

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6280510号
(P6280510)

(45) 発行日 平成30年2月14日(2018.2.14)

(24) 登録日 平成30年1月26日(2018.1.26)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/122

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 45/00

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/18

請求項の数 14 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2014-559040 (P2014-559040)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月1日 (2013.3.1)
 (65) 公表番号 特表2015-508782 (P2015-508782A)
 (43) 公表日 平成27年3月23日 (2015.3.23)
 (86) 國際出願番号 PCT/BR2013/000063
 (87) 國際公開番号 WO2013/126980
 (87) 國際公開日 平成25年9月6日 (2013.9.6)
 審査請求日 平成28年2月16日 (2016.2.16)
 (31) 優先権主張番号 BR1020120047390
 (32) 優先日 平成24年3月2日 (2012.3.2)
 (33) 優先権主張国 ブラジル(BR)
 (31) 優先権主張番号 BR1020120065495
 (32) 優先日 平成24年3月23日 (2012.3.23)
 (33) 優先権主張国 ブラジル(BR)

(73) 特許権者 514219994
 アマゾニア フィトメディカメントス リ
 ミターダ
 AMAZONIA FITOMEDICA
 MENTOS LTDA.
 ブラジル国 シーイーピー-60844-1
 50, シーイー フォルタレザ, ルア
 フランシスコ レアンドロ ナンバー3
 99B-サラO1
 Rua Francisco Leand
 ro no 399B - sala O
 1 CEP 60844-150 For
 taleza - CE (BR)
 (74) 代理人 110001139
 S K特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】潜伏HIVウイルスの再活性化におけるインゲノール誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

人間の体内のウイルスリザーバー中の潜伏HIVを再活性化させるための調製物の調製における1種又はそれ以上の式I:

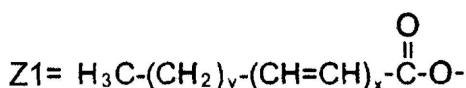
【化1】



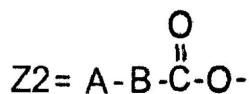
10

のインゲノール誘導体 (Zは、Z1又はZ2)

【化2】



【化3】



$Z = Z_1$ の場合、 x 及び y は整数、

x は 2 から 10 及び y は 2 から 7 (但し、 $3 - (2, 4, 6 - \text{ドデカトリエノイル})$ インゲノール) 及び ($3 - (2, 4, 6, 8 - \text{テトラデカテトラノイル})$ インゲノール) を除く)；

及び $Z = Z_2$ の場合、

A はフェニル、 $C H_3 -$ 又は $C H_2 = C H -$ 、

B は $- C H = C H -$ 、 $[- C H_2 -]_q$ 又は $[- C H_2 -]_w$ 、

式中 q は 1 から 10 の整数であり、 w は 1 から 10 の整数であって：

A がフェニルの場合、B は $- C H = C H -$ ；

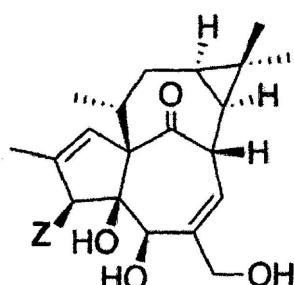
A が $C H_3 -$ の場合、B は $[- C H_2 -]_q$ ；

A が $C H_2 = C H -$ の場合、B は $[- C H_2 -]_w$ の使用。

【請求項2】

前記 1 種又はそれ以上の式1のインゲノール誘導体は、構造式

【化4】



を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項3】

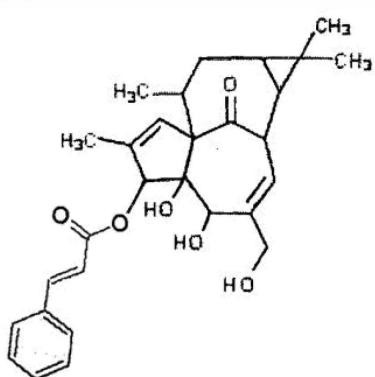
$Z = Z_1$ の場合、 x は 3 から 5 及び y は 3 から 4 であることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項4】

$X = Z_2$ の場合、前記インゲノール誘導体は、A, B, C 及び D :

【化5】

A



10

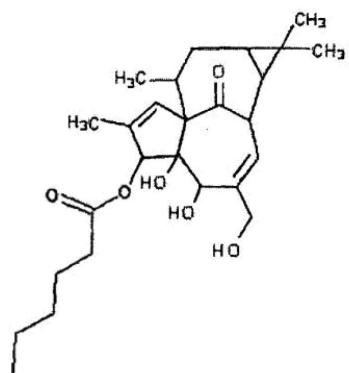
20

30

40

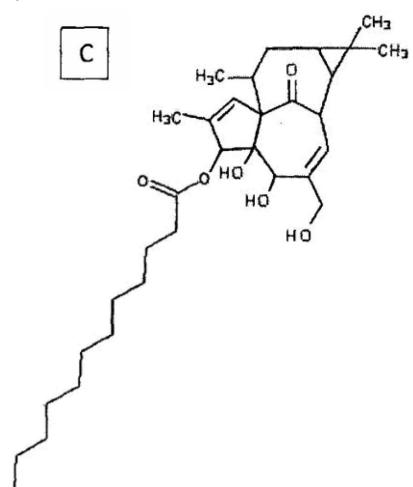
【化6】

B



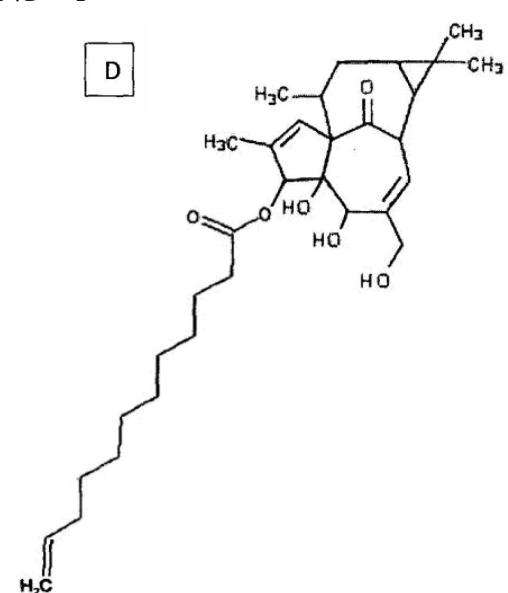
【化7】

C



【化8】

D



の中の 1 種又はそれ以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の 1 種又はそれ以上の式 I のインゲノール誘導体、及び活発な複製状態下にあるウイルスに対して作用する少なくとも 1 種の活性抗 レトロウイルス薬を含むことを特徴とする、潜伏 HIV の治療のための医薬的混合物。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 種の活発に複製するウイルスに対して作用する活性抗 レトロウイルス薬は、ヌクレオシド又は非ヌクレオシド逆転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、共同 受容体拮抗剤、レトロウイルスインテグラーゼ阻害剤、ウイルス吸着阻害剤、特定ウイルス転写阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤及びその組み合わせの中から選ばれることを特徴とする、請求項 5 に記載の医薬的混合物。

【請求項 7】

前記 1 種又はそれ以上の式 I のインゲノール誘導体及び前記少なくとも 1 種の抗レトロウイルス薬は、同じ投与形態であることを特徴とする、請求項 5 に記載の混合物。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の混合物及び製剤上許容される医薬用添加物を包含することを特徴とする、潜伏 H I V の治療のための医薬組成物。

【請求項 9】

式 I のインゲノール誘導体又は活発に複製するウイルスに対して作用する抗レトロウイルス薬とは異なる 1 又は複数の他の有効成分を更に含有することを特徴とする、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の 1 種又はそれ以上の式 I のインゲノール誘導体を含むことを特徴とする、人間の体内でウイルスリザーバー中の潜伏 H I V ウィルスを再活性化するための、医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の 1 種又はそれ以上の式 I のインゲノール誘導体及び製剤上許容される医薬用添加物を含むことを特徴とする、H I V ウィルスにより引き起こされる感染を治療するためのアジュバント。

【請求項 12】

医薬療法における使用であることを特徴とする、患者への投与に適した、請求項 5 ~ 7 の何れかに記載の医薬的混合物。

【請求項 13】

医薬療法における使用であることを特徴とする、患者への投与に適した、請求項 8 ~ 10 の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項 14】

医薬療法における使用であることを特徴とする、患者への投与に適した、請求項 11 に記載のアジュバント。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、一般的にウイルスリザーバー中の潜伏 H I V ウィルスの再活性化剤としてある種のインゲノール誘導体の使用に関する。別の態様において、本発明は、上記インゲノール誘導体と活発に複製するウイルスに対して実質的に作用する抗 レトロウイルス薬とを含む組み合わせ及び組成物に関する。

【0002】**発明の背景**

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) は、免疫系の破壊の結果、生命を脅かす日和見感染に生体が適切に反応できなくなることを特徴とする致死的な病気である A I D S (即ち、後天性免疫不全症候群) の原因となる病原体として知られている。

【0003】

高活性抗 レトロウイルス療法 (H A A R T として知られている) は、H I V 複製を抑制するために使用されている。それは、逆転写酵素阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤及び侵入阻害剤を含む活性抗 レトロウイルス化合物を少なくとも 3 種用いる抗 A I D S 「カクテル」として一般的に知られている治療法のみから構成される。

10

20

30

40

50

【0004】

しかしながら、感染者では、潜伏的に感染された C D 4 陽性 T リンパ球細胞（即ち、宿主細胞のゲノムに組み込まれた残留潜伏 D N A を含有している細胞）のリザーバー由来のウイルスは、H A A R T 療法の中断後にウイルスの複製を素早く回復する。

【0005】

従って、そのような持続的な潜伏感染が克服されない場合、H I V は慢性的にウイルス感染をおこし続ける。

【0006】

従来技術における理論的根拠によれば、そのようなリザーバーに含有される潜伏ウイルスの活性化は、抗 レトロウイルス薬の存在下で、体免疫系がそれらを検出することができ且つウイルスに対する活性薬剤にそれらがアクセスできるようにすることを意図するものであり、これによって、宿主の免疫系の反応によって及び / 又は細胞でアポトーシスが引き起されるように、ウイルスタンパク発現細胞を破壊し、その結果、抗 レトロウイルス薬の作用によりリザーバーから出てきたウイルスの複製が阻害されるため、H I V の持続的な潜伏感染リザーバーが排除され、感染が全て根絶される。

10

【0007】

言い換えると、潜伏感染の選択的な誘発は、抗 レトロウイルス薬及び抗ウイルス免疫反応が、残留する H I V 感染にアクセスして根絶することを可能にする。即ち、抗 レトロウイルス薬を後で使用することなく免疫系を一時的に安定化することのみならず、人間の体内で H I V 感染を完全に抑えることを可能にする。

20

【0008】

発明の詳細な説明

「活発な複製状態下にあるウイルスに対する活性抗レトロウイルス剤」との記載は、人間の体内で H I V ウィルスリザーバーに対して、実質的には作用しない又は限られた状態でのみ作用する薬剤に関すると、以下、本文中で認識される。

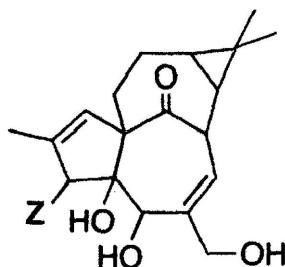
【0009】

本発明の、第 1 の態様は、以下の 1 種又はそれ以上の式 I :

式 I

【化 9】

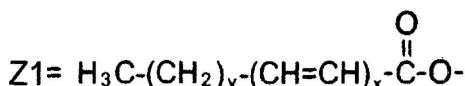
30



のインゲノール誘導体の使用に関するものであり、H I V 感染の治療又はA I D S 治療における製品のアジュバントの調製において使用され、式中 Z は Z 1

【化 10】

40



又は Z 2

【化 11】



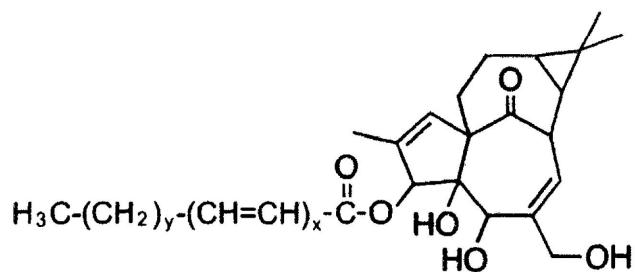
であり、

50

$Z = Z_1$ の場合、本発明のインゲノール誘導体は以下の式II：

式II

【化12】



10

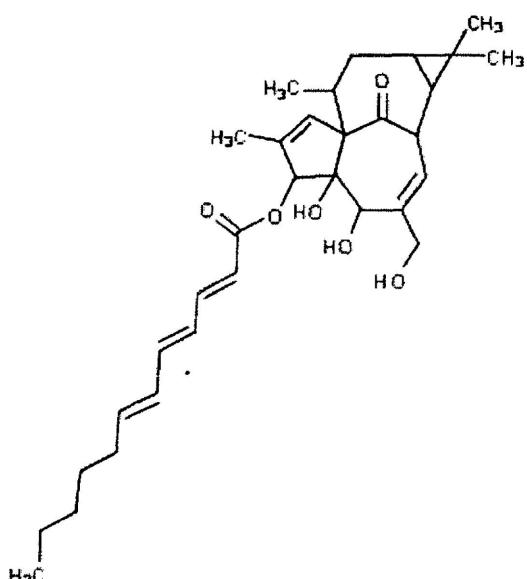
として描かれるインゲノール誘導体であって、

x 及び y は整数であり、 x は 2 から 10 及び y は 2 から 7 である。

【0010】

式IIは特に、 x は 3 から 5 及び y は 3 から 4 である。式IIの具体的な実施形態を挙げる
と、式中 $x = 3$ 及び $y = 4$:

【化13】

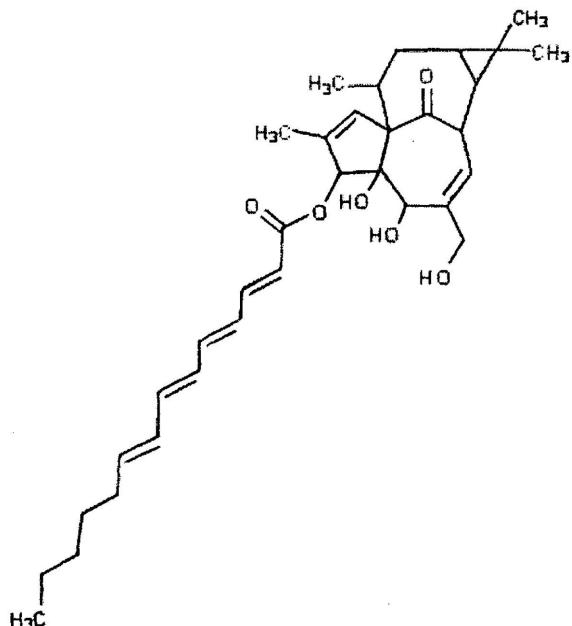


20

30

3 - (2, 4, 6 - ドデカトリエノイル) インゲノール)、並びに式中 $x = 4$ 及び $y = 4$:

【化14】



10

(3-(2,4,6,8-テトラデカテトラノイル) インゲノール)である。

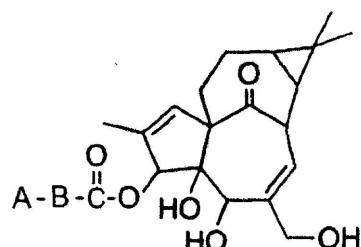
【0011】

20

式Iに関して、Z = Z₂の場合、本発明のインゲノール誘導体は以下の式III：

式III

【化15】



30

として描かれ、

Aはフェニル、CH₃又はCH₂=CH-であり、Bは-CH=CH-、[-CH₂-]q又は[-CH₂-]_wであり、式中qは1から10、特に2から6の1つの整数であり、wは1から10、特に8から10の1つの整数であって：

Aがフェニルの場合、Bは-CH=CH-；

AがCH₃-の場合、Bは[-CH₂-]_q；

AがCH₂=CH-の場合、Bは[-CH₂-]_wが与えられる。

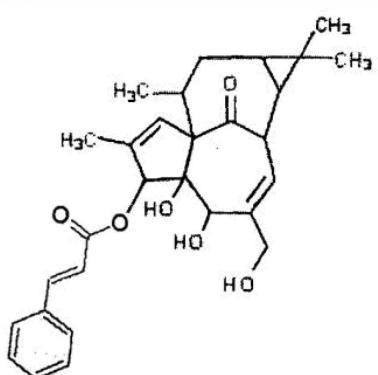
【0012】

本発明に適する式IIIのインゲノール誘導体の具体的な例は、限定するものではないが、以下の構造式A、B、C及びDである。

40

【化 1 6】

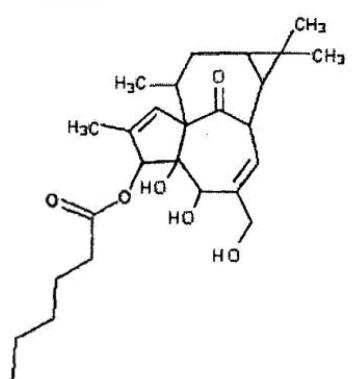
A



10

【化 1 7】

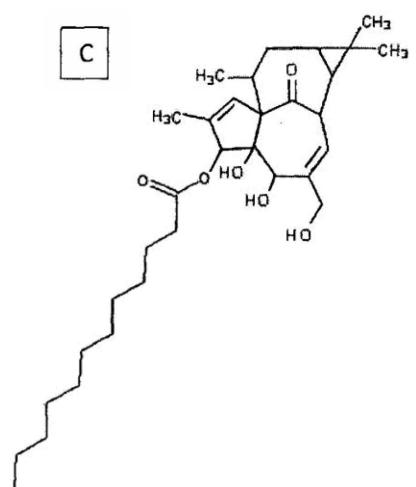
B



20

【化 1 8】

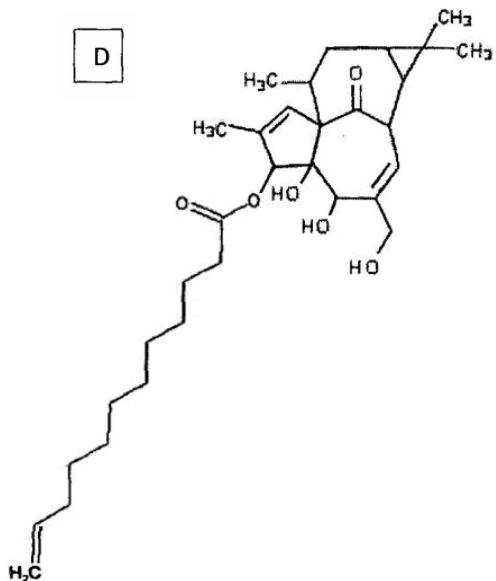
C



30

40

【化19】



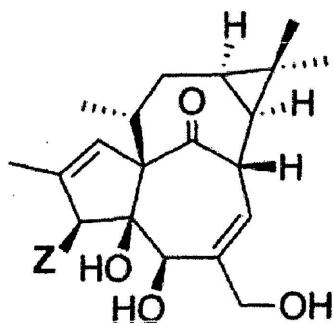
10

【0013】

特に、本発明にかかる式Iのインゲノール誘導体は、以下のコンホメーションを示す。

【化20】

20



【0014】

30

この発明の趣旨によれば、「アジュvant」とは、特定の疾患又は症状の治療において、ある薬剤又は有効成分の作用と併用をする又は補助する薬剤又は有効成分である。単独で、病気又は疾患を効果的に治療し、治癒を実現するのは、「アジュvant」の一般的な独自の効果ではない（アジュvantは他の効果を含み得る）。

【0015】

別の態様において、本発明は人間の体内のウイルスリザーバー中の潜伏HIVウイルスの再活性化における上記式Iのインゲノール誘導体の使用に関する。それは医薬療法における使用である。

【0016】

40

別の態様において、本発明は、HIVウイルス感染の治療又は予防に有効な組み合わせに関するものであって、1種又はそれ以上の式Iのインゲノール誘導体及び活発な複製状態下にあるウイルスに対する活性抗レトロウイルス薬を少なくとも1種、特にヌクレオシド又は非ヌクレオシド逆転写阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、共同受容体拮抗剤、レトロウイルスインテグラーゼ阻害剤、ウイルス吸着阻害剤、特定ウイルス転写阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤及びその組み合わせの中から選ばれる活性抗レトロウイルス薬を少なくとも1種含む。

【0017】

この発明の目的によれば、「組み合わせ」とは、少なくとも式Iのインゲノール誘導体（化合物a）及び活発に複製するウイルスに対して実質的に作用する少なくとも1種の抗レトロウイルス薬（化合物b）を含む、人へ投与するのに適切な用量、併用、混合、配

50

合、製剤又は相当物の任意の形態をとるものとして認識される。

【0018】

更に、本発明中で採用される意味によれば、「組み合わせ」は、少なくとも式Iのインゲノール誘導体（化合物a）及び少なくとも1種の抗レトロウイルス薬（化合物b）を単一の投与量単位で（例えば、タブレット、カプセル、アンプル、バッグ等）又は様々な投与量単位で利用することができ、化合物(a)及び(b)は、一緒に又は別々に、同時にでも又は経時にでも、患者への投与のために提供されると認識される。

【0019】

本発明の組み合わせのための投与形態に特に制限はなく、すでに述べたもの以外に、リポソーム及びナノ粒子又は当業者により知られている任意の他の形態を包含する。 10

【0020】

特に、本発明は、上記組み合わせと製剤上許容される医薬用添加物を含有する医薬組成物に関するものである。以下の刊行物は、そのような添加物の情報源として挙げられる：“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”、第20版又はその以降の版、Lippincott publishing house、Williams and Wilkins; “Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Anselら、第7版、Lippincott publishing house、Williams&Wilkins; “Handbook of Pharmaceutical Excipients” (2000) A.H. Kibbeら、第3版、American Pharmaceutical Association Publishing House. 20

【0021】

別の態様において、本発明の組成物は、式Iのインゲノール及び抗レトロウイルス薬とは異なる他の有効成分を更に含有することもできる。特に、本発明の組成物は、式Iの上記インゲノール誘導体以外にも、人間の体内のウイルスリザーバー中の潜伏レトロウイルスを再活性化することができる1種又はそれ以上の化合物を含む。

【0022】

別の態様において、本発明は、人間の体内のウイルスリザーバー中の潜伏HIVを再活性化するために有効なアジュバントに関するものであり、1種又はそれ以上の式Iのインゲノール誘導体、及び製剤上許容される医薬用添加物を含むことを特徴とする。 30

【0023】

別の態様において、本発明は、上に記載されたような、HIVの治療又は予防の方法に関するものであり、そのような治療を必要とする患者に組み合わせを投与するステップを含むことを特徴とする。上記治療は、同時に又は経時に、組み合わせの構成成分を投与するステップを含む。

【0024】

更に、別の具体的な態様において、本発明は、人間の体内のHIVウイルスリザーバー中の潜伏HIVウイルスを再活性化するための方法に関するものであり、1種又はそれ以上の式Iのインゲノール誘導体を患者に投与するステップを含むことを特徴とする。 40

【0025】

本発明に適するヌクレオシド系逆転写阻害剤の中で、限定するものではないが、化合物であるAZT(ジドブジン)、3TC(ラミブジン)、d4T(スタブジン)、アバカビル、ddI(ジダノシン)、ddC(ザルシタビン)、FTC(エムトリシタビン、PMPA(R) 9 (2-ホスホニルメトキシプロピル)アデニン)、テノホビル、アデホビル、アムドキソビル、エルブシタビン、アロブジン、ラシビル、アブリタビン(apicitabina)、ホスファジド(fosfazida)及びホジブジンチドキシリルが挙げられる。

【0026】

本発明に適する非ヌクレオシド系逆転写阻害剤の中で、限定するものではないが、化合物であるネビラピン、エファビレンツ、デラビルジン、ロビリド、エトラビリン、(+ 50

) カラノリド、リルピビリン及びレルシビリンが挙げられる。

【0027】

本発明に適するプロテアーゼ阻害剤の中で、限定するものではないが、化合物であるリトナビル、ロピナビル、ネルフィナビル、サクイナビル、インジナビル、アタザナビル、アンプレナビル、ダルナビル、ホサンプレナビル及びチプラナビルが挙げられる。

【0028】

本発明に適するインテグラーゼ阻害剤の中で、限定するものではないが、化合物であるラルテグラビル、エルビテグラビル及びドルテグラビルが挙げられる。

【0029】

本発明に適する融合阻害剤の中で、限定するものではないが、化合物であるエンフィルチド及びチフィルチドが挙げられる。 10

【0030】

本発明に適する共同受容体阻害剤の中で、限定するものではないが、CCR5共同受容体阻害剤であるビクリビロック及びマラビロックが挙げられる。

【0031】

本発明のインゲノール誘導体、複製しているウイルスに対して活性を有する活性抗レトロウイルス薬又はそれらを含有する本発明の組み合わせは、例えば、経口、非経口、静脈内、動脈内、腹腔内、経皮、舌下、直腸内、筋肉内、経頬(transbucal)、鼻腔内、リポソーム、吸入、膣内、皮下、内部脂肪内、眼球内、関節内又は鞘内といった任意の適切な経路で患者に投与することができ、カテーテル又はステント等を使用して投与することもできる。 20

【0032】

本発明のインゲノール誘導体又は本発明の組み合わせで使用される投薬形態に関して特別な制限はない。例えば、タブレット、ピル、カプセル、細粒、ペレット等が経口投与用に使用される。液体経口投与溶液としては、分散液、懸濁液、エマルジョン、オイル等が使用される。

【0033】

投薬形態は、即時の放出でも、時間をかけて又は制御されて放出するものであってよい。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】図1Aは、本発明のインゲノール誘導体(以下、Kyoto I I、上に示したマークッシュ形式においてZ = Z1)を種々の濃度で用いた、J1at8.4クローンにおける潜伏からの誘発に関するグラフを示す。陽性コントロールとして20ngのTNF-αを使用した。結果は、誘発された細胞を%として示されている。

【図1B】図1Bは、上に記載されたKyoto I I誘導体を種々の濃度で用いた、J1at6.3クローンにおける潜伏からの誘発に関するグラフを示す。陽性コントロールとして20ngのTNF-αを使用した。結果は、誘発された細胞を%として示されている。

【図1C】図1Cは、上に記載されたKyoto I I誘導体を4μm用いた、J1at6.3クローンにおける潜伏からの誘発に関するグラフを示す。陽性コントロールとして20ngのTNF-αを使用した。結果は、誘発された細胞を%として示されている。 40

【図2】図2は、上に記載されたインゲノール誘導体Kyoto I Iを種々の濃度で用いた、72時間培養されたヒトPBM C細胞(末梢血単核細胞)におけるアポトーシス活性を示すヒストグラムである。

【図3】図3は、インゲノール誘導体Kyoto I Iに関する、J1at6.3クローンにおけるHIV潜伏からの誘発及び対応する細胞毒性を示す複合グラフである。

【図4】図4は、A誘導体(Z = Z2の場合)に関する、J1at6.3クローンにおけるHIV潜伏からの誘発及び対応する細胞毒性を示す複合グラフである。

【図5】図5は、B誘導体(Z = Z2の場合)に関する、J1at6.3クローンにおけるHIV潜伏からの誘発及び対応する細胞毒性を示す複合グラフである。 50

【図6】図6は、C誘導体($Z = Z_2$ の場合)に関する、J1at6.3クローンにおけるHIV潜伏からの誘発及び対応する細胞毒性を示す複合グラフである。

【図7】図7は、エファビレンツだけで治療された患者から得た血液細胞のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)のグラフである。

【図8】図8は、エファビレンツ及び本発明のインゲノール誘導体Bで治療された患者から得た血液細胞のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)のグラフである。

【図9】図9は、インゲノール誘導体Ky o II($Z = Z_1$ の場合)及びインゲノール誘導体A、B、及びC($Z = Z_2$ の場合)に関する、ヒト及びサルのリンパ球表面上のCD4 HIV 1受容体の下方制御を示している、フローサイトメトリー分析値である。

【図10】図10は、インゲノール誘導体Ky o II($Z = Z_1$ の場合)及びインゲノール誘導体A、B、及びC($Z = Z_2$ の場合)に関する、サルのリンパ球表面上のCD4 HIV 1受容体の下方制御を示している、フローサイトメトリー分析値である。

【図11】図11は、インゲノール誘導体Ky o II($Z = Z_1$ の場合)及びインゲノール誘導体A、B、及びC($Z = Z_2$ の場合)に関する、ヒトのリンパ球表面上のCD4 HIV 1受容体の下方制御を示している、フローサイトメトリー分析値である。

【図12】図12は、インゲノール誘導体Ky o II($Z = Z_1$ の場合)及びインゲノール誘導体A、B、及びC($Z = Z_2$ の場合)に関する、ヒトのリンパ球表面上のCD4 HIV 1受容体の下方制御を示している、フローサイトメトリー分析値である。

【実施例】

【0035】

以下、本発明の実施例が与えられているが、本発明の限定は添付された請求項においてのみ述べられるため、このような実施例は本発明の趣旨を限定するものではない。

【0036】

本発明の Z_1 インゲノール誘導体

実施例1及び2は、式(1)の2種のインゲノール誘導体($Z = Z_1$)である3-(2,4,6-ドデカトリエノイル)-インゲノール($x = 3$ 及び $y = 4$)及び3-(2,4,6,8-テトラデカテトラノイル)-インゲノール($x = 4$ 及び $y = 4$)の1:1の混合物(ジメチルスルホキシド溶液中において濃度20mM)であり、本明細書中でKy o IIと呼ばれる混合物に関する。このような溶液は、活性濃度を得るために培養液にて希釈して使用される。

【0037】

実施例1

以下の試験は、潜伏HIV 1のin vitroのモデルとして働く、Jurkat系統由来のJ1atと呼ばれる細胞株で行われた。同様に、HIV 1ウイルスで感染された休止CD陽性T細胞と同様に、J-Lat細胞は、活性化される可能性のある、細胞ゲノム領域に組み込まれたHIV 1の完全なゲノムを保持するが、これらの領域の転写は一時的に阻害される。更に、J-Lat細胞株中に組み込まれた潜伏プロウイルスは、GEP(緑色蛍光蛋白質)遺伝子をエンコードしているため、HIV 1の転写活性の蛍光リポーターを提供する。これらの細胞を、陽性のコントロールとしてウイルスの再活性化のためにTNF-(20ng/ml)で処理し、その効果をインゲノール Z_1 誘導体の混合物と比較した。

【0038】

HIVウイルス遺伝子の発現は、TNF-で処理後48~72時間の間GFPリポーター遺伝子によりフローサイトメトリーでモニターされた。

【0039】

J1atクローン細胞6.3及び8.4(B. Matija Peterlin博士、米国、カリフォルニア州、サンフランシスコ、カリフォルニア大学、により提供された)は、10%FBS(ウシ胎児血清)を含有する RPMI培養液(米国 Rosewell Park Memorial Institute-Invitrogenにより販売された)中で保持された。J1atクローン細胞6.3及び8.4は、 10^6 cel

10

20

30

40

50

$1\text{ s} / \text{mL}$ の濃度において、24時間の間、種々の濃度の誘導体 Ky o II を用いて誘発させ、陽性コントロールとしては $20\text{ ng} / \text{mL}$ の TNF - を使用した。

【0040】

この誘発ステップの後、細胞を RPMI 培養液で洗浄して、10%ウシ胎児血清を含有する RPMI 中に再び懸濁し、潜伏ウイルス誘発を得るために 24 時間以上培養した。

【0041】

誘発後、 $30,000$ の細胞を、 GFP マーカー発現細胞を読み取るために BD - Ex calibur フローサイトメーター（米国 Becton Dickinson Company and Co.）で分析した。1つの細胞サンプルは誘発させず、偽コントロール（MOCK と称される）として働くように培地で 48 時間保持して、プロウイルスの自発的誘発を記録した（バックグラウンド）。

【0042】

図 1A 及び 1B のヒストグラムは、Ky o II サンプルが、24時間の誘発後、J1at クローン 6.3 及び 8.4 において存在する潜伏ウイルスを濃度依存的に活性化することができ、たとえ非常に低い濃度 ($0.4\text{ }\mu\text{m}$) であっても培地における J1at クローン細胞の 8%まで誘発することができ、 $40\text{ }\mu\text{m}$ の濃度においては細胞のほぼ 30%近くを誘発させたことから、それが TNF - の効果をしのいでいるということを示している。

【0043】

図 1C は、 $4\text{ }\mu\text{m}$ の Ky o II を用いて上に記載されたものと同じプロトコルに従って、Cellquest software (米国 Becton Dickinson and Company) で得られた生データを表わすヒストグラムである。この場合、陽性コントロールとして 20 ng の TNF - を使用した。結果は、誘発された細胞を % として示されている。

【0044】

実施例 2 毒性

実施例 1 の Ky o II 混合物中の誘導体は、J - 1at 細胞において潜伏ウイルスを誘発する濃度では、ヒト PBMC 細胞への細胞毒性はないということが、この試験で確かめられる。従って、 $10^6\text{ cells} / \text{mL}$ 濃度のヒト PBMC 細胞を、10%ウシ胎児血清を有する RPMI 培養液中で培養して、種々の濃度の Ky o II に曝して、72 時間培地に置いた。曝露後、細胞をエチレンジアミン四酢酸で染色した。しかし後、細胞を 100 G で 3 分間遠心分離して、それと同じボリュームの 2%ウシ胎児血清を含有する $1\times\text{PBS}$ (Ca^{2+} 及び Mg^{2+} 無し, Cat No. 9240, 米国 Irvine Scientific Company) で洗浄した。PBS 又は「リン酸緩衝塩類溶液」はリン酸を用いて緩衝処理された生理食塩水である。この洗浄を 3 回繰り返し、細胞を $500\text{ }\mu\text{g}$ のヨウ化プロピジウムを含有する $1\times\text{PBS}$ 中に懸濁して、フローサイトメトリーで分析されるまで、5 分間 4 でインキュベーションした。インキュベーション後、 $30,000$ の細胞を BD - Ex calibur フローサイトメトリーで分析した。このプロトコルを用いると分解された DNA を有する細胞又はアポトーシスが進んだ段階にある細胞の量を知ることができた（図 2）。 $10\text{ }\mu\text{M}$ 迄の濃度では、インゲノール誘導体は PBMC 細胞に対する細胞毒性はないが、 $100\text{ }\mu\text{M}$ では 100% 死んだ状態であったということが観察できた。

【0045】

実施例 3 細胞毒性の立証 vs. 反応性

この実施例は、上の実施例 1 及び 2 の Z = Z 1 であるインゲノール誘導体の Ky o II 混合物、及び Z = Z 2 であり上に A、B、及び C と示される式 I の 3 種のインゲノール誘導体の両方に対する、細胞毒性の影響と HIV の再活性化との関連性を示すことを目的とした。これらの場合において、 $10^6\text{ cells} / \text{mL}$ の濃度の J1at クローン細胞 6.3 を、種々の濃度の Ky o II、A、B、及び C を用いて 24 時間誘発させた。誘発ステップの後、細胞を RPMI 培養液で洗浄して、10%ウシ胎児血清を含有する RPMI 中

10

20

30

40

50

に再び懸濁し、潜伏ウイルスの誘発のために更に24時間の間培養した。

【0046】

誘発後、30,000の細胞を、GFPマーカータンパク発現細胞を読み取るためにBD-Excaliburフローサイトメーター(米国 Beckton Dickinson Company and Co.)で分析した。1つの細胞サンプルは誘発させず、偽コントロールとして培地に48時間保持し(MOCKと称される)、こうすることでプロウイルスの自発的誘発を記録した(バックグラウンド)。ヨウ化プロピジウムを用いた染色法を用いて、混合物の細胞毒性を測定した。然る後、細胞を1000Gで3分間遠心分離して、それと同じボリュームの2%ウシ胎児血清を含有する1×PBS(Ca²⁺及びMg²⁺無し、Cat No. 9240, Irvine Scientific Company, USA)で洗浄した。この洗浄を3回繰り返して、細胞を500μgのヨウ化プロピジウムを含有する1×PBS中に懸濁し、フローサイトメトリーで分析されるまで5分間4でインキュベーションした。インキュベーション後、30,000の細胞をBD-Excaliburフローサイトメトリーで分析した。このプロトコルを用いると、正確な細胞生存率で測定することにより、分解されたDNAを有する細胞又はアポトーシスが進んだ段階における細胞の量を正確に知ることができる(図2)。結果は、構成図中にプロットしており、それらの細胞毒性に対する混合物の誘発能力を比較したものである。

【0047】

実施例4 抗レトロウイルス薬で治療中の患者由来のHIV陽性ヒト細胞の試験

20

この実験において、Bとして記載されている式Iのインゲノール誘導体(Z=Z2)が、すでに1年以上の間抗レトロウイルス薬で治療してウイルス量が検出されない患者由来の潜伏細胞を活性化させる能力について試験した。すでにジドブシン+ラミブシン(AZT+3TC)及びエファビレンツで過去14か月の間治療してウイルス量が検出されていない、CD4>500Cell/mm³の患者(MLVとして定義される)を選択した。20mLの血液を患者からEDTA(エチレンジアミン四酢酸)チューブに集めて、PBMA細胞を単離し、10%ウシ胎児血清及び50IU/mLのIL2(インターロイキン2)を含有するRPMI培養液中に置き、種々の選択的組成物と共に5mLの同一細胞(10⁶/mL)を2本のボトル中で増殖させた。10μMのエファビレンツ(抗ウイルス薬)をコントロールのボトルに添加して、培養細胞から最終的には起こるであろうウイルスの複製を遮断した。もう1本のボトル中には、エファビレンツ(10μM)及び本発明のB誘導体(1μM)の両方を含めた。両方のボトルを37で72時間培養して、その後PBMЦ由来の細胞内RNAをRNEasyキット(米国 QiaGen Company)で抽出し、そのHIV 1ゲノムRNAの量を、HIV 1ゲノムのgag領域とハイブリダイズするプライマーである非切断ウイルスRNA GAG1 センスI、II((5' T C A G C C C A G A A G T A A T A C C C A T G T 3'; ゲノム位置1280-1303; TM=58.3)及びSK431 アンチセンスI(5' T G C T A T G T C A G T T C C C C T T G G T T C T C T 3'; ゲノム位置1474-1500; TM=61.5)を使用して、10ラウンドのPCRとしてセミネストリアルタイム(semi nested real time)PCR反応を実行して、その後、プライマー GAG1 センスI、II(5' T C A G C C C A G A A G T A A T A C C C A T G T 3'; ゲノム位置1280-1303; TM=58.3)及びアンチセンスAG2 II(5' C A C T G T G T T A G C A T G G T G T T 3'; ゲノム位置1341-1362.55.1 TM=57)を使用してセミネストリアルタイム反応を実行することによって測定し、GAG3 プローブ(FAM-ATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGA-TAMRA; ゲノム位置1311-1337; TM=61)を使用して同定した。HIV 1 vRNAを検出するためのセミネストリアルタイムPCR反応は以下のようにして行われた:抽出された細胞RNAを水で10倍に希釈して、プロウイルスDNAのいかなる痕跡も除去するように15分間DNase I(米国 Invitrogen Corporation)で処理した。その後、DNase 40

30

40

50

Iを1 mMのEDTA及び50 mMのDTT(ジチオトレイトール)の存在下での70
 10分間のインキュベーション下で不活性化した。RNAの逆転写は、42で60分間
 、ランダムな6量体プライマー及びSuperScript III(米国Invitrogen
 のcDNA合成用酵素の商標名)を用いて行った。次に、cDNAをPCR反応にかけた。
 第1PCRラウンドで使用されたプライマーの組み合わせは、HIV-Iのgag
 内部領域を增幅させるSK431及びGAG1であった。この第1ラウンドは、5 μLの
 cDNA、20 mMのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(pH 8.3)、50 mM
 のKCl、2 mMのMgCl₂、0.4 mMのDNTT(デオキシヌクレオチド三リン
 酸)及び1UのAmpli-Taq(米国Applied BiosystemsのDNAポリメラーゼ)、及び50 ngのそれぞれのプライマーを有する、25 μLのボリュームで従来のPCR装置において行われた。PCRの条件は：94で3分間に続いて、9
 4で30秒間、55で30秒間及び72で1分間であった。この最初のPCRの産
 生物は、0.2 μmのプライマー GAG1及びGAG2及び0.2 μmのFAM-GA
 G3 プローブを含む、50倍に希釈された第1ラウンド産生物を2 μl有する25 μl
 のトータルボリュームのTagMan反応混合物を使用して、ABIプリズム7000機
 (Applied Biosystems, USA)において、第2回目のセミネストリアルタイムPCRを行った。リアルタイムPCRの条件は：50で2分間及び95
 で10分間に続いて、50サイクルの95で15秒間及び60で1分間とした。増
 幅産物のサイズは、第1ラウンドでは221 bpであり、(リアルタイム)PCRでは
 83 bpだった。
 20

【0048】

図7では、10 μMのエファビレンツを含有する、MLV患者由来のPBM C培養では
 、細胞内vRNAが產生されなかったため、リアルタイムセミネストPCRで検出で
 きる産生物は生み出されなかったということが認められる。

【0049】

一方、10 μMのエファビレンツ及び1 μMの本発明の誘導体Bが添加されたPBM C
 培養においては、これらの血液細胞におけるHIV潜伏ウイルスのサインである、細胞内
 HIV-1のvRNAの出現が確認された(図8)。

【0050】

実施例5
 30
 ヒト及びブタオザル(Macaca nemestrina)CD4陽性リンパ球及び
 マクロファージの表面上におけるCD4受容体の下方制御

式Iのインゲノール誘導体(Z=Z2)が、実施例3のJ1at細胞における潜伏状態
 からHIVを活性化する濃度で、HIV-ヒト及びSIV-ブタオザルのCD4陽性リン
 パ球及びマクロファージの表面上におけるCD4細胞受容体の発現を下方制御するとい
 うことが、この試験で確かめられる。この実験のために、ヒト及びサル由来のPBM Cは
 フィコールハイバック密度勾配法(Ficoll-Hypaque density
 gradient)(水溶液中で容易に溶ける高密度親水性中性多糖類の混合物。フィコ
 ールは、米国GEヘルスケア・バイオサイエンスの登録商標)により単離した。従つ
 て、ヒト及びサル由来のPBM C細胞を、10⁶ cells/mLの濃度で、10%ウシ胎
 児血清を含有するRPMI培地で24時間培養して、接着細胞(マクロファージへと分
 化する単球)を、全てのリンパ球を含有する細胞上清から単離した。それら2種類の細胞
 群を、種々の濃度の本発明のA、B、及びC誘導体に曝して、72時間培地に置いた。曝
 露後、細胞を、抗CD4と一緒にリンパ球特異的モノクローナル(抗CD3)及び单
 球/マクロファージ特異的モノクローナル(抗CD14)により染色した。然る後に、
 細胞を1000Gで3分間遠心分離して、それと同じボリュームの2%ウシ胎児血清を含
 有する1×PBS(Ca²⁺及びMg²⁺無し、Cat No.9240、米国Irvine
 Scientific Company)で洗浄した。この洗浄を3回繰り返して、細胞を、1/1000希釈の当該抗体を含有する1×PBS中に懸濁し、フローサイ
 トメトリーで分析されるまで、30分間4でのインキュベーションに置いた。インキュ
 40

50

ペーション後、30,000の細胞をBD-Excaliburフローサイトメーター(米国Beckton Dickinson and co.)で分析し、上記群を分離した。B誘導体なしの細胞密度を100%と仮定して、CD4受容体密度を種々の濃度のB誘導体で推定した。ブリオスタチン、プロストラチン及びPMA(ホルボールエステル)のような、CD4を下方制御することがすでに知られている分子も、A、B、及びC誘導体との比較のために、これらの試験に用いた。

【0051】

本発明のインゲノールZ2誘導体が、ヒト(図11)及びブタオザル(図9)のリンパ球の表面上におけるCD4 HIV-1受容体の発現を下方制御できたことは注目に値する。同様に、これらの混合物は、ヒト(図12)及びブタオザル(図10)の単球/マクロファージにおけるCD4も下方制御できた。比較対象の分子(ブリオスタチン、プロストラチン及びPMA、図9及び図10を参照されたい)と比べた場合、サル細胞のCD4の下方制御に対するZ2インゲノール誘導体の大きなパワーは注目に値するものだった。

【0052】

A、B、及びCインゲノール誘導体は、感染標的細胞の表面上で主要なHIV受容体(CD4)を下方制御することができた。従って、本発明のインゲノール誘導体は、潜伏状態からHIVを活性化することの他に、新しい細胞中へのその侵入を阻止することによりウイルス感染の進行を妨げるということが証明されている。

【0053】

当業者は、本文中及び本実施例に含まれる教示により、本発明の利点を容易に評価でき、添付された特許請求の範囲に規定された本発明の範囲から逸脱することなく、実施形態に対する修正又は等価な変更を容易に提案することができる。

10

20

【図1A】

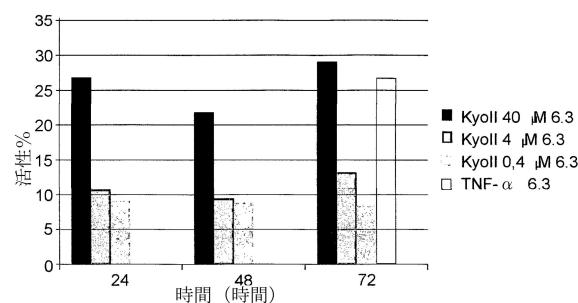


FIG. 1A

【図1C】

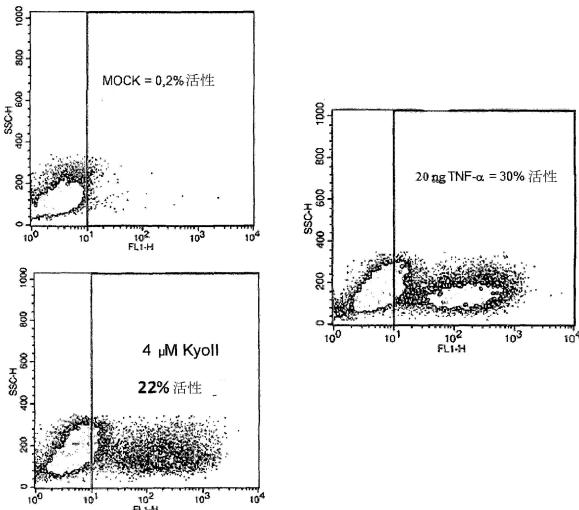


FIG. 1C

【図1B】

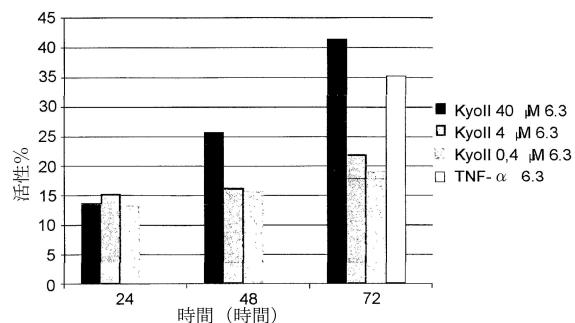


FIG. 1B

【図2】

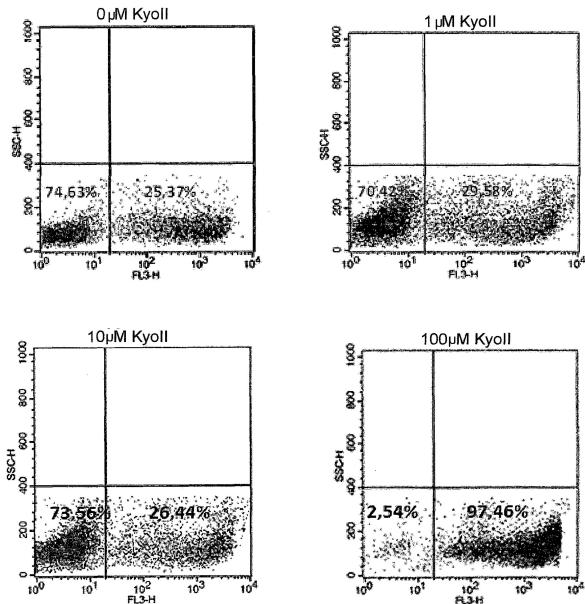


FIG. 2

【図3】

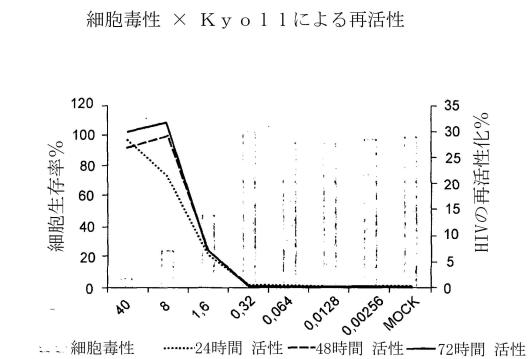


FIG. 3

【図4】

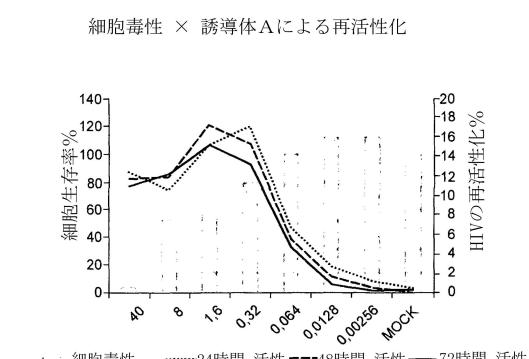


FIG. 4

【図5】

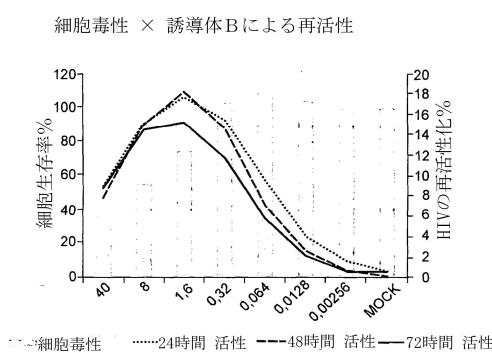


FIG. 5

【図6】

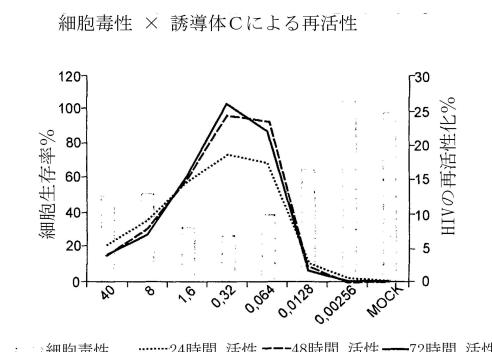


FIG. 6

【図7】

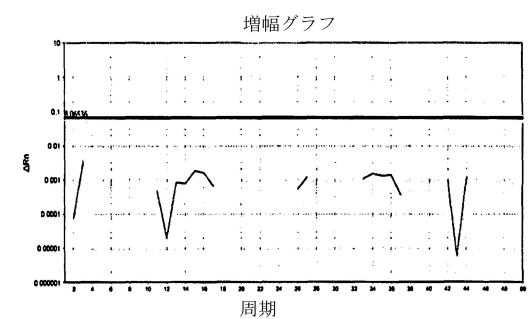


FIG. 7

【図8】

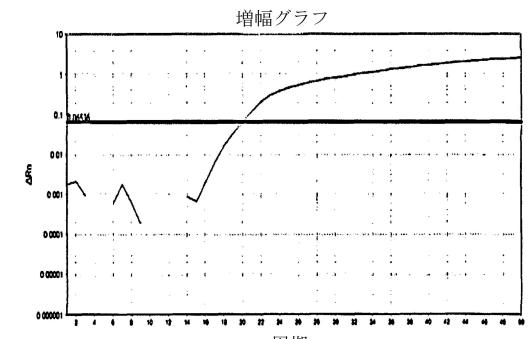


FIG. 8

【図 9】

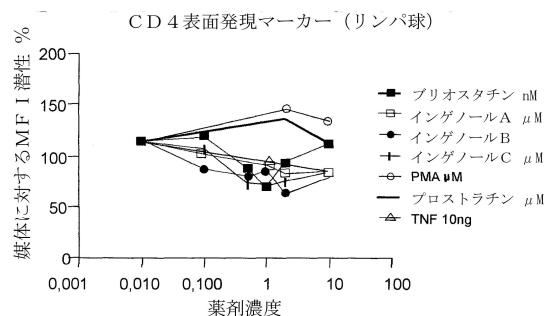


FIG. 9

【図 11】

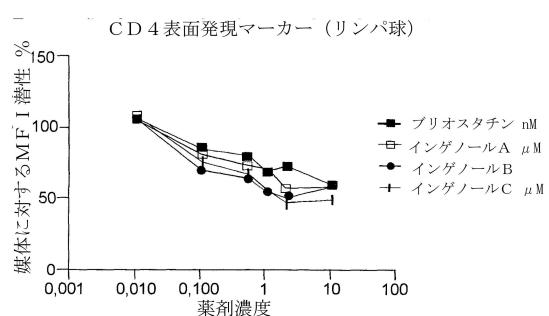


FIG. 11

【図 10】

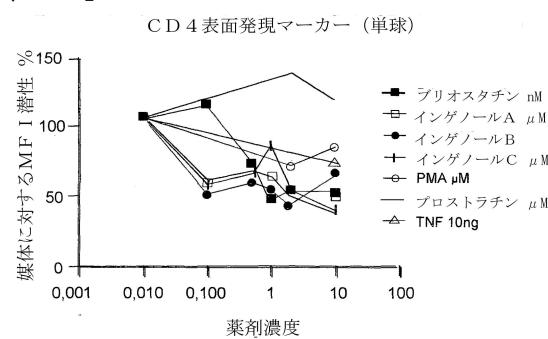


FIG. 10

【図 12】

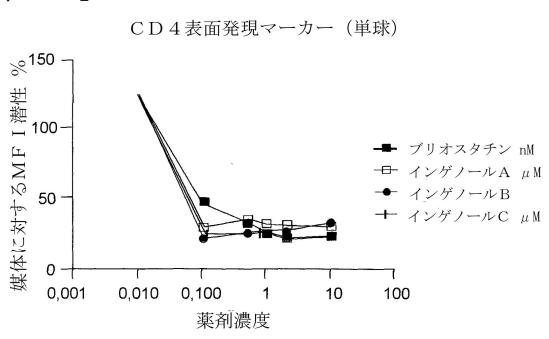


FIG. 12

フロントページの続き

(74)代理人 100130328

弁理士 奥野 彰彦

(74)代理人 100130672

弁理士 伊藤 寛之

(72)発明者 ピアノヴスキー、ルイス フランシスコ

ブラジル サンパウロ州 12917-025 ブラガンサ パウリスタ、ユーロヴィル、セトゥ
バル通り、15番

(72)発明者 タヌリ、アミルカル

ブラジル リオデジャネイロ州 リオデジャネイロ 22450-130 レブロン、ティモテオ
ダ コスタ通り 478/301

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 國際公開第2011/086423 (WO, A1)

特表2008-543966 (JP, A)

特開2003-171349 (JP, A)

特開平07-165600 (JP, A)

臨床と研究, 2007年, Vol.84, No.5, p.11-16

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 2006年, Vol.22, No.9, p.854-864

Current Drug Targets, 2011年, Vol.12, p.348-356

Phytochemistry, 1982年, Vol.21, No.3, p.725-726

Carcinogenesis, 1987年, Vol.8, No.1, p.1-4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31/00

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)