

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4392473号
(P4392473)

(45) 発行日 平成22年1月6日 (2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日 (2009.10.23)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/216 (2006.01)

A 6 1 K 31/216

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 4 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2000-604837 (P2000-604837)
 (86) (22) 出願日 平成12年3月14日 (2000.3.14)
 (65) 公表番号 特表2002-539156 (P2002-539156A)
 (43) 公表日 平成14年11月19日 (2002.11.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/006669
 (87) 国際公開番号 W02000/054761
 (87) 国際公開日 平成12年9月21日 (2000.9.21)
 審査請求日 平成15年7月25日 (2003.7.25)
 (31) 優先権主張番号 60/125,194
 (32) 優先日 平成11年3月18日 (1999.3.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504412945
 ザ ブライハム アンド ウイメンズ ホ
 スピタル, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 115 ボストン, フランシス ストリ
 ート 75
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 サーハン, チャールズ・エヌ
 アメリカ合衆国マサチユセッツ州0248
 1 ウエルズリー・クラウンリツジロード5
 1

審査官 大野 晃

最終頁に続く

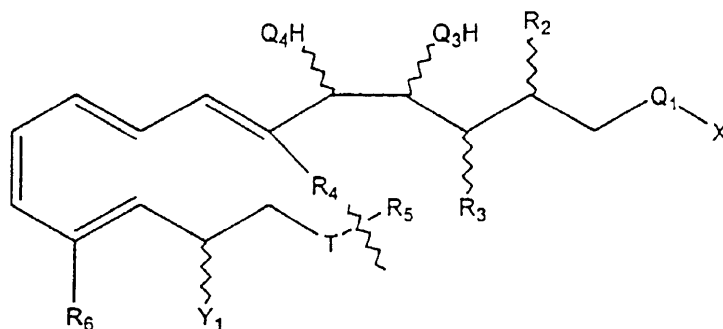
(54) 【発明の名称】 ホスホリパーゼDの活性の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式

【化13】

式中、XはR₁、OR₁もしくはSR₁であり；式中、R₁は、

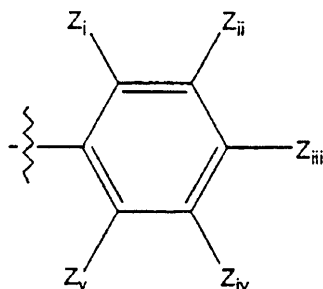
(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1から8個までの炭素原子のアルキル；

(iii) 3ないし10個の炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7ないし12個の炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル ;
 (vi) 置換フェニル
 【化 1 4】



10

(ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである) ;

(vii) 検出可能な標識分子 ; または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル ;

であり ;

20

式中、 Q_1 は $(\text{C}=\text{O})$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合には X は存在せず ;

式中、 Q_3 および Q_4 はそれぞれ独立に O 、 S もしくは NH であり ;

式中、 R_2 および R_3 の一方が水素原子でありかつ他方が

(a) H ;

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子のアルキル ;

(c) 3から6個までの炭素原子のシクロアルキル ;

(d) 直鎖もしくは分枝状であってよい2から8個までの炭素原子のアルケニル ; または

(e) $\text{R}_a\text{Q}_2\text{R}_b$ (ここで Q_2 は $-\text{O}-$ もしくは $-\text{S}-$ であり ; ここで R_a は直鎖もしくは分枝状であってよい0から6個までの炭素原子のアルキレンであり、また、ここで R_b は直鎖もしくは分枝状であってよい0から8個までの炭素原子のアルキルであるが、但し、 R_b が0である場合には R_b は水素原子である) ;

30

であり ;

式中、 R_4 は

(a) H ;

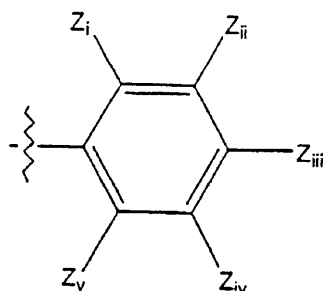
(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から6個までの炭素原子のアルキル ;

であり ;

式中、 R_5 は

【化 1 5】

40



50

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 Y_1 は、 $-OH$ 、メチル、 $-SH$ 、直鎖もしくは分枝状の 2 から 4 個までの炭素原子のアルキル、1 から 4 個までの炭素原子のアルコキシ、または CH_aZ_b であり、ここで $a+b=3$ 、 $a=0$ ないし 3、 $b=0$ ないし 3、および Z はシアノ、ニトロもしくはハロゲンであり；

式中、 R_6 は

(a) H；

(b) 直鎖もしくは分枝状の 1 から 4 個までの炭素原子のアルキル；

であり；

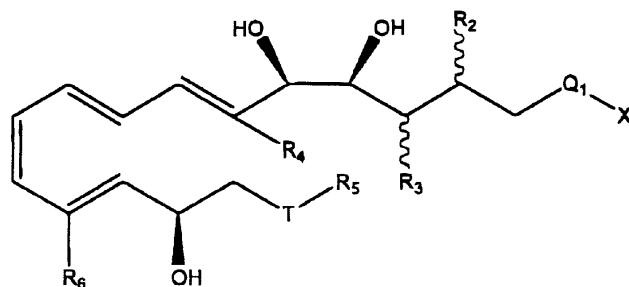
式中、 T は O もしくは S である、

の最低 1 種のリポキシン化合物であって 15 - エピ - 16 (パラ - フルオロ) - フェノキシ - LXA_4 、16 - (パラ - フルオロ) - フェノキシ - LXA_4 、15 - エピ - 16 - フェノキシ - LXA_4 及び 16 - フェノキシ - LXA_4 を除く上記リポキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩の治療上有効な量を含んで成る、被験体における血管収縮または骨髄抑制に関連する疾患または病状を治療するための製薬学的組成物。

【請求項 2】

式

【化 16】



式中、 X は R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり；

式中、 R_1 は、

(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル；

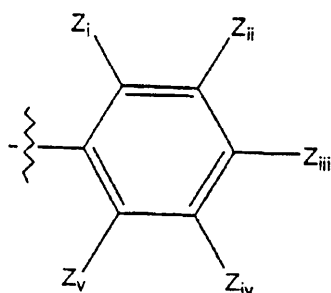
(iii) 3 ないし 10 個の炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7 ないし 12 個の炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル；

(vi) 置換フェニル

【化 17】



10

20

30

40

50

(ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

(vii) 検出可能な標識分子；または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル；

であり；

式中、 Q_1 は $(\text{C}=\text{O})$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合には X は存在せず；

式中、 R_2 および R_3 の一方が水素原子でありかつ他方が

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子のアルキル；

(c) 3から6個までの炭素原子のシクロアルキル；

(d) 直鎖もしくは分枝状であってよい2から8個までの炭素原子のアルケニル

；または

(e) $\text{R}_a\text{Q}_2\text{R}_b$ (ここで Q_2 は $-\text{O}-$ もしくは $-\text{S}-$ であり；ここで R_a は直鎖もしくは分枝状であってよい0から6個までの炭素原子のアルキレンであり、また、ここで R_b は直鎖もしくは分枝状であってよい0から8個までの炭素原子のアルキルであるが、但し、 R_b が0である場合には R_b は水素原子である)；であり；

式中、 R_4 は

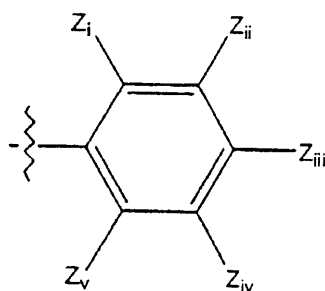
(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から6個までの炭素原子のアルキル

であり；

式中、 R_5 は

【化18】



であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 R_6 は

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状の1から4個までの炭素原子のアルキル

であり；

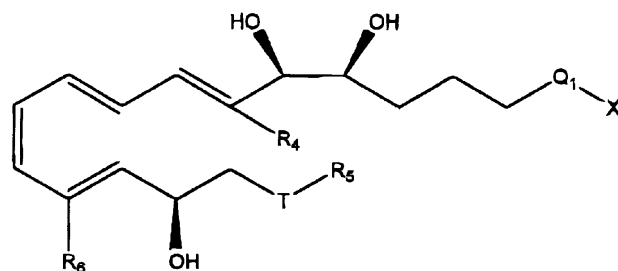
式中、 T は O もしくは S である、

の最低1種のリポキシン化合物であって15-エピ-16(パラ-フルオロ)-フェノキシ- LXA_4 、16-(パラ-フルオロ)-フェノキシ- LXA_4 、15-エピ-16-フェノキシ- LXA_4 及び16-フェノキシ- LXA_4 を除く上記リポキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩の治療上有効な量を含んで成る、被験体における血管収縮または骨髄抑制に関連する疾患または病状を治療するための製薬学的組成物。

【請求項 3】

式

【化 19】



10

式中、XはR₁、OR₁もしくはSR₁であり；

式中、R₁は、

(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1から8個までの炭素原子のアルキル；

(iii) 3ないし10個の炭素原子のシクロアルキル；

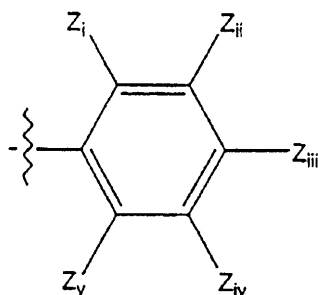
(iv) 7ないし12個の炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル；

(vi) 置換フェニル

【化 20】

20



30

(ここで、Z_i、Z_{ii}、Z_{iii}、Z_{iv}およびZ_vは、-NO₂、-CN、-C(=O)-R₁、-SO₃H、水素原子、ハロゲン、メチル、-OR_xからそれぞれ独立に選択され、ここで、R_xは直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

(vii) 検出可能な標識分子；または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル；

であり；

式中、Q₁は(C=O)、SO₂もしくは(CN)であるが、但し、Q₁がCNである場合にはXは存在せず；

式中、R₄は

(a) H；

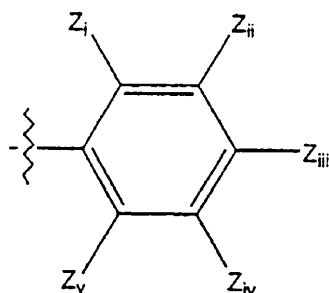
(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から6個までの炭素原子のアルキル；

であり；

式中、R₅は

40

【化 2 1】



10

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 R_6 は

(a) H；

(b) 直鎖もしくは分枝状の 1 から 4 個までの炭素原子のアルキル

であり；

20

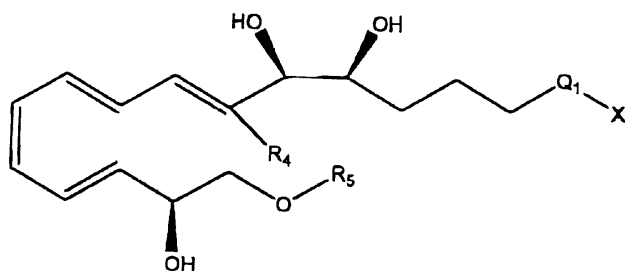
式中、 T は O もしくは S である、

の最低 1 種のリポキシン化合物であって 15 - エピ - 16 (パラ - フルオロ) - フェノキシ - LXA_4 、16 - (パラ - フルオロ) - フェノキシ - LXA_4 、15 - エピ - 16 - フェノキシ - LXA_4 及び 16 - フェノキシ - LXA_4 を除く上記リポキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩の治療上有効な量を含んで成る、被験体における血管収縮または骨髄抑制に関連する疾患または病状を治療するための製薬学的組成物。

【請求項 4】

式

【化 2 2】



30

式中、 X は R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり；

式中、 R_1 は、

(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル；

(iii) 3 ないし 10 個の炭素原子のシクロアルキル；

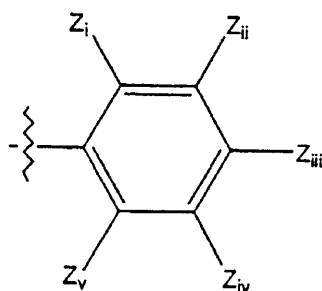
(iv) 7 ないし 12 個の炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル；

(vi) 置換フェニル

40

【化 2 3】



10

(ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

(vii) 検出可能な標識分子；または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニルであり；

式中、 Q_1 は $(\text{C}=\text{O})$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合には X は存在せず；

20

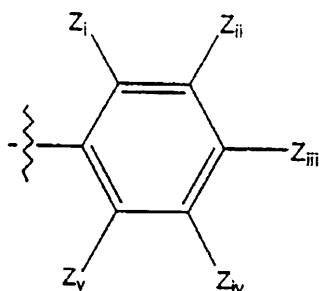
式中、 R_4 は

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から6個までの炭素原子のアルキルであり；

式中、 R_5 は

【化 2 4】



30

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基である；

40

の最低1種のリポキシン化合物であって15-エピ-16(パラ-フルオロ)-フェノキシ- LXA_4 、16-(パラ-フルオロ)-フェノキシ- LXA_4 、15-エピ-16-フェノキシ- LXA_4 及び16-フェノキシ- LXA_4 を除く上記リポキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩の治療上有効な量を含んで成る、被験体における血管収縮または骨髄抑制に関連する疾患または病状を治療するための製薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

好中球(PMN)の活性化は、宿主防禦、炎症および再灌流傷害のような多様な宿主応答

50

で中心的な役割を演じている(Weissmann, G., Smolen, J. E. と Korchak, H. M. (1980) Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. N. Engl. J. Med. 303, 27-34)。PMNホスホリパーゼが炎症刺激に
10 応答して活性化されて、細胞膜を再生し(remodel)、かつ、機能的応答の伝達において細胞内もしくは細胞外媒介物質として作用する生物活性脂質を生成させる(Serhan, C. N., Haeggstrom, J. Z. と Leslie, C. C. (1996) Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J. 10, 1147-1158)。微生物応答および急性炎症応答の重要な構成要素は、
反応性酸素種および食作用のある液胞に標的を定められる顆粒酵素を包含するが、しかし、これらの潜在的に毒性の作用物質の異常な放出は炎症の拡大ならびに組織傷害につながる
可能性があり、そして広範な疾患に関与している(Weiss, S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. N. Engl. J. Med. 320, 365-376)。過剰に豊富な炎症応答を予防しかつ宿主に対
20 する損傷を制限するため、これらのPMNプログラムは厳格に調節されている。内在性の抗炎症もしくは保護シグナルとして作用する宿主の媒介物質は、最近になって認識されて
いるのみである(Serhan, C. N. (1994) Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. Biochim. Biophys. Acta 1212, 1-25)。

【0002】

(発明の要約)

本発明は、ホスホリパーゼD(PLD)活性を伴う疾患もしくは病状の調整方法に関する。該方法は、有効な抗PLD量の下述される式を有するリポキシン類似物の被験体への投与を包含し、その結果、PLD誘導性活性が調整される。

【0003】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼD(PLD)活性の治療方法にもまた関する。該方法は、有効な抗PLD量の下述されるリポキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLDに開始される活性が治療される。

【0004】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼD(PLD)誘導性スーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性に随伴する疾患もしくは病状の調整方法にさらに関する。該方法は、有効な抗PLD量の下述されるリポキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLDのスーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性により開始されるを伴う疾患もしくは病状が調節される。

【0005】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼD(PLD)誘導性スーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性の治療方法にさらに関する。該方法は、有効な抗PLD量の下述されるリポキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLD誘導性スーパーオキシド生成もしくは
40 脱顆粒活性が治療される。

【0006】

好ましい態様において、本発明の方法はインビトロもしくはインビボで実施される。

【0007】

別の局面において、本発明は、被験体における、上に列挙された活性もしくは病状を治療するための包装された製薬学的組成物に向けられる。該包装された製薬学的組成物は、治療上有効な量の下述される式の1つを有する最低1種のリポキシン化合物を保持する容器、および被験体における該活性もしくは病状を治療するためのリポキシン化合物の使用のための説明書を包含する。

【0008】

10

20

30

40

50

(発明の詳細な記述)

本発明の特徴および他の詳細を今やより具体的に記述し、かつ、請求の範囲に指摘することができる。本発明の特定の態様は具体的に説明するために示すものであり、本発明の制限として示すものでないことが理解されよう。本発明の本質の特徴は、本発明の範囲から離れることなく、多様な態様で 사용할 ことができる。

【0009】

反対する細胞外シグナル(正もしくは負)が細胞内シグナル伝達事象にどのように翻訳されるかを理解することは広範に興味深い。受容体とリガンドの相互作用は、宿主の防禦および炎症で重要な細胞応答を調整するシグナルとして作用するヒト好中球(PMN)による生物活性脂質の生成を開始する。新規のポリイソプレニルホスフェート(PIPP)シグナル伝達経路が同定され、そしてその構成要素の1つ、プレスクアレンジホスフェート(PSDP)が、ホスファチジン酸を包含する数種の刺激によるスーパーオキシドアニオン生成を調節するPMN中の強力な負の細胞内シグナルであることが見出された(Levyら(1998)Nature, 389, 985-990)。PMNに対する反対する作用をもつオータコイド、強力な化学誘因物質ロイコトリエンB₄(LTB₄)、および動員のための「停止シグナル」、リポキシンA₄(LXA₄)による細胞内PIPPシグナル伝達が決 定された。LTB₄受容体活性化は、PLDの活性化および細胞応答と同時発生するPSDPレベルの迅速な低下を開始した。鮮明に対照的に、LXA₄受容体の活性化は、PSDPの蓄積ならびにPLDおよびスーパーオキシドアニオン生成の双方の強力な阻害につながる、LTB₄に開始されるPSDPの再生を反転させた。従って、PSDPレ 20
ベルおよびPLD活性について、反対する応答を惹起する2種のPMNリガンドとの逆の関係が確立された。加えて、PSDPは、単離されたヒト組換え体(Ki=6nM)および植物(Ki=20nM)双方のPLDを直接阻害した。一緒にすれば、これらの知見は、PIPPの再生をPMNの機能の細胞内調節に結びつけ、そして、シグナル伝達における脂質抑制物質としてのPIPPの役割、すなわち細胞のシグナル伝達におけるインビボでのアスピリンの抑制性の作用もまた説明するかも知れない新規のメカニズムを示唆する。

【0010】

生物活性脂質は、細胞の応答を調節する特定の正もしくは負のいずれかのシグナルを担持する細胞表面受容体の活性化により迅速に生成される。これは、関係するエイコサノイド、ロイコトリエンB₄(LTB₄)(強力な化学誘因物質)(Borgeat, P.とNaccache, P.H.(1990)Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄. Clin. Biochem. 23, 459-468)およびリポキシンA₄(LXA₄)(PMNの動員のための内在性の「停止シグナル」)(Serhan, C.N.(1994)Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. Biochim. Biophys. Acta 1212, 1-25)により例示される。LTB₄およびLXA₄は、高度に特異的かつ別個のGタンパク質共役型膜受容体と相互作用する(Yokomizo, T.、Izumi, T.、Chang, K.、Takuwa, T.とShimizu, T.(1997)A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. Nature 387, 620-624; Fiore, S.、Romano, M.、Reardon, E.M.とSerhan, C.N.(1993)Induction of functional lipoxin A₄ receptors in HL-60 cells. Blood 81, 3395-3403)。それらは、それぞれ、LTB₄に開始される化学走性、接着および移動(transmigration)のLXA₄阻害を包含する反対するPMN応答を惹起する(Serhan, C.N.(1994)Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. Biochim. Bi 30
40
50

ophys. Acta 1212、1-25)。

【0011】

本出願を通じて使用される略語は：COX、シクロオキシゲナーゼ；15-エピ-LX、15-エピマーのリボキシリン；15-エピ-LXA₄、15-エピ-16-パラフルオロフェノキシLXA₄メチルエステル；FDP、ファルネシルジホスフェート；GST、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ；LTB₄、ロイコトリエンB₄；LO、リボキシゲナーゼ；PA、ホスファチジン酸；PC、ホスファチジルコリン；cPLD、キャベツホスホリパーゼD；PIPP、ポリイソプレニルホスフェート；PMN、多形核白血球；PSDP、プレスクアレンジホスフェート；PSMP、プレスクアレノモノホスフェート；Sf9、スポドプテラ フルギペルダ (Spodoptera frugiperda)；TLC、薄層クロマトグラフィーを包含する。

10

【0012】

アスピリンは脂質媒介物質の生合成に影響を及ぼすことが知られており、そしてその抗炎症特性のため臨床上演に使用されている。アスピリンの抗炎症作用の原因である機構はかなり興味深いままである。とりわけ、消化管に面倒をかけずかつステロイドの有害な副作用を所有しない新たな「スーパーアスピリン」が探索されている (Isakson, P.、Seibert, K.、Masferrer, J.、Salvemini, D.、Lee, L.とNeedleman, P. (1995) Discovery of a better aspirin. Advances in Prostaglandin, Thromboxane & Leukotriene Research 23、49-54)。一局面において、アスピリンは、プロスタノイド形成の阻害に加えて、インビボの炎症の間に細胞を横断する (transcellular) 経路 (例えば、組織に存する細胞と浸潤する白血球との間) (図1Aを参照されたい) による、LXの新規の炭素15のエピマーの内在性の生成を誘導する (Chiang, N.、Takano, T.、Clish, C. B.、Petasis, N. A.、Tai, H. - H.とSerhan, C. N. (1998) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA₄ ELISA. J. Pharmacol Exper. Ther. 287、779-790)。これらのアスピリンに誘導されるリボキシリン (15-エピ-LX) は、PMN応答の阻害剤として天然のLXよりもなおより強力である。なぜなら、部分的に、それらはより長く活性であるからである (Serhan, C. N.、Maddox, J. F.、Petasis, N. A.、Akritopoulou-Zanze, I.、Papayianni, A.、Brady, H. R.、Colgan, S. P.とMadara, J. L. (1995) Design of lipoxin A₄ stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. Biochemistry 34、14609-14615)。LXおよび15-エピ-LXによるPMN阻害は、「阻害性」シグナルの特異的受容体活性化により (そしてLTB₄受容体での直接の受容体レベルの拮抗作用を介してでなく) 惹起される (Takano, T.、Fiore, S.、Maddox, J. F.、Brady, H. R.、Petasis, N. A.とSerhan, C. N. (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: Evidence for anti-inflammatory receptors. J. Exp. Med. 185、1693-1704)。さらに、LTB₄受容体は新規のHIV-1補助受容体としてもまた作用するという最近の知見 (Owman, C.、Garzino-Demo, A.、Cocchi, F.、Popovic, M.、Sabirsh, A.とGallo, R. (1998) The leukotriene B₄ recept

20

30

40

50

or functions as a novel type of coreceptor or mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 95、9530-9534) により、LTB₄受容体の調節における興味が高められている。

【0013】

約100年の使用にもかかわらず、アスピリンの治療上の影響の完全な知識は、多くの新たに発見される臨床上的利用性を未だ発展させている(Marcus, A. J. (1995) Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 333、656-658)。アスピリンの規則的摂取は、心筋梗塞、結腸直腸癌腫およびアルツハイマー病の罹患率を低下させる(Vainio, H. とMorgan, G. (1997) Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. Pharmacol Toxicol 81、151-152) が、しかし胃腸の潰瘍形成のようなアスピリンからの副作用がその使用を制限する可能性がある。炎症の間に誘導されるシクロオキシゲナーゼ(COX)の第二のアイソフォームの最近の発見は、COX-1の保護的な構成する機能を混乱させることなくCOX-2を選択的に阻害することができる「スーパーアスピリン」の探索につながった(Isakson, P.、Seibert, K.、Masferrer, J.、Salvemini, D.、Lee, L. とNeedleman, P. (1995) Discovery of a better aspirin. Advances in Prostaglandin, Thromboxane & Leukotriene Research 23、49-54; Herschman, H. R. (1998) Recent progress in the cellular and molecular biology of prostaglandin synthesis. Trends in Cardiovasc. Med. 8、145-150)。この点でとりわけ興味深いことに、PMNの移動を阻害する15-エピ-LXは、アスピリンの有益な恩恵のいくつかの基礎となるかも知れないアスピリンのアセチル化能力の内在性の生成物である。LXおよび15-エピ-LX双方の安定な類似物を調製した。これらは、15-エピ-LXA₄と同様にLXA₄受容体を介して作用する(Serhan, C. N.、Maddox, J. F.、Petasis, N. A.、Akritopoulou-Zanze, I.、Payianni, A.、Brady, H. R.、Colgan, S. P. とMadaras, J. L. (1995) Design of lipoxin A₄ stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. Biochemistry 34、14609-14615; Takano, T.、Fiore, S.、Maddox, J. F.、Brady, H. R.、Petasis, N. A. とSerhan, C. N. (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: Evidence for anti-inflammatory receptors. J. Exp. Med. 185、1693-1704)。リポキシン化合物の適する製造方法は、例えば、引用により本明細書に組み込まれる米国特許第5,411,951号、同第5,648,512号、同第5,650,435号および同第5,750,354号明細書にもまた見出すことができる。例えば、15-エピ-16-パラフルオロフェノキシリポキシンA₄メチルエステル(15-エピ-LXa)は、マウス耳皮膚の炎症において迅速な不活性化に抵抗するのみならずしかし局所に作用してPMN浸潤および血管透過性を阻害する15-エピ-LXA₄(図1、下左)の合成の類似物である(Takano, T.、Clish, C. B.、Gronert, K.、Petasis, N. とSerhan, C. N. (1998) Neutrophil-mediated change

10

20

30

40

50

s in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. J. Clin. Invest. 101、819-826)。

【0014】

PMN応答の受容体に稼働される封鎖の原因であるシグナル伝達経路(1種もしくは複数)の解明は興味深い。ホスホリパーゼD(PLD)を介するシグナル伝達は細胞性応答の装備で中枢的役割を演じている。PLDは、リガンドへの曝露から数秒以内に、膜のホスファチジルコリン(PC)を加水分解してホスファチジン酸(PA)を生成する(Billah, M. M.、Eckel, S.、Mullmann, T. J.、Egan, R. W. と Siegel, M. I. (1989) Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. J. Biol. Chem. 264、17069-17077)。PAの形成は、小胞の分泌およびNADPH酸化酵素の集成を包含する機能的応答に一時的に先行する(Wakelam, M. J. O.、Martin, A.、Hodgkin, M. N.、Brown, F.、Pettit, T. R.、Cross, M. J.、De Takats, P. G. と Reynolds, J. L. (1997) Role and regulation of phospholipase D activity in normal and cancer cells. Advances in Enzyme Regulation 37、29-34; Olson, S. C. と Lambeth, J. D. (1996) Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. Chem. Phys. Lipids 80、3-19)。PLD1およびPLD2の数種のアイソザイムをクローン化しかつ特徴づけし(Steed, P. M.、Clark, K. L.、Boyar, W. C. と Lasala, D. J. (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. FASEB J. 12、1309-1317)、PLD1bがヒト顆粒球中の顕著なアイソフォームとして同定された(Martin, A.、Saqib, K. M.、Hodgkin, M. N.、Brown, F. D.、Pettit, T. R.、Armstrong, S. と Wakelam, M. J. O. (1997) Role and regulation of phospholipase D signalling. Biochem. Soc. Trans. 25、1157-1160)。ヒトPLDの完全なDNAおよびアミノ酸配列はHammondら(1995) J. Biol. Chem. 270:29640-29643およびHammondら(1997) J. Biol. Chem. 272:3860-3868に開示され、その完全な内容は引用により本明細書に組み込まれ、また、ジェンバンク(GenBank)受託番号第NM002662号および第U38545号でもまた見出すことができる。

【0015】

最近、新規のポリイソプレニルホスフェート(PIPP)シグナル伝達経路が同定され(図1A)、そして、PMNにおいては、プレスクアレンジホスフェート(PSDP)が生物学的活性を担持し、そしてPAを包含する数種の刺激によるスーパーオキシドアニオンの生成を予防する負の細胞内シグナルとして作用することが見出された(Levy, B. D.、Petasis, N. A. と Serhan, C. N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. Nature 389、985-989)。PLDの活性化はスーパーオキ

10

20

30

40

50

シドアニオンの生成に結びつけられる (Agwu, D. E., McPhail, L. C., Sozzani, S., Bass, D. A. と McCall, C. E. (1991) Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase. J. Clin. Invest. 88, 531 - 539) ため、PIPP のシグナル伝達が包括的な細胞の活性化に決定的なホスホリパーゼ活性もまた調節することが決定された。(i) LTB₄ 受容体の活性化が、PIPP のシグナル伝達の重要な構成要素である PSDP を迅速に分解する (これは LXA₄ 受容体アゴニストにより反転される) こと、(ii) アスピリンに誘導される 15 - エピ - LXA₄ の安定な類似物が、LTB₄ に開始される PLD の活性化およびスーパーオキシドアニオンの生成を強力に阻害すること、ならびに (iii) PSDP はヒト組換えおよび植物双方の PLD を直接阻害することが見出された。これらの知見は、調節的シグナル伝達経路としての受容体に開始される PIPP の再生の証拠を提供する。

10

【0016】

本発明は、ホスホリパーゼ D (PLD) 活性に随伴する疾患もしくは病状の調整方法に関する。該方法は、有効な抗 PLD 量の下述される式を有するリボキシン類似物の被験体への投与を包含し、その結果、PLD 誘導性活性が調整される。

【0017】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼ D (PLD) 活性の治療方法にも関する。該方法は、有効な抗 PLD 量の下述されるリボキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLD 誘導性活性が治療される。

20

【0018】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼ D (PLD) 誘導性スーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性に随伴する疾患もしくは病状の調整方法にさらに関する。該方法は、有効な抗 PLD 量の下述されるリボキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLD のスーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性の誘導に随伴する疾患もしくは病状が調節される。

【0019】

本発明は、被験体におけるホスホリパーゼ D (PLD) 誘導性スーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性の治療方法にさらに関する。該方法は、有効な抗 PLD 量の下述されるリボキシン類似物の投与を包含し、その結果、PLD 誘導性スーパーオキシド生成もしくは脱顆粒活性が治療される。

30

【0020】

好ましい態様において、本発明の方法はインビトロもしくはインビボで実施される。

【0021】

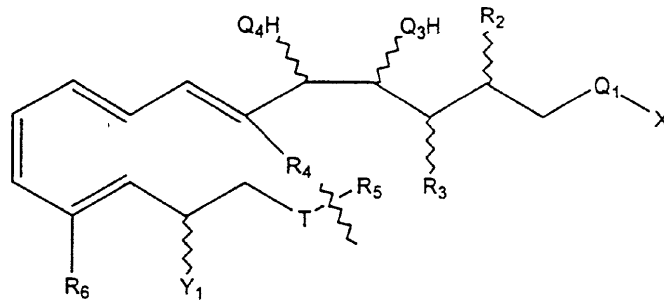
別の局面において、本発明は、被験体における上に列挙された活性もしくは病状を治療するための包装された製薬学的組成物に向けられる。該包装された製薬学的組成物は、治療上有効な量の下述される式の 1 つを有する最低 1 種のリボキシン化合物を保持する容器、および被験体における活性もしくは病状を治療するための該リボキシン化合物の使用のための説明書を包含する。

40

【0022】

一態様において、本発明で有用な化合物は、式 (I)

【0023】**【化25】**



【 0 0 2 4 】

10

式中、Xは R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり；

式中、 R_1 は、

(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1から8個までの炭素原子のアルキル；

(iii) 3ないし10個の炭素原子のシクロアルキル；

(iv) 7ないし12個の炭素原子のアラルキル；

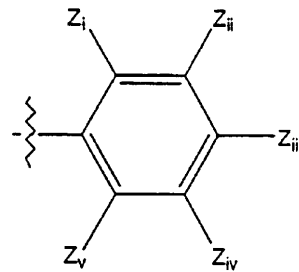
(v) フェニル；

(vi) 置換フェニル

【 0 0 2 5 】

【 化 2 6 】

20



【 0 0 2 6 】

30

(ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

(vii) 検出可能な標識分子；または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル；であり；

式中、 Q_1 は $(C=O)$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合にはXは存在せず；

式中、 Q_3 および Q_4 はそれぞれ独立にO、SもしくはNHであり；

式中、 R_2 および R_3 の一方が水素原子でありかつ他方が

40

(a) H；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子のアルキル；

(c) 3から6個までの炭素原子のシクロアルキル；

(d) 直鎖もしくは分枝状であってよい2から8個までの炭素原子のアルケニル；または

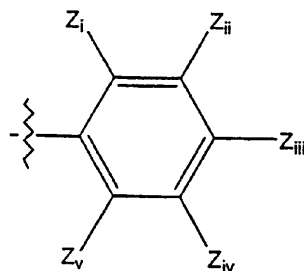
(e) $R_aQ_2R_b$ (ここで Q_2 は $-O-$ もしくは $-S-$ であり；ここで R_a は直鎖もしくは分枝状であってよい0から6個までの炭素原子のアルキレンであり、また、ここで R_b は直鎖もしくは分枝状であってよい0から8個までの炭素原子のアルキルであるが、但し、 R_b が0である場合には R_b は水素原子である)；

であり；

式中、 R_4 は

50

(a) H ;
 (b) 直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 6 個までの炭素原子のアルキル
 であり ;
 式中、 R_5 は
 【 0 0 2 7 】
 【 化 2 7 】

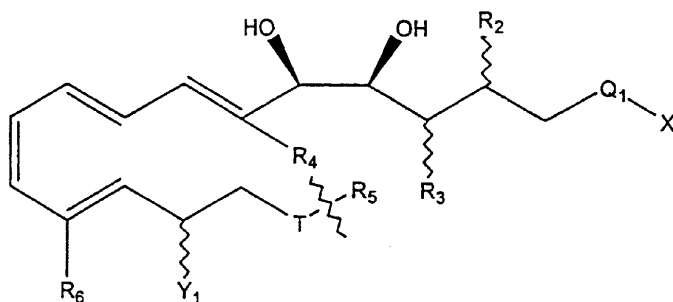


10

【 0 0 2 8 】
 であり、
 ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシル
 20
 、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり ;
 式中、 Y_1 は、 $-OH$ 、メチル、 $-SH$ 、直鎖もしくは分枝状の 2 から 4 個までの炭素原子のアルキル、1 から 4 個までの炭素原子のアルコキシ、または CH_aZ_b であり、ここで $a+b=3$ 、 $a=0$ ないし 3、 $b=0$ ないし 3、および Z はシアノ、ニトロもしくはハロゲンであり ;
 式中、 R_6 は
 (a) H ;
 (b) 直鎖もしくは分枝状の 1 から 4 個までの炭素原子のアルキル ;
 であり ;
 式中、 T は O もしくは S である、
 30
 ならびにその製薬学的に許容できる塩を有する。

【 0 0 2 9 】
 別の態様において、本発明で有用な化合物は、式 (I I)

【 0 0 3 0 】
 【 化 2 8 】

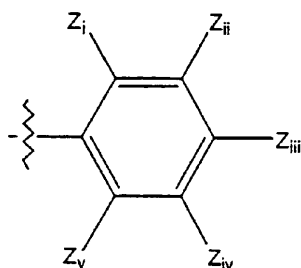


40

【 0 0 3 1 】
 式中、 X は R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり ;
 式中、 R_1 は、
 (i) 水素原子 ;
 (ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル ;

50

- (i i i) 3 ないし 1 0 個の炭素原子のシクロアルキル ;
 (i v) 7 ないし 1 2 個の炭素原子のアラルキル ;
 (v) フェニル ;
 (v i) 置換フェニル
【 0 0 3 2 】
【 化 2 9 】



10

【 0 0 3 3 】
 (ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシルである) ;

(v i i) 検出可能な標識分子 ; または

20

(v i i i) 2 から 8 個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル
 であり ;

式中、 Q_1 は $(C=O)$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合には X は存在せず ;

式中、 R_2 および R_3 の一方が水素原子でありかつ他方が

(a) H ;

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子のアルキル ;

(c) 3 から 6 個までの炭素原子のシクロアルキル ;

(d) 直鎖もしくは分枝状であってよい 2 から 8 個までの炭素原子のアルケニル ; または

(e) $R_aQ_2R_b$ (ここで Q_2 は $-O-$ もしくは $-S-$ であり ; ここで R_a は直鎖もしくは分枝状であってよい 0 から 6 個までの炭素原子のアルキレンであり、また、ここで R_b は直鎖もしくは分枝状であってよい 0 から 8 個までの炭素原子のアルキルであるが、但し、 R_b が 0 である場合には R_b は水素原子である) ;

30

であり ;

式中、 R_4 は

(a) H ;

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 6 個までの炭素原子のアルキル

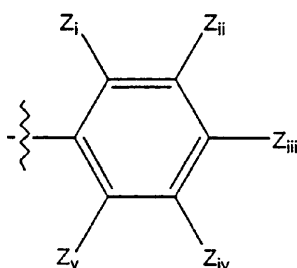
であり ;

式中、 R_5 は

【 0 0 3 4 】

40

【 化 3 0 】



【 0 0 3 5 】

50

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 Y_1 は、 $-\text{OH}$ 、メチル、 $-\text{SH}$ 、直鎖もしくは分枝状の 2 から 4 個までの炭素原子のアルキル、1 から 4 個までの炭素原子のアルコキシ、または CH_aZ_b であり、ここで $a+b=3$ 、 $a=0$ ないし 3、 $b=0$ ないし 3、および Z はシアノ、ニトロもしくはハロゲンであり；

式中、 R_6 は

(a) H；

(b) 直鎖もしくは分枝状の 1 から 4 個までの炭素原子のアルキル

であり；

式中、 T は O もしくは S である、

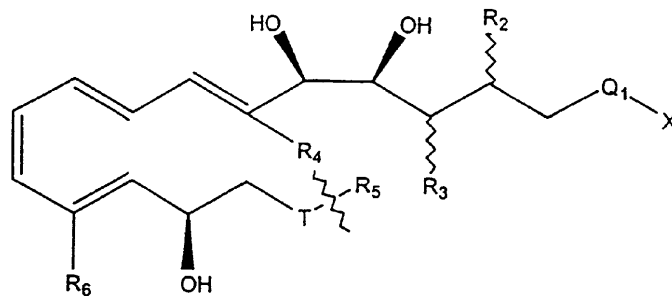
ならびにその製薬学的に許容できる塩を有する。

【0036】

本発明は、式 (III)

【0037】

【化31】



【0038】

式中、 X は R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり；

式中、 R_1 は、

(i) 水素原子；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル；

(iii) 3 ないし 10 個の炭素原子のシクロアルキル；

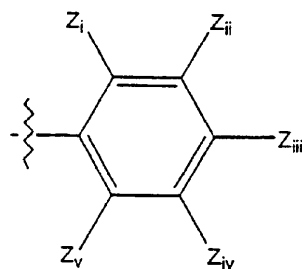
(iv) 7 ないし 12 個の炭素原子のアラルキル；

(v) フェニル；

(vi) 置換フェニル

【0039】

【化32】



【0040】

(ここで、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$

10

20

30

40

50

、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

(vii) 検出可能な標識分子；または

(viii) 2から8個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニルであり；

式中、 Q_1 は $(C=O)$ 、 SO_2 もしくは (CN) であるが、但し、 Q_1 が CN である場合には X は存在せず；

式中、 R_2 および R_3 の一方が水素原子でありかつ他方が

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子のアルキル；

(c) 3から6個までの炭素原子のシクロアルキル；

(d) 直鎖もしくは分枝状であってよい2から8個までの炭素原子のアルケニル；または

(e) $R_a Q_2 R_b$ (ここで Q_2 は $-O-$ もしくは $-S-$ であり；ここで R_a は直鎖もしくは分枝状であってよい0から6個までの炭素原子のアルキレンであり、また、ここで R_b は直鎖もしくは分枝状であってよい0から8個までの炭素原子のアルキルであるが、但し、 R_b が0である場合には R_b は水素原子である)；

であり；

式中、 R_4 は

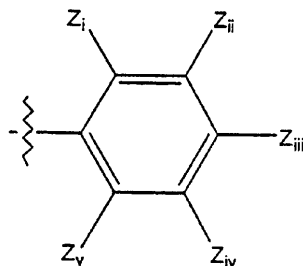
(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1から6個までの炭素原子のアルキルであり；

式中、 R_5 は

【0041】

【化33】



【0042】

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 R_6 は

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状の1から4個までの炭素原子のアルキルであり；

式中、 T は O もしくは S である、

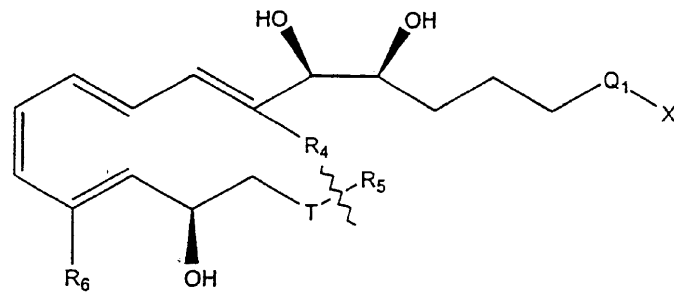
を有する有用なポリキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩にもまた向けられる。

【0043】

本発明は、さらに、式(IV)

【0044】

【化34】



【 0 0 4 5 】

10

式中、XはR₁、OR₁もしくはSR₁であり；

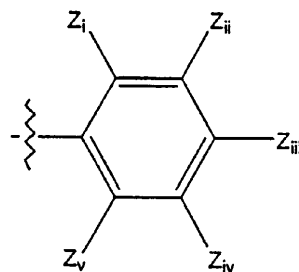
式中、R₁は、

- (i) 水素原子；
- (i i) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル；
- (i i i) 3 ないし 1 0 個の炭素原子のシクロアルキル；
- (i v) 7 ないし 1 2 個の炭素原子のアラルキル；
- (v) フェニル；
- (v i) 置換フェニル

【 0 0 4 6 】

【 化 3 5 】

20



【 0 0 4 7 】

(ここで、Z_i、Z_{ii}、Z_{iii}、Z_{iv}およびZ_vは、-NO₂、-CN、-C(=O)-R₁、-SO₃H、水素原子、ハロゲン、メチル、-OR_xからそれぞれ独立に選択され、ここで、R_xは直鎖もしくは分枝状であってよい1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシルである)；

30

(v i i) 検出可能な標識分子；または

(v i i i) 2 から 8 個までの炭素原子の直鎖もしくは分枝状鎖のアルケニル；であり；
 式中、Q₁は(C=O)、SO₂もしくは(CN)であるが、但し、Q₁がCNである場合にはXは存在せず；

式中、R₄は

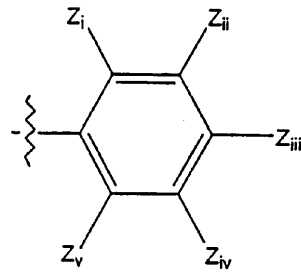
- (a) H；
- (b) 直鎖もしくは分枝状であってよい1 から 6 個までの炭素原子のアルキル

40

式中、R₅は

【 0 0 4 8 】

【 化 3 6 】



【 0 0 4 9 】

10

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい 1 から 8 個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 R_6 は

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状の 1 から 4 個までの炭素原子のアルキル ；

であり ；

式中、 T は O もしくは S である、

20

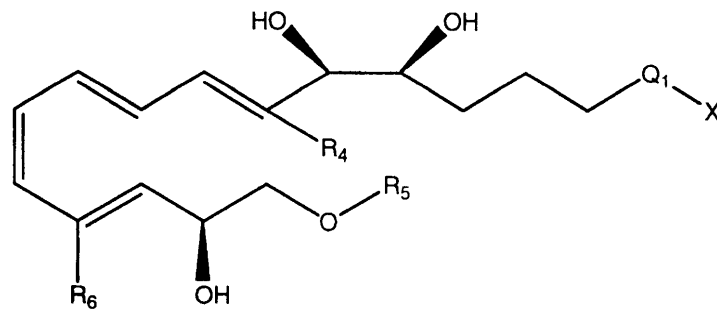
を有する有用なポリキシン化合物、ならびにその製薬学的に許容できる塩に向けられる。

【 0 0 5 0 】

本発明は、さらに、式 (V)

【 0 0 5 1 】

【 化 3 7 】



30

【 0 0 5 2 】

式中、 X は R_1 、 OR_1 もしくは SR_1 であり ；式中、 R_1 は、

(i) 水素原子 ；

(ii) 直鎖もしくは分枝状であってよい、1 から 8 個までの炭素原子のアルキル ；

40

(iii) 3 ないし 10 個の炭素原子のシクロアルキル ；

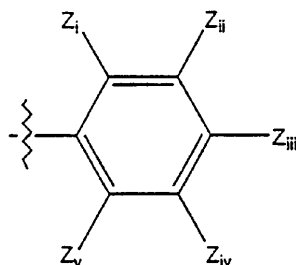
(iv) 7 ないし 12 個の炭素原子のアラルキル ；

(v) フェニル ；

(vi) 置換フェニル

【 0 0 5 3 】

【 化 3 8 】



【 0 0 5 4 】

(式中、 Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、それぞれ独立して $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ (式中、 R_x は直鎖または分枝状であってもよい炭素原子1～8個である)、およびヒドロキシルより選ばれる)

10

(vii) 検出可能な標識分子、または

(viii) 炭素原子2～8個の直鎖または分枝状アルケニル

であり、

式中、 Q_1 は、 $(\text{C}=\text{O})$ 、 $-\text{SO}_2$ または (CN) であり、ただし Q_1 が CN の場合には、 X は存在せず、

式中、 R_4 は、

(a) H 、

(b) 直鎖または分枝状であってもよい炭素原子1～6個のアルキル

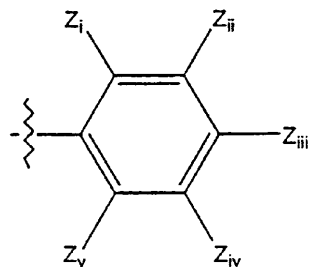
であり、

式中、 R_5 は、

20

【 0 0 5 5 】

【 化 3 9 】



30

【 0 0 5 6 】

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-\text{OR}_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってもよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシル、または置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であり；

式中、 R_6 は

(a) H ；

(b) 直鎖もしくは分枝状の1から4個までの炭素原子のアルキル；

である、

を有する有用なリポキシン化合物；ならびに

その製薬学的に許容できる塩

に向けられる。

40

【 0 0 5 7 】

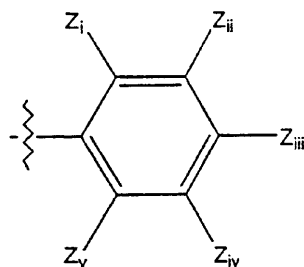
好ましい態様において、 X は OR_1 であり、ここで R_1 は水素原子、1ないし4個の炭素原子のアルキル基もしくは製薬学的に許容できる塩であり、 Q_1 は $\text{C}=\text{O}$ であり、 R_2 および R_3 (存在する場合)は水素原子であり、 R_4 は水素原子もしくはメチルであり、 Q_3 およ

50

び Q_4 (存在する場合) は双方とも O であり、 R_6 (存在する場合) は水素原子であり、 Y_1 (存在する場合) は OH であり、 T は O であり、そして R_5 は置換フェニル、例えば

【0058】

【化40】



10

【0059】

であり、

ここで Z_i 、 Z_{ii} 、 Z_{iii} 、 Z_{iv} および Z_v は、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)-R_1$ 、 $-SO_3H$ 、水素原子、ハロゲン、メチル、 $-OR_x$ からそれぞれ独立に選択され、ここで、 R_x は、直鎖もしくは分枝状であってよい1から8個までの炭素原子およびヒドロキシルである。ある態様において、 R_5 についてパラフルオロフェニルおよび/もしくは未置換フェニルが除外される (例えば15-エピ-16-(パラフルオロ)フェノキシ-LXA₄、16-(パラフルオロ)フェノキシ-LXA₄、15-エピ-16-フェノキシ-LXA₄ もしくは16-フェノキシ-LXA₄)。米国特許第5,441,951号明細書により包含される化合物は本発明の一定の態様から除外される。

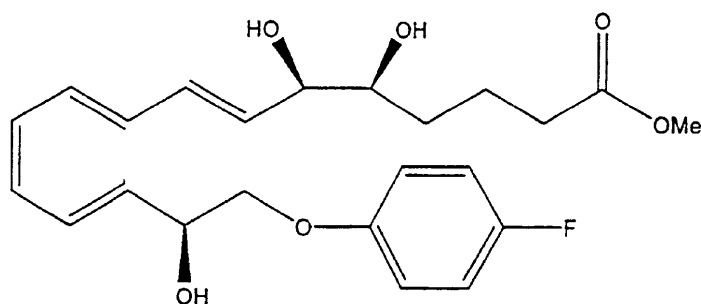
20

【0060】

さらに別の態様において、本発明は、上述された式を有する化合物および製薬学的に許容できる担体を包含する製薬学的組成物に向けられる。一態様において、好ましい化合物は

【0061】

【化41】



30

【0062】

である。好ましい一態様において、製薬学的担体はケトン、例えばアセトンでない。

【0063】

好ましい態様において、 Y_1 はヒドロキシルであり、また、ヒドロキシルを担持する炭素は R もしくは S 配置を有することができる。最も好ましい態様において、ヒドロキシル基 (例えば Y_1) を担持するキラル炭素は、当該技術分野で既知であるように、15-エピ-リポキシンと呼称される。

40

【0064】

ある態様において、 R_2 、 R_3 、 Q_3 および Q_4 基を担持する炭素のキラリティーは、それぞれ独立に R もしくは S のいずれかであることができる。好ましい態様において、 Q_3 および Q_4 は構造 I I、I I I、I V もしくは V に示されるキラリティーを有する。

【0065】

好ましい態様において、 R_4 は水素である。他の好ましい態様において、 R_6 は水素である

50

。

【 0 0 6 6 】

加えて、 R_5 は、1と約6個との間の炭素原子、好ましくは1と4個との間の炭素原子、最も好ましくは1と3個との間、そして好ましくは1もしくは2個の炭素原子を有する置換もしくは未置換、分枝状もしくは非分枝状のアルキル基であることができる。炭素原子は、ハロゲン原子、ヒドロキシル基もしくは他の基を包含する置換基を有することができる。

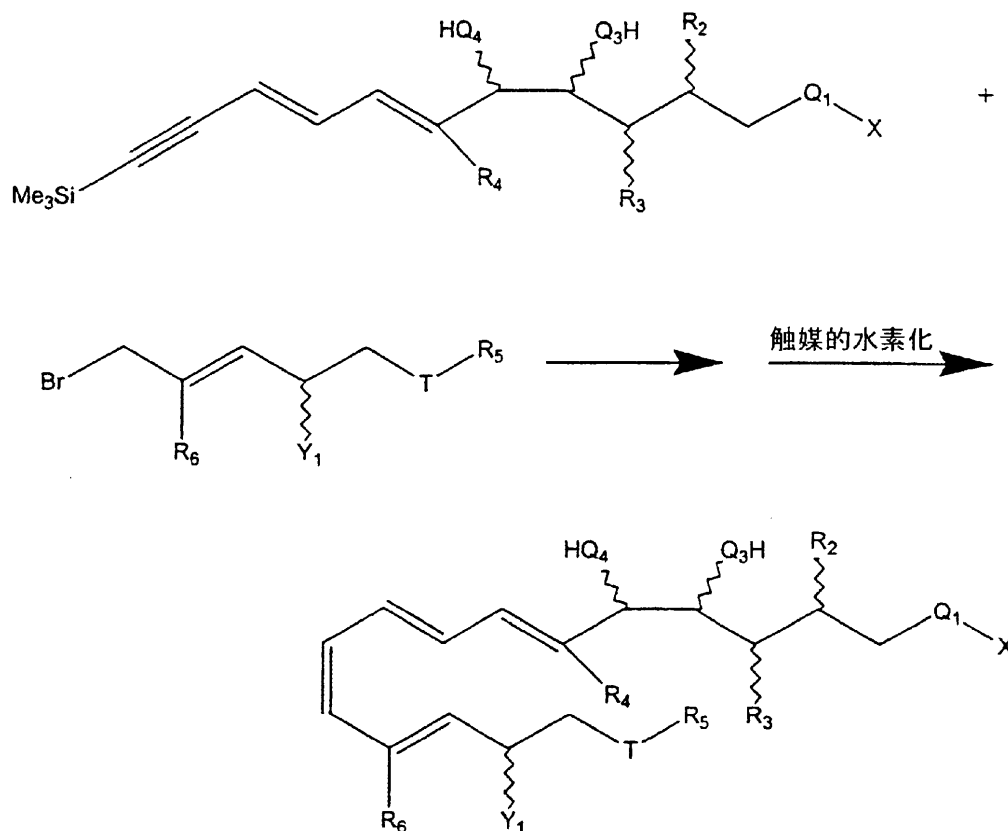
【 0 0 6 7 】

本発明で有用な化合物は、以下の合成スキームにより製造することができる：

【 0 0 6 8 】

10

【 化 4 2 】



20

30

【 0 0 6 9 】

ここで、 X 、 Q_1 、 Q_3 、 Q_4 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 Y_1 および T は上で定義されたとおりである。当該技術分野で既知の適する方法を使用して各断片を製造することができる。例えば、アセチレン断片は、Nicolaou, K. C. ら (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 1100; Nicolaou, K. C. ら (1989) *J. Org. Chem.* 54: 5527; Webber, S. E. ら (1988) *Adv. Exp. Med. Biol.* 229: 61; および米国特許第5,441,951号明細書に論考される方法により製造することができる。第二の断片は、Raduchel, B. と Vorbruggen, H. (1985) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 14: 263の方法により製造することができる。

40

【 0 0 7 0 】

「リポキシン類似物」は、「天然のリポキシン」の活性領域と同様に機能する「活性領域」を有するがしかし天然のリポキシンと異なる「代謝転化領域 (metabolic transformation region)」を有する化合物を意味する。リポキシン

50

類似物は、天然のリボキシシンに構造的に類似である化合物、同一の受容体認識部位を共有する化合物、リボキシシンと同一もしくは類似のリボキシシン代謝転化領域を共有する化合物、およびリボキシシンの類似物であると技術に認識される化合物を包含する。リボキシシン類似物は、リボキシシン類似物の代謝物を包含する。本明細書に開示される化合物は1個もしくはそれ以上の非対称中心を含有してよい。非対称炭素原子が存在する場合、1個以上の立体異性体が可能であり、そして、示される構造表示内に全部の可能な異性体が包含されることを意図している。光学的に活性の(R)および(S)異性体は、当業者に既知の慣習的技術を使用して分割してもよい。本発明は、可能なジアステレオマーならびにラセミおよび光学的に分割された異性体を包含することを意図している。

【0071】

10

「対応するリボキシシン」および「天然のリボキシシン」という用語は、天然に存在するリボキシシンもしくはリボキシシン代謝物を指す。類似物がリボキシシン特異的受容体に対する活性を有する場合、対応するもしくは天然のリボキシシンはその受容体に対する正常なリガンドである。例えば、類似物が、分化されたHL-60細胞上のLXA₄特異的受容体である場合、対応するリボキシシンはLXA₄である。類似物が、天然に存在するリボキシシンにより拮抗される(ロイコトリエンのような)別の化合物に対するアンタゴニストとしての活性を有する場合、その天然のリボキシシンが対応するリボキシシンである。

【0072】

「活性領域」は、インピボで細胞の相互作用に関連する天然のリボキシシンもしくはリボキシシン類似物の領域を意味する。活性領域は、細胞のリボキシシン受容体、または酵素およびその補助因子を包含する巨大分子もしくは巨大分子の複合体の「認識部位」を結合することができる。好ましいリボキシシンA₄類似物は、天然のリボキシシンA₄のC₅-C₁₅を含んで成る活性領域を有する。好ましいリボキシシンB₄類似物は、天然のリボキシシンB₄のC₅-C₁₄を含んで成る活性領域を有する。

20

【0073】

「認識部位」もしくは受容体という用語は技術に認識され、そしてホルモン、ロイコトリエンおよびリボキシシンのようなある群の細胞のメッセンジャーが、それらのメッセンジャーに対する生化学的および生理学的応答が開始される前に最初に相互作用しなくてはならない、機能的な巨大分子もしくは巨大分子の複合体を全般として指すことを意図している。本出願で使用されるところの受容体は、無傷のもしくは浸透化された細胞上、または器官を包含する組織中で単離することができる。受容体は生存する被験体から、もしくはその中にあってよいが、またはそれはクローン化してもよい。受容体は通常存在してよいが、または疾患状態、傷害もしくは人工的手段により誘導してもよい。本発明の化合物は、認識部位の天然の基質に関して可逆的に、不可逆的に、競争的に、非競争的に(non competitively)もしくは競合せずに(unc competitively)結合してよい。

30

【0074】

「代謝転化領域」という用語は、その上で酵素もしくは酵素およびその補助因子が、その酵素もしくは酵素および補助因子が通常リボキシシン上で転化する1種もしくはそれ以上の代謝転化を実施することを試みる、リボキシシン、リボキシシン代謝物、もしくはリボキシシン類似物の代謝物を包含するリボキシシン類似物の部分を全般として指すことを意図している。代謝転化領域は転化を受けやすくても受けやすくなくてもよい。リボキシシンの代謝転化領域の制限しない一例は、C-13, 14の二重結合もしくはC-15のヒドロキシル基または双方を包含するLXA₄の一部である。

40

【0075】

「検出可能な標識分子」という用語は、該検出可能な標識分子が結合されている化合物もしくは受容体認識部位を追跡(trace)、追跡(track)もしくは同定するのに使用される蛍光、リン光および放射標識された分子を包含することを意味する。標識分子は、当該技術分野で既知の数種の方法のいずれかにより検出することができる。

【0076】

50

「標識されたりボキシン類似物」という用語は、限定されるものでないがトリチウム (^3H)、重水素 (^2H)、炭素 (^{14}C) もしくは別の方法で標識された (例えば蛍光で) ような放射活性同位体で標識されている化合物を包含することがさらに理解される。本発明の化合物は、例えば動力学的結合実験のため、代謝経路および酵素の機構をさらに解明するため、もしくは分析化学の技術分野で既知の方法による特徴づけのため、標識もしくは誘導体化してよい。

【0077】

「代謝を阻害する」という用語は、天然のリボキシンを代謝する酵素の活性の封鎖もしくは抑制を意味する。封鎖もしくは抑制は、共有結合、不可逆的結合、不可逆的結合の実際的な効果を有する可逆的結合、または酵素がその通常の様式でリボキシン類似物の代謝物、

10

【0078】

「代謝に抵抗する」という用語は、リボキシンを代謝する最低1種の酵素による代謝分解的転化の1種もしくはそれ以上をうけることに失敗することを包含することを意味している。代謝に抵抗する LXA_4 類似物の2つの制限しない例は、1) 15-オキソの形態に酸化することができない構造、および2) 15-オキソの形態に酸化することができるがしかし13, 14-ジヒドロの形態への酵素的還元を受けやすすくない構造、である。

【0079】

「代謝をよりゆっくりと受ける」という用語は、より遅い反応の動力学を有すること、またはリボキシンを代謝する酵素の1種もしくはそれ以上による一連の代謝転化の完了により長い時間を必要とすることを意味する。よりゆっくりと代謝を受ける LXA_4 類似物の制限しない一例は、C-15の脱水素について LXA_4 が有するよりもより大きな遷移状態エネルギーを有する構造である。なぜなら、該類似物はC-16で立体的に妨げられているからである。

20

【0080】

「組織」という用語は、無傷の細胞、血液、血漿および血清のような血液調製物、骨、関節、筋、平滑筋および器官を包含することを意図している。

【0081】

「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素、もしくはフルオロ、クロロ、プロモおよびヨードを包含することを意味している。ある局面において、本発明の化合物はハロゲン化合物 (例えばフッ素化合物) を包含しない。

30

【0082】

「被験体」という用語は、炎症、炎症応答、血管収縮および骨髄抑制により引き起こされるもしくはそれらに寄与される病状もしくは疾患を受けやすい生存する生物体を包含することを意図している。被験体の例は、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギおよびマウスを包含する。被験体という用語はトランスジェニック種を包含することをさらに意図している。

【0083】

本発明の化合物を医薬としてヒトおよび哺乳動物に投与する場合、それらはそれ自体、または例えば製薬学的に許容できる担体とともに0.1ないし99.5% (より好ましくは0.5ないし90%) の有効成分を含有する製薬学的組成物として与えることができる。

40

【0084】

本明細書で使用されるところの「製薬学的に許容できる担体」という句は、それがその意図された機能を実施できるような、被験体内でもしくは被験体に本発明の化合物 (1種もしくは複数) を運搬もしくは輸送することに関与する、液体もしくは固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒もしくは被包化物質のような製薬学的に許容できる物質、組成物もしくはベヒクルを意味する。典型的には、こうした化合物は、1つの器官もしくは身体の部分から別の器官もしくは身体の部分まで運搬もしくは輸送される。各担体は、該製剤の他の成分と適合性であるという意味において「許容でき」なければならず、また、患者に対し有害であってはならない。製薬学的に許容できる担体として作用することができる物質の

50

いくつかの例は：乳糖、ブドウ糖およびショ糖のような糖類；トウモロコシデンプンおよびパレイショデンプンのようなデンプン類；セルロースならびにカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよびセルロースアセテートのようなその誘導体；粉末にされたトラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；カカオバターおよび坐剤蠟のような賦形剤；ラッカセイ油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油のような油類；プロピレングリコールのようなグリコール類；グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールのような多価アルコール類；エチルオレエートおよびエチルラウレートのようなエステル類；寒天；水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムのような緩衝剤；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張の生理的食塩水；リンゲル溶液；エチルアルコール；リン酸緩衝溶液；ならびに製薬学的製剤で使用される他の非毒性の適合性の物質を包含する。

10

【0085】

ある態様においては、本発明の化合物は1種もしくはそれ以上の酸官能基を含有してよく、そして、従って、製薬学的に許容できる塩基とともに製薬学的に許容できる塩を形成することが可能である。これらの例における「製薬学的に許容できる塩」という用語は、本発明の化合物の比較的非毒性の無機および有機塩基付加塩を指す。これらの塩は、同様に、該化合物の最終の単離および精製の間に、あるいはその遊離酸の形態の精製された化合物を、製薬学的に許容できる金属陽イオンの水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩のような適する塩基、アンモニア、または製薬学的に許容できる有機の一級、二級もしくは三級アミンと別個に反応させることによりインシトゥで製造することができる。代表的なアルカリもしくはアルカリ土類の塩は、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびアルミニウム塩などを包含する。塩基付加塩の形成に有用な代表的有機アミンは、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどを包含する。

20

【0086】

「製薬学的に許容できるエステル」という用語は、本発明の化合物の比較的非毒性のエステル化された生成物を指す。これらのエステルは、該化合物の最終の単離および精製の間に、またはその遊離酸の形態もしくはヒドロキシルの精製された化合物を適するエステル化剤と別個に反応させることにより、インシトゥで製造することができる。カルボン酸は触媒の存在下でアルコールでの処理を介してエステルに転化することができる。該用語は、生理学的条件下で溶媒和されることが可能な低級炭化水素基、例えばアルキルエステル、メチル、エチルおよびプロピルエステルを包含することをさらに意図している。好ましい一態様において、エステルはメチルエステルでない（例えば、Bergerら、上記を参照されたい）。

30

【0087】

ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムのような湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、ならびに着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、矯味矯臭剤および香料、保存剤および抗酸化剤もまた該組成物中に存在することができる。

【0088】

製薬学的に許容できる抗酸化剤の例は：アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどのような水溶性抗酸化剤；アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどのような脂溶性抗酸化剤；およびクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような金属キレート剤を包含する。

40

【0089】

本発明の製剤は、静脈内、経口、鼻、局所、経皮、口腔内、舌下、直腸、膣および/もしくは非経口投与に適するものを包含する。該製剤は、単位投与剤形で便宜的に存在してよく、また、調剤の技術分野で公知のいずれかの方法により製造してよい。単一の投薬形態を生じさせるため担体物質と組み合わせることができる有効成分の量は、一般に、治療効

50

果を生じさせる化合物の量であることができる。一般に、この量は、１００パーセントから、約１パーセントから約９９パーセントまでの有効成分、好ましくは約５パーセントから約７０パーセントまで、最も好ましくは約１０パーセントから約３０パーセントまでの範囲にあることができる。

【００９０】

これらの製剤もしくは組成物の製造方法は、本発明の化合物を担体および場合によっては１種もしくはそれ以上の補助成分と連合させる段階を包含する。一般に、該製剤は、本発明の化合物を液体の担体もしくは微細に分割された固体の担体、または双方と均一にかつ緊密に連合させること、および、その後、必要な場合は生成物を造形することにより製造する。

10

【００９１】

経口投与に適する本発明の製剤は、カプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、（味を付けられた主薬、通常はショ糖およびアラビアゴムもしくはトラガカントを使用する）トローチ剤、散剤、顆粒剤の形態で、あるいは水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁剤、または水中油もしくは油中水の液体乳剤、またはエリキシル剤もしくはシロップ剤、または（ゼラチンおよびグリセリンもしくはショ糖およびアラビアゴムのような不活性基剤を使用する）香錠ならびに／または含嗽剤などとしてであってよく、それぞれは、有効成分として予め決められた量の本発明の１種の化合物を含有する。本発明の化合物はボラス、舐剤もしくはパスタ剤として投与してもよい。

【００９２】

20

経口投与のための本発明の固形の投薬形態（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤など）においては、有効成分を、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウムのような１種もしくはそれ以上の製薬学的に許容できる担体、ならびに／または以下、すなわちデンプン、乳糖、ショ糖、ブドウ糖、マンニトールおよび／もしくはケイ酸のような増量剤（filler）もしくは増量剤（extender）；例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖および／もしくはアラビアゴムのような結合剤；グリセロールのような湿潤剤（humectant）；寒天、炭酸カルシウム、パレイショもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩および炭酸ナトリウムのような崩壊剤；パラフィンのような溶解遅延剤；四級アンモニウム化合物のような吸収促進剤；例えばセチルアルコールおよびグリセロールモノステアレートのような湿潤剤（wetting agent）；カオリンおよびベントナイト粘土のような吸収剤；タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体のポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよびそれらの混合物のような滑沢剤；ならびに着色剤のいずれかと混合する。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合には、製薬学的組成物は緩衝剤もまた含んでよい。類似の型の固体の組成物は、乳糖（lactose）もしくは乳糖（milk sugar）、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用する軟および硬充填ゼラチンカプセル中の増量剤としてもまた使用してよい。

30

【００９３】

錠剤は、場合によっては１種もしくはそれ以上の補助成分とともに圧縮もしくは成形により作成してよい。圧縮錠剤は、結合剤（例えばゼラチンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えばデンプングリコール酸ナトリウムもしくは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤を使用して製造してよい。成形錠剤は、適する機械中で、不活性の液体希釈剤で湿らされた粉末にされた化合物の混合物を成形することにより作成してよい。

40

【００９４】

本発明の製薬学的組成物の錠剤、ならびに糖衣錠、カプセル剤、丸剤および顆粒剤のような他の固体の投薬形態は、場合によっては、割線をつけてよいが、もしくは腸溶コーティングおよび医薬処方技術分野で公知の他のコーティングのようなコーティングおよび殻（shell）をもって製造してよい。それらはまた、例えば所望の放出プロファイルを提

50

供する変動する比率のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソームおよび/もしくは微小球体を使用してその中の有効成分の遅いもしくは制御された放出を提供するように処方してもよい。それらは、例えば、細菌を保持するフィルターを通す濾過により、または使用直前に滅菌水もしくははいくらかの他の滅菌の注入可能な媒体に溶解することができる滅菌の固形組成物の形態中に滅菌剤を組み込むことにより、滅菌してよい。これらの組成物は、場合によっては乳白剤もまた含有してよく、そして、それらが有効成分（１種もしくは複数）のみを、もしくは優先的には消化管のある一部分で、場合によっては遅延された様式で放出する組成物のものであってよい。使用することができる埋め込む組成物の例はポリマー性物質および蠟を包含する。有効成分は、適切な場合は１種もしくはそれ以上の上述された賦形剤で微小被包化された形態にあることもまたできる。

10

【 0 0 9 5 】

本発明の化合物の経口投与のための液体の投薬形態は、製薬学的に許容できる乳剤、マイクログエマルジョン、溶液、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤を包含する。液体の投薬形態は、有効成分に加えて、例えば水もしくは他の溶媒のような当該技術分野で普遍的に使用される不活性の希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、油類（とりわけ綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールならびにソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにそれらの混合物のような可溶化剤および乳化剤を含有してよい。

20

【 0 0 9 6 】

経口組成物は、不活性の希釈剤を除いて、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味料、矯味矯臭剤、着色料、香料および保存剤のような補助物質もまた包含することができる。

【 0 0 9 7 】

懸濁剤は、有効成分に加えて、例えばエトキシシロ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微晶質セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにそれらの混合物のような懸濁化剤を含有してよい。

【 0 0 9 8 】

直腸もしくは腔投与のための本発明の製薬学的組成物の製剤は坐剤として提示することができ、これは、本発明の１種もしくはそれ以上の化合物を、例えばカカオバター、ポリエチレングリコール、坐剤蠟もしくはサリチレートを含んで成る１種もしくはそれ以上の非刺激性の賦形剤もしくは担体と混合することにより製造してよく、また、これは室温で固体であるがしかし体温で液体であり、そして従って直腸もしくは腔腔中で溶融しかつ有効成分を放出することができる。

30

【 0 0 9 9 】

腔投与に適する本発明の製剤は、適切であることが当該技術分野で既知であるような担体を含有する腔坐剤、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、パスタ剤、泡剤もしくはスプレー製剤もまた包含する。

40

【 0 1 0 0 】

本発明の化合物の局所もしくは経皮投与のための投薬形態は、散剤、スプレー剤、軟膏剤、パスタ剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液、貼付剤および吸入剤を包含する。有効成分を、製薬学的に許容できる担体、および必要とされることができるいずれかの保存剤、緩衝剤もしくは噴射剤と滅菌条件下で混合してよい。

【 0 1 0 1 】

軟膏剤、パスタ剤、クリーム剤およびゲル剤は、本発明の有効成分に加えて、動物および植物脂肪、油、蠟、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、もしくはそれらの混合物のような賦形剤を含有してよい。

50

【0102】

散剤およびスプレー剤は、本発明の化合物に加えて、乳糖、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、もしくはこれらの物質の混合物のような賦形剤を含有することができる。スプレー剤は、クロロフルオロヒドロカーボン、ならびにブタンおよびプロパンのような揮発性の未置換の炭化水素のような通例の噴射剤を付加的に含有することができる。

【0103】

経皮貼付剤は、身体に対する本発明の化合物の制御された送達を提供するという付加される利点を有する。こうした投薬形態は、化合物を適正な媒体に溶解もしくは分散させることにより作成することができる。皮膚を横断する化合物の流入を増大させる吸収促進剤もまた使用することができる。こうした流入の速度は、速度制御膜を提供すること、またはポリマーマトリックスもしくはゲル中に有効成分を分散させることのいずれかにより制御することができる。

10

【0104】

眼用製剤、眼用の軟膏剤、散剤、溶液などもまた本発明の範囲内にあるとして企図される。

【0105】

非経口投与に適する本発明の製薬学的組成物は、1種もしくはそれ以上の製薬学的に許容できる滅菌の等張の水性もしくは非水性の溶液、分散液、懸濁液もしくは乳液、または使用直前に滅菌の注入可能な溶液もしくは分散剤に再構成してよい滅菌粉末とともに1種もしくはそれ以上の本発明の化合物を含んで成り、それらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、意図される受領者の血液と製剤を等張にする溶質、または懸濁化剤もしくは増粘剤を含有してよい。

20

【0106】

本発明の製薬学的組成物で使用してよい適する水性および非水性の担体の例は、水、エタノール、(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのような)多価アルコールおよびそれらの適する混合物、オリーブ油のような植物油、ならびにエチルオレエートのような注入可能な有機エステルを包含する。適正な流動性は、例えばレシチンのようなコーティング物質の使用、分散剤の場合には必要とされる粒子径の維持、および界面活性剤の使用により維持することができる。

30

【0107】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤のような補助物質もまた含有してよい。多様な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの包含により、微生物の作用の予防を確実にしてよい。糖類、塩化ナトリウムなどのような等張剤を組成物中に包含することもまた望ましいことができる。加えて、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる作用物質の包含により、注入可能な医薬の形態の持続性の吸収をもたらしてもよい。

【0108】

いくつかの場合には、薬物の効果を延長させるために、皮下もしくは筋肉内注入からの薬物の吸収を遅延させることが望ましい。これは、乏しい水溶解性を有する晶質もしくは非晶質物質の液体懸濁液の使用により達成してよい。その場合、薬物の吸収速度はその溶解速度に依存し、溶解速度は順に結晶の大きさおよび結晶形に依存することができる。あるいは、非経口で投与される薬物の形態の遅延される吸収は、油性ベヒクル中に薬物を溶解もしくは懸濁することにより達成する。

40

【0109】

注入可能なデポの形態は、ポリラクチド-ポリグリコリドのような生物分解可能なポリマー中で主題の化合物の微小被包化マトリックスを形成することにより作成する。ポリマーに対する薬物の比、および使用される特定のポリマーの性質に依存して、薬物放出速度を制御することができる。他の生物分解可能なポリマーの例は、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)を包含する。デポの注入可能な製剤は、リボソームもしくは身体

50

組織と適合するマイクロエマルジョン中に薬物を捕捉することによってもまた製造する。

【0110】

本発明の製剤は、経口、非経口、局所もしくは直腸で与えてよい。それらはもちろん、各投与経路に適する形態により与える。例えば、それらは、錠剤もしくはカプセル剤の形態で、注入、吸入、眼用ローション、軟膏、坐剤など、注射 (i n j e c t i o n)、点滴 (i n f u s i o n) もしくは吸入による投与；ローション剤もしくは軟膏剤による局所；および坐剤により直腸により投与する。静脈内注入投与が好ましい。

【0111】

本明細書で使用されるところの「非経口投与」および「非経口で投与される」という句は、通常は注入による腸および局所投与以外の投与様式を意味し、そして、静脈内、筋肉内、動脈内、硬膜下腔内、被膜内、眼内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内および胸骨下の注入 (i n j e c t i o n) および注入 (i n f u s i o n) を制限なしに包含する。

10

【0112】

本明細書で使用されるところの「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」および「末梢に投与される」という句は、それが患者の全身に進入し、そして従って代謝および他の同様の過程を受けるような中枢神経系中に直接以外の化合物、薬物もしくは他の物質の投与、例えば皮下投与を意味する。

【0113】

これらの化合物は、経口で、例えばスプレー剤によるような鼻で、直腸で、腔内に、非経口で、槽内に、ならびに口腔内および舌下を包含する散剤、軟膏剤もしくはドロップ剤によるように局所を包含するいずれかの適する投与経路により、治療のため、ヒトおよび他の動物に投与してよい。

20

【0114】

選択された投与経路に関係なく、適する水和された形態で 사용할ことができる本発明の化合物、および／もしくは本発明の製薬学的組成物は、当業者に既知の慣習的方法により製薬学的に許容できる投薬形態に処方する。

【0115】

本発明の製薬学的組成物中の有効成分の実際の投薬量レベルは、患者に対し毒性であることなく、特定の患者、組成物および投与様式について所望される治療応答を達成するのに有効である有効成分の量を得るように変動してよい。

30

【0116】

選択される投薬レベルは、使用される本発明の特定の化合物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定の化合物の排泄速度、治療の期間、使用される特定の化合物とともに使用される他の薬物、化合物および／もしくは物質、治療されている患者の年齢、性別、体重、病状、全体的健康状態および以前の病歴、ならびに医学の技術分野で公知の同様の因子を包含する多様な因子に依存することができる。

【0117】

当該技術分野の通常の熟練を有する医師もしくは獣医師は、必要とされる製薬学的組成物の有効量を容易に決定しかつ処方することができる。例えば、医師もしくは獣医師は、製薬学的組成物中で使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるものより低いレベルで開始しそして所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることができる。

40

【0118】

一般に、本発明の化合物の適する一日用量は、治療効果を生じさせるのに有効な最低用量である化合物の量であることができる。こうした有効用量は、一般に、上述された因子に依存することができる。一般に、患者のための本発明の化合物の静脈内および皮下の用量は、指示された鎮痛効果のために使用される場合、1日あたり体重1キログラムあたり約0.0001から約100mgまで、より好ましくは1日あたり1kgあたり約0.01

50

から約50mgまで、そしてさらにより好ましくは1日あたり1kgあたり約0.1から約40mgまでの範囲にあることができる。例えば、約0.01マイクログラムと20マイクログラムとの間、約20マイクログラムと100マイクログラムとの間、および約10マイクログラムと200マイクログラムとの間の本発明の化合物を、被験体の体重20グラムあたりに投与する。

【0119】

所望の場合は、有効成分の有効一日用量を、場合によっては単位投与剤形で、その日を通じて適切な間隔で別個に投与される2、3、4、5、6もしくはそれ以上の下位用量として投与してよい。

【0120】

本発明の化合物を単独で投与することが可能である一方、該化合物を製薬学的組成物として投与することが好ましい。

方法

材料。

【0121】

15-エピ-LXa、PSDPおよびPSMPは全有機合成により調製し、そしてそれらの物理的、化学的および生物学的特性により特徴づけした(Takano, T., Clish, C.B., Gronert, K., Petasis, N.とSerhan, C.N. (1998) Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. J. Clin. Invest. 101, 819-826; Levy, B.D., Petasis, N.A.とSerhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signaling. Nature 389, 985-989)。LTB₄はケイマンケミカル(Cayman Chemical)(ミシガン州アナーバー)から購入し、キャベツPLD(cPLD)、FDP、スクアレン、溶解緩衝液試薬およびチトクロームcはシグマケミカルカンパニー(Sigma Chemical Co.)(ミズーリ州セントルイス)からであり、また、PCおよびPAはアヴァンティポーラーリピッズ(Avanti Polar Lipids)(アラバマ州アラバスター)からであった。各生物活性脂質の完全性および濃度は、各一連の実験の直前に、UV分析(エイコサノイドおよび類似物)ならびにリン定量(ポリイソプレニルホスフェート)(Takano, T., Clish, C.B., Gronert, K., Petasis, N.とSerhan, C.N. (1998) Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. J. Clin. Invest. 101, 819-826; Levy, B.D., Petasis, N.A.とSerhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signaling. Nature 389, 985-989)により評価した。

ヒトPMN

末梢静脈血(約180ml)は、最低2週間いずれかの医薬の服用を否定しかつブリガムアンドウィメンズホスピタル(Brigham and Women's Hospital)のヒト研究委員会(Human Research Committee)により承認されたプロトコルに対し書かれたインフォームド・コンセントを与えた健康志願者から静脈穿刺により得た。PMNを全血から単離し、そして(Levy, B.D., Petasis, N.A.とSerhan, C.N. (1997) Polyisopre

10

20

30

40

50

nyl phosphates in intracellular signalling. Nature 389, 985 - 989) でのとおり、[- ^{32}P] ATP (40 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ 、90分、37) で定常状態標識 (steady state labeled) した。標識された PMN を再懸濁し (1 mM CaCl_2 を含む PBS、pH 7.40 の 1 ml あたり 20×10^6 個)、そして LTB_4 (100 nM)、15 - エピ - LXa (100 nM) もしくはベヒクル (0.1% EtOH) に 0 ないし 300 秒間 (37) 曝露した。指定された間隔で各インキュベーションからアリコートを取り出して、ケン化不可能な脂質 ($10 \sim 12 \times 10^6$ 個の PMN) の放射標識および PLD 活性 ($1 \sim 1.25 \times 10^6$ 個の PMN) を測定した。各インキュベーション中に存在する物質をケン化し、抽出し、そしてホスホイメーキング (phosphoimaging) を伴う TLC (モデル 425 E および積分ソフトウェア; モレキュラー ダイナミクス (Molecular Dynamics)) により分離し、これを参考文献 22 でのとおり PSDP の質量決定に使用した。

組換えヒト PLD1b の調製

スポドプテラ フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞は、10% ウシ胎児血清 (ギブコ (Gibco)) を補充された TC100 培地 1 ml 中に細胞 2×10^5 ないし 2×10^6 個で懸濁液中で培養した。ヒト PLD1b をコードする cDNA (胎盤組織からクローン化された) を、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、ヘキサヒスチジン、プロテインキナーゼ A のリン酸化部位および トロピン切断部をコードするベクター配列の下流かつそれと同じ読み枠で伝達ベクター pACGHLT (ファーマーミンゲン (Pharmingen)) に挿入した。供給元の説明書 (インヴィトロジェン (Invitrogen)) に従い、GST-hPLD1b 構築物を、直線状にされたポリヘドリンを含まない (PH-) AcMNPV DNA、Bac-N-Blue とともに Sf9 細胞にコトランスフェクションした。直鎖状にされたウイルスと伝達ベクターとの間の相同的組換えは、感染性の組換えウイルスを生じるのに不可欠なウイルス遺伝子 ORF1629 の機能を復帰させた。2 回のブランク精製の後に、 8×10^7 pfu/ml の力価が得られるまで、Sf9 細胞の大スケール感染により組換えウイルスを増幅した。GST-hPLD1b を生成させるため、細胞 2×10^6 個/ml の Sf9 細胞 500 ml を、10:1 の感染多重度でウイルスに感染させた。細胞を感染 72 時間後に収穫し、溶解し、そして供給元の説明書 (ファーマーミンゲン (Pharmingen)) に従って、発現された GST-hPLD1b をグルタチオンアガロースビーズ上で精製した。ヤギ抗 GST pAb (アマーシャム ファルマシア バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech))、および PLD のコンセンサスペプチド配列 GSANIN (P. Parker、ICRF、英国ロンドンの贈与物) に対し生じられたウサギ pAb との免疫反応性、ならびにインビトロ PLD アッセイ (24) での活性により、精製された組換えタンパク質を同定した。

PLD 活性およびスーパーオキシドアニオン生成。

【0122】

休止期、もしくはアゴニストへの曝露後に、0.1 M Hepes (pH 7.4)、0.7 mM オルトパナジウム酸ナトリウム、10 μM p - ニトロフェニルリン酸、10 mM EGTA、5.5% トリトン X - 100、0.5 M - グリセロリン酸、10 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、0.1 mM モリブデン酸アンモニウム、12 mM DFP、5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ロイペプチン、2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ アプロチニンおよび 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ペプスタチン A より構成される溶解緩衝液を使用して、細胞からライセートを生成させ (参考文献 25 でのとおり)、そしてバイオアッセイに利用した。

【0123】

PMN ライセート ($90 \sim 130 \mu\text{g}$ タンパク質)、精製されたホスホリパーゼ D (3 ~ 30 単位) (EC 3.1.4.4、シグマ ケミカル カンパニー (Sigma Chemical Co.)) もしくは組換え hPLD1b を加温し (哺乳動物酵素について 37 およびキャベツについて 30、3 分)、そして、 CaCl_2 (30 mM) を含む

10

20

30

40

50

トリス - HCl (50 mM、pH 7.5) 中で PSDP、PSMP もしくは FDP (10 ~ 1000 nM、5 分、37 °C) 次いで PC (0.5 ないし 5 mM) に曝露した。EDTA (50 mM) を含む トリス - HCl (1 M) を用いて 30 秒間隔で (0 ~ 90 秒) 反応を停止した。参考文献 26 でのとおり、コリン放出を定量した。

【0124】

新たに単離されたヒト PMN (HBSS + 1.6 mM CaCl_2 1 ml あたり 1 ~ 3 × 10⁶ 個の PMN) を、15 - エピ - LXA (1 ~ 100 nM) もしくはベヒクル (0.1 % エタノール) の存在下でインキュベート (5 分、37 °C) し、そしてその後チトクローム c (7 mg / ml) の存在下で LTB₄ (100 nM) に曝露した (10 分)。参考文献 22 でのとおりにスーパーオキシドアニオンの生成を測定した。

10

統計学的解析。

【0125】

結果は平均 ± S.E. として表し、また、統計学的有意差はスチューデントの t 検定を使用して評価した。

結果

ロイコトリエン B₄ は PIPP の迅速な再生：PSDP の分解を刺激する。

【0126】

ロイコトリエン B₄ はその受容体と相互作用して、ホスホリパーゼおよびシグナルへの細胞の応答を迅速に活性化する (Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, T. と Shimizu, T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620 - 624)。LTB₄ 受容体の活性化が PIPP およびとりわけ PSDP の再生につながるかどうかを決定するため、細胞のリン酸のプールを [³²P] - ATP で定常状態標識し (方法を参照されたい)、そして LTB₄ (100 nM) もしくはベヒクル (0.1 % エタノール) 単独のいずれかに曝露した。0 から 300 秒 (37 °C) までの時間を設定された間隔でアリコートを取り出し、そしてケン化不可能なリン酸化された脂質を単離し、かつ、[³²P] の取込みについてホスホイメージャーにより定量した。刺激されない PMN 中の PSDP レベルは、10⁷ 個の PMN あたり約 1.7 nmol (約 50 nM) である (Levy, B.D., Petasis, N.A. と Serhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. *Nature* 389, 985 - 989)。PSDP およびプレスクアレンモノホスフェート (PSMP) は ATP から [³²P] を取込み (しかしファルネシルジホスフェート (FDP) は取り込まない)、最近の証拠 (Levy, B.D., Petasis, N.A. と Serhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. *Nature* 389, 985 - 989) と矛盾しない。LTB₄ は、迅速な (30 秒以内に明白) (図 1B) および 60 秒以内での [³²P] - PSDP の統計学的に有意の減少 (28 %) (図 1C) を開始した。[³²P] - PSDP レベルは、続く 270 秒以内に基礎の量 (t = 0) に戻った。LTB₄ 受容体活性化後の [³²P] - PSDP の変化は PSDP 量の変化を反映した。これらの結果は、PSDP が PMN 中に存在したことを確認し (Levy, B.D., Petasis, N.A. と Serhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. *Nature* 389, 985 - 989)、また、LTB₄ が、細胞の活性化の LTB₄ の動力学と同時の PIPP の再生の時間経過とともに PSDP の顕著な減少を開始した (図 1) ことを示した (Borgeat, P. と Naccache, P.H. (1990) Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄. *Clin. Biochem.* 23, 459 - 468; Levy, B.D., Petasis, N.A. と Serhan, C.N. (1997) Polyisoprenyl phosphate

20

30

40

50

s in intracellular signalling. Nature 389、985 - 989)。15 - エピマーのLX類似物はPSDPを高めるLTB₄のプログラムを切り替える。

【0127】

LXA₄および数種の15 - エピ - LXA₄の安定な類似物の双方が、PMN上のLXA₄受容体に作用してインピボの浸潤を阻害する。LXおよび15 - エピ - LXがPIPPのシグナル伝達を介して阻害作用を媒介するかどうかを決定するため、PSDPのLTB₄(100 nM)に刺激される変化に対する15 - エピ - LXA₄類似物(15 - エピ - LXa)(100 nM、5分、37)の影響を、PMNの脂質の[³²P]標識を使用して検査した(上を参照されたい、平行のインキュベーションで)。15 - エピ - LXaは、単独ではPIPPの再生の速度に影響を及ぼさなかった(図1B)。興味深いことに、等モル濃度の15 - エピ - LXaの存在下でのLTB₄への曝露は、PSDPのLTB₄に開始される減少を予防したのみならず、しかし付加的に60秒での[³²P] - PSDPの有意の増大(約72%)を刺激した(図1C)。PSDPレベルは、LTB₄への曝露後最低300秒間上昇し続けた(図1B)。天然のLXA₄、およびその関連するLXA₄受容体アゴニスト、16 - フェノキシ - LXA₄メチルエステルは、15 - エピ - LXa > 16 - フェノキシ - LXA₄ > LXA₄という潜在力の等級の順序をもつ、15 - エピ - LXaと質的に類似の応答を与え、15 - エピ - LXaが1 ~ 2桁より強力であった。これらの結果は、インピボでLTB₄応答を阻害する15 - エピ - LXa(Takano, T.、Fiore, S.、Maddox, J. F.、Brady, H. R.、Petasis, N. A.とSerhan, C. N.(1997) Aspirin - triggered 15 - epi - lipoxin A₄(LXA₄) and LXA₄ stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: Evidence for anti - inflammatory receptors. J. Exp. Med. 185、1693 - 1704)が、LTB₄に開始されるPIPPシグナル伝達を劇的に切り替えることを示す。さらに、LXA₄およびLTB₄受容体の共活性化により惹起されるPSDPレベルの上昇は、PSDPの蓄積の時間経過がLXおよび15 - エピ - LXaによるLTB₄の作用の調節と相互に関係したことを示す(下を参照されたい)。

15 - エピ - LXaはLTB₄に刺激されるPLD活性およびO₂⁻生成を阻害する。

【0128】

LTB₄に刺激されるPLD活性は、PMNの形態学的変化、脱顆粒およびO₂⁻産生を伴う(Olson, S. C.とLambeth, J. D.(1996) Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. Chem. Phys. Lipids 80、31 - 19; Zhou, H. - L.、Chabot - Fletcher, M.、Foley, J. J.、Sarau, H. M.、Tzimas, M. N.、Winkler, J. D.とTorphy, T. J.(1993) Association between leukotriene B₄ - induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. Biochem. Pharmacol. 46、139 - 148)。PIPPのLTおよびLXに媒介される再生が特定の細胞シグナル伝達事象と相互に関係しているかどうかを決定するため、図1で使用された同一のインキュベーションからの細胞ライセート中でPLD活性をモニターした。LTB₄はPLD活性の増大を与え、これは60秒までに最大となった(図2A)。LTB₄およびPLDのこれらの値は、より早期の報告(Gomez - Cambronero, J.(1995) Immunoprecipitation of a phospholipase D activity with antiphosphotyrosine antibodies. J. Interferon Cytokine Res. 15、877 - 885; Zhou, H. - L.、Chabot - Fletcher, M.、Foley, J. J.、Sarau,

10

20

30

40

50

H. M., Tzimas, M. N., Winkler, J. D. と Torphy, T. J. (1993) Association between leukotriene B₄-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 46, 139-148) のものと矛盾しない。15-エピ-LXaの存在下では、LTB₄に刺激されるPLD活性が60秒で阻害された(約81%) (図2AおよびB)。15-エピ-LXaはLTB₄に刺激されるO₂⁻生成もまた強力に阻害した(図2C)。一緒にすれば、これらの知見は、反対する細胞応答にシグナルを送るリガンドと受容体の相互作用が、[³²P]-PSDPレベルとPLD活性との間の逆の関係を与えたことを示し、PSDPがPLDを制御することができたことを立証する。

10

植物および哺乳動物双方のPLDの直接阻害。

【0129】

ポリイソプレニルホスフェートがPLDに直接作用するかどうかを決定するため、PSDPおよび緊密に関係する脂質を、精製された植物酵素(EC 3.1.4.4; V_m = 0.29 nmol/秒、K_m = 1.4 mM)とともにインキュベートした。図3に見られるとおり、PSDPは、20 nMのK_iで((PSDP) = 10 nM)濃度依存性の様式で(10ないし1000 nM) cPLDを阻害した。ラインウィーバー・バーク解析(図3)は競争的阻害モデルと矛盾しなかった。PSMP(1個のリン酸のみ少ない)のような緊密に関係する脂質は、PSDPに比較して、阻害能力の100倍より大きい喪失を示した(表I)。匹敵する阻害は、他のポリイソプレノイド(すなわちFDPおよびスクアレン)もしくはPLD生成物(PA)で明白でなかった。PSDPを用いてインビトロで組換えヒトPLD1bの動力学を決定することにより、PSDPが哺乳動物のPLDもまた阻害することができるかどうかを決定した。組換え酵素(V_m = 0.36 nmol/秒、K_m = 13.8 mM)もまた、6 nMのK_iで、PSDPにより劇的に阻害された(表I)。

20

【0130】

【表1】

表1. PSDPはホスホリパーゼDを選択的に阻害する：関係する内在性脂質との構造活性相関

30

脂質	酵素	K _m (mM)	V _m	
	cPLD	1.4	0.29	
	rhPLD1b	13.8	0.36	
		K _{m app} (mM)	V _{m app}	K _i (nM)
ブレスクアレンジホスフェート	cPLD	2.1	0.25	20
	rhPLD1b	3.1	0.03	6
ブレスクアレンモノホスフェート	cPLD	3.1	0.36	3210
スクアレン	cPLD	4.0	0.46	0
ファルネシルジホスフェート	cPLD	0.9	0.25	0
ホスファチジン酸	cPLD	3.6	0.43	0

40

PLDの酵素の動力学をPSDPもしくは関係する脂質の存在下で決定した。試験化合物の存在下での精製されたもしくは単離されたPLD(反応当り3単位のcPLDもしくは0.3単位のrhPLD1b)の活性を、図3の説明文中に記述されるとおり測定した(n≥3)。式:傾き=K_m/v_m(1+[I]/K_i)を使用してK_iを計算した。阻害の非存在はK_i=0として報告する。

50

【0131】

PLDの活性化は、その活性を調整する多くの補助因子の存在下にインピボで起こるため、PMNライセート中のPLD活性に対するPSDPの影響もまた決定した。LTB₄の60秒後にPSDPレベルが低下し(28%、図1)、また、PLD活性は最大であった(図2)。この時点(60秒、LTB₄ 100nM)でのPMNライセートへのPSDP(100nM)の添加は、PLD活性の89.5 ± 9.7%の障害を与えた。これらの結果は、集合的に、PSDPが植物および哺乳動物双方のPLDの強力な障害剤であったことを示し、そして、PLD活性に伴うPSDPの作用における末端のリン酸およびイソプレノイド鎖長の双方の決定的な役割を確立する。

【0132】

本結果は、PIPPの再生を、PMNの応答の細胞外調節物質により使用される「停止」シグナル伝達のための迅速なスイッチとして特徴づける。LTB₄受容体の活性化は、増大されたPLD活性(図2)と一時的に時を同じくしたPSDPの迅速かつ一過性の減少(図1)を開始した。PSDPの再生が基礎の値に戻る際に、PLDの活性が低下し、逆の関係を示しかつこの中枢的な脂質修飾酵素の調節におけるPSDPの役割を示唆している。LTB₄およびLXA₄受容体アゴニスト(15-エピ-LXA)に曝露された細胞は、PSDPの再生の劇的な切り替えを示し、増大された[³²P]-PSDPならびにPLD活性およびスーパーオキシドアニオン生成の双方の顕著な障害を与えた(図1および2)。加えて、合成のPSDPは単離されたPLDの選択的かつ強力な障害剤であり(図3、表I)、これは他の緊密に関係する脂質により共有されない特性である。一緒にすると、PSDPレベルとPLD活性との間の相反する関係、ならびに組換えヒトPLD1b、精製されたcPLDおよびPMNライセート中でのPLD活性の直接の障害は、PMNのPLD活性の内在性の脂質調節物質としてのPSDPの役割を支持する。反対する作用(すなわち刺激および障害)をもつPMNリガンドによる受容体活性化に際して開始されるPIPPの再生の異なる一時的プロファイルは、PIPPの再生およびPSDPそれ自身が、細胞内シグナル伝達における重要な構成要素として、とりわけ「停止」シグナルとして作用するかもしれないことを示唆している。

【0133】

コレステロールはPMNにおける生合成産物でない。なぜなら、それらは、アセテートからのその内在性の形成に必要な雑多な機能の酸化酵素および環化酵素を欠くからである(Shechter, I., Fogelman, A. M. と Popjak, G. (1980) A deficiency of mixed function oxidase activities in the cholesterol biosynthetic pathway of human granulocytes. J. Lipid Res. 21, 277-283)。本知見を考慮すれば、PMNにおける結果として生じる生合成のスクアレンでの終了は、スクアレンの直接の前駆物質PSDPのような生成物はコレステロール生合成と別個の機能を担持することを示唆している。これゆえに、ヒトPMNにおいて明らかにされたPIPPのシグナル伝達経路が他の細胞型に広がっているかも知れないことがありそうである。PSDPの形成は、メバロン酸およびポリイソプレニルホスフェートの生合成に影響を与えることが既知の食餌の影響に加え、可溶性の免疫刺激および増殖因子によってもまた活発に調節されている(図1B、C)。例えば顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子はPMNにおけるPSDPの再生を増大させる一方、化学走性ペプチドfMLPは(数秒以内で)PSDPの迅速な減少およびPSMPの相反する増大を誘発し、これらは5~10分以内に基礎に戻る(Levy, B. D., Petasis, N. A. と Serhan, C. N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. Nature 389, 985-989)。PIPPの再生のこの時間経過は、大きさおよび程度において、PSDPのLTB₄に開始される減少に類似であり(図1BおよびC)、そして、PSDPにより障害されるO₂⁻生成のような活性化する好中球応答の時間経過と良好に相互に関係する。末梢血PMN中のPSDPの存在は、内在性の供給源から

10

20

30

40

50

それらがコレステロールを生成させる能力がないこと、多様な分類の受容体アゴニストの受容体に媒介される炎症刺激に应答してのその迅速な再生、およびナノモル濃度レベルでPLD活性およびNADPH酸化酵素を阻害するその能力にもかかわらず、新規の負の細胞内シグナルとしてのPSDPの役割を支持する証拠である。従って、この新たに明らかにされたPIPPシグナル伝達は、活性化される場合に迅速に正の細胞内刺激（例えばイノシトール三リン酸、ジアシルグリセロールおよび Ca^{2+} ）を生成させる、十分に認識されたホスホチジルイノシトールシグナル伝達経路（Pettit, T. R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J. M. と Wakeham, M. J. O. (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. J. Biol. Chem. 272, 17354 - 17359 に概説される）に対照的に、負のシグナルレベルを低下させるよう機能するかも知れない。

【0134】

先導的非ステロイド性抗炎症薬アスピリンは、完全に解明されるべきままである機構によるコレステロール生合成もまた達成する（Rabinowitz, J. L., Baker, D. G., Villanueva, T. G., Asanza, A. P. と Capuzzi, D. M. (1992) Liver lipid profiles of adults taking therapeutic doses of aspirin. Lipids 27, 311 - 314）。アスピリンは、シクロオキシゲナーゼ（COX）のその十分に認識された阻害を越えて、アスピリンにアセチル化されるCOX-2および5-リポキシゲナーゼによる細胞と細胞の相互作用の間に、15-エピ-LX（天然の15-Sを含有するLXの炭素15-R-エピマー）を生成させる抗炎症回路を定位置に設定するよう、この系を略奪する可能性がある（図1A、およびChiang, N., Takano, T., Clish, C. B., Petasis, N. A., Tai, H. - H. と Serhan, C. N. (1998) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A_4 (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA $_4$ ELISA. J. Pharmacol. Exper. Ther. 287, 779 - 790）。これらのアスピリンに誘導されるLXは抗炎症および抗増殖特性を担持し（Claria, J. と Serhan, C. N. (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 9475 - 9479; Serhan, C. N. (1997) Lipoxins and Novel Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxins: A Jungle of Cell-Cell Interactions or a Therapeutic Opportunity. Prostaglandins 53, 107 - 137）、かつ、アスピリンの有益な治療作用の構成要素を媒介することができる。本実験で観察されるとおり、15-エピ-LX模倣物によるLXA $_4$ 受容体の活性化は、LTB $_4$ 受容体により開始されるPSDPの再生を反転させ、PSDPレベルの上昇につながった（図1）。15-エピ-LXAがPLD活性およびスーパーオキシドアニオン生成の双方を阻害した（図2）ため、これらの結果は、PIPPの再生を過剰な炎症応答のアスピリンの阻害の細胞の基礎の一構成要素として関係させる。調節するLTB $_4$ の刺激作用に加え、LTB $_4$ 受容体シグナル伝達の阻害のこの新規の機構は、宿主防禦においてより広範な役割もまた演じているのかも知れない。なぜなら、この受容体は最近、HIV-1の補助受容体として同定されたからである（Owman, C., Garzino-Demo, A., Cocchi, F., Popovic, M., Sabirsh, A.

10

20

30

40

50

と Gallo, R. (1998) The leukotriene B₄ receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 95、9530 - 9534)。

【0135】

PLDによるPCのPAへの加水分解は、PMNの活性化の間の広範な受容体分類による経膜的シグナル伝達で決定的であるようである (Olson, S. C. と Lambeth, J. D. (1996) Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. Chem. Phys. Lipids 80、3 - 19)。Gタンパク質に結合される (linked) 受容体および受容体チロシンキナーゼの双方がPLDを活性化する。白血球においては、PKC を包含する数種の因子 (キナーゼに依存しない様式で)、および増大された細胞内カルシウムが、PLD1を活性化することができる (Extton, J. H. (1997) New developments in phospholipase D. J. Biol. Chem. 272、15579 - 15582)。PMNにおけるfMLPに刺激されたPLDの活性は、ADP-リボシル化因子 (ARF) および小型のGTPアーゼ、RhoAの膜会合により増大される (Fensome, A.、Whatmore, J.、Morgan, C.、Jones, D. と Cockcroft, S. (1998) ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. J. Biol. Chem. 273、13157 - 13164)。ここでもかなり興味深いことに、PSDPは調節タンパク質の非存在下で組換えhPLD1bを直接阻害した (表Iを参照されたい)。これらの結果は、PSDPはPLDをその触媒中心で阻害することができ、また、触媒中心が保存されているPLD1aおよびPLD2アイソフォームのような他のPLDアイソフォームで作用することがありそうであることを示唆する。PLDの内在性の阻害剤として作用するPSDPの能力は、ここで明らかにされた構造活性相関を満たす設計による、より強力なPLD阻害剤の製造のための鋳型として今や作用することができる、PSDPの独特の三次元および物理的・化学的特性から生じることがありそうである。

【0136】

複雑な宿主応答におけるPMNの活性化の調節は、可溶性の媒介物質、および、とりわけ、ここでPIPPの再生の顕著に異なる特徴を与えた (図1)、LTおよびLXのような反対する作用をもつオートコイドにより部分的に制御されている (Serhan, C. N.、Haeggstrom, J. Z. と Leslie, C. C. (1996) Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J. 10、1147 - 1158)。大部分の細胞型において、PSDPは、2個のFDPの頭部と頭部の縮合を触媒するミクロソームのスクアレン合成酵素によるコレステロール産生における生合成中間体として認識されている (Jarstfer, M. B.、Blagg, B. S. J.、Rogers, D. H. と Poulter, C. D. (1996) Biosynthesis of squalene. Evidence for a tertiary cyclopropylcarbonyl cationic intermediate in the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. J. Amer. Chem. Soc. 118、13089 - 13090)。PMNにおけるPSDPのリガンドに稼働される迅速な再生は、膜中のLTB₄およびLXA₄受容体の近傍で発生することがありそうであり、そして1)新規の生合成および/もしくは代謝経路、または2)小胞体から膜ドメインまでのタンパク質とのPIPPの細胞内トラフィック (trafficking)

から生じることができる P S D P の非ミクロソームのプールを示唆する。A T P から P S D P (しかし F D P でない) への [^{32}P] の取込み (結果を参照) は、P M N における P S D P 形成の新規経路を支持するさらなる証拠である。本結果は、P I P P の再生が、細胞表面受容体の活性化に結びつけられ、また、反対する生物学的作用をもつ細胞外リガンドの細胞内伝播に関与することを示唆する。本作業モデルにおいて、「負の脂質シグナル」(すなわち P S D P) は、「休止」細胞において爪車装置のように設定点で保持される。入ってくる正のシグナル (L T B₄、f M L P など) がこの阻害性脂質の分解および不活性化 (例えば、不活性の一リン酸種 P S D M P への P S D P の再生) を開始する (図 1 A および参考文献 22)。従って、P I P P の再生は選んだ細胞過程の活性化の閾をなす (threshold) 細胞内の正のシグナルの装備を可能にする。この型のシグナル伝達

10

が、化学走性、顆粒の流動化およびスーパーオキシドアニオン生成のような P M N の高度に特化された機能的応答を刺激する L T B₄ のようなアゴニストにより必要とされる選択性およびかたい結合を説明するのもかも知れない。細胞のシグナル伝達のこのモデル、すなわち負の脂質シグナルの受容体に開始される分解が他の受容体および細胞型で起こる程度は、さらなる研究のため存続する。

【 0 1 3 7 】

要約すると、ヒト P M N における P I P P のリガンドに稼働される迅速な再生、およびナノモル濃度レベルでの P L D 活性の直接の阻害は、細胞内シグナルとしての P S D P の役割を支持し、そして、それにより P S D P が細胞応答を調節することができる新規の細胞内標的を提供する (Levy, B. D., Petasis, N. A. と Serhan, C. N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in intracellular signalling. Nature 389, 985 - 989)。

20

P I P P の広範な存在、ならびに植物および動物界における P L D の決定的な役割を考えれば、ヒト P M N におけるここで最初に確立された P I P P の再生および P L D の直接の阻害は、他の細胞型および種での細胞のシグナル伝達においてより広範な意味を有することができる (Martin, A., Saqib, K. M., Hodgkin, M. N., Brown, F. D., Pettit, T. R., Armstrong, S. と Wakelam, M. J. O. (1997) Role and regulation of phospholipase D signaling. Biochem. Soc. Trans. 25, 1157 - 1160; Bach, T. J. (1995) Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants a review. Lipids 30, 191 - 202)。

30

本結果は、内在性の細胞内脂質によるシグナル伝達に関するホスホリパーゼの直接の阻害を示し、また、細胞応答の制御における脂質とタンパク質の相互作用、すなわち抑制物質脂質の受容体に開始される分解 (アスピリンに誘導される 15 - エピマーの L X の作用を介してアスピリン摂取による調節にもまたさらされる) についての新たなパラダイムを述べた、最初のものである。一緒にすると、これらの結果は、P I P P シグナル伝達経路が薬理的介入においてもまた興味深いかも知れないこと、および、とりわけ、P S D P のコンホメーションが新規阻害剤の設計の鋳型として作用する可能性があることを示唆している。

【 0 1 3 8 】

【 表 2 】

10

20

30

40

参考文献

1. Weissmann, G., Smolen, J. E., and Korchak, H. M. (1980) Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 303, 27-34
2. Serhan, C. N., Haeggstrom, J. Z., and Leslie, C. C. (1996) Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 10, 1147-1158
3. Weiss, S. J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-376 10
4. Serhan, C. N. (1994) Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 1-25
5. Borgeat, P., and Naccache, P. H. (1990) Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄. *Clin. Biochem.* 23, 459-468
6. Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, T., and Shimizu, T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620-624 20
7. Fiore, S., Romano, M., Reardon, E. M., and Serhan, C. N. (1993) Induction of functional lipoxin A₄ receptors in HL-60 cells. *Blood* 81, 3395-3403
8. Isakson, P., Seibert, K., Masferrer, J., Salvemini, D., Lee, L., and Needleman, P. (1995) Discovery of a better aspirin. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane & Leukotriene Research* 23, 49-54
9. Chiang, N., Takano, T., Clish, C. B., Petasis, N. A., Tai, H.-H., and Serhan, C. N. (1998) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA₄ ELISA. *J. Pharmacol Exper. Ther.* 287, 779-790 30
10. Serhan, C. N., Maddox, J. F., Petasis, N. A., Akritopoulou-Zanze, I., Papayianni, A., Brady, H. R., Colgan, S. P., and Madara, J. L. (1995) Design of lipoxin A₄ stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 34, 14609-14615
11. Takano, T., Fiore, S., Maddox, J. F., Brady, H. R., Petasis, N. A., and Serhan, C. N. (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ (LXA₄) and LXA₄ Stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: Evidence for anti-inflammatory 40

【 0 1 3 9 】

【 表 3 】

- receptors. *J. Exp. Med.* 185, 1693-1704
12. Owman, C., Garzino-Demo, A., Cocchi, F., Popovic, M., Sabirsh, A., and Gallo, R. (1998) The leukotriene B₄ receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9530-9534
 13. Marcus, A. J. (1995) Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 333, 656-658
 14. Vainio, H., and Morgan, G. (1997) Aspirin for the second hundred years: new uses for an old drug. *Pharmacol Toxicol* 81, 151-152 10
 15. Herschman, H. R. (1998) Recent progress in the cellular and molecular biology of prostaglandin synthesis. *Trends in Cardiovasc. Med.* 8, 145-150
 16. Takano, T., Clish, C. B., Gronert, K., Petasis, N., and Serhan, C. N. (1998) Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. *J. Clin. Invest.* 101, 819-826
 17. Billah, M. M., Eckel, S., Mullmann, T. J., Egan, R. W., and Siegel, M. I. (1989) Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 264, 17069-17077 20
 18. Wakelam, M. J. O., Martin, A., Hodgkin, M. N., Brown, F., Pettit, T. R., Cross, M. J., De Takats, P. G., and Reynolds, J. L. (1997) Role and regulation of phospholipase D activity in normal and cancer cells. *Advances in Enzyme Regulation* 37, 29-34 30
 19. Olson, S. C., and Lambeth, J. D. (1996) Biochemistry and cell biology of phospholipase D in human neutrophils. *Chem. Phys. Lipids* 80, 3-19
 20. Steed, P. M., Clark, K. L., Boyar, W. C., and Lasala, D. J. (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J.* 12, 1309-1317
 21. Martin, A., Saqib, K. M., Hodgkin, M. N., Brown, F. D., Pettit, T. R., Armstrong, S., and Wakelam, M. J. O. (1997) Role and regulation of phospholipase D signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 1157-1160 40
 22. Levy, B. D., Petasis, N. A., and Serhan, C. N. (1997) Polyisoprenyl phosphates in

【 0 1 4 0 】

【 表 4 】

- intracellular signalling. *Nature* 389, 985-989
23. Agwu, D. E., McPhail, L. C., Sozzani, S., Bass, D. A., and McCall, C. E. (1991) Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 88, 531-539
 24. Pettit, T. R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J. M., and Wakelam, M. J. O. (1997) Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. *J. Biol. Chem.* 272, 17354-17359 10
 25. Gomez-Cambrero, J. (1995) Immunoprecipitation of a phospholipase D activity with antiphosphotyrosine antibodies. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 877-885
 26. Abousalham, A., Riviere, M., Teissere, M., and Verger, R. (1993) Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim. Biophys. Acta* 1158, 1-7
 27. Zhou, H.-L., Chabot-Fletcher, M., Foley, J. J., Sarau, H. M., Tzimas, M. N., Winkler, J. D., and Torphy, T. J. (1993) Association between leukotriene B₄-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 46, 139-148 20
 28. Shechter, I., Fogelman, A. M., and Popjak, G. (1980) A deficiency of mixed function oxidase activities in the cholesterol biosynthetic pathway of human granulocytes. *J. Lipid Res.* 21, 277-283
 29. Rabinowitz, J. L., Baker, D. G., Villanueva, T. G., Asanza, A. P., and Capuzzi, D. M. (1992) Liver lipid profiles of adults taking therapeutic doses of aspirin. *Lipids* 27, 311-314
 30. Claria, J., and Serhan, C. N. (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9475-9479 30
 31. Serhan, C. N. (1997) Lipoxins and Novel Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxins: A Jungle of Cell-Cell Interactions or a Therapeutic Opportunity? *Prostaglandins* 53, 107-137
 32. Exton, J. H. (1997) New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 272, 15579-15582
 33. Fensome, A., Whatmore, J., Morgan, C., Jones, D., and Cockcroft, S. (1998) ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of 40

【 0 1 4 1 】

【 表 5 】

phospholipase D in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 13157-13164

34. Jarstfer, M. B., Blagg, B. S. J., Rogers, D. H., and Poulter, C. D. (1996)
Biosynthesis of squalene. Evidence for a tertiary cyclopropylcarbinyl cationic
intermediate in the rearrangement of presqualene diphosphate to squalene. *J.*
Amer. Chem. Soc. 118, 13089-13090
35. Bach, T. J. (1995) Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants --a
review. *Lipids* 30, 191-202

10

【 0 1 4 2 】

当業者は、上述された態様に基づく、本発明のさらなる特徴および利点を認識するであろう。従って、本発明は、付属として付けられた請求の範囲により示されるようなものを除き、とりわけ示されかつ記述されたものにより制限されるべきでない。背景の節にあるものを包含する、本明細書で引用される全部の刊行物および参考文献は、はっきりと、そっくりそのまま引用により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

本発明は、付随する図面とともに利用される以下の詳細な記述からより完全に理解することができ、ここで：

20

【図 1】 発明にかかる、アスピリンに誘導される LXA_4 類似物によるヒト PMN：生合成スイッチにおいて LTB_4 が $PSDP$ を迅速に再生することを示す。図 A：アスピリンに誘導される 15 - エピ - LXA_4 生合成のスキームおよび安定な類似物、15 - エピ - 16 - パラフルオロフェノキシ - LXA_4 メチルエステル (15 - エピ - LXa) の構造 (左)、ならびに $PIPP$ シグナル伝達の仮説のスキーム (右)。PMN を [- ^{32}P] - ATP で標識し、そして LTB_4 (、 100 nM)、15 - エピ - LXa (、 100 nM)、ベヒクル (、 0 . 1 % エタノール) もしくは 15 - エピ - LXa (100 nM、5 分) 次いで LTB_4 (、 100 nM) とともにインキュベートした (12 . 5 $\times 10^6$ ml $^{-1}$ 、37)。ケン化不可能な脂質を抽出しかつ TLC により分離し、そしてホスホイメーキングにより [^{32}P] の取込みを定量した (方法を参照されたい)。値は濃度計の測定値である。図 B は代表的な時間経過 (n = 5) を報告し、そして図 C は 60 秒での変化 (平均 \pm S . E .) を示す。* はスチューデントの t 検定により $P < 0 . 05$ 。

30

【図 2】 発明にかかる、15 - エピ - LXA_4 類似物が LTB_4 に刺激される PLD 活性およびスーパーオキシドアニオン生成を阻害することを立証する。 $PSDP$ を測定するのに使用された PMN の同一のアリコートから細胞ライセート (細胞 2 ~ 5 $\times 10^6$ 個、90 ~ 130 μ g タンパク質) を調製し (図 1 および方法を参照されたい)、37 に加温し、そして PC (30 mM $CaCl_2$ を含む 50 mM トリス - HCl、pH 7 . 5 中 2 mM) に曝露した。30 秒間隔で反応を停止し、そしてコリンの放出を定量した (26)。図 A 中の値は、コリン放出に対する 15 - エピ - LXa の影響の代表的なもの (n = 5、d = 4) であり、また、図 B は 60 秒での変化 (平均 \pm S . E .) を示す。新たに単離されたヒト PMN によるスーパーオキシドアニオンの生成を、 LTB_4 (100 nM)、15 - エピ - LXa (100 nM)、および増大する濃度の 15 - エピ - LXa (1 ~ 100 nM、5 分、37) 次いで LTB_4 (100 nM、10 分、37) について測定した (10 分、37)。図 C 中に報告される値は n = 3 の別個の PMN ドナーについての平均 \pm S . E . である。* はスチューデントの t 検定により $P < 0 . 05$ 。

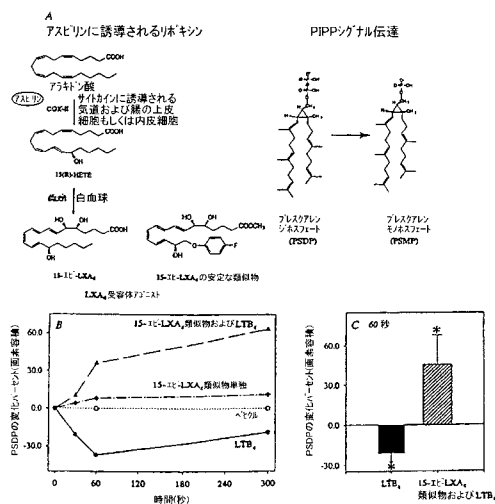
40

【図 3】 発明にかかる、 $PSDP$ がホスホリパーゼ D を阻害することを立証する。精製された PLD (3 単位の EC 3 . 1 . 4 . 4 . / 125 μ l) を加温 (3 分、30) し、そして、30 mM $CaCl_2$ を含む 50 mM トリス - HCl (pH 7 . 5) 中で $PSDP$ (10 ~ 1000 nM、5 分、30) もしくはベヒクル (0 . 04 % のエタノール

50

最終濃度) 次いでPC (0.5 ~ 5 mM) に曝露した。30秒間隔で反応を停止し、そして図2の説明中のとおりコリン放出を定量した。値は、PSDPの非存在下(、 $r^2 = 0.963$)での反応についてのn = 4の平均、ならびにPSDP(、10、100および1000 nMについてそれぞれ $r^2 = 0.995$ 、 0.971 および 0.953)を伴うn = 3の平均を表す。CS Chem3D Proソフトウェア(ケンブリッジソフトコーポレーション(CambridgeSoft、Corp.)、マサチューセッツ州ケンブリッジ)を使用して、PSDPのエネルギー最小化モデルを計算した(挿入図)。

【図1】



【図2】

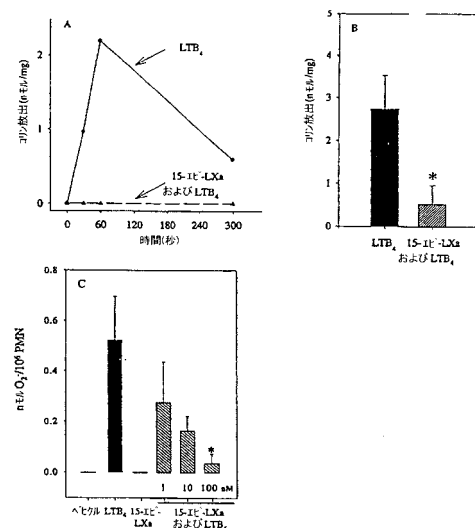


FIG. 1

FIG. 2

【図 3】

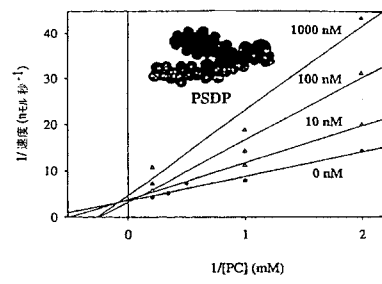


FIG. 3

フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許第05441951(US,A)

国際公開第95/001179(WO,A1)

Andrew T. Gewirtz et al., Journal of Clinical Investigation, 1998年, Vol.101, No.4, p.1860-1869

Tomoko Takano et al., Journal of Clinical Investigation, 1998年, Vol.101, No.4, p.819-826

Charles N. Serhan et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 1999年, Vol.447, p.133-149

Tomoko Takano et al., Journal of Experimental Medicine, 1997年, Vol.185, No.9, p.1693-1704

David E. Agwu et al., Journal of Clinical Investigation, 1991年, Vol.88, No.2, p.531-539

Bruce D. Levy et al., Nature, 1997年, Vol.389, p.985-990

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CAplus(STN)

REGISTRY(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)