

(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2005-515973

(P2005-515973A)

(43) 公表日 平成17年6月2日(2005.6.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 07 K 7/54	C 07 K 7/54	4 C 08 4
A 61 K 38/00	A 61 P 1/02	4 H 04 5
A 61 P 1/02	A 61 P 9/10	
A 61 P 9/10	A 61 P 9/10	1 O 1
A 61 P 11/00	A 61 P 9/10	1 O 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-536266 (P2003-536266)	(71) 出願人	500020760
(86) (22) 出願日	平成14年10月17日 (2002.10.17)		ザ・ユニバーシティ・オブ・クイーンズラ
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月17日 (2004.6.17)		ンド
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/001427		オーストラリア4072クイーンズランド
(87) 国際公開番号	W02003/033528		州セント・ルチア
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003.4.24)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	PR 8334		弁理士 青山 稔
(32) 優先日	平成13年10月17日 (2001.10.17)	(74) 代理人	100067035
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Gタンパク質結合受容体アンタゴニストとしての環状ペプチド

(57) 【要約】

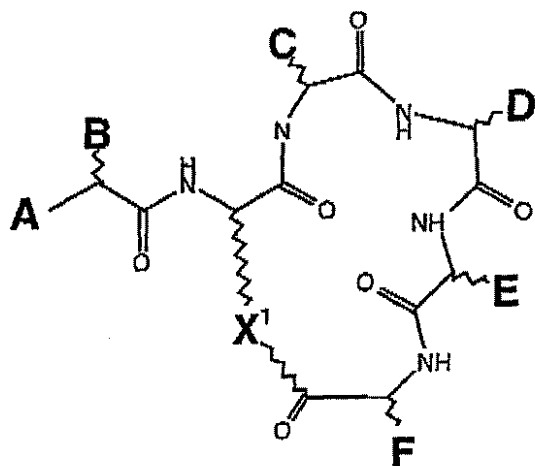
本発明は、Gタンパク質結合受容体の活性を調整する能力を有する新規の環状化合物に関する。この化合物は、好ましくはアンタゴニストとして作用する。好ましい実施態様において、本発明は、C5a受容体の環状ペプチドおよびペプチド様アンタゴニストを提供する。このものは多形核白血球およびマクロファージ上のC5a受容体に対して活性である。本発明の化合物は、強力かつ選択的であり、種々の炎症状態の処置に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G タンパク質結合受容体のアンタゴニストであり、アゴニスト活性を実質的に有さない化合物であって、下記の一般式：

【化 1】



10

[式中、A は、H、アルキル、アリール、 NH_2 、NH - アルキル、N (アルキル) $_2$ 、NH - アリール、NH - アシル、NH - ベンゾイル、 NH SO_3 、 NH SO_2 - アルキル、 NH SO_2 - アリール、OH、O - アルキルまたは O - アリールであり；

20

B は、アルキル、アリール、フェニル、ベンジル、ナフチルもしくはインドール基、または L - フェニルアラニンや L - フェニルグリシンなどの D - もしくは L - アミノ酸の側鎖であり、しかし、グリシン、D - フェニルアラニン、L - ホモフェニルアラニン、L - トリプトファン、L - ホモトリプトファン、L - チロシンまたは L - ホモチロシンの側鎖でなく；

C は、小さい置換基であり、しかし、イソロイシン、フェニルアラニンまたはシクロヘキシルアラニンなどのかさ高い置換基でなく；

D は、中性 D - アミノ酸の側鎖であり、しかし、グリシンや D - アラニンの側鎖などの小さい側鎖、D - トリプトファンなどのかさ高い平面側鎖、または D - アルギニンや D - リシンなどのかさ高い電荷側鎖でなく；

30

E は、かさ高い置換基であり、または L - 1 - ナフチルもしくは L - 3 - ベンゾチエニルアラニンであり、しかし、D - トリプトファン、L - N - メチルトリプトファン、L - ホモフェニルアラニン、L - 2 - ナフチル - L - テトラヒドロイソキノリン、L - シクロヘキシルアラニン、D - ロイシン、L - フルオレニルアラニンまたは L - ヒスチジンの側鎖でなく；

F は、L - アルギニン、L - ホモアルギニン、L - シトルリンまたは L - カナバニンの側鎖、あるいはこれらのバイオ同配体であり；

X は、 $-(\text{CH}_2)_n \text{NH}-$ または $-(\text{CH}_2)_n \text{S}-$ 、n が 1 ~ 4 の整数； $-(\text{CH}_2)_2 \text{O}-$ ； $-(\text{CH}_2)_3 \text{O}-$ ； $-(\text{CH}_2)_3-$ ； $-(\text{CH}_2)_4-$ ； $-\text{CH}_2 \text{COCH}_2 \text{R NH}-$ ；あるいは $-\text{CH}_2 \text{CHCOCH}_2 \text{R NH}-$ 、R が普通のまたは稀なアミノ酸の側鎖である]

40

を有する環状ペプチドまたはペプチド様化合物（ただし、この化合物は AcF-[OPdChaWR]（化合物 1）ではない）である化合物。

【請求項 2】

C が、D -、L - またはホモ - アミノ酸であるが、イソロイシン、フェニルアラニンまたはシクロヘキシルアラニンでない、請求項 1 の化合物。

【請求項 3】

C が、グリシン、アラニン、ロイシン、バリン、プロリン、ヒドロキシプロリンまたは

50

チオプロリンの側鎖である、請求項 1 の化合物。

【請求項 4】

D が、中性 D - アミノ酸の側鎖であるが、グリシン、D - アラニン、D - トリプトファン、D - アルギニンまたは D - リシンの側鎖でない、請求項 1 - 3 のいずれかの化合物。

【請求項 5】

D が、D - ロイシン、D - ホモロイシン、D - シクロヘキシルアラニン、D - ホモシクロヘキシルアラニン、D - バリン、D - ノルロイシン、D - ホモノルロイシン、D - フェニルアラニン、D - テトラヒドロイソキノリン、D - グルタミン、D - グルタメートまたは D - チロシンの側鎖である、請求項 4 の化合物。

【請求項 6】

E が、かさ高い置換基であり、または L - 1 - ナフチルもしくは L - 3 - ベンゾチエニルアラニンであるが、D - トリプトファン、L - N - メチルトリプトファン、L - ホモフェニルアラニン、L - 2 - ナフチル - L - テトラヒドロイソキノリン、L - シクロヘキシルアラニン、D - ロイシン、L - フルオレニルアラニンまたは L - ヒスチジンの側鎖でない、請求項 1 - 5 のいずれかの化合物。

【請求項 7】

E が、L - フェニルアラニン、L - トリプトファンおよび L - ホモトリプトファンよりなる群から選ばれるアミノ酸の側鎖である、請求項 6 の化合物。

【請求項 8】

F が、L - アルギニン、L - ホモアルギニン、L - シトルリンまたは L - カナバニンの側鎖、あるいはこれらのバイオ同配体である、請求項 1 - 7 のいずれかの化合物。

【請求項 9】

n が 2 または 3 である、請求項 1 - 8 のいずれかの化合物。

【請求項 10】

A が、アセタミド基、アミノメチル基または置換もしくは非置換スルホナミド基である、請求項 1 - 9 のいずれかの化合物。

【請求項 11】

置換スルホナミド上の置換基が、1 ~ 6 炭素原子のアルキル鎖またはフェニルもしくはトルイル基である、請求項 10 の化合物。

【請求項 12】

アルキル鎖が 1 ~ 4 炭素原子を有する、請求項 11 の化合物。

【請求項 13】

化合物が、C5a 受容体、バソプレシン受容体またはニューロキニン受容体に対するアンタゴニスト活性を有する、請求項 1 - 12 のいずれかの化合物。

【請求項 14】

化合物が、C5aR に対するアンタゴニスト活性を有するが、C5a アゴニスト活性を有さない、請求項 13 の化合物。

【請求項 15】

化合物が、アンタゴニスト活性をサブマイクロモル濃度で有する、請求項 1 - 14 のいずれかの化合物。

【請求項 16】

化合物が、受容体親和性 $IC_{50} < 25 \mu M$ およびアンタゴニスト強度 $IC_{50} < 1 \mu M$ を有する、請求項 15 の化合物。

【請求項 17】

化合物が、化合物 2 ~ 6、10 ~ 15、17、19、20、22、25、26、28、30、31、33 ~ 37、39 ~ 45、47 ~ 50、52 ~ 58 および 60 ~ 70 よりなる群から選ばれる、請求項 16 の化合物。

【請求項 18】

化合物が、化合物 33、化合物 60 または化合物 45 である、請求項 17 の化合物。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

請求項 1 - 18 のいずれかの化合物を、薬学的に許容される担体または賦形剤とともに含む組成物。

【請求項 20】

G タンパク質結合受容体により調整される病的状態の処置方法であって、請求項 1 - 18 のいずれかの化合物の有効量を、該処置を必要とする哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【請求項 21】

G タンパク質結合受容体により調整される状態が、C5a 受容体により調整される状態である、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

状態が、C5a の過剰発現または過小調節を含む、請求項 21 の方法。

【請求項 23】

状態が、関節リウマチ、成人呼吸切迫症候群 (ARDS)、全身性エリテマトーデス、組織拒絶反応症、虚血性心疾患、再灌流障害、敗血症ショック、歯肉炎、腺維症、粥状動脈硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、喘息、痴呆、中枢神経系障害、肺創傷疾患、体外透析後症候群、および乾癬、湿疹、接触性皮膚炎などの皮膚炎症性障害よりなる群から選ばれる、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

再灌流障害の処置方法であって、請求項 1 - 18 のいずれかの化合物または化合物 1 の有効量を、該処置を必要とする哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、G タンパク質結合受容体の活性を調整する能力を有する新規の環状化合物に関する。この化合物は、好ましくはアンタゴニストとして作用する。好ましい実施態様において、本発明は、C5a 受容体の環状ペプチドおよびペプチド様アンタゴニストを提供する。このものは多形核白血球およびマクロファージ上の C5a 受容体に対して活性である。本発明の化合物は、強力かつ選択的であり、種々の炎症状態の処置に有用である。

【0002】

発明の背景

特許および特許出願を含む、本明細書に引用されたすべての文献は、出典明示により本明細書の一部とする。いかなる文献も先行技術を構成すると認められるものではない。文献の説明において、これらの著者が主張することを述べるが、本出願人は、引用文献の正確さおよび妥当性について争う権利を留保する。明確に理解されるように、本明細書に多くの先行公表が引用されているが、この引用が、オーストラリアおよび他の国における当技術分野での一般知識の部分を構成することの容認を形成するものではない。

【0003】

G タンパク質結合受容体は、人体で広く認められており、既知細胞受容体型の約 60 % を含み、非常に広範な外因性リガンドについて細胞膜を通るシグナル伝達を仲介する。このものは、生理学および病態生理学的プロセスの種々のアレイに参与する。このプロセスには、限定でないが、心臓血管系、中枢および末梢神経系、生殖系、代謝系、消化系、免疫炎症系および成長の障害、ならびに他の調節的および増殖的障害に関連するものである。G タンパク質結合受容体の機能を選択的に調整する物質は、重要な医療的適用を有する。これらの受容体は、そのシグナル伝達における極めて重要な役割からして、主要な薬物標的であると認められることが増えてきている (G protein-coupled Receptors, IBC Biomedical Library Series, 1996)。

【0004】

最もよく研究された G タンパク質結合受容体のひとつは C5a についての受容体である。C5a は、既知の最も強力な走化性物質のひとつであり、好中球およびマクロファージ

10

20

30

40

50

を損傷部位に動員し、それらの形態を変え、顆粒減少を誘発し、カルシウム可動、血管透過性（浮腫）および好中球接着を増加し、平滑筋を収縮し、ヒスタミン、TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-8、プロスタグランジンおよびロイコトリエンを含む炎症メディエーターの放出およびリソソーム酵素の放出を促進し、酸素ラジカルの形成を促進し、抗体の産生を高める（Gerard and Gerard, 1994）。

【0005】

C5aの過剰発現および過小調節は、免疫系仲介炎症状態の病因に関与する。例えば、関節リウマチ、成人呼吸切迫症候群（ARDS）、全身性エリテマトーデス、組織拒絶反応症、虚血性心疾患、再灌流障害、敗血症ショック、乾癬、歯肉炎、粥状動脈硬化症、アルツハイマー病、肺創傷疾患、体外透析後症候群およびその他の種々の症状に関与する（Whaley 1987; Sim 1993）。

10

【0006】

C5aの炎症後作用を制限する物質は、慢性炎症ならびにその随伴疼痛および組織障害を抑制するのに効力を有する。この理由によって、C5aとその受容体との結合を防止する分子は、補体活性化によって起こされた慢性炎症障害の処置に有用である。そのような化合物も補体媒介免疫メカニズムに貴重な新しい観点を提供する。

【0007】

われわれの前の出願PCT/AU98/00490（その全開示を出典明示により本明細書の一部とする）において、ヒトC5aのC末端のいくつかの類似体についての三次元構造を記載し、その情報を、C5aのアゴニストまたはアンタゴニストとして挙動する、ヒトC5a受容体（C5aR）に結合する新規化合物を設計するのに使用した。かつて、推定アンタゴニストは受容体結合およびアンタゴニスト活性にC末端アルギニンおよびC末端カルボキシレートを必要とすると考えられていた（Kontekatis et al., 1994）。PCT/AU98/00490において、実際に末端カルボキシレート基を、C5aRとの高度の結合親和性あるいはアンタゴニスト活性に一般的に必要なでないことを明らかにした。それに代えて、今まで認識されていなかった構造特性、回転配座が、好中球上のヒトC5a受容体との高い結合親和性について要の認識特性であることを発見した。これらの知見を用いて、われわれは、C5a受容体との相互作用についての疎水性アレイ中に疎水性基を集合せしめうる拘束的構造テンプレートを設計した。

20

【0008】

われわれの前出願中に同定された最も強力な化合物における各アミノ酸残基での構造を変えることによる効果を調べて、今回、ヒト好中球上のC5a受容体の環状アンタゴニストについてのさらなる例を開発し、一連の化合物について強力なC5aRアンタゴニスト活性を同定した。これらの各化合物はPCT/AU98/00490で規定された一般的な三次元構造必要条件を満足する環状の骨格（scaffold）を含むが、今回、この環に接着する特定の置換基が驚くべきことに非常に予期できない結果をもたらし、前出願PCT/AU98/00490では正確に予測できなかった高と低の両方のアンタゴニスト効力をつくることを見いだした。これらの驚くべき新知見によって、C5a受容体の活性アンタゴニズムについての必要な薬種を純化し、さらに明確にできる。本明細書に記載の予期せざる構造-活性の関係は、ヒト多形核白血球（好中顆粒球）上のC5a受容体の活性アンタゴニズムについて純化された構造的薬物運搬を明確にする。この薬物運搬は他のヒトおよび哺乳動物の細胞上のC5a受容体についても適切であると思われる。

30

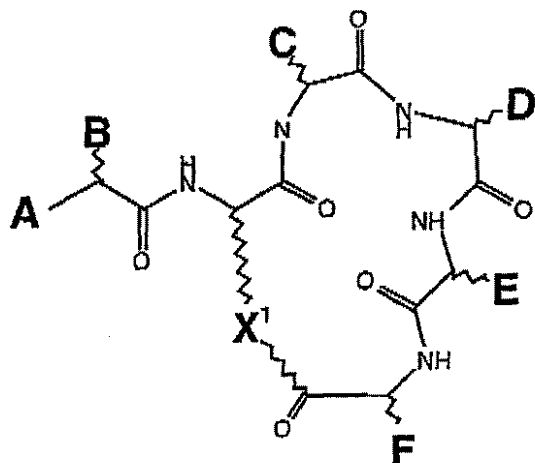
40

【0009】

発明の要旨

第1態様において、本発明は、Gタンパク質結合受容体のアンタゴニストである化合物を提供する。このものは、アゴニスト活性を実質的に有さず、下記の式Iの環状ペプチドまたはペプチド様化合物である。

【化 1】



10

【0010】

式中、Aは、H、アルキル、アリール、 NH_2 、NH-アルキル、N(アルキル) $_2$ 、NH-アリール、NH-アシル、NH-ベンゾイル、 NHSO_3 、 NHSO_2 -アルキル、 NHSO_2 -アリール、OH、O-アルキルまたはO-アリールである。

【0011】

Bは、アルキル、アリール、フェニル、ベンジル、ナフチルもしくはインドール基、またはL-フェニルアラニンやL-フェニルグリシンなどのD-もしくはL-アミノ酸の側鎖であるが、しかし、グリシン、D-フェニルアラニン、L-ホモフェニルアラニン、L-トリプトファン、L-ホモトリプトファン、L-チロシンまたはL-ホモチロシンの側鎖でない。

20

【0012】

Cは、小さい置換基、例えば、グリシン、アラニン、ロイシン、バリン、プロリン、ヒドロキシプロリンまたはチオプロリンなどのD-、L-もしくはホモアミノ酸の側鎖であるが、しかし、好ましくは、かさ高い置換基、例えば、イソロイシン、フェニルアラニンまたはシクロヘキシルアラニンでない。

30

【0013】

Dは、D-ロイシン、D-ホモロイシン、D-シクロヘキシルアラニン、D-ホモシクロヘキシルアラニン、D-バリン、D-ノルロイシン、D-ホモノルロイシン、D-フェニルアラニン、D-テトラヒドロイソキノリン、D-グルタミン、D-グルタメートまたはD-チロシンなどの中性D-アミノ酸の側鎖であるが、しかし、好ましくは、グリシンまたはD-アラニンの側鎖などの小さい側鎖、D-トリプトファンなどのかさ高い平面側鎖、あるいはD-アルギニンまたはD-リシンなどのかさ高い電荷側鎖でない。

【0014】

Eは、かさ高い置換基、例えば、L-フェニルアラニン、L-トリプトファンおよびL-ホモトリプトファンよりなる群から選ばれるアミノ酸の側鎖であり、あるいはL-ナフチルもしくはL-3-ベンゾチエニルアラニンであるが、しかし、D-トリプトファン、L-N-メチルトリプトファン、L-ホモフェニルアラニン、L-2-ナフチル-L-テトラヒドロイソキノリン、L-シクロヘキシルアラニン、D-ロイシン、L-フルオレニルアラニンまたはL-ヒスチジンの側鎖でない。

40

【0015】

Fは、L-アルギニン、L-ホモアルギニン、L-シトルリンまたはL-カナバニンの側鎖、あるいはこれらのバイオ同配体であり、すなわち末端のグアニジンまたはウレア基が拘束され、炭素骨格が異なる構造を有する基で置き換えられている側鎖であり、その側鎖が全体として親基と同様に標的タンパク質と反応するような側鎖である。

【0016】

50

Xは、 $-(CH_2)_nNH-$ または $-(CH_2)_nS-$ 、 n が1～4の整数、好ましくは2または3； $-(CH_2)_2O-$ ； $-(CH_2)_3O-$ ； $-(CH_2)_3-$ ； $-(CH_2)_4-$ ； $-CH_2COCHR NH-$ ； $-CH_2CHCOCHR NH-$ 、 R が普通のまたは希なアミノ酸の側鎖；である。

【0017】

ただし、この化合物は、下記に示す化合物1ではない。

Cにおいて、ヒドロキシプロリンおよびチオプロリンのシスおよびトランス両方の型を使用できる。

【0018】

好ましくは、Aは、アセトアミド基、アミノメチル基、あるいは置換または非置換のスルホンアミドである。

10

好ましくは、Aが置換スルホンアミドであるとき、置換基は、1～6、好ましくは1～4炭素原子のアルキル鎖、あるいはフェニルまたはトリル基である。

【0019】

好ましくは、Gタンパク質結合受容体はC5a受容体である。しかし、われわれの前出願の代表的化合物もバソプレシンおよびニューロキニン受容体で顕著な結合親和性を有することを見いだしたので、これらの受容体も本発明の範囲内にある。

【0020】

特に好ましい実施態様において、化合物はC5aに対するアンタゴニスト活性化を有し、C5aアゴニスト活性を有さない。

20

【0021】

本発明の環状化合物は、好ましくはヒトまたは哺乳動物の細胞上のC5a受容体のアンタゴニストである。この細胞には、限定でないが、ヒト多形核白血球およびヒトマクロファージがある。本発明の化合物は、C5a受容体に好ましくは強力かつ選択的に結合し、さらに好ましくはサブマイクロモル濃度で強力なアンタゴニスト活性を有する。さらにより好ましくは、化合物は受容体親和性 $IC_{50} < 25 \mu M$ およびアンタゴニスト強度 $IC_{50} < 1 \mu M$ を有する。

【0022】

さらに好ましくは、化合物は、本明細書に記載の化合物2～6、10～15、17、19、20、22、25、26、28、30、31、33～37、39～45、47～50、52～58および60～70よりなる群から選ばれる。最も好ましくは、化合物は、化合物33、化合物60または化合物45である。

30

【0023】

本明細書の目的において、用語「アルキル」は、1～6、好ましくは1～4炭素の直鎖、分枝または環状の置換または非置換のアルキル鎖を意味する。最も好ましくは、アルキル基はメチル基である。用語「アシル」は、1～6、好ましくは1～4炭素の置換または非置換のアシルを意味する。最も好ましくは、アルキル基はアセチルである。用語「アリール」は、置換または非置換のホモ環またはヘテロ環を意味し、好ましくは環が5または6員環である。

【0024】

40

「普通の」アミノ酸は、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパルテート、アスパラギン、グルタメート、グルタミン、システイン、メチオニン、アルギニン、リシン、プロリン、セリン、トレオニン、ヒスチジンよりなる群から選ばれるL-アミノ酸である。

【0025】

「希な」アミノ酸には、限定でないが、D-アミノ酸、ホモアミノ酸、N-アルキルアミノ酸、デヒドロアミノ酸、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン以外）、オルト-、メタ-もしくはパラ-アミノ安息香酸、オルニチン、シトルリン、カナバニン、ノルロイシン、 γ -グルタミン酸、アミノ酪酸、L-フルオレニルアラニン、L-3-ベンゾチエニルアラニン、 β -ジ置換アミノ酸がある。

50

【 0 0 2 6 】

第 2 態様において、本発明は、本発明の化合物を薬学的に許容される担体または賦形剤とともに含む組成物を提供する。

【 0 0 2 7 】

本発明の組成物は、経口、非経口、噴霧、鼻腔内、膜貫通または他の局所適用での使用のために製剤し得るが、経口または局所の製剤が好ましい。局所投与には、ジメチルスルホネートまたはプロピレングリコールなどのビヒクルを使用し得る。他のビヒクルも処置される組織表面に応じて好ましい。

【 0 0 2 8 】

本発明の化合物は、すべてではないが大部分が、代謝酵素、例えば、消化管、血液、肺などの細胞内酵素の存在で安定であると思われる。この安定性は、当業者に既知の通常的な方法で容易に試験できる。

【 0 0 2 9 】

所望の経路によるいかなる投与のためにも適した製剤を、標準的な方法で調製できる。例えば、下記のような周知のテキストブックを参照できる。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, vol. II, 2000 (20th edition), A. R. Gennaro (ed), Williams & Wilkins, Pennsylvania.

【 0 0 3 0 】

第 3 の態様において、本発明は、G タンパク質結合受容体により仲介される病的状態の処置法を提供する。これは、本発明の化合物の有効量を処置を必要とする哺乳動物または脊椎動物に投与する工程を含む。

【 0 0 3 1 】

G タンパク質結合受容体により仲介される状態は、好ましくは C 5 a 受容体により仲介される状態であって、さらに好ましくは C 5 a の過剰発現または過小調節を含む。このような状態には、限定でないが、関節リウマチ、成人呼吸切迫症候群 (A R D S)、全身性エリテマトーデス、組織拒絶反応症、虚血性心疾患、再灌流障害、敗血症ショック、歯肉炎、線維症、粥状動脈硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、喘息、痴呆、中枢神経系障害、肺創傷疾患、体外透析後症候群、および乾癬、湿疹、接触性皮膚炎などの皮膚炎症性障害がある。

【 0 0 3 2 】

ひとつの好ましい実施態様において、この状態は関節リウマチである。

第 2 の好ましい実施態様において、この状態は再灌流障害である。この第 2 実施態様において、式 I についての条件が適用されないことが明確に理解されるであろう。

【 0 0 3 3 】

本発明がいずれにしても特定の動物または種類の処置に限定されるものではないが、本発明の化合物がヒトの医療上の処置に有用であり、さらに動物の獣医学上の処置に有用であることを特に理解すべきである。動物には、イヌやネコなどの愛玩動物、ウシ、ウマ、ヒツジなどの家畜、およびヒト以外の霊長類、大きいウシ科、ネコ科、有蹄類、イヌ科を含む動物園の動物がある。処置し得る他の種類に爬虫類、魚類、両生類がある。

【 0 0 3 4 】

化合物は、適当な用量および適当な経路で投与できる。経口、局所、膜貫通または鼻腔内の投与が、その経路での大きい便利さおよび許容性からして、好ましい。局所適用には、腔または直腸投与のためのベッサリーまたは座剤などの製剤の使用、あるいは耳や眼への局所投与のための水滴剤の使用がある。有効量は、個々の処置について、処置される症状の性質、年齢、体重、健康状態などに依存する。これは、担当の医師または獣医師の裁量である。適当な用量レベルは、当技術分野でよく知られる方法を用いて、試行錯誤の試験により容易に決定できる。

【 0 0 3 5 】

本明細書の目的において、用語「含むこと」は、「含んでいること」であって、「限定されること」を意味しないことは、明確に理解されるであろう。用語「含む」は対応する

10

20

30

40

50

意味を有する。

【0036】

(図面の簡単な説明)

図1は、静脈内(A)、経口(B)、局所(C)、AcF-[OPdChaWR]および適当な対照(D)による皮膚アルサス(Arthus)反応に関連する血管滲出の阻害を示す。

図2は、静脈内(A)、経口(B)、局所(C)のAcF-[OPdChaWR]および適当な対照(D)による皮膚アルサス反応に関連する循環TNF- 上昇の阻害を示す。

【0037】

図3は、静脈内、経口、局所のAcF-[OPdChaWR]による皮膚アルサス反応に関連する病因指標の低下を示す。

10

図4は、消化器虚血-再灌流誘発の腸浮腫に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【0038】

図5は、消化器虚血-再灌流誘発の好中球減少症に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

図6は、消化器虚血-再灌流誘発の血漿TNF- 上昇に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【0039】

図7は、消化器虚血-再灌流誘発の血漿ハプトグロビン上昇に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

20

図8は、消化器虚血-再灌流誘発のアスパルテート・アミノトランスフェラーゼに対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【0040】

図9は、消化器虚血-再灌流の組織病理に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

図10は、2~14日に経口投与されたAcF-[OPdChaWR]による関節炎右膝関節肥厚の阻害を示す。

【0041】

図11は、関節洗浄における右膝関節TNF- およびIL-6レベルの阻害を示す。「非処置」は、AcF-[OPdChaWR]で処置されていない動物を意味する。ただし、右膝は抗原後に感作を受けた。

30

【0042】

図12は、3D53のDMSO/蒸留水またはPG・H₂O液の皮膚適用が15分以内に循環血漿中にC5aアンタゴニストの出現をもたらすこと、および有意のレベルが少なくとも4時間持続することを示す。ポイントは各群(n=6~8)で平均±SEMを表示する。

【0043】

図13は、C5aアンタゴニストの局所投与によるC5a誘発の好中球減少症の阻害を示す。結果を0時間ベースラインからの%変化で表す。

図14は、ラットにおいてC5aアンタゴニストの局所投与が静注のLPSの全身的作用を阻害することを示す。データによると、静脈(1mg/kg)または皮膚適用による局所(50mg/kg全適用量:溶媒ビヒクル50%DMSO/50%H₂O)での種々のC5aアンタゴニストの投与が静注LPS(1mg/kg)による好中球減少症を阻害する。(a)3D53(化合物1)、(b)化合物45、(c)化合物17。

40

【0044】

図15は、ラットでの灌流時における(A)クレアチニン・キナーゼ(CK)および(B)乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血漿レベルの増加に対するC5aアンタゴニストAcF-[OPdChaWR]の作用を示す。データは平均±SEM(n=6~10)を表示する。* P<0.05、全薬物処置群対虚血/灌流(I/R)単独群; † P<0.05、全薬物処置群対シャム手術群。

【0045】

50

図 16 は、ラットでの灌流 2、3、4 時間後における (A) アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および (B) アスパラテートアミノトランスフェラーゼ (AST) の血漿レベルの増加に対する C5a アンタゴニスト AcF-[OPdChaWR] の作用を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 6 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、全薬物処置群対虚血 / 灌流 (I/R) 単独群; † $P < 0.05$ 、全薬物処置群対シャム手術群。

【0046】

図 17 は、ラットにおける (A) 循環 PMN、(B) 筋肉ミエロペルオキシダーゼ (MPO)、(C) 肺 MPO、(D) 肝 MPO レベルを示す。レベルはラットにおける試験完了時に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血 / 灌流 (I/R) 単独群; † $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

10

【0047】

図 18 は、試験完了時に採取されたラット肝ホモゲネートサンプル中の TNF- α レベルを示す。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血 / 灌流 (I/R) 単独群; † $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【0048】

図 19 は、試験完了時のラット後足筋肉の浮腫量 (ウェット・ツー・ドライ比率) を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血 / 灌流 (I/R) 単独群; † $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【0049】

発明の詳細な説明

20

一般的に、用語「処置する」「処置」および類似用語は、所望の薬理学的および/または生理学的作用を得るために対象、組織または細胞に影響を及ぼすことを意味して、本明細書で使用する。作用は、疾患やその兆候または症候を完全にまたは部分的に防ぐことで予防的であり、および/または疾患を部分的または完全に治癒することで治療的であり得る。本明細書で用いられる「処置する」は、脊椎動物、哺乳類、特にヒトでの疾患のすべての治療または予防を包含する。それには、疾患に罹り得るが、まだそうとは診断されていない対象における発症の予防; 疾患の阻止、すなわち疾患進行の停止; 疾患の作用の緩解または軽減、すなわち疾患作用の退行がある。

【0050】

本発明は、疾患の軽減に有用な種々の医薬組成物を含む。本発明のひとつの実施態様における医薬組成物は、式 I の化合物、あるいはその類似体、誘導体または塩と 1 以上の医薬活性物質、または式 I の化合物と 1 以上の医薬活性物質の組合せ物を、担体、賦形剤、添加剤または補助剤を用いて、対象への投与に適した形態につくることにより調製する。

30

【0051】

よく使用される担体または補助剤には、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、乳糖、マニトールおよび他の糖類、タルク、乳タンパク、ゼラチン、デンプン、ビタミン、セルロースおよびその誘導体、動物性および植物性油、ポリエチレングリコール、および滅菌水、アルコール類、グリセロールおよび多価アルコールなどの溶媒がある。静脈用ビヒクルは液体または栄養充填物を含む。保存剤には、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスがある。他の薬学的に許容される担体には、水性溶液、塩を含む非毒性賦形剤、保存剤、緩衝液などがあり、例えば、下記に記載されている。Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed. Williams & Wilkins (2000) および The British National Formulary 43rd ed. (British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2002; <http://bnf.rhn.net>) (出典明示により本明細書の一部とする)。医薬組成物の種々の成分の pH および厳密な濃度は、通常の技術で調整できる。参照、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7th ed., 1985)。

40

【0052】

医薬組成物は、好ましくは用量単位で調製し投与する。固体の用量単位には、錠剤、カプセル、座剤がある。対象の処置のために、化合物の活性、投与形態、障害の性質および重篤度、対象の年齢および体重に従って、異なる 1 日用量を用い得る。しかし、ある種の

50

状況においては、さらに高いまたは低い１日用量が適している。１日用量の投与は、個々の用量単位の形態での単回投与またはいくつかの小用量単位の投与で、あるいは具体的な間隔での分割用量の多回投与でもって行い得る。

【 0 0 5 3 】

本発明の医薬組成物は、医療的有効量で局所的または全身的に投与できる。この使用での有効量は、もちろん、疾患の重篤度ならびに対象の体重および一般的状態に依存する。典型的には、インビトロで使用される用量は、医薬組成物のインシトゥ投与に有用な量について役立つ指標であり、また動物モデルを用いて、細胞毒性副作用の処置のための効果的な量を決定し得る。種々の考察すべき事項が、例えば、Langer, Science, 249: 1527, (1990) に記載されている。経口使用の製剤は硬カプセルの形態であり得る。カプセル中
10
で、活性成分を不活性の固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合する。また、経口使用の製剤は軟ゼラチンカプセルの形態であり得る。カプセル中で、活性成分を水または油性媒体、例えば、ピーナッツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合する。

【 0 0 5 4 】

水性懸濁液は、活性物質を水性懸濁液の製造に適した賦形剤とともに混合物中に通常含有する。このような賦形剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、アカシアガムなどの懸濁剤；分散剤や湿潤剤、(a) レシチンなどの自然界に存在のホスファチドであり得るもの；(b) アルキレンオキシドと脂肪酸の縮合産物、例えば、ポリオキシエチレンステアレート；(c) エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合産物、例えば、ヘプタデカエチルエノキシセタノール；(d) エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導された部分的エステル縮合産物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート；または(e) エチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトール無水物から誘導された部分的エステル縮合産物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。
20

【 0 0 5 5 】

医薬組成物は、無菌の注射用水性または油性の懸濁液であり得る。この懸濁液は、上記のような適当な分散剤や湿潤剤および懸濁剤を用いる既知の方法により製剤できる。無菌の注射用製剤は、非経口的に許容される希釈剤すなわち溶媒中無菌の注射用溶液または懸濁液、例えば、1, 3 - ブタノール溶液であり得る。使用し得る許容のビヒクルおよび溶媒には、水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム液がある。さらに、無菌の不揮発性油を溶媒または懸濁媒体として通常的に使用できる。この目的のために、すべての緩和な不揮発性油を使用でき、合成モノまたはジグリセリドがある。さらに、オレイン酸などの脂肪酸を注射用の調製に使用できる。
30

【 0 0 5 6 】

式 I の化合物は、リポソーム送達システムの形態、例えば、小さい単層小胞、大きい単層小胞、多層小胞などの形態でも投与し得る。リポソームは、種々のホスホリピド、例えば、コレステロール、ステアリルアミン、ホスファチジルコリンなどから形成され得る。

【 0 0 5 7 】

本発明の式 I の化合物についての用量レベルは、体重 k g 当たり約 0.5 m g から約 20 m g の範囲に通常あり、好ましい用量は 1 日体重 k g 当たり約 0.5 m g から約 10 m g の範囲である（患者 1 人あたり 1 日に約 0.5 g から約 3 g）。1 回量をつくるための担体材料と組合せ得る活性成分の量は、処置される対象および投与の特定の状態によって変わってくる。例えば、ヒトへの経口投与を意図する製剤は、約 5 m g から 1 g の活性化合物を、適当で便利な量の担体材料とともに含有し得る。担体は全組成物の約 5 から 90 % であり得る。用量単位形態は、約 5 m g から 500 m g の活性成分を一般的に含有し得る。
40

【 0 0 5 8 】

しかし、理解されるように、特定の患者についての具体的な用量レベルは、種々の因子
50

によって変わってくる。それには、使用する具体的な化合物の活性、年齢、体重、全身の健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、排泄速度、併用薬剤、治療を施そうとする疾患の重篤度などがある。

【0059】

さらに、本発明化合物のいくつかは、水または共通の有機溶媒と溶媒和物を形成し得る。この溶媒和物は、本発明の範囲に包含される。

本発明の化合物はさらに、他の化合物と追加的に組み合わせられて、効果的な組み合わせをつくり得る。医薬活性物質と本発明の式Ⅰの化合物とのすべての化学的に両立し得る組合せを含むことを意図する。

明確に理解されるように、医薬製剤、投与経路、用量レベルなどについての上記の説明は等しく化合物1に適用可能である。 10

【0060】

本明細書で使用する略号は次のとおりである。

BOP：ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリ-(ジメチルアミノ)-ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート

C5cR：C5a受容体

dH₂O：蒸留水

D-Cha：D-シクロヘキシルアミン

DIPA：ジイソプロピルエチルアミン

DMF：N,N-ジメチルホルマミド 20

DMSO：ジメチルスルホキシド

HBTU：O-ベンゾトリアゾールN',N',N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート

HEPES：N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]

HPLC：高速液体クロマトグラフィ-

RP-HPLC：逆相高速液体クロマトグラフィ-

i.v.：静脈内

LPS：リボポリサッカライド

PMN：多形核顆粒球 30

po：経口

RMSD：二乗平均平方根偏差

rp-HPLC：逆相高速液体クロマトグラフィ-

TFA：トリフルオロ酢酸；

本明細書を通じて、通常の三文字表記および一文字表記をアミノ酸に使用する。

【0061】

用語「3D53」および「PMX53」は同義語であり、化合物Ac-Phe-[Orn-Pro-dCha-Trp-Arg]を表す。

用語「LP-10」および「PMX-201」は同義語であり、化合物Ac-Phe-[Orn-Pro-dCha-Trp-Cit]を表す。 40

用語「LP-16」および「PMX-205」は同義語であり、化合物HC-[Orn-Pro-dCha-Trp-Arg]（「HC」はヒドロシナメートを示す）を表す。

【0062】

本発明を下記の一般的方法および実施例のみについての参考として記載する。

現在までに試験した式Ⅰの全化合物が広い類似の薬理学的活性を有することを見出した。この活性は、化合物1（3D53またはPMX53とも呼ぶ）の活性に類似するが、個々の化合物の物理化学的性質、効力およびバイオアベイラビリティが具体的な置換基によってある程度異なる。このように、化合物1でインビトロまたはインビボで得られた結果をもって、対応するアッセイにおける式Ⅰの化合物の活性を合理的に推測できるであろう。

【0063】

一般的方法

保護されたアミノ酸および樹脂をNovabiochemから得た。TFA、DIEAおよびDMF(ペプチド合成等級)をAuspepから購入した。すべての他の材料は、特に断わらない限り試薬等級である。暫定的規模での逆相HPLC分離をVydac C18逆相カラム(2.2 × 2.5 cm)で行い、そして分析逆相HPLC分離をWaters Delta-Pak PrepPak C18逆相カラム(0.8 × 10 cm)で行った。これには、溶媒A = 水/0.1% TFAおよび溶媒B = 水10%/アセトニトリル90%、0.09% TFAの勾配混合物を用いた。ペプチドの分子量の測定は電子スプレー質量分析で三重四極子質量分析計(PE SCIEX API III)により記録した。参照(Haviland et al, 1995)。¹H-NMRスペクトルをBruker ARX 500 MHz またはVarian Unity 400分析計で記録した。プロトン移行は2D NMR試験(DFCOSY, TOCSY, NOESY)で測定した。

化合物は質量分析法および逆相分析HPLCで調べた。

【0064】

化合物の合成

直線的ペプチド配列を当業者に周知のマニュアル工程型標準的固相ペプチド合成法(SPPS)により会合した。アミノ酸またはペプチド末端をHBTU、DIEAでインシトゥ中性化で活性にした。カップリングを標準の定量的ニンヒドリン試験でモニターした。Boc化学をアミノ酸の一時的N保護のために用い、Boc基除去のためにTFAで1分間2回処理した。ペプチドを、Novabiochem Boc-D-Arg(Tos)-PMA または Boc-L-Arg(Tos)-PAM 樹脂上で置換値約0.2 - 0.5 nmol/gで合成した。ペプチドを、液体HF(10 mL)、p-クレゾールの-5、1-2時間の処理で完全に脱保護し、開裂した。ペプチドを、逆相HPLC(例えば、勾配: 0% Bから75% B, 60分間以上)で精製し、電子スプレー質量分光法により分析した。

【0065】

あるいは、直線状ペプチドは、Fmoc-D-Arg(Mtr)-Wang 樹脂上でのHBTU/DIEA活性化を用いるFmoc化学により合成できる。Fmoc基除去は、50%ピペリジン/DMFでの2回の1分間処置を用いて行った。95% TFA/2.5% TIPS/2.5% H₂Oを用いる開裂および脱保護でMtr-保護ペプチドを得る。これはRP-MPLCで精製できる。

【0066】

直線状ペプチドの環化についての一般的方法で、ペプチド(1等量)およびBOP(5等量)をDMFに溶かし(10 mMペプチド濃度)、激しく攪拌し、DIEA(15等量)を加える。ほとんどの場合、反応は2時間で完了するが、通常、室温で溶液の攪拌を1夜続ける。DMFを高度の真空、30、回転蒸留器で除去し、RP-HPLCで精製する。遊離N末端を含有する環状ペプチドのために、環化工程の際に一時的N末端保護基としてFmoc基を使用した。DMFを高度の真空、30、回転蒸留器で除去し、ついでペプチドを30%ピペリジン/DMFで1時間、室温で処理し、Fmoc基を除去した。その後、高度真空での溶媒除去およびRP-HPLCによる精製を行った。環合成についての代表的例を下記する。

【0067】

NMR構造決定

¹H-NMRスペクトルを試験化合物(750 μl d₆-DMSO中3 mg、2.5 0)について溶媒対照で、Varian Unity 400分光計により24 で記録した。2次元¹H-NMR NOESY(遅延時間2.0秒、混合時間50-300分)、DFQ-COSYおよびTOCSY(混合時間75分)試験で収集し、相感受性モードで記録した。すべての実験について、データ収集時間 = 0.186秒、スペクトル幅 = 5500 Hz、複数点(t₁軸) = 1024。データは両軸において、ゼロ付加して、1024の実質点へFourier移行した。

【0068】

化合物1についてのNMRデータをSilicon Graphics Ind 計算センターでのTRIAD ソ

10

20

30

40

50

フトウェア (Tripos Assoc.) で処理した。2D NOE 交差ピークを積分し、強 (1.8 - 2.5)、中程度 (2.3 - 3.5) および弱 (3.3 - 5.0) に分類した。暫定的 3 次元構造を、Diana 2.8 (69 距離制約、隣接残基について 27 およびさらに離れるもの 6 を含む) を用いて重複 2 面角制約法 (REDAC) で上限および下限距離制限ファイルから計算した。上限および下限距離制約を MARDIGRAS で正確に計算した。この段階で、可能な水素結合についてペプチドを調べ、結合を距離制約として加えた。50 最低エネルギー Diana 構造を制約分子動力学 (RMD) および制約エネルギー最小化 (REM) の対象とした。REM は、最初に 50 段階急勾配低下、次いで 100 段階共役傾斜最小化法からなる。RMD は、構造の模擬加熱で行い、1 ps につき 300 K、次いで 1 ps につき 500 K で行った。温度を徐々に下げ、2 ps 以上で 300 K、最終的に 2 ps につき 200 K とした。REM を再び 50 段階急勾配低下、200 段階勾配、次いで 300 段階 Powell 最小化を行った。最終構造を調べて、骨格重原子 (N、C および C) を越える平均対の平方自乗平均差異を得る。50 構造中 30 ですべての骨格原子 (O、N、C) につき平方自乗平均 < 0.5 であった。

【0069】

受容体結合アッセイ

新鮮ヒト PMN を (Sanderson et al, 1995) 記載のように単離し、アッセイを行った。それには、緩衝液の 50 mM HEPES、1 mM CaCl_2 、5 mM MgCl_2 、0.5 % ウシ血清アルブミン、0.1 % バシトラシンおよび 100 μM フェニルメチルスルホンフルオリド (PMSEF) を用いた。4 でのアッセイにおいて、緩衝液、非標識ヒト組換え C5a (Sigma) またはペプチド、Hunter/Bolton 標識 ^{125}I -C5a (~20 pM) (New England Nuclear, MA) および PMN (0.2×10^6) を、Millipore Multiscreen アッセイプレート (HV 0.45) に順次加え、最終容量を 200 μl / ウエルとした。60 分間 4 でインキュベートした後、サンプルを濾過しプレートを 1 回緩衝液で洗った。フィルターを乾燥し、パンチし、LKB ガンマ計で計数した。非特異的結合を 1 mM ペプチドまたは 100 nM C5a で調べた。これは典型的に 10 - 15 % の全結合をもたらすものであった。データ解析は非直線的回帰および Dunnett post テストで統計処理した。

【0070】

アンタゴニスト活性についてのミエロペルオキシダーゼ放出アッセイ

細胞を (Sanderson et al, 1995) 記載のように単離し、シトチャラシン B とともにインキュベートした (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 分間、37)。0.15 % ゼラチンおよびペプチドを含む Hank's Balanced Salt 溶液を 96 ウエルプレート (全量 100 μl / ウエル) に加え、次いで 25 μl 細胞 4×10^6 / mL) を加えた。C5a に拮抗する各ペプチドの能力を調べるために、細胞を 5 分間 37 各ペプチドとともにインキュベートし、C5a (100 nM) を加え、さらに 5 分間インキュベートした。次いで、50 μl のリン酸ナトリウム (0.1 M、pH 6.8) を各ウエルに加え、プレートを室温に冷やし、等量のジメトオキシベンジジン (5.7 mg/mL) と H_2O_2 (0.51 %) からなる 25 μl の新鮮混合物を各ウエルに加えた。反応を 10 分で、2 % アジドナトリウムを加えて停止した。吸光度を 450 nm で Bioscan 450 plate reader により測定し、対照値 (ペプチドなし) で修正し、非直線回帰で解析した。

【0071】

抗炎症活性のインビボアッセイ

下記によく知られたインビボアッセイ系を用いて、本発明の化合物の抗炎症活性を調べる。すべてのアッセイデータの解析には、非直線回帰解析、Student's t - 検定、分散分析を用いた。有意水準の閾値は $P < 0.05$ である。

【0072】

(a) カラゲナン足蹠浮腫

麻酔 (腹腔内、ケタミンおよびキシラジン) ウイスターラット (150 - 200 g) またはマウスに滅菌空気 (20 ml 1 日目、10 ml 4 日目) を背中の皮下組織へ注射した。空洞を 6 日後に使用できる。カラゲナン (2 ml、1 % w/w 0.9 % 塩類溶液) を空気ポーチに注

入し、滲出液を10時間後に採取した。試験化合物を6日後に毎日投与し、抗炎症作用を空気ポーチ滲出液中の細胞を示差計数して調べた。動物を注射後の適当な時に殺し、2 ml 0.9%塩類溶液を用いて空洞を洗い、ヘパリンを入れた管に洗液を移し、細胞を血球計およびDiff-Quik染色細胞遠心製剤で計数した。

【0073】

あるいは、通常のカラゲナン足蹠浮腫をウイスターマウスで、カラゲナンを足蹠に注射してつくり、2時間後に可視でき、4時間後に最大となる浮腫が生じた。試験化合物を炎症起剤の40分前に与え、2および4時間後の足蹠をマイクロカリパスで測定した。参照 Fairlie, D. P. et al (1987) および Walker and Whitehouse (1978)。

【0074】

10

(b) アジュバント関節炎

アジュバント関節炎をラット(3種)に、関節原性アジュバントをフロイントアジュバントなどの油状担体とともに尾基部に接種して、微生物学的に(殺菌 *Mycobacterium tuberculosis* を注射)または化学的に(アヴリジンで)起こした(参照 Whitehouse, M. W., Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases, Eds. Greenwald, R. A.; Diamond, H. S.; Vol. 1, pp. 3-16, CRC Press)

【0075】

13日以内に、アジュバント関節炎が、尾の局所的炎症および潰瘍、全4足蹠の腫脹、足蹠および耳の炎症性損傷および体重減少や発熱で表われる。これらの症状は、ヒトの炎症疾患に似ており(Winter and Nuss, 1966)、ヒトで効果を現すインドメサシンやシクロスポリンなどの薬剤により改善される(例えば、Ward and Cloud, 1966)。14日目での薬剤処置をしないと、関節炎ラットに足蹠の肥厚が生じ、血清中のアルブミンが低下し、急性相反応タンパク質が増加し、バルビテュレートによる睡眠時間の延長で表されるように生体異物の肝代謝を抑制した。

20

【0076】

活性を調べるために、アルトリトゲン(0日目)の接種10-13日後に化合物を4日間経口(10 mg/kg/日以下)または腹腔内投与した。足蹠の厚さおよび尾の容量のマイクロカリパス測定、および炎症損傷の観察によって調べたところ、炎症は前足および後足で認められないか、非常に減少していた。動物を18日目に頸部切断で殺した。ただし、炎症徴候がなかった場合は、倫理委員会の特別の許可を得て観察を続けた。試験を続けて情報量を最大にし、化合物間の初期の比較を可能にした。この日常的なアッセイは、ヒトに用いられる抗炎症剤を同定するのに、よく受け入れられる。

30

【0077】

薬物動態

雄および雌のウイスターラット(200-250 g)を、ゾレチル(50 mg/kg)およびキシラジン(10 mg/kg; Lyppard, Australia)の腹腔内投与により麻酔した。面積5 x 10 cmの毛を剃り、ラットの下腹部に印をつけて、その上に薬物を適用した。10 mg/kgのC5aアнтаゴニストを含有する保存液を溶媒プロピレングリコールまたはジメチルスルホキシド中に水で種々の濃度として溶解し、へらでラットの剃毛下腹部に均等に塗った。足の加熱でラットの体重を保持し、血液サンプルを最初の1時間は15分の間隔で、その後は1時間の間隔で計3時間で採取した。

40

【0078】

血液サンプルをヘパリン含有(500単位/μl)の管に直ちにに加え、遠心分離した(11000 x g)。各サンプルの血漿層を取り出し、-20℃で保存した。重水素化内部標準液、²H₃CO-F-[OPdCHaWR]50 μl(50%アセトニトリル/水中5 μg/mL)を加え、攪拌した。サンプルをさらに1:3に高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)級アセトニトリルで希釈し、激しく攪拌し(20秒)、ついで遠心分離した(11000 x g)。この操作でサンプル中に多量の血漿タンパク質を得て、血漿から薬物の完全な抽出をなす。サンプルの液体部分をEppendorf管に入れ、分析まで保存した。

50

【0079】

これらのサンプルを96ウェルプレートに移し、GeneVac 遠心蒸留器で蒸発乾固しついで動相でウェル中に再構築した(20 μ l)。液体クロマトグラフィー(LCMS)によるサンプルの分析を、PE Sciex Qstar Pulsar ESI-TOP 質量分光器と結合したウェルプレート自動サンプラーを備えた Agilent 1100 シリーズ HPLC で行った。濃度を薬物：内部標準のピーク面積比の標準曲線から決定した。標準は、適当な量の薬物および内部標準を非処置ラットからの血漿に加えて調製し、抽出し、実験サンプルと同じ方法で調製した。

【0080】

実施例1：環状化合物の合成

10

環状 AcF-[OPdChaWR](1)の合成

直鎖状ペプチド Ac-Phe-Orn-Pro-dCha-Trp-Arg を、Boc-L-Arg(Tos)-PAM 樹脂(338 mg, SV=0.591 mmol/g)上で、HBTU/DIEA 活性化およびイン・シチュでの中和を用いる、0.20 mmole スケールで Boc 化学によって合成した。樹脂(457 mg)の開裂および脱保護を、-5~0 で1~2時間、HF(10 ml)およびp-クレゾール(1 ml)で処理することによって達成し、粗製ペプチド(160 mg, 90%)を得た。環状化には、DMF(57 mL)中で、15時間、粗製ペプチド(41 mg, 45 μ mol)、BOP(126 mg, 0.28 mmol)および DIEA(158 Ab, 0.9 mmol)を攪拌することが含まれる。該溶媒を真空で除去し、環状ペプチドを rpHPLC(18.8 mg, 47%) Rt=10.8 分(勾配：70% A / 30% B から 0% A / 100% B、30分にわたって)によって精製した。MS:[M+H]⁺(計算値)=896.5, [M+H]⁺(実測値)=896.5。

20

【0081】

環状 AcF-[OPdPheWR](33)の合成

直鎖状ペプチド Ac-Phe-Orn-Pro-dPhe-Trp-Arg を、Boc-L-Arg(Tos)-PAM 樹脂上で、HBTU/DIEA 活性化およびイン・シチュでの中和を用いて、Boc 化学によって合成した。該樹脂の開裂および脱保護を、-5~0 で1~2時間、HF(10 ml)およびp-クレゾール(1 ml)で該樹脂を処理することによって達成し、粗製ペプチドを得た。環状化には、DMF(10 mL)中で、15時間、粗製ペプチド(85 mg)、BOP(200 mg)および DIEA(222 μ L)を攪拌することが含まれる。該溶媒を、真空で除去し、該環状ペプチドを rpHPLC によって精製した(31 mg)。Rt=16.7 分(勾配：70% A / 30% B から 0% A / 100% B、30分にわたって)。MS:[M+H]⁺(計算値)=890.5, [M+H]⁺(実測値)=890.5。

30

【0082】

環状 AcF-[OPdChaFR](60)の合成

直鎖ペプチド Ac-Phe-Orn-ProD-Cha-Phe-Arg を、Boc-L-Arg(Tos)-PAM 樹脂上で、HBTU/DIEA 活性化およびイン・シチュでの中和を用いて、Boc 化学によって合成した。樹脂の開裂および脱保護を、HF(10 ml)およびp-クレゾール(1 ml)で該樹脂を-5~0 で1~2時間処理することによって達成し、粗製ペプチドを得た。環状化には、DMF(1 mL)中で15時間、粗製ペプチド(104 mg)、BOP(57 mg)および DIEA(103 μ L)を攪拌することが含まれる。該溶媒を真空で除去し、環状ペプチドを rpHPLC(52 mg)によって精製した。Rt=11.37 分(勾配：70% A / 30% B ~ 0% A / 100% B、15分にわたって) MS:[M+H]⁺(計算値)=857.5, [M+H]⁺(実測値)=857.4

40

【0083】

環状 AcF-[OpdCha(N-Me-Phe)R](64)の合成

直鎖状ペプチド Ac-Phe-Orn-pro-dCha-(N-Me-Phe)-Arg-OH を、メチル-L-Phe(281 mg, 2 等量)、Fmoc-dCha(275 mg, 2 等量)、Fmoc-Pro(472 mg, 4 等量)、Fmoc-Orn(Boc)(477 mg, 3 等量)、Fmoc-Phe(542 mg, 4 等量)および Ac₂O(4 等量)を用いる Novabiochem の Fmoc-L-Arg(p

50

b f)-樹脂(0.35 mmol/g)上で、HBTU/DIEA活性化およびイン・シチュでの中和を用いるFmoc化学によって合成した。樹脂の開裂および脱保護を、95% TFAで(15 mL)1時間該樹脂を処理することによって達成し、ジエチルエーテルによる沈殿後、粗製ペプチド(150 mg)を得る。環状化には、DMF(2 mL)中で、rpHPLC精製ペプチド(100 mg)、BOP(200 mg)およびDIEA(222 μ L)を4時間攪拌することが含まれる。該溶媒を真空で除去し、環状ペプチドをrpHPLCによって精製した(50 mg) Rt=33分間(勾配:70%A/30%Bから0%A/100%B、30分にわたって) MS:[M+H]⁺(計算値)=871.5, [M+H]⁺(実測値)871.5.

【0084】

環状AcF-[{Orn-(N-Me)}PdChaWR](66)の合成

10

Boc-(N-Me-Orn)-OHを、論文(Pol. J. Chem. 1988, 62,257-261)のとおり合成した。直鎖状ペプチドAc-Phe-[Orn-(N-MeCbz)]-Pro-dCha-Trp-Arg-OHを、NovabiochemのBoc-L-Arg(tosyl)Pam樹脂(0.41 mmol/g)上で、HBTU/DIEA活性化およびイン・シチュでの中和を用いるBoc化学によって合成した。該樹脂の開裂および脱保護を、HF/pクレゾールで2時間該樹脂を処理することによって達成し、ジエチルエーテルによる沈殿後、粗製ペプチドを得た。環状化には、DMF(2 mL)中で、RP-HPLC精製ペプチド(100 mg)、BOP(200 mg)およびDIEA(222 μ L)を4時間攪拌することが含まれる。該溶媒を真空で除去し、該環状ペプチドを、rpHPLCによって精製した。Rt=11.5分(35%B). MS:[M+H]⁺(計算値)=910.5, [M+H]⁺(実測値)=910.5.

20

【0085】

精製および特徴分析

粗製ペプチドを、Vydac C18 逆相カラム(2.2 x 25 cm)を用いる分取rpHPLCを用いて精製した。溶媒Aから溶媒Bの勾配(1 mL/分)を用い、214 nmで追跡した。フラクションを回収し、正確な分子量についてイオンスプレイ質量分光法(ISMS)によって試験し、精製度をDelta-Pak PrepPak C18 逆相カラム(0.8 x 10 cm)(勾配を変えて、例えば:0から75%Bまで、60分間以上)での分析用rp-HPLCによってチェックした。アセトニトリルは、HPLCグレード(BDH Laboratories)であり、TFAは合成グレード(Auspep)であった。

【0086】

30

表1は、環状化合物1-70を製造するために用いた反応の例、特定の溶出条件下での電子スプレー質量分光法(Mass Spec Found)によるそれらの特徴分析および逆相HPLC(rp-HPLC)保持時間(Rt分間)を示す。

【0087】

表2は、各々の化合物の構造を表し、ミエロペルオキシダーゼアッセイで測定し、ヒト多形核白血球(好中球)上のC5a受容体に対する各々の受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力を列挙する。

【0088】

表1:表2に記載した環状化合物の合成および特徴分析のまとめ

【表 1】

化合物	直鎖ペプチド の量	BOP の量	DIPEA の量	DMF の量	サイクル 収量	質量分 分析の 計算値	質量分 分析の 実測値	rpHPLC 条件	rpHPLC Rt (分)
1	41mg	126mg	158μL	57mL	19mg	895.5	896.5	30→100%B 30m	10.8
2						957.5	958.5	30→100%B 30m	14.8
3	78mg	36mg	71μL	1mL	29mg	937.6	938.5	30→100%B 30m	13.1
4	65mg	29mg	57μL	1mL		966.6	967.5	15→100%B 60m	18.5-20.5
5	81mg	36mg	71μL	1mL		967.5	968.5	30→100%B 90m	23.2
6	25mg	-	0.25mL 2M NaOH MeOH	0.5mL	定量的			上記	19.3
7	92mg	200mg	222μL	10mL	29mg	910.5	910.3	30→100%B 30m	23.0-23.8
8	87mg	200mg	222μL	10mL	18mg	896.5	898.4	30→100%B 30m	13.1-14.2
9	55mg	200mg	222μL	10mL	5mg	912.5	912.5	30→100%B 30m	3.2-4.2
10	105mg	200mg	222μL	10mL	51mg	932.5	932.7	30→100%B 30m	6.0-8.2
11	88mg	200mg	222μL	10mL	27mg	1008.5	1008.7	30→100%B 30m	10.4-11.7
12	72mg	200mg	222μL	10mL	15mg	882.5	882.5	30→100%B 30m	7.0-8.0
13	53mg	28mg	56μL	1mL	21mg	805.5	806.5	30→100%B 60m	7.6
14	51mg	200mg	222μL	10mL	12mg	914.5	914.5	30→100%B 30m	8.6-9.4
15	90mg	200mg	222μL	10mL	33mg	914.5	914.5	30→100%B 30m	7.3-8.5
16	81mg	200mg	222μL	10mL	22mg	935.5	935.5	30→100%B 30m	21.8-22.2
17	90mg	46mg	91μL	1mL	46mg	838.5	839.4	30→100%B 60m	13.4-17
18	60mg	31mg	61μL	1mL	25mg	836.5	837.4	30→100%B 60m	15.1-18
19	53mg	33mg	65μL	1mL		691.4	692.4	30→100%B 60m	9-10.5
20	66mg	200mg	222μL	10mL	15mg	898.5	898.5	30→100%B 30m	14.2-14.7
21	81mg	200mg	222μL	10mL	22mg	912.5	912.5	30→100%B 30m	17.2-18.0
22	59mg	200mg	222μL	10mL	20mg	945.5	946.7	30→100%B 30m	
24	110mg	200mg	222μL	10mL	37mg	952.6	952.4	30→100%B 30m	16.7-17.2
25	82mg	200mg	222μL	10mL	20mg	912.5	912.5	30→100%B 30m	7.2-8.3

10

20

30

40

50

【表 2】

化合物	直鎖ペプチド の量	BOPの量	DIPEA の量	DMFの量	サイクル収量	質量分光 分析の 計算値	質量分光 分析の 実測値	rpHPLC 条件	rpHPLC Rt (分)
26	71mg	200mg	222μL	10mL	16mg	928.5	928.5	30→100%B 30m	6.7-7.6
27	75mg	200mg	222μL	10mL	21mg	896.5	896.7	30→100%B 30m	25.9-26.3
28	130mg	62mg	122μL	2mL	90mg	909.5	910.4	30→100%B 60m	14.6-17.6
29	143mg	73mg	144μL	2mL	60mg	841.4	842.5	30→100%B 60m	7.4-8.9
30	135mg	72mg	142μL	2mL		813.4	814.4	10→100%B 60m	16.8-18.6
31	102mg	52mg	101μL	1mL		855.5	856.6	30→100%B 60m	8.2-9.7
32	49mg	200mg	222μL	10mL	8mg	928.5	929.6	30→100%B 30m	12.7-13.7
33	85mg	200mg	222μL	10mL	31mg	889.5	890.5	30→100%B 30m	16.5-16.9
34	122mg	57mg	113μL	2mL		901.5	902.2	30→100%B 15m	6.0
35	106mg	49mg	95μL	2mL		901.5	902.2	30→100%B 15m	10.7
36	120mg	61mg	122μL	2mL		855.5	856.4	30→100%B 60m	9.2-10.7
39	70mg	200mg	222μL	10mL	28mg	906.5	906.7	30→100%B 60m	
40	62mg	34mg	66μL	1mL		799.4	800.6	20→100%B 60m	9-9.7
44	100mg	48mg	93μL	1mL		909.5	910.6	30→100%B 60m	13.4-16.3
45	94mg	45mg	89μL	1mL		896.5	897.8	30→100%B 60m	14.0-15.2
49	55mg	29mg	58μL	1mL		796.4	797.4	30→100%B 60m	17.2-18.6
50	75mg	30mg	0.06mL	1mL	35mg	862.5	863.7	30→100%B 90m	21-23
51	64mg	27mg	0.05mL	1mL	25mg	822.5	823.7	30→100%B 90m	14.5-17
52	196mg	94mg	184μL	2mL	67mg	906.5	907.5	30→100%B 60m	17-18.4
53	177mg	84mg	166μL	2mL		906.5	907.6	30→100%B 60m	16.1-20.4
54	79mg	200mg	222μL	10mL	22mg	944.5	945.5	30→100%B 30m	
56	161mg	79mg	156μL	2mL		868.5	869.2	30→100%B 60m	
57	70mg	39mg	70μL	1mL		846.5	847.4	10→100%B 60m	15.3-17.6
58	160mg	76mg	150μL	2mL		912.5	913.3	30→100%B 60m	15.4-19.6
59	150mg	73mg	143μL	2mL		895.5	896.6	30→100%B 15m	10.4

10

20

30

40

50

【表 3】

化合物	直鎖ペプチド の量	BOPの量	DIPEA の量	DMFの量	サイクル収量	質量分光 分析の 計算値	質量分光 分析の 実測値	LC/MS 条件	LC/MS Rt (分)
60						856.5	857.4	30→100%B 15m	11.4
61	160mg	80mg	156μL	2mL		870.5	871.4	30→100%B 60m	13.9-17.4
62	180mg	91mg	180μL	2mL	84mg	850.4	851.4	30→100%B 60m	8.9-11.3
63	174mg	83mg	164μL	2mL	75mg	900.5	901.4	30→100%B 60m	13.4-15.3
64	100mg	200mg	222μL	2mL	50mg	870.5	871.5	30→100%B 60m	33.0
65	100mg	200mg	222μL	2mL		903.5	904.5	35%B	8.2
66	100mg	200mg	222μL	2mL		909.5	910.5	35%B	11.5
67	50mg	50mg	100μL	5mL	22mg	861.6	862.6	30→100%B 30m	20.5
68	50mg	50mg	100μL	5mL	18mg	881.5	882.4	30→100%B 30m	29.5
69	50mg	50mg	100μL	5mL	19mg	863.0	864.0	30→100%B 30m	23.2
70	50mg	50mg	100μL	5mL	4mg*	884.0	885.0	30→100%B 30m	29.5

10

20

30

40

50

* T y r - O - ベンジルは使用されたアミノ酸であったが、この産物は、ベンジル置換基を持つメタ - C - 置換チロシン（参照：化合物 70 の構造）への転位を包含した。

【 0 0 8 9 】

実施例 2：環状化合物のアンタゴニスト活性

表 2 は、実施例 1 で合成した化合物の構造、さらにミエロペルオキシダーゼアッセイによって測定した場合、ヒト多形核白血球（好中球）上の C 5 a 受容体についての各々の受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力を示す。

【 0 0 9 0 】

化合物 1 - 9、16 - 18、20、21、23、24、27 - 32、36、38、44、51 および 59 は、我々の先の特許出願 P C T / A U 9 8 / 0 0 4 9 0 に記載した一般構造の広い範囲内に存在する。しかし、表 2 は、実際、これらの化合物のうち、1 - 6、17、20、28、30、36 および 44 のみが、ヒト好中球上の C 5 a 受容体に対して、かなりアンタゴニスト効力 ($IC_{50} < 1 \mu M$) を持つということを示す。他の化合物 7 - 9、16、18、21、23、24、27、29、32、38、51 および 59 は、全ての場合において、 $IC_{50} > 1 \mu M$ で、評価できるほどのアンタゴニスト効力および / または受容体親和性を示さない。

10

【 0 0 9 1 】

一方、化合物 10 - 15、19、22、25、26、33 - 35、37、39 - 43、45、47 - 50、52 - 58 および 60 - 70 は、P C T / A U 9 8 / 0 0 4 9 0 の範囲には含まれないが、それらは、その明細書中に開示されているものと同一または類似の環状骨格 (scaffold) を含む。表 2 は、これら新規化合物 10 - 12、14、15、25、33、35、40、45、48、52、58、60、66 および 68 - 70 は、相当なアンタゴニスト効力 ($IC_{50} < 1 \mu M$) を持つことを示す。しかし、他の化合物 (13、19、22、26、34、37、39、41 - 43、47、49、50、53 - 57、61 - 65 および 67) は、これら全ての場合において、 $IC_{50} > 1 \mu M$ で、評価できるほどのアンタゴニスト効力 / または受容体親和性を示さない。

20

【 0 0 9 2 】

表 2 に示した結果から、我々は、サブマイクロモルのアンタゴニスト効力を得るため、または予想するために、C 5 a 受容体アンタゴニスト活性について活性な薬種に対する制限をさらに明確にし、改良することが可能となった。

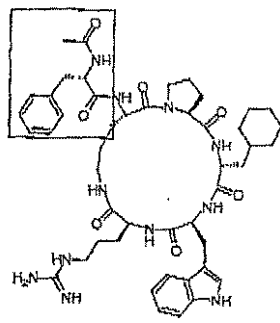
30

【 0 0 9 3 】

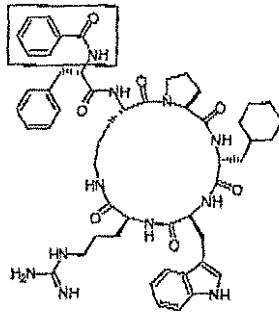
表 2：ヒト多形核白血球に対する C 5 a 受容体の環状アンタゴニスト 70 の例についての構造および活性

C 5 a R アンタゴニストの例

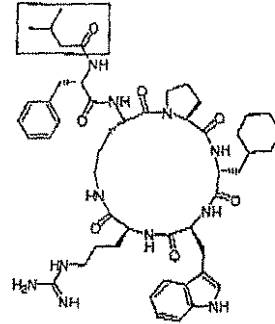
【表 4】



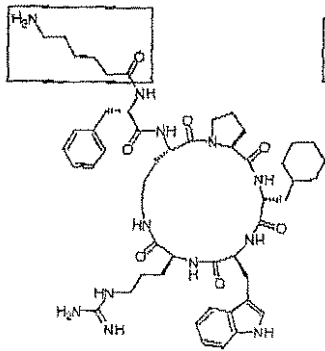
C5aR 結合 IC50: 0.43 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 28nM



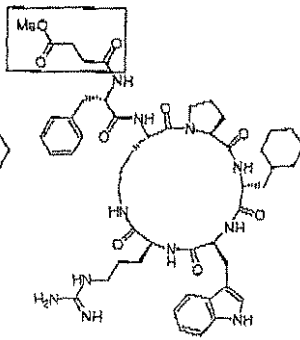
C5aR 結合 IC50: 1.1 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 110nM



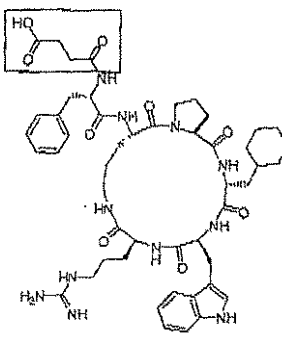
C5aR 結合 IC50: 0.84 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 90nM



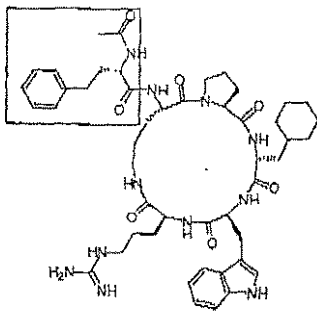
C5aR 結合 IC50: 0.23 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 62nM



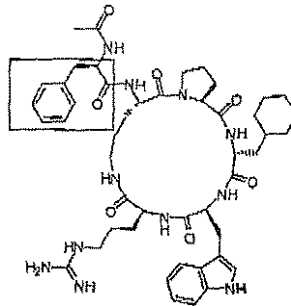
C5aR 結合 IC50: 0.44 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 38nM



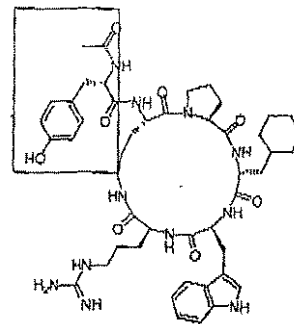
C5aR 結合 IC50: 0.43 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 23nM



C5aR 結合 IC50: >1000 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



C5aR 結合 IC50: 28.7 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



C5aR 結合 IC50: >9 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND

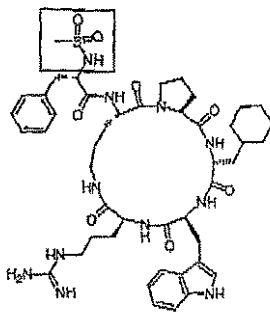
10

20

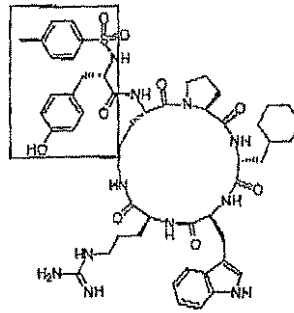
30

40

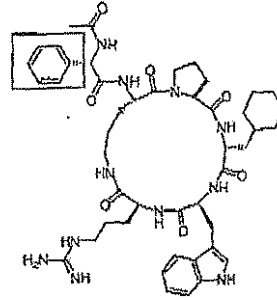
【表 5】



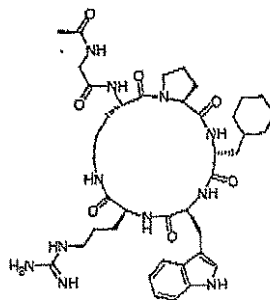
10
C5aR 結合 IC50: 0.47 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 34nM



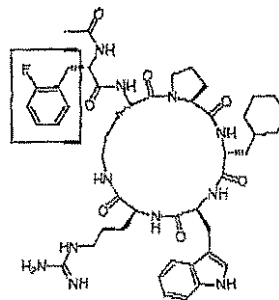
11
C5aR 結合 IC50: 0.94 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 291nM



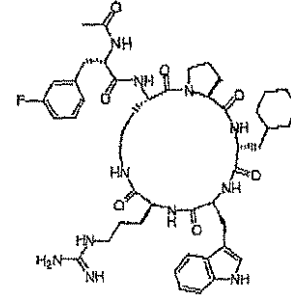
12
C5aR 結合 IC50: 0.76 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 151nM



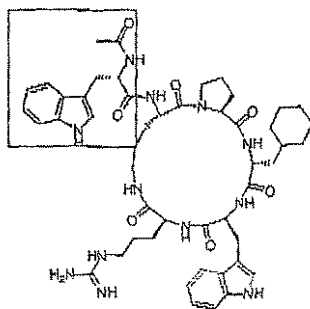
13
C5aR 結合 IC50: 17 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



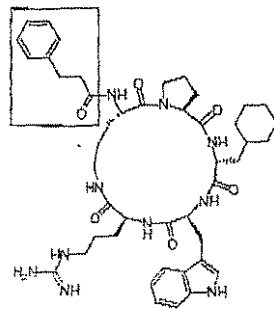
14
C5aR 結合 IC50: 0.52 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 38nM



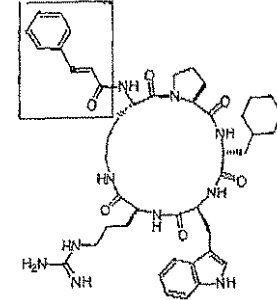
15
C5aR 結合 IC50: 0.39 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



16
C5aR 結合 IC50: 19.2 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



17
C5aR 結合 IC50: 0.23 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: 31nM



18
C5aR 結合 IC50: 9.9 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND

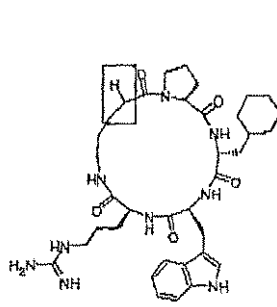
10

20

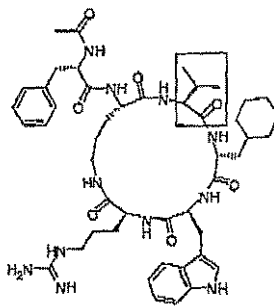
30

40

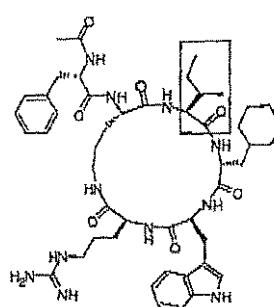
【表 6】



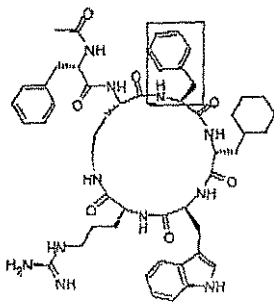
19
C5aR 結合 IC50: 16.1 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



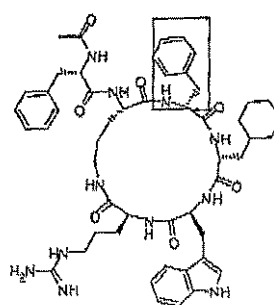
20
C5aR 結合 IC50: 0.68 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



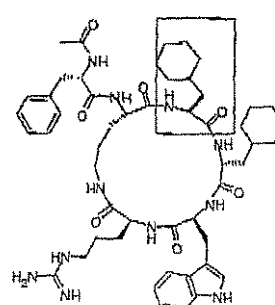
21
C5aR 結合 IC50: 2.9 μ M
C5aR Antagonist IC50: ND



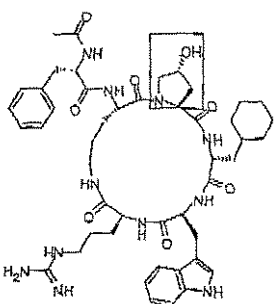
22
C5aR 結合 IC50: 2.4 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



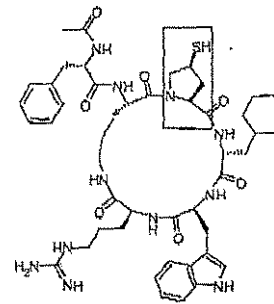
23
C5aR 結合 IC50: 2.4 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



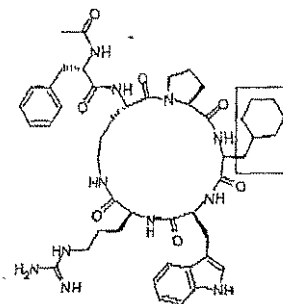
24
C5aR 結合 IC50: >1000 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



25
C5aR 結合 IC50: 0.27 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



26
C5aR 結合 IC50: 75.5 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND



27
C5aR 結合 IC50: 144 μ M
C5aR アントゴニスト IC50: ND

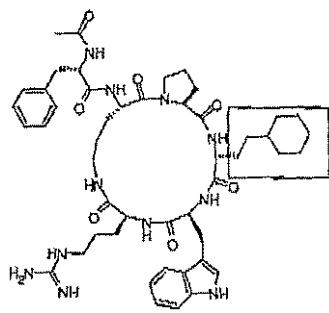
10

20

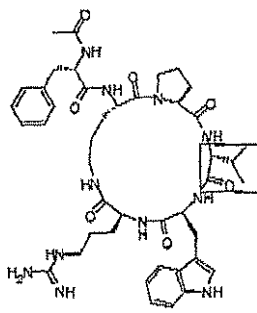
30

40

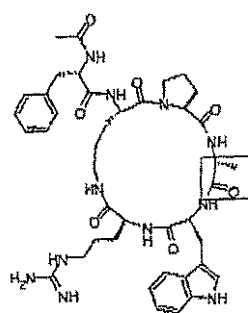
【表 7】



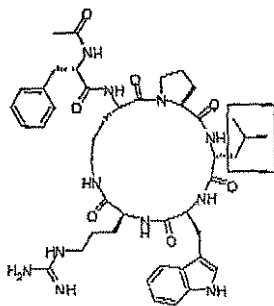
28
C5aR 結合 IC50: 0.39 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 40nM



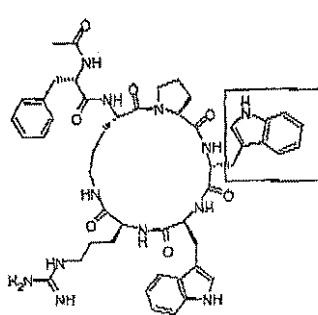
29
C5aR 結合 IC50: 13 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



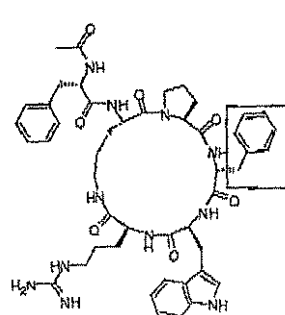
30
C5aR 結合 IC50: 145 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 37.1 μ M



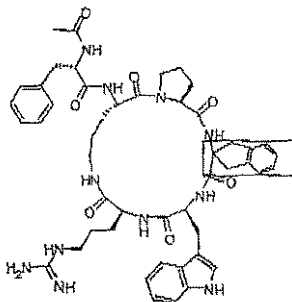
31
C5aR 結合 IC50: 1.1 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 35nM



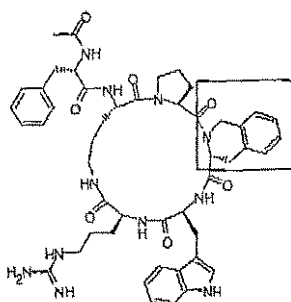
32
C5aR 結合 IC50: 30.1 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



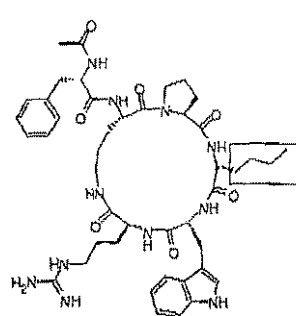
33
C5aR 結合 IC50: 0.26 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 22nM



34
C5aR 結合 IC50: 22.7 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



35
C5aR 結合 IC50: 9.2 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 15nM



36
C5aR 結合 IC50: 0.53 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 30nM

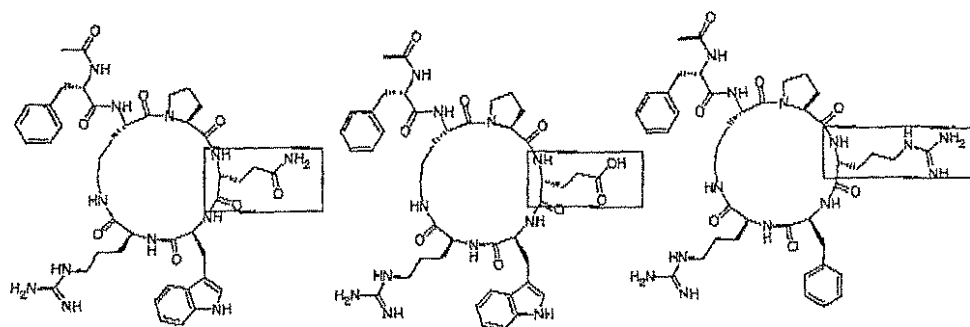
10

20

30

40

【表 8】

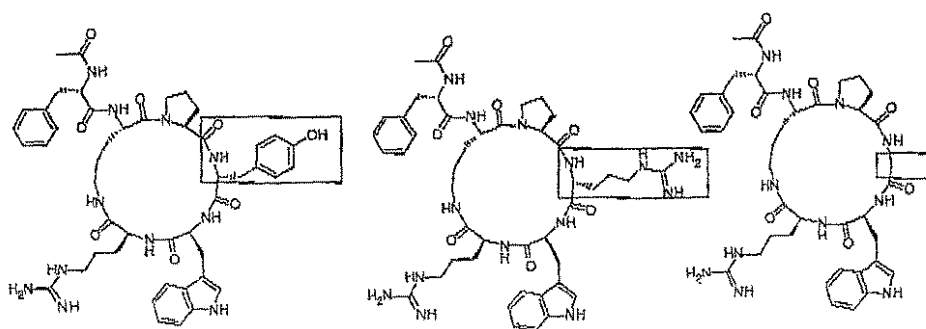


37
C5aR 結合 IC50: 77 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 77nM

38
C5aR 結合 IC50: 77 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 77nM

39
C5aR 結合 IC50: >1000 μ M
C5aR Antagonist IC50: ND

10

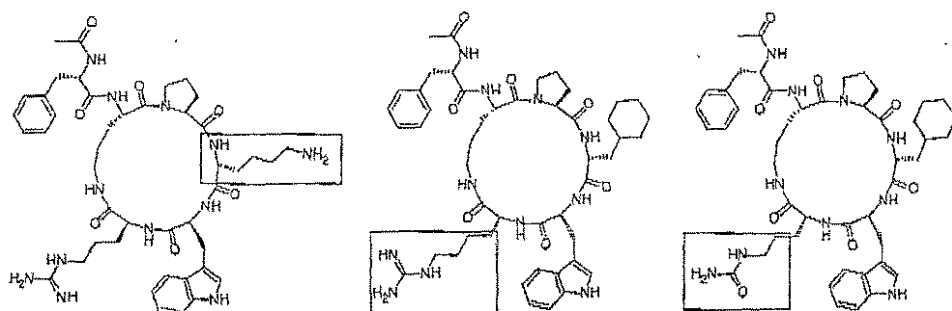


40
C5aR 結合 IC50: 2.16 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 360nM

41
C5aR 結合 IC50: >100 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND

42
C5aR 結合 IC50: 1092 μ M
C5aR Antagonist IC50: ND

20



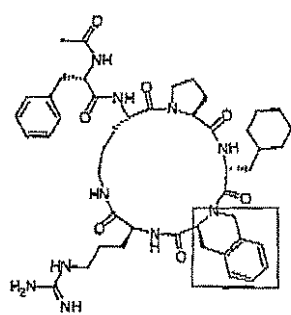
43
C5aR 結合 IC50: 77 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 77nM

44
C5aR 結合 IC50: 1.36 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 180nM

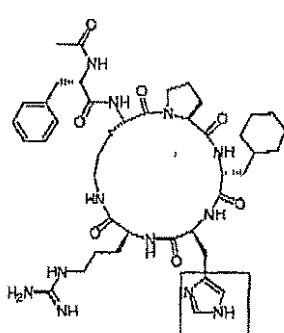
45
C5aR 結合 IC50: 6.0 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 690nM

30

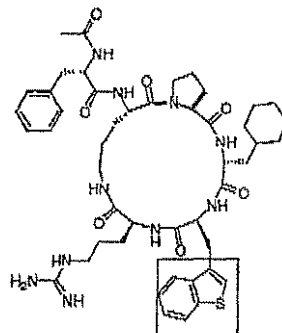
【表 9】



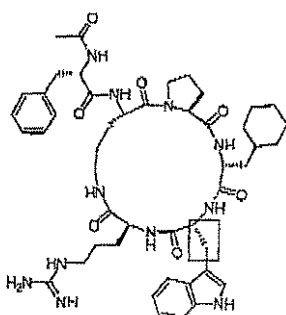
56
C5aR 結合 IC50: 3.7 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 10.9 μ M



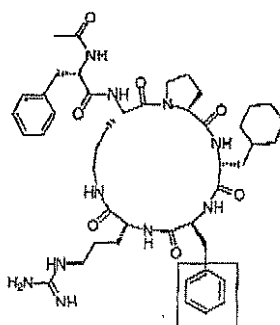
57
C5aR 結合 IC50: 23.3 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



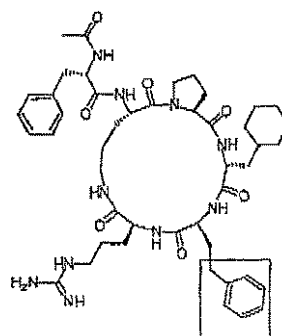
58
C5aR 結合 IC50: 0.28 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 172nM



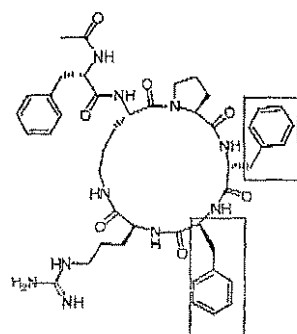
59
C5aR 結合 IC50: 30.4 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



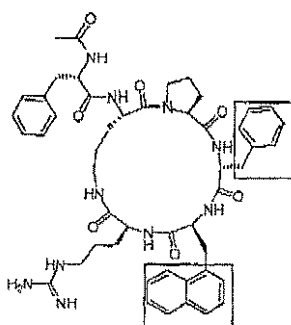
60
C5aR 結合 IC50: 0.24 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 32nM



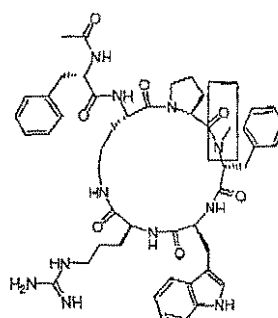
61
C5aR 結合 IC50: 11.3 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



62
C5aR 結合 IC50: 5.2 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 4.6 μ M



63
C5aR 結合 IC50: 3.1 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: ND



64
C5aR 結合 IC50: 27 μ M
C5aR アンタゴニスト IC50: 2 μ M

10

20

30

40

【0094】

「C5a 結合 IC50」とは、ヒト PMN に対して最大結合の 50% を達成するのに必要な化合物の濃度を言う。

【0095】

「C5a アンタゴニスト IC50」とは、C5a に刺激されたヒト PMN から放出されるミエロペルオキシダーゼの 50% の拮抗を達成するのに必要な化合物濃度をいう。

【0096】

枠内の領域が、構造間で相対的な変化の位置を示す。化合物 I は、我々の先の出願 PCT/AU98/00490 からリード化合物であり、比較の目的のために含める。

【0097】

50

実施例 3 : C 5 a の環状アンタゴニスト

これらの環状アンタゴニストおよびそれら明白な受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力のうちのいくつかの例を表 3 に示す。表 3 中、アミノ酸について 1 文字コードを使用する。「d」は、アミノ酸の右旋性 (dextro) (D) 形態を示す。「ND」は、「測定されない (not determined)」を示す。

【 0 0 9 8 】

表 3 . C 5 a アンタゴニストとしての新規化合物

【 表 1 0 】

AcPhe 置換	化合物番号	n	結合 IC50 (μM)	アンタゴニスト IC50 (nM)
MsF[OP-dCha-WR]	10	3	0.47	34
TsF[OP-dCha-WR]	11	3	0.96	291
AcPhg[Opd-Cha-WR]	12	3	0.76	151
AcG[OP-dCha-WR]	13	3	37.2	ND
Ac(o-フルオロ)F[OP-dCha-WR]	14	3	0.52	38
Ac(m-フルオロ)F[OP-dCha-WR]	15	1	0.39	ND
HC[OP-dCha-WR]	17	3	0.22	31
Hydrogen[OP-dCha-WR]	19	3	>1000	ND

10

20

M s = メシル、T s = トシル、M e S u c = メチルサクシネート、S u c = サクシネート、A h x = 6 - アミノヘキサノエート、H P h e = ホモフェニルアラニン、P h g = フェニルグリシン、H C = ヒドロシンナメート、N D = 実施せず

【 表 1 1 】

Pro 置換	化合物番号	n	結合 (μM)	アンタゴニスト (nM)
AcF[O-Hyp-dCha-WR]	25	3	0.27	ND
AcF[O-Thp-dCha-WR]	26	1	75.5	ND
AcF[O-Phe-dCha-WR]	22	3	2.43	ND

30

H y p = trans - ヒドロキシプロリン、T h p = cis - チオプロリン

【 表 1 2 】

D-Cha 置換	Lab Code	n	結合 (μM)	アンタゴニスト (nM)
AcF[OP-dCha-WR]	3D53,1	13	0.45	28
AcF[OP-dLeu-WR]	31	3	1.13	35
AcF[OPGWR]	42	3	1082	ND
AcF[OP-dVal-WR]	29	3	13.0	ND
AcF[OP-dnle-WR]	36	3	0.53	30
AcF[OP-dTic-WR]	35	3	9.18	15,000
AcF[OP-aic-WR]	34	3	22.71	ND
AcF[OP-dTyr-WR]	40	3	2.16	300
AcF[OP-dArg-WR]	41	3	>100	ND
AcF[OP-dPhe-WR]	33	3	0.26	22
AcF[OP-dhCha-WR]	28	3	0.39	40.5

40

50

A i c - アミノインダンカルボン酸
 T i c - テトラヒドロイソキノリン
 d h C h a - D - ホモヘキシルアラニン

【表 1 3】

Trp置換	Lab Code	n	結合 (μ M)	アンタゴニスト (nM)
AcF[OP-dCha-HR]	57	3	23.5	ND
AcF[OP-dCha-FR]	60	3	0.25	32
AcF[OP-dCha-LR]	51	3	18.9	3,000
AcF[OP-dCha-Cha-R]	50	3	11.9	4,500
AcF[OP-dCha-hPhe-R]	61	3	11.5	ND
AcF[OP-dCha-2Nal-R]	53	3	15.8	ND
AcF[OP-dCha-Bta-R]	58	3	0.28	172
AcF[OP-dCha-Flu-R]	54	3	28.9	ND
AcF[OP-dCha-1Nal-R]	52	3	0.71	46.6
AcF[OPdCha-Tic-R]	56	3	3.73	10,900
AcF[OP-dCha-G-R]	55	3	>1000	ND
AcF[OPdCha-dTrp-R]	59	3	30.4	ND

10

20

h P h e = ホモフェニルアラニン、2 N a l = 2 - ナフチルアラニン、1 N a l = 1 - ナフチルアラニン、B t a = ベンゾチエニルアラニン、F l u = フルオレニルアラニン、T y r - O - アルキル = チロシンの O - アルキル化アナログ、T i c = テトラヒドロイソキノリン

【表 1 4】

Arg置換	Lab Code	n	結合 (μ M)	アンタゴニスト (nM)
AcF[OPdChaW-Cit]	45	3	6.00	690
AcF[OPdChaW-K]	47	3	24.15	ND
AcF[OPdChaW-hArg]	44	3	1.36	ND

30

C a n = L - カナバニン、C i t = シトルリン、h A r g = ホモアルギニン

【表 1 5】

多重置換	Lab Code	n	結合 (μ M)	アンタゴニスト (nM)
AcF[OP-dPhe-dleu-Nal-R]	105	3	3.1	ND
AcF[OP-dPhe-FR]	62	3	5.2	5,210
AcF[DapOPdChaWRC]	151	3	1.84	100
AcF[OP-dPhe-1Nal-R]	63	3	3.1	ND
AcF[OP-dPhe-Y-R]	150	3	69.2	ND

40

1 N a l = L - ナフチルアラニン、D a p = 2',3 - ジアミノプロピオン酸 D - P h e = D - フェニルアラニン

【0099】

実施例 4：薬種の精製

表 2 の結果を基にして、我々は、下記のように、ヒト多形核白血球上の C 5 a 受容体への活性なアンタゴニズムのための、精巧な薬物を開発することができる：

50

位置「A」は、活性に対する悪影響がなく、H（例えば、化合物17、18）、アルキル、アリール、NH₂、NHアルキル、N(アルキル)₂、NHアリール、NHアシル(例えば、化合物1、3、4、5、6)、NHベンゾイル(例えば、化合物2)、OH、Oアルキル、Oアリール、NH₂SO₂アルキル(例えば、化合物10)、NH₂SO₂アリール(例えば、化合物11)を含む非常に多くの基を許容できる。

【0100】

「A」位置での置換に対する広い許容は、環状ペプチド骨格への付加物に対する受容体中に十分なスペースが存在することを示す。そのため、この位置は、アンタゴニストの水および脂質溶解性を変えるために置換基を付加し、それによりアンタゴニストの経口または経皮吸収を増強するために使用し得る。また、この位置は、標識、例えば蛍光タグ、ア

10

【0101】

位置「B」は、アルキル、アリール、フェニル、ベンジル、ナフチルまたはインドール、またはD-またはL-アミノ酸の側鎖、例えば、L-フェニルアラニン(化合物1)またはL-フェニルグリシン(化合物12)であり得る。それは、D-フェニルアラニン(化合物8)、L-ホモフェニルアラニン(化合物7)、L-チロシン(化合物9)、L-ホモチロシン、グリシン(化合物13)、L-トリプトファン(化合物16)またはL-ホモトリプトファンの側鎖でない。

【0102】

位置「B」は、置換基に関して広い範囲を許容しない。L-フェニルアラニンのベンジル基が、多くの置換を許容できず、かさ高くせしめ得ないことがわかった。この位置は、IC₅₀により測定されるように、修飾に対する最も高い効果が受容体親和性に対するものであるため、アンタゴニズム自体に対して重要であるというよりもむしろ受容体結合のために必要であると思われる。

20

【0103】

位置「C」は、小さな置換基、例えば、D-またはL-アミノ酸、例えばプロリン(化合物1)、L-バリン(化合物20)、アラニン、trans-ヒドロキシプロリン(化合物25)またはcis-チオプロリン(化合物26)の側鎖などである。かさ高い置換基、例えば、L-イソロイシン(化合物21)、D-またはL-フェニルアラニン(化合物22、23)、L-シクロヘキシルアラニン(化合物24)の側鎖などでない。

30

【0104】

位置「D」は、かさ高い置換基、例えば、D-ロイシン(化合物31)、D-ホモロイシン、D-シクロヘキシルアラニン(化合物1)、D-ホモシクロヘキシルアラニン(化合物28)、バリン(化合物29)、D-ノルロイシン(化合物36)、D-ホモロイシン、D-フェニルアラニン(化合物33)、D-テトラヒドロイソキノリン(化合物35)、D-グルタミン(化合物37)、D-グルタメート(化合物38)またはD-チロシン(化合物40)などのDアミノ酸の側鎖である。小さな置換基は、グリシン、D-アラニン(化合物30)などの側鎖、D-トリプトファン(化合物32)の様なかさ高い平面の側鎖、D-アルギニン(化合物39)またはD-リジン(化合物43)の様なかさ高い荷電側鎖、またはL-シクロヘキシルアラニン(化合物27)の様なL-アミノ酸の側鎖でない。骨格上の位置「D」で小さなD-アミノ酸、および小さなまたは大きなL-アミノ酸は、C_{5a}受容体に対する親和性を大きく低下させる。

40

【0105】

位置「E」は、D-トリプトファン(化合物59)またはL-N-メチルトリプトファン(化合物47)以外の、L-トリプトファン(化合物1)およびL-ホモトリプトファン；L-ホモフェニルアラニン(化合物61)以外のL-フェニルアラニン(化合物60)；L-2-ナフチル(化合物53)以外のL-ナフチル(化合物52)；L-3-ベンゾチエニルアラニン(化合物58)、のかさ高い側鎖の中から選択される。L-シクロヘキシルアラニン(化合物50)、D-ロイシン(化合物51)、L-フルオレニルアラニン(化合物54)、グリシン(化合物

50

55)、L-テトラヒドロイソキノリン(化合物56)またはL-ヒスチジン(化合物57)の側鎖である。

【0106】

環状ペプチド骨格上の位置「E」での置換基は、C5a受容体のアンタゴニズムにとって非常に重要である。この位置での置換基は、通常、アゴニスト応答と関連した配座の変化を制限し得る。これは、受容体中のアンタゴニストを固定し、アンタゴニズムに必要な、受容体中の配座再編成を防ぐ「ブロッキング」残基でもある。

【0107】

位置「F」は、L-アルギニン(化合物1)、L-ホモアルギニン(化合物44)、L-シトルリン(化合物45);またはL-カナビニン(化合物48)の側鎖であり得る。D-またはL-リジン(化合物47)、D-またはL-ホモリジン、またはグリシン(化合物49)でない。この位置での置換基のサイズは、高い受容体親和性を与えるのに重要である。シトルリン化合物は、荷電側鎖を持たないが、この位置でのアルギニンと比べて、評価できるアンタゴニスト効力を持つ。

【0108】

位置「X」は、 $-(CH_2)_nNH-$ または $-(CH_2)_n-S-$ (式中、nは、1~4の整数であって、好ましくは2または3である)、 $-(CH_2)_2O-$ 、 $(CH_2)_3O-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-CH_2COCHR NH-$ または $-CH_2-NHCOCHR NH-$ (式中、Rは、全ての普通のまたは稀なL-またはD-アミノ酸の側鎖である)であり得る。この群は、例えば、化合物1のArgとPhe残基間の環状化リンクを与え、環状骨格の構造に影響する。さらに、置換基、例えば、このリンカー上のRなどは、場合により受容体残基と相互作用し、アンタゴニストの親和性を増強し得る。

【0109】

オルニチンの窒素のN-メチル化は、アンタゴニストの効力に対して事実上全く影響はないが、その環のアミノ酸化合物の成分のN-メチル化は、化合物(例えば、64、65)の受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力を低下させる傾向がある。

【0110】

骨格に対する多重変化は、化合物1と比較してアンタゴニスト効力の増加を得るためには不利益であり得る。すなわち、L-Pheは、アンタゴニスト効力において変化はほとんどなく、化合物1においてL-Trpに対する適切な置換(例えば、60)であったが、化合物1への変化の組み合わせ、例えばTrpの代わりにL-Phe、Argの代わりにL-ホモPhe(例えば、67)、またはArgの代わりにp-クロロ-フェニルアラニン(例えば、68)は、受容体に対する親和性の低下およびアンタゴニスト効力の低下を導いた。同様に、化合物1において、L-TrpをL-Pheに置換し、またD-ChaもD-Pheに置換した場合、該化合物は、実質的な効力(例えば、62)を失った。化合物1におけるD-ChaからD-Pheへの変化は、アンタゴニスト効力(例えば、33)を維持させる一方で、この変化は、L-Phe(62)によるL-Trpへの置換と対になった場合に不利益である。

【0111】

いずれか1つの変化(例えば、33、60)は、変化が一緒になされた場合(例えば、62)よりも、実質的に高い効力が生じるため、これらの残基の受容体への結合の際に共同性が存在するのは明白である。Argを、荷電したアミンを含んだままである芳香族基に置換した場合(69)、60のPheを置換したチロシン(70)に置換した場合にみられるように、活性の顕著な低下がおきた。

【0112】

このような変化は、全て、ヒトPMNC5a受容体に対する親和性とアンタゴニスト効力を発生させるために、使用した環状骨格に対して何が許容となり得るか、なり得ないかについて示すものである。他のタイプの細胞上のC5a受容体は、側鎖について異なった許容を持つかもしれないが、環状骨格は活性化合物の基本構造をとったままであることが判った。

【0113】

10

20

30

40

50

実施例 5 : ラットにおける逆受動アルサス反応

逆受動腹膜アルサス反応を、先に記載したように (Strachan et al., 2000) 誘導し、一群のラットを、抗体の腹膜への沈着 (注入) 前に経口胃管栄養法 (10 mg kg^{-1} は、200L の最終体積に対して 10 % エタノール / 90 % 食塩溶液中で溶解される) によって A c F - [O P d C h a W R] (1) で前処理するか、または抗体注入の 30 分前に適当な経口ビヒクル対照で前処理した。雌ウィスターラット ($150 - 250 \text{ g}$) を、ケタミン (80 mg kg^{-1} i.p.) およびキシラジン (12 mg kg^{-1} i.p.) で麻酔した。

【0114】

ラットの側部表面を、注意深く剃り、各々側部表面上で 5 つの異なる部分を明確に線で区分けした。逆受動アルサス反応を、抗体注射 10 分前に、経口静脈に、エバンスブルー (15 mg kg^{-1} i.v.)、トリオボアルブミン (20 mg kg^{-1} i.v.) を注射することによって、各皮膚部位に誘導した。ウサギ抗-トリオボアルブミン (生理食塩水単独、最注射容量 $30 \mu\text{L}$ で、100、200、300 または $400 \mu\text{g}$ 抗体) を、ラットの各側表面上の 2 つの別々の皮膚部分に 2 回注射し、ラットあたり全 10 注射部を与えた。ラットを、加熱パッド上におき、血液試料を定期的に採取し、麻酔を 4 時間処理中維持した。血液を氷上で自然凝固させ、血清試料を採取し、 -20°C で保存した。皮膚アルサス反応の誘導 4 時間後、麻酔したラットを安楽死させ、 10 mm^2 面積の皮膚を、アルサス反応の各部位から採取した。皮膚試料を、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を用いて組織分析の少なくとも 10 日前に 10 % の緩衝ホルマリン中で保存した。さらに、皮膚試料の第 2 番目のセットを、ホルムアミド (1 mL) 中に一晩おき、皮膚中への血清の滲出の指標として、エバンスブルー抽出物の吸収を 650 nm で測定した。図 1 は、皮膚パンチ抽出物、次いで部位あたり $0 - 400 \mu\text{g}$ でのウサギ抗チキンオボアルブミンの皮膚内注射、次いで A c F - [O P d C h a W R] による静脈的、経口的または局所的な前処理を示す。データは、血漿吸収の 650 nm での吸収 % を、平均値 \pm S E M ($n = 3 - 6$) として示す。* は平均値 \pm S E M ($n = 3 - 6$) としてアルサス反應對照の値と比較した時、 P 値 ≤ 0.05 を示す。

【0115】

ラットを、静脈的に (10 % エタノールを含有する生理食塩水 (200 L) 中 $0.3 - 1 \text{ mg kg}^{-1}$ 、皮膚アルサス反応の開始 10 分前)、経口的に (経口胃管栄養 (法) により 10 % エタノールを含有する生理食塩水 (200 μL) 中 $0.3 - 10 \text{ mg kg}^{-1}$ 、開始 30 分前)、または局所的に (部位あたり $200 - 400 \mu\text{g}$ 、皮膚アルサス反応の開始 10 分前) のいずれかにより、C5aR アンタゴニスト、TFA 塩として A c F - [O P d C h a W R] (1)、または適当なビヒクルを用いて前処理した。アンタゴニストの局所適用には、10 % ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の $10 - 20 \text{ mg mL}^{-1}$ 溶液 (20 μL) の適用、すなわちアルサス反応の誘導 10 分前に各部位の皮膚上に直接塗布することを含む。

【0116】

エバンスブルー単独で処理したラットからの生理食塩水単独の注射部位を抗原対照として扱い、エバンスブルー + 局所 DMSO 単独で処理したラットからの生理食塩水注射部位をビヒクル対照として扱い、エバンスブルー +、静脈、経口または局所的なアンタゴニスト単独で処理したラットからの生理食塩水単独の注射部位をアンタゴニスト対照として扱い、エバンスブルー + 皮膚のラビット抗チキンオボアルブミンを抗体対照として扱う。単離したヒト PMN において $> 1 \text{ mM}$ の IC_{50} 結合親和性を持つ以外、A c F - [O P d C h a W R] (1) の組成と類似した化学組成および溶解性を持つペプチド A c F - [O P G W R] の局所適用を、不活性ペプチド対照として扱う。A c F - [O P G W R] を、10 % の DMSO に溶解し、アルサス反応の開始 10 分前に部位あたり $400 \mu\text{g}$ を局所的に適用した。

【0117】

TNF 測定

血清 TNF 濃度を、酵素結合免疫吸着剤アッセイ (ELISA) キットを用いて測定した。使用した抗体対は、ビオチン化したネズミ抗ラット TNF 抗体と対にしたウサギ抗ラット TNF 抗体であった。図 2 は、静脈的に、経口的にまたは局所的に、A c F - [O

P d C h a W R]で前処理したラット群を用いて、皮膚アルサス反応の開始後の規則的な時間間隔での血清 T N F 濃度を示す。データを、平均値 \pm S E M ($n = 3 - 6$) として示す。* はアルサス反応の対照値と比較した時、 ≤ 0.05 の P 値を示す。

【 0 1 1 8 】

インターロキン-6 の測定

前記の E L I S A 方法を用いて、血清および腹膜洗浄液のインターロイキン 6 (I L - 6) 濃度を測定するのに使用した (Strachan et al., 2000)。

【 0 1 1 9 】

病理学評価

ラット皮膚試料を、少なくとも 10 日間、10% 緩衝ホルマリンで固定し、標準的な組織技術を用いてヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。皮膚試料を、病理学に関する証拠として盲検法で分析し、ラット P M N 浸潤の程度を 0 - 4 のスケールで評価した。皮膚アルサス反応の開始により、間質性好中球を増加させ、下記の方法で定量した。異常性を検出しなかった場合には、断片に 0 のスコアをつけた。1 のスコアは、管腔外の炎症細胞の移動は示さないが、血管中で増加した P M N の出現を示した。2 および 3 のスコアは、間質性組織中の P M N 数の増加および血管周辺の炎症細胞のより顕著な蓄積の様相を示した。最大スコアの 4 は重篤な病理学的異常を示すが、皮膚断片中に存在し、組織中への P M N の過剰な浸潤および血管から離れるこれらの細胞の移動を示した。図 3 は、抗体の量の増加させつつ皮膚内注射をすると、皮膚試料 (A) によって数値化された病理指標における用量応答性の増加を導くことを示す。A c F - [O P d C h a W R] で、静脈的 (B) ($n = 3$)、経口的 (C) ($n = 3$) および局所的 (D) ($n = 3$) に前処理したラットにおいて、生理食塩水または部位あたり 400 μ g 抗体 ($n = 5$) を用いて皮内注射した皮膚試料についてのデータを示す。データを、平均値 S E M \pm S E M として示した。* は、非パラメータ t 試験を用いるアルサス反応値と比較した時、 $P < 0.05$ である。

【 0 1 2 0 】

実施例 6 : ラットにおける腸管の虚血再灌流損傷モデルに対する C 5 アンタゴニストの効果

雌ウィスターラット (250 - 300 g, $n = 132$) を飢餓状態にし、全ての実験 12 時間前から水のみを与える。動物をケタミン (80 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) を腹膜内注射により麻酔し、ラットを加熱パッド上におき、通常の体温を維持した。腹部を、中線の切開部から開腹し、上部腸間膜動脈 (S M A) を暴露した。動脈に対する非外傷性の閉塞装置を、ポリエチレンチューブの長さを通るループ状の絹の縫合線からつくった。S M A を、ループの末端へ引き張り閉塞した。ポリエチレンカテーテルを、大腿部血管に挿入し、5% エタノール A c F - [O P d C h a W R] (1) 1 mg/kg または無菌の発熱物質を含まない生理食塩水を、0.2 ml 容量で点滴を行った。点滴を、2 分間にわたって行なった。A c F - [O P d C h a W R] (1) (0.3、1、10 mg/kg) の経口用量を、S M A 閉塞 60 分前に、胃管栄養 (法) (25% エタノール中、0.2 ml の生理食塩水) によって達成した。腸の虚血を、30 分間 S M A をクランプによって誘導し、その後に閉塞縫糸を除去し、次いで再灌流を、さらに 120 分間追跡した。シャム手術したラットを、血管閉塞を省略して同じ様式で処理し、無菌、発熱物質を含まない生理食塩水 (0.2 ml) を用いて注入するか、または 25% エタノール中生理食塩水 (0.2 ml) を用いて胃管栄養法を行った。血液試料 (50 μ l) を、P M N 数の推計のための実験の 180 分にわたって、規則的な時間間隔でヘパリン化したエッペンドルフチューブに採取した。種々連の同一実験において、腫瘍壊死因子 (T N F -)、ハプトグロビン (H p) およびアスパルテート・アミノトランスフェラーゼ (A S T) 濃度を後の測定のために、全血液を 180 分間にわたって規則的な時間間隔で採取し、氷上で凝固させ、血清または血清試料を採取し、-20 で保存した。120 分の再灌流の時点で、この動物を、ペントバルビタールの過量を用いて安楽死させた。閉塞した回腸の断片を取出し、管腔を生理食塩水で洗浄し、腸を拭いて乾かして秤量した。試験片を、オープン内で 24 時間、80 で乾燥させ、組織の乾燥重量を得た。腸浮腫を、湿潤および乾燥組織重量の比を評価することにより測定した。さらに、

虚血および正常の腸の両切片を採取し、生理食塩水で洗浄し、すぐに組織試験のために10%緩衝ホルムアルデヒド生理食塩水で固定した。

【0121】

図4は、小腸の湿潤対乾燥重量の比が、シャム手術した動物に比べて虚血-再灌流後に有意に増加することを示す。C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR], 1 mg/kg i.v.および10 mg/kg p.o.の処理により、非処理の虚血-再灌流(I/R)動物と比べて有意に組織浮腫が低下した。データは、平均値±SEM(各グループでn=4-6)として示す。*、P<0.05、対シャム手術した動物。+、P<0.05、対I/R動物。

【0122】

好中球アッセイ

PMW計測のために血液(50 μl)を、ヘパリン処理チューブ中に入れ、次いで等量のhistopaque 1083 (Sia, U. S. A.)を重層し、PNFを単離し、細胞数をヘマトメーター上で計測した。PMN値の濃度は、SMA閉塞の直前に得られた値の平均%±SEM値として示す。

【0123】

図5は、消化管の虚血-再灌流により、シャム手術した動物(A、B)と比較して循環PMN濃度において顕著な低下することを示す。

【0124】

C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR] 1 mg/kgのi.v.(A)および10 mg/kgのp.o.(B)を用いるラットの前処理は、虚血-再灌流により誘導される好中球を有意に阻害することを示す。1 mg/kg p.o.(B)の処理動物は、好中球の阻害を示さなかった。データは、平均±SEM(各グループ、n=6)として示す。*は、P<0.05対対照動物である。棒線は虚血の30分間を示す。

【0125】

腫瘍壊死因子 測定

血清TNF-濃度を、酵素標識免疫吸着測定法(OptEIA, Pharmingen, USA)を用いて、製造業者の指示書に従い測定した。血清試料中のTNF-の濃度を、標準曲線からの線形回帰分析によって測定した。

【0126】

図6は、消化管虚血-再灌流により、シャム手術した動物と比較すると血清TNF-において顕著な増加をすることを示す。C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR] 1 mg/kg i.v.および1-10 mg/kg p.o.により、ラットを前処理すると、血清のTNFレベルの変化を完全に阻害した。データは、平均±SEM(各グループ、n=6)として示す。*、P<0.05 対シャム手術した動物。直線は、虚血30分間を示す。

【0127】

ハプトグロビンアッセイ

血清Hpを、Hpアッセイキット(Tridelata. Development Ltd. U. K)を用いて、製造業者の指示書に従い、測定した。血清試料中のHp濃度を、標準曲線からの線形回帰分析によって測定した。

【0128】

図7は、消化管虚血-再灌流により、シャム手術した動物に比べて血清ハプトグロビンが有意に増加することを示す。C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR] 1 mg/kg i.v.および1、10 mg/kg p.o.により前処理したラットは、血清ハプトグロビンレベルにおける増加を有意に阻害した。データは、平均値±SEM(各グループ、n=4-6)を示す。*、P<0.05 対シャム手術した動物。+、P<0.05 対I/R動物。

【0129】

アスパルテート・アミノトランスフェラーゼ アッセイ

血漿AST(AS T / G O T;Sigma, USA)濃度を、血清を採取して、製造業者の指示書

10

20

30

40

50

に従い、48時間以内に測定した。血漿AST濃度を、校正曲線から導いた。結果を、Sigma-Franke(SF) units/mlで表現する。

【0130】

図8は、消化管虚血-再灌流により、シャム手術した動物と比べて、血漿アスパルテート・アミノトランスフェラーゼが有意に増加することを示す。C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR] 1mg/kg i.v.および1、10mg/kgによる処理により、非処理I/R動物と比べて、消化管虚血-再灌流誘導性アスパルテート・アミノトランスフェラーゼが有意に低下した。データは、平均±SEM(各グループ、n=6)として示す。*、 $P < 0.05$ 対シャム手術した動物。+、 $P < 0.05$ 対I/R動物。

【0131】

組織病理学

試験片を、10%ホルムアルデヒド-生理食塩水で固定し、パラフィンワックス中に埋込み、連続切断し(薄切片にする)、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。組織を、盲検法に経験豊富な観察者が、判断し、記録した。腸組織損傷の程度を、前記等級の0-8からのスケール範囲を用いて定量した(Chiu et al., 1970)。

【0132】

図9により、消化管虚血-再灌流が、シャム手術した動物と比べて腸への顕著なダメージを生ずることを示す。C5a受容体アンタゴニストACF-[OPdChaWR]の1mg/kg i.v.および1、10mg/kgによる処理により、非処理I/R動物と比べて、消化管虚血-再灌流誘導組織損傷が有意に低下した。データは、平均±SEM(各グループ、n=6)として示す。*、 $P < 0.05$ 対I/R動物。

【0133】

実施例7：ラットの一関節(Monoarticular)抗原で誘導された関節炎

雌ウィスターラット(150-250g)を、the Central Animal Breeding House, University of Queenslandから得た。メチル化したウシ血清アルブミン(mBSA)(0-5mg)を、フロイントの完全アジュバンド(0.5mg)に溶解し、超音波処理し、均質な懸濁液を生成した。各ラットに、1日目と7日目に、この懸濁液(0.5mL)の皮下注射で投与した。12-28日間、ラットを別々のケージに分け、体重および食事および水の接種を毎日追跡した。ラットは、通常水道水またはACF-[OPdChaWR](1)を含有する飲料水のいずれかを投与した。体重と水の摂取を、毎日追跡し、ラットにC5aRアンタゴニストACF-[OPdChaWR](1)(1mg/kg/day)の1日用量を、試験の12-28日間投与した。14日目に、ラットを麻酔し、後肢の毛を刈った。各ラットは、左ひざにはmBSA(0.5mg)、右ひざには生理食塩水の関節内(intra-articular)注射(100μl)を投与した。通常の飲料水を投与したラット由来の生理食塩水単独投与のひざを、生理食塩水対照として用い、飲料水中にACF-[OPdChaWR](1)を投与したラット由来の生理食塩水単独投与のひざを、アンタゴニスト対照として用いる。

【0134】

ラットを、28日目に安楽死させ、全血を、エッペンドルフチューブ中に採取し、氷上で凝固させた。血液試料を遠心分離(11,000rpm×3分間)し、血清を採取し、ELISAを用いる血清サイトカインの分析まで-20℃で保存した。各ひざの莢膜(capsule)を、生理食塩水(100μl)で洗浄し、全細胞計測を、ヘマトメーターを用いて測定した。さらに、ひざの関節洗浄液のアリコート、スライドガラス上に滴加し、空気乾燥に供した。乾燥させてから、細胞を、示差(diffrential)染色(Diff Quick)で染色し、示差細胞計測を、40×乾燥レンズの顕微鏡を用いて行った。残っている各関節からの洗浄液を、ELISAを用いて関節内のサイトカインレベルに関する後の分析まで-20℃で保存した。各ひざの関節を取出し、皮膚を外科用メスにより剥がし、固定した。ひざの試料を、10%の緩衝ホルマリンで、10日間保存した。次いで、ひざを、蒸留水で洗浄し、脱石灰化のためにEDTA溶液の飽和溶液に21日間おき、パラフィンワックス中に埋込んだ。

【0135】

10

20

30

40

50

ひざ組織試料を、実施例6で上記のような標準的組織学的技術を用いて作成し、ヘマトキシリンとエオシン染色により染色した。組織スライドを、盲検法で分析した。組織断片を、滑液の細胞増殖、炎症細胞浸潤、軟骨破壊および出血の発生増加に伴ってスコアを増加させて、異常なしのスコア0を持つスコア0から4で評価した。試料中には、どの試料においても、顕著な骨腐食の兆候はなかった。血清および滑液の試料を、TNFおよびIL-6レベルについてELISA分析日に解凍した。濃度は、前記実施例6で記載したようにELISAを用いて標準曲線から測定した。

【0136】

図10が、-2から+14日目に経口的投与したACF-[OPdChWR]により関節炎右ひざ関節の膨れを阻害を示す一方、図11は、関節洗浄液中の右ひざ関節TNF-およびIL-6レベルの阻害を示す。非処理とは、ACF-[OPdChWR]で処理していないが、抗原感作により攻撃を受けた右ひざを持つ動物を示す。

10

【0137】

実施例8：C5aアンタゴニストの局所皮膚投与

本発明は、C5aのアンタゴニストの局所投与が、補体システムの活性化を包含する局所炎症疾患の処置に用い得ることを教示する。本実施例において、我々は、C5aアンタゴニストの局所適用により、全身性薬理作用、および循環中に薬理的な適切濃度のC5aアンタゴニストの出現が生ずることを立証する。

【0138】

環状アンタゴニストのin vivoの薬理特性を、下記局所皮膚投与を試験した。エンドトキシンのモデルを使用し、ここで、1mg/kg Escherichiacoli liposaccharide (LPS; serotype 55:BS, Sigma, USA, stored at 100 mg/mL in dH₂O, 4)をラットにi.v注射して、循環中のPMNレベルおよび血圧の急性変化を発生させる。

20

【0139】

これらパラメーターを、C5aRアンタゴニスト(1mg/kg i.v または50mg/kg/ラット局所的)の存在下および非存在下で測定した。この研究は、全身性薬理活性が観察されたため、C5a受容体アンタゴニストの局所投与がこれら化合物の送達に関する有効な方法であることを示す。

【0140】

200-250g重量の雌ウィスターラットを、全てのC5a受容体アンタゴニストのin vivo試験に使用した。ラットを、上記方法を用いて麻酔し、加熱パッドに移し、体温が実験中維持するようにした。カテーテルを、大腿部静脈に挿入し、縫合して固定し、ヘパリン化した生理食塩水(100 μL)で洗浄した。アンタゴニストまたはビヒクルのいずれかをラットに投与した。静脈注射(10%エタノールを含有する生理食塩水200 μL中1mg/kg、LPS攻撃の10分前)または局所的に(50%ジメチルスルホキシド/H₂O中、部位あたり10mg、攻撃の完了60分前)で、ラットを、LPS(生理食塩水(100 μL)中2 μg kg⁻¹ i.v)、組換え体ヒトC5a(100 μL中2 μg kg⁻¹)、ビヒクル対照のいずれかを用いて、アンタゴニストまたはビヒクル対照の、i.v投与10分後または局所投与の60分後に、大腿部のカテーテルからi.v注入した。全ての薬剤を、2分間にわたってi.vで注射し、その後生理食塩水(100 μL)の注入により、薬物の送達を完全にした。

30

40

【0141】

全血液試料(0.1 mL)を、薬物およびLPSまたはC5a投与時に尾静脈から採取した。試料を、LPS(0時)の注射に対して-15、0、5、10、15、30、60、90、120および150分で採取し、ヘパリン含有チューブ中に(500 Units/mL)入れた。PMNを単離し、血液(100 μL)をHistopaque 1077 (Sigma U. S. A.)溶液(200 μL)上に重層し、400 xg、室温(25)、30分間で遠心分離した。血小板を多く含む血漿の上清層、単核白血球およびリンパ球の境界面およびHistopaqueの分離層を除去し、廃棄し、PMNおよび赤血球細胞を多く含む層を残す。冷蒸留水(4)(9 mL)を、残存ペレットに残し、40秒間振とうし、赤血液細胞を溶解させた。ダルベッコ・リン酸緩衝食塩

50

水(10x濃度)を添加し、等張に戻した。次いで、細胞を、400xg、15分間、10で遠心分離した。得られる上清を廃棄し、PMNのペレットを残した。PMNを、さらに生理食塩水(9mL)で洗浄し、再度400xg、10分間、10で遠心分離した。得られる上清をもう一度廃棄し、残存ペレットを、生理食塩水と混合ウェル(100μL)に再懸濁した。PMNの数を、血球計上で計測した。各時点での細胞数を、攻撃完了前またはLPSの前の0時点での全細胞数の%として計測した。

【0142】

この研究のために選択した雌ウィスターラットを、下記処理群に分割する：

- (a) LPS単独、この100μL中、5%エタノール(-15分)+1mg/kg LPS(0分)を入れた；
- (b) エタノール対照、この100μL中、5%エタノール(-15分)を入れ、ラットで測定したパラメーターに対するエタノールの影響を試験した；
- (c) アンタゴニスト対照、環状アンタゴニスト(1mg/kg)を-15分時点でi.v.により入れた；
- (d) i.v. アンタゴニスト+LPS、環状アンタゴニスト(-15分)(1mg/kg)およびLPS(0分)(1mg/kg)を入れる；そして、
- (e) 局所適用したアンタゴニスト+LPS、アンタゴニスト(10mg/ラット)を、ラットの腹部上に塗布し、次いで0分時点でLPSをi.v.注入した。

10

【0143】

ラットの皮膚に適用用量(50mg/kg)でC5aアンタゴニスト、例えば3D53(PMX53)の投与により、循環中の血漿において薬理的に顕著なレベルの薬物が検出された。種々の溶媒、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)、プロピレングリコール(PG)および水中に溶解して薬物を適用すると、様々な組み合わせにおいて、図12に示したように薬学的に適切な循環中の薬物濃度の出現を導く。これは、DMSO/蒸留H₂Oまたはプロピレングリコール(PG)/H₂O中3D53を皮膚適用することにより、15分以内に循環している血漿中にC5aアンタゴニストが出現し、有意なレベルが少なくとも4時間持続することを示す。

20

【0144】

実施例9：C5aアンタゴニストの皮膚適用後の全身効果

実施例8に記載のように、動物の皮膚へのC5aアンタゴニストの局所適用は、循環中の薬物の薬理的に適切なレベルを生む。これらのレベルが全身性活性を持つことを示すために、i.v. 投与したC5aの中性親和性効果を阻害するC5aアンタゴニストのこれらの循環レベルの能力を測定した。

30

【0145】

50%プロピレングリコールおよび50%蒸留H₂O中、C5a受容体アンタゴニスト3D53(10mg/per rat)を投与した。組成物を、30分間腹部皮膚(4x8cm²)上に均一に塗布し、次いで、C5aを、生理食塩水溶液中(200μL)、2μg/kg用量で、i.v. 投与した。血液試料を、各時点：-30(薬物投与前)、0(C5aの注射前)および5、15、30、60および120分、循環しているPMNを測定するために取り出した。

図13に示したように、化合物3D53の局所投与は、実際のC5aの中性親和性効果を防げた。

40

【0146】

実施例10：LPSの全身性効果を阻害するC5aアンタゴニストの局所投与

C5aアンタゴニスト、3D53(化合物1)、さらに化合物17および化合物45を、50%DMSO/50%H₂O中で10mg/ラット用量で、上記と同様に局所適用した。

LPSを、アンタゴニストの皮膚適用60分後、1mg/kgでi.v.注射した。循環するPMNレベルを、LPS注射後150分間追跡し、LPSを注射した時の0時間からのPMNレベルの%変化を計算した。この結果は、図14に示したが、局所的に適用した各C5aアンタゴニストがi.v. LPSに対する好中球の反応を阻害し、その阻害はこの薬物のi.v.投与後に観察される阻害に匹敵し得るということを示す。

50

【0147】

実施例11：虚血-再灌流損傷に対するC5aアンタゴニストの効果

下肢虚血-再灌流(I/R)損傷は、腹部動脈瘤の外科修復の後、さらに外傷圧縮損傷(korrigan and Stotland, 1993)後の深刻な問題である。骨格筋肉組織の虚血および続く再灌流は、作用を受けた筋肉における炎症応答、さらに他の組織における損傷誘導を刺激する(Gute et al, 1998)。肢虚血の重篤な症例において、発生する再灌流は、高い死亡率と関連し、多機能臓器不全を起こす(Defraigne and Pincemail, 1997)。ラットでの、下肢虚血-再灌流(I/R)の後の、局所的で離れた臓器損傷の様々なパラメーターを阻害する強力なC5a受容体アンタゴニストの能力を調査するために、ラット後肢を、2時間虚血に供し、4時間再灌流した。この止血帯ショックモデルは、下肢I/R損傷のモデルとして広く用いられている。

10

【0148】

ラットを、2時間両側後肢の虚血および4時間の再灌流に供した。薬物処理ラットに、i.v.で虚血10分前または再灌流の10分前に、または経口で(10 mg/kg)虚血30分前にAcF-[OPdCh aWR](1 mg/kg)を与えた。循環クレアチンキナーゼ(CK)、ラクトデヒドロゲナーゼ(LDH)、アラニンおよびアスパルテート・アミノトランスフェラーゼ(ALT/AST)、クレアチニン、血液尿素窒素(BUN)、多形核白血球(PMN)およびカルシウム(Ca^{++})およびカリウム(K^{+})イオンのレベルを測定した。この生物学的指標は、I/R事象の後に組織または臓器損傷を反映することが知られている。

20

【0149】

測定したその他のパラメーターには、尿タンパク質レベル、肺、肝臓および筋肉における筋肉浮腫およびミエロペルオキシダーゼ(MPO)濃度、肝臓懸濁液のTNF-濃度も含まれる。シャム手術した動物と比べてこれらマーカーのいずれにおいても顕著な変化は、全く観察されず、薬物単独では、これらマーカーにおける変化によって判定されるような悪影響がないことを示す。肢I/R損傷は、CK、LDH、ALT、AST、クレアチニン、BUN、タンパク尿、PMN、血清 K^{+} 、筋肉浮腫、臓器MPOおよび肝臓懸濁液のTNF-濃度が有意に増加するが、血清 Ca^{++} 濃度が有意に低下することによって特徴づけられる。ラットをAcF-[OPdCh aWR]で処理した場合、これら全てのパラメーターが有意に改善した。

30

【0150】

この試験を、the National Health & Medical Research Council of Australiaのガイドライン、およびthe University of Queensland Animal Ethics Committee承認の実験プロトコルに従って行った。250-300 gの体重の雌ウィスターラットを、一晚絶食させ、i.p.注射で、キシラジン(6 mg/kg)およびケタミン(120 mg/kg)を用いて麻酔した。麻酔を、ケタミンの追加注射により試験中維持した。ラットを、加熱パッド上におき、通常の体温を維持し、ポリエチレンカテーテルを、C5aアンタゴニストまたは7%エタノール/生理食塩水を注入するために右側の頸静脈に挿入した。次いで、両側の後肢虚血を、各後肢の大きな転子の上にラテックスのリング(marking rings; Hayes Veterinary Supplies, Brisbane, Australia)を適用することにより誘導した。虚血2時間後、ラテックスリングを、切断し、除去し、肢体を4時間の再灌流に供した。6つの実験群を用いた：(a)シャム手術したもの、(b)虚血単独、(c)I/R単独、(d)虚血10分前に投与したI/R+C5aアンタゴニスト(1 mg/kg, i.v.)、(e)虚血30分前に投与したI/R+C5aアンタゴニスト(10 mg/kg, p.o.)および(f)再灌流10分前に投与したI/R+C5aアンタゴニスト(1 mg/kg, i.v.)。

40

【0151】

シャム手術した動物は、虚血または再灌流のいずれも進行しなかった、そして虚血単独の動物を、その後の再灌流をせずに2時間止血帯を適用させた。その他の全ての群には、2時間の虚血、4時間の再灌流を行った。シャム手術処理群、虚血単独群およびI/R群を、虚血10分前に薬物の代わりに7%エタノール/生理食塩水を注入した。試験中、血液を、尾静脈から採取し、血清または血漿を、後の生物学的アッセイのために4 または

50

20 のいずれかで保存した。尿タンパク質レベルを測定するために、尿を、この試験の最後まで採取した。実験の終了時に、ラットを安楽死させ、肺の断片、肝臓および腓(ひ)腹筋を除去し、浮腫を秤量し、好中球の蓄積および肝臓 T N F を試験する。

【0152】

全ての実験結果を平均 ± 標準誤差 (S E M) として表現する。

【0153】

データ分析は、Graphpad Prism 3.0 software (GraphPad Software, Inc.USA)を用いて行った。統計学的比較を、シャム手術群、および I / R 単独群に対して、分散に関する 1 元配置分散分析、次いで Dunnett comparison post-test 分析を用いて行った。統計学的有意差を、 $P < 0.05$ で評価した。

10

【0154】

(a) 阻害クレアチンキナーゼおよびラクテートデヒドロゲナーゼの阻害

クレアチンキナーゼ (C K) の循環レベルを、製造業者の指示書に従って、C K キット (Sigma, St. Louis, USA) を用いて、虚血直後、次いで 1、2、3 時間の再灌流および試験完了時に採取した血清試料において測定した。血清を、I / R 単独動物において、C K 測定のために止血帯解放 10 分後に採取した。再灌流 2 時間後に採取した試料には 1 : 5 希釈を用いた。

【0155】

ラクテートデヒドロゲナーゼ (L D H) の循環レベルを、虚血直後、次いで 1、2、3 時間の再灌流および試験完了時に採取した血清試料で測定した。血清を、I / R 単独の動物において、L D H 測定のために止血帯解放 10 分後に採取した。L D H 濃度を、再灌流 2 時間後に採取した 1 : 4 希釈の試料を用いて、L D H キット (Sigma) で、製造業者の指示書に従って測定した。両酵素について、全試料を、4 で保存し、採取 24 時間以内で分析した。結果を、Sigma-Franke (SF) units/mL として表現した。

20

【0156】

図 15 に示したように、両側後肢 I / R により、再灌流の 1、2、3 および 4 時間後、C K および L D H 両方の循環レベルの上昇が生じ、4 時間後に両酵素はピークに到達した。虚血単独のラットは、シャム手術したラットと比べて、C K または L D H レベル (C K、 58.3 ± 23.5 units/mL; L D H、 269.5 ± 72.8 units/mL; $P > 0.05$; $n = 4$) のどちらも顕著な上昇は示さなかった。I / R 単独ラットにおいて、止血帯解放 10 分後 (C K、 73.9 ± 28.1 units/mL; L D H、 395.3 ± 123.2 units/mL; $P > 0.05$; $n = 4$)、シャム手術したラットと比較して、これらの酵素レベルにおいて顕著な増加はなく、4 時間にわたって再灌流に依存した上昇を示す。再灌流は、C K および L D H ($P < 0.05$) の両方の血漿レベルを有意に上昇させた。虚血前に、C 5 a アンタゴニストによって、i.v. (1 mg/kg) または経口 (10 mg/kg) のいずれかで処理したラットは、I / R 単独ラット ($P < 0.05$) と比較して、C K および L D H 両方に類似した有意に低いレベルを示した。さらに、再灌流直前に C 5 a アンタゴニスト (1 mg/kg) を i.v. 処理したラットは、虚血前処理ラット ($P < 0.05$) と類似した程度の C K および L D H レベルの顕著な阻害を示した。全ての薬物処理ラットにおける再灌流中のこれら酵素レベルは、シャム手術したラットよりも非常に高く、C 5 a アンタゴニスト ($P < 0.05$) による部分的な阻害を示す。

30

40

【0157】

(b) アラニントランスミナーゼおよびアスパルテート・アミノトランスフェラーゼの阻害

アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) およびアスパルテート・アミノトランスフェラーゼ (A S T) の循環レベルを、試験完了時、続く 2 および 3 時間の再灌流時に採取した血漿試料で測定した。止血帯解放 10 分後に、I / R 単独動物における A L T および A S T の測定のために、血清を採取した。A L T および A S T の濃度を、4 で保存した採取血漿を 24 時間以内に、A L T / A S T キット (GPT/GOT; Sigma) で、製造業者の指示書に従って測定した。

50

結果を、S F units/mLとして表現した。

【0158】

図16に示したように、肢体I/Rにより、再灌流の2、3または4時間後の血漿中、ALTおよびASTの上昇がおき、両酵素のピークが4時間後に達成した。虚血2時間単独のラットは、シャム手術したラットと比べて、ALTまたはASTレベル(ALT、 12.9 ± 4.6 unit/mL; AST、 91.4 ± 10.4 units/mL; $P > 0.05$; $n = 4$)いずれも顕著な増加を示さなかった。I/R単独のラットにおいて、シャム手術したラットと比べて、止血帯解放10分後、これら酵素レベル(ALT、 18.1 ± 4.4 units/mL; AST、 105.9 ± 21.3 units/mL; $P > 0.05$; $n = 4$)における顕著な増加を示さなかったが、それはまた再灌流に依存した上昇であることを示す。3群全てにおいて、C5aアンタゴニスト処理ラットは、I/R単独ラットと比較して、ALTおよびASTレベルにおいて類似した顕著な低下を示すことがわかった($P < 0.05$)。2または3時間ではなく再灌流の4時間後、薬物処理ラットは、シャム手術したラットと比較して、ALTのレベルを有意に上昇した($P < 0.05$; 図16A)。対照的に、これら薬物処理ラットは、シャム手術したラットと比較して、測定した全ての時点でASTレベルが増加し、ALTおよびASTに対してC5aアンタゴニストの分化抑制を示す($P < 0.05$; 図16B)。

(c) カリウムおよびカルシウムイオンの血清レベルにおける変化の阻害

カリウムイオン(K^+)の血清レベルを、各実験の完了時およびI/R単独動物に対して止血帯解放10分後、flame photometer(Corning 435; Corning, U.S.A.)で測定した。血清カルシウムイオン(Ca^{++})濃度を、試験完了時およびI/R単独動物について止血帯解放10分後に、カルシウムキット(Sigma)を用いて測定した。試料を、 -20°C で保存し、 K^+ および Ca^{++} レベルを、採取2週間以内に測定した。結果を、mmol/Lとして表現し、表1にまとめた。

【0159】

表1：ラットにおける虚血後および4時間の再灌流後の血清カチオンレベルの変化

【表16】

実験群	n ^a	血清 K^+ (mmol/L)	血清 Ca^{++} (mmol/L)
シャム手術	8	$4.84 \pm 0.29^*$	$2.66 \pm 0.06^*$
虚血単独	4	$4.70 \pm 0.17^*$	$2.52 \pm 0.10^*$
I/R ^b 単独	10	$7.53 \pm 0.34^†$	$2.23 \pm 0.09^†$
I/R + 1mg/kg i.v. 虚血前	8	$6.13 \pm 0.18^*$	$2.46 \pm 0.04^*$
I/R + 10mg/kg p.o. 虚血前	6	$5.57 \pm 0.58^*$	$2.49 \pm 0.04^*$
I/R + 1mg/kg i.v. 再還流前	6	$5.02 \pm 0.32^*$	$2.45 \pm 0.10^*$

データは平均 \pm S E Mを表現する。

ラット数

虚血/再灌流

* $P < 0.05$ vs I/R単独

† $P < 0.05$ vs シャム手術したもの

【0160】

血液尿素の窒素、クレアチニンおよび尿タンパク質の阻害

血液尿素窒素(BUN)の循環レベルを、尿素窒素キット(Sigma)を用いて、製造業者の指示書に従って、試験の完了時に採取した血清試料中で測定した。試料を、 -20°C で保存し、採取2週間以内に分析した。クレアチニンの循環レベルを、クレアチニンキット(Sigma)を用いて、製造業者の指示書に従って試験完了時に血清試料中で測定した。試験完了1時間前に採取した尿試料中のタンパク質濃度を、タンパク質キット(Sigma)により、製造業者の指示書に従って測定した。試料を、 4°C で保存し、採取24時間以内に分析した。mg/dLとして表現した3つ全てのパラメーターについての結果を、表2に示した。

10

ラットにおける虚血および4時間の再灌後の腎臓損傷マーカーにおける変化

【0161】

表2：ラットにおける虚血および4時間再灌流後の肝臓損傷マーカーにおける変化

【表17】

実験群	n ^a	血清BUN ^b (mg/dL)	血清クレアチニン (mg/dL)	尿タンパク質 (mg/dL)
シャム手術	8	21.9 ± 1.2*	0.79 ± 0.12*	10.7 ± 2.2*
虚血単独	4	22.8 ± 2.5*	0.62 ± 0.26*	13.3 ± 7.0*
I/R ^c 単独	10	41.9 ± 3.1 [†]	1.66 ± 0.09 [†]	120.3 ± 18.9 [†]
I/R + 1mg/kg i.v. 虚血前	8	23.6 ± 1.6*	1.07 ± 0.07*	36.4 ± 11.4*
I/R + 10mg/kg p.o. 虚血前	6	21.8 ± 2.1*	1.14 ± 0.14*	45.8 ± 9.8*
I/R + 1mg/kg i.v. 再灌流前	6	22.0 ± 2.2*	1.22 ± 0.05*	41.2 ± 11.4*

20

30

データは平均 ± S E Mを表す

^a ラット数

^b 血液尿素の窒素

^c 虚血 / 再灌流

^d 検出できない

* $P < 0.05$ vs I / R 単独

† $P < 0.05$ vs シャム手術したもの

40

【0162】

高カリウム血症を、再灌流4時間後シャム手術したラットと比べて、I / R単独ラットで観察した($P < 0.05$)。再灌流の直前に処理したラットは、ほぼ通常レベルを示すが、3つの薬物処理群の全てのラットは、I / R単独ラットよりも K^{+} レベルが有意に低かった($P < 0.05$)。虚血および再灌流4時間後、I / R単独ラットは、シャム手術した動物と比べて、 Ca^{++} の血清濃度が有意に低かった($P < 0.05$)。3つの薬物処理群の全てのラットは、I / Rで誘導された Ca^{++} レベルの減少と同様の阻害を示した($P < 0.05$)。薬物処理したI / Rラット、さらに虚血単独のラットにおける K^{+} および Ca^{++} の両方のレベルは、シャム手術したラットのレベルと有意差はなかった($P > 0.05$)

50

)。I / R 単独ラット (K^+ 、 5.27 ± 0.49 mmol/L ; Ca^{++} 、 2.50 ± 0.17 mmol/L ; $P > 0.05$; $n = 4$) における止血帯解放 10 分後のこのようなイオンのレベルは、シャム手術したラットにおけるレベルと有意差はなかった。

【0163】

虚血および 4 時間の再灌流後、I / R 単独ラットは、シャム手術したラットと比べて、有意に血清 BUN およびクレアチニンレベルが上昇し、さらに尿タンパク質濃度も上昇した ($P < 0.05$)。これらのパラメーターのいずれにおいても、2 時間の虚血単独は、シャム手術したラットと比べて、これらのパラメーターのいずれにおいても上昇しなかった ($P > 0.05$)。

【0164】

全 3 群において C5 a アンタゴニストで処理したラットは、I / R 単独ラットと比べて、これらのパラメーターのレベルが有意に低下し ($P < 0.05$)、これらのレベルは、シャム手術したラットのレベルと有意差はなかった ($P > 0.05$)。

【0165】

多形核白血球数および好中球の蓄積に関する阻害

虚血前および試験完了時に採取したヘパリン化血液試料を、Strachan et al., (2000) に記載のように循環 PMN の数を測定した。最終試料中の PMN の数を、虚血前の数の平均 $\% \pm SEM$ として表現した。

【0166】

図 17 A に示したように、循環 PMN の数は、シャム手術したラットと比べて、再灌流 4 時間後の I / R 単独ラットにおいて有意に上昇することが判った ($P < 0.05$)。虚血単独ラットは、シャム手術したラットと比べて、PMN の有意な上昇を示さなかった ($P > 0.05$)。薬物処理群全てのラットにおいて、PMN 数は、シャム手術したラットの数と有意差はなく ($P > 0.05$)、I / R 単独ラットと比べて有意に低下しており ($P < 0.05$)、虚血前の i.v. (1m/kg) 処理したラットが最大の阻害効果を提示した。

【0167】

ラットの肝臓、肺および筋肉中の好中球浸潤を、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性のレベルを測定することによって決定した。試験完了時に得た、肺 (~ 0.5 g)、肝臓 (~ 1 g) および左下肢筋肉 (~ 1 g) の断片を秤量し、次いでリン酸緩衝食塩水 (PBS) (1 mL) を用いて懸濁した。次いで、試料を、肝臓および肺の試料には 20 秒間、または筋肉試料には 60 秒間、超音波処理した。遠心分離 ($14,000 \times g$ 、10 分間、 22°) の後、得られる上清を、MPO レベルについて直ぐに試験した。アッセイ混合物は、O-ジアナジジン (2.85 mg/mL ; signa)、水素ペルオキシダーゼ (0.85%) および PBS 中で $1:40$ 希釈した試料を含む。吸光度を、基質添加 5 分後に 450 nm で読み取り、結果を吸光度 units/組織 g として表現した。

【0168】

ラットの後下肢筋肉、肺および肝臓中の MPO 活性のレベルを、組織中への好中球滞留の指標とした (Kyriakides et al., 2000)。図 17 B、C および D に示したように、I / R 単独ラットの後下肢筋肉、肺および肝臓において、シャム手術したラットのレベルと比べて、MPO 活性が有意に上昇したが ($P < 0.05$)、一方で、シャム手術したラット、虚血単独ラットは、これらの組織のいずれにおいても MPO 活性の有意な上昇を示さなかった ($P > 0.05$)。全て 3 つの群において薬物処理ラットは、I / R 単独ラットに匹敵した全ての組織において MPO 活性において有意な減少を示し ($P < 0.05$)、このレベルは、シャム手術したラットにおけるレベルと有意差を示さなかった ($P > 0.05$)。

【0169】

肝臓懸濁液 TNF の阻害

TNF のレベルを、前記のように、酵素結合免疫吸着剤アッセイ (OptEIA, Pharmingen, USA) を用いて、肝臓懸濁液の上清試料において測定した (Strachan et al., 2000)。肝臓懸濁液試料の $1:10$ 希釈の上清を、アッセイに用いた。上清を、 -20° で保存し、採取試料を 2 週間以内に分析した。結果を、ng/g 組織として表現した。図 18 に示したよ

10

20

30

40

50

うに、I / R 単独ラットからの肝臓懸濁液試料は、シャム手術したラットからのレベルと比べて、TNF- α 濃度が有意に増加した ($P < 0.05$)。虚血単独ラットにおける TNF- α 抗体のレベルは、シャム手術したラットレベルと有意な差はなかった ($P > 0.05$) の。薬物処理ラットにおいて、3 群全ては、I / R 単独ラットと比べて、TNF- α 濃度において同様に低下し ($P < 0.05$)、シャム手術した動物のレベルとは有意差はなかった ($P > 0.05$)。

【0170】

筋肉浮腫の阻害

試験完了時に得られる右下肢筋肉 (~ 1 g) の断片を秤量し、24 時間 80 °C でオーブン内に静置して再度秤量した。湿重量対乾燥重量比を測定し、筋肉浮腫の指標とした。図 19 に示したように、I / R 単独ラットにおける後下肢筋肉の湿重量対乾燥重量比は、シャム手術した動物と比べて、有意に増加した ($P < 0.05$)。虚血単独動物における比は、シャム手術した動物と有意差はなかった ($P > 0.05$)。薬物処理ラットの 3 群全てにおいて、I / R 単独ラットと比べて、湿重量対乾燥重量比は同様の低下を示し ($P < 0.05$)、これらの値は、シャム手術した動物では有意差はなかった ($P > 0.05$)。

【0171】

この結果は、組織ストレスの様々な指標によって測定したように、2 時間の止血帯により誘導した両側後下肢虚血および 4 時間の再灌流に供したラットが、局所損傷および、肺、肝臓および腎臓に対する損傷の両方をこうむったことを示すものである。虚血単独に供したラットは、シャム手術した動物に比べて、疾患マーカーにおける変化は顕著ではなかった。また、再灌流 10 分間後に I / R 単独の動物から採取した血液も、シャム手術した動物と比べて、CK、LDH、AST、ALT、 K^+ または Ca^{++} の血漿または血清レベルにおける顕著な変化はなかった。局所骨格筋肉損傷の重症度を、再灌流 4 時間後の筋肉浮腫の増加および好中球の蓄積、さらに再灌流期間中の血清 CK および LDH を測定することによって評価した。サイトゾルの酵素である CK は、筋肉において優勢であり、筋肉組織損傷に関する信頼性のあるマーカーである (Tay et al., 2000)。ラクテートデヒドロゲナーゼは、筋肉で見いだされたサイトゾル酵素でもあるが、数多くの他の組織にも存在する (Carter et al., 1998)。結果として、LDH は、筋肉損傷に関するあまり特異的な尺度ではないが、依然一般的な組織損傷の尺度を提供するものであった。

【0172】

離れた臓器損傷の指標を、虚血および再灌流に供した動物の肺、肝臓および腎臓で検出した。肺損傷の強度を、肺柔組織中の好中球の蓄積増加を測定することによって評価した。また、肝臓の損傷を、肝臓の TNF- α および好中球の蓄積における増加を測定することによって、そして ALT および AST の血漿レベルの増加を測定することによって定量した。ALT および AST の血漿レベルの増加は、肝臓病理学的なマーカーとして使用されてきたが、これら両酵素は筋肉中에서도見いだされ、従って、これらのいかなる増加も、肝臓損傷よりもむしろ一部は筋肉に関連している (Tay et al., 2000) かもしれない。骨格筋 I / R 後の腎臓機能不全は一般的である (Tanaka et al., 1995)。我々は、I / R ラットにおいて、血清 BUN および血清クレアチニンの増加を見いだした。

【0173】

しかしながら、クレアチニン、特に BUN は筋肉から誘導され、この観察される増加は、筋肉損傷に関連し得る (Carter et al., 1998)。我々は、I / R ラットにおいて尿タンパク質中でかなり増加することを見出したが、それはある程度の腎臓損傷を示す。

【0174】

C5a アンタゴニスト AcF-[OPdChaWR] は、このモデルにおいて局所組織および隔離した内臓損傷の多数の疾患マーカーを阻害することがわかった。これらの結果は、骨格筋肉 I / R 損傷の病態生理学において C5a に対する重要な役割を示唆する。ヒトにおいて下肢虚血および再灌流の後の合併症の高い発病率を示すので、本発明の C5a 受容体アンタゴニストは、これら合併症、特に I / R 損傷が予測される場合に、例えば手術上の処理の際に、これら合併症の起こりうる将来的治療を提示するものである。前炎症性

10

20

30

40

50

サイトカインの産生および好中球の密集の両方を阻害するC 5 a アнтаゴニストの能力は、疾患改変特性における重要な因子でありうる。ここに示された経口活性は、臨床的環境において、その広範な使用に対して有用な薬物特性である。

【0175】

議論

本発明は、ヒトC 5 a にも結合する細胞に結合するように予め組織された、一連の配座的に拘束された回転を含む環状分子を記述するものである。本発明の化合物の主な特徴は、環状骨格によって提示された予め組織された回転配座であり、その構造が少なくとも3つの疎水性基を隣接するスペース中に集め、それが疎水性表面「パッチ」を作り出す。

【0176】

10

アンタゴニストのこの回転配座は、環状ペプチドが、C 5 a 受容体の膜貫通領域中で、ヒトC 5 a のC 末端によって結合される位置でまたは近傍で結合するのを可能にする。

【0177】

本明細書に記載の結果は、非常に強く配座的に拘束された小分子のC 5 a のアンタゴニストの設計と開発を可能にした。原則として、これら環状アンタゴニストの主な特徴は、本明細書に記載の環状ペプチド骨格に結合するものと同等または類似した置換基を受容体に結合したときに、これらC 5 a 受容体アンタゴニストによって占領されるものと類似した3次元空間へ、同じように投影する関連のない非ペプチドテンプレート进行設計するのに有用なものである。

【0178】

20

環状ペプチドは、薬物候補として非環状ペプチドを超えるいくつかの重要な利点がある(Fairlie et al 1995, Fairlie et al, 1998, Tyndall and Fairlie, 2001)。本明細書中に記載の環状化合物は、少なくとも数時間、37 で、ヒト血液または血漿中、ヒトまたはラットの胃液、または消化酵素、例えば、ペプシン、トリプシンおよびキモトリプシンの存在下、タンパク質分解に対して安定である。対照的に、L-アミノ酸からなる短い直鎖ペプチドは、その状況下で数分以内に、急速にアミノ酸成分に分解される。第2の利点は、非環状または直鎖ペプチドと対照的に、環状および非ペプチド分子によってとられる拘束された単一配座にあり、それは受容体の結合に必要なもののほかに溶液中の多様な構造をとるための十分な柔軟性がある。第3には、本発明に記載のような環状化合物は、通常、まれに経口的に投与され得ない非環状ペプチドよりも、薬剤として、脂溶性が高く、薬理的生物利用性が高い。第4には、環状分子の血漿中の半減期が、ペプチドよりも通常長い。

30

【0179】

当業者には明らかなように、本発明は、明確および理解の目的で、いくらか詳細に説明してきたが、明細書中で開示された本発明の概念の範囲を逸脱せずに、本明細書に記載の態様および方法に対して様々な修飾および改変をなし得る。次頁に記載する本明細書中で引用された文献を、出典明示により本明細書の一部とする。

【0180】

引用文献

Carter WO, Bull C, Bortolon E, et al. A murine skeletal muscle ischemia-reperfusion injury model : differential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. J Appl Physiol 1998; 85 : 1676-1683.

40

Defraigne JO, Pincemial J. Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prevention. Acta Chir Belg 1997 ; 97 : 176-186.

DeMartino, J.A., Konteatis, Z.D., Siciliano, S.J., Van Riper, G. , Underwood, D.J., Fischer, P.A., Springer, M.S. J. Biol. Chem., 1995 270 15966-15969

Demartino, J. A. , Van Riper, G., Siciliano, S-J., Molineaux, C.J., Konteatis, Z.D., Rosen, H. Springer, M.S.

J. Biol. Chem., 1 269 14446-14450.

50

- Ember, J.A. , Sanderson, S.D., Taylor, S.M., Kawahara, M. and Hugli, T.E.J. *Immunol.*, 1992 148 3165-3173.
- Fairlie, D.P., Wong, A.K. ; West, M. W. *Curr. Med. Chem.*, 1998, 5, 29-62.
- Fairlie, D.P., Abbenante, G and March,D. *Curr. Med. Chem.*, 1995 2 672-705.
- Finch, A.M., Vogen, S.M., Sherman, S. A., Kirnarsky, L., Taylor, S.M., and Sanderson, S.D.J. *Med Chem.* , 1997 40 877.
- Gerard, C and Gerard, N.P. *Ann. Rev. Immunol.*, 1994 12 775-808.
- Gerard, N and Gerard, C. *Nature*, 1991 349 614-617.
- Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ.
- Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biol Biochem* 1998; 179 :169-187. 10
- Haviland, D. L., McCoy, R.L., Whitehead, W. T., Akama, H. , Molmenti, E. P. , Brown, A., Haviland, J. C. , Parks, W.C. , Perlmutter, D.H and Wetsel, R.A.J. *Immunol.*, 1995 154 1861-1869.
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Luly, J.R., Carter, G.W.J. *Med. Chem.*, 1991 34 2068-71.
- Kawai, M., Quincy, D.A., Lane, B., Mollison, K.W., Or, Y.-S., Luly, J.R., and Carter, G.W.J. *Med. Chem.*, 1992 35 220-223.
- Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14:165-175. 20
- Kohl, J., Lubbers, B., Klos, A., et al. *Eur. J. Immunol.*, 1993 23 646-652.
- Konteatis, Z.D., Sicilian, S.J., Van Riper, G., Molineaux, C.J., Pandya, S., Fischer, P., Rosen, H., Mumford, R.A., and Springer, M.S.J. *Immunol.*, 1994 153 4200-4204.
- Kyriakides C, Austen WG, Jr., Wang Y, et al. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma* 2000;48:32-38.
- Morgan, E.L., Sandersori, S.D., Schloz, W., Noonai, D.J., W Weigle, W.O. and Hugli, T.E. *J. Immunol.*, 1992 48 3937-3942.
- Sanderson, S.D., Ember, J.A., Kirnarsky, L. , Sherman, S.A., Finch, A.M., Taylor, S.M. *J. Med. Chem.*, 1994 37 3171-3180. 30
- Sanderson, S.D., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Vogen, S.M., Prakesh, O., Ember, J.A., Finch, A.M. and Taylor, S.M. *J. Med. Chem.*, 1995 38 3669-3675.
- Siciliano, S.J., Rollins, T.E., DeMartino, J., Konteatis, Z., Malkowitz, L., VanRiper, G., Bondy, S., Rosen, H. and Springer, M. *S.Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994 91 1214-1218.
- Sim, E. *The Natural Immune System. Humoral Factors*, 1993, IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- Strachan, AJ, Haaïma, G, Fairlie, DP and SM Taylor. Inhibition of the reverse passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats by a small molecule C5a receptor antagonist. *J Immuno.* 164:6560-6565, 2000. 40
- Strachan AJ, Woodruff TM, Haaïma G, et al. A new small molecule C5a receptor antagonist inhibits the reverse-passive Arthus reaction and endotoxic shock in rats. *J Immunol* 2000 ; 164 : 6560-6565.
- Tanaka T, Kita T, Liu R, Tanaka N. Protective effect of peptide leukotriene antagonist on renal failure induced by a tourniquet in rabbits. *Forensic Sci Int* 1995; 71 :57-64.
- Tay SK, Ong HT, Low PS. Transaminitis in Duchenne's muscular dystrophy. *Ann Acad Med Singapore* 2000 ; 29 :719-722.
- Tempero, R.M., Hollingsworth, M.A., Burdick, M.D., Finch, A.M., Taylor S.M., V 50

ogen, S.M., Morgan, E.L., and Sanderson, S.D. J. Immunol., 1997 158 1377-1382. Tyndall, J.D.A.; Fairlie, D.P. Curr. Med. Chem. 2001, 8, 893-907.

Whaley, K. Complement in Health and Disease. Immunology and Medicine Series, Edward Reeves, W. G., 1987, MTP Press Ltd, Lancaster.

【図面の簡単な説明】

【0181】

【図1】図1は、静脈内(A)、経口(B)、局所(C)、AcF-[OPdCh aWR]および適当な対照(D)による皮膚アルサス(Arthus)反応に関連する血管滲出の阻害を示す。

【図2】図2は、静脈内(A)、経口(B)、局所(C)のAcF-[OPdCh aWR]および適当な対照(D)による皮膚アルサス反応に関連する循環TNF- α 上昇の阻害を示す。 10

【図3】図3は、静脈内、経口、局所のAcF-[OPdCh aWR]による皮膚アルサス反応に関連する病因指標の低下を示す。

【図4】図4は、消化器虚血-再灌流誘発の腸浮腫に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【図5】図5は、消化器虚血-再灌流誘発の好中球減少症に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【図6】図6は、消化器虚血-再灌流誘発の血漿TNF- α 上昇に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。 20

【図7】図7は、消化器虚血-再灌流誘発の血漿ハプトグロビン上昇に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【図8】図8は、消化器虚血-再灌流誘発のアスパルテート・アミノトランスフェラーゼに対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【図9】図9は、消化器虚血-再灌流の組織病理に対するC5aアンタゴニストの作用を示す。

【図10】図10は、2~14日に経口投与されたAcF-[OPdCh aWR]による関節炎右膝関節肥厚の阻害を示す。

【図11】図11は、関節洗浄における右膝関節TNF- α およびIL-6レベルの阻害を示す。「非処置」は、AcF-[OPdCh aWR]で処置されていない動物を意味する。 30
ただし、右膝は抗原後に感作を受けた。

【図12】図12は、3D53のDMSO/蒸留水またはPG・H₂O液の皮膚適用が15分以内に循環血漿中にC5aアンタゴニストの出現をもたらすこと、および有意のレベルが少なくとも4時間持続することを示す。ポイントは各群(n=6~8)で平均±SEMを表示する。

【図13】図13は、C5aアンタゴニストの局所投与によるC5a誘発の好中球減少症の阻害を示す。結果を0時間ベースラインからの%変化で表す。

【図14】図14は、ラットにおいてC5aアンタゴニストの局所投与が静注のLPSの全身的作用を阻害することを示す。データによると、静脈(1mg/kg)または皮膚適用による局所(50mg/kg全適用量:溶媒ビヒクル50%DMSO/50%H₂O)での種々のC5aアンタゴニストの投与が静注LPS(1mg/kg)による好中球減少症を阻害する。(a)3D53(化合物1)、(b)化合物45、(c)化合物17。 40

【図15】図15は、ラットでの灌流時における(A)クレアチニン・キナーゼ(CK)および(B)乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血漿レベルの増加に対するC5aアンタゴニストAcF-[OPdCh aWR]の作用を示す。データは平均±SEM(n=6~10)を表示する。* P<0.05、全薬物処置群対虚血/灌流(I/R)単独群; + P<0.05、全薬物処置群対シャム手術群。

【図16】図16は、ラットでの灌流2、3、4時間後における(A)アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)および(B)アスパラテートアミノトランスフェラーゼ(ASAT)の血漿レベルの増加に対するC5aアンタゴニストAcF-[OPdCh aWR]の 50

作用を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 6 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、全薬物処置群対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、全薬物処置群対シャム手術群。

【図 17 A】図 17 A は、ラットにおける (A) 循環 PMN レベルを示す。レベルはラットにおける試験完了時に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【図 17 B】図 17 B は、ラットにおける (B) 筋肉ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を示す。レベルはラットにおける試験完了時に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【図 17 C】図 17 C は、ラットにおける (C) 肺 MPO レベルを示す。レベルはラットにおける試験完了時に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【図 17 D】図 17 D は、ラットにおける (D) 肝 MPO レベルを示す。レベルはラットにおける試験完了時に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

【図 18】図 18 は、試験完了時に採取されたラット肝ホモゲネートサンプル中の TNF- α レベルを示す。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

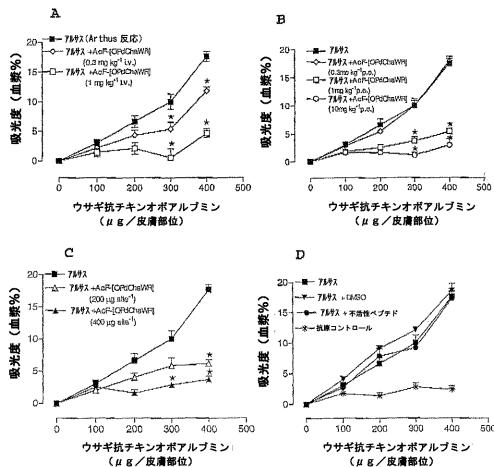
【図 19】図 19 は、試験完了時のラット後足筋肉の浮腫量 (ウェット・ツー・ドライ比率) を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 4 \sim 10$) を表示する。* $P < 0.05$ 、対虚血/灌流 (I/R) 単独群; + $P < 0.05$ 、対シャム手術群。

10

20

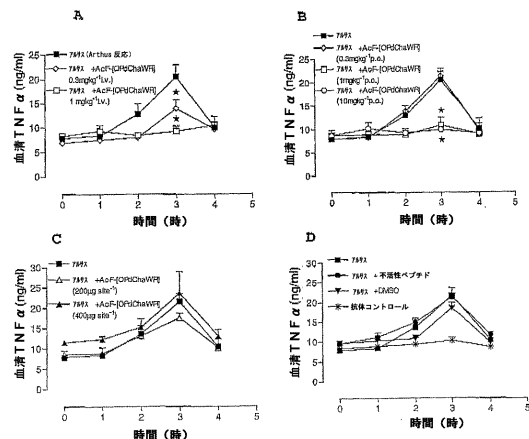
【図 1】

Figure 1

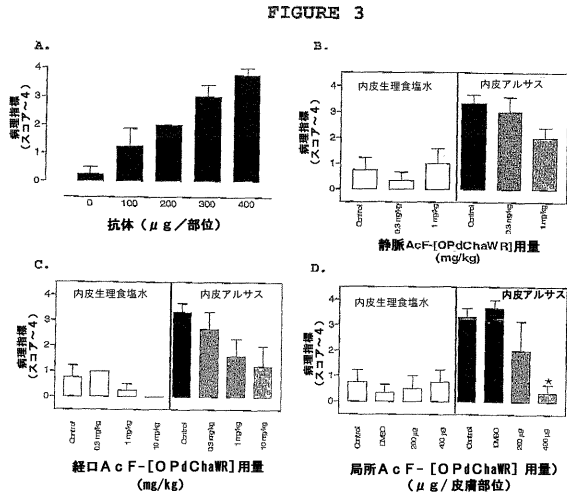


【図 2】

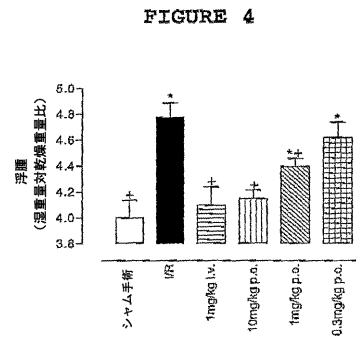
Figure 2



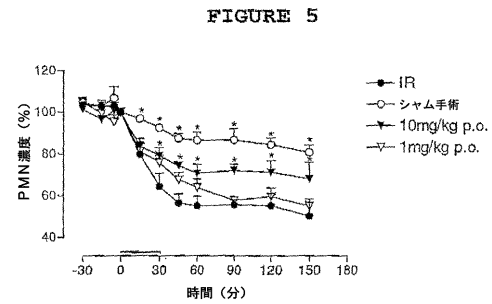
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

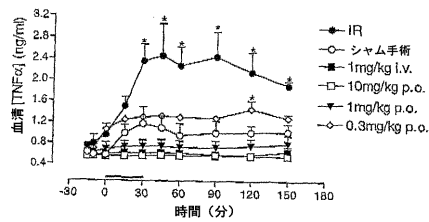
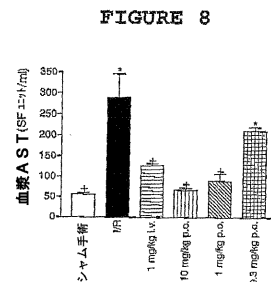
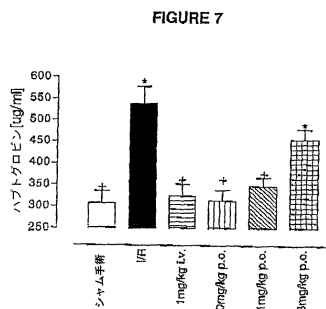


FIGURE 6

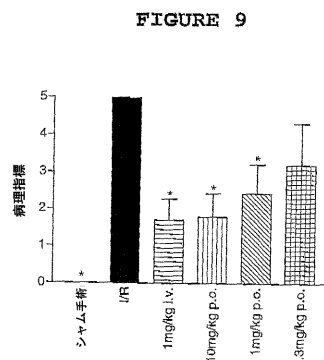
【図 8】



【図 7】

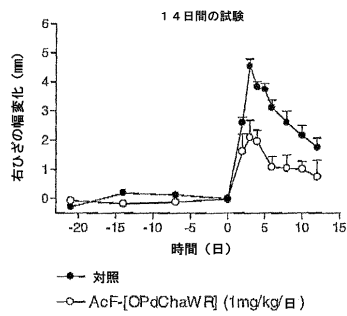


【図 9】



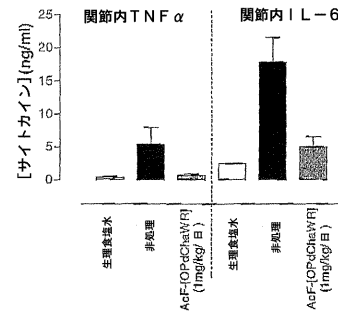
【図 10】

FIGURE 10



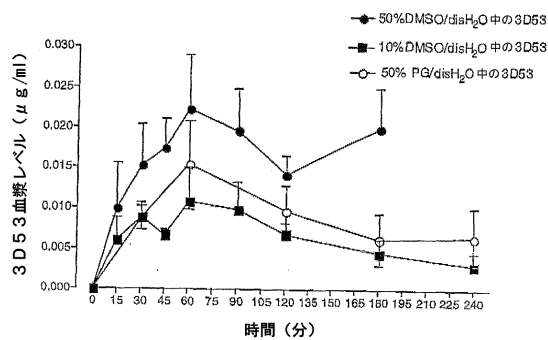
【図 11】

FIGURE 11



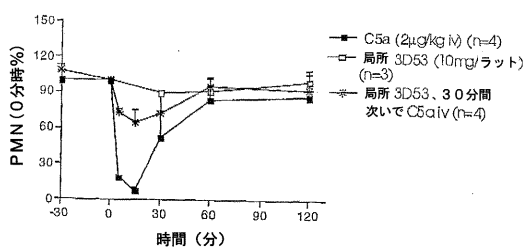
【図 12】

FIGURE 12



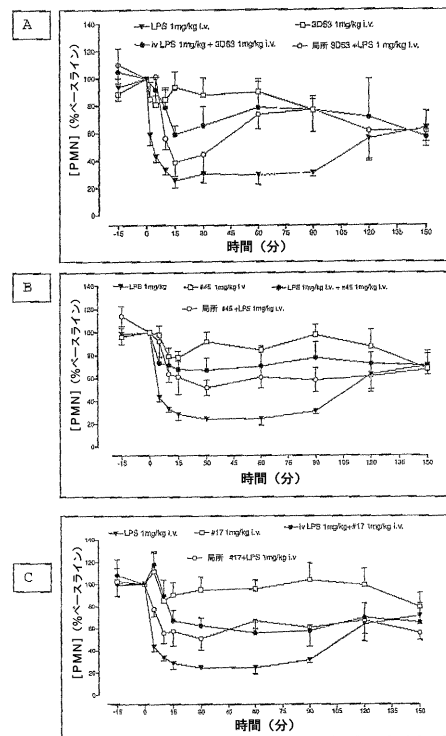
【図 13】

FIGURE 13



【図 14】

FIGURE 14



【図 15】

Figure 15A

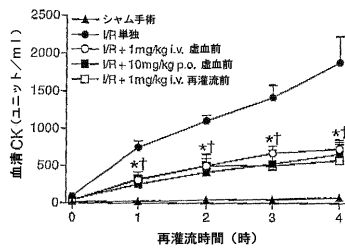
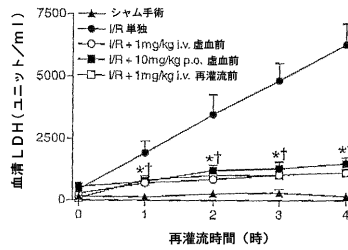


Figure 15B



【図 16】

Figure 16A

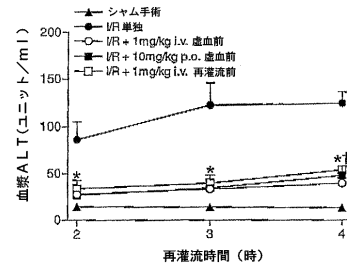
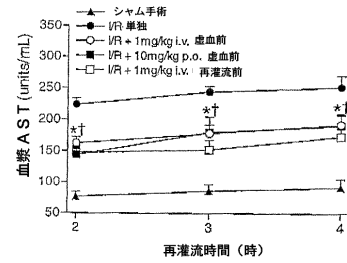
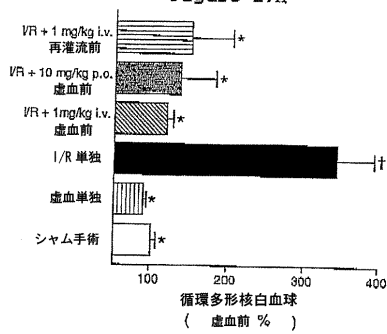


Figure 16B



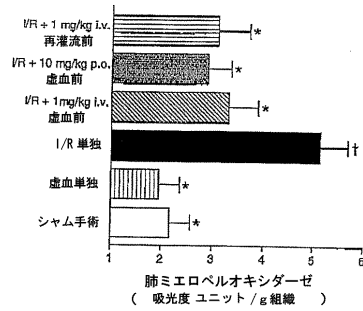
【図 17 A】

Figure 17A



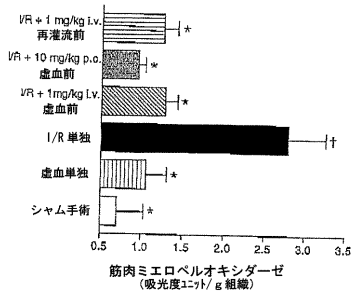
【図 17 C】

Figure 17C



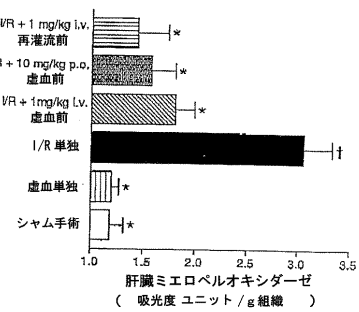
【図 17 B】

Figure 17B



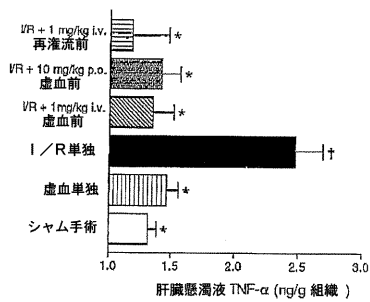
【図 17 D】

Figure 17D



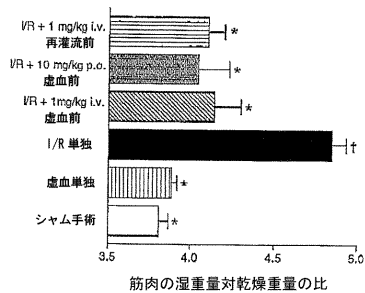
【 図 18 】

Figure 18



【 図 19 】

Figure 19



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成15年10月16日 (2003.10.16)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

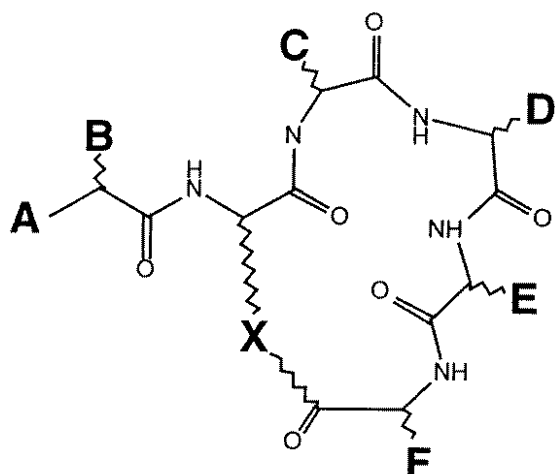
【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

Gタンパク質結合受容体のアンタゴニストであり、アゴニスト活性を実質的に有さない化合物であって、下記の一般式：

【化 1】



[式中、A は、H、アルキル、アリール、 NH_2 、NH - アルキル、N (アルキル) $_2$ 、NH - アリール、NH - アシル、NH - ベンゾイル、 NHSO_3 、 NHSO_2 - アルキル、 NHSO_2 - アリール、OH、O - アルキルまたは O - アリールであり；

B は、アルキル、アリール、ベンジル、ナフチルもしくはインドール基、または L - フェニルアラニンもしくは L - フェニルグリシンの側鎖であり；

C は、グリシン、アラニン、ロイシン、バリン、プロリン、ヒドロキシプロリンまたはチオプロリンの側鎖であり；

D は、D - ロイシン、D - ホモロイシン、D - シクロヘキシルアラニン、D - ホモシクロヘキシルアラニン、D - バリン、D - ノルロイシン、D - ホモノルロイシン、D - フェニルアラニン、D - テトラヒドロイソキノリン、D - グルタミン、D - グルタメートまたは D - チロシンの側鎖であり；

E は、L - 1 - ナフチルもしくは L - 3 - ベンゾチエニルアラニンであり、または L - フェニルアラニン、L - トリプトファンおよび L - ホモトリプトファンよりなる群から選ばれるアミノ酸の側鎖であり；

F は、L - アルギニン、L - ホモアルギニン、L - シトルリンまたは L - カナバニンの側鎖、あるいはこれらのバイオ同配体であり；

X は、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ または $-(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ 、 n が 1 ~ 4 の整数； $-(\text{CH}_2)_2\text{O}-$ ； $-(\text{CH}_2)_3\text{O}-$ ； $-(\text{CH}_2)_3-$ ； $-(\text{CH}_2)_4-$ ； $-\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{R}-$ ；あるいは $-\text{CH}_2\text{CHCOCH}_2\text{R}-$ 、R が普通のまたは希なアミノ酸の側鎖である]

を有する環状ペプチドまたはペプチド様化合物（ただし、この化合物は AcF-[OPdChaWR] （化合物 1）ではない）である化合物。

【請求項 2】

n が 2 または 3 である、請求項 1 の化合物。

【請求項 3】

A が、アセタミド基、アミノメチル基または置換もしくは非置換スルホナミド基である、請求項 1 または 2 の化合物。

【請求項 4】

置換スルホナミド上の置換基が、1 ~ 6 炭素原子のアルキル鎖またはフェニルもしくはトルイル基である、請求項 3 の化合物。

【請求項 5】

アルキル鎖が 1 ~ 4 炭素原子を有する、請求項 4 の化合物。

【請求項 6】

化合物が、C5a 受容体、パソプレシン受容体またはニューロキニン受容体に対するア

ンタゴニスト活性を有する、請求項 1 - 5 のいずれかの化合物。

【請求項 7】

化合物が、C 5 a R に対するアンタゴニスト活性を有するが、C 5 a アゴニスト活性を有さない、請求項 6 の化合物。

【請求項 8】

化合物が、アンタゴニスト活性をサブマイクロモル濃度で有する、請求項 1 - 7 のいずれかの化合物。

【請求項 9】

化合物が、受容体親和性 $IC_{50} < 25 \mu M$ およびアンタゴニスト強度 $IC_{50} < 1 \mu M$ を有する、請求項 8 の化合物。

【請求項 10】

化合物が、化合物 2 ~ 6、10 ~ 15、17、19、20、22、25、26、28、30、31、33 ~ 37、39 ~ 45、47 ~ 50、52 ~ 58 および 60 ~ 70 よりなる群から選ばれる、請求項 9 の化合物。

【請求項 11】

化合物が、化合物 33、化合物 60 または化合物 45 である、請求項 10 の化合物。

【請求項 12】

請求項 1 - 11 のいずれかの化合物を、薬学的に許容される担体または賦形剤とともに含む組成物。

【請求項 13】

G タンパク質結合受容体により調整される病的状態の処置方法であって、請求項 1 - 12 のいずれかの化合物の有効量を、該処置を必要とする哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【請求項 14】

G タンパク質結合受容体により調整される状態が、C 5 a 受容体により調整される状態である、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

状態が、C 5 a の過剰発現または過小調節を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

状態が、関節リウマチ、成人呼吸切迫症候群 (ARDS)、全身性エリテマトーデス、組織拒絶反応症、虚血性心疾患、再灌流障害、敗血症ショック、歯肉炎、腺維症、粥状動脈硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、喘息、痴呆、中枢神経系障害、肺創傷疾患、体外透析後症候群、および乾癬、湿疹、接触性皮膚炎などの皮膚炎症性障害よりなる群から選ばれる、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

再灌流障害の処置方法であって、請求項 1 - 12 のいずれかの化合物または化合物 1 の有効量を、該処置を必要とする哺乳動物に投与する工程を含む方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

実施例 3 : C 5 a の環状アンタゴニスト

これらの環状アンタゴニストおよびそれら明白な受容体結合親和性およびアンタゴニスト効力のうちのいくつかの例を表 3 に示す。表 3 中、アミノ酸について 1 文字コードを使用する。「d」は、アミノ酸の右旋性 (dextro) (D) 形態を示す。「ND」は、「測定されない (not determined)」を示す。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

実施例4：薬種の精製

表2の結果を基にして、我々は、下記のように、ヒト多形核白血球上のC5a受容体への活性なアンタゴニズムのための、精巧な薬物を開発することができる：

位置「A」は、活性に対する悪影響がなく、H（例えば、化合物17、18）、アルキル、アリール、NH₂、NHアルキル、N(アルキル)₂、NHアリール、NHアシル（例えば、化合物1、3、4、5、6）、NHベンゾイル（例えば、化合物2）、OH、Oアルキル、Oアリール、NH₂SO₂アルキル（例えば、化合物10）、NH₂SO₂アリール（例えば、化合物11）を含む非常に多くの基を許容できる。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01427
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C07K 7/56; A61K 38/08; A61P 11/00, 9/10, 17/00, 37/00		
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)		
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) STN: CAS ONLINE - orn-[valhypphepro]' .. '[argharlys]/SQSP and keyword: cyclic		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 00406 A1 (University of Queensland) 7 January 1999 See whole document	1-24
X	Paczkowski N J et al, "Pharmacological characterization of antagonists of the C5a receptor" British Journal of Pharmacology 1999 128 (7) pages 1461-1466 See whole document	1-24
<input 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 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 16 December 2002		Date of mailing of the international search report 20 DEC 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer O.L. CHAI Telephone No : (02) 6283 2482

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU02/01427

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos : 1-16, 19-24 (all in parts)

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:

The claims are couched in broad terms and cover a large number of compounds and thus a complete search is not feasible for economic reasons. Consequently the search has been restricted to those compounds described in the examples.

3. ☐ Claims Nos :

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/01427

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member	
WO	9900406	AU	80926/98	EP	1017713
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デイビッド・フェアリー

オーストラリア 4 1 2 7 クイーンズランド州スプリングウッド、トレバリヤン・ドライブ 7 3 番

(72)発明者 スティーブ・テイラー

オーストラリア 4 3 0 0 クイーンズランド州ベルバード・パーク、パーディタ・ストリート 1 7 番

(72)発明者 イアン・アレキサンダー・シールズ

オーストラリア 4 3 0 6 クイーンズランド州ミューアリー、シャーロックス・ロード・ロット 2 番

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA10 BA16 BA17 BA24 CA59 MA17
MA23 MA24 MA31 MA35 MA37 MA52 MA60 MA66 NA14 ZA02
ZA15 ZA16 ZA36 ZA40 ZA45 ZA59 ZA61 ZA89 ZA96 ZB07
ZB08 ZB11 ZB15 ZB35 ZC42
4H045 AA10 AA30 BA13 BA14 EA20 FA41 HA02