薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (9) 856-859 (1988)

抗ウイルス剤に関する研究 (第1報) ピリドベンゾアゾール類の抗ウイルス活性

茂田士郎,^{*,a} 細谷光亮,^a 望月 忍,^a 千葉卓男^{*,b}

福島医科大学細菌学,^a 東北大学薬学部^b

Studies on Antiviral Agents. I. Antiviral Activity of Pyridobenzoazoles

SHIRO SHIGETA,^{*,a} MITSUAKI HOSOYA,^a SHINOBU MOCHIZUKI,^a
and TAKUO CHIBA^{*,b}

Department of Bacteriology, Fukushima Medical College,^a Hikarigaoka 1,
Fukushima 960, Japan and Pharmaceutical Institute,
Tohoku University,^b Aobayama, Sendai 980, Japan

(Received April 4, 1988)

Various pyridoazoles have been synthesized and tested against respiratory syncytial virus, Flu-V (A-Ishikawa/17/82), and herpes simplex virus (KOS-1). Among these compounds, 2-carboxy-4-ethoxycarbonyl-1-oxo-1*H*,5*H*-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (2) and 2-benzamido-4-cyano-1-oxo-1*H*,5*H*-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (4) were found to have significant antiviral activity.

Keywords—antiviral activity; respiratory syncytial virus; influenza virus; herpes simplex virus; pyrido[1,2-*a*]benzimidazole; antiviral agent

β -ラクタム系抗生物質による細菌感染症に対する化学的療法は飛躍的に進展し、多くのすぐれた薬剤が開発されている。これに対しウイルス感染症に活性のある薬剤として報告され、しかも臨床に適用可能とされるものはあまりにも数の上で少なすぎる現状となっている。近年、Ara-A (arabinofuranosyl adenine),¹⁾ 及び ACV (acyclovir)²⁾ 等の抗ヘルペスウイルス活性を有する化学療法剤が開発され、臨床面ですぐれた成果を挙げている。このように純粋に化学的に合成された薬剤に活性を示すものが多い中で、deoxyribonucleic acid (DNA) ウイルス特にヘルペスウイルスに有効なものが大部分を占め、ribonucleic acid (RNA) ウイルスに対する薬剤の開発には遅れが目立っている。最近、acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) の猛威が知られることとなり、ますます RNA ウイルスに活性な薬剤の出現が望まれるに至っている。特に RSV (respiratory syncytial ウイルス) は古くから乳幼児に重篤な細気管支炎や肺炎を引き起こす悪質な RNA ウイルスとして知られている。しかしながら、ワクチンによる予防法は良い結果がみられず、逆に重症な肺炎を惹起させてしまうことが多い。現在のところ、合成薬剤である ribavirin が吸入法で用いられ、^{3,4)} RSV に対して治療効果が認められているにすぎない。このように RNA ウイルスに対して臨床面で使用可能な薬剤の種類が少ないことと、またより広い抗ウイルス

Chart 1

ペクトルを有する薬剤の開発が急務とされていることから、新規な抗ウイルス剤の合成を目的として以下に述べる研究を実施した。

従来より、ベンズイミダゾール誘導体の中にピコルナウイルスに対し、活性を示す薬剤⁵⁾や RSV に活性な薬剤⁶⁾が報告されていることに着目し、種々のピリドベンゾアゾール誘導体を合成し、組織培養細胞におけるウイルスの増殖抑制作用について検討を加えた。その結果、ピリドベンゾアゾール誘導体の中に顕著な抗ウイルス活性を有する化合物を見出した。

実験の部

ウイルスと細胞 RSV は Long 株を HeLa 細胞で、influenza ウイルス (Flu-V) は A-Ishikawa/17/82 (H₃N₂) を MDCK 細胞で、更に単純ヘルペスウイルス (HSV) は KOS 株 (1) を HEF 細胞で assay した。

抗ウイルス効果測定⁷⁻⁹⁾ 96 穴のマイクロプレートに細胞を 35°C で 2 日間培養して単層となったところで増殖用培養液 (GM) を捨て、最終濃度が 200, 40, 8.0, 1.6, 0.3 及び 0 µg/ml となるように細胞維持液 (MS) で希釈した薬剤溶液を 0.1 ml ずつ加えた。更に各穴に 30 tissue culture infective dose (TCID₅₀) のウイルス液 0.1 ml を加え、35°C で 5% CO₂ インキュベーターを用い 5 日間培養した後、各穴における cytopathogenic effects (CPE) の有無を観察して ED₅₀ (effective dose) を求めた。

細胞毒性 細胞が単層となったところで GM を薬剤希釈溶液に換え、毎日形態の変化を観察し、細胞毒性を調べた。薬剤添加後 2 日目と 7 日目に生細胞数の生存率 (viability) がコントロールのその 50% に減少する薬剤濃度 (CTD₅₀: cytotoxic dose) を求めた。また [5-³H]ウリジン及び [CH₃-³H]デオキシチミジンの細胞内不溶性分画中への取り込みを調べ、コントロールの取り込みの 50% に抑制する薬剤濃度 (ID₅₀: inhibitory dose) を求めた。

RSV 増殖実験 HeLa 細胞に MOI (multiplicity of infection) 0.1 で RSV を感染させ、0, 8, 16, 24 及び 60 時間後に細胞及び維持液を 1 回凍結融解して集め、低速遠心による上清中の感染性ウイルス力価を TCID₅₀

Chart 2

TABLE I. Values ($\mu\text{g/ml}$) of ED_{50} and CTD_{50} of Pyrido[1,2-*a*]benzoxazoles (1–10), Pyrimido[1,2-*a*]benzimidazole (11), and Ribavirin

1–10

11

Compound	X	R_1	R_2	RSV		FluV-A		HSV	
				ED_{50}	CTD_{50}	ED_{50}	CTD_{50}	ED_{50}	CTD_{50}
1	NH	NHCOPh	CO_2Et	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
2	NH	CO_2H	CO_2Et	40 <	40 <	≈ 40	<200	7.3	25
3	NH	NHCOPh	COCH_3	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
4	NH	NHCOPh	CN	0.95	30	≈ 8	40 <	8 <	<40
5	NH	CO_2H	CN	40 <	<200	≈ 200	<200	40 <	<200
6	S	NHCOPh	CO_2Et	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
7	S	NHCOPh	COCH_3	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
8	S	NHCOPh	CN	40 <	40 <	40 <	<200	40 <	<200
9	O	NHCOPh	CO_2Et	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
10	O	NHCOPh	CN	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <	40 <
11	—	—	—	8 <	8 <	40 <	40 <	8 <	40 <
Ribavirin	—	—	—	2.8	<200	3.4	<500	40 <	<200

法で測定した。薬剤を 2 又は 5 $\mu\text{g/ml}$ 加えたものと、コントロールのウイルス力価を比較して RSV の増殖抑制を検討した。

薬剤の合成 化合物 1–10 は既報¹⁰⁾に従い、それぞれ対応するベンズイミダゾール酢酸、ベンゾチアゾール酢酸及びベンゾオキサゾール酢酸誘導体と 4-ethoxymethylene-2-phenyl-5-oxazolone (**12**) とより合成した。また化合物 2 と 5 は ethyl 2-benzimidazoleacetate (**13**) 及び 2-benzimidazoleacetonitrile (**14**) と 5-methoxymethylene-2,2-dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan (**15**) との反応により合成した。更に化合物 11 を 2-aminobenzimidazole (**16**) と 12 とより合成した。化合物 2, 5 及び 11 の合成法を以下に述べる。

2-Carboxy-4-ethoxycarbonyl-1-oxo-1*H*,5*H*-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**2**)——化合物 13 (408 mg, 2 mmole) に CHCl_3 (10 ml) 中化合物 15 (340 mg, 2 mmole) を加え、2 h 加熱還流する。析出する結晶を濾取し、 CH_2Cl_2 -MeOH (1 : 1) で再結晶して 2 (針状晶) を得る。収量 516 mg (86%)。mp 238–240°C (dec.). Anal. Calcd $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 60.00; H, 4.03; N, 9.33. Found: C, 59.94; H, 3.98; N, 9.25. IR (KBr): 3340, 1638 cm^{-1} .

2-Carboxy-4-cyano-1-oxo-1*H*,5*H*-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**5**)——化合物 14 (314 mg, 2 mmole) と化合物 15 (340 mg, 2 mmole) とを CHCl_3 (10 ml) 中 2 h 加熱還流する。析出する結晶を濾取し、AcOH より再結晶する。収量 450 mg (89%)。mp 285–290°C (dec.) (りん片状晶)。Anal. Calcd $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3$: C, 61.16; H, 2.79; N, 16.60. Found: C, 61.20; H, 2.68; N, 16.79. IR (KBr): 3340, 2200, 1636 cm^{-1} .

2-Benzamido-1-oxo-1*H*,5*H*-pyrimido[1,2-*a*]benzimidazole (**11**)——化合物 16 (266 mg, 2 mmole) と化合物 12 (434 mg, 2 mmole) とを CHCl_3 (10 ml) 中反応させて 11 を得た。収量 559 mg (92%)。mp 297°C (dec.) りん片状晶 (EtOH より再結晶)。Anal. Calcd $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 66.23; H, 3.92; N, 9.09. Found: C, 66.04; H, 4.09; N, 8.89. IR (KBr): 3340, 1637 cm^{-1} .

結果及び考察

11 種類の化合物について RSV, FluV-A 及び HSV に対する抗ウイルス活性をスクリーニングしたところ、次のような結果が得られた。化合物 2 及び 4 以外に抗ウイルス活性を示すものはなかった。化合物 2 は HSV に対して、 ED_{50} が 7.3 $\mu\text{g/ml}$ 、形態変化による CTD_{50} が 25 $\mu\text{g/ml}$ 、また FluV-A に対して ED_{50} が約 40 $\mu\text{g/ml}$ と HSV と FluV-A に対し抗ウイルス作用を示した。また化合物 4 は RSV に対して ED_{50} が 0.95 $\mu\text{g/ml}$ 、形態

変化による CTD₅₀ が約 30 µg/ml であり, 更に FluV-A に対して ED₅₀ が約 8 µg/ml と RSV と FluV-A に対して抗ウイルス活性を示した. 化合物 4 が RSV に対して効果があることが判明したので, HeLa 細胞に対する viability による CTD₅₀ を調べたところ, 2 日目が 75 µg/ml で 7 日目が 5 µg/ml であった. またウリジン及びデオキシチミジンの取り込み抑制による ID₅₀ はそれぞれ 26.5 µg/ml と 30.5 µg/ml であり, RNA と DNA の合成がともに抑制されることも判明した. この際, selectivity index (S.I.) は約 30 であった. 化合物 4 の RSV 増殖抑制の効果は 2 µg/ml の濃度で 16 時間以降にみられ, ウイルス力価をコントロールの 10^{-1.5}—10^{-2.5} 倍に抑制した.

以上の結果から, 化合物 4 は rivabirin と同程度の S.I. で RSV の増殖を抑制することが明らかとなった. また, 4 と同じピリドベンズイミダゾール環を基本骨格とする 2 が FluV-A と HSV に対して抗ウイルス活性を示すことより, ピリドベンズイミダゾール誘導体が broad-spectrum を有する抗ウイルス物質の可能性が高いと考えられる. なお他のベンゾアゾール環系, ベンゾチアゾールやベンゾオキサゾール誘導体では全く活性を示さないことから, ベンズイミダゾール環はこの系において必須の骨格であることが明白となった. また, 化合物 4 の 4 位のシアノ基をエトキシカルボニル基に置換した化合物 1 では効果の消失がみられた. 次に化合物 4 の 2 位のベンズアミド基をカルボキシ基に置換しても (化合物 5), 効果が消失することが判明した. 更に化合物 4 の 4 位炭素原子を窒素原子に置換した化合物 11 にも著しい効果が認められないことから, 4 位シアノ基と 2 位ベンズアミド基は抗 RSV 活性において重要な役割を果していることが推察される. 現在のところ, 構造活性相関などまだ不明な点が多いが, 従来より報告されている抗ウイルス剤はほとんどが核酸の類似体であることと比較すると, 全く新しい骨格を有していることから, 今後更に類縁化合物を合成し, その作用機構の解明を目的として研究を行う予定である.

謝辞 本研究にあたり, 共同研究の機会を与えて下さいました国立仙台病院臨床研究部部長 沼崎義夫医学博士に深謝いたします.

引用文献

- 1) W. W. Lee, A. Benitez, L. Goodman, B. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2648 (1960); R. W. Sidwell, G. J. Dixon, S. M. Sellers, F. M. Shabel Jr., *Appl. Microbiol.*, **16**, 370 (1968); F. M. Shabel Jr., *Chemotherapy*, **13**, 321 (1968).
- 2) G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, H. J. Shaeffer, *J. Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5716 (1977); H. J. Shaeffer, *Nature* (London), **272**, 583 (1978).
- 3) R. W. Sidwell, J. H. Huffmann, G. P. Khare, L. B. Allen, J. T. Witkowski, R. K. Robins, *Science*, **177**, 705 (1972).
- 4) 茂田士郎, 化学療法の領域, **2**, 164 (1986).
- 5) C. J. Pfau, K. P. Camyre, *Virology*, **35**, 375 (1968).
- 6) E. J. Dubovi, J. D. Geratz, S. R. Shaver, R. R. Tidwell, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 649 (1981).
- 7) F. Kawana, S. Shigeta, M. Hosoya, H. Suzuki, E. de' Clercq, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1225 (1987).
- 8) S. Shigeta, K. Konno, T. Yokota, K. Nakamura, E. de' Clercq, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 906 (1988).
- 9) 茂田士郎, 川口英洋, 伊藤正彦, 臨床とウイルス, **12**, 428 (1984).
- 10) T. Chiba, T. Takahashi, C. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4002 (1985).