

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3904364号

(P3904364)

(45) 発行日 平成19年4月11日(2007.4.11)

(24) 登録日 平成19年1月19日(2007.1.19)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 493/08 (2006.01)

C O 7 D 493/08

C

A 6 1 K 31/357 (2006.01)

A 6 1 K 31/357

A 6 1 P 33/06 (2006.01)

A 6 1 P 33/06

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2000-58736 (P2000-58736)
 (22) 出願日 平成12年3月3日(2000.3.3)
 (65) 公開番号 特開2001-247575 (P2001-247575A)
 (43) 公開日 平成13年9月11日(2001.9.11)
 審査請求日 平成15年7月23日(2003.7.23)

(73) 特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 井原 正隆
 宮城県仙台市太白区緑ヶ丘3-34-17
 (72) 発明者 高須 清誠
 宮城県仙台市太白区八本松1-13-11
 -1329
 (72) 発明者 綿矢 有佑
 岡山県岡山市門田屋敷2-2-58-10
 2
 (72) 発明者 金 恵淑
 岡山県岡山市津島桑の木町6-1-314
 最終頁に続く

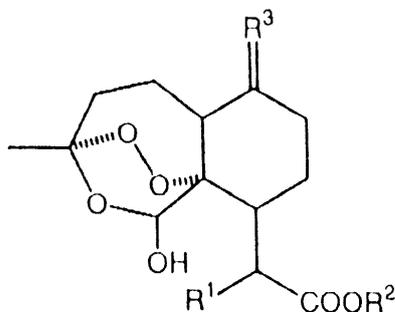
(54) 【発明の名称】 抗マラリア活性を有する新規化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式(I)

【化1】



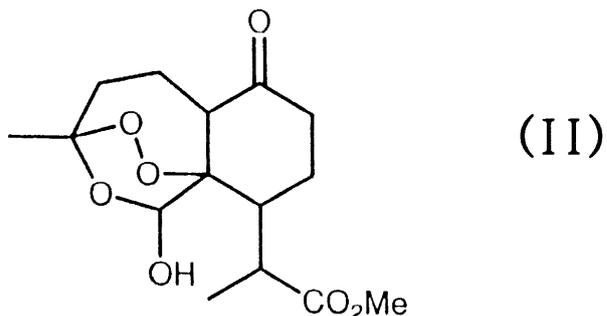
(I)

[式中、 R^1 は、水素原子又は分枝を有してもよいC1～C6のアルキル基を表し、 R^2 は、水素原子、分枝を有してもよいC1～C6のアルキル基又は置換基を有してもよいアール基を表し、 R^3 は、酸素原子、硫黄原子、 NR^4 (R^4 は水素原子もしくは分枝を有してもよいC1～C6のアルキル基)又は CR^5_2 (R^5 は互いに独立して水素原子もしくは分枝を有してもよいC1～C6のアルキル基)]で示される化合物。

【請求項2】

一般式 (I) で示される化合物が、次式 (II) で示される 12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンであることを特徴とする請求項 1 記載の化合物。

【化 2】

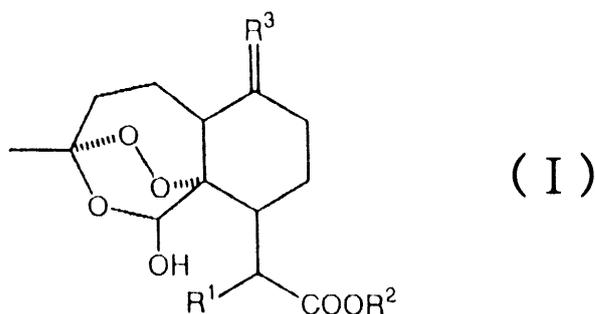


10

【請求項 3】

一般式 (I)

【化 3】



20

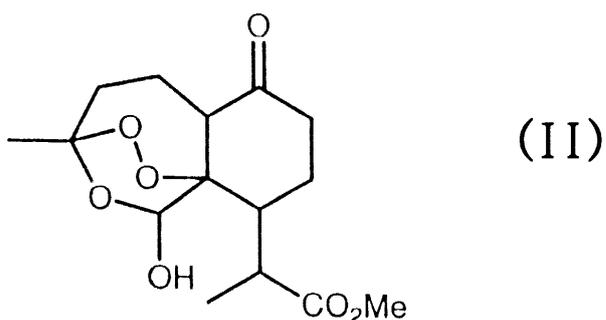
[式中、R¹は、水素原子又は分枝を有してもよいC 1 ~ C 6 のアルキル基を表し、R²は、水素原子、分枝を有してもよいC 1 ~ C 6 のアルキル基又は置換基を有してもよいアール基を表し、R³は、酸素原子、硫黄原子、NR⁴ (R⁴は水素原子もしくは分枝を有してもよいC 1 ~ C 6 のアルキル基) 又はCR⁵₂ (R⁵は互いに独立して水素原子もしくは分枝を有してもよいC 1 ~ C 6 のアルキル基)] で示される化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗マラリア剤。

30

【請求項 4】

一般式 (I) で示される化合物が、次式 (II) で示される 12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンであることを特徴とする請求項 3 記載の抗マラリア剤。

【化 4】



40

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗マラリア活性を有する新規化合物及び該新規化合物を有効成分として含有する抗マラリア剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

マラリアはハマダラカ *Anopheles* spp. によってヒトからヒトに媒介され、蚊の唾液と共に孢子小体の形で人体に注入されたマラリア原虫は肝細胞内に入り、赤外型（組織型）原虫となって増殖し、10～14日後に分裂小体となって流血中に感染し、栄養体、分裂体と成長する無性生殖をとおして増殖する。成熟した分裂体の中に植物の種子に相当する分裂小体ができ、これがこぼれて次の赤血球に入って再び無性生殖を繰り返す。一部の分裂小体は無性生殖をしないで雌雄の生殖母体となるが、ヒト体内ではそれ以上増殖できず、蚊の体内に入って初めて雌雄の生殖体となり接合して有性生殖を営む。いくつかの段階をへて孢子嚢に成熟するとその中に無数の孢子小体ができ、それが蚊の吸血時その唾液とともにヒトに感染する。ヒトに感染するマラリア原虫には熱帯熱、三日熱、卵形、及び四日熱マラリア原虫の4種類があるが、世界中で患者数2～3億人、死者年間2～3百万人と推定されている。近年、殺虫剤耐性の蚊やクロロキン耐性のマラリア原虫が出現し、対策が困難となっている。

10

【0003】

従来、抗マラリア剤又は抗マラリア化合物としては、特開2000-7673号公報記載の2個の複素環を含有するオルソ-縮合系の新規化合物や、特開平11-228446号公報記載のICAM-1発現抑制作用を有する化合物を有効成分として含有する抗マラリア剤や、特開平11-228422号公報記載の5-*o*-スルファモイル-2-クロロアデノシン等のヌクレオシド誘導體等を有効成分として含有する抗マラリア剤や、特開平11-228408号公報記載のトリコテセン類等を有効成分として含有する抗マラリア剤や、特開平10-265382号公報記載のシクロプロジギオシン等を有効成分とする抗マラリア剤や、特開平8-231401号公報記載のリミノフェナジンを有効成分として含有するマラリア予防又は治療薬や、特開平8-73355号公報記載のキノリン誘導體等を有効成分として含有する抗マラリア薬耐性克服剤や、特開平8-59471号公報記載の5-フルオロオロチン酸及びスルファモノメトキシンを有効成分とする抗マラリア剤や、特開平7-82165号公報記載の黄耆、桂皮、地黄、芍薬、川きゅう、蒼朮、当帰、人参、茯苓及び甘草、又はこれらの抽出物を有効成分として含有する抗マラリア剤や、特開平6-157308号公報記載のテトラピロール誘導體等を有効成分とする抗マラリア剤や、特開平5-97665号公報記載の15-デオキシスバガリン等を有効成分とする抗マラリア剤等が知られている。

20

30

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

マラリアは毎年2～3億人に感染し、2～3百万人が死亡している重大な感染症である。さらに、マラリアの特効薬として多用されてきたクロロキンに耐性をもつマラリア原虫の出現が深刻な問題となっており、有効な治療薬の開発が急務とされている。キク科植物から単離されるトリオキサ構造を持つアルテミシニンは、クロロキン耐性マラリア原虫に対して有効であり、現在、この天然由来の化合物が治療薬として使われている。しかしながら、アルテミシニンに対しても耐性を示すマラリア原虫がすでに現れており、このことがさらに問題となっている。本発明の課題は、抗マラリア活性を有する新規化合物及び該新規化合物を有効成分として含有する抗マラリア剤を提供することにある。

40

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するためにアルテミシニン類縁体の合成について鋭意研究し、分子内ディールス・アルダー反応によって合成した双環性のオレフィンより光酸素酸化反応を利用して合成した12-ヒドロキシ-2-(1-メトキシカルボニルエチル)-5-オキソ-10,11,13-トリオキサトリシクロ[7.2.0.0^{1,6}]トリデカン

50

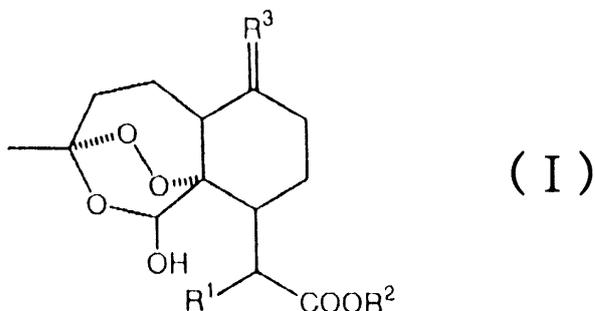
が、非常に高い抗マラリア活性と選択毒性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち本発明は、次の一般式(I) [式中、 R^1 は、水素原子又は分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基を表し、 R^2 は、水素原子、分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基又は置換基を有してもよいアリール基を表し、 R^3 は、酸素原子、硫黄原子、N R^4 (R^4 は水素原子もしくは分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基)又はC R^5_2 (R^5 は互いに独立して水素原子もしくは分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基)]で示される化合物(請求項1)や、

【0007】

【化5】



10

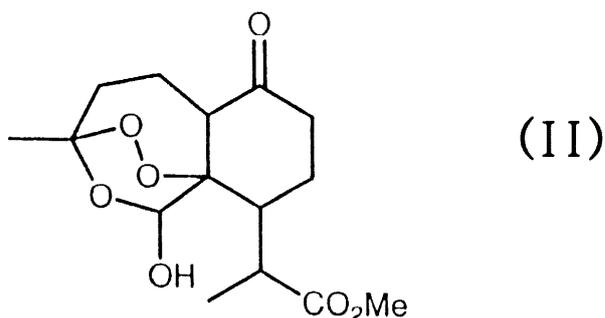
20

【0008】

一般式(I)で示される化合物が、次式(II)で示される12-ヒドロキシ-2-(1-メトキシカルボニルエチル)-5-オキソ-10,11,13-トリオキサトリシクロ[7.2.0.0^{1,6}]トリデカンであることを特徴とする請求項1記載の化合物(請求項2)に関する。

【0009】

【化6】



30

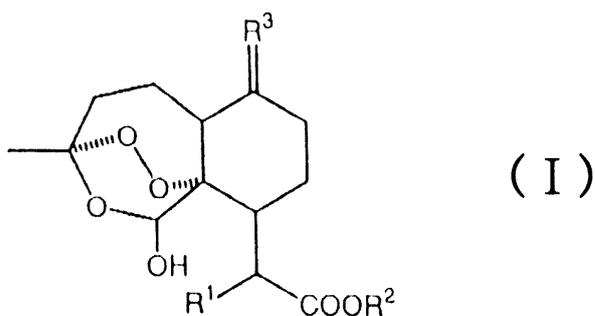
【0010】

また本発明は、次の一般式(I) [式中、 R^1 は、水素原子又は分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基を表し、 R^2 は、水素原子、分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基又は置換基を有してもよいアリール基を表し、 R^3 は、酸素原子、硫黄原子、N R^4 (R^4 は水素原子もしくは分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基)又はC R^5_2 (R^5 は互いに独立して水素原子もしくは分枝を有してもよいC1~C6のアルキル基)]で示される化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗マラリア剤(請求項3)や、

【0011】

【化7】

40



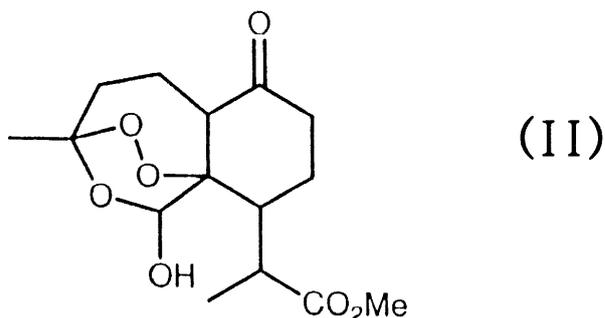
10

【0012】

一般式 (I) で示される化合物が、次式 (II) で示される 12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンであることを特徴とする請求項 3 記載の抗マラリア剤 (請求項 4) に関する。

【0013】

【化 8】



20

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の一般式 (I) で示される化合物中、R¹は、水素原子又は分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基を表し、分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、イソプロピル基、t - ブチル基等を具体的に例示することができる。また、R²は、水素原子、分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基又は置換基を有してもよいアリール基を表し、分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、イソプロピル基、t - ブチル基等を、アリール基としては、フェニル基、トリル基、ナフチル基等をそれぞれ具体的に例示することができる。また、アリール基における置換基としては分枝を有してもよい C 1 ~ 6 のアルキル基、分枝を有してもよい C 1 ~ 6 のアルコキシ基等を例示することができる。

30

【0015】

また、本発明の一般式 (I) で示される化合物中、R³は、酸素原子、硫黄原子、NR⁴ (R⁴は水素原子もしくは分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基) 又は CR⁵₂ (R⁵は互いに独立して水素原子もしくは分枝を有してもよい C 1 ~ C 6 のアルキル基) を表す。NR⁴における R⁴としては、水素原子、メチル基、エチル基、イソプロピル基、t - ブチル基等を具体的に例示することができる。また、CR⁵₂における R⁵としては、水素原子、メチル基、エチル基、イソプロピル基、t - ブチル基等を具体的に例示することができ、これら 2 つの R⁵は同一あるいは異なっていてもよい。

40

【0016】

これら一般式 (I) で示される化合物の中でも、優れた抗マラリア活性を有する式 (II) で示される 12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンが抗マラリア活

50

性及び選択毒性の点で好ましい。

【0017】

また、本発明の一般式 (I) で示される化合物や、式 (II) で示される 12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンの製造方法は特に限定されるものではなく、例えば 1, 4 - ブタンジオール誘導体から数工程の公知の合成反応を行い、合成したトリエンを、デス - マーティン (Dess-Martin) 酸化、続く分子内ディールス・アルダー (Diels-Alder) 反応により立体選択的にシステカロンに変換し、次いで塩基処理した後に、一重項酸素酸化 - 空気酸化 (Rothの方法) に付すことでパーオキサイド体として得ることができる。

10

【0018】

本発明化合物を、マラリア原虫類による感染症の予防、抑制及び治療に使用する場合、投与経路としては、経口、皮下注射、静脈注射、局所投与等のいずれでもよい。また、製剤としては、通常、製薬的に許容される担体、賦形剤、その他添加剤を用いて製造した散剤、錠剤、細粒剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤等の経口剤、点眼剤、注射剤、坐剤等の非経口剤を挙げることができる。製薬的に許容される担体や賦形剤、その他添加剤としては、グルコース、ラクトース、ゼラチン、マンニトール、でんぷんペースト、トリケイ酸マグネシウム、コーンスターチ、ケラチン、コロイド状シリカ等があり、さらには、安定剤、増量剤、着色剤及び芳香剤の様な補助剤を含有してもよい。これらの製剤は、各々当業者に公知慣用の製造方法により製造できる。また、1日当たりの投与量は、患者の症状、体

20

【0019】

【実施例】

以下本発明を実施例に基づき説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

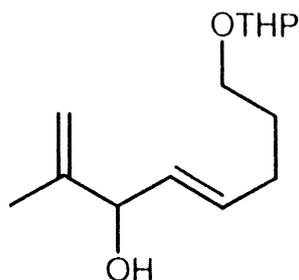
実施例 1 [12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンの製造]

12 - ヒドロキシ - 2 - (1 - メトキシカルボニルエチル) - 5 - オキソ - 10, 11, 13 - トリオキサトリシクロ [7.2.0.0^{1,6}] トリデカンを、(4E) - 7 - メチル - 1 - テトラヒドロピラノキシ - 4, 7 - オクタジエン - 6 - オールを出発物質として合成した。なお、次式 (1) に示す出発物質である (4E) - 7 - メチル - 1 - テトラヒドロピラノキシ - 4, 7 - オクタジエン - 6 - オールは、文献 (the Journal of Organic Chemistry, Vol. 51, 4023-4028, 1986) 記載の方法により合成した。

30

【0020】

【化9】



(1)

40

【0021】

実施例 1 - 1 [新規物質 (4E) - 7 - メチル - 6 - プロパノイロキシ - 1 - テトラヒドロピラノキシ - 4, 7 - オクタジエン - 6 - オールの合成]

7.26 g の (4E) - 7 - メチル - 1 - テトラヒドロピラノキシ - 4, 7 - オクタジエ

50

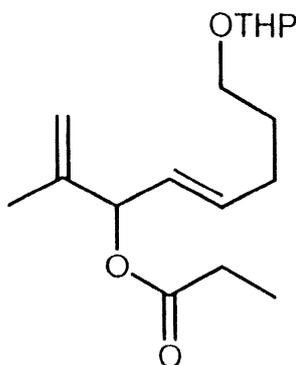
ン - 6 - オール (1) と、 7 . 4 m l のピリジンを塩化メチレン (6 5 m l) の溶液とする。これに、 0 で 3 . 1 m l の塩化プロピオニルを滴下し、 3 0 分攪拌した。その後、水を加えジエチルエーテルで抽出し、有機層を 1 0 % の硫酸水素カリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン - 酢酸エチル (1 0 : 1 v / v) 溶出部より 7 . 7 4 g の無色油状物質を収率 8 6 % で得た。得られた物質の物性は以下のとおりであり、かかる物性に基づく化合物の構造式を式 (2) に示す。

【 0 0 2 2 】

IR (neat) cm^{-1} : 1740. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 1.15 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.47-1.76 (8H, m), 1.72 (3H, s), 2.10-2.20 (2H, m), 2.36 (2H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.32-3.54 (4H, m), 3.68-3.90 (4H, m), 4.53-4.60 (1H, m), 4.88 (1H, s), 4.98 (1H, s), 5.45 (1H, dd, $J = 14.5, 7.0$ Hz), 5.57 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 5.75 (1H, dd, $J = 14.5, 7.0$ Hz). MS m/z : 295 ($\text{M}^+ - 1$). 元素分析 Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$: C, 68.87; H, 9.52. Found: C, 69.02; H, 9.39.

【 0 0 2 3 】

【化 1 0】



(2)

【 0 0 2 4 】

実施例 1 - 2 [新規物質メチル (2 S^{*}, 3 R^{*}, 4 E) - 2, 6 - ジメチル - 3 - [3 - (テトラヒドロピラノキシ)プロピル] - ヘプタ - 4, 6 - ジエノエートの合成]
1 . 5 1 m l のジソプロピルアミンの THF 溶液 (5 0 m l) に、 0 にて 5 . 1 m l のブチルリチウムのヘキサン溶液 (1 . 5 4 M) を滴下した後、 0 にて 3 0 分、 - 7 8 で 1 時間攪拌した。これに、 1 . 0 g の上記で得られた化合物 (2) のテトラヒドロフラン溶液 (5 m l) を 1 時間かけて滴下し、 - 7 8 で 1 時間攪拌した。その後、 1 . 0 3 m l のクロロトリメチルシランを加えて 1 時間攪拌し、徐々に室温まで昇温し 2 時間攪拌した。反応終了後、 2 m l のメタノールを加え 3 0 分間攪拌した。溶媒を留去して得られる残留物を重曹水で塩基性にして逆抽出し、得られる水層を 1 0 % の硫酸水素カリウムで酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残留物にエーテル (3 m l) を加え、 0 で過剰量のジアゾメタンのジエチルエーテル溶液を滴下し、 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン - 酢酸エチル (9 : 1 v / v) 溶出部より 0 . 7 6 g の淡黄色油状物質を収率 7 2 % で得た。得られた物質の物性は以下のとおりであり、かかる物性に基づく化合物の構造式を式 (3) に示す。

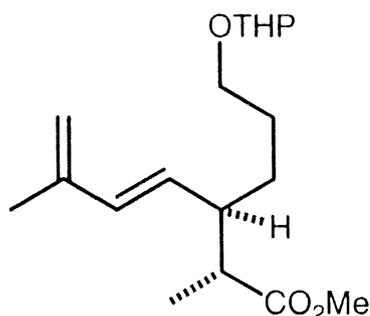
【 0 0 2 5 】

IR (neat) cm^{-1} : 1725. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 1.04 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.18-1.80 (9H, m), 1.79 (3H, s), 2.31-2.47 (2H, m), 3.27-3.39 (2H, m), 3.41-3.55 (2H, m), 3.64 (3H, s), 3.77-3.87 (2H, m), 4.54 (1H, br s), 4.86 (2H, br s), 5.28 (1H, dd, $J = 15.7, 9.3$ Hz), 6.11 (1H, d, $J = 15.7$ Hz). MS m/z : 310 (M^+). 元素分析 C

alcd for $C_{18}H_{30}O_4$: C, 69.64; H, 9.74. Found : C, 69.87; H, 10.04.

【 0 0 2 6 】

【 化 1 1 】



(3)

10

【 0 0 2 7 】

実施例 1 - 3 [新規物質メチル (2 S^{*}, 3 R^{*}, 4 E) - 3 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 2 , 6 - ジメチルヘプタ - 4 , 6 - ジエノートの合成]

0 . 1 1 g の上記で得られた化合物 (3) のメタノール溶液 (6 m l) に室温にて 3 4 m g のトルエンスルホン酸・一水和物を加え、1時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去して得られた残留物に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン - 酢酸エチル (2 : 1 v / v) 溶出部より 7 5 . 0 m g の無色油状物質を収率 9 4 % で得た。得られた物質の物性は以下のとおりであり、かかる物性に基づく化合物の構造式を式 (4) に示す。

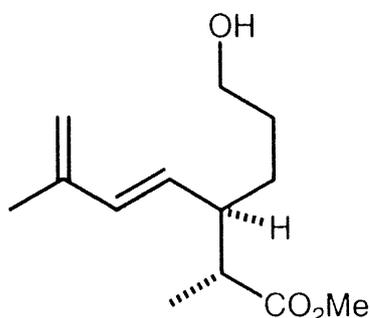
20

【 0 0 2 8 】

IR (neat) cm^{-1} : 3400, 1740, 1610. 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : 1.08 (3H, d, J = 6 . 7 Hz), 1.30-1.83 (4H, m), 1.83 (3H, s), 2.24-2.45 (2H, m), 3.59-3.70 (2H, m), 3 . 68 (3H, s), 4.89 (2H, s), 5.27 (1H, dd, J = 15.7, 9.3 Hz), 6.10 (1H, dd, J = 15 . 7 Hz). MS m/z : 226 (M⁺). 元素分析 Calcd for $C_{13}H_{22}O_3$: C, 71.39; H, 9.59. Found : C, 71.12; H, 9.75.

【 0 0 2 9 】

【 化 1 2 】



(4)

30

40

【 0 0 3 0 】

実施例 1 - 4 [新規物質メチル (2 S^{*}, 3 R^{*}, 4 E) - 3 - (3 - ヒドロキシ - 4 - ペンテニル) - 2 , 6 - ジメチルヘプタ - 4 , 6 - ジエノートの合成]

2 5 3 m g の上記で得られた化合物 (4) の塩化メチレン溶液 (4 m l) に、室温にて 6 3 1 m g の重クロム酸ピリジニウム塩、及び 0 . 7 g の粉末状 4 のモレキュラーシーブを順次加え、1 . 5 時間攪拌した。ジエチルエーテルで希釈し、1 g のフロリジルを加え 1 0 分攪拌した後、混合物をセライト濾過した。ろ液を減圧留去して、粗アルデヒドを黄色油状物として得た。この粗物質をテトラヒドロフラン溶液 (3 m l) にし、- 7 8 で 1 . 1 m l のビニルマグネシウムブロマイド - テトラヒドロフラン溶液 (1 . 0 M) を滴

50

下し、20分間攪拌した。その後、0にて飽和塩化アンモニウム水溶液を加えジエチルエーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル(4:1 v/v)溶出部より0.18gの無色油状物質を収率65%で得た。得られた物質の物性は以下のとおりであり、かかる物性に基づく化合物の構造式を式(5)に示す。

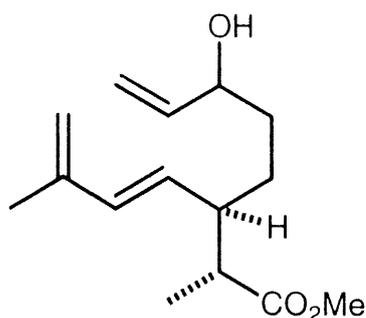
【0031】

IR (neat) cm^{-1} : 3500, 1740, 1620. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 1.08 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.25-1.69 (4H, m), 1.82 (3H, s), 2.23-2.45 (2H, m), 3.67 (3H, s), 4.08 (1H, br s), 4.90 (2H, s), 5.10 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 5.21 (1H, d, $J = 16.5$ Hz) 5.29 (1H, dd, $J = 9.0, 14.7$ Hz), 5.76-5.90 (1H, m), 6.14 (1H, d, $J = 14.7$ Hz). MS m/z : 295 ($\text{M}^+ - 1$). 元素分析 Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$: C, 68.99; H, 9.80. Found : C, 68.92; H, 9.88.

10

【0032】

【化13】



(5)

20

【0033】

実施例1-5 [新規物質(1R^{*}, 2R^{*}, 6R^{*}, 1S^{*})-2-(1-メトキシカルボニルメチル)-9-メチルピシクロ[4.4.0]デカン-9-エン-5-オンの合成]

デス・マーチン試薬(32.8mg)の塩化メチレン溶液(1.0ml)に、上記で得られた化合物(5)(12.1mg)の塩化メチレン溶液(0.5ml)を0で加え、室温にて2時間攪拌した。その後、飽和重曹水-2%のチオ硫酸ナトリウム水溶液(1:7 v/v)に注ぎ、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を水、及び飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル(6:1 v/v)溶出部より9.4mgの淡黄色油状物質を収率78%で得た。得られた物質の物性は以下のとおりであり、かかる物性に基づく化合物の構造式を式(6)に示す。

30

【0034】

IR (neat) cm^{-1} : 1720, 1705. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : 1.22 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.47-1.56 (2H, m), 1.62 (3H, s), 1.85-1.94 (2H, m), 2.01-2.13 (2H, m), 2.24-2.45 (3H, m), 2.56 (1H, br s), 2.85 (1H, dt, $J = 7.0, 7.0$ Hz), 3.64-3.75 (3H, m), 5.32 [1H, br s]. MS m/z : 250 (M^+). HRMS m/z (M^+) : Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$: 250.1568. Found : 250.1530.

40

【0035】

【化14】

8 (2H, m), 2.54-2.61 (2H, m), 2.78 (1H, dd), 3.68-3.71 (1H, s), 3.69 (3H, s), 5.80 (1H, s). MS m/z: 314 (M⁺).

【0040】

実施例2 [抗マラリア活性と選択毒性の測定]

実施例1で得られた式(II)で示される本発明の化合物12-ヒドロキシ-2-(1-メトキシカルボニルエチル)-5-オキソ-10,11,13-トリオキサトリシクロ[7.2.0.0^{1,6}]トリデカンの抗マラリア活性と選択毒性を測定した。抗マラリア活性については50%阻害濃度の測定により、また選択毒性については化学療法係数(選択毒性)の算定により評価した。

【0041】

実施例2-1 [熱帯熱マラリア原虫の培養]

抗マラリア活性の測定には、供試マラリア原虫として、熱帯熱マラリア原虫である*P. Falciparum* FCR-3 strain (ATCC 30932) 及び *P. Falciparum* Honduras-1 strain (ATCC 30935) を用いた。また、供試培地として、ろ過滅菌したRPMI 1640培地をpH 7.4に調整し、ヒト血清を10%となるように添加した培地を用いた。上記熱帯熱マラリア原虫の培養はO₂濃度5%、CO₂濃度5%、N₂濃度90%、温度は36.5で行った。ヘマトクリット値(赤血球浮遊液中に占める赤血球の体積の割合)は5%にして用いた。培養開始時の熱帯熱マラリア原虫の初期感染率は0.1%とした。24穴培養プレートを用いて培養し、培地は毎日交換し、感染率4%で植継ぎを行った。感染率は薄層塗抹標本を作成し、元来マラリア検査のため開発されたギムザ染色あるいはDiff-Quick染色を行った後、顕微鏡(油浸、1000×)下で計測し、熱帯熱マラリア原虫感染率を下記式から算出した。

【0042】

【数1】

$$\text{マラリア原虫感染率(\%)} = \frac{\text{感染赤血球数}}{\text{総赤血球数}} \times 100$$

【0043】

実施例2-2 [熱帯熱マラリア原虫増殖阻害試験]

培養した熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を遠心分離で集め、血清を含む培地で洗浄した後、非感染赤血球を加え、初期感染率0.3%の熱帯熱マラリア原虫培養液を調製した。このときのヘマトクリット値は3%とした。試験に用いる式(II)で示される本発明の化合物、及び3種類の陽性対照薬(キニーネ、アルテミシニン、アルテスナート、メフロキン)を滅菌水、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF、以下同じ)、あるいはジメチルスルホキシド(DMSO、以下同じ)に溶解し、所定濃度のサンプル溶液を調製した。24穴培養プレートにサンプル溶液を5~10µlずつ加えた。サンプル溶液はデュプリケート(duplicate)あるいはトリプリケート(triplicate)にとった。コントロールは滅菌水、DMF、あるいはDMSOを1ウェル当たり10µl加えた。次に、初期感染率0.3%調製した上記熱帯熱マラリア原虫培養液を990~995µlずつ加え、静かにピペティングを行い培地に一様に懸濁させた。培養プレートはCO₂-O₂-N₂(5%, 5%, 90%)インキュベーター中で72時間培養した後、それぞれのウェルについて薄層塗抹標本を作成し、ギムザ染色あるいはDiff-Quick染色を行った後、顕微鏡(油浸、1000×)下で計測し、試験液添加群及びコントロールの熱帯熱マラリア原虫感染率を算出した。上記で求めた熱帯熱マラリア原虫感染率から次式によって増殖阻害率を算出し、50%増殖阻害濃度(EC₅₀)を求めた。

【0044】

【数2】

10

20

30

40

$$\text{増殖阻害率 (\%)} = \frac{1 - (b - a)}{(c - a)} \times 100$$

a : 初期感染率

b : 72時間後のサンプル液の感染率

c : 72時間後のコントロールの感染率

【0045】

10

実施例2-3 [マウスFM3A細胞増殖阻害試験]

マウス乳癌由来FM3A細胞の野生株であるF28-7株を用いた。培地はES培地に非動化した胎児牛血清を2%となるように添加し、CO₂濃度5%、37℃で培養した。この条件下でのFM3A細胞F28-7株の倍加時間は約12時間であった。前培養を行い、対数増殖期に入った細胞を5×10⁴ cells/mlになるように培地で希釈する。

サンプル溶液は上記実施例2-2と同じものを用いた。24穴培養プレートにサンプル溶液を5~10μlずつ加えた(培地等を加えると最終濃度は1×10⁻⁴~1×10⁻⁵Mとなった)。サンプル溶液はデュープリケートあるいはトリプリケートにとり、コントロールとして滅菌水、DMF、あるいはDMSOを10μl加えたウェルも同時に用意した。

次に、用意しておいた培養細胞浮遊液を990から995μlずつ加え、静かにピペティングを行い培地に一様に懸濁させた。48時間培養した後、それぞれのウェルについて細胞数をセルコントローラー(CC-108; Toa. Medical Electrics社製)で計数し、下記式により増殖率を算出し、50%増殖阻害率(IC₅₀)を算出した。細胞増殖阻害活性は、サンプル溶液を添加したウェルの細胞数及びコントロールの細胞数から算出した。これにより、サンプルの細胞毒性を評価した。

20

【0046】

【数3】

$$\text{増殖率 (\%)} = \frac{(C - A)}{(B - A)} \times 100$$

30

A : 初期細胞数

B : 2日後のコントロールの細胞数

C : サンプル添加した2日後の細胞数

【0047】

試験例2-4 [薬効判定]

熱帯熱マラリア原虫とマウスFM3A細胞に対するサンプルのEC₅₀値、IC₅₀値からサンプルの抗マラリア作用を評価する。熱帯熱マラリア原虫に対する選択毒性の指標として用いられる化学療法係数を下記式により算出し、薬効判定を行った。

40

【0048】

【数4】

$$\text{化学療法係数} = \frac{\text{マウスFM3A細胞に対するサンプルのIC}_{50}\text{値}}{\text{熱帯熱マラリア原虫に対するサンプルのEC}_{50}\text{値}}$$

【0049】

本発明化合物及び陽性対象薬についての熱帯熱マラリア原虫とマウスFM3A細胞に対す

50

るサンプルの EC_{50} 値、 IC_{50} 値、並びに化学療法係数を表 1 に示す。表 1 の結果から、本発明化合物は、毒性が低く、極めて優れたマラリア原虫増殖阻害活性を有していることがわかった。

【 0 0 5 0 】

【表 1】

化合物	50%増殖阻害濃度 (M)		化学療法係数
	EC_{50}	IC_{50}	IC_{50}/EC_{50}
本発明化合物	3.9×10^{-8}	2.4×10^{-5} (78% growth)	>1,000
キニーネ	1.1×10^{-7}	1.0×10^{-4}	910
アルテミシニン	7.9×10^{-9}	1.0×10^{-5}	1,300
アルテスナート	1.7×10^{-8}	3.0×10^{-6}	180
メフロキン	3.2×10^{-8}	2.9×10^{-6}	90

10

【 0 0 5 1 】

【発明の効果】

本発明の抗マラリア活性を有する新規化合物は、薬剤耐性を有する熱帯熱マラリア原虫の成育を 3.9×10^{-8} モル濃度で阻止し、マウスの F A 3 A 細胞との比較によって、1,000 倍以上の選択毒性を示すことから、抗マラリア剤として極めて有用である。

20

フロントページの続き

審査官 榎本 佳予子

(56)参考文献 IMAKURA, Yasuhiro et al. , Acid degradation products of qinghaosu and their structure-activity relationships , Heterocycles , 1990年 , 31(6) , p.1011-1016

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C07D493/08

A61K 31/357

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)