (2H, m), 3.75 ~ 3.85 (1H, m), 4.24 ~ 4.29 (1H, m)

10

20

30

40

50

、5.19 (1H, t, J = 4.8 Hz)、5.27 (1H, d, J = 4.2 Hz)、5.80 ~ 5.95 (1H, m)、6.14 (1H, t, J = 6.4 Hz)、6.60 ~ 6.75 (1H, m)、7.15 ~ 7.25 (2H, m)、8.26 (1H, s)、11.56 (1H, s)、12.16 (1H, br s)。

## 【0197】

濾液および洗浄液を合わせ、そして乾燥するまでエバポレートした。得られた粘性の黄色固体をMeOHに溶解し、これから、白色沈殿物が形成された。この固体を濾別してさらに0.200gの生成物を得た。

## 【0198】

(方法II)

表題化合物をまた、上記と匹敵する収率で5-(4-カルボメトキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(Va)(実施例2における方法に従って調製された)から調製し得る。

## 【0199】

(実施例12)

(5-(4-ブromo-1E,3E-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(VIIa)および5-(4-ブromo-1E,3Z-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(VIIb))

DMF(1mL)中の5-(4-カルボキシ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(VI)(0.200g、0.62mmol)の溶液に、KHCO<sub>3</sub>(0.185g、1.84mmol)を添加し、そしてこの混合物を20分間、25にて攪拌した。DMF(0.3mL)中のN-ブromosuccinimide(0.117g、0.65mmol)の溶液を滴下した。スムーズガスエボリューション(smooth gas evolution)(CO<sub>2</sub>)を添加の間中行った。得られた褐色の懸濁物を2時間、25にて攪拌し、この時点で、TLCは、(VI)が完全に消費されたことを示した。水(10mL)をこの懸濁物に添加し、そして得られた溶液をEtOAc(15mLで2回)で抽出した。抽出物をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、そして溶媒を減圧下でエバポレートして黄色固体(178mg、80%収率)を得た。この黄色固体は、<sup>1</sup>H NMRによって示されるように、2つの異性体の混合物からなっていた。この粗生成物を、移動相として水中の20%アセトニトリルを用いた半分取HPLC(逆相C18カラム)によって分離して、以下の異性体を得た：

5-(4-ブromo-1E,3Z-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン：保持時間10.5分間；<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)：2.11~2.18(2H, m)、3.50~3.70(2H, m)、3.80(1H, 歪んだq, J = 3.5 Hz)、4.25(1H, br s)、5.08(1H, br s)、5.25(1H, br s)、6.15(1H, t, J = 6.5 Hz)、6.40(1H, d, J = 7 Hz)、6.53(1H, d, J = 15.6 Hz)、6.83(1H, dd, J = 7, 10 Hz)、7.39(1H, dd, J = 10, 15.6 Hz)。

## 【0200】

5-(4-ブromo-1E,3E-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン：保持時間15.1分間；<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>)：2.12~2.16(2H, m)、3.50~3.70(2H, m)、3.80(1H, q, J = 3.2 Hz)、4.26(1H, m)、5.13(1H, br s)、5.25(1H, br s)、6.14(1H, t, J = 6.5 Hz)、6.36(1H, d, J = 15.6 Hz)、6.67(1H, d, J = 13.1 Hz)、6.84(1H, dd, J = 11, 13.1 Hz)、7.04(1H, dd, J = 11, 15.6 Hz)。

## 【0201】

(実施例13)

実施例11、方法IIに記載される手順を用いて、以下の化合物が同様の様式で入手され得る：5-(4-クロロ-1,3-ブタジエニル)-2'-デオキシウリジン(工程B

10

20

30

40

50

におけるN - プロモスクシンイミドの代わりにN - クロロスクシンイミドを用いる) ; 5 - ( 4 - ヨード - 1 , 3 - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン ( N - プロモスクシンイミドの代わりにヨウ化ナトリウム ( sodium iodide ) 中のヨウ素を用いる ) 。

**【 0 2 0 2 】**

( 実施例 1 4 )

( 5 - ( 2 - プロモビニル ) - 2 ' - デオキシウリジンフェニルN - メトキシ - L - アラニニル ホスホルアミデート )

( フェニルN - メトキシ - L - アラニニルホスホクロリデート )

L - アラニンメチルエステルヒドロクロリド ( 2 4 5 . 8 g ; 1 . 7 6 m o l ) を、 1 2 L の 3 首丸底フラスコ ( 機械式スターおよび温度計を備えた ) 中に入れ、続いて 4 . 0 L のジクロロメタンを入れた。この混合物を室温にて 1 5 分間攪拌した。フェニルホスホジクロリデート ( 3 7 0 . 0 g ; 1 . 7 6 m o l ) をこの混合物に添加し、そして攪拌を室温にて 1 5 分間続けた。このフラスコを、ドライアイスを含む浴の中に入れ、そして均質な懸濁物が形成されるまで、攪拌を 2 0 分間続けた。

**【 0 2 0 3 】**

新鮮に希釈されたトリ - n - ブチルアミン ( 6 2 6 . 5 g ; 3 . 3 8 m o l ) を、この反応混合物に激しく攪拌しながら、フラスコの内側の温度が約 0 ° に保たれるようにして滴下した ( 約 9 0 分間 ) 。浴を除去し、そして攪拌を室温にて 6 時間続けた。この溶液を、この混合物のいくつかの部分を用いてロータリーエバポレーターでエバポレートすることによって約 2 . 8 4 L になるまで濃縮し、そしてこの混合物をアルゴン化でシールし、そして - 2 0 ° で保存した。この生成物は、リン NMR によって 8 5 % 純粋であり、約 0 . 5 M のフェニルメトキシアラニニルホスホクロリデートという評価濃度を与えた。

**【 0 2 0 4 】**

( 実施例 1 5 )

( 5 - ( 2 - プロモビニル ) - 2 ' - デオキシウリジンフェニルN - メトキシ - L - アラニニルホスホルアミデート ( NB 1 0 1 1 ) )

この反応を、アルゴン雰囲気で行った。5 - ( 2 - プロモビニル ) - 2 ' - デオキシウリジン ( B V d U ) ( 2 0 4 g ; 6 1 2 m m o l ) を、機械式スターを備えた 3 首 3 L 丸底フラスコ中に入れた。このフラスコを、氷水浴中に入れ、そして滴下漏斗を用いて 1 5 分間かけて、反応混合物を激しく混合しながら 1 6 0 0 m L ( 約 8 0 0 m m o l ) のフェニルメトキシアラニニルホスホクロリデート試薬を添加し、続いてシリンジを用いて 1 0 0 m L の N - メチルイミダゾールを 5 分間かけて添加した。5 分後、この混合物は透明になり、そして 1 0 分後、氷水浴を除去して混合物を、攪拌を続けながら室温まで温めた。この反応を、逆相 H P L C によってモニタリングし、そして 3 時間で完了した。この反応を 1 0 0 m L のメタノールの添加によってクエンチングし、そしてこの混合物をオイルになるまでエバポレートし、6 L のジクロロメタンに再度溶解し、そして 8 0 0 g のシリカゲルに通した。B V d U - P A の主な部分を本明細書中で NB 1 0 1 1 といい、これを、ローディングの間にカラムに通し、そして最終的に NB 1 0 1 1 の溶出を、ジクロロメタン中の 5 L の 5 % メタノールに通すことによって完了した。NB 1 0 1 1 を含む全ての画分を合わせ、そしてオイルになるまでエバポレートし、残渣を 4 L の酢酸エチルに溶解し、そして混合物を水 ( 2 L で 2 回 ) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして酢酸エチル ( 3 0 0 m L で 3 回 ) で洗浄した。合わせた濾液および洗浄液をエバポレートして、淡く着色した白色泡状物を得た ; 総重量約 5 4 0 g 。

**【 0 2 0 5 】**

粗生成物を、それぞれ溶離液として、C H <sub>2</sub> C l <sub>2</sub> 中の 0 % ~ 5 % の M e O H および C H <sub>2</sub> C l <sub>2</sub> 中の 1 0 % M e O H を用いた 2 回のシリカゲルクロマトグラフィーによって精製した。生成物の収量は ( > 9 8 % 純度 ) は 6 4 g であった。

**【 0 2 0 6 】**

( 実施例 1 6 )

実施例 15 に記載される方法を用いて、以下のヌクレオシドのフェニル N - メトキシ - L - アラニルホスホルアミデートを調製した：

- 1 . 5 - ( 4 , 4 - ジブromo - 1 , 3 - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 2 . 5 - ( 2 - クロロビニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 3 . 5 - トリフルオロメチル - 2 ' - デオキシウリジン、
- 4 . 5 - ( 4 - カルベトキシ - 1 , 3 - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 5 . 5 - ( 4 - カルボメトキシ - 1 , 3 - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 6 . 5 - ( 4 - ブロモ - 1 E , 3 E - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 7 . 5 - ( 4 - ブロモ - 1 E , 3 Z - ブタジエニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 8 . 5 - ( トリメチルシリルエチニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 9 . 5 - ( エチニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 10 . 5 - ( 1 - デシニル ) - 2 ' - デオキシウリジン、
- 11 . 3 - ( 2 ' - デオキシ - D - リボフラノシル ) - 2 , 3 - ジヒドロフロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 - オン、
- 12 . 3 - ( 2 ' - デオキシ - D - リボフラノシル ) - 6 - オクチル - 2 , 3 - ジヒドロフロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジン - 2 - オン。

10

【 0 2 0 7 】

( 誘導体 )

本明細書中に記載される上記の化合物の塩、エステルおよびエーテルもまた、本発明の範囲内にある。本発明のプロドラッグの塩は、無機または有機の酸および塩基から誘導され得る。酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール ( glycollic ) 酸、乳酸、サリチル酸 ( salicylic )、コハク酸、トルエン - p - スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸およびベンゼンスルホン酸が挙げられる。他の酸 (例えば、シュウ酸) は、それら自体は薬学的に受容可能ではないが、本発明の化合物およびそれらの薬学的に受容可能な酸付加塩を得る際に中間体として有用な塩の調製において用いられ得る。塩基の例としては、アルカリ金属 (例えば、ナトリウム) 水酸化物、アルカリ土類金属 (例えば、マグネシウム) 水酸化物、アンモニア、および式  $NW_4^+$  の化合物 (ここで、W は  $C_{1-4}$  アルキルである) が挙げられる。

20

30

【 0 2 0 8 】

塩の例としては、以下が挙げられる：酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩 ( diglucuronate )、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩 ( flucoheptanoate )、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモエート ( palmoate )、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバレート ( pivallate )、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシレート ( tosylate ) およびウンデカン酸塩。塩の他の例としては、適切なカチオン (例えば、 $Na^+$ 、 $NH_4^+$  および  $NW_4^+$  (ここで、W は  $C_{1-4}$  アルキル基である) ) と化合した本発明の化合物のアニオンが挙げられる。

40

【 0 2 0 9 】

治療用途のためには、本発明の化合物の塩は、薬学的に受容可能である。しかし、薬学的に受容可能でない、酸と塩基との塩もまた、例えば、薬学的に受容可能な化合物の調製または精製において用途を見出し得る。

【 0 2 1 0 】

本発明の方法によって同定されたプロドラッグまたは化合物のエステルとしては、2'

50

-、3'-および/または5'-ヒドロキシ基のエステル化によって得られたカルボン酸エステル(すなわち、-O-C(=O)R)が挙げられ、ここで、Rは、以下から選択される：(1)直鎖または分枝鎖のアルキル(例えば、n-プロピル、t-ブチル、またはn-ブチル)、アルコキシアリル(例えば、メトキシメチル)、アラキル(例えば、ベンジル)、アリーロキシアリル(例えば、フェノキシメチル)、アリール(例えば、ハロゲン、C<sub>1-4</sub>アルキルまたはC<sub>1-4</sub>アルコキシまたはアミノによって必要に応じて置換されたフェニル)；(2)スルホン酸エステル(例えば、アルキルスルホニル(例えば、メタンスルホニル)またはアラキルスルホニル)；(3)アミノ酸エステル(例えば、L-バリンまたはL-イソロイシル)；(4)ホスホン酸エステルならびに(5)モノ-、ジ-またはトリリン酸エステル。リン酸エステルは、例えば、C<sub>1-20</sub>アルコールもしくはそれらの反応性誘導体によって、または2,3-ジ-(C<sub>6-24</sub>)アシルグリセロールによってさらにエステル化され得る。このようなエステルにおいて、他に指定しない限り、存在する任意のアルキル部分は、1個~18個の炭素原子、特に1個~6個の炭素原子、より具体的には1個~4個の炭素原子を有利に含む。このようなエステル中に存在する任意のシクロアルキル部分は、3個~6個の炭素原子を有利に含む。このようなエステル中に有利に存在する任意のアリール部分は、フェニル基を含む。本発明のリキソ(lyxo)-フラノシルプロドラッグ誘導体の例としては例えば、化学的に保護されたヒドロキシ基(例えば、O-アセチル基で)を有するもの、例えば、2'-O-アセチル-リキソ-フラノシル；3'-O-アセチル-リキソ-フラノシル；5'-O-アセチル-リキソ-フラノシル；2',3'-ジ-O-アセチル-リキソ-フラノシルおよび2',3',5'-トリ-O-アセチル-リキソ-フラノシルが挙げられる。

10

20

【0211】

本発明の化合物のエーテルとしては、メチルエーテル、エチルエーテル、プロピルエーテル、ブチルエーテル、イソブチルエーテル、およびsec-ブチルエーテルが挙げられる。

【0212】

さらなる実施形態では、基質は、ピリミジンにも葉酸塩にも化学的に関連していなくてもよいが、むしろ、合理的薬物設計の公知のパラメーターに基づいて合成される。Dunn, W. J.ら(1996)を参照のこと。

【0213】

(例えば、反応生成物が、dUMPのプロモビニル誘導体の代謝拮抗物質である場合)生成物についての化学的アッセイは、以下に提供される実施例に、またはBarr, P. J.ら(1983)によって記載される。

30

【0214】

(細胞におけるヌクレオシドおよびリン酸塩の量についてのアッセイ)

このアッセイを化合物NB1011を用いて行った。しかし、以下の方法が、本発明のプロドラッグを用いた適用または使用のために、容易に変更されることが当業者に理解される。

【0215】

10% FCSおよび抗生物質を補充したRPMI培地中の細胞株MCF7(乳癌細胞株)；MCF7TDX(Tomodex耐性乳癌細胞株)およびH630R10(S. Copur博士、Yale Universityより得た5-FU耐性結腸癌細胞株(Copur, S.ら(1995)を参照のこと)を、皿あたり750,000細胞の量で、100mmのペトリ皿にプレティングし、そして37で一晩インキュベートした。100μMのBVdUを各皿に添加し、そして細胞を2日間37で増殖させ続けた。その後、培地を吸引し、そして細胞を2度リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で洗浄した。次いで、皿あたり1mlのPBSを添加し、そして皿を-80のフリーザーに置いた。細胞を凍結/解凍手順を2度繰り返すことによって破壊した。生じる懸濁液中の細胞細片をスピンドウンし(13,000rpm、10分間)、そして上清を、20で、Sorvall Super T21遠心分離機(Rotor SL-50-T、1,912g)

40

50

で、5,000 rpm、30分間の遠心分離によって、Centrifugal Filter Device (Centrifree、30,000カットオフ、Amicon) を通すことによって脱タンパク質した。通過物を100 µlの容量まで濃縮し、そしてHPLCカラム (Adsorbosphere HS, C18, 5 µm, 4.6 mm × 150 mm, Alltech) に注入した。サンプルを、トリフルオロ酢酸を含む水中のアセトニトリル勾配を使用して分析した。BvdU - 誘導体の吸収の最大である300 nmでピークを検出し、そして化合物の量は、300 nmでのピーク面積として表現された。化合物の同定を、それらの保持時間およびスペクトルの、信頼できる標準のものとの比較によって行った。

## 【0216】

(アラマープルー細胞増殖アッセイ)

このアッセイを、化合物NB1011および本発明のプロドラッグを用いて行った。指数関数的に増殖する細胞を、384ウェルの平底組織培養プレートに移した。全ての細胞型を、ウェルあたり500細胞の密度(25 µLの完全培地(RPMI 1640 + 10%胎児ウシ血清 + 抗生物質/抗真菌剤)中)で、プレートした。24時間後(0日目)に、 $10^{-3} \sim 10^{-10}$  Mの用量範囲にわたる化合物を含む25 µLの完全培地を、3連で添加した。薬剤曝露時間は120時間(5日)であり、その後、増殖阻害をアッセイした。5 µLのレドックス指示薬である、アラマープルーを、各ウェルに添加した(10% v/v)。37 °Cでの4時間のインキュベーション後、蛍光を、535 nmの励起および595 nmの発光でモニタリングした。

## 【0217】

(クリスタルバイオレット細胞増殖阻害アッセイ)

このアッセイを化合物NB1011および本発明のプロドラッグを用いて行った。試験化合物の細胞の増殖をブロックする能力を、クリスタルバイオレット手順により決定した。(Sugarman, B. J. ら(1985); およびAntelman, D. ら(1995))。

## 【0218】

化合物を、1 Mの濃度までジメチルスルホキシドに溶解した。それらをさらに、必要な場合、DMEEM細胞培養培地中に希釈し、続いて96ウェルマイクロタイタープレートの第1ウェルに希釈した。各濃度を標的細胞株について3連で試験した。1 µM ~ 3000 µMの化合物濃度を試験した。細胞を、化合物と共に、72時間インキュベートし、プレートを洗浄し、そして細胞をメタノールを用いて固定し、そしてクリスタルバイオレットで染色した(Sugarman, B. J. ら(1985); およびAntelman, D. ら(1995)に記載のように)。

## 【0219】

(細胞株におけるTKおよびTSレベルのウェスタンブロット分析)

ウェスタンブロット実験を、ヒト正常結腸上皮細胞型CCD18co(ATCC, Manassas, VAより入手)、5-FUに対して耐性である結腸腺癌細胞株H630R10(S. Copur博士, Yale Universityより入手, Copur, S. ら(1995)を参照のこと)、およびHER2をトランスフェクトされた乳癌細胞株(Pegram, M. D. ら(1997))を使用して行った。細胞をRIPA緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS および0.5%デオキシコール酸、ナトリウム塩およびプロテアーゼインヒビター)に溶解した。タンパク質濃度を、BCA-200タンパク質アッセイキット(Pierce, Rockford, ILより入手)を使用して決定した。各細胞株由来の10 µgのタンパク質を、12% SDS-PAGEによって分離した。分離されたタンパク質を、PVDFメンブレン(Amersham, Englandより入手)に移し、ヒトチミジル酸シンターゼモノクローナル1次抗体および抗チューブリンモノクローナル抗体(NeoMarkers, Fremont, CAより製造)を用いてイムノブロットを続けた。西洋ワサビペルオキシダーゼに連結したヒツジ抗マウスIgを2

10

20

30

40

50

次抗体として使用した (Amersham)。ECL plus kit (Amersham) を免疫反応性の検出のために使用した。チミジル酸シターゼに対応するバンドを画像分析 (Molecular Dynamics Storm) によって定量し、そしてチュープリンのバンドに対して正規化した。

#### 【0220】

(細胞株におけるTS mRNAのRT-PCR分析)

異なる細胞株におけるヒトチミジル酸シターゼ転写物の発現レベルをRT-PCRを使用して定量した。ヒトチミジル酸シターゼおよびβ-アクチンの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、以下のように設計した：チミジル酸シターゼセンスプライマー (配列番号1) 5' - GGGCAGATCCAACACATCC - 3' (チミジル酸シターゼcDNA配列 (Genbank登録番号X02308) の塩基208~226に対応する)、アンチセンスプライマー (配列番号2) 5' - GGTCAACTCCCTGTCCTGAA - 3' (塩基564~583に対応する)、β-アクチンセンスプライマー (配列番号3) 5' - GCCAACACAGTGCTGTCTG - 3' (β-アクチン遺伝子配列 (Genbank登録番号M10277) の塩基2643~2661に対応する) およびアンチセンスプライマー (配列番号4) 5' - CTCCTGCTTGCTGATCCAC - 3' (塩基2937~2955に対応する)。

10

#### 【0221】

総RNAを、Rneasy mini kit (Qiagen, Valencia, CAより入手) を使用して、細胞から単離した。あらゆるDNAのコンタミネーションをモニタリングするために、β-アクチンの増幅のためのプライマーを、エキソン4/イントロン5/エキソン5接合点にわたるように設計した。ゲノムDNA鋳型は、313bpのβ-アクチンフラグメントを生じ、そしてcDNA鋳型は、210bp産物を生成する。

20

#### 【0222】

逆転写反応をSuperScript preamplification system (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) を使用して行った。製造者のプロトコルに従い、3μgの総RNAを、20μlの容量の緩衝液にアプライし、逆転写反応を行った。

#### 【0223】

PCR反応を、逆転写反応からの3μlのcDNA混合物、3mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、20mM Tris-Cl、pH8.4、0.2mMの各dNTP、0.4TMのチミジル酸シターゼセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、ならびに3ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Promega, Madison, WIより入手) を含む48μlの容量で行った。反応混合物を94℃で3分間インキュベートし、以下の10サイクルを続けた：94℃で1分間のインキュベーション、58℃で1分間のインキュベーション、次いで72℃で1分間のインキュベーション。10サイクル後、2μl中のヒトβ-アクチンプライマーを、0.2μMの最終濃度となるように添加し、最終反応容量を50μlにした。PCR反応を合計28サイクル続け、続いて72℃で7分間インキュベーションした。

30

#### 【0224】

5μlのPCR産物を、2%アガロースゲルの電気泳動によって分離し、続いてSYBR Gold核酸ゲル染色 (Molecular Probes, Eugene, Oreより入手) を用いた染色をした。チミジル酸シターゼに対応するDNAのバンドをMolecular Dynamics Stormによって定量し、そしてβ-アクチンのバンドに対して正規化した。

40

#### 【0225】

(ノーザンプロット分析)

ノーザンプロットをInvitrogen (Carlsbad, CA) より入手し、そしてクローン化TS cDNAプローブにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションシグナルは、ハウスキーピング転写物としてのリボソームタンパク質S9に対して正規

50

化した。正規化シグナルが少なくとも2倍に増強された（正常組織コントロールと比較して）場合、腫瘍はTS mRNAを過剰発現したと考えられた。

【0226】

（ヒトチミジル酸シターゼのクローニング、発現および精製）

E. coliにおける発現のために、完全ヒトTS ORFを、T7プロモーター発現ベクターpET28a (Novagen, Inc.)にサブクローニングした。生じるプラスミドベクターは、6つのヒスチジン、続いてトロンピン切断部位を有する組換え融合タンパク質としてのヒトTSの合成をコードする。この融合タンパク質は、合計20のさらなるアミノ酸を、ヒトTSのアミノ末端に添加する。組換えタンパク質を生成するために、ヒトTS発現ベクターを、E. coli株BL21 (DE3) (lacオペレーターの制御下で染色体に挿入されたT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を有する株)に導入した。

10

【0227】

ヒトTS-ポリ-His融合タンパク質を、金属キレート化アフィニティー樹脂 (Novagen, Inc.)を使用して精製した。タンパク質を精製し、その後10% SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。タンパク質濃度を、Pierce BCAタンパク質アッセイを使用して決定した。約10mgのヒトTS融合タンパク質をE. coliの500ml培養から回収した。銀染色で可視化した場合、ヒトTSに対応するバンドのみが明確であった。ヒトTSバンドの同定を、抗TSモノクローナル抗体TS106 (NeoMarkers)を用いて、ウエスタンブロットを行うことによって確認した。

20

【0228】

（チミジル酸シターゼ (TS) 酵素活性アッセイ）

TS活性を、Wahbala, (1961)の分光光度アッセイを使用して測定した。このアッセイにおいて、TS活性を、dUTPがdTTPに転換される際に、補因子5、10メチレントラヒドロ葉酸が、ジヒドロ葉酸に酸化される場合に生じる、340nmの吸光度における増加を測定することによってモニタリングする。この方法によって調製された酵素は、0.5~0.65ユニット/mgタンパク質の比活性を有する。1ユニットは、1分あたり1μモルのdTMPの生成として定義される。この値は、Pedersen-Lane, J.ら(1997)によって報告された値と類似である。

30

【0229】

（TSプロドラッグ代謝の細胞内産物の決定）

活性化および作用の提案された機構を実証して、そして候補治療剤である薬剤を規定するために、TSプロドラッグ代謝の細胞内産物を決定することが重要である。アリアルホスホジエステルアミデートの細胞内代謝の受け入れられる観点の1つは、カルボン酸への酵素的変換（ホスホモノエステルアミデートの5'-モノホスホリルヌクレオシドへの分子内再整列）を含む。Valletteら(1996)を参照のこと。しかし、この機構は、全てのホスホアミデートに基づくプロヌクレオチドの細胞内プロセッシングを描写する可能性は低い。例えば、異なる機構が、アリアルホスホモノエステルアミデートプロセッシングについて提唱されており、この1つは、ホスホアミデート加水分解物による1リン酸塩種へのホスホアミデートの単なる直接変換を含む。McInteeら(1997)およびFriesら(1995)を参照のこと。1リン酸ヌクレオシドをマスクしないための機構にかかわらず、このアッセイは、細胞内での、細胞内1リン酸塩の細胞傷害性化合物へのTS変換の産物を検出する。

40

【0230】

高いTS発現細胞株の50%増殖阻害を誘導する量のプロドラッグ化合物とともに細胞をインキュベートする（前出の72Hアッセイにおいて）。低TS発現細胞および高TS発現細胞の両方を用いる（例えば、CCD18co 対 H630R10）。経時的研究を実施し、ここで処理した細胞を、McIntee, E. J.ら(1997)に記載の方法に従って処理する。細胞を60%メタノール含有の水で、-20で溶解し、そして遠心分離によって粒子状残渣を除去する。上清を乾燥し、そして-20で貯蔵する。この

50

アリコートを、最初に RP - HPLC により評価し、次いで、LC - MS により 1 リン酸塩へのホスホルアミデートの細胞内変換を実証し、そしてまたチミジル酸シターゼによる 1 リン酸塩の変換を確認する。

【 0 2 3 1 】

( 精製したチミジル酸シターゼを利用する基質活性の実証 )

このアッセイは、将来の TS 酵素調製物の比活性を決定し、このような調製物の経時的な活性を保証し、そして適切な活性についてスクリーニングされた化合物がインビトロ反応条件下で TS 酵素を不活化するか否かを決定する。

【 0 2 3 2 】

プロドラッグ化合物が精製された組換え TS 酵素とともにインキュベートされる場合、どの反応産物が産生されるかを決定するために、TS 活性アッセイで使用された条件と同様の反応条件を用いて、インビトロで反応産物を生成する。次いで、これらの反応産物を GC - 質量分析法で分析し、形成された実際の分子を同定する。

10

【 0 2 3 3 】

( 結果 )

( TS は、いくつかの腫瘍細胞株および原発性腫瘍で高度に発現される )

正常なヒトの脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、小腸、胃の筋肉、精巣、卵巣、子宮、前立腺、甲状腺、唾液腺、副腎、皮膚、末梢血リンパ球、骨髄における、そしてヒト結腸および適合するヒト正常組織由来の、チミジル酸シターゼ発現レベルを、上記のように、定量的 RT - PCR を用いて決定した。アクチンのためのプライマーを、エキソン 4 / イントロン 5 / エキソン 5 接合部にわたるように設計し、可能性のある DNA 混入についてモニターした。従って、図 3 に報告された結果は、相対的 TS mRNA レベルとして示される。図 3 A は、複数の正常ヒト組織における相対的 TS mRNA を示す。図 3 B は、正常ヒト結腸組織と腫瘍ヒト結腸組織との間の平均 TS mRNA の比較である。

20

【 0 2 3 4 】

種々の培養正常細胞株および腫瘍細胞株におけるチミジル酸シターゼ ( TS ) タンパク質レベルを、上記の手順に従って決定した。タンパク質レベルをウエスタンブロット分析により測定した ; 結果を以下に示す。

【 0 2 3 5 】

【 表 3 】

30

表 3.

ヒトの正常細胞および腫瘍細胞型におけるTSタンパク質レベル

細胞株	詳細	TSレベル <sup>1</sup>
NHOST	骨、骨芽細胞	51
NPRSC	前立腺、間質	98
CCD18co	結腸上皮、線維芽細胞	100
W138	肺、胚性	150
DET551	皮膚、線維芽細胞様、胚性	177
MRC9	肺、線維芽細胞様、胚性	211
NHDF	皮膚、線維芽細胞様	224
NHLF	肺、線維芽細胞様	236
平均		156 ± 24 <sup>2</sup>

10

<sup>1</sup>. チミジル酸シンターゼ (TS) - TSレベルを、ウエスタンブロット分析を用いて決定した。定量した発現レベルを、細胞株 CCD18co の値に対する値として表した。

20

<sup>2</sup>. 標準誤差

腫瘍細胞 (≥ 4 X TS)

細胞株	詳細	TSレベル <sup>1</sup>
H630/TDX	結腸、癌腫、TDX <sup>2</sup> 耐性	671
HCTC (+)	結腸、癌腫、TS増大	1276
MCF7/TDX	乳房、腺癌、TDX <sup>2</sup> 耐性	1980
H630R10	結腸、癌腫、5-FU <sup>3</sup> 耐性	2305
平均		1558 ± 354 <sup>4</sup>

30

<sup>1</sup>. チミジル酸シンターゼ (TS) - TSレベルを、ウエスタンブロット分析を用いて決定した。定量した発現レベルを、細胞株 CCD18co の値に対する値として表した。

<sup>2</sup>. Tomudex

<sup>3</sup>. 5-フルオロウラシル

<sup>4</sup>. 標準誤差

(細胞中で測定したBVdUMPおよびBVdUの量)

細胞株 MCF7、MCF7TDX および H630R10 (それぞれ、BVdU で処理) の溶解物中に存在する BVdUMP または BVdU の量を、300nm での対応する HPLC のピークの面積として示す。300nm でのこれらの化合物の減衰係数は同じであり、従って、ピーク面積の比較により、形成された量の直接比較が可能になることに注意のこと。

40

【0236】

以下の表 4 は、2 日間の処理後、細胞の内側で測定された BVdUMP および BVdU のレベルを示す。細胞を 100 μm の BVdU とともに完全培地中でインキュベートした。溶解液を調製し、そして BVdUMP および BVdU のレベルを決定した。

【0237】

【表 4】

表4

細胞株	BVdUMP	BVdU	$BVdUMP / (BVdUMP + BVdU) \times 100$
MCF7	63.7	90.8	44.2
MCF7TDX	10.9	39.0	21.2
H630R10	<1	26.3	<4

この表は、BVdUTDXが、3つ全ての細胞型に浸透し得るが、MCF7およびMCF7TDX細胞株においては、BVdUMPが最も顕著であるように示す。H630R10細胞株では、わずかな変換しか生じていない。

## 【0238】

別の実験では、MCF7およびH630R10細胞の溶解液を用いて、リン酸ドナー法として、ATPを添加した無細胞系において、BVdUリン酸化反応を触媒した。これにより、H630R10細胞溶解液に比較して、MCF7TDX細胞溶解液におけるこの反応のかなり高い速度が確認された。Look, K. Y. ら(1997)に記載のように調製した腫瘍溶解液を調製し、そしてBVdU(または他の候補ヌクレオシド)とともにこのアッセイで用いて、所定の患者がヌクレオシド対ホスホルアミデート治療についての候補であるか否かを決定し得る。

## 【0239】

これらの結果は、MCF7TDX細胞において、BVdUがリン酸化され得、対応する1リン酸塩(引き続くTS反応のための基質)を生じ得るが、一方H630R10細胞では、このようなリン酸化は、MCF7TDXよりも有意に遅く進行することを示す。MCF7TDXが乳房腫瘍細胞株であると述べることは重要である。乳房腫瘍細胞において、他の組織由来のヒトTKと異なる特性を有するTKが見出されたことが報告されている(Madec, Aら(1988))。このTKは、BVdUリン酸化の原因であり得る。上記に示された結果に基づいて、BVdUのようなヌクレオシドが、BVdUがリン酸化され得る、特定の型の癌(乳癌を含む)の処置に特に有用であり得ることが期待される。さらに、上記の実験手順により、以下のアプローチを用いる、所定の癌型のための、BVdUまたは他のヌクレオシドを用いることの実施可能性のインビトロ決定が可能になる。組織サンプルが利用可能な場合、細胞は、BVdUを用いてインビトロで処理され得、そしてBVdUMPの可能性のある形成がモニターされ得る。BVdUMP形成が記録されれば、この腫瘍型は、ホスホルアミデート誘導体に対抗するような首尾良いヌクレオシド処置のための候補として考慮されなければならない。

## 【0240】

## 【表5】

10

20

30

表5.  
正常細胞および腫瘍細胞のAlamar Blue細胞傷害アッセイ

	MCF7DX	IC50 (μM)		平均値 (腫瘍)	IC50 (μM)		平均値 (正常)
		H630R10	HT1080		CCd18co	Det551	
NB1011	2	82	182	88.7	414	398	406
BVDU	0.02	201	719	306.7	1000	ND	1000
NB1012	127	82	-	104.5	ND	110	110
NB1013	26	92	ND	59.0	ND	570	570
NB1020	0.48	326	1000	442.2	1000	ND	1000
NB1014	396	287	ND	341.5	ND	239	239
NB1016	877	337	ND	607.0	ND	338	338
NB1021	637	141	1000	592.7	1000	ND	1000
NB1017	55	52	ND	53.5	ND	137	137
NB1024	4	14	258	92.0	1000	ND	1000
NB1018	115	164	ND	139.5	ND	412	412
NB1022	8	0.03	3	3.7	9	ND	9
NB1019	251	95	ND	173.0	ND	ND	-
NB1023	5	0.11	2	2.4	11	ND	11
NB1026	1000	1000	1000	1000.0	1000	ND	1000
NB1025	49	192	454	231.7	378	ND	378

【 0 2 4 1 】

【表6】

表6.  
正常細胞および腫瘍細胞のクリスタルバイオレット(Crystal Violet)アッセイ

	IC50 (μM)		平均値 (腫瘍)	IC50 (μM)		平均値 (正常)
	H630R10	HT1080 #12		CCD18co	Det551	
NB1011	130	1.2	65.6	408	356	382
BVDU	405	7	206.0	1000	625	812.5
NB1017	111	17	64.0	206	253	229.5
NB1024	92	3.3	47.7	784	460	622
NB1018	248	20	134.0	254	431	342.5
NB1022	3.8	0.3	2.1	0.7	3.6	2.15
NB1019	220	24	122.0	162	824	493
NB1023	2.7	0.2	1.5	0.9	3.3	2.1

表5および6における番号付けは、下に示す構造をいう。アラマーブルー(Alamar Blue)アッセイを用いた試験の結果は、表5に示し、そしてクリスタルバイオレット(crystal violet)に基づくアッセイの結果は、表6に示す。MCF7-TDXを、Tomudex(TSの直接のインヒビター)の存在下で、細胞培養中の選択を介してMCF7乳房腫瘍細胞から誘導した。このような選択は、しばしばTSの高い細胞内レベルを生じる(Freemantle, S. J.ら(1995))。同様に、H6

10

20

30

40

50

30R10は、H630結腸癌細胞から誘導された、5FU（フルオロピリミジン）耐性の結腸癌上皮細胞株である。Copur, Sら（1995）を参照のこと。HT1080、#12は、HT1080腫瘍細胞へ導入された導入遺伝子を介して高レベルのTSを発現する線維肉腫腫瘍細胞株である。これらのアッセイにおいて用いられる正常な細胞株としては、CCD18co（正常結腸上皮）およびDet551（正常皮膚）が挙げられる。

【0242】

表5および6の両方のデータは、ほとんどの化合物がホスホルアミデートおよびヌクレオシドとして活性であることを示す。例外の1つはNB1026<sup>TM</sup>であり、これは、ホスホルアミデートとしての検出可能な活性はほとんど有さないが、ヌクレオシド（NB1025<sup>TM</sup>）として活性である。この結果は、NB1026<sup>TM</sup>がNB1011<sup>TM</sup>と同様には活性化され得ないことを示す。ヌクレオシド、特にBVdU、NB1020<sup>TM</sup>（ClVdU）およびNB1024<sup>TM</sup>での細胞傷害性の結果は、驚くべきである。なぜなら、この文献は、BVdUのような5-置換化合物は、それらがウイルス性チミジンキナーゼを発現しない限り、ヒト細胞によって効率的にリン酸化されないことを教示するからである。Balzarini, Jら（1985）およびDe Clerq, Eら（1997）を参照のこと。これらの著者は、ヘルペスウイルスがコードするTKにより一旦リン酸化されれば、5-置換ヌクレオチド誘導体がTS酵素に結合して、それを不活性化し得ることを提示している。表4～6の結果は、少なくともいくつかの腫瘍細胞が、BVdUと類似の、5-置換ウリジン分子、および本明細書に示される他のヌクレオシドをリン酸化し得る、異常なチミジンキナーゼ活性を有し得ることを初めて実証する。あるいは、いくつかの腫瘍細胞は、異常に大量の、または正常型のTK酵素を有し得（Suki, Sら（1995）；およびRomain, Sら（1995））、このことは、それに対応するリン酸塩に対して、低い十分なヌクレオシド活性化を導く。

【0243】

上記で試験した化合物NB1024<sup>TM</sup>は、以下の2つの異性体の混合物から構成される：5-（4-プロモ-1E, 3E-ブタジエニル）-2'-デオキシウリジン（VIAa）（異性体2）、および5-（4-プロモ-1E, 3Z-ブタジエニル）-2'-デオキシウリジン（VIBb）（異性体1）。これらの2つの化合物を、上記（実施例12）のように、移動相として20%アセトニトリル含有水を用いてセミ-プレパラータイプHPLC（逆相C18カラム）により分離した。次いで、それぞれの単離された化合物が細胞増殖をブロックする能力を、クリスタルバイオレット手順により決定した。結果を表7に示す。2つの異性体はZ異性体と顕著に異なる活性を示し、このことは、E異性体と比較して活性を阻害する有意に大きい増殖を示す。

【0244】

【表7】

表7. NB1024異性体の細胞傷害活性

	TS HT1080 #12	MCF7TDX	CCD18co	Det551
NB1011	4.3	4.2	461	263
BVdU	ND	<0.8	>1000	>1000
NB1024混合物	10.7	6.4	>300	>300
NB1024異性体1	10.1	9.8	>300	>300
NB1024異性体2	>300	>300	>300	>300

最初の2つの細胞株、TS HT1080 #12およびMCF7TDXは、高レベルのTSを発現するが、他の2つ、CCD18coおよびDet551は、正常細胞である。

【0245】

本発明は、詳細にかつその特定の実施形態を参照して記載されてきたが、種々の変更お

よび改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、そこでなされ得ることが当業者には明白である。

【 0 2 4 6 】

( 参考文献 )

【 0 2 4 7 】

【 表 8 】

文献

- Abraham et al. (1996) *J. Med. Chem.* 39: 4569-4575
- Akdas, A. et al. (1996) *Eur. Urol.* 29(4):483-486 10
- Almasan, A. et al. (1995a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5436-5440
- Almasan, A. et al. (1995b) *Cancer Metastases Rev.* 14:59-73
- Antelman, D. et al. (1995) *Oncogene* 10:697
- Asakura, J. et al. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:2855-2858
- Asakura, J. et al. (1990) *J. Org. Chem.* 55:4928-4933
- Aschele, C. et al. (1999) *J. Chem. Oncol.* 17(6):1760-1770
- Balzarini, J. et al. (1985) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 7:19-28
- Balzarini, J. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7295-7299 20
- Banerjee, D. et al. (1995) *Acta Biochem Pol.* 42:457
- Banerjee, D. et al. (1998) *Cancer Res.* 58:4292-4296
- Barbour, K.W. et al. (1992) *Molec. Pharmacol.* 42:242-248
- Barbato, et al. (1989) *Nucleosides Nucleotides* 8(4):515-528
- Barr and Robins (1981) *J. Med. Chem.* 24(12):1385-1388
- Barr, P.J. et al. (1983) *Biochemistry* 22:1696-1703
- Barrett, J.E. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120:449-450 30
- Benzaria et al. (1996) *J. Med. Chem.* 39: 4958
- Bergstrom, D.E. et al. ((1981) & (1984) *J. Med. Chem.* 27:279-284
- Bertino, J.R. et al. (1996) *Stem Cells* 14:5
- Bigge, et al (1980) *J. Amer. Chem. Soc.* 102:2033-2038
- Callahan, A.P. et al. (1989) *Comm. Nucl. Med.* 20:3-6
- Carreras and Santi (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64:721-762
- Carter, P. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289
- Chadhuri, N.C. et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:10434-10442 40
- Chen, L. et al. (1996) *Cancer Res.* 56:1331-1340
- Cho, Y.M. et al. (1994) *Tetrahedron Lett.* 25:1149-1152
- Clarke, R. (1996) *Breast Cancer Res. Treat.* 39:1-6

(表-2のつぎ)

- Cobleigh, M.A. et al. (1999) *J. Clin. Oncol.* 17(9):2639-2648
- Connors, T.A. and Knox, R.J. (1995) *Stem Cells* 13:501-511
- Copur, S. et al. (1995) *Biochem. Pharm.* 49(10):1419-1426
- Crisp, G.T. (1989) *Synth. Commun.* 19:2117-2123
- Cruickshank, K.A. et al. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:5221-5224
- Dale, et al. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2238-2242
- DeClercq, E. et al. (1983) *J. Med. Chem.* 26:661-666
- DeClercq, E. et al. (1997) *Clin. Micro. Review* 10(4):674-693 10
- Dicken, A.P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11797-11801
- Dirven, H.A. et al. (1995) *Cancer Res.* 55:1701-1706
- Dorr, R.T. and Von Hoff, D.D., eds. (1994) "Cancer Chemotherapy Handbook" 2nd ed.  
(Appleton and Lange), pp. 768-773
- Dyer, R.L. et al. (1991) *Nucl. Acids Chem.* 4:79-83
- Edler, D. et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6(2):488-492
- Fan, J. and Bertino, J. (1987) *Oncogene* 14:1191-1200
- Farquhar et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:3902-3909 20
- Farquhar, J. et al. (1995) *J. Med. Chem.* 38:488-495
- Freed, et al. (1989) *Biochem. Pharmacol.* 38:3193-3198
- Freemantle, S.J. et al. (1995) *Br. J. Cancer* 71:925-930
- Fries, K.M., et al. (1995) *J. Med. Chem.* 38:2672-2680
- Funk, J.O. (1999) *Anticancer Res.* 19(6A):4772-4780
- Goodwin, J.T. et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34:5549-5552
- Gottesman, M.M. et al. (1995) *Annu. Rev. Genet.* 29:607
- Graham, D. et al. (1998) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1:1131-1138
- Haskell, C.M. ed., (1995) *Cancer Treatment* 4th Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA 30
- Hobbs, F.W. Jr. (1989) *J. Org. Chem.* 54:3420-3422
- Holy, et al. (1999) *J. Med. Chem.* 42(12):2064-2086
- Hostetler, et al. (1997) *Biochem. Pharmacol.* 53:1815
- Houze, T.A. (1997) *Tumour Biol.* 18:53-68
- Hsiao and Bardos (1981) *J. Med. Chem.* 24:887-889
- Hudziak, R.M. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5102
- Husain, et al. (1994) *Cancer Res.* 54:539 40

(参考文献)

- Jackman, A.L. et al. (1995a) *Ann. Oncol.* 6(9):871-881
- Jackman, A.L. et al. (1995b) *Anticancer Drug Des.* 10:573
- Johnson, P.G. et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1923-1931
- Jones, R.G. and Mann, M.J. (1953) *J. Am. Cancer Soc.* 75: 4048-4052
- Kashani-Sabet et al. (1988) *Cancer Res.* 48:5775-5778
- Kobayashi, H. et al. (1995) *Japan. J. Cancer Res.* 86:1014-1018
- Krajewskas and Snugar (1982) *Biochem. Pharmacol.* 31(6):1097-1102
- Lasic, D.D. (1996) *Nature* 380:561-562 10
- Lee, V. et al. (1997) *Exp. Cell Res.* 234:270-276
- Lenz, H.J. et al. (1998) *Clin. Cancer Res.* 4:1227-1234
- Les, A. et al. (1988) *Bio. Structure and Dynamics* 15(4): 703-715
- Lewis, J.G. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3176-3181
- Lin, W-Y. et al. (1997) *Eur. J. Nucl. Med.* 24:590-595
- Livak, K. J. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:4831-4837
- Lönn, U. et al. (1996) *Cancer* 77(1):107-112
- Look, K.Y. et al. (1997) *Anticancer Res.* 17:2353-2356 20
- Lovejoy, et al. (1997) *J. Pathol.* 181:130-135
- Madec, A. et al. (1988) *Bull Cancer* 75:187-194
- Mader, R.M. et al. (1998) *Gen. Pharmacol.* 31(5):661-666
- McGuigan, C. (1993) *J. Med. Chem.* 36:1048-1052
- McGuigan, C. (1996) *J. Med. Chem.* 39:1748-1753
- McGuigan, C. et al. (1994) *FEBS Lett.* 351:11-14
- McIntee, E.J. (1997) *J. Med. Chem.* 40:3323-3331
- Melton, R.G. and Sherwood, R.E. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88:153-165
- Meier, et al. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7:1577 30
- Meier, et al. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7:99
- Meier, et al., (1997) *International Antiviral News.* 5:183
- Miller, J.H., "A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria" Cold Spring Harbor Press (1992)
- Morgan, A.S. et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2568-2575
- Negishi, et al. (1996) *Nuc. Acids Symp. Ser.* 35:137-138
- Paradiso, A. et al. (2000) *Br. J. Cancer* 82(3):560-567
- Pederson-Lane, J. (1997) *Protein Expression and Purification* 10:256-262 40

## (参考文献)

- Pegram, M.D. et al. (1997) *Oncogene* 15:537-547
- Phelps, M.E. et al. (1980) *J. Med. Chem.* 23:1229-1232
- Pluta, et al. (1999) *Boll. Chim. Farm.* 138(1):30-33
- Robins, M.J. et al. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:421-424
- Robins, M.J. et al. (1982) *Can. J. Chem.* 60:554-557
- Robins, M.J. et al. (1983) *J. Org. Chem.* 48:1854-1862
- Romain, S. et al. (1995) *Intl. J. Cancer* 61(1):7-12 10
- Roth, J.A. et al. (1999) *Oncology* 13(10 Supp. 5):148-154
- Ruth, J.L. et al. (1978) *J. Org. Chem.* 43:2870-2876
- Saboulard, L. et al. (1999) *Mol. Pharm.* 56:693-704
- Santi, D.V. (1980) *J. Med. Chem.* 23:103-111
- Sastry, et al., (1992) *Mol. Pharmacol* 41:441-445
- Schaechter, M. et al., eds. (1993) *Mechanisms of Microbial Disease*, 2<sup>nd</sup> Ed., Williams and Wilkins
- Shepard, H.M. et al. (1988) *J. Clin. Immunol.* 8:353-395
- Simon, S.M. and Schindler, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3497 20
- Smith, K.A. et al. (1995) *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B. Biol. Sci.* 347:49-56
- Spector, D.L. et al. (1998) *Cells, A Laboratory Manual*, Vols I to III, Cold Spring Harbor Press
- Stühlinger, M. et al. (1994) *J. Steroid Biochem.* 49:39
- Sugarman, B.J. et al. (1985) *Science* 230:943-945
- Suki, S. et al. (1995) *Leukemia Lymphoma* 18(1-2):87-92
- Tannock, I.F. (1996) *J. Clin. Oncol.* 14(12):3156-3174
- Teh, B.T. (1999) *Anticancer Res.* 19(6A):4715-4728
- Tolstikov, V.V. et al. (1997) *Nucleosides Nucleotides* 16:215-225 30
- Troutner, D.A. (1987) *Nucl. Med. Biol.* 14:171-176
- Valette, et al. (1996) *J. Med. Chem* 39:1981
- Voet, et al. (1995) *Biochemistry* 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc.
- Wahba, A.J. et al. (1961) *J. Biol. Chem.* 236(3):C11
- Wallis, et al. (1999) *Farmaco* 54(1-2):83-89
- Wataya, Y. (1979) *J. Med. Chem.* 22:339-340
- Wettergren, Y. et al. (1994) *Mol. Genet.* 20:267-285
- Whalen and Boyer (1998) *Semin. Liver Dis.* 18(4):345-358 40

## (参考文献)

- Wilson, J.D., et al. (eds.) "Harrison's Principles of Internal Medicine" 12<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, Inc., pp. 21-76 (1991)
- Yen, Y. et al. (1994) *Cancer Res.* 54:3686-3691
- Zeid, et al. (1999) *Nucleosides Nucleotides* 18(1):95-111

【図 1 A】本明細書中に記載される着想は、図 1 A および 1 B に、チミジル酸シターゼ酵素および化合物 NB 1 0 1 1<sup>TM</sup>の例を用いてグラフとして示される。図 1 A は、腫瘍細胞中のどれほど高レベルの TS が毒素の優先的作製をもたらし得るかを示す。

【図 1 B】本明細書中に記載される着想は、図 1 A および 1 B に、チミジル酸シターゼ酵素および化合物 NB 1 0 1 1<sup>TM</sup>の例を用いてグラフとして示される。図 1 B は、NB 1 0 1 1<sup>TM</sup>の BVdUMP への変換、およびその後の TS との相互作用による、ヌクレオチド毒素の作製を示す。

【図 2】図 2 A および図 2 B は、本発明の高処理能力スクリーニングを図示するフローチャートである。

【図 3 A】図 3 A は、種々のヒト組織における相対 TS レベルを示す。

10

【図 3 B】図 3 B は、正常組織とヒト結腸腫瘍組織との間の平均 TS mRNA レベルの比較を示す。

【図 4】図 4 は、本発明のプロ [ 2 , 3 - d ] ピリミジノンヌクレオシドについての合成スキームを示す。合成プロトコルは、上記に詳細に記載される。

【 図 1 A 】

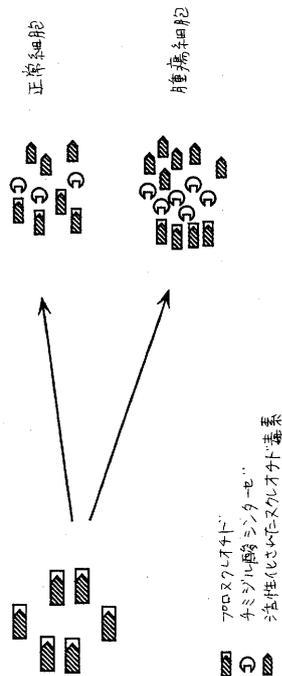


Fig. 1A

【 図 1 B 】

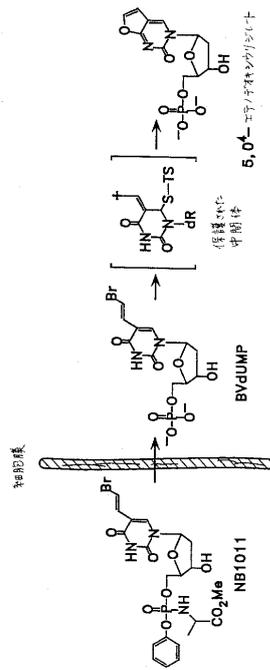


Fig. 1B

【 図 2 】

どのようにしてTSリード分子を見出すか：  
例えば、チミジル酸シンターゼを標的酵素  
として用いた、高処理能力スクリーニングの設計

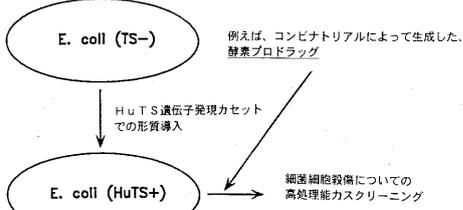


Fig. 2A

どのようにしてTSリード分子を見出すか：  
2つの酵素（例えば、チミジル酸シンターゼ（TS）  
およびチミンキナーゼ（TK））の置換

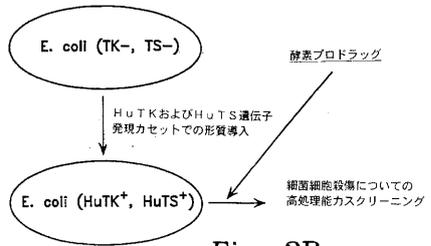


Fig. 2B

【 図 3 A 】

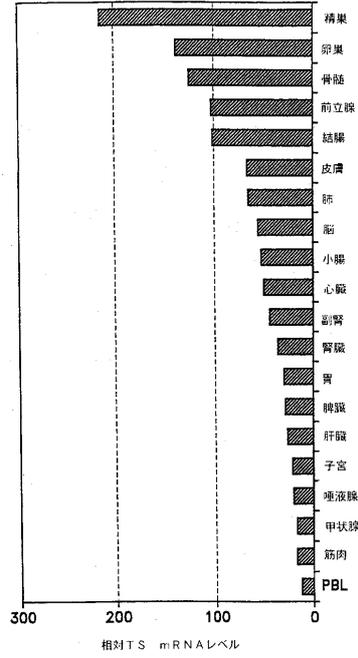


Fig. 3A

【 図 3 B 】

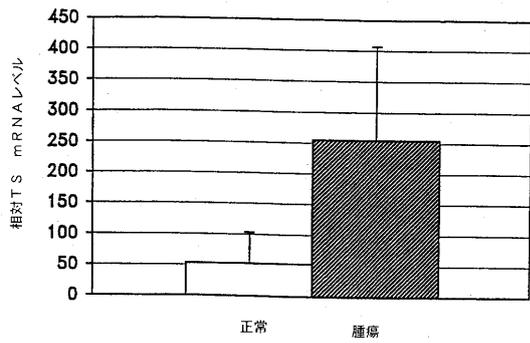


Fig. 3B

【 図 4 】

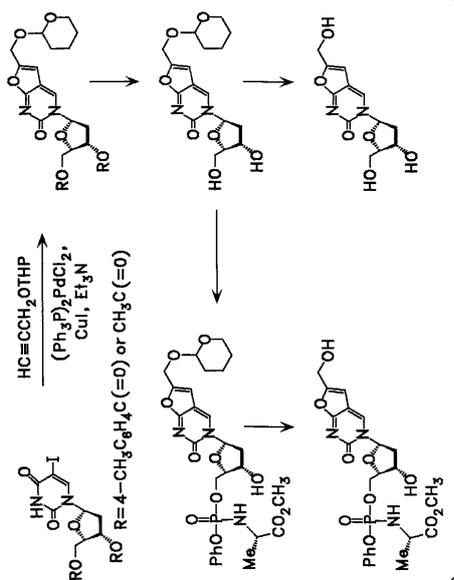


Fig. 4

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 0 7 H 19/23 (2006.01) C 0 7 H 19/23  
C 1 2 Q 1/527 (2006.01) C 1 2 Q 1/527

(31)優先権主張番号 60/191,315

(32)優先日 平成12年3月21日(2000.3.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 チャン, ミン ファイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 , エンシニタス, オーチャード ウッド ロード 1 6 4 2

(72)発明者 グロージアック, マイケル ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3 , パロ アルト, プリムローズ ウェイ 1 5 3

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 0 8 1 1 0 (WO, A 1)

国際公開第 9 9 / 0 2 3 1 0 4 (WO, A 1)

国際公開第 9 9 / 0 3 7 7 5 3 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07H 1/00-99/00

A61K 31/33-33/44

A61P 1/00-43/00

C12Q 1/527

CAplus/REGISTRY(STN)