

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2016 年 1 月 28 日(28.01.2016)



(10) 国際公開番号  
**WO 2016/013557 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*A61K 31/196* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61K 31/192* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070767
- (22) 国際出願日: 2015 年 7 月 22 日(22.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-149613 2014 年 7 月 23 日(23.07.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 廣明 秀一(HIROAKI Hidekazu); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 天野 剛志(TENNO Takeshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Ai-

chi (JP). 中倉 由香子(NAKAKURA Yukako); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 野田 翔太(NODA Syouta); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

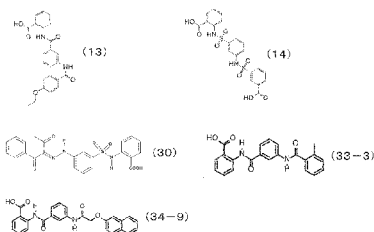
(74) 代理人: 松本 征二(MATSUMOTO Seiji); 〒1410031 東京都品川区西五反田 1 丁目 1 1 番 1 号 アイオス五反田駅前ビル 1001 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

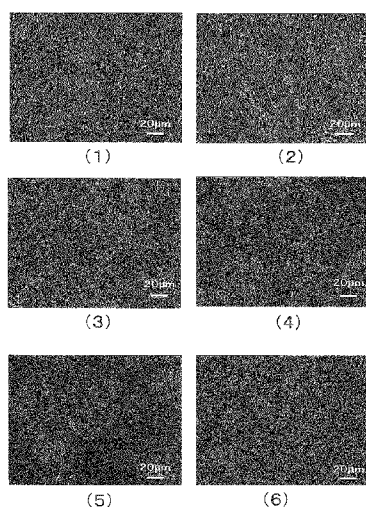
(54) Title: TIGHT JUNCTION FORMATION REGULATOR, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAID REGULATOR

(54) 発明の名称: タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物



(57) Abstract: Provided is a tight junction formation regulator which can regulate a specified stage in the mechanism of the formation of a tight junction. A tight junction formation regulator comprising at least one compound selected from compounds respectively represented by formulae (13), (14), (30), (33-3) and (34-9).

(57) 要約: タイトジャンクション形成メカニズムのどの段階の制御であるのか明らかなタイトジャンクション形成制御剤を提供する。下記式(13)、(14)、(30)、(33-3)及び(34-9)で表される化合物を少なくとも一種含むタイトジャンクション形成制御剤。





(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物に関するもので、特に、クローディンとLNX1との相互作用を阻害することで、タイトジャンクションの形成を制御する制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物に関するものである。

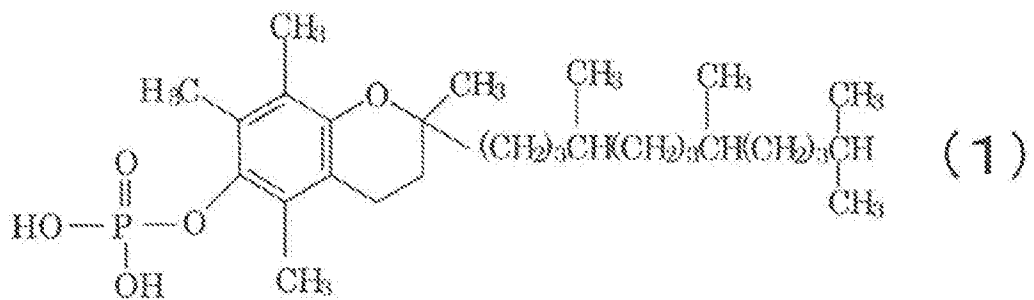
### 背景技術

[0002] 体内の恒常性を維持するためには、水分、糖分、イオンなどを体内に封じ込めることが重要である。上皮細胞は外界と内部を隔てる役割を担っている細胞であり、細胞同士をつなぐ細胞接着装置が発達している。いくつか存在する細胞接着装置のうち最も外側に存在するのがタイトジャンクションである。タイトジャンクションは上皮細胞間で膜タンパク質クローディンが強固に相互作用することで形成されており、水やイオンの自由な透過を妨げている。このようなタイトジャンクションの機能は、皮膚の保湿や、脳内への異物混入を防いでいる血液脳関門において特に重要である。したがって、タイトジャンクション形成を制御する物質は、化粧品や医療品開発のターゲットとして注目を浴びている。

[0003] タイトジャンクション形成の促進剤としては、下記式（1）で表わされる化合物のナトリウム塩及びカリウム塩を配合したタイトジャンクション形成促進剤が知られている（特許文献1参照）。

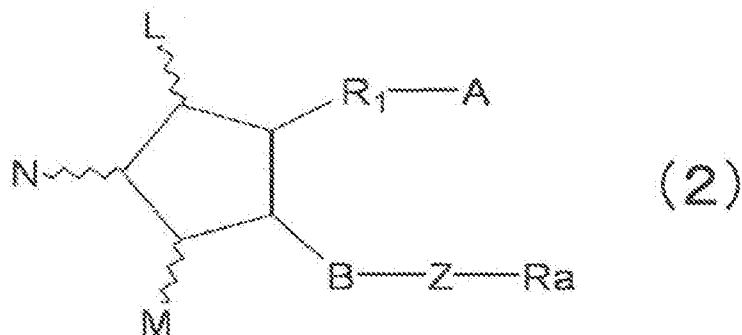
[0004]

[化1]



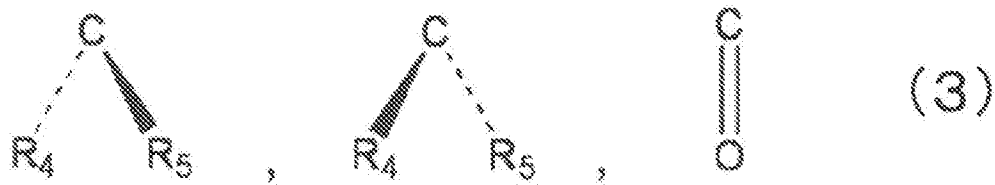
[0005] また、下記式 (2) で表わされる化合物を含む医薬組成物も知られている (特許文献 2 参照)。

[化2]



[式中、 $\text{L}$ 、 $\text{M}$ および $\text{N}$ は、水素原子、ヒドロキシ、ハロゲン原子、低級アルキル、ヒドロキシ(低級)アルキル、低級アルカノイルオキシまたはオキソであり、ここで $\text{L}$ および $\text{M}$ の少なくとも1つは水素以外の基であり、5員環は少なくとも1つの二重結合を有していてもよく； $\text{A}$ は、 $-\text{CH}_3$ 、または $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{COCH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ またはそれらの官能性誘導体であり； $\text{B}$ は、単結合、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ または $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-$ であり； $\text{Z}$ は、

[化3]



または単結合であり、

ここで $R_4$ および $R_5$ は、水素、ヒドロキシ、ハロゲン、低級アルキル、低級アルコキシまたはヒドロキシ(低級)アルキルであり、 $R_4$ および $R_5$ が同時にヒドロキシおよび低級アルコキシであることはなく；

$R_1$ は、非置換、またはハロゲン、低級アルキル、ヒドロキシ、オキシ、アリールまたは複素環基により置換された、二価の飽和または不飽和の低または中級の脂肪族炭化水素残基であり、脂肪族炭化水素中の少なくとも1つの炭素原子は所望により酸素、窒素または硫黄により置換されており；そして

$R_a$ は、非置換、またはハロゲン、オキシ、ヒドロキシ、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、シクロ(低級)アルキル、シクロ(低級)アルキルオキシ、アリール、アリールオキシ、複素環基または複素環オキシ基により置換された、飽和または不飽和の低または中級の脂肪族炭化水素残基；低級アルコキシ；低級アルカノイルオキシ；シクロ(低級)アルキル；シクロ(低級)アルキルオキシ；アリール；アリールオキシ；複素環基；複素環オキシ基である]。

[0006] 更に、漏出性または損傷を受けたタイトジャンクションの処置および細胞外マトリクスの増強をするため、体液の移動を予防もしくは制限するか、組織もしくは細胞を安定化するか、または汚染を予防することが必要な部位に投与されたときに、それらを達成する、有効量の自己組織化ペプチドを含む処方物であって、該自己組織化ペプチドは、同じペプチド鎖内の、正に帯電した残基の配列および負に帯電した残基の配列；正に帯電した残基の一続きの1つ以上および負に帯電した残基の一続きの1つ以上；およびそれらの組み合わせからなる群から選択される処方物、も知られている（特許文献3参

照)。

[0007] ところで、クローディンは様々な種類が知られており、その発現は細胞・組織において特異性がある。その特異性は、水やイオンの透過性において差をもたらしているため、特異的なクローディンの発現、タイトジャンクションの形成は組織特異的な機能発現においてきわめて重要である。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0008] 特許文献1：特許第4 6 8 4 9 0 6 号公報

特許文献2：国際公開第2 0 1 0 / 1 3 7 7 3 1 号

特許文献3：国際公開第2 0 0 8 / 1 1 3 0 3 0 号

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、上記特許文献1及び2に記載されている発明は、クローディンの発現を活性化する化合物の投与によりクローディンの発現量が増加し、その結果、タイトジャンクションの形成を促しているが、組織特異的・細胞特異的なクローディンの発現を制御する技術ではない。また、上記特許文献3に記載されている発明は、損傷を受けた細胞間を強制的に結びつけるペプチドに関する技術で、負傷や外科手術等の緊急時には役立つものの、タイトジャンクション形成を制御するものではない。

[0010] 更に、細胞間の接着は、クローディンとその裏打ちタンパク質ZO-1／2が相互作用することで自動的に行われるが、上記特許文献1～3に記載されている発明は、単に現象を確認しているに過ぎず、細胞のどの位置にクローディンが形成されるのか等の具体的なメカニズムに基づいた技術ではないため、医療応用性に限界があるという問題がある。

[0011] 本発明は、上記従来の問題を解決するためになされた発明であり、鋭意研究を行ったところ、(a) 下記式(13)、(14)、(30)、(33-3)、(34-9)に示す化合物は、クローディンを細胞内へ取り込ませる

ことでタイトジャンクションを消失させるタンパク質であるLNX1と相互作用すること、(b)前記相互作用の結果、LNX1とクローデインとの相互作用が阻害され、クローデインは細胞内へ取り込まれなくなりタイトジャンクションは維持され続けること、を新たに見出し、本発明を完成した。

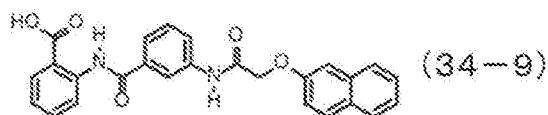
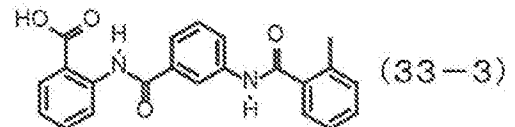
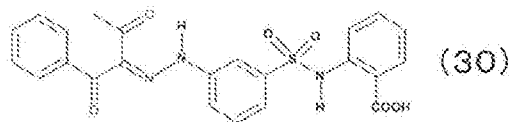
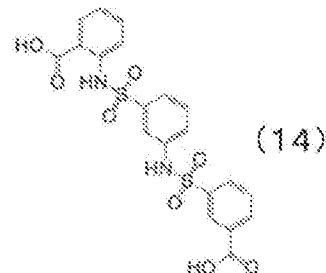
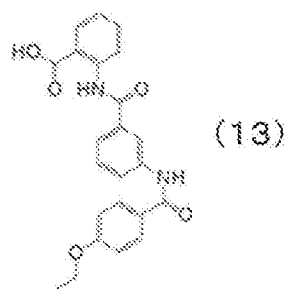
[0012] すなわち、本発明の目的は、タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明は、以下に示す、タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物に関する。

[0014] (1) 下記式(13)、(14)、(30)、(33-3)及び(34-9)で表される化合物を少なくとも一種含むタイトジャンクション形成制御剤。

[化1]



(2) 前記化合物が、式(13)又は(14)で表される化合物である上記(1)に記載のタイトジャンクション形成制御剤。

(3) 前記化合物がクローデインの細胞内への取り込みを防ぐことでタイト

ジャンクションの形成を制御する上記（１）又は（２）に記載のタイトジャンクション形成制御剤。

（４）上記（１）～（３）の何れかーに記載のタイトジャンクション形成制御剤を含む医薬組成物。

## 発明の効果

[0015] 本発明のタイトジャンクション形成制御剤は、LNX1に特異的に反応することでLNX1とクローディンとが相互作用することを阻害し、その結果、クローディンの細胞内への取り込みが阻害されることでタイトジャンクション形成状態を制御することができる。したがって、タイトジャンクション形成メカニズムのどの段階での制御であるのか明らかであることから、医薬品、化粧品等への応用が可能である。

## 図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、細胞接着装置の概要を説明する図である。

[図2]図2は、本発明のタイトジャンクション形成の制御概要を説明する図である。

[図3]図3は、LNX1の構造を示している。

[図4]図4は、実施例1及び比較例1の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの結果を示す。

[図5]図5は、実施例1及び比較例1から得られた各残基のシグナル変化の大きさを示すグラフである。

[図6]図6は、mLNX1PDZ2の構造のリボンモデルを示す。

[図7]図7は、実施例2及び比較例1の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの結果を示す。

[図8]図8は、実施例2及び比較例1から得られた各残基のシグナル変化の大きさを示すグラフである。

[図9]図9は、mLNX1PDZ2の構造のリボンモデルを示す。

[図10]図10は、図面代用写真で、（１）は実施例3の〔Western blotting〕により得られた写真、（２）は化合物を添加しなかった

〔免疫染色〕により得られた写真である。

[図11]図 1 1 は、図面代用写真で、（１）は実施例 3 で得られた免疫染色の写真、（２）は実施例 4 で得られた免疫染色の写真、（３）は実施例 5 で得られた免疫染色の写真、（４）は実施例 6 で得られた免疫染色の写真、（５）は実施例 7 で得られた免疫染色の写真、（６）は比較例 1 4 で得られた免疫染色の写真である。

### 発明を実施するための形態

[0017] 以下に、本発明のタイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物について詳しく説明する。

[0018] 図 1 は、細胞接着装置の概要を説明する図である。上皮細胞は、隣り合う細胞と相互に接着したシートを形成することで、体の内部と外界の環境が分けられているが、細胞間の接着には、細胞膜に存在する細胞接着装置が重要な役割を果たしている。脊椎動物の上皮には、頂端面から基底面に向かって密着結合（tight junction；TJ）、接着結合（adherens junction；AJ）、デスモソーム、ギャップ結合と呼ばれる細胞接着装置が存在する。それぞれの細胞接着装置は機能が異なっており、タイトジャンクションは上皮層の隣接する細胞同士を密着させ、分子が細胞の間から漏れないように機能している。AJは隣接する細胞のアクチンの束同士、デスモソームは隣接する細胞の中間径フィラメント同士をつなぎ、どちらも上皮細胞同士の結合に関与している。ギャップ結合は細胞間チャンネルを形成し、無機イオンや水溶性小分子を通過させる機能を担っている。

[0019] このうち、最も頂端面に位置するタイトジャンクションは、空間の区画化や恒常性の維持に重要な役割を果たしている。タイトジャンクションは細胞間を通過する物質を大きさや電荷選択的に制御するバリア機能を担っている他、細胞膜上に存在するタンパク質や脂質の拡散を防ぎ、細胞極性を維持するフェンス機能を担っている。このため、タイトジャンクションの機能障害は炎症性腸疾患（IBD）や感染症、がん、血管性浮腫、血行性転移等の様々な疾病を引き起こすと考えられ、タイトジャンクション形成を適切に制御

することで、医療に応用することができる。

[0020] 図2は、本発明のタイトジャンクション形成の制御概要を説明する図である。タイトジャンクションの主要構成因子は4回膜貫通型タンパク質クローディン（CLD）である。クローディンは膜裏打ちタンパク質であるZO-1との複合体であるが、生体中では、クローディンを消失させるタンパク質であるLigand of Numb binding protein X-1（LN X 1）、及びZO-1の両方が発現している（図2（1））。そして、LN X 1よりZO-1の発現が優位になると、消滅するクローディンよりZO-1と複合体を形成するクローディンの方が多くなるため、タイトジャンクションが形成される（図2（2））。逆に、ZO-1よりLN X 1の発現が優位になると、ZO-1と複合体を形成するクローディンより消滅するクローディンの方が多くなるため、タイトジャンクションは消滅する（図2（3））。本発明のタイトジャンクション形成制御剤は、LN X 1のクローディン認識部位に特異的に結合する低分子化合物を用いることでLN X 1とクローディンの相互作用を阻害し、タイトジャンクション形成を制御するものである。

[0021] 本発明のタイトジャンクション形成制御剤に含まれる低分子化合物は、*in silico*スクリーニング法を用い、LN X 1に結合することでLN X 1とクローディンの相互作用を阻害する化合物の候補リストを作成し、各候補化合物の有用性について確認をすることで得られる。化合物の候補リストは、（1）クローディンと相互作用するLN X 1の領域を同定し、（2）上記（1）で同定した領域について、単体の立体構造をX線結晶構造解析にて決定し、（3）クローディン由来ペプチドと相互作用する領域の相互作用面を溶液NMR法にて同定し、（4）同定した相互作用面に結合しうる低分子化合物の候補（阻害物質の候補）について、DOCK、AutoDock、GOLD、FlexX等の公知のドッキングソフトウェアを用いて探索することで作成することができる。また、各候補化合物の有用性は、NMR、*in vitro*、動物実験等、公知の有用性確認実験により確認をすれ

ばよい。

[0022] 図3は、LNX1の構造を示している。LNX1は、細胞運命決定とエンドサイトーシスに関わるタンパク質Numbと相互作用するタンパク質として知られている。LNX1は2つのスプライシング変異体p70（分子量約70kDa）とp80（分子量約80kDa）が存在し、共通の構造としてNumb結合領域NPAYモチーフと、タンパク質-タンパク質相互作用モジュールとして機能するPDZドメインを4つ有する。また、LNX1p80のみN末端側にRINGフィンガードメインを持ち、E3活性を有している。本発明においては、LNX1p80のPDZ2ドメインに結合する化合物を探索したが、LNX1p80及びLNX1p70の他のドメインもクローディングと結合することが知られていることから、他のドメインに結合する低分子化合物を探索してもよい。LNX1p80及びLNX1p70のアミノ酸配列は公知であり、UniProt（O70263）等から入手することができる。

[0023] 本発明のタイトジャンクション形成制御剤は、医薬組成物、医薬部外品、化粧品または食品のいずれにも用いることができ、その剤型としては、例えば、散剤、丸剤、錠剤、注射剤、座剤、乳剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤（チンキ剤、流エキス剤、酒精剤、懸濁剤、リモナーデ剤等を含む）、化粧水、クリーム、乳液、ゲル剤、エアゾール剤、パック、洗浄剤、浴用剤、ファンデーション、打粉、口紅、軟膏、パップ剤、ペースト剤、プラスター剤、エッセンス、錠菓、飲料等が挙げられる。また、本発明の効果を損なわない範囲内で、通常の化粧品、医薬部外品、医薬組成物等に用いられる各種成分、例えば油性成分、乳化剤、保湿剤、増粘剤、薬効成分、防腐剤、顔料、粉体、pH調整剤、紫外線吸収剤、抗酸化剤、香料等を適宜配合することができる。更に、本発明のタイトジャンクション形成制御剤は、抗炎症剤、整腸剤、抗菌剤、抗生物質等の公知の医薬品と組み合わせた医薬組成物として用いることもできる。例えば、O157等の毒素を産出する大腸菌の抗菌剤にタイトジャンクション形成制御剤を添加すると、タイトジャンクションを強

化することで産出した毒素の吸収を抑えながら、大腸菌を死滅させることができる。

[0024] 油性成分としては、例えば流動パラフィン、ワセリン、マイクロクリスタリンワックス、スクワラン、ホホバ油、ミツロウ、カルナウバロウ、ラノリン、オリーブ油、ヤシ油、高級アルコール、脂肪酸、高級アルコールと脂肪酸のエステル、シリコーン油等が挙げられる。乳化剤としては、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の非イオン界面活性剤、ステアロイル乳酸ナトリウム等のアニオン界面活性剤、大豆リン脂質等の両性界面活性剤、塩化アルキルトリメチルアンモニウム等のカチオン界面活性剤が挙げられる。保湿剤としては、例えばグリセリン、ソルビトール、キシリトール、マルチトール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、1,3-ブチレングリコールなどが挙げられる。増粘剤としては、例えばカルボキシビニルポリマー、キサンタンガム、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、ベントナイト等の粘土鉱物等が挙げられる。薬効成分としては、例えば各種ビタミンおよびその誘導体、アラントイン、グリチルリチン酸およびその誘導体、各種動植物抽出物等が挙げられる。

[0025] 本発明のタイトジャンクション形成制御剤中に配合される化合物の量は、剤型や期待する効果の程度により異なるが、通常0.001質量%以上、好ましくは0.1～50質量%程度配合するのがよい。0.001質量%未満では十分な効果が得られにくく、50%を超えて配合した場合、効果の増強は認められにくく不経済である。また、化合物は単独又は組み合わせて用いてもよい。

[0026] 以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのもので

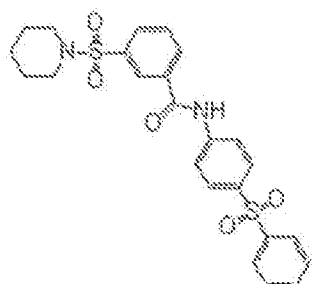
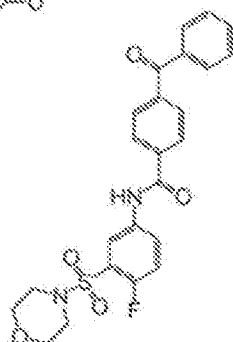
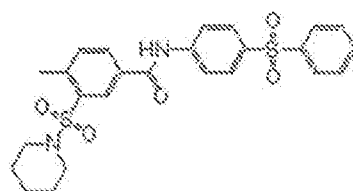
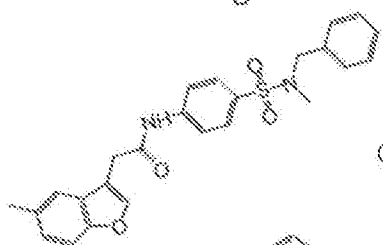
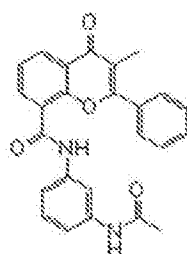
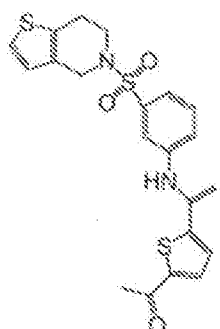
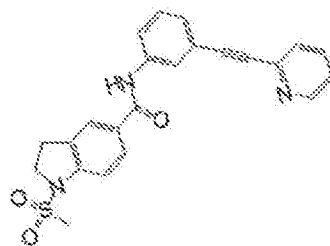
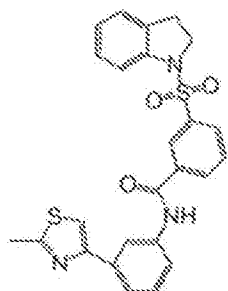
あるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

## 実施例

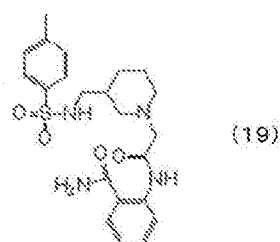
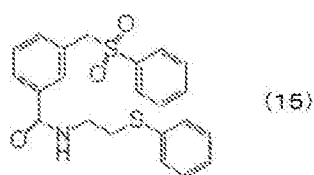
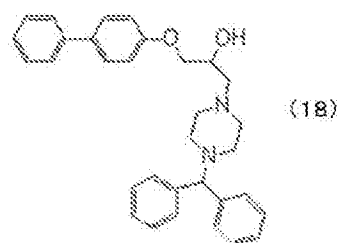
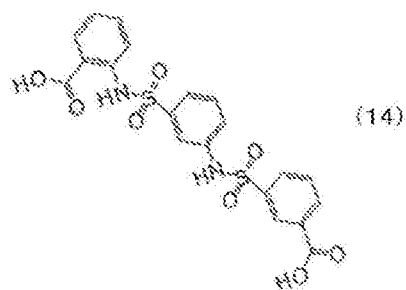
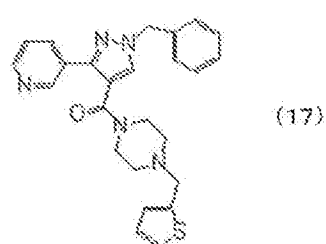
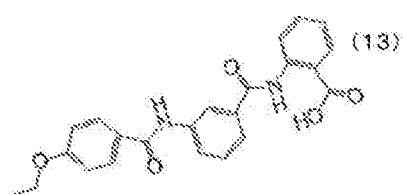
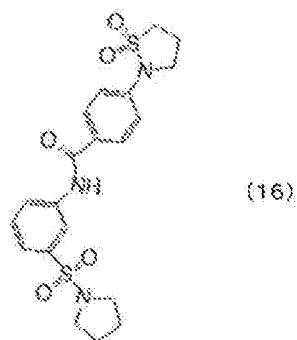
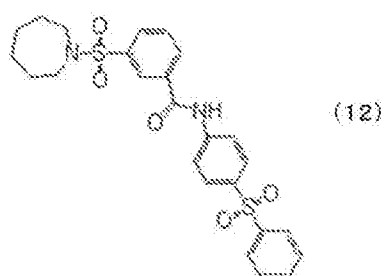
### [0027] [候補化合物リストの作成]

Protein Data Bank (PDB) から mLNx1p80 の PDZ2 ドメインの PDB ファイル (PDB ID: 3VQF)、化合物のデータベース ZINC (<http://www.zinc.docking.org>) および LigandBox (<http://www.ligandbox.protein.osaka-u.ac.jp/ligandbox/>) からリガンドファイル (MOL2 ファイル) を入手した。タンパク質-リガンド・ドッキングソフトウェア GOLD Suite に付属する分子ビューワー Hermes を立ち上げ、GOLD の Wizard を選択し、Load Protein ボタンで目的タンパク質の PDB ファイルを開き、その後は、マニュアルにしたがって、操作をした。なお、mLNx1PDZ2 とドッキングする化合物の検索は、入手したリガンドファイルからランダムに抽出した ZINC 由来の化合物約 24 万件、および LigandBox 由来の化合物約 24 万件から行った。以下に、候補化合物リストを記載する。なお、式 (4) ~ (32)、式 (33-1) ~ (33-11)、式 (34-1) ~ (34-14)、式 (35-1) ~ (35-2)、式 (36-1) ~ (36-2) で表す化合物はナミキ商事株式会社から購入することができる。

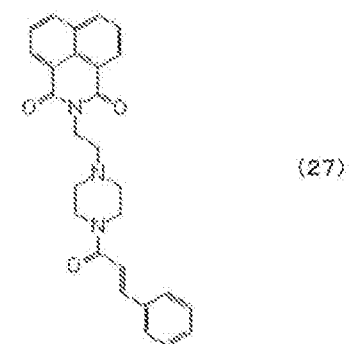
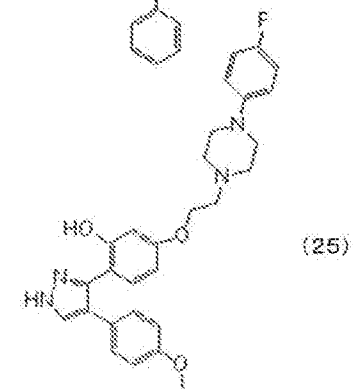
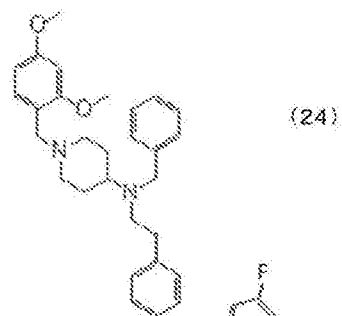
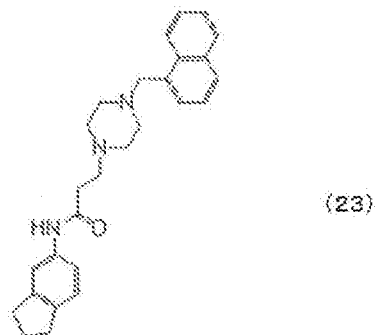
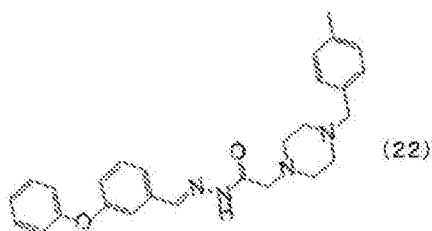
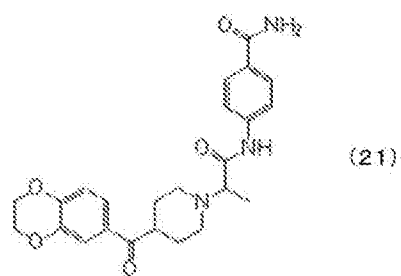
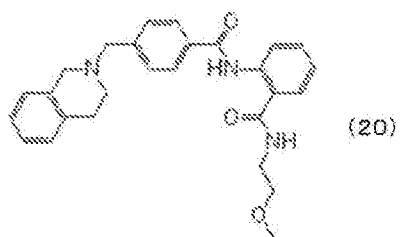
[化4]



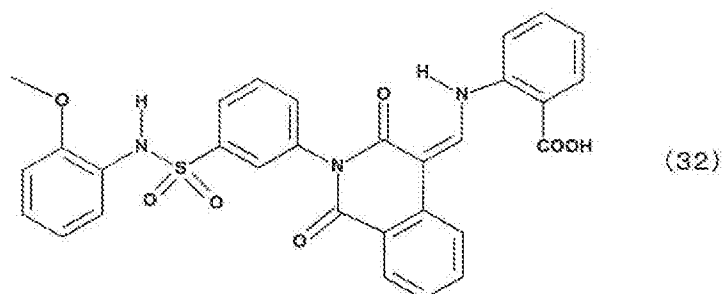
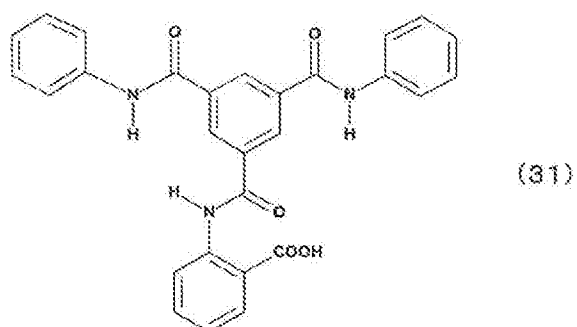
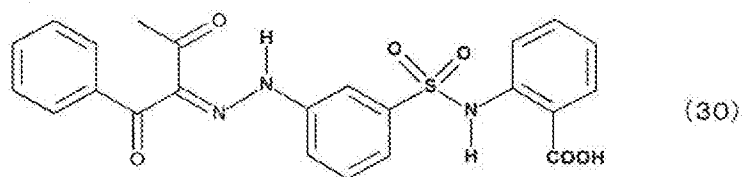
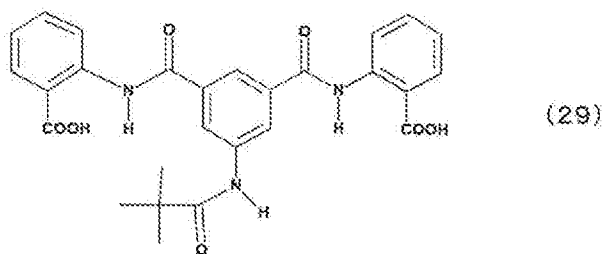
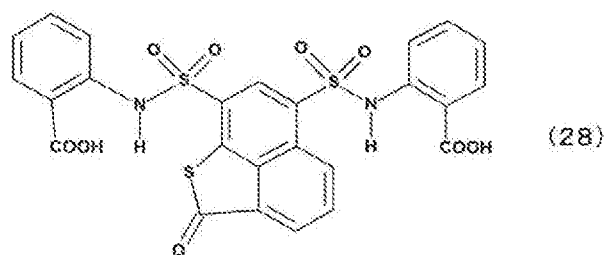
[化5]



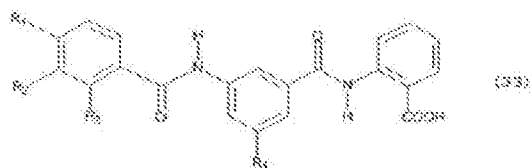
[化6]



[化7]



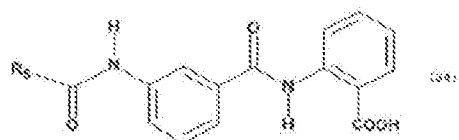
[化8]



式(33)の $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

| 式       | $R_1$                                        | $R_2$                                        | $R_3$          | $R_4$       |
|---------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|-------------|
| (33-1)  | $\text{CH}_3-$                               | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-2)  | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$                                  | $\text{Cl}-$   | $\text{H}-$ |
| (33-3)  | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$                                  | $\text{CH}_3-$ | $\text{H}-$ |
| (33-4)  | $\text{H}-$                                  | $\text{Cl}-$                                 | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-5)  | $\text{H}-$                                  | $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}-$    | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-6)  | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$                                  | $\text{Br}-$   | $\text{H}-$ |
| (33-7)  | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-8)  | $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}-$    | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-9)  | $\text{H}-$                                  | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ | $\text{H}-$    | $\text{H}-$ |
| (33-10) | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$    |             |
| (33-11) | $\text{NO}_2-$                               | $\text{H}-$                                  | $\text{H}-$    |             |

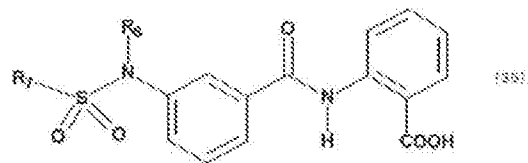
## [化9]



式(34)のR<sub>6</sub>の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

|        |  |         |  |
|--------|--|---------|--|
| (34-1) |  | (34-8)  |  |
| (34-2) |  | (34-9)  |  |
| (34-3) |  | (34-10) |  |
| (34-4) |  | (34-11) |  |
| (34-5) |  | (34-12) |  |
| (34-6) |  | (34-13) |  |
| (34-7) |  | (34-14) |  |

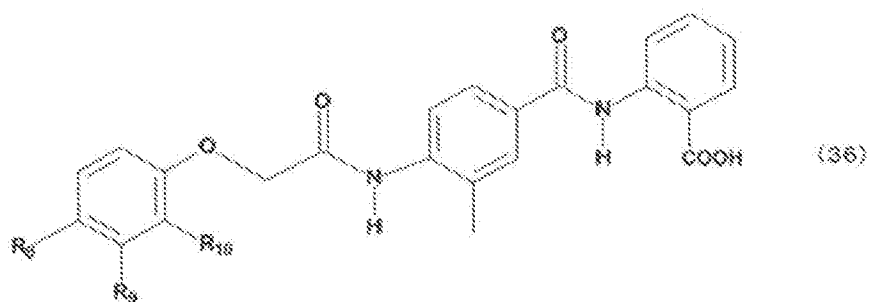
## [化10]



式(35)の $R_6$ 、 $R_7$ の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

| 式      | $R_6$             | $R_7$ |
|--------|-------------------|-------|
| (35-1) | H-                |       |
| (35-2) | CH <sub>3</sub> - |       |

## [化11]



式(36)の $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ の置換基を組合せた具体的化合物は以下のとおり。

| 式      | $R_8$                               | $R_9$             | $R_{10}$          |
|--------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
| (36-1) | (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH- | H-                | H-                |
| (36-2) | H-                                  | CH <sub>3</sub> - | CH <sub>3</sub> - |

[0028] [<sup>15</sup>N標識したマウス(m) LNX1PDZ2の培養・精製]

GE Healthcare社から購入したpGEX-6P-3プラスミドから作製したpGEX-6P3-Pプラスミド（天野剛志 他, “高効率かつ高速な融合タンパク質発現ベクターの構築法”、2006、実験医学、

24、1675-1680参照）に、mLNx1PDZ2（UniProt ID: O70263から入手したアミノ酸配列のアミノ酸番号381-467）をコードしているDNA断片（UniProtからリンクされているENA ID: AF03745.1の塩基番号1338-1598）を接続した。さらに紫外線吸収向上のため、上記mLNx1PDZ2断片の12塩基上流にチロシン残基を挿入するための3塩基（配列：TAT）を点変異により組み込んだmLNx1PDZ2のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質の発現プラスミド（pGEX-6P3-P mLNx1PDZ2+Y1）を作製し、大腸菌BL21（DE3）に形質転換し、<sup>15</sup>N標識したM9培地（1L: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 17.91g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.99g, NaCl 0.5g, thymidine 20mg, adenosine 20mg, guanosine 20mg, cytidine 20mg, thiamine 20mg, biotin 20mg, 10mM FeCl<sub>3</sub> 330μl, 1M MgSO<sub>4</sub> 1ml, 50mM MnCl<sub>2</sub> 1ml, 50mM CaCl<sub>2</sub> 2ml, 80% glycerol 1.4ml, 50mg/ml ampicillin 1ml, glucose 4g, <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl 0.5g）中で、1mM IPTGによる発現誘導後、20℃で一晩培養した。培養後、Beckman Coulter（J6-M1 Centrifuge）で遠心し（4000rpm、15min、4℃）、集菌した。

菌体に破碎バッファー（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH7.0、菌体1gに対し約10ml）を加え、懸濁し、Bioruptorで超音波破碎した（on time 30sec/off time 30sec、total 10min×4回）。破碎後、Hitachi High-Speed Refrigerated Cent

rifuges (himac CR22G) で遠心し (18000 rpm、20 min、4°C)、上清を回収した。上清をDEAEカラム (GE Healthcare)、GST-acceptカラム (nacalaitesque) に通し、GST融合タンパク質を樹脂に吸着させた。カラム上にPreScission protease 200  $\mu$ lを加え、4°Cで一晩インキュベートし、GSTタグを切断した。切断後、PreScission cleavageバッファー (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 7.0) で目的タンパク質を溶出した。得られたタンパク質溶液は、Microsep 1K Centrifugal Devices (PALL) を用いた遠心 (ROTANTA 460R) により濃縮し、AKTAprime plus (GE Healthcare) を用いてゲル濾過 (50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、pH 7.0) を行った。透析を行い、凍結乾燥により濃縮した後、NMRバッファー (20 mM MOPS、150 mM NaCl、50 mM MgSO<sub>4</sub>、pH 6.8) に透析し、<sup>15</sup>N-mLNX1PDZ2サンプルとした。

[0029] [mLNX1PDZ2の主鎖帰属]

次に、<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N標識したmLNX1PDZ2サンプル (約0.9 mM) を用いて、<sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-HSQC、HNCACB、CBCA (CO) NH、HNCA、HN (CO) CA、HN (CA) CO、HNCOスペクトルを測定し、Sparky 3.114を用いて連鎖帰属法により主鎖の帰属を行った。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトル上でpeak pickを行った後、対応するピークをHNCACB、CBCA (CO) NHスペクトル上で抽出し、stripを作成した。作成したstripを並べ替えることにより帰属を行った。HNCA/HN (CO) CA、HN (CA) CO/HNCOスペクトルも同様にしてstripを作成し、帰属を確定させた。また、自動帰属ソフトウェアMARS 1.2を用いて、帰属の確認を行った。NMR測定は、Bruker社AvanceIII 600 MHz デジタルNMR装置を用

いた。更に、 $^{15}\text{N}$ 標識した培地でm L N X 1 P D Z 2の発現中に $^{14}\text{N}$ アミノ酸を加えると、そのアミノ酸残基のNMRシグナルが消失する現象に基づくインバースラベル法を用いて帰属の確認を行ったところ、帰属した結果はほぼ正確であると確認できた。

[0030] [m L N X 1 P D Z 2と化合物のNMR滴定実験]

<実施例1>

$^{15}\text{N}$ 標識したm L N X 1 P D Z 2 (約0.1 mM) に、式(13)の化合物(終濃度0.2 mM、DMSO終濃度5%)を添加し、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを測定した。Sparky 3.114を用いて得られたスペクトルを解析した後、シグナルの化学シフト変化から、m L N X 1 P D Z 2と化合物の結合を確認した。なお、測定には、Bruker社Avance III 600 MHz デジタルNMR装置を用いた。

[0031] <比較例1>

式(13)の化合物を添加しなかった以外は、実施例1と同様に $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを測定した。

[0032] 図4は、実施例1及び比較例1の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの結果を示す。式(13)の化合物を添加しなかった比較例1のm L N X 1 P D Z 2のシグナルと、添加した実施例1のシグナルでは、一部のシグナルがシフトしていた。シグナルのシフトは、式(13)の化合物がm L N X 1 P D Z 2と結合することでドメインの微小な構造が変化したためで、以上の結果より、式(13)に表す化合物は、m L N X 1 P D Z 2と結合していることが確認できた。

[0033] 次に、m L N X 1 P D Z 2における式(13)に表す化合物の結合部位を次の手順により決定した。図5は、実施例1及び比較例1から得られた各残基のシグナル変化の大きさを示すグラフで、グラフからシグナルが0.015 ppm以上変化した残基を同定した。次に、公知のX線結晶解析により決定したm L N X 1 P D Z 2の結晶構造をもとに作製したリボンモデルに、シグナルが0.015 ppm以上変化した残基についてシグナルの変化の大き

さにしたがって色付けした。図6は、色付けしたmLNX1PDZ2のリボンモデルを示す。また、mLNX1PDZ2に対するクロードインのNMR滴定実験により予め確認したmLNX1PDZ2のリガンド認識部位と、上記のシグナルが変化した残基の位置はほぼ同じであった。以上の結果より、式(13)に表す化合物は、mLNX1PDZ2のリガンド認識部位に結合していることが確認できた。

[0034] <実施例2>

式(13)の化合物に換え、式(14)の化合物(終濃度1.0mM、DMSO終濃度5%)を添加した以外は、実施例1と同様にスペクトル解析した。

[0035] 図7は、実施例2及び比較例1の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの結果を示す。式(14)の化合物を添加しなかった比較例1のmLNX1PDZ2のシグナルと、添加した実施例2のシグナルでは、一部のシグナルがシフトしており、式(14)に表す化合物は、mLNX1PDZ2と結合していることが確認できた。

[0036] 次に、mLNX1PDZ2における式(14)に表す化合物の結合部位を、次の手順により決定した。図8は、実施例2及び比較例1から得られた各残基のシグナル変化の大きさを示すグラフで、グラフからシグナルが0.04ppm以上変化した残基を同定した。次に、実施例1と同様に、シグナルが0.04ppm以上変化した残基についてシグナルの変化の大きさにしたがってmLNX1PDZ2のリボンモデルに色付けした。図9は、色付けしたmLNX1PDZ2のリボンモデルを示す。また、mLNX1PDZ2のリガンド認識部位と、上記のシグナルが変化した残基の位置はほぼ同じであった。以上の結果より、式(14)に表す化合物は、mLNX1PDZ2のリガンド認識部位に結合していることが確認できた。

[0037] <比較例2～13>

式(13)に表す化合物に換え、式(4)～(12)及び式(15)～(17)に表す化合物を用いた以外は、実施例1と同様にスペクトル解析し比

較例 1 のスペクトルと対比した。しかしながら、何れの化合物もスペクトルのシグナル変化は見られなかった。

[0038] 以上の結果より、式 (13) 及び (14) に共通する構造であるアントラニル酸が、mLNX1PDZ2 との結合に重要であることが判明した。また、本発明者らは、以前に PDZ ドメインと低分子化合物との相互作用を NMR 滴定実験により検証しており、複数の PDZ ドメインに対し群特異的に結合する化合物として、DIF (diclofenac)、FLF (flufenamic acid)、FUA (fusidic acid) を同定している (Tenno, T., et. al., "Accidental Interaction between PDZ Domains and Diclofenac Revealed by NMR-Assisted Virtual Screening", 2013, Molecules, 18, 9567-9581 参照)。これらの化合物には、部分構造として安息香酸またはフェニル酢酸骨格が含まれる。さらに、これまでに PDZ ドメインの相互作用を阻害する低分子化合物としていくつか報告されているが、それらの化合物のほとんどに安息香酸骨格が含まれている (例えば、Fujii, N., et. al., "Rational design of a nonpeptide general chemical scaffold for reversible inhibition of PDZ domain interactions", 2013, Bioorg. Med. Chem. Lett., 17, 549-552, 等参照)。以上の結果から、PDZ ドメインとの結合には安息香酸骨格が重要であり、さらに mLNX1PDZ2 との結合にはアントラニル酸骨格が重要であることが示唆された。なお、化合物は、mLNX1PDZ2 の立体構造からみて、分子量が 1000 以下であることが望ましい。また、PDZ ドメインとの結合を検証するため、化合物は水溶性であることが好ましく、CLogP 3.5 以下であることが望ましい。

[0039] [化合物の細胞アッセイ]

### ＜実施例 3＞

次に、NMRでmLNX1PDZ2に結合することが確認された式(13)で表される化合物について、イヌ腎臓尿細管上皮細胞を用いてタイトジャンクション形成に与える影響についてアッセイを行った。アッセイは、MDCK-II細胞(Madin-Darby Canine Kidney Strain II; 本研究では神戸大学大学院医学研究科細胞生物学の古瀬幹夫教授から入手した細胞を用いたが、DSファーマバイオメディカル株式会社からも購入可能である。)を用い、下記「免疫染色」に記載されている手順で行った。また、MDCK-II細胞に関して、内在性LNX1が発現しているのか否かについても確認を行った。内在性LNX1の発現の確認は、下記「Western blotting」に記載されている手順、及び下記「免疫染色」において、化合物を添加せず、化合物添加後の48h培養をしなかった以外は「免疫染色」と同様の手順で行った。

#### [0040] 「免疫染色」

カバーガラスを入れた6 well dishに細胞を播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータで一晩培養した。培地をアスピレーターで吸引した後、DMEM(+10%FBS、1%Pen/Stre)培地1mlと調整した式(13)で表される化合物1mlを加え(終濃度100μM、DMSO終濃度0.1%)、CO<sub>2</sub>インキュベータで48h培養した。培養後、培地をアスピレーターで吸引し、無血清DMEM培地を1ml加え、アスピレーターで吸引した(×2回)。冷メタノールを1ml加え、-20℃で20分静置した。新しい6 well dishにPBSを2ml加え、その中にカバーガラスを入れて洗浄した。PBSをP-1000ピペットマンで吸い出し、新たにPBSを1ml加えて洗浄した(×2回)。PBSを吸い出した後、ブロッキング溶液(5%スキムミルク溶液)を1ml加えて、室温で1hインキュベートした。スキムミルク溶液で希釈した100μlの一次抗体溶液の上に、固定した細胞面が下になるようにカバーガラスをかぶせ、4℃で一晩インキュベートした。翌日、6 well dishにPBSを1ml加え、その

中にカバーガラスを入れて洗浄した。PBSをP-1000ピペットマンで吸い出し、新たにPBSを1ml加えて洗浄した(×2回)。スキムミルク溶液で希釈した100 $\mu$ lの二次抗体溶液の上に、固定した細胞面が下になるようにカバーガラスをかぶせ、室温で1hインキュベートした。6 well dishにPBSを1ml加え、その中にカバーガラスを入れて洗浄した。PBSをP-1000ピペットマンで吸い出し、新たにPBSを1ml加えて洗浄した(×2回)。封入剤10 $\mu$ lをスライドガラスの上に滴下し、その上にカバーガラスをかぶせた。遮光し、翌日OLYMPUS社の顕微鏡IX71を用いて検鏡した。なお、露光時間は固定して撮影した(1/5 sec)。

なお、一次抗体には、Rabbit anti-Claudin-2 antibody (51-6100、invitrogen)をスキムミルク溶液で250倍に希釈したもの、及びRabbit anti-LNX1 antibody (AV473367、Sigma-Aldrich)をスキムミルク溶液で100倍に希釈したものを用いた。

また、二次抗体には、Anti-Rabbit IgG (whole molecule), F(ab')<sub>2</sub> fragment-Cy3 antibody (C2306、Sigma-Aldrich)をスキムミルク溶液で500倍に希釈したもの、及びAnti-Rabbit IgG (whole molecule), F(ab')<sub>2</sub> fragment-FITC antibody (F1262、Sigma-Aldrich)をスキムミルク溶液で200倍に希釈したものを用いた。

#### [0041] [Western blotting]

細胞を6 well plateに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータで培養した。培地をアスピレーターで吸引し、PBS 1mlで洗浄した(×2回)。SDS-Sample bufferを適量加え、セルスクレーパーでかきとった。Bioruptorで2min超音波破碎した後、95℃で3min加熱し、サンプルとした。

サンプルはSDS-PAGEで分離し、そのゲルをB液 (tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.30g、methanol 5ml、MilliQ、total 100ml) に浸した。PVDF膜 (AE-6668、ATTO) は100% methanol に約20sec浸した後、B液中に30min以上浸透させた。濾紙 (CB-06A、ATTO) はA液 (tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.82g、methanol 2.5ml、MilliQ、total 50ml) に2枚、B液に1枚、C液 (6-aminocaproic acid 0.26g、tris (hydroxymethyl) aminomethane 0.15g、methanol 2.5ml、MilliQ、total 50ml) に3枚浸した。コンパクトプロットAE-7500 (ATTO) の陽極板に濾紙、PVDF膜、ゲルを重ねた後、陰極をセットし、通電することによりタンパク質をPVDF膜に移行させた。PVDF膜をblocking agent (5%スキムミルク、0.1%Tween20 in PBS) に浸し、室温で1h振とうさせた。PVDF膜をblocking agentで希釈した一次抗体溶液に浸し、4℃で一晩インキュベートした。PDVF膜をwash buffer (1×TBS、0.1%Tween20) に浸し、5min振とうさせて (×4回) 洗浄した後、blocking agentで希釈した二次抗体溶液に浸し、室温で1hインキュベートした。PDVF膜をwash bufferに浸し、5min振とうさせて (×4回) 洗浄した。PDVF膜上にChemiluminescence (nacalaitesque) をかけ、インキュベートし、LAS-3000miniで検出した。

なお、一次抗体には、Rabbit anti-LNX1 antibody (AV473367、Sigma-Aldrich) を用い、blocking agentで1000倍に希釈したものを用了。

また、二次抗体には、Anti-Rabbit IgG HRP (W40

1 B、Promega) を用い、blocking agent で 10000 倍に希釈したものを用いた。

[0042] [MDC K-II細胞における内在性 L N X 1 の発現確認]

図 10 (1) は、上記 [Western blotting] により得られた写真である。また、図 10 (2) は、上記 [免疫染色] において、化合物を添加せず、添加後の 48 h 培養をしなかった以外は同様の手順で免疫染色した写真である。

[0043] 図 10 (1) に示すように、Western blotting では、75 kDa 付近にバンドが確認出来たので、L N X 1 の発現が確認できた。また、図 10 (2) に示すように、免疫染色では、細胞内に輝点が存在していることから L N X 1 の発現が確認できた。以上の結果から、MDC K-II細胞において、L N X 1 が内在的に発現していることを確認した。

[0044] [式 (13) で表される化合物のアッセイ]

図 11 (1) は、実施例 3 で得られた免疫染色の写真である。

[0045] <実施例 4 ~ 7>

式 (13) で表される化合物に換え、実施例 4 として式 (14)、実施例 5 として式 (30)、実施例 6 として式 (33-3)、実施例 7 として式 (34-9) で表される化合物を用いた以外は実施例 3 と同様の手順で免疫染色を行った。図 11 (2) は実施例 4、図 11 (3) は実施例 5、図 11 (4) は実施例 6、図 11 (5) は実施例 7 で得られた免疫染色の写真である。

[0046] <比較例 14>

式 (13) で表される化合物を添加しなかった以外は実施例 3 と同様の手順で免疫染色を行った。図 11 (6) は、比較例 14 で得られた免疫染色の写真である。

[0047] 図 11 (6) の比較例 14 の写真と比べ、実施例 3 ~ 7 の図 11 (1) ~ (5) の写真は、細胞と細胞の間の白色部分が明らかに濃くなっており、クロードインのタイトジャンクションへの増蓄が確認された。この結果、及び

NMR 滴定実験の結果から、式 (13)、(14)、(30)、(33-3) 及び (34-9) で表される化合物が m L N X 1 P D Z 2 に結合し、m L N X 1 P D Z 2 とクロードインの結合を阻害することで、クロードインの細胞内への取り込みを阻害し、結果的にタイトジャンクションを強化したと考えられる。

[0048] また、ヒト、マウス、イヌの L N X 1 P D Z 2 ドメインのクロードインが相互作用する面に位置するアミノ酸配列について調べた。調べたアミノ酸配列は、何れも U n i P r o t から入手した次の部分である。

<ヒト> I D : Q 8 T B B 1 のアミノ酸番号 3 7 7 - 4 6 3 ( 8 7 配列 )

<マウス> I D : O 7 0 2 6 3 のアミノ酸番号 3 8 1 - 4 6 7 ( 8 7 配列 )

<イヌ> I D : E 2 R B E 8 のアミノ酸番号 3 8 1 - 4 6 7 ( 8 7 配列 )

ヒト、マウス、イヌの L N X 1 P D Z 2 ドメインのアミノ酸配列 ( 上記 8 7 配列 ) の相同性は、ヒトとマウスは 9 5 %、ヒトとイヌは 9 4 %、マウスとイヌは 9 4 % と非常に高かった。また、クロードインが相互作用する面に位置するアミノ酸の配列 ( 上記 8 7 配列の 1 8 番目のグリシン ~ 2 3 番目のアルギニン、及び 6 6 番目のプロリン ~ 7 4 番目のグルタミン ) は、ヒト、マウス、イヌで完全に一致していた。したがって、式 (13) 及び (14) で表される化合物は、ヒトのタイトジャンクション形成の制御にも用いることができる。

### 産業上の利用可能性

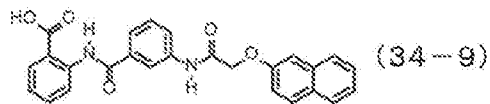
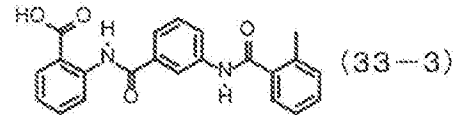
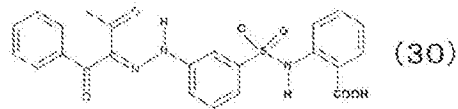
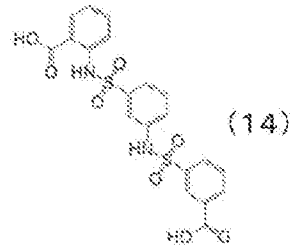
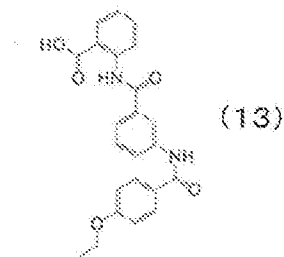
[0049] 本発明の式 (13)、(14)、(30)、(33-3) 及び (34-9) で表される化合物は、L N X 1 に特異的に反応することで、L N X 1 とクロードインとが相互作用することを阻害し、その結果、クロードインの細胞内への取り込みが阻害されることでタイトジャンクション形成状態を制御することができる。したがって、タイトジャンクション形成メカニズムのどの

段階での制御であるのか明らかであることから、医薬品、化粧品等への応用が可能である。

## 請求の範囲

[請求項1] 下記式（13）、（14）、（30）、（33-3）及び（34-9）で表される化合物を少なくとも一種含むタイトジャンクション形成制御剤。

[化1]

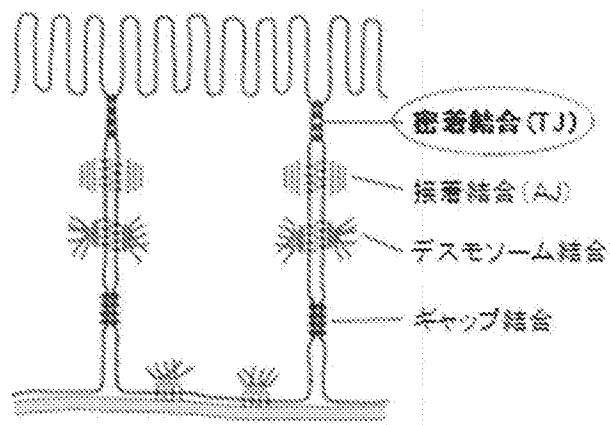


[請求項2] 前記化合物が、式（13）又は（14）で表される化合物である請求項1に記載のタイトジャンクション形成制御剤。

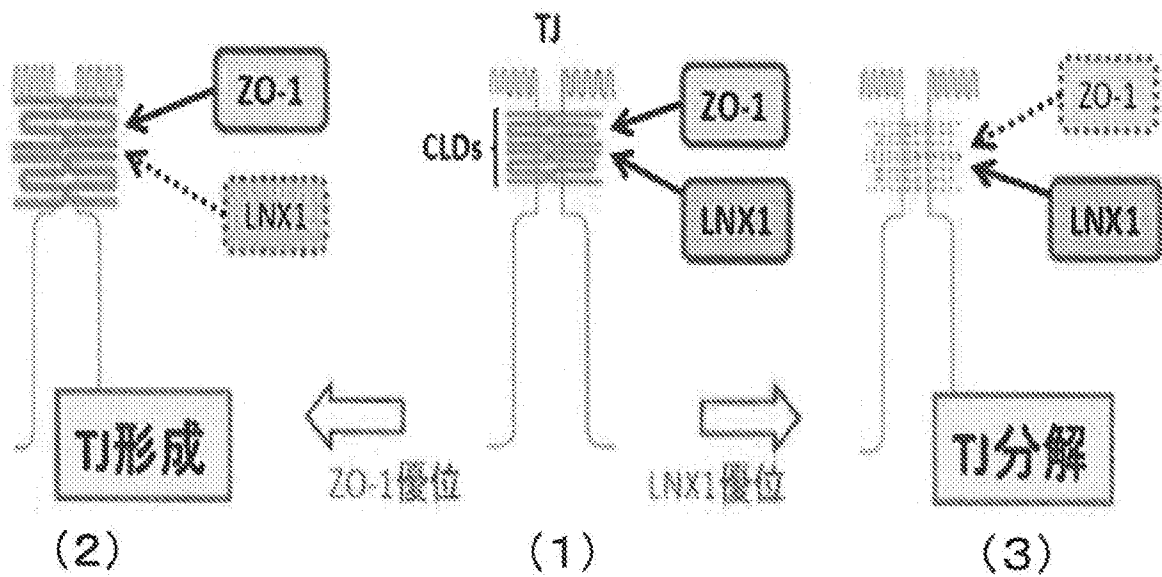
[請求項3] 前記化合物がクロードインの細胞内への取り込みを防ぐことでタイトジャンクションの形成を制御する請求項1又は2に記載のタイトジャンクション形成制御剤。

[請求項4] 請求項1～3の何れか一項に記載のタイトジャンクション形成制御剤を含む医薬組成物。

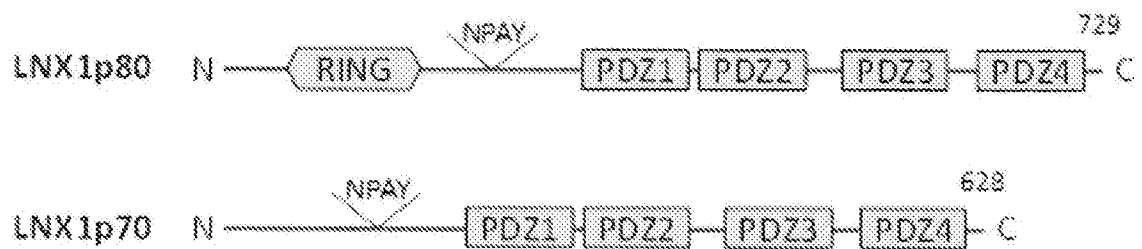
[図1]



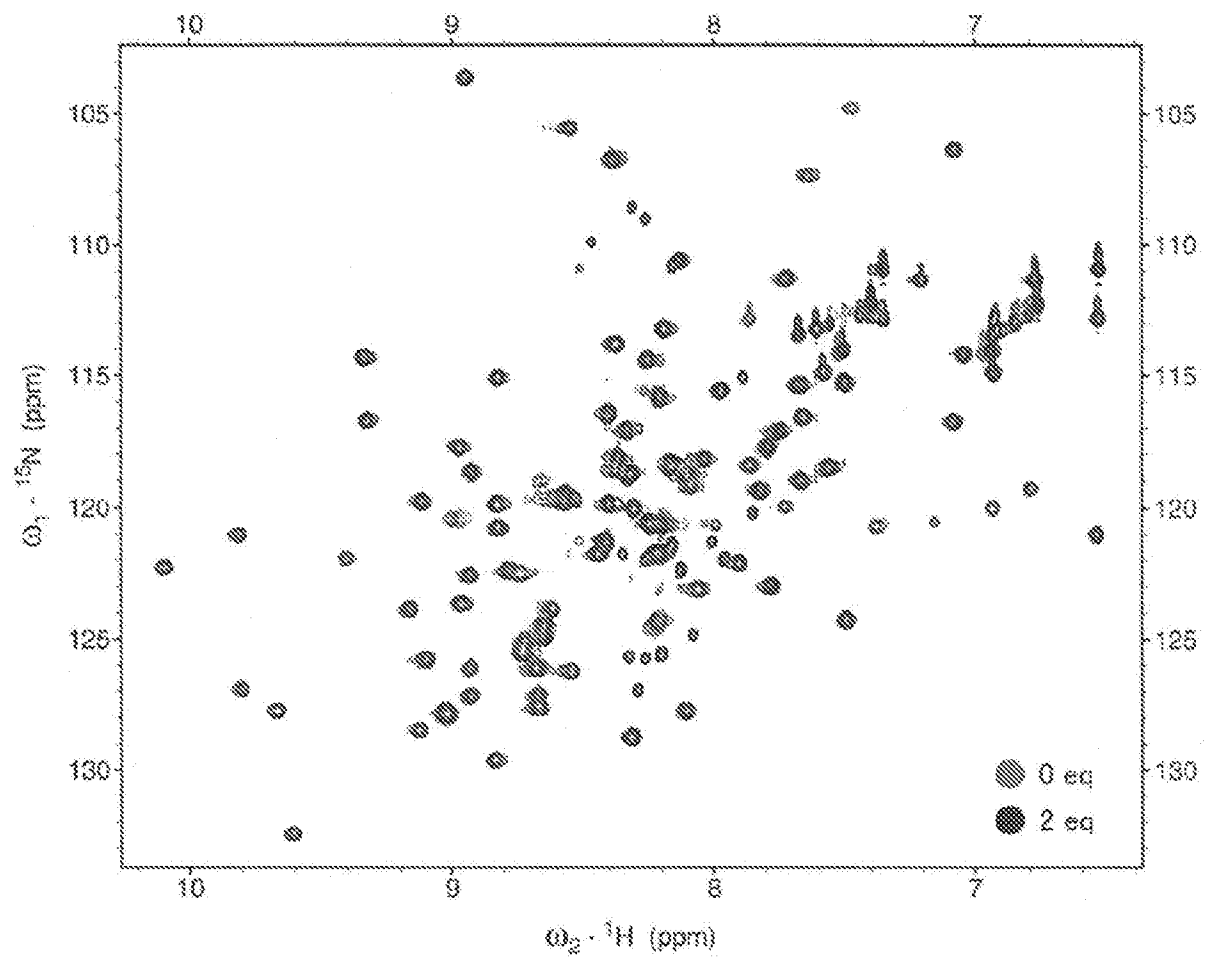
[図2]



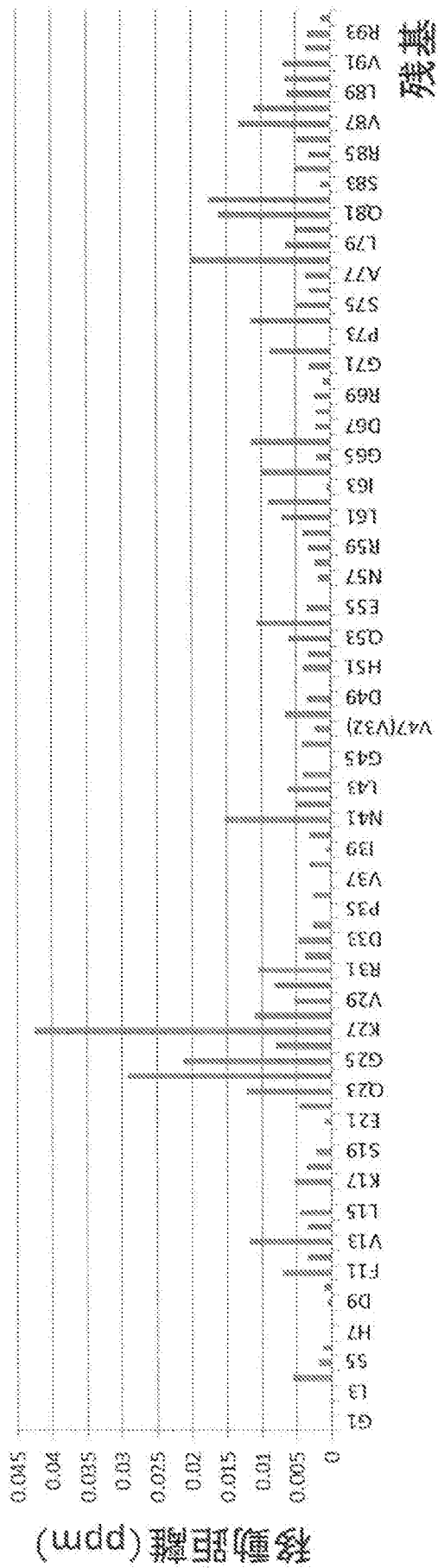
[図3]



[図4]



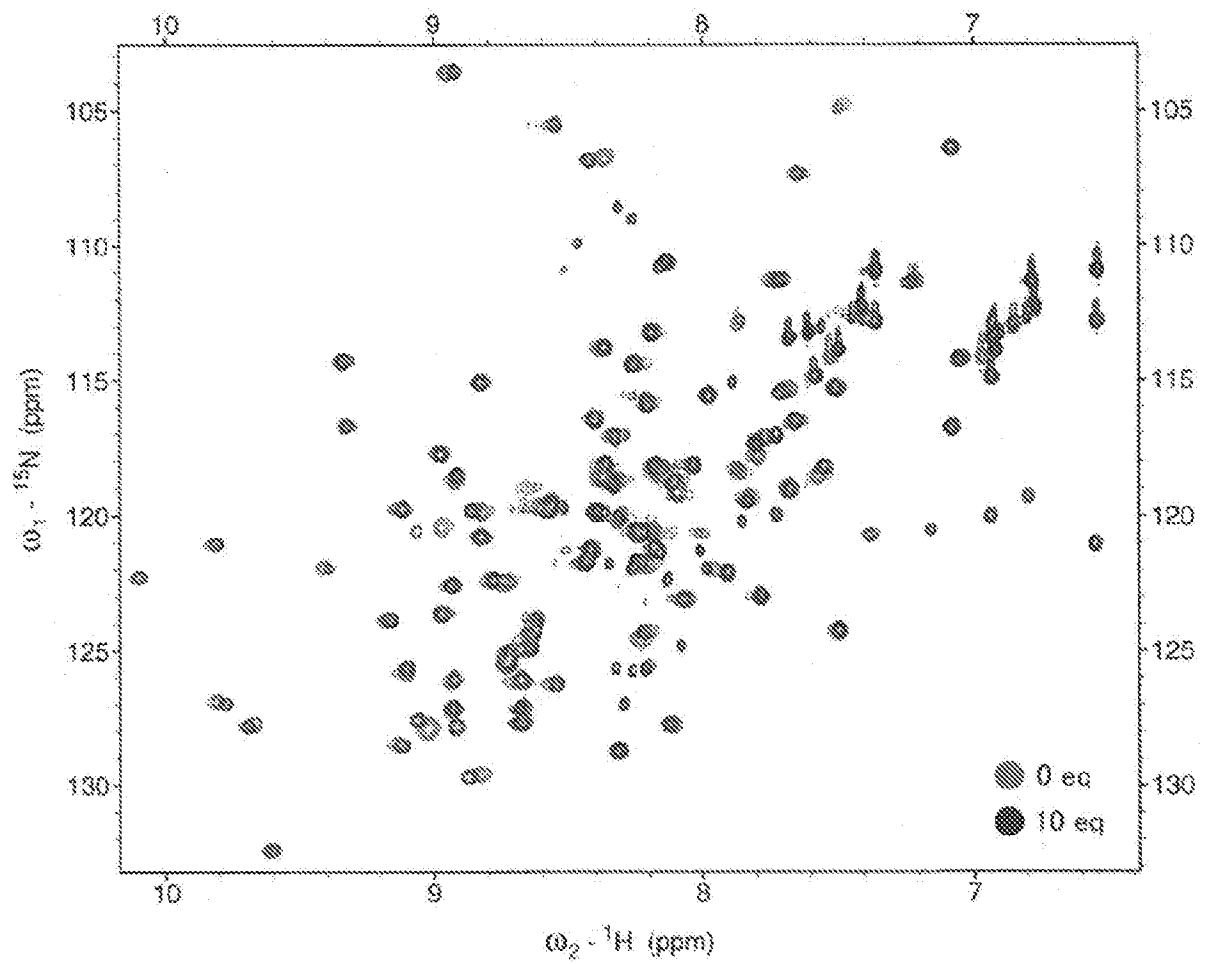
[図5]



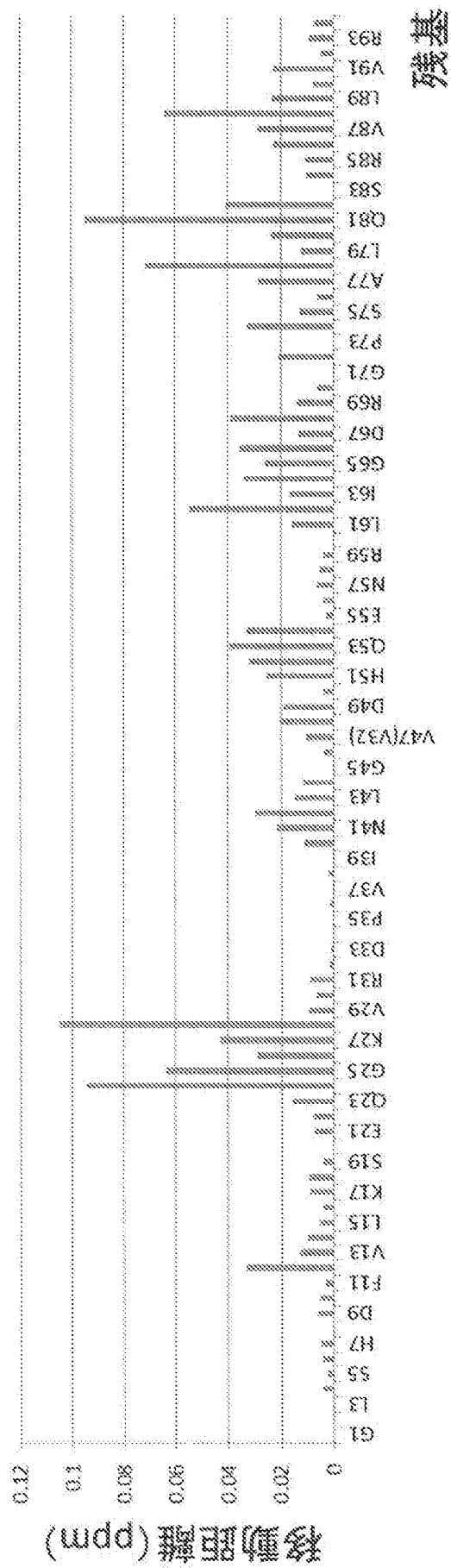
[図6]



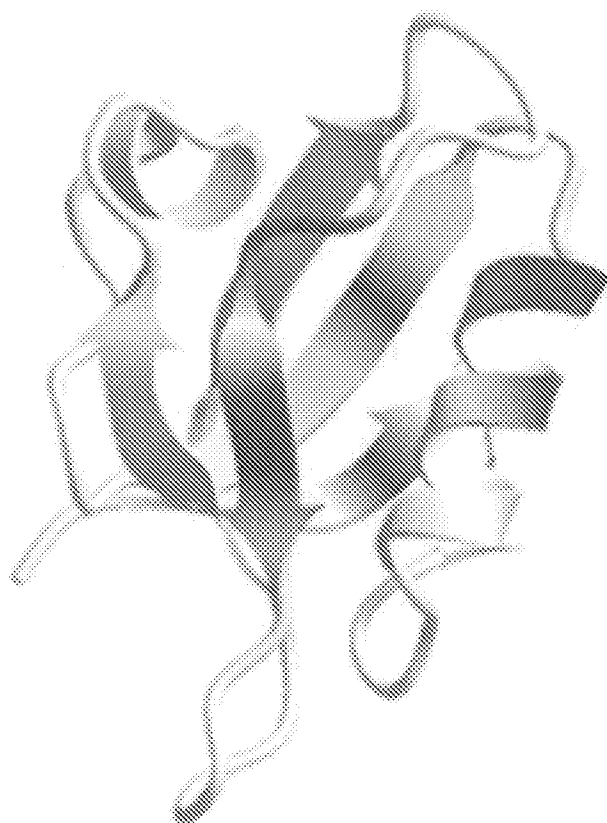
[図7]



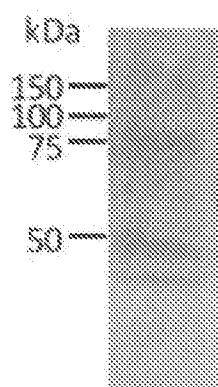
[図8]



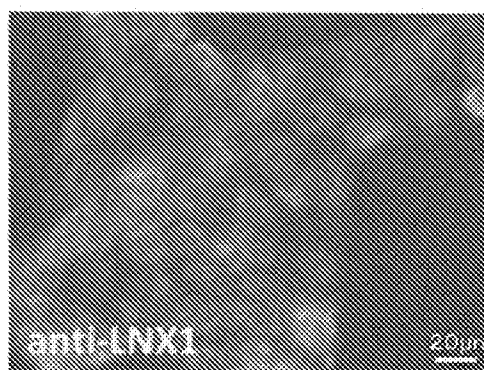
[図9]



[図10]

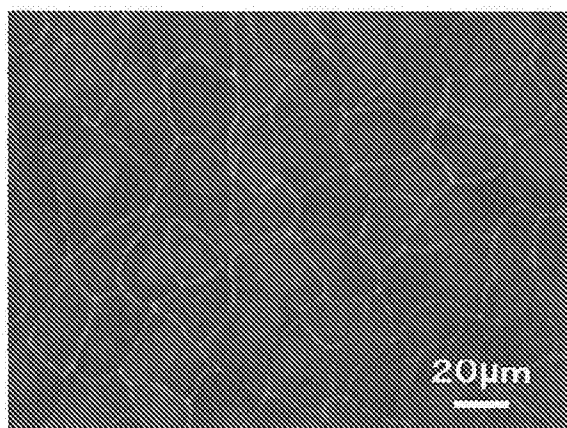


(1)

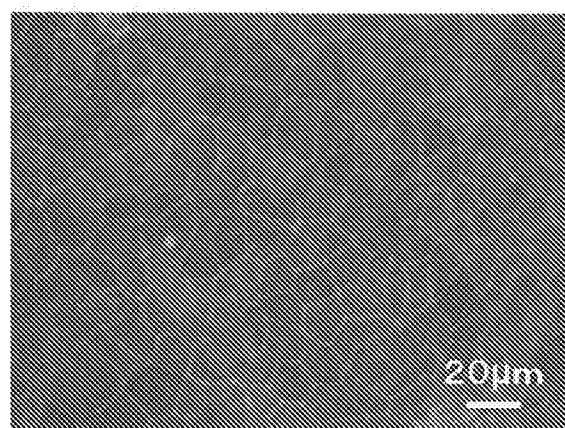


(2)

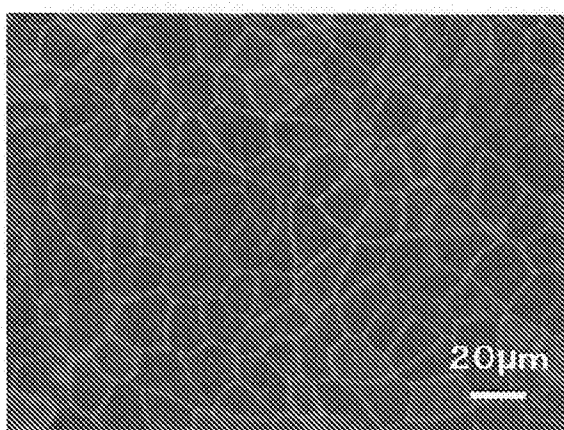
[図11]



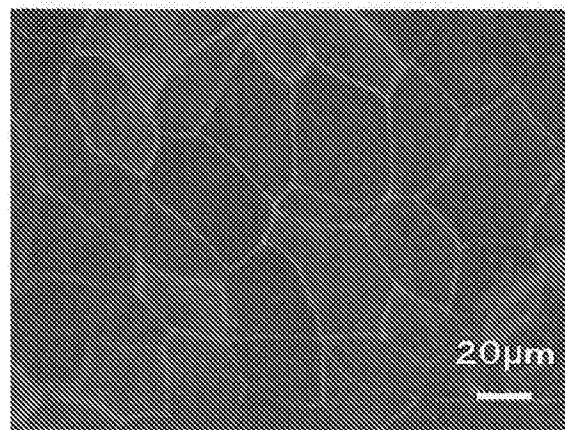
(1)



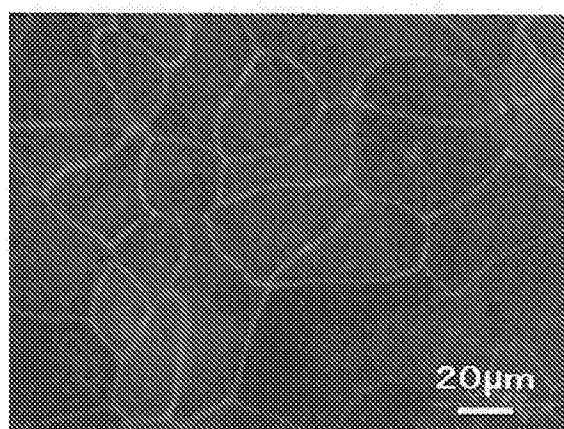
(2)



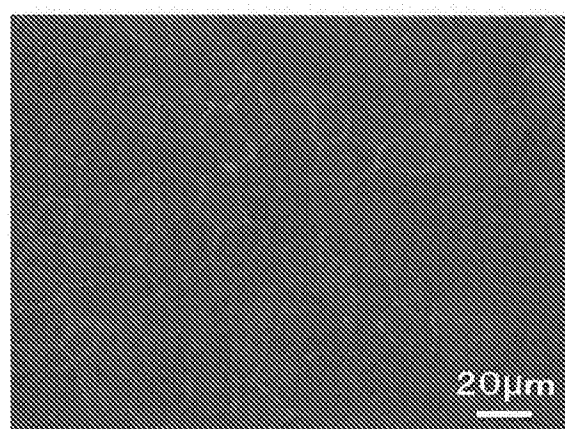
(3)



(4)



(5)



(6)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070767

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/196(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61K31/196, A61K31/192, A61P43/00

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2015 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2015 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2015 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2009/0105218 A1 (7TM PHARMA A/S),<br>23 April 2009 (23.04.2009),<br>claims; tables 1, 3<br>& JP 2008-500991 A & WO 2005/115374 A1<br>& EP 1758571 A1 & CN 1980664 A<br>& KR 10-2007-0045153 A | 1-4                   |
| X         | WO 2011/155898 A1 (WADELL, Goran et al.),<br>15 December 2011 (15.12.2011),<br>claims; table 3<br>& US 2013/0210915 A1 & EP 2580190 A1                                                           | 1-4                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

26 August 2015 (26.08.15)

Date of mailing of the international search report

08 September 2015 (08.09.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/070767

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070767

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Supplementation of Box No. III:

Document 1 discloses a therapeutic agent for inflammatory bowel disease, which comprises a compound represented by formula (13). Therefore, parts of claims 1-4 which relate to a compound represented by formula (13) are not novel over document 1 and therefore have no special technical feature.

Consequently, claims are respectively classified into the following two inventions.

(Invention1) Parts of claims 1-4 which relate to compounds respectively represented by formula (13), formula (33-3) and formula (34-9).

Parts of claims 1-4 which relate to a compound represented by formula (13) are classified into Invention 1.

Parts of claims 1-4 which relate to compounds respectively represented by formula (33-3) and formula (34-9) are classified into Invention 1, because the parts share a common partial structure produced by the binding of anthranilic acid to m-carboxyaniline through a peptide bond and therefore it is efficient to carry out the search on the parts together with parts of claims 1-4 which relate to a compound represented by formula (13) comprehensively.

(Invention2) Parts of claims 1-4 which relate to compounds respectively represented by formula (14) and formula (30).

The parts share a common structure produced by the condensation of anthranilic acid with m-aniline sulfonic acid. Therefore, both of the part of claims 1-4 which relates to a compound represented by formula (14) and the part of claims 1-4 which relates to a compound represented by formula (30) are classified into Invention 2.

Further, there is no same or corresponding special technical feature between Invention 1 and Invention 2.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/196(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/196, A61K31/192, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                            | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X               | US 2009/0105218 A1 (7TM PHARMA A/S) 2009.04.23, 特許請求の範囲、表 1、表 3 & JP 2008-500991 A & WO 2005/115374 A1 & EP 1758571 A1 & CN 1980664 A & KR 10-2007-0045153 A | 1-4            |
| X               | WO 2011/155898 A1 (WADELL, Goran et al.) 2011.12.15, 特許請求の範囲、表 3 & US 2013/0210915 A1 & EP 2580190 A1                                                        | 1-4            |

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 8 . 0 9 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

加藤 文彦

4 C

5 5 7 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

## 第 I I I 欄の補足：

文献 1 には、式 (13) で表される化合物を含む炎症性腸疾患の治療剤が記載されており、請求項 1-4 の式 (13) で表される化合物に関する部分は、文献 1 により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。

そして、請求の範囲は、各々下記の 2 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1-4 の式 (13)、式 (33-3)、式 (34-9) で表される化合物に関する部分  
請求項 1-4 の式 (13) で表される化合物に関する部分は、発明 1 に区分する。

請求項 1-4 の式 (33-3)、式 (34-9) で表される化合物に関する部分は、アントラニル酸と m-カルボキシアニリンがペプチド結合した共通の部分構造を有し、請求項 1-4 の式 (13) で表される化合物に関する部分とまとめて調査を行うことが効率的であるため、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 1-4 の式 (14)、式 (30) で表される化合物に関する部分

両者は、アントラニル酸と m-アニリンスルホン酸が縮合した共通構造を有するため、請求項 1-4 の式 (14)、式 (30) で表される化合物に関する部分はともに発明 2 に区分する。

また、発明 1 及び発明 2 の間には、同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。