(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 8 月 26 日(26.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/095706 A1

(51) 国際特許分類:
C07C 57/03 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01) *A61P 15/08* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/052509

(22) 国際出願日: 2010 年 2 月 19 日(19.02.2010)

(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 2009-037939 2009 年 2 月 20 日(20.02.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学 **(The University of Tokyo)** [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 有田　誠 **(ARITA Makoto)** [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 新井　洋由 **(ARAI Hiroyoshi)** [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 磯部　洋輔 **(ISOBE Yousuke)** [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 田口　良 **(TAGUCHI Ryo)** [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 山本　秀策, 外 **(YAMAMOTO Shusaku** et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目２番２７号　クリスタルタワー１５階 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: NOVEL ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS

(54) 発明の名称 : 新規抗炎症性化合物

(57) **Abstract**: Disclosed are compounds with a novel structure which are to be used for overcoming the disadvantages of the existing steroid drugs and NSAIDs. It is clarified that specific dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (for example, 11,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid (11,18-diHEPE), 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid (17,18-diHEPE), etc.) that have never been known in public have an activity of regulating neutrophils. Thus, the infiltration of neutrophils into a tissue and activation of the same, which are observed in acute inflammation, can be unexpectedly remarkably inhibited thereby. The aforesaid compounds have never been known hitherto and, therefore, usefulness as novel therapeutics is provided.

(57) 要約: 本発明は、従来のステロイド剤およびＮＳＡＩＤの上記欠点を克服するための新規構造の化合物を提供することを課題とする。従来公知とされていないエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の特定のジヒドロキシ体（１１，１８ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、１７，１８ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）など）が好中球の抑制活性を有することを見出し、上記課題を解決した。本発明は、急性炎症時において見出される好中球の組織への浸潤および活性化を、予想外に顕著に抑制する。本発明の化合物は、従来知られていない化合物である。したがって、新たな治療剤としての有用性を提供する。

WO 2010/095706 A1

明　細　書

発明の名称 ： 新規抗炎症性化合物

技術分野

[0001] 本発明は、新規抗炎症性の化合物に関する。

背景技術

[0002] 炎症性疾患は、現代において、対策が必要な重要な疾患分野のひとつであるが、現在の抗炎症薬としては、代表的にステロイド剤、非ステロイド抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）呼ばれるアスピリン、イブプロフェンなどの物質が使用されている。

[0003] しかし、これらの物質のうち、ステロイド剤は、効果が高いことから、臨床現場において、急性・慢性のいずれの炎症性疾患の治療薬としても用いられているが、多用することによる抵抗性の獲得、副作用等の問題点が指摘されている。

[0004] ＮＳＡＩＤは、解熱鎮痛作用を有することから、対症療法として用いられているが、ＮＳＡＩＤもまた、長期間の服用により、消化管に障害が生じたり、心疾患リスクの増大、炎症性組織損傷などの進行が生じることが知られており、深刻な問題点となっている（非特許文献１、２）。

[0005] また、レゾルビンＥ１（ＲｖＥ１；５Ｓ，１２Ｒ，１８Ｒ－トリヒドロキシエイコサペンタエン酸）などのレゾルビンというエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）の１８位と５位に水酸基を持つ物質およびその誘導体、プロテクチンＤ１というドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）の１０位と１７位に水酸基を持つ物質およびその誘導体が抗炎症活性を有することが知られている（非特許文献３、４）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｓｉｎｇｈ　Ｇ．Ａｍ．Ｊ．Ｍｅｄ．１０５，３１Ｓ－３８Ｓ（１９９８），

非特許文献2：Ｆｕｎｋ Ｃ．Ｄ．ａｎｄ ＦｉｔｚＧｅｒａｌｄ Ｇ．Ａ．Ｊ．Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ ５０，４７０－４７９（２００７）

非特許文献3：Ｓｅｒｈａｎ Ｃ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ ７３，１５５－１７２（２００４）

非特許文献4：Ｅ．Ｔｊｏｎａｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ＆ Ｂｉｏｌｏｇｙ １３，１１９３-１２０２，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２００６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、従来のステロイド剤およびＮＳＡＩＤの上記欠点を克服するための新規構造の化合物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、鋭意検討した結果、レゾルビン・プロテクチンとは異なる従来公知とされていないエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の特定のジヒドロキシ体（８，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（８，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、１１，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、１２，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、１７，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、１０，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）、１４，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）、１９，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）など）が好中球の抑制活性を有することを見出し、上記課題を解決した。

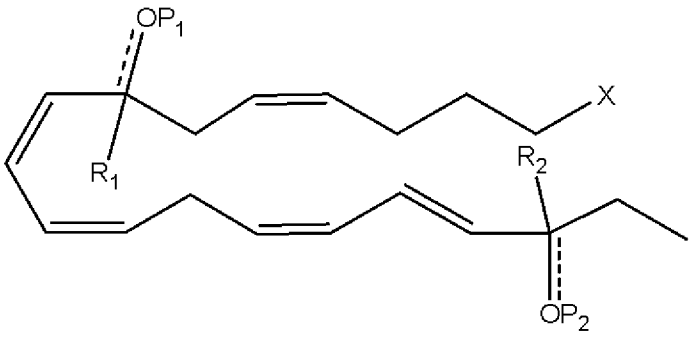
[0009] したがって、本発明は、以下を提供する。

（１）

８，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（８，１８－ｄｉＨＥＰＥ）

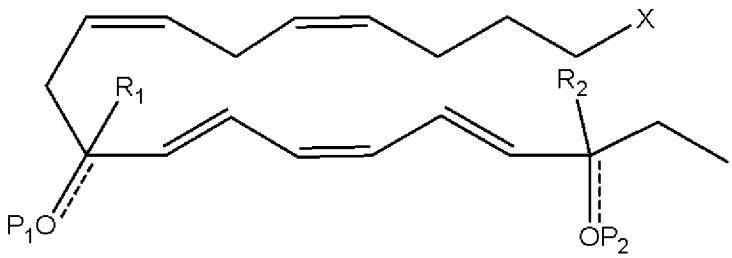
類

[0010] [化1]



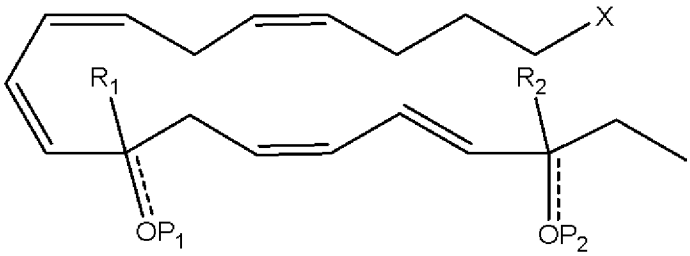
[0011] １１，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ）類

[0012] [化2]



[0013] １２，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ）類

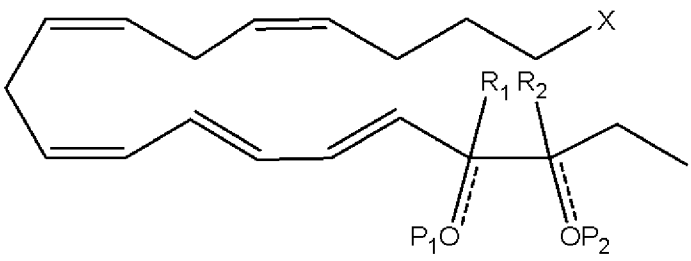
[0014] [化3]



[0015] １７，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）類

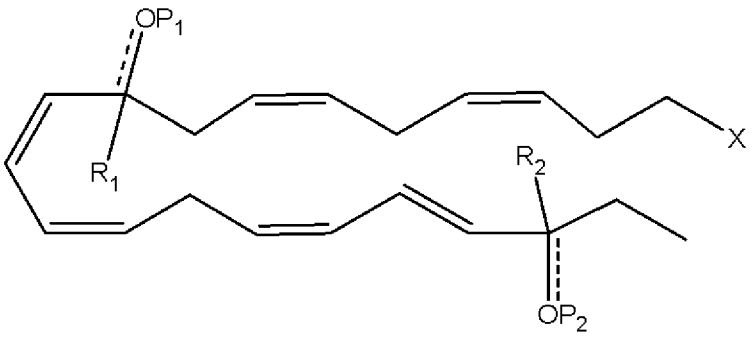
[0016]

[化4]



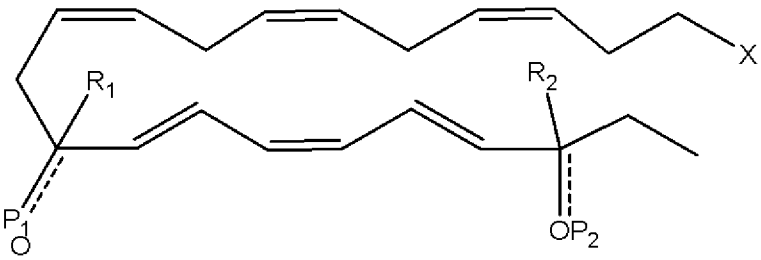
[0017] １０，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）類

[0018] [化5]



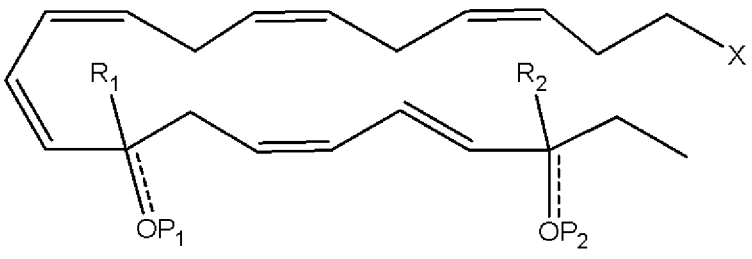
[0019] １３，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）類

[0020] [化6]



[0021] １４，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）類

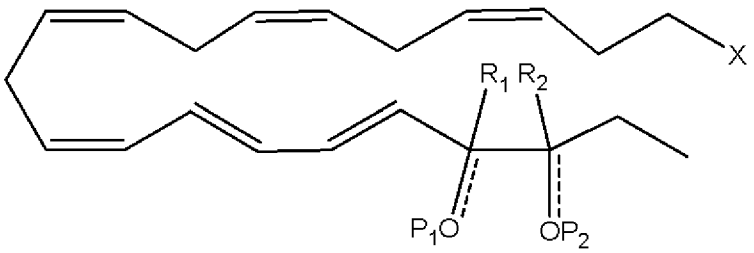
[0022] [化7]



[0023] および

１９，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）類

[0024] [化8]



[0025] から選択される化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、

ここで、

P_1およびP_2は、各々独立して、

[0026] [化9]

[0027] が単結合を示す場合は、保護基、水素原子、アルキル、水酸基もしくは置換された水酸基またはその組み合わせであり、

[0028] [化10]

[0029] が二重結合を示す場合は、P_1、P_2、R_1およびR_2は、存在せず、

[0030] [化11]

[0031] が単結合の場合、

R_1およびR_2は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキルアリール基またはその組み合わせであり；

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ$_3$、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－Ｃ（Ｏ）Ｈ、－Ｃ（ＮＨ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－Ｃ（Ｓ）Ｈ、－Ｃ（Ｓ）ＯＲ$_3$、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－ＣＮ

であり；

R_3は、水素、保護基、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルまたは式：－NR_aR_b（式中、R_aおよびR_bは各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_aとR_bは隣接する窒素原子と一緒になって、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよい。）であり；

R_4およびR_5は、各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_4とR_5は隣接する窒素原子と一緒になって、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよく；

そして、化合物の二重結合配置は各々独立してシスまたはトランスのいずれかであり得る、

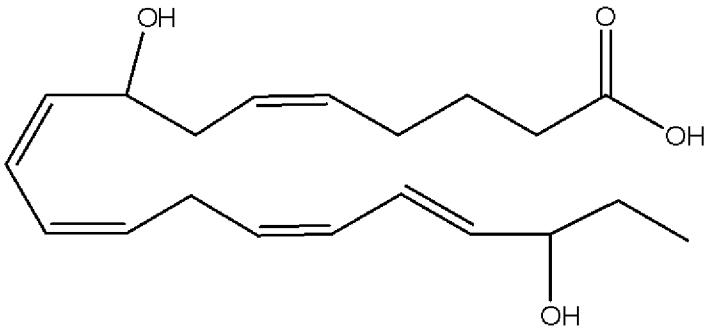
化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

（２）項目１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、以下

８，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（８，１８－ｄｉＨＥＰＥ）

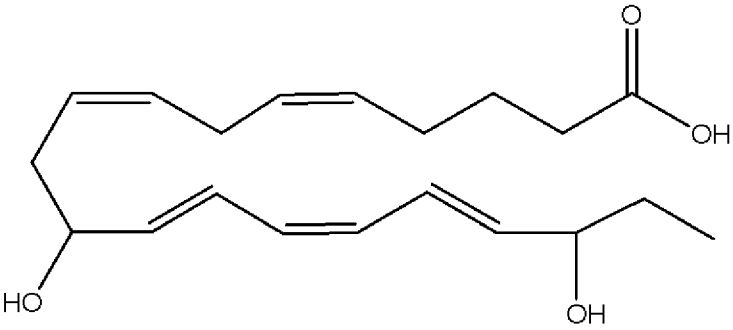
[0032]

[化12]



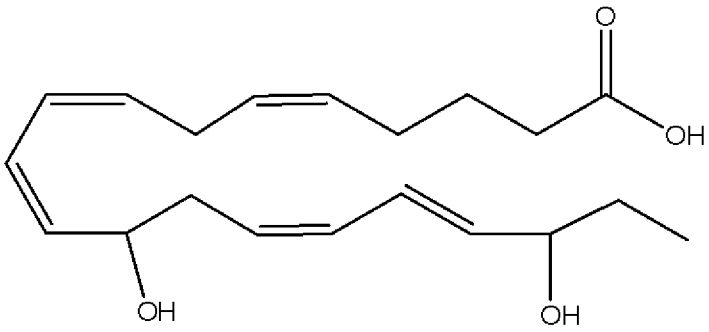
[0033] １１，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ）

[0034] [化13]



[0035] １２，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ）

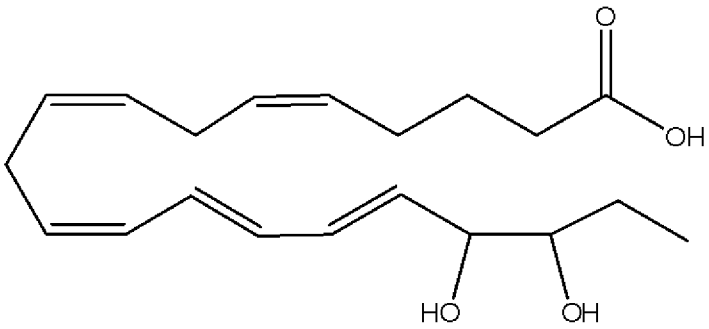
[0036] [化14]



[0037] １７，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）

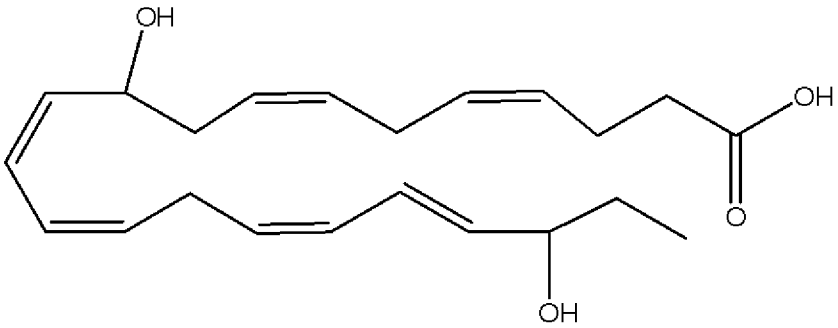
[0038]

[化15]



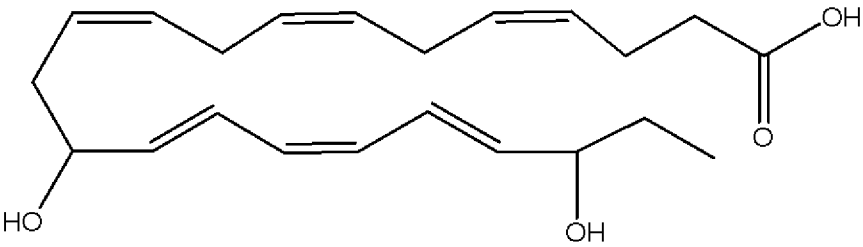
[0039] １０，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）

[0040] [化16]



[0041] １３，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）

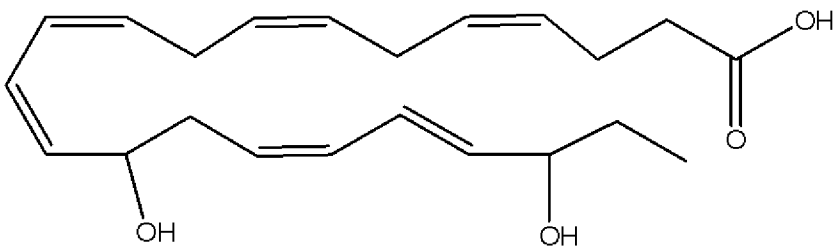
[0042] [化17]



[0043] １４，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）

[0044]

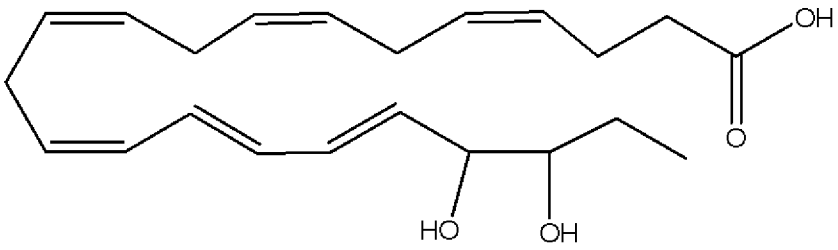
[化18]



[0045] および

１９，２０－ジヒドロキシドコサヘキサエン酸（１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ）

[0046] [化19]



[0047] からなる群より選択される、化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

（３）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、好中球抑制剤。

（４）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む医薬。

（５）前記医薬は、肺切迫症候群、成人呼吸窮迫症候群および慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）から選択される肺疾患；虚血性心疾患、虚血性腎疾患、虚血性脳疾患および虚血性肝疾患から選択される虚血性疾患；炎症性疾患；びらん性胃炎・胃潰瘍・十二指腸潰瘍・気管支喘息、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、クローン病、悪性腫瘍、卵巣嚢腫、卵管炎、子宮筋腫、子宮内膜症、自然流産、妊娠中毒症、不妊症および月経困難症から選択されるストレス性疾患から選択される好中球の抑制により改善される疾患、障害または状態を処置または予防するためのものである、項目４に記載の医薬。

（６）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な

塩もしくは溶媒和物を製造する方法であって、

Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；および

Ｂ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する、方法。

（７）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を製造する方法であって、

Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；

Ｂ）Ａ）工程で得られた前記酵素代謝産物を、精製後または精製しないで８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて二次酵素代謝産物を得る工程；ならびに

Ｃ）必要に応じて該二次酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて

置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する、方法。

（８）必要に応じて前記Ｂ）工程およびＣ）工程を繰り返す工程をさらに包含する、項目７の方法。

（９）炎症性疾患を処置または予防する方法であって、該処置または予防が必要な被験体に項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を投与する工程を包含する、方法。

（１０）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、医薬品を製造するための使用。

（１１）項目１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、好中球が関連する疾患、障害または状態を処置または予防するための医薬品を製造するための使用。

（１２）項目１または２に記載の化合物またはＰＵＦＡ代謝物を分析する方法であって、以下の液体クロマトグラフィー条件

Ａ液：水／酢酸＝１００／０．１、およびＢ液：アセトニトリル／メタノール＝４／１を用いた溶媒系として用い、流速：０～３０分→５０μＬ／分、３０～３３分→８０μＬ／分、３３～４５分→１００μＬ／分を用い、勾配として図１Ｂに記載のものまたはその改変系を使用し、図１Ｃに記載のパラメータを用いることを特徴とする、

方法。

（１３）Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；および

Ｂ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する、方法によって生産される生成物であって、

但し、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２およびプロテクチンＤ１を除く、生成物。

[0048] 上記条件設定においては、合成した化合物（たとえば、酵素で合成したもの。１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ，１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが相当する。）についてはＭＳ／ＭＳの実測値からＭＲＭの親マスと子マスのペアーを最適化（衝突エネルギーの最適化）することができる。また検量線を作製したら定量分析が可能になる。合成しないものは仮想条件を設定して、検出目的のＭＲＭを行う。

[0049] これらのすべての局面において、本明細書に記載される各々の実施形態は、適用可能である限り、他の局面において適用されうることが理解される。

[0050] 複数の実施形態が開示されるが、本発明のなお他の実施形態は、以下の詳細な説明から当業者には明らかになるであろう。明らかであるように、本発明は、すべて本発明の技術思想および範囲から逸脱することなく、種々の明白な態様において修飾が可能である。従って、図面および詳細な説明は、事実上例示的であると見なされ、制限的であるとは見なされない。

発明の効果

[0051] 本発明は、急性炎症時において見出される好中球の組織への浸潤および活性化を、予想外に顕著に抑制する。本発明の化合物は、従来知られていない化合物である。したがって、新たな治療剤としての有用性を提供する。

[0052] また、本発明の化合物は、生体内においても見出されることが本発明において見出されたことから、中長期の投与において副作用の少ない治療剤であると期待される。また、ステロイド剤およびＮＳＡＩＤとは作用が異なることから、抗炎症剤としても、既存のステロイド剤等との併用することによる効果が期待される。

図面の簡単な説明

[0053] [図1A]マルチプルリアクションモニタリング（ＭＲＭ）の原理を示す図である。下は、ＬＴＢ$_4$での測定例を示す。Ｍ$^-$は親マス値を、Ａ$^-$は子マス値を示す。

[図1B]本発明のＭＲＭにおいて用いた溶媒グラジエントの例を示す。

[図1C]図１Ｃは、従来ＭＲＭによる測定対象となっている多不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）代謝物のリストである。図中、ＥＥＴはエポキシエイコサトリエン酸、ＥＴＥはエイコサテトラエン酸、ＨＤｏＰＥはヒドロキシドコサペンタエン酸、ＤＰＥはドコサペンタエン酸を表す。

[図2A-1]炎症初期（４時間後）の腹腔液浸出液（ＰＥＣ）と１８－ヒドロキシエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）のインキュベーションを示す。星印がそれぞれの異性体を含めた代謝物のピークを示す。左から順に、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２、８，１８－ジヒドロキシエイコサペンタエン酸（ｄｉＨＥＰＥ）を示す。

[図2A-2]炎症初期（４時間後）の腹腔液浸出液（ＰＥＣ）と１８－ヒドロキシエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）のインキュベーションを示す。星印がそれぞれの異性体を含めた代謝物のピークを示す。左から順に、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを示す。

[図2B-1]炎症後期（４８時間後）のＰＥＣと１８－ＨＥＰＥのインキュベーションを示す。星印がそれぞれの異性体を含めた代謝物のピークを示す。左から順に、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２、８，１８－ｄｉＨＥＰＥを示す。

[図2B-2]炎症後期（４８時間後）のＰＥＣと１８－ＨＥＰＥのインキュベーションを示す。星印がそれぞれの異性体を含めた代謝物のピークを示す。左から順に、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを示す。

[図2C]野生型および１２／１５－ＬＯＸ$^{-/-}$マウスを用いて行った、炎症誘導

４８時間後のＰＥＣと１８－ＨＥＰＥとのインキュベーションにより生成した代謝物の定量を示す。左側の黒い柱が野生型、右側の灰色の柱が１２／１５－ＬＯＸ$^{-/-}$マウスでの結果を示す。

[図2D]図２Ｄは、１８－ＨＥＰＥと好酸球とのインキュベーションの結果生じた各代謝物の解析結果を示す。星印がそれぞれの主要な代謝物のピークを示す。左上から右上に順に、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２、８，１８－ｄｉＨＥＰＥを示し、左下から右下に順に１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを示す。

[図2E]図２Ｅは、２０－ＨＤｏＨＥと好酸球とのインキュベーションの結果生じた各代謝物の解析結果および相対定量を示す。星印がそれぞれの主要な代謝物のピークを示す。左上から右上に順に、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥを示し、左下から右下に順に、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＤｏＨＥを示す。

[図2F]図２Ｆは、エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）の代謝物である１８－ＨＥＰＥを起点とした代謝経路を示す。

[図2G]図２Ｇは、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）の代謝物である２０－ＨＤｏＨＥを起点とした代謝経路を示す。なお、実験的には、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥは、８－ＬＯＸを使用して合成することができる。

[図3A]図３Ａは、１８－ＨＥＰＥとｓＬＯＸとをインキュベーションし、そのサンプルを逆相高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で精製した結果を示す逆相ＨＰＬＣクロマトグラム（２７０ｎｍでの吸光クロマトグラム）の結果である。

[図3B]実施例３のピーク１～４の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）（ａ）、吸光スペクトル（ｂ）および１１，１８－ｄｉＨＥＰＥの構造（ｃ）を示す。

[図3C]実施例３のピーク５～６の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）（ａ）、吸光スペクトル（ｂ）および17，１８－ｄｉＨＥＰＥの構造（ｃ）を示す。

[図3D]図３Ｄは、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥであるピーク５および６についての、腹膜炎誘導４８時間後のＰＥＣと１８－ＨＥＰＥとをインキュベーシ

ョンしたサンプル（生体サンプル；ｓａｍｐｌｅ）とのスパイク実験結果を示す。上から順に、ｓａｍｐｌｅのみ、ピーク５のみ、ピーク６のみ、ピーク５およびｓａｍｐｌｅ、ピーク６およびｓａｍｐｌｅの逆相ＨＰＬＣクロマトグラムを示す。矢印で示すように、ピーク５およびピーク６は、生体サンプルのうちの１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを特異的に検出するチャンネルのメジャーピーク２つと一致している。

[図4A]図４Ａは、ザイモザン（ｚｙｍｏｓａｎ）腹膜炎モデルにおける１８－ＨＥＰＥ由来代謝物（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）の生理活性の評価を示す。（ａ）左から生理食塩水（コントロール）、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ１０ｎｇ、デキサメタゾン１０μｇをそれぞれマウス尾静脈から注入し、５分後にザイモザン　１ｍｇを腹腔内投与して腹膜炎を開始した。２時間後に腹腔内の細胞を回収し、ＰＭＮ（好中球）（各群について左端の柱）、リンパ球（各群について中央の柱）およびマクロファージ（各群について右端の柱）の数についてそれぞれＦＡＣＳを用いた解析を行った結果を示す。各々３回の実験の平均をとり、値は平均±ＳＥＭとして示す。**は生理食塩水に対してｐ＜０．０１、***は生理食塩水に対してｐ＜０．００１を表す。（ｂ）腹膜炎モデルにおける１７，１８－ｄｉＨＥＰＥの活性が用量依存的であることを示す。結果は平均＋ＳＤで示し、*は生理食塩水に対してｐ＜０．０５を表す。

[図4B]図４Ｂは、急性肺損傷モデルにおける１８－ＨＥＰＥ由来代謝物（１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）の生理活性の評価を示す。左から無処理（ｉｎｔａｃｔ）、気管支内塩酸投与（ｓａｌｉｎｅ／ＨＣｌ）、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ　１０ｎｇ尾静脈投与後に気管支内塩酸投与（１７，１８ｄｉＨＥＰＥ／ＨＣｌ）後、１２時間の時点での肺に浸潤した総細胞数（ａ）、好中球数（ｂ）およびマクロファージ数（ｃ）を示す。各々３～回の実験の平均をとり、値は平均±ＳＥＭとして示す。*はｓａｌｉｎｅ／ＨＣｌに対してｐ＜０．０５を表す。

[図4C]図４Ｃは、ザイモザン腹膜炎モデルにおけるピーク５および６の生理

活性の評価を示す。対照として、生理食塩水およびデキサメタゾンを用いた。灰色の柱は好中球、黒色の柱はリンパ球、白色の柱はマクロファージを示す。

[図4D]図４Ｄは、腹膜炎モデルにおける合成した化合物の活性が用量依存的であることを示す。結果は平均＋ＳＤで示し、*は生理食塩水に対してｐ＜０．０５、**は生理食塩水に対してｐ＜０．００１を表す。

[図4E]図４Ｅは、急性肺損傷モデルにおける合成した化合物の活性評価を示す。左から無処理（ｉｎｔａｃｔ）、気管支内塩酸投与（ｓａｌｉｎｅ／ＨＣｌ）、ピーク６　１０ｎｇ尾静脈投与後に気管支内塩酸投与（Ｐｅａｋ６／ＨＣｌ）後、１２時間の時点での肺に浸潤した好中球数を示す。

[図4F]図４Ｆは、IC_{40}の用量を検討するための用量－好中球数の減少の関係を示すグラフである。

[図5]図５は、１８－ＨＥＰＥと８－ＬＯＸとをインキュベーションしたサンプルの、逆相ＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）、ピーク１の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）および８，１８－ｄｉＨＥＰＥの構造（Ｂ）を示す。

[図6]図６は、２０－ＨＤｏＨＥと８－ＬＯＸとをインキュベーションしたサンプルの、逆相ＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）、ピーク１の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）および１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥの構造（Ｂ）を示す。

[図7]図７は、１２－ＨｐＥＰＥとｓＬＯＸとをインキュベーションしたサンプルの、逆相ＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）、ピーク１および２の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）ならびに１２，１８－ｄｉＨＥＰＥの構造（Ｂ）を示す。

[図8]図８は、１４－ＨｐＥＰＥとｓＬＯＸとをインキュベーションしたサンプルの、逆相ＨＰＬＣクロマトグラム（Ａ）、ピーク１の質量分析（ＭＳ／ＭＳ）および１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥの構造（Ｂ）を示す。

[図9A]図９Ａは、エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）の代謝物である１２－ＨｐＥＰＥを起点とした代謝経路を示す。

[図9B]図９Ｂは、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）の代謝物である１４－ＨｐＤｏＨＥを起点とした代謝経路を示す。

[図10]図１０は、種々の化合物についての活性の比較を示す。

[図11]図１１は、１８－ＨＥＰＥとヒト好酸球とのインキュベーションの結果生じた各代謝物の解析結果を示す。星印がそれぞれの主要な代謝物のピークを示す。左上から右上に順に、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２、８，１８－ｄｉＨＥＰＥを示し、左下から右下に順に１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを示す。

[図12]図１２は、２０－ＨＤｏＨＥとヒト好酸球とのインキュベーションの結果生じた各代謝物の解析結果を示す。星印がそれぞれの主要な代謝物のピークを示す。左上から右上に順に、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥを示し、左下から右下に順に、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＤｏＨＥを示す。

発明を実施するための形態

[0054] 以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当上記分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0055] （用語の定義）

本明細書において、必要に応じて、以下の略語を用いる。

AA：アラキドン酸；arachidonic acid

CCR：ケモカインレセプター；chemokine (C-C motif) receptor

COX：シクロオキシゲナーゼ；cyclooxygenase

DHA：ドコサヘキサエン酸；docosahexaenoic acid

DPA：ドコサペンタエン酸；docosapentaenoic acid

EET：エポキシエイコサトリエン酸；epoxy eicosatrienoic acid

Ep：エポキシ；epoxy

EpDPE：エポキシドコサペンタエン酸；epoxy docosapentaenoic acid

EpETE：エポキシエイコサテトラエン酸；epoxy eicosatetraenoic acid

EPA：エイコサペンタエン酸；eicosapentaenoic acid

ETE：エイコサテトラエン酸；eicosatetraenoic acid

HBSS：ハンクス平衡化塩溶液；hanks' balanced salt solution

HDoHE：ヒドロキシドコサヘキサエン酸；hydroxy docosahexaenoic acid

HEPE：ヒドロキシエイコサペンタエン酸；hydroxy eicosapentaenoic acid

HETE：ヒドロキシエイコサテトラエン酸；hydroxy eicosatetraenoic acid

HpDoHE：ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸；hydroperoxy docosapentanoic acid

HpEPE：ヒドロペルオキシエイコサペンタエン酸；hydroperoxy eicosapentanoic acid

LC：液体クロマトグラフィー；liquid chromatography

LOX：リポキシゲナーゼ；lipoxygenase

LT：ロイコトリエン；leukotriene

LX：リポキシン；lipoxin

MRM：マルチプルリアクションモニタリング；multiple reaction monitoring

N：ノルマル・規定；normal

PBS：リン酸緩衝化生理食塩水；phosphate buffered saline

PEC：腹腔浸出細胞；peritoneal exudate cells

PD1：プロテクチンＤ１；protectin D1

PG：プロスタグランジン；prostaglandin

ppt.：ペレット；pellet

PUFA：多不飽和脂肪酸；polyunsaturated fatty acid

Rv：レゾルビン；resolvin

sLOX：ダイズリポキシゲナーゼ；soybean lipoxygenase

Tg：トランスジェニック；transgenic

UPLC：超高速液体クロマトグラフィー；ultra performance liquid chromatography

（用語）

以下に本明細書において用いられる各用語の意味を説明する。各用語は本明細書中、統一した意味で使用し、単独で用いられる場合も、または他の用語と組み合わされて用いられる場合も、同一の意味で用いられる。

[0056] 本明細書中、「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素を意味する。フッ素、塩素、および臭素が好ましい。

[0057] 本明細書中、「アルキル」とは、それ自体、または別の置換基の一部として、親のアルカンの単一の炭素原子からの１個の水素原子の除去によって誘導され、言及される数の炭素原子を有する（すなわち、Ｃ１～Ｃ６は１個～６個の炭素原子を意味する）、飽和または不飽和の、分枝状の、直鎖状の、または環状の一価炭化水素基をいう。代表的には、炭素原子数１～８の直鎖または分枝鎖の１価の炭化水素基を包含する。例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ｎｅｏ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、イソヘキシル、ｎ－ヘプチル、ｎ－オクチル等が挙げられる。好ましくは、Ｃ１－Ｃ６アルキルが挙げられる。さらに好ましくは、Ｃ１－Ｃ４アルキルが挙げられる。特に炭素数を指定した場合は、その数の範囲の炭素数を有する「アルキル」を意味する。

[0058] 本明細書中、「アルケニル」とは、それ自体、または別の置換基の一部として、親のアルケンの単一の炭素原子からの１個の水素原子の除去によって誘導され、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有する、不飽和で分枝状の、直鎖状の、または環状の炭化水素基をいう。代表的には、炭素原子数が２～８個であり、１個もしくは２個以上の二重結合を有する、直鎖または分

枝鎖の１価の炭化水素基を包含する。基は二重結合についてシス配座またはトランス配座のいずれであってもよい。例えば、ビニル、アリル、１－プロペニル、２－ブテニル、２－ペンテニル、２－ヘキセニル、２－ヘプテニル、２－オクテニル等が挙げられる。好ましくは、Ｃ２－Ｃ６アルケニルが挙げられる。さらに好ましくは、Ｃ２－Ｃ４アルケニルが挙げられる。

[0059] 本明細書中、「アルキニル」とは、炭素原子数が２～８個であり、１個もしくは２個以上の三重結合を有する、直鎖または分枝鎖の１価の炭化水素基を包含する。例えば、エチニル、１－プロピニル、２－プロピニル、２－ブチニル、２－ペンチニル、２－ヘキシニル、２－ヘプチニル、２－オクチニル等が挙げられる。好ましくは、Ｃ２－Ｃ６アルキニルが挙げられる。さらに好ましくは、Ｃ２－Ｃ４アルキニルが挙げられる。

[0060] 本明細書中、アルキル、アルケニルまたはアルキニルの「ジイル」とは、それ自体、または別の置換基の一部として、親のアルカン、アルケン、アルキンの２個の異なる炭素原子の各々からの１個の水素原子の除去によって、または親のアルカン、アルケン、アルキンの単一の炭素原子からの２個の水素原子の除去によって誘導され、言及される数の炭素原子を有する（すなわち、Ｃ１～Ｃ６は１個～６個の炭素原子を意味する）、飽和または不飽和の、分枝状の、直鎖状の、または環状の二価炭化水素基をいう。２個の一価の基の中心または二価の基の中心の各結合価が、同じ原子または異なる原子と結合を形成することができる。典型的なジイル基には以下が含まれるがこれらに限定されない：メタンジイル；エタン－１，１－ジイル、エタン－１，２－ジイル、エテン－１，１－ジイル、エテン－１，２－ジイルなどのエチルジイル；プロパン－１，１－ジイル、プロパン－１，２－ジイル、プロパン－２，２－ジイル、プロパン－１，３－ジイル、シクロプロパン－１，１－ジイル、シクロプロパン－１，２－ジイル、プロプ－１－エン－１，１－ジイル、プロプ－１－エン－１，２－ジイル、プロプ－２－エン－１，２－ジイル、プロプ－１－エン－１，３－ジイル、シクロプロプ－１－エン－１，２－ジイル、シクロプロプ－２－エン－１，２－ジイル、シクロプロプ－

２－エン－１，１－ジイル、プロプ－１－イン－１，３－ジイルなどのプロピルジイル；ブタン－１，１－ジイル、ブタン－１，２－ジイル、ブタン－１，３－ジイル、ブタン－１，４－ジイル、ブタン－２，２－ジイル、２－メチル－プロパン－１，１－ジイル、２－メチル－プロパン－１，２－ジイル、シクロブタン－１，１－ジイル；シクロブタン－１，２－ジイル、シクロブタン－１，３－ジイル、ブト－１－エン－１，１－ジイル、ブト－１－エン－１，２－ジイル、ブト－１－エン－１，３－ジイル、ブト－１－エン－１，４－ジイル、２－メチル－プロプ－１－エン－１，１－ジイル、２－メタニリデン－プロパン－１，１－ジイル、ブタ－１，３－ジエン－１，１－ジイル、ブタ－１，３－ジエン－１，２－ジイル、ブタ－１，３－ジエン－１，３－ジイル、ブタ－１，３－ジエン－１，４－ジイル、シクロブト－１－エン－１，２－ジイル、シクロブト－１－エン－１，３－ジイル、シクロブト－２－エン－１，２－ジイル、シクロブタ－１，３－ジエン－１，２－ジイル、シクロブタ－１，３－ジエン－１，３－ジイル、ブト－１－イン－１，３－ジイル、ブト－１－イン－１，４－ジイル、ブタ－１，３－ジイン－１，４－ジイルなどのブチルジイル；など。特定のレベルの飽和が意図される場合、命名法アルキルジイル、アルケニルジイルおよび／またはアルキニルジイルが使用される。２個の結合価が同じ炭素原子上にあることが特に意図される場合、命名法「アルキリデン」が使用される。好ましい実施形態において、アルキルジイル基は（Ｃ１～Ｃ６）アルキルジイルである。基の中心が末端の炭素にある飽和非環式アルカニルジイル基、例えば、メタンジイル（メタノ）；エタン－１，２－ジイル（エタノ）；プロパン－１，３－ジイル（プロパノ）；ブタン－１，４－ジイル（ブタノ）；などもまた好ましい（「アルキレノ」ともいう）。

[0061] 本明細書中、「シクロアルキル」とは、それ自体、または別の置換基の一部として、親のアルケンの単一の炭素原子からの１個の水素原子の除去によって誘導される、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有する、不飽和で分枝状の、直鎖状の、または環状の炭化水素基をいう。代表的には、炭素原

子数が３～８個であるシクロアルキルを包含する。例えば、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、シクロオクチルが挙げられる。好ましくはＣ３－Ｃ６シクロアルキルが挙げられる。

[0062] 本明細書中、「シクロアルケニル」とは、炭素原子数が３～８個であるシクロアルケニルを包含する。例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニルが挙げられ、好ましくはＣ３－Ｃ６シクロアルケニルが挙げられる。

[0063] 本明細書中、「アルコキシ」としては、メチルオキシ、エチルオキシ、ｎ－プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、ｎ－ブチルオキシ、イソブチルオキシ、ｓｅｃ－ブチルオキシ、ｔｅｒｔ－ブチルオキシ、ｎ－ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、２－ペンチルオキシ、３－ペンチルオキシ、ｎ－ヘキシルオキシ、イソヘキシルオキシ、２－ヘキシルオキシ、３－ヘキシルオキシ、ｎ－ヘプチルオキシ、ｎ－オクチルオキシ等が挙げられる。好ましくは、Ｃ１－Ｃ６アルキルオキシが挙げられる。さらに好ましくは、Ｃ１－Ｃ４アルキルオキシが挙げられる。特に炭素数を指定した場合は、その数の範囲の炭素数を有する「アルコキシ」を意味する。

[0064] 本明細書中、「アルキルスルホニル」としては、メチルスルホニル、エチルスルホニル、ｎ－プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ｎ－ブチルスルホニル、イソブチルスルホニル、ｓｅｃ－ブチルスルホニル、ｔｅｒｔ－ブチルスルニル、ｎ－ペンチルスルホニル、イソペンチルスルホニル、２－ペンチルスルホニル、３－ペンチルスルホニル、ｎ－ヘキシルスルホニル、イソヘキシルスルホニル、２－ヘキシルスルホニル、３－ヘキシルスルホニル、ｎ－ヘプチルスルホニル、ｎ－オクチルスルホニル等が挙げられる。好ましくは、Ｃ１－Ｃ６アルキルスルホニルが挙げられる。さらに好ましくは、Ｃ１－Ｃ４アルキルスルホニルが挙げられる。

[0065] 本明細書中、「アルキルオキシカルボニル」としては、メチルオキシカルボニル、エチルオキシカルボニル、ｎ－プロピルオキシカルボニル、イソプ

ロピルオキシカルボニル、ｎ－ブチルオキシカルボニル、ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル、ｎ－ペンチルオキシカルボニル等が挙げられる。好ましくは、Ｃ１－Ｃ４アルキルオキシカルボニルが挙げられる。特に好ましくは、Ｃ１－Ｃ２アルキルオキシカルボニルが挙げられる。

[0066] 本明細書中、「アシル」とは、ホルミル、アルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、シクロアルケニルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、ヘテロサイクルカルボニルを包含する。例えば、アセチル、プロピオニル、ブチロイル、ベンゾイル等が挙げられる。

[0067] 本明細書中、「低級アルキル」とは、炭素数１～６、好ましくは炭素数１～３の直鎖または分枝状のアルキルを包含し、例えばメチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、イソブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、およびイソヘキシル等が挙げられる。

[0068] 「低級アルコキシ」、「ヒドロキシ低級アルキル」、「ヒドロキシ低級アルコキシ」、「低級アルコキシカルボニル」、「低級アルキルアミノ」、「低級アルコキシ低級アルコキシ」、「低級アルキルカルバモイル」、「ヒドロキシ低級アルキルカルバモイル」、「低級アルコキシイミノ」、「低級アルキルチオ」、「低級アルキルスルホニル」、「低級アルキルスルホニルオキシ」「低級アルキルスルファモイル」、および「低級アルキルスルフィニル」の低級アルキル部分も上記「低級アルキル」と同様である。

[0069] 本明細書中、「置換もしくは非置換の低級アルキル」は、置換されていてもよく、好ましくは置換基群αから選択される１以上の基で置換されていてもよい。

[0070] ここで置換基群αとは、ハロゲン、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ヒドロキシ低級アルコキシ、低級アルコキシ低級アルコキシ、アシル、アシルオキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、アミノ、アシルアミノ、低級アルキルアミノ、イミノ、ヒドロキシイミノ、低級アルコキシイミノ、低級

アルキルチオ、カルバモイル、低級アルキルカルバモイル、ヒドロキシ低級アルキルカルバモイル、スルファモイル、低級アルキルスルファモイル、低級アルキルスルフィニル、シアノ、ニトロ、炭素環式基および複素環式基からなる群である。

[0071] 本明細書中、「低級アルケニル」とは、任意の位置に１以上の二重結合を有する炭素数２～１５、好ましくは炭素数２～１０、より好ましくは炭素数２～６、さらに好ましくは炭素数２～４の直鎖または分枝状のアルケニルを包含する。具体的にはビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、プレニル、ブタジエニル、ペンテニル、イソペンテニル、ペンタジエニル、ヘキセニル、イソヘキセニル、ヘキサジエニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、ペンタデセニル等を包含する。

[0072] 本明細書中、「低級アルキニル」とは、任意の位置に１以上の三重結合を有する炭素数２～１０、好ましくは炭素数２～８、さらに好ましくは炭素数３～６の直鎖または分枝状のアルキニルを包含する。具体的には、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニル等を包含する。これらはさらに任意の位置に二重結合を有していてもよい。

[0073] 本明細書中、「炭素環式基」としては、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリールおよび非芳香族縮合炭素環式基等包含する。

[0074] 本明細書中、「置換もしくは非置換のアミノ」とは、前記「アルキル」、後記「アリール」、後記「ヘテロアリール」、後記「ヘテロサイクル」、前記「アシル」、前記「アルキルオキシカルボニル」、前記「アルキルスルホニル」、後記「アリールスルホニル」、後記「ヘテロアリールスルホニル」、後記「ヘテロサイクルスルホニル」で１または２個所置換されていてもよいアミノを包含する。例えば、アミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノ、ベンジルアミノ、アセチルアミノ、ベンゾイルアミノ、メチルオキシカルボニルアミノ、メチルス

ルホニルアミノ等が挙げられる。好ましくはアミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルメチルアミノ、ジエチルアミノ、アセチルアミノ、メチルスルホニルアミノ等が挙げられる。

[0075] 本明細書中、「置換もしくは非置換のカルバモイル」とは、置換もしくは非置換のアミノ部分が前記「置換もしくは非置換のアミノ」である置換もしくは非置換のアミノカルボニルを包含する。例えば、カルバモイル、Ｎ－メチルカルバモイル、Ｎ，Ｎ－ジメチルカルバモイル、Ｎ－エチル－Ｎ－メチルカルバモイル、Ｎ，Ｎ－ジエチルカルバモイル、Ｎ－ベンジルカルバモイル、Ｎ－アセチルカルバモイル、Ｎ－メチルスルホニルカルバモイル等が挙げられる。好ましくは、カルバモイル、Ｎ－メチルカルバモイル、Ｎ，Ｎ－ジメチルカルバモイル、Ｎ－メチルスルホニルカルバモイル等が挙げられる。

[0076] 本明細書中、「アリール」とは、単環状もしくは縮合環状芳香族炭化水素を包含する。これは前記「シクロアルキル」、後記「ヘテロアリール」、後記「ヘテロサイクル」と可能な全ての位置で縮合していてもよい。アリールが単環および縮合環のいずれである場合も、すべての可能な位置で結合しうる。例えば、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、アントリル、テトラヒドロナフチル、１，３－ベンゾヂオキソリル、１，４－ベンゾジオキサニル等が挙げられる。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。さらに好ましくは、フェニルが挙げられる。

[0077] 本明細書中、「複素環式」または「ヘテロサイクル」とは、酸素原子、硫黄原子および窒素原子等のヘテロ原子を環内に１～４個含んでいてもよく、置換可能な任意の位置に結合手を有していてもよい非芳香族ヘテロ環式基を包含する。また、そのような非芳香族ヘテロ環式基がさらに炭素数１～４のアルキル鎖で架橋されていてもよく、シクロアルカン（５～６員環が好ましい）やベンゼン環が縮合していてもよい。非芳香族であれば、飽和でも不飽和でもよい。好ましくは５～８員環であるが、さらに非芳香族ヘテロ環が縮合していてもよい。例えば、ピロリニル（例えば、１－ピロリニル、２－ピ

ロリニル、３－ピロリニル）、ピロリジニル（例えば、１－ピロリジニル、２－ピロリジニル、３－ピロリジニル）、ピロリジノン、イミダゾリニル（例えば、１－イミダゾリニル、２－イミダゾリニル、４－イミダゾリニル）、イミダゾリジニル（例えば、１－イミダゾリジニル、２－イミダゾリジニル、４－イミダゾリジニル）、イミダゾリジノン、ピラゾリニル（例えば、１－ピラゾリニル、３－ピラゾリニル、４－ピラゾリニル）、ピラゾリジニル（例えば、１－ピラゾリジニル、３－ピラゾリジニル、４－ピラゾリジニル）、ピペリジノン、ピペリジノ、ピペリジニル（例えば、２－ピペリジニル、３－ピペリジニル、４－ピペリジニル）、ピペラジニル（例えば、１－ピペラジニル、２－ピペラジニル）、ピペラジノン、モルホリニル（例えば、２－モルホリニル、３－モルホリニル）、モルホリノ、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル等があげられる。

[0078] 本明細書中、「ヘテロアリール」とは、任意に選ばれる、酸素原子、硫黄原子または窒素原子等のヘテロ原子を環内に１個以上含む５～６員の芳香環を包含する。「ヘテロアリール」は、「複素環式基」のうち、芳香族環式基であるものを包含する。これは前記「シクロアルキル」、前記「アリール」、前記「ヘテロサイクル」、もしくは他のヘテロアリールと可能な全ての位置で縮合していてもよい。ヘテロアリールが単環および縮合環のいずれである場合も、すべての可能な位置で結合しうる。例えば、ピロリル（例えば、１－ピロリル、２－ピロリル、３－ピロリル）、フリル（例えば、２－フリル、３－フリル）、チエニル（例えば、２－チエニル、３－チエニル）、イミダゾリル（例えば、２－イミダゾリル、４－イミダゾリル）、ピラゾリル（例えば、１－ピラゾリル、３－ピラゾリル、４－ピラゾリル）、イソチアゾリル（例えば、３－イソチアゾリル）、イソキサゾリル（例えば、３－イソキサゾリル）、オキサゾリル（例えば、２－オキサゾリル、４－オキサゾリル、５－オキサゾリル）、チアゾリル（例えば、２－チアゾリル、４－チアゾリル、５－チアゾリル）、ピリジル（例えば、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル）、ピラジニル（例えば、２－ピラジニル）、ピリミジ

ニル（例えば、２－ピリミジニル、４－ピリミジニル）、ピリダジニル（例えば、３－ピリダジニル）、テトラゾリル（例えば、１Ｈ－テトラゾリル）、オキサジアゾリル（例えば、１，３，４－オキサジアゾリル）、チアジアゾリル（例えば、１，３，４－チアジアゾリル）、インドリジニル（例えば、２－インドリジニル、６－インドリジニル）、イソインドリル（例えば、２－イソインドリル）、インドリル（例えば、１－インドリル、２－インドリル、３－インドリル）、インダゾリル（例えば、３－インダゾリル）、プリニル（例えば、８－プリニル）、キノリジニル（例えば、２－キノリジニル）、イソキノリル（例えば、３－イソキノリル）、キノリル（例えば、２－キノリル、５－キノリル）、フタラジニル（例えば、１－フタラジニル）、ナフチリジニル（例えば、２－ナフチリジニル）、キノラニル（例えば、２－キノラニル）、キナゾリニル（例えば、２－キナゾリニル）、シンノリニル（例えば、３－シンノリニル）、プテリジニル（例えば、２－プテリジニル）、カルバゾリル（例えば、２－カルバゾリル、４－カルバゾリル）、フェナントリジニル（例えば、２－フェナントリジニル、３－フェナントリジニル）、アクリジニル（例えば、１－アクリニジル、２－アクリニジル）、ジベンゾフラニル（例えば、１－ジベンゾフラニル、２－ジベンゾフラニル）、ベンゾイミダゾリル（例えば、２－ベンゾイミダゾリル）、ベンゾイソキサゾリル（例えば、３－ベンゾイソキサゾリル）、ベンゾオキサゾリル（例えば、２－ベンゾオキサゾリル）、ベンゾオキサジアゾリル（例えば、４－ベンゾオキサジアゾリル）、ベンゾイソチアゾリル（例えば、３－ベンゾイソチアゾリル）、ベンゾチアゾリル（例えば、２－ベンゾチアゾリル）、ベンゾフリル（例えば、３－ベンゾフリル）、ベンゾチエニル（例えば、２－ベンゾチエニル）、ジベンゾチエニル（例えば、２－ジベンゾチエニル）、ベンゾジオキソリル（例えば、１，３－ベンゾジオキソリル）等が挙げられる。

[0079] 本明細書中、「複素環式基」としては、酸素、硫黄および窒素等から任意に選択されるヘテロ原子を環内に１以上有する複素環式基を包含し、具体的

にはピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアゾリル、トリアジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、チアジアゾリル等の５～６員のヘテロアリール；ジオキサニル、チイラニル、オキシラニル、オキセタニル、オキサチオラニル、アゼチジニル、チアニル、チアゾリジニル、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペリジル、ピペラジニル、モルホリニル、モルホリノ、チオモルホリニル、チオモルホリノ、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル、テトラヒドロフリル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロチアゾリル、テトラヒドロチアゾリル、テトラヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジニル、ヘキサヒドロアゼピニル、テトラヒドロジアゼピニル、テトラヒドロピリダジニル等の非芳香族複素環式基；インドリル、イソインドリル、インダゾリル、インドリジニル、インドリニル、イソインドリニル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、プリニル、プテリジニル、ベンゾピラニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソオキサゾリル、ベンズオキサゾリル、ベンズオキサジアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾフリル、イソベンゾフリル、ベンゾチエニル、ベンゾトリアゾリル、チエノピリジル、チエノピロリル、チエノピラゾリル、チエノピラジニル、フロピロリル、チエノチエニル、イミダゾピリジル、ピラゾロピリジル、チアゾロピリジル、ピラゾロピリミジニル、ピラゾロトリアニジル、ピリダゾロピリジル、トリアゾロピリジル、イミダゾチアゾリル、ピラジノピリダジニル、キナゾリニル、キノリル、イソキノリル、ナフチリジニル、ジヒドロチアゾロピリミジニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ジヒドロベンゾフリル、ジヒドロベンズオキサジニル、ジヒドロベンズイミダゾリル、テトラヒドロベンゾチエニル、テトラヒドロベンゾフリル、ベンゾジオキソリル、ベンゾジオキソニル、クロマニル、クロメニル

、オクタヒドロクロメニル、ジヒドロベンゾジオキシニル、ジヒドロベンゾオキセジニル、ジヒドロベンゾジオキセピニル、ジヒドロチエノジオキシニル等の２環の縮合複素環式基；およびカルバゾリル、アクリジニル、キサンテニル、フェノチアジニル、フェノキサチイニル、フェノキサジニル、ジベンゾフリル、イミダゾキノリル、テトラヒドロカルバゾリル等の３環の縮合複素環式基等を包含する。好ましくは５～６員のヘテロアリールまたは非芳香族複素環式基である。

[0080] 本明細書中、「アルキレン」とは、炭素数１～１０の直鎖状または分枝状のアルキレンを意味し、例えば、メチレン、１－メチルメチレン、１，１－ジメチルメチレン、エチレン、１－メチルエチレン、１－エチルエチレン、１，１－ジメチルエチレン、１，２－ジメチルエチレン、１，１－ジエチルエチレン、１，２－ジエチルエチレン、１－エチル－２－メチルエチレン、トリメチレン、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、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、２，２－ジエチルトリメチレン、２－エチル－２－メチルトリメチレン、テトラメチレン、１－メチルテトラメチレン、２－メチルテトラメチレン、１，１－ジメチルテトラメチレン、１，２－ジメチルテトラメチレン、２，２－ジメチルテトラメチレン、２，２－ジ－ｎ－プロピルトリメチレン等が挙げられる。特に、炭素数２～６の直鎖状または分枝状のアルキレンが好ましい。

[0081] 本明細書中、「アルケニレン」とは、炭素数２～１０の直鎖状または分枝状のアルケニレンを意味し、例えば、エテニレン、１－メチルエテニレン、１－エチルエテニレン、１，２－ジメチルエテニレン、１，２－ジエチルエテニレン、１－エチル－２－メチルエテニレン、プロペニレン、１－メチル－２－プロペニレン、２－メチル－２－プロペニレン、１，１－ジメチル－２－プロペニレン、１，２－ジメチル－２－プロペニレン、１－エチル－２－プロペニレン、２－エチル－２－プロペニレン、１，１－ジエチル－２－

プロペニレン、１，２－ジエチル－２－プロペニレン、１－ブテニレン、２－ブテニレン、１－メチル－２－ブテニレン、２－メチル－２－ブテニレン、１，１－ジメチル－２－ブテニレン、１，２－ジメチル－２－ブテニレン等が挙げられる。特に、炭素数２～６の直鎖状または分枝状のアルケニレンが好ましい。

[0082] 本明細書中、「アルキニレン」とは、任意の位置に三重結合を有し、さらに二重結合を有していてもよい、直鎖または分枝状の炭素数２～１０、好ましくは炭素数２～６、好ましくは炭素数２～４の２価の炭素鎖を包含する。具体的にはエチニレン、プロピニレン、ブチニレン、ペンチニレンおよびヘキシニレン等が挙げられる。

[0083] 本明細書中、「アルキルカルボニル」のアルキル部分は、上記「アルキル」を意味する。

[0084] 本明細書中、「アルケニルオキシ」および「アルケニルカルボニル」のアルケニル部分は、上記「アルケニル」を意味する。

[0085] 本明細書中、「アリールオキシ」および「アリールカルボニル」のアリール部分は、上記「アリール」を意味する。

[0086] 本明細書中、「ヘテロアリールカルボニル」のヘテロアリール部分は、上記「ヘテロアリール」を意味する。

[0087] 本明細書中、「ヘテロサイクルカルボニル」のヘテロサイクル部分は、上記「ヘテロサイクル」を意味する。

[0088] 本明細書中、「アリールスルホニル」のアリール部分は、上記「アリール」を意味する。

[0089] 本明細書中、「ヘテロアリールスルホニル」のヘテロアリール部分は、上記「ヘテロアリール」を意味する。

[0090] 本明細書中、「ヘテロサイクルスルホニル」のヘテロサイクル部分は、上記「ヘテロサイクル」を意味する。

[0091] 本明細書中、炭素原子を置き換えることができる典型的なヘテロ原子および／またはヘテロ原子基には以下が含まれるがこれらに限定されない：－Ｏ

－、－Ｓ－、－Ｓ－Ｏ－、－ＮＲ’－、－ＰＨ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_2$－、－Ｓ（Ｏ）ＮＲ’－、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲ’－など、その組み合わせを含む。ここで、各Ｒ’は独立して水素または（Ｃ１－Ｃ６）アルキルである。

[0092] 本明細書中、「芳香族環系」とは、共役π電子系を有する不飽和環または多環式環系をいう。１つ以上の環が芳香族性であり、１つ以上の環が飽和または不飽和である縮合環系、例えば、フルオレン、インダン、インデン、フェナレン、テトラヒドロナフタレンなどは具体的に「芳香族環系」の定義の中に含まれる。典型的な親の芳香族環系には以下が含まれるがこれらに限定されない：アセアントリレン、アセナフチレン、アセフェナントリレン、アントラセン、アズレン、ベンゼン、クリセン、コロネン、フルオランセン、フルオレン、ヘキサセン、ヘキサフェン、ヘキサレン、インダセン、ｓ－インダセン、インダン、インデン、ナフタレン、オクタセン、オクタフェン、オクタレン、オバレン、ペンター２，４－ジエン、ペンタセン、ペンタレン、ペンタフェン、ペリレン、フェナレン、フェナントレン、ピセン、プレイアデン、ピレン、ピラントレン、ルビセン、テトラヒドロナフタレン、トリフェニレン、トリナフタレンなど、ならびにその種々のヒドロ異性体。

[0093] 本明細書中、「非芳香族縮合炭素環式基」とは、上記「シクロアルキル」、「シクロアルケニル」および「アリール」から選択される２個以上の環状基が縮合した基を包含し、具体的にはインダニル、インデニル、テトラヒドロナフチルおよびフルオレニル等が挙げられる。

[0094] 本明細書中、「置換もしくは非置換の炭素環式基」および「置換もしくは非置換の複素環式基」の置換基としては、任意の置換基が挙げられ、好ましくは低級アルキルおよび置換基群αからなる群から選択される１以上の基が挙げられる。

[0095] 本明細書中、「置換もしくは非置換のアルキル」、「置換もしくは非置換のアルケニル」、「置換もしくは非置換のアルキニル」、「置換もしくは非置換のアリール」、「置換もしくは非置換のシクロアルキル」「置換もしく

は非置換のシクロアルケニル」、「置換もしくは非置換のヘテロアリール」、「置換もしくは非置換のヘテロサイクル」、「置換もしくは非置換のアシル」、「置換もしくは非置換のアルコキシ」、「置換もしくは非置換のアルキレン」、「置換もしくは非置換のアルケニレン」、および「置換もしくは非置換のアルキニレン」における置換基としては、例えば、ヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、ハロゲン化アルキル（例：CF_3、CH_2CF_3、CH_2CCl_3）、ニトロ、ニトロソ、シアノ、アルキル（例：メチル、エチル、イソプロピル、ｔｅｒｔ－ブチル）、アルケニル（例：ビニル）、アルキニル（例：エチニル）、シクロアルキル（例：シクロプロピル、アダマンチル）、シクロアルキルアルキル（例：シクロヘキシルメチル、アダマンチルメチル）、シクロアルケニル（例：シクロプロペニル）、アリール（例：フェニル、ナフチル）、アリールアルキル（例：ベンジル、フェネチル）、ヘテロアリール（例：ピリジル、フリル）、ヘテロアリールアルキル（例：ピリジルメチル）、ヘテロサイクル（例：ピペリジル）、ヘテロサイクルアルキル（例：モルホリルメチル）、アルコキシ（例：メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ）、ハロゲン化アルキルオキシ（例：OCF_3）、アルケニルオキシ（例：ビニルオキシ、アリルオキシ）、アリールオキシ（例：フェニルオキシ）、アルキルオキシカルボニル（例：メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）、アリールアルキルオキシ（例：ベンジルオキシ）、アミノ（例：アルキルアミノ（例：メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ）、アシルアミノ（例：アセチルアミノ、ベンゾイルアミノ）、アリールアルキルアミノ（例：ベンジルアミノ、トリチルアミノ）、ヒドロキシアミノ、アルキルアミノアルキル（例：ジエチルアミノメチル）、スルファモイル等からなる群から選択される。１～４個の当該置換基で置換し得る。あるいは、低級アルキルおよび置換基群αからなる群から選択される１以上の基で置換されていてもよい。

[0096] 上記に定義した基はさらに十分に認識された置換基を作製するために当該分野において一般的に使用される接頭辞および／または接尾辞を含んでもよ

い。例として、「アルキルオキシ」または「アルコキシ」とは、式－ＯＲ’’の基をいい、「アルキルアミン」とは式－ＮＨＲ’’の基をいい、「ジアルキルアミン」とはＮＲ’’Ｒ’’の基をいい、ここで、各Ｒ’’は独立してアルキルである。別の例として、「ハロアルコキシ」または「ハロアルキルオキシ」とは、式－ＯＲ’’’の基をいい、ここでＲ’’’はハロアルキルである。

[0097] 本明細書中、「溶媒和物」とは、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩の溶媒和物を意味し、例えば有機溶媒との溶媒和物（例えば、アルコール（例：エタノール）和物）、水和物等を包含する。水和物を形成する時は、任意の数の水分子と配位していてもよい。水和物としては、１水和物、２水和物等を挙げることができる。

[0098] 本明細書において「プロドラッグ」とは、生体の代謝機構を逆手にとり、もとのままの形では薬作用を示さないかまたは非常に弱い活性を示すのみであるが、生体内で代謝されることで、初めて薬理活性を示すか薬理活性が増大されるように修飾されているもののことをいう。本発明の薬学的に許容されるプロドラッグとしては、当該分野において公知の任意の形態を採用することができる。塩、溶媒和物などのほか、エステル、アミドなどもプロドラッグの一例として挙げることができる。

[0099] 本明細書中、「薬学的に受容可能な塩、エステル、アミド、およびプロドラッグ」という用語は、本明細書で使用される場合、本明細書の化合物のカルボン酸塩、アミノ酸付加塩、エステル、アミド、およびプロドラッグをいい、これは、正常な医学的判断の範囲内にあり、過度の毒性、炎症、アレルギー応答などなしで、患者の組織との接触における使用のために適切であるものであり、本発明の化合物のそれらの意図される使用のために有効であるものをいう。

[0100] 本明細書中、「塩」という用語は、比較的非毒性の、本発明の化合物の無機または有機の酸付加塩をいう。これらの塩は、化合物の最終的な単離および精製の間に一時的に、またはその遊離塩基型で精製された化合物を適切な

有機もしくは無機の酸と別々に反応させること、およびそのように形成された塩を単離することによって調製することができる。

[0101] 本発明の化合物の薬学的に許容される塩としては、以下の塩が挙げられる。

[0102] 本発明の化合物の薬学的に許容される塩基性塩として、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アンモニウム塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、エタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、プロカイン塩、メグルミン塩、ジエタノールアミン塩またはエチレンジアミン塩等の脂肪族アミン塩；Ｎ，Ｎ－ジベンジルエチレンジアミン、ベネタミン塩等のアラルキルアミン塩；ピリジン塩、ピコリン塩、キノリン塩、イソキノリン塩等のヘテロ環芳香族アミン塩；テトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルトリエチルアンモニウム塩、ベンジルトリブチルアンモニウム塩、メチルトリオクチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等の第４級アンモニウム塩；アルギニン塩、リジン塩等の塩基性アミノ酸塩等が挙げられる。

[0103] 本発明の化合物の薬学的に許容される酸性塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、過塩素酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、プロピオン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマール酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩等の有機酸塩；メタンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩等のスルホン酸塩；アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等の酸性アミノ酸等が挙げられる。

[0104] 特に塩酸、リン酸、酒石酸またはメタンスルホン酸等が好ましい。これらの塩は、通常行われる方法によって形成させることができる。

[0105] 本明細書中、「薬学的に受容可能なエステル」という用語は、本発明の化合物の比較的非毒性の、エステル化生成物をいう。これらのエステルは、化

合物の最終的な単離および精製の間にインサイチュで、またはその遊離酸型もしくはヒドロキシルで精製された化合物を適切なエステル化剤と別々に反応させることによって調製することができる。カルボン酸は、触媒の存在下で、アルコールとの処理を介してエステルに転換することができる。この用語は、生理学的条件下で、溶媒和可能な低級炭化水素基、例えば、アルキルエステル、メチルエステル、エチルエステル、およびプロピルエステルを含むことがさらに意図される。

[0106] 本明細書において「異性体」とは、当該分野において使用される通常の意味と動揺に用いられ、分子式が同じで構造式や性質の異なる物質をいう。本発明で使用される異性体は、特定の異性体に限定するものではなく、全ての可能な異性体（例えば、ケトーエノール異性体、イミンーエナミン異性体、ジアステレオ異性体、光学異性体、鏡像異性体、幾何異性体、立体異性体、シストートランス異性体、配座異性体および回転異性体等）やラセミ体を含むものである。本発明の化合物の各々において１つ以上のキラル中心が存在することが理解されるべきである。本発明は、各化合物のすべての立体化学型、例えば、エナンチオマー、ジアステレオマーおよびラセミ化合物を包含することが理解されるべきである。不斉炭素原子が存在する場合、１つより多くの立体異性体が可能であり、すべての可能な異性体型が、示される構造の表現の中に含まれることが意図される。任意に、活性な（Ｒ）および（Ｓ）異性体が、当業者に公知である従来的な技術を使用して分離されてもよい。本発明は、可能なジアステレオマーならびにラセミ化合物および光学分割された異性体を含むことを意図する。

[0107] 以下の説明を通して、特定の二重結合が示される場合、シス配置とトランス配置の両方を含むことを意図することが理解されるべきである。例示的な化学式は、特定の配置とともに提供されるが、完全性のために、二重結合を変化させることができる。明細書の簡潔さを維持する目的のため、あらゆる構造異性体が示されるわけではない。しかし、これは、事実上、限定と見なされるべきではない。加えて、合成スキームが提供される場合、すべてのシ

ス／トランス配置異性体もまた意図され、合成方法の範囲内にあることが理解されるべきである。

[0108] 本発明の化合物におけるヒドロキシルは、当該分野において公知であるものなどの種々の保護基によって保護することができる。

[0109] 本明細書中、「保護基」とは、分子中の反応性官能基に結合された場合に、官能基の反応性をマスクし、減少し、または妨害する一群の原子をいう。典型的には、保護基は、合成の過程の間に所望されるように選択的に除去されてもよい。保護基の例は、ＧｒｅｅｎｅおよびＷｕｔｓ、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、第３版、１９９９，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹならびにＨａｒｒｉｓｏｎら、Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ、Ｖｏｌｓ．１－８，１９７１－１９９６，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹにおいて見ることができる。代表的な窒素保護基には以下が含まれるがこれらに限定されない：ホルミル、アセチル、トリフルオロアセチル、ベンジル、ベンジルオキシカルボニル（「ＣＢＺ」）、ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（「Ｂｏｃ」）、トリメチルシリル（「ＴＭＳ」）、２－トリメチルシリル－エタンスルホニル（「ＴＥＳ」）、トリチルおよび置換トリチル基、アリルオキシカルボニル、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル（「ＦＭＯＣ」）、ニトロ－ベラトリルオキシカルボニル（「ＮＶＯＣ」）など。代表的なヒドロキシル保護基には、ヒドロキシル基がアセチル化（エステル化）またはアルキル化されているもの、例えば、ベンジルエーテルおよびトリチルエーテル、ならびにアルキルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、トリアルキルシリルエーテル（例えば、ＴＭＳ基またはＴＩＰＰＳ基）、グルコールエーテル、例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコール誘導体、およびアリルエーテルが含まれるがこれらに限定されない。

[0110] 当業者は、どの保護基がヒドロキシル基の保護のために有用であり得るかを容易に決定することができる。標準的な方法は当該分野において公知であ

り、文献中により完全に記載されている。例えば、適切な保護基は当業者によって選択されることができ、ＧｒｅｅｎおよびＷｕｔｓ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ５および７，１９９１において記載されており、この教示は参考として本明細書に援用される。好ましい保護基には、メチルおよびエチルエーテル、ＴＭＳまたはＴＩＰＰＳ基、酢酸（エステル）またはプロピオン酸基およびグリコールエーテル、例えば、エチレングリコールおよびプロピレングルコール誘導体が含まれる。

[0111] 例えば、１つ以上のヒドロキシル基が、酸塩化物またはシリルクロライドの存在下で、穏やかな塩基、例えば、トリエチルアミンで処理され、ヒドロキシルイオンとハロゲン化物との間の反応を容易にすることができる。代替的には、ハロゲン化アルキルが、ヒドロキシルイオン（リチウムジイソプロピルアミドなどの塩基によって生成する）と反応して、エーテル形成を容易にすることができる。

[0112] レゾルビン・プロテクチン類は、以下をいう：５Ｓ，１２Ｒ，１８Ｒ－トリヒドロキシ－６Ｚ，８Ｅ，１０Ｅ，１４Ｚ，１６Ｅ－エイコサペンタエン酸：レゾルビンＥ１ａ；５Ｓ，１８Ｒ－ジヒドロキシ－６Ｅ，８Ｚ，１１Ｚ，１４Ｚ，１６Ｅ－エイコサペンタエン酸：レゾルビンＥ２；７Ｓ，８，１７Ｒ－トリヒドロキシードコサ－４Ｚ，９Ｅ，１１Ｅ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ１；７Ｓ，１６，１７Ｒ－トリヒドロキシードコサ－４Ｚ，８Ｅ，１０Ｚ，１２Ｅ，１４Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ２；４Ｓ，１１，１７Ｒ－トリヒドロキシードコサ－５，７Ｅ，９Ｅ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ３；４Ｓ，５，１７Ｒ－トリヒドロキシードコサ－６Ｅ，８Ｅ，１０Ｚ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ４；７Ｓ，１７Ｒ－ＤｉＨＤＨＡ７Ｓ，１７Ｒ－ジヒドロキシードコサ－５Ｚ，８Ｅ，１０Ｚ

，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ５；４Ｓ，１７Ｒ－ＤｉＨＤＨＡ４Ｓ，１７Ｒ－ジヒドロキシ－ドコサ－５Ｅ，７Ｚ，１０Ｚ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型レゾルビンＤ６；１０，１７Ｒ－ＤｉＨＤＨＡ１０，１７Ｒ－ジヒドロキシ－ドコサ－４Ｚ，７Ｚ，１１，１３，１５，１９Ｚ－ヘキサエン酸：アスピリントリガー型１０，１７Ｒ－ドコサトリエン；７Ｓ，８，１７Ｓ－ＴｒｉＨＤＨＡ７Ｓ，８，１７Ｓ－トリヒドロキシ－ドコサ－４Ｚ，９Ｅ，１１Ｅ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ１ａ；７Ｓ，１６，１７Ｓ－ＴｒｉＨＤＨＡ７Ｓ，１６，１７Ｓ－トリヒドロキシ－ドコサ－４Ｚ，８Ｅ，１０Ｚ，１２Ｅ，１４Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ２ａ；４Ｓ，１１，１７Ｓ－ＴｒｉＨＤＨＡ４Ｓ，１１，１７Ｓ－トリヒドロキシ－ドコサ－５，７Ｅ，９Ｅ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ３ａ；４Ｓ，５，１７Ｓ－ＴｒｉＨＤＨＡ４Ｓ，５，１７Ｓ－トリヒドロキシ－ドコサ－６Ｅ，８Ｅ，１０Ｚ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ４ａ；７Ｓ，１７Ｓ－ＤｉＨＤＨＡ７Ｓ，１７Ｓ－ジヒドロキシ－ドコサ－５Ｚ，８Ｅ，１０Ｚ，１３Ｚ，１５Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ５；４Ｓ，１７Ｓ－ＤｉＨＤＨＡ４Ｓ，１７Ｓ－ジヒドロキシ－ドコサ－５Ｅ，７Ｚ，１０Ｚ，１４Ｚ，１６Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：レゾルビンＤ６ａ；１０，１７Ｓ－ＤｉＨＤＨＡ１０，１７Ｓ－ジヒドロキシ－ドコサ－４Ｚ，７Ｚ，１１Ｅ，１３Ｅ，１５Ｚ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：１０，１７Ｓ－ドコサトリエン、ニューロプロテクチンＤ１；１６，１７Ｓ－ジヒドロキシ－ドコサ－４Ｚ，７Ｚ，１０Ｚ，１２Ｅ，１４Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：１６，１７Ｓ－ドコサトリエン；１６，１７－エポキシ－ドコサ－４Ｚ，７Ｚ，１０Ｚ，１２Ｅ，１４Ｅ，１９Ｚ－ヘキサエン酸：１６，１７－エポキシ－ドコサトリエン。

[0113] 本発明の化合物は、レゾルビン・プロテクチンとは異なる従来公知ではなかったと考えられる物質である。

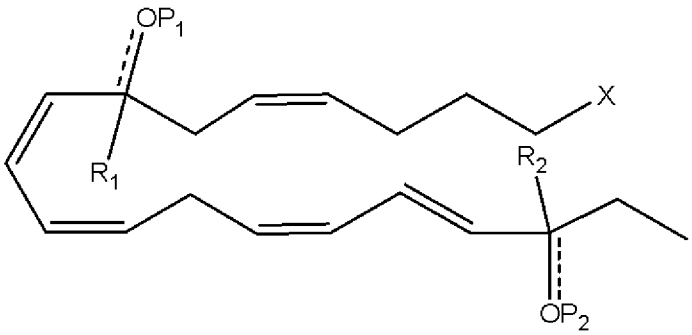
[0114] （好ましい実施形態）

本発明の好ましい実施形態を、以下に掲げる。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでない。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

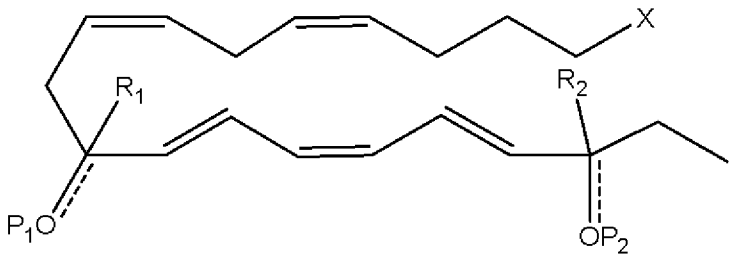
[0115] （化合物）

１つの局面において、本発明は、以下の化合物を提供する。

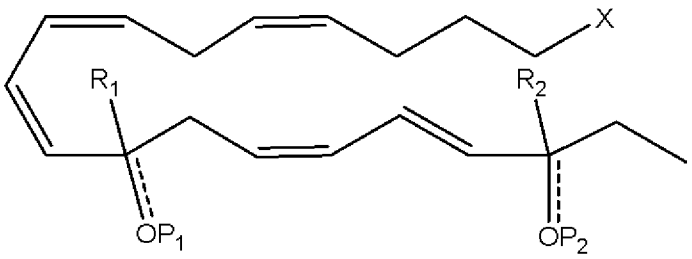
[0116] [化20]



[0117] [化21]

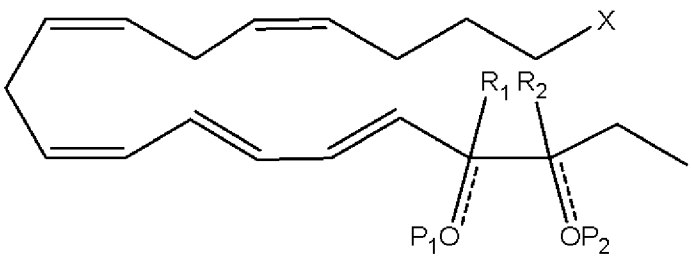


[0118] [化22]

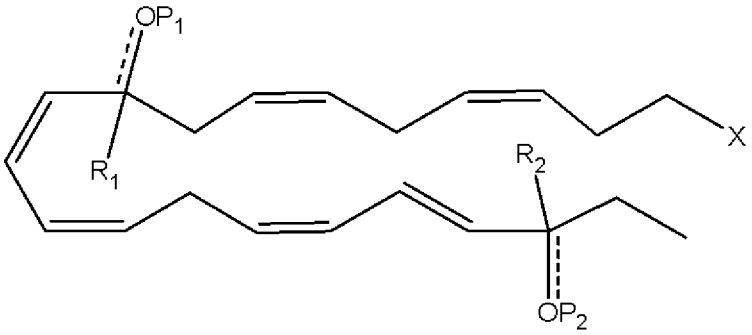


[0119]

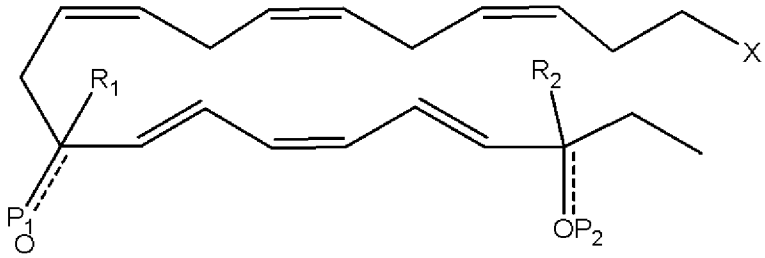
[化23]



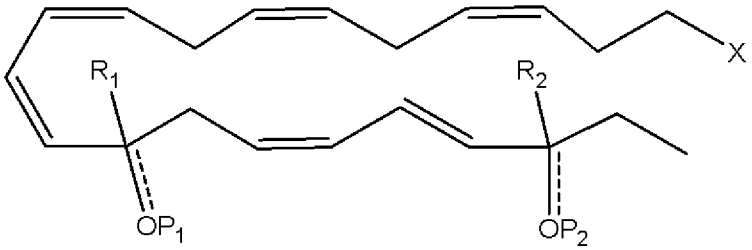
[0120] [化24]



[0121] [化25]

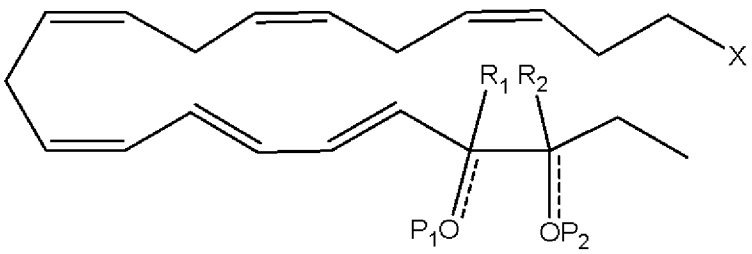


[0122] [化26]



[0123] および

[0124] [化27]



[0125] から選択される化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、

ここで、

P_1およびP_2は、各々独立して、

[0126] [化28]

[0127] が単結合を示す場合は、保護基、水素原子、アルキル、水酸基もしくは置換された水酸基またはその組み合わせであり、

[0128] [化29]

[0129] が二重結合を示す場合は、P_1、P_2、R_1およびR_2は、存在せず、

[0130] [化30]

[0131] が単結合の場合、

R_1およびR_2は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキルアリール基またはその組み合わせであり；

Xは、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ$_3$、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－Ｃ（Ｏ）Ｈ、－Ｃ（ＮＨ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－Ｃ（Ｓ）Ｈ、－Ｃ（Ｓ）ＯＲ$_3$、－Ｃ（Ｓ）ＮＲ$_4$Ｒ$_5$、－ＣＮであり；

R_3は、水素、保護基、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルまたは式：－ＮＲ$_a$Ｒ$_b$（式中、R_aおよびR_bは各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、

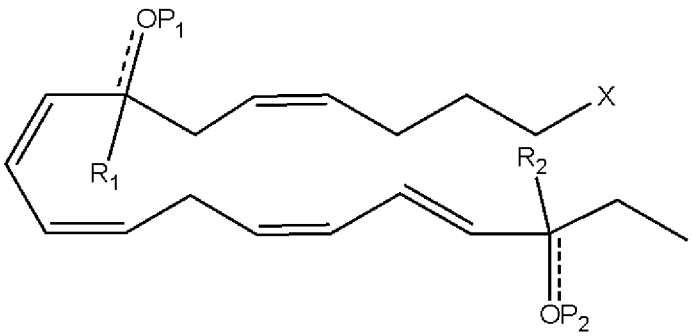
置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_aとR_bは隣接する窒素原子と一緒になって、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよい。）であり；R_4およびR_5は、各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_4とR_5は隣接する窒素原子と一緒になって、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよく；そして、化合物の二重結合配置は各々独立してシスまたはトランスのいずれかであり得る、化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を提供する。

[0132] 以下に、これらの化合物をより詳細に説明する。

[0133] （８，１８－ｄｉＨＥＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0134] [化31]



[0135] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0136] [化32]

[0137] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

[0138] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1および

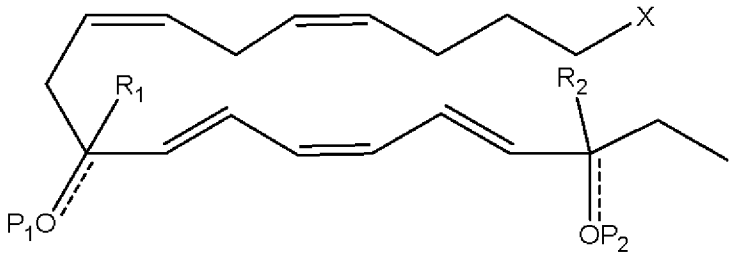
R_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0139] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0140] （１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0141] [化33]



[0142] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0143] [化34]

[0144] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

[0145] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

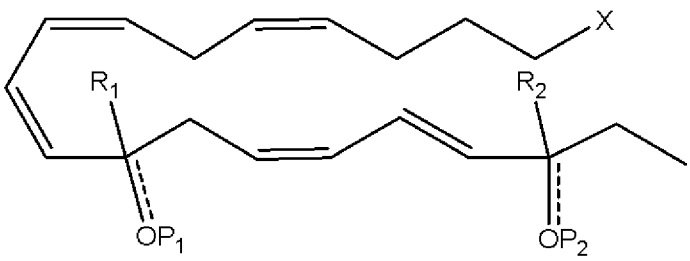
[0146] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0147] （１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0148]

[化35]



[0149] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0150] [化36]

[0151] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

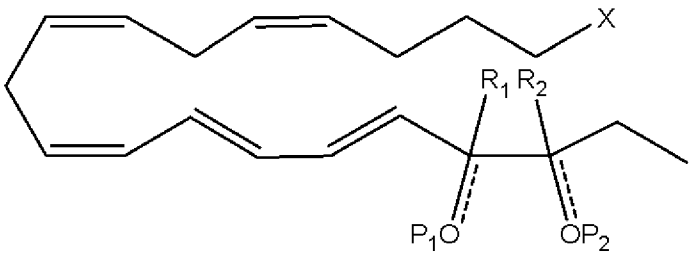
[0152] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0153] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0154] （１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0155] [化37]



[0156] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0157] [化38]

[0158] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

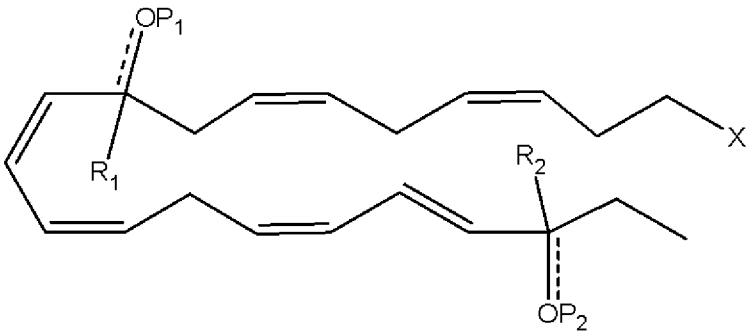
[0159] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0160] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0161] （１０，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0162] [化39]



[0163] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0164] [化40]

[0165] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

[0166] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

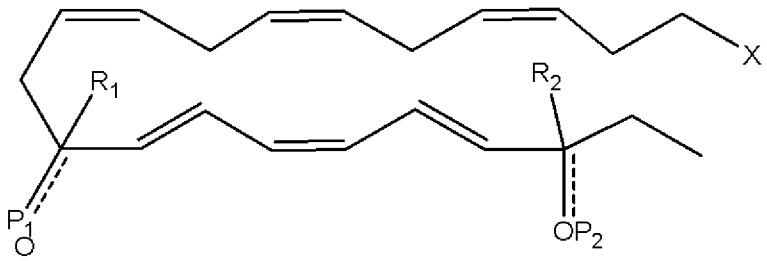
[0167] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカル

ボン酸塩である。

[0168] （１３，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0169] [化41]



[0170] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0171] [化42]

[0172] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

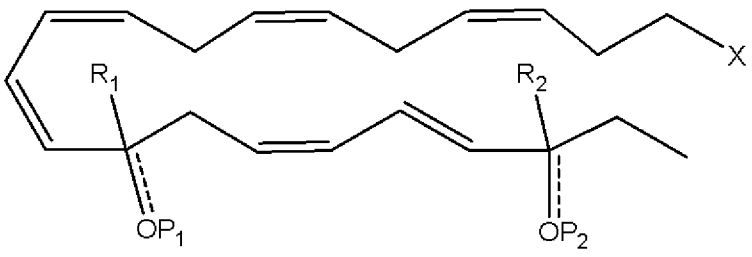
[0173] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0174] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0175] （１４，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0176] [化43]



[0177] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0178] [化44]

[0179] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

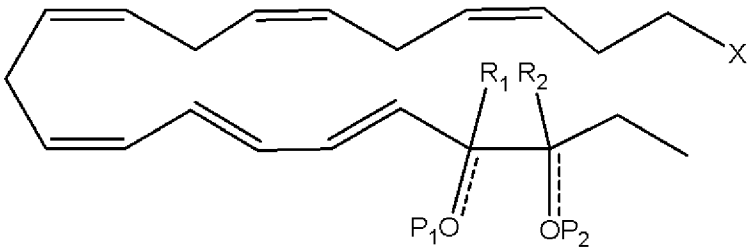
[0180] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0181] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

[0182] （１９，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ関連化合物）

１つの局面において、本発明は、化学式：

[0183] [化45]



[0184] を有する、化合物および薬学的組成物を提供する。ここで

[0185] [化46]

[0186] 、P_1、P_2、R_1、R_2およびＸは各々独立して、上記に定義した通りである。

[0187] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は各々水素原子であり、R_1およびR_2は、各々独立して、メチル基または水素原子またはその組み合わせであり、Ｘはカルボン酸またはカルボン酸エステルである。

[0188] Ｘはカルボン酸、エステル、アミド、チオカルバメート、カルバメート、

チオエステル、チオカルボキサミド、またはニトリルでありうる。好ましくは、Ｘはカルボン酸、カルボン酸エステル、または薬学的に受容可能なカルボン酸塩である。

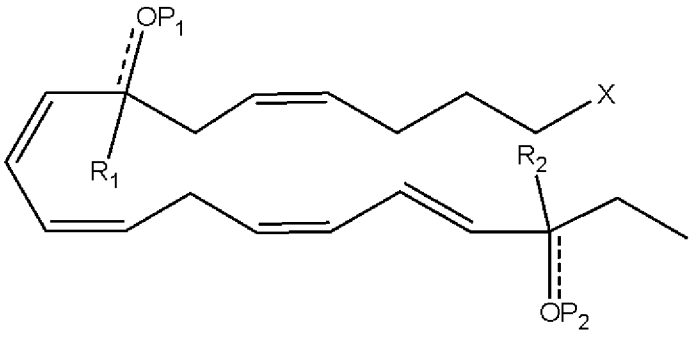
[0189] これらの化合物は、いずれも、ω３系列の　ＰＵＦＡに属するエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）やドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）の代謝物であり、従来知られていなかった１２／１５ＬＯＸ、８－ＬＯＸ等の代謝物であり、公知のレゾルビン、プロテクチンといった代謝物とは異なる別の系列の代謝物に属するという点で、まったく新規な化合物グループであるといえる。

[0190] 特定の実施形態において、R_1、R_2、P_1およびP_2が水素原子でありＺがカルボン酸である場合、化合物は単離され、および／または精製されるかのいずれかであってもよい。このような化合物の純度は、ＧＣ、ＭＳ、または^{1}ＨＮＭＲなどを用いた分析測定に基づいて、少なくとも８０％純度、特に、少なくとも約９０％の純度、より特定すると少なくとも９５％の純度、およびより好ましくは少なくとも約９９％の純度である。これは、本明細書全体で、すべての単離された化合物および／または精製された化合物において適用する。

[0191] （化合物の別の改変形態）

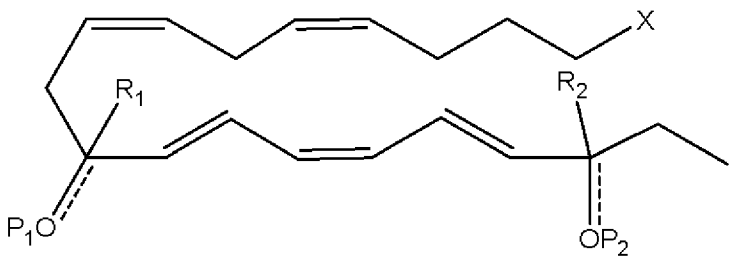
別の局面では、本発明は、以下のように表現することができる。

[0192] [化47]

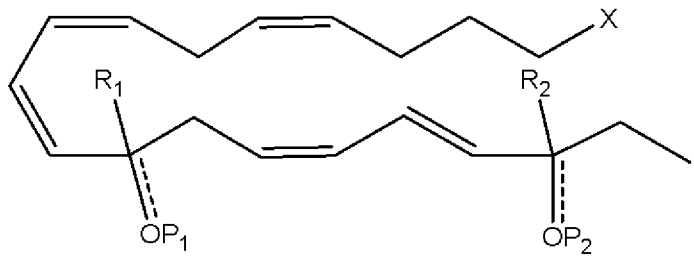


[0193]

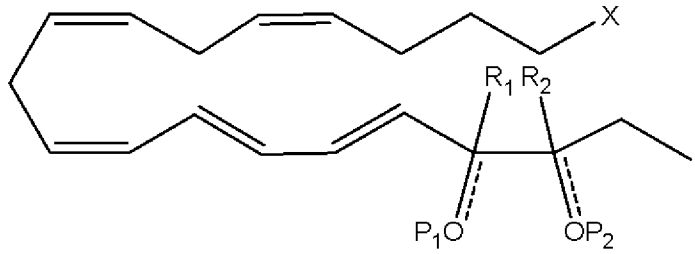
[化48]



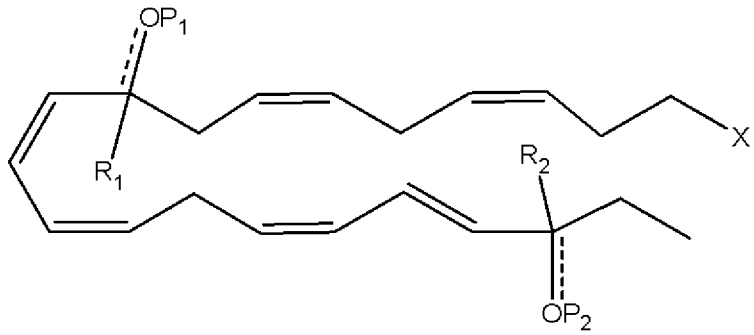
[0194] [化49]



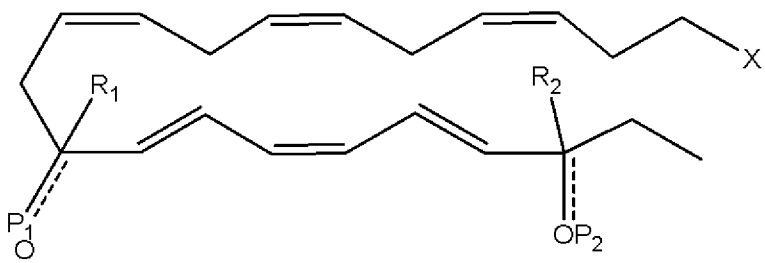
[0195] [化50]



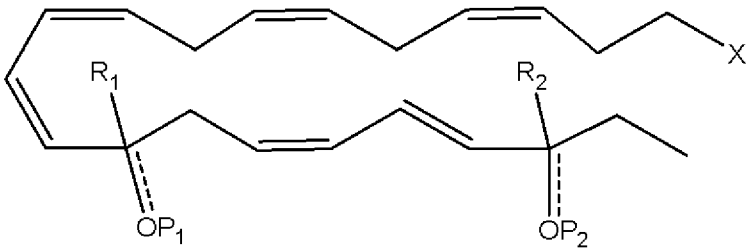
[0196] [化51]



[0197] [化52]

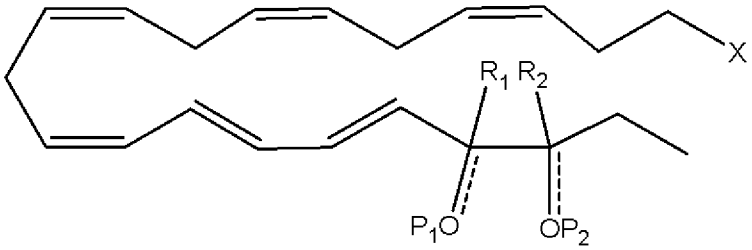


[0198] [化53]



[0199] および

[0200] [化54]



[0201] から選択される化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、

式中、

P_1およびP_2は、各々独立して、

[0202] [化55]

[0203] が単結合を示す場合は、保護基、水素原子、アルキル、水酸基もしくは置換された水酸基またはその組み合わせであり、

[0204] [化56]

[0205] が二重結合を示す場合は、P_1、P_2、R_1およびR_2は、存在せず、

[0206] [化57]

[0207] が単結合の場合、

R_1およびR_2は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキルアリール基またはそ

の組み合わせであり；

Ｘは、－Ｃ（Ｏ）ＯＲｄ、－Ｃ（Ｏ）ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（Ｏ）Ｈ、－Ｃ（ＮＨ）ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（Ｓ）Ｈ、－Ｃ（Ｓ）ＯＲｄ、－Ｃ（Ｓ）ＮＲｃＲｃ、－ＣＮであり；

各Ｒａは、存在する場合、水素、（Ｃ１～Ｃ６）アルキル、（Ｃ３～Ｃ８）シクロアルキル、シクロヘキシル、（Ｃ４～Ｃ１１）シクロアルキルアルキル、（Ｃ５～Ｃ１０）アリール、フェニル、（Ｃ６～Ｃ１６）アリールアルキル、ベンジル、２～６員ヘテロアルキル、３～８員シクロヘテロアルキル、モルホリニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ピペリジニル、４～１１員シクロヘテロアルキルアルキル、５～１０員ヘテロアリールおよび６～１６員ヘテロアリールアルキルからなる基より独立して選択され；

各Ｒｂは、存在する場合、＝Ｏ、－ＯＲｄ、（Ｃ１～Ｃ３）ハロアルキルオキシ、－ＯＣＦ$_3$、＝Ｓ、－ＳＲｄ、＝ＮＲｄ、＝ＮＯＲｄ、－ＮＲｃＲｃ、ハロゲン、－ＣＦ$_3$、－ＣＮ、－ＮＣ、－ＯＣＮ、－ＳＣＮ、－ＮＯ、－ＮＯ$_2$、＝Ｎ$_2$、－Ｎ$_3$、－Ｓ（Ｏ）Ｒｄ、－Ｓ（Ｏ）$_2$Ｒｄ、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＯＲｄ、－Ｓ（Ｏ）ＮＲｃＲｃ、－Ｓ（Ｏ）$_2$ＮＲｃＲｃ、－ＯＳ（Ｏ）Ｒｄ、－ＯＳ（Ｏ）$_2$Ｒｄ、－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＯＲｄ、－ＯＳ（Ｏ）$_2$ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（Ｏ）Ｒｄ、－Ｃ（Ｏ）ＯＲｄ、－Ｃ（Ｏ）ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（ＮＨ）ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（ＮＲａ）ＮＲｃＲｃ、－Ｃ（ＮＯＨ）Ｒａ、－Ｃ（ＮＯＨ）ＮＲｃＲｃ、－ＯＣ（Ｏ）Ｒｄ、－ＯＣ（Ｏ）ＯＲｄ、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲｃＲｃ、－ＯＣ（ＮＨ）ＮＲｃＲｃ、－ＯＣ（ＮＲａ）ＮＲｃＲｃ、－［ＮＨＣ（Ｏ）］$_n$Ｒｄ、－［ＮＲａＣ（Ｏ）］$_n$Ｒｄ、－［ＮＨＣ（Ｏ）］$_n$ＯＲｄ、－［ＮＲａＣ（Ｏ）］$_n$ＯＲｄ、－［ＮＨＣ（Ｏ）］$_n$ＮＲｃＲｃ、－［ＮＲａＣ（Ｏ）］$_n$ＮＲｃＲｃ、－［ＮＨＣ（ＮＨ）］$_n$ＮＲｃＲｃおよび－［ＮＲａＣ（ＮＲａ）］$_n$ＮＲｃＲｃからなる基より独立して選択される適切な基であり；

各Ｒｃは、存在する場合、独立して保護基もしくはＲａであり、または、代替的には、各Ｒｃはそれが結合する窒素原子と一緒になって５～８員シク

ロヘテロアルキルもしくはヘテロアリールを形成し、これらは１つ以上の同じもしくは異なるさらなるヘテロ原子を任意に含んでもよく、そして１つ以上の同じもしくは異なるＲａ基もしくは適切なＲｂ基で任意に置換されてもよく；

各ｎは、存在する場合、独立して、０～３の整数であり；

各Ｒｄは、存在する場合、独立して、保護基またはＲａである。

[0208] １つの実施形態では、Ｘは、カルボン酸、エステル、薬学的に受容可能なカルボン酸塩、またはそのプロドラッグである。

[0209] 特定の実施形態において、Ｘはカルボン酸の薬学的に受容可能な塩であり、特に、アンモニウム塩であり、またはプロドラッグを形成する。

[0210] また、１つの実施形態では、Ｃ－５、Ｃ－６、Ｃ－１２、Ｃ－１３、Ｃ－１４、Ｃ－１５、Ｃ－１６、Ｃ－１７、Ｃ－１８、Ｃ－１９またはＣ－２０が、存在する場合、これがキラル中心であるならば、各々独立してＲ配置もしくはＳ配置またはＲ／Ｓ配置を有していてもよい。

[0211] ある実施形態において、P_1およびP_2は、存在する場合、各々独立して水素原子であり、Ｘはカルボン酸またはエステルである。

[0212] 他の実施形態において、P_1およびP_2の１つ以上は水素原子であり、Ｘはカルボン酸またはエステルである。

[0213] 特定の実施形態において、R_1およびR_2は、存在する場合、各々独立して、メチル、エチル、およびプロピルなどの低級アルキル基であり、トリフルオロメチルのように、ハロゲン化され得る。１つの態様において、R_1およびR_2の少なくとも１つは、存在する場合、水素原子ではない。一般的に、Ｘはカルボン酸であり、P_1およびP_2の１つ以上は水素原子である。

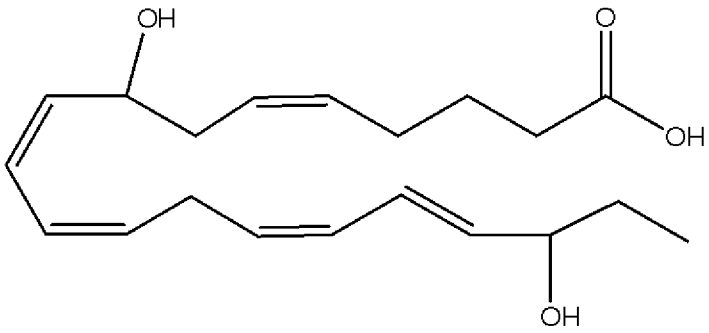
[0214] 特定の実施形態において、P_1およびP_2は、各々独立して水素原子であり、Ｘはカルボキシルエステルである。他の実施形態において、P_1およびP_2は、各々独立して水素原子であり、Ｘはカルボン酸である。他の実施形態において、P_1およびP_2は、各々独立して水素原子であり、Ｘはカルボン酸でない。

[0215] １つの局面において、本明細書に記載される化合物は、単離および／または精製され、特に、P_1およびP_2は、各々独立して水素原子であり、Ｘはカルボン酸である化合物が単離および／または精製される。

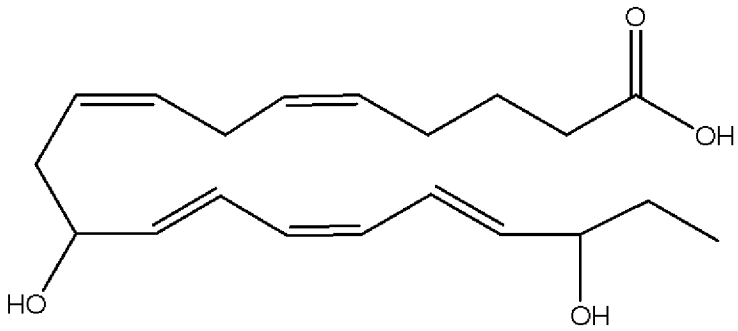
[0216] 本発明の化合物は、好中球の抑制によって治療または予防しうる疾患たとえば、炎症性疾患を処置するために有用である。このような用途は、炎症疾患以外にも種々存在し、本明細書において他の箇所に記載されるようなものが例示される。

[0217] 従って、好ましい実施形態では、本発明は、以下の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を提供する：

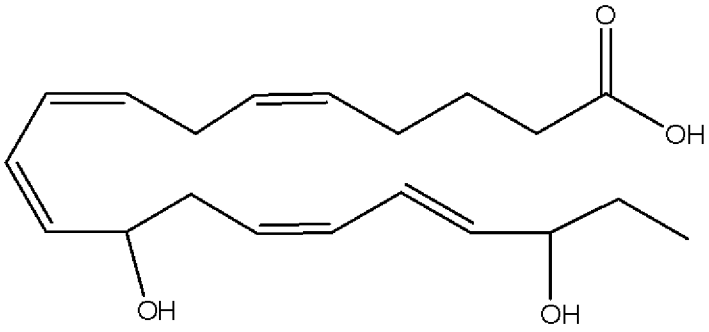
[0218] [化58]



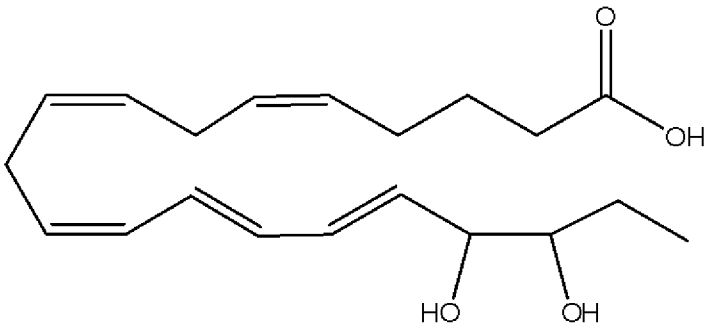
[0219] [化59]



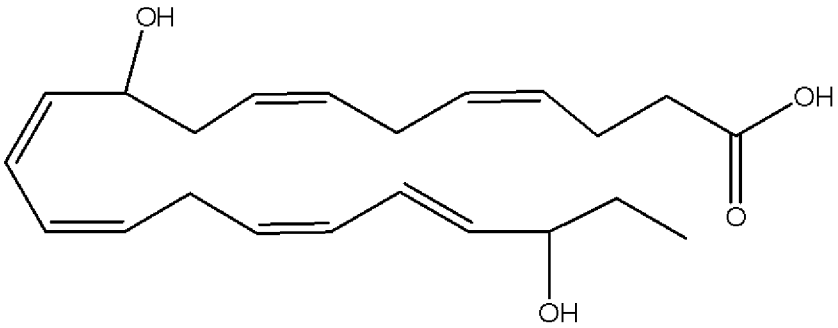
[0220] [化60]



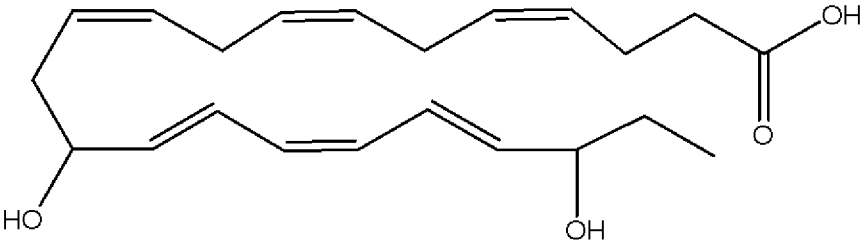
[0221] [化61]



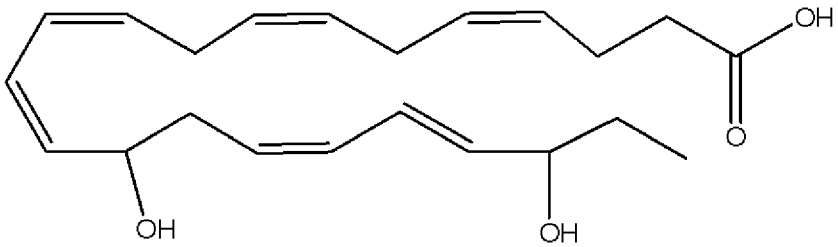
[0222] [化62]



[0223] [化63]



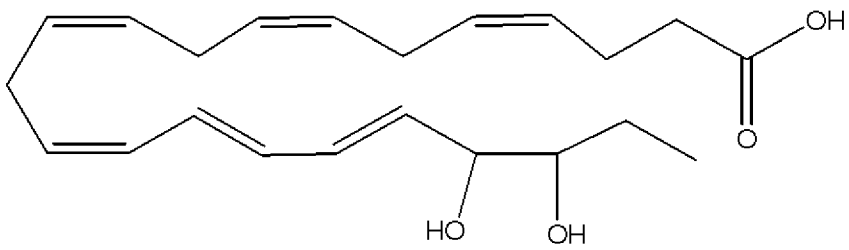
[0224] [化64]



[0225] または

[0226]

[化65]



[0227] 本明細書に記載される化合物は、腹膜炎モデルにおける好中球浸潤のダウンレギュレーションによって認められるような抗炎症活性を有する。

[0228] 本発明の化合物において見出される「Ｘ」は、当業者によって１つの特定の部分から別のものに変更することができることが理解されるべきである。このことを達成するために、ある特定の例において、１つ以上の基は保護を必要とし得る。このこともまた当業者の範囲内である。例えば、カルボン酸エステルは、アミンを用いる処理によってアミドに転換することができる。このような相互変換は当該分野において公知である。

[0229] 本発明の化合物において、「ヒドロキシル」立体化学に対する言及は例示的であること、およびこの用語は保護されたヒドロキシル基ならびに遊離のヒドロキシル基を含むことを意味することが理解されるべきである。特定の実施形態において、Ｃ－１７位はＲ配置を有する。他の実施形態において、Ｃ－１７位はＳ配置を有する。他の実施態様において、本発明の特定の実施形態はＣ－１８位においてＲ配置を有する。

[0230] 本発明の化合物は、当該分野において公知であるものなどの種々の保護基によって保護することができる。当業者は、どの保護基が、Ｇｒｅｅｎおよびｗｕｔｓ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ５および７，１９９１、ならびに本願明細書に記載の手法等を用いて、ヒドロキシル基の保護のために有用であり得るかを容易に決定することができる。

[0231] 本発明の化合物について、すべてのヒドロキシル基が保護される必要があるわけではないこともまた理解されるべきである。１個または２個すべての

ヒドロキシル基を保護することができる。これは、ＧｒｅｅｎおよびＷｕｔｓ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ５および７，１９９１等の公知文献、および本明細書の他の箇所に記載される手法を用いて、ヒドロキシル基を保護するために使用される試薬の化学量論的な選択によって達成することができる。当該分野において公知である方法、例えば、ＨＰＬＣ、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）、フラッシュクロマトグラフィー、ゲル浸透クロマトグラフィー、結晶化、蒸留などは、モノ保護化またはジ保護化されたヒドロキシ化合物を分離するために使用することができる。

[0232] 上記に同定した化合物の各々は、種々の異性体の形態をとりうることが理解される。特に、本発明の化合物において１つ以上のキラル中心が存在することが理解されるべきである。本発明は、各化合物のすべての立体化学型、例えば、エナンチオマー、ジアステレオマーおよびラセミ化合物を包含することが理解されるべきである。不斉炭素原子が存在する場合、１つより多くの立体異性体が可能であり、すべての可能な異性体型が、示される構造の表現の中に含まれることが意図される。任意に、活性な（Ｒ）および（Ｓ）異性体が、当業者に公知である従来的な技術を使用して分離されてもよい。本発明は、可能なジアステレオマーならびにラセミ化合物および光学分割された異性体を含むことを意図する。

[0233] 本発明の化合物は、アセチレン性および／またはエチレン性不飽和部位を含む。炭素炭素二重結合が存在する場合、立体配置化学はシス（Ｅ）またはトランス（Ｚ）のいずれかであり得、本明細書全体での表現は限定を意味しない。表現は、一般的に、関連するＤＨＡまたはＥＰＡ化合物の立体配置化学に基づいて提示され、理論によって制限されないが、同様の立体配置化学を有すると考えられる。本明細書全体で、炭素間結合は、特に、結合が最終的に互いに対して配置される様式を示すために、簡素化している。例えば、レゾルビンのアセチレン部分は、実際には、約１８０°のジオメトリーを含

んでいるが、しかし、合成および最終生成物と出発物質との関係の理解の補助のために、このような角度は、理解を補助するために極端な表現が使用されていることが理解されるべきである。

[0234] 本発明はまた、アセチレン部分の水素化によって、１種以上の生成物を生じ得る化合物をも包含することが理解される。すべての可能な生成物が本明細書中に含まれることが意図される。例えば、ジアセチレン性の本発明の化合物の水素化は、８種までの生成物（両方のアセチレン部分の水素化が完了する場合（これは既知の方法によってモニターすることができる）、４種のジエン生成物、すなわち、シス、シス；シス、トランス；トランス、シス；トランス、トランス）、および４種のモノアセチレンーモノアセチレン生成物（シスまたはトランス「モノエン」ーアセチレン；アセチレンーシスまたはトランス「モノエン」）を産生することができる。すべての生成物は、ＨＰＬＣ、ＧＣ、ＭＳ、ＮＭＲ、ＩＲによって分離および同定することができる。

[0235] 当該分野において公知の技術は、本発明の化合物のカルボン酸／エステル官能基を、カルボキサミド、チオエステル、ニトリル、カルバメート、チオカルバメートなどに転換するために使用することができ、本明細書に援用される。アミドなどの適切な部分は、当該分野において公知であるように、さらに置換することができる。

[0236] （本発明の化合物の生産）

本発明の化合物は、一般的な有機化学の手法により合成されるか、あるいは、前駆体として比較的豊富に存在する１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥ等に１２／１５－ＬＯＸ等のリポキシゲナーゼ等の酵素を作用させることによって生産することができる。

[0237] したがって、本発明は、本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を製造する方法を提供する。この方法は、Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）またはドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、あるいは１８－ヒドロキシエイコサペンタエン酸（１８－ＨＥＰＥ）または２０－ヒ

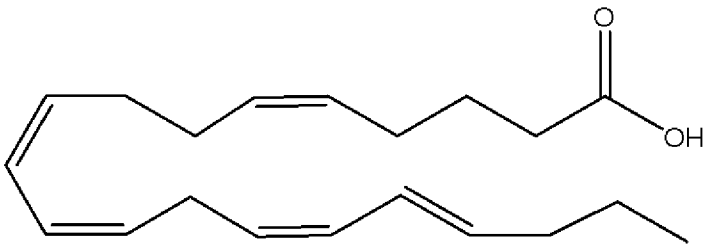
ドロキシドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（例えば、マウス組換え８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ））、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）（たとえば、血小板型１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）（たとえば、白血球型１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ、あるいは好酸球もしくはその抽出物を接触させて酵素代謝産物を得る工程；およびＢ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する。過酸化物（ペルヒドロキシ体）ができているときに、これを還元するとヒドロキシ体が生成される。これをさらに酸化すると、対応するケトン体が生成される。これらのいずれも、生理活性物質としての可能性を有する。これらの酵素は、以下を公知の技術を用いて利用することができる。マウス組換え８－ＬＯＸ：Ｊｉｓａｋａ Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，２７２，２４４１０－２４４１６（１９９７）；血小板型１２－ＬＯＸ：Ｙｏｓｈｉｍｏｔｏ Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ Ｖｏｌ．６８－６９，２４５－２６２（２００２）；白血球型１２／１５－ＬＯＸ：Ｋｕｈｎ Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ Ｖｏｌ．６８－６９，２６３－２９０（２００２）；ｓＬＯＸ：Ｏｌｉｗ Ｅ．Ｈ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ Ｖｏｌ．６８－６９，３１３－３２４（２００２）。好酸球は、そのまま用いてもよく、目的とする酵素活性が見られる限り、抽出物を用いてもよい。８－ＬＯＸを用いて１０，２０－ＨＤｏＰＥが生産されたことは予想外であるといえる。したがって、上記Ａ）工程に続き、Ｂ’）Ａ）工程で得られた前記酵素代謝産物を、精製後または精製しないで８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポ

キシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて二次酵素代謝産物を得る工程；ならびにＣ’）必要に応じて該二次酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程、ならびにこれらＢ’）およびＣ’）を必要に応じて繰り返すことによって、所望の酸化体を得ることができる。Ｂ’）工程においては、Ａ）工程において複数の過酸化体が得られうることから、それらを個々に分離（精製）して、あるいは精製しないで、再度同じ酵素または別の酵素に接触させることによって、さらなる酸化を行うことができる。ここで使用される精製は本明細書に記載される方法が例示され、例えば、ＨＰＬＣなどを挙げることができるがこれに限定されず、分離、精製の程度も適宜調整しうることが理解される。

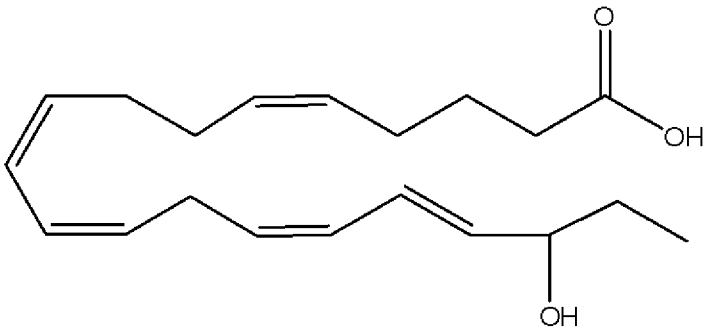
[0238] 例えば、例示的な方法としては、必要に応じて１２－ＬＯＸで用いて１２－ヒドロペルオキシエイコサペンタエン酸（１２－ＨｐＥＰＥ）または１４－ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸（ＨｐＤｏＨＥ）を作製し、その後、Ａ）１２－ヒドロペルオキシエイコサペンタエン酸（１２－ＨｐＥＰＥ）または１４－ヒドロペルオキシドコサヘキサエン酸（ＨｐＤｏＨＥ）にダイズリポキシゲナーゼを接触させて酵素代謝産物を得る工程；およびＢ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含するものを挙げることができる（図９Ａおよび図９Ｂ）。

[0239] 以上の技術およびその他の公知の技術を用いて、以下の化合物：

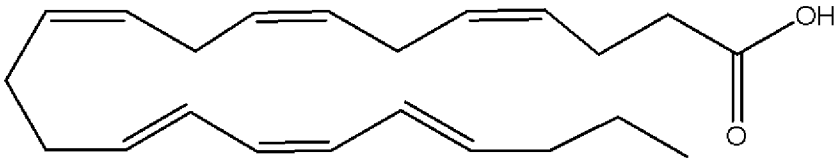
[0240] [化66]



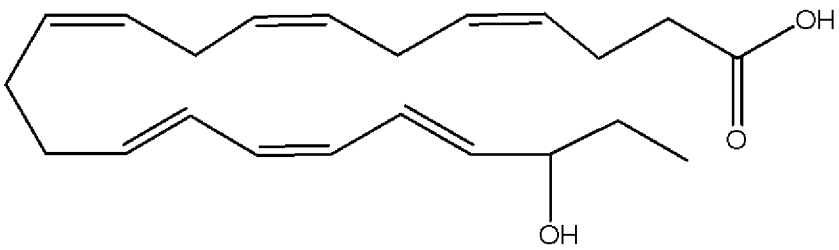
[0241] [化67]



[0242] [化68]



[0243] [化69]



[0244] を原料として本発明の化合物を生産することができる。

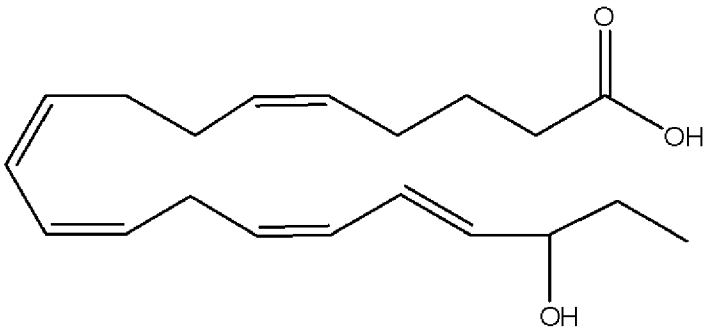
[0245] ＥＰＡおよびＤＨＡは、生体内に豊富に存在することから、食品等を原料として抽出することもでき、あるいは、市販のものを購入してもよい。ここで、１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＰＥは、市販のもの（Ｃａｙｍａｎ社から入手可能）を使用することができ、あるいは、以下の手法を用いて製造することもできる。１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＨＥはどちらも、ω３　ＰＵＦＡのまさにω３部位が酸化された代謝物である。

[0246] 本発明の生産方法において使用される酵素は、８－リポキシゲナーゼ（例えば、マウス組換え８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ））、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）（たとえば、血小板型１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）（たとえば、白血球型１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ、あるいは好酸球から得られる酵素などを挙げることができ、これらは、その基質特異性を考慮しながら、

適宜適切な酵素を利用することができることが理解される。

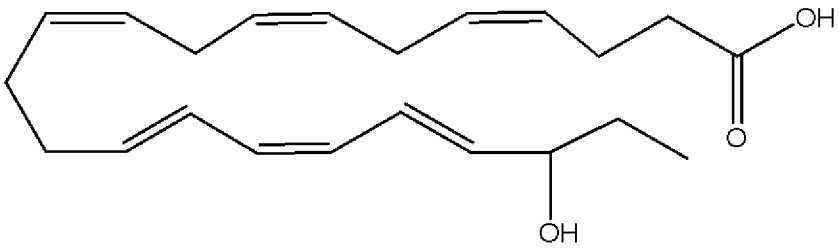
[0247] 以下に示す前駆体材料（１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＰＥ）は市販の物（Ｃａｙｍａｎ　Ｉｎｃ．から入手可能）を利用するか、化学合成または生体内からの抽出によって得ることができる。

[0248] [化70]



[0249] および

[0250] [化71]



[0251] 本明細書において使用される精製、分離または単離方法または技術には、必要な場合、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）、結晶化、および蒸留が含まれる。特徴付けは、紫外線（ＵＶ）分析、質量分析（ＭＳ）、ＭＳ／ＭＳ、ＧＣ／ＭＳ、核磁気共鳴（ＮＭＲ）などによって行うことができる。当業者は、本明細書の教示に基づいて、これらの新規な化合物を調製、単離、および特徴付けするための種々の方法を利用することができる。

[0252] Ｐ１、Ｐ２が、水素以外、例えば、保護基、水素原子、アルキル、水酸基もしくは置換された水酸基またはその組み合わせであるときは、当該分野で公知の技術を用いて、前駆体にこれらの置換基を導入した後に、酵素反応をさせるか、あるいは、それぞれが水素である化合物を本明細書に記載される

手法によって製造した後置換基を導入する方法によって、あるいはそれらの組み合わせによって、本発明の化合物を製造することが理解される。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0253] 例えば、Ｐ１、Ｐ２が水素である化合物を製造した後、これらの化合物のヒドロキシルを、アルキル基あるいは種々の保護基（例えば、当該技術分野で公知のもの）で置換することによってＰ１、Ｐ２が水素以外のものを製造することができる。当業者は、これらの水酸基の保護にはどの保護基が有用であり得るかを容易に決定できる。標準的な方法は、当該技術分野で公知であり、そして文献で十分に記述されている。例えば、アルキル基による置換、適当な保護基での置換は、当業者により実施され、容易に選択され得、そしてＧｒｅｅｎ ａｎｄ Ｗｕｔｓ、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ ５ ａｎｄ ７，１９９１（その教示内容は、本明細書中で参考として援用されている）で記述されている内容を参酌することができる。好ましい保護基には、メチルおよびエチルエステル、ＴＭＳおよびＴＩＰＰＳ基、酢酸エステルまたはプロピオン酸エステル基およびグリコールエーテル（例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコール誘導体）が挙げられる。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0254] あるいは、$Ｐ_1$、$Ｐ_2$が水酸基もしくは置換された水酸基であるとき、すなわち、過酸化体については、酵素反応によって得られるものを単離するか、置換された水酸基の場合は、過酸化体をさらに、上記公知技術を用いてアルキル基、保護基等の置換基で置換してもよい。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0255] $Ｒ_1$、$Ｒ_2$が、水素以外、例えば、ハロゲン原子、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキル基、置換または非置換のアリール基、置換また

は非置換の、分枝状または非分枝状アルキルアリール基またはその組み合わせであるときは、当該分野で公知の技術を用いて、前駆体にこれらの置換基を導入した後に、酵素反応をさせるか、あるいは、それぞれが水素である化合物を本明細書に記載される手法によって製造した後置換基を導入する方法によって、あるいはそれらの組み合わせによって、本発明の化合物を製造することが理解される。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0256] ここで、R_1およびR_2が、水素以外の場合、すなわち「R保護化学」の使用は、本発明の化合物中の近接するジオールには必ずしも必要ではない。典型的には、近接するジオールは容易に酸化されず、それゆえに、一般的には、ヒドロキシル基の酸素原子に隣接する水素原子の置換によってこのような保護を必要としない。したがって、このような保護は必要ではないと一般的には見なされているが、保護基として上記のような置換基を用いる、ヒドロキシル基の酸素原子に隣接する水素原子の置換によって、隣接するジオールのヒドロキシル基が、独立して「保護され得る」化合物を調製することが可能である。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0257] そのようなR_1およびR_2基の導入は、例えば、Ｐｆｉｔｚｎｅｒ－Ｍｏｆｆａｔｔ酸化、Ｓｗｅｒｎ酸化、Ｊｏｎｅｓ酸化などによって、ヒドロキシ基を酸化してケトンとし、Ｇｒｉｇｎａｒｄ反応、Ｂａｒｂｉｅｒカップリング反応、ジヨードサマリウム存在下でのＫａｇａｎ－Ｍｏｌａｎｄｅｒ反応等により、アルコールへの還元とともに、R_1、R_2がアルキル、アリール、アルキルアリールなどの置換基を導入することができ、必要に応じてP_1、P_2などをさらに導入することができる。そのような技術としては、レゾルビン・プロテクチンにおける公知の誘導体製造技術を応用することができる。

[0258] 以下の合成経路は、目的の本発明の化合物を調製するための方法を例証する。調製物は限定を意図しないが、より伝統的に実施に沿って本発明の化合物を調製するための別の手段として働き、上記の生体合成に対する相補物と

して見なされるべきである。

[0259] 本発明の化合物は、有機合成法によっても合成することができる。

[0260] （生物活性、薬剤および医薬、治療法、および医薬の製造における使用）

１つの局面において、本発明は、本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、好中球抑制剤を提供する。

[0261] あるいは、別の局面において、本発明は、炎症性疾患を処置または予防する方法であって、該処置または予防が必要な被験体に本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を投与する工程を包含する、方法を提供する。

[0262] さらに別の局面において、本発明は、炎症性疾患を処置または予防する方法であって、本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、医薬品を製造するための使用に関する。

[0263] さらに別の局面において、本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、好中球が関連する疾患、障害または状態を処置または予防するための医薬品を製造するための使用に関する。

[0264] これらの医薬、薬剤（好中球抑制剤など）、治療方法、予防方法、処置または予防のための医薬品の製造においては、以下のような実施形態がある。以下に順に説明する。

[0265] したがって、本発明は、たとえば、急性炎症時における好中球の組織への浸潤および活性化を防止することができる。このような防止能力は、虚血再灌流障害、脳卒中、心筋梗塞、急性腎炎などにおいて見出される好中球の組織への浸潤および活性化を防止するにおいて有用である。したがって、本発明は、非常に低用量で、強力に好中球の組織への浸潤および活性化を抑制することから、その治療薬としての効果を有するものとして有用であることが理解される。また、リウマチ性関節炎、炎症性大腸炎、喘息などの慢性炎症性疾患においても、本発明の化合物は、本来生体内に存在する内在性物質であることも判明したことから、中長期投与による副作用の少ない治療改善効果が期待される。

[0266] 本明細書において「好中球に関連する疾患、障害または症状」とは、好中球の阻害によって改善される疾患、障害または症状をいう。このような疾患状態または症状は本明細書全体で記載され、その全体が本明細書に援用される。将来発見される可能性がある、好中球調節と関連する現在未知の状態もまた本発明に包含される。なぜなら、好中球調節に関連する状態としての特徴付けは、当業者によって容易に決定可能であるからである。

[0267] １つの実施形態では、本発明はまた、炎症と関連する疾患状態または症状を治療する、寛解、および治癒させるための方法にも関する。

[0268] 本発明が標的とする疾患は、以下を含む。消化器系（口、胃、食道、小腸および大腸）の多くの胃腸の炎症性障害、たとえば、口内炎、歯周病、食道炎、胃炎、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、感染性腸炎（ウイルス性、細菌性、寄生生物性）、抗生物質関連下痢、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ大腸炎、顕微鏡的またはリンパ性大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープおよび家族性ポリープ症候群（例えば、家族性ポリポーシス症候群、ガードナー症候群）、ヘリコバクター・ピロリ、過敏性腸症候群、非特異性下痢病、および腸癌；炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、外界からの刺激によって誘導される大腸炎（例えば、化学療法、放射線治療などの投与等の治療レジメンによって引き起こされるか、またはそれと関連する（例えば、副作用として）胃腸の炎症（例えば、大腸炎））、慢性肉芽腫性疾患、セリアック病、セリアックスプルー（腸の裏層が、グルテンとして知られているタンパク質の摂取に応答して炎症を起こす遺伝性疾患）、食物アレルギー、胃炎、感染性胃炎、または全腸炎（例えば、ヘリコバクター・ピロリ感染性慢性活性胃炎）および感染性因子によって引き起こされる他の型の胃腸の炎症などの炎症性疾患；肺切迫症候群、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）などの肺疾患；虚血性心疾患、虚血性腎疾患、虚血性脳疾患、虚血性肝疾患などの虚血性疾患；びらん性胃炎・胃潰瘍・十二指腸潰瘍・気管支喘息、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、クローン病、悪性腫瘍、卵巣嚢腫、卵管炎、子宮筋腫、子宮内膜症、自然流産、妊娠中毒症、不妊症

および月経困難症から選択されるストレス性疾患など。

[0269] 炎症には、急性および慢性の炎症状態が包含される。急性炎症は、一般的に、短時間の発症および好中球の浸潤または流入によって特徴付けられる。慢性炎症は、一般的に、比較的長い期間（例えば、数日間、数週間、数ヶ月間、または数年間、および被験体の寿命まで）の発症および単核細胞の浸潤または流入によって特徴付けられる。慢性炎症はまた、典型的には、自発的回復および自発的発生の期間によっても特徴付けられ得る。

[0270] １つの局面において、本発明は、本発明の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む医薬を提供する。

[0271] 本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩は、そのまま単独で投与することも可能であるが、通常各種の医薬製剤として提供するのが好ましい。また、それら医薬製剤は、動物および人に使用される。

[0272] 投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口または例えば、直腸内、膣内、鼻内、口腔内、舌下、経皮的、皮下、筋肉内、静脈内等の非経口をあげることができる。単回剤形を製造するためにキャリア材料と合わせることができる活性成分の量は、一般的に、治療的効果を生じる化合物の量である。一般的に、１００パーセントの中から、この量は、約１パーセントから約９９パーセントの活性成分、好ましくは、約５パーセントから約７０パーセント、最も好ましくは、約１０パーセントから約３０パーセントの範囲である。

[0273] 投与形態としては、カプセル剤、錠剤、丸薬、顆粒剤、散剤、シロップ剤、ロゼンジ（好ましい基剤、通常はスクロースおよびアカシアもしくはトラガカントを使用する）、乳剤、座剤、注射剤等がある。経口投与に適当な、例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビット、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、オリーブ油、大豆油等の油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造できる。また、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤

等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニット等の賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製造できる。あるいは、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油もしくは油中水液体エマルジョンとして、またはエリキシルもしくはシロップとして、または芳香錠（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアなどの不活性基剤を使用する）、および／またはマウスウォッシュとしてなどであってもよく、各々が所定量の本発明の化合物を活性成分として含む。本発明の化合物はまた、ボーラス、舐剤またはペーストとして投与されてもよい。

[0274] 非経口投与に適当な製剤は、好ましくは受容者の血液と等張である活性化合物を含む滅菌水性製剤からなる。例えば、注射剤の場合、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。

[0275] 本明細書中、「薬学的に受容可能なキャリア」とは、それがその意図される機能を実行できるように、被験体の中にまたは被験体に本明細書の化合物を運ぶ際または輸送する際に含まれる、薬学的に受容可能な材料、組成物またはビヒクル、例えば、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル化材料を意味する。典型的には、このような化合物は、１つの器官、または身体の部分から、別の器官、または身体の部分に運ばれまたは輸送される。各キャリアは、製剤の他の成分と適合性であり、患者に対して有害でないという意味で「受容可能」でなくてはならない。薬学的に受容可能なキャリアとして働くことができる材料のいくつかの例には：ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖；コーンスターチおよびポテトスターチなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバターおよび坐剤ワックスなど

の賦形剤；ピーナッツオイル、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油などのオイル；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張性生理食塩水；リンガー液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；および薬学的製剤中で利用される他の非毒性適合性材料などが含まれる。

[0276] 特定の実施形態において、本発明の化合物は、１つ以上の酸性官能基を含んでもよく、従って、薬学的に受容可能な塩基と薬学的に受容可能な塩を形成することが可能である、このような塩または塩基などは、例えば、Ｂｅｒｇｅ Ｓ．Ｍ．ら、「Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓａｌｔｓ」Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ，１９７７；６６：１－１９を参照をすることができる（これは参考として本明細書に援用される）。

[0277] 局所製剤は、活性化合物を１種もしくはそれ以上の媒質、例えば鉱油、石油、多価アルコール等または局所医薬製剤に使用される他の基剤中に溶解または懸濁させて調製する。腸内投与のための製剤は、通常の担体、例えばカカオ脂、水素化脂肪、水素化脂肪カルボン酸等を用いて調製し、座剤として提供される。

[0278] 本発明では、非経口剤においても、経口剤で例示したグリコール類、油類、フレーバー類、防腐剤（抗酸化剤を含む）、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される１種もしくはそれ以上の補助成分を添加することもできる。

[0279] 薬学的に受容可能な抗酸化剤の例には、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、プロピルガレート、α－トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；およびクエン酸、エ

チレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤などが含まれる。

[0280] 本発明の化合物もしくはその薬学的に許容される塩等の適切な１日または１回の用量は、治療効果を生じるために有効な最低用量である化合物の量であるが、本発明の化合物もしくはその薬学的に許容される塩等の有効用量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、治療すべき症状の性質もしくは重篤度等により異なることが理解される。通常、経口投与量は、１日当たり０．０１～１０００ｍｇ／人、好ましくは５～５００ｍｇ／人であり、投与回数は、１日１回または分割して投与するのが好ましい。一般的に、患者のための本発明の化合物もしくはその薬学的に許容される塩等の静脈内用量および皮下用量は、示される鎮痛効果のために使用される場合、１日あたり約０．０００１～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは、１日あたり約０．０１～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、およびさらにより好ましくは、１日あたり約０．１～約４０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲であり、治療的または予防的な有効量としては例えば、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは、１～１０ｍｇ／ｋｇ体重であるである。例えば、約０．０１μｇから２０μｇの間、約２０μｇから１００μｇの間、および１０μｇから２００μｇの間の本発明の化合物が、被験体体重の２０ｇあたりに投与される。投薬量の値は、軽減される状態の型および重篤度に伴って変化する可能性があることが注目されるべきである。

[0281] これらの製剤または組成物を調製する方法は、本発明の化合物を、キャリアと、そして任意に、１種以上の補助成分と一緒にする工程を含む。一般的に、製剤は、本発明の化合物を、液体キャリアと、または微細に分割した固体キャリアと、またはその両方と、均一かつ密接に一緒にする工程、次いで、必要な場合、生成物を成型する工程によって調製される。

[0282] 本明細書中、経口投与のための本発明の固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、散剤、顆粒剤など）において、活性成分は、１種以上の薬学的に受容可能なキャリア、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カリウ

ム、および／または以下のいずれかと混合され得る：デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／もしくはケイ酸などの充填剤もしくは増量剤；例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／もしくはアカシアなどの結合剤；グリセロールなどの保湿剤；寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；パラフィンなどの溶液遅延剤；四級アンモニウム化合物などの吸収加速剤；例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなどの湿潤剤；カオリンおよびベントナイトクレイなどの吸収剤；タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびその混合物などの滑沢剤；ならびに着色料。カプセル、錠剤、および丸薬の場合において、薬学的組成物はまた、緩衝剤を含んでもよい。同様の型の固体組成物はまた、ラクトースまたは乳糖などの賦形剤、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用して、ソフトおよびハード充填ゼラチンカプセル中の充填剤として利用してもよい。

[0283] 錠剤は、任意選択的に１種以上の補助成分とともに、圧縮および成型によって作製されてもよい。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存料、崩壊剤（例えば、グリコール酸デンプンナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤または分散剤を使用して調製してもよい。成型錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を適切な機械で成型することによって作製してもよい。

[0284] 本発明の薬学的組成物の錠剤、または他の固体剤形、例えば、糖衣錠、カプセル、丸薬、および顆粒剤は、コーティングおよび殻、例えば、腸溶コーティングおよび医薬品製剤の分野において周知である他のコーティングとともに、任意に与えられまたは調製されてもよい。これらはまた、その中の活性成分の遅延放出または制御された放出を提供するために、例えば、所望の

放出プロフィールを提供するための様々な割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、リポソームおよび／またはミクロスフェアを使用して、製剤化されてもよい。これらは、例えば、細菌保持フィルターを通した濾過によって、または使用直前に滅菌水もしくはある他の滅菌注射可能媒体の中に溶解することができる滅菌固体組成物の型で滅菌薬剤を組み込むことによって、滅菌されてもよい。これらの組成物はまた、任意に不透明化剤を含んでもよく、これらが活性成分のみを、または優先的に、胃腸管の特定の部分に、任意に、遅延様式で放出する組成物であってもよい。使用することができる包埋組成物の例には、ポリマー性物質およびワックスが含まれる。活性成分はまた、適切な場合、上記の賦形剤の１種以上を伴うマイクロカプセル化型であり得る。

[0285] 本発明の化合物の経口投与のための液体剤形には、薬学的に受容可能なエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルが含まれる。本発明において使用されうる活性成分に加えて、液体剤形は、当該分野において一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水および他の溶媒、溶解剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、オイル（特に、綿実油、ラッカセイ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、およびこれらの混合物などを含み得る。

[0286] 本発明の経口組成物はまた、不活性希釈剤の他に、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味料、香料、着色料、芳香剤、および保存料などのアジュバントを含み得る。

[0287] 本発明の懸濁液は、本発明の活性化合物に加えて、懸濁液、例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール、およびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタ水酸化物、

ベントナイト、寒天およびトラガカント、およびその混合物などを含み得る。

[0288] 本発明の薬学的組成物の製剤は、直腸または膣投与のために、坐剤として提供されてもよく、これは、室温で固体であるが体温では液体であり、それゆえに、直腸または膣腔中で溶解し、活性化合物を放出する、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックスまたはサリチル酸塩を含む１種以上の適切な非刺激性の賦形剤またはキャリアと、１種以上の本発明の化合物を混合することによって調製され得る。

[0289] 本発明の製剤はまた、膣投与のために、適切であることが当該分野において公知であるようなキャリアを含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、またはスプレー製剤を包含する。

[0290] 本発明の化合物の局所的または経皮的な投与のための剤形には、散剤、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤が含まれる。活性化合物は、滅菌条件下で、薬学的に受容可能なキャリアと、および必要とされ得る任意の保存剤、緩衝剤、または噴霧剤と混合されてもよい。

[0291] 軟膏、ペースト、クリーム、およびゲルは、本発明の活性化合物に加えて、動物および植物の脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび二酸化亜鉛、またはその混合物などの賦形剤を加えてもよい。

[0292] 散剤およびスプレーは、本発明の化合物に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などの賦形剤を含むことができる。スプレーは、クロロフルオロハイドロカーボンならびにブタンおよびプロパンなどの揮発性の非置換ハイドロカーボン等の、慣用的な噴霧剤をさらに含むことができる。

[0293] 経皮パッチは、身体への本発明の化合物の制御送達を提供することの付加

的な利点を有する。このような剤形は、適切な媒体中で化合物を溶解または分散させることによって作製することができる。吸収増強剤もまた、皮膚を横切る化合物の流入を増加するために使用することができる。このような流入の速度は、速度制御膜を提供すること、またはポリマーマトリックスもしくはゲルに活性化合物を分散させることのいずれかによって制御することができる。

[0294] 本発明は、眼科の製剤、眼の軟膏、散剤、溶液などを包含することが意図され、このような溶液は、結膜炎の治療のために有用である。

[0295] 本発明の薬学的組成物は、非経口投与のために用いられ、薬学的に受容可能な滅菌等張水溶液または非水性溶液、分散液、懸濁液もしくはエマルジョン、または使用直前に滅菌注射液もしくは分散液に再構成され得る滅菌粉末と組み合わせた１種以上の本発明の組成物を含み、これは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質、または懸濁剤もしくは濃厚剤を含んでもよい。

[0296] 本発明の薬学的組成物中で利用されてもよい適切な水系および非水系キャリアの例には、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、および適切なその混合物、植物性オイル、例えば、オリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散の場合における必要とされる粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

[0297] これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の作用の妨害は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含めることによって保証されてもよい。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物に含めることもまた所望され得る。加えて、注射可能な薬学的型の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる剤を含めることによってもたらされ得る。

[0298] ある場合において、薬物の効果を延長するために、皮下または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅くすることが所望される。これは、乏しい水溶性を有する結晶性またはアモルファス性の物質の液体懸濁液の使用によって達成されてよい。次いで、薬物の吸収の速度はその解離の速度に依存し、次には、結晶サイズおよび結晶型に依存し得る。代替的には、非経口的に投与された薬物型の遅延吸収は、オイルビヒクル中に薬物を溶解または懸濁することによって達成される。

[0299] 注射可能なデポー型は、ポリラクチドーポリグリコリドなどの生物分解ポリマー中で対象の化合物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製される。ポリマーに対する薬物の比率に依存して、利用される特定のポリマーの性質、薬物放出の速度を制御することができる。他の生物分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が含まれる。デポー注射可能製剤はまた、身体組織と適合性であるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬物を包括することによっても調製される。

[0300] 本発明はまた、種々の疾患状態および症状の治療または予防における使用のための、本明細書全体で記載される新規な化合物を含むパッケージされた医薬品を提供する。

[0301] 本明細書において、「予防」するとは、本発明の標的とする疾患、障害または症状が発生する前に、何らかの手段により、その疾患、障害または症状を生じさせないかまたは少なくとも遅延させること、あるいは疾患、障害または症状の原因自体が生じたとしてもそれが原因の障害が生じないような状態にすることをいう。

[0302] 本明細書において、「治療」するとは、既に発症している本発明の標的とする疾患、障害または症状の進行を食い止めるか、または完全または部分的に拘わらず、本発明の標的とする疾患、障害または症状が改善することをいう。

[0303] 本明細書において「被験体」とは、本発明の標的とする疾患、障害または症状の対象とされる動物をいう。本発明が対象とする動物は、例えば、鳥類

、哺乳動物などであってもよい。好ましくは、そのような動物は、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）であり得る。例示的な被験体としては、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない。さらに好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモットなどの小動物が用いられ得る。もちろん、本発明の被験体には、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、およびマウスが含まれる。

[0304] 本発明の調製物は、経口的に、非経口的に、局所的に、または直腸的に与えられ得る。これらは、当然、各投与経路について適切である型によって与えられる。例えば、これらは、注射、吸入、眼ローション、軟膏、坐剤などの注射、注入または吸入による投与によって錠剤またはカプセル型で；ローションまたは軟膏によって局所的に；および坐剤によって直腸的に投与される。

[0305] 本明細書において、「経口投与」および「経口的に投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、通常は注射による経腸的および局所的な投与以外の投与の様式を意味し、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内の注射および注入を含む。

[0306] 本明細書において、「全身投与」「全身的に投与される」「末梢投与」および「末梢的に投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、中枢神経系への直接的に以外の化合物、薬物または他の物質の投与であって、その結果、それが患者の系に入り、従って、代謝および他の同様のプロセスに供せられる投与、例えば、皮下投与を意味する。

[0307] 本発明の化合物は、経口的に、鼻に、例えば、スプレーによって、直腸内、膣内、非経口的に、大槽内、および局所的に、口腔剤および舌下剤を含む散剤、軟膏、またはドロップによってなどを含めた任意の適切な経路によっ

て、治療のためにヒトおよび他の動物に投与され得る。

[0308] 選択される投与の経路に関わらず、適切な水和型で使用されてもよい本発明の化合物、および／または本発明の薬学的組成物は、当業者に公知である従来的な方法によって薬学的に受容可能な剤形に製剤化される。

[0309] 本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬レベルは、患者に対する毒性を伴うことなく、特定の患者に対する所望の治療的応答、組成、および投与の様式を達成するために有効である活性成分の量を得るように変動され得る。

[0310] 選択された投薬レベルは、利用される本発明の特定の化合物、そのエステル、塩、またはアミドの活性、投与の経路、投与の時間、利用される特定の化合物の排出の速度、治療の期間、利用される特定の化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態、および以前の医学的履歴、ならびに医学分野において周知である同様の因子を含む種々の因子に依存する。

[0311] 当該分野における通常の技能を有する医師または獣医は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医は、所望の治療効果を達成するために必要とされるよりも少ないレベルで、薬学的組成物中の本発明の化合物の投薬を開始し、所望の効果が達成されるまで、投薬量を徐々に増加させ得る。

[0312] 一般的に、本発明の化合物の適切な１日の用量は、治療効果を生じるために有効な最低用量である化合物の量である。そのような有効な用量は一般的に上記の因子に依存する。一般的に、患者のための本発明の化合物の静脈内用量および皮下用量は、示される鎮痛効果のために使用される場合、１日あたり約０．０００１～約１００ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは、１日あたり約０．０１～約５０ｍｇ／ｋｇ体重、およびさらにより好ましくは、１日あたり約０．１～約４０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。例えば、約０．０１μｇから２０μｇの間、約２０μｇから１００μｇの間、および１０μｇから２００μｇの間の本発明の化合物が、被験体体重の２０ｇあたりに投与さ

れる。

[0313] 所望される場合、活性化合物の有効な１日の用量は、単位剤形中で、任意に、１日を通して適切な間隔で、２個、３個、４個、５個、６個またはそれ以上の分割用量として別々に投与され得る。

[0314] 本発明の薬学的組成物は、本発明の１種以上の本発明の化合物の「治療有効量」または「予防有効量」を含む。「治療有効量」とは、所望の治療的結果、例えば、種々の疾患状態または症状と関連する効果の減少または予防を達成するために、必要である投薬量および時間での有効量をいう。本発明の化合物の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの要因、および個体において所望の効果を誘発する治療化合物の能力に従って変化し得る。治療有効量はまた、治療剤の任意の毒性または有害な影響に対して治療的に有益な効果が上回るものである。「予防有効量」とは、所望の予防的結果を達成するために、必要である投薬量および時間での有効量をいう。典型的には、予防用量は疾患の前にまたはその初期の段階において使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

[0315] 投薬治療計画（resimen）は、最適な所望の応答（例えば、治療応答または予防応答）を提供するために調整され得る。例えば、単回ボーラスが投与され得、いくつかの分割用量が時間にわたって投与され得、またはこの用量は治療状態の要件によって示されるように比例的に減少または増加され得る。投与の容易さおよび投薬の均一性のために、単位剤形の非経口組成物を製剤化することがとりわけ有利である。単位剤形とは、本明細書で使用される場合、治療される哺乳動物被験体についての単位投薬量として適している物理的に別個の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと共同して、所望の効果を生じるように計算された活性化合物の所定量を含む。本発明の単位剤形についての詳細は、（ａ）本発明の化合物の独特な特性および達成される特定の治療的または予防的効果、ならびに（ｂ）個体における感受性の治療のためにこのような活性化合物を構成することの当該分野における固有の制限によって決定され、かつ直接的にこれらに依存する。

[0316] 本発明の化合物の治療的または予防的な有効量についての例示的な非限定的な範囲は、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは、１～１０ｍｇ／ｋｇである。投薬量の値は、軽減される状態の型および重篤度に伴って変化する可能性があることが注目されるべきである。任意の特定の被験体について、特定の投薬量・投与頻度等は、個体の必要性、ならびに組成物を投与しまたは組成物の投与を監督する人の専門的な判断に従って経時的に調整されるべきであること、ならびに本明細書に示される投薬量範囲は例示のみであり、本発明の範囲および実施を制限することを意図しないことがさらに理解されるべきである。

[0317] 本発明の化合物の、吸入による肺への送達は、気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患のようなＣＯＰＤ等の一般的な局所的状態を含む種々の呼吸状態（気道の炎症）を処置するための、本明細書全体で記載される１つの方法である。本発明の化合物は、呼吸可能なサイズの粒子（直径で約１０μｍ未満）のエアロゾルの型で肺に投与し得る。このエアロゾル製剤は、液体または乾燥粉末として提供し得る。液体エアロゾル中で適切な粒子サイズを保証するために、懸濁液として、粒子は、呼吸サイズで調製することができ、次いで、噴霧剤を含む懸濁液製剤に取り込み得る。代替的には、製剤は、製剤中の適切な粒子サイズについての懸念を回避するために溶液型で調製し得る。溶液製剤は、呼吸サイズの粒子または液滴を産生する様式で分散されるべきである。

[0318] 一旦調製されると、エアロゾル製剤は、定量バルブを備えたエアロゾルキャニスターに満たされる。製剤は、バルブから被験体まで、用量を方向付けるように適合されたアクチュエーターを介して分配される。

[0319] 本発明の製剤は、（ｉ）複数の治療有効用量を提供するために十分な量の少なくとも１種の化合物；（ｉｉ）各々の製剤を安定化するために有効な量の水の添加；（ｉｉｉ）エアロゾルキャニスターからの複数の用量を噴霧するために十分な量の噴霧剤；および（ｉｖ）任意のさらなる選択的な成分、例えば、共溶媒としてのエタノールを合わせること；および成分を分散させ

ることによって調製し得る。成分は、従来的なミキサーまたはホモジナイザーを使用して、振盪することによって、または超音波エネルギーによって分散させ得る。バルク製剤は、バルブからバルブへの移動方法を使用すること、圧力の充填によって、または従来的なコールド充填方法を使用することによって、より小さな個々のエアロゾルバイアルに移動させ得る。懸濁液エアロゾル製剤中で使用される安定化剤が噴霧剤中で溶解性であることは必要とはされない。十分に溶解性でないものは、適切な量の薬物粒子にコートし得、次いで、コートされた粒子は、上記のように製剤中に組み込み得る。

[0320] 本発明の製剤を送達するためにはまた、慣用されるバルブ、好ましくは定量バルブを備えたエアロゾルキャニスターも、使用することができる。従来的なＣＦＣ製剤を送達するために定量バルブ中で使用される従来的なネオプレンおよびブナのバルブラバーが、ＨＦＣ－１３４ａまたはＨＦＣ－２２７を含む製剤とともに使用することができる。熱可塑性エラストマー材料、例えば、ＦＬＥＸＯＭＥＲ™ＧＥＲＳ　１０８５　ＮＴポリオレフィン（Ｕｎｉｏｎ　Ｃａｒｂｉｄｅ）からの押し出し、注入成型、または圧縮成型によって形成される隔壁もまた適切である。

[0321] 本発明の製剤は、コートされているかまたはコートされていない、陽極酸化したかまたは陽極酸化していない、従来的なエアロゾルキャニスター、例えば、アルミニウム、ガラス、ステンレス鋼、ポリエチレンテレフタレートのそれの中に含めることができる。

[0322] 本発明の製剤は、気管支拡張をもたらすために、または本明細書全体で記載されるような、吸入による治療に敏感である状態、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患などを治療するために、経口吸入によって、呼吸管および／または肺に送達させることができる。

[0323] 本発明の製剤はまた、本明細書全体で言及されるような呼吸状態を治療または予防するために、当該分野において公知であるような鼻吸入によって送達することもできる。

[0324] 本発明の化合物について、単独で投与されることは可能であるが、薬学的

組成物として化合物を投与することが好ましい。

[0325] 本発明は、パッケージング材料、およびパッケージング材料中に含まれる本発明の化合物の製剤を含む製造物をも包含する。この製剤は、少なくとも１種の本発明の化合物を含み、パッケージング材料は、製剤が、本明細書に記載されるような１種以上の状態を治療するために、一定量で、一定頻度で、およびこのような状態を治療または予防するために有効な期間、被験体に投与可能であることを示すラベルまたはパッケージ挿入物を含む。このような状態は本明細書全体で言及され、参考として本明細書に援用される。適切な化合物は本明細書に記載されるものを利用することができる。

[0326] より具体的には、本発明は、パッケージング材料、およびパッケージング材料に含まれる少なくとも１種の本発明の化合物を含む製品を特徴とする。パッケージング材料は、製剤が、本明細書全体で議論されるような疾患と関連する徴候を治療または予防するために被験体に投与可能であることを示すラベルまたは取扱説明書を含む。

[0327] 以上から、１つの好ましい局面において、本発明の医薬は、以下を含むがそれらに限定されない疾患、障害、状態などの処置または予防において有用である：肺切迫症候群、成人呼吸窮迫症候群、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）などの肺疾患；虚血性心疾患、虚血性腎疾患、虚血性脳疾患、虚血性肝疾患などの虚血性疾患；消化器系（口、胃、食道、小腸および大腸）の多くの胃腸の炎症性障害、たとえば、口内炎、歯周病、食道炎、胃炎、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、感染性腸炎（ウイルス性、細菌性、寄生生物性）、抗生物質関連下痢、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ大腸炎、顕微鏡的またはリンパ性大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープおよび家族性ポリープ症候群（例えば、家族性ポリポーシス症候群、ガードナー症候群）、ヘリコバクター・ピロリ、過敏性腸症候群、非特異性下痢病、および腸癌；炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、外界からの刺激によって誘導される大腸炎（例えば、化学療法、放射線治療などの投与等の治療レジメンによって引き起こされるか、またはそれと関連する（例えば、副作用として

）胃腸の炎症（例えば、大腸炎））、慢性肉芽腫性疾患、セリアック病、セリアックスプルー（腸の裏層が、グルテンとして知られているタンパク質の摂取に応答して炎症を起こす遺伝性疾患）、食物アレルギー、胃炎、感染性胃炎、または全腸炎（例えば、ヘリコバクター・ピロリ感染性慢性活性胃炎）および感染性因子によって引き起こされる他の型の胃腸の炎症などの炎症性疾患；びらん性胃炎・胃潰瘍・十二指腸潰瘍・気管支喘息、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、クローン病、悪性腫瘍、卵巣嚢腫、卵管炎、子宮筋腫、子宮内膜症、自然流産、妊娠中毒症、不妊症および月経困難症から選択されるストレス性疾患。

[0328] 本発明は、または、より詳細には、以下をも処置または予防することができる：胃腸炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、感染性腸炎、抗生物質関連下痢、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ大腸炎、顕微鏡的またはリンパ性大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープ、家族性ポリープ、家族性ポリポーシス症候群、ガードナー症候群、ヘリコバクター・ピロリ、過敏性腸症候群、非特異性下痢病、および腸癌、あるいは、炎症性疾患（アレルギー性疾患（アレルギー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎など）、関節リウマチ、アナフィラキシーなど）、動脈硬化症、血管系・循環器系疾患、がん・腫瘍（過増殖性失調）、免疫系疾患、細胞増殖性疾患、感染症等を含む。例えば乾癬、肺線維症、糸球体腎炎、ガン、アテローム性硬化症、および抗血管形成（例えば、腫瘍成長、糖尿病性網膜症）を含む。具体的には、たとえば、本発明医薬組成物は、脳炎、脊髄炎および脳脊髄炎、髄膜炎、炎症性多発性ニューロパチー、神経炎、涙腺炎、眼窩炎、結膜炎（アレルギー性結膜炎、春季角結膜炎など）、角膜炎、網脈絡膜瘢痕、眼内炎、球後視神経炎、網膜症、緑内障、蜂窩織炎、外耳炎、軟骨膜炎、中耳炎、耳管炎、乳突起炎、鼓膜炎、迷路炎、歯髄炎、歯周炎、唾液腺炎、口内炎、舌炎、甲状腺炎、心膜炎、心内膜炎、心筋炎、高血圧症、心不全、動脈硬化（アテローム粥状硬化症など）、再狭窄、虚血再還流障害、血栓症（心筋梗塞、脳梗塞、など）、肥満症、血管炎、脈管炎、多発性動脈炎、リンパ節炎、リンパ腫、ホジキン病、

好酸球性疾患（好酸球増多症、肺好酸球症、肺アスペルギルス症など）、炎症性または閉塞性気道疾患（アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、肺炎、喉頭炎、喉頭気管炎、気管支炎、喘息、急性肺障害、急性呼吸促拍症候群、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患など）、胸膜炎、塵肺症、中皮腫、食道炎、胃空腸潰瘍、胃炎、十二指腸炎、食物アレルギー、敗血症、肝炎、肝線維症、肝硬変、胆嚢炎、膵炎、腹膜炎、糖尿病（Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病）、炎症性またはアレルギー性皮膚疾患（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎（アレルギー性接触皮膚炎、刺激性接触皮膚炎など）、乾癬、蕁麻疹、光アレルギー性反応、円形脱毛症など）、皮膚肥厚性障害（皮膚好酸球性肉芽腫など）、皮膚多発性筋炎、皮下脂肪組織炎、甲状腺機能亢進症、サルコイドーシス、自己免疫性血液疾患（溶血性貧血、突発性血小板減少性紫斑病など）、（全身性）紅斑性狼瘡、再発性多発性軟骨炎、多軟髄炎、スクレロドーマ（ｓｃｌｅｒｏｄｏｍａ）、ウェゲナー肉芽腫症、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、重筋無力症、スチーブンスージョンソン症候群、特発性スプルー、自己免疫炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病など）、内分泌眼病、サルコイドーシス、肺胞炎、慢性過敏性肺臓炎、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、ぶどう膜炎、乾性角結膜炎，間質性肺線維症、虹彩毛様体炎、乾癬性関節炎、糸球体腎炎、全身性硬化症、全身性結合組織疾患（シェーグレン症候群、ベーチェット病、びまん性筋膜炎など）、間質性筋炎、炎症性多発性関節障害、炎症性関節炎、関節リウマチ、変形性関節症，滑膜炎、滑液包炎、腱鞘炎、慢性多発性骨髄炎、腎炎症候群、尿細管間質性腎炎、膀胱炎、前立腺炎、精巣炎、精巣上体炎、卵管炎、卵巣炎、子宮頚部炎、女性骨盤炎症、外陰腟炎症、臓器移植拒絶、骨髄移植拒絶、移植片対宿主病等の疾患の予防および／または治療剤あるいは熱傷、外傷性炎症の治療剤など。

[0329] 以上のように、肥満やインスリン抵抗性（メタボリックシンドローム）において、脂肪組織へのマクロファージ浸潤を伴う炎症性変化が病態に大きく寄与している（Ｔｉｌｇ，Ｈ．ａｎｄ　Ｍｏｓｃｈｅｎ，Ａ．Ｒ．（２００６）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６，７７２－７８３）。したがって

、本発明の化合物は、このような生活習慣病に有用であることが理解される。

[0330] 別の局面において、本発明はまた、別の抗炎症剤、たとえば、ステロイド剤またはＮＳＡＩＤ（アスピリン、イブプロフェンなど）などの他の薬剤との併用での投与によって、被験体における胃腸疾患または状態を治療または予防するための方法にも関する。これらの薬剤は、同時または、２つの異なる時点で投与され得る。

[0331] 図面および本文におけるすべての結果は、群あたりのｎ匹の動物の平均±ＳＥとして表現する。統計学的有意差は、Ｓｔｕｄｅｎｔ　ｔ検定によって決定した。ｐ値＜０．０５等（場合によっては、０．０７であったり、０．０１であったりする）によって表示されるものが有意な差異とみなす。

[0332] （本発明の化合物の分析法）

１つの局面において、本発明は、本発明を分析する方法を提供する。抗炎症のための治療的基礎を開発するための指標としての有効なｎ－３状態レベルを評価するための治療マーカーとして、ヒト体液（血液、尿、母乳）、生検材料などでこれらの化合物をアッセイするために向けることができる。これには、ＬＣ－ＭＳ－ＭＳおよびＧＣ－ＭＳ特性が含まれ、これはまた、これらの新規な生成物をモニターするＥＬＩＳＡアッセイを取り扱うためにはるかに容易な開発をもたらし得る。

[0333] したがって、本発明は、本発明の化合物またはＰＵＦＡ代謝物を分析する方法であって、

以下の液体クロマトグラフィー条件

Ａ液：水／酢酸＝１００／０．１、およびＢ液：アセトニトリル／メタノール＝４／１を用いた溶媒系として用い、流速：０～３０分→５０μＬ／分、３０～３３分→８０μＬ／分、３３～４５分→１００μＬ／分、および図１Ｂに記載のグラジエントを用い、図１Ｃに記載のパラメータを用いることを特徴とする、マルチプルリアクションモニタリング（ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ）を用いる方法を提供する。

[0334] 条件設定においては、合成できた化合物（本件の場合は酵素で合成したもの、たとえば本発明の１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ，１７，１８－ｄｉＨＥＰＥがこれに相当）についてはＭＳ／ＭＳの実測値からＭＲＭの親マスと子マスのペアーを最適化（衝突エネルギーの最適化）を行うことができる。また検量線を作製したら定量分析が可能になる。合成できないもの（本件では１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ，８，１８－ｄｉＨＥＰＥに相当）は仮想条件を設定して、検出目的のＭＲＭを行うことができる。この方法を用いることによって、本発明の新規化合物を分析することができる。

[0335] （一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９８９）．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒおよびその３ｒｄ Ｅｄ．（２００１）；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．（１９８７）．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．（１９８９）．Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ；Ｉｎｎｉｓ，Ｍ．Ａ．（１９９０）．ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．（１９９２）．Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒ

eene Pub. Associates；Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology：A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates；Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press；Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology：A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates；Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications：Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入＆発現解析実験法」羊土社、１９９７などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

[0336] 人工的に合成した遺伝子を作製するためのＤＮＡ合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis：A Practical Approach, IRLPress；Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis：A Practical Approach, IRL Press；Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues：A Practical Approac, IRL Press；Adams, R. L. etal. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman&Hall；Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acid

s, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

[0337] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0338] 以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0339] 以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、この実施例等により本発明の技術的範囲が限定されるものではない。以下において使用した試薬類は、特に言及した場合を除いて、市販されているものを使用した。

[0340] （実施例１：１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＨＥの代謝物に関する解析：ＰＵＦＡ代謝物の高感度分析法の確立）

本実施例では、新規化合物の分析をも可能にするために、まず、ＰＵＦＡ代謝物を高感度に、かつ多種類のものを一斉に定量分析できる系を確立することを試みた。本実施例では、高速液体クロマトグラフィーータンデムマススペクトロメトリー（ＵＰＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）を用いたマルチプルリアクションモニタリング（Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｍｏｎｉｔｏｒｉｎｇ；ＭＲＭ）による多価不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡ）代謝物の一斉定量分析系を確立した。

[0341] ＭＲＭは、ＭＳ／ＭＳを用いて目的の代謝物を選択的に、かつ高感度で分析できる手法である（図１Ａ）。ＰＵＦＡの代謝物のＭＳ／ＭＳを測定すると、例えば酸化物であれば、その水酸基の前後の炭素－炭素結合でフラグメンテーションを起こす。すると、その代謝物の構造に特徴的なＭＳ／ＭＳ値が検出される。そこで、ある代謝物の分子量に由来するＭＳ値（ネガティブイオンモードのため、ＰＵＦＡ代謝物の場合はプロトンが抜けてイオン化した時のＭＳ値である、分子量－１）を親ＭＳ値（M^-）、およびその代謝物の構造に特徴的なＭＳ／ＭＳ値を子ＭＳ値（A^-）とし、親ＭＳ値／子ＭＳ値の組み合わせを持つ物質のみを選択的に検出する手法がＭＲＭである。具体的には三連四重極型のＭＳを用い、あらかじめ設定した親ＭＳ値をまずＱ１で選択的に検出する。この時他の分子は除外され、Ｑ１を通過した分子のみが次のｑ２でエネルギーを加えられ、フラグメント化される。生じたフラグメントのうち、あらかじめ設定した子ＭＳ値を持つもののみが、次のＱ３で選択的に検出される。この親ＭＳ値／子ＭＳ値の組み合わせを一つのチャンネルとし、目的の分子全てについて、それぞれの親マス値／子マス値の組み合わせ、およびそれぞれに最適なコーン電圧、衝突エネルギーを１つのチャンネルとして設定して行く。一つのチャンネルのスキャンスピードが約３０ｍｓｅｃであるので、１００種類の代謝物のチャンネルを分析したとしても、一回のスキャンにかかる時間は約３秒である。従って、ＬＣで分離した際の代謝物の溶出時間が３秒以上であればその代謝物の検出が可能である。実際の溶出時間は十数秒程度であるので、原理的には３００種類以上の代謝物が検出可能である。ただ、ピークトップ付近での検出を行うことを加味すると、およそ百数十種類の代謝物までなら定量性も保ちつつ、一斉に分析を行える。さらにＬＣを用いた分離系を組み合わせることでそれぞれの代謝物に特異的な保持時間（ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ　ｔｉｍｅ）の情報も得られ、それらの情報から、目的の代謝物群の高感度な一斉定量分析を行える。

[0342] 本実施例では、ほとんどの化合物は合成品を購入して用いたが、一部購入できないものについては、酵素反応により作製した。

[0343] 炎症時に１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＨＥから生成する代謝物について調べるために、急性炎症時に炎症部位に集積してくる白血球と１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥとのインキュベーションを行い、マルチプルリアクションモニタリング（ＭＲＭ）により１８－ＨＥＰＥ代謝物および２０－ＨＤｏＨＥ代謝物の包括的メタボローム解析を行うこともできる。

[0344] （順相ＨＰＬＣを用いた化合物の精製）

ヘキサン：和光純薬工業

イソプロパノール：和光純薬工業

酢酸：和光純薬工業。

[0345] （ＭＲＭによるＰＵＦＡ代謝物の一斉分析系の確立）

ＰＵＦＡ代謝物のスタンダード（特に記載の無いものは全てＣａｙｍａｎより購入した）

PGE_2、２０－ヒドロキシ－PGE_2、PGD_2、$PGF_{2\alpha}$、６－ケト－$PGF_{1\alpha}$、１５－デオキシ－$\Delta^{12,14}$－PGJ_2、LxA_4、LTB_4、２０－ヒドロキシ－LTB_4、LTC_4、LTD_4、TxB_2、５－ＨＥＴＥ、５，６－ＥＥＴ、８－ＨＥＴＥ、８，９－ＥＥＴ、１２－ＨＥＴＥ、１１，１２－ＥＥＴ、１５－ＨＥＴＥ、１４，１５－ＥＥＴ、１６－ＨＥＴＥ、１７－ＨＥＴＥ、２０－ＨＥＴＥ、５，１５－ｄｉＨＥＴＥ、８，１５－ｄｉＨＥＴＥ、１４，１５－ｄｉＨＥＴＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＴＥ、５－オキソ－ＥＴＥ、１５－オキソ－ＥＴＥ、LTB_5：Ｂｉｏｍｏｌ、ＲｖＥ２（本学部有機反応化学教室より頂いた）、PGE_3、PGD_3、ＲｖＥ１、５－ＨＥＰＥ、８－ＨＥＰＥ、１２－ＨＥＰＥ、１５－ＨＥＰＥ、１４，１５－ＥｐＥＴＥ、１８－ＨＥＰＥ、１７，１８－ＥｐＥＴＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ：１８－ＨＥＰＥを用いて合成（本明細書参照）、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ：１８－ＨＥＰＥを用いて合成（本明細書参照）、ＲｖＤ１、４－ＨＤｏＨＥ、７－ＨＤｏＨＥ、１０－ＨＤｏＨＥ、１３－ＨＤｏＨＥ、１４－ＨＤｏＨＥ、１７－ＨＤｏＨＥ、１６，１７－ＥｐＤＰＥ、２０－ＨＤｏＨＥ、１９，２０－ＥｐＤＰＥ、７，１７－ｄｉＨＤｏＨＥ：ＤＨＡを用いて合成

（本明細書参照）、１０，１７－ｄｉＨＤｏＨＥ：ＤＨＡを用いて合成（本明細書参照））、アラキドン酸：ＳＩＧＭＡ、ＤＨＡ：ＳＩＧＭＡ、ＥＰＡ：ＳＩＧＭＡ、ＤＰＡ（ω６）、ＤＰＡ（ω３）。

[0346] （ＬＣの溶媒）

酢酸：和光純薬工業

メタノール：和光純薬工業

アセトニトリル：和光純薬工業。

[0347] （ＭＲＭによるＰＵＦＡ代謝物の一斉定量分析系の確立）

（スタンダード化合物のＭＳ／ＭＳ測定）

スタンダードとして用意した化合物をそれぞれ約１μＭとなるようにメタノール／ｍｉｌｌｉＱ／酢酸＝９０／１０／０．１の溶液で調整し、約１５０μｌを１０μＬ／分で送液しながら、４０００Ｑ－ＴＲＡＰ（アプライドバイオシステム）でＭＳ／ＭＳを測定した。

[0348] （コーン電圧および衝突エネルギーの最適化）

それぞれ測定したＭＳ／ＭＳ値から、その化合物の構造に特徴的なＭＳ／ＭＳ値を選び、コーン電圧（Ｃｏｎｅ　Ｖｏｌｔａｇｅ）と衝突エネルギー（Ｃｏｌｌｉｓｉｏｎ　Ｅｎｅｒｇｙ）を振って測定を行うことで、そのＭＳ／ＭＳ値が一番感度良く検出されるような条件を決定した。

[0349] （ＬＣによる分離条件の検討）

ポンプはＵＰＬＣ（Ｗａｔｅｒｓ）、カラムはＡｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣ　ＢＥＨ　C_{18}　１．７μｍ（１．０×１５０ｍｍ）を用いた。溶媒はＡ液：ｍｉｌｌｉＱ／酢酸＝１００／０．１、およびＢ液：アセトニトリル／メタノール＝４／１を基本とし、時間ごとに比率、流速を調節し、スタンダード化合物の混合物（ｍｉｘｔｕｒｅ）が３０分以内で分離度も良く溶出する条件を決定した。最終的なＬＣ条件は以下の通りである。

[0350] 溶媒グラジエントは、図１Ｂを参照。この条件設定においては、合成した化合物（たとえば、酵素で合成したもの。１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ，１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが相当する。）についてはＭＳ／ＭＳの実測値からＭ

ＲＭの親マスと子マスのペアーを最適化（衝突エネルギーの最適化）することができる。また検量線を作製したら定量分析が可能になる。合成しないものは仮想条件を設定して、検出目的のＭＲＭを行うことができる。

流速　：　０～３０分→５０μＬ／分

３０～３３分→８０μＬ／分

３３～４５分→１００μＬ／分。

[0351]　（スタンダード化合物を用いた検量線の作製）

スタンダード化合物を用いて５ｐｇ／１０μＬ～１ｎｇ／１０μＬまでの希釈系列を作製し、確立したＬＣ条件、およびＭＲＭプログラムで分析し、検量線を作製した。ピークの高さをシグナル強度とした。

[0352]　（結果）

（ＭＲＭによるＰＵＦＡ代謝物の一斉定量分析系の確立）

（ＰＵＦＡ代謝物の一斉分析系の確立）

スタンダード化合物を用いて、それぞれの化合物に特異的なＭＲＭチャンネルを作製した。また、全く新規の構造の代謝物など、スタンダード化合物が存在しない場合は、構造から推定されるＭＳ／ＭＳ値、および類似の構造の代謝物のコーン電圧および衝突エネルギーを参考に、仮想的にチャンネルを作製した。そういった作業を積み重ねていった結果、現在までに１００種類以上の代謝物の一斉分析系を確立した（図１Ｃ）。酵素的に生成すると考えられているＰＵＦＡ代謝物だけでなく、これまでに報告の無い新規代謝物についても３０種類以上をＭＲＭプログラムに登録した。また、これらの代謝物のほとんどはＰＵＦＡ酸化物のポジションアイソマーであり、脱水や脱炭酸に由来する共通のＭＳ／ＭＳ値を持つ。そういったＭＳ／ＭＳ値を子マス値として用いることで、ＰＵＦＡのモノヒドロキシドやジヒドロキシド、トリヒドロキシドなどを網羅的に検出するＭＲＭチャンネルも作製した。

[0353]　（ＬＣの分離条件の検討）

次に、ＰＵＦＡ代謝物がうまく分離する条件を検討した。ＰＵＦＡ代謝物（酸化物）は、基本的にはＰＵＦＡの炭素鎖の様々な位置に酸素（水酸基）

の付加したものであり、構造的に非常に似ているため、分離が難しい。アセトニトリル、メタノール、水を様々な両比で混合し、また流速の最適化も行ったところ、４５分でＰＵＦＡ代謝物を非常によく分離させる系を確立した。ＨＥＰＥスタンダード混合物（ｍｉｘｔｕｒｅ）をＬＣで分離し、ＭＲＭ分析を行い、それぞれの代謝物に特異的なチャンネルのクロマトグラムを示している。例えば、１８－ＨＥＰＥと１７，１８－ＥｐＥＴＥは構造特異的なＭＳ／ＭＳのフラグメントが同じなため、一つのチャンネルで両方とも検出されるが、高分離能のＬＣの系を確立したことにより、それぞれを保持時間（ｒｅｔｅｎｔｉｏｎ　ｔｉｍｅ）の違いによって区別することができた。

[0354] （検量線の作製）

本実施例で確立したＭＲＭ測定メソッドを用いて、スタンダード化合物の混合物を、量をふって測定した。その結果、５ｐｇ～１ｎｇの範囲で精度の高い検量線を引くことができた。

[0355] 以上、ＰＵＦＡ代謝物の高感度一斉定量分析系を確立することに成功した。

[0356] （実施例２：代謝経路の解析および新規化合物の存在の証明）

本実施例では、１８－シリーズＥＰＡ代謝パスウェイの解析を行った。そこで、生体内にいままで見出されたことがない新規化合物が存在することを見出した。

[0357] そこで、炎症時に１８－ＨＥＰＥからどのような代謝物が生成するかを増幅してとらえることを目的に、１８－ＨＥＰＥと炎症部位に浸潤してくる白血球とのインキュベーションを行った。白血球がＰＥＣ（腹腔液浸出液；Ｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　Ｅｘｕｄａｔｅ　Ｃｅｌｌｓ）として多く炎症部位に浸潤し、かつその回収が容易なザイモザン腹膜炎モデルを用いた。ザイモザン投与により腹膜炎が惹起されると、最初に好中球が浸潤し、その後好中球の減少と共に今度は単球・マクロファージが浸潤してくる、急性炎症に特徴的なパターンを示す。今回は、炎症の初期としてザイモザン投与４時間後、

炎症の後期として４８時間後のＰＥＣを用い、１８－ＨＥＰＥとのインキュベーションを行った。

[0358] （材料および方法）

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス　８－１０週齢、雄性：日本クレア

１２／１５－ＬＯＸ$^{-/-}$マウス　８－１０週齢、雄性：Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ

ｚｙｍｏｓａｎＡ：和光純薬工業

リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）：１３７ｍＭ　塩化ナトリウム（ＮａＣｌ），２．７ｍＭ　塩化カリウム（ＫＣｌ），１０ｍＭ　リン酸水素二ナトリウム（Na_2HPO_4），２ｍＭ　リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）；適宜調製した。

ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）（Ca^{2+}，Mg^{2+}含有）：Ｇｉｂｃｏ

Ａ２３１８７：ＳＩＧＭＡ：ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）（和光純薬工業）に溶解し、２ｍＭとして－２０℃保存した。

１８－ＨＥＰＥ：Ｃａｙｍａｎ。

[0359] （１．炎症の初期および後期のＰＥＣとのインキュベーション）

ｚｙｍｏｓａｎＡを１ｍｇ／ｍＬで生理食塩水に懸濁し、３７℃で３０分間加温した。それをマウスに１ｍＬ腹腔内投与した。４時間後および４８時間後にマウスを屠殺し、腹腔にＰＢＳを５ｍＬ注入した。腹膜を１００回揉んだ後、腹腔内液を全量チューブに回収した。細胞の計数後、１２００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心し、細胞（ｐｐｔ．）にＨＢＳＳを加え、９００μＬを５０ｍＬチューブにうつした（5×10^6細胞／チューブ）。細胞の入ったチューブを３７℃でプレインキュベーションし、その間に１８－ＨＥＰＥおよびカルシウムイオノフォアＡ２３１８７の調製を行った。１８－ＨＥＰＥは、まず１．５ｍＬチューブにとり、窒素により溶媒を飛ばし、完全に乾固させた。そこにＨＢＳＳを加え、超音波処理して溶解させた（２００μＭ）。Ａ２３１８７は、ＨＢＳＳで希釈して４０μＭとした。以上調整した１８－ＨＥＰＥおよびＡ２３１８７を５０μＬずつ細胞の入ったチューブに添加

し、フタを少しあけて３７℃で３０分間インキュベーションを行った（１８－ＨＥＰＥは１０μＭ、Ａ２３１８７は２μＭ　最終濃度）。３０分後、氷冷メタノールを２ｍＬ加え、ボルテックス処理し、１時間以上、－２０℃で静置した。固相抽出により脂肪酸代謝物の画分を調整し、ＭＲＭによる分析を行った。

[0360] （結果）

（１．炎症の初期および後期のＰＥＣとのインキュベーション）

１８－ＨＥＰＥをＰＥＣとインキュベーションし、ＭＲＭによる分析を行った。その結果、抗炎症性メディエーターとして知られるＲｖＥ１やＲｖＥ２の他、いくつかのＭＲＭチャンネルで１８－ＨＥＰＥ依存的なピークが認められた（図２Ａ）。これらのピークは、そのＭＲＭチャンネル、および１８－ＨＥＰＥ依存的に認められた点から、それぞれ８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥであると考えられる。いくつかのチャンネルについては複数のピークが認められるが、これは二重結合の配位の違い（ｃｉｓ，ｔｒａｎｓ）や、水酸基の立体配置（Ｓ体、Ｒ体）の違いによるものではないかと考えられる。

[0361] また、ＲｖＥ１やＲｖＥ２は炎症初期のＰＥＣとのインキュベーションの方でより多く産生される傾向が認められたが、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥや１７，１８－ｄｉＨＥＰＥは炎症後期のＰＥＣとのインキュベーションの方がより多い傾向にあった（図２Ｂ）。ＲｖＥ１やＲｖＥ２は１８－ＨＥＰＥに５－ＬＯＸが作用することで生成することが明らかとなっている（非特許文献３、４）が、それ以外の代謝物が生成するという報告は無い。また、マウスのＰＥＣに存在するリポキシゲナーゼには、５－ＬＯＸおよび１２／１５－ＬＯＸが考えられる。そこで、次にこれらの新規代謝物の産生酵素を明らかにする目的で、１２／１５－ＬＯＸ$^{-/-}$マウスを用い、炎症誘導４８時間のＰＥＣで同様のインキュベーションを行ったところ、８，１８－、１２，１８－、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥについては１２／１５－ＬＯＸ$^{-/-}$マウス

で顕著に減少していた（図２Ｃ）。つまり、それらの代謝物は１２／１５－ＬＯＸにより産生されることが示唆された。１１，１８－ｄｉＨＥＰＥはそれ以外の酵素により産生されると考えられる。この時に考えられる酵素反応の反応機構を図２Ｆ～Ｇに示した。１２／１５－ＬＯＸはＥＰＡの１０位、および１３位の炭素から水素を引き抜く活性を有するため、本発明の新規代謝物を生成するものと考えられる。

[0362] （ａ．好酸球の単離）

ｚｙｍｏｓａｎ　Ａ（和光純薬工業）を１ｍｇ／ｍＬの濃度で生理食塩水に懸濁し、３７℃で３０分間加温した。このｚｙｍｏｓａｎ　Ａ懸濁液（１ｍＬ）を、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（野生型；８～１０週齢、メス；日本ＳＬＣ）に腹腔内投与した。４８時間後、腹腔内に滲出してきた細胞を回収し、細胞数をカウントした。１２００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離し、上清（滲出液）を－２０℃で保存した。沈殿物（細胞）をＰＢＳに懸濁し、７０μｍおよび３８μｍのメッシュに通して、ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で好酸球ポピュレーションの選別を行った。

[0363] （ｂ．１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥと好酸球とのインキュベーション）

１８－ＨＥＰＥ（Ｃａｙｍａｎ）または２０－ＨＤｏＨＥ（Ｃａｙｍａｎ）を１．５ｍＬチューブにとって、溶媒を窒素で飛ばし、ＨＢＳＳ（Ca^{2+}，Mg^{2+}含有；Ｇｉｂｃｏ）に溶解させた（１００μＭ）。また、ＤＭＳＯ（和光純薬）中２ｍＭのカルシウムイオノフォアＡ２３１８７（ＳＩＧＭＡ）の溶液をＨＢＳＳで希釈した（２０μＭ）。野生型マウスに由来する好酸球を１．２５×10^6細胞／ｍＬとなるようにＨＢＳＳで希釈し、５０ｍＬチューブに入れた（５×10^5細胞／チューブ）。このチューブに、上で調製した１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥ（ともに最終濃度１０μＭ）とＡ２３１８７（最終濃度２μＭ）とを加え、３７℃で３０分間加温した。このチューブに、２倍容の氷冷メタノール（和光純薬工業）を加えてボルテックスし、－２０℃で保存した。

[0364] （ｃ．固相抽出による脂肪酸代謝物の画分の調製）

サンプルがメタノールを１０％以上含む場合は、ｍｉｌｌｉＱ水を加えてメタノール含量を１０％ｖ／ｖ未満となるようにした。サンプルに１Ｎ塩酸（和光純薬工業）を加えて、ｐＨを約３にした。次にＬＴＢ$_4$－６，７，１４，１５－ｄ$_4$（Ｂｉｏｍｏｌ）を１ｎｇ加えた。バキュームポンプ付きカラム立て（Ｗａｔｅｒｓ）にＳｅｐ－ｐａｋ　Ｃ$_{18}$カートリッジ（５００ｍｇ；Ｗａｔｅｒｓ製）を装着し、メタノール　２０ｍＬ、ｍｉｌｌｉＱ水　２０ｍＬの順に流してカラムの平衡化を行った。次にサンプルを流し、ｍｉｌｌｉＱ水　２０ｍＬで洗浄した。その後、ヘキサン（和光純薬工業）１０ｍＬを流して中性脂質を溶出させ、次にギ酸メチル（和光純薬工業）１０ｍＬを流して脂肪代謝物を溶出させ、この画分を回収した。窒素で溶媒を飛ばし、メタノールに溶解させた。

[0365] （ｄ．マルチプルリアクションモニタリング（ＭＲＭ）による脂質解析）

ＭＲＭはある化合物のＭＳ値（Ｑ１）および構造に特徴的なＭＳ／ＭＳ値（Ｑ３）の組み合わせから、その化合物を特異的に検出する測定手法である。本明細書において同定した１８－ＨＥＰＥ由来の代謝物は、ネガティブイオンモードで測定した際のＭＳ値は１８－ＨＥＰＥに一つ酸素が付加した３３３で全て等しいが、酸素の付加する位置により構造特異的なＭＳ／ＭＳの値は異なる。それぞれの代謝物を検出するチャンネル（Ｑ１／Ｑ３）を、ＲｖＥ１＝（３４９／１９５）、ＲｖＥ２＝（３３３／１９５）、８，１８－ｄｉＨＥＰＥ＝（３３３／１５５）、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ＝（３３３／１６７）、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ＝（３３３／１７９）、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ＝（３３３／２０１）とした。また、ＤＨＡ代謝物については、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ＝（３５９／１５３）、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ＝（３５９／１９３）、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ＝（３５９／２０５）、１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ＝（３５９／２２７）とした。さらに、このＭＲＭをＬＣを組み合わせてそれぞれのチャンネルのクロマトグラムを作製した。測定機器として４０００Ｑ－ＴＲＡＰ（アプライドバイオ

システムズ）、ポンプにはＵＰＬＣ（Ｗａｔｅｒｓ）を用いた。サンプルは最終的にｍｉｌｌｉＱ水／メタノール＝４０／６０の溶媒３０μＬに溶解し、うち１０μＬを測定に用いた。ＬＣの条件は以下の通りであった：

（移動相の組成）

Ａ液：ｍｉｌｌｉＱ水／酢酸＝１００／０．１

Ｂ液：アセトニトリル／メタノール＝４／１

０～　５分　Ａ液２７％；

５～１５分　Ａ液２７％→７０％；

１５～２５分　Ａ液７０％→８０％；

２５～３５分　Ａ液８０％→１００％；

３５～４５分　Ａ液１００％

・流速

０～３０分　　５０μＬ／分；

３０～３３分　　８０μＬ／分；

３３～４５分　１００μＬ／分

（カラム）

Ｘ　ｂｒｉｄｇｅ　C_{18}　５．０μｍ，４．６ｍｍ×１００ｍｍ（Ｗａｔｅｒｓ）。

[0366] ＭＲＭによる１８－ＨＥＰＥ代謝物および２０－ＨＤｏＨＥ代謝物の包括的メタボローム解析の結果、１８－ＨＥＰＥからは、ＲｖＥ１、ＲｖＥ２等の既知の代謝物に加え、少なくとも４つの新規代謝物（８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）が生成され（図２Ｄ）、そして、２０－ＨＤｏＨＥからは、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥが生成されたことが明らかになった（図２Ｅ）。ＲｖＥ１、ＲｖＥ２および１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥは主に好酸球に高発現している５－ＬＯＸにより産生されることが知られているが、一方本明細書において同定した４つの１８－ＨＥＰＥ由

来の新規代謝物（８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ）、ならびに１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥはいずれも、５－ＬＯＸ以外の酵素により産生されることが明らかになった（図２Ｆおよび２Ｇ）。

[0367] よって、本実施例では、本発明の新規化合物が、好酸球により生産されることが明らかになった。

[0368] （実施例３：１８－ＨＥＰＥ由来の代謝物の合成）

本発明では、１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＰＥ由来の新規代謝物に該当する新規化合物を合成することができることを実証した。これらは、鋭意検討した結果１２／１５－ＬＯＸまたはダイズＬＯＸ（ｓＬＯＸ）により生成することが見出された。そこで、これらの代謝物の活性を評価すべく、そのためにそれらの代謝物を、酵素反応を用いて合成することを試みた。本実施例では、マウスの１２／１５－ＬＯＸの代わりとして、汎用に供する目的でｓＬＯＸを用いて酵素反応を行った。また、生成した代謝物が生体の生成するものと一致するかを、スパイク実験により検証した。

[0369] （材料）

（１．酵素反応によるＤＨＡのジヒドロキシ体の作製）

ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）を用いた酵素反応

ホウ酸緩衝液（ｐＨ９．０）：ホウ酸および塩化カリウム（いずれも和光純薬工業）をｍｉｌｌｉＱに溶解する。１Ｎの水酸化カリウム（和光純薬工業）溶液を加えてｐＨを９．０に設定し、その後ｍｉｌｌｉＱでホウ酸および塩化カリウムが５０ｍＭとなるようにメスアップした。

ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）：ＳＩＧＭＡ

テトラヒドロホウ酸ナトリウム：和光純薬工業

ＤＨＡ：ＳＩＧＭＡ：１００ｍｇ／ｍＬのメタノール（和光純薬工業）溶液として、－２０℃保存した。

[0370] （２．固相抽出による脂肪酸代謝物画分の調製）

・Ｓｅｐ－ｐａｋC_{18}Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ（５００ｍｇ）：Ｗａｔｅｒｓ

・メタノール：和光純薬工業

・ギ酸メチル：和光純薬工業

・ヘキサン：和光純薬工業

塩酸：和光純薬工業：ｍｉｌｌｉＱで１Ｎとなるように希釈し、室温で保存した。

・ｐＨ試験紙：ＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ

１００ｐｇ／μＬとなるようにエタノール（和光純薬工業）に希釈し、－２０℃で保存した。

[0371] （３．逆相ＨＰＬＣを用いた化合物の精製）

・メタノール：和光純薬工業

・０．０１％ｖ／ｖ酢酸：ｍｉｌｌｉＱ（純水）に、ｖ／ｖで０．０１％となるように酢酸（和光純薬工業）を加えた。

[0372] （４．生体サンプルとのスパイク実験）

・本実施例で合成、精製した化合物

・１８－ＨＥＰＥと炎症後期（４８時間後）のＰＥＣとのインキュベーションサンプル

（方法）

（ａ．酵素反応による合成）

１８－ＨＥＰＥ（Ｃａｙｍａｎ）をナスフラスコに３００μｇとり、窒素で溶媒を飛ばし、ここに、ホウ酸緩衝液（ホウ酸、塩化カリウムそれぞれ５０ｍＭ、ｐＨ９．０）を９ｍＬ加えて溶解させた。ここに、ダイズリポキシゲナーゼ（ＳＩＧＭＡ）を１ｍｇ加えて酵素反応を進行させ、その後$NaBH_4$（和光純薬工業）を用いて還元反応を行った。その後、固相抽出により脂肪酸代謝物の画分を調製した。

[0373] （ｂ．逆相ＨＰＬＣによる化合物の分離、精製）

前述のように調製した脂肪酸代謝物の画分の溶媒を窒素で飛ばし、ＨＰＬＣの初期移動相（H_2O／ＭｅＯＨ／酢酸＝３５／６５／０．０１）に溶解させ

た。これをＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にかけて、ピークをガラス小試験管に分取した。窒素で溶媒を飛ばして乾固させ、最終的にエタノール溶液として、－２０℃で保存した。逆相ＨＰＬＣの条件は以下の通りであった：

・移動相の組成

Ａ液：メタノール

Ｂ液：ｍｉｌｌｉＱ水／酢酸＝１００／０．０１

０～２１分　Ａ６５％

２１～３５分　Ａ１００％

・カラム

Ｘ　ｂｒｉｄｇｅ　C_{18}　５．０μｍ，４．６ｍｍ×１００ｍｍ（Ｗａｔｅｒｓ）

・流速

０．７ｍＬ／分。

[0374] （結果）

１８－ＨＥＰＥとｓＬＯＸを反応させ、逆相ＨＰＬＣで精製を行ったところ、６本のピークが生成した（図３Ａ）。そこで、この６本を全て分取し、ＭＳ／ＭＳを測定したところ、ピーク１～４は１１位に酸素が添加されたことで生じるフラグメントのマス値（１６７）が認められたこと、また吸光スペクトルを測定した結果、二重結合が３つ共役した（トリエン）ときに特徴的な２７０ｎｍ付近をλ_{max}とする三つ山のスペクトルが認められたことから、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥであると考えられた（図３Ｂ）。また、ピーク５および６は１７位に酸素が添加されたことで生じるフラグメントのマス値（２０１）が認められたこと、また同様にトリエンに特徴的なスペクトルが認められたことから、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥであると考えられた（図３Ｃ）。それぞれ複数のピークが認められたが、これは、二重結合のシス、トランスに由来するか、基質の１８－ＨＥＰＥがラセミ体であるので、エナンチオマーに由来するものと考えられる。

[0375] 白血球とのインキュベーションでは、８，１８－、１２，１８－、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが１２／１５－ＬＯＸ依存的に生成したが、ｓＬＯＸを用いた反応では１１，１８－、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが生成した。この違いはおそらく、マウスの１２／１５－ＬＯＸには１２－ＬＯＸ活性が存在するがｓＬＯＸには１５－ＬＯＸ活性しか存在しないなど、酵素の性質の違いによるものと考えられる。

[0376] また得られた化合物のうち、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥであるピーク５および６について、生体サンプル（腹膜炎誘導４８ｈ後のＰＥＣと１８－ＨＥＰＥとをインキュベーションしたサンプル）とのスパイク実験を行ったところ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを特異的に検出するチャンネルのメジャーピーク２つと一致した（図３Ｄ）。酵素反応により得られた１７，１８－ｄｉＨＥＰＥの２つアイソフォームは、生体が生成するものと同一であると考えられる。１１，１８－ｄｉＨＥＰＥも同様に合成されるものと期待される。

[0377] （実施例４：１８－ＨＥＰＥ由来代謝物の生理活性の評価）

本実施例では、実施例１で合成された化合物の腹膜炎モデルにおける生理活性の評価を行い、抗炎症活性があるか評価を行った。

[0378] （材料）

（１．ザイモザン腹膜炎の誘導）

・マウスＣ５７ＢＬ／６Ｊ　７週齢、雄性：日本クレア

・生理食塩水：大塚製薬

・ｚｙｍｏｓａｎＡ：和光純薬工業

・リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）

（２．ＦＡＣＳの三色染め（ＣＤ１１ｂ，Ｇｒ－１，Ｆ４／８０））

・抗マウスＣＤ１６／ＣＤ３２（０．５ｍｇ／ｍＬ）：ＢＤＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ

・ＦＩＴＣ抗マウスＦ４／８０（０．５ｍｇ／ｍＬ）：ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ

・ＰＥ抗マウスＬｙ－６Ｇ＆Ｌｙ－６Ｃ（Ｇｒ－１）（０．２ｍｇ／ｍＬ）

：ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ

・ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５抗マウスＣＤ１１ｂ（Ｍａｃ－１）（０．２ｍｇ／ｍＬ）：ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ

・染色抗体ｍｉｘ

ＦＩＴＣ抗マウスＦ４／８０を１．０μＬ／サンプル

ＰＥ抗マウスＬｙ－６Ｇ＆Ｌｙ－６Ｃを０．５μＬ／サンプル

ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５抗マウスＣＤ１１ｂを０．５μＬ／サンプル

上記の抗体を５０μＬ／サンプルのＰＢＳに希釈する。用事調製。

・ＰＢＳ：実施例２と同様。

[0379] （３．急性肺損傷モデルを用いた評価）

・マウスＣ５７ＢＬ／６Ｊ　７週齢、雄性：日本クレア

・塩酸：ＳＩＧＭＡ

・ネンブタール：大日本住友製薬

・ケタミン：第一三共プロファーマ

・キシラジン：バイエルメディカル

・ＰＢＳ：実施例２と同様に適宜調製

・生理食塩水：大塚製薬

・簡易ギムザ染色液Ｄｉｆｆｑｕｉｃｋ：シスメックス。

[0380] （方法）

（ａ．ザイモザン腹膜炎モデルを用いた評価）

炎症モデルには、酵母の細胞壁成分であるザイモザンを腹腔内投与することにより惹起する、ザイモザン腹膜炎を用いた。本モデルは、腹腔内の浸出液を回収できるため、サイトカインやエイコサノイドの分析に適したモデルである。

[0381] ｚｙｍｏｓａｎＡ（和光純薬工業）を１ｍｇ／ｍＬとなるように生理食塩水中に懸濁し、３７℃で３０分間加温した。その後、このｚｙｍｏｓａｎＡ溶液をボルテックスし、室温に戻した。先の実施例で合成した化合物１７，１８－ｄｉＨＥＰＥを１．５ｍＬチューブにとり、窒素で溶媒を飛ばして完

全に乾固させた後、生理食塩水を加えて溶解させた。次にこの化合物溶液１００μＬを、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（７週齢、オス；日本クレア）の尾静脈から注入した（１ｎｇまたは１０ｎｇ／マウス）。対照として、生理食塩水（Ｓａｌｉｎｅ）のみ、そして、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾン（１０μｇ／マウス）を注入した群を用いた。この約２分後にザイモザンＡ溶液１ｍＬを腹腔内投与した。２時間後、腹腔内に浸出してきた細胞をＰＢＳでチューブに回収し、細胞数をカウントした。その後このチューブを１２００ｒｐｍ、４℃で５分間遠心分離して上清を除き、沈殿物（ペレット）をＰＢＳ中に懸濁させ、ＦＡＣＳの三色染めによるポピュレーションの解析を行った。

[0382] （ｂ．ＦＡＣＳの三色染め）

腹腔細胞を２．５×１０^{6}細胞／ｍＬに調整し、２００μＬを５ｍＬ丸底チューブ（ＢＤＦａｌｃｏｎ）に入れた（５×１０^{5}細胞／チューブ）。このチューブに、チューブ１本あたり１μＬの抗マウスＣＤ１６／ＣＤ３２抗体（０．５ｍｇ／ｍＬ；ＢＤＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を加え、室温で１０分間インキュベーションした。このチューブに、染色抗体ミックス（１サンプルあたり、１．０μＬのＦＩＴＣ結合抗マウスＦ４／８０抗体（０．５ｍｇ／ｍＬ；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、０．５μＬのＰＥ結合抗マウスＬｙ－６Ｇ＆Ｌｙ－６Ｃ抗体（０．２ｍｇ／ｍＬ；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）および０．５μＬのＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５結合抗マウスＣＤ１１ｂ抗体（０．２ｍｇ／ｍＬ；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を５０μＬのＰＢＳに希釈して調製）を５０μＬ／チューブで添加し、室温、遮光下で１５分間インキュベーションした。測定はＦＡＣＳ Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で行った。

[0383] この結果、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが１０ｎｇ／マウスというごく低用量で好中球の浸潤を約４０％抑制した（図４Ａ）。この好中球抑制活性は、対照として用いたデキサメタゾンの、１０μｇ／マウスとほぼ同等であった。

[0384] （ｃ．急性肺損傷モデルを用いた解析）

生理食塩水に溶解した化合物１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ　１００μＬを、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（７週齢、オス；日本クレア）の尾静脈から注入した。１５分後、このマウスにケタミン（第一三共プロファーマ）とキシラジン（バイエル　メディカル）の混合液を腹腔内投与して麻酔をかけ、気管を露出して、塩酸（ｐＨ１．０、０．１Ｎ；ＳＩＧＭＡ）２５μＬを左気管支内に投与した。対照として、生理食塩水のみを注入し、麻酔後に塩酸の左気管支内投与を行った群（ｓａｌｉｎｅ／ＨＣｌ）と無処置の群（ｉｎｔａｃｔ）とを用いた。１２時間後にこのマウスを屠殺して、０．７ｍＬのＰＢＳで２回気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を行った。ＢＡＬ液中の細胞数をカウントし、簡易ギムザ染色液Ｄｉｆｆｑｕｉｃｋ（シスメックス）を用いた簡易ギムザ染色によって細胞のポピュレーションを定量した。

[0385] 結果を図４Ｂに示す。

[0386] （結果）

合成した化合物をザイモザン腹膜炎モデルで評価したところ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥであるピーク５および６に、１０ｎｇという低用量で炎症初期の好中球の浸潤を抑制する活性が認められた（図４Ｃ）。またこれらの活性は用量依存的であり（図４Ｄ）、１０ｎｇでの好中球浸潤抑制活性は、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾン１０μｇに匹敵するものであった（図４Ｃ）。この時他の細胞群（マクロファージなど）に対する抑制効果は認められなかった。１７，１８－ｄｉＨＥＰＥの活性には、他の既存の薬剤に対して好中球に対して顕著に高い活性を有する（図４Ｃ）。

[0387] また、腹膜炎で活性の認められた１７，１８－ｄｉＨＥＰＥについて、好中球の浸潤を腹膜炎モデル以外でも評価するべく、急性肺損傷モデルの解析を行った。その結果、このモデルでも、ピーク６について、１０ｎｇで好中球特異的な浸潤抑制活性が認められた（図４Ｅ）。この結果により、この化合物が、好中球の浸潤を特徴とする呼吸器系疾患（虚血再灌流障害や特発性肺繊維症など）に対して治療効果を示すことが期待される。

[0388] これを、IC_{40}としてあらわすと、図４Ｆのようになる。このグラフからわかるように、IC_{40}は、ほぼ８ｎｇと算出された。従来の化合物では、せいぜい１００ｎｇ程度のものが最強のものであったから、本発明の化合物は、従来のものよりも１桁以上強力な好中球抑制活性を示すことになる。

[0389] ザイモザンを腹腔内投与すると、腹腔内にいる常在性のマクロファージがこれを感知し、好中球遊走因子を放出する。すると末梢血中の好中球がインテグリンなどを介して血管内皮細胞と相互作用し、内皮細胞間を浸潤して炎症部位へ遊走する。従って、好中球の浸潤が抑制されたメカニズムとしては、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥがマクロファージに作用して好中球遊走因子の放出を抑制している可能性、また血管内皮細胞もしくは好中球に作用して、浸潤を抑制している可能性が考えられる。細胞を用いたアッセイにより、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥの作用点を明らかにすることができる。

[0390] 今回同定した１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが好中球の炎症部位への浸潤を何らかのメカニズムにより抑制し、炎症の収束に寄与している可能性を示すものである。

[0391] （実施例５：組み換えＬＯＸによる生産例）

実施例３におけるｓＬＯＸに代えて、マウス１２／１５－ＬＯＸあるいは血小板型１２－ＬＯＸを大腸菌で発現した組換え酵素を用いて、本発明の化合物を生産することを実証する。

[0392] 酵素に関する情報は、血小板型１２－ＬＯＸについては、ＹｏｓｈｉｍｏｔｏＴ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ ＭｅｄｉａｔｏｒｓＶｏｌ．６８－６９，２４５－２６２（２００２）、白血球型１２／１５－ＬＯＸについては、ＫｕｈｎＨ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ａｎｄ Ｏｔｈｅｒ Ｌｉｐｉｄ Ｍｅｄｉａｔｏｒｓ Ｖｏｌ．６８－６９，２６３－２９０（２００２）を参考にして、組換え技術等については当該分野で周知の技術（例えば、本明細書において援用されるＳａｍｂｒｏｏｋ Ｊ．ｅｔ ａｌ．など）を用いて、組換え酵素を生産することができる。

[0393] このようにして合成した酵素を実施例３で用いたｓＬＯＸの代わりに用いて、本発明の化合物を合成することができる。

[0394] 白血球とのインキュベーションでは、８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが１２／１５－ＬＯＸ依存的に生成することが分かっていることから、これらの化合物が主に生成されることが期待される。また、血小板型１２－ＬＯＸの場合も同様の結果が期待される。

[0395] また、原料として、ＨＤｏＰＡを用いた場合は、１３，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ、１９，２０－ｄｉＨＤｏＰＥが生成することが期待される。

[0396] （実施例６：ＤＨＡ代謝物の生理活性）

実施例５で生産した物質を、実施例４に記載のプロトコールに基づき、活性を測定する。

[0397] その結果、８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＰＥ、１９，２０－ｄｉＨＤｏＰＥなどの好中球抑制活性を測定することができる。

[0398] （実施例７：組換えマウスＬＯＸを用いた合成例）

本実施例では、実施例３におけるｓＬＯＸに代えて、組換えマウス８－ＬＯＸを用いて、本発明の化合物を生産することを実証する。

[0399] （材料）

（１．酵素反応によるジヒドロキシ体の作製）

ＰＢＳ

組換えマウス８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）：マウス皮膚からＲＮＡを抽出し、ＲＴ－ＰＣＲにより増幅して、ｐＣｏｌｄ　ＴＦ　ＤＮＡ（ＴａＫａＲａ）ベクターに組み込み、ＢＬ－２１コンピテントセルにトランスフォーメーションした。遺伝子が導入された大腸菌をＬＢ培地で培養し、ＩＰＴＧを１ｍＭになるように加えて、１５℃でタンパク質の誘導を行った。誘

導後の大腸菌を破砕し、遠心した上清をニッケルカラムにかけ、目的のタンパク質を精製した。

テトラヒドロホウ酸ナトリウム（ＮａＢＨ$_4$）：和光純薬工業

１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＨＥ：Ｃａｙｍａｎ

（２．逆相ＨＰＬＣを用いた化合物の精製）

・メタノール：和光純薬工業

・０．０１％ｖ／ｖ酢酸：ｍｉｌｌｉＱ（純水）に、ｖ／ｖで０．０１％となるように酢酸（和光純薬工業）を加えた。

[0400] （方法）

（ａ．酵素反応による合成）

１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥを反応容器にとり、窒素で溶媒を飛ばし、ここに、１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥの濃度が３０μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳを加えて溶解させた。ここに、８－ＬＯＸを０．１ｍｇ／ｍＬとなるように加えて酵素反応を進行させ、その後ＮａＢＨ$_4$を用いて還元反応を行った。その後、固相抽出により脂肪酸代謝物の画分を調製した。

[0401] （ｂ．逆相ＨＰＬＣによる化合物の分離、精製）

前述のように調製した脂肪酸代謝物の画分の溶媒を窒素で飛ばし、ＨＰＬＣの初期移動相（１８－ＨＥＰＥの反応物については、Ｈ$_2$Ｏ／ＭｅＯＨ／酢酸＝３５／６５／０．０１、２０－ＨＤｏＨＥの反応物については、Ｈ$_2$Ｏ／ＭｅＯＨ／酢酸＝３０／７０／０．０１）に溶解させた。これをＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にかけて、ピークをガラス小試験管に分取した。窒素で溶媒を飛ばして乾固させ、最終的にエタノール溶液として、－２０℃で保存した。逆相ＨＰＬＣの条件は以下の通りであった：

・移動相の組成

Ａ液：メタノール

Ｂ液：ｍｉｌｌｉＱ水／酢酸＝１００／０．０１

（１８－ＨＥＰＥの反応物）

０～２１分　Ａ６５％

２１～３５分　Ａ１００％

（２０－ＨＤｏＨＥの反応物）

０～２１分　Ａ７０％

２１～３５分　Ａ１００％

・カラム

ＴＳＫ－ＧＥＬ　ＯＤＳ－１００Ｖ　３μｍ，４．６ｍｍ×７．５ｃｍ（東ソー）

・流速

０．７ｍＬ／分。

[0402] （結果）

１８－ＨＥＰＥを８－ＬＯＸと反応させ、逆相ＨＰＬＣで精製を行ったところ、１本のピークが生成した（図５Ａ）。そこで、２本を分取し、ＭＳ／ＭＳを測定したところ、ＥＰＡの８位及び１８位に水酸基が導入されたことにより生じるフラグメンンイオンのＭＳ／ＭＳ値が認められたことから、８，１８－ｄｉＨＥＰＥであると考えられた（図５Ｂ）。

[0403] ２０－ＨＤｏＨＥを８－ＬＯＸと反応させた時の反応物についても同様に、１本のピークが生成（図６Ａ）し、ＭＳ／ＭＳの結果から同様に１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥと考えられた（図６Ｂ）。

[0404] 以上の結果から、８－ＬＯＸを用いた場合も、１２／１５－ＬＯＸまたはｓＬＯＸと同様に、本発明の化合物を合成できることが実証された。

[0405] （実施例８：１２－ＨｐＥＰＥおよび１４－ＨｐＤｏＨＥ由来の代謝物の合成）

本実施例では、１８－ＨＥＰＥおよび２０－ＨＤｏＨＥの代わりとして、１２－ＨｐＥＰＥおよび１４－ＨｐＤｏＨＥを基質として用いて、本発明の化合物を生産することを実証する。

[0406] （材料）

（１．酵素反応によるジヒドロキシ体の作製）

ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）を用いた酵素反応

ホウ酸緩衝液（ｐＨ９．０）

ホウ酸および塩化カリウム（いずれも和光純薬工業）をｍｉｌｌｉＱ水に溶解する。１Ｎの水酸化カリウム（和光純薬工業）溶液を加えてｐＨを９．０に設定し、その後ｍｉｌｌｉＱ水でホウ酸および塩化カリウムが５０ｍＭとなるようにメスアップした。

ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）：ＳＩＧＭＡ

テトラヒドロホウ酸ナトリウム（$NaBH_4$）：和光純薬工業

１２－ＨｐＥＰＥおよび１４－ＨｐＤｏＨＥ：ＥＰＡおよびＤＨＡをそれぞれマウス１２－ＬＯＸ（実施例７のマウス８－ＬＯＸと同様にして調製）と反応させて抽出、調製した。

[0407] （２．逆相ＨＰＬＣを用いた化合物の精製）

・メタノール：和光純薬工業

・０．０１％ｖ／ｖ酢酸：ｍｉｌｌｉＱ（純水）に、ｖ／ｖで０．０１％となるように酢酸（和光純薬工業）を加えた。

[0408] （方法）

（ａ．酵素反応による合成）

１２－ＨｐＥＰＥまたは１４－ＨｐＤｏＨＥを反応容器にとり、窒素で溶媒を飛ばし、ここに、１２－ＨｐＥＰＥまたは１４－ＨｐＤｏＨＥの濃度が３０μｇ／ｍＬとなるようにホウ酸緩衝液を加えて溶解させた。ここに、ｓＬＯＸを０．１ｍｇ／ｍＬとなるように加えて酵素反応を進行させ、その後$NaBH_4$を用いて還元反応を行った。その後、固相抽出により脂肪酸代謝物の画分を調製した。

[0409] （ｂ．逆相ＨＰＬＣによる化合物の分離、精製）

前述のように調製した脂肪酸代謝物の画分の溶媒を窒素で飛ばし、ＨＰＬＣの初期移動相（１２－ＨｐＥＰＥの反応物については、H_2O／ＭｅＯＨ／酢酸＝３５／６５／０．０１、１４－ＨｐＤｏＨＥの反応物については、H_2

Ｏ／ＭｅＯＨ／酢酸＝３０／７０／０．０１）に溶解させた。これをＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にかけて、ピークをガラス小試験管に分取した。窒素で溶媒を飛ばして乾固させ、最終的にエタノール溶液として、－２０℃で保存した。逆相ＨＰＬＣの条件は以下の通りであった：

・移動相の組成

Ａ液：メタノール

Ｂ液：ｍｉｌｌｉＱ水／酢酸＝１００／０．０１

（１２－ＨｐＥＰＥの反応物）

０～２１分　Ａ６５％

２１～３５分　Ａ１００％

（１４－ＨｐＤｏＨＥの反応物）

０～２１分　Ａ７０％

２１～３５分　Ａ１００％

・カラム

ＴＳＫ－ＧＥＬ　ＯＤＳ－１００Ｖ　３μｍ，４．６ｍｍ×７．５ｃｍ（東ソー）

・流速

０．７ｍＬ／分。

[0410] （結果）

１２－ＨｐＥＰＥをｓＬＯＸと反応させ、逆相ＨＰＬＣで精製を行ったところ、２本のピークが生成した（図７Ａ）。そこで、２本を分取し、ＭＳ／ＭＳを測定したところ、どちらもＥＰＡの１２位及び１８位に水酸基が導入されたことにより生じるフラグメントイオンのＭＳ／ＭＳ値が認められたことから、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥであると考えられた（図７Ｂ）。複数のピークが認められたが、これは二重結合のシス、トランスに由来するか、水酸基の配位がＳ体かＲ体かによるものであると考えられる。

[0411] １４－ＨｐＤｏＨＥとｓＬＯＸの反応物については、５本のピークが生成

した（図８Ａ）。そのうちの２本についてはＭＳ／ＭＳから同様に１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥであると考えられた（図８Ｂ）。

[0412] 以上の結果から、１２－ＨｐＥＰＥまたは１４－ＨｐＤｏＨＥを基質として用いた場合も、１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥと同様に、本発明の化合物を合成できることが実証された。この時に考えられる酵素反応の反応機構を図９Ａ～Ｂに示した。ｓＬＯＸはＥＰＡの１６位、およびＤＨＡの１８位の炭素から水素を引き抜いた結果、本発明の代謝物を生成するものと考えられる。

[0413] （実施例９：各種化合物についての生理活性の比較）

実施例４のザイモザン腹膜炎モデルの手法に準じて、デキサメタゾン、レゾルビンＥ２（ＲｖＥ２）、８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＤｏＨＥの各々について、生理活性を比較検討した。

[0414] （材料）

・マウスＣ５７ＢＬ／６Ｊ　７週齢、雄性：日本クレア

・生理食塩水：大塚製薬

・ザイモザンＡ：和光純薬工業

・リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）

・デキサメタゾン：ＳＩＧＭＡ

・レゾルビンＥ２（ＲｖＥ２）：Ｏｇａｗａ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｏｒｇ　Ｌｅｔｔ．１１，３６０２－３６０５（２００９）に従って調製した。

・８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥおよび１９，２０－ｄｉＤｏＨＥ：各々、１８－ＨＥＰＥまたは２０－ＨＤｏＨＥを基質として上記実施例等に記載される酵素反応により調製。

[0415] （方法）

炎症モデルには、酵母の細胞壁成分であるザイモザンを腹腔内投与することにより惹起する、ザイモザン腹膜炎を用いた。本モデルは、腹腔内の浸出液を回収できるため、サイトカインやエイコサノイドの分析に適したモデルである。

[0416] ザイモザンＡ（和光純薬工業）を１ｍｇ／ｍＬとなるように生理食塩水中に懸濁し、３７℃で３０分間加温した。その後、このザイモザンＡ溶液をボルテックスし、室温に戻した。各種化合物を１．５ｍＬチューブにとり、窒素で溶媒を飛ばして完全に乾固させた後、生理食塩水を加えて溶解させた。次にこの化合物溶液１００μＬを、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウス（７週齢、雄性；日本クレア）の尾静脈から注入した（ＥＰＡ代謝物およびＤＨＡ代謝物については１００ｐｇ、１ｎｇ、１０ｎｇ、５０ｎｇまたは１００ｎｇ／マウス、ＲｖＥ２については１００ｎｇまたは１μｇ／マウス、デキサメタゾンについては１μｇ、１０μｇまたは１００μｇ／マウス；各々、図１０を参照のこと）。対照として、生理食塩水（Ｓａｌｉｎｅ）のみ、そして、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾン（１０μｇ／マウス）を注入した群を用いた。この約２分後にザイモザンＡ溶液１ｍＬを腹腔内投与した。２時間後、腹腔内に浸出してきた細胞をＰＢＳでチューブに回収し、細胞数をカウントした。

[0417] （結果）

種々の化合物をザイモザン腹膜炎モデルで評価したところ、各種化合物について、用量依存性の好中球浸潤抑制活性が見られた（図１０）。１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥでは、１ｎｇで、抗炎症性ステロイドであるデキサメタゾン１μｇを上回る活性が見られ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥおよび１４，２０－ｄｉＨＤｏＨＥの好中球浸潤抑制活性が非常に強力なものであることが分かる。

[0418] 総合すると、８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１０，２０－ｄｉＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄｉＨ

ＤｏＨＥ、１９，２０－ｄｉＨＤｏＨＥでは、統計学的に有意な効果が見られ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥについても好中球浸潤抑制活性を有する傾向があることが判明した。１３，２０－ｄｉＨＤｏＨＥについては、これらの７化合物に類似する構造を有していることから、抗炎症活性を有する可能性があり、別の測定系において抗炎症活性が測定されることが大いに期待される。

[0419] （実施例１０：ヒト好酸球による産生）

本実施例では、ヒト好酸球による本発明の新規化合物の産生を実証した。

[0420] ヒト末梢血より公知の技術を用いて好酸球を精製した。具体的には、末梢血から得た顆粒球分画より、ＣＤ１６ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｌ Ｂｉｏｔｅｃ）をもちいて好中球を除去して分離した（Ｈａｎｓｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４５，１０５－１１０）。このヒト好酸球に対して、ＨＢＳＳ中の１．０ｘ１０^{6}細胞／ｍｌに１８－ＨＥＰＥもしくは２０－ＨＤｏＨＥを１０μＭで添加し、カルシウムイオノフォアＡ２３１８７（ＳＩＧＭＡ）１０μＭを加えて刺激し、３０分後に氷冷メタノールを加えて反応停止し、固相抽出を行った。固相抽出は実施例等に記載されるように行った。

[0421] 分析は、実施例１および２等に記載されるように、ＭＲＭを用いて行った。

[0422] （結果）

図１１および１２に記載されるように、１８－ＨＥＰＥを原料に用いた場合、本発明の８，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１１，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１２，１８－ｄｉＨＥＰＥ、１７，１８－ｄｉＨＥＰＥが生成した。また、レゾルビンＥ１およびレゾルビンＥ２の生成も観察された。２０－ＨＤｏＨＥを原料に用いた場合、１０，２０－ｄＨＤｏＨＥ、１３，２０－ｄＨＤｏＨＥ、１４，２０－ｄＨＤｏＨＥ、１９，２０－ｄＨＤｏＨＥが生成した。これらのことから、結果のＭＲＭクロマトグラムは基本的にマウス好酸球の結果と同様であることが判明した。

[0423] 以上から、本発明の化合物は、ヒトにおいても、生体内に存在しているということができることが理解される。

[0424] また、本発明の化合物は、マウス好酸球のみならず、ヒト好酸球によっても、生産することができることが明らかになった。

[0425] （実施例１１：ヒト好中球の遊走阻害実験）

好中球に対する抑制活性を別の観点で測定するために、ヒト好中球の遊走阻害実験を行う。

[0426] 実施例３または５で生産される化合物を用いる。

[0427] ヒト末梢血より好中球を単離し（Ｓｅｒｈａｎ Ｃ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ．３４，１４６０９－１４６１５（１９９５）を参照。）、標的となる化合物を加えた培養液（ＲＰＭＩ－０．１％ＢＳＡ）に３×１０^{5}細胞／２００μｌになるように混合し、３７℃１５分間インキュベーションを行う。その後セルカルチャーインサート（ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ ｉｎｓｅｒｔ）（２４ウエル，３μｍ ｐｏｒｅ；Ｆａｌｃｏｎ製）に移し、下層に遊走因子としてＬＴＢ４（５ｎＭ）加え、２時間後に下層に移行した好中球数を測定する。

[0428] このようにして遊走阻害を行う化合物を分析することができる。

[0429] （考察）

本実施例および他の実施例の結果から、本発明の化合物について、以下のように考察することができる。本発明の化合物は上記の通り、インビトロおよびインビボにおいて好中球抑制を示す。したがって本発明医薬組成物は、脳炎、脊髄炎および脳脊髄炎、髄膜炎、炎症性多発性ニューロパチー、神経炎、涙腺炎、眼窩炎、結膜炎（アレルギー性結膜炎、春季角結膜炎など）、角膜炎、網脈絡膜瘢痕、眼内炎、球後視神経炎、網膜症、緑内障、蜂窩織炎、外耳炎、軟骨膜炎、中耳炎、耳管炎、乳突起炎、鼓膜炎、迷路炎、歯髄炎、歯周炎、唾液腺炎、口内炎、舌炎、甲状腺炎、心膜炎、心内膜炎、心筋炎、高血圧症、心不全、動脈硬化（アテローム粥状硬化症など）、再狭窄、虚血再還流障害、血栓症（心筋梗塞、脳梗塞、など）、肥満症、血管炎、脈管

炎、多発性動脈炎、リンパ節炎、リンパ腫、ホジキン病、好酸球性疾患（好酸球増多症、肺好酸球症、肺アスペルギルス症など）、炎症性または閉塞性気道疾患（アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、肺炎、喉頭炎、喉頭気管炎、気管支炎、喘息、急性肺障害、急性呼吸促拍症候群、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患など）、胸膜炎、塵肺症、中皮腫、食道炎、胃空腸潰瘍、胃炎、十二指腸炎、食物アレルギー、敗血症、肝炎、肝線維症、肝硬変、胆嚢炎、膵炎、腹膜炎、糖尿病（Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病）、炎症性またはアレルギー性皮膚疾患（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎（アレルギー性接触皮膚炎、刺激性接触皮膚炎など）、乾癬、蕁麻疹、光アレルギー性反応、円形脱毛症など）、皮膚肥厚性障害（皮膚好酸球性肉芽腫など）、皮膚多発性筋炎、皮下脂肪組織炎、甲状腺機能亢進症、サルコイドーシス、自己免疫性血液疾患（溶血性貧血、突発性血小板減少性紫斑病など）、（全身性）紅斑性狼瘡、再発性多発性軟骨炎、多軟髄炎、スクレロドーマ（ｓｃｌｅｒｏｄｏｍａ）、ウェゲナー肉芽腫症、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、重筋無力症、スチーブンスージョンソン症候群、特発性スプルー、自己免疫炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病など）、内分泌眼病、サルコイドーシス、肺胞炎、慢性過敏性肺臓炎、多発性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、ぶどう膜炎、乾性角結膜炎、間質性肺線維症、虹彩毛様体炎、乾癬性関節炎、糸球体腎炎、全身性硬化症、全身性結合組織疾患（シェーグレン症候群、ベーチェット病、びまん性筋膜炎など）、間質性筋炎、炎症性多発性関節障害、炎症性関節炎、関節リウマチ、変形性関節症，滑膜炎、滑液包炎、腱鞘炎、慢性多発性骨髄炎、腎炎症候群、尿細管間質性腎炎、膀胱炎、前立腺炎、精巣炎、精巣上体炎、卵管炎、卵巣炎、子宮頚部炎、女性骨盤炎症、外陰腟炎症、臓器移植拒絶、骨髄移植拒絶、移植片対宿主病等の疾患の予防および/または治療剤あるいは熱傷、外傷性炎症の治療剤として使用しうる。

[0430] （実施例１２　溶解性試験）

化合物の溶解度は、１％　ＤＭＳＯ添加条件下で決定することができる。ＤＭＳＯにて１０ｍｍｏｌ／Ｌ　化合物溶液を調製し、化合物溶液６μＬを

ｐＨ６．８人工腸液（０．２ｍｏｌ／Ｌリン酸二水素カリウム試液　２５０ｍＬに０．２ｍｏｌ／Ｌ　水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）試液　１１８ｍＬ、水を加えて１０００ｍＬとした）５９４μＬに添加することができる。２５℃で１６時間静置させた後、混液を吸引濾過することができる。ろ液をメタノール／水＝１／１にて２倍希釈し、絶対検量線法によりＨＰＬＣまたはＬＣ／ＭＳ／ＭＳを用いてろ液中濃度を測定することができる。

[0431] （実施例１３　代謝安定性試験）

市販のプールドヒト肝ミクロソームを用いて、対象化合物を一定時間反応させ、反応サンプルと未反応サンプルの比較により残存率を算出し、肝で代謝される程度を評価することができる。

[0432] ヒト肝ミクロソーム０．５ｍｇタンパク質／ｍＬを含む０．２ｍＬの緩衝液（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ　塩化カリウム、１０ｍｍｏｌ／Ｌ　塩化マグネシウム）中で、１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＤＰＨ存在下で３７℃、０分あるいは３０分間反応させることができる（酸化的反応）。反応後、メタノール／アセトニトリル＝１／１（ｖ／ｖ）溶液の１００μＬに反応液５０μＬを添加、混合し、３０００ｒｐｍで１５分間遠心することができる。その遠心上清中の試験化合物をＬＣ／ＭＳ／ＭＳにて定量し、３０分間反応後の試験化合物の残存率を０分反応時の化合物量を１００％として計算することができる。

[0433] 結果は、化合物濃度が０．５μｍｏｌ／Ｌの場合、化合物濃度が２μｍｏｌ／Ｌの場合等の種々の場合を評価することができる。

[0434] （実施例１４　ＣＹＰ阻害試験）

市販のプールドヒト肝ミクロソームを用いて、ヒト主要ＣＹＰ５分子種（ＣＹＰ１Ａ２、２Ｃ９、２Ｃ１９、２Ｄ６、３Ａ４）の典型的基質代謝反応として７－エトキシレゾルフィンのＯ－脱エチル化（ＣＹＰ１Ａ２）、トルブタミドのメチル－水酸化（ＣＹＰ２Ｃ９）、メフェニトインの４’－水酸化（ＣＹＰ２Ｃ１９）、デキストロメトルファンのＯ－脱メチル化（ＣＹＰ２Ｄ６）、テルフェナジンの水酸化（ＣＹＰ３Ａ４）を指標とし、それぞれ

の代謝物生成量が被検化合物によって阻害される程度を評価することができる。

[0435] 反応条件は以下のとおりである：基質、０．５μｍｏｌ／Ｌ　エトキシレゾルフィン（ＣＹＰ１Ａ２）、１００μｍｏｌ／Ｌ　トルブタミド（ＣＹＰ２Ｃ９）、５０μｍｏｌ／Ｌ　Ｓ－メフェニトイン（ＣＹＰ２Ｃ１９）、５μｍｏｌ／Ｌ　デキストロメトルファン（ＣＹＰ２Ｄ６）、１μｍｏｌ／Ｌ　テルフェナジン（ＣＹＰ３Ａ４）；反応時間、１５分；反応温度、３７℃；酵素、プールドヒト肝ミクロソーム　０．２ｍｇタンパク質／ｍＬ；被検薬物濃度、１、５、１０、２０μｍｏｌ／Ｌ（４点）。

[0436] ９６穴プレートに反応溶液として、５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液中に各５種の基質、ヒト肝ミクロソーム、被検薬物を上記組成で加え、補酵素であるＮＡＤＰＨを添加して、指標とする代謝反応を開始し、３７℃、１５分間反応させた後、メタノール／アセトニトリル＝１／１（ｖ／ｖ）溶液を添加することで反応を停止させる。３０００ｒｐｍ、１５分間の遠心操作後、遠心上清中のレゾルフィン（ＣＹＰ１Ａ２代謝物）を蛍光マルチラベルカウンタで、トルブタミド水酸化体（ＣＹＰ２Ｃ９代謝物）、メフェニトイン４’－水酸化体（ＣＹＰ２Ｃ１９代謝物）、デキストロルファン（ＣＹＰ２Ｄ６代謝物）、テルフェナジンアルコール体（ＣＹＰ３Ａ４代謝物）をＬＣ／ＭＳ／ＭＳで定量することができる。

[0437] 薬物を溶解する溶媒であるＤＭＳＯのみを反応系に添加することができるものをコントロール（１００％）とし、被検薬物溶液を加えたそれぞれの濃度での残存活性（％）を算出し、濃度と抑制率を用いて、ロジスティックモデルによる逆推定によりIC_{50}を算出することができる。

[0438] （実施例１５　ＣＹＰ３Ａ４蛍光ＭＢＩ試験）

ＣＹＰ３Ａ４蛍光ＭＢＩ試験は、代謝反応による化合物のＣＹＰ３Ａ４阻害の増強を調べる試験であり、酵素に大腸菌発現ＣＹＰ３Ａ４を用いて、７－ベンジルオキシトリフルオロメチルクマリン（７－ＢＦＣ）がＣＹＰ３Ａ４酵素により脱ベンジル化し、蛍光を発する代謝物７－ハイドロキシトリフ

ルオロメチルクマリン（ＨＦＣ）を生成する反応を指標として行う。

[0439] 反応条件は以下のとおりである：基質、５．６μｍｏｌ／Ｌ　７－ＢＦＣ；プレ反応時間、０または３０分；反応時間、１５分；反応温度、２５℃（室温）；ＣＹＰ３Ａ４含量（大腸菌発現酵素）、プレ反応時６２．５ｐｍｏｌ／ｍＬ、反応時６．２５ｐｍｏｌ／ｍＬ（１０倍希釈時）；被検薬物濃度、０．６２５、１．２５、２．５、５、１０、２０μｍｏｌ／Ｌ（６点）。

[0440] ９６穴プレートにプレ反応液としてＫ－Ｐｉ緩衝液（ｐＨ７．４）中に酵素、被検薬物溶液を上記のプレ反応の組成で加え、別の９６穴プレートに基質とＫ－Ｐｉ緩衝液で１／１０希釈されるようにその一部を移行し、補酵素であるＮＡＤＰＨを添加して指標とする反応を開始し（プレ反応無）、所定の時間反応後、アセトニトリル／０．５ｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ（トリスヒドロキシアミノメタン）＝４／１を加えることによって反応を停止させる。また残りのプレ反応液にもＮＡＤＰＨを添加しプレ反応を開始し（プレ反応有）、所定時間プレ反応後、別のプレートに基質とＫ－Ｐｉ緩衝液で１／１０希釈されるように一部を移行し指標とする反応を開始することができる。所定の時間反応後、アセトニトリル／０．５ｍｏｌ／Ｌ　Ｔｒｉｓ（トリスヒドロキシアミノメタン）＝４／１を加えることによって反応を停止することができる。それぞれの指標反応を行ったプレートを蛍光プレートリーダーで代謝物である７－ＨＦＣの蛍光値を測定することができる（Ｅｘ＝４２０ｎｍ、Ｅｍ＝５３５ｎｍ）。

[0441] 薬物を溶解した溶媒であるＤＭＳＯのみを反応系に添加したものをコントロール（１００％）とし、被検薬物溶液を加えたそれぞれの濃度での残存活性（％）を算出し、濃度と抑制率を用いて、ロジスティックモデルによる逆推定によりIC_{50}を算出することができる。IC_{50}値の差が５μｍｏｌ／Ｌ以上の場合を（＋）とし、３μｍｏｌ／Ｌ以下の場合を（－）とすることができる。

[0442] （実施例１６　ＦＡＴ試験）

凍結保存しているネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍ

ｕｒｉｕｍ　ＴＡ９８株、ＴＡ１００株）２０μＬを１０ｍＬ液体栄養培地（２．５％　Ｏｘｏｉｄ　ｎｕｔｒｉｅｎｔ　ｂｒｏｔｈ　Ｎｏ．２）に接種し３７℃にて１０時間、振盪前培養することができる。ＴＡ９８株は９ｍＬの菌液を遠心（２０００×ｇ、１０分間）して培養液を除去し、９ｍＬのＭｉｃｒｏ　Ｆ緩衝液（リン酸水素二カリウム（K_2HPO_4）：３．５ｇ／Ｌ、リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）：１ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム（$(NH_4)_2SO_4$）：１ｇ／Ｌ、クエン酸三ナトリウム二水和物：０．２５ｇ／Ｌ、硫酸マグネシウム七水和物（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）：０．１ｇ／Ｌ）に菌を懸濁し、１１０ｍＬのＥｘｐｏｓｕｒｅ培地（ビオチン：８μｇ／ｍＬ、ヒスチジン：０．２μｇ／ｍＬ、グルコース：８ｍｇ／ｍＬを含むＭｉｃｒｏＦ緩衝液）に添加し、ＴＡ１００株は３．１６ｍＬ菌液に対しＥｘｐｏｓｕｒｅ培地１２０ｍＬに添加し試験菌液を調製することができる。被験物質ＤＭＳＯ溶液（最高用量５０ｍｇ／ｍＬから２倍公比で８段階希釈）、陰性対照としてＤＭＳＯ、陽性対照として非代謝活性化条件ではＴＡ９８株に対しては５０μｇ／ｍＬの４－ニトロキノリン－１－オキシドＤＭＳＯ溶液、ＴＡ１００株に対しては０．２５μｇ／ｍＬの２－（２－フリル）－３－（５－ニトロ－２－フリル）アクリルアミドＤＭＳＯ溶液、代謝活性化条件ではＴＡ９８株に対して４０μｇ／ｍＬの２－アミノアントラセンＤＭＳＯ溶液、ＴＡ１００株に対しては２０μｇ／ｍＬの２－アミノアントラセンＤＭＳＯ溶液それぞれ１２μＬと試験菌液５８８μＬ（代謝活性化条件では試験菌液４９８μＬとＳ９　ｍｉｘ　９０μＬの混合液）を混和し、３７℃にて９０分間、振盪培養することができる。被験物質を暴露することができる菌液４６０μＬを、Ｉｎｄｉｃａｔｏｒ培地（ビオチン：８μｇ／ｍＬ、ヒスチジン：０．２μｇ／ｍＬ、グルコース：８ｍｇ／ｍＬ、ブロモクレゾールパープル：３７．５μｇ／ｍＬを含むＭｉｃｒｏＦ緩衝液）２３００μＬに混和し５０μＬずつマイクロプレート４８ウェル／用量に分注し、３７℃にて３日間、静置培養する。アミノ酸（ヒスチジン）合成酵素遺伝子の突然変異によって増殖能を獲得した菌を含むウェルは、ｐＨ変化により紫色か

ら黄色に変色するため、１用量あたり４８ウェル中の黄色に変色することができる菌増殖ウェルを計数し、陰性対照群と比較して評価することができる。変異原性が陰性のものを（－）、陽性のものを（＋）として示すことにより評価することができる。

[0443] （実施例１７　ｈＥＲＧ試験）

心電図ＱＴ間隔延長のリスク評価を目的として、ｈｕｍａｎ　ｅｔｈｅｒ－ａ－ｇｏ－ｇｏ　ｒｅｌａｔｅｄ　ｇｅｎｅ（ｈＥＲＧ）チャンネルを発現させたＨＥＫ２９３細胞を用いて、心室再分極過程に重要な役割を果たす遅延整流Ｋ$^{+}$電流（I_{Kr}）への作用を検討することができる。

[0444] 全自動パッチクランプシステム（ＰａｔｃｈＸｐｒｅｓｓ　７０００Ａ，Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．）を用い、ホールセルパッチクランプ法により、細胞を－８０ｍＶの膜電位に保持することができる後、＋５０ｍＶの脱分極刺激を２秒間、さらに－５０ｍＶの再分極刺激を２秒間与えた際に誘発されるI_{Kr}を記録する。発生する電流が安定した後、被検物質を目的の濃度で溶解させた細胞外液（ＮａＣｌ：１３７ｍｍｏｌ／Ｌ、塩化カリウム（ＫＣｌ）：４ｍｍｏｌ／Ｌ、塩化カルシウム二水和物（$CaCl_2 \cdot 2H_2O$）：１．８ｍｍｏｌ／Ｌ、塩化マグネシウム六水和物（$MgCl_2 \cdot 6H_2O$）：１ｍｍｏｌ／Ｌ、グルコース：１０ｍｍｏｌ／Ｌ、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ）－１－ｐｉｐｅｒａｚｉｎｅｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ、４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジンエタンスルホン酸）：１０ｍｍｏｌ／Ｌ、ｐＨ＝７．４）を室温条件下で、１０分間細胞に適用させる。得られたI_{Kr}から、解析ソフト（ＤａｔａＸｐｒｅｓｓ　ｖｅｒ．１、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を使用して、保持膜電位における電流値を基準に最大テール電流の絶対値を計測することができる。さらに、被検物質適用前の最大テール電流に対する阻害率を算出し、媒体適用群（０．１％ジメチルスルホキシド溶液）と比較して、被検物質のI_{Kr}への影響を評価することができる。結果は、化合物濃度１μｍｏｌ／Ｌでの阻害率を示すことが

できる。

[0445] （実施例２１　ＢＡ試験）

経口吸収性は、以下のＢＡ試験を用いて実施することができる。

[0446] 以下に実験材料および方法を示す。

（１）使用動物：ラットあるいはマウスを使用した。

（２）飼育条件：ラットは、固形飼料および滅菌水道水を自由摂取させた。

（３）投与量、群分けの設定：経口投与、静脈内投与を所定の投与量により投与した。以下のように群を設定した。（化合物ごとで投与量は変更有）

経口投与　１～３０ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝２～３）

静脈内投与　０．５～１０ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝２～３）

（４）投与液の調製：経口投与は溶液または懸濁液として投与した。静脈内投与は可溶化して投与した。

（５）投与方法：経口投与は、経口ゾンデにより強制的に胃内に投与した。静脈内投与は、注射針を付けたシリンジにより尾静脈から投与した。

（６）評価項目：経時的に採血し、血漿中薬物濃度をＬＣ／ＭＳ／ＭＳを用いて測定した。

（７）統計解析：血漿中濃度推移について、非線形最小二乗法プログラムＷｉｎＮｏｎｌｉｎ（登録商標）を用いて血漿中濃度 - 時間曲線下面積（ＡＵＣ）を算出し、経口投与群と静脈内投与群のＡＵＣからバイオアベイラビリティ（ＢＡ）を算出した。

[0447] 結果は、例えば、ラット、経口投与１ｍｇ／ｋｇでのＢＡ値を示すことができる。

[0448] （実施例２２：製剤例１　錠剤）

本発明により同定した、医薬成分について、常法により次の組成からなる錠剤を製造する。

本発明の化合物	１００ｍｇ
乳　　糖	６０ｍｇ
馬鈴薯でんぷん	３０ｍｇ

ポリビニルアルコール　２ｍｇ

ステアリン酸マグネシウム　１ｍｇ

タール色素　微量。

[0449]　（実施例２３：製剤例２　散剤）

本発明により同定した、医薬成分について、常法により次の組成からなる散剤を製造する。

本発明の化合物　１５０ｍｇ

乳　糖　２８０ｍｇ。

[0450]　（実施例２４：製剤例３　シロップ剤）

本発明により同定した、医薬成分について、常法により次の組成からなるシロップ剤を製造する。

本発明の化合物　１００ｍｇ

精製白糖　４０　ｇ

ｐ－ヒドロキシ安息香酸エチル　４０ｍｇ

ｐ－ヒドロキシ安息香酸プロピル　１０ｍｇ

チョコフレーバー　０．１ｃｃ

これに水を加えて全量１００ｃｃとする。

[0451]　以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

[0452]　本願はまた、2009年2月20日に出願した日本国出願特願2009-037939号に対して優先権を主張するものであって、特願2009-037939号の内容もまた、具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考

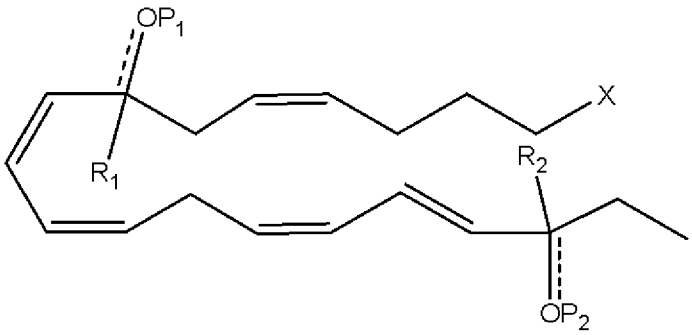
として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

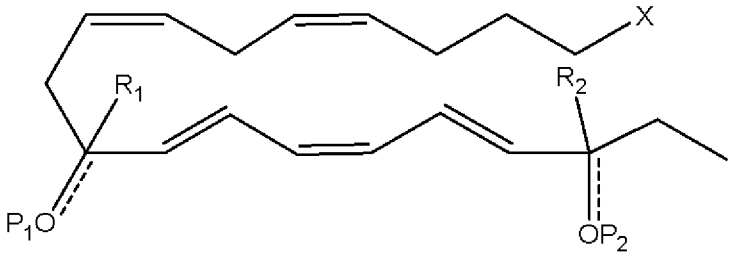
[0453] 本発明は、好中球抑制に関連する疾患または障害を処置するための医薬、それに使用される化合物、その薬学的に許容される塩、またはそれらの水和物等プロドラッグを提供する。本発明の化合物は本明細書において記載されるとおり、優れた好中球抑制作用を示す。したがって、本発明は製薬産業等において有用である。

請求の範囲

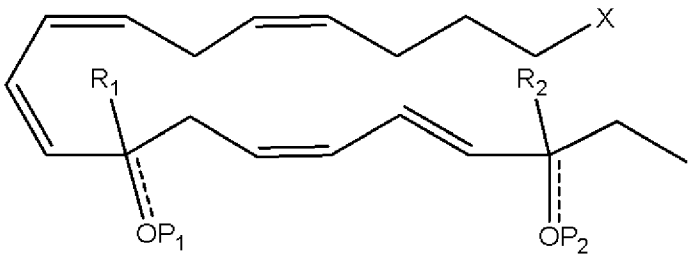
[請求項1] [化1]



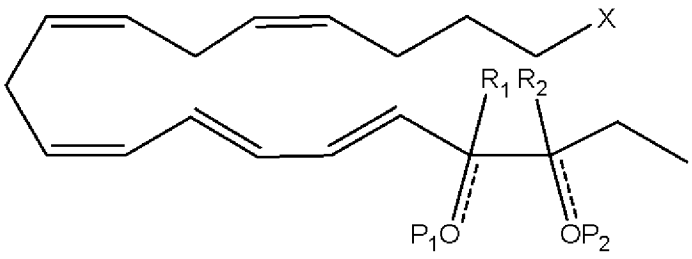
[化2]



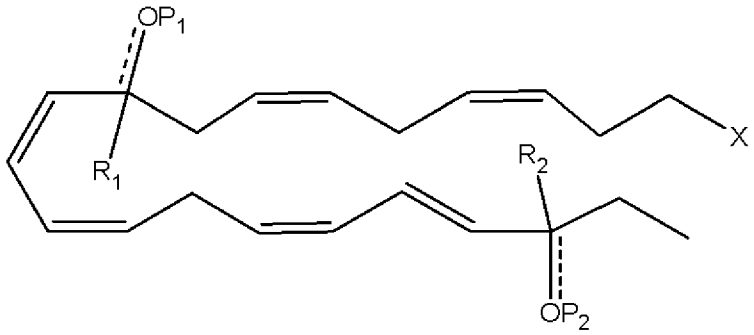
[化3]



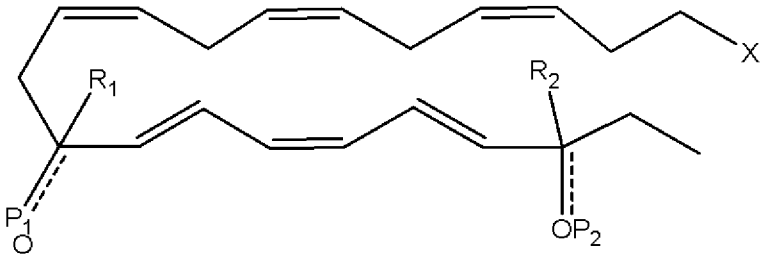
[化4]



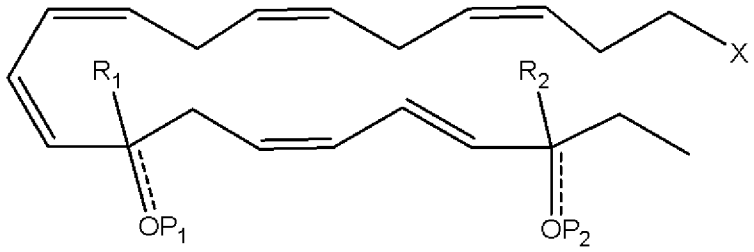
[化5]



[化6]

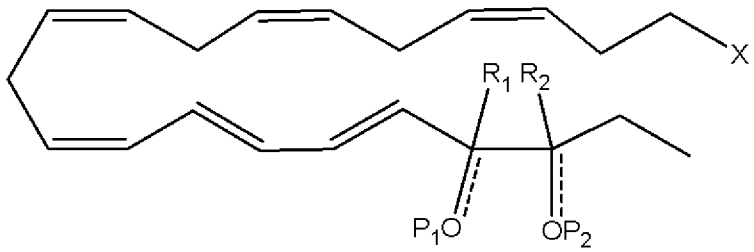


[化7]



および

[化8]



から選択される化合物、またはその薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、

ここで、

P_1およびP_2は、各々独立して、

[化9]

が単結合を示す場合は、保護基、水素原子、アルキル、水酸基もしくは置換された水酸基またはその組み合わせであり、

[化10]

が二重結合を示す場合は、P_1、P_2、R_1およびR_2は、存在せず、

[化11]

が単結合の場合、

R_1およびR_2は、各々独立して、水素原子、ハロゲン原子、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換の、分枝状または非分枝状アルキルアリール基またはその組み合わせであり；

Xは、－Ｃ（Ｏ）ＯR_3、－Ｃ（Ｏ）ＮR_4R_5、－Ｃ（Ｏ）Ｈ、－Ｃ（ＮＨ）ＮR_4R_5、－Ｃ（Ｓ）Ｈ、－Ｃ（Ｓ）ＯR_3、－Ｃ（Ｓ）ＮR_4R_5、－ＣＮであり；

R_3は、水素、保護基、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルまたは式：－Ｎ$R_a$$R_b$（式中、$R_a$および$R_b$は各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_aとR_bは隣接する窒素原子と一緒になって

、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよい。）であり；

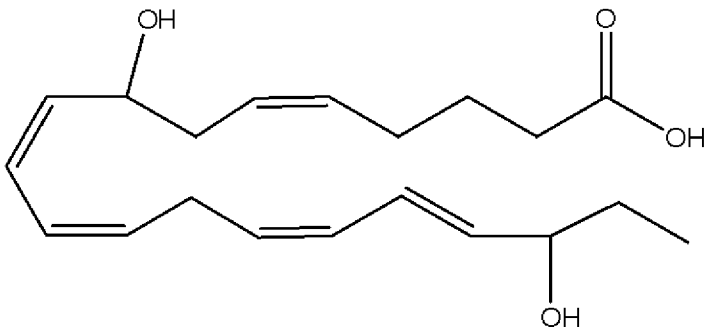
R_4およびR_5は、各々独立して、水素、置換もしくは非置換のアルキル、置換もしくは非置換のアルケニル、置換もしくは非置換のアルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のシクロアルケニル、置換もしくは非置換のヘテロサイクルであるか、またはR_4とR_5は隣接する窒素原子と一緒になって、置換もしくは非置換の含窒素ヘテロ環を形成していてもよく；

そして、化合物の二重結合配置は各々独立してシスまたはトランスのいずれかであり得る、

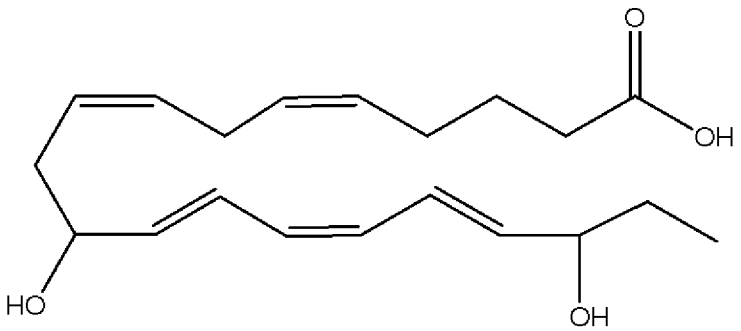
化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

[請求項2] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物であって、以下

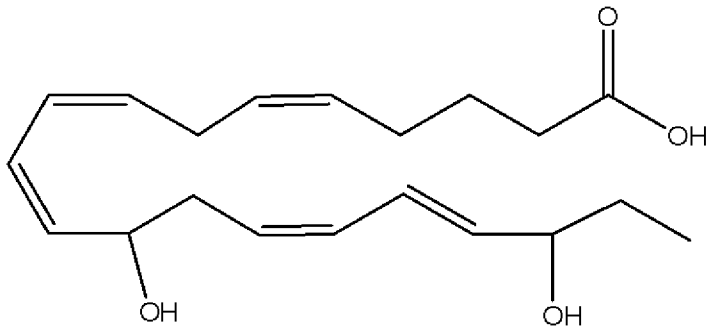
[化12]



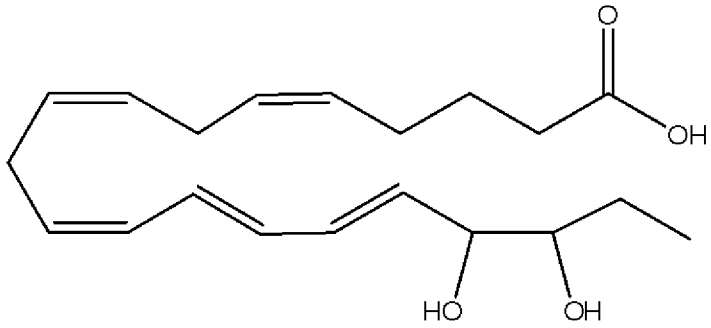
[化13]



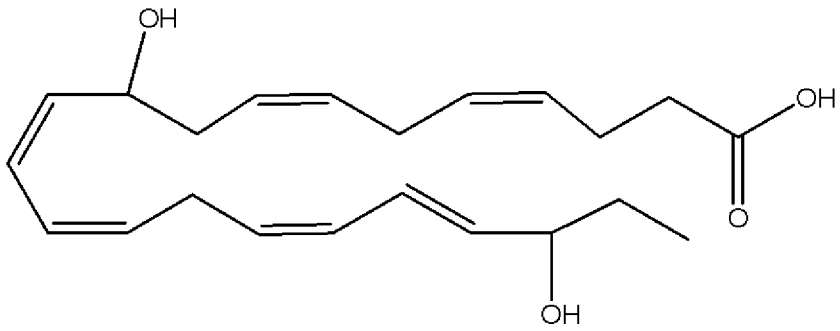
[化14]



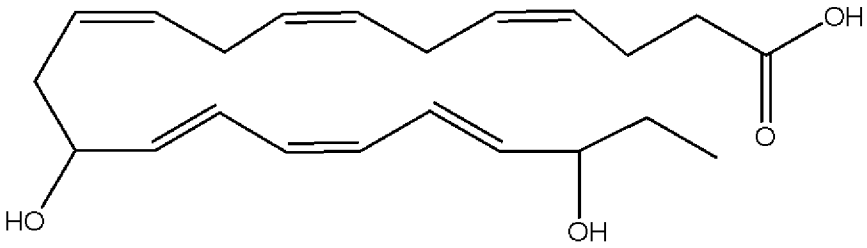
[化15]



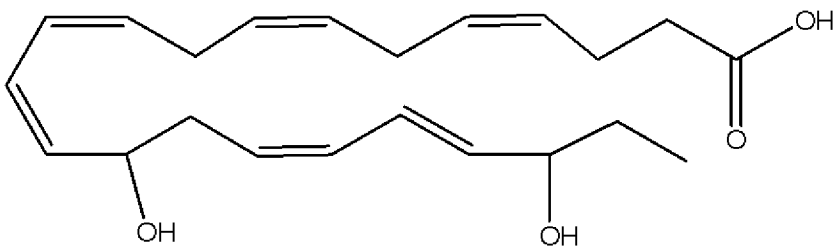
[化16]



[化17]

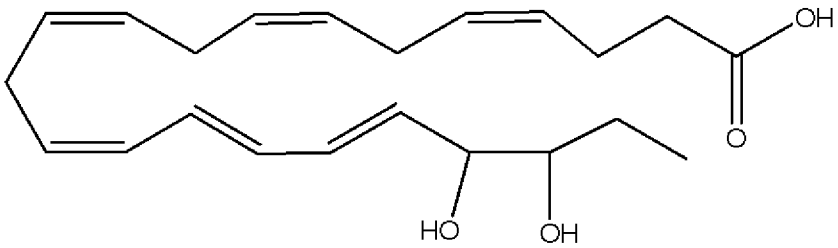


[化18]



および

[化19]



からなる群より選択される、化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物。

[請求項3] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む、好中球抑制剤。

[請求項4] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を含む医薬。

[請求項5] 前記医薬は、肺切迫症候群、成人呼吸窮迫症候群および慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）から選択される肺疾患；虚血性心疾患、虚血性腎疾患、虚血性脳疾患および虚血性肝疾患から選択される虚血性疾患；炎症性疾患；びらん性胃炎・胃潰瘍・十二指腸潰瘍・気管支喘息、潰瘍性大腸炎、動脈硬化症、クローン病、悪性腫瘍、卵巣嚢腫、卵管炎、子宮筋腫、子宮内膜症、自然流産、妊娠中毒症、不妊症および月経困難症から選択されるストレス性疾患から選択される好中球の抑制により改善される疾患、障害または状態を処置または予防するためのものである、請求項４に記載の医薬。

[請求項6] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を製造する方法であって、

Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；および

Ｂ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程

を包含する、方法。

[請求項7] 請求項１または２に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を製造する方法であって、

Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；

Ｂ）Ａ）工程で得られた前記酵素代謝産物を、精製後または精製しないで８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物からなる群より選択される少なくとも１つを接触させて

二次酵素代謝産物を得る工程

Ｃ）必要に応じて該二次酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する、方法。

[請求項8] 炎症性疾患を処置または予防する方法であって、該処置または予防が必要な被験体に請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を投与する工程を包含する、方法。

[請求項9] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、医薬品を製造するための使用。

[請求項10] 請求項１に記載の化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物の、好中球が関連する疾患、障害または状態を処置または予防するための医薬品を製造するための使用。

[請求項11] 請求項１に記載の化合物またはＰＵＦＡ代謝物を分析する方法であって、

以下の液体クロマトグラフィー条件

Ａ液：水／酢酸＝１００／０．１、およびＢ液：アセトニトリル／メタノール＝４／１を用いた溶媒系として用い、流速：０～３０分→５０μＬ／分、３０～３３分→８０μＬ／分、３３～４５分→１００μＬ／分を用い、および図１Ｂまたはその改変系を用い、図１Ｃに記載のパラメータを用いることを特徴とする、

方法。

[請求項12] Ａ）エイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）、ドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）、１８－ヒドロキシルエイコサペンタエン酸（ＨＥＰＥ）または２０－ヒドロキシルドコサヘキサエン酸（ＨＤｏＨＥ）に８－リポキシゲナーゼ（８－ＬＯＸ）、１２－リポキシゲナーゼ（１２－ＬＯＸ）、１２／１５－リポキシゲナーゼ（１２／１５－ＬＯＸ）、ダイズリポキシゲナーゼ（ｓＬＯＸ）および好酸球もしくはその抽出物から

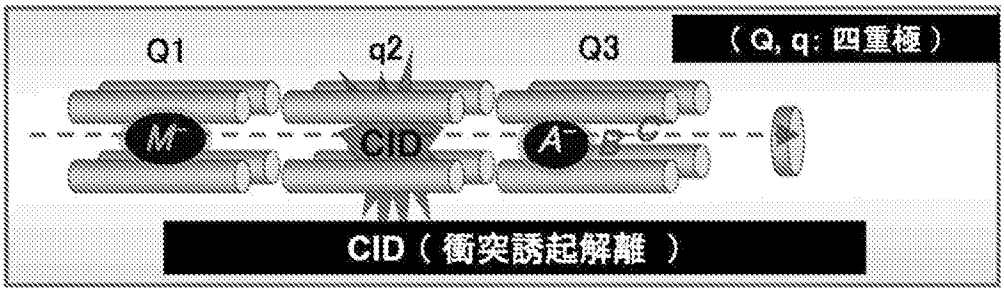
なる群より選択される少なくとも１つを接触させて酵素代謝産物を得る工程；および

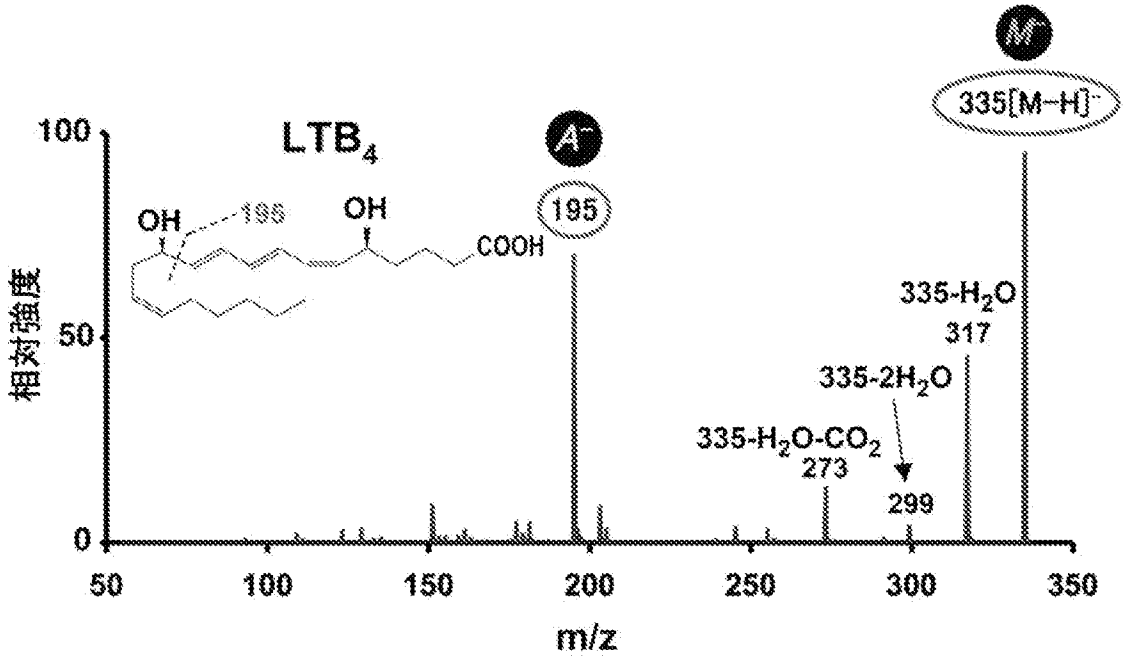
Ｂ）必要に応じて該酵素代謝産物を還元または酸化し、必要に応じて置換基を導入し、必要に応じて目的とする該化合物または該化合物の薬学的に受容可能な塩もしくは溶媒和物を分離もしくは精製する工程を包含する、方法によって生産される生成物であって、

但し、レゾルビンＥ１、レゾルビンＥ２およびプロテクチンＤ１を除く、生成物。

[図1A]

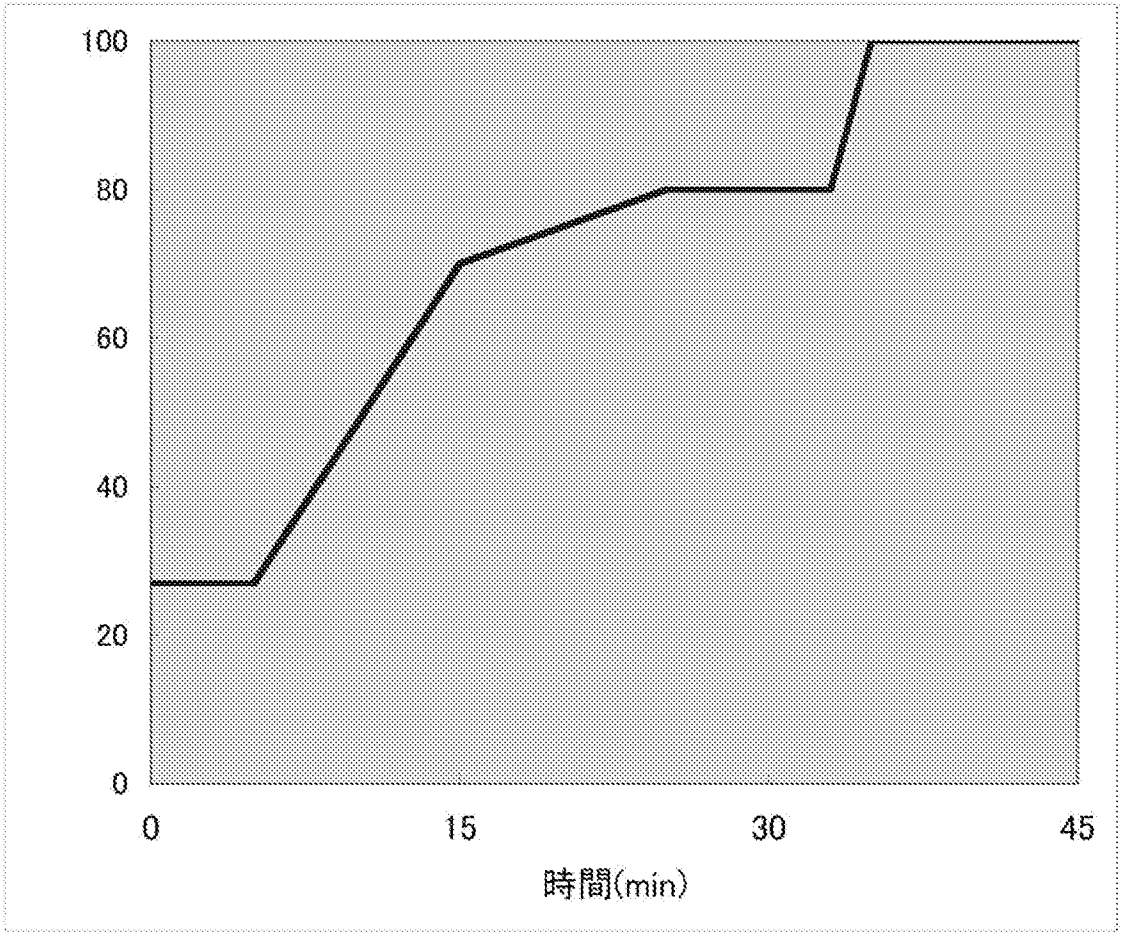
Fig. 1A


Q1
q2
Q3
（Q, q: 四重極）
M⁻
CID
A⁻
CID（衝突誘起解離）


M⁻
335[M−H]⁻
LTB4
A⁻
195
OH
OH
COOH
335-H2O
317
335-2H2O
335-H2O-CO2
273
299
相対強度
100
50
0
50
100
150
200
250
300
350
m/z

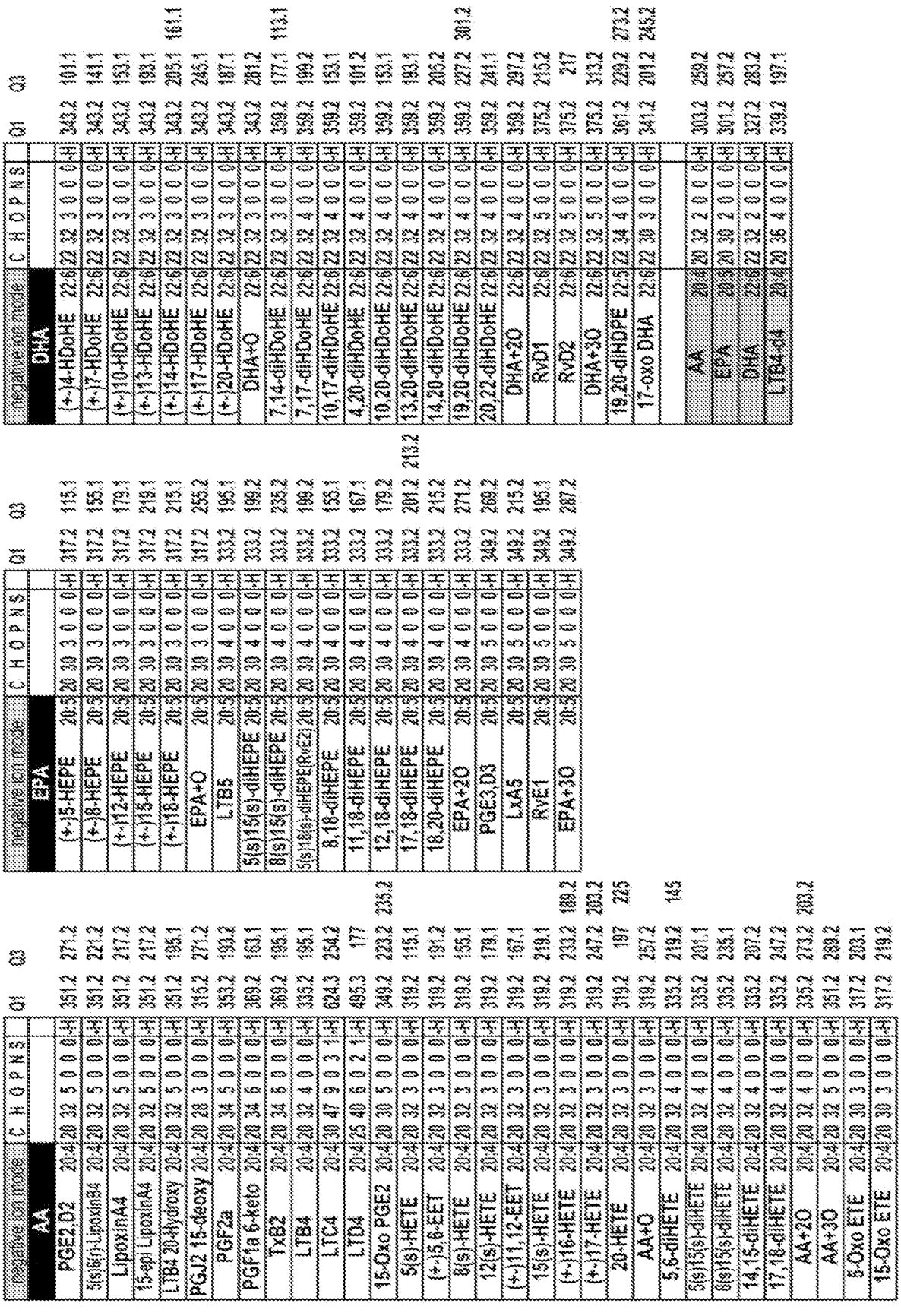
[図1B]

Fig. 1B



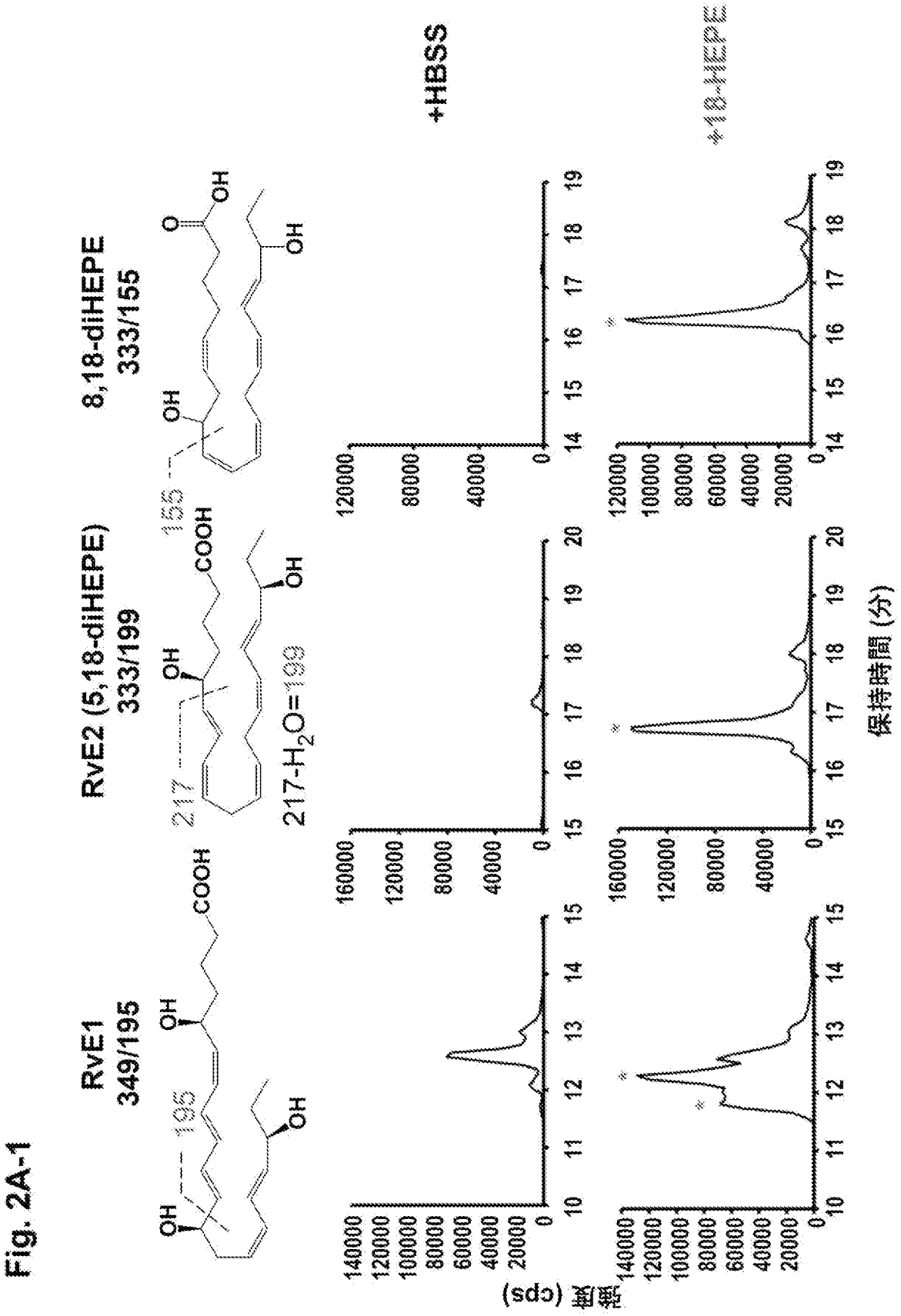
[図1C]

Fig. 1C


negative ion mode C H O P N S Q1 Q3
AA
PGE2,D2 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 271.2
5(s)6(r)-LipoxinB4 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 221.2
LipoxinA4 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 217.2
15-epi LipoxinA4 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 217.2
LTB4 20-Hydroxy 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 195.1
PGJ2 15-deoxy 20:4 20 28 3 0 0 0[-H] 313.2 271.2
PGF2a 20:4 20 34 5 0 0 0[-H] 353.2 193.2
PGF1a 6-keto 20:4 20 34 6 0 0 0[-H] 369.2 163.1
TxB2 20:4 20 34 6 0 0 0[-H] 369.2 195.1
LTB4 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 195.1
LTC4 20:4 38 47 9 0 3 1[-H] 624.3 254.2
LTD4 20:4 25 40 6 0 2 1[-H] 495.3 177
15-Oxo PGE2 20:4 20 30 5 0 0 0[-H] 349.2 223.2 235.2
5(s)-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 115.1
(+-)5,6-EET 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 191.2
8(s)-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 155.1
12(s)-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 179.1
(+-)11,12-EET 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 167.1
15(s)-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 219.1
(+-)16-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 233.2 189.2
(+-)17-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 247.2 283.2
20-HETE 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 197 225
AA+O 20:4 20 32 3 0 0 0[-H] 319.2 257.2
5,6-diHETE 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 219.2 145
5(s)15(s)-diHETE 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 201.1
8(s)15(s)-diHETE 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 235.1
14,15-diHETE 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 207.2
17,18-diHETE 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 247.2
AA+2O 20:4 20 32 4 0 0 0[-H] 335.2 273.2 283.2
AA+3O 20:4 20 32 5 0 0 0[-H] 351.2 289.2
5-Oxo ETE 20:4 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 203.1
15-Oxo ETE 20:4 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 219.2
EPA
(+-)5-HEPE 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 115.1
(+-)8-HEPE 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 155.1
(+-)12-HEPE 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 179.1
(+-)15-HEPE 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 219.1
(+-)18-HEPE 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 215.1
EPA+O 20:5 20 30 3 0 0 0[-H] 317.2 255.2
LTB5 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 195.1
5(s)15(s)-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 199.2
8(s)15(s)-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 235.2
5(s)18(±)-diHEPE(Rv2) 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 199.2
8,18-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 155.1
11,18-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 167.1
12,18-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 179.2
17,18-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 201.2 213.2
18,20-diHEPE 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 215.2
EPA+2O 20:5 20 30 4 0 0 0[-H] 333.2 271.2
PGE3,D3 20:5 20 30 5 0 0 0[-H] 349.2 269.2
LxA5 20:5 20 30 5 0 0 0[-H] 349.2 215.2
RvE1 20:5 20 30 5 0 0 0[-H] 349.2 195.1
EPA+3O 20:5 20 30 5 0 0 0[-H] 349.2 287.2
DHA
(+-)4-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 101.1
(+-)7-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 141.1
(+-)10-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 153.1
(+-)13-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 193.1
(+-)14-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 205.1 161.1
(+-)17-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 245.1
(+-)20-HDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 187.1
DHA+O 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 343.2 281.2
7,14-diHDoHE 22:6 22 32 3 0 0 0[-H] 359.2 177.1 113.1
7,17-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 199.2
10,17-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 153.1
4,20-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 101.2
10,20-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 153.1
13,20-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 193.1
14,20-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 205.2
19,20-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 227.2 301.2
20,22-diHDoHE 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 241.1
DHA+2O 22:6 22 32 4 0 0 0[-H] 359.2 297.2
RvD1 22:6 22 32 5 0 0 0[-H] 375.2 215.2
RvD2 22:6 22 32 5 0 0 0[-H] 375.2 247
DHA+3O 22:6 22 32 5 0 0 0[-H] 375.2 313.2
19,20-diHDPE 22:5 22 34 4 0 0 0[-H] 361.2 229.2 273.2
17-oxo DHA 22:6 22 30 3 0 0 0[-H] 341.2 201.2 245.2
AA 20:4 20 32 2 0 0 0[-H] 303.2 259.2
EPA 20:5 20 30 2 0 0 0[-H] 301.2 257.2
DHA 22:6 22 32 2 0 0 0[-H] 327.2 283.2
LTB4-d4 20:4 20 36 4 0 0 0[-H] 339.2 197.1

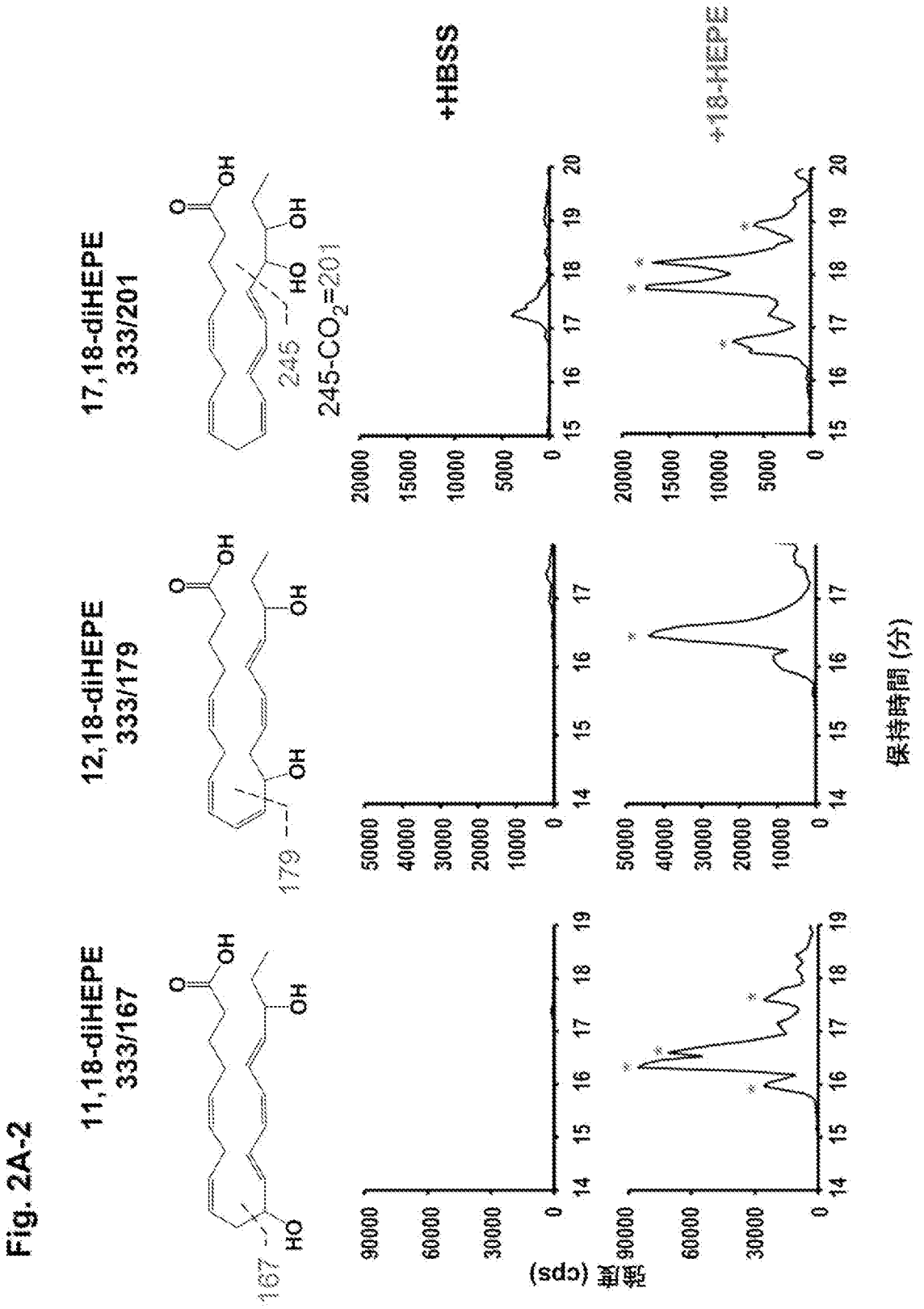
[図2A-1]

Fig. 2A-1


RvE1
349/195
RvE2 (5,18-diHEPE)
333/199
8,18-diHEPE
333/155
195
217
155
217-H2O=199
OH
COOH
+HBSS
+18-HEPE
強度 (cps)
保持時間 (分)

[図2A-2]

Fig. 2A-2


11,18-diHEPE
333/167
12,18-diHEPE
333/179
17,18-diHEPE
333/201
245-CO2=201
+HBSS
+10-HEPE
強度 (cps)
保持時間 (分)

[図2B-1]

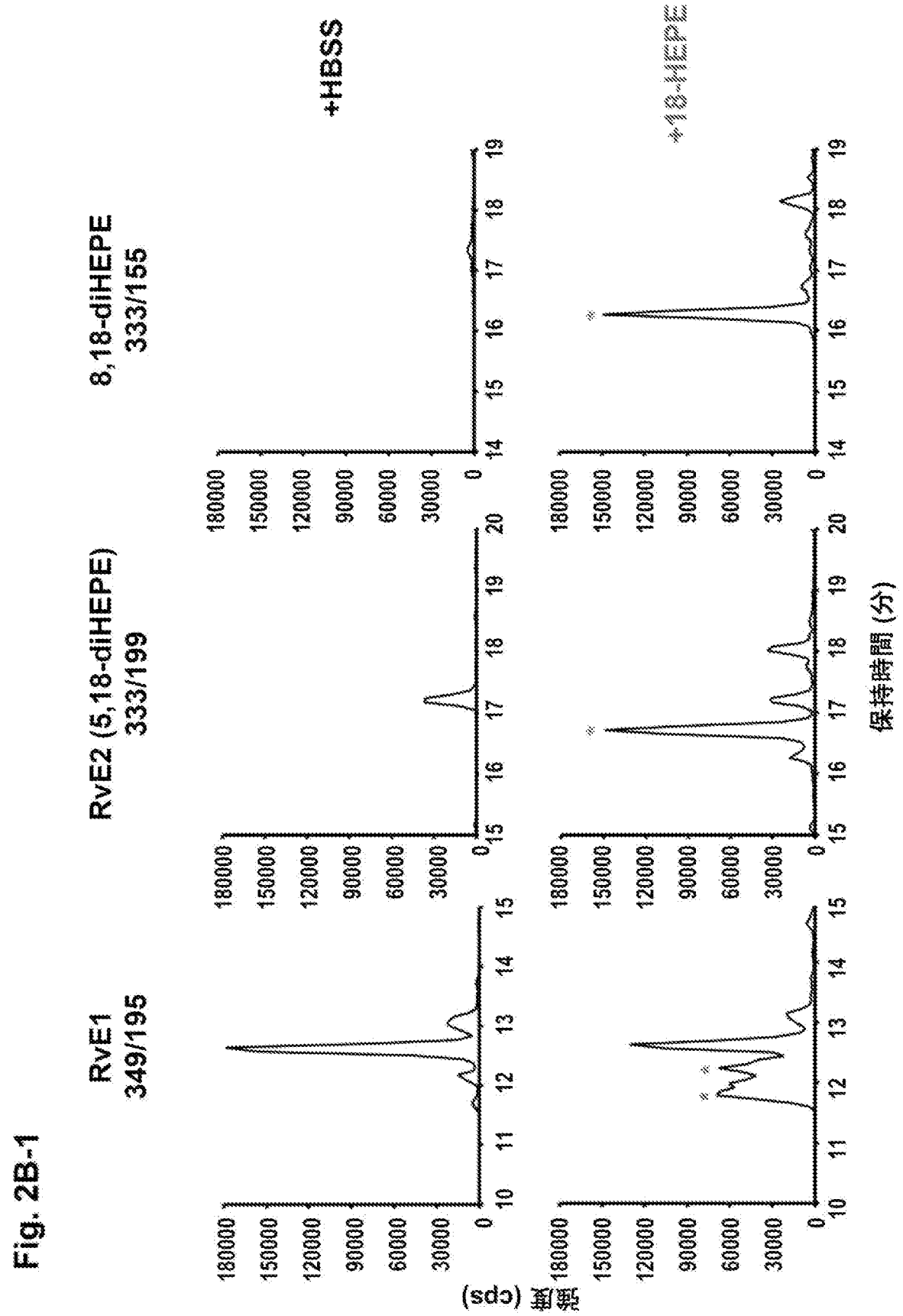

+HBSS
+18-HEPE
RvE1
349/195
RvE2 (5,18-diHEPE)
333/199
8,18-diHEPE
333/155
強度 (cps)
保持時間 (分)

Fig. 2B-1

[図2B-2]

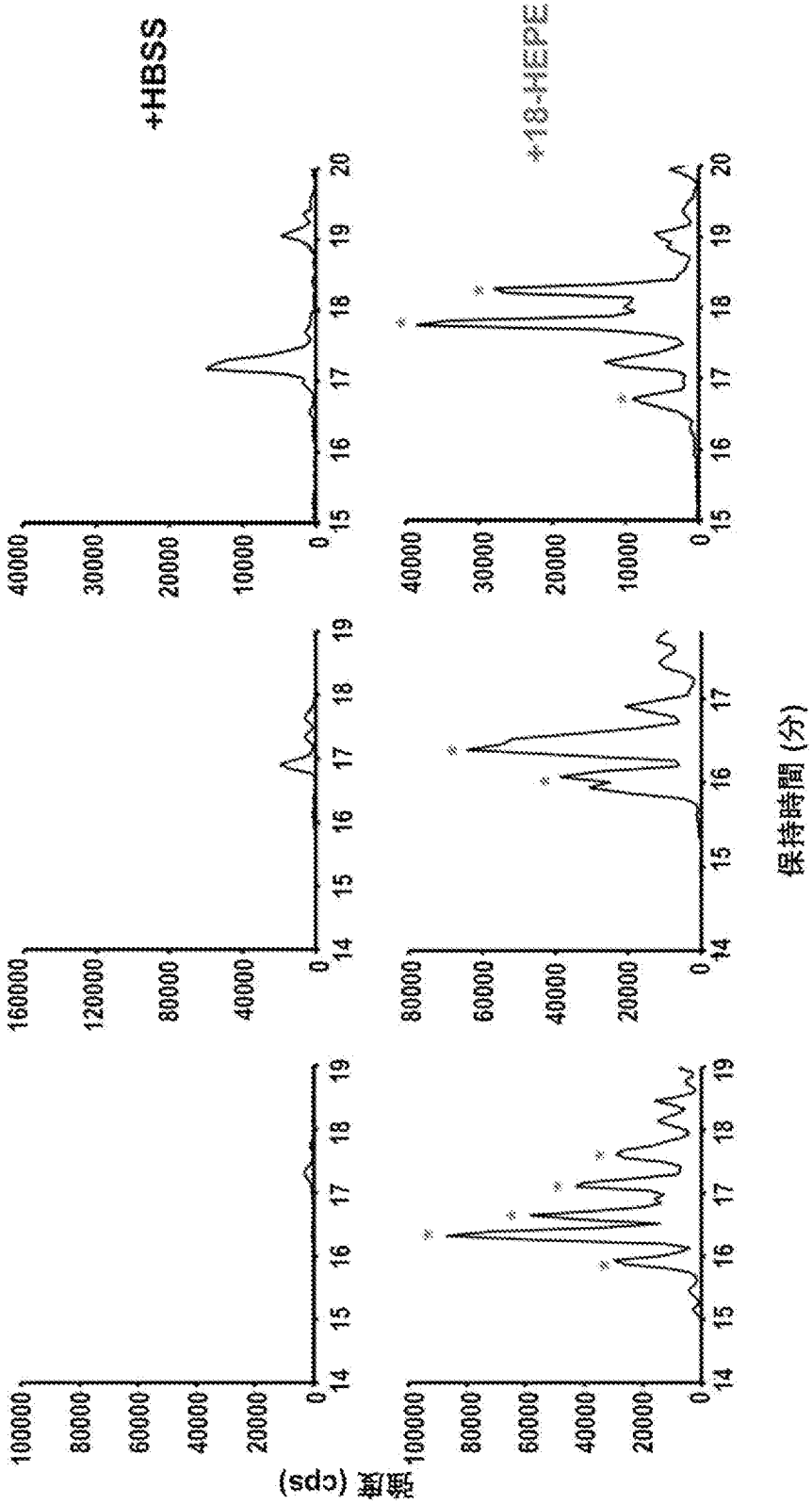
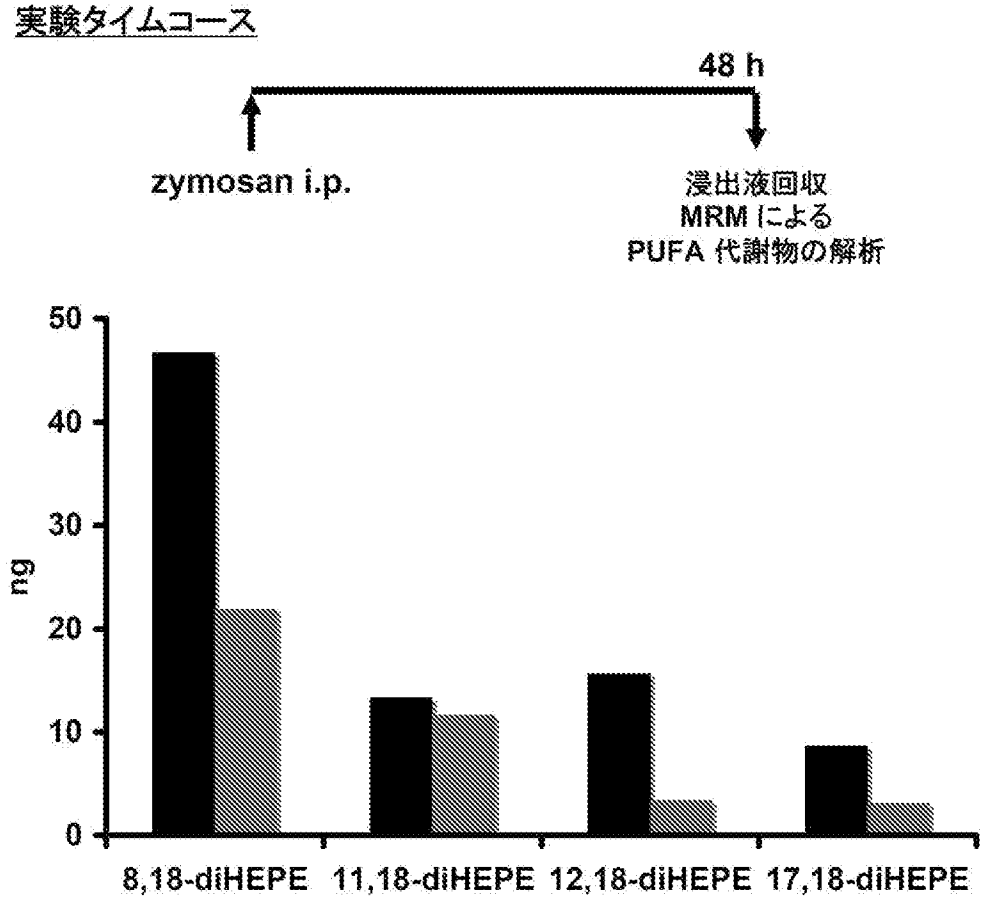

+HBSS
+18-HEPE
11,18-diHEPE
333/167
12,18-diHEPE
333/179
17,18-diHEPE
333/201
強度 (cps)
保持時間 (分)

Fig. 2B-2

[図2C]

Fig. 2C


実験タイムコース
48 h
zymosan i.p.
浸出液回収
MRM による
PUFA 代謝物の解析
50
40
30
20
10
0
ng
8,18-diHEPE
11,18-diHEPE
12,18-diHEPE
17,18-diHEPE

[図2D]

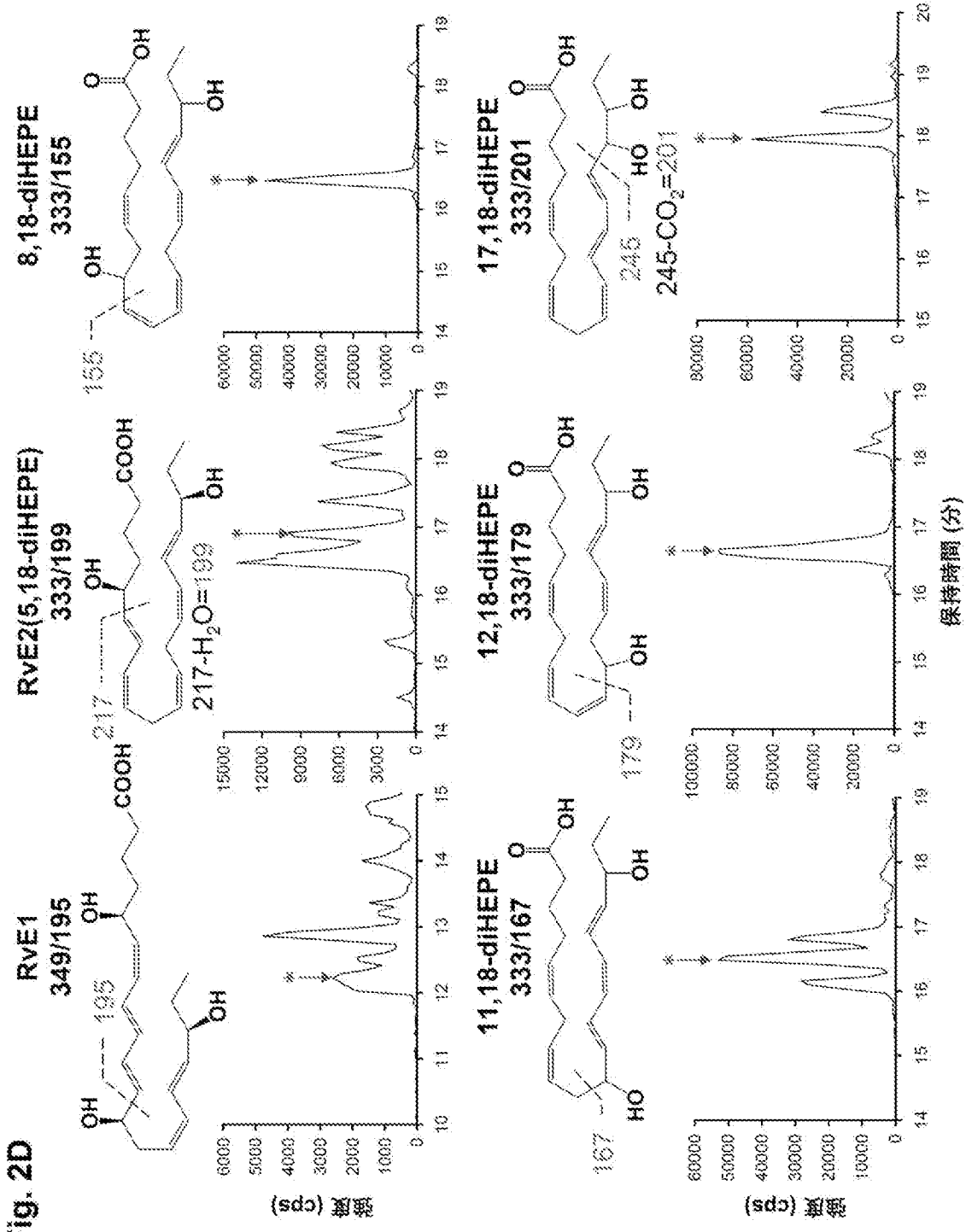
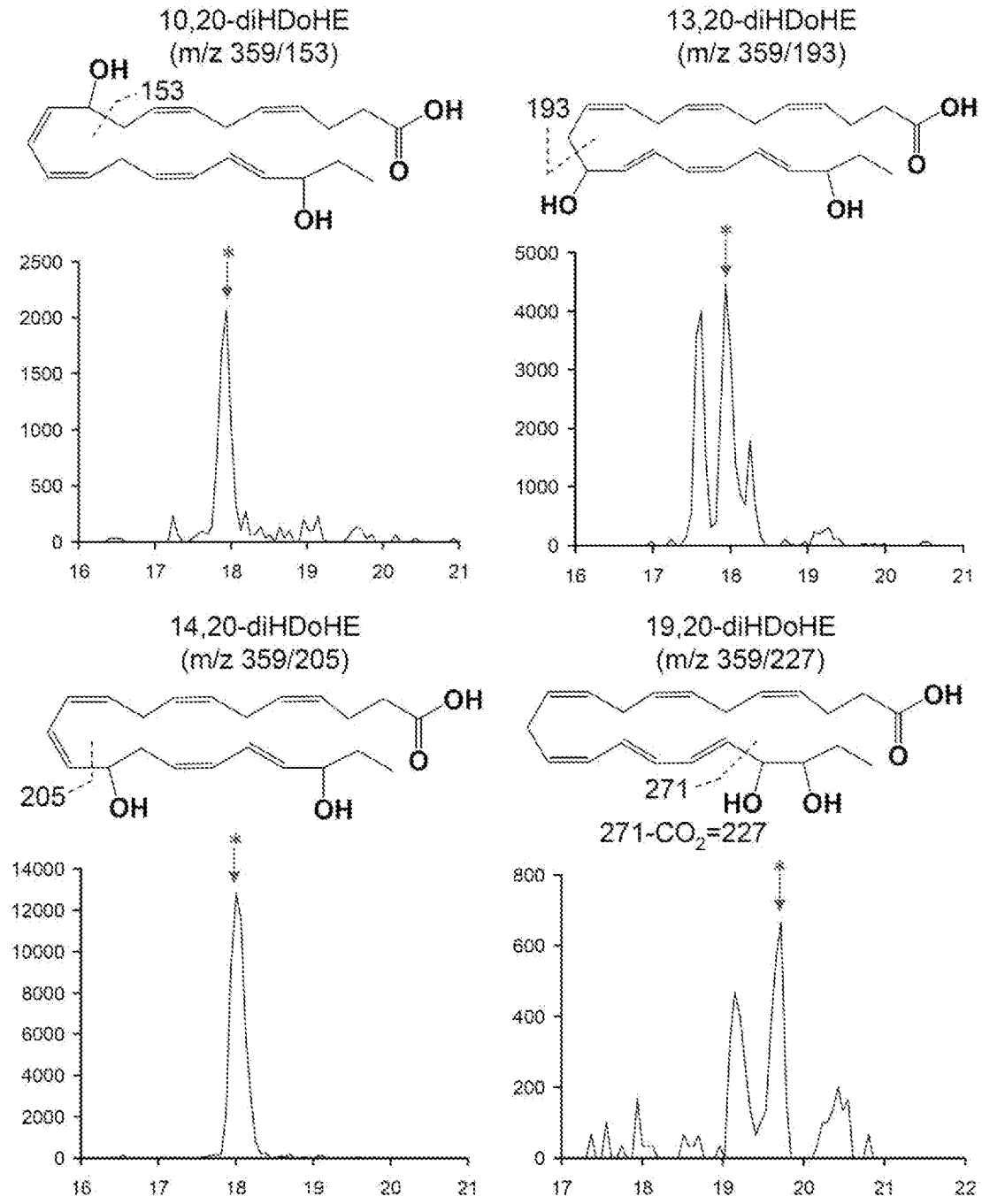

RvE1
349/195
RvE2(5,18-diHEPE)
333/199
8,18-diHEPE
333/155
11,18-diHEPE
333/167
12,18-diHEPE
333/179
17,18-diHEPE
333/201
217-H2O=199
245-CO2=201
強度 (cps)
保持時間 (分)

Fig. 2D

[図2E]

Fig. 2E


10,20-diHDoHE
(m/z 359/153)
OH
153
OH
O
OH
2500
2000
1500
1000
500
0
16
17
18
19
20
21
13,20-diHDoHE
(m/z 359/193)
193
OH
O
HO
OH
5000
4000
3000
2000
1000
0
16
17
18
19
20
21
14,20-diHDoHE
(m/z 359/205)
OH
O
205
OH
OH
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
16
17
18
19
20
21
19,20-diHDoHE
(m/z 359/227)
OH
O
271
HO
OH
271-CO2=227
800
600
400
200
0
17
18
19
20
21
22

[図2F]

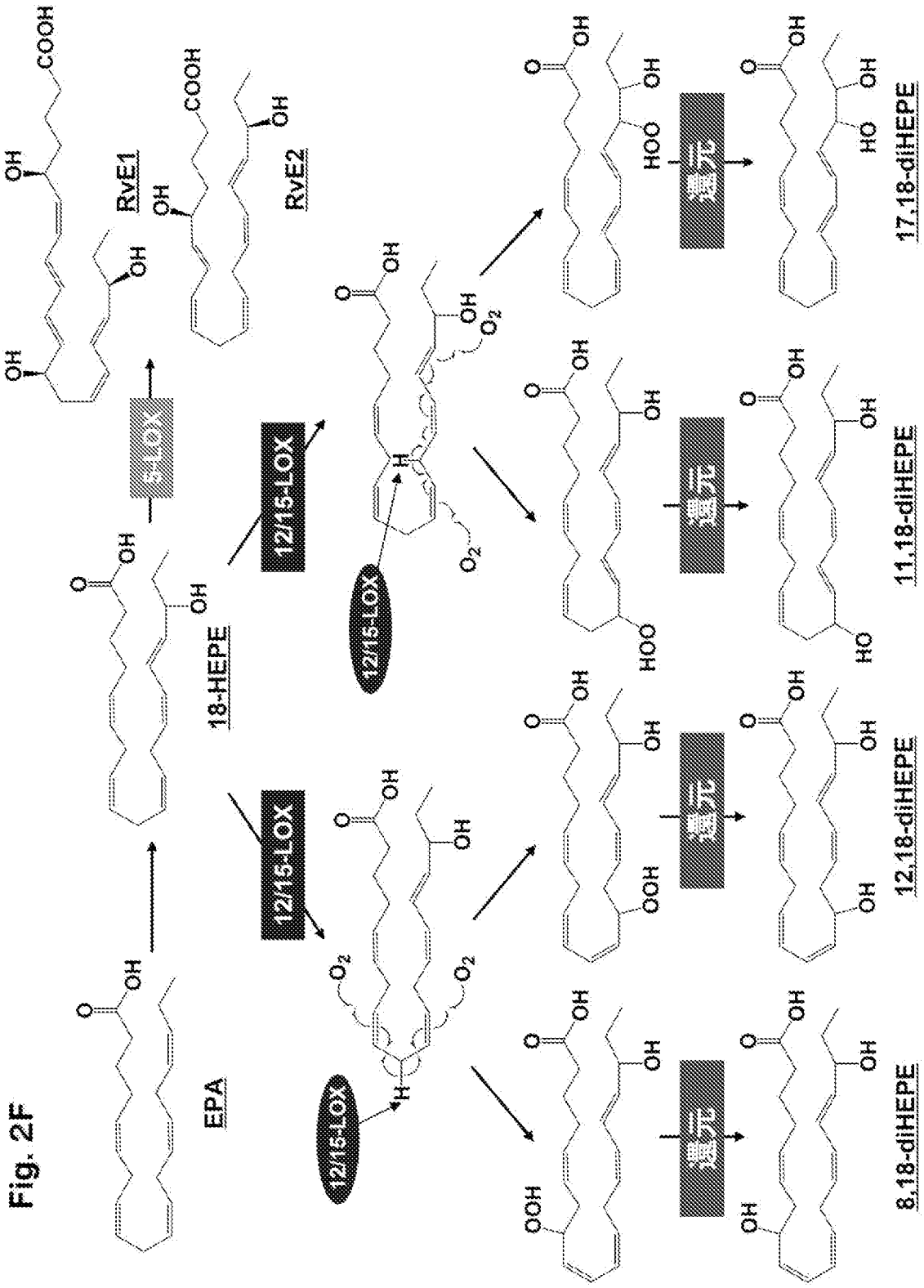

EPA
12/15-LOX
18-HEPE
5-LOX
RvE1
RvE2
12/15-LOX
12/15-LOX
12/15-LOX
過酸化
過酸化
過酸化
過酸化
8,18-diHEPE
12,18-diHEPE
11,18-diHEPE
17,18-diHEPE

Fig. 2F

[図2G]

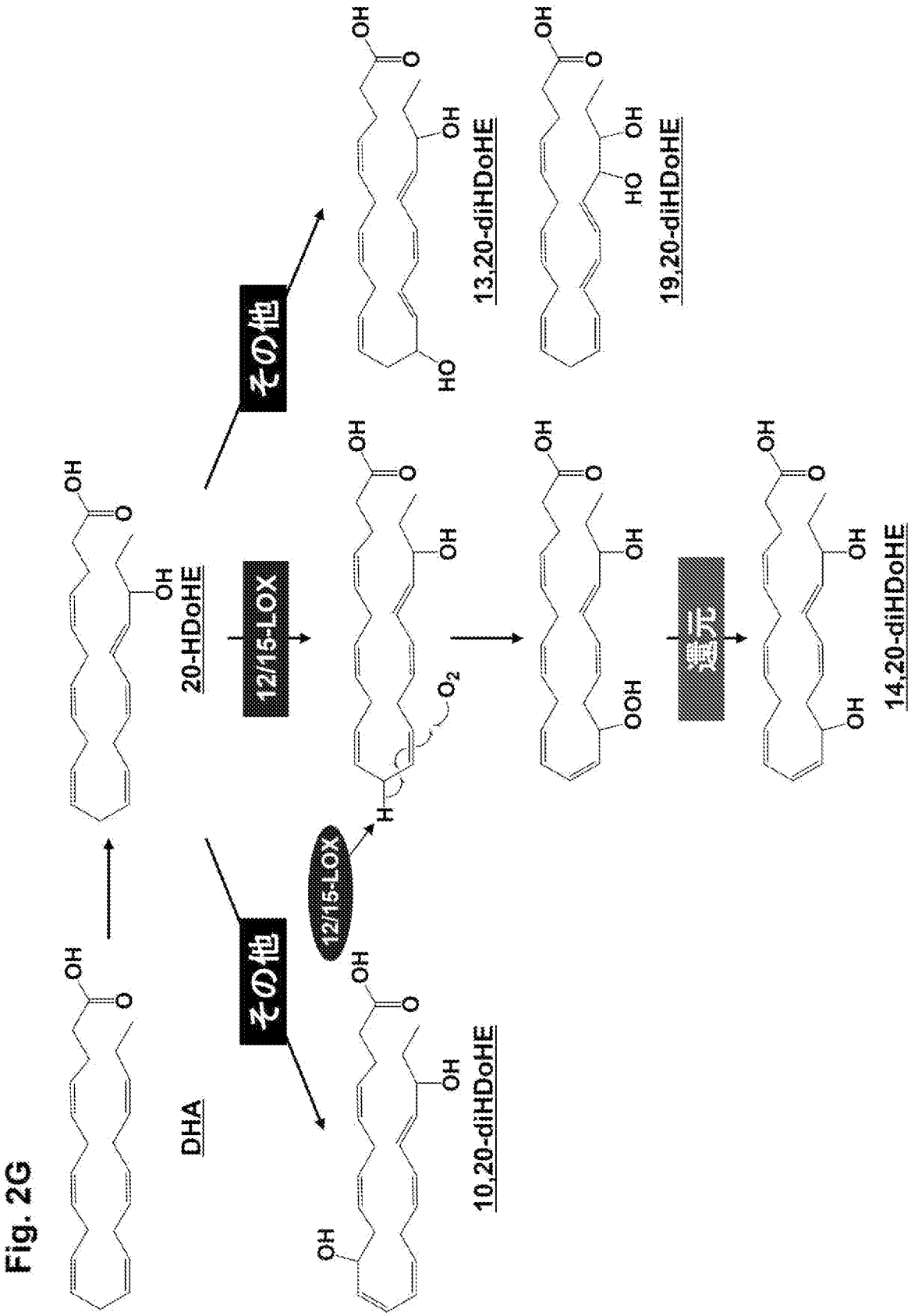
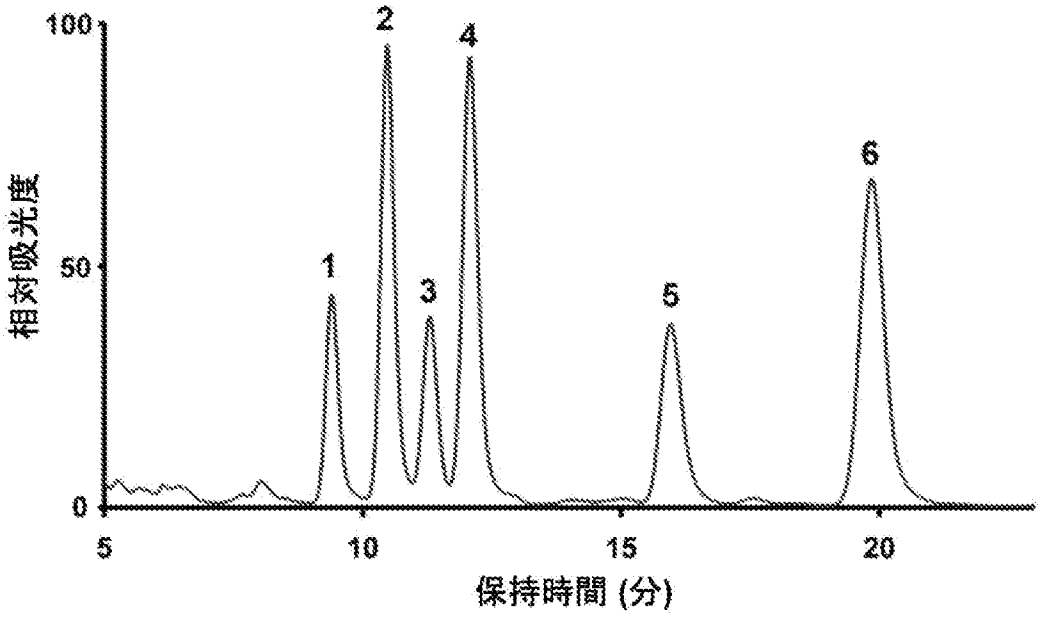

DHA
20-HDoHE
12/15-LOX
その他
13,20-diHDoHE
19,20-diHDoHE
10,20-diHDoHE
14,20-diHDoHE
還元

Fig. 2G

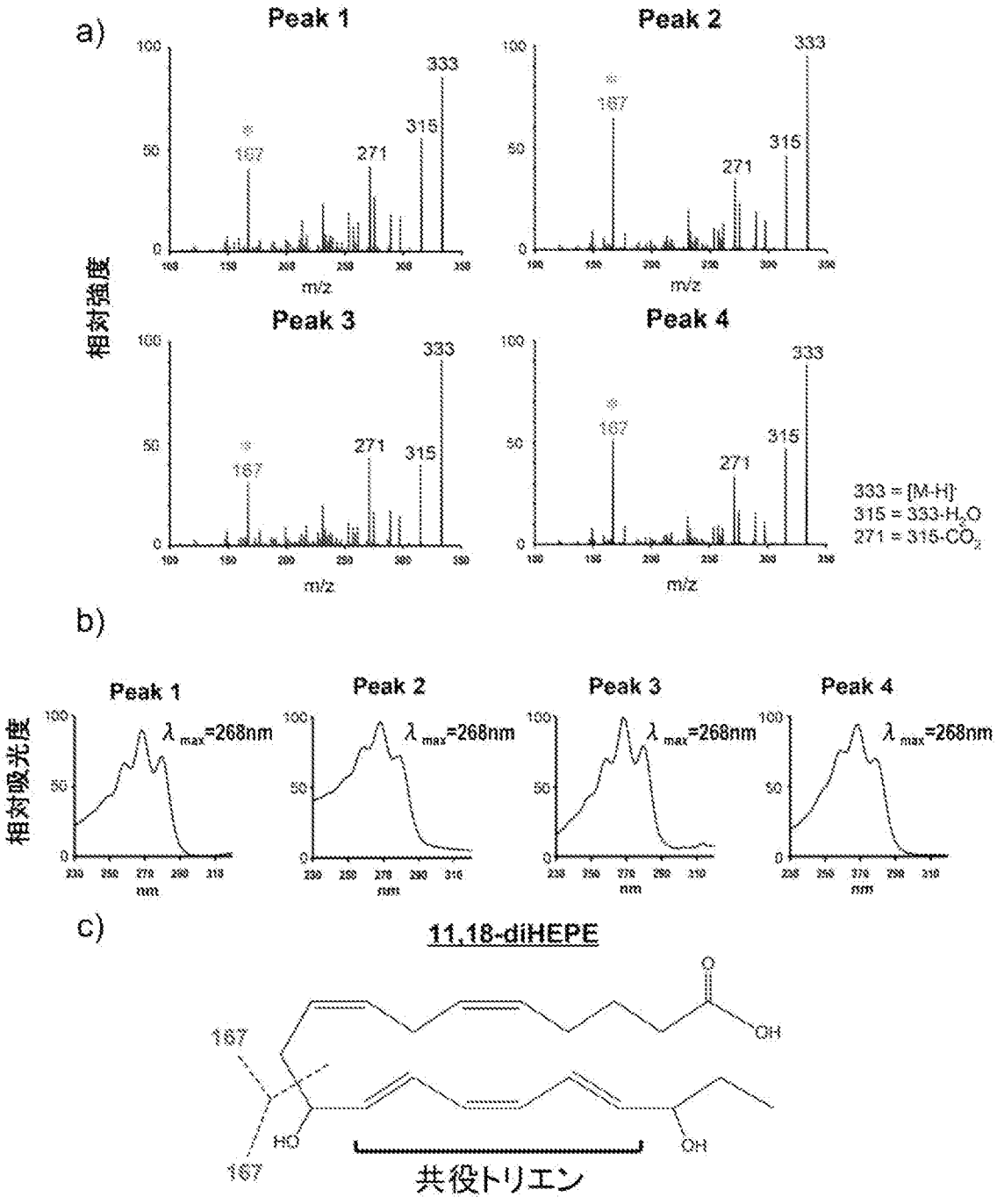
[図3A]

Fig. 3A



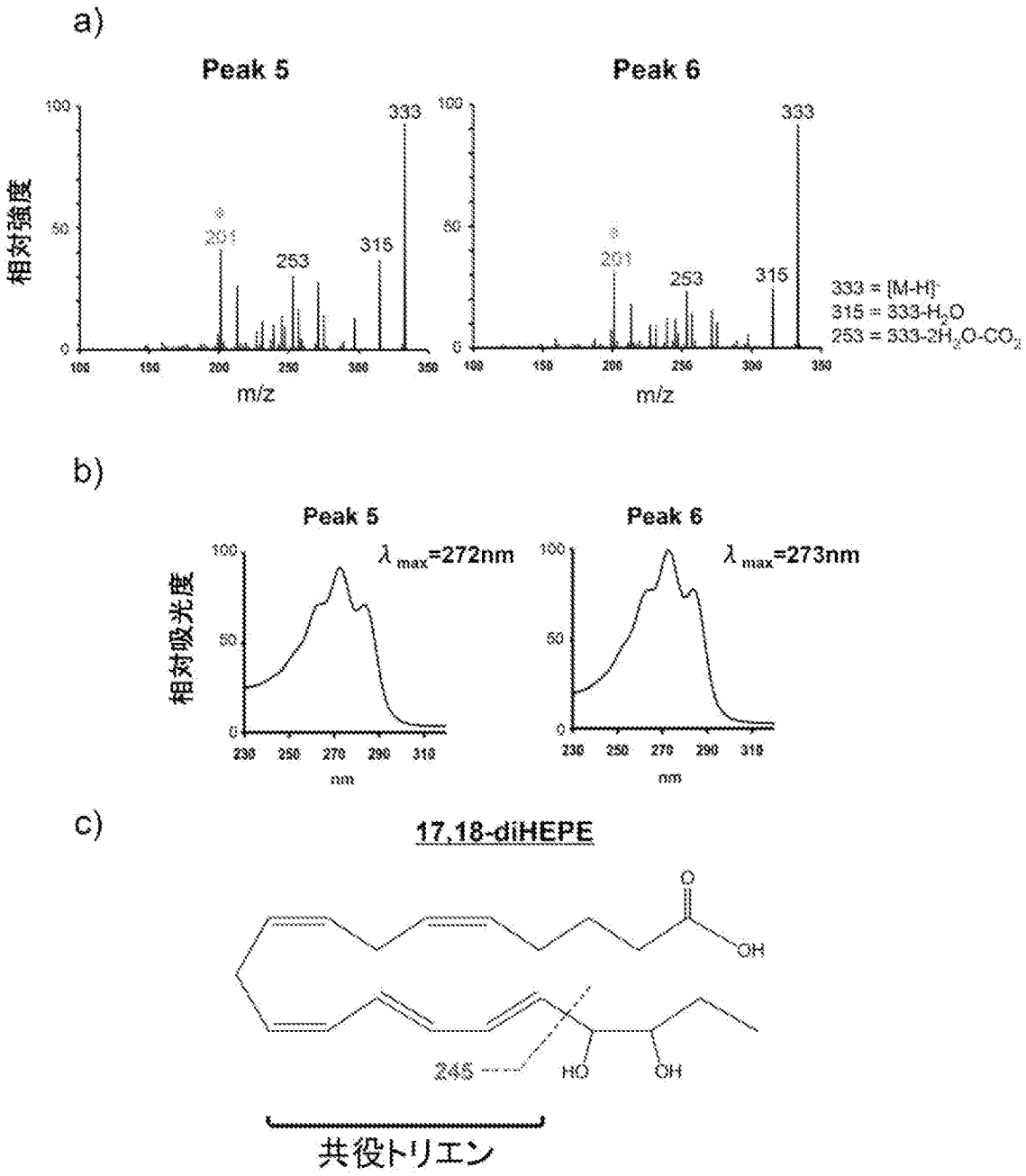
[図3B]

Fig. 3B


a)
Peak 1
Peak 2
Peak 3
Peak 4
相対強度
m/z
333
315
271
167
333 = [M-H]-
315 = 333-H2O
271 = 315-CO2
b)
相対吸光度
λmax=268nm
nm
c)
11,18-diHEPE
OH
HO
共役トリエン

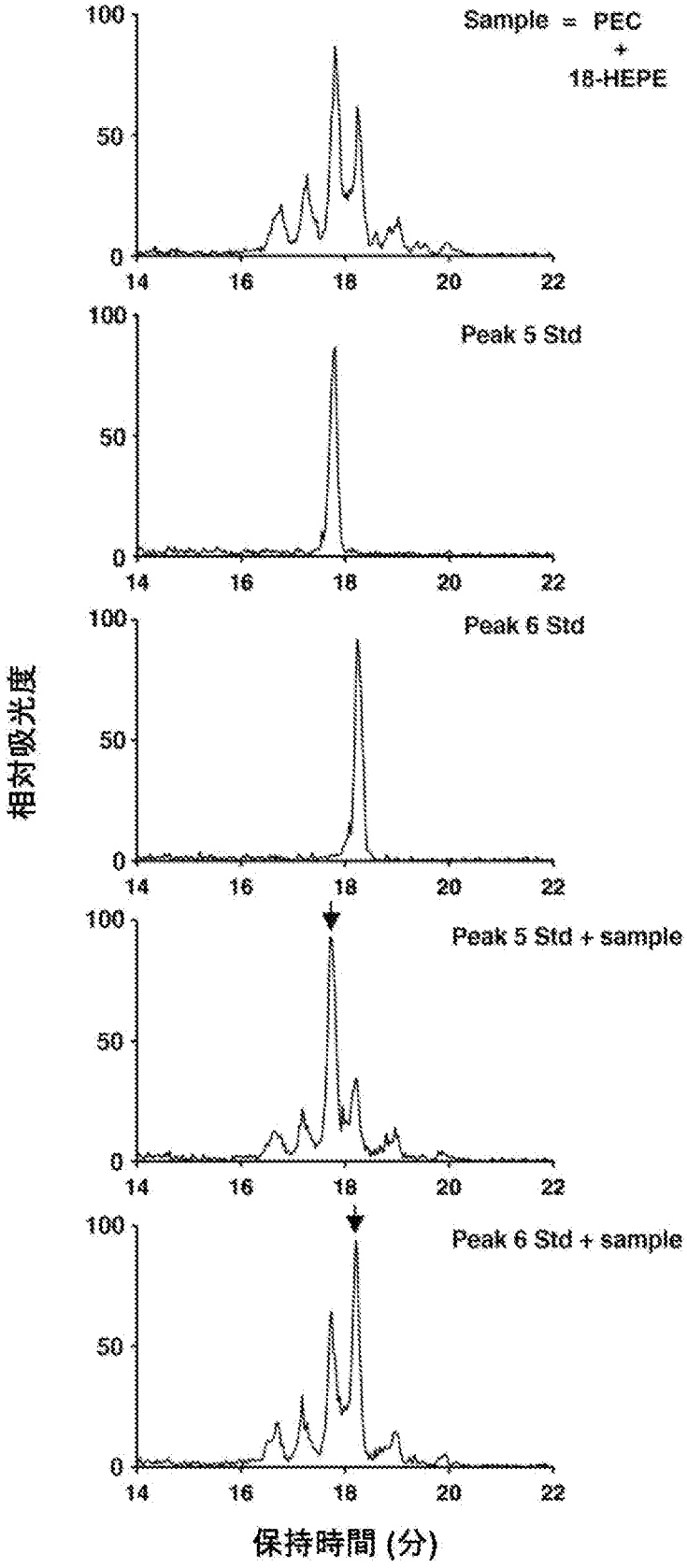
[図3C]

Fig. 3C


a)
Peak 5
Peak 6
相対強度
333
315
253
251
m/z
333 = [M-H]-
315 = 333-H2O
253 = 333-3H2O-CO2
b)
Peak 5
Peak 6
λmax=272nm
λmax=273nm
相対吸光度
nm
c)
17,18-diHEPE
OH
HO
OH
共役トリエン

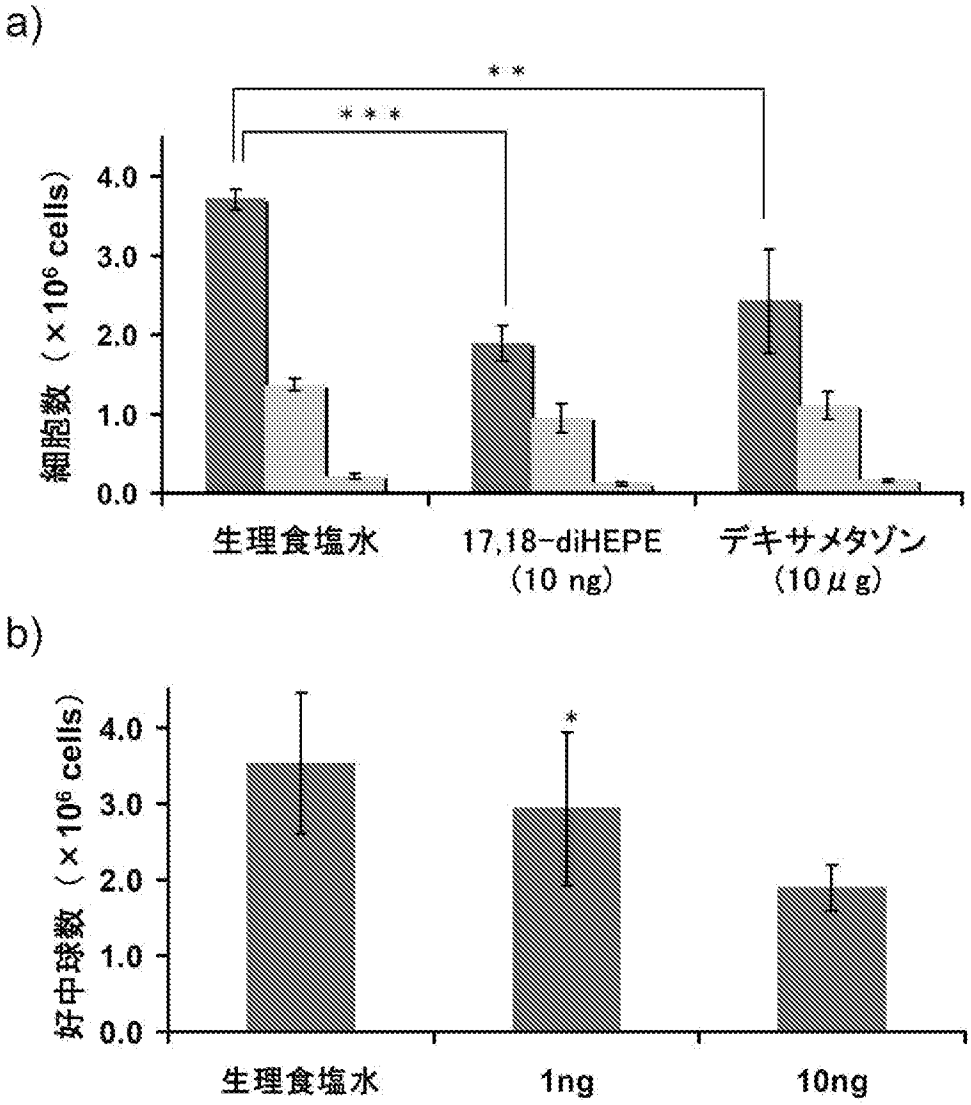
[図3D]

Fig. 3D


Sample = PEC + 18-HEPE
Peak 5 Std
Peak 6 Std
Peak 5 Std + sample
Peak 6 Std + sample
100
50
0
14
16
18
20
22
相対吸光度
保持時間 (分)

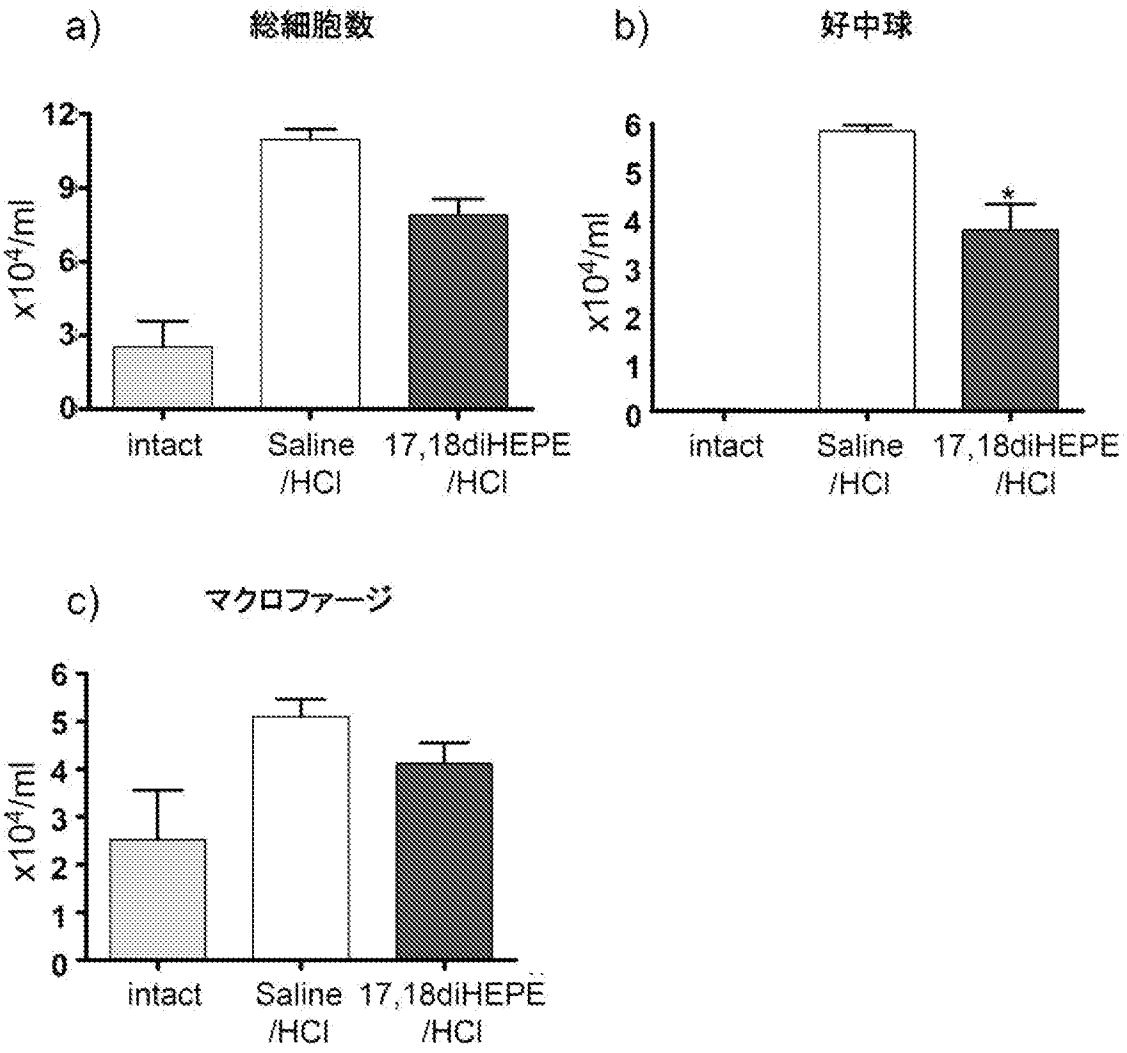
[図4A]

Fig. 4A


a)
＊＊
＊＊＊
細胞数（×10⁶ cells）
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
生理食塩水
17,18-diHEPE
(10 ng)
デキサメタゾン
(10μg)
b)
好中球数（×10⁶ cells）
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
＊
生理食塩水
1ng
10ng

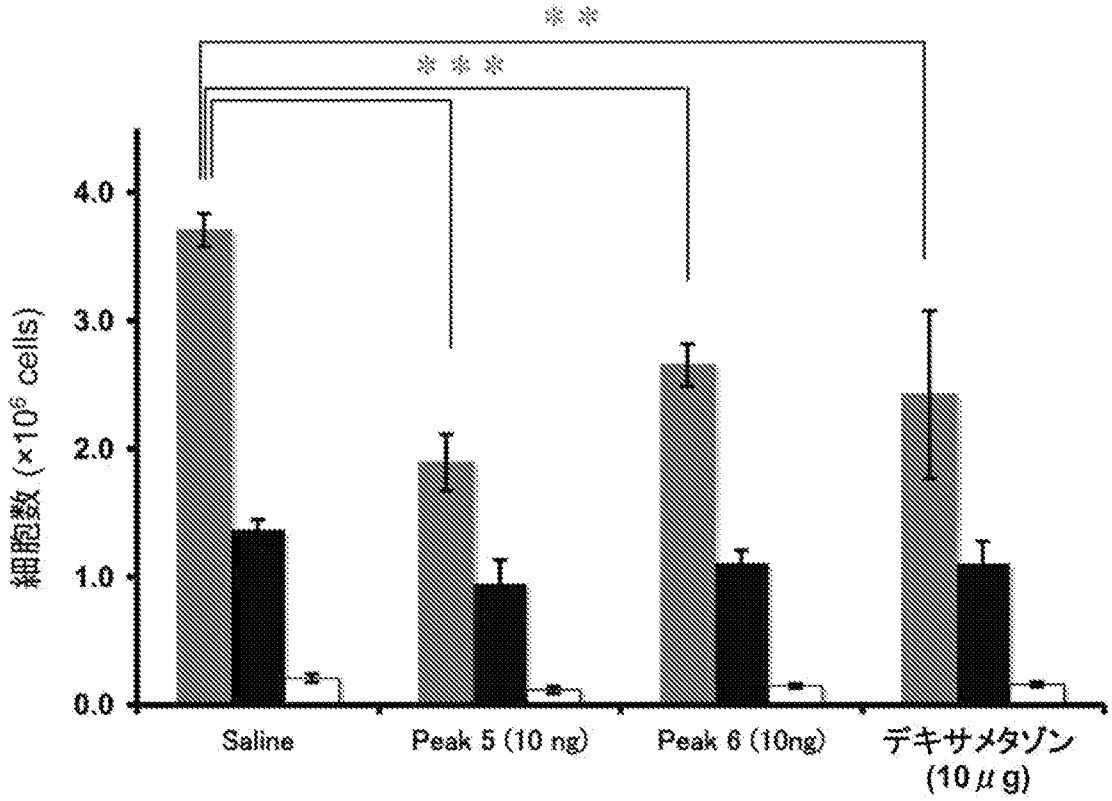
[図4B]

Fig. 4B


a)
総細胞数
x10⁴/ml
12
9
6
3
0
intact
Saline /HCl
17,18diHEPE /HCl
b)
好中球
x10⁴/ml
6
5
4
3
2
1
0
*
intact
Saline /HCl
17,18diHEPE /HCl
c)
マクロファージ
x10⁴/ml
6
5
4
3
2
1
0
intact
Saline /HCl
17,18diHEPE /HCl

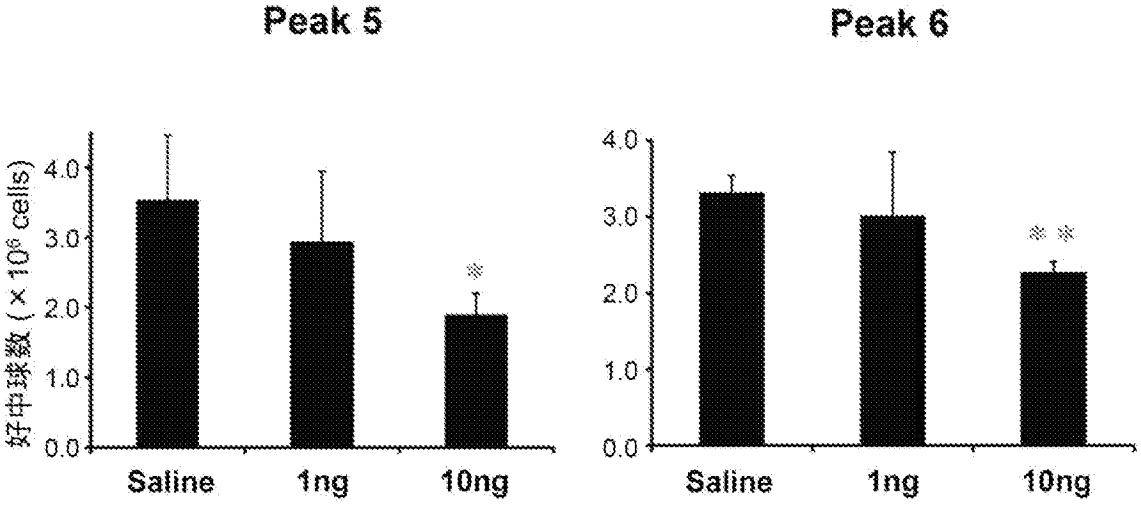
[図4C]

Fig. 4C



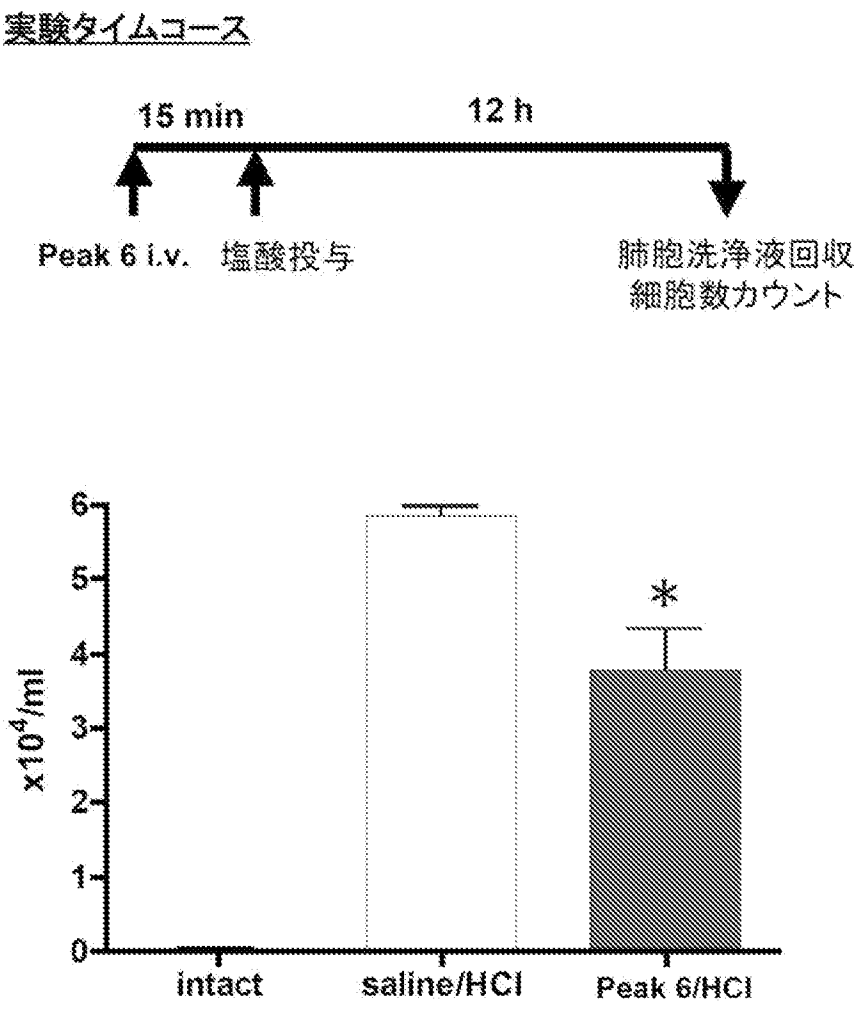
[図4D]

Fig. 4D



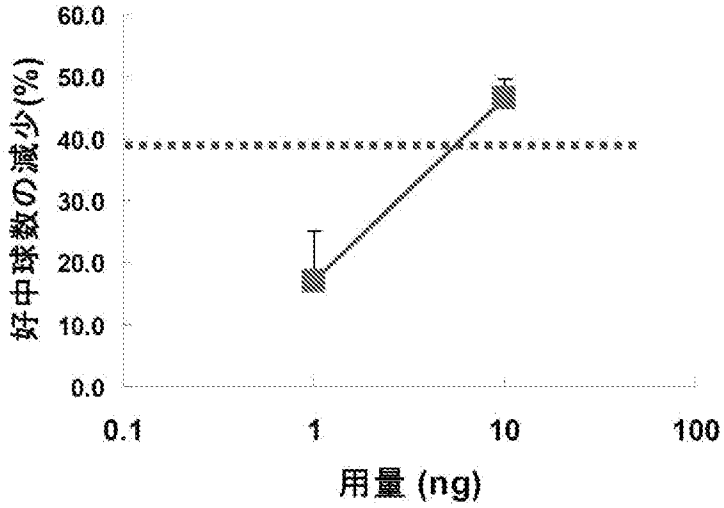
[図4E]

Fig. 4E


実験タイムコース
15 min
12 h
Peak 6 i.v.
塩酸投与
肺胞洗浄液回収
細胞数カウント
x10^4/ml
0
1
2
3
4
5
6
*
intact
saline/HCl
Peak 6/HCl

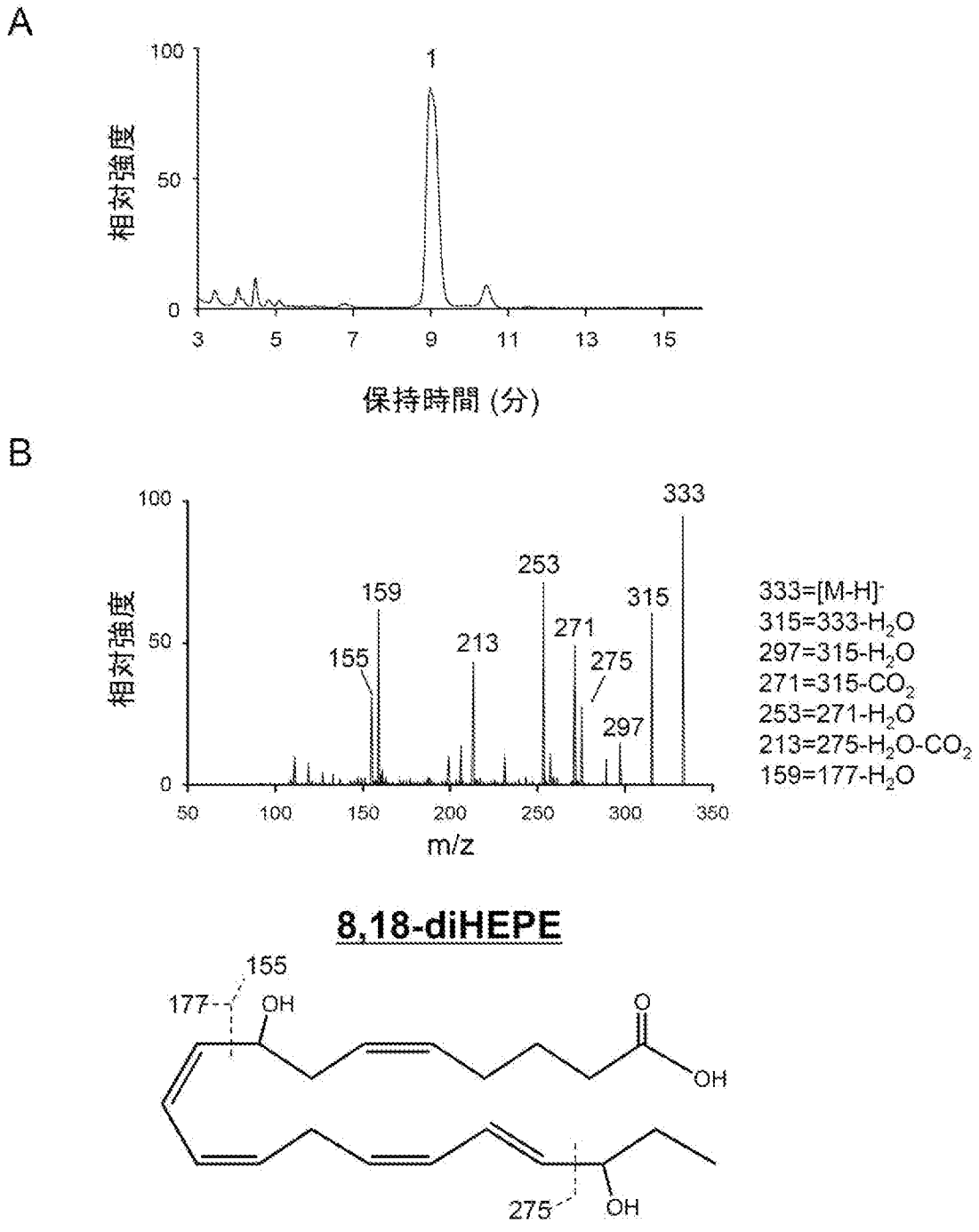
[図4F]

Fig. 4F



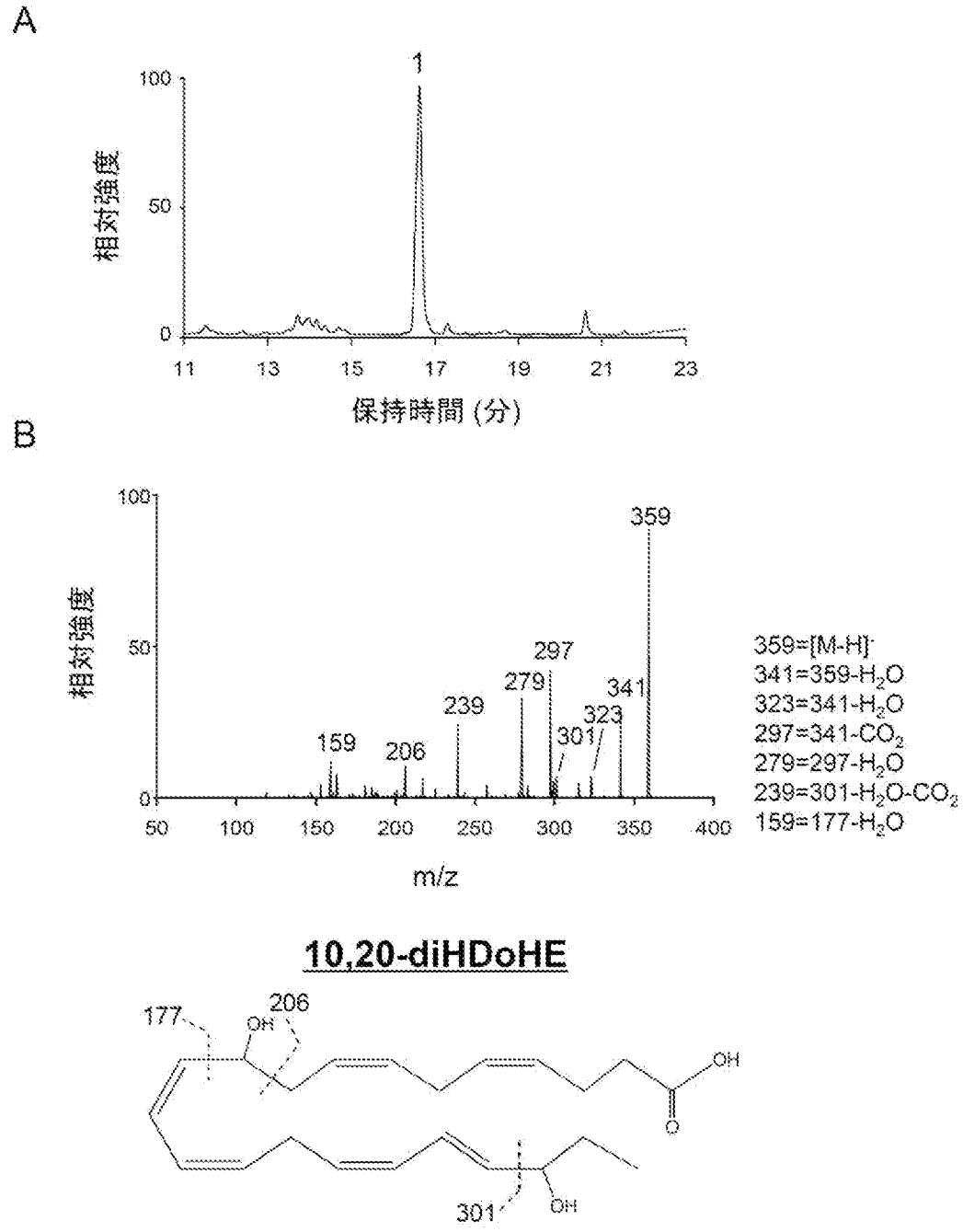
[図5]

Fig. 5


A
100
50
0
相対強度
1
3
5
7
9
11
13
15
保持時間 (分)
B
100
50
0
相対強度
333
253
159
315
271
213
155
275
297
50
100
150
200
250
300
350
m/z
333=[M-H]-
315=333-H2O
297=315-H2O
271=315-CO2
253=271-H2O
213=275-H2O-CO2
159=177-H2O
8,18-diHEPE
155
177
OH
O
OH
275
OH

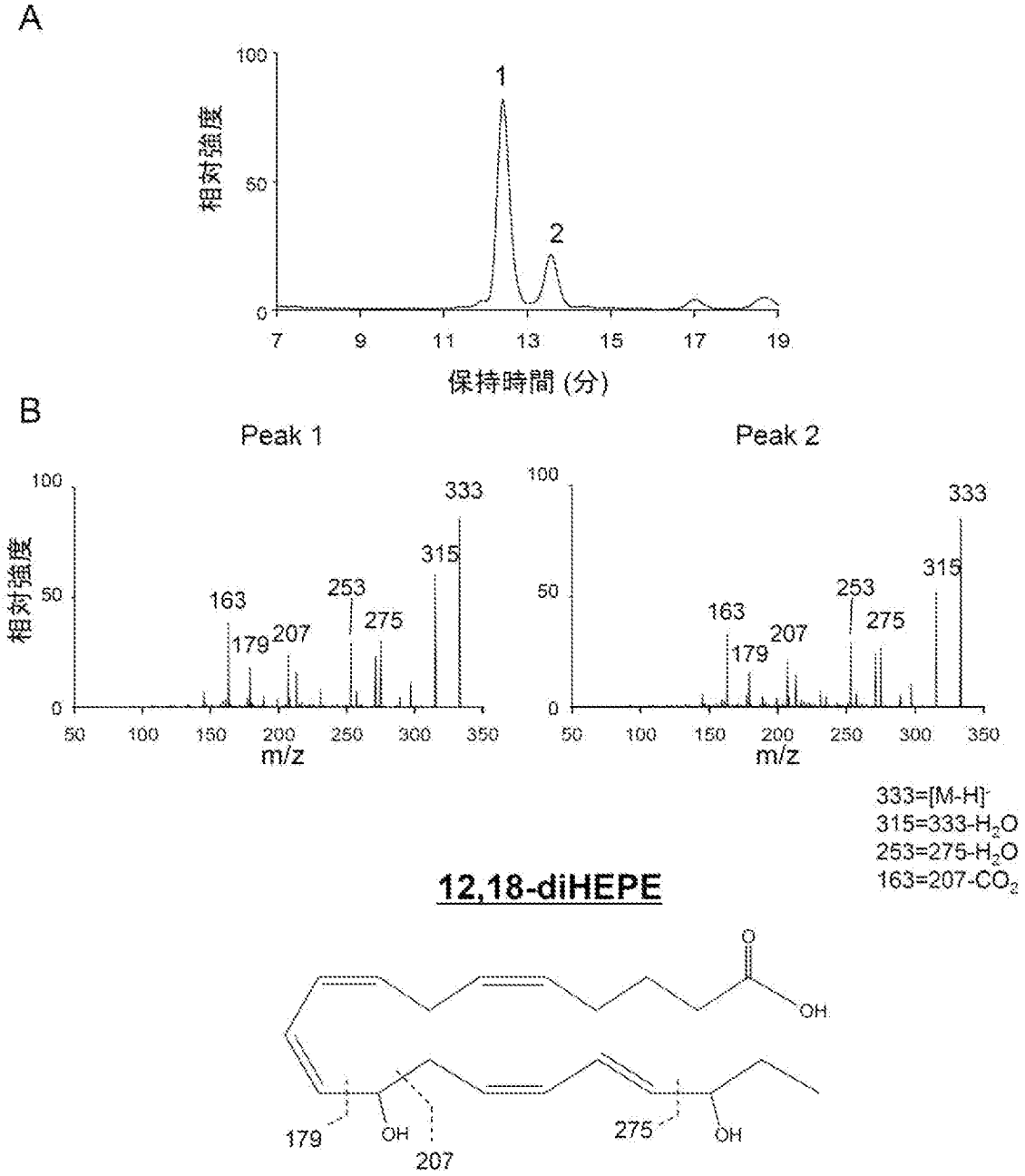
[図6]

Fig. 6


A
1
100
50
0
相対強度
11
13
15
17
19
21
23
保持時間 (分)
B
100
50
0
相対強度
359
297
279
341
239
323
301
159
206
50
100
150
200
250
300
350
400
m/z
359=[M-H]-
341=359-H2O
323=341-H2O
297=341-CO2
279=297-H2O
239=301-H2O-CO2
159=177-H2O
10,20-diHDoHE
177
206
OH
OH
O
301
OH

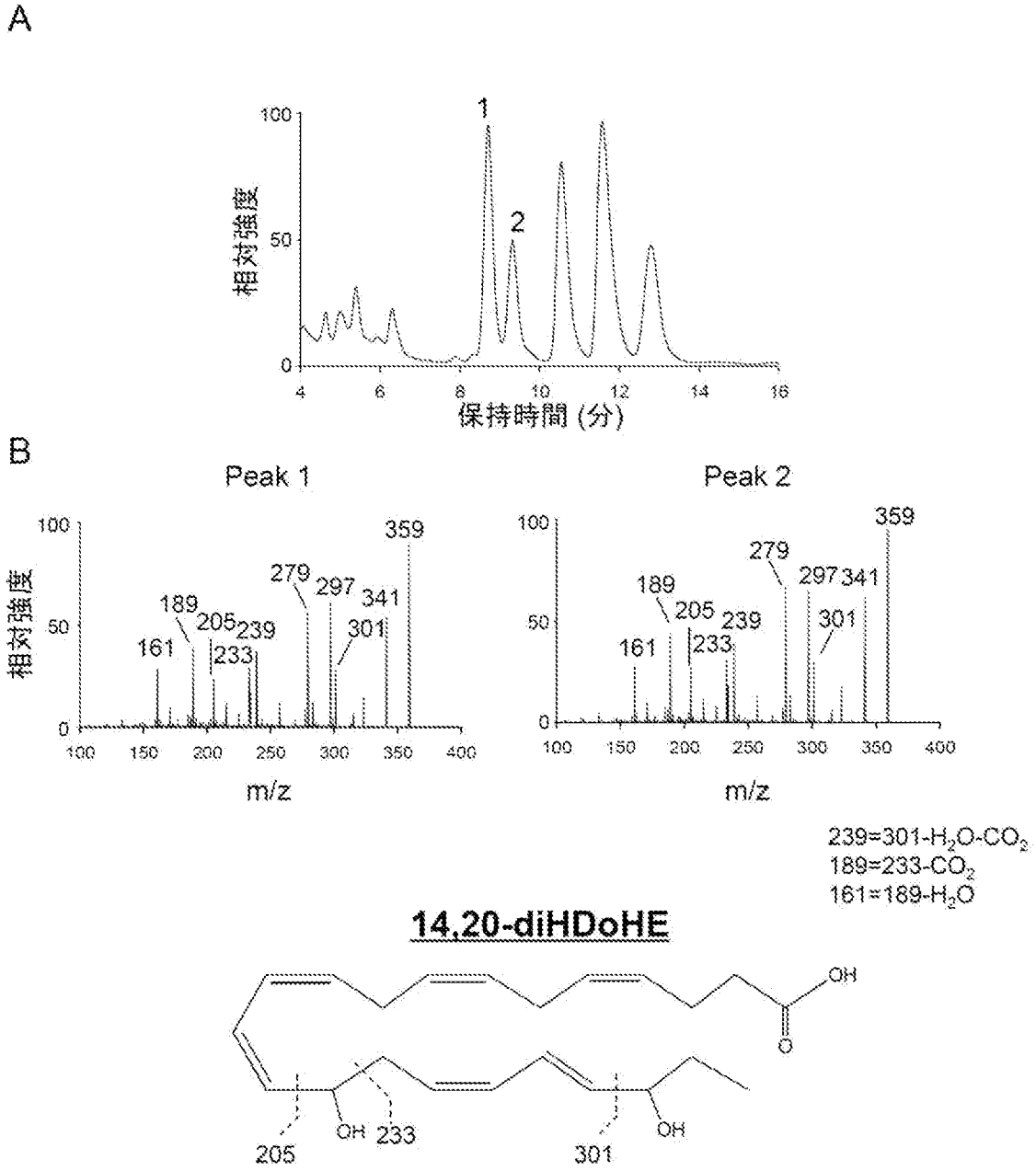
[図7]

Fig. 7


A
100
50
0
相対強度
1
2
7
9
11
13
15
17
19
保持時間 (分)
B
Peak 1
Peak 2
100
50
0
相対強度
333
315
253
275
207
179
163
50
100
150
200
250
300
350
m/z
333=[M-H]-
315=333-H2O
253=275-H2O
163=207-CO2
12,18-diHEPE
O
OH
179
OH
207
275
OH

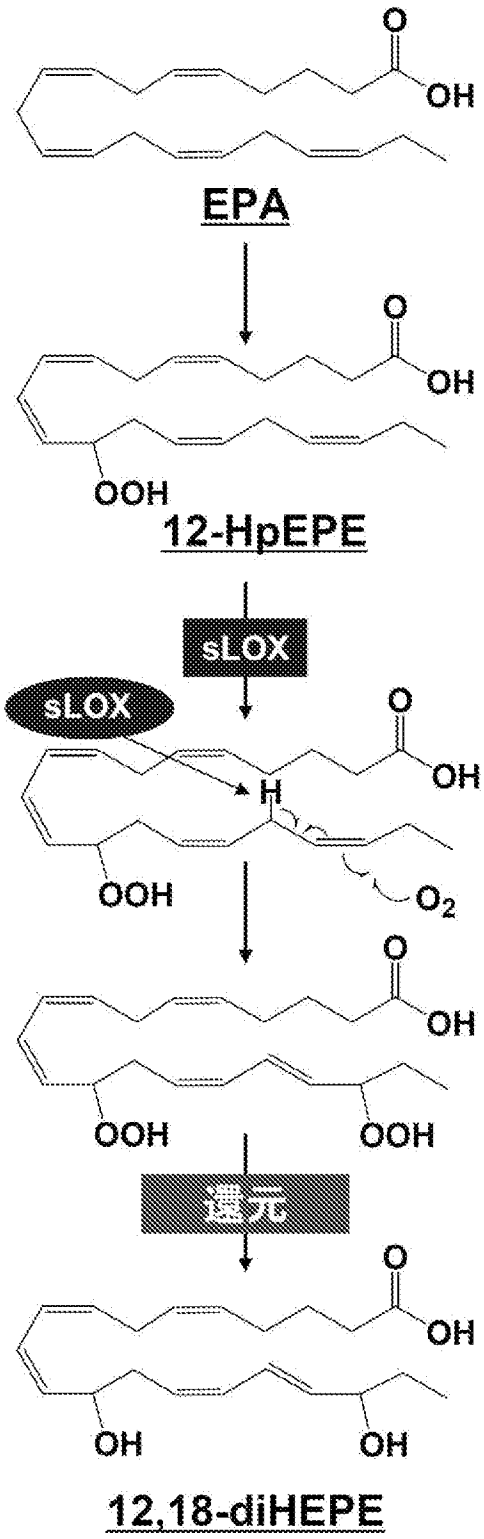
[図8]

Fig. 8


A
相対強度
保持時間 (分)
1
2
B
Peak 1
Peak 2
m/z
239=301-H2O-CO2
189=233-CO2
161=189-H2O
14,20-diHDoHE
OH
205
233
301

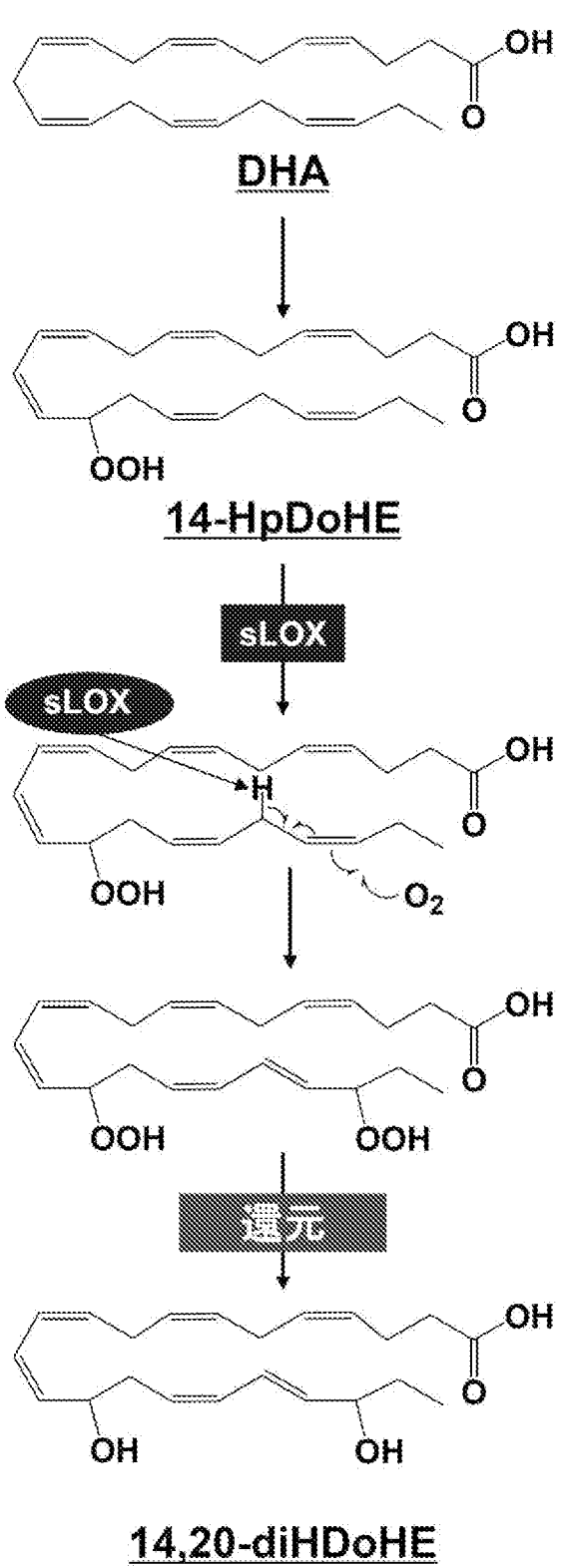
[図9A]

Fig. 9A


O
OH
EPA
O
OH
OOH
12-HpEPE
sLOX
sLOX
O
OH
H
OOH
O2
O
OH
OOH
OOH
還元
O
OH
OH
OH
12,18-diHEPE

[図9B]

Fig. 9B


OH
O
DHA
OH
O
OOH
14-HpDoHE
sLOX
sLOX
OH
O
H
OOH
O_2
OH
O
OOH
OOH
還元
OH
O
OH
OH
14,20-diHDoHE

[図10]

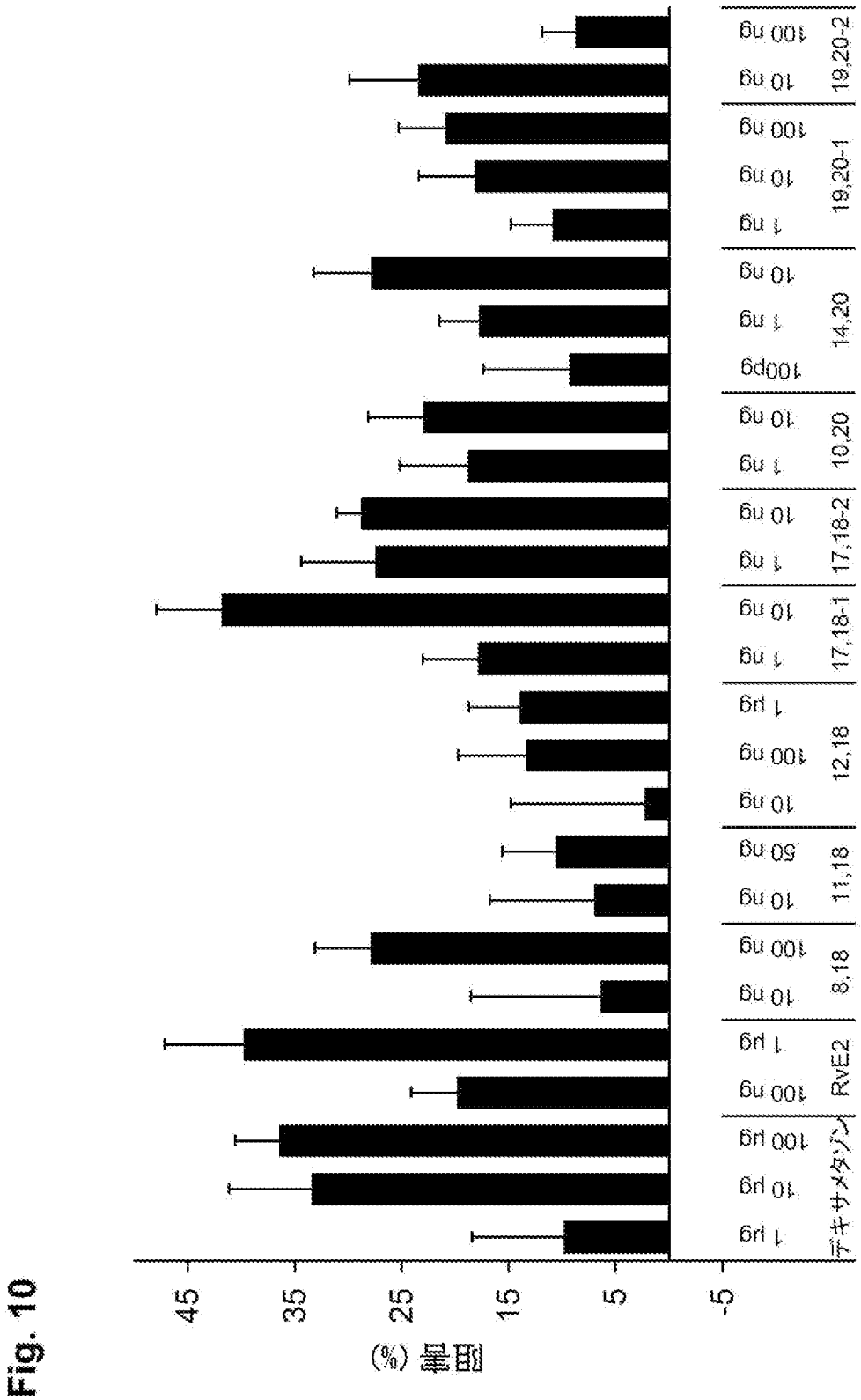

阻害 (%)
45
35
25
15
5
-5
デキサメタゾン
1 μg
10 μg
100 μg
RvE2
1 μg
100 ng
8,18
10 ng
100 ng
11,18
10 ng
50 ng
12,18
10 ng
100 ng
1 μg
17,18-1
1 ng
10 ng
17,18-2
1 ng
10 ng
10,20
1 ng
10 ng
14,20
100pg
1 ng
10 ng
19,20-1
1 ng
10 ng
100 ng
19,20-2
10 ng
100 ng

Fig. 10

[図11]

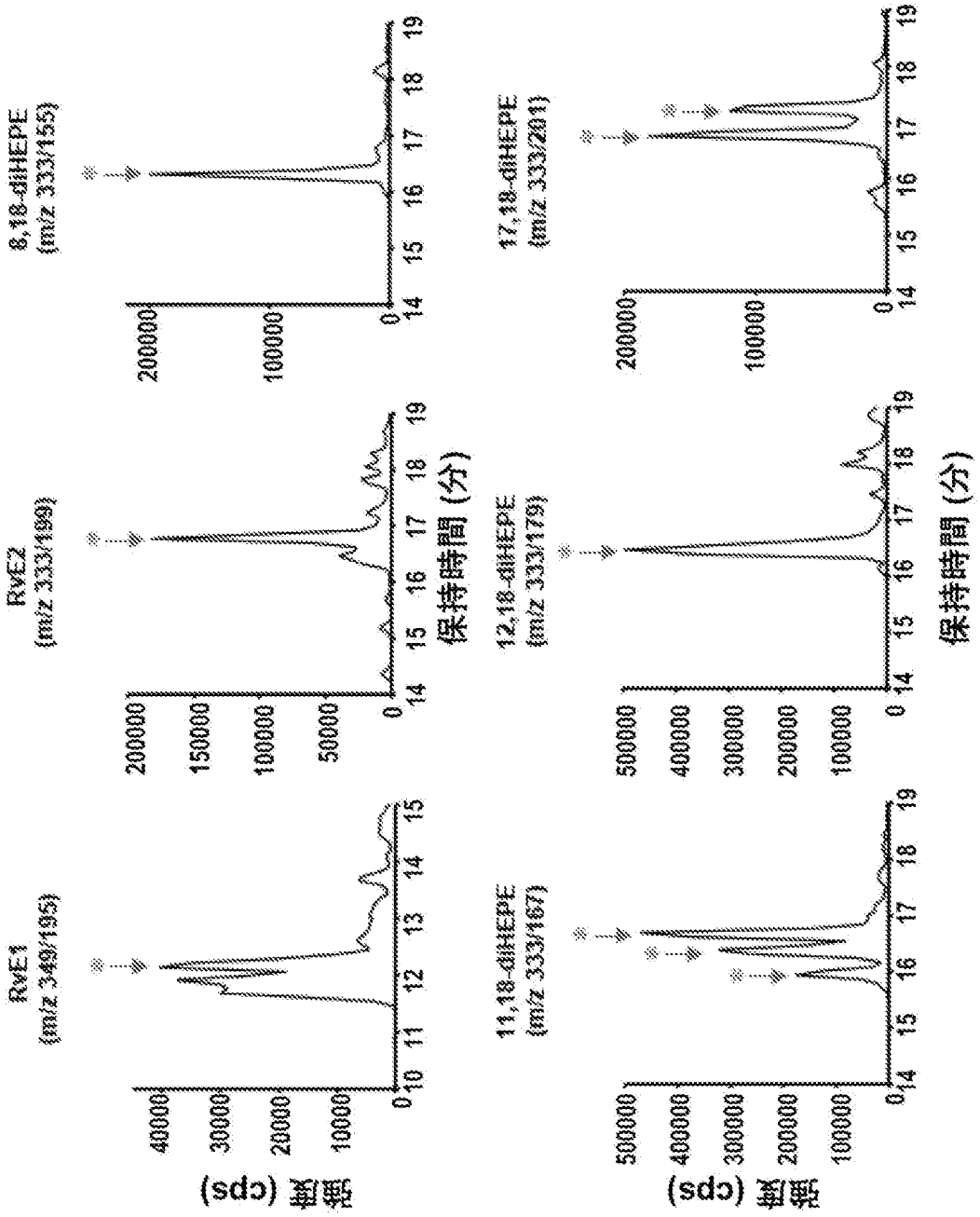
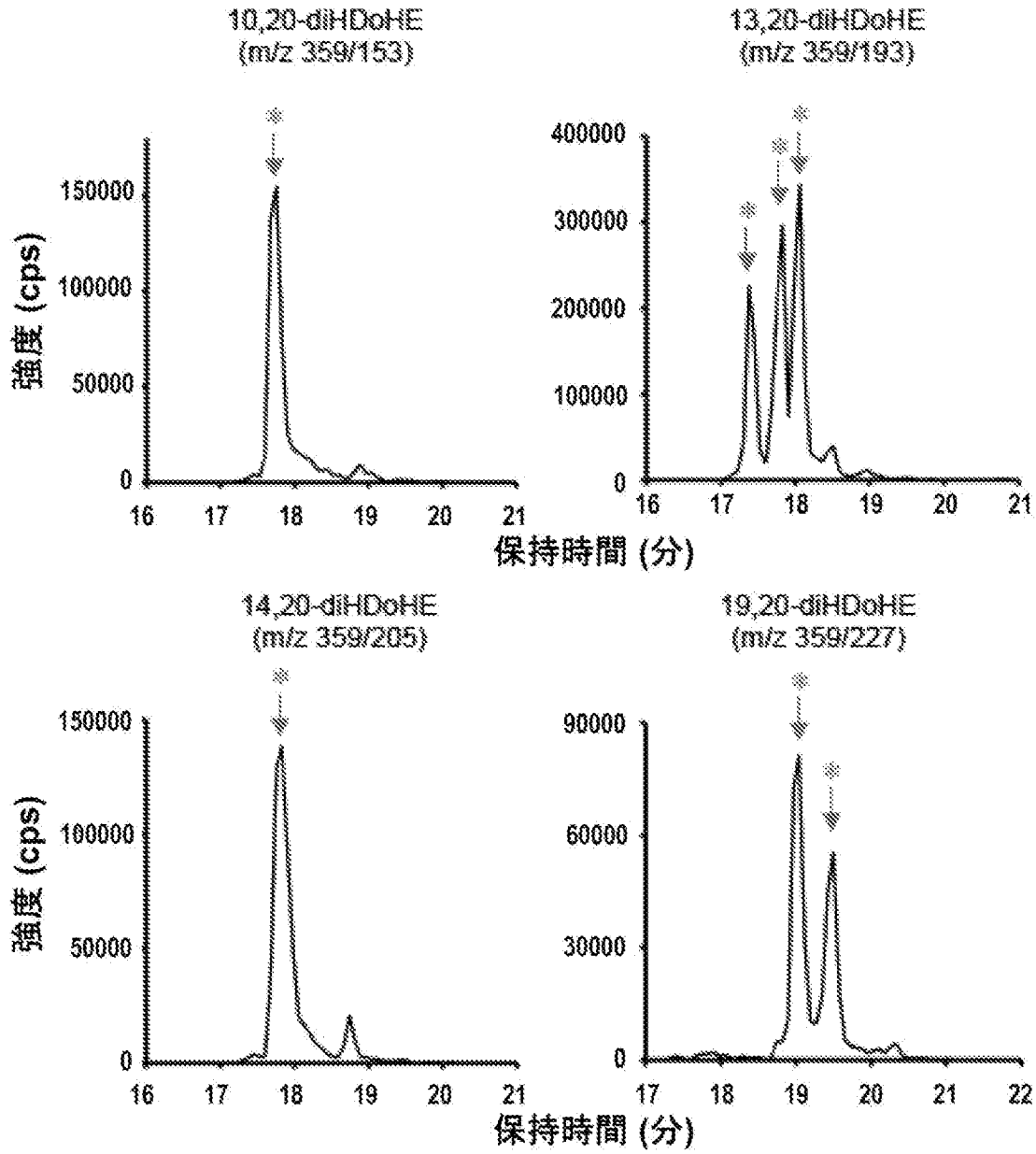

RvE1
(m/z 349/195)
RvE2
(m/z 333/199)
8,18-diHEPE
(m/z 333/155)
11,18-diHEPE
(m/z 333/167)
12,18-diHEPE
(m/z 333/179)
17,18-diHEPE
(m/z 333/201)
強度 (cps)
保持時間 (分)

Fig. 11

[図12]

Fig. 12


10,20-diHDoHE
(m/z 359/153)
13,20-diHDoHE
(m/z 359/193)
14,20-diHDoHE
(m/z 359/205)
19,20-diHDoHE
(m/z 359/227)
強度 (cps)
保持時間 (分)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/052509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
C07C57/03, C12P7/64

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus/REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2006/055965 A2 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.), 26 May 2006 (26.05.2006), entire text; examples 7, 9; fig. 7, 9 & US 2006/0241088 A1 & EP 1824809 A2 & AU 2005306320 A1 & IN 2007DN03920 P1 & KR 2007090928 A & CN 101102988 A & JP 2008-520739 A & MX 2007006049 A1 & BR 2005016803 A & US 2009/0318394 A1	1-5,9-10,12 6-7,11

☐ 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	Date of mailing of the international search report
14 April, 2010 (14.04.10)	27 April, 2010 (27.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/052509

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

C07C57/03(2006.01)i, *A61K31/202*(2006.01)i, *A61P1/04*(2006.01)i, *A61P1/16*(2006.01)i, *A61P9/10*(2006.01)i, *A61P11/00*(2006.01)i, *A61P11/06*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P15/08*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C12P7/64*(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/052509

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. [X] Claims Nos.: 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 8 relates to a method for treating or preventing inflammatory diseases and, therefore, pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods to be practiced on the human body. Thus, it relates to a subject matter which (continued to extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５２５０９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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.　C07C57/03, C12P7/64

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

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/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus/REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII),
医学・薬学予稿集全文データベース

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2006/055965 A2 (MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION) 2006.05.26, 全文、例えば、Example7,9、FIG.7,9 & US 2006/0241088 A1 & EP 1824809 A2 & AU 2005306320 A1 & IN 2007DN03920 P1 & KR 2007090928 A & CN 101102988 A & JP 2008-520739 A & MX 2007006049 A1 & BR 2005016803 A & US 2009/0318394 A1	1-5, 9-10, 12 6-7, 11

☐　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	国際調査報告の発送日
１４．０４．２０１０	２７．０４．２０１０

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	清水　晋治	４Ｂ	３５３５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

発明の属する分野の分類
C07C57/03(2006.01)i, A61K31/202(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P15/08(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５２５０９

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

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

１．☑ 請求項　8　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項８は、炎症性疾患の処置または予防する方法であり、手術又は治療による人体の処置方法及び人体の診断方法に該当するから、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。