

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年5月11日 (11.05.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/049215 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/06 (2006.01)	A61P 13/02 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)	A61P 15/08 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)	A61P 15/12 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)	A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)	A61P 19/02 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)	A61P 19/04 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)	A61P 21/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)	A61P 21/04 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	A61P 25/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)	A61P 27/02 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)	A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 31/04 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01)	A61P 37/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)	A61P 43/00 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)	C07D 261/14 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)	C07D 277/20 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)	C07D 277/42 (2006.01)

市此花区春日出中3丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP). 福島 晃久 (FUKUSHIMA, Akihisa) [JP/JP]; 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 大日本住友製薬株式会社 知的財産部 (春日出) Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/020221

(22) 国際出願日: 2005年11月2日 (02.11.2005)

(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2004-318771 2004年11月2日 (02.11.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大日本住友製薬株式会社 (DAINIPPON SUMITOMO PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号 Osaka (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田頭 秋三 (TAGASHIRA, Shuzo) [JP/JP]; 〒5540022 大阪府大阪

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMBINATION DRUG FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASE

(54) 発明の名称: 自己免疫疾患を治療するための併用薬

(57) Abstract: It is intended to provide a combination drug for preventing and/or treating an autoimmune disease. More specifically speaking, a combination drug for preventing and/or treating an autoimmune disease which contains a CaMKII inhibitor and a disease-modifying antirheumatic drug; a medicinal composition, a commercial package, a kit, etc. for the combination; a potentiator for the effect of preventing and/or treating an autoimmune disease of a disease-modifying antirheumatic drug which contains a CaMKII inhibitor as the active ingredient; a method of screening a CaMKII inhibitor appropriately usable in combination, and so on.

(57) 要約: 自己免疫疾患を予防および/または治療するための併用薬を提供する。より具体的には、CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する、自己免疫疾患の予防および/または治療のための併用薬; 当該併用のための医薬組成物、商業パッケージ、およびキット等; CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、疾患修飾性抗リウマチ薬の自己免疫疾患予防および/または治療効果の増強剤; 併用に適したCaMKII阻害剤のスクリーニング方法等を提供する。

WO 2006/049215 A1

明 細 書

自己免疫疾患を治療するための併用薬

技術分野

[0001] 本発明は、自己免疫疾患を予防および／または治療するための併用薬に関する。

背景技術

[0002] 生体は通常、自己の構成成分(自己抗原)に対しては免疫応答を示さず、免疫学的恒常性が保たれている。このような恒常性は自然免疫寛容と呼ばれている。この寛容状態が破れて、自己抗原と反応する抗体やリンパ球が生じてくることがある。このような現象を自己免疫と呼び、それが引金となって起こってくる病気を自己免疫疾患と呼んでいる。自己免疫疾患には全身性自己免疫疾患と臓器特異的自己免疫疾患がある。代表的なものとして前者は全身性エリテマトーデス、関節リウマチが挙げられ、後者は多発性硬化症、重症筋無力症、自己免疫性喀血性貧血、橋本氏甲状腺炎などが挙げられる。全身性の自己免疫疾患は、古くは結合組織の増生を特徴とする膠原病という範疇に入れられていた。しかし近年、それらの成因が研究されてきて、少なくとも部分的には自己免疫が関与していると考えられるようになってきたが、なお不明な点も多い。一方、臓器特異的自己免疫疾患では、自己抗体の病因的役割がはっきりしている場合が多い。これまでの研究から、臓器特異的自己免疫疾患は、抗原刺激を受けた Tリンパ球によって引き起こされるものと推定されるに至っている。自己抗体の産生機序については、さまざまな考えが出されている。第1は特定の自己抗体の産生にあずかる遺伝子の関与説である。第2は、通常血中に微量にしか存在しない抗原がなんらかの原因で多量に放出されること、ないし抗原がなんらかの原因で修飾されることによるものである。第3は、抗体産生にあずかるリンパ球側に異常があり、寛容状態から逸脱してしまうことによるものである。おそらく、これらが重複して自己抗体が産生されてくると考えられている。

[0003] 関節リウマチ(rheumatoid arthritis)は自己免疫疾患の一つで、多発性関節炎を主徴とし、同時に多臓器を障害する原因不明の全身性炎症疾患であり、寛解と増悪を繰り返しながら慢性に進行し、無治療で放置すると関節の破壊と変形を来し、やがて

運動機能障害を呈し、ときには生命をも脅かす可能性もある疾患である。しかしながら現在の医学では関節リウマチを完全に治癒させることも予防することもできないとされている。従って、現時点での治療目標は早期に診断し、早期から積極的治療を開始し、リウマチ性炎症を可及的速やかにかつ最大限に抑制して、非可逆的変化の出現を防止、ないしはその進展を阻止することにより、患者の身体的、精神的、社会的な生活の質(QOL)の向上を図ることである。

[0004] 関節リウマチの治療に使用されている主な薬物は、非ステロイド系抗炎症薬(以下、「NSAIDs」と記載する)、疾患修飾性抗リウマチ薬(disease modifying anti-rheumatic drugs:以下、「DMARDs」と記載することもある)及び副腎皮質ステロイド薬である。

[0005] NSAIDsは関節リウマチ患者に最初に使用される薬物であり、鎮痛効果は速やかに得られるが、抗炎症作用は1〜2週間後に発現する。NSAIDsには炎症の程度を軽減させる作用はあっても、リウマチ性炎症の進行を阻止する作用、関節破壊を防止する作用はない。また、NSAIDsの副作用はその薬理作用(cyclooxygenase-1阻害活性)とは切り離せないものが多く、消化管障害等はしばしば治療の妨げともなる。

[0006] DMARDsは、関節リウマチの免疫異常を是正することによりリウマチ性炎症を鎮静化させて、寛解導入を目的とする薬物の総称である。DMARDsは一般に遅効性であるが、効果が発現すると長期間に亘って効果が持続する。DMARDsには鎮痛効果がなく、投与開始時は速効性のNSAIDsや副腎皮質ステロイド薬を併用する。一方、問題点として、まれに骨髄抑制、腎炎、間質性肺炎などの重篤な副作用が出現することや至適用量に個人差があることなどが知られている。さらに、従来のDMARDsは投与を持続することにより耐性を示すことが多く(エスケープ現象)、その効果は2〜3年で減弱し、投与中止に至る例が少なくない。

[0007] 副腎皮質ステロイド薬はリウマチ性炎症を迅速かつ確実に抑制し、短期間ではあるものの、関節リウマチ患者のQOLを著しく改善するが、長期連用による効果の減弱、離脱困難(反跳現象、離脱症候群)、関節破壊の進行阻止不能、さらに感染症の誘発、副腎機能不全、消化管障害、骨粗鬆症などの重篤な副作用の出現などの弊害も多い。

[0008] 自己免疫疾患、特に関節リウマチの病態形成には様々な細胞が関与していること

が知られている。代表的なものとしては、Tリンパ球、マクロファージ細胞、破骨細胞（関節の破壊に関与している）、線維芽細胞（関節強直に関与している）などが挙げられる。（G. S. Firestein et al., "RHEUMATOID ARTHRITIS"; OXFORD UNIVERSITY PRESS, 2000）

[0009] 難治性の関節リウマチに対しては、DMARDsの併用療法（例えば、レフルノミドとメソトレキサートの併用療法）も検討されているが、それに対する難治性または薬剤抵抗性の関節リウマチ患者も見られている。また、複数の非ステロイド系抗炎症薬、DMARDsおよび副腎皮質ステロイド薬を患者の状態と共に変更していく治療する方法が従来から検討されており、例えば、ピラミッド方式の他、Sawtooth方式、Step-down bridge方式が試されている。

1. ピラミッド方式

最初に、非ステロイド抗炎症薬を使用し、効果がなくなった時点で、DMARDsや副腎皮質ステロイド薬を追加していく方式である。

2. Sawtooth方式

最初から、DMARDsを使用し、効果がなくなった（エスケープ現象）時点で、次のDMARDsへと変更していく方式である。DMARDsの多剤併用も平行して実施される。

3. Step-down bridge方式

最初から、副腎皮質ステロイド薬、DMARDsを多剤併用し、炎症を抑制できた段階で、強力なDMARDsから徐々に中止していく方式である。

しかし、これらの方式を用いても、自己免疫疾患、特に関節リウマチに対しては、十分効果的な予防剤および／または治療剤がなく、より優れた自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤が望まれている。

[0010] カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素II（CaMキナーゼII：本明細書において「CaMKII」と略記する）は、ラット脳においてトリプトファンヒドロキシラーゼ（神経伝達物質の一つであるセロトニン生合成の律速酵素）を活性化する新しいタイプのカルモジュリン依存性リン酸化酵素として1980年に発見された酵素である。本酵素は、細胞外刺激により細胞内に増加した Ca^{2+} とカルモジュリンの複合体により活性化されることが知られている。最近の研究の進展に伴い、本酵素が記憶などの高次神経機能の

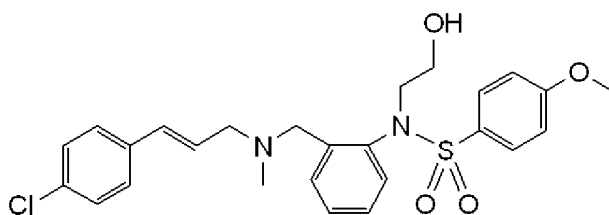
制御や種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。本酵素は、1)脳に多量に存在する、2)可溶型と顆粒結合型がある、3)基質特異性が広い、4)臓器特異性アイソフォームが存在する、5)自己リン酸化によって活性を制御する、などの際立った特長を備えている。特に当該酵素は、脳神経系において、神経伝達物質の生合成、神経伝達物質の放出、記憶の基本原則と考えられている長期増強作用、記憶、特に空間記憶に関与していることが示唆されている。現在までに、CaMKIIのアイソフォーム(サブタイプ)として、CaMKII α 、 β 、 β' 、 γ および δ が知られており、 γ はさらに γA 、 γB および γC が知られている。これらのうち、CaMKII α 、 β および β' のアイソフォームは、脳に局在化している。

しかし、CaMKIIの発現もしくは活性を調節することにより、自己免疫疾患の予防および／または治療が達成できるとの報告は全く知られていなかった。まして、CaMKII阻害剤とDMARDsとを、自己免疫疾患の予防および／または治療の目的で併用することに関しては、全く知られていなかった。

[0011] 具体的なCaMKII阻害剤の例としては、例えば、以下のものが知られている。

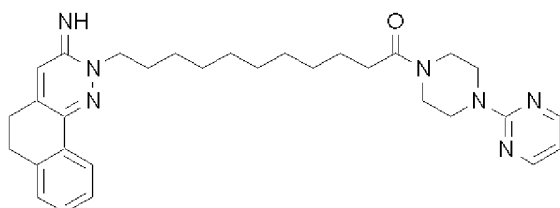
・KN-93 N-(2-[N-[4-クロロシナミル]-N-メチルアミノメチル]フェニル)-N-(2-ヒドロキシエチル)-4-メトキシベンゼンスルホンアミド (特開平6-293730、非特許文献1)

[0012] [化1]



・1-[1-オキソ-11-(5,6-ジヒドロ-3-イミノベンゾ[h]シノリン-2(3H)-イル)ウンデシル]-4-(2-ピリジニル)-ピペラジン(非特許文献2)

[0013] [化2]



・配列 Lys-Lys-X-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Phe-Asp-Ala-Tyr (式中、XはAlaまたはLysである。)で示されるアミノ酸配列を有するペプチド(特許文献1)

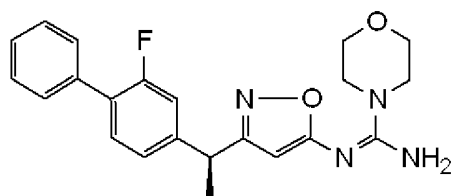
・配列 Lys-Lys-Ala-Leu-His-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Cys-Leu (KKALHRQEAVDCL)で示されるアミノ酸配列を有するペプチド(特許文献2、特表2001-509808;抗不整脈用途が示唆されている)

[0014] しかしながら、これら具体的なCaMKII阻害剤に関し、自己免疫疾患に対する作用は知られていなかった。

[0015] 一方、下記式1aで表される3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ]イソキサゾール(以下、「化合物(I)」とも称する)に関して、代表的な関節リウマチのモデル動物であるアジュバント関節炎ラットおよびコラーゲン関節炎マウスに対して抗関節炎作用があることが報告されている(例えば、特許文献3および非特許文献3~5参照)。

式1a:

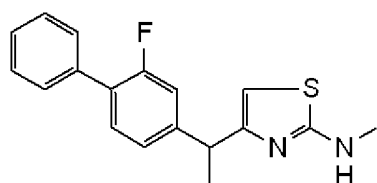
[0016] [化3]



[0017] また、下記式2で表される4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾール(以下、「化合物(II)」とも称する)に関して、アジュバント関節炎ラットにおける抗関節炎作用、およびマウスIII型アレルギー反応試験における浮腫抑制作用が報告されている(例えば、特許文献4参照)。

式2:

[0018] [化4]



[0019] しかし、化合物(I)、化合物(II)のCaMKIIに対する作用は、これまで全く知られてい

なかった。また、これら化合物とDMARDsとの併用効果は、これまで全く知られていなかった。

[0020] 特許文献1:特開平11-152298号公報

特許文献2:国際公開第98/33491号パンフレット

特許文献3:特許第3237608号明細書

特許文献4:特公平4-80035号公報

非特許文献1:Biochem Biophys Res Commun 1991; 181(3):p.968-75

非特許文献2:J. Med. Chem., 2002, 45, p.563-566

非特許文献3:田頭秋三、「炎症・再生」、Vol.21、No.4、p.472 (2001)

非特許文献4:F. Nishikaku, "Annals of the Rheumatic Diseases", vol.60 supplement 1, p.159 (2001)

非特許文献5:F. Nishikaku, "Annals of the Rheumatic Diseases", vol.61 supplement 1, p.194 (2002)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0021] 本発明の目的は、自己免疫疾患を予防および／または治療するための優れた併用薬を提供することである。さらに本発明は、当該併用薬の有効成分となる候補物質を探索し取得するために有用なスクリーニング方法を提供することをも目的とする。

課題を解決するための手段

[0022] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、以下IおよびIIの驚くべき知見を得た。

I. CaMKII阻害剤が自己免疫疾患予防剤および／または治療剤として有用であること

(1) 化合物(I)、化合物(II)およびこれらの誘導体がCaMKII阻害作用を示すこと。(実施例1、2)

(2) 自己免疫疾患、特に関節リウマチの病態形成に関与する種々の細胞(Tリンパ球、マクロファージ細胞、破骨細胞、線維芽細胞、滑膜細胞など)に対して、化合物(I)、KN-93等のCaMKII阻害剤が抑制的に作用すること。(実施例3～7)

(3) CaMKII阻害剤として公知であるKN-93等が自己免疫疾患の動物モデルで有用性を示すこと。(実施例10)

(4) 自己免疫疾患の動物モデルにおいて、罹患部ではCaMKII産生細胞の比率が亢進していること、すなわちCaMKIIが自己免疫疾患の病態形成に関与していること。(実施例12)

(5) CaMKIIによるリン酸化によって変動する各種因子に対し、化合物(I)およびKN-93が以下(a)-(c)の作用を有すること。

(a)化合物(I)およびKN-93が $I\kappa B\alpha$ の分解を抑制すること。(実施例13)

(b)化合物(I)およびKN-93が、bFGFによるサイクリンD1の発現増強を抑制すること。(実施例14)

(c)化合物(I)およびKN-93が、Aktのリン酸化を抑制すること。(実施例14)

(6) 単球系細胞において、炎症性刺激によりCaMKIIの発現が誘導されること、すなわちCaMKIIが自己免疫疾患の病態形成に関与していること。(実施例15)

(7) CaMKII配列特異的siRNAにより、滑膜細胞の細胞増殖が抑制されること(実施例16)。すなわち、CaMKII γ の発現を抑制、または活性を阻害することにより、滑膜細胞の異常増殖が抑制され、よって関節リウマチ等の疾患における関節の病態改善(慢性炎症の抑制、関節破壊の抑制、関節変形への進行抑制など)が達成されうること。

(8) 関節リウマチの動物モデルにおいて、化合物(I)が優れた関節破壊抑制効果を示すこと。(実施例20および21)

[0023] CaMKIIに関連して変動する因子は、 $I\kappa B\alpha$ 、細胞質ホスホリパーゼA2(cPLA2)、細胞周期因子サイクリンD1、細胞表面レセプターCD44、EGFレセプター、Stat1など多数知られている(J. Biol. Chem. 276, 36008-36013; J. Biol. Chem. 276, 39653-39660; Exp. Cell Res. 240, 218-227; Biochem. J. 357, 843-850; J. Biol. Chem. 274, 16168-16173; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5971-5976)。

本発明者らは、これらのうち $I\kappa B\alpha$ およびサイクリンD1に着目し、鋭意検討を行った結果、前記(5)の知見を得た。これら知見より、化合物(I)などのCaMKII阻害剤は、I

$\kappa B \alpha$ の分解を抑制し、Tリンパ球の活性化を抑制すると考えられる。また、化合物(I)などのCaMKII阻害剤によって、線維芽細胞においてCaMKIIが阻害されることによりAktのリン酸化が抑制され、それを介し下流のサイクリンD1の発現が抑制され細胞周期の停止が起こる、すなわち細胞増殖が抑制されることが考えられる。

[0024] 本発明者らは、上記の知見より、これら化合物(化合物(I)、KN-93など)はCaMKII阻害作用を介して自己免疫疾患の病態改善効果を発揮することを見出すとともに、CaMKIIの発現もしくは活性を阻害する物質が、自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤として有効に利用できることの確信を得た。

[0025] II. CaMKII阻害剤とDMARDsを併用することにより、自己免疫疾患の予防および／または治療において優れた併用効果が達成されること

本発明者らは、CaMKII阻害剤である化合物(I)を、種々の疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)と併用したところ、自己免疫疾患に対して、それぞれ単独の効果からは予測することができない顕著に優れた予防効果および／または治療効果を有すること、即ちCaMKII阻害剤とDMARDsとの併用は自己免疫疾患の予防および／または治療において顕著な有用性を示すことを見出した(実施例17～23)。とりわけ、従来、既知の抗リウマチ薬の単独療法では十分な効果が得られにくかった関節破壊の抑制に対して、CaMKII阻害剤とDMARDsとの併用療法が優れた関節破壊抑制効果を示すことを見出した(実施例20)。

本発明によれば、CaMKII阻害剤またはDMARDsのいずれか一方のみによる治療では達成できない優れた自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成することが可能である。また、CaMKII阻害剤またはDMARDsのいずれか一方のみによる治療では副作用が問題となる場合に、それぞれの投与量を低減して併用することにより副作用を軽減した形で、優れた自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成することも可能である。

本発明は以上IおよびIIの知見に基づき完成したものである。

[0026] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[2]疾患修飾性抗リウマチ薬と併用するための、CaMKII阻害剤を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[3]疾患修飾性抗リウマチ薬の投与と同時に、分離して、または続けて投与される項[2]記載の予防剤および／または治療剤。

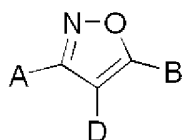
[4]副作用によって、十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られる量の疾患修飾性抗リウマチ薬が投与できない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対し、疾患修飾性抗リウマチ薬の投与と同時に、分離して、または続けて投与されるためのCaMKII阻害剤を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[5]副作用が肝障害、腎障害および胃腸障害から選ばれる1または複数である項[4]記載の予防剤および／または治療剤。

[0027] [6]CaMKII阻害剤が、式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である項[1]～[5]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。

式1:

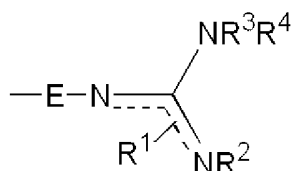
[0028] [化5]



[式中、Dは水素原子、ハロゲン原子、水酸基、メルカプト基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいスルファモイル基、スルホ基、 $-R^5$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2R^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CO)SR^7$ 、 $-(CS)OR^7$ または $-CS_2R^7$ (式中、 R^5 は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいシクロアルケニル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表す。 R^6 は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいアリール基または置換されてもよい複素環基を表す。 R^7 は置換されてもよいアルキル基または置換されてもよいアリール基を表す。)]を

AおよびBは、一方が、式：

[0029] [化6]



(Eは単結合またはアルキレン基を表す。

2つの破線は、一方が実線と共に2重結合を意味し、他方が実線と共に単結合を意味する。R¹は破線が実線と共に単結合を表す結合に結合する窒素原子に結合する。

R¹、R²、R³およびR⁴は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、メルカプト基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいスルファモイル基、スルホ基、NH基の保護基、 $-R^5$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2R^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CO)SR^7$ 、 $-(CS)OR^7$ または $-CS_2R^7$ (式中、R⁵、R⁶およびR⁷は前記と同義である。)を表す。また、R¹、R²、R³およびR⁴は、このうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成してもよい。また、式： $-NR^3R^4$ は、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ で表される基を表してもよい。

R⁴³およびR⁴⁴は、以下の(1)または(2)の通りである。

(1)独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは1～3の整数を表す。)、 $-(CH_2)_n-CO_2R^{32}$ (nは前記と同義である。R³²は炭素数1～3のアルキル基を表す。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (nは前記と同義である。R³³およびR³⁴は独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mは2または3を表す。R³⁵は水素原子、炭素数1～3のアルキル基または $-(CH_2)_m-OR^{36}$ (mは前記と同義である。R³⁶は水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。))を表す。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (mは前記と同義である。R³⁷およびR³⁸は独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表すか、またはR³⁷およびR³⁸は一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、アゼパン、モルホリンまたはN-メチルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、アゼパン、モルホリンおよ

びN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は、独立して水素原子、炭素数1～3のアルキル基、フェニルまたはピリジルを表す。)を表す。

(2)一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキソ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。)

で表される基を表す。

AおよびBは、他方が、式: $-J-G$

(式中、Gは置換されてもよいアリール基、もしくは置換されてもよい複素環基を表す。Jは $-C(R^8R^9)-$ または $-C(=CR^8R^9)-$ を表す。 R^8 および R^9 は、各々独立して、水素原子、置換されてもよい低級アルコキシ基、または置換されてもよい低級アルキル基を表す。また、 R^8 および R^9 が結合して一緒になって、炭素原子と共に、置換されてもよい炭化水素環、置換されてもよい1, 3-ジオキサン環または置換されてもよい1, 3-ジオキソラン環を形成してもよい。)

で表される基を表す。]

[0030] [7]Eが単結合または低級アルキレン基である項[6]記載の予防剤および／または治療剤。

[8]Dが水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、 $-R^5$ または $-CO_2R^6$ (式中、 R^5 および R^6 は項[6]における意義と同義である。)である項[6]または項[7]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。

[9]Dが水素原子、カルボキシ基、 $-R^5$ または $-CO_2R^6$ (式中、 R^5 および R^6 は項[6]における意義と同義である。)である項[8]記載の予防剤および／または治療剤。

[10] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換さ

れてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいシクロアルケニル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表すか、式： $-NR^3R^4$ が、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、項[6]における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する項[6]～[9]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。

[11] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表すか、式： $-NR^3R^4$ が、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、項[6]における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する項[10]記載の予防剤および／または治療剤。

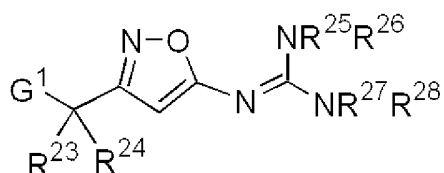
[12]Gが置換されてもよいフェニル、置換されてもよいナフチル、置換されてもよいフリル、置換されてもよいチエニル、置換されてもよいインドリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいベンゾチエニル、置換されてもよいイソベンゾフラニル、置換されてもよいピロリル、置換されてもよいベンゾフリル、置換されてもよいイミダゾリル、置換されてもよいピラゾリル、置換されてもよいイソキサゾリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいチアゾリル、置換されてもよいオキサゾリル、置換されてもよいベンズイミダゾリル、置換されてもよいベンゾチアゾリル、置換されてもよいベンズオキサゾリル、置換されてもよいピリジル、置換されてもよいピラジニル、置換されてもよいピリミジニル、置換されてもよいピリダジニル、置換されてもよいトリアジニル、置換されてもよいキノリル、置換されてもよいイソキノリル、置換されてもよいキナゾリニル、置換されてもよいキノキサリニル、置換されてもよい2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシニルまたは置換されてもよいカルバゾリルである項[6]～[11]のいずれ

か記載の予防剤および／または治療剤。

[0031] [13] CaMKII阻害剤が、式A1または式A2で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である項[6]記載の予防剤および／または治療剤。

式A1:

[0032] [化7]



[式中、G¹は、フェニル、ビフェニル-4-イル、3-ベンゾイルフェニル、4-ベンゾイルフェニル、1H-インドール-2-イル、1H-インドール-3-イル、1-メチル-1H-インドール-2-イル、1-メチル-1H-インドール-3-イル、2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-イル、1-ベンゾフラン-5-イル、1-ベンゾフラン-6-イル、キノリル、イソキノリル、フェニルピリジル、フェニルピリミジニル、フェニルピリダジニルまたはフェニルピラジニル(これらにおいて、フェニル、ビフェニル-4-イル、3-ベンゾイルフェニル、4-ベンゾイルフェニル、1H-インドール-2-イル、1H-インドール-3-イル、1-メチル-1H-インドール-2-イル、1-メチル-1H-インドール-3-イル、2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-6-イル、1-ベンゾフラン-5-イル、1-ベンゾフラン-6-イル、キノリル、イソキノリル、フェニルピリジル、フェニルピリミジニル、フェニルピリダジニルおよびフェニルピラジニルは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アセチル、シアノ、-CO₂R²⁹(R²⁹は炭素数1～3のアルキル基を表す。)および-CONR³⁰R³¹(R³⁰およびR³¹は、独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。)からなる群から任意に選ばれる1または2個の基で置換されてもよい。)を表す。

R²³およびR²⁴は、独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、メキシまたはエトキシを表すか、または一緒になってメチレンを表す。

式: =C(NR²⁵R²⁶)NR²⁷R²⁸は、以下の(1)、(2)または(3)の通りである。

(1) R²⁵およびR²⁶は、以下の(a)または(b)の通りであり、R²⁷およびR²⁸は、以下の(c)または(d)の通りである。

(a)独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は項[6]における意義と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は項[6]における意義と同義である。)を表す。

(b)一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(c)独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(d)一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(ここで、5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(2) R^{26} および R^{27} は、一緒になって2つの窒素原子、炭素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(ここで、5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい)を表す。

R^{25} および R^{28} は、独立して水素原子、炭素数1～3のアルキル基、アセチルまたは

$-(CH_2)_m-OR^{36}$ (m は前記と同義である。 R^{36} は項[6]における意義と同義である。)を表す。

(3)式: $=C(NR^{25}R^{26})NR^{27}R^{28}$ が、式: $=C(NR^{41}R^{42})N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ を表す。

R^{41} および R^{42} は、以下の(a¹)または(b¹)の通りであり、 R^{43} および R^{44} は、以下の(c¹)または(d¹)の通りである。

(a¹)独立して水素原子、炭素数1~4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1~3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

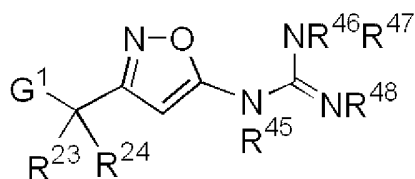
(b¹)一緒になって窒素原子と共に、5~7員飽和含窒素複素環基(5~7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(c¹)独立して水素原子、炭素数1~4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1~3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(d¹)一緒になって窒素原子と共に、5~7員飽和含窒素複素環基(5~7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。]

式A2:

[0033] [化8]



[式中、 G^1 、 R^{23} および R^{24} は前記と同義である。

式： $-N(R^{45})C(NR^{46}R^{47})=NR^{48}$ は、以下の(1¹)または(2¹)の通りである。

(1¹) R^{45} は、炭素数1～3のアルキル基またはアセチルを表す。 R^{48} は、水素原子、炭素数1～3のアルキル基またはアセチルを表す。

R^{46} および R^{47} は、以下の(a²)または(b²)の通りである。

(a²)独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-COR^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(b²)一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

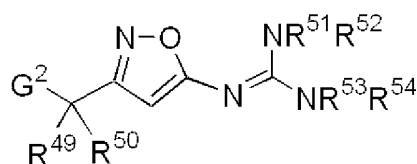
(2¹) R^{45} および R^{46} は、一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(ここで、5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

R^{47} および R^{48} は、独立して水素原子、炭素数1～3のアルキル基、アセチルまたは $-(CH_2)_m-OR^{36}$ (m および R^{36} は前記と同義である。)を表す。]

[14]CaMKII阻害剤が、式A3で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である項[6]記載の予防剤および／または治療剤。

式A3:

[0034] [化9]



[式中、 G^2 は、2-フルオロ-ビフェニル-4-イル、2'-フルオロ-ビフェニル-4-イルまたは3-ベンゾイルフェニルを表す。 R^{49} は、メチルを表す。 R^{50} は、水素原子、メチル、メトキシまたはエトキシを表す。

式： $=C(NR^{51}R^{52})NR^{53}R^{54}$ は、 (1^2) 、 (2^2) または (3^2) の通りである。

$(1^2)R^{51}$ および R^{52} は、以下の (a^3) 、 (b^3) または (c^3) の通りであり、 R^{53} および R^{54} は、以下の (d^3) 、 (e^3) または (f^3) の通りである。

(a^3) 独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(b^3) 一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は項[6]における意義と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は項[6]における意義と同義である。)を表す。

(c^3) 一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

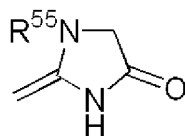
(d³) 独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(e³) 一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、R³³およびR³⁴は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよびR³⁵は前記と同義である。) または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、R³⁷およびR³⁸は前記と同義である。) を表す。

(f³) 一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。) を表す。

(2²) 式: $=C(NR^{51}R^{52})NR^{53}R^{54}$ が、式:

[0035] [化10]



(式中、R⁵⁵は、炭素数1～3のアルキル基、アセチルまたは $-(CH_2)_m-OR^{56}$ (mは前記と同義である。R⁵⁶は水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。) を表す。) で表される基を表す。

(3²) 式: $=C(NR^{51}R^{52})NR^{53}R^{54}$ が、式: $=C(NR^{57}R^{58})N=C(NH_2)NR^{59}R^{60}$ を表す。

。

R⁵⁷ および R⁵⁸ は、以下の (a⁴)、(b⁴) または (c⁴) の通りであり、R⁵⁹ および R⁶⁰ は、以下

の(d⁴)、(e⁴)または(f⁴)の通りである。

(a⁴)独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(b⁴)一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、R³³およびR³⁴は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよびR³⁵は前記と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、R³⁷およびR³⁸は前記と同義である。)を表す。

(c⁴)一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

(d⁴)独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(e⁴)一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、R³³およびR³⁴は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよびR³⁵は前記と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、R³⁷およびR³⁸は前記と同義である。)を表す。

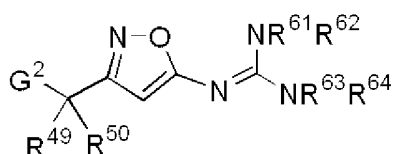
(f⁴)一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3の

アルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1~3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1~3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1~3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。]

[15]CaMKII阻害剤が、式A4で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である項[6]記載の予防剤および/または治療剤。

式A4:

[0036] [化11]



[式中、 G^2 、 R^{49} および R^{50} は、項[14]における意義と同義である。

式： $=C(NR^{61}R^{62})NR^{63}R^{64}$ は、以下の(1³)、(2³)または(3³)の通りである。

(1³) R^{63} および R^{64} は、共に水素原子を表す。

R^{61} および R^{62} は、以下の(a⁵)、(b⁵)または(c⁵)の通りである。

(a⁵)独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す。

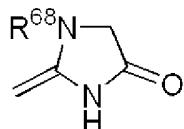
(b⁵)一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-CO_2R^{32}$ (nおよび R^{32} は項[6]における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{65}$ (mは2または3を表す。 R^{65} は、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、2-ヒドロキシエチルまたは3-ヒドロキシプロピルを表す。)または $-(CH_2)_m-NR^{66}R^{67}$ (mは前記と同義である。 R^{66} および R^{67} は、独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表すか、または R^{66} および R^{67} は一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンまたはN-メチルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンおよびN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。)を表す。

(c⁵)一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンまたはN-メ

チルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンおよびN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

(2³)式: $=C(NR^{61}R^{62})NR^{63}R^{64}$ が、式:

[0037] [化12]



(R⁶⁸は、炭素数1~3のアルキル基、2-ヒドロキシエチルまたは3-ヒドロキシプロピルを表す。)で表される基を表す。

(3³)R⁶¹およびR⁶²は、一緒になって窒素原子と共に、モルホリンを表し、R⁶³およびR⁶⁴は、一緒になって、アミノ-モルホリン-4-イル-メチレンを表す。]

[16]G²が2-フルオロ-ビフェニル-4-イルまたは2'-フルオロ-ビフェニル-4-イルであり、R⁵⁰が水素原子またはメチルであり、R⁶³およびR⁶⁴が共に水素原子であり、R⁶¹およびR⁶²が、以下の(a⁶)または(b⁶)の通りである、項[15]記載の予防剤および/または治療剤:

(a⁶)独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す;

(b⁶)一緒になって窒素原子と共に、モルホリン(モルホリンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

[0038] [17]CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である項[1]~[5]のいずれか記載の予防剤および/または治療剤。

[0039] [18]疾患修飾性抗リウマチ薬が、下記から選ばれる1または複数の薬剤である項[1]~[17]のいずれか記載の予防剤および/または治療剤:

レフルノミド、メソトレキサート、D-ペニシラミン、ブシラミン、サラゾスルファピリジン、アクタリット、ロベンザリット、シクロフォスファミド、クロラムブシル、ミゾリビン、アザチオプリン、オーラノフィン、金チオマレイン酸ナトリウム、金チオ硫酸、金チオグルコース、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン、クロロキン、タクロリムス、エタネルセプト、インフリキシマブ、アナキンラ、ケリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、およびヒト型抗I

L-6R抗体。

[19]疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである項[18]記載の予防剤および／または治療剤。

[20]自己免疫疾患が、下記から選ばれるいずれかの疾患である項[1]～[19]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤：

関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本病、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性血液性疾患、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、間質性肺腺維症およびシェーグレン症候群。

[21]自己免疫疾患が関節リウマチである項[20]記載の予防剤および／または治療剤。

[0040] [22]CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強剤。

[0041] [23]CaMKII阻害剤が、下記の工程(a)、(b)および(c)を含むスクリーニング方法により選択された物質である項[22]記載の増強剤：

(a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する工程。

[24]CaMKII阻害剤が、10 μ Mの濃度におけるCaMKIIの阻害率が30%以上である物質である項[23]記載の増強剤。

[0042] [25]CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミ

ノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、項[22]記載の増強剤。

[26]疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである項[22]～[25]のいずれか記載の増強剤。

[27]自己免疫疾患が関節リウマチである項[22]～[26]のいずれか記載の増強剤。

[28]第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果の合計を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。

[29]第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。

[30]CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、項[28]または[29]のいずれか記載の組成物。

[31]疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである項[28]～[30]のいずれか記載の組成物。

[32]自己免疫疾患が関節リウマチである項[28]～[31]のいずれか記載の組成物。

[0043] [33]以下の(1)および(2)を含む商業パッケージ:

(1) CaMKII阻害剤を含有する医薬組成物;

(2) 当該医薬組成物を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して自己免疫疾患予防および／または治療用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した、該医薬組成物に関する記載物。

[34]以下の(1)および(2)を含む商業パッケージ:

(1)CaMKII阻害剤を含有する医薬組成物;

(2)当該医薬組成物を、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果を増強する用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した、該医薬組成物に関する記載物。

[35]CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロピフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、項[33]または[34]記載の商業パッケージ。

[36]疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである項[33]～[35]のいずれか記載の商業パッケージ。

[37]自己免疫疾患が関節リウマチである項[33]～[36]のいずれか記載の商業パッケージ。

[0044] [38]CaMKII阻害剤を含む第1の組成物、および疾患修飾性抗リウマチ薬を含む第2の組成物をパッケージ内に含有する、自己免疫疾患予防および／または治療用のキット。

[39]自己免疫疾患の予防および／または治療用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の使用。

[40]疾患修飾性抗リウマチ薬と併用することを特徴とする自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤の製造のためのCaMKII阻害剤の使用。

[41]疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患の予防および／または治療効果増強用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤の使用。

[42]CaMKII阻害剤を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して投与することを特徴とする自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

[43]CaMKII阻害剤を投与することを含む、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強方法。

[44]疾患修飾性抗リウマチ薬によって十分な予防および／または治療効果が得られない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対して、疾患修飾性抗リウマチ薬の自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強に有効な量のCaMKII阻害剤を投

与することを含む自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

[0045] また、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[45] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果増強剤のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する工程。

[46] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むことを特徴とする、疾患修飾性抗リウマチ薬と併用される自己免疫疾患予防剤および／または治療剤のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する工程。

[0046] また、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[47] CaMKII阻害剤と併用するための、疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[48] 副作用によって、十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られる量のCaMKII阻害剤が投与できない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対し、CaMKII阻害剤の投与と同時に、分離して、または続けて投与されるための疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[49] 副作用が肝障害、腎障害および胃腸障害から選ばれる1または複数である項[48]記載の予防剤および／または治療剤。

[50] 疾患修飾性抗リウマチ薬を有効成分として含有する、CaMKII阻害剤による自己

免疫疾患予防および／または治療効果の増強剤。

[51]第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果の合計を上回り、該第2医薬組成物はCaMK II阻害剤を含み、該第1医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含む組成物。

[52]第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果を上回り、該第2医薬組成物はCaMKII阻害剤を含み、該第1医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含む組成物。

[53]疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する医薬組成物、および当該医薬組成物をCaMKII阻害剤と併用して自己免疫疾患予防および／または治療用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む、商業パッケージ。

[54]疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する医薬組成物、および当該医薬組成物をCaMKII阻害剤の自己免疫疾患予防および／または治療効果増強の用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した該医薬組成物に関する記載物を含む、商業パッケージ。

[55]CaMKII阻害剤と併用することを特徴とする自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤の製造のための疾患修飾性抗リウマチ薬の使用。

[56]CaMKII阻害剤による自己免疫疾患の予防および／または治療効果増強用医薬組成物を製造するための、疾患修飾性抗リウマチ薬の使用。

[57]疾患修飾性抗リウマチ薬を投与することを含む、CaMKII阻害剤による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強方法。

[58]CaMKII阻害剤によって十分な予防および／または治療効果が得られない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対して、CaMKII阻害剤の自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強に有効な量の疾患修飾性抗リウマチ薬を投与することを含

む自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

[0047] [59] CaMKII阻害剤が項[6]記載の式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である、項[22]～[58]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[60] CaMKII阻害剤が3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、項[22]～[59]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[61] 3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩の投与量が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールのフリー体に換算して1日当たり約40～約240mg／人である項[60]記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[62] 3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩の投与量が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールのフリー体に換算して1日当たり約140～約240mg／人である項[60]記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[63] 疾患修飾性抗リウマチ薬が、下記から選ばれる1または複数の薬剤である項[22]～[62]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法：

レフルノミド、メソトレキサート、D-ペニシラミン、ブシラミン、サラゾスルファピリジン、アクタリット、ロベンザリット、シクロフォスファミド、クロラムブシル、ミゾリビン、アザチオプリン、オーラノフィン、金チオマレイン酸ナトリウム、金チオ硫酸、金チオグルコース、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン、クロロキン、タクロリムス、エタネルセプト、インフリキシマブ、アナキンラ、ケリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、およびヒト型抗I

L-6R抗体。

[64]疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである、項[63]記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[65]メソトレキサートの投与量が1週間当たり約5～約30mg／人である項[64]記載の予防剤および／または治療剤；増強剤；医薬組成物；組成物；商業パッケージ；キット；使用；または方法。

[66]サラゾスルファピリジンの投与量が1日当たり約0.5～約4g／人である項[64]記載の予防剤および／または治療剤；増強剤；医薬組成物；組成物；商業パッケージ；キット；使用；または方法。

[67]レフルノミドの投与量が1日当たり約5～約30mg／人である項[64]記載の予防剤および／または治療剤；増強剤；医薬組成物；組成物；商業パッケージ；キット；使用；または方法。

[68]自己免疫疾患が、下記から選ばれるいずれかの疾患である項[22]～[67]のいずれか記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法：

関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本病、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性血液性疾患、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、間質性肺腺維症およびシェーグレン症候群。

[69]自己免疫疾患が関節リウマチである、項[68]記載の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法。

[0048] さらに、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[70]CaMKII阻害剤と疾患修飾性抗リウマチ薬とを組み合わせる自己免疫疾患

の予防剤および／または治療剤。

[71] CaMKII阻害剤と疾患修飾性抗リウマチ薬とを組み合わせる医薬。

[0049] また、前記のように、本発明のCaMKII阻害剤は、疾患修飾性抗リウマチ薬(DMA RDs)との併用療法により優れた関節破壊抑制効果(特に、自己免疫疾患に罹患した哺乳動物における関節破壊抑制効果)を示すことから、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[72] CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する関節破壊抑制剤。

[73] 疾患修飾性抗リウマチ薬と併用するための、CaMKII阻害剤を含有する関節破壊抑制剤。

[74] 疾患修飾性抗リウマチ薬の投与と同時に、分離して、または続けて投与される項[73]記載の関節破壊抑制剤。

[75] CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、疾患修飾性抗リウマチ薬による関節破壊効果の増強剤。

[76] CaMKII阻害剤を含む第1の組成物、および疾患修飾性抗リウマチ薬を含む第2の組成物をパッケージ内に含有する、関節破壊抑制用途のキット。

[77] 関節破壊抑制用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の使用。

[78] 疾患修飾性抗リウマチ薬と併用することを特徴とする関節破壊抑制剤の製造のためのCaMKII阻害剤の使用。

[79] 疾患修飾性抗リウマチ薬による関節破壊抑制効果増強用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤の使用。

[80] CaMKII阻害剤を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して投与することを特徴とする関節破壊抑制方法。

[81] CaMKII阻害剤を投与することを含む、疾患修飾性抗リウマチ薬による関節破壊抑制効果の増強方法。

[82] 疾患修飾性抗リウマチ薬によって十分な予防および／または治療効果が得られない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対して、疾患修飾性抗リウマチ薬の関節破壊抑制効果の増強に有効な量のCaMKII阻害剤を投与することを含む関節破壊

抑制方法。

さらに、前記項[1]～[71]において、「自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤」を「関節破壊抑制剤」に、「自己免疫疾患予防および／または治療効果」を「関節破壊抑制効果」に、「自己免疫疾患予防および／または治療用途」を「関節破壊抑制用途」に、「自己免疫疾患予防および／または治療用」を「関節破壊抑制用」に、「自己免疫疾患予防および／または治療方法」を「関節破壊抑制方法」に、それぞれ書き換えた態様も、本発明の態様に含まれる。

[0050] また、前記の記載、および実施例1－16で示されるように、本発明のCaMKII阻害剤は、単独投与においても自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤として有用である。従って、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[B1] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤のスクリーニング方法：

- (a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する工程。

[B2] 自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤が、免疫の異常亢進改善剤である[B1]記載のスクリーニング方法。

[B3] 自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤が、関節リウマチ患者における慢性炎症の抑制剤、関節破壊の抑制剤、関節変形への進行抑制剤、または身体機能の改善剤である[B1]記載のスクリーニング方法。

[B4] 10 μ Mの濃度におけるCaMKIIの阻害率が30%以上である物質を選択する工程を含む[B1]～[B3]のいずれか記載のスクリーニング方法。

[B5] 10 μ Mの濃度におけるCaMKIIの阻害率が60%以上である物質を選択する工程を含む[B1]～[B3]のいずれか記載のスクリーニング方法。

[B6] [B1]～[B5]のいずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される物質

を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[0051] [B7] CaMKII阻害作用を有する物質を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B8] CaMKII阻害作用を有する物質が、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度におけるCaMKIIの阻害率が30%以上である物質である[B7]記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B9] CaMKII阻害作用を有する物質が、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度におけるCaMKIIの阻害率が60%以上である物質である[B7]記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B10] 関節リウマチの予防剤および／または治療剤である[B6]～[B9]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B11] 関節リウマチ患者における慢性炎症の抑制、関節破壊の抑制、関節変形への進行抑制、または身体機能の改善のための[B6]～[B9]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[0052] [B12] 項[6]記載の式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩を有効成分とするCaMKII阻害剤。

[0053] [B13] Eが単結合または低級アルキレン基である[B12]記載のCaMKII阻害剤。

[B14] Dが水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、 $-\text{R}^5$ または $-\text{CO}_2\text{R}^6$ (式中、 R^5 および R^6 は[B12]における意義と同義である。)である[B12]または[B13]のいずれか記載のCaMKII阻害剤。

[B15] Dが水素原子、カルボキシ基、 $-\text{R}^5$ または $-\text{CO}_2\text{R}^6$ (式中、 R^5 および R^6 は[B12]における意義と同義である。)である[B14]記載のCaMKII阻害剤。

[0054] [B16] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいシクロアルケニル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表す

か、式: $-NR^3R^4$ が、式: $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、[B12]における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する[B12]～[B15]のいずれか記載のCaMKII阻害剤。

[B17] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表すか、式: $-NR^3R^4$ が、式: $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、[B12]における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する[B16]記載のCaMKII阻害剤。

[0055] [B18] Gが置換されてもよいフェニル、置換されてもよいナフチル、置換されてもよいフリル、置換されてもよいチエニル、置換されてもよいインドリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいベンゾチエニル、置換されてもよいイソベンゾフラニル、置換されてもよいピロリル、置換されてもよいベンゾフリル、置換されてもよいイミダゾリル、置換されてもよいピラゾリル、置換されてもよいイソキサゾリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいチアゾリル、置換されてもよいオキサゾリル、置換されてもよいベンズイミダゾリル、置換されてもよいベンゾチアゾリル、置換されてもよいベンズオキサゾリル、置換されてもよいピリジル、置換されてもよいピラジニル、置換されてもよいピリミジニル、置換されてもよいピリダジニル、置換されてもよいトリアジニル、置換されてもよいキノリル、置換されてもよいイソキノリル、置換されてもよいキナゾリニル、置換されてもよいキノキサリニル、置換されてもよい2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシニルまたは置換されてもよいカルバゾリルである[B12]～[B17]のいずれか記載のCaMKII阻害剤。

[0056] [B19] 項[13]記載の式A1または式A2で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩を有効成分とする[B12]記載のCaMKII阻害剤。

[0057] [B20] 項[14]記載の式A3で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許

容される塩を有効成分とする[B12]記載のCaMKII阻害剤。

[0058] [B21] 項[15]記載の式A4で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩を有効成分とする[B12]記載のCaMKII阻害剤。

[0059] [B22] G^2 が2-フルオロビフェニル-4-イルまたは2'-フルオロビフェニル-4-イルであり、 R^{50} が水素原子またはメチルであり、 R^{63} および R^{64} が共に水素原子であり、 R^{61} および R^{62} が、以下の(a⁶)または(b⁶)の通りである、[B21]記載のCaMKII阻害剤：

(a⁶)独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す；

(b⁶)一緒になって窒素原子と共に、モルホリン(モルホリンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

[0060] [B23] 3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ]イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含むCaMKII阻害剤。

[B24] 4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾールまたはその薬学上許容される塩を有効成分として含むCaMKII阻害剤。

[B25] $I\kappa B\alpha$ の分解抑制作用を有する物質を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B26] サイクリンD1の発現増強に対する抑制作用を有する物質を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B27] Aktのリン酸化抑制作用を有する物質を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[0061] [B28] CaMKII阻害作用を有する物質が、CaMKII遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである、[B7]－[B11]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B29] CaMKII阻害作用を有する物質が、CaMKII遺伝子に対するsiRNAである[B7]－[B11]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B30] siRNAが、以下の配列で表されるsiRNAである、[B29]に記載の自己免疫疾

患の予防剤および／または治療剤：

センス鎖： 5'-CGU GAG GCU CGG AUA UGU CdTdT-3'

アンチセンス鎖：5'-GAC AUA UCC GAG CCU CAC GdTdT-3'

[B31] CaMKII阻害作用を有する物質が抗CaMKII抗体である、[B7]－[B11]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[0062] [B32] 哺乳動物体内におけるCaMKIIの発現もしくは活性を、自己免疫疾患の予防および／または治療に有効な程度阻害することを含む、該哺乳動物の自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

[B33] CaMKII阻害作用を有する物質を、自己免疫疾患の予防および／または治療に有効な量哺乳動物に投与することを含む、該哺乳動物の自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

[B34] 自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤の製造のための、CaMKII阻害作用を有する物質の使用。

[0063] また、本発明の態様として、以下のものも挙げることができる。

[B35] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とCaMKII発現細胞を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII発現細胞内のCaMKII蛋白量を測定し、該蛋白量を、被験物質を接触させない対照細胞内の上記蛋白量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの産生を阻害する被験物質を選択する工程。

[B36] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とCaMKII発現細胞を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII発現細胞内のCaMKII遺伝子発現量を測定し、該遺伝子発現量を、被験物質を接触させない対照細胞内の上記遺伝子発現量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの遺伝子発現を阻害する被験物質を選

択する工程。

[B37] 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤のスクリーニング方法：

(a) 被験物質と脱リン酸化CaMKII酵素を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素リン酸化レベルと比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性化を阻害する被験物質を選択する工程。

[0064] 本発明の好ましい態様として、以下のものも挙げることができる。

[B38] CaMKIIがCaMKII γ またはCaMKII δ である[B1]－[B5]のいずれか記載のスクリーニング方法。

[B39] CaMKIIがCaMKII γ である[B1]－[B5]のいずれか記載のスクリーニング方法。

[B40] CaMKIIがCaMKII γ またはCaMKII δ である[B6]－[B11]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B41] CaMKIIがCaMKII γ である[B6]－[B11]のいずれか記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B42] CaMKIIがCaMKII γ またはCaMKII δ である[B32]または[B33]記載の予防および／または治療方法。

[B43] CaMKIIがCaMKII γ である[B32]または[B33]記載の予防および／または治療方法。

[B44] CaMKIIがCaMKII γ またはCaMKII δ である[B34]記載の使用。

[B45] CaMKIIがCaMKII γ である[B34]記載の使用。

[0065] また、本発明の別の態様として、以下のものも挙げることができる。

[B46] [B1]－[B5]または[B35]－[B39]のいずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される物質(但し、以下の(1)および(2)を除く)を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤：

(1) [B12]記載の式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容され

る塩；

(2) 4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾールまたはその薬学上許容される塩。

[B47] CaMKII阻害作用を有する物質(但し、以下の(1)および(2)を除く)を有効成分として含む自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤：

(1) [B12]記載の式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩；

(2) 4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾールまたはその薬学上許容される塩。

[B48] 関節リウマチの予防剤および／または治療剤である[B47]記載の自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。

[B49] [B12]－[B24]のいずれか記載のCaMKII阻害剤を有効成分として含む、免疫の異常亢進改善剤。

[B50] [B12]－[B24]のいずれか記載のCaMKII阻害剤を有効成分として含む、関節リウマチ患者における慢性炎症の抑制剤、関節破壊の抑制剤、関節変形への進行抑制剤、または身体機能の改善剤。

[B51] 自己免疫疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、交換性脈炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、またはシェーグレン症候群である[B2]記載のスクリーニング方法。

[B52] 自己免疫疾患が、関節リウマチまたは多発性硬化症である[B2]記載のスクリーニング方法。

発明の効果

[0066] 本発明により、自己免疫疾患を予防および／または治療するための優れた薬剤、

特に併用薬を提供することができる。さらに本発明により、当該予防薬、治療薬、または併用薬の有効成分となる候補物質を探索し取得するために有用なスクリーニング方法を提供することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0067] 以下に、本発明をさらに詳細に説明する。

なお、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編)及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

[0068] アリール基としては、例えば炭素数6～14のアリール基が挙げられ、具体的には、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、フェナントリル、アントリル等が挙げられる。好ましくは、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチルが挙げられる。

[0069] 複素環基としては、例えば1～6個の窒素原子、酸素原子および／または硫黄原子を含有する1～3環の5～7員環の飽和複素環基または不飽和複素環基が挙げられる。

かかる飽和複素環基としては、具体的にはテトラヒドロフリル、ピロリジニル、ピラゾリジニル、イミダゾリジニル等の1～3環の5員環飽和複素環基、ピペリジル、モルホリニル、チアモルホリニル、ピペラジニル、ヘキサヒドロピリミジニル等の1～3環の6員環飽和複素環基、アゼパニル等の1～3環の7員環飽和複素環基等が挙げられる。

かかる不飽和複素環基としては、具体的にはフリル、チエニル、インドリル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、イソベンゾフラニル、ピロリル、ベンゾフリル、イミダゾリル、4, 5-ジヒドロ-1H-イミダゾリル、ピラゾリル、イソキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンズオキサゾリル、カルバゾリル等の1～3環の5員環不飽和複素環基、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、1, 4, 5, 6-テトラヒドロピリミジニル、3, 6-ジヒドロ-2H-[1, 3, 5]オキサジアジニル、ピリダジニル、トリアジニル、キノリル、イソキノリル、キナゾリニル、キノキサリニル、クロメニル、2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキサニル等の1～3環の6員環不飽和複素環基、4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-1H-[1, 3]ジアゼピニル等の1～3環の7員環不飽和複素環基等が挙げられる。

[0070] 置換アリール基および置換複素環基における置換基としては、例えば下記のa)からg)の各群に含まれる任意の基が挙げられ、これらが任意に1または複数個置換してよい。

a): ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、アジド基、メルカプト基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよい低級アルコキシアミノ基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシル基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいカルバモイルオキシ基、スルホ基、置換されてもよいスルファモイル基

b): $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-CO_2R^{10}$ 、 $-SO_3R^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ 、 $-C(=NOH)R^{10}$

[式中、 R^{10} は、フェニル基または単環の複素環基を表す。フェニル基または単環の複素環基は、例えばハロゲン原子、低級アルキル基、低級ハロアルキル基、シアノ基、ニトロ基、アジド基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、カルボキシ基、低級アルキルカルボニル基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、低級アルキルスルフィニル基および低級アルキルスルホニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

[0071] c): アルキル基、アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アルコキシ(チオカルボニル)基、アルキルチオ基、(アルキルチオ)チオカルボニル基、(アルキルチオ)カルボニル基、アルキルカルボニル基、アルキルチオイル基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルホニル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルチオイルオキシ基、アルキルスルホニルオキシ基

[この群の各基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキソ基、チオキソ基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいカルバモイルオキシ基、スルホ基、置換されてもよいスルファモイル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)、

低級シクロアルキル基(低級シクロアルキル基は、例えばハロゲン原子、低級アル

キル基、低級ハロアルキル基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基および低級ハロアルコキシ基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。)、

低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基および低級アルキルチオ基(低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基および低級アルキルチオ基は、例えばハロゲン原子、低級シクロアルキル基、単環の複素環基、フェニル基、シアノ基、ニトロ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、カルボキシ基、低級アルキルカルボニル基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、低級アルキルスルフィニル基および低級アルキルスルホニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。)等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

[0072] d): アルケニル基

[アルケニル基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ および $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

[0073] e): アルキニル基

[アルキニル基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ および $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

f): アルケニルオキシ基、アルケニルオキシカルボニル基、アルケニルカルボニル基、アルケニルカルボニルオキシ基、アルキニルオキシ基、アルキニルオキシカルボニル基

[この群の各基は、例えばハロゲン原子、オキシ基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルキルチオ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、低級アルコキシカルボニル基およびフェニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

- [0074] g): 低級シクロアルキル基、低級シクロアルキルオキシ基、低級シクロアルキルカルボニル基、低級シクロアルキルカルボニルオキシ基、低級シクロアルキルオキシカルボニル基、低級シクロアルケニル基、低級シクロアルケニルオキシ基、低級シクロアルケニルカルボニル基、低級シクロアルケニルカルボニルオキシ基、低級シクロアルケニルオキシカルボニル基

[この群の各基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、低級アルキル基、低級ハロアルキル基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルキルチオ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基および低級アルコキシカルボニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

- [0075] 置換アリール基および置換複素環基の置換基としては、具体的にはメチル、2-メチル-1-プロピル、ヘキシル、2-メチル-2-プロピル、2-プロピル、フェニル、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、1, 1, 2, 2, 2-ペンタフルオロエチル、6, 6, 6-トリフルオロヘキシル、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、メキシメチル、ヘキシルオキシメチル、シクロプロピルメキシメチル、アセトキシメチル、N, N-ジメチルカルバモイルオキシメチル、メタンスルホニルオキシメチル、N, N-ジメチルスルファモイルオキシメチル、2-(1-ピロリジニル)エトキシメチル、2-メトキシエチル、カルボキシメチル、メキシカルボニルメチル、カルバモイルメチル、アミジノメチル、メチルチオメチル、シアノメチル、アミノメチル、アミノエチル、N-アセチルアミノメチル、エテニル、2-プロペニル、エチニル、2-プロピニル、2-メトキシカルボニルエテニル、フルオロ、クロロ、ブロモ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、アミノ、N, N-ジメチルアミノ、メルカプト、スルホ、カルボキシ、アミジノ、メトキシ、シクロプロピルメトキシ、2-

—(1-ピロリジニル)エトキシ、メトキシカルボニルメトキシ、2-アセトキシエトキシ、2-ヒドロキシエトキシ、2-メトキシエトキシ、4, 4, 5, 5, 5-ペンタフルオロペントキシ、2-メタンスルフィニルエトキシ、フェノキシ、ベンジルオキシ、4-メトキシベンジルオキシ、メトキシカルボニルオキシ、1-ピロリジニル、3-ヒドロキシ-1-ピロリジニル、アセチルアミノ、N-アセチル-N-メチルアミノ、N-メタンスルホニルアミノ、N-メタンスルホニル-N-メチルアミノ、メトキシカルボニル、2-メチル-2-プロピルオキシカルボニル、2, 2, 2-トリフルオロエトキシカルボニル、カルバモイル、N, N-ジメチルカルバモイル、2-チアゾリジニル、2-オキサゾリジニル、5-テトラゾリル、メタンスルフィニル、スルファモイル、N, N-ジメチルスルファモイル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、トリフルオロアセチル、ホルミル、エチレンジオキシメチル、イミノ、メキシイミノ等が挙げられる。

- [0076] かかる置換基において好ましい置換基としては、具体的にはメチル、2-メチル-1-プロピル、ヘキシル、2-メチル-2-プロピル、2-プロピル、フェニル、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、メキシメチル、シクロプロピルメキシメチル、アセトキシメチル、N, N-ジメチルカルバモイルオキシメチル、メタンスルホニルオキシメチル、N, N-ジメチルスルファモイルオキシメチル、2-(1-ピロリジニル)エトキシメチル、2-メトキシエチル、カルボキシメチル、メトキシカルボニルメチル、カルバモイルメチル、アミノメチル、メチルチオメチル、シアノメチル、アミノメチル、アミノエチル、N-アセチルアミノメチル、フルオロ、クロロ、ブロモ、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、アミノ、N, N-ジメチルアミノ、メキシ、2-(1-ピロリジニル)エトキシ、メトキシカルボニルメトキシ、2-アセトキシエトキシ、2-ヒドロキシエトキシ、2-メトキシエトキシ、2-メタンスルフィニルエトキシ、1-ピロリジニル、3-ヒドロキシ-1-ピロリジニル、アセチルアミノ、N-アセチル-N-メチルアミノ、N-メタンスルホニルアミノ、N-メタンスルホニル-N-メチルアミノ、メトキシカルボニル、2-メチル-2-プロピルオキシカルボニル、2, 2, 2-トリフルオロエトキシカルボニル、カルバモイル、N, N-ジメチルカルバモイル、メタンスルフィニル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、トリフルオロアセチル等が挙げられる。

アリール基および複素環基における好ましい置換基数は、1、2または3が挙げられ

る。また、アリール基および複素環基は、無置換であっても好ましい。

[0077] アルキル基としては、例えば直鎖または分枝した炭素数1～10のアルキル基が挙げられ、具体的には、メチル、エチル、プロピル、1-メチルエチル、ブチル、1-メチルプロピル、2-メチル-1-プロピル、1, 1-ジメチルエチル、ペンチル、1, 1-ジメチルプロピル、2, 2-ジメチルプロピル、1-メチルブチル、3-メチルブチル、ヘキシル、2-メチルペンチル、3, 3-ジメチルブチル、ヘプチル、1-エチルペンチル、5-メチルヘキシル、オクチル、1, 5-ジメチルヘキシル、2-エチルヘキシル、ノニル、デシル等が挙げられる。低級アルキル基としては、炭素数1～6のアルキル基が挙げられる。

[0078] 置換アルキル基における置換基としては、例えば下記のa)からd)の各群に含まれる任意の基が挙げられ、これらが任意に1または複数個置換してよい。

a): ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよい低級アルコキシアミノ基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいカルバモイルオキシ基、スルホ基、置換されてもよいスルファモイル基

b): 低級シクロアルキル基、低級シクロアルキルオキシ基、低級シクロアルキルカルボニル基、低級シクロアルキルカルボニルオキシ基、低級シクロアルキルオキシカルボニル基、低級シクロアルケニル基、低級シクロアルケニルオキシ基、低級シクロアルケニルカルボニル基、低級シクロアルケニルカルボニルオキシ基、低級シクロアルケニルオキシカルボニル基

[この群の各基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、低級アルキル基、低級ハロアルキル基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルキルチオ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基および低級アルコキシカルボニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。
]

[0079] c): アルコキシ基、アルコキシカルボニル基、アルコキシ(チオカルボニル)基、アル

キルチオ基、(アルキルチオ)チオカルボニル基、(アルキルチオ)カルボニル基、アルキルカルボニル基、アルキルチオイール基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルホニル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルチオイールオキシ基、アルキルスルホニルオキシ基

[この群の各基は、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいカルバモイルオキシ基、スルホ基、置換されてもよいスルファモイル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)、

低級シクロアルキル基(低級シクロアルキル基は、例えばハロゲン原子、低級アルキル基、低級ハロアルキル基、置換されてもよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基および低級ハロアルコキシ基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。)、

低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基および低級アルキルチオ基(低級アルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基および低級アルキルチオ基は、例えばハロゲン原子、低級シクロアルキル基、単環の複素環基、フェニル基、シアノ基、ニトロ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、カルボキシ基、低級アルキルカルボニル基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、低級アルキルスルフィニル基および低級アルキルスルホニル基等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。)等の群から任意に選ばれる1または複数の基で置換されてもよい。]

d): $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)

[0080] 置換アルキル基としては、具体的にはトリフルオロメチル、2-ニトロエチル、2-シアノプロピル、4-メルカプトブチル、3-オキソブチル、2-ピペリジノエチル、2-ヒドロキシエチル、3-メトキシプロピル、エトキシカルボニルメチル、シクロプロピルメチル、シクロヘキシルメチル、6-シクロヘキシルヘキシル、3-シクロヘキセニルブチル、2-フェニルブチル、ベンジル、2-ナフチルメチル、フェネチル、2-ピリジルメ

チル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、2-キノリルメチル、3-キノリルメチル、3-チエニルプロピル、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、アミノメチル、アミノエチル、カルボキシメチル、エトキシカルボニルメチル、カルバモイルメチル等が挙げられる。

なお、低級ハロアルキル基とは、1～5個のハロゲン原子が置換した低級アルキル基をいう。

[0081] アルコキシ基とは、アルキル基が結合したオキシ基をいう。具体的には、メキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、1, 1-ジメチルエトキシ、ペントキシ、ヘキソキシ等が挙げられる。置換アルコキシ基の置換基は、置換アルキル基の置換基と同じものが挙げられる。置換アルコキシ基としては、具体的には、シクロプロピルメキシ、トリフルオロメキシ、2-ピロリジノエトキシ、ベンジルオキシ、2-ピリジルメトキシ等が挙げられる。

なお、ハロアルコキシ基とは、1～5個のハロゲン原子で置換されたアルコキシ基をいう。

アルコキシカルボニル基とは、アルコキシ基が結合したカルボニル基をいう。具体的には、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、2-プロポキシカルボニル等が挙げられる。置換アルコキシカルボニル基における置換基としては、置換アルキル基における置換基と同じものが挙げられる。

[0082] アルケニル基としては、1～3個の2重結合を有する炭素数2～10の直鎖または分岐鎖のアルケニル基が挙げられる。具体的には、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチルエテニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、2-メチル-2-プロペニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、4-ペンテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、1-ヘプテニル、2-ヘプテニル、1-オクテニル、2-オクテニル、1, 3-オクタジエニル、2-ノネニル、1, 3-ノナジエニル、2-デセニル等が挙げられる。好ましいアルケニル基としては、例えばエテニル、1-プロペニル、1-ブテニル基が挙げられる。低級アルケニル基としては、炭素数2～6のアルケニル基が挙げられる。

置換アルケニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メ

ルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、低級アルコキシカルボニル基、低級アルキルチオ基、アシル基、アシルオキシ基、カルボキシ基、置換されてよいカルバモイル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)等が挙げられる。

また、アルケニルオキシ基とは、アルケニル基が結合したオキシ基をいう。

[0083] アルキニル基としては、1～3個の3重結合を有する炭素数2～10の直鎖または分岐鎖のアルキニル基が挙げられる。具体的にはエチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、4-ペンチニル、1-オクチニル、6-メチル-1-ヘプチニル、2-デシニル等が挙げられる。好ましいアルキニル基としては、例えば1-プロピニル、1-ブチニル基等が挙げられる。低級アルキニル基としては、炭素数2～6のアルキニル基が挙げられる。

置換アルキニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、置換されてよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルキルチオ基、カルボキシ基、置換されてよいカルバモイル基、低級アルコキシカルボニル基、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-OCH_2R^{10}$ 、 $-SCH_2R^{10}$ (式中、 R^{10} は前記と同義である。)等が挙げられる。

また、アルキニルオキシ基とは、アルキニル基が結合したオキシ基をいう。

[0084] シクロアルキル基としては、例えば炭素数3～10のシクロアルキル基が挙げられ、具体的には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル等が挙げられる。低級シクロアルキル基としては、炭素数3～6のシクロアルキル基が挙げられる。また、シクロアルキルオキシ基とは、シクロアルキル基が結合したオキシ基をいう。

シクロアルケニル基としては、例えば炭素数3～10のものが挙げられ、具体的にはシクロヘキセニル等が挙げられる。低級シクロアルケニル基としては、炭素数3～6のシクロアルケニル基が挙げられる。また、シクロアルケニルオキシ基とは、シクロアルケ

ニル基が結合したオキシ基をいう。

置換シクロアルキル基および置換シクロアルケニル基の置換基としては、例えばハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、オキシ基、チオキシ基、低級アルキル基、低級ハロアルキル基、置換されてよいアミノ基、水酸基、低級アルコキシ基、低級ハロアルコキシ基、アシル基、アシルオキシ基、低級アルキルチオ基、カルボキシ基、置換されてよいカルバモイル基、低級アルコキシカルボニル基等が挙げられる。

[0085] アシル基としては、例えば、式 $-Z-R^{11}$ （式中、Zは $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-SO-$ または $-SO_2-$ を表し、 R^{11} は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアリール基または置換されてもよい複素環基を表す。）で表されるアシル基等が挙げられる。アシル基としては、具体的にはホルミル、アセチル、プロパノイル、2-プロパノイル、ピバロイル、バレリル、ピバロイル、トリフルオロアセチル、ベンゾイル、ナフトイル、ニコチノイル、メタンスルホニル、トリフルオロメタンスルホニル、p-トルエンスルホニル等が挙げられる。好ましいアシル基としては、アセチル基等が挙げられる。また、アシルオキシ基とは、アシル基が結合したオキシ基をいう。

[0086] 置換カルバモイル基における置換基としては、例えばアリール基もしくは複素環基で置換されてもよいアルキル基、およびアリール基、複素環基等が挙げられ、同一または異なった複数のものが独立して置換してもよい。置換カルバモイル基としては、具体的にはエチルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、フェニルカルバモイル、2-ピリジルカルバモイル、ベンジルカルバモイル、(3-ピリジルメチル)カルバモイル等が挙げられる。

置換スルファモイル基における置換基としては、例えばアルキル基、アリール基、複素環基等が挙げられ、同一または異なった複数のものが独立して置換してもよい。置換スルファモイル基としては、具体的にはエチルスルファモイル、ジメチルスルファモイル、フェニルスルファモイル、2-ピリジルスルファモイル等が挙げられる。

置換アミノ基における置換基としては、例えばアシル基、アルキル基等が挙げられ、同一または異なった複数のものが独立して置換してもよい。具体的な置換アミノ基としては、アセトアミド、プロピオンアミド、ブチルアミド、2-ブチルアミド、メチルアミノ、2-メチル-1-プロピルアミノ、ジエチルアミノ等が挙げられる。

置換ヒドロキシルアミノ基における置換基は、窒素原子、酸素原子のいずれの原子に置換してもよく、その置換基としては、置換アミノ基における置換基と同じものが挙げられる。

[0087] ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等が挙げられる。

[0088] アルキレン基としては、例えば炭素数1~10の直鎖または分枝したアルキレン基が挙げられる。具体的には、メチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、ヘプタメチレン、オクタメチレン、ノナメチレン、デカメチレン、メチルメチレン、エチルメチレン、ジメチルメチレン、1, 1-ジメチルエチレン、1, 2-ジメチルエチレン、1-メチルトリメチレン、2-メチルトリメチレン、1, 1-ジメチルトリメチレン、1, 2-ジメチルトリメチレン、1, 3-ジメチルトリメチレン、2, 2-ジメチルトリメチレン、1-エチルトリメチレン、2-エチルトリメチレン、1, 1-ジエチルトリメチレン、1, 2-ジエチルトリメチレン、1, 3-ジエチルトリメチレン、2, 2-ジエチルトリメチレン等が挙げられる。

低級アルキレン基としては、例えば炭素数1~6の直鎖または分枝したアルキレン基が挙げられる。

[0089] NH基の保護基としては、通常用いられる各種の保護基が可能であるが、好適には例えば、メキシカルボニル、エトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等のカルバメート型の保護基、アセチル、ベンゾイル等のアミド型の保護基、ベンジル、ニトロ、p-トルエンスルホニル、メタンスルホニル等が挙げられる。

[0090] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって窒素原子と共に形成される置換されてもよい複素環における複素環としては、例えば1~6個の窒素原子、酸素原子および／または硫黄原子を含有する(窒素原子を少なくとも1つ含む)5~7員環の単環もしくは2環の飽和複素環または不飽和複素環が挙げられる。具体的には、ピロリジン、イミダゾリジン、4, 5-ジヒドロ-1H-イミダゾール、ピペリジン、ピペリジン-4-オン、ピペラジン、モルホリン、チアモルホリン、1, 4, 5, 6-テトラヒドロ-ピリミジン、ヘキサヒドロ-ピリミジン、3, 6-ジヒドロ-2H-[1, 3, 5]オキサジ

アジン等が挙げられる。置換複素環における置換基としては、置換複素環基における置換基と同じものが挙げられる。

R^8 および R^9 が結合して一緒になって炭素原子と共に形成される置換されてもよい炭化水素環としては、例えば置換されてもよい炭素数3～8のシクロアルカン環または置換されてもよい炭素数3～8のシクロアルケン環等が挙げられる。かかるシクロアルカン環またはシクロアルケン環としては、具体的には、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタン、シクロプロペン、シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロヘプテン等が挙げられる。置換炭化水素環における置換基としては、置換シクロアルキル基における置換基と同じものが挙げられる。

[0091] 式1のイソキサゾール誘導体においてイソキサゾール環に極性を有する官能基を導入した化合物は、特に、体内動態が改善され、副作用も少なく、長期間投与が可能である。

[0092] 式1のイソキサゾール誘導体の薬学上許容される塩としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩等の有機塩基塩等が挙げられる。

[0093] 本発明におけるCaMKII阻害剤には、本明細書中で例示した具体的化合物(例えば、式1のイソキサゾール誘導体、化合物(I)、化合物(Ib)、化合物(Ic)、化合物(II)など)のあらゆる立体異性体、光学活性体、互変異性体、プロドラッグ、誘導体等を包含している。また、本発明はそれらの水和物等の溶媒和物およびあらゆる態様の結晶形のものも包含している。

[0094] 式1のイソキサゾール誘導体は、例えば、特許文献3に記載の方法によって製造することができる。

[0095] 以下、本発明の自己免疫疾患予防剤および／または治療剤、および本発明のCaMKII阻害剤のスクリーニング方法について詳細に説明する。

[0096] I. 自己免疫疾患予防剤および／または治療剤

一般に「自己免疫疾患」は、自己の組織を構成する成分に反応する抗体あるいはリンパ球が、体内で持続的に産生されることによって組織障害をきたす疾患であり、大別すると下記に掲げる臓器特異的自己免疫疾患と臓器非特異的自己免疫疾患(全身性自己免疫疾患)の2つに分類することができる。

[0097] (1) 臓器特異的自己免疫疾患:橋本病、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性血液性疾患(例えば、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症等)、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、間質性肺腺維症およびシェーグレン症候群。

[0098] (2)臓器非特異的自己免疫疾患(全身性自己免疫疾患):関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症および混合結合組織病。

[0099] 本発明はこれらの「自己免疫疾患」を任意に対象とするものである。好ましくは、関節リウマチおよび多発性硬化症を例示することができる。さらに好ましくは、関節リウマチを例示することができる。本発明の予防剤および／または治療剤、増強剤、組成物、商業パッケージ、キット、使用、または方法はこれらの自己免疫疾患に罹患した哺乳動物を任意に対象とすることができ、より好ましくは、自己免疫疾患に罹患した患者を対象とすることができる。

[0100] また本発明の「自己免疫疾患予防剤および／または治療剤」とは、上記各種の自己免疫疾患に対して、以下の(1)および(2)に示した作用から選ばれる1または複数の作用を有するものである。

(1) 予防作用:その発症を抑制する作用(発症抑制作用)、およびその発症を遅延させる作用(発症遅延作用)

(2)治療作用:発症後その症状を軽減若しくは改善する作用(症状緩和作用、症状改善作用)、病態の進行を抑制する作用(進行抑制作用)、病態の進展を抑制する作用(進展抑制作用)、または疾患を治癒する作用(治癒作用)

その意味で、本発明の「自己免疫疾患予防剤および／または治療剤」には、自己免疫疾患予防剤(自己免疫疾患予防剤には、自己免疫疾患発症抑制剤および自己免疫疾患発症遅延剤などが含まれる)、自己免疫疾患治療剤(自己免疫疾患治療剤には、自己免疫疾患症状緩和剤、自己免疫疾患症状改善剤、自己免疫疾患進行抑制剤および自己免疫疾患進展抑制剤などが含まれる)、および、自己免疫疾患の予防作用と治療作用とを併せ持つ剤が含まれる。予防作用は予防効果と、治療作用は治療効果と言い換えることもできる。

[0101] 本発明において「CaMKII阻害作用」とは、その作用機序の別を問うことなく、CaMKIIの機能発現を阻害する作用を広く意味するものである。なお、ここで「CaMKIIの機能発現を阻害する作用」には、CaMKIIの蛋白質合成(CaMKIIの遺伝子発現を含む)や分泌を阻害する作用、発現したCaMKIIの活性化(リン酸化)を阻害する作用、活性化したCaMKIIを不活性化(脱リン酸化)する作用、及び活性化したCaMKII酵素活性を阻害する作用が包含される。本明細書では、このようなCaMKIIの機能発現の阻害を単にCaMKII阻害作用またはCaMKIIの阻害ということもある。

[0102] なお、本発明の「CaMKII阻害剤(CaMKII阻害作用を有する物質)」は、上記に掲げる阻害作用のいずれか少なくとも1つの作用を有する物質であればよく、その形態や性状の別を何ら問うものではない。また、本発明の「CaMKII阻害剤」は、少なくともヒトCaMKIIに対して阻害作用を有するものであればよく、ヒト以外の哺乳類やその他の生物種に由来するCaMKIIに対する阻害作用の有無は、特に制限されない。

[0103] 本発明のCaMKII阻害剤には、蛋白質、ペプチド、及び低分子化合物等も含まれる。CaMKII阻害作用を有する例えば低分子化合物は、低分子化合物ライブラリー(例えば、CamBridge Research Laboratories社等の低分子化合物ライブラリー)等に対して後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって、取得することができる。

[0104] 本発明のCaMKII阻害剤が抗CaMKII抗体である場合、当該抗体は、CaMKIIを特異

的に認識することができるものであればいかなる抗体でもよく、このような抗体はCaMKIIタンパクを用いて、公知の方法で調製することができる。本発明の抗CaMKII抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、およびFabフラグメント、Fab発現ライブラリーなどによって生成されるフラグメントのような抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。

- [0105] 本発明のCaMKII阻害剤として、CaMKII遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを例示することもできる。CaMKII遺伝子としては、 α 、 β 、 β' 、 γ 、 δ などいずれのアイソフォームでもよいが、好ましくはCaMKII γ 遺伝子またはCaMKII δ 遺伝子を挙げることができ、さらに好ましくはCaMKII γ 遺伝子を挙げることができる。例えば、GenBankに以下のAccession No.で登録されている遺伝子配列が利用できる。

ヒトCaMKII α	Accession No. AF145710
ヒトCaMKII β	Accession No. NM_172084
ヒトCaMKII γ	Accession No. L07044
ヒトCaMKII δ	Accession No. AF071569

また、GenBankには、CaMKII遺伝子の各アイソフォームにおける種々の変異体の遺伝子配列も登録されており、これらの配列情報を利用することもできる。

- [0106] ここで相補的なポリヌクレオチド(相補鎖、逆鎖)とは、CaMKII遺伝子の塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を有するその部分配列(ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう)に対して、A : TおよびG : Cといった塩基対関係に基づき、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジентな条件でハイブリダイスすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジентな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に示されるように、複合体或いはプローブと結合する核酸の融解温度(

T_m)に基づいて決定することができる。例えば、ハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

- [0107] また、正鎖側のポリヌクレオチドには、前記CaMKII遺伝子の塩基配列、またはその部分配列を有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

上記正鎖のポリヌクレオチドおよび相補鎖(逆鎖)のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよい。

- [0108] また、本発明のCaMKII阻害剤としては、CaMKII遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドの一態様として、CaMKII遺伝子に対するsiRNA(small interfering RNA)を挙げることできる。siRNAとは、RNAi(RNA干渉; RNA interference)で使用する21～23塩基の二本鎖RNAの総称である。RNAiとは、細胞に導入された二本鎖RNAが、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現(タンパク質合成)を抑制する現象のことであり、この方法は、標的遺伝子(mRNA)を破壊することで発現を抑制する為、遺伝子の機能解析に有効な方法として近年注目されている。

- [0109] CaMKII遺伝子に対するsiRNAは、CaMKII遺伝子(α 、 β 、 β' 、 γ 、 δ などいずれのアイソフォームでもよい)に関する前記の塩基配列情報(GenBank等)を元に、公知の方法で種々設計し、調製することができる。例えば、siRNAの設計方法として、Chalk et al., "Improved and automated prediction of effective siRNA", Biochem Biophys Res Commun. 2004 ;319(1):264-74、あるいは Reynolds et al., "Rational siRNA design

n for RNA interference”, Nature Biotechnology 2004 ;22, 326–330 に記載の方法を用いることができる。また、インターネット上で利用可能なsiRNA 設計プログラム(例えば、Cold Spring Harbor Laboratory, “siRNA sequence finder”, <http://www.sinc.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html> など)を利用して適切なsiRNAを設計することも可能である。このようにして設計し、調製したsiRNAは、例えば実施例16に例示したような試験方法により、実際にCaMKII遺伝子発現を抑制する作用を有するか否かを確認することができる。

[0110] 以上説明するCaMKII阻害剤は、自己免疫疾患予防剤および／または治療剤として、特にDMARDsと併用される自己免疫疾患予防剤および／または治療剤として有用である。またCaMKII阻害剤は、上記に具体的に掲げる物質に特に限定されることなく、下記に記載する本発明のスクリーニング方法によって取得することも可能である。

[0111] 従って、本発明が対象とする自己免疫疾患予防剤および／または治療剤、特にDMARDsと併用される自己免疫疾患予防剤および／または治療剤には、

(1) 上記のCaMKII阻害剤を有効量含有する製剤;並びに

(2) 下記に記載するスクリーニング方法によって取得されるCaMKII阻害剤を有効量含有する製剤;

がいずれも包含される。なお、ここでCaMKII阻害剤の有効量は、それを含有する自己免疫疾患予防剤および／または治療剤が結果としてCaMKII阻害効果を発揮するようなCaMKII阻害作用物質の配合量であればよく、特に制限されるものではない。また自己免疫疾患予防剤および／または治療剤は、CaMKII阻害作用物質以外に薬学的に許容される担体や各種の添加剤を含有していてもよい。

[0112] かかる担体や添加剤の種類、自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の形態、並びに自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の用法(投与形態、投与方法、投与量)については、後述の(III)の欄で詳細に説明する。

[0113] II. 自己免疫疾患予防剤および／または治療剤(特に、DMARDsとの併用で有効な自己免疫疾患予防剤および／または治療剤)の有効成分のスクリーニング方法

本発明者らは、後述する実施例に示すように、CaMKIIの機能発現を阻害することによって自己免疫疾患の発症を抑制し、かつ／または病態を改善することができる

いう新たな知見を取得した。このことから、CaMKII阻害剤は自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の有効成分として有用と考えられる。さらに本発明者らは、実施例に示すように、CaMKII阻害剤とDMARDsとを組み合わせ投与することにより、自己免疫疾患に対して、それぞれ単独の効果からは予測することができない顕著に優れた予防効果および／または治療効果を有するという新たな知見を取得した。このことから、CaMKII阻害剤は、DMARDsと併用される自己免疫疾患予防および／または治療のための併用剤として、また、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強剤として有用と考えられる。

本発明のスクリーニング方法は、かかる知見に基づいて開発されたものであり、被験物質の中からCaMKII阻害剤を探索することによって、(i) 単独使用でも有効な自己免疫疾患予防剤および／または治療剤、または(ii) DMARDsと併用される自己免疫疾患予防および／または治療のための併用剤、の有効成分を取得しようとするものである。

[0114] 本発明のスクリーニング方法が対象とする「CaMKII阻害剤」は、結果としてCaMKIIの機能発現(機能発揮、作用)を阻害し得る物質であればよく、その作用機序を特に限定するものではない。CaMKII阻害作用として、具体的には、1) 活性化したCaMKII酵素活性を阻害する作用、2) CaMKIIの活性化を阻害する作用、3) 活性化したCaMKIIを不活性化(脱リン酸化)する作用、及び4) CaMKIIの発現又は分泌を阻害する作用を挙げることができる。CaMKII阻害剤は、かかるCaMKII阻害作用の少なくとも1つを有するものであればよい。

[0115] CaMKII阻害剤となり得る候補物質としては、核酸、ペプチド、蛋白質、有機化合物(低分子化合物を含む)、無機化合物などを挙げることができる。本発明のスクリーニング方法は、これらの候補物質となりえる物質または該物質を含む試料(これらを総称して「被験物質」という)を対象として実施することができる。さらに、候補物質を含む試料(被験物質)として、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、微生物培養上清、及び菌体成分などを使用することもできる。

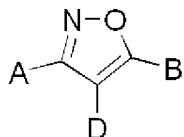
[0116] 本発明の「CaMKII阻害剤」は、薬学的に許容される限りいかなる構造のものでも良く、以下に限定されないが、その好ましい具体例として例えば以下のものを挙げるこ

ができる。

・式1のイソキサゾール誘導体

式1:

[0117] [化13]



[式中、A、B、およびDは前記の項[6]と同意義を表す]

・式1のイソキサゾール誘導体の中で、より好ましいものとしては、前記の項[7]、[8]、[9]、[10]、[11]、[12]、[13]、[14]、[15]および[16]に記載した化合物を挙げることができる。

・3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-{[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾール(化合物(I))

・N'-{3-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)-エチル]-イソキサゾール-5-イル}-N,N-ジメチル-グアニジン塩酸塩(化合物(Ib))

・N-エチル-N'-{3-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)-エチル]-イソキサゾール-5-イル}-グアニジン塩酸塩(化合物(Ic))

・4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾール(化合物(I I))

・KN-93: N-(2-[N-[4-クロロシナミル]-N-メチルアミノメチル]フェニル)-N-(2-ヒドロキシエチル)-4-メトキシベンゼンスルホンアミド

・1-[1-オキソ-11-(5,6-ジヒドロ-3-イミノベンゾ[h]シノリン-2(3H)-イル)ウンデシル]-4-(2-ピリミジニル)-ピペラジン

・配列 Lys-Lys-X-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Phe-Asp-Ala-Tyr (式中、XはAlaまたはLysである。)で示されるアミノ酸配列を有するペプチド

・配列 Lys-Lys-Ala-Leu-His-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Cys-Leuで示されるアミノ酸配列を有するペプチド

[0118] 本発明のスクリーニング方法は、かかる被験物質の中から上記に掲げるCaMKII阻

害作用を指標として上記CaMKII阻害作用の少なくとも1つを有する物質を探索することによって実施される。斯くして選別取得される被験物質は、自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の有効成分として有用であるとともに、DMARDsと併用される自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の有効成分として有用である。

[0119] 本発明のスクリーニング方法の具体的態様としては、限定されないが、例えば以下に示す方法をあげることができる。

方法1

下記の工程(a)、(b)および(c)を含む、CaMKII阻害剤のスクリーニング方法：

- (a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する工程。

方法2

下記の工程(a)、(b)および(c)を含む、CaMKIIの産生阻害作用を有する物質のスクリーニング方法：

- (a) 被験物質とCaMKII発現細胞(Jurkat細胞、THP-1細胞など)を接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させたCaMKII発現細胞内のCaMKII蛋白量を測定し(ウェスタンブロッティング法など)、該蛋白量を、被験物質を接触させない対照細胞内の上記蛋白量と比較する工程、
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの産生を阻害する被験物質を選択する工程。

方法3

下記の工程(a)、(b)および(c)を含む、CaMKIIの遺伝子発現阻害作用を有する物質のスクリーニング方法：

- (a) 被験物質とCaMKII発現細胞(Jurkat細胞、THP-1細胞など)を接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させたCaMKII発現細胞内のCaMKII遺伝子発現量を測定し(ノ

ーザンブロットイング、RT-PCR法など)、該遺伝子発現量を、被験物質を接触させない対照細胞内の上記遺伝子発現量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの遺伝子発現を阻害する被験物質を選択する工程。

方法4

下記の工程(a)、(b)および(c)を含む、CaMKIIの活性化阻害作用を有する物質のスクリーニング方法:

- (a) 被験物質と脱リン酸化CaMKII酵素を接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素リン酸化レベルと比較する工程、
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性化を阻害する被験物質を選択する工程。

[0120] 上記の方法1～方法4において、スクリーニングの際の被験物質濃度、および「CaMKII阻害作用を有する」と判定するための判定基準は、適宜設定することができる。例えば被験物質濃度としては、これに限定されないが、100 μ M、10 μ M、1 μ M、0.1 μ M、0.01 μ M、0.001 μ M、およびこれらの中間的な濃度(5 μ M、3 μ M、2 μ M、0.5 μ M、0.3 μ M、0.2 μ Mなど)を挙げることができる。「CaMKII阻害作用を有する」と判定するための判定基準としては、これに限定されないが、対照と比較してのCaMKIIの阻害率が、例えば以下のものを挙げることができる。

- (1) 被験物質濃度10 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が30%以上;
- (2) 被験物質濃度10 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が40%以上;
- (3) 被験物質濃度10 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が60%以上;
- (4) 被験物質濃度1 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が40%以上;
- (5) 被験物質濃度1 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が60%以上;
- (6) 被験物質濃度0.1 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が40%以上; および
- (7) 被験物質濃度0.1 μ MにおいてCaMKIIの阻害率が60%以上。

好ましい判定基準としては、上記基準の中で、例えば(1)、(2)、(3)、(4)または(5)が挙げられる。より好ましくは、(1)、(3)または(4)が挙げられる。さらに好ましくは

、(3)または(4)が挙げられる。

[0121] また、上記のスクリーニング方法において使用するCaMKIIは、 α 、 β 、 β' 、 γ 、 δ などいずれのアイソフォームでもよいが、好ましくはCaMKII γ またはCaMKII δ を挙げることができる、さらに好ましくはCaMKII γ を挙げることができる。

[0122] 本発明における、CaMKII阻害剤のスクリーニング方法は、上記態様には限定されず、当業者の技術常識に基づいて適宜設計することが可能である。

[0123] 以上説明した、CaMKII阻害剤のスクリーニング方法によって被験物質の中から選別された候補物質は、更に、例えばヒトの各種の自己免疫疾患を模倣した病態モデル動物を用いた薬効試験(特にDMARDsとの併用薬効試験)や安全性試験に供することにより、より一層実用的な自己免疫疾患予防剤および／または治療剤(特に、DMARDsとの併用に適した自己免疫疾患予防剤および／または治療剤)の有効成分として取得することができる。

[0124] より具体的には、本発明のスクリーニング方法によって選別された候補物質について、自己免疫疾患の治療剤として有用かどうか、特にリウマチ等の慢性炎症に有効かどうかは、関節リウマチの病態モデル動物(例えば、コラーゲン誘導性関節炎 [Trentham DE, Townes AS, Kang AH: Autoimmunity to type II collagens: An experimental model of arthritis J Exp Med 146:857-868, 1977]、抗原誘導性関節炎、またはアジュバント誘導性関節炎 [Pearson CM: Development of arthritis, peri-arthritis and periotitis in rats given adjuvant. Proc Soc Exptl Biol Med 91:95-101, 1956]等のいずれかのマウスもしくはラット)を用いた薬効試験を行うことにより評価できる。

[0125] 特に、ラットのアジュバント関節炎モデルを用いることにより、当該候補物質について関節リウマチに対する抑制効果(予防効果、治療効果)を詳細に評価することができる。ラットのアジュバント関節炎は、発症機序にTリンパ球が関与し、関節の軟骨・骨変化および線維化を主体に進行する実験的関節炎であり、慢性炎症の基礎的研究および治療薬の薬効薬理研究における疾患モデルとして広く用いられている。アジュバント関節炎の病態は通常、(1)注射足のみが腫脹する非特異的1次炎症期(ピーク: 4～5日後)、(2)所属リンパ節内に活性化リンパ球が増加する誘導期(期間: 5～9日)、(3)多発性関節炎が発症するアジュバント関節炎の増悪期(ピーク: 15～17日

)、および(4)関節の変形・破壊を残し炎症が鎮静化する自然治癒期(25日以降の期間)のように進行する。注射足側はアジュバント感作による非特異的な1次炎症も病態の進行に関与しているのに対し、非注射足側はTリンパ球の関与により発症し病態が進行していくことから、より関節リウマチに近い現象がみられると考えられる。また、薬物作用は、接種日から投与する予防効果と、関節炎が発症した後に投与を開始する治療効果が検討されている。薬効評価の指標としては、(1)左右後肢それぞれの容積、(2)薬物投与の前後に左右それぞれの後肢容積を測定し、投与前後の容積差を算出することにより得られる浮腫量の変化、(3)軟X線による骨の形態学的評価、および(4)組織切片による病理学的評価などが一般的に用いられている。

[0126] また、選別された候補物質について、多発性硬化症の病態モデル動物(例えばEA E発症誘導マウス)を用いた薬効試験を行うことにより、当該候補物質について多発性硬化症に対する抑制効果(予防効果、治療効果)を評価することができる。

[0127] 以上述べた、自己免疫疾患(関節リウマチ、多発性硬化症など)の病態モデル動物を用いた薬効試験において、DMARDsと併用投与する試験を行うことにより、当該候補物質についてDMARDsと併用した場合の自己免疫疾患予防および／または治療効果を評価することができる。

[0128] このようにして選別、取得された物質は、さらにその構造解析結果に基づいて、化学的合成、生物学的合成(発酵)または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができる。

[0129] 以上のような本発明のスクリーニング方法を用いて選択されるCaMKII阻害剤は、前述の如き自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の有効成分として、特にDMARDsとの併用剤として有用である。ここで自己免疫疾患としては、具体的には本明細書の第I章に記載する各種の疾病を任意に挙げることができるが、特に本発明が対象とするCaMKII阻害剤は、関節リウマチ、多発性硬化症、及び全身性エリテマトーデス、好ましくは関節リウマチ、及び多発性硬化症、さらに好ましくは関節リウマチに対して有効に使用することができる。

[0130] 本発明は、上記のスクリーニング方法により得られるCaMKII阻害剤を含有する、DMARDsと併用される自己免疫疾患予防剤および／または治療剤を提供するもので

ある。また、本発明には、併用剤、増強剤、キット、使用、方法等、他の実施態様も含まれるが、他の態様については後述の(III)の欄で詳細に説明する。

[0131] III. 自己免疫疾患予防剤および／または治療剤の形態および用法について

以下、本発明における自己免疫疾患予防および／または治療のための併用剤の製造方法、投与形態、投与方法及び投与量等につき説明する。

[0132] 本発明における自己免疫疾患予防および／または治療のための併用剤は、少なくとも一種のCaMKII阻害剤と、少なくとも一種の疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)とを組み合わせる製剤であり、両者をそれぞれ単独で、又は、適宜薬理学的に許容され得る担体もしくは賦形剤と混合した後に組み合わせる製剤であり、経口的または非経口的に用いることができる。併用剤の形態としては、有効成分であるCaMKII阻害剤とDMARDsとを、例えば(1)公知の製剤学的製造法に準じ、所望により適宜製剤学的に許容され得る賦形剤等と共に単一の製剤に製造する、(2)それぞれを所望により製剤学的に許容され得る賦形剤等を用いて各製剤とし同時又は時差を設けて組み合わせる使用(併用)する、又は(3)それぞれを常法により適宜賦形剤と共にそれぞれ製剤化したものをセット(キット剤等)等としてもよい。本発明の製剤は、それぞれの化合物が別々に製剤化されている場合、本発明の目的が達成される限り、製剤を別々に、同時に又は時間差をおいて、同一の投与対象に用いてもよく、各製剤の投与経路および投与回数は異なってもよい。本発明の自己免疫疾患予防および／または治療のための併用剤においては、有効成分のすべてが一製剤中に含まれていてもよく、また有効成分のそれぞれ又は一部が別々に製剤化されていてもよい。

[0133] すなわち本発明には、自己免疫疾患の予防および／または治療のための併用の態様であって、限定されないが、以下に示すような態様が含まれる。

- (1) CaMKII阻害剤およびDMARDsを含有する予防剤および／または治療剤；
- (2) DMARDsと併用するための、CaMKII阻害剤を含有する予防剤および／または治療剤；
- (3) CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、DMARDsによる予防および／または治療効果の増強剤；

(4) CaMKII阻害剤を含む第1の組成物、および疾患修飾性抗リウマチ薬を含む第2の組成物を含むキット;

(5) CaMKII阻害剤と併用するための、DMARDsを含有する予防剤および/または治療剤; および

(6) DMARDsを有効成分として含有する、CaMKII阻害剤による予防および/または治療効果の増強剤;

これらの態様において、予防剤は「予防用医薬組成物」と、治療剤は「治療用医薬組成物」と、増強剤は「増強用医薬組成物」と、それぞれ言い換えることも可能である。

[0134] また、上記種々の予防剤および/または治療剤、増強剤、キット等を製造するためのCaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の一方、または両方を組み合わせたの使用も本発明の態様として挙げられる。

さらに、CaMKII阻害剤を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して投与することを特徴とする自己免疫疾患の予防および/または治療方法も本発明の態様として挙げられる。また、CaMKII阻害剤を投与することを含む、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および/または治療効果の増強方法も本発明の態様として挙げられる。

[0135] CaMKII阻害剤が低分子化合物、ペプチドまたは抗体などの蛋白質である場合は、これらの物質について通常用いられる一般的な医薬組成物(医薬製剤)の形態に調製することができ、その形態に応じて経口または非経口的に投与することができる。一般的には以下のような投与形態、及び投与方法が挙げられる。

[0136] 投与形態としては、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤及びカプセル剤等の固形製剤や、溶液、懸濁液、乳液、シロップ及びエリキシルなどの液剤などの形態を挙げることができる。これらの各種形態は、投与経路に応じて経口投与剤の他、経鼻剤、経皮剤、直腸投与剤(坐剤)、舌下剤、経膣剤、注射剤(経静脈、経動脈、経筋肉、皮下、皮内)や点滴剤等の非経口投与剤に分類することができる。例えば、経口投与剤としては、例えば錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、溶液、懸濁液、乳液、及びシロップ等が、又は直腸投与剤や経膣剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤などの形態を採ることができる。経皮剤としては、例

例えばローション等の液剤の他、クリームや軟膏等の半固形剤の形態を採ることもできる。

[0137] 注射剤としては、例えば溶液、懸濁液または乳剤等の形態を採ることができ、具体的には無菌処理した水、水-プロピレングリコール溶液、緩衝化液、0.4重量%濃度の生理食塩水等を例示することができる。さらに注射剤は、液剤に調製した後、凍結処理又は凍結乾燥処理されていてもよく、これにより保存することができる。後者の凍結乾燥処理で調製される凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

[0138] 上記の医薬組成物(医薬製剤)の形態には、当該分野で行われている通常的手法により、CaMKII阻害剤と薬学的に許容される担体を配合することによって調製される。薬学的に許容される担体としては、賦形剤、希釈剤、充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤及び分散剤などを例示することができる。また、さらに当該分野において通常用いられる添加剤を配合することもできる。かかる添加剤は、調製する医薬組成物の形態に応じて、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、増粘剤、pH調整剤、乳化剤、懸濁化剤、防腐剤、香料、着色料、張度調節剤、キレート剤、界面活性剤などの中から適宜選択して用いることができる。

[0139] CaMKII阻害剤が式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である場合には、CaMKII阻害剤を含有する製剤として、例えば、特開平11-240873、WO 98/47880、特開2000-186077等に記載の方法で製造することができる製剤が挙げられる。また、化合物(I)を含有する製剤は、例えば国際公開第02/092094号パンフレット(対応EP特許:EP 1374871 A1)に記載の方法で製造することもできる。

[0140] 上記のCaMKII阻害剤を含む製剤は、DMARDsを含有する製剤と併用することができるが、例えば、DMARDsを上記製剤に加えて配合した製剤とすることもできる。また、両者を医師の処方箋に従って混合して医薬を製造することもできる。併用する場合には、CaMKII阻害剤と、DMARDsとは、種々異なるルートにより同時にもしくは別々に、または例えば同日に時間をずらして、または数日間～数週間さらには数ヶ月にわたり所定の間隔をおいて投与することができる。

[0141] これらの医薬組成物におけるCaMKII阻害剤の投与量や投与回数は、投与形態、

患者の疾患やその病状の程度、患者の年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ等、あるいはその他の要因を考慮して決められる。典型的には、CaMKII阻害剤とDMARDsとの併用に関する個々の一日投与量は、それらが単独で投与される場合の実態(推奨臨床投与量)に対して最少推奨臨床投与量の約1/50以上最大推奨臨床投与量以下の範囲である。例えば、CaMKII阻害剤の投与量として、通常は成人に対し1日あたり有効成分の量として約0.0001～約1000mgの範囲、好ましくは約0.001～約300mgの範囲、さらに好ましくは約0.1～約300mgの範囲を1日1回または数回に分けて投与することができる。好ましくは経口投与である。また、これらの投与量は、併用されるDMARDsとの併用効果を観察しながら、適宜減量することもできる。

[0142] CaMKII阻害剤が化合物(I)である場合は、成人に対し1日あたり投与量として好ましくは約20～約300mgの範囲を、より好ましくは約30～約300mgの範囲を、さらに好ましくは約40～約240mgの範囲を、特に好ましくは約80～約240mgの範囲を1日1回または数回に分けて経口投与することができる。投与回数は1日1回投与が好ましい。より具体的には、例えば80mgを1日1回、120mgを1日1回、または240mgを1日1回経口投与することができる。また、これらの投与量は、併用されるDMARDsとの併用効果を見ながら、適宜減量することもできる。

[0143] CaMKII阻害剤と併用される疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)としては、関節リウマチの免疫異常を是正することによりリウマチ性炎症を鎮静化させて、寛解導入をする薬物が挙げられる。具体的には、以下の薬物を挙げることができる。

レフルノミド(leflunomide:Lancet. 1999 Jan 23;353(9149):259-66)

メソトレキサート(methotrexate:US 2512572)

D-ペニシラミン(D-penicillamine:Nature, 151, 107(1943))

ブシラミン(bucillamine:US 4305958)

サラゾスルファピリジン(salazosulfapyridine:Br Med J. 1980 Feb 16;280(6212):442-4;

スルファサラジン(sulphasalazine)とも呼ばれる)

アクタリット(actarit:US 4720506)

ロベンザリット(lobenzarit:J Rheumatol. 1984 Oct;11(5):615-23)

シクロフォスファミド(cyclophosphamide:Naturwiss, 45, 64(1957))

クロラムブシル(chlorambucil:US 2944079)

ミゾリビン(mizoribine:US 3888843)

アザチオプリン(azathioprine:US 3056785)

オーラノフィン(auranofin:US 3635945)

金チオマレイン酸ナトリウム(gold sodium thiomalate:Rheumatol Rehabil 1975 May;14 (2):101-14)

金チオ硫酸(aurotiosulfate)

金チオグルコース(aurothiogluucose:Agents Actions 1976 Feb;6(1-3):355-63)

シクロスポリン(cyclosporine:US 4117118)

ヒドロキシクロロキン(hydroxychloroquine:US 2546658)

クロロキン(chloroquine:US 2233970)

タクロリムス(tacrolimus, FK506:EP 184162)

エタネルセプト(Etanercept:Ann Pharmacother 1997 Nov;31(11):1335-8)

インフリキシマブ(Infliximab:Lancet 1994 Oct 22;344(8930):1105-10)

アナキンラ(Anakinra:Expert Opin Investig Drugs. 2000 Jan;9(1):113-27)

ケリキシマブ(keliximab:J Rheumatol 2002 Feb;29(2):220-9)

アダリムマブ(adalimumab, D2E7:Ann Rheum Dis. 1999 Nov;58 Suppl 1:i70-2)

リツキシマブ(rituximab, IDEC-102:Blood 1994 Jan;83(2):435-45, Blood 1997 Sep;90(6):2188-95)

ヒト型抗IL-6R抗体(MRA:Ann Rheum Dis. 2000 Nov;59 Suppl 1:i21-7)

[0144] これらのDMARDsの中で、好ましくはレフルノミド、メトトレキサートおよびサラゾスルフアピリジンを挙げることができる。さらに好ましくはメトトレキサートを挙げることができる。

[0145] これらのDMARDsの使用においては、しばしば副作用が問題となる。副作用としては、例えば、肝障害、腎障害、胃腸障害、血液障害、または骨髄障害などが挙げられる。より具体的には、例えばDMARDsとしてメトトレキサートまたはレフルノミドを選択した場合、肝障害、血液障害、または骨髄障害を持った自己免疫疾患(例えば、関

節リウマチ)患者には副作用のためメトトレキサートまたはレフルノミドは服用困難である。また、投与開始時にこれらの症状が無くとも、投与を継続する間にこれらの副作用が発現し、これらDMARDs(メトトレキサートまたはレフルノミド)の投与継続が困難になるか、投与量の減量を余儀なくされる、あるいはDMARDsの更なる増量が困難になることも起こる。一方、本発明のCaMKII阻害剤(例えば、化合物(I)に代表される式1のイソキサゾール誘導体)はこれらの副作用がないか少ないため、メトトレキサートまたはレフルノミドなどのDMARDsで十分な治療ができない上記の自己免疫疾患患者には特に有効である。また、CaMKII阻害剤とDMARDsとを併用することで、それぞれの作用を相互に補完しあうことができるため、上記の副作用のために十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られる量のDMARDsが投与できない自己免疫疾患患者に対し、DMARDsと本発明のCaMKII阻害剤を併用することにより、単剤投与の場合よりDMARDsの投与量を低減した形で有効性(予防および／または治療効果)を高めることができる。従って、本発明により、副作用が少なく有効性の高い、総合的に優れた自己免疫疾患予防剤および／または治療剤を提供することができる。

[0146] DMARDsが低分子化合物、ペプチドまたは抗体などの蛋白質である場合は、これらの物質について通常用いられる一般的な医薬組成物(医薬製剤)の形態に調製することができ、その形態に応じて経口または非経口的に投与することができる。一般的には以下のような投与形態、及び投与方法が挙げられる。

[0147] 投与形態としては、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤及びカプセル剤等の固形製剤や、溶液、懸濁液、乳液、シロップ及びエリキシルなどの液剤などの形態を挙げることができる。これらの各種形態は、投与経路に応じて経口投与剤の他、経鼻剤、経皮剤、直腸投与剤(坐剤)、舌下剤、経膈剤、注射剤(経静脈、経動脈、経筋肉、皮下、皮内)や点滴剤等の非経口投与剤に分類することができる。例えば、経口投与剤としては、例えば錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、溶液、懸濁液、乳液、及びシロップ等が、又は直腸投与剤や経膈剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤などの形態を採ることができる。経皮剤としては、例えばローション等の液剤の他、クリームや軟膏等の半固形剤の形態を採ることもでき

る。

[0148] 注射剤としては、例えば溶液、懸濁液または乳剤等の形態を採ることができ、具体的には無菌処理した水、水—プロピレングリコール溶液、緩衝化液、0.4重量%濃度の生理食塩水等を例示することができる。さらに注射剤は、液剤に調製した後、凍結処理又は凍結乾燥処理されていてもよく、これにより保存することができる。後者の凍結乾燥処理で調製される凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。

[0149] 上記の医薬組成物(医薬製剤)の形態には、当該分野で行われている通常的手法により、DMARDsと薬学的に許容される担体を配合することによって調製される。薬学的に許容される担体としては、賦形剤、希釈剤、充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤及び分散剤などを例示することができる。また、さらに当該分野において通常用いられる添加剤を配合することもできる。かかる添加剤は、調製する医薬組成物の形態に応じて、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、増粘剤、pH調整剤、乳化剤、懸濁化剤、防腐剤、香料、着色料、張度調節剤、キレート剤、界面活性剤などの中から適宜選択して用いることができる。

このような形態を有する医薬組成物は、目的とする疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、経口投与、あるいは静脈、動脈、皮下、皮内または筋肉内に投与するか、又は病変の認められる組織そのものに直接局所投与してもよいし、また経皮投与や直腸投与も可能である。

[0150] これらの医薬組成物におけるDMARDsの投与量や投与回数は、投与形態、患者の疾患やその病状の程度、患者の年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ等、あるいはその他の要因を考慮して決められる。典型的には、DMARDsとCaMKII阻害剤との併用に関する個々の一日投与量は、それらが単独で投与される場合の実態(推奨臨床投与量)に対して最少推奨臨床投与量の約1/50以上最大推奨臨床投与量以下の範囲である。例えば、DMARDsの投与量として、通常は成人に対し1日あたり有効成分の量として約0.0001～約4000mgの範囲、好ましくは約0.001～約3000mgの範囲、さらに好ましくは約0.1～約300mgの範囲を1日1回または数回に分けて投与することができる。また、投与サイ

クルを1週間として1週間毎に1回、または2～3回に分けて投与することもできる。

[0151] 個々のDMARDsの具体的な臨床投与量および用法としては、例えば以下のものが挙げられる。レフルノミドでは1日当たり5－30mg、好ましくは10－20mgを1日1回投与することができる。メソトレキサートでは1週間当たり5－30mg、好ましくは6－25mgを単回、または2－3回に分けて投与することができる。サラゾスルファピリジンでは1日当たり0.5－4g、好ましくは1－3gを1日1回、または2－3回に分けて投与することができる。いずれの剤も、経口投与が好ましい。これらの投与量は、併用されるCaMKII阻害剤との併用効果を見ながら、適宜減量することもできる。

[0152] 本発明の併用薬は、さらに非ステロイド系抗炎症薬または副腎皮質ステロイド薬等と併用することもできる。非ステロイド系抗炎症薬としては、具体的には、サリチル酸系(アスピリン等)、アントラニル系(メフェナム酸、フルフェナム酸等)、インドール酢酸系(インドメタシン、スリンダック、アセメタシン等)、フェニル酢酸系(ジクロフェナック、フェンブフェン等)、プロピオン酸系(イブプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン、ナプロキセン、チアプロフェン等)、オキシカム系(ピロキシカム、テノキシカム、アンピロキシカム等)、ピラゾロン系(ケトフェン、ブタゾン等)等が挙げられる。副腎皮質ステロイド薬としては、具体的にはデキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、コルチゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、ベクロメタゾン、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、ハロブレドン等が挙げられる。これらの化合物は、エステル化されていてもよく、ナトリウム塩等の塩の形態であってもよく、水和物等の溶媒和物であってもよい。

[0153] 本発明の「治療効果」とは、自己免疫疾患に対する治療作用のことを指す。前述したように、自己免疫疾患に対する治療作用とは、例えば、発症後その症状を軽減若しくは改善する作用(症状緩和作用、症状改善作用)、病態の進行を抑制する作用(進行抑制作用)、病態の進展を抑制する作用(進展抑制作用)、または疾患を治癒する作用(治癒作用)などが挙げられる。

[0154] 自己免疫疾患が関節リウマチである場合には、本発明の「治療効果」は、関節リウマチ患者における慢性炎症の抑制効果、関節破壊の抑制効果、関節変形への進行抑制効果および身体機能の改善効果等を指標として、その効果を判断することがで

きる。

[0155] 関節リウマチ患者における「身体機能の改善」とは、滑膜の慢性炎症による関節の疼痛・膨張などの関節症状を改善し、関節の破壊や変形を抑制することにより日常生活動作能力が改善することをいう。日常生活動作能力は、例えば、衣類着脱・身支度、起立、食事、歩行、衛生、伸展、握力および活動を指標として評価することができる。具体的には、例えば、患者によるHAQ (Health Assessment Questionnaire) (Fries JF, et al., Arthritis Rheumatism, 23, p.137-145, 1980)を用いて評価することができる。

[0156] また、関節リウマチにおける「治療効果」の評価のために、米国リウマチ学会による改善基準(ACR20;Felson Dt et al. The American College of Rheumatology preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis., Arthritis Rheum. 1995, 38:p.727-735; 1996, 39:p.34-40)を使用することができる。

米国リウマチ学会による改善基準(ACR20): 以下の1)および2)で20%以上の改善が認められ、かつ、3)-7)の5項目のうち少なくともいずれか3項目で20%以上の改善が認められた場合に、「米国リウマチ学会による基準:20%改善」(ACR基準20%改善)とする。

- 1)疼痛関節数の減少
- 2)膨張関節数の減少
- 3)患者による疾患活動性の全般的評価
- 4)担当医による疾患活動性の全般的評価
- 5)患者による疼痛度評価
- 6)患者による身体機能評価
- 7)CRPまたは赤沈値

同様に、1)および2)で50%以上の改善が認められ、かつ、3)-7)の5項目のうち少なくともいずれか3項目で50%以上の改善が認められた場合に、「米国リウマチ学会による基準:50%改善」(ACR基準50%改善)とする。また、1)および2)で70%以上の改善が認められ、かつ、3)-7)の5項目のうち少なくともいずれか3項目で70%以上の改善が認められた場合に、「米国リウマチ学会による基準:70%改善」(ACR基準70%改善)と

する。

- [0157] また、X線像による手・足の関節破壊の進行度を評価することにより、関節破壊抑制効果を評価し、治療効果を判断することができる。評価方法としては、例えばLarsenスコアまたはSharpスコアを用いることができる(Acta Radiologica Diagnosis 18: 481-491, 1977; J Rheumatol 22(10): 1974-1975, 1995; Bailliere's Clinical Rheumatology: 10(3): 435-453, 1996)。
- [0158] ACR基準20%改善を満たす患者の割合、ACR基準50%改善を満たす患者の割合、ACR基準70%改善を満たす患者の割合、または関節破壊抑制効果(X線)等の評価指標から任意に選択した指標を用い、CaMKII阻害剤またはDMARDsいずれかの単独投与群(またはその両方の群)の治療効果と併用投与群の治療効果を比較することにより、本発明のCaMKII阻害剤とDMARDsとの併用にかかる併用効果を評価することができる。
- [0159] 本発明における「副作用によって、十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られる量の疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARDs)が投与できない自己免疫疾患患者」とは、以下に限定されないが、例えば以下に述べる患者が挙げられる。
- (1) 通常用いられる当該DMARDsの最大用量(以下、「最大推奨臨床投与量」と称する)を既に投与されているが、自己免疫疾患予防および／または治療効果として十分な効果が得られていない患者；
 - (2) 当該DMARDsの投与を少量より開始し、効果を観察しながら用量を段階的に増加させて来たが、副作用の発現により現在の用量より増量投与することができない患者；
 - (3) 一定用量(この場合の用量は、最大推奨臨床投与量の場合、およびそれより低用量の場合の両方の場合が考えられる)で当該DMARDsの投与を継続してきたが、前述のエスケープ現象(投与継続により耐性を示し、効果減弱を示す状態)により十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られなくなっている状態の患者であり、副作用のためにこれ以上用量を増加できない患者；および
 - (4) 当該DMARDsの投与により引き起こされ易い副作用に関し、当該副作用が起こりやすい素因を持つ患者であって、当該DMARDsの単剤投与では、効果が得られるた

めの推奨投与量を投与することは副作用のために危険であると考えられる患者;など。

具体的なDMARDsの副作用としては、前述したものが挙げられる。

[0160] これらの自己免疫疾患患者に対して、本発明のCaMKII阻害剤との併用投与を行うことにより、DMARDsの投与量を増加させることなく、併用による優れた自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成することが可能である。従って、副作用を軽減した形で、優れた自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成することが可能となる。

[0161] 「十分な治療効果」とは、前述した種々の評価指標から選択される指標によって評価可能であり、患者の疾患やその病状等、種々の要因により変わりうるが、例えば関節リウマチの場合、前述の「米国リウマチ学会による基準:20%改善」、あるいは「米国リウマチ学会による基準:50%改善」などを具体的な基準として例示することができる。

[0162] 本発明の以下の態様(1)および(2)において、「治療効果の合計を上回り」、および「治療効果を上回り」の意味について、以下に具体的に説明する。

(態様1)第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果の合計を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。

(態様2)第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。

[0163] 例えば以下の4群を比較対照する試験を想定する。グループAとグループCとの間で、第1医薬組成物の有効投与量(有効成分の投与量)は等しく、グループBとグル

ープCとの間で、第2医薬組成物の有効投与量(有効成分の投与量)は等しいものとする。

グループP:薬物非投与群(またはプラセボ投与群)

グループA:第1医薬組成物単独投与群

グループB:第2医薬組成物単独投与群

グループC:第1医薬組成物および第2医薬組成物の併用投与群

この場合において、着目した特定の治療効果の指標(仮にEとする)に関し、グループP、A、BおよびCの指標Eによる効果がそれぞれE(P)、E(A)、E(B)およびE(C)であるとき、前記「態様1」における「治療効果の合計を上回り」とは、グループCでの効果が、グループAでの効果とグループBでの効果の合計を上回ること、すなわち、 $E(C) > E(A) + E(B)$ であることを言う。比較のために、通常はEとして、薬物非投与群(またはプラセボ投与群)と比較した値、すなわち $E(P) = 0$ となるように標準化した値を用いる。

一方、前記「態様2」における「治療効果を上回り」とは、グループCでの効果が、グループAでの効果を上回り、かつ、グループBでの効果をも上回ること、すなわち、「 $E(C) > E(A)$ かつ $E(C) > E(B)$ であること」を言う。指標Eとしては、定量的な指標でも定性的な指標でもよい。定量的な指標としては、例えば前述のACR基準20%改善を満たす患者の割合およびACR基準50%改善を満たす患者の割合などが挙げられ、定性的な指標としては、例えば前述の、X線像による手・足関節破壊抑制効果(スコアによる評価)などが挙げられる。

[0164] 実施例

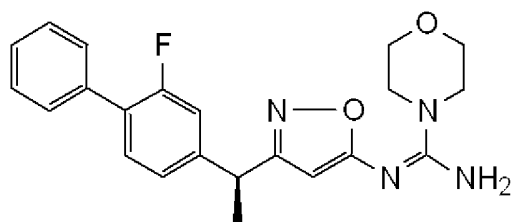
以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

なお、実施例において、下記の化合物を使用した。

化合物(I): 3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾール(例えば、特許第3237608号明細書に記載の方法に従って合成できる)

式1a:

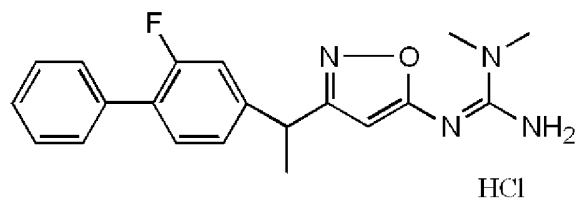
[0165] [化14]



化合物(Ib): N'-{3-[1-(2-フルオロ-ビフェニル-4-イル)-エチル]-イソキサゾール-5-イル}-N,N-ジメチル-グアニジン塩酸塩(例えば、特許第3237608号明細書に記載の方法に従って合成できる)

式1b:

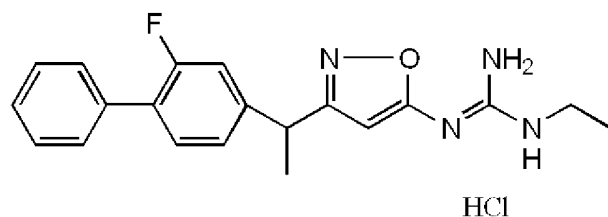
[0166] [化15]



化合物(Ic): N-エチル-N'-{3-[1-(2-フルオロ-ビフェニル-4-イル)-エチル]-イソキサゾール-5-イル}-グアニジン塩酸塩(例えば、特許第3237608号明細書に記載の方法に従って合成できる)

式1c:

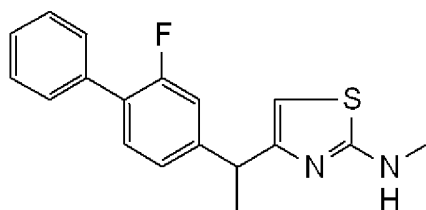
[0167] [化16]



化合物(II): 4-[1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-2-(メチルアミノ)チアゾール(例えば、特公平4-80035号公報に記載の方法に従って合成できる)

式2:

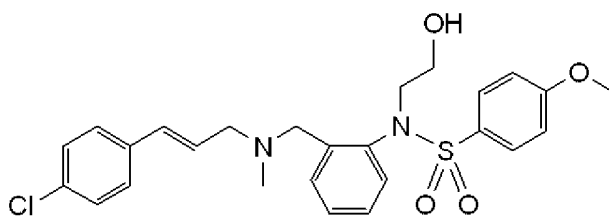
[0168] [化17]



KN-93: N-(2-[N-[4-クロロシンナミル]-N-メチルアミノメチル]フェニル)-N-(2-ヒドロキシエチル)-4-メキシベンゼンスルホンアミド(特開平6-293730号公報に記載の方法に従って合成できる)

式3:

[0169] [化18]



実施例 1

[0170] 実施例1 CaMKII阻害活性の検討(1)

被験物質はDMSOに溶解し、CaMKII反応緩衝液(50mM Tris-HCl ;pH7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1mM Dithiothreitol(DTT))(すべてNakalaiTesque社)で各種濃度に希釈した。ラット由来のCaMKII α (最終濃度 0.75 μ g/ml) (Santa Cruz社)を被験物質存在下でCaMKII反応緩衝液に溶解したAutocamtide-2^(R) (40 μ M) (CALBIOCHEM社)およびCaMKII活性化緩衝液(1 mM $CaCl_2$, 1 μ M calmodulin) (NakalaiTesque社)と混合し、さらにATP (50 μ M) (NakalaiTesque社)を加えることで反応を開始した。反応は30℃で5分間行い、その後、SDS-PAGE サンプル緩衝液を加え、5分間のboilingで反応を停止した。反応液中の蛋白は15% SDS-PAGEで分離し、PVDF膜にblottingした。Autocamtide-2に取り込まれたリンは抗リン酸化セリン/スレオニン抗体(Santa Cruz社)を反応させ、ECLシステム(Amersham社)とNIH Image (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/> よりダウンロードできる)を用いて定量化した。

各被験物質のCaMKII阻害活性を表1に示した。いずれの各被験物質も1 μ Mあるいは10 μ M以上の濃度でCaMKIIの活性を阻害する作用を有することが明らかにな

った。

表1. 被験物質によるCaMKII 阻害作用

[0171] [表1]

被験物質	濃度 (μ M)	阻害率 (%)
化合物 (I)	10	85
	1	47
	0.1	39
化合物 (II)	10	92
	1	62
	0.1	45
化合物 (I b)	10	71
	1	42
	0.1	13
化合物 (I c)	10	68
	1	36
	0.1	11
KN-93	10	77
	1	58
	0.1	25

実施例 2

[0172] 実施例2 CaMKII阻害活性の検討(2)

CaMKII γ 遺伝子は、GenBankの Accession No.L07044の配列をもとに合成したプライマー2種(5'-TC GGA TCC AGC ATG GCC ACC ACC GCC ACC TG-3'[配列番号4]、5'-TA GAA TTC ACA CTG CAG CGG TGC GGC AGG[配列番号5])と、定法にしたがって調製した培養細胞Jurket T細胞由来のcDNAを鋳型としてPCR法によって調製した。調製したCaMKII γ の遺伝子は、BamHI,EcoRIで切り出して、transfer vectorのpFastBac1のMCSに導入した。このvectorをもとに発現ウイルスを作製、増幅した。詳細はBac-to-Bacバキュロウイルス発現システム(Invitrogen社)のマニュアルに従った。発現したCaMKII γ の精製は、文献記載の方法(Biochemical & Biophysical Research Communications. 173(2):578-84, 1990)に準じて行った。即ち、発現細胞を超音波によって破碎し、遠心操作で得た細胞可溶性画分から、最終濃度60%の硫酸分画、カルモジュリンセファロース(Amasham Biosciences社)によるアフィニティー精製により調製した。発現の確認は、 γ 特異的抗CaMKII抗体、sc1541(SantaCruz

社)を用い、western blotting法により行った。

ラット由来のCaMKII α に替えて、上記手順により調製したヒトCaMKII γ を用い、他の条件は実施例1と同様にして被験物質のCaMKII γ 阻害活性を測定した。

各被験物質のCaMKII阻害活性を表2に示した。KN-93は1 μ M以上の濃度で、化合物(I)は10 μ M以上の濃度で、いずれもCaMKIIの活性を阻害する作用を有することが明らかになった。

表2. 被験物質によるCaMKII 阻害作用

[0173] [表2]

被験物質	濃度 (μ M)	阻害率 (%)
化合物 (I)	30	57
	10	33
	1	7
KN-93	30	107
	10	101
	1	27

実施例 3

[0174] 実施例3 Tリンパ球に対する作用

Tリンパ球をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とCalcium Ionophore A23187で刺激した時のIL-2産生に対する化合物(I)およびKN-93の作用を評価した。

EL-4細胞(マウスTリンパ球系細胞株)を10%仔ウシ血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM:GIBCO社)で培養し、実験に供した。5 $\times$ 10⁴個/wellの割合で細胞を96穴プレートに播き込み、被験化合物を含むDMEM培地と刺激剤としてPMAおよびA23187を含むDMEM培地を添加し、20時間培養した。被験化合物および刺激剤の最終濃度は化合物(I)が1-30 μ M、KN-93が1-10 μ M、PMAが25ng/ml、A23187が250ng/mlとなるように調製した。培養後プレートを遠心し、マイクロピペットで上清を回収した。上清中のIL-2量をEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)法で定量した。定量方法はキット(MOUSE IL-2 Immunoassay; R&D Systems)の使用説明書に従って実施した。

図1に示す通り、化合物(I)およびKN-93は用量依存的にIL-2の産生を抑制した。

実施例 4

[0175] 実施例4 マクロファージに対する作用

マクロファージをリポポリサッカライド (LPS) で刺激した時のIL-6産生に対する化合物 (I) およびKN-93の作用を評価した。

J774A.1細胞 (マウスマクロファージ細胞株) を10%仔ウシ血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: GIBCO社) で培養し、実験に供した。5 × 10⁴個/wellの割合で細胞を96穴プレートに播き込み、被験化合物を含むDMEM培地と刺激剤としてLPSを含むDMEM培地を添加し、24時間培養した。被験化合物および刺激剤の最終濃度は化合物 (I) が1-30 μM、KN-93が1-3 μM、LPSが1 μg/mlとなるように調製した。培養後プレートを遠心し、マイクロピペットで上清を回収した。上清中のIL-6量をEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で定量した。定量方法はキット (MOUSE IL-6 Immunoassay; R&D Systems) の使用説明書に従って実施した。

図2に示す通り、化合物 (I) およびKN-93は用量依存的にIL-6の産生を抑制した。

実施例 5

[0176] 実施例5 線維芽細胞の増殖に対する作用

線維芽細胞をbasic fibroblast growth factor (bFGF) で刺激した時の細胞増殖に対する化合物 (I) およびKN-93の作用を評価した。

L929細胞 (マウス線維芽細胞株) を10%仔ウシ血清含有MEMアール培地 (E-MEM: GIBCO社) で培養し、実験に供した。細胞を血清不含のE-MEMに懸濁し2 × 10⁴個/wellの割合で細胞を96穴プレートに播き込み、72時間培養した。被験化合物を含むE-MEM培地を添加後1時間培養し、刺激剤としてRecombinant human FGF basic (bFGF) を含むE-MEM培地を添加し20時間培養した。各wellに5-bromo 2'-deoxyuridine (Brd-U) 溶液を添加し、37℃にて更に4時間培養した。細胞を固定し、取り込まれたBrd-UをCell proliferation ELISA system (Amersham) を用いて検出し、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。この吸光度の値を細胞増殖の指標とした。

図3に示す通り、化合物 (I) およびKN-93は用量依存的に線維芽細胞の増殖を抑制した。

実施例 6

[0177] 実施例6 ヒト滑膜由来細胞の増殖に対する作用

ヒト滑膜細胞株SW982細胞の増殖に対する化合物(I)およびKN-93の作用を評価した。

SW982細胞(ヒト滑膜細胞株;ATCCより入手)をFCS(SIGMA社製)含有DMEM培地(GIBCO社製)で培養し、実験に供した。SW982を96well平底プレートに無血清下で 4×10^4 /wellで播き込んだ。薬剤は細胞の播き込みと同時に添加し、 $200 \mu\text{l}$ /wellで培養した。18時間後にalar blue^(R)(BIOSOURCE社) $20 \mu\text{l}$ を各wellに添加し、更に6時間培養し、マイクロプレートリーダーにて各wellの吸光度を測定した。吸光度は570nmと600nmの2波長で測定した。A1=570nmの吸光度(細胞の入っているwell)、A2=600nmの吸光度(細胞の入っているwell)、B1=570nmの吸光度(培地のみの入っているwell)、B2=600nmの吸光度(培地のみの入っているwell)とした場合、 $(A1-A2) - (B1-B2)$ の値を算出し、細胞数の指標として表示した。

図4に示す通り、CaMKII阻害剤である化合物(I)およびKN-93は用量依存的にヒト滑膜細胞SW982の増殖を抑制した。これらの結果はSW982の増殖の維持にCaMKII活性が関与していることを示しており、化合物(I)およびKN-93がCaMKII阻害によってSW982の細胞死を誘導していることを強く示唆している。

実施例 7

[0178] 実施例7 破骨細胞の形成に対する作用

破骨細胞の形成に対する化合物(I)およびKN-93の作用を評価した。

コラーゲン関節炎を発症したマウスの罹患足を採取し、10%仔ウシ血清含有 α -MEM培地(GIBCO社)中でDispase(合同酒造)およびcollagenase S1(新田ゼラチン)存在下で37°C、5-6時間処理し、単分散細胞浮遊液を回収した。これを遠心、再懸濁により洗浄し実験に供した。 2×10^4 個/wellの割合で細胞を96穴プレートに播き込み、被験化合物を含む α -MEM培地を添加し、9日間培養した。培養後、TRAP染色用キット(Sigma社)を用い染色し、顕微鏡下でウェルあたりの破骨細胞数を計測した。TRAP染色はキットの使用説明書に従って実施した。

図5に示す通り、化合物(I)およびKN-93は用量依存的に破骨細胞の形成を抑制し

た。

実施例 8

[0179] 実施例8 アジュバント誘発関節炎に対する作用

アジュバント誘発関節炎モデルはラットに惹起される代表的な慢性炎症モデルであり、抗炎症剤や抗リウマチ剤の薬理評価に広く用いられている。そこで、このモデルを用い化合物(I)および化合物(II)の効果を治療試験または発症予防試験で検討した。治療試験では、薬物投与による浮腫抑制効果を検討するため、投与期間前後の後肢容積の差を算出し、浮腫量の変化を検討した。発症予防試験では投与期間中、経時的に後肢容積を測定し、長期間にわたる薬物の効果を検討した。なお、薬効評価の指標として後肢容積または浮腫量を用いているが、浮腫量とはアジュバントを感作していない正常の後肢容積からの増加分なので、どちらの指標もほぼ同義に用いることができる。

(実験方法)

Mycobacterium butyricum (アジュバント) の流動パラフィン懸濁液 (1mg/200 μ l) をSDまたはLewisラット (共に雄性、6週齢) の右側後肢足蹠皮下に注入し関節炎を惹起した。治療試験ではアジュバント注入後17日目から、体重100g当たり1mlの投与量になるように調製した化合物(I)または化合物(II)の0.5%メチルセルロース懸濁液を1日1回連続5日間経口投与した。陽性対照として同様に調製したインドメタシン懸濁液を投与した。投与直前および最終投与の5時間後に水置換法にて左右それぞれの後肢容積を測定し、投与直前の値と最終投与5時間後の値との差を算出し浮腫量の変化とした。発症予防試験ではアジュバントを注入した当日から1日1回連続21日間投与した。隔日に水置換法にて左右後肢容積を測定した。また化合物(II)の発症予防試験では対照として抗リウマチ薬D-ペニシラミン懸濁液を同様に投与した。

尚、コントロールとして被験化合物を含まない0.5%メチルセルロースのみを上記と同様にして投与した。

[0180] (結果)

アジュバントを注入すると、10日前後に左後肢 (非注射足) に関節炎を発症し、肢容積は17日目前後まで増大し、最大値に達する。そこで、化合物(I) (2.5-80mg/kg) を

1日1回5日間経口投与した場合の左後肢における浮腫量の変化を図6に示した。化合物(II) (10-50mg/kg)を1日1回5日間経口投与した場合の左右後肢における浮腫量の変化を図7に示した。また、化合物(I) (2.5-80mg/kg)をアジュバント注入の当日から21日間経口投与した場合の左右後肢容積を図8に示した。化合物(II) (50mg/kg)をアジュバント注入の当日から21日間経口投与した場合の浮腫量を図9に示した。比較対照のため、陽性対照インドメタシン(0.5mg/kg)、D-ペニシラミン(50mg/kg)およびコントロール群の結果も各図中に合わせて示した。

図6および図7に示したように、アジュバント注入により引き起こされた左後肢の浮腫が最大値に達してから投与を開始する治療試験において、化合物(I)および化合物(II)投与群では、顕著な浮腫抑制効果がみられた。また、左後肢が浮腫を呈する前に投与を開始する発症予防試験においても、図8および図9に示したように、化合物(I)および化合物(II)は顕著な浮腫抑制効果を示した。

実施例 9

[0181] 実施例9 コラーゲン関節炎マウスに対する作用

関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎マウスを用いて、化合物(I)の薬効評価を行った。コラーゲン関節炎の惹起は常法に従った。すなわち、エーテル麻酔下、マウス(DBA/1J、雄性、日本チャールズリバー)の尾根部に0.1mlのエマルジョンを注入し初回免疫を行った。エマルジョンはウシII型コラーゲン溶液(2mg/ml; コラーゲン研修会)とフロイント完全アジュバント(Difco)を等量混合し作製した。3週間後、同組成のエマルジョンを0.1ml尾根部に注入し追加免疫を行い、関節炎を惹起した。関節炎の程度は次の基準に従いスコアで表示した。

- 0 : 無症状
- 1 : 2関節以下の腫脹
- 2 : 3関節以上の腫脹/手足の軽度の発赤・浮腫
- 3 : 3関節以上の腫脹/手足の中度の発赤・浮腫
- 4 : 手足の重度の発赤・浮腫/関節強直

各肢について0-4点で評価する為、1個体で取りうる最大スコアは16となる。

化合物(I)および陽性対照のプレドニゾロンは0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、

マウスの体重10 g当たり0.1 mlを経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液のみを経口投与した。投与は初回免疫と同時に開始し、1日1回、35日間連日実施した。

その結果を、図10および図11に示す。対照群のマウスは10匹中9匹が関節炎を発症し、その程度も重篤であった。一方、化合物(I)を投与したマウスでは用量依存的に発症を抑制し、関節炎の程度も軽微であった。

実施例 10

[0182] 実施例10 実験的アレルギー性脳脊髄炎に対する作用

多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスを用いてKN-93の薬効評価を行なった。実験的アレルギー性脳脊髄炎の惹起はBradleyらの方法(J. Clinical Investigation, 107: 995-1006, 2001)に従った。すなわち、7週齢の雌性 SJL/Jマウス(チャールズリバーより購入)の背後部皮下にFreund完全アジュバントに混和したPLP部分ペプチド($\text{PLP}_{139-151}$: $\text{NH}_2\text{-HSLGKWLGHDPKF-COOH}$;配列番号12)150 μg を注射した。症状の重篤さの程度は次の基準に従いスコア(病態スコア)で表示した。

- 0 : 無症状
- 0.5: 尾の軽い麻痺
- 1 : 尾の麻痺
- 2 : 軽度の後肢の麻痺
- 3 : 中程度から強度の後肢の麻痺、あるいは軽度の前肢の麻痺
- 4 : 完全な後肢の麻痺、あるいは中程度から強度の前肢の麻痺
- 5 : 四肢の麻痺あるいは死線期にある
- 6 : 死亡

KN-93は0.5%メチルセルロース溶液に懸濁(0.1mg/ml)し、マウスの体重10 g当たり0.1 mlを皮下投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液のみを皮下投与した。投与は感作後7日目から開始し、1日1回、24日間連日実施した。

その結果を、図12に示す。対照群のマウスは重篤な実験的アレルギー性脳脊髄炎を発症し、試験期間中に10匹中7匹が神経麻痺により死亡した。一方、KN-93(1mg/

kg) を投与したマウスも発症はしたが、症状は対照群に比べはるかに軽く、死亡例は10匹中2匹であった。

実施例 11

[0183] 実施例11 実験的アレルギー性脳脊髄炎に対する作用

多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスを用いて化合物(I)の薬効評価を行なった。実験的アレルギー性脳脊髄炎の惹起はBradleyらの方法(J. Clinical Investigation, 107: 995-1006, 2001)に従った。すなわち、7週齢の雌性 SJL/Jマウス(チャールズリバーより購入)の背後部皮下にFreund完全アジュバントに混和したPLP部分ペプチド(PLP₁₃₉₋₁₅₁) 150 μ gを注射した。症状の重篤さの程度は次の基準に従いスコア(病態スコア)で表示した。

- 0 : 無症状
- 0.5: 尾の軽い麻痺
- 1 : 尾の麻痺
- 2 : 軽度の後肢の麻痺
- 3 : 中程度から強度の後肢の麻痺、あるいは軽度の前肢の麻痺
- 4 : 完全な後肢の麻痺、あるいは中程度から強度の前肢の麻痺
- 5 : 四肢の麻痺あるいは死線期にある
- 6 : 死亡

化合物(I)は0.5%メチルセルロース溶液に懸濁してそれぞれ8mg/ml(80mg/kg投与群)、4mg/ml(40mg/kg投与群)および2mg/ml(20mg/kg投与群)の投与液を調製し、マウスの体重10 g当たり0.1 mlを経口投与した。陽性対照としてのプレドニゾロン群では、プレドニゾロンを0.5%メチルセルロース溶液に懸濁して0.3mg/mlの投与液を調製し、マウスの体重10 g当たり0.1 mlを経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液のみを皮下投与した。投与は感作日から開始し、1日1回、40日間連日実施した。Normal群では、PLP₁₃₉₋₁₅₁ 感作および被験物質投与を共に行わなかった。

その結果を、表3、図13および図14に示す。化合物(I)は、病態スコアをいずれの投与量でも抑制し、その作用は用量依存的であった。また、対照群では全例(9匹中9匹)が発症し、試験期間中に9匹中4匹が神経麻痺により死亡したのに対し、化合物

(I) 投与群では80mg/kg投与群で10匹中1匹死亡した以外は死亡例がなかった。プレドニゾロンは発症を強く抑制した(10匹中2匹のみ発症)が、対照群や化合物(I)投与群とは異なり、発育による体重の自然増加を強く抑制した。この結果はプレドニゾロンの連続投与に伴う作用であり、慢性の病態に長期投与を行う場合の問題点となる。即ち、CaMKII阻害剤である化合物(I)は、代表的なステロイドであるプレドニゾロン投与群において見られた長期投与時の強い体重増加抑制を伴うことなく、実験的アレルギー性脳脊髄炎の病態重症化を用量依存的に抑制することが示された。

表3. 実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスにおける効果

[0184] [表3]

被験物質	用量 (mg/kg)	n	発症率	死亡率
対照群		9	9/ 9	4/ 9
Normal群		10	0/10	0/10
プレドニゾロン	3	10	2/10	0/10
化合物 (I)	20	10	8/10	0/10
	40	10	7/10	0/10
	80	10	8/10	1/10

実施例 12

[0185] 実施例12 コラーゲン関節炎(CIA)マウス関節炎罹患部におけるCaMKIIの発現

CIAマウスの関節炎罹患部の組織切片を作成し、免疫染色法により炎症部位におけるCaMKII蛋白の発現を検討した。

CIAは常法により惹起した。すなわち、エーテル麻酔下、マウス(DBA/1J、雄性、日本チャールズリバー)の尾根部に0.1mlのエマルジョンを注入し初回免疫を行った。エマルジョンはウシII型コラーゲン溶液(2mg/ml;コラーゲン研修会)とフロイント完全アジュバント(Difco)を等量混合し作製した。3週間後、同組成のエマルジョンを0.1ml尾根部に注入し追加免疫を行い、さらに4週間飼育した後、関節炎を発症したマウスの後肢を採取し、4%パラホルムアルデヒド中で固定した。固定した後肢から病理組織標本作製し免疫染色に用いた。免疫染色はベクタステイン^(R) ABC-PO (ウサギIgG) キット(Vector社)を用い、一次抗体としてラビット抗CaMKIIポリクローナル抗体(M-17 6; Santa Cruz Biotechnology)を50倍希釈で用い、モイストチャンバー内で一晩反応

させた。その他はキットの使用説明書に従って実施した。

図15に示す通り、正常滑膜ではCaMKII発現細胞はほとんど見られないが、滑膜炎部位ではCaMKII発現細胞が多数みられる。また図16に示す通り、炎症の亢進したパンスス(肉芽状組織)において、CaMKII発現細胞が多数観察された。以上の知見は、CaMKIIがリウマチの病態形成に関与していることを示唆している。

実施例 13

[0186] 実施例13 I κ B α の分解に対する作用の検討

Tリンパ球をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とCalcium Ionophore A23187で刺激した時の I κ B α の分解に対する化合物(I)およびKN-93の作用を評価した。

EL-4細胞(マウスTリンパ球系細胞株)を10%仔ウシ血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM:GIBCO社)で培養し、実験に供した。サブコンフルエントに増殖した細胞を遠心回収し、 5×10^6 cells/tubeとなるようにエッペンドルフチューブに分注した。化合物(I) (final 30 μ M)またはKN-93 (final 10 μ M)を添加し37°Cウォーターバスでプレインキュベーションした後、PMA (final 125ng/ml) およびA23187 (final 1 μ g/ml)で刺激した(total volume 500 μ l)。刺激後15分または30分インキュベーションした後、ice cold Stop Solution(1 $\times$ PBS、1mM Na₃VO₄、5mM EDTA)1ml添加し反応を停止させた。遠心洗浄後、TNE buffer(50mM Tris-HCl、1% NP-40、20mM EDTA、100 μ g/ml PMSF、30 μ l/ml Aprotinin、1mM Na₃VO₄、5mM NaF、12mM β -glycerolphosphate)で溶解した。12% SDS-PAGE後、タンパクをPVDF membraneに転写し、抗I κ B α 抗体(C-21、Santa Cruz社)を用いてwestern blottingを行った。

図17に示す通り、化合物(I)およびKN-93はI κ B α の分解を抑制した。

実施例 14

[0187] 実施例14 サイクリンD1の発現およびAktのリン酸化に対する作用の検討

線維芽細胞をbasic fibroblast growth factor (bFGF)で刺激した時のサイクリンD1の発現およびAktのリン酸化に対する化合物(I)およびKN-93の作用を評価した。

L929細胞(マウス線維芽細胞株)を10%仔ウシ血清含有MEMアール培地(E-MEM: GIBCO社)で培養し、実験に供した。細胞を血清不含のE-MEMに懸濁し72時間培養した。被験化合物を含むE-MEM培地を添加後1時間培養し、刺激剤としてRecom

binant human FGF basic (bFGF)を含むE-MEM培地を添加しさらに培養した。RIPA bufferで細胞を溶解し、total cell lysateを得た。SDS-PAGE後、タンパクをPVDF membraneに転写し、抗cyclin抗体または抗Akt抗体(共にSanta Cruz社)を用いてwestern blottingを行った。

図18および図19に示す通り、化合物(I)およびKN-93はサイクリンD1の発現増強を抑制し、Aktのリン酸化も抑制した。

実施例 15

[0188] 実施例15 炎症性刺激によるCaMKIIの発現変動

ヒト単球系細胞株であるTHP-1(大日本製薬より購入)を実験に供した。10%FCS(SIGMA)を含むRPMI1640培地(GIBCO)を用いてTHP-1細胞を 5×10^5 cells/mlの濃度に調製し、24wellプレートの各wellに0.5mlずつ加えた。さらに、10%FCS(SIGMA)を含むRPMI1640培地(GIBCO)を用いて4 μ g/mlに調製したリポポリサッカライド(LPS: Difco)と400 U/mlに調製したIFN- γ (ナカライテスク)をそれぞれ0.25 μ lずつ添加して培養を開始した。無刺激群には10%FCS(SIGMA)を含むRPMI1640培地(GIBCO)のみを添加した。その後、経時的に細胞を回収し、RIPA Bufferで細胞溶解液を調製後、蛋白量測定キット(Bio-Rad Dc Protein Assay: BIO RAD)を用いて蛋白量を定量した。細胞溶解液50 μ gを8-16%グラジュエントゲル(旭テクノグラス)に添加してSDS-PAGEを行なった。PVDFメンブレンへトランスファー後、ブロッキング剤(ECL Blocking agent: Amersham)を1時間反応させ、その後、1次抗体である抗CaMKII γ 抗体(Santa Cruz)あるいは抗CaMKII δ 抗体(Santa Cruz)を500倍にブロッキング剤で希釈したものを1時間室温で反応させた。メンブレンを洗浄後、2次抗体であるhorseradish i peroxidase標識抗ヤギIgG抗体(Amersham)をブロッキング剤で2000倍に希釈したものを40分間反応させた。その後、メンブレンを洗浄し、ECL Plus (Amersham)を用いてメンブレンにブロットされた蛋白を検出した。

結果を図20に示す。THP-1細胞において、炎症性刺激によりCaMKIIの発現が誘導されることが明らかとなった。

実施例 16

[0189] 実施例16 ヒト滑膜由来細胞の増殖に対するsiRNAの作用

CaMKIIと自己免疫疾患の関連をより明確にするため、CaMKII配列に特異的なsiRNAを設計、作製し、ヒト滑膜由来細胞株であるSW982細胞を用いてCaMKII配列特異的siRNAの影響を検討した。

1. CaMKII配列特異的siRNA(small interfering RNA)の設計、及び作製

CaMKII配列特異的siRNAとして、CaMKII γ 遺伝子 (GenBank Accession No.L07044) の塩基配列情報に基づき、表4に示す3種の特異的な siRNA 配列を設定し、センス鎖とアンチセンス鎖により二本鎖が形成された siRNA を日本バイオサービス社より購入した(3種のsiRNAを、以下CaMKII γ siRNA(A)、(B)および(C)と称する)。

表4. CaMKII γ siRNAの配列

siRNA名	配列	配列番号	位置
(A) センス鎖	5'-CGU GAG GCU CGG AUA UGU CdTdT-3'	6	199-217
(A) アンチセンス鎖	5'-GAC AUA UCC GAG CCU CAC GdTdT-3'	7	
(B) センス鎖	5'-CAU CCA AAC AUC GUG CGC CdTdT-3'	8	229-247
(B) アンチセンス鎖	5'-GGC GCA CGA UGU UUG GAU GdTdT-3'	9	
(C) センス鎖	5'-GCA GAU GCC AGC CAC UGU AdTdT-3'	10	352-370
(C) アンチセンス鎖	5'-UAC AGU GGC UGG CAU CUG CdTdT-3'	11	

(「位置」は、GenBank Accession No.L07044に登録されているCaMKII γ 配列中の位置番号を表す。)

コントロールとして哺乳類に存在しない配列で作製されたsiRNAであるScramble II Duplex (DHARMACON)を用いた。

2. CaMKII γ 発現抑制による細胞増殖に対する効果

SW982細胞(ATCCより入手)はFCS(SIGMA)含有DMEM培地(GIBCO)で培養し、実験に供した。この細胞を24wellプレートに 1×10^5 cell/well添加し、24時間後に、CaMKII γ siRNA $3 \mu\text{l}$ (60pmol)およびGeneSilencer (Gene Therapy Systems, Inc) $10.5 \mu\text{l}$

を各wellに加えた。

siRNAの導入効率を検討するために、蛍光を標識したsiRNAであるFluorescein Labeled Luciferase GL2 Duplex (DHARMACON)をCaMKII γ siRNAの代わりに添加した。24時間の培養後、siRNAの導入効率は細胞内に取り込まれたFluorescein Labeled Luciferase GL2 Duplexをフローサイトメーターで測定した。また、細胞内のCaMKII量はsiRNAの導入3日後に細胞を回収し、RIPA Bufferで細胞溶解液を調製後、蛋白量測定キット (Bio-Rad Dc Protein Assay: BIO RAD)を用いて蛋白量を定量し、50 μ gを8-16%グラジュエントゲル (旭テクノグラス)に添加してSDS-PAGEを行った。PVDFメンブレンへトランスファー後、ブロッキング剤 (ECL Blocking agent: Amersham)を1時間反応させ、その後、1次抗体である抗CaMKII γ 抗体 (Santa Cruz)を500倍にブロッキング剤で希釈したものを1時間室温で反応させた。メンブレンを洗浄後、2次抗体であるhorseradishi peroxidase標識抗ヤギIgG抗体 (Amersham)をブロッキング剤で2000倍に希釈したものを40分間反応させた。その後、メンブレンを洗浄し、ECL Plus (Amersham)を用いてメンブレンにブロットされた蛋白を検出した。

細胞の増殖はAlamar Blue(R)の取り込みを指標に測定した。すなわち、siRNAを導入後に3日間細胞を培養し、血清を含まないDMEM培地に交換してさらに24時間培養した。その後、Alamar Blue(R)を各wellに添加し、1時間後に蛍光光度計で蛍光強度を測定した (励起: 544nm、波長: 590nm)。

その結果、本実験の条件下では約80%の細胞にsiRNAが導入されることが確認された (図21および図22)。3種類のsiRNAの効果をCaMKII γ の発現量で検討した結果を図23に示した。SW982細胞ではCaMKII γ の発現が認められたが、(A)配列のsiRNAを細胞内に導入することでCaMKII γ の発現抑制が観察された。また、(A)配列のsiRNAを導入した細胞のみで増殖の抑制が認められた (図24)。

3. 考察

上記に記載した通り、CaMKII阻害剤である化合物 (I) またはKN-93を添加するとヒト滑膜由来細胞SW982の細胞増殖がほぼ完全に抑制されること (実施例6)、および、CaMKII γ の発現を抑制するsiRNAであるCaMKII γ siRNA(A)を導入したSW982では細胞増殖が抑制されること (本実施例) より、SW982の細胞増殖にはCaMKII γ の発現

が深く関与していることが明らかとなった。このことは、CaMKII γ の発現を抑制、または活性を阻害することにより、滑膜細胞の異常増殖が抑制され、よって関節リウマチ等の疾患における関節の病態改善(慢性炎症の抑制、関節破壊の抑制、関節変形への進行抑制など)が達成されることを示している。

実施例 17

[0190] 実施例17 アジュバント誘発関節炎に対する併用効果

アジュバント誘発関節炎モデルはラットに惹起される代表的な慢性炎症モデルであり、抗炎症剤や抗リウマチ剤の薬理評価に広く用いられている。そこで、このモデルを用いて、CaMKII阻害剤である3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルホリン-4-イル)メチレン]アミノ]イソキサゾール(化合物(I))とDMARDs(レフルノミドおよびサラゾスルファピリジン)との併用効果を検討した。

(実験方法)

Mycobacterium butyricum(アジュバント)の流動パラフィン懸濁液(1mg/200 μ l)をLewisラット(雄性、6週齢)の右側後肢足蹠皮下に注入し関節炎を惹起した。アジュバント注入後17日目から、体重100g当たり0.5mlの投与量になるように調製した化合物(I)(10mg/kg)およびDMARDs(レフルノミド(5mg/kg)またはサラゾスルファピリジン(400mg/kg))の0.5%メチルセルロース懸濁液を単独または併用で1日1回連続5日間経口投与した。投与直前および最終投与の5時間後に水置換法にて左後肢容積を測定し、差を算出し浮腫量の変化とした。尚、コントロールとして被験化合物を含まない0.5%メチルセルロースのみを上記と同様にして投与した。

[0191] (結果)

アジュバントを注入すると、10日前後に左後肢(非注射足)に関節炎を発症し、肢容積は17日目前後まで増大し、最大値に達する。そこで、化合物(I)とDMARDsの代表例としてレフルノミドまたはサラゾスルファピリジンとを併用投与した場合の浮腫量の変化を図25および図26に示した。比較対照のため、化合物(I)単独投与群、DMARDs単独投与群、およびコントロール群の結果も各図中に合わせて示した。

図25および図26に示したように、アジュバント注入により引き起こされた左後肢の浮腫が最大値に達してから投与を開始する試験において、化合物(I)とDMARDsの

併用投与群では、化合物(I)単独またはDMARDs単独投与群に比べて顕著な浮腫抑制効果がみられた。

実施例 18

[0192] 実施例18 アジュバント誘発関節炎に対する併用効果

実施例17と同様にして、化合物(I)とDMARDs(メソトレキサート)との併用効果を検討した。

(実験方法)

実施例17と同様にしてアジュバント誘発関節炎を惹起したラットに対して、アジュバントを注入した当日からDMARDs(メソトレキサート(0.060mg/kgまたは0.045mg/kg;0.5%メチルセルロース懸濁液))の投与を開始し、1日1回連続21日間経口投与した。感作後10日目から化合物(I)(10mg/kg)を単独または併用で1日1回連続12日間経口投与した。隔日に水置換法にて左後肢容積を測定した。尚、コントロールとして被験化合物を含まない0.5%メチルセルロースのみを上記と同様にして投与した。

[0193] (結果)

DMARDsの代表例としてメソトレキサート(0.060mg/kg、0.045mg/kg)をアジュバント注入の当日から投与し、10日目から化合物(I)(10mg/kg)を併用投与した場合の左後肢容積を図27および図29に、左後肢の発症率を図28および図30にそれぞれ示した。比較対照のため、化合物(I)単独投与群、DMARDs単独投与群、およびコントロール群の結果も各図中に合わせて示した。

図27および図28に示したように、左後肢が浮腫を呈する前にDMARDsの投与を開始する試験において、化合物(I)単独投与群ではほとんど効果がみられない場合でも、DMARDs単独投与群の発症予防効果、浮腫抑制効果と比べて、化合物(I)とDMARDsとの併用投与群の方が、顕著な発症予防効果、浮腫抑制効果を示した。さらに、図29および図30に示したように、DMARDs単独投与群でもほとんど効果がみられない用量と化合物(I)を併用投与した場合でも、併用投与群は顕著な浮腫抑制効果を示した。

実施例 19

[0194] 実施例19 アジュバント誘発関節炎に対する併用効果

実施例17と同様にラットアジュバント誘発関節炎に対する併用効果を検討した。

(実験方法)

実施例17と同様の方法によって関節炎を惹起し、アジュバントを注入した当日から、体重100g当たり0.5mlの投与量になるように調製した化合物(I)およびDMARDsの代表例としてのメソトレキサートの0.5%メチルセルロース懸濁液を単独または併用で1日1回連続17日間経口投与した。投与直前および最終投与後に水置換法にて左後肢容積を測定し、さらに左後肢容積増加量のAUC(投与期間中の各時点の値に対する群分け時の値の差を時間に対してプロットした曲線の曲線下面積)を求めた。また、左後肢(非注射足)および右後肢(注射足)の関節破壊をX線により測定し、これを評価指標として併用効果を評価することも可能である。

(結果)

化合物(I) (20mg/kg)とメソトレキサート(0.060mg/kg)とを併用投与した場合の浮腫量(左後肢容積の増加量、即ちその時点の容積と群分け時の容積の差で示した)の変化、および左後肢の発症率を図31および図32に示した。同様に、化合物(I) (40mg/kg)とメソトレキサート(0.060mg/kg)とを併用投与した場合の結果を図33および図34に、化合物(I) (80mg/kg)とメソトレキサート(0.060mg/kg)とを併用投与した場合の結果を図35および図36に示した。比較対照のため、化合物(I)単独投与とメソトレキサート単独投与、およびコントロール群の結果も各図中に合わせて示した。さらに、各用量、単独投与および併用投与での左後肢容積増加量のAUC(投与期間中の各時点の容積増加量を時間に対してプロットした曲線の曲線下面積)を図37にまとめて示した。

図31および図32に示したように、アジュバント注入日から投与する試験において、化合物(I) (20mg/kg)単独投与群は浮腫抑制効果を示し、メソトレキサート(0.060mg/kg)単独投与群は発症予防効果および浮腫抑制効果を示したが、化合物(I) (20mg/kg)とメソトレキサートの併用投与群は各単独投与群に比較して顕著な浮腫抑制効果を示した。また、図33ー図36に示したように、化合物(I) (40および80mg/kg)単独投与群およびメソトレキサート(0.060mg/kg)単独投与群はいずれも発症予防効果および浮腫抑制効果を示したが、この場合も化合物(I) (40mg/kgおよび80mg/kg)とメソ

レキサート(0.060mg/kg)との併用投与群は、各用量の化合物(I)単独投与群およびメソトレキサート単独投与群のいずれと比較しても顕著な発症予防効果および浮腫抑制効果を示した。さらに、図37に示したように、左後肢容積増加量のAUCを指標とした場合においても、化合物(I)(20、40、および80mg/kg)とメソトレキサート(0.060mg/kg)との併用投与群が各用量の単独投与群に比較して顕著な浮腫抑制効果を示すことが明らかとなった。

実施例 20

[0195] 実施例20 アジュバント誘発関節炎に対する併用効果(関節破壊抑制効果)

実施例17と同様にラットアジュバント誘発関節炎に対する併用効果を検討した。

(実験方法)

実施例17と同様の方法によって関節炎を惹起し、アジュバントを注入した当日から、体重100g当たり0.5mlの投与量になるように調製した化合物(I)およびDMARDsの代表例としてのメソトレキサートの0.5%メチルセルロース懸濁液を単独または併用で1日1回連続17日間経口投与した。最終投与後に全てのラットについて、炭酸ガス高濃度吸引による安楽死を実施した。両後肢を頸骨の中間部分より切断した。両後肢は10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。軟X線写真を撮影し、関節部位の構造をマイクロスコープを用いて観察した。関節破壊の程度をスコアで記録した。観察部位は、脛骨・踵骨・足根骨の3ヶ所とし、とりうる最大のスコアは12とした。

関節破壊スコア

0: 正常

1: 軽度の関節および骨破壊と軟骨の新生

2: 中等度の関節および骨破壊と軟骨の新生ならびに軽度の化骨化

3: 強度の関節および骨破壊と化骨化

4: 著しい関節および骨破壊と変形ならびに強度の化骨化

(結果)

各用量(化合物(I))は1日当たり20,40または80mg/kg、メソトレキサートは1日当たり0.06mg/kg)における単独投与および併用投与での右後肢関節破壊スコアを図38に

まとめて示した。また、コントロール群(図39)、メソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg; 図40)、化合物(I)単独投与群(40mg/kg; 図41)および化合物(I) (40mg/kg) + メソトレキサート(0.06mg/kg)併用投与群(図42)の4つの群について、関節炎ラット右後肢の軟X線写真を、各群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例で示した。

同様に、各用量における単独投与および併用投与での左後肢関節破壊スコアを図43にまとめて示した。また、コントロール群(図44)、メソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg; 図45)、化合物(I)単独投与群(40mg/kg; 図46)および化合物(I) (40mg/kg) + メソトレキサート(0.06mg/kg)併用投与群(図47)の4つの群について、関節炎ラット左後肢の軟X線写真を、各群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例で示した。

図38－図47に示したように、アジュバント注入日から投与する試験において、化合物(I)単独投与群は、左右両側後肢に対して用量依存的な関節破壊抑制効果を示した。さらに、化合物(I)は、メソトレキサート(0.06mg/kg)と併用投与することにより、メソトレキサートによる右後肢および左後肢の関節破壊抑制効果を用量依存的に、かつ顕著に増強した。とりわけ、化合物(I) (80mg/kg) + メソトレキサート(0.06mg/kg)併用投与群は、左後肢の関節破壊を完全に抑制し、極めて高い併用効果を示した。

以上のように、化合物(I)とメソトレキサートの併用投与により、各単独投与に比較して顕著に優れた関節破壊抑制効果が得られ、当該併用は関節リウマチの予防および／または治療において顕著な有用性を示すことが明らかとなった。

以上に記載の実施例と同様にして、化合物(I)と、メソトレキサート以外のDMARDsとの併用投与試験を行うことにより、併用効果を確認することができる。

実施例 21

[0196] 実施例21 T細胞に対する併用効果

Tリンパ球をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とCalcium Ionophore A23187で刺激した時のIL-2産生に対する化合物(I)とメソトレキサートの併用効果について評価した。

(実験方法)

EL-4細胞(マウスTリンパ球系細胞株)を10%仔ウシ血清含有Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM:GIBCO社)で培養し、実験に供した。5×10⁴個/wellの割合で細胞を96穴プレートに播き込み、被験化合物を含むDMEM培地と刺激剤としてPMAおよびA23187を含むDMEM培地を添加し、3日間培養した。被験化合物は、化合物(I)とメントレキサートの各単剤および併用とし、併用時の添加比率は化合物(I)とメントレキサートを10:1となるよう段階希釈調製した。刺激剤の最終濃度はPMAが25nM、A23187が250ng/mLとなるように調製した。培養後プレートを遠心し、マイクロピペットで上清を回収した。上清中のIL-2量をEnzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)法で定量した。定量方法はキット(MOUSE IL-2 Immunoassay; R&D Systems)の使用説明書に従って実施した。

(Combination Indexの算出方法) Combination Index (CI)は以下の方法により算出した。

$$fa/f = (D/Dm)^m \cdots \text{式(F1)}$$

$$fa: \text{薬剤による抑制率} (fa = 1-f) \cdots \text{式(F2)}$$

D: 薬剤濃度

Dm: IC_{50}

m: 薬剤濃度-曲線のパラメーター

式(F1)と式(F2)より、

$$(1-f)/f = (D/Dm)^m \cdots \text{式(F3)}$$

式(F3)より、

$$\begin{aligned} D &= Dm \times ((1-f)/f)^{1/m} \\ &= Dm \times (fa/(1-fa))^{1/m} \cdots \text{式(F4)} \end{aligned}$$

化合物(I)、メントレキサート(MTX)の単剤処理時、併用処理時の実験結果より、式(F4)を用いてそれぞれのDを求めた。

$$CI = Dc1/Df1 + Dc2/Df2 + (Dc1 \times Dc2)/(Df1 \times Df2) \cdots \text{式(F5)}$$

D1: 化合物(I)の濃度

D2: MTXの濃度

添え字f: 単剤

添え字c:併用

式(F5)よりCIを求め、 $f_a = 0.8$ におけるCIを用いて評価した。

CI<1のとき相乗効果を、CI=1のとき相加効果を、CI>1のとき拮抗をそれぞれ示す。

(結果)

図48に示すように、The SAS system Release 8.2 (SAS Institute Inc.)を用いて求めた $f_a=0.8$ (80%阻害濃度)におけるCI値は、0.368 (95% 信頼区間: 0.144-0.619)であった。このように、T細胞からのIL-2産生における化合物(I)とメソトレキサートを併用した場合の抑制効果は有意に相乗的であることが示された(危険率5%)。

実施例 22

[0197] 実施例22 リウマチ患者に対する併用効果

メソトレキサートによる治療においてメソトレキサートの効果がない、もしくは効果が不十分と考えられる関節リウマチ患者に、メソトレキサートに加えて1日1回食後に化合物(I)を経口投与する。メソトレキサートの用量は、前治療と同用量とするか、または1週間当たり6mg-25mgの範囲で患者の状態に合わせて選択される。化合物(I)の用量は、プラセボ、80mg/日および240mg/日とする(各群約100症例)。投与期間は48週間とするが、24週目に規定の有効基準に達していない者は除外する(疼痛関節数、膨張関節数または赤沈値のいずれかに20%以上の改善が認められた場合を、規定の有効基準に達したとする)。基準に達した者は、盲検を維持したまま48週まで投薬を続ける。投与開始16週後または24週後に、「米国リウマチ学会による基準(ACR基準):20%改善」を満たす患者の割合をプラセボ、80mg/日および240mg/日群間で比較することにより、化合物(I)とメソトレキサートとの併用投与による有効性(化合物(I)による、メソトレキサートの関節リウマチ治療効果の増強作用)が評価できる。なお、本明細書の実施例において、ACR基準の 3) 患者による疾患活動性の全般的評価、4) 担当医による疾患活動性の全般的評価、および 5) 患者による疼痛度評価については、視覚アナログスケール(VAS)により評価できる。「VAS(visual analog scale ;視覚アナログスケール)、100mm」とは、評価者が、評価を0から100mmの線上に表示することにより評価した指標であり、0から100までの整数で表される。線分の長さは100mm以外(例えば、200mmなど)であっても良いが、本明細書でVAS(視覚アナロ

グスケール)とは、0から100までの範囲でスコア化したものを言う。

実施例 23

[0198] 実施例23 リウマチ患者に対する併用効果

メソトレキサートによる治療においてメソトレキサートの効果がない、もしくは効果が不十分と考えられる関節リウマチ患者に、メソトレキサートに加えて1日1回食後に化合物(I)を経口投与する。メソトレキサートの用量は、前治療と同用量とするか、または1週間当たり10mg-25mgの範囲で患者の状態に合わせて選択される。投与期間は48週間とし、最初の24週間は、化合物(I)の用量として、プラセボ、120mg/日、240mg/日(各群約100例、合計約300例)を二重盲検下で投与する。その後の24週間は、非盲検下(オープン試験)で全ての被験者に240mg/日を投与する。投与開始24週後に、「米国リウマチ学会による基準(ACR基準):20%改善」を満たす患者の割合をプラセボ、120mg/日および240mg/日群間で比較することにより、化合物(I)とメソトレキサートとの併用投与による有効性(化合物(I)による、メソトレキサートの関節リウマチ治療効果の増強作用)が評価できる

実施例 24

[0199] 実施例24 リウマチ患者に対する併用効果(関節破壊抑制効果)

メソトレキサートによる治療歴においてメソトレキサートの効果がない、もしくは効果が不十分と考えられる関節リウマチ患者に、メソトレキサートに加えて1日1回食後に化合物(I)を経口投与する。メソトレキサートの用量は、前治療と同用量とするか、または1週間当たり6mg-25mgの範囲で患者の状態に合わせて選択される。化合物(I)の用量は、プラセボ、80mg/日および240mg/日とする(各群約100症例)。投与期間は48週間とするが、24週目に規定の有効基準に達していない者は除外する(疼痛関節数、膨張関節数または赤沈値のいずれかに20%以上の改善が認められた場合を、規定の有効基準に達したとする)。基準に達した者は、盲検を維持したまま48週まで投薬を続ける。投与開始48週後に、X線像による手・足の関節破壊の進行度を評価することにより、関節破壊抑制効果を評価する。当該効果をプラセボ、80mg/日および240mg/日群間で比較することにより、化合物(I)とメソトレキサートとの併用投与による有効性(化合物(I)による、メソトレキサートの関節リウマチ治療効果の増強作

用)が評価できる。

実施例 25

[0200] 実施例25 リウマチ患者に対する併用効果(関節破壊抑制効果)

メソトレキサートによる治療歴においてメソトレキサートの効果がない、もしくは効果が不十分と考えられる関節リウマチ患者に、メソトレキサートに加えて1日1回食後に化合物(I)を経口投与する。メソトレキサートの用量は、前治療と同用量とするか、または1週間当たり10mg-25mgの範囲で患者の状態に合わせて選択される。投与期間は48週間とし、最初の24週間は、化合物(I)の用量として、プラセボ、120mg/日、240mg/日(各群約100例、合計約300例)を二重盲検下で投与する。その後の24週間は、非盲検下(オープン試験)で全ての被験者に240mg/日を投与する。投与開始24週間後および48週間後に、X線像による手・足の関節破壊の進行度を評価することにより、関節破壊抑制効果を評価する。当該効果をプラセボ、120mg/日および240mg/日群間で比較することにより、化合物(I)とメソトレキサートとの併用投与による有効性(化合物(I)による、メソトレキサートの関節リウマチ治療効果の増強作用)が評価できる。

[0201] 上記記載した実施例(実施例17~25)より、CaMKII阻害剤(例えば化合物(I)等)とDMARDs(例えばメソトレキサート、サラゾスルファピリジン、レフルノミドなど)との併用により、それぞれ単独の効果からは予測することができない顕著に優れた自己免疫疾患の予防効果および/または治療効果が達成されること、即ちCaMKII阻害剤とDMARDsとの併用は自己免疫疾患の予防および/または治療において顕著な有用性を示すことが明らかとなった。

また、別途行ったラットおよびヒトの反復投与試験の結果より、化合物(I)の血中濃度(AUC)を等しくするためには、ラットでの投与量5mg/kg(1日1回経口投与)は、ヒトでの投与量14.2~18.8mg/人(1日1回経口投与)に相当することが判明している。従って、上記実施例における化合物(I)のラットへの1日投与量である10~80mg/kgは、ヒトでの1日投与量としては約28~約300mg/人に対応すると考えられる。

産業上の利用可能性

[0202] 本発明により、自己免疫疾患を予防および/または治療するための優れた併用薬を提供することができる。さらに本発明により、当該併用薬の有効成分となる候補物

質を探索し取得するために有用なスクリーニング方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0203] [図1]マウスTリンパ球系細胞株EL-4細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とCalcium Ionophore A23187で刺激した時のIL-2産生量を示すグラフである。結果は各群とも6ウェルの平均値と標準偏差で示す。化合物(I)添加群(1-30 μ M)、KN-93添加群(1-10 μ M)およびコントロール群の結果を示す。

[図2]マウスマクロファージ細胞株J774A.1細胞をリポポリサッカライド (LPS) で刺激した時のIL-6産生量を示すグラフである。結果は各群とも6ウェルの平均値と標準偏差で示す。化合物(I)添加群(1-30 μ M)、KN-93添加群(1-3 μ M)およびコントロール群の結果を示す。

[図3]マウス線維芽細胞株L929細胞をRecombinant human FGF basic (bFGF) で刺激した時の細胞増殖を示すグラフである。細胞増殖の指標としてブロモデオキシウリジン (Brd-U) の取り込みを波長450nmの吸光度として測定した。結果は各群とも6ウェルの平均値と標準偏差で示す。▲は化合物(I)添加群(0.3-10 μ M)の結果を示す。■はKN-93添加群(1-30 μ M)の結果を示す。○は無刺激コントロール群の結果を示す。●は刺激コントロール群の結果を示す。

[図4]ヒト滑膜由来細胞であるSW982細胞の増殖を示すグラフである。結果は各群とも6ウェルの平均値で示す。▲は化合物(I)添加群(1-30 μ M)の結果を示す。■はKN-93添加群(1-30 μ M)の結果を示す。●はコントロール群の結果を示す。

[図5]コラーゲン関節炎マウス関節炎罹患部由来細胞を培養した時の破骨細胞形成数を示すグラフである。結果は各群とも6ウェルの平均値と標準偏差で示す。化合物(I)添加群(0.5-20 μ M)、KN-93添加群(0.3-5 μ M)およびコントロール群の結果を示す。

[0204] [図6]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢の浮腫量の変化を示すグラフである。結果は各群とも10例の平均値と標準偏差で示す。化合物(I)投与群(2.5-80 mg/kg)、インドメタシン投与群(0.5mg/kg)およびコントロール群の結果を示す。

[図7]ラットのアジュバント誘発関節炎における左右後肢の浮腫量の変化を示すグラフである。化合物(II)投与群(10-50mg/kg) (各群7例の平均値と標準偏差)およびコ

ントロール群(8例の平均値と標準偏差)の結果を示す。

[図8]ラットのアジュバント誘発関節炎における左右後肢容積の経日推移を示すグラフである。グラフ中、○は化合物(I) (2.5mg/kg) 投与群の結果を示す。■は化合物(I) (5mg/kg) 投与群の結果を示す。□は化合物(I) (10mg/kg) 投与群の結果を示す。▲は化合物(I) (20mg/kg) 投与群の結果を示す。△は化合物(I) (40mg/kg) 投与群の結果を示す。●は化合物(I) (80mg/kg) 投与群の結果を示す。◇はインドメタシン(0.5mg/kg) 投与群の結果を示す。×は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。+は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。AUC値を用いて統計解析を行った。ウィリアムズの多重比較、片側検定において、化合物(I) (20mg/kg) 投与群は右後肢容積($p<0.01$)および左後肢容積($p<0.05$)で有意、化合物(I) (40mg/kg) 投与群および化合物(I) (80mg/kg) 投与群は、左右いずれの後肢容積においても有意($p<0.01$)であった。また、Studentのt検定、両側検定において、インドメタシン(0.5mg/kg) 投与群は、左右いずれの後肢容積においても有意($p<0.01$)であった。

[図9]ラットのアジュバント誘発関節炎における左右後肢浮腫量の経日推移を示すグラフである。グラフ中、●は化合物(II) (50mg/kg) 投与群の結果を示す。△はD-ペニシラミン(50mg/kg) 投与群の結果を示す。○は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群10-12例の平均値で示す。

- [0205] [図10]関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎マウスを用いて化合物(I)を試験した時の、関節炎発症率を示すグラフである。○は化合物(I) (5mg/kg) 投与群の結果を示す。△は化合物(I) (10mg/kg) 投与群の結果を示す。□は化合物(I) (20mg/kg) 投与群の結果を示す。▲は化合物(I) (40mg/kg) 投与群の結果を示す。■は化合物(I) (80mg/kg) 投与群の結果を示す。×はプレドニゾロン(3mg/kg) 投与群の結果を示す。●は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。ボンフェローニ補正フィッシャーの直接確率法による頻度検定において、化合物(I) (5mg/kg) 投与群($p<0.05$)、化合物(I) (10,20,40および80mg/kg) 投与群($p<0.01$)はいずれも有意差を示した。また、フィッシャーの直接確率法による頻度検定において、プレドニゾロン(3mg/kg) 投与群は有意差を示した($p<0.01$)

。

[図11]関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎マウスを用いて化合物(I)を試験した時の、関節炎スコアを示すグラフである。○は化合物(I) (5mg/kg) 投与群の結果を示す。△は化合物(I) (10mg/kg) 投与群の結果を示す。□は化合物(I) (20mg/kg) 投与群の結果を示す。▲は化合物(I) (40mg/kg) 投与群の結果を示す。■は化合物(I) (80mg/kg) 投与群の結果を示す。×はプレドニゾロン(3mg/kg) 投与群の結果を示す。●は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。シャーリーウィリアムズの多重比較検定において、化合物(I) (5mg/kg) 投与群($p<0.05$)、化合物(I) (10,20,40および80mg/kg) 投与群($p<0.01$)はいずれも有意差を示した。また、ウィルコクソン検定において、プレドニゾロン(3mg/kg) 投与群は有意差を示した($p<0.01$)。

[図12]多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスを用いてKN-93を試験した時の、病態スコアを示すグラフである。＊はKN-93(1mg/kg) 投与群の結果を示す。●は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図13]多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスを用いて化合物(I)を試験した時の、病態スコアを示すグラフである。□は化合物(I) (20mg/kg) 投与群の結果を示す。▲は化合物(I) (40mg/kg) 投与群の結果を示す。■は化合物(I) (80mg/kg) 投与群の結果を示す。×はプレドニゾロン(3mg/kg) 投与群の結果を示す。●は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。＋は正常コントロール群の結果を示す。対照群は9例、他の各群は10例の平均値で示す。

[図14]多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスを用いて化合物(I)を試験した時の、体重増加に及ぼす作用を示すグラフである。□は化合物(I) (20mg/kg) 投与群の結果を示す。▲は化合物(I) (40mg/kg) 投与群の結果を示す。■は化合物(I) (80mg/kg) 投与群の結果を示す。×はプレドニゾロン(3mg/kg) 投与群の結果を示す。●は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。＋は正常コントロール群の結果を示す。対照群は9例、他の各群は10例の平均値で示す。

[0206] [図15]CIAマウスの滑膜部位におけるCaMKIIの免疫染色の結果である。黒色に見える細胞はCaMKII発現細胞を示している。

[図16]CIAマウスのパンヌス(肉芽状組織)におけるCaMKIIの免疫染色の結果である。黒色に見える細胞はCaMKII発現細胞を示している。

[0207] [図17]マウスTリンパ球系細胞株EL-4細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とCalcium Ionophore A23187で刺激した時の細胞質内における $I\kappa B\alpha$ の発現をウェスタンブロッティングで検出した結果である。化合物(I) 30 μ M添加、KN-93 10 μ M添加およびコントロールの結果を示す。

[図18]マウス線維芽細胞株L929細胞をRecombinant human FGF basic (bFGF)で刺激した時の細胞内におけるサイクリンD1の発現をウェスタンブロッティングで検出した結果である。化合物(I) 添加(1.25-20 μ M)、KN-93添加(5-20 μ M)、無刺激コントロールおよび刺激コントロールの結果を示す。

[図19]マウス線維芽細胞株L929細胞をRecombinant human FGF basic (bFGF)で刺激した時の細胞内におけるリン酸化AktおよびAktの発現をウェスタンブロッティングで検出した結果である。化合物(I) 20 μ M添加、KN-93 20 μ M添加、無刺激コントロールおよび刺激コントロールの結果を示す。

[0208] [図20]ヒト単球系細胞株THP-1細胞をLPS+IFN γ で刺激した時の、細胞内におけるCaMKII γ およびCaMKII δ の発現をウェスタンブロッティングで検出した結果である。

[図21]蛍光標識siRNAを用いて最適な導入条件を検討した際の、対照としてのトランスフェクションがない場合のフローサイトメーター解析の結果を示す。縦軸は細胞数を表し、横軸は蛍光強度をLogスケールで表す。

[図22]蛍光標識siRNAを用いて最適な導入条件を検討した際の、最適な条件時(siRNA 60pmol)のフローサイトメーター解析の結果を示す。縦軸は細胞数を表し、横軸は蛍光強度をLogスケールで表す。

[図23]ヒト滑膜由来細胞SW982細胞に、CaMKII γ siRNA(A)、(B)および(C)をそれぞれ導入した時のCaMKII γ の発現をウェスタンブロッティングで検出した結果である。図中の(A)、(B)および(C)はCaMKII γ siRNA(A)、(B)および(C)を、それぞれ導入した場合の結果を示す。SCは、コントロールとしてScramble II Duplex(SC)を導入した場

合の結果を示す。Mockは、siRNAを何も含まず導入用試薬だけでトランスフェクションを行った場合の結果を示す。図中に、「CaMKII γ 」で示したバンドがCaMKII γ のバンドである。

[図24]ヒト滑膜由来細胞SW982細胞に、CaMKII γ siRNA(A)、(B)および(C)をそれぞれ導入した時の細胞増殖を示すグラフである。細胞増殖の指標として、Alamar Blue (R)添加後、蛍光強度(励起:544nm、波長:590nm)を測定した。図中の(A)、(B)および(C)はCaMKII γ siRNA(A)、(B)および(C)を、それぞれ導入した場合の結果を示す。S Cは、コントロールとしてScramble II Duplex(SC)を導入した場合の結果を示す。Mockは、siRNAを何も含まず導入用試薬だけでトランスフェクションを行った場合の結果を示す。

[0209] [図25]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢の浮腫量の変化を示すグラフである。グラフ中、Aは化合物(I) (10mg/kg)とレフルノミド (5mg/kg)との併用投与群の結果を示す。Bは化合物(I)単独投与群 (10mg/kg)の結果を示す。Cはレフルノミド単独投与群 (5mg/kg)の結果を示す。Dは被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも7例の平均値で示す。グラフ中のパーセントは浮腫抑制率を示す。

[図26]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢の浮腫量の変化を示すグラフである。グラフ中、Aは化合物(I) (10mg/kg)とサラゾスルファピリジン (400mg/kg)との併用投与群の結果を示す。Bは化合物(I)単独投与群 (10mg/kg)の結果を示す。Cはサラゾスルファピリジン単独投与群 (400mg/kg)の結果を示す。Dは被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも7例の平均値で示す。グラフ中のパーセントは浮腫抑制率を示す。

[0210] [図27]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢の容積の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◇は化合物(I) (10mg/kg)とメソトレキサート (0.060mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群 (10mg/kg)の結果を示す。▲はメソトレキサート単独投与群 (0.060mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□はアジュバント誘発関節炎を惹起しない正常動物群(正常コントロール群)の結果を示す。各群とも8例の平均値で示す。

[図28]ラットのアジュバント誘発関節炎における発症率の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◇は化合物(I)(10mg/kg)とメソトレキサート(0.060mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(10mg/kg)の結果を示す。▲はメソトレキサート単独投与群(0.060mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも8例の平均値で示す。

[図29]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢の容積の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◇は化合物(I)(10mg/kg)とメソトレキサート(0.045mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(10mg/kg)の結果を示す。▲はメソトレキサート単独投与群(0.045mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも8例の平均値で示す。

[図30]ラットのアジュバント誘発関節炎における発症率の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◇は化合物(I)(10mg/kg)とメソトレキサート(0.045mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(10mg/kg)の結果を示す。▲はメソトレキサート単独投与群(0.045mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。各群とも8例の平均値で示す。

[0211] [図31]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢容積の増加量(その時点の容積と群分け時の容積の差)の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I)(20mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(20mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図32]ラットのアジュバント誘発関節炎における発症率の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I)(20mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(20mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図33]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢容積の増加量(その時点の容積と群分け時の容積の差)の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I) (40mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(40mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図34]ラットのアジュバント誘発関節炎における発症率の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I) (40mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(40mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図35]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢容積の増加量(その時点の容積と群分け時の容積の差)の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I) (80mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(80mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図36]ラットのアジュバント誘発関節炎における発症率の経日推移を示すグラフである。グラフ中、◆は化合物(I) (80mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群(80mg/kg)の結果を示す。△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。各群とも10例の平均値で示す。

[図37]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢容積増加量のAUC(投与期間中の各時点の容積増加量を時間に対してプロットした曲線の曲線下面積)グラフである。グラフ中、◆は化合物(I) (20mg/kg、40mg/kg、80mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群の結果を示す。○は化合物(I)単独投与群の結果を示す。

△はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)の結果を示す。■は被験化合物非投与群(コントロール群)の結果を示す。□は正常コントロール群の結果を示す。

[0212] [図38]ラットのアジュバント誘発関節炎における右後肢関節破壊スコアのグラフである。結果は各群とも10例の平均値と標準偏差で示す。正常コントロール群、被験化合物非投与群(コントロール群)、メソトレキサート(0.06mg/kg)単独投与群、化合物(I)(20mg/kg、40mg/kgおよび80mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群、および化合物(I)(20mg/kg、40mg/kgおよび80mg/kg)単独投与群の結果を示す。

[図39]アジュバント誘発関節炎ラット右後肢の軟X線像である。写真はコントロール群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア10)。

[図40]アジュバント誘発関節炎ラット右後肢の軟X線像である。写真はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア9)。

[図41]アジュバント誘発関節炎ラット右後肢の軟X線像である。写真は化合物(I)単独投与群(40mg/kg)群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア5)。

[図42]アジュバント誘発関節炎ラット右後肢の軟X線像である。写真は化合物(I)(40mg/kg) + メソトレキサート(0.06mg/kg)併用投与群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア2)。

[0213] [図43]ラットのアジュバント誘発関節炎における左後肢関節破壊スコアのグラフである。結果は各群とも10例の平均値と標準偏差で示す。正常コントロール群、被験化合物非投与群(コントロール群)、メソトレキサート(0.06mg/kg)単独投与群、化合物(I)(20mg/kg、40mg/kgおよび80mg/kg)とメソトレキサート(0.06mg/kg)との併用投与群、および化合物(I)(20mg/kg、40mg/kgおよび80mg/kg)単独投与群の結果を示す。

[図44]アジュバント誘発関節炎ラット左後肢の軟X線像である。写真はコントロール群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア3)。

[図45]アジュバント誘発関節炎ラット左後肢の軟X線像である。写真はメソトレキサート単独投与群(0.06mg/kg)群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア2)。

[図46]アジュバント誘発関節炎ラット左後肢の軟X線像である。写真は化合物(I)単独投与群(40mg/kg)群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア1)。

[図47]アジュバント誘発関節炎ラット左後肢の軟X線像である。写真は化合物(I)(40mg/kg) + メソトレキサート(0.06mg/kg)併用投与群群のうち平均的なスコアを示した個体の代表的な例である(スコア0)。

- [0214] [図48]マウスTリンパ球系細胞株EL-4細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)とCalcium Ionophore A23187で刺激した時のIL-2産生に対する化合物(I)とメソトレキサート併用効果について示した。図中のfaはIL-2産生阻害率を、CIはCombination Indexを示している。

配列表フリーテキスト

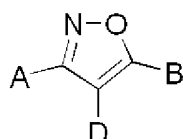
- [0215] 配列番号1: 阻害剤ペプチド
配列番号2: 阻害剤ペプチド
配列番号3: 阻害剤ペプチド
配列番号4: プライマー
配列番号5: プライマー
配列番号6: siRNA
配列番号7: siRNA
配列番号8: siRNA
配列番号9: siRNA
配列番号10: siRNA
配列番号11: siRNA
配列番号12: PLP(139-151)

請求の範囲

- [1] CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。
- [2] 疾患修飾性抗リウマチ薬と併用するための、CaMKII阻害剤を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。
- [3] 疾患修飾性抗リウマチ薬の投与と同時に、分離して、または続けて投与される請求項2記載の予防剤および／または治療剤。
- [4] 副作用によって、十分な自己免疫疾患予防および／または治療効果が得られる量の疾患修飾性抗リウマチ薬が投与できない自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対し、疾患修飾性抗リウマチ薬の投与と同時に、分離して、または続けて投与されるためのCaMKII阻害剤を含有する自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。
- [5] 副作用が肝障害、腎障害および胃腸障害から選ばれる1または複数である請求項4記載の予防剤および／または治療剤。
- [6] CaMKII阻害剤が、式1で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である請求項1～5のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。

式1:

[化1]

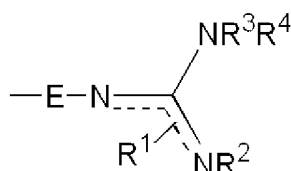


[式中、Dは水素原子、ハロゲン原子、水酸基、メルカプト基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいスルファモイル基、スルホ基、 $-R^5$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2R^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CO)SR^7$ 、 $-(CS)OR^7$ または $-CS_2R^7$ (式中、 R^5 は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいシクロアルケニル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表す。 R^6 は置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよ

いアルキニル基、置換されてもよいアリール基または置換されてもよい複素環基を表す。 R^7 は置換されてもよいアルキル基または置換されてもよいアリール基を表す。)を表す。

AおよびBは、一方が、式：

[化2]



(Eは単結合またはアルキレン基を表す。

2つの破線は、一方が実線と共に2重結合を意味し、他方が実線と共に単結合を意味する。 R^1 は破線が実線と共に単結合を表す結合に結合する窒素原子に結合する。

R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、メルカプト基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、置換されてもよいスルファモイル基、スルホ基、NH基の保護基、 $-R^5$ 、 $-OR^5$ 、 $-CO_2R^6$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CO)SR^7$ 、 $-(CS)OR^7$ または $-CS_2R^7$ (式中、 R^5 、 R^6 および R^7 は前記と同義である。)を表す。また、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、このうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成してもよい。また、式： $-NR^3R^4$ は、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ で表される基を表してもよい。

R^{43} および R^{44} は、以下の(1)または(2)の通りである。

(1)独立して水素原子、炭素数1~4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は1~3の整数を表す。)、 $-(CH_2)_n-CO_2R^{32}$ (n は前記と同義である。 R^{32} は炭素数1~3のアルキル基を表す。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n は前記と同義である。 R^{33} および R^{34} は独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m は2または3を表す。 R^{35} は水素原子、炭素数1~3のアルキル基または $-(CH_2)_m-OR^{36}$ (m は前記と同義である。 R^{36} は水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す。))を表す。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m は前記と同義である。 R^{37} および R^{38} は独

立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表すか、または R^{37} および R^{38} は一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、アゼパン、モルホリンまたはN-メチルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、アゼパン、モルホリンおよびN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は、独立して水素原子、炭素数1～3のアルキル基、フェニルまたはピリジルを表す。)を表す。

(2)一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。)

で表される基を表す。

AおよびBは、他方が、式： $-J-G$

(式中、Gは置換されてもよいアリール基、もしくは置換されてもよい複素環基を表す。Jは $-C(R^8R^9)-$ または $-C(=CR^8R^9)-$ を表す。 R^8 および R^9 は、各々独立して、水素原子、置換されてもよい低級アルコキシ基、または置換されてもよい低級アルキル基を表す。また、 R^8 および R^9 が結合して一緒になって、炭素原子と共に、置換されてもよい炭化水素環、置換されてもよい1, 3-ジオキサン環または置換されてもよい1, 3-ジオキソラン環を形成してもよい。)

で表される基を表す。]

- [7] Eが単結合または低級アルキレン基である請求項6記載の予防剤および／または治療剤。
- [8] Dが水素原子、ニトロ基、シアノ基、カルボキシ基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいカルバモイル基、 $-R^5$ または $-CO_2R^6$ (式中、 R^5 および R^6 は請求項6における意義と同義である。)である請求項6または7のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。
- [9] Dが水素原子、カルボキシ基、 $-R^5$ または $-CO_2R^6$ (式中、 R^5 および R^6 は請求項6

における意義と同義である。)である請求項8記載の予防剤および／または治療剤。

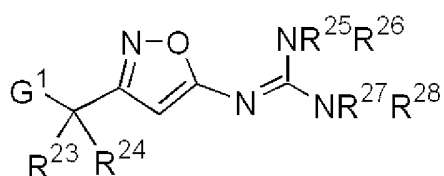
- [10] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいシクロアルケニル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表すか、式： $-NR^3R^4$ が、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、請求項6における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する請求項6～9のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。
- [11] R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 が、各々独立して、水素原子、水酸基、置換されてもよいアミノ基、置換されてもよいヒドロキシルアミノ基、置換されてもよいアルコキシ基、置換されてもよいアルキル基、置換されてもよいアルケニル基、置換されてもよいアルキニル基、置換されてもよいシクロアルキル基、置換されてもよいアリール基、置換されてもよい複素環基またはアシル基を表すか、式： $-NR^3R^4$ が、式： $-N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ (R^{43} および R^{44} は、請求項6における意義と同義である。)で表される基を表すか、または、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 のうちの任意の2つが結合して一緒になって、窒素原子と共に、置換されてもよい複素環を形成する請求項10記載の予防剤および／または治療剤。
- [12] Gが置換されてもよいフェニル、置換されてもよいナフチル、置換されてもよいフリル、置換されてもよいチエニル、置換されてもよいインドリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいベンゾチエニル、置換されてもよいイソベンゾフラニル、置換されてもよいピロリル、置換されてもよいベンゾフリル、置換されてもよいイミダゾリル、置換されてもよいピラゾリル、置換されてもよいイソキサゾリル、置換されてもよいイソチアゾリル、置換されてもよいチアゾリル、置換されてもよいオキサゾリル、置換されてもよいベンズイミダゾリル、置換されてもよいベンゾチアゾリル、置換されてもよいベンズオキサゾリル、置換されてもよいピリジル、置換されてもよいピラジニル、置換されてもよいピリミジニル、置換されてもよいピリダジニル、置換されてもよいトリアジニル、置

換されてもよいキノリル、置換されてもよいイソキノリル、置換されてもよいキナゾリニル、置換されてもよいキノキサリニル、置換されてもよい2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシニルまたは置換されてもよいカルバゾリルである請求項6～11のいずれか記載の予防剤および／または治療剤。

- [13] CaMKII阻害剤が、式A1または式A2で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である請求項6記載の予防剤および／または治療剤。

式A1:

[化3]



[式中、G¹は、フェニル、ビフェニル-4-イル、3-ベンゾイルフェニル、4-ベンゾイルフェニル、1H-インドール-2-イル、1H-インドール-3-イル、1-メチル-1H-インドール-2-イル、1-メチル-1H-インドール-3-イル、2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシニル-6-イル、1-ベンゾフラン-5-イル、1-ベンゾフラン-6-イル、キノリル、イソキノリル、フェニルピリジル、フェニルピリミジニル、フェニルピリダジニルまたはフェニルピラジニル(これらにおいて、フェニル、ビフェニル-4-イル、3-ベンゾイルフェニル、4-ベンゾイルフェニル、1H-インドール-2-イル、1H-インドール-3-イル、1-メチル-1H-インドール-2-イル、1-メチル-1H-インドール-3-イル、2, 3-ジヒドロベンゾ[1, 4]ジオキシニル-6-イル、1-ベンゾフラン-5-イル、1-ベンゾフラン-6-イル、キノリル、イソキノリル、フェニルピリジル、フェニルピリミジニル、フェニルピリダジニルおよびフェニルピラジニルは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、アセチル、シアノ、 $-\text{CO}_2\text{R}^{29}$ (R^{29} は炭素数1～3のアルキル基を表す。)および $-\text{CONR}^{30}\text{R}^{31}$ (R^{30} および R^{31} は、独立して水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。)からなる群から任意に選ばれる1または2個の基で置換されてもよい。)を表す。

R^{23} および R^{24} は、独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、メキシまたはエトキシを表すか、または一緒になってメチレンを表す。

式： $=C(NR^{25}R^{26})NR^{27}R^{28}$ は、以下の(1)、(2)または(3)の通りである。

(1) R^{25} および R^{26} は、以下の(a)または(b)の通りであり、 R^{27} および R^{28} は、以下の(c)または(d)の通りである。

(a) 独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は請求項6における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は請求項6における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は請求項6における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は請求項6における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は請求項6における意義と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は請求項6における意義と同義である。)を表す。

(b) 一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(c) 独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(d) 一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(ここで、5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(2) R^{26} および R^{27} は、一緒になって2つの窒素原子、炭素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(ここで、5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水

酸基、アルコキシ基、オキソ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい)を表す。

R^{25} および R^{28} は、独立して水素原子、炭素数1～3のアルキル基、アセチルまたは $-(CH_2)_m-OR^{36}$ (m は前記と同義である。 R^{36} は請求項6における意義と同義である。)を表す。

(3) 式: $=C(NR^{25}R^{26})NR^{27}R^{28}$ が、式: $=C(NR^{41}R^{42})N=C(NH_2)NR^{43}R^{44}$ を表す。

R^{41} および R^{42} は、以下の (a¹) または (b¹) の通りであり、 R^{43} および R^{44} は、以下の (c¹) または (d¹) の通りである。

(a¹) 独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(b¹) 一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキソ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

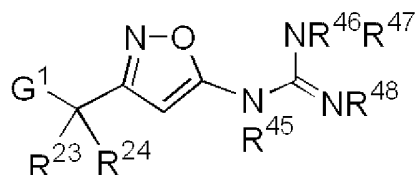
(c¹) 独立して水素原子、炭素数1～4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (n は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (n および R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n 、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (m および R^{35} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m 、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1～3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R^{39} および R^{40} は前記と同義である。)を表す。

(d¹) 一緒になって窒素原子と共に、5～7員飽和含窒素複素環基(5～7員飽和含

窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。]

式A2:

[化4]



[式中、G¹、R²³およびR²⁴は前記と同義である。

式: $-N(R^{45})C(NR^{46}R^{47})=NR^{48}$ は、以下の(1¹)または(2¹)の通りである。

(1¹) R⁴⁵は、炭素数1~3のアルキル基またはアセチルを表す。R⁴⁸は、水素原子、炭素数1~3のアルキル基またはアセチルを表す。

R⁴⁶およびR⁴⁷は、以下の(a²)または(b²)の通りである。

(a²) 独立して水素原子、炭素数1~4のアルキル基、 $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、R³³およびR³⁴は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよびR³⁵は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、R³⁷およびR³⁸は前記と同義である。)、フェニル、ピリジル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピラジニル、テトラゾリル、ベンジル、ピリジルメチル、ピリミジニルメチル、ピリダジニルメチル、ピラジニルメチル、テトラゾリルメチル、水酸基、炭素数1~3のアルコキシ基または $-NR^{39}R^{40}$ (R³⁹およびR⁴⁰は前記と同義である。)を表す。

(b²) 一緒になって窒素原子と共に、5~7員飽和含窒素複素環基(5~7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

(2¹) R⁴⁵およびR⁴⁶は、一緒になって窒素原子と共に、5~7員飽和含窒素複素環基(ここで、5~7員飽和含窒素複素環基は、アルキル基、アミノ基、水酸基、アルコキシ基、オキシ基からなる群から任意に選ばれる1または2個の置換基で置換されてもよい。)を表す。

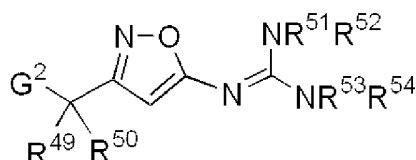
R⁴⁷およびR⁴⁸は、独立して水素原子、炭素数1~3のアルキル基、アセチルまたは

—(CH₂)_m—OR³⁶ (mおよびR³⁶は前記と同義である。)を表す。]

- [14] CaMKII阻害剤が、式A3で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である請求項6記載の予防剤および／または治療剤。

式A3:

[化5]



[式中、G²は、2-フルオロ-ビフェニル-4-イル、2'-フルオロ-ビフェニル-4-イルまたは3-ベンゾイルフェニルを表す。R⁴⁹は、メチルを表す。R⁵⁰は、水素原子、メチル、メキシまたはエトキシを表す。

式: =C(NR⁵¹R⁵²)NR⁵³R⁵⁴は、(1²)、(2²)または(3²)の通りである。

(1²)R⁵¹およびR⁵²は、以下の(a³)、(b³)または(c³)の通りであり、R⁵³およびR⁵⁴は、以下の(d³)、(e³)または(f³)の通りである。

(a³)独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(b³)一方が水素原子を表し、他方が—(CH₂)_n—COCH₃ (nは請求項6における意義と同義である。)、—(CH₂)_n—CO R³² (nおよびR³²は請求項6における意義と同義である。)、—(CH₂)_n—CONR³³R³⁴ (n、R³³およびR³⁴は請求項6における意義と同義である。)、—(CH₂)_m—OR³⁵ (mおよびR³⁵は請求項6における意義と同義である。)または—(CH₂)_m—NR³⁷R³⁸ (m、R³⁷およびR³⁸は請求項6における意義と同義である。)を表す。

(c³)一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピ

ペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

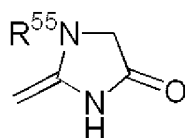
(d³) 独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(e³) 一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、R³³およびR³⁴は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよびR³⁵は前記と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、R³⁷およびR³⁸は前記と同義である。)を表す。

(f³) 一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

(2²) 式: $=C(NR^{51}R^{52})NR^{53}R^{54}$ が、式:

[化6]



(式中、R⁵⁵は、炭素数1～3のアルキル基、アセチルまたは $-(CH_2)_m-OR^{56}$ (mは前記と同義である。R⁵⁶は水素原子または炭素数1～3のアルキル基を表す。))を表す

。)で表される基を表す。

(3²)式: $=C(NR^{51}R^{52})NR^{53}R^{54}$ が、式: $=C(NR^{57}R^{58})N=C(NH_2)NR^{59}R^{60}$ を表す。

R^{57} および R^{58} は、以下の(a⁴)、(b⁴)または(c⁴)の通りであり、 R^{59} および R^{60} は、以下の(d⁴)、(e⁴)または(f⁴)の通りである。

(a⁴)独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

(b⁴)一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよび R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよび R^{35} は前記と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)を表す。

(c⁴)一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1～3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1～3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1～3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

(d⁴)独立して水素原子または炭素数1～4のアルキル基を表す。

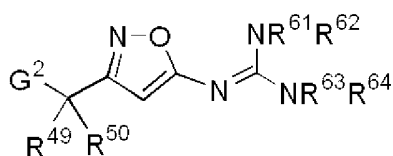
(e⁴)一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-COCH_3$ (nは前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよび R^{32} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_n-CONR^{33}R^{34}$ (n、 R^{33} および R^{34} は前記と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{35}$ (mおよび R^{35} は前記と同義である。)または $-(CH_2)_m-NR^{37}R^{38}$ (m、 R^{37} および R^{38} は前記と同義である。)を表す。

(f⁴) 一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1~3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1~3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、または1もしくは2個の炭素数1~3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジン(これらにおいて、ピロリジン、アゼパン、モルホリン、チアゾリン、ピペリジン-2-オン、ピペリジン-4-オン、チアモルホリン、炭素数1~3のアルキル基で4位が置換されてもよいピペラジン、炭素数1~3のアルコキシ基で4位が置換されてもよいピペリジン、4-ヒドロキシピペリジン、および1または2個の炭素数1~3のアルキル基で置換されてもよいアミノ基で4位が置換されたピペリジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。]

- [15] CaMKII阻害剤が、式A4で表されるイソキサゾール誘導体またはその薬学上許容される塩である請求項6記載の予防剤および/または治療剤。

式A4:

[化7]



[式中、G²、R⁴⁹およびR⁵⁰は、請求項14における意義と同義である。

式: =C(NR⁶¹R⁶²)NR⁶³R⁶⁴は、以下の(1³)、(2³)または(3³)の通りである。

(1³)R⁶³およびR⁶⁴は、共に水素原子を表す。

R⁶¹およびR⁶²は、以下の(a⁵)、(b⁵)または(c⁵)の通りである。

(a⁵) 独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す。

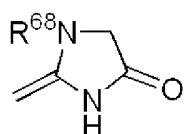
(b⁵) 一方が水素原子を表し、他方が $-(CH_2)_n-CO R^{32}$ (nおよびR³²は請求項6における意義と同義である。)、 $-(CH_2)_m-OR^{65}$ (mは2または3を表す。R⁶⁵は、水素原子、炭素数1~3のアルキル基、2-ヒドロキシエチルまたは3-ヒドロキシプロピルを表す。)または $-(CH_2)_m-NR^{66}R^{67}$ (mは前記と同義である。R⁶⁶およびR⁶⁷は、独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表すか、またはR⁶⁶およびR⁶⁷は一緒

になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンまたはN-メチルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンおよびN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。)を表す。

(c⁵) 一緒になって窒素原子と共に、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンまたはN-メチルピペラジン(これらにおいて、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンおよびN-メチルピペラジンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

(2³) 式: $=C(NR^{61}R^{62})NR^{63}R^{64}$ が、式:

[化8]



(R⁶⁸は、炭素数1~3のアルキル基、2-ヒドロキシエチルまたは3-ヒドロキシプロピルを表す。)で表される基を表す。

(3³) R⁶¹ および R⁶² は、一緒になって窒素原子と共に、モルホリンを表し、R⁶³ および R⁶⁴ は、一緒になって、アミノ-モルホリン-4-イル-メチレンを表す。]

- [16] G² が 2-フルオロ-ビフェニル-4-イルまたは 2'-フルオロ-ビフェニル-4-イルであり、R⁵⁰ が水素原子またはメチルであり、R⁶³ および R⁶⁴ が共に水素原子であり、R⁶¹ および R⁶² が、以下の (a⁶) または (b⁶) の通りである、請求項15記載の予防剤および/または治療剤:

(a⁶) 独立して水素原子または炭素数1~3のアルキル基を表す;

(b⁶) 一緒になって窒素原子と共に、モルホリン(モルホリンは、1または2個のメチルで置換されてもよい。)を表す。

- [17] CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である請求項1~5のいずれか記載の予防剤および/または治療剤。

- [18] 疾患修飾性抗リウマチ薬が、下記から選ばれる1または複数の薬剤である請求項1~17のいずれか記載の予防剤および/または治療剤:

レフルノミド、メソトレキサート、D-ペニシラミン、ブシラミン、サラゾスルファピリジン

、アクタリット、ロベンザリット、シクロフォスファミド、クロラムブシル、ミゾリビン、アザチオプリン、オーラノフィン、金チオマレイン酸ナトリウム、金チオ硫酸、金チオグルコース、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン、クロロキン、タクロリムス、エタネルセプト、インフリキシマブ、アナキンラ、ケリキシマブ、アダリムマブ、リツキシマブ、およびヒト型抗IL-6R抗体。

[19] 疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである請求項18記載の予防剤および／または治療剤。

[20] 自己免疫疾患が、下記から選ばれるいずれかの疾患である請求項1～19のいずれか記載の予防剤および／または治療剤：

関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本病、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、I型糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性血液性疾患、自己免疫性溶血性貧血、突発性血小板減少症、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、間質性肺線維症およびシェーグレン症候群。

[21] 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項20記載の予防剤および／または治療剤。

[22] CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強剤。

[23] CaMKII阻害剤が、下記の工程(a)、(b)および(c)を含むスクリーニング方法により選択された物質である請求項22記載の増強剤：

(a) 被験物質とCaMKII酵素および基質とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたCaMKII酵素による基質のリン酸化レベルを測定し、該リン酸化レベルを、被験物質を接触させない対照酵素の上記リン酸化レベルと比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CaMKIIの活性を阻害する被験物質を選択する

工程。

- [24] CaMKII阻害剤が、10 μ Mの濃度におけるCaMKIIの阻害率が30%以上である物質である請求項23記載の増強剤。
- [25] CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、請求項22記載の増強剤。
- [26] 疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである請求項22～25のいずれか記載の増強剤。
- [27] 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項22～26のいずれか記載の増強剤。
- [28] 第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果の合計を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。
- [29] 第2医薬組成物と共に用いて自己免疫疾患に罹患した哺乳動物において自己免疫疾患予防および／または治療効果を達成するための第1医薬組成物であって、該効果は該第1及び第2医薬組成物を別々に投与することによって達成される自己免疫疾患予防および／または治療効果を上回り、該第2医薬組成物は疾患修飾性抗リウマチ薬を含み、該第1医薬組成物はCaMKII阻害剤を含む組成物。
- [30] CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ}イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、請求項28または29のいずれか記載の組成物。
- [31] 疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである請求項28～30のいずれか記載の組成物。
- [32] 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項28～31のいずれか記載の組成物。
- [33] 以下の(1)および(2)を含む商業パッケージ：
(1) CaMKII阻害剤を含有する医薬組成物；
(2) 当該医薬組成物を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して自己免疫疾患予防および

／または治療用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した、該医薬組成物に関する記載物。

[34] 以下の(1)および(2)を含む商業パッケージ:

(1) CaMKII阻害剤を含有する医薬組成物;

(2) 当該医薬組成物を、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果を増強する用途に使用することができるまたは使用すべきであることを記載した、該医薬組成物に関する記載物。

[35] CaMKII阻害剤が、3-[(1S)-1-(2-フルオロビフェニル-4-イル)エチル]-5-[[アミノ(モルフォリン-4-イル)メチレン]アミノ]イソキサゾールまたはその薬学上許容される塩である、請求項33または34記載の商業パッケージ。

[36] 疾患修飾性抗リウマチ薬がメソトレキサート、サラゾスルファピリジンまたはレフルノミドである請求項33～35のいずれか記載の商業パッケージ。

[37] 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項33～36のいずれか記載の商業パッケージ。

[38] CaMKII阻害剤を含む第1の組成物、および疾患修飾性抗リウマチ薬を含む第2の組成物をパッケージ内に含有する、自己免疫疾患予防および／または治療用のキット。

[39] 自己免疫疾患の予防および／または治療用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の使用。

[40] 疾患修飾性抗リウマチ薬と併用することを特徴とする自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤の製造のためのCaMKII阻害剤の使用。

[41] 疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患の予防および／または治療効果増強用医薬組成物を製造するための、CaMKII阻害剤の使用。

[42] CaMKII阻害剤を疾患修飾性抗リウマチ薬と併用して投与することを特徴とする自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

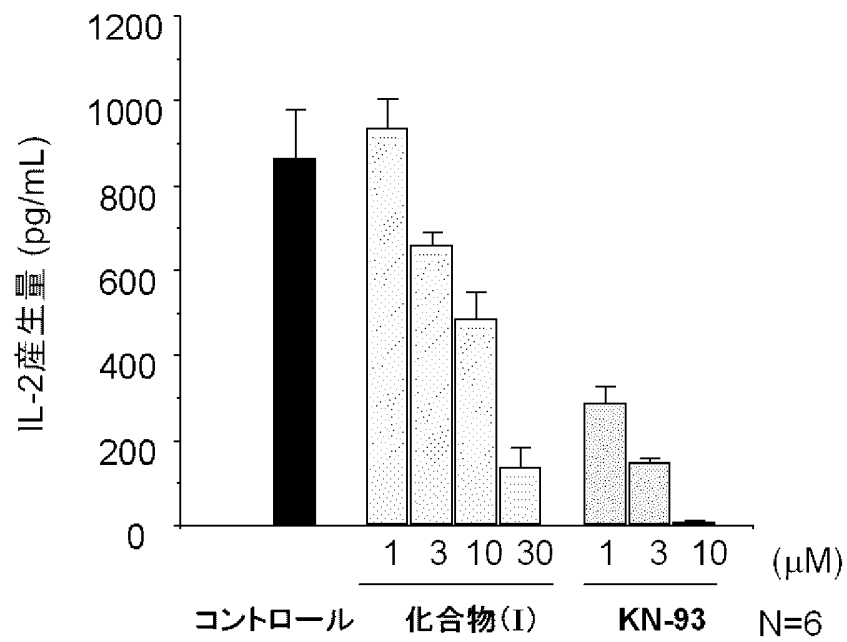
[43] CaMKII阻害剤を投与することを含む、疾患修飾性抗リウマチ薬による自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強方法。

[44] 疾患修飾性抗リウマチ薬によって十分な予防および／または治療効果が得られな

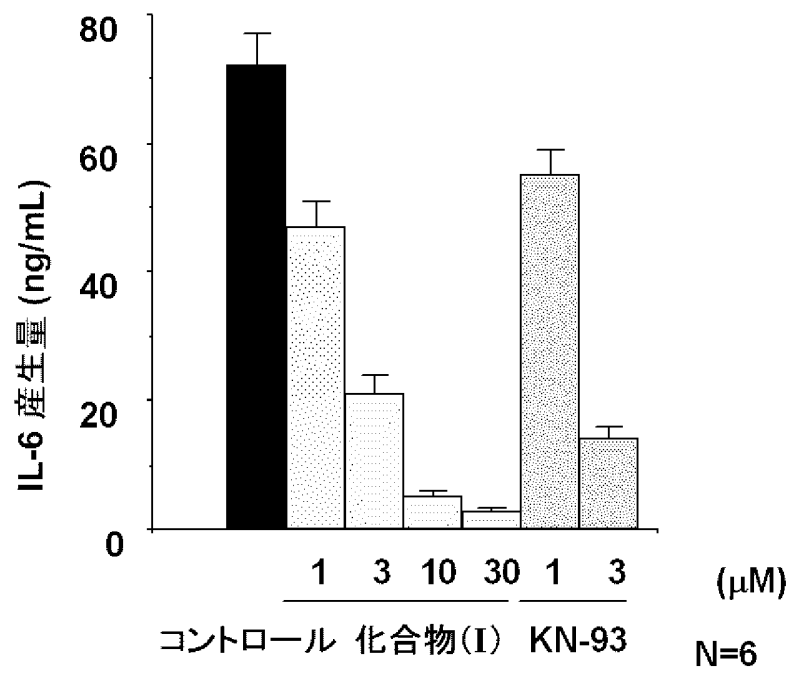
い自己免疫疾患に罹患した哺乳動物に対して、疾患修飾性抗リウマチ薬の自己免疫疾患予防および／または治療効果の増強に有効な量のCaMKII阻害剤を投与することを含む自己免疫疾患の予防および／または治療方法。

- [45] CaMKII阻害剤と疾患修飾性抗リウマチ薬とを組み合わせる自己免疫疾患の予防剤および／または治療剤。
- [46] CaMKII阻害剤と疾患修飾性抗リウマチ薬とを組み合わせる医薬。
- [47] CaMKII阻害剤および疾患修飾性抗リウマチ薬を含有する関節破壊抑制剤。
- [48] 疾患修飾性抗リウマチ薬と併用するための、CaMKII阻害剤を含有する関節破壊抑制剤。
- [49] CaMKII阻害剤を有効成分として含有する、疾患修飾性抗リウマチ薬による関節破壊効果の増強剤。

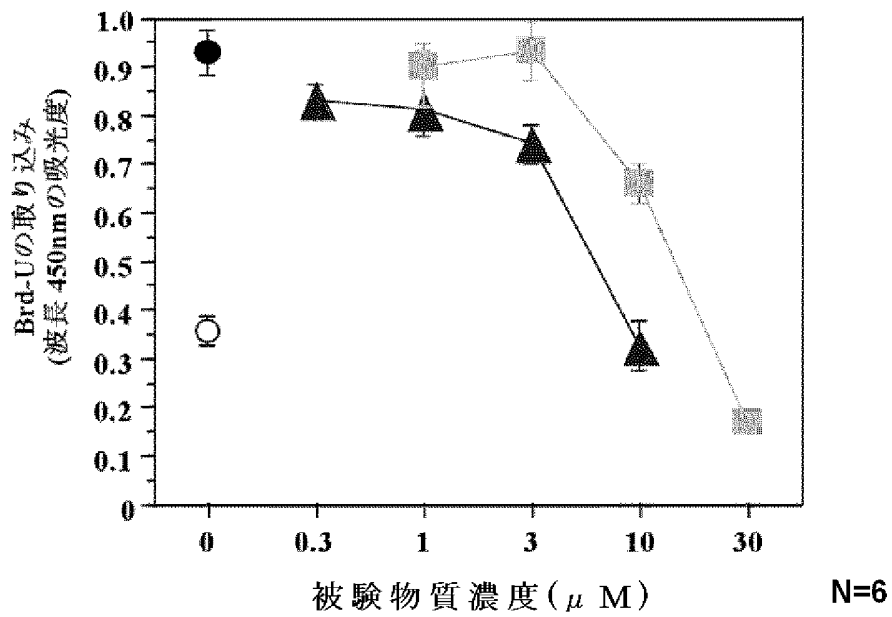
[図1]



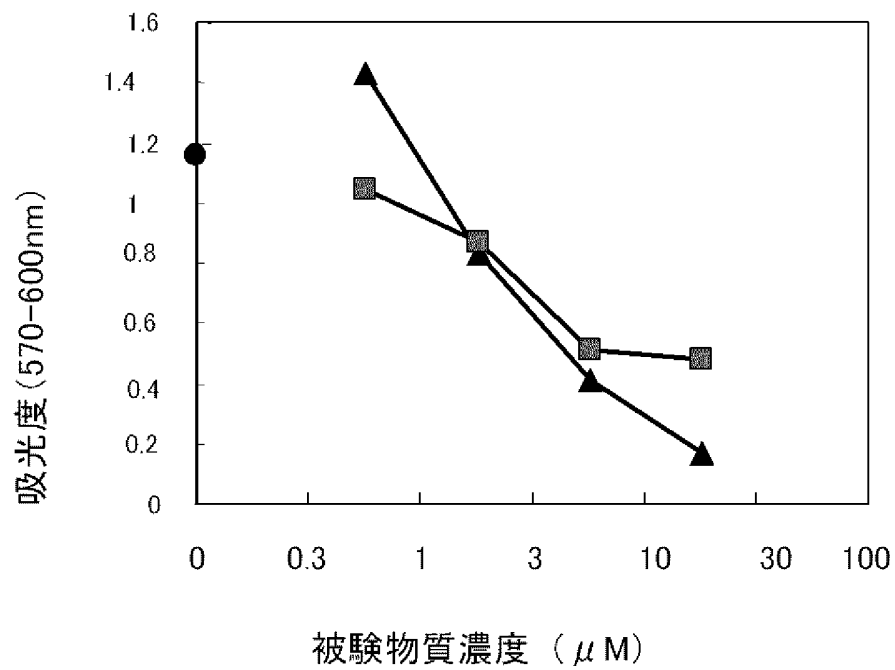
[図2]



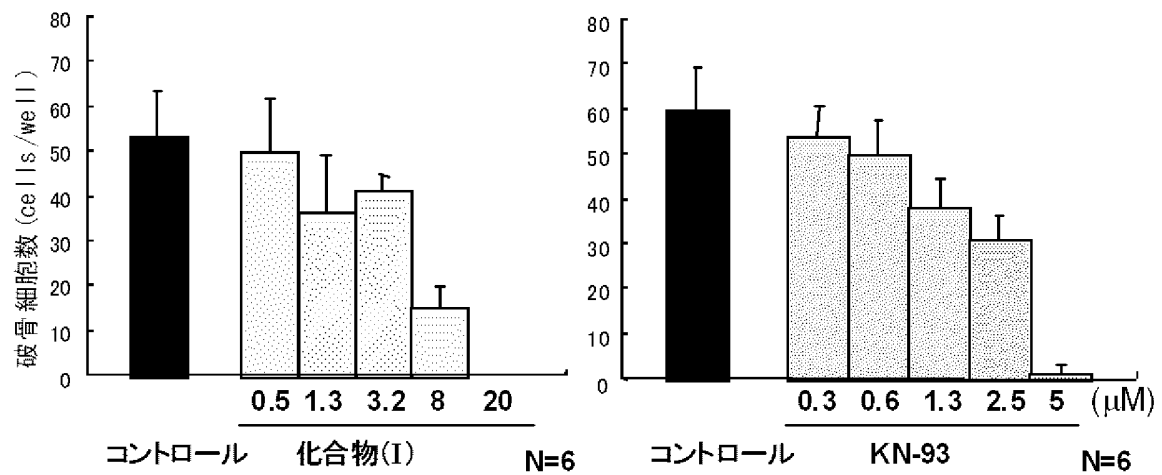
[図3]



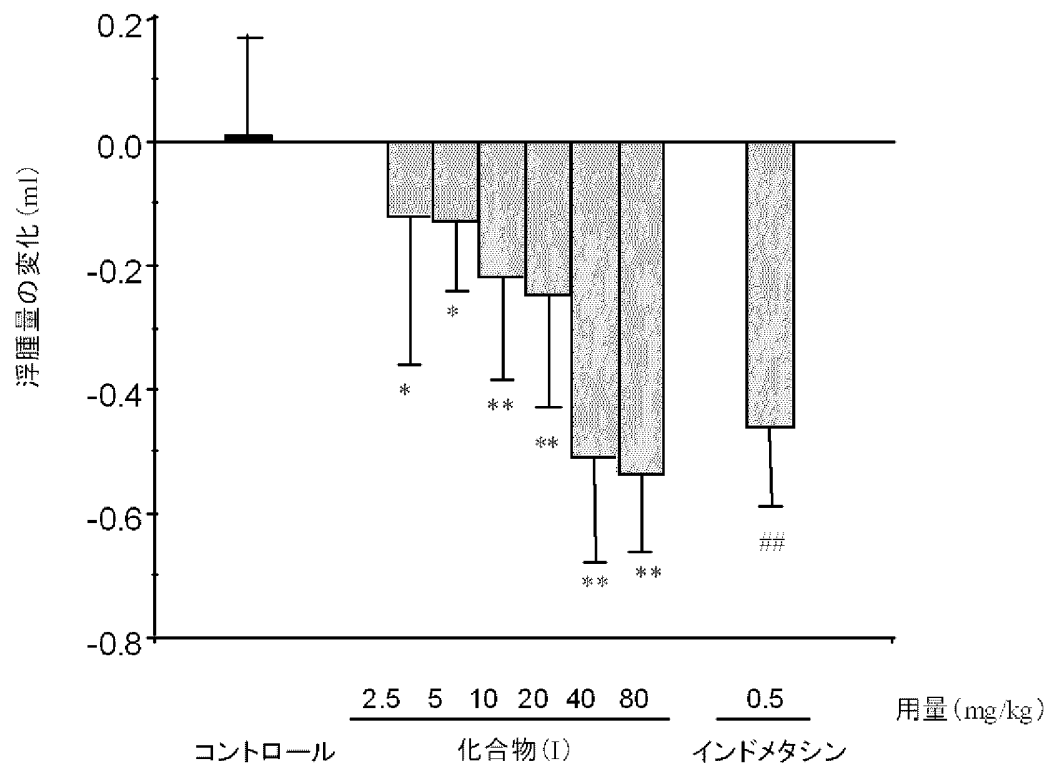
[図4]



[図5]



[図6]

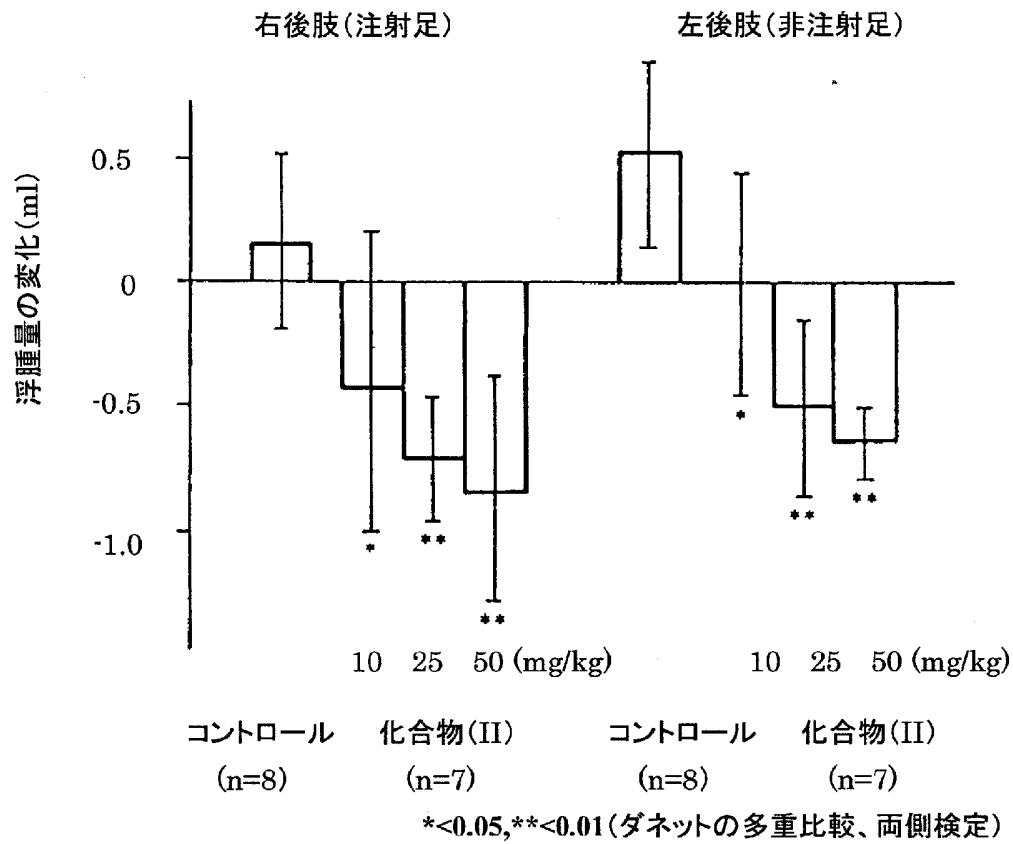


N=10.

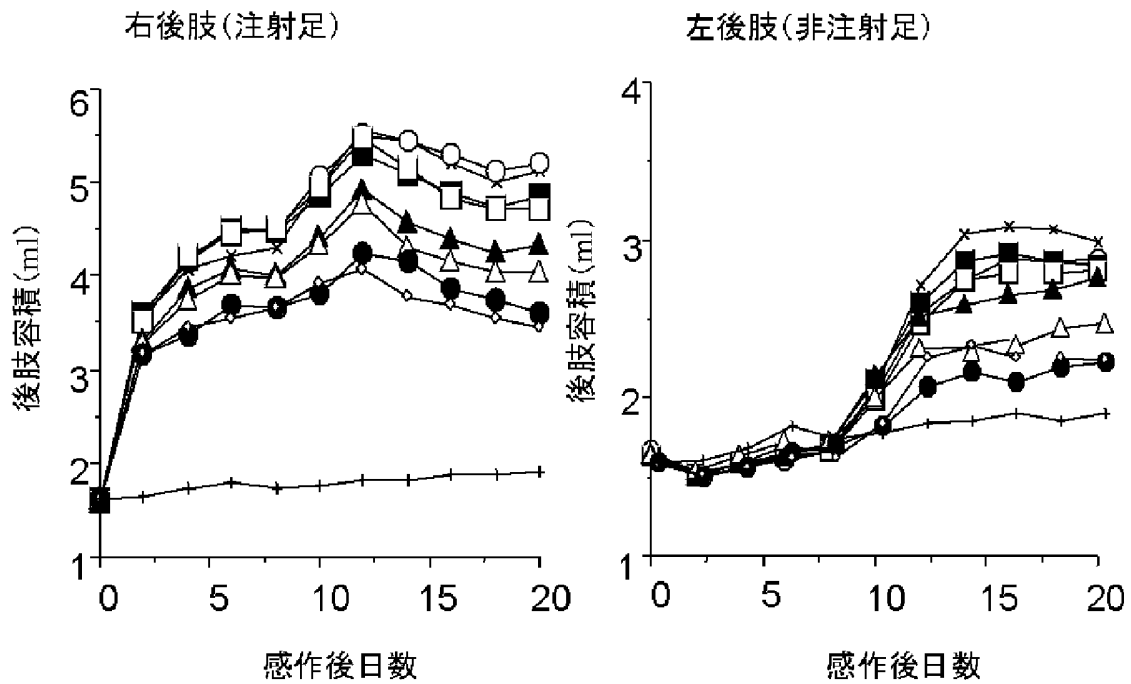
*p<0.05, **p<0.01 (ウィリアムズの多重比較、片側検定)

###p<0.01 (Studentのt検定、両側検定)

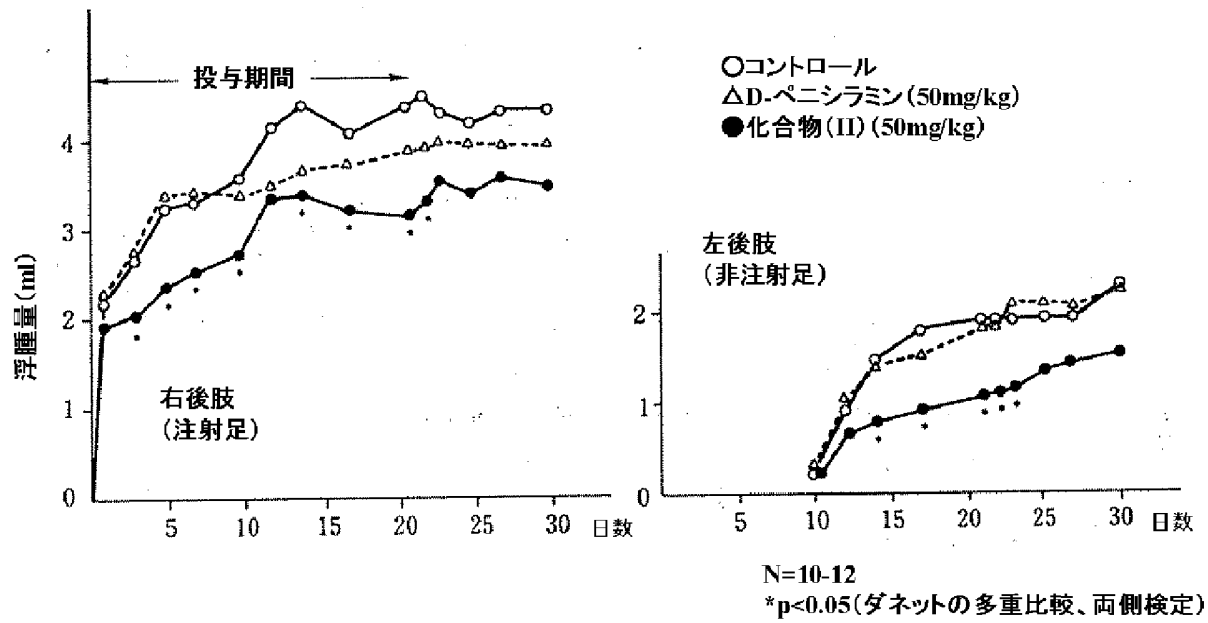
[図7]



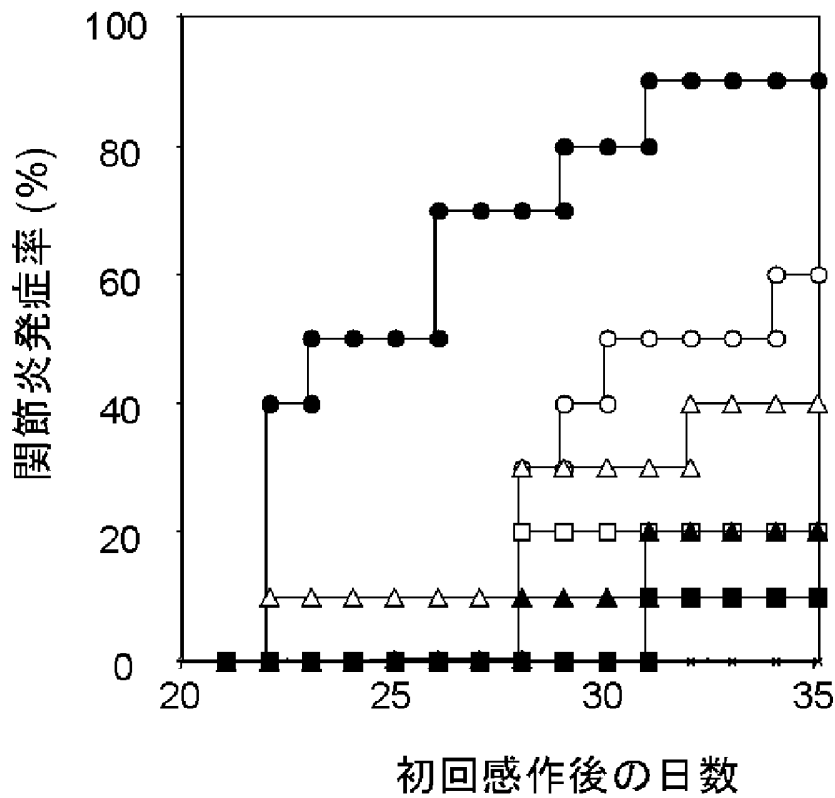
[図8]



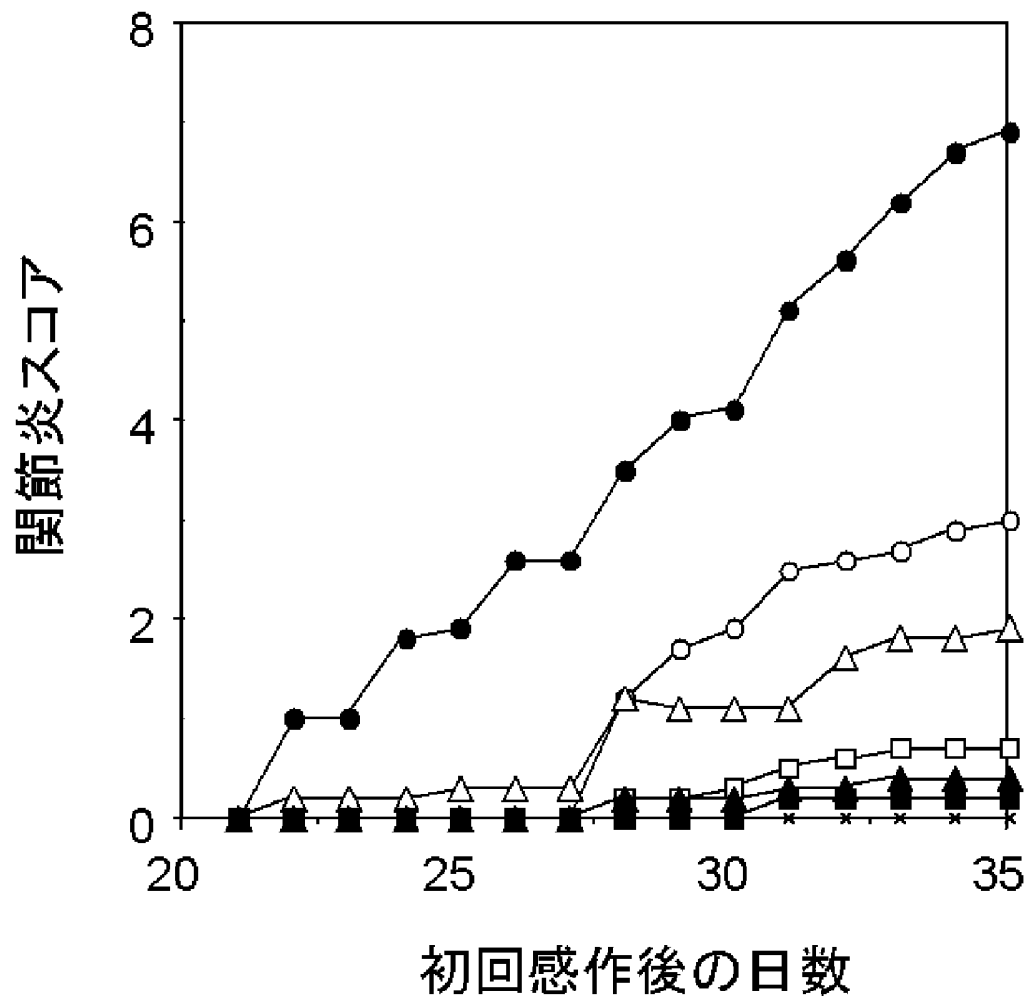
[図9]



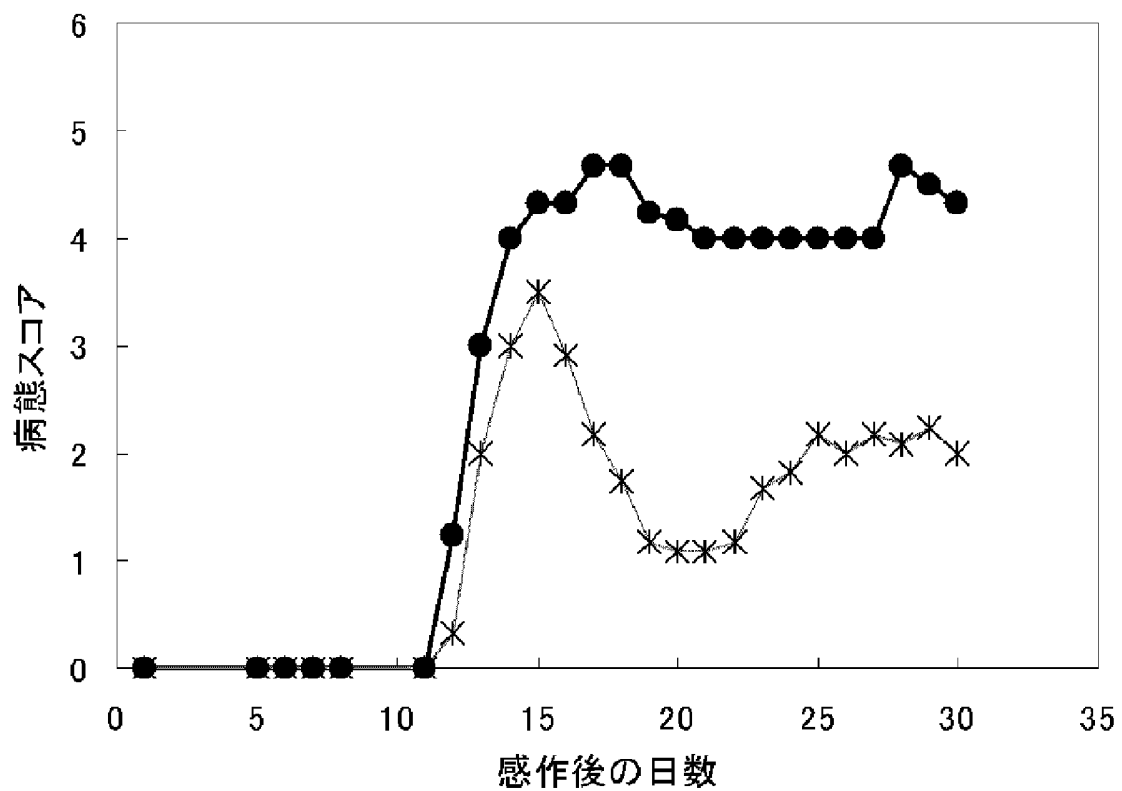
[図10]



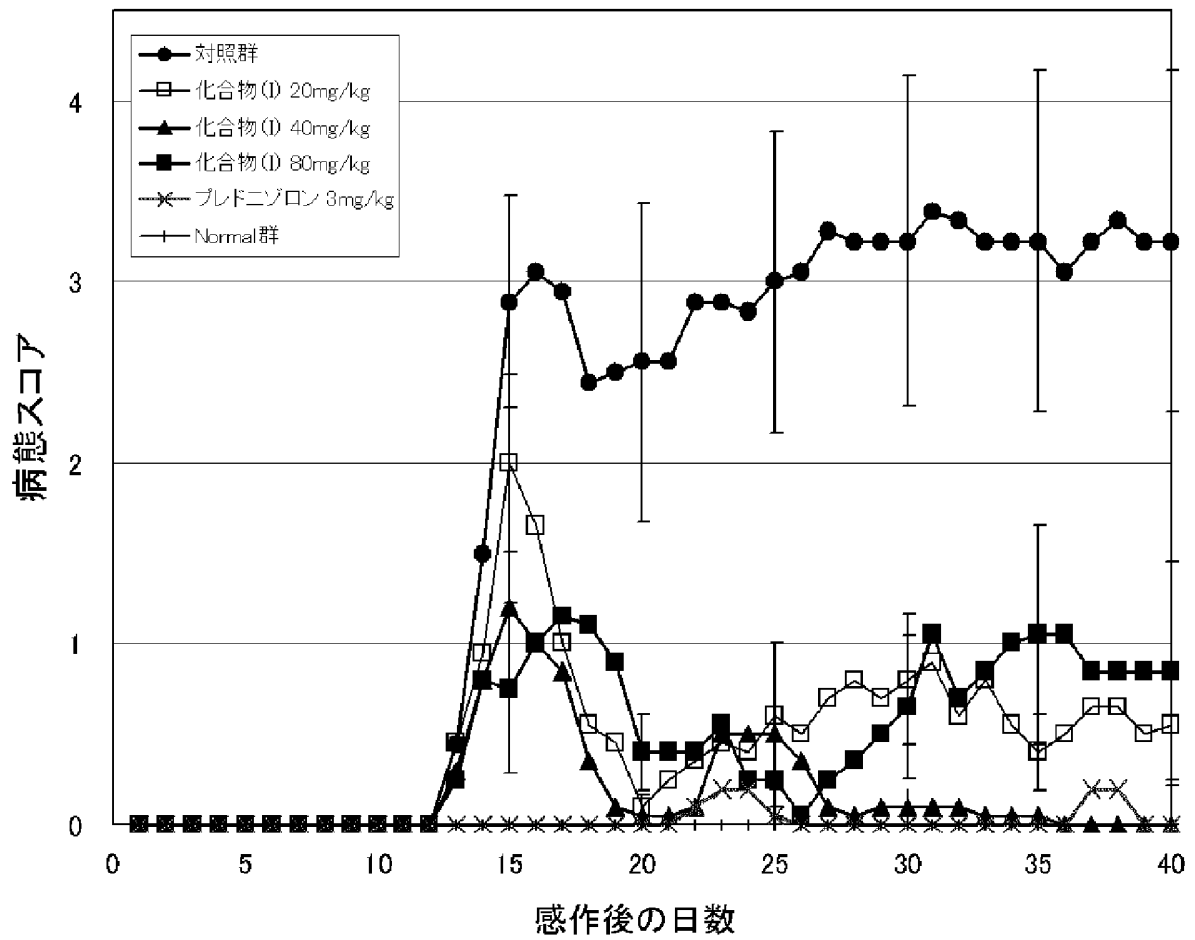
[図11]



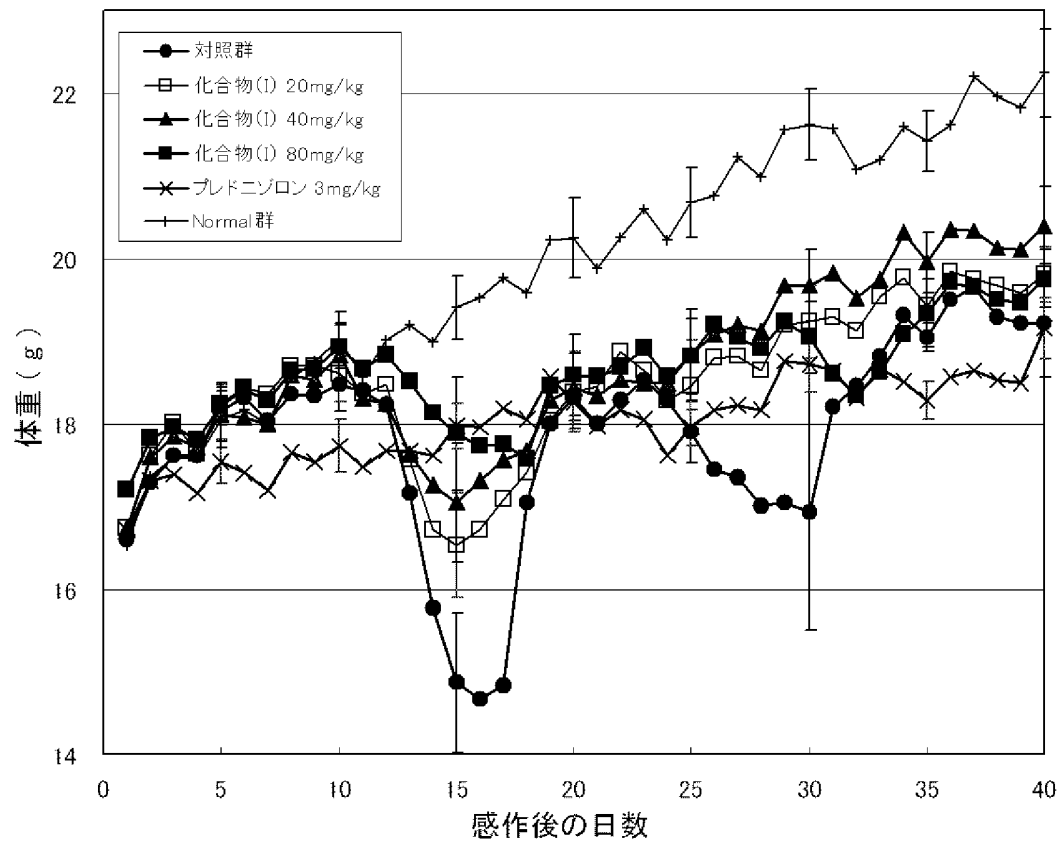
[図12]



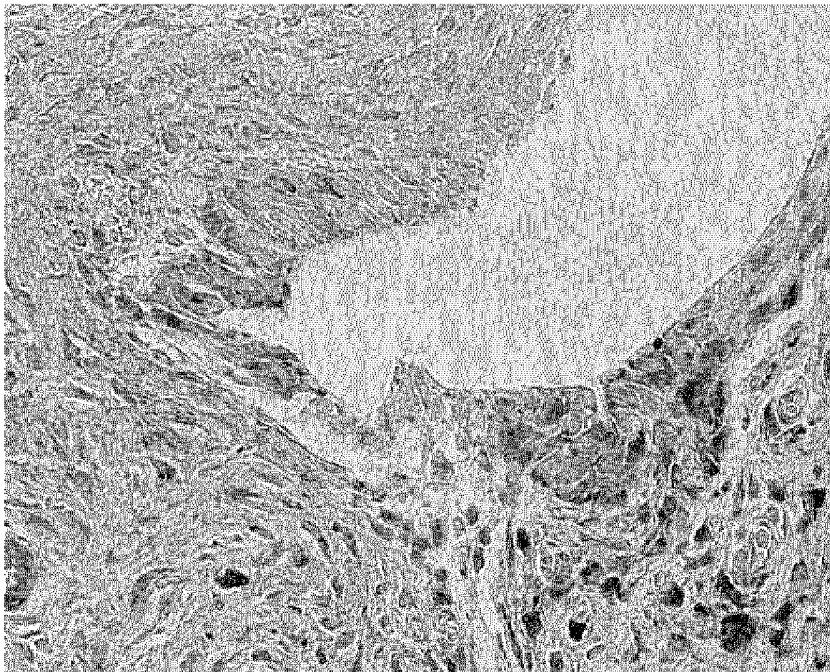
[図13]



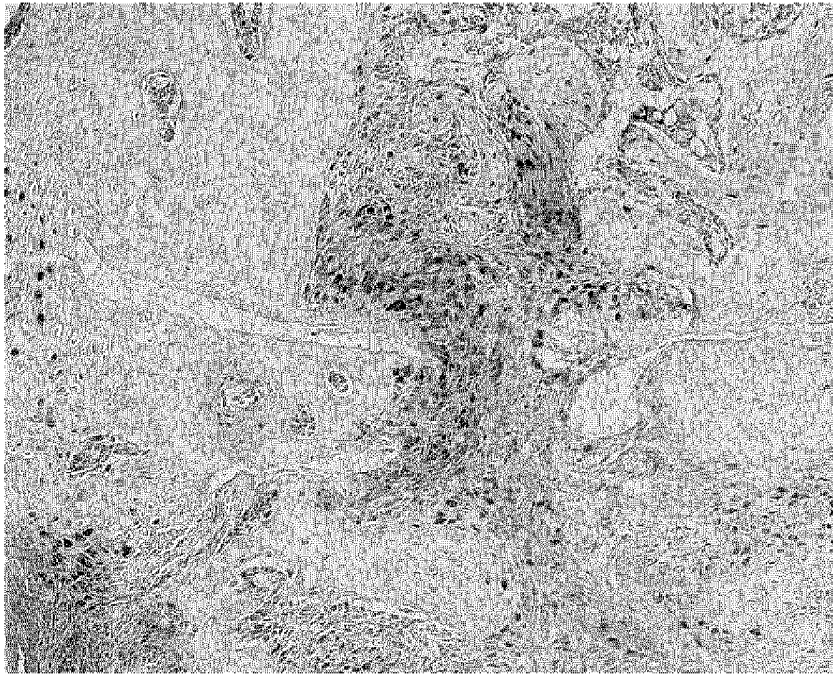
[図14]



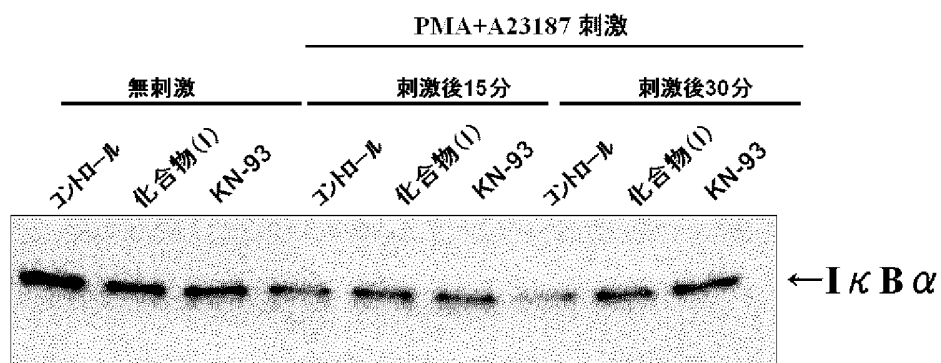
[図15]



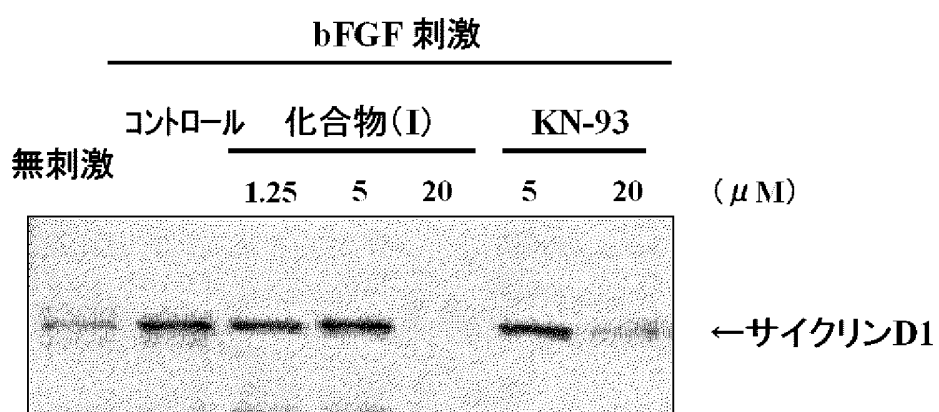
[図16]



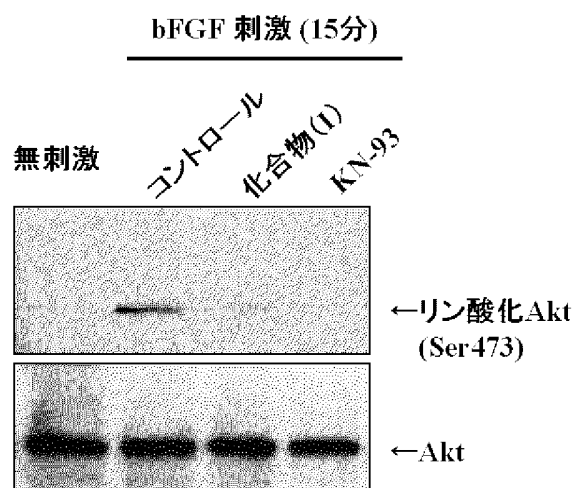
[図17]



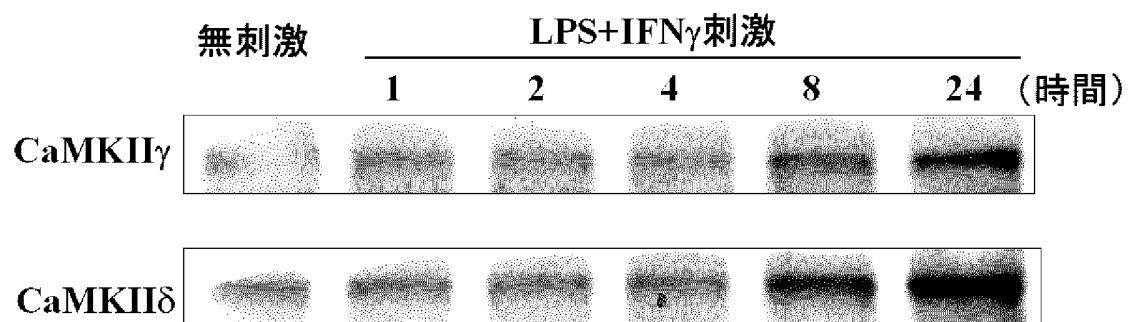
[図18]



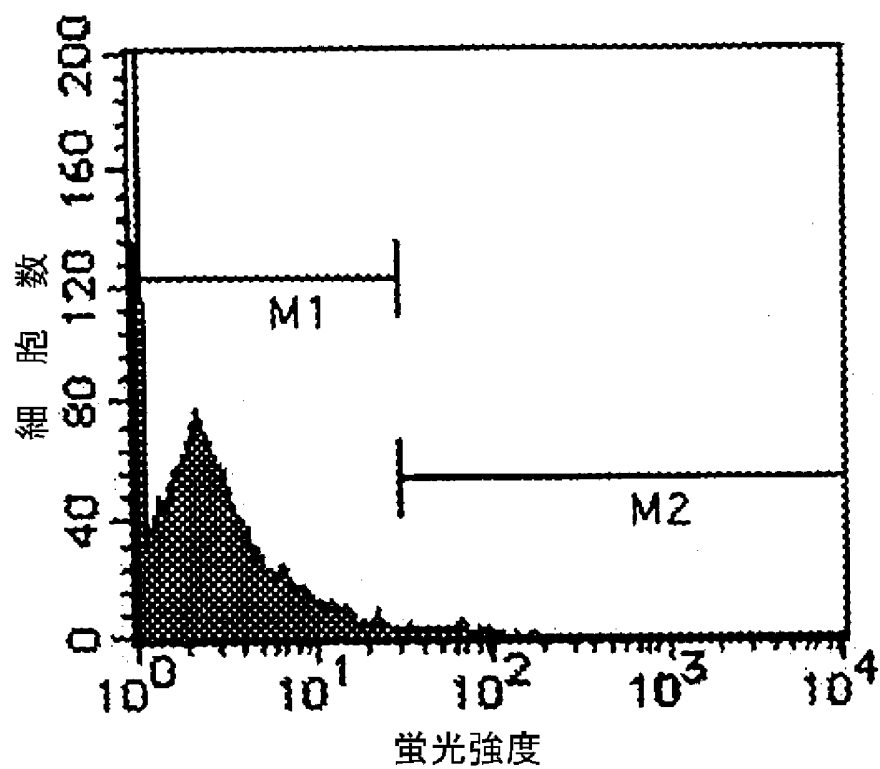
[図19]



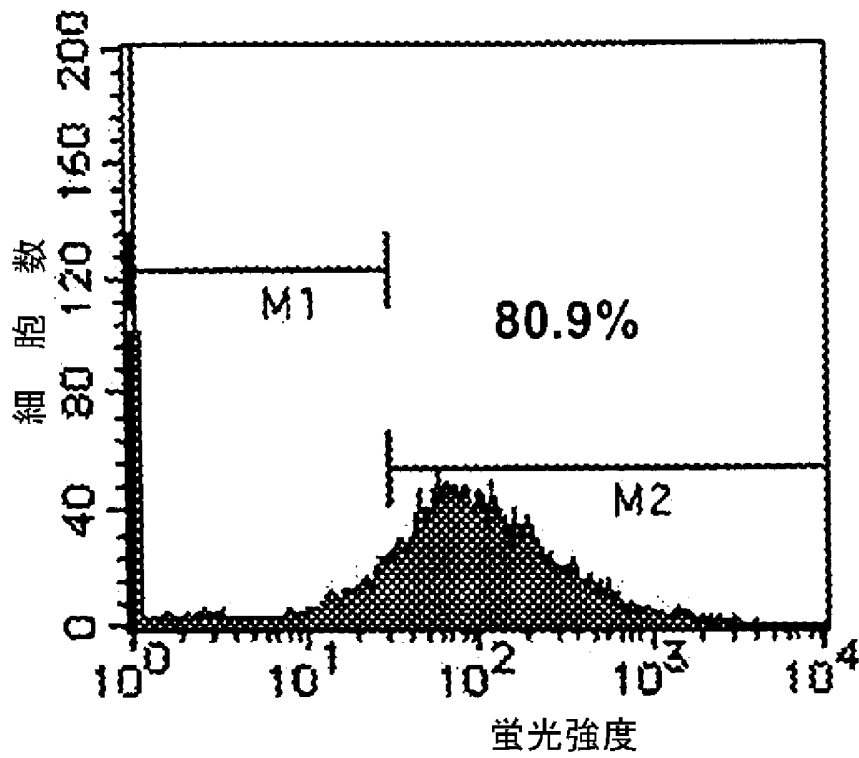
[図20]



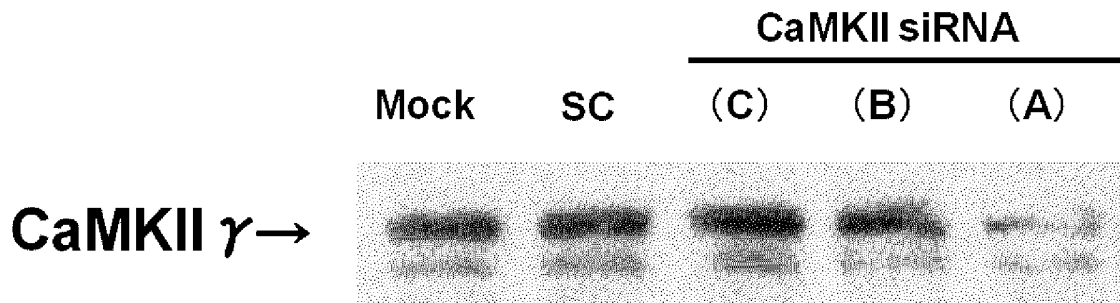
[図21]



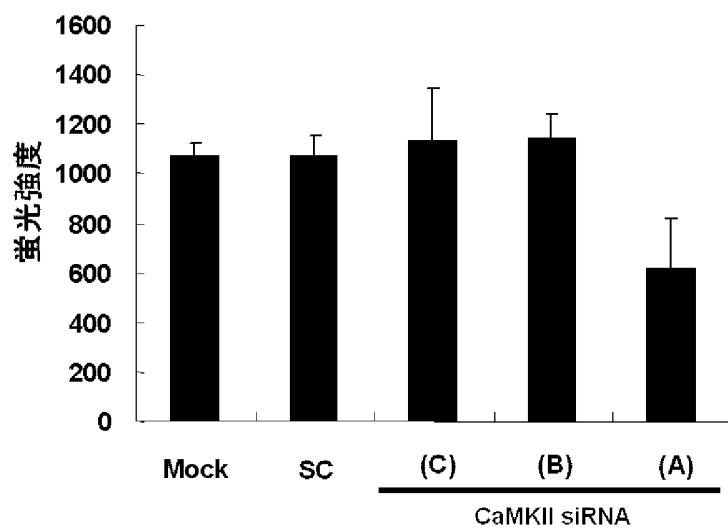
[図22]



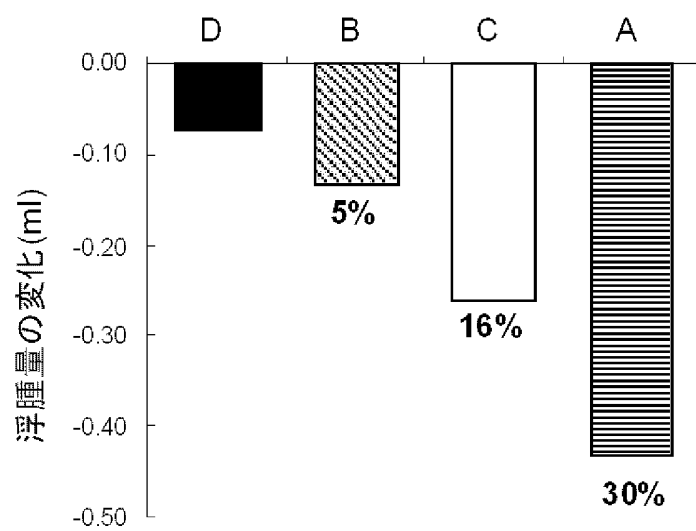
[図23]



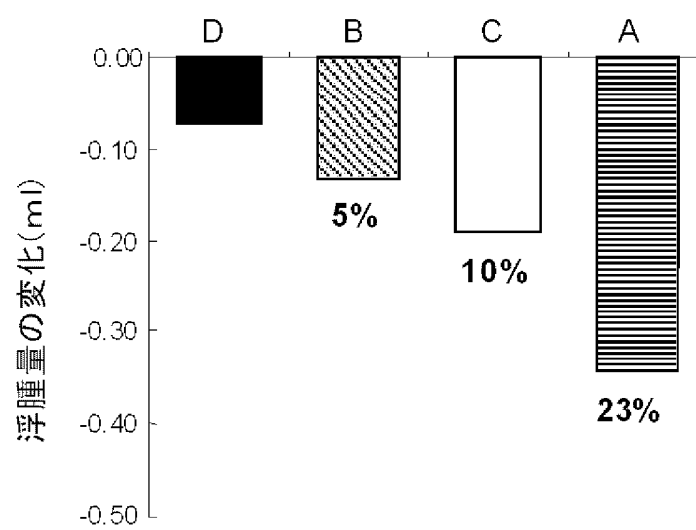
[図24]



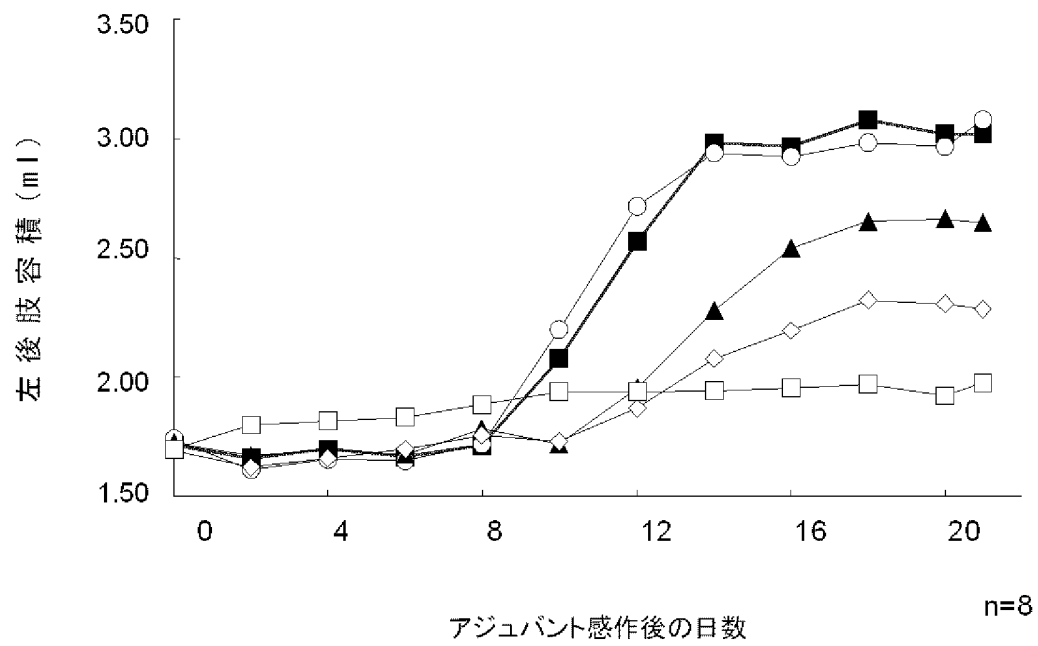
[図25]



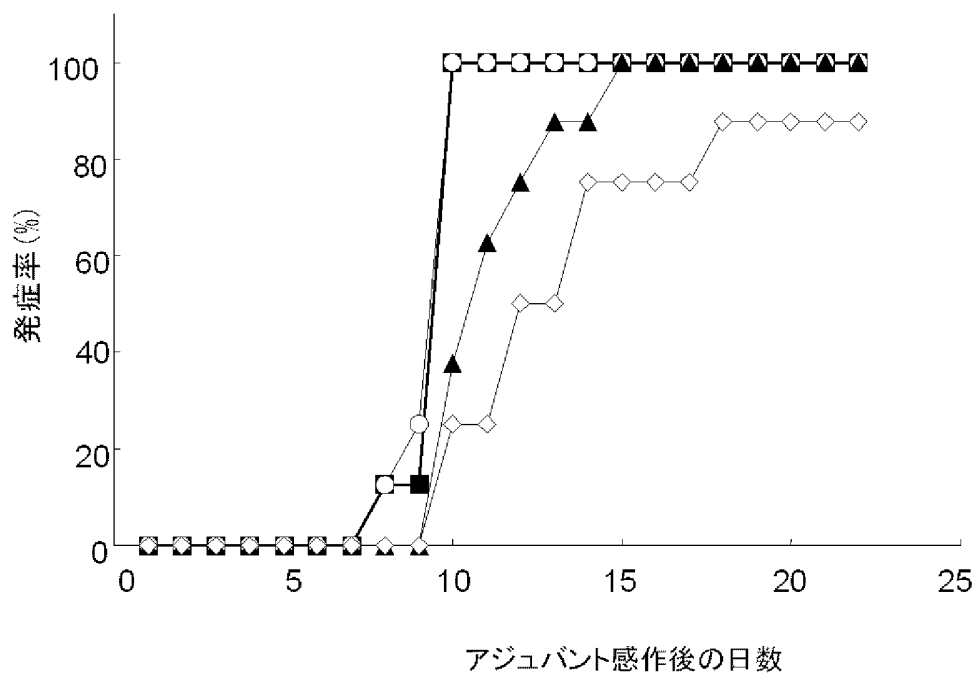
[図26]



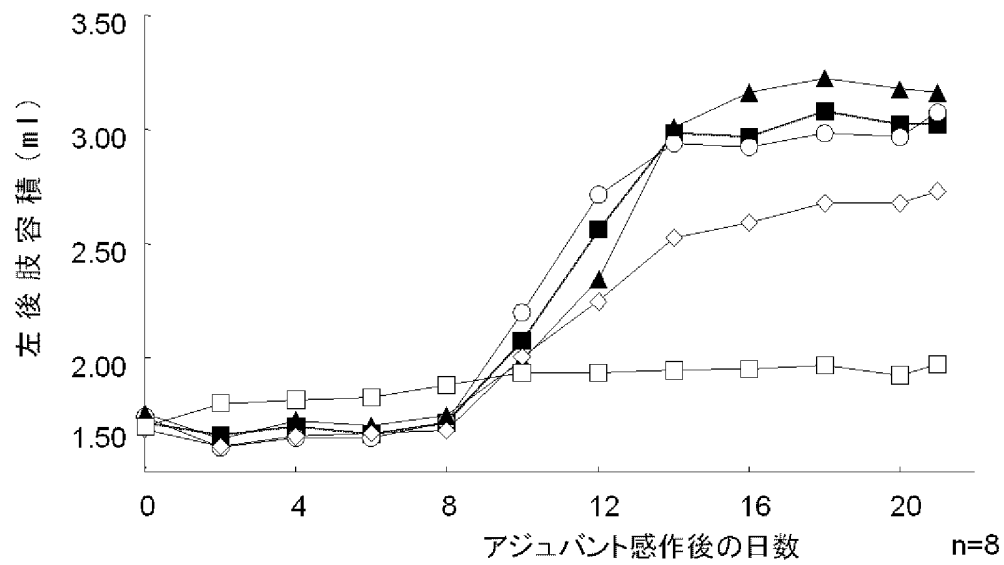
[図27]



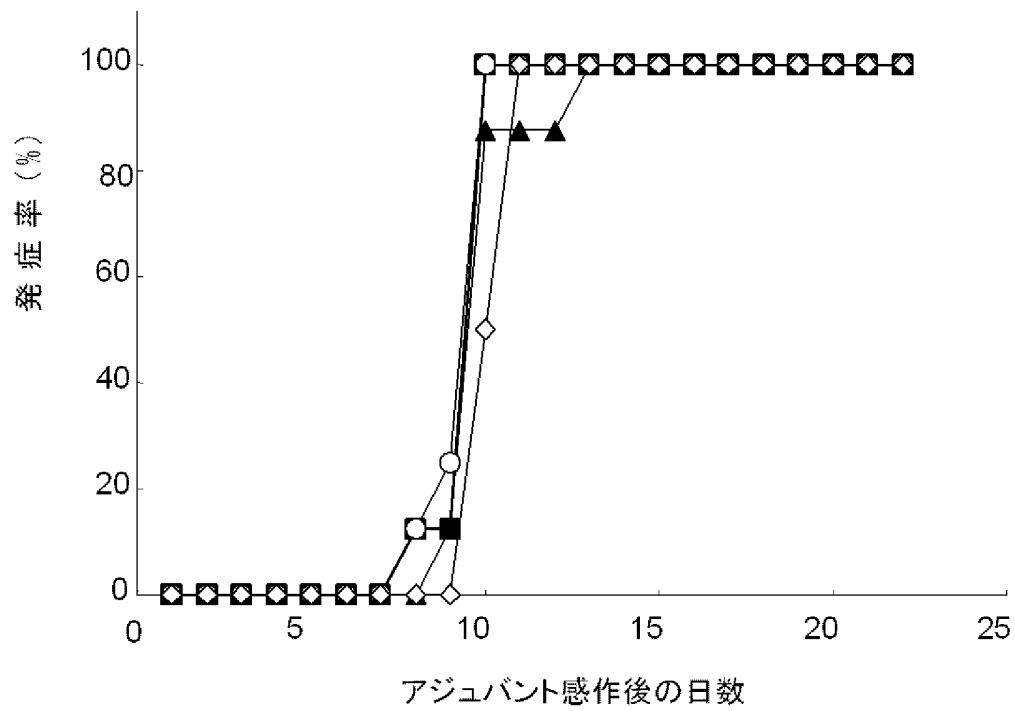
[図28]



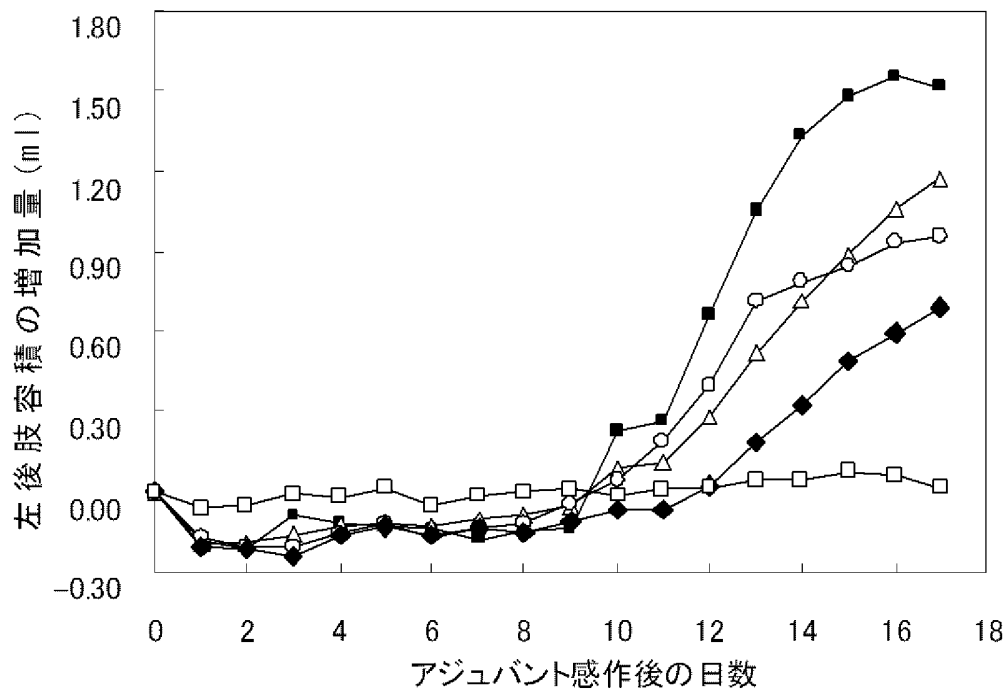
[図29]



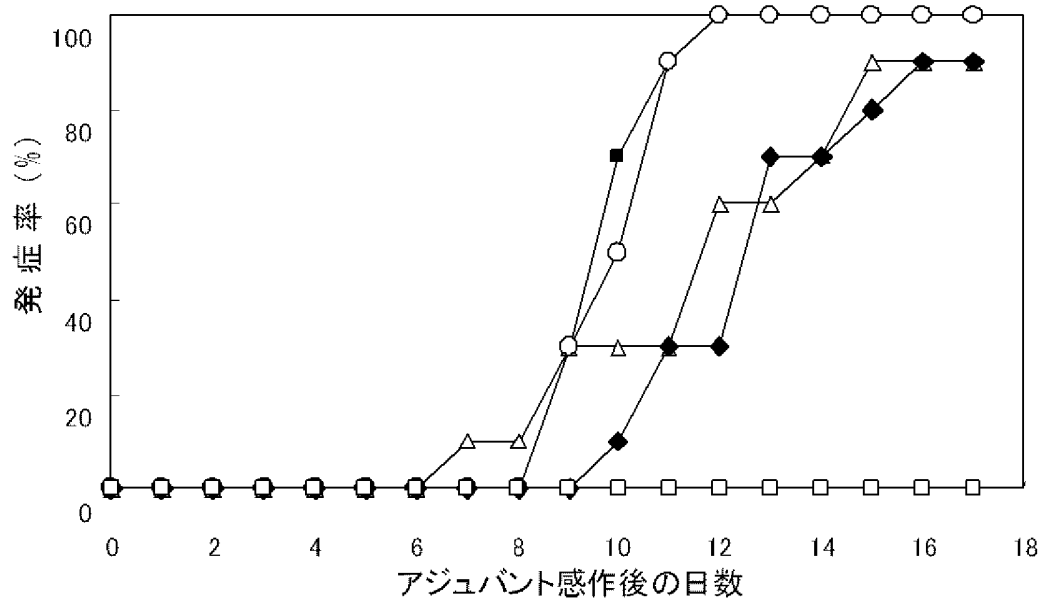
[図30]



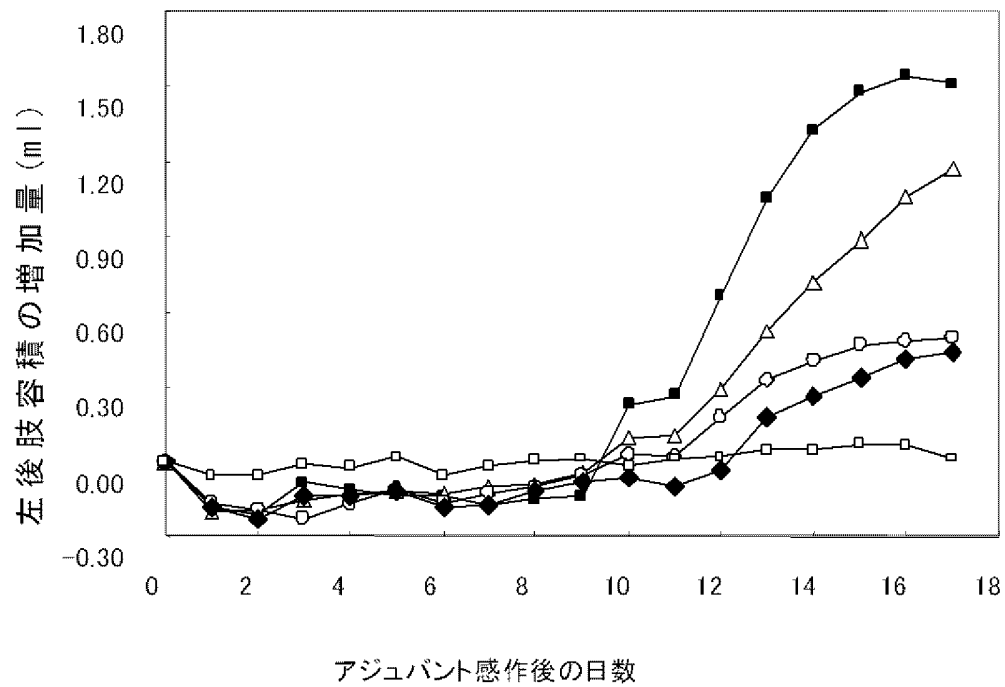
[図31]



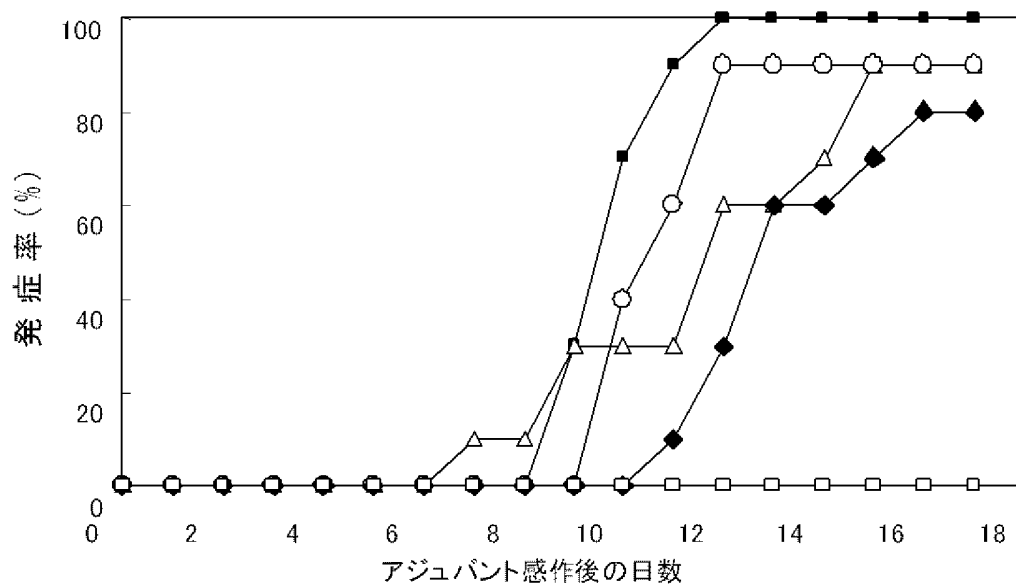
[図32]



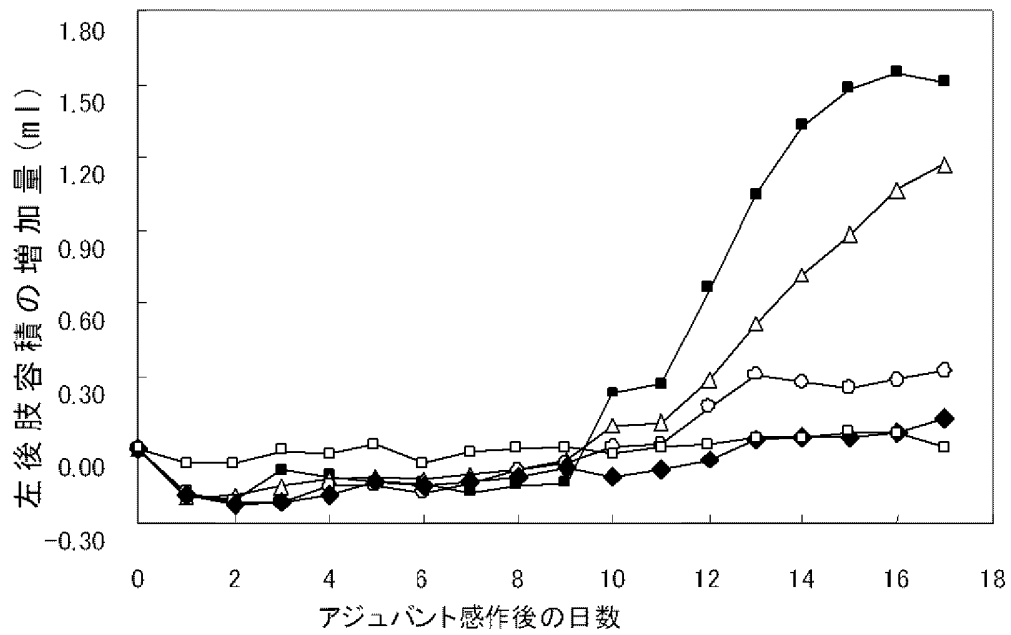
[図33]



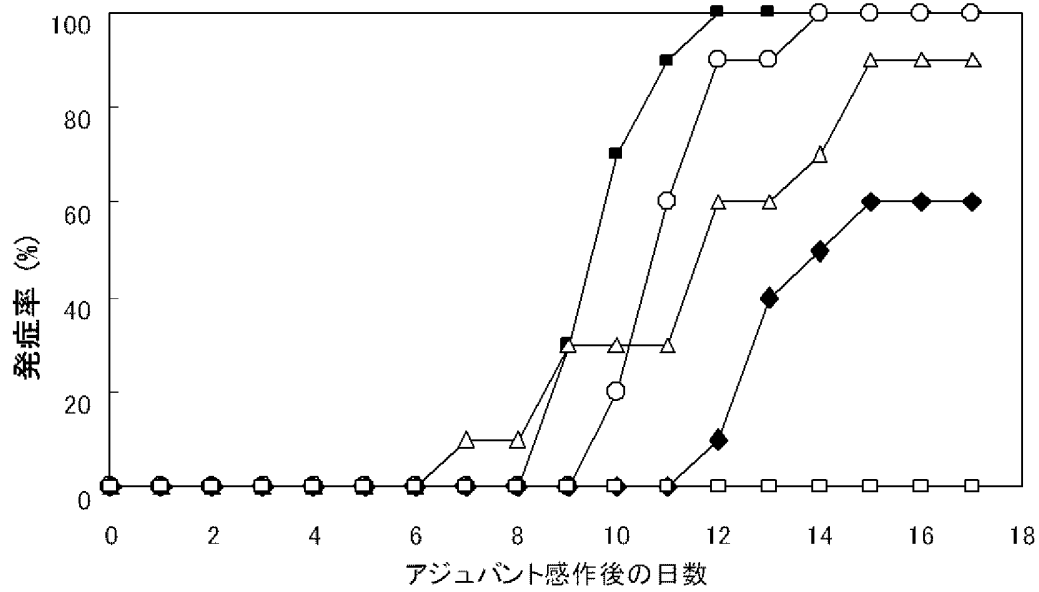
[図34]



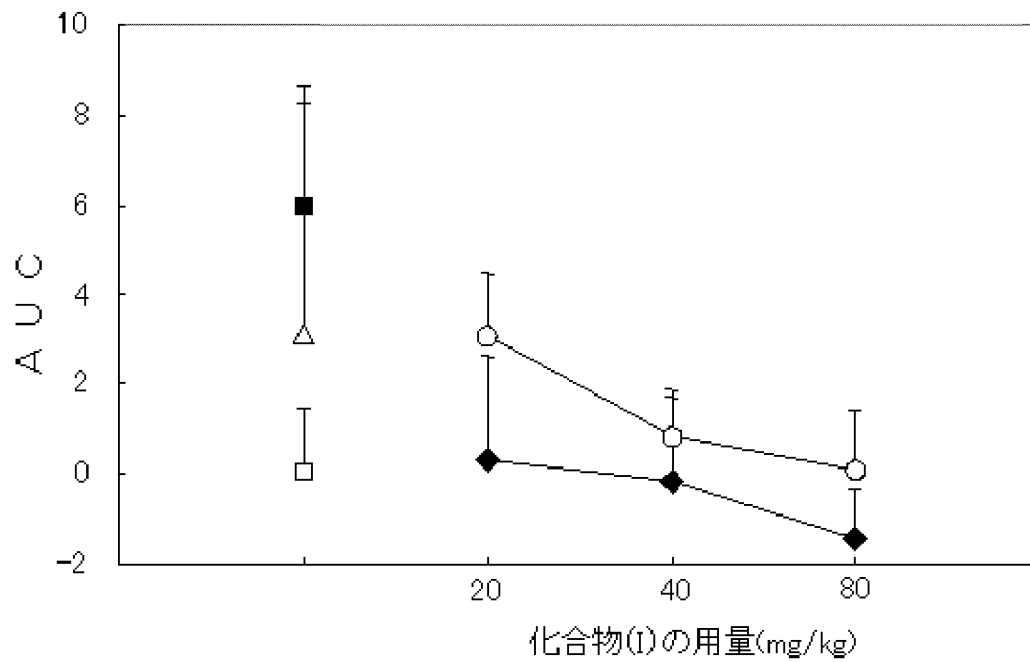
[図35]



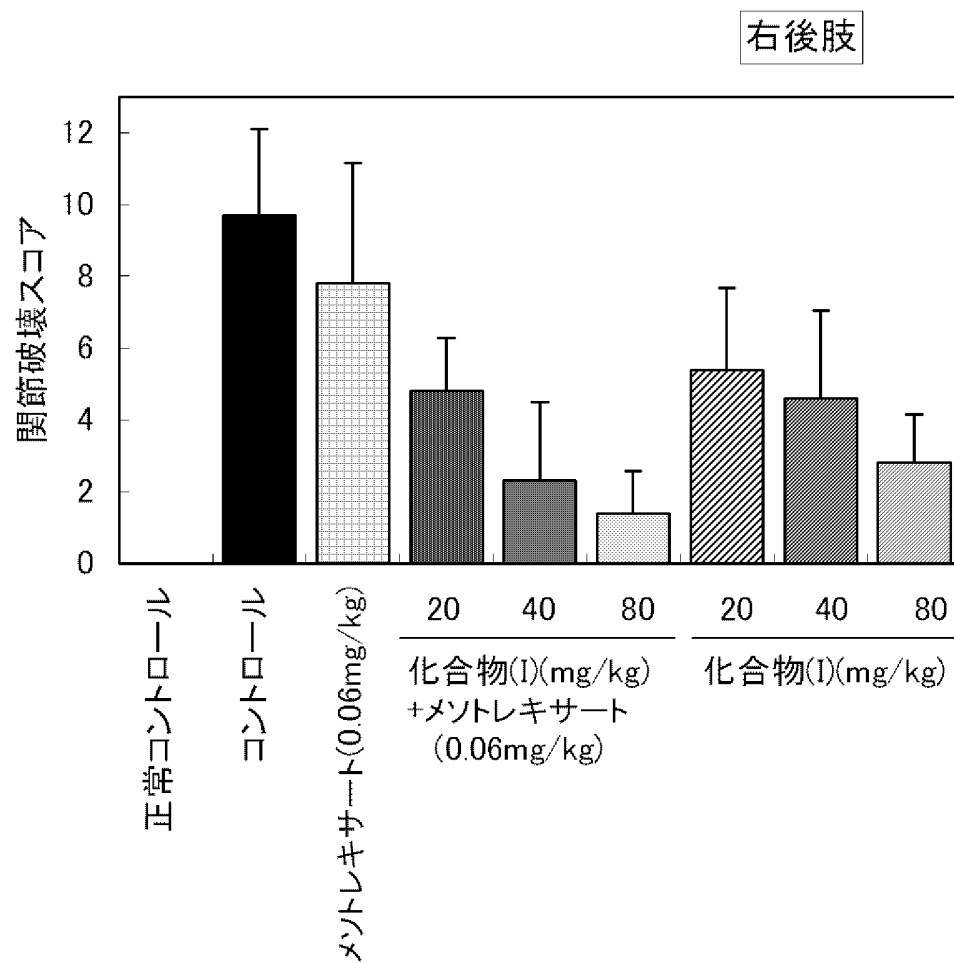
[図36]



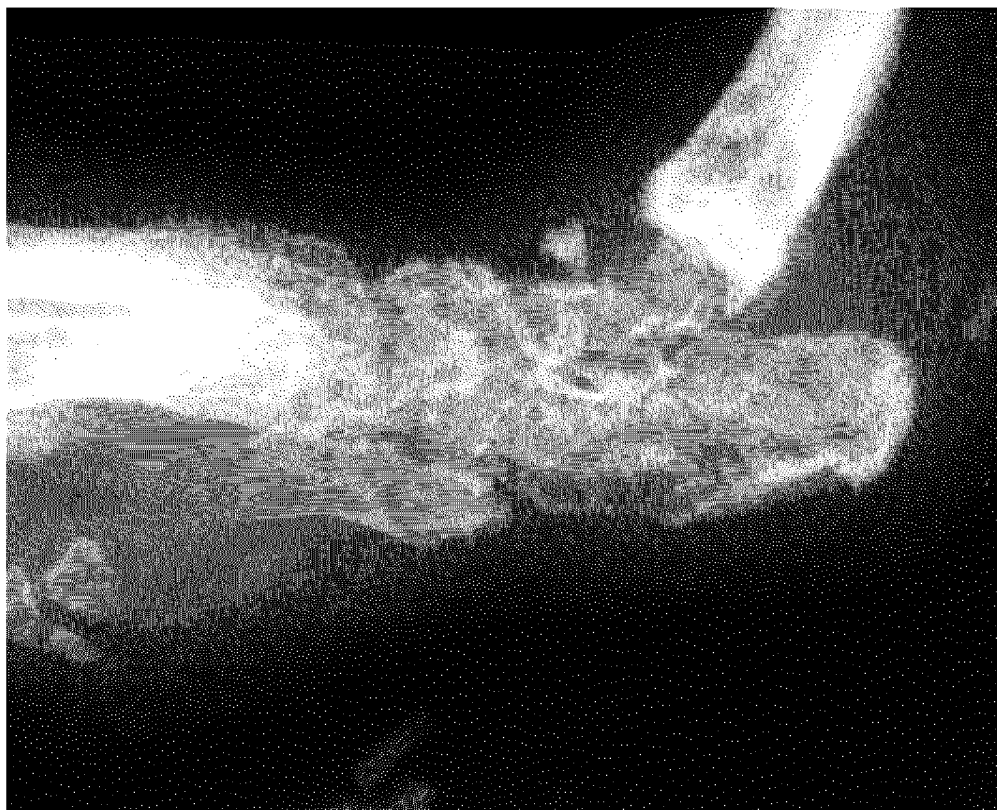
[図37]



[図38]



[図39]



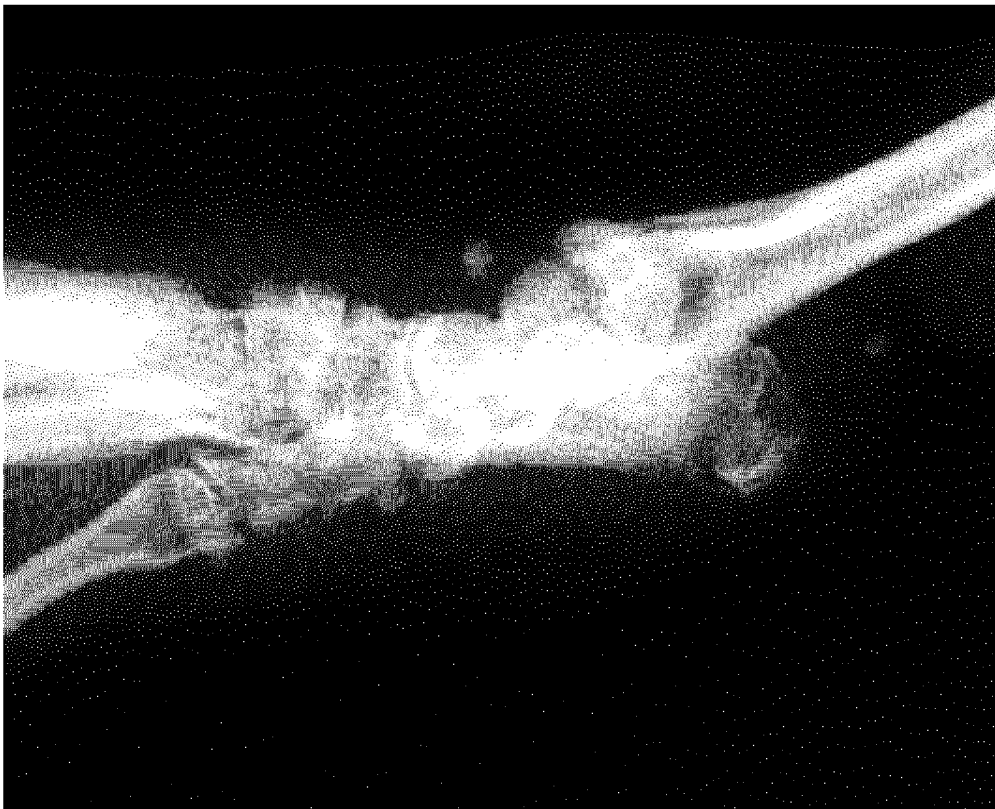
[図40]



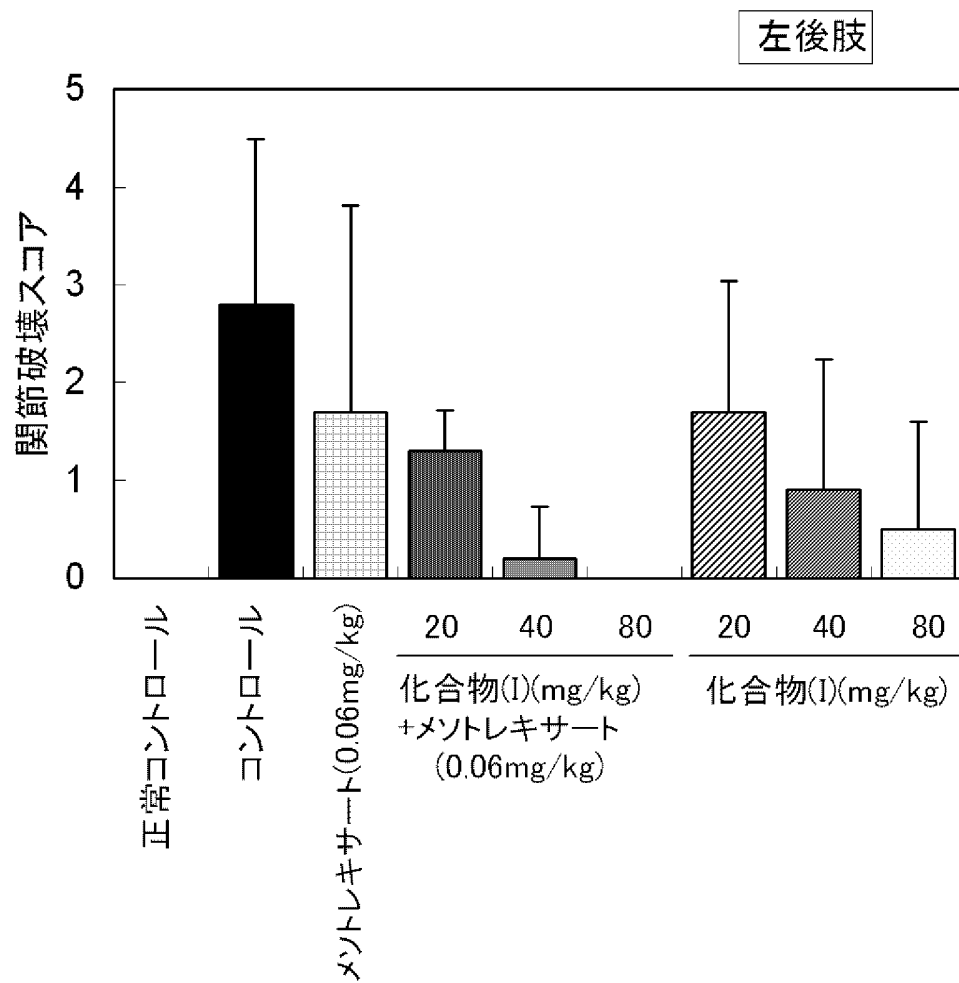
[図41]



[図42]



[図43]



[図44]



[図45]



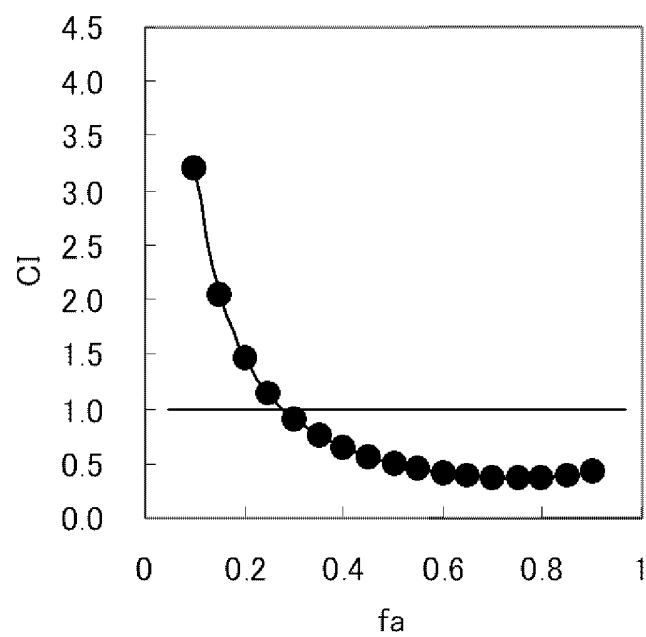
[図46]



[図47]



[図48]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/06 (2006.01), A61K31/18 (2006.01), A61K31/42 (2006.01), A61K31/426 (2006.01), A61K31/519 (2006.01), A61K31/5377 (2006.01), A61K31/635 (2006.01), A61P1/04 (2006.01), A61P1/16 (2006.01), A61P3/00 (2006.01), 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) A61K45/06 (2006.01), A61K31/18 (2006.01), A61K31/42 (2006.01), A61K31/426 (2006.01), A61K31/519 (2006.01), A61K31/5377 (2006.01), A61K31/635 (2006.01), A61P1/04 (2006.01), A61P1/16 (2006.01), A61P3/00 (2006.01), 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 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPLUS (JOIS), JSTPLUS (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/39552 A1 (ALTANA PHARMA AG.), 15 May, 2003 (15.05.03), Claims 1 to 20 & JP 2005-508983 A & EP 1448202 A	1-41, 45-49
Y	WO 03/41650 A2 (IMMUNEX CORP.), 22 May, 2003 (22.05.03), Claim 9 & JP 2005-532256 A & EP 1453540 A	1-41, 45-49
Y	JP 2000-72776 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 March, 2000 (07.03.00), Par. No. [0034] & WO 99/65916 A1 & EP 1087977 A	1-41, 45-49
☒ 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 15 December, 2005 (15.12.05)		Date of mailing of the international search report 27 December, 2005 (27.12.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-146903 A (Sankyo Co., Ltd.), 21 May, 2003 (21.05.03), Claims 4 to 5 & WO 03/20768 A1	1-41, 45-49
Y	JP 11-240873 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 07 September, 1999 (07.09.99), Claims 1 to 16 & WO 98/47880 A1 & EP 979226 A1	1-41, 45-49
Y	ROTHENBERG Ralph J., EFFECTS OF CALMODULIN INHIBITORS ON RABBIT SYNOVIOCYTE PHOSPHOLIPASE A ₂ , PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND MEDICINE, 1987, Vol.29, No.1, pages 61 to 69	1-41, 45-49
Y	JP 11-152298 A (Director General, Agency of Industrial Science and Technology), 08 June, 1999 (08.06.99), Claim 2; Par. No. [0017] (Family: none)	1-41, 45-49
Y	WO 03/29428 A2 (VANDERBILT UNIVERSITY), 10 April, 2003 (10.04.03), Claims 1 to 8 & JP 2005-504829 A & EP 1439849 A2	1-41, 45-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020221

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P3/08(2006.01), **A61P3/10**(2006.01), **A61P5/14**(2006.01), **A61P7/00**
(2006.01), **A61P7/04**(2006.01), **A61P7/06**(2006.01), **A61P11/00**(2006.01),
A61P13/02(2006.01), **A61P15/08**(2006.01), **A61P15/12**(2006.01), **A61P17/00**
(2006.01), **A61P19/02**(2006.01), **A61P19/04**(2006.01), **A61P21/00**(2006.01),
A61P21/04(2006.01), **A61P25/00**(2006.01), **A61P27/02**(2006.01), **A61P29/00**
(2006.01), **A61P31/04**(2006.01), **A61P37/00**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01),
C07D261/14(2006.01), **C07D277/20**(2006.01), **C07D277/42**(2006.01)

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61P3/08(2006.01), **A61P3/10**(2006.01), **A61P5/14**(2006.01), **A61P7/00**
(2006.01), **A61P7/04**(2006.01), **A61P7/06**(2006.01), **A61P11/00**(2006.01),
A61P13/02(2006.01), **A61P15/08**(2006.01), **A61P15/12**(2006.01), **A61P17/00**
(2006.01), **A61P19/02**(2006.01), **A61P19/04**(2006.01), **A61P21/00**(2006.01),
A61P21/04(2006.01), **A61P25/00**(2006.01), **A61P27/02**(2006.01), **A61P29/00**
(2006.01), **A61P31/04**(2006.01), **A61P37/00**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01),
C07D261/14(2006.01), **C07D277/20**(2006.01), **C07D277/42**(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020221

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.: 42 - 44
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 42 to 44 are relevant to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods.
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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020221

<Subject of search>

Claims 1 to 41 and 45 to 49 relate to a preventive and/or a remedy for an autoimmune disease which contains a compound defined by the desired property as "a CaMKII inhibitor" as the active ingredient. Although claims 1 to 5, 18 to 24, 26 to 29, 31 to 34, 36 to 41 and 45 to 49 involve any compounds having this property, only small part of the claimed compounds are disclosed in the meaning within PCT Article 5. Thus, it appears that these claims are not supported by the disclosure of the description in the meaning of PCT Article 6.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the compounds having the property as "a CaMKII inhibitor" cannot be specified. Thus, claims 1 to 5, 18 to 24, 26 to 29, 31 to 34, 36 to 41 and 45 to 49 do not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on the relationship between "a CaMKII inhibitor" and an autoimmune disease and preventives and/or remedies containing, as the active ingredients, the compound that is particularly cited in the description and specified in claim 6 or KN-93 and a disease-modifying antirheumatic drug. On the other hand, complete search was made on claims 6 to 17, 25, 30 and 35.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **A61K45/06** (2006.01), **A61K31/18** (2006.01), **A61K31/42** (2006.01), **A61K31/426** (2006.01), **A61K31/519** (2006.01), **A61K31/5377** (2006.01), **A61K31/635** (2006.01), **A61P1/04** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P3/00** (2006.01), **A61P3/08** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P5/14** (2006.01), (続きあり)

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. **A61K45/06** (2006.01), **A61K31/18** (2006.01), **A61K31/42** (2006.01), **A61K31/426** (2006.01), **A61K31/519** (2006.01), **A61K31/5377** (2006.01), **A61K31/635** (2006.01), **A61P1/04** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P3/00** (2006.01), **A61P3/08** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P5/14** (2006.01), (続きあり)

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	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)

BIOSIS (STN), CAplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JOIS), JSTPlus (JOIS)

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 請求の範囲の番号
Y	WO 03/39552 A1 (ALTANA PHARMA AG) 2003.05.15, 請求項 1-20 & JP 2005-508983 A & EP 1448202 A	1-41, 45-49
Y	WO 03/41650 A2 (IMMUNEX CORPORATION) 2003.05.22, 請求項 9 & JP 2005-532256 A & EP 1453540 A	1-41, 45-49
Y	JP 2000-72776 A (武田薬品工業株式会社) 2000.03.07, 【0034】 & WO 99/65916 A1 & EP 1087977 A	1-41, 45-49

☒ 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

15.12.2005

国際調査報告の発送日

27.12.2005

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)

榎本 佳子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3229

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 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-146903 A (三共株式会社) 2003.05.21, 請求項 4 - 5 & WO 03/20768 A1	1-41, 45-49
Y	JP 11-240873 A (住友製薬株式会社) 1999.09.07, 請求項 1 - 1 6 & WO 98/47880 A1 & EP 979226 A1	1-41, 45-49
Y	ROTHENBERG Ralph J., EFFECTS OF CALMODULIN INHIBITORS ON RABBIT SYNOVIOCYTE PHOSPHOLIPASE A ₂ , PROSTAGLANDINS LEUKOTRIENES AND MEDICINE, 1987, Vol.29, No.1, Pages 61-69	1-41, 45-49
Y	JP 11-152298 A (工業技術院長) 1999.06.08, 請求項 2、【0 0 1 7】 (ファミリーなし)	1-41, 45-49
Y	WO 03/29428 A2 (VANDERBILT UNIVERSITY) 2003.04.10, 請求項 1 - 8 & JP 2005-504829 A & EP 1439849 A2	1-41, 45-49

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））の続き

Int.Cl. **A61P7/00** (2006.01), **A61P7/04** (2006.01), **A61P7/06** (2006.01), **A61P11/00** (2006.01), **A61P13/02** (2006.01), **A61P15/08** (2006.01), **A61P15/12** (2006.01), **A61P17/00** (2006.01), **A61P19/02** (2006.01), **A61P19/04** (2006.01), **A61P21/00** (2006.01), **A61P21/04** (2006.01), **A61P25/00** (2006.01), **A61P27/02** (2006.01), **A61P29/00** (2006.01), **A61P31/04** (2006.01), **A61P37/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D261/14** (2006.01), **C07D277/20** (2006.01), **C07D277/42** (2006.01)

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））の続き

Int.Cl. **A61P7/00** (2006.01), **A61P7/04** (2006.01), **A61P7/06** (2006.01), **A61P11/00** (2006.01), **A61P13/02** (2006.01), **A61P15/08** (2006.01), **A61P15/12** (2006.01), **A61P17/00** (2006.01), **A61P19/02** (2006.01), **A61P19/04** (2006.01), **A61P21/00** (2006.01), **A61P21/04** (2006.01), **A61P25/00** (2006.01), **A61P27/02** (2006.01), **A61P29/00** (2006.01), **A61P31/04** (2006.01), **A61P37/00** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D261/14** (2006.01), **C07D277/20** (2006.01), **C07D277/42** (2006.01)

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. ☒ 請求の範囲 4 2 - 4 4 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、
請求の範囲 4 2 - 4 4 は、人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に該当するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ 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. ☐ 請求の範囲 _____ 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の範囲について作成した。
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の範囲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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲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ので、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の範囲について作成した。

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を伴う異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1-41、45-49は、「CaMKII阻害剤」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする自己免疫疾患の予防剤及び／又は治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1-5、18-24、26-29、31-34、36-41、45-49は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「CaMKII阻害剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-5、18-24、26-29、31-34、36-41、45-49は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、「CaMKII阻害剤」と自己免疫疾患との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲6に特定されている化合物又はKN-93と、疾患修飾性抗リウマチ薬とを有効成分とする自己免疫疾患の予防剤及び／又は治療剤について行った。また、請求の範囲6-17、25、30、35については、完全な調査を行った。