

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年4月30日 (30.04.2009)

PCT

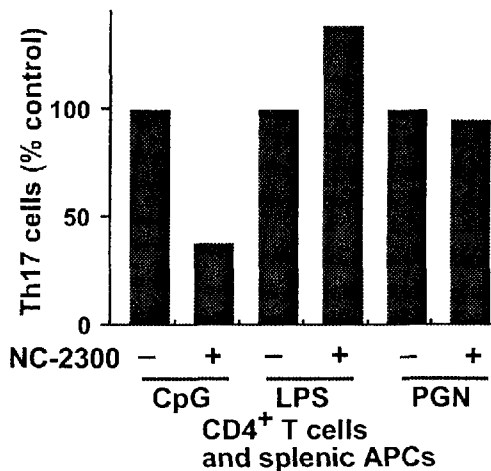
(10) 国際公開番号
WO 2009/054454 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01) *C07D 303/48* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
- (30) 優先権データ:
 特願 2007-276937
 2007年10月24日 (24.10.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学
 法人 東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY
 CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL
 UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島
 1-5-45 Tokyo (JP). 日本ケミファ株式会社 (NIP-
 PON CHEMIPHAR CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1010032 東
 京都千代田区岩本町2丁目2番3号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/069235
- (22) 国際出願日: 2008年10月23日 (23.10.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高柳 広
 (TAKAYANAGI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1500047 東京都涉
 谷区神山町3-6-8 Tokyo (JP). 朝霧 成拳 (ASAGIRI,
 Masataka) [JP/US]; 920930375 カリフォルニア州ラホ
 [続葉有]

(54) Title: REGULATOR FOR SIGNALING OF TOLL-LIKE RECEPTOR, WHICH COMPRISES CATHEPSIN INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: カテプシン阻害剤を有効成分として含有するToll様受容体のシグナル伝達の調整剤

[図10]



(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a regulator for the signaling of TLR. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] Disclosed is a preparation comprising, as an active ingredient, a cathepsin inhibitor such as monosodium (2S,3S)-3-[[[(1S)-1-isobutoxymethyl-3-methylbutyl]carbonyl]oxirane-2-carboxylate. The preparation can be used as a regulator for the signaling of TLR, a therapeutic agent for treating a disease associated with the signaling of TLR, a therapeutic agent for a disease associated with the induction of a Th17 cell, a therapeutic agent for a disease associated with the production of IL-6, IL-12, IL-17 or IL-23, or a therapeutic agent for systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, Crohn's disease, psoriasis or acute disseminated encephalomyelitis.

(57) 要約: 【課題】TLRのシグナル伝達の調整剤を提供すること。

【解決手段】(2S, 3S)-3-

[[[(1S)-1-イソブトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウム) などのカテプシン阻害剤を有効成分として含有する製剤をTLRのシグナル伝達の調整剤、TLRのシグナル伝達に関与する疾患の治療の調整剤、Th17細胞の誘導に関与する疾患の治療剤、IL-6、IL-12、IL-17又はIL-23の産生に関与する疾患の治療剤、並びに全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、又は急性散在性脳脊髄炎の治療剤として使用する。

WO 2009/054454 A1



ヤ、NSB3318、MC#0375、ギルマン・
ドライブ9500 California (US). 平井 利武 (HIRAI,
Toshitake) [JP/JP]; 〒2780036 千葉県野田市中野台鹿
島町15-4 Chiba (JP).

(74) 代理人: 柳川 泰男 (YANAGAWA, Yasuo); 〒1600004 東
京都新宿区四谷2-14 ミツヤ四谷ビル8階 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM,
KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,

SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

カテプシン阻害剤を有効成分として含有するToll様受容体のシグナル伝達の調整剤

技術分野

[0001] 本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達の調整剤に関する。

背景技術

[0002] Toll様受容体(TLR)は動物の細胞表面にある受容体タンパク質で、病原微生物の特異的な構造(pathogen-associated molecular patterns:PAMPs)を認識して自然免疫を活性化するシグナル伝達に関与することが知られている。

TLRはヒトでは10種類のサブタイプの存在が確認されており、そのうち微生物由来の糖タンパク質、脂質成分を認識するTLR1, 2, 4, 6は、細胞膜表面に局在し、微生物由来の核酸成分を認識するTLR3, 7, 8, 9は、細胞内エンドソームに局在している。

そして、TLRは異物を認識すると、炎症性サイトカインやインターフェロン(IFN)を産生することから、TLRの機能を適切に制御することが、病気をコントロールする上で重要となる。たとえば、TLR3, 7, 8, 9のアンタゴニストである4-第一級アミノキノリンを自己免疫、炎症、アレルギー、喘息等の疾患へ応用することが提案されている。(特許文献1)

[0003] 従来、CD⁴⁺ヘルパーT細胞には細胞性免疫に関与する1型ヘルパーT(Th1)細胞と、液性免疫に関与するTh2細胞があることが知られていた。

最近、Th17と呼ばれる新たなT細胞サブセットが存在し、これがアレルギー応答や自己免疫、細胞外増殖性の細菌感染防御などで中心的な役割を果たしていることが分かってきている。

そして、Th17は、インターロイキン-23(IL-23)により維持・誘導されることも判明している。

Th17は、IL-17を産生することも知られている。

そこで、IL-23のアゴニスト又はアンタゴニストを腫瘍の治療に使用することが提案されている。(特許文献2)

IL-17活性を阻害する物質の多発性硬化症や慢性関節リウマチの治療への応用も提案されている。(特許文献3、4、5)

また、IL-17の産生を阻害するために、IL-23アンタゴニスト(抗IL-23又は抗IL-23レセプター抗体)で処理することで、炎症性疾患(慢性関節リウマチ、多発性硬化症等)を治療することも提案されている。(特許文献6)

[0004] ところで、カテプシンはパパイン様リソソームシステインタンパク質分解酵素ファミリーを構成し、その分解活性を発揮するのに低いpH環境が必要とされる。カテプシンはかつて非特異的に細胞内タンパク質を除去する必須の酵素として認識されていたが、時空的発現様式と基質特異性に基づいた特定の細胞型特異的機能を持っている。

そして、ファミリーを構成するカテプシンKは、その遺伝子発現において他の細胞と比べて、特に破骨細胞に多く発現しているタンパク質分解酵素である。さらに、破骨細胞におけるカテプシンKの発現レベルは、他のシステインプロテアーゼに比べて約20~500倍も高いことがわかり、カテプシンKが破骨細胞特異的に多く発現している酵素であることが確認されている。またカテプシンKは破骨細胞が分泌し、骨基質を消化するタンパク質分解酵素の中で、特に重要な酵素であることが理解されてきている。

従って、カテプシンK阻害作用を有する薬物である(2S, 3S)-3-[[[(1S)-1-イソプトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウムは、骨粗鬆症治療薬として期待されている。(特許文献7)

しかしながら、カテプシンK阻害剤が、上記のTLRのシグナル伝達に関与することや、Th17の産生、IL-6、IL-12、IL-17、IL-23の産生に関与する疾患に有効であることは知られていない。

[0005] 特許文献1:特表2007-524615号公報

特許文献2:特表2006-520781号公報

特許文献3:特表2007-511593号公報

特許文献4:特開2000-186046号公報

特許文献5:特表2004-517918号公報

特許文献6:特表2006-514004号公報

特許文献7:国際公開第99/11640号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の目的はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達の調整剤を提供すること、TLRのシグナル伝達が関与する疾患の治療剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達の調整剤に関する。

また、本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達に関与する疾患の治療剤に関する。

本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTh17細胞の誘導に関与する疾患の治療剤にも関する。

本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有するIL-6、IL-12、IL-17又はIL-23の産生に関与する疾患の治療剤にも関する。

本発明はカテプシン阻害剤を有効成分として含有する全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、又は急性散在性脳脊髄炎の治療剤にも関する。

発明を実施するための最良の形態

- [0008] 次に本発明を詳細に説明する。

本発明のカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達の調整剤及びカテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達に関与する疾患の治療剤において、TLRとしてはTLR3、TLR7、TLR8又はTLR9から選択されるものが挙げられ、好ましくはTLR9である。

カテプシン阻害剤を有効成分として含有するTLRのシグナル伝達に関与する疾患

、カテプシン阻害剤を有効成分として含有するTh17細胞の誘導が関与する疾患、カテプシン阻害剤を有効成分として含有するIL-6、IL-12、IL-17又はIL-23の産生が関与する疾患としては、免疫関連疾患、骨関連疾患及び癌疾患から選択されるものが挙げられる。

免疫関連疾患としては、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、急性散在性脳脊髄炎、又は多発性硬化症等の自己免疫疾患、感染症、喘息が挙げられ、特に自己免疫疾患が好ましい疾患として挙げられる。

[0009] また、本発明のカテプシン阻害剤としては、WO96/30354、WO99/11640、WO97/21694、WO98/47887、特開平11-263783、WO01/058886、WO01/49288、WO01/70232、WO03/053331、WO03/075836、WO03/091202、WO2004/108661、WO2005/000800、WO2005/066180、WO2007/025774等の特許文献記載のものやT. Yasuma et al., J. Med. Chem. 1998, 41, 4301-4308; N. Katumuma et al., FEBS Lett., 1999, 458, 6-10; T. Otsuka et al., J. Antibiot., 1999, 52, 536-541; R. W. Marquis et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 1380-1395; J. Robichaud et al., J. Med. Chem. 2003, 46, 3709-3727; C. S. Li et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 1985-1989等に記載のカテプシンB阻害剤、カテプシンH阻害剤、カテプシンK阻害剤、カテプシンL阻害剤又はカテプシンS阻害剤が挙げられ、好ましくはカテプシンB阻害剤、カテプシンH阻害剤、カテプシンK阻害剤であり、さらに好ましくはカテプシンK阻害剤である。

[0010] また、本発明において、カテプシン阻害剤としては、N-[1-[(シアノメチル)カルバモイル]シクロヘキシル]-4-(4-プロピルピペラジン-1-イル)ベンズアミド、N-[(1S)-3-メチル-1-[[(4S, 7R)-7-メチル-3-オキソ-1-(ピリジン-2-イルスルホニル)ヘキサヒドロ-1H-アゼピン-4-イル]カルバモイル]ブチル]-1-ベンゾフラン-2-カルボキサミド、(2R)-N-シアノメチル-4-メチル-2-(4'-ピペラジン-1-イル-1, 1'-ビフェニル-3-イル)ペンタンアミド、N-[3-[(2Z)-2-(3-メチル-1, 3-チアゾリジン-2-イリデン)ヒドラジノ]-2, 3-ジオキソ-1-テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルプロピル]シクロヘプタンカルボ

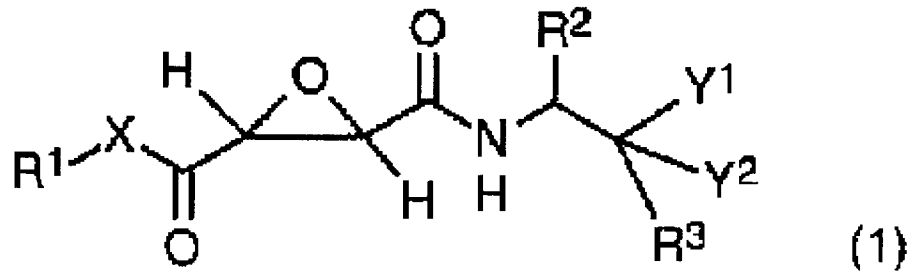
キサミド、N-シアノメチル-4-メチル-2-[2, 2, 2-トリフルオロ-1-(4'-メチルスルホニル-1, 1'-ビフェニル-4-イル)エチルアミノ]ペンタンアミド、又は(2S, 3S)-3-[[(1S)-1-イソブトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウムが好ましい。

また、本発明において、カテプシン阻害剤としては、E-64dが好ましい。

さらに、本発明において、カテプシン阻害剤としては、次に挙げるエポキシコハク酸アミド誘導体も好ましい。

(1) 次の一般式(1)で表わされるエポキシコハク酸アミド誘導体またはその生理学的に許容できる塩。

[0011] [化1]



[0012] [上記の式において、R¹は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり；R²は、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり；R³は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキ

ル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり;Xは、 $-O-$ または $-NR^4-$ (R^4 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)であり; Y^1 は、 OR^5 (R^5 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、 SR^6 (R^6 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、または NR^7R^8 (R^7 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり、そして R^8 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)であり;そして Y^2 は、水素原子または炭素原子数が1~10のアルキル基である;あるいは、 Y^1 と Y^2 とは一緒になって、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=N-R^9$ (R^9 は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12

の複素環基、または炭素原子数が3～12の複素環基と炭素原子数が1～6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、あるいは=N-OR¹⁰(R¹⁰は、水素原子、炭素原子数が1～10のアルキル基、炭素原子数が6～20のアリール基、炭素原子数が6～20のアリール基と炭素原子数が1～6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3～12の複素環基、または炭素原子数が3～12の複素環基と炭素原子数が1～6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)を表わしてもよい; なお、上記R⁵～R¹⁰のアルキル基はいずれも、ヒドロキシ基、アミノ基、炭素原子数が1～6のアルキルアミノ基、合計炭素原子数が2～12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が1～6のアルコキシ基、カルボキシ基、炭素原子数が2～7のアルコキシカルボニル基、カルバモイル基、炭素原子数が2～7のアルキルアミノカルボニル基、合計炭素原子数が3～13のジアルキルアミノカルボニル基、およびグアニジノ基からなる群より選ばれる一もしくは二以上の置換基を有していてもよく、また上記R¹～R¹⁰の各アリール基および各複素環基は、炭素原子数が1～6のアルキル基、ヒドロキシ基、アミノ基、炭素原子数が1～6のアルキルアミノ基、合計炭素原子数が2～12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が1～6のアルコキシ基、ハロゲン原子、炭素原子数が1～6のハロアルキル基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、炭素原子数が2～7のアルコキシカルボニル基、カルバモイル基、炭素原子数が2～7のアルキルアミノカルボニル基、合計炭素原子数が3～13のジアルキルアミノカルボニル基、アミノ基、およびグアニジノ基からなる群より選ばれる一もしくは二以上の置換基を有していてもよい]。

[0013] (2)一般式(1)のR¹が、水素原子または炭素原子数が1～6のアルキル基である(1)記載の化合物。

(3)一般式(1)のR²が、炭素原子数が1～6のアルキル基、フェニル基又はベンジル基である(1)又は(2)記載の化合物。

(4)一般式(1)のR³が、水素原子または炭素原子数が6～20のアリール基である(1)～(3)の何れかに記載の化合物。

(5)一般式(1)のXが、-O-である(1)～(4)の何れかに記載の化合物。

(6)一般式(1)のY¹が、ヒドロキシ基、炭素原子数が1～6のアルコキシ基、アセト

キシ基、又は炭素原子数が6～20のアリール基と炭素原子数が1～6のアルキル基からなるアラルキルオキシ基である(1)～(5)の何れかに記載の化合物。

(7)一般式(1)の R^2 が、イソブチル基またはイソプロピル基であり、 R^3 が水素原子であり、 Y^1 が OR^5 (R^5 は(1)と同じ)であり、そして Y^2 が水素原子である(1)、(2)又は(5)のうちの何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。

(8)一般式(1)の R^2 がイソブチル基またはイソプロピル基であり、 R^3 が炭素原子数が6～20のアリール基であり、 Y^1 が OR^5 (R^5 は(1)と同じ)であり、そして Y^2 が水素原子である(1)、(2)又は(5)の何れかに記載の化合物。

(9)一般式(1)の Y^1 と Y^2 とが一緒になって、 $=O$ を形成する(1)～(5)の何れかに記載の化合物。

(10)生理学的に許容できる塩がアルカリ金属塩である(1)～(9)の何れかに記載の化合物。

[0014] 上記一般式(1)で表されるエポキシコハク酸アミド誘導体の具体例を、下記の第1表(第1-1表、第1-2表、第1-3表、そして第1-4表)に示す。

第1-1表、第1-2表、第1-3表、そして第1-4表における R^1 、 R^2 、 R^3 、 X 、 Y^1 および Y^2 は、それぞれ前記の一般式(1)に示した記号に相当する。また、下記の各表において、各記号はそれぞれ下記の基を表わす。

H:水素、Me:メチル、Et:エチル、Ph:フェニル、Bn:ベンジル、iPr:イソプロピル、iBu:イソブチル、sBu:sec-ブチル、tBu:tert-ブチル、cHex:シクロヘキシル、4-MePh:4-メチルフェニル、4-ClPh:4-クロロフェニル、4-tBuPh:4-tert-ブチルフェニル、4'-HOBn:4'-ヒドロキシベンジル

[0015] [表1]

第1-1表

| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|-----|-------------------------|----------------|
| 1 | Et | iBu | Ph | O | OH | H |
| 2 | H | iBu | Ph | O | OH | H |
| 3 | iPr | iBu | Ph | O | OH | H |
| 4 | Et | iBu | Ph | NH | OH | H |
| 5 | Ph | iBu | Ph | NMe | OH | H |
| 6 | Et | iBu | 4-MePh | O | OH | H |
| 7 | Et | iBu | 4-ClPh | O | OH | H |
| 8 | Et | iBu | iPr | O | OH | H |
| 9 | Et | sBu | Ph | O | OH | H |
| 10 | Et | Ph | Ph | O | OH | H |
| 11 | Et | iBu | Ph | O | OMe | H |
| 12 | Et | iBu | Ph | O | OEt | H |
| 13 | Et | iBu | H | O | OH | H |
| 14 | Et | iBu | Me | O | OH | Me |
| 15 | Et | iBu | Ph | O | =O (Y ² と共に) | |
| 16 | Et | iPr | Ph | O | =O (Y ² と共に) | |
| 17 | Et | iPr | Ph | O | =S (Y ² と共に) | |
| 18 | H | sBu | Ph | O | OH | H |
| 19 | H | Ph | Ph | O | OH | H |
| 20 | H | iBu | Ph | O | OMe | H |
| 21 | H | iBu | H | O | OH | H |

[0016] [表2]

第1-2表

| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|---|------------------------------|----------------|
| 22 | Et | iBu | Ph | O | アセトキシ | H |
| 23 | Et | iBu | Ph | O | ベンゾイルオキシ | H |
| 24 | iPr | iBu | Ph | O | OMe | H |
| 25 | Bn | iBu | Ph | O | OMe | H |
| 26 | Et | iBu | Ph | O | ベンジルオキシ | H |
| 27 | Et | iBu | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 28 | Et | iBu | H | O | 4'-クロロベンジルオキシ | H |
| 29 | Et | iBu | H | O | 2'-メチルベンジルオキシ | H |
| 30 | Et | iBu | H | O | 3', 4', 5'- トリメトキシベンジルオキシ | H |
| 31 | Et | iPr | H | O | 2'-クロロベンジルオキシ | H |
| 32 | Et | iPr | H | O | 4'-メチルベンジルオキシ | H |
| 33 | Et | iBu | H | O | 4'-アミジノベンジルオキシ | H |
| 34 | Et | iBu | H | O | 4'-グアジノ ベンジルオキシ | H |
| 35 | Et | iBu | H | O | カルボキシメトキシ | H |
| 36 | Et | iBu | H | O | (2-エトキシカルボニル エチル) オキシ | H |
| 37 | Et | iBu | H | O | (1-ピペラジニルカルボニル) メトキシ | H |
| 38 | Et | iBu | H | O | イソブチルアミノ | |

[0017] [表3]

第1-3表

| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|---|------------------------|----------------|
| 39 | Et | iBu | H | O | ジエチルアミノ | H |
| 40 | Et | iBu | H | O | ベンジルアミノ | H |
| 41 | Et | iBu | H | O | ベンゾイルアミノ | H |
| 42 | Et | iBu | H | O | ベンジルカルボニルアミノ | H |
| 43 | Et | iBu | H | O | イソプロトキシ | H |
| 44 | Et | Bn | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 45 | Et | Bn | H | O | イソプロトキシ | H |
| 46 | Et | 4'-HOBn | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 47 | Et | iBu | H | O | ジフェニルメトキシ | H |
| 48 | H | iBu | Ph | O | ベンジルオキシ | H |
| 49 | H | Bn | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 50 | H | iBu | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 51 | H | iBu | H | O | (4-グアニジノ ブチル) オキシ | H |
| 52 | H | iBu | H | O | (2-エチルアミノ エチル) オキシ | H |
| 53 | H | iBu | H | O | (2-ジエチルアミノ エチル) オキシ | H |

[0018] [表4]

第1-4表 (その1)

| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|---|-------------------------|----------------|
| 54 | Et | iBu | cHex | O | OH | H |
| 55 | Et | iBu | cHex | O | OMe | H |
| 56 | Et | iBu | H | O | 2'-メチルベンジル オキシ | H |
| 57 | Et | iBu | H | O | 2', 6'-ジメチル ベンジルオキシ | H |
| 58 | Et | iBu | H | O | 4'-イソプロピル ベンジルオキシ | H |
| 59 | Et | iBu | H | O | 2'-クロロベンジル オキシ | H |
| 60 | Et | iBu | H | O | 4'-トリフルオロ メチルベンジルオキシ | H |
| 61 | Et | iBu | H | O | 4'-シアノベンジル オキシ | H |
| 62 | Et | iBu | H | O | 3'-アミノベンジル オキシ | H |
| 63 | Et | iBu | H | O | (3-ピリジル) メトキシ | H |
| 64 | Et | iBu | H | O | (3-チエニル) メトキシ | H |
| 65 | Et | iBu | H | O | (2-ベンズイミダゾリル) メトキシ | H |
| 66 | Et | iBu | H | O | (1-ナフチル) メトキシ | H |
| 67 | Et | iBu | H | O | 2-ナフチルオキシ | H |

[0019] [表5]

第1-4表 (その2)

| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|---|-------------------------------|----------------|
| 68 | Et | iBu | H | O | フェノキシ | H |
| 69 | Et | iBu | H | O | 2-フェニルエトキシ | H |
| 70 | Et | iBu | H | O | 3-フェニルプロポキシ | H |
| 71 | Et | iBu | H | O | エトキシ | H |
| 72 | Et | iBu | H | O | (3-メチルブチル) オキシ | H |
| 73 | Et | iBu | H | O | ヘキシルオキシ | H |
| 74 | Et | iBu | H | O | シクロプロピルメトキシ | H |
| 75 | Et | iBu | H | O | シクロヘキシルメトキシ | H |
| 76 | Et | iBu | H | O | (2-メチル-2- プロペニル) オキシ | H |
| 77 | Et | iBu | H | O | (3-メチル-2- ブテニル) オキシ | H |
| 78 | Et | iBu | H | O | 2-メトキシエトキシ | H |
| 79 | Et | iBu | H | O | (ジメチルカルバモイル) メトキシ | H |
| 80 | Et | iBu | H | O | 3-(4-ベンジル-1-ピ ペラジニル) プロポキシ | H |
| 81 | Et | iBu | H | O | 4-ジエチルアミノブチル オキシ | H |

[0020] [表6]

第1-4表 (その3)

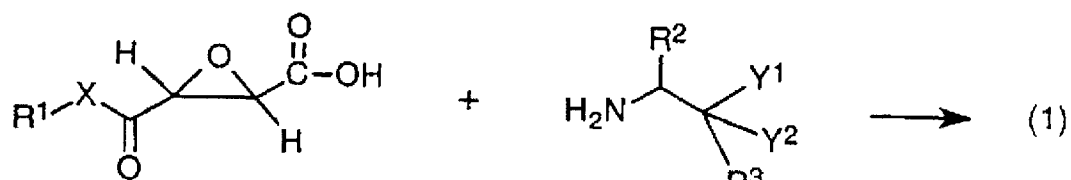
| 化合物番号 | R ¹ | R ² | R ³ | X | Y ¹ | Y ² |
|-------|----------------|----------------|----------------|---|---------------------|----------------|
| 82 | iPr | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 83 | tBu | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 84 | cHex | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 85 | Ph | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 86 | 4-tBuPh | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 87 | H | iBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 88 | Et | iPr | H | O | イソプトキシ | H |
| 89 | Et | sBu | H | O | イソプトキシ | H |
| 90 | Et | iPr | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 91 | Et | Bn | H | O | ベンジルオキシ | H |
| 92 | Et | iBu | H | O | 2-メチルプロピオニル アミノ | H |
| 93 | Et | iBu | H | O | ヘキサノイルアミノ | H |
| 94 | Et | iBu | H | O | N-ベンジル-N-メチル アミノ | H |
| 95 | Et | iBu | H | O | N-ヘキシル-N-メチル アミノ | H |

[0021] 上記一般式(1)で表されるエポキシコハク酸アミド誘導体は、生理学的に許容可能な塩として用いてもよい。例えば、R¹が水素原子で、Xが-O-の場合における、アルカリ金属(例、ナトリウム、カリウム)との塩、アルカリ土類金属(例、カルシウム)との塩、有機アミン(例、トリエチルアミン、ピリジン)との塩を挙げることができる。

次に上記一般式(1)で表されるエポキシコハク酸アミド誘導体の製造方法について説明する。上記一般式(1)で表されるエポキシコハク酸アミド誘導体は、公知の物質から、アミド結合の生成反応、エステル反応、あるいは加水分解反応を利用して製造することができる。下記に、それぞれの反応の反応式を示す。

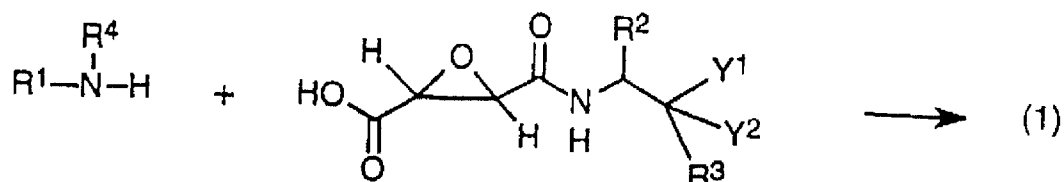
1)アミド結合の生成(1)

[0022] [化2]



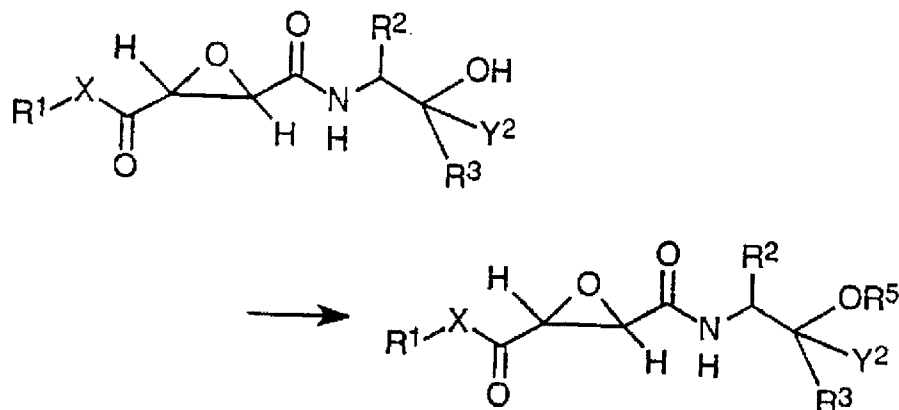
[0023] 2)アミド結合の生成(2)

[0024] [化3]



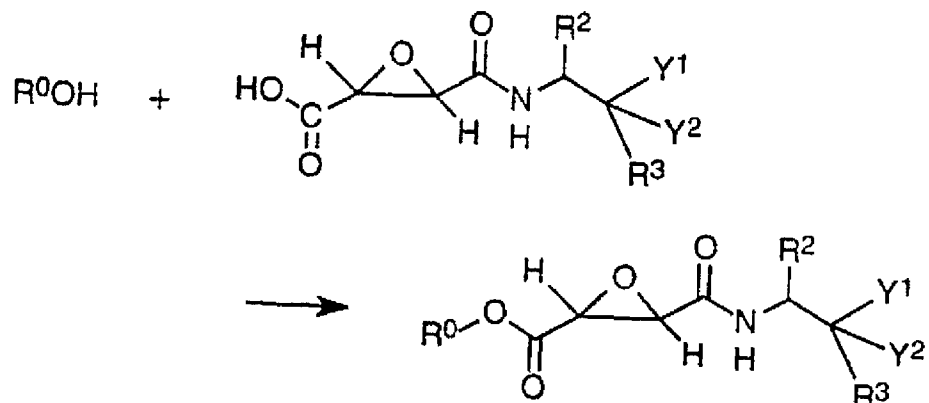
[0025] 3)エステル化反応

[0026] [化4]



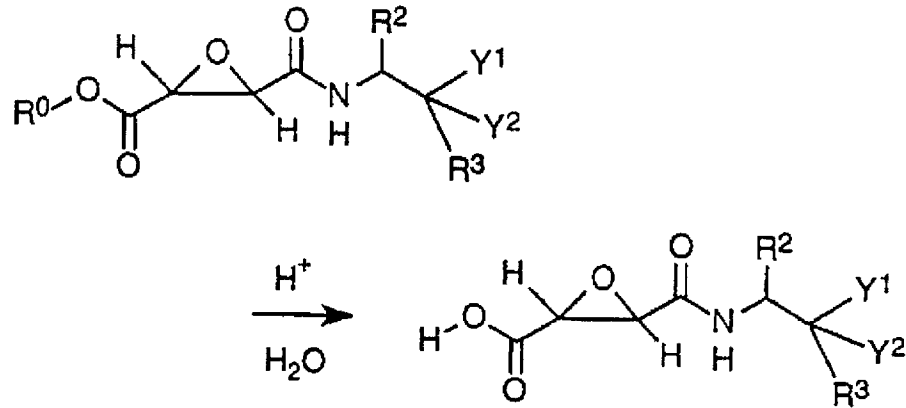
[0027] 4)エステル化反応

[0028] [化5]



[0029] 5)加水分解反応

[0030] [化6]



[0031] さらにまた、本発明において、カテプシン阻害剤としては、(2S, 3S)-3-[[[(1S)-1-イソブトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウム(以下、NC-2300と略す。図1)が好ましい。

[0032] 次に薬理実験について記載する。

ラットアジュバント関節炎モデルにNC-2300を経口投与して、破骨細胞性骨吸収の阻害剤として臨床で使用されているビスホスホネート製剤の1つであるアレンドロネートとの薬効比較実験を行った。アジュバントモデルでの骨量減少は主に2つのタイプがあり、炎症関節部位での骨侵食と関節周囲の骨粗鬆症である。軟X線解析の結果、NC-2300が足蹠の骨侵食を顕著に抑制することが明らかになった。この作用はアレンドロネートではみられなかった(図2AとB)。しかしながら、骨密度(BMD)の測定では両化合物がともに脛骨近位端関節周囲の骨粗鬆症を同程度抑制することを示した(図2CとD)。アレンドロネートは骨侵食を効果的に抑制しなかった理由として、1つは炎症性サイトカインによって刺激された破骨細胞がビスホスホネート耐性になっていることが考えられた。これらの結果はカテプシンKが関節炎で関節周囲骨粗鬆症と同様に骨侵食をも防ぐための有望な標的であることを示している。

[0033] 次にNC-2300が関節炎の発症率には影響を与えず、関節炎の過程で足蹠浮腫を改善し(図3AとB)、運動機能も改善することを見出した(図3C)。NC-2300は関節炎の発症開始後に投与しても炎症を改善した。これらの結果はカテプシンKが破骨細胞以外の細胞で機能し、自己免疫性の炎症に重要な役割を担っていることを示

している。

[0034] アジュバント関節炎ではアジュバント局所注射が樹状細胞による抗原提示を刺激し、さらにT細胞の自己免疫、マクロファージによる炎症性サイトカイン及び破骨細胞を介した骨破壊に至る。そのアジュバント効果は主にTLRシグナルの活性化を誘導する病原微生物の特異的な構造(PAMPs)に依存している。それゆえに、T細胞、マクロファージ、樹状細胞におけるカテプシンKの発現の有無を解析して、これらの細胞の活性化に対するカテプシンK阻害剤の効果を調べた。

RT-PCR解析の結果、カテプシンK mRNAは非接着性の骨髄細胞や脾臓由来T細胞ではほとんど検出されなかった(図4A)。一貫して、NC-2300は抗CD3/CD28で刺激したT細胞の増殖やIL-2産生に影響を与えなかった。マクロファージでカテプシンKは発現しているという報告があるが、NC-2300はPAMPsによって刺激した骨髄由来マクロファージの活性化には有意な効果はなかった。骨髄由来樹状細胞ではカテプシンK mRNAが検出できるレベルまで発現していることを明らかにした(図4A)。樹状細胞のカテプシンK mRNA発現は破骨細胞と比べてはるかに低いが、樹状細胞でのカテプシンK活性はカテプシンK特異的な蛍光基質であるZ-Gly-Pro-Arg-MCA(Z:ベンジロキシカルボニル;MCA:4メチルクマリル7アミド)を用いて確認することができた。そしてその活性はNC-2300によって濃度依存的に阻害された(図4B)。

なお、樹状細胞の抗原提示能におけるカテプシンKの役割を調べたところ、樹状細胞による抗原取り込み、分解もしくは提示にはカテプシンK活性は必要ではないと考えられた。

[0035] アジュバント関節炎を誘発するのに用いた完全フロイントアジュバント(CFA)は不完全フロイントアジュバントとマイコバクテリア死菌の混合物であり、この死菌はTLR2、TLR4、TLR9のアゴニストを含む様々なPAMPsが入っている。それゆえに、カテプシンK不活性化の有無でこれらPAMPsへの樹状細胞の反応を調査した。酵素免疫測定法(ELISA)の解析により、樹状細胞によるサイトカイン産生はTLR2アゴニストであるペプチドグリカン(PGN)やTLR4アゴニストであるリポポリサッカライド(LPS)ではなくTLR9アゴニストである非メチル化CpG鎖を含んだオリゴデオキシヌクレオチ

ドによって刺激されたときに産生されるIL-12やIL-23がNC-2300によって有意に阻害されることを明らかにした(図5A)。カテプシンKの不活化はTLR9のmRNA発現に大きな影響を示さなかった。骨髄由来樹状細胞においてCpGによるIL-6、IL-12、IL-23の発現はNC-2300によりmRNAレベルで抑制され(図5B)、Flt3リガンドで分化誘導した樹状細胞のCpGによる1型IFN産生はNC-2300によって抑制された。これらの結果はTLR9シグナルによって調節されている遺伝子誘導プログラムにおいてカテプシンKが重要な役割を演じていることを示唆している。

[0036] 次にpoly(I:C) (TLR3リガンド)及びR837 (TLR7, 8リガンド)で処理したマウス脾臓由来樹状細胞のサイトカインmRNA発現に対するNC-2300の効果を測定した。

マウス脾臓由来樹状細胞は脾臓より調製した。総(Total)RNAは刺激3時間後に抽出した。

その結果、マウス脾臓由来樹状細胞においてpoly(I:C)及びR837処理前による1型IFNの発現はNC-2300によりmRNAレベルで抑制された(図6)。

また、カテプシン阻害剤であるE64dも同様にマウス脾臓由来樹状細胞において、poly(I:C)及びR837処理による1型IFNの発現をmRNAレベルで抑制した。

[0037] CFA中のマイコバクテリア成分をDNA分解酵素で処理すると、アジュバント関節炎の誘発に影響せずに重症度が著しく減弱することが報告されている。DNA分解酵素処理したマイコバクテリア成分にCpG DNAを加えることで、アジュバントは重度な関節炎を誘発するようになる。これらの結果は、TLR9を介する免疫反応が自己免疫性炎症の重症度を決定することを示唆する。CFA接種後の数週間に亘りマイコバクテリアDNAが検出されることから、その間、CpG DNAが自己免疫性炎症を増悪しているのかもしれない。これらの結果はカテプシンKがTLR9シグナルを介して炎症に関与しているという考えを支持するものである。

CpG DNAは細胞の中に取り込まれた後、エンドソームコンパートメントのTLR9に結合する。TLR9とCpGの結合はMyD88を活性化し、さらにマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)、インターフェロン調節因子(IRF)そして核内因子kB(NF- κ B)経路のような下流の伝達経路を活性化する。これらの経路の活性化は樹状細

胞で炎症性サイトカインの産生とCD40、CD80、CD86のような細胞表面分子の発現を誘導する。NC-2300はin vitroで骨髄由来の樹状細胞の分化には影響がなく、電子顕微鏡解析ではカテプシンK欠損マウスの骨髄由来樹状細胞は正常な細胞形態を示していた(図7A)。次に樹状細胞でCpGによって誘導されるシグナル系について調査をおこなった。LPSではなく、CpGによって引き起こされる樹状細胞内の細胞外シグナル制御キナーゼ1/2(ERK1/2)のリン酸化がカテプシンK不活性化によって抑制されていた(図7B)。ゲルシフトアッセイ(EMSA)の結果、CpGによる樹状細胞でのIRFとNF- κ Bの活性化がカテプシンKの不活性化によって抑制されていることが明らかになった(図7C)。加えて、NC-2300の処理により、樹状細胞でCD40、CD80、CD86の発現が減少した(図8A)。したがって、カテプシンKの不活性化が樹状細胞のTLR9シグナルの下流経路を抑制したことから、カテプシンKがTLR9の近位のシグナルに重要な役割を担っていることが示唆された。しかしながら、カテプシンK欠損マウスの樹状細胞ではCpGのエンドサイトーシスには影響がみられなかった(図8B)。

[0038] カテプシンK欠損マウスの樹状細胞でCpGによるIL-12とIL-6の産生が著しく減少していることを観察した。ところがLPSによるこれらサイトカインの産生には影響が見られなかった(図8C)。エンドソームの酸性化を抑制するクロロキンはTLR9シグナルを阻害することが知られている。TLR9はエンドソーム内pHが酸性状態の時により強くCpGと相互作用していることが報告されている。しかしながら、TLR9シグナルにおけるエンドソーム酸性化の役割については未だその詳細は明らかになっていない。カテプシンK欠損によるCpG-TLR9シグナルの選択的な阻害はクロロキンの作用と似ており、これはクロロキンはカテプシンKの不活性化が同じシグナル系を標的としている可能性を示すものである。カテプシンK欠損マウスの樹状細胞におけるサイトカイン産生はクロロキン添加によってより一層抑制された(図8C)。このことは、わずかであるが他のpH感受性酵素の関与もあることを示唆している。カテプシンはエンドソームに局在することが知られており、もっぱら酸性条件下で活性化される。従って、クロロキンの効果は、これら酵素の阻害、主にカテプシンKの阻害を介しているものと考えている。カテプシンKがエンドソーム内でCpG-TLR9シグナルをどのように調

節しているかは不明であるが、薬剤によってカテプシンKを阻害したことによって得られた結果から、この酵素のタンパク質分解活性がCpG-TLR9シグナルにおいて重要であることを明確に示唆している。カテプシンKがTLR9シグナルの近位に影響を与える細胞内タンパク質を分解している可能性を無視することはできないが、カテプシンKがCpG-TLR9の間の相互作用を抑制しているタンパク質の分解に関与していたり、またはカテプシンKを介したタンパク質分解がTLR9の構造的変化をもたらして、CpGとの相互作用を増強している可能性もあると考えている。

[0039] カテプシン類が破骨細胞非依存的に自己免疫性炎症で重要な役割を担っていることを明らかにするために、カテプシンK欠損マウスを用いてTLR9シグナルが強く関与するとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルの作製を試みた。野生型とカテプシンK欠損マウスとの間にEAEの発症頻度には違いは見られなかったが、カテプシンK欠損マウスでは麻痺の重症度がコントロールマウスよりより低くなっていた (図9A)。また、脊髄の病理学的解析において、カテプシンK欠損マウスでは炎症 (図9B上, HE staining)、T細胞の浸潤 (図9B中, anti-CD3 staining) および脱髄 (図9B下, LFB staining) が劇的に減少していることが示された。

[0040] Th17細胞がEAEでの自己免疫性炎症には必須であることが示されていることから、樹状細胞のTh17細胞誘導能に対するカテプシンKの不活化がもたらす影響を検討した。樹状細胞をCpG、LPS、あるいはPGNの存在下でCD4陽性T細胞と共培養し、IL-17の細胞内染色法によってTh17細胞の誘導に対するNC-2300の効果の評価した。興味深いことに樹状細胞をCpGで刺激したときのみ、樹状細胞のTh17細胞誘導能がカテプシンKの不活化によって顕著に阻害された (図10)。

CpG刺激でした時のみにみられる樹状細胞のサイトカイン発現に対するカテプシンKの役割の結果と併せて考えると、カテプシンK不活化によるTh17細胞誘導の減少は、少なくとも部分的にはIL-6やIL-23のようなTh17細胞の誘導、増殖に関与しているサイトカインの発現が樹状細胞で減少した結果と考えられる。

[0041] 以上、破骨細胞特異的な酵素として考えられていたカテプシンKが免疫系で重要な役割を担っていることが判明した。カテプシンKはTLR9によるCpGの取り込みが行われるエンドソームの酸性条件下で機能し、TLR9シグナルの近位で重要な役割

を担っている。エンドソーム酸性化阻害剤であるクロロキンがCpGを介したTLR9シグナルをどのように阻害しているかは明確ではないが、TLR9シグナルに対するカテプシンKの役割はこの結果とよく一致している。クロロキンは関節リウマチの治療で長く使用されてきている。クロロキンをカテプシン阻害剤ととらえる概念は抗リウマチ薬として臨床効果があるクロロキンの分子的、細胞的なメカニズムを説明してくれるものかもしれない。近年、別の抗リウマチ薬である金チオマレートがカテプシンKの触媒ドメインに結合することが報告されていた。カテプシンの直接の基質が何であるか不明であるが、カテプシンの薬剤による阻害と遺伝子破壊による研究によって、カテプシンが樹状細胞特異的なTLR9シグナルでそれまで予想をもしえなかった免疫学的役割を担っていることが総合的に示唆された。

カテプシン阻害剤が関節炎モデルの自己免疫性炎症を抑制すること、および破骨細胞がその発症に関与していないことが明らかなEAEモデルに対してカテプシンK欠損マウスが耐性を持つということから、免疫系調節にカテプシン類が重要であるということが強く示されることになった。詳細なメカニズムについては不明であるものの、Th17の調節がカテプシンによる自己免疫性炎症の制御機構の1つであることをここで明らかになった。したがって、骨粗鬆症治療においてはカテプシンK阻害剤の免疫系への副作用に対しては十分な配慮が払われるべきであるが、その一方でTh17細胞と破骨細胞の両方に依存した病態である自己免疫性関節炎の治療においては、カテプシン阻害剤が2重の恩恵をもたらすかもしれない。

[0042] 以上、本発明の有効成分であるカテプシン阻害剤は、TLRのシグナル伝達を調整し、Th-17細胞の誘導を抑制し、IL-6、IL-12、IL-17、IL-23の誘導を抑制することから、これらに関連する疾患の治療剤として有用で、特に全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、急性散在性脳脊髄炎あるいは多発性硬化症等の自己免疫疾患、感染症、喘息等の免疫疾患の治療剤、並びに骨関連疾患、癌疾患等の治療剤として期待される。

特にカテプシンK阻害剤は、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、又は急性散在性脳脊髄炎等の自己免疫疾患の治療剤として有用である。

本発明の有効成分であるカテプシン阻害剤は、ヒトに対して一般的な経口投与又

は非経口投与のような適当な投与方法によって投与することができる。

[0043] 製剤化するためには、製剤の技術分野における通常の方法で錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、懸濁剤、注射剤、坐薬等の剤型に製造することができる。

これらの調製には、通常賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、色素、希釈剤などが用いられる。ここで、賦形剤としては、乳糖、D-マンニトール、結晶セルロース、ブドウ糖などが、崩壊剤としては、デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム(CMC-Ca)などが、滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどが、結合剤としては、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ゼラチン、ポリビニルピロリドン(PVP)などが挙げられる。

[0044] 投与量は通常成人においては、注射剤で有効成分である本発明化合物を1日約0.1mg~100mg、経口投与で1日1mg~2000mgであるが、年齢、症状等により増減することができる。

[0045] 次に、実施例を挙げ、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0046] 本発明で使用した材料と方法は以下のとおりである。

<材料と方法>

1. 動物

我々はP. Saftig et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA95, 13453(1998)に記載されているカテプシンK欠損マウスともう1つのカテプシンK欠損マウスの2種類のカテプシンK欠損マウスを使用した。もう1つのカテプシンK欠損マウスはカテプシンK遺伝子座にCreがノックインしたマウス(cathepsin K^{Cre/+}ヘテロマウス)を交配させることによって繁殖させた。バックグラウンドがBALB/cマウスでI-Adが卵白アルブミンの323-339番目のペプチドを認識するDO11.10TCRをトランスジェニックしたマウスを含むすべての動物は特定病原体のない環境下で維持された。そしてすべての動物実験は東京医科歯科大学の施設委員会の許可のもとで行われた。

[0047] 2. 骨髄細胞からの樹状細胞とマクロファージの発生

マウスからの未成熟樹状細胞はK. Inaba et al., J. Exp. Med. 176, 1693(1

992)に記載されているように発生させた。簡潔に書くと、骨髄細胞は 10ngml^{-1} のマウスGM-CSFもしくはマウスFlt3Lを含む10%FBS入りRPMI1640培地で6日間培養した。緩く張り付いている細胞は静かにピペッティングすることで回収して、骨髄由来樹状細胞として使用した。骨髄由来マクロファージを獲得するために骨髄細胞は 10ngml^{-1} のM-CSFを含む10%FBS入り α -MEM培地で2日間培養した。そして張り付いた細胞を骨髄由来マクロファージとして使用した。病原微生物の特異的な構造(PAMPs)を用いた刺激のために、細胞を24穴プレートに $5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ で播種して、 10ngmL^{-1} リポポリサッカライド(LPS)、 $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ペプチドグリカンタイプI(PGN)もしくはエンドトキシンのないホスホロチオエイトで安定化したCpGオリゴヌクレオチド(CpG ODN)とともに培養した。

[0048] 3. 酵素免疫定量法(ELISA)

細胞はNC-2300の存在下もしくは非存在下でPAMPsもしくは抗CD3/CD28抗体の有無で3時間から24時間培養した。そして培養上清中のサイトカイン濃度はELISAキットにより製造者の指示に従って測定した。

[0049] 4. 細胞増殖試験

細胞増殖はCell Proliferation ELISAキットを用いて製造者の手順に従って評価した。

[0050] 5. フローサイトメトリー

染色前、細胞は非特異的染色を最小限にするためにマウスBD FC Blockで処理した。それから細胞は蛍光色素分子が結合したモノクローナル抗体で染色した。以下の蛍光色素分子が結合したモノクローナル抗体を使用した;アロフィコシアニン(APC)が結合した抗CD3e抗体(145-2C11)、フルオレセインイソチオシアネイト(FITC)が結合した抗CD4抗体(RM4-5)、抗CD11c抗体(HL3)、抗CD40抗体(3/23)、抗CD80抗体(16-10A1)、抗CD86抗体(GL1)、抗I-A^d抗体(AM S-32.1)、およびフィコエリトリン(PE)が結合した抗マウスIL-17抗体(TC11-18H10)。細胞内サイトカイン染色のために細胞を集め、推奨された濃度のGolgiPlugの存在下で未刺激のまま、もしくはイオノマイシン($4 \mu\text{g mL}^{-1}$)とPMA(40ng mL^{-1})で5時間刺激した。標準的な細胞内サイトカイン染色は次のように行った。はじ

めに細胞をAPCが結合した抗CD3抗体およびFITCが結合した抗CD4抗体で細胞外染色を行い、それからCytofix/Cytoperm溶液で固定と細胞膜透過処理を行った。そして最後に、PEが結合した抗IL-17抗体で細胞内染色を行った。フローサイトメトリーによる解析はCellQuestを用いたFACSscanもしくはDivaソフトを用いたFACS Cantollによって行った。

[0051] 6. Th17細胞分化

CD4陽性T細胞と脾臓の樹状細胞は抗CD4抗体マイクロビーズと磁気ソーターを使用して脾臓から分離した。これらの細胞は 2 ng ml^{-1} のヒトTGF- β 、 $10\text{ }\mu\text{ g ml}^{-1}$ の抗IFN- γ 抗体および抗IL-4抗体の存在下、CpG ODN、LPS、もしくはPGNの有無で3日間、抗CD3抗体と抗CD28抗体(それぞれ $1\text{ }\mu\text{ g ml}^{-1}$)が結合したプレートで刺激した。

[0052] 7. 電子顕微鏡(EM)

樹状細胞は2.5%EMグレードグルタルアルデヒド(100mMリン酸緩衝液、pH7.4で希釈)で2時間固定して、それから100mMリン酸緩衝液(pH7.4)で2時間洗浄し、さらに1%四酸化オスミウム(100mMリン酸緩衝液、pH7.4で希釈)で2時間後固定したのち、EM標本として処理した。

[0053] 8. エンドサイトーシス試験

FITCが結合した卵白アルブミン(卵白アルブミンFITC)もしくはFITCが結合したCpG ODN(CpG-FITC)をそれぞれ終濃度 $100\text{ }\mu\text{ g ml}^{-1}$ もしくは $1\text{ }\mu\text{ M}$ で細胞培養液に加えた。それから細胞を5%CO₂と湿気のある環境で4°Cもしくは37°Cで30分間処理した。細胞は1%FCSと0.01%NaN₃を含有する冷PBSで3回洗浄して、フローサイトメトリーで解析した。トリパンブルーは細胞外蛍光を消失するために使用した。

[0054] 9. RT-PCR解析

RT-PCR解析はK. Sato et al., Nat Med 12, 1410(2006)に記載してあるように行った。次のPCRプライマーを使用した。

[0055] カテプシンK:

5'-ATACGTTACTCCAGTCAAGAACCAG-3' (sense)および

5' -ATAATTCTCAGTCACACAGTCCACA-3' (antisense);

[0056] ベータアクチン:

5' -GTACGACCAGAGGCATACAGG-3' (sense) および

5' -GATGACGATATCGCTGCGCTG-3' (antisense).

[0057] 10. 定量RT-PCR

定量RT-PCRはK. Sato et al., Nat Med 12, 1410(2006)に記載してあるように行った。次のプライマーを使用した。

[0058] II23a:

5' -ATGCTGGATTGCAGAGCAGTA-3' (sense) および

5' -ACGGGGCACATTATTTTGTAGTCT-3' (antisense);

[0059] II12a:

5' -CCCTTGCCCTCCTAAACCAC-3' (sense) および

5' -AAGGAACCCTTAGAGTGCTTACT-3' (antisense);

[0060] II12b:

5' -GACACGCCTGAAGAAGATGAC-3' (sense) および

5' -TAGTCCCTTTGGTCCAGTGTG-3' (antisense);

[0061] Ifnb1:

5' -CAGGCAACCTTTAAGCATCAG-3' (sense) および

5' -CCTTTGACCTTTCAAATGCAG-3' (antisense).

[0062] mRNA発現レベルはベータアクチンの発現レベルで標準化した。

[0063] 11. 免疫ブロット法解析

樹状細胞はバックグラウンドを減らすために低濃度血清入り培地(0.1%FBS)で4時間培養した。それからNC-2300非存在下もしくは存在下でCpG ODNもしくはLPSで刺激した。刺激した細胞はK. Sato et al., Nat Med12, 1410(2006)に記載したように免疫ブロット法解析を抗ERK1/2抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体、抗ベータアクチン抗体を用いて行った。

[0064] 12. ゲルシフト法(EMSA)

樹状細胞はバックグラウンドを減らすために低濃度血清入り培地(0.1%FBS)で4

時間培養した。それからNC-2300非存在下もしくは存在下でCpG ODNもしくはLPSで刺激した。EMSAはH. Hemmi et al., Nature 408, 740(2000)に記載してあるように行った。EMSAで使用したオリゴヌクレオチドプローブを次に示す。

[0065] NF- κ B:

5'-ATCAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCC-3' (sense) および

5'-GGAAAGTCCCCAGCGGAAAGTCCCTGAT-3' (antisense);

[0066] ISRE:

5'-GATCCATGCCTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAGCC-3' (sense) および

5'-GGCTTCAGTTTCGGTTTCCCTTTCCCGAGGCATGGATC-3' (antisense).

[0067] オリゴヌクレオチドプローブはT4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して[γ - 32 P]ATPを末端にラベルした。

[0068] 13. 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)

マウスMOG₃₅₋₅₅ ペプチド (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) は東京大学医科学研究所で合成された。6~12週齢のマウスは $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ Mycobacterium tuberculosis H37RAを含んだコンプリートフロイントアジュバントで乳化したMOGペプチド ($250 \mu\text{g}$ /マウス) で免疫した。免疫後、そのマウスに百日せき毒素 (200n g /マウス) を0日目と2日目に腹腔内投与した。動物は次の基準を使用して3週間にわたってEAEの臨床サインを記録した。0:臨床サインなし、1:尻尾の下垂、2:尻尾の不動および歩行異常、3:部分的な後肢麻痺、4:後肢麻痺、5:前肢麻痺および瀕死、6:死。組織学的解析は次のように行った。マウスはPBSでかん流して、次に4%パラホルムアルデヒドでかん流した。脊髄はパラフィンで包埋して、炎症評価のためにヘマトキシリン-エオシン染色を、脱髄の程度の評価のためにルクソールファーストブルー染色を、そしてT細胞浸潤の評価のために抗CD3抗体を用いた免疫染色を行った。

[0069] 14. 統計分析

統計分析は適用する場合スチューデントt検定、フィッシャーの直接確率計算法お

よびチューキークレーマー検定もしくはダネット多重比較検定を伴う分散分析を行った。すべての統計分析データは平均値±標準誤差である。

[0070] [実施例1]

NC-2300とアレンドロネートのアジュバント関節炎の改善効果の比較

(1) 足関節の軟X線評価

ラットアジュバント関節炎モデルにNC-2300を経口投与して、アレンドロネートとの薬効比較実験を行った。ラットは0日目に完全フロイントアジュバントを接種した。NC-2300、アレンドロネート及び媒体を表記された投与量で0日目から始めて35日までラットに投与した。

足関節の軟X線評価(36日目)から重度な関節破壊(関節空の狭窄、浸潤、そして骨棘形成)が媒体もしくはアレンドロネート投与ラットで観察されたが、NC-2300投与ラットでは観察されなかった。(図2AとB)。

[0071] (2) 関節周囲の骨粗鬆症に対するNC-2300及びアレンドロネートの効果

次に、関節周囲の骨粗鬆症に対するNC-2300及びアレンドロネートの効果を測定するため、脛骨近位端について36日目に軟X線評価を行った。また脛骨近位端の骨中無機質密度はpQCTによって評価した。

骨密度(BMD)の測定では両化合物がともに脛骨近位端関節周囲の骨粗鬆症を同程度抑制することを示した(図2CとD)。

[0072] (3) 足蹠浮腫におけるNC-2300およびアレンドロネートの効果、並びにNC-2300及び媒体を投与したアジュバント関節炎の後肢足蹠の評価

次に、足蹠浮腫におけるNC-2300およびアレンドロネートの効果を測定しその結果を図3Aに示す。

また、NC-2300および媒体を投与したアジュバント関節炎の後肢足蹠の評価を測定し、その結果を図3Bに示す。

NC-2300は関節炎の発症率には影響を与えず、関節炎の過程で足蹠浮腫を改善した。(図3AとB)

[0073] (4) NC-2300による関節炎ラットの行動量の回復

次に、NC-2300による関節炎ラットの行動量の回復(35日目)を測定し、その結

果を図3Cに示す。

NC-2300高用量の投与群は関節炎により誘発される立ち上がり行動の不能を有意に改善して(左)、後肢跛行の重症度を減少した(右)。

[0074] 図2のB、D及び図3のA及びC:n=10、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001(対媒体投与群)。N.D. 検出できず。

[0075] [実施例2]

カテプシンK阻害に基づく骨髄由来樹状細胞(BM-DCs)のToll様受容体9シグナルの選択的抑制

骨髄由来樹状細胞は表示がない限り顆粒球・単球コロニー刺激因子(GM-CSF)によって誘導した。

[0076] (1)骨髄由来樹状細胞におけるカテプシンK mRNA発現のRT-PCR解析

T細胞、マクロファージ、樹状細胞におけるカテプシンKの発現の有無を解析して、これらの細胞の活性化に対するカテプシンK阻害剤の効果を調べた。

図4Aに骨髄由来樹状細胞におけるカテプシンK mRNA発現のRT-PCR解析結果を示す。

RT-PCR解析の結果、カテプシンK mRNAは非接着性の骨髄細胞や脾臓由来T細胞ではほとんど検出されなかった(図4A)。NC-2300は抗CD3/CD28で刺激したT細胞の増殖やIL-2産生に影響を与えなかった。

NC-2300はPAMPsによって刺激した骨髄由来マクロファージの活性化には有意な効果はなかった。骨髄由来樹状細胞ではカテプシンK mRNAが検出できるレベルまで発現していることを明らかにした(図4A)。

[0077] (2)骨髄由来樹状細胞のカテプシンK活性の測定

次に、骨髄由来樹状細胞のカテプシンK活性を測定した。

骨髄由来樹状細胞をカテプシンK阻害剤であるNC-2300有無で24時間前処理した。冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄したのち、そして細胞粉砕後は酵素活性に供した。カテプシンK活性はカテプシンK特異的基質であるZ-Gly-Pro-Arg-MCA(GPR)を用いて測定した。

その結果、樹状細胞のカテプシンK mRNA発現は破骨細胞と比べてはるかに低

いが、樹状細胞でのカテプシンK活性はカテプシンK特異的な蛍光基質であるZ-Gly-Pro-Arg-MCA (Z: ベンジロキシカルボニル; MCA: 4メチルクマリル7アミド)を用いて確認することができた。そしてその活性はNC-2300によって濃度依存的に阻害された(図4B)。

[0078] (3) TLR刺激によるサイトカイン産生に対するカテプシン阻害の効果

次に、TLR刺激によるサイトカイン産生に対するカテプシンK阻害の効果を測定した。骨髄由来樹状細胞をペプチドグリカン(PGN)、リポポリサッカライド(LPS)、そして非メチル化CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG)で24時間刺激し、その培養上清を酵素免疫測定法(ELISA)に用いた。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (対媒体投与群)。

[0079] 酵素免疫測定法(ELISA)の解析により、樹状細胞によるサイトカイン産生はTLR2アゴニストであるペプチドグリカン(PGN)やTLR4アゴニストであるリポポリサッカライド(LPS)ではなくTLR9アゴニストである非メチル化CpG鎖を含んだオリゴデオキシヌクレオチドによって刺激されたときに産生されるIL-12やIL-23がNC-2300によって有意に阻害されることを明らかにした(図5A)。

[0080] (4) CpG処理した骨髄由来樹状細胞のサイトカインmRNA発現に対するNC-2300の効果

次に、CpG処理した骨髄由来樹状細胞のサイトカインmRNA発現に対するNC-2300の効果を測定した。骨髄由来樹状細胞はGM-CSFもしくはFlt3リガンドによって分化させた。Total RNAはCpG刺激6時間後に抽出した。

[0081] その結果、骨髄由来樹状細胞においてCpGによるIL-6、IL-12、IL-23の発現はNC-2300によりmRNAレベルで抑制され(図5B)、Flt3リガンドで分化誘導した樹状細胞のCpGによる1型IFN産生はNC-2300によって抑制された。

[0082] [実施例3]

poly(I:C) (TLR3リガンド) 及びR837 (TLR7, 8リガンド) で処理したマウス脾臓由来樹状細胞のサイトカインmRNA発現に対するNC-2300の効果

poly(I:C) 及びR837処理したマウス脾臓由来樹状細胞のサイトカインmRNA発現に対するNC-2300の効果を測定した。

脾臓を8～10週齢の雌性マウスから摘出した。摘出した脾臓から樹状細胞(DC)を分離するためにpan DCマイクロビーズを製造者(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)の指示に従って使用した。

Total RNAは刺激3時間後に抽出した。

その結果、マウス脾臓由来樹状細胞においてpoly(I:C)及びR837処理による1型IFNの発現はNC-2300によりmRNAレベルで抑制された(図6)。

また、カテプシン阻害剤であるE64dも同様にマウス脾臓由来樹状細胞において、poly(I:C)及びR837処理による1型IFNの発現をmRNAレベルで抑制した。

[0083] [実施例4]

TLR9を介した免疫反応と自己免疫性炎症のカテプシンによる調節

(1)野生型とカテプシンK遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞の電子顕微鏡写真

次に、野生型とカテプシンK遺伝子欠損マウスの骨髄由来樹状細胞の電子顕微鏡写真を図7Aに示す。

NC-2300はin vitroで骨髄由来の樹状細胞の分化には影響がなく、電子顕微鏡解析ではカテプシンK欠損マウスの骨髄由来樹状細胞は正常な細胞形態を示していた(図7A)。

[0084] (2)CpG刺激した樹状細胞におけるERKリン酸化に対するNC-2300の抑制作用

次に樹状細胞でCpGによって誘導されるシグナル系について調査をおこなった。LPSではなく、CpGによって引き起こされる樹状細胞内での細胞外シグナル制御キナーゼ1/2(ERK1/2)のリン酸化がカテプシンK不活化によって抑制されていた(図7B)。

[0085] (3)CpG誘導によるインターフェロン調節因子とNF- κ B転写因子活性化に対するカテプシンK阻害の効果(EMSA)

次に、CpG誘導によるインターフェロン調節因子(図7Cの左)とNF- κ B(図7Cの右)転写因子活性化に対するカテプシンK阻害の効果(EMSA)を測定した。

ゲルシフトアッセイ(EMSA)の結果、CpGによる樹状細胞でのIRFとNF- κ Bの

活性化がカテプシンKの不活化によって抑制されていることが明らかになった(図7C)。

- [0086] (4)NC-2300処理した樹状細胞の細胞表面分子CD40、CD80、CD86のTLRを介した発現

次に、NC-2300処理した樹状細胞の細胞表面分子CD40、CD80、CD86のTLRを介した発現の減弱を測定した。樹状細胞はCpGもしくはLPSで24時間刺激し、フローサイトメトリーで解析した。

その結果NC-2300の処理により、樹状細胞でCD40、CD80、CD86の発現が減少した(図8A)。したがって、カテプシン類の不活化が樹状細胞のTLR9シグナルの下流経路を抑制したことから、カテプシン類がTLR9の近位のシグナルに重要な役割を担っていることが示唆された。

- [0087] (5)カテプシンK遺伝子欠損マウス由来樹状細胞におけるCpGの取り込み

カテプシンK遺伝子欠損マウス由来樹状細胞におけるCpGの取り込みを測定した。樹状細胞はCpG-FITC存在下で4°Cもしくは37°Cで培養した。細胞内活性はフローサイトメトリーで解析した。

その結果、カテプシンK欠損マウスの樹状細胞ではCpGのエンドサイトーシスには影響がみられなかった(図8B)。

- [0088] (6)LPSもしくはCpGによる野生型もしくはカテプシンK遺伝子欠損マウス由来樹状細胞のサイトカイン産生

次に、LPSもしくはCpGによる野生型もしくはカテプシンK遺伝子欠損マウス由来樹状細胞のサイトカイン産生を測定した。クロロキンはエンドソームの酸性化を抑制するため刺激1時間前に加えた。N. D. 検出できず。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (対野生型)。

その結果、カテプシンK欠損マウスの樹状細胞でCpGによるIL-12とIL-6の産生が著しく減少していることを観察した。ところがLPSによるこれらサイトカインの産生には影響が見られなかった(図8C)。

カテプシンK欠損マウスの樹状細胞におけるサイトカイン産生はクロロキリン添加によってより一層抑制された(図8C)。このことは、わずかであるが他のpH感受性酵素の

関与もあることを示唆している。従って、クロロキンの効果は、これら酵素の阻害、主にカテプシンKの阻害を介しているものと考えている。

薬剤によってカテプシンKを阻害したことによって得られた結果から、この酵素のタンパク質分解活性がCpG-TLR9シグナルにおいて重要であることを明確に示唆している。

[0089] (7)カテプシンK遺伝子欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症度

カテプシンKが破骨細胞非依存的に自己免疫性炎症で重要な役割を担っていることを明らかにするために、カテプシンK欠損マウスを用いてTLR9シグナルが強く関与するとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルの作製を試みた。

図9Aに対照群(野生型とカテプシン1欠損マウス)とカテプシンK遺伝子欠損マウスにおけるEAEのクリニカルスコアを示す。

図9Bに、免疫後21日目の対照マウスとカテプシンK遺伝子欠損マウスの脊髄切片の病理学的解析結果を示す。野生型とカテプシンK遺伝子欠損マウスからの腰髄切片は炎症を評価するためにヘマトキシリンとエオシンで染色して(HE染色)、CD3を免疫染色して(抗CD3染色)、そしてミエリン量を評価するためにルクソールファーストブルー(LFB染色)で染色した。矢印は炎症細胞の浸潤(HE染色)と脱髄範囲(LFB染色)を示している。

[0090] その結果、野生型とカテプシンK欠損マウスの間にEAEの発症頻度には違いは見られなかったが、カテプシンK欠損マウスでは麻痺の重症度がコントロールマウスよりより低くなっていた(図9A)。また、脊髄の病理学的解析において、カテプシンK欠損マウスでは炎症(図9B上、HE staining)、T細胞の浸潤(図9B中、anti-CD3 staining)および脱髄(図9B下、LFB staining)が劇的に減少していることが示された。

[0091] (8)LPSもしくはPGNではなくCpGによるTh17分極のカテプシンK不活化の影響

LPSもしくはPGNではなくCpGによるTh17分極がカテプシンK不活化による影響を測定した。

CD4陽性T細胞と樹状細胞は脾臓から調製し、3日間CpG、LPSもしくはPGNの

存在下で共培養した。培養後、CD3e陽性CD4陽性IL-17陽性細胞の存在率をフローサイトメトリーで解析した。

IL-17の細胞内染色法によってTh17細胞の誘導に対するNC-2300の効果を評価した。その結果、樹状細胞をCpGで刺激したときのみ、樹状細胞のTh17細胞誘導能がカテプシン類の不活化によって顕著に阻害された(図10)。

図面の簡単な説明

[0092] [図1]NC-2300の構造式を示す。

[図2]NC-2300とアレンドロネートのアジュバント関節炎に関する実験結果を示す図である。

[図3]NC-2300とアレンドロネートのアジュバント関節炎に関する実験結果を示す図である。

[図4]カテプシンK mRNAの発現及びカテプシンK活性を示す図である。

[図5]カテプシン阻害に基づく骨髄由来樹状細胞(BM-DCs)のTLR9シグナルの選択的抑制を示す図である。

[図6]カテプシン阻害に基づくTLR3, 7, 8シグナルの選択的抑制を示す図である。

[図7]電子顕微鏡写真及びカテプシン阻害の効果を示す図である。

[図8]TLR9を介した免疫反応と自己免疫性炎症とカテプシン類による調節を示す図である

[図9]野生型とカテプシンK欠損マウスでのEAEの発症頻度を示す図である。

[図10]Th17細胞の誘導に対するNC-2300の効果を示す図である。

符号の説明

[0093] 図2のA 足関節の軟X線評価

図2のB 足関節の軟X線評価

図2のC 骨密度の測定

図2のD 骨中無機質密度の測定

図3のA 足蹠浮腫の効果

図3のB 後肢足蹠の評価

図3のC 行動量の回復

図4のA mRNAの発現のRT-PCR解析

図4のB カテプシンK活性の測定

図5のA カテプシンK阻害の効果

図5のB サイトカインmRNAの発現

図6のA TLR3シグナルの阻害

図6のB TLR7, 8シグナルの阻害

図7のA 電子顕微鏡写真

図7のB ERK1/2のリン酸化

図7のC カテプシンK阻害の効果

図8のA フローサイトメトリー解析

図8のB フローサイトメトリー解析

図8のC サイトカインの産生

図9のA EAEの臨床スコア

図9のB 脊髄切片の病理学的解析

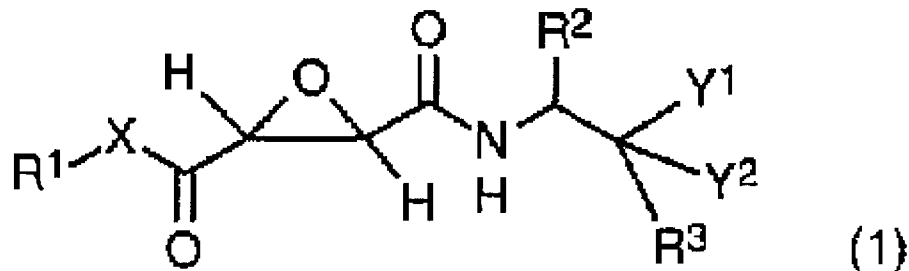
請求の範囲

- [1] カテプシン阻害剤を有効成分として含有するToll様受容体のシグナル伝達の調整剤。
- [2] カテプシン阻害剤を有効成分として含有するToll様受容体のシグナル伝達が関与する疾患の治療剤。
- [3] Toll様受容体がTLR3、TLR7、TLR8又はTLR9から選択される請求項1又は2記載の調整剤又は治療剤。
- [4] Toll様受容体がTLR9である請求項1又は2記載の調整剤又は治療剤。
- [5] カテプシン阻害剤を有効成分として含有するTh17細胞の誘導が関与する疾患の治療剤。
- [6] カテプシン阻害剤を有効成分として含有するIL-6、IL-12、IL-17又はIL-23の産生が関与する疾患の治療剤。
- [7] 疾患が免疫関連疾患、骨関連疾患及び癌疾患から選択される請求項2～6の何れかの項に記載の治療剤。
- [8] 疾患が、自己免疫疾患である請求項2～6の何れかの項に記載の治療剤。
- [9] カテプシン阻害剤を有効成分として含有する全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、クローン病、乾癬、又は急性散在性脳脊髄炎の治療剤。
- [10] カテプシン阻害剤が、カテプシンK阻害剤、カテプシンL阻害剤、カテプシンB阻害剤、カテプシンH阻害剤又はカテプシンS阻害剤から選択される請求項1～9の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [11] カテプシン阻害剤が、カテプシンK阻害剤である請求項1～9の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [12] カテプシン阻害剤が、N-[1-[(シアノメチル)カルバモイル]シクロヘキシル]-4-(4-プロピルピペラジン-1-イル)ベンズアミド、N-[(1S)-3-メチル-1-[(4S, 7R)-7-メチル-3-オキソ-1-(ピリジン-2-イルスルホニル)ヘキサヒドロ-1H-アゼピン-4-イル]カルバモイル]ブチル]-1-ベンゾフラン-2-カルボキサミド、(2R)-N-シアノメチル-4-メチル-2-(4'-ピペラジン-1-イル-1, 1'-ビフェニル-3-イル)ペンタンアミド、N-[3-[(2Z)-2-(3-メチ

ルー1, 3-チアゾリジン-2-イリデン)ヒドラジノ]-2, 3-ジオキソ-1-テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルプロピル]シクロヘプタンカルボキサミド、N-シアノメチル-4-メチル-2-[2, 2, 2-トリフルオロ-1-(4'-メチルスルホニル-1, 1'-ビフェニル-4-イル)エチルアミノ]ペンタンアミド、又は(2S, 3S)-3-[[(1S)-1-イソプトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウムから選択される請求項1~9の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。

[13] カテプシン阻害剤が、次の一般式(1)で表わされるエポキシコハク酸アミド誘導体またはその生理学的に許容できる塩である請求項1~9記載の調整剤又は治療剤。

[化1]



[上記の式において、R¹は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり；R²は、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり；R³は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が2~10のアルケニル基、炭素原子数が2~10のアルキニル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキ

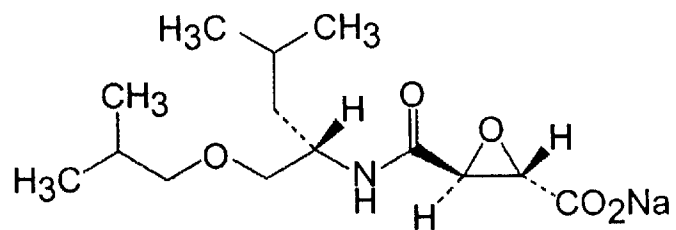
ル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり;Xは、-O-または-NR⁴- (R⁴は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)であり;Y¹は、OR⁵ (R⁵は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、SR⁶ (R⁶は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、またはNR⁷R⁸ (R⁷は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が2~20のアシル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基であり、そしてR⁸は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)であり;そしてY²は、水素原子または炭素原子数が1~10のアルキル基である;あるいは、Y¹とY²とは一緒になって、=O、=S、=N-R⁹ (R⁹は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12

の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)、あるいは=N-OR¹⁰(R¹⁰は、水素原子、炭素原子数が1~10のアルキル基、炭素原子数が6~20のアリール基、炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなるアラルキル基、炭素原子数が3~12の複素環基、または炭素原子数が3~12の複素環基と炭素原子数が1~6のアルキル基とからなる複素環アルキル基である)を表わしてもよい; なお、上記R⁵~R¹⁰のアルキル基はいずれも、ヒドロキシ基、アミノ基、炭素原子数が1~6のアルキルアミノ基、合計炭素原子数が2~12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が1~6のアルコキシ基、カルボキシ基、炭素原子数が2~7のアルコキシカルボニル基、カルバモイル基、炭素原子数が2~7のアルキルアミノカルボニル基、合計炭素原子数が3~13のジアルキルアミノカルボニル基、およびグアニジノ基からなる群より選ばれる一もしくは二以上の置換基を有していてもよく、また上記R¹~R¹⁰の各アリール基および各複素環基は、炭素原子数が1~6のアルキル基、ヒドロキシ基、アミノ基、炭素原子数が1~6のアルキルアミノ基、合計炭素原子数が2~12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が1~6のアルコキシ基、ハロゲン原子、炭素原子数が1~6のハロアルキル基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、炭素原子数が2~7のアルコキシカルボニル基、カルバモイル基、炭素原子数が2~7のアルキルアミノカルボニル基、合計炭素原子数が3~13のジアルキルアミノカルボニル基、アミジノ基、およびグアニジノ基からなる群より選ばれる一もしくは二以上の置換基を有していてもよい]。

- [14] 一般式(1)のR¹が、水素原子または炭素原子数が1~6のアルキル基である請求項13記載の調整剤又は治療剤。
- [15] 一般式(1)のR²が、炭素原子数が1~6のアルキル基、フェニル基又はベンジル基である請求項13又は14記載の調整剤又は治療剤。
- [16] 一般式(1)のR³が、水素原子または炭素原子数が6~20のアリール基である請求項13~15の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [17] 一般式(1)のXが、-O-である請求項13~16の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。

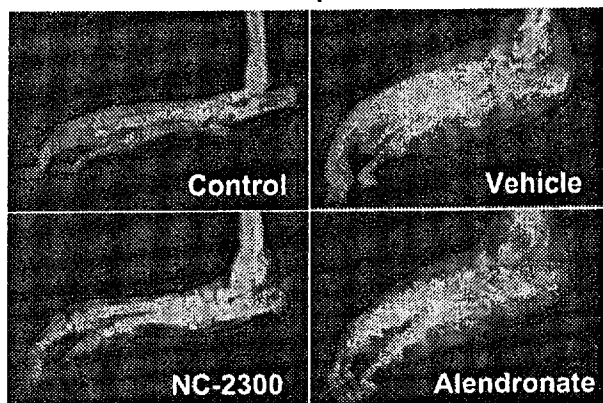
- [18] 一般式(1)の Y^1 が、ヒドロキシル基、炭素原子数が1~6のアルコキシ基、アセトキシ基、又は炭素原子数が6~20のアリール基と炭素原子数が1~6のアルキル基からなるアラルキルオキシ基である請求項13~17の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [19] 一般式(1)の R^2 が、イソブチル基またはイソプロピル基であり、 R^3 が水素原子であり、 Y^1 が OR^5 (R^5 は請求項13と同じ)であり、そして Y^2 が水素原子である請求項13、14又は17のうちの何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [20] 一般式(1)の R^2 がイソブチル基またはイソプロピル基であり、 R^3 が炭素原子数が6~20のアリール基であり、 Y^1 が OR^5 (R^5 は請求項13と同じ)であり、そして Y^2 が水素原子である請求項13、14又は17の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [21] 一般式(1)の Y^1 と Y^2 とが一緒になって、 $=O$ を形成する請求項13~17の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [22] 生理学的に許容できる塩がアルカリ金属塩である請求項13~21の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。
- [23] カテプシン阻害剤が、(2S, 3S)-3-[[(1S)-1-イソブトキシメチル-3-メチルブチル]カルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸モノナトリウムである請求項1~9の何れかの項に記載の調整剤又は治療剤。

[図1]

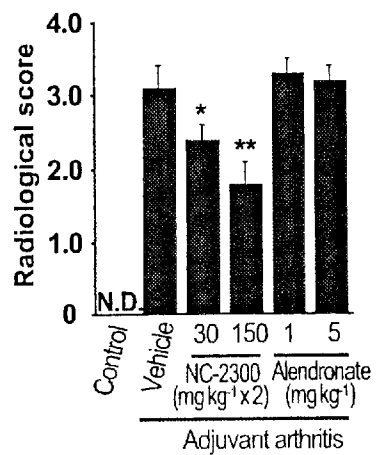


[図2]

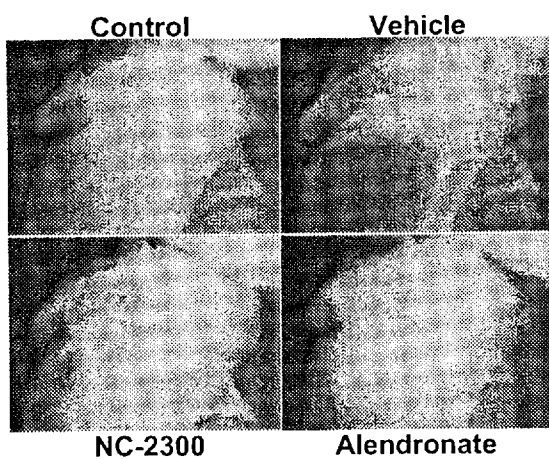
A Hind paw



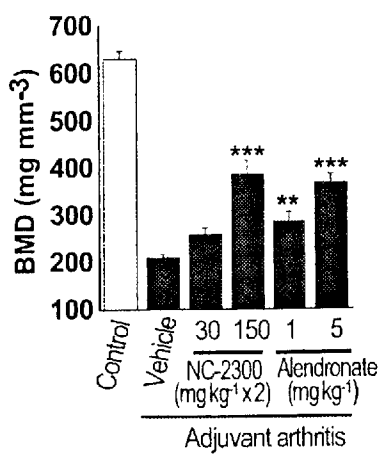
B



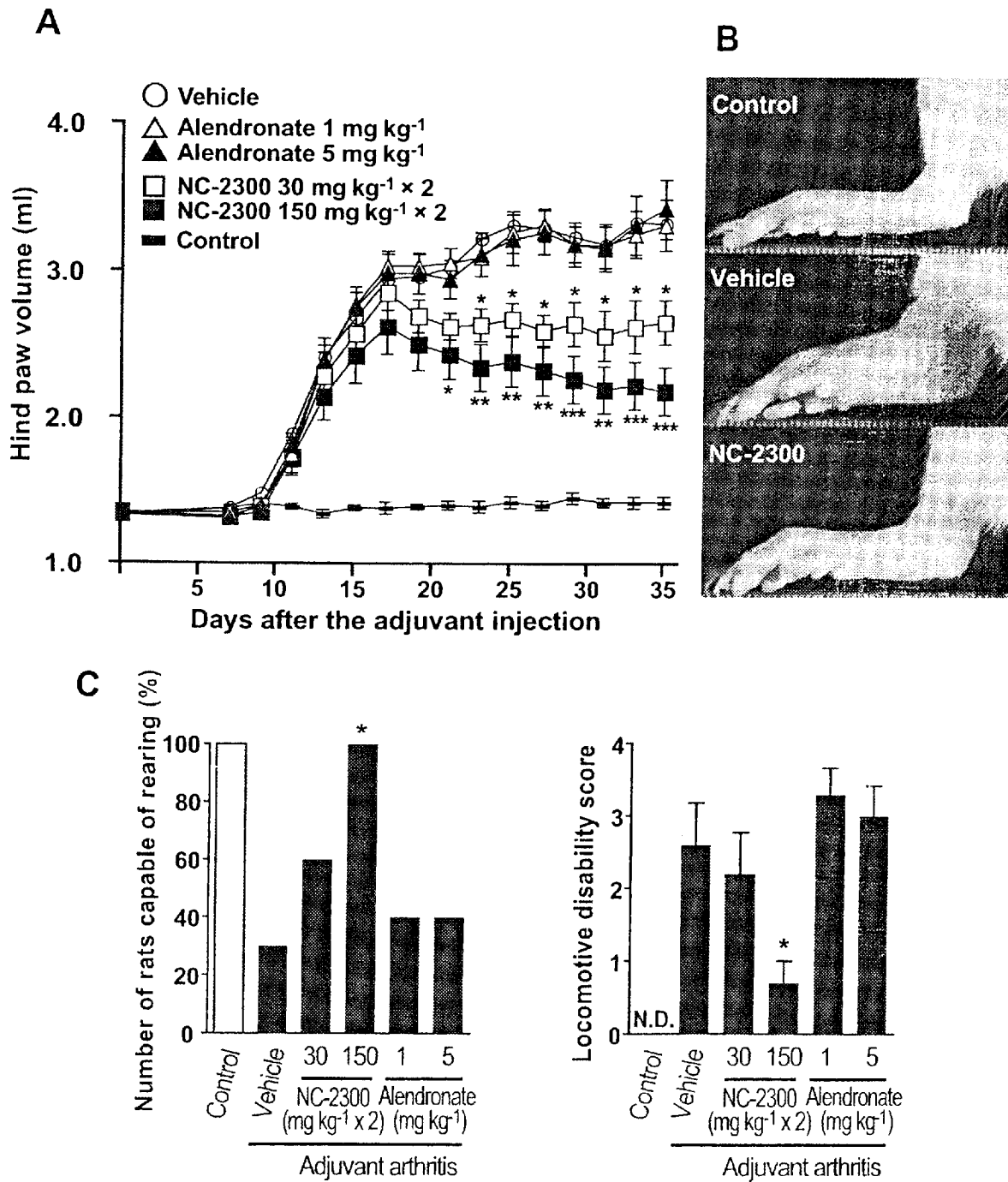
C Proximal tibia



D

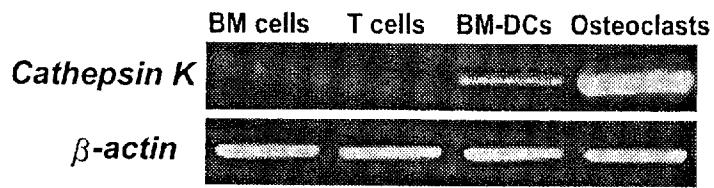


[図3]

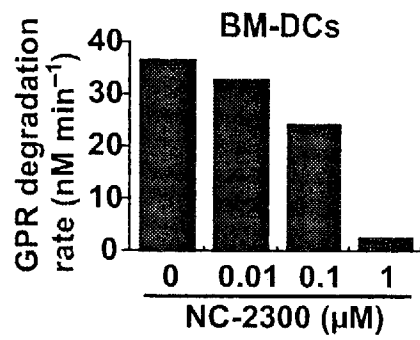


[図4]

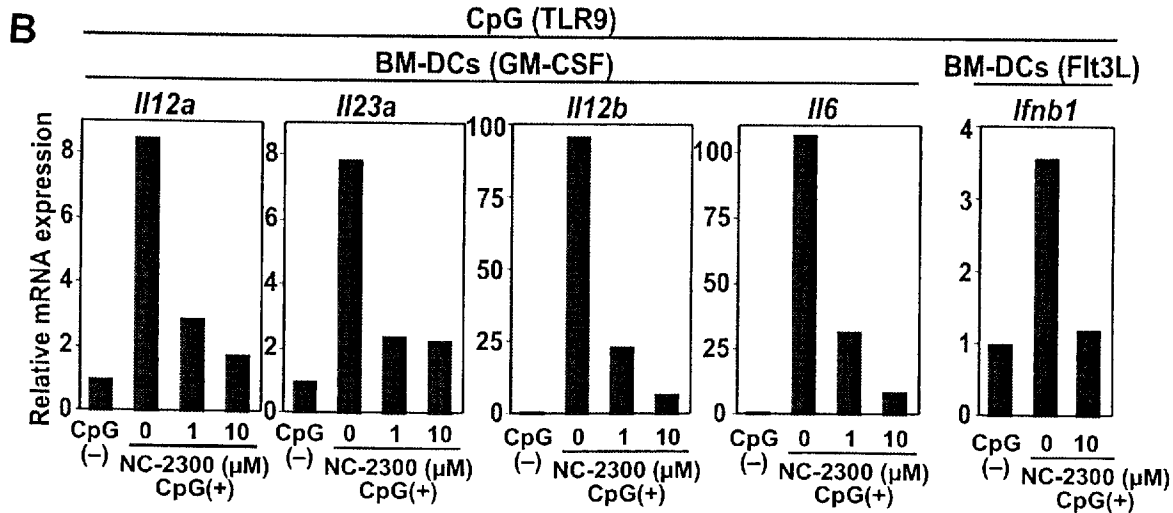
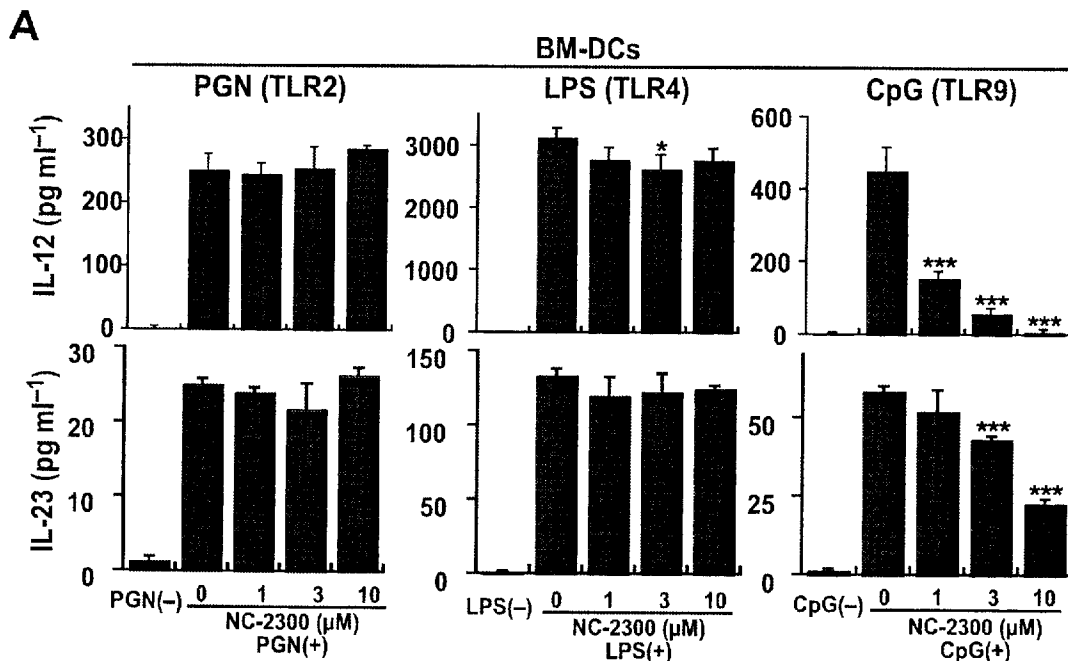
A



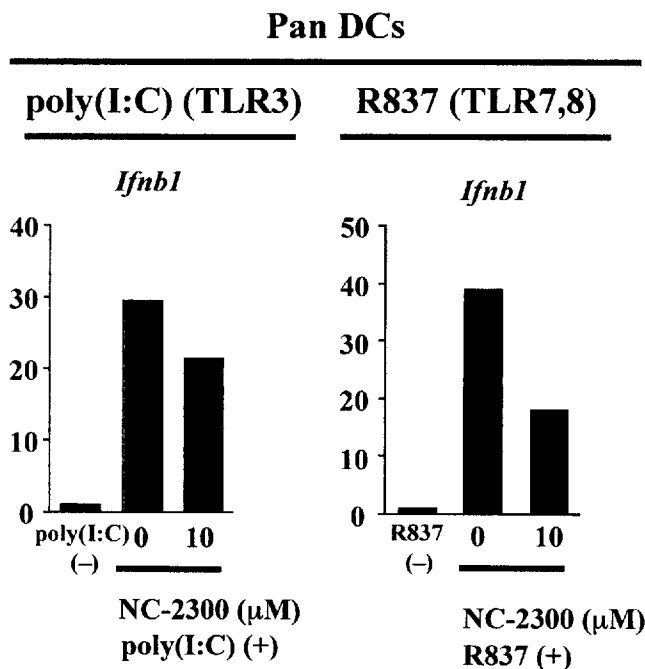
B



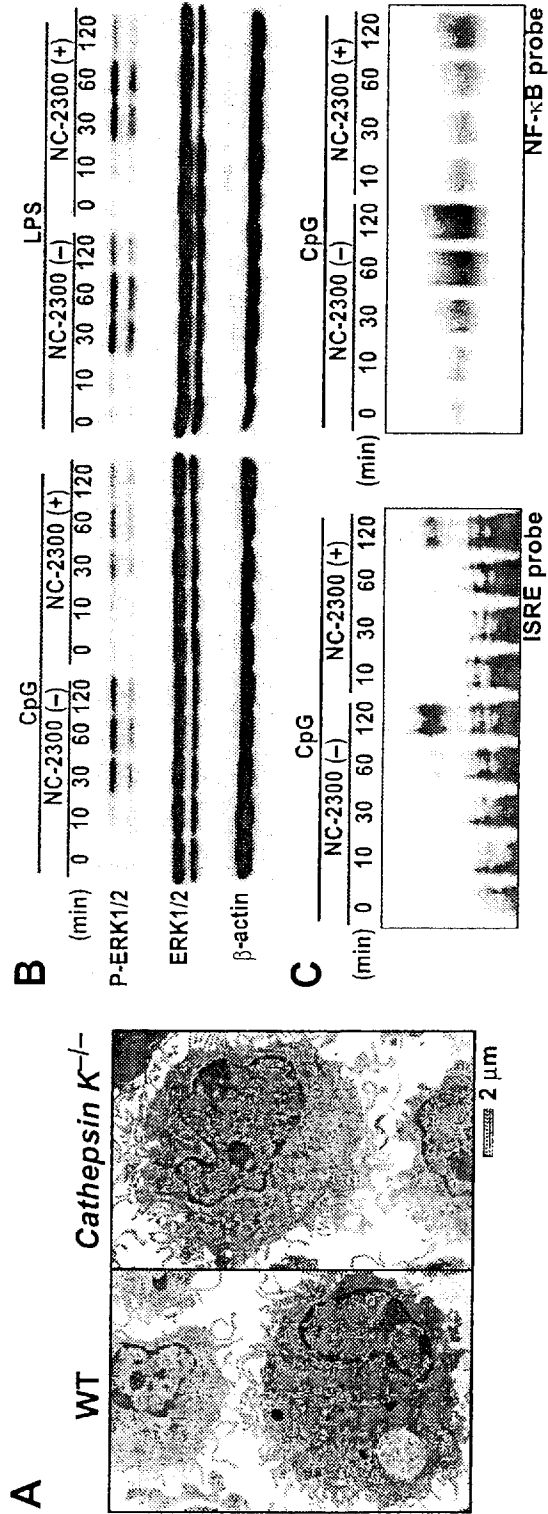
[圖5]



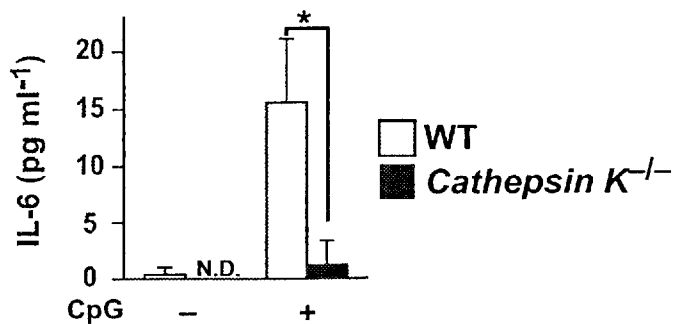
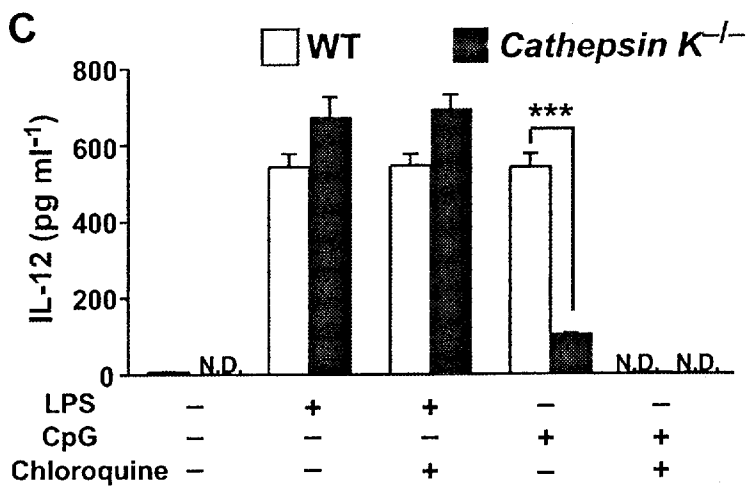
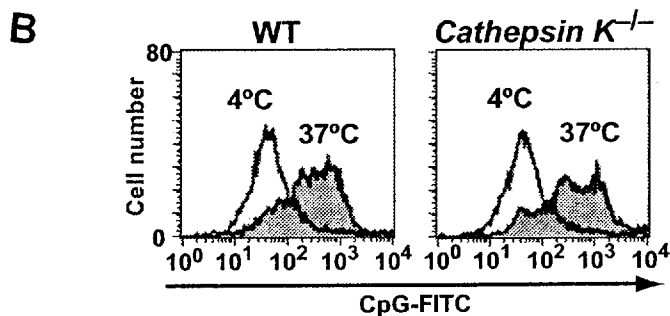
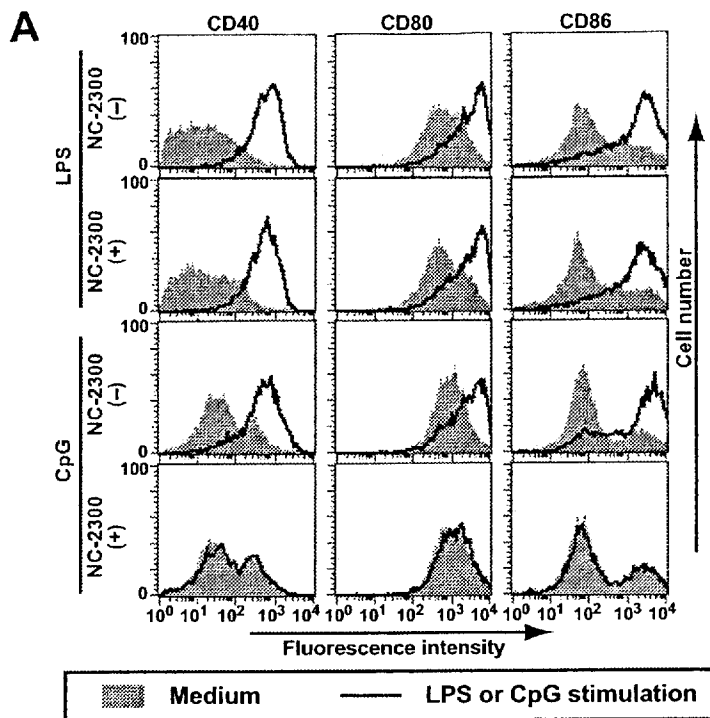
[圖6]



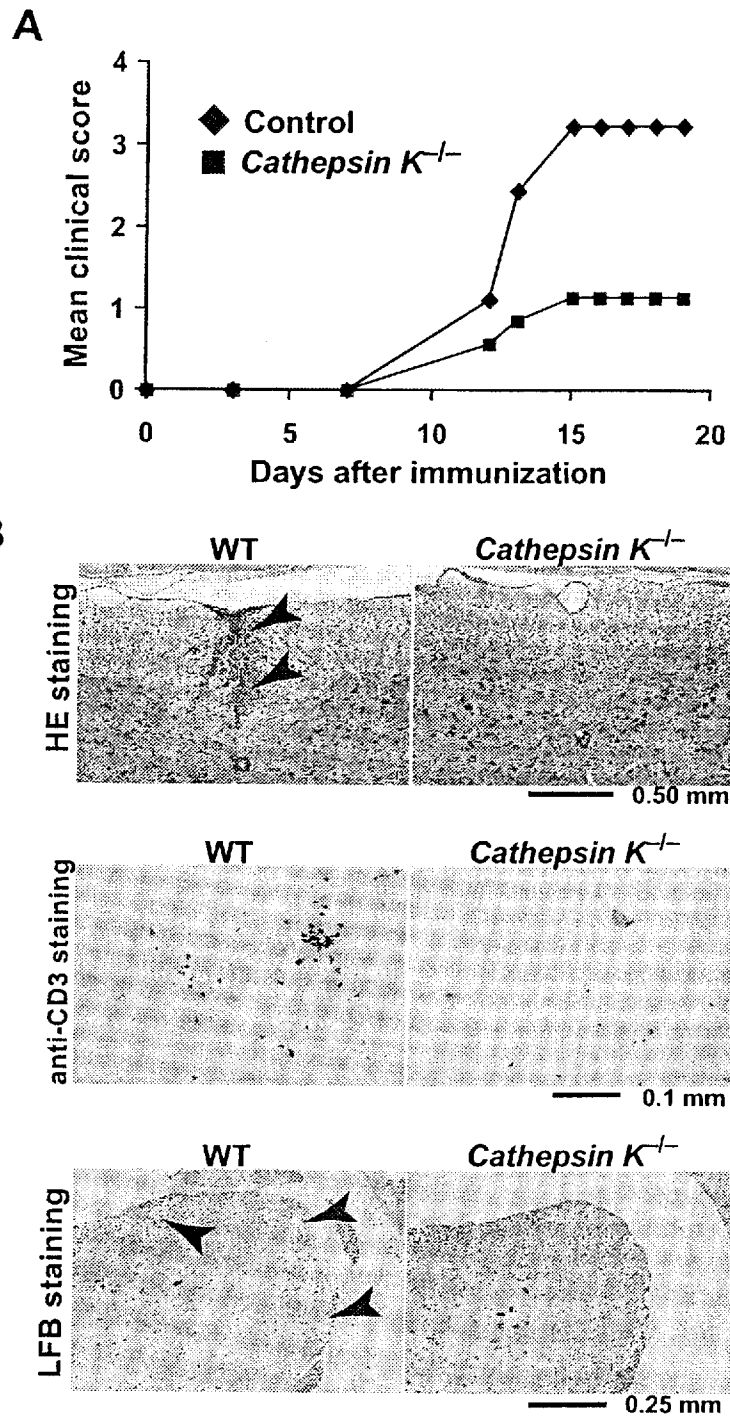
[図7]



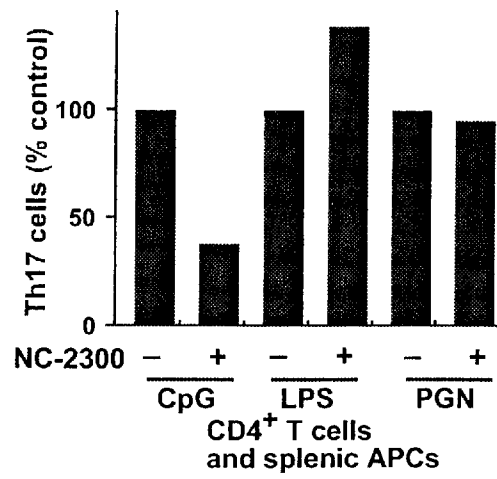
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069235

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet. | | |
|--|---|--|
| 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) A61K45/00, A61K31/336, A61P1/04, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/06, A61P19/00, A61P25/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C07D303/48 | | |
| 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 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y | WO 1999/11640 A1 (NIPPON CHEMIPHAR CO., LTD.), 11 March, 1999 (11.03.99), Full text & US 2002/0091131 A1 & EP 1022276 A1 & AU 8997898 A | 1-8, 10-23 9 |
| X | JP 6-336428 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 06 December, 1994 (06.12.94), Full text (Family: none) | 8-10 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 07 November, 2008 (07.11.08) | | Date of mailing of the international search report 18 November, 2008 (18.11.08) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069235

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP 2002-539190 A (AXYS PHARMACEUTICALS, INC.), 19 November, 2002 (19.11.02), Full text; particularly, Claims 10 to 17; Par. Nos. [0001] to [0006] & US 2003/0092634 A1 & EP 1159260 A & WO 2000/055124 A & AU 3895900 A | 7-11 |
| X | JP 2003-519125 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 17 June, 2003 (17.06.03), Full text; particularly, Claims 27 to 35; Par. Nos. [0005] to [0008], [0039] to [0043] & US 2001/0008901 A1 & EP 1244621 A & WO 2001/047886 A1 | 7, 8, 10, 11 |
| X | JP 2005-501017 A (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.), 13 January, 2005 (13.01.05), Full text; particularly, Claims 20 to 27; Par. Nos. [0001] to [0009], [0275] to [0276] & US 2003/0119827 A1 & EP 1399431 A & WO 2002/100849 A2 | 7-11 |
| X | JP 2000-509376 A (Massachusetts Institute of Technology), 25 July, 2000 (25.07.00), Full text & US 2003/0166534 A1 & EP 912601 A & WO 1997/040066 A1 & AU 2741897 A | 8-10 |
| X | JP 2006-519768 A (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.), 31 August, 2006 (31.08.06), Full text & US 2004/0180886 A1 & EP 1606258 A & WO 2004/083182 A1 | 8-10 |
| X | JP 2006-505526 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 16 February, 2006 (16.02.06), Full text; particularly, Claim 6; Par. No. [0004] & US 2005/0030912 A1 & EP 1539178 A & WO 2004/017911 A2 | 8, 10 |
| X | JP 2004-526662 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 02 September, 2004 (02.09.04), Full text; particularly, Claims 37, 38, 45 to 47; Par. Nos. [0001] to [0003], [0006], [0058] & US 2004/0229863 A1 & EP 1278502 A & WO 2001/089451 A2 | 8, 10 |
| X | WO 2006/109045 A2 (THE QUEEN'S OF BELFAST), 19 October, 2006 (19.10.06), Full text & EP 1879923 A & JP 2008-534026 A | 8, 10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069235

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TSUKUBA T. et. al., Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors, Journal of Biochemistry, 2006, Vol.140, No.1, P.57-66 | 1-3, 6 |
| P, X | ASAGIRI M. et. al., Cathepsin K-Dependent Toll-Like Receptor 9 Signaling Revealed in Experimental Arthritis, Science, 2008.02.01, Vol.319, No.5863, P.624-627 | 1-23 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069235

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/336(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i,
A61P11/06(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i,
A61P19/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P37/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D303/48(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/069235

Claims 1-11

With regard to the term "a cathepsin inhibitor", it is unclear as to what types of components are specifically included within or excluded from the scope of the term. Therefore, with regard to these claims, the international search could not be made completely.

| | | | |
|---|--|---|------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照 | | | |
| 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 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00, A61K31/336, A61P1/04, A61P11/06, A61P13/12, A61P17/06, A61P19/00, A61P25/00, A61P35/00, A61P37/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P37/08, A61P43/00, C07D303/48 | | | |
| 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008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) C A p l u s (STN)、MEDLINE (STN)、J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | |
| 引用文献の 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 請求の範囲の番号 | |
| X Y | WO 1999/11640 A1 (NIPPON CHEMIPHAR CO. LTD.) 1999.03.11, 全文 & US 2002/0091131 A1 & EP 1022276 A1 & AU 8997898 A | 1-8, 10-23 9 | |
| X | JP 6-336428 A (武田薬品工業株式会社) 1994.12.06, 全文 (ファミリーなし) | 8-10 | |
| X | JP 2002-539190 A (AXYS PHARMACEUTICALS, INC.) 2002.11.19, 全文、特に請求項 10~17、【0001】~【0006】 & US 2003/0092634 A1 & EP 1159260 A & WO 2000/055124 A & AU 3895900 A | 7-11 | |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 | | の日の後に公表された文献 | |
| 「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 | | 「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 | |
| 「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 | | 「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 | |
| 「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) | | 「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 | |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」 同一パテントファミリー文献 | |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | |
| 国際調査を完了した日 07. 11. 2008 | 国際調査報告の発送日 18. 11. 2008 | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 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) 田村 聖子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 | 4C | 9051 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の 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 請求の範囲の番号 |
| X | JP 2003-519125 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AKTIENGESELLSCHAFT) 2003.06.17, 全文、特に請求項27～35、【0005】～【0008】、【0039】～【0043】 & US 2001/0008901 A1 & EP 1244621 A & WO 2001/047886 A1 | 7, 8, 10, 11 |
| X | JP 2005-501017 A (ベーリンガー インゲルハイム ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2005.01.13, 全文、特に請求項20～27、【0001】～【0009】、【0275】～【0276】 & US 2003/0119827 A1 & EP 1399431 A & WO 2002/100849 A2 | 7-11 |
| X | JP 2000-509376 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 2000.07.25, 全文 & US 2003/0166534 A1 & EP 912601 A & WO 1997/040066 A1 & AU 2741897 A | 8-10 |
| X | JP 2006-519768 A (ベーリンガー インゲルハイム ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2006.08.31, 全文 & US 2004/0180886 A1 & EP 1606258 A & WO 2004/083182 A1 | 8-10 |
| X | JP 2006-505526 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2006.02.16, 全文、特に請求項6、【0004】 & US 2005/0030912 A1 & EP 1539178 A & WO 2004/017911 A2 | 8, 10 |
| X | JP 2004-526662 A (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 2004.09.02, 全文、特に請求項37、38、45～47、【0001】～【0003】、【0006】、【0058】 & US 2004/0229863 A1 & EP 1278502 A & WO 2001/089451 A2 | 8, 10 |
| X | WO 2006/109045 A2 (THE QUEEN'S OF BELFAST) 2006.10.19, 全文 & EP 1879923 A & JP 2008-534026 A | 8, 10 |
| X | TSUKUBA T. et. al., Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors, Journal of Biochemistry, 2006, Vol. 140, No. 1, P. 57-66 | 1-3, 6 |
| PX | ASAGIRI M. et. al., Cathepsin K-Dependent Toll-Like Receptor 9 Signaling Revealed in Experimental Arthritis, Science, 2008.02.01, Vol. 319, No. 5863, P. 624-627 | 1-23 |

発明の属する分野の分類

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/336(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P11/06(2006.01)i,
A61P13/12(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07D303/48(2006.01)i

請求の範囲 1-11について

「カテプシン阻害剤」なる語には、具体的にどの成分が包含され、また、含まれないのかが不明確となっている。したがって、これらの範囲については、完全な国際調査を行うことができなかった。