

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-164125

(P2016-164125A)

(43) 公開日 平成28年9月8日(2016.9.8)

| | | |
|---------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
| A 6 1 K 31/498 (2006.01) | A 6 1 K 31/498 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 33/02 (2006.01) | A 6 1 P 33/02 1 7 1 | |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

| | | | |
|-----------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2013-138824 (P2013-138824) | (71) 出願人 | 504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地 |
| (22) 出願日 | 平成25年7月2日(2013.7.2) | (71) 出願人 | 598041566 学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号 |
| | | (74) 代理人 | 100110973 弁理士 長谷川 洋 |
| | | (74) 代理人 | 100120293 弁理士 中谷 智子 |
| | | (72) 発明者 | 五十嵐 郁男 北海道帯広市稲田町西2線13番地 国立 大学法人帯広畜産大学内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バベシア症の治療剤及び予防剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 マダニ科のダニによって媒介される原虫の一種のヒトおよび家畜感染性バベシア類として、イヌバベシア、ウシバベシア、ウマバベシア、げっ歯類バベシアの増殖抑制剤、治療剤及び予防剤の提供。

【解決手段】 クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、イヌバベシア、ウマバベシア、ウシバベシア、げっ歯類バベシア等のバベシア類の増殖抑制用薬剤、並びに、ヒトおよび家畜におけるバベシア類感染症の治療用又は予防用薬剤等。クロファジミンとは、2-(4-クロロアニリノ)-3-イソプロピルイミノ-5-(4-クロロフェニル)3,5-ジヒドロフェナジンのであり、フェナジン系化合物である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、バベシア類の増殖抑制用薬剤。

【請求項 2】

クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、バベシア類感染症の治療用又は予防用薬剤。

【請求項 3】

ヒト又は家畜動物におけるバベシア類の感染症を治療又は予防するための、請求項 2 に記載の治療用又は予防用薬剤。

10

【請求項 4】

バベシア類が、ヒトおよび家畜感染性バベシアである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 5】

バベシア類が、イヌバベシア、ウマバベシア、ウシバベシア、げっ歯類バベシアである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 6】

バベシア類が薬剤耐性バベシアである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 7】

経口投与形態又は非経口的投与形態である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フェナジン系化合物クロファジミン (clofazimine) を有効成分として含有するヒトおよび家畜のバベシア症の治療剤及び予防剤に関する。

【背景技術】

【0002】

バベシア症は主に家畜動物に発症するバベシア感染症である。イヌバベシア (*Babesia gibsoni*)、ウシバベシア (*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*)、ウマバベシア (*Babesia caballi*、*Babesia (Theileria) equi*)、げっ歯類バベシア (*Babesia microti*) などがあり、これらはマダニ科のマダニによって媒介され、吸血により感染する。バベシアは赤血球内で増殖を繰り返すため、発熱、脾腫、貧血、血色素尿を呈し、その死亡率は 10 ~ 50 % に至る。また、げっ歯類バベシアはヒトにも感染することが報告されており、人獣共通感染症として認識されている。ヒトのバベシア症の場合、特に高齢者、脾臓摘出患者、AIDS 患者においては死に至る場合がある。また、不顕性感染の場合があり、輸血などで他者への感染が危惧される。

30

【0003】

家畜に対するバベシア症には、既存の薬剤としてガナゼック (ジミナゼンアセチレート)、イミドカルブ、フェナミジン、トリパンプルーが用いられるが、いずれも原虫を完全に殺滅することが困難であり、また肝毒性といった重篤な副作用を伴うこと、また、その残留性が問題となっている。さらにはこれら薬剤に耐性を持つバベシアの出現が報告されている。ヒトのバベシア症の治療にはアジスロマイシンとアトバコンの併用、又はキニンとクリンダマイシンの併用を用いるが、新たな治療薬は開発されていない。

40

【0004】

このように、既存の抗バベシア薬の欠点を克服する新規な抗バベシア薬の開発が望まれている。特に中南米、アフリカ、アジア、オセアニア諸国などでの大規模な家畜経営において家畜のバベシア症は生産性の低下をもたらし、食糧経済問題につながるものが危惧される。さらに、最近における地球規模での環境変化によりバベシア類の流行地域がさらに拡大傾向の様相を呈している。従って今後殺原虫効果が高く、かつ宿主に対する毒性が

50

低い新規抗バベシア薬開発の必要性が極めて高いものと考えられている。

【0005】

抗バベシア薬の開発においては、*in vitro*で効果が確認されたものは報告されているが、*in vivo*では効果が確認できない、毒性が確認される、一部のバベシアに対して効果を示さない等の問題があり、安全な薬剤は見出されていない。

【0006】

クロファジミンは抗結核作用、抗炎症作用、免疫抑制作用が報告されており、ハンセン病治療薬として知られている化合物である（特許文献1および非特許文献1）。例えば特許文献1にはクロファジミンの製造法及び性状が開示されている。しかしながら、クロファジミンとバベシアとの関係は知られていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】US Patent 2,948,726

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】M. C. Cholo, H. C. Steel, P. B. Fouria W. A. Germishuizen & R. Anderson: Clofazimine: current status and future prospects. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 29: 290-298, 2012

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

よって、本発明の目的は、バベシア類、例えば、イヌバベシア、ウシバベシア、ウマバベシア、げっ歯類バベシアの感染によるヒトおよび家畜のバベシア症の治療および予防のための新規の医薬組成物を提供することである。また、本発明の目的は、*in vitro*のみならず、*in vivo*で有効であり、毒性が低く、臨床において適用可能なヒトおよび家畜のバベシア症の治療剤および予防剤を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上述の既存の抗バベシア薬における種々の問題点を解決すべく、種々のバベシアに対して*in vitro*及び*in vivo*の両方で有効な化合物について鋭意研究したところ、クロファジミンがバベシア類の増殖抑制に対して優れた有効性を示し、かつ、毒性の低い化合物であることを見出した。特に、本発明者らは、クロファジミンがバベシア感染動物モデルにおいて優れた治療効果と安全性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

よって、本発明は、バベシア類、例えば、イヌバベシア、ウシバベシア、ウマバベシア、げっ歯類バベシアなどのヒトおよび家畜への感染症の治療及び予防、並びにバベシア類の増殖抑制のための新規の医薬組成物として、クロファジミンを提供するものである。

具体的には、本発明は、クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を有効成分として含有するバベシア類の増殖抑制剤に関する。また、本発明はクロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を投与することを特徴とするバベシア類の増殖抑制方法に関する。

【0012】

本発明はまた、クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を有効成分として含有する、バベシア類の感染治療剤及び予防剤に関する。また、本発明はクロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩を投与することを特徴とするバベシア類の感染症の治療方法及び予防方法に関する。

10

20

30

40

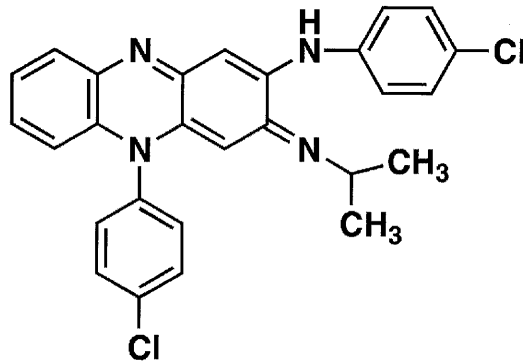
50

【 0 0 1 3 】

本明細書において、「クロファジミン」とは、下記式で表わされる、化学名が 2 - (4 - クロロアニリノ) - 3 - イソプロピルイミノ - 5 - (4 - クロロフェニル) 3 , 5 - ジヒドロフェナジンであり、分子式 $C_{27}H_{22}Cl_2N_4$ で表される分子量 473.40 のフェナジン系化合物である。

【 0 0 1 4 】

【 化 1 】



(I)

【 0 0 1 5 】

クロファジミンは二級又は三級のアミン基を有することから、水溶液中等においてプロトンが配位して塩基となることができる。本明細書においてクロファジミンとは、このようなクロファジミンの（遊離）塩基を包含する。また、同様に本明細書におけるクロファジミンは、このようなクロファジミンの塩基と無機又は有機の酸とが結合して形成した塩であって、医薬として体内に投与することが許容可能な塩を包含する。「薬理的に許容される塩」とは、クロファジミンが、無機又は有機の塩基又は酸と結合して形成した塩であって、医薬として体内に投与することが許容可能な塩のことである。このような塩は、例えば、Berger, J. Pharm. Sci. 66: 1-19 (1977) 等に記載されている。塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸の塩；メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸、酢酸、プロピオン酸塩、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、シュウ酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、マンデル酸、ケイ皮酸、乳酸、グリコール酸、グルクロン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、サリチル酸等の有機酸との塩；又はアスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸との塩などを挙げることができる。なお、クロファジミンの水和物又は溶媒和物およびクロファジミンの塩の水和物又は溶媒和物も本発明のクロファジミンに包含される。

【 0 0 1 6 】

本明細書において、「バベシア類」とは、アピコンプレクサ門孢子虫綱ピロプラズマ目に属する原虫である。本明細書において、バベシア類としては、ヒト又は家畜に感染する能力を有するバベシア類（ヒト又は家畜感染性バベシア）が好ましい。バベシア類がヒト又は家畜に感染性であるか否かは、公知の文献により、又は被験動物由来の赤血球に被験バベシア類を接触させ、バベシア類が増殖するか否かを測定し、増殖する場合には該被験動物に感染性であると判定することにより調べることができる。バベシア類は、イヌバベシア (*Babesia gibsoni*)、ウシバベシア (*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*)、ウマバベシア (*Babesia caballi*) およびタイレリア (*Babesia (Theileria) equi*)、並びに、げっ歯類バベシア (*Babesia microti*) を含む。バベシア類として、好ましくは、イヌバベシア (*Babesia gibsoni*)、タイレリア (*Babesia (Theileria) equi*)、及びげっ歯類バベシア (*Babesia microti*) である。また、本明細書において、バベシア類として好ましくは、薬剤

20

30

40

50

耐性バベシア類である。薬剤耐性バベシア類が耐性を示す薬剤としては、抗バベシア薬として用いられているか、又は用いることができる薬剤であれば特に限定されるものではなく、例えば、ガナゼック（ジミナゼンアセチュレート）、イミドカルブ、フェナミジン、又はトリパンプルーを挙げることができる。被験バベシア類が薬剤耐性バベシア類であるか否かは、該バベシア類に関する公知の情報により知ることができる。あるいは、被験バベシア類が薬剤耐性バベシア類であるか否かは、被験バベシア類を抗バベシア作用が発揮可能な濃度の前記抗バベシア薬と共に動物由来の赤血球に接触させ、バベシア類が増殖するか否かを測定し、増殖する場合には該被験バベシア類は薬剤耐性バベシア類であると判定することにより調べることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】クロファジミンの *in vivo* における抗バベシア活性試験の結果を示すグラフである。縦軸は原虫感染赤血球率 (Parasitemia) (%) を示し、横軸はバベシア投与後の経過日数 (Days post-inoculation) を示す。黒丸は薬剤無添加の陰性対照群を示し、白丸はクロファジミンを 20 mg/kg で経口投与した群を示し、三角はクロファジミンを 20 mg/kg で腹腔投与した群を示し、逆三角はガナゼックを 25 mg/kg で皮下投与した群を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

前記の式 (I) で表されるフェナジン系化合物であるクロファジミンは、US Patent 2,948,726 記載の方法に従って製造することができる。また、クロファジミンは、市販品（例えば、Sigma社、米国）として購入することもできる。

20

【0019】

本発明の医薬組成物は、経口投与形態、又は注射剤（筋肉注射、静脈内注射、皮下注射）、点滴剤等の非経口投与形態で用いることができる。本発明のバベシア類の増殖抑制方法、並びに、バベシア類感染症の治療方法及び予防方法は、クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩の有効量をそれを必要とする対象に投与することを含む。クロファジミン、クロファジミンの遊離塩基又はその薬理的に許容される塩により治療又は予防する対象としては、哺乳動物が好ましく、特に、ヒト及び家畜動物（犬、猫、馬、羊、山羊、牛、豚、驢馬、駱駝、アルパカ、モルモット、兎、ミンク、ラット、及びネズミ等の哺乳類）であり、更に好ましくは、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、及びげっ歯類であり、最も好ましくは、ヒト、ウシ、及びウマである。本化合物を哺乳動物等に投与する場合、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等として経口投与してもよいし、又は、注射剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。また、家畜等へ投与する場合、飼料等へ混和した形で投与することができる。投与量は症状の程度、年齢、疾患の種類等により異なるが、通常成人1日当たり50 mg ~ 500 mg を1日1 ~ 数回に分けて投与する。

30

【0020】

本発明のバベシア類の感染治療剤及び予防剤は、通常の薬学的に許容される担体を用いて、常法により製剤化することができる。経口用固形製剤を調製する場合は、主薬に賦形剤、更に必要に応じて、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えた後、常法により溶剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等とする。注射剤を調製する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加し、常法により皮下又は静脈内用注射剤とする。

40

【0021】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

【実施例1】

【0022】

クロファジミンの *in vitro* におけるバベシア増殖阻害活性

50

北里大学獣医学部で保有しているイヌバベシア (*Babesia gibsoni*) を用いて、イヌバベシアに対するクロファジミンの *in vitro* における抗バベシア活性を Matsuu らの方法 (Matsuu, A., Koshida, Y., Kawahara, M., Inoue, K., Ikadai, H., Hikasa, Y., Okano, S., Higuchi, S., Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* *in vivo* and *in vitro*, *Vet Parasitol.*, 124: 9 - 18. (2004)) に従って測定した。

帯広畜産大学原虫病研究センターで保有しているウシバベシア (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*)、ウマバベシア (*Babesia caballi*, *Babesia equi*) を用いて、これらのバベシアに対するクロファジミンの *in vitro* における抗バベシア活性を Bork らの方法 (Bork, S., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Kumar, S., Sugimoto, C., Igarashi, I., Growth inhibitory effect of heparin on *Babesia* parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 48: 236 - 241 (2004)) に従って測定した。

【0023】

Babesia gibsoni の培養については、Matsuu の方法 (Matsuu, A., Koshida, Y., Kawahara, M., Inoue, K., Ikadai, H., Hikasa, Y., Okano, S., Higuchi, S., Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* *in vivo* and *in vitro*, *Vet Parasitol.*, 124: 9 - 18 (2004)) にて、維持、継代を行ったものを用いた。すなわち、24穴培養プレート内で、20% イヌ血清を添加した RPMI 1640 培養液と新鮮なイヌ赤血球を用いて継代した原虫感染赤血球を希釈し (ヘマトクリット値: 5 ~ 10%、原虫感染赤血球率: 0.5 ~ 1%)、37 にて 5% CO₂ - 95% air 下で培養を行い、毎日の培養液交換と 4 ~ 5 日毎に新鮮な赤血球を添加して連続培養を行った。

【0024】

Babesia bovis, *Babesia bigemina*, *Babesia caballi*, *Babesia equi* の培養については、それぞれ Levy と Ristic の方法 (Levy, MG and Ristic, M., *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture, *Science.*, 207: 1218 - 1220, (1985))、Vega らの方法 (Vega, CA, Buening, GM., Green, TJ., Carson, CA., *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*, *American Journal of Veterinary Research.*, 46: 416 - 420 (1985))、Holman らの方法 (Holman, PJ., Frerichs, WM., Chieves, L., Wagner, GG., *Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses.*, *Journal of Clinical Microbiology.*, 31: 698 - 701 (1993))、Holman らの方法 (Holman, PJ., Chieves, L., Frerichs, WM., Olson, D., Wagner, GG., **Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium.*, *Journal of Parasitology.*, 80: 232 - 236 (1994)) を若干改変し、維持、継代を行ったものを用いた。すなわち、24穴培養プレート内で、40% ウシあるいはウマ血漿を添加した 199 (*Babesia bovis*, *Babe*

10

20

30

40

50

sia bigemina, *Babesia equi*)あるいはRPMI 1640 (*Babesia caballi*)培養液と新鮮なウシあるいはウマ赤血球を用いて継代した原虫感染赤血球を希釈し(ヘマトクリット値:5~10%、原虫感染赤血球率:0.5~1%)、37℃にて5%O₂-5%CO₂-90%N₂の混合ガス下で培養を行い、毎日の培養液交換と4~5日毎に新鮮な赤血球を添加して連続培養を行った。

【0025】

*Babesia gibsoni*は自然感染した青森の土佐犬から分離し、連続培養で維持した株を用いた。*Babesia bovis*および*Babesia bigemina*はワシントン州立大学獣医学部 Guy Palmer教授、*Babesia caballi*、*Babesia equi*は日本競馬界競走馬総合研究所栃木支所金丸卓美所長より分与を受けた。

10

【0026】

薬剤感受性試験は、Matsuuの方法(Matsuu, A., Yamasaki, M., Xuan, X., Ikadai, H., Hikasa, Y., *In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against Babesia gibsoni* (Aomori strain), *Vet Parasitol.*, 157:1-8 (2008)およびBorkらの方法(Bork, S., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Kumar, S., Sugimoto, C., Igarashi, I., *Growth inhibitory effect of heparin on Babesia parasites*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 48:236-241 (2004))に従って測定した。被験化合物としては、クロファジミン、既存抗バベシア剤であるガナゼック(ジミナゼンジアセチュレート、ノバルティス社)を用いた。具体的には、*Babesia gibsoni*の場合、96穴プレートの各ウェルに200μLの培養したバベシア感染赤血球(感染率:1~3%)、最終濃度0.0001~1μMとなるような濃度段階希釈した被験化合物を含む20%血漿加培養液(RPMI 1640)が含まれる条件で培養を行った。24時間毎に被験化合物を含む培養液を交換した。*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*、*Babesia caballi*、*Babesia equi*の場合、96穴プレートの各ウェルに培養したバベシア感染赤血球(感染率:1%)20μLと最終濃度0.05~200μMとなるような濃度段階希釈した被験化合物を含む40%血漿加培養液(RPMI 1640あるいは199培養液)200μLを混和し、前述の混合ガス下で96時間培養を行った。24時間毎に被験化合物を含む培養液を交換した。

20

30

【0027】

原虫増殖の測定はMatsuuの方法(Matsuu, A., Yamasaki, M., Xuan, X., Ikadai, H., Hikasa, Y., *In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against Babesia gibsoni* (Aomori strain), *Vet Parasitol.*, 157:1-8 (2008)およびBorkらの方法(Bork, S., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Kumar, S., Sugimoto, C., Igarashi, I., *Growth inhibitory effect of heparin on Babesia parasites*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 48:236-241 (2004))を若干変更して用いた。

40

【0028】

すなわち、毎日培養液を換える時に、感染赤血球の一部を用いて塗抹標本を作製し、メタノール固定後、ギムザ染色を行った。その後、約1000個の赤血球を観察し、バベシアに感染している赤血球の数を求め、感染率を算出した。化合物の50%原虫増殖阻止濃

50

度 (IC50 値) は培養 3 日のバベシア感染率を用いて化合物濃度作用曲線より求めた。

【0029】

本発明に用いたクロファジミンの化合物と既知の抗バベシア剤の培養バベシアに対する抗バベシア活性は表 1 に示す通りであった。

【0030】

【表 1】

| バベシア原虫種 | IC50 値 (μM) | |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | クロファジミン (clofazimine) | ガナゼック (diminazen acetulate) |
| <i>Babesia gibsoni</i> | 0.74 | 0.088 |
| <i>Babesia bovis</i> | 4.50 | 0.34 |
| <i>Babesia bigemina</i> | 3.00 | 0.17 |
| <i>Babesia caballi</i> | 4.30 | 0.009 |
| <i>Babesia equi</i> | 0.29 | 0.63 |

【0031】

クロファジミンは、イヌバベシア (*Babesia gibsoni*)、ウシバベシア (*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*)、ウマバベシア (*Babesia caballi*、*Babesia equi*)、に対してそれぞれ IC₅₀ 値：0.74 μM、4.5 μM、3.0 μM、4.3 μM、0.29 μM であり、既存の抗バベシア剤であるガナゼックの 1/477 ~ 1/0.46 倍程度の抗バベシア活性を示し、特に *Babesia equi* に対する増殖抑制効果は顕著であった。

20

【実施例 2】

【0032】

クロファジミンの細胞毒性試験

クロファジミンの細胞毒性試験は乙黒らの方法 (Otoguro, K., Kohana, A., Manabe, C., Ishiyama, A., Ui, H., Shiomi, K., Yamada, H. & Omura, S.: Potent antimalarial activity of polyether antibiotic, X-206. J. Antibiot., 54: 658-663, (2001)) に準じて行った。すなわち、Dr. L. Maes (Tibotec NV, Mechelen, ベルギー) より分与された、宿主細胞のモデルであるヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞 MRC-5 細胞を 10% 牛胎児血清 (FCS) 及び抗生物質添加 MEM 培地にて維持、継代培養を行ったものを用いた。

30

【0033】

10% FCS - MEM にて 1×10^3 細胞 / ウェルとなるように調整したヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞 MRC-5 細胞浮遊液を、96 穴プレートに 100 μL 添加し混和後、37 °C にて 5% CO₂ - 95% air 下で 24 時間培養を行った。その後、各ウェルに 10% FCS - MEM 90 μL と最終濃度 250 ~ 0.1 μg/mL となるような濃度段階希釈した被験化合物の溶液 (5% ジメチルスルホキシド水溶液) 10 μL を添加し、混和後、前述のガス下で 7 日間培養を行った。MRC-5 細胞の増殖の有無は MTT 法にて比色定量した。化合物の 50% 細胞増殖阻止濃度 (IC50 値) は化合物濃度作用曲線より求めた。また、選択毒性比 (SI: Selectivity Index) は、(細胞毒性の IC50 値) / (抗バベシア活性の IC50 値) により計算して求めた。

40

【0034】

本発明に用いたクロファジミンと既存の抗バベシア剤の細胞毒性を表 2 に示す

【0035】

【表 2】

| 培養ヒト細胞に対するクロファジミン (clofazimine) の細胞毒性 | |
|---------------------------------------|-------------|
| 化合物 | IC50 値 (μM) |
| | MRC-5 細胞 |
| クロファジミン (clofazimine) | 211.24 |
| ガナゼック (diminazen acetulate) | 18.40 |

【0036】

クロファジミンのヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞 MRC-5 に対する細胞毒性 (IC50 値) は 211.24 μM であった。また、既存薬であるガナゼックの細胞毒性値は 18.40 μM であった。クロファジミンの細胞毒性はガナゼックの 1 / 11.5 倍程度と弱いものであった。

10

【0037】

本発明に用いたクロファジミンと既存の抗バベシア剤の選択毒性比 (SI) を表 3 に示す。

【0038】

【表 3】

| バベシア原虫種 | SI 値 (細胞毒性 IC50 値 / 抗バベシア活性 IC50 値) | |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | クロファジミン (clofazimine) | ガナゼック (diminazen acetulate) |
| <i>Babesia gibsoni</i> | 285 | 209 |
| <i>Babesia bovis</i> | 47 | 54 |
| <i>Babesia bigemina</i> | 70 | 108 |
| <i>Babesia caballi</i> | 49 | 2044 |
| <i>Babesia equi</i> | 728 | 29 |

【0039】

選択毒性比 (SI: Selectivity Index) は (細胞毒性の IC50 値) / (抗バベシア活性の IC50 値) により計算して求めた。

クロファジミンは、イヌバベシア (*Babesia gibsoni*)、ウシバベシア (*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*)、ウマバベシア (*Babesia caballi*、*Babesia equi*)、に対してそれぞれ SI: 285、47、70、49、728 であった。

【実施例 3】

【0040】

クロファジミンの *in vivo* における抗バベシア活性試験

クロファジミンのネズミバベシア (*Babesia microti* ミュンヘン株) 感染実験モデルに対する *in vivo* での治療効果を Aboulaila らの方法 (Aboulaila, M., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Ueno, A., Nakano, Y., Yokoyama, M., Yoshinary, T., Nagano, D., Katayama, K., El-Bahy, N., Yokoyama, N., and Igarashi, I. Apicoplast-targeting antibacterials inhibit the growth of *Babesia* parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56:3196-3206 (2012)) を用いて測定した。

30

40

ネズミバベシア *Babesia microti* ミュンヘン株は、Dr. O. Heyd

50

orn (Free University of Berlin、ドイツ)より分与を受けた。

【0041】

供試動物としては8週令のBALB/cマウス(日本クレア社)の雌、体重19~22gの一群5匹を用いた。in vivo passageにて維持・継代した*B. microti* 1×10^7 個の感染赤血球を腹腔内接種にて感染させた。感染日を0日目として、赤血球感染率が1%に達した時(感染後1日目)に10%ジメチルスルホキサイド水溶液(DMSO)に溶解したクロファジミンを腹腔内(i.p.)又は経口(p.o.)、ガナゼックを皮下(s.c.)に投与し、以後1日1回5日間連続投与し(1~5日目)、毎日尾静脈より血液塗末標本を作製し、原虫感染赤血球率(parasitemia)を測定した。

10

【0042】

本発明に用いたクロファジミンと既存の抗バベシア剤の感染実験モデルにおける治療効果の結果を図1に示す。

【0043】

薬剤無添加の対照群では、感染後7日で*Babesia microti*の原虫感染赤血球率が45.9%と最高に達し、以後漸減し感染後20日で抹消血液中から消失した。クロファジミンの20mg/kgの腹腔内投与で、8.8%の最高寄生率が感染後7日で認められ、対照群と比べ原虫感染赤血球率が80.8%抑制され、治療効果が認められた。更に、クロファジミンの20mg/kgの経口投与では、感染後5日で最高寄生率が5.3%より認められず、対照群と比べ88.5%の原虫感染赤血球率の抑制効果を示し、更なる治療効果が認められた。一方、陽性対照として用いた既存の抗バベシア剤であるガナゼックは、25mg/kgの皮下投与で、感染後6日で5.4%の最高寄生率に達し、無添加対照群と比較して88.2%の原虫感染赤血球率の抑制効果が認められた。このことより、クロファジミンは腹腔内投与又は経口投与でガナゼックと同程度の用量で同等の治療効果があることが示された。ガナゼックは生体内での副作用が強いが、本発明によりクロファジミンと併用し、ガナゼックの用量を低減する可能性も見出された。

20

なお、クロファジミンの経口投与におけるLD50は、マウスに対し>13,300mg/kg、ラット8,400mg/kg、モルモット4,400mg/kg、ウザギ1,500mg/kgである(文献:日本標準商品分類番号876239 医薬品インタビューフォーム)。一方、ガナゼックの皮下投与におけるLD50はマウスに対し258mg/kgであり、クロファジミンよりも毒性が高い。(Bauer, F., *Arzneimittel-forschung*. 6: 674-677 (1956))

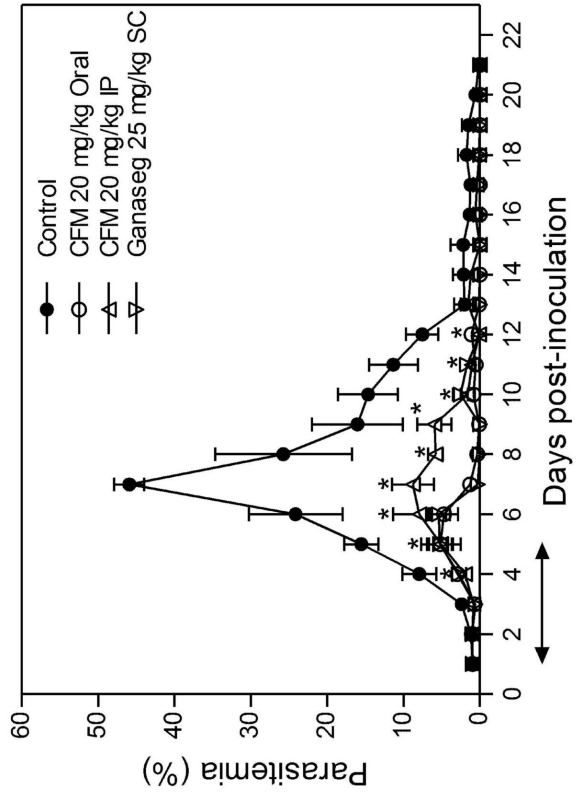
30

【産業上の利用可能性】

【0044】

以上説明したように、本発明に用いたクロファジミンは、バベシア類に対してin vitro及びin vivoで抗バベシア活性を示すことから、バベシア症に対する治療薬および予防剤としてヒトおよび家畜の臨床応用に用いることができる。

【 図 1 】



フロントページの続き

- (72)発明者 横山 直明
北海道帯広市稲田町西2線13番地 国立大学法人帯広畜産大学内
- (72)発明者 ダバスレン バトルジ
モンゴル国ウランバートル市ザイサン210153
- (72)発明者 モハマド アブレラ
エジプト共和国ミヌーフィーヤ県サダト市32897
- (72)発明者 大村 智
東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内
- (72)発明者 石山 亜紀
東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内
- (72)発明者 乙黒 一彦
東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内
- (72)発明者 岩月 正人
東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内
- (72)発明者 筏井 宏実
青森県十和田市東23番町35-1 北里大学内
- Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC51 MA01 MA04 NA14 ZB38 ZC61