

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-524129

(P2008-524129A)

(43) 公表日 平成20年7月10日 (2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/421 (2006.01)	A 6 1 K 31/421	4 C 0 5 6
C 0 7 D 263/32 (2006.01)	C 0 7 D 263/32	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2007-545894 (P2007-545894)	(71) 出願人	397056695
(86) (22) 出願日	平成17年12月6日 (2005.12.6)		サノフィーアベンティス・ドイチュラント
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月15日 (2007.6.15)		・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/013046		テル・ハフツング
(87) 国際公開番号	W02006/063715		ドイツ連邦共和国デー 6 5 9 2 9 フラン
(87) 国際公開日	平成18年6月22日 (2006.6.22)		クフルト・アム・マイン・ブリュニングシ
(31) 優先権主張番号	04029946.3		ユトラーセ 5 0
(32) 優先日	平成16年12月17日 (2004.12.17)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100127926
			弁理士 結田 純次
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
		(74) 代理人	100140132
			弁理士 竹林 則幸

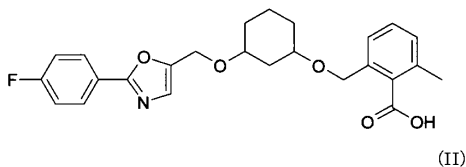
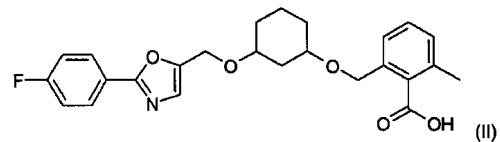
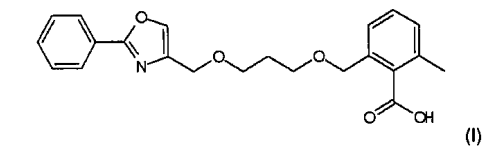
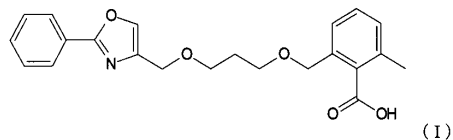
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 うっ血性心不全の治療のための P P A R 作動薬の使用

(57) 【要約】

本発明は、うっ血性心不全 (C H F) の治療用の式 (I) 又は (I I) の P P A R 作動薬の使用を記載する。

【化 1】

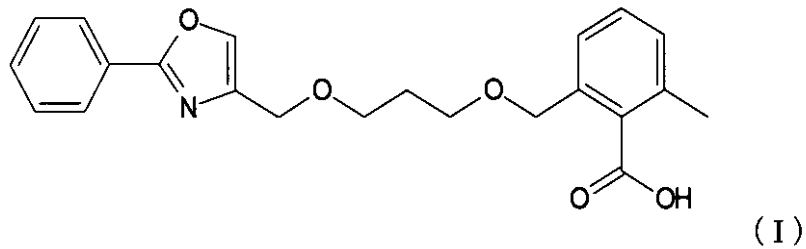


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

うっ血性心不全（CHF）の治療用薬剤の製造のための、式（I）：

【化 1】



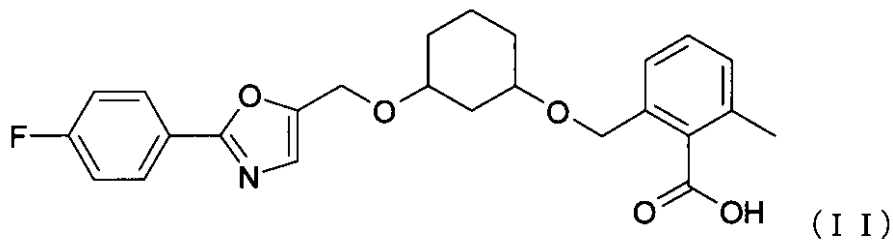
10

の化合物又はその薬学的に許容される塩又は生理的機能性誘導体の使用。

【請求項 2】

うっ血性心不全（CHF）の治療用薬剤の製造のための、式（II）：

【化 2】



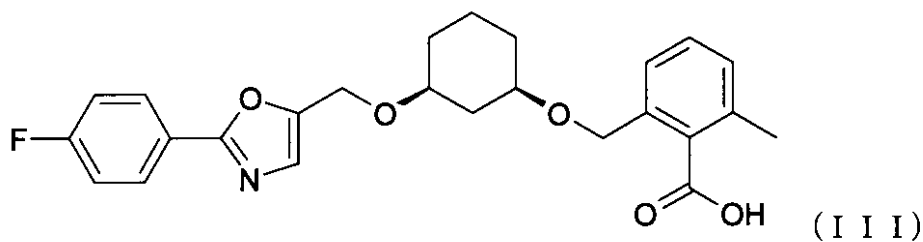
20

の化合物又はその薬学的に許容される塩又は生理的機能性誘導体の使用。

【請求項 3】

化合物（II）が式（III）：

【化 3】



30

の化合物によって特徴付けられる、請求項 2 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、うっ血性心不全の治療のための PPAR 作動薬の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

うっ血性心不全は、肺に液体の貯留を引き起こす、心臓の役に立たないポンプ機能がある破壊的な疾患である。典型的な症状としては、息切れ、平らに横たわったときの呼吸困難及び脚や足首の腫脹を包含する。そのような体力の進行性障害は、究極的には死に至る。心不全には多くの原因があるが、最も頻度が高いのは、心筋梗塞（全ての原因の内約 60 パーセント）、慢性高血圧（約 25%）、遺伝的素質（10%）及び心筋症、又はこれら因子の組合せである。

【0003】

40

50

患者においては、CHFの重症度は、ニューヨーク心臓協会（NYHA）によって開発された分類法に基づき、臨床症状に従って分類されている。患者の体力が、NYHA・I（症状を訴えない）、NYHA・II（中程度の動作中に症状を訴える）、NYHA/II（軽度の動作中に症状を訴える）、又はNYHA・IV（安静時に症状を訴える）への分類を決定づける。

【0004】

CHFの進行を遅らせるCHFの現行の治療は、大幅に生存を延長する。それにもかかわらず、いずれのNYHAの病期にあっても、全般的な死亡率は高く、主としてNYHA・II期又はIII期の患者において実行された、近年の大規模試験で年間平均15パーセントであった。死亡率改善が証明されて、現在承認されているCHFの医薬品の全て（例えば、利尿薬、ACE阻害剤、遮断薬）に共通する不都合な点は、血圧を低下させる影響である。併用療法は多くの患者の血圧が大巾に低下するので、しばしば不可能である。結果として、新しい作用機作を標的とする、代替治療戦略が、CHFの薬物療法の更なる進歩のために緊急に必要とされている。

10

【0005】

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）は、あるクラスの核内ホルモン受容体を表し、その中の2つ（PPAR 及びPPAR ）は、心筋及び血管を含む多くの組織で発現されている。PPARの活性化によって、種々の遺伝子の発現が、次いで、タンパク質の産生が導かれる。PPAR 活性化剤（例えば、ロシグリタゾン）は、インスリン感受性の改善及びインスリン抵抗性の顕性糖尿病への進行を遅らせるという効果に基づいて、II型糖尿病の治療に対して承認されている（Malinowski and Bolesta Clin. Therapeutics (2000), 22, 1151-1168; Leff and Reed, Curr. Med. Chem. Immunology, Endocrine & Metabolic Agents (2002), 2, 33-47）。更に、ある種のPPAR 活性化剤、フィブラート、は、血中コレステロールレベルを減じる能力があるので、臨床で使用されている（Sacks-FM, Am. J. Cardiol. (2001), 88(12A), 14N-18N）。フィブラートとは構造的に異なり、より強力な新規PPAR 活性化剤は、脂質障害及び糖尿病に対する臨床開発が行われている（Inoue and Katayama, Current Drug Targets: Cardiovascular & Haematological Disorders (2004), 4, 35-52）。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

不全心筋では、代謝障害が脂肪酸からグルコース酸化へのシフトと平行している。この作用は、心筋におけるエネルギー生成の効率を減じ、代わりに、CHFにおける収縮機能の喪失に寄与することになる。高齢ラットモデルにおいて、身体トレーニングによるCHFの改善は、心筋におけるPPAR の発現の正常化と平行している。

【0007】

それらの代謝効果とは別に、心臓に関してPPAR活性化剤の直接的効果については殆ど知られていない。インビトロの単離された新生児心筋細胞において、PPAR 活性化剤のフェノフィブラート及びWY 14,643の両者、並びにPPAR 活性化剤のロシグリタゾンは、エンドセリン-1誘発肥大を予防することができた。同様に、PPAR 活性化剤は、単離した心筋細胞での機械的ひずみによって誘発された肥大を減少した。動脈性高血圧のモデルにおいて、PPAR 及びPPAR 活性化は、両者とも、心臓線維症を減少した。急性心筋虚血及び再灌流のマウスモデルにおいて、PPAR 及びPPAR 活性化は、心筋梗塞面積を減少することが示された。心筋梗塞後の慢性相において、PPAR 活性化剤は、心筋リモデリング及び心不全症状を改善することを示した（Lianget al. Endocrinology 2003, 144: 4187-4194）。他方では、心不全は、II型糖尿病の患者では、PPAR 作動薬によって悪化するであろうという証拠がある。

40

【0008】

それ故、CHFにおけるPPAR 活性化の利点は、議論の余地があるが、CHFにおける選択的PPAR 活性化の役割についてはデータが全くない。

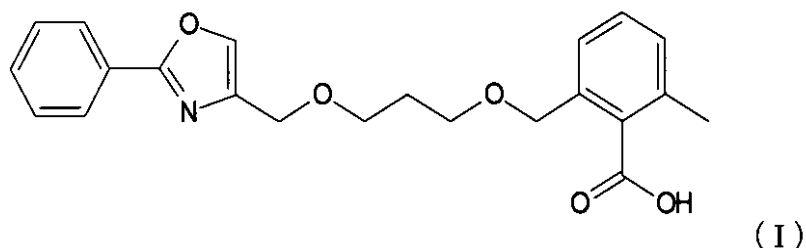
50

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の1つの実施態様は、うっ血性心不全（CHF）の治療のための薬剤を製造するための、式（I）：

【化1】



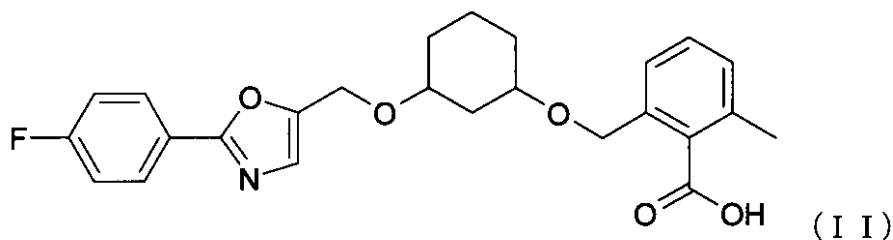
10

の化合物又はその薬学的に許容される塩又は生理学的機能性誘導体の使用である。

【0010】

更なる実施態様は、うっ血性心不全（CHF）の治療のための薬剤を製造するための、式（II）：

【化2】



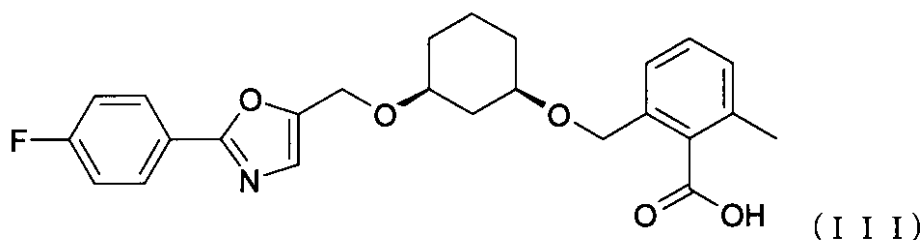
20

の化合物又はその薬学的に許容される塩又は生理学的機能性誘導体の使用である。

【0011】

式（II）の好ましい化合物は、式（III）：

【化3】



30

の化合物である。

【0012】

式（I）の化合物は、国際特許出願第2004/085377号、実施例5に従って製造された。式（II）及び（III）の化合物は、国際特許出願第03/020269号、実施例I及びIIに従って製造された。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

薬学的に許容される塩は、出発物質又は塩基化合物と比較して、より大きな水への溶解性の故に、医薬としての適用に好適である。これらの塩は、薬学的に許容される陰イオン又は陽イオンを有していなければならない。本発明の化合物の好適な薬学的に許容される酸付加塩は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸、硫酸のような無機酸の塩、及び、例えば、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、クエン酸、エタンスルホン酸、フ

50

マル酸、グルコン酸、グリコール酸、イセチオン酸、乳酸、ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、コハク酸、p - トルエンスルホン酸及び酒石酸のような有機酸の塩である。好適な薬学的に許容される塩基性塩は、アンモニウム塩、(ナトリウム塩及びカリウム塩のような)アルカリ金属塩、及び(マグネシウム塩及びカルシウム塩のような)アルカリ土類金属塩である。

【0014】

本明細書で使用される用語「生理学的機能性誘導体」は、例えば、ヒトのような哺乳類に投与した場合、例えば、式(I)、(II)若しくは(III)の化合物又はその活性代謝物を(直接的に、又は間接的に)形成することができるエステルのような、本発明の式(I)の化合物の生理学的に容認される誘導体のいずれをも表している。生理学的機能性誘導体は、又、例えば、H. OkadaらChem. Pharm. Bull. 1994, 42, 57-61に記載されているように、本発明の化合物のプロドラッグを包含する。そのようなプロドラッグは、本発明の化合物にインビボにおいて代謝され得る。これらのプロドラッグは、それ自体、活性を有していても、いなくてもよい。

10

【0015】

本発明の化合物は、種々の多型体、例えば、アモルファス及び結晶性多型体として存在してもよい。本発明の化合物の全ての多型体は、本発明の範囲内に属し、本発明の更なる態様である。

【0016】

所望の生物学的効果を達成するのに必要な式(I)、(II)又は(III)の化合物の量は、多くの因子、例えば、選択された具体的な化合物、使用の意図、投与様式、及び患者の臨床状態に依存する。一日投与量は、一般的に、体重1kgにつき1日当たり約0.3mgから100mg(典型的には、約3mgから50mg)の範囲、例えば約3~10mg/kg/日である。静脈内投与量は、例えば、約0.3mgから1.0mg/kgの範囲であってもよく、体重1kg当たり、及び1分当たり約10ngから100ngの注入として、好適に投与することができる。これらの目的に好適な注入溶液は、例えば、1ミリリットル当たり約0.1ngから10mg、典型的には、約1ngから10mg含有していてもよい。単回投与量は、例えば、活性化合物の約1mgから10gを含有していてもよい。それ故、注射用アンプルは、例えば、約1mgから100mgを含有していてもよく、そして、例えばカプセル又は錠剤のような経口的に投与することができる単回投与製剤は、例えば、約1.0から1000mg、典型的には、約10から600mgを含有していてもよい。上に挙げた状態の治療のためには、式(I)、(II)又は(III)の化合物は、化合物それ自体として使用してもよいが、許容される担体との医薬組成物の形態であってもよい。担体は、それが組成物の他の成分と適合性があり、患者の健康に有害でないという意味において、許容されるものである。担体は、固体若しくは液体又はその両者であってもよく、しばしば単回投与用として、例えば、錠剤として、上記化合物と共に処方され、ここで、上記錠剤は、約0.05から95重量%の活性化合物を含有していてもよい。その他の医薬として活性な物質も、式Iの別の化合物を含めて、同様に存在し得る。本発明の医薬組成物は、公知の薬学的方法の1つによって製造することができ、その方法は、本質的に、上記成分を薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤と混合することから成ってもよい。

20

30

40

【0017】

本発明の医薬組成物は、経口、経直腸、局所、経口腔(例えば、舌下)及び非経口(例えば、皮下、筋肉内、経皮又は静脈内)投与に好適なものを包含する。但し、最も好適な投与様式は、それぞれ個々の場合において、治療される状態の性質及び重症度、並びに各々の場合において使用される式(I)、(II)又は(III)の化合物の性質に依存する。被覆された製剤及び被覆された徐放性製剤も、又、本発明の枠内に属している。好ましいものは、酸及び胃液抵抗性製剤である。胃液に抵抗性のある好適な被覆は、酢酸フタル酸セルロース、フタル酸ポリ酢酸ビニル、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びメタクリル酸及びメタクリル酸メチルのアニオン性ポリマーを含む。

50

【 0 0 1 8 】

経口投与用に好適な医薬品は、例えば、カプセル、ウエハー、又は錠剤のような分離された単位の形態であってもよく、それらの各々は、粉末又は顆粒として、水性又は非水性液体の溶液又は懸濁液として、又は水中油又は油中水懸濁液として、一定の量の式 (I)、(I I) 又は (I I I) の化合物を含有している。これらの組成物は、既に挙げたように、活性化合物及び担体 (1 つ又はそれ以上の更なる成分から構成されていてもよい) を接触させる工程を包含する、いずれかの好適な医薬の方法によって製造することができる。組成物は、一般的に活性化合物を液体及び / 又は細かく砕いた固形担体と均一に均質に混合することによって製造され、その後、必要に応じて製品は成形される。このように、錠剤は、例えば、化合物の粉末又は顆粒を、必要に応じて 1 つ又はそれ以上の追加の成分と共に、圧縮又は成形することによって製造することができる。圧縮した錠剤は、例えば、粉末又は顆粒のような自由に流動する形態の化合物を、必要に応じて、結合剤、流動促進剤、不活性希釈剤及び / 又は 1 つ又はそれ以上の界面活性剤 / 分散剤と、好適な機械で混合しながら、打錠することによって製造することができる。成形された錠剤は、粉末の形態であって、不活性な液体希釈剤で濡れている化合物を、好適な機械で成形することによって製造することができる。

10

【 0 0 1 9 】

経口 (舌下) 投与に好適な医薬組成物は、式 (I)、(I I) 又は (I I I) の化合物を、着色料、通常はショ糖及びアラビアゴム又はトラガカントゴムと共に含有する錠剤、及びゼラチン及びグリセリン又はショ糖及びアラビアゴムのような不活性基剤中に化合物を含んだトローチを含む。

20

【 0 0 2 0 】

非経口投与に好適な医薬組成物は、対象である受容者の血液に等張である、式 (I)、(I I) 又は (I I I) の化合物の滅菌水性製剤を含む。これらの製剤は、静脈内投与することができるが、投与は、皮下、筋肉内又は皮内注射によって行ってもよい。これらの製剤は、化合物を水と混合し、得られた溶液を滅菌し、血液と等張にすることによって製造することができる。本発明の注射し得る組成物は、一般的に活性化合物を約 0 . 1 から 5 重量 % 含有する。

【 0 0 2 1 】

直腸投与に好適な医薬組成物は、単回投与座薬の形態であってもよい。これらは、式 (I) の化合物を 1 つ又はそれ以上の通常の固形担体、例えば、カカオバターと混合し、得られた混合物を成形することによって製造することができる。

30

【 0 0 2 2 】

皮膚での局所使用に好適な医薬組成物は、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、スプレー、エアロゾル又はオイルの形態であってもよい。好適な担体は、例えば、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール及びこれらの物質の 2 つ又はそれ以上の混合物である。活性化合物は、一般的に、組成物の約 0 . 1 から 1 5 重量 %、例えば約 0 . 5 から 2 % の濃度で存在する。

【 0 0 2 3 】

経皮投与も又可能である。経皮使用に好適な医薬組成物は、患者の表皮に長期間密着するのに好適な単一のプラスターの形態であることができる。そのようなプラスターは、粘着剤中に溶解及び / 又は分散された、又はポリマー中に分散された、必要に応じて緩衝化された水性溶液中に、活性化合物を好適に含有する。好適な活性化合物の濃度は、約 1 重量 % から 3 5 重量 % であり、又は約 3 % から 1 5 % である。可能性があるのは、例えば、Pharmaceutical Research, 2(6): 318 (1986) に記載されているような、エレクトロトランスポート又はイオントフォoresis によって放出される活性化合物である。

40

【 0 0 2 4 】

C H F の改善に対する P P A R (ロシグリタゾン) 又は P P A R (式 (I)、(I I) 又は (I I I) の化合物) のいずれかの特異的活性化の効果を試験するために、慢性冠動脈結紮ラットモデルを使用した。何故なら、心筋梗塞が先進工業国における C H F の

50

最も一般的な原因であるからである。

【0025】

P P A R の活性化が、うっ血性心不全に有益であることが本明細書に示される。心筋機能に関して、収縮期及び拡張期の両者の左心室機能、即ち、心排出量が、式(I)、(II)又は(III)の化合物による治療後に改善されるが、P P A R 活性化剤では改善されない。

【0026】

P P A R の活性化も、又、右心室及び肺重量の両者の正常化によって証明されるように、肺のうっ血を改善する(低い肺重量は、良好な心機能の指標であり、高い肺重量は、しばしば心臓の機能低下(すなわちC H F)に起因する肺のうっ血を示している)。

10

【0027】

以前の研究で、P P A R 及びP P A R の活性化の両者が、インビトロで筋細胞肥大を減少させること、ミネラルコルチコイド依存性高血圧における線維症を減少すること、及び急性虚血再灌流モデルにおいて心筋梗塞面積を限定する(上記参照)ことが報告されていた。心筋梗塞後心不全における、これら2つのP P A Rサブタイプの活性化の相反する効果は、それ故に、予期されなかった。この矛盾する発見の理由の1つは、2つのP P A Rサブタイプの組織特異的発現差異であるかもしれない。

【0028】

略語及び頭文字

C H F : うっ血性心不全

20

L V : 左心室 / 左心室の

M I : 心筋梗塞

P P A R : ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体

S E M : 平均値の標準偏差

【0029】

〔実施例1〕

うっ血性心不全の治療のための式(I)の化合物の使用についての概念研究の証明

雄性ウイスターラットを、1ケージ当たり3頭、温度、湿度及び光の標準条件下で収容した。動物は、標準食(ナトリウム含量: 0.2%、Altomin, Lage, Germany製)及び水道飲料水を自由摂取とした。慢性心不全を、大動脈からの左冠動脈の起点よりおよそ2 m 遠位の左冠動脈の永久的閉塞によって誘導し、繋がっていない左心室壁の大きな梗塞を作成した。長期間治療を心筋梗塞が作成された日に開始し、8週間続けた。

30

【0030】

治療期間の終了時に、心機能を、単離された動いている心臓標本を用いて測定した(改変 Langendorff 装置、Linz et al., J. Ren. Angiotensin Aldosterone Syst., 2003を参照)。心臓を、Langendorff 法に従って、酸素供給した(95% O₂、5% C O₂)以下の組成の非循環Krebs-Henseleit溶液で灌流した: (mmol / L) N a C l、118; K C l、4.7; C a C l₂、2.5; M g S O₄、1.6; N a H C O₃、24.9; K H₂ P O₄、1.2; グルコース、5.5; ビルビン酸ナトリウム、2.0。左心耳の切開によって、左心房にカニューレを挿入した。60 mm H g の一定の灌流圧で15分間の平衡期間の後、一定の充満圧11 mm H g で、心臓を作動モードに転換した。次いで、後負荷圧を、毎2分毎に40から140 mm H g に段階的に変化させた。表のデータは、代表的なものであり、一定の後負荷圧80 mm H g に対して得られたものである。流動シグナル及び圧シグナルは、平均毎2秒毎に500 H z で取り出したものである。心拍出量は、身体を通して血液を送り込む心臓の総能力を測定するものである。L V d P / d t m a x は、心筋収縮能の指標、即ち、心臓の能力を発生する力である。L V d P / d t m i n は、緩和する心筋の能力の指標である。更に、肺重量は、C H F の間接的徴候である、肺うっ血の指標として測定された。

40

【0031】

式(I)の化合物での治療(固形飼料に圧縮し、結果として20 mg / k g / 日の投与

50

量となった)は、心筋梗塞発症後の日から開始した。純粋なPPAR 作動薬ロシグリタゾンを、追加群(固形飼料中に3 mg/kg/日)に比較のために使用した。

【0032】

式(I)のPPAR 活性化剤での長期間治療は、心不全の異なった態様を改善するが、(ロシグリタゾンを使用した)PPAR の活性化は改善しない。全体的に、これらのデータは、うっ血性心不全の治療における、式(I)の化合物の有益な効果に対する強い理論的根拠を提供する。

【表1】

試験条件	肺重量 グラム	心拍出量 mL/分	LV dP/dtmax mmHg/s	LV dP/dtmin mmHg/s
疑似手術 (MI なし、非治療)	1.88 ± 0.10*	37.3 ± 3.5*	5780 ± 191*	3527 ± 217*
MI プラセボ	2.96 ± 0.40	18.9 ± 2.9	3748 ± 176	2119 ± 75
MI ロシグリタゾン 3 mg/kg/日	3.67 ± 0.38*	10.2 ± 3.8*	3491 ± 147	2081 ± 65
MI 化合物(I) 20 mg/kg/日	1.62 ± 0.06*	25.8 ± 4.3*	4614 ± 253*	2502 ± 77*

10

20

【0033】

データは、平均 ± 平均値の標準偏差を表す。N = 6 ~ 12 頭/群。*印は、対プラセボ $p < 0.05$ 。心拍出量、LV dP/dtmax 及び LV dP/dtmin は、80 mmHg の負荷後(動いている心臓)で測定した。

【0034】

〔実施例2〕

慢性心筋梗塞における用量反応

雄性スプラグドウレイラットを、心筋梗塞(MI)を作成し、続いて心不全を発症するために、左冠動脈の長期間結紮で前処置した。式(I)の化合物での治療(固形飼料に圧縮し、結果として異なった1日投与量となった)は、心筋梗塞発症後の日から開始した。8週間の治療後、動物を殺処理し、肺重量を計った、そして単離した心臓の機能を、実施例1に記載したのと同じ様式で、動いている心臓のモードでエキスビボ(ex vivo)で解析した(上記参照)。この方法は、心筋の機能の異なった態様を評価できる。本実験シリーズにおいて確立された治療の原理の効果に対する比較のために、CHFの治療において活性であることが知られている、二成分ACE/NEP、即ち、バソペプチダーゼ、阻害剤(7-(2-アセチルスルファニル-3-メチル-ブチルアミノ)-6-オキソ-1,2,3,4,6,7,8,12b-オクタヒドロ-ベンゾ[c]ピリド[1,2-a]アゼピン-4-カルボン酸;国際特許出願第02/083671号)を、追加群に用いた。

30

40

【0035】

式(I)の化合物での長期間治療は、心不全の異なった態様を改善する。これらのデータは、共に、うっ血性心不全における式(I)の化合物の有益な効果を証明している。

【表 2】

試験条件	肺重量 g/100g 体重	心拍出量 mL/分	LV dP/dtmax mmHg/s	LV dP/dtmin mmHg/s
疑似手術 (MI なし、非治療)	0.39 ± 0.01*	36.0 ± 2.7*	5807 ± 192*	2985 ± 109*
MI プラセボ	0.71 ± 0.07	7.3 ± 1.8	3170 ± 247	2056 ± 138
MI 化合物(I) 1mg/kg/日	0.80 ± 0.08	12.5 ± 3.3	3280 ± 250	1886 ± 137
MI 化合物(I) 3mg/kg/日	0.54 ± 0.08 *	21.5 ± 5.4*	3665 ± 166*	2353 ± 77*
MI 化合物(I) 10 mg/kg/日	0.54 ± 0.09*	21.0 ± 4.0*	4043 ± 256*	2339 ± 111*
MI VPI 30 mg/kg/日	0.56 ± 0.07*	27.2 ± 3.5*	3868 ± 172*	2379 ± 120*

10

【0036】

データは、平均 ± 平均値の標準偏差で表す。N = 6 ~ 12 頭 / 群。* 印は、対プラセボ p < 0.05。心拍出量、LV dP/dtmax 及び LV dp/dtmin は、80 mmHg の負荷後（動いている心臓）で測定した。

20

【0037】

〔実施例 3〕

式 (I) の化合物の作動薬効力

式 (I) の化合物の作動薬活性を、国際特許出願第 03 / 020269 号に従って、以下のように試験した。ヒト PPAR に結合して、作動薬の様式で活性化する物質の有効性を解析するために、安定なトランスフェクト HEK 細胞株 (HEK = ヒト胎児腎臓)、本明細書では「PPAR 受容体細胞株」と称する、を使用した。

【0038】

PPAR 作動薬の活性は、以下に記載する 3 日間試験で測定した。

30

第 1 日：

PPAR 受容体細胞株を、以下の添加物を含有する DMEM 培地 (Life Technologies 社) で、80% コンフルエンスまで培養した：10% c s F C S (ウシ胎仔血清、Hyclone 社)、抗生物質 [ゼオジン (Invitrogen 社) 0.5 mg/ml、G418 (Life Technologies 社) 0.5 mg/ml、1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (Life Technologies 社)] 及び L-グルタミン (Life Technologies 社) 2 mM。培養は、37℃、5% CO₂ の条件下に細胞培養インキュベーター内で標準細胞培養瓶 (Becton Dickinson 社) 中で行った。80% コンフルエント細胞を PBS (Life Technologies 社) 30 ml で 1 回洗滌し、トリプシン溶液 (Life Technologies 社) 2 ml を用いて、37℃ で 2 分間処理し、上記した培地 5 ml をとり、細胞計数器で計数した。500,000 細胞/ml に希釈した後、各々の場合 100,000 細胞を、透明なプラスチックの底部を有する 96 ウェルマイクロタイタープレート (Corning Costar 社) の各ウェルに播種した。プレートを細胞インキュベーターで 37℃、5% CO₂ の雰囲気中で 24 時間インキュベートした。

40

【0039】

第 2 日：

被検 PPAR 作動薬を、DMSO 中濃度 10 mM に溶解した。この原液を、c s - F C S 5% (Hyclone 社)、L-グルタミン (Life Technologies 社) 2 mM 及び上記した抗生物質 (ゼオジン、G418、ペニシリン及びストレプトマイシン) を加えた、フェノールレッド・フリーの DMEM 培地 (Life Technologies 社) に希釈した。被検物質は、通常、11 の異なった濃度 (10 μM ; 3.3 μM ; 1 μM ; 0.33 μM ; 0.1 μM ; 0.033 μM ; 0.01 μM ; 0.0033 μM ; 0.001 μM ; 0.00033 μM ; 0.0001 μM) に希釈した。

50

0.33 μ M ; 0.01 μ M ; 0.0033 μ M ; 0.001 μ M ; 0.00033 μ M ; 及び 0.0001 μ M) で試験した。より強力な化合物は、1 μ M から 10 pM 又は 100 nM から 1 pM の濃度範囲で試験した。各ウエルから、第1日に播種した PPAR レポーター細胞株の培地を吸引により完全に除去し、直ちに、培地中に希釈した被検物質を細胞に加えた。物質の希釈及び添加は、ロボット (Beckman Biomek 2000) を使用して実施することができる。培地中に希釈した被検物質の最終容積は、96 ウエルプレートのウエル当たり 100 μ l であった。アッセイにおける DMSO 濃度は、常に、溶媒の細胞障害効果を予防するために 0.1 容量% 未満であった。アッセイが個々のプレートで行われていることを示すため、同様に 11 の異なった濃度に希釈した、標準 PPAR 作動薬を、各プレートに加えた。試験プレートをインキュベーターで、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 雰囲気で、24 時間インキュベートした。

10

【0040】

第3日：

被検物質で処理した PPAR 受容体細胞をインキュベーターから取り除き、細胞溶解をよくするため -20 $^{\circ}$ C で1時間凍結した。プレートを解凍した後 (少なくとも30分間室温で解凍する)、バッファ-1 (Luc-Screen kit #LS1000, PE Biosystems Tropix社) 50 μ l を各ウエルにピペット注入し、発光を測定するために、プレートを装置に移し、ピペット操作単位に合わせた (Luminoscan Ascent, LabSystems社)。測定装置のルシフェラーゼ反応を、バッファ-2 (Luc-Screen kit #LS1000, PE Biosystems Tropix社) 50 μ l を96 ウエルプレートの各ウエルにピペット注入し、開始した。個々のウエルへのバッファ-2の添加は、製造社 (LabSystems社) の指示書に従って、決められた同じ時間間隔で行った。全ての試料を、バッファ-2 添加の正確に16分後に測定した。測定時間は、1試料当たり10秒である。

20

【0041】

化合物 (I) 及び (II) の PPAR 作動薬活性並びに化合物 (I) 、 (II) 及び (III) の PPAR 作動薬活性は、同様な方法で測定することができる。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/013046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/421 A61P9/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/192956 A1 (MAIER CLAUS-JURGEN ET AL) 30 September 2004 (2004-09-30) paragraph '0006! claim 6	1
Y	WO 00/64888 A (AVENTIS PHARMACEUTICALS PRODUCTS INC; JAYYOSI, ZAID; MCGEEHAN, GERARD,) 2 November 2000 (2000-11-02) claims 69-79	1
X	WO 03/020269 A (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH) 13 March 2003 (2003-03-13) claims 1,15	2,3
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 February 2006		01/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bonzano, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/013046

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/082621 A (BETHESDA PHARMACEUTICALS, INC; UNIVERSITY OF MISSISSIPPI; PERSHADSINGH) 30 September 2004 (2004-09-30) page 2, paragraph 6	1-3
Y	WO 2004/103997 A (PFIZER PRODUCTS INC; CHANG, GEORGE) 2 December 2004 (2004-12-02)	1-3
X	page 1, paragraph 1 page 5, line 30 - page 6, line 2	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/013046

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004192956 A1	30-09-2004	NONE	
WO 0064888 A	02-11-2000	AU 781266 B2 AU 4689500 A BR 0010605 A CA 2370250 A1 CN 1349525 A CZ 20013833 A3 EE 200100556 A EP 1177187 A1 HR 20010795 A1 HU 0201291 A2 JP 2002543073 T MX PA01010880 A NO 20015075 A NZ 515086 A PL 351409 A1 SK 15532001 A3 ZA 200108798 A	12-05-2005 10-11-2000 13-02-2002 02-11-2000 15-05-2002 13-02-2002 17-02-2003 06-02-2002 28-02-2003 28-09-2002 17-12-2002 06-05-2002 23-11-2001 31-10-2003 22-04-2003 04-06-2002 05-03-2003
WO 03020269 A	13-03-2003	AU 2002333456 A2 BG 108598 A BR 0212158 A CA 2458210 A1 CN 1549713 A EE 200400059 A EP 1425014 A1 HR 20040199 A2 HU 0401564 A2 JP 2005525294 T MA 27134 A1 MX PA04001850 A NZ 531440 A PL 367342 A1 US 2003144332 A1	18-03-2003 31-03-2005 13-07-2004 13-03-2003 24-11-2004 15-04-2004 09-06-2004 30-04-2005 29-11-2004 25-08-2005 03-01-2005 15-06-2004 28-10-2005 21-02-2005 31-07-2003
WO 2004082621 A	30-09-2004	NONE	
WO 2004103997 A	02-12-2004	CA 2525501 A1	02-12-2004

フロントページの続き

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

(72)発明者 ヴォルフガング・リンツ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 シュテファン・シェーファー

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 オイゲン・ファルク

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

(72)発明者 ハンス - ルートヴィヒ・シェーファー

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ - アベンティス・ドイツ
ラント・ゲー・エム・ペー・ハー

F ターム(参考) 4C056 AA01 AB01 AC02 AD01 AE03 BA08 BC01

4C086 AA01 AA02 BC69 MA01 MA04 NA14 ZA36