

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年12月30日(30.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/157515 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 211/88 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/45 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/061636
- (22) 国際出願日: 2009年6月25日(25.06.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-166290 2008年6月25日(25.06.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤 一夫 (UMEZAWA, Kazuo) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 石川 裕一 (ISHIKAWA, Yuichi) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 西山 繁 (NISHIYAMA, Shigeru) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 橘 みゆき (TACHIBANA, Miyuki) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 兼田 亜弓 (KANEDA, Ayumi) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横
- 浜市港北区日吉3丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人(ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル 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, 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, 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, PE, 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, MK, 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 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2009/157515 A1

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: 医薬組成物

(57) Abstract: Provided are pharmaceutical compositions that inhibit expression of iNOS and COX-2 without inhibiting NF- κ B. The pharmaceutical compositions that inhibit expression of iNOS and COX-2 without inhibiting NF- κ B comprise the DTCM glutarimide represented by formula (I) as active ingredient, and as a result are able to inhibit nitrogen monoxide (NO) production and prostaglandin production.

(57) 要約: 本発明の目的は、NF- κ Bを阻害せずにiNOSとCOX-2の発現を阻害する医薬組成物を提供することである。NF- κ Bを阻害せずにiNOSとCOX-2の発現を阻害する医薬組成物は、有効成分として、式(I)で示されるDTCMグルタルイミドを含有し、結果的に一酸化窒素(NO)の産生やプロスタグランジンの産生を阻害することができる。

明 細 書

発明の名称： 医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 一酸化窒素（NO）は、各種生体維持機構に関わる必須な内因性物質である一方、炎症等の原因物質にもなり得る。NO合成酵素（NOS）は、L-アルギニンを基質としてNO生成を触媒する酵素であり、iNOS、eNOS、nNOSという3つのアイソフォームが存在する。

[0003] 誘導型NO合成酵素iNOSは、他のアイソフォームと異なって、通常酵素活性は見られない。しかし、細胞がサイトカインやLPSなどの刺激を受けると、iNOSの産生が誘導され、大量のNOが一過性に産生される。このNOは、炎症のメディエーターであり、例えば、敗血症性ショックや、炎症による血管拡張や低血圧症の原因等になる。

[0004] 同様に、サイトカインや増殖因子などの刺激により誘導される酵素として、シクロオキシナーゼ2（COX-2）が知られている。この酵素もまた、プロスタグランジンの産生を通じ、炎症反応のメディエーターとして機能する。

[0005] このように、これら2つの誘導酵素は、炎症の主な反応経路を構成するため、iNOSやCOX-2を阻害する化合物を見出すことは、新規抗炎症薬の創製につながると考えられている（Mini Rev Med Chem vol.8, p.73-90, 2008）。

[0006] 一方、iNOSとCOX-2はNF- κ Bという転写因子が活性化されることにより、特にマクロファージ等で発現が誘導されることが知られているため、NF- κ Bを阻害することによってiNOSとCOX-2の発現を阻害する抗炎症剤の開発が期待されてきた。

[0007] また、iNOSは、大腸癌や乳癌をはじめとする種々の癌で高発現を示し

、更に、このDTCMグルタルイミドは、細胞の腫瘍性トランスフォーメーション及び腫瘍転移を阻害し得るので、抗腫瘍剤として使用できる。腫瘍細胞においてCOX-2を阻害すると腫瘍細胞の増殖が抑制されることなどから、iNOSやCOX-2の阻害剤は、抗腫瘍剤としても期待されている。

[0008] しかし、NF-κBを阻害することによってiNOSとCOX-2の発現を阻害する薬剤は、NF-κBを阻害することによる副作用の危険性が生じる。

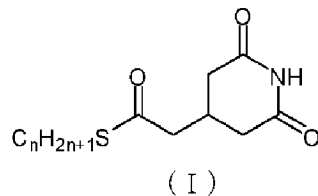
発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] そこで、本発明は、NF-κBを阻害せずにiNOSとCOX-2の発現を阻害する医薬組成物を提供することを目的としてなされた。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の化合物は、下式(I)で示される。



(式中、nは1～24のいずれかの整数である。)

また、本発明の、一酸化窒素(NO)産生阻害剤、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)発現阻害剤、プロスタグランジン産生阻害剤、破骨細胞分化抑制剤、COX-2発現阻害剤、iNOSまたはCOX-2が介在する疾患の治療剤は、上記化合物(I)を有効成分として含有する。前記疾患が、免疫性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、または腫瘍であってもよい。

[0011] また、本発明の、iNOSまたはCOX-2が介在する疾患の治療方法は、該疾患を有する患者に、上記化合物(I)を有効成分として含有する医薬組成物を投与する工程を含む。前記疾患が、免疫性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、または腫瘍であってもよい。例えば、リウマチ、変形性関節症、膠原病、バセドー氏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、感染症、関節炎、発熱、腰痛症、月経困難症、歯周

病、骨粗鬆症、骨がんであってもよい。

[0012] ==関連出願へのクロスリファレンス==

本出願は、平成20年6月25日付で出願した日本国特許出願第2008-166290に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明の一実施例において、RAW264.7細胞にDTCMグルタリイミド-C12を投与した時の、各DTCMグルタリイミド濃度に対する細胞生存率を示すグラフである。

[図2]本発明の一実施例において、RAW264.7細胞にDTCMグルタリイミド-C12を投与した時の、各DTCMグルタリイミド濃度に対する細胞増殖率を示すグラフである。

[図3]本発明の一実施例において、RAW264.7細胞にDTCMグルタリイミド-C12を投与した時の、各DTCMグルタリイミド濃度に対するDNA、RNA、タンパク質に対する合成阻害を示すグラフである。

[図4]本発明の一実施例において、DTCMグルタリイミド-C12が、マクロファージ活性化によるNO産生を抑制することを示すグラフである。

[図5]本発明の一実施例において、DTCMグルタリイミド-C6が、マクロファージ活性化によるNO産生を抑制することを示すグラフである。

[図6]本発明の一実施例において、DTCMグルタリイミド-C12の、マクロファージ活性化によるNO産生抑制効果は、DTCMグルタリイミド-C12のNO捕捉活性によるものではないことを示すグラフである。

[図7]本発明の一実施例において、DTCMグルタリイミド-C12が、マクロファージ活性化におけるiNOS発現を抑制することを示すグラフである。

[図8]本発明の一実施例において、DTCMグルタリイミド-C12が、マクロファージ活性化におけるCOX-2遺伝子発現を抑制することを示すグラフである。

[図9]本発明の一実施例において、DTCMグルタルイミド-C12が、マクロファージ活性化によるIL-6産生には影響しないことを示すグラフである。

[図10]本発明の一実施例において、DTCMグルタルイミド-C12が、マクロファージ活性化におけるNF- κ B活性化には影響しないことを、IKB- α の分解および再誘導を指標にして示すグラフである。

[図11]本発明の一実施例において、DTCMグルタルイミド-C12が、マクロファージ活性化におけるNF- κ B活性化には影響しないことを、NF- κ BのDNA結合能を指標にして示すグラフである。

[図12]本発明の一実施例において、DTCMグルタルイミド-C12が、マクロファージ活性化によるMAPK活性化には影響しないことを示すグラフである。

[図13]本発明の一実施例において、 $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度のDTCMグルタルイミド-C12が、マウス骨髄由来マクロファージに対して毒性を持たないことを示すグラフである。

[図14]本発明の一実施例において、マウス骨髄由来マクロファージからの破骨細胞への分化誘導におけるRANKL処理およびDTCMグルタルイミド-C12処理の影響を示す顕微鏡写真である。

[図15]本発明の一実施例において、マウス骨髄由来マクロファージをRANKL処理あるいはDTCMグルタルイミド-C12処理した場合の、分化した破骨細胞数を示すグラフである。

[図16]本発明の一実施例において、F9細胞をDTCMグルタルイミド-C12処理した場合の、生細胞率を示すグラフである。

[図17]本発明の一実施例において、F9細胞をDTCMグルタルイミド-C12処理した場合の、細胞増殖を示すグラフである。

発明を実施するための形態

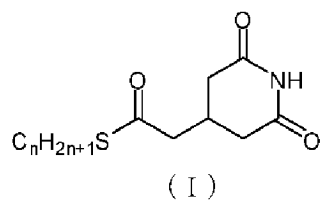
[0014] 以下に、本発明の実施の形態において実施例を挙げながら具体的かつ詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0015] 実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd. などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0016] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

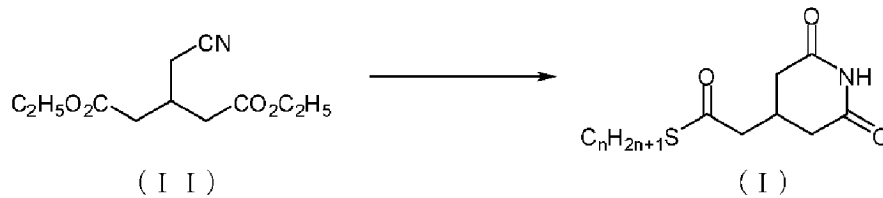
[0017] == D T C M グルタルイミド (DTCM-glutarimide) ==

本発明の化合物は、式 (I) で示される D T C M グルタルイミドである。



式中、 n は特に限定されないが、 $1 \sim 24$ のいずれかの整数であれば好ましく、 $1 \sim 18$ のいずれかの整数であればより好ましく、 $1 \sim 12$ または $6 \sim 18$ であることがさらに好ましく、 $6 \sim 12$ であることがもっとも好ましい。

[0018] この D T C M グルタルイミドは、例えば、以下のようにして合成できる。



まず、化合物（II）を酢酸に溶解させ、濃硫酸を加え、加熱還流する。反応混合物に水を加え、さらに加熱還流する。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去すると、油状物質が得られる。この油状物質をジメチルホルムアミドに溶解し、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド、4-ジメチルアミノピリジン、1-アルカンチオールを加え、室温で攪拌する。得られた反応液に水を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。その後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製すると、化合物（I）が無色固体として得られる。ここで、1-アルカンチオールのアルカン鎖のCの数を選択することで、化合物（I）のnの数を調整できる。

[0019] == iNOS発現阻害剤、COX-2発現阻害剤 ==

本発明のiNOS発現阻害剤は、有効成分として、上記式（I）で示されるDTCMグルタリイミドを含有し、NF-κBを阻害せずにiNOSの発現を阻害することにより、iNOS産生を阻害し、結果的に一酸化窒素（NO）の産生を阻害することができる。

[0020] また、本発明のCOX-2阻害剤は、有効成分として、式（I）で示されるDTCMグルタリイミドを含有し、NF-κBを阻害せずにCOX-2の発現を阻害することにより、COX-2産生を阻害し、結果的にプロスタグランジンの産生を阻害したり、破骨細胞の分化を抑制したりすることができる。

[0021] == iNOSまたはCOX-2が介在する疾患の治療剤 ==

iNOS産生の抑制及びCOX-2産生の抑制は、それぞれiNOS及びCOX-2が介在する疾患の治療につながる。したがって、iNOS発現やCOX-2発現を抑制することにより、式(1)で示されるDTCMグルタリミドは、iNOSまたはCOX-2が介在する疾患の治療剤として有用である。

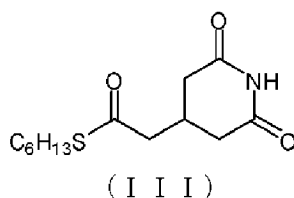
[0022] ここで、iNOSまたはCOX-2が介在する疾患とは、例えば、関節リウマチ等のリウマチ、変形性関節症、膠原病、バセドー氏病などの自己免疫疾患をはじめとする免疫性疾患、パーキンソン病・アルツハイマー病・多発性硬化症・筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、感染症・関節炎・発熱・腰痛症・月経困難症などの様々な炎症性疾患、乳がん・前立腺がん・結腸がん・大腸癌・胃ガン・食道がん・肺がん・肝がん・膵がん・扁平上皮がん・脳腫瘍・骨がん・多発性骨髄腫などの腫瘍、等である。また、プロスタグランジンの産生を阻害することにより、血管新生を阻害したり、炎症を抑制したりすることができ、破骨細胞の分化を抑制することにより、歯周病、骨粗鬆症、骨がんなどの治療や骨髄腫の進行抑制が可能になる。従って、式(1)で示されるDTCMグルタリミドは、特に抗免疫性疾患剤、抗神経変性疾患剤、血管新生阻害剤、非ステロイド系抗炎症剤、解熱鎮痛剤、抗腫瘍剤、等として有用である。

[0023] ==薬剤の製造方法及び投与方法==

これらの薬剤は、DTCMグルタリミドの他、薬学的に許容しうる通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤等の各種調剤用配合成分を含有することができる。またこれらの薬剤を患者に投与するに際しては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量で、また、経口投与又は非経口投与などの適切な投与方法で投与すれば良い。

[0024] 《実施例》

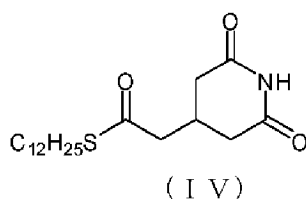
(1) DTCMグルタリミド (DTCM-glutarimide) の合成



まず、上記式 (I I I) で表される D T C M グルタルイミド C-6 を以下のようにして合成した。

[0025] 上記化合物 (I I) 1 g を酢酸 10 mL に溶解させ、濃硫酸 1 mL を加え、2 時間加熱還流した。反応混合物に水 5 mL を加え、さらに 2 時間加熱還流した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下で溶媒を除去すると、油状物質 0.85 g が得られた。この油状物質をジメチルホルムアミド 20 mL に溶解し、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド 1.1 g、4-ジメチルアミノピリジン 7.1 g、1-ヘキサントチオール 1.4 mL を加え、室温で 4 時間攪拌した。得られた反応液に水を加え、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過後、溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製すると、化合物 (I I I) が無色固体として 0.69 g 得られた。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.30 (6H, complex), 1.55 (2H, dd, $J = 7.6, 14.9$ Hz), 2.36 (2H, complex), 2.73 (5H, complex), 2.90 (2H, t, $J = 7.3$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CDCl_3) 14.1, 22.5, 27.7, 28.5, 29.3, 29.4, 31.3, 37.1, 47.9, 166.8, 171.12, 171.15.



同様に、1-ヘキサントチオールの代わりに、1-ドデカンチオールを用いて反応させ、上記式 (I V) で表される D T C M グルタルイミド C-12 を

合成した。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (3H, t, $J=7.0$ Hz), 1.27 (18H, complex), 1.55 (2H, dd, $J=6.5, 13.2$ Hz), 2.36 (2H, complex), 2.71 (5H, complex), 2.93 (2H, t, $J=7.0$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CDCl_3) 14.2, 22.7, 27.7, 28.9, 29.1, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 32.0, 37.2, 47.8, 166.8, 171.0.

(2) DTCMグルタリイミドが細胞に与える毒性の評価 I

本実施例では、DTCMグルタリイミドがRAW264.7細胞に与える細胞毒性を、細胞生存率及び細胞増殖率を指標として評価した。

RAW264.7細胞を、10%FBSを含むDMEM培地を用いてプラスチックディッシュに 1×10^4 cells/mlで播種し、0、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各濃度でDTCMグルタリイミド-C12を培地に添加し、24時間及び48時間培養した後、血球計算盤を用いて全細胞数を調べ、Trypan blue dye exclusion assayを用いて生細胞数を調べた。図1には各DTCMグルタリイミド濃度に対する細胞生存率（生細胞数/全細胞数）を、図2には各培養時間に対する全細胞数をプロットした。

[0026] 図1に示すように、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までのDTCMグルタリイミド濃度では、48時間後も細胞生存率がほぼ減少せず、細胞致死効果が検出されなかった。そして、図2に示すように、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度では、48時間後も全細胞数がほぼ減少せず、細胞増殖抑制が検出されなかった。

[0027] (3) DTCMグルタリイミドが細胞に与える毒性の評価 II

本実施例では、DTCMグルタリイミドがRAW264.7細胞に与える細胞毒性を、DNA、RNA、タンパク質に対する合成阻害を指標として評価した。

(2)と同様の条件で各濃度(0、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のDTCMグルタリイミド-C12を添加した培地を用いてRAW264.7細胞を6時間培養後、 ^3H 標識の0.1%チミジン、0

1%ウリジン、0.1%ロイシンを添加し、さらに1時間培養した。細胞を回収し、TCA不溶性画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。DTCMグルタリイミド-C12添加無しのコントロールで得られた結果を100とし、各DTCMグルタリイミド-C12濃度で得られた計測値を相対値として図3のようにグラフ化した。

[0028] 図3に示すように、10.0 μ g/mLまでのDTCMグルタリイミド濃度で、DNA、RNA、タンパク質のいずれに対しても、有意な合成阻害活性が検出されなかった。

[0029] (4) DTCMグルタリイミドによる、マクロファージ活性化によるNO産生の抑制

本実施例では、DTCMグルタリイミドがマクロファージ活性化によるNO産生を抑制することを示す。

(2)と同様の条件で各濃度(0、0.1、0.3、1.0、3.0 μ g/mL)のDTCMグルタリイミド-C12を添加した培地を用いてRAW264.7細胞を2時間培養後、3.0 μ g/mLのLPSを添加して、さらに20時間培養した。その後、NO産生量をGriess反応によって測定し、各DTCMグルタリイミド-C12濃度に対してグラフ化(図4の棒グラフ)した。

[0030] 図4に示すように、RAW264.7細胞は、LPSを刺激した20時間後に過剰にNOを産生しており、DTCMグルタリイミド-C12は、このNOの産生を濃度依存的に顕著に抑制した。なお、NOを発現しないネガティブコントロール(以下、図中ではCと示す。)として、LPSによって刺激していない細胞を用い、NO発現を抑制するポジティブコントロールとして、DTCMグルタリイミド-C12のかわりに、10 μ g/mLの(-)-DHMEQ(以下、図中ではDと示す。)を添加した培地で培養した細胞を用いた。

[0031] また、同時にMTT法により生細胞を計測し、細胞増殖抑制について調べた(図4の折れ線グラフ)が、各DTCMグルタリイミド-C12濃度に対

して全細胞数は変わらず、DTCMグルタルイミド-C12の添加は細胞増殖には影響を与えなかった。このように、DTCMグルタルイミド-C12の、マクロファージ活性化によるNO産生の抑制効果は、細胞増殖抑制によるものではない。

[0032] 同様の実験をDTCMグルタルイミド-C6で行ったところ、DTCMグルタルイミド-C12で得られたのとほぼ同じ結果が得られた(図5)。

[0033] さらに、NOは培養上清中に放出されると、速やかにnitrite (NO_2^-)に代謝されることから、培養上清中のnitriteをGriess法により測定し、DTCMグルタルイミド-C12のNO捕捉活性の指標とした。なお、検量線は亜硝酸ナトリウムを用いて作成した。

[0034] 1. 5 mL エッペンドルフチューブ内で、亜硝酸ナトリウムを蒸留水に溶かし、0.001、0.01、0.1、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亜硝酸ナトリウム水溶液を用意して検量線を作成した。その後、これらの亜硝酸ナトリウム水溶液に3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDTCMグルタルイミド-C12を直接添加し、10分間静置した後、それぞれを100 μL ずつ96ウエルプレートにとった。そこにGriess試薬を100 μL 添加して10分間反応させ、マイクロプレートリーダーで波長570 nmにおけるOD値を測定した。

[0035] 図6に示すように、DTCMグルタルイミド-C12はNO捕捉活性を有さなかった。

このように、DTCMグルタルイミドの、マクロファージ活性化によるNO産生抑制効果は、DTCMグルタルイミドのNO捕捉活性によるものではない。

[0036] (5) DTCMグルタルイミドによる、マクロファージ活性化におけるiNOS発現の抑制

本実施例では、DTCMグルタルイミドがマクロファージ活性化におけるiNOS遺伝子発現を抑制することを示す。

(4)と同様の条件でRAW264.7細胞を活性化し、細胞を回収して常法によってタンパク質を抽出し、抗iNOS抗体(Santa Cruz Biotechnolog

y) 及び抗 α -チューブリン抗体 (Sigma Aldrich Japan) を希釈率 1/3000 で用いて、ウエスタン・ブロッティングを行った。なお、iNOS を発現しないネガティブコントロールとして、LPS によって刺激していない細胞を用い、iNOS 発現を抑制するポジティブコントロールとして、DTCM グルタルイミド-C12 のかわりに、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の (-)-DHMEQ を添加した培地で培養した細胞を用いた。

[0037] 図 7 に示すように、RAW264.7 細胞は、LPS で刺激することにより iNOS を発現するようになるが、DTCM グルタルイミド-C12 はこの iNOS の発現を濃度依存的に顕著に抑制した。

このように、DTCM グルタルイミドは、マクロファージ活性化における iNOS 遺伝子発現を抑制し、その抑制の強さは DTCM グルタルイミドの濃度に相関する。

[0038] (6) DTCM グルタルイミドによる、マクロファージ活性化における COX-2 発現の抑制

本実施例では、DTCM グルタルイミドがマクロファージ活性化における COX-2 遺伝子発現を抑制することを示す。

(4) と同様の条件で RAW264.7 細胞を活性化し、細胞を回収して常法によってタンパク質を抽出し、抗 COX-2 抗体 (BD Bioscience) 及び抗 α -チューブリン抗体 (Sigma Aldrich Japan) を希釈率 1/3000 で用いて、ウエスタン・ブロッティングを行った。COX-2 を発現しないネガティブコントロールとして、LPS によって刺激していない細胞を用い、COX-2 発現を抑制するポジティブコントロールとして、DTCM グルタルイミド-C12 のかわりに、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の (-)-DHMEQ を添加した培地で培養した細胞を用いた。

[0039] 図 8 に示すように、RAW264.7 細胞は、LPS で刺激することにより COX-2 を発現するようになるが、DTCM グルタルイミド-C12 はこの COX-2 の発現を濃度依存的に顕著に抑制した。

このように、DTCM グルタルイミドは、マクロファージ活性化における

COX-2 遺伝子発現を抑制し、その抑制の強さはDTCMグルタリミドの濃度に相関する。

[0040] (7) DTCMグルタリミドは、マクロファージ活性化によるIL-6産生には影響しない

炎症性刺激によって活性化されたマクロファージは、IL-6やTNF- α などの炎症性サイトカインを産生するが、本実施例では、DTCMグルタリミドがマクロファージ活性化によるIL-6産生には影響しないことを示す。

[0041] (4)と同様の条件でRAW264.7細胞を活性化し、細胞を回収して常法によってタンパク質を抽出し、抗IL-6抗体があらかじめ固定化されている96wellのポリスチレンマイクロプレートを用いて、ELISA法を行った。なお、IL-6を産生しないネガティブコントロールとして、LPSによって刺激していない細胞を用い、IL-6産生を抑制するポジティブコントロールとして、DTCMグルタリミド-C12のかわりに、10 μ g/mL (-) -DHMEQを添加した培地で培養した細胞を用いた。図9に、10⁶細胞あたりのIL-6の検出濃度を示す。

[0042] 図9に示すように、RAW264.7細胞は、LPSで刺激することによりIL-6を発現するようになり、DTCMグルタリミド-C12は、3.0 μ g/mL以下の濃度では、このIL-6の産生には全く影響を与えなかった。

このように、DTCMグルタリミドは、細胞毒性の生じない濃度では、マクロファージ活性化におけるIL-6の発現を阻害しない。

[0043] (8) DTCMグルタリミドはマクロファージ活性化におけるNF- κ B活性化には影響しない

細胞内から核内へのシグナル伝達に関与するNF- κ Bは、免疫・炎症反応において刺激誘導される多くの遺伝子の発現誘導に関わっている転写因子として知られている。RAW264.7細胞において、マクロファージを活性化するLPS刺激は、TLR4を介してNF- κ Bを活性化する。また、

NF- κ Bは通常、抑制タンパク質 I κ Bと複合体を形成し、不活化された状態で細胞質中に存在するが、LPSなどの刺激を受けると、I κ B- α はリン酸化された後、ユビキチン化を受け、プロテアソームによって分解される。さらに、I κ B- α のプロモーター領域にはNF- κ Bの結合サイトが存在するため、NF- κ Bの活性化によってI κ B- α は再誘導される。このように、マクロファージ活性化後の調節にNF- κ Bが重要な役割を果たしているが、本実施例では、DTCMグルタルイミドがマクロファージ活性化におけるNF- κ B活性化には影響しないことを示す。

[0044] まず、(2)と同様の条件で、3.0 μ g/mLのDTCMグルタルイミド-C12を添加しない培地と添加した培地を用いて、RAW264.7細胞を2時間培養後、3.0 μ g/mLのLPSを添加して、さらに0、5、15、30、60分の各時間培養した。それぞれの細胞を回収して常法によってタンパク質を抽出し、抗I κ B- α 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を希釈率1/500で、抗 α -チューブリン抗体 (Sigma Aldrich Japan) を希釈率1/3000で用いて、用いて、ウエスタン・ブロッティングを行った。

[0045] 図10に示すように、DTCMグルタルイミド-C12未処理では、LPSを刺激した15分後にI κ B- α の分解がおり、30分後から再誘導が起こった。そして、DTCMグルタルイミド-C12で前処理しても、細胞毒性の生じない濃度では、I κ B- α の分解および再誘導には影響を与えなかった。

[0046] 次に、(2)と同様の条件で、各濃度(0、0.1、0.3、1.0、3.0 μ g/mL)のDTCMグルタルイミド-C12を添加した培地を用いてRAW264.7細胞を2時間培養後、3.0 μ g/mLのLPSを添加して、30分間培養した。その後、核抽出物を常法により調整し、³²Pでラベルしたプローブ3 μ Lを用いてゲルシフトアッセイを行った。

[0047] プローブの調製は、以下のように行った。まず、1.75 pmol/mL oligonucleotide (Promega社) (5'-ATGTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' 配列番号1) を

4 μ L、10 \times T4 PNK バッファー (Takara) を4 μ L、nucleotide free water を10 μ L混ぜ、ここに2 μ Lの [γ - 32 P] -ATP (Amersham社) を加えて37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした後、80 μ LのTE バッファー (10 mM Tris-HCl : 1 mM EDTA=1 : 1) を加え、反応を停止させた。その後、充填されていたTE バッファーを除去して蒸留水で洗浄した後、Nick Column (Amersham社) に100 μ Lの反応液をのせた後、400 μ Lの蒸留水をのせ、カラムからの溶出液を1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。さらに蒸留水を400 μ Lのせ、再びカラムから出てきたフラクションを1.5 mL エッペンドルフチューブに回収し、これを標識されたDNAプローブとした。

[0048] なお、NF- κ Bを活性化しないネガティブコントロールとして、LPSで活性化しない細胞を用い、NF- κ Bの活性を抑制するポジティブコントロールとして、DTCMグルタルイミド-C12のかわりに、10 μ g/mLの(-)-DHMEQを添加した培地で培養した細胞を用いた。また、NF- κ Bが結合したプローブによるシグナルは、DHMEQで消失することと、抗p65抗体 (Santa Cruz Biotechnology) によるスーパーシフトが生じることにより、同定した。

[0049] 図11に示すように、LPS刺激によりNF- κ Bの活性化が観察されたが、DTCMグルタルイミド-C12前処理は、3.0 μ g/mL以下の濃度では、NF- κ BのDNA結合能を抑制しなかった。

このように、DTCMグルタルイミドは、細胞毒性の生じない濃度では、マクロファージの活性化におけるNF- κ Bの活性化を阻害しない。

[0050] (9) DTCMグルタルイミドはマクロファージ活性化によるMAPK活性化には影響しない

マクロファージ活性化によって誘導されるNO産生には、NF- κ Bだけでなく、ERK1/2、JNKおよびp38を含むMAPKの活性化が関わっていることが知られている。また、炎症性サイトカイン遺伝子の発現にも、ERK1/2、JNKおよびp38を含むMAPKの活性化が必須である

ということも報告されている。しかし、本実施例では、DTCMグルタルイミドがマクロファージ活性化におけるp38、ERKおよびJNKのリン酸化には影響しないことを示す。

[0051] まず、(8)と同様に調整したタンパク質抽出物に対し、抗リン酸化p38抗体(Cell Signaling Technology社)、抗p38抗体(Santa Cruz Biotechnology社)、抗リン酸化ERK抗体(Cell Signaling Technology社)、抗ERK抗体(Santa Cruz Biotechnology社)、抗リン酸化JNK抗体(Cell Signaling Technology社)、抗JNK抗体(Santa Cruz Biotechnology社)をそれぞれ希釈率500分の1で用い、抗 α -チューブリン抗体(Sigma Aldrich Japan社)を希釈率300分の1で用いて、ウエスタン・ブロッティングを行った。

[0052] 図12に示すように、DTCMグルタルイミド-C12未処理では、p38は、LPSで細胞を刺激した10分後に活性化され、60分後には活性化が減衰している。DTCMグルタルイミド-C12前処理においても、このp38の活性化のパターンには変化はない。

[0053] また、ERKについても同様に、DTCMグルタルイミド-C12未処理では、LPSで細胞を刺激した10分後に活性化され、60分後には活性化が減衰している。DTCMグルタルイミド-C12前処理においても、このERKの活性化のパターンには変化はない。

[0054] このように、DTCMグルタルイミドは、細胞毒性の生じない濃度では、マクロファージの活性化におけるMAPKの活性化には影響しない。

[0055] (10) DTCMグルタルイミドがマウス骨髄由来マクロファージに与える毒性の評価

本実施例では、DTCMグルタルイミドが初代マウス骨髄由来マクロファージに与える細胞毒性を、細胞の生存率によって評価した。

[0056] 頸椎脱臼法により屠殺した8週齢のICRマウス(オス、チャールズ・リバーより購入)を滅菌環境下で解剖し、大腿骨および尺骨を両足から単離した。21G注射針を接続した1mLシリンジを用い、骨髄腔を α -MEMで

2、3回洗浄した。この洗浄液 (α -MEM) をナイロンメッシュ (330 mesh) に通過させて不要な細胞を除去し、骨髓細胞を単離した。このようにして得られた骨髓細胞の α -MEM 懸濁液を $1.25 \sim 3.75 \times 10^6$ 細胞/mL に調製した。この骨髓細胞懸濁液 80 mL に対して 0.1% BSA 含有 PBS で調製した $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の hM-CSF (和光純薬工業株式会社) を $80 \mu\text{L}$ 添加した (最終濃度 $10 \text{ ng}/\text{mL}$)。この細胞を、24 ウェルプレート (Corning社) に $500 \mu\text{L} \sim 1 \text{ mL}$ /ウェルずつ播種し、2日間 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。2日後、非付着性細胞を α -MEM で洗い流した後、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ の hM-CSF を含む新しい α -MEM に交換し、得られた付着性細胞をマウス骨髓由来マクロファージとした。

[0057] 調製されたマウス骨髓由来マクロファージを、24 ウェルプレート (Corning社) に 1 mL ずつ播種した ($1.25 \sim 3.75 \times 10^6$ 細胞/mL)。各ウェルに、1.0、3.0、10.0、あるいは $30.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ の DTCM グルタルイミド-C12 を添加し、各実験群を 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。対照群には DTCM グルタルイミド-C12 を加えずに同条件下で培養した。

[0058] ==トリパンブルー染色による細胞生存率計測 (Tripán blue dye exclusion assay) ==

各実験群において、DTCM グルタルイミド-C12 添加 24 時間、48 時間あるいは 72 時間後に、細胞をセルスクレーパーで剥離して α -MEM に懸濁し、 1 mL の細胞懸濁液を新しいエッペンドルフチューブに回収した。対照群でも同様にして、培養開始から 24 時間、48 時間、あるいは 72 時間後に細胞懸濁液を回収した。これを、 3500 rpm で 5 分間遠心して細胞を沈殿させた。実験群については、上清を除去した。対照群について、上清を回収した。その後、各実験群および対照群の細胞沈殿に、対照群から回収した上清を $80 \mu\text{L}$ 、および、 $20 \mu\text{L}$ トリパンブルー染色液 (4 mg トリパンブルーを 1 mL の $9 \text{ mg}/\text{mL}$ NaCl に溶解して調製) を加えて再懸濁することにより、トリパンブルーによって死細胞が青く染色される。

この細胞懸濁液 10 μ L を、血球計算盤（エルマ社）に滴下し、倍率 100 倍の顕微鏡下で全細胞と死細胞を計数した。この時、1 枚の血球計算盤において一視野あたりおよそ 100 個前後の細胞を計数し、4 視野から各々得られた細胞死生存率の平均を算出した。細胞生存率（%）の算出には下記式を用いた。

[0059] 生存率（%） = （全細胞数 - 死細胞数） \div 全細胞数 \times 100

図 13 に示すように、DTCM グルタルイミド-C12 が 3.0 μ L の群では、培養時間に関わらずマウス骨髄細胞由来マクロファージの生存率は 80% 以上であった。一方、DTCM グルタルイミド-C12 が 10.0 あるいは 30.0 μ L の群では、培養時間に関わらずマウス骨髄細胞由来マクロファージの生存率は低下した。

[0060] この結果は、マウス骨髄細胞由来マクロファージに対し、3.0 μ L までの DTCM グルタルイミド-C12 が毒性を有さないことを示している。従って、マウス骨髄由来マクロファージを用いた下記実施例における DTCM グルタルイミド-C12 は 3.0 μ g/mL 以下に設定した。

[0061] (11) DTCM グルタルイミドによるマウス骨髄由来マクロファージの破骨細胞分化の抑制

本実施例では、DTCM グルタルイミドが、マウス骨髄由来マクロファージの破骨細胞分化を抑制することを示す。

[0062] 実施例 (10) で調製した初代マウス骨髄由来マクロファージを、24 ウェルプレート（Corning 社）に 500 μ L ずつ播種した（ $1.25 \sim 3.75 \times 10^6$ 細胞/mL）。ここに、最終濃度 0、0.3、1.0、あるいは、3.0 μ g/mL になるように各 5 μ L の DTCM グルタルイミド-C12 を添加した。各実験群を 37°C、5% CO₂ 条件下で 2 時間培養した。0.1% BSA 含有 PBS で調製した 10 μ g/mL hRANKL（和光純薬株式会社）を 5 μ L 添加し（最終濃度 100 ng/mL）、培養を続けた。なお、RANKL はマクロファージ等からの破骨細胞分化を誘導する因子として知られている（Kobayashi et al. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 19(1), 61-7

2, 2009)。また、対照群は、RANKLおよびDTCMグルタルイミドを添加しないこと以外は同条件で培養を行った。

[0063] 5日間培養後、培養液を除去し、細胞をPBSで洗浄した。ウェルに3.5%パラホルムアルデヒドを250 μ L加えて細胞を5分間固定した後、固定液をPBSで洗浄した。さらに、アセトン：エタノール（1：1 v/v）を250 μ L加えて30秒静置し、脱脂を行った。PBSで洗浄後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色液（0.01%ナフトールAS-MXリン酸、0.05%ファストレッドバイオレットLBソルトをTRAP緩衝液（50mM L-酒石酸ナトリウム、90mM 酢酸ナトリウム三水和物）で調製）を1ウェルあたり500 μ L加えて室温で5～20分間インキュベートし、染色が確認されたら染色液を除去し、反応を停止した。250 μ LのPBSを加えてプレートを顕微鏡下で観察した。破骨細胞は、TRAP陽性であることが知られているので、顕微鏡下で、3核以上が融合したTRAP陽性細胞を成熟した破骨細胞とし、その数を全視野で計測した。

[0064] 図14および図15に示すように、RANKLを加えない群では破骨細胞は観察されないが（図14A）、RANKLを加えた群では破骨細胞の分化が誘導された（図14B）。そして、DTCMグルタルイミド-C12を添加した場合に、破骨細胞数が有意に減少した（図14C～E、図15）。

[0065] この結果は、DTCMグルタルイミドがマクロファージからの破骨細胞の分化を抑制することを示している。従って、DTCMグルタルイミドを破骨細胞によって骨破壊の生じる各種疾病の治療に用いることができる。

[0066] (12) DTCMグルタルイミドによる癌細胞の生存率低下および増殖抑制
本実施例では、DTCMグルタルイミドが癌細胞の生存率を低下させ、増殖を抑制する効果を有することを示す。

[0067] マウス胚性腫瘍由来F9細胞（理化学研究所 筑波研究所バイオリソースセンター 細胞材料開発室より購入）を、15%FBSを含むDMEM培地を用いてプラスチックディッシュに 1×10^4 細胞/mLで播種し、0、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μ g/mLの各濃度でDT

CMグルタルイミド-C12を培地に添加し、24、48、あるいは72時間培養した。実施例(10)に記載の「トリパンブルー染色による生細胞率計測」に従い、細胞の生存率を計測した。また同様にして調製した培養細胞懸濁液を、懸濁液における細胞数をコールカウンター(Beckman coulter社)で計数し、細胞増殖を検出した。

[0068] 図16に示すように、いずれの培養時間の群においても、DTCMグルタルイミド-C12濃度依存的にF9細胞の細胞生存率が有意に低下した(t検定)。また、DTCMグルタルイミド-C12濃度が10あるいは30 μ g/mLの場合には、24時間あるいは48時間培養群と比較して72時間培養群におい細胞生存率が有意に低下した。

[0069] また、図17に示すように、DTCMグルタルイミド-C12を添加して培養した群では、DTCMグルタルイミド-C12無添加の群と比較して細胞増殖が抑制された。この細胞増殖抑制は、DTCMグルタルイミド-C12濃度が高いほど、また、DTCMグルタルイミド-C12添加後の培養時間が長いほどより高い効果が認められた。

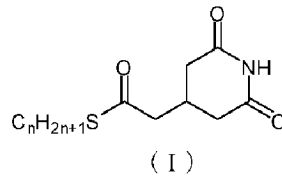
[0070] この結果は、DTCMグルタルイミドが腫瘍細胞の生存率を低下させる効果、および、増殖抑制の効果を有していることを示している。従って、DTCMグルタルイミドを各種癌の治療に用いることができる。

産業上の利用可能性

[0071] 本発明によって、NF- κ Bを阻害せずにiNOSとCOX-2の発現を阻害する医薬組成物を提供することが可能となった。

請求の範囲

[請求項1] 下式（I）で示される化合物を有効成分として含有する医薬組成物。



（式中、n は 1 ～ 24 のいずれかの整数である）

[請求項2] 請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有する一酸化窒素（NO）産生阻害剤。

[請求項3] 請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有する誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）発現阻害剤。

[請求項4] 請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有するシクロオキシゲナーゼ 2（COX-2）発現阻害剤。

[請求項5] 請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有するプロスタグランジン産生阻害剤。

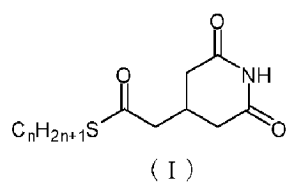
[請求項6] 請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有する破骨細胞分化抑制剤。

[請求項7] 誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）またはシクロオキシゲナーゼ 2（COX-2）が介在する疾患の治療剤であって、請求項 1 に記載の医薬組成物を有効成分として含有する治療剤。

[請求項8] 前記疾患が、自己免疫性疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、または腫瘍であることを特徴とする請求項 7 に記載の治療剤。

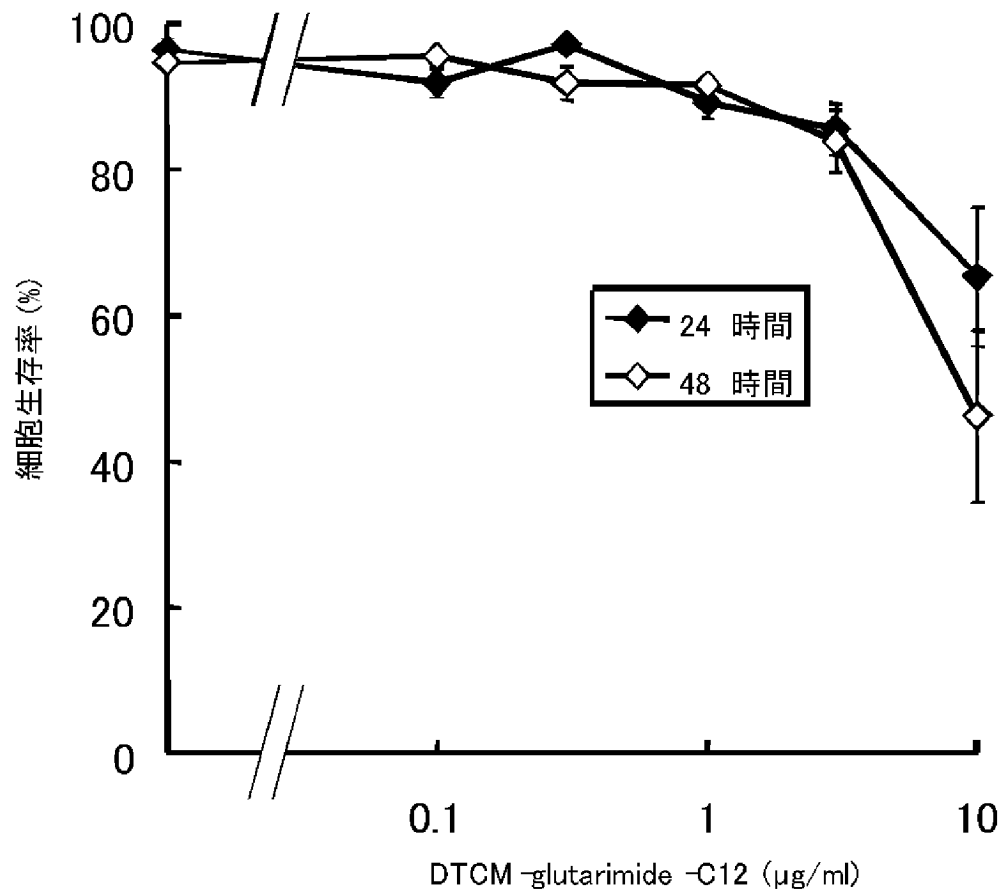
[請求項9] リウマチ、変形性関節症、膠原病、バセドー氏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、感染症、関節炎、発熱、腰痛症、月経困難症、歯周病、骨粗鬆症、骨がんであることを特徴とする請求項 7 に記載の治療剤。

[請求項10] 下式（I）で示される化合物。

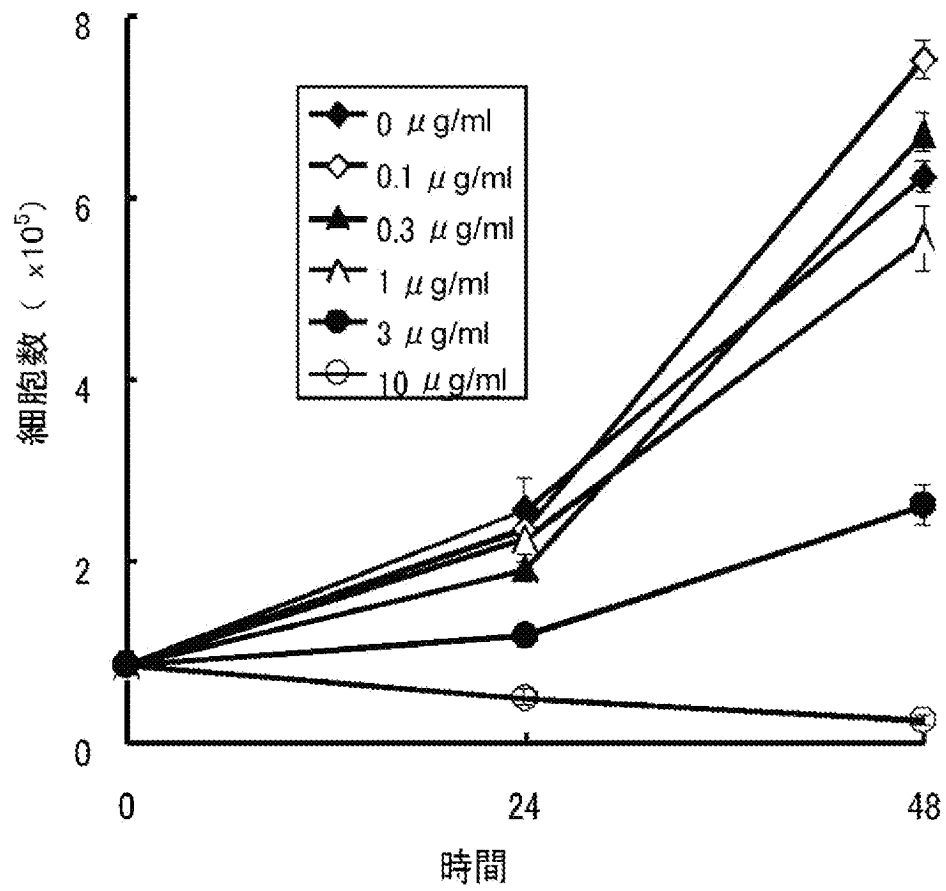


(式中、nは6～18のいずれかの整数である)

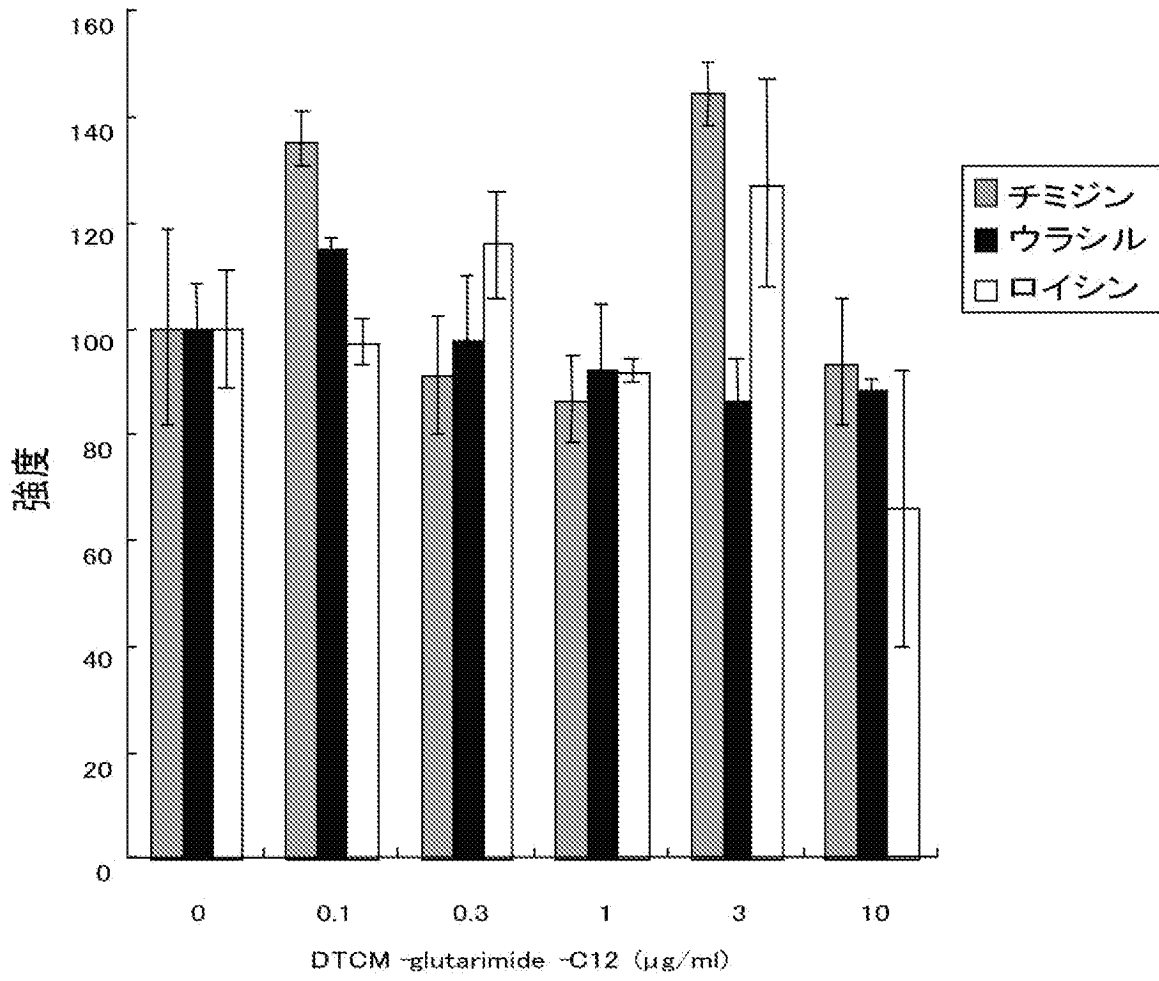
[図1]



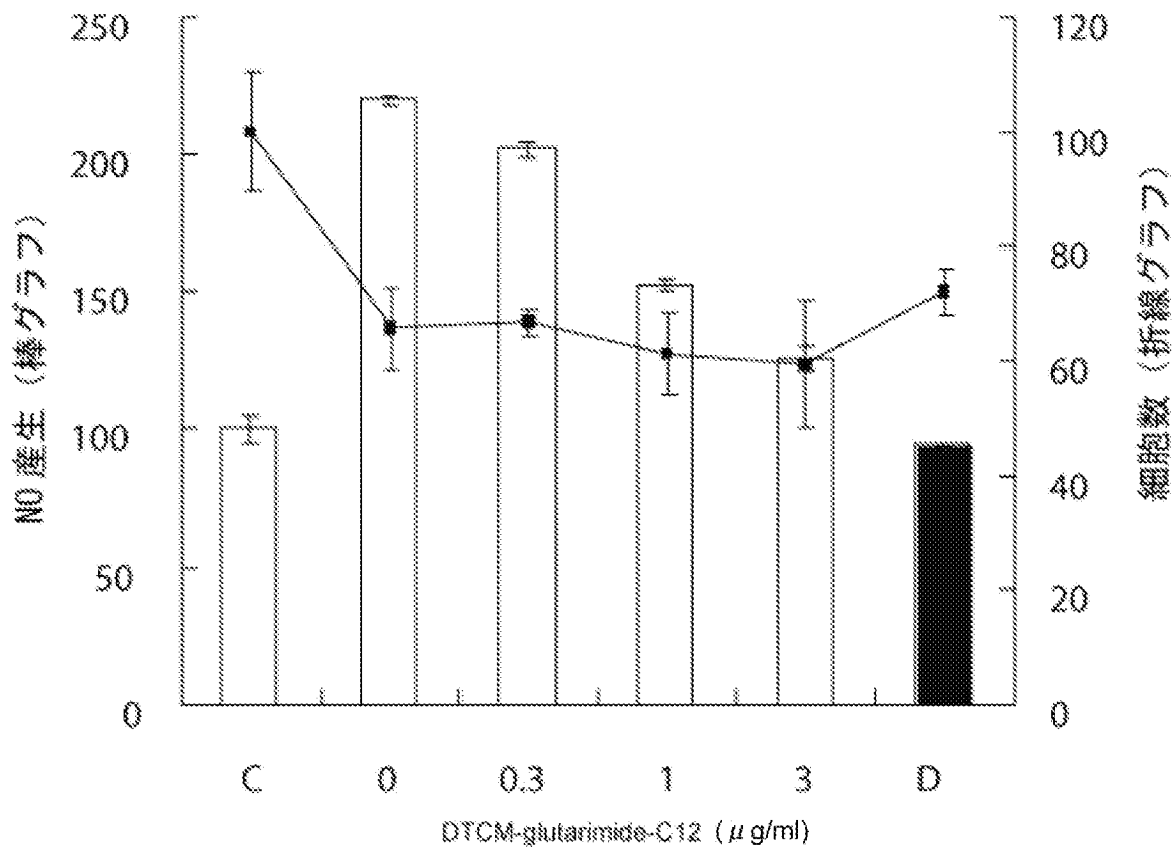
[図2]



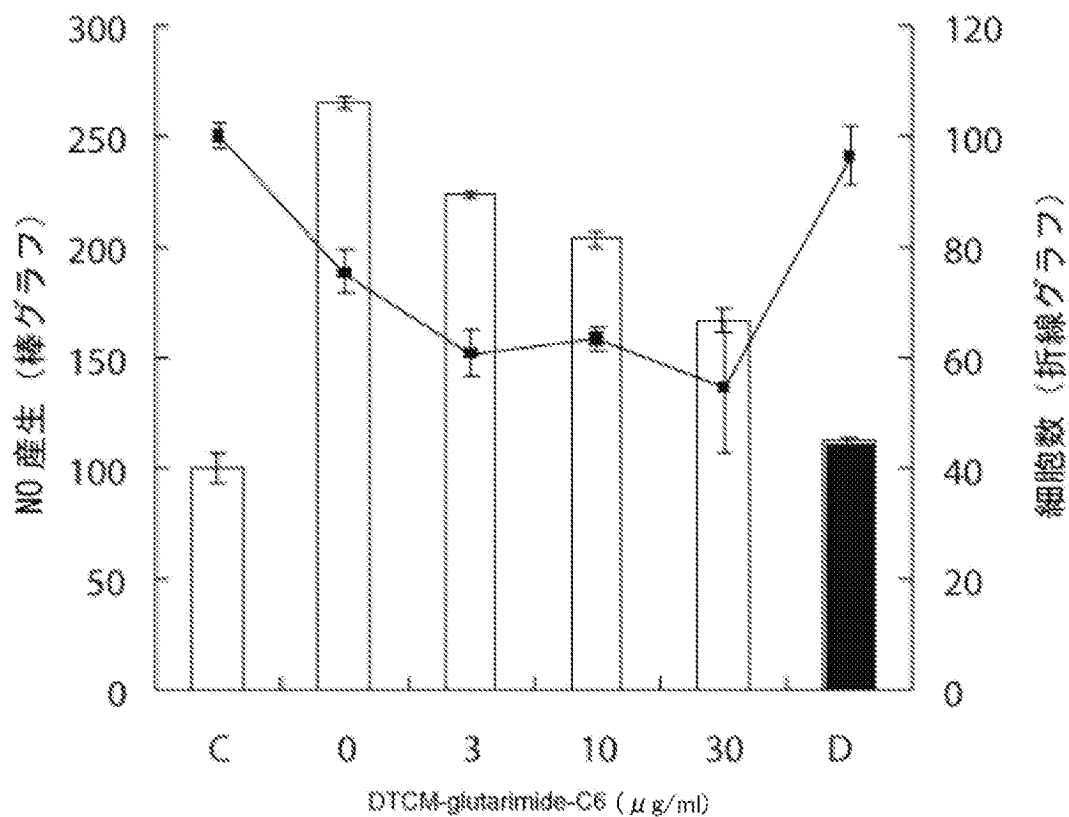
[図3]



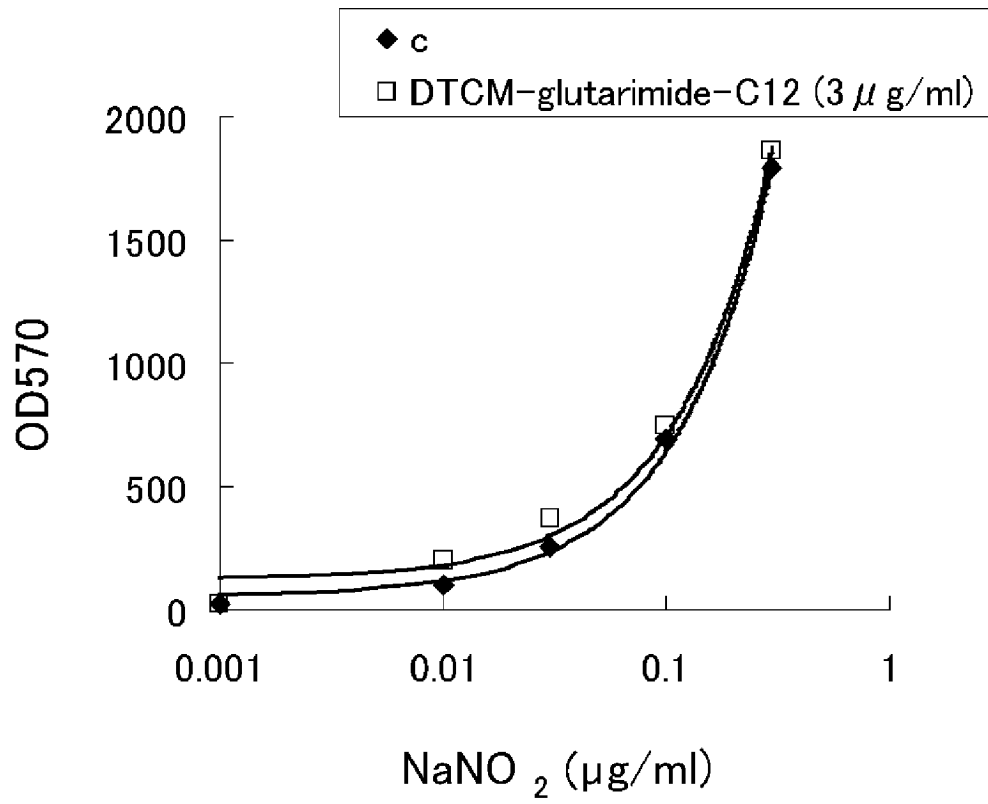
[図4]



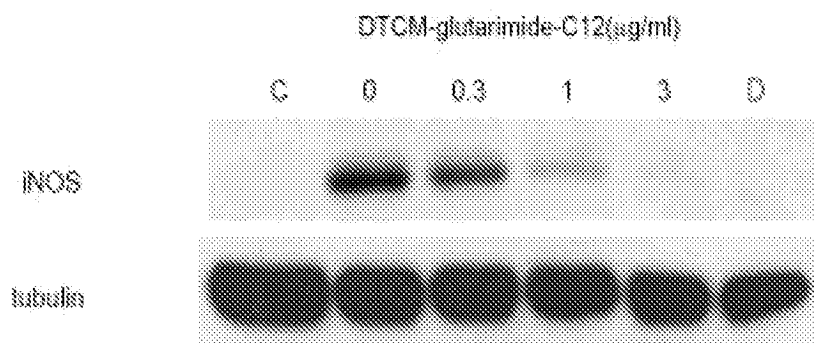
[図5]



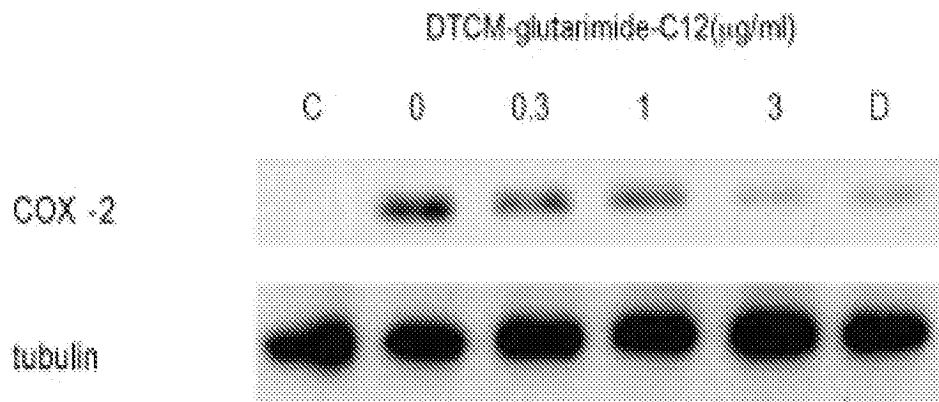
[图6]



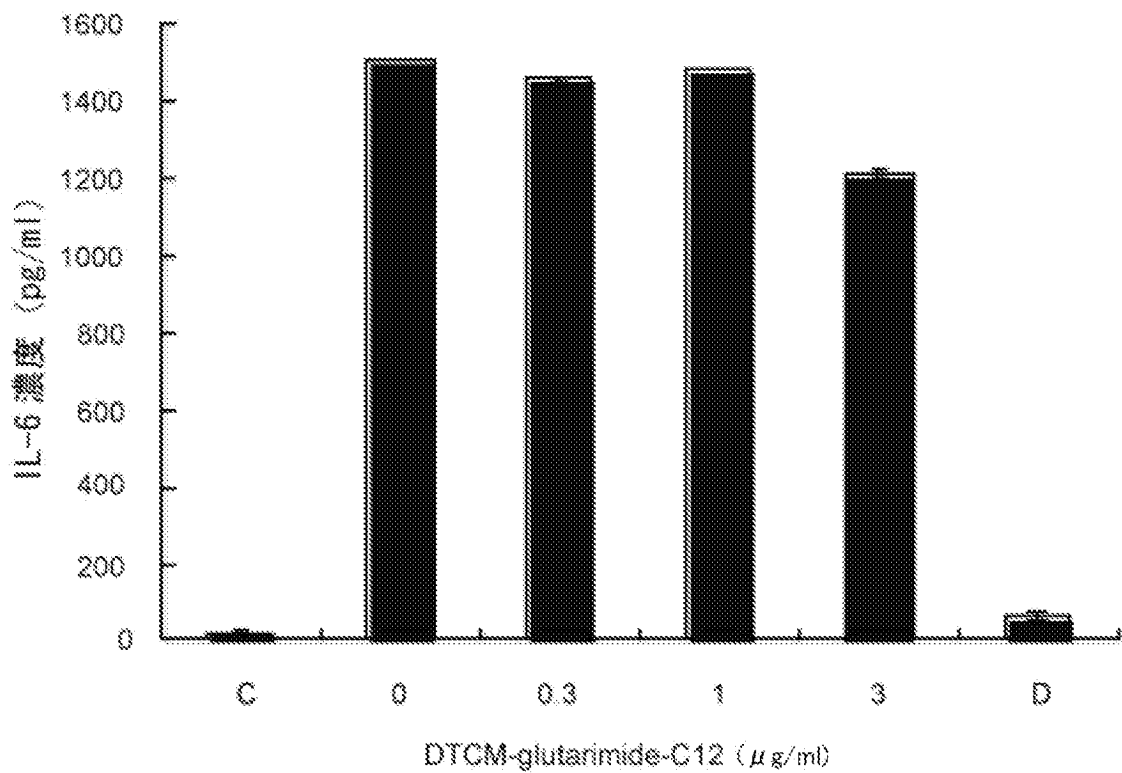
[图7]



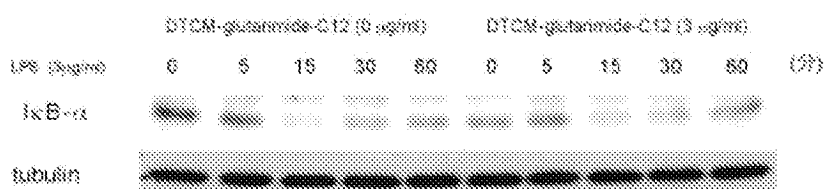
[図8]



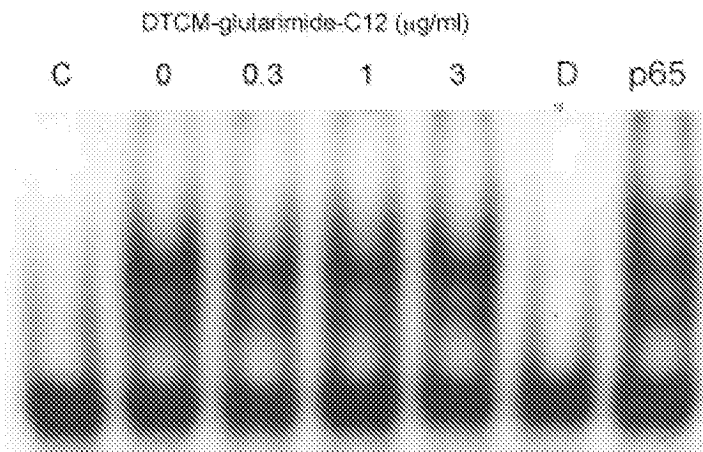
[図9]



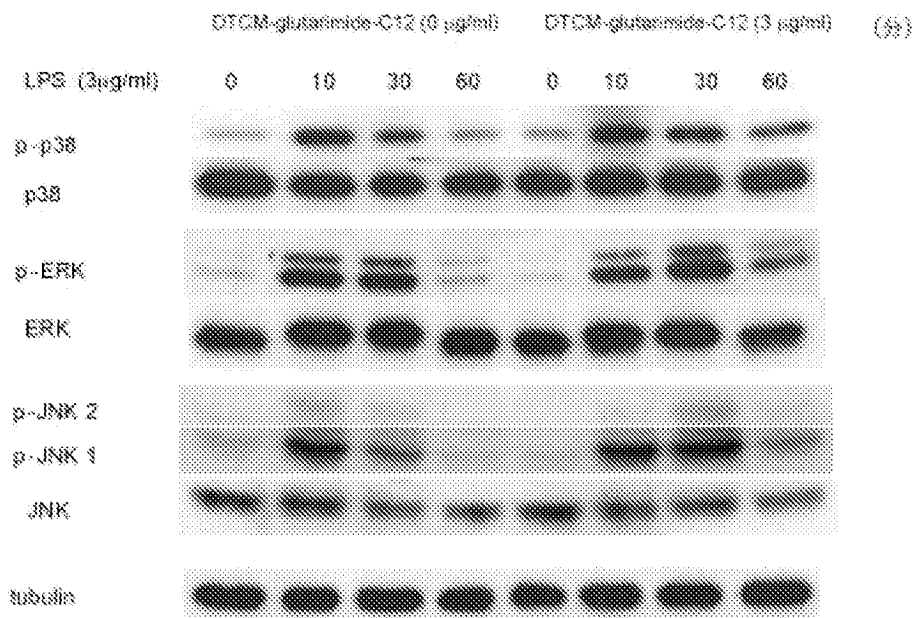
[図10]



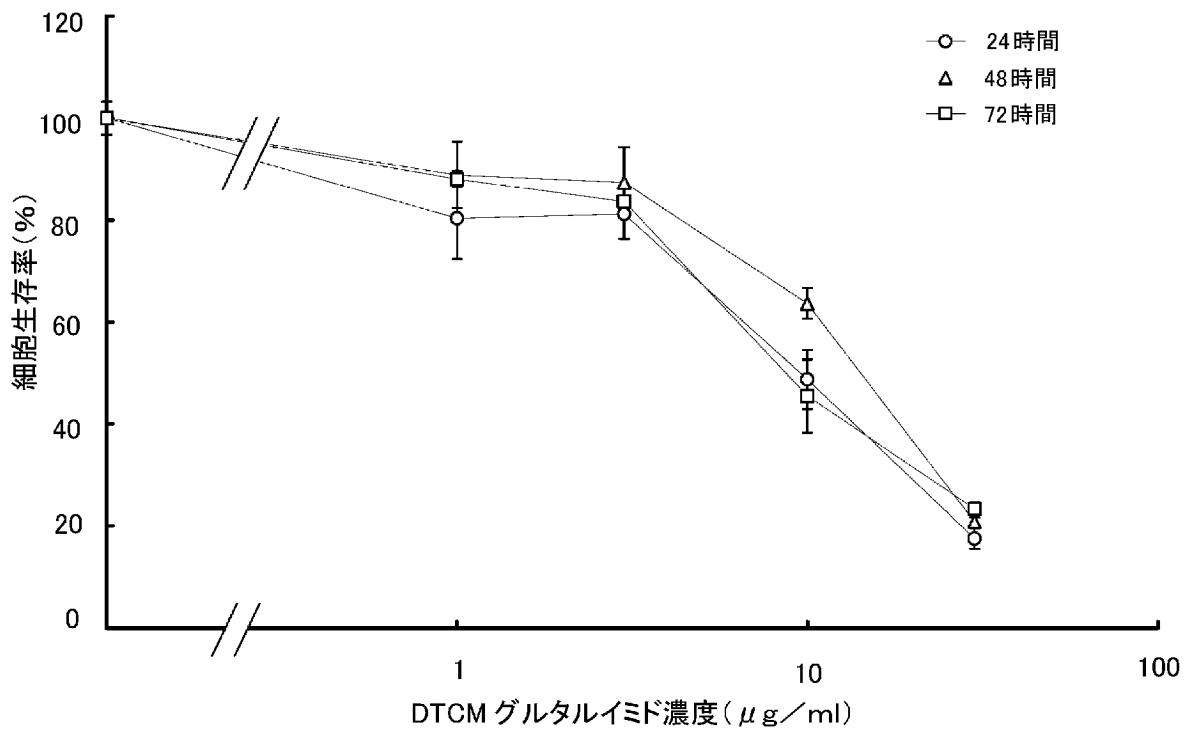
[図11]



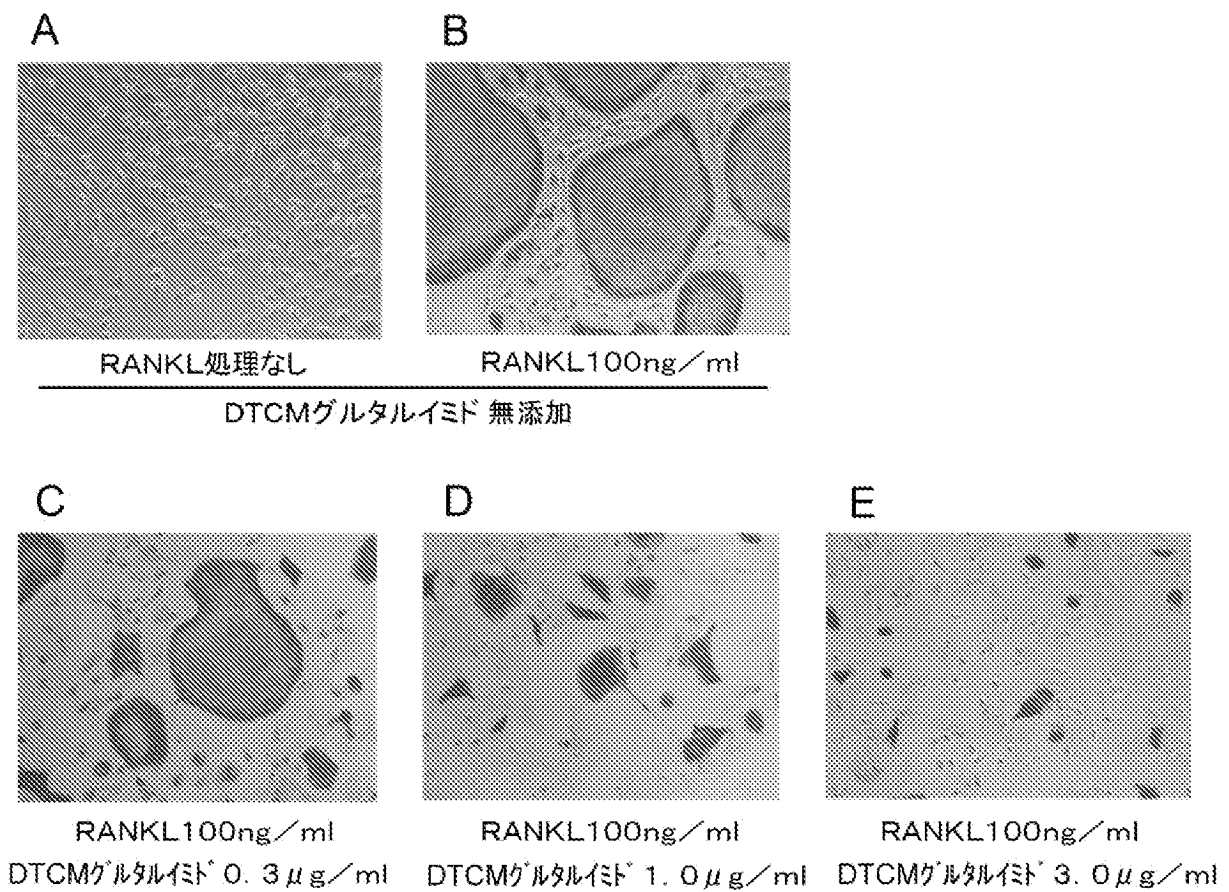
[図12]



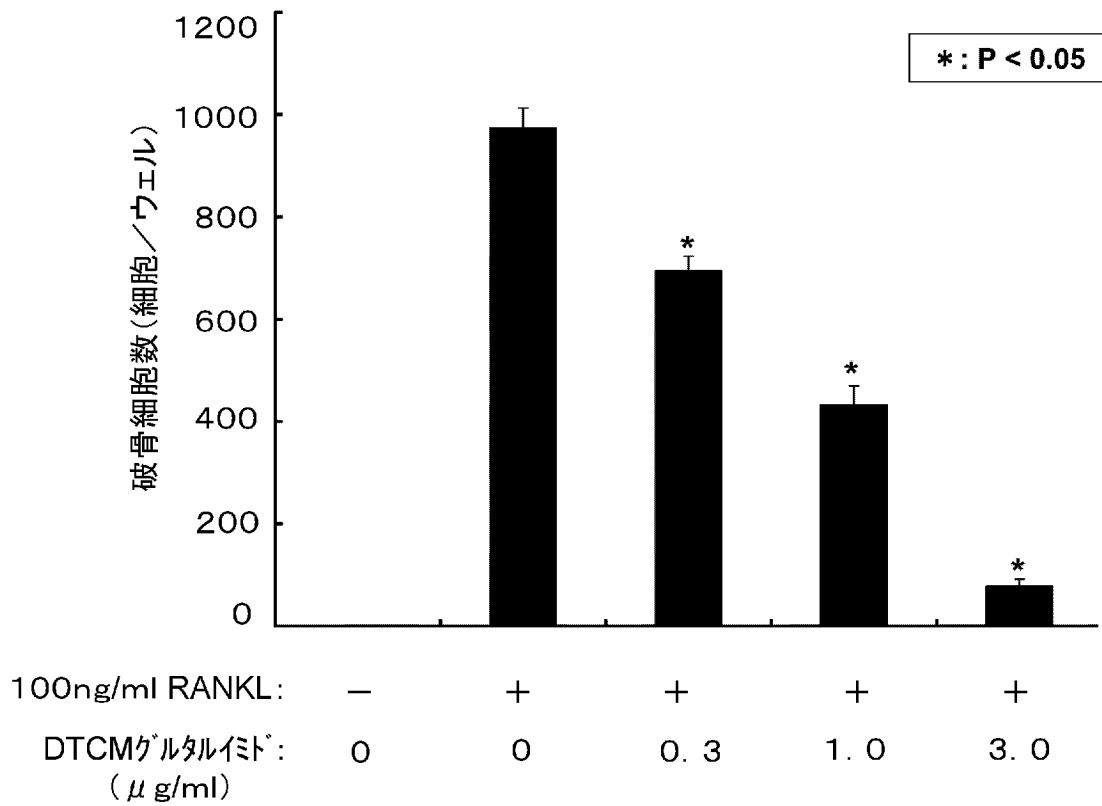
[図13]



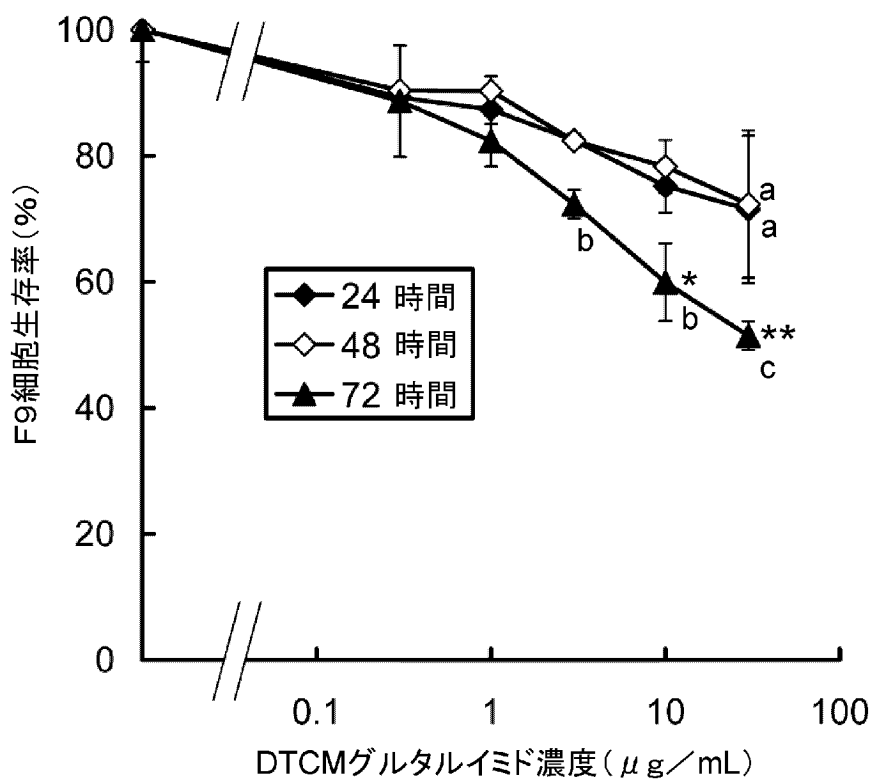
[図14]



[図15]



[図16]



*p<0.05: 同濃度の24/48時間と比較

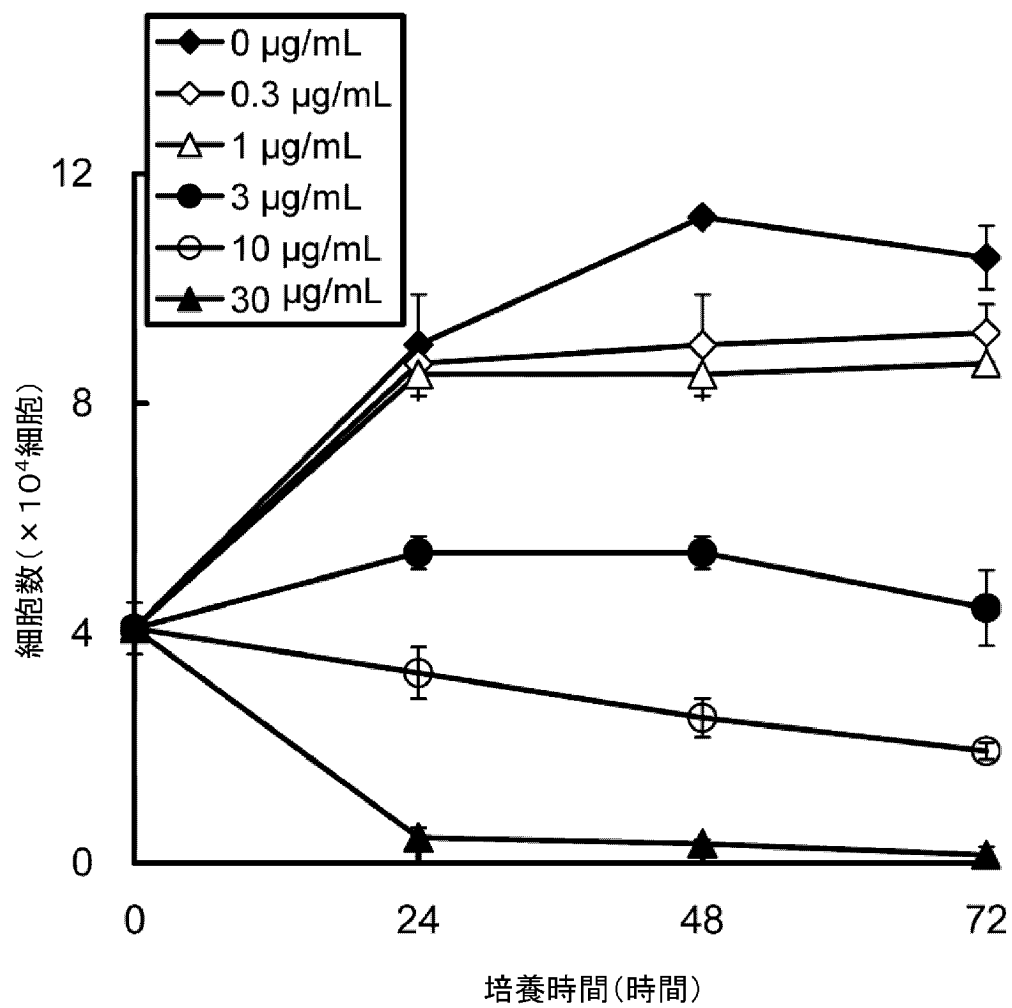
**p<0.03: 同濃度の24/48時間と比較

a p<0.05: 0.3 μg/mlと比較

b p<0.03: 0.3 μg/mlと比較

c p<0.0005: 0.3 μg/mlと比較

[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/061636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07D211/88(2006.01)i, A61K31/45(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D211/88, A61K31/45, A61P25/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAITO, N. et al., Studies on a new antiviral antibiotic, 9-methylstreptimidone. I, The Journal of Antibiotics, 1974, Vol.27, No.3, p.206-214	1-10
A	WO 2007/077861 A1 (UNIV KEIO, JP), 12 July, 2007 (12.07.07), & JP 2007-182397 A	1-10
A	JP 10-120654 A (ONO PHARM CO., LTD.), 12 May, 1998 (12.05.98), (Family: none)	1-10
A	US 3435007 A (DOW CHEM CO.), 25 March, 1969 (25.03.69), (Family: none)	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 08 September, 2009 (08.09.09)	Date of mailing of the international search report 13 October, 2009 (13.10.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/061636

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	ISHIKAWA, Y. et al, Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methylstreptimidone, an inhibitor of NF- κ B, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, Vol.19, No.6, p.1726-1728	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D211/88(2006.01)i, A61K31/45(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07D211/88, A61K31/45, A61P25/00, A61P29/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

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

CAplus(STN), REGISTRY(STN)

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 請求項の番号
A	SAITO, N. et al., Studies on a new antiviral antibiotic, 9-methylstreptimidone. I, The Journal of Antibiotics, 1974, Vol.27, No.3, p.206-214	1-10
A	WO 2007/077861 A1 (UNIV KEIO, JP) 2007.07.12, & JP 2007-182397 A	1-10
A	JP 10-120654 A (ONO PHARM CO LTD) 1998.05.12, (ファミリーなし)	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.2009

国際調査報告の発送日

13.10.2009

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)

齋藤 恵

4 P

9164

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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 請求項の番号
A	US 3435007 A (DOW CHEM CO) 1969.03.25., (ファミリーなし)	1-10
T	ISHIKAWA, Y. et al, Synthesis and biological evaluation on novel analogs of 9-methylstreptimidone, an inhibitor of NF- κ B, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, Vol.19, No.6, p.1726-1728	1-10