

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4335311号
(P4335311)

(45) 発行日 平成21年9月30日 (2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月3日 (2009.7.3)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)	A 6 1 K 31/7056
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 37/64
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
請求項の数 5 (全 19 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願平9-510502
 (86) (22) 出願日 平成8年8月30日 (1996.8.30)
 (65) 公表番号 特表2001-500471 (P2001-500471A)
 (43) 公表日 平成13年1月16日 (2001.1.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/013721
 (87) 国際公開番号 W01997/008180
 (87) 国際公開日 平成9年3月6日 (1997.3.6)
 審査請求日 平成15年8月12日 (2003.8.12)
 (31) 優先権主張番号 08/521, 474
 (32) 優先日 平成7年8月30日 (1995.8.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509045759
 ユーイービー リサーチ ファンデーション
 アメリカ合衆国 アラバマ 35294-0111 パーミンハム サウス トゥウ
 エンティース ストリート 701 アド
 ミニストレイション ビルディング スイ
 ート1120ジー
 (73) 特許権者 509045760
 シナズィ, レイモンド エフ
 アメリカ合衆国・ジョージア州・3030
 5・エーティーワン・スイート・2204
 ・ピーチツリー・ロード・2881
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテアーゼインヒビターの生物学的及び抗ウイルス活性を改善する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H I V 感染治療用組成物であり、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン、トロレアンドマイシン、クラリスロマイシン及びロキシスロマイシン並びにリンコサミド系抗生物質であるリンコマイシンからなる群から選択される1種又はそれ以上のA A G (アルファ - 1 - 酸 糖タンパク質) 結合性化合物を混ぜた、S C - 5 2 1 5 1、M K - 6 3 9、R o 3 1 - 8 9 5 9、及びV X - 4 7 8 からなる群から選択される1種又はそれ以上のプロテアーゼインヒビターの有効量を備えたことを特徴とする組成物。

【請求項2】

プロテアーゼ逆転写酵素インヒビター、抗融合/結合性剤、抗インテグラーゼ剤及び抗ウイルスオリゴヌクレオチドからなる群より選択される1種またはそれ以上の補足的治療薬を更に備えたことを特徴とする請求項1記載の組成物。

【請求項3】

上記1種又はそれ以上のA A G (アルファ - 1 - 酸 糖タンパク質) 結合性化合物が、エリスロマイシン、トロレアンドマイシン、クラリスロマイシン及びロキシスロマイシンからなる群より選択されるマクロライド系抗生物質であることを特徴とする請求項2記載の組成物。

【請求項4】

上記1種又はそれ以上のA A G (アルファ - 1 - 酸 糖タンパク質) 結合性化合物が、リンコマイシンであることを特徴とする請求項2記載の組成物。

【請求項5】

上記1種又はそれ以上のAAG(アルファ-1-酸糖タンパク質)結合性化合物が、ロキシロマイシン又はクラリスロマイシン又はそれらの混合物であることを特徴とする請求項1記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

発明の分野

本発明は、プロテアーゼインヒビター(protease inhibitors)のような治療薬剤を細胞が取り込む(uptake)ことを改善し及びそれらの活性、殊に抗-HIV活性を増強するための方法に関する。

10

背景の検討

エイズ(AIDS)として知られる病気は早くも1979年に最初に確認された。CDC(Centers for Disease Control and Prevention)に報告された事例の数はその時から各年劇的に増加し、且つ1982年においてCDCはエイズの新たな流行を宣言した。1987年12月と1988年11月の間、32,000を超えるエイズの新たな事例がCDCによって報告された(HIV/AIDSサーベイランスレポート, 1-16, 1989年12月)。3,000を超える新規の事例が1984年だけで報告された。早くも1995年で、世界保健機構(WHO)では、世界中で発生しているこの病気の事例が少なくとも4百万と見積もった。また凡そ1千万の人々が今日、HIVに感染していると見積もっている。

アメリカ合衆国において、エイズは約441,000の事例が今までCDCにより報告されている。1995年1月現在、CDCは、合衆国単独でエイズにより250,000人が死亡していることを報告した。人間の生存の期間におけるエイズ伝染の代価は不安定(staggering)であり、且つ最悪の事態がさらに到来することは明らかである。

20

レトロウイルスはエイズの原因となる作因として定義される。最近、ヒト免疫不全ウイルスタイプ1(HIV)がエイズのためのウイルス応答のための適した名称として現われている。HIVの抗体はエイズ感染者又は前エイズ症候群(pre-AIDS syndrome)として診断された患者の80%以上に存在し、且つそれはまた危険群と同定された中から高率で見出されている。

エイズに伸展する危険性を診断することは困難であると見なされる。エイズはHIVに感染した殆ど全ての個人において結局発現することが知られる。

30

患者はT細胞の免疫が損なわれ完全な免疫システム獲得を持つ以前の健全な成人の時にエイズを持つものと一般的に診断される。その損なわれた免疫性は18ヶ月から3年の期間を通じて現われる。この損なわれた免疫性の結果として、その患者は、日和見感染を受け易く、カボジ肉腫、及び免疫システムの機能低下に関連した別の疾患のような各種の癌腫になる。

病気を予防すること又はエイズの免疫不全性の有意な転換ができる現に有効である治療は無い。日和見感染を持つ全ての患者とカボジ肉腫を持った全ての患者のうちの概ね半数は、診断の二年以内に死亡している。エイズを持つ患者における免疫システムの復活の試みは今までのところ成功していない。

3-アジド-3-デオキシチミジン(AZT)は、HIV感染とエイズの治療において最も汎用されているが、それは可逆性の骨髄毒性のような重要な負の副作用を持ち、かつ患者によってAZTに対してウイルス抵抗性が発現する。このように治療の他の方法は非常に切望されている。

40

ウイルスは伝統的に抗体治療にตอบสนองしない。それ故に、他の治療剤はウイルス感染を治療する時に使用される。昨今発見された治療の一つは、ウイルス複製サイクルを分裂させるプロテアーゼインヒビターを使用しあちこち循環させるものである。プロテアーゼインヒビター治療は、レトロウイルス(例えばHIV)、ヘパドナウイルス(例えばC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus))、ヘルペスウイルス(例えば単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus)及びサイトメガロウイルス)及びミクソウイルス(例えばインフルエンザウイルス)、同様に寄生プロトゾア(例えばクリプトスポリジウム及びマラリア)

50

、癌の化学療法とウイルス性病状の病気によるそれらの事例のような、ウイルス感染症を含む疾患の広い範囲の治療に使用し得る潜在能力を持っている。実施例のために、H I V複製サイクルにおけるH I Vプロテアーゼの役割を以下に記す。

H I Vプロテアーゼと複製サイクル

H I VはD N A中間体を通して複製する。それぞれのウイルス粒子はウイルスのヌクレオカプシド蛋白質 (nucleocapsid protein) によって囲まれた二つの同一の一重鎖R N A分子を含む。ウイルスの残るコアはカプシド (capsid) とマトリックス蛋白質とから構成されている。宿主細胞 (host cells) 内のウイルスの遺伝的材料の複製化及び構築のために要求される酵素もまた、そのカプシドの内部に含まれる。ウイルス粒子の外被覆はウイルス性外皮糖タンパク質 (viral envelope glycoproteins) と宿主細胞に由来する膜とから構成される。

10

他のレトロウイルスと共に、H I Vは、g a g , p o l , 及びe n v 遺伝子のための同様の基本的な遺伝的構造を持つ。これらの遺伝子は、非スプライス伝達R N Aと呼ばれる、ウイルスの遺伝的材料の一つの中間体形態から発現し、先駆体 (precursor) g a g - p o l 融合ポリタンパク質の合成を生じる。そのポリタンパク質は次いで成熟したウイルスのタンパク質を生じるように、H I Vプロテアーゼ酵素によって切断される。g a g 先駆体は、p 1 7 (マトリックス)、p 2 4 (カプシド)、p 7 (ヌクレオカプシド) 及びp 6 に切断する。一方、p o l 先駆体は、個別のプロテアーゼ、逆転写酵素及びインテグラーゼ酵素にて処理される。かくしてH I Vプロテアーゼは、全ての伝染し得るウイルスにおけるウイルス粒子の成熟に通じる開裂発生の調整カスケードのために応答し得るものである。

20

H I Vプロテアーゼはアスパラギン酸プロテアーゼファミリーの一員である。それは2つのサブユニットのホモ二量体として機能する哺乳動物のアスパラギン酸プロテアーゼとは異なる。対照してみると、哺乳動物のプロテアーゼは単量体ポリタンパク質である。しかしながらプロテアーゼの二つの型は、それらの全体的な構造と機能において類似する。1988年において、それは非感染性、未熟なウイルス粒子、H I Vの複製サイクル内で必須の機能を提供し且つエイズのための特異的抗ウイルス薬の設計のため魅力ある標的となるプロテアーゼ作製の示唆の結果により、H I Vプロテアーゼ遺伝子の変異又は欠失が観測された。他のアスパラギン酸プロテアーゼに関する研究から蓄積された知見の広大な内容、最も注目し得るヒトのレニン、H I Vプロテアーゼインヒビターの設計と発見とを容易にしている。コンピューター補助論理的薬物設計 (computer-aided rational drug design) における最近の前進はH I Vの有効で且つ高度に特異的なインヒビターの発見のための製薬及び遺伝子工学において広く翻訳されている。プロテアーゼインヒビターは、そのインビトロにおける論理的解釈を提供でき、プロテアーゼインヒビターの構造が複合体であれば、エックス線分析によって決定される。

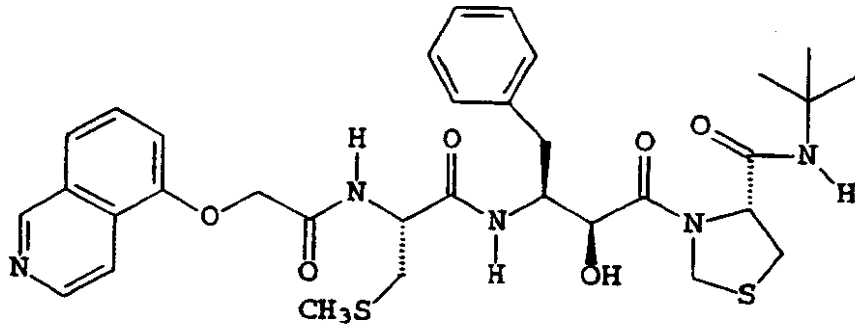
30

H I V複製の後段階では、構成タンパク質と複製性酵素先駆体の成熟化の過程のためにウイルスのコード化されたアスパラギン酸プロテアーゼが要求される。プロテアーゼの阻害は、未熟化、非感染ウイルス粒子及びウイルス伝染性の停止の結果を生じる。

H I Vプロテアーゼインヒビター

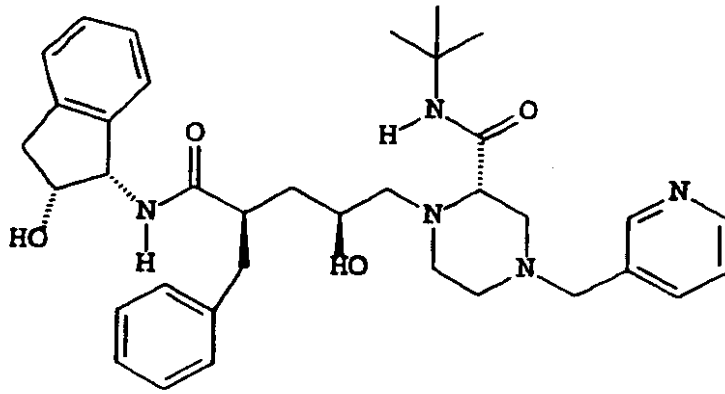
これまでに、H I Vプロテアーゼ機能を阻害する数々の化合物が確認されている。以下の図表は臨床試験の様々な段階で広く知られたH I Vプロテアーゼインヒビターの種類を示し、且つH I V治療におけるこれら化合物を調査している会社である。

40



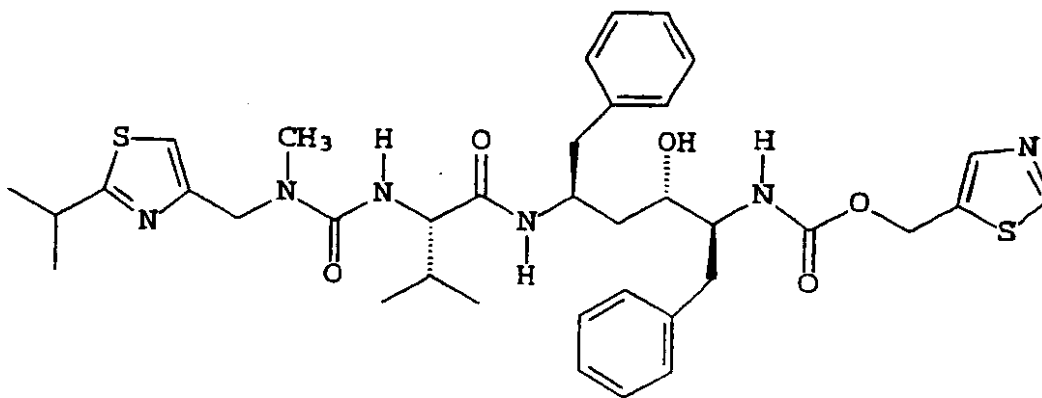
10

KNI-272



20

MK-639



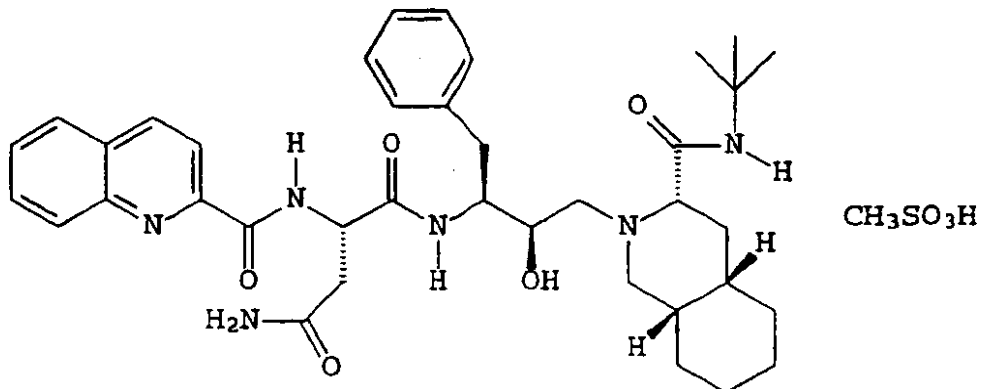
40

ABT-538

H I V プロテアーゼインヒビター (I)

化合物	薬剤クラス	会社
Ro 31-8959	ヒト [*] ロキシエチルアミン	ネフマン-ラロッシュ
MK-639	ヒト [*] ロキシアミノペンタン アミト [*]	メルク, sharpe & dohme
ABT-538	Symmetry-Based	アボット
SC-52151	ヒト [*] ロキシエチルウレア	シール/モンサント
XM-323	サイクリックウレア	デュボソ/メルク
KNI-272	フェニルノルスタチン	京都製薬/NCI
U-103,017	ピラノン	Upjohn/ファーマシア
Ag-1343	ヒト [*] ロキシエチルアミン	Agouron
VX-478	ヒト [*] ロキシエチルスルフォンアミト [*]	Vertex/Glaxo-Wellcome
DPM-450	サイクリックウレア	デュボソ-メルク
BMS-182,193	アミノアルコール	Bristol-Myere Squibb
CGP-53820	シュート [*] シンメトリックインヒビター	チルカ [*] イキ [*]
CGP-53437	ヒト [*] ロキシエチレン アイソスター	チルカ [*] イキ [*]
HOE/BAY-793	C2-シンメトリック [*] ヘ [*] フ [*] チ [*] ミメチック	Hoechst/ハイ [*]
RPI-312	シンセチック [*] ヘ [*] フ [*] チ [*]	武田化学工業

構造式は上記プロテアーゼインヒビターの選択のために以下に用意される。

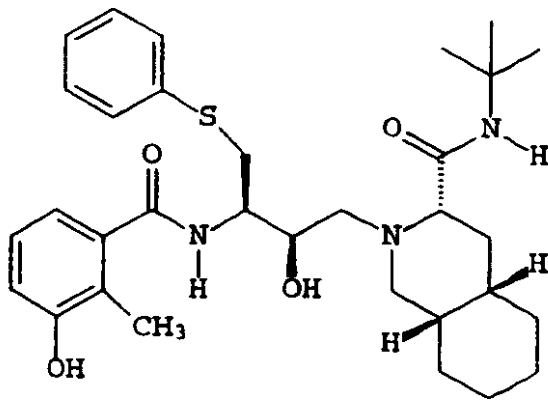


10

20

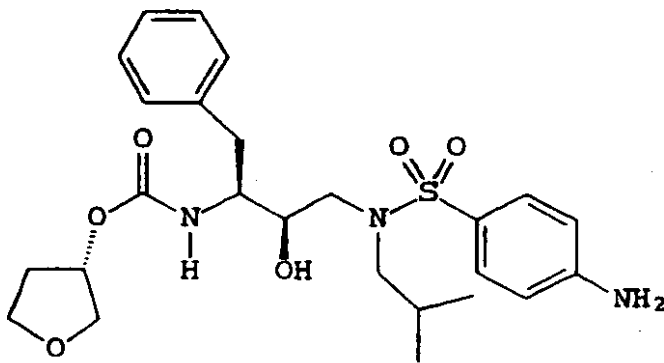
30

40



AG-1343

10



VX-478

20

これらの化合物は、それらがHIVの複製サイクルの後段階でHIVを攻撃することから抗レトロウイルスの一つの特に有望な新規のクラスを組み上げ、且つこれにより慢性的な感染細胞中の潜伏ウイルスに対して潜在的な攻撃をする。一般に許可された、AZT, ddI, ddC、及びより最近のd4Tと対照すれば、逆転写酵素のインヒビターとして働き、HIV複製の早い段階でウイルスの酵素に作用する。一方、これらの薬剤はHIV感染を妨げることができ且つ更なる感染が無いよう細胞を保護し、それらは慢性的な感染細胞のように既に完成した細胞に対し本質的に不活性である。感染が細胞中に一旦確立すると(例えばHIV遺伝的材料が宿主細胞ゲノム内に統合される)、逆転写酵素はもはやウイルス複製のために要求されない。しかしながら、プロテアーゼ酵素は感染をもたらすビリオン(virions)、成熟したウイルス粒子のために必須である。HIVプロテアーゼインヒビターの機能は、新規に作製されるウイルス粒子に非感染性を与えることである。それ故に、慢性的な感染細胞中で活性な薬剤、単独で又は他の抗-HIV薬剤と組み合わせるかのいずれか一方で使用される、HIV感染の治療において成功の機会を提供する薬剤が緊急に必要とされる。

30

40

一つのファクターは、プロテアーゼインヒビターのような薬剤のインビトロでのEC₅₀(中間有効濃度)と、インビボでの生理的条件下で要求される薬剤のタンパク質結合性の範囲及び効果の抗ウイルス性の濃度の間の相関関係に影響を与えることができる。幾つかのHIVプロテアーゼインヒビターの抗ウイルス活性はヒトの血清又は血漿の高い濃度での存在を減少させる結果を示している(Bilello, アブストラクト #419 1st Intl. Conference on Human Retroviruses, Dec. 12-16 1993 Washington, D.C.; Bilello, アブストラクト 178, 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Oct. 4-7, 1994)。HIVプロテアーゼインヒビターの高い結合親和性は、それらの親

50

油性に係る (Kagayamaら, *Antimicro. Agents and Chemother.*, 38:1107-1111, 1994)。ソマドシイら (Sommadossiら, アブストラクト "A Human Serum Glycoprotein Profoundly Affects Antiviral Activity of the Protease Inhibitor SC-52151 by Decreasing Its Cellular Uptake" The Second Nat '1 Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, DC, 1995年1月30日) 及びビレロら (Bilelloら, 1993 supra) には、アルブミンではないが、ヒト血漿の両方の主要成分で、プロテアーゼインヒビター-A77003とSC-52151及びそれらの類似物の抗ウイルス活性を著しく減じることができるヒトのアルファ-1-酸糖タンパク質(AAG)を最近示している。AAGは、0.5から1.5mg/mlの通常の生理学的レベルを持つ急性期タンパク質であり、感染、癌、炎症及び創傷によってホメオスタシスの傷害の後に増加させることができる。AAGの平均値は、健康人と比べ、エイズ及び癌の患者は50-100%高いことが報告されている (Oeiら, *J. AIDS*, 6:25-27, 1993)。

実験で抗ウイルス活性が確かめられた抗HIV薬剤は、デキストラン硫酸、オリゴヌクレオチド及びペプチドミメチック基(peptidomimetic-based)プロテアーゼインヒビター、及びより小さい範囲について、ヌクレオシド類似物、(Kagayamaら (supra); Hartmanら, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 6:805-812, 1990) を含み、ヒト血清又はヒト血漿の成分の高い濃度によって顕著に作用する。特別の薬剤の候補の構造はインビトロでの血漿タンパク質結合親和性 (Schmid in "The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control" Ed. by F.W. Putnam, Academic Press, Inc. New York, pp184-228, 1975) を予想して使用することができないが、アルブミン又はAAGのような血漿又は血漿成分の生理学的に適切な濃度の存在する中で抗ウイルス能力を縮小することは、臨床学的に重大な意味を持たすことができる。

EC₅₀に作用しかつプロテアーゼインヒビターの抗ウイルス濃度の別のファクターは、プロテアーゼインヒビターに抵抗するウイルスの株の発展である。あらゆるプロテアーゼインヒビターと逆転写酵素インヒビターの安易な使用は、抵抗性ウイルス株を生じる可能性を持つ。これはHIV感染の治療に事例において特別なことであるが、その能力のためにHIVは直ちに変異し且つ抵抗性は発展する。メローら (Mellrsら, *International Antiviral News*, 3(1), pp 8-13, 1995) はRTインヒビターと抵抗性変異体に発展しているHIVに対するプロテアーゼインヒビターの多様性を最近報告している。(Condraら, *Nature* 374, pp. 569-571, 1995を参照)。

かくして、同一又は一様に高い抗ウイルス活性のレベルを保持する間に弱いプロテアーゼインヒビターを用いた治療が実行できるなら、感染薬はプロテアーゼインヒビターに対する抗体を減少すべき株の中の変異を処理する傾向となる。

結論において、AAGに対するプロテアーゼインヒビターの結合は、抗-HIV活性の変更という結果を生じる薬剤の細胞取り込みを主に減退させることになる。それ故、プロテアーゼインヒビターの細胞への取り込みを続行することが、それらのインビボでの抗-HIV活性のため、およびそのような細胞の合体のために危うければ、AAGの効果は封じねばならない。

発明の開示

従って本発明の目的の一つは、プロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みと細胞内濃度を増加させるための方法の提供である。

本発明の更なる目的は、プロテアーゼ逆転写酵素インヒビター、抗融合/結合性剤 (anti fusion/binding agents)、抗インテグラーゼ剤及び抗ウイルスオリゴヌクレオチドから選択された1種またはそれ以上の付加的な治療薬の存在中、1種またはそれ以上のプロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みと細胞内濃度を増加するための方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、病原性ウイルス及びウイルス性、カビ性、抗レニン、寄生プロトゾア、癌及び抗菌性疾患を含む感染性疾患のためのプロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みと細胞内濃度を増加するための方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、HIVプロテアーゼインヒビターの抗HIV活性の改善のための

10

20

30

40

50

方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、プロテアーゼインヒビターの存在中、AAGを競合的に結合させるための方法を提供することである。

本発明の更なる目的は、細胞への取り込みのためにプロテアーゼインヒビターの有効性を増加させることによって、プロテアーゼインヒビターを基礎とした治療において投与されるプロテアーゼインヒビターの量を減じる方法を提供することである。

本発明のこれら及び他の目的は、マクロライド (Macrolide) 及びリンコサミド (Lincosamide) ファミリーのような、AAGプロテアーゼインヒビター結合定数より優れた結合定数を持つAAG結合性の幾つかの、有効なAAGバインダーの発見によって満足されており、かくしてプロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みが増加され、且つプロテアーゼインヒビター、殊にプロテアーゼインヒビターの抗HIV活性のような治療薬の細胞の取り込みと抗ウイルス活性を改善するための方法においてこの発見を使用する。

好適な実施態様の詳細な説明

本発明は、プロテアーゼインヒビターの細胞への取り込みと細胞内濃度を改善するための方法に関し、その必要における主体として、プロテアーゼインヒビターに対するAAGの親和性よりも強力なAAGへの親和性を有するAAG-結合性化合物の有効量を、単独で或いは1種又はそれ以上の付加的な治療薬と組み合わせて投与することを備える。

この方法において、AAG結合性化合物が実験的に働く全てではない。事実、本発明のAAG-結合性化合物は、プロテアーゼインヒビターの存在中でAAGに競合的に結合するAAG結合性のために、十分に強い親和性を有する必要がある。

本発明において使用される好適なAAG-結合性化合物は、マクロライド系抗生物質およびリンコサミド系抗生物質を含む。より好ましいマクロライド系抗生物質は、エリスロマイシン (erythromycin)、トロレアンドマイシン (troleandomycin)、クラリスロマイシン (clarithromycin) 及びロキシスロマイシン (roxithromycin) を含む。最も好ましいマクロライド系抗生物質はクラリスロマイシンとロキシスロマイシンである。最も好適なリンコサミド抗生物質はリンコマイシン (lincomycin) である。

本発明の好適な方法において、AAG結合性化合物は、投薬組成物のための通常の方法の何れかにおいて投与することができる。そのような方法は、静脈内に腹腔内に、及び経口内への投与を含むが、それに限定されない。その組成物は、注射用溶液、経口摂取溶液、タブレット、カプセル、トローチ剤、粉末、などの形態において投与することができる。本発明の方法において、AAG結合性化合物は、単独で或いは2種またはそれ以上のAAG結合性化合物の混合物として投与することができる。加えて、AAG結合性化合物は、プロテアーゼインヒビターの投与の直前に、プロテアーゼインヒビターの投与と同時に、或いはプロテアーゼインヒビターの投与の後に、投与することができ、好ましくはプロテアーゼインヒビターの投与の直前又は同時である。

プロテアーゼインヒビター療法において使用される何れかのプロテアーゼインヒビターが本発明の方法において使用可能である。プロテアーゼインヒビターは、単独で或いは2種又はそれ以上の混合物として投与して良い。好適なプロテアーゼインヒビターは、前述の表中に記したものを含み、SC-52151が最も好ましい。

1種又はそれ以上のプロテアーゼインヒビターと1種又はそれ以上のAAG結合性化合物が同時に投与されるならば、それらは直接の投与に先立って混入して良く、或いはAAG結合性化合物の投与のための上述した形態の何れかで投与することができる。

本発明の更なる実施態様において、本発明による1種又はそれ以上のAAG結合性化合物は、プロテアーゼ逆転写酵素インヒビター、抗融合/結合性剤、抗インテグラーゼ剤及び抗ウイルス性オリゴヌクレオチドから選択される1種又はそれ以上の補足的な治療薬と併合した1種又はそれ以上のプロテアーゼインヒビターの投与と共に投与されて良い。

本発明によるAAG結合性化合物は、非-プロテアーゼインヒビターを基礎とした治療におけるその正常の投薬範囲の0.1倍から、その最大許容投薬量(その化合物の毒性に基づく)までの投薬範囲において使用される。好ましくは、本発明によるAAG結合性化合物は、非-プロテアーゼインヒビターを基礎とした治療におけるその正常の投薬範

10

20

30

40

50

図の1から10倍の投薬範囲において使用される。例えば、ロキシスロマイシンは、150 mgで一日2回の量において細菌感染の治療に通常使用される。しかしながら、本発明の方法において、ロキシスロマイシンは1日2回、15 mgから3000 mgの量で投与される。

プロテアーゼインヒビター治療の間にAAG結合性化合物を使用することによって、プロテアーゼインヒビターの細胞への取り込みを増加させる本発明が提供される。本発明は一方で、本発明のAAG結合性化合物の作用の形態に関する何らかの特別な理論によって結合されることを望むものではなく、それはAAGに非結合性であるが故に生じるよりフリーな(非結合性の)プロテアーゼインヒビターの存在においてAAG結合性化合物がAAGに競合的に結合することによるものと確信される。これは細胞の取り込みのためにより有効なプロテアーゼインヒビターを提供するものと確信される。

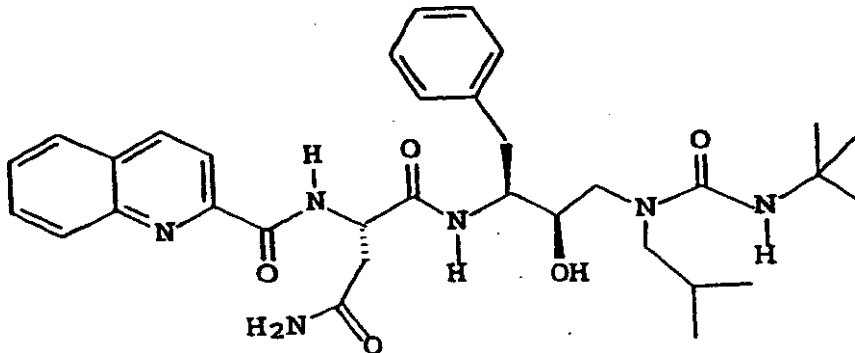
10

本方法は、レトロウイルス(例えばHIV)、ヘパドナウイルス(例えばC型肝炎ウイルス)、ヘルペスウイルス(例えば単純ヘルペスウイルスとサイトメガロウイルス)及びミクソウイルス(例えばインフルエンザウイルス)によってこれらに起因する各種のウイルス感染症、及び同様に寄生プロトゾア(クリプトスポリジウム及びマラリア)、プロテアーゼインヒビターを用いて治療される癌の化学療法及び病態疾患の治療、それに限定されない、を含むプロテアーゼインヒビターを用いた各種の治療に有益である。

実施例のために、HIVプロテアーゼインヒビターの細胞への取り込みについての本方法の効果を以下に記す。

SC-52151は、例えば(S)-ヒドロキシ配置が好ましいレニンインヒビターとは対照をなして、(R)-ヒドロキシ異性体において強い選択性が示される(ヒドロキシエチル)ウレアアイソスターを結合させるHIVプロテアーゼインヒビターの有効なクラスの一員である。そのSC-52151の構造を、式(I)として以下に示す。

20



(I)

30

SC-52151は他のHIVプロテアーゼインヒビターに比して、インビトロでの同様の抗ウイルス有効性と、選択性を有する(Chang, J. Physicians Assoc. Aids Res., July pp.8-18, 1994)。

HIVプロテアーゼインヒビターSC-52151は、ヒドロキシエチルウレアアイソスターを含む密着結合性の遷移状態類似物である。最近の臨床試行において、PCR, RNA, P24抗原又はCD4+を含むSC-52151は抗-HIV活性のマーカー上に測定されない効果を導き、経口吸収にもかかわらず、インビトロでのEC₅₀を上記の5から18倍より上の血漿レベルに導く。ヒト血清AAGはウイルス性プロテアーゼインヒビターのウイルス学的効果を妨害することが示されている。次の表は、HIVに感染したCEM細胞中のプロテアーゼインヒビターのインビトロでの抗ウイルス活性におけるAAGの有効性を示す。

40

HIVに感染したCEM細胞中のプロテアーゼインヒビターのインビトロにおける抗ウイルス活性についてのヒト血清アルファ-1酸糖タンパク質(AAG)の有効性。

化合物	EC ₉₀ ^a (ng/ml)		単独の化合物に 関係するEC ₉₀ の増加倍率
	AAG (0 mg/ml)	AAG (2 mg/ml)	
AZT	9	10	0
SC-52151	80	1970	24.6
VX-478	40	1200	30
Ro 31-8959	15	96	6.4
MK-639	20	100	5.0

10

^aEC₉₀値はHIV感染細胞の清澄な上澄みに合同した逆転写活性の阻害に関係する適応曲線から評価した。

生理学的濃度で、ヒト血清AAGは、Ro 31-8959とMK-639のEC₉₀値を5-6倍に増幅し且つSC-52151のEC₉₀値を25倍増加すると共に、プロテアーゼインヒビターのインビトロにおける抗-HIV活性を妨害するよう見える。VX-478とKNI-272の抗ウイルス活性もまたAAGの存在によって多くは影響される。SC-52151, VX-478及びKNI-272に関連するタンパク質結合性の研究では、これらは各々AAGとヒト血漿タンパク質に結合される。ヒトのHIVに感染しPHA活性化された抹消血液単核細胞(PCMC)に対する1μMのSC-52151の暴露は、30分以内に1.5から4.0pmole/10⁶細胞の細胞内定常状態レベルの結果を生じ、非感染細胞より2-3倍増加した。細胞が低い或いは高い感染多重度(MOI)で感染した時、SC-52151の細胞内含有量に違いのないことが検出された。アルブミンではないAAGの生理学的濃度はSC-52151の抗ウイルス能力に実質的に影響を及ぼす。

20

本発明によるAAG結合性化合物は、AAGが存在すると結合し、プロテアーゼインヒビターをフリーの状態とし、又はAAGに対するプロテアーゼインヒビターの結合を妨げることにより、SC-52151のようなプロテアーゼインヒビターの活性増加を提供する。

30

広く記載された本発明の有する、更なる理解は、単なる説明の目的のためにここに提供されかつ別の特定された場合を除き限定されることを企図しないある特定の実施例に鑑みて得ることができる。

実施例

SC-52151の調製

プロテアーゼインヒビターSC-52151はゲットマンら(Getmanら, J. Med. Chem., 36:288-291 (1993))の方法を用いて調製される。

SC-52151の細胞への取り込みにおけるAAG結合性化合物の有効性

フィトヘマグルタニン(phytohemagglutinin;PHA)-刺激したヒト抹消血液単核細胞(PBMC)中のHIVプロテアーゼインヒビターSC-52151の細胞の蓄積は、1mg/mlのAAGと本発明のAAG結合性化合物を各種の濃度で含む活性調節剤の存在中、1μMのSC-52151に曝露した後に測定される。活性調節剤の各々はAAGとSC-52151の添加より15分前に加えられ且つ実験は測定の2時間前に実行される。以下の全ての実験にヒトAAGが使用される。ウシAAGの使用は同様の結果を得ることができるが、しかしながら本発明のAAG結合性化合物の細胞の取り込みの活性と効果はウシAAGの使用で弱れられる。その結果を次の表において示す。

40

表 1

活性調節剤 (μM)	ヒト A A G (1mg/ml)	細胞の取り込み ($\text{pmole}/10^6\text{細胞}^*$)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.44	100
無し	+	0.12	8.3
エリスロマイシン(50)	+	0.55	38.2
エリスロマイシン(100)	+	0.85	59.0
エリスロマイシン(500)	+	1.50	104.2
トロレアンドマイシン(50)	+	0.42	29.2
トロレアンドマイシン(100)	+	0.64	44.4
トロレアンドマイシン(500)	+	1.29	89.6

10

20

* $1\text{ pmole}/10^6\text{細胞} = \text{概略 } 1\ \mu\text{M}$

表 1 は A A G が不在中での S C - 5 2 1 5 1 の投与及び A A G の 1mg/ml の存在中で H I V プロテアーゼインヒビター S C - 5 2 1 5 1 の投与とを比較して、A A G の存在中でプロテアーゼインヒビター S C - 5 2 1 5 1 の細胞の取り込みに関しての有効性を示す。表中に示す如く、プロテアーゼインヒビターの細胞濃度が $50\ \mu\text{M}$ から $500\ \mu\text{M}$ の範囲を通して、A A G の不在において得られるレベルの本質的に 100% に著しく増加する。細胞濃度 $50\ \mu\text{M}$ のエリスロマイシンとトロレアンドマイシンの一様な低レベルは、A A G の無いコントロールの $30 - 40\%$ であり、A A G の存在中で実行されたコントロール実験は、A A G の不在中で得られるものに比較して僅か 8.3% に細胞濃度が減じられた。かくして明確に示されたように、エリスロマイシンとトロレアンドマイシンのようなマクロ

30

ライド系抗生物質は、プロテアーゼインヒビターの細胞濃度をかなり増加することができる。クラリスロマイシンは、エリスロマイシン又はトロレアンドマイシンに比較して、クラリスロマイシンの低い投薬量でプロテアーゼインヒビターの細胞濃度を増化させることによって示される通り、エリスロマイシン又はトロレアンドマイシンで見られるよりも、プロテアーゼインヒビター細胞濃度に関する一様に強い有効性を提供する。この結果は表 2 中に示す。

表 2

活性調節剤 (μM)	ヒト A A G (mg/ml)	細胞の取り込み ($\text{pmole}/10^6$ 細胞*)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.02	100
無し	+	0.09	8.8
クラリスロマイシン(50)	+	0.54	52.9
無し	-	1.25	100
無し	+	0.13	10.4
クラリスロマイシン(100)	+	1.02	82.0

* $1 \text{ pmole}/10^6$ 細胞 = 概略 $1 \mu\text{M}$

全てとは限らないが A A G 結合性化合物は、低濃度で本発明において有望に使用される。更に、全てではないがマクロライド系抗生物質は、ミデカマイシン (midecamycin)、オレアンドマイシン (oleandomycin) 及びスピラマイシン (spiramycin) を用いて得られた結果を提供する以下の表 3 中に示す通り有用である。H I V プロテアーゼインヒビターの細胞濃度の幾らかの改善は、これらのマクロライド系抗生物質を用いて得られるが、その効果は A A G に強力な結合親和性を有するマクロライド系抗生物質に対して明らかに劣る。

表 3

活性調節剤 (μM)	ヒト A A G (mg/ml)	細胞の取り込み ($\text{pmole}/10^6$ 細胞*)	コントロールに対する パーセント (%)
ミデカマイシン(100)	+	0.24	19.3
オレアンドマイシン(100)	+	0.29	23.3
スピラマイシン(100)	+	0.23	18.5
アシスロマイシン(100)	+	0.18	17.7
シヨサマイシン(100)	+	0.37	26.4
ロキタマイシン(100)	+	0.34	24.3

* $1 \text{ pmole}/10^6$ 細胞 = 概略 $1 \mu\text{M}$

本発明において使用する最強のマクロライド系抗生物質の一つはロキシスロマイシンである。表 4 と 5 にロキシスロマイシンを用いた二つの従属実験から得られた結果を示す。H I V プロテアーゼインヒビター S C - 5 2 1 5 1 の細胞濃度は、A A G が存在し且つロキシスロマイシンの不在において実行された実験に比較して改善されるだけでなく、S C - 5 2 1 5 1 の細胞濃度は A A G の不在中で実行したコントロールに比べても増加しており、細胞濃度が該コントロールを 72.4% 超えるほど高く増加した。従って、ロキシスロマイシンは、A A G が不在の時、予め到達する程度より以上及び超えて、プロテアーゼ

ンヒビターの細胞濃度を増大する。これらの結果から明らかなように、マクロライド系抗生物質のAAG結合能力は、ミデカマイシンのような有能なAAG結合能力を有することが知られた化合物からプロテアーゼインヒビターの細胞濃度に影響するファクターだけではなく、100 μ Mで一様なプロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みに著しい影響を及ぼすことはない。

表 4

活性調節剤 (μ M)	ヒトAAG (1mg/ml)	細胞の取り込み (pmole/ 10^6 細胞*)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.27	100
無し	+	0.11	8.7
ロキシスロマイシン(10)	+	0.27	21.6
ロキシスロマイシン(50)	+	2.08	163.8
ロキシスロマイシン(100)	+	2.19	172.4

* 1 pmole/ 10^6 細胞 = 概略 1 μ M

表 5

活性調節剤 (μ M)	ヒトAAG (1mg/ml)	細胞の取り込み (pmole/ 10^6 細胞*)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.47	100
無し	+	0.10	6.8
ロキシスロマイシン(10)	+	0.30	20.4
ロキシスロマイシン(20)	+	0.97	66.0
ロキシスロマイシン(30)	+	1.33	90.5
ロキシスロマイシン(40)	+	1.96	133.3
ロキシスロマイシン(50)	+	2.16	147.0

* 1 pmole/ 10^6 細胞 = 概略 1 μ M

表6は、AAGに結合することが知られたリンコサミド系抗生物質、クリンダマイシン (clindamycin) に比較して、リンコサミド系抗生物質であるリンコマイシンを用いて得られた細胞濃度における改善を示す。その結果、クリンダマイシンがプロテアーゼインヒビター細胞取り込みを無視できる程度に増加させることが示されたことからして、AAG結合性がプロテアーゼインヒビターの細胞取り込みの増加を演じる上での単なるファクターでないことを再び示す。

表 6

活性調節剤 (μM)	ヒト A A G (1mg/ml)	細胞の取り込み ($\text{pmole}/10^6\text{細胞}^*$)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.44	100
無し	+	0.12	8.3
リンゴマイシン(50)	+	0.43	29.9
リンゴマイシン(100)	+	0.55	38.2
リンゴマイシン(500)	+	1.28	88.8
クリンタマイシン(100)	+	0.15	10.4

* $1\text{ pmole}/10^6\text{細胞} = \text{概略 } 1\ \mu\text{M}$

本発明は、A A G-プロテアーゼインヒビター結合性を分裂させ或いは妨害する A A G に対して十分な結合親和性を有し、且つプロテアーゼインヒビターの細胞の取り込みを増加する A A G 結合性化合物の使用を請求する。表 7 の化合物は A A G に結合することが知られている (Kremerら, Pharm. Rev. 40 (1), 1-47, 1988 とそこに引用された参考文献)。しかしながら、例えそれらの化合物が A A G に結合することが知られていたとしても、S C - 5 2 1 5 1 中で細胞の取り込みに適度な改善が示されたベラパミールを除いて、それらは臨床的な相対濃度でのプロテアーゼインヒビター濃度について有意な有効性を有することは現われなかった。

10

20

表 7

活性調節剤 (μM)	ヒト A A G (1mg/ml)	細胞の取り込み ($\text{pmole}/10^6\text{細胞}^*$)	コントロールに対する パーセント (%)
無し	-	1.44	100
無し	+	0.12	8.3
チオリダジソン(5)	+	0.17	11.8
無し	-	0.65	100
無し	+	0.06	9.2
ヘラハミール(10)	+	0.23	35.4
無し	-	0.58	100
無し	+	0.074	12.6
アラゾシオン(5)	+	0.089	15.2
ジソピラミド(5)	+	0.11	19.3
ジヒドリタモール(1)	+	0.084	14.3
イントメタシオン(5)	+	0.083	14.2
オキシプロロール(5)	+	0.10	17.7

* $1\text{ pmole}/10^6\text{細胞} = \text{概略 } 1\text{ }\mu\text{M}$

上述した研究において示されたプロテアーゼインヒビターの細胞取り込みの増加は、抗ウイルス化合物の細胞取り込みの増加が示されるマクロライド系抗生物質の存在中で回復されるであろうプロテアーゼインヒビターの抗ウイルス活性かどうか更なる研究をした。

抗ウイルスの研究

細胞. 健全な HIV-1 血清反応陰性、且つ B 型肝炎ウイルス血清反応陰性の供与者からのヒト P B M C は、 $1,000 \times g$ で 30 分間、フィコール-ハイパック不連続密度勾配遠心分離によって分離し、そしてリン酸塩緩衝液 (pH7.2, PBS) にて 2 度洗浄し、さらに $300 \times g$ で 10 分間ペレット化した。感染の前に、その細胞は、15%の加熱不活性化したウシ胎児血清、1.5 mM の L-グルタミン、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 U/ml)、及び 4 mM の重炭酸ナトリウム緩衝液を補充した R P M I 1640 培地中で三日間、 $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でフィトヘマグルチニン (P H A) によって刺激した。

ウイルス. HIV-1 (L A V - 1 株) は C D C , アトランタ、G A から入手した。そのウイルスは、P H A 又はフンギゾンを除き、且つ 100 U/ml の組替え体インターロイキン-2 (Cetus) 及び $7\text{ }\mu\text{g/ml}$ の D E A E - デキストラン (ファーマシア, Uppsala, スウェーデン) を補充した以外は先の記述 (McDougal ら, J. Immun. Meth. 76:171-183, 1985) の通りの R P M I 1640 培地を用いてヒト P B M C 中で増殖させた。無細胞培養の上清から得られたウイルスは滴定し且つ等分して使用するまで -70°C で保管した。

ヒト P B M C 中のウイルス複製の禁止

非感染化した P H A - 刺激ヒト P B M C は、約 2×10^6 細胞 / ml を含む 5 ml の懸濁液が付与されるように 25 cm^2 フラスコ中に均一に分配した。ウイルスの適当な希薄物は

10

20

30

40

50

培養液中に感染するために加えられる。接種物の逆転写酵素 (RT) の活性の測定値は、 $60,000 \text{ dpm RT 活性} / 10^6 \text{ 細胞 (MOI} = 0.01)$ であった。RPMI 1640 培地 5 ml の 2 度の遠心分離後に補充されるべき薬剤が上述した通り添加される。平衡細胞密度で非感染化した及び未処理の PBMC は、コントロールとして平行して培養した。その培養物は湿った 5% CO_2 - 95% 空気中のインキュベーター中に、全ての培養物が上清の RT 活性のためのサンプルとされる時点で感染した後、6 日間保管した。研究の前に、最大 RT レベルはその時点で得られたことが示されている。処理しないコントロールと比較した細胞の上清を結合した RT 活性の 90% の減少が提供された濃度が、 EC_{90} 値として以下に報告される。

RT 活性アッセイ. 各培養物からの上清 6 ml は、 $300 \times g$ で 10 分間の遠心分離によって清浄化した。ウイルス粒子は、ベックマン 70.1 Ti ローターを用いて $40,000 \text{ rpm}$ で 30 分間遠心分離し、5 ml のサンプルからペレット化し、更にウイルス分散緩衝液 (50 mM トリス塩酸、 $\text{pH} 7.8$ 、800 mM の NaCl 、20% のグリセロール、0.5 mM のフェニルメチルスルホニルフルオリド、及び 0.5% のトリトン X-100) 200 μl 中に懸濁させた。

その RT アッセイは、スピラら (Spiral, J. Clin. Microbiol. 25:97-99, 1987) によって記述された通り、96 穴マイクロタイタープレート中で実行した。その反応混合物、50 mM のトリリス塩酸 $\text{pH} 7.8$ 、9 の MgCl_2 、5 mM のジチオトレイトール、 $4.7 \mu\text{g/ml}$ ($\text{rA})_n \cdot (\text{dT})_{12-18}$ 、 $140 \mu\text{M}$ の dATP 、及び $0.22 \mu\text{M}$ [^3H] TTP (比活性 78.0 Ci/mmol , $17,300 \text{ cpm/pmol}$ に等しい; NEN リサーチプロダクツ、ボストン、MA.) は、それぞれの穴に加えられる。そのサンプル (20 μl) は 37 で 2 時間インキュベートしてから反応混合物に加える。その反応は、0.45 mM のピロリン酸を含む 10% トリクロロ酢酸 100 μl の添加によって停止される。沈澱した酸不溶性の核酸は、スカトロンセミオートマチックハーベスター (Skatron semi-automatic harvester) (セッティング 9) を用いるガラスフィルター上に捕集される。そのフィルターは 5% TCA と 70% エタノールで洗浄し、乾燥し、そしてシンチレーション管 (scintillation vials) に移した。シンチレーション液 (エコライト、ICN M, Irvine, CA) 4 ml を加え、そしてそれぞれのサンプル中の放射能活性の量は、パッカード トリ-カーブ リキッド シンチレーション アナライザー (Packard Tri-Carb liquid scintillation analyzer (model 2,000CA)) を用いて測定される。その結果は、

最初の清浄化した上清の dpm/ml に明示される。上記 PBMC 中の抗 HIV-1 アッセイのための手続は、公開されている (Schinazi ら, in Antimicrob. Agents Chemother. 32:1784-1789, 1988 及び Schinazi ら, in Antimicrob. Agents Chemother. 34:1061-1067 1990)。CEM 研究は、スキナジら (Schinazi ら, in Antimicrob. Agents Chemother. 36:2423-2431, 1992) によって開示された通り実行される。

次の表 8 に、急性感染した PBMC と CEM 細胞におけるマクロライド系抗生物質による SC-52151 の抗 HIV 活性の復活に関する抗ウイルス研究の結果を提示する。

10

20

30

表 8 : 急性感染細胞におけるマクロライド系抗生物質によるSC-52151の抗HIV活性の復活

処 理	急性感染ヒトPBMでの実験			感染CEM細胞での実験		
	組成物中薬剤 単剤又は SC-52151 でのEC ₅₀	組成物中薬剤 単剤又は SC-52151 での単位	SC-52151と AAGの相対的 なEC ₅₀ の 減少倍率	組成物中薬剤 単剤又は SC-52151での EC ₅₀ , μM	SC-52151と AAGの相対的 なEC ₅₀ の 減少倍率	感染CEM細胞での実験
SC-52151	0.14	μM		0.14		
AAG	> 5	mg/ml				
クワリタロニン	> 600	μM				
エリスロマイシン	> 1000	μg/ml		107.0		
ロキシスロマイシン	> 1000	μM				
SC-52151 + AAG (1 mg/ml)	1.22	μM		1.18		
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + クワリタロニン (0.5 μM)	0.63	μM	1.9			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + クワリタロニン (5 μM)	0.26	μM	4.7			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + クワリタロニン (30 μM)	0.062	μM	19.7			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + クワリタロニン (50 μM)	< 0.01	μM	> 122			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + エリスロマイシン (10 μg/ml)	0.58	μM	2.1	0.59	2.0	
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + エリスロマイシン (50 μg/ml)	0.14	μM	8.7			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + エリスロマイシン (100 μg/ml)	0.033	μM	37.0	< 0.01	> 118	
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + ロキシスロマイシン (1 μM)	0.97	μM	1.3			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + ロキシスロマイシン (10 μM)	0.53	μM	2.3			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + ロキシスロマイシン (30 μM)	0.059	μM	20.7			
SC-52151 + AAG (1 mg/ml) + ロキシスロマイシン (50 μM)	0.05	μM	24.4			

上述のデータより、クラリスロマイシン、エリスロマイシン及びロキシスロマイシンは、

10

20

30

40

50

600 μM までのHIV-1に対する抗ウイルス活性は全てが本質的に不活性である。PBM又はCEM細胞中にSC-52151が単独で存在する時、SC-52151のEC₉₀は0.14 μM である。AAGが添加された時、PBM中のSC-52151のEC₉₀は1.22 μM の大きなレベルに増加する(CEM細胞中1.18 μM)。しかしながら、本発明のAAG結合性化合物、すなわちクラリスロマイシン、エリスロマイシン及びロキシスロマイシンが添加された時、EC₉₀が投薬量に比例して減少され、優れた抗ウイルス能力を示す。特に、本発明のAAG結合性化合物の添加は、抗ウイルス活性を増加させるものと解釈されるSC-52151の細胞取り込みの増加を提供する。事実、上記表中のAAG結合性化合物は、SC-52151単独で達せられたものを超えた抗ウイルス活性の増加を提供する。この増幅された活性は、PBM細胞とCEM細胞の両方の上記結果によって確認される通り、細胞系に従うのではない。

明らかに、本発明の付加的な修正や変化は、上記の教示に照して可能である。それ故に添付のクレームの範囲内にあると理解されるべき発明は、特徴的なこの記載以外のことを実行することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00 1 2 1

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(72)発明者 シナズィ, レイモンド エフ

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 0 3 3 ディケイター リージェンシー ウォーク ドライヴ
1 5 2 4

(72)発明者 ソーマドゥスィ, ジャン - ピエール

アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 4 2 パーミンハム グレイストーン ウェイ 5 0 7 5

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表平 1 1 - 5 0 8 8 8 4 (J P , A)

KAGEYAMA,S. et al, Protein binding of human immunodeficiency virus protease inhibitor KNI-272 and alteration of its in vitro antiretroviral activity in the presence of high concentrations of proteins, Antimicrob Agents Chemother, 1 9 9 4年, Vol.38, No.5, p. 1107-11

BILELLO,J.A. et al, Reduction of the in vitro activity of A77003, an inhibitor of human immunodeficiency virus protease, by human serum alpha 1 acid glycoprotein, J Infect Dis, 1 9 9 5年 5月, Vol.171, No.3, p.546-51

DETTE,G.A. et al, The binding protein of erythromycin in human serum, Biochem Pharmacol, 1 9 8 6年, Vol.35, No.6, p.959-66

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 45/00

A61K 31/7048

A61K 31/7056

A61K 38/55

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)