

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2012年5月3日(03.05.2012)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2012/056976 A1

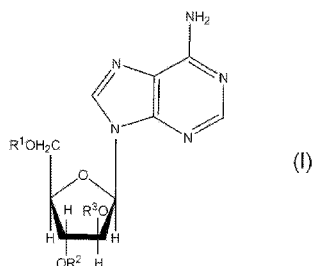
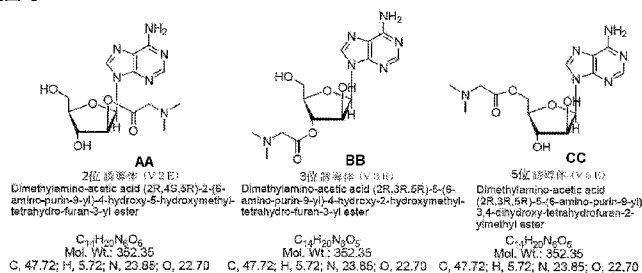
- (51) 国際特許分類:  
*C07H 19/19* (2006.01) *A61P 9/06* (2006.01)  
*A61K 31/7076* (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)  
*A61P 1/08* (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61P 9/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/074098
- (22) 国際出願日: 2011年10月20日(20.10.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-240301 2010年10月27日(27.10.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 公立大学法人横浜市立大学(Public University Corporation Yokohama City University) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号 Kanagawa (JP). 国立大学法人横浜国立大学(National University Corporation Yokohama National University) [JP/JP]; 〒2408501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台7番1号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: および  
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石川 義弘 (ISHIKAWA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 奥村 敏 (OKUMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 星野 雄二郎 (HOSHINO, Yujiro) [JP/JP]; 〒2408501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台7番1号 国立大学法人横浜国立大学内 Kanagawa (JP). 井上 誠一 (INOUE Seiichi) [JP/JP]; 〒2408501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台7番1号 国立大学法人横浜国立大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 間山 世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機会館4階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,

[続葉有]

(54) Title: MODULATOR OF ACTIVITY OF ADENYLATE CYCLASE

(54) 発明の名称: アデニル酸シクラーゼの活性調節剤

[図1]



AA POSITION-2 DERIVATIVE (V2E)  
BB POSITION-3 DERIVATIVE (V3E)  
CC POSITION-5 DERIVATIVE (V5E)

(57) Abstract: Provided is a novel compound capable of inhibiting cardiac adenylate cyclase. The compound is a compound represented by formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt, ester or solvate thereof. (In the formula, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> independently represent a hydrogen atom or an acyl group having an acidic or basic substituent, wherein a case in which each of R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> represents a hydrogen atom simultaneously is excluded.) Also provided are a modulator of the activity of adenylate cyclase, a pharmaceutical composition and a food composition, each of which comprises the compound or a pharmaceutically acceptable salt, ester or solvate thereof.

(57) 要約: 心臓型アデニル酸シクラーゼを阻害できる新規化合物を提供する。下記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ、独立に、水素原子又は酸性若しくは塩基性置換基を有するアルキル基であるが、但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>のすべてが水素原子であることはない) 上記化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含むアデニル酸シクラーゼ活性調節剤、医薬組成物及び食品組成物も提供される。

WO 2012/056976 A1

MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称： アデニル酸シクラーゼの活性調節剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、アデニル酸シクラーゼの活性調節剤に関する。

### 背景技術

[0002] 心不全は世界的に主要な死亡原因であり、わが国でも3大死因の一つに挙げられる。心不全患者において慢性的に亢進した交感神経系を抑制することが、心不全治療の世界標準指針であり、レニンアンジオテンシン系阻害剤およびベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）が主たる治療薬として使用されている。しかしながらベータ遮断剤による一過性の心機能抑制は、特に高齢者にとって、治療の導入に当たっての大きな妨げとなる。一方、ベータ遮断薬には呼吸器の抑制作用もあり、肺気腫などの合併症の多い高齢者では大きな問題となっている。ベータアドレナリン受容体は、細胞膜に存在するアデニル酸シクラーゼ酵素を活性化して細胞内サイクリックAMP（cAMP）濃度を上昇させることで心機能を調節している。すなわち、上記のベータ遮断薬は、アデニル酸シクラーゼ酵素の活性およびその下流のcAMPシグナルを抑制することでその薬理効果を発揮する。一方、肺気管支にもベータアドレナリン受容体が発現しているため、ベータ遮断薬によって気管支筋の収縮がおこり呼吸機能の異常を誘発する。

[0003] このようなベータ遮断薬による呼吸器系への副作用は、ベータアドレナリン受容体には3種類のサブタイプしかなく、発現の臓器特異性が比較的低いことがその原因として挙げられる。一方、アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプが知られており、心臓型と呼ばれるサブタイプは心臓特異的に発現し、肺にはほとんど発現が認められない。またベータ遮断薬はVaughan Williams分類II群薬として分類され抗不整脈作用が存在することも古くから知られている。したがって、心臓型のアデニル酸シクラーゼを選択的に抑制することで、呼吸器への副作用なくベータ遮断薬と同様の心不全ならびに不整脈への

治療効果が期待できる。

- [0004] 心臓型アデニル酸シクラーゼを標的にした薬剤はすでに臨床応用されているものがある（非特許文献1）。心臓型アデニル酸シクラーゼの阻害薬としていくつかの化合物がすでに報告されているが（非特許文献2及び3）、臨床応用は始まっておらず、新規化合物も報告されていない。同阻害剤は心不全薬として有用である可能性がこれまでの動物実験から強く示唆されている（非特許文献4～7）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1：Toya et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 1998 Jan;30(1):97-108  
非特許文献2：J. Biol. Chem. 276; 47785-47793, 2001  
非特許文献3：J. Biol. Chem. 279; 40938-40945, 2004  
非特許文献4：Circ. Res. 93: 364-371, 2003  
非特許文献5：Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:9986-90, 2003  
非特許文献6：Cell 130:247-58, 2007  
非特許文献7：Circulation 116:1776-83, 2007

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、これまでに公表されていない新規化合物で、心臓型アデニル酸シクラーゼを阻害できるものを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

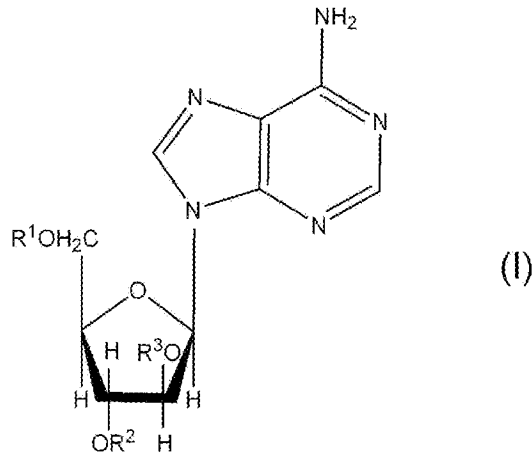
- [0007] 本発明者らは、既知の心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤であるビダラビン(vidarabine)から複数の誘導体を合成し、心臓型に対する抑制作用と、心不全予防効果を検討した。心不全予防効果に関しては、マウスモデルで実際に心不全を作製し、それに心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤を投与した群における治療効果を比較検討した。その結果、心臓型アデニル酸シクラーゼ

を阻害する効果がある新規化合物を見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

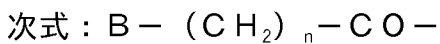
(1) 下記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。

[0009] [化1]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ、独立に、水素原子又は酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基であるが、但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>のすべてが水素原子であることはない)

(2) 酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基が、



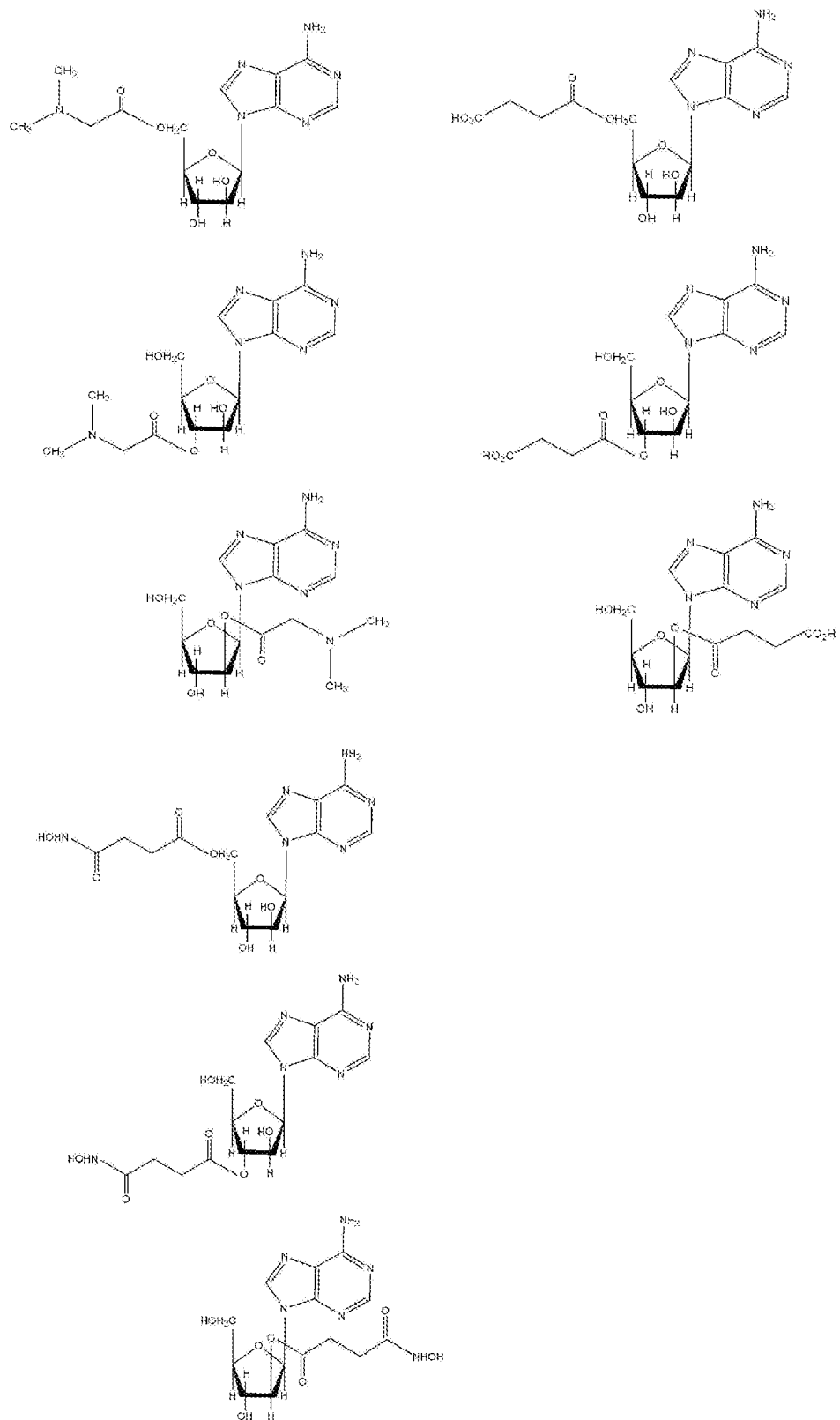
(式中、nは1～4の整数であり、Bは酸性若しくは塩基性置換基である。)で表される基である(1)記載の化合物。

(3) 酸性若しくは塩基性置換基が、アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、カルボキシル基又はヒドロキシカルバモイル基である(1)又は(2)記載の化合物。

(4) 下記のいずれかの式で表される(1)～(3)のいずれかに記載の化合物。

[0010]

[化2]



(5) (1) ~ (4) のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される

塩、エステル又は溶媒和物を含むアデニル酸シクラーゼ活性調節剤。

(6) アデニル酸シクラーゼが心臓型アデニル酸シクラーゼである(5)記載の薬剤。

(7) (1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む医薬組成物。

(8) ベータ遮断剤の適応症の予防及び/又は治療に用いられる(7)記載の医薬組成物。

(9) ベータ遮断剤の適応症が、心不全、心筋梗塞、不整脈、狭心症、高血圧症及びそれらに関連する病態および疾患から成る群より選択される(8)記載の医薬組成物。

(10) (1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む食品組成物。

(11) アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持のために用いられる(10)記載の食品組成物。

(12) (1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の医薬的に有効な量を被験者に投与することを含む、ベータ遮断剤の適応症を予防及び/又は治療する方法。

(13) ベータ遮断剤の適応症の予防及び/又は治療のための(1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の使用。

(14) ベータ遮断剤の適応症を予防及び/又は治療する方法に使用するための(1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。

(15) (1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の有効量を被験者に投与することを含む、アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持方法。

(16) アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予

防又は健康維持のための(1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の使用。

(17) アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持方法に使用するための(1)～(4)のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。

[0011] ビダラピンは心臓型アデニル酸シクラーゼに対する阻害効果を持つが、水溶性が少ないため、体内分布として中枢組織への移行が多い。そのため中枢に対する副作用をしめず。本発明の新規化合物は水溶性がきわめて高いため、中枢への移行が極めて少なく、心臓に対する治療効果が高く得られると考えられる。

### 発明の効果

[0012] 本発明の新規化合物は、心臓型アデニル酸シクラーゼの活性阻害剤として有効である。本発明の新規化合物は、例えば、心不全、心筋梗塞、不整脈の治療薬として利用することができる。

[0013] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2010-240301の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1]新規化合物、ビダラピン誘導体の化学構造式。

[図2]マウス線条体のアデニル酸シクラーゼ活性に対する各種化合物の抑制効果。線条体は脳の一部であり、5型アデニル酸シクラーゼが酵素活性のほぼすべてを占めることが知られている。このため5型アデニル酸シクラーゼ活性を試験するには心臓以上に選択性が高いとされている。50  $\mu$ Mのフォルスコリン存在下かつ阻害剤非存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性を100とした相対値を示す (n=4、means  $\pm$  S.E.)。

[図3]線条体、心臓、および肺のアデニル酸シクラーゼ活性に対する各種ビダラピン誘導体の抑制効果。50  $\mu$ Mのフォルスコリン存在下かつ阻害剤非存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性を100とし、各種阻害剤を図の横軸に示す濃度で処理した際に減少したアデニル酸シクラーゼ活性を示した。(n=4、mean



s±S.E.)。

[図4]野生型(WT)および5型アデニル酸シクラーゼノックアウト(AC5KO)マウスの各組織におけるアデニル酸シクラーゼ活性に対するビダラビン誘導体の抑制効果。50 μMのフォルスコリン存在下かつ阻害剤非存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性を100とした相対値を示す(n=4, means±S.E.)。

[図5]各種ビダラビン誘導体のアデニル酸シクラーゼ活性抑制効果の組織選択性。各濃度における、線条体アデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を1とした時の相対値で示した(n=4, means±S.E.)。

[図6]AC5KOマウスとWTマウスの心筋組織膜タンパク内のアデニル酸シクラーゼ活性に対する各種化合物の抑制効果。50 μMイソプロテレノール存在下かつ阻害剤非存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性を100とした相対値を示す(n=8, means±S.E.)

[図7]フォルスコリン刺激によるH9c2細胞中でのcAMP蓄積に与える各ビダラビン誘導体の効果。100 μMのフォルスコリン存在下かつ阻害剤非存在下におけるH9c2細胞内cAMPレベルを100としたときの相対値を示す(n=1)。

[図8]フォルスコリン刺激(5 μM)による成体ラット培養心筋細胞中でのcAMP蓄積に与える各ビダラビン誘導体の効果。5 μMのフォルスコリン存在下かつ阻害剤非存在下における成体ラット培養心筋細胞内cAMPレベルを100としたときの相対値を示す(n=4, means±S.E.)

[図9]心不全の予防効果。野生型マウス(C57BL/6N)にオスモティックミニポンプ(Alzet2001)をもちいてイソプロテレノール(60mg/kg/day 7日間)のみを1週間投与したマウス(IS0)、イソプロテレノールと同時にビダラビン、V2E、V3E、V5Eをそれぞれ投与した(15mg/kg/day 7日間)。その結果イソプロテレノールのみを投与したマウスでは、投与前に比較して心機能(LVEF:心拍出量)の低下がみられたが、ビダラビンと同時に併用投与したマウスでは心機能低下が有意に抑制された。またビダラビンと同等の心機能抑制効果がV2E、V3E、V5Eを併用投与したマウスでも確認された(n=3-8, means±SE, \*P<0.05)。

[図10]心筋細胞のTUNEL。ラット胎児培養心筋細胞の培養液にイソプロテレノ

ール( $10^{-5}$ M)、イソプロテレノールと同時にビダラビン、V2E、V3E、V5Eをそれぞれ併用刺激(48時間)した後細胞のアポトーシス陽性細胞をTUNEL染色で評価した。V2E、V3E、V5Eはビダラビンと同等のイソプロテレノール刺激によるアポトーシス抑制効果を示した( $n=4-7$ , means $\pm$ SE, \* $P<0.05$ )。

[図11]毒性試験。ビダラビン、V2E、V3E、V5Eをオスモティックミニポンプを用いて投与(15mg/kg/day 7日間)後に採血を行い、BUN, Creatinine, GPT, GOTを測定してコントロール群と比較した。コントロール群に比較して有意なBUN, Creatinine, GPT, GOTの上昇は見られなかった( $n=4-8$ , means $\pm$ SE)。

[図12]心筋組織のTUNEL。慢性カテコラミン負荷マウス(図9)で用いたマウスの心臓のアポトーシス陽性心筋細胞をTUNEL染色で評価した( $n=4-6$ , means $\pm$ SE)。

[図13]中枢神経系に及ぼす影響。ストリキニーネ痙攣に対して抑制作用を示すことが報告されている薬剤の作用部位は中枢であり、ビダラビンも中枢移行性を示しストリキニーネ痙攣に対して抑制作用を示す(医薬品研究 18, 561-576, 1982)。そこでビダラビン、V2E、V3E、およびV5Eの中枢移行性を、ストリキニーネ投与によりマウス(C57BL/6N)に惹起される強直伸展性痙攣および死亡に対する拮抗作用により評価した。生理食塩水に溶解したストリキニーネ硝酸塩をマウス(C57BL/6N:日本エスエルシー, 雄, 10-12週齢)の頸背部皮下に1.5 mg/kgとなるように投与し、強直伸展性痙攣を起こし死亡に至るまでの時間を計測し、中枢移行に対する影響を間接的に評価した。ビダラビン、V2E、V3E、およびV5Eは生理食塩水に溶解または懸濁させ、ストリキニーネ投与の15分前に腹腔内に投与した( $n=4-10$ , means $\pm$ SE)(図13)。なお死亡は胸郭呼吸運動の停止で判断した。

[図14]抗不整脈(心房細動抑制)作用。オスモティックミニポンプ(Alzet 2001)を用いて正常野生型マウス(C57BL/6N)にDMSOに溶解したビダラビン(15mg/kg/day)、V2E、V3E、およびV5E(19.8 mg/kg/day)、またはDMSOのみを投与し、2.5 mAの電圧刺激を経食道カテーテルを用いて、30 msec間隔で60秒間加える(心房頻回刺激: Circ Res 97, 62-69, 2005)ことで誘発される一過性

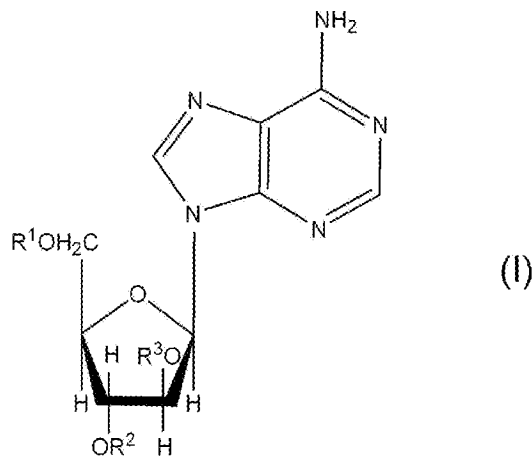
心房細動が正常洞リズムに戻るまでの心房細動持続時間を測定した (n=4-8, means±SE)。

### 発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

本発明は、下記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を提供する。

[0016] [化3]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ、独立に、水素原子又は酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基であるが、但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>のすべてが水素原子であることはない)

本発明の化合物には立体異性体が存在しうるが、本発明はこれらの異性体すべてを包含する。例えば、光学活性体、ジアステレオマー、ラセミ体などはすべて本発明に含まれる。

[0017] 本発明の化合物において、酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基は、



(式中、nは1～4の整数であり、Bは酸性若しくは塩基性置換基である。)で表される基であるとよい。

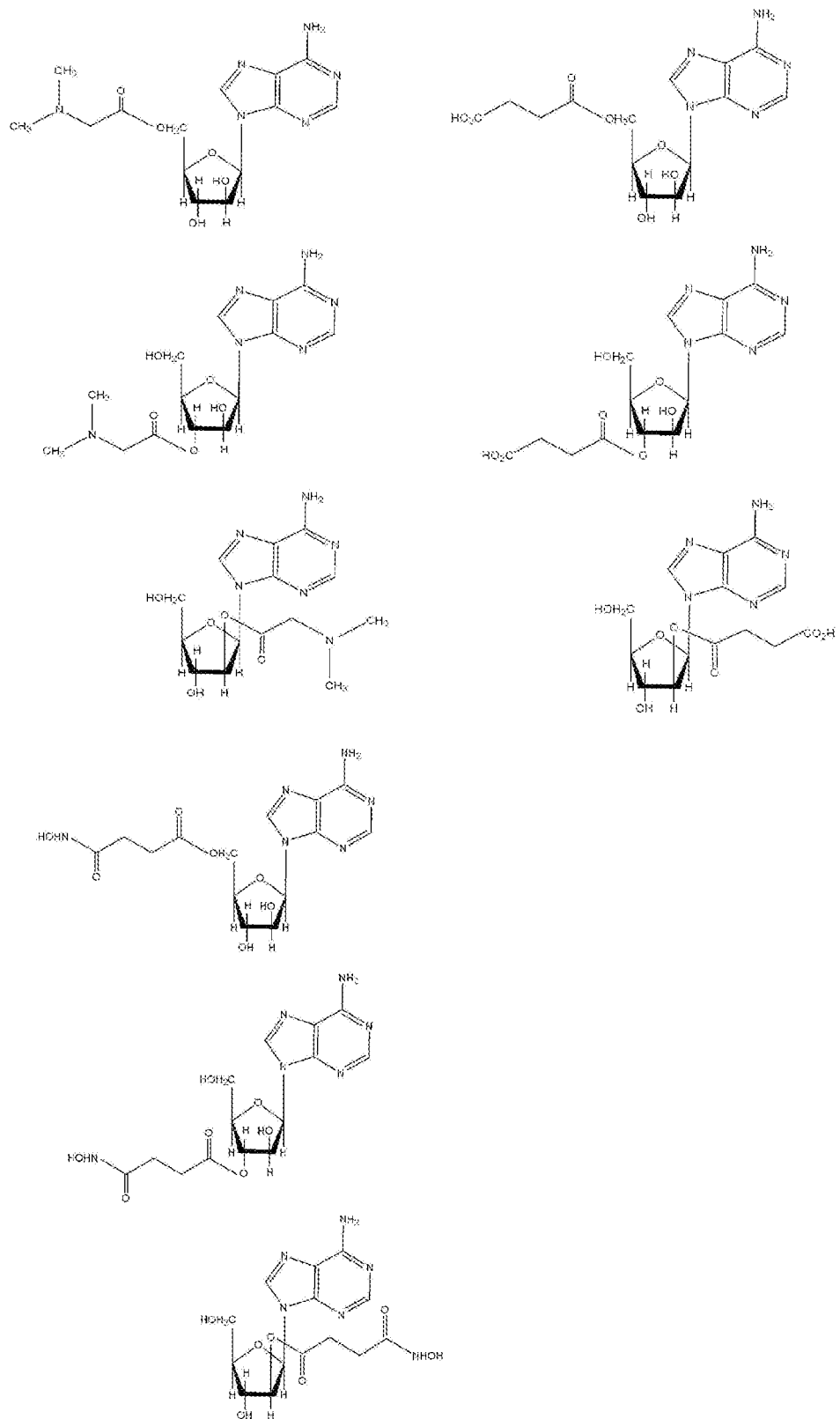
[0018] Bの酸性若しくは塩基性置換基は、アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、カルボキシル基又はヒドロキシカルバモイル基であるとよい。アミ

ノ基に置換されるアルキル基は、炭素数 1 から 4 個の直鎖状または分枝状のアルキル基、より好ましくは、メチル基、エチル基、ノルマルプロピル基、イソプロピル基、ノルマルブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0019] 本発明の化合物としては、下記のいずれかの式で表される化合物を例示することができる。

[0020]

[化4]



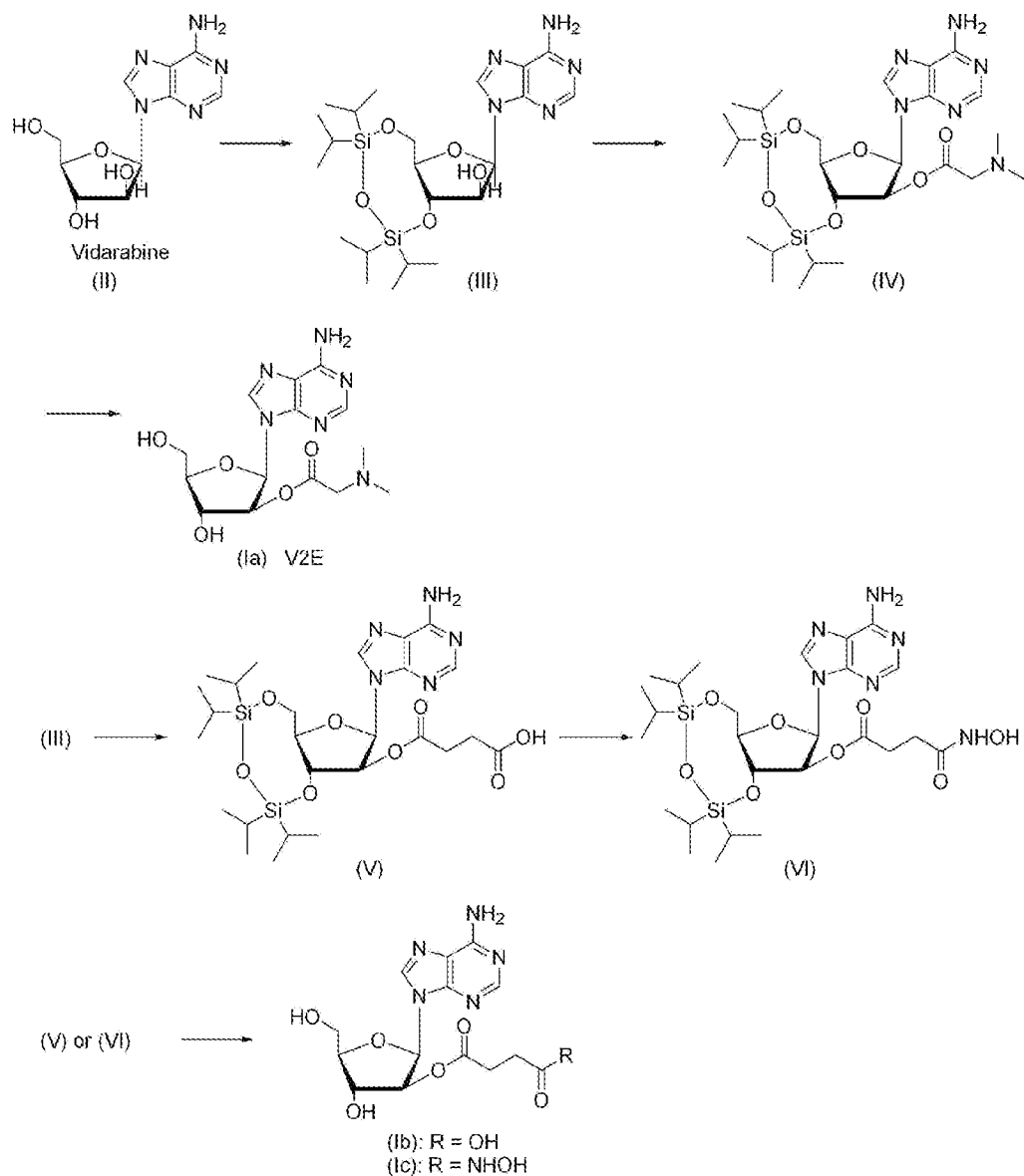
本発明の化合物は、以下の反応スキームに従って、製造することができる

。

[0021] 文献 (O'Mahony, G.; Sundgren, A.; Svensson, S.; Grotli, M. *Tetrahedron* 2007, 63, 6901-6908.) に記載の方法に従いビダラビン (II) からジシロキサニリデン保護した化合物 (III) を合成した。化合物 (III) と N, N-ジメチルグリシンに脱水縮合剤 (DCC) を作用させることにより良好な収率でエステル化体 (V) が得られる。最後にテトラブチルアンモニウムフルオリドを作用させて、ジシロキサニリデン基を脱保護することにより目的の 2 位置換体 (Ia) が得られる。また、化合物 (III) と無水コハク酸を作用させることによりエステル化体 (V) が得られる。このエステル化体 (V) を 1-プロピルりん酸環状無水物で活性化し、ヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させることによりヒドロキサム酸 (VI) が合成できる。最後にそれぞれにテトラブチルアンモニウムフルオリドを作用させて、ジシロキサニリデン基を脱保護することにより目的の 2 位置換体 (Ib)、(Ic) がそれぞれ得られる。N, N-ジメチルグリシンの代わりに他の酸性又は塩基性基を有するカルボン酸を、無水コハク酸の代わりに他の無水カルボン酸を用いてもよい。

[0022]

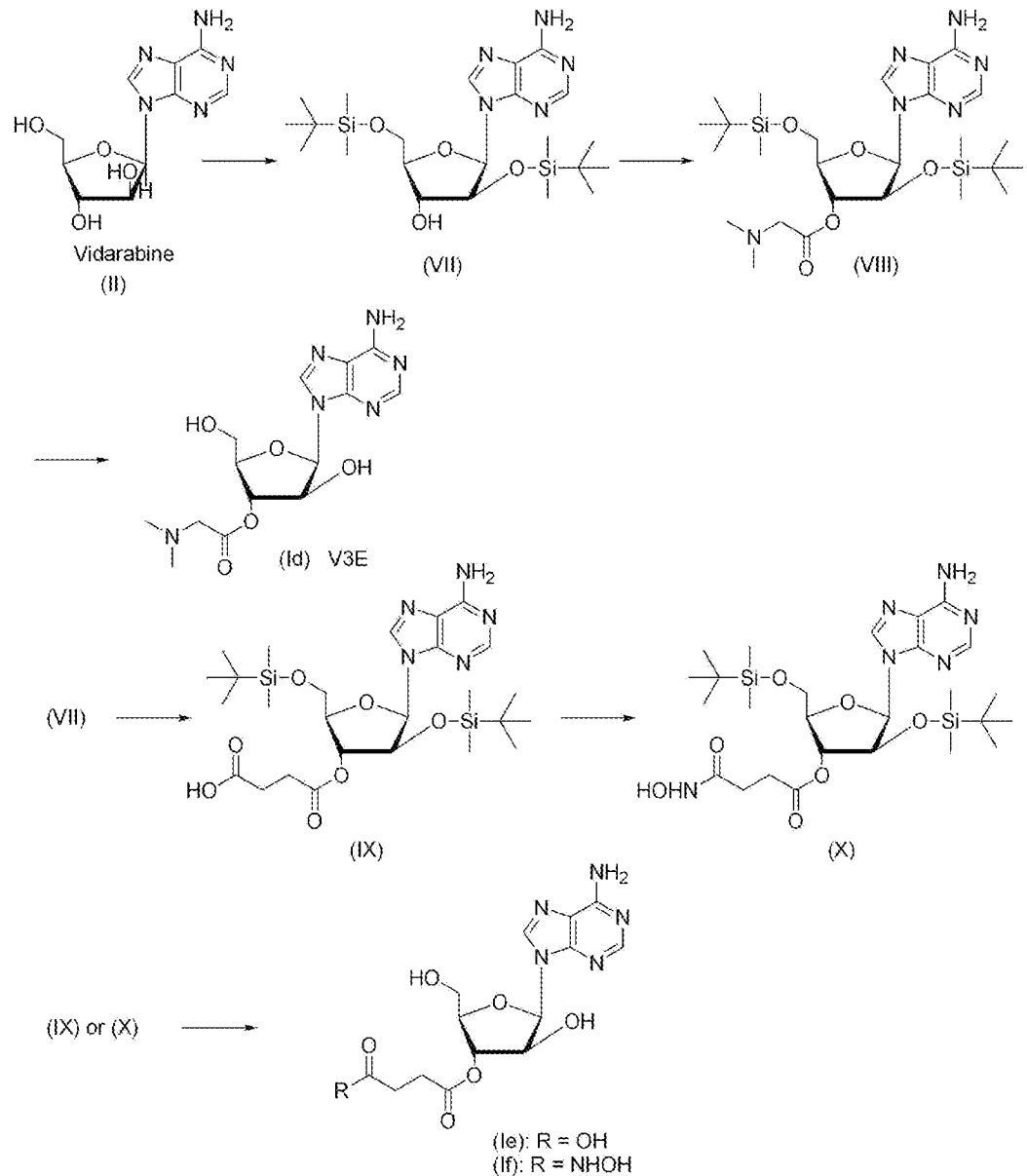
[化5]



文献 (Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.) に記載の方法を参考にビダラビン (II) からシリル保護した化合物 (VII) を合成した。化合物 (VII) と N, N-ジメチルグリシンに脱水縮合剤 (DCC) を作用させることにより良好な収率でエステル化体 (VIII) が得られる。最後にテトラブチルアンモニウムフルオリドを作用させて、シリル基を脱保護することにより目的の3位置換体

(Id) が得られる。また、化合物 (VII) と無水コハク酸を作用させることにより良好な収率でエステル化体 (IX) が得られる。このエステル化体 (IX) を 1-プロピルりん酸環状無水物で活性化し、ヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させることによりヒドロキサム酸 (X) が合成できる。最後にそれぞれにテトラブチルアンモニウムフルオリドを作用させて、シリル基を脱保護することにより目的の 3 位置換体 (Ie)、(If) がそれぞれ得られる。N, N-ジメチルグリシンの代わりに他の酸性又は塩基性基を有するカルボン酸を、無水コハク酸の代わりに他の無水カルボン酸を用いてもよい。

[0023] [化6]

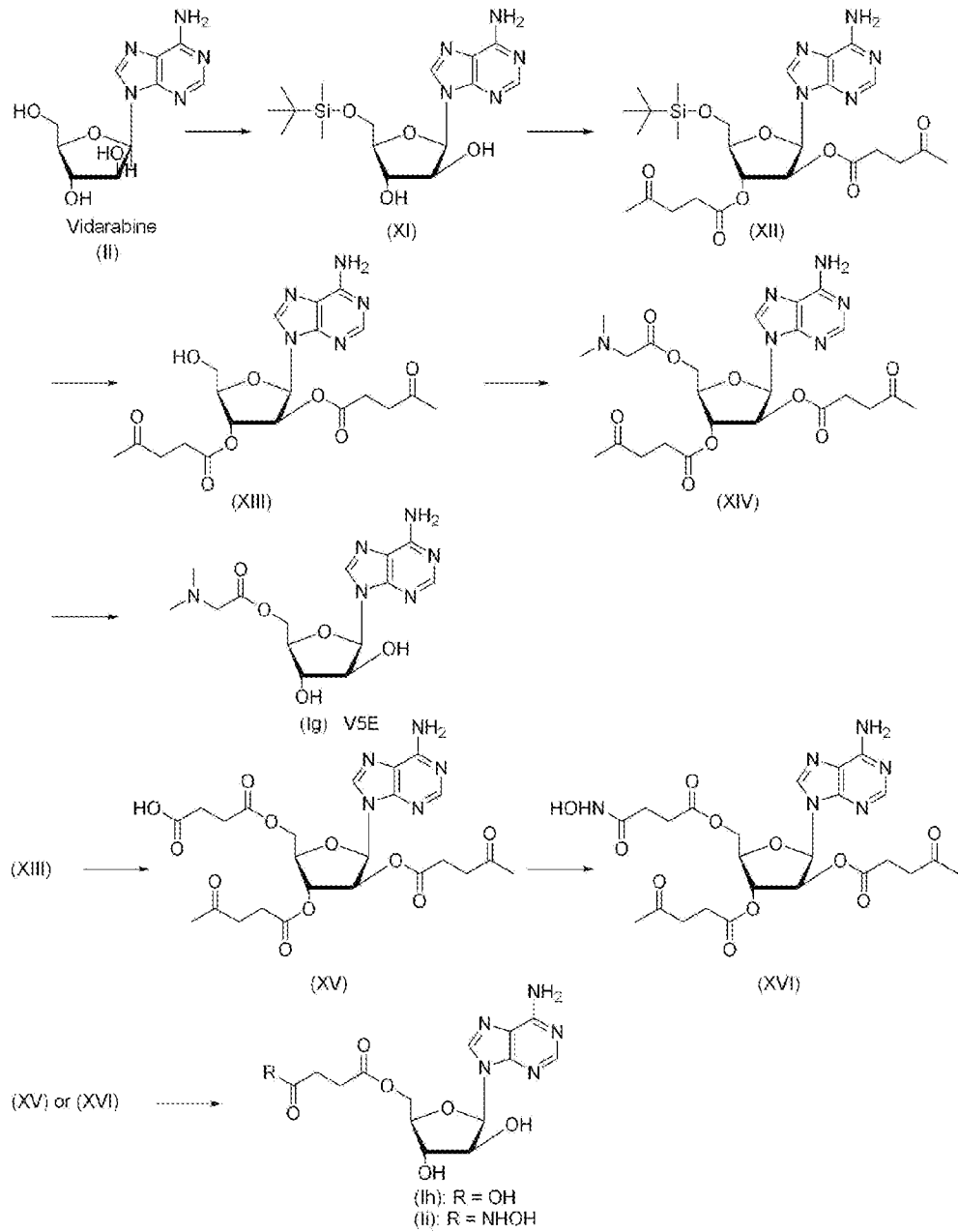




文献 (Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.) に記載の方法を参考にビダラビン (II) からジエステル化合物 (XIII) を合成した。化合物 (XIII) と N, N-ジメチルグリシンに脱水縮合剤 (DCC) を作用させることにより良好な収率でトリエステル化体 (XIV) が得られる。最後にヒドラジン水和物を作用させて、脱保護することにより目的の 5 位置換体 (Ig) が得られる。また、化合物 (XIII) と無水コハク酸を作用させることにより良好な収率でエステル化体 (XV) が得られる。このエステル化体 (XV) を 1-プロピルりん酸環状無水物で活性化し、ヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させることによりヒドロキサム酸 (XVI) が合成できる。最後にそれぞれにヒドラジン水和物を作用させて、脱保護することにより目的の 5 位置換体 (Ih)、(Ii) がそれぞれ得られる。N, N-ジメチルグリシンの代わりに他の酸性又は塩基性基を有するカルボン酸を、無水コハク酸の代わりに他の無水カルボン酸を用いてもよい。

[0024]

[化7]



[0025] 本発明の化合物の医薬的に許容される塩としては、ナトリウムリン酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩、硫酸塩などの塩を例示することができるが、これらに限定されない。本発明の化合物の医薬的に許容されるエステルとしては、エチレングリコールエステル、ジエチレングリコールエステル、トリエチレングリコールエステル、ポリエチレングリコールエステル、リン酸エステルなどのエステルを例示することができるが、これらに限定さ

れない。

- [0026] 本発明の化合物の医薬的に許容される溶媒和物としては、水、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、酢酸エチルなどとの溶媒和物を例示することができるが、これらに限定されない。
- [0027] 本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル及び溶媒和物は、アデニル酸シクラーゼ活性調節剤として利用することができる。
- [0028] また、本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル及び溶媒和物は、ベータ遮断剤の適応症（例えば、心不全、心筋梗塞、不整脈、狭心症、高血圧症、それらに関連する病態および疾患（例えば、振戦、乗り物酔い、時差ボケ、睡眠障害、バセドウ病、食道胃静脈瘤、偏頭痛、パーキンソン病など）の予防及び/または治療に用いることができる (Cardiac Practice 20, 69-73, 2009)。
- [0029] 心不全及び/又は心筋梗塞に関連する病態および疾患としては、不整脈、浮腫、息切れ、狭心症などを例示することができるが、これらに限定されない。
- [0030] 従って、本発明は、上記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含むアデニル酸シクラーゼ活性調節剤を提供する。本発明の薬剤は、心臓型アデニル酸シクラーゼに対して特に効果的である。
- [0031] また、本発明は、上記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む医薬組成物を提供する。
- [0032] 本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物が医薬として用いられる場合には、常法により製剤化した医薬製剤（例えば、注射剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤など）として、ヒト又は動物などの被験者に投与することができる。例えば、有効成分の量に換算して、1日あたり約10~50 mg/kg（体重）、好ましくは1日あたり約10~15 mg/kg（体重）の投与量で、1回または数回に分けて経口又は非経口投与するとよいが、その投与量や投与回数は、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

。注射剤に製剤化する場合には、蒸留水、生理食塩水などの担体を用いるとよく、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤に製剤化する場合には、デンプン、乳糖、白糖、炭酸カルシウムなどの賦形剤、デンプンのり液、アラビアゴム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤など、デンプン、寒天、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤などを用いるとよい。製剤中の有効成分の含有率は、1～99重量%の間で変動させることができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの形態をとる場合には、有効成分を5～80重量%含有させるのが好ましく、注射剤の場合には、有効成分を1～10重量%含有させるのが好ましい。

[0033] 本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル及び溶媒和物は、アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態（例えば、骨粗しょう症、皮膚のシワなどの老化現象、酸化ストレス過多、臓器機能低下など）の予防又は健康維持のために用いることもできる。その場合、本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル及び溶媒和物は、清涼飲料などの飲料、飴、ガム、パンなどの食品、粉末スープ、ふりかけなどの粉末製品等の飲食品に添加したり、適宜、賦形剤、香料、色素などとともに丸剤、顆粒、錠剤、カプセル剤などに成型して、健康食品あるいは栄養補助食品として供給することができる。従って、本発明は、本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む食品組成物を提供する。

[0034] 食品組成物における本発明の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の配合量は、有効成分を0.1～50重量%含有させるのが好ましい。

## 実施例

[0035] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0036] 〔実施例1〕

当教室の先行研究において、心臓型サブタイプの5型アデニル酸シクラーゼを欠損させた動物モデルが作製された (Circ. Res. 93: 364-371, 2003; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:9986-90, 2003; Cell 130:247-58, 2007; Circulation 116:1776-83, 2007)。本動物モデルを解析したところ、カテコラミン刺激に対する応答は低下するが定常状態の心機能は低下しないこと、慢性圧負荷やカテコラミンストレスによる心機能低下を予防することが明らかとなった (Circ. Res. 93: 364-371, 2003; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:9986-90, 2003; Circulation 116:1776-83, 2007)。これらのことは、5型サブタイプの選択的抑制は心機能を低下させずに心不全時に心臓保護的に働くことを示す。一方、長年抗ヘルペス剤として臨床で用いられてきた薬剤 (ビダラビン) が5型サブタイプ選択的な抑制効果を示すことが明らかになり、心不全モデル実験でも当該薬剤による心筋保護的な作用が示された (J. Biol. Chem. 279: 40938-40945, 2004)。また、85万種類の薬剤を独自に開発したコンピュータモデルにて解析した結果、5型サブタイプ選択的な抑制剤が複数同定された。一方、5型サブタイプ欠損マウスの脳線条体組織では野生型マウスに比べてアデニル酸シクラーゼ活性が2割程度まで低下していた (J. Biol. Chem. 278:16936-16940, 2003)。すなわち、野生型線条体組織のアデニル酸シクラーゼ活性はその大部分が5型サブタイプによるものであることから、当該組織が5型サブタイプの活性を選択的に抑制する薬剤のスクリーニングに適していると考えられた。

[0037] 本研究では、アデニル酸シクラーゼ5型サブタイプ選択的な心不全治療薬を新たに開発することを最終的な目標としている。今回、ビダラビンをベースに高い親水性を付与した3種類の化合物を新規に合成し、以下に示す実験によりそれら化合物の5型サブタイプへの抑制効果を検討した。親水性をたかめることにより、中枢の一部 (線条体) に発現する5型サブタイプに対する刺激性を抑えることができると考えられる。

[0038] 方法

<ビダラビン誘導体>

ビダラビンの2位、3位、5位にそれぞれジメチルアミノ酢酸基を導入した新規化合物を合成した(図1)。

[0039] <2-O-(N,N-ジメチルグリシル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを経典 (O' Mahony, G.; Sundgren, A.; Svensson, S.; Grotli, M. *Tetrahedron* 2007, 63, 6901-6908.) の方法に従って、ヒドロキシ基をジシロキサニリデン保護し、化合物 (III) を調製した。

[0040] 化合物 (III) 510 mg と N, N-ジメチルグリシン 113 mg をジクロロメタン 5 mL に溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 248 mg を加え、室温で6時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って3回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 19:1) にて精製し、化合物 (IV) 488 mg (82%収率)を得た。この様にして得た化合物 (IV) をテトラヒドロフラン 5 mL に溶解させ、テトラブチルアンモニウムフルオリド 1.8 mL (1 M テトラヒドロフラン溶液)を加え、12時間室温で攪拌を行った。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 15:1) にて精製し、白色粉末として目的物 (Ia) を 260 mg (90%収率)で得た。

[0041]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )

$\delta$  8.24 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 6.45 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 5.84 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.32 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 5.12 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.46 (q,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 3.87-3.61 (m, 3H), 3.05 (d,  $J = 17.0$  Hz, 1H), 2.53 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H), 1.91 (s, 6H).

[0042] <3-O-(N,N-ジメチルグリシル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを経典 (Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.) の方法を参考に、二つのヒドロキシ基をシリル保護した。N, N-ジメチルホルム

アミド 20 mL にビダラビン (II) 2.0 g を攪拌懸濁させ、そこへ N, N-ジメチルアミノピリジン 0.114 g とトリエチルアミン 3.10 mL 加え、最後に tert-ブチルジメチルクロロシラン 2.26 g を加えた。室温で 24 時間反応させた後、溶媒を減圧下留去し、残渣に酢酸エチルを加え、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄し、続いて水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を留去することにより化合物 (VII) を得た。

[0043] 化合物 (VII) 496 mg と N, N-ジメチルグリシン 113 mg をジクロロメタン 5 mL に溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 248 mg を加え、室温で 6 時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って 3 回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 19:1) にて精製し、化合物 (VII I) 465 mg (80% 収率) を得た。この様にして得た化合物をテトラヒドロフラン 5 mL に溶解させ、テトラブチルアンモニウムフルオリド 1.8 mL (1 M テトラヒドロフラン溶液) を加え、12 時間室温で攪拌を行った。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 15:1) にて精製し、目的物 (Id) を 259 mg (92% 収率) で得た。

[0044]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )

$\delta$  8.22 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 6.27 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.28 (t,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.00-3.96 (m, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.29 (s, 2H), 2.28 (s, 6H).

[0045] <5-O-(N,N-ジメチルグリシル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを文献 (Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.) の方法に従って、ヒドロキシ基をシリル保護し、続いてレブリン酸との縮合によりエステル化し、最後にシリル基を脱保護することにより化合物 (XIII) を調整した。

[0046] 化合物 (XIII) 463 mg と N, N-ジメチルグリシン 113 mg をジクロロメタン 5 mL に溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 248 mg を加え、室温で6時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って3回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 19:1) にて精製し、化合物 (XIV) 400 mg (73%収率)を得た。この様にして得た化合物をピリジン-酢酸緩衝液に溶解させ、ヒドラジーン水和物 0.107 mL を加え、1時間室温で攪拌を行った。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 15:1) にて精製し、白色粉末として目的物 (Ig) を 167 mg (65%収率)で得た。

[0047]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )

$\delta$  8.14 (s, 2H), 7.26 (s, 2H), 6.30 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 5.79 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 4.41 (dd,  $J = 7.1, 11.8$  Hz, 1H), 4.30 (dd,  $J = 3.6, 11.8$  Hz, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.98 (s, 1H), 3.19 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H), 2.23 (s, 6H).

合成された2位置換体 (V2E)、3位置換体 (V3E) および5位置換体 (V5E) は10 mMとなるように純水でストック溶液を調製した。ビダラビンは100%ジメチルスルホキシドに溶解して同様に10 mMのストック溶液を調製した。

[0048] <2-O-(3-カルボキシプロピオニル)ビダラビンと2-O-(3-(N-ヒドロキシカルバモイル)プロピオニル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを文献 (O'Mahony, G.; Sundgren, A.; Svensson, S.; Grotli, M. *Tetrahedron* 2007, 63, 6901-6908.) の方法に従って、ヒドロキシ基をジシロキサニリデン保護し、化合物 (III) を調製した。

[0049] 化合物 (III) 510 mg をピリジン 5 mL に溶解し、無水コハク酸 120 mg を加え、室温で6時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って3回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマ



トグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 19:1）にて精製し、化合物（V）を580 mg（95%収率）で得た。

[0050] 1-プロピルりん酸環状無水物（1 M 酢酸エチル溶液、1 mL）をアセトニトリル 3 mL に加え、上記で得た化合物（V）610 mg とトリエチルアミン 0.50 mL を加えた。30分室温で攪拌後、ヒドロキシルアミン塩酸塩 208 mg を加え、室温で12時間攪拌をした。反応液を酢酸エチルで薄めた後、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 10:1）にて精製し、化合物（VI）386 mg（62%収率）を得た。

[0051] 上記で得た化合物（V）610 mg あるいは（VI）625 mg をテトラヒドロフラン 5 mL に溶解させ、テトラブチルアンモニウムフルオリド（1 M テトラヒドロフラン溶液、3 mL）を加え、12時間室温で攪拌を行った。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 10:1）にて精製し、それぞれ目的物（Ib）302 mg（82%収率）、（Ic）310 mg（81%収率）で得た。

[0052] <3-O-(3-カルボキシプロピオニル)ビダラビンと3-O-(3-(N-ヒドロキシカルバモイル)プロピオニル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを文献（Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.）の方法に従って、ヒドロキシ基をシリル保護し、化合物（VII）を調製した。

[0053] 化合物（VII）496 mg をピリジン 5 mL に溶解し、無水コハク酸 120 mg を加え、室温で6時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って3回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 19:1）にて精製し、化合物（IX）を572 mg（96%収率）で得た。

[0054] 1-プロピルりん酸環状無水物（1 M 酢酸エチル溶液、1 mL）をアセトニ

トリル 3 mL に溶解させ、上記で得た化合物 (IX) 596 mg とトリエチルアミン 0.50 mL を加えた。30分室温で攪拌後、ヒドロキシルアミン塩酸塩 208 mg を加え、室温で12時間攪拌をした。反応液を酢酸エチルで薄めた後、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 15:1) にて精製し、化合物 (X) 403 mg (66%収率)を得た。

[0055] 上記で得た化合物 (IX) 596 mg あるいは (X) 611 mg をテトラヒドロフラン 5 mL に溶解させ、テトラブチルアンモニウムフルオリド(1 M テトラヒドロフラン溶液、5 mL)を加え、12時間室温で攪拌を行った。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 10:1) にて精製し、白色粉末としてそれぞれ目的物 (Ie) 301 mg (82%収率)、(If) 309 mg (81%収率)を得た。

[0056] <5-O-(3-カルボキシプロピオニル)ビダラビンと5-O-(3-(N-ヒドロキシカルバモイル)プロピオニル)ビダラビンの合成>

東京化成工業製ビダラビンを文献 (Shen, W.; Kim, J.-S.; Kish, P. E.; Zhang, J.; Mitchell, S.; Gentry, B. G.; Breitenbach, J. M.; Drach, J. C.; Hilfinger, J. *Bio. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 792-796.) の方法に従って、ヒドロキシ基をシリル保護し、続いてレブリン酸との縮合によりエステル化し、最後にシリル基を脱保護することにより化合物 (XIII) を調製した。

[0057] 化合物 (XIII) 463 mg をピリジン 5 mL に溶解し、無水コハク酸 120 mg を加え、室温で6時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンを使って3回抽出操作を行い、抽出した有機層に硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過をして、ろ液を濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール 10:1) にて精製し、化合物 (XV) 539 mg (96%収率)を得た。

[0058] 1-プロピルりん酸環状無水物 (1 M 酢酸エチル溶液、1 mL) をアセトニトリル 3 mL に溶解させ、上記で得た化合物 (XV) 564 mg とトリエチルアミ

ン 0.50 mL を加えた。30分室温で攪拌後、ヒドロキシルアミン塩酸塩 208 mg を加え、室温で12時間攪拌をした。反応液を酢酸エチルで薄めた後、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 10:1）にて精製し、化合物（XVI）360 mg（62%収率）を得た。

[0059] 上記で得た化合物（XV）564 mg あるいは（XVI）579 mg をピリジン-酢酸緩衝液に溶解させ、ヒドラジン-水和物 0.107 mL を加え、1時間室温で攪拌した。反応液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン／メタノール 10:1）にて精製し、白色粉末としてそれぞれ目的物（Ih）310 mg（84%収率）、（Ii）305 mg（80%収率）を得た。

[0060] <膜アデニル酸シクラーゼアッセイ>

生後12~15週齢の野生型マウス（C57BL）（日本チャールズリバー株式会社）およびAC5ノックアウト（KO）マウス（Circ. Res. 93: 364-371, 2003）から線条体・心臓・肺組織を摘出し、それぞれの膜タンパク質画分を調製した。得られた膜タンパク質標品を用い、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン（50  $\mu$ M、Sigma Cat. No. F6886）および各種化合物の存在下で30°Cにて反応液（20 mM HEPES, pH 8、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTA, pH 8、0.1 mM ATP、1 mM phospho creatine、8 U/mL creatine phosphor kinase、200  $\mu$ M IBMX）をインキュベートしcAMPを産生させた。線条体および肺では1  $\mu$ g、心臓では2  $\mu$ gの膜タンパク質をそれぞれ本アッセイに用いた。反応開始から15分（線条体、肺）、または30分（心臓）後にトリクロロ酢酸（TCA）溶液を終濃度5%となるように添加して反応を終了させ、遠心分離（13, 500 x g、10分）によりタンパク質を沈殿させた。

[0061] <H9c2培養細胞>

ラット心臓由来のH9c2細胞（ATCC）は、10%（v/v）のウシ胎児血清（FBS）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM、Sigma Cat. No. D6429）を用い、95%空気-5%CO<sub>2</sub>存在下に37°Cで培養した。80~90%コンフルエントのH9c2細胞を10%FBSを含むDMEMに懸濁し、24穴プレートに1ウェルあたり細胞数が

4万となるように細胞懸濁液を500  $\mu$ L添加し、37°Cで一晩インキュベートした。その後細胞を無血清DMEM (500  $\mu$ L/well) 中で48時間インキュベートし、cAMP accumulationアッセイに供した。

[0062] <ラット成体心筋細胞>

Sprague-Dawley雄ラット (日本エスエルシー) (240-260g)をペントバルビタール(50mg/kg ip)で麻酔後、ヘパリンを投与(1000UPS/kg iv)したのち、迅速に心臓を摘出し、すみやかにランゲンドルフ還流装置に摘出した心臓を装着する。0.06%コラゲナーゼと0.02%プロテアーゼを含むCa<sup>2+</sup>-free Tyrode溶液で還流を行った。KB溶液(KOH 85mM, KCl 30mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30, MgSO<sub>4</sub> 3, EGTA 0.5, HEPES 10, l-Glutamine 50, Taurin 20mM, pH7.4)内で遊離してくる心筋細胞をフィルターろ過したのち10%FBSを含むDMEMに懸濁した。24穴プレートに1ウェルあたり細胞数が4万となるように細胞懸濁液を500  $\mu$ L添加し、37°Cで一晩インキュベートした。その後細胞を無血清DMEM (500  $\mu$ L/well) 中で4時間インキュベートし、cAMP accumulationアッセイに供した(Circulation 98, 1329-1334, 1998)。

[0063] <cAMP accumulationアッセイ>

H9c2細胞を500  $\mu$ MのIBMX存在下、37°Cで20分間インキュベートした後、各種ビダラビン誘導体を50  $\mu$ Mとなるように培養液に添加し、さらに10分間37°Cでインキュベートした。その後、フォルスコリンを100  $\mu$ Mとなるように添加しcAMP産生反応を開始させた。反応開始20分後、培養液を吸引し、200  $\mu$ Lの7.5% (v/v) TCA溶液を加えて反応を停止させ、さらに4°Cで一晩インキュベートした。また各種ビダラビン誘導体は10  $\mu$ M、フォルスコリンは5  $\mu$ M刺激条件下でラット成体培養心筋細胞をもちいても同様の実験を行った。

[0064] 膜アデニル酸シクラーゼアッセイ、cAMP accumulationアッセイともにTCA溶液中に含まれるcAMPを [<sup>125</sup>I]-cAMPを用いたラジオイムノアッセイにより測定した。

[0065] <慢性カテコラミン負荷実験>

イソプロテレノールを満たした浸透圧ミニポンプをマウス皮下に移植し、

徐放性にイソプロテレノールを1週間連続投与をおこなった (60mg/kg)。心臓超音波検査にて、心機能 (EF, エジェクションフラクション、駆出率) を測定し、イソプロテレノール投与前後で比較した。一般にイソプロテレノールをミニポンプを用いてマウスに投与すると、心機能 (EF) が低下する (心不全を発症する) ことが知られている。

[0066] <心筋細胞のTUNEL>

ラット胎児培養心筋細胞 (妊娠ラット (ウイスター) を日本エスエルシーより購入) の培養液にイソプロテレノール ( $10^{-5}\text{M}$ )、イソプロテレノールと同時にビダラビン、V2E、V3E、V5E ( $10^{-5}\text{M}$ ) をそれぞれ併用刺激 (48時間) した後細胞のアポトーシス陽性細胞をTUNEL染色で評価した。

[0067] <毒性試験>

野生型マウス (C57BL/6N: 日本エスエルシー) にビダラビン、V2E、V3E、V5Eをオスモティックミニポンプを用いてに投与後 (15mg/kg/day 7日間) 採血を行い、BUN, Creatinine, GPT, GOTを測定してコントロール群と比較した。

[0068] <心筋組織のTUNEL>

慢性カテコラミン負荷実験用いたマウスのアポトーシス陽性細胞をTUNEL染色で評価した。

[0069] 結果

新規に合成した3種類のビダラビン誘導体 (図1) は、いずれも純水により10 mMのストック溶液を調製した。臨床において、抗ヘルペス治療薬としては約2 mMのビダラビン点滴液を使用することから (アラセナ-A点滴静注用、持田製薬)、それと比較して5倍程度の濃度の溶液を調製することが可能であった。一方、今回ビダラビンは10 mMのストック溶液を100%DMSOを用いて調製した。

[0070] 野生型マウスの線条体膜のアデニル酸シクラーゼ活性は、50  $\mu\text{M}$ のフォルスコリン刺激で約15~20倍に上昇した。各種化合物を100  $\mu\text{M}$ の濃度で処理したところ、5型サブタイプの選択的抑制剤として既に報告されているビダラビンは、フォルスコリン存在下におけるアデニル酸シクラーゼ活性を約17.3%

まで抑制した。一方、フォルスコリンにより刺激されたアデニル酸シクラーゼ活性をV2Eは約24.5%、V3Eは約25.1%、V5Eは約24.9%まで減少させた（図2）。

[0071] 続いて、各種ビダラビン誘導体について野生型マウスの線条体、心臓および肺のアデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を3種類の濃度（10、50、100  $\mu\text{M}$ ）で解析した。その結果、線条体のアデニル酸シクラーゼ活性に対する $\text{IC}_{50}$ 値はビダラビンが約6.0  $\mu\text{M}$ 、V2Eが約13.1  $\mu\text{M}$ 、V3Eが約13.0  $\mu\text{M}$ 、およびV5Eが25.1  $\mu\text{M}$ と推定された。同様に、心臓における各種薬剤の $\text{IC}_{50}$ 値はそれぞれ7.7  $\mu\text{M}$ 、17.8  $\mu\text{M}$ 、19.9  $\mu\text{M}$ 、および42.9  $\mu\text{M}$ であった。これらのことは、線条体の全アデニル酸シクラーゼに占める5型サブタイプの発現比率が心臓のそれよりも圧倒的に高いためであると考えられた（図3）。さらに、AC5K0マウスの線条体のアデニル酸シクラーゼ活性に対するこれらの化合物の抑制効果は、野生型に比べて低いことが明らかになった（図4）。特に、線条体膜のアデニル酸シクラーゼ活性は50  $\mu\text{M}$ の阻害剤存在下でもコントロールの80%程度に保持されていた。このことは、各種ビダラビン誘導体が高い5型アデニル酸シクラーゼ抑制作用を持つことを示す。

[0072] また、V2Eは10  $\mu\text{M}$ の濃度において野生型心臓アデニル酸シクラーゼ活性を肺の約2.6倍強く抑制し、線条体は肺の約3.0倍強く抑制した。当該濃度におけるビダラビンの抑制効果の組織特異性は、肺と比較して心臓が約2.4倍、線条体が約2.8倍高いことから、V2Eはビダラビンと同等の5型選択的な抑制効果を有する親水性の高い化合物であることが示唆された（図5）。

[0073] 各種ビダラビン誘導体の5型アデニル酸シクラーゼノックアウトマウス（AC5K0）に対する抑制効果を野生型マウスと比較したところ、心筋組織膜タンパク内のアデニル酸シクラーゼ活性に対する各種ビダラビン誘導体の抑制効果は野生型マウスのほうがAC5K0に比較して有意に高かった。この結果はビダラビン誘導体が5型サブタイプに選択的な抑制効果があることを示唆している（図6）。

[0074] 一方、膜標本としたアデニル酸シクラーゼではなく、インタクトな細胞内

におけるアデニル酸シクラーゼによるcAMP産生に対する抑制作用の有無を確認することを目的に、フォルスコリンで刺激した細胞中に蓄積するcAMPレベルに与えるビダラビン誘導体の効果を調べた。今回は、予備的な実験としてラット心臓由来のH9c2培養細胞を材料として用いた。一般に化合物の中には細胞膜透過性の低いものもあり、そのような化合物は生体内での活性が極めて低くなるためである。その結果、各種阻害剤の存在下ではフォルスコリンにより蓄積したcAMPレベルがコントロールと比べて著明に低い値を示した（ビダラビン；約35.1%、V2E；約57.1%、V3E；約45.7%、V5E；約82.5%）（図7）。同様の実験を成体ラット心筋細胞を用いて行ったが、H9C2細胞を用いた場合と同様の傾向が得られた（図8）。このことから、ビダラビンおよびビダラビン誘導体は、インタクト細胞に対してもアデニル酸シクラーゼ抑制剤としての効果を発揮することが期待された。つまり良好な膜透過性を有することがわかった。

[0075] 野生型マウス(C57BL/6N)にオスモティックミニポンプ(Alzet2001)をもちいてイソプロテレノール(60mg/kg/day 7日間)のみを1週間投与したマウス(I S0)、イソプロテレノールと同時にビダラビン、V2E、V3E、V5Eをそれぞれ投与した(15mg/kg/day 7日間)。その結果イソプロテレノールのみを投与したマウスでは、投与前に比較して心機能(LVEF:心拍出量)の低下がみられたが、ビダラビンを同時に併用投与したマウスでは心機能低下が有意に抑制された(図9)。またビダラビンと同等の心機能抑制効果がV2E、V3E、V5Eを併用投与したマウスでも確認された(n=3-8, means+SE, \*P<0.05) (図9)。

[0076] 以上、本研究では新規に合成した3種類のビダラビン誘導体が高い親水性を有し、かつ5型アデニル酸シクラーゼを強く抑制することが明らかとなった。とりわけ2位置換体はビダラビンと同様の5型サブタイプ選択な抑制効果を持つことが示唆され、心不全の予防効果が示された。

[0077] 心筋細胞のTUNELでは、ラット胎児培養心筋細胞の培養液にイソプロテレノール( $10^{-5}$ M)、イソプロテレノールと同時にビダラビン、V2E、V3E、V5Eをそれぞれ併用刺激(48時間)した後細胞のアポトーシス陽性細胞をTUNEL染色で評

価した。V2E, V3E, V5Eはビダラビンと同等のイソプロテレノール刺激によるアポトーシス抑制効果がみられた( $n=4-7$ , means $\pm$ SE,  $*P<0.05$ ) (図10)。

[0078] 毒性試験では、ビダラビン、V2E、V3E、V5Eをオスモティックミニポンプを用いて投与(15mg/kg/day 7日間)を投与後に採血を行い、BUN, Creatinine, GPT, GOTを測定してコントロール群と比較した。コントロール群に比較して有意なBUN, Creatinine, GPT, GOTの上昇は見られなかった( $n=4-8$ , means $\pm$ SE) (図11)。

イソプロテレノールを用いた慢性カテコラミン負荷マウスの心筋組織のアポトーシス陽性心筋細胞の割合をTUNEL染色で評価した。慢性カテコラミン刺激により誘導される心筋細胞のアポトーシスをビダラビンとV2Eは同等に抑制した( $n=4-6$ , means $\pm$ SE) (図12)。

[0079] ビダラビン、V2E、V3E、およびV5Eの中枢移行性を、ストリキニーネ投与によりマウスに惹起される強直伸展性痙攣および死亡に対する拮抗作用により評価した。生理食塩水に溶解したストリキニーネ硝酸塩をマウス(C57BL/6N:日本エスエルシー, 雄, 10-12週齢)の頸背部皮下に1.5 mg/kgとなるように投与し、強直伸展性痙攣を起こし死亡に至るまでの時間を計測した。ビダラビン、V2E、V3E、およびV5Eは生理食塩水に溶解または懸濁させ、ストリキニーネ投与の15分前に腹腔内に投与した。

[0080] ビダラビンはヘルペス脳炎治療薬として臨床応用され中枢移行性が確認されているが150 mg/kg (0.525 mmol/kg)、300 mg/kg (1.05 mmol/kg)で容量依存的にストリキニーネによる痙攣死までの時間を有意に延長させた。一方、V2E、V3E、およびV5Eはビダラビンと同様の投与量において、死亡までの時間を延長しなかった。すなわちV2E、V3E、V5Eはいずれの薬剤も、ストリキニーネによる死亡発現率には影響を与えず中枢移行性がきわめて低いことが示唆された。なおいずれの薬剤を用いた実験でも死亡率は100%であった( $n=4-10$ , means $\pm$ SE) (図13)。

[0081] イソフルレンを用いてマウスを吸入麻酔後、心内心電図を記録する目的で口腔内から心電図アンプに接続した電極カテーテル(Millar: Model EPR800



、サイズ1.1 F、長さ4.5 cm)をゆっくりと食道に挿入し、P波が最も大きく記録される部位で電極カテーテルを固定した。固定した電極カテーテルは位置が動かないよう慎重に電気刺激装置に接続し、以後は体表面心電図をII誘導で記録した。次に2.5 mAの電圧刺激を30 msec間隔で60秒間加えることで、その後心房細動が一過性に誘発される。体表面心電図上、基線からP波が消失するとともに、R-R間隔が一定でなく脈が不整になることを確認できる時間を心房細動持続時間とした。

[0082] オスモティックミニポンプ(Alzet: 2001)を用いて正常野生型マウス(C57BL/6N)にDMSOに溶解したビダラビン(15mg/kg/day)、V2E、V3E、およびV5E(19.8 mg/kg/day)、またはDMSOのみを投与し、上記の条件で心房細動を誘発して正常洞リズムに戻るまでの心房細動持続時間を測定した(図14)。正常洞リズムが5分間以上持続し、心房細動の再発現がない事を確認して実験終了とした。なお、ヘルペス治療において、ヒトに対して認可されているビダラビンの最大投与量は15mg/kg/dayを10日間である。

ビダラビン、V2E、V3E、ならびにV5Eはペーシングにより誘発された心房細動が正常洞リズムにもどるまでの時間を有意に短縮した(n=4-8, means±SE)。

[0083] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

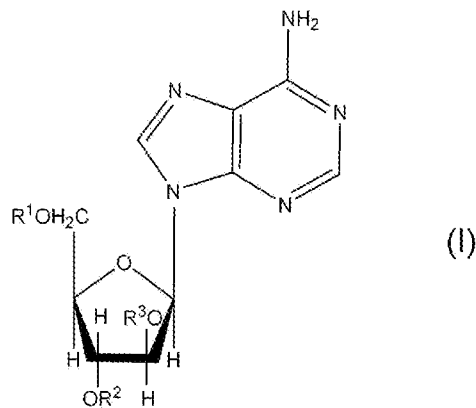
### 産業上の利用可能性

[0084] 本発明は、心不全、心筋梗塞、不整脈などの予防及び/又は治療に利用可能である。

## 請求の範囲

[請求項1] 下記の式(I)で表される化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。

[化1]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ、独立に、水素原子又は酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基であるが、但し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>のすべてが水素原子であることはない)

[請求項2] 酸性若しくは塩基性置換基を有するアシル基が、



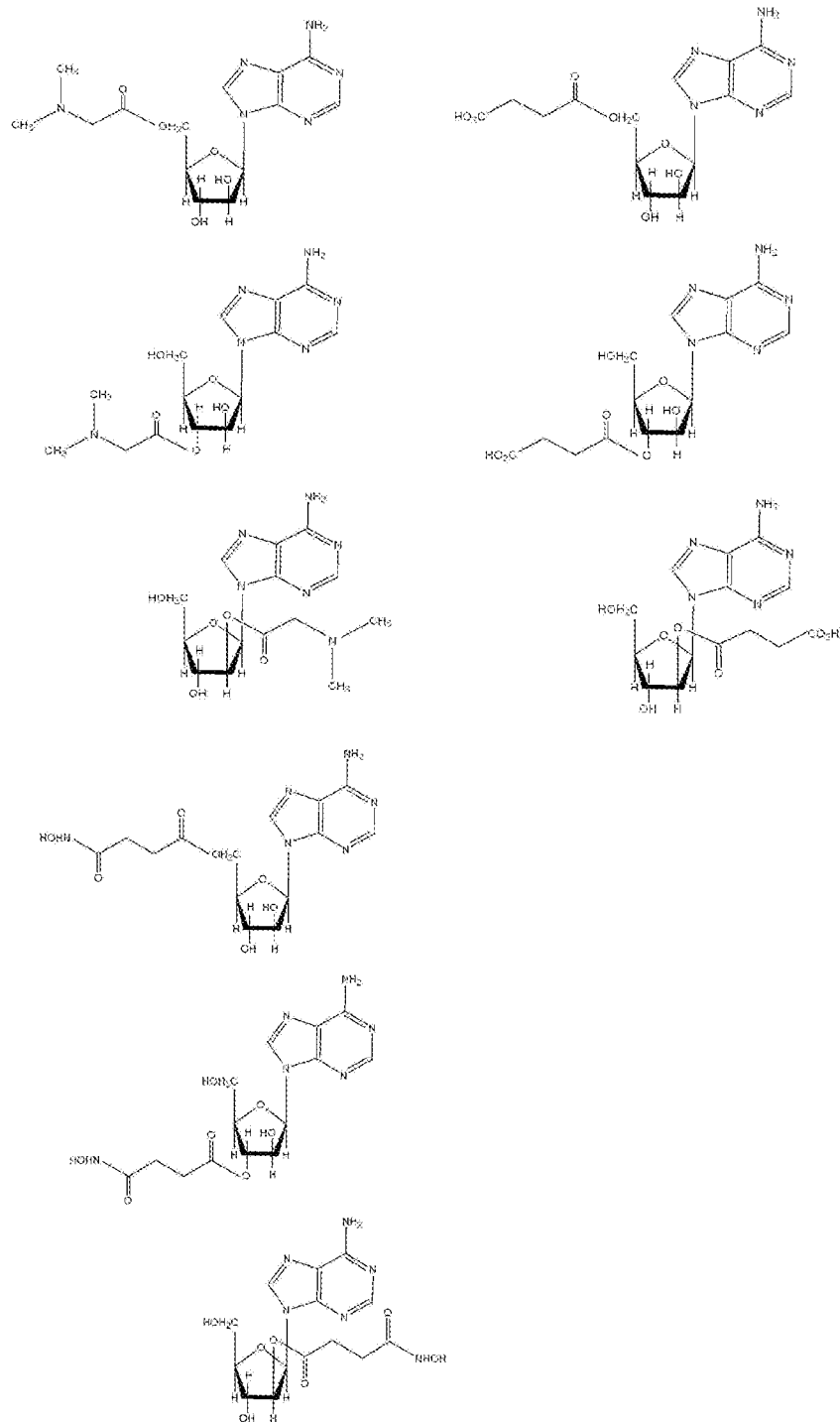
(式中、nは1～4の整数であり、Bは酸性若しくは塩基性置換基である。)

で表される基である請求項1記載の化合物。

[請求項3] 酸性若しくは塩基性置換基が、アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、カルボキシル基又はヒドロキシカルバモイル基である請求項1又は2記載の化合物。

[請求項4] 下記のいずれかの式で表される請求項1～3のいずれかに記載の化合物。

[化2]



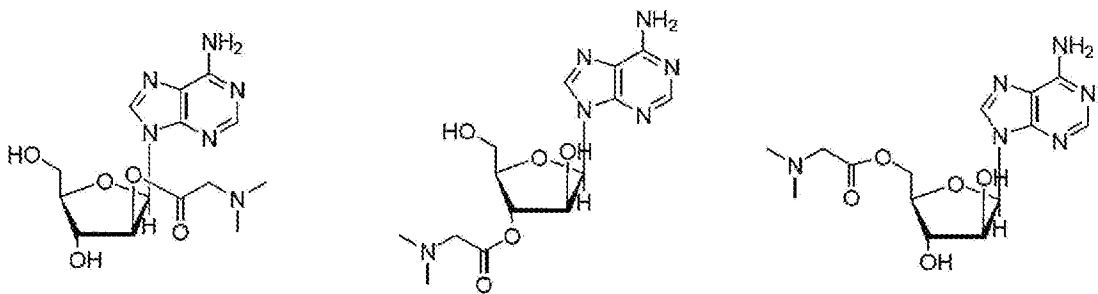
[請求項5] 請求項 1～4 のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含むアデニル酸シクラーゼ活性調節剤。

[請求項6] アデニル酸シクラーゼが心臓型アデニル酸シクラーゼである請求項 5 記載の薬剤。

- [請求項7] 請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む医薬組成物。
- [請求項8] ベータ遮断剤の適応症の予防及び/又は治療に用いられる請求項7記載の医薬組成物。
- [請求項9] ベータ遮断剤の適応症が、心不全、心筋梗塞、不整脈、狭心症、高血圧症及びそれらに関連する病態および疾患から成る群より選択される請求項8記載の医薬組成物。
- [請求項10] 請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物を含む食品組成物。
- [請求項11] アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持のために用いられる請求項10記載の食品組成物。
- [請求項12] 請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の医薬的に有効な量を被験者に投与することを含む、ベータ遮断剤の適応症を予防及び/又は治療する方法。
- [請求項13] ベータ遮断剤の適応症の予防及び/又は治療のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の使用。
- [請求項14] ベータ遮断剤の適応症を予防及び/又は治療する方法に使用するための請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。
- [請求項15] 請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の有効量を被験者に投与することを含む、アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持方法。
- [請求項16] アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防又は健康維持のための請求項1～4のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物の使用。
- [請求項17] アンチエイジングおよび長寿、それに関連する疾患および病態の予防

又は健康維持方法に使用するための請求項 1～4 のいずれかに記載の化合物、その医薬的に許容される塩、エステル又は溶媒和物。

[図1]



2位誘導体 (V2E)

Dimethylamino-acetic acid (2R,4S,5R)-2-(6-amino-purin-9-yl)-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-yl ester

$C_{14}H_{20}N_6O_5$   
Mol. Wt.: 352.35

C, 47.72; H, 5.72; N, 23.85; O, 22.70

3位誘導体 (V3E)

Dimethylamino-acetic acid (2R,3R,5R)-5-(6-amino-purin-9-yl)-4-hydroxy-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-yl ester

$C_{14}H_{20}N_6O_5$   
Mol. Wt.: 352.35

C, 47.72; H, 5.72; N, 23.85; O, 22.70

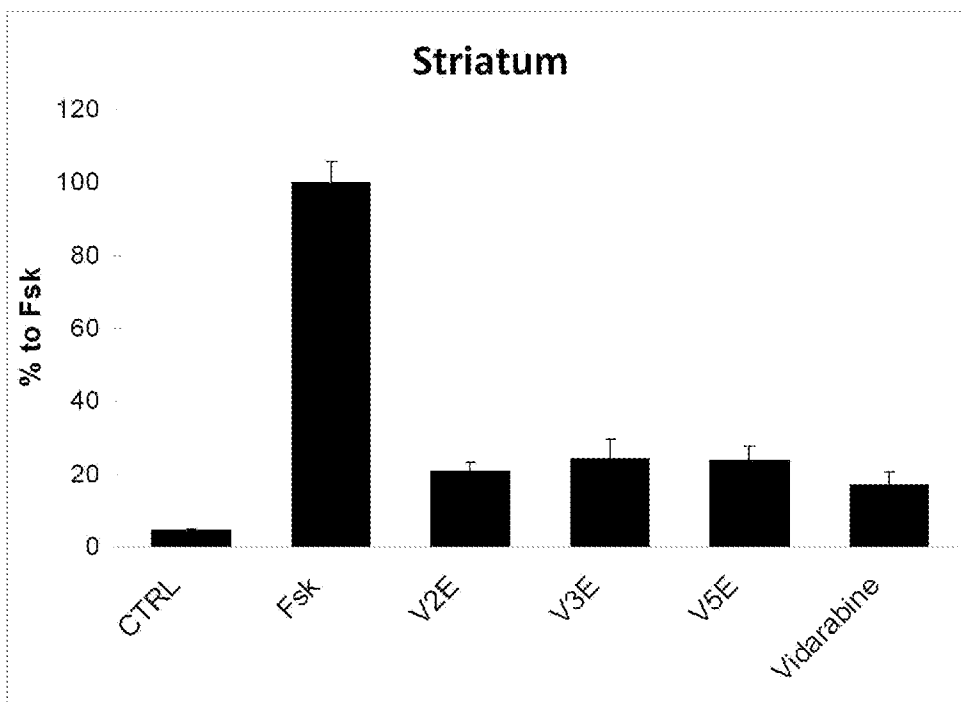
5位誘導体 (V5E)

Dimethylamino-acetic acid (2R,3R,5R)-5-(6-amino-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-ylmethyl ester

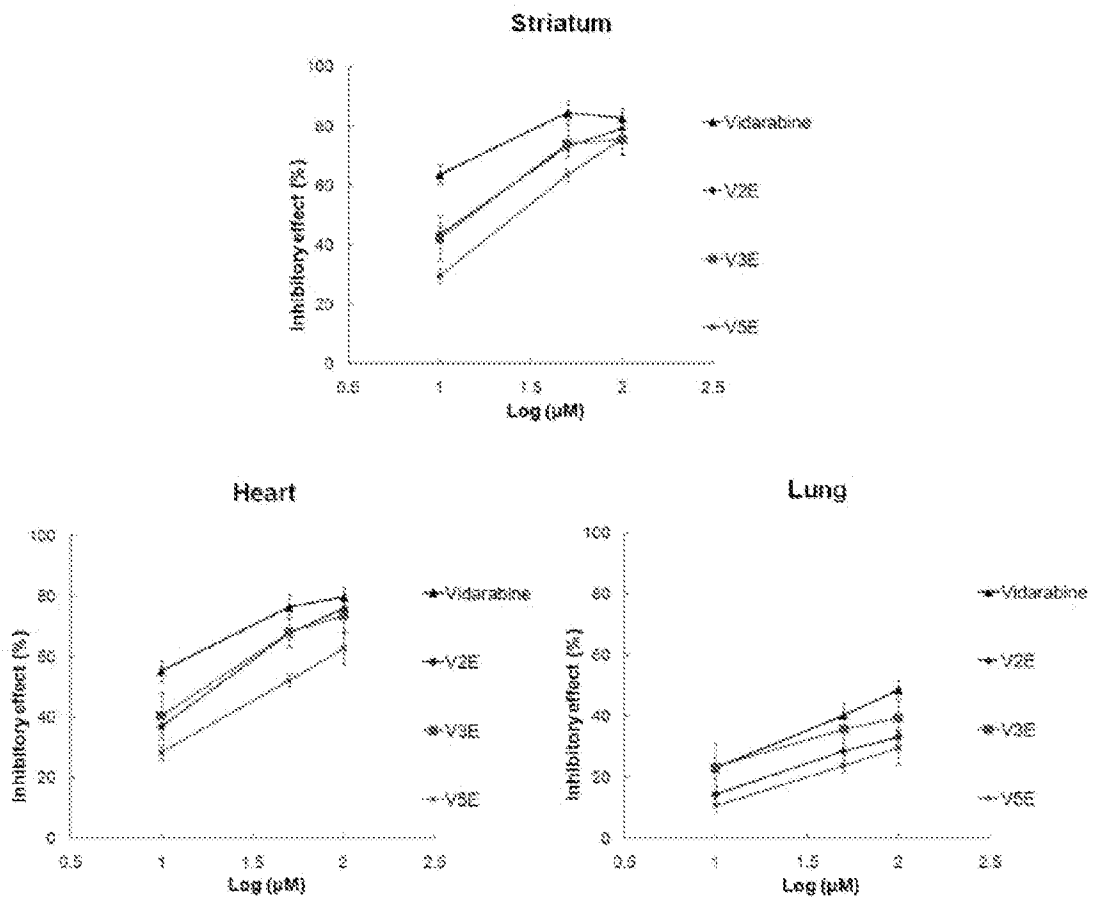
$C_{14}H_{20}N_6O_5$   
Mol. Wt.: 352.35

C, 47.72; H, 5.72; N, 23.85; O, 22.70

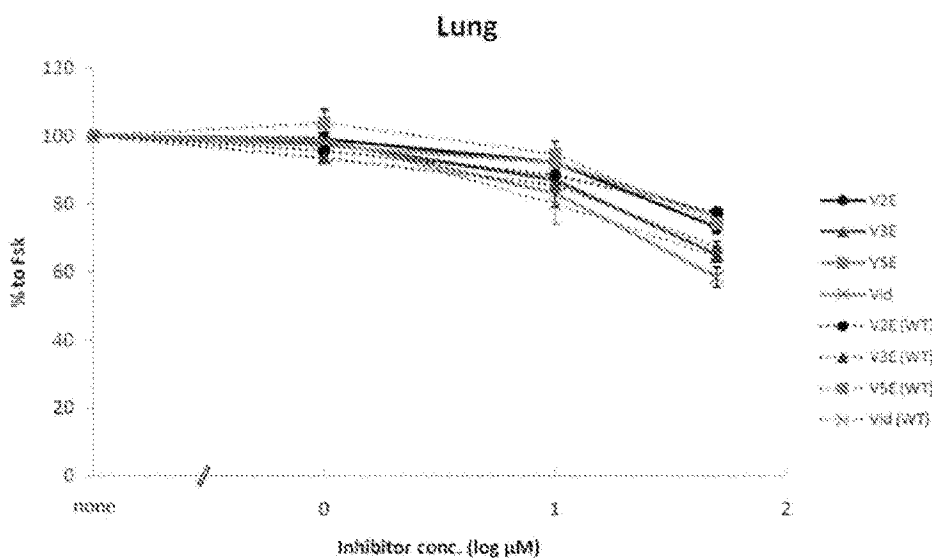
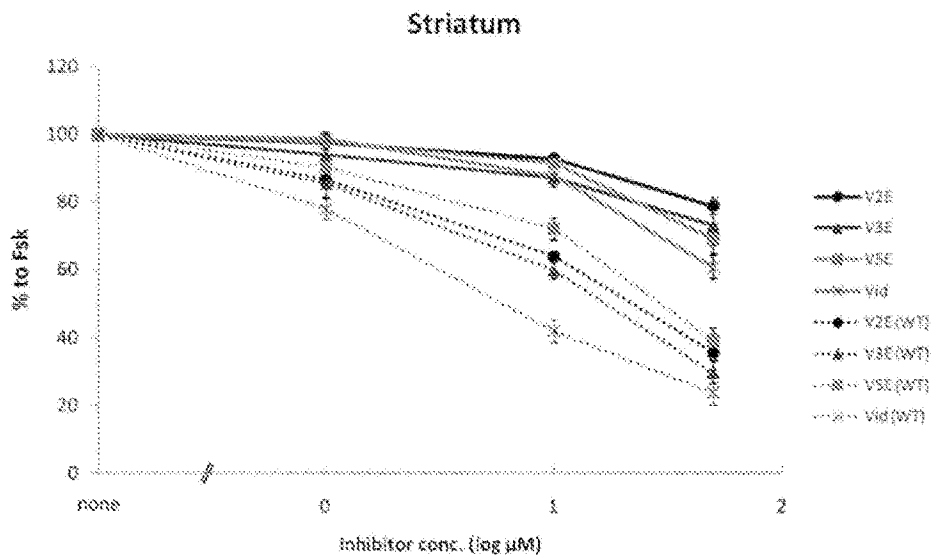
[図2]



[圖3]



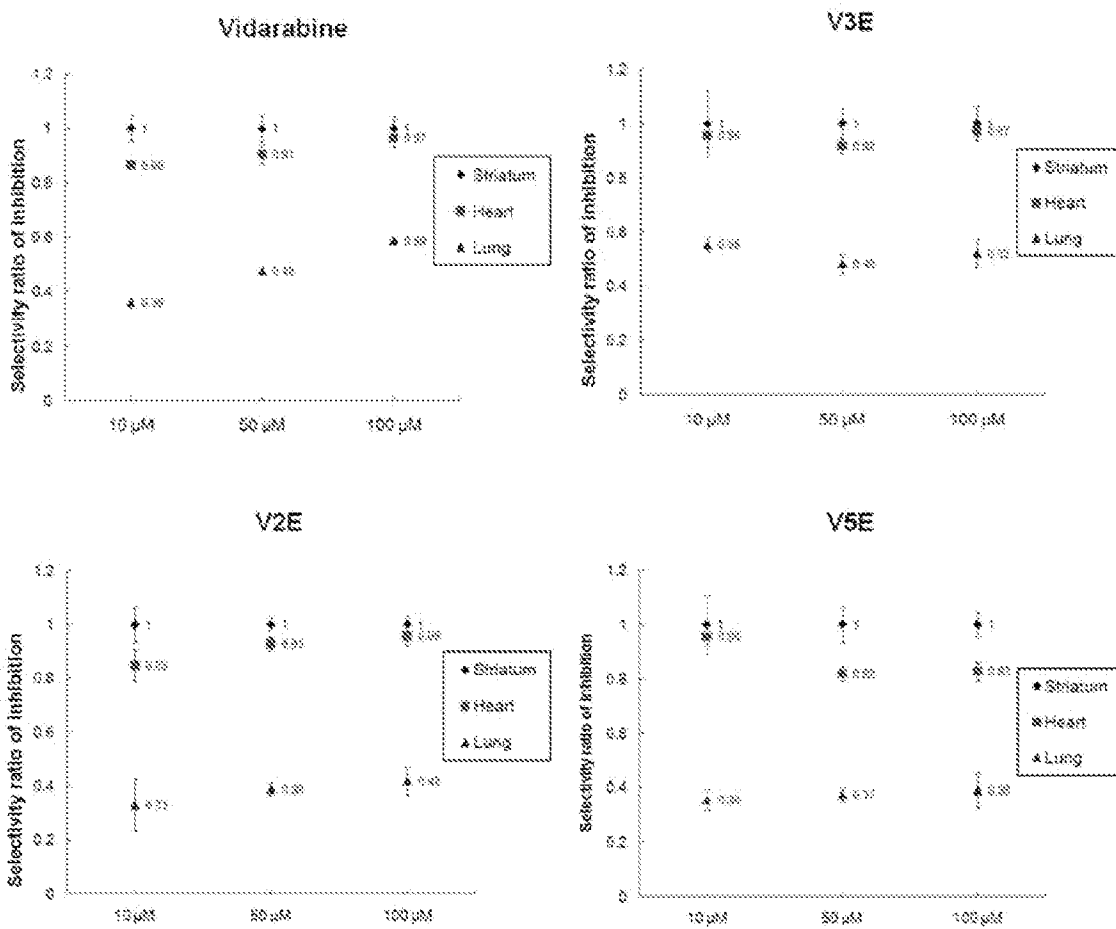
[圖4]



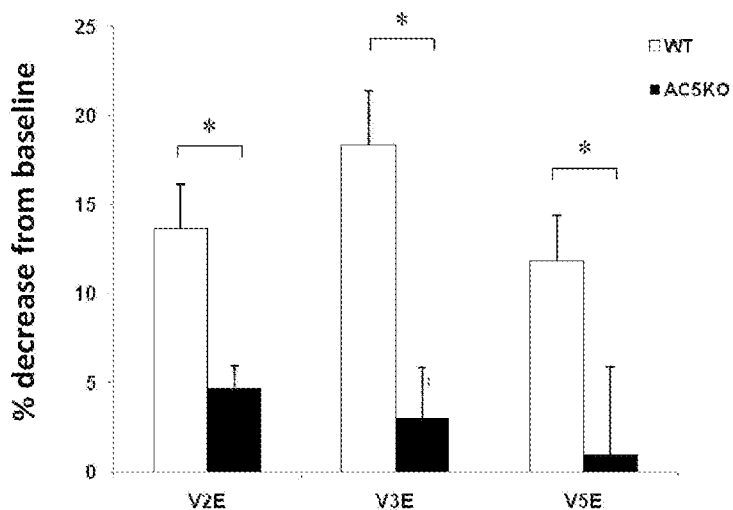
+



[圖5]

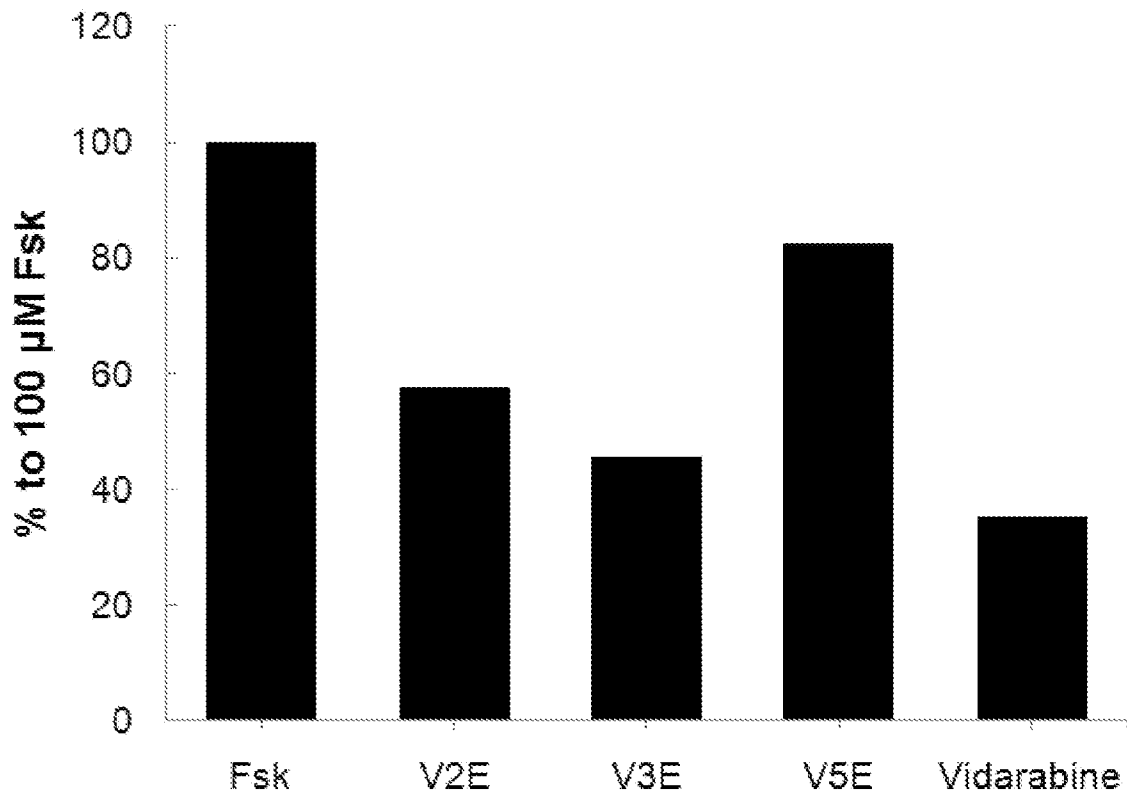


[圖6]

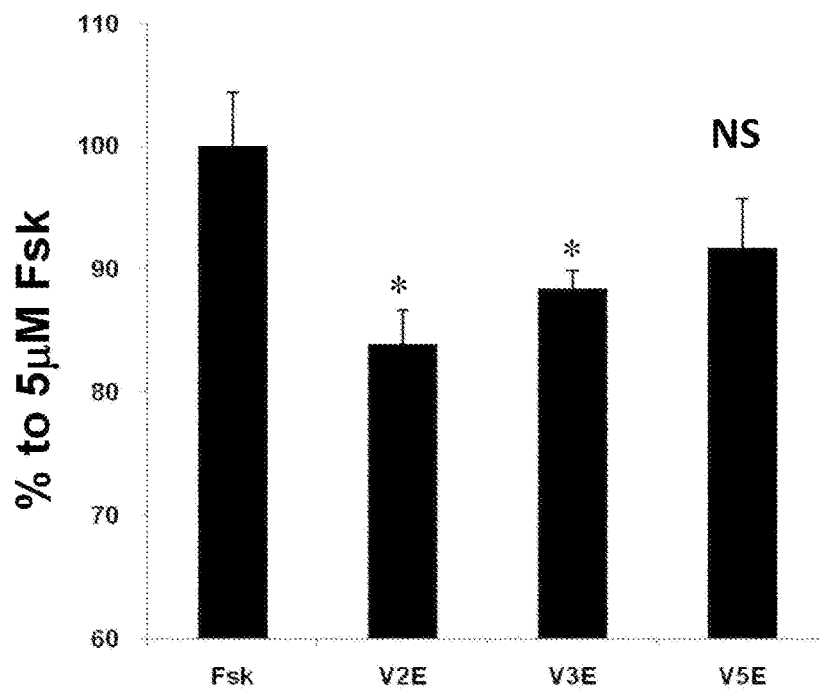


\* P<0.05 vs. WT  
n=6

[図7]

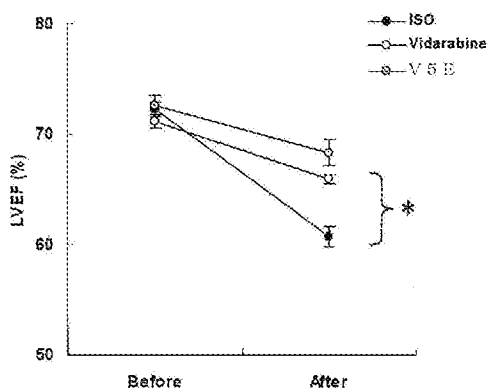
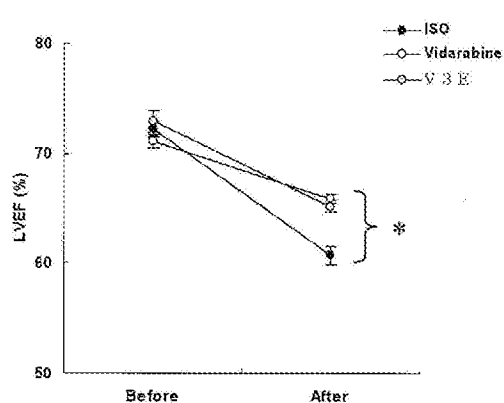
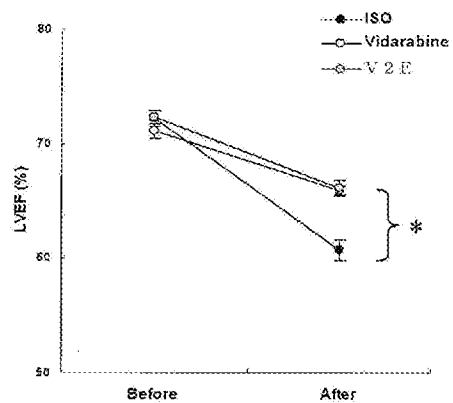


[図8]

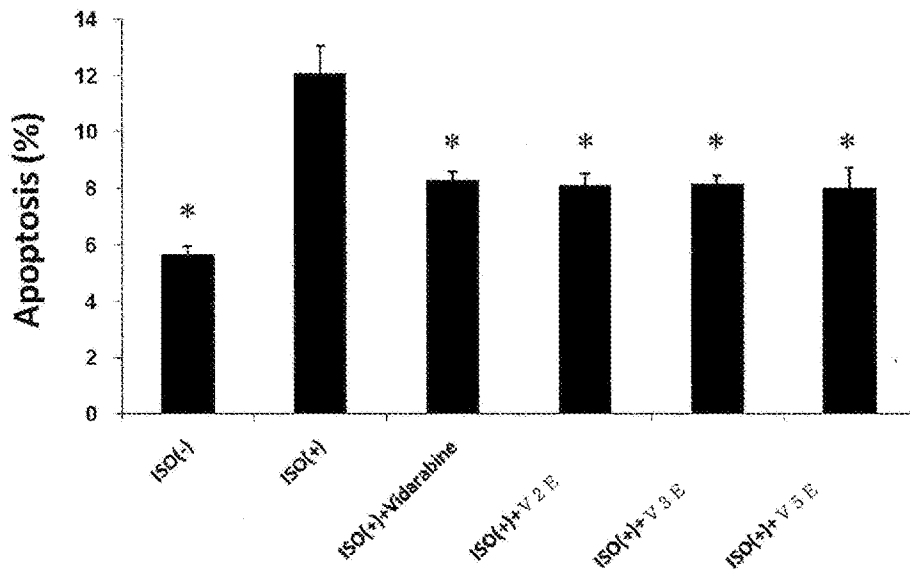


\* P<0.05 vs. Fsk  
n=4

[Figure 9]

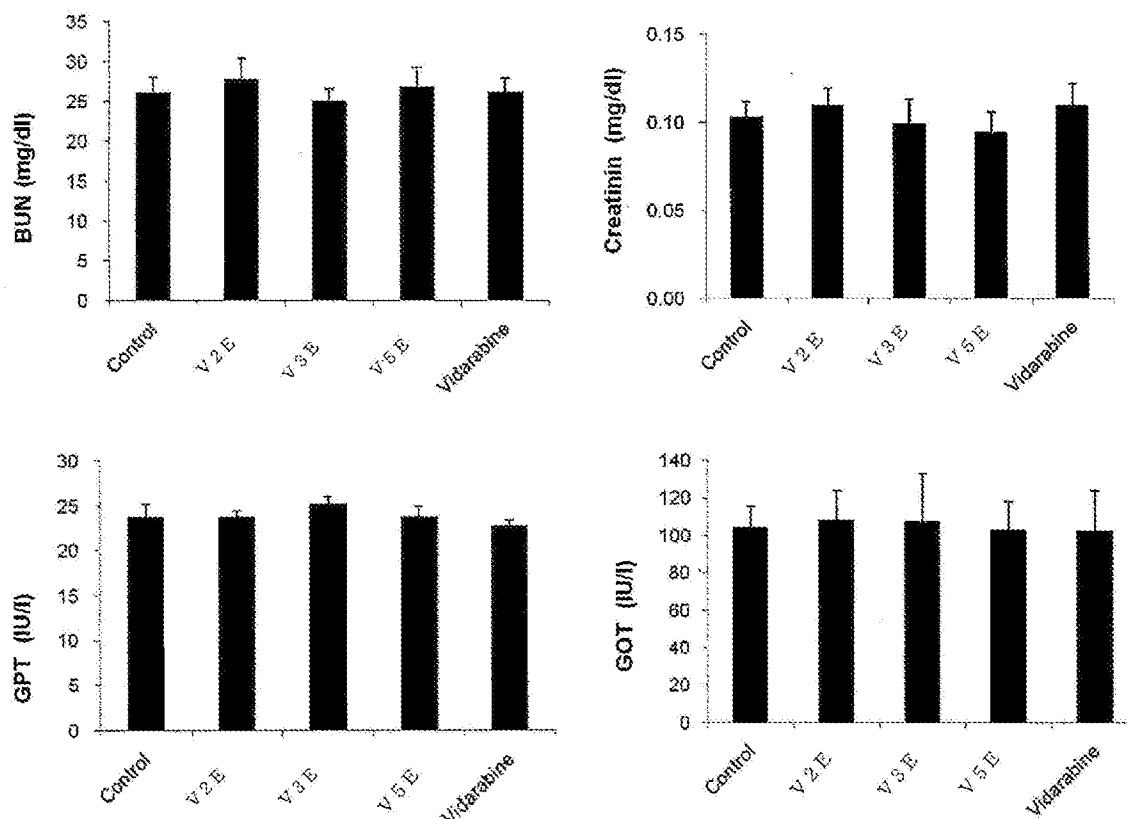


[Figure 10]



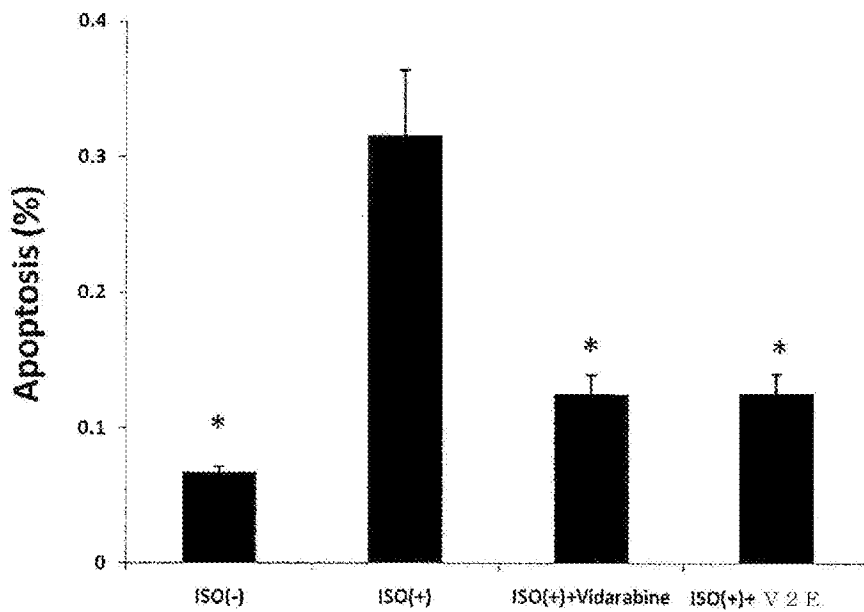
\*P<0.05 vs. ISO(+)  
n=4-7

[図11]



## AC5 抑制剤(15mg/kg/day 7days)

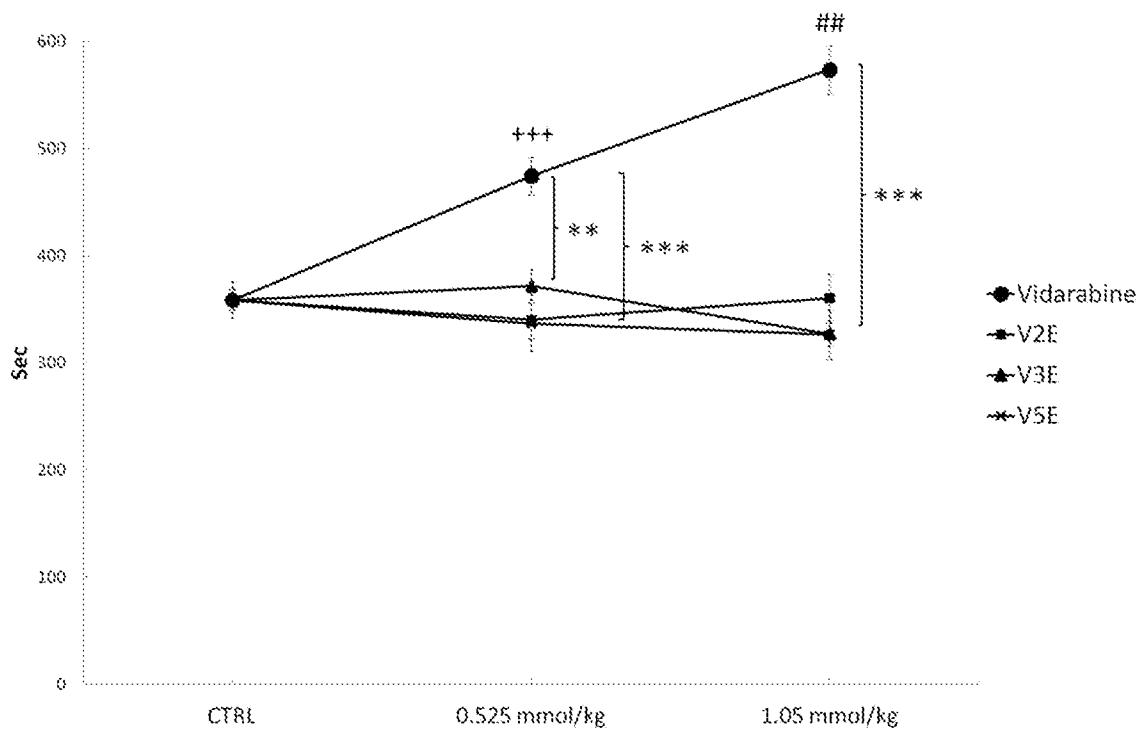
[図12]



\*P<0.05 vs. ISO(+)  
n=4-6

[圖13]

## Time to death induced by strychnine

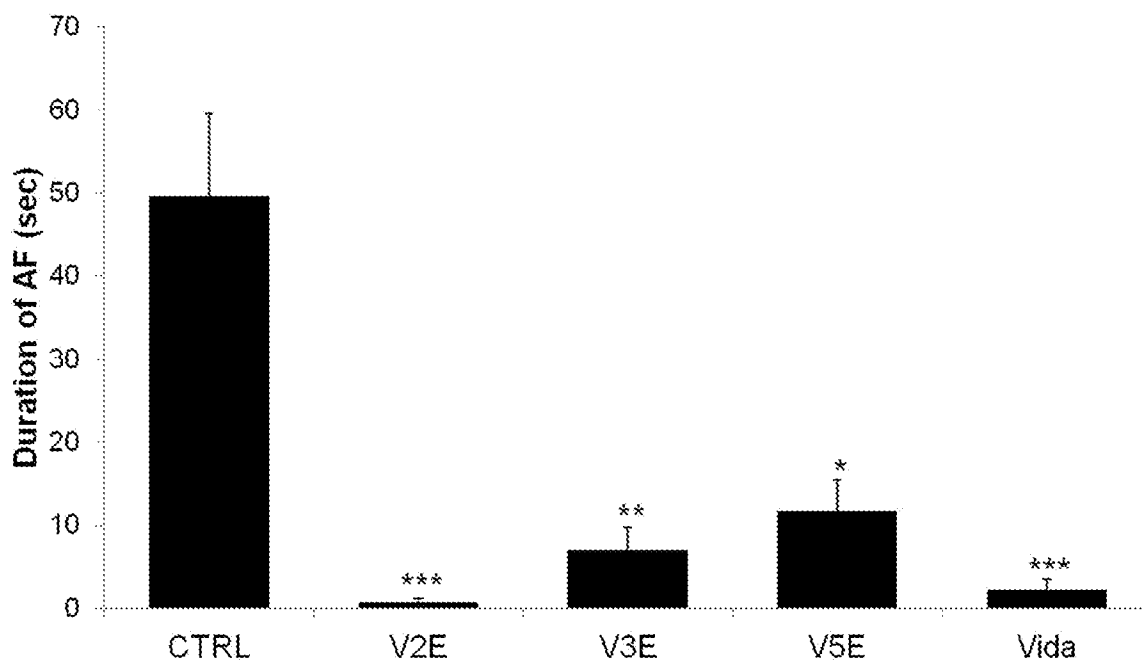


n=4-10,

\*\*&lt;0.01; \*\*\*P&lt;0.001, +++P&lt;0.001 vs CTRL; ##P&lt;0.01 vs Vidarabine 0.525 mmol/kg

[圖14]

## Esophageal pacing



n=4-8, \*P&lt;0.05; \*\*P&lt;0.01; \*\*\*P&lt;0.001 vs CTRL

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074098

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H19/19(2006.01)i, A61K31/7076(2006.01)i, A61P1/08(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/06(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H19/19, A61K31/7076, A61P1/08, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P9/12, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/112348 A2 (TSRL INC.), 04 October 2007 (04.10.2007), claims 1, 15, 19 to 22; examples 9 to 11 & US 2007/167353 A1	1-3, 7, 10-11, 14, 17
X	CN 1817866 A (Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences), 16 August 2006 (16.08.2006), claim 1; compound 4 (Family: none)	1-2, 7, 10-11, 14, 17
X	JP 2000-302675 A (Sankyo Co., Ltd.), 31 October 2000 (31.10.2000), claim 1; example 7 (Family: none)	1-3, 7, 10-11, 14, 17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 November, 2011 (28.11.11)

Date of mailing of the international search report  
06 December, 2011 (06.12.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074098

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bruce M. Chassy, et al., <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 1967, 242(16), pages 3655 to 3658	1-2,14,17
X	Ivan Rychlik, et al., <i>Journal of Molecular Biology</i> , 1969, 43(1), pages 13 to 24	1-3,14,17
X	S. K. Chung, et al., <i>Bioorganic Chemistry</i> , 1978, 7(3), pages 303 to 312	1-3,14,17
X	Prakash Bhuta, et al., <i>Biochemistry</i> , 1982, 21(5), pages 899 to 905	1-3,14,17
X	Max H. Iltzsch, et al., <i>Biochemical Pharmacology</i> , 1995, 49(10), pages 1501 to 1512	1-4,7,10-11, 14,17
X	Alex M. Aronov, et al., <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i> , 1998, 8(24), pages 3505 to 3510	1-4,7,10-11, 14,17
X	Roger A. Johnson, et al., <i>Molecular Pharmacology</i> , 1989, 35(5), pages 681 to 688	1-11,14,17
X	Takeshi Onda, et al., <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 2001, 276(51), pages 47785 to 47793	1-11,14,17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/074098

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.: 12-13, 15-16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 12 to 13 and 15 to 16 involve "methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy".
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C07H19/19(2006.01)i, A61K31/7076(2006.01)i, A61P1/08(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/06(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C07H19/19, A61K31/7076, A61P1/08, A61P9/00, A61P9/04, A61P9/06, A61P9/10, A61P9/12, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2007/112348 A2 (TSRL INC) 2007. 10. 04, 請求項 1、15、19～22、実施例 9～11 & US 2007/167353 A1	1-3, 7, 10-11, 14, 17
X	CN 1817866 A (Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences) 2006. 08. 16, 請求項 1、化合物 4 (ファミリーなし)	1-2, 7, 10-11, 14, 17

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの                  「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献                  「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 28. 11. 2011	国際調査報告の発送日 06. 12. 2011
----------------------------	----------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 智雄	4 P	4150
	電話番号 03-3581-1101 内線 3492		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2000-302675 A (三共株式会社) 2000. 10. 31, 請求項 1、実施例 7 (ファミリーなし)	1-3, 7, 10-11, 14, 17
X	Bruce M. Chassy, et al., Journal of Biological Chemistry, 1967, 242(16), 3655-3658 頁	1-2, 14, 17
X	Ivan Rychlik, et al., Journal of Molecular Biology, 1969, 43(1), 13-24 頁	1-3, 14, 17
X	S. K. Chung, et al., Bioorganic Chemistry, 1978, 7(3), 303-312 頁	1-3, 14, 17
X	Prakash Bhuta, et al., Biochemistry, 1982, 21(5), 899-905 頁	1-3, 14, 17
X	Max H. Iltzsch, et al., Biochemical Pharmacology, 1995, 49(10), 1501-1512 頁	1-4, 7, 10-11, 14, 17
X	Alex M. Aronov, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998, 8(24), 3505-3510 頁	1-4, 7, 10-11, 14, 17
X	Roger A. Johnson, et al., Molecular Pharmacology, 1989, 35(5), 681-688 頁	1-11, 14, 17
X	Takeshi Onda, et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(51), 47785-47793 頁	1-11, 14, 17

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 12-13, 15-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 12-13、15-16 は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。