

(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2021-176822

(P2021-176822A)

(43) 公開日 **令和3年11月11日(2021.11.11)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/421 (2006.01)	A 6 1 K 31/421	4 C 0 8 6
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02 1 7 1	
	A 6 1 P 33/02	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2020-81936 (P2020-81936)	(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	令和2年5月7日 (2020.5.7)	(71) 出願人	520158241 成田 絃一 宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内
		(71) 出願人	520159444 村田 敏拓 宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内
		(72) 発明者	菅沼 啓輔 北海道帯広市稲田町西2線11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】 トリパノソーマ症の治療薬及び予防薬

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、トリパノソーマの増殖を阻害する一方で、宿主細胞への毒性が低い薬剤を提供することを目的とするものである。

【解決手段】 本発明は 2 - (2 ' , 3 ' - d i m e t h o x y p h e n y l) - 5 - (2 ' ' - m e t o x y p h e n y l) o x a z o l e、その異性体、薬学的に許容される塩を有効成分とする抗トリパノソーマ、特に動物アフリカトリパノソーマの病原原虫である *Trypanosoma congolense* に有効な抗トリパノソーマ剤に関するものである。本発明の抗トリパノソーマ剤は、貧血・回帰熱・神経障害などのトリパノソーマ症の予防及び/又は治療に利用することができる。

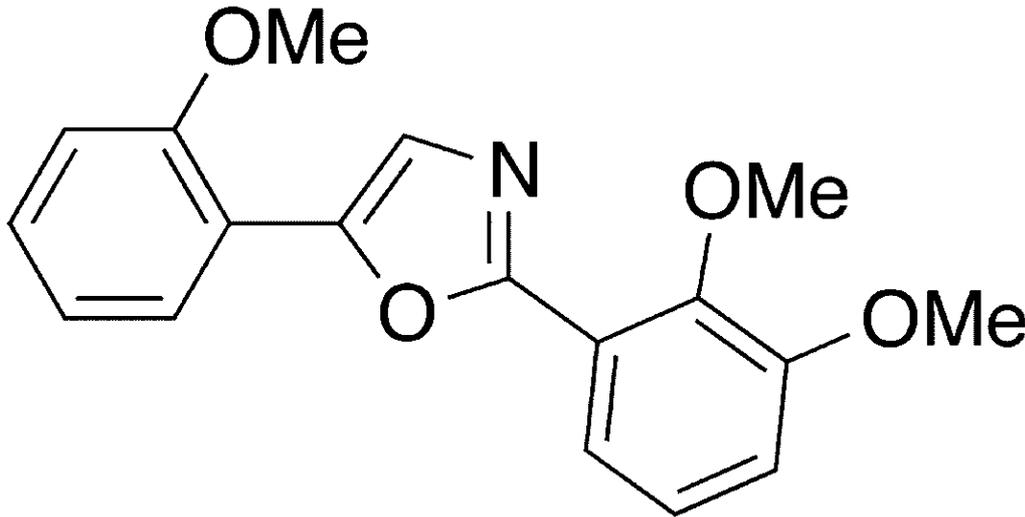
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 - (2 ' , 3 ' - d i m e t h o x y p h e n y l) - 5 - (2 ' ' - m e t o x y p h e n y l) o x a z o l e (化 1)、その異性体、薬学的に許容される塩を有効成分とする抗トリパノソーマ剤。

【化 1】



(I)

【請求項 2】

トリパノソーマの増殖阻止剤である、請求項 1 に記載の抗トリパノソーマ剤。

【請求項 3】

請求項 1 及び請求項 2 のいずれかに記載の抗トリパノソーマ剤を含む、トリパノソーマ症の治療及び / 又は予防のための医薬。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はトリパノソーマ症治療薬及び予防薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

トリパノソーマ (*Trypanosoma* spp.) はキネトプラスト綱に属する住血寄生性の原虫である。トリパノソーマはヒトに感染するヒトアフリカトリパノソーマ (*Human African Trypanosomes: Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. b. gambiense*) と動物トリパノソーマ (*Animal Trypanosomes: T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) に大別される。

40

【0003】

トリパノソーマ症はこれらのトリパノソーマが宿主哺乳類に感染することで引き起こされる致死性の原虫病である。トリパノソーマ症は病原トリパノソーマ種と宿主哺乳類によって、*T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* の感染により引き起こされるヒトアフリカトリパノソーマ症、*T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax* の感染により引き起こされるアフリカ動物トリパノソーマ症 (ナガ

50

ナ病)、T. evansiの感染により引き起こされるスーラ病及びT. equiperdumの感染により引き起こされる瘧疾(こうえき)に区別される。

【0004】

これらの疾病のうち、ヒト及び動物アフリカトリパノソーマ症は、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国で流行している。一方、スーラ病及び瘧疾は、世界各国で流行している。アフリカ動物トリパノソーマの中でも、T. congolenseは病原性が最も高い。

【0005】

多くのトリパノソーマは宿主血流中で増殖したのち、中枢神経系・脳脊髄液に寄生する。血流中に寄生している段階では貧血や回帰熱などの非特異症状を呈す。一方で病態が進行し、トリパノソーマが中枢神経系で増殖すると運動失調、麻痺、昏睡などの神経症状を呈し、最終的に死に至る(非特許文献1, 2)。

10

【0006】

トリパノソーマがその細胞表面に発現する抗原を高頻度かつランダムに変化させるため、トリパノソーマ症に対するワクチン開発は非常に困難であり現在有効なワクチンは存在しない。そのためトリパノソーマ症対策は診断後の適切な薬剤投与による治療が中心である。現在用いられている抗トリパノソーマ薬としては、ペンタミジン、スラミン、キナピラミン、メラルソプロールなどが用いられている(非特許文献1, 2)。

【0007】

しかしながら、ペンタミジンなどの既存薬剤の多くは開発から既に50年以上が経過している。不適切な投与や低品質な粗悪品の濫用によって薬剤耐性トリパノソーマ及び薬剤耐性トリパノソーマ症が複数報告されている。さらに有機ヒ素剤であるメラルソプロールの投与により反応性脳症など重篤な副作用が一定割合で発生する(非特許文献3)。

20

【0008】

新規薬剤開発に関連しては、従来から天然由来の抗トリパノソーマ活性化合物の探索が広く行われており、これまでに有力な候補化合物としてフラボノイドやキサントン、キノン、アルカロイドやセスキテルペノイド、大環状化合物から環状ペプチドに至るまで母骨格が多岐にわたる数多くの天然物が活性化合物として報告されている(非特許文献4)。発明者らはT. congolenseに対して生育阻害活性を示す植物由来成分として、モンゴル国薬用植物であるOxytropis lanataの根由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール類が有力であることを報告している(非特許文献5)。

30

【0009】

天然物由来化合物は、資源量に限りがあり、かつ阻害活性そのものが弱い、あるいは細胞毒性が高く選択毒性の観点からその有用性を立証できないことも多く、天然物由来化合物そのものの医薬品化は困難な場合が多い。

【0010】

既存薬に対する耐性原虫の出現、及び重篤な副作用を有す既存薬も存在していることから、副作用が少ない新規抗トリパノソーマ薬の開発が望まれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

40

【非特許文献1】Federica Giordani et al., Parasitology. 2016, 143: 1862 - 1889

【非特許文献2】Philippe Buscher et al., The Lancet. 2017, 390: 2397 - 2409

【非特許文献3】Rita Capela et al., International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 5748 - 5777

【非特許文献4】Cockram and Smith., J. Nat. Prod. 2018, 81: 2138 - 2154

【非特許文献5】Banzragchgarav et al., J. Nat. Prod

50

. 2016, 79: 2933 - 2940

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、トリパノソーマの増殖を阻害し、かつ宿主の細胞に対する毒性の低い抗トリパノソーマ剤を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

抗トリパノソーマ活性が報告されたモンゴルの薬用植物 *Oxytropis lanata* に由来する各種 2,5-diphenyloxazoles 関連化合物を基本骨格とした類縁化合物 47 種を合成した。各類縁化合物について抗トリパノソーマ活性を評価することで、特にナガナ病の病原体として最も重要な *T. congolense* に有効かつ細胞毒性を低下させた類縁化合物を見出し、本発明を完成させた。

10

【0014】

本発明は、以下の態様を含む。

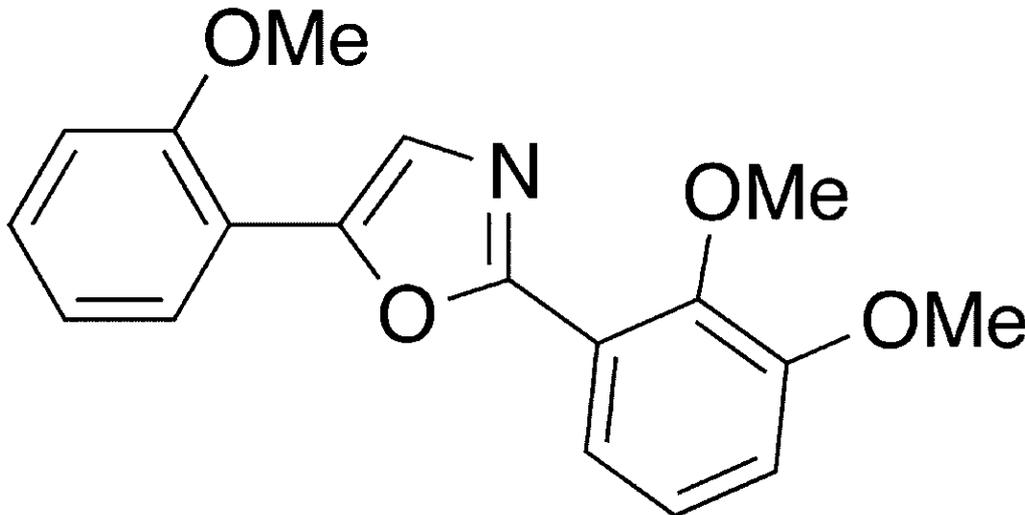
(1) 2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole (化1)、その異性体、薬学的に許容される塩を有効成分とする抗トリパノソーマ剤。

(2) トリパノソーマの増殖阻止剤である、(1)に記載の抗トリパノソーマ剤。

(3) (1)及び(2)のいずれかに記載の抗トリパノソーマ剤を含む、トリパノソーマ症の治療及び/又は予防のための医薬。

20

【化1】



(I)

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば 2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole はトリパノソーマ (*T. congolense*) の増殖を低濃度で阻害するとともに、細胞毒性は著しく低い。すなわち、*T. congolense* に対する選択性が高い。同化合物の阻害効果、細胞毒性及び選択性は、トリパノソーマ症治療薬開発に向けたヒット化合物評価の指標 (Nwaka and Hudson., Nature Reviews Drug Discovery. 20

50

06, 5:941-955) に準じている。本発明の抗トリパノソーマ薬は、動物アフリカトリパノソーマ症の予防及び/または治療に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】天然由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール類縁化合物1~4の合成経路を示している。また合成中間体として化合物9~12、13~16を得ている。

【図2】2, 5-ジフェニルオキサゾール1のオキサゾール骨格を修飾した化合物5~7および1のフェニル基の位置異性体である2, 4-ジフェニルオキサゾール8の合成経路を示している。また合成中間体として化合物17~20を得ている。

【図3】2, 5-ジフェニルオキサゾール21~43の合成経路を示している。

10

【図4】2, 5-ジフェニルオキサゾール44~47の合成経路を示している。

【発明を実施するための形態】

【0017】

A. 天然物由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール類縁化合物47種類の全合成

天然由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール1~4およびその類縁化合物の合成を行った。以下の図1~4を用いてそれぞれの化合物の合成経路について説明する。

図1において、天然由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール1~4の合成経路を示している。2, 5-ジフェニルオキサゾール骨格の構築についてはGaoらの手法(Wen-Gao et al., Org. Biomol. Chem., 2013, 11:7123-7128)を参考に行った。対応するプロモアセトフェノンおよびベンジルアミンを炭酸カリウムの存在下、ヨウ素で処理することで2, 5-ジフェニルオキサゾール9~12をそれぞれ合成した。次いで、三臭化ホウ素を用いて脱メチル化を行った後、アセチル基で保護することにより、アセチル体13~16を得た。最後に、酸性条件下、アセチル基を除去することで、天然物由来の2, 5-ジフェニルオキサゾール1~4を合成した。

20

【0018】

図2では2, 5-ジフェニルオキサゾール1のオキサゾール骨格を修飾した化合物5~7, 17~19および1のフェニル基の位置異性体である2, 4-ジフェニルオキサゾール8, 20の合成経路を示している。チアゾール5はアミノケトンX1および酸クロリドX2から得られるアミドX3をローソン試薬で処理した後、脱メチル化を行うことで合成した。1, 3, 4-オキサジアゾール6はヒドラジドX4およびカルボン酸X5から合成されるジヒドラジドX6を塩化ホスホリルで処理した後、脱メチル化を行うことで合成した。また、ジヒドラジドX6をローソン試薬で処理した後、脱メチル化を行うことで、1, 3, 4-チアジアゾール7を合成した。さらに、プロモアセトフェノンX7とカルボン酸X5から合成されるエステルX8を三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体存在下、アセトアミドで処理し、オキサゾール環を構築した後、脱メチル化を行い、2, 4-ジフェニルオキサゾール8を合成した。

30

【0019】

図1における化合物9~12の合成法と同様に種々のプロモアセトフェノンおよびベンジルアミンを組み合わせることで様々な置換様式を有する2, 5-ジフェニルオキサゾール21~39を合成した(図3)。また、合成した類縁化合物の中で2''位にベンジロキシ基を有するオキサゾール39のベンジル基を除去することで対応するフェノール40を得た。さらに、フェノール40に対し、塩基性条件下、種々のハロゲン化アルキルを作用させ、エトキシ体41, プロポキシ体42およびMOM体43をそれぞれ合成した。

40

【0020】

図4は2''位に窒素官能基を有する類縁化合物44~47の合成経路を示している。アミノケトンX9および酸クロリドX2より得られるアミドX10を塩化ホスホリルで処理することでニトロ基を有するオキサゾール44を合成した。次いで、オキサゾール44のニトロ基を還元することで対応するアミン45へと導いた。アミン45をヨウ化メチルで処理することでジメチルアミン46を合成し、塩化アセチルで処理することでアセトアミド47をそれぞれ合成した。

50

【0021】

このように合成した47種類の2,5-ジフェニルオキサゾール類縁化合物を表1にまとめると。

【表1】

化合物の構造式と名称

ID	名称	構造式	分子式	ID	名称	構造式	分子式
1	2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)oxazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	25	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-phenyl oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃
2	2-(2',5'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)oxazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	26	2-(2',4'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
3	2-phenyl-5-(2'',5''-dihydroxyphenyl)oxazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	27	2-(2',6'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
4	2-(2',5'-dihydroxyphenyl)-5-(2'',5''-dihydroxyphenyl)oxazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₅	28	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(3''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
5	2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)thiazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S	29	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(4''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
6	2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole		C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₄	30	2-(2'-methoxyphenyl)-5-(2'',5''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄
7	2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole		C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	31	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',3''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅
8	2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-4-(2''-hydroxyphenyl)oxazole		C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	32	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',4''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅
* 9	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	33	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',5''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅
10	2-(2',5'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	34	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',6''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅
11	2-phenyl-5-(2'',5''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	35	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',3'',4''-trimethoxyphenyl)oxazole		C ₂₀ H ₂₁ NO ₆
12	2-(2',5'-dimethoxyphenyl)-5-(2'',5''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅	36	2-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-5-(2'',3''-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₂₀ H ₂₁ NO ₆
13	2-(2',3'-diacetoxyphenyl)-5-(2''-acetoxyphenyl)oxazole		C ₂₁ H ₁₇ NO ₇	37	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-5-(naphthalen-2-yl)oxazole		C ₂₁ H ₁₇ NO ₃
14	2-(2',5'-diacetoxyphenyl)-5-(2''-acetoxyphenyl)oxazole		C ₂₁ H ₁₇ NO ₇	38	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(o-tolyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₃
15	2-phenyl-5-(2'',5''-diacetoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₅ NO ₅	39	5-(2''-(benzyl oxy)phenyl)-2-(2',3'-dimethoxyphenyl)oxazole		C ₂₄ H ₂₁ NO ₄
16	2-(2',5'-diacetoxyphenyl)-5-(2'',5''-diacetoxyphenyl)oxazole		C ₂₃ H ₁₉ NO ₉	40	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₄
17	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)thiazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₃ S	41	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-ethoxyphenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₄
18	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole		C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₄	42	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-propoxyphenyl)oxazole		C ₂₀ H ₂₁ NO ₄
19	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole		C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	43	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-[2''-(methoxymethoxy)phenyl]oxazole		C ₁₉ H ₁₉ NO ₅
20	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-4-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	44	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-nitrophenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₅
21	2-(2'-methoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	45	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-aminophenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₃
22	2-(3'-methoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	46	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-N,N-dimethylaminophenyl)oxazole		C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃
23	2-(3'-methoxyphenyl)-5-(3''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	47	2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-acetamidophenyl)oxazole		C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄
24	2-(4'-methoxyphenyl)-5-(4''-methoxyphenyl)oxazole		C ₁₇ H ₁₅ NO ₃				

*本発明の化合物

【0022】

B. 抗トリパノソーマ活性試験

各種ヒト及び動物トリパノソーマ(表2)に対する種類の各種化合物の抗トリパノソーマ活性を、Suganumaらの方法(Suganuma et al., Journal of

l of Veterinary Medical Scinence . 2 0 1 4 , 7 6 (1 1) : 1 4 3 7 - 1 4 4 1) に準じて細胞の内在性のATPを生物発光として定量し、生細胞数を測定するCell Titer Glo試薬 (Promega) を用いて評価した。各種化合物は段階希釈し、各濃度における増殖阻害率を計算することで、これらの化合物の各種トリパノソーマに対する50%発育阻害濃度 (IC₅₀) を算出した (表3)。

【表2】

使用したトリパノソーマと動物細胞について

<i>Trypanosoma</i> /Cell	病名	宿主/由来
<i>T. congolense</i> IL3000 strain (Tc)	ナガナ病	哺乳動物
<i>T. brucei brucei</i> GuTat3.1 strain (Tbb)	ナガナ病	動哺乳動物
<i>T. evansi</i> Tansui strain (Tev)	スーラ病	哺乳動物
<i>T. b. rhodesiense</i> IL1501 strain (Tbr)	ヒトアフリカ睡眠病 (急性型)	ヒト、哺乳動物
<i>T. b. gambiense</i> IL1922 strain (Tbg)	ヒトアフリカ睡眠病 (慢性型)	ヒト
MDBK (ウシ腎臓細胞株)		ウシ

【表 3】

抗トリパノソーマ活性試験及び細胞毒性試験の結果

ID	IC ₅₀ (µg/mL)					
	Tbb	Tbg	Tbr	Tc	Tev	MDBK
1	2.44	3.63	0.77	0.3	1.27	1.89
2	6.96	21.78	22.68	2.56	5.98	20.85
3	5.21	4.5	4.58	1.19	3.09	1.9
4	15.61	22.35	20.58	2.47	12.68	6.46
5	2.21	2.33	2.23	0.65	1.15	5.7
6	0.51	0.52	0.51	0.18	0.22	1.59
7	1.12	1.3	1.27	0.24	0.62	3.89
8	0.35	0.43	0.41	0.23	0.11	2.62
9*	>25	>25	>25	0.24	>25	>100
10	>25	>25	>25	>25	>25	>100
11	>25	>25	>25	4.32	>25	>100
12	>25	>25	>25	1	>25	>100
13	1.81	2.57	1	0.32	2.2	2.1
14	13.29	21.88	22.15	5.71	13.42	25.38
15	5.59	14.15	21.72	1.33	6.36	3.25
16	15.94	22.57	21.49	7.63	20.29	13.61
17	10.47	10.29	9.68	1.85	10.11	37.48
18	4.15	4.14	4.18	0.84	2.33	10.08
19	9.79	7.24	8.94	1.24	9.23	>100
20	11.87	12.05	9.84	2.93	11.79	>100
21	>25	>25	>25	0.78	>25	>100
22	>25	>25	>25	1.88	>25	45.32
23	17.5	18.82	18.71	6.01	17.29	>100
24	>25	>25	>25	>25	>25	>100
25	24.37	23.83	23.66	1.13	23.35	11.42
26	23.45	11.14	18.43	4.76	23.42	18.52
27	6.14	7.66	5.73	1.65	6.44	11.69
28	23.65	23.01	23.7	3.22	23.03	29.97
29	23.79	23.19	23.96	5.37	20.5	7.11
30	>25	6.92	>25	1.33	>25	>100
31	23.89	23.63	23.96	9.01	23.15	30.99
32	12.09	10.65	9.79	0.53	9.62	>100
33	>25	>25	>25	0.53	>25	>100
34	10.78	8.82	10.98	2.62	9.09	31.27
35	24.12	23.54	24.14	8.78	23.37	36.81
36	23.79	23.45	23.94	19.03	4.91	>100
37	23.7	17.12	23.76	15.17	22.94	14.15
38	11.55	11.81	11.81	0.87	10.63	16.79
39	6.01	6.29	6.13	2.99	6.49	37.79
40	>25	>25	>25	>25	>25	>100
41	>25	>25	>25	1.44	>25	>100
42	6.89	9.58	9.18	2.57	9.64	>100
43	7.34	6.68	8.96	1.75	8.82	28.07
44	16.17	20.68	18.41	2.74	16	>100
45	13.09	13.91	18.41	2.69	31.19	14.12
46	6.62	11.43	7.56	1.51	8.02	>100
47	>25	>25	>25	12.91	>25	>100
スラミン	0.09	0.09	0.11	10.25	0.54	-

*本発明の化合物

【 0 0 2 3 】

C . 動物細胞に対する毒性試験

ウシ腎臓由来細胞であるMDBK細胞に対する種類の各種化合物の細胞毒性を、Molefeらの方
法 (Molefe et al., Parasitology Research, 2017, 116: 2407-2415) に準じて細胞の内在性の脱水素酵素活
性を還元型ホルマザン色素の吸光度として定量し、生細胞数を測定するCell Counting Kit-8試薬 (同仁化学研究所) を用いて評価した。各種化合物は段階希
釈し、各濃度における増殖阻害率を計算することで、これらの化合物のMDBK細胞に対
する50%発育阻害濃度 (IC₅₀) を算出した (表3)。抗トリパノソーマ薬の選択性

の指標としてトリパノソーマに対する IC_{50} / 細胞に対する IC_{50} 比を求めた (表 4)。

【表 4】

選択性

ID	トリパノソーマ IC_{50} / MDBK 細胞 IC_{50}				
	Tbb	Tbg	Tbr	Tc	Tev
1	0.77	0.52	2.46	6.32	1.48
2	2.99	0.96	0.92	8.16	3.49
3	0.36	0.42	0.42	1.6	0.61
4	0.41	0.29	0.31	2.62	0.51
5	2.58	2.44	2.56	8.77	4.95
6	3.1	3.08	3.09	8.82	7.24
7	3.47	2.99	3.07	15.95	6.33
8	7.51	6.12	6.44	11.46	23.1
9*	ND	ND	ND	>414.00	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	>100.30	ND
13	1.16	0.82	2.1	6.63	0.96
14	1.91	1.16	1.15	4.45	1.89
15	0.58	0.23	0.15	2.45	0.51
16	0.85	0.6	0.63	1.78	0.67
17	3.58	3.64	3.87	20.24	3.71
18	2.43	2.44	2.41	12.01	4.32
19	10.22	13.81	11.19	80.36	10.83
20	>8.42	>8.30	>10.16	>34.15	>8.48
21	ND	ND	ND	>127.72	ND
22	<1.82	<1.82	<1.82	24.16	<1.82
23	5.71	5.31	5.35	16.64	5.78
24	ND	ND	ND	ND	ND
25	0.47	0.48	0.48	10.11	0.49
26	0.79	1.66	1	3.89	0.79
27	1.9	1.53	2.04	7.09	1.82
28	1.27	1.3	1.26	9.31	1.3
29	0.3	0.31	0.3	1.32	0.35
30	ND	>14.45	ND	>75.00	ND
31	1.3	1.31	1.29	3.44	1.34
32	>8.27	>9.39	>10.21	>189.62	>10.39
33	ND	ND	ND	>187.67	ND
34	2.9	3.54	2.85	11.94	3.44
35	1.53	1.56	1.53	4.19	1.58
36	>4.20	>4.26	>4.18	>5.25	>20.36
37	0.6	0.83	0.6	0.93	0.62
38	1.45	1.42	1.42	19.25	1.58
39	6.29	6.01	6.16	12.66	5.83
40	ND	ND	ND	ND	ND
41	ND	ND	ND	>69.37	ND
42	>14.52	>10.44	>10.89	>38.93	>10.37
43	3.83	4.2	3.13	16.08	3.18
44	>6.18	>4.84	>5.43	>36.48	>6.25
45	1.08	1.01	0.77	5.24	0.45
46	>15.11	>8.75	>13.23	>66.44	>12.47
47	ND	ND	ND	>7.75	ND

*本発明の化合物

【0024】

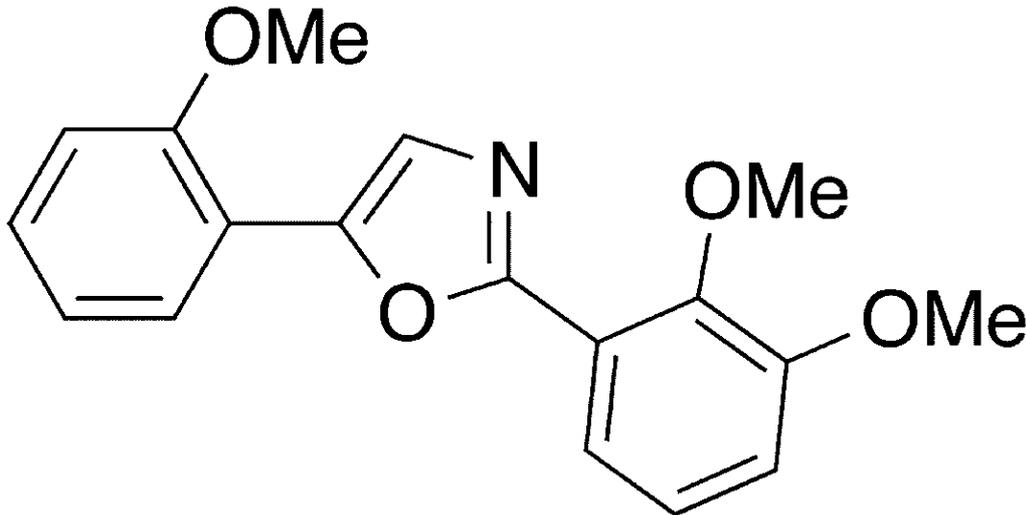
以上の結果より、類縁化合物 9 : 2 - (2 ' , 3 ' - dimethoxyphenyl) - 5 - (2 ' ' - methoxyphenyl) oxazole が特に T . congolense に対して高い増殖抑制活性 (IC_{50} : 0 . 24 μ g / mL) と低い細胞毒性 (IC_{50} : > 100 μ g / mL) を示し、その結果から高い選択性 (> 414) を有していることが明らかとなった。さらに 2 , 5 - ジフェニルオキサゾール類縁化合物のメトキシ化によって細胞毒性が低下すること、化合物の水酸基の数及び位置と抗トリパノソーマ

活性間に相関が認められた。またこれらの化合物の中で 2' ' 位の官能基の分子量が抗トリパノソーマ活性と細胞毒性のバランスに重要であることが示唆された。

【 0 0 2 5 】

本発明の第一の態様は、下記式 (I) で表される化合物、その異性体、薬学的に許容される塩を有効成分とする抗トリパノソーマ剤に関する。

【 化 1 】



(I)

【 0 0 2 6 】

「異性体」は、式 (I) で表される化合物において存在し得る配座異性体などを意味する。

【 0 0 2 7 】

式 (I) で表される化合物の薬学的に許容される塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸およびリン酸などの鉱酸との塩；ギ酸、酢酸、シュウ酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸および酒石酸などのカルボン酸との塩；アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性アミノ酸との塩；並びにメタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ヒドロキシベンゼンスルホン酸およびナフタレンスルホン酸などのスルホン酸との塩などの無機酸および有機酸との塩などを挙げることができる。

【 0 0 2 8 】

本発明との関連で抗トリパノソーマ剤とは、トリパノソーマの増殖抑制及び殺滅、宿主組織からのトリパノソーマの駆除など、トリパノソーマの数及び/又はその活動の抑制、低減、停止などのために用いられる剤をいう。

【 0 0 2 9 】

式 (I) で表される化合物は、そのまま抗トリパノソーマ剤として利用してもよく、さらに賦形剤、結合剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、固結・付着防止剤、滑沢剤、吸収・吸着担体、溶剤、増量剤、等張化剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、増粘剤、被覆剤、吸収促進剤、ゲル化・凝固促進剤、光安定化剤、保存剤、防湿剤、乳化・懸濁・分散安定化剤、着色防止剤、脱酸素・酸化防止剤、矯味・矯臭剤、着色剤、起泡剤、消泡剤、無痛化剤、帯電防止剤、緩衝・pH調節剤などの各種添加物を配合して抗トリパノソーマ剤又はこれを含む医薬若しくは医薬組成物として利用してもよい。

【 0 0 3 0 】

本発明の第二の態様は、第一の態様の抗トリパノソーマ剤を含む、トリパノソーマ症の

治療及び / 又は予防のための医薬に関する。

【 0 0 3 1 】

本発明との関連でトリパノソーマ症とは、トリパノソーマの感染、又は感染により引き起こされるあらゆる症状若しくは状態をいう。本発明の医薬は、かかる感染又はこれに伴う症状若しくは状態の治癒、寛解、改善、予防のために恒温動物に投与することで使用される

【 0 0 3 2 】

本発明の医薬は、トリパノソーマに感染し得る全ての恒温動物を対象として適用することができる。そのような恒温動物の例としては、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、サルその他の非ヒト哺乳動物及びヒトを挙げることができる。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の医薬の剤形としては、経口剤（錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤など）、注射剤、坐剤、外用剤（軟膏剤、貼付剤など）、エアゾール剤などを挙げることができる。

【 0 0 3 4 】

錠剤、散剤、顆粒剤などの経口用固形製剤は、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、無水第二リン酸カルシウム、部分アルファ化デンプン、コンスタチ及びアルギン酸などの賦形剤；単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、水及びエタノールなどの結合剤；乾燥デンプン、アルギン酸、寒天末、デンプン、架橋ポリビニルピロリドン、架橋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及びデンプングリコール酸ナトリウムなどの崩壊剤；ステアリルアルコール、ステアリン酸、カカオバター及び水素添加油などの崩壊抑制剤；ケイ酸アルミニウム、リン酸水素カルシウム、酸化マグネシウム、タルク、無水ケイ酸などの固結防止・付着防止剤；カルナバロウ、軽質無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム、硬化油、硬化植物油誘導体、胡麻油、サラシミツロウ、酸化チタン、乾燥水酸化アルミニウムゲル、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、リン酸水素カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びポリエチレングリコールなどの滑沢剤；第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウム、尿素及び酵素などの吸収促進剤；デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、無水ケイ酸、含水二酸化ケイ素、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム及びコロイド状ケイ酸などの吸収・吸着担体といった固形製剤化医薬用添加物を用い、常法に従い調製すればよい。

20

30

【 0 0 3 5 】

さらに錠剤は、必要に応じ、通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、胃溶性被覆錠、腸溶性被覆錠及び水溶性フィルムコティング錠とすることができる。

【 0 0 3 6 】

カプセル剤は、上記で例示した各種の医薬を、硬質ゼラチンカプセル及び軟質カプセルなどに充填して調製される。

40

【 0 0 3 7 】

また、溶剤、増量剤、等張化剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、増粘剤などの上記した各種の液体製剤化用添加物を用い、常法に従い調製して、水性又は油性の懸濁液、溶液、シロップ及びエリキシル剤とすることもできる。

【 0 0 3 8 】

注射剤は、例えば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸及び水酸化ナトリウムなどの希釈剤

50

；クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム及びリン酸ナトリウムなどのpH調整剤及び緩衝剤；ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコ-ル酸及びチオ乳酸などの安定化剤；食塩、ブドウ糖、マンニト-ル又はグリセリンなどの等張化剤；カルボキシメチルセルロ-スナトリウム、プロピレングリコ-ル、安息香酸ナトリウム、安息香酸ベンジル、ウレタン、エタノ-ルアミン、グリセリンなどの溶解補助剤；グルコン酸カルシウム、クロロブタノ-ル、ブドウ糖、ベンジルアルコ-ルなどの無痛化剤；及び局所麻酔剤などの液体製剤化用の医薬品添加物を用い、常法に従い調製すればよい

【0039】

本発明の医薬の投与方法は特に限定されないが、製剤の形態に応じて適宜決定される。例えば、非経口製剤である場合は、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与などを挙げることができる。好ましい実施形態の一つにおいて、本発明の抗トリパノソーマ剤は、経口投与、静脈内投与により生体に投与される。

10

【0040】

本発明の医薬の投与量は、投与された対象において治療及び/又は予防効果を奏する量、すなわち有効量であればよい。有効量は対象となる動物の種類、症状の程度、ヒトにあっては患者の年齢、性別、疾患の形態その他の条件などに応じて適宜選択されるが、通常成人に対して体重1kgあたり10 μ g~2000 μ g、好ましくは50 μ g~1000 μ g、より好ましくは100 μ g~500 μ gであり、これを1日に1回若しくは複数回に分けて、又は間歇的に投与することができる。

【0041】

本発明の第三の態様は、第二の態様の医薬の有効量を対象に投与することを含む、トリパノソーマ症を治療及び/又は予防する方法に関する。

20

【0042】

以下、非限定的な実施例を示して、本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0043】

<実験材料>

(1)化合物

天然由来の2,5-ジフェニルオキサゾールを含む47種類の類縁化合物(表1)を図1~4に示す合成経路に基づき合成し、以下の実験に用いた。

30

【0044】

(2)トリパノソーマ及び動物細胞

表2に示した各種ヒト及び動物トリパノソーマを用いて、Hirumiらの方法(Hirumi et al., Parasitology, 1991, 2: 224-236)に準じて培養維持した。一方、表2に示したウシ腎臓細胞(MDBK細胞)を用いて、Molefeらの方法(Molefe et al., Parasitology Research, 2017, 116(9): 2407-2415)に準じて培養維持した。

【0045】

<実施例1>

1.抗トリパノソーマ活性試験

40

各種トリパノソーマをSuganumaらの方法に準じて96ウェルオプティカルボトムマイクロプレート(Nunc)中で各種濃度に調整した薬剤入り培養液と混和し、三日間培養維持した。その後、Cell Titer Glo(Promega)を各ウェルに添加し混和したのち、発光プレートリーダーを用いて各ウェルの生物発光値を計測した。陰性コントロールと各濃度の発光値から発育阻害率を算出したのち、50%発育阻害濃度(IC₅₀)を算出した。なお陰性コントロールには薬剤の溶媒(DMSO)を用いた。(表3)

【0046】

2.細胞毒性試験

MDBK細胞を表2の終濃度になるように適宜培養液で希釈したのち、Molefeら

50

の方法に準じて96ウェルマイクロプレート(Nunc)中で各種濃度に調整した薬剤入り培養液と混和し、三日間培養維持した。その後、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を添加し混和したのち、吸光プレートリーダーを用いて各ウェルの450nm吸光値を計測した。なお吸光値はCell Counting Kit-8添加直後(T0)及び37度で4時間静置したのち(T4)の二回計測した。T4とT0の吸光値の差分を算出し、陰性コントロールと各濃度の吸光値から発育阻害率を算出したのち、IC₅₀を算出した。なお陰性コントロールには薬剤の溶媒(DMSO)を用いた。(表3)

【0047】

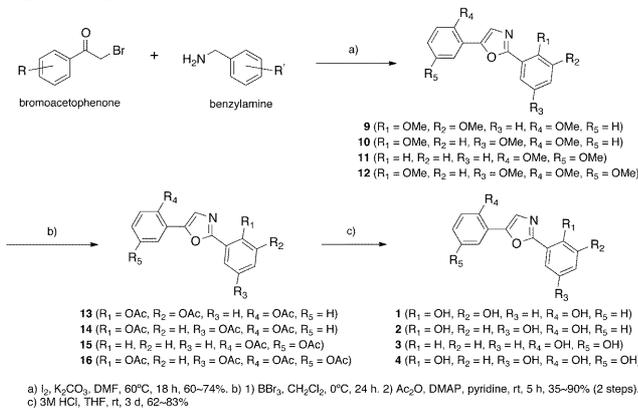
3. 選択指数の算出

抗トリパノソーマ薬の選択性の指標として、トリパノソーマに対するIC₅₀/細胞に対するIC₅₀を求めた(表4)。

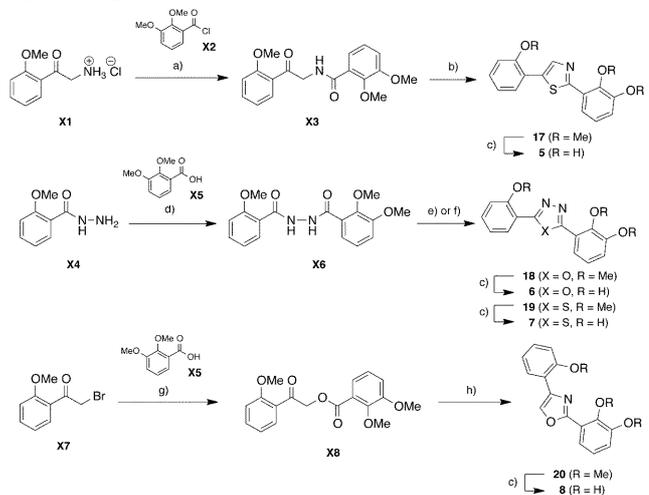
【0048】

以上の結果より、類縁化合物9:2-(2',3'-dimethoxyphenyl)-5-(2''-methoxyphenyl)oxazoleが特にT.congolenseに対して高い増殖抑制活性(IC₅₀:0.24μg/mL)と低い細胞毒性(IC₅₀:>100μg/mL)を示し、その結果から高い選択性(>414)を有していることが明らかとなった。さらに2,5-ジフェニルオキサゾール類縁化合物のメトキシ化によって細胞毒性が低下すること、化合物の水酸基の数及び位置と抗トリパノソーマ活性間に相関が認められた。またこれらの化合物の中で2''位の官能基の分子量が抗トリパノソーマ活性と細胞毒性のバランスに重要であることが示唆された。

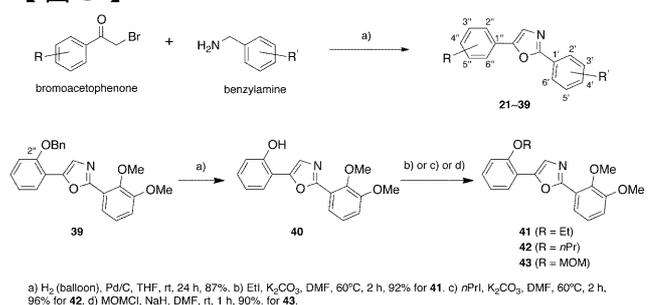
【図1】



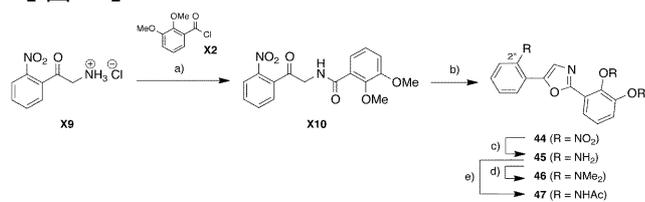
【図2】



【図3】



【 図 4 】



a) **X2**, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 16 h, 45%. b) POCl₃, reflux, 3 h, 89%. c) H₂ (balloon), Pd/C, MeOH, rt, 1 h, 77%.
d) MeI, K₂CO₃, 60°C, 24 h, 70%. e) AcCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 3 h, 87%.

フロントページの続き

(72)発明者 成田 紘一

宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内

(72)発明者 村田 敏拓

宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC69 MA01 MA04 NA14 ZB38