

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-517888

(P2016-517888A)

(43) 公表日 平成28年6月20日 (2016. 6. 20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 J</b> 9/00 (2006.01)	<b>C 0 7 J</b> 9/00 <b>C S P</b>	4 C 0 8 1
<b>A 6 1 K</b> 31/575 (2006.01)	<b>A 6 1 K</b> 31/575	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P</b> 19/00 (2006.01)	<b>A 6 1 P</b> 19/00	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P</b> 19/10 (2006.01)	<b>A 6 1 P</b> 19/10	4 C 0 9 1
<b>A 6 1 K</b> 35/32 (2015.01)	<b>A 6 1 K</b> 35/32	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-512081 (P2016-512081)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月2日 (2014. 5. 2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年1月4日 (2016. 1. 4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/036680  
 (87) 国際公開番号 W02014/179756  
 (87) 国際公開日 平成26年11月6日 (2014. 11. 6)  
 (31) 優先権主張番号 61/818, 825  
 (32) 優先日 平成25年5月2日 (2013. 5. 2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607 オークランド フランクリン ス  
 トリート 1111 トウエルフス フロ  
 ア  
 (74) 代理人 100107984  
 弁理士 廣田 雅紀  
 (74) 代理人 100102255  
 弁理士 小澤 誠次  
 (74) 代理人 100096482  
 弁理士 東海 裕作  
 (74) 代理人 100188352  
 弁理士 松田 一弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨選択的骨形成のオキシステロール骨標的薬剤

## (57) 【要約】

骨障害の治療のための化合物及び組成物が示される。骨障害の治療のためのオキシステロール化合物及び組成物が示される。本化合物は、3 - 位置、6 - 位置、又は20 - 位置に結合したテトラサイクリンフラグメントからなどのBTA - リンカーと(3S, 5S, 6S, 8R, 9S, 10R, 13S, 14S, 17S) - 17 - [(2S) - 2 - ヒドロキシオクタン - 2 - イル] - 10, 13 - ジメチル - 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 - テトラデカヒドロ - 1H - シクロペンタ[a]フェナントレン - 3, 6 - ジオールの抱合体又は誘導体である。これらの骨形成オキシステロール化合物は、ヘッジホッグシグナル経路を刺激するさまざまなリンカー単位は特定のエステラーゼに感受性がある。

【選択図】 図7

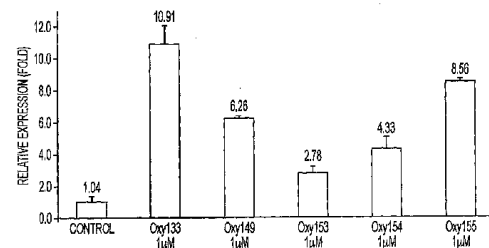
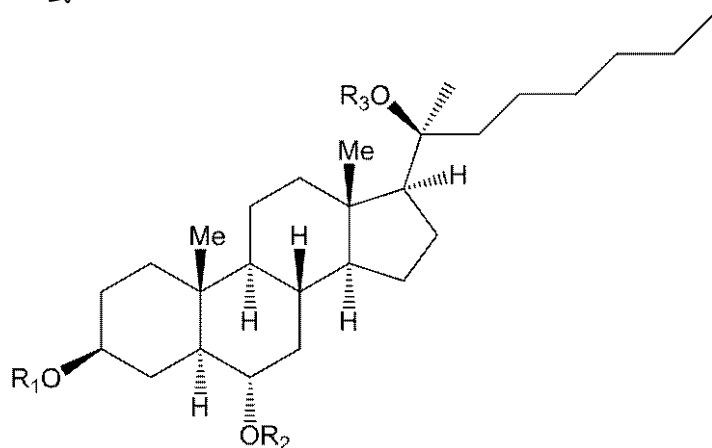


FIG. 7

## 【特許請求の範囲】

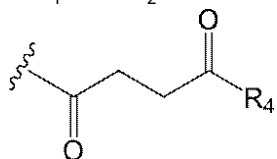
## 【請求項 1】

式

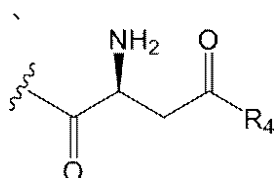


10

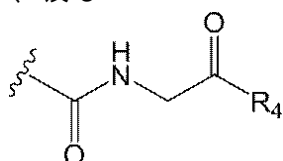
の化合物であって、

 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  が独立して水素、

20

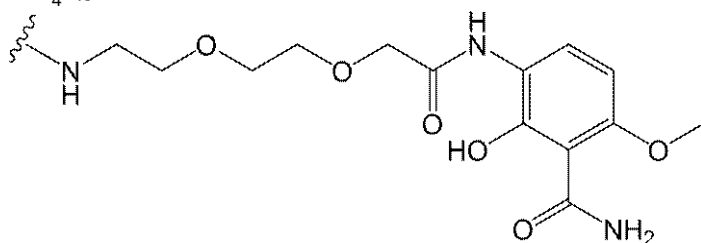


、及び



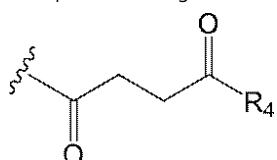
30

、から成る群から選択され、

 $R_4$  が

40

であり、

 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  のうち少なくとも1つが水素ではなく、 $R_1$  及び  $R_3$  が水素である場合、 $R_2$  が

ではない、前記化合物。

## 【請求項 2】

 $R_3$  が水素である、請求項 1 に記載の化合物。

50

## 【請求項 3】

$R_2$  が水素であり、 $R_3$  が水素である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 4】

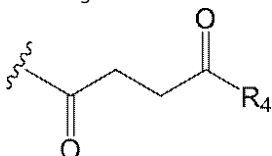
$R_1$  が水素であり、 $R_3$  が水素である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

$R_3$  が水素であり、 $R_1$  が水素ではなく、 $R_2$  が水素ではない、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

$R_3$  が水素であり、 $R_1$  及び  $R_2$  がそれぞれ

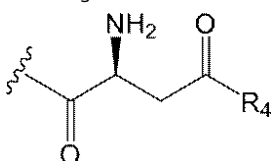


10

である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

$R_3$  が水素であり、 $R_1$  及び  $R_2$  がそれぞれ

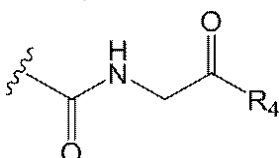


20

である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

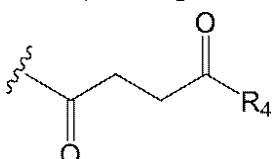
$R_3$  が水素であり、 $R_1$  及び  $R_2$  がそれぞれ



である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

$R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  がそれぞれ

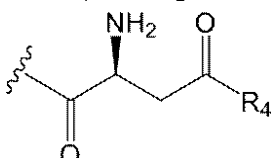


30

である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 10】

$R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  がそれぞれ

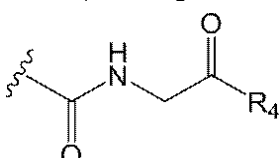


40

である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 11】

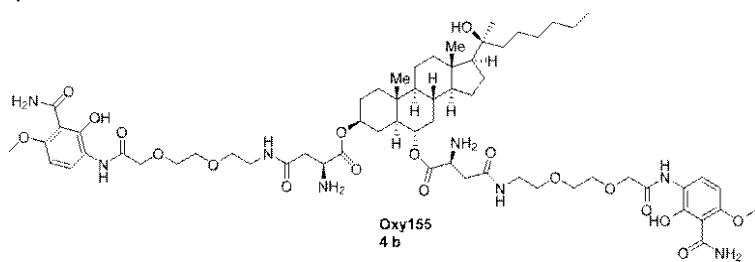
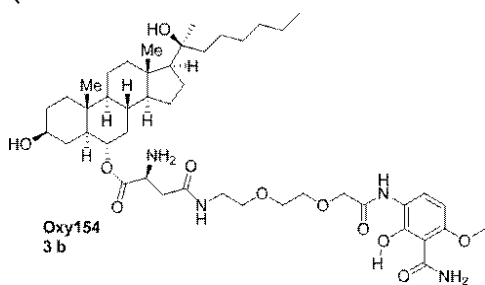
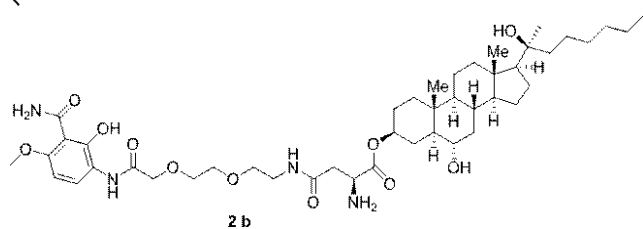
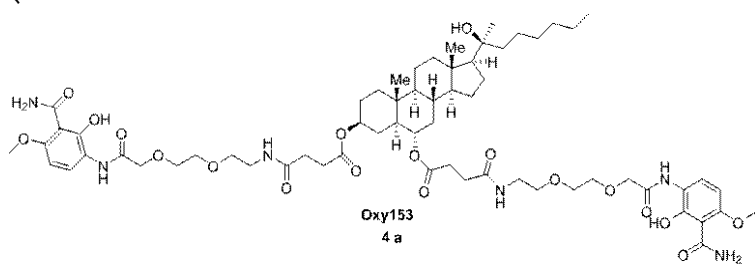
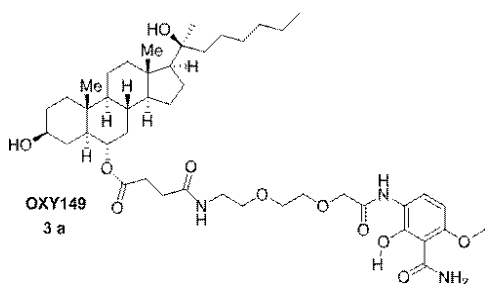
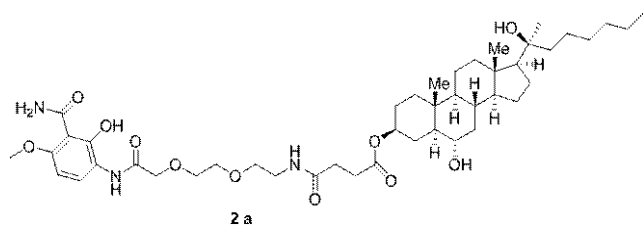
$R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  がそれぞれ

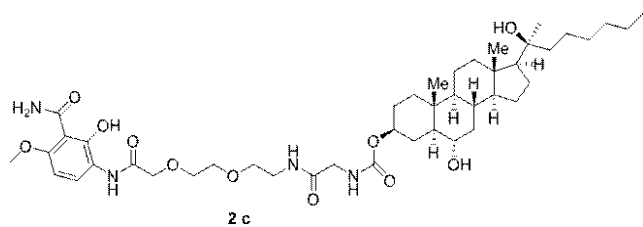


である、請求項 1 に記載の化合物。

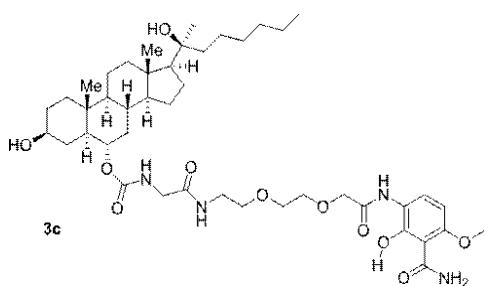
## 【請求項 12】

50

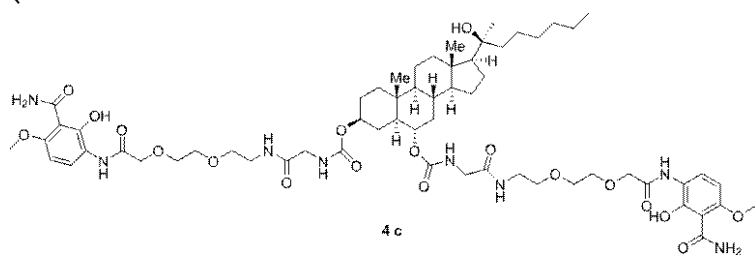




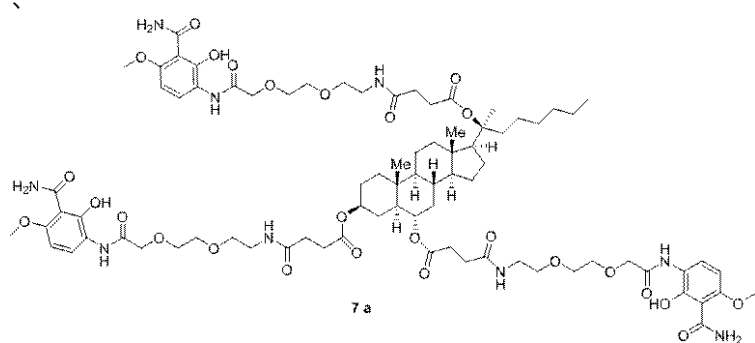
2c



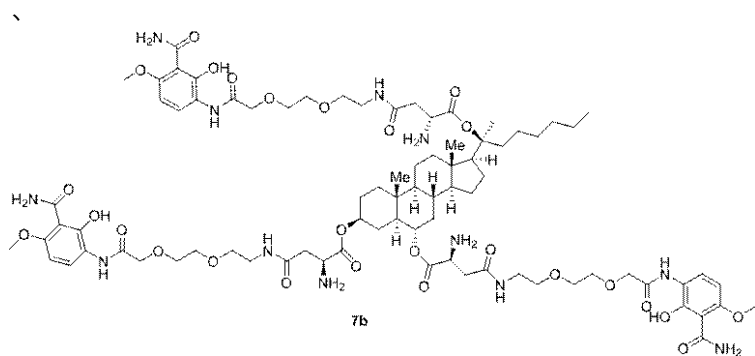
3c



4c



7a



7b

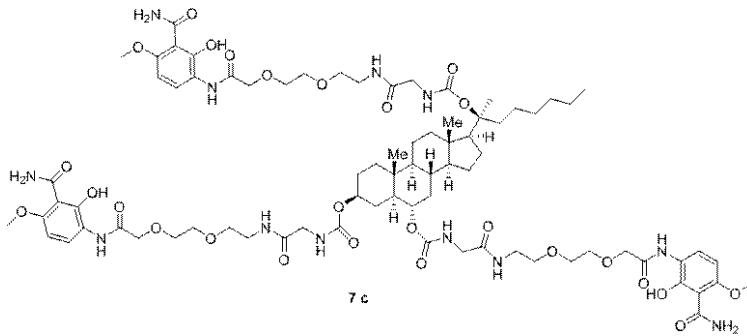
、及び

10

20

30

40



から成る群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

請求項 1 の化合物及び薬学的に許容されるキャリア又は希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 1 4】

対象に効果的な量の請求項 1 の化合物を投与することを含む、骨障害を患っている対象（ヒト又は動物）を治療する方法。

【請求項 1 5】

前記の化合物が局所送達をもたらすように対象に投与される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記の化合物が全身送達をもたらすように対象に投与される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記の骨障害が骨折、骨粗鬆症、及び骨基質減少症から成る群から選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

骨芽前駆細胞に効果的な量の請求項 1 の化合物を接触させることを含む、骨障害を患っている対象（ヒト又は動物）を治療する方法。

【請求項 1 9】

前記の骨芽前駆細胞が *in vitro* で前記の化合物と接触する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

対象に請求項 1 8 の接触された骨芽前駆細胞を投与することを含む、骨障害を患っている対象（ヒト又は動物）を治療する方法。

【請求項 2 1】

前記の接触された骨芽前駆細胞が対象に局所に投与される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記の接触された骨芽前駆細胞が対象に全身に投与される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

細胞のヘッジホッグシグナル経路が刺激されるように細胞に効果的な量の請求項 1 の化合物を投与することを含む、細胞を治療する方法

【請求項 2 4】

前記の細胞が組織又は器官の一部である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記の化合物が *in vivo*（局所に及び / 又は全身に）で投与される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

組織又は器官のヘッジホッグシグナル経路が刺激されるように請求項 2 3 に示した組織又は器官の細胞治療することを含む、組織又は器官のヘッジホッグシグナル経路の治療的活性から便益を受ける、対象（ヒト又は動物）を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

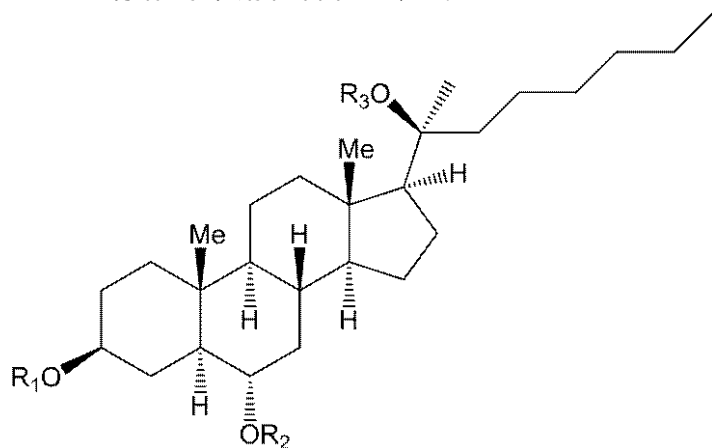
## 【0001】

本発明は、骨障害の治療の分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明の実施形態は、オキシステロール骨標的薬剤化合物、本明細書に示したように、例えば、O x y 1 3 3 - テトラサイクリン誘導体化合物を含む組成物である。オキシステロール骨標的薬剤化合物は、式

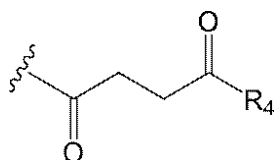


10

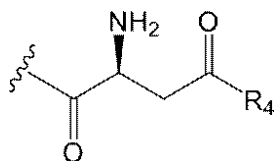
20

の化合物を含むことができ、

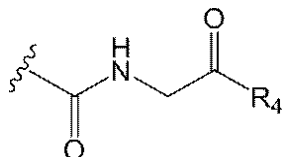
$R_1$ 、 $R_2$ 、及び $R_3$ が独立して水素、



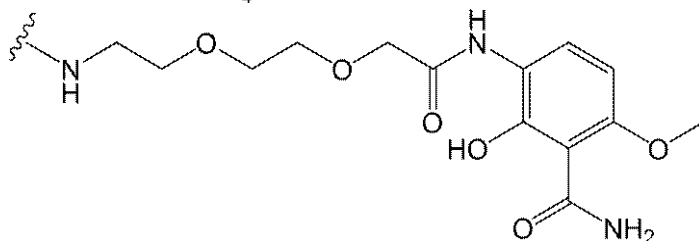
、



、及び / 又は



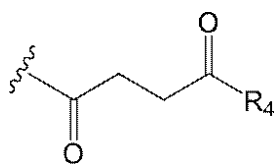
であり、及び $R_4$ が



30

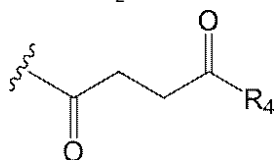
40

である。 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び $R_3$ の少なくとも1つは水素ではなく、 $R_1$ 及び $R_3$ が水素である場合、 $R_2$ が

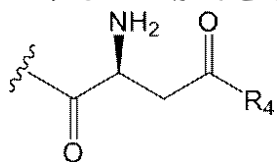


ではない。例えば、 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び / 又は  $R_3$  を水素とすることができる。例えば、 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び / 又は  $R_3$  を水素としないことができる。 $R_3$  を水素とすることができる。 $R_2$  を水素とすることができる、 $R_3$  を水素とすることができる。 $R_1$  を水素とすることができる、 $R_3$  を水素とすることができる。 $R_3$  を水素とすることができる、 $R_1$  を水素としないことができ、 $R_2$  を水素としないことができる。 $R_3$  を水素とすることができる、 $R_1$  及び  $R_2$  それぞれを

10

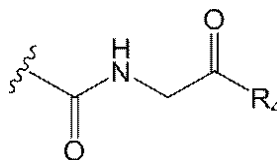


とすることができる。 $R_3$  を水素とすることができる、 $R_1$  及び  $R_2$  それぞれを

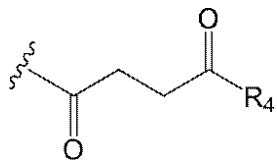


とすることができる。 $R_3$  を水素とすることができる、 $R_1$  及び  $R_2$  それぞれを

20

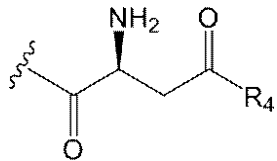


とすることができる。 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  それぞれを

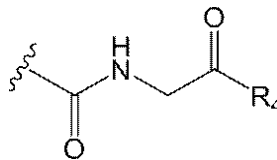


とすることができる。 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  それぞれを

30

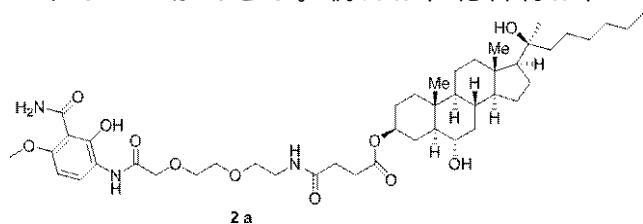


とすることができる。 $R_1$ 、 $R_2$ 、及び  $R_3$  それぞれを

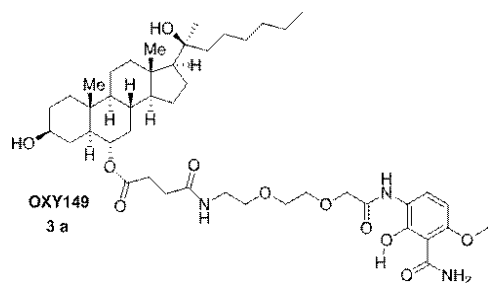


とすることができる。例えば、化合物は、

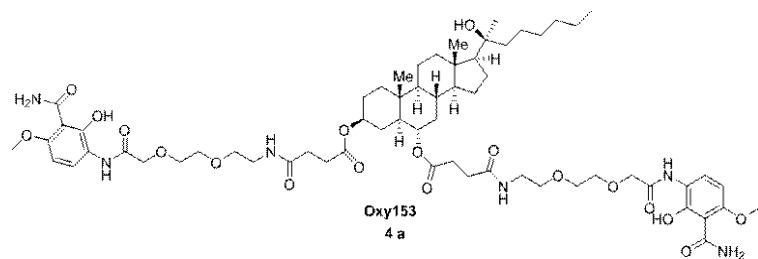
40



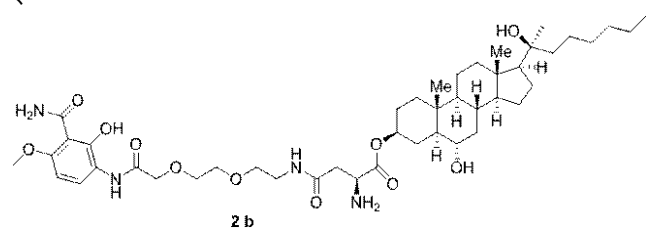




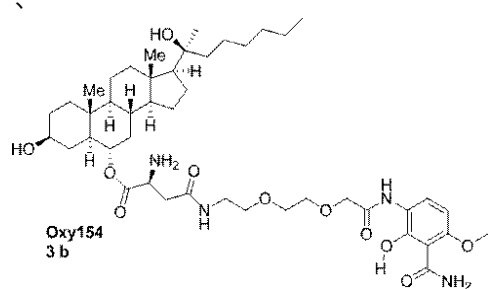
10



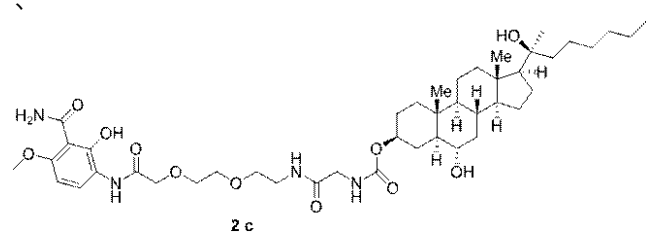
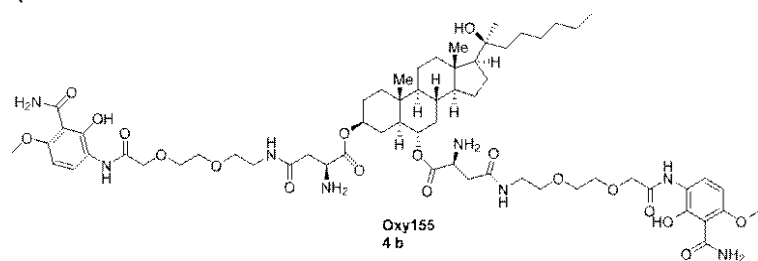
20

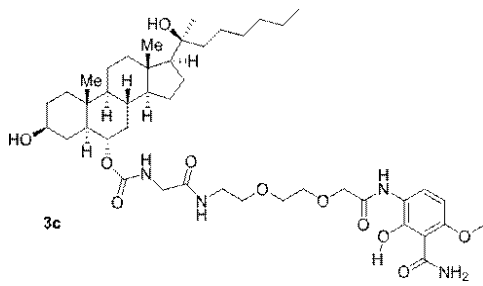


30

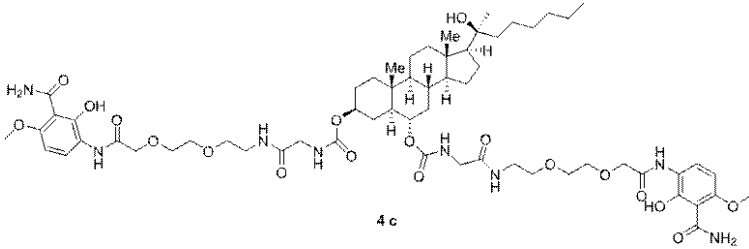


40



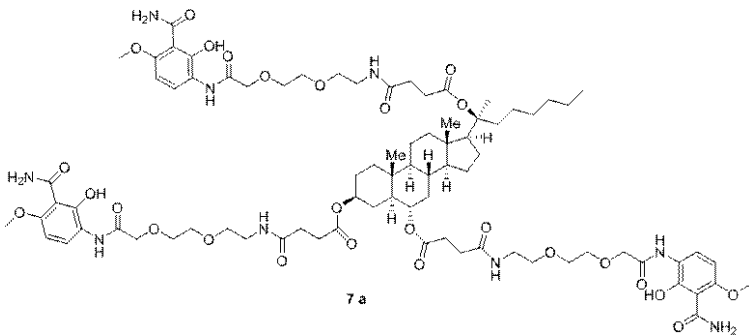


、



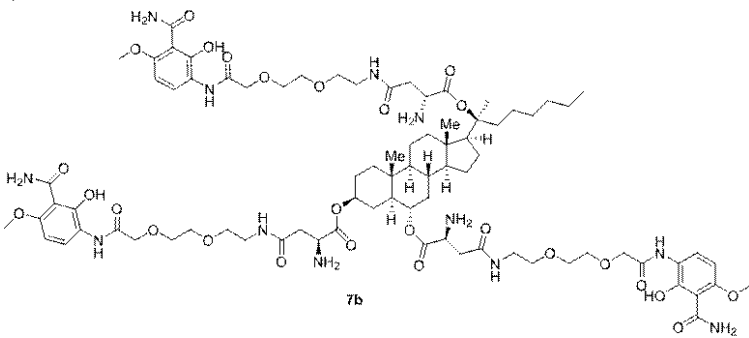
10

、



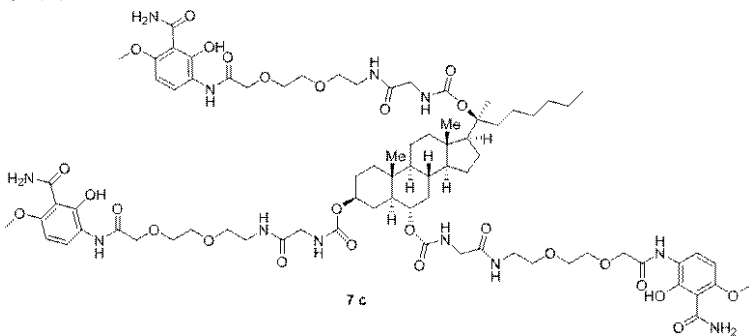
20

、



30

、又は



40

とすることができる。

【0003】

組成物は、薬学的に許容されるキャリア又は希釈剤を含むことができ、医薬製剤とすることができる。本発明の方法は、これらに限定されないが、骨折、骨粗鬆症、及び／又は

50

骨基質減少症を含む骨障害の治療のために、オキシステロール骨標的薬剤化合物をヒト又は動物とすることができる対象の、局所及び／又は全身に投与及び／又は送達することを含む。本発明の方法は、オキシステロール骨標的薬剤化合物による骨芽前駆細胞の *in vitro*での治療、及びこれ（骨芽前駆細胞）に続いて、これらに限定されないが、骨折、骨粗鬆症、及び／又は骨基質減少症を含む骨障害の治療のために、ヒト又は動物とすることができる対象の局所及び／又は全身に投与及び／又は送達することを含む。本発明の方法は、オキシステロール骨標的薬剤化合物を細胞に、例えば、局所に及び／又は全身に形成すること、及び／又は投与することを含み、例えば、その結果、細胞のヘッジホッグシグナル経路が刺激される。細胞は、組織又は器官の一部とすることができ、化合物は、*in vivo*（局所に又は全身に）に投与することができる。本発明に従った方法は、細胞にオキシステロール骨標的薬剤を投与することにより、組織又は器官の細胞を治療することによって、例えば、組織又は器官のヘッジホッグシグナル経路の治療的活性から便益を受けるヒト又は動物とすることができる対象を治療し、その結果、組織又は器官のヘッジホッグシグナル経路が刺激されることを含む。

10

20

30

40

50

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0004】

【図1】BTAリンカー結合の部位とOxy 133化合物の構造を示す。

【図2】テトラサイクリン及びPEG（ポリエチレングリコール）リンカー及びテトラサイクリンフラグメントから形成されたBTA-リンカー1の構造を示す。

【図3】さまざまなリンカー単位のエステラーゼによる開裂に対する相対的感受性を図示する。

【図4】オキシステロールと接触した *in vitro* 骨髄基質細胞、M2-10B4のアルカリホスファターゼ（ALP）酵素活性を示す。

【図5】 *in vitro* でオキシステロールと初回接触4日後のM2-10B4細胞によるALP遺伝子の発現を示す。

【図6】 *in vitro* でオキシステロールと初回接触4日後のM2-10B4細胞の骨シアロタンパク質（BSP）遺伝子の発現を示す。

【図7】 *in vitro* でオキシステロールと初回接触4日後のM2-10B4細胞のオステリックス（OSX）遺伝子の発現を示す。

【図8】 *in vitro* でオキシステロールと初回接触4日後のM2-10B4細胞のPatched1（Ptch）遺伝子の発現を示す。

【図9】は *in vitro* でオキシステロールと初回接触4日後のM2-10B4細胞のヘッジホッグ（Hh）相互作用タンパク質（HIP）遺伝子の発現を示す。

【図10】ヒドロキシアパタイト（HAP）と接触ありなしの分析対象物質の濃度を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0005】

以下に本発明の実施形態を詳細に記載する。実施形態を記載する場合、明確さのために特定の用語を用いる。しかし、本発明は、選択した特定の用語に限定されることを意図しない。当業者であれば、本発明の精神及び範囲から離れることなく、他の同等の部分を用いることができ、他の方法を開発することができることと認識するであろう。

#### 【0006】

本出願は、2013年5月2日に出願された米国特許仮出願第61/818,825号に対する利益を主張するものであり、その全体が参照により組み込まれる。

#### 【0007】

骨粗鬆症は、1千万人を超えるアメリカ人、高齢女性集団のほぼ50%及び高齢男性集団の10%を超える人に影響を及ぼす、よくみられる代謝性骨疾患である（T. D. Racher et al., Lancet 2011, 377, 1276-1287; B. C. Silva et al., Annu. Rev. Med. 2011, 62, 307-322; G. P. Lyritis et al., Ann. N. Y. Acad. Sci

. 2010, 1205, 277-283; S. Khosla et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 2012, 97, 2272-2282; T. J. Aspray et al., Maturitas 2012, 71, 76-78; D. M. Black et al., N. Engl. J. Med. 2012, 366, 2051-2053)。骨基質減少症(骨量の減少)、骨粗鬆症を発現する主なリスク因子は、さらによくみられ、3千4百万人のアメリカ人に影響を及ぼす(Silva; Lyritis; Khosla; Aspray)。骨折は、骨粗鬆症及び骨基質減少症の一般的な合併症であり、入院及び身体障害などの有意な社会経済的コストが生じ、骨折がなければ健康で機能している高齢者の老化及び死亡の原因となることがきわめて多い(Lyritis)。加齢による骨粗鬆症性骨損失及びこれによる合併症が高齢集団の有意な罹病率及び致死率の原因である(Rachner; Silva; Lyritis; Khosla; Aspray; Black)。骨粗鬆症の2つの可能な治療戦略のうち、骨損失/吸収の予防又は骨成長の刺激、ビスフォスフォネート薬剤による抗吸収治療がさらに確立されている(Khosla; M. Sharpe, et al., Drugs, 2001, 61, 999-1039)。「現在の骨粗鬆症の治療のほとんど全部ならびに骨粗鬆症患者の骨吸収のレベルを減少させるための臨床研究目的の可能性のある新しい治療の大部分」(Khosla; Aspray; Black; L. Brewer et al., Eur. J. Clin. Pharmacol. 2011, 67, 321-331)。市販されている治療薬又は骨吸収の機序を対象にする臨床試験の治療薬としては、ビスフォスフォネート(例えば、アレンドロネート)、デノスマブ(プロリア)、ゾレドロン酸(リクラスト)、オダナカチブ、及びサラカチニブが挙げられる(Brewer)。抗吸収薬剤治療は、骨密度の広範な損失を既に来している進行した骨粗鬆症とは異なり、疾病の初期及び軽症を治療するのに最も効果的である(Khosla; Brewer)。

#### 【0008】

あるいは、骨同化剤が、特に進行した疾病に追加的治療オプションを提供することができ、この領域のFDA承認の薬剤が少ないにもかかわらず有意に骨粗鬆症の治療を改善する(E. Canalis, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2010, 95, 1496-1504)。現時点で、重度の骨粗鬆症患者の治療に利用できる唯一のFDA承認の骨同化剤がテリパラチド(フォルテオ)であり、これは副甲状腺ホルモン(PTH)の遺伝子組換え形態であり、毎日の注射により断続的に投与しなければならない(F. Vescini et al., Clin. Cases Miner. Bone Metab. 2012, 9, 31-36)。フォルテオは、有意な骨形成をもたらし、骨折リスクを減少させることができるが、その使用は安全性の懸念のために厳重に制限される(Canalis; Vescini; R. Dimitriou et al., BMC Medicine 2011, 9, 1-10)。骨肉腫のリスクの増大などの有害な副作用のために、フォルテオの薬剤ラベル表示が患者集団及び投与期間(24ヵ月未満)の点で厳しく制限される。臨床研究中の他の同化剤としては、内因性間欠熱PTH分泌を刺激するカルシリティック薬剤、及びWntシグナリングの拮抗剤の抑制剤が挙げられる(Rachner; Dimitriou)。

#### 【0009】

軽度の骨粗鬆症患者では、ビスフォスフォネート薬剤(例えば、アレンドロン酸、フォサマックス)が骨密度の改善及び骨折リスクの減少などの有意な利益をもたらすことができる(Khosla; Sharpe)。しかし、アレンドロン酸を含むビスフォスフォネート薬剤は、空腹条件下で摂取した場合でも、低い経口生物学的利用率、平均0.6~0.7%を示す。食事及び飲料(水以外)とともに薬剤を摂取すると、さらに生物学的利用率を減少させ、空腹条件下で摂取すると患者の大部分に重度の上部消化管刺激を引き起す(Aspray)。このため、空腹条件下での反復、毎日、経口の投与では、用量の99%超は、吸収することができず、利用されないで身体から排泄されるが、ビスフォスフォネート薬剤の送達を薬理的に実現可能まで最大化する必要がある。吸収することができるビスフォスフォネート薬剤のフラクションは、急速にヒトの身体内に分配することがで

き、薬剤の約50%が骨表面に結合し、残りは変化せず腎臓を介して排出される。経口吸収が少ないという物理化学的基礎は、全ビスフォスフォネート薬剤の不可避な部分である陰性荷電ホスホネート部分に関係すると考えられている。この欠点を克服するために、ホスホネート電荷作用を遮蔽することを意図する脂肪酸及び胆汁酸結合によるプロドラッグアプローチを含む、戦略が検討されてきた(P. Vachal et al., J. Med. Chem. 2006, 49, 3060-3063; O. Bortolini et al., Euro. J. Med. Chem. 2012, 52, 221-229)。

#### 【0010】

骨折治癒及び脊椎障害の外科的治療を含む医療用途で骨成長を促進するために生物学的製剤が一般に用いられている(E. E. Johnson et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 2000, 371, 61-74; G. R. Mundy, Annu. Rev. Med. 2002, 53, 337-54; G. A. Rodan et al., Science 2000, 289, 1508-14; S. T. Yoon, Clin. Orthop. Relat. Res. 2002, 395, 33-43)。変形性椎間板疾患及び腰椎及び頸椎に影響を及ぼす関節炎に対処するために整形外科医及び神経外科医によって同様に脊椎固定術が施行されることが多い。歴史的に、一般に患者の腸骨稜から採取される、自家骨移植片が脊椎レベル間の固定を増すために用いられてきた。しかし、採取部の罹病率との関係、手術時間の増加、及び自家骨移植片の採取に関係した失血の増加が(E. D. Arrington et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 1996, 329, 300-9; A. R. Vaccaro et al., Spine J. 2002, 2, 206-15; J. A. Rihn et al., Spine 2010, 35, 1629-39)安全で効果的な代替案を見つける動機となった。

#### 【0011】

ヒトの脊椎固定を促進するために遺伝子組換えヒト骨形態形成タンパク質-2(rhBMP-2)が一般に用いられる。この使用は、単一レベル前方経路腰椎椎体間固定のために2002年にアメリカ食品医薬品局(FDA)によって承認された(M. Mitka, JAMA 2011, 306, 1311-2)。この時以来rhBMP-2の使用は有意に増加し、この使用の適応が広がり、腰椎後方固定及び頸椎固定を含む。rhBMP-2の有効性にもかかわらず、最新の報告では脊椎固定手術中に用いる場合、その安全性を疑問視している。報告された合併症としては、血清腫形成、軟組織膨脹、脊椎溶骨、異所性骨形成、逆行射精、及び発癌性が挙げられている(K. - U. Lewandrowski, Spine J. 2007, 7, 609-14; D. A. Wong, Spine J. 2008, 8, 1011-8; J. D. Smucker et al., Spine, 2006, 31, 2813-9; E. J. Carragee, Spine J., 2011, 11, 471-91)。さらに、頸椎へのその使用により気道浮腫がみられており、FDAに頸椎手術でのその使用を警告する公衆衛生通知を出すよう促している。

#### 【0012】

本発明のある実施形態では、骨形成オキシステロール、Oxy 133と骨標的薬剤(BTA)との組み合わせである新しい分子が合成されている。この分子を全身に投与すると、選択的に骨組織に戻り及び骨形成を増やす可能性がある。骨粗鬆症の治療のための骨同化剤としてこの分子を用いることができる。骨標的骨形成オキシステロールは、全身に投与する場合、有意な毒性又は免疫作用があると予期されていない。

#### 【0013】

多能性間葉幹細胞(MSC)の骨形成骨芽細胞への細胞分化は、同化骨成長の駆動体となることができる。特定の自然オキシステロールは、in vitroでMSCの脂肪細胞分化を阻止しながら骨形成を誘発することができ、in vivoのラットの頭蓋冠欠損モデルで局所の骨形成を促進することができる(T. L. Aghaloo et al., J. Orthop. Res. 2007, 25, 1488-1497)。in vitro又はin vivoのラット脊椎固定モデルで用いる場合、自然オキシステロール

より骨形成活性が大きな新しい半合成オキシステロールの合成及び特性付けが報告されている (J. S. Johnson et al., J. Cell. Biochem. 2011, 112, 1673 - 1684; S. R. Montgomery et al., J. Bone Miner. Res. 2014, accepted for publication)。本発明のある実施形態では、骨粗鬆症の治療が必要であり、全身投与 (iv (静脈内)、ip (非経口)、又は経口) という状況で、骨同化剤として新しい骨形成オキシステロールが示される。

#### 【0014】

オキシステロール、コレステロール酸化の生成物は、in vivoで形成され、細胞分化及びコレステロール物質代謝を含むさまざまな生物学的過程に参与している (G. J. Schroepfer, Physiol. Rev. 2000, 80, 362 - 554; S. Gill et al., Prog. Lipid Res. 2008, 47, 391 - 404; B. Sottero et al., Curr. Top. Med. Chem. 2009, 16, 685 - 705)。自然オキシステロールは、ヒト及び動物の循環及びさまざまな組織でみられ、骨を形成する骨形成特性を有する可能性がある (J. R. Dwyer et al., J. Biol. Chem. 2007, 282, 8959 - 8968; W. K. Kim et al., J. Bone Miner. Res. 2010, 25, 782 - 795; H. T. Kha et al., J. Bone Miner. Res. 2004, 19, 830 - 840; J. A. Richardson et al., J. Cell. Biochem. 2007, 100, 1131 - 1145; C. M. Amantea et al., J. Cell. Biochem. 2008, 105, 424 - 436)。骨髄基質細胞 (間葉幹細胞、MSC) 及び胚繊維芽細胞を含む多能性間葉骨形成細胞にこれらのオキシステロールを投与すると、in vitroで豊富に石灰化された骨マトリックスのしっかりとした骨形成分化及び形成をもたらすことができる (Kim; Kha; Richardson)。理論によって束縛されないが、これらの作用は古典的なヘッジホッグ (Hh) タンパク質とは関係のないHhシグナル経路の活性化により一部調節される可能性がある (Dwyer)。さらに強力なオキシステロールのファミリーが、これから誘導される骨形成及び抗脂肪細胞化活性が自然オキシステロールより優れている可能性がある (J. S. Johnson; Montgomery)。このような分子が、in vitroで強力な骨形成活性を示し、in vivoでしっかりとした骨形成及び脊椎固定を刺激する可能性がある。この分子が有意な免疫原性反応を引き起こすことは予期されない (J. S. Johnson; Montgomery)。

#### 【0015】

成人時の骨の健康は、骨形成骨芽細胞及び骨吸収破骨細胞それぞれの同化及び異化細胞活性の協調的バランスに依存している。多能性間葉幹細胞 (別名、髄基質細胞、MSC) は、骨芽細胞及び脂肪細胞を含むさまざまな細胞型の前駆体集団を形成する。新しい骨の形成は、多くの因子によって中断される可能性がある過程である、MSCの骨芽細胞分化によって推進される。加齢因子、疾病因子及びタバコ及びアルコール乱用などの生活習慣因子が、骨芽細胞分化を犠牲にしてMSC集団を脂肪形成へ向かわせ、その結果本格的な骨粗鬆症及び骨折修復不全となることが多い骨基質減少障害となる (A. Sloan et al., The Surgeon, 2010, 8, 111 - 116; D. A. Chakkalakal, Alcohol Clin. Exp. Res. 2005, 12, 2077 - 2090)。MSCの細胞系列特異的分化の背景にある機序が重要となる可能性がある。因子が脂肪形成を抑制しながら、骨芽細胞形成を刺激することができる。

#### 【0016】

自然発生オキシステロールは、MSC及び他の多能性間葉細胞に効果がある薬剤様分子として機能することができる (Aghaloo; Dwyer; Kim; Kha; Richardson; Amantea)。ヒト循環及びさまざまな組織に生じるオキシステロールは、コレステロールが代謝的に変換してステロイドホルモン及び胆汁酸を形成する短命中間体となる可能性がある (Schroepfer)。しかし、自然オキシステロールは

、受動的代謝物質としてのその役割以上に、シグナリング分子として機能することができ、生理的現象の範囲を調節することができ、その中には脂質のホメオスタシスならびに分化、炎症及びアポトーシスなどの細胞の状態に対する制御がある (Gill)。すなわち、オキシステロールは、組織特異的シグナリングの調節剤として役割を演じることができる。オキシステロールに関する初期の研究では、その病理的寄与を検討し、全オキシステロールが、その特異な化学組成にもかかわらずほぼ同じ特性を有すると考えた (Sottero)。オキシステロール化学型は、オキシステロールの細胞の状況及び正確な化学組成に依存するさらに個別特性を有する可能性がある (S. Nachtergaele et al., Nat. Chem. Biol. 2012, 8, 211-220)。いくつかのオキシステロールは、酸化ストレスを促進することができる (Sottero)。しかし、骨形成オキシステロールは、前駆細胞の骨形成分化に係わる酸化ストレスの有害効果を抑制することができる (D. Shouhed, J. Cell. Biochem. 2005, 95, 1276-1283)。いくつかのオキシステロールは、LXR受容体の内在性リガンドであると考えられる。しかし、オキシステロールの骨形成活性は、LXR活性化の結果ではない可能性があるが、Hhシグナリングの活性化により調節される可能性がある (Dwyer)。Hhシグナリングのオキシステロール誘導活性化はHhタンパク質と関係なく起き、その結果、非正準Wnt及びNotchシグナリングの活性化となる可能性がある (Kha; Amantea)。基準値PKA/cAMP、PKC、MAPK、及びPI3-キナーゼシグナリングが、これらのオキシステロールに対するさまざまな態様の細胞応答を調節することに関与している可能性がある (Kha; Richardson)。いくつかのオキシステロールの細胞傷害性が報告されたが (Schroepfer)、in vitroで1~20 µMで骨形成細胞により投与した場合、又は、in vivoで、ラット脊椎固定モデル (40 mg) に、又は、マウスに、局所投与中に、ipで50 mg/kgで1週間に3回計8週間投与した場合、行動の転換がないことが明らかになり、骨形成オキシステロールによる毒性作用はみられなかった。

10

20

30

40

#### 【0017】

骨形成剤の可能性のあるものとして、自然発生オキシステロール、20(S)-ヒドロキシコレステロール、22(S)-ヒドロキシコレステロール及び22(R)-ヒドロキシコレステロールを使用することができる (Kha; Richardson; Amantea)。in vitro及びin vivoのいずれでも効果がある一連の強力な骨形成オキシステロール構造類似体が特定された。この半合成オキシステロールのファミリーのメンバーがコラーゲンスポンジを介して横突起の間に局所に塗布した場合、ラットにしっかりした骨形成及び脊椎固定を誘発する (J. S. Johnson)。化合物OXY133は、骨形成活性が強化された一連の構造類似体である (図1) (Montgomery)。Oxy133は、培養したヒト初代間葉幹細胞に骨発生を誘発し、ラットに他の構造類似体と比べて加速した方法で脊椎固定を誘発することができる。Oxy133は、ウサギ脊椎固定及びウサギ頭蓋冠欠損モデルなどの骨疾病の非げっ歯類動物モデルにしっかりした骨発生を誘発することができる。Oxy133は、脊椎固定及び非癒合骨折の修復に適用の可能性があり、局所投与の薬剤開発候補である。しかし、骨粗鬆症の骨形成を刺激するための同化因子の可能性のあるものとしてOxy133のようなオキシステロールの全身投与を意図する場合、1つは、ヒト肝ミクロソーム (HLM) のその短半減期 (5分未満) 及び必ずしも骨組織の付着に有利ではない組織内分布を考えなければならない。さらに、骨発生の可能な機序のために、MSCのHh経路の一時的活性化、他の組織への暴露を最小化しながら骨組織の選択性を増すことが賢明である可能性がある。これは、骨標的薬剤 (BTA) をそれを選択的に骨に送達するオキシステロール分子に結合することによって実現することができる。

#### 【0018】

骨特異的薬剤送達は、有効性を増し、副作用を最小化し、適切な投与を可能にするために骨疾病にほんのわずかに許容される薬剤 (例えば、エストラジオール及びジクロフェナク) にあてはまるだけではない (S. Zhang et al., Chem. Soc. R

50

ev. 2007, 36, 507-31)。本発明のある実施形態では、骨特異的薬剤送達  
の概念は、全身骨疾病のために以前に試験されていない骨形成分子に適用され、骨粗鬆症  
の効果的な治療となる。骨形成特性を有するHhシグナリングのオキシステロール系作動  
薬がこのカテゴリーに入る可能性がある。骨特異的薬剤送達剤は、加水分解可能リンカー  
結合を介してこれらの薬剤分子に結合することができる(M. W. Orme et al  
, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 1375-1380;  
Zhang)。

#### 【0019】

化合物Oxy 133 (図1)は、強力な骨形成オキシステロールとして機能することが  
でき、in vitroで骨形成細胞の骨形成分化、及びラット及びウサギ脊椎固定モデル  
でin vivoでしっかりした骨形成を誘発する。骨形成オキシステロール、Oxy  
149は、Oxy 133及びテトラサイクリンの誘導体である骨標的薬剤(BTA)の組  
み合わせである。図1に示したように、我々はBTAがOxy 133に結合する3つの部  
位、すなわち、コハク酸又はアスパラギン酸リンカーのいずれかを介して炭素3、炭素6  
、及び炭素20のヒドロキシ基を特定した。テトラサイクリンBTAフラグメントのリン  
カー結合としては、これらに限定されないが、図2に図示したBTA-リンカー1となる  
ものなどのスクシネート系リンカー及びポリエチレングリコール(PEG)系リンカー単  
位が挙げられる。例えば、Oxy 133-BTA構造類似体は、BTAが炭素6のヒドロ  
キシ基に結合することができる。BTAが炭素3若しくは炭素20、又は1つより多い炭  
素に結合して、Oxy 133で計2又は3のBTA単位となることができる他の構造類似  
体も本明細書に示される。

10

20

#### 【0020】

例えば、整形外科医療のための骨特異的薬剤送達系による骨特異的薬剤送達は、有効性  
を増し、副作用を最小化し、適切な投与を可能にするために骨疾病にほんのわずかに許容  
される薬剤(例えば、エストラジオール及びジクロフェナク)にあてはまるだけではない  
。この概念は、全身骨疾病のために以前に試験されていない骨形成分子に展開することが  
でき、骨粗鬆症の効果的な治療になる可能性がある。骨形成特性を有するヘッジホッグ  
(Hh)シグナリングのオキシステロール系作動薬が、ほとんどこのカテゴリーに入る。オ  
リゴペプチドからさまざまなビスフォスフォネートまでの範囲の骨親和性が高い公知の物  
質のうち、抗生物質テトラサイクリンは、比較的非中毒性であり、経口で利用でき、「ヒ  
トが経験した」骨標的薬剤又は成分である。しかし、その強力な抗生物質活性、化学的複  
雑度、及び安定性の欠如が、骨標的薬剤(BTA)としての未変性テトラサイクリンの臨  
床的可能性を制限する。このため、テトラサイクリンフラグメントがBTA単位として考  
えられている。後者は、ヒドロキシapatite結合測定法でテトラサイクリンと比べて骨  
親和性のほとんど(80%)を保持しながら抗菌活性、及び過度の化学的複雑度がない。  
テトラサイクリンBTAフラグメントのリンカー結合としては、図2に図示した、例えば  
、BTA-リンカー1のためのスクシネート系リンカー及びポリエチレングリコール(PEG)  
系リンカー単位を挙げることができる。BTA剤は、加水分解可能リンカー結合を  
介して薬剤分子に結合することができる。BTA単位に結合後の薬剤分子が薬理的活性  
を保持する場合、非加水分解可能結合を用いることができる。エステル基はさらに不安定  
なチオエステル及びさらに安定したアミドと比較して好適な安定性の範囲にあるため、エ  
ステル基を用いることができる(L. Gil et al., Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 901-919)。エステル基のin vivo安定性は、さら  
にエステル基に隣接した置換によって微調整することができる(T. C. Bruice  
et al., Bioorganic Chemistry, Vol. 1, W. A. Benjamin, New York, 1966, 1-258)。このため、Oxy 133-BTAエステル抱合  
体が、骨組織に選択的に付着させ、続いて酵素リンカー加水分解及び骨形成剤、Oxy 1  
33を制御速度で標的組織に放出する全身投与(経口、ip、又はiv)に好適である可  
能性がある。以下に記載したようにエステル縮合を介して無水コハク酸に直接結合するこ  
とによって、このようにBTA-リンカー1がOxy 133の6-位置に結合して抱合体

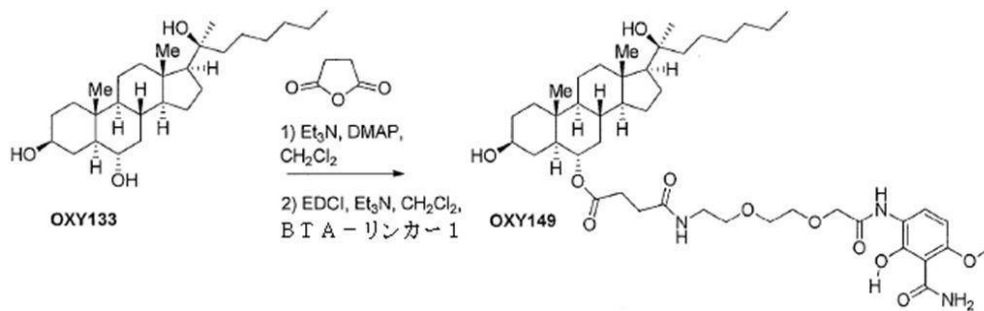
30

40

50



O x y 1 4 9 ( 3 a ) を形成することができる。



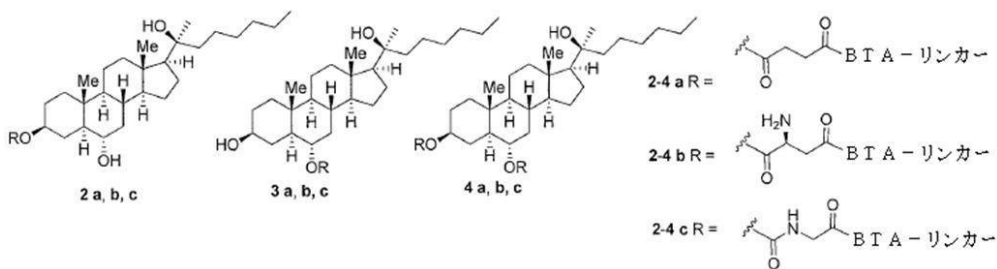
10

( O x y 1 3 3 では、6 - ヒドロキシ基は、3 - ヒドロキシ基より無水コハク酸に対する反応性が高い。) 得られた抱合体、O X Y 1 4 9 は、治療の4日後に骨形成分化マーカー、アルカリホスファターゼ活性の誘発レベルによって測定し、C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞中に親 O x y 1 3 3 のほとんどの骨形成活性を保持する ( 対照 : 2 ± 1 ; O x y 1 3 3 ( 1 μ M ) : 3 9 0 ± 1 0 ; O x y 1 4 9 ( 1 μ M ) : 1 0 0 ± 1 2 ; O x y 1 4 9 ( 5 μ M ) : 5 0 0 ± 1 8 ; O x y 1 4 9 ( 1 0 μ M ) : 4 8 0 ± 1 2 ; O x y 1 4 9 ( 2 0 μ M ) : 4 7 0 ± 2 5 ) 。 調節可能なリンカー結合を用いて O X Y 1 3 3 の 3 - 及び / 又は 6 - 位置を介して B T A - リンカー 1 を結合することができる。

20

#### 【 0 0 2 1 】

構造類似体 2、3、及び 4、O x y 1 3 3 が、コハク酸 ( a シリーズ ) 又はアスパラギン酸 ( b シリーズ ) 及び a カルバメートリンカー単位 ( c シリーズ ) から誘導されるエステルリンカー単位、すなわち、以下に記載する調節可能なリンカー結合を有するオキシステロール B T A 抱合体と 3 - 及び / 又は 6 - 位置を介して B T A に抱合される。



30

#### 【 0 0 2 2 】

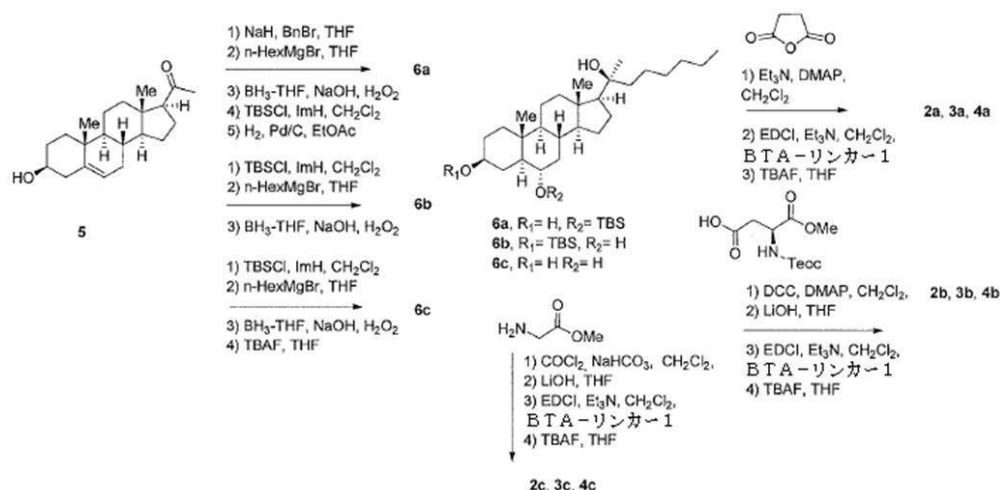
カルバメートリンカーは、エステルリンカーと比べてエステラーゼ加水分解に対してさらに安定していなければならない。コハク酸系リンカーは、さらに容易にアミノエステル結合を酵素加水分解することができるアスパラギン酸系リンカーと比べてエステラーゼ加水分解に対してさらに安定していなければならない。エステル加水分解の速度の差を用いて標的骨組織の O x y 1 3 3 の放出を微調整することができる。例えば、ウレタン単位を用いて B T A に抱合された O x y 1 3 3 は、抱合体がアスパルテートを用いて形成される場合よりさらに安定していなければならない。さまざまなリンカー単位のエステラーゼによる開裂に対する相対的感受性を図 3 に図示する。

40

#### 【 0 0 2 3 】

プレゲネロン ( 5 ) から開始する O x y 1 3 3 - B T A 抱合構造類似体 2、3、及び 4 の合成を以下に示す。後者は、3 - ヒドロキシ基の保護、側鎖の付加、5 - アルケン基のヒドロホウ素化酸化、及びその後、所望の構造類似体に応じて、ヒドロキシ基の選択的保護又は脱保護によって、公知の方法によって特異的に保護された O x y 1 3 3 誘導体、6 a ~ c に転換することができる。これらの化合物の結合パートナーを調整することができる。

50



10

20

30

40

## 【0024】

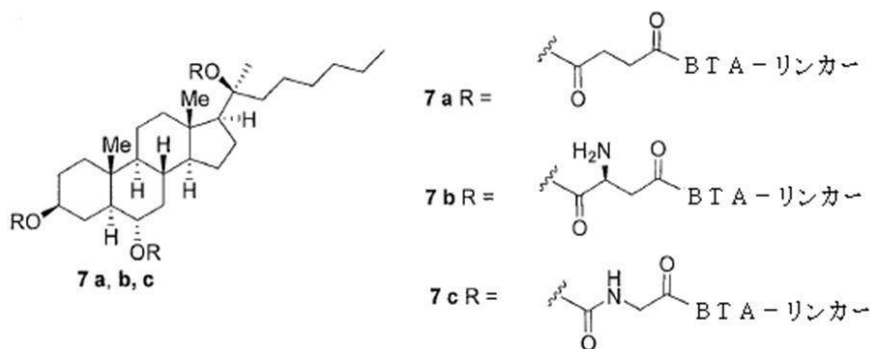
最初に、無水コハク酸又は保護されたアスパラギン酸により3及び/又は6-ヒドロキシ基で特異的に保護されたOxy133誘導体6a~cをアシル化し、その後、得られたカルボン酸を図6に示したようにエステル抱合体をもたらすBTA-リンカー1に結合させる。エステル結合反応後、テトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)により、tert-ブチルジメチルシリルエーテル(TBS)及び、2~4bの場合、2-トリメチルシリルエチルカルバメート(Teoc)単位を開裂させ、コハク酸リンカー(2~4a)及びアスパラギン酸リンカー(2~4b)を組み入れている最終生成物をもたらすことができる。予備試験で得られたOxy149に相当する化合物3aを図3に示す。カルバメート結合構造類似体、2~4c、は、グリシンメチルエステルをイソシアネートに変換し、合成が類似形態に進んだ後にOxy133誘導体6a~cをカルバミル化することによって調製される。

## 【0025】

Oxy133-BTAの誘導体は、1)アッセイスクリーンに基づいた、おそらくさらに好ましい細胞開裂可能特性に基づいたC3H10T1/2細胞でOxy149より高い骨形成活性を有し、及び2)最適化されたヒドロキシアパタイト結合能力を示す可能性がある。

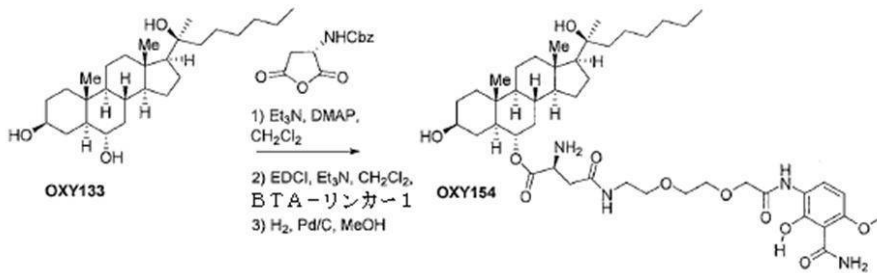
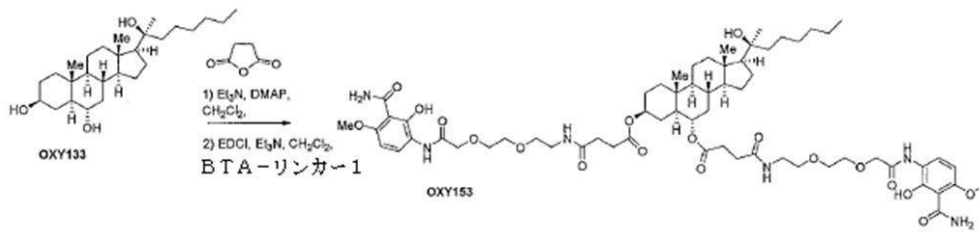
## 【0026】

究極アシル化条件を用いて、C-20で第3級アルコールをアシル化し、以下に示したようにペルアシル化オキシステロールBTA抱合構造類似体をもたらすことができる。

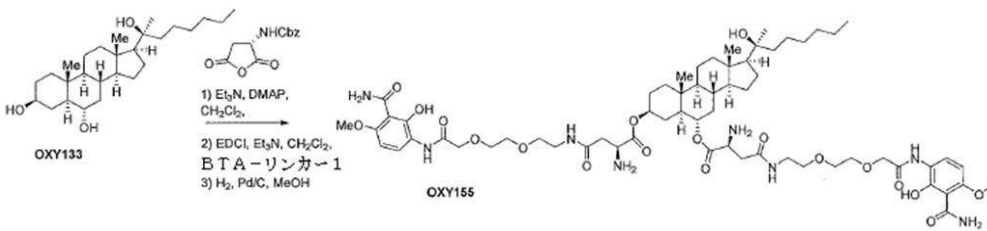


## 【0027】

Oxy133化合物から開始する、化合物3b(Oxy154)、4a(Oxy153)、及び4b(Oxy155)(図4に示した)を得るための合成経路を以下に示す。



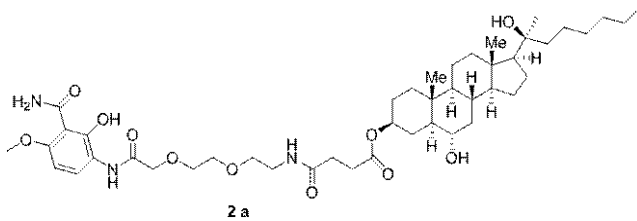
10



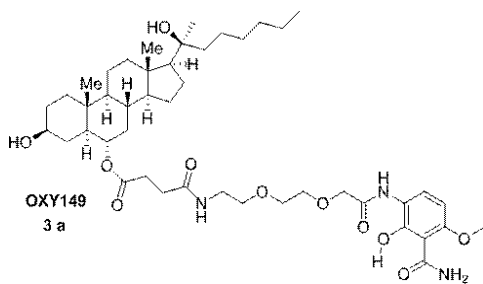
20

【 0 0 2 8 】

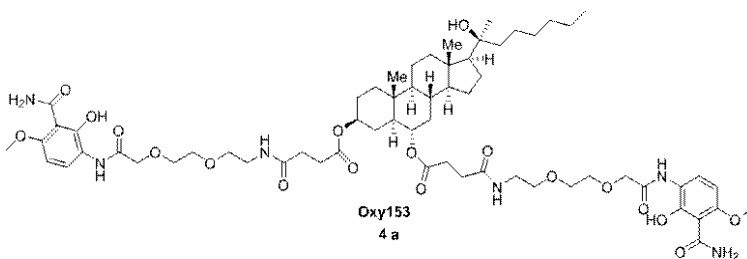
合成が前記に記載されているいくつかの分子の要約を以下に提供する。



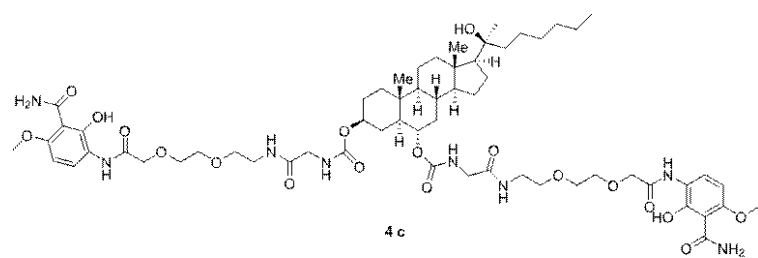
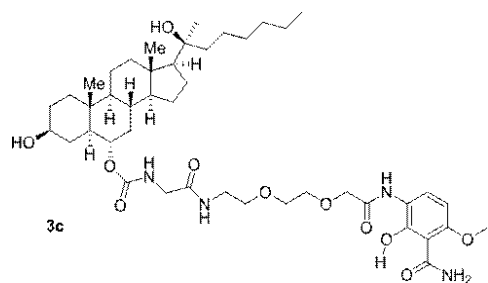
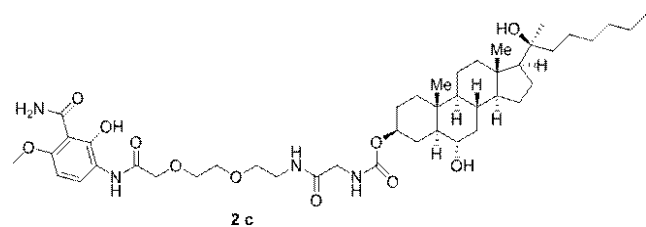
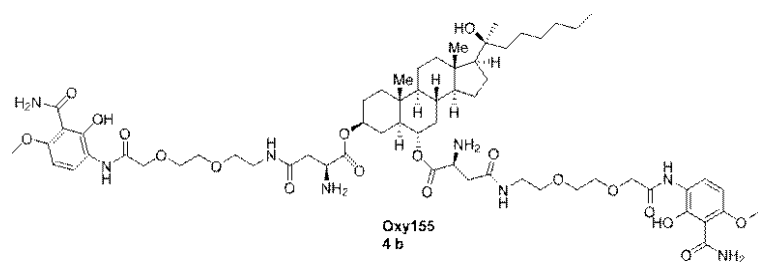
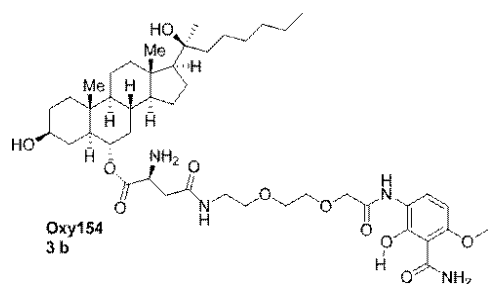
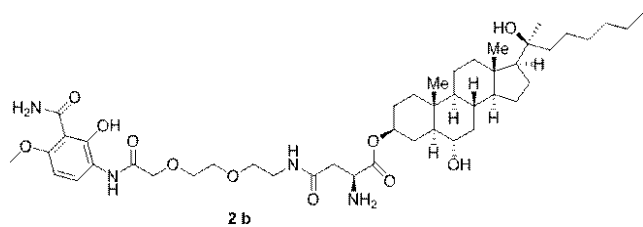
30

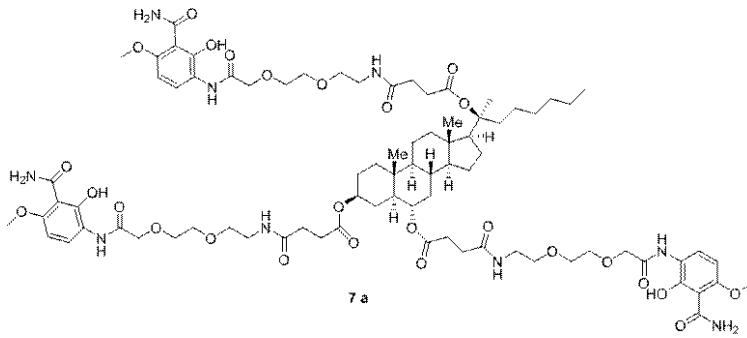


40

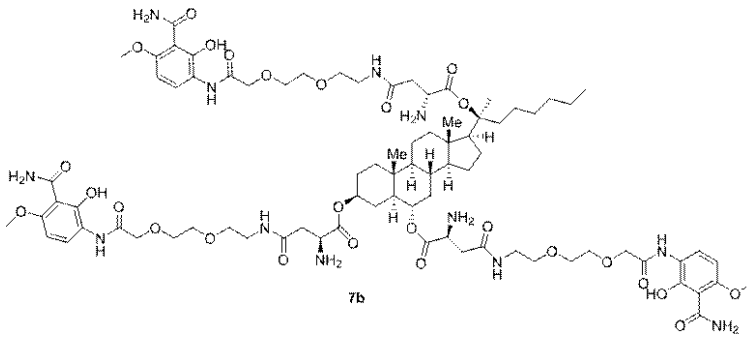


50

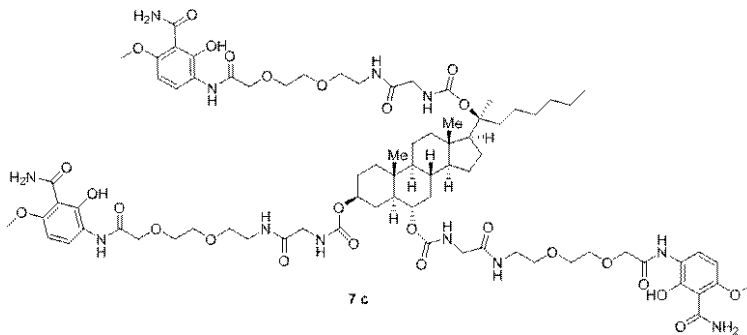




10



20



30

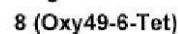
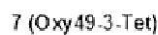
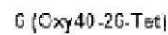
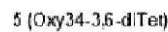
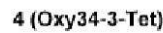
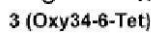
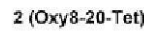
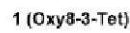
## 【 0 0 2 9 】

本発明の実施形態は、O x y 1 3 3、又はオキシステロールが本発明者らによって記載されたテトラサイクリン - 誘導骨標的部分の他の変型に結合される、本発明者らによって前記に記載した他の骨形成オキシステロールを含むハイブリッド分子に関する。いくつかのこのような部分は、例えば、US Pat . 7 , 1 9 6 , 2 2 0 及びUS Pat . 7 , 1 9 6 , 2 2 0 に記載されている。

## 【 0 0 3 0 】

本明細書に記載したように骨形成オキシステロール分子をこのようなテトラサイクリン誘導体に結合（抱合）する、及び用いることができる。このような代表的なオキシステロールとしてはO x y 8、O x y 3 4、O x y 4 0、及びO x y 4 9、又は本発明者ら又は他の者によって以前に記載された他の好適なオキシステロールが挙げられる。このようないくつかのハイブリッド分子には以下のものが含まれる。

40



## 10

20

## 30

50

胞化分化を抑制することができるOxy 34及びOxy 49を含む20Sのさらに強力な構造類似体を合成することができる(J. S. Johnson)。Oxy 34及びOxy 49は脊椎後側方固定のラットモデルで*in vivo*で脊椎固定を刺激することができる(J. S. Johnson)。オキシステロールは、医師が、例えば、長骨骨折、脊椎障害、及び骨粗鬆症治療するのにさらに実行可能な臨床的オプションとなる可能性がある。

#### 【0033】

本発明の実施形態の化合物は、本明細書に定義したように治療に効果的な量の本発明の化合物で調製される医薬組成物、及び薬学的に許容されるキャリア又は希釈剤として有用である。

10

#### 【0034】

本発明の化合物は、医薬組成物として製剤化して治療が必要な対象、例えばヒトの患者などの哺乳動物、に、選択した投与の経路にふさわしいさまざまな形態、例えば、経口、経鼻、腹腔内、又は非経口で、静脈内、筋肉内、局所又は皮下の経路により、又は組織への注射により投与することができる。

#### 【0035】

このため、本発明の化合物は、例えば、経口で、不活性希釈剤又は同化性食用キャリアなどの薬剤学的に許容できるビヒクルと組み合わせ、又は吸入もしくは吹入によって、全身に投与することができる。本発明の化合物は、ハード又はソフトシェルゼラチンカプセルに封入することができ、圧縮して錠剤にすることができ、又は直接患者の食事の食品と混合することができる。経口治療的投与では、本化合物は1つ以上の賦形剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、口内錠剤、トローチ、カプセル、エリキジール剤、懸濁液、シロップ、オブラート剤などの形態で 사용할ことができる。不活性粉末キャリアと本化合物を混合して、対象が吸入又は吹入することができる。このような組成物及び調剤は、本発明の実施形態の化合物を少なくとも0.1%含有しなければならない。組成物及び調剤の割合は言うまでもなく、変えることができ、使いやすく特定の単位剤型の重量の約2%～約60%とすることができる。このような治療に有用な組成物中の化合物の量は、効果的な投与濃度が得られるようにする。

20

#### 【0036】

錠剤、トローチ、丸薬、カプセルなどは、このほか、結合剤、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ又はゼラチン、賦形剤、例えば、ケイ酸ニカルシウム、崩壊剤、例えば、コーンスターチ、馬鈴薯澱粉、アルギン酸など、潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムを含有することができ、甘味剤、例えば、蔗糖、果糖、乳糖もしくはアスパルテム、又は香味剤、例えば、ハッカ、冬緑油、又はチェリー香味剤を添加することができる。単位剤型がカプセルである場合、前記の型の物質に加えて、液体キャリア、例えば、植物油又はポリエチレングリコールを含有することができる。さまざまな他の物質を被覆剤として存在させることができる、又はその他の方法で固体単位剤型の物理的な形態を変更することができる。例えば、錠剤、丸薬、又はカプセルをゼラチン、ワックス、セラック、又は糖などで被覆することができる。シロップ又はエリキジール剤が有効化合物、甘味剤として蔗糖又は果糖、防腐剤としてメチル及びプロピルパラベン、染料及び香味剤、例えば、チェリー又はオレンジフレーバーを含有することができる。言うまでもなく、単位剤型を調製するのに使用される任意の物質は、薬剤学的に許容できるものにし、用いられる量で実質的に非毒性にしなければならない。また、持効性調剤及び器具に本化合物を組み入れることができる。例えば、化合物を持効性カプセル、持効性錠剤、持効性丸薬、及び持効性ポリマー又はナノパーティクルに組み入れることができる。

30

40

#### 【0037】

化合物は、点滴又は注射により静脈内又は胸腔内又は皮下に投与することもできる。水に任意で非毒性界面活性剤と混合して化合物の溶液を調製することができる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン及びこれらの混合物、ならびに油に分散液を調製することもできる。貯蔵及び使用の通常の条件下では、これらの調剤が微生物の

50

成長を防止するため防腐剤を含有することができる。

【0038】

注射又は点滴に好適な薬剤剤型は、無菌の注射可能又は点滴可能な溶液又は分散液の即時調製に適合しており、任意でリポゾームに封入した化合物を含む無菌水性溶液もしくは分散液、又は無菌粉末を含むことができる。いずれの場合でも、最終剤型は、製造及び貯蔵の条件下で、無菌、流動体及び安定していなければならない。液体キャリア又はビヒクルは、溶媒又は液体分散液媒質、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、及び好適なこれらの混合物を含むことができる。例えば、リポゾームの形成によって、分散液の場合必要な粒子径の維持によって、又は界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。さまざまな抗菌及び抗真菌剤、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、チメロサルなどによって微生物の作用を防止することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、緩衝剤、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。吸収を遅延させる薬剤の組成物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンの使用により、注射可能組成物の持続的吸収をもたらすことができる。

10

【0039】

このほか、好適な溶媒中の必要な量の化合物を前記に列挙したさまざまな他の成分に組み入れ、必要に応じて、濾過殺菌により無菌の注射可能溶液を調製する。無菌の注射可能溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥技術であり、あらかじめ無菌濾過した溶液に存在する任意の追加の所望の成分を加えて有効成分の粉末を生成する。

20

【0040】

局所投与では、純粋形態で本化合物を塗布することができる。しかし、皮膚病学的に許容できるキャリア（固体又は液体とすることができる）と組み合わせて組成物又は製剤として皮膚に化合物を投与することが好ましい。

【0041】

有用な固体キャリアとしては、微粉固体、例えば、タルク、クレー、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどが挙げられる。他の固体キャリアとしては、非中毒性ポリマーナノパーティクル又はマイクロパーティクルが挙げられる。有用な液体キャリアとしては、水、アルコール又はグリコール又は水/アルコール/グリコールブレンドが挙げられ、この中に本化合物を効果的な濃度で、任意で非毒性界面活性剤を使って溶解させる、又は分散させることができる。補助剤、例えば、芳香剤及び追加の抗菌剤を添加して、特定の使用の特性を最適化することができる。包帯及び他の手当用品に含浸させるために使用される吸収パッドから得られた液体組成物を塗布することができる、又はポンプ式若しくはエアゾールスプレーを使用して患部に吹き付けることができる。

30

【0042】

このほか、増粘剤、例えば、合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩及びエステル、脂肪アルコール、改質セルロース又は改質無機物質を液体キャリアとともに使用して、使用者の皮膚に直接塗布するために塗り広げられるペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成することができる。

40

【0043】

抑制剤を皮膚に塗布するために使用することができる有用な皮膚病学的組成物の例が、当技術分野で知られており、例えば、Jacquetら（U.S. Pat. No. 4,608,392）、Geria（U.S. Pat. No. 4,992,478）、Smithら（U.S. Pat. No. 4,559,157）及びWortzman（U.S. Pat. No. 4,820,508）を参照。これらは参照によりここに組み入れられる。

【0044】

動物モデルの*in vitro*活性、及び*in vivo*活性を比較することによって式Iの化合物の有用な用量を決定することができる。効果的な用量をマウス、及び他の動

50



物、ヒトに外挿する方法が当技術分野で知られており、例えば、U . S . P a t . N o . 4 , 9 3 8 , 9 4 9 を参照。これは参照によりここに組み入れられる。

【 0 0 4 5 】

例えば、ローションなどの液体組成物中の化合物の濃度は、約 0 . 1 ~ 2 5 重量 %、又は約 0 . 5 ~ 1 0 重量 % とすることができる。ゲル又は粉末などの半 - 固体又は固体組成物中の濃度は、約 0 . 1 ~ 5 重量 %、又は約 0 . 5 ~ 2 . 5 重量 % とすることができる。

【 0 0 4 6 】

治療に使用するために必要な化合物の量は、選択した特定の塩だけでなく、投与の経路、治療される病態の性質ならびに患者の年齢及び病態で変わり、最終的に担当医師又は臨床医の裁量によるものとなる。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の薬剤の投与の効果的な用量及び経路は、従来のものである。本薬剤の正確な量（効果的な用量）は、対象次第で、例えば、対象の種、年齢、体重及び一般的又は臨床の状態、治療する障害の重症度又は機序、用いられる特定の薬剤又はビヒクル、投与の方法及びスケジュールなどに応じて変わる。治療に効果的な用量は、当業者に公知の従来の方法によって経験的に決定することができる。例えば、The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds., Macmillan Publishing Co., New York を参照。例えば、効果的な用量は、最初に細胞培養アッセイ又は好適な動物モデルのいずれかで見積もることができる。動物モデルを用いて、投与の好適な濃度の範囲及び経路を決定することもできる。その後、このような情報を用いて、ヒトに投与するための有用な用量及び経路を決定することができる。治療の用量は、類似の治療薬の用量から類推して選択することもできる。

20

【 0 0 4 8 】

特定の投与の方法及び投与計画は、症例の詳細（例えば、対象、疾病、関係する疾病の状態、及び治療が予防的なものかどうか）を考慮して担当臨床医によって選択される。治療には、数日から数ヵ月、又はさらに数年までの期間にわたる、化合物（単数又は複数）の 1 日又は複数の日の用量が、関係する可能性がある。

【 0 0 4 9 】

しかし、一般的に、好適な用量は、1 日当たり体重の約 0 . 0 0 1 ~ 約 1 0 0 m g / k g、例えば、約 0 . 0 1 ~ 約 1 0 0 m g / k g の範囲となり、例えば、1 日当たりレシピエントの体重 1 キログラム当たり約 0 . 1 m g 超、又は 1 日当たりレシピエントの体重 1 キログラム当たり約 1 ~ 約 1 0 m g の範囲である。例えば、好適な用量は、1 日当たり体重の約 1 m g / k g、1 0 m g / k g、又は 5 0 m g / k g とすることができる。

30

【 0 0 5 0 】

化合物は、使いやすく単位剤型で投与され、例えば、1 単位剤型当たり 0 . 0 5 ~ 1 0 0 0 0 m g、0 . 5 ~ 1 0 0 0 0 m g、5 ~ 1 0 0 0 m g、又は約 1 0 0 m g の有効成分を含有する。

【 0 0 5 1 】

化合物は、ピーク血しょう濃度が、例えば、約 0 . 5 ~ 約 7 5  $\mu$  M、約 1 ~ 5 0  $\mu$  M、約 2 ~ 約 3 0  $\mu$  M、又は約 5 ~ 約 2 5  $\mu$  M となるように投与することができる。例示的な好適な血しょう濃度としては、少なくとも又は 0 . 2 5、0 . 5、1、5、1 0、2 5、5 0、7 5、1 0 0、又は 2 0 0  $\mu$  M 以下が挙げられる。例えば、血しょうレベルは、約 1 ~ 1 0 0 マイクロモル又は約 1 0 ~ 約 2 5 マイクロモルとすることができる。これは、例えば、任意で生理食塩水中の化合物の 0 . 0 5 ~ 5 % 溶液を静脈内注射することにより、又は経口で約 1 ~ 1 0 0 m g の化合物を含有する大形丸剤として投与して、実現することができる。好適な血液レベルは、1 時間当たり体重 1 k g 当たり約 0 . 0 0 0 0 5 ~ 5 m g、例えば、少なくとも又は 0 . 0 0 0 0 5、0 . 0 0 0 5、0 . 0 0 5、0 . 0 5、0 . 5、又は 5 m g / k g / h r 以下をもたらす断続的輸血により維持することができる。あるいは、体重 1 k g 当たり約 0 . 0 0 0 2 ~ 2 0 m g、例えば、体重 1 k g 当たり化

40

50

化合物の少なくとも又は0.0002、0.002、0.02、0.2、2、20、又は50mg以下を含有する間欠的輸血によりこのようなレベルを得ることができる。

【0052】

化合物は、使いやすく一回量又は適切な間隔に投与される分割投与量、例えば、1日当たり1、又は2、3、4又はそれ以上の分割投与量(sub-doses)で示すことができる。分割投与量自体をさらに、例えば、多数のばらばらに厳密でなく間隔をあけた投与(例えば、吸入器による複数回の吸入による)に分割することができる。

【0053】

本発明の態様は、本明細書に示した化合物を含む生体活性もしくは医薬組成物又はこれらの薬学的に許容される塩もしくは溶媒化合物及び薬学的に許容されるキャリアである。用語「生体活性」組成物又は「医薬」組成物は、本明細書に交換可能で用いられる。この用語はともに対象に投与する、塗布するために用いる、又は対象に導入される医療器具に存在することなどができる組成物を指す。これらの生体活性又は医薬組成物は、時には本明細書に「本発明の医薬組成物又は生体活性組成物」として引用されている。時には語句「化合物の投与」は、本明細書に対象にこの化合物を投与する文脈で用いられる(例えば、対象に本化合物を接触させる)。このように使用される本化合物は、一般的に本化合物を含む医薬組成物又は生体活性組成物の形態とすることができると理解しなければならない。

10

【0054】

本発明のもう1つの態様は、ヘッジホッグ(Hh)経路媒介反応が骨芽細胞分化、骨形態形成、及び/又は骨増殖の刺激であり、細胞又は組織に効果的な量(例えば、治療に効果的な量)の化合物を接触させることを含む、細胞又は組織、例えば、対象でヘッジホッグ(Hh)経路媒介反応を誘発する(刺激する、強化する)方法である。Hh媒介反応は、再生医療で有用である可能性がある。

20

【0055】

本発明のもう1つの態様は、対象に効果的な量の化合物を含む生体活性組成物又は医薬組成物を投与することを含む、骨障害、骨基質減少症、骨粗鬆症、又は骨折の対象を治療する方法である。例えば、骨量を増加させる、骨粗鬆症の症状を改善する、又は他の状態を減少する、解消する、予防する又は治療するために、治療に効果的な用量で効果的な剤型で選択した間隔で、対象に、骨形態形成、及び/又は骨増殖の増加から便益を受ける生体活性組成物又は医薬組成物を投与することができる。骨粗鬆症の症状を改善するために、治療に効果的な用量で効果的な剤型で選択した間隔で、対象に生体活性組成物又は医薬組成物を投与することができる。1つの実施形態では、哺乳動物の間葉幹細胞(例えば、対象から又は好適な哺乳動物から、又は組織又は細胞バンクから)を採取すること、細胞の骨芽細胞分化を誘発するために化合物で哺乳動物の間葉細胞を治療すること、及び対象に分化した細胞を投与することによって、対象を治療して骨形成を誘発する。

30

【0056】

いずれの本発明の方法でも、局所投与によって細胞組織又は器官に本化合物を投与することができる。例えば、クリームなどで局所に本化合物を塗布することができる、又は細胞組織もしくは器官に直接、本化合物を注入する、そうでなければ導入することができる、又は好適な医療器具(例えば、インプラント)で本化合物を導入することができる。あるいは、全身に、例えば、経口で、静脈内に(IVであるが)、又は腹腔内(ip)注射又は皮下(subcu)注射などの注射を介して本化合物を投与することができる。

40

【0057】

本発明のもう1つの態様は、1つ以上の本明細書に記載した方法を実施するためのキットである。キットは、任意で容器内に効果的な量(例えば、治療に効果的な量)の化合物を含むことができる。

【0058】

本発明のもう1つの態様は、表面がある基体を含む、対象(例えば、ヒトなどの動物)の身体に使用されるインプラントである。インプラントの表面又は内側は、周囲の骨組織

50

に骨形成を誘発するのに十分な量の本化合物を含む生体活性組成物又は医薬組成物を含む。

【0059】

任意で、本発明の生体活性組成物、方法、キット又は医療器具は、例えば、副甲状腺ホルモン、フッ化ナトリウム、インスリン様成長因子Ⅰ（ILGF-Ⅰ）、インスリン様成長因子Ⅱ（ILGF-Ⅱ）、形質転換成長因子（TGF-）、チトクロムP450抑制剤、骨形成プロスタノイド、BMP2、BMP4、BMP7、BMP14、及び/又は、例えば、ビスフォスフォネートなどの抗吸収剤などの1つ以上の他の好適な治療の剤を含むことができる。

【0060】

本明細書に示した本化合物に加えて、本発明の他の実施形態は、本化合物のジアステレオマー、ラセミ体、光学異性体、及び他の異性体を含む、式に示したいずれの立体中心での個々の立体異性体の任意及びすべてのものを包含する。本発明の実施形態では、水和物及び有機溶媒で形成された水和物などの本化合物のポリモルフ及び溶媒化合物のすべてが含まれる。「溶媒化合物」は、溶質の1つ以上の分子によって形成された複合体又は凝集体、例えば、化合物又はこれの薬学的に許容される塩、及び溶媒の1つ以上の分子である。このような溶媒化合物は、実質的に固定モル比の溶質及び溶媒を有する結晶質固体とすることができる。好適な溶媒は、当業者に知られており、例えば、水、エタノール又はジメチルスルホキシドである。位置特異的及び/又はエナンチオ選択的合成及び分解などの当技術分野で公知の方法によってこのような異性体、ポリモルフ、及び溶媒化合物を調製

10

20

【0061】

塩を調製する能力は、化合物の酸性度又は塩基度に依存している。本化合物の好適な塩としては、これらに限定されないが、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、過塩素酸、硫酸、硝酸、リン酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ビルビン酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、炭酸ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクロヘキサンスルファミン酸、サリチル酸、p-アミノサリチル酸、2-フェノキシ安息香酸、及び2-アセトキシ安息香酸で生成された塩などの酸添加塩；サッカリンで生成された塩；ナトリウム及びカリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム及びマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；及び第4級アンモニウム塩などの有機又は無機リガンドで形成された塩が挙げられる。

30

【0062】

さらに好適な塩としては、これらに限定されないが、本化合物の酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、炭酸水素塩、硫酸水素塩、二酒石酸塩、ホウ酸塩、プロミド、エデト酸カルシウム、カムシレート、炭酸塩、クロリド、クラブラン酸塩、クエン酸塩、ジヒドロクロリド、エデト酸塩、エジシル酸塩、エストレート、エシレート、フマル酸塩、グルセプテート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニレート、ヘキシルレゾルシン酸塩、ヒドラバミン、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヒドロキシナフトエ酸塩、ヨーダイド、イセチオン酸塩、乳酸塩、ラクトビオン酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、メチルプロミド、メチル硝酸塩、メチル硫酸塩、ムカート、ナプシル酸塩、硝酸塩、N-メチルグルカミンアンモニウム塩、オレイン酸塩、パモ酸塩（エンボン酸塩）、パルミチン酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩/ニリン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、硫酸塩、塩基性酢酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、テオクレート、トシル酸塩、トリエチオダイド、及びバレリアン酸塩が挙げられる。

40

【0063】

本明細書での化合物の言及は薬学的に許容される塩又はこれらの溶媒化合物を含むと理解しなければならない。

【0064】

50

特に対象を治療するための使用のための本発明の方法、組成物又はキットのいずれでも、本発明の組成物は、任意で1つ以上の他の好適な治療薬と組み合わせることができる。特定の状態の治療に好適な任意の治療薬を用いることができる。好適なこのような薬剤又は医薬品は当業者に明白である。例えば、骨障害の治療には、本発明の組成物と組み合わせ、従来の治療の薬剤を用いることができるいくつかのこのような薬剤としては、例えば、副甲状腺ホルモン、フッ化ナトリウム、インスリン様成長因子I (ILGF-I)、インスリン様成長因子II (ILGF-II)、形質転換成長因子 (TGF- )、チトクロムP450抑制剤、骨形成プロスタノイド、BMP2、BMP4、BMP7、BMP14、及び/又はビスフォスフォネート又は骨吸収の他の抑制剤が挙げられる。

#### 【0065】

本発明の組成物及び薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物として、本発明の組成物又は化合物を製剤化することができる。「薬学的に許容されるキャリア」とは、生物学的に又はほかの点で好ましくないものではない物質を意味し、すなわち、好ましくない生物学的作用を引き起こすことなく、又は含有されている医薬組成物の他の成分と有害に相互作用することなく、対象に当該物質を投与することができる。当該キャリアは、当業者によく知られているように有効成分の分解を最小化する及び対象の有害な副作用を最小化するように必然的に選択される。薬学的に許容されるキャリア及び医薬組成物の他の成分の考察には、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, 1990を参照。いくつかの好適な医薬キャリアは当業者に明白であり、例えば、水（無菌及び/又は脱イオン水を含む）、好適な緩衝剤（PBSなど）、生理的生理食塩水、細胞培養基（DMEMなど）、人工脳脊髄液、ジメチルスルホキシド（DMSO）などが挙げられる。

#### 【0066】

当業者であれば、本発明の特定の製剤が、少なくとも一部、特定の薬剤又は用いられる薬剤と投与の選択経路の組み合わせに依存すると認識するであろう。このため、本発明の組成物の幅広い好適な製剤がある。いくつかの代表的な製剤を以下に記載する。他の製剤は、当業者に明白であろう。局所に又は治療が必要な細胞組織又は器官に直接、化合物を投与することができる、又は全身に化合物を投与することができる。

#### 【0067】

経口投与に好適な製剤又は組成物は、水、生理食塩水、又は果汁などの希釈剤に溶解した効果的な量の化合物などの液体溶液；それぞれが固体、顆粒又は凍結乾燥細胞として所定の量の有効成分を含有する、カプセル、薬袋又は錠剤；溶液又は水性液体中の懸濁液；及び水中油滴型乳剤又は油中水滴型乳剤で構成することができる。錠剤形態には、1つ以上のラクトース、マンニトール、コーンスターチ、バレイショデンプン、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、着色料、及び同種同効キャリアを含むことができる。消化管内で本発明の薬剤の分解を阻止するために、合成及び天然ポリマーミクロスフェア、又は他の手段に、経口送達に好適な製剤を組み入れることもできる。

#### 【0068】

非経口投与（例えば、静脈内）に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を所定のレシピエントの血液と等張にする溶質を含有することができる水性及び非水性の等張性無菌注射溶液、ならびに懸濁化剤、溶解剤、増粘剤、安定剤、及び防腐剤を含むことができる水性及び非水性の無菌懸濁液が含まれる。製剤は、アンプル及びバイアルなどのユニット・ドーズ型又はマルチ・ドーズ型の密封容器に入れ、使用直前に、無菌の液体キャリア、例えば、注射用の水を添加するだけでよいフリーズドライ（すなわち、凍結乾燥）状態で保管することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、前記に記載したような無菌の粉末、顆粒及び錠剤から調製することができる。

#### 【0069】

吸入により投与するために、化合物を単独で又は他の治療の剤と組み合わせて、エアゾール製剤に作製することができる。これらのエアゾール製剤を、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの許容される加圧噴射剤に入れることができる。

【0070】

局所投与に好適な製剤には、着香料、通常、スクロース及びアカシア又はタラガカントの有効成分を含むロゼンジ；ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシアなどの不活性基剤の有効成分を含む香錠；好適な液体キャリアの有効成分を含むうがい薬；又はクリーム、乳剤、懸濁液、溶液、ゲル、クリーム、ペースト、フォーム、潤滑剤、噴霧剤、坐剤などが含まれる。

【0071】

他の好適な製剤には、例えば、持効性の化合物に好適なハイドロゲル及びポリマー、又は化合物の少用量送達に好適なナノパーティクルが含まれる。このような製剤は、当業者によく知られている。

【0072】

当業者であれば、やがて特定の用途に基づいて好適又は適切な製剤を選択、適合又は開発することができることを認識するであろう。また、本発明の医薬組成物は、全身、局所又は両者かどうかなどのさまざまな経路によって、投与のために調製することができる。このような例としては、直接注射、カテーテル又は他の医療器具による導入、局所塗布、直接塗布、及び／又は器具を動脈又は他の適切な組織部位に埋没することなどによって、これらに限定されないが、関節内、頭蓋内、皮内、肝内、筋肉内、眼内、腹腔内、髄腔内、静脈内、皮下、経皮、又は直接骨部のアステローム部位に実施される投与が挙げられる。

【0073】

外科器具若しくは医療器具若しくはインプラント内に含まれるように、又はこれらによる放出に適合するように化合物を製剤化することができる。特定の態様では、化合物でインプラントを被覆するそうでなければ治療することができる。例えば、ハイドロゲル、又は、生体親和性及び／又は生分解性ポリマーなどの他のポリマーを用いて、本発明の組成物でインプラントを被覆することができる（すなわち、ハイドロゲル又は他のポリマーを用いて、医療器具での使用に組成物を適合させることができる）。薬剤で医療器具を被覆するためのポリマー及びコポリマーは、当技術分野で周知である。医療器具及びインプラントの例としては、これらに限定されないが、縫合系及び人工関節などの人工器官が挙げられ、例えば、ピン、スクリュー、プレート又は人工関節の形状とすることができる。

【0074】

化合物の「効果的な量」は、本明細書で用いられる場合、少なくとも検出可能な効果をもたらすことができる量を指す。「治療に効果的な量」は、本明細書で用いられる場合、治療される対象に合理的な期間にわたって少なくとも検出可能な治療の反応（例えば、1つ以上の症状の改善）をもたらすことができる量を指す。

【0075】

本発明の実施形態では、化合物がさまざまな従来のアッセイによって測定されるとおり、非治療対照試料の反応の約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、150%、200%以上治療の反応を刺激する又は抑制することができる。これらの範囲の中間値も含まれる。

【0076】

化合物の用量は、錠剤又はカプセルなどの単位剤型とすることができる。用語「単位剤型」は、本明細書で用いられる場合、動物（例えば、ヒト）の対象のための単位用量として好適な物理的に分離した単位を指し、各単位が、薬学的に許容される希釈剤、キャリア、又はビヒクルとともに所望の効果をもたらすのに十分な量に計算され、単独で又は他の治療薬と組み合わせて所定の量の本発明の薬剤を含有する。

【0077】

当業者は、個々の患者に所望の効果的な量又は効果的な濃度の薬剤をもたらすために用いられる、組成物の正確な製剤のための投与の適切な用量、スケジュール、及び方法を規

10

20

30

40

50

定どおりに決定することができる。当業者は、疾病、障害、又は状態のしかるべき臨床的症状を分析することに加えて、しかるべき患者の試料（例えば、血液及び／又は組織）を直接又は間接的に分析することによって本化合物の「効果的な濃度」の適切な指標を容易に決定し、使用することもできる。

【0078】

本発明に関係してヒト、などの動物、に投与される化合物又はその組成物の正確な用量は、対象の種、年齢、体重、及び一般的状態、治療する障害の重症度又は機序、用いられる特定の薬剤又はビヒクル、投与の方法、患者が摂取している他の医薬品、及び個々の投与計画及び特定の患者に適切な用量レベルを決定する場合に担当医師が通常考慮する他の因子などに応じて、対象次第で変わる。in vivoで所望の濃度を実現するために用いられる用量は、本化合物の形態の効力、ホストの本化合物と関係する薬力学、追加的薬剤のありなし、感染した個体の疾病の状態の重症度、ならびに、全身投与の場合、個体の体重及び年齢によって決定される。用量のサイズは、用いられる特定の薬剤、又はその組成物に伴う可能性がある有害な副作用の存在によって決定することもできる。一般的に、可能である場合は常に、有害な副作用を最小に維持することが好ましい。

10

【0079】

例えば、約5 ng（ナノグラム）～約1000 mg（ミリグラム）、又は約100 ng～約600 mg、又は約1 mg～約500 mg、又は約20 mg～約400 mgの範囲の用量で投与することができる。例えば、用量は、約0.0001 mg/kg～約1500 mg/kg、又は約1 mg/kg～約1000 mg/kg、又は約5 mg/kg～約150 mg/kg、又は約20 mg/kg～約100 mg/kgの体重比の用量を実現するように選択することができる。例えば、用量単位は、化合物又は化合物を含む組成物の範囲が約1 ng～約5000 mg、又は約5 ng～約1000 mg、又は約100 ng～約600 mg、又は約1 mg～約500 mg、又は約20 mg～約400 mg、又は約40 mg～約200 mgとすることができる。本発明の1つの実施形態では、前記の化合物の量（例えば、数グラム）が、スカフォールドの一部として脊椎固定法などの局所に投与される。

20

【0080】

所望の治療の効果を誘発するために必要に応じて、1日当たり1回、1日当たり2回、1日当たり4回、1日当たり4回以上の用量で投与することができる。例えば、用量投与計画は、約0.01～約1000 nM、又は約0.1～約750 nM、又は約1～約500 nM、又は約20～約500 nM、又は約100～約500 nM、又は約200～約400 nMの範囲で本発明の化合物の血清濃度を実現するように選択することができる。例えば、用量投与計画は、約1 µg/L（1リットル当たりのマイクログラム）～約2000 µg/L、又は約2 µg/L～約1000 µg/L、又は約5 µg/L～約500 µg/L、又は約10 µg/L～約400 µg/L、又は約20 µg/L～約200 µg/L、又は約40 µg/L～約100 µg/Lの範囲で本発明の化合物の最大半量の用量の平均血清濃度を実現するように選択することができる。

30

【0081】

本発明の特定の実施形態には、治療の結果を改善するために化合物で独立して又は相乗作用的に作用する追加的薬剤による治療を含むこともできる。組み合わせ治療で投与する場合、本化合物と同時に本化合物以外の薬剤を与えることができる、又は所望のとおり時間差で投与することができる。組成物に2つ（以上）の薬剤を組み合わせることもできる。組み合わせる場合、いずれかが単独で用いる場合よりそれぞれの用量を少なくすることができる。標準用量パラメータを用いて当業者によって好適な用量を決定することができる。

40

【0082】

本明細書で用いられる場合、文脈が明らかに別段の指示をしない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は複数の指示物を含む。

【0083】

50

「対象」は、本明細書で用いられる場合、化合物で治療することができる状態の症状を示す任意の動物を含む。好適な対象（患者）としては、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、又はモルモットなど）、家畜、及び飼育動物又はペット（ネコ、イヌ、又はウマなど）が挙げられる。ヒトの患者を含む非ヒト霊長動物及びヒトが含まれる。典型的な対象には、異常な量（「正常」又は「健康な」対象より少ない量）の1つ以上のヘッジホッグシグナリングによって刺激されている生理的活性を示す動物が含まれる。異常な活性はヘッジホッグ活性の活性化を含むさまざまな機序の任意のものによって制御することができる。異常な活性の結果、病態となる可能性がある。

#### 【0084】

本発明の1つの実施形態は、*in vitro*又は*in vivo*のいずれかで本明細書に開示したいずれかの方法に有用なキットである。このようなキットは、化合物又は生体活性もしくはその医薬組成物を含み、例えば、Hh経路-媒介活性、又は他の好適な治療の薬剤を増加させる1つ以上他のオキシステロールを含むことができる。任意で、キットは、方法を実施するための指示書を含む。本発明のキットの任意の要素には、好適な緩衝剤、薬学的に許容されるキャリアなど、容器、又は包装材料が含まれる。キットの試薬は、試薬が、例えば、凍結乾燥形態又は安定化液体で安定している容器中にあるようにすることができる。試薬は、単一使用形態、例えば、単一剤型とすることもできる。当業者であれば、本発明の方法のいずれかを実施するのに好適なキットの構成要素を認識するであろう。

10

#### 【0085】

化合物を単独で又は他の治療の薬剤と組み合わせて用いて、さまざまな状態を治療することができる。

20

#### 【0086】

化合物は、ヘッジホッグ経路活性を増加させることができる。

#### 【0087】

化合物の1つの作用は、その細胞系列特異的分化をさまざまな細胞型、例えば、骨芽細胞に誘発するために多能性細胞を標的にすることができる。例えば、化合物で処理した間葉幹細胞が骨芽細胞分化のマーカーの誘発発現を示す可能性がある。任意の特定の機序に束縛されることを望まないと、この細胞系列特異的分化が、これらの細胞でのヘッジホッグシグナリングの誘発の結果であることを示唆している。しかし、本明細書に記載した治療の方法は、本化合物が機能する機序とは関係なく本発明に含まれる。化合物は、骨形成、骨芽細胞分化、骨形態形成及び/又は骨増殖の刺激から便益を受ける状態を治療するのに有用である可能性がある。これらの状態又は治療のうち、例えば、脊椎固定又は骨粗鬆症で局所骨形成の刺激のための骨誘導治療、骨折の修復又は治癒、あごの骨形成の増加が臨床効果によるものである歯科の方法、外傷によって誘発された頭蓋顔面骨欠損又は口蓋裂/口唇裂などの先天性奇形の修復、及び生まれつき骨成長が異常である他の多くの筋骨格系障害は、当業者に明白であろう。開放性骨折及び非癒合のリスクが高い骨折を治療するために、及び脊椎障害の対象、を含む脊椎固定（例えば、前方経路腰椎椎体間固定、後方経路腰椎椎体間固定、及び頸椎固定）が必要な対象又は変形性椎間板疾患又は腰椎及び頸椎に影響を及ぼす関節炎の対象に治療を施すことができる。さらに、化合物を用いて破骨細胞による骨吸収の増加から同時に骨芽細胞による骨形成の減少となっている、特に加齢及び閉経後集団で、骨粗鬆症を治療することができる。

30

40

#### 【0088】

さらに具体的には、以下の型の骨関連治療を実施することができる。

#### 【0089】

1. これらに限定されないが本化合物を吸収し、その後、身体内に入れられるコラーゲンなどの相溶性分子からなるスカフォールドを用いて、局所の骨形成を刺激するために身体の局所に送達される骨形成剤として化合物を用いることができる。例えば、本化合物を含有し、横突起の間に又は2つ以上の頸椎が固定される椎間板に入れることができるスカフォールドが、例えば、脊椎固定、仮関節及び非癒合固定で示される。他の実施形態では

50

、本化合物を含有するスカフォールドは、骨形成及び骨折の治癒を刺激するために骨折した骨に入れられる；本化合物による骨の再生が示される頭蓋又は顎顔面骨欠損などの骨欠損に入れられる；又は人工歯根などの歯科の方法の前に骨を再生する手段として骨形成を刺激するためにあごの骨に入れられる。

#### 【0090】

2. *in vitro*で骨形成剤として化合物を用いることができる。例えば、局所の骨形成を刺激するために前記1)に示したように、整形外科的及び他の方法で、このような細胞を利用する前に、骨形成分化を刺激するために骨形成細胞、例えば間葉幹細胞に化合物を投与することができる。

#### 【0091】

3. 骨形成細胞のヘッジホッグシグナル経路を刺激するために、*in vitro*で化合物を用いて、これにより*in vitro*又は*in vivo*で細胞を骨形成分化させることができる。

#### 【0092】

前記及び以下の例では、全温度が調整されていない摂氏度で示され、別段の記載がない限り、部及びパーセントのすべてが重量部及び重量パーセントである。

#### 【0093】

前記に記載した骨形成オキシステロールは、対象とする細胞、組織、又は器官を標的にするための直接、局所投与に有用である。

#### [実施例]

#### 【0094】

Oxy 149 (3a)、Oxy 153 (4a)、Oxy 154 (3b)、及びOxy 155 (4b)は、骨形成骨髄基質細胞、M2-10B4の骨形成分化を誘発する化合物Oxy 133のBTA抱合構造類似体である。アルカリホスファターゼ(ALP)酵素活性の誘発、ならびに骨形成分化マーカー遺伝子ALP、骨シアロタンパク質(BSP)、及びオステリックス(OSX)の誘発発現によって骨形成分化を評価した。

#### 【0095】

*in vitro*で1  $\mu$ Mの濃度のこれらのオキシステロールのそれぞれと接触させた骨髄基質細胞、M2-10B4のALP活性を図4に示している。細胞とオキシステロールが接触しなかった対照と比較して(対照の相対発現が1.01であった)1  $\mu$ Mの濃度の各オキシステロールとの初回接触4日後に*in vitro*でM2-10B4細胞のALPの遺伝子発現を図5に示している。

#### 【0096】

M2-10B4細胞のALPの活性化に基づいたこれらのオキシステロールのEC50の要約を表1に示している。

オキシステロール	EC50
Oxy149	0.40 $\mu$ M
Oxy153	1.40 $\mu$ M
Oxy 154	0.63 $\mu$ M
Oxy155	0.33 $\mu$ M

表1

#### 【0097】

1  $\mu$ Mの濃度の各オキシステロールとの初回接触4日後に*in vitro*でM2-10B4細胞のBSPの遺伝子発現を図6に示している。1  $\mu$ Mの濃度の各オキシステロールとの初回接触4日後に*in vitro*でM2-10B4細胞のOSXの遺伝子発現を図7に示している。

#### 【0098】

ヘッジホッグHh標的遺伝子Patched 1 (Ptch)及びHh相互作用タンパク

10

20

30

40

50



質 (H I P) の誘発発現によって明らかになったとおり、O x y 1 4 9、O x y 1 5 3、O x y 1 5 4、及びO x y 1 5 5がM 2 - 1 0 B 4細胞のヘッジホッグ (H h) シグナリングを活性化する。また、H h経路抑制剤シクロパミン (C y p) のオキシステロール誘発骨形成分化への抑制効果によって評価されたとおり、H hシグナリングを活性化することによってこれらのオキシステロールが骨形成分化を誘発する。1  $\mu$  Mの濃度の各オキシステロールとの初回接触4日後にi n v i t r oでM 2 - 1 0 B 4細胞のP t c h遺伝子の発現を図8に示している。1  $\mu$  Mの濃度の各オキシステロールとの初回接触4日後にi n v i t r oでM 2 - 1 0 B 4細胞のH I P遺伝子の発現を図9に示している。

#### 【0099】

H h経路抑制剤シクロパミンは、オキシステロール誘発アルカリホスファターゼ活性を抑制することができる。各オキシステロールとの接触ありなしで、i n v i t r oでシクロパミン (C y c ; 5  $\mu$  M) をM 2 - 1 0 B 4骨髄基質細胞と接触させる効果を表2に示している。

治療	A L P活性(単位/m gタンパク質 $\pm$ S D)
対照	1 $\pm$ 1
Oxy133 (1 $\mu$ M)	714 $\pm$ 5
Oxy133 + Cyc	31 $\pm$ 7
Oxy149 (1 $\mu$ M)	358 $\pm$ 51
Oxy149 + Cyc	26 $\pm$ 3
Oxy153 (5 $\mu$ M)	154 $\pm$ 36
Oxy153 + Cyc	19 $\pm$ 7
Oxy154 (1 $\mu$ M)	390 $\pm$ 68
Oxy154 + Cyc	18 $\pm$ 2
Oxy155 (1 $\mu$ M)	582 $\pm$ 8
Oxy155 + Cyc	39 $\pm$ 2
Cyc	1 $\pm$ 1

表2

#### 【0100】

O x y 1 3 3のB T A抱合構造類似体、すなわち、O x y 1 4 9、O x y 1 5 3、O x y 1 5 4、及びO x y 1 5 5は、i n v i t r oでヒドロキシアパタイト (H A P) 骨無機質を結合することができる。以下のとおり、i n v i t r o H A P結合アッセイを実施した。100%ジメチルスルホキシド (D M S O) 中に各分析対象物質の1 m M溶液を作製した。その後、さらに希釈し、p H 7 . 5の50 m M T r i s - H C l緩衝液中に20% D M S Oと各分析対象物質の20  $\mu$  M溶液を生成した。陰性対照としてエストラジオールを用いた及び20  $\mu$  Mの濃度でH A Pと結合しないことを示した。用いられたH A P濃度は50 m g / m Lであった。

#### 【0101】

各分析対象物質では、3つの組に試料を調製した。マイクロ遠心チューブに对照試料 (1 m Lの20  $\mu$  M分析対象物質) を移動した。マイクロ遠心チューブ中で第2の組の試料 (1 m Lの20  $\mu$  M分析対象物質) に50 m gのH A Pを添加した。試料をボルテックスし、10分間室温で穏やかに反転して混合し、その後、2分間4, 400 r p mで遠心分離し、試料に含有されるH A Pを沈殿させた。もう1つの組のマイクロ遠心チューブに上澄み液を移動した。

#### 【0102】

B i o - R a d S m a r t - S p e c 3 0 0 0を用いて220 ~ 520 n mで各分析対象物質の電子スペクトル走査 (紫外 - 可視) を得た。盲検液は、50 m M T r i s - H C

1 緩衝液、pH 7.5、20% DMSOであった。最大吸光度 ( $m_{a x}$ ) の波長を測定し、ベール - ランベルトの法則を用いて消散係数 ( ) を計算した。

#### 【0103】

HAPでインキュベートした試料の吸光度を  $m_{a x}$  で測定し、その後、ベール - ランベルトの法則及び事前に計算した を用いて分析対象物質のモル濃度を測定した。HAPと接触ありなしの分析対象物質 17 - エストラジオール、Oxy 149、Oxy 153、及びOxy 155の濃度を図10に示している。

#### 【0104】

その後、%結合の以下の式を用いて、各試料のHAPに吸収された分析対象物質のフラクションを計算した。

$$(H_0 - H) / H_0 \cdot 100 = \% \text{ 結合}$$

$H_0$  が対照試料の平均濃度であり、 $H$  がHAPで処理した試料の平均計算濃度である。HAPに対する17 - エストラジオール、Oxy 149、Oxy 153、及びOxy 155のパーセント結合を表3にまとめている。

化合物	ヒドロキシアパタイトに対する%結合
17β-エストラジオール	-1.95%
Oxy149	67.44%
Oxy153	95.78%
Oxy155	76.68%

表3

10

20

#### 【0105】

本出願に記載、引用、又は言及されている、これらに限定されないが、雑誌論文、特許出願、及び特許を含む、文書、参考文献、及び情報のすべては、あたかもそれぞれが個々に組み入れられるようにここに全体が参照により組み入れられる。このような文書には、これらに限定されないが、米国特許仮出願第61/643,746号(2012年5月7日に出願された)、国際出願第PCT/US2013/032693号(2013年3月15日に出願された)、米国特許仮出願第61/643,776号(2012年5月7日に出願された)、及び国際出願第PCT/US2013/032650号(2013年3月15日に出願された)が含まれる。このような文書には、これらに限定されないが、WO/2008/115469、WO/2008/082520、WO/2007/098281、WO/2007/028101、WO/2006/110490、WO/2005/020928、及びWO/2004/019884として公開された特許強力条約(PCT)国際出願も含まれる。

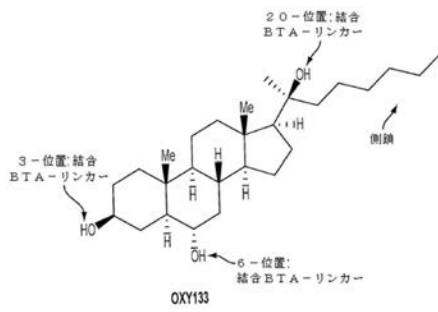
#### 【0106】

本明細書に図示し、記載した実施形態は、本発明を作製し、使用するための発明者らに公知の最良の方法を当業者に教示することだけを意図している。本明細書には本発明の範囲を限定するものはないと考えなければならない。示した全実施例は、代表的なものであり、限定するものではない。本発明の前記に記載した実施形態は、前記の教示に照らして当業者によって認識されるように本発明から逸脱することなく、修正する又は変更することができる。このため、クレーム及びその均等物の範囲内で、具体的に記載したものの以外のやり方で本発明を実施することができると理解しなければならない。

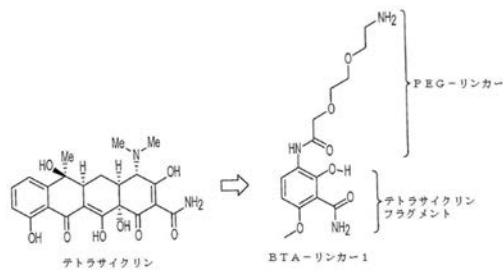
30

40

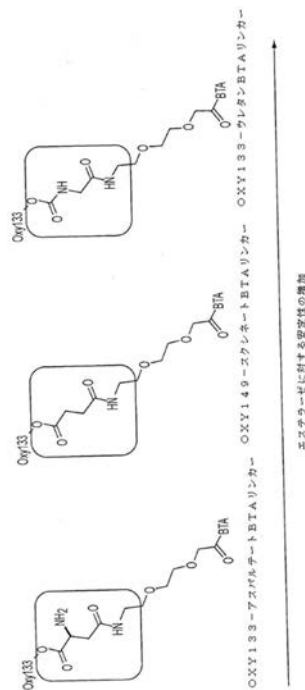
【図 1】



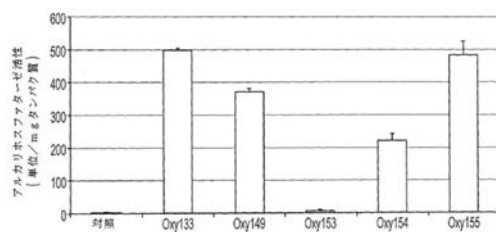
【図 2】



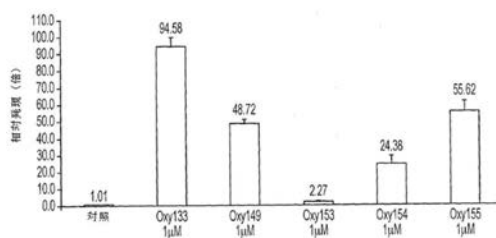
【図 3】



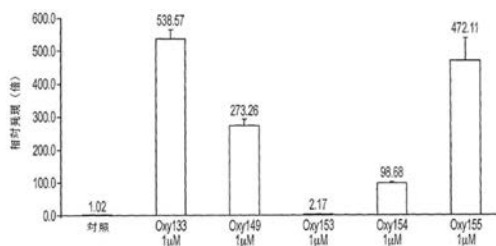
【図 4】



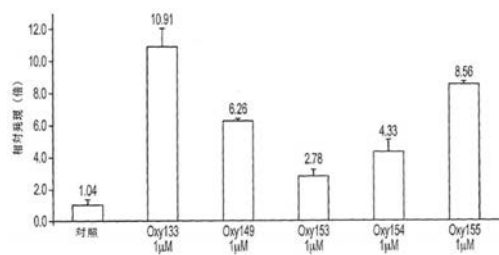
【図 5】



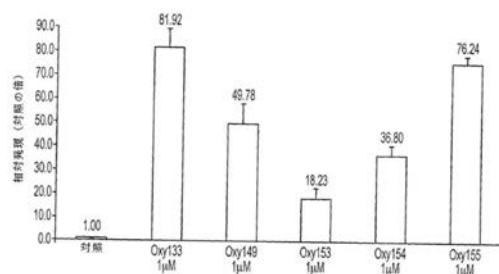
【図 6】



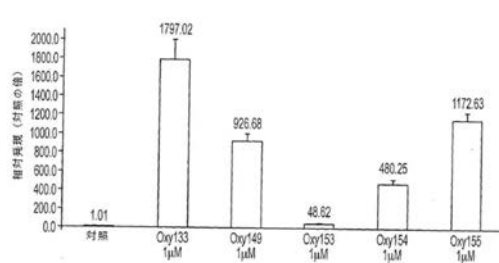
【図 7】



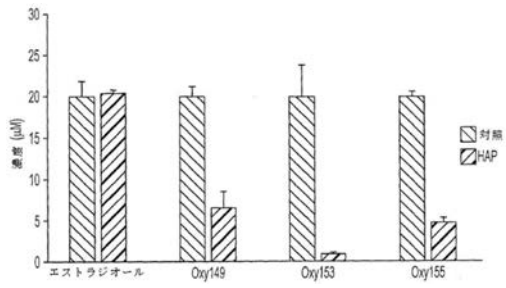
【図 8】



【図 9】



【図 10】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/036680

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 31/575 (2014.01)

CPC - C07J 9/00 (2014.09)

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)

IPC(8) - A61K 31/56, 31/575; A61P 19/08; C07J 9/00 (2014.01)

CPC - A61K 31/56, 31/575; C07J 9/00 (2014.09)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
USPC - 514/182; 552/540, 542, 546

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

PatBase, Google Patents, STN, Google Scholar, PubChem

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0008297 A1 (PARHAMI et al) 13 January 2011 (13.01.2011) entire document	1-26
A	WO 2012/024584 A2 (XIAO et al) 23 February 2012 (23.02.2012) entire document	1-26
A	WO 2012/024583 A2 (EPPERSON et al) 23 February 2012 (23.02.2012) entire document	1-26
A	WO 2012/024581 A2 (EPPERSON et al) 23 February 2012 (23.02.2012) entire document	1-26
A	STAPPENBECK et al. Novel oxysterols activate the Hedgehog pathway and induce osteogenesis. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22(18):5893-5897, 2012 [retrieved on 22.08.2014]. Retrieved from the Internet. <URL: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12009584">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12009584</a> >. Abstract	1-26
A, P	WO 2013/169397 A1 (PARHAMI et al) 14 November 2013 (14.11.2013) entire document	1-26
A, P	WO 2013/169399 A1 (PARHAMI et al) 14 November 2013 (14.11.2013) entire document	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

\* 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2014

Date of mailing of the international search report

10 SEP 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-1774

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**A 6 1 L 27/00 (2006.01)** A 6 1 L 27/00 G

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

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100172797

弁理士 有馬 昌広

(72)発明者 パラミ ファラッド

アメリカ国 カリフォルニア 9 0 0 4 9 ロサンジェルス # 2 1 2 サウスバーリントンアベニュー 6 1 2

(72)発明者 スタッペンベック フランク

アメリカ国 カリフォルニア 9 2 1 1 6 サンディエゴ イーストマウンテンビュードライブ 4 7 7 5

F ターム(参考) 4C081 AB02 BA12 CD34

4C086 AA01 AA02 AA03 DA11 MA01 MA04 NA14 ZA96 ZA97 ZC41

4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 NA14 ZA96 ZA97 ZC41

4C091 AA01 BB01 CC01 DD01 EE04 EE05 FF04 FF14 GG01 HH01

JJ03 KK01 LL01 MM03 NN01 PA02 PA05 PA06 PB04 QQ01