

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5430552号
(P5430552)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

(51) Int. Cl.	F 1
A 61 K 31/538	(2006.01) A 61 K 31/538
C 07 D 265/34	(2006.01) C 07 D 265/34 C S P
C 07 D 413/12	(2006.01) C 07 D 265/34
C 07 D 417/12	(2006.01) C 07 D 413/12
A 61 P 33/02	(2006.01) C 07 D 417/12

請求項の数 5 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-502848 (P2010-502848)
(86) (22) 出願日	平成21年3月11日 (2009.3.11)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/054634
(87) 国際公開番号	W02009/113569
(87) 国際公開日	平成21年9月17日 (2009.9.17)
審査請求日	平成24年1月20日 (2012.1.20)
(31) 優先権主張番号	特願2008-62410 (P2008-62410)
(32) 優先日	平成20年3月12日 (2008.3.12)
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)

(73) 特許権者	505232346 学校法人星薬科大学 東京都品川区荏原2丁目4番41号
(73) 特許権者	508075834 株式会社 シンスター・ジャパン 神奈川県小田原市栄町二丁目9番地46号
(73) 特許権者	306037311 富士フィルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ベンゾ [a] フェノキサチン化合物を有効成分として含有する原虫疾患予防又は治療用医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造式 1B で示される化合物又はその塩を有効成分として含有する、原虫疾患予防又は治療用医薬組成物。

【化 1】



10

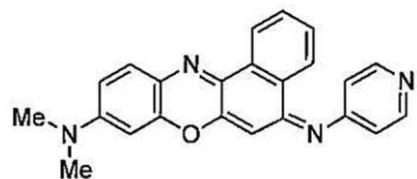
1B

20

【請求項2】

以下の構造式 1 C ~ 1 H、1 J ~ 1 M、1 P、1 R ~ 1 T、1 a ~ 1 c 及び 1 e ~ 1 h のいずれかで示される化合物又はその塩を有効成分として含有する、原虫疾患予防又は治療用医薬組成物。

【化 2】



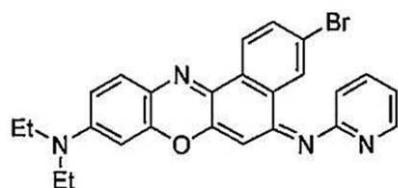
1c



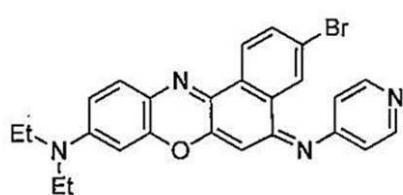
1D



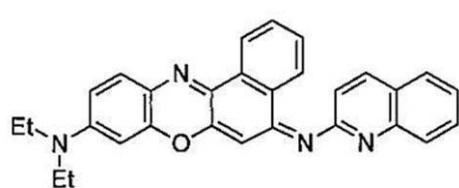
1F



1F



1G



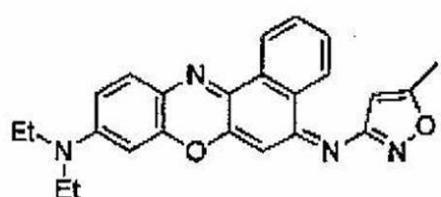
30

10

20

30

【化 3】



1J

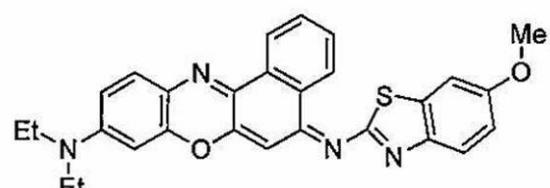


1K

10

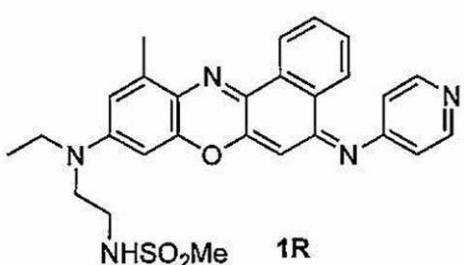


1L



1M

1P



1R

Chemical structure of compound **1S** is shown, featuring a complex polycyclic system with an NHSO_2Me group.

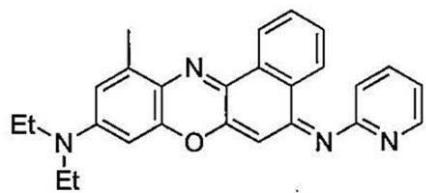
15



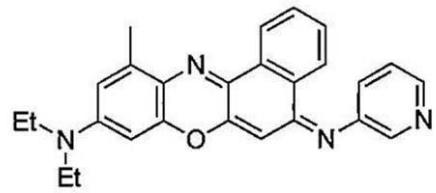
17

30

【化 4】



1a

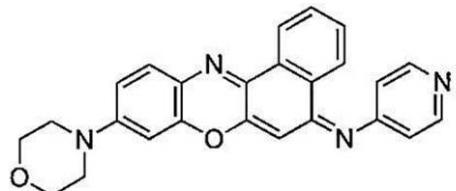


1b

10

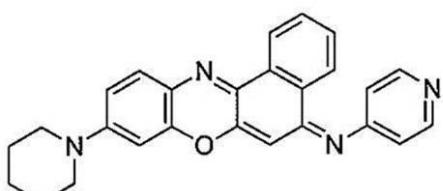


1c

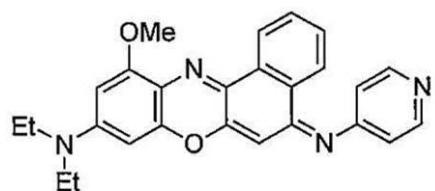


1e

20

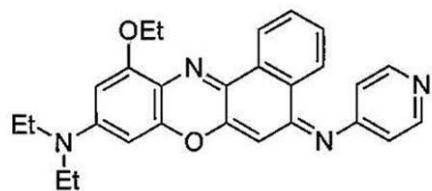


1f



1g

30



1h



前記原虫疾患がマラリア症、リーシュマニア症、アフリカ睡眠病、シャーガス病、トキソプラズマ症、リンパフィラリア症、バベシア症、又はコクシジウム症である、請求項1または2に記載の医薬組成物。

40

【請求項 4】

前記原虫疾患がマラリア症、リーシュマニア症、アフリカ睡眠病、又はシャーガス病である、請求項3に記載の医薬組成物。

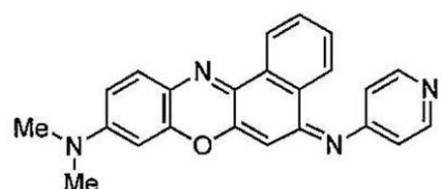
三、請求項 5

以下の構造式 1 B ~ 1 G、 1 J ~ 1 K、 1 M、 1 P、 1 R ~ 1 T、 1 a ~ 1 c 及び 1 e ~ 1 h のいずれかで示される化合物。

【化 5】

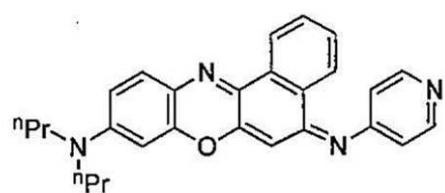


1B



1C

10

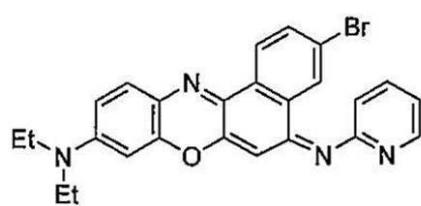


1D



1E

20



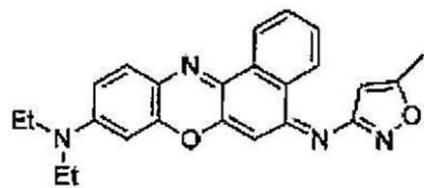
1F



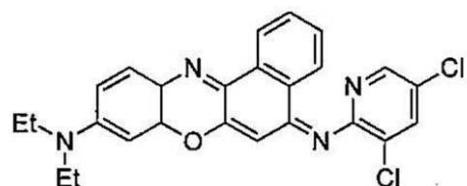
1G

30

【化 6】

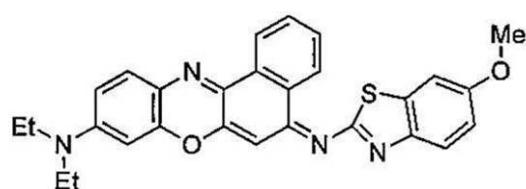


1J



1K

10

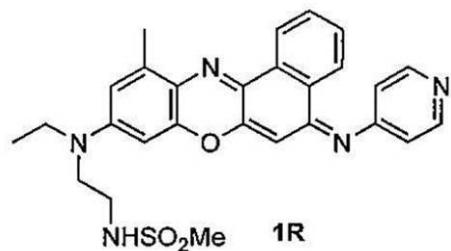


1M

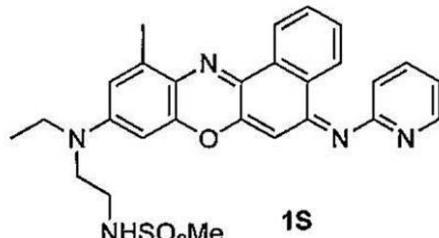


1P

20

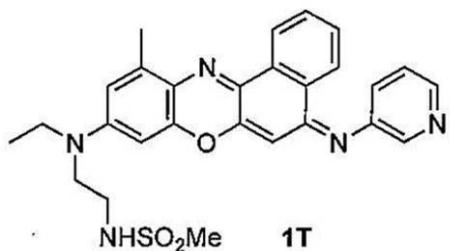


1R



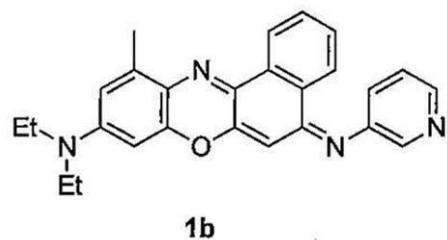
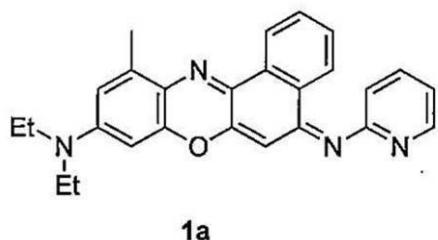
1s

30

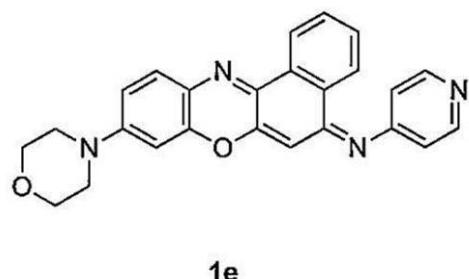


11

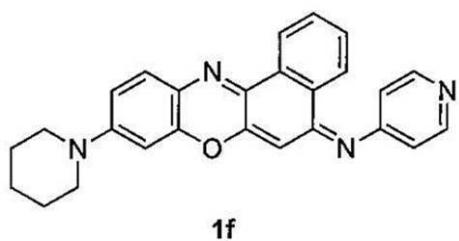
【化7】



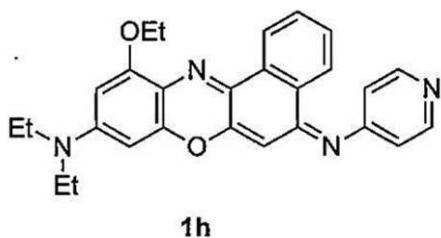
10



20



30



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明はベンゾ[a]フェノキサチン化物を有効成分として含有する原虫疾患予防又は治療用医薬組成物及び新規なベンゾ[a]フェノキサチン化物に関する。本発明の医薬組成物は、特に、例えば、薬剤耐性マラリアを含むマラリア症、リ・シュマニア症、アフリカ睡眠病やシャ・ガス病を含むトリパノソ・マ症、トキソプラズマ症、及びクリプトスボリジウム症のような寄生虫感染に関する疾患の治療及び治療に有用である。

【背景技術】

【0002】

寄生性の原虫感染症は、現在でも特に熱帯や亜熱帯地域を中心に多く知られており、例えばマラリア症、リ・シュマニア症、アフリカ睡眠病（アフリカ・トリパノソーマ症）、シ

50

ヤーガス病（アメリカ・トリパノソーマ症）、リンパフィラリア症、バベシア症、クリプトスピリジウム症、トキソプラズマ症などが挙げられる。これらには、ヒトのみに感染するもの及び、家畜や小動物にも感染する人畜共通感染症であるものに分類されるが、どちらにおいても重大な経済的かつ社会的損害をもたらす。

【0003】

これらの疾病の中には十分な効果を示す治療薬がないもの、治療薬に対する耐性原虫の出現及び拡散、治療薬の副作用などが問題となっているものもあり、有効な薬剤が切望されている。また、これらの疾病の中には、一般的な社会生活を送ることが不可能になるほどの重篤な症状を示すもの、さらには介護必要な寝たきり状態を余儀なくさせるもの、致死性の症状に発展させるものがあり、早急な化学療法剤の開発が不可欠である。しかし、これらの疾病に有効性を示すワクチンは現在のところ存在せず、今後も開発が困難とされている。そのような背景のもと、内服や注射、もしくはそれに準じる投与形態で服用できる化学療法剤の開発が切望されている。

10

【0004】

本発明者の一人である井原正隆等は、これまでに、フェノキサニジウム化合物を活性成分とする原虫疾患予防又は治療用医薬組成物（特許文献1）、及びアザロダシアニン化合物を活性成分とする原虫疾患予防又は治療用医薬組成物（特許文献2）を研究開発した。

【0005】

これまでに、ベンゾ[a]フェノキチンおよびその酸との塩であるベンゾ[a]フェノキサゾニウム化合物1が多数合成されておりこれらについて抗腫瘍性が報告されている（非特許文献1～5）。一方、マラリア等の熱帯病の原因となる原虫に対する生育阻害活性の報告例については、一般式（1）のR³が水素原子、又はエチル基の例が記載されているもののそのin vitro、及びin vivo活性は低いものである（非特許文献6、及び7）。

20

【0006】

【特許文献1】国際公開公報WO2006/087935号パンフレット

【特許文献2】国際公開公報WO2006/137258号パンフレット

【非特許文献1】M. L. Crossley, P. F. Dreisbach, C. M. Hofman, R. P. Parker, J. Am. Chem. Soc., 74, 573-578 (1952)

【非特許文献2】M. L. Crossley, R. J. Turner, C. M. Hofmann, P. F. Dreisbach, R. P. Parker, J. Am. Chem. Soc., 74, 578-584 (1952)

30

【非特許文献3】M. L. Crossley, C. M. Hofmann, P. F. Dreisbach, J. Am. Chem. Soc., 74, 584-586 (1952)

【非特許文献4】N. Motohashi, Yakugaku Zasshi, 102, 646-650 (1982)

【非特許文献5】N. Motohashi, Medicinal Research Reviews, 11, 239-294 (1991)

【非特許文献6】K. Takasu, T. Shimogama, C. Satoh, M. Kaiser, R. Brun, M. Ihara, J. Med. Chem., 50, 2281- 2284 (2007).

【非特許文献7】J. L. Vennerstrom, M. T. Makler, C. K. Angerhofer, J. A. Williams, Antimicrob. Agents Chemother., 39, 2671 - 2677 (1995).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0007】

本発明の目的は、寄生性の原虫感染症に対して高い治療効果と選択性を有する、新たな治療用及び/又は予防用の医薬組成物、特に寄生性の原虫感染症に罹患した生体に対して低毒性で、投与することにより有意な治癒効果を示す治療用及び予防用の医薬組成物提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は上記課題を解決するために、多種多様な化合物について疾病原因となる原虫の増殖効果を検定し、さらに副作用の指標となる哺乳類細胞に対しての細胞毒性を評価した。また、そこで選抜された化合物について、宿主モデルとしてマラリア感染マウスを用

50

いて、任意の量もしくは形態で投与しマラリアの治療効果を評価し、50%以上のマラリア原虫増殖抑制効果を示す化合物を探索した。その結果、本発明者は、以下に示す一般式1で表されるベンゾ[a]フェノキチン化合物及びその塩を有効成分として含む医薬組成物が優れた原虫疾患予防又は治療謳歌を有することを初めて見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成了。

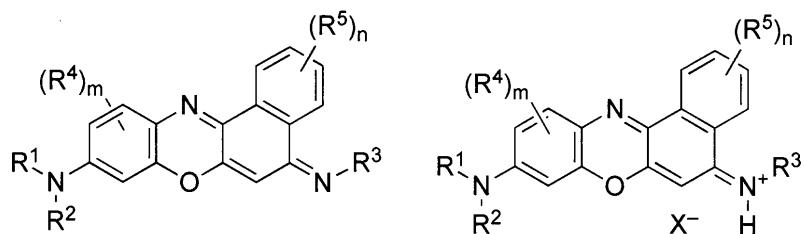
【 0 0 0 9 】

即ち、本発明は、以下の各態様に係るものである。

1. 下記一般式(1)で示されるベンゾ[a]フェノキサチン化合物又はその塩を有効成分として含有する原虫疾患予防又は治療用医薬組成物。

(0 0 1 0)

【化 1 】



1

10

20

(式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、置換若しくは未置換のアルキル基、アルケニル基、アリール基又はヘテロ環残基を表し、又は、R¹及びR²は縮合して環を形成し、R³は置換若しくは未置換のアルケニル基、アリール基又はヘテロ環残基を表し、R⁴及びR⁵はそれぞれ独立にハロゲン原子、置換若しくは未置換のアルキル基、アルケニル基、アリール基、アルコキシ基、アルキルチオ基、又はアミノ基を表し、mは0～3のいずれかの整数、nは0～5のいずれかの整数を表し、X⁻は、陰イオンを表す。)

2. 一般式(1)において、R¹及びR²それぞれ独立に水素原子、炭素数が1～8のアルキル基、炭素数が3～8のアルケニル基、炭素数が6～10のアリール基又は炭素数が1～10のヘテロ環残基であり、R³は炭素数が3～8のアルケニル基、炭素数が6～10のアリール基又は炭素数が1～10のヘテロ環残基であり、R⁴およびR⁵はそれぞれ独立にハロゲン原子又は炭素数が1～8のアルキル基であり、m及びnはそれぞれ独立に0又は1を表し、X⁻で表される陰イオンが、塩素原子、臭素原子、硝酸イオン、硫酸イオン、P-トルエンスルホン酸イオン又はシュウ酸イオンである、請求項1記載の医薬組成物。

30

3. 一般式(1)において、R¹及びR²はそれぞれ独立にメチル基、エチル基、プロピル基、2-ヒドロキシエチル基、又は2-メタンスルホンアミドエチル基であり、R³はヘテロ環残基を表す、上記1又は2記載の医薬組成物。

4. R^3 はピリジル基、ピリミジル基、イミダゾリル基、テトラゾリル基又はチアゾリル基である、上記3記載の医薬組成物。

49

5. R^4 はフッ素原子、塩素原子、メトキシ基、エトキシ基、又はメチル基である、上記 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

6 R^4 の置換位置が 1, 1 位を含む 上記 5 記載の医薬組成物。

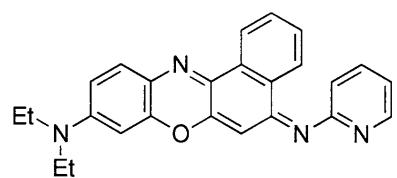
7. R⁵はフッ素原子、塩素原子又はメチル基である、上記1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

8 R⁵の置換位置が3位を含む 上記7記載の医薬組成物

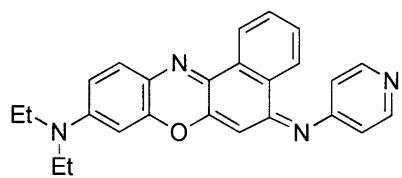
9. 以下の構造式 1A～1T 及び 1a～1h のいずれかで示される化合物又はその塩を有効成分として含有する原虫疾患予防又は治療用医薬組成物

0 0 1 1 1

【化 2】

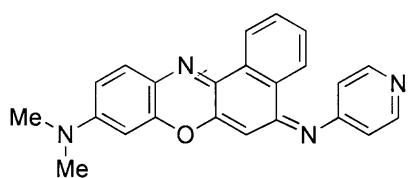


1A

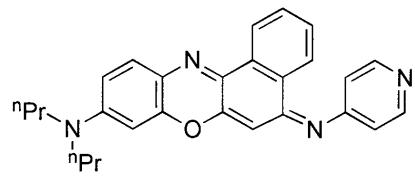


1B

10

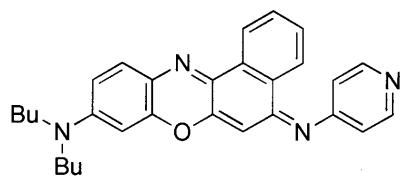


1C

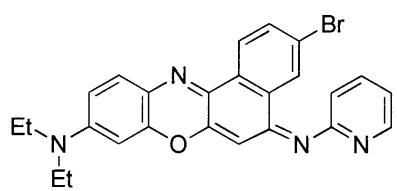


1D

20

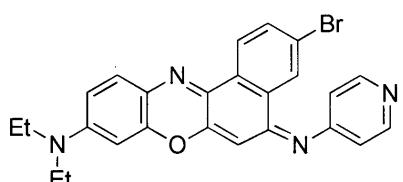


1F

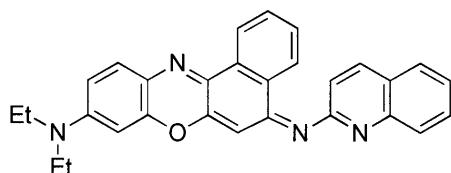


1F

30

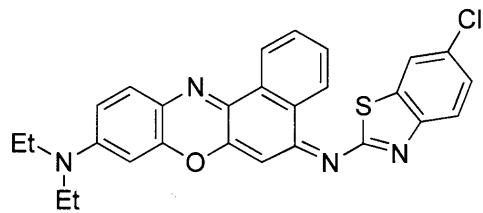


1G

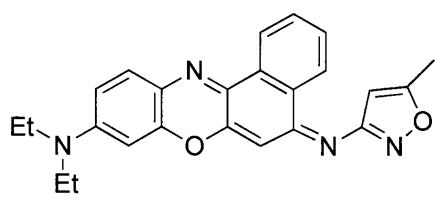


1H

40

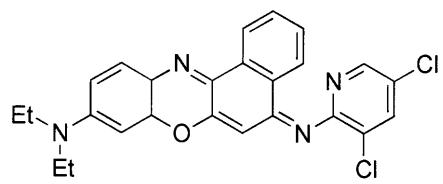


11

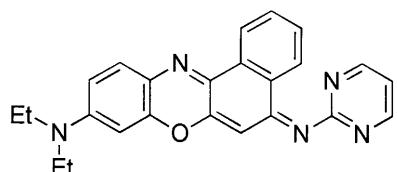


1J

【化 3】

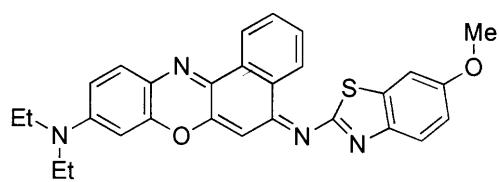


1K

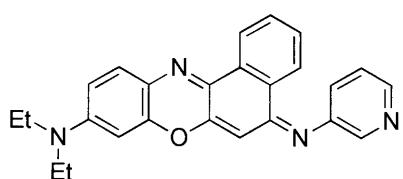


1L

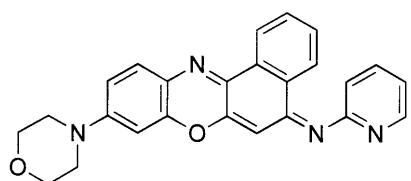
10



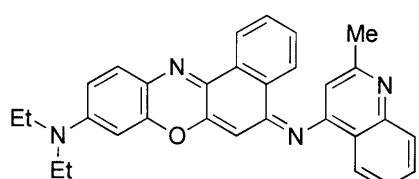
1M



1N

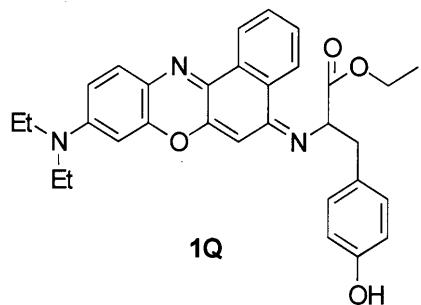


10

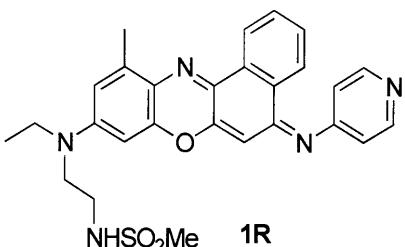


1P

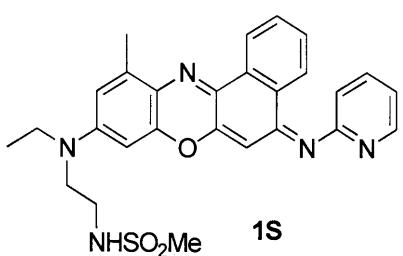
20



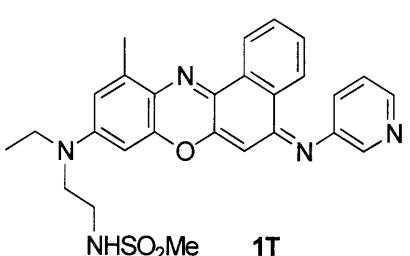
1Q



30



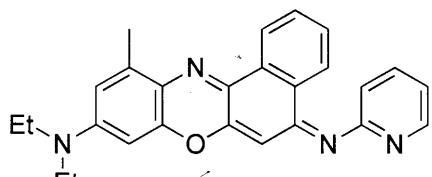
1S



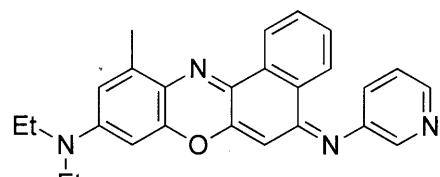
11

40

【化4】

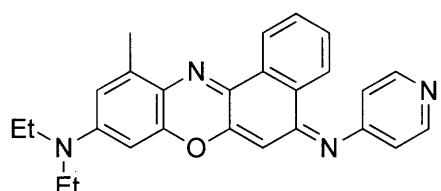


1a

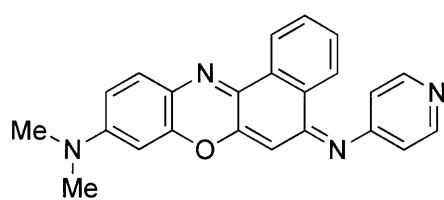


1b

10

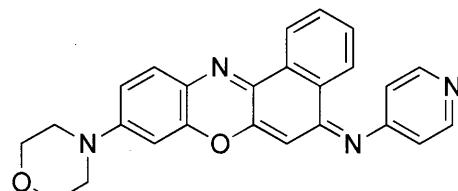


1c

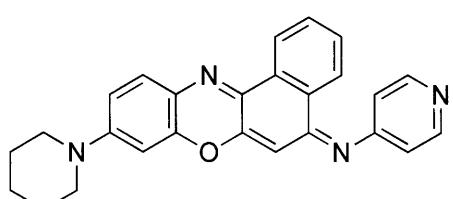


1d

20

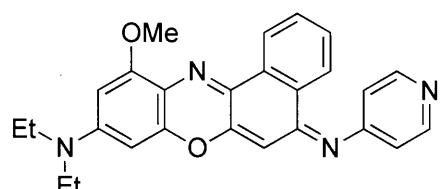


1e

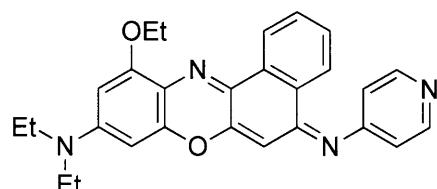


1f

30



1g



1h

40

10. 原虫寄生感染症がマラリア症、リーシュマニア症、アフリカ睡眠病、シャーガス病、トキソプラズマ症、リンパフィラリア症、バベシア症、又はコクシジウム症である、上記1~9のいずれか一項に記載の医薬組成物。

11. 原虫寄生感染症がマラリア症、リーシュマニア症、アフリカ睡眠病、又はシャーガス病である、上記10に記載の医薬組成物。

12. 上記の構造式1A~1T及び1a~1hのいずれかで示される化合物。

【発明の効果】

【0012】

本発明の医薬組成物に有効成分として含まれるベンゾ[*a*]フェノキサチン化合物又はそ

50

の塩は、寄生性の原虫感染症に対して低用量の投与によっても増殖阻害効果を示し、原虫増殖阻害を示す用量より高い用量の投与によっても哺乳類細胞を傷つけない（選択性係数が高い）。また、マラリア感染マウスを用いた *in vivo* の治療試験において、従来公知の化合物と比較して、有意に高い治癒率及び有意な延命効果を示すことが確認された。更に、急性毒性も極めて低いことから、副作用の改善されたマラリア治療薬等として有効であることが確認された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明による医薬組成物について具体的に説明する。以下、単に「本発明化合物」と記載するときは、一般式（1）で示される本発明化合物を全て含む。以下に本発明化合物の各部分における具体例及び好適例を挙げるが、本発明化合物の範囲はこれらに限定されるものではない。

10

【0014】

一般式（1）で示される本発明化合物において、具体的として、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、炭素数が1～8のアルキル基、炭素数が3～8のアルケニル基、炭素数が6～10のアリール基および炭素数が1～10のヘテロ環残基を表し、R³は炭素数が3～8のアルケニル基、炭素数が6～10のアリール基および炭素数が1～10のヘテロ環残基を表し、R¹とR²は縮合して環を形成しても良い。炭素数1～8のアルキル基の好ましい例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、シクロヘキシル基、及びオクチル基が挙げられる。これらの好ましい置換基としては、フッ素原子、塩素原子、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基、オキシカルボニル基、カルボキシ基、カルボンアミド基、スルフォンアミド基が挙げられる。炭素数3～8のアルケニル基の好ましい例としては、ビニル基、アリル基、ブテニル基、及びオクテニル基が挙げられ、それらの置換基としては、フッ素原子、塩素原子が挙げられる。炭素数6～10のアリール基の好ましい例としては、フェニル基、ナフチル基が挙げられ、それらの置換基としては、フッ素原子、塩素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基、カルボキシ基が挙げられる。炭素数が1～10のヘテロ環残基としては、ピリジル基、ピリミジル基、トリアジル基、ピリダジル基、イミダゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、チアゾリル基、及びオキサゾリル基が挙げられ、それらの置換基として好ましくは、フッ素原子、塩素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基、カルボキシ基、及びピリジル基が挙げられる。m及びnは好ましくは0又は1を表す。Xで表される陰イオンの好ましい例は、塩素原子、臭素原子、硝酸イオン、硫酸イオン、P-トルエンスルホン酸イオン、シュウ酸イオンが挙げられ、特に好ましくは塩素イオンを表す。R⁴は好ましくはハロゲン原子、アルコキシ基又はメチル基等の炭素数1～8のアルキル基を表し、特に好ましくは、フッ素原子、塩素原子、メトキシ基、エトキシ基又はメチル基であり、その置換位置は11位である。R⁵は特に好ましくはフッ素原子、塩素原子又はメチル基であり、その置換位置は3位が特に好ましい。R⁴及びR⁵の置換基としては、フッ素原子、ヒドロキシ基、又はアルコキシ基が挙げられる。

20

【0015】

30

R¹及びR²は特に好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基、2-ヒドロキシエチル基、又は2-メタンスルホンアミドエチル基である。R³は好ましくはヘテロ環残基を表し、より好ましくはピリジル基、ピリミジル基、イミダゾリル基、テトラゾリル基又はチアゾリル基を表し、特に好ましくはピリジル基またはイミダゾリル基を表す。

40

【0016】

上記の一般式（1）で示される本発明化合物に含まれる化合物の中で、特に、以下の構造式1A～1Tのいずれかで示される化合物又はそれらの塩は本発明医薬組成物の有効成分として特に好適な例である。更に、これらの化合物は物質自体として新規なものであり、従って、本発明はこれら新規な化合物自体にも係る。

【0017】

50

上記の化合物を含有する本発明の医薬組成物は、マラリア症、アフリカ・トリパノソマ症（別名；アフリカ睡眠病）、アメリカ・トリパノソマ症（別名；シャ・ガス病）、リ・シュマニア症、バベシア症、リンパフィラリア症、トキソプラズマ症（エイズなどの日和見感染症）、クリプトスボリジウム症（熱帯性下痢）、その他寄生性の原虫による感染が原因となる多様なタイプの疾病的治療及び予防に有効に使用できる。

【0018】

本発明の医薬組成物において、有効成分として1又は2種類以上の本発明化合物を含有してもよく、更に、必要に応じて、従来から用いられている抗原虫感染症剤を含む当業者に公知の任意の他の治療薬と組合せて使用しても良い。かかる抗原虫感染症剤の好適な例としては、クロロキン、メフロキン、アルテミシニン、アトバコン、及びピリメサミン（以上、マラリア症の治療薬）；スラミン、ペントミジン、メラルソプロル、及びアスコフラノン（以上、アフリカ睡眠病の治療薬）ベンズニダゾル（以上、シャ・ガス病の治療薬）、ペントスタム、アンフォテリシンB、ミルテフォシン及びフルコナゾール（以上、リ・シュマニア症の治療薬）等が挙げられる。

【0019】

一般式（1）の化合物と組合せて、本発明の医薬組成物に用いることのできる医薬キャリア-又は希釈剤の好適な例としては塩化ナトリウム；塩化マグネシウム；塩化亜鉛、グルコ-ス；サッカロ-ス；ラクト-ス；エチルアルコ-ル；グリセリン；マンニト-ル；ソルビト-ル；ペントエリスリト-ル；ジエチレングリコ-ル、プロピレングリコ-ル、ジプロピレングリコ-ル、ポリエチレングリコ-ル400、他のポリエチレングリコ-ル；トリラウリン酸グリセリル、及びジステアリン酸グリセリルの如き脂肪酸のモノ、ジ及びトリグリセリド；ペクチン；でんぶん；アルギニン酸；キシロ-ス；タルク；石松子；オリ-ブ油、ピ-ナツ油、ヒマシ油、コ-ン油、紅花油、小麦麦芽油、ゴマ油、棉実油、ヒマワリ油及びタラ肝油の如きオイル及び油脂；ゼラチン；レシチン；シリカ；セルロ-ス；メチルヒドロキシプロピルセルロ-ス、メチルセルロ-ス、ヒドロキシエチルセルロ-スの如きセルロ-ス誘導体；ステアリン酸カルシウム、ラウリン酸カルシウム、オレイン酸マグネシウム、パルミチン酸カルシウム、ベヘン酸カルシウム及びステアリン酸マグネシウム等の12～22の炭素原子を有する脂肪酸の塩；シクロデキストリン類（例えば、-シクロデキストリン、-シクロデキストリン、-シクロデキストリン、ヒドロキシエチル-シクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、ジヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、カルボキシメチルエチル-シクロデキストリン、シクロアワオドリン、及びジメチル-シクロデキストリン等）；乳化剤（例えば、2～22の炭素原子、特に10～18の炭素原子を有する飽和及び不飽和の脂肪酸とグリコ-ル、グリセリン、ジエチレングリコ-ル、ペントエリスリト-ル、エチルアルコ-ル、ブチルアルコ-ル、オクタデシルアルコ-ルの如き1～20の炭素原子を有する一価の脂肪族アルコ-ル又は多価アルコ-ルとのエステル；及びジメチルポリシロキサンの如きシリコ-ン等が挙げられる。更に、医薬組成物に従来から用いられてきた当業者に公知の任意の追加のキャリア-も本発明の医薬組成物に使用することが出来る。

【0020】

本発明の化合物の薬学的な有効量及び投与方法又は投与手段は、感染症の原因となる寄生原虫の種類、原虫の寄生部位、病状の重さ、治療方針、患者の年齢、体重、性別、全般的な健康状態、及び患者の（遺伝的）人種的背景に応じて、当業者が適宜選択することができる。一般的には、本発明の化合物の投与量は1～10,000mg/日/体重70kg、より一般的には50～2000mg/日/体重70kgである。

【0021】

本発明医薬組成物は投与方法・投与経路等に応じて当業者に公知の任意の形状とすることが出来る。それらは適当な方法で投与することが出来る。例えば、形状が、液体状、錠剤状、コロイド状のものを、液状の場合、5%グルコ-ス水溶液に溶かした形で或いは上記のキャリア-又は希釈剤を伴った形で、静脈内、腹腔内、皮下に注射する方法が挙げられる。錠剤状の場合では経口から服用が挙げられ、コロイド状の場合は皮膚に塗布する等

10

20

30

40

50

の方法が挙げられる。尚、上記一般式(1)で示される化合物は、本発明の医薬組成物の使用目的、対象、及び形状等に応じて、適當な量で含有されることが出来るが、通常、1mg～10,000mg程度、好ましくは、10mg～3,000mg程度含有されている。

【実施例】

【0022】

以下に本発明を詳細に説明するために、構造式1A～1Tのいずれかで示される本発明化合物の合成法、及び、これら化合物の有効性を明らかにした。即ち、これら化合物及びその医薬組成物の有効性を明らかにするために、in vitroによるマラリア原虫、リーシュマニア原虫、アフリカ・トリパノソーマ原虫、アメリカ・トリパノソーマ原虫の増殖阻害活性スクリーニング試験、及び、マラリア感染マウスを用いるin vivoによる治療効果を試験し評価した。尚、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

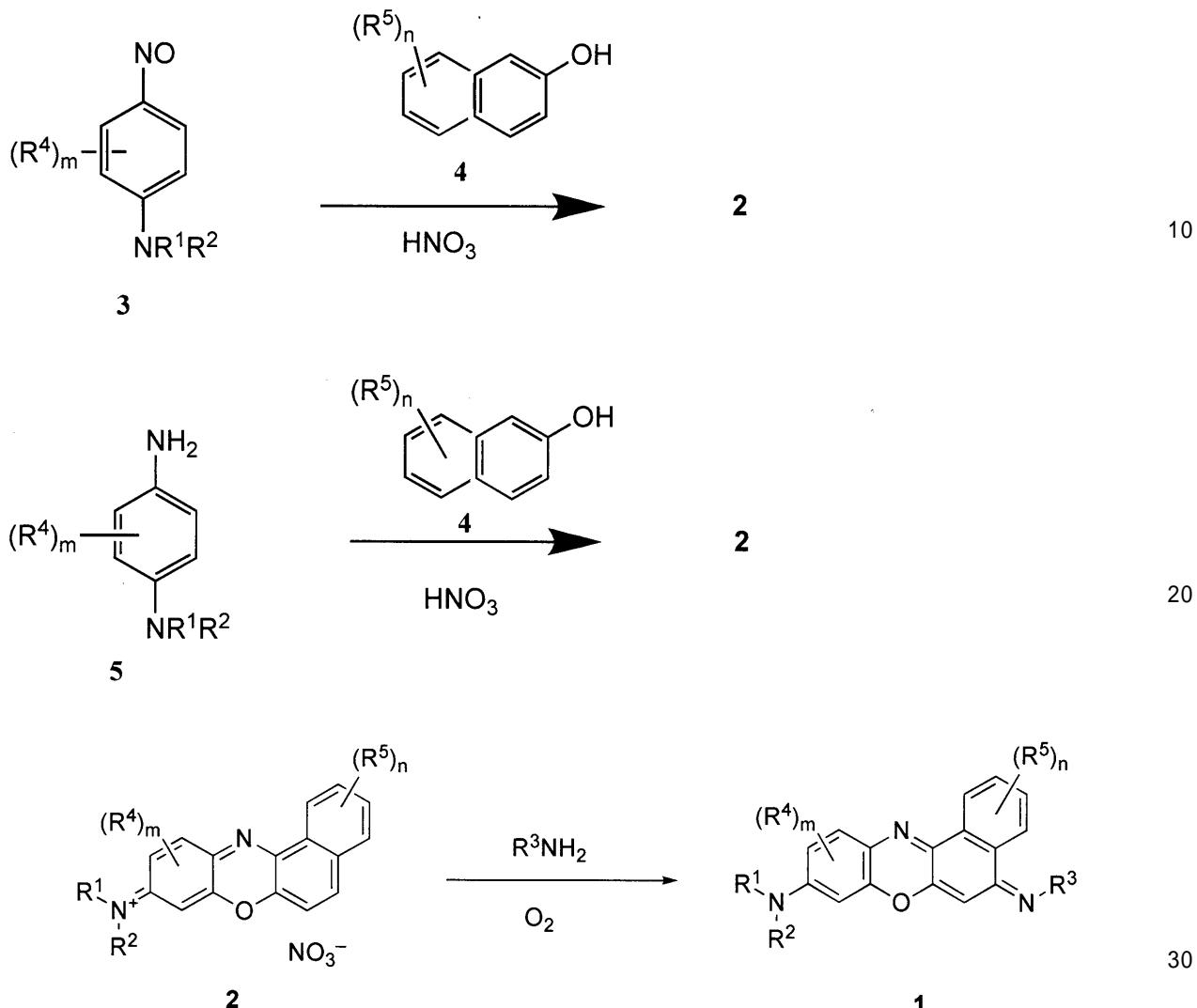
【0023】

【ベンゾ[a]フェノキサチン化合物の合成】

以下の反応式において、一般式1で表されるベンゾ[a]フェノキサチン化合物およびその塩は、一般式3で示される4-ニトロソアニリン誘導体又は5で示されるp-フェニレンジアミン類と一般式4で示される2-ナフトール誘導体をHNO₃等の酸化剤の存在下に反応させることにより2を得た後、第一級アミンと酸素を含む酸化剤の存在下にエタノール中で反応させるとベンゾ[a]フェノキサチン1が、遊離塩基として安定な物質として得られた。これらの構造は¹Hおよび¹³C NMR、IR、UV、マススペクトルさらに元素分析によって決定した。また、これらは塩酸塩としても精製が可能である。なお、1A-1Tは総て新規化合物である。

【0024】

【化5】



【0025】

[本発明のベンゾ[a]フェノキサチニウム実施例]

Benzo[a]phenoxazine 1A-1Tの合成

硝酸ベンゾ[a]フェノキサチニウム 2 (非特許文献3) (1 mmol)をエタノール (5 mL)に溶解し、相当するアミン (3 mmol)を攪拌下に一気に加え、この混合物を一晩加熱還流し、さらに室温で1日攪拌する。溶媒を留去後、残留物をシリカゲルクロマトグラフィーにて2回精製する。溶出液はCHCl₃: MeOH (10:1, v/v) ついで CHCl₃: MeOH (10:0.3, v/v)を用いる。溶媒を留去後、生成物をAcOEt ついで Et₂Oで洗浄してベンゾ[a]フェノキサチニウム 1A-Tを得た。

【0026】

N,N-Diethyl-5-(pyridin-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1A)

Yield 55 %, mp 169-170 ; IR (neat, cm⁻¹): 2975, 1645, 1590, 1580, 1490, 1455,

1270, 1220, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 532 (4.57); ¹H N

MR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.39 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6

40

50

.27 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.54 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.99-7.03 (m, 2H), 7.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.60-7.72 (m, 3H), 8.50-8.51 (m, 1H), 8.60-8.64 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) ppm 12.6, 44.9, 96.3, 99.1, 108.6, 117.0, 118.6, 123.7, 124.7, 125.3, 129.8, 130.1, 130.3, 131.6, 132.8, 137.6, 141.9, 146.6, 148.9, 149.0, 149.9, 157.9, 163.8; MS (EI $^+$): m/z: 394 [M \times] $^+$; HRMS (EI $^+$) 394.1793 [M \times] $^+$, found 394.1767; Anal. Calcd. For $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O} \times 0.75\text{H}_2\text{O}$: C, 73.60; H, 5.81; N, 13.73; Found: C, 73.68; H, 5.57; N, 13.43.

【 0 0 2 7 】

N,N-Diethyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1B)

Yield 38 %, mp 247-248; IR (neat, cm^{-1}): 2975, 1640, 1595, 1575, 1490, 1455, 1270, 1220, 1110; UV-vis (CHCl_3): (nm) ($\log /L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 713 (4.48), 537 (4.49); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 6.13 (s, 1H), 6.29 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.85-6.86 (m, 2H), 7.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.61-7.69 (m, 2H), 8.50-8.52 (m, 2H), 8.54 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.62 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) ppm 12.6, 44.9, 96.3, 97.7, 108.8, 116.0, 123.9, 124.7, 125.1, 129.9, 130.3, 130.5, 131.6, 132.2, 141.5, 146.6, 149.1, 150.0, 150.4, 156.8, 159.4; MS (EI $^+$): m/z: 394 [M \times] $^+$; HRMS (EI $^+$) 394.1793 [M \times] $^+$, found 394.1807; Anal. Calcd. For $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O} \times 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 75.26; H, 5.68; N, 14.04; Found: C, 75.31; H, 5.10; N, 13.88.

1B · HCl mp > 300; IR (neat, cm^{-1}): 2920, 2850, 1638, 1579, 1518, 1318, 1251, 1162, 1077; UV-vis (EtOH): (nm) ($\log /L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 602 (4.64), 213 (4.63); ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ppm 1.47 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 4.02 (dd, $J = 20.5, 7.1$ Hz, 4H), 7.38 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.93-7.87 (m, 1H), 7.97 (dd, $J = 10.0, 2.6$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 9.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); MS (ESI $^+$): m/z: 395.2 [M-Cl] $^+$; Anal. Calcd. For $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O} \times 2.5\text{H}_2\text{O}$: C, 63.09; H, 5.93; N, 11.77; Found: C, 62.66; H, 5.42; N, 11.57.

【 0 0 2 8 】

N,N-Dimethyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1C)

Yield 44 %, mp 217-218; IR (neat, cm^{-1}): 2954, 2887, 1628, 1592, 1577, 1447, 1442, 1359, 1200, 1111, 1002, 746; UV-vis (CHCl_3): (nm) ($\log /L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 546 (4.42), 236 (4.21); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm 3.07 (s, 6H), 6.14 (s, 1H), 6.33 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.85-6.87 (m, 2H), 7.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.53-7.55 (m, 2H), 7.66-7.7 (m, 2H), 8.53 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.64 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) ppm 40.3, 96.9, 97.9, 109.1, 112.9, 116.9, 123.9, 125.1, 129.2, 130.1, 130.4, 131.5, 132.2, 142.1, 146.2, 149.08, 152.2, 156.8, 159.4; MS (EI $^+$): m/z: 367.1 [M+1] $^+$; HRMS (EI $^+$) 366.1478 [M \times] $^+$, found 366.1480.

【 0 0 2 9 】

N,N-Dipropyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1D)

Yield 39 %, mp 215-216; IR (neat, cm^{-1}): 2962, 2876, 1635, 1580, 1547, 1483, 1458, 1361, 1238, 1112, 772; UV-vis (CHCl_3): (nm) ($\log /L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 716 (4.97), 550 (5); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) ppm 1.051 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.57 (m, 4H), 3.5 (t, $J = 7.1$ Hz, 4H), 6.31 (s, 1H), 6.6 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 8.9, 2.7$ Hz, 1H), 7.14-7.16 (m, 2H), 7.71-7.77 (m, 2H), 7.8 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.45 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.72-8.76 (m, 2H), 8.9 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) ppm 11.3, 20.5, 53.1, 96.4, 97.2, 109.6, 116.8, 123.9, 125.1, 125.3, 129.9, 130.6, 130.7, 131.7, 132.4, 140.7, 146.6, 149.7, 150

.9, 151.7, 152.2, 157.4; MS (EI⁺): m/z: 422 [M × +1]⁺; HRMS (EI⁺) 422.2106 [M ×]⁺, found 422.2128.

【 0 0 3 0 】

N,N-Dibutyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1E)

Yield 25 %, mp 188-189 ; IR (neat, cm⁻¹): 2950, 2872, 1626, 1581, 1514, 1457, 1365, 1324, 1285, 1218, 772; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 545 (4.06), 222 (3.92); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 6H), 1.37 (m, 4H), 1.6 (m, 4H), 3.3 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 6.13 (s, 1H), 6.27 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 9, 2.7 Hz, 1H), 7.39-7.34 (m, 2H), 7.62-7.7 (m, 2H), 7.84-7.89 (m, 2H), 8.2 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.5 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 8.6 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 13.9, 20.2, 29.4, 50.9, 51.1, 96.3, 97.3, 109.4, 116.6, 123.8, 123.9, 124.0, 125.0, 125.3, 127.3, 128.3, 129.9, 130.1, 130.5, 130.6, 131.0, 146.6, 149.5, 150.7, 157.2; MS (EI⁺): m/z: 451 [M × +1]⁺; HRMS (EI⁺) 450.2406 [M ×]⁺, found 450.2409

【 0 0 3 1 】

3-Bromo-N,N-diethyl-5-(pyridin-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1F)

Yield 73 %, mp 204-205 ; IR (neat, cm⁻¹): 2980, 1640, 1590, 1580, 1490, 1455, 1320, 1250, 1115; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 544 (4.62); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.40 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6.26 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.55 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.04 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.70-7.74 (m, 2H), 8.44 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.50-8.51 (m, 1H), 8.78 (d, J = 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 45.0, 96.3, 99.1, 108.9, 117.2, 118.9, 124.7, 124.8, 125.5, 128.2, 130.4, 133.1, 134.1, 137.7, 140.8, 146.7, 148.9, 149.0, 150.2, 156.7, 163.2; MS (Cl⁺): m/z: 473 [MH]⁺; HRMS (Cl⁺) 473.0976 [MH]⁺, found 473.0981; Anal. Calcd. For C₂₅H₂₁BrN₄O × 3H₂O: C, 56.93; H, 5.16; N, 10.62; Found: C, 57.41; H, 4.35; N, 10.01.

【 0 0 3 2 】

3-Bromo-N,N-diethyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1G)

Yield 28 %, mp 269-271 ; IR (neat, cm⁻¹): 2980, 1635, 1590, 1575, 1490, 1410, 1355, 1250, 1115; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 720 (4.44), 547 (4.43); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6.08 (s, 1H), 6.27 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 6.84-6.86 (m, 2H), 7.47 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.73 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.53-8.55 (m, 2H), 8.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 45.0, 96.2, 97.5, 109.1, 116.0, 124.81, 124.85, 125.6, 128.0, 130.3, 130.6, 133.3, 133.5, 140.4, 146.6, 149.1, 150.2, 150.3, 155.7, 159.2; MS (Cl⁺): m/z: 473 [MH]⁺; HRMS (Cl⁺) 473.0976 [MH]⁺, found 473.1017; Anal. Calcd. For C₂₅H₂₁BrN₄O × 4H₂O: C, 73.86; H, 5.77; N, 11.88; Found: C, 73.16; H, 5.29; N, 11.67.

【 0 0 3 3 】

N,N-Diethyl-5-(quinolin-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1H)

Yield 71 %, mp 234-236 ; IR (neat, cm⁻¹): 2980, 1635, 1585, 1540, 1510, 1340, 1265, 1220, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 691 (4.30), 539 (4.57); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.39 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6.26 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.57 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.44-7.48 (m, 1H), 7.52 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.63-7.70 (m, 3H), 7.79-7.83 (m, 1H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.14-8.16 (m, 1H), 8.62-8.72 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 44.9, 96.3, 99.3, 108.9, 117.6, 123.7, 124.8, 124.9, 125.6, 125.7, 127.4, 128.5, 129.5, 129.8, 130.3, 130.4, 50

130.5, 131.7, 132.5, 137.8, 146.7, 148.0, 149.2, 150.0, 156.4, 158.2; MS (EI⁺): m/z: 444 [M_x]⁺; HRMS (EI⁺) 444.1950 [M_x]⁺, found 444.1931; Anal. Calcd. For C₂₉H₂₄N₄O₂ × 1.5H₂O: C, 73.86; H, 5.77; N, 11.88; Found: C, 73.16; H, 5.29; N, 11.67

【 0 0 3 4 】

5-(6-Chlorobenzo[d]thiazol-2-ylimino)-N,N-diethyl-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1I)

Yield 45 %, mp 229-231 ; IR (neat, cm⁻¹): 2975, 1640, 1585, 1545, 1510, 1460, 1420, 1320, 1220, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 583 (4.62); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.44 (q, J = 7.1 Hz, 4H) 10 6.40 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.62-7.71 (m, 2H), 7.75 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.64-8.66 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 45.1, 96.2, 100.4, 109.9, 120.7, 122.5, 123.7, 125.7, 125.9, 126.4, 129.0, 129.8, 130.6, 131.0, 131.6, 132.1, 136.2, 140.4, 146.9, 150.5, 150.7, 151.4, 157.9, 160.3; MS (CI⁺): m/z: 485 [MH]⁺; HRMS (CI⁺) 485.1203 [MH]⁺, found 485.1268; Anal. Calcd. For C₂₇H₂₁CIN₄OS × 0.5H₂O: C, 65.64; H, 4.49; N, 11.34; Found: C, 65.39; H, 4.42; N, 10.97.

【 0 0 3 5 】

N,N-Diethyl-5-(5-methylisoxazol-3-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1J)

Yield 34 %, mp 195-196 ; IR (neat, cm⁻¹): 2975, 1635, 1590, 1560, 1490, 1275, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 539 (4.65); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.45 (s, 3H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.92 (s, 1H), 6.33 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 7.51 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.60-7.68 (m, 2H), 8.59-8.63 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 12.7, 44.9, 96.3, 99.1, 99.6, 109.0, 123.7, 125.0, 125.5, 129.8, 130.3, 130.5, 131.5, 132.3, 141.3, 146.7, 149.2, 150.1, 160.3, 168.8, 169.6; MS (EI⁺): m/z: 398 [M_x]⁺; HRMS (EI⁺) 398.1742 [M_x]⁺, found 398.1721; Anal. Calcd. For C₂₄H₂₂N₄O₂ × 2H₂O: C, 66.34; H, 6.03; N, 12.89; Found: C, 66.54; H, 5.43; N, 12.67.

【 0 0 3 6 】

5-(3,5-Dichloropyridin-2-ylimino)-N,N-diethyl-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1K)

Yield 10 %, mp 192-193 ; IR (neat, cm⁻¹): 2980, 1640, 1590, 1555, 1420, 1275, 1210, 1115; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 547 (4.67); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6.34 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.61 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.63-7.71 (m, 2H), 7.78 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.63-8.69 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 45.0, 96.3, 98.8, 109.3, 123.7, 124.6, 125.2, 125.6, 125.8, 129.9, 130.4, 130.7, 131.6, 132.0, 137.3, 141.1, 145.4, 146.7, 149.4, 150.3, 158.5, 158.8; MS (EI⁺): m/z: 462 [M_x]⁺; HRMS (EI⁺) 462.1014 [M_x]⁺, found 462.0958; Anal. Calcd. For C₂₅H₂₀Cl₂N₄O₂ × 0.5H₂O: C, 63.57; H, 4.48; N, 11.86; Found: C, 63.48; H, 4.30; N, 11.72.

【 0 0 3 7 】

N,N-Diethyl-5-(pyrimidin-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1L)

Yield 24 %, mp 208-210 ; IR (neat, cm⁻¹): 2975, 1640, 1590, 1550, 1395, 1275, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 543 (4.62); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.43 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.63 (dd, J = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.61-7.70 (m, 2H), 8.63 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 4.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12 50

.6, 45.01, 96.2, 99.3, 109.6, 115.6, 123.6, 125.4, 125.7, 129.8, 130.5, 130.8, 131.6, 131.9, 140.9, 146.7, 149.4, 150.4, 158.6, 159.0, 168.1; MS (EI⁺): m/z: 395 [M \times]⁺; HRMS (CI⁺) 396.1824 [MH]⁺, found 396.1850; Anal. Calcd. For C₂₄H₂₁N₅O₅ \times 1.5H₂O: C, 68.23; H, 5.73; N, 16.58; Found: C, 68.60; H, 5.29; N, 16.34.

【 0 0 3 8 】

N,N-Diethyl-5-(6-methoxybenzo[d]thiazol-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1M) Yield 52 %, mp 197-198 ; IR (neat, cm⁻¹): 2975, 1635, 1585, 1430, 1320, 1270, 1110; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 582 (4.69); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.89 (s, 3H), 6.39 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.03 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.62-7.70 (m, 3H), 7.81 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.64-8.69 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.6, 45.0, 55.8, 96.2, 100.7, 104.2, 109.7, 114.7, 122.5, 123.7, 125.7, 125.8, 129.7, 130.4, 130.8, 131.6, 132.3, 136.3, 140.8, 146.9, 147.2, 150.2, 150.5, 156.5, 159.4, 160.3; MS (CI⁺): m/z: 481 [MH]⁺; HRMS (CI⁺) 481.1698 [MH]⁺, found 481.1691; Anal. Calcd. For C₂₈H₂₄N₄O₂S \times 0.5H₂O: C, 68.69; H, 5.15; N, 11.44; Found: C, 68.41; H, 5.01; N, 11.23.

【 0 0 3 9 】

N,N-Diethyl-5-(pyridin-3-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1N) Yield 43 %, mp 198-199 ; IR (neat, cm⁻¹): 2971, 1636, 1589, 1564, 1488, 1469, 1408, 1352, 1271, 1218, 1109, 1014; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 533 (4.46), 240 (4.36); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 6.24 (s, 1H), 6.29 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.29-7.31 (m, 2H), 7.50 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.63-7.69 (m, 2H), 8.28 (d, J = 1.47 Hz, 1H), 8.37 (dd, J = 4.33, 1.80 Hz), 8.57 (d, J = 7.62 Hz, 1H), 8.64 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.58, 44.92, 96.3, 97.7, 108.8, 123.6, 123.8, 124.8, 125.07, 128.1, 129.9, 130.2, 130.4, 131.5, 132.4, 141.8, 142.4, 144.5, 146.6, 149.1, 150.02; MS (EI⁺): m/z: 395.1 [M+1]⁺; HRMS (EI⁺) 394.1793 [M \times]⁺, found 394.1792.

【 0 0 4 0 】

N-(9-Morpholino-5H-benzo[a]phenoxazin-5-ylidene)pyridin-2-amine (10) Yield 39 %, mp 235-236 ; IR (neat, cm⁻¹): 3066, 2962, 2855, 1636, 1592, 1585, 1551, 1488, 1462, 1423, 1332, 1307, 1237, 1123, 772; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 525 (4.38), 225 (4.33); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 3.38 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 3.87 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 6.6 (s, 1H), 6.89 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.6 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.72-7.74 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.81 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 8.35 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 8.5 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 8.69 (t, J = 7.9, Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 47.7, 66.4, 99.5, 99.8, 106.4, 111.7, 117.6, 119.2, 124.0, 125.8, 127.3, 130.4, 130.5, 130.6, 131.2, 131.6, 138.0, 146.1, 148.5, 148.9, 153.1, 157.5; MS (EI⁺): m/z: 409.1 [M+1]⁺; HRMS (EI⁺) 408.1586 [M \times]⁺, found 408.1568.

【 0 0 4 1 】

N,N-Diethyl-5-(2-methylquinoline-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1P) Yield 38 %, mp 229-230 ; IR (neat, cm⁻¹): 3059, 2973, 2930, 1637, 1590, 1552, 1489, 1463, 1407, 1352, 1271, 1252, 1113, 770; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log /L mol⁻¹cm⁻¹): 683 (4.10), 537 (4.24); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.88 (s, 3H), 6.03 (s, 1H), 6.28 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.58-6.69 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 7.41-7.74 (m, 6H), 8.2 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.63-8.70 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.5, 25.4, 44.9, 96.3, 98.2, 108.8, 110.0, 121.1, 122.2, 123.8, 123.9, 124.7, 150

24.8, 125.3, 126.2, 126.5, 126.9, 127.9, 128.4, 129.6, 130.0, 130.3, 130.5, 131.2, 131.6, 132.1, 141.5, 146.6, 149.1, 150.0, 157.3, 159.3, 159.7; MS (EI⁺): m/z: 459.1 [M_x+1]⁺; HRMS (EI⁺) 458.2106 [M_x]⁺, found 458.2125.

【 0 0 4 2 】

Ethyl 2-[9-(Diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-ylideneamino]-3-(4-hydroxyphenyl)propanoate (1Q)

Yield 37 %, mp 175-176 ; IR (neat, cm⁻¹): 3312, 3066, 2978, 2934, 1734, 1637, 1586, 1515, 1444, 1409, 1376, 1354, 1272, 1252, 1170, 1014; UV-vis (CHCl₃): (nm) (log ϵ /L mol⁻¹cm⁻¹): 539 (4.41), 387 (4.04); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.37 (t, J = 7.13 Hz, 3H), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 4.82 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.17 (s, 1H), 6.30 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.55-658 (dd, J = 8.95, 2.58 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.46 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.43 Hz, 2H), 7.49-7.50 (m, 2H), 7.67-7.81 (m, 2H), 8.63-8.69 (dd, J = 8.95, 2.58 Hz, 1H), 9.87 (s, 1H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm 12.5, 14.2, 36.9, 44.5, 53.8, 61.9, 96.2, 98.6, 109.5, 122.3, 123.9, 123.8, 125.02, 125.7, 128.8, 129.9, 130.2, 130.5, 131.3, 132.5, 146.6, 148.3, 150.4, 155.3, 156.1, 170.4; MS (EI⁺): m/z: 510 [M_x]⁺; HRMS (EI⁺) 510.2393 [M_x]⁺, found 510.2413.

【 0 0 4 3 】

N-Ethyl-N-(2-methansulfonamidylethyl)-11-methyl-5-(pyridine-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1R)

Yield 38 %, mp 235-236 ; IR (neat, cm⁻¹): 3633, 3023, 2972, 1639, 1605, 1581, 1556, 1491, 1412, 1370, 1313, 1219, 1136; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.21 (t, J = 7.01 Hz, 3H), 2.6 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 3.35 (q, J = 6.62 Hz, 2H), 3.47 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.58 (t, J = 6.62 Hz, 2H), 6.13 (s, 1H), 6.24 (d, J = 2.41 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.86 (d, J = 5.58 Hz, 1H), 7.65-7.69 (m, 2H), 8.51-8.54 (m, 3H), 8.68 (dd J = 7.46, Hz, 1H); MS (EI⁺): m/z: 502.3 [M_x+1]⁺

1R · HCl mp > 300; IR (neat, cm⁻¹): 3062, 2979, 2864, 1639, 1580, 1512, 1444, 1364, 1320, 1236, 1194, 1079; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.21 (t, J = 7.01 Hz, 3H), 2.6 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 3.14 (q, J = 6.62 Hz, 2H), 3.49 (t, J = 6.62 Hz, 2H), 5.99 (s, 1H), 6.42 (d, J = 2.41 Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.91 (d, J = 5.58 Hz, 1H), 7.19-7.2 (t, J = 6.24 Hz, 1H), 7.69-7.81 (m, 2H), 8.45 (dd J = 7.96, 1.11 Hz, 1H), 8.51 (dd J = 4.56, 157, Hz, 2H), 8.59 (dd J = 7.96, 0.99 Hz, 1H); MS (EI⁺): m/z: 503.2 [M_x+1]⁺.

【 0 0 4 4 】

N-Ethyl-N-(2-methansulfonamidylethyl)-11-methyl-5-(pyridine-2-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1S)

Yield 41 %, mp 221-222 ; IR (neat, cm⁻¹): 3632, 3065, 2979, 1634, 1593, 1580, 1549, 1488, 1462, 1370, 1320, 1272, 1147, 772; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 3.32 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 3.38 (q, J = 7.12 Hz, 2H), 3.51 (t, J = 6.76 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 6.5 (d, J = 8.27 Hz, 1H), 6.64 (t, J = 7.27 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.01 Hz, 1H), 7.01-7.06 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.44 (t, J = 7.01 Hz, 1H), 7.64-7.7 (m, 2H), 8.06 (d, J = 4.15 Hz, 1H), 8.51-8.6 (m, 2H); MS (EI⁺): m/z: 502.3 [M_x+1]⁺

【 0 0 4 5 】

N-Ethyl-N-(2-methansulfonamidylethyl)-11-methyl-5-(pyridine-3-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1T).

Yield 45 %, mp 227-228 ; IR (neat, cm⁻¹): 3620, 3065, 2975, 1634, 1591, 1554, 1488, 1411, 1319, 1272, 1218, 1147, 772; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1.2 (t, J = 7.02 Hz, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.97 (s, 3H), 3.35 (q, J = 6.62 Hz, 2H), 3.46

20

30

40

50

(q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.57 (t, $J = 6.56$ Hz, 2H), 6.2 (m, 2H), 6.49 (d, $J = 1.98$ Hz, 1H), 7.29-7.31 (m, 2H), 7.65-7.67 (m, 2H), 8.25 (d, $J = 1.59$ Hz, 1H), 8.37 (dd, $J = 4.36$, 1.66 Hz, 1H), 8.61 (dd, $J = 7.9$, 1.3 Hz, 1H), 8.684 (dd, $J = 7.46$, 1.3 Hz, 1H); MS (ESI $^+$): m/z: 502.3 [M \times +1] $^+$

【 0 0 4 6 】

N,N-Diethyl-11-methyl-5-(pyridin-2-ylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1a)

Yield 13.8 %, 1a \cdot HCl mp 167.2-168.4 °C; IR n (neat, cm^{-1}): 2978, 1638, 1594, 1577, 1530, 1446, 1245, 1196, 1124, 870, 780; UV-vis (MeOH): I (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 668 (4.85); ^1H NMR (400 MHz, MeOD) d ppm 8.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.41 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J = 7.5$, 1H), 7.78 (t, $J = 7.5$, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.30-7.19 (m, 1H), 6.89 (d, $J = 2.4$, 1H), 3.80 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.73 (s, 3H), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) d ppm 159.5, 153.0, 151.5, 147.4, 146.7, 145.6, 145.2, 142.4, 141.4, 132.6, 131.9, 131.2, 130.0, 126.8, 124.6, 124.3, 122.4, 119.3, 117.5, 107.5, 97.3, 36.7, 17.5, 13.6; MS (ESI $^+$): m/z: 409.1 [M $^+$]; Anal. Calcd. For $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O} \times 4.5\text{H}_2\text{O}$: C, 59.37; H, 6.51; N, 10.65; Found: C, 59.24; H, 5.66; N, 10.55.

【 0 0 4 7 】

N,N-Diethyl-11methyl-5-(pyridin-3-ylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1b)

Yield 18.2 %, 1b \cdot HCl mp 161.6-163.1 °C; IR n (neat, cm^{-1}): 2978, 1639, 1585, 1546, 1449, 1381, 1321, 1249, 1198, 1125, 1089, 988; UV-vis (MeOH): I (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 656 (4.64); ^1H NMR (400 MHz, MeOD) d ppm 9.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.02 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.68 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.12 (dd, $J = 8.4$, 5.0 Hz, 1H), 8.02 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.91 (m, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.87 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.86 (s, 3H), 1.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) d ppm 158.6, 151.7, 151.6, 149.9, 146.3, 141.9, 169.6, 139.4, 138.8, 137.4, 133.0, 132.4, 131.2, 130.0, 129.4, 125.4, 125.0, 124.3, 120.9, 99.0, 96.5, 39.8, 17.4, 13.6; MS (ESI $^+$): m/z: 409.1 [M $^+$]; Anal. Calcd. For $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O} \times 4.5\text{H}_2\text{O}$: C, 59.37; H, 6.51; N, 10.65; Found: C, 59.63; H, 5.36; N, 10.56.

【 0 0 4 8 】

N,N-Diethyl-11-methyl-5-(pyridin-4-ylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1c)

Yield 26.6 %, 1c \cdot HCl mp >300 °C; IR n (neat, cm^{-1}): 2977, 1639, 1579, 1513, 1443, 1324, 1249, 1199, 1072, 946, 823, 780; UV-vis (MeOH): I (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 594 (4.22); ^1H NMR (400 MHz, MeOD) d ppm 9.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.06-7.96 (m, 2H), 7.86-7.90 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.0 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.89 (s, 3H), 1.46 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) d ppm 160.2, 158.7, 152.0, 147.3, 146.5, 144.6, 144.4, 142.5, 132.9, 131.9, 131.5, 130.0, 127.9, 124.8, 124.7, 123.4, 112.9, 110.5, 97.6, 39.5, 17.5, 14.1; MS (ESI $^+$): m/z: 394 [M $^+$]; Anal. Calcd. For $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O} \times 4.5\text{H}_2\text{O}$: C, 59.37; H, 6.51; N, 10.65; Found: C, 58.51; H, 5.57; N, 10.52.

【 0 0 4 9 】

N,N-Dimethyl-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazin-9-amine (1d)

Yield 14.1 %, mp >300 °C; IR n (neat, cm^{-1}): 1641, 1599, 1579, 1486, 1401, 1366, 1337, 1263, 1201, 1133, 1114, 986, 809, 769; UV-vis (CHCl₃): I (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 532 (4.67); ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) d ppm 8.64 (dd, $J = 7.8$, 1.6 Hz, 1H), 8.54 (dd, $J = 4.8$, 1.5 Hz, 2H), 8.52 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.77-7.59 (m, 2H), 7.55 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 4.8$, 1.5 Hz, 2H), 6.60 (dd, $J = 9.0$, 2.7 Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 3.07 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz

, CDCl_3) δ ppm 159.9, 156.9, 152.3, 149.7, 149.2, 146.3, 142.0, 132.2, 131.5, 130.5, 130.3, 130.1, 125.2, 125.1, 124.0, 116.2, 109.3, 97.9, 96.9, 40.3; MS (ESI $^+$): m/z : 367.1 [M+H] $^+$; Anal. Calcd. For $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O} \times 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 73.58; H, 5.10; N, 14.92; Found: C, 73.27; H, 4.85; N, 14.62.

【0050】

9-Morpholino-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine (1e)

Yield 14.5 %, mp >300 °C; IR ν (neat, cm^{-1}): 2968, 2835, 1635, 1595, 1578, 1510, 1488, 1239, 1121, 1110, 1043, 1003, 827, 755; UV-vis (CHCl_3): λ (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 502 (4.49); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.69-8.62 (m, 1H), 8.54 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 2H), 8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.77-7.63 (m, 2H), 7.58 (d, J = 8.9, 1H), 6.85 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 2H), 6.78 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.6, 1H), 6.15 (s, 1H), 3.86 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.29 (t, J = 4.8 Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 159.1, 156.5, 152.8, 150.2, 148.7, 145.8, 144.0, 132.4, 131.2, 130.5, 130.4, 130.1, 126.6, 125.2, 124.1, 115.9, 111.2, 99.7, 98.4, 66.4, 47.6; MS (ESI $^+$): m/z : 409.2 [M+H] $^+$; Anal. Calcd. For $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2 \times 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 71.93; H, 5.07; N, 13.42; Found: C, 72.15; H, 5.08; N, 12.23.

【0051】

9-(Piperidin-1-yl)-5-(pyridin-4-ylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine (1f)

Yield 1.5 %, mp 266.8-268.2 °C; IR ν (neat, cm^{-1}): 2931, 2850, 1635, 1595, 1577, 1485, 1239, 1112, 1000, 827, 756; UV-vis (CHCl_3): λ (nm) ($\log e/\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 530 (4.52); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.68-8.61 (m, 1H), 8.54 (dd, J = 4.6, 1.5 Hz, 2H), 8.51 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.71-7.63 (m, 2H), 7.53 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 4.6, 1.5 Hz, 2H), 6.78 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.35 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 1.71-1.65 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 159.7, 156.9, 153.0, 149.8, 149.1, 146.1, 142.6, 132.1, 131.3, 130.5, 130.3, 130.1, 125.7, 125.1, 124.0, 116.3, 111.6, 99.3, 97.9, 48.8, 25.2, 24.2; MS (ESI $^+$): m/z : 407.1 [M+H] $^+$; Anal. Calcd. For $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$: C, 76.83; H, 5.46; N, 13.78; Found: C, 76.15; H, 5.47; N, 13.77.

【0052】

[薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫に対する活性と選択性 (in vitro)]

1. クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫の培養

本実験では、*Plasmodium falciparum* K1株の原虫を用いた。実験に用いた培地は、ろ過滅菌した RPMI-1640 培地で、ヒト血清を 5 % となるよう添加した。マラリア原虫の培養は O_2 濃度 3 %、 CO_2 濃度 4 %、 N_2 濃度 93 %、温度は 37 °C で行った。

【0053】

2. クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫増殖阻害スクリーニング試験

試験に用いる本発明化合物又は陽性対象薬 (クロロキン) は DMSO に溶解し、所定濃度の試験液とした。培養したマラリア原虫感染赤血球を遠心分離で集め、非感染赤血球で希釈し、初期感染率 0.15 % とした。このときのヘマトクリット値は 2.5 % とした。

96 穴培養プレートのウェルに、200 μL のマラリア感染培養液を加え、所定濃度の薬剤を含む試験液又は薬剤を含まない DMSO を加え調整した。試験液は duplicate にとった。

37 °C で 48 時間培養した後、0.5 μCi の放射性のトリチウム (^3H) 標識されたヒポキサンチンを各ウェルに加えた。さらに 24 時間同条件で培養した後、グラスファイバーフィルター上に採取し蒸留水で洗浄した。ベータプレート液体シンチレーションカウンター (Wallac 社製) で放射線強度を計測し、試験液添加群及びコントロールのマラリア原虫感染率を算出した。

【0054】

10

20

30

40

50

上記で求めたマラリア原虫感染率から次式によって増殖阻害率を算出し、50%増殖阻害濃度(EC_{50})を求める。

$$\text{増殖阻害率(\%)} = \{ 1 - (b - a) / (c - a) \} \times 100$$

a : 初期感染率

b : 試験液添加時の感染率

c : コントロールの感染率

【0055】

3. ラットL6細胞増殖阻害試験

ラット由来L6細胞(rat skeletal myoblast cell)を用いた。培地はRPMI1640培地に、L-グルタミン(200mM)が1%、胎児牛血清が10%となるように添加し、 CO_2 濃度5%、37で培養した。

試験に用いる本発明化合物又は対照薬をDMSOに溶解し、所定濃度の試験液とした。

前培養を行い、対数増殖期に入った細胞を含む培地を96穴培養プレートのウェルにとり、次に所定濃度の薬剤を含む試験液又は薬剤を含まないDMSOを加えた。試験液はduplicataにとった。

培養プレートをインキュベーター中で72時間培養した後、増殖阻害活性を検定した。検定は以下のように行つた。それぞれのウェルに10 μ LのAlamar Blue水溶液を加え、さらに2時間培養した。次に、培養プレートを蛍光マイクロプレートリーダー(Spectramax Gemini XS; 米国モレキュラー・デバイス社製)に装着し、536nmの励起波長で照射し、588nmの蛍光強度を測定し、試験液添加群及びコントロールのL6細胞の残存率を算出した。

【0056】

上記で求めた細胞残存率から次式によってL6細胞に対する増殖阻害率を算出し、50%増殖阻害濃度(EC_{50})を求めた。

$$\text{増殖阻害率(\%)} = \{ (C - A) / (B - A) \} \times 100$$

A : 初期細胞数

B : 3日後のコントロールの細胞数

C : サンプル添加した3日後の細胞数

【0057】

4. クロロキン耐性マラリアに対する薬効判定

クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫とラットL6細胞に対するサンプルの EC_{50} 値からサンプルの抗マラリア作用を評価する。クロロキン耐性マラリア原虫に対する選択毒性の指標として用いられる化学療法係数を下記式により算出し、薬効判定を行つた。選択毒性の値は大きいほど副作用の危険性が少ないことを意味する。

【0058】

$$\text{化学療法係数} = (\text{ラットL6細胞に対するサンプルの } EC_{50} \text{ \text{値}})$$

$$\div (\text{クロロキン耐性熱帯熱マラリア原虫に対するサンプルの } EC_{50} \text{ \text{値}})$$

【0059】

本発明化合物及び陽性対象薬についてのクロロキン感受性熱帯熱マラリア原虫とラットL6細胞に対するサンプルの各 EC_{50} 値、並びに選択毒性係数を表1及び表2に示す。

【0060】

以下の表1に示す様に、ベンゾ[a]フェノキサチン化合物は、薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum K1)に対して強い殺傷能を示し、また、ラットの通常細胞(L-6)に対する毒性に比べての選択毒性性は高いことが確認された。

【0061】

【表1】

50%増殖阻害濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			
化合物	<i>P. falciparum</i> K1	Cytotoxicity L6	選択性
1A	0.006	6.22	1037
1B	0.003	21.96	7320
1F	0.018	>90	>5000
1G	0.005	>90	>18000
1H	0.012	30.15	2513
1I	0.428	>90	210
1J	0.005	36.8	7360
1K	0.029	83.1	2866
1L	0.002	5.4	2700
1M	0.054	80.6	1492
クロロキン	0.047	データなし	データなし

【0062】

【表2】

化合物	<i>P. falciparum</i> K1	Cytotoxicity L6	選択性
1N	0.009	46.11	5123
10	0.015	20.8	1386
1P	0.036	6.6	183
1Q	0.045	33.8	751
1R	0.009	7.97	885
1S	0.007	0.307	43
1T	0.008	23.91	2988
1a	0.014	6.83	487
1b	0.011	39.79	3617
1c	0.008	38.52	481

【0063】

30

[マラリア感染マウスの経口投与での治癒試験 (in vivo)]

本実験ではローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* NK65株) を用いた。

感染血液はICR系雌性SPFマウス4~6週齢 (20-26g) に腹腔内または尾静脈投与で感染させ継体したものを使用している。マラリア感染マウスの尾静脈から採血し感染率を求め適度に感染 (10-20%の感染率) しているのを確認した後、マウス心臓からヘパリン入り注射器でマラリア感染血液を採血した。その後、赤血球数 (cells/ml) と原虫感染率から、投与量1mlあたり 5.0×10^{-6} のマラリア原虫となるように血液を生理食塩水にて希釈した。これを未感染マウス (ICR系雌性5週齢) の体重20gあたり0.2mlずつ尾静脈より感染させた (Day-0)。試験に用いる化合物は10%DMSO溶液 (DMSOを1mlと5%Glucose solutionを9mlの混合液) に溶解した。

40

【0064】

マウスは1群4匹とし、マラリア感染24時間後 (Day-1) に化合物をマウスの体重1kgあたり100mgとなるよう算出したものを経口投与し、一方、マウスの体重1kgあたり30mgとなるように算出したものについてはマラリア感染24時間後 (Day-1)、48時間後 (Day-2)、72時間後 (Day-3) の合計3回、経口投与を行った。

【0065】

マラリア感染96時間後 (Day-4) と144時間後 (Day-6) にマウスの尾より血液を採取し、薄層塗抹標本を作成し、顕微鏡下で化合物投与群とコントロール (化合物非投与) 群のマラリア原虫感染数を計測し、マラリア原虫感染率 (Parasitemia) を算出した。

【0066】

50

上記で求めたマラリア原虫感染率から次式によって、薬剤投与時の治癒率 (Suppression) を算出した。

治癒率 : Suppression (%) = (B - A) / B × 100

A : 本試験化合物を投与したマウスの原虫感染率

B : コントロール (化合物非投与) マウスの原虫感染率

延命日数 : MSD (day) = C - D C : 本試験化合物を投与したマウスのマラリア感染日から死亡日までの日数の平均

D : コントロール (化合物非投与) マウス4匹のマラリア感染日から死亡日までの日数の平均

【0067】

10

更に、マウスの体重変化と毛つや等を観察し、化合物投与による急性毒性等の副作用を評価した。以上の実験で得られた結果を以下の表3及び表4に示す。

【0068】

【表3】

化合物	投与量(mg/kg)	投与回数	治癒率 (%)		延命日数(days)
			4日	6日	
1A	100	1	100	97	2.3
1B	100	1	100	99	14.6
1B	100	3	100	100	30日以上(完治)
1A	30	3	85	99	15.0
1B	30	3	98	99	60日以上 (完治)
1H	100	1	81	71	4.3
1N	100	1	41	0	0
1O	100	1	81	60	0.6
1R	100	1	100	95.7	15.7
1S	100	1	100	100	11.3
1T	100	1	96,5	79.4	13.3
1U	100	1	0	16.8	0.8
1V	100	1	0	11.4	0.8
コントロール	—	—	0	0	0

20

30

40

【0069】

【表4】

化合物	投与量(mg/kg)	投与回数	治癒率 (%)		延命日数(days)
			4日	6日	
1a	100	1	100	99	14.3
1b	100	1	100	96	12.3
1c	100	1	100	99	13.0
Oxazin 170 perchlorate	100	1	40	57	1.3
Nile blue A	100	1	15	5	0.3
Nile red	100	1	16	3	0

10

20

【0070】

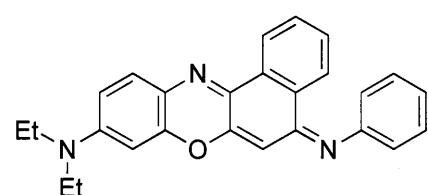
表2から明らかなように、マラリア感染マウスに対して本発明化合物を経口投与した場合、1A及び1Bの100mg/kg及び30mg/kgでの投与によって高い治療率が認められ、延命日数もコントロールに比べ顕著に延命し、特に1Bでは完全治癒が認められた。一方、以下に示す既知のベンゾ[a]フェノキサチン化合物1Uおよび1V(非特許文献2)には有効性は殆ど観察されなかった。さらに、1Bは経口投与で300mg/kgの単回投与で臓器の異常や死亡が観察されず、安全性に優れることが証明された。1Bの塩酸塩においても同様な効果が認められている。また、A環上にメチル基およびメタンスルфонアミジルエチル基を持つ1R、1Sおよび1Tもマウスでのin vivo試験で優れた治癒効果を示している。

【0071】

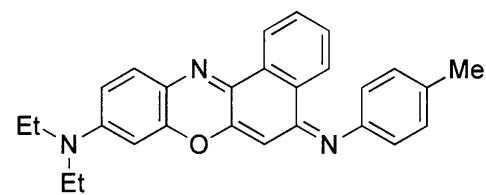
更に、表3から明らかなように、新規ベンゾ[a]フェノキサチン(1a, 1b, 1c)はローデントマラリアを用いてのin vivo試験で高い有効性を示した。しかしながら、既知化合物であるOxazin 170 perchlorate(非特許文献6)、Nile blue A(非特許文献7)およびNile redには有効性は認められなかった。

【0072】

【化5】



1U



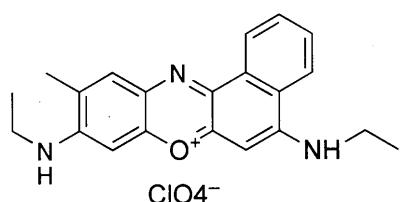
1V

30

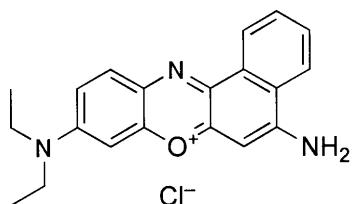
40

【0073】

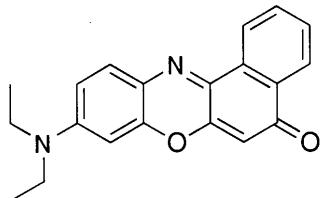
【化6】



Oxazin 170 perchlorate



Nile blue A



Nile red

10

【0074】

[アフリカ・トリパノソーマ原虫、アメリカ・トリパノソーマ原虫、リーシュマニア原虫に対する *in vitro* での阻害抑制活性 (*in vitro*)]

20

【0075】

1. アフリカ・トリパノソーマ原虫の培養

本実験では、*Trypanosoma brucei rhodensiense* (ST I B 900株) の原虫の血流棲息型トリポマスチゴート体を用いた。実験に用いた培地は、ろ過滅菌したMEM培地に、25 mMのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、1 g/Lのグルコース、1%のMEM非必須アミノ酸、0.2 mMの2-メルカプトエタノール、2 mMのピルビン酸ナトリウム塩、0.1 mMのヒポキサンチン及び15%熱処理ウマ血清を加えたものを用いた。原虫の培養はCO₂濃度を5%とした空気中で、温度は37℃で行った。

30

【0076】

2. アフリカ・トリパノソーマ原虫増殖阻害スクリーニング試験

試験に用いる本発明化合物、または陽性対象薬 (メラルソプロール) はジメチルスルホキシド (DMSO、以下同じ) に溶解し、所定濃度の試験液とした。

96穴培養プレートのウェルに、原虫の個数が8×10³個を含む培地と、所定濃度の薬剤を含む試験液又は薬剤を含まないDMSOを加え、それぞれ100 μLになるよう培地を加え調整した。試験液はduplicateにとった。

培養プレートをインキュベーター中で72時間培養した後、増殖阻害活性を検定した。検定は以下のように行った。それぞれのウェルに10 μLのAlamar Blue水溶液を加え、さらに2時間培養した。次に、培養プレートを蛍光マイクロプレートリーダー (Spectramax Gemini XS; 米国モレキュラー・デバイス社製) に装着し、536 nmの励起波長で照射し、588 nmの蛍光強度を測定し、試験液添加群及びコントロールのトリパノソーマ原虫感染率を算出した。

40

【0077】

3. アメリカ・トリパノソーマ原虫の培養

本実験では、*Trypanosoma cruzi* (Tulahuen C2C4株) の原虫のラットL6細胞に感染したアマスチゴート体及びトリポマスチゴート体を用いた。実験に用いた培地は、L6細胞を含む RPMI 1640培地に、L-グルタミン (200 mM) が1%、胎児牛血清が10%となるように添加し、CO₂濃度5%、37℃で培養した。

50

【0078】

4. アメリカ・トリパノソーマ原虫増殖阻害スクリーニング試験

試験に用いる本発明化合物、または陽性対象薬（ベンズニダゾール）はDMSOに溶解し、所定濃度の試験液とした。

96穴培養プレートのウェルに、原虫の個数が 5×10^3 個を含む培地を加え48時間前培養を行った。培地を交換後、所定濃度の薬剤を含む試験液又は薬剤を含まないDMSを加えた。試験液はduplicateにとった。

培養プレートをインキュベーター中で96時間培養した後、増殖阻害活性を検定した。検定は以下のように行った。それぞれのウェルに $50 \mu L$ のCPRG/Nonidetを加え、さらに2~6時間放置した。次に、培養プレートを吸光マイクロプレートリーダーに装着し、 $540 nm$ の吸光度を測定し、試験液添加群及びコントロールのトリパノソーマ原虫感染率を算出した。

【0079】

5. リーシュマニア原虫の培養

本実験では、Leishmania donovani (MHOM/ET/67/L82株)を用いた。原虫はSyrian Goldenハムスターで継代し、そこからアマスチゴート体を得た。実験には10%の加熱処理したウシ胎児血清を加えたSM培地を用い、pH 5.4に調整し CO_2 濃度5%の空気下、37で培養した。

【0080】

6. リーシュマニア原虫増殖阻害スクリーニング試験

試験に用いる本発明化合物、または陽性対象薬（ミルテフォシン）はDMSOに溶解し、所定濃度の試験液とした。

96穴培養プレートのウェルに所定の個数の原虫を含む培地を加え前処理をほどこした後、CASYセル分析システム（ドイツ・Scharfe社製）でアマスチゴートの濃度を計測した。その後、所定濃度の薬剤を含む試験液又は薬剤を含まないDMSを加えた。試験液はduplicateにとった。

培養プレートをインキュベーター中で72時間培養した後、増殖阻害活性を検定した。検定は以下のように行った。それぞれのウェルに $10 \mu L$ のAlamar Blue水溶液を加え、さらに2時間培養した。次に、培養プレートを蛍光マイクロプレートリーダー（Spectramax Gemini XS；米国モレキュラー・デバイス社製）に装着し、 $536 nm$ の励起波長で照射し、 $588 nm$ の蛍光強度を測定し、試験液添加群及びコントロールのリーシュマニア原虫感染率を算出した。

【0081】

上記で求めた各原虫感染率から次式によって増殖阻害率を算出し、50%増殖阻害濃度（EC₅₀）を求めた。

$$\text{増殖阻害率} (\%) = \{ 1 - (b - a) / (c - a) \} \times 100$$

a：初期感染率

b：試験液添加時の感染率

c：コントロールの感染率

【0082】

以上の実験で得られた、本発明のベンゾ[a]フェノキサチン化合物のアフリカ・トリパノソーマ原虫 (Trypanosoma brucei rhodesiense)、アメリカ・トリパノソーマ原虫 (Trypanosoma cruzi)、リーシュマニア原虫 (Leishmania donovani)に対する阻害抑制作用を以下の表5及び表6に示す。これから本発明のベンゾ[a]フェノキサチン化合物はこれら原虫の生育を有意に阻害することが分かる。

【0083】

10

20

30

40

【表5】

化合物	50%増殖阻害濃度(μg/ml)		
	<i>Trypanosoma brucei rhod.</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania donovani</i>
1A	0.87	1.29	0.378
1B	14.2	4.44	2.56
1F	56.5	>30	4.76
1G	61	>30	19.13
1H	4.6	3.31	1.25
1I	44.8	>30	19.62
1J	11.8	21.84	1.86
1K	38.6	>30	8.13
1L	0.804	1.78	0.662
1M	40	>30	13.8
メラルソプロール	0.0024		
ベンズニダゾール		0.2253	
ミルフォテシン			0.1135

【0084】

【表6】

化合物	<i>Trypanosoma brucei rhod.</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania donovani</i>
1R	5.345	2.01	3.92
1S	0.714	0.376	2.09
1a	0.569	0.366	0.386
1b	6.65	1.67	1.82
1c	4.26	1.19	3.59

10

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明の化合物を活性成分として含有させることにより、優れた原虫感染症の治療剤及び/又は予防剤を提供することが出来る。

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 33/06 (2006.01) A 6 1 P 33/02
A 6 1 P 33/06

(73)特許権者 508076691

スイス トロピカル アンド パブリック ヘルス インスティトゥ - ト
Swiss Tropical and Public Health Institute
スイス国 CH - 4002 バーゼル ソシンシュトラッセ 57

(74)代理人 100079049

弁理士 中島 淳

(74)代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(74)代理人 100099025

弁理士 福田 浩志

(72)発明者 井原 正隆

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 葛 健鋒

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 荒井 千夏

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 ナサル サード モハメド イスマイル

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 楊梅

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 伊藤 勇

東京都品川区荏原2丁目4番41号 学校法人星薬科大学内

(72)発明者 レト プラン

CH - 4002 バーゼル ソシンシュトラッセ 57 シュバイツアリッシュ・トロッペンインスティトゥート内

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 國際公開第2006/087935 (WO, A1)

米国特許第02677684 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31 / 538

C 0 7 D 265 / 34

C 0 7 D 413 / 12

C 0 7 D 417 / 12

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)