

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4121151号
(P4121151)

(45) 発行日 平成20年7月23日(2008.7.23)

(24) 登録日 平成20年5月9日(2008.5.9)

(51) Int. Cl.		F I
C07D 219/08	(2006.01)	C07D 219/08
A61K 31/473	(2006.01)	A61K 31/473
A61K 31/4745	(2006.01)	A61K 31/4745
A61P 31/12	(2006.01)	A61P 31/12
A61P 31/18	(2006.01)	A61P 31/18

請求項の数 9 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-537456
 (86) (22) 出願日 平成9年4月9日(1997.4.9)
 (65) 公表番号 特表2000-508662(P2000-508662A)
 (43) 公表日 平成12年7月11日(2000.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/007070
 (87) 国際公開番号 W01997/038999
 (87) 国際公開日 平成9年10月23日(1997.10.23)
 審査請求日 平成15年11月21日(2003.11.21)
 (31) 優先権主張番号 60/015,326
 (32) 優先日 平成8年4月12日(1996.4.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/035,050
 (32) 優先日 平成9年1月22日(1997.1.22)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国メリーランド州20852
 , ロックヴィル, エグゼクティブ・プール
 バード 6011, スウィート 325,
 ナショナル・インスティテューツ・オブ・
 ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジー・
 トランスファー
 (74) 代理人
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人
 弁理士 今井 庄亮
 (74) 代理人
 弁理士 増井 忠武

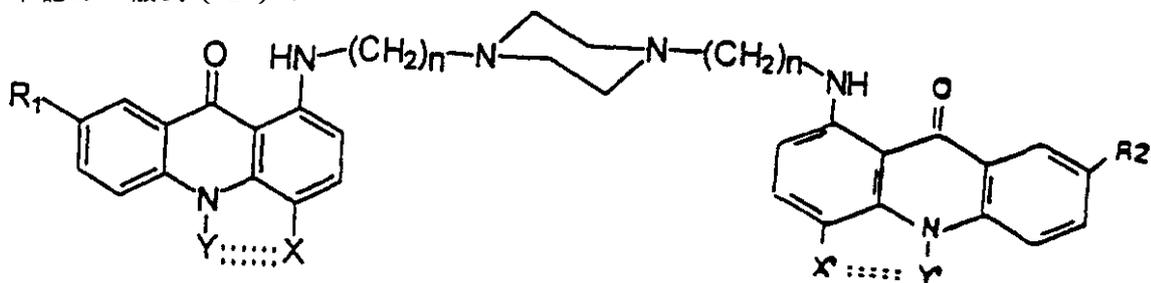
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗新生物薬および抗レトロウイルス薬として有用なアクリドンから誘導された化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記的一般式(I)：



(I)

(式中、

R₁およびR₂は独立して - H、- OH、アミノ、C₁-C₈アルキルアミノ、C₁-C₈ジアルキルアミノ、C₁-C₈アルコキシ、C₁-C₈アルキル、C₁-C₈ハロアルキルまたはハロゲンであり；

nは2~6であり；

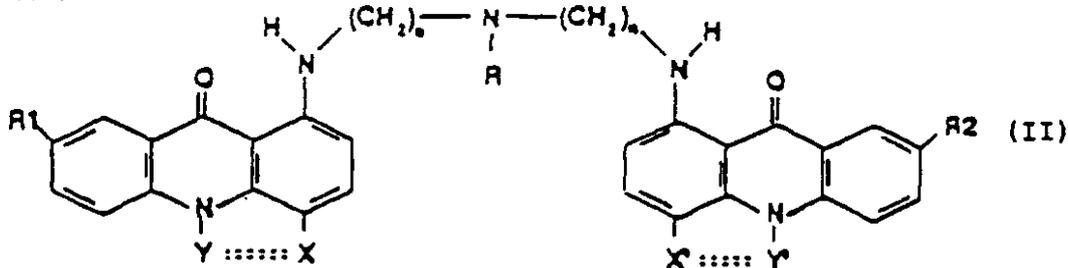
XおよびX'は独立して - Nまたは - NO₂であり；

YおよびY'は独立して - Nまたは - CHまたは - Hであり；

二重破線は二重結合または結合なしを表し；したがって、XまたはX が - Nであり、YまたはY が - CHまたは - Nである場合、二重破線は二重結合であり、XまたはX が - NO₂であり、YまたはY が - Hである場合、二重破線は結合なしである) で示される化合物又はその薬剤学的に許容しうる酸付加塩。

【請求項 2】

次式：



10

(式中、

RはH、C₁ - C₈アルキルであり；

R₁およびR₂は独立して - H、- OH、アミノ、C₁ - C₈アルキルアミノ、C₁ - C₈ジアルキルアミノ、C₁ - C₈アルコキシ、C₁ - C₈アルキル、C₁ - C₈ハロアルキルまたはハロゲンであり；

nは2 - 6であり；

XおよびX'は独立して - Nまたは - NO₂であり；

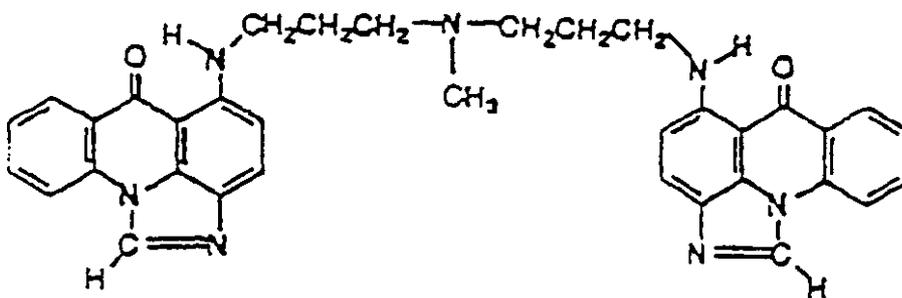
YおよびY'は独立して - Nまたは - CHまたは - Hであり；

二重破線は二重結合または結合なしを表し；したがって、XまたはX' が - Nであり、YまたはY' が - CHまたは - Nである場合、二重破線は二重結合であり、XまたはX' が - NO₂であり、YまたはY' が - Hである場合、二重破線は結合なしである) の化合物および薬剤学的に許容しうるキャリアーを含む、ウイルス複製を阻害するための薬剤組成物。

20

【請求項 3】

化合物が次式：

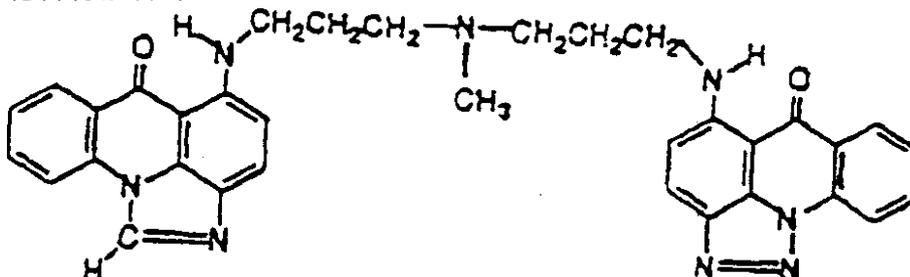


30

を含む、ウイルス複製を阻害するための請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 4】

化合物が次式：



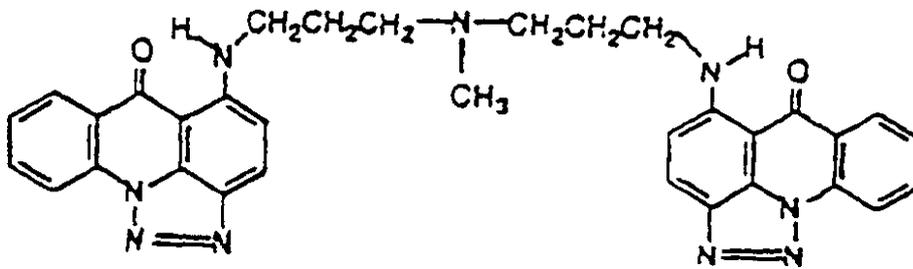
40

を含む、ウイルス複製を阻害するための請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 5】

化合物が次式：

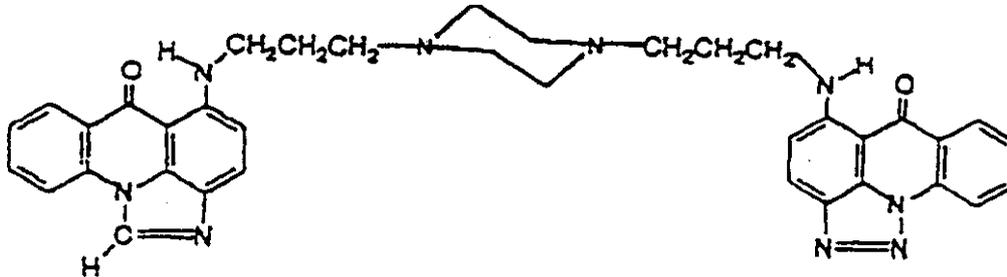
50



を含む、ウイルス複製を阻害するための請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 6】

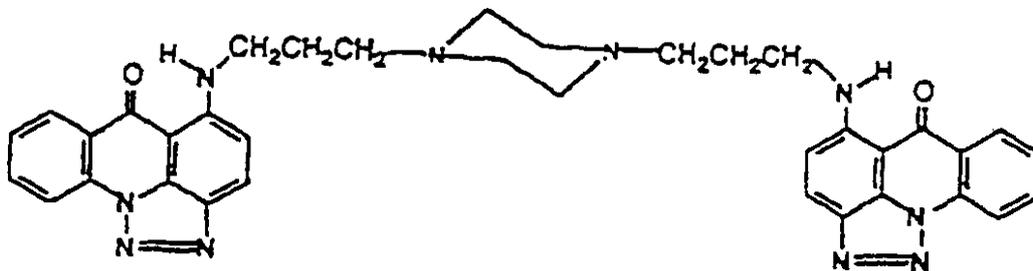
化合物が次式：



を含む、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 7】

化合物が次式：



を含む、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 8】

請求項 1 記載の化合物および薬剤学的に許容しうるキャリアーを含む、ウイルスの複製を阻害するための薬剤組成物。

【請求項 9】

請求項 1 記載の化合物および薬剤学的に許容しうるキャリアーを含む、新生物細胞増殖を阻害するための薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、アクリドンから誘導された化合物であるビスイミダゾアクリドン類、ピストリアゾロアクリドン類、ならびにイミダゾアクリドン部分およびトリアゾロアクリドン部分の両方を含むハイブリッド分子に関する。これらの化合物は抗新生物薬および抗レトロウイルス薬として有用である。

発明の背景

高い抗腫瘍活性を示す多数のアクリジン系化合物が最近報告された。Cholody W.M.ら (1990) は、5 - [(アミノアルキル)アミノ]イミダゾ[4,5,1-de]アクリジン - 6 - オンを新規な一群の抗新生物薬として記載している (J. Med. Chem. 33:49-52 (1990))。8 - 置換された 5 - [(アミノアルキル)アミノ] - 6 H - v - トリアゾロ[4,5,1-de]アクリジン - 6 - オンも有効な抗新生物薬として記載されている (J. Med. Chem. 33:2852-2856 (1990))。発色団修飾された抗新生物薬イミダゾアクリドンの合成、およびそれらがネズミ白血病に有効であることが記載されている (J. Med. Chem. 35:378-382 (1992))。Capps, D.B.らは、2 - (アミノアルキル) - 5 - ニトロピラゾロ[3,4

10

20

30

40

50

, 5 - k 1] アクリドン を新規な一群の抗腫瘍薬として記載している (J . Med . Chem . 35 : 4770 - 4778 (1992)) 。

上記の化合物は、共通の構造特色として (アミノアルキル) アミノ残基を含む側鎖 1 個を保有する四環式平面発色団をもつ。これらの化合物の主な標的は DNA であり、それらはインターカレーションにより DNA に結合すると考えられている。

アクリドンその他の平面状芳香族化合物がインターカレーションにより DNA と相互作用しうることに基づいて、二官能性化合物も有効な抗腫瘍薬として研究されている。Chen, T . K . ら (1978) は、二官能性インターカレーターとしてジアクリジン類を研究した (J . Med . Chem . 21 : 868 - 874 (1978)) 。 Gaugain, B . ら (1978) は、エチジウムホモ二量体およびアクリジンエチジウムヘテロ二量体の合成および立体配座特性につき記載している (Biochemistry 17 : 5071 - 5078 (1978)) 。 Sinha, B . K . ら (Biochemistry 17 : 5071 - 5078 (1977)) は、ビス (キナルジン) 誘導体の合成および抗腫瘍性につき記載している (J . Med . Chem . 20 : 1528 - 1531 (1977)) 。 Roques, B . P . ら (1979) は、ピリドカルバゾール二量体の抗白血病活性につき記載している (Biochem . Pharmacol 28 : 1811 - 1815 (1979)) 。 Pelaprat, D . ら (1980) は、7 H - ピリドカルバゾール二量体を有効な抗腫瘍薬として記載している (J . Med . Chem . 23 : 1336 - 1343 (1980)) 。 Brana, M . F . ら (1993) は、一群の抗腫瘍薬としてのビス - ナフトアルイミドを記載している (Anti - Cancer Drug Design 8 : 257 - 268 (1993)) 。

適切なリンカーにより連結した 2 つの芳香環系を含む二官能性インターカレーターが核酸に強く結合することに関して、論理的根拠が提唱された (Canellakis, E . S . , et al . , Biochem . Biophys . Acta 418 : 277 - 283 (1976)) 。このような化合物は DNA に高い親和性を示すが、このインターカレーションによる DNA との強い結合は一般に抗腫瘍活性とは無関係であることが見出された。

平面状発色団の物理化学的特性、連結鎖の性質 (その長さ、堅固さ、およびイオン化状態) 、結合位置、その他の要因を含めた多数の要因が、これらの化合物と DNA の結合および生物学的作用に強く影響を与える。さらに、DNA 結合親和性と細胞毒性の間に直接的関係はないことが見出された。

二官能性インターカレーター群のインビボ抗腫瘍作用に関するそれらの構造 - 活性関係は依然として分からないので、そのような活性を示す構造を推定することができない。わずかな構造修飾がその薬剤の生物学的特性を著しく変化させる可能性がある。したがって、高い抗新生物活性、特に特定の腫瘍に選択的に向けられた活性をもつ他の化合物を見出すという目標がある。

特定のビスイミダゾアクリドン類、近縁のピストリアゾロアクリドン類、ならびにイミダゾアクリドン部分およびトリアゾロアクリドン部分の両方を含むハイブリッド分子が有効かつ選択的な抗腫瘍薬であることは、先に開示されている (米国特許第 5,508,289 号) 。本発明は、新規な一群のアクリジン系化合物、ならびに抗新生物薬および抗レトロウイルス薬としてのそれらの使用に関する。米国特許第 5,508,289 号に開示されるビスイミダゾアクリドン類、ピストリアゾロアクリドン類およびハイブリッド分子が抗レトロウイルス薬として有用であることがさらに見出された。

発明の概要

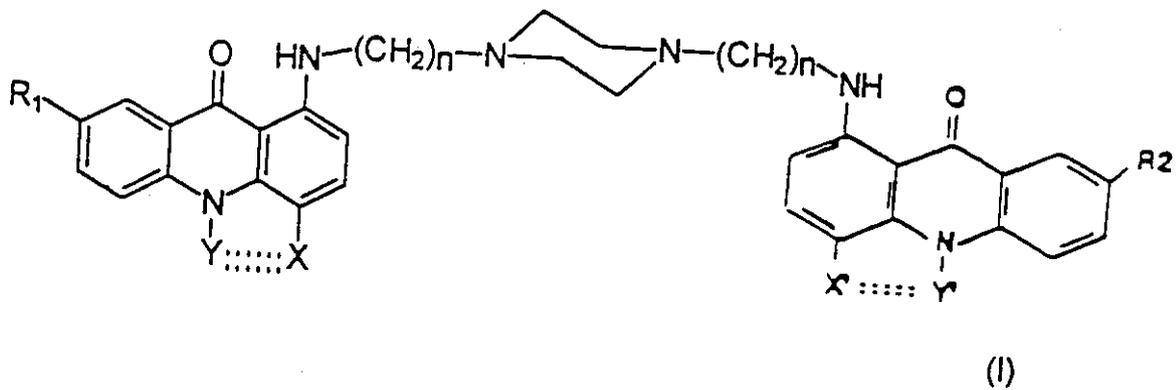
本発明は、下記一般式 (I) の化合物 :

10

20

30

40



10

(式中、 R_1 および R_2 は独立して - H、- OH、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、アルキル、ハロアルキルまたはハロゲンであり； n は2～6であり； X および X' は独立して - Nまたは - NO₂であり； Y および Y' は独立して - Nまたは - CHまたは - Hであり；二重破線は二重結合または結合なしを表し；したがって、 X または X' が - Nであり、 Y または Y' が - CHまたは - Nである場合、二重破線は二重結合であり、 X または X' が - NO₂であり、 Y または Y' が - Hである場合、二重破線は結合なしである)に関する。

本発明は、少なくとも1種類の上記化合物、および薬剤学的に許容しうるキャリアーを含む、薬剤組成物をも提供する。

本発明はさらに、新生物細胞増殖の処置を必要とする対象においてそれを処置する方法であって、対象に新生物細胞増殖の処置に有効な量の前記薬剤組成物を投与することを含む方法を提供する。

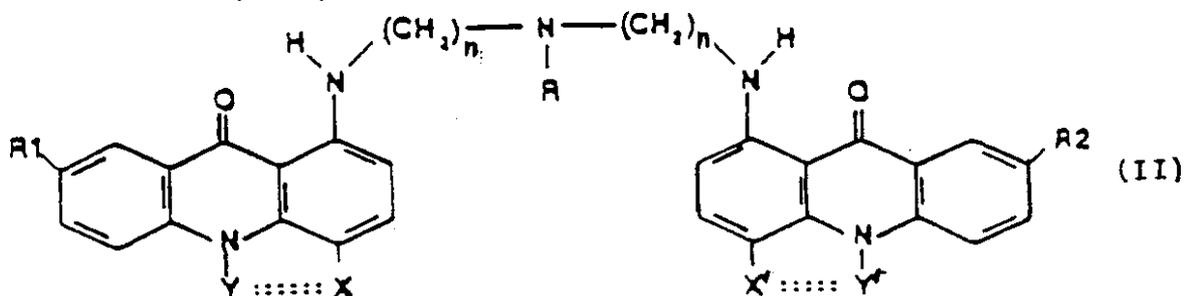
20

本発明はさらに、ヒト細胞を含めた細胞の集団においてレトロウイルス感染を処置する方法であって、有効量の少なくとも1種類の式(I)の化合物を該細胞集団と接触させるか、またはレトロウイルス感染細胞を有する対象に投与することを含む方法を提供する。

本発明の範囲には、ヒト細胞を含めた細胞の集団をレトロウイルスによる発病に対し保護する方法であって、細胞を抗レトロウイルスに有効な量の少なくとも1種類の式(I)の化合物と接触させるか、またはそれで処置することを含む方法も含まれる。

本発明のさらに他の態様は、ヒト細胞を含めた細胞の集団においてレトロウイルス感染を処置する方法であって、レトロウイルス感染細胞を有する対象の細胞に、有効量の少なくとも1種類の式(II)の化合物：

30



(式中、 R はH、アルキル、または化合物をプロドラッグとして機能させる基であり； n は2～6であり； R_1 、 R_2 、 X 、 Y 、 X' または Y' および二重破線は式(I)につき前記に定義したとおりである)を投与し、および/または接触させることを含む方法を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

図1．対称的化合物の製造を示す模式図。

図2．ピストリアゾロアクリドン化合物の製造を示す模式図。

図3．インビトロでのヒト異種移植片に対する抗腫瘍活性。

図4．WMC-26の細胞保護活性。

図5．WMC-42の細胞保護活性。

図6．非感染細胞との平行実験(WMC-26)。

50

図7．非感染細胞との平行実験（WMC - 42）。

図8．HIV複製の阻害（NSC - 682404）。

図9．HIV複製の阻害（NSC - 682405）。

図10．NSC - 682405（“テマクラジン（temacrazine）”）は逆転写によるプロウイルスDNA形成を阻止する効力をもたない。

図11．U1アッセイにおけるテマクラジンの作用。

図12．テマクラジンがウイルスタンパク質の産生およびプロセッシングに与える影響。

図13．テマクラジンによる、感染力価をもつ無傷HIV - 1ビリオンの不活性化。

図14．テマクラジンはHIV - 1 LTR指向性転写を非特異的に阻害しない。

図15．テマクラジンがHIV - 1感染細胞におけるmRNA発現およびスプライシングに与える影響。

図16．テマクラジンはHIV - 1特異性mRNAを阻害して、“rev非依存性に類似する”表現型を形成する。

10

発明の詳細な記述

本明細書中で用いる単独または組み合わせた“アルキル”という用語は、1～約8個、好ましくは1～約6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖アルキル基を意味する。そのような基の例には、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、sec - ブチル、t - ブチル、アミル、イソアミル、ヘキシル、オクチルなどが含まれる。アルキル基は、所望により後記に述べる置換基で置換されていてもよい。単独または組み合わせた“アルコキシ”という用語はアルキルエーテル基を意味し、ここでアルキルという用語は前記に定義したとおりである。適したアルキルエーテル基の例には、メトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、イソプロポキシ、n - ブトキシ、イソブトキシ、sec - ブトキシ、t - ブトキシなどが含まれる。

20

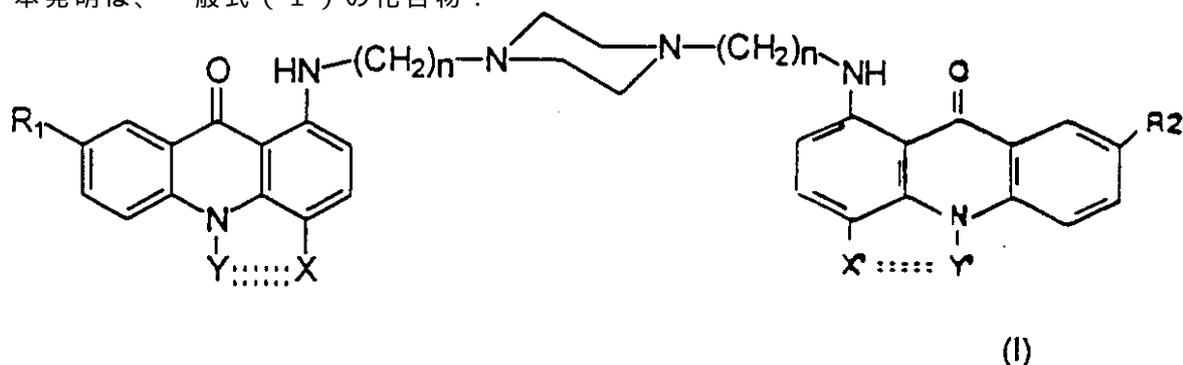
“ハロゲン”または“ハロ”という用語は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味する。

“ハロアルキル”という用語は、前記に定義した意味をもつアルキル基において1個またはそれ以上の水素がハロゲンで置換されたものを意味する。そのようなハロアルキル基の例には、クロロメチル、1 - プロモエチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、1, 1, 1 - トリフルオロエチルなどが含まれる。

上記の全般的記載において述べた、所望により存在しうる置換基には、少なくとも1個のアルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、アルカリール、ヘテロアリール、アルコキシ、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、ハロアルキルが含まれ、これらの任意置換基も所望により置換されていてもよく、所望により置換された基は同一または異なる任意置換基1個または複数個で置換されていてもよい。

30

本発明は、一般式(I)の化合物：



40

（式中、 R_1 および R_2 はそれぞれ独立して - H、- OH、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルコキシ、アルキル、ハロアルキルまたはハロゲン原子であり； n は2～6であり； X および X' および X'' は独立して - Nまたは - NO_2 であり； Y および Y' は独立して - Nまたは - CHまたは - Hであり；二重破線は二重結合または結合なしを表し；したがって、 X または X' が - Nであり、 Y または Y' が - CHまたは - Nである場

50

合、二重破線は二重結合であり、XまたはX が -NO₂であり、YまたはY が -Hである場合、二重破線は結合なしである)に関する。

好ましい態様において、R₁およびR₂はそれぞれ独立して -H、-OH、-NH₂、C₁~C₆アルキルアミノ、C₁~C₆ジアルキルアミノ、C₁~C₆アルキル、フッ素、塩素または臭素である。より好ましい態様には、n = 3であり、YおよびY が -Nであり、XおよびX が -CHであり、R₁およびR₂がHであり、かつ二重破線が二重結合である化合物が含まれる。

本発明化合物は、遊離塩基またはその薬剤学的に許容しうる酸付加塩の形で使用できる。塩形成に適した酸の例は、メタンスルホン酸、硫酸、塩酸、リン酸、酢酸、クエン酸、乳酸、アスコルビン酸、マレイン酸などである。好ましい態様において、本発明化合物はメ
10
タンスルホン酸塩、たとえばジメタンスルホン酸塩、または他の塩類、たとえばジ塩酸塩の形で存在し、これらは変動可能な程度に水和されていてもよい。さらに、式IおよびIIの化合物をプロドラッグ形態でも使用できる。プロドラッグ形態は当業者に知られており、そのような最も有効な形態は当業者が判定できる。

本発明はまた、式(I)および/または(II)のうち少なくとも1種類、ならびに薬剤学的に許容しうるキャリアーを含む、薬剤組成物に関する。キャリアーは、配合物の他の成分と相溶性であり、かつそのレシピエントにとって有害でないという意味で、“許容しうる”ものでなければならない。上記化合物を薬剤学的に許容しうる1種類またはそれ以上の希釈剤またはキャリアー、および所望により、それ自体が療法薬(本発明化合物と相乗性である)であってもよい他のいずれかの成分と配合することができる。配合物中に存在する本発明化合物の濃度は、選択したキャリアーおよび目的とする結果に依存するであ
20
らう。

適した薬剤用キャリアーの例には、特にラクトース、スクロース、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶質セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、粉末(powders)、食塩液、水が含まれる。キャリアーの選択は投与経路に依存するであろう。配合物を単位剤形で提供するのが好都合であり、これらは製剤技術分野で周知の方法で、有効化合物をキャリアーまたは希釈剤(懸濁液または溶液として)、および所望により1種類またはそれ以上の補助成分、たとえば緩衝剤、着香剤、界面活性剤などと混和することにより製造できる
30
。

静脈内、筋肉内、皮下または腹腔内投与のためには、本発明化合物を、好ましくはレシピエントの血液と等張である無菌水溶液と混和する。このような配合物は、塩化ナトリウム、グリシンなどの生理学的に適合性の物質を含有しかつ生理学的条件に適合する緩衝化されたpHをもつ水に、固体有効成分を溶解して水溶液を調製し、この溶液を無菌にすることにより調製できる。これらの配合物は1回量または多数回量で密封したアンプルまたはバイアルなどの容器内にあってもよい。

経口投与のためには、慣用される添加物、たとえばラクトース、マンニトール、コーンスターチまたはバレイショデンプン; 結合剤、たとえば結晶質セルロース、セルロース誘導体、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチン; 崩壊剤、たとえばコーンスターチ、バレイショデンプンまたはカルボキシメチルセルロースナトリウム; ならびに滑沢剤、た
40
とえばタルクまたはステアリン酸マグネシウムを含むカプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤または懸濁液剤として、配合物を提供できる。

非経口投与に適した配合物は、好ましくは等張にした、有効化合物の無菌水性調製物を含むことが好都合である。注射用製剤は、非水性溶剤、たとえば植物油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸のエステルまたはプロピレングリコールに本発明化合物を懸濁または乳化することによっても配合できる。

本発明はさらに、新生物細胞増殖の処置を必要とする対象においてそれを処置する方法であって、対象に新生物細胞増殖の処置に有効な量の前記薬剤組成物を投与することを含む方法を提供する。

“処置”という用語には、新生物細胞増殖あるいはレトロウイルスの生育、増殖および/
50

または拡散の部分的または完全な阻害、ならびに新生物細胞またはレトロウイルス、および/またはレトロウイルス感染細胞の部分的または完全な破壊が含まれる。“対象”という用語には、癌またはレトロウイルス感染を伴うと診断されたヒトまたは動物の対象が含まれる。

投与は、当業者に知られている手段、たとえば経口、直腸、局所、静脈内、皮下、筋肉内または腹腔内投与経路で行うことができる。

投与の形態および量は、既知の抗新生物治療または予防方式を参照して容易に確立できる。しかし一般に本発明化合物の投与量は、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲内であろう。実際の用量は、投与経路、個々の化合物の薬物動態および毒物学的特性、ならびに目的とする結果に依存するであろう。

式 I および II の本発明化合物は、ヒトおよび動物の細胞を含めた細胞の集団においてレトロウイルス感染を処置するのに有用であり、その際、有効量の少なくとも 1 種類の式 I および/または II の化合物を、レトロウイルス感染細胞を有する対象の細胞集団に接触、またはその対象に投与することを含む。

式 I および II の化合物を含む本発明化合物は、多くのレトロウイルス系において感染性ウイルスの拡散を阻止する機能をもちうる。本発明化合物により抑制しうる他のレトロウイルスには HTLV - I、HTLV - II、BLV、EIAV、FIV、SIV、STLV および ビスナウイルスが含まれるが、これらに限定されない。

式 I および II の化合物に関連する初期の実験で、精製した全長 HIV - 1 インテグラーゼを用いたインビトロ実験においてこれらの物質が組み込み (integration) および崩壊 (disintegration) の両段階を阻害することが明らかになった。これらの化合物および他の数種類を、HIV - 1 に感染した末梢血リンパ球に関連する抗ウイルスアッセイにおいて試験した。

前記に開示した配合物は HIV 感染症の処置のための有効かつ比較的安全な薬剤であるが、有益な結果を得るためにこれらの配合物と他の抗ウイルス医薬または薬剤を同時投与する可能性を排除しない。このような他の抗ウイルス医薬または薬剤には、可溶性 CD 4、サリドマイド、ジデオキシイノシン、ジデオキシチミン、ジドブジン (zidovudine)、ジデオキシシチジン、ガンシクロビル (gancyclovir)、アシクロビル (acyclovir)、ホスホノホルメート、アマトラジン (amatradine)、リババリン (ribavarin)、抗ウイルス性インターフェロン (たとえば α -インターフェロン、 β -インターフェロン、またはインターロイキン - 2)、またはエーロゾルペンタミジン、そのほか、抗 HIV - 1 療法に用いられる物質が含まれる。

感染細胞をウイルス活性阻害のために処置するのは、一定期間であってもよく、連続的であってもよい。ウイルス活性は、p 24 などのウイルスタンパク質の量を監視するか、または逆転写酵素量を測定するか、または ^{35}S -met パルスチェイス標識および免疫沈降実験によりウイルスタンパク質の活性を監視するか、または当業者に周知の他の方法により測定できる (Kayeyama, S., et al., (1994), AIDS Res. and Human Retroviruses, 10:735-745)。

本発明を以下の実験の詳細の部に記載する。これは本発明の理解を補助するために具体例を述べたものであり、後記の請求の範囲に定めた本発明をいかなる点でも限定するものとは解すべきではない。

実験の詳細の部

材料および方法 . 用いた溶剤はすべて試薬用である。試薬はすべてアルドリッチ・ケミカルズまたはフルカ (Fluka) から入手され、受け取ったままの状態で行われた。融点はエレクトロサーマル毛管融点測定装置で測定され、未補正である。

化学合成 . 両方の発色団が等しい本発明化合物は、図 1 に示した経路で製造された。中間体クロロニトロアクリドン 1 は従来の記載に従って (Capps, D.B., et al., J. Med. Chem. 35:4770-4778 (1992); Lehmstedt, K., et al., Chem. Berichte 70:1526-1538 (1937))、またはそれに類する方法で製造された。このアクリドンを当量の適切なピペリジン誘導体 2 と反応させて、ビスニトロアクリドン 3 を得た。これをギ酸および塩化スズ (II) と反

10

20

30

40

50

応させて、最終ビスイミダゾアクリドン 4 を得た。

トリアゾロ系列の対称的薬物は図 2 に従って製造された。アクリドンを過剰のピペラジン誘導体と、生成物 7 が形成されるように反応させる。

本発明化合物の合成に関する詳細な記述は以下のとおりである。

実施例 1

1, 4 - ビス [3 - [(4 - ニトロ (10 H) - 9 - オキソ - アクリジン - 1 - イル) アミノ] プロピル] ピペラジン (3)

1 - クロロ - 4 - ニトロ - 9 (10 H) - アクリジノン (1) (2 . 7 5 g , 0 . 0 1 m o l)、5 0 m L の D M S O、1, 4 - ビス (3 - アミノプロピル) ピペラジン (2) (1 . 0 0 2 g , 0 . 0 0 5 m o l)、およびジイソプロピルエチルアミン (1 . 9 5 g , 0 . 0 1 5 m o l) の混合物を 8 0 で 8 時間攪拌した。この反応混合物に 1 0 0 m L の 1 % 水酸化ナトリウム水溶液を添加し、1 0 分間攪拌し、冷蔵庫内に一夜放置した。沈殿をろ過により採集し、水で洗浄し、DMA から結晶化して、2 . 7 4 g (8 1 %) の黄色の (3) を得た。融点 2 7 4 ~ 2 7 9 (分解)。分析 (C₃₆H₃₆N₈O₆ · H₂O) C , H , N。

1, 4 - ビス [3 - [(6 - オキソ - 6 H - イミダゾ [4 , 5 , 1 - d e] - アクリジン - 5 - イル) アミノ] プロピル] ピペラジン (4)

2 . 0 3 g (0 . 0 0 3 m o l) の (3) を 5 0 m L の 8 5 % ギ酸に溶解した。この溶液に、濃塩酸 6 m L 中における SnCl₂ 5 . 7 g (0 . 0 3 m o l) の溶液を添加し、混合物を還流下に 3 6 時間攪拌した。冷却後、沈殿をろ過し、5 0 m L のメタノールで洗浄し、3 0 0 m L の水に移し、1 0 % 水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ性にした。3 0 m L のクロロホルム - メタノール (1 0 : 1) 混合物を添加し、2 時間激しく攪拌した。溶解しない物質をろ過により除去し、クロロホルム層を分離した。この抽出液に 2 g のシリカゲルを添加し、溶剤を真空下で蒸発させた。次いでこのゲルをシリカゲルカラムに乗せ、クロロホルム - メタノール (1 0 : 1) で溶離した。主画分を採集し、溶剤を蒸発させた後、1 . 0 5 g (5 5 %) の黄色の (4) を得た。融点 2 8 9 ~ 2 9 3 (分解)。分析 (C₃₈H₃₆N₈O₂ · H₂O) C , H , N。

1, 4 - ビス [3 - [(6 - オキソ - 6 H - v - トリアゾロ [4 , 5 , 1 - d e] - アクリジン - 5 - イル) アミノ] プロピル] ピペラジン (6)

5 - クロロ - 6 H - v - トリアゾロ [4 , 5 , 1 - d e] - アクリジン - 6 - オン (5) (5 . 1 2 g , 0 . 0 2 m o l)、6 0 m L の D M S O、1, 4 - ビス (3 - アミノプロピル) ピペラジン (2) (2 . 0 0 3 g , 0 . 0 1 m o l)、およびジイソプロピルエチルアミン (2 . 6 g , 0 . 0 2 m o l) の混合物を 1 0 0 で 2 0 時間攪拌した。この反応混合物に 1 5 0 m L の 2 % 水酸化ナトリウム水溶液を添加し、1 0 分間十分に攪拌し、冷蔵庫内に一夜放置した。沈殿をろ過により分離し、水で洗浄し、2 0 0 m L の 1 % メタンスルホン酸水溶液に移し、室温で 1 時間攪拌した。溶解しない物質をろ過により除去した。ろ液を水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ性にした。遊離塩基の沈殿をろ過により分離し、水で洗浄し、次いで沸騰 DMA から 2 回結晶化して、3 . 8 4 g (6 0 %) の黄色の (6) を得た。融点 2 4 2 ~ 2 4 5 。分析 (C₃₆H₃₄N₁₀O₂ · H₂O) C , H , N。
(6) の構造を単結晶 X 線構造解析により確認した。生物学的試験のために、(4) および (6) の遊離塩基をメタンスルホン酸塩または塩酸塩などの水溶性塩に変換した。

実施例 2

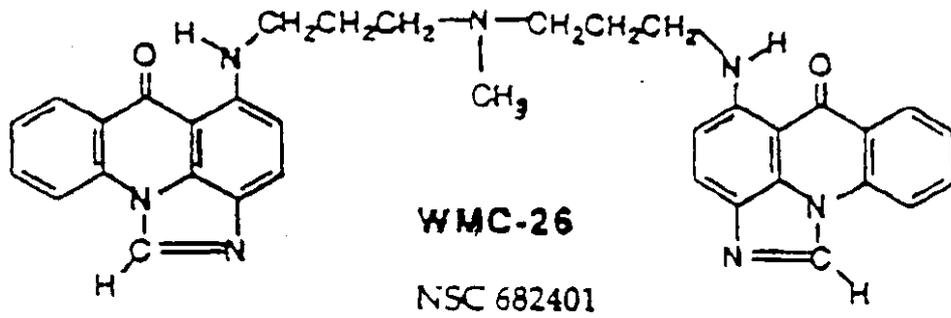
6 のジ塩酸塩

6 (1 . 2 g , 0 . 0 0 2 m o l) をクロロホルム中の 1 0 % メタノールの沸騰混合物 (4 0 0 m L) に溶解した。この高温溶液に、メタノール中の 0 . 4 M 塩酸 1 0 m L (塩化アセチルをメタノールに溶解することにより調製) を添加し、数分間攪拌した。溶剤を蒸発させることにより約 1 0 0 m L に濃縮した。エーテル 1 0 0 m L を添加し、塩の黄色沈殿をろ過により分離し、エーテルで洗浄し、乾燥させた。収率 - 1 0 0 %、融点 > 3 0 0 (分解)。分析 (C₃₆H₃₄N₁₀O₂ · 2 H C l · H₂O) C , H , N。

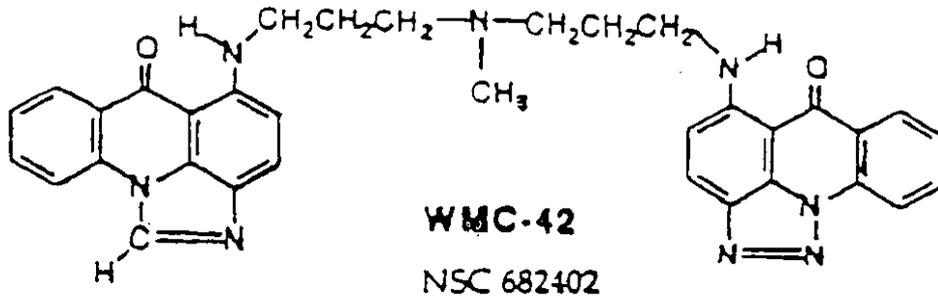
インビトロで数種類の腫瘍異種移植片に対する化合物 (4) の活性を試験した。これらの

腫瘍に由来する細胞系につき、標準クローン原性アッセイ (clonogenic assay) プロトコールを用いて実験を行った。試験したすべての細胞系につき、平均 IC_{70} (すなわち腫瘍細胞を 70% 死滅させた化学物質の濃度) は $2.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。胃癌 GF X (251/14) はこの平均用量 (median dose) で感受性であったが、乳腫瘍 MAC L (MCF7 X / 13) には平均用量の 2 倍以上が必要であった。黒色腫 MEX F (514/12) はこの薬物に対し完全に非感受性であり、腎癌 RX F (1220/5) も同様であった。前立腺癌細胞系 PR X F (PX2M/27 および DU145 X / 2) はこの薬物にきわめて感受性であり、特に PC3 M が IC_{70} を達成するのに要したのは 1 ナノグラム / mL 未満であった。結果を図 3 に示す。

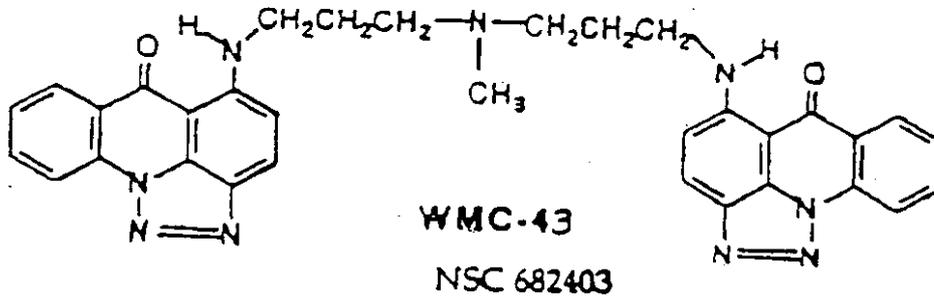
種々の化合物に関連する実験を行った。これらの化合物は下記の構造式をもつ (それらの別表示を含む) :



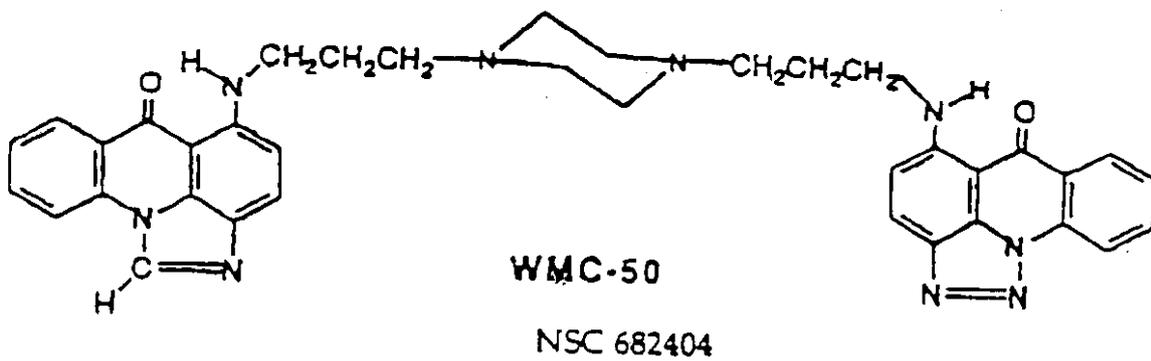
10



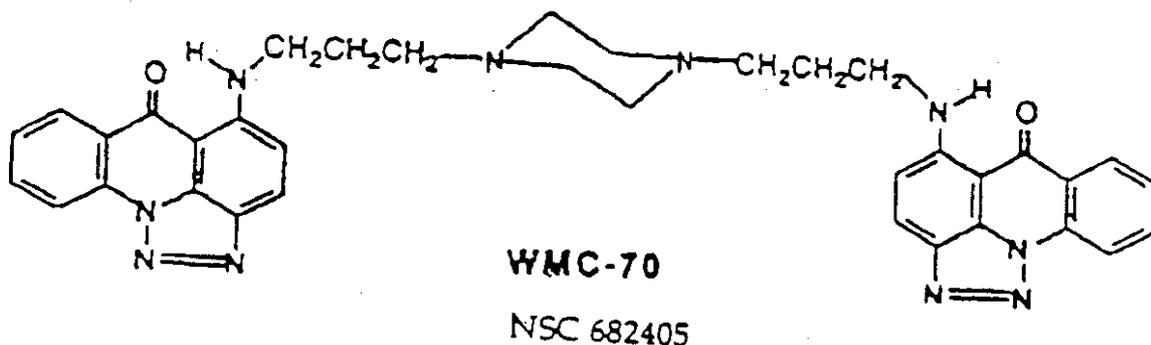
20



30



40



WMC 26 および WMC 42 に関連する実験で、精製した全長 HIV - 1 インテグラーゼを用いたインビトロ実験においてこれらの化合物が組み込みおよび崩壊の両段階を阻害する

50

ことが明らかになった。次いでこれらの化合物および他の数種類を、H I V - 1 に感染した末梢血リンパ球に関連する細胞保護アッセイにおいて試験した。

要約すると、感染した培養細胞をウイルスにより死滅させ、死滅しつつある細胞が放出する酵素によるホルマザン色素 (X T T) の酸化による発色により、細胞毒性を検出する (Weislow et al., J.Natl.Cancer Inst.81:577-586,1989)。有効な抗ウイルス薬は、ウイルスのある致死機能を阻害することにより、感染細胞を細胞毒性から保護することができる。したがって、抗ウイルス活性のインビトロの証明は、推定薬物によるウイルスの細胞変性作用に対する用量依存性保護に依存する。図 4 および 5 は、W M C 2 6 および W M C 4 2 の細胞保護活性を示す。多くの薬物が本来細胞に対し毒性でもあるので、非感染細胞をこれらの細胞が薬物の作用により死滅する濃度に達するまで薬物で処理する平行実験を行う。これらのデータを図 6 および 7 に示す。明らかにこれらの薬物は両方とも、薬物誘導による死滅を生じた濃度よりはるかに低い濃度で感染リンパ球を保護することができた。これは、これらの化合物がこのアッセイ法できわめて良好な療法指数をもつことを意味する。

これらの予備データの結果、他の細胞系における抗ウイルス活性を確認するために、多様なプロトコルを用いてさらに実験を行った。リンパ球での予備実験が感染マクロファージを用いて確認された。H I V - 1 感染 C E M S S 白血病細胞で、さらにいっそう広範な実験を行った。残念ながら、W M C 2 6 などの化合物は白血病に対しては細胞毒性がきわめて高く (ナノモル量) (Cholody et al., J.Med.Chem.55:2338-2245,1995)、したがってこのアッセイ法では細胞保護性であることを示せなかった。しかし 2 種類の誘導体は、高い抗ウイルス活性を維持しながら低い抗白血病活性をもつことが認められた。図 8 および 9 は、それぞれこの細胞系における W M C - 5 0 および W H C - 7 0 の細胞保護活性を示す。両化合物ともきわめて低い濃度で明らかに細胞保護性であるが、明らかに W M C - 7 0 はその療法指数が卓越しているのにより良い薬物であると思われる。たとえば W M C - 7 0 がウイルスの細胞毒性を 5 0 % にまで阻害する濃度 (E C ₅₀ 値) は 1 ナノモル未満であるが、この薬物が 5 0 % の細胞を死滅させるのはマイクロモルより高い濃度である。これは、3 桁以上の療法指数を与える。対応する W M C - 5 0 の療法指数は約 1 0 0 ~ 2 0 0 であり、これはかなり許容できる。W M C - 7 0 につき他の実験を行った。この薬物は、ウイルス複製に伴う他の 2 つの重要な酵素である H I V プロテアーゼまたは逆転写酵素をいずれも阻害しないことが示された。W M C - 7 0 は、ウイルス複製にきわめて重要であると考えられるウイルスの構造上の他の特徴である g a g タンパク質ジンクフィンガーにも損傷を与えなかった。興味深いことに、H I V - 1 ウイルス自体をこの薬物で処理すると、ウイルスが C E M 細胞に感染する能力を阻害するように思われた。さらに W M C - 7 0 は、ウイルスの転写後事象に影響を与えるように思われる。すべてのウイルスが組み込まれた細胞を薬物で処理すると、見かけ上は正常なウイルス g a g p 5 5 ポリタンパク質が形成されるが、これはそれ以上はプロセッシングされない。すなわち p 2 4 は検出できないことが明らかになる。この化合物がその抗ウイルス活性を及ぼす主な機構は組み込みの阻害であると思われるが、この薬物および拡大するとこの群の他の抗ウイルス薬の療法作用に関係する他の機構もあると思われる。

化合物 W C - 2 6、W M C - 4 2、W M C - 5 0 および W M C - 7 0 は、H I V 感染症およびエイズに対し有効な活性をもつ有効な抗ウイルス薬である。(“ W M C - 7 0 ” を本明細書では “ N S C 6 8 2 4 0 5 ” または “ テマクラジン ” と呼ぶ。)

実施例 3

被験化合物の抗ウイルス性

W M C 系列の化合物の抗ウイルス性を評価した。まずすべての化合物を、X T T 細胞保護アッセイ法により、それらが細胞培養物における H I V - 1 複製を阻害する効力につき試験した。このアッセイ法では、化合物が C E M - S S 細胞を H I V - 1_{RF} の細胞変性作用から保護する濃度依存性効力を測定する。5 0 % の保護を与える化合物濃度が E C ₅₀ 抗ウイルス値であり、一方、細胞を 5 0 % 死滅させる化合物濃度は I C ₅₀ 毒性値である。表 1 に示すように化合物 N S C 6 8 2 4 0 1 ~ N S C 6 8 2 4 0 3 は不活性であり、毒性

10

20

30

40

50

のない場合は抗ウイルス作用がないことを示す。NSC 682404は $EC_{50} = 0.41 \text{ nM}$ および $IC_{50} = 158 \text{ nM}$ を示し、一方テマクラジンは $EC_{50} = 1.1 \text{ nM}$ および $IC_{50} = 2.77 \mu\text{M}$ を示した(図8および9も参照)。したがってテマクラジンはX T T細胞保護アッセイにおいて最も有効な化合物であった。これらの化合物をヒト単球/マクロファージ培養物においてH I V - 1_{ADA}に対する抗H I V - 1活性を試験した場合も、この結論に達した(表1)。

実施例4

被験化合物の機械的特性

H I V - 1の既知の抗ウイルス標的に対する機械的試験で得たデータも表1に示す。これらの化合物は宿主細胞へのH I V - 1の付着、H I V - 1逆転写酵素もしくはプロテアーゼの酵素活性、またはp7ヌクレオキャプシドタンパク質ジンクフィンガーを阻害しなかった。これまでの所見にもとづいて、本発明者はテマクラジン同族体の生物学的アッセイ法に努力を向けた。時間経過アッセイでテマクラジンは、プロウイルスDNAのLTR/gag領域が増幅されたことが示すように、逆転写中に起きるプロウイルスDNAの形成を阻害しなかった(図10)。テマクラジンは、精製オリゴマーおよび組換えH I V - 1インテグラーゼを用いたインビトロアッセイにおいて、濃度依存性様式で $EC_{50} = 10 \sim 100 \text{ nM}$ で3側プロセッシングおよび鎖移動活性を阻害した(表1A)。

これらの所見は、テマクラジンがH I V - 1インテグラーゼ阻害薬として作用することと一致する。H I V - 1複製サイクル中で、プロウイルスDNA形成は組込み事象の前に完了するからである。ウイルスの付着および融合を阻害する実験化合物(たとえば硫酸デキストラン)、および逆転写を阻害する化合物(DDC、AZT、ネビラピン(Nevirapine)など)は、時間経過アッセイでプロウイルスDNAの形成を阻害する。

10

20

表 1

化合物	*XTT アッセイ (mM)		Mo/Mφ (nM)		^b 付着	RT	^c p7NC ジンク フィンガー
	EC ₅₀	IC ₅₀	EC ₅₀	IC ₅₀	ID ₅₀ (μM)	ID ₅₀ (μM)	ID ₅₀ (μM)
682401	不活性		50	1000	NI _{100μM}	NI _{100μM}	NI
682402	不活性		160	10000	NI _{100μM}	NI _{100μM}	NI
682403	不活性		ND		NI _{μM}	NI _{100μM}	NI
682404	0.41	158	100	10000	NI _{100μM}	35	NI
682405	1.1	2767	10	10000	NI _{100μM}	NI _{100μM}	NI

- ^a X T T細胞保護はスクリーニングアッセイで得たデータを表す。
- ^b ビリオン付着、R Tおよびプロテアーゼに関する機械的試験は前記に従って行われた。これらの数値はI D₅₀であり、指示した活性を50%阻害した濃度を表す。
- ^c p 7 N C ジンクフィンガーアッセイでは、p 7 N Cタンパク質を25 μ Mの各化合物で10分間処理した後のジンクフィンガーの低下率を、相対蛍光単位(R F U)で測定した。
- ^d “不活性”は、その化合物がスクリーニングに際し効果を示さなかったことを表す。
- ^e “N I”は指示した高い試験濃度で活性の阻害がないことを表す。

10

20

30

表1A テマクラジンに関する作用機構試験

分子標的 付着	$I_{50}(\mu M)^1$	
	テマクラジン	対照化合物
gp 120-CD4	NI ⁴	1.1 μM (ファルマタリア)
RT酵素活性 rAdT鋳型/プライマー	NI	27 nM (AZTTP)
rCdG鋳型/プライマー	NI	6 nM (UC38)
プロテアーゼ活性 HPLCによるアッセイ	NI	3 nM (KNI-272)
Pr55 ^{gag} プロセッシング	NI	1-10 nM (KNI-272)
インテグラーゼ	0.01~0.1	0.5 μM (ISIS 5320)
NCp7 ⁵ TSQ(RFU増加/90分)	NI	17 (NSC-624151)
Trp ³⁷ (RFU減少/10分)	NI	145 (NSC-624151)

¹ I_{50} は指示した活性を50%阻害する薬物濃度である。

² 各アッセイにつき陽性対照は以下のものであった；付着：ファルマタリア

(Farmatalia) IC_{50} 1.1 μM (D. J. Clanton et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 5:771(1992))、逆転写酵素阻害：rAdT鋳型/プライマー-AZTTP 27 nM、rCdG鋳型/プライマー-UC38 6 nM (J.P. Bader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:6740(1991))、プロテアーゼ阻害 (Ala-Ser-Glu-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Glu-アミド基質開裂のHPLC検出)：KNI-272 3 nM (S. Kageyama et al., Antimicrob. Agents Chemother., 37:810(1993))、インテグラーゼ阻害薬、ISIS 5320 (R. W. Buckheit Jr., et al., AIDS Res. Hum. Retrovir., 10:1497(1994))、およびNCp7 Zn²⁺駆出、NSC-625151 (ジチアン (Dithiane)) (W.G. Rice et al., Antimicrob. Agents and Chemother., 41 印刷中(1997))。

³ CEM-SS細胞へのHIV-1_{RF}の付着；付着は、細胞溶解物のp24

ELISAアッセイにより細胞結合p24量を測定することにより判定。

⁴ NIは高い試験濃度で阻害がないことを示す。

⁵ 変化を単位時間当たりの相対蛍光単位として表す。

実施例5

テマクラジンがHIV-1複製サイクルの後期に与える影響

HIV-1複製サイクルの後期事象のモデルとして、2コピーのHIV-1プロウイルスDNAを潜在感染させたU1細胞を用いた。TNF- α など特定の因子により、これらのU1細胞におけるウイルス産生の高水準発現を刺激することができる。U1細胞をTNF

10

20

30

40

50

- で24時間刺激した後、種々の濃度のテマクラジンを添加し、培養物をさらに48時間インキュベートした。この時点で、細胞を生存性、ならびにウイルスタンパク質の合成およびプロセシングの含量につき評価し、一方、無細胞上清をウイルスp24含量および放出ビリオンの感染力価につき評価した。図11は、ウイルス産生(p24)が4nM未満で阻害されたこと、および放出ウイルス粒子が非感染性であること(1ml当たりの感染単位“IU/ml”として表す)を示す。これらのU1細胞につき30nMを越えると、細胞生存性が低下した。興味深いことに、p7およびp24抗血清を用いたウェスタンブロット法によるウイルスタンパク質の検査(図12)で、gag前駆物質ポリタンパク質(Pr55^{gag})は合成されたが、これがHIV-1プロテアーゼによりプロセシングされて成熟ウイルスタンパク質(p24およびp7NC)になることはないのが明らかになった。

10

同様な試験で、細胞をTNFで24時間処理した後にテマクラジンを添加するか、またはテマクラジンとTNFを同時に添加するか、またはテマクラジンをTNF添加の24時間後に添加した。TNF誘導およびテマクラジン処理の後、培養を72時間続け、その後ビリオン関連p24および細胞生存性(XTT色素還元)を測定した。テマクラジンは両方のU1において(および潜在感染細胞系ACH-2においても)HIV-1ウイルス複製の有効な阻害薬であり、EC₅₀は10~100nMであった。さらに、テマクラジン仲介によるウイルス阻害は、テマクラジンとTNFの添加順序により有意には影響されなかった。

培養物をテマクラジンで30分間パルスすると、TNF刺激後に感染性ウイルスの産生を示すことも認められた。

20

実施例6

テマクラジンによるHIV-1の直接不活性化

表1の機械的試験は、本発明化合物がHIV-1プロテアーゼ活性を阻害しないことを示した。しかしHPLCによるアッセイ(表1で採用)が正確な所見を与えることを確認するために、Gagプロセシングアッセイでのテマクラジンの作用を評価した。このアッセイでは、精製した組換えHIV-1プロテアーゼ酵素を被験物質により37で1時間予備処理し、次いで組換えPr55^{gag}前駆物質ポリタンパク質をこの処理酵素に暴露した。図13に示すように、プロテアーゼ単独では前駆物質を効果的にプロセシングすることができた。さらに、この酵素を本発明化合物で予備処理しても阻害作用がなかった。これらの所見を合わせて、テマクラジンはHIV-1プロテアーゼ酵素を阻害しないことが証明された。

30

所見の意義

テマクラジンは、急性感染症モデルにおいて、増殖している細胞におけるリンパ球指向性(Lymphocytotropic)HIV-1株、および増殖していない正常細胞における単球指向性HIV-1株に対し、有効な抗HIV-1活性を示した。さらに、本発明化合物は先に感染した細胞に対し抗ウイルス作用を及ぼした。後期作用の厳密な性質については調査中であるが、テマクラジンは先に感染した細胞から新たな感染性ウイルスが産生されるのを有効に阻害した。HIV-1感染者においてウイルス負荷を低下させるいかなる手段もインピボで後続の感染周期を低下させる結果になるとすれば、これは本発明化合物のきわめて重要な作用である。さらに、本発明化合物がビリオンを直接に不活性化しうることは、著しく重要である。これにより血漿の感染力価が効果的に低下し、後続周期のウイルス複製および接種が阻止されるからである。

40

実施例7

HIV-1転写の開始および調節には、細胞性転写因子、たとえばNF- κ B、SP-1およびAP-1との複雑な一連の相互作用、ならびに転写複合体への細胞性因子の関与が要求される。さらに、本明細書中で用いた組込み後モデルはTNF刺激したU1およびACH-2細胞を必要とし、このモデルはNF- κ B転写複合体の関与だけでなく、TNFシグナル伝達経路の成分をも必要とする。テマクラジンが非特異的に転写に影響を与えたか、またはTNFシグナル伝達経路の妨害により複製をダウンレギュレーションしてい

50

たということを除くために、BF-24細胞においてLTR指向性クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)活性を測定した。BF-24細胞はTHP-1単球系に由来し、HIV-1 LTRの転写制御下で安定に組み込まれたCAT遺伝子を保有する(Schwartz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7200 (1989); B.K. Felber et al., Science 239:184 (1988))。LTRはこの細胞系においてIL-6、PMAおよびTNFにより誘導することができ、酵素活性をもつクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ("CAT")を産生する。TNFによるCAT酵素活性の誘導はウイルス成分が存在しなくても起き、したがってウイルス性調節タンパク質に依存しない作用機構が確認されるであろう。BF-24細胞をTNFで刺激し、テマクラジンで24時間処理し、次いでCAT酵素活性測定のために細胞タンパク質を採集した(図14)。

蛍光性ボディピー(Bodipy)結合クロラムフェニコールを用い、アセチルCoAを含有するタンパク質抽出液50μgと18時間反応させた後、CAT活性を測定した。図14は、BF-24細胞単独では固有CAT活性が低く、これをTNFで少なくとも10倍誘導できることを示す。BF-24細胞を最高5μMのテマクラジンで処理しても、CAT誘導は有意には変化しなかった。CAT発現には逆転写は必要ないのでテマクラジンの活性に影響を与えないAZTも、不活性であった。これらのデータは非特異的転写/翻訳作用に反論するものであるが、この仮説を証明するために特異的実験を行った。CEM-SS細胞における³Hロイシン(タンパク質の代謝を測定するため)、³Hチミジン(DNAの複製を測定するため)、³Hウリジン(RNAの産生を測定するため)の取込みを測定し、テマクラジンがこれらの細胞性パラメーターに影響を与えないことが認められた。これらのデータは、テマクラジンの抗ウイルス活性が転写の非特異的ダウンレギュレーションによるものではなく、ウイルス因子(1またはそれ以上)の関与を必要とすることを強く示唆する。

実施例 8

テマクラジンはTNF誘導の24時間前または後に投与すると、500または50nMで、非スプライスマRNAまたはシングルスプライスマRNAの発現を完全に阻害した。テマクラジンとTNFを同時に添加した場合も同様な結果がみられた。これに対し、すべてのマルチスプライスrev非依存性mRNAを検出するために設計されたRT-PCRプライマーを用いた場合、テマクラジンはHIV-1マルチスプライス転写体の発現を変化させなかった(図15)。

対照として、ハウスキーピング遺伝子ポルホピリノーゲンデアミナーゼ(ヒドロキシメチルピランシンターゼ、"PBGD")を増幅して、負荷の均一性を測定した。この薬物はPBGD発現を低下させなかったため、これはテマクラジンが転写を非特異的にダウンレギュレーションしないことを証明する。

実施例 9

テマクラジンがHIV-1 mRNA発現を調節していたという可能性を評価するために、全HIV-1 mRNAの発現をノーザンプロット法により調べた(図16)。

図16は、TNFで刺激するとU1細胞におけるHIV-1特異性mRNAの発現が著しく増大することを示す。TNF刺激したU1細胞を10および100nMのテマクラジンで処理すると、mRNAの産生が全面的に抑制され、刺激していないU1細胞の外観にきわめて近似する外観をもつ表現型("rev"非依存性表現型)が生じる。しかし1nMテマクラジンによる処理ではシングルスプライスマRNAおよび非スプライスマRNAが減少し、マルチスプライスマRNAは明らかに減少しなかった。これらのRNA阻害パターンは、テマクラジンがmRNAを含有するrev反応性要素(RRE)の発現を阻害または変化させていることを示唆する。

実施例 10

インビボデータ

テマクラジンの新規な作用機構、ならびにHIV-1に対するその広範な活性および高い療法指数が得られたので、本発明者らはHIV-1複製のヌードマウス中空繊維モデルにおいてそのインビボおよび抗ウイルス特性を評価することにした。要約すると、CEM-

10

20

30

40

50

SS細胞をHIV-1_{RF}に感染させ、中空繊維に挿入し、ヌードマウスの腹腔内または皮下に移植した。DMSOビヒクル中のテマクラジンを1日3回、2回または1回、1日当たりの全投与量25mg/kgで6日間腹腔内投与した。同様にマウスをテマクラジンの経口投与および静脈内投与により処置した。腹腔洗浄液および血清の試料を採集し、p24の発現を抗原捕獲法により測定した。結果を表2に示す。テマクラジンの腹腔内投与では、腹腔洗浄液中の検出可能なp24の量が投与計画に関係なく5~10倍減少した。テマクラジンは血清中のp24量も減少させた。したがってテマクラジンはインビボでのHIV-1複製を低下させる。

ここに提示する実験は、テマクラジンが感染細胞中でHIV-1生活周期の組み込み後事象と相互作用することにより機能することを示す。この相互作用により、非スプライスおよびシングルスプライス転写体が選択的に枯渇して、ウイルス転写体が失われる。この薬物は、新規な抗ウイルス作用機構により機能する。なおかつテマクラジンがインビボモデルでHIV-1複製を阻害しうることにより、有効な抗ウイルス薬としてのテマクラジンおよびその同族体の有用性はさらに増す。

表2. 中空繊維マウスモデルにおけるテマクラジンのインビボ活性

処理 ²	動物	腹腔洗浄液 (pg p24)			血清 (pg p24)		
		平均	SD	p ¹	平均	SD	P
非感染	3	0	0	-	0	0	-
食塩液 q8h ³	5	2185	675	-	2694	717	-
DMSO q8h	5	2451	868	-	3716	1287	-
ddC 40 mg/Kg q8h	3	7	12	0.002 ⁴	87	21	0.0009
テマクラジン							
8.5mg/kg q8h	2	460	396	0.026	1790	198	0.1
12.5 mg/kg	3	190	97	0.004	1863	601	0.06
q12h							
25 mg/kg q24h	3	593	250	0.002	2030	903	0.01

ヌードマウスに、HIV-1_{RF}感染末梢血単核細胞を装入した中空繊維を移植し、テマクラジンを投与した（全投与量25mg/kg）。

¹ スチューデントのt-検定

² すべての化合物を腹腔内投与した。

³ qは投与回数である。

⁴ DMSOのみを注射した動物と有意に異なる群。

本明細書中で述べた刊行物はすべて、それらの全体が本明細書に参考として含まれる。以上、本発明を明確にし、理解するために、ある程度詳細に記載したが、当業者はこの開示を読むことにより本発明の真の範囲から逸脱することなく形態および詳細を多様に変更

しうることが認識されるであろう。

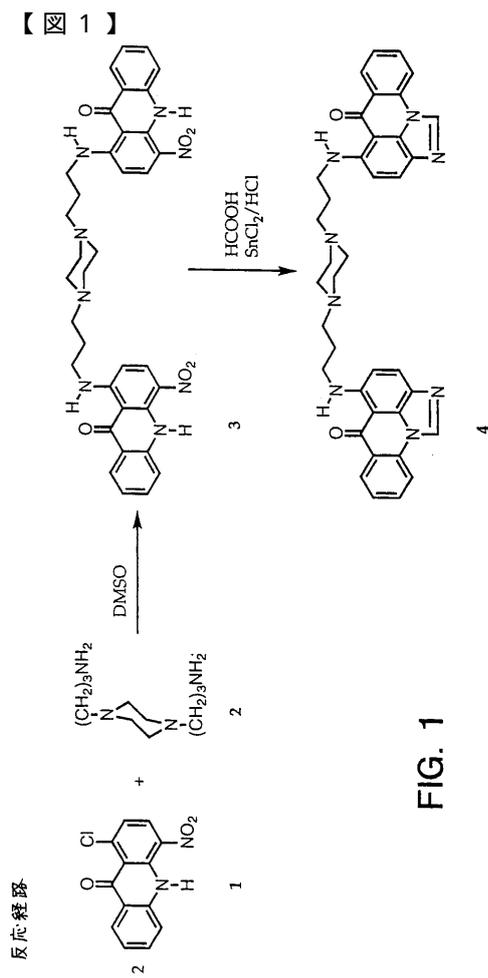


FIG. 1

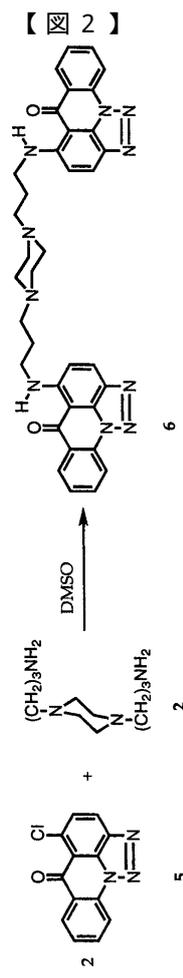


FIG. 2

【図3】

ヒト腫瘍移植片におけるWMC50のインビトロ作用

腫瘍系代	実験No.	コロニー数	平均に對するIC70の分布 対数自盛り軸	IC50 ug/ml	IC70 ug/ml	IC90 ug/ml
GXF	U1531H	83	2.268	>100.000	2.424	>100.000
HAEL	HCF7X/13	48		>100.000	7.498	>10.000
HEXF	U1622X	70		>100.000	>100.000	>100.000
PRXF	PC3M/27	23		<0.001	<0.001	>1.000
	DU145X/2	73		0.177	0.749	>1.000
RXF	1220/5	57		>100.000	>100.000	>100.000
平均		n=6	2.268 ug/ml	0.297	2.268	14.677

FIG. 3

【図4】

濃度	反復1	反復2	RT (cpm/15ul) 平均	標準偏差	対照に對するウイルス%	阻害率%
0	52387.00	52387.00	52612.00	318.20	100.00	0.00
0.0336	32529.00	719.00	50782.00	35399.89	48.94	51.06
0.1049	70227.00	31610.00	16171.00	21834.04	30.74	69.26
0.3277	24750.00	7516.00	16375.50	12529.23	31.13	68.87
1.0240	10035.00	5890.00	5597.00	414.36	10.64	89.36
3.2000	3290.00	1010.00	897.00	79.90	1.81	98.19
10.0000	758.00	879.00	1762.50	1249.46	3.55	96.65

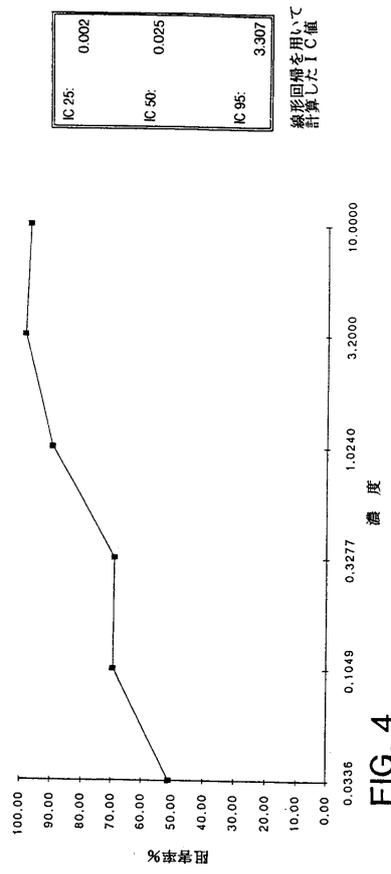


FIG. 4

【図5】

濃度	反復1	反復2	RT (cpm/15ul) 平均	標準偏差	対照に對するウイルス%	阻害率%
0	52387.00	52387.00	52612.00	318.20	100.00	0.00
0.0336	32529.00	56627.00	44578.00	17039.86	84.73	15.27
0.1049	70227.00	43206.00	56716.50	19106.73	100.00	0.00
0.3277	24750.00	12264.00	18507.00	8828.94	35.18	64.82
1.0240	10035.00	5893.00	7964.00	2928.84	15.14	84.86
3.2000	3290.00	1404.00	2347.00	1333.60	4.46	95.54
10.0000	758.00	724.00	741.00	24.04	1.41	98.59

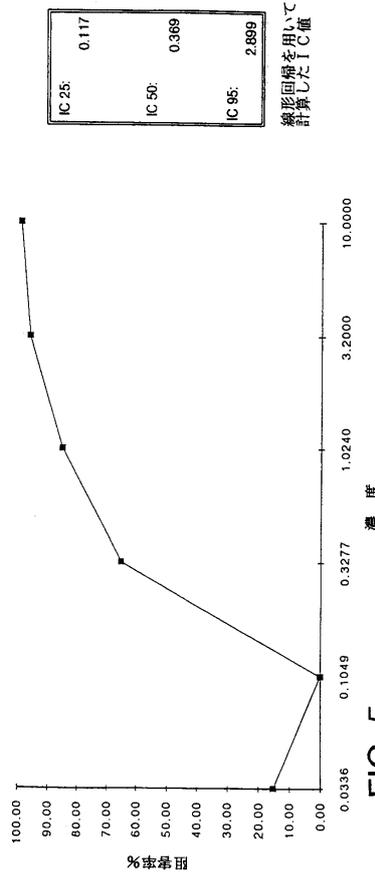


FIG. 5

【図6】

濃度	反復1	反復2	Q.D.の読み、アライメント・アールー平均	標準偏差	対照に對する細胞%	毒性%
0	1.17	1.17	1.17	0.00	100	0
0.4000	1.23	1.23	1.23	0.00	100	0
0.8000	1.25	1.25	1.25	0.00	100	0
1.6000	1.21	1.21	1.21	0.00	100	0
3.2000	1.14	1.14	1.14	0.00	97	3
10.0000	1.12	1.12	1.12	0.00	96	4

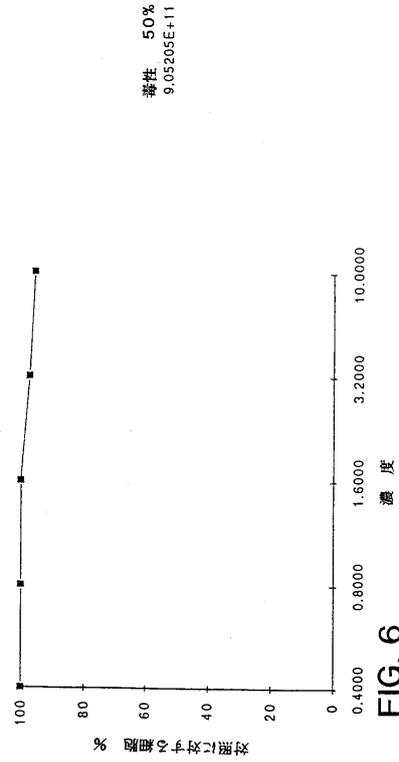
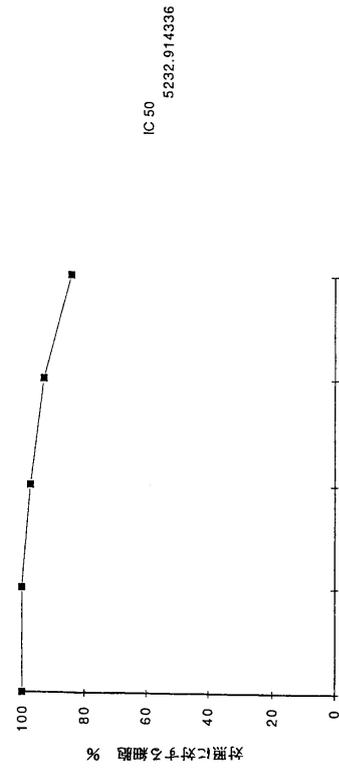


FIG. 6

【 図 7 】

濃 度	反復1	反復2	O. D. の読み、アラマー・ブルー平均	標準偏差	対照に対する細胞 %	毒性%
0	1.17	1.17	1.17	0.00	100	0
0.4000	1.30	1.30	1.30	0.00	100	0
0.8000	1.21	1.21	1.21	0.00	100	0
1.6000	1.14	1.14	1.14	0.00	97	3
3.2000	1.09	1.09	1.09	0.00	93	7
10.0000	0.98	0.98	0.98	0.00	84	16



【 図 8 】

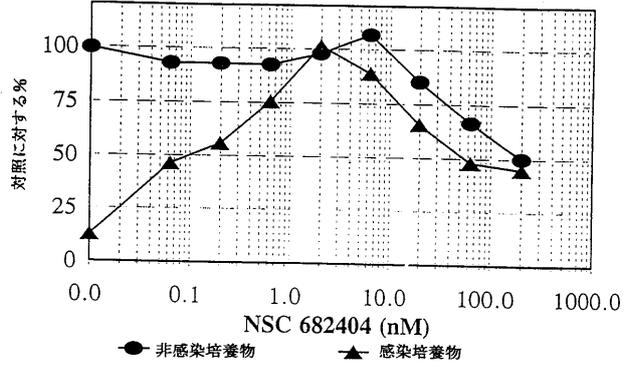


FIG. 8

【 図 9 】

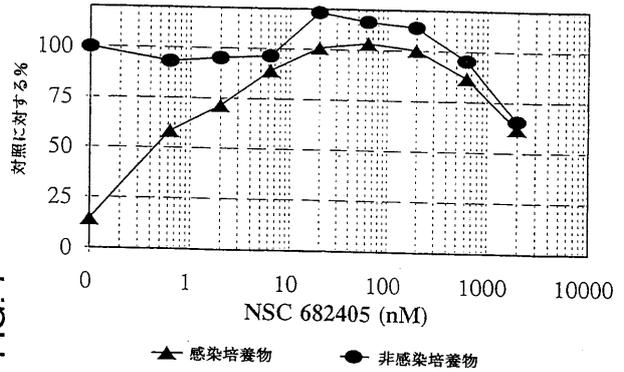


FIG. 9

FIG. 7

【 図 10 】

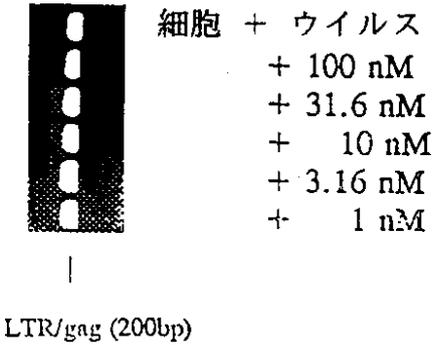


FIG. 10

【 図 11 】

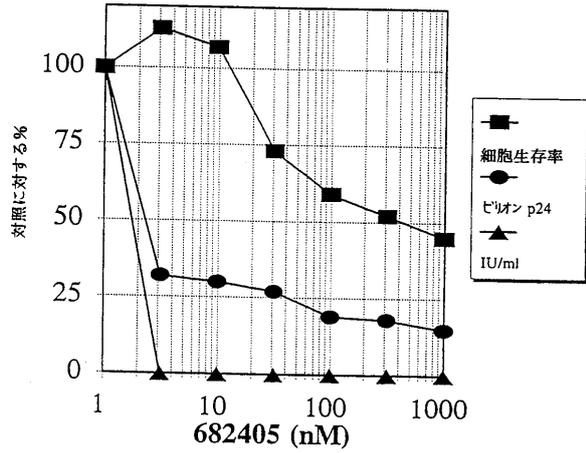


FIG. 11

【 図 12 】

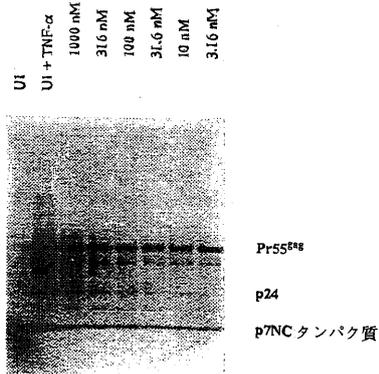


FIG. 12

【 13 】

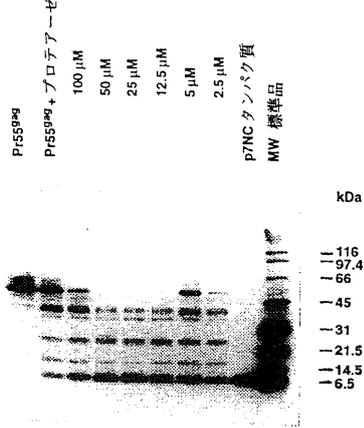


FIG. 13

【 14 】

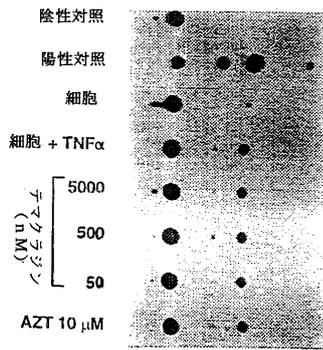


FIG. 14

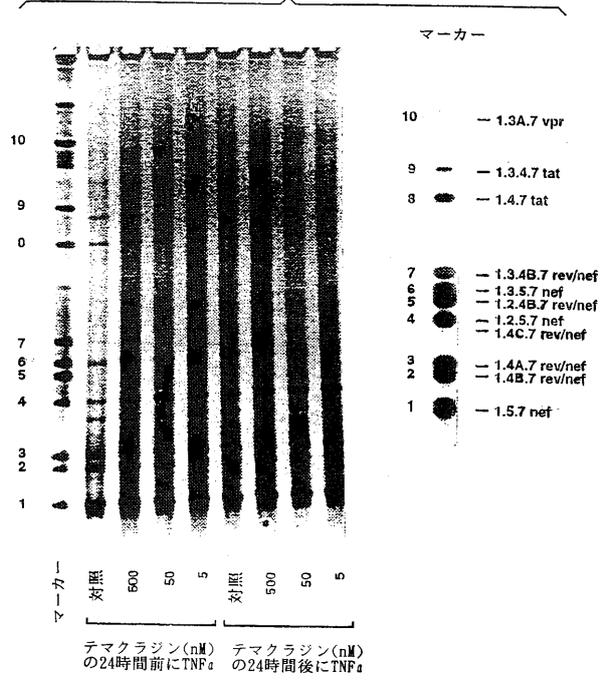
【 16 】



FIG. 16

【 15 】

FIG. 15



対照 600 50 5 対照 500 50 5

テムクラジン (nM) の24時間前にTNFα テムクラジン (nM) の24時間後にTNFα

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 D 471/06	(2006.01)	C 0 7 D 471/06

(74)代理人

弁理士 栗田 忠彦

(74)代理人

弁理士 小林 泰

(74)代理人

弁理士 藍原 誠

(72)発明者 ミシエジャ, クリストファー・ジェイ

アメリカ合衆国メリーランド州20878, ポトマック, ヒドゥン・グレン・レーン 13814

(72)発明者 チョロディ, マレック・ダブリュー

アメリカ合衆国メリーランド州21702, フレデリック, タニー・アベニュー 1408

(72)発明者 ライス, ウィリアム・ジー

アメリカ合衆国メリーランド州21701, フレデリック, マグノリア・アベニュー 625

(72)発明者 ターピン, ジェイムズ・エイ

アメリカ合衆国メリーランド州21705, フレデリック, バスフォード・ロード 3712, ピー・オー・ボックス 3758

審査官 新留 素子

(56)参考文献 国際公開第95/025093(WO, A1)

特開昭60-136567(JP, A)

特表平06-508102(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D219/08

A61K 31/473

A61K 31/4745

A61P 31/12

A61P 31/18

A61P 35/00

C07D471/06

CA(STN)

CAOLD(STN)

REGISTRY(STN)