

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529402

(P2017-529402A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006. 01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006. 01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006. 01)	A 6 1 P 1/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-535966 (P2017-535966)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月29日 (2017. 5. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/072488
 (87) 国際公開番号 W02016/050806
 (87) 国際公開日 平成28年4月7日 (2016. 4. 7)
 (31) 優先権主張番号 1417165.6
 (32) 優先日 平成26年9月29日 (2014. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 514073617
 ザ プロボースト, フェローズ, ファンデーション スカラーズ, アンド ジ アザー メンバーズ オブ ボード, オブ ザ カレッジ オブ ザ ホーリー アンド アンディバイデッド トリニティ オブ クイーン エリザベス ニア ダブリン アイルランド国, ダブリン 2, カレッジ グリーン
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国
 (72) 発明者 ケリー, ヴィンセント
 アイルランド国, カウンティー・ラウス, ドローエダ, グランジベラー, モーガンズ タウン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の処置

(57) 【要約】

本発明は、自己免疫疾患、特に多発性硬化症の処置への新規なアプローチに関する。本発明の更なる実施態様では、自己免疫疾患の処置に使用するための、キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、該分子がヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼの基質ではなく、そして該分子がインターフェロンガンマを低下させる効果を有する分子が提供される。好ましくは、自己免疫疾患は多発性硬化症である。

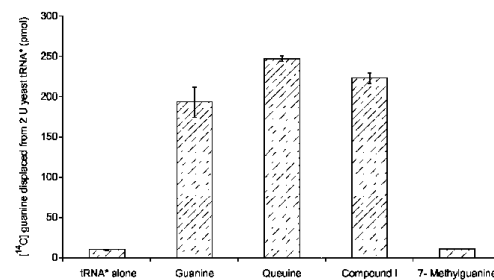


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫疾患の処置に使用するためのキューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子。

【請求項 2】

自己免疫疾患の処置に使用するためのキューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H P R T) の基質ではない、分子。

【請求項 3】

自己免疫疾患の処置に使用するためのキューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、インターフェロンガンマ産生を低下させる効果も有する、分子。

10

【請求項 4】

自己免疫疾患の処置に使用するためのキューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、H P R T の基質ではなく、かつインターフェロンガンマ産生を低下させる効果を有する、分子。

【請求項 5】

キューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子が、グアニン置換アッセイにおいて ≥ 50 pmol の置換を有している、先行する請求項のいずれか記載の使用。

20

【請求項 6】

分子が、H P R T アッセイにおいて対照の $\geq 60\%$ 量で G M P 生成物を生じる、先行する請求項のいずれか記載の使用。

【請求項 7】

分子が、 $100\ \mu\text{M}$ の濃度で野生型細胞におけるインターフェロンガンマ産生を低下させる、先行する請求項のいずれか記載の使用。

【請求項 8】

自己免疫疾患が、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬、糖尿病、及びクローン病を含む炎症性腸疾患から選択される請求項 1～7 記載の使用；並びに移植拒絶反応を抑制する薬剤としての請求項 1～7 記載の使用。

30

【請求項 9】

自己免疫疾患が、多発性硬化症である、請求項 1～7 記載の使用。

【請求項 10】

追加の治療剤と組み合わせた、請求項 1～9 記載の使用。

【請求項 11】

前記治療剤が、患者における多発性硬化症の損傷の影響を処置するための医薬品である、請求項 10 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、自己免疫疾患、特に多発性硬化症の処置への新規なアプローチに関する。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症 (M S) は、体内の自身の免疫系が脳や脊髄の白質を攻撃する中枢神経系 (C N S) の衰弱性疾患である。これは、C N S 保護ミエリン層への炎症誘導性の損傷の引き金となって脱髄を引き起こす。ミエリンの消失により、ニューロンが更なる攻撃に曝されて、多発性硬化病変の形成に至る。この損傷は、神経系の一部の伝達する能力を混乱させ、このため、疲労、かすみ目、認知障害及び痙攣を含む広範な問題を生じる。多くの患者は、不可逆性運動障害の発生に苦しんでいる。長期予後は不良であり、疾患の発生から 15 年以内に患者の約 50% は、支援なしには歩行できなくなる (非特許文献 1)。

50

【0003】

MSは、単独の攻撃（再発型）又は経時的な蓄積（進行型）のいずれかで発生する新しい症状を伴う、幾つかの型をとる。

【0004】

現在、多発性硬化症の治療は知られていない。現在の処置は、発作後に機能を改善し及び／又はその後の発作を予防しようと努めるものである。MSを処置するために使用される医薬品は、適度に有効ではあるが、有害作用を及ぼすこと、そして忍容性が低いことがある。

【0005】

多くの注射可能な最先端治療薬がある：

- ・ベータインターフェロン1a（Avonex）
- ・ベータインターフェロン1a（Rebif）
- ・ベータインターフェロン1b（Betaferon）
- ・グラチラマー酢酸塩（Copaxone）

【0006】

インターフェロンはインフルエンザ様の症状を引き起こすことがあり、グラチラマーを服用している一部の人は、フラッシング、胸部圧迫、心臓の動悸、息切れ及び不安を伴う注射後反応を経験するが、これは通常30分も続かない。より危険であるが、あまり一般的ではないのは、肝臓の損傷である。グラチラマーには注射部位の皮膚刺激と関連がある。

【0007】

追加の治療法は以下を含む：

- ・Natalizumabは、第一選択薬よりも再発率を低下させる；しかし、進行性多巣性白質脳症のような副作用の問題のために、これは、他の処置法に反応しないか又は重症疾患のために確保される第二選択薬である。
- ・Fingolimod（Gilenya）－急速に進行する重症再発寛解型MS（1年に2回以上の再発）の人々のために、そしてベータインターフェロン剤の1つでの処置にもかかわらずMSが活動性を維持している人々の第二選択処置薬として、2011年3月に認可された。
- ・フマル酸ジメチル（Tecfidera）は、2013年にFDAから認可を受けたもので、MSの再発寛解型の成人用の経口第一選択治療法である。
- ・Teriflunomide（Aubagio）は、2012年9月にFDAの承認を受けたもので、再発型MSの処置用の経口投与可能な免疫調節薬である。
- ・Mitoxantroneは、その使用が、重度の副作用、収縮機能不全、不妊症及び急性骨髄性白血病により制限されるが、他の医薬品に反応しない患者のための第三選択肢である。

【0008】

コルチコステロイド（すなわち、ステロイド剤）は、時として、錠剤の形態で又は静脈内点滴のいずれかで数日間投与される。ステロイド剤が長期的な病気の経過に影響を与えるという証拠はないが、再発からの回復を早める点で有効であることがある。

【0009】

原発性進行性MSの経過を変える処置は示されておらず、2011年現在で、続発性進行性MSにはミトキサントロン1剤しか承認されていない。この母集団では、ミトキサントロンが疾患の進行を適度に遅らせ、2年にわたり再発率を低下させることを、暫定的な証拠が裏付けている。

【0010】

再発寛解型MSのための更に有効で、便利で、かつ忍容性のある処置法を探索する、進行中の研究がある。

【0011】

モノクローナル抗体は、高い関心を集めている。CD52モノクローナル抗体のアレムツズマブ、CD25モノクローナル抗体のダクリズマブ並びにリツキシマブ、オクレリズマブ及びオフアツムマブのようなCD20モノクローナル抗体は、いずれもある程度の有

10

20

30

40

50

用性を示しており、有望な処置として研究中である。これらの使用には、危険をはらむ副作用、最も重要には日和見感染の出現も伴っている。

【0012】

したがって、MSの処置に対する大きなアンメット・メディカル・ニーズ (unmet medical need) がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Polman and Uitdehaag, 2000

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、自己免疫疾患、特に多発性硬化症の処置のための新しい医薬品を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

Th細胞の機能及び分化の不均衡は、炎症及び自己免疫疾患を引き起こし得る。抗原によるナイーブCD4+T細胞の活性化は、それらの特異的エフェクターT (Teff) 細胞 (Th1、Th2又はTh17) 及び制御性T細胞 (Treg) への分化を起こすが、これは、Teff細胞の機能を抑制し、それによって免疫反応を抑える。特に、Th1及びTh17細胞並びにこれらの特徴的なサイトカインであるIFN-ガンマ及びIL-17は、多発性硬化症 (MS) を含む多くの自己免疫疾患の発生において決定的に重要な役割を果たすことが示されている。

20

【0016】

このプロセスの調節のため、ひいてはこのような疾患の処置のための新規な機序が同定されている。キューインtRNA-リボシルトランスフェラーゼ1としても知られるtRNAグアニントランスグリコシラーゼ (TGT) 及びキューインtRNA-リボシルトランスフェラーゼドメイン含有1 (QTRTD1) の2つのタンパク質から作られる酵素複合体 (後にキューイン-インサターゼ (insertase) 酵素複合体と呼ばれる) を利用することができる分子は、自己免疫疾患のモデルにおいて有益な効果を有することが証明されている。

30

【0017】

更に、競合する経路の回避において選択的 (例えば、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T) の基質にはならない) であるか又はより積極的にはインターフェロンガンマレベルを低下させるそれらの分子は、特に有効である。

【発明の効果】

【0018】

本発明は、自己免疫疾患、特に多発性硬化症の処置のための新しい医薬品を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として使用される化合物の能力のアッセイ-酵母tRNAからの [¹⁴C] グアニンを置換することによる (図1)。

40

【図2】ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素の基質又はインヒビターとして化合物を評価するためのアッセイ、即ち「HPR Tアッセイ」 (図2)。

。

【図3】インターフェロンガンマを低下させる分子の能力は、以下のエキスピボアッセイで測定され得る (図3)。

【図4a】図4a~4dは、100 µM濃度のN-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド (図4a~dには化合物Iとして示される) での処置により、増殖が野生型T細胞で50%未満に減少したことを示す。

50

【図 4 b】図 4 a～4 d は、100 μ M 濃度の N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（図 4 a～d には化合物 I として示される）での処置により、増殖が野生型 T 細胞で 50% 未満に減少したことを示す。

【図 4 c】図 4 a～4 d は、100 μ M 濃度の N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（図 4 a～d には化合物 I として示される）での処置により、増殖が野生型 T 細胞で 50% 未満に減少したことを示す。

【図 4 d】図 4 a～4 d は、100 μ M 濃度の N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（図 4 a～d には化合物 I として示される）での処置により、増殖が野生型 T 細胞で 50% 未満に減少したことを示す。

【図 5】図 5 は、N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド分子（化合物 I として示される）のインビボ試験の結果を示す。

【図 6】図 6 は、観察された障害スコアと一致して、接種 21 日後 (dpi) に、処置動物が、対照の体重レベルの 96.6% に達する（19.9 グラム対 20.6 グラム）正常体重増加への劇的な回復を示したことを示す。

【図 7】運動協調性及び後肢の強さもまた、マウスが水平バーを越える能力によって評価した（図 7）。

【発明を実施するための形態】

【0020】

第 1 の実施態様では、自己免疫疾患の処置のためのヒトキューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子を記載する。

【0021】

より具体的には、多発性硬化症の処置に使用するためのキューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子を記載する。

【0022】

本発明の更なる実施態様では、自己免疫疾患の処置に使用するための、キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子が提供されるが、該分子は、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T) の基質ではない。好ましくは、自己免疫疾患は多発性硬化症である。

【0023】

更に記載されるのは、自己免疫疾患の処置に使用するための、キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、この分子は、免疫細胞アッセイにおいてインターフェロンガンマ産生を低下させる効果をも有する。好ましくは、自己免疫疾患は多発性硬化症である。

【0024】

本発明の更なる実施態様では、自己免疫疾患の処置に使用するための、キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として作用可能な分子であって、該分子が HPR T の基質ではなく、そして該分子がインターフェロンガンマを低下させる効果を有する分子が提供される。好ましくは、自己免疫疾患は多発性硬化症である。

【0025】

野生型細胞におけるインターフェロンガンマ産生を低下させる分子に関して、好ましいのは、100 μ M の濃度でそれを低下可能なそれらの分子である。

【0026】

特に好ましいのは、インターフェロンガンマを ≤ 1750 ng/ml まで低下させるそれらの分子である。

【0027】

最も好ましいのは、インターフェロンガンマを ≤ 1100 ng/ml まで低下させるそれら

10

20

30

40

50

の分子である。

【0028】

或いは、TGT遺伝子がノックアウトされた動物由来の細胞（後にTGT-KO細胞と呼ばれる）を用いて、インターフェロンガンマ産生を低下させる分子について試験することができる。好ましいのは、100 μMの濃度でそれを≤3500 ng/mlに低下させないそれらの分子である。

【0029】

特に好ましいのは、インターフェロンガンマを≤4250 ng/mlに低下させないそれらの分子である。

【0030】

最も好ましいのは、それを≤5000 ng/mlに低下させないそれらの分子である。

【0031】

当業者は、特定の分子がキューインーインサターゼ酵素複合体の基質であるか否かを決定する方法を知る。例えば、キューインーインサターゼ酵素複合体基質として作用可能な分子は、後述される置換アッセイの使用によって同定され得る（図1）：

【0032】

〔8-¹⁴C〕グアニン標識tRNA（tRNA*）の産生

成分を表1にリストされる順序で加えた。8-〔¹⁴C〕グアニン溶液を反応物に加える前に、〔8-¹⁴C〕グアニンが0.01M HCl水溶液として供給されるため、溶液を0.01M NaOH等容量（vol/vol）で中和した。Saccharomyces cerevisiae由来の酵母tRNAのストック溶液を、ヌクレアーゼフリーの超純水中で2吸光度単位（260 nm）の濃度にした。N末端ポリヒスチジンタグを含む組換え大腸菌（Escherichia coli（E. coli））tRNAグアニントランスグリコシラーゼ酵素（大腸菌TGT）は、以前に報告（Boland et al., 2009）されたとおりBL21 BL21（DE3）tgt::Km^r細胞において産生された。

【0033】

【表1】

表1 〔8-¹⁴C〕グアニンtRNA標識反応の成分

成分	容量 (μL)	最終濃度
1 M Tris-HCl pH 7.5	7.5	50 mM
5 M NaCl	0.6	20 mM
1 M MgCl ₂	0.75	5 mM
1 M DTT	0.3	2 mM
酵母 tRNA (2abs/μl)	12.5	25 Abs (反応全体)
H ₂ O	130 μL まで	
大腸菌 TGT	10 μL	10 μg
〔8- ¹⁴ C〕グアニン	10 μL	

【0034】

反応を37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、反応を緩衝液で400 μLとした。反応混合物を酸性フェノール：クロロホルム（5：1；pH 4.5）等量（400 μL）の添加により抽出し、16,000×gで5分間遠心分離した。上の水相を新しい1.5mLチューブに移した。3M 酢酸ナトリウム（水溶液）0.1容量（40 μL）及びエタノール2容量（800 μL）の添加により、アンチコドンループの第3位に〔8-¹⁴C〕グアニンを持つ放射性標識tRNA（tRNA*）を沈殿させて、-20℃で一晩インキュベートした。翌朝、4℃、16,000×gで20分間遠心分離する

ことにより tRNA* をペレット化した。ペレットを乱すことなく、氷冷 70% エタノール 1 mL でペレットを洗浄した。tRNA* ペレットをヌクレアーゼフリー水 20 µL に再懸濁して、濃度を A₂₆₀ で分光光度測定した。

【0035】

置換アッセイ

各反応をトリプリケイトで準備して、37℃で1時間インキュベートした。反応の各成分を表2に示す順序で加え、最後に tRNA* を加えることにより反応を開始させた。「化合物」とは、調査中の分子を指す。

【0036】

【表2】

10

表2 [8-¹⁴C] グアニン置換アッセイの成分

成分	容量 (µL)	最終濃度
1 M Tris-HCl pH 7.5	7.5	50 mM
5 M NaCl	0.6	20 mM
1 M MgCl ₂	0.75	5 mM
1 M ジチオトレイトール	0.3	2 mM
化合物 (2 mM ストック)	15	200 µM
H ₂ O	140まで	
キューイン-インサターゼ酵素	10	2 µg
tRNA*	2 Abs単位	1.8 µM

20

【0037】

DEAE カラムの調製：Whatmann DEAE 52-セルロース樹脂約 25 g を秤量して 50 ml の滅菌 RNA フリーチューブに入れた。200 mM トリス-HCl (pH 7.5) 容量 20 ml を加え、チューブを 5 回反転させ、そして卓上遠心分離機で 750 × g で遠心分離することにより樹脂を沈降させた。流し込みにより上清を取り出し、pH を確認した。洗浄液が pH 7.5 に達するまで、樹脂の洗浄を更に 4 回繰り返した。樹脂を 200 mM トリス-HCl (pH 7.5) との 1:1 スラリーに懸濁させ、樹脂の最終床容量 1 ml が達成されるまで 1.5 ml スピнкаラム (ガラス繊維フィルターを含む) に充填した。

30

【0038】

インキュベーション後、反応をカラムに充填し、0.1 × g で 10 秒間回転させた。フロースルーを集めて、カラムに再充填した。この工程を 5 回繰り返すことにより、tRNA の最大の結合を可能にした。次いで洗浄緩衝液 (20 mM トリス-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl₂、200 mM NaCl) 8 × 250 µL でカラムを洗浄し、各洗浄の間に 0.1 × g で 10 秒間回転させた。これらの充填及び洗浄工程をシンチレーションバイアルに集めた。次に結合 tRNA を、溶離緩衝液 (20 mM トリス-HCl、pH 7.5、10 mM MgCl₂、1 M NaCl) 中のアリコート 4 × 250 µL に溶出して、シンチレーションバイアルに集めた。Ecoscint A (シンチレーションカクテル) 10 mL を全てのバイアルに加えた。フロースルー及び洗浄液を含むバイアルは、置換 [¹⁴C] グアニンについて計数される。

40

このアッセイ (図 1 参照) では、200 µM キューイン塩基 (キューイン-インサターゼ酵素複合体の天然基質) による最大置換は、240 pmol [¹⁴C] グアニンである。バックグラウンド値は ≤ 10 pmol である。したがって、≥ 50 pmol の置換は TGT の基質として陽性と考えられる。

【0039】

キューイン-インサターゼ酵素複合体の基質として使用される化合物の能力のアッセイ-酵母 tRNA からの [¹⁴C] グアニンを置換することによる (図 1)。

グアニン、キューイン、N-((2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-

50

ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-5-イル) メチル) -3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド (化合物 I として示される) 及び 7-メチルグアニンを、酵母 tRNA 中のグアニンを置換する能力について評価した。先ず、酵母 tRNA に、大腸菌 TGT 酵素により $[8-^{14}\text{C}]$ グアニン (tRNA*) を供給した。各反応において、 2A_2 $_{60}$ 吸光度単位の tRNA* を、特定分子 $200\text{ }\mu\text{M}$ と一緒に使用した。反応物を DEAE セルロースカラム 1ml 上で処理した。反応フロースルー及び洗浄液を集めて、置換 $[^{14}\text{C}]$ グアニンの存在について液体シンチレーション計数によって分析した。

【0040】

同様に、当業者が読めば、ある化合物が HPR T の基質又はインヒビターであるか否かを決定するのに適した方法を知ることができよう。例えば、HPR T の基質でもインヒビターでもない分子は、以下のアッセイを用いて同定され得る：

10

【0041】

ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素の基質又はインヒビターとして化合物を評価するためのアッセイ、即ち「HPR T アッセイ」(図 2)。

カラムの調製及び平衡化：Dowex-1x8 (メッシュサイズ $200\sim400$) を秤量して滅菌 50ml チューブに入れ、 1M HCl 水溶液で 3 回洗浄することにより樹脂を供給した。次に中性 pH に達するまで樹脂を Milli-Q H_2O (各 20ml) で 5~6 回洗浄した。カラム (Bio-rad 10mL プラスチックカラム) に湿った Dowex 1mL を準備した (湿性混合物をアブライシ、沈降させ、充填容量が 1mL に達するまで更にアブライした)。充填樹脂を milli-Q H_2O 10 容量 (v/v) で濯ぐことにより、中性 pH 及び着実な充填が達成されたことを確実にした。

20

【0042】

HPR T 反応を、以下の成分により容量 $100\text{ }\mu\text{L}$ にしてトリプリケイトで準備する：

20mM HEPES (pH 8)

10mM MgCl_2

0.1mM ピロリン酸ホスホリボシル (PRPP-アッセイ当日に新たに作る)

$20\text{ }\mu\text{M}$ $[8-^{14}\text{C}]$ -グアニン

$400\text{ }\mu\text{M}$ 被験化合物

【0043】

反応混合物を 37°C に予熱後、組換えヒト HPR T 酵素 10ng を加えた。反応を 1 時間進行させた後、 100°C で 8 分間加熱することによって停止させる。熱不活化酵素 (反応物に加える前に 100°C で 8 分間処理した) を含む対照反応も常に含めた。

30

【0044】

不活化後、反応を室温まで冷却 (氷を使用) した後、反応物を Dowex-1x8 (メッシュサイズ $200\sim400$) の 1mL 充填樹脂カラムに適用した。カラムを milli-Q H_2O 5mL 及び 10mM HCl 10mL で洗浄することにより、未結合の未反応グアニンを除去した。GMP を 50mM HCl 5mL でカラムからシンチレーションバイアルに溶出した。シンチレーションカクテル (Ecoscint A) 15mL を加え、バイアルを計数することにより GMP への $[8-^{14}\text{C}]$ -グアニンの変換のレベルを評価した。

【0045】

HPR T の基質でもインヒビターでもない分子については、反応により $[8-^{14}\text{C}]$ -グアニンのみを含む対照反応物の $\geq 60\%$ の量で GMP 生成物が生じる。

40

【0046】

グアニン、キューイン、HCl (2-アミノ-5-[[[(1S, 4S, 5R)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-イル] アミノ] メチル]-1, 7-ジヒドロ-4H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-4-オン、一塩酸塩) 及び N-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-5-イル) メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド (グラフ上で化合物 I として示される) の結果を図 2 に示す。

【0047】

50

インターフェロンガンマを低下させる分子の能力は、以下のエキスピボアッセイで測定され得る（図3）：

Stromnes and Gorman, (2006)に記載されているとおり、慢性の単相性EAEを8～10週齢のメスのC57BL/6マウスに誘発させた。動物を氷冷リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で経心灌流して、脾臓を取り出した。

【0048】

70ミクロンのナイロンメッシュを通す押し出しにより脾臓の単細胞懸濁液を製造し、 $240 \times g$ で5分間の遠心分離によりcRPMI培地（10%ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン、100単位 ペニシリン、1mg/ml ストレプトマイシンを含有するRoswell Park Memorial Institute 培地）中で細胞を洗浄し、計数して、培地単独（陰性対照）又は50 $\mu g/ml$ ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質ペプチド（MOG₃₃₋₅₅）100 μl を含有するU底96ウェルプレートに $1 \times 10^6 / mL$ の最終密度で播種した。分子の全ストック濃度を滅菌DMSO中に調製して、10 μM 及び100 μM 濃度の細胞で試験した。分子の投与は、細胞中の0.5%の最終DMSO濃度を超えなかった。72時間後、プレートを $240 \times g$ で3分間遠心分離することにより、細胞を沈降させた。上清を慎重に取り出し、eBioscienceのELISAキットに供給された製造業者のプロトコールに従ってIFNガンマについてアッセイした。

【0049】

この試験法は、本明細書に記載のとおり野生型細胞又はTGT-KO細胞の両方で使用することができる。

【0050】

本発明における使用に適した分子は、以下を含む：

2-アミノ-5-（（（3-フェニルプロピル）アミノ）メチル）-3,7-ジヒドロ-4H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン

N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド

2-アミノ-5-（（ブチルアミノ）メチル）-3,7-ジヒドロ-4H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン

N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）ブタン-1-アミニウム・クロリド

2-アミノ-5-（（ヘキシルアミノ）メチル）-3,7-ジヒドロ-4H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン

N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）ヘキサン-1-アミニウム・クロリド

キューイン；2-アミノ-5-（（（（1S,4S,5R）-4,5-ジヒドロキシシクロペンタ-2-エン-1-イル）アミノ）メチル）-3,7-ジヒドロ-4H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン

キューインHCl 2-アミノ-5-[[[(1S,4S,5R)-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-イル]アミノ]メチル]-1,7-ジヒドロ-4H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン、一塩酸塩。

【0051】

理論に拘束されるものではないが、本発明の化合物は新しい薬物経路を介して作用するようである。これらは、2つのタンパク質：TGT（tRNAグアニントランスグリコシラーゼ）及びQTRTD1（キューイン-tRNAトランスグリコシラーゼドメイン含有1）からなる酵素複合体（本明細書ではキューイン-インサターゼ酵素複合体と呼ばれる）を利用する。その効果は、エフェクターT細胞（Teff）数を減少させ及び／又は制御性T細胞（Treg）の相対数を増加させることである。Treg細胞は、非自己タンパク質からの自己の決定に複雑に関与する、即ち、免疫系によって攻撃されないように自己のタンパク質を保護する、免疫系の一部である。

【0052】

キューインーインサターゼ酵素複合体の天然の基質は、真核生物細胞には合成できない分子であるキューインである。しかしながら、これは、ほとんどの細菌によって容易に産生されるため、ヒトでは、腐敗した食物又は腸内微生物叢のいずれかからキューインが取り入れられているはずである。キューインーインサターゼ酵素複合体は、キューインを、チロシルー、ヒスチジニルー、アスパラギニルー及びアスパルチルトランスファーRNA (GUNファミリーのtRNA; tRNA_{GUN}) のアンチコドンループに揺らぎ位置で挿入する。体内のtRNA_{GUN}の大部分は、揺らぎ位置でキューインにより修飾される。急速に増殖する細胞では、tRNA_{GUN}アイソタイプの揺らぎ位置において、キューインが欠乏しているか又は枯渇している（低修飾）ことは注目に値する。6-チオグアニン (6TG) を用いた以前の研究により、キューインーインサターゼ酵素複合体のこの代替基質の使用が、慢性MSのマウスモデル（即ち、実験的自己免疫性脳脊髄炎; EAE）に劇的な効果を及ぼし得ることが証明されている。残念なことに、治療的観点から、6TGは、HPRTのより強力な基質である（キューインーインサターゼ酵素複合体より約10倍高い）という問題に悩まされている。これはその後DNAに組み入れられるため、遺伝毒性であり、MSの処置法としては不適切になる。

【0053】

本発明は、6TGの有益な側面（tRNA_{GUN}の揺らぎ位置へのキューインーインサターゼ依存性交換）を利用可能な分子を中心に展開するが、これにより、6TGの主要な生物学的活性（即ち、HPRT活性及びその後のDNAへの挿入）に関連する問題を回避する。

【0054】

図4a~4dは、100 μM濃度のN-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（図4a~dには化合物Iとして示される）での処置により、増殖が野生型T細胞で50%未満に減少したことを示す。観察された効果へのHPRT関与の欠如は、HPRT遺伝子がノックアウトされた細胞における同様の増殖の減少によって実証された（HPRT KO、図4b）。HPRT活性の欠如は、分子が基質でもインヒビターでもないことが示された組換えHPRT酵素を用いるインビトロアッセイによっても確認されている（図2）。キューインーインサターゼ酵素複合体の必要性は、TGT遺伝子がノックアウトされた細胞（TGT KO、図4d）における増殖に及ぼす100 μM濃度のN-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（化合物Iとして示される）の効果の欠如によって確認される。これらのデータは、作用機序には実際にキューインーインサターゼ酵素複合体が介在していることを示しており、そしてこのことは、ダブルTGT:HPRTノックアウトが、100 μM濃度のN-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（式(I)）で処置したとき本質的に影響を受けないという事実によって更に確認される（図4c）。組換えTGT酵素を用いるN-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド（化合物I）のインビトロ分析もまた、化合物がTGTの基質であることを示している（図1）。データは、該化合物がキューインーインサターゼ酵素複合体の基質として作用するが、HPRTの基質ではないことを実証している。

【0055】

キューインーインサターゼ酵素複合体の基質は、ナイーブ集団に影響を与えることなく、脳炎誘発性（encephalitogenic）エフェクターT細胞及び記憶T細胞集団を抑制するように機能する。これらの同じ免疫細胞集団は、全ての自己免疫疾患の病因に広く寄与する。

【0056】

急速に増殖する細胞のトランスファーRNA (tRNA) は、キューイン修飾が欠乏（

10

20

30

40

50

低修飾)している;例は、胎児肝臓、複数の腫瘍型及び再生成人肝(regerating adult liver)を含む。これとは対照的に、完全に分化した細胞の成人のtRNAは、高レベルのキューインを含み、そしてこれは、取り込まれた後には置き換えられない。

【0057】

急速に増殖している免疫細胞のtRNA(自己免疫反応において生じる)は、同様にキューイン修飾が欠乏していることが予想できよう。免疫細胞のキューイン欠乏tRNAに選択的に新規キューイン-インサーターゼ基質を組み込むことにより、増殖及びサイトカイン産生を混乱させ、それにより免疫反応を調節することができよう。

【0058】

本発明の化合物は、多発性硬化症、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬、糖尿病及びクローン病を含む炎症性腸疾患を含むがこれらに限定されない、自己免疫症状の処置に;並びに移植拒絶反応を抑制する薬剤として有用であることを見出す。

【0059】

本発明はまた、哺乳動物、特にヒトにおける多発性硬化症を処置する方法であって、該哺乳動物に、ある量の本明細書中と同義の分子又はその薬学的に許容し得る塩若しくは溶媒和物を投与することを含む方法に関する。

【0060】

「処置」という用語は、症状の治癒的、好転的、軽減的、緩和的及び予防的処置を含むことが意図される。

【0061】

本発明は更に、多発性硬化症の治療に使用するための、他の適切な薬剤と組み合わせた本発明の分子に関する。

【0062】

多発性硬化症に罹患している患者は、一般に追加の治療剤を併用される。重度の発作を患う患者には、メチルプレドニゾロンのような静脈内コルチコステロイド、或いは手法など又は血漿交換を、任意の処置法と併用し得る。

【0063】

多発性硬化症に起因する神経細胞損傷の影響によって、患者には様々な形態の損傷が生じる。神経損傷は、疼痛、膀胱の制御困難及び他の多くの問題につながる可能性がある。このため、MS損傷の影響の処置に役立つように、多発性硬化症の患者には、しばしば追加の医薬品が処方される。適切な併用剤は、以下を含むであろう:

膀胱の問題には

- ・ボツリヌス毒素(Botox)
- ・デスモプレシン(Desmospray、Desmotabs)
- ・オキシブチニン(Ditropan、Lyrinel)
- ・トルテロジン(Detrusitol)

鬱病には

- ・アミトリプチリン(Triptafen)
- ・フルオキセチン(Prozac)
- ・イミプラミン(Tofranil)
- ・パロキセチン(Seroxat)

勃起不全には

- ・アルプロスタジル(Caverject、MUSE、Viridal Duo)
- ・クエン酸シルデナフィル(Viagra)
- ・タダラフィル(Cialis)
- ・バルデナフィル(Levitra)

疲労には

- ・アマンタジン(Lysovir、Symmetrel)
- ・モダフィニル(Provigil)

視神経炎には

10

20

30

40

50

- ・ステロイド
疼痛には
- ・アミトリプチリン (Tryptafen)
- ・カルバマゼピン (Tegretol)
- ・ガバペンチン (Neurontin)
- ・イブプロフェン
- ・イミプラミン (Tofranil)
- ・ラモトリジン (Lamictal)
- ・フェニトイン (Epanutim)
- ・プレガバリン (Lyrica) 10
- 歩行の問題には
- ・ファミプリジン (Fampyra)
- 情動調節障害 (Psuedobulbar) には
- ・Nuedexta
- 痙性及び痙攣には
- ・バクロフェン (Lioresal)
- ・ボツリヌス毒素 (Botox)
- ・カルバマゼピン (Tegretol)
- ・クロナゼパム (Rivotril)
- ・ダントロレン (Dantrium) 20
- ・ジアゼパム (Valium)
- ・ガバペンチン (Neurontin)
- ・フェノール
- ・テトラヒドロカンナビノール及びカンナビジオール (Sativex)
- ・チザニジン (Zanaflex)
- 振戦には
- ・クロナゼパム (Rivotril)
- ・視床切除術
- 三叉神経痛には
- ・カルバマゼピン (Tegretol) 30
- ・ガバペンチン (Neurontin)
- ・オクスカルバゼピン (Trileptal)
- ・フェニトイン (Epanutim)
- ・プレガバリン (Lyrica)

【0064】

他の治療剤が、通常MSの患者に投与される。他のこのような医薬品は、医師や他の治療の熟練者には周知である。

【0065】

このような薬剤は、逐次に、同時に又は併用して投与され得る。

【0066】

本発明はまた、本発明の分子及び薬学的に許容し得る希釈剤又は担体を含む、医薬組成物に関する。

【0067】

本発明の化合物の送達に適した医薬組成物及びその調製方法は、当業者には容易に明らかとなる。このような組成物及びその調製方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995)に見出され得る。

【0068】

式(I)の化合物は、経口投与され得る。経口投与は、化合物が消化管に入るように嚥下を伴うか又は化合物が口から直接血流に入る口腔内若しくは舌下投与を採用し得る。経口投与に適した製剤は、錠剤、微粒子、液体又は粉末を含むカプセル剤、トローチ剤 (lo 50

zenges) (液体充填を含む)、チュアブル剤 (chews)、マルチパーティクル及びナノ粒子剤、ゲル剤、固溶体剤、リポソーム剤、フィルム剤、腔坐剤、スプレー剤のような固体製剤、並びに液体製剤を含む。

【0069】

液体製剤は、懸濁剤、液剤、シロップ剤及びエリキシル剤を含む。このような製剤は、軟又は硬カプセル剤中の充填剤として採用され得、典型的には、担体 (例えば、水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース又は適切な油) 並びに1種以上の乳化剤及び／又は懸濁化剤を含む。液体製剤はまた、例えば、サシエット (sachet) からの、固体の再構成により調製され得る。

【0070】

式 (I) の化合物はまた、Expert Opinion in Therapeutic Patents, 11 (6), 981-986, by Lian and Chen (2001) に記載されているような、速溶性、速崩壊性の剤形にも使用され得る。

【0071】

錠剤の剤形に関して、用量に応じて、本薬剤は、剤形の1重量%~80重量%、更に典型的には剤形の5重量%~60重量%を占め得る。本薬剤に加えて、錠剤は一般に崩壊剤を含有する。崩壊剤の例は、デンプングリコール酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、微結晶性セルロース、低級アルキル置換ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、アルファ化デンプン及びアルギン酸ナトリウムを含む。一般に、崩壊剤は、1重量%~25重量%を構成する。本発明の1つの実施態様において、崩壊剤は、剤形の5重量%~20重量%を構成する。結合剤は、一般に、錠剤の製剤に凝集性を付与するために使用される。適切な結合剤は、微結晶性セルロース、ゼラチン、糖類、ポリエチレングリコール、天然及び合成ゴム、ポリビニルピロリドン、アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルセルロース並びにヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む。錠剤はまた、希釈剤 (乳糖 (一水和物、噴霧乾燥一水和物、無水物など)、マンニトール、キシリトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、微結晶性セルロース、デンプン及び二塩基性リン酸カルシウム二水和物のような) を含んでもよい。錠剤はまた、場合により、ラウリル硫酸ナトリウム及びポリソルベート80のような界面活性剤並びに二酸化ケイ素及びタルクのような流動促進剤を含んでもよい。存在する場合、界面活性剤は、錠剤の0.2重量%~5重量%を構成してもよく、そして流動促進剤は、錠剤の0.2重量%~1重量%を構成してもよい。錠剤はまた、一般に、滑沢剤 (ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、フマル酸ステアリルナトリウム及びステアリン酸マグネシウムとラウリル硫酸ナトリウムとの混合物のような) を含有する。滑沢剤は一般に、0.25重量%~10重量%を構成する。本発明の1つの実施態様において、滑沢剤は、錠剤の0.5重量%~3重量%を構成する。他の見込まれる成分は、酸化防止剤、着色料、香味剤、保存料及び矯味剤を含む。

【0072】

例示的な錠剤は、最大約80%の薬剤、約10重量%~約90重量%の結合剤、約0重量%~約85重量%の希釈剤、約2重量%~約10重量%の崩壊剤及び約0.25重量%~約10重量%の滑沢剤を含有する。

【0073】

錠剤用混合物は、直接又はローラーによって圧縮して錠剤を形成し得る。或いは、錠剤用混合物又は混合物の一部を、打錠の前に、湿式、乾式若しくは溶融造粒するか、溶融凝固するか又は押出成形し得る。最終製剤は、一層以上を構成し、そしてコーティングをされても、されなくともよく；更にカプセル化されてもよい。錠剤の製剤は、Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, by H. Lieberman and L. Lachman (Marcel Dekker, New York, 1980) において考察される。

【0074】

ヒトの使用又は獣医学的使用のための消耗品の経口フィルムは、典型的には、急速に溶解するか又は粘膜付着性であってよい、柔軟な水溶性又は水膨潤性の薄膜剤形であり、典型的には、式（I）の化合物、フィルム形成ポリマー、結合剤、溶媒、保湿剤、可塑剤、安定化剤又は乳化剤、粘度調整剤及び溶媒を含む。製剤の幾つかの成分は、1つ以上の機能を果たしてもよい。フィルム形成ポリマーは、天然の多糖類、タンパク質又は合成親水コロイドから選択され得、典型的には0.01～99重量%の範囲、更に典型的には30～80重量%の範囲で存在する。他の見込まれる成分は、酸化防止剤、着色料、香味料及び旨味調味料、保存料、唾液分泌促進剤、冷却剤、共溶媒（油類を含む）、軟化剤、増量剤、消泡剤、界面活性剤並びに矯味剤を含む。本発明に関連するフィルムは、典型的には、剥離可能な裏支持体又は裏紙上にコーティングされた水性薄膜の蒸発乾燥により調製される。これは、乾燥オープン若しくはトンネル乾燥機（典型的には複合コータードライヤー（combined coater dryer））内で又は凍結乾燥若しくは真空乾燥によって行われ得る。

10

【0075】

経口投与用の固体製剤は、即時及び／又は調節放出されるように製剤化され得る。調節放出は、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出及びプログラム放出を含む。本発明の目的に適した放出調節製剤は、米国特許第6,106,864号明細書に記載されている。高エネルギー分散並びに浸透性粒子及び被覆粒子のような他の適切な放出技術の詳細は、Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1-14, by Verma et al (2001)に見出されよう。制御放出を達成するためのチューインガムの使用は、国際公開第00/35298号に記載されている。

20

【0076】

式（I）の化合物はまた、血流中、筋肉中又は内臓中に直接投与され得る。このような非経口投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、脳室内、尿道内、胸骨内（intrasternal）、頭蓋内、筋肉内及び皮下投与を含む。非経口投与に適したデバイスは、有針（マイクロニードルを含む）注射器、無針注射器及び注入技術を含む。

【0077】

本発明の化合物はまた、皮膚又は粘膜に局所的に、即ち、皮膚的又は経皮的に投与され得る。

【0078】

式（I）の化合物はまた、典型的にはドライパウダー吸入器からのドライパウダーの剤形で（単独で、混合物（例えば、乳糖とのドライ混合物にして）として又は混合成分粒子（例えば、ホスファチジルコリンのようなリン脂質との混合）としてのいずれか）で適切な噴射剤（1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン又は1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-ヘプタフルオロプロパンのような）を用いるか又は用いずに加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー（好ましくは、電気流体力学を利用して微細ミストを生成するアトマイザー）又はネブライザーからのエアロゾルスプレーとして、或いは点鼻薬として、鼻腔内には又は吸入により投与することができる。鼻腔内使用には、この粉末は、生体接着剤、例えば、キトサン又はシクロデキストリンを含んでもよい。鼻腔内使用には、この粉末は、生体接着剤、例えば、キトサン又はシクロデキストリンを含んでもよい。

30

40

【0079】

加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー又はネブライザーは、例えば、エタノール、水性エタノール又は化合物の分散、可溶化若しくは延長放出のための適切な代替剤、溶媒としての噴射剤及びオプシオンの界面活性剤（トリオレイン酸ソルビタン、オレイン酸又はオリゴ乳酸など）を含む、式（I）の化合物の溶液又は懸濁液を含有する。

【0080】

ドライパウダー剤又は懸濁剤製剤での使用に先立ち、薬剤製品は、吸入による送達に適したサイズ（典型的には5ミクロン未満）に微粉化される。これは、らせんジェットミル粉碎、流動床ジェットミル粉碎、ナノ粒子を形成するための超臨界流体処理、高圧均質化又は噴霧乾燥のような、任意の適切な粉碎方法によって達成され得る。

50

【0081】

吸入器又はインサフレーターで使用するためのカプセル（例えば、ゼラチン又はヒドロキシプロピルメチルセルロースで作られている）、プリスター及びカートリッジは、本発明の化合物の粉末混合物、乳糖又はデンプンのような適切な粉末基剤及び１－ロイシン、マンニトール又はステアリン酸マグネシウムのような性能変更剤を含有するように製剤化され得る。乳糖は、無水物であっても又は一水和物の形態であってもよいが、好ましくは後者である。他の適切な賦形剤は、デキストラン、グルコース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、フルクトース、スクロース及びトレハロースを含む。

【0082】

微細ミストを生成するために電気流体力学を利用したアトマイザーで使用するのに適した液剤製剤は、1回の作動につき1 µg～20 mgの本発明の化合物を含有し得、そして作動容量は、1 µl～100 µlまで変化し得る。典型的な製剤は、式（I）の化合物、プロピレングリコール、滅菌水、エタノール及び塩化ナトリウムを含んでよい。プロピレングリコールの代わりに使用され得る代替溶媒は、グリセロール及びポリエチレングリコールを含む。

10

【0083】

メントール及びレボメントールのような適切な香味料又はサッカリン若しくはサッカリンナトリウムのような甘味料を、鼻腔内投与を意図した本発明のそれらの製剤に添加し得る。鼻腔内投与用の製剤は、即時放出及び／又は調節放出（例えば、PGLAを使用する）されるように製剤化され得る。調節放出は、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出及びプログラム放出を含む。

20

【0084】

式（I）の化合物はまた、典型的には、等張性のpH調整した滅菌生理食塩水中の微粉化懸濁液又は溶液の滴剤の剤形にして、眼又は耳に直接投与され得る。

【0085】

式（I）の化合物は、前記の投与方式のいずれかを使用するとき、その溶解性、溶解速度、味、生物学的利用能及び／又は安定性を改善するために、シクロデキストリン及びその適切な誘導体又はポリエチレングリコール含有ポリマーのような可溶性の高分子体と組み合わせられ得る。例えば、薬剤－シクロデキストリン複合体は、大部分の剤形及び投与経路に対して一般に有用であることが見出されている。包接複合体及び非包接複体の両方を使用し得る。薬剤との直接的複合体化の代替として、シクロデキストリンは、補助添加剤（即ち、担体、希釈剤又は可溶化剤として）として使用されてもよい。これらの目的のために最も普通に使用されるものは、アルファー、ベーター及びガンマシクロデキストリンであり、その例は、国際公開第91/11172号、同第94/02518号及び同第98/55148号に見出され得る。

30

【実施例】

【0086】

実験

本発明における使用に適した種々の分子の合成法を以下に記載する。

全ての出発物質及び試薬は市販されており、Fluorochemから購入された2－アミノ－3H－ピロロ[2,3-d]ピリミジン－4（7H）－オンを除いて、Aldrichから得られた。

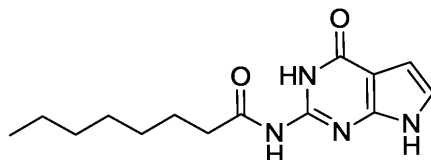
40

【0087】

調製1：2－オクタノイルアミノ－ピロロ[2,3-d]ピリミジン－4－オン

【0088】

【化 1】



攪拌棒を含む 50 cm³ 丸底フラスコに、2-アミノ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4(7H)-オン(2.00 g、13.33 mmol)を仕込んだ。フラスコにセプタムを取り付け、Ar 雰囲気下に置いた。新たに蒸留したピリジン(20.00 cm³)をシリンジで加え、生じた懸濁液を氷上で冷却した。この溶液をこの温度で平衡にさせ(約5分)、次いで塩化オクタノイル(6.80 cm³、39.99 mmol)を滴下した。生じた懸濁液を85℃で30分間加熱した。室温に冷却後、6.5%エタノール性アンモニア(60 cm³)を加えて、生じた懸濁液を室温で一晩攪拌した。生成物の沈殿物を真空濾過により取り出して、エタノール、続いてジエチルエーテルで洗浄することにより、純粋な所望の生成物(2.56 g、70%)を黄色の固体として得た、融点>300℃(分解)。

Akimoto et al. 1986及びAkimoto et al. 1988に基づく手順。

δ_H (400 MHz, DMSO-d₆): 0.86 (3H, t, J 5.1), 1.26 (8H, m), 1.58 (2H, 見かけ 5 重項), 2.01 (1H, br s, NH), 2.43 (2H, t, J 5.1), 6.40 (1H, d, J 2.0), 7.01 (1H, d, J 2.0), 11.43 (1H, br s, NH), 11.67 (1H, br s, NH)

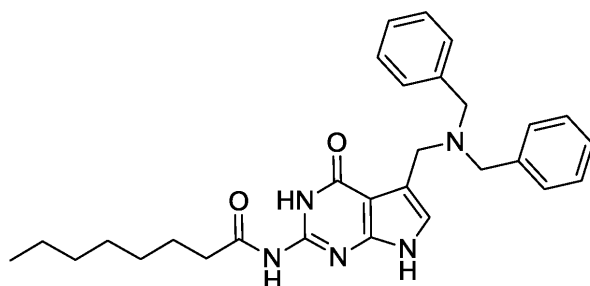
HRMS (m/z ESI⁻): 実測値: 275.1517 ([M-H]⁻ C₁₄H₁₉N₄O₂; 要求値: 275.1508)

【0089】

調製 2: 2-オクタノイルアミノ-5-(ジベンジル)アミノ)メチル)-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン

【0090】

【化 2】



攪拌棒を含む 50 cm³ 反応容器に、2-オクタノイルアミノ-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-オン(1.00 g、3.60 mmol)、ジベンジルアミン(2.00 cm³、10.80 mmol)、ホルマリン(349.00 μ L、12.60 mmol)及び80%水性酢酸(36 cm³)を仕込んだ。生じた懸濁液を60℃で20時間加熱し、室温に冷却し、0.5M HCl(36 cm³)で希釈して室温で30分間攪拌した。この混合物を濃アンモニア水溶液(36 cm³)で中和してクロロホルム(3×50 cm³)で抽出した。有機抽出物を合わせ、乾燥させ(MgSO₄)で蒸発乾固した。粗残渣をカラムクロマトグラフィー(9:1のジクロロメタン-MeOH~7:3のジクロロメタン-MeOH)により精製することによって、所望の化合物(1.45 g、84%)を黄色の粉末として得た、融点>300℃(分解)。Akimoto et al. 1986及びAkimoto et al. 1988に基づく手順。

δ_H (400 MHz, DMSO-d₆): 0.86 (3H, t, J 7.1), 1.25 (8H, m), 1.57 (2H, m), 2.42 (2H, t, J 7.1), 3.57 (4H, s), 3.76 (2H, s), 6.88 (1H, s), 7.23 (2H, t, J 7.3), 7.31 (4H, 見かけ t), 7.41 (4H, d, J 7.3), 11.34 (1H, s, NH), 11.57 (1H, s, NH), 11.68 (1H, s, NH)

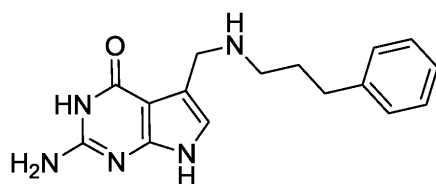
HRMS (m/z ESI⁺): 実測値: 486.2863 ([M+H]⁺ C₂₉H₃₆N₅O₂; 要求値: 486.2869)

【 0 0 9 1 】

実施例 1 2-アミノ-5-((3-フェニルプロピル)アミノ)メチル)ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-オン

【 0 0 9 2 】

【化 3】



10

攪拌棒を含む大きなカルーセル管に、2-オクタノイルアミノ-5-((ジベンジル)アミノ)メチル)ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4-オン(100.0 mg、0.21 mmol)、3-フェニルプロピルアミン(146.00 μ L、1.03 mmol)及び1:1のTHF-メタノール(2.00 cm^3)を仕込んだ。この懸濁液を脱気して反応容器を密封した。懸濁液を75℃で24時間加熱し、室温に冷却して、5M KOH(146.00 μ L)で処理して室温で65時間攪拌した。溶液を真空中で濃縮して、粗残渣をカラムクロマトグラフィー(9:0.9:0.1のジクロロメタン-MeOH-NH₄OH)により精製した。微量不純物を除去するために、生じた固体をHPLCグレードのヘキサン、次にジエチルエーテルで洗浄した。これにより、所望の化合物(28 mg、46%)を橙色の粉末として得た、融点>300℃(分解)。Akimoto et al. 1986及びAkimoto et al. 1988に基づく手順。

20

δ_{H} (600 MHz, DMSO- d_6): 1.24 (1H, br s, NH), 1.66 (2H, 見かけ 5重項), 1.91 (1H, s, NH), 2.44 (2H, t, J 6.9), 2.57 (2H, t, J 6.9), 3.59 (2H, s), 6.15 (2H, br s), 6.45 (1H, s), 7.15 (1H, t, J 7.4), 7.16 (3H, m), 7.25 (2H, 見かけ t), 10.70 (1H, br s)

δ_{C} (600 MHz, DMSO- d_6): 30.6, 32.9, 45.2, 47.5, 48.6, 79.2, 98.7 (q), 113.6 (q), 125.5, 128.2, 128.3, 142.3 (q), 152.2 (q), 160.5 (C=O)

ν_{max} (フィルム)/ cm^{-1} : 697, 748, 749, 1080, 1420, 1596, 2927

30

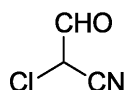
HRMS (m/z ESI⁺): 実測値: 298.1662 ([M+H]⁺ C₁₆H₂₀N₅O; 要求値: 298.1668)

【 0 0 9 3 】

調製 3: 2-クロロ-3-オキソプロパンニトリル

【 0 0 9 4 】

【化 4】



アルゴンの陽圧下の乾燥丸底フラスコ内で、無水THF(90 mL)中のNaOMe(7.14 g、0.13 mol)の懸濁液を-5℃に冷却した。ギ酸メチル(9 mL、0.15 mol)をシリンジで1分間かけて滴下し、-5℃で20分間攪拌を続けた。次に、クロロアセトニトリル(8.33 mL、0.13 mol)を滴下漏斗により45分間かけて滴下した。混合物は白色から黄色に変わり、-5℃で更に2時間攪拌したところ、反応混合物は橙色になった。浴を取り外して、反応物が室温まで温まるに任せた。反応混合物のアリコートに濃HCl 1滴で処理して、TLCにより分析すると、100% EtOAcで溶出する、 $R_f = 0.45$ の所望の生成物の存在を示した。混合物を0℃に冷却して、濃HCl(12 mL)を滴下すると、その間に混合反応物がサクランボ赤色(cherry red)になった。生じた懸濁液をセライト(celite)パッドで濾過して、濾液が無色になるまでセライトをEtOAcで洗浄した。集めた濾液を水浴で40℃以下の温度で減圧濃縮することにより、

40

50

クロロ（ホルミル）アセトニトリル¹を黒色の油状物として定量的収率で与えたが、これを更に精製することなく使用した。Brooks 2012に基づく手順。

δ_{H} (400 MHz, CDCl_3) 9.38 (s, 1H).

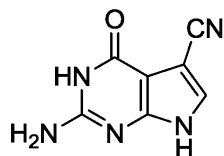
δ_{C} NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 168.2, 126.6, 67.8.

【0095】

調製4：2-アミノ-4, 7-ジヒドロ-4-オキソ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボニトリル

【0096】

【化5】



10

2, 4-ジアミノ-6-ヒドロキシピリミジン (3.00 g, 24 mmol) を、ミリポア水 (90 mL) 中の酢酸ナトリウム (6.4 g, 76 mmol) の溶液に加えて 50 °C で 1 時間攪拌した。50 °C のうちに、mQ 水 (44 mL) 中の粗クロロ（ホルミル）アセトニトリル (3.00 g, 32 mmol) の溶液を滴下漏斗で滴下すると、その間に反応はベージュ色になったが、50 °C で 18 時間加熱を続け、その後、反応を 100 °C まで 3 時間加熱した。反応混合物が室温まで冷却するに任せて、濾過により固体を取り出した。固体を EtOH に懸濁して、固体が溶解するまで 5M KOH 水溶液を加えた。活性炭を溶液に加えて、混合物を 30 分間攪拌した後、濾過により固体を除去した。濾液の pH を濃 HCl 水溶液で pH = 6 に調整すると、その間に沈殿物が形成され、これを濾過によって集めた。最終の微量の水を固体から除去するために、これをトルエン/メタノールの 1/1 混合物に溶解し、次に減圧濃縮した。得られた固体を P_2O_5 で乾燥させることにより、所望の化合物 (1.68 g, 9.6 mmol, 収率 40%) をベージュ色の固体として与えた。Brooks 2012 に基づく手順。

20

δ_{H} (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.98 (br s, 1H) 10.74 (br s, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.43 (s, 2H).

30

δ_{C} (100 MHz, DMSO-d_6) δ 158.0, 154.3, 152.1, 128.2, 116.4, 99.2, 86.0.

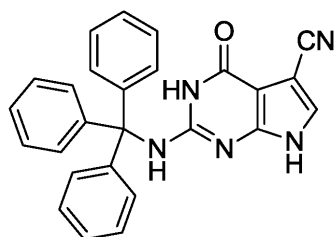
HRMS (m/z ESI⁻): $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$ [M-H]⁻ 実測値 174.0415 要求値: 174.0416.

【0097】

調製5：4, 7-ジヒドロ-4-オキソ-2-[(トリフェニルメチル)アミノ]-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボニトリル

【0098】

【化6】



40

アルゴン雰囲気下の乾燥丸底フラスコ内で、塩化トリチル (1.20 g, 4.28 mmol) を、無水ピリジン (29 mL) 中の 2-アミノ-4, 7-ジヒドロ-4-オキソ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボニトリル (0.50 g, 2.85 mmol) の溶液に加えた。この混合反応物を 90 °C で 48 時間加熱した。反応混合物を減圧下で濃縮し、次いでシリカゲルに吸収させ、2% MeOH で開始し 10% まで上昇する勾配のジ

50

クロロメタン／MeOHで溶出するシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。所望の化合物を褐色の固体（0.63 g、1.5 mmol、収率53%）として得た。

。Oelgen 2008に基づく手順。

δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.80 (br s, 1H); 10.64 (br s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.29-7.28 (m, 12H), 7.23-7.17 (m, 3H), 5.73 (s, 1H).

HRMS (m/z ESI⁺): C₂₆H₁₈N₅O [M-H]⁺ 実測値 416.1514 要求値: 416.1511.

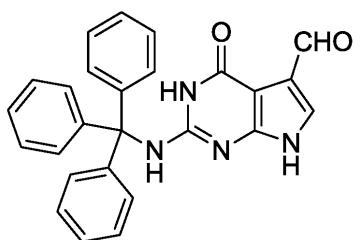
【0099】

調製6：4, 7-ジヒドロ-4-オキソ-2-[(トリフェニルメチル)アミノ]-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボキサルデヒド

10

【0100】

【化7】



20

HMDS（6 mmol、1.3 mL）を、丸底フラスコ内の無水トルエン（8 mL）中の4, 7-ジヒドロ-4-オキソ-2-[(トリフェニルメチル)アミノ]-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-カルボニトリル（1.30 g、3 mmol）と硫酸アンモニウム（397 mg、0.3 mmol）との混合物に加えた。還流冷却器を取り付けて、フラスコを還流温度で一晩加熱した。混合物を室温に冷却して、減圧下で濃縮した。陽圧のアルゴン下で、粗反応混合物を無水ジクロロメタン（8 mL）に可溶化して-78℃に冷却した。この温度で、DiBAL-H（4.5 mL、ジクロロメタン中1M、4.5 mmol）を滴下した。2時間後、TLC（EtOAc 100%）により分析すると、少量の出発物質が残っていることを示した。そのため、DiBAL-H溶液を更に2 mL滴下した。1時間後、反応が完了し、H₂O/AcOHの混合物（9/1、3.5 mL）を-78℃で加えた。反応混合物がゆっくりと室温まで温まるに任せた。EtOAc/H₂Oの混合物（1/1、300 mL）を反応混合物に加えて、室温で2時間攪拌を続けた。層を分離し、有機層をブラインで洗浄して、水層をEtOAcで抽出した。合わせた有機画分をMgSO₄で乾燥させ、濾過して減圧で濃縮した。粗反応生成物を、EtOAcで溶出するシリカゲルのパッドを通して濾過することにより、黄色の固体（1.01 g、2.38 mmol、76%）を与えた。Brooks 2010及びBrooks 2012に基づく手順。

30

δ_H (400 MHz, DMSO- d_6) 11.82 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.31-7.27 (m, 13H), 7.23-7.19 (m, 3H).

HRMS (m/z ESI⁻): C₂₆H₁₈N₄O₂ [M-H]⁻ 実測値 419.1508 要求値: 419.1508.

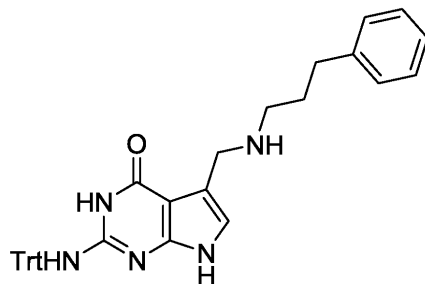
【0101】

調製7：5-((3-フェニルプロピルアミノ)メチル)-2-(トリチルアミノ)-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4(7H)-オン

40

【0102】

【化 8】



10

一般手順 A：メタノール（ 5 cm^3 ）中の N-（（4-オキソ-2-（トリチルアミノ）-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）ホルムアミド（200.0 mg、0.48 mmol）及び硫酸ナトリウム（5.0 mg）の懸濁液にアルゴン雰囲気下で 3-フェニルプロピルアミン（74.00 μL 、0.52 mmol）を加え、生じた懸濁液を室温で 2 時間攪拌した。次いで水素化ホウ素ナトリウム（55.0 mg、1.43 mmol）を加え、反応混合物を室温で更に 1 時間攪拌した。水（ 5 cm^3 ）を加えて、生じた懸濁液を 10 分間攪拌した後、ジクロロメタン（ $3 \times 5\text{ cm}^3$ ）で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ（ MgSO_4 ）、真空中で濃縮することにより、粗生成物を生成し、これをフラッシュクロマトグラフィー（9：1 のジクロロメタン-MeOH）により精製することによって、所望の化合物を白色の固体（210 mg、41.8%）として生成した、融点 $> 300^\circ\text{C}$ （分解）。Brooks 2010 及び Brooks 2012 に基づく手順。

20

^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1.73 (2H, 5 重項, J 7.8), 2.56 (4H, m), 3.74 (1H, s), 6.42 (1H, s, H-6), 7.19 (20H, m), 7.45 (1H, bs, NH), 10.78 (1H, bs, NH)

^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 31.7, 32.8, 45.4, 47.8, 70.4 (q), 99.7 (q), 114.9, 117.6 (q), 125.9, 126.0, 126.9, 128.0, 128.6, 129.0, 142.6 (q), 145.4 (q), 150.0 (q), 150.4 (q), 159.7 (C=O)

HRMS (m/z - ESI^+): 実測値: 540.2757 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}$ 要求値: 540.2765

$\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1542, 1611, 1670, 2868, 2951

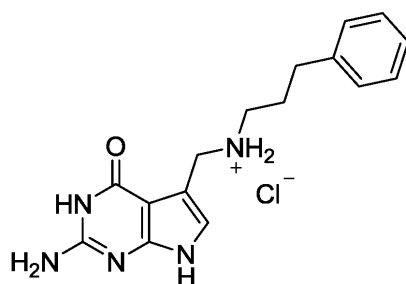
【0103】

実施例 2 N-（（2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル）メチル）-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド

30

【0104】

【化 9】



40

一般手順 B：攪拌棒を含む 5 cm^3 の反応容器に、5-（（3-フェニルプロピルアミノ）メチル）-2-（トリチルアミノ）-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4（7H）-オン（210.0 mg、0.39 mmol）及び 1.25 M メタノール性 HCl（ 3 cm^3 ）を仕込んだ。生じた溶液を室温で 16 時間攪拌した。沈殿した生成物を真空濾過により取り出して、ジクロロメタンで洗浄することにより、所望の化合物を白色の粉末（84 mg、68%）として生成した、融点 $> 300^\circ\text{C}$ （分解）。Brooks 2010 及び Brooks 2012 に基づく手順。

50

δ_{H} (600 MHz, DMSO- d_6): 1.90 (2H, 見かけ 5 重項), 2.63 (2H, t, J 7.8), 2.90 (2H, m), 4.13 (2H, t, J 5.2), 6.57 (2H, bs), 6.80 (1H, d, J 2.3), 7.16 (3H, m), 7.26 (2H, t, J 7.0), 9.11 (2H, bs), 11.05 (1H, m, NH), 11.31 (1H, ブロード 2 重項, NH)

δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6): 27.6, 32.1, 42.9, 45.6, 48.9, 98.6, 108.7 (q), 117.9 (q), 126.4, 128.6, 128.7, 140.9 (q), 152.9 (q), 160.5 (C=O)

HRMS (m/z ESI⁺): 実測値: 298.1662 (M⁺ C₁₆H₂₀N₅O 要求値: 298.1664)

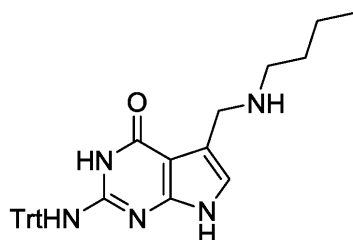
ν_{max} (フィルム)/cm⁻¹: 1456, 1625, 2443, 2713, 2756, 2873, 2933, 3184

【0105】

調製 8 5-((3-ブチルアミノ)メチル)-2-(トリチルアミノ)-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4(7H)-オン

【0106】

【化10】



20

N-((4-オキソ-2-(トリチルアミノ)-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド(200.00 mg、0.48 mmol)、n-ブチルアミン(95.00 μ L、0.95 mmol)及びNaBH₄(55 mg、1.43 mmol)を用いて一般手順Aのとおり調製することにより、所望の生成物を白色の粉末(200 mg、88%)として生成した、融点>300℃(分解)。

δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6): 0.84 (3H, t, J 7.3), 1.30 (2H, 見かけ 6 重項), 1.51 (2H, 見かけ 5 重項), 2.82 (2H, t, J 7.3), 4.01 (2H, s), 6.62 (1H, s), 7.24 (15H, m), 7.57 (1H, bs), 11.07 (1H, bs)

δ_{C} (400 MHz, DMSO- d_6): 13.9, 19.6, 28.0, 42.9, 46.0, , 70.6 (q), 99.4 (q), 108.9, 118.0 (q), 127.0, 128.1, 129.0, 145.2 (q), 150.5 (q), 150.6 (q), 160.3 (C=O)

ν_{max} (フィルム)/cm⁻¹: 1545, 1613, 1672, 2870, 2956

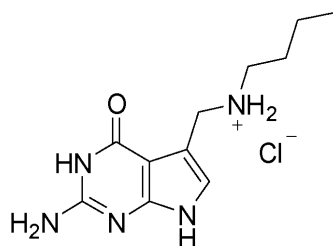
HRMS (m/z ESI⁺): 実測値: 478.2600 ([M+H]⁺ C₃₀H₃₂N₅O; 要求値: 478.2607)

【0107】

実施例 3 N-((2-アミノ-4-オキソ-4, 7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)ブタン-1-アミニウム・クロリド

【0108】

【化11】



40

5-((ブチルアミノ)メチル)-2-(トリチルアミノ)-3H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-4(7H)-オン(108 mg、0.39 mmol)及び1.25 M メタノール性HCl(3 cm³)を用いて一般手順Bのとおり調製することにより、所望の生成物を白色の粉末(72 mg、67%)として生成した、融点>300℃(分解)。

50

δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6): 0.86 (3H, t, J 7.4), 1.31 (2H, 見かけ 6 重項), 1.57 (2H, 見かけ 5 重項), 2.90 (2H, m), 4.12 (2H, t, J 5.3), 6.49 (2H, bs), 6.81 (1H, s), 9.01 (2H, bs), 10.98 (2H, bs), 11.29 (1H, bs)

δ_{C} (400 MHz, DMSO- d_6): 18.7, 24.7, 32.7, 47.4, 50.6, 103.6 (q), 114.0, 123.2 (q), 153.3 (q), 157.6 (q), 164.7 (C=O)

HRMS (m/z ESI $^{+}$): 実測値: 236.1518 (M^{+} C₁₁H₁₈N₅O 要求値: 236.1511)

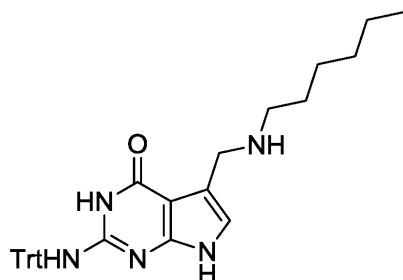
ν_{max} (フィルム)/cm $^{-1}$: 1456, 1625, 1668, 2443, 2713, 2756, 2873, 2933, 3184

【0109】

調製 9 5-((3-ヘキシルアミノ)メチル)-2-(トリチルアミノ)-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4(7H)-オン

【0110】

【化12】



10

20

N-((4-オキソ-2-(トリチルアミノ)-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド(200.0mg、0.48mmol)、n-ヘキシルアミン(125.00μL、0.95mmol)及び水素化ホウ素ナトリウム(55mg、1.43mmol)を用いて一般手順Aのとおり調製することにより、所望の生成物を白色の粉末(200mg、83.0%)として生成した、融点>300℃(分解)。

δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6): 0.82 (3H, t, J 7.4), 1.20 (6H, m), 1.34 (2H, 見かけ 5 重項), 2.40 (2H, t, J 7.4), 3.60 (2H, s), 6.30 (1H, s), 7.23 (15H, m), 7.37 (1H, bs), 10.62 (1H, bs)

δ_{C} (400 MHz, DMSO- d_6): 14.4, 22.5, 26.8, 31.6, 29.6, 45.2, 48.3, 70.4 (q), 99.7 (q), 115.2, 116.7 (q), 127.0, 128.1, 129.0, 145.4 (q), 150.1 (q), 150.5 (q), 159.7 (C=O)

ν_{max} (フィルム)/cm $^{-1}$: 1552, 1648, 1734, 2856, 2928

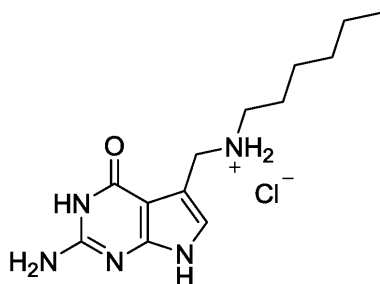
HRMS (m/z ESI $^{-}$): 実測値: 504.2769 ([M-H] $^{-}$ C₃₂H₃₄N₅O; 要求値: 504.2763)

【0111】

実施例 4 N-((2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)ヘキサ-1-アミニウム・クロリド

【0112】

【化13】



40

5-((ヘキシルアミノ)メチル)-2-(トリチルアミノ)-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4(7H)-オン(190mg、0.39mmol)及び1.25Mメタノ

50

ール性HCl (3 cm^3)を用いて一般手順Bのとおり調製することにより、所望の生成物を白色の粉末 (70 mg、64.8%)として生成した、融点 $>300^\circ\text{C}$ 。

δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6): 0.83 (3H, t, J 7.2), 1.25 (6H, m), 1.59 (2H, 見かけ 6重項, J 7.2), 2.87 (2H, m), 4.11 (2H, t, J 5.3), 6.71 (2H, bs), 6.84 (1H, d, J 3.6), 9.11 (2H, bs), 11.25 (1H, bs), 11.46 (1H, bs)

δ_{C} (400 MHz, DMSO- d_6): 14.3, 22.3, 25.8, 25.9, 31.1, 42.6, 46.1, 98.9 (q), 109.3 (q), 118.5, 148.1 (q), 152.8 (q), 159.8 (C=O)

ν_{max} (フィルム)/ cm^{-1} : 1578, 1625, 1669, 2429, 2712, 2861, 2930, 2957, 3266

HRMS (m/z ESI $^+$): 実測値: 264.1830 ([M+H] $^+$ C $_{13}$ H $_{22}$ N $_5$ O 要求値: 264.1824)

【0113】

本明細書に記載される全ての実施例は、TGT基質である。

本明細書に記載される全ての実施例は、HPR Tのインヒビターでも基質でもない。

【0114】

インビボでのこれらの化合物の可能性を評価するために、新しい化学物質(NCE)による処置の前にマウスに慢性単相性EAE疾患を誘発させた。完全フロイントアジュバント(CFA;熱不活化結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) 5 mg/mlを含む)中のMOG₃₃₋₅₅ペプチド(Genscript) 150 μg を含有するエマルジョン200 μl の皮下(s.c.)注射により、8~10週齢の雌マウス(C57BL/6)にEAE疾患を誘発させた。同日、マウスに百日咳毒素(Pertussis Toxin)(Kaketsuken、日本) 500 ngを腹腔内(i.p.)投与し、2日後に再び投与した。24時間ごとに疾患の重症度を記録した: 0-正常; 1-弛緩尾; 2-歩行障害/不安定歩行; 3-完全な後肢衰弱; 4-後肢及び前肢麻痺; 5-瀕死状態/死亡。プロトコルは、実験的アレルギー性脳脊髄炎の能動的誘発のためのNature Protocolsに基づいており、これは採点方法を含む:

【0115】

Stromnes IM, Goverman JM (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc. 1(4):1810-9.

【0116】

図5は、N-((2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド分子(化合物Iとして示される)のインビボ試験の結果を示す。EAEスコアは、尾麻痺及び四肢麻痺のような問題に関する疾患の進行の評価に関連しており、スコアが高いほど状態は悪い。スコア1は、尾緊張度の低下を示し、スコア2は、後肢の衰弱(不全対麻痺)を示し、スコア3は、後肢の麻痺及び/又は失調を示す。未処置動物は、疾患が継続的かつ進行性に悪化していることに留意されたい。対照的に、N-((2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド(化合物Iとして示される)で処置した動物は、最高用量投与(30 mg/kg、腹腔内)で急速(24時間以内)な症状の好転を示して、動物は1日1回、4回の処置後に無病であると採点された。低用量では、動物の反応は遅かったが、全ての場合において、疾患の進行は停止して好転した。

【0117】

図6は、観察された障害スコアと一致して、接種21日後(dpi)に、処置動物が、対照の体重レベルの96.6%に達する(19.9グラム対20.6グラム)正常体重増加への劇的な回復を示したことを示す。これは、21dpiでの未処置EAE罹患動物における対照のレベルの86.4%までの体重の持続的低下(17.8グラム対20.6グラム)とは対照的である。運動協調性及び後肢の強さもまた、マウスが水平バーを越える能力によって評価した(図7)。非罹患動物は、平均時間4.3 $\pm$ 0.57秒でバーを越えた。9dpiから、EAEマウスは成績の急速な劣化を示し、続いて装置をつかみ続けることができなくなった。驚くべきことに、N-((2-アミノ-4-オキソ-4,7-ジヒドロ-3H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)メチル)-3-フェニルプロパン-1-アミニウム・クロリド(化合物Iとして示される)処置によって、4回の処置以

10

20

30

40

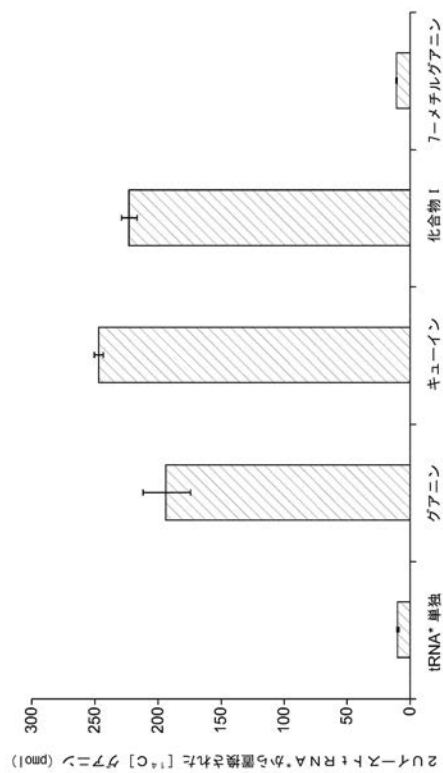
50

内に E A E 罹患マウスの成績は対照レベルまで完全に回復した。

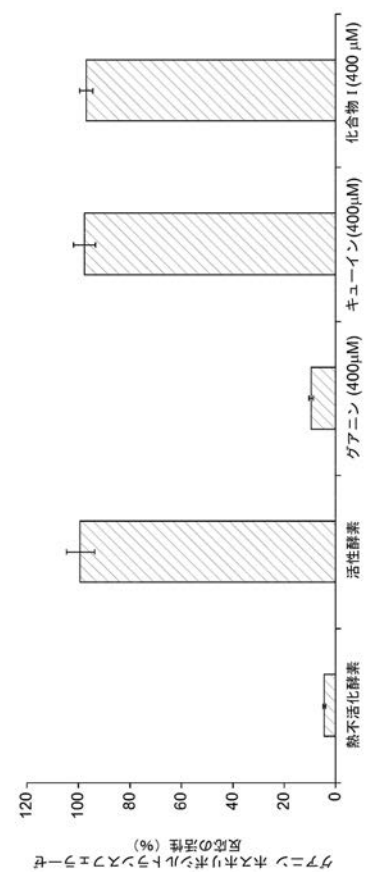
【 0 1 1 8 】

図 5、6 及び 7 に示されたデータに加えて、本明細書に記載される全ての分子は、慢性 E A E モデルで試験され、被験体における無病状態への症状の好転を含むまでの実質的な改善を示すことが見出された。

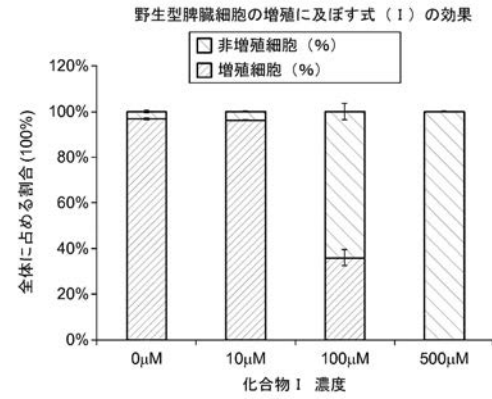
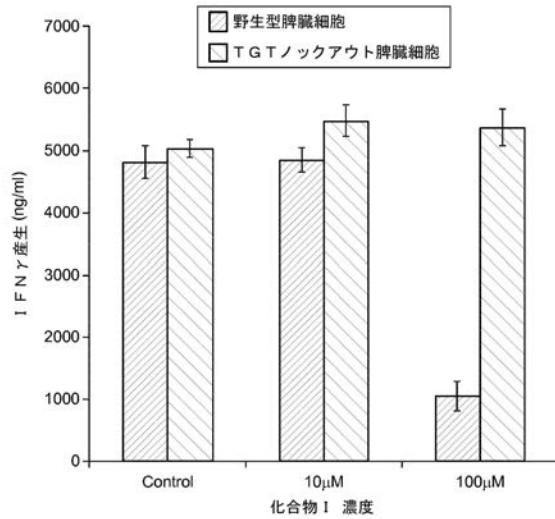
【 図 1 】



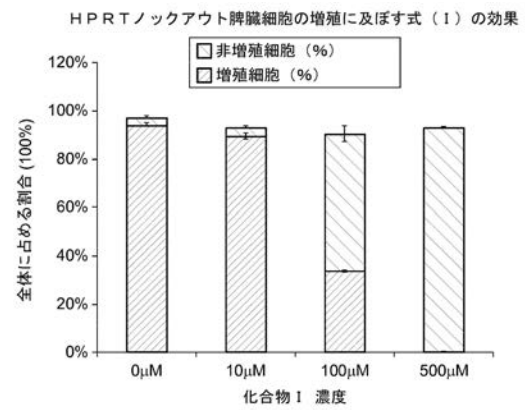
【 図 2 】



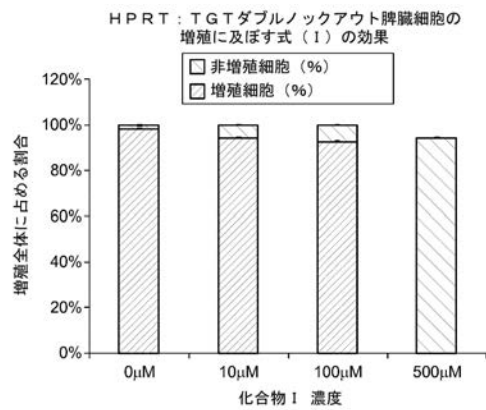
【図 4 a】



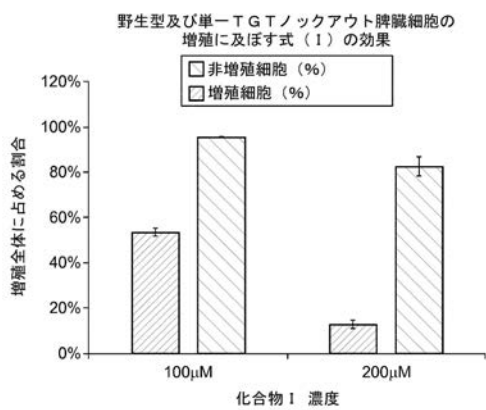
【図 4 b】



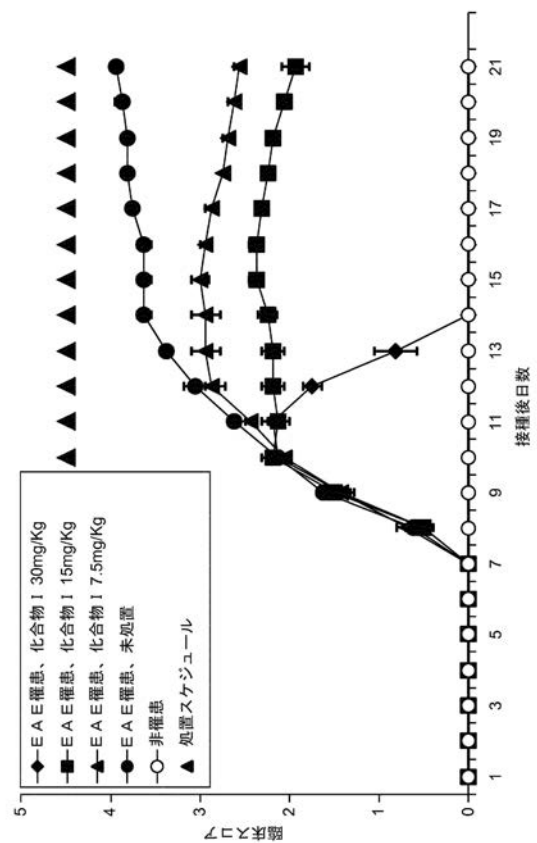
【図 4 c】



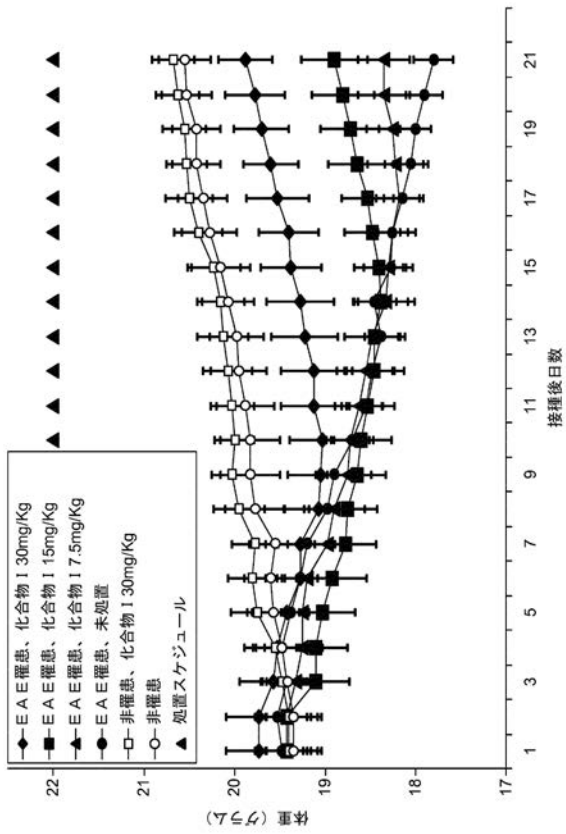
【図 4 d】



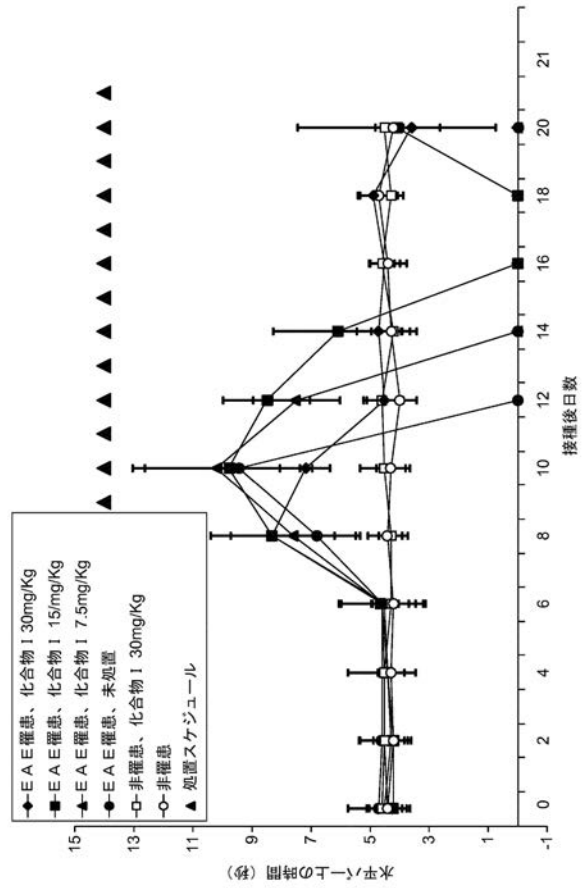
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/072488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/519 A61P37/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILOSLAV KVERKA ET AL: "Safety and efficacy of the immunosuppressive agent 6-tioguanine in murine model of acute and chronic colitis", BMC GASTROENTEROLOGY, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 11, no. 1, 5 May 2011 (2011-05-05), page 47, XP021098129, ISSN: 1471-230X, DOI: 10.1186/1471-230X-11-47 abstract ----- -/--	1,3,5,7,8
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 January 2016		27/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Allnutt, Sarah

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/072488

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMILLE MASON ET AL: "Thioguanine for refractory psoriasis: A 4-year experience", JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY., vol. 44, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 67-72, XP55239426, US ISSN: 0190-9622, DOI: 10.1067/mjd.2001.109296 abstract	1,3,5,7,8
A	----- NOBUKO SHINDO-OKADA ET AL: "Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver", BIOCHEMISTRY, vol. 19, no. 2, 1 January 1980 (1980-01-01), pages 395-400, XP55239435, US ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00543a023 abstract	1-11
Y	----- HIROSHI AKIMOTO ET AL: "Queuine analogs. Their synthesis and inhibition of growth of mouse L5178Y cells in vitro", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 29, no. 9, 1 September 1986 (1986-09-01), pages 1749-1753, XP055238846, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm00159a031 page 1750, column 2, paragraphs 2,3,6,7; table 1	1-11
Y	----- US 5 061 707 A (KOSTLAN CATHERINE R [US] ET AL) 29 October 1991 (1991-10-29) column 2, lines 19-26	1-11
Y	----- US 5 002 950 A (MALONE THOMAS C [US] ET AL) 26 March 1991 (1991-03-26) column 2, line 31 - line 4; claim 5 ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/072488

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GEOFFREY C. HOOPS ET AL: "Mechanism-Based Inactivation of tRNA-Guanine Transglycosylase from Escherichia coli by 2-Amino-5-(fluoromethyl)pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one", BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 47, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 15539-15544, XP55223113, US ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00047a020 abstract -----	1-11
Y	Varghese,Sreeja: "The Queuine-Transfer RNA Pathway as a novel drug mechanism to treat Multiple Sclerosis", 1 January 2012 (2012-01-01), XP002752735, Retrieved from the Internet: URL:http://www.worldcat.org/title/queuine-transfer-rna-pathway-as-a-novel-drug-mechanism-to-treat-multiple-sclerosis/oclc/856580202 [retrieved on 2016-01-08] page 1 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/072488

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5061707	A	29-10-1991	NONE	

US 5002950	A	26-03-1991	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C084 AA17 AA19 AA20 NA05 ZA021 ZA661 ZA681 ZA891 ZA961 ZB081
 ZC351 ZC751
 4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA02 ZA66
 ZA68 ZA89 ZA96 ZB08 ZC35 ZC75