

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577191号
(P7577191)

(45)発行日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(24)登録日 令和6年10月24日(2024.10.24)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 31/27 (2006.01)	A 6 1 K 31/27	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z Z N A
請求項の数 7 (全19頁)		

(21)出願番号	特願2023-507695(P2023-507695)	(73)特許権者	523037716 セルリオンバイオメッド インク . CELLIONBIOMED INC . 大韓民国 3 4 0 1 3 大田広域市 儒城区 1 7 テクノ 4 路 大徳ビズセンター A - 4 0 7 号 # A - 4 0 7 h o , D a e d e o k B i z C e n t e r , 1 7 T e c h n o 4 - r o , Y u s e o n g - g u , D a e j e o n , 3 4 0 1 3 , R e p u b l i c o f K o r e a
(86)(22)出願日	令和3年7月29日(2021.7.29)	(74)代理人	110004392 弁理士法人佐川国際特許商標事務所
(65)公表番号	特表2024-500262(P2024-500262 A)	(74)代理人	100110766 弁理士 佐川 慎悟
(43)公表日	令和6年1月9日(2024.1.9)		
(86)国際出願番号	PCT/KR2021/009884		
(87)国際公開番号	WO2022/030879		
(87)国際公開日	令和4年2月10日(2022.2.10)		
審査請求日	令和5年2月2日(2023.2.2)		
(31)優先権主張番号	10-2020-0096595		
(32)優先日	令和2年8月3日(2020.8.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フェニルアルキルカルバマート化合物を含むK C A 3 . 1 チャネル介在性疾患治療用組成物

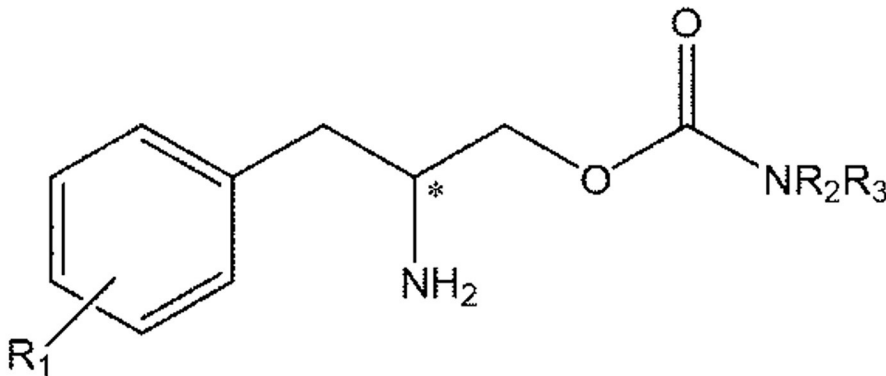
(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記 [構造式 1] で表されるフェニルアルキルカルバマート化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含むことを特徴とする、線維化抑制用組成物。

【化 1】

[構造式 1]



上記〔構造式 1〕中、

R 1 は、1 個または 2 個存在し、かつ、水素、F、Cl、Br、I の中から選ばれ、R 2 および R 3 は、それぞれ 1 個存在し、かつ、それぞれ、水素、メチル、エチル、プロピル、アミノカルボニルの中から選ばれ、* 表示は、キラル中心を意味する。

【請求項 2】

上記〔構造式 1〕中、R 2 と R 3 が水素であることを特徴とする請求項 1 に記載の線維化抑制用組成物。

【請求項 3】

上記〔構造式 1〕中、R 1 は、1 個または 2 個の F であり、R 2 と R 3 は、それぞれ 1 個存在し、かつ、それぞれ、水素、メチル、アミノカルボニルの中から選ばれることを特徴とする請求項 1 に記載の線維化抑制用組成物。

10

【請求項 4】

上記〔構造式 1〕で表される化合物は、R - 異性体または S - 異性体の含有量が 90% 以上のキラル化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の線維化抑制用組成物。

【請求項 5】

2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマート；
 2 - アミノ - 3 - (3 - フルオロフェニル)プロピルカルバマート；
 2 - アミノ - 3 - (3, 4 - ジクロロフェニル)プロピルカルバマート；
 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルメチルカルバマート；
 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピル(アミノカルボニル)カルバマート；
 2 - アミノ - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル)プロピルカルバマート；
 2 - アミノ - 3 - [3 - (トリフルオロメチル)フェニル]プロピルカルバマートの中から選ばれたいずれか 1 つを含むことを特徴とする線維化抑制用組成物。

20

【請求項 6】

上記〔構造式 1〕で表される化合物は、(R) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマートヒドロクロリドであることを特徴とする請求項 1 に記載の線維化抑制用組成物。

【請求項 7】

前記線維化は、肝線維化又は肺線維化であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の線維化抑制用組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フェニルアルキルカルバマート化合物を含む $K_{Ca}3.1$ チャネル介在性疾患治療用組成物に関し、より詳細に説明すると、従来嗜眠症治療剤に使用されているソリアムフェトール (soloriamfetol)、すなわち 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマートに代表されるフェニルアルキルカルバマート化合物を有効成分として含み、細胞膜で $K_{Ca}3.1$ チャネルの発現を抑制することによって、 $K_{Ca}3.1$ チャネル介在性疾患、例えば、線維化疾患、自己免疫疾患およびがん疾患を治療する用途に使用できる医薬組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

人体内で $K_{Ca}3.1$ チャネルは、非興奮性細胞 (non-excitabile cells) の線維芽細胞、肝星細胞、血管内皮細胞、神経細胞、がん細胞、免疫細胞 (T cells、B cells) などに分布している。一般的に、 K^+ チャネルは、膜電圧の過分極を通じて Ca^{2+} の細胞内流入を増加させて細胞を活性化させる役割をする。ところで、 Ca^{2+} は、二次メッセンジャー (second messenger) あるいは細胞内の様々な酵素の co-factor として作用し、細胞内シグナル伝達過程に非常に重要な役割をする。したがって、 $K_{Ca}3.1$ チャネルが活性化して細胞内 Ca^{2+} が増加すると、細胞増殖、上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal t

50

r a n s i t i o n)、細胞移動 (m i g r a t i o n)、細胞外基質 (e x t r a c e l l u l a r m a t r i x)、あるいは酸化窒素のような物質の生産および分泌などが促進される。

【 0 0 0 3 】

筋線維芽細胞（あるいは活性化した肝星細胞）の形成は、線維化過程で最も重要な段階であり、上皮間葉移行などを通じて起こる。筋線維芽細胞が形成され、肝星細胞が活性化すると、このような細胞の増殖が活発に起こり、この細胞で細胞外基質の形成が起こり、線維化が活発に行われる。血管内皮細胞あるいは上皮細胞などから筋線維芽細胞が形成される上皮間葉移行は、 Ca^{2+} 依存的な過程であることが知られている。線維化誘発因子である TGF による上皮間葉移行は、特に Ca^{2+} に敏感であることが知られている。K_{Ca3.1} チャネルは、筋線維芽細胞と肝星細胞などで細胞内 Ca^{2+} を調節して上皮間葉移行を調節する。

10

【 0 0 0 4 】

K_{Ca3.1} チャネルが活性化すると、このような K^+ チャネルが発現する細胞によって異なる反応が起こる。免疫細胞を介して免疫細胞の増殖とサイトカインの分泌などを通じて炎症および免疫反応を増加させる。血管内皮細胞を介して血管新生を促進し、酸化窒素の分泌を通じて血管弛緩を誘発させる。また、線維芽細胞および肝星細胞を介して線維化疾患を誘発する。すなわち、筋線維芽細胞 (m y o f i b r o b l a s t s) を生成したり肝星細胞を活性化させ、コラーゲンなど細胞外基質の生成などを誘発して結合組織 (c o n n e c t i v e t i s s u e) の形成に寄与する。また、一部のがん細胞の増殖および転移にも重要な役割をする。したがって、K_{Ca3.1} チャネルは、炎症および自己免疫疾患、線維化疾患およびがん疾患の進行に非常に重要な役割をすると推定することができる。

20

【 0 0 0 5 】

サイトカインと H_2O_2 のような炎症誘発因子 (p r o - i n f l a m m a t o r y a g e n t s) は、免疫細胞の増殖など免疫および炎症反応を増幅させ、TGF と PDGF のような成長因子を含む線維化誘発因子 (p r o - f i b r o t i c a g e n t s) は、線維化反応を増幅させる。ところで、このような炎症誘発因子と線維化誘発因子は、K_{Ca3.1} チャネルの発現を増加させる。すなわち、炎症誘発因子と線維化誘発因子による炎症および免疫反応、および線維化反応を増幅させる過程に K_{Ca3.1} チャネルの発現増加が重要な役割をする。

30

【 0 0 0 6 】

このように K_{Ca3.1} チャネルの発現が増加すると、線維化疾患とがん疾患など増殖性疾患、自己免疫疾患など炎症性疾患などの進行が促進される。したがって、このような疾患を K_{Ca3.1} チャネル介在性疾患と規定することができる。近年、K_{Ca3.1} チャネル抑制薬物を用いて炎症および自己免疫疾患、線維化疾患およびがん疾患治療剤を開発しようとする努力が続いて試みられている。このような努力の一環として、代表的な K_{Ca3.1} 抑制剤であるセニカポク (s e n i c a p o c) は、鎌状赤血球貧血症 (s i c k l e c e l l a n e m i a) を含む各種炎症および自己免疫疾患、線維化疾患治療剤として開発中にある。

40

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、梨花女子大学の産学協力団の米国特許 US 9, 259, 412 B2 (特許文献 1) およびその Family patent である韓国登録特許第 10 - 141 4831 号において、従来嗜眠症 (n a r c o l e p s y) 治療剤に使用されているモダフィニル (m o d a f i n i l) およびその誘導体を有効成分として含む K_{Ca3.1} チャネル介在性疾患の治療または予防用組成物を提示している。ここで、K_{Ca3.1} チャネル介在性疾患としては、鎌状赤血球貧血症、急性免疫反応または自己免疫疾患を含む免疫疾患、前立腺がんまたはすい臓がんを含むがん疾患、トラウマ脳損傷、退行性神経疾患および分泌性下痢などが例示されている。

【 0 0 0 8 】

50

なお、ソリアムフェトール (solriamfetol)、すなわち 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマート (2 - amino - 3 - phenylpropyl carbamate) は、嗜眠症治療剤であり、韓国 SK Corporation により「スノシ (Sunosi)」という製品名で開発、販売されている。これと関連して、SK Corporation の米国特許 US 5, 955, 499 B2 (特許文献 2) および US 6, 140, 532 B2 (特許文献 3) とこれらの Family patent である韓国登録特許第 10 - 197892 号および第 10 - 173863 号には、ソリアムフェトールおよびその誘導体が中枢神経系治療剤、特に抗うつ剤および抗不安剤として有用であると報告されている。

【0009】

また、米国特許 US 9, 464, 041 B2 (特許文献 4) およびその Family patent である韓国公開特許第 10 - 2019 - 105675 号には、ソリアムフェトールおよびその誘導体を使用してうつ病、がん、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、慢性疲労、線維筋痛 (fibromyalgia)、慢性痛、外傷性脳損傷、AIDS、および骨関節炎などの疾患によって伴う疲労を治療または予防する方法が開示されており、米国特許 US 10, 351, 517 B2 (特許文献 5) およびその Family patent である韓国登録特許第 10 - 1335941 号には、日中の過剰な眠気 (excessive daytime sleepiness) および病的睡眠 (pathological somnolence) を含む睡眠覚醒障害を治療する方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】米国特許第 9, 259, 412 号明細書 (韓国登録特許第 10 - 1414831 号)

【文献】米国特許第 5, 955, 499 号明細書 (韓国登録特許第 10 - 197892 号)

【文献】米国特許第 6, 140, 532 号明細書 (韓国登録特許第 10 - 173863 号)

【文献】米国特許第 9, 464, 041 号明細書 (韓国公開特許第 10 - 2019 - 105675)

【文献】米国特許第 10, 351, 517 号明細書 (韓国登録特許第 10 - 1335941 号)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、 K^+ チャネルを抑制する物質を用いて $K_{Ca3.1}$ チャネル介在性疾患を治療する方法について研究しているところ、驚くべきことに、従来嗜眠症治療剤に使用されているソリアムフェトールを含むフェニルアルキルカルバマート化合物が $K_{Ca3.1}$ チャネルの発現を抑制することができるという可能性を把握し、多様な実験を通じてこのような可能性を事実として立証することによって、本発明を完成するに至った。

【0012】

これより、本発明の目的は、前記フェニルアルキルカルバマート化合物を有効成分として含む新しい $K_{Ca3.1}$ チャネル介在性疾患治療用組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明による $K_{Ca3.1}$ チャネル介在性疾患治療用組成物は、下記 [構造式 1] で表されるフェニルアルキルカルバマート化合物またはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含むことを特徴とする。

【0014】

10

20

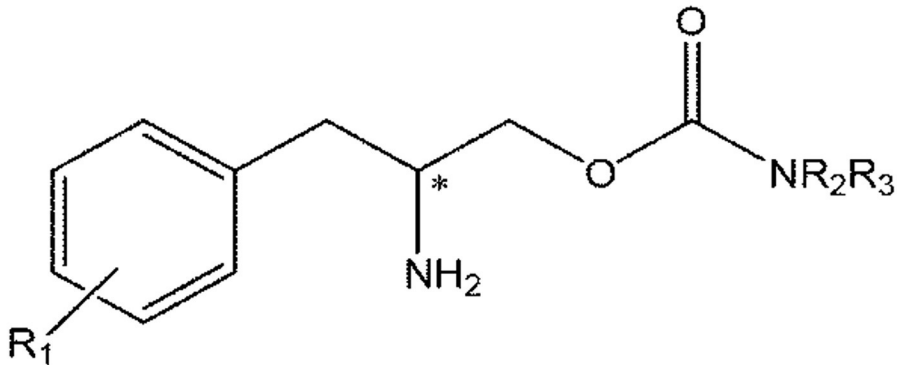
30

40

50

【化 1】

〔構造式 1〕



10

上記〔構造式 1〕中、R₁は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アミン、ニトロ、硫化水素、メチル、メチルハロゲン、エチル、プロピル、メトキシ、エトキシ、ビニル、アリールの中から選ばれた 1 個または 2 個の官能基であり、R₂および R₃は、それぞれ水素、メチル、エチル、プロピル、アミドの中から選ばれた 1 個の官能基であり、* 表示は、キラル中心を意味する。

20

【0015】

また、本発明による K_{C a 3} . 1 チャネル介在性疾患治療用組成物は、上記〔構造式 1〕中、R₂と R₃が水素である化合物を含むことを特徴とする。

【0016】

また、本発明による K_{C a 3} . 1 チャネル介在性疾患治療用組成物は、上記〔構造式 1〕中、R₁が水素、F、Cl、Br、Iの中から選ばれた 1 個または 2 個の官能基である化合物を含むことを特徴とする。

【0017】

また、本発明による K_{C a 3} . 1 チャネル介在性疾患治療用組成物は、上記〔構造式 1〕中、R₁が 1 個または 2 個の F であり、R₂と R₃は、それぞれ水素、メチル、アミドの中から選ばれた 1 個の官能基である化合物を含むことを特徴とする。

30

【0018】

また、上記〔構造式 1〕で表される化合物は、R - 異性体または S - 異性体の含有量が 90% 以上のキラル化合物であることを特徴とする。

【0019】

また、上記〔構造式 1〕で表される化合物は、

2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマート；

2 - アミノ - 3 - (3 - フルオロフェニル)プロピルカルバマート；

2 - アミノ - 3 - (3, 4 - ジクロロフェニル)プロピルカルバマート；

2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルメチルカルバマート；

2 - アミノ - 3 - フェニルプロピル(アミノカルボニル)カルバマート；

2 - アミノ - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル)プロピルカルバマート；

2 - アミノ - 3 - [3 - (トリフルオロメチル)フェニル]プロピルカルバマートの中から選ばれたいずれか 1 つであることを特徴とする。

40

【0020】

また、前記 K_{C a 3} . 1 チャネル介在性疾患は、肝線維化および肺線維化を含む線維化疾患、自己免疫疾患、およびがん疾患であることを特徴とする。

【発明の効果】

【0021】

本発明による上記構造式 1 化合物は、線維芽細胞を対象とする生体外実験で K_{C a 3} .

50

1チャンネルの発現を抑制する効果とともに、炎症および線維化を抑制する効果があり、さらに、肝疾患が誘発されたマウスモデルに対する生体内実験でも炎症および線維化を抑制する効果があることが確認された。

【0022】

したがって、上記構造式1化合物は、人体内で発生する $K_{Ca}3.1$ チャンネル介在性疾患である各種炎症および自己免疫疾患、線維化疾患、およびがん疾患の治療のための新しい医薬組成物に有用に使用でき、必要によっては、動物用薬品として開発されることもできることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の構造式2化合物が線維芽細胞において $K_{Ca}3.1$ 電流に及ぼす効果を示す図である。

【図2】本発明の構造式3～8化合物が線維芽細胞において $K_{Ca}3.1$ 電流に及ぼす効果を示す図である。

【図3】炎症を誘発するLPS (lipopolysaccharides) に24時間露出させた線維芽細胞において本発明の構造式2～8化合物が炎症マーカーの発現に及ぼす効果を示す図である。

【図4】線維化を誘発するTGF β に24時間露出させた線維芽細胞において本発明の構造式2～8化合物が線維化マーカーの発現に及ぼす効果を示す図である。

【図5】ブレオマイシン (bleomycin) により肺線維化が誘発されたマウスモデルにおいて本発明による構造式2化合物の線維化抑制効果をコラーゲンに対するMasson's trichrome染色で確認した結果を示す図である。

【図6】ブレオマイシンにより肺線維化が誘発されたマウスモデルにおいて本発明による構造式2化合物が線維化マーカーであるmRNA発現に及ぼす影響を示す図である。

【図7】CDAHFD給餌により肝線維化が誘発されたマウスモデルにおいて本発明による構造式2化合物の線維化抑制効果をコラーゲンに対するMasson's trichrome染色で確認した結果を示す図である。

【図8】CDAHFD給餌により肝線維化が誘発されたマウスモデルにおいて本発明による構造式2化合物が線維化マーカーであるmRNA発現に及ぼす影響を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

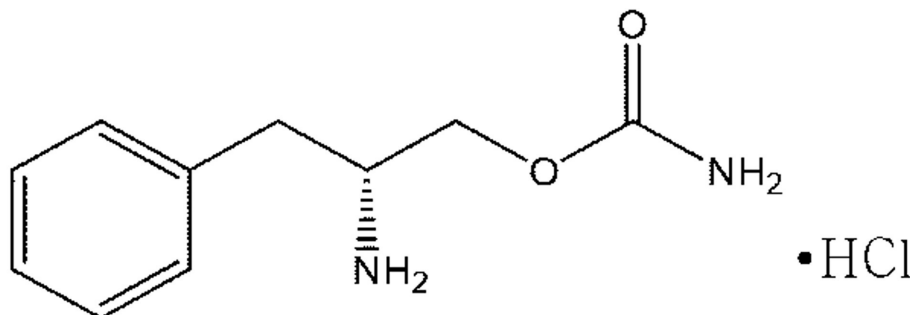
【0024】

本発明による上記構造式1のフェニルアルキルカルバマート化合物は、具体的には、次の構造式2～構造式8化合物を含む。

【0025】

【化2】

[構造式2]



【0026】

10

20

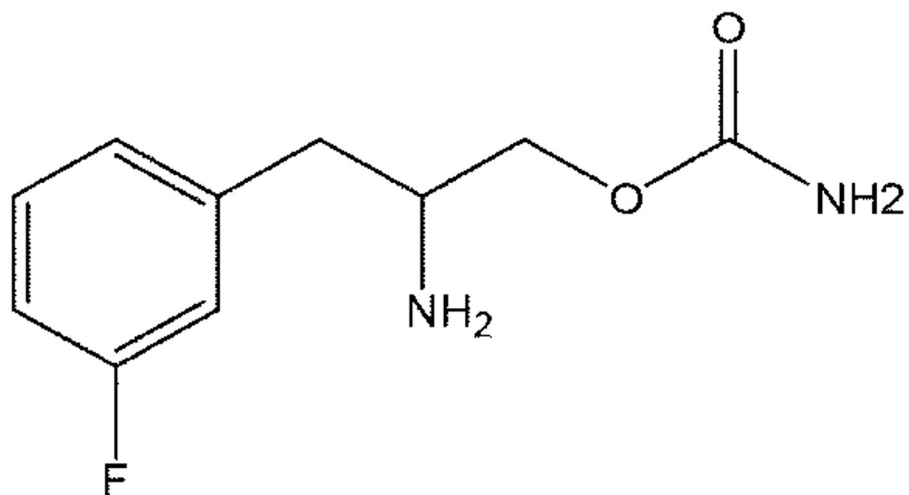
30

40

50

【化 3】

[構造式 3]

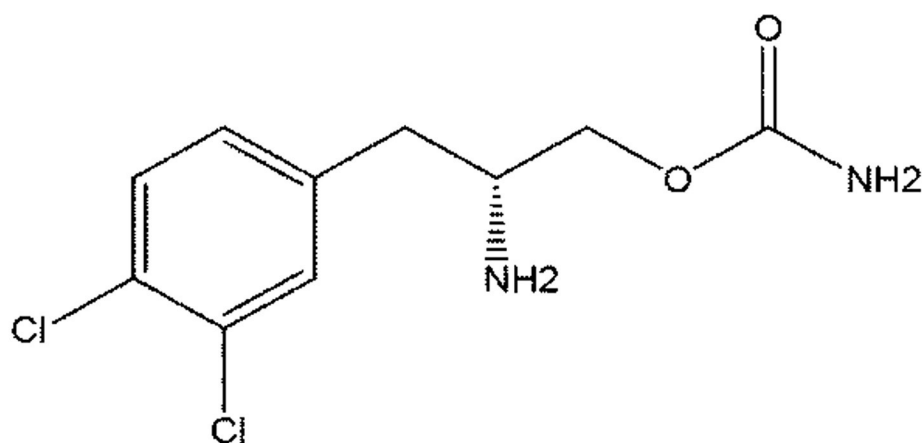


10

【0027】

【化 4】

[構造式 4]



30

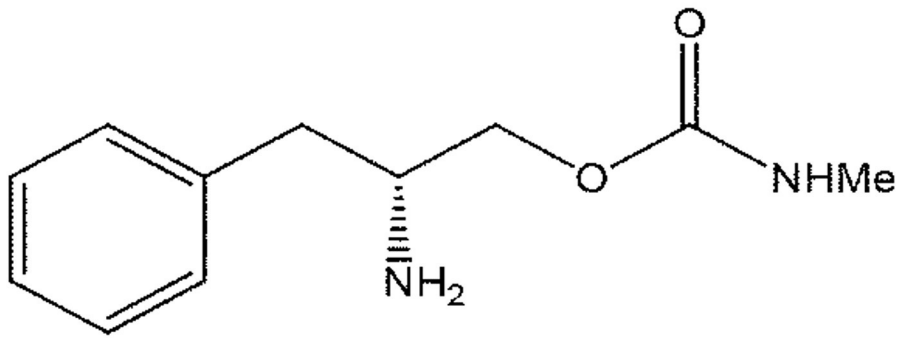
【0028】

40

50

【化5】

[構造式5]

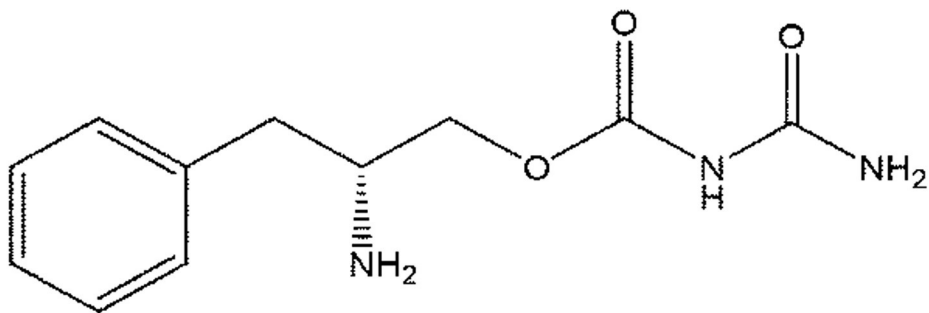


10

【0029】

【化6】

[構造式6]

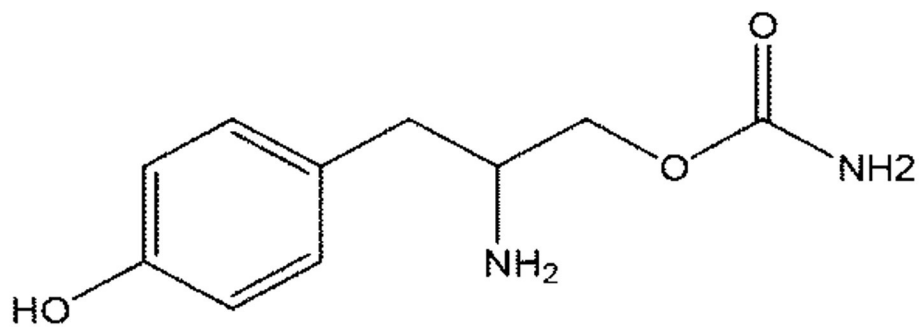


20

【0030】

【化7】

[構造式7]



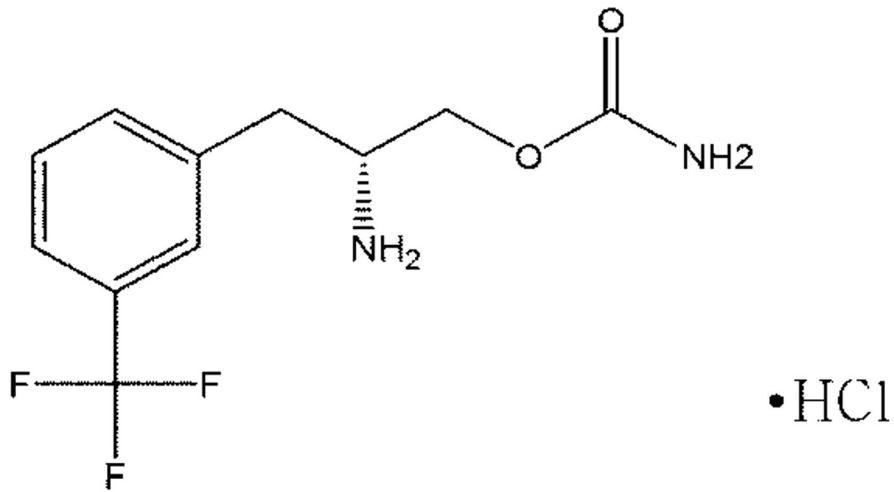
40

【0031】

50

【化 8】

[構造式 8]



10

【 0 0 3 2 】

上記構造式 2 ~ 構造式 8 化合物の化学名と本発明者が付与したコード名は、次のとおりである。

20

【 0 0 3 3 】

30

40

50

【表 1】

構造式	化学名	コード名
2	(R) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルカルバマート ヒドロクロリド (R)-2-amino-3-phenyl propylcarbamate hydrochloride	S F - 2
3	2 - アミノ - 3 - (3 - フルオロフェニル) プロピルカルバマート 2-amino-3-(3-fluorophenyl)propylcarbamate	S F - 3
4	(2 R) - 2 - アミノ - 3 - (3 , 4 - ジクロロフェニル) プロピルカルバマート (2R)-2-amino-3-(3,4-dichlorophenyl)propylcarbamate	S F - 4
5	(2 R) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピルメチルカルバマート (2R)-2-amino-3-phenylpropyl methylcarbamate	S F - 5
6	(2 R) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロピル (アミノカルボニル) カルバマート (2R)-2-amino-3-phenylpropyl (aminocarbonyl) carbamate	S F - 6
7	2 - アミノ - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピルカルバマート 2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propylcarbamate	S F - 7
8	(2 R) - 2 - アミノ - 3 - [3 - (トリフルオロメチル) フェニル] プロピルカルバマートヒドロクロリド / (2R)-2-amino-3-[3-(trifluoromethyl) phenyl]propylcarbamate hydrochloride	S F - 8

10

20

30

【 0 0 3 4 】

上記構造式 2 化合物は、ソリアムフェトール (s o l r i a m f e t o l) という一般名で知られており、現在嗜眠症治療剤に使用されている。上記構造式 3 化合物の製造方法は、米国特許 US 6 , 1 4 0 , 5 3 2 B 2 および Family patent である韓国登録特許第 1 0 - 1 7 3 8 6 3 号に公知にされており、上記構造式 4 化合物は、米国公開特許 US 2 0 0 5 / 0 0 8 0 2 6 8 A 1 に記載された方法によって製造することができる。

【 0 0 3 5 】

上記構造式 5 化合物の製造方法は、米国特許 US 5 , 7 0 5 , 6 4 0 B 2 に公知にされており、上記構造式 6 化合物の製造方法は、米国特許 US 9 , 4 0 3 , 7 6 1 B 2 またはその Family patent である韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 6 - 0 1 2 6 9 8 8 号に公知にされており、上記構造式 7 化合物は、米国特許 US 6 , 1 4 0 , 5 3 2 B 2 の [実施例 9] および国際公開特許 WO 9 8 / 1 5 5 2 6 の [実施例 9] に記載された方法によって製造することができる。

40

【 0 0 3 6 】

上記構造式 8 化合物は、バイエルが出願した米国特許 US 9 , 1 8 0 , 1 2 0 B 2 またはその Family patent である韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 3 - 0 1 3 8 2 1 6 号の [実施例 4 8 A] に記載された方法によって製造することができる。

【 0 0 3 7 】

参考として、前記バイエル特許には、上記構造式 8 化合物が肝硬変などに使用できると記載されている。しかしながら、前記バイエル特許では、上記構造式 8 化合物が V 1 a 、

50

V2受容体拮抗剤として抗利尿ホルモンであるバソプレシン作用を抑制することで、心不全治療、腎臓、血流力学効果を通じて心血管障害を含む肝硬変などを治療することを目的としている。

【0038】

一方、本発明では、上記構造式8化合物がK_{Ca}3.1チャネルの発現を抑制することで、線維化発生の直接的な原因を解決することを目的としているので、本発明は、前記バイエル特許によって付随的に得られる肝硬変治療とは明らかな差異があると言える。

【0039】

本発明による薬学的組成物は、上記構造式1化合物の薬学的に許容可能な塩を含む。ここで、「薬学的に許容可能な塩」というのは、通常、金属塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが含まれ得る。

10

【0040】

また、本発明による薬学的組成物は、上記構造式1化合物の溶媒和物および水和物を全部含み、ラセミ体と可能なすべての立体異性体も含み、また、各化合物の結晶形態または非結晶形態を含んでもよい。

【0041】

本発明による薬学的組成物は、通常の方法によって錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、エアロゾル、滅菌注射溶液などの形態に剤形化することができる。また、使用目的によって経口投与したり非経口投与とすることができ、非経口投与時に皮膚外用または腹腔内注射、直腸内注射、皮下注射、静脈注射、筋肉内注射または胸部内注射の注入方式を選択することができる。

20

【0042】

本発明による薬学的組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄率および疾患の重症度によって変わることができる。好ましい一日投与量は、有効成分を基準として0.2~20mg/kg、より好ましくは、0.5~10mg/kgであり、一日に1回~2回投与することができるが、これに制限されない。

【実施例】

【0043】

以下、本発明によるフェニルアルキルカルバマート化合物の薬理効果を説明する。

【0044】

1) 実験方法

1-1) 線維芽細胞の培養

ダルベッコ培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hyclone, Logan, UT)で線維芽細胞(CRL-2795; American Type Culture Collection, VA)を培養した。すべての細胞は、5%二酸化炭素湿式条件で37℃に維持した。このように培養した線維芽細胞は、炎症誘発物質であるLPS(lipopolysaccharides)と、線維化誘発因子であるTGF- β 、および本発明の構造式2~8化合物(以下、SF-2~SF-8化合物という)にそれぞれ24時間露出させた後、抗炎症および抗線維化効果の試験を行った。

30

【0045】

1-2) 肺線維化マウスモデルの構築

本発明によるSF-2化合物の線維化抑制効果を確認するために、次のような実験を実施した。まず、C57BL/6野生型マウス(オリエンタルバイオ社から購入)を6~8匹ずつ3グループに分類して、それぞれ疾患誘発群と薬物投与群および正常対照群として使用した。各グループ別の試験対象マウスを次のように処理した。

40

【0046】

(1) 疾患誘発群; 試験対象マウスの気道内にブレオマイシン(bleomycin) 1.5 unitを注入し、肺線維化を誘発した。次に、下記薬物投与群に投与したSF-2化合物と同量の蒸留水を週5回腹腔内注射(100mg/kg)した。添付の図面においてBLM(bleomycin)は、このような疾患誘発群を意味する。

50

【 0 0 4 7 】

(2) 薬物投与群；試験対象マウスの気道内にプレオマイシン 1 . 5 u n i t を注入し、次に、本発明の S F - 2 化合物を週 5 回腹腔内注射 (1 0 0 m g / k g) した。添付の図面において B L M + S F - 2 は、このような薬物投与群を意味する。

【 0 0 4 8 】

(3) 正常対照群；前記疾患誘発群に注入したプレオマイシンの量と同量の蒸留水を気道内に注入した。次に、前記薬物投与群に投与した S F - 2 化合物と同量の蒸留水を週 5 回腹腔内注射した。添付の図面において C あるいは C o n t r o l は、このような正常対照群を意味する。

【 0 0 4 9 】

各グループ別のマウスモデルを前記のような方法で 4 週間薬物処理を行った後、過量の麻酔剤を投与して即死させた後、肺を摘出し、次の試験に使用した。

【 0 0 5 0 】

1 - 3) 脂肪性肝疾患マウスモデルの構築

本発明の S F - 2 化合物が肝炎症および線維化に及ぼす治療効果を確認するために、次の実験を実施した。まず、C 5 7 B L / 6 野生型マウス (オリエントアルバイオ社から購入) をそれぞれ 6 ~ 8 匹ずつ 3 グループに分類して、疾患誘発群と薬物投与群および正常対照群として使用した。各グループ別の試験対象マウスを次のように処理した。

【 0 0 5 1 】

(1) 疾患誘発群；試験対象マウスを C D A H F D 給餌 (c h o l i n e d e f i c i e n t , L - a m i n o - a c i d - d e f i n e d , h i g h - f a t d i e t w i t h 0 . 1 % m e t h i o n i n e . A 0 6 0 7 1 3 0 2 , R e s e a r c h D i e t s , N e w B r u n s w i c k , N J) で飼育し、脂肪性肝疾患および線維化を誘発した。次に、ゾンデ (オラルチューブ) を用いて下記薬物投与群に投与した S F - 2 化合物と同量の蒸留水を週 5 回投与した。添付の図面において C D A H F D は、このような疾患誘発群を意味する。

【 0 0 5 2 】

(2) 薬物投与群；試験対象マウスを前記 C D A H F D 給餌とともに本発明の S F - 2 化合物を週 5 回投与 (1 0 0 m g / k g / d a y) した。添付の図面において C D A H F D + S F - 2 は、このような薬物投与群を意味する。

【 0 0 5 3 】

(3) 正常対照群；試験対象マウスを正常な給餌で飼育した。次に、ゾンデ (オラルチューブ) を用いて前記薬物投与群に投与した S F - 2 化合物と同量の蒸留水を週 5 回投与した。添付の図面において C あるいは C o n t r o l は、このような正常対照群を意味する。

【 0 0 5 4 】

各グループ別のマウスモデルを前記のような方法で 1 6 週間薬物処理した後、過量の麻酔剤を投与して即死させた後、肝を摘出し、次の試験に使用した。

【 0 0 5 5 】

1 - 4) 肺および肝組織のパラフィン組織標本の製作および形態学的変化の観察

前記マウスモデルから摘出した肺および肝組織をパラホルムアルデヒド溶液で固定させ、1 ~ 2 m m の厚さに切断した。切断した組織をパラフィンに包埋し、4 μ m の厚さに切ってキシレンでパラフィンを除去した後、エタノールでキシレンを除去し、水道水で洗浄して、パラフィン組織標本を製作した。

【 0 0 5 6 】

前記肺および肝組織で線維化マーカーであるコラーゲンに対する組織免疫学的染色 (i m m u n o h i s t o c h e m i s t r y) は、M a s s o n ' s t r i c h r o m e 染色法で実施した。

【 0 0 5 7 】

1 - 5) リアルタイム重合酵素連鎖反応 (R e a l t i m e P C R) 分析

10

20

30

40

50

前記マウスモデルから抽出した肺および肝組織で炎症あるいは線維化因子の mRNA 発現程度をリアルタイム重合酵素連鎖反応で測定した。前記組織の RNA を TRIzol 試薬 (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) で分離し、BcaBEST 重合酵素 (Takara Shuzo) を使用して一本鎖 cDNA を合成した後、重合酵素連鎖反応を行った。

【0058】

この際、使用した炎症誘発サイトカインおよび線維化マーカーのプライマー配列 (配列番号 1 ~ 30) は、下記表 2 および表 3 の通りである。

【0059】

【表 2】

炎症誘発サイトカイン プライマー配列

	センス	配列番号	アンチセンス	配列番号
TNF α	F-CCCCAAGGGATGAG AAGTT	5	R-CACTGGTGGTTGCTA CGA	6
CCL2	F-CCCCAAGAAGGAATG GGTCC	7	R-TGCTTGAGGTGTTGTG GAA	8
IL1 α	F-GAGCCGGGTGACAGT ATCAG	11	R-ACTTCTGCCTGACGAGC TTC	12
IL6	F-ACCAGAGGAAATTTTC AATA GGC	13	R-TGATGCACTGCAGAA AACA	14
mGAP DH	F-CCGTATTGGGCGCCTG GTCA	19	R-CCGGCCTTCTCCATGGT GGT	20

【0060】

【表 3】

線維化マーカープライマー配列

	センス	配列番号	アンチセンス	配列番号
Col1 α	F-ACAGTCCAGTCTTCA TTGC	21	R-GCACTCTTCTCCTGGT CCTG	22
α -SMA	F-CTGACAGAGGCACCAC TGAA	31	R-CATCTCCAGAGTCCAG CACA	32
mGAP DH	F-CCGTATTGGGCGCCTG GTCA	33	R-CCGGCCTTCTCCATGG TGGT	34

【0061】

1 - 6) 電気生理学的分析

分離培養した単一線維芽細胞で細胞膜を介した電流 (whole cell current) をパッチクランプ法 (patch-clamp technique) で測定した。全細胞電圧固定 (whole-cell voltage clamp) 細胞で微細ガラス

10

20

30

40

50

電極を通じて - 100 mV から + 100 mV までの電圧ランプ (voltage ramp) を加え、発生する電流を増幅器 (EPC-10, HEKA, Lambrecht, Germany) で増幅した後、1 ~ 4 kHz の標本抽出率で記録した。

【0062】

標準外用液は、150 mM NaCl、6 mM KCl、1.5 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、10 mM HEPES、10 mM グルコース、pH 7.4 (NaOH で滴定) を含み、微細ガラス電極 (ピペット) 溶液は、40 mM KCl、100 mM K-aspartate、2 mM MgCl₂、0.1 mM EGTA、4 mM Na₂ATP、10 mM HEPES、pH 7.2 (KOH で滴定) を含む。ピペット溶液中、自由 Ca²⁺ 濃度は、5 mM EGTA 存在下に適量の Ca²⁺ を加えて、1 μM に調節した (CaBuf で計算; G. Droogmans, Leuven, Belgium)。

10

【0063】

K_{Ca}3.1 電流は、次のような方法で分離した。全細胞電圧固定された細胞にガラス電極を通じて 1 μM Ca²⁺ を注入し、K_{Ca}3.1 電流を活性化させる 1-エチル-2-ベンゾイミダゾリノン (1-ethyl-2-benzimidazolinone; 1-EBIO、100 μM) を加えて記録した電流において K_{Ca}3.1 チャネル抑制剤である TRAM-34 (10 μM) により抑制される電流を K_{Ca}3.1 電流と判定し、記録された電流は、細胞静電容量で割って標準化した。

【0064】

1-7) 統計的分析

実験結果は、平均値 ± 標準誤差 (S.E.M) で表現した。統計的な分析は、Student's t-test で行い、有意レベル 0.05 以下を有意差があるものと判定した。

20

【0065】

2) 培養細胞を用いた実験結果

2-1) K_{Ca}3.1 電流に及ぼす SF-2 化合物の効果

【0066】

添付の図 1 は、前記線維芽細胞で K_{Ca}3.1 チャネル電流に及ぼす SF-2 化合物の効果を示す図である。細胞内 Ca²⁺ と 1-EBIO によって活性化した K_{Ca}3.1 電流は、SF-2 によって濃度依存的に抑制された。

【0067】

K_{Ca}3.1 電流の大きさは、SF-2 化合物に露出させない細胞において 37.49 ± 1.51 pA/pF、および SF-2 化合物 10、30、100、300、1000 nM に露出させた細胞においてそれぞれ 26.65 ± 1.89 mV/pF、11.69 ± 1.66 mV/pF、7.12 ± 1.33 mV/pF、1.87 ± 0.24 mV/pF、1.95 ± 0.44 mV/pF であって、K_{Ca}3.1 電流が有意に減少した。

30

【0068】

2-2) K_{Ca}3.1 電流に及ぼす SF-3 ~ SF-8 化合物の効果

添付の図 2 は、前記線維芽細胞において K_{Ca}3.1 チャネル電流に及ぼす SF-3 ~ SF-8 化合物の効果を示す図である。細胞内 Ca²⁺ と 1-EBIO によって活性化した K_{Ca}3.1 電流は、SF-3 ~ SF-8 化合物によって濃度依存的に抑制された。

40

【0069】

2-3) SF-3 ~ SF-8 化合物による炎症抑制効果

添付の図 3 は、前記線維芽細胞において LPS によって誘発された炎症に対する SF-2 ~ SF-8 化合物の抑制効果を示す図である。LPS による炎症誘発効果は、炎症マーカーの mRNA 発現程度で判定した。前記線維芽細胞を LPS (10 μg/ml) に 24 時間露出させると、炎症マーカーである IL6 などの mRNA 量が増加した。

【0070】

また、線維芽細胞を LPS とともに SF-2 ~ SF-8 化合物中の 1 つに 24 時間露出させると、炎症マーカーの mRNA の発現程度が減少した。添付の図 3 では、試験結果は、平均 ± SE で表記し、n = 6 ~ 8、## < 0.01 (正常対照群 vs. 疾患誘発群)、

50

* * < 0 . 0 1 (疾患誘発群 v s . 薬物投与群) を意味する。

【 0 0 7 1 】

2 - 4) S F - 3 ~ S F - 8 化合物による線維化抑制効果

添付の図 4 は、線維芽細胞において T G F によって誘発された線維化に対する S F - 2 ~ S F - 8 化合物の線維化抑制効果を示す図である。ここで、T G F による線維化誘発効果は、線維化マーカーの m R N A 発現程度で判定した。前記線維芽細胞を T G F (1 0 n g / m l) に 2 4 時間露出させると、線維化マーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)、collagen 1 (Col 1)、collagen 3 (Col 3) m R N A 量が増加した。

【 0 0 7 2 】

また、線維芽細胞を T G F とともに S F - 2 ~ S F - 8 化合物中の 1 つに 2 4 時間露出させると、線維化マーカーの発現程度が減少した。添付の図 4 において試験結果は、平均 \pm S E で表記し、n = 6、## < 0 . 0 1 (正常対照群 v s . 疾患誘発群)、* * < 0 . 0 1 (疾患誘発群 v s . 薬物投与群) を意味する。

【 0 0 7 3 】

3) 肺疾患マウスモデルに対する S F - 2 化合物の効果

3 - 1) 組織学的あるいは免疫組織学的分析結果

前記マウスモデルから摘出した肺組織でパラフィン組織標本を製作し、線維化マーカーであるコラーゲンに対する組織免疫学的染色を施行した。添付の図 5 は、前記肺組織の M a s s o n ' s t r i c h r o m e 染色結果を示す図であり、正常対照群 (S h a m c o n t r o l) に比べて疾患誘発群 (B L M) において線維化程度が増加し、薬物投与群 (B L M + S F - 2) では、線維化程度が減少したことが確認された。

【 0 0 7 4 】

したがって、本発明の S F - 2 化合物は、肺線維化を抑制する効果があることを確認することができる。添付の図 5 において、「B L M」は、ブレオマイシン 1 . 5 u n i t s 処理による疾患誘発群、「B L M + S F - 2」は、p h l e o m y c i n 1 . 5 u n i t とともに S F - 2 化合物 1 0 m g / k g / d a y または 1 0 0 m g / k g / d a y を投与した薬物投与群を意味する。

【 0 0 7 5 】

3 - 2) 線維化マーカー m R N A 発現に対する分析結果

前記マウスモデルで S F - 2 化合物が線維化マーカーである m R N A 発現に及ぼす影響を確認するために、線維化マーカーである C o l 1 (c o l l a g e n 1)、C o l 3 (c o l l a g e n 3)、 α -SMA (α -smooth muscle actin) に対する R T - P C R を行った。

【 0 0 7 6 】

図 6 から分かるように、正常対照群 (C) に比べて疾患誘発群 (B L M) の肺組織において C o l 1、C o l 3、 α -SMA の m R N A 発現レベルが大きく増加し、線維化が進行されたことが分かった。しかしながら、薬物投与群 (B L M + S F - 2) では、C o l 1、C o l 3、 α -SMA の m R N A 発現レベルが大きく減少して線維化が抑制されることを確認した。このような結果は、本発明の S F - 2 化合物が肺線維化を抑制する効果があることを示唆する。図 6 で、試験結果は、平均 \pm S E で表記し、n = 6、* < 0 . 0 5、* * < 0 . 0 1 を意味する。

【 0 0 7 7 】

4) 肝疾患マウスモデルに対する実験結果

4 - 1) 組織学的あるいは免疫組織学的分析

添付の図 7 は、前記肝組織のコラーゲン繊維に対する M a s s o n ' s t r i c h r o m e 染色結果を示す図であり、正常対照群 (S h a m c o n t r o l) の肝組織は、まだ線維化が進行されない健康な状態であるのに対し、疾患誘発群 (C D A H F D) の肝組織は、青色で染色されていて、線維化が進行していることを確認した。ところで、前記疾患誘発群に S F - 2 化合物を投与した薬物投与群 (C D A H F D + S F - 2) の肝組織で

10

20

30

40

50

は、青色で染色された程度が大きく減少し、線維化が大きく抑制されることが観察された。

【0078】

4-2) 線維化マーカーmRNA発現に対する分析結果

前記マウスモデルでSF-2化合物が線維化マーカーmRNA発現に及ぼす影響を確認するために、線維化マーカーであるCol1 (collagen 1)、Col3 (collagen 3)、 α -SMA (α -smooth muscle actin) に対してRT-PCRを行った。

【0079】

図8から分かるように、正常対照群(C)に比べて疾患誘発群(CDAHFD)の肺組織においてCol1、Col3、 α -SMAのmRNA発現レベルが大きく増加し、線維化が進行されたことが示された。しかしながら、薬物投与群(CDAHFD+SF-2)では、Col1、Col3、 α -SMAのmRNA発現レベルが大きく減少し、線維化が抑制されることを確認した。

10

【0080】

このような結果は、本発明のSF-2化合物が肝線維化を抑制する効果があることを示唆する。図8で、試験結果は、平均 \pm SEで表記し、 $n=6$ 、 $* < 0.05$ 、 $** < 0.01$ を意味する。

【0081】

5) 実験結果の評価

以上のような実験結果から、本発明の構造式2化合物、すなわちソリアムフェトール、プレオマイシンにより肺線維化が誘発されたマウスモデルおよびCDAHFD給餌により肝線維化が誘発されたマウスモデルにおいてそれぞれ線維化抑制効果があることが確認された。

20

【0082】

また、本発明の構造式2~8化合物は、LPSにより炎症が誘発された線維芽細胞およびTGF β により線維化が誘発された線維芽細胞においてそれぞれ炎症と線維化を抑制する効果があることが確認された。このような結果は、本発明の構造式2~8化合物は、Kca3.1チャネルの発現を抑制する効果があることを意味する。

【0083】

なお、背景技術で前述したように、Kca3.1チャネルは、炎症および線維化疾患以外に自己免疫疾患およびがん疾患の進行にも非常に重要な役割をする。それで、全世界の様々な研究グループあるいは製薬会社がTRAM-34、セニカボク(senicapoc)などKca3.1チャネル抑制剤(inhibitor)を用いて自己免疫疾患、炎症および線維化疾患、がん疾患治療剤を開発している。

30

【0084】

このようにKca3.1チャネルを抑制する場合、炎症および線維化疾患だけでなく、自己免疫疾患およびがん疾患の進行を抑制することができ、したがって、本発明の構造式2~8化合物は、自己免疫疾患およびがん疾患の治療にも効果があるという結論が十分に可能である。

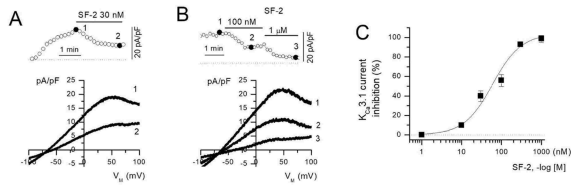
【0085】

なお、本発明では、現実的な限界によって上記構造式1化合物に属するすべての化合物について前述のような実験を実施しなかったが、化学的活性と生体内における代謝メカニズムなどを考慮してみると、上記構造式1化合物は、いずれも、上記構造式2~8化合物と類似の薬理的効果をも有することが推測される。

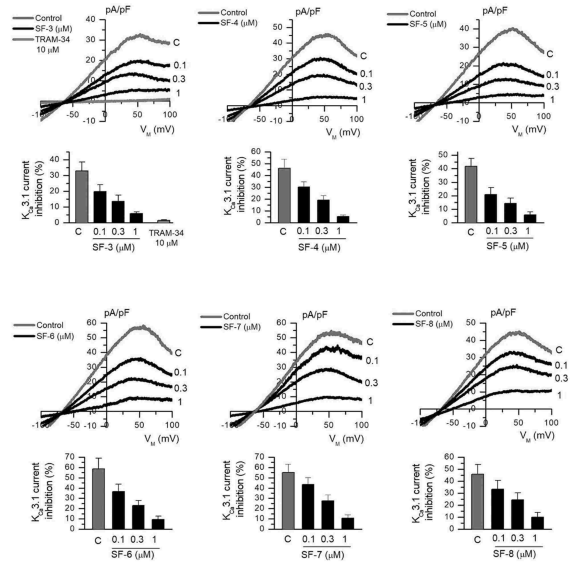
40

【 図面 】

【 図 1 】

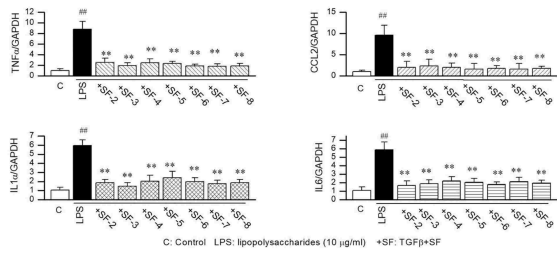


【 図 2 】

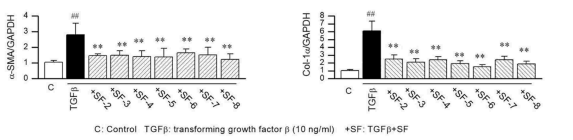


10

【 図 3 】



【 図 4 】



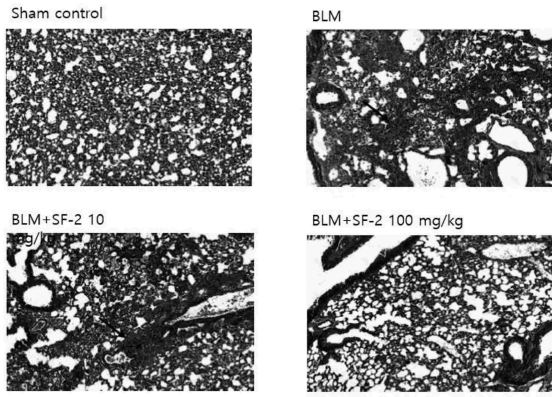
20

30

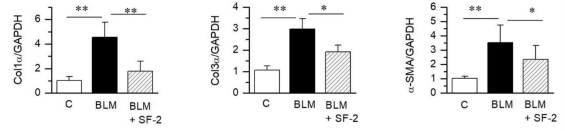
40

50

【 5 】

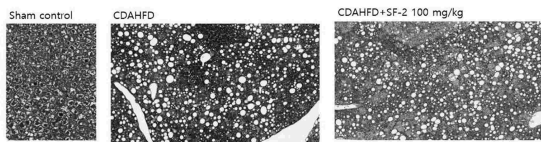


【 6 】

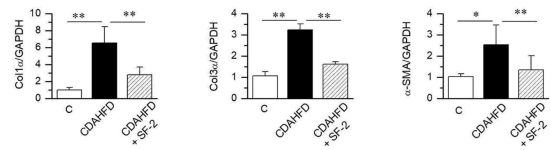


10

【 7 】



【 8 】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100165515
弁理士 太田 清子
- (74)代理人 100169340
弁理士 川野 陽輔
- (74)代理人 100195682
弁理士 江部 陽子
- (74)代理人 100206623
弁理士 大窪 智行
- (72)発明者 キム ソンジン
大韓民国 30062 世宗特別自治市 パルグントゥル路 15 1909 - 1703
- (72)発明者 スー スクヒョ
大韓民国 10323 京畿道 高陽市 一山東区 ウィンティ4路 45 406 - 804
- 審査官 新熊 忠信
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0296333 (US, A1)
特表2016 - 512531 (JP, A)
特表2012 - 530779 (JP, A)
CNS Drugs, 2020年01月17日, Vol.34, pp.9-27
CNS Drugs, 2017年, Vol.31, pp.821-834
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 31/00 - 33/44
A61P 1/00
A61P 11/00
A61P 43/00
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)