

(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
2016 年 12 月 1 日(01.12.2016)



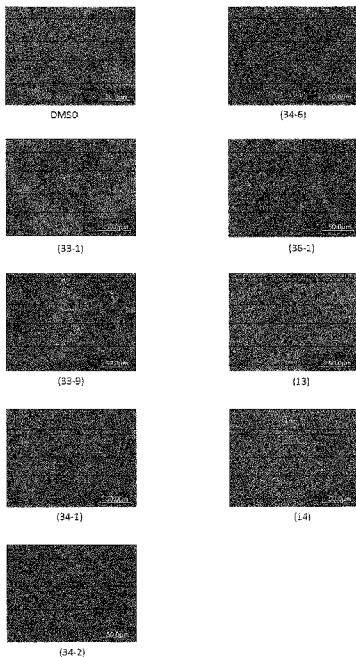
(10) 国際公開番号
WO 2016/190310 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 47/16 (2006.01) A61K 31/341 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01) A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/065324
- (22) 国際出願日: 2016 年 5 月 24 日(24.05.2016)
- (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 2015-106881 2015 年 5 月 26 日(26.05.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 廣明 秀一(HIROAKI Hidekazu); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 天野 剛志(TENNO Takeshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 野田 翔太(NODA Syouta); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 松本 征二(MATSUMOTO Seiji); 〒1410031 東京都品川区西五反田 1 丁目 1 1 番 1 号 アイオス五反田駅前ビル 1001 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

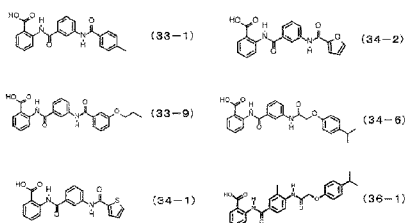
(54) Title: TIGHT JUNCTION MITIGATOR, DRUG ABSORPTION AUXILIARY COMPRISING SAME, AND MEDICINAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 発明の名称: タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a tight junction mitigator. To solve the problem, provided is a tight junction mitigator that comprises at least one of the compounds represented by formulae (33-1), (33-9), (34-1), (34-2), (34-6) and (36-1).

(57) 要約: タイトジャンクションの緩和剤を提供することを課題とする。下記式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物を少なくとも1種含むタイトジャンクションの緩和剤を提供することで課題を解決できる。





(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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

(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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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：

タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物

技術分野

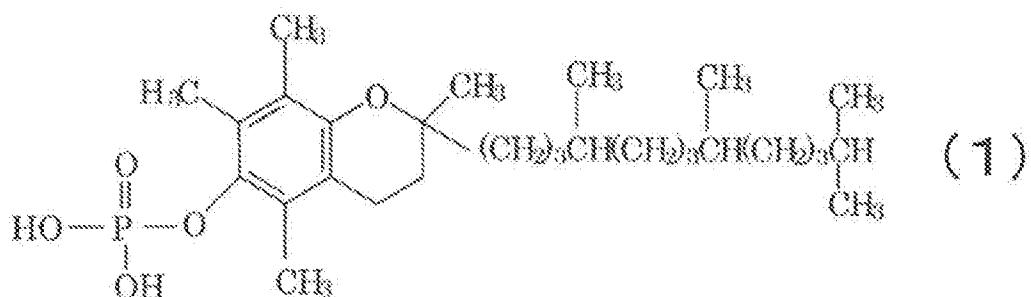
[0001] 本発明は、タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物に関するものである。

背景技術

[0002] 体内の恒常性を維持するためには、水分、糖分、イオンなどを体内に封じ込めることが重要である。上皮細胞は外界と内部を隔てる役割を担っている細胞であり、細胞同士をつなぐ細胞接着装置が発達している。いくつか存在する細胞接着装置のうち最も外側に存在するのがタイトジャンクションである。タイトジャンクションは上皮細胞間で膜タンパク質クローディングが強固に相互作用することで形成されており、水やイオンの自由な透過を妨げている。このようなタイトジャンクションの機能は、皮膚の保湿や、脳内への異物混入を防いでいる血液脳関門において特に重要である。したがって、タイトジャンクション形成を制御する物質は、化粧品や医療品開発のターゲットとして注目を浴びている。

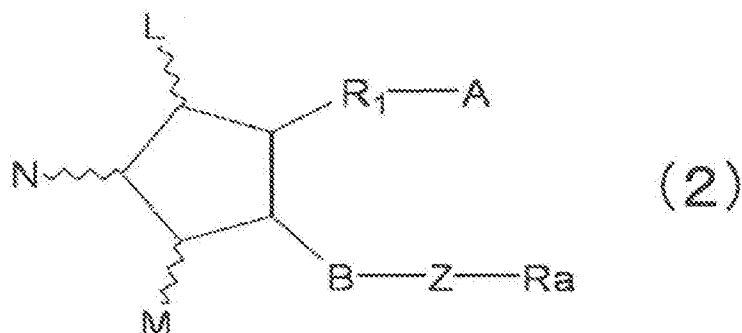
[0003] タイトジャンクション形成の促進剤としては、下記式（１）で表わされる化合物のナトリウム塩及びカリウム塩を配合したタイトジャンクション形成促進剤が知られている（特許文献１参照）。

[0004] [化1]



[0005] また、下記式（2）で表わされる化合物を含む医薬組成物も知られている（特許文献2参照）。

[化2]



[式中、L、MおよびNは、水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン原子、低級アルキル、ヒドロキシ(低級)アルキル、低級アルカノイルオキシまたはオキシであり、ここでLおよびMの少なくとも1つは水素以外の基であり、5員環は少なくとも1つの二重結合を有していてもよく；Aは、 $-CH_3$ 、または $-CH_2OH$ 、 $-COCH_2OH$ 、 $-COOH$ またはそれらの官能性誘導体であり；Bは、単結合、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH=CH-$ 、 $-C\equiv C-CH_2-$ または $-CH_2-C\equiv C-$ であり；Zは、

[化3]



または単結合であり、

ここで R_4 および R_5 は、水素、ヒドロキシ、ハロゲン、低級アルキル、低級アルコキシまたはヒドロキシ(低級)アルキルであり、 R_4 および R_5 が同時にヒドロキシおよび低級アルコキシであることはなく；

R_1 は、非置換、またはハロゲン、低級アルキル、ヒドロキシ、オキシ、ア

リールまたは複素環基により置換された、二価の飽和または不飽和の低または中級の脂肪族炭化水素残基であり、脂肪族炭化水素中の少なくとも1つの炭素原子は所望により酸素、窒素または硫黄により置換されており；そして

R a は、非置換、またはハロゲン、オキソ、ヒドロキシ、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、シクロ(低級)アルキル、シクロ(低級)アルキルオキシ、アリール、アリールオキシ、複素環基または複素環オキシ基により置換された、飽和または不飽和の低または中級の脂肪族炭化水素残基；低級アルコキシ；低級アルカノイルオキシ；シクロ(低級)アルキル；シクロ(低級)アルキルオキシ；アリール；アリールオキシ；複素環基；複素環オキシ基である]。

[0006] 更に、漏出性または損傷を受けたタイトジャンクションの処置および細胞外マトリクスの増強をするため、体液の移動を予防もしくは制限するか、組織もしくは細胞を安定化するか、または汚染を予防することが必要な部位に投与されたときに、それらを達成する、有効量の自己組織化ペプチドを含む処方物であって、該自己組織化ペプチドは、同じペプチド鎖内の、正に帯電した残基の配列および負に帯電した残基の配列；正に帯電した残基の一続きの1つ以上および負に帯電した残基の一続きの1つ以上；およびそれらの組み合わせからなる群から選択される処方物、も知られている（特許文献3参照）。

[0007] 逆に、タイトジャンクションを緩和する調製剤としては、LSR (lipolysis-stimulated receptor) と相互作用する物質、すなわちLSR遺伝子の発現抑制物質またはLSRの機能阻害物質をトリセルラージャクションなどのタイトジャンクションに導入することにより、トリセルリンの導入が抑制され、細胞間の結合が緩和されることが知られている。そして、細胞間の結合が緩和されることで、タイトジャンクションを通る物質の透過性、とりわけトリセルラージャクションを通る物質の透過性が増加し、経皮、経粘膜的に非侵襲的、非観血的に多くの薬剤を体内へ移行できることも知られている（特許文献4参照）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特許第4 6 8 4 9 0 6号公報

特許文献2：国際公開第2 0 1 0 / 1 3 7 7 3 1号

特許文献3：国際公開第2 0 0 8 / 1 1 3 0 3 0号

特許文献4：特許第5 4 2 9 7 3 6号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

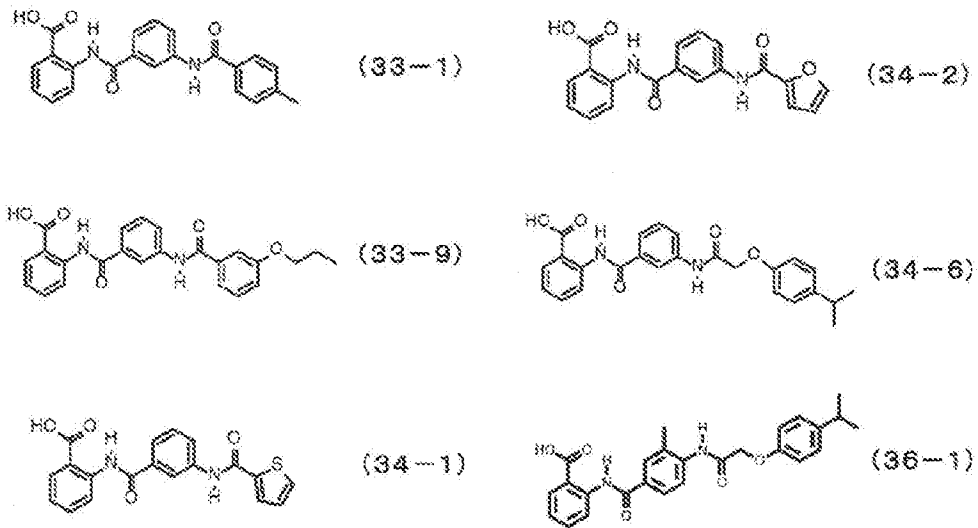
[0009] 上記のとおり、タイトジャンクションを強化、又は緩和することは知られている。特に、タイトジャンクションを緩和すると、経皮、経粘膜的に非侵襲的、非観血的に薬剤を体内に移行できることから、ドラッグデリバリー系への応用が期待される。

[0010] ところで、上記特許文献4に記載されている発明は、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、阻害ペプチド、ドミナントネガティブ変異体等のL S R遺伝子の発現抑制物質またはL S Rの機能阻害物質を用いてL S Rを抑制し、その結果、トリセルリンの誘導を阻害し、トリセルラーゼジャンクションを通る物質の透過性を増加している。しかしながら、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、阻害ペプチド、ドミナントネガティブ変異体等を量産化するにはコスト面の問題もあり、また、抗体や阻害ペプチドは安定性の問題がある。一方、低分子化合物はコストや安定性の面で優れているが、タイトジャンクションを緩和する化合物は知られていない。

[0011] 本発明は、上記従来の問題を解決するためになされた発明であり、タイトジャンクション形成を制御する因子であるL N X 1のクローディング認識部位に作用する低分子化合物の探索を行ったところ、(1) 同じ認識部位をターゲットとしたが、驚くべきことに、タイトジャンクションの形成を強化する化合物、及びタイトジャンクションの形成を緩和する化合物が得られること

、(2) 下記式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物がタイトジャンクションを緩和できることを新たに見出し、本発明を完成した。

[0012] [化4]



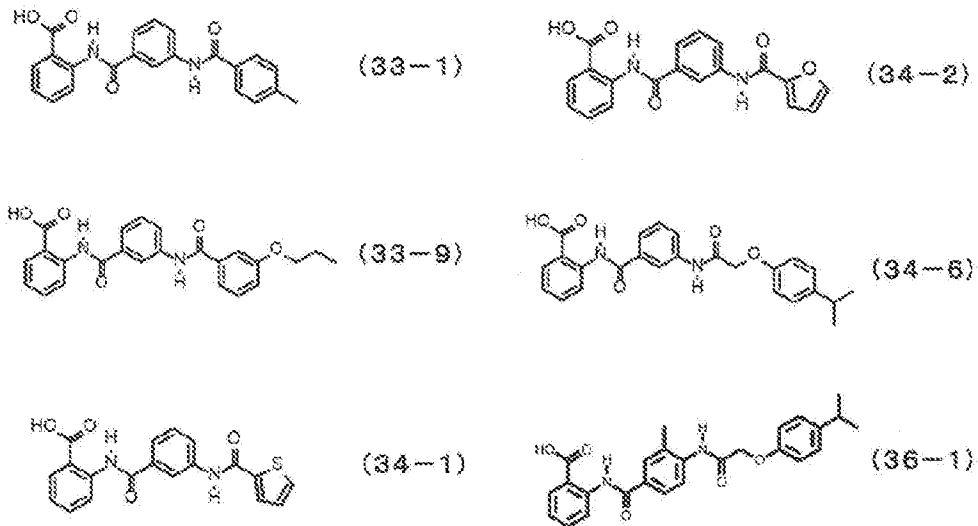
[0013] すなわち、本発明の目的は、タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明は、以下に示す、タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物に関する。

[0015] (1) 下記式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物を少なくとも1種含むタイトジャンクションの緩和剤。

[化5]



(2) 上記(1)に記載のタイトジャンクションの緩和剤を含む薬剤吸収補助剤。

(3) 上記(1)に記載のタイトジャンクションの緩和剤を含む医薬組成物。

発明の効果

[0016] 本発明のタイトジャンクションの緩和剤は、タイトジャンクションを緩和することができる。したがって、本発明のタイトジャンクションの緩和剤を薬剤吸収補助剤として使用、又は、薬剤を含む医薬組成物にタイトジャンクションの緩和剤を混合しておくことで、体内に移行させることが不可能、あるいは不十分にしかできなかった薬剤を、大量かつ速やかに、しかも非侵襲的、非観血的に体内へ移行させることができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、細胞接着装置の概要を説明する図である。

[図2]図2は、本発明のタイトジャンクション形成の制御概要を説明する図である。

[図3]図3は、L N X 1 の構造を示している。

[図4]図4は、図面代用写真で、式(33-1)、(33-9)、(34-1)

）、（３４－２）、（３４－６）、（３６－１）、（１３）及び（１４）で表される化合物、並びにコントロール（ＤＭＳＯ）をＭＤＣＫⅠⅠに暴露して得られた免疫染色の写真である。

発明を実施するための形態

[0018] 以下に、本発明のタイトジャンクションの緩和剤（以下、単に「緩和剤」と記載することがある。）、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物について詳しく説明する。

[0019] 図１は、細胞接着装置の概要を説明する図である。上皮細胞は、隣り合う細胞と相互に接着したシートを形成することで、体の内部と外界の環境が分けられているが、細胞間の接着には、細胞膜に存在する細胞接着装置が重要な役割を果たしている。脊椎動物の上皮には、頂端面から基底面に向かって密着結合（tight junction；ＴＪ）、接着結合（adherens junction；ＡＪ）、デスモソーム、ギャップ結合と呼ばれる細胞接着装置が存在する。それぞれの細胞接着装置は機能が異なっており、タイトジャンクションは上皮層の隣接する細胞同士を密着させ、分子が細胞の間から漏れないように機能している。ＡＪは隣接する細胞のアクチンの束同士、デスモソームは隣接する細胞の中間径フィラメント同士をつなぎ、どちらも上皮細胞同士の結合に関与している。ギャップ結合は細胞間チャンネルを形成し、無機イオンや水溶性小分子を通過させる機能を担っている。

[0020] このうち、最も頂端面に位置するタイトジャンクションは、空間の区画化や恒常性の維持に重要な役割を果たしている。タイトジャンクションは細胞間を通過する物質を大きさや電荷選択的に制御するバリア機能を担っている他、細胞膜上に存在するタンパク質や脂質の拡散を防ぎ、細胞極性を維持するフェンス機能を担っている。このため、タイトジャンクションの機能障害は炎症性腸疾患（ＩＢＤ）や感染症、がん、血管性浮腫、血行性転移等の様々な疾病を引き起こすと考えられ、タイトジャンクション形成を適切に制御することで、医療に応用することができる。

[0021] 図２は、タイトジャンクション形成の制御概要を説明する図である。タイ

トジャンクションは4回膜貫通型タンパク質クローディン（CLD）と膜裏打ちタンパク質であるZO-1が相互作用することで形成される。一方、生体内ではクローディンを消失させるタンパク質であるLigand of Numb binding protein X-1（LNKX1）も発現しており、（図2（1））クローディンとLNKX1が相互作用するとクローディンが細胞内に取り込まれタイトジャンクションが消滅する。このような状況でLNKX1よりZO-1の相互作用が優位になると、細胞内に取り込まれるクローディンよりZO-1と複合体を形成するクローディンの方が多くなるため、タイトジャンクションの形成が亢進する（図2（2））。逆に、ZO-1よりLNKX1の相互作用が優位になると、ZO-1と複合体を形成するクローディンより細胞内に取り込まれるクローディンの方が多くなるため、タイトジャンクションは消滅する（図2（3））。本発明においては、式（33-1）、（33-9）、（34-1）、（34-2）、（34-6）、（36-1）で表される化合物を加えることでタイトジャンクションが緩和（消失）することから、ZO-1よりLNKX1の相互作用が優位になるように化合物が作用していると考えられる。なお、上記の化合物を有効成分としてタイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物として用いる場合は、上記化合物から選択される1種を用いてもよいし、組み合わせて用いてもよい。

[0022] 図3は、LNKX1の構造を示している。LNKX1は、細胞運命決定とエンドサイトーシスに関わるタンパク質Numbと相互作用するタンパク質として知られている。LNKX1は2つのスプライシング変異体p70（分子量約70kDa）とp80（分子量約80kDa）が存在し、共通の構造としてNumb結合領域NPAYモチーフと、タンパク質-タンパク質相互作用モジュールとして機能するPDZドメインを4つ有する。また、LNKX1 p80のみN末端側にRINGフィンガードメインを持ち、E3活性を有している。本発明においては、LNKX1 p80のPDZ2ドメインに結合する化合物を探索したが、LNKX1 p80及びLNKX1 p70の他のドメインもクロ

ーディングと結合することが知られていることから、他のドメインに結合する低分子化合物を探索してもよい。L N X 1 p 8 0 及び L N X 1 p 7 0 のアミノ酸配列は公知であり、UniProt (O 7 0 2 6 3) 等から入手することができる。

[0023] 本発明の緩和剤に含まれる低分子化合物は、*in silico*スクリーニング法を用い、化合物の候補リストを作成し、各候補化合物の有用性について確認をすることで得られる。具体的には、化合物の候補リストは、(1) クローディングと相互作用するL N X 1 の領域を同定し、(2) 上記(1)で同定した領域について、単体の立体構造をX線結晶構造解析にて決定し、(3) クローディング由来ペプチドと相互作用する領域の相互作用面を溶液NMR法にて同定し、(4) 同定した相互作用面に結合しうる低分子化合物の候補について、DOCK、AutoDock、GOLD、FlexX等の公知のドッキングソフトウェアを用いて探索する、ことで作成することができる。また、各候補化合物の有用性は、NMR、*in vitro*、動物実験等、公知の有用性確認実験により確認をすればよい。

[0024] 本発明の緩和剤は、薬剤吸収補助剤、医薬組成物、医薬部外品等に用いることができる。その剤型としては、例えば、薄膜剤、散剤、丸剤、錠剤、注射剤、座剤、乳剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤（チンキ剤、流エキス剤、酒精剤、懸濁剤、リモナーデ剤等を含む）等が挙げられる。また、本発明の効果を損なわない範囲内で、通常の医薬部外品、医薬品等に用いられる各種成分、例えば油性成分、乳化剤、保湿剤、増粘剤、薬効成分、防腐剤、粉体、pH調整剤、紫外線吸収剤、抗酸化剤等を適宜配合することができる。

[0025] 本発明の緩和剤を薬剤吸収補助剤として用いる場合は、吸収させたい薬剤と併せて使用すればよい。なお、本発明において「薬剤吸収補助剤」とは、薬剤の吸収効率を向上させるための剤を意味する。また「薬剤」とは、投与された場合に所望の治療効果または予防効果を有する、あるいは有することが期待される物質を意味する。本発明の薬剤吸収補助剤と共に用いられる薬剤としては、例えば、公知の経皮投与薬、経鼻・経腸等の経粘膜投与薬、注

射投与薬、点眼投与薬、吸入投与薬等が挙げられる。本発明の薬剤吸収補助剤は、公知の薬剤と同時に用いてもよいし、先に薬剤吸収補助剤を皮膚や粘膜に塗布、又は点眼や吸入することでタイトジャンクションを緩和し、その後薬剤を使用してもよい。

[0026] また、本発明の緩和剤は、公知の経皮投与薬、経鼻・経腸等の経粘膜投与薬、注射投与薬、点眼投与薬、吸入投与薬等に予め添加しておくことで薬剤吸収性を高めた医薬組成物として用いることもできる。

[0027] 以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

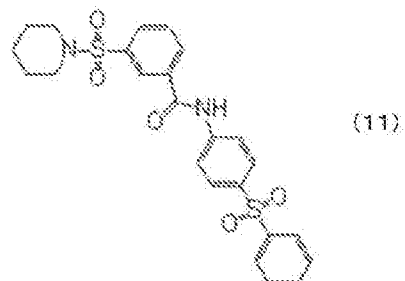
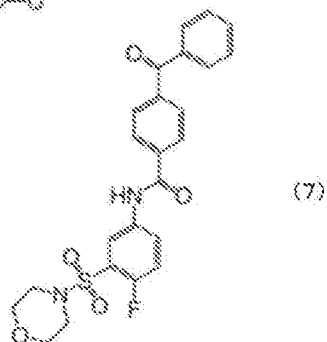
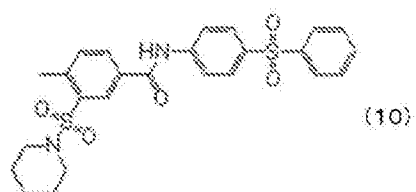
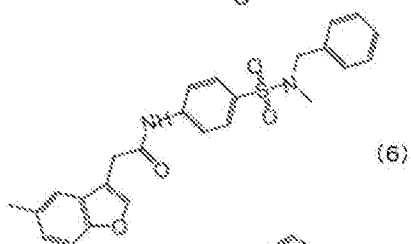
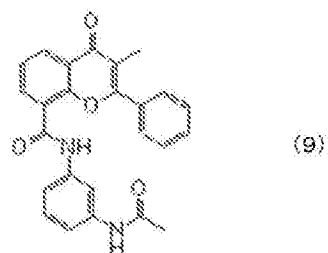
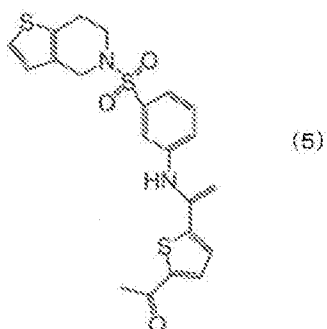
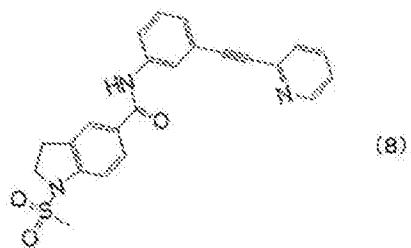
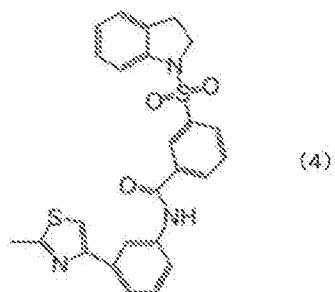
実施例

[0028] [候補化合物リストの作成]

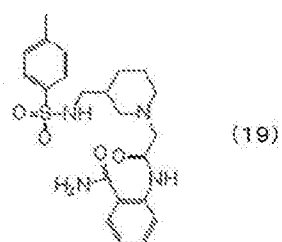
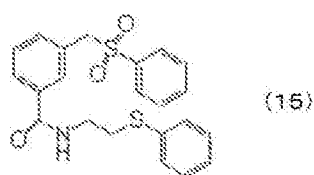
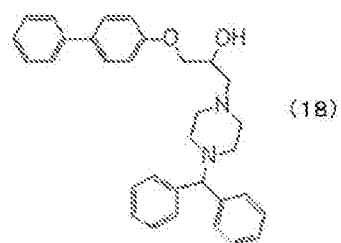
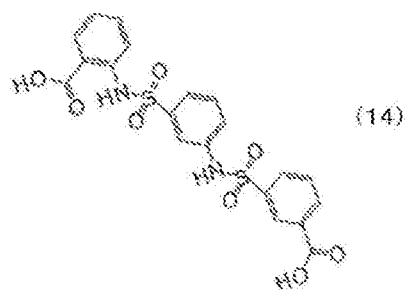
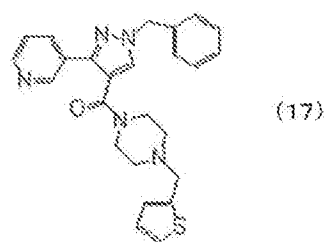
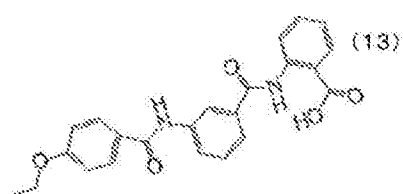
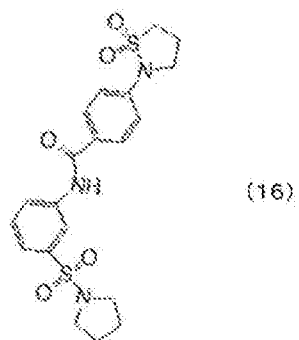
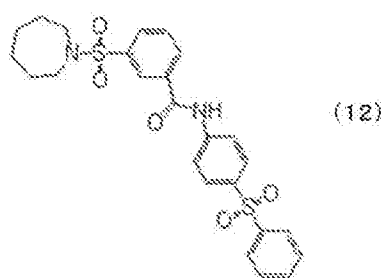
まず、Protein Data Bank (PDB) からマウスLNx1p80のPDZ2ドメインのPDBファイル(PDB ID: 3VQF)を入手した。次に、ナミキ商事株式会社のオンライン化合物構造検索サイトChemCupid (登録商標、<http://www.namiki-s.co.jp/chemcupid/>)において、アントラニル酸部位をもつ化合物の検索を行った。その結果得られた化合物について、LigandBox (<http://www.ligandbox.protein.osaka-u.ac.jp/ligandbox/>)とデータの照合を行い、当該化合物のMOL2ファイル入手し、フォーカストライブラリーを構築した。タンパク質-リガンド・ドッキングソフトウェアGOLD Suiteに付属する分子ビューワーHermesを立ち上げ、GOLDのWizardを選択し、Load Proteinボタンで目的タンパク質のPDBファイルを開き、その後は、マニュアルにしたがって、操作をした。以下に、候補化合物リストを記載する。なお、式(4)～(32)、式(33-1

) ~ (33-11)、式(34-1) ~ (34-14)、式(35-1) ~ (35-2)、式(36-1) ~ (36-2)で表す化合物はナミキ商事株式会社から購入することができる。

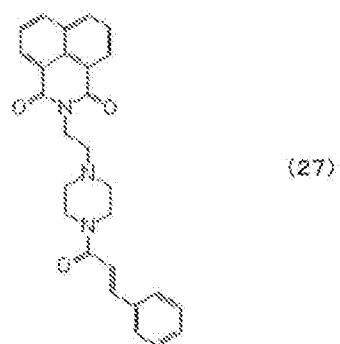
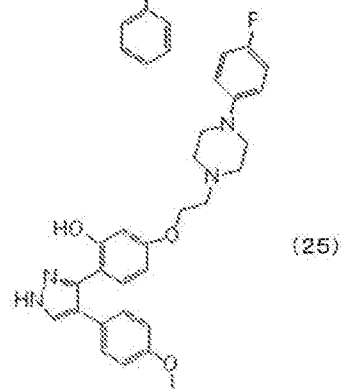
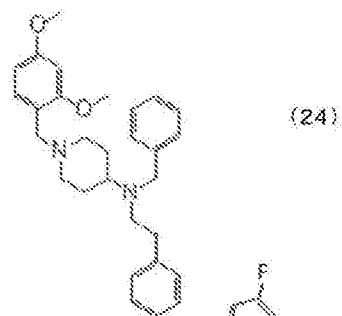
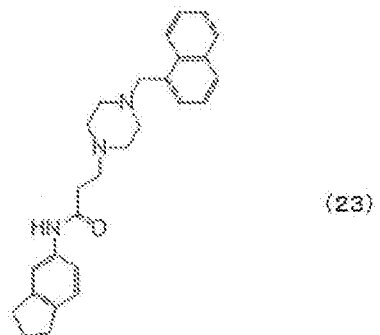
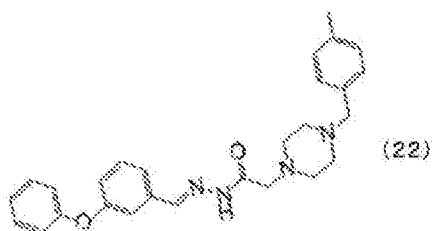
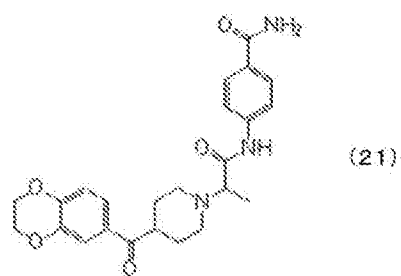
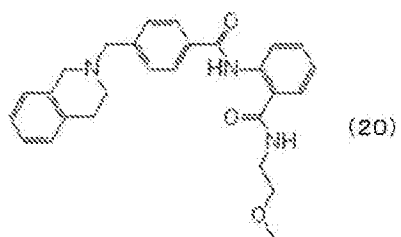
[化6]



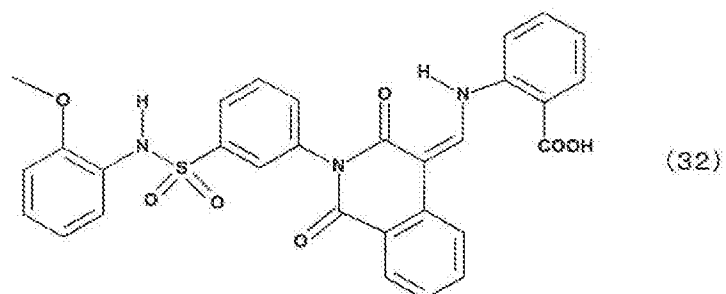
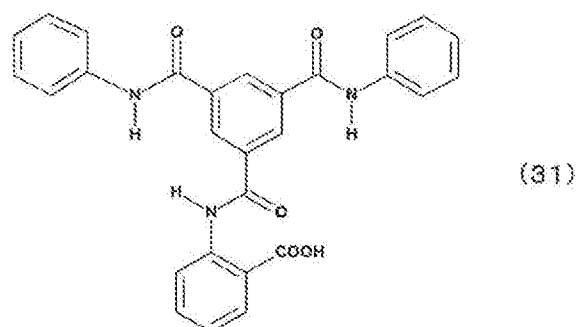
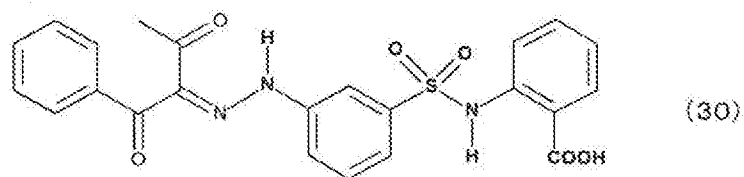
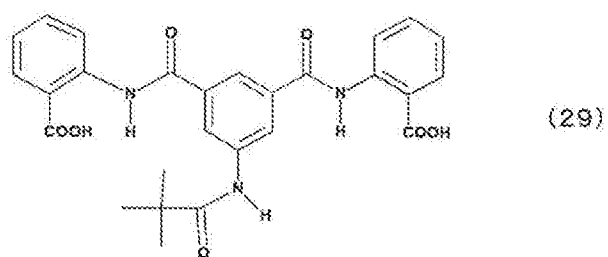
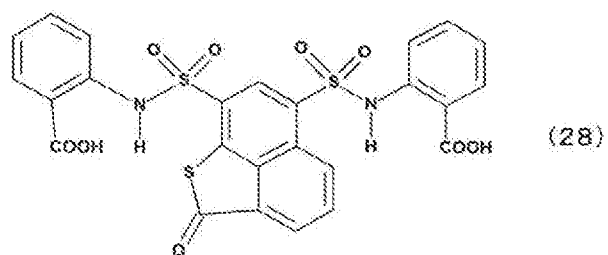
[化7]



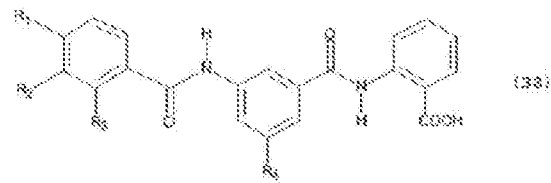
[化8]



[化9]



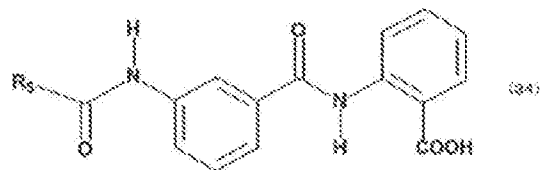
[化10]



式(33)のR₁、R₂、R₃、R₄の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

式	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(33-1)	CH ₃ -	H-	H-	H-
(33-2)	H-	H-	Cl-	H-
(33-3)	H-	H-	CH ₃ -	H-
(33-4)	H-	Cl-	H-	H-
(33-5)	H-	CH ₃ C(=O)O-	H-	H-
(33-6)	H-	H-	Br-	H-
(33-7)	CH ₃ CH ₂ CH ₂ O-	H-	H-	H-
(33-8)	CH ₃ C(=O)O-	H-	H-	H-
(33-9)	H-	CH ₃ CH ₂ CH ₂ O-	H-	H-
(33-10)	H-	H-	H-	
(33-11)	NO ₂ -	H-	H-	

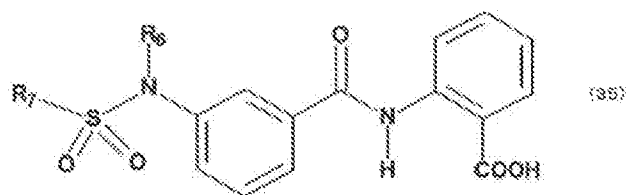
[化11]



式(34)のR₅の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

(34-1)		(34-8)	
(34-2)		(34-9)	
(34-3)		(34-10)	
(34-4)		(34-11)	
(34-5)		(34-12)	
(34-6)		(34-13)	
(34-7)		(34-14)	

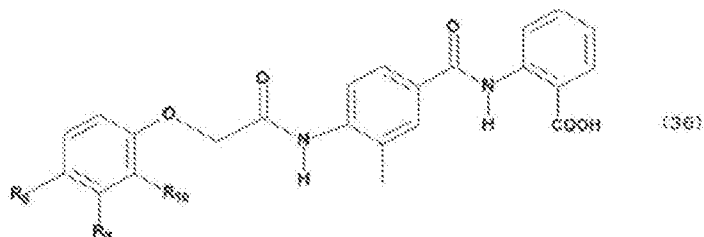
[化12]



式(35)の R_6 、 R_7 の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

式	R_6	R_7
(35-1)	H-	
(35-2)	CH_3 -	

[化13]



式(36)の R_8 、 R_9 、 R_{10} の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

式	R_8	R_9	R_{10}
(36-1)	$(CH_3)_2CH$ -	H-	H-
(36-2)	H-	CH_3 -	CH_3 -

[0029] [化合物の細胞アッセイ]

候補化合物から化合物をピックアップし、以下の手順でタイトジャンクシ

オン形成に与える影響についてアッセイを行った。

[0030] (1) 細胞の培養

細胞は、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株MDCK II (Madin-Darby Canine Kidney Cell Strain II; 本研究では神戸大学の古瀬幹夫教授から入手した細胞を用いたが、DSファーマバイオメディカル株式会社からも購入可能である)を用いた。この細胞は10% FBS (gibco)、penicillin/streptomycin (gibco)を含むD-MEM培地(Wako)で培養した。

[0031] (2) 抗体と試薬

ウサギ抗CLD2抗体はシグマアルドリッチ社より購入した。2次抗体であるCy3標識抗ウサギIgG抗体、FITC標識抗マウスIgG抗体はシグマアルドリッチ社より購入した。

[0032] (3) 細胞の免疫染色

6well dishの各ウェルにカバーガラスを入れ、そこに30×10⁴のMDCK II細胞を播種し、37℃、5%CO₂環境で24hインキュベートした。その後、D-MEM培地に100μM、DMSO濃度0.1%になるように式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)、(36-1)、(13)及び(14)で表される化合物を混合し、細胞に添加した後、37℃、5%CO₂環境で48hインキュベートした。

インキュベート後、FBS、抗生物質を含有していないD-MEM培地で2回洗浄後、-20℃の冷メタノールをかけ、-20℃で20min静置することでカバーガラスに細胞を固定化した。その後、TBS-T (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5, 0.1% Tween 20)で洗浄後、ブロッキング溶液(5%スキムミルク in TBS-T)を加え、室温で1hインキュベートした。その後、ブロッキング溶液で希釈した1次抗体希釈液をパラフィルム上に乗せ、そこに細胞固定面が向くようにカバーガラスをかぶせ、4℃、湿潤環境で23hインキュベ

トした。その後、カバーガラスを回収し、TBS-Tで2回洗浄した。そして、ブロッキング溶液で希釈した2次抗体希釈液をパラフィルム上に乗せ、そこに細胞固定面が向くようにカバーガラスをかぶせ、室温、遮光環境で1hインキュベートした。その後、カバーガラスを回収しTBS-Tで2回洗浄後、TBS-Tで希釈したDAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩) 溶液 (DOJINDO, (1:1000)) をかけ、室温、遮光条件で5minインキュベートした。その後、TBS-Tで3回洗浄後、封入剤によりカバーガラスを封入した。これらのサンプルはOLYMPUS社の顕微鏡IX71を用いて顕微鏡観察した。なお、コントロールとして、0.1%ジメチルスルホキシド (DMSO) に暴露した細胞を用いた。

[0033] 図4は、上記式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)、(36-1)、(13)及び(14)で表される化合物、並びにコントロール(DMSO)をMDCKIIに暴露して得られた免疫染色の写真である。図4の写真から、式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物を細胞に暴露するとコントロールより細胞と細胞の間の白色部分が明らかに薄くなっており、タイトジャンクションの緩和(消滅)が確認された。一方、式(13)及び(14)で表される化合物を細胞に暴露すると、細胞と細胞の間の白色部分が明らかに濃くなっており、クローディアンのタイトジャンクションへの増蓄が確認された。

[0034] 以上の結果より、式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物がタイトジャンクションを緩和することが明らかとなった。

[0035] また、ヒト、マウス、イヌのLNXP2ドメインのクローディンが相互作用する面に位置するアミノ酸配列について調べた。調べたアミノ酸配列は、何れもUniProtから入手した次の部分である。

<ヒト> ID: Q8TBB1のアミノ酸番号377-463 (87配列

)

<マウス> ID: O70263のアミノ酸番号381-467 (87配列

)

<イヌ> ID: E2RBE8のアミノ酸番号381-467 (87配列

)

ヒト、マウス、イヌのLN_X1PDZ2ドメインのアミノ酸配列(上記87配列)の相同性は、ヒトとマウスは95%、ヒトとイヌは94%、マウスとイヌは94%と非常に高かった。また、クローディングが相互作用する面に位置するアミノ酸の配列(上記87配列の18番目のグリシン~23番目のアルギニン、及び66番目のプロリン~74番目のグルタミン)は、ヒト、マウス、イヌで完全に一致していた。したがって、式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物は、ヒトのタイトジャンクションの緩和にも用いることができる。

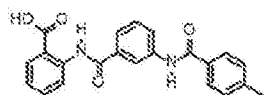
産業上の利用可能性

[0036] 本発明の式(33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6)及び(36-1)で表される化合物は、タイトジャンクションを緩和することができる。したがって、薬剤吸収補助剤や、医薬組成物等への応用が可能である。

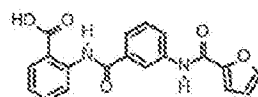
請求の範囲

[請求項1] 下記式 (33-1)、(33-9)、(34-1)、(34-2)、(34-6) 及び (36-1) で表される化合物を少なくとも 1 種含むタイトジャンクションの緩和剤。

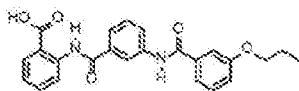
[化1]



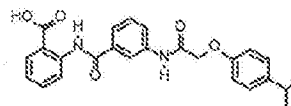
(33-1)



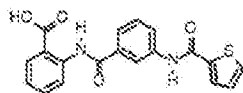
(34-2)



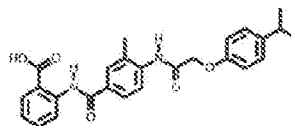
(33-9)



(34-6)



(34-1)

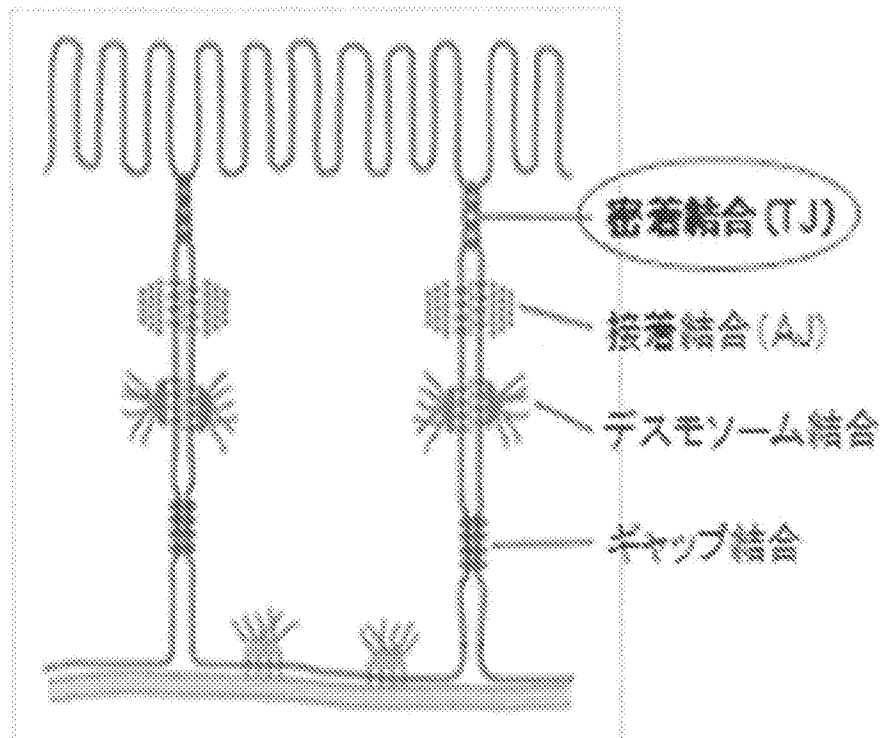


(36-1)

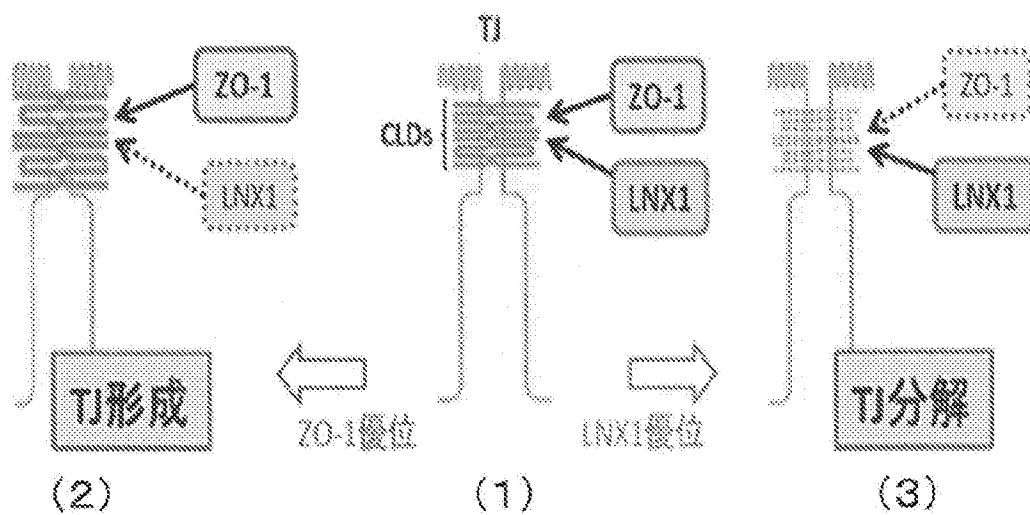
[請求項2] 請求項1に記載のタイトジャンクションの緩和剤を含む薬剤吸収補助剤。

[請求項3] 請求項1に記載のタイトジャンクションの緩和剤を含む医薬組成物。

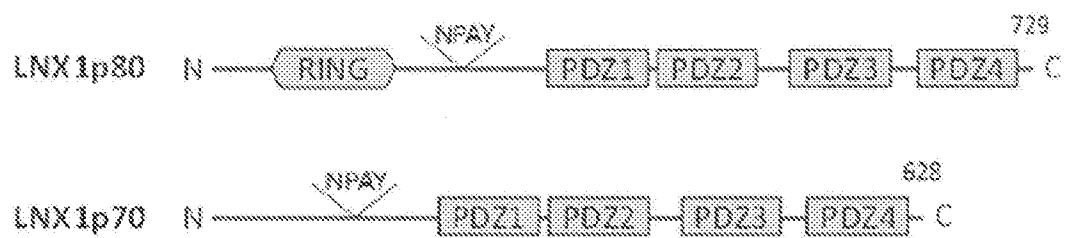
[図1]



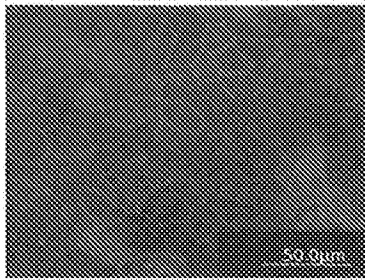
[図2]



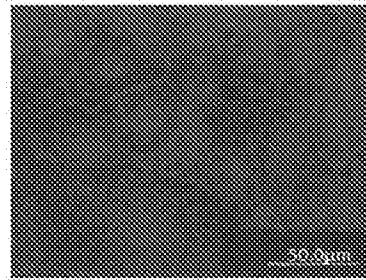
[図3]



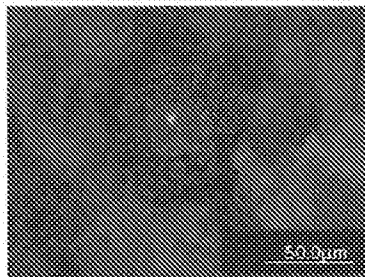
[図4]



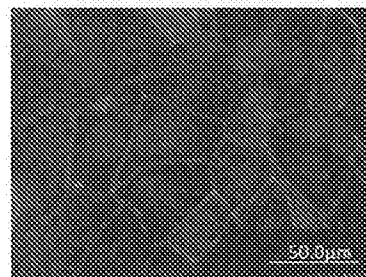
DMSO



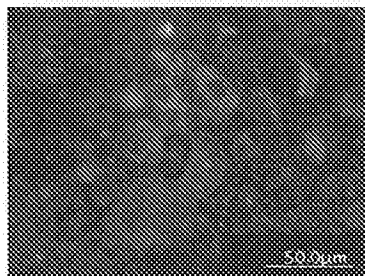
(34-6)



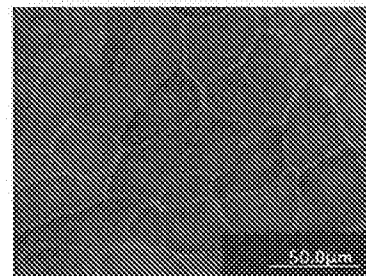
(33-1)



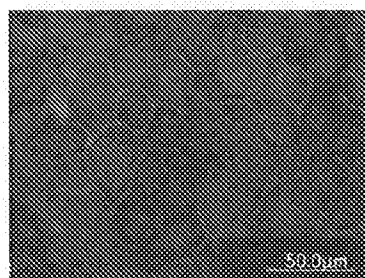
(36-1)



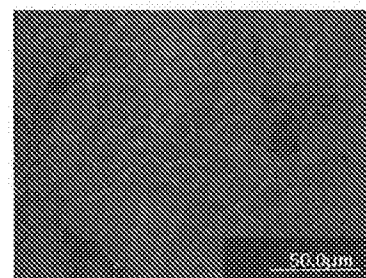
(33-9)



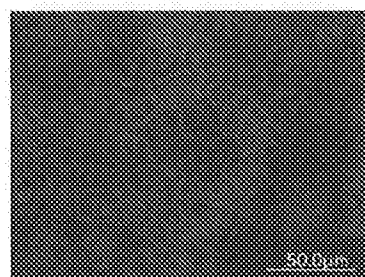
(13)



(34-1)



(14)



(34-2)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/16(2006.01)i, A61K47/22(2006.01)i, A61K31/196(2006.01)n,
A61K31/341(2006.01)n, A61K31/381(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n

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)

A61K47/16, A61K47/22, A61K31/196, A61K31/341, A61K31/381, 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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2005/115374 A1 (7TM PHARMA A/S), 08 December 2005 (08.12.2005), claims; page 1, 1st to 2nd paragraphs; page 14, 6th paragraph to page 15, 1st paragraph; page 34, compounds B33, B35, B41 & US 2009/0105218 A1 & EP 1758571 A1 & EP 2336113 A1	3 1, 2
X A	WILLIAMS, J.R. et al, Unique Ligand Selectivity of the GPR92/LPA5 Lysophosphatidate Receptor Indicates Role in Human Platelet Activation, Journal of Biological Chemistry, 2009, Vol.284, No.25, p.17304-17319, Abstract, p.17313, right column, p.17318, Table 6, Compound 5987411, p.17318, Table 7	3 1, 2

☒ 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
12 July 2016 (12.07.16)

Date of mailing of the international search report
19 July 2016 (19.07.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065324

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WU, S. et al, In Silico Screening for PTPN22 Inhibitors: Active Hits from an Inactive Phosphatase Conformation, ChemMedChem, 2009, Vol.4, p.440-444, Abstract, p.442, Table 1, Compound 8, p.443, Figure 4, Compound 8	3 1,2
A	JP 2001-527572 A (UNIVERSITY OF MARYLAND-BALTIMORE), 25 December 2001 (25.12.2001), claims; pages 16 to 17, 38 to 39 & US 5945510 A & WO 1998/052415 A1 & EP 982988 A1 & DE 69818450 D	1-3
A	WO 2009/015382 A2 (ALBA THERAPEUTICS CORP.), 29 January 2009 (29.01.2009), claims; pages 1, 7; examples 1 to 3 & US 2010/0286036 A1 & TW 200918086 A	1-3
A	JP 2010-248094 A (Kobe University), 04 November 2010 (04.11.2010), claims; paragraph [0011]; examples 1, 2 (Family: none)	1-3
A	WO 2007/026516 A1 (Kyoto University), 08 March 2007 (08.03.2007), claims; paragraph [0004]; examples 2, 3 & JP 2008-271784 A	1-3
P, A	WO 2016/013557 A1 (Nagoya University), 28 January 2016 (28.01.2016), claims; pages 16 to 18; examples 1 to 7 (Family: none)	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K47/16(2006.01)i, A61K47/22(2006.01)i, A61K31/196(2006.01)n, A61K31/341(2006.01)n,
A61K31/381(2006.01)n, A61P43/00(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. A61K47/16, A61K47/22, A61K31/196, A61K31/341, A61K31/381, 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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

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 A	WO 2005/115374 A1 (7TM PHARMA A/S) 2005.12.08, Claims, p.1 の第 1-2 パラグラフ, p.14 の第 6 パラグラフ-p.15 の第 1 パラグラフ, p.34 の Compound B33, B35, B41 & US 2009/0105218 A1 & EP 1758571 A1 & EP 2336113 A1	3 1, 2

☒ 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。

* 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

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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 2 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

深谷 良範

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

3 8 5 2

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 A	WILLIAMS, J. R. et al, Unique Ligand Selectivity of the GPR92/LPA5 Lysophosphatidate Receptor Indicates Role in Human Platelet Activation, Journal of Biological Chemistry, 2009, Vol.284, No.25, p.17304-17319, Abstract, p.17313 の右欄, p.17318 の Table 6 Compound 5987411, p.17318 の Table 7	3 1,2
X A	WU, S. et al, In Silico Screening for PTPN22 Inhibitors: Active Hits from an Inactive Phosphatase Conformation, ChemMedChem, 2009, Vol.4, p.440-444, Abstract, p.442 の Table 1 Compound 8, p.443 の Figure 4 Compound 8	3 1,2
A	JP 2001-527572 A (ユニバーシティ オブ メリーランド, ボルティモア) 2001.12.25, 特許請求の範囲, p.16-17, 38-39 & US 5945510 A & WO 1998/052415 A1 & EP 982988 A1 & DE 69818450 D	1-3
A	WO 2009/015382 A2 (ALBA THERAPEUTICS CORPORATION) 2009.01.29, Claims, p.1,7, Example 1-3 & US 2010/0286036 A1 & TW 200918086 A	1-3
A	JP 2010-248094 A (国立大学法人神戸大学) 2010.11.04, 特許請求の範囲, [0011], 実施例 1,2 (ファミリーなし)	1-3
A	WO 2007/026516 A1 (国立大学法人京都大学) 2007.03.08, 請求の範囲, [0004], 実施例 2,3 & JP 2008-271784 A	1-3
P, A	WO 2016/013557 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2016.01.28, 請求の範囲, p.16-18, 実施例 1-7 (ファミリーなし)	1-3