

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538276

(P2009-538276A)

(43) 公表日 平成21年11月5日 (2009.11.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/445 (2006.01)	A 6 1 K 31/445	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-507606 (P2009-507606)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月24日 (2007. 4. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月19日 (2008. 12. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2007/050177
 (87) 国際公開番号 W02007/123403
 (87) 国際公開日 平成19年11月1日 (2007. 11. 1)
 (31) 優先権主張番号 60/794, 088
 (32) 優先日 平成18年4月24日 (2006. 4. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

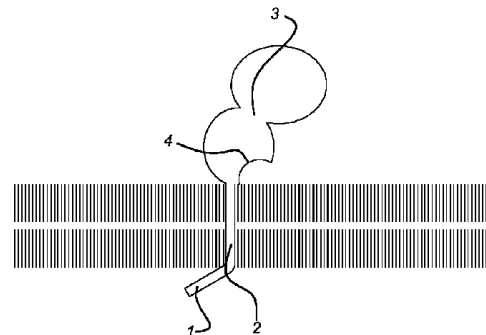
(71) 出願人 508318421
 アカデミッシュ メディシュ セントラム
 オランダ国 エヌエル - 1105 ビ
 ーエー アムステルダム、 マイベルクド
 レーフ 45
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 嚢胞性線維症の改良型治療

(57) 【要約】

本発明は、嚢胞性線維症の治療のための治療標的を開示する。非リソソームグルコシルセラミダーゼ (GBA 2) の阻害が、一般的 de l F 5 0 8 - C F T R 突然変異を保持する C F 患者由来の細胞においてクロライド電流を十分に回復させることが判明した。膜二重層面の最上部に位置する酵素の触媒中心 (4) とともに、特に強力な阻害剤が、膜二重層に挿入できる基を有するデオキシノジリマイシン誘導体に認められる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

嚢胞性線維症の治療用薬剤の調製のための G B A 2 阻害剤の使用。

【請求項 2】

前記阻害剤が、膜二重層に挿入できる基に結合したイミノ糖部分を含み、前記基が 6 個 ~ 40 個の炭素原子を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

膜二重層に挿入できる前記基が、1 個の窒素原子が存在する 6 員環を含む前記イミノ糖に結合する、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

膜二重層に挿入できる前記基が、前記イミノ糖の前記 6 員環の前記窒素原子に結合する、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記イミノ糖が、デオキシノジリマイシン又はその誘導体である、請求項 2 から 4 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記デオキシノジリマイシンが、グルコピラノースの立体配置を有する、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

6 個 ~ 40 個の炭素原子を含む前記基が、疎水性部分を含み、前記疎水性部分が、環を含有する 3 個以上の炭素原子を含み、前記環が、別の環と 2 個以上の炭素原子を共有する、請求項 2 から 6 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

前記疎水性部分がコレステロール、 α -コレスタノール、フェナントレン及びアダマンタンから選択される、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

6 個 ~ 40 個の炭素原子を含む前記基が、三級ブチル又はネオペンチル基を含む、請求項 2 から 6 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

前記阻害剤が、N - [5' - (アダマンタン - 1' - イル - メトキシ) - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン、N - [5' - (アダマンタン - 1' - イル - メトキシ) - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシン、N - [5' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン及び N - [5' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシンから選択される、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 11】

アルキルが、4 個 ~ 12 個の炭素原子を有するアルキレン基を意味する、N - [5' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - 1 - デオキシノジリマイシン又は N - [5' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、嚢胞性線維症の分野にある。特に、嚢胞性線維症の治療の治療標的及び適切な化合物が提供される。

【背景技術】

【0002】

嚢胞性線維症 (C F) は、身体の種類部分、特に肺及び消化器系を侵す遺伝性の状態である。C F は、白人に最も一般的な遺伝性疾患で、出生児 2 , 500 人当たり約 1 人が罹患する。C F の乳児 5 人中約 1 人は、出生時に診断され、その場合、当該乳児の腸管が特に濃厚な胎便によって閉塞される。この状態は、手術を要する場合がある。C F の人々の

10

20

30

40

50

うち、半数をわずかに上回る人々は、年令相応の成長や体重増加を示していないので、乳児として診断される。これは、膵臓が十分な脂肪分解酵素を産生しておらず、食物中の脂肪の最適以下の吸収を起こし、カロリー摂取減少及び成長遅滞を生じるためである。未治療のCF患者は、油状の排便、腹痛及び体重増加の問題を示し続ける。便秘も、頻発する症状である。時には、腸管は、完全に閉塞され、激しい胃痛を生じる。

【0003】

CFは、肺の罹患も特徴とする。健康な者では、肺の気道表面に一定の粘液流があり、これが、残渣及び細菌を除去する。CFでは、粘液は、過剰の粘着性があり、細菌増殖に理想的な環境を提供する。CF患者は、胸部細菌感染及び肺炎の危険がある。当該患者が早期に、適切に治療されなければ、これらは治癒が非常に困難である。症状は、持続性咳嗽、喀痰（唾液及び粘液）の過剰産生、喘鳴、普通の活動に伴う息切れを含む。CFに伴う他の問題が確認されている。

10

【0004】

CFは、劣性遺伝し、罹患（CFTR）遺伝子は、第7染色体に位置する。当該遺伝子は、クロライドチャンネルCFTRをコードする。嚢胞性線維症（CF）では、最も一般的な突然変異 $\Delta F508$ は、CF遺伝子タンパク質、クロライドチャンネルCFTR、の活性及び細胞表面発現を減少させる。英国における白人集団の22人中約1人は、第7染色体対の一方に $\Delta F508$ 突然変異を保持する（キャリア）。

【0005】

現在、CFTRへの有効な治療は存在せず、治療法は、症状の鎮静化に限られる。CF患者は、粘着性粘液を緩める手助けとなる強いマッサージを含む毎日の胸部理学療法を必要とする。患者は、どの胸部感染症も抗生物質で速やかに治療されることも必要である。MMR（はしか、おたふく風邪及び風疹）及びDTP（ジフテリア、破傷風及び百日咳）などの通常の小児期ワクチン接種は、CFの人々にとって重要であり、胸部感染症予防に役立てるために、流感及び肺炎球菌（*pneumococcus*）に対するワクチン接種も受けるべきである。大半のCF患者は、それぞれの食事又はスナックとともに、失われた膵臓酵素を供給し、適正な消化を可能にするカプセルの服用を必要とする。追加療法は、肺感染症に対抗する抗生物質の連日経口投与又は吸入、吸入抗喘息療法、副腎皮質ホルモン錠、特にビタミンA及びDの食事でのビタミン補給剤、喀痰の粘着性を減少させる薬物（パルモザイム）の吸入、便秘を緩和する、又は酵素補助剤の活性を改善する薬物、CF関連糖尿病用のインスリン、CF関連肝臓疾患用薬物、呼吸を助け、不妊問題克服に役立てる酸素を含むことができる。

20

30

【0006】

最も一般的なCF突然変異 $\Delta F508$ は、ERに若干非効率的に折り畳まれた変異タンパク質を生じ、細胞表面発現減少、及びクロライド電流容量減少を起こす。CFには、複数の治療アプローチが考えられる。1つのアプローチは、遺伝子治療に基づく（適正なCFTR cDNAの導入）。或いは、内因性変異CFTR活性の増加が、治療手段として考えられる。一般に、 $\Delta F508$ CFTRのクロライドコンダクタンスのわずかな増加が、治療手段になると考えられている。そのため、ER中の変異CFTRタンパク質の折畳みの薬理的改善、変異CFTRタンパク質の細胞表面発現の薬理的増強、及び当該変異CFTRタンパク質によるクロライドコンダクタンスの薬理的増強が検討されている。現在、これらのアプローチはいずれも、CF患者の主要な問題を是正する有効な薬剤を生み出していない。

40

【0007】

CFの是正は、基礎となる欠損の是正、即ち、上皮細胞の頂側膜のクロライドチャンネルCFTRの活性低下の是正が必要になる。CF患者の過半数は、変異 $\Delta F508$ -CFTRタンパク質を保持している。したがって、解決すべき問題は、特に、 $\Delta F508$ -CFTR保持患者の上皮細胞のクロライド電流を増加させることである。効率的な治療的是正に関しては、これらの個体のクロライドコンダクタンス容量の部分的改善のみで十分であると考えられる。

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

CFTRTタンパク質は、上皮細胞の頂側膜のスフィンゴ糖脂質に富む脂質ラフトに位置することが確認された。クロライドチャンネルCFTRの活性は、スフィンゴ糖脂質及びセラミドを含有するその微小環境に影響される。これを考慮して、セラミドの選択的局所減少が、クロライドチャンネル(delf508)-CFTRの活性への主要な有益刺激作用を有し、したがって、CFの治療手段になると想定された。これを念頭において、CFTRTタンパク質のスフィンゴ脂質微小環境を制御するタンパク質/酵素を同定し、それによって、CF治療法開発に標的を提供することが、本発明の目的であった。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上皮細胞頂側膜にも位置する酵素である非リソソームグルコシルセラミダーゼを発見することによってこの目的を達成した。この酵素は、グルコシルセラミドのセラミドへの変換を触媒し、したがって、脂質ラフトの組成に影響を与える。対応する遺伝子及びタンパク質の同定により、当該酵素が、GBA2(グルコシダーゼ、ベータ(胆汁酸)2)と同一であることが判明し、したがって、GBA2が、CFTRによるクロライドコンダクタンスの調節において、その脂質ラフト微小環境を変化させることによって重要な役割を果たすことが認められた。

20

【0010】

この非リソソームグルコシルセラミダーゼを標的として同定することによって、CFの治療法が、GBA2の、好ましくは選択的な阻害にあることが判明した。当該酵素の阻害は、クロライド電流を増加させ、CF罹患患者、特にdelf508 CFTR保持患者において治療効果を発揮するはずである。

【0011】

したがって、本発明は、嚢胞性線維症の治療法であって、前記方法が、治療有効量のGBA2阻害剤を、当該阻害剤を必要とする対象に投与する段階を含む治療法に関する。又は、言い換えれば、本発明は、嚢胞性線維症の治療用薬剤の調製のためのGBA2阻害剤の使用に関する。

30

【0012】

最近、ミグルスタット(N-ブチル-1-デオキシノジリマイシン)のCFに対する有益な効果が報告されている(Norez et al., FEBS Letters 580(2006)2081~2086)。しかし、この刊行物では、異なる作用機序が提案されており、つまり、小胞体アルファ-グルコシダーゼの阻害である。本発明は、この刊行物とは逆に、CFに対するはるかに有効で特異的な治療薬である化合物の生成を可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

非リソソームグルコシルセラミダーゼは、グルコシルセラミダーゼをセラミドに効率的に変換できる酵素である。当該酵素の機能を洞察するため、本発明者らは、非リソソームグルコシルセラミダーゼの存在について、各種の組織及び細胞型を分析した。従来のアッセイ、5mMコンジュリトールB-エポキシドの存在下での4-メチルウンベリフェリル-ベータ-グルコシドの加水分解の測定が使用された。これらの条件下では、リソソームグルコセレブロシダーゼ(GBA1)による基質の分解は、コンジュリトールB-エポキシドの共有結合によって不可逆的に阻害される。

40

【0014】

本発明者らは、前記非リソソームグルコシルセラミダーゼが上皮細胞に特に豊富で、その頂側膜に位置することを認めた。上皮細胞からの単離頂側膜中の非リソソームグルコシルセラミダーゼの富化は、約450倍である。したがって、非リソソームグルコシルセラミダーゼは、クロライドチャンネルCFTRに類似した膜分画に位置する。

50

【0015】

培養上皮細胞の頂側膜分画中のタンパク質の分析後、非リソソームグルコシルセラミダーゼの分子の性質が特定された。分析は、二次元ゲル電気泳動及びタンパク質染色によって実施された。候補となる100kDaタンパク質が同定された。当該候補タンパク質は、トリプシンで部分消化され、トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列がMS/MS分析によって決定された。確定されたアミノ酸配列の、タンパク質データベースとの比較から、前記GBA2遺伝子が、非リソソームグルコシルセラミダーゼをコードし得ることが示唆された。

【0016】

GBA2が実際に非リソソームグルコシルセラミダーゼをコードすることを実証するために、細胞にGBA2 cDNAを発現させた。細胞溶解物の分析は、非リソソームグルコシルセラミダーゼ活性が、GBA2 cDNAの発現時に増加することを示した。逆に、GBA2 siRNAの発現は、非リソソームグルコシルセラミダーゼ活性の減少を招いた。GBA2遺伝子産物は、膜に及ぶ100kDaタンパク質であり、その推定触媒部位が膜の最上部にあると推測される。図を参照されたい。アミノ酸972個のタンパク質（分子量104kDa）であるGBA2の以下の特徴が、図に示されている。即ち、（1）サイトゾルドメイン（aa706～927）は、PM/エンドソーム/リソソームの選別用ジロイシンモチーフを含有する；（2）1個の膜貫通ドメイン；（3）システインに富む内腔ドメイン（aa1～690）；（4）膜内腔面最上部の予測触媒中心である。

【0017】

この構造予測は、膜に結合し、膜二重層に挿入されながら、スフィンゴ糖脂質基質を分解する、酵素の既知の特徴に完全に一致する。

【0018】

本発明者らは、GBA2が上皮細胞の頂側膜中でのセラミド生成を司るという発見に従って、GBA2の阻害剤は、CFに有益な効果を有するはずである、と考えた。したがって、一般に、ベータ-グルコシダーゼ阻害剤が適しているはずである。本発明の一実施形態では、CFの治療にベータ-グルコシダーゼ阻害剤が使用される。一実施形態では、本発明による阻害剤は、イミノ糖部分を含む。イミノ糖部分は、窒素原子が、モノサッカライド中に通常存在する環内酸素に取って代わっているモノサッカライドの構造類似物として定義される。好ましい実施形態では、当該イミノ糖は、少なくとも1個の窒素原子が存在する5員又は6員環を含む。好ましくは、残りの4個又は5個の環原子は、炭素原子である。一実施形態では、阻害剤は、1個の窒素原子が存在する6員環を有するモノサッカライドを含む。当該イミノ糖部分は、どのモノサッカライド立体配置も有することができる。かかる立体配置は、炭水化物の化学者には既知である。当該イミノ糖は、通常のモノサッカライドから1個又は複数個のOH基が欠損した、例えば、デオキシ-、ジデオキシなどの化合物も包含する。

【0019】

例えば、ベータ-グルコシダーゼ阻害剤に結合するために、特に挿入を可能にする基であるイミノ糖、即ち、言い換えれば、前記膜二重層中への挿入が可能な基を含むのが有利である。かかる基は、親油性基と称することもできる。イミノ糖の場合、かかる基は、モノサッカライド環のどの原子とも、直接に、又はモノサッカライド環原子でのヒドロキシル置換基の酸素原子を介した共有結合によって結合できる。好ましい実施形態では、膜二重層中に挿入できる基がモノサッカライド環の不特定又は特定の窒素原子に結合する。膜二重層に挿入できるように、イミノ糖に結合した基が、当該二重層脂質環境と正の相互作用を行うのに十分に疎水性である、即ち、言い換えれば、親油性であるのが好ましい。基が少なくとも6個の炭素原子を含む場合、当該基は、十分に疎水性又は親油性である。好ましくは、当該基は、40個未満の炭素原子を含む。したがって、一実施形態では、イミノ糖は、6個～40個の炭素原子を含む基で置換される。かかる基は、直鎖又は分枝状であることができるアルキル鎖であると考えられ、O、S及びNなどの1個又は複数個のヘテロ原子で遮断可能であり、また、当該アルキル鎖は、1個又は複数個の不飽和基、例え

10

20

30

40

50

ば二重又は三重炭素 - 炭素結合を含有することもできる。例えば、オレイル鎖（好ましくはシス型の二重結合 1 個を有する C 18）は、脂質二重層と良好に相互作用することが既知である。分枝しているか、かかるアルキル鎖に置換基を含有する炭素原子であるかを考慮せずに、30 個未満の炭素原子のアルキル鎖に相当する、又は、24 個以下の炭素原子のアルキル鎖にも相当する長さが、通常、膜二重層との有益な相互作用には十分である。

【0020】

或いは、6 個～40 個の炭素原子を含む基を、疎水性部分を含む基と見なすこともできる。疎水性部分の適切な説明は、膜二重層に挿入できる環状基を含有する炭素原子である。適切には、当該環状基は、環を含有する 2 個の炭素原子を含み、又は、好ましくは、環を含有する 3 個以上もの炭素原子を含む。有利には、かかる多環構造では、少なくとも 2 個の環、好ましくは少なくとも 3 個以上の環、好ましくはすべての環が、別の環と 2 個以上の炭素原子を共有する。かかる基の適切な例は、コレステロール、 β -コレスタノール、フェナントレン、アダマンタンなどである。かかる基を、ヒドロキシル官能基を介してアルキル鎖に結合し、当該アルキル鎖を、イミノ糖、好ましくは当該イミノ糖の環内窒素に結合するのが有利である。疎水性部分とイミノ糖を結合するアルキル鎖は、好ましくは、少なくとも 2 個、好ましくは少なくとも 3 個の炭素原子を含む。大型疎水性部分が阻害剤に含まれる場合、当該疎水性部分とイミノ糖を結合するアルキル鎖は、好ましくは、12 個以下、好ましくは 10 個以下の炭素原子を、又は 9 個又は 8 個以下の炭素原子も含む。当該アルキル鎖は、少なくとも 1 個のヘテロ原子、例えば O 原子を含むことができ、それを介して、疎水性部分がアルキル鎖に結合できる。

【0021】

特に、強力な非リソソームグルコシルセラミダーゼ阻害剤は、デオキシノジリマイシン部分を含有することが既知である。例えば、デオキシノジリマイシン部分に結合するために、膜二重層中への挿入を可能にする基を含むのが有利である。ある既知の強力な GBA2 阻害剤は、Overkleeft et al., J Biol Chem 1998, vol. 273, no. 41, pp 26522 ~ 26527 に公表されている N-[5'-(アダマンタン-1'-イル-メトキシ)-ペンタン]-1-デオキシノジリマイシン (AMP-DNM) である。この構造は、GBA2 に対して、約 1 nM の IC50 を有する。

【0022】

delF508-CFTR 含有上皮 CF 細胞の、AMP-DNM とのインキュベーション時のクロライド電流は、治療効果を有すると見なされるレベルまで回復した。delF508-CFTR 保持マウスの状態改善によっても明らかのように、クロライドコンダクタンスの大幅な矯正を得るには、クロライドコンダクタンス容量の部分回復で十分である。

【0023】

したがって、クロライドチャネル delF508-CFTR に対する有益な効果には、GBA2 の阻害が必要となる。AMP-DNM は、治療可能性を有する、強力な GBA2 阻害剤である。この種の化合物は、選択性を高めることによって改良可能である。疎水性デオキシノジリマイシンは、グルコシルセラミドシンターゼの既知阻害剤でもある。一実施形態では、当該化合物は、グルコシルセラミドシンターゼ (GCS) の同時阻害をできる限り防止するのに特に有用であると考えられる。糖立体配置の変化及びアルキル鎖の変化及び/又は前記疎水性部分の変化、並びに、疎水性基が糖部分に結合する形若しくは手段の変化、特に、前記疎水性部分及びイミノ糖部分に結合するアルキル鎖の変化によって、より選択的な化合物が生成可能である。

【0024】

一実施形態では、本発明による阻害剤は、デオキシノジリマイシン又はその誘導体であるイミノ糖を含む。誘導体は、各種モノサッカライド立体配置及び/又はモノサッカライド OH 基上に置換基を有するデオキシノジリマイシンを包含する。一実施形態では、デオキシノジリマイシンは、グルコピラノースの立体配置を取り、別の実施形態では、デオキ

シノジリマイシンは、イドピラノースの立体配置を取る。適切には、当該阻害剤は、N - [5 ' - (アダマンタン - 1 ' - イル - メトキシ) - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン (AMP - DNM) 又は N - [5 ' - (アダマンタン - 1 ' - イル - メトキシ) - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシン (イド - AMP - DNM) である。
【 0 0 2 5 】

一実施形態では、膜二重層に挿入できる 6 個 ~ 4 0 個の炭素原子を含む基は、大きなアルキル基、例えば三級ブチル又はネオペンチル基を含む。適切には、当該ネオペンチル基は、ネオペンチルアルコールの結合から生じる。有利なことに、当該三級ブチル又はネオペンチル基は、6 個 ~ 4 0 個の炭素原子を有する基、特に膜二重層に挿入できるアルキル鎖の末端位にある。本発明による適切な阻害剤は、N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン又は N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシンである。他の適切な阻害剤は、N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシンのような類似化合物であるが、その場合、当該ペンタンアルキル鎖は、少なかれ多かれ炭素原子、特に C H ₂ 基、例えば、N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - ブタン] - 、 - ヘキサン] - 、 - ヘプタン] - 、 - オクタン] - 、 - ノナン] - 、 - デカン] - 1 - デオキシノジリマイシンなど、又は L - イド化合物を含む。

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態では、本発明による阻害剤は、250 nM 未満、好ましくは 150 nM 未満の、GBA2 に対する IC50 を有する。別の実施形態では、当該阻害剤は、1 m M よりも高い、好ましくは 100 μ M よりも高い GCS への IC50 を有するのが好ましい。

【 0 0 2 7 】

本発明は、N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - 1 - デオキシノジリマイシン又は N - [5 ' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシンにも関し、アルキルは、4 個 ~ 12 個の炭素原子、好ましくは 4 個 ~ 11 個、4 個 ~ 10 個まで、4 個 ~ 9 個まで、4 個 ~ 8 個まで、4 個 ~ 7 個の炭素原子、好ましくは、4 個 ~ 12 個の C H ₂ 基、好ましくは 4 個 ~ 11 個、4 個 ~ 10 個、4 個 ~ 9 個、4 個 ~ 8 個、4 個 ~ 7 個の直鎖状の C H ₂ 基を有するアルキレン基を意味する。本発明は、医薬品、及びかかる化合物を薬学的に許容可能なキャリアとともに含む医薬組成物としての、かかる化合物の使用にも関する。

【 0 0 2 8 】

重要なことに、本発明による阻害剤の正の効果は、ER アルファ - グルコシダーゼの阻害又はスフィンゴ糖脂質合成の阻害による deIF508 - CFTR の ER の折畳みの改善が原因とは考えられない。したがって、本発明は、全く新規の洞察、即ち、GBA2 の特異的阻害剤が、嚢胞性線維症の治療への高度に特異的な治療薬であることを提示するものである。

【 実施例 】

【 0 0 2 9 】

deIF508 - CFTR 含有上皮 CF 細胞における cAMP - 活性化クロライド電流に対する AMP - DNM の効果を、以下のアッセイによって検討した：

穿孔全細胞パッチクランプ分析を、CF15 細胞 (deIF508 ホモ接合性患者から得られたヒト鼻上皮細胞系) に適用した。細胞内液を満たしたパッチ電極 (抵抗 3 ~ 4 M) (GC150 - TF10 , Harvard Apparatus , USA) を RK - 400 増幅器 (Biologic , France) に Ag / AgCl ペレットを通して連結した。外部溶液 (mM) : 145 NaCl、4 CsCl、1 MgCl₂、1 CaCl₂、5 d - グルコース、10 TES (pH 7.4、315 mOsm)。ピペット内溶液 (mM) : 113 1 - アスパラギン酸、113 CsOH、27 CsCl、1 NaCl、1 EGTA、1 MgCl₂、3 Mg - ATP (即時)、10 TES (CsOH により pH 7.2、285 mOsm) 及びアンホテリシン B (100 μ g / ml)、2 時間ごとに再調製

した。インプット抵抗が $15\text{ M}\Omega$ の細胞だけを分析した。平均アクセス抵抗及び全細胞キャパシタンスは、 $12 \pm 0.6\text{ M}\Omega$ 及び $35 \pm 4.3\text{ pF}$ であった ($n = 44$)。電流は、 -80 mV から $+80\text{ mV}$ まで、 20 mV ずつ増加させる電圧ステップに対応して得た。データは、pClamp 6.0.3 パッケージソフトウェア (Axon Instruments, USA) を使って収集した。CFTR Cl^- チャネル活性は、ヨウ素 (^{125}I) 流出技術によって細胞群についてアッセイした。

【0030】

上皮細胞の 10 nM AMP-DNM とのインキュベーションは、 delF508-CFTR 含有上皮 CF 細胞の cAMP-活性化クロライド電流を正常レベルの 30% まで回復することが判明した。かかる矯正度は、治療効果に十分であると考えられる。

10

【0031】

CF に対する GBA2 阻害剤の治療可能性を検討するために、さらに、 delF508 マウスの回腸粘膜からの腸外植片に対する AMP-DNM の効果を分析した。以下のアッセイを使用した：

Rotterdam $\text{delF508}/\text{delF508-CFTR}$ マウス ($\text{Cftr}^{\text{tm1Eur}}$)、その同産仔対照 (FVB 同系交配、 14 週齢～ 17 週齢、体重 $20\text{ g} \sim 30\text{ g}$ 、無病原体環境下、固形食で飼育) 及び Cftr-KO マウス ($\text{Cftr}^{\text{tm2Cam}}$) を使用した。筋肉剥離回腸粘膜を、インスリン ($10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) 及びデキサメサゾン ($20\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) 補充 William E-Glutamax 培地中でインキュベートした。異なる時点で、反復洗浄によって当該化合物を除去し、それに続いて、ミニ-Ussing チャンバーで短絡電流 (I_{sc}) を測定した。ウェスタンブロッティングを実施し、イムノプロットを、モノクローナルマウス抗 CFTR 抗体 ($10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、IgG₁M3A7、Chemicon, USA) で探査した。タンパク質レベルを、濃度測定値及び対照の百分率として表示した。免疫組織化学検査では、組織を 4% (重量/容積) パラホルムアルデヒドに固定した。切片 ($5\text{ }\mu\text{m}$) を、抗体 R3195 ($1:500$) で染色した。

20

【0032】

10 nM AMP-DNM は、 delF508 マウスの回腸粘膜の腸陰窩の成熟及び機能性 delF508-CFTR を救済することが認められた。

30

【0033】

GBA2 (GBA2 含有膜による、過剰のコンジュリトール B-エポキシドの存在下、4-メチルウンベリフェリル-ベータグルコシドの加水分解の分析によって測定) に対する化合物の阻害能とクロライド電流への正の効果の間に密接な関連性が存在することが認められた。

【0034】

構造上の必要条件をさらに検討するために、各種のスペーサーと疎水性基で、化合物を検討した (表 1 参照)。やはり、GBA2 の阻害能は、クロライド電流の矯正を良好に予測することが認められた。

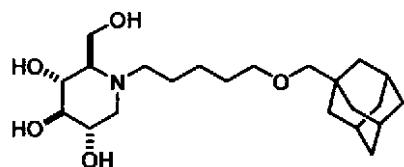
【0035】

表 1：膜二重層に挿入できる基のバリエーション

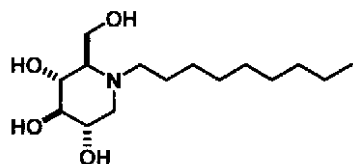
40

特定アッセイで測定した場合の、クロライド電流及び GBA2 及び GCS に対する IC₅₀ 値を改善する能力に関する被験イミノ糖の構造

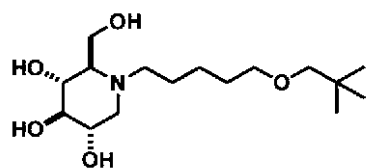
【表 1】



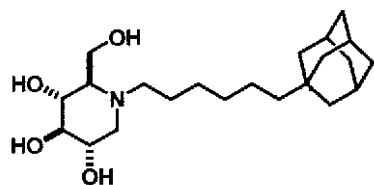
N-[5'-(アダマンタン-1'-イル-メトキシ)-ペンタン]-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 1 nM 0.2 μM



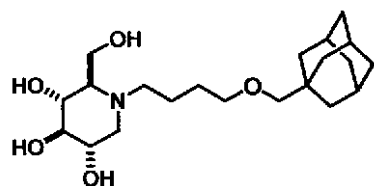
N-ノニル-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 6 nM 8 μM



N-[5'-ネオペンチルオキシ-ペンタン]-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 30nM >100μM

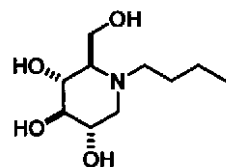


N-[6'-アダマンタチル-ヘキサン]-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 1nM 7.5 μM



N-[5'-(アダマンタン-1'-イル-メトキシ)-ブタン]-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 2 nM 10 μM

比較例



N-ブチル-1-デオキシノジリマイシン IC₅₀ 300nM 80 μM

【 0 0 3 6 】

GCSと比較したGBA2阻害の特異性を高めるには、ブタノイル-スパーサー又はヘキシル-スパーサーが有利であることが分かる。疎水基は、変化してもよい。これに関連した例は、N-[5'-ネオペンチルオキシ-ペンタン]-1-デオキシノジリマイシンである。当該化合物は、GBA2に対するIC₅₀が、AMP-DNMに比較して劣るに

10

20

30

40

50

もかわらず、GCSをほとんど阻害しないので、比較的より特異的な阻害剤である。

【0037】

IC50値の決定

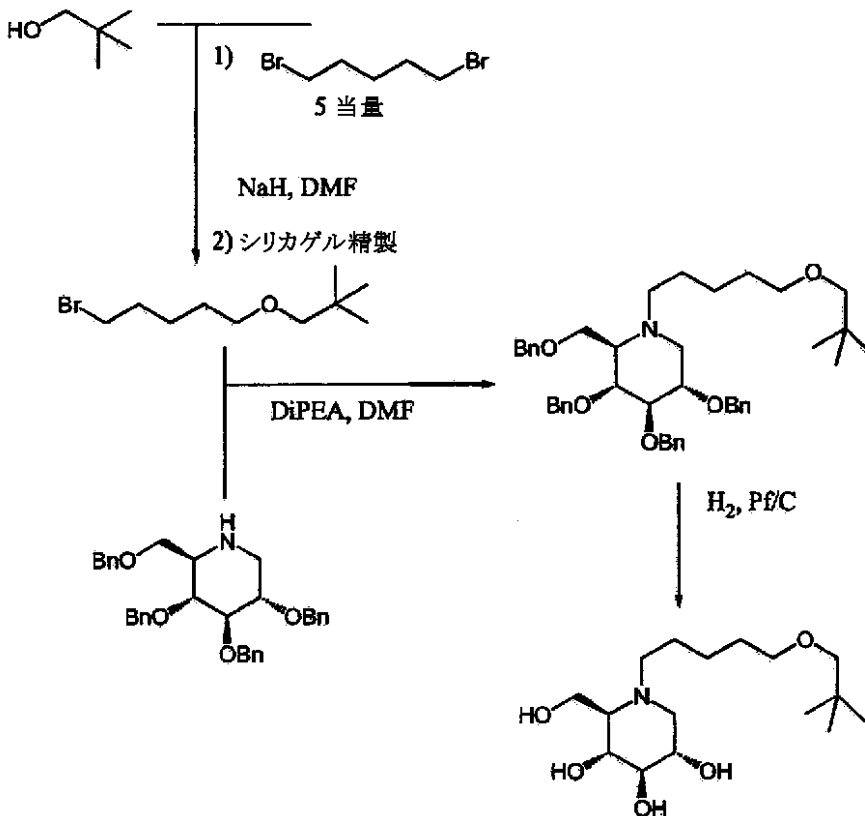
非リソソームグルコシルセラミダーゼ及びグルコシルセラミドシンターゼ（GCS）のIC50値を、酵素調製物を各種の阻害剤希釈物に曝露し、酵素活性が50%減少する濃度を測定することによって決定した。J. Biol. Chem., 273, 26522~27 (1998)の26523ページ、酵素アッセイを見出しとする記述通りに、アッセイを実施した。

【0038】

デオキシノジリマイシン化合物の合成経路

各種の適切なデオキシノジリマイシン系阻害剤の合成は、他で、例えば、J. Biol. Chem., 1998, vol 273, pp 26522~27及び米国特許第6,177,447号に詳細に記述されている。N-[5'-ネオペンチルオキシ-ペンタン]-1-デオキシノジリマイシンの合成について、以下に経路を示す。全ての段階は、有機化学者にとって標準的なもので、適切な反応条件は、常法に従って確定できる。

【化1】

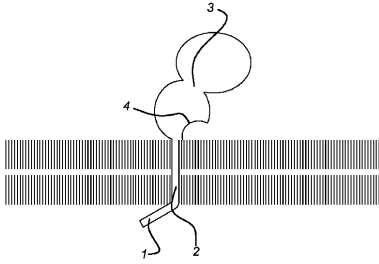


10

20

30

【 図 1 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成20年4月24日 (2008.4.24)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

嚢胞性線維症の治療用薬剤の調製のための、膜二重層に挿入できる基に結合したデオキシノジリマイシン部分又はその誘導体を含み、前記基が、6個～40個の炭素原子を含む基であるGBA2阻害剤の使用。

【 請求項 2 】

膜二重層に挿入できる前記基が、前記デオキシノジリマイシン部分の前記窒素原子に結合する、請求項1に記載の使用。

【 請求項 3 】

前記デオキシノジリマイシンがグルコピラノースの立体配置を有する、請求項1又は2に記載の使用。

【 請求項 4 】

前記デオキシノジリマイシンが、イドピラノースの立体配置を有する、請求項1又は2に記載の使用。

【 請求項 5 】

6個～40個の炭素原子を含む前記基が、疎水性部分を含み、前記疎水性部分が、環を含有する3個以上の炭素原子を含み、前記環が、別の環と2個以上の炭素原子を共有する、請求項1から4までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記疎水性部分がコレステロール、
- コレスタノール、フェナントレン及びアダマンタンから選択される、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

6 個～40 個の炭素原子を含む前記基が、三級ブチル又はネオペンチル基を含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

前記阻害剤が、N - [5' - (アダマンタン - 1' - イル - メトキシ) - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン、N - [5' - (アダマンタン - 1' - イル - メトキシ) - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシン、N - [5' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - 1 - デオキシノジリマイシン及び N - [5' - ネオペンチルオキシ - ペンタン] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシンから選択される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 9】

アルキルが、4 個～12 個の炭素原子を有するアルキレン基を意味する、N - [5' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - 1 - デオキシノジリマイシン又は N - [5' - ネオペンチルオキシ - アルキル] - L - イド - 1 - デオキシノジリマイシン。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2007/050177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07H15/12 A61K31/70 A61P43/00		
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) A61K C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/046672 A (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV POITIERS [FR]; BECQ FREDERIC [FR]; N) 26 May 2005 (2005-05-26) abstract page 3, line 6 - line 15 claims 1-9	1-11
X	NOREZ ET AL: "Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 580, no. 8, 3 April 2006 (2006-04-03), pages 2081-2086, XP005413398 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document	1
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 August 2007		Date of mailing of the international search report 06/09/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Damiani, Federica

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2007/050177

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/123055 A (MUSC FOUND FOR RES DEV [US]; SINGHINDERJIT [US]; SINGH AVTAR K [US]) 29 December 2005 (2005-12-29) page 3, line 24 - page 4, line 25	1
Y	WO 01/02586 A (UNIV MCGILL [CA]; HERSCOVICS ANNETTE A [CA]; TREMBLAY LINDA O [CA]) 11 January 2001 (2001-01-11) page 3, line 19 - line 25 page 14 - page 15 claims 5,6	1-10
A	GOLD V ET AL: "IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition" COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY. INTERNATIONAL UNION OF PURE & APPLIED CHEMISTRY (IUPAC) RECOMMENDATIONS, OXFORD, BLACKWELL SCIENTIFIC, GB, 1997, page 1, XP002362833 page 1349	1-10
Y	OVERKLEEFTH S ET AL: "GENERATION OF SPECIFIC DEOXYNOJIRIMYCIN-TYPE INHIBITORS OF THE NON-LYSOSOMAL GLUCOSYL CERAMIDASE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 273, no. 41, 9 October 1998 (1998-10-09), pages 26522-26527, XP000934220 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-10
Y	WO 98/02161 A (UNIV AMSTERDAM [NL]; AERTS JOHANNES MARIA FRANCISCU [NL]; PANDIT UPEND) 22 January 1998 (1998-01-22) cited in the application the whole document	1-10
A	MATERN H ET AL: "Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 25 APR 1997, vol. 272, no. 17, 25 April 1997 (1997-04-25), pages 11261-11267, XP002445180 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-10

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2007/050177

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2007/014327 A (UNIV FLORIDA RESEARCH FOUNDAT [US]; KAUSHAL SHALESH [US]; NOORWEZ SYE) 1 February 2007 (2007-02-01) page 2, line 1 - line 5 claims 37,38 page 12, last paragraph - page 13, paragraph FIRST	1-6
A,P	BOOT ROLF G ET AL: "Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 12 JAN 2007, vol. 282, no. 2, 12 January 2007 (2007-01-12), pages 1305-1312, XP002445181 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2007/050177

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005046672 A	26-05-2005	AU 2004289083 A1 BR PI0416228 A CA 2545133 A1 CN 1897933 A EP 1680105 A2 FR 2861991 A1 JP 2007510699 T KR 20060130058 A	26-05-2005 02-01-2007 26-05-2005 17-01-2007 19-07-2006 13-05-2005 26-04-2007 18-12-2006
WO 2005123055 A	29-12-2005	NONE	
WO 0102586 A	11-01-2001	AU 5799500 A	22-01-2001
WO 9802161 A	22-01-1998	AT 322900 T AU 732552 B2 AU 3464797 A CA 2260790 A1 DE 69735669 T2 IL 128036 A JP 2000516577 T US 6177447 B1	15-04-2006 26-04-2001 09-02-1998 22-01-1998 29-03-2007 31-08-2005 12-12-2000 23-01-2001
WO 2007014327 A	01-02-2007	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100097870
 弁理士 梶原 斎子

(74)代理人 100140556
 弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719
 弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258
 弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969
 弁理士 井上 洋一

(72)発明者 アーツ、ヨハネス マリア フランシスカス ゲラルデウス
 オランダ国、アブクーデ、サンドベルイシュトラート 3

(72)発明者 ブート、ロルフ ガブリエル
 オランダ国、アムステルダム、デル アルピホフ 3 6

F ターム(参考) 4C076 EE59 FF34
 4C084 AA19 NA11 ZA59 ZA66 ZC20
 4C086 AA01 AA02 BC21 MA01 MA04 NA11 ZA59 ZA66 ZC20