

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4633927号
(P4633927)

(45) 発行日 平成23年2月16日 (2011.2.16)

(24) 登録日 平成22年11月26日 (2010.11.26)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 H 19/10 (2006.01)

C O 7 H 19/10

A 6 1 K 31/7084 (2006.01)

A 6 1 K 31/7084

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 11/10 (2006.01)

A 6 1 P 11/10

A 6 1 P 11/12 (2006.01)

A 6 1 P 11/12

請求項の数 14 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-550472 (P2000-550472)
 (86) (22) 出願日 平成11年5月19日 (1999.5.19)
 (65) 公表番号 特表2002-516273 (P2002-516273A)
 (43) 公表日 平成14年6月4日 (2002.6.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/010948
 (87) 国際公開番号 WO1999/061012
 (87) 国際公開日 平成11年12月2日 (1999.12.2)
 審査請求日 平成18年5月18日 (2006.5.18)
 (31) 優先権主張番号 60/086,543
 (32) 優先日 平成10年5月22日 (1998.5.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500297524
 インスパイアー ファーマシューティカルズ、インコーポレイティド
 アメリカ合衆国、ノースカロライナ 27703, ダラム, エンペラー プールバード 4222, スイート 200
 (73) 特許権者 592255431
 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロライナ アット チャペル ヒル
 アメリカ合衆国、ノース カロライナ 27599, チャペル ヒル, バイナム ホール, ザ キャンパス ボックス 4100
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬

最終頁に続く

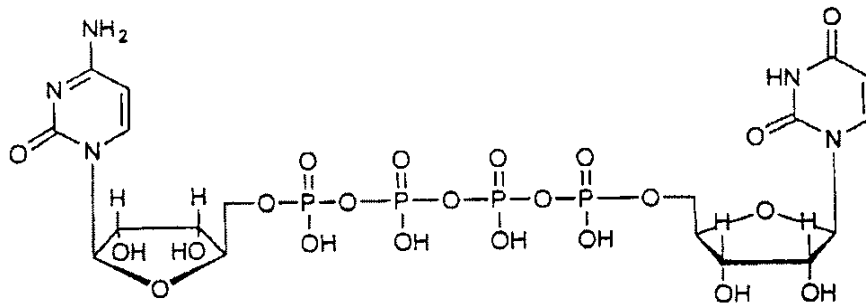
(54) 【発明の名称】 治療用ジヌクレオチドおよび誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類において分泌物浄化力を増加させ且つ繊毛運動頻度を増加させるための医薬組成物であって、式 I :

【化 1】

式 I

10

の化合物またはその医薬上許容される塩を含んで成る医薬組成物。

【請求項 2】

20

哺乳類において慢性閉塞性肺疾患を治療するための医薬組成物であって、分泌物の浄化および除去を増加させるのに有効な量の請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩を含んで成る医薬組成物。

【請求項 3】

哺乳動物において急性および慢性静脈洞炎を治療するための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の分泌物浄化有効量を含んで成る医薬組成物。

【請求項 4】

哺乳類において深部痰検体の喀出を促進するための医薬組成物であって、検体試料の喀出を促進するのに有効な量の請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩を含んで成る医薬組成物。

30

【請求項 5】

咳浄化力を増加させるための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の有効量を含んで成る医薬組成物。

【請求項 6】

肺の画像診断を強化するための医薬組成物であって、画像を得る前に肺からの分泌物を浄化するのに有効な量の請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩を含んで成る医薬組成物。

【請求項 7】

肺炎の予防のための医薬組成物であって、分泌物浄化力を増加させるのに有効な量の請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩を含んで成る医薬組成物。

40

【請求項 8】

中耳炎の治療のための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の有効量を含んで成る医薬組成物。

【請求項 9】

吸引した生物兵器剤の浄化を増加させるための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の有効量を含んで成る医薬組成物。

【請求項 10】

ドライアイ症の治療のための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の有効量を含んで成る医薬組成物。

50

【請求項 1 1】

網膜剥離の治療のための医薬組成物であって、請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩の有効量を含んで成る医薬組成物。

【請求項 1 2】

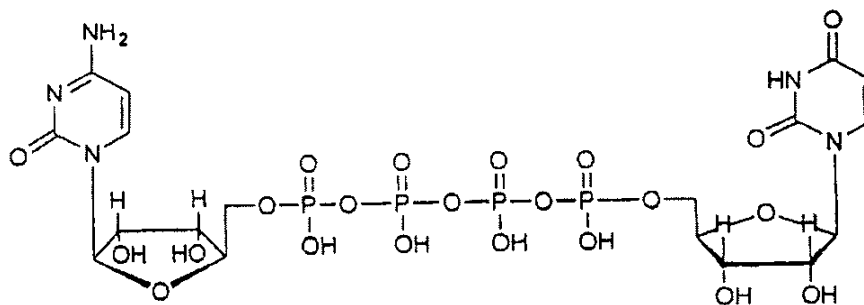
請求項 1 に記載の式 I の化合物またはその医薬上許容される塩、および医薬上許容される担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項 1 3】

式 I :

【化 2】

10

式 I

20

の化合物のアミドであって、式 I のシトシンアミノ基が NH-COR により置き換えられており、ここで R が C_{1-6} アルキル、フェニル、またはハロゲンにより、 C_{1-4} アルキルにより、 C_{1-4} アルコキシにより、ニトロによりもしくはヒドロキシにより置換されたフェニルである、アミド。

30

【請求項 1 4】

P^1 - (シチジン 5' -) - P^4 - (ウリジン 5' -) 四リン酸テトラアンモニウム塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、保有された分泌物の浄化（クリアランス）を増加させる方法であって、 P^1 - (シチジン 5' -) - P^4 - (ウリジン 5' -) 四リン酸（ CP_4U ）またはその医薬上許容されるエステル、アミドもしくは塩を投与することによって、保有された粘液性分泌物の水和を増加させ、ムチンの生成を刺激し、そして繊毛運動頻度（ciliary beat frequency）を増加させることによる方法に関する。

40

【0002】

発明の背景

米国で慢性閉塞性肺疾患（COPD）にかかっている患者は一千五百万人おり、6 番目の主な死因となっている。それは肺における粘液分泌物の停留により特徴付けられる。COPD と診断された多くの患者は慢性気管支炎（CB）と呼ばれる障害を持ち、600,000 人の患者が CB の急性再燃のために毎年入院する。COPD に似た臨床プロファイルを呈する肺障害の別例は、嚢胞性繊維症（CF）と原発性纖毛運動不全（PCD）である。原発性にせよ二次性にせよ、嚢胞性繊維症は咳によってしか浄化できない保有分泌物を生成する。COPD 患者の大部分は、粘膜纖毛浄化力が減損しているために、咳を利用して保有分泌物の浄化を助けている。

50

【 0 0 0 3 】

保有された粘液性分泌物の蓄積によって特徴付けられる別の病的状態は静脈洞炎である。静脈洞炎は、典型的には上部呼吸器感染に関連付けられる副鼻腔洞の炎症である。それは推定三千万人を冒している我が国で最も一般的な健康管理上の病訴である〔A. Moss & V. Parsons, National Center for Health Statistics, 1986: 66-7, DHHS Publication No. (PHS) 86-1588 (1985)〕。

【 0 0 0 4 】

中耳炎 (O M) は、主に 3 才以下の子供を苦しめる中耳のウイルス性または細菌性感染症である。それは一般に鼻腔や耳管を経て中耳内に広がる上部呼吸器感染によって突然発病する。約 2500 ~ 5000 万人の来院者が毎年 O M の診断と治療に訪れる。3 才までに、子供の約 75 % が少なくとも 1 回は急性 O M を経験しただろう〔J. Klein, Clin. Infect. Dis. 19, 823-33 (1994)〕。抗生物質での適切な処置の後も中耳に溜まった液体が残り、聴覚障害並びに潜在的な言語および認識の発達の遅れを引き起こす。中耳内の分泌物を浄化する能力の向上が、中耳炎の重大な後遺症を減少させるかまたは無くすだろう。

10

【 0 0 0 5 】

保有分泌物に特徴づけられる追加の障害は肺炎である。様々な理由のために不動状態にされた患者は肺炎を発病する危険性が高い。過剰の警戒や無数の介入にもかかわらず、毎年 400,000 人以上の患者が肺炎を起こし、かなりの罹病率と死亡率を伴う。挿管入と機械換気を必要とする患者は、不動状態と粘膜纖毛浄化力の減少のため、更に換気装置関連肺炎 (V A P) の危険性もある。V A P の死亡率は毎年 V A P を発病する 100,000 人以上の患者の 50 % 超である場合がある。

20

【 0 0 0 6 】

涙液分泌系の排膿を増加させることが治療上望ましい状態もある。涙液排膿系が正しく機能していないと、結果として過剰な流涙 (流涙症)、粘膜化膿性流出および再発性涙囊炎を生じうる。鼻涙管閉鎖症の現行治療法は、大部分が侵害的な外科手術法であり、ゆえに研究者らは非侵害的な薬剤療法を発見しようと努めている。

【 0 0 0 7 】

涙液分泌は、気道上皮を水和するのと同様な P 2 Y₂ および / または P 2 Y₄ プリン作用性レセプター媒介機構を介して涙液分泌付属組織から刺激することができる。ドライアイ症は、その結果生じる眼球表面病と共に、涙液生成の減少または涙膜蒸発の増加により特徴づけられる前角膜の涙膜の異常によって生じる一般的な適応症名である。現在のところ、ドライアイ症の薬剤療法は眼を一時的に再水和するための人工涙 (塩溶液) の投与に大方向限定されている。しかしながら、免荷は短命であるので、頻繁な投与が必要である。

30

【 0 0 0 8 】

通常、粘膜分泌物は粘膜纖毛浄化 (M C C) 系によって排出される。M C C は次の 3 成分の総合作用を頼みにしている: 1) 杯細胞と粘膜下腺による粘液分泌; 2) 管腔表面を通過する粘液を先に進ませる上皮細胞上の纖毛の運動; および 3) 付随して粘液中への水分の流量を調節する管腔上皮細胞内外へのイオン輸送。

【 0 0 0 9 】

ウリジン 5' - 三リン酸 (U T P) のようなヌクレオシドリン酸が M C C 系の全成分を活性調節することは現在知られている。第一に、U T P は試験管内で杯細胞によるムチン分泌の速度と総量の両方を増加させることが示されている〔M. Lethem 他、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9, 315-22 (1993)〕。第二に、U T P は試験管内でヒト気道上皮細胞中の纖毛運動頻度を増加させることが証明されている〔D. Drutz 他、Drug Dev. Res. 37(3), 185 (1996)〕。そして第三に、U T P は試験管内で気道上皮細胞からの Cl⁻ 分泌を増加させ、よって水分分泌を増加させることが示されている〔S. Mason 他、Br. J. Pharmacol. 103, 1649-56 (1991)〕。更に、U T P に応答したタイプ II 肺胞細胞からの界面活性剤の放出〔Gobran, Am. J. Physiol. 267, L625-L633 (1994)〕が、肺の最適な機能発揮に貢献し、M C C を最大にするのを助けるかもしれないと考えられている。U T P は P 2 Y₂ レセプターによるホスホリパーゼ C の刺激によって細胞内 C a⁺⁺ を増加させることが証

40

50

明されている〔H. Brown他、Mol. Pharmacol. 40, 648-55 (1991)〕。

【0010】

UTPによる粘膜纖毛促進系の全成分の活性調節は、何ら重大な副作用なしに正常志願者における肺粘膜纖毛浄化力の改善をもたらす〔K. Olivier他、Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154, 217-23 (1996)〕。その上、UTPはPCD患者において咳浄化力（咳をすることによる保有分泌物の浄化）をかなり増加させる〔P. Noone他、Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153, A530 (1996)〕。ジヌクレオチド P^1 , P^4 -ジ（ウリジン5'-）四リン酸が正常健康志願者において痰生成を増加させる（これはMCCの向上を意味する）ことも証明されている。

【0011】

UTPが保有粘膜分泌物の浄化を増加させる能力を持つと証明されたことは、安定性を高めながら治療効率を維持または改善するために別のヌクレオシドリン酸を研究する動機を本出願人らに与えた。本研究の過程で、他のシチジン含有ジヌクレオシド四リン酸 C_2P_4 とは異なり、 CP_4U が P_2Y_2 および P_2Y_4 レセプター上で驚くべき能力を有することが発見された。更に、 CP_4U が、生物学的製剤中でのその安定性によって証明されるように、生物学的分解に対して予想外に大きく高められた抵抗力を有することが観察された。本発明は、高められた生物学的安定性の結果としての、呼吸療法における CP_4U の効能と作用期間の増加に基づいている。

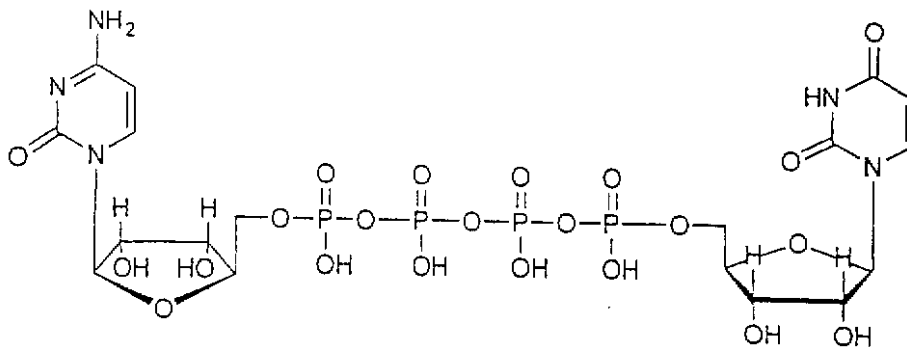
【0012】

発明の要約

治療を必要とする患者において粘液を水和させそして纖毛運動頻度を増加させることによる、分泌物浄化力（クリアランス）を高める方法が開示される。この方法は、式Iの化合物：

【化2】

式I



またはその医薬上許容される塩、エステルもしくはアミドを前記患者に投与することを含んでなる。

【0013】

式Iの化合物の新規エステルとアミドも開示される。

【0014】

式Iの化合物は、 P_2Y_2 および/または P_2Y_4 プリン作用性レセプターの高選択的且つ安定性アゴニストである。よって、それらは慢性気管支炎、PCDおよび嚢胞性繊維症のような慢性閉塞性肺疾患の治療に有用であり、そしてそれらは肺炎を起こす危険性のある不動状態の患者の治療にも有用であろう。更に、それらは一般に保有された粘液性分泌物

を浄化しそして纖毛運動頻度を高める能力を有することから、本発明の化合物は静脈洞炎や中耳炎の治療にも有用である。本発明の化合物は、肺癌、肺炎および他の炎症疾患の危険性がある患者において診断目的での痰検体の喀出を促進するのにも有用である。更に、式Ⅰの化合物は喘息の治療において補助剤となりうると仮定される。それらは、肺からの粘液性分泌物の浄化を増加させることにより運動選手の能力を高めることもできるだろう。式Ⅰの化合物は外傷治癒にも有用かもしれない。

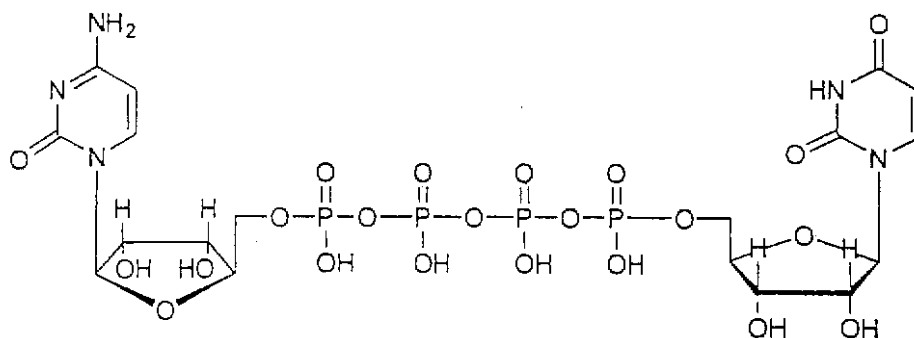
【 0 0 1 5 】

発明の詳細な説明

本発明は、治療の必要な患者において保有された粘液性分泌物を浄化しそして纖毛運動頻度を増加させる方法を提供する。本発明の方法は式Ⅰの化合物

【 化 3 】

式Ⅰ



またはその医薬上許容される塩、エステルもしくはアミドを前記患者に投与することを含んでなる。

【 0 0 1 6 】

塩、エステルおよびアミドを含む式Ⅰの化合物を以降「本発明の化合物」と称することにする。

【 0 0 1 7 】

本発明の化合物はその医薬上許容される塩も包含する。そのような塩としては非限定的に、アルカリ金属塩、例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩；アルカリ土類金属塩、例えばマグネシウム塩もしくはカルシウム塩；マンガン塩；またはアンモニウム塩もしくはテトラアルキルアンモニウム塩、すなわち NX_4^+ (ここで X は C_{1-4} アルキルである) が挙げられる。医薬上許容される塩は、親化合物の所望の生物活性を維持しており且つ望ましくない毒性作用を付与しない塩である。本発明の塩はモノ - 、ジ - 、トリ - およびテトラ - カチオンを包含し、単一のカチオンまたは混合カチオンを含んでもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明は、本明細書中に開示される化合物の新規アシル化プロドラッグ (例えばエステルとアミド) も提供する。本発明の好ましいエステルとしては、エステル基の非カルボニル成分が直鎖または分岐鎖アルキル、例えば n - プロピル、t - ブチル、n - ブチル、アルコキシアルキル (例えばメトキシメチル)、アラキル (例えばベンジル)、アリールオキシアルキル (例えばフェノキシメチル) およびアリール (例えばフェニル) からなる群より選ばれるカルボン酸エステル；スルホン酸エステル、例えばアルキル - またはアラキルスルホニル (例えばメタンスルホニル)；アミノ酸エステル (例えば L - バリルまたは L - イソロイシル)；ジカルボン酸エステル (例えばヘミスクシネート) が挙げられる

。ホスホン酸エステルは、例えば C_{1-20} アルコールによりまたは 2, 3 - ジ (C_{6-24}) アシルグリセロールにより更にエステル化されてもよい。そのようなエステル中に存在するどんなアルキル成分でも、1 ~ 18個の炭素原子、特に 1 ~ 4個の炭素原子を含有する。3 ~ 18個の炭素原子を含むアルキル基は飽和であっても不飽和であってもよい。そのようなエステル中に存在するどのアリアル成分も、好ましくは、場合により例えばハロゲンにより、 C_{1-4} アルキルにより、 C_{1-4} アルコキシにより、ニトロによりまたはヒドロキシルにより置換されることがあるフェニル基を包含する。上述した本発明の医薬上許容されるアミドとしては、シトシンアミノ基がアミドの形、例えば $NHCO R$ の形である誘導体が挙げられ、ここで R は C_{1-6} アルキルまたはアリアル (例えばハロゲンにより、 C_{1-4} アルキルにより、 C_{1-4} アルコキシにより、ニトロによりまたはヒドロキシルにより置換されることがあるフェニル) である。

10

【0019】

本発明の化合物は $P2Y_2$ および / または $P2Y_4$ プリン作用性レセプターの高選択的アゴニストであり、よってそれらは慢性気管支炎、急性気管支炎、慢性気管支炎の急性再燃、PCD および嚢胞性繊維症といった慢性閉塞性肺疾患にかかっている哺乳類 (ヒトを含む) の治療において、並びに不動状態により起こりうる肺炎の予防において有用である。繊毛が損傷しているかまたは欠乏している場合には、本発明の化合物が咳浄化力を増加させる。更に、それらの化合物は一般に保有された粘液分泌物を浄化しそして繊毛運動頻度を刺激することができるために、本発明の化合物はヒトを含む哺乳類の急性および慢性静脈洞炎並びに中耳炎の治療に有用である。分泌物浄化力を高めることにより、これらの化合物は吸引される生物学的闘争剤に対する暴露の前または後の保護剤として有用である。

20

【0020】

驚くべき生物学的安定性のために、本発明の化合物は増加された呼吸療法作用期間を提供する。この安定性の向上は、急性と慢性の両方の呼吸器疾患の治療の際に利点を与える。

【0021】

式 I の化合物のエステルおよびアミドは、ドライアイや網膜剥離のような眼科疾患の治療に有用である。それらは涙液系の排膿を増加させるためにも有用である。

【0022】

本発明の化合物は主にヒト被検者の処置に関するけれども、それらは獣医学目的で他の哺乳類被検体、例えばイヌ、ネコおよびウマの処置にも使用できる。

30

【0023】

本発明の化合物は、常用の医薬上許容される非毒性の担体、佐剤および賦形剤を含有する投与単位製剤において経口的に、局所的に、非経口的に、吸入もしくは噴霧により、手術中に、直腸内に、または腔内に投与することができる。本明細書中で使用する局所的という語は、パッチ剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤、液体洗浄剤または点鼻剤、点耳剤もしくは点眼剤を包含する。本明細書中で使用する非経口という語は、皮下注射、静注、筋肉内注射、胸骨筋内注射または点滴注入技術を包含する。

【0024】

本発明の別の観点では、本発明の化合物と医薬上許容される担体とを含有する医薬製剤が提供される。1もしくは複数の本発明の化合物が、1もしくは複数の非毒性の医薬上許容される担体もしくは希釈剤もしくは佐剤と共に、および所望により他の活性成分と共に、存在してもよい。そのような担体の一例は糖であり、この場合、化合物は肺もしくは気道送達用の担体 (例えば乳糖、ショ糖、トレハロース、マンニトール) または他の許容される賦形剤と共に単純に混合してまたはグラシフィケーションを通して母材中に含めることができる。

40

【0025】

本発明の化合物は、DNアーゼやアセチルシステインのような粘液溶解剤または放射性標識物質と一緒にまたは別個に投与することができる。

【0026】

本発明の化合物を含有する医薬組成物は、経口投与用に適当な剤形、例えば錠剤、ロゼン

50

ジ、水性もしくは油性懸濁液剤、分散性粉剤もしくは粒剤、乳剤、硬質もしくは軟質カプセル剤、またはシロップ剤もしくはエリキシル剤の形であることができる。経口投与用の組成物は医薬組成物の製造のための当該技術分野で既知の任意方法に従って調製することができ、そしてそのような組成物は、医薬として外見が良く且つ口に合った製剤を提供するために甘味剤、矯味矯臭剤、着色剤および保存剤から成る群より選ばれた１もしくは複数の剤を含むことができる。錠剤は活性成分と混合して、錠剤の製造に適当である非毒性の医薬上許容される賦形剤を含有する。それらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；顆粒化剤および崩壊剤、例えばコーンスターチまたはアルギン酸；結合剤、例えばデンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム；並びに滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクであることができる。錠剤は未コーティングであってもよく、または胃腸管中での崩壊と吸収を遅らせ、それによって長期間に渡り持続された作用を提供するために周知の技術によりコーティングを施してもよい。例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートのような遅延材料を使用してもよい。

10

【 0 0 2 7 】

経口用製剤は、活性成分が不活性固形希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウムもしくはカオリンと混合された硬質ゼラチンカプセル剤として提供してもよく、あるいは活性成分が水または油性媒質、例えば落花生油、流動パラフィンもしくはオリーブ油と混合された軟質ゼラチンカプセル剤として提供してもよい。

【 0 0 2 8 】

20

水性製剤は、製剤に適した賦形剤と共に活性成分を含有する。そのような賦形剤は懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロースおよびアルギン酸ナトリウムである。分散剤または湿潤剤は、天然のホスファチド、脂肪酸とアリレンオキシドとの縮合生成物、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、脂肪酸とヘキシトールからの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、または脂肪酸とヘキシトール無水物から誘導された部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物であることができる。当業者は、上記の一般記載中に含まれる多数の特定の賦形剤および湿潤剤を知っているだろう。水性製剤は１または複数の保存剤、例えばp - ヒドロキシ安息香酸エチル - もしくはn - プロピルエステル、１または複数の着色剤、１または複数の矯味矯臭剤、および１または複数の甘味剤、例えばショ糖もしくはサッカリンを含んでもよい。

30

【 0 0 2 9 】

水の添加による水性懸濁液の調製に適当である分散性粉剤および粒剤は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤および１もしくは複数の保存剤と混合した状態で活性成分を提供する。適当な分散剤または湿潤剤および懸濁剤は既に上述したものにより例示される。追加の賦形剤、例えば甘味剤、矯味矯臭剤および着色剤も存在してよい。

【 0 0 3 0 】

本発明の化合物は無菌媒質中で非経口投与することができる。使用する賦形剤および濃度に依存して、薬剤は賦形剤中に懸濁または溶解することができる。有利には、局所麻酔薬のような佐剤、保存剤および緩衝剤を賦形剤中に溶解することができる。無菌注射剤は、非毒性の非経口投与に適当な希釈剤または溶剤中の無菌注射溶液または懸濁液であることができる。使用できる適当な賦形剤および溶剤としては、特に無菌水、塩溶液またはリンガー液が挙げられる。

40

【 0 0 3 1 】

本発明の化合物は薬剤の経耳、直腸内または腔内投与用の坐剤の形で投与することもできる。それらの組成物は、常温では固体であるが体温では液体であり従って融解して薬剤を放出するであろう適当な非刺激性賦形剤と薬剤を混合することにより調製することができる。適当な材料はカカオ脂およびポリエチレングリコールである。

【 0 0 3 2 】

本発明の化合物の溶液は、灌注、洗浄、局所適用、注射のような方法または当業者に既知の他の方法を用いて、手術中点滴注入法により投与することができる。

50

【 0 0 3 3 】

呼吸器疾患の治療には、約 10^{-7} M ~ 約 10^{-1} M、好ましくは 10^{-5} M ~ 約 10^{-3} Mの濃度レベル、または約 1 ~ 400 mgの投与量を使用できる。眼科用または洞用には、0.1 ~ 10.0%濃度を使用できる。担体材料と混合して1回量を作ることができる活性成分の量は、治療する宿主および投与の特定方法によって異なるだろう。しかしながら、ある特定の患者に対する特定の用量レベルは、使用する特定化合物の活性、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与期間、投与経路、吸収、分布、代謝および排出の速度、併用する薬剤並びに治療を受ける特定の病気の種類や重症度といった様々な要因に依存することは理解されるだろう。

【 0 0 3 4 】

本発明の化合物は、非限定的にカルボニルジイミダゾールまたはジシクロヘキシルカルボジイミドのような縮合剤で活性化されたウリジン-リン酸、ニリン酸または三リン酸を、シチジン-リン酸、ニリン酸または三リン酸と縮合せしめて、所望のジヌクレオチド四リン酸〔 P_1 - (シチジン 5' -) P_4 - (ウリジン 5' -) 四リン酸〕を形成させることにより；あるいは同様に活性化されたシチジン-リン酸、ニリン酸または三リン酸をウリジン-リン酸、ニリン酸または三リン酸と縮合せしめることにより、調製することができる。同様な手法により〔 P_1 - (シチジン 5' -) ウリジン 5' -) 四リン酸の N^4 - アジド誘導体が得られる。出発物質として使用するヌクレオシドリン酸は市販されているか（Sigma社）、または当業者に周知の方法により対応するヌクレオシドから調製することができる。同様に、ヌクレオシドが市販されていない場合、それらは他の容易に入手可能なヌクレオシドの修飾により、または当業者に周知の方法による複素環式化合物と糖前駆体からの合成により、調製することができる。

【 0 0 3 5 】

当業者は、式 I の化合物の医薬上許容される塩およびアシル化プロドラッグを調製するのに使用できる追加の合成方法を知っているだろう。塩は例えばカチオン交換樹脂を使って調製することができる。エステルおよびアミドは、例えば、塩基性触媒、例えば第三アミン、第四級アンモニウム塩または無機塩基の存在下でまたは非存在下で、所望のヒドロキシまたはアミノ化合物を、カルボニルジイミダゾール、ジシクロヘキシルカルボジイミドもしくは他の適当な縮合剤によって活性化された適当な酸と反応させるか、または酸無水物もしくは酸塩化物と反応させることにより、調製することができる。

【 0 0 3 6 】

当業者は、下記の実施例により証明されるように、出発物質を変更しそして追加の段階を使って本発明に含まれる化合物を製造できることを理解するだろう。場合によって、上記変換を達成するために特定の反応性官能基の保護が必要であるかもしれない。一般に、そのような保護基の必要性並びにそのような基を結合・除去するのに必要な条件は有機合成技術の熟練者にとって明白であろう。

【 0 0 3 7 】

本発明を下記の実施例により更に例証するが、この実施例は発明の範囲または精神においてこの中に記載される特定の手順に限定するものとして解釈してはならない。

【 0 0 3 8 】

実施例 1

P^1 - (シチジン 5' -) - P^4 - (ウリジン 5' -) 四リン酸テトラアンモニウム塩の調製

遊離酸形のウリジン 5' - リン酸 (Sigma) (3.0 g) をトリブチルアミン (2.0 mL) と共に DMF 中に溶かして 0.34 M 溶液を作ることにより、ウリジン 5' - リン酸トリブチルアミン塩を調製した。ウリジン 5' - リン酸トリブチルアミン塩の無水 DMF 溶液 (5.6 mL, 1.89 ミリモル, 0.34 M) を N_2 下で 10 mL 丸底フラスコに添加し、そこにカルボニルジイミダゾール (459 mg, 2.83 ミリモル) を加え、溶液を 25 °C で 30 分間攪拌した。三ナトリウム塩を Dowex 50H⁺ 樹脂で処理し次いで DMF 中トリブチルアミンで処理することにより調製したシチジン 5' - 三リン酸トリブチルアミン塩の DMF 溶液を添加し、そして

反応混合物を65℃で3時間攪拌した。溶液を真空中で蒸発させ、カラムクロマトグラフィー（DEAE Sephadex；H₂Oから0.3 M NH₄HCO₃への勾配）により2回精製した。純粋画分を35℃で減圧濃縮し、水を加えて10回再蒸発させ、白色固体（203 mg）を得た。¹H-NMR（D₂O，TMS）4.1 (m, br, 6H)，4.2 (m, 4H)；5.8 (m, 3H)；5.95 (m, 1H)；7.7 (m, 2H)；³¹P-NMR（D₂O，H₃PO₄ std）-22.4 (m, 2P)，-10.6 (m, 2P)；C₁₈H₂₆N₅O₂₂P₄についての正確な計算質量（M-H）=788.0020，実測質量7887.9985。

【0039】

実施例2

P¹ - (シチジン 5'-) - P⁴ - (ウリジン 5'-) 四リン酸テトラアンモニウム塩の調製

水（5 mL）中のウリジン 5'-三リン酸（UTP）三ナトリウム塩（5.86 g, 0.01モル）の溶液を、ピリジニウム形のBioRad AG-MP 50強陽イオン交換樹脂（50 mLベット容積）のカラムに適用し、そして蒸留水（約300 mL）を使ってトリブチルアミン（5.55 g, 0.03モル）の入ったフラスコ中に溶出させた。懸濁液をエタノール（50 mL）と共に振盪し、混合物を冷蔵庫の中に一晩置いておいた。溶液をろ過して少量の油状残渣を除去し、減圧下で蒸発乾固せしめ、そして残渣を室温で0.08 mmHg（10.67 Pa）で1時間乾燥させた。残渣を2×20 mLの無水ジメチルホルムアミド（DMF）とともに0.01 mmHg（1.33 Pa）で蒸発させることにより乾燥させた。得られた無水トリブチルアミン塩を無水アセトンで100 mLにして原液（0.1M UTP）を調製した。前記UTP溶液のアリコート（10 mL，1ミリモル）にジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）（Baker，1.0 g，5.0ミリモル）を加え、溶液を室温で30分間攪拌した。沈澱したジシクロヘキシル尿素をろ過により除去し、反応混合物をヘキサン（100 mL）で抽出し、残渣を乾燥重水素化ジメチルスルホキシド（DMSO-d₆，3.0 mL）中に溶かした。このウリジン 5'-環状メタリン酸（UcTP）溶液を、CMP遊離酸（Sigma，0.65 g，2ミリモル）へのトリブチルアミン（0.714 mL，3ミリモル）の添加により調製したシチジン 5'-一リン酸（CMP）トリブチルアミン塩に添加し、そして懸濁液を50℃で24時間攪拌した。反応混合物を高真空下で一晩蒸発させ、残渣を水（5 mL）に溶かし、そして半調製用イオン交換クロマトグラフィー（Hamilton PRP X-100カラム、同組成1.0M炭酸水素アンモニウムを用いて、流速8 mL/分で30分間溶出、500 μLを複数回注入）により分離した。ジヌクレオチド四リン酸は31分と37分の間に溶出した。生成物を含む画分を水と共に繰り返し蒸発させ、そして残渣を凍結乾燥して白色固体として目的化合物（59 mg）を得た。D₂O中での¹H-NMR（テトラメチルシランからの ppm）：4.10-4.13 (m, 6H)；4.17-4.26 (m, 4H)；5.815 (d, J=7.8 Hz, 1H)；5.82 (d, J=5.0 Hz, 2H)；6.082 (d, J=7.7 Hz, 1H)；7.80 (d, J=7.8 Hz, 1H)；7.91 (d, J=8.2 Hz, 1H)。D₂O中での³¹P-NMR（H₃PO₄からの ppm）：-22.45 (m, 2P)；-10.80 (m, 2P)。

【0040】

実施例3

イノシトールリン酸アッセイにより測定した薬理活性

本発明の化合物の医薬としての有用性は、P₂Y₂および別のP₂Yレセプター活性についてのイノシトールリン酸アッセイにより示される。E. Lazarowski他，Bri. J. Pharm. 116, 1619-1627 (1995)に記載されたこの汎用アッセイは、Gタンパク質を介してホスホリパーゼCに結合する化合物活性化レセプターの活性の測度としてのイノシトールリン酸形成の測定を頼みにしている。

【0041】

E. Lazarowski他，Bri. J. Pharm. 116, 1619-1627 (1995)に記載されたイノシトールリン酸アッセイを使って、P₂Y₁、P₂Y₂、P₂Y₄およびP₂Y₆レセプター活性を惹起せしめる能力について式Iの化合物を試験した。CP₄Uおよび全てのシチジン含有ジヌクレオチドC₂P₄についての結果を下記の表Iに要約する。

【0042】

【表1】

10

20

30

40

50

表 1 : 活性の要約

 EC_{50} (μ モル)

化合物	P_2Y_1	P_2Y_2	P_2Y_4	P_2Y_6
C_2P_4	IA*	IA*	IA*	IA*
CP_4U	IA*	0.45	0.65	3.5

10

IA* = 不活性 (すなわち $30 \mu M$ でアゴニスト活性なし)

【 0 0 4 3 】

このアッセイにおいて、 CP_4U は全てのシチジンジヌクレオチド類似体 C_2P_4 に比べて、 P_2Y_2 および P_2Y_4 レセプター上で驚くべき活性を示した。

20

【 0 0 4 4 】

実施例 4

生体内での塩化物分泌の誘導は、そのような分泌物の移動と浄化から患者が恩恵を得るような病気において、濃厚な気道粘液性分泌物の水和を促進する。先端の非CFTR塩化物チャンネルの活性化は塩化物イオンと水の流入を誘導し、それが肺分泌物の再水和を助ける (Boucher, 米国特許第5,292,498号およびBoucher他, 米国特許第5,635,160号明細書並びにそのなかの参考文献)。

【 0 0 4 5 】

ヒト鼻気道細胞における塩化物分泌

切除したばかりのヒト鼻手術標本から気道上皮細胞を脱分離し (desegregate) そして単離した [Yankaskas他, Am. Rev. Respir. Dis. 132, 1281-1287 (1985)]。集密の単層をF-12ホルモン補足培地 [Wu他, Am. Rev. Respir. Dis. 132, 311-320 (1985)] 中において透過性コラーゲンマトリックス支持体上で培養した。細胞を37℃でインキュベートし、集密にまで増殖させた。細胞間の強固な接合の形成を調べるために上皮内外抵抗の発生をモニタリングした。強固な接合の形成後が確認された後、培養物を含むマトリックス支持体を改良Ussingチャンバーに据え付けた。

30

【 0 0 4 6 】

培養ヒト気道上皮をクレブス重炭酸リンガー液 [KBR (mMで) 140 Na^+ , 120 Cl^- , 5.2 K^+ , 25 HCO_3^- , 2.4 HPO_4^{2-} , 0.4 HPO_4^- , 1.1 Ca^{2+} , 1.2 Mg^{2+} および 5.2 グルコース] の粘膜下組織浴の入ったUssingチャンバーに据え付けた。管腔表面をKBRまたは高 K^+ 低 Cl^- (HKLC) リンガー液 [(mMで) 40 Na^+ , 100 K^+ , 4.5 Cl^- , 120 グルコネート, 25 HCO_3^- , 2.4 HPO_4^{2-} , 0.4 HPO_4^- , 1.1 Ca^{2+} , 1.2 Mg^{2+} および 5.2 グルコース] に浸した。

40

【 0 0 4 7 】

細胞を増殖させるための透過性コラーゲンマトリックスを支えるプラスチックカップに合うように、ポリカーボネートUssingチャンバーを圧延した。 I_{sc} 、上皮内外電位差および抵抗を含む生体電氣的特性をモニタリングした。デジタル電圧計 (UNC Electronics, Chapel Hill, NC) を使って短絡電流 (I_{sc}) を測定し、帯記録紙レコーダー上にプロットした。周期的に開回路電位を記録し、そして10 mV電圧パルスに応答した電流の振れ (deflection) により、電圧クランプモードにおいて電氣伝導度をモニタリングした。

【 0 0 4 8 】

50

I_{sc} が安定したベースラインを記録したら、ナトリウム吸収を防ぐため、先端面を浸している溶液にアミロリド ($100 \mu M$) を添加した。これらの条件下で測定した残留 I_{sc} は、塩化物分泌の優れた近似値であった [Boucher他、J. Clin. Invest. 78, 1245-1252 (1986); Willumsen他、Am. J. Physiol. 256, C226-233, C1033-C1044, C1045-C1053 (1989)]。安定なベースラインを記録した後、上皮培養物の先端面が浸っているチャンバーに試験化合物の溶液を添加した。 I_{sc} の変化を記録した。0.5 log段階で試験化合物の濃度を累積的に付加することにより、濃度応答曲線を得た。

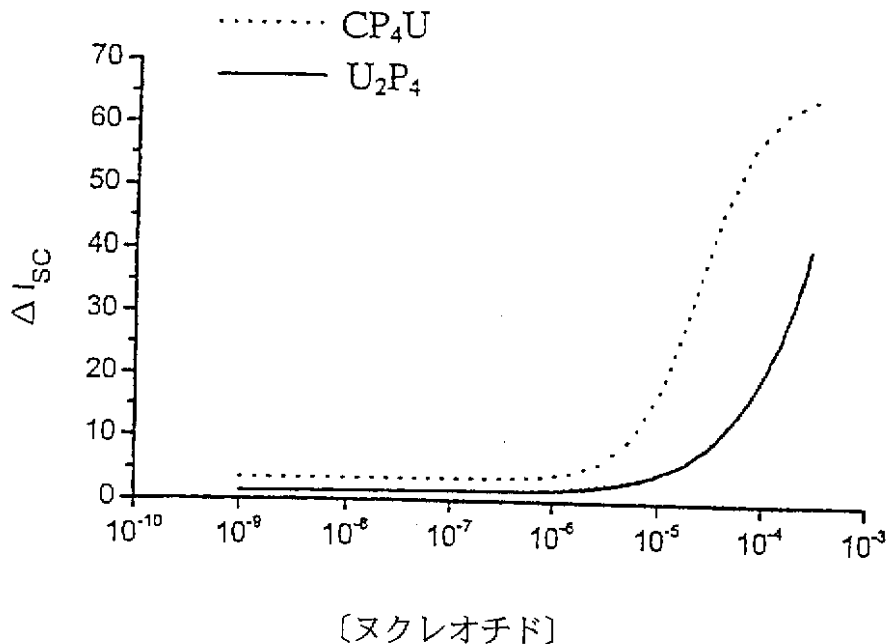
【0049】

実施例4の図1は、細胞表面媒質に U_2P_4 または CP_4U を添加した時のヒト鼻上皮細胞における塩化物イオン拡散電位の変化 (I_{sc} 、短絡電位の変化) を示す。その結果は、塩化物分泌アッセイにおいて CP_4U がどのウリジン含有ジヌクレオチド U_2P_4 よりもほぼ10倍有力であることを示す。

【0050】

【表2】

図1



【0051】

ヒト気道細胞上でのインキュベーションにより測定した代謝安定性

式Iの化合物 (CP_4U) を培養ヒト気管支 (気道) 上皮細胞の表面上に存在する酵素による代謝に抵抗する力について試験し、その結果をジヌクレオチド U_2P_4 [P^1 , P^4 -ジ (ウリジン 5'-) 四リン酸] およびヌクレオシド三リン酸 UTP (ウリジン 5'-三リン酸) と比較した。上皮細胞はALI培地中で気相-液相界面上で単層培養させた。アッセイは、0.1 mMヌクレオチド基質を使って、KRB-リンガー液 (pH 7.2) 中の完全に分化した細胞に対して37℃で行った。5, 10, 15, 20, 40および60分目に気道表面液のアリコート采取了。そのアリコートを煮沸しそしてろ過することによって代謝を停止させ、次の条件を使った高性能液体クロマトグラフィーにより試料を分析した: C18カラム上で

、10～100 mM KH_2PO_4 の55分間に渡る勾配と、一定組成の8 mMテトラブチルアンモニウム硫酸水素塩および10%メタノールを用いた。

【0052】

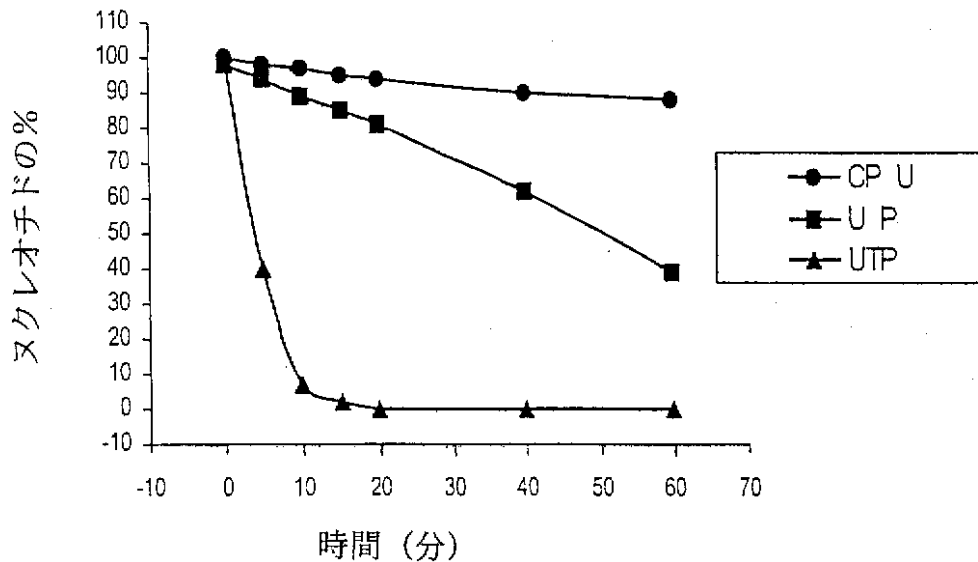
結果を図IIに示す。式Iの化合物 CP_4U は、その他のヌクレオチド UTP と U_2P_4 に比べて予想外の安定性を示した。 CP_4U は60分間に渡り代謝されなかったのに対し、 UTP と U_2P_4 はそれぞれ100%と40%分解された。

【0053】

【表3】

図II

ヒト気管支上皮細胞による CP_4U 、 U_2P_4 および
 UTP の加水分解の比較速度



【0054】

本発明の主題である化合物を動物モデルにおいて試験した〔L. Allegra他、J. Applied Physiol., 55(3) 726-730 (1983); J.R. Sabater他、Am. Respir. Crit. Care Med., 154, 341-345 (1996)〕。噴霧した化合物は、賦形剤対照に比べて気管粘液速度 (TMV) を刺激した。TMVは1本の大きい気道における粘膜纖毛浄化力の測度である。

【0055】

本発明に属する技術分野の当業者が本発明を実施しそして使用できるよう十分、明確、簡明かつ正確な用語で本発明、並びにその実施方法および使用方法を記載してきた。上記記載は本発明の好ましい態様を説明したものであり、そして特許請求の範囲内に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく本発明に変更が可能であることを理解すべきである。発明と見なされる内容を具体的に指摘し且つ弁別的に権利請求するために、特許請求の範囲が本明細書を締め括る。

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 27/04 (2006.01) A 6 1 P 27/04
A 6 1 P 27/16 (2006.01) A 6 1 P 27/16
- (74)代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
- (74)代理人 100087871
 弁理士 福本 積
- (74)代理人 100082898
 弁理士 西山 雅也
- (74)代理人 100081330
 弁理士 樋口 外治
- (72)発明者 イアークサ, ベンジャミン アール.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 6 0 8, ローリー, ハザウェイ ロード 1 3 3 0
- (72)発明者 ペンダーガスト, ウィリアム
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 7 1 3, ダーハム, ウィリアムスバーグ ウェイ 5 8
 1 5
- (72)発明者 ライドアウト, ジャネット エル.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 6 0 7 - 3 0 1 0, ローリー, モーニングサイド ドラ
 イブ 3 1 0 1
- (72)発明者 ピッチャー, マリス
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ, チャペル ヒル
- (72)発明者 ブーチャー, リチャード シー.
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 5 1 4, チャペル ヒル, ギムゴウル ロード 7 3 5
- (72)発明者 スタッツ, モンロー ジャクソン
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ 2 7 5 1 4, チャペル ヒル, モーガン ブラフ レーン
 1 0 4

審査官 荒木 英則

- (56)参考文献 特表2 0 0 1 - 5 2 6 6 3 5 (J P , A)
 国際公開第9 8 / 0 3 4 5 9 3 (WO , A 1)
 特開2 0 0 5 - 0 1 5 4 9 1 (J P , A)
 国際公開第9 8 / 5 2 0 4 2 (WO , A 1)
 国際公開第9 9 / 3 9 1 9 0 (WO , A 1)
 COSTE, H., et al., J. Biol. Chem., 262(25), pp.12096-12103 (1987)
 井上 忠雄, 防衛技術ジャーナル, 18(3), pp.4-14 (1998)
 FRANZ, D.R., et al., JAMA, 278(5), pp.399-411 (1997)
 瀬戸 康雄, 薬学雑誌, 129(1), pp.53-69 (2009)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07H 1/00-99/00
 A61K 31/00-31/80
 A61P 1/00-43/00
 CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)