

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/066073

発行日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(43) 国際公開日 平成14年8月29日(2002.8.29)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/53
C 1 2 Q 1/68
GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/58

GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/53 M
C 1 2 Q 1/68 A
GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/58 A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

出願番号	特願2002-565631 (P2002-565631)	(71) 出願人	000000217 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/001562	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(22) 国際出願日	平成14年2月21日(2002.2.21)	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(31) 優先権主張番号	特願2001-44646 (P2001-44646)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
(32) 優先日	平成13年2月21日(2001.2.21)	(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
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	仙波 太郎 日本国茨城県牛久市ひたち野東82-10
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

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) 【要約】

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検定する方法。

【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検定する方法。

【請求項 2】

インテグリンがインテグリン 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

免疫化学的方法が F A C S 法である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 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。

【請求項 6】

インテグリンの発現量を、インテグリンをコードする m R N A 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 7】

m R N A の量を定量的 P C R により測定する、請求項 6 に記載の方法。

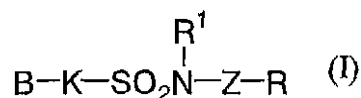
【請求項 8】

請求項 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 m R N A の定量試薬。

20

【請求項 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 1 0 アリール環または 6 員ないし 1 0 員ヘテロアリール環を、

K は単結合、- C H = C H -、または - (C R ^{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、

30

R ¹ 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 - C O - N H - 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 1 0 アリール環または 6 員ないし 1 0 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、もしくはその薬理学的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項 2 に記載の方法。

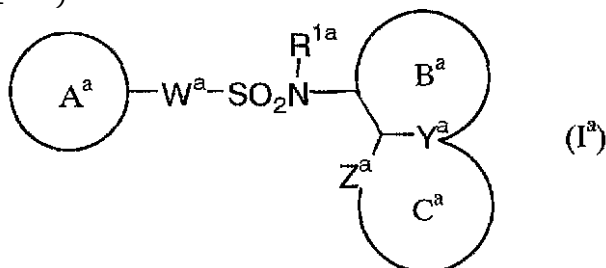
【請求項 1 0】

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 9 に記載の方法。

40

【請求項 1 1】

薬剤が、一般式 (I ^a)



[式中、

50

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^{1 a} 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^{2 a}) - (式中、R^{2 a} 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2に記載の方法。 10

【請求項12】

W^a が単結合である、請求項11に記載の方法。

【請求項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、請求項11に
 記載の方法。

【請求項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、請求項11 ~ 13の
 いずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

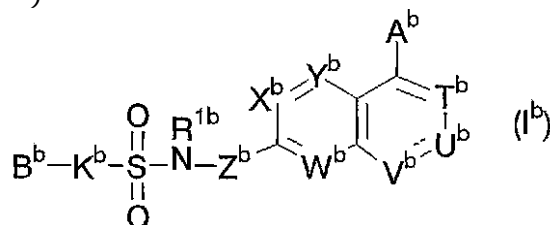
C^a 環が置換基を有していてもよいピロールである、請求項11 ~ 14 いずれか一項に記
 載の方法。 20

【請求項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、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

薬剤が、一般式 (I^b)

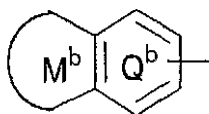


30

[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 - 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、 40

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。) を、

50

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るもよい $C1-C4$ 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るもよい $C1-C4$ 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るもよい $C2-C4$ 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、 $-CH_2-$ 、酸素原子または $-CO-$ を、

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、

$-$ 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るもよい $C1-C4$ 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るもよい $C1-C4$ 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 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、置換基を有しているもよい。) 、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、置換基を有しているもよい $C1-C8$ 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る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るもよいアミノ基で置換されているもよい $C1-C4$ 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る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、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

Z^b が単結合である、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

A^b がハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されているもよい $C1-C4$ 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るもよい $C1-C4$ 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るもよい $C2-C4$ のアルケニル基またはアルキニル基である、請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 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、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

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 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【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 QOL 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 (surrogate) マーカーとして使用されている。

10

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 (time to progression)、無病期間 (disease free survival)、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。

20

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 Panorex 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 (Stephan B et al, Clinical Cancer Research, 1999, 5, 3999-4004)、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 (prostatic specific antigen) 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 (Denis L and Mahler C. Urology, 1996, 47 (1A Suppl), 26-32.)。

30

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 (matrix metalloproteinase inhibitor) BMS 275291 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 (Clin. Cancer Res., 2000, 6 (8), 3290-6)。

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。

40

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。

これらのインテグリンの中で、インテグリン 2 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関与すること (Ge

50

orge E et al, Exp. Cell. Res. 1996. 224, 39-51) が知られている。

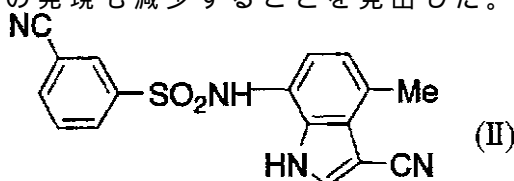
また、in vivoにおいて、インテグリン 1とインテグリン 2の抗体がVEGFによる血管新生を抑制した(Donald R S et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. 94. 13612-13617)と報告されている。

インテグリン v 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 v 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)-による血管新生にはインテグリン v 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)-による血管新生にはインテグリン v 5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 v 3抗体、インテグリン v 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 2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 2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 2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の下では、末梢血の血小板表面のインテグリン 2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 2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検定する方法。

2. インテグリンがインテグリン 2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。

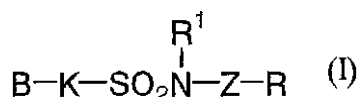
5. 3に記載の方法において使用するインテグリンの定量試薬。

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、

10

20

30

40

50

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、

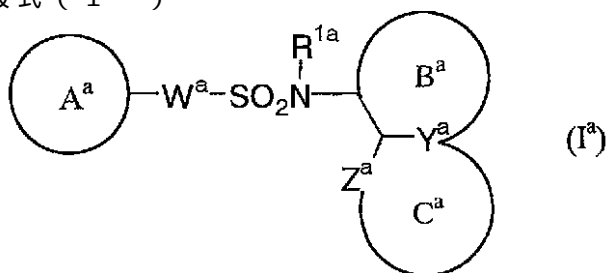
Zは単結合または-CO-NH-を、

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、2に記載の方法。

10

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)



20

[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。)を、

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。

30

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。

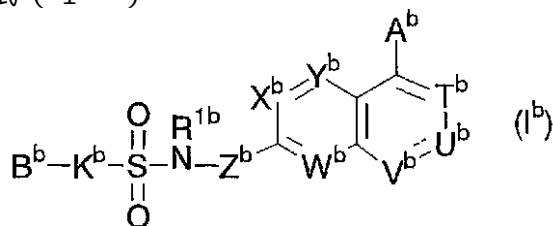
14. B^a環が置換基を有していてもよいベンゼンまたはピリジンである、11~13のいずれか一項に記載の方法。

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。

40

17. 薬剤が、一般式(I^b)

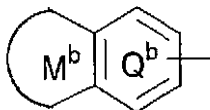


[式中、

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C₁-C

50

4 アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、 $-(CO)_k^b NR^{2b} R^{3b}$ (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よい)、置換基を有していてもよい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、
 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



10

(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。)

を、
 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よいC1 - C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、 $-(CO)_n^b NR^{6b} R^{7b}$ (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、

20

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、 $-CH_2-$ 、酸素原子 - または $-CO-$ を、

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、

$-$ は単結合または二重結合を意味する。)

30

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、 $-(CO)_q^b NR^{10b} R^{11b}$ (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よいアミノ基で置換されていてよい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。

40

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、1

50

7 ~ 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 C1 - C4 アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、 $-(CO)_r^b NR^{12b} R^{13b}$ (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、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。 10

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。 20

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。 30

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。 40

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、100 g, 10 min, 室温で遠心する。上層を多血小板血漿とし、これを 1500 g, 10 min 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。 50

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・E L I S A ・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。E L I S A 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S D Sを含む緩衝液に可溶化後、S D S - P A G E ・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。

10

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P B S 396 μ lにて希釈する。F I T C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C D 49 b F I T C標識(B D P h a r m i n g e n, C a t. B D - 558757)、ヒトであれば抗ヒトC D 49 b F I T C標識(B D P h a r m i n g e n, C a t. B D - 555498)を0.1% B S Aを含むP B S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60 min反応させ、フィルター(F A L C O N, C a t. 2235)に通す。P B S 900 μ lを加え、フローサイトメーター(B e c t o n D i c k i n s o n, F A C S C a l i b u r)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。

20

3. 血小板中のインテグリンm R N A量の定量

1) . R N Aの抽出

R N A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I S O G E N 1 m lにて溶解し、室温に5 min放置する。クロロホルム0.2 m lを加え、攪拌して2 min放置する。13000 r p m, 15 min, 4 (M X - 150, T O M Y, R o t o r T M A - 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0.5 m lを加え、室温に5 min放置する。13000 r p m, 10 min, 4 (M X - 150, T O M Y, R o t o r T M A - 11)で遠心し、上清を捨てる。70%エタノール水溶液1 m lを加え、15000 r p m, 15 min, 4 (M X - 150, T O M Y, R o t o r T M A - 11)で遠心する。上清を捨て、R N a s e フリーH₂Oにて溶解する。

30

2) . R N Aの定量

R N Aはノーザンブロット解析、ドットブロット解析、R N a s e プロテクションアッセイ、コンパラティブ(comparative) R T - P C R、コンペティティブ(competitive) R T - P C R、定量的P C R等の技術により定量出来る。好ましくは定量的P C Rであることが望ましい。以下に定量的P C R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P C RはT a q M a n プローブとA B I P r i s m 7700 Sequence Detection System(Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用い、次のように行う。

40

操作は逆転写反応及びP C R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R N Aにd N T P ・ o l i g o d (T)₁₆プライマー・R n a s e インヒビター・M u l t i s c r i b e R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e (P e r k i n - E l m e r A p p l i e d B i o s y s t e m s)を加え、25にて10分間

50

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。

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。

10

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。

20

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。

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

30

されている。また、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。

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

40

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を定量するのに使用される試薬と同様でよい。この態様の定量試薬は、mRNAの定量の方法に応じて、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。例えば、PCR、ハイブリダイゼーションなどに基づく方法が挙げられる。通常には、インテグリンをコードするmRNAに相補的な、プライマーやプローブとして使用できる核酸を含む。なお、既知のインテグリンをコードする塩基配列に基づき、プライマーやプローブを設計することは当業者であれば容易である。

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

50

ば、キットには、PCRプライマー、好ましくは定量的PCRのための標識プライマー、コントロールプライマー、コントロールDNAが含まれてよい。

薬剤は、好ましくは、一般式(I)、一般式(I^a)または一般式(I^b)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。

一般式(I)のBおよびRにおける、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とは、炭素数6から10の芳香族炭化水素基または、ヘテロ原子として窒素原子、酸素原子および硫黄原子のうち少なくとも1個を含む6員ないし10員の芳香族ヘテロ環を意味し、その環上に1以上の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。具体的には例えば、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、4, 5, 6, 7-テトラヒドロインドール、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン、2, 3-ジヒドロベンゾフラン、インダン、テトラロン、インドリン、イソインドリン、クロマン、テトラリンなどが挙げられる。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ことができる。

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。

10

20

30

40

50

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アル基を意味し、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

10

20

30

40

50

、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^{1 a}、R^{2 a} 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 - 1 H - 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 - 1 H - 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 - プロモ - 5 - メチル - 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
- 4) N - (5 - プロモ - 3 - 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
- 5) N - (3 - プロモ - 5 - メチル - 1 H - インドール - 7 - イル) - 3 - シアノベンゼンスルホンアミド
- 6) N - (4 - プロモ - 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 - プロモ - 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 - プロモ - 5 - メチル - 1 H - インドール - 7 - イル) - 5 - シアノ - 2 -

10

20

30

40

50

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「C5 - C12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^{1b}、R^{4b}、R^{5b}におけるC1 - C4アルキル基、またはA^b、D^b、R^{1b}、R^{2b}、R^{3b}、R^{6b}、R^{7b}、R^{8b}、R^{9b}、R^{10b}、R^{11b}、R^{12b}、R^{13b}、R^{14b}、R^{15b}、G^{1b}、G^{2b}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C1 - C4アルキル基におけるC1 - C4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 - モノプロムエチル基、1, 2 - ジフルオロエチル基、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てもよい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

10

20

30

40

50

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てもよいとは、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て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。

10

本発明において、 A^b および D^b に見られる $C_2 - C_4$ 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、ピリジリル基、ピリミジリル基、ピラジリル基、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、フタラジニル基などを挙げることができる。

20

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ピロリジニル基、ピペリジニル基、モルホリノ基、チオモルホリノ基、ピペラジニル基など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 $C_1 - C_4$ 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、 $C_1 - C_4$ アルキル-S(O)_s、 $b - C_1 - C_4$ -アルキレン基、 $C_1 - C_4$ アルキル基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、 $C_1 - C_4$ アルキル基で置換されていてもよい $C_1 - C_4$ 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。

30

また、 $C_1 - C_8$ 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「保護基を有していてもよいアミノ基」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} 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きでもよく、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。

40

本発明において「置換基を有していてもよい」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 $C_1 - C_4$ アルキル基またはアルコキシ基、水酸基、ヒドロキシ $C_1 - C_4$ アルキル基、モノまたはジ $C_1 - C_4$ アルキル基で置換されて

50

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プラスチック(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細胞培養用プラスチックにまきこんだ後、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, 500 ng/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 caliber(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(relative mean fluorescence intensity) = 試料MFI(mean fluorescence intensity) / バックグラウンドMFI

図1に示すように化合物A(50, 500 ng/ml)はHUVECのインテグリン₂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型コラーゲンを分注し、ゲル化した後、HUVEC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、1~1.2×10⁵細胞/ウェルでまきこんだ。37℃で一晩培養し、I型コラーゲン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

10

20

30

40

50

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℃で4日間培養した。なお、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体の作用については、96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、HUVEC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MacSCOPE 2.56(MITANI)を用いて管腔の長さを測定することによりHUVEC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 $\alpha 2$ 抗体はHUVEC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 $\alpha 2$ 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HUVEC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 $\alpha 2$ 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。

10

【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 $\alpha 2$ 発現抑制作用との相関

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200mg/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60min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。

20

図4に示すとおり化合物Aは100mg/kg及び200mg/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 $\alpha 2$ 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。

30

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 $\alpha 2$ の発現量を減少させた。血小板におけるインテグリン $\alpha 2$ の発現量の減少は、腫瘍体積増加の抑制が見られる100mg/kg及び200mg/kgの用量で観察され、血小板におけるインテグリン $\alpha 2$ 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。

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。

40

【図面の簡単な説明】

図1は、化合物Aのインテグリン $\alpha 2$ 発現に対する効果を示す。

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 】

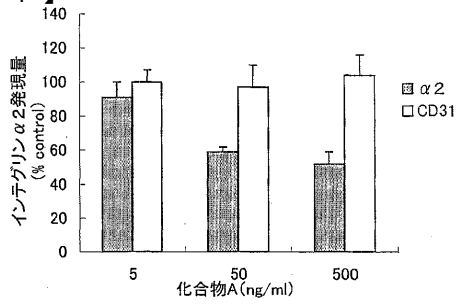


図 1

【 図 3 】

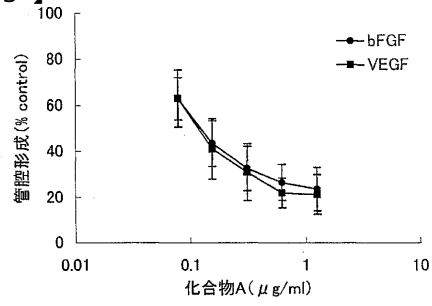


図 3

【 図 2 】

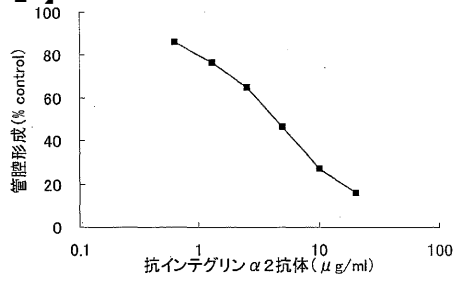


図 2

【 図 4 】

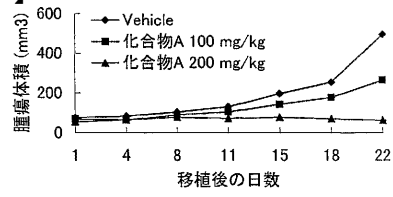


図 4

【 図 5 】

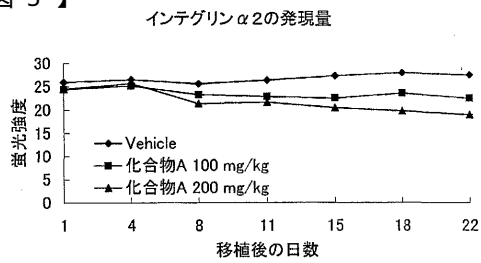


図 5

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月2日(2002.12.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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検定する方法。

【請求項2】

インテグリンがインテグリン 2 である、請求項1に記載の方法。

【請求項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、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

免疫化学的方法がFACS法である請求項3に記載の方法。

【請求項5】

請求項3に記載の方法において使用する、抗インテグリン抗体を含んでなるインテグリンの定量試薬。

【請求項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請求項1に記載の方法。

【請求項7】

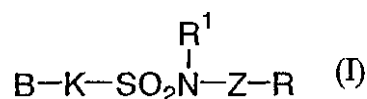
mRNAの量を定量的PCRにより測定する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

請求項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に相補的な核酸を含んでなる、インテグリンをコードするmRNAの定量試薬。

【請求項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、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、

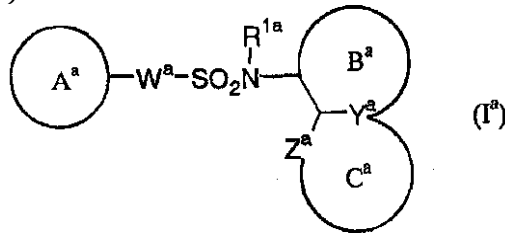
Rは置換基を有していてもよく、環の一部が飽和されていても良い、C6-C10アリール環または6員ないし10員ヘテロアリール環を、それぞれ意味する。)で表されるスルホンアミド化合物、もしくはその薬理学的に許容される塩、またはそれらの水和物である、請求項2に記載の方法。

【請求項10】

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9に記載の方法。

【請求項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2に記載の方法。

【請求項12】

W^a が単結合である、請求項11に記載の方法。

【請求項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、請求項11に記載の方法。

【請求項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、請求項11 ~ 13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

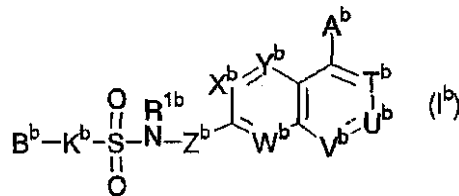
C^a 環が置換基を有していてもよいピロールである、請求項11 ~ 14いずれか一項に記載の方法。

【請求項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、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

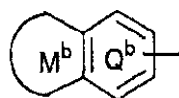
薬剤が、一般式 (I^b)



[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C1 - C4アルキル基またはアルコキシ基、シアノ基、 - (CO)_k^b NR^{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、

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 1 2 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、
K^b は単結合、または - (C R^{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、

【請求項 1 8】

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 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

Z^b が単結合である、請求項 1 7 または 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

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 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

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、- (C O)_r^b N R^{1 2 b} R^{1 3 b} (式中、R^{1 2 b} および R^{1 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、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、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

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 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

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 1 7 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

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、インテグリンの発現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 記載の方法。

【請求項 2 5】

血小板以外の細胞が腫瘍細胞であり、インテグリンの発現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 記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/01562
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K49/00, 31/404, 31/506, 45/00, 31/4439, 31/4025, A61P9/00, 35/00, C07D209/42, 209/30, 401/12, 403/12, 409/12, G01N33/15, 33/50, 33/49 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) Int.Cl. ⁷ A61K49/00, 31/404, 31/506, 45/00, 31/4439, 31/4025, A61P9/00, 35/00, C07D209/42, 209/30, 401/12, 403/12, 409/12, G01N33/15, 33/50, 33/49 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1940-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002 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	WO 99/02551 A1 (Heino, Jyrki et al.), 21 January, 1999 (21.01.99), Whole document; especially lines from 6 to 11 in page 2 & US 6096707 A & EP 994898 A1 & JP 2001-509515 A	1-4, 6, 7 8-23
A	WO 95/07276 A1 (Eisai Co., Ltd.), 16 March, 1995 (16.03.95), Whole document & JP 07-083828 A & EP 673937 A1 & US 5721246 A	1-4, 6, 7, 9-23
A	WO 00/050395 A1 (Eisai Co., Ltd.), 31 August, 2000 (13.08.00), Whole document & JP 2000-247949 A & EP 1074542 A1	1-4, 6, 7, 9-23
<input checked="" 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 document 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		"I" 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 10 May, 2002 (10.05.02)		Date of mailing of the international search report 28 May, 2002 (28.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/01562
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	WO 01/056607 A1 (Eisai Co., Ltd.), 09 August, 2001 (09.08.01), (Family: none)	1-4, 6, 7, 9-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/JP02/01562
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:	
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p>	
<p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 5, 8 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: Although the inventions as set forth in claims 5 and 8 relate to "a reagent", these claims does not specify any component employed therein but merely use of the reagent. Thus, no meaningful international search can be made on these claims.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JP02/01562												
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁷ A61K49/00, 31/404, 31/506, 45/00, 31/4439, 31/4025, A61P9/00, 35/00, C07D209/42, 209/30, 401/12, 403/12, 409/12, G01N33/15, 33/50, 33/49</p>														
<p>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. Cl⁷ A61K49/00, 31/404, 31/506, 45/00, 31/4439, 31/4025, A61P9/00, 35/00, C07D209/42, 209/30, 401/12, 403/12, 409/12, G01N33/15, 33/50, 33/49</p>														
<p>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 1940-1992年 日本国公続実用新案公報 1971-1992年 日本国登録実用新案公報 1994-1996年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年</p>														
<p>国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用字) CAPLUS (STN)、REGISTRY (STN)</p>														
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリ*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>WO 99/02551 A1(Heino, Jyrki et. al.)1999.01.21, whole document, especially lines from 6 to 11 in page 2 & US 6096707 A & EP 994898 A1 & JP 2001-509515 A</td> <td>1-4, 6, 7 8-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 95/07276 A1(Eisai Co., Ltd.)1995.03.16, whole document & JP 07-083828 A & EP 673937 A1 & US 5721246 A</td> <td>1-4, 6, 7, 9-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 00/050395 A1(Eisai Co., Ltd.)2000.08.31, whole document & JP 2000-247949 A & EP 1074542 A1</td> <td>1-4, 6, 7, 9-23</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリ*	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 請求の範囲の番号	X A	WO 99/02551 A1(Heino, Jyrki et. al.)1999.01.21, whole document, especially lines from 6 to 11 in page 2 & US 6096707 A & EP 994898 A1 & JP 2001-509515 A	1-4, 6, 7 8-23	A	WO 95/07276 A1(Eisai Co., Ltd.)1995.03.16, whole document & JP 07-083828 A & EP 673937 A1 & US 5721246 A	1-4, 6, 7, 9-23	A	WO 00/050395 A1(Eisai Co., Ltd.)2000.08.31, whole document & JP 2000-247949 A & EP 1074542 A1	1-4, 6, 7, 9-23
引用文献の カテゴリ*	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 請求の範囲の番号												
X A	WO 99/02551 A1(Heino, Jyrki et. al.)1999.01.21, whole document, especially lines from 6 to 11 in page 2 & US 6096707 A & EP 994898 A1 & JP 2001-509515 A	1-4, 6, 7 8-23												
A	WO 95/07276 A1(Eisai Co., Ltd.)1995.03.16, whole document & JP 07-083828 A & EP 673937 A1 & US 5721246 A	1-4, 6, 7, 9-23												
A	WO 00/050395 A1(Eisai Co., Ltd.)2000.08.31, whole document & JP 2000-247949 A & EP 1074542 A1	1-4, 6, 7, 9-23												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の縦書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。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリ 「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」 優先権主張に拠る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</p> <p>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、発明の原理又は発明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</p>														
国際調査を完了した日	10.05.02	国際調査報告の発送日 28.05.02												
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 田村 聖子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9051												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/01562
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 請求の範囲の番号
PX	WO 01/056607 A1 (Eisai Co., Ltd.) 2001.08.09 (No family)	1-4, 6, 7, 9-23

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/01562

第I種 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)
注第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. 請求の範囲 _____ 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、
- 2. 請求の範囲 5, B _____ 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、
 請求の範囲5及びBに記載の発明は、「試薬」にかかるものであるが、これらの請求の範囲にはその試薬の用途が示されているに過ぎず、用いる成分がなんら特定されていないため、有意義な国際調査を行うことができない。
- 3. 請求の範囲 _____ 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II種 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限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 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の範囲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限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の範囲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限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の範囲について作成した。

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なかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

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partment 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

(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。

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	JPWO2002066073A1	公开(公告)日	2004-06-17
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		
[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 A61P9/00 A61P35/00 C07D209/42 C07K14/705 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	A61P9/00 A61P35/00 C07D209/42 C07K14/70546 G01N33/566 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		
优先权	2001044646 2001-02-21 JP		
其他公开文献	JPWO2002066073A5 JP4255285B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种测试药物对整合素表达的影响的方法，该方法包括以下步骤：测量所施用药物的患者的血小板中的整合素表达量；以及确定药物对除血小板以外的细胞中的整合素表达的影响的步骤。基于测得的表达量。

