

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-543748

(P2008-543748A)

(43) 公表日 平成20年12月4日(2008.12.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	4 C 0 5 0
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04 1 4 2	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 19 頁) 最終頁に続く

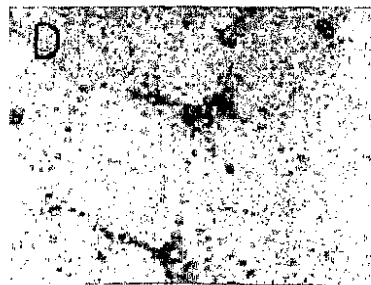
(21) 出願番号	特願2008-515614 (P2008-515614)	(71) 出願人	501187848
(86) (22) 出願日	平成17年10月21日 (2005.10.21)		ドン・ア・ファーム・カンパニー・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月7日 (2008.2.7)		大韓民国、130-070 ソウル、ドン
(86) 国際出願番号	PCT/KR2005/003526		ダエムーンク、ヨンドゥードン、25
(87) 国際公開番号	W02006/132460		2
(87) 国際公開日	平成18年12月14日 (2006.12.14)	(74) 代理人	100102842
(31) 優先権主張番号	10-2005-0050033		弁理士 葛和 清司
(32) 優先日	平成17年6月10日 (2005.6.10)	(72) 発明者	チョイ, スル ミン
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		大韓民国 キュンギード 443-470
			、スウォンシ、ヨントンク、ヨントン
			ードン、ロッテ アパートメント #94
			4-1712

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピラゾロピリミジノン誘導体を含む肝疾患の予防及び治療剤

(57) 【要約】

本発明は、ピラゾロピリミジノン誘導体（5-〔2-プロピルオキシ-5-（1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル）フェニル〕-1-メチルプロピル-1,6-ジヒドロ-7H-ピラゾロ（4,3-d）ピリミジン-7-オン）を有効成分として含む肝疾患の予防及び治療用医薬組成物に関する。本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、肝星細胞でのコラーゲン合成抑制効果が優秀であり、同時に肝内抵抗および門脈圧を低下させて門脈を介した肝臓内血液流入を増加させるため、肝線維化、肝線維化の進行による肝硬変、門脈圧亢進症及びそれらから誘発される多様な合併症の予防及び治療剤に有用に使用することができる。また、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、人体内半減期が長いいため服用回数を減らすことができ、慢性肝疾患患者におけるコンプライアンスを大幅に高めることができる。

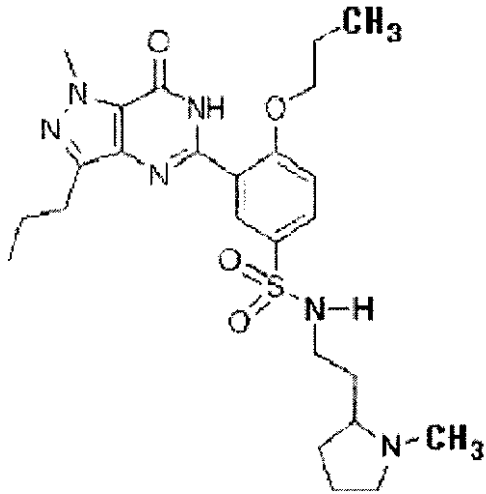


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の化学式 1 で表されるピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む肝線維化抑制剤。

【化 1】

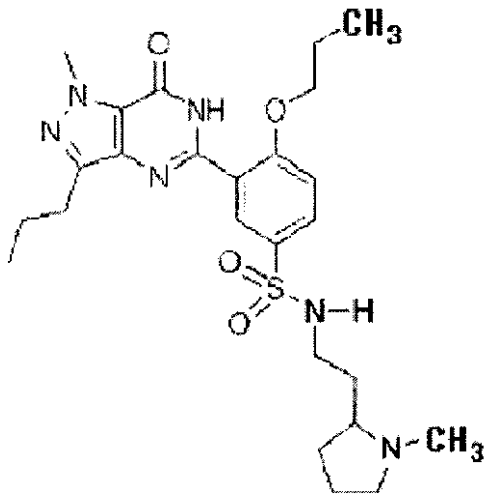


化学式 1

【請求項 2】

下記の化学式 1 で表されるピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む、肝硬変予防及び治療用医薬組成物。

【化 2】

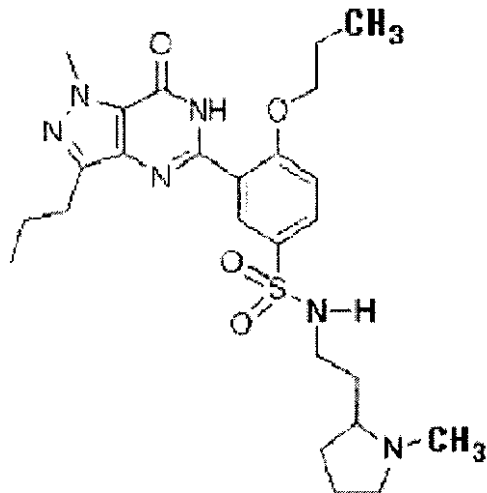


化学式 1

【請求項 3】

下記の化学式 1 で表されるピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む門脈圧亢進抑制剤。

【化 3】



化学式 1

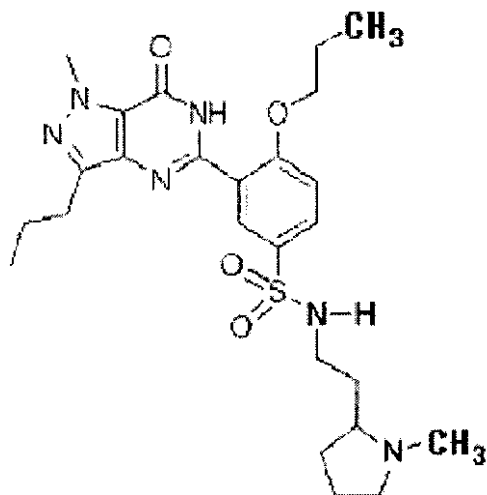
10

【請求項 4】

下記の化学式 1 で表されるピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む、門脈圧亢進症から誘発される合併症の予防及び治療用医薬組成物。

【化 4】

20



化学式 1

30

【請求項 5】

門脈圧亢進症から誘発される合併症が、食道静脈瘤、脾臓腫大及び脾機能亢進症、腹水症、特発性細菌性腹膜炎、肝腎症候群、肝性脳症または肝肺症候群からなる群から選択されるいずれか 1 つ以上であることを特徴とする、請求項 4 に記載の門脈圧亢進症から誘発される合併症の予防及び治療用医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む肝疾患の予防及び治療用医薬組成物、より詳細には、ピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む、肝線維化 (hepatic fibrosis)、肝線維化によって誘発される肝硬変、門脈圧亢進症及び門脈圧亢進症から誘発される多様な合併症の予防及び治療用医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

肝臓は、生体内のどの器官よりも生化学的に多様な機能を有している。それは生体内に

50

吸収された食物、薬物及びその他の外部物質等が通過する器官であり、すべての外部、内部の毒性物質を水溶性の形態に変化させて体外に排出する機能を有する。また肝臓は多くの臓器の代謝機能に関与する。さらに、肝組織はアルブミンなど人体に必須なタンパク質を合成して供給するなど、活性物質を生成及び処理する機能がある。このように肝臓はヒトの代謝機能を統括する極めて重要な器官であり、そこでは数多くの化学工程が起きている。現在確認されているだけでも500種類に及ぶ化学工程が短時間に遂行されていることが知られている。このような肝機能の大部分は、直径15～30ミクロンに過ぎない個々の肝細胞内で起きており、ヒトの肝臓にはこのような肝細胞がおおよそ2500億個存在することが明らかにされている。

【0003】

10

肝機能の中心的役割を担当する肝細胞が損傷を受けると、肝細胞の壊死が起きる。肝細胞は本来的に再生能力に優れており、壊死後再生されるが、このような壊死と再生が繰り返されると肝線維症が引き起こされ、その結果として肝硬変、門脈圧亢進症およびそれらから誘発される多くの合併症などの疾病が誘発される。

【0004】

このような一連の関連疾患は、肝線維化後に発症する。肝線維化は、肝臓に線維形成性物質であるコラーゲンが蓄積することにより起きる。肝臓の細胞は、肝細胞、類洞内皮細胞（SEC）、クッパー細胞、肝星細胞（HSC）から構成され、これら4種の細胞の中で肝線維化に最も重要な役割を演じるのが肝星細胞である（American Journal of Physiology. Gastrointestinal & Liver Physiology, 2000年, 第279（1）巻, G7）。肝星細胞は、肝臓の全細胞の約15%を占め、正常状態ではビタミンAの前駆体であるレチノイドを貯蔵する機能を有する。しかし、肝細胞が損傷を受けると、クッパー細胞が損傷した肝細胞を貪食して様々なサイトカイン（TGF-β、PDGF、FGF、HGF、PAF及びET-1）を分泌して星細胞を増殖させ、星細胞は筋線維芽細胞に分化する。筋線維芽細胞はコラーゲンを合成し、合成されたコラーゲンが細胞外基質に蓄積されて肝臓の線維化が起きる。これは、肝星細胞の活性化が肝線維化過程において必須であることを意味する。

20

【0005】

より具体的には、前記星細胞の活性化は、前炎症（pre-inflammatory）段階、炎症段階及び炎症後（post-inflammatory）段階の三段階で達成される。

30

【0006】

前炎症段階において、肝細胞の損傷は、星細胞増殖の刺激因子である傷ホルモン（wound hormone）の分泌や、細胞増殖阻害因子であるアルギナーゼの減少により肝星細胞を増殖させる。多くの場合、アルコールによるアセトアルデヒドや過酸化脂質の生成は、基質遺伝子の発現を促進する。

【0007】

炎症段階では、活性化したクッパー細胞及び血小板などから分泌されたサイトカイン（TGF-β、PDGF、FGF、HGF、PAF及びET-1）などによって肝星細胞が増殖し、線維細胞生成能力を有する筋線維芽細胞に分化する（Seminars in Liver Disease, 1996年, 第16（4）巻, 357頁、Journal of Hepatology, 1997年, 第26（6）巻, 1220頁）。

40

【0008】

炎症後段階では、完全に分化した前記筋線維芽細胞から様々なサイトカインや成長因子が分泌され、未分化の星細胞を活性化させるとともに、分化した筋線維芽細胞は多くの細胞外基質を分泌する。活性化し、星細胞から分化した筋線維芽細胞はコラーゲンを合成し、合成されたコラーゲンは細胞外基質に蓄積する。コラーゲンモノマーは、非常に不安定で生体温度で容易に分解し、分解したモノマーが重合して肝線維化が誘発される（American Journal of Physiology, 1993年, 第264（4 Pt 1）巻, G589頁）。

【0009】

肝硬変の原因は、持続的に蓄積された前記コラーゲンが重合して非水溶性線維に変化する

50

る肝線維化に起因する。肝硬変はまた、長期間の過度なアルコール摂取、肝炎、有毒物質への暴露などによって肝細胞の破壊、再生、瘢痕化などを伴う肝臓での持続的な炎症によっても誘発される。この結果、肝臓の大きさが減少し表面が凸凹になる。重篤な肝硬変は、門脈圧亢進症、出血（特に食道と胃の出血）、肝癌、老廃物蓄積による中毒、昏睡等の生命に脅威を与える合併症を誘発し得る深刻な疾病である。（N.Engl.J.Med.第350巻，1646～1654頁）。

【0010】

門脈圧亢進症は、肝星細胞の活性化、肝線維化及び肝硬変と密接な連関がある。肝星細胞の活性化により分化した筋線維芽細胞は、肝細胞の伸縮性低下を誘発し、それにより肝内血管抵抗（intrahepatic resistance）が増加するため、門脈圧亢進症が発生する。（Semin Liver Dis, 2001年，第21巻，337～349頁）。 10

【0011】

肝組織は、他の臓器とは異なり、二重に血流供給を受けることが特徴的であり、肝動脈を通じて酸素が豊富な動脈血が肝組織に流入し、肝門脈を通じて胃や腸で吸収された栄養分を含む静脈血が流入する。肝動脈を通じて400ml／分程度、門脈を通じて1200ml／分程度が流入するため、肝内部に流入する総血流量のうち、1／4が肝動脈を通り、残りの3／4が門脈を通る。

【0012】

門脈圧は、他の静脈圧と同様に動脈圧の1／10程度でしかないため、容易に血液循環に障害が生じ得る。持続的な炎症による肝細胞の損傷および再生の反復によって線維性物質が蓄積し、再生結節が形成される。再生結節が肝組織内の血液の通路を圧迫したり血管自体を締めつけたりすると、血液循環障害が発生する。門脈に流入する血液量は一定であるのに、血液循環障害によって肝臓を通過する血液量が減少すると、門脈圧が増加して門脈圧亢進を誘発する。また、門脈は逆流防止弁がない静脈であるため、血液循環障害による圧力増加によって血液の逆流が生じ得、相当量の血流が肝臓を通過することができずに迂回するようになる。その結果、消化管（特に食道及び胃腸）内に側副血管（collateral vessels）が発達するようになり、脾機能亢進症を誘発するようになる。側副血管は、食道の粘膜下、前側腹壁、直腸など低圧領域で発達し、胃と食道の静脈瘤、腹水、痔疾及び脾臓腫大などの症状が随伴する。 20

【0013】

門脈圧亢進症の最も多い合併症は食道静脈瘤であり、この静脈瘤の形成には少なくとも12mmHgの圧力が必要である。肝硬変患者の1／3程度が食道と胃に静脈瘤を有し、これは死因の約30％を占める（American Family Physician, 1997年，第55（5）巻，1851頁）。現在まで食道と胃の静脈瘤による出血に直接的に関与する因子について完全には理解されていないが、門脈圧亢進症の重篤度と静脈瘤の大きさが関連することが知られている（Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach, 1996）。 30

【0014】

従来、門脈圧亢進症を治療するために、門脈床（portal bed）への流れを減少させるべく脾臓摘出や門脈大静脈吻合術などの外科手術が試みられた。また、門脈圧亢進症のための医薬としては、急性静脈瘤出血時に使用されるバソプレッシン、ソマトスタチン、非特異的β-アドレナリン遮断薬、α-アドレナリン遮断薬及び硝酸塩製剤などが挙げられる。これらの医薬は、肝臓への動脈血流を減少させることにより、門脈圧を低下させる。その結果、すでに悪化している肝臓内部への全体的な門脈血流がさらに悪くなる。したがって、門脈圧を選択的に低下させることができる物質の開発が長年求められてきた。 40

【0015】

勃起不全治療剤の有効成分としてすでに知られているホスホジエステラーゼ5（以下「PDE5」と記す）阻害剤が、門脈圧亢進症及びその関連疾患に対しても有効であることが示された。

【0016】

例えば、PCT／EP2004／006014には、PDE5阻害剤の門脈圧亢進症の 50

予防及び治療への使用が記載されている。正確には、PDE5阻害剤であるシルデナフィル及びバルデナフィルが、門脈血管の直径及び門脈血液の流れを増加させることで、門脈血圧を低下させ、門脈圧亢進症及びその合併症の予防及び治療に効果を有する。

【0017】

しかし、門脈の弛緩は、必ずしも肝血流量増加及び門脈圧低下につながるものではなく、実際に特定のPDE5阻害剤が肝血流及び門脈圧に及ぼす影響を正確に予測することは不可能である。

【0018】

実験的肝硬変モデルでシルデナフィルが全身及び内臓の血行動態に及ぼす影響を調査した先行報告によれば、シルデナフィルは、平均動脈圧を低下させて全身性低血圧を誘発しながら、腸間膜血流及び門脈圧を用量依存的に増大させる (Liver International, 2004年, 第24(1)巻, 63頁、Digestive Disease Week, Abs S1553, 2003年)。したがって、前記研究では、シルデナフィルによる門脈圧の増大が出血合併症を起こし得るため、肝硬変患者にシルデナフィルを処方するには追加的な研究が必要であると結論づけている。

10

【0019】

また、肝硬変では局所的なNO過剰生成による内臓血管弛緩が観察される。ある報告によれば、シルデナフィルはNOの効果を増大させ、これにより腸間膜血管緊張性が減少し、門脈血流量が増加する (Liver International, 2004年, 第24(1)巻, 63頁、Digestive Disease Week, Abs S1553, 2003年)。

20

【0020】

一般的に、肝硬変、門脈圧亢進症などの肝疾患を有する患者では、肝の代謝能力が多かれ少なかれ減少しているため、薬剤の曲線下面積 (AUC; area under the concentration-time curve) 及び半減期が増加する (Alimentary Pharmacology Therapeutics, 2004年, 第20(1)巻, 29頁、Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 2003年, 第25(8)巻, 625頁)。

【0021】

それにもかかわらず、慢性肝疾患患者は、長期間の服用および多数の薬剤の処方を必要とする。患者が、半減期が短い薬剤を処方された場合、患者のコンプライアンスのレベルは低下し、効果的な治療が妨げられる。

30

【0022】

したがって、薬効が持続し、患者のコンプライアンスのレベルを高める慢性肝疾患治療剤を調製するための研究が試みられてきた。そして、合成ソマトスタチン類似体オクトレオチドを徐放製剤として1日1回投与した場合に、門脈圧低下効果が長期間維持されたことが報告された (Hepatology Research, 2001年, 第19(2)巻, 108頁)。さらに、肝門脈硬化症 (hepatoportal sclerosis) によって誘発された門脈高血圧マウスに徐放性ランレオチドを1日1回筋肉注射すると、末梢血管弛緩及び過剰な血液循環の発生が遅延し、門脈高血圧及び内臓鬱血、ならびに門脈体循環シャントを予防することができた (Journal of Hepatology, 1999年, 第31(3)巻, 482頁)。

【0023】

前記のような問題点を考慮すると、副作用を示すことなく肝血流量を増加させるとともに門脈圧を低下させ、かつ半減期が長くコンプライアンスを高めることができる新規な医薬を開発する必要性がある。

40

【0024】

本発明者等は、ピラゾロピリミジノン誘導体、5-[2-プロピルオキシ-5-(1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル)フェニル]-1-メチル-プロピル-1,6-ジヒドロ-7H-ピラゾロ(4,3-d)ピリミジン-7-オンという新規化合物を合成し、先行研究 (大韓民国登録特許第377,782号) でそのPDE5阻害効果について報告した。その後、本発明者等は、PDE5阻害剤である前記ピラゾロピリミジノンについて研究を継続遂行する中、前記ピラゾロピリミジノンがコラーゲン合成抑制

50

効果に優れ、門脈圧を低下させ、かつ半減期が長く、慢性肝疾患患者のコンプライアンスを高めることができることを確認して本発明を完成した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

本発明の目的は、ピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む肝疾患予防及び治療用医薬組成物を提供することにある。

【0026】

また、本発明の別の目的は、肝線維化抑制剤を提供することにある。

【0027】

さらに、本発明の他の目的は、肝線維化を抑制することで、肝硬変を予防及び治療する組成物を提供することにある。

【0028】

また、本発明の目的は、門脈圧亢進抑制剤を提供することにある。

【0029】

さらに、本発明の他の目的は、門脈圧亢進症の進行により発生する合併症の予防及び治療用医薬組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0030】

前記目的を達成するために、本発明は、ピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む、肝線維化、肝硬変、門脈圧亢進症及びそれによって誘発される合併症の予防及び治療用医薬組成物を提供する。

【0031】

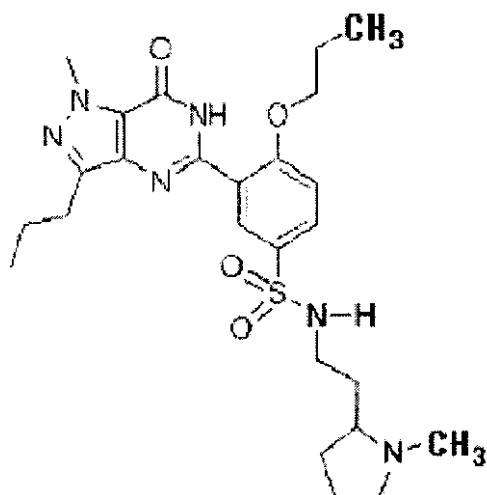
以下、本発明を詳しく説明する。

【0032】

本発明は、下記化学式1で表されるピラゾロピリミジノン誘導体（5-〔2-プロピルオキシ-5-（1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル）フェニル]-1-メチル-プロピル-1,6-ジヒドロ-7H-ピラゾロ（4,3-d）ピリミジン-7-オン：5-[2-propyloxy-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyloxyethylamidosulphonyl)phenyl]-1-methyl-propyl-1,6-dihydro-7H-pyrazolo(4,3-d)pyrimidin-7-one）を有効成分として含む、肝線維化、肝硬変及び門脈圧亢進症ならびにこれらによって誘発される合併症の予防及び治療用医薬組成物を提供する。

【0033】

【化1】



化学式 1

【0034】

ピラゾロピリミジノン誘導体は、PDE5阻害剤の一種である。PDE5阻害活性が強いとともに選択性が高い。ピラゾロピリミジノン誘導体は、溶解度が改善されており吸収が早く、高い生体利用率と大きな体内分布容積を有する。さらに、シルデナフィル及びバルデナフィルに比べて体内半減期が少なくとも3倍程度長いという特徴がある。

【0035】

ピラゾロピリミジノン誘導体の理化学的性質は次のとおりである。水には溶けにくい、酢酸、メタノール、クロロホルムにはよく溶けて、融点は158～161℃であり、 pK_{a1} 、 pK_{a2} 値はそれぞれ6.5及び12.5程度であり、水和物や溶媒化物ではない白色または淡黄色の粉末である。

【0036】

前記ピラゾロピリミジノン誘導体は、大きく3工程で合成される。これを概略的に見てみると下記のようになる。

【0037】

まず、第1工程では、4-[2-プロピルオキシ-5-(クロロスルホニル)ベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを製造する。この製造のために、一定量の4-[2-プロピルオキシベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを0℃に冷却した一定量のクロロスルホン酸の溶液に加え、その混合物を攪拌、ろ過、洗浄及び乾燥などの過程に供し、4-[2-プロピルオキシ-5-(クロロスルホニル)ベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを得る。

【0038】

第2工程では、前記第1工程で得たピラゾール化合物から、4-[2-プロピルオキシ-5-(1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル)ベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを製造する。この製造のために、0℃で、第1工程の一定量の4-[2-プロピルオキシ-5-(クロロスルホニル)ベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを含むジクロロメタン溶液に、一定量の2-(2-アミノエチル)-1-メチルピロリジンを加えて攪拌し、反応終了後、前記反応溶液をジクロロメタンで希釈して、その有機層を洗浄、乾燥、濃縮及びろ過などの過程に供し、4-[2-プロピルオキシ-5-(1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル)ベンズアミド]-1-メチル-3-プロピル-5-カルバモイルピラゾールを得る。

【0039】

第3工程では、前記第2工程で得た化合物から本発明のピラゾロピリミジノン誘導体である5-[2-プロピルオキシ-5-(1-メチル-2-ピロリジニルエチルアミドスルホニル)フェニル]-1-メチル-3-プロピル-1,6-ジヒドロ-7H-ピラゾロ(4,3-d)ピリミジン-7-オンを製造する。そのために、第2工程で合成した一定量のピラゾール化合物をトープタノールに溶解し、その溶液に一定量のカリウムトープトキシドを加えて一定時間還流する。反応完結後、反応液を冷却、希釈、洗浄、乾燥させ、その後、減圧蒸留、溶媒除去及びシリカゲルカラムクロマトグラフィーを遂行して一定量の本発明のピラゾロピリミジノン誘導体を得る。

【0040】

本発明は、肝疾患予防及び治療用医薬組成物に関するものであり、具体的には次のように説明することができる。

1) 本発明は、肝線維化抑制剤を提供する。2) また、本発明は肝線維化を抑制する肝硬変予防及び治療用医薬組成物を提供する。3) さらに、本発明は門脈圧亢進抑制剤を提供する。4) また、門脈圧亢進により誘発される合併症の予防及び治療用医薬組成物を提供する。

【0041】

肝星細胞でコラーゲン合成が増加して肝線維化が進行すると、線維質の間に残った肝細胞が肝機能を維持するために増殖し、それによって再生結節が形成される。このような線

10

20

30

40

50

維化と再生結節によって肝小葉の中心静脈の血管が圧迫されて門脈から肝臓への血液流入が塞がれるようになると、門脈圧亢進症が現れる。

【0042】

すなわち、肝線維化を抑制すると門脈圧を低下させることができ、門脈圧を低下させて門脈内の血流量が増加すると、肝の血流が改善して肝保護効果が現れる。

【0043】

このように、肝線維化および門脈圧の制御は、肝臓の保護と密接に関連している。本発明のピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む組成物は、肝星細胞でコラーゲン合成を抑制して肝線維化の進行を防止することができ、肝臓保護作用を示すと共に、門脈に直接作用して門脈圧を低下させ、門脈血流量を増加させるため、肝線維化及び門脈圧亢進症に関連する慢性肝疾患に卓越した治療効果を示す。

10

【0044】

本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、従来の他のPDE5阻害剤と比較して、コラーゲン合成抑制効果において10～16倍優れている。かかる優れた効果により、本発明のピラゾロピリミジン誘導体が、肝臓における肝星細胞でのコラーゲン合成による肝線維化を抑制し、肝臓を保護できることが確認された(表1参照)。また、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、濃度依存的に門脈圧を低下させるが、門脈径及び門脈内血流量を増大させる。したがって、例えば、門脈圧をむしろ増加させると報告されたシルデナフィルとは異なり、本発明のピラゾロピリミジン誘導体は、門脈圧亢進症及びそれにより誘発される多様な合併症の治療にも効果的に使用することができる(表2参照)。

20

【0045】

前記慢性肝疾患は、肝線維化の進行による肝硬変及び門脈圧亢進症から誘発される多様な合併症を含む(Rubin Farber Pathology, 1999年)。このような合併症の例としては、食道静脈瘤(American Family Physician, 1997年, 第55(5)巻, 1851頁)、脾臓腫大及び脾機能亢進症、腹水症、肝腎症候群(Gastroenterology, 第120巻, No. 3)、特発性細菌性腹膜炎(Curr Opinion In Gastroenterology, 2004年, 第20巻, 254-263頁)、肝肺症候群(Dig Dis Sci, 2003年, 第48巻, 556-560頁)、肝性脳症(Neuroreport, 2003年, 第14巻, 2379-2382頁)などを挙げることができる。これら合併症を具体的に詳しく見ると次のようである。

【0046】

食道静脈瘤は、食道や胃に異常な静脈ができることであり、悪化すると、この静脈が裂けて出血を起こすようになる。肝門脈圧の増加によって血液の流れが正常でなくなると、脾臓細胞の大きさが増加する脾臓腫大が発生し、これにより出血が生じることがある。腹水症は、胃腸外の腹腔内に水が溜まるもので、門脈圧の増加が血漿とリンパにおいて圧力を上昇させ、リンパ液の停滞が生じ、腹腔内に水分の流出を誘発する。患者の肺が腹水に押されて呼吸困難となり、長期化すると敗血症で死亡することもある。特発性(自発性(autogenous))細菌性腹膜炎も門脈圧の増加によって誘発され、胃や腸が裂けて内容物が流れ出たり外傷を負ったりした場合のように、先行原因がある腹膜炎(二次性腹膜炎)とは異なり、腹水を伴う患者においてしばしば発生する。肝腎症候群は、肝硬変によって腎臓機能が極端に低下した状態で、体液平衡がとれずに腎臓機能の低下が誘発される。肝肺症候群は、肝硬変などの慢性肝疾患を有する患者において、具体的な心疾患や肺疾患がないにもかかわらず低酸素症が起きる疾病である。肝性脳症は、肝硬変のように肝機能が低下した場合、体内有毒物質であるアンモニアを尿素に変換することができずに、神経系に影響が及び、悪化すると昏睡状態に陥って死亡することもある疾病である。

30

40

【0047】

前述のように、血液循環障害によって門脈の圧力が上昇すると、門脈で血液の逆流が起こり得、相当量の血流が肝臓を通過することができずに迂回するようになる。その結果、消化管内、例えば食道の粘膜下、前側腹壁、直腸など特に圧力が低い部位に側副血管が形成され、前記の合併症を誘発するようになる。結局、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、根本的に門脈圧の上昇を抑制することで、前記合併症の予防及び治療剤としても効

50

果的に使用することができる。

【0048】

本発明によるピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む予防及び治療用医薬組成物は、一般的な医薬製剤の形態で 사용할 ことができる。すなわち、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、経口及び非経口の様々な剤形で投与することができ、本発明では経口投与が好ましい。また、製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩解剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を使用して調剤することができる。

【0049】

経口投与のための固形製剤には、錠剤、丸薬、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれ得る。このような固形製剤は、ピラゾロピリミジノン誘導体に、1種または2種以上の賦形剤、例えば、デンプン、炭酸カルシウム、スクロースまたはラクトース、ゼラチンなどを混合して調剤される。また、単純な賦形剤以外に、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤も使用することができる。

【0050】

また、経口投与のための液状製剤としては、懸濁剤、液剤、乳剤、シロップ剤などが該当し、よく使用される単純な希釈剤である水、流動パラフィンなどのほか、様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味料、芳香剤、保存剤などが含まれ得る。非経口投与のための製剤には、滅菌水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、座薬が含まれる。非水性溶剤、懸濁溶剤としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルなどの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能なエステルなどが使用できる。座薬の基剤としては、ハードファット (witepsol)、マクロゴール、ツイーン (tween) 61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用され得る。

【0051】

本発明のピラゾロピリミジノン誘導体を有効成分として含む医薬組成物の有効な投与量または服用量は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食事、投与頻度、投与方法、排泄率及び疾患の重症度に応じてその範囲が多様であり、服用する場合、成人を基準に1日50～200mgを1回ないし数回(2～4回)に分けて服用することが好ましい。

【0052】

以下、本発明の好ましい態様を例によって詳しく説明する。但し、下記の例は本発明を例示するだけのものであって、本発明の内容が下記の例によって限定されるものではない。

【0053】

<例1>肝星細胞を使用したピラゾロピリミジノン誘導体のコラーゲン合成抑制効果の検討

本発明のピラゾロピリミジノン誘導体のコラーゲン合成抑制効果を調べるために、下記の実験を遂行した。

【0054】

Sprague Dawley系雄ラット(体重約300g、n=10)から肝星細胞を分離した。まず、ケタミンを腹腔内注射して全身麻酔した後、腹部を切開してヘパリンを門脈に注射し、次いで0.02%のプロナーゼ、0.015%のコラゲナーゼを含有するHank's緩衝液で肝臓を一定時間灌流し、肝臓を解体した。その後、肝臓を摘出して滅菌したペトリ皿上で破碎し、プロナーゼおよびDNaseを含有する緩衝液に浸漬し、滅菌したペトリ皿上でホモジナイズした。

【0055】

調製した試料を、50mlチューブに100μmのナイロンメッシュでろ過した後、50gで2分間遠心分離して上澄み液の非実質細胞を分離し、さらに4℃、450gで10分間遠心分離した。その後、沈殿物を25μg/mlの濃度でDNaseを含む緩衝液に十分浮遊させ、4℃、450gでの10分間の遠心分離を2回繰り返した。最終的な沈殿物を緩衝液21mlに浮遊させた後、25%のOptiPrep 17mlと混合し、最終的に1

10

20

30

40

50

1. 2%のOptiPrep溶液 (1.058 g/cm^3) を調製した。OptiPrepと混合した細胞浮遊液を、17%のOptiPrep 3 mlが入った15 mlチューブ4個に注意深く分注し、その上に緩衝液1 mlを添加した。4℃、1400 gで17分間遠心分離した後、緩衝液と11.8%のOptiPrepとの間のやや濁って見える層から純粋な肝星細胞を得た。

【0056】

分離した肝星細胞は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) に浮遊させて洗浄した後、10%のFBS (Fetal Bovine Serum) と抗生剤とを含むDMEMに再び浮遊させ、培養容器に接種して37℃、5%CO₂の培養器で培養した。培養液は最初24時間後に交換し、その後毎48時間ごとに交換して継代培養を実施した。

【0057】

8回継代した肝星細胞を 2×10^5 個ずつ分けた後、25 ng/mlのPDGF (Platelet Derived Growth Factor) で24時間前処理した。ここで、ピラゾロピリミジノン誘導体、シルデナフィル及びバルデナフィルを、0、3、5及び10 ng/mlの種々の濃度で添加して反応させた後、全RNAを集めてコラーゲンに対するRT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) を遂行した。

【0058】

β-アクチンに対する相対的な濃度を測定して、標的物質と他の試験物質との差を分析した。コラーゲン合成抑制効果は、試験物質を添加しなかった場合に比べてその合成を50%減少させる試験薬物の濃度 (Inhibitory Concentration 50%、IC₅₀) で評価した。その結果を表1に示す。

【0059】

【表1】

表1 PDE5阻害剤のコラーゲン合成抑制効果

	ピラゾロピリミジノン誘導体	シルデナフィル	バデナフィル
IC ₅₀ (nM)	0.8 ± 0.2 ^a	13.1 ± 2.3	7.8 ± 1.7
^a 平均 ± 標準偏差			

【0060】

表1に示したように、ピラゾロピリミジノン誘導体のIC₅₀は0.8±0.2nMであり、シルデナフィル及びバルデナフィルに比べてそれぞれ約16倍及び約10倍高いコラーゲン合成抑制効果が示された。したがって、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、他のPDE5阻害剤であるシルデナフィル及びバルデナフィルより、肝星細胞でのコラーゲン合成抑制効果が非常に優れており、コラーゲン合成過多による肝線維化の抑制効果及び肝保護効果が卓越していることを確認することができた。

【0061】

<例2> 肝線維化動物モデルを使用したピラゾロピリミジノン誘導体の肝保護効果の検討
本発明のピラゾロピリミジノン誘導体のコラーゲン合成抑制効果を生体内実験を通じて調べるために、下記の実験を行った。

【0062】

Sprague Dawley系雄ラット (体重約300 g) を4群 (5匹/群) に分けて、正常対照群を除いた残りの動物に次のように肝線維化を誘発した (Toxicology, 2001)。DMN (ジメチルニトロサミン) を3回/週の頻度で、連続して合計2週間、10 mg/kgの用量で腹腔内投与した。ピラゾロピリミジノン及びシルデナフィルは、DMN誘発期間の2週間、各々10 mg/kg/日の用量でトリアゾールバッファー (Merck) に溶解して経口投与し、溶媒対照群にはトリアゾールバッファーのみを投与した。試験終了後に肝臓を摘出して10%中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋し、4 μm間隔で切片を作製した。その後、切片をキシレンで処理してパラフィンを除去し、次いでアルコール及び0.1%過酸化水素 (H₂O₂) で処理した。PBSで処理した後、1:500に希釈したI型コラーゲンに対するポリクローナル抗血清 (Chemicon) および1:100に希釈したIII型コラーゲンに対するポリクローナル抗血清 (BioGenesis) で37℃にて1時間

10

20

30

40

50

処理した。洗浄後、標本を1：200に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGで処理した。免疫組織学的染色は、アビジン・ビオチン複合体（Vector Laboratories）と反応させた後、抗原抗体複合体を、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）で発色させ、光学顕微鏡を使用して撮影した。これを図1～4に示す。対照群は、一次抗体の代りに非免疫ウマ血清を使用した。

【0063】

図1～4に示したように、溶媒対照群の肝門脈領域および門脈周囲領域で正常動物に比べて著しいコラーゲンの合成が観察され、ピラゾロピリミジノン誘導体及びシルデナフィルによってコラーゲンの合成が低下したことを確認することができた。しかし、ピラゾロピリミジノン誘導体投与群では、シルデナフィル投与群に比べてコラーゲン合成の減少が明らかに大きかった。

【0064】

＜例3＞門脈圧亢進動物モデルを使用したピラゾロピリミジノン誘導体の効果の検討

本発明のピラゾロピリミジノン誘導体の門脈圧亢進に対する効果を調べるために、下記の実験を行った。

【0065】

体重約10kgのビーグル犬12頭を任意に4群（1群あたり3頭）に分け、胆管結紮術を施した。手術の2週間後に、ピラゾロピリミジノン、シルデナフィル、及びバルデナフィルを10mg/kg/日の用量で経口投与し、3頭は溶媒のみを投与した。その後、動物を4時間以上絶食させてからペントバルビタールを静脈投与して麻酔し、腸間膜静脈を通じて門脈まで挿管して門脈圧を測定した。

【0066】

また、ドップラー超音波検査（Doppler ultrasonography）により門脈の直径を測定し、門脈内の血流を下記の数式1で計算した。その結果を表2に示す。

【0067】

血流量 = $\pi R^2 \times V \times 60$ （R：門脈径/2、V：平均血流速度）…数式1

【0068】

【表2】

表2 ピラゾロピリミジノン誘導体の門脈圧亢進に対する効力

	溶媒 投与群	ピラゾロピリミジ ノン誘導体投与群	シルデナフィル 投与群	バデナフィル 投与群
門脈圧（kPa）	3.13 ± 0.31 ^a	2.50 ± 0.20 *	2.93 ± 0.25	2.87 ± 0.25
門脈直径（mm）	7.07 ± 0.15	7.70 ± 0.26	7.47 ± 0.21	7.43 ± 0.21
門脈内血流量（ml/分）	584.26 ± 159.97	932.31 ± 89.83 *	754.47 ± 80.24	729.29 ± 83.23
^a 平均 ± 標準偏差、* 統計学的有意性が見られる（p < 0.05）				

【0069】

表2に示したように、門脈圧は、溶媒投与群に比べてピラゾロピリミジノン誘導体投与群で21%、シルデナフィル投与群で7%、バルデナフィル投与群で9%程度低下することを確認した。門脈径は、ピラゾロピリミジノン誘導体、シルデナフィル及びバルデナフィル投与群で6～9%程度増加したが、薬物間で統計学的に有意な差異は観察されなかった。門脈内血流量は、溶媒投与群に比べてピラゾロピリミジノン誘導体投与群で約59.5%の顕著な増加を示し、シルデナフィル及びバルデナフィル投与群では各々29.1%及び24.8%程度増加することが確認された。

【0070】

したがって、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は他の薬物とは異なり、門脈圧を著しく低下させながら門脈内血流量を増加させることから、食道静脈瘤出血などの合併症な

しに門脈圧亢進症及びそれによる多様な合併症の治療に効果的に使用できることを確認した。

【0071】

＜例4＞ピラゾロピリミジノン誘導体のヒト体内薬物動態試験

門脈圧亢進症患者の中で19歳から45歳の間の年齢に属する志願者を対象にして、体重が45kg以上で理想体重（ideal body weight）の15%偏差以内にあり、自らの考えで参加を決めて書面同意し、試験者を信頼し、協力的であり、制限事項を順守する人を選定した。選定した患者を無作為に3群に分け、ピラゾロピリミジノン誘導体、シルデナフィル及びバルデナフィルをそれぞれ100、50及び10mgの用量で服用するようにした。参加者は9人で、そのうち3人はピラゾロピリミジノン誘導体、他の3人はシルデナフィル、残りの3人にはバルデナフィルを服用するようにした。

10

【0072】

試験は、二重盲検法で行い、試験当日午前8～9時頃に試験薬物を240mlの水とともに服用するようにした。服用後、4時間は禁食するようにし、4時間後に昼食、9時間後に夕食を標準食で提供した。採血は、服用当日試験薬物服用前、服用の0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、12、24及び32時間後に実施した。血漿を分離してHPLC法で分析した。血漿0.5mlに0.1M炭酸ナトリウム100μlとエチルエーテル1.0mlとを加えて1分間よく混合した後、12,000rpmで3分間遠心分離した。次いで上清を採取し、有機溶媒をスピードバック（speed vac）を使用して揮発させた後、移動相100μlを添加して攪拌し、HPLCの注入器に注入した。結果を表3に示す。

20

【0073】

【表3】

表3 門脈圧亢進症患者における、ピラゾロピリミジン、シルデナフィル及びバルデナフィルの半減期比較

	ピラゾロピリミジノン 誘導体 (100mg)	シルデナフィル (50mg)	バルデナフィル (10mg)
半減期（時間）	15.1 ± 3.5 ^a	4.5 ± 1.2	6.3 ± 2.1
^a 平均 ± 標準偏差			

30

【0074】

表3に示したように、ピラゾロピリミジノン誘導体の半減期は、15.1 ± 3.5時間で、シルデナフィル（4.5 ± 1.2）及びバルデナフィル（6.3 ± 2.1）の半減期に比べて、それぞれ3倍及び2倍以上長いことが示された。

【0075】

したがって、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、肝線維化抑制効果及び門脈圧亢進症治療効果が優秀なだけでなく、他のPDE5阻害剤に比べて半減期が長く、投薬回数を減少させることができるため、慢性肝疾患患者のコンプライアンスを大幅に改善できることが明らかとなった。

40

【0076】

下記に本発明の組成物の製剤例を例示する。

【0077】

＜製剤例＞経口投与のための薬学製剤の製造

1. 散剤の製造

ピラゾロピリミジノン誘導体 2g

乳糖 1g

前記の成分を混合し、気密袋に充填して散剤を製造した。

【0078】

50

2. 錠剤の製造

ピラゾロピリミジノン誘導体 100mg

トウモロコシデンプン 100mg

乳糖 100mg

ステアリン酸マグネシウム 2mg

前記の成分を混合した後、通常の錠剤の製造方法にしたがって打錠し、錠剤を製造した。

【0079】

3. カプセル剤の製造

ピラゾロピリミジノン誘導体 100mg

トウモロコシデンプン 100mg

乳糖 100mg

ステアリン酸マグネシウム 2mg

前記の成分を混合した後、通常のカプセル剤の製造方法にしたがってゼラチンカプセルに充填し、カプセル剤を製造した。

【産業上の利用可能性】

【0080】

本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、肝星細胞でのコラーゲン合成抑制効果に優れ、同時に門脈に直接作用し、門脈径及び門脈内血流量を増加させて門脈圧を減少させるため、肝線維化、肝線維化の進行による肝硬変及び門脈圧亢進症及びそれらから誘発される多様な合併症の予防及び治療に有用に使用することができる。また、本発明のピラゾロピリミジノン誘導体は、人体内半減期が長いため、服用回数を減らすことができ、慢性肝疾患患者のコンプライアンスを大幅に高めることができる。

【0081】

本明細書に記載した実施形態及び概念は、本発明と同じ目的で遂行される他の実施形態への変形または設計に容易に使用することができる。このような均等な実施形態は、本発明の技術的思想及び範囲から逸脱するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】本発明の例2による正常動物群におけるコラーゲン合成抑制効果を示す光学顕微鏡写真図である。

【図2】本発明の例2による溶媒対照群におけるコラーゲン合成抑制効果を示す光学顕微鏡写真図である。

【図3】本発明の例2によるシルデナフィル投与群におけるコラーゲン合成抑制効果を示す光学顕微鏡写真図である。

【図4】本発明の例2によるピラゾロピリミジノン誘導体投与群におけるコラーゲン合成抑制効果を示す光学顕微鏡写真図である。

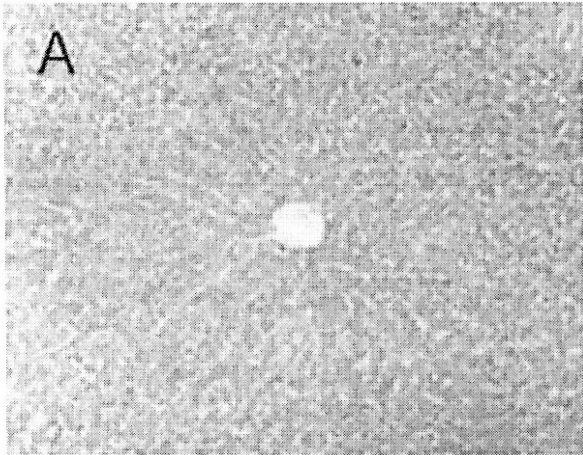
10

20

30

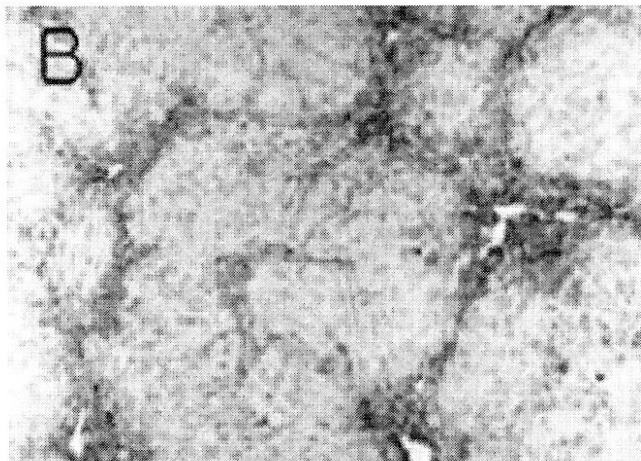
【図 1】

【図 1】



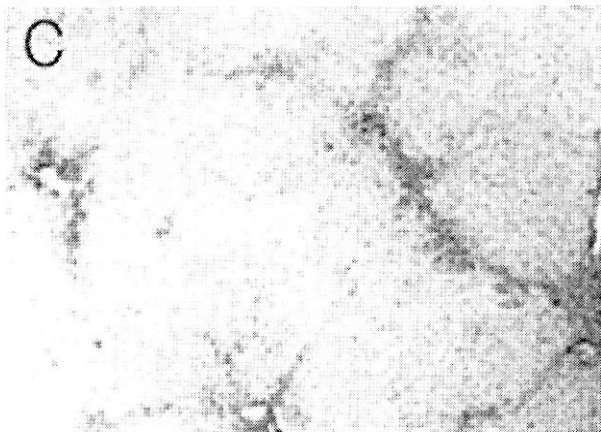
【図 2】

【図 2】



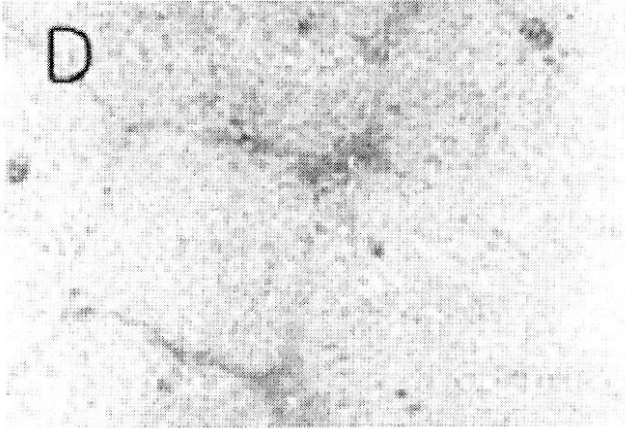
【図 3】

【図 3】



【図 4】

【図 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2005/003526
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 31/519(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/519		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975.		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN (Caslink)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A Y	KANG et. al. 'DA-8159, a potent cGMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats' In: Archives of pharmacal research, 2003, 26(8), p.612-619	1 - 2 3 - 5
A Y	KANG et. al. 'DA-8159, a new PDE5 inhibitor, attenuates the development of compensatory right ventricular hypertrophy in a rat model of pulmonary hypertension' In: Journal of international medical research, 2003, 31(6), p.517-528	1 - 2 3 - 5
A	WO 04108138 A1 (PFIZER INC.) 16 DEC. 2004, see entire document.	1 - 5
A	WO 04002461 A2 (PFIZER INC.) 08 JAN. 2004, see entire document.	1 - 5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 FEBRUARY 2006 (23.02.2006)		Date of mailing of the international search report 23 FEBRUARY 2006 (23.02.2006)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Jae Jeong Telephone No. 82-42-481-5604 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2005/003526

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 04108138 A1	16-12-2004	CA 2528975 AA US 2005049255 A1	16-12-2004 03-03-2005
WO 04002461 A2	08-01-2004	US 2004132731 A1 EP 1524996 A2	08-07-2004 27-04-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01) A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アーン, ビョン オク
大韓民国 キュンギード 449-813、ヨンジンシー、ポコkkerミョン、ヨンムンリー、バ
エムルーマエル 555 #102-201

(72)発明者 ヨー, ムーヒ
大韓民国 ソウル 135-241、カンナムーク、ガエポ 1ドン、ウースン 3チャ アパー
トメント #5-801

Fターム(参考) 4C050 AA01 BB05 CC08 EE04 FF02 GG03 HH04
4C086 AA01 AA02 CB06 NA14 ZA31 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81