

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4255285号
(P4255285)

(45) 発行日 平成21年4月15日(2009.4.15)

(24) 登録日 平成21年2月6日(2009.2.6)

| (51) Int.Cl. | F I |
|-------------------------|-----------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | GO 1 N 33/53 M |
| GO 1 N 33/566 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A |
| GO 1 N 33/58 (2006.01) | GO 1 N 33/566 A |
| | GO 1 N 33/58 A |

請求項の数 24 (全 21 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2002-565631 (P2002-565631) | (73) 特許権者 | 506137147 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年2月21日(2002.2.21) | | エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2002/001562 | | ジメント株式会社 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/066073 | | 東京都文京区小石川四丁目6番10号 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年8月29日(2002.8.29) | (74) 代理人 | 100100549 |
| 審査請求日 | 平成17年1月12日(2005.1.12) | | 弁理士 川口 嘉之 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2001-44646 (P2001-44646) | (74) 代理人 | 100090516 |
| (32) 優先日 | 平成13年2月21日(2001.2.21) | | 弁理士 松倉 秀実 |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | (74) 代理人 | 100089244 |
| | | | 弁理士 遠山 勉 |
| | | (72) 発明者 | 小野 尚人 |
| | | | 日本国茨城県牛久市南2丁目30-1 牛 |
| | | | 久ロイヤルレジデンスB-109 |
| | | (72) 発明者 | 仙波 太郎 |
| | | | 日本国茨城県牛久市ひたち野東82-10 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 インテグリン発現抑制を介した血管新生抑制剤の効果を検定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤の投与を受けた患者の血小板におけるインテグリン 2 の発現量を測定する工程、及び、測定された発現量に基づき血小板以外の、血管新生が起こり得る組織の細胞又は腫瘍細胞である細胞に対する該薬剤の影響を判定する工程を含んで成る、該細胞に対する該薬剤の影響を検定する方法。

【請求項2】

前記細胞が血管内皮細胞又は腫瘍細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

インテグリン 2 の発現量を、免疫化学的方法により測定する、請求項1又は2に記載の方法。 10

【請求項4】

免疫化学的方法がフローサイトメトリーである請求項3に記載の方法。

【請求項5】

インテグリン 2 の発現量を、インテグリン 2 をコードするmRNAの量を測定することにより測定する請求項1に記載の方法。

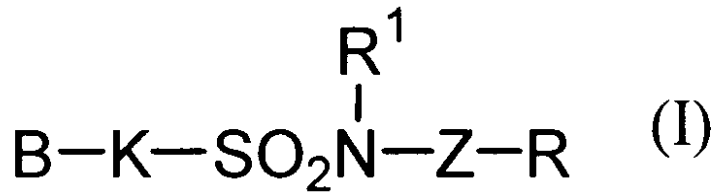
【請求項6】

mRNAの量を定量的PCRにより測定する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

薬剤が、一般式(1)

【化1】



〔式中、

Bは置換基を有していてもよく、環の一部が飽和されていても良い、C6-C10アリール環または6員ないし10員ヘテロアリール環を、

Kは単結合、-CH=CH-、または-(CR^{4b}R^{5b})_m^b-（式中、R^{4b}およびR^{5b}は同一または相異なって水素原子、C1-C4アルキル基を、m^bは1または2の整数を意味する。）を、

R¹は水素原子またはC1-C6アルキル基を、

Zは単結合または-CO-NH-を、

Rは置換基を有していてもよく、環の一部が飽和されていても良い、C6-C10アリール環または6員ないし10員ヘテロアリール環を、それぞれ意味する。〕で表されるスルホンアミド化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

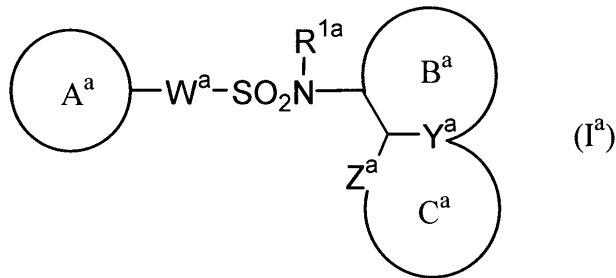
【請求項8】

Rがインドール、キノリン、またはイソキノリンである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

薬剤が、一般式(I^a)

【化2】



〔式中、

A^a環は置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を、

B^a環は置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環を、

C^a環は置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環を、

R^{1a}は水素原子またはC1-C6アルキル基を、

W^aは単結合または-CH=CH-を、

Y^aは炭素原子または窒素原子を、

Z^aは-N(R^{2a})-（式中、R^{2a}は水素原子または低級アルキル基を意味する。）または窒素原子を、それぞれ示す。〕で表わされるスルホンアミド化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

W^aが単結合である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

W^aが単結合であり、Z^aが-NH-であり、かつY^aが炭素原子である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

B^a環が置換基を有していてもよいベンゼンまたはピリジンである、請求項9～11の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

C^a環が置換基を有していてもよいピロールである、請求項 9 ~ 12 いずれか一項に記載の方法。

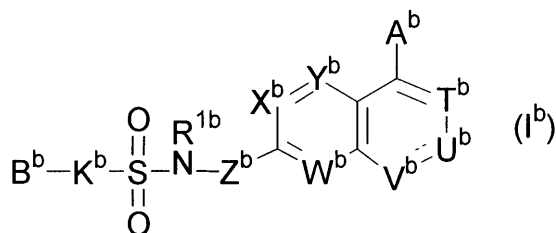
【請求項 14】

A^a環が置換基を有していてもよいベンゼンまたはピリジンであり、B^a環が置換基を有していてもよいベンゼンであり、C^a環が置換基を有していてもよいピロールであり、W^aが単結合であり、Z^aが-NH-である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

薬剤が、一般式(I^b)

【化 3】



10

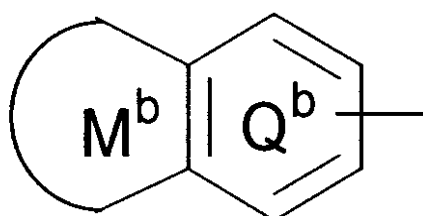
[式中、

A^bは水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、-(CO)_k^bNR^{2b}R^{3b}（式中、R^{2b}およびR^{3b}は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基を意味し、k^bは0または1を意味する。）、置換基を有していてもよいC2-C4のアルケニル基またはアルキニル基、または下記A群から選ばれる置換基を有していてもよいフェニル基またはフェノキシ基を、

20

B^bは下記A群から選ばれる置換基を有していてもよいアリール基または単環ヘテロアリール基、または

【化 4】



30

(式中、環Q^bは1つまたは2つの窒素原子を有していてもよい芳香環を、環M^bは環Q^bと二重結合を共有するC5-C12不飽和の単環または複環を意味し、当該環は、窒素原子、酸素原子、硫黄原子から選ばれる1から4のヘテロ原子を有していてもよい。環Q^bおよび環M^bは窒素原子を共有する場合がある。また、環Q^bおよび環M^bは下記A群から選ばれる置換基を有していてもよい。)

40

K^bは単結合、または-(CR^{4b}R^{5b})_{m^b}-（式中、R^{4b}およびR^{5b}は同一または相異なって水素原子、C1-C4アルキル基を、m^bは1または2の整数を意味する。）を、

T^b、W^b、X^bおよびY^bは同一または相異なって=C(D^b)-[式中、D^bは水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、-(CO)_n^bNR^{6b}R^{7b}（式中、R^{6b}およびR^{7b}は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基を意味し、n^bは0または1を意味する。）、または置換基を有していてもよいC2-C4のアルケニル基またはアルキニル基を、それぞれ示す]、または窒素原子を、

U^bおよびV^bは同一または相異なって、=C(D^b)-（式中、D^bは前記を意味する。）、窒素原子、-CH₂-、酸素原子または-CO-を、

50

Z^bは単結合または-CO-NH-を、
R^{1b}は水素原子またはC1-C4アルキル基を、
【化5】

— — —
———

は単結合または二重結合を意味する。)

A群：ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、-R^{8b}R^{9b}N(NH)_p^b- (式中、R^{8b}およびR^{9b}は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基を意味し、p^bは0または1を意味する。また、R^{8b}およびR^{9b}は結合している窒素原子と一緒になって5または6員式環を形成してもよく、当該環はさらに窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよく、置換基を有していてもよい。)、モノまたはジC1-C4アルキル基で置換されていてもよいアミノスルホニル基、置換基を有していてもよいC1-C8アシル基、C1-C4アルキル-S(O)_s^b-C1-C4アルキレン基(式中、s^bは0、1または2の整数を意味する。)、C1-C4アルキルまたは置換基を有していてもよいフェニルスルホニルアミノ基、-(CO)_q^bNR^{10b}R^{11b}(式中、R^{10b}およびR^{11b}は同一または相異なって水素原子、またはハロゲン原子またはC1-C4アルキル基で置換されていてもよいアミノ基で置換されていてもよいC1-C4アルキル基を意味し、q^bは0または1を意味する。)、または置換基を有していてもよいアリアル基またはヘテロアリアル基を意味する。)で表わされるスルホンアミド含有複素環化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

U^bおよびV^bが=C(D^b)- (式中、D^bは前記を意味する。)、または窒素原子である、請求項15記載の方法。

【請求項17】

Z^bが単結合である、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

T^b、U^b、V^b、W^b、X^bおよびY^bの少なくとも一つが窒素原子である、請求項15~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

A^bがハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、-(CO)_r^bNR^{12b}R^{13b}(式中、R^{12b}およびR^{13b}は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基を意味し、r^bは0または1を意味する。)、または置換基を有していてもよいC2-C4のアルケニル基またはアルキニル基である、請求項15~18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

T^b、U^b、V^b、W^b、X^bまたはY^bのうち一つのみが窒素原子である、請求項15~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

T^b、W^bまたはY^bの一つのみが窒素原子である、請求項15~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

薬剤が、N-(3-シアノ-4-メチル-1H-インドール-7-イル)-3-シアノベンゼンスルホンアミド、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

血小板以外の細胞が、血管新生が起こり得る組織の細胞であり、前記細胞に対する影響

が血管新生抑制作用として判定される請求項 1 ~ 2.2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2.4】

血小板以外の細胞が腫瘍細胞であり、前記細胞に対する影響が腫瘍増殖抑制作用として判定される請求項 1 ~ 2.2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、インテグリンの発現に影響を与える薬剤、好ましくは血管新生抑制剤の効果を検定する方法に関する。

背景技術

癌は死亡率の高い疾患であり、抗癌剤による治療の目的は一般に患者 Q O L の向上及び生存期間の延長にある。しかし、薬剤による延命効果を短期間で判定することは困難であり、腫瘍縮小率や血中腫瘍抗原量が、治療効果の指標となる代理 (s u r r o g a t e) マーカーとして使用されている。

また、抗癌剤の臨床試験においても、延命期間を薬剤の効果判定に用いた場合には長期の試験が必要となるため、比較的短期間で評価可能である腫瘍縮小率が代理マーカーとして利用されてきた。しかし、腫瘍縮小率は必ずしも延命の指標とならないことが指摘されている。そこで、腫瘍縮小率に加え、増悪抑制期間 (t i m e t o p r o g r e s s i o n)、無病期間 (d e c e a s e f r e e s u r v i v a l)、生物学的マーカーなどを代理マーカーとして用いることが試みられているが、これらの方法は未だ確立していない。

薬剤の投与により引き起こされ、かつ生存期間の延長と密接に関連する変化を示す生物学的マーカーを代理マーカーとして利用することができれば、臨床試験において適正な治療方法を容易に決定でき、治療時には薬剤の治療効果の指標としての使用が可能となると考えられる。

代理マーカーとしては次のものが報告されている。

糖タンパク E p C A M に対する抗体 P a n o r e x は、最初に大腸癌細胞の腫瘍マーカーとして見出され、後に接着分子として同定されたが、骨髄中に残存する微小癌細胞消失の代理マーカーとして生存率との相関性が検討されており (S t e p h a n B e t a l , C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h , 1 9 9 9 , 5 , 3 9 9 9 - 4 0 0 4)、平行して大規模な第三相臨床試験が進行中である。

前立腺特異抗原 (p r o s t a t i c s p e c i f i c a n t i g e n) は、前立腺癌のホルモン療法の代理マーカーとして、至適投与量の決定に用いられた (D e n i s L a n d M a h l e r C . U r o l o g y , 1 9 9 6 , 4 7 (1 A S u p p l) , 2 6 - 3 2 .)。

血管新生阻害剤に関する代理マーカーの使用としては、マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビター (m a t r i x m e t a l l o p r o t e i n a s e i n h i b i t o r) B M S 2 7 5 2 9 1 の第一相臨床試験で、皮膚に穴を開けたときの創傷治癒の血管新生を指標とする方法が検討され、また別のマトリックスメタロプロテイナーゼインヒビターで、腫瘍部位での酵素活性をマーカーとする方法が報告されている (C l i n . C a n c e r R e s . , 2 0 0 0 , 6 (8) , 3 2 9 0 - 6)。

また血管新生阻害剤は、癌以外の疾患、例えば動脈硬化症・糖尿病性網膜症・網膜静脈閉塞症・未熟児網膜症・加齢黄斑変性・血管新生緑内障・関節リュウマチ・小児関節リュウマチ・乾せん・血管腫・血管線維腫等の有効な治療薬となることが期待される。これらの疾患においても、血管新生の代理マーカーが見出されれば、それを指標として薬剤の適切な投与量を設定し、薬剤の効果や使用期間を判断することが可能となる。

インテグリンは細胞表面に発現される細胞接着分子で、鎖と鎖から構成されている。インテグリンは細胞外マトリックス膜タンパクと細胞との接着、または細胞間の接着に関与している。細胞接着分子がインテグリンに結合すると、細胞内のシグナル系が動きだし、その結果、細胞接着だけでなく、細胞進展、細胞増殖、アポトーシス、分化、細胞骨格配向、細胞移動、組織形成、癌の浸潤・転移、創傷治癒、血液凝固などが稼働する。

10

20

30

40

50

これらのインテグリンの中で、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ はコラーゲン、ラミニンなどを接着分子としており、血管新生時における血管内皮細胞のチューブ形成に参与すること (George E et al, Exp. Cell. Res. 1996. 224, 39-51) が知られている。

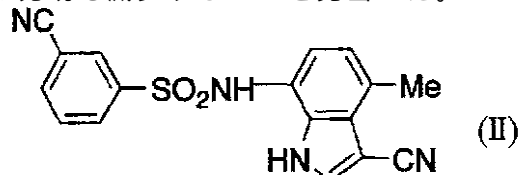
また、in vivoにおいて、インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ とインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の抗体が VEGF による血管新生を抑制した (Donald RS et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. 94. 13612-13617) と報告されている。

インテグリン $\alpha v \beta 3$ は血管新生を起こしている内皮細胞に特異的に存在し、ニワトリ胚漿尿膜を使用した血管新生モデルにおいてインテグリン $\alpha v \beta 3$ 中和抗体 (LM609) が繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor) - 2 (FGF-2) による血管新生を抑制した (Brook, P. C. et al. Science, 1994, 264, 569-571) と報告されている。また、FGF-2, 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor) - α による血管新生にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ が関与し、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor) (VEGF)、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor) - β による血管新生にはインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が関与する (Friedlander, M. et al. Science, 1995, 270, 1500-1502) と報告されている。抗インテグリン $\alpha v \beta 3$ 抗体、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 阻害剤は現在、臨床試験中である。

発明の開示

本発明の課題は、インテグリン、好ましくはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の発現に影響を与え、血管新生を抑制する薬剤の代理マーカーを見出すことにある。

本発明者らは、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の発現抑制を介して血管新生を阻害する、式 (II) の化合物 (以下、化合物 A と称す) を代表とする薬剤により、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の発現が低下し血管新生が減少して癌細胞の増殖が抑制される様な条件下では、末梢血の血小板表面のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の発現も減少することを見出した。



そして、末梢血血小板表面のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 量が、血管新生抑制の代理マーカーとして有用であることを見出して本発明を完成させた。

すなわち本発明は、以下のものを提供する。

1. 薬剤の投与を受けた患者の血小板におけるインテグリンの発現量を測定する工程、及び、測定された発現量に基づき血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現に対する該薬剤の影響を判定する工程を含んで成る、該薬剤のインテグリンの発現に対する影響を判定する方法。

2. インテグリンがインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ である、1に記載の方法。

3. インテグリンの発現量を、免疫化学的方法により測定する、1に記載の方法。

4. 免疫化学的方法が FACS 法である 3に記載の方法。

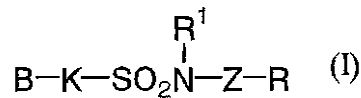
5. 3に記載の方法において使用するインテグリンの定量試薬。

6. インテグリンの発現量を、インテグリンをコードする mRNA の量を測定することにより測定する 1に記載の方法。

7. mRNA の量を定量的 PCR により測定する、6に記載の方法。

8. 6に記載の方法において使用するインテグリンをコードする mRNA の定量試薬。

9. 薬剤が、一般式 (I)



[式中、

B は置換基を有していてもよく、環の一部が飽和されていても良い、C 6 - C 10 アリール環または 6 員ないし 10 員ヘテロアリール環を、

K は単結合、- CH = CH -、または - (CR^{4b} R^{5b})_{m^b} - (式中、R^{4b} および R^{5b} は同一または相異なって水素原子、C 1 - C 4 アルキル基を、m^b は 1 または 2 の整数を意味する。) を、

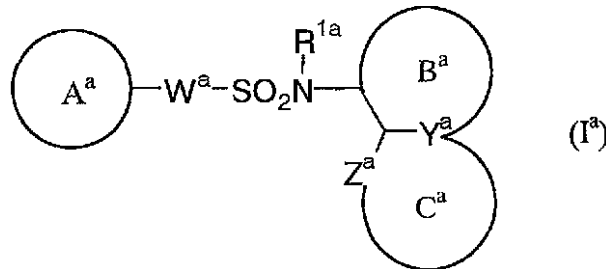
R¹ は水素原子または C 1 - C 6 アルキル基を、

Z は単結合または - CO - NH - を、

R は置換基を有していてもよく、環の一部が飽和されていても良い、C 6 - C 10 アリール環または 6 員ないし 10 員ヘテロアリール環を、それぞれ意味する。] で表されるスルホンアミド化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、2 に記載の方法。

10 . R がインドール、キノリン、またはイソキノリンである、9 に記載の方法。

11 . 薬剤が、一般式 (I^a)



[式中、

A^a 環は置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環を、

B^a 環は置換基を有していてもよい、6 員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を 1 個含む不飽和 6 員ヘテロ環を、

C^a 環は置換基を有していてもよい、窒素原子を 1 または 2 個含む 5 員ヘテロ環を、

R^{1a} は水素原子または C 1 - C 6 アルキル基を、

W^a は単結合または - CH = CH - を、

Y^a は炭素原子または窒素原子を、

Z^a は - N (R^{2a}) - (式中、R^{2a} は水素原子または低級アルキル基を意味する。)、または窒素原子を、それぞれ示す。] で表わされるスルホンアミド化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、2 に記載の方法。

12 . W^a が単結合である、11 に記載の方法。

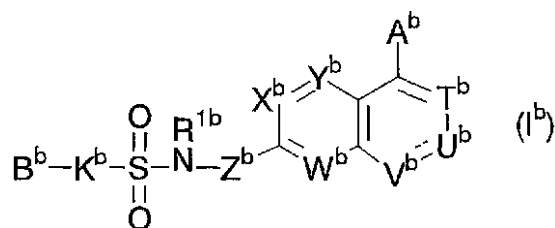
13 . W^a が単結合であり、Z^a が - NH - であり、かつ Y^a が炭素原子である、11 に記載の方法。

14 . B^a 環が置換基を有していてもよいベンゼンまたはピリジンである、11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

15 . C^a 環が置換基を有していてもよいピロールである、11 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

16 . A^a 環が置換基を有していてもよいベンゼンまたはピリジンであり、B^a 環が置換基を有していてもよいベンゼンであり、C^a 環が置換基を有していてもよいピロールであり、W^a が単結合であり、Z^a が - NH - である、11 に記載の方法。

17 . 薬剤が、一般式 (I^b)

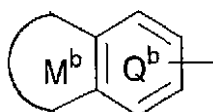


[式中、

A^b は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、- (CO)_{k^b}NR^{2^b}R^{3^b} (式中、R^{2^b} および R^{3^b} は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基を意味し、k^b は 0 または 1 を意味する。)、置換基を有していてもよい C 2 - C 4 のアルケニル基またはアルキニル基、または下記 A 群から選ばれる置換基を有していてもよいフェニル基またはフェノキシ基を、

10

B^b は下記 A 群から選ばれる置換基を有していてもよいアリール基または単環ヘテロアリール基、または



(式中、環 Q^b は 1 つまたは 2 つの窒素原子を有していてもよい芳香環を、環 M^b は環 Q^b と二重結合を共有する C 5 - C 12 不飽和の単環または複環を意味し、当該環は、窒素原子、酸素原子、硫黄原子から選ばれる 1 から 4 のヘテロ原子を有していてもよい。環 Q^b および環 M^b は窒素原子を共有する場合がある。また、環 Q^b および環 M^b は下記 A 群から選ばれる置換基を有していてもよい。) を、

20

K^b は単結合、または - (CR^{4^b}R^{5^b})_{m^b} - (式中、R^{4^b} および R^{5^b} は同一または相異なって水素原子、C 1 - C 4 アルキル基を、m^b は 1 または 2 の整数を意味する。) を、

T^b、W^b、X^b および Y^b は同一または相異なって = C (D^b) - [式中、D^b は水素原子、ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、- (CO)_{n^b}NR^{6^b}R^{7^b} (式中、R^{6^b} および R^{7^b} は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基を意味し、n^b は 0 または 1 を意味する。)、または置換基を有していてもよい C 2 - C 4 のアルケニル基またはアルキニル基を、それぞれ示す]、または窒素原子を、

30

U^b および V^b は同一または相異なって、= C (D^b) - (式中、D^b は前記を意味する。)、窒素原子、- CH₂-、酸素原子 - または - CO - を、

Z^b は単結合または - CO - NH - を、

R^{1^b} は水素原子または C 1 - C 4 アルキル基を、

- - - は単結合または二重結合を意味する。)

A 群：ハロゲン原子、水酸基、ハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、- R^{8^b}R^{9^b}N (NH)_{p^b} - (式中、R^{8^b} および R^{9^b} は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基を意味し、p^b は 0 または 1 を意味する。また、R^{8^b} および R^{9^b} は結合している窒素原子と一緒に 5 または 6 員式環を形成してもよく、当該環はさらに窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよく、置換基を有していてもよい。)、モノまたはジ C 1 - C 4 アルキル基で置換されていてもよいアミノスルホニル基、置換基を有していてもよい C 1 - C 8 アシル基、C 1 - C 4 アルキル - S (O)_{s^b} - C 1 - C 4 アルキレン基 (式中、s^b は 0、1 または 2 の整数を意味する。)、C 1 - C 4 アルキルまたは置換基を有していてもよいフェニルスルホニルアミノ基、- (CO)_{q^b}NR^{10^b}R^{11^b} (式中、R^{10^b} および R^{11^b} は同一または相異なって水素原子、またはハロゲン原子または C 1 - C 4 アルキル基で置換されていてもよいアミノ基で置換

40

50

されていてもよいC 1 - C 4アルキル基を意味し、 q^b は0または1を意味する。) または置換基を有していてもよいアリール基またはヘテロアリール基を意味する。]で表わされるスルホンアミド含有複素環化合物、もしくはその薬理的に許容される塩、またはそれらの水和物である、2に記載の方法。

18. U^b および V^b が $=C(D^b)-$ (式中、 D^b は前記を意味する。)、または窒素原子である、17に記載の方法。

19. Z^b が単結合である、17または18に記載の方法。

20. T^b 、 U^b 、 V^b 、 W^b 、 X^b および Y^b の少なくとも一つが窒素原子である、17~19のいずれか一項に記載の方法。

21. A^b がハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC 1 - C 4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、 $-(CO)_r^bNR^{12b}R^{13b}$ (式中、 R^{12b} および R^{13b} は同一または相異なって水素原子またはハロゲン原子で置換されていてもよいC 1 - C 4アルキル基を意味し、 r^b は0または1を意味する。)、または置換基を有していてもよいC 2 - C 4のアルケニル基またはアルキニル基である、17~20のいずれか一項に記載の方法。

22. T^b 、 U^b 、 V^b 、 W^b 、 X^b または Y^b のうち一つのみが窒素原子である、17~21のいずれか一項に記載の方法。

23. T^b 、 W^b または Y^b の一つのみが窒素原子である、17~22のいずれか一項に記載の方法。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、該薬剤のインテグリンの発現に対する影響を検定する方法であって、薬剤の投与を受けた患者の血小板におけるインテグリンの発現量を測定する工程、及び、測定された発現量に基づき血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現に対する該薬剤の影響を判定する工程を含むことを特徴とする。

インテグリンはインテグリン 2であることが好ましい。インテグリン 2は、細胞表面に発現される接着分子のインテグリンファミリーの一つである。ヒトインテグリン 2の配列は、GenBankにAccession No. NM_002203で登録されている。

上記化合物Aは、特にインテグリン 2発現を低下させて、血管新生阻害作用および抗腫瘍増殖作用を示す。従って、血小板上のインテグリン 2発現量を測定することにより、化合物Aにより代表される薬剤の効果を一層高感度で判定することができる。

患者への薬剤の投与量や投与方法は特に限定されず、その薬剤の目的に適合したものでよい。本発明の方法は、経口投与などの全身的投与による薬剤の影響を検定するのに用いることが好ましい。

血小板以外の細胞は、特に限定されないが、血管新生が起こり得る組織の細胞であることが好ましく、例えば、腫瘍組織の血管内皮細胞が挙げられる。また、インテグリン 2を介して細胞増殖・アポトーシス・分化といったシグナルが伝達される線維芽細胞、腫瘍細胞、例えばメラノーマ細胞であることが好ましい。更にインテグリン 2は単球、B細胞、T細胞で発現が確認されているので、これらの細胞も挙げられる。本発明の方法は、これらの細胞の機能を推定するのにも役立つ。

血小板におけるインテグリンの発現量の測定方法は特に限定されず、免疫化学的方法などにより測定してもよいし、インテグリンをコードするmRNAの量を測定してもよい。

インテグリンの発現量の免疫化学的方法による測定方法としては、FACS法が挙げられる。FACS法は、蛍光活性化セルソーターを用いて、蛍光標識抗体により免疫化学的に染色した細胞の蛍光強度などを測定する方法である。

インテグリンをコードするmRNAの量の測定方法としては、定量的PCRが挙げられる。

以下に、発現量の測定工程の一態様について、1.血小板の分離、2.血小板表面のインテグリン量の定量、3.血小板中のインテグリンmRNA量の定量の順に詳細に説明する。

10

20

30

40

50

1. 血小板の分離

血小板の分離は遠心・ゲル濾過・フローサイトメトリー等の技術によりできる。

1) . 遠心分離: 血液に10%量の3.8%クエン酸ナトリウム水溶液を加え、100g, 10min, 室温で遠心する。上層を多血小板血漿とし、これを1500g, 10minで遠心することにより沈査から血小板を得る。

2) . フローサイトメトリー: PBS等にて希釈した血液をフローサイトメーターに流し、レーザー光線あるいは類似の光線をあてる。そのとき発生する前方散乱光および側方散乱光の強度にて血小板と他の血球とを分離することが可能である。

2. 血小板表面のインテグリン量の定量

血小板表面のインテグリン量の定量は免疫化学的方法、例えば免疫組織染色・ELISA・ウェスタンブロット・フローサイトメトリー等の技術により測定できる。ELISAでは、例えば固相化した血小板の表面抗原に対する抗体で血小板を固相に結合させ、洗浄後標識した抗インテグリン抗体を反応させて、結合した標識の量から血小板表面のインテグリンを定量できる。またウェスタンブロットでは、例えば分離した血小板をSDSを含む緩衝液に可溶化後、SDS-PAGE・ウェスタンブロットを行い、メンブレン上にブロットされたインテグリンを標識した抗インテグリン抗体により定量することができる。この際、同時に血小板表面抗原に対する抗体で血小板の量を定量すれば、血小板当たりのインテグリンの量を定量することも可能である。

フローサイトメトリーでは、例えば全血を希釈し標識した抗インテグリン抗体を結合させて、前方散乱光および側方散乱光により血小板分画を分離し、血小板上の蛍光強度を測定することにより血小板上のインテグリンの量を定量できる。以下にフローサイトメトリーについて具体的に説明するが、本発明はこれにより限定されない。フローサイトメトリーによれば、血小板を分離することなく全血を用いて、インテグリン量の定量が可能である。

血液4 μ lを0.0038%クエン酸ナトリウム水溶液を含むPBS396 μ lにて希釈する。FITCで標識したインテグリンに対する抗体、好ましくはインテグリン 2に対する抗体、マウスであれば例えば抗マウスCD49b FITC標識(BD Pharmingen, Cat. BD-558757)、ヒトであれば抗ヒトCD49b FITC標識(BD Pharmingen, Cat. BD-555498)を0.1%BSAを含むPBSにて適当な濃度に希釈する。この抗体10 μ lを希釈した血液90 μ lに加える。室温にて60min反応させ、フィルター(FALCON, Cat. 2235)に通す。PBS900 μ lを加え、フローサイトメーター(Becton Dickinson, FACSCalibur)にて前方散乱光および側方散乱光により血小板分画を分離し、血小板上の蛍光強度を測定することにより血小板上のインテグリン、好ましくはインテグリン 2の量を定量する。

3. 血小板中のインテグリンmRNA量の定量

1) . RNAの抽出

RNAはチオシアン酸グアニジン法、フェノール法等により抽出できる。分離した血小板をISOGEN 1mlにて溶解し、室温に5min放置する。クロロホルム0.2mlを加え、攪拌して2min放置する。13000rpm, 15min, 4 (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11)で遠心し、上清を別のチューブに移す。イソプロパノール0.5mlを加え、室温に5min放置する。13000rpm, 10min, 4 (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11)で遠心し、上清を捨てる。70%エタノール水溶液1mlを加え、15000rpm, 15min, 4 (MX-150, TOMY, Rotor TMA-11)で遠心する。上清を捨て、RNaseフリーH₂Oにて溶解する。

2) . RNAの定量

RNAはノーザンブロット解析、ドットブロット解析、RNaseプロテクションアッセイ、コンパラティブ(comparative)RT-PCR、コンペティティブ(competitive)RT-PCR、定量的PCR等の技術により定量出来る。好ましくは

定量的PCRであることが望ましい。以下に定量的PCRの技術について説明するが、本発明はこれにより限定されない。定量的PCRはTaqManプローブとABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用い、次のように行う。

操作は逆転写反応及びPCR反応の2段階で行う。最初の段階である逆転写反応は、得られたRNAにdNTP・oligo d(T)₁₆プライマー・Rnaseインヒビター・Multiscribe Reverse Transcriptase (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を加え、25にて10分間保温後、48にて30分間加熱することにより行う。反応を95 5分間加熱することにより停止させる。

10

得られたcDNAを第2段階のPCR反応に供する。PCR反応は、例えば2.5ng cDNA、1xTaqMan PCR buffer、3mM MgCl₂、各200μM dATP、dCTP、dGTP、400μM dUTP、200nMプライマー対、0.01U/μl AmpErase UNG、0.025U/μl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Perkin-Elmer Applied Biosystems)の反応系で行う。反応条件は50 2分間、95 10分間に次いで95 20秒間・55 20秒間・72 30秒間を40サイクルで行う。プライマーとプローブはPimer Expression (Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用いて設計する。複数検体の比較は、定量値を各検体の転写量に変動の少ないハウスキーピング遺伝子、好ましくはGAPDHのmRNAレベルにより補正して行う。

20

上記のような発現量の測定工程により測定された発現量に基づき血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現に対する該薬剤の影響が判定される。この判定は、血小板におけるインテグリンの発現量が血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現量に相関することに基づいて行うことができる。すなわち、血小板における発現量が減少すれば、薬剤は、血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現を減少させる影響があると判定でき、逆に血小板における発現量が増加すれば、薬剤は、血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現を増加させる影響があると判定できる。

本発明は、また、本発明の方法において使用する定量試薬を提供する。

第1の態様の定量試薬は、また、薬剤の投与を受けた患者の血小板におけるインテグリンの発現量を免疫化学的方法により測定する工程、及び、測定された発現量に基づき血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現に対する該薬剤の影響を判定する工程を含んで成る、該薬剤のインテグリンの発現に対する影響を検定する方法に使用するインテグリンの定量試薬である。

30

この態様の定量試薬の構成成分は、インテグリンを免疫化学的に定量するのに使用される試薬と同様でよい。この態様の定量試薬は、免疫化学的方法による測定の方法に応じて、定量試薬の製造に通常に用いられる技術を選択して用いることにより製造することができる。通常には、抗インテグリン抗体を含む。抗インテグリン抗体は、蛍光物質により標識されていてもよい。

定量試薬が複数の構成成分から構成される場合には、キットとされてもよい。また、定量試薬は、定量試薬に用いるのに許容可能な担体をさらに含む組成物とされてもよい。例えば、キットには、蛍光標識したインテグリン 2に対するモノクローナル抗体、または、インテグリン 2に対するモノクローナル抗体と蛍光標識した抗マウスIg抗体、希釈液、固定液が含まれてよい。

40

第2の態様の定量試薬は、薬剤の投与を受けた患者の血小板におけるインテグリンの発現量を、インテグリンをコードするmRNAの量を測定することにより測定する工程、及び、測定された発現量に基づき血小板以外の細胞におけるインテグリンの発現に対する該薬剤の影響を判定する工程を含んで成る、該薬剤のインテグリンの発現に対する影響を検定する方法に使用するインテグリンの定量試薬である。

この態様の定量試薬の構成成分は、インテグリンをコードするmRNAを定量するのに使

50

する)、式 - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a は低級アルキル基、低級アルコキシ基またはハロゲン原子で置換されていてもよい、フェニル基またはヘテロアリール基を意味し、u^a は0または1~5の整数を意味する)、式 - CONH - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a およびu^a は前記を意味する)、または式 - SO₂ - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a およびu^a は前記を意味する) で示される基などを挙げる事ができる。

一般式 (I) においては、R がインドール、キノリン、またはイソキノリンである化合物が好ましい。

上記一般式 (I^a) において、A^a 環の意味する「置換基を有していてもよい、単環式または二環式芳香環」とは、芳香族炭化水素、または窒素原子、酸素原子および硫黄原子のうち少なくとも1個を含む芳香族ヘテロ環であり、当該環上には置換基1~3個があってもよい。A^a 環に含まれる主な芳香環を例示すると、ピロール、ピラゾール、イミダゾール、チオフェン、フラン、チアゾール、オキサゾール、ベンゼン、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジン、ナフタレン、キノリン、イソキノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、インドール、イソインドール、インドリジン、インダゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、ベンズオキサゾール、ベンズイミダゾール、ベンゾピラゾール、ベンゾチアゾールなどがある。上記芳香環は置換基1~3個を有していてもよく、置換基が複数個ある場合には、同一または異なってもよい。置換基としては、例えば、低級アルキル基または低級シクロアルキル基で置換されていてもよいアミノ基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、水酸基、ニトロ基、メルカプト基、シアノ基、低級アルキルチオ基、ハロゲン基、式 - a^a - b^a [式中、a^a は単結合、- (CH₂)_{k^a} -、- O - (CH₂)_{k^a} -、- S - (CH₂)_{k^a} - または - N (R^{3^a}) - (CH₂)_{k^a} - を、k^a は1~5の整数を、R^{3^a} は水素原子または低級アルキル基を、b^a は - CH₂ - d^a (式中、d^a は低級アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、ハロゲン基、水酸基、低級アルキルチオ基、シアノ基または低級アルコキシ基を意味する) を意味する] で示される基、式 - a^a - e^a - f^a [式中、a^a は前記と同じ意味を、e^a は - S (O) - または - S (O)₂ - を、f^a は低級アルキル基または低級アルコキシ基で置換されていてもよいアミノ基、低級アルキル基、トリフルオロメチル基、- (CH₂)_{m^a} - b^a または - N (R^{4^a}) - (CH₂)_{m^a} - b^a (式中、b^a は前記と同じ意味を示し、R^{4^a} は水素原子または低級アルキル基を、m^a は1~5の整数を意味する) を意味する] で示される基、式 - a^a - g^a - h^a [式中、a^a は前記と同じ意味を示し、g^a は - C (O) - または - C (S) - を、h^a は低級アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、水酸基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、- (CH₂)_{n^a} - b^a または - N (R^{5^a}) - (CH₂)_{n^a} - b^a (式中、b^a は前記と同じ意味を示し、R^{5^a} は水素原子または低級アルキル基を、n^a は1~5の整数を意味する) を意味する] で示される基、式 - a^a - N (R^{6^a}) - g^a - i^a [式中、a^a およびg^a は前記と同じ意味を示し、R^{6^a} は水素原子または低級アルキル基を、i^a は水素原子、低級アルコキシ基またはf^a (f^a は前記と同じ意味を示す) を意味する] で示される基、式 - a^a - N (R^{7^a}) - e^a - f^a (式中、a^a、e^a およびf^a は前記と同じ意味を示し、R^{7^a} は水素原子または低級アルキル基を意味する) で示される基、式 - (CH₂)_{p^a} - j^a - (CH₂)_{q^a} - b^a (式中、j^a は酸素原子または硫黄原子を意味し、b^a は前記と同じ意味を示し、p^a およびq^a は同一または異なって1~5の整数を意味する)、式 - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a は低級アルキル基、低級アルコキシ基またはハロゲン原子で置換されていてもよい、フェニル基またはヘテロアリール基を意味し、u^a は0または1~5の整数を意味する)、式 - CONH - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a およびu^a は前記を意味する)、または式 - SO₂ - (CH₂)_{u^a} - Ar^a (式中、Ar^a およびu^a は前記を意味する) で示される基などを挙げる事ができる。

上記置換基例において、アミノ基が2個のアルキル基で置換されている場合には、これらのアルキル基が結合して5または6員環を形成していてもよい。また、A^a 環が水酸基ま

10

20

30

40

50

たはメルカプト基を有する含窒素ヘテロ環である場合には、これらの基が共鳴構造をとることにより、オキソ基またはチオキソ基の形になっていてもよい。

B^a環の意味する「置換基を有していてもよい、6員環式不飽和炭化水素またはヘテロ原子として窒素原子を1個含む不飽和6員ヘテロ環」とは、一部が水素化されていてもよい、ベンゼンまたはピリジンであり、当該環上に置換基1または2個を有していてもよく、置換基が2個ある場合には同一または異なってもよい。

C^a環の意味する「置換基を有していてもよい、窒素原子を1または2個含む5員ヘテロ環」とは、一部が水素化されていてもよい、ピロール、ピラゾール、イミダゾールであり、当該環上に置換基1または2個を有していてもよく、置換基が2個ある場合には同一または異なってもよい。

B^a環およびC^a環が有していてもよい置換基としては、例えば、ハロゲン基、シアノ基、低級アルキル基、低級アルコキシ基、水酸基、オキソ基、式 - C(O) - r^a (式中、r^aは水素原子、低級アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、低級アルキル基、低級アルコキシ基または水酸基を意味する)、低級アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、トリフルオロメチル基などを挙げることができる。

上記一般式(I^a)において、R^{1a}、R^{2a}およびA^a環、B^a環、C^a環が有していてもよい置換基の定義中の低級アルキル基であり、その例としては、炭素数1~6の直鎖もしくは分枝状のアルキル基、例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基(アミル基)、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,2-ジメチルプロピル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、1-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、1,1-ジメチルブチル基、1,2-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、1-エチルブチル基、2-エチルブチル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1,2,2-トリメチルプロピル基、1-エチル-1-メチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基などを意味する。これらのうち好ましい基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基などを挙げることができ、これらのうち、最も好ましい基としてはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基を挙げることができる。

A^a環が有していてもよい置換基の定義中の低級シクロアルキル基とは炭素数3~8のシクロアルキル基であり、その例としては、シクロプロピル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などを挙げることができる。

A^a環、B^a環およびC^a環が有していてもよい置換基の定義中の低級アルコキシ基とは、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、tert-ブトキシ基など上記の低級アルキル基から誘導される低級アルコキシ基を意味するが、これらのうち最も好ましい基としてはメトキシ基、エトキシ基を挙げることができる。低級アルキルチオ基とは、上記の低級アルキル基から誘導される低級アルキルチオ基を意味する。ハロゲン原子としてはフッ素原子、塩素原子、臭素原子などが挙げられる。

これらのうちで特に好ましい化合物としては、

- 1) N-(3-シアノ-4-メチル-1H-インドール-7-イル)-3-シアノベンゼンスルホンアミド
- 2) N-(3-シアノ-4-メチル-1H-インドール-7-イル)-6-クロロ-3-ピリジンスルホンアミド
- 3) N-(3-ブロモ-5-メチル-1H-インドール-7-イル)-4-スルファモイルベンゼンスルホンアミド
- 4) N-(5-ブロモ-3-クロロ-1H-インドール-7-イル)-6-アミノ-3-ピリジンスルホンアミド
- 5) N-(3-ブロモ-5-メチル-1H-インドール-7-イル)-3-シアノベンゼ

10

20

30

40

50

ンスルホンアミド

6) N - (4 - ブロモ - 1 H - インドール - 7 - イル) - 4 - シアノベンゼンスルホンアミド

7) N - (4 - クロロ - 1 H - インドール - 7 - イル) - 6 - アミノ - 3 - ピリジンスルホンアミド

8) N - (3 - ブロモ - 4 - クロロ - 1 H - インドール - 7 - イル) - 6 - アミノ - 3 - ピリジンスルホンアミド

9) N - (3 - ブロモ - 5 - メチル - 1 H - インドール - 7 - イル) - 5 - シアノ - 2 - チオフェンスルホンアミド

10) N - (4 - ブロモ - 3 - クロロ - 1 H - インドール - 7 - イル) - 2 - アミノ - 5 - ピリミジンスルホンアミド

11) N - (3 - クロロ - 1 H - インドール - 7 - イル) - 4 - スルファモイルベンゼンスルホンアミド

などが挙げられる。

上記一般式 (I ^a) で示されるスルホンアミド誘導体は酸または塩基と塩を形成する場合もある。本発明は化合物 (I ^a) の塩をも包含する。酸との塩としては、たとえば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩等の無機酸塩や酢酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸などの有機酸との塩を挙げることができる。また、塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などの無機塩、トリエチルアミン、アルギニン、リジン等の有機塩基との塩を挙げることができる。

本発明において、環 Q ^b の意味する「1つまたは2つの窒素原子を有していてもよい芳香環」とは、芳香族炭化水素、または1つまたは2つの窒素原子を6員式芳香族ヘテロ環である。環 Q ^b に含まれる主な芳香環を例示すると、ベンゼン、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジンなどがある。また、環 M の意味する「C 5 - C 12 の不飽和の単環または複環を意味し、当該環は窒素原子、酸素原子、硫黄原子から選ばれる1から4のヘテロ原子を有していてもよい。」とは、環 Q ^b と二重結合を共有する不飽和の単環または複環で有り、ベンゼン、ナフタレン等の芳香族炭化水素、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロヘプテン、シクロオクテン、シクロペンタジエン、シクロヘプタジン、シクロオクタジエン等の不飽和炭化水素、テトラヒドロピリジン、ピロール、フラン、チオフェン、オキサゾール、イソキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、ピラゾール、イミダゾール、トリアゾール、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジン、トリアジン、インドール、イソインドール、キノリン、イソキノリン、インダゾリジン、ナフチリジン、ベンゾフラン、ベンゾピラン、ベンゾチオフェン、ベンツイミダゾールベンゾキサゾール、ベンゾチアゾール、ピロロピリジン、ピリドピリミジン、イミダゾピリジン等の不飽和複素環を意味する。また、「環 Q ^b と環 M ^b は1つの窒素原子を共有してもよい。」とは、両環の縮合位置に窒素原子がある場合をいい、そのようにして形成される環としては、インダゾリジン、イミダゾ [1 , 2 - a] ピリジン、イミダゾ [1 , 5 - a] ピリジン、ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジンなどを挙げることができる。

本発明において、R ^{1 b}、R ^{4 b}、R ^{5 b} における C 1 - C 4 アルキル基、または A ^b、D ^b、R ^{1 b}、R ^{2 b}、R ^{3 b}、R ^{6 b}、R ^{7 b}、R ^{8 b}、R ^{9 b}、R ^{10 b}、R ^{11 b}、R ^{12 b}、R ^{13 b}、R ^{14 b}、R ^{15 b}、G ^{1 b}、G ^{2 b} および A 群におけるハロゲン原子で置換されていてもよい C 1 - C 4 アルキル基における C 1 - C 4 アルキル基とは、炭素数 1 ~ 4 の直鎖もしくは分枝状のアルキル基、例えばメチル基、エチル基、n - プロピル基、イソプロピル基、n - ブチル基、イソブチル基、sec - ブチル基、tert - ブチル基を意味する。ハロゲン原子で置換されていてもよいとは、これらのアルキル基がフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子から選ばれるハロゲン原子で置換されていてもよいことを意味する。例えば、モノフルオロメチル基、モノクロロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、1 - または 2 - モノフルオロエチル基、1 - または 2 - モノクロロエチル基、1 - または 2 - モノブロムエチル基、1 , 2 - ジフルオル

10

20

30

40

50

エチル基、1,2-ジクロロエチル基、1,1,2,2,2-ペンタフルオロエチル基、3,3,3-トリフルオロプロピル基などを挙げることができる。それらの例の好ましいものとして、モノフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、トリフルオロメチル基、1-または2-モノフルオロエチル基、1,2-ジフルオロエチル基、1,1,2,2,2-ペンタフルオロエチル基などを挙げることができる。

本発明において、A^b、D^bおよびA群におけるハロゲン原子で置換されているもよいC1-C4アルコキシ基におけるC1-C4アルコキシ基とは、炭素数1~4の直鎖もしくは分枝状のアルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロピルオキシ基、イソプロピルオキシ基、n-ブチルオキシ基、イソブチルオキシ基、sec-ブチルオキシ基、tert-ブチルオキシ基を意味する。ハロゲン原子で置換されているもよいとは、これらのアルコキシ基がフッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子から選ばれるハロゲン原子で置換されているもよいことを意味する。例えば、モノフルオロメトキシ基、ジフルオロメトキシ基、トリフルオロメトキシ基、1-または2-モノフルオロエトキシ基、1-または2-モノクロロエトキシ基、1-または2-モノブロムエトキシ基、1,2-ジフルオロエトキシ基、1,1,2,2,2-ペンタフルオロエトキシ基、3,3,3-トリフルオロプロピルオキシ基などを挙げることができる。それらの例の好ましいものとして、モノフルオロメトキシ基、ジフルオロメトキシ基、トリフルオロメトキシ基、1-または2-モノフルオロエトキシ基、1,2-ジフルオロエトキシ基、1,1,2,2,2-ペンタフルオロエトキシ基などを挙げることができる。

本発明において、A^bおよびD^bに見られるC2-C4アルケニル基またはアルキニル基とは炭素数2から4のアルケニル基またはアルキニル基を意味し、ビニル基、アリル基、2-または3-ブテニル基、1,3-ブタジエニル基、エチニル基、2-プロピニル基、2-メチルエチニル基、2-または3-ブチニル基等を挙げることができる。

本発明において、B^bおよびA群に見られるアリール基とは芳香族炭化水素を意味し、フェニル基、ナフチル基などを挙げることができる。また、ヘテロアリール基とは窒素原子、酸素原子、硫黄原子を1または2以上含有する単環または複環であり、例えば、ピロリル、イミダゾリル基、ピラゾリル基、トリアゾリル基、フリル基、チエニル基、オキサゾリル基、イソキサゾリル基、チアゾリル基、イソチアゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリミジル基、ピラジル基、インドリル基、インドリジニル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、キノリニル基、イソキノリニル基、キナゾリニル基、フトラジニル基などを挙げることができる。

本発明において、R^{8b}、R^{9b}に見られる「R^{8b}およびR^{9b}は結合している窒素原子と一緒に5または6員式環を形成してもよく、当該環はさらに窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよく、」とは、R^{8b}およびR^{9b}が結合している窒素原子と一緒に5または6員式環を形成することを意味する。

本発明において、A群に見られるモノまたはジC1-C4アルキル基で置換されているもよいアミノスルホニル基、C1-C4アルキル-S(O)₂-C1-C4-アルキレン基、C1-C4アルキル基または置換基を有しているもよいフェニルスルホニルアミノ基、C1-C4アルキル基で置換されているもよいC1-C4アルキル基とは、上記と同じアルキル基を意味し、アルキレン基とは、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、またはメチルメチレン基、1-または2-メチルエチレン基、1-、2-または3-メチルプロピレン基、ジメチルメチレン基などを挙げることができる。

また、C1-C8アルカノイル基とホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、ベンゾイル基等を意味する。

本発明のJ^bに見られる「保護基を有しているもよいアミノ基」における保護基とは、通常の有機合成上アミノ基の保護基として知られている基であればいかなるきでもよく、特に限定はされないが、例えばベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、ホルミル基、アセチル基、クロロアセチル基、2,2,2-トリクロロエチル基、ベンジリデン基、ベンツヒドリル基、トリチル基などを挙げることができる。また、保護基を有

10

20

30

40

50

していてもよいカルボキシ基における保護基およびR^{16b}におけるカルボキシ基の保護基とは、通常の有機合成上カルボキシ基の保護基として知られている基であればいかなる基でもよく、特に限定はされないが、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、t-ブチル基、メトキシメチル基、2,2,2-トリクロロエチル基、ピバロイルオキシメチル基、ベンジル基などを挙げることができる。

本発明において「置換基を有してもよい」における置換基とは、上に述べたハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC1-C4アルキル基またはアルコキシ基、水酸基、ヒドロキシC1-C4アルキル基、モノまたはジC1-C4アルキル基で置換されていてもよいアミノ基、C2-C4アルケニル基またはアルキニル基、シアノ基、C1-C8アシル基、モノまたはジC1-C4アルキル基で置換されていてもよいアミノスルホニル基、カルボキシ基、C1-C4アルコキシカルボニル基、モノまたはジC1-C4アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基等を意味する。

上記一般式(I^b)で示されるスルホンアミド含有複素環化合物は酸または塩基と塩を形成する場合もある。本発明は化合物(I^b)の塩をも包含する。酸との塩としては、たとえば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩等の無機酸塩や酢酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、クエン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との塩を挙げることができる。また、塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などの無機塩、トリエチルアミン、アルギニン、リジン等の有機塩基との塩を挙げることができる。

また、これら化合物の水和物はもちろんのこと光学異性体が存在する場合はそれらすべてが含まれることはいうまでもない。また、生体内で酸化、還元、加水分解、抱合などの代謝を受けて本化合物から生成する血管新生抑制作用を示す化合物をも包含する。またさらに、本発明は生体内で酸化、還元、加水分解などの代謝を受けて本発明化合物を生成する化合物をも包含する。

本発明において使用される化合物は種々の方法によって製造することができる。例えば、特開平7-165708号公報、特開平8-231505号公報にそのいくつかが具体的に開示されている。

実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

[参考例1] 化合物Aのインテグリン₂発現に対する効果

ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)は、ヒト臍帯より単離し、EGM培地(2% FCS, ヒドロコルチゾン不含, Clonetics)で培養した。I型コラーゲンコートフラスコ(スミロン)で継代培養し、4~6継代で使用した。抗ヒトインテグリン₂抗体(A2-IE10)はUpstate Biotechnology Inc.より、抗ヒトCD31抗体(JC/70A)およびウサギ抗マウスイムノグロブリンのFITC標識F(ab')₂フラグメントはDakoより購入した。

25cm²細胞培養用フラスコにまきこんだ後、CO₂インキュベーターにて37℃で培養し、3時間後に化合物A(5, 50, 500ng/ml)を含む同培地と交換し、更に48時間培養した。細胞を回収し、2×10⁵個の細胞を100μlのPBS(0.1% BSA, 0.05% NaN₃)に浮遊させ、1μgの一次抗体を加えて4℃で30分間インキュベートし、PBSで洗浄後、FITC標識二次抗体で30分間インキュベートした。PBSで洗浄後、CellFix(Becton Dickinson)で細胞を固定した。FACS calibur(Becton Dickinson)を用い、各サンプル2×10⁴個の細胞の蛍光値を測定した。細胞表面分子の発現量は、各サンプルの蛍光値を一次抗体なしの対照(control)サンプルの蛍光値で補正して求めた(次式)。

$$RMFI(\text{relative mean fluorescence intensity}) = \text{試料MFI}(\text{mean fluorescence intensity}) / \text{バックグランドMFI}$$

図1に示すように化合物A(50, 500ng/ml)はHUVECのインテグリン₂

10

20

30

40

50

発現量を減少させた。

[参考例2] 抗インテグリン 2抗体及び化合物Aの管腔形成に対する影響

24ウェルプレートにI型コラーゲンゲルを分注し、ゲル化した後、HUV ECを、10 ng/ml EGF (GIBCO BRL)と20 ng/ml bFGF (GIBCO BRL)または20 ng/ml VEGF (和光純薬)を含む無血清培地 (Human endothelial-SFM Basal Growth Medium, GIBCO BRL)に懸濁し、 $1 \sim 1.2 \times 10^5$ 細胞/ウェルでまきこんだ。37°Cで一晩培養し、I型コラーゲンゲルを重層してゲル化させた後、薬剤 (抗インテグリン 2抗体または化合物A)を含む上記無血清培地 (EGFとbFGFまたはVEGFを含む)を加え、更に37°Cで4日間培養した。なお、抗インテグリン 2抗体の作用については、96

10

ウェルプレートを使用して実験を行った。
培養後、細胞をMTTにより発色させ、HUV ECが形成する管腔を顕微鏡下で写真撮影した。写真をスキャナで取り込み画像解析ソフトMac SCOPE 2.56 (MITANI)を用いて管腔の長さを測定することによりHUV ECの管腔形成を定量した。

図2に示すように抗インテグリン 2抗体はHUV ECのbFGFにより誘導される管腔形成を阻害し、bFGFによる管腔形成にインテグリン 2が関与していることが示された。また図3に示すように、化合物AはHUV ECのbFGFまたはVEGFにより誘導される管腔形成を阻害した。参考例2の結果と併せ、化合物Aはインテグリン 2発現を抑制することにより管腔形成を阻害したものと考えられた。

[実施例1] 化合物Aの腫瘍体積増加抑制作用と血小板インテグリン 2発現抑制作用との相関

20

KP-1 (ヒト膀胱癌細胞株)のPBS懸濁液 (5×10^7 細胞/ml) 100 μ lをマウス (SLCKSN, 雌, lot. 085605376)の皮下に移植した。移植1週間後から0.5%メチルセルロース水溶液 (vehicle)または化合物A 100もしくは200 mg/kg (0.5%メチルセルロース懸濁液)を一日二回経口投与した。体重および腫瘍体積を経日的に測定した。経日的にマウスをジエチルエーテル麻酔し、眼底よりキャピラリー管を用いて採血を行った。血液4 μ lを0.0038%クエン酸ナトリウム水溶液を含むPBS 396 μ lにて希釈した。抗マウスCD49b FITC標識抗体 (Phramingen, Cat. 09794D, lot. M006073)を0.1% BSAを含むPBSにて30倍希釈した。この抗体10 μ lを希釈した血液90 μ lに加えた。室温にて60 min反応させ、フィルター (FALCON, Cat. 2235)に通した。PBS 900 μ lを加え、フローサイトメーター (Becton Dickinson, FACSCalibur)にて、前方散乱光および側方散乱光により血小板分画を分離し、血小板上の蛍光強度を測定した。

30

図4に示すとおり化合物Aは100 mg/kg及び200 mg/kgの用量で、KP-1腫瘍体積の増加を抑制した。参考例1及び2の結果と併せると、化合物Aはインテグリン 2の発現を抑制することにより管腔形成を阻害し、腫瘍によって誘導される血管新生を抑制した結果、腫瘍体積の増加を抑制したものと考えられた。

図5に示すとおり、化合物Aは同時に測定した血小板におけるインテグリン 2の発現量を減少させた。血小板におけるインテグリン 2の発現量の減少は、腫瘍体積増加の抑制が見られる100 mg/kg及び200 mg/kgの用量で観察され、血小板におけるインテグリン 2発現量が、化合物Aの腫瘍体積増加抑制作用の代理マーカーとなり得ることが示された。

40

産業上の利用の可能性

本発明により、インテグリンの発現を抑制することにより薬効を発揮する薬剤、例えば血管新生阻害剤の薬効を、血小板におけるインテグリンの発現量を代理マーカーとしてモニターすることが可能となる。血小板は、試料としての採取が容易なので、効率的にモニターすることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

図1は、化合物Aのインテグリン 2発現に対する効果を示す。

50

図 2 は、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体の管腔形成に対する影響を示す。

図 3 は、化合物 A の管腔形成に対する影響を示す。

図 4 は、化合物 A の腫瘍体積増加に対する抑制作用を示す。

図 5 は、化合物 A の血小板におけるインテグリン $\alpha 2$ 発現に及ぼす影響を示す。

【 図 1 】

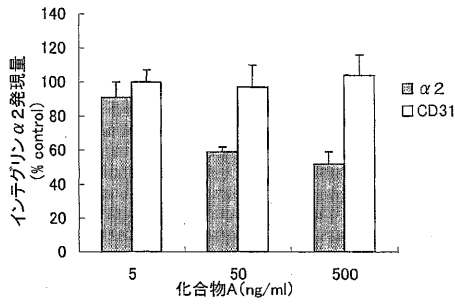


図 1

【 図 3 】

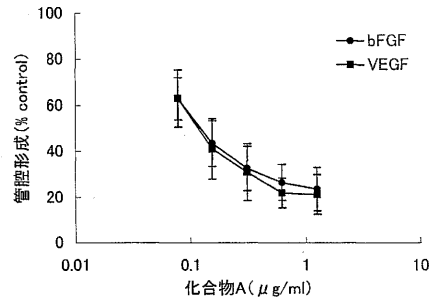


図 3

【 図 2 】

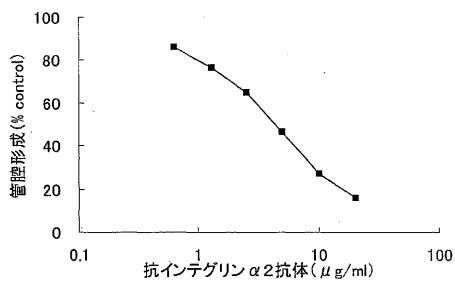


図 2

【 図 4 】

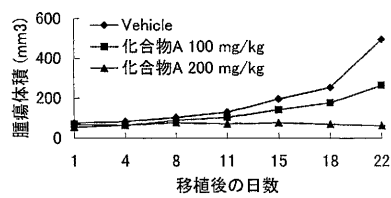


図 4

【 図 5 】

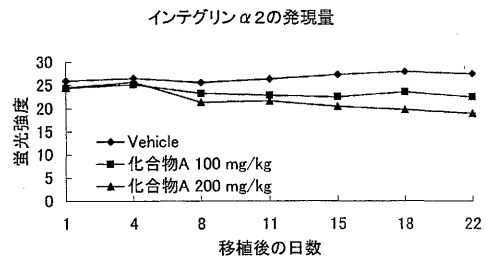


図 5

フロントページの続き

- (72)発明者 畑 直子
日本国茨城県つくば市松代2 - 20 - 6
- (72)発明者 船橋 泰博
アメリカ合衆国 10036 ニューヨーク州 ニューヨーク ウェスト 48 ストリー
ト 235 アパートメント 19ジェイ
- (72)発明者 若林 利明
日本国茨城県つくば市下広岡668 - 36

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 Cancer Res , 1996年, Vol.56, No.21, Page.5071-5078
Hum Cell , 1998年, Vol.11, No.4, Page.207-214
血栓と循環 , 2000年, Vol.8, No.4, Page.304-307
癌治療と宿主 , 1998年, Vol.10, No.3, Page.299-307
ICUとCCU , 2000年, Vol.24, No.5, Page.299-309
ビタミン , 2000年, Vol.74, No.7, Page.365-366
J Biol Chem , 1991年, Vol.266, No.18, Page.12008-120014
Proc Natl Acad Sci , 1997年, Vol.94, No.25, Page.13612-13617
Biochem Pharmacol , 1990年, Vol.39, No.2, Page.233-239
Int J Cancer , 1997年, Vol.72, No.4, Page.642-648
腎臓 , 1997年, Vol.19, No.3, Page.90-91

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
G01N33/48 ~ 33/98
C12Q1/68
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)

| | | | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 通过抑制整联蛋白表达来测定血管生成抑制剂的的作用的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP4255285B2 | 公开(公告)日 | 2009-04-15 |
| 申请号 | JP2002565631 | 申请日 | 2002-02-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 卫材株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 卫材有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 卫材研发管理有限公司 | | |
| [标]发明人 | 小野尚人 仙波太郎 畑直子 船橋泰博 若林利明 | | |
| 发明人 | 小野 尚人 仙波 太郎 畑 直子 船橋 泰博 若林 利明 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/58 A61P9/00 A61P35/00 C07D209/42 C07K14/705 G01N33/50 | | |
| CPC分类号 | G01N33/566 C07D209/42 C07K14/70546 G01N2333/70546 G01N2500/00 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.A G01N33/566 G01N33/58.A | | |
| 代理人(译) | 川口义行 远山 勉 | | |
| 审查员(译) | 三木隆 | | |
| 优先权 | 2001044646 2001-02-21 JP | | |
| 其他公开文献 | JPWO2002066073A5 JPWO2002066073A1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

测量接受药剂的患者血小板中整联蛋白表达的量，并基于测量的表达量确定药剂对除血小板外的细胞中整联蛋白表达的影响，一种测定药物对整合素表达影响的方法。

