

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4507027号  
(P4507027)

(45) 発行日 平成22年7月21日(2010.7.21)

(24) 登録日 平成22年5月14日(2010.5.14)

(51) Int.Cl.	F 1
<b>A 6 1 K 31/353 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/353
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00 1 0 1
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02
<b>A 6 1 P 1/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/02
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00

請求項の数 2 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-192268  
 (22) 出願日 平成11年7月6日(1999.7.6)  
 (65) 公開番号 特開2000-226329(P2000-226329A)  
 (43) 公開日 平成12年8月15日(2000.8.15)  
 審査請求日 平成18年6月6日(2006.6.6)  
 (31) 優先権主張番号 特願平10-359996  
 (32) 優先日 平成10年12月4日(1998.12.4)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第1項適用 平成10年8月8日 日本生薬学会発行の「日本生薬学会第45回年会講演要旨集」に発表

(73) 特許権者 000006138  
 明治乳業株式会社  
 東京都江東区新砂1丁目2番10号  
 (73) 特許権者 598174406  
 秋澤 俊史  
 大阪府枚方市招提東町1-38-5-401  
 (72) 発明者 秋澤 俊史  
 大阪府枚方市招提東町1-38-5-401  
 (72) 発明者 矢原 正治  
 熊本県菊池郡菊陽町津久礼140-2  
 (72) 発明者 橋本 文雄  
 鹿児島県鹿児島市唐湊3-31-1 2-6号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MMP阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

theasinensin A、theasinensin F、theasinensin D、theasinensin G、oolongtheanin 3'-O-gallate、oolongtheanin、assamicain A、assamicain C、oolonghomobisflavan C、EGCG 6-6 EGCG、(-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate、(-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate、8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate、epitheafag allin 3-O-gallateから選択される1つ以上の化合物からなるMT1-MMPおよびマトリライシン(MMP-7)阻害剤。

【請求項2】

theasinensin A、theasinensin F、theasinensin D、theasinensin G、oolongtheanin 3'-O-gallate、oolongtheanin、assamicain A、assamicain C、oolonghomobisflavan C、EGCG 6-6 EGCG、(-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate、(-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate、8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate、epitheafag allin 3-O-gallateから選択される1つ以上の化合物からなる慢性関節リウマチ、変形性関節症、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤及び転移、潰瘍形成、骨疾患、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染症、又は糖尿病合併症の治療及び予防用医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カテキン化合物を有効成分とするマトリックスメタロプロテアーゼ(matrix m

etalloproteinases : MMPs) 阻害剤に関する。さらに、MMPsによる細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) の分解によって引き起こされる慢性関節リウマチ、変形性関節症等の関節疾患、癌細胞の転移、歯肉炎等の難治性疾患の治療及び予防に有用なMMPs阻害剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来 の 技術 】

MMPsは、結合組織の分解及び再構築 (remodelling) に関与する一群の酵素で、 $Zn^{2+}$ を活性部位にもつ。現在までに16種類ものヒトMMPsが同定され (Nagase, H. : Biol. Chem., 378 : 151-160, 1997)、これらは、一次構造と基質特異性の違いから、コラゲナーゼ群、ゼラチナーゼ群、ストロメライシン群、膜型 (MT-MMP)、及びその他 (マトリライシン) の5群に分類される。

10

【 0 0 0 3 】

MMPsは、細胞外基質の構成タンパク質、例えば、関節のライニング (lining)、間質性の結合組織、基底膜、軟骨などに存在するタンパク質を分解する。これらのタンパク質は、コラーゲン (collagen)、ラミニン (laminin)、エラスチン (elastin)、フィブロネクチン (fibronectin)、プロテオグリカン (proteoglycan)、などを含む。

【 0 0 0 4 】

コラーゲンは、哺乳動物組織の約1/3を占める主要な構造タンパク質であり、軟骨、骨、腱、及び皮膚を含む多くのマトリックス組織の必須な成分である。間質性コラゲナーゼ (MMP-1) は、nativeなI、II、III型コラーゲン分子を3 : 1の箇所ですべて特異的に切断する。コラゲナーゼにより1箇所を切断されると、通常組織内では安定なコラーゲン分子は、生理学的温度 (体温) で自然に変性して一本鎖のゼラチンとなり、他の様々なプロテアーゼにより分解されるようになる。その結果、マトリックス組織の構造の完全性が失われる。この過程は不可逆的である。

20

【 0 0 0 5 】

ゼラチナーゼ (MMP-2) は、ゼラチン (変性コラーゲン)、IV型コラーゲン (基底膜) 及びV型コラーゲン、フィブロネクチン (軟結合組織及び基底膜に存在する高度にクロスリンクした高分子の多機能性糖タンパク質)、及びエラスチン (動脈、腱、皮膚など弾性組織の特殊成分をなす構造タンパク質) を変性させる。

【 0 0 0 6 】

ストロメライシン1 (MMP-3) 及び2 (MMP-10) は、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、及びコラーゲン (IV型及びIX型) を含む広範囲のマトリックス基質を分解する。

30

【 0 0 0 7 】

マトリライシン (MMP-7) も、また、プロテオグリカン、ゼラチン、エラスチン及びラミニンを含む広範囲のマトリックス基質を分解する。

【 0 0 0 8 】

正常組織においては、MMPsの活性は、1) 潜在型酵素 (pro-MMP) の産生、2) その潜在型酵素の活性化、3) 活性化酵素のインヒビターによる阻害、の3つのステップで厳密に調節されている。その結果、MMPsによる結合組織の分解と、新しいマトリックス組織の合成とは、ダイナミックに平衡を保っている。

40

【 0 0 0 9 】

しかしながら、多くの病的疾患においては、MMPs活性の調節不能により、MMPs活性が増強し、ECMの分解が亢進する。これらの病的状態は、関節炎 (例えば、慢性関節リウマチ及び変形性関節症)、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤及び転移、組織の潰瘍形成 (例えば、角膜潰瘍、胃潰瘍、或いは表皮性潰瘍)、骨疾患 (例えば、骨粗鬆症及び人工関節置換術後の弛みなどの骨吸収性疾患)、血管再開塞及び再狭窄、HIV感染及び糖尿病合併症、等の難治性疾患の治療を遅延させている主要な原因の一つとなっている。したがって、MMPsに対して阻害作用を有する物質は、これら難治性疾患の予防及び治療剤として有用であると考えられる。

50

## 【 0 0 1 0 】

例えば、血管新生の阻害やMMPsの活性化の阻害による癌転移治療薬として、ヒドロキサム酸骨格をもつマリマスタット（3R-(2,2-ジメチル-1S-メチルカルバモイル-プロピルカルバモイル)-2S-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノ-ヒドロキサム酸）を始めとして、いくつかの抗転移薬剤が臨床開発中である。しかし、これらの抗腫瘍転移薬剤は、腫瘍細胞の生物学的特徴を標的としているので、抗癌剤のように、直接的腫瘍縮小効果が認められないため、抗癌剤の評価基準をそのまま適用して判断するのが難しく、その有用性の臨床評価はこれからである。

## 【 0 0 1 1 】

その他、MMPs阻害剤として、フラボノイド化合物（特開平8-104628号公報）、エスクレチン誘導体（特開平8-183785号公報）、スルホニルアミノ酸誘導体（特開平9-309875号公報）、TIMPs（特開平10-17492号公報）、等が知られている。

10

## 【 0 0 1 2 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

このように、これまで報告されている数多くのMMPs阻害剤の臨床応用について、抗腫瘍転移薬剤を例にとれば、その臨床的有用性は、まだ不明であり、さらに新たなMMPs阻害剤の候補物質の開発が求められている。

## 【 0 0 1 3 】

## 【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、上記課題を解決するために、カテキン化合物の抗酸化活性や抗ウイルス活性、など多様な生物活性に着目し、カテキン化合物がMMPsに対して阻害作用を有するかもしれないと推測し、カテキンのMMPs阻害活性を調べた結果、カテキンが、その多様な生物活性と併せて、MMP阻害作用を示し、結果として、MMPs活性の調節不能に起因する難治性疾患の治療及び予防に対する有用性が期待できることを見出した。

20

## 【 0 0 1 4 】

すなわち、本発明は、

( 1 ) カテキン化合物を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ ( MMPs ) 阻害剤、

( 2 ) カテキン化合物が、 theasinensin A、 theasinensin F、 theasinensin D、 theasinensin G、 oolongtheanin 3'-O-gallate、 oolongtheanin、 assamicain A、 assamicain C、 oolonghomobisflavan C、 EGCG 6-6 EGCG、 (-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate、 (-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate、 8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate)、 epitheafلاغallin 3-O-gallate、 theaflavin 3'-O-gallate、 theaflavin 3,3'-di-O-gallate、 (+)catechin、 (-)catechin、 (-)epicatechin、 (±)gallocatechin、 (-)epigallocatechin、 (-)catechin-3-O-rha、 (-)epigallocatechin-3-O-gallate、 epicatechin-3-O-gallate、 (-)catechin(-3-O-rhamnopyranosyl)-(4-8)(-)catechin、 である ( 1 ) のマトリックスメタロプロテアーゼ ( MMPs ) 阻害剤、

30

( 3 ) カテキン化合物を有効成分として含有するマトリックスメタロプロテアーゼ ( MMPs ) 活性調節不能に起因する難治性疾患の治療及び予防剤、

( 4 ) 難治性疾患が慢性関節リウマチ、変形性関節症、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤及び転移、潰瘍形成、骨疾患、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染症、又は糖尿病合併症である ( 3 ) の治療及び予防剤、

40

( 5 ) カテキン化合物が、 theasinensin A、 theasinensin F、 theasinensin D、 theasinensin G、 oolongtheanin 3'-O-gallate、 oolongtheanin、 assamicain A、 assamicain C、 oolonghomobisflavan C、 EGCG 6-6 EGCG、 (-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate、 (-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate、 8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate)、 epitheafلاغallin 3-O-gallate、 theaflavin 3'-O-gallate、 theaflavin 3,3'-di-O-gallate、 (+)catechin、 (-)catechin、 (-)epicatechin、 (±)gallocatechin、 (-)epigallocatechin、 (-)catechin-3-O-rha、 (-)epigallocatechin-3-O-gallate、 epicatechin-3-O-gallate、 (-)catechin(-3-O-rhamnopyranosyl)-(4-8)(-)catechin、 である (

50

3)又は(4)の予防及び治療剤、  
に関する。

【0015】

【発明の実施形態】

カテキンは、木本植物の木心に多く含まれる水溶性のポリフェノールで、縮合型タンニンの前駆体と考えられている。茶には数種のカテキンが含まれており、茶特有の渋み成分をなしている。緑茶中のカテキン含量は10~15%で、エピガロカテキンガレートが半量以上を占める。カテキンには、抗酸化活性、抗ウイルス作用、など多様な生物活性があり、抗癌剤との併用による抗癌の増強(特開平10-036260公報)や、インフルエンザウイルス感染阻止効果(島村忠勝:日本医事新報, No. 3737: 126-127, 平成7.12.9)、などが記載されている。しかしながら、カテキンが、MMPsに対して阻害作用を示すことは、これまで知られていない。

10

【0016】

本発明には、緑茶、紅茶などの茶葉から、水や低級アルコールなどの水性溶媒、或いはアセトン、酢酸エチルなどの有機溶媒で抽出して得られるカテキン化合物、さらには、これらを分画、精製したカテキン化合物、などを用いることができるが、他の植物から抽出単離したもの(市販されている)や化学合成したものでもよい(Nonaka, G. et al.: Chem. Pharm. Bull. 34: 61-65, 1986; Hashimoto, F. et al.: Chem. Pharm. Bull. 36: 1676-1684, 1988; Hashimoto, F. et al.: Chem. Pharm. Bull. 37: 3255-3263, 1989)。

例えば、theasinensin A(1)、theasinensin F(2)、theasinensin D(3)、theasinensin G(4)、oolongtheanin 3'-O-gallate(5)、oolongtheanin(6)、assamicain A(7)、assamicain C(8)、oolonghomobisflavan C,EGCG 6-6 EGCG(9)、(-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate(10)、(-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate(11)、8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate(12)、epitheafalagin 3-O-gallate(13)、theaflavin 3'-O-gallate(14)、theaflavin 3,3'-di-O-gallate(15)、(+)-catechin(16)、(-)-catechin(17)、(-)-epicatechin(18)、(±)gallocatechin(19)、(-)-epigallocatechin(20)、(-)-catechin-3-O-rha(21)、(-)-epigallocatechin-3-O-gallate(22)、epicatechin-3-O-gallate(23)、(-)-catechin(-3-O-rhamnopyranosyl)-(4-8)(-)-catechin(24)、などが挙げられるが、本発明のMMPs阻害活性を有するその他のカテキン化合物も本発明に包含される。本発明においては、これらのカテキン化合物を単独又は組み合わせて用いることができる。

20

30

【0017】

本発明において、カテキン化合物は、実施例に示すように、MMPs阻害作用を有することが明らかにされた。癌組織中でその活性型が検出されているMMP-2(Davies, B. et al.: Cancer Res. 53: 5365-5369, 1993; Emonard, H.P. et al.: Cancer Res. 52: 5845-5848, 1992)、癌細胞表層で潜在型MMP-2と相互作用するMT1-MMP、及び通常の上皮性細胞には発現しないが、上皮性の癌細胞である大腸癌や胃癌で特異的に発現が亢進しているMMP-7(Mori, M. et al.: Cancer, 75: 1516-1519, 1995; Kataoka, H. Oncol. Res. 9: 101-109, 1997)に対して、カテキン化合物が、極めて低濃度で阻害作用を示すことは、注目すべきことである。癌組織中の活性型MMP-2の存在は、胃癌や乳癌にの浸潤度と非常によく相関していることから(Polette, M. et al.: Virchows Arch. 428: 29-35, 1996)、MMP-2の癌浸潤における役割がさらにクローズアップされている。MT1-MMPは、潜在型MMP-2の細胞膜上の活性化因子であることが証明されており(Sato, H. et al.: Nature, 370: 61-65, 1994)、さらにMT1-MMPが、様々な癌細胞の膜上に発現していることが示されている(Yamamoto, M. et al.: Cancer Res. 56: 384-392, 1996; Okada, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2730-2734, 1995; Ohtani, H. et al.: Int. J. Cancer, 68: 565-570, 1996)。それに加え、MT1-MMP自身もI、II、III型コラーゲン、フィブロネクチンを分解することが報告され(Ohuchi, E. et al.: J. Biol. Chem. 272: 2466-2451, 1997)、この酵素が発現することは、ECM分解を2方向から助長することが示唆される。エピ

40

50

ガロカテキンと他のカテキンとを組み合わせることにより、MMPs阻害作用のスペクトラムの拡大、相加効果、あるいは相乗効果が期待される。

【0018】

本発明のカテキンを有効成分とするMMPs阻害剤の製剤形態は、一般的な形態でよい。カテキン単独、又はカテキンと製剤上許容できる単体若しくは希釈剤との混合物のいずれでも、製剤として使用することができる。製剤中の有効成分の量も限定されるものではない。

【0019】

本発明のMMPs阻害剤は、経口又は非経口のいずれでも投与することができる。投与量は、年齢、個人差、病状等に依るので、特に限定されないが、1日当たり0.1~500mg/kg(体重)、好ましくは、0.5~200mg/kg(体重)である。通常、1日量を、1回又は2~4回に分けて投与する。

10

【0020】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0021】

[実施例1]

マトリライシン(MMP-7)、膜型のMT1-MMP(membrane-type MMP)、及びゼラチナーゼA(MMP-2)のcDNA(Nagase, H.: Biol. Chem., 378: 151-160, 1997; Sato, H. et al.: Nature, 370: 61-65, 1994; Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 4: 197-250, 1993)を

20

、C末端にヒスチジン6残基を持つ組換え潜在型酵素(proMMP)として、大腸菌大量発現系を用い発現させた後活性化した。

発現ベクターpTH-72は、タンデムリピートのT7プロモーターの下流に、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン、マルチクロニング部位、ヘキサヒスチジンタグをコードする配列、及び翻訳終始コドンを含んでいる。

ヒトMT1-MMP(プロドメイン-触媒ドメイン)cDNAを、5' PCRプライマー: 5'-ggcggatccatgctcgcctccctcggctcg-3'(配列番号: 1)、及び3' PCRプライマー: 3'-gccgtcgactgtccgtcacagatgttggg-5'(配列番号: 2)を用い、MT1-MMPの3.5kb cDNA断片を含むpME18S-MT-MMPを鋳型として、PCR反応を行った。得られた<sup>18</sup>Leuから<sup>322</sup>Asnまでをコードする0.8kb PCR断片をBam HI/Sal Iで消化し、pTH-72発現ベクター(pTH-MT1MMP-PC)のBam HI/Sal I

30

部位にクローン化した。

ヒトMMP-2(プロドメイン-触媒ドメイン)cDNAを、5' PCRプライマー: 5'-ggcggatccatggcgccgtcgccatcatc-3'(配列番号: 3)、及び3' PCRプライマー: 3'-gccgtcgactacaatgtcctgtttgcagat-5'(配列番号: 4)を用い、MMP-2の3.3kb cDNA断片を含むpSG-GeIAを鋳型として、PCR反応を行った。得られた<sup>30</sup>Alaから<sup>474</sup>Valまでをコードする1.3kbPCR断片をBam HI/Sal Iで消化し、pTH-72発現ベクター(pTH-MMP2-PC)のBam HI/Sal I部位にクローン化した。

ヒトMMP-7は、文献記載の方法(Itoh, M. et al.: J. Biochem., 119: 667-673, 1996)で発現させた。

ヒト組換えMMPsの発現、精製、及び巻き戻し(リフォールディング; refolding)は、文献記載の方法(例えば、西村義文, 大野茂雄 監修: タンパク実験プロトコール, 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ2 構造解析編, 1997)に準じて行った。すなわち、MMPsを含む発現ベクター(pTH-MMP-7, pTH-MT1-MMP-PC、或いはpTH-MMP2-PC)を、大腸菌BL21(DE3)株にトランスフェクトし、IPTGで発現誘導した。発現タンパクは、Ni-NTA樹脂(QIAGEN INC., USA)を用いてアフィニティー精製後、リフォールディングを行った。

40

【0022】

MMP-7およびMT1-MMPはトリプシンと37℃、5分間反応後、DIFP(diisopropylphosphofluoridate)とトリプシン阻害剤(Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, NaN<sub>3</sub> 0.02%, Brij35 0.05%)を加えて活性型へ移行させた。一方、MMP-2はp-APMA(p-aminophenylmercuric acetate)と37℃、15分間反応させて活性型へ移行させた。

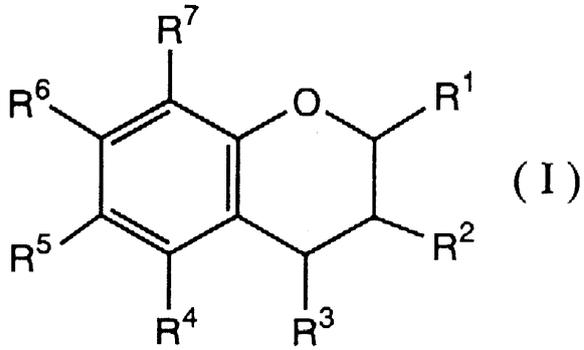
50

## 【 0 0 2 3 】

これらを酵素標本とし、蛍光性ペプチド基質(MOCac/DNP peptide)切断活性反応を、蛍光マイクロプレートリーダー(励起波長 340nm, 蛍光波長 400nm)による蛍光強度で測定し、酵素活性とした。カテキン化合物は、一般式(Ⅰ)で示す(式中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、及びR<sup>7</sup>は、表1~4にそれぞれ対応する化学式を示した。rhaは、L-ラムノースを示す。)

## 【 0 0 2 4 】

## 【化1】

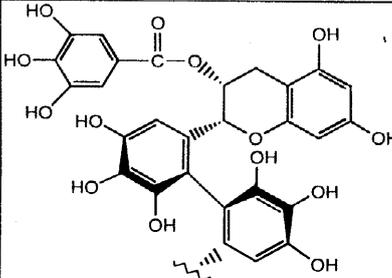
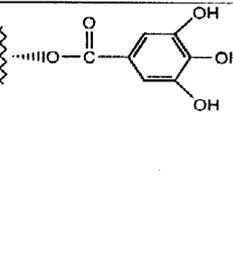
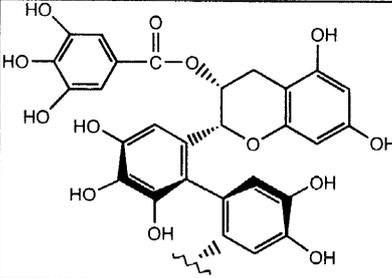
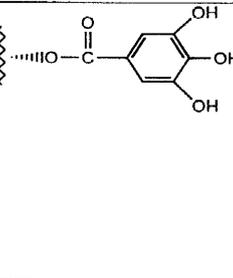
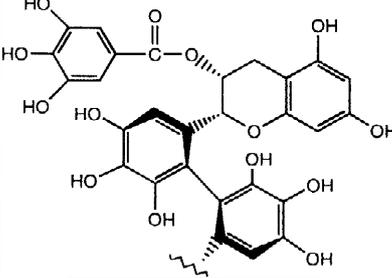
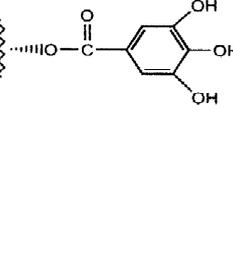
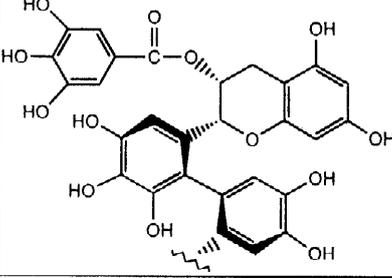
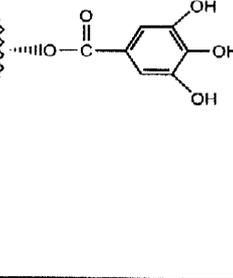
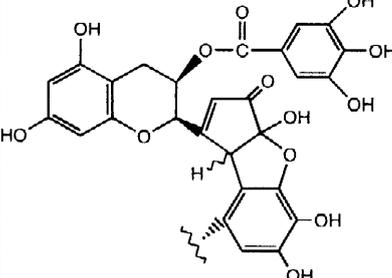
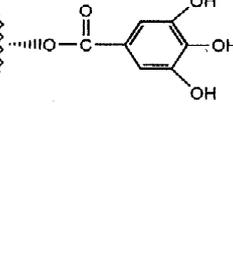
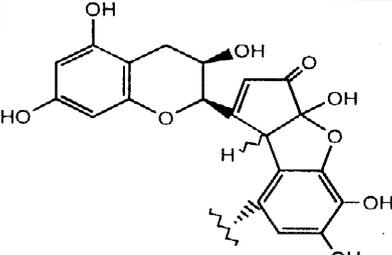
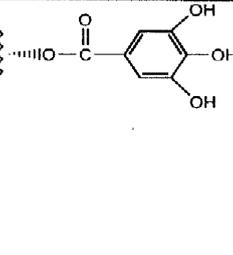


10

20

## 【 0 0 2 5 】

## 【表1】

化合物	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1			H
2			H
3			H
4			H
5			H
6			H

10

20

30

40

【 0 0 2 6 】

【 表 2 】

50

化合物	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
7			H
8			H
9			H
10			H
11			H
12			H
13			H
14			H
15			H

10

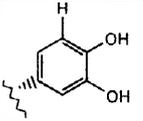
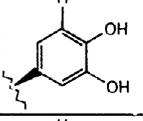
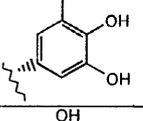
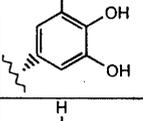
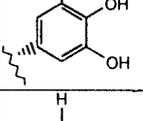
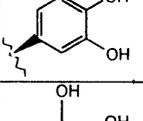
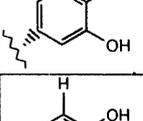
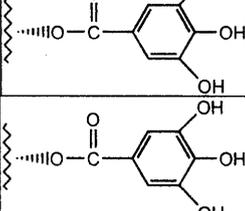
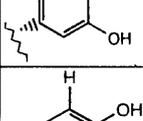
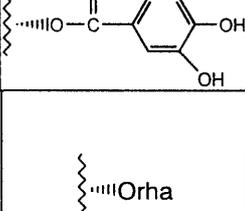
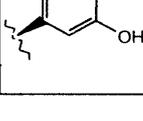
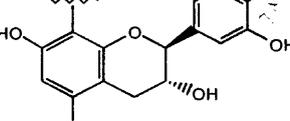
20

30

40

【 0 0 2 7 】

【 表 3 】

化合物	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
16			H
17			H
18			H
19			H
20			H
21			H
22			H
23			H
24			

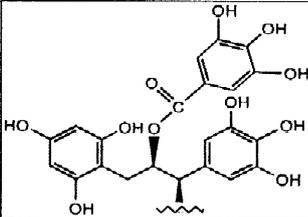
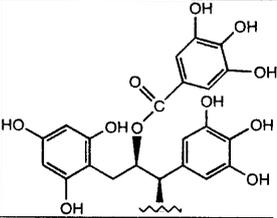
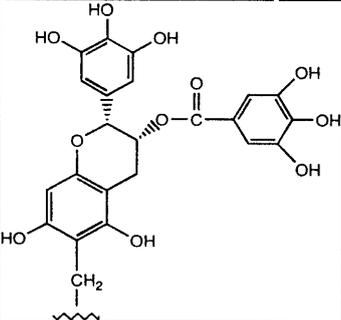
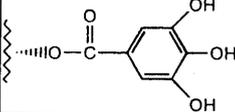
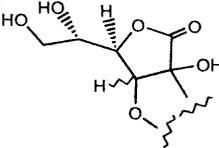
10

20

30

【 0 0 2 8 】

【 表 4 】

化合物	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
1	OH	H	OH	H
2	OH	H	OH	H
3	OH	H	OH	H
4	OH	H	OH	H
5	OH	H	OH	H
6	OH	H	OH	H
7	OH	H	OH	
8	OH		OH	H
9	OH		OH	H
10		H	OH	H
11	OH	H	OH	H
12	OH	H		H
13	OH	H	OH	H
14	OH	H	OH	H
15	OH	H	OH	H
16	OH	H	OH	H
17	OH	H	OH	H
18	OH	H	OH	H
19	OH	H	OH	H
20	OH	H	OH	H
21	OH	H	OH	H
22	OH	H	OH	H
23	OH	H	OH	H
24	OH	H	OH	H

10

20

30

40

## 【 0 0 2 9 】

すなわち、theasinensin A ( 1 )、theasinensin F ( 2 )、theasinensin D ( 3 )、theasinensin G ( 4 )、oolongtheanin 3'-O-gallate ( 5 )、oolongtheanin ( 6 )、assamicain A ( 7 )、assamicain C ( 8 )、oolonghomobisflavan C,EGCG 6-6 EGCG ( 9 )、(-)-epigallocatechin 3,5-di-O-gallate ( 1 0 )、(-)-epigallocatechin 3,3'-and 3,4'-di-O-gallate ( 1 1 )、8-C-ascorbyl(-)-epigallocatechin 3-O-gallate ( 1 2 )、epitheafлагallin 3-O-gallate ( 1 3 )、theaflavin 3'-O-gallate ( 1 4 )、theaflavin 3,3'-di-O-gallate ( 1 5 )、(+)-catechin ( 1 6 )、(-)-catechin ( 1 7 )、(-)-epicatechin ( 1 8 )、(±)-gallocatechin ( 1 9 )、(-)-epigallocatechin ( 2 0 )、(-)-catechin

50

-3-0-rha ( 2 1 )、(-)epigallocatechin-3-0-gallate ( 2 2 )、epicatechin-3-0-gallate ( 2 3 )、(-)catechin(-3-0-rhamnopyranosyl)-(4-8)(-)catechin ( 2 4 )である。

【 0 0 3 0 】

カテキン化合物は、50%エタノールに溶解させ10mMとし、水で1mM、300  $\mu$ M、100  $\mu$ M、30  $\mu$ M、10  $\mu$ M、3  $\mu$ Mに希釈した。MMPs阻害活性の測定は、活性型MMP40  $\mu$ l、カテキン20  $\mu$ l、アッセイバッファー20  $\mu$ l (Tris-HCl pH7.5 500mM, NaCl 1.5M, CaCl<sub>2</sub> 100mM, ZnSO<sub>4</sub> 50  $\mu$ M, NaN<sub>3</sub> 30mM, Brij35 0.05%)を、37℃、15分間プレインキュベーションした後、MOCA c/DNP peptide 120  $\mu$ l (4.16  $\mu$ M)を添加し、37℃、15分毎に2時間反応させた。2時間後の50%酵素阻害濃度 (IC<sub>50</sub>)を、表5に示す。

【 0 0 3 1 】

【表5】

化合物	MMP-7	MT1-MMP	MMP-2
1	0.072	0.35	16
2	0.060	0.30	11
3	0.058	0.29	17
4	0.074	0.40	16
5	0.065	0.20	15
6	0.085	0.30	37
7	0.044	0.23	38
8	0.089	0.12	18
9	0.050	0.18	29
10	0.25	0.022	23
11	0.45	0.044	17
12	0.46	0.036	25
13	0.25	0.025	16
14	0.35	0.070	23
15	0.30	0.041	19
16	175	>100	>100
17	8	>100	>100
18	>100	>100	>100
19	5.5	42	>100
20	17.5	69	>100
21	>100	>100	>100
22	1.6	0.09	>100
23	9.5	29	>100
24	68	80	>100

10

20

30

40

## 【0032】

表5から、カテキン化合物が、MMPs阻害作用を有することが明らかである。

## 【0033】

## 【発明の効果】

本発明により、カテキン化合物が、MMPsに対する阻害作用を有することが明らかにされた。MMPsを有効成分として含有するMMPs阻害剤は、MMPs活性調節不能に起因する難治性疾患、例えば、関節炎（例えば、慢性関節リウマチ及び変形性関節症）、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤及び転移、組織の潰瘍形成（例えば、角膜潰瘍、胃潰瘍、或いは表皮性潰瘍）、骨疾患（例えば、骨粗鬆症及び人工関節置換術後の弛みなどの骨吸収性疾患）、血管再開塞及び再狭窄、HIV感染及び糖尿病合併症、等の治療及び予防剤として期待で

50

きる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.

TOSHIFUMI AKISAWA

<120> matrix metalloproteinase inhibitor

10

<130> P99006

<140>

<141>

<150> JP P1998-359996

20

<151> 1998-12-04

<160> 4

<210> 1

30

<211> 30

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 1

ggcggatcca tgcctgccctc cctcggctcg 30

<210> 2

40

<211> 30

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 2

gggtttaga cacigccctt gcagctgccg 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> HUMAN

10

<400> 3

ggcggatcca tggcgccgtc gcccatcatc 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> HUMAN

20

<400> 4

tagacgtttg tccigtaaca tcagctgccg 30

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
C 0 7 D 311/62	(2006.01)	C 0 7 D 311/62
C 0 7 D 407/14	(2006.01)	C 0 7 D 407/14

- (72)発明者 山田 昌司  
東京都墨田区緑1丁目2番11号 明治乳業株式会社栄養・医薬開発部内
- (72)発明者 須磨 幸恵  
東京都墨田区緑1丁目2番11号 明治乳業株式会社栄養・医薬開発部内
- (72)発明者 河野 哲也  
神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内
- (72)発明者 内田 勝幸  
神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内
- (72)発明者 大柴 幸男  
神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社ヘルスサイエンス研究所内

審査官 三上 晶子

- (56)参考文献 特表平10-512582(JP,A)  
特開平09-309833(JP,A)  
特表平08-504213(JP,A)  
特開平04-066524(JP,A)  
特開平04-077424(JP,A)  
特開平10-130255(JP,A)  
SAZUKA,M. et al, Inhibition of Collagenases from Mouse Lung Carcinoma Cells by Green Tea Catechins and Black Tea Theaflavins., Biosci Biotechnol Biochem, 1997年, Vol.61, No.9, pp.1504-1506  
浦谷貴之 他, ポリフェノール類のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)阻害活性について, 日本生薬学会第45年会講演要旨集, 1998年 8月 8日, p.188  
SORIANI,M. et al, Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells., FEBS Lett, 1998年11月, Vol.439, No.3, pp.253-257  
MAKIMURA,M. et al, Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity, Journal of Periodontology, 1993年, Vol.64, No.7, pp.630-636  
TIXIER,J.M. et al, Evidence by in vivo and in vitro studies that binding of pycnogenols to elastin affects its rate of degradation by elastases, Biochemical Pharmacology, 1984年, Vol.33, No.24, pp.3933-3939  
HASHIMOTO,F. et al, Tannins and related compounds. CXIV. Structures of novel fermentation products, theogallinin, theaflavinin and desgalloyl theaflavinin from black tea, and changes of tea leaf polyphenols during fermentation, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1992年, Vol.40, No.6, pp.1383-1389  
HASHIMOTO,F. et al, Tannins and related compounds. LXXVII. Novel chalcone-flavan dimers, assamicains A, B and C, and a new flavan-3-ol and proanthocyanidins from the fresh

leaves of *Camellia sinensis* L. var. *assamica* Kitamura, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1989年, Vol.37, No.1, pp.77-85

HASHIMOTO, F. et al, Tannins and related compounds. LXIX. Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. (2), *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988年, Vol.36, No.5, pp.1676-1684

NONAKA, G. et al, Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf.

(1), *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1983年, Vol.31, No.11, pp.3906-3914

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07D309/00-315/00

C07D401/00-421/14

A61K 31/33-33/44

A61P 1/00-43/00

A61K 36/00-36/9068

A23L 1/27- 1/308

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamII)