

(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
2010年11月11日(11.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/128663 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/12 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/057763
- (22) 国際出願日: 2010年5月6日(06.05.2010)
- (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 2009-112974 2009年5月7日(07.05.2009) 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 群馬大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 Gunma (JP). 国立大学法人 東北大学(TOHO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 久保原 禰(KUBOHARA, Yuzuru) [JP/JP]; 〒3718512 群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法

人群馬大学内 Gunma (JP). 村上 正巳(MURAKAMI, Masami) [JP/JP]; 〒3718512 群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 高橋 克典(TAKAHASHI, Katsunori) [JP/JP]; 〒3718512 群馬県前橋市昭和町三丁目39番15号 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 大島 吉輝(OSHIMA, Yoshiteru) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 菊地 晴久(KIKUCHI, Haruhisa) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

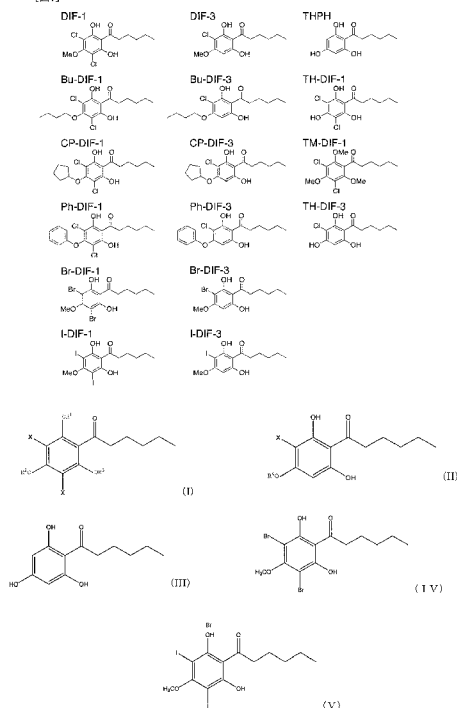
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: INTERLEUKIN-2 PRODUCTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: インターロイキン-2産生抑制剤

[要1]



(57) Abstract: A compound represented by one of formulae (I)-(V) or a pharmaceutically acceptable salt thereof is used as an active ingredient for an interleukin-2 production inhibitor. In formula (I), R¹, R² and R³ each represents a hydrogen atom or the same group selected from among alkyl groups having 1-5 carbon atoms, and X represents a halogen atom. In formula (II), R⁴ represents a hydrogen atom or an alkyl group having 1-5 carbon atoms, and X represents a halogen atom.

(57) 要約: 式(I)~(V)のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩をインターロイキン-2産生抑制剤の有効成分とする。式(I)中、R¹、R²、R³は水素または炭素数1~5のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、Xはハロゲンを示す。式(II)中、R⁴は水素または炭素数1~5のアルキル基を示し、Xはハロゲンを示す。

WO 2010/128663 A1



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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： インターロイキン-2 産生抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、インターロイキン-2 (IL-2) 産生抑制剤及びそれを含む免疫抑制剤に関する。

背景技術

[0002] 過去数十年の間、多くの免疫抑制剤が開発され、抗炎症剤や臓器移植の際の拒絶反応を軽減させる目的で利用されてきた（非特許文献1）。免疫抑制剤の多くはリンパ球を標的としたものだが、その作用機構の違いによりいくつかのタイプに分類される。例えば、グルココルチコイドは主にIL-2やその他のメディエータの遺伝子発現を抑制することで、免疫抑制効果を発揮している。シクロホスファミド代謝物はDNA塩基をアルキル化し、Bリンパ球による免疫反応を優先的に抑制する。また、シクロスポリンA (CsA) やタクロリムス (FK506) は、T細胞のカルシニューリン活性を抑制することで、IL-2やその他のサイトカインの産生を抑制している。

しかし、これらの免疫抑制剤を患者に投与する場合、程度の差はあるものの常に副作用を警戒する必要がある。免疫抑制剤の種類によりその副作用も異なるがグルココルチコイドの場合、高濃度で投与すると、糖尿病、骨粗鬆症、緑内障や感染症の罹患率上昇などの副作用がある。また、CsAやFK506は臓器移植時の拒絶反応の抑制や関節リウマチ患者における病状の進行を遅らせることなどで臨床的な効果をもたらしているが、これらの薬剤も腎機能障害や神経障害、消化器系の毒性などが臨床的に観察されており、明らかにそれらの有用性を減少させている。

今後も、従来とは作用機序の異なる薬剤、副作用の少ない薬剤の開発が待ち望まれている。

[0003] 細胞性粘菌Dictyostelium discoideum（以後、粘菌）は、森の落ち葉の下などに生息する下等真核生物で、カビによく似た子実体を形成する。しかし

、粘菌とカビ（真菌）類は、進化的にかけ離れた生物群であり、本発明者らは、真菌類と同様に「粘菌類=薬剤資源（抗生物質などの宝庫）」と考え研究を進めており、実際に、いくつかの薬剤候補物質を報告してきた。

DIF-1 (differentiation-inducing factor-1)は、粘菌の柄細胞分化誘導因子として単離、同定された塩素を含む低分子化合物である。同時に単離されたDIF-3は分化誘導活性が低く、DIF-1 の分解産物であることがわかっている。

近年本発明者らは、哺乳類細胞に対する各種DIF 誘導体の薬理作用を調べ、DIF関連化合物 (DIFs) に抗腫瘍活性や細胞の糖代謝を促進する活性があることを報告してきた。また、「化学構造-活性相関」の解析を行い、DIFs の有する「抗腫瘍活性」と「糖代謝促進活性」は、DIF の側鎖修飾によって分離できる可能性も示してきた(非特許文献2～5)。

先行技術文献

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: Allison, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. Immunopharmacol. 47, 63-83 (2000)
非特許文献2: Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 18;236(2):418-22
非特許文献3: Cancer Res. 2004, 64, 2568-2571
非特許文献4: Biochem. Pharmacol. 2005, 70, 676-685
非特許文献5: FEBS Journal 2007, 274, 3392-3404

発明の概要

- [0005] 本発明は、免疫抑制剤などとして有用なIL-2産生抑制剤を提供することを課題とする。
- [0006] 本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、式(Ⅰ)～(Ⅴ)のいずれかで表される化合物がIL-2産生抑制作用を有することを見出した。このことから、これらの化合物が免疫抑制剤などとして有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0007] すなわち、本発明は下記式(Ⅰ)～(Ⅴ)のいずれかで表される化合物ま

たはその薬学的に許容される塩を有効成分とするIL-2産生抑制剤に関する。

本発明はまた、前記IL-2産生抑制剤を含む免疫抑制剤に関する。

本発明はまた、IL-2産生抑制または免疫抑制のための下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩に関する。

本発明はまた、下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩の、IL-2産生抑制または免疫抑制の製造における使用に関する。

本発明はまた、下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を投与する工程を含むIL-2産生抑制方法または免疫抑制方法に関する。

[0008] 式 (I) ~ (V) で表される化合物は、哺乳類免疫系細胞の活性を調節する薬剤、あるいは、抗炎症剤、自己免疫疾患やアレルギーの治療薬、臓器移植時の拒絶反応抑制剤などとして好適に用いることができる。また、IL-2 発現やサイトカイン研究などの基礎研究用試薬としても好適に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]各種DIF関連化合物の構造を示す図。

[図2]Jurkat細胞における、各種DIF関連化合物（それぞれ5 μ M）のIL-2 mRNA量 (A)、IL-2 タンパク質量 (B)、および細胞増殖 (C) に対する効果を示す図。コントロールとして0.1% EtOH (vehicle)を、ポジティブコントロールとして1 μ M のCsAとFK506をそれぞれ用いた。*は $p < 0.05$ versus 0.1% EtOH (by t-test)で有意差があることを示す。

[図3]Jurkat細胞におけるIL-2 mRNA量、IL-2 タンパク質量、および細胞増殖に対するTH-DIF-1, TM-DIF-1, Bu-DIF-3 およびCP-DIF-3の効果の濃度依存性を示す図。

[図4]Jurkat細胞におけるAP-1、NF-ATおよびNF- κ Bの活性に対するTH-DIF-1, TM-DIF-1, Bu-DIF-3 およびCP-DIF-3の効果の濃度依存性を示す図。

[図5]Jurkat細胞におけるINF- γ mRNA量とINF- γ タンパク質量に対する

TH-DIF-1, TM-DIF-1, Bu-DIF-3 およびCP-DIF-3 (それぞれ5 μ M) の効果を示す図。コントロールとして0.1% EtOH (vehicle)を、ポジティブコントロールとして1 μ M のCsAとFK506を用いた。*は $p < 0.05$ versus 0.1% EtOH (by t-test)で有意差があることを示す。

[図6] (A) 各種DIF関連化合物 (それぞれ5 μ M) の、K562 ヒト白血病細胞とマウス3T3-L1 細胞の増殖に対する効果を示す図。(B) 各種DIF関連化合物 (それぞれ5 μ M) の、Confluentマウス3T3-L1 細胞の糖取り込みに対する効果を示す図。CsAとFK506についても評価した。*は $p < 0.05$ versus 0.1% EtOH (by t-test)で有意差があることを示す。

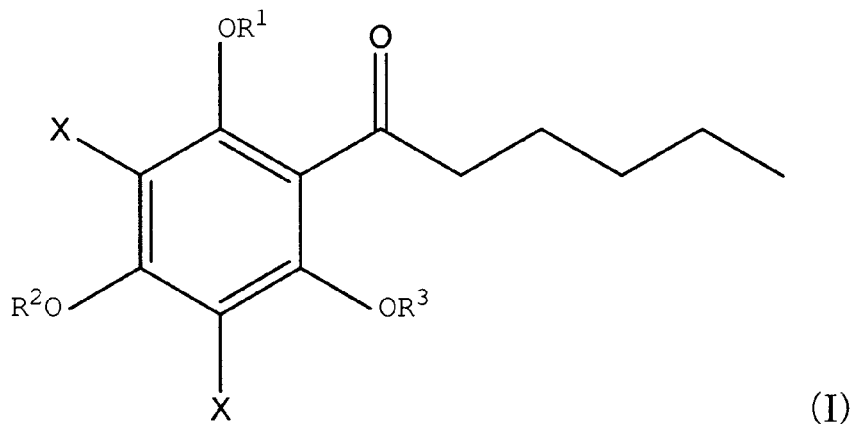
[図7]コンカナバリンA (ConA) 刺激によるマウス血清中IL-2の上昇に対するTM-DIF-1の効果を示す図。グラフの値は平均値 (n=4) と標準偏差 (Bars)。* $P < 0.03$ versus Control. ** $P < 0.0001$ versus Control (by ANOVA, post hoc Fisher's protected least significant difference)で、それぞれ有意差があることを示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に本発明を詳しく説明する。

本発明のIL-2産生抑制剤は、式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする。

[0011] [化1]

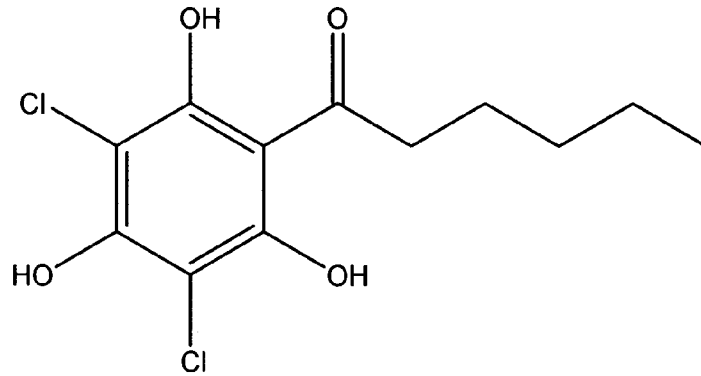


式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は水素または炭素数1~5のアルキル基から選ばれる同一の基を示す。XはCl、Br、Iなどのハロゲンを表し、Clがより好まし

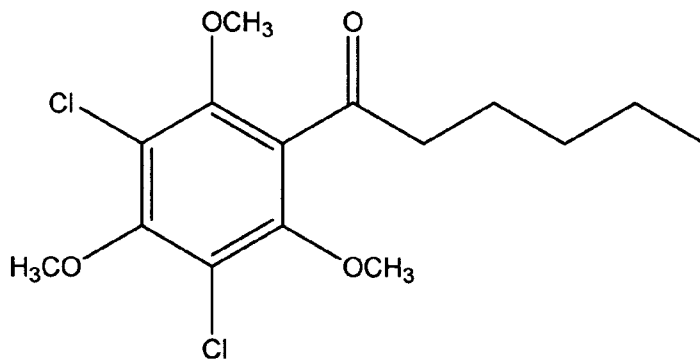
い。尚、本明細書において、アルキル基はシクロアルキル基を含む。

[0012] 式 (I) の化合物としては、下記の化合物が好ましい。

[化2]

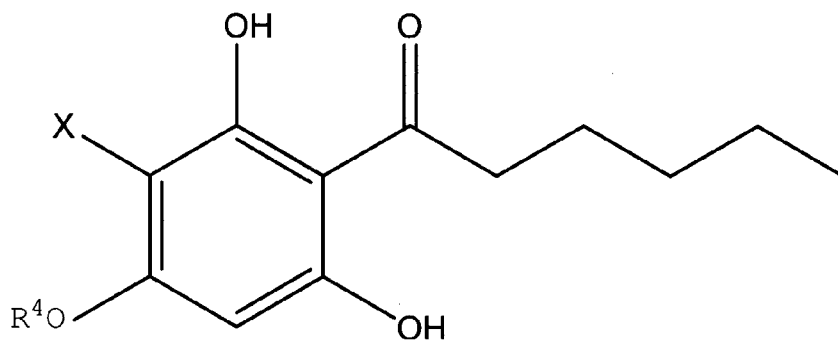


TH-DIF-1



TM-DIF-1

[0013] [化3]

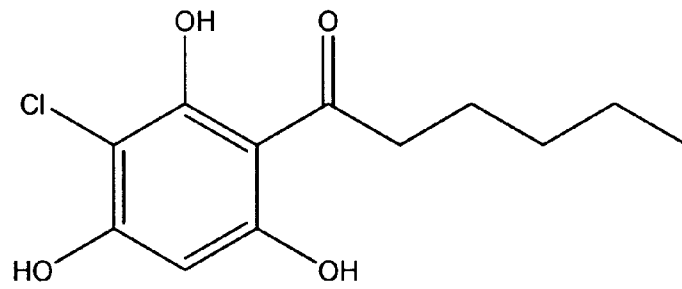


(II)

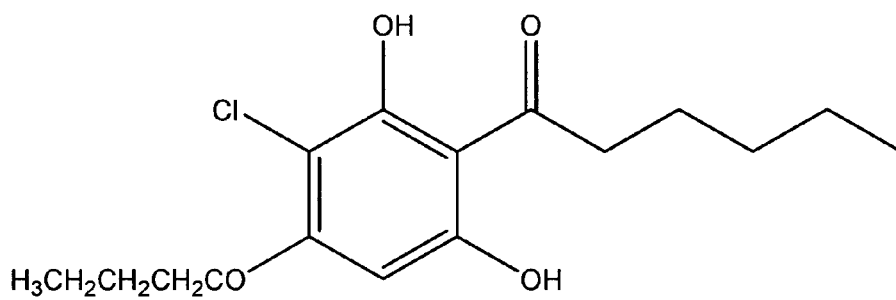
式中、R⁴は水素または炭素数1～5のアルキル基を示す。XはCl、Br、Iなどのハロゲンを表し、Clがより好ましい。

[0014] 式 (I I) の化合物としては、下記の化合物が好ましい。

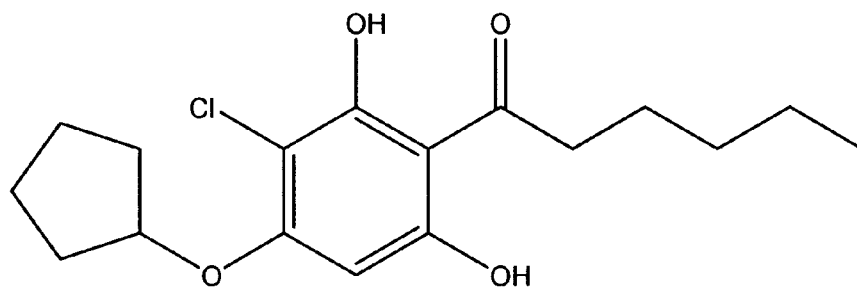
[化4]



TH-DIF-3



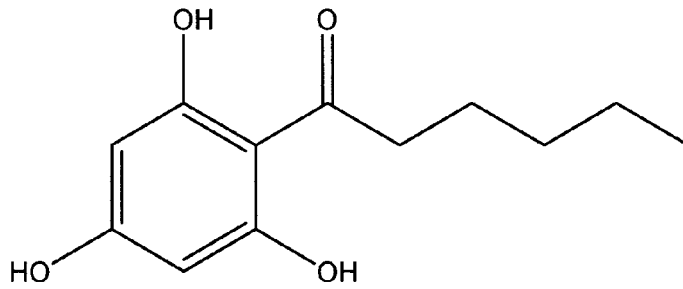
Bu-DIF-3



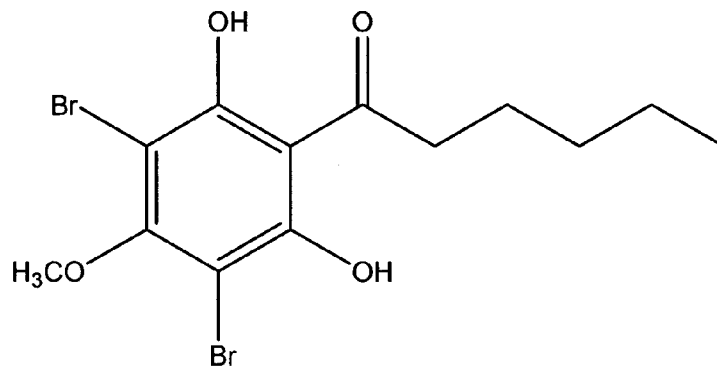
CP-DIF-3

[0015]

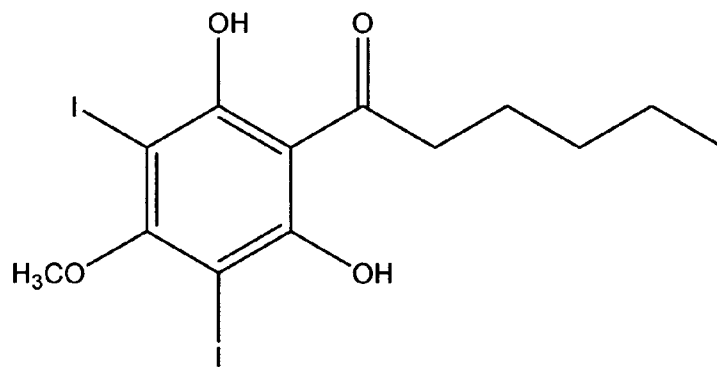
[化5]



(III) THPH



(IV) Br-DIF-1



(V) I-DIF-1

[0016] 上記式 (I) ~ (V) の化合物はBiochem. Pharmacol. 2005, 70, 676-685 .に記載された方法によって合成することができる。

[0017] 式 (I) ~ (V) の化合物またはその薬学的に許容される塩は、IL-2産生抑制効果を有する。したがって、免疫抑制剤の有効成分として用いることができる。なお、IL-2産生抑制効果とは、IL-2の産生をmRNAレベルとタンパク質レベルの少なくとも一方において抑制する効果を意味し、少なくともタンパク質レベルにおいて産生を抑制することが好ましい。

[0018] 式 (I) ~ (V) の化合物の薬学的に許容される塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等の金属塩、アンモニウム塩などが

挙げられる。なお、式（I）～（V）の化合物は水和物であってもよい。

[0019] 式（I）～（V）の化合物またはその薬学的に許容される塩を含有してなる医薬は、医薬製剤の製造法で一般的に用いられている公知の手段に従って、該化合物またはその薬学的に許容される塩を、そのまま、あるいは薬理的に許容される担体と混合して、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等の医薬製剤として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に安全に投与することができる。

式（I）～（V）の化合物またはその塩のIL-2産生抑制剤または免疫抑制剤中の含有量は、製剤全体の約0.01ないし約100重量%である。

式（I）～（V）の化合物またはその塩の投与量は、IL-2産生抑制または免疫抑制に有効な量であればよく、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより異なり特に制限されないが、一般的に、患者（体重60kgとして）に対して、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。

[0020] 薬理的に許容される担体としては、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤、あるいは液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤及び無痛化剤等が挙げられる。更に必要に応じ、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカ

ルシウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、*L*-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、*D*-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、等の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。等張化剤としては、例えばブドウ糖、*D*-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、*D*-マンニトール等が挙げられる。緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。無痛化剤としては、例えばベンジルアルコール等が挙げられる。防腐剤としては、例えばパラヒドロキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

なお、本発明の免疫抑制剤はその他の薬剤と併用してもよい。

実施例

[0021] 以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0022] 1) Jurkat 細胞における IL-2 産生に対する各種 D I F 誘導体 (DIFs) の効果

一連の実験では、Jurkat 細胞 (T 細胞のモデル細胞) の *in vitro* 培養系

を用いた。12 wellプラスチックプレートのそれぞれのwell中に、10%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地に懸濁したJurkat細胞を1 mL (10^6 cells/mL) ずつ分注する。そこにvehicle (0.1% EtOH : Control)あるいはDIFs (それぞれ5 μ M)を加え、30分後、ConA (コンカナバリンA : 25 μ g/mL)を添加し、3時間後のIL-2 mRNA 発現量と、12時間後のIL-2 タンパク質産生量(培地中に分泌されたIL-2量)を調べた(図2)。ポジティブコントロールとして1 μ MのCsAとFK506を用いた。なお、IL-2 タンパク質産生は抗IL-2抗体を用いたELISA法、IL-2 mRNA 発現はReal Time RT-PCR法により測定した。

[0023] その結果、いくつかの誘導体がIL-2 産生を阻害することが明らかとなった(図2A、B)。

[0024] さらに、IL-2 産生をよく阻害するDIF 誘導体TH-DIF-1, TM-DIF-1, Bu-DIF-3 およびCP-DIF-3 を用いて、詳細な検討をした(図3)。その結果、これらの誘導体は濃度依存的にIL-2 産生を阻害することが明らかとなった。

[0025] 同時に、ConA添加12時間後のcell viability に対する各化合物の効果をMTT 法によって検討したが、5 μ MのDIFs の細胞毒性はほとんど見られなかった(図2C)。

[0026] これらの結果は、DIF 誘導体がIL-2 産生制御剤として、基礎研究に利用できる可能性、さらには免疫抑制剤として臨床応用できる可能性を示唆している。

[0027] 2) AP-1, NF κ B, NFAT 活性に対するDIFs の効果

ConAは、Jurkat細胞表面のT-cell receptorに結合し、細胞内の各種酵素活性を調節し、最終的に転写制御因子であるAP-1, NF κ B, NFATを活性化することによってIL-2発現を制御していると考えられている。そこで、DIFs の作用機序を明らかにするために、AP-1, NF κ B, NFAT活性に対するDIFs の効果を検討した。それぞれの因子が結合するpromoter 領域にレポーター(ルシフェレース)遺伝子をつないだベクターをJurkat 細胞に導入し、DIFs (それぞれ5 μ M)の存在下、非存在下でConA で刺激後、それぞれの細胞のルシフェレース活性を測定した。さらに、TH-DIF-1, TMDIF-1, Bu-DIF-3 とCP-DIF-3を

用いて、詳細な検討をした(図4)。

[0028] その結果、TH-DIF-1 やTM-DIF-1 はAP-1 とNFAT を阻害し、Bu-DIF-3 やCP-DIF-3 は、NFAT とNFkB 活性を阻害することが明らかとなった。これらの結果は、DIFs によるIL-2 発現制御の機序には複数の作用点があることが示唆している。

[0029] 3) IFN- γ 発現に対するDIFs の効果 (図5)

次に、Jurkat 細胞における (ConA 刺激による) Interferon- γ (IFN- γ) mRNAとタンパク質発現に対するDIFsの効果調べた。細胞を5 μ M DIFs存在下で30分培養し、さらにConAを添加し3時間後のIFN- γ mRNA発現量と、12時間後のIFN- γ タンパク質量 (培地中に分泌されたIFN- γ タンパク質量) を調べた。コントロールとして0.1% EtOH (vehicle)を、ポジティブコントロールとして1 μ M のCsAとFK506を用いた。なお、IFN- γ タンパク質産生は抗IFN- γ 抗体を用いたELISA法、IFN- γ mRNA 発現はReal Time RT-PCR法により測定した。

[0030] その結果、既知の免疫抑制剤であるCsA やFK506 (1 μ M)がIFN- γ mRNA とタンパク質の発現をよく抑制したのに対して、DIF 誘導体の作用は小さかった。この結果は、IL-2 発現を比較的特異的に制御できる因子、さらにはより副作用の少ない免疫制御因子として、DIF 誘導体を利用できる可能性を示唆している。

[0031] 4) K562 ヒト白血病細胞とマウス3T3-L1 細胞に対するDIFs の効果 (図6)

前述のように、DIF 誘導体には、抗腫瘍活性(Kubohara, 1999; Shimizu et al. 2004; Gokan et al. 2005;etc.)と糖代謝促進活性(Omata et al. 2007; Kubohara et al. 2008)を有するものがある。そこで、DIFs の化学構造とそれらの薬理活性と本発明のIL-2 発現制御活性の相関を検討した。

まず、K562細胞、あるいは3T3-L1細胞を0.1% EtOH, 1 μ M CsA, 1 μ M FK506, あるいは5 μ M DIFs存在下で3日間培養後の細胞数を測定、比較した。その結果、TH-DIF-1, TM-DIF-1 は、K562 細胞や3T3-L1 細胞 (正常細胞のモデル) の増殖にはほとんど影響しないこと、Bu-DIF-3, CP-DIF-3はK562 細胞の増

殖をある程度阻害すること等が明らかとなった(図6A)。

また、confluent な状態の3T3-L1 細胞を、0.1% EtOH, 1 μ M CsA, 1 μ M FK506, あるいは5 μ M DIFs存在下で数時間培養し、細胞の糖消費量を測定した。その結果、細胞の糖代謝に対する影響は、TM-DIF-1 の活性もやや高いが、その他のDIFs の効果は程度の差はあるが総じて小さかった(図6B)。さらに、既知免疫抑制剤CsA が若干の細胞増殖抑制作用と糖代謝抑制作用を示すことも明らかとなった。

これらの結果から、既知の2つの作用機序と本発明IL-2 発現制御機序は少なくとも一部異なる可能性が示された。特に、TH-DIF-1 は高いIL-2 発現抑制活性のみが確認されており、特異的IL-2 発現抑制剤、さらには副作用の少ない免疫抑制剤の候補物質、リード化合物として特に期待できる。

[0032] 5) コンカナバリンA (ConA) 刺激によるマウス血清中IL-2の上昇に対するTM-DIF-1の効果

Control群およびTM-DIF-1群のマウス(それぞれn = 4)に、5 mL/kgのVehicleとTM-DIF-1 (10 mg/kg)を静脈内投与し、その15分後にConA(200 μ g/個体)を静脈内に投与した。

IL-2抑制のポジティブコントロールとしてFK506を用いた。FK506群のマウス(n = 4)は、FK506(50 mg/kg)を経口投与し、120分後にConA(200 μ g/個体)を静脈内に投与した。

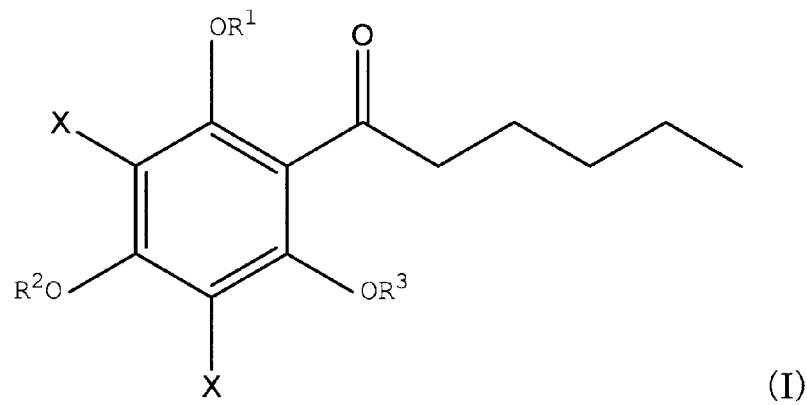
そして、Control群、TM-DIF-1群およびFK506群について、ConA刺激4時間後に全採血し、血清中のIL-2濃度を測定した。

その結果、TM-DIF-1が有意にConA刺激によるIL-2上昇を抑制した。なお、TM-DIF-1投与に伴う急性毒性やマウスの行動異常等は特に観察されなかった。

請求の範囲

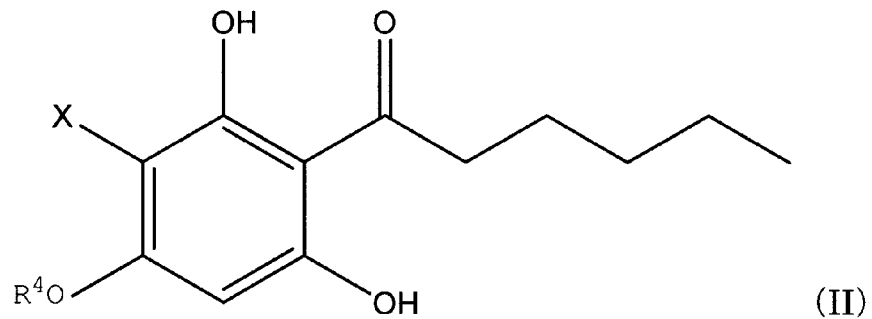
[請求項1] 下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分とするインターロイキン-2 産生抑制剤。

[化1]



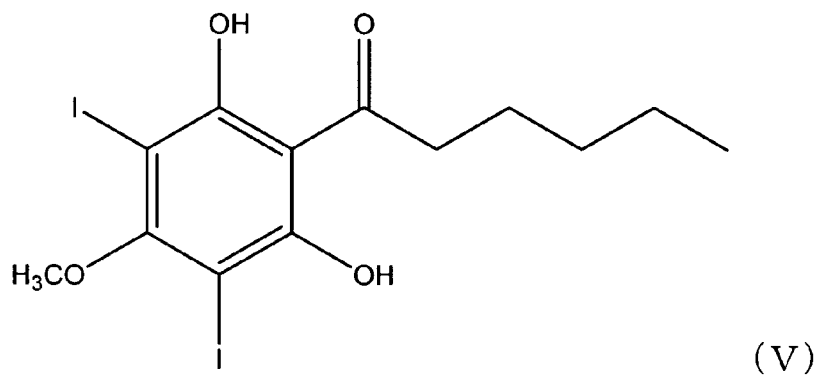
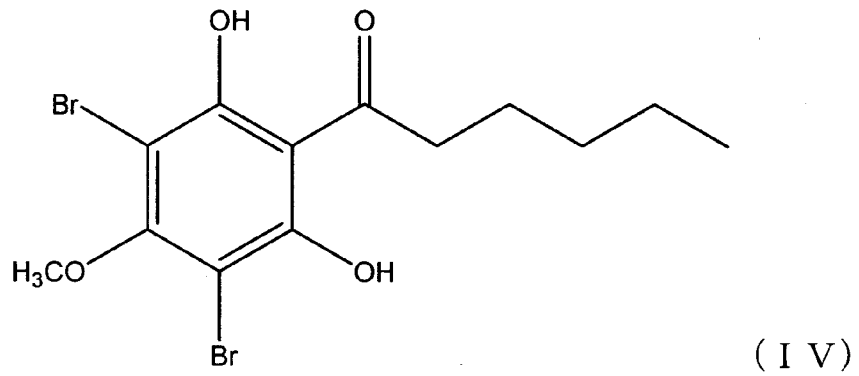
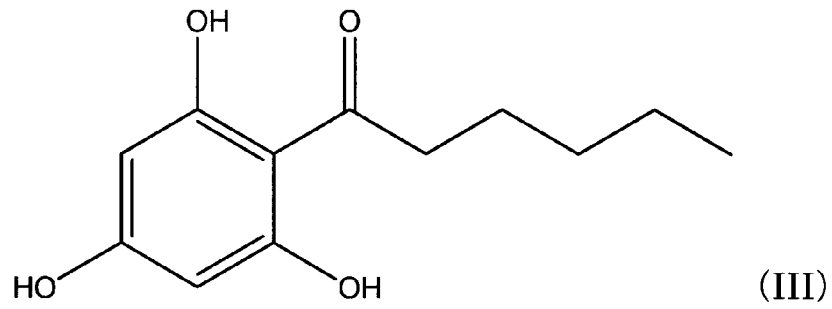
式中、R¹、R²、R³は水素または炭素数 1 ~ 5 のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、X はハロゲンを示す。

[化2]



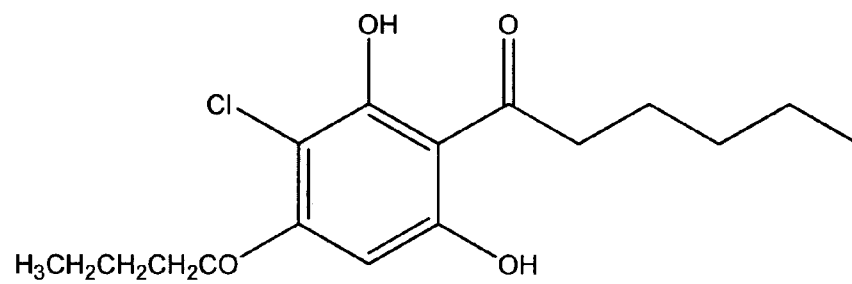
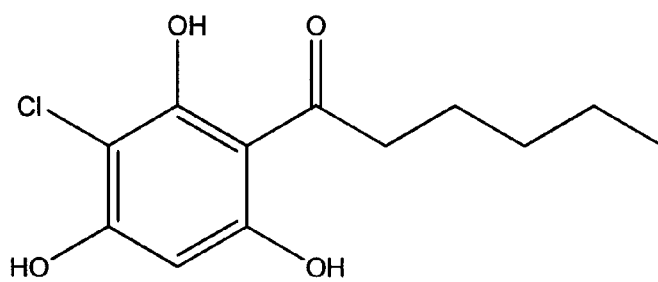
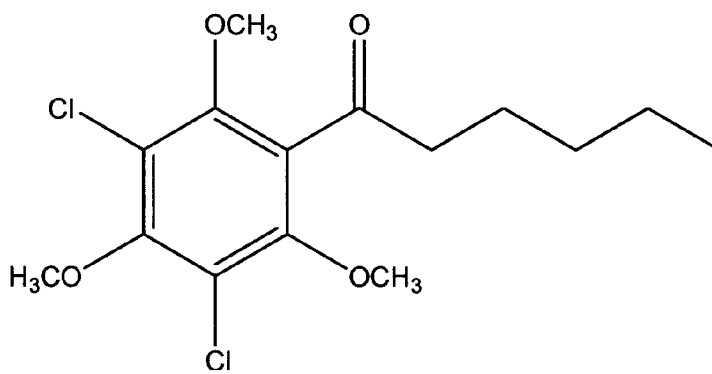
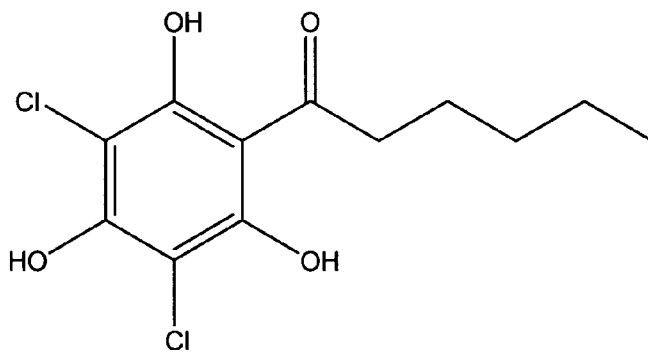
式中、R⁴は水素または炭素数 1 ~ 5 のアルキル基を示し、X はハロゲンを示す。

[化3]

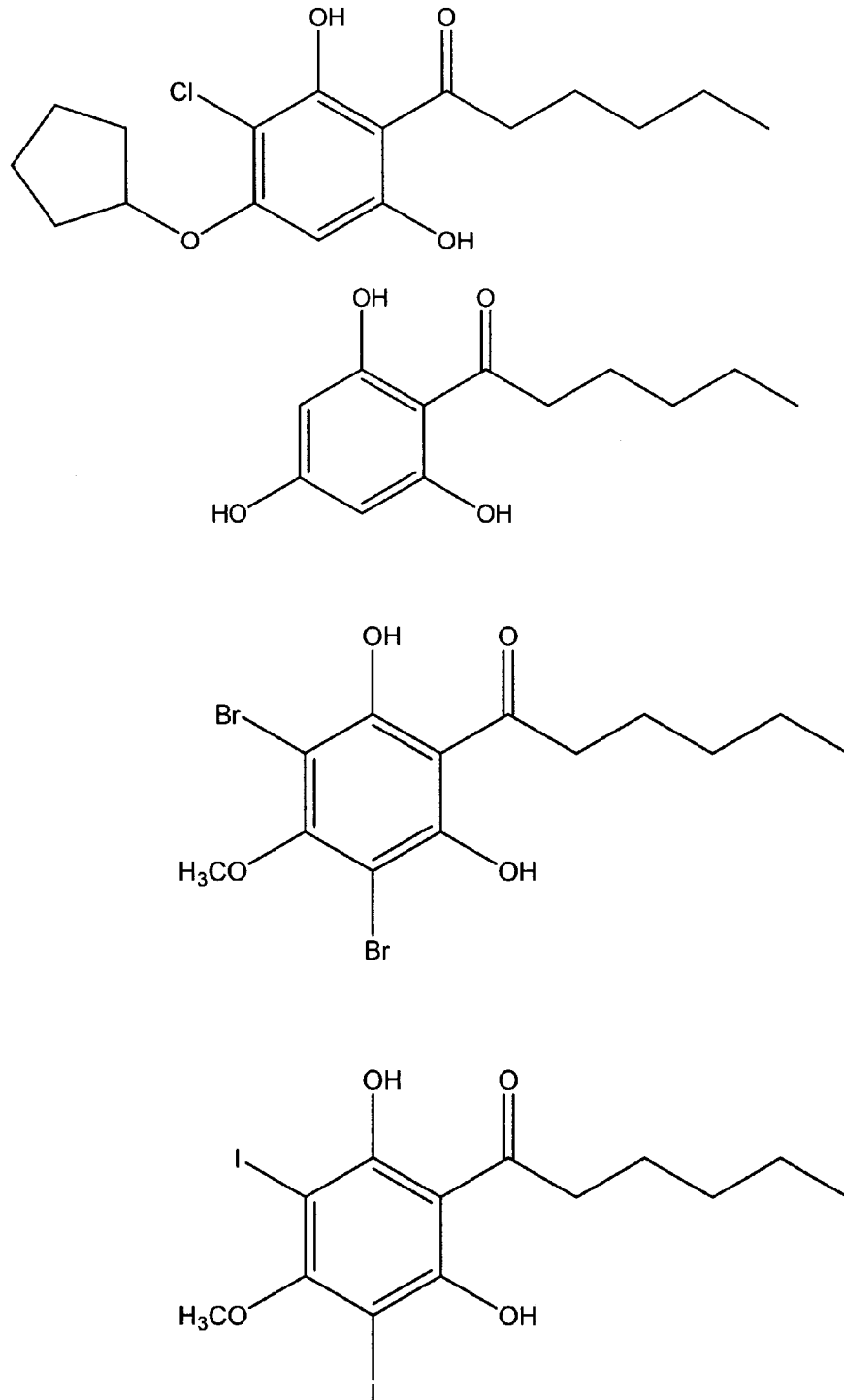


[請求項2] 式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物が以下のいずれかの化合物である、請求項 1 に記載のインターロイキン-2 産生抑制剤。

[化4]



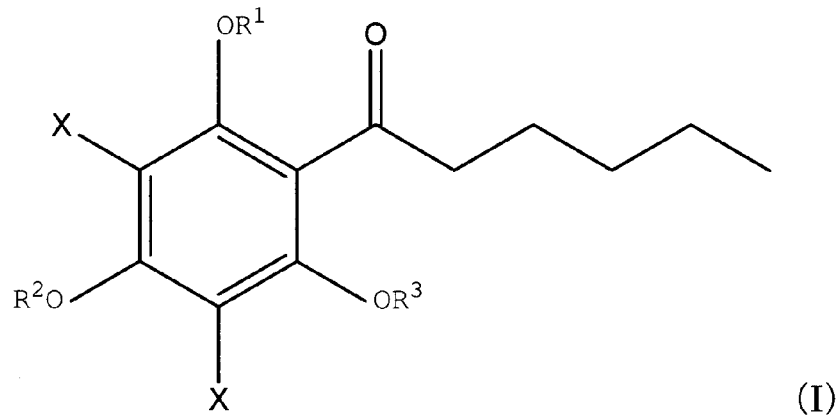
[化5]



[請求項3] 請求項1又は2に記載のインターロイキン-2産生抑制剤を含む免疫抑制剤。

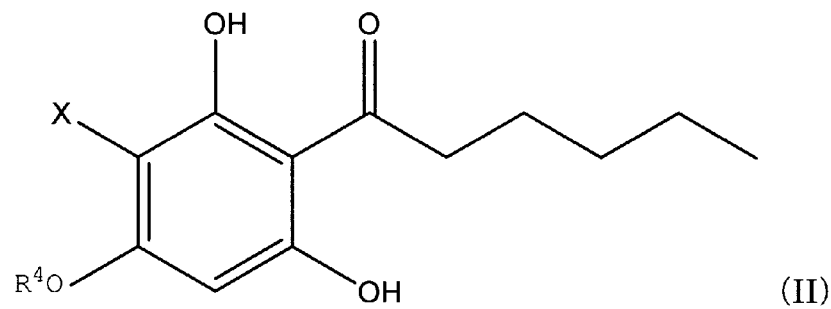
[請求項4] インターロイキン-2産生抑制のための、下記式(I)~(V)のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩。

[化6]



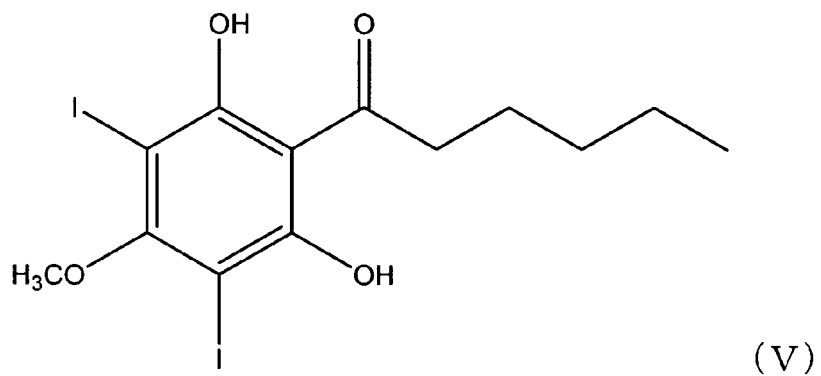
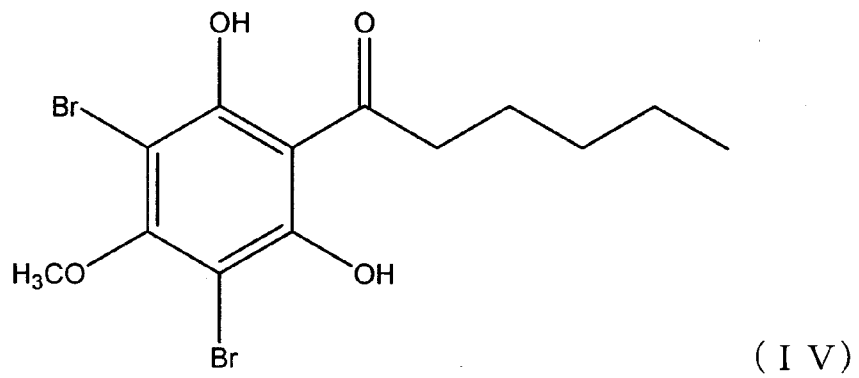
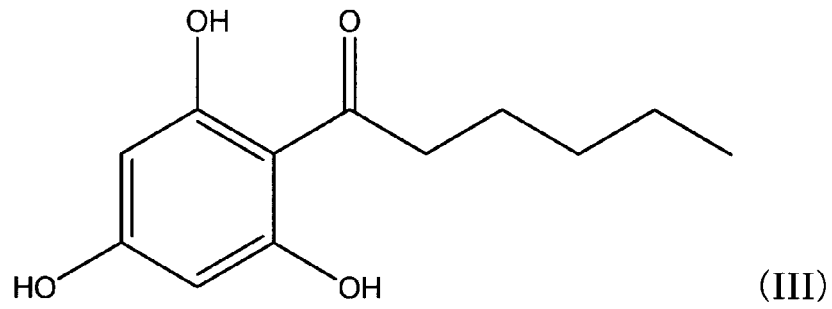
式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は水素または炭素数1～5のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、 X はハロゲンを示す。

[化7]



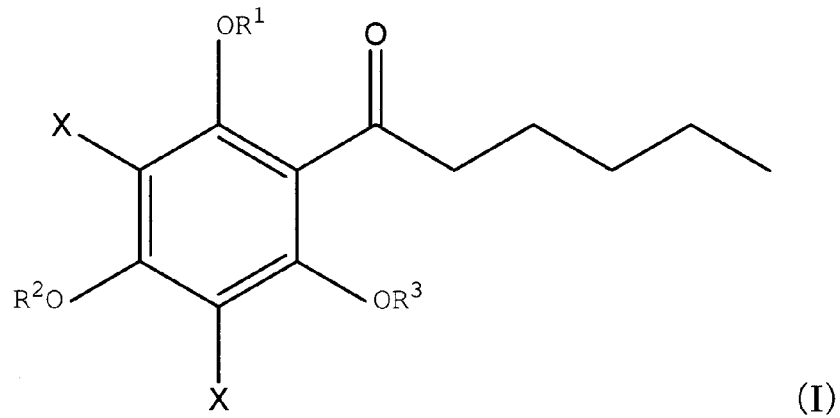
式中、 R^4 は水素または炭素数1～5のアルキル基を示し、 X はハロゲンを示す。

[化8]



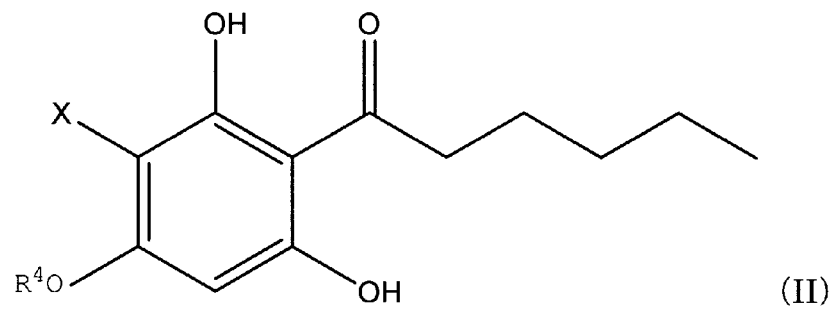
[請求項5] 免疫抑制のための、下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩。

[化9]



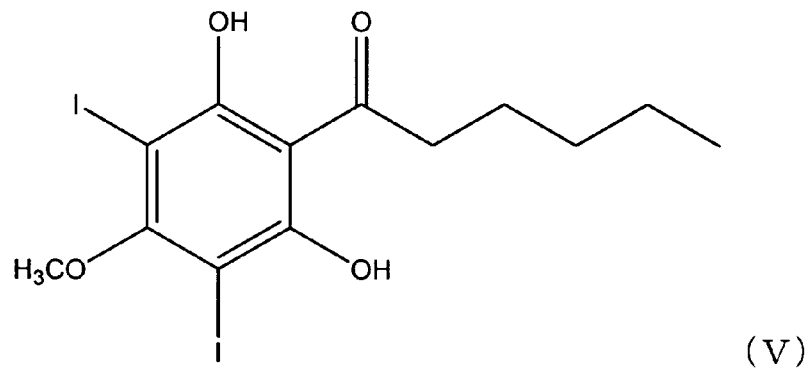
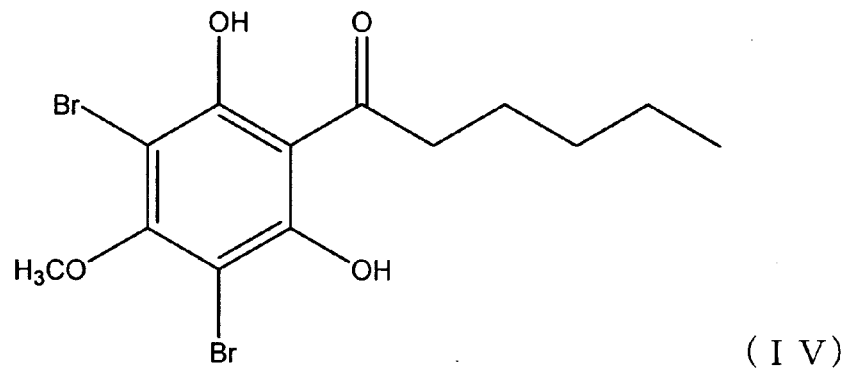
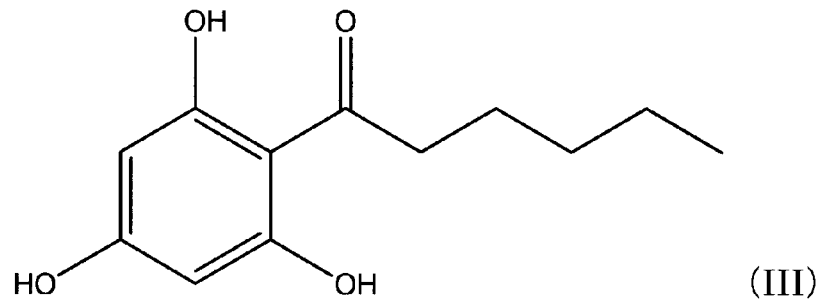
式中、R¹、R²、R³は水素または炭素数1～5のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化10]



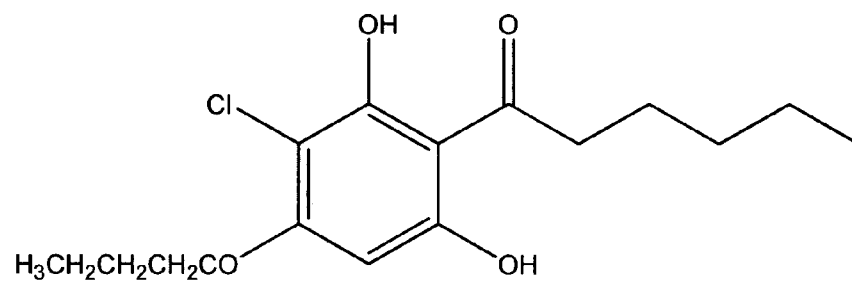
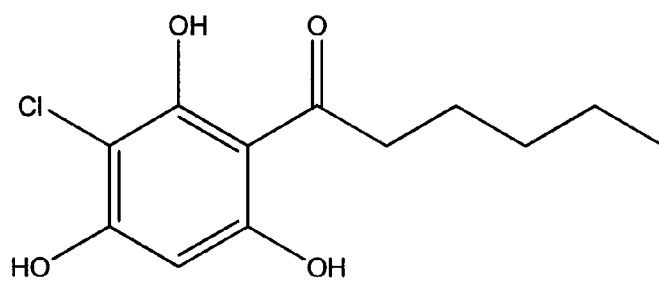
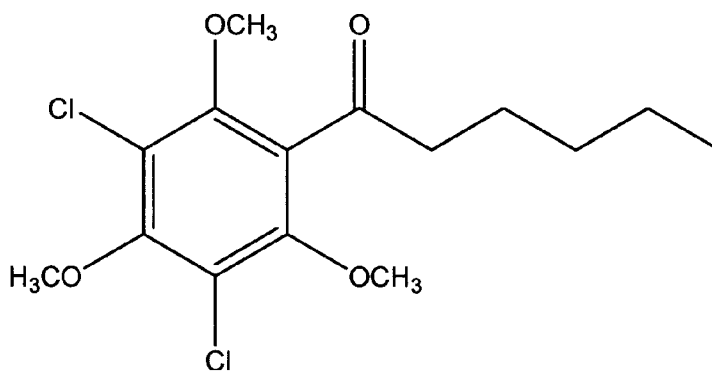
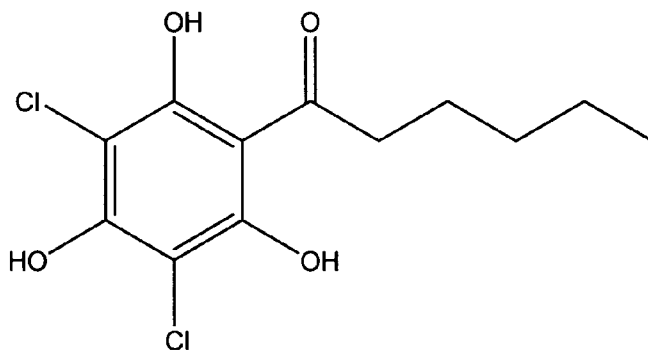
式中、R⁴は水素または炭素数1～5のアルキル基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化11]

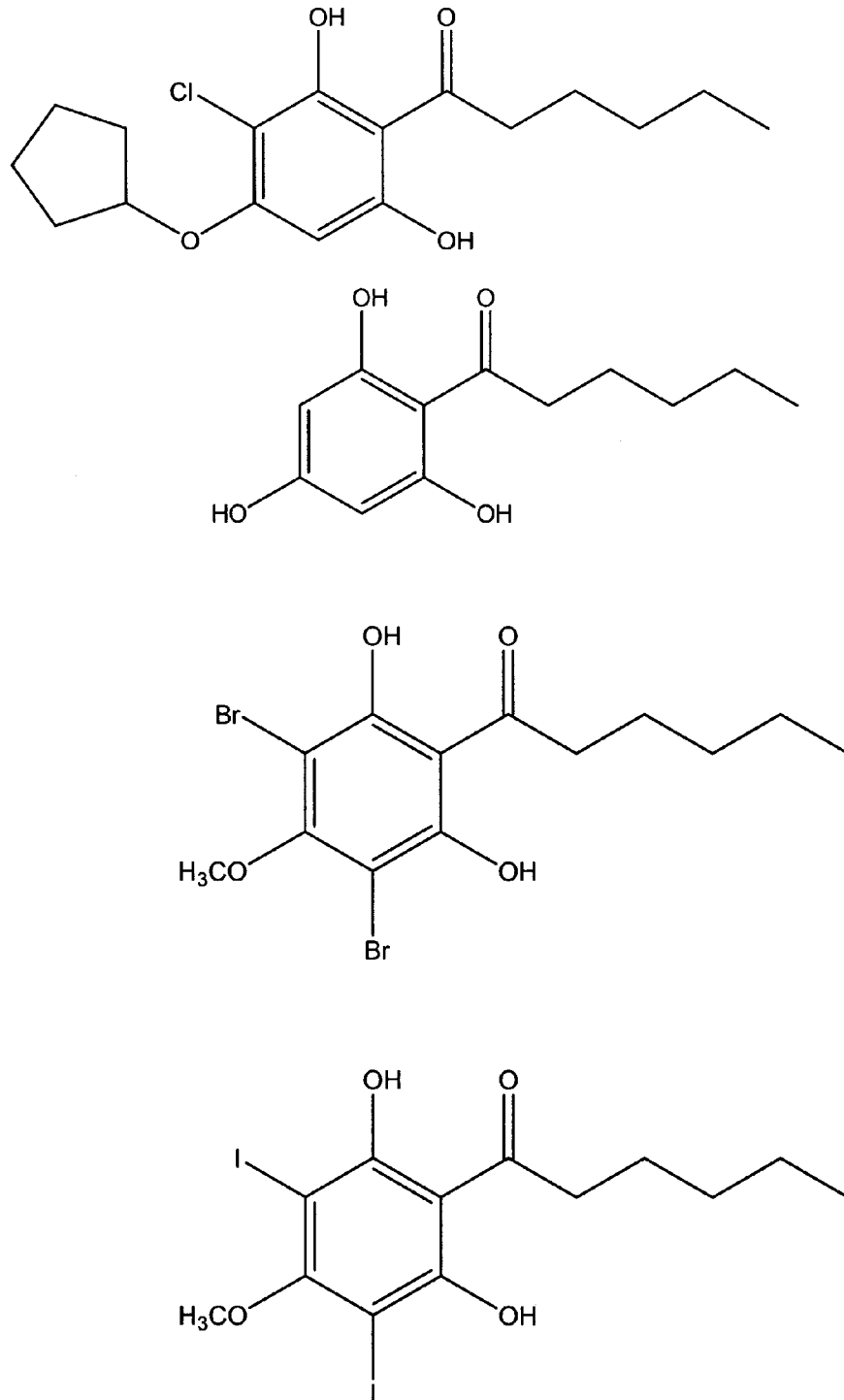


[請求項6] 以下のいずれかの化合物である、請求項4または5に記載の式(I)～(V)のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩。

[化12]

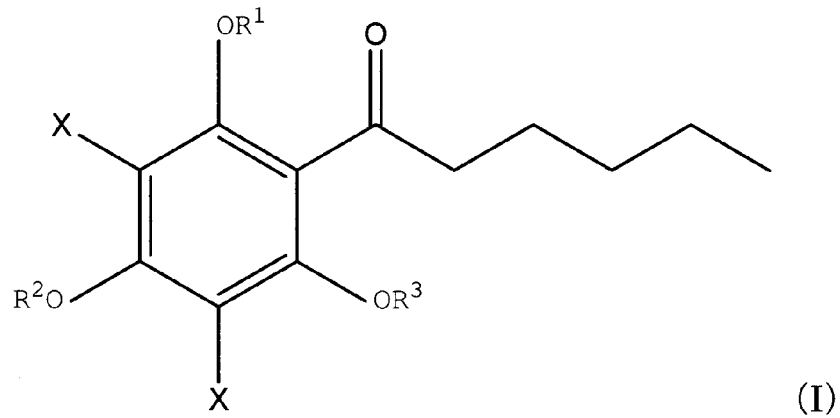


[化13]



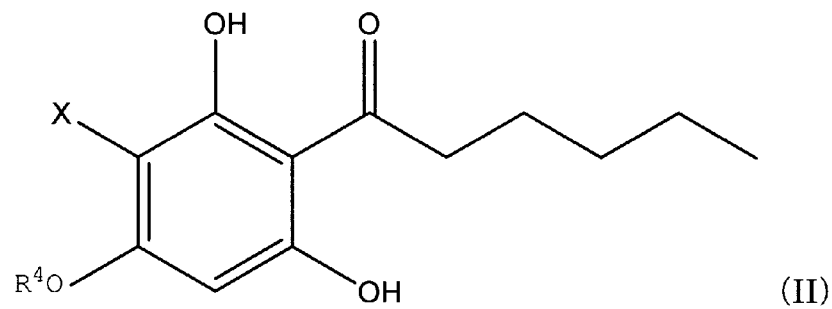
[請求項7] 下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を投与する工程を含む、インターロイキン-2 産生抑制方法。

[化14]



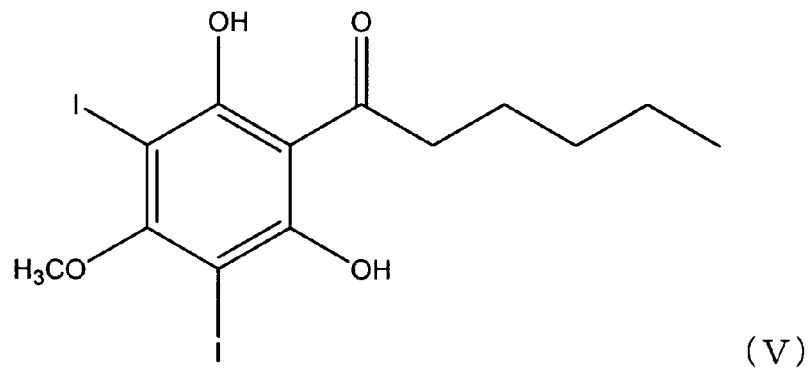
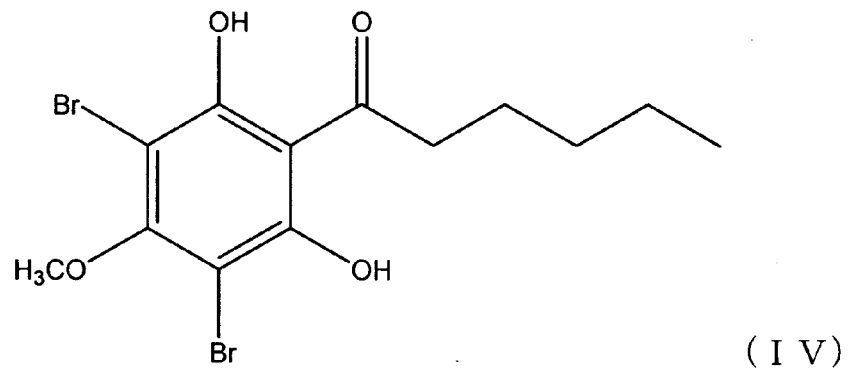
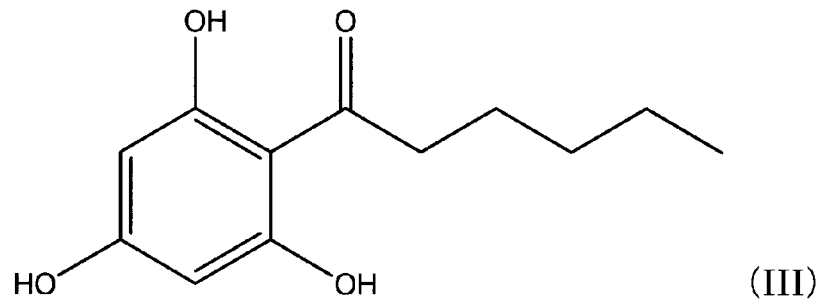
式中、R¹、R²、R³は水素または炭素数1～5のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化15]



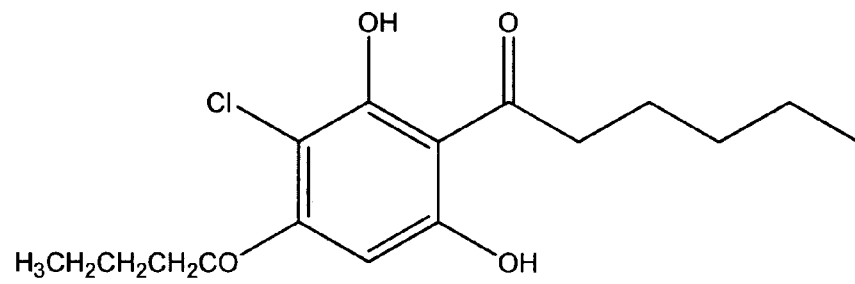
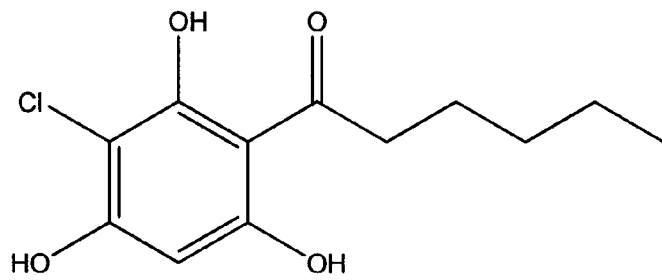
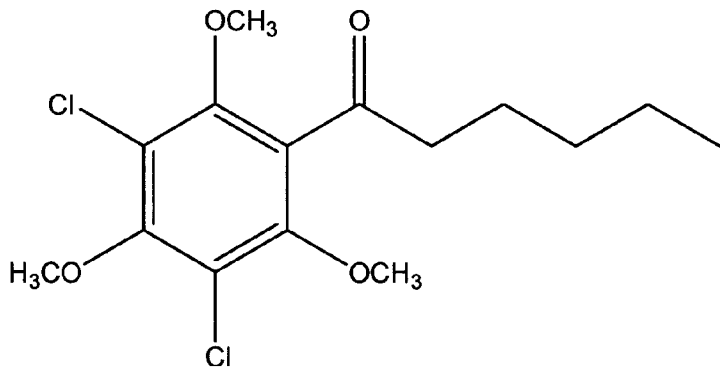
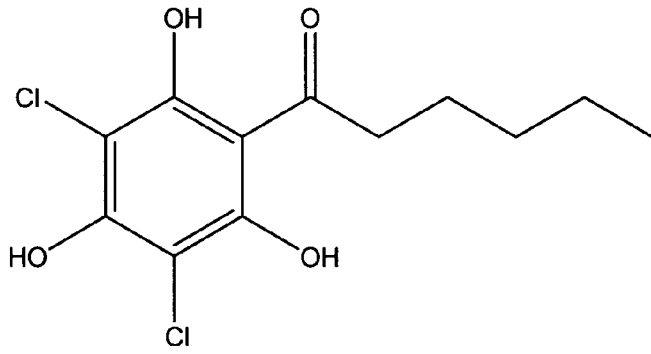
式中、R⁴は水素または炭素数1～5のアルキル基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化16]

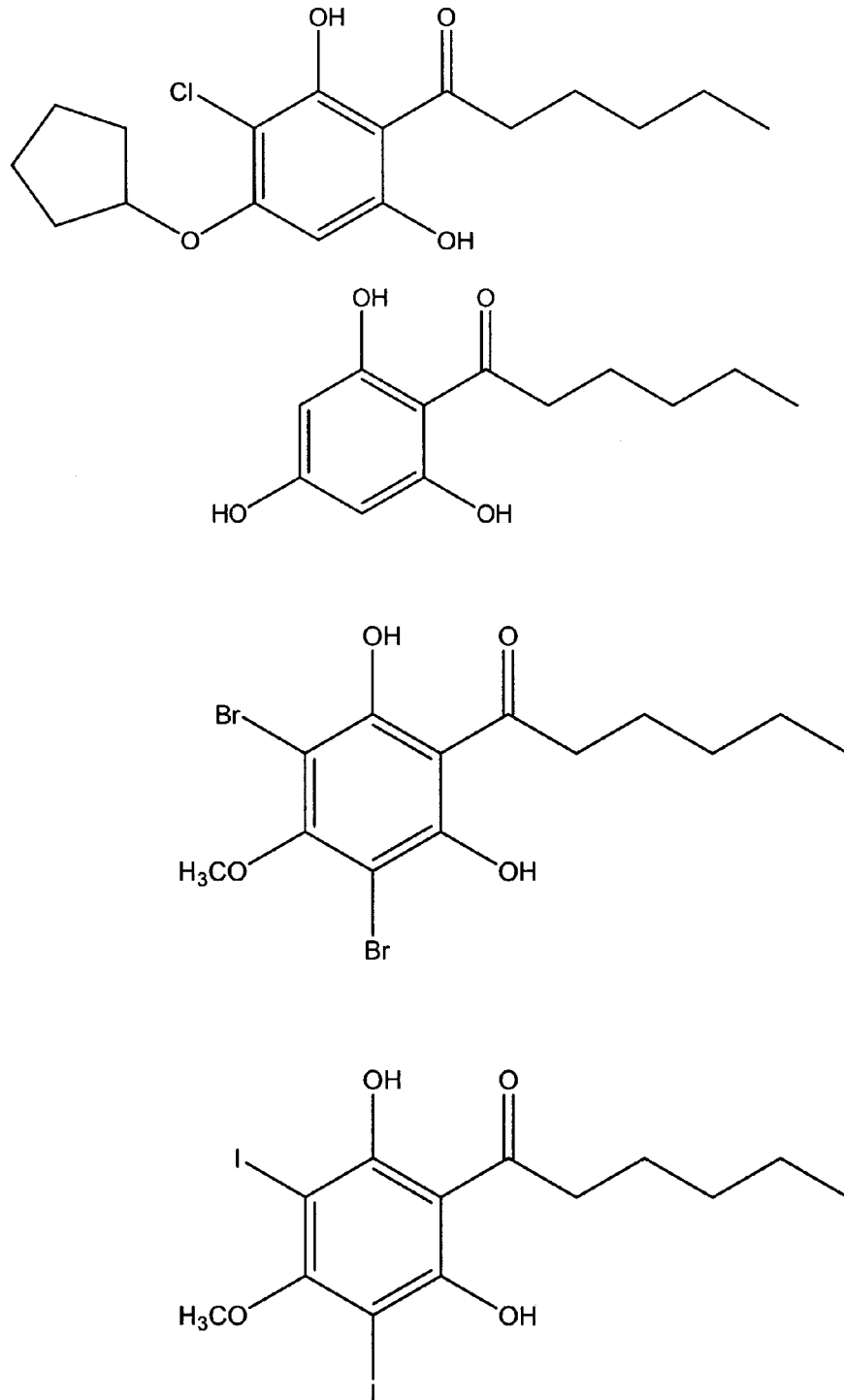


[請求項8] 式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物が以下のいずれかの化合物である、請求項 7 に記載の方法。

[化17]



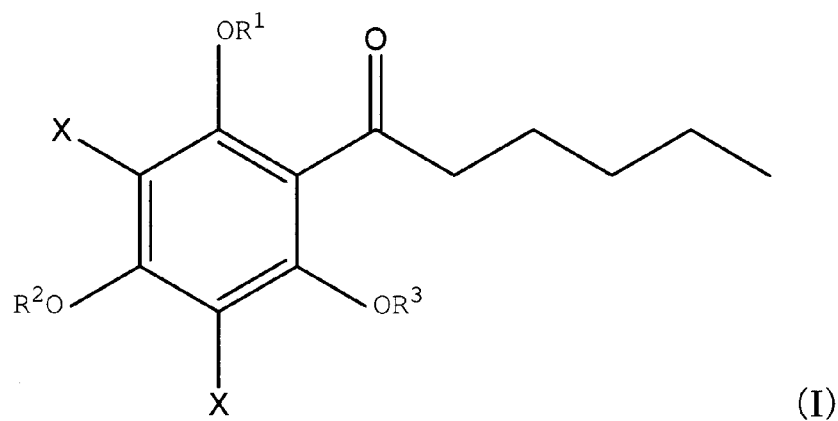
[化18]



[請求項9]

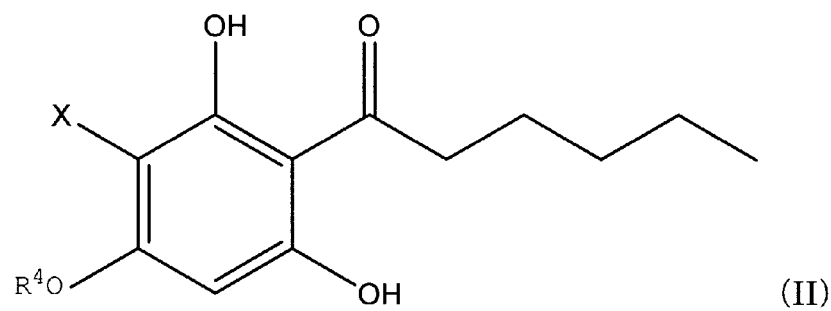
下記式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物またはその薬学的に許容される塩を投与する工程を含む、免疫抑制方法。

[化19]



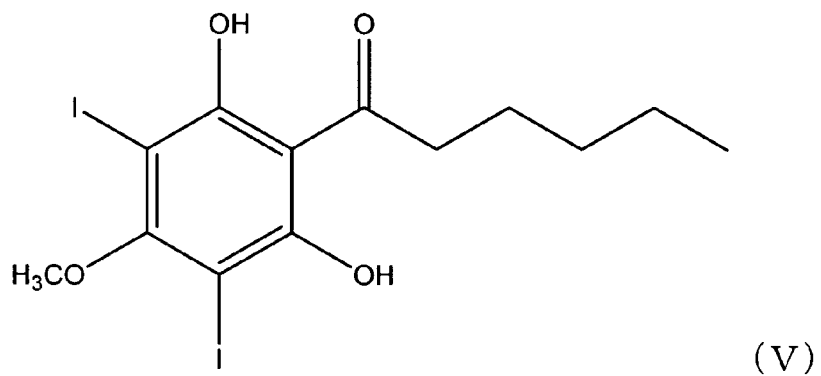
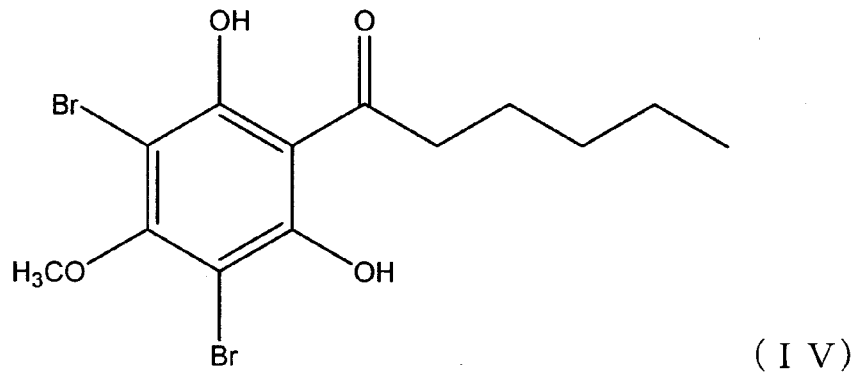
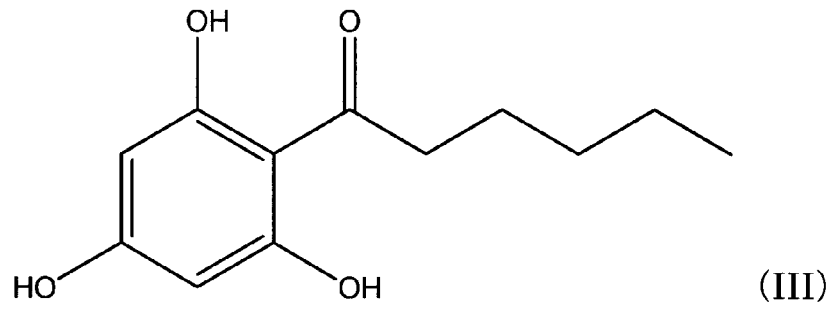
式中、R¹、R²、R³は水素または炭素数1～5のアルキル基から選ばれる同一の基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化20]



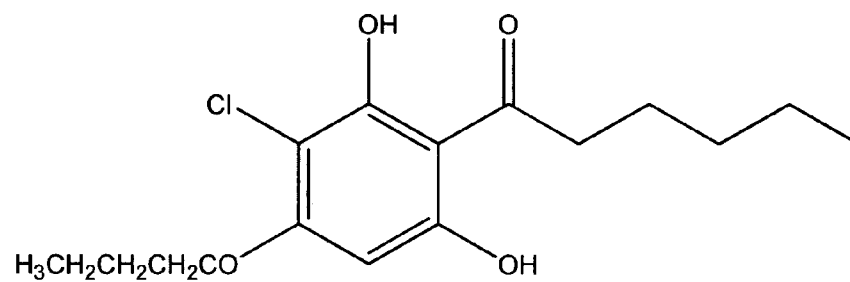
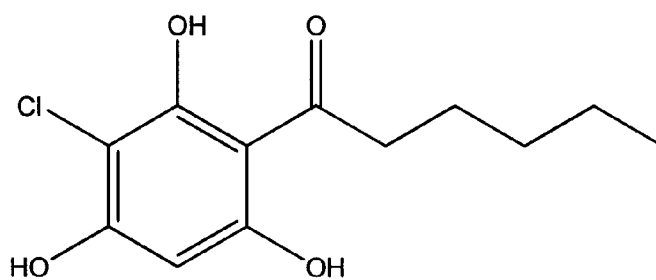
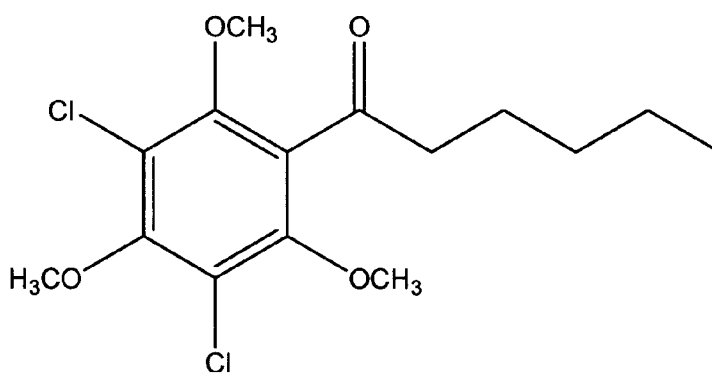
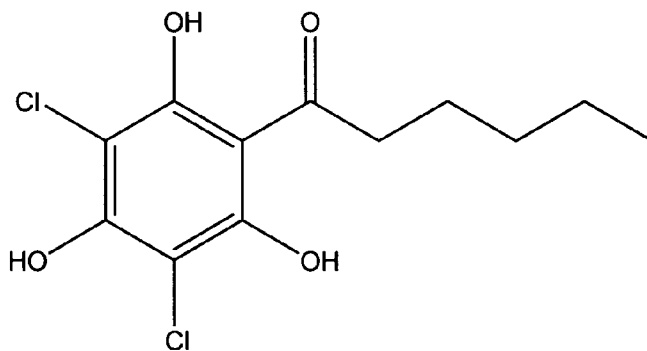
式中、R⁴は水素または炭素数1～5のアルキル基を示し、Xはハロゲンを示す。

[化21]

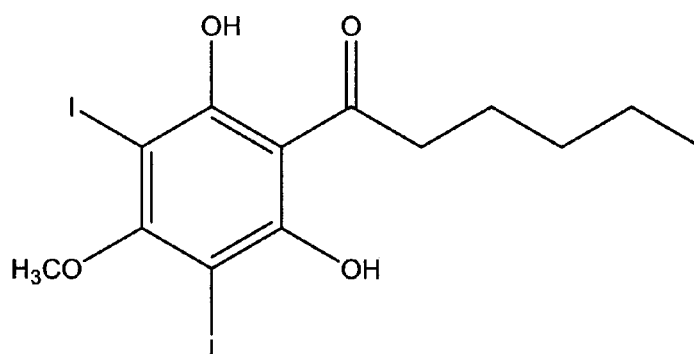
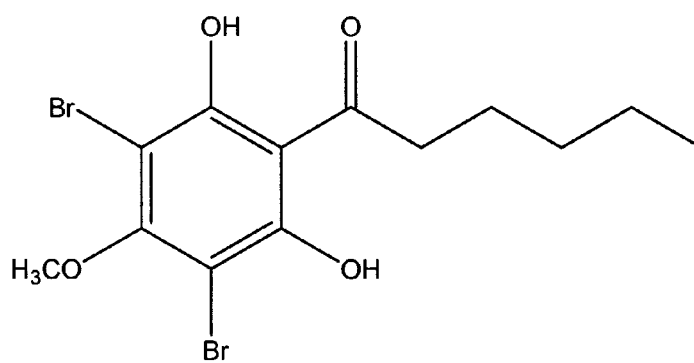
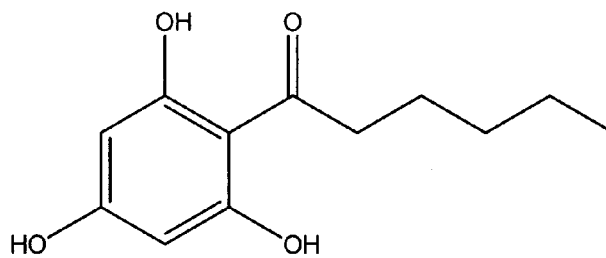
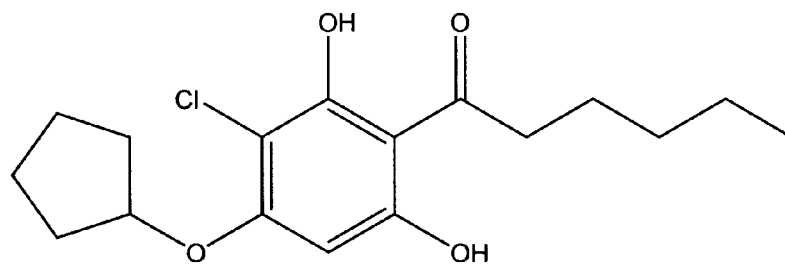


[請求項10] 式 (I) ~ (V) のいずれかで表される化合物が以下のいずれかの化合物である、請求項9に記載の方法。

[化22]

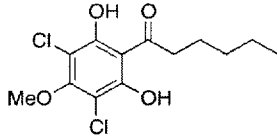


[化23]

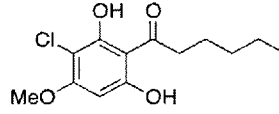


[圖1]

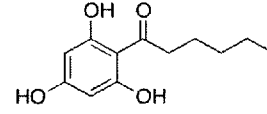
DIF-1



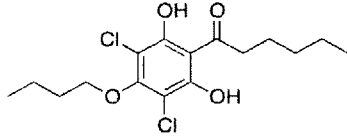
DIF-3



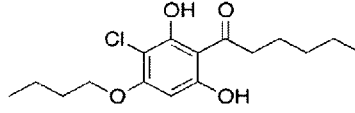
THPH



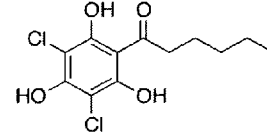
Bu-DIF-1



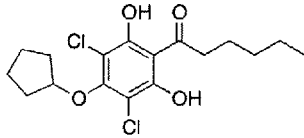
Bu-DIF-3



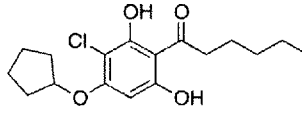
TH-DIF-1



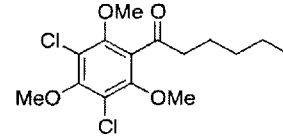
CP-DIF-1



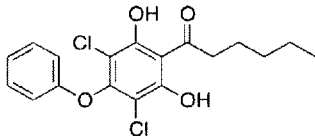
CP-DIF-3



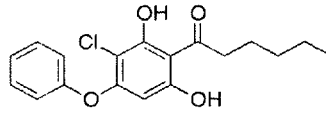
TM-DIF-1



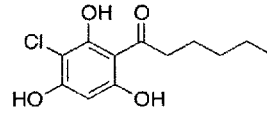
Ph-DIF-1



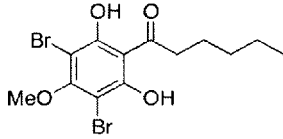
Ph-DIF-3



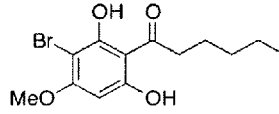
TH-DIF-3



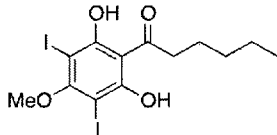
Br-DIF-1



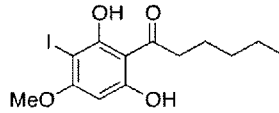
Br-DIF-3



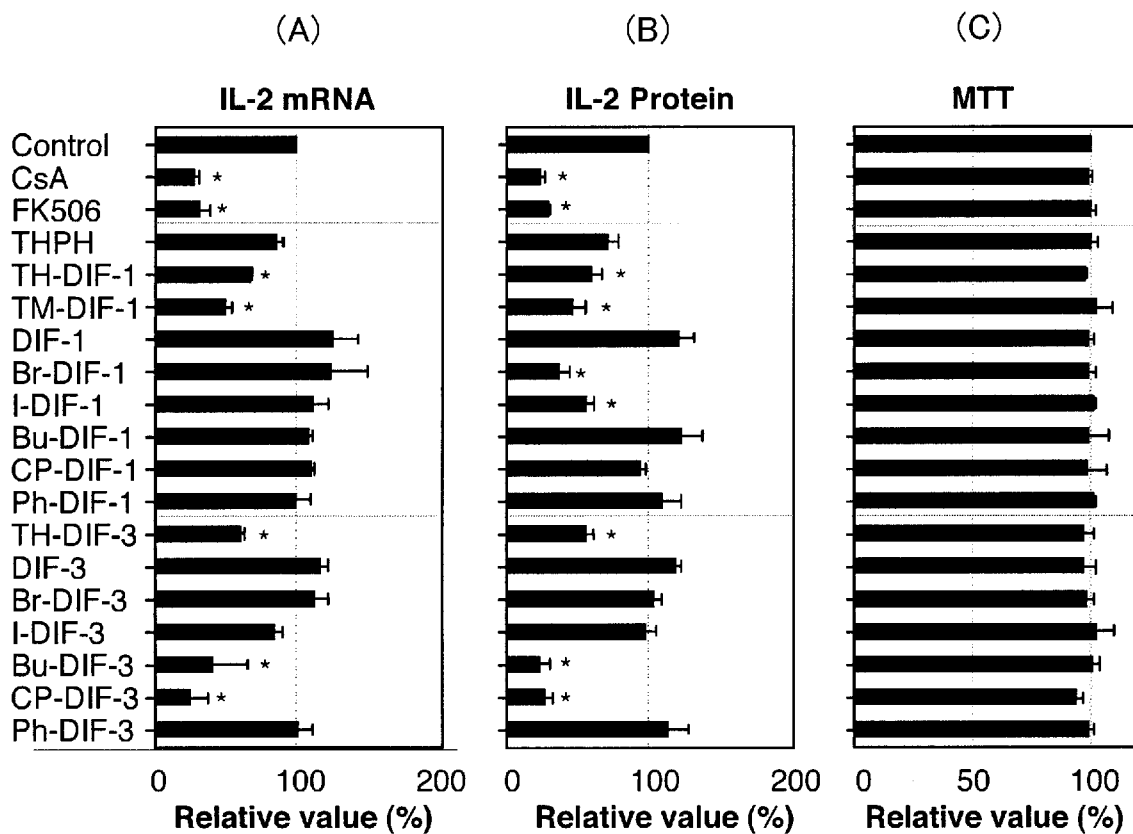
I-DIF-1



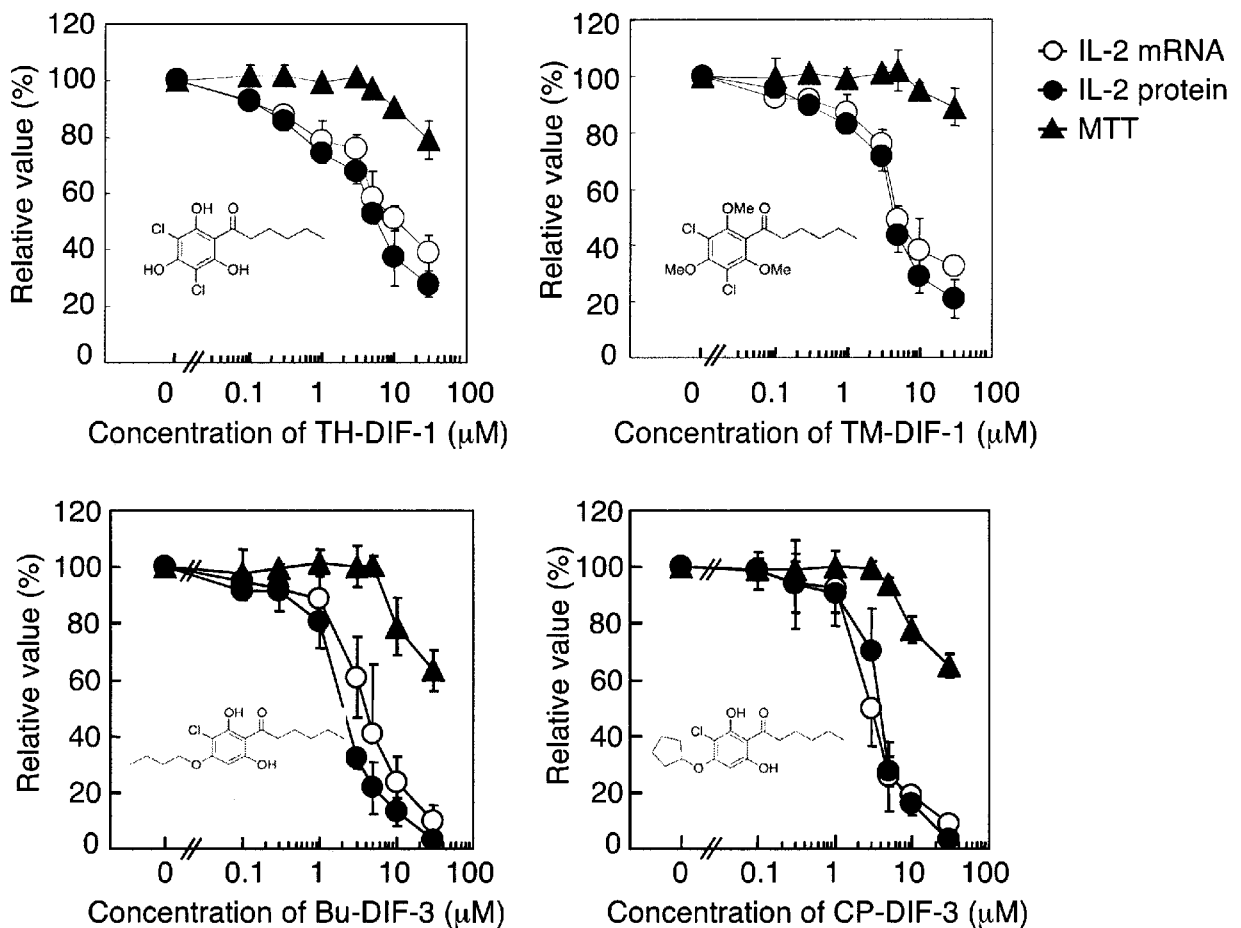
I-DIF-3



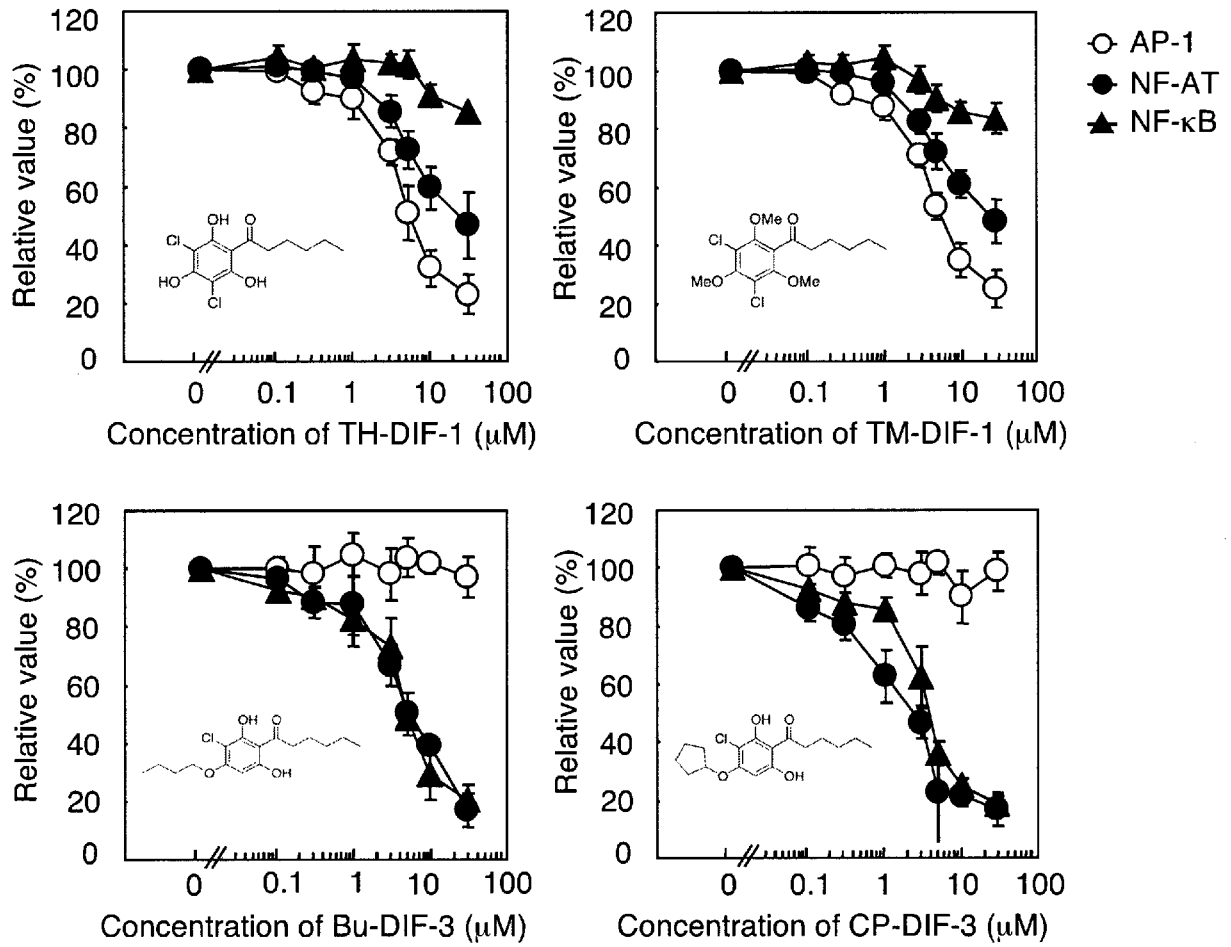
[Fig 2]



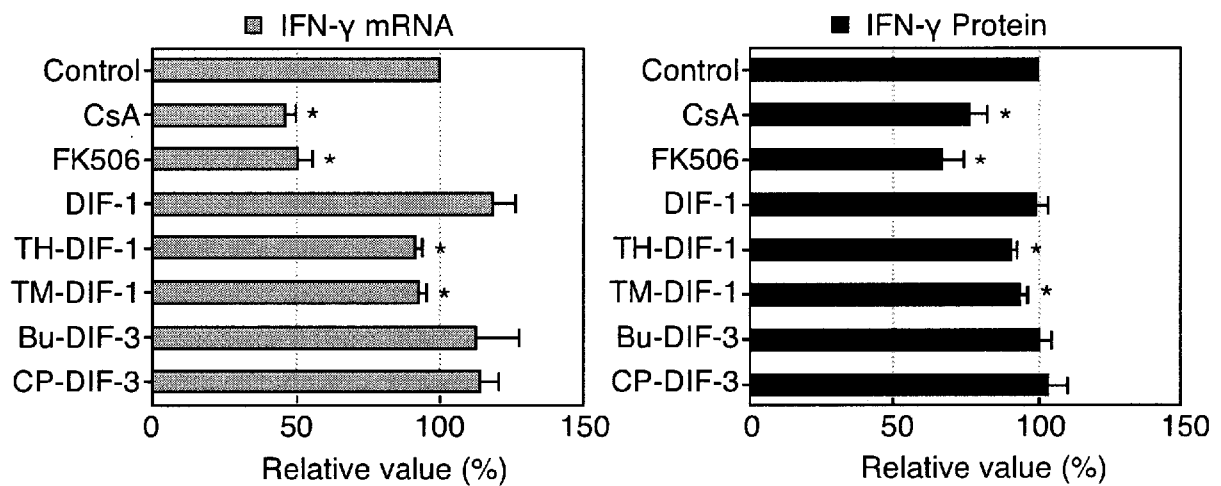
[Fig 3]



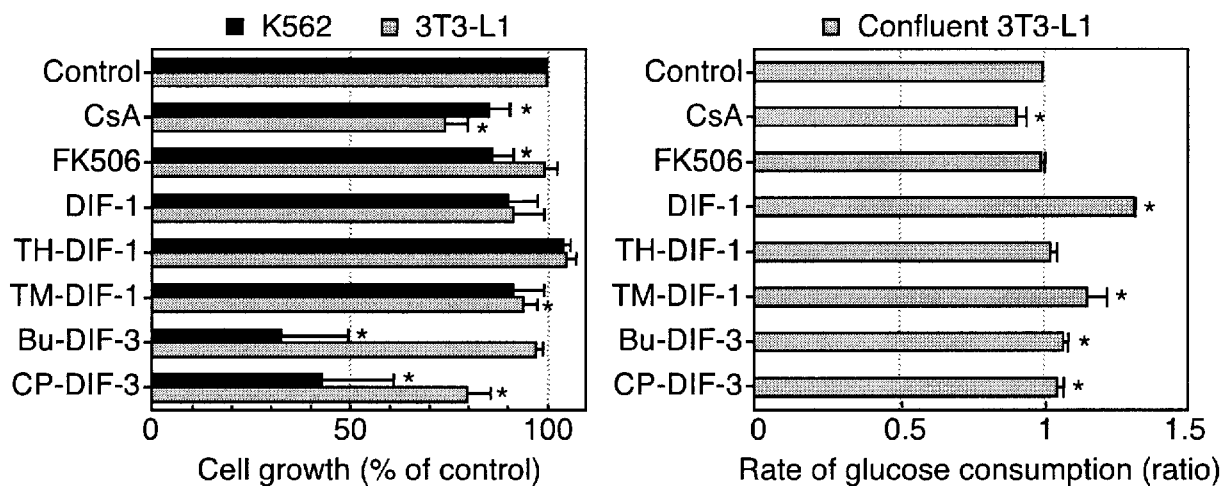
[圖4]



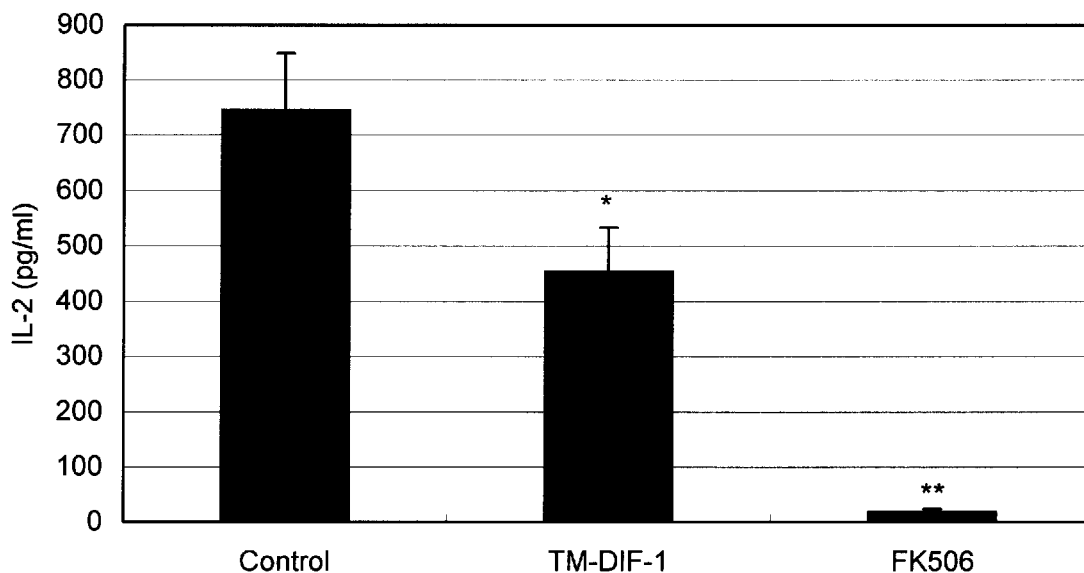
[圖5]



[Fig 6]



[Fig 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/12(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/12, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P37/08, 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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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.
X A	JP 04-108730 A (FUJI REBIO KABUSHIKI KAISHA), 09 April 1992 (09.04.1992), entire text; particularly, claims; examples; particularly, examples 8, 13 (Family: none)	1-2, 4-6 3
X	Naomi G, Haruhisa K, Koji N, et al. Structural requirement of Dictyostelium differentiation- inducing factors for their stalk-cell-inducing activity in Dictyostelium cells and anti- proliferative activity in K562 human leukemic cells, Biochemical Pharmacology, 2005, Vol.70, pages 676-685, entire text, particularly, page 677	4-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"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
31 May, 2010 (31.05.10)

Date of mailing of the international search report
08 June, 2010 (08.06.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057763

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/254130 A1 (BIODERM RES, US), 16 October 2008 (16.10.2008), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057763

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

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

1. Claims Nos.: 7-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

Remark on Protest

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

<Regarding Coverage of Search>

Claims 1, 3

The invention of claim 1 is related to an interleukin-2 production inhibitor which contains a compound represented by one of formulae (I)-(V) as an active ingredient.

The compounds represented by formula (I) include various kinds of compounds wherein R1-R3 are hydrogen atoms or the same alkyl groups having 1-5 carbon atoms (including cycloalkyl groups, hereinafter the same shall apply) and the two Xs are halogen atoms (selected from four kinds of halogen atoms, namely fluorine atoms, chlorine atoms, bromine atoms and iodine atoms); and the compounds represented by formula (II) include various kinds of compounds wherein R4 is a hydrogen atom or an alkyl group having 1-5 carbon atoms and X is a halogen atom. Meanwhile, the compounds which are confirmed in the description to have interleukin-2 production inhibitory activity are only two kinds of compounds represented by formula (I) wherein R1-R3 are hydrogen atoms or the same specific alkyl groups having 1-5 carbon atoms and Xs are specific halogen atoms, and four kinds of compounds represented by formula (II) wherein R4 is a hydrogen atom or a specific alkyl group having 1-5 carbon atoms and X is a specific halogen atom (among those compounds, one compound (I-DIF-3) has a very weak action). In this connection, it cannot be considered that all the compounds represented by formulae (I) and (II), which include various kinds of compounds that are different from one another in the number of carbon atoms in the alkyl groups having 1-5 carbon atoms represented by R1-R4 or in the kind of halogen atom represented by X, have interleukin-2 production inhibitory activity, for the following reasons: (1) the compounds represented by formula (II) include compounds (DIF-3, Br-DIF-3) which do not have interleukin-2 production inhibitory activity; and (2) a little difference in the number of carbon atoms in the alkyl groups having 1-5 carbon atoms represented by R1-R4 or in the kind of halogen atom represented by X is considered to have a huge effect on the interleukin-2 production inhibitory activity in view of the fact that (i) a compound (DIF-3) which is different from the compounds (Bu-DIF-3, CP-DIF-3) of formula (II), which are confirmed to have interleukin-2 production inhibitory activity, only in the number of carbon atoms in the alkyl group having 1-5 carbon atoms represented by R4 (that corresponds to R2 in formula (I)), and (ii) a compound (DIF-1) which is different from the compounds (Br-DIF-1, I-DIF-1) of formulae (IV) and (V), which are confirmed to have interleukin-2 production inhibitory activity, only in the kind of halogen atom represented by X in formulae (I) and (II), does not have interleukin-2 production inhibitory activity, and the like.

Consequently, the invention of claim 1 is not disclosed by the description in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art, and is not considered to be fully supported by the description. (PCT Article 5, Article 6)

For the reasons stated above, with respect to claim 1, this international search report covers those supported by the description within the meaning of PCT Article 6 while being disclosed by the description within the meaning of PCT Article 5, namely specific compounds among those represented by formulae (I) and (II), which are confirmed to have interleukin-2 production inhibitory activity.

The same is true of the invention of claim 3 which is related to an immunosuppressive agent that contains the interleukin-2 production inhibitor of claim 1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/12(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, A61P37/08(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. A61K31/12, A61P29/00, A61P37/02, A61P37/06, A61P37/08, 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	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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
X	JP 04-108730 A (FUJI REBIO KK) 1992.04.09,	1-2, 4-6
A	文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例、特に、実施例 8、13 (ファミリーなし)	3

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

31.05.2010

国際調査報告の発送日

08.06.2010

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)

北畑 勝彦

4C

3337

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

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
X	Naomi G, Haruhisa K, Koji N, et al. Structural requirement of Dictyostelium differentiation-inducing factors for their stalk-cell-inducing activity in Dictyostelium cells and anti-proliferative activity in K562 human leukemic cells, Biochemical Pharmacology, 2005, Vol.70, pages 676-685 文献全体、特に、第677頁	4-6
A	US 2008/254130 A1 (BIODERM RES, US) 2008.10.16, 文献全体、特に、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-6

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

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 7-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項7～10は、治療による人体の処置方法に該当することから、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

〈調査の対象に関して〉

請求項1、3

請求項1は、式(I)～(V)の化合物を有効成分とするインターロイキン2産生抑制剤に係る発明である。

式(I)の化合物には、R1～R3が同一の水素或いは炭素数1～5のアルキル基(シクロアルキル基も含まれる。以下、同様。)であり、2つのXがハロゲン(弗素、塩素、臭素、沃素の4種類)である多種類の化合物が、式(II)の化合物には、R4が水素或いは炭素数1～5のアルキル基であり、Xがハロゲンである多種類の化合物が、それぞれ、包含される一方で、明細書にてインターロイキン2産生抑制作用が確認されているのは、式(I)の化合物についてはR1～R3が特定の同一の水素或いは炭素数1～5のアルキルであり、且つ、Xが特定のハロゲンである2種類の化合物についてのみであり、式(II)の化合物についてはR4が特定の水素或いは炭素数1～5のアルキルであり、且つ、Xが特定のハロゲンである4種類(このうちの1種類(I-DIF-3)については作用が極めて弱い)の化合物についてのみである。そして、ここで、(1)式(II)の化合物には、インターロイキン2産生抑制作用を奏さないもの(DIF-3、Br-DIF-3)も包含されること、(2)(i)インターロイキン2産生抑制作用が確認されている式(II)の化合物(Bu-DIF-3、CP-DIF-3)と、R4(式(I)ではR2に相当)の炭素数1～5のアルキル基の炭素数のみが相違する化合物(DIF-3)、や、(ii)インターロイキン2産生抑制作用が確認されている式(IV)、(V)の化合物(Br-DIF-1、I-DIF-1)と、式(I)、(II)のXに相当するハロゲンの種類のみが相違する化合物(DIF-1)、が、インターロイキン2産生抑制作用を奏さない等、式(I)、(II)のR1～R4の炭素数1～5のアルキル基の炭素数やXのハロゲンの種類のわずかな相違がインターロイキン2産生抑制作用に多大な影響を及ぼすと認められること、を考慮すれば、R1～R4の炭素数1～5のアルキル基の炭素数やXのハロゲンの種類が相違する多種類の化合物が包含されるところの式(I)、(II)の化合物の全てがインターロイキン2産生抑制作用を奏し得るとは認められない。

してみれば、請求項1に係る発明については、当該技術分野の専門家がその発明を実施することができる程度に明細書が明確かつ十分に記載されておらず、また、上記請求項に係る発明が明細書により十分な裏付けがなされているともいえない(PCT第5条、第6条)。

以上の理由により、請求項1について、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において明細書に開示されている部分、具体的には、式(I)、(II)の化合物がインターロイキン2産生抑制作用が確認されている特定の化合物である態様を中心に調査を行った。

請求項1に係るインターロイキン2産生抑制剤を含む免疫抑制剤に係る請求項3に係る発明についても同様のことがいえる。