

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/136887

発行日 平成29年4月6日(2017.4.6)

(43) 国際公開日 平成27年9月17日(2015.9.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/381 (2006.01)	A 6 1 K 31/381	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	

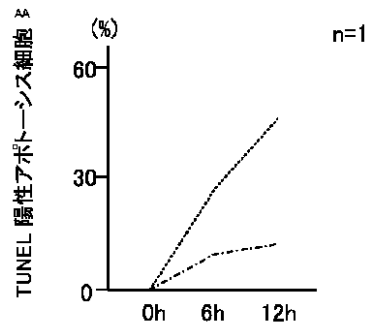
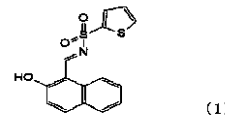
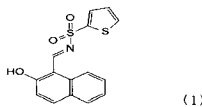
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

出願番号 特願2016-507342 (P2016-507342)	(71) 出願人 504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/001118	
(22) 国際出願日 平成27年3月3日(2015.3.3)	(74) 代理人 110001427 特許業務法人前田特許事務所
(31) 優先権主張番号 特願2014-46300 (P2014-46300)	(72) 発明者 越智 光夫 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立 大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究 院内
(32) 優先日 平成26年3月10日(2014.3.10)	(72) 発明者 泉 聡太郎 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立 大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究 科内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BB02 MA01 MA04 NA14 ZB15 ZC41 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 滑膜細胞増殖抑制剤及び滑膜細胞の増殖抑制方法

(57) 【要約】

滑膜細胞の増殖を適切に抑制できる滑膜細胞増殖抑制剤を提供する。式1を含有することを特徴とする。小胞体ストレス応答を阻害し、小胞体ストレスにて滑膜細胞をアポトーシスに誘導し、滑膜炎を抑制する。関節リウマチは滑膜細胞の異常な増殖により分泌されるサイトカインや蛋白分解酵素によって関節軟骨、ひいては関節を破壊するが、IRE1を抑制することにより、XBP1遺伝子の転写・活性化を阻害(小胞体ストレス応答を阻害)し、ERAD系を抑制することにより滑膜細胞をアポトーシスに導いて、滑膜細胞の増殖を抑制する。



+IL-1(1ng/ml)+TNFα(1ng/ml): - - - - -
+IL-1(1ng/ml)+TNFα(1ng/ml)+STF(100μM): - · - · - · -

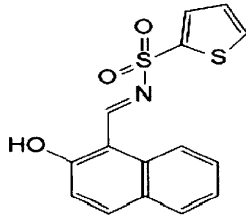
AA: TUNEL-positive apoptotic cells

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 1 又は式 2 の少なくとも何れか一方の化合物を含有することを特徴とする滑膜細胞増殖抑制剤。

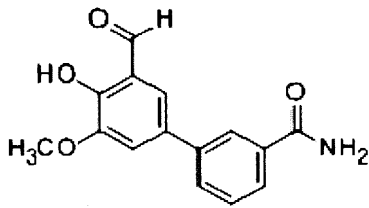
【化 1】



(1)

10

【化 2】



(2)

20

【請求項 2】

関節リウマチの治療に用いられることを特徴とする請求項 1 に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

【請求項 3】

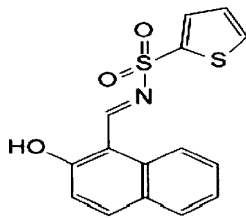
関節リウマチ治療薬のエスケープ現象を回避することを特徴とする請求項 2 に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

【請求項 4】

式 1 又は式 2 の少なくとも何れか一方の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする滑膜細胞の増殖抑制方法。

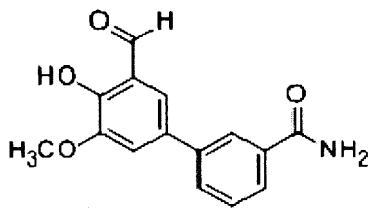
30

【化 1】



(1)

【化 2】



(2)

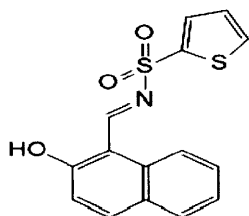
40

【請求項 5】

式 1 又は式 2 の少なくとも何れか一方の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする関節リウマチの予防及び / 又は治療方法。

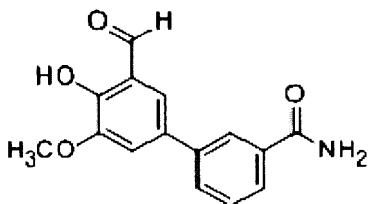
50

【化1】



(1)

【化2】



(2)

10

【請求項6】

0.01～10mg/mLの前記薬剤を6週間～18週間の間隔をおいて投与することを特徴とする請求項5に記載の関節リウマチの予防及び/又は治療方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、滑膜細胞増殖抑制剤及び滑膜細胞の増殖抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチ（以下「RA」と記載することもある。）は多発性の滑膜関節炎を主病変とする全身性炎症疾患である。30-50歳代の女性に好発するが、小児発症や高齢発症もみられる。日本における患者数は約70万人とされ、そのうち約1割は身障者とされている。倦怠感等の全身症状、朝のこわばりと共に関節の疼痛、腫張、発赤、圧痛を対称性に認める。関節炎による骨・関節破壊の進行は、靭帯の弛緩、腱鞘炎等と共に亜脱臼や種々の関節変形をもたらす。

30

【0003】

関節リウマチの進行による病型は3型に分類され、多くは多周期型（70%）であるが、2年以内に寛解をみる単周期型（20%）や進行型（10%）もみられる。また、経過中種々の関節外症状もみられ、血管炎を基盤とする生命予後の不良な臨床病態は、日本では悪性関節リウマチの概念でとらえられている。

【0004】

何らかの原因によって抗原提示細胞（マクロファージ、樹状細胞）が活性化されると、HLAクラスIIと抗原をヘルパーT細胞に提示し、ヘルパーT細胞の活性化をもたらす。その活性化にはcostimulatory signal (CD28/B7)が必要で、これには接着分子が関与する。ヘルパーT細胞からB細胞、形質細胞へ分化し、リウマトイド因子等の自己抗体を産生する系が活性化される。リウマトイド因子を含む可溶性の免疫複合体は好中球により貪食され、活性化した好中球から産生されるプロスタグランジンやリソゾーム酵素、活性酸素等が組織障害をもたらす。また、抗原提示細胞であるマクロファージが活性化されるとIL-1やTNF-等のサイトカインを産生する（関節リウマチ病理メカニズムの「滑膜炎症」）。そしてこれらは滑膜細胞の増殖、破骨細胞の活性化、線維芽細胞の増殖、軟骨細胞の障害をもたらす（関節リウマチ病理メカニズムの「滑膜増生」）。更に、滑膜細胞の増殖によりPGE₂、IL-1、IL-6、IL-8、MCP-1等のプロスタグランジンやサイトカインが産生され、また軟骨細胞と共にコラゲナーゼ等を含むプロテアーゼ産生の亢進をもたらす、これらは骨破

40

50

壊につながる（関節リウマチ病理メカニズムの「関節破壊」）。これらのサイトカインは全身の免疫や炎症にかかわる細胞の活性化にも関与する。

【0005】

関節リウマチの早期寛解を目的としては、免疫調節薬、免疫抑制薬、生物学的製剤が提供されている。免疫調節薬には、D-ペニシラミン、ブシラミン、ロベンザリット、アクタリット等が含まれるが、全ての関節リウマチ患者に同等に効果がみられるわけではなく、更には重篤な副作用も存在する。免疫抑制剤には、メトトレキセート、ミゾリピン、レフルノミド等が含まれるが、これらの薬剤には時には重篤な副作用もみられる。

【0006】

上記のようにIL-1とTNF- α は関節リウマチの滑膜炎と骨関節破壊に関与する重要なサイトカインであり、これらのサイトカインを阻害する生物学的製剤が注目されている。最も効果的な抗サイトカイン療法は、関節リウマチの炎症に中心的に働いているTNF- α に対する阻害薬であり、例えばキメラ型抗TNFモノクローナル抗体（マウス蛋白を25%含有）であるインフリキシマブが挙げられる。この生物学的製剤は全身投与されるものであり、その効果は約2週間目より認められることが多い。しかし、上述の生物学的製剤は投与を継続しているのに治療効果が減少することがある。これをエスケープ減少と呼ぶ。更には全身投与であるため、病初期の手指等の小関節に対し選択的に使用するには副作用を懸念しはばかれる傾向がある。また結核を含む感染症や過敏反応等の副作用も発生することがある。

10

【0007】

近年、関節リウマチの病態について小胞体ストレスが関与していることが明らかとなってきた。正常な高次構造に折り畳まれなかったタンパク質（unfolded protein）が小胞体に蓄積し、それにより細胞への悪影響（ストレス）が生じることを小胞体ストレス（Endoplasmic reticulum (ER) stress）という。過剰もしくは持続する小胞体ストレスは細胞の正常な生理機能を妨げるため、細胞にはその障害を回避し、恒常性を維持する仕組みが備わっている。この小胞体ストレスに対する細胞の反応を小胞体ストレス応答（unfolded protein response: UPR）という。小胞体膜上に存在する3つの1回膜貫通型タンパク質（IRE1, PERK, ATF6）が小胞体ストレスセンサーとして異常タンパク質の蓄積を感知し、細胞質あるいは核内にシグナルを伝える。

20

【0008】

特許文献1には、B細胞自己免疫疾患を治療する薬剤としてIRE1阻害化合物が記載されており、そのB細胞自己免疫疾患の一具体例として関節リウマチが記載されている。また非特許文献1には、骨髄由来の未分化な細胞をマクロファージに分化させ、そのマクロファージに対する8-formyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin(4 μ 8C)の効果が記載されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特表2013-525281号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Toll-like receptor-mediated IRE1 activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis The EMBO Journal(2013) 32, 2477-2490

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかし、特許文献1には、当該文献に記載されているIRE1阻害化合物を用いた関節リウマチの治療に関する実施例がなく、当該文献記載のIRE1阻害化合物の関節リウマチへの治療効果が不明である。また、非特許文献1には関節外でのマクロファージの免疫応答が記載されているにすぎない。上記のように関節リウマチの病理メカニズムは滑膜炎・滑膜増生・関節破壊の3段階に分けられ、言うまでもなく関節リウマチ治療の最終目標は関節

50

破壊の抑制にある。従来の関節リウマチ治療薬の大半は第1段階の炎症の抑制に主眼を置いたものであるが、炎症には非常に多数の因子が関与しているためある因子の経路を抑制しても他の因子の経路が活性化することがあり炎症抑制が継続しない場合がある。そこで第2段階の滑膜細胞の増殖を抑制することにより関節破壊を効果的に抑制する手法が望まれる。

【0012】

本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、滑膜細胞の増殖を適切に抑制できる滑膜細胞増殖抑制剤及び増殖抑制方法を提供することを目的とする。

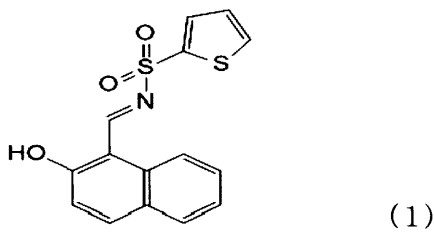
【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明にかかる滑膜細胞増殖抑制剤は、式1又は式2の少なくとも何れか一方の化合物を含有することを特徴とする。

【0014】

【化1】

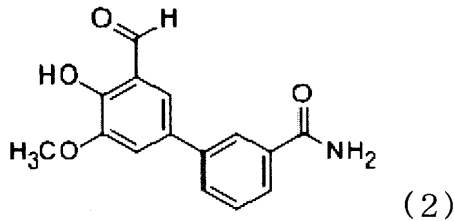


10

20

【0015】

【化2】



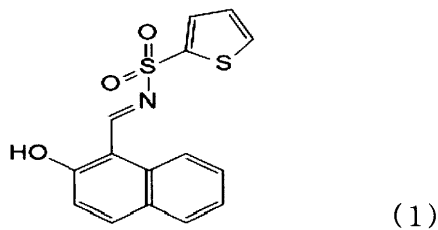
30

【0016】

本発明にかかる滑膜細胞の増殖抑制方法は、式1又は式2の少なくとも何れか一方の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする。

【0017】

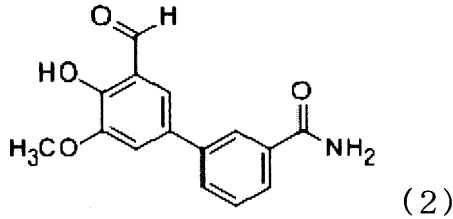
【化3】



40

【0018】

【化4】



【発明の効果】

【0019】

10

本発明によれば、滑膜細胞の増殖を適切に抑制できる滑膜細胞増殖抑制剤及び増殖抑制方法が得られる。これにより、関節リウマチに対して十分な治療効果を有する関節リウマチ治療剤が得られる。本発明にかかる滑膜細胞増殖抑制剤を関節リウマチの治療に適用すれば、早期治療効果の発揮が期待され、継続した治療効果を有し、従来のごとく全身投与を行うことなく関節リウマチを発症している箇所投与することができるので、体全体への影響を少なくし、局所のみを治療することができる。即ち、全身投与による生物学的製剤の場合は1回の点滴に時間がかかるが、本発明を用いる関節リウマチ治療剤は局所注射できるため1回の投与が数分で終了する。また全身点滴静注投与による生物学的製剤の場合と比較して、感染症やアレルギー等の副作用の発生を軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0020】

【図1】小胞体ストレス応答の概念を説明する図である。

【図2】関節リウマチの病態メカニズムを説明する図である。

【図3】抗原誘導性関節炎(AIA)の組織を示す写真図である。

【図4】STF-083010の作用により抗原誘導性関節炎(AIA)が改善された組織を示す写真図である。

【図5】関節炎指数を示す図である。

【図6】ATF6の場合のFold inductionを示す図である。

【図7】PERKの場合のFold inductionを示す図である。

【図8】IRE1の場合のFold inductionを示す図である。

30

【図9】Edemの場合のFold inductionを示す図である。

【図10】ERdj5の場合のFold inductionを示す図である。

【図11】TUNEL法陽性アポトーシス細胞の割合を示す図である。

【図12】再発性AIAモデルの膝関節内の関節炎の状態を示す図であり、そのうち(A)は膝関節における免疫染色図であり、(B)は(A)の拡大図である。

【図13】再発性AIAモデルの関節炎指数を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

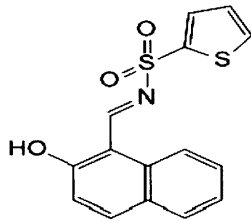
40

【0022】

本実施形態にかかる滑膜細胞増殖抑制剤は、式1又は式2の少なくとも何れか一方の化合物を含有する。

【0023】

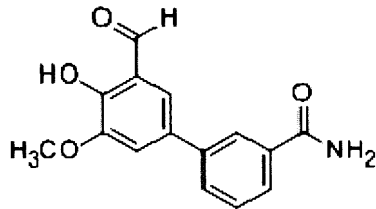
【化5】



(1)

【0024】

【化6】



(2)

10

【0025】

式1にかかる化合物は、STF-083010(N-[(2-Hydroxynaphthalen-1-yl)methylidene]thiophene-2-sulfonamide)である。また、式2にかかる化合物は、3-Formyl-4-hydroxy-5-methoxybiphenyl-3-carboxamideである。

20

【0026】

本発明において関節リウマチの予防及び/又は治療方法は、式1又は式2の少なくとも何れか一方の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする。

【0027】

本明細書において「治療」には、症状を治癒すること、症状を改善すること及び症状の進行を抑えることが含まれる。「予防」とは症状の発症の防止又は遅延をいう。

【0028】

細胞が有する蛋白質分泌機能を正常に保つためには、分泌された蛋白質が正常に折りたたまれることと、異常な折り畳み構造となってしまった蛋白質を除去・分解する機構が必要である。これらの作業はともに小胞体内で行われるが、そこには蛋白質の恒常性を維持するための調節機構が存在する。異常な折り畳み構造の蛋白質が小胞体内に蓄積することを小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスは、細胞内外の環境変化によって引き起こされ、例えば細胞への栄養飢餓、ウイルス感染、酸化ストレス刺激等によってタンパク質の正常な折り畳みが阻害され、小胞体ストレスとなる。蛋白質の恒常性を維持する調節機構は小胞体ストレスに対応する細胞の生理応答と考えられ、小胞体ストレス応答(UPR)と称されている。小胞体ストレス応答機構は、(i)翻訳抑制、(ii)小胞体分子シャペロンの転写誘導、(iii)小胞体関連分解(ERAD)による異常タンパク質の分解という3つの反応から構成されている(図1)。そして小胞体ストレスを感知する主なセンサーは、小胞体膜上に3つ存在し、それぞれIRE1、PERK、ATF6と言われる。

30

40

【0029】

IRE1は、小胞体膜貫通型キナーゼであり、細胞質側のC-末端にはRNaseドメインがある。異常タンパク質を感知したIRE1は自己リン酸化により立体構造が変化し、その結果、C末端のRNaseドメインが活性化して、基質であるXBP1(X-box binding protein 1)mRNAをスプライシングする。26塩基がスプライスアウトされたXBP1 mRNA(spliced form)は読み枠が変化し、このmRNAから転写因子として機能する活性型XBP1タンパク質が産生される。転写活性を持つようになったXBP1によって転写誘導される分子は、小胞体シャペロン群と、ERADに関わる一連の遺伝子群である。なお、XBP1はイントロンが短いため翻訳抑制作用を持たず、前駆体型XBP1 mRNAも翻訳される。このようにIRE1-XBP1経路は、異常タンパク質を小胞体から排除・分解し、小胞体の恒常性を復元させる働きがある。

50

【0030】

本明細書において、IRE1阻害剤とは、IRE1の機能を阻害する薬剤であり、具体的には上記のIRE1-XBP1-EDEM経路の流れを阻害する機能を有する薬剤である。

【0031】

後述の実施例にて示されるように、本発明者は小胞体ストレスセンサーのうち関節リウマチにおける主たる治療標的がIRE1にあることを突き止めた。関節リウマチは滑膜細胞の増殖により軟骨細胞の障害をもたらすものであるが、本発明者は、小胞体ストレスセンサーであるIRE1を抑制することにより、XBP1遺伝子の活性化を阻害(小胞体ストレス応答を阻害)し、これにより滑膜細胞をアポトーシスに導いて、滑膜細胞の増殖を抑制できることを新知見として見だし、かかる事実に基づいて本発明を完成させた。

10

【0032】

図2には、関節リウマチの病態メカニズムが記載されている。関節リウマチは多因子疾患と考えられており、遺伝的背景・感染・タバコ等を機に発症する。発症すると、自己の何らかの抗原に対し、自己免疫反応を起こし始める。抗原提示細胞が、自己を非自己と認識し、B細胞及びT細胞を活性化させる。B細胞は抗体を産生し、T細胞はマクロファージ(M)を活性化させる。活性化されたMは腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor:TNF)やインターロイキン(IL)-1,6等のさまざまな炎症性サイトカインを産生する(上流での応答)。TNFやIL-1は、マクロファージ自身を活性化させるばかりでなく、滑膜を形作る線維芽細胞をも活性化して増殖させる。増殖した滑膜線維芽細胞は、IL-6等のサイトカインを大量に放出する他、関節組織を破壊するタンパク分解酵素を産生し、関節内でパンナスと呼ばれる絨毛のような組織を形成して罹患関節の骨や軟骨を破壊する(下流での応答)。

20

【0033】

非特許文献1であるThe EMBO Journalで報告されている内容は、骨髄由来の未分化な細胞をMに分化させ、4 μ 8Cを投与した場合におけるMでのIRE1の働きを報告している。つまり関節外でのMの免疫応答(上流での応答)を示している。それに対して本願発明では、関節リウマチ患者の膝滑膜組織から分離した滑膜細胞を用いており、式1又は式2にかかる化合物を投与した場合における滑膜細胞でのIRE1の働きを示している(下流での応答)。即ち、本願発明では、関節内における炎症性サイトカインによる滑膜増殖を観察し、式1又は式2にかかる化合物を関節内投与した場合における滑膜細胞のアポトーシス亢進(滑膜炎の抑制)を規定している。抗リウマチ薬の投与を続け関節リウマチがよくコントロールされていても、治療法を変えないのに再び活動性が亢進してくることがあり、この現象はエスケープ現象と呼ばれる。エスケープ現象が現れる場合、服用開始後2-3年で関節リウマチの活動が亢進する。しかしながら本発明においては、式1又は式2にかかる化合物を関節内投与することにより滑膜細胞のアポトーシスを亢進させ、免疫反応を起こすための滑膜細胞が存在しない状況を作成するので、後述の実施例にて示されるように、このようなエスケープ現象を回避することができる。

30

【0034】

本実施形態にかかる滑膜細胞増殖抑制剤は、その製剤形態は特に限定されるものではないが、好ましくは注射用製剤である。注射用製剤とすることにより、手指等の小関節に対しても簡便に適用することができる。

40

【0035】

注射用製剤は、例えば、液剤、乳濁液、又は懸濁液の形態で調製され、血液に対して等張にされる。液体、乳濁液又は懸濁液の形態の製剤は、例えば、水性媒体、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルを用いて調製される。水性媒体としては、水又は水含有する媒体が挙げられる。水としては、滅菌水が使用される。水含有する媒体としては、例えば、生理食塩水、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)又は乳酸配合リンゲル液等が挙げられる。

【0036】

50

注射用製剤において許容される含有量は、副作用等の障害が生じない限り特に限定されるものではないが、用量として例えば0.01~10mg/mL、好ましくは0.05~5mg/mLである。なお、関節リウマチ治療薬として著名なメトトレキサート(MTX)は、原則1週間あたり6mgで経口投与されるが、その用法としては1週間あたりで2-4回に分割して12時間間隔で1-2日間かけて投与される。しかしながら本発明においては免疫反応を起こすための滑膜細胞が存在しない状況を作出するので、従来と比較して薬効の持続性を大幅に向上させることができ、用法として特に限定されるものではないが例えば6週間~18週間の間隔において投与することが可能である。

【0037】

注射用製剤において、当技術分野で通常使用されている添加剤を適宜用いることができる。添加剤としては、例えば、等張化剤、安定化剤、緩衝剤、保存剤、キレート剤、抗酸化剤、又は溶解補助剤等が挙げられる。

10

【0038】

等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン等が挙げられる。安定化剤としては、例えば亜硫酸ナトリウム等が挙げられる。緩衝剤としては、例えば、ホウ酸緩衝剤、リン酸緩衝剤等が挙げられる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル、ベンジルアルコール、クロクレゾール等が挙げられる。キレート剤としては、例えば、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等が挙げられる。溶解補助剤としては、例えば、デキストラン、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。注射用製剤にはpH調整剤が含有されていても良い。pH調整剤は、酸類であっても塩基類であってもよい。具体的には、酸類としては、例えば、アスコルビン酸、塩酸等が挙げられる。塩基類としては、例えば、水酸化カリウム、水酸化カルシウム等が挙げられる。

20

【実施例】

【0039】

(実施例1)

実施例1では、IRE1阻害剤の一種であるSTF-083010を使用したin vivoでの関節リウマチの治療効果実験結果を示す。

【0040】

マウスに抗原としてメチル化ウシ血清アルブミン(mBSA)10µg/bodyを背部尾側皮下投与して1次感作し、その10日後にmBSA 20µg/jointを膝関節内に注入して二次感作し、関節炎を惹起することにより、関節リウマチ(抗原誘導性関節炎:AIA)モデルマウスを作成した。この手法は世界的に広く受け入れられている方法である。図3に示すように、17日目のマウスの膝では、滑膜炎が活発に起っている組織像が確認できた。しかしながら、11日目にマウス膝関節内にSTF-083010を投与した場合は、図4に示すように、劇的にその症状の改善が認められた。

30

【0041】

図5は関節炎指数を示すものであり、AIA単独群は、10日後にmBSA 20µg/jointを膝関節内に注入して二次感作させ、17日目における関節炎指数を示したものである。また+STF-083010 10µM群は、10日後にmBSA 20µg/jointを膝関節内に注入して二次感作させ、その翌日である11日目にSTF-083010をマウス膝関節内に10µM注入した場合の関節炎指数を示したものである。また同様に+STF-083010 100µM群は、10日後にmBSA 20µg/jointを膝関節内に注入して二次感作させ、その翌日である11日目にSTF-083010をマウス膝関節内に100µM注入した場合の関節炎指数を示したものである。

40

【0042】

なお、関節炎指数は、関節リウマチモデルマウスの膝切片を用いてスコアリングされるものであり、滑膜炎、関節内の炎症性細胞の出現、軟部組織の炎症、軟骨損傷、骨破壊の5つの項目につき、0~3点でひどければ3点と評価し、合計で15点が最大となるものである。図5に示されるように、STF-083010を10µM用いた場合も100µM用いた場合も、劇的に関節炎指数が減少することが示された。なお、これらのIRE1阻害剤の濃度は、副作用を避

50

けさらに低下させて投与されても良い。

【0043】

(実施例2)

実施例2では、小胞体ストレスセンサーIRE1、PERK、ATF6のうち、関節リウマチにおける主たる治療標的がIRE1にあることを突き止めた実験結果を示す。

【0044】

リウマチ患者の整形外科関節手術時に、同意が得られたリウマチ患者の膝関節から採取した滑膜組織から滑膜細胞を分離してシャーレ上で培養し、刺激を与えた。細胞は、0時間、3時間、6時間、12時間それぞれの培養液に浸された後に、細胞を回収してPCR法にてATF6、PERK、IRE1の細胞内でのmRNAの発現を測定した。

10

【0045】

図6はATF6の場合、図7はPERKの場合、図8はIRE1の場合を示す。DMSOは溶液自体に毒性がないことを示すコントロール群である。+IL-1+TNF- α は、細胞培養液にIL-1及びTNF- α を加えることを示しており、リウマチ患者由来の細胞をより生体に近い炎症状況を作り出している。図6~図8に示されるように、IRE1の場合はATF6やPERKの場合と異なり、リウマチの炎症がおこることで、IRE1だけがコントロールと違う動きを示した。つまり、関節リウマチ患者の滑膜細胞において、滑膜炎が起っている状態では、IRE1が炎症反応の主な調節因子になっている可能性が示唆された。また、IL-1、TNF- α に更にSTFを加えることで、特にIRE1の発現が低下していることを示し、これはIRE1を選択的に阻害している証拠を示すものと考えられる。

20

【0046】

(実施例3)

実施例3では、EDEM及びERdj5の場合において、同様の手法を用いてそれぞれのmRNAの発現を測定した。小胞体内での蛋白分解機構ERAD系を直接制御しているのが、IRE1の下流にあるEDEMと言われている。図9に示されるように、EDEMもIRE1と同調するようにSTF-083010を加えることで、12時間後にはかなり発現が低下していることが示された。

【0047】

ERdj5はEDEM1に結合するタンパク質として同定された小胞体に内在する酸化還元酵素であり、誤ったシステイン残基の間で形成されたジスルフィド結合を還元することで異常タンパク質の小胞体関連分解を促進する。図10に示されるように、ERdj5ではSTF-083010を加えても発現低下は示されなかった。

30

【0048】

(実施例4)

実施例4では、TUNEL法陽性アポトーシス細胞を測定した。TUNEL法とは、アポトーシス(プログラムされた細胞の死)の過程で生じる断片化されたDNAを、TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)法により検出する方法である。断片化されたDNAをビオチン標識ヌクレオチドで標識した後、HRP標識ストレプトアビジンを反応させて染色した。図11に示されるように、STF-083010を加えることで、12時間後にはシャーレ内のリウマチ患者由来の滑膜細胞の50%以上が、アポトーシスを起こしていることが示された。

40

【0049】

(実施例5)

実施例5では、再発性AIAモデルマウスでのSTF-083010の有用性を確認した。再発性のAIAモデルマウスとして適切な動物モデルは過去に報告されていないが、再発性AIAモデルマウスについては以下のように作製した。即ち、1日目にマウスに抗原としてmBSA 10 μ g/bodyを背部尾側皮下投与して1次感作し、その10日後にmBSA 20 μ g/jointを膝関節内に注入して二次感作し、関節炎を惹起させた。11日目にSTF-083010を用いて、いったん関節炎を抑えた。コントロールモデルは、STF-083010の代わりにDMSOを関節内に投与した。18日目に、再度関節内にmBSA 20 μ g/jointを投与して関節炎を惹起させた。すると、再発性AIAモデル群では、関節炎や軟骨損傷は認めなかった(図12(A)(B))。図12(A)は、再発性AIAモデルの膝関節内の関節炎の状態を示す免疫染色図であり、図12(B)は、(A)の部

50

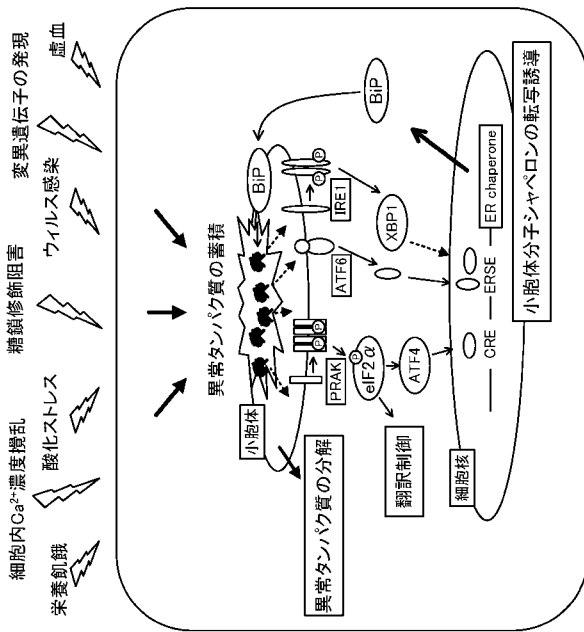
分拡大図である。これらの結果を半定量的に判定すると、再発性AIAモデルでは有意に関節炎指数が低かった（図13）。図13は、再発性AIAモデルの関節炎指数を示す図である。これにより、最初のSTF-083010の投与にて、mBSAに対する免疫反応を起こすための滑膜細胞が存在しない可能性が示された。

【産業上の利用可能性】

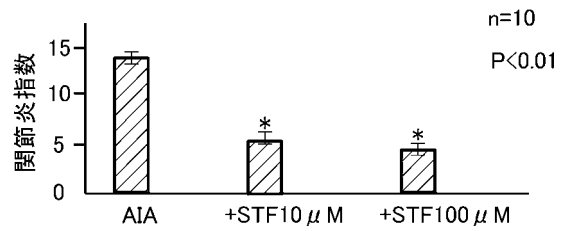
【0050】

関節リウマチの治療に利用できる。

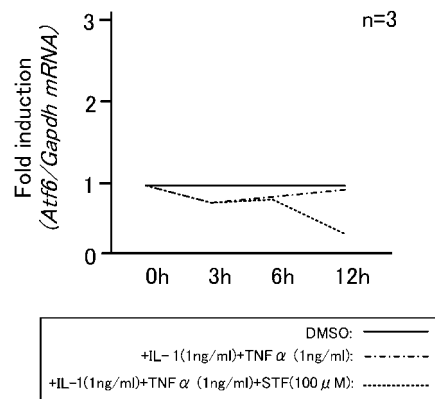
【図1】



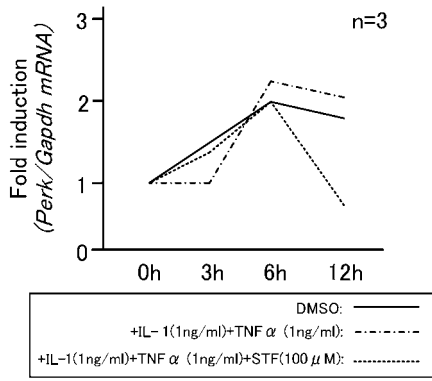
【図5】



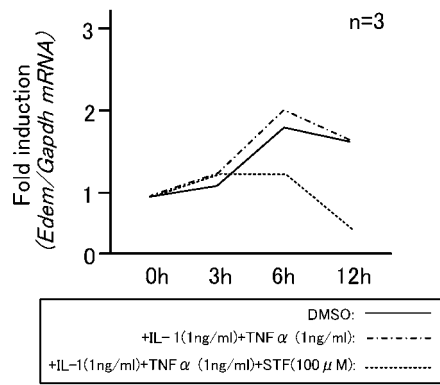
【図6】



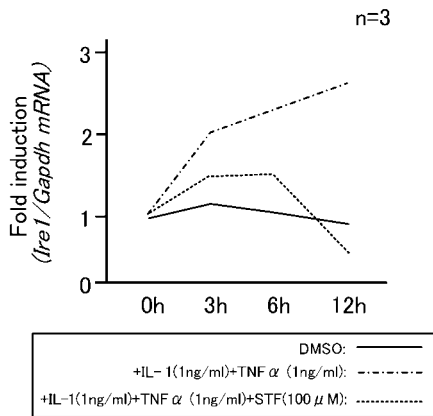
【 図 7 】



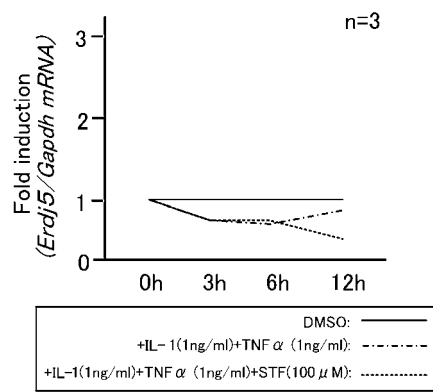
【 図 9 】



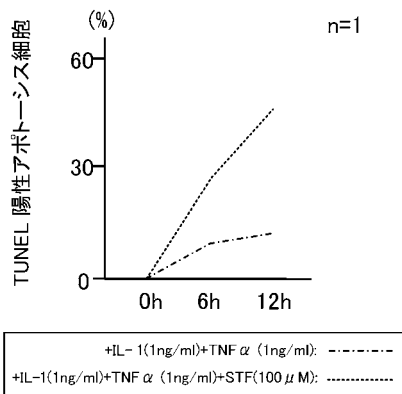
【 図 8 】



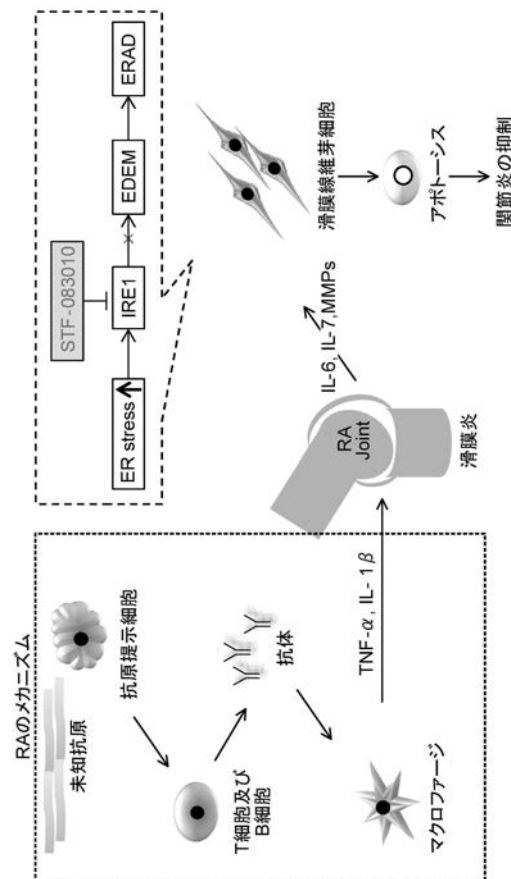
【 図 10 】



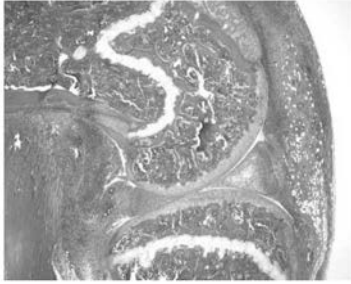
【 図 11 】



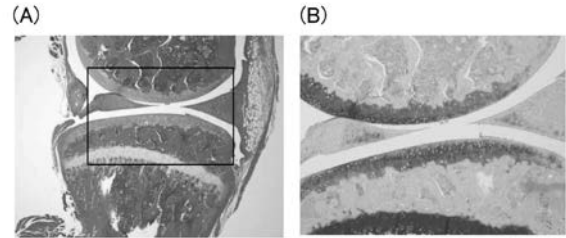
【 図 2 】



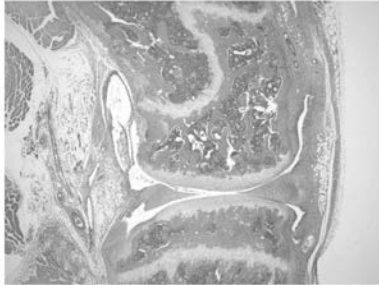
【 図 3 】



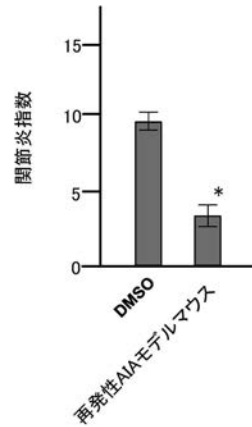
【 図 1 2 】



【 図 4 】



【 図 1 3 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年6月17日 (2015.6.17)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

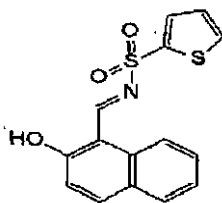
【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

式 1 の化合物を含有することを特徴とする滑膜細胞増殖抑制剤。

【 化 1 】



(1)

【 請求項 2 】

関節リウマチの治療に用いられることを特徴とする請求項 1 に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

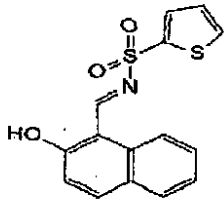
【 請求項 3 】

関節リウマチ治療薬のエスケープ現象を回避することを特徴とする請求項 2 に記載の滑膜細胞増殖抑制剤。

【 請求項 4 】

式 1 の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする滑膜細胞の増殖抑制方法。

【化 1】

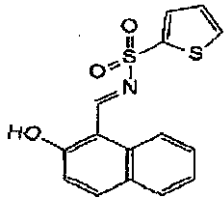


(1)

【請求項 5】

式 1 の化合物を含有する薬剤を使用することを特徴とする関節リウマチの予防及び / 又は治療方法。

【化 1】



(1)

【請求項 6】

0.01 ~ 10 mg / mL の前記薬剤を 6 週間 ~ 18 週間の間隔をおいて投与することを特徴とする請求項 5 に記載の関節リウマチの予防及び / 又は治療方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/001118
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61P29/00(2006.01)i, A61K31/166(2006.01)i, A61K31/381(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) A61P29/00, A61K31/166, A61K31/381, 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-529147 A (Mankind Corp.), 26 August 2010 (26.08.2010), paragraphs [0003], [0123], [0173], [0231] & US 2009/0186893 A1 & WO 2008/154484 A1 & EP 2520561 A1	1-3
Y	Qiu Q et al, Toll-like receptor-mediated IRE1 α activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis., EMBO J., 2013, 32(18), 2477-2490	1-3
A	WO 2012/064774 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY), 18 May 2012 (18.05.2012), fig. 1D to 1F & US 2013/0303599 A1	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March 2015 (31.03.15)		Date of mailing of the international search report 07 April 2015 (07.04.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/001118

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.: 4-6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4-6 involve "methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and diagnostic methods for the human body or animal body".
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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 1 1 1 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61P29/00(2006.01)i, A61K31/166(2006.01)i, A61K31/381(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. A61P29/00, A61K31/166, A61K31/381, 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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									
Y	JP 2010-529147 A (マンカインド コーポレーション) 2010.08.26, 段落[0003]、[0123]、[0173]、[0231] & US 2009/0186893 A1 & WO 2008/154484 A1 & EP 2520561 A1	1-3									
Y	Qiu Q et al, Toll-like receptor-mediated IRE1 α activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis., EMBO J., 2013, 32(18), 2477-2490	1-3									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 31.03.2015		国際調査報告の発送日 07.04.2015									
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) 前田 亜希	4C 3956								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/001118
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	WO 2012/064774 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2012.05.18, 図 1 D - 1 F & US 2013/0303599 A1	1 - 3

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 0 1 1 1 8

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 4-6 は、この国際調査機関が調査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4-6は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法及び人体又は動物の体の診断方法」を包含するものである。
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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, 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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。