

(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2007-536243

(P2007-536243A)

(43) 公表日 平成19年12月13日(2007. 12. 13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 1 8
A 6 1 P 3/06 (2006. 01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 31/4045 (2006. 01)	A 6 1 K 31/4045	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-511494 (P2007-511494)	(71) 出願人	506151486
(86) (22) 出願日	平成17年5月3日 (2005. 5. 3)		イリプサ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月28日 (2006. 11. 28)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 950
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/015281		51, サンタ クララ, セントラル
(87) 国際公開番号	W02005/112953		エクスプレスウェイ 3410
(87) 国際公開日	平成17年12月1日 (2005. 12. 1)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	10/838, 879		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年5月3日 (2004. 5. 3)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	シャルモ, ドミニク
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 950
			08, キャンベル, プレースブリッジ
			コート 1238
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホリパーゼ A₂ 阻害薬を用いた、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、心臓血管疾患の治療

(57) 【要約】

本発明は、高コレステロール血症や高トリグリセリド血症などの脂質代謝異常に関する疾患、およびアテローム性動脈硬化や冠状動脈疾患などの心臓血管疾患の、治療の方法を提示する。この方法は一般に、被験者が、肥満やインスリン抵抗性または糖尿病のうちいずれか1つまたは複数のリスクを有する群に、この被験者が属することを識別し、この被験者にホスホリパーゼ A₂ 阻害薬（ホスホリパーゼ A₂ 1B 阻害薬）の効果的な用量を投与することから成る。好ましいホスホリパーゼ A₂ 阻害薬は、インドール化合物またはインドール関連化合物、またはその塩などの、五員環と六員環を融合した部分を有する置換有機化合物から成る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者の高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、およびこれらの組合せのうちいずれかの疾患を治療する方法。この方法は、肥満やインスリン抵抗性または糖尿病のうちいずれか1つまたは複数のリスクを有する群に、被験者が属することを識別し、この被験者にホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量を投与することから成る。

【請求項 2】

被験者の血清中の非HDLコレステロールを調節する方法。この方法は、肥満やインスリン抵抗性または糖尿病のうちいずれか1つまたは複数のリスクを有する群に、被験者が属することを識別し、この被験者にホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量を投与することから成る。

10

【請求項 3】

被験者の血清中のトリグリセリドを調節する方法。この方法は、肥満やインスリン抵抗性または糖尿病のうちいずれか1つまたは複数のリスクを有する群に、被験者が属することを識別し、この被験者にホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量を投与することから成る。

【請求項 4】

被験者の疾患を治療するための薬として使用する薬剤の製造のため、ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の使用を含む方法。ここで被験者の疾患とは、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、およびこれらの組合せのうちいずれかの疾患であり、この被験者は、肥満やインスリン抵抗性または糖尿病のうちいずれか1つまたは複数のリスクを有する群に属する。

20

【請求項 5】

食べられる食品とホスホリパーゼ-A₂ IB阻害薬から成る食品製品組成。

【請求項 6】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が、五員環と六員環を融合した部分を有する置換有機化合物、またはその塩から成る、請求項1～5のいずれかの発明。

【請求項 7】

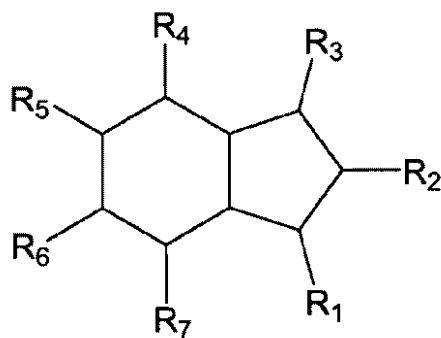
ホスホリパーゼ-A₂ IB阻害薬が、1つまたは複数のヘテロ原子を含む五員環と六員環を融合したもので、このヘテロ原子は、この五員環または六員環の環構造内、または五員環と六員環それぞれの環構造内にある、請求項1～5のいずれかの発明。

30

【請求項 8】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が、次の化学式に示される化合物、またはその塩から成る、請求項1～6のいずれかの発明。

【化 1】



40

ここでこの、五員環と六員環が融合したコア構造は飽和でも不飽和でもよく、R₁ ~ R₇ は次の群から独立して選択することができる： 水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、ハロゲン基、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換され

50

た置換基、およびこれらの組合せ。

【請求項 9】

$R_1 \sim R_7$ のうち独立して選択される2つの隣り合う置換基間に別の環をもつことができ、この追加環は五員環、六員環、七員環のいずれかを独立に選び、また炭素環、複素環、あるいはこの組合せにすることができる、請求項8の発明。

【請求項 10】

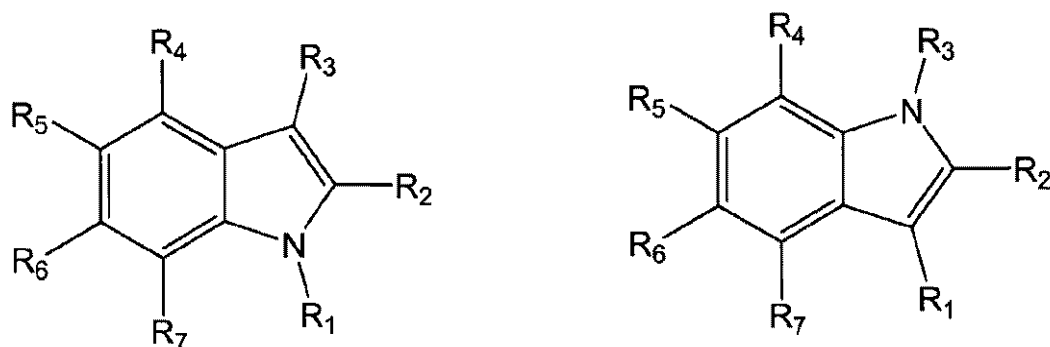
ホスホリパーゼ A_2 1B阻害薬が、インドール化合物、またはその塩から成る、請求項1~7のいずれかの発明。

【請求項 11】

ホスホリパーゼ A_2 1B阻害薬が、次の化学式に示すインドール化合物、またはその塩から成る、請求項1~5のいずれかの発明。

10

【化 2】



20

ここで、それぞれの化学式について、 $R_1 \sim R_7$ は次の基の中から独立に選択される： 水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。

【請求項 12】

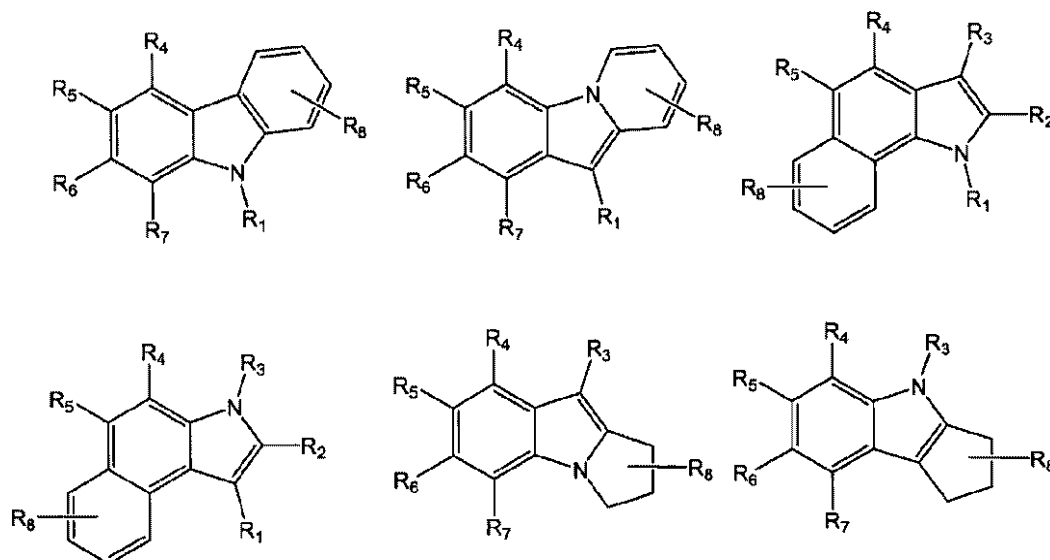
それぞれの化学式について、 $R_1 \sim R_7$ のうち独立して選択される2つの隣り合う置換基間に別の環をもつことができ、この追加環は五員環、六員環、七員環のいずれかを独立に選

30

【請求項 13】

阻害薬が、次の化学式のいずれかのインドール化合物から成る、請求項12の発明。

【化 3】



40

50

【請求項 14】

次の条件を満たす、請求項8、9、11～13のいずれかの発明。

R_1 は水素、酸素、イオウ、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、置換された置換基の中から選択される。

R_2 は水素、酸素、ハロゲン基、カルボニル基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基の中から選択される。

R_3 は水素、酸素、イオウ、アミン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基の中から選択される。

10

R_4 と R_5 はそれぞれ独立に、水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基の中から選択される。

R_6 は水素、酸素、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、酸基、アルキル基、炭素環基、アシルアミノ基、置換された置換基の中から選択される。

R_7 は水素、ハロゲン基、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基の中から選択される。

【請求項 15】

R_1 がアルキル基、炭素環基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～14のいずれかの発明。

20

【請求項 16】

R_2 がハロゲン基、アルキル基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～15のいずれかの発明。

【請求項 17】

R_3 がカルボニル基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～16のいずれかの発明。

【請求項 18】

R_4 と R_5 がそれぞれ独立に、酸素、水酸基(-OH)、酸基、アルキル基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～17のいずれかの発明。

【請求項 19】

30

R_6 がアミン基、酸基、アルキル基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～18のいずれかの発明。

【請求項 20】

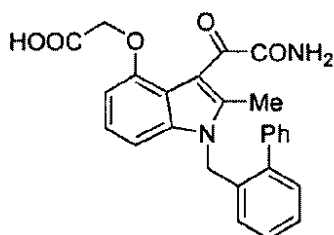
R_7 が炭素環基、置換された置換基のいずれかである、請求項8、9、11～19のいずれかの発明。

【請求項 21】

ホスホリパーゼ A_2 1B 阻害薬が、次の化学式に示される化合物、またはその塩である、請求項1～5のいずれかの発明。

【化 4】

40



【請求項 22】

ホスホリパーゼ A_2 1B 阻害薬が、投与後または飲食後に、消化器官管腔内に集中して留まる、前述の請求項のいずれかの発明。

50

【請求項 23】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が、消化器官粘膜からは吸収されないで、消化器官管腔内に集中して留まる、請求項21の発明。

【請求項 24】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が消化器官粘膜細胞にいったん吸収され、消化器官管腔内に排出されて戻されることにより、ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が集中消化器官管腔内に集中して留まる、請求項21の発明。

【請求項 25】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が、消化器官管腔内にある分泌ホスホリパーゼA₂ IBのカルシウム依存性の活性を阻害する、前述の請求項のいずれかの発明。

10

【請求項 26】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が、膵臓分泌ホスホリパーゼA₂ IBの活性を阻害する、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項 27】

疾患が高コレステロール血症である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 28】

疾患が高トリグリセリド血症である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 29】

疾患がアテローム性動脈硬化である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

20

【請求項 30】

疾患が冠状動脈疾患である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 31】

治療が予防的である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 32】

治療が臨床治療的である場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

30

【請求項 33】

被験者が2型糖尿病のリスクを有する群に属する場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 34】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が十二指腸に到達できるような方法によってホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が投与される、請求項1～3およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 35】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬が経口投与される場合の、請求項1～3およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

40

【請求項 36】

製剤が、効果的な用量のホスホリパーゼA₂ IB阻害薬から成る場合の、請求項4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 37】

食品製品組成が、効果的な用量のホスホリパーゼA₂ IB阻害薬から成る場合の、請求項5およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 38】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量が、ホスホリパーゼA₂ IB活性の少なくとも約30%を阻害するのに足る、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項 39】

50

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量が、ホスホリパーゼA₂ IB活性の少なくとも約40%を阻害するのに足る、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項40】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量が、ホスホリパーゼA₂ IB活性の少なくとも約50%を阻害するのに足る、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項41】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量が、ホスホリパーゼA₂ IB活性の少なくとも約60%を阻害するのに足る、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項42】

ホスホリパーゼA₂ IB阻害薬の効果的な用量が、ホスホリパーゼA₂ IB活性の約30%～約100%を阻害するのに足る、前述の請求項のいずれかの発明。 10

【請求項43】

被験動物が哺乳動物である、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項44】

被験動物が哺乳動物で、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコ、イヌ、家禽類、ブタ、ウシ、ウマのいずれかである、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項45】

被験動物がヒトである、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項46】

ホスホリパーゼA₂ 阻害薬が、リパーゼを基本的に阻害しない、前述の請求項のいずれかの発明。 20

【請求項47】

ホスホリパーゼA₂ 阻害薬が、ホスホリパーゼBを基本的に阻害しない、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項48】

ホスホリパーゼ阻害薬が、ホスホリパーゼA₂ の活性を阻害するけれども、リン脂質の代謝活性を有する他の消化器官ホスホリパーゼは基本的に阻害しない、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項49】

ホスホリパーゼ阻害薬が、ホスホリパーゼA₂ の活性を阻害するけれども、ホスファチジルコリンまたはホスファチジルエタノールアミンの代謝活性を有する他の消化器官ホスホリパーゼは基本的に阻害しない、前述の請求項のいずれかの発明。 30

【請求項50】

ホスホリパーゼ阻害薬が、ホスホリパーゼA₂ の活性を阻害するけれども、消化器官粘膜細胞に結合した他のホスホリパーゼは基本的に阻害しない、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項51】

被験者が、高脂肪高炭水化物食により誘発される肥満またはインスリン抵抗性のリスクを有する群に属する場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。 40

【請求項52】

被験者が、高脂肪高糖類食により誘発される肥満またはインスリン抵抗性のリスクを有する群に属する場合の、請求項1、4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項53】

被験者が心臓血管疾患のリスクを有する群にも属する場合の、請求項1～4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項54】

被験者が、高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食のいずれか1つあるいは組合せを摂っている場合の、請求項1～4およびそれらに依存する請求項のいずれかの発明。 50

【請求項 5 5】

食品製品組成が、高炭水化物食品、高糖類食品、高脂肪食品、高コレステロール食品のいずれか1つ、あるいは組合せから成る場合の、請求項5およびそれに依存する請求項のいずれかの発明。

【請求項 5 6】

ホスホリパーゼA₂ 阻害薬が、投与後または飲食後に、顕著な脂肪便を引き起こさない、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項 5 7】

ホスホリパーゼ阻害薬が、ピグアニド、チアゾリジンジオン、スタチン、フィブレート、エゼチミブ、サポニン、ニコチン酸、およびこれらの組合せのうち少なくとも1つと一緒に投与できる、前述の請求項のいずれかの発明。

10

【請求項 5 8】

ホスホリパーゼ阻害薬が、 α -グルコシダーゼ阻害薬、胆汁酸結合剤、脂肪結合剤、経口抗糖尿病薬、コレステロール輸送阻害薬、リパーゼ阻害薬、食欲抑制剤、およびこれらの組合せのうち少なくとも1つと一緒に投与できる、前述の請求項のいずれかの発明。

【請求項 5 9】

ホスホリパーゼ阻害薬が、これとかなり類似した治療効果を有する、ZetiaやOrlistatなど他の化合物または薬剤と一緒に投与できる、前述の請求項のいずれかの発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連申請

この特許申請は、共同所有共同申請の米国特許申請Serial No. 10/838,879 ("Phospholipase Inhibitors Localized in the Gastrointestinal Lumen", May 3, 2004年5月3日、Hui et al.により申請) に優先する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ホスホリパーゼは、膜の流動性安定性の調節、リン脂質の消化代謝、および炎症経路や血行調整その他の細胞プロセスに関連する細胞内メッセンジャーの生成など、さまざまな生化学的プロセスに重要な役割を果たす酵素群である。ホスホリパーゼは、選択的リン酸化、pH、細胞内カルシウム濃度などの、さまざまなメカニズムによって自己調節が行われている。ホスホリパーゼの活性を調整することによって、関連する生化学プロセスを調節するようにすることができ、この目的でこれまでに数多くのホスホリパーゼ阻害薬が開発されている。

30

【0003】

この分野では、数多くのホスホリパーゼ-A₂ (PL A₂ または PL A₂) 阻害薬が知られている。PL A₂ 阻害薬には例えば、小分子阻害薬やリン脂質類似体、遷移状態類似体化合物などがある。これら小分子阻害薬は、例えば、炎症状態に関連する適応のために開発されたものが多い。知られているホスホリパーゼ-A₂としては次のような例があり、この他にもあり得る：アルキノイル安息香酸、チオフエンカルボン酸、フランカルボン酸、ピリジンカルボン酸(例：US5086067を参照)、カルボン酸アミド誘導体(例：W09108737を参照)、アミノ酸エステルおよびアミド誘導体(例：W02002008189を参照)、アミノテトラゾール(例：US5968963を参照)、アリルオキシアシル チアゾール(例：W000034254を参照)、アゼチジノン(例：W09702242を参照)、ベンゼンスルホン酸誘導体(例：US5470882を参照)、安息香酸誘導体(例：JP08325154を参照)、ベンゾチオフエン(例：W002000641を参照)、ベンジルアルコール(例：US5124334を参照)、ベンジルフェニルピリミジン(例：W000027824を参照)、ベンジルアミン(例：US5039706を参照)、シナモン酸化合物(例：JP07252187を参照)、シナモン酸誘導体(例：US5578639を参照)、シクロヘプタインドール(例：W003016277を参照)、エタンアミンベンゼン、イミダゾリジノン、チアゾールジノン、

40

50

ピロリジノン (例: W003031414を参照)、インドールグリオキサミド (例: US5654326を参照)、インドールグリオキサミド (例: W09956752を参照)、インドール (例: US6630496 および W09943672を参照)、インドリ (例: W0003048122を参照)、インドリ含有スルホンアミド、N-シル-N-シナモニルエチレンジアミン誘導体 (例: W09603371を参照)、ナフィルアセトアミド (例: EP77927を参照)、N-置換グリシン (例: US 5298652を参照)、リン脂質誘導体 (例: US5144045およびUS6495596を参照)、ピペラジン (例: W003048139を参照)、ピリドンおよびピリミドン (例: W003086400を参照)、6-カルバモイルピコリン酸誘導体 (例: JP07224038を参照)、ステロイド、およびアミノ含有側鎖をもつ、ステロイドの環状炭化水素類似体 (例: W08702367を参照)、トリフルオロブタノン (例: US6350892およびUS 2002068722を参照)、アビエチン酸誘導体 (例: US4948813を参照)、ベンジルホスフィン酸エステル (例: US5504073)。

10

【 0 0 0 4 】

膵臓ホスホリパーゼA2 IB (PLA2) は、リン脂質の消化処理の役割を担っていると考えられている。例えばPLA2 IBは、ホスファチジルコリン(PC) を代謝により分解し、リソホスファチジルコリン (LPC) と遊離脂肪酸 (FFA) を反応生成物として生成する作用を有する酵素である。胆汁リン脂質が腸粘液内のコレステロール摂取を遅らせることと、PCの脂肪分解がコレステロール吸収のために必要な前準備であることが報告されている。(Rampone, A. J. and L. W. Long (1977). "The effect of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine on the absorption and mucosal metabolism of oleic acid and cholesterol in vitro." *Biochim Biophys Acta* 486(3): 500-10. Rampone, A. J. and C. M. Machida (1981). "Mode of action of lecithin in suppressing cholesterol absorption." *J Lipid Res* 22(5): 744-52)。さらに、ホスファチジルコリンがコレステロール吸収を遅らせるという事実は、ラットおよび人間に投与した研究でも明らかにされている。例えば、PLA2IB がコレステロール胆汁酸トリグリセリドの混合ミセル中で行うPCの代謝は、コレステロールを腸細胞に吸収するための最初の段階であることが報告されている。(Mackay, K., J. R. Starr, et al. (1997). "Phosphatidylcholine Hydrolysis Is Required for Pancreatic Cholesterol Esterase- and Phospholipase A2-facilitated Cholesterol Uptake into Intestinal Caco-2 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272(20): 13380-13389)。また、PLA2 IB活性は、リン脂質を含む小胞内における、膵臓リパーゼ/コリパーゼ媒介によるトリアシルグリセロール加水分解に必要であり、これも消化器官からのトリグリセリド吸収のために必要な前準備段階である。(Young, S. C. and D. Y. Hui (1999). "Pancreatic lipase/colipase-mediated triacylglycerol hydrolysis is required for cholesterol transport from lipid emulsions to intestinal cells." *Biochem J* 339 (Pt 3): 615-20)。PLA2IB阻害薬は、ラットを用いたリンパ瘻の実験で、コレステロール吸収を低下させることが示されている。(Homan, R. and B. R. Krause (1997). "Established and emerging strategies for inhibition of cholesterol absorption." *Current Pharmaceutical Design* 3(1): 29-44)。

20

30

【 0 0 0 5 】

また最近、遺伝子操作によりPLA2欠損 (PLA2 (-/-) マウス、またここではPLA2ノックアウトマウスとも呼ぶ) を用いた研究では、PLA2 (-/-) マウスに通常の食餌を与えたところ、そのコレステロール吸収効率と血漿中脂質濃度は野生型マウスPLA2(+/+) とほぼ同じであった。(Richmond, B. L., A. C. Boileau, et al. (2001). "Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice." *Gastroenterology* 120(5): 1193-202)。同じ研究で、PLA2 (-/-) 群では、膵臓PLA2活性がないにもかかわらず腸内PCが完全に加水分解されていたことも示された。この研究により、ホスホリパーゼ活性を有する1つまたは複数の他の酵素が、PLA2活性を補償し、リン脂質に触媒として作用しコレステロール吸収を促進していることが示された。この観察結果より、コレステロール吸収を鈍らせるためにこれまで投与されていたPLA2阻害薬 (例えば W0 96/01253 of Homan et al. 参照) は、おそらくPLA2に対して非選択的 (非特異性) であることが予想される。すなわち、これらの阻害薬は明らかに

40

50

、PLA2以外のホスホリパーゼ(例えばホスホリパーゼB)も阻害し、これら他の酵素がPLA2活性の欠乏を補おうとするのを阻んでいる。したがって、PLA2を阻害することは、コレステロール吸収の低下に必要ではあるが、通常の食餌を与えたマウスにおいてコレステロール吸収を低下させるにはこれだけでは充分ではないと結論づけられる。

【0006】

さらに、PLA2ノックアウトマウスを用いた別の研究では、高脂肪高コレステロール食餌を与えられたマウスにおいて、食餌による肥満と肥満によるインスリン抵抗性に対し、有益な影響があったことが報告されている。(Huggins, Boileau et al. 2002). 特に、野生型マウスとPLA2 (-/-) マウスを正常な食餌で管理した場合、体重増加には差が見られなかったことは、過去の研究報告(Richmond, Boileau et al. 2001)とも合致している。しかしながら、高脂肪高コレステロール食餌を投与した場合、野生型PLA2(+/+) マウスと比べると、PLA2 (-/-) マウスには、次のような結果が生じたことが報告されている：16週間で体重増加が減少し、一方野生型マウスでは脂肪が増加したため、体重の差が観察された；空腹時の血漿中レプチン濃度がかなり低下した；グルコース負荷耐性が向上した；高脂肪食餌によって起きるインスリン抵抗性に対する防御力が向上した。しかしながら、高脂肪高コレステロール食餌を投与した野生型PLA2(+/+) マウスとPLA2 (-/-) マウスにおいて、血漿中の遊離脂肪酸、コレステロール、トリグリセリド濃度については、明らかな差は見られなかった。PLA2(-/-) マウスでは便に含まれる脂肪量が増加していることが明らかになっているが、明白な脂肪便を起こしているわけではなく、脂肪吸収がやや減少しただけであることが示されている。

10

20

【0007】

米国で糖尿病を患う人は1820万人にのぼり、人口の6%以上を占めている。糖尿病とは、インスリンの生成または適切な利用ができなくなっている疾患である。2型糖尿病(別名非インスリン依存性糖尿病、NIDDM)は糖尿病と診断された患者の80~90%を占め、インスリン抵抗性により起こる。2型糖尿病におけるインスリン抵抗性とは、血漿中のインスリン濃度が正常~高値であるにもかかわらず、血中グルコース濃度を好ましい範囲に保つことができない状態である。

【0008】

肥満は、2型糖尿病の主要因のひとつであり、冠状血管心疾患、骨関節症、呼吸障害、一部の癌など、さまざまな疾患の要因にもなっている。体重増加を抑制しようとするさまざまな試みにもかかわらず、米国をはじめとする先進諸国では、肥満が常に、深刻な健康問題のひとつである。実際、米国の成人の60%以上が体重超過であると見なされ、医学的に肥満とされる人は約22%にのぼる。

30

【0009】

食べ物も、非HDLコレステロールなどの血漿中のコレステロール値を上げる要因となり、他の脂質関連の疾患にも寄与する。この脂質関連の疾患は、一般に脂質代謝異常と呼ばれ、高コレステロール血症や高トリグリセリド血症などさまざまな徴候を含む。非HDLコレステロールは、アテローム発生およびその続発症、すなわち動脈硬化や冠状動脈疾患、心筋梗塞、虚血性脳卒中などの心臓病を含む心臓血管疾患と密接な関係がある。これらを合わせると、先進諸国において予防可能な疾患の中で筆頭に挙げられる。実際米国では1200万人が冠状動脈疾患を有しており、高コレステロールで治療が必要な人は約3600万人にのぼると見積られている。

40

【0010】

高コレステロール血症患者では、LDLコレステロールを低くすることが治療の主目的となる。ヒドロキシメチルグルタリル-コエンザイムA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬(スタチン)が、血清中LDLコレステロール値を下げるのに使用されていることが報告されている。しかしながら、スタチン系薬剤の使用に関しては、肝不全や横紋筋融解(筋肉の病変)など重篤で命に関わり得る副作用が報告されている。最近では、コレステロール阻害薬として、単独投与またはスタチンとの併用で、エゼチミブが使用されるようになった。高トリグリセリド血症の患者では、血清中の高トリグリセリド濃度を下げるためにフィブレート

50

(ジェムフィブロジルなど) が使用されている。しかし、この薬を使用した患者の一部から消化器官の副作用が報告され、またスタチンとジェムフィブロジルを併用投与された一部患者で、明らかな筋炎が生じたことが報告されている。腎不全や肝不全、腎臓肝臓機能障害は、ジェムフィブロジル投与が相対禁忌となる。これは、同薬の約60～90%が腎臓で処理され、残ったものが肝臓で分解されると見られているためである。特に、高トリグリセリド血症は高コレステロール血症と深くリンクしている可能性がある。トリグリセリド濃度が400～1000mg/dlの患者は、LDLコレステロールも10～30%増加していることがある。高トリグリセリド血症でHDLコレステロールが低い患者に対しては、血清HDLコレステロールを高め、血清トリグリセリド濃度を低くするために、ニコチン酸が使用される。この主な副作用は、一部の患者に皮膚の紅潮が起こることである。(例えば一般には、Knopp, RH : Drug treatment of lipid disorders, New England Journal of Medicine 341:7 (1999) 498; Pasternak, RC et al: ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the use and safety of statins, Circulation 106 (2002) 1024; Grundy, SM et al: Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines, Circulation 110 (2004) 227を参照)。

10

【0011】

糖尿病や肥満、コレステロール関連疾患(一般的な脂質障害を含む)の罹患率が非常に高いにもかかわらず、これら疾患の治療には、副作用を減らすなどの改善アプローチが依然として必要とされている。ホスホリパーゼ阻害薬は、炎症関連適応ではさまざまなものについて数多くの評価研究が行われているが、肥満や糖尿病、コレステロール関連疾患(脂質代謝異常など)をはじめとする食物関連や代謝関連の適応への治療については、ホスホリパーゼA2阻害薬の効果を調べる研究はあまり行われていない。この点については特に、高脂肪高コレステロール食餌を与えた野生型PLA2(+/-) マウスおよびPLA2 (-/-) マウスで比べたin-vivo 研究の論文によれば、血漿中遊離脂肪酸、血漿中コレステロール、血漿中トリグリセリド濃度には、明らかな差は見られなかったことが報告されている。よってこれまでの報告では、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病のリスクを有する集団の患者に対する、ホスホリパーゼA2を使用した高コレステロール血症や高トリグリセリド血症の治療方法はまだ確立していない。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

30

【0012】

発明の概要

本発明は、インスリン関連疾患(糖尿病など)、体重関連疾患(肥満など)、コレステロール関連疾患など、ホスホリパーゼに関連した疾患の治療に有益なホスホリパーゼ阻害薬から成る、方法、組成、薬剤、食品、キットを提示する。

【0013】

本発明の第1の面は、被験者における高コレステロール血症や高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、これらの組み合わせから成る群の病状治療方法に関するものである。この方法は、被験者がまず、次のいずれのリスクを有する群に属するかを識別する：(i) 肥満、(ii) インスリン抵抗性、(iii) 糖尿病(2型糖尿病)、(iv) 食物関連の病状(例：食物が原因となって起こる病状、特に高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食などによる)、(v) これらの組合せ。次に、被験者に対するホスホリパーゼA2阻害薬(好ましくはホスホリパーゼA₂ IB 阻害薬)の効果的な量を投与する。

40

【0014】

本発明の第2の面は、被験者における血清中非HDLコレステロールを調整するための方法を示す。この方法は、被験者がまず、次のいずれのリスクを有する群に属するかを識別する：(i) 肥満、(ii) インスリン抵抗性、(iii) 糖尿病(2型糖尿病)、(iv) 食物関連の病状(例：食物が原因となって起こる病状、特に高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食などによる)、(v) これらの組合せ。次に、被験者に対するホスホリパー

50

ゼA₂阻害薬（好ましくはホスホリパーゼA₂ IB阻害薬）の効果的な量を投与する。

【0015】

本発明の第3の面は、被験者における血清中トリグリセリドを調整するための方法を示す。この方法は、被験者がまず、次のいずれのリスクを有する群に属するかを識別する：(i) 肥満、(ii) インスリン抵抗性、(iii) 糖尿病（2型糖尿病）、(iv) 食物関連の病状（例：食物が原因となって起こる病状、特に高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食などによる）、(v)これらの組合せ。次に、被験者に対するホスホリパーゼA₂阻害薬（好ましくはホスホリパーゼA₂ IB阻害薬）の効果的な量を投与する。

【0016】

本発明の第4の面は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、これらの組み合わせのいずれかを有する被験者の治療に用いる薬剤製薬に、ホスホリパーゼ-A₂阻害薬（好ましくはホスホリパーゼ-A₂ IB阻害薬）を使用することから成る方法に関連する。ここで被験者は、次のいずれかのリスクを有する群に属する：(i) 肥満、(ii) インスリン抵抗性、(iii) 糖尿病（2型糖尿病）、(iv) 食物関連の病状（例：食物が原因となって起こる病状、特に高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食などによる）、(v)これらの組合せ。

【0017】

本発明の第5の面は、食べられる食品とホスホリパーゼ-A₂阻害薬（好ましくはホスホリパーゼ-A₂ IB阻害薬）から成る食品製品に関するものである。いくつかの実施例において、この食品はビタミンサプリメントとホスホリパーゼ-A₂阻害薬から成る（あるいはこれらを主成分とする）ものにすることができる。

【0018】

本発明の実施例全般において、上記の第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、治療対象の病状には、高コレステロール血症または高トリグリセリド血症のいずれかを含めることができ、いくつかの実施例においてはこれら両方とも含まれる。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で使用することができる。

【0019】

本発明の実施例全般において、本発明の上記第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、被験者は食物関連の疾患のリスクを有する群に属すると識別され、その食物関連の疾患は少なくとも高炭水化物食または高糖類食のいずれか、さらに場合によっては高脂肪食や高コレステロール食も（さまざまな組合せで）組み合わせたものに関連している。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で使用することができる。

【0020】

本発明の実施例全般において、上記の第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、ホスホリパーゼ-A₂阻害薬は、五員環と六員環を融合したものから成る置換有機化合物（または置換有機化合物部分を含む）から成るものにすることができる。好ましい実施例において、この阻害薬は、五員環と六員環を融合したものから成る置換有機化合物（または置換有機化合物部分を含む）で、この五員環または六員環の環構造内、または五員環と六員環それぞれの環構造内に1つまたは複数のヘテロ原子（例えば窒素、酸素、イオウ）を含むものにし、この置換基によってこの化合物（または化合物部分）のホスホリパーゼ-A₂阻害機能が阻害されているものにすることができる。好ましい実施例において、ホスホリパーゼ-A₂阻害薬またはその阻害機能部分は、置換インドール部分などのインドール含有部分（ここではインドール、インドール化合物、インドール部分とも言及される）を有するものにすることができる。特に好ましいインドール化合物および部分が、ここで記述される。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で使用することができる。

【0021】

本発明の実施例全般において、上記の第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、

10

20

30

40

50

ホスホリパーゼ-A2阻害薬には管腔集中機能を持たせることができる。例えば、ホスホリパーゼ-A2阻害薬には、阻害薬に管腔集中機能をもたらすような化学的物理的性質を持たせることができる。このような実施例において好ましくは、ホスホリパーゼ阻害薬の約80%が消化管内に留まるような化学的または物理的性質を有し、さらに好ましくは、(それぞれ、被験者に阻害薬を投与後)ホスホリパーゼ阻害薬の少なくとも約90%が消化管内に留まるような化学的または物理的性質を有する。このような化学的物理的性質は、例えば、オリゴマー部分やポリマー部分、疎水性部分、親水性部分、荷電部分、およびこれらの組合せのうち、少なくとも1つを有する阻害薬によって実現できる。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で 사용할ことができる。

10

【0022】

本発明の実施例全般において、上記の第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、ホスホリパーゼ-A2阻害薬は、五員環と六員環を融合したものから成る置換有機化合物から成る、または主成分とするものにすることができる。いくつかの実施例においてホスホリパーゼ阻害薬は、五員環と六員環を融合したものを有する置換有機化合物部分から成り、その部分は非吸収性または吸収不能部分、好ましくは非吸収性または吸収不能のオリゴマー部分またはポリマー部分に結合している(共有結合、直接的結合、または結合部分を介した間接的結合など)。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で 사용할ことができる。

【0023】

本発明の実施例全般において、上記の第1～第5の面それぞれに関する実施例も含めて、ホスホリパーゼ-A₂阻害薬は、投与または摂取の後に顕著な脂肪便を引き起こさない。これら実施例はそれぞれ、上記および以下に述べられている他の面や実施例と、さまざまな特定の組合せや順序で 사용할ことができる。

20

【0024】

上記には、本発明のさまざまな面を要約してさまざまな機能が記載されているが、これらについて下記に述べる詳細は、制限なく、本発明のさまざまな面それぞれについて使用することができる。本発明の他の機能、目的、利点については、一部はこの分野の技能をもつ者には明らかであり、一部はここにおいて指摘される。簡略仕様に記載されている参照文献は、あらゆる目的について参照によってここに組み込まれる。さらに、この分野の技能をもつ者には、ここに公開または申請されている内容に関する特許文献および非特許文献として、この内容についてさらに詳しい手順説明を提供する関連文献が数多く存在する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

発明の明細

本発明は、ホスホリパーゼ阻害薬と、そのホスホリパーゼ阻害薬を構成する組成(製薬組成、薬剤、食品を含む)、その製剤薬剤食品の製造方法、およびそれらをさまざまな病状の治療薬として使用する方法を提示する。本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、詳細を下記に示すように、インスリン関連疾患(糖尿病など)、体重関連疾患(肥満など)、コレステロール関連疾患、およびこれらの組合せを含む、ホスホリパーゼに関連した数多くの疾患の治療において使用することができる。特に、ホスホリパーゼ-A2阻害薬(特に分泌されたカルシウム依存型ホスホリパーゼ阻害薬と、特にホスホリパーゼ-A2 1B阻害薬を含む)は、特定の被験者群で高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患のいずれかまたは複数を治療するのに有利に使用することができる。具体的には、これらのホスホリパーゼ-A2阻害薬は、(i)肥満、(ii)インスリン抵抗性、(iii)糖尿病(2型糖尿病)、(iv)食物関連の病状、(v)これらの組合せ、のリスクを有する群に属すると識別されている被験者の治療に用いられる。この状況での使用において、食物関連の病状とは、好ましくは、食べ物に関連した病状(食べ物が原因となって生じた病状)であり、高炭水化物食、高糖類食、高コレステロール食のいずれかまたは複数が含

40

50

まれる。好ましい実施例において、これらのホスホリパーゼ-A2阻害薬は高コレステロール血症および高トリグリセリド血症(いくつかの実施例ではこれら両方)の少なくとも一方を治療するのに用いられる。好ましい実施例において、食物関連の病状とは、好ましくは、高炭水化物食または高糖類食の少なくともいずれか1つに関連し、オプションとして高脂肪食や高コレステロール食も伴う。

【0026】

概要

本発明は、一面において、特に脂質代謝異常と呼ばれる病状(特定の患者における高コレステロール血症および高トリグリセリド血症)の治療方法から成る。この病状を有する患者は、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病(2型糖尿病など)、食物関連の病状のうちいずれか1つまたは複数について、高いリスクを有する。

10

【0027】

肝臓でのトリグリセリド合成は、存在する脂肪酸、貯蔵グリコーゲン、インスリン対グルカゴン比によって調節されている。高グルコース食の患者(例えば高炭水化物食や高糖類食のいずれかで、場合によってはこれに高脂肪食や高コレステロール食も伴う)、およびこのような食事を通常摂取していることが知られる群の患者は、過剰なインスリンレベルを維持するホルモンバランスが維持される傾向にあり、従ってグリコーゲン貯蔵が進む傾向にあり、これら両方によって肝臓トリグリセリド合成が進む。さらに、糖尿病患者は、体重超過であることが多く、メタボリック障害の観点からカロリー超過状態にあるため、特にこの状態になりやすい。ゆえに、本発明は特に、ここに説明される各実施例において、高トリグリセリド血症に対する治療の観点に注目する。

20

【0028】

本発明のホスホリパーゼA2阻害薬は、血清トリグリセリドおよび血清コレステロール値を調節することができる。本申請書には特に記載されていない理論に拘束されることなく、これらの調節作用は、複数のメカニズム経路によって起こる可能性がある。例えば、本発明のホスホリパーゼA2阻害薬は消化器官からのコレステロール吸収とトリグリセリド吸収を調節することができ、また例えばリソホスファチジルコリン(PLA2触媒によるホスファチジルコリンの加水分解生成物)などのシグナル分子を介して、脂肪とグルコースの代謝を調節することができる。ここでこのシグナル分子は、直接に作用するか、またはインスリンなどの他のホルモンと共に作用する。この代謝調節によって、被験者群(上記)に属する患者の血清コレステロール値と血清トリグリセリド濃度の両方に直接影響を与えることができる。特に、高二糖類食や高炭水化物食、高脂肪 / 高糖類食、高脂肪 / 高炭水化物食のいずれかを摂取している患者に有効である。この点に関して、VLDLは肝臓から末梢組織へと体内循環するために、肝臓によって製造されるリポタンパク質である。VLDLのコア部分にはトリグリセリド、コレステロール、ホスホリパーゼが含まれ、周辺部分にはアポリポタンパク質B100、C1、CII、CIII、Eが含まれる。VLDLの重量の半分以上はトリグリセリドであり、VLDLのサイズはトリグリセリドの量によって決まる。カロリーが過剰な状態や糖尿病、アルコール消費後は、過剰なトリグリセリドが存在するため、肝臓によって非常に大きなVLDLが分泌される。ホスホリパーゼA2活性の阻害により、例えば肝臓でのトリグリセリド合成などを含む、代謝の調節を行うことができる。トリグリセリド合成の調節(低下、あるいは少なくとも増加程度が比較的抑制)により、血清トリグリセリド濃度や血清コレステロール値の調節の基盤ができ、ひいては高トリグリセリド血症や高コレステロール血症の治療の基盤が得られる。この治療は特に、糖尿病患者(炭水化物の制限のため、脂肪の多い食事になることが多い)と高トリグリセリド血症患者(脂肪の代わりに高炭水化物食を摂ることが多い)の両方に有益である。この点について、多くの糖尿病患者や高トリグリセリド血症患者にとって、高タンパク食にするだけでは、通常、長期的に持続するのは難しい。

30

40

【0029】

さらに、血清トリグリセリド濃度の調節により、アテローム性動脈硬化などの心臓血管疾患にも有益な効果が得られる。肝臓でトリグリセリドをパッケージしたVLDLは循環血中

50

に放出され、リポプロテインリパーゼにより加水分解されて、VLDLレムナント (=IDL) に変換される。VLDLレムナントは肝臓に戻る(大きいものは優先的にこちらになる)か、またはLDL値を上昇させる。ゆえに、循環血中のVLDLが上昇するとHDL (コレステロールの逆輸送を行うはたらきがある)が下がる。高トリグリセリド血症によりLDL値の上昇とHDL値の低下が起こるため、高トリグリセリド血症は、アテローム性動脈硬化や冠状動脈疾患 (および上記のその他の疾患も含む)のリスクファクターとなっている。従って、本発明のホスホリパーゼA2阻害薬を用いた高トリグリセリド血状態の調節は、このような心臓血管疾患の治療の基盤ともなる。

【0030】

ホスホリパーゼ関連疾患の治療方法

10

高トリグリセリド血症および高コレステロール血症の治療のための好ましい実施例において、本発明の方法には、ホスホリパーゼ-A2活性の調節や消化器官粘膜からのホスホリパーゼ-A2吸収の調節、ホスホリパーゼによるリン脂質基質の酵素加水分解による生成物の生成や吸収の調節が含まれる。この方法は、インスリン関連疾患(糖尿病など)、体重関連疾患 (肥満など)、コレステロール関連疾患 (一般的な脂質代謝異常を含む)、これらの組合せを治療するため広く行われている他の治療例と、一緒に行うことで有益な結果が得られる。

【0031】

本発明は、被験動物治療のための方法、製薬組成、薬剤、キットを提示する。ここで「被験動物」とは、人間以外の哺乳類だけでなく、人間も含む。例えば哺乳動物としては、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコ、イヌ、ブタ、家禽類、ウシ、ウマ、これらの組合せの中から選ばれる。

20

【0032】

ここで使用される「治療」という語には、治療効果や予防的効果の達成が含まれる。治療効果とは、対象疾患の根本的治癒や状態改善を意味する。例えば、糖尿病患者における治療効果とは、糖尿病の根本的治癒または状態改善が含まれる。また治療効果は、元となっている疾患そのものはまだ残っていても、それに関連する生理学的症状を根本的に治癒または状態改善し、これにより患者の回復が見られるようにすることである。例えば、糖尿病でPL A₂ 活性を低下させると、インスリン抵抗性が補正されるだけでなく、疲労感や目のかすみ、手足の刺激感など糖尿病に伴うその他の症状を有する患者についても改善が見られ、治療上利益が得られる。予防的効果については、たとえ診断がついていなくとも、ホスホリパーゼ関連の病状(糖尿病、肥満、高コレステロール血症など)の高リスク患者や、これら病状の生理学的症状を訴える患者に対し、本発明のホスホリパーゼ阻害薬を投与することができる。

30

【0033】

いくつかの実施例において、本発明は、消化器官粘膜から吸収されず、またあるいは消化器官粘膜細胞からの流出の結果として消化器官管腔内に集中して留まることができるような、ホスホリパーゼ阻害薬を含む組成を提示する。

【0034】

好ましい実施例において、本発明のホスホリパーゼ阻害薬には、ホスホリパーゼ-A2活性を阻害することにより、1つまたは複数の病状の治療において、予防的効果と治療的効果のいずれか、または両方がある。

40

【0035】

いくつかの実施例において、治療される病状は食事によって生じたものである。すなわち、この病状は、食事によってもたらされ、加速し、悪化し、または影響を受けたものである。このような病状には例えば、糖尿病、体重増加、脂質代謝異常 (高脂血症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症など)、および派生疾患として知られる心臓血管疾患 (心臓病や脳卒中など)、高血圧、癌、睡眠時無呼吸、骨関節症、胆嚢疾患、脂肪肝、2型糖尿病、その他のインスリン関連疾患などがあり、これらに限られない。好ましい実施例において、これら病状の1つまたは複数は、高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、

50

高コレステロール食のいずれか1つまたは複数(一般的には単独で、あるいは欧米型食事としてのさまざまな組合せで)の摂取の結果生じることがある。ただし、いくつかの実施例において、治療する病状の1つまたは複数は、遺伝的原因や代謝異常、環境要因、行動要因、またはこれらの組合せによって生じることがある。

【0036】

欧米型食事と欧米型関連食事

一般に、本発明のいくつかの実施例は、高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食のいずれか1つあるいは複数の組合せに関連している。このような食事は全般に、ここにおいて「高リスク食」と呼ばれる(これには例えば、欧米型食事が含まれ得る)。このような食事は、肥満関連の病状やインスリン関連の病状、コレステロール関連の病状などを含む、1つまたは複数の病状について、被験患者のリスク条件を高めることがある。特に、こういった高リスク食は、いくつかの実施例において、少なくとも高炭水化物食を含み、これに高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食のいずれか1つまたは複数を伴う。高リスク食には、高糖類食に、高脂肪食と高コレステロール食のいずれか1つまたは両方を伴ったものも含まれる。高リスク食には、高脂肪食に高コレステロール食を伴ったものも含まれる。いくつかの実施例において、高リスク食には、高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食を組み合わせたものが含まれる。また他の実施例において、高リスク食には、高炭水化物食、高糖類食、高コレステロール食が含まれる。また他の実施例において、高リスク食には、高炭水化物食、高脂肪食、高コレステロール食が含まれる。また他の実施例において、高リスク食には、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食が含まれる。いくつかの実施例において、高リスク食には、高炭水化物食、高糖類食、高脂肪食、高コレステロール食が含まれる。

10

20

【0037】

一般に、被験者の食事は、合計カロリーの内容(例えば、一日の合計カロリー内容)から成る。いくつかの実施例において、被験者の食事は高脂肪食である。このような実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50%が脂肪によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20%が脂肪によるものである。いくつかの実施例において、高脂肪食に、高炭水化物食、高糖類食、高コレステロール食のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10%が脂肪によるものである。

30

【0038】

同様に、いくつかの実施例において、食事は高炭水化物食である。このような実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50%が炭水化物によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20%が炭水化物によるものである。いくつかの実施例において、高炭水化物食に、高脂肪食、高糖類食、高コレステロール食のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10%が炭水化物によるものである。

40

【0039】

さらに、いくつかの実施例において、食事は高糖類食である。実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50%が糖類によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20%が糖類によるものである。いくつかの実施例において、高糖類食に、高脂肪食、高炭水化物食、高コレステロール食のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10%が糖類によるものである。

【0040】

同様に、いくつかの実施例において、食事は高コレステロール食である。このような実施例において、食事は少なくとも約1%のコレステロール(wt/wt、脂肪に対する割合)を

50

含む。この他の実施例において、食事には少なくとも約0.5 %、または少なくとも約0.3 %、または少なくとも約0.1 %、または少なくとも約0.07 %のコレステロール (wt/wt、脂肪に対する割合) が含まれる。いくつかの実施例において、高コレステロール食に、高脂肪食、高炭水化物食、高糖類食のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、食事には少なくとも約0.05 %、または少なくとも約0.03 % (wt/wt、脂肪に対する割合) のコレステロールが含まれる。

【0041】

一例として、高脂肪食には例えば、肉、乳製品、アルコールを多く含み、また加工食品や牛肉羊肉、炭酸飲料、菓子類、精白した穀物、デザート、高脂肪乳製品などが含まれ、このとき脂肪由来のカロリーは少なくとも25%で飽和脂肪由来のカロリーは少なくとも約8 %、または、脂肪由来のカロリーは少なくとも30%で飽和脂肪由来のカロリーは少なくとも約10%、または、脂肪由来のカロリーは少なくとも34%で飽和脂肪由来のカロリーは少なくとも約12%、または、脂肪由来のカロリーは少なくとも42%で飽和脂肪由来のカロリーは少なくとも約15%、または、脂肪由来のカロリーは少なくとも50%で飽和脂肪由来のカロリーは少なくとも約20%である。このような高脂肪食のひとつが「欧米型食事」であり、これは例えば、典型的なアメリカ型食事や西ヨーロッパ型食事、オーストラリア型食事、日本型食事など、先進工業国の食事を指す。欧米型食事の典型的な例としては例えば、脂肪が少なくとも約17%でコレステロールが少なくとも約0.1%(wt/wt)、または脂肪が少なくとも約21%でコレステロールが少なくとも約0.15% (wt/wt)、または脂肪が少なくとも約25%でコレステロールが少なくとも約0.2%(wt/wt) の食事が挙げられる。

【0042】

このような高リスク食には、1つまたは複数の高リスク食品が含まれていることがある。
食品の使用される条件を検討し、一般に、本発明のいくつかの実施例は、高炭水化物食品、高糖類食品、高脂肪食品、高コレステロール食品のいずれか1つあるいは複数の組合せに関連している。このような食品は全般に、ここにおいて「高リスク食品」と呼ばれる (これには例えば、欧米型食品が含まれ得る)。このような食品は、肥満関連の病状やインスリン関連の病状、コレステロール関連の病状などを含む、1つまたは複数の病状について、被験患者のリスク条件を高めることがある。特に、こういった高リスク食品は、いくつかの実施例において、少なくとも高炭水化物食品を含み、これに高糖類食品、高脂肪食品、高コレステロール食品のいずれか1つまたは複数を伴う。高リスク食品には、高糖類食品に、高脂肪食品と高コレステロール食品のいずれか1つまたは両方を伴ったものも含まれる。高リスク食品には、高脂肪食品に高コレステロール食品を伴ったものも含まれる。いくつかの実施例において、高リスク食品には、高炭水化物食品、高糖類食品、高脂肪食品を組み合わせたものが含まれる。また他の実施例において、高リスク食品には、高炭水化物食品、高糖類食品、高コレステロール食品が含まれる。また他の実施例において、高リスク食品には、高炭水化物食品、高脂肪食品、高コレステロール食品が含まれる。また他の実施例において、高リスク食品には、高糖類食品、高脂肪食品、高コレステロール食品が含まれる。いくつかの実施例において、高リスク食品には、高炭水化物食品、高糖類食品、高脂肪食品、高コレステロール食品が含まれる。

【0043】

ここで、食品の組成は食品の合計カロリー内容から成る。いくつかの実施例において、食品は高脂肪食品である。このような実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50 % が脂肪によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20 % が脂肪によるものである。いくつかの実施例において、高脂肪食品に、高炭水化物食品、高糖類食品、高コレステロール食品のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10% が脂肪によるものである。

【0044】

10

20

30

40

50

同様に、いくつかの実施例において、食品は高炭水化物食品である。このような実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50%が炭水化物によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20%が炭水化物によるものである。いくつかの実施例において、高炭水化物食品に、高脂肪食品、高糖類食品、高コレステロール食品のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10%が炭水化物によるものである。

【0045】

さらに、いくつかの実施例において、食品は高糖類食品である。このような実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約50%が糖類によるものである。またこの他の実施例において、合計カロリー内容の少なくとも約40%、または少なくとも約30%、または少なくとも約25%、または少なくとも約20%が糖類によるものである。いくつかの実施例において、高糖類食品に、高脂肪食品、高炭水化物食品、高コレステロール食品のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、合計カロリー内容の少なくとも約15%、または少なくとも約10%が糖類によるものである。

10

【0046】

同様に、いくつかの実施例において、食品は高コレステロール食品である。このような実施例において、食品は少なくとも約1%のコレステロール (wt/wt、脂肪に対する割合) を含む。この他の実施例において、食品には少なくとも約0.5%、または少なくとも約0.3%、または少なくとも約0.1%、または少なくとも約0.07%のコレステロール (wt/wt、脂肪に対する割合) が含まれる。いくつかの実施例において、高コレステロール食品に、高脂肪食品、高炭水化物食品、高糖類食品のいずれか1つまたは複数を組み合わせた場合において、食品には少なくとも約0.05%、または少なくとも約0.03% (wt/wt、脂肪に対する割合) のコレステロールが含まれる。

20

【0047】

上記のように、本発明の方法は、インスリン関連疾患、体重関連疾患、コレステロール関連疾患 (一般的な脂質代謝異常を含む)、これらの組合せを治療するため広く行われている他の治療例と、一緒に行うことで有益な結果が得られる。これら病状の各側面について下記に記載する。

【0048】

30

インスリン関連疾患の治療

ここで用いられる「インスリン関連疾患」という語は、身体のインスリン生成やインスリン使用が適切でない、糖尿病などの病状を指す。典型的には、前糖尿病状態または糖尿病の診断は、空腹時血漿グルコース検査 (FPG) や経口グルコース負荷試験 (OGTT) により行われる。FPG検査の場合、空腹時の血中グルコース濃度が約100~125mg/dlが前糖尿病状態、空腹時の血中グルコース濃度が約126 mg/dl以上の場合が糖尿病であることを示す。OGTT試験では、患者の空腹時の血中グルコース濃度と、グルコースを多量に含んだ飲物を飲んで2時間後の血中グルコース濃度を測定する。2時間後の血液グルコース濃度が約140~199mg/dlが前糖尿病状態、2時間後の血液グルコース濃度が約200 mg/dl以上の場合が糖尿病であることを示す。

40

【0049】

特定の実施例において、本発明の、管腔集中型ホスホリパーゼ阻害薬は、例えば糖尿病 (好ましくは2型糖尿病) などのインスリン関連疾患の治療に有益である。この利点としては例えば、インスリン感受性の増加とグルコース負荷耐性の改善が挙げられ、この他にもあり得る。他の利点としては、空腹時血中インスリン濃度の低下、組織内グルコース濃度の上昇、インスリン刺激によるグルコース代謝の増加などがあり得る。

【0050】

これらの利点は、特定の仮説に限定されることなく、PLA₂ 活性の低下によって得られる数多くの効果によってもたらされたものであり、例えば消化器官粘膜を介したリン脂質の膜輸送の減少や、1-アシルリソリン脂質 (1-アシルリソホスファチジルコリンなど) の

50

生成減少や輸送減少などがある。ここで1-アシルリソホスファチジルコリンは、糖尿病などのインスリン関連疾患における二次的経路で、シグナル分子としてはたらくことがある。

いくつかの実施例において、管腔集中型のホスホリパーゼ阻害薬は、ホスホリパーゼA2を阻害するのに使用されるが、ホスホリパーゼBを阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬はホスホリパーゼA2を阻害するが、他の消化器官内ホスホリパーゼは阻害しない。すなわち、ホスホリパーゼA1を阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。また、ホスホリパーゼBを阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。

10

【0051】

体重関連疾患の治療

ここで用いられる「体重関連疾患」という語は、望ましくない体重超過や肥満、高脂血症状態を指し、特に高脂肪食や欧米型食事によって生じた体重増加を指す。通常、体重超過あるいは肥満であるかどうかの判定基準には、ボディマス指数 (BMI) が使用される。例えば成人の場合、BMIが約25以上の場合に体重超過、約30以上の場合に肥満と見なされる。子供の場合は、年齢ボディマス指数表が使用され、BMIが約85パーセントイルを超える場合は「体重超過の危険」、約95パーセントイルを超える場合は「肥満」と見なされる。

【0052】

特定の実施例において、本発明の、管腔集中型ホスホリパーゼA2阻害薬は、望ましくない体重超過や肥満などの体重関連疾患の治療に用いることができる。特定の実施例において、管腔集中型ホスホリパーゼA2阻害薬は、典型的な欧米型食事後の脂質吸収を低下させる。特定の実施例において、管腔集中型ホスホリパーゼA2阻害薬は、典型的な欧米型食事を摂取している被験者の脂肪排泄を増加させる。特定の好ましい実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は、(典型的な)欧米型食事を摂取している被験者の体重増加を低下させる。特定の実施例において、本発明の適用により、特定の組織や器官の重量増加を優先的に減らすことができる。例えば、いくつかの実施例においてホスホリパーゼA2阻害薬は、欧米型食事を摂取している被験者の白色脂肪の重量増加を減らすことができる。

20

【0053】

これらの利点は、特定の仮説に限定されることなく、PLA₂ 活性の低下によって得られる数多くの効果によってもたらされたものである。例えば、PL A₂ 活性の阻害により、消化器官管腔 (例えば小腸粘膜) を介したリン脂質の輸送を減少させることができ、これにより、特に高脂肪食を与えられている哺乳動物において、腸細胞でリン脂質蓄積 (ホスファチジルコリンなど) の消費が起こる。このような場合、リン脂質の新たな合成は、トリグリセリドをキロミクロンとして運搬するために必要なリン脂質 (例えばホスファチジルコリン) の高い回転率を維持するには充分ではない場合があり (Tso, in Fat Absorption, 1986, chapt.6 177-195, Kuksis A., Ed. を参照)、参照によってここに組み込まれる。PL A₂ 阻害によって、1-アシルリソリン脂質 (1-アシルリソホスファチジルコリンなど) の生成も抑制されることがある。この1-アシルリソリン脂質は、セクリチンなどの消化酵素やホルモンを放出するなど、脂肪吸収の上方調節経路においてシグナル分子としてはたらく可能性がある。これについてはHuggins, Protection against diet-induced obesity and obesity-related insulin resistance in Group 1B- PL A₂ -deficient mice, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283:E994-E1001 (2002) に記載されており、参照によってここに組み込まれる。

30

【0054】

本発明の他の一面として、体重増加による食事誘発性糖尿病の発症を低下または遅らせるための組成、キット、方法が提示される。制限のない高脂肪食により、体重増加だけでなく、糖尿病性のインスリン抵抗性も増大し得る。この抵抗性は、被験者においてインスリン濃度とレプチン濃度が低下していることによって認識されることがある。ここに公開

40

50

されるホスホリパーゼ阻害薬、組成、キット、方法は、食事による糖尿病や、その他のインスリン関連疾患（欧米型食事を摂取している被験者でのインスリン濃度やレプチン濃度の低下）の予防的治療に用いることができる。

【0055】

いくつかの実施例において、管腔集中型のホスホリパーゼ阻害薬は、ホスホリパーゼA2を阻害するのに使用されるが、ホスホリパーゼBを阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬はホスホリパーゼA2を阻害するが、他の消化器官内ホスホリパーゼは阻害しない。すなわち、ホスホリパーゼA1を阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。また、ホスホリパーゼBを阻害することではなく、または顕著に阻害することではなく、または基本的に阻害することはない。

10

【0056】

コレステロール関連疾患の治療

ここで用いられる「コレステロール関連疾患」という語は、HMG-CoAリダクターゼ活性の調節または生成の調節が望ましい状態で、またはHMG-CoAリダクターゼの生成物の影響を調節することが望ましい状態で、いずれの場合にも一般的に、脂質代謝異常を含むことがあるような状態を指す。好ましい実施例において、本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、HMG-CoAリダクターゼの活性あるいは生成を低下させ、またはHMG-CoAリダクターゼの生成物の影響を低下させる。例えば、コレステロール関連疾患には、コレステロール値の上昇、特に血漿中の非HDLコレステロール値の上昇(LDLコレステロール値やVLDL/LDL値の上昇)が含まれ得る。通常、コレステロール値が高いとされる基準にはさまざまあり、例えばPearlman BL, The New Cholesterol Guidelines, Postgrad Med, 2002; 112(2):13-26に記載されており、参照によりここに組み込まれる。ガイドラインとしては、HDL値と比較したLDL値など、血清中の脂肪プロファイルがある。

20

【0057】

コレステロール関連疾患の例としては、高コレステロール血症、アテローム発生およびその続発症である心臓血管疾患（アテローム性動脈硬化を含む）、その他の血管炎症、心筋梗塞、虚血性脳卒中、閉塞性脳卒中、末梢血管疾患、その他、コレステロールの低下により利益が得られるような疾患が含まれる。

【0058】

本発明の組成、キット、方法で治療が可能なその他のコレステロール関連疾患としては、現在スタチン系薬剤で治療されている疾患や、その他、コレステロール吸収の低減によって利益が得られるような疾患が含まれる。

30

【0059】

特定の実施例において、本発明の、管腔集中型ホスホリパーゼA2阻害薬は、コレステロール値の低下、特に血漿中非HDLコレステロール値の低下、および高トリグリセリド血症の治療に用いることができる。

【0060】

いくつかの好ましい実施例において、この組成はホスホリパーゼA2と、ホスホリパーゼA2に加えて他の消化器官内ホスホリパーゼを少なくとも1つ（好ましくはホスホリパーゼB、またはホスホリパーゼA1、ホスホリパーゼC、ホスホリパーゼDなど）阻害することができる。

40

【0061】

本発明の他の実施例において、各種ホスホリパーゼに対する活性の差を利用することによって、他のホスホリパーゼ阻害によって生じる好ましくない副作用を起こさずに、特定のホスホリパーゼ関連疾患を治療することができる。例えば、特定の実施例において、PLA₂を阻害するけれどもPLA₁やPLB、PLC、PLDなどを阻害しない、または顕著に阻害することはない、または基本的に阻害しないようなホスホリパーゼ阻害薬は、インスリン関連疾患（糖尿病など）や体重関連疾患（肥満など）の治療に使用することができ、このときにホスホリパーゼ阻害治療を受けている被験者（被験者が高脂肪食を摂取中の場合など）

50

のコレステロール吸収に影響を与えず、または顕著には影響を与えず、または基本的には影響を与えない。

【0062】

ここに公開されるホスホリパーゼ阻害薬、方法、キットは、ホスホリパーゼ関連疾患の治療に用いることができる。いくつかの好ましい実施例において、この治療の効果は、被験者の食事や活動に変化をもたらすことなく実現することができる。例えば、消化器官内のPL A₂ 活性が阻害されることにより、欧米型食事を摂る被験者は、PL A₂ 阻害薬治療を受けていない被験者に比べて、脂肪吸収が低下し、あるいは体重増加が減る可能性がある。さらに好ましくは、被験者のエネルギー消費量や食物摂取に変化、あるいは顕著な変化、あるいは基本的な変化がないままに、そして被験者の体温に変化、あるいは顕著な変化、あるいは基本的な変化がないままに、この脂肪吸収体重増加の低下が起こる。さらに、好ましい実施例において、本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、非高脂肪食の代謝に対する正常状態に影響を与えることなく、高脂肪食の特定の有害な結果を相殺するために使用することができる。

10

【0063】

本発明には、ホスホリパーゼ関連疾患の治療に用いることができるキットも含まれる。このホスホリパーゼ関連疾患は、好ましくはホスホリパーゼA2関連疾患や、食事によって起こるホスホリパーゼ関連疾患（例えばインスリン関連疾患（糖尿病、特に2型糖尿病など）や体重関連疾患（肥満など）、コレステロール関連疾患などを含みこれらに限定されない）が含まれる。このキットは、本発明の組成が少なくとも1種類と、ここに記載されているさまざまな方法に従った使用説明書から成る。

20

【0064】

阻害薬の調剤、投与経路、効果的な用量

本発明に役立つホスホリパーゼ阻害薬、または薬学的に受容できるこれらの塩は、さまざまな投与経路や方法を使って患者に投与することができる。「薬学的に受容できる塩」とは、本発明の化合物の生物学的効果および特性を維持でき、生物学的あるいは他の面で不都合が生じないような塩のことである。このような塩としては、塩酸、臭素酸、リン酸、硝酸、硫酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、マンデル酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸など、無機酸または有機酸との塩が含まれる。さらに、本発明の化合物にカルボキシル基などの酸基が含まれている場合は、無機塩基または有機塩基との、薬学的に受容できる塩に転換することができる。適した塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンなどがある。

30

【0065】

必要や目的に応じて、ホスホリパーゼ阻害薬は、1つまたは複数の他の治療薬と組み合わせ投与することができる。本発明の組成と共に投与できる治療薬の選択は、ある程度、治療する疾患によって異なる。例えば、肥満やその他体重関連疾患の治療の場合、本発明のいくつかの実施例におけるホスホリパーゼ阻害薬は、スタチン剤やフィブレート剤、胆汁酸結合剤、エゼチミブ剤(Zetiaなど)、サポニン剤、リパーゼ阻害剤(Orlistatなど)、食欲抑制剤といった薬剤と組み合わせて使用することができる。インスリン関連疾患（糖尿病など）に関して、本発明のいくつかの実施例におけるホスホリパーゼ阻害薬は、ビッグアニド剤(Metforminなど)、チアゾリジンジオン、 α -グルコシダーゼ阻害薬などと組み合わせて使用することができる。

40

【0066】

ホスホリパーゼ阻害薬（または薬学的に受容できる塩）は、それ自体で、または製薬組成の形で投与することができる。この製薬組成においては、活性組成は、薬学的に受容できる担体や賦形剤、希釈剤を1つまたは複数使った混合物中に用いられる。本発明に従った使用の製薬組成は、従来的手法により調剤することができる。すなわち、1つまたは複数の、生理学的に受容できる担体（賦形剤と助剤から成る）を使用し、活性物質のプロセ

50

スを促進し、製薬分野で使用可能な調剤にする。適切な調剤は、選択する投与経路によって異なる。

【0067】

ホスホリパーゼ阻害薬は直接配置や経口、直腸経由で投与することができる。好ましくは、このホスホリパーゼ阻害薬またはホスホリパーゼ阻害薬から成る製薬組成は経口投与される。ホスホリパーゼ阻害薬を投与する経口剤の形態には、粉末、錠剤、カプセル、溶液、乳剤などがある。効果量を1用量で投与することもできれば、適切な時間間隔（例えば数時間）において、用量を何回かに分けて投与することもできる。

【0068】

経口投与では、この分野でよく知られている薬学的に受容できる担体活性物質と活性物質とをあらかじめ混合して調剤することができる。治療する患者に経口投与するための、本発明の組成の調剤に使用できる担体としては、錠剤、粒剤、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、カシェ剤、その他類似の形態がある。いくつかの実施例において、この阻害薬は徐放薬として製剤することができる。経口用途の製薬調剤は、固体賦形剤と、得られた混合物をすり潰し（オプション）、細粒の混合物を処理し、場合によっては適切な助剤を加えて、錠剤または糖衣錠コアを得る。適切な賦形剤としては、特に糖などの増量剤（ラクトース、蔗糖、マンニトール、ソルビトールなど）と、セルロース調剤（例えばトウモロコシでんぷん、小麦でんぷん、米でんぷん、馬鈴薯でんぷん、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン(PVP) など）がある。望ましい場合は、架橋ポリビニルピロリドンや寒天、アルギン酸またはその塩（アルギン酸ナトリウムなど）の分解剤を追加することもできる。

【0069】

糖衣錠コアは、適切なコーティングで提供される。このためには、濃縮糖液を使用することができる。この濃縮糖液にはオプションとして、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、Carbopolゲル、ポリエチレングリコールや二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒や溶媒混合物などを含めることができる。識別のためや、活性物質用量が異なる組合せを区別するため、染料や顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに追加することもできる。いくつかの実施例において、経口調剤には腸内用樹脂コーティングはない。

【0070】

経口投与に用いられる製薬製剤には、ゼラチン製のプッシュフィット型カプセルや、ゼラチンと可塑剤（グリセロールやソルビトール）製の密封型ソフトカプセルが含まれる。プッシュフィット型カプセルには、増量剤（ラクトースなど）、結合剤（でんぷんなど）、潤滑剤（タルクやステアリン酸マグネシウム）、安定剤（オプション）と活性成分との混合物を中に入れることができる。ソフトカプセルについては、活性組成を適切な液体（脂肪油、液体パラフィン、液体ポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁させる。さらに、安定剤を追加することもできる。経口投与用の製剤はすべて、投与に適した用量でなければならない。

【0071】

経口用および非経口用の液体調剤に使用する適切な担体としては、薬学的に受容できる非水性の極性溶媒が含まれ、これには炭化水素、アルコール、アミド、油脂、エステル、エーテル、ケトン、これらの混合物があり、さらに水、生理食塩水、電解質溶液、デキストロース溶液（DW5など）、その他の薬学的に受容できる水性の液体がある。

【0072】

薬学的に受容できる非水性の極性溶媒としては、以下のものが挙げられ、これらに限定されない：アルコール類（脂肪族アルコールまたは芳香族アルコールで炭素数が2~30のもの。メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、t-ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、ベンジルアルコール、アミレンハイドレート、グリセリン（グリセロール）、グリコール、ヘキシレングリコール、ラウリルアルコール、セ

10

20

30

40

50

チルアルコール、ステアリルアルコール、テトラヒドロフルフリルアルコール、脂肪酸アルコールの脂肪酸エステル(ポリエチレングリコールやポリプロピレングリコールをはじめとするポリアルキレングリコールなど)、ソルビタン、コレステロール、蔗糖など); アミド類 (ジメチルアセトアミド(DMA)、ベンジルベンゾエートDMA、N,N-ジメチルアセトアミドのアミド類、2-ピロリジノン、ポリビニルピロリドン、1-メチル-2-ピロリジノンなど); エステル類(2-ピロリジノン、1-メチル-2-ピロリジノン、酢酸エステル(モノアセチン、ジアセチン、トリアセチンなど)など、脂肪族または芳香族エステル(ジメチルスルホキシド(DMSO)、オレイン酸アルキル、カプリル酸エチル、安息香酸エチル、酢酸エチル、オクタン酸エステル、安息香酸ベンジル、酢酸ベンジル、グリセリンエステル(モノグリセリル、ジグリセリル、トリグリセリルのクエン酸エステルまたは酒石酸エステルなど)、炭酸エチル、オレイン酸エチル、乳酸エチル、N-メチルピロリジノン、脂肪酸エステル(ミリスチン酸イソプロピルなど))、ソルビタンの脂肪酸エステル、モノステアリン酸グリセリル、グリセリドエステル(モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド)、脂肪酸由来PEGエステル(ヒドロキシステアリン酸PEG、ヒドロキシオレイン酸PEGなど)、プルロニック60、ポリオキシエチレンソルビトールオレイン酸ポリエステル、ポリオキシエチレンソルビタンエステル(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアリン酸、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウリル酸、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミチン酸)、アルキレンオキシ基置換の脂肪酸エステル(ポリオキシシル40水素化ひまし油、ポリオキシエチレン化ひまし油など)、糖脂肪酸エステル(単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはこれらの混合物と脂肪酸(カプリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、カプリル酸、ラウリル酸、ステアリン酸などの飽和脂肪酸と、パルミトレイン酸、オレイン酸、エライジン酸、エルカ酸、リノール酸などの不飽和脂肪酸)との縮合生成物)、ステロイドエステルなど); アルキルエーテル、アリルエーテル、環状エーテル(ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジメチルイソソルビドなど); グリコフロール(テトラヒドロフルフリルアルコールポリエチレングリコールエーテル); ケトン類(アセトン、メチルイソブチルケトン、メチルエチルケトンなど); 脂肪族環状脂肪族芳香族炭化水素(ベンゼン、シクロヘキサン、ジクロロメタン、ジオキソラン、ヘキサン、n-ヘキサン、n-デカン、n-ドデカン、スルホラン、テトラメチレンスルホキシド、テトラメチレンスルホン、トルエン、テトラメチレンスルホキシド、ジメチルスルホキシド(DMSO)など); 油脂(鉱物油、動物性油、植物性油、精油、合成由来)(鉱物油(精製パラフィン油、脂肪族炭化水素、蝋ベースの炭化水素、芳香族炭化水素、脂肪族炭化水素と芳香族炭化水素の混合物など)、植物性油(亜麻仁油、大豆油、ひまし油、菜種油、ココヤシ油、桐油、ベニバナ油、綿実油、グラウンドナッツ油、ヤシ油、オリーブ油、コーン油、コーン胚芽油、胡麻油、桃仁油、ピーナツ油など)、グリセリド類(モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド)、動物性油(タラ肝油、ハリバ肝油、魚油、鯨油、スクアレン、スクアラン、ポリオキシエチレン化ひまし油、サメ肝油、オレイン油など)); ハロゲン化アルキルまたはハロゲン化アリル(塩化メチレンなど); モノエタノールアミン; トロラミン; 石油ベンジン; オメガ-3多不飽和脂肪酸(-リノレン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸など); 12-ヒドロキシステアリン酸のポリグリコールエステル; ポリエチレングリコール; ポリオキシエチレングリセロールなど。

【0073】

本発明のホスホリパーゼ阻害薬の製剤組成に使用するのに、受容できるその他の溶媒としては、例えば、直接配置用としては、この分野でよく知られている技法がある。詳しくはModern Pharmaceuticals, (G. Banker et al., eds., 3d ed.)(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1995), The Handbook of Pharmaceutical Excipients, (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.; The Pharmacological Basis of Therapeutics, (Goodman & Gilman, McGraw Hill Publishing), Remington's Pharmaceutical Sciences (A. Gennaro, ed., 19th ed.)(Mack Publishing, Easton, Pa., 1995), Pharmaceutical Dosage Forms, (H. Lieberman et al., eds.)(Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 19

80); The United States Pharmacopeia 24, The National Formulary 19, (National Publishing, Philadelphia, Pa., 2000) を参照のこと。

【0074】

直腸投与の製剤は、ホスホリパーゼ阻害薬を消化器官内（小腸など）に放出するため、座剤、軟膏、浣腸剤、錠剤、クリームなどの形で調製することができる。直腸座剤は、本発明のホスホリパーゼ阻害薬1つまたは複数と、薬学的に受容できるその塩、受容できる賦形剤（ココアバターなど）を混合し、融点を調節するために必要に応じて蠟を追加して調製することができる。受容できる賦形剤としては他に、グリセリン、サリチル酸塩、ポリエチレングリコールなどがある。これらは通常の保管温度では固体で、ホスホリパーゼ阻害薬を放出するのに適した体内（直腸内など）温度では液体となる。ソフトなゼラチンタイプの直腸用製剤や座剤には、油も使用される。さまざまな分子量のポリエチレングリコールなど、水溶性の座剤ベースも使用することができる。水、生理食塩水、水性デキストロースおよび関連の糖水溶液、グリセロールを使用し、懸濁剤としてペクチンやcarboxymethylcellulose、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースを用い、緩衝液や保存料なども加えて、懸濁液製剤を調製することもできる。

10

【0075】

本発明の使用に適した製薬組成は、活性成分が効果的な分量、すなわち治療する病状のうちすくなくとも1つについて、治療や予防のメリットを達成するのに十分な分量で存在する組成である。個々の用途に効果的な実際量は、病状や投与経路によって異なってくる。有効量の決定は、特にここに記載される情報を踏まえれば、ゆうにこの分野の技能の範囲内である。例えば上の表1には、対応するホスホリパーゼ阻害薬部分の効果的な用量を選択するのに、通常この分野で用いられている技法のひとつを利用したガイドラインとして、IC50の値と範囲が示されている。

20

【0076】

ホスホリパーゼ阻害薬に関しての効果的な量とは、一般に、医療製薬分野の規制指導機関（FDAやAMAなど）またはメーカーやサプライヤーが推奨または認定する、用量範囲、投与方式、製剤形態などを意味する。ホスホリパーゼ阻害薬の効果的な用量は、例えば、Physicians Desk Referenceで見つけることができる。インスリン関連疾患（糖尿病など）、体重関連疾患（肥満など）、コレステロール関連疾患などのホスホリパーゼ関連疾患の治療においてメリットを得るための効果的な量とは、一般に、医療製薬分野の規制指導機関（FDAやAMAなど）またはメーカーやサプライヤーが推奨または認定する、臨床結果を達成するレベルを意味する。

30

【0077】

この分野の通常の技法に通じた者ならば、ホスホリパーゼ阻害薬の効果的な量を決定することができる。本発明において、消化器官管腔に集中的に留まるホスホリパーゼ阻害薬の効果的な量は、このような管腔集中機能を持たない場合の投与量よりも少なくすることができる。本発明については、ホスホリパーゼ阻害薬の投与量を少しでも減少させることが有用であると見なされる。ホスホリパーゼ阻害薬の効果的な投与量を大幅に、または統計的に顕著に減少させることが、特に好ましい。本発明のいくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は、管腔集中機能を持たない阻害薬に比べて、ホスホリパーゼの活性を低下させる効果が高い。ホスホリパーゼ阻害薬の管腔集中機能により、インスリン関連疾患（糖尿病など）、体重関連疾患（肥満など）、コレステロール関連疾患など、ホスホリパーゼに関連した疾患の治療に必要な効果的な用量を、約5%～約95%減らすことができる。使用するホスホリパーゼ阻害薬の量は、推奨用量と同じこともあれば、より多いこともあり、また、より少ないこともある。

40

【0078】

いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬の推奨用量は、約0.1 mg/kg/日～約1,000 mg/kg/日の範囲である。人間に対する有効量は、動物モデルから決定することができる。例えば、人間の用量は、動物（下記の例に記述されたマウスモデルなど）に効果が見出された循環中濃度や消化管内濃度を達成するように、処方することができる。

50

【0079】

この分野で通常の技能をもつ者であれば、ホスホリパーゼの生成物 (PL A₂ の生成物であるリソホスファチジルコリン (LPC) など) の量を測定することにより、ホスホリパーゼの障害程度を測定することができる。LPCの量は例えば、食後に小腸内やリンパ液、血清中の濃度を測定することによって決定できる。ホスホリパーゼ障害の量を測定する他の技法としては、消化器官内の流動サンプルを直接採取する方法がある。この分野で通常の技能をもつ者であれば、例えば、血清中のコレステロール値やトリグリセリド濃度を調べることににより、患者における本発明のホスホリパーゼ障害薬の効果をモニターすることもできる。他の技法は、この分野で通常の技能をもつ者にとっては明らかである。いくつかの実施例について、ホスホリパーゼ障害の測定や、ホスホリパーゼ障害薬の効果を検証するアプローチは、後述の例に詳しく説明される。

10

【0080】

好ましいインドール関連化合物と、PLA₂障害薬としてのインドール化合物

好ましい実施例において、ホスホリパーゼA₂ IB障害薬は、五員環と六員環を融合した部分を有する置換有機化合物から成る。本発明はまた別の面において、このホスホリパーゼA₂ IB障害薬の効果的な量を投与することによって、被験者の脂肪やグルコース、コレステロールの代謝を調節する方法を検討する。本発明にはさらに別の面として、ホスホリパーゼA₂ IB障害薬を使用した方法を含む。ここで被験者の疾患 (体重関連疾患、インスリン関連疾患、コレステロール関連疾患、およびこれらの組合せ) を治療するための製剤として使用する薬剤投与が指示され、またホスホリパーゼA₂ IB障害薬は五員環と六員環を融合した部分を有する置換有機化合物から成る。本発明には、さらに別の面として、食べられる食品とホスホリパーゼ-A₂ IB障害薬から成る食品組成が含まれ、好ましくは、このホスホリパーゼ-A₂ IB障害薬が五員環と六員環を融合したものを有する置換有機化合物から成る。

20

【0081】

ゆえに、本発明のさまざまな面の好ましい実施例全般において、ホスホリパーゼ障害薬 (または障害機能部分) は、五員環と六員環を融合した部分 (または薬学的に受容できるその塩) を有する置換有機化合物 (または置換有機化合物から派生した部分) を有する。好ましくは、この障害薬はホスホリパーゼ-A₂の障害機能、好ましくはホスホリパーゼ-A₂ IBの障害機能をもたらしている置換基を有している。好ましくは、ホスホリパーゼ障害薬は、1つまたは複数のヘテロ原子 (例えば窒素、酸素、イオウ) を含む五員環と六員環を融合したもので、このヘテロ原子は、この五員環または六員環の環構造内、または五員環と六員環それぞれの環構造内 (または薬学的に受容できる塩) にある。さらに好ましくは、この障害薬 (または障害機能部分) には、ホスホリパーゼ障害機能をもたらす効果がある置換基を持たせることができる。

30

【0082】

例5 (関連する例5A~5Cも含む) に示すように、五員環と六員環を融合した部分を有する置換有機化合物 (またはその誘導体部分) は、効果的なホスホリパーゼ-2A IB障害薬であり、遺伝的欠損のあるPLA₂(-/-) マウスの効果に匹敵する表現型効果を有する。さらに、このような化合物 (またはその誘導体部分) は、体重関連疾患やインスリン関連疾患、コレステロール関連疾患 (特に、肥満や糖尿病、インスリン抵抗性、グルコース不耐性、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症などを含む) などの治療に有効である。

40

【0083】

特定の化合物 (2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸) についてのみが例5に記載されている in-vivo 研究で評価されているが (図2)、以下に述べるように、障害効果は構造と活性の関係によって生じると考えられるため、この研究結果は本発明をさらに幅広くサポートする。簡単に言えば、本申請書に特に記載されていない理論に拘束されることなく、五員環と六員環を融合したもののから成る化合物は、置換基の配置に適切な結合距離と結合角度を有するという特長がある。例えば、図6Aに示すインドール化合物の配置3と配置4や、図6Bに示す五員

50

環と六員環の融合を含むインドール関連化合物の $-R_3$ および $-R_4$ 配置などがこれにあたる。これらインドール化合物およびインドール関連化合物の鏡像類似体も、後述のように、本発明に関連して使用することができる。

【0084】

後述するいくつかの好ましい実施例において、ホスホリパーゼ-A2阻害薬（または阻害機能部分）はインドール化合物またはインドール関連化合物から成る。

【0085】

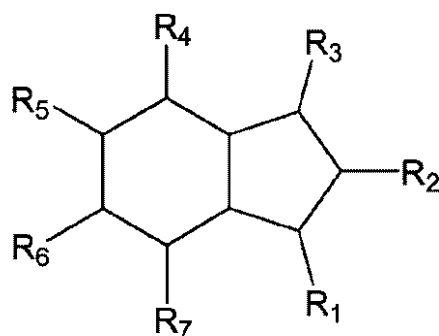
また、後述するいくつかの好ましい実施例において、ホスホリパーゼ-A2阻害薬（または阻害機能部分）は管腔集中型ホスホリパーゼ-A2阻害薬である。

【0086】

特に好ましい実施例において、ホスホリパーゼA2の阻害機能部分は、五員環と六員環の融合した化合物（または薬学的に受容できるその塩）から成る。この構造を下の化学式（I）に示す：

【0087】

【化5】



(I)

ここでこのコア構造は飽和（図示）でも不飽和（非図示）でもよく、 $R_1 \sim R_7$ は次の群から独立して選択することができる：水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、ハロゲン基、水酸基（ $-OH$ ）、チオール基（ $-SH$ ）、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。また、これらの追加または代替として、 $R_1 \sim R_7$ のうち独立して選択される2つの隣り合う置換基間に別の環をもつことができ、この追加環は五員環、六員環、七員環のいずれかを独立に選び、また炭素環、複素環、あるいはこの組合せにすることができる。

【0088】

ここで一般に、上記のインドール関連化合物における $R_1 \sim R_7$ について：

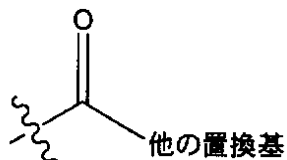
アミン基は第一アミン、第二アミン、第三アミンのいずれでもよい。

ハロゲン基はフッ素、塩素、臭素、ヨウ素のいずれでもよい。

カルボニル基は、下の化学式に示すように、さらに置換基（下記に定義）を有するカルボニル官能部分でもよい。

【0089】

【化6】



酸基は、プロトンを供給する有機基であり、水素結合することができるもので、カルボン

10

20

30

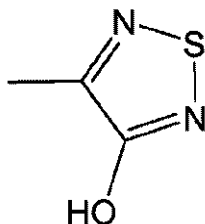
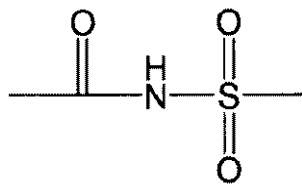
40

50

酸、硫酸、スルホン酸、ホスホン酸、置換ホスホン酸、リン酸、置換リン酸、5-テトラゾリルなどがこれに含まれ、これらに限定されない。

【0090】

【化7】



10

アルキル基自体、または他の置換基の一部となるアルキル基は、置換基を有しているものでも有していないものでもよく、直鎖または分岐した炭化水素であり、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、*tert*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、デシル基、ドデシル基、オクタデシル基などがある。

アルケニル基自体、または他の基と組み合わせるアルケニル基は、置換基を有しているものでも有していないものでもよく、直鎖または分岐した、不飽和結合を有する炭化水素であり、ビニル基、プロペニル基、クロトニル基、イソペンテニル基、さまざまなブテニル異性体などがある。

炭素環基は置換基を有しているものでも有していないものでもよく、飽和または不飽和のいずれでもよく、炭素原子のみから成る5~14員の有機環で、例えばシクロアルキル基、シクロアルケニル基、フェニル基、スピロ[5.5]ウンデカニル基、ナフチル基、ノルボルナニル基、ビシクロヘプタジエニル基、トルリル基、キシレニル基、インデニル基、スチルベニル基、テルフェニリル基、ジフェニルエチレニル基、フェニルシクロヘキセニル基、アセナフチレニル基、アンスラセニル基、ピフェニル基、ビベンジリル基などがある。

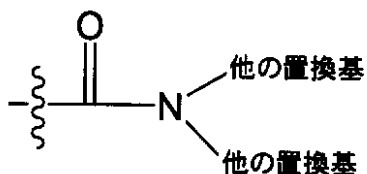
複素環基は、単環でも複環でもよく、飽和でも不飽和でもよく、また置換基を有しているものでも有していないものでもよく、5~14の複素環員原子をもち、1~3個のヘテロ原子(窒素、酸素、イオウのいずれでもよい)を有する。複素環基としては、ピロリル基、ピロロジニル基、ペリジニル基、フラニル基、チオフェニル基、ピラゾリル基、イミダゾリル基、フェニルイミダゾリル基、トリアゾリル基、イソキサゾリル基、オキサゾリル基、チアゾリル基、チアジアゾリル基、インドリル基、カルバゾリル基、ノルハルマニル基、アザインドリル基、ベンゾフラニル基、ジベンゾフラニル基、ジベンゾチオフェニル基、インダゾリル基、イミダゾピリジニル基、ベンゾトリアゾリル基、アンスラニル基、1,2-ベンズイソキサゾリル基、ベンズオキサゾリル基、ベンゾチアゾリル基、プリニル基、ピリジニル基、ジピリジリル基、フェニルピリジニル基、ベンジルピリジニル基、ピリミジニル基、フェニルピリミジニル基、ピラジニル基、1,3,5-トリアジニル基、キノリニル基、フタルアジニル基、キナゾリニル基、モルホリノ基、チオモルホリノ基、ホモピペラジニル基、テトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基、オキサカニル基、1,3-ジオキサニル基、1,3-ジオキサニル基、1,4-ジオキサニル基、テトラヒドロチオフェニル基、ペンタメチレンスルファジリル基、1,3-ジチアニル基、1,4-ジチアニル基、1,4-チオキサニル基、アゼチジニル基、ヘキサメチレンイミニウム基、ヘプタメチレンイミニウム基、ピペラジニル基、キノキサリニル基などがある。

アシルアミノ基は、下の化学式に示すように、さらに2つの置換基(下記に定義)を有するアシルアミノ官能部分でもよい。

【0091】

40

【化 8】

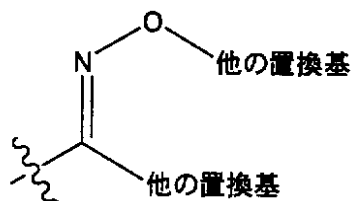


オキシミル基は、下の化学式に示すように、さらに2つの置換基（下記に定義）を有するオキシミル官能部分でもよい。

【0092】

10

【化 9】

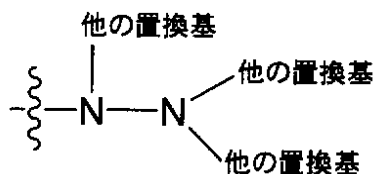


ヒドラジル基は、下の化学式に示すように、さらに3つの置換基（下記に定義）を有するヒドラジル官能部分でもよい。

【0093】

20

【化 10】



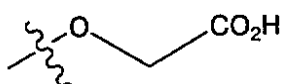
置換基を有する置換基とは、列記されている置換基の1つまたは複数を組み合わせたもので、好ましくは例えば、次のような部分から成る：

下記のような、-酸素-アルキル-酸部分

30

【0094】

【化 11】

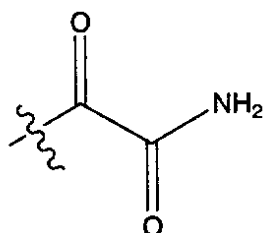


下記のような、-カルボニル-アシルアミノ-水素部分

【0095】

【化 12】

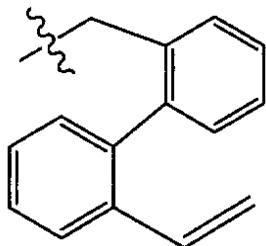
40



下記のような、-アルキル-炭素環-アルケニル部分

【0096】

【化 1 3】

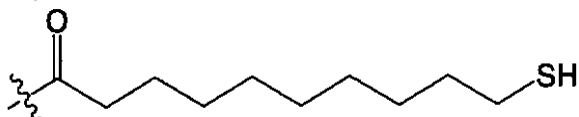


下記のような、-カルボニル-アルキル-チオール部分

10

【0097】

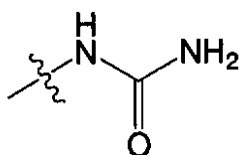
【化 1 4】



下記のような、-アミン-カルボニル-アミン部分

【0098】

【化 1 5】



20

さらなる置換基としては、水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、ハロゲン基、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せの中から選択される。

このインドール関連化合物の $R_1 \sim R_7$ の特に好ましい置換基について、好ましいインドール化合物と関連して下記に述べる。

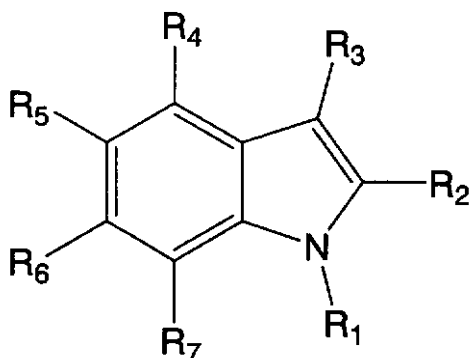
30

【0099】

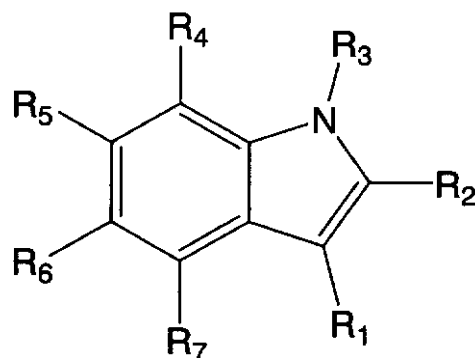
好ましい実施例において、ホスホリパーゼ-A2阻害機能部分は、置換インドール部分などのインドール化合物（インドール含有化合物またはインドール官能部分を有する化合物）から成る。例えばその実施例において、インドール含有化合物は化学式IIおよびIII(下図)に示すような化合物である：

【0100】

【化 1 6】



(II)



(III)

40

ここで $R_1 \sim R_7$ は次の基の中から独立に選択される： 水素、酸素、イオウ、リン、アミン

50

基、ハロゲン基、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。また、これらの追加または代替として、 $R_1 \sim R_7$ のうち独立して選択される2つの隣り合う置換基間に別の環をもつことができ、この追加環は五員環、六員環、七員環のいずれかを独立に選び、また炭素環、複素環、あるいはこの組合せにすることができる。

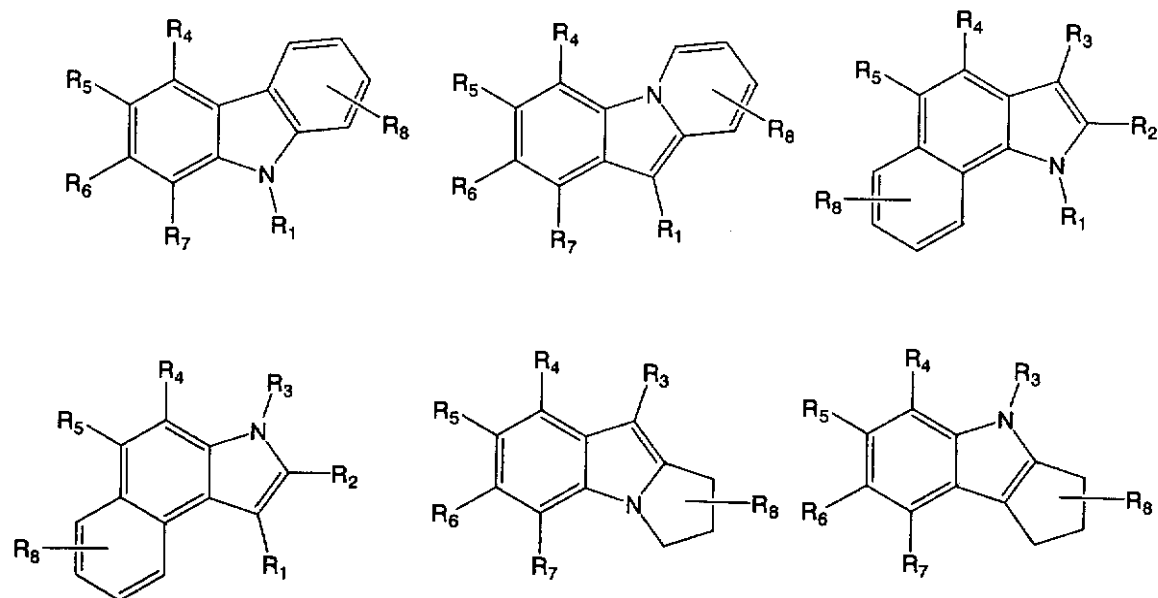
【0101】

追加の環を有するインドール化合物としては、例えば、化学式 IVa ~ IVf がある (下図の、上段左から右へ順に IVa、IVb、IVc、下段左から右へ順に IVd、IVe、IVf) :

【0102】

10

【化17】



20

一般に、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基などのさまざまなタイプの置換基は、融合した五員環六員環を有するインドール関連化合物と関連して、上記で定義できる。

30

【0103】

本発明の実施例それぞれにおいて、融合した五員環六員環を有するインドール関連化合物およびインドール化合物を含めて、好ましい置換基について、下記に説明される。

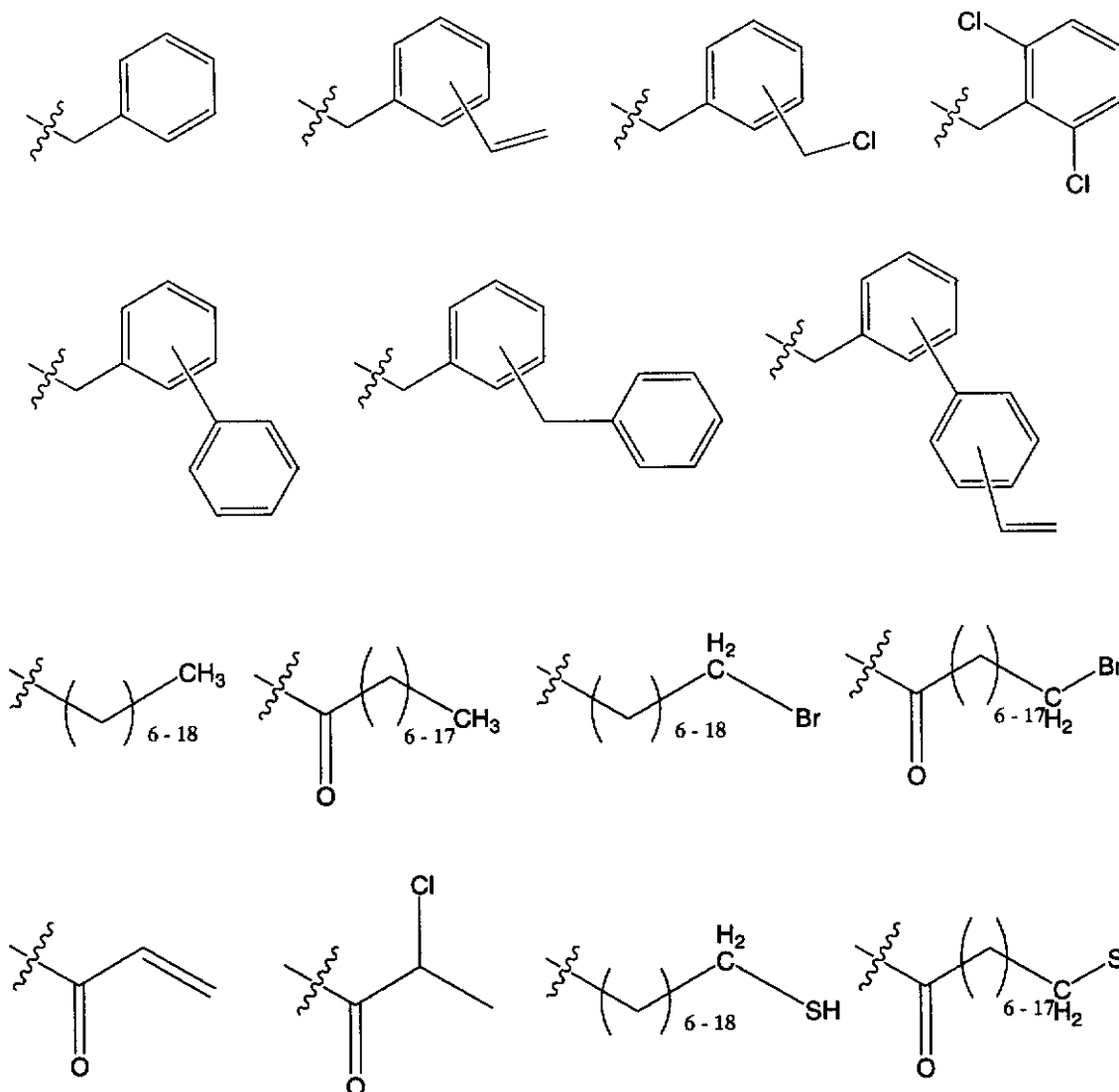
【0104】

好ましい R_1 は、次の中から選択される： 水素、酸素、イオウ、アミノ基、ハロゲン基、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_1 は、次の中から選択される： 水素、ハロゲン基、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_1 は特に、アルキル基、炭素環基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_1 の置換された置換基は、特に次のような化合物または部分が好ましい：

40

【0105】

【化 1 8】



10

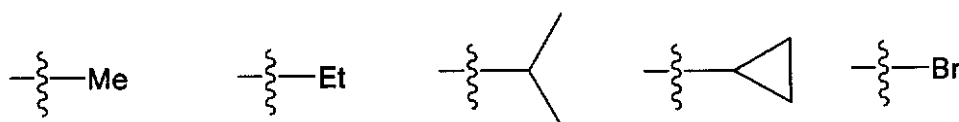
20

30

好ましい R_2 は、次の中から選択される：水素、酸素、ハロゲン基、カルボニル基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_2 は、次の中から選択される：水素、ハロゲン基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_2 は特に、ハロゲン基、アルキル基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_2 の置換された置換基は、特に次のような化合物または部分が好ましい：

【0106】

【化 1 9】



40

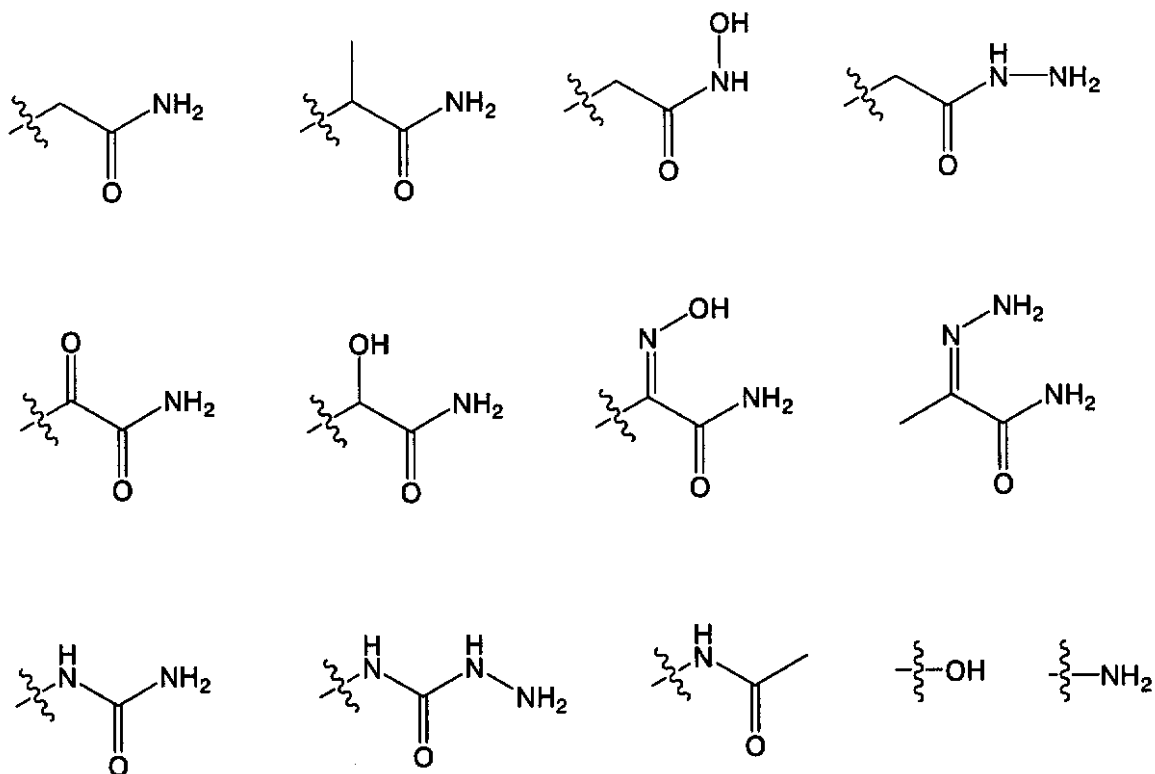
好ましい R_3 は、次の中から選択される：水素、酸素、イオウ、アミン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_3 は、次の中から選択される：水素、酸素、アミン基、水酸基(-OH)、カルボニル基、アルキル基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_3 は特に、カルボニル基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_3 の置換された置換基は、特に次の

50

ような化合物または部分が好ましい：

【 0 1 0 7 】

【 化 2 0 】



10

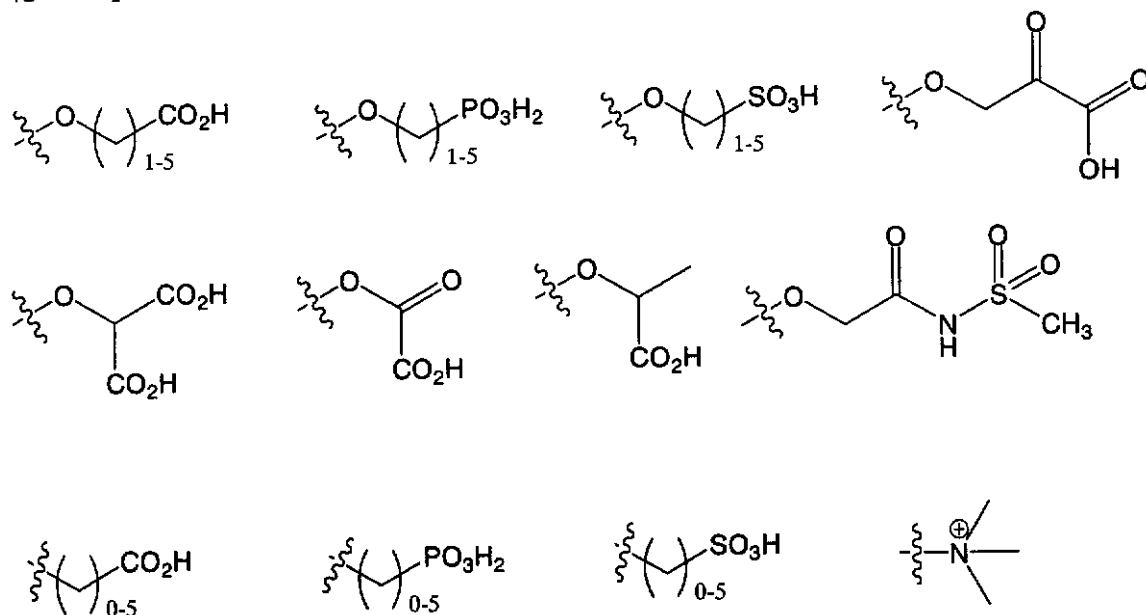
20

好ましい R_4 および R_5 は、次の中から独立に選択される：水素、酸素、イオウ、リン、アミン基、水酸基 (-OH)、チオール基 (-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、複素環基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_4 および R_5 は、次の中から独立に選択される：水素、酸素、イオウ、アミン基、酸基、アルキル基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_4 と R_5 はそれぞれ独立に、酸素、水酸基 (-OH)、酸基、アルキル基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_4 および R_5 の置換された置換基は、特に次のような化合物または部分が好ましい：

30

【 0 1 0 8 】

【 化 2 1 】



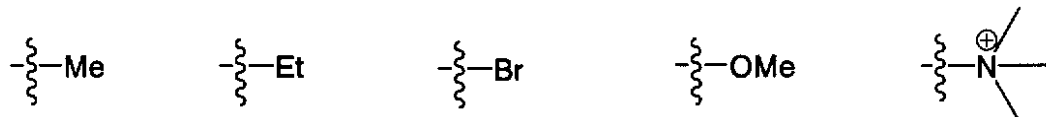
40

50

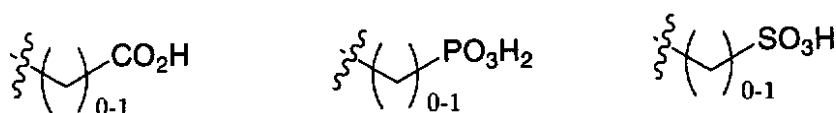
好ましい R_6 は、次の中から選択される：水素、酸素、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、酸基、アルキル基、炭素環基、アシルアミノ基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_6 は、次の中から選択される：水素、酸素、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、酸基、アルキル基、アシルアミノ基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_6 は特に、アミン基、酸基、アルキル基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_6 の置換された置換基は、特に次のような化合物または部分が好ましい：

【0109】

【化22】



10

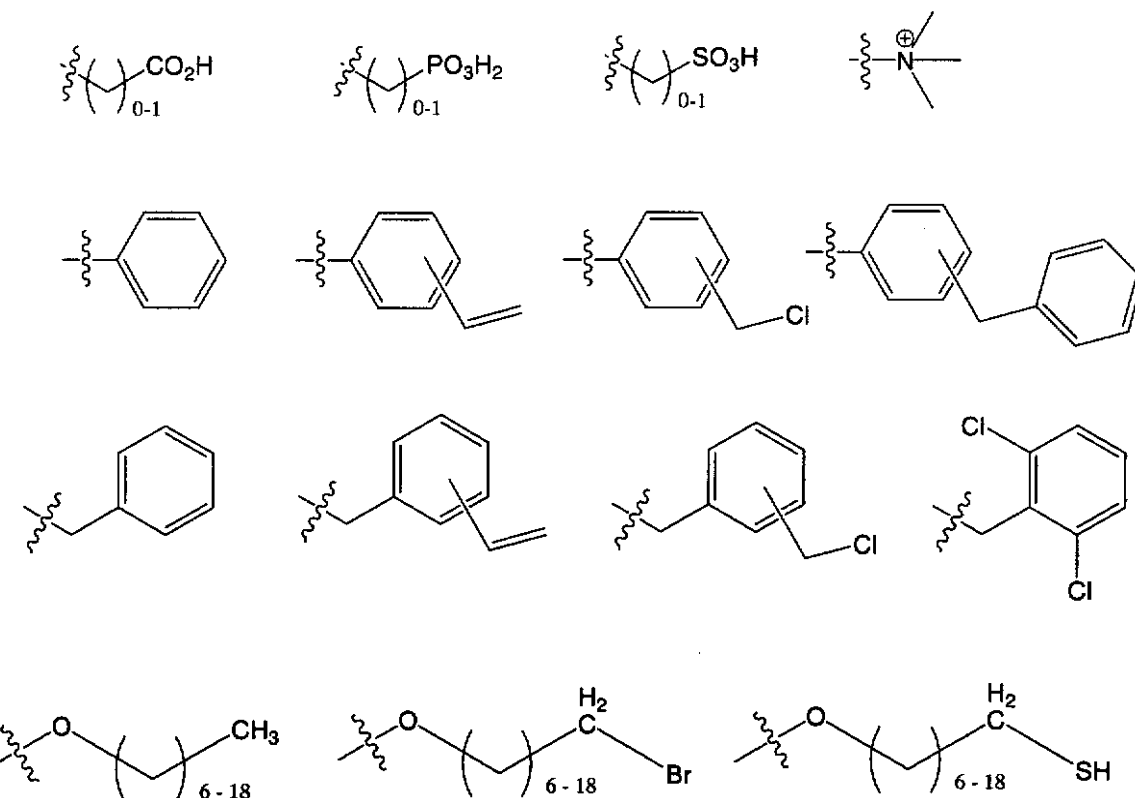


好ましい R_7 は、次の中から選択される：水素、酸素、イオウ、アミン基、ハロゲン基、水酸基(-OH)、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、複素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。特に好ましい R_7 は、次の中から選択される：水素、ハロゲン基、チオール基(-SH)、カルボニル基、酸基、アルキル基、アルケニル基、炭素環基、置換された置換基、およびこれらの組合せ。 R_7 は特に、炭素環基、置換された置換基の中から優先的に選択される。 R_7 の置換された置換基は、特に次のような化合物または部分が好ましい：

20

【0110】

【化23】



30

40

上記の置換基 $R_1 \sim R_7$ それぞれについての好ましい選択は、それぞれのバリエーションおよ

50

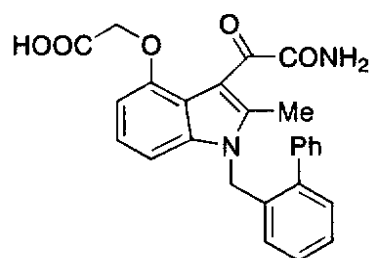
び組合せで使用する事ができる。例えば特定の好ましい実施例において、本発明の阻害薬は、 $R_1 \sim R_7$ を次のように選択した置換基で構成することができる： R_1 は好ましくはアルキル基、炭素環基、置換された置換基の中から選択される。 R_2 は好ましくはハロゲン基、アルキル基、置換された置換基の中から選択される。 R_3 は好ましくはカルボニル基、アシルアミノ基、オキシミル基、ヒドラジル基、置換された置換基の中から選択される。 R_4 と R_5 はそれぞれ独立に、好ましくは酸素、水酸基(-OH)、酸基、アルキル基、置換された置換基の中から選択される。 R_6 は好ましくはアミン基、酸基、アルキル基、置換された置換基の中から選択される。 R_7 は好ましくは炭素環基、置換された置換基の中から選択される。

【0111】

いくつかの実施例において、特定のインドールグリオキサミドが、PLA₂阻害機能部分として特に有用である。具体的には、図2に示す[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] (ここではILY-4001およびメチルインドキサムとも呼ぶ) が、効果的なホスホリパーゼ阻害薬または阻害機能部分であることが見出されている。このインドール化合物の構造を、下記の化学式(V)に示す：

【0112】

【化24】



(V)

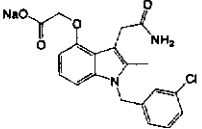
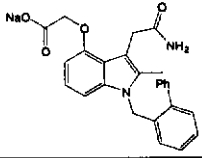
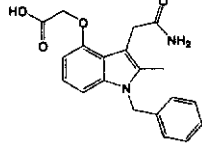
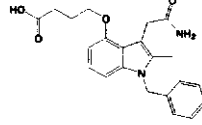
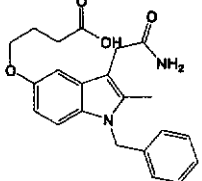
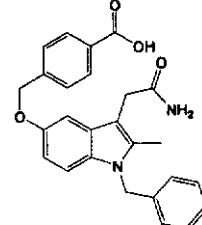
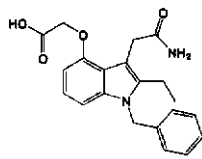
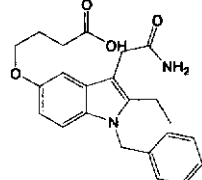
この化合物は、in-vitro分析に基づき、さまざまなクラスのPLA₂のホスホリパーゼ活性に対し、in vitroでのマウスおよびヒトのPLA₂酵素に対する強い阻害薬として作用する(Singer, Ghomashchi et al. 2002; Smart, Pan et al. 2004)ことが示されている。このインドール化合物は上記のように、合成され(例4を参照)、マウスモデルにおいてホスホリパーゼ-A2阻害のin-vivoでの評価が行われた。(例5(例5A~5Cを含む)を参照)。このインドール化合物について、阻害活性、吸収、生物学的利用能の観点で特性が調べられている。(例6(例6A~6Cを含む)を参照)。

他のインドール化合物も、本発明の範囲に含まれる。例えば、文献では数多くのインドール類について、構造と活性との関係を研究した報告が記述されている(Schevitz, Bach et al. 1995; Dillard, Bach et al. 1996; Dillard, Bach et al. 1996; Draheim, Bach et al. 1996; Mihelich and Schevitz 1999)。表1は、さまざまなインドール化合物について、ヒト非膵臓PLA₂(hnp PLA₂)、ヒト膵臓分泌PLA₂(hps PLA₂)、ブタ膵臓分泌PLA₂(pps PLA₂)など異なるホスホリパーゼ酵素に対する活性データの報告をまとめたものである。

【0113】

【化 2 5】

表 1: インドール化合物

構造	IC ₅₀ (μM) hnp PLA ₂	IC ₅₀ (μM) hps PLA ₂	IC ₅₀ (μM) pps PLA ₂
	0.052 ± 0.012	1.2	0.02
	0.010 ± 0.001	4.09	0.014
	0.052 ± 0.010	1.4	0.15
	0.399 ± 0.045	3.66	0.61
	0.152 ± 0.033	69	25
	0.147 ± 0.009	22.5	7.5
	0.024 ± 0.001	1.8	0.13
	0.189 ± 0.006	94	13.5

10

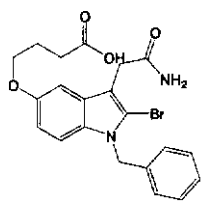
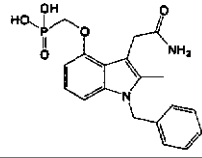
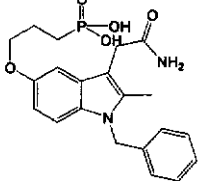
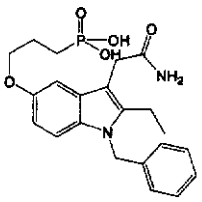
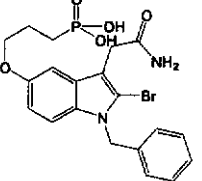
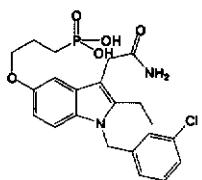
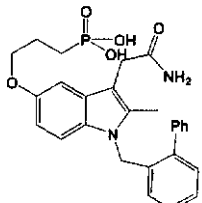
20

30

40

【 0 1 1 4 】

【化 2 6】

構造	IC ₅₀ (μM) hnp PLA ₂	IC ₅₀ (μM) hps PLA ₂	IC ₅₀ (μM) pps PLA ₂
	0.073 ± 0.016	15.9	2.86
	1.29 ± 0.16	73.5	5.55
	0.057 ± 0.004	67	27
	0.023 ± 0.005	91.1	35.5
	0.033 ± 0.004	6.2	2.2
	0.016 ± 0.010	46.2	
	0.022 ± 0.006	39	7.6

10

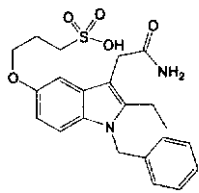
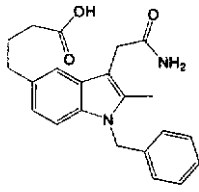
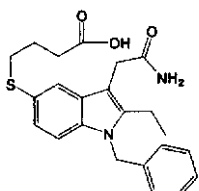
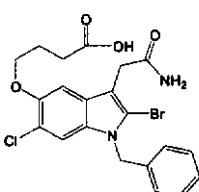
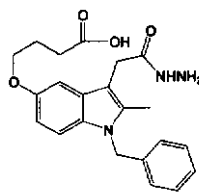
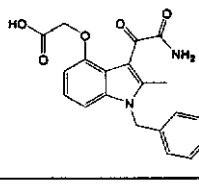
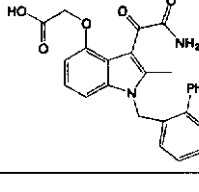
20

30

40

【 0 1 1 5 】

【化 2 7】

構造	IC ₅₀ (μM) hnp PLA ₂	IC ₅₀ (μM) hps PLA ₂	IC ₅₀ (μM) pps PLA ₂
	0.050 ± 0.015	135	5.8
	0.155 ± 0.029	94	
	0.023 ± 0.005	16	
	0.020 ± 0.003	3.2	1.3
	1.020 ± 0.150	活性なし	活性なし
	0.011 ± 0.004	0.761	0.015
	0.006 ± 0.001	0.364	0.097

10

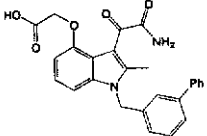
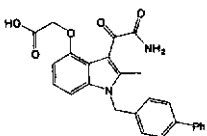
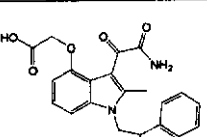
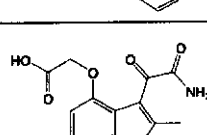
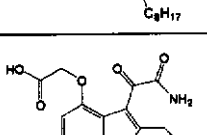
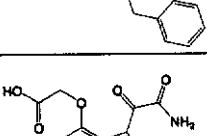
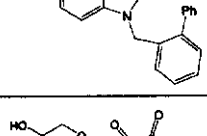
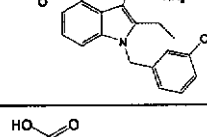
20

30

40

【 0 1 1 6 】

【化 2 8】

構造	IC ₅₀ (μM) hnp PLA ₂	IC ₅₀ (μM) hps PLA ₂	IC ₅₀ (μM) pps PLA ₂
	0.009 ± 0.001	0.57	0.007
	0.043 ± 0.003	1.09	
	0.009 ± 0.004	1.2	
	0.008 ± 0.003	0.78	
	0.009 ± 0.001	0.228	0.048
	0.004 ± 0.001	0.062	
	0.007 ± 0.002	0.39	0.003
	46	>100	

10

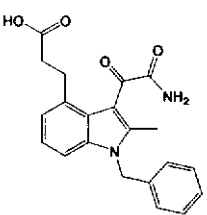
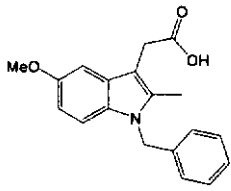
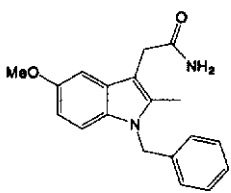
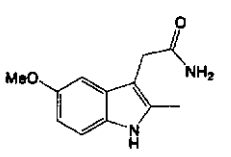
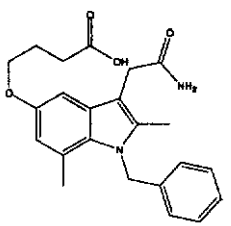
20

30

40

【 0 1 1 7 】

【化 2 9】

構造	IC ₅₀ (μM) hnp PLA ₂	IC ₅₀ (μM) hps PLA ₂	IC ₅₀ (μM) pps PLA ₂
	0.145 ± 0.006	>100	
	13.6 ± 4.2		
	0.84 ± 0.17		
			
	0.075 ± 0.013		

他のインドール化合物も、本発明の範囲に含めることができる。表2には、このような他のインドール化合物をいくつか挙げる。

【 0 1 1 8 】

10

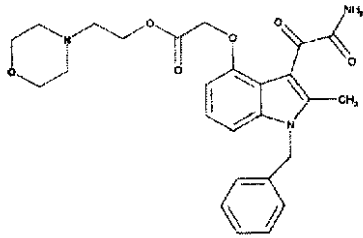
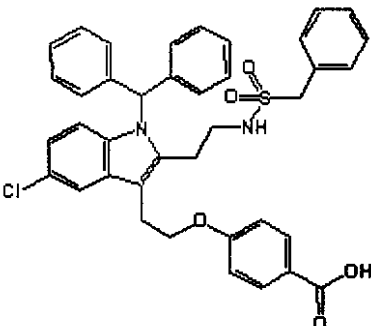
20

30

40

【化 3 0】

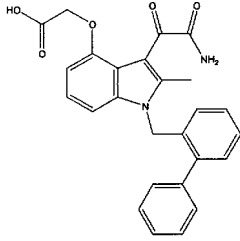
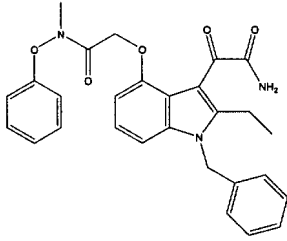
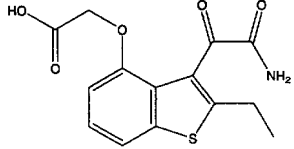
表 2: インドール化合物

<p>インドールグリオキサミド</p> 	10
<p>インドリ含有スルホンアミド類</p> 	

他に、ヘテロ原子を少なくとも1つ有する五員環六員環融合を有する他の化合物（ここではインドール関連化合物と総称する）も、本発明に関連して使用することができる。表3には、このような他のインドール関連化合物がいくつか挙げられており、該当するものについては特許番号も記載されている。

【 0 1 1 9】

【化 3 1】

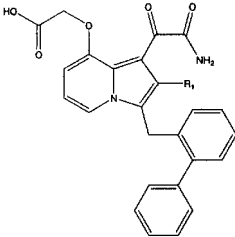
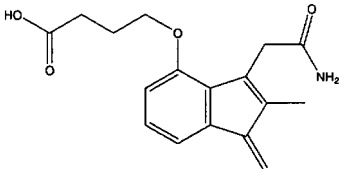
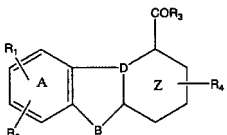
骨格	構造	特許番号
インドールアセトアミド / グリオキサミド	 <p>メチルインドキサンの構造式</p>	WO9921559
インドールグリオキサミド	 <p>インドールグリオキサミドの構造式</p>	WO0121587
ベンゾチオフェン	 <p>ベンゾチオフェンの構造式</p>	

10

20

【 0 1 2 0 】

【化 3 2】

骨格	構造	特許番号
インドリジン		US 6645976
インデン		US 6214876
置換三環系化合物	 <p>A:フェニルまたはピリジル</p> <p>BとDは独立にNあるいはC</p> <p>Zはシクロヘキシル、フェニル、ピリジルなど</p>	WO9818464

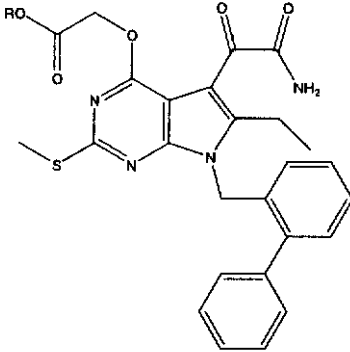
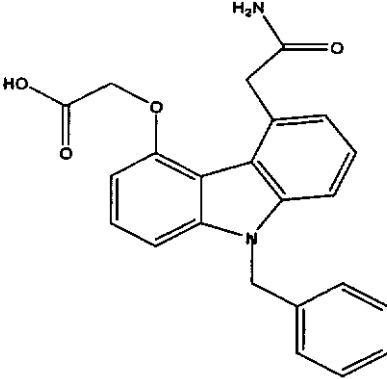
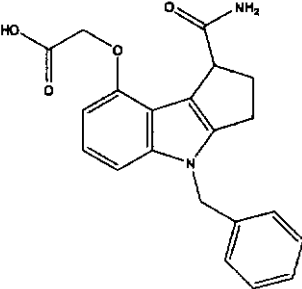
10

20

30

【 0 1 2 1 】

【化 3 3】

骨格	構造	特許番号
二環系ピロール-ピリ ミジン		
カルバゾール		WO03014082
シクロペンタインド ール		

10

20

30

【 0 1 2 2 】

【化 3 4】

骨格	構造	特許番号
シクロヘプタインドール		WO03016277

10

図6Cと6Dに示すように、本発明のインドール化合物には一般に、「逆インドール化合物」が含まれる。これは五員環と六員環の間の融合部結合に直交して二等分する線を対称軸とし、置換基は同じ位置まま保持された、インドールのコア構造の鏡像類似体である。(図6Cと図6Dを比較のこと)。本発明のインドール化合物とインドール関連化合物には、「相反インドール化合物」と「相反インドール関連化合物」が含まれる。これは五員環と六員環の間の融合部結合に沿った線を対称軸とし、少なくとも $-R_3$ と $-R_4$ 位置のそれぞれの置換基、および $-R_1$ と $-R_7$ 位置のそれぞれの置換基が同じ位置に保持され、 $-R_2$ 位置と、 $-R_5$ および $-R_6$ 位置の少なくとも一方の置換基が同じ位置に保持された、インドールのコア構造の鏡像類似体である。

20

【0123】

化学式 (I) ~ (V)で示されているものを含め、上記のインドール関連化合物およびインドール化合物すべての塩は、本発明の別の一面である。本発明の化合物で酸性基または塩基性基を有する場合、さまざまな塩が形成でき、これらは元の化合物より水溶性が高く、生理学的にも適していることがある。

30

【0124】

薬学的に許容できる塩としては、アルカリ金属またはアルカリ土類金属との塩、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アルミニウムなどとの塩があり、これらに限定されない。塩は、溶液中で酸を塩基で処理するか、または酸をイオン交換樹脂に通すことにより、簡単に酸を含まない状態に調製される。薬学的に受容できる塩の定義に含まれるものは、比較的無毒で、無機有機塩基を追加した本発明の化合物の塩である。この塩基には例えば、アンモニウム、第四アンモニウム、アミン陽イオン（本発明の化合物との塩を形成するのに十分な塩基性を有する窒素含有塩基から誘導される）がある（例えばS. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Phar. Sci., 66: 1-19 (1977)を参照）。さらに、本発明の化合物の塩基性基は、適切な有機酸または無機酸と反応して、次のような塩を形成することができる：酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、重硫酸塩、重酒石酸塩、ホウ酸塩、臭化物、カンシル酸塩、炭酸塩、塩化物、クラブラン酸塩、クエン酸塩、塩化物、エデト酸塩、エジシラート、エストラート、エシラート、フッ化物、フマル酸塩、グルセプタート、グルコン酸塩、グルタミン酸塩、グリコリルアルサニル酸塩、ヘキシルレゾルシン酸塩、臭化物、塩化物、ヒドロキシナフトアート、ヨウ化物、イソチオン酸塩、乳酸塩、ラクトピオン酸塩、ラウリン酸塩、リンゴ酸塩、マルセアート、マンデル酸塩、メシル酸塩、臭化メチル塩、硝酸メチル、硫酸メチル、ムカート、ナプシラート、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パントテン酸塩、リン酸塩、ポリガラクトロン酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、

40

50

塩基性酢酸塩、コハク酸塩、タンニン酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩、トリフルオロ酢酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、吉草酸塩。

【0125】

この分野の技能をもつ者であれば、ここに記載されている化合物の互変体や構造異性体、幾何異性体、光学異性体の現象を示すことができる。本発明には、ここに記載されている性質を有する化合物のあらゆる互変体、構造異性体、光学異性体、幾何異性体も含み、またこれらさまざまな形態の混合物も含むことが理解されるはずである。ここに記載されている化合物のプロドラッグおよび活性代謝物も、本発明の範囲に含まれる。

【0126】

ホスホリパーゼと、インドールおよびインドール関連化合物の使用による阻害

10

本発明のさまざまな面に含まれる実施例において全般に、本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、ホスホリパーゼの触媒活性を改変または阻害（鈍化させる、または低下させる）ことができる。ここで好ましくは、ホスホリパーゼは消化器官内（胃を含む）で分泌または保持され、さらに好ましくは十二指腸や小腸内で分泌または保持される。例えばこのような酵素には、グループIB分泌ホスホリパーゼ A_2 (PL A_2 -IB) が優先的に含まれこれらに限定されない。ここでこれらは膵臓ホスホリパーゼ A_2 (p-PL A_2)とも呼ばれ、ここではPL A_2 IB またはホスホリパーゼ- A_2 IBと呼ばれる。これら酵素には、グループIIAホスホリパーゼ A_2 (PL A_2 IIA) などの、他の分泌ホスホリパーゼ A_2 も含まれる。いくつかの実施例において、特に本発明の好ましいインドール化合物および好ましいインドール関連化合物に関連し、他のホスホリパーゼ（例えばホスホリパーゼ A_1 (PL A_1)、ホスホリパーゼB (PLB)、ホスホリパーゼC (PLC)、ホスホリパーゼD (PLD) など)も、本発明の範疇にあると見なされる。本発明の阻害薬は、好ましくは、少なくともホスホリパーゼ- A_2 IB 酵素の活性を阻害する。

20

【0127】

いくつかの実施例において、本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、ホスホリパーゼ A_2 活性など（例えばホスホリパーゼ A_2 IBなどを含む）のホスホリパーゼ活性を特異的に阻害する、または顕著に特異的に阻害する。例えば、いくつかの好ましい実施例において、本発明の阻害薬は、膵臓トリグリセリドリパーゼ(PTL) やカルボキシエステリパーゼ (CEL) といったリパーゼ類は阻害しない、または顕著には阻害しない、または基本的に阻害しない。いくつかの好ましい実施例において、本発明の阻害薬はPL A_2 を阻害し、好ましくはホスホリパーゼ- A_2 IBを阻害するが、それぞれの場合において、他のホスホリパーゼは阻害しないか、または顕著には阻害しないか、または基本的には阻害しない。またいくつかの好ましい実施例において、本発明の阻害薬はPL A_2 を阻害し、好ましくはホスホリパーゼ- A_2 IBを阻害するが、それぞれの場合において、PL A_1 は阻害しないか、または顕著には阻害しないか、または基本的には阻害しない。またいくつかの好ましい実施例において、本発明の阻害薬はPL A_2 を阻害し、好ましくはホスホリパーゼ- A_2 IBを阻害するが、PLBは阻害しないか、または顕著には阻害しないか、または基本的には阻害しない。いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は消化器官粘膜上では作用しない。例えば、膜に結合したホスホリパーゼを阻害することはなく、または顕著に阻害することはない、または基本的に阻害することはない。

30

40

【0128】

PL A_2 、PL A_1 、PLBの活性の違いは、この分野で一般によく知られている。PL A_2 はリン脂質をsn-2 位置で加水分解し、1-アシルリソリン脂質と脂肪酸を遊離させる。PL A_1 はリン脂質のsn-1 位置に作用して、2-アシルリソリン脂質と脂肪酸を遊離させる。ホスホリパーゼBはリン脂質のsn-1 位置とsn-2位置の両方に切れ目を入れ、グリセロールと2つの脂肪酸に分解する。例えば、Devlin, Editor, Textbook of Biochemistrywith Clinical Correlations, 5th ed. Pp 1104-1110 (2002) を参照。

【0129】

消化器官内のPL A_1 、PL A_2 (ホスホリパーゼ- A_2 IBを含む)、PLBが作用するリン脂質基質は、ほとんどがホスファチジルコリンとホスファチジルコリンエタノールアミンであり

50

、これらは食物由来のものもあれば胆汁酸由来のものもあり、また細胞膜の剥落物に由来することもある。例えば、ホスファチジルコリンの消化の場合、PLA₁ はsn-1 位置に作用して2-アシルリソホスファチジルコリンと遊離脂肪酸を生成する。PL A₂ はsn-2 位置に作用して1-アシルリソホスファチジルコリンと遊離脂肪酸を生成する。PLBは両方の位置に作用して、グリセロール3-ホスホリルコリンと遊離脂肪酸2つを生成する(Devlin, 2002)。

【0130】

膵臓PL A₂(およびホスホリパーゼ-A₂ IB) は、膵臓外分泌腺の腺房から分泌され、膵液を介して十二指腸内に放出される。PL A₂(およびホスホリパーゼ-A₂ IB) はプロ酵素として分泌され、ポリペプチド鎖を持っているため、この部分にプロテアーゼによって割れ目が入り、これにより酵素の触媒部位が活性化される。PLA₂ イソ酵素についての構造と活性の関係 (SAR) の報告には、数多くの共通特徴がある (例えばGelb M., Chemical Reviews, 2001, 101:2613-2653; Homan, R., Advances in Pharmacology, 1995, 12:31-66; and Jain, M. K., Intestinal Lipid Metabolism, Biology, pathology, and interfacial enzymology of pancreatic phospholipase A₂, 2001, 81-104を参照。このそれぞれが、参照によってここに組み込まれる)。

10

【0131】

本発明の阻害薬は、ホスホリパーゼ活性、特にPL A₂ 活性を阻害する、この共通特徴の一部を利用することができる。PL A₂ 酵素の共通特徴としては、サイズが約13~約15 kDaで、熱に安定で、6~8個のジスルフィド架橋をもつことなどがある。また、PLA₂ 酵素の共通特徴には、活性部位構造の保護や、カルシウム依存活性もある。さらに、HisとAspの残基が水分子およびカルシウム陽イオンに協調して結合し、His-カルシウム-Aspの組合せとなる触媒メカニズムも含まれる。リン脂質基質は、詳細が後述されるように、プラスに荷電している疎水性残基(リジンおよびアルギニン残基)に包まれているスロットに、極性の頭部を持つ基が入り込むことにより、この触媒部位にアクセスできる。触媒部位内では、複数配位結合したカルシウムイオンが、リン脂質基質のsn-2 位置のアシルカルボニル基を活性化させ、加水分解が起きる (Devlin, 2002)。いくつかの好ましい実施例において、本発明の阻害薬は、この触媒部位と相互作用することにより、PLA₂ の触媒活性を阻害する。

20

【0132】

PL A₂ 酵素は主に、消化器官管腔内にある脂質凝集体の脂質水界面において、リン脂質基質を分解する活性を有する。脂質凝集体は例えば、脂肪滴や乳液滴、液胞、混合ミセル、ディスクなどがあり、これらにはトリグリセリドや脂肪酸、胆汁酸、リン脂質、ホスファチジルコリン、リソリン脂質、リソホスファチジルコリン、コレステロール、コレステロールエステル、その他の両親媒性物質、その他の食物代謝生成物などが含まれる。このような酵素は、脂質水の界面に「留まって」いる間に、作用すると見なされる。このような脂質集合体において、上記の他の化合物と共に、リン脂質基質は通常、単一層または二層になり、これが脂質集合体の外側表面を形成する。触媒部位を保持するホスホリパーゼの表面は、リン脂質基質にアクセスするため、この界面に接触している。このようなホスホリパーゼの表面は、i-フェース(酵素の界面認識面)として知られる。PL A₂ の i-フェースの構造的機能は、数多く公表されている。例えば、Jain, M.K, et al, Methods in Enzymology, vol.239, 1995, 568-614を参照し、参照によってここに組み込まれる。本発明の阻害薬は、PLA₂ 活性を阻害する構造的機能を利用することができる。例えば、触媒部位を形成するスロットの開口部は、i-フェース面に対して垂直であることが知られている。開口部は、疎水性残基の最初のクラウンによって囲まれており(主にロイシンとイソロイシンの残基)、これ自身が、陽イオン残基のリング内に収められている(リジンおよびアルギニン残基を含む)。

30

40

【0133】

記載のように、PL A₂ 酵素は、保護されている活性部位構造や、触媒メカニズム (HisとAspの残基が水分子およびカルシウム陽イオンに協調して結合する)を共有している。理

50

論に拘束されることなく、リン脂質基質は、プラスに荷電している疎水性残基に包まれているスロットに、極性の頭部を持つ基が入り込むことにより、このような酵素の触媒部位にアクセスできる。触媒部位内では、複数配位結合したカルシウムイオンが、リン脂質基質の sn-2 位置のアシルカルボニル基を活性化させ、加水分解が起きる。

【0134】

ホスホリパーゼ-A2酵素の構造活性関係については数多くの研究があり、これに例5（例5A～5Cを含む）に示されている重要な実験データを考え併せれば、この分野の技能をもつ者は、ILY-4001について観察された阻害効果が、本発明の他のインドール化合物（同じコア構造を有するもの）やインドール関連化合物（五員環および六員環の融合部分から成る）の中で、特に評価すべきものであることがわかる。特に、本申請書に明示的に記載されていない理論に拘束されることなく、例えば図6Aに示すインドール構造の3、4、5位置の置換基は、酵素およびカルシウムイオンとの極性相互作用（カルシウム依存性のホスホリパーゼ活性に関連して）を効果的にするよう選択評価することができるため、この分野の技能を有する者には有効であることがわかる。同様に、このインドール構造の1および2位置の置換基を、比較的疎水性のものに選択評価できるため、この分野の技能を有する者には有効であることがわかる。組合せを考えると、3、4、5位置に極性基、1、2位置に比較的疎水性の基を配置すると、この阻害薬（または阻害部分）が疎水性の脂質と水との界面に（疎水性部分を介して）効果的になじむことができ、また、阻害薬（または阻害部分）の極性部分が酵素のポケット（極性の頭部を持つ基が、プラスに荷電している疎水性残基に包まれているスロットに通る）に効果的にはまり込むことができる。同様に、例えば図6Bに示すように、インドール関連化合物の対応する基にも同じ機能をもたせることができ、これが評価される。特に、インドール関連化合物のR₃、R₄、R₅位置の置換基は、酵素およびカルシウムイオンとの極性相互作用を考えて効果的に選択評価することができ、インドール関連化合物のR₁とR₂位置の置換基は、比較的疎水性のものを選択評価することができるため、この分野に技能をもつ者には評価される。

【0135】

同様に、図6Cと6Dに示すように、前述の、特定インドール化合物のコア構造の鏡像類似体である逆インドール化合物と、前述の、特定インドール化合物またはインドール関連化合物のコア構造の別種の鏡像類似体である相反インドール化合物および相反インドール関連化合物は、同じように極性基と疎水性基を配置することにより、本発明の範疇内で、別のインドール構造やインドール関連構造を提示することができる。

【0136】

さらに、この分野の技能をもつ者であれば、既知の分析評価アプローチを用いて、本発明の範囲にある特定の阻害薬を評価することができる。例えば、本発明の阻害薬の阻害程度は、in-vitro 分析（例えば例6Aを参照）やin-vivo 研究（例えば例5を参照）を用いて評価することができる。さらに、ホスホリパーゼ酵素とホスホリパーゼ阻害薬との結合は、核磁気共鳴を用いて、例えばその結合作用に必要な部位、または必要でない部位を識別し、評価することができる。さらに、この分野に技能を有する者は、ホスホリパーゼ阻害薬の構造活性関係（SAR）を活用して、構造的バリエーションが許されている位置を調べることができる。ホスホリパーゼ阻害薬候補のライブラリは、ホスホリパーゼ阻害機能部分のさまざまな結合部位がまとめられており（上記の情報に基づくか、または無作為に選択）、これにより、複数の方向にホスホリパーゼ阻害機能部分を置くことができる。候補物のホスホリパーゼ阻害活性を評価することにより、ホスホリパーゼ阻害機能部分をポリマー部分または他の非吸収性部分に適切に取り付けたホスホリパーゼ阻害薬を得ることができる。

【0137】

一般に、阻害の程度は本発明では狭い意味では重要ではないが、特定の実施例においては大きな意味をもつことがある。ゆえに、「阻害」およびこの関連用語は、酵素活性の完全な阻害を意味するものではない。例えば阻害とは、阻害薬がない場合に比較して、酵素活性を少なくとも約50%、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましく

10

20

30

40

50

は少なくとも約98%、さらに好ましくは少なくとも99%、低下させることを意味する。最も好ましくは、ホスホリパーゼ阻害治療を受ける患者において、治療する疾患(例えばここに公開されているもの)の少なくとも1つに対し治療または予防的なメリットを生じさせるのに充分効果的な用量で、酵素活性を低減することを意味する。また反対に、「阻害しない」およびこの関連用語は必ずしも、酵素活性への影響が全く存在しない状態を意味するものではない。例えば、阻害薬の存在下において酵素活性が約20%、約10%、約5%、好ましくは約2%、より好ましくは約1%低減した状態を意味する。最も好ましくは、明らかな効果が生じない程度の、酵素活性のごくわずかな低下を意味する。さらに、「顕著に阻害しない」およびこの関連用語は、阻害薬の存在下において酵素活性が約40%、約30%、約25%、好ましくは約20%、より好ましくは約15%低減した状態を意味する。さらに、「基本的

10

に阻害しない」およびこの関連用語は、阻害薬の存在下において酵素活性が約30%、約25%、約20%、好ましくは約15%、より好ましくは約10%低減した状態を意味する。阻害薬は、ホスホリパーゼ活性を、可逆的または不可逆的に阻害するよう影響を与える。本発明のホスホリパーゼ阻害薬による可逆的阻害には、競合的(例えば、ホスホリパーゼの触媒部位にホスホリパーゼ阻害薬が結合する場合)な場合と非競合的(ホスホリパーゼのアロステリック部位にホスホリパーゼ阻害薬が結合し、アロステリックな変化をもたらす場合)、および競合不可(阻害薬が、ホスホリパーゼと基質の複合体に結合する場合)のものがある。阻害は不可逆反応のこともある。この場合、ホスホリパーゼ阻害薬は、ホスホリパーゼの特定部位に結合したまま、または顕著に結合したまま、または本質的に結合したままであり、酵素から分離せず、または顕著に分離することはなく、または本質的に分離することはない。

20

【0138】

管腔集中 PLA2

前述のように、いくつかの実施例において、本発明のPLA2阻害薬は、好ましくは管腔集中型PLA2である。このホスホリパーゼ阻害薬は、管腔集中機能と酵素阻害機能の両方を有するようにすることができる。いくつかのスキームにおいて、このような二機能性は共同作用的に(例えば、同じ構造特徴や荷電性の特徴を使用することによって)実現することができ、また他のスキームでは、管腔集中機能は酵素阻害機能とは独立に(異なる構造や荷電性の特徴を使用することによって)実現することができる。

【0139】

図2に示す化合物2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸(ここではILY-4001またはメチルインドキサムとも呼ぶ)は、in-vitro Caco-2細胞検査(例6Bを参照)およびin-vivoの生物学的利用能研究(例えば例6Cを参照)を使用して、その吸収性が評価されている。本発明の好ましい実施例によると、例えば、荷電の改変や、インドール部分とポリマーとの間の共有結合により、この化合物の生物学的利用能が低下する代わりに管腔集中機能を向上させることができる。(例えば共同所有PCT申請番号US/2005/_____, Charmot et al. "Phospholipase Inhibitors Localized in the Gastrointestinal Lumen" (2005年5月3日)を参照。この内容は参照によってここに組み込まれる。)

30

【0140】

本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、好ましくは消化器官管腔内に集中して留まり、これにより、被験者に投与した場合に、ホスホリパーゼ阻害薬の多くの部分が消化器官管腔に残る。投与後、管腔集中型ホスホリパーゼ阻害薬は、消化器官(胃、十二指腸、小腸、大腸)に留まり、自然に通り抜ける(消化器官を経由して体外に排泄されるまで)。ホスホリパーゼ阻害薬は好ましくは、少なくとも胃と十二指腸を通過する間はかなり安定(例えば、組成や、ホスホリパーゼを阻害する機能の面で)であり、さらに好ましくは、胃、十二指腸、小腸を通過する間はかなり安定であり、最も好ましくは、全消化器官を通過する間ずっと、かなり安定である。ホスホリパーゼ阻害薬は、消化器官管腔内で作用し、例えばホスホリパーゼ基質を異化するか、または、ホスホリパーゼによる消化生成物の吸収や下流の活性を改変することができる。

40

50

【0141】

ホスホリパーゼ阻害薬は、あるアプローチにおいて、消化器官管腔内に留まり、消化器官粘膜からは吸収されない。別のアプローチでは、ホスホリパーゼ阻害薬は粘膜細胞にいったん吸収され、消化器官管腔内に排出されて戻されることにより、消化器官管腔内に集中して留まることができる。

【0142】

概して、ホスホリパーゼ阻害薬に管腔集中機能をもたせる前述のような一般的アプローチの分類に拘束されることなく、本発明の好ましいホスホリパーゼ阻害薬は（本発明のさまざまな面を考慮した上で）、いくつかの全般的な管腔集中機能の実施例によって実現できる。ある全般的な管腔集中機能の実施例において、例えば、ホスホリパーゼ阻害薬は、

10

本発明のホスホリパーゼ阻害部分（前述のインドール関連化合物およびインドール化合物）に、あるオリゴマーまたはポリマー部分が共有結合（直接に、または結合部分を介して間接的に結合）したものである。さらに全般的な実施例において、上記のインドール関連化合物およびインドール化合物を含め、管腔集中型ホスホリパーゼ阻害薬は、それ自体の置換有機小分子とすることができる。

【0143】

本発明のさまざまな面に含まれているそれぞれの面および実施例において一般に、阻害薬は、被験者に投与した後、被験者の消化器官管腔内に留まる。ここで被験者は被験動物、好ましくは哺乳動物であり、これにはヒトや、他の哺乳動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコ、イヌ、ブタ、家禽類、ウシ、ウマなど）が含まれる。「消化器官管腔」という後は、ここでは単に「管腔」とも呼ばれ、動物の内臓一般も含めた消化器官の内側の空間を指す。いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は消化器官粘膜からは吸収されない。「消化器官粘膜」とは、身体他の部分と消化器官管腔とを分ける細胞層を指し、胃粘膜や腸粘膜、例えば小腸の粘膜などが含まれる。いくつかの実施例において、管腔集中機能は、消化器官粘膜細胞によって阻害薬がいったん吸収された後、消化器官管腔内に排出されることによって達成される。「消化器官粘膜細胞」とは、消化器官粘膜のあらゆる細胞を指し、例えば、小腸の腸細胞、結腸の腸細胞、頂端部細胞などの腸の上皮細胞が含まれる。このような排出によって、全体的な「非吸収性」が実現でき、この語および類似表現が以下用いられる。

20

【0144】

好ましいアプローチにおいて、ホスホリパーゼ阻害薬は、消化器官管腔から消化器官粘膜細胞にはあまり吸収されない阻害薬である。ここで「吸収されない」という表現は、使用された阻害薬のかなりの部分、好ましくは統計的にかなりの部分、より好ましくはホスホリパーゼ阻害薬の実質上すべてが、消化器官管腔内に留まることを指す。例えば、ホスホリパーゼ阻害薬の少なくとも約80%が消化器官管腔内に留まり、ホスホリパーゼ阻害薬の少なくとも約85%が消化器官管腔内に留まり、ホスホリパーゼ阻害薬の少なくとも約90%が消化器官管腔内に留まり、少なくとも約95%、少なくとも約98%、好ましくは少なくとも約99%、より好ましくは少なくとも約99.5%が消化器官管腔内に留まる。その代わり、血清中生物学的利用能の点で述べたように、ホスホリパーゼ阻害薬のうち生理学的にはごくわずかの量が、被験者に投与後に被験者の血清中に吸収されている。例えば、ホスホリパーゼ阻害薬を被験者に投与後、投与したホスホリパーゼ阻害薬の約20%未満が被験者の血清中に生じ（投与後の検出可能な血清中生物学的利用能に基づく）、好ましくはホスホリパーゼ阻害薬の約15%未満、最も好ましくはホスホリパーゼ阻害薬の約10%未満が被験者の血清中に生じる。いくつかの実施例においては、約5%未満、約2%未満、約1%未満、最も好ましくは約0.5%が、被験者の血清中に生じる。いくつかの場合において、消化器官管腔集中機能では、例えば細胞間輸送および細胞内輸送の両方について、および能動的輸送や受動的輸送について、消化器官粘膜を介した移動量を減らすことができる。このような実施例のホスホリパーゼ阻害薬は、例えば小腸の頂端部細胞を介した細胞内輸送について、消化器官粘膜細胞への浸透全体が阻害される。このような実施例においてホスホリパーゼ阻害薬は、管腔内を覆う消化器官粘膜細胞間の細胞間輸送において、「タイトな接合」を通り抜

30

40

50

ける浸透全体が阻害される。「吸収されない」という表現は、以下「非吸収性」「非吸収」などの類似表現としても同様に以下用いられる。

【0145】

いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬または阻害部分は、ホスホリパーゼ阻害薬の特に荷電やサイズ、およびその他の物理的・化学的パラメータを改変することによって、非吸収性にすることができる。例えばいくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は、消化器官粘膜からの吸収を最小限またはゼロにするような分子構造にすることができる。薬剤の吸収性については、例えば、Lipinskyルール（"the rule of five"とも呼ばれる）などの薬力学原則を適用することによって選択できる。ガイドラインとしてLipinskyは(i) 分子量、(ii) 水素結合ドナーの数、(iii) 水素結合アクセプターの数、(iv) 水/オクタノールの分配係数 (Moriguchi logP) を示し、それぞれが特定の閾値を超えれば、一般に、全身性濃度には顕著な影響は生じない。Lipinsky et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 2001 3-26を参照。この内容は参照によってここに組み込まれる。従って、非吸収性のホスホリパーゼ阻害薬は、Lipinskyの閾値の1つまたは複数、好ましくは2つ以上、3つ以上、4つ以上、またはLipinskyの閾値すべてを上回るような分子構造を構成することによって実現できる。詳しくはLipinsky et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*, *Adv. Drug Delivery Reviews*, 46:3-26 (2001) や、Lipinski, *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*, *J. Pharm. & Toxicol. Methods*, 44:235-249(2000) を参照。この内容は参照によってここに組み込まれる。いくつかの好ましい実施例において、例えば、本発明のホスホリパーゼ阻害薬は、次のような特性を1つまたは複数有するように構築することができる：(i) 分子量が約500 Daより大きい、(ii) NHやOHなどの水素結合ドナーとなり得るものの数が約5より大きい、(iii) O原子やN原子などの水素結合アクセプターとなり得るものの数が約10より大きい、(iv) Moriguchi分配係数が約 10^5 より大きい、すなわちlogPが約5より大きい。下記に述べるホスホリパーゼ阻害薬やホスホリパーゼ阻害部分の既知の技法はすべて、非吸収性分子構造の構築に使用することができる。

【0146】

好ましくは、この化合物の浸透性は実験によってスクリーニングされる。浸透係数はこの分野の技能を有するものに知られている方法によって測定することができ、例えばCaco-2細胞浸透性検査などがある。ヒト結腸腺癌由来細胞であるCaco-2を用いて、腸の薬剤吸収をモデル化し、浸透性に基づき化合物のランク付けをすることができる。例えば、Caco-2単層における見かけの浸透速度が 1×10^{-7} cm/sec以下の範囲で測定され、ヒトにおいてほとんど吸収されない相関関係が示されている (Artursson P, K. J. 1991)。浸透性は、消化器官粘膜のモデルとして人工膜を使用して測定することもできる。例えば、合成膜をレシチンやドデカンに浸し、消化器官粘膜の浸透特性を模することができる。この膜は、コンパートメントの隔膜として使用し、一方のコンパートメントにホスホリパーゼ阻害薬を入れ、浸透速度をモニターすることができる。("Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175(3): 880-885を参照。) また、平行人工膜透過試験(PAMPA)を行うこともできる。このようなin vitro測定は、実際のin vivoの浸透性を妥当に示すことができる。例えばWohnsland et al. *J. Med. Chem.*, 2001, 44:923-930; Schmidt et al., Millipore corp. Application note, 2002, n° AN1725EN00, and n° AN1728EN00を参照。これらの内容は参照によってここに組み込まれる。浸透係数は、常用対数LogPeとして報告される。

【0147】

いくつかの実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬の浸透係数Log Pe は、Wohnsland et al. *J. Med. Chem.* 2001, 44: 923-930に記載されている浸透性測定実験で測定した場合、好ましくは約-4未満、または約 -4.5未満、または約 -5未満、より好ましくは約 -5.5未満、さらに好ましくは約 -6未満である。

【0148】

10

20

30

40

50

記載のように、ある一般的な管腔集中型の実施例において、ホスホリパーゼ阻害薬は前述のインドール関連化合物およびインドール化合物などのホスホリパーゼ阻害部分と、それに結合あるいは付属する非吸収性のオリゴマーまたはポリマー部分から成り、ここでこのオリゴマーまたはポリマー部分は、疎水性部分、親水性部分、あるいは荷電部分とすることができる。いくつかの好ましい実施例において、ホスホリパーゼ阻害部分はポリマー部分と結合している。一般に、このようなポリマー阻害剤は、例えば荷電特性や、親水性 / 疎水性のバランスや配分、分子構造などいくつかの機能の選択または組合せにより非吸収性となるような大きさに構築され、酵素阻害機能を有する。この全般的な実施例におけるオリゴマーまたはポリマーは、好ましくは水溶性であり、好ましくはコポリマー（2種類のモノマー繰り返し単位から成るポリマーや、ターポリマー、4種以上から成るポリマーを含む）であり、例えばランダムコポリマーやブロックコポリマーを含む。オリゴマーまたはポリマーには一般に、1つまたは複数の陰イオンモノマー部分など、1つまたは複数のイオン性モノマー部分を含むことができる。オリゴマーまたはポリマーには一般に、1つまたは複数の疎水性モノマー部分を含むことができる。

10

20

【0149】

この全般的な実施例において、もう1つ具体的なアプローチとして、ポリマー部分は比較的大きな分子量とし、例えば約1000 Da～約500,000 Da、好ましくは約5000～約200,000 Da、より好ましくは、十分に大きな分子量によって、消化器官粘膜からの吸収量（合計）を阻害または除外することができる。大きなポリマー部分にすると、例えば比較的大きな水溶性または不溶性（架橋構造など）のポリマーに複数の阻害部分（図2に関連して後述）をもたせるといった体外除去アプローチに有利となり得る。

【0150】

この全般的な実施例において、もう1つ別の具体的なアプローチとして、オリゴマーまたはポリマー部分は低分子量として、例えば約5000 Da未満とし、好ましくは約3000Da、場合によっては約1000 Daとすることができる。このアプローチにおいて好ましくは、オリゴマーまたはポリマー部分は主に疎水性ポリマーのブロックから成り、これにより水脂質界面になじむ阻害薬にすることができる。

【0151】

文献

下記の参考文献には、例えば上記に述べたような、本発明に関連した、この分野における既知の情報が記載されている。場合によっては、これら参考文献は、最初の2著者名および発行年を記載することによって本発明の申請文中に記載されている。これらの参考文献の内容は参照によってここに組み込まれる。

30

【0152】

【化35】

Baker, R. R. and H. Chang (2000). "A metabolic path for the degradation of lysophosphatidic acid, an inhibitor of lysophosphatidylcholine lysophospholipase, in neuronal nuclei of cerebral cortex." Biochim Biophys Acta 1483(1): 58-68.

40

【0153】

【 化 3 6 】

Baker, R. R. and H. Y. Chang (1999). "Evidence for two distinct lysophospholipase activities that degrade lysophosphatidylcholine and lysophosphatidic acid in neuronal nuclei of cerebral cortex." Biochim Biophys Acta **1438**(2): 253-63.

Carriere (1993). "Secretion and contribution to Lipolysis of Gastric and Pancreatic Lipases During a Test Meal in Humans." Gastroenterology: 876-888.

Carriere, F., C. Renou, et al. (2000). "The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals." Gastroenterology **119**(4): 949-60.

10

Duan, R. D. and B. Borgstrom (1993). "Is there a specific lysophospholipase in human pancreatic juice?" Biochim Biophys Acta **1167**(3): 326-30.

Dunlop, M. E., E. Muggli, et al. (1997). "Differential disposition of lysophosphatidylcholine in diabetes compared with raised glucose: implications for prostaglandin production in the diabetic kidney glomerulus in vivo." Biochim Biophys Acta **1345**(3): 306-16.

20

el Soda, M., L. Pannell, et al. (1989). "Microencapsulated enzyme systems for the acceleration of cheese ripening." J Microencapsul **6**(3): 319-26.

Flieger, A., S. Gong, et al. (2001). "Novel lysophospholipase A secreted by Legionella pneumophila." J Bacteriol **183**(6): 2121-4.

30

Flieger, A., B. Neumeister, et al. (2002). "Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of Legionella pneumophila and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine." Infect Immun **70**(11): 6094-106.

Gesta, S., M. F. Simon, et al. (2002). "Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis." J Lipid Res **43**(6): 904-10.

【 0 1 5 4 】

40

【 化 3 7 】

McMorn, P. and G. J. Hutchings (2004). "Heterogeneous enantioselective catalysts: strategies for the immobilisation of homogeneous catalysts." Chem Soc Rev **33**(2): 108-22.

Millan, C. G., M. L. Marinero, et al. (2004). "Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers." J Control Release **95**(1): 27-49.

Muzykantov, V. R. (2001). "Delivery of antioxidant enzyme proteins to the lung." Antioxid Redox Signal **3**(1): 39-62.

10

Ross, B. M. and S. J. Kish (1994). "Characterization of lysophospholipid metabolizing enzymes in human brain." J Neurochem **63**(5): 1839-48.

Sakagami, H., J. Aoki, et al. (2005). "Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP) family." J Biol Chem.

20

Shah, N. P. (2000). "Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods." J Dairy Sci **83**(4): 894-907.

Shanado, Y., M. Kometani, et al. (2004). "Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach." Biochem Biophys Res Commun **325**(4): 1487-94.

Sunaga, H., H. Sugimoto, et al. (1995). "Purification and properties of lysophospholipase isoenzymes from pig gastric mucosa." Biochem J **308** (Pt 2): 551-7.

30

Taniyama, Y., S. Shibata, et al. (1999). "Cloning and expression of a novel lysophospholipase which structurally resembles lecithin cholesterol acyltransferase." Biochem Biophys Res Commun **257**(1): 50-6.

Tokumura, A., Y. Kanaya, et al. (2002). "Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits." J Lipid Res **43**(2): 307-15.

40

【 0 1 5 5 】

【化 3 8】

Tokumura, A., E. Majima, et al. (2002). "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase." J Biol Chem **277**(42): 39436-42.

Tosti, E., L. Dahl, et al. (1999). "Endothelial degradation of extracellular lysophosphatidylcholine." Scand J Clin Lab Invest **59**(4): 249-57.

Toyoda, T., H. Sugimoto, et al. (1999). "Sequence, expression in *Escherichia coli*, and characterization of lysophospholipase II." Biochim Biophys Acta **1437**(2): 182-93.

10

Walde, P. and S. Ichikawa (2001). "Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications." Biomol Eng **18**(4): 143-77.

Wang, A. and E. A. Dennis (1999). "Mammalian lysophospholipases." Biochim Biophys Acta **1439**(1): 1-16.

20

Wang, A., H. C. Yang, et al. (1999). "A specific human lysophospholipase: cDNA cloning, tissue distribution and kinetic characterization." Biochim Biophys Acta **1437**(2): 157-69.

Witt, W., A. Mertsching, et al. (1984). "Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **795**(1): 117-24.

Witt, W., M. E. Schweingruber, et al. (1984). "Phospholipase B from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Separation of two forms with different carbohydrate content." Biochim Biophys Acta **795**(1): 108-16.

30

Wright, L. C., J. Payne, et al. (2004). "Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*." Biochem J **384**(Pt 2): 377-84.

【実施例】

【0 1 5 6】

40

例1: マウスモデルにおけるインスリン抵抗性の低下

ホスホリパーゼ阻害薬（例えばここに公開されているホスホリパーゼ阻害部分から成る組成）は、マウスモデルに用いて、例えば食餌による糖尿病の発症に関連し、例えば食餌によるインスリン抵抗性の抑制を示すことができる。ホスホリパーゼ阻害薬は被験動物に対し、特定の用量（例えば約1 ml/体重kg、または約25～約50 μ l/回）の餌サプリメントまたは経口胃管BIDによって投与することができる。典型的な担体の阻害薬懸濁液は、PEG-400が約9%、Tween80が約0.05%、阻害薬濃度が約5～約13 mg/mlから成る。この懸濁液を、毎日の餌のサプリメントとして食餌重量の約0.015%未満追加するか、または経口胃管BIDで1日約10mg/体重kg～約90 mg/体重kgを投与する。

【0 1 5 7】

50

使用するマウス用餌は、欧米型食事（高脂肪や高コレステロール）を模した組成にすることができる。例えば、餌には食餌重量で乳脂肪約21%、コレステロール約0.15%を含めることができ、この場合、合計カロリーの42%が脂肪由来のカロリーとなる。詳しくはHarlan Teklad, diet TD88137 を参照。餌に阻害薬を混合する場合は、研究期間中毎日、その担体を、阻害薬を含む場合も含まない場合にも、餌に混合してマウスに与えることができる。

【0158】

この研究の期間は通常約6～約8週間であり、被験動物にはこの期間中毎日、用量を投与する。投与群は通常、各群約6～約8匹の被験動物が含まれ、投与しない比較標準群と、担体だけの比較標準群、投与量が約10mg/体重kg～約90 mg/体重kgの範囲の用量投与群から構成することができる。

10

【0159】

約6～約8週間の研究期間終了時点で、経口グルコース負荷耐性検査やインスリン感受性検査を次のように行うことができる：

経口グルコース負荷耐性検査 - 一晚絶食後、各投与量群のマウスに、生理食塩水約50 μ l中、グルコースをボラスで与える（例えば約2 g/体重kgを胃管経由で）。グルコース投与前と、投与から約15分後、約30分後、約60分後、約120分後に尾静脈から血液サンプルを採取する。各時点の血中グルコース濃度を測定する。

【0160】

インスリン感受性検査 - 約6時間の絶食後の朝、各投与量群のマウスに、例えば腹膜投与により、ウシインスリン（例えば約1 U/体重kg）を投与する。インスリン投与前と、投与から約15分後、約30分後、約60分後、約120分後に尾静脈から血液サンプルを採取する。各時点の血漿中インスリン濃度を、例えばラジオイムノアッセイにより測定する。

20

【0161】

非吸収性のホスホリパーゼ阻害薬（例えばホスホリパーゼA2阻害薬など）の効果は、インスリン抵抗性の低下である。すなわち、細胞内のグルコース代謝効率が向上したことにより、欧米型食餌（高脂肪 / 高コレステロール）を摂取する投与群の被験動物の方が、比較標準群の動物に比べて、グルコース大量投与にも耐えられる力が向上している。用量の効果についても測定することができる。

【0162】

例2：マウスモデルにおける脂肪吸収の低下

ホスホリパーゼ阻害薬（例えばここに公開されているホスホリパーゼ阻害部分から成る組成）は、マウスモデルに用いて、例えば欧米型食餌を摂取している被験動物において、脂質吸収を低下させることができる。ホスホリパーゼ阻害薬は被験動物に対し、特定の用量（例えば約1 ml/体重kg、または約25～約50 μ l/回）の餌サプリメントまたは経口胃管BIDによって投与することができる。典型的な担体の阻害薬懸濁液は、PEG-400が約9%、Tween80が約0.05%、阻害薬濃度が約5～約13 mg/mlから成る。この懸濁液を、毎日の餌のサプリメントとして食餌重量の約0.015%未満追加するか、または経口胃管BIDで1日約10mg/体重kg～90 mg/体重kgを投与する。

30

【0163】

使用するマウス用餌は、欧米型食事（高脂肪や高コレステロール）を模した組成にすることができる。例えば、餌には食餌重量で乳脂肪約21%、コレステロール約0.15%を含めることができ、この場合、合計カロリーの42%が脂肪由来のカロリーとなる。詳しくはHarlan Teklad, diet TD88137 を参照。餌に阻害薬を混合する場合は、研究期間中毎日、その担体を、阻害薬を含む場合も含まない場合にも、餌に混合してマウスに与えることができる。

40

【0164】

約6～約8週間の期間中、トリグリセリド測定を行い、被験動物にはこの期間中毎日、用量を投与する。投与群は通常、各群約6～約8匹の被験動物が含まれ、投与しない比較標準群と、担体だけの比較標準群、投与量が約10mg/体重kg～約90 mg/体重kgの範囲の用量投

50

と群から構成することができる。毎週、血漿サンプルを被験動物から採取し、全トリグリセリド濃度を分析することにより、循環血中に吸収された脂質の量を測定することができる。

【0165】

非吸収性のホスホリパーゼ阻害薬（例えばホスホリパーゼA2阻害薬など）の効果は、血漿中脂質濃度の全体的な低下である。すなわち、欧米型食餌（高脂肪 / 高コレステロール）を摂取する投与群の被験動物の方が、比較標準群の動物に比べて、脂肪吸収が減少することが示されている。用量の効果についても測定することができる。

【0166】

例3：マウスモデルにおける、食餌による高コレステロール血症の減少

ホスホリパーゼ阻害薬（例えばここに公開されているホスホリパーゼ阻害部分から成る組成）は、マウスモデルに用いて、例えば欧米型食餌を摂取している被験動物において、食餌による高コレステロール血症を抑制することができる。ホスホリパーゼ阻害薬は被験動物に対し、餌サプリメントまたは経口胃管BID（例えば約1 ml/体重kg、または約25～約50 μl/回）によって投与することができる。典型的な担体の阻害薬懸濁液は、PEG-400が約9%、Tween80が約0.05%、阻害薬濃度が約5～約13 mg/mlから成る。この懸濁液を、毎日の餌のサプリメントとして食餌重量の約0.015%未満追加するか、または経口胃管BIDで1日約10mg/体重kg～約90mg/体重kgを投与する。

【0167】

使用するマウス用餌は、欧米型食事（高脂肪や高コレステロール）を模した組成にすることができる。例えば、餌には食餌重量で乳脂肪約21%、コレステロール約0.15%を含めることができ、この場合、合計カロリーの42%が脂肪由来のカロリーとなる。詳しくはHarlan Teklad, diet TD88137 を参照。餌に阻害薬を混合する場合は、研究期間中毎日、その担体を、阻害薬を含む場合も含まない場合にも、餌に混合してマウスに与えることができる。

【0168】

約6～約8週間の期間中、コレステロールやトリグリセリドの測定を行い、被験動物にはこの期間中毎日、用量を投与する。投与群は通常、各群約6～約8匹の被験動物が含まれ、投与しない比較標準群と、担体だけの比較標準群、投与量が約10mg/体重kg～約90 mg/体重kgの範囲の用量投与群から構成することができる。毎週、血漿サンプルを被験動物から採取し、全コレステロール濃度や全トリグリセリド濃度を分析することにより、循環血中に吸収されたコレステロールや脂質の量を測定することができる。マウスの血漿コレステロールの多くはHDLに関連しているため（ヒトにおいてはコレステロールの多くはLDL関連である）、HDLと非HDLの割合を区別して、非吸収ホスホリパーゼ阻害薬が血漿中の非HDL（例えばVLDL/LDL）の濃度を低下させる効果を測定するのに利用することができる。

【0169】

非吸収性のホスホリパーゼ阻害薬（例えばホスホリパーゼA2阻害薬など）の効果は、欧米型食餌（高脂肪 / 高コレステロール）を摂取する投与群の被験動物の方が、比較標準群の動物に比べて、高コレステロール血症が全体的に低下することである。用量の効果についても測定することができる。

【0170】

例4：ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] (メチルインドキサム)の合成

この例では、ホスホリパーゼ阻害薬または阻害部分として使用する化合物を合成した。具体的には、図2に示す化合物2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸が合成された。この化合物はこれらの例においてILY-4001と呼ばれ、またメチルインドキサムとも称される。

【0171】

図9には、ILY-4001の合成経路全体のアウトラインを示す。図9で、各化合物の下にある番号は、下記の実験説明の各化合物化学名に付いているカッコの番号に対応している。

10

20

30

40

50

【0172】

2-メチル-3-メトキシアニリン(2) [04-035-11]。水和ヒドラジン (159.7 g、3.19 mol) を攪拌しながら冷やし(約5℃)、ここに10~20℃の85%ギ酸(172.8 g、3.19 mol)を滴下して加えた。この混合液を、メタノール中(1000 mL)の2-メチル-3-ニトロアニソール(1) (53.34 g、0.319 mol) 溶液に亜鉛末(104.3 g、1.595 mol)を攪拌懸濁した液に、滴下して加えた。発熱反応が生じた。加え終わったら、反応混合液をさらに2時間攪拌し(温度が61℃から室温になるまで)、生じた沈殿を濾過し、メタノールで洗った(3×150 mL)。濾液は減圧下で濃縮し、体積を約250 mLとした。この濃縮液をEtOAc(500 mL)と飽和NaHCO₃水溶液(500 mL)で処理した。水相は分離し、廃棄した。この有機相を水(300 mL)で洗い、1NHCl(800 mL)で抽出した。この酸性の抽出液を、EtOAc(300 mL)で洗い、K₂CO₃(90g)で塩基性化した。EtOAc(3×200 mL)で遊離塩基2を抽出し、抽出液を合わせてMgSO₄で乾燥させた。濾過して、濾液から溶媒を除去した後、赤い油状の生成物2を得た。これは、さらに精製することなく、次の段階に使用した。収量：42.0 g (96%)。

【0173】

N-tert-ブチルオキシカルボニル-2-メチル-3-メトキシアニリン(3) [04-035-12]。アミン2(42.58 g、0.31 mol)と重炭酸ジ-tert-ブチル(65.48 g、0.30 mol)をTHF(300 mL)に攪拌して溶液とし、これを4時間還流加熱した。室温まで冷ました後、反応混合液を減圧下で濃縮し、この液をEtOAc(500 mL)に溶かした。この液を0.5 Mクエン酸(2×100 mL)で洗い、水(100 mL)で洗い、飽和NaHCO₃水溶液(200 mL)で洗い、塩水(200 mL)で洗い、最後にMgSO₄で乾燥させた。濾過して、濾液から溶媒を除去した後の残留物(赤い油状、73.6g)をヘキサン(500 mL)に溶かし、シリカゲルパッド(TLC用)で濾過した。濾液を減圧下で蒸発させ、黄色い固体のN-Boc アニリン 3を得た。収量：68.1g (96%)。

【0174】

4-メトキシ-2-メチル-1H-インドール(5) [04-035-13]。N-Boc アニリン 3(58.14 g、0.245 mol)を無水THF(400 mL)に溶かし攪拌冷却(-50℃)した溶液に、1.4 M sec-BuLiのシクロヘキサン溶液(0.491 mol、350.7 mL)を-48~-50℃で滴下して加え、反応混合液を放置して-20℃にした。-60℃に冷却した後、N-メトキシ-N-メチルアセトアミド(25.30 g、0.245 mol)のTHF溶液(25 mL)を-57~-60℃で滴下して加えた。-60℃で1時間、反応混合液を攪拌し、1時間放置して15℃にした。-15℃まで冷ました後、反応液に2NHCl(245 mL)を加えて反応を止め、この液に2N HClを加えてpHを約7に調整した。有機相は分離し、別に保存した。水相はEtOAc(3×100mL)で抽出した。有機相溶液を減圧下で濃縮し、残った青白い油をEtOAc(300 mL)に溶かし、EtOAc抽出液と合わせた。この液を水(2×200mL)で洗い、0.5 Mクエン酸(100 mL)で洗い、飽和NaHCO₃水溶液(100 mL)で洗い、塩水(200 mL)で洗い、最後にMgSO₄で乾燥させた。濾過して、濾液から溶媒を除去した後、最初のN-Boc アニリン 3と中間生成物ケトン 4(モル比は約1:1)の混合物が、青白い油(67.05 g)として得られた。

【0175】

得られた油を無水CH₂Cl₂(150 mL)に溶かし、この溶液を0~-5℃に冷却した。トリフルオロ酢酸(65 mL)を滴下して加え、反応混合液を放置して室温にした。16時間攪拌した後、さらにトリフルオロ酢酸(35 mL)を加え、さらに16時間攪拌を続けた。この反応混合液を減圧下で濃縮し、赤い油状の液をCH₂Cl₂(500 mL)に溶かした。この溶液を、水(3×200 mL)で洗い、MgSO₄で乾燥させた。シリカゲル 60のパッドで濾過し、この濾液を減圧下で蒸発させて、黄色い固体の粗製生成物5(27.2 g)を得た。乾燥クロマトグラフィー(シリカゲルTLC、溶媒はヘキサン中20% EtOAc)によって精製し、白色固体のインドール 5を得た。収量：21.1g (53%)。

【0176】

1-[(1,1'-ビフェニル)-2-イルメチル]-4-メトキシ-2-メチル-1H-インドール(6) [04-035-14]。インドール 5(16.12 g、0.10 mol)を無水DMF(100 mL)に溶かした溶液を、攪

拌しながら冷やした (約15) 水素化ナトリウム (0.15 mol、6.0 g、ミネラルオイル中に60%、ヘキサン100mLで洗ってから反応に使用) の懸濁液 (DMF 50 mL中) の中に滴下して加えた。この反応混合液を室温で0.5時間攪拌した。反応混合液を約5 に冷却した後、臭化2-フェニルベンジル (25.0 g、0.101 mol) を滴下して加え、この反応混合液を室温で18時間攪拌した。水 (10 mL) およびEtOAc (500 mL) を加えて、反応を止めた。この混合液を、水 (2×200 mL + 3×100 mL) で洗い、塩水 (200 mL) で洗い、MgSO₄ で乾燥させた。濾過して、減圧下で濾液から溶媒を除去した後の残留物 (35.5 g、赤色の粘稠な油) を乾燥クロマトグラフィー (シリカゲルTLC、溶媒はヘキサン中CH₂Cl₂ 5% 25%) で精製し、青白い油状の生成物 6 を得た。収量：23.71 g (72%)。

【0177】

1-[(1,1'-ビフェニル)-2-イルメチル]-4-ヒドロキシ-2-メチル-1H-インドール (7) [04-035-15]。メトキシ誘導体 6 (23.61 g、72.1 mmol) を無水CH₂Cl₂ (250 mL) に溶かし攪拌冷却 (10) した溶液に、CH₂Cl₂ 中のBBr₃ 1M溶液 (300 mmol、300 mL) を15~20 で滴下して加え、この濃い色の反応混合物を室温で5時間攪拌した。室温まで冷ました後、反応混合液を約5 に冷却し、あらかじめ冷やしてあった (15) EtOAc (450 mL) に溶かした。この溶液を、水 (3×200 mL) で洗い、塩水 (200 mL) で洗い、MgSO₄ で乾燥させた。濾過して、減圧下で濾液から溶媒を除去した後の残留物 (26.1 g、濃い色の半固体) を乾燥クロマトグラフィー (シリカゲルTLC、溶媒はヘキサン中EtOAc5% 25%) で精製し、茶色固体の生成物 7 を得た。収量：4.30 g (19%)。

【0178】

2-{1-[(1,1'-ビフェニル)-2-イルメチル]-2-メチル-1H-インドール-4-イル}オキシ}酢酸メチルエステル (8) [04-035-16]。水素化ナトリウム (0.549 g、13.7 mmol、ミネラルオイル中に60%) の無水DMF (15 mL) 中懸濁液を攪拌し、ここに化合物 7 (4.30 g、13.7 mmol) のDMF (30 mL) 溶液を滴下して加え、この反応混合液を室温で40分間攪拌した。メチルプロモ酢酸 (2.10 g、13.7 mmol) を滴下して加え、室温でさらに21時間攪拌を続けた。この反応混合液を、EtOAc (200 mL) で希釈し、水 (4×200mL) で洗い、塩水 (200 mL) で洗い、MgSO₄ で乾燥させた。濾過して、減圧下で濾液から溶媒を除去した後の残留物 (5.37g、濃い色の半固体) を乾燥クロマトグラフィー (シリカゲルTLC、溶媒はヘキサン中EtOAc 5% 30%) で精製し、黄色い固体の生成物 8 を得た。収量：4.71g (89%)。

【0179】

2-{[3-(2-アミノ-1,2-ジオキソエチル)-1-[(1,1'-ビフェニル)-2-イルメチル]-2-メチル-1H-インドール-4-イル}オキシ}酢酸メチルエステル (9) [04-035-17]。塩化オキサリル (1.55 g、12.2 mmol) の無水CH₂Cl₂ (20 mL) 溶液を攪拌し、ここに化合物 8 のCH₂Cl₂ (40 mL) 溶液を滴下して加え、この反応混合液を室温で80分間攪拌した。反応混合液を約10 に冷却した後、NH₃ のCH₂Cl₂ (10 mL) 飽和溶液を滴下して加え、この反応混合液に、約0 でNH₃ (気体) を飽和させた。沈殿の生成が観察された。この反応混合物を放置して室温にし、減圧下で濃縮して乾燥させた。濃い色の固形物 (6.50 g) を乾燥クロマトグラフィー (シリカゲルTLC、溶媒はヘキサン中30% EtOAc 100% EtOAc) によって精製し、黄色い固体の生成物9 を得た。収量：4.64 g (83%)。

【0180】

2-{[3-(2-アミノ-1,2-ジオキソエチル)-1-[(1,1'-ビフェニル)-2-イルメチル]-2-メチル-1H-インドール-4-イル}オキシ}酢酸 (ILY-4001) [04-035-18]。化合物 9 (4.61 g、10.1 mmol) をTHF (50 mL) および水 (10 mL) の混合液に溶かし、溶液を攪拌し、水酸化リチウム一水和物 (0.848 g、20.2 mmol) を水 (20 mL) に溶かした溶液を少しずつ加え、この反応混合液を室温で2時間攪拌した。水 (70 mL) を加えた後、この反応混合液を減圧下で濃縮し、体積を約100 mL とした。黄色い沈殿の生成が観察された。この黄色いスラリーに、2NHCl (20 mL) とEtOAc (200 mL) を加え、この混合液を室温で16時間攪拌した。黄緑色の沈殿を濾過し、これをEtOAc (3×20 mL)、Et₂O (20 mL)、ヘキサン (20 mL) で洗った。減圧下で乾燥し、青白い固体の生成物 (2.75 g) を得た。MS: 443.27 (M⁺ + 1)。元素分析: C₂₆H₂₂N₂O₅ + H₂O の計算値: C, 67.82、H, 5.25、N, 6.08。実測値: C, 68.50、H,

10

20

30

40

50

4.96、N, 6.01。HPLC：純度96.5%。¹HNMR (DMSO-d₆) 7.80 (br s, 1H)、7.72-7.25 (m, 9H)、7.07 (t, 1H)、6.93(d, 1H)、6.57 (d, 1H)、6.43 (d, 1H)、5.39 (s, 2H)、4.68 (s, 2H)、2.38 (s, 3H)。

【0181】

この濾液の水相を分離して捨て、有機相を塩水 (100 mL) で洗い、MgSO₄ で乾燥させた。濾過し、濾液の溶媒を減圧下で除去し、残った緑色の固形物をEtOAc (3×10 mL)、Et₂O (10 mL)、ヘキサン (10 mL) で洗った。減圧下で乾燥し、緑色っぽい固体の生成物の追加分 (1.13 g) を得た。

合計収量：2.75g + 1.13 g = 3.88 g (87%)。

【0182】

例5：ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (メチルインドキサム)のPLA2-IB阻害薬としてのIn-Vivo評価と、食物関連疾患の治療

この例は、図2に示す化合物2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸が、効果的なホスホリパーゼ-2A IB阻害薬であることを示し、遺伝的欠損のあるPLA2 (-/-) マウスの効果に近い、または匹敵する表現型効果を有することを示している。この例ではまた、この化合物(またはその誘導体部分)が、体重関連疾患やインスリン関連疾患、コレステロール関連疾患 (特に、肥満や糖尿病、インスリン抵抗性、グルコース不耐性、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症などを含む)などの治療に有効であることも示している。この例では、化合物[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ビフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸]はILY-4001 (またはメチルインドキサムとも呼ぶ) と称される。

【0183】

ILY-4001(図2)は、野生型マウスおよび遺伝子欠損のあるPLA2 (-/-) マウス (PLA2ノックアウト (KO) マウスとも呼ばれる) を用いた一連の実験において、PLA2IB阻害薬として評価された。これらの実験において、野生型マウスとPLA2 (-/-) マウスは高脂肪 / 高糖類食餌を摂取した。この詳細を下記に述べる。

【0184】

ILY-4001は、1-パルミチトイル-2-(10-ピレンデカノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール検定(PLA2 IB酵素で処理した担体からのピレン基質放出を測定)において、ヒトPLA2 IB酵素に対するIC50測定値が約0.2 uM、マウスPLA2 IB酵素に対しては0.15uMである (Singer, Ghomashchi et al. 2002)。実験研究により、IC-50値が約0.062と測定された。(例6Aを参照)。メチルインドキサムは、マウスおよびヒトの膵臓PLA2に対する活性に加え、低pHでも安定なため、胃を通過しても問題がないと予測される。Caco-2検査(例6Bを参照)および薬力学研究 (例6Cを参照)の結果から、ILY-4001は消化器官管腔による吸収が比較的低いことがわかる。

【0185】

この例5の研究では、治療群として24匹のマウスが使用された。詳細を下の表4に示す。簡単に説明すると、4つの群に分けられ、各群にはマウス6匹ずつが含まれる。このうち3つの群は、野生型PLA2(+/+) マウスが6匹ずつ属し (合計18匹)、残る1群には遺伝子欠損のあるPLA2 (-/-) マウス6匹が含まれた。野生型群の1つは、野生型の比較標準群として用い、ILY-4001の投与は行わなかった。他の2つの野生型群にはILY-4001が投与された。1つの群には25mg/kg/日の低用量 (表4にはLと記載)、もう1つの群には90 mg/kg/日の高用量 (表4にはHと記載) を投与した。PLA2 (-/-) の群は、陽性比較標準群として用いた。

【0186】

10

20

30

40

【化 3 9 - 1】

表 4：ILY-4001 研究の各投与群

群番号	処置群	動物数	ILY-4001 用量 (mg/kg/日)	継続期間 (週)
1	C57BL/6(wt)	6	0	10
2	C57BL/6(wt)	6	25 (L)	10

10

【 0 1 8 7】

【化 3 9 - 2】

3	C57BL/6(wt)	6	90 (H)	10
4	C57BL/6(PLA ₂ -KO)	6	0	10

20

この研究に使用した実験プロトコルは次の通りである。野生型および同遺伝子型 PLA2 (-/-) C57BL/Jマウスを含む、4つの群のマウスは、低脂肪 / 低炭水化物食に3日間順化させた。3日間の順化の後、一晚絶食させ、血清サンプルを採取して血漿中コレステロール値、トリグリセリド濃度、グルコース濃度のベースラインを確定し、また体重のベースラインも得た。各処置群のマウスに、高脂肪 / 高糖類の糖尿病誘発性食を与えた (Research Diets D12331)。高脂肪 / 高糖類の D12331 食 1000 g には、カゼイン (228g)、DL-メチオニン (2g)、マルトデキストリン 10 (170g)、蔗糖 (175g)、大豆油 (25g)、水素化ココヤシ油 (333.5g)、ミネラルミックス S10001 (40g)、重炭酸ナトリウム (10.5g)、クエン酸カリウム (4g)、ビタミンミックス V10001 (10g)、重酒石酸コリン (2g) 画布汲まれている。この食餌に ILY-4001 投与を追加し、結果として体重 25g のマウスが消化する同化合物の日平均用量が次のようになるようにした：0mg/kg/日 (野生型比較標準群および PLA2 (-/-) 比較標準群)；25 mg/kg/日 (野生型低用量投与群)、90 mg/kg/日 (野生型高用量投与群)。被験動物は10週間にわたり高脂肪 / 高糖類食を継続し、指定の ILY-4001 投与を受けた。

30

【 0 1 8 8】

処置開始時と、研究開始から4週後および10週後の時点で、全投与群および比較標準群の全被験動物について体重が測定された。(例 5A を参照)。また、処置開始時と研究開始から4週後および10週後の時点で血液も採取され、空腹時グルコース濃度が測定された(例 5B を参照)。コレステロールおよびトリグリセリド濃度は、処置開始時 (ベースライン) および10週後に採取された血液で測定された。(例 5C を参照)。

40

【 0 1 8 9】

例 5A：ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (メチルインドキサム) の PLA2-IB 阻害薬としての In-Vivo 評価における体重増加

例 5 において概要が述べられているこの研究では、処置開始時と、研究開始から4週後および10週後の時点で、全投与群および比較標準群の全被験動物について体重が測定された。高脂肪 / 高糖類の糖尿病誘発性食に ILY-4001 を付加した上記の処置プロトコルを使用した場合、体重増加の顕著な減少が見られた。

【 0 1 9 0】

図 3 を参照し、ILY-4001 を投与されていない野生型マウス (第 1 群、野生型比較標準) の

50

体重増加は、研究開始から4週まで、予測されたパターン通りかなりの体重増加が起こり、10週後には体重増加はさらに倍増した。これに対し、PLA2(-/-) マウス (PLA2 KOマウス) もILY-4001の投与は受けておらず、同じ食餌を与えられているが (第4群、PLA2 (-/-) 比較標準)、4週～10週の間には統計的に有意な変化は見られず、研究期間全体での体重増加はごくわずか (5 g未満) であった。2つの処置群 (25 mg/kg/日および90 mg/kg/日) では、野生型比較標準群に比べ、4週後と10週後の体重増加が顕著に減少した。両処置群とも、4週後の体重増加は、PLA2(-/-) マウスでの体重増加にかなり近い値を示した。低用量処置群は、10週後の体重増加は、PLA2 (-/-) マウスでの体重増加に匹敵する値を示した。

【0191】

10

例5B: ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (メチルインドキサム)のPLA2-IB阻害薬としてのIn-Vivo評価における空腹時血清グルコース濃度

例5において概要が述べられているこの研究では、処置開始時と研究開始から4週後および10週後の時点で血液が採取され、空腹時グルコース濃度が測定された。高脂肪 / 高糖類の糖尿病誘発性食にILY-4001を付加した上記の処置プロトコルを使用した場合、空腹時血清グルコース濃度の顕著な減少が見られた。

【0192】

図4を参照して、野生型比較標準マウス (第1群) は高い血漿グルコース濃度を維持しており、4週後と10週後において高脂肪 / 高糖類の糖尿病誘発性食に見合った結果となった。これに対してPLA2(-/-) KOマウス (第4群) では、4週後と10週後における空腹時グルコース濃度が統計的に有意な減少を示した。これは、この糖尿病誘発性食を摂っているマウスでは通常見られないような、インスリンに対する感受性の高さを示している。高用量ILY-4001処置群 (第3群) も、4週後と10週後における空腹時グルコース濃度が、同様に低下した。これは、高脂肪 / 高糖類を摂る野生型マウスに比べ、この群のインスリン感受性が向上しており、PLA2(-/-) KOマウスの表現型に近いことを示す。低用量ILY-4001処置群 (第2群) は、4週後ではある程度の効果が見られたが、10週後では有益な効果は観察されなかった。

20

【0193】

例5C: ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (メチルインドキサム)のPLA2-IB阻害薬としてのIn-Vivo評価における血清コレステロールおよびトリグリセリド濃度

30

例5において概要が述べられているこの研究では、処置開始時と研究開始から10週後の時点で血液が採取され、コレステロールおよびトリグリセリド濃度が測定された。高脂肪 / 高糖類の糖尿病誘発性食にILY-4001を付加した上記の処置プロトコルを使用した場合、血清コレステロール値と血清トリグリセリド濃度の両方において、顕著な減少が見られた。

【0194】

図5Aおよび5Bを参照して、高脂肪 / 高糖類食の開始から10週後に、野生型比較標準の被験動物 (第1群) は、研究開始時に測定したベースラインと比較して、血中コレステロール値 (図5A) とトリグリセリド濃度 (図5B) の両方においてかなり顕著な増加が見られた。これに対しPLA2 (-/-) KOの被験動物 (第4群) は、これら脂質の同じような増加は示さなかった。コレステロール値およびトリグリセリド値はそれぞれ、野生型比較標準群の2分の1から3分の1であった。ILY-4001処置群は、高用量 (第2群) でも低用量 (第3群) でも明らかに、血漿中コレステロール値とトリグリセリド値は顕著に低下し、PLA2 (-/-) KOマウスに匹敵する有益な効果が得られた。

40

【0195】

例6: 特性研究 - ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸]

この例では、ILY-4001[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチ

50

ル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (ここではメチルインドキサムと呼ぶ) の特性を調べる。IC50検査によって活性を調べ (例6A)、in-vitro Caco-2検査によって細胞吸収を調べ (例6B)、in-vivo マウス研究によって生物学的利用能を調べる (例6C)。

【0196】

例6A: IC-50研究 - ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸]

この例では、ILY-4001[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ) 酢酸] (ここではメチルインドキサムと呼ぶ) のIC50活性値を評価する。

【0197】

ICを測定するには、文献に記載されているPLA2活性の連続蛍光測定法を用いた

【0198】

【化40】

(Leslie, CC and Gelb, MH (2004) Methods in Molecular Biology "Assaying phospholipase A2 activity", 284: 229-242, Singer, AG, et al. (2002) Journal of Biological Chemistry "Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2", 277: 48535-48549, Bezzine, S, et al. (2000) Journal of Biological Chemistry "Exogenously added human group X secreted phospholipase A(2) but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells", 275: 3179-3191、およびこれらに記載されている参照文献)。

全般に、この検査には、sn-2 脂肪アシル鎖の端にピレンフルオロフォアを有するホスファチジルグリセロール (またはホスファチジルメタノール) 基質を使用した。理論に拘束されることなく、リン脂質担体にある近隣リン脂質とピレンとの近さにより、モノマーピレンの性質とは異なるスペクトル特性が現われる。ウシの血清アルブミンが水相にあり、PLA2触媒反応によりグリセロール主鎖から放出されるピレン脂肪酸を捕捉する。ただしこの検査では、強い阻害薬が、グリセロール主鎖からのピレン脂肪酸放出を阻害することがある。よって、図7Aのスキーム1に示すように、この特性により、アルブミン結合ピレン脂肪酸の蛍光をモニターすることによって、感度の高いPLA2阻害検査が可能になる。任意のホスホリパーゼに対する、任意の阻害薬の効果と阻害薬濃度を、測定することができる。

【0199】

この例では、次の試薬および機器を一般業者から入手した:

1. ブタPLA2 IB
2. 1-ヘキサデカノイル-2-(1-ピレンデカノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホグリセロール (PPyrPG)
3. 1-ヘキサデカノイル-2-(1-ピレンデカノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホメタノール (PPyrPM)
4. ウシ血清アルブミン (BSA、無脂肪酸)
5. 2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール塩酸 (Tris-HCl)
6. 塩化カルシウム
7. 塩化カリウム
8. 溶媒: DMSO、トルエン、イソプロパノール、エタノール
9. MolecularDevices SPECTRAmax マイクロプレート分光蛍光計
10. Costar96 ウェル黒色ウォール / 透明ボトムプレート

この例では、次の試薬を調製した:

1. PPyrPG(or PPyrPM) ストック溶液 (1 mg/ml) (トルエンとイソプロパノールを1:1で混合した溶媒中)

10

20

30

40

50

2. 阻害薬ストック溶液 (10 mM) (溶媒: DMSO)
3. 3%(w/v) ウシ血清アルブミン (BSA)
4. ストック緩衝溶液: 50 mM Tris-HCl、pH 8.0、50 mM KCl、1 mM CaCl₂

この例では、次の手順を実施した:

1. ストック緩衝溶液 47 ml に 3% BSA を 3 ml 加えて、検査用緩衝溶液を調製した。
2. 希釈した阻害薬を順に検査用緩衝溶液に加え、溶液Aを調製した。阻害薬は8~15 uMの範囲で、3倍に希釈した。
3. PLA2を検査用緩衝溶液に加え、溶液Bを調製した。この溶液は、酵素活性の損失を防ぐため、使用の直前に調製した。
4. PPyrPG ストック溶液 30ul を、エタノール 90 ul に加え、次に PPyrPG 溶液 120 ul 全部を、約1分間かけて滴下により、検査用緩衝溶液 8.82 ml に攪拌しながら連続的に加えていき、最終濃度が 4.2uM の PPyrPG 担体溶液にする。
5. SPECTRAmax マイクロプレート分光蛍光計は 37 °C に設定した。
6. Costar96 ウェル黒色ウォール / 透明ボトムプレートの阻害検査ウェルそれぞれに、溶液Aを 100 ul 加えた。
7. Costar96 ウェル黒色ウォール / 透明ボトムプレートの阻害検査ウェルそれぞれに、溶液Bを 100 ul 加えた。
8. Costar96 ウェル黒色ウォール / 透明ボトムプレートの阻害検査ウェルそれぞれに、溶液Cを 100 ul 加えた。
9. 分光蛍光計のチャンバー内で3分間、プレートを保温した。
10. 励起 342nm、放射 395 nm の設定を用いて、蛍光を測定した。

【0200】

この例では、BioDataFit1.02 (4パラメータモデル) ソフトウェアパッケージを用いて I C50 を算出した。曲線を生成する式は:

【0201】

【化41】

$$y_j = \beta + \frac{\alpha - \beta}{1 + \exp(-\kappa(\log(x_j) - \gamma))}$$

30

ここで: α は上の漸近線の値、 β は下の漸近線の値、 γ は縮尺、 κ は下記の変曲点の x 座標を示す係数

【0202】

【化42】

$$\exp \left[\frac{\kappa \gamma - \log \left(\frac{1 + \kappa}{\kappa - 1} \right)}{\kappa} \right]$$

40

ここで $\alpha > 0$ 、 $\beta < 0$ 、 $\gamma < 0$ が拘束条件となる。

図7Bに示されている結果より、50%最大PLA2活性となる ILY4001濃度は、0.062uMと算出された。

【0203】

例6B: Caco-2吸収研究 - ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸]

50

この例では、Caco-2細胞を用いたin-vitro検査を用いて、ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] (ここではメチルインドキサムと呼ぶ) の小腸吸収を評価する。

【0204】

簡単に説明すれば、ヒト結腸腺癌由来細胞であるCaco-2を用いて、腸の薬剤吸収をモデル化するものである。Caco-2単層における見かけの浸透速度が 1×10^{-7} cm/sec以下の範囲で測定され、ヒトにおいて比較的ほとんど吸収されない相関関係が示されている。(Artursson, P., K. Palm, et al. (2001). "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport." *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 27-43.)

化合物の浸透性を測定するには、Caco-2細胞(ATCC)を、 6×10^4 cells/cm²の密度で、24ウェルのトランスウェル(Costar)に入れる。37°C、湿度95%、空気95%、CO₂ 5%の条件下、MEM (Mediatech) 中で単層として成長し、20%FBS、100 U/ml ペニシリン、100 ug/ml ストレプトマイシンの追加によって差別化する。この培養基は、48時間ごとに交換した。21日後、HBSSとHEPESから成る輸送緩衝溶液で細胞を洗い、各ウェルについて経上皮電気抵抗(TEER)を測定することにより、単層の完全性を評価した。TEER値が350 ohm-cm²以上のウェルについて、検査を行った。

【0205】

ILY-4001およびプロパノロール(細胞内輸送の比較標準)を輸送緩衝溶液で希釈して50 ug/mlにし、ウェルに個別に追加した。15分、30分、45分、1時間、3時間、6時間時点で底部側方ウェルからサンプル150ulを採取してLC/MS分析にかけた。サンプルを採取した後は、採取分の量を、温めた輸送緩衝溶液で補充した。見かけの浸透速度(cm/s)は、次の式で算出される：

$$P_{app} = (dQ/dt) \times (1/C_0) \times (1/A)$$

ここでdQ/dtは、経時的にサンプル採取した量についての浸透速度、C₀は初期濃度、Aは単層の表面積(0.32 cm²)である。実験の終わりにTEER測定を再度行い、350 ohm-cm²を下回っているウェルについては、単層の完全性が損なわれているため、これらの分析は無効であることを意味する。最後に、ウェルを輸送緩衝溶液で洗い、100 uMのLucifer Yellowをウェルに追加した。15分、30分、45分時点でサンプルが採取され、LC/MS分析によって、細胞間輸送を測定した。

【0206】

ILY-4001に関するCaco-2浸透性研究の結果を図8Aに示す。ILY-4001の見かけの浸透速度(cm/s)は約 1.66×10^{-7} と測定された。細胞間輸送および細胞内輸送の比較標準としてのLucifer Yellowとプロパノロールの透過性結果も測定された。この結果を図8Bに示す。測定された見かけの浸透速度(cm/s)は、プロパノロールについては約 1.32×10^{-5} 、Lucifer Yellowについては約 $2.82 \times 10^{-7} \pm 0.37 \times 10^{-7}$ であった。

【0207】

例6C：薬力学研究 - ILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸](メチルインドキサム)

この例では、ILY-4001[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] (ここではメチルインドキサムと呼ぶ)の生物学的利用能を評価する。具体的には、投与後の全身循環血中における不変ILY-4001の割合の測定を行った。

【0208】

生物学的利用能は、AUC-経口 / AUC-静脈血(IV)の比として算出された。この比を得るために、被験動物の最初の群に一定量のILY-4001を静脈血注入(IV)し、投与後、いくつかの時点(例えば5分後から24時間後まで)における血液中のILY-4001濃度を測定した。別の被験動物群において、経口投与で同様に行い、投与後、いくつかの時点(例えば30分後から24時間後まで)における血液中のILY-4001濃度を測定した。全身循環血中のILY-4001濃度は、一般的に行われている方法で測定された(例えばEvans, G., *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. Boca Raton, CRC Press (2004)を参照)。具体的には

、液体シンチレーション/質量分析計/質量分析計 (LC/MS/MS) 分析法を用いて、経口投与および静注投与後の ILY-4001 の血漿中濃度を定量した。測定された薬力学パラメータは、 C_{max} 、AUC、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、F (生物学的利用能) であった。

【0209】

この手順では、ILY-4001 の用量は静注投与で 3mg/kg、経口投与で 30 mg/kg とした。この研究結果が表 5 にまとめられている。経口投与では、生物学的利用能が元の投与量の 28% と測定された。これは、ILY-4001 が消化器官から吸収されて全身循環血には行かない量が、72% であることを示している。

【0210】

【化43】

10

表 5: ILY-4001 の薬力学研究の結果

	静注	経口
$t_{1/2}$ (h)	1.03	1.25
C_{max} (ng/mL)	3168	2287
T_{max} (h)	0.083	1
AUC 0-24) (h*ng/mL)	2793	5947
AUC(0-inf) (h*ng/mL)	2757	5726
%F		28.0

20

この特許明細書中に言及されている公開情報および特許申請はすべて、個々の公開情報や特許、特許申請が具体的かつ個別に記述されるのと同様に、参照によってここに組み込まれる。

【0211】

添付の請求項の主旨あるいは範囲から外れることなく、これに対してさまざまな変更ができることは、この分野の通常の技能を有する者にとっては評価でき、このような変更は本発明の範囲内に考慮される。

【図面の簡単な説明】

【0212】

【図1】図1は、リン脂質が加水分解されて、対応するリソリン脂質となる化学反応において、ホスホリパーゼ-A2 酵素 (PLA2) が触媒として作用する様子を示す図解である。

30

【図2】図2は、[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] (ここでは ILY-4001 およびメチルインドキサムとも呼ぶ) の化学構造である。

【図3】図3は例5Aの結果をグラフで表わしたものである。ILY-4001 を低用量投与されたマウス群 (4001-L) と高用量投与されたマウス群 (4001-H) の体重増加を、野生型の比較標準群 (Control) および遺伝子欠損のある PLA2 (-/-) ノックアウトマウス (PLA2 K0) と比較している。

【図4】図4は例5Bの結果をグラフで表わしたものである。ILY-4001 を低用量投与されたマウス群 (4001-L) と高用量投与されたマウス群 (4001-H) の空腹時血清グルコース濃度を、野生型の比較標準群 (Control) および遺伝子欠損のある PLA2 (-/-) ノックアウトマウス (PLA2 K0) と比較している。

40

【図5】図5Aおよび5Bは、例5Cの結果をグラフで表わしたものである。ILY-4001 を低用量投与されたマウス群 (4001-L) と高用量投与されたマウス群 (4001-H) の血清コレステロール値 (図5A) および血清トリグリセリド濃度 (図5B) を、野生型の比較標準群 (Control) および遺伝子欠損のある PLA2 (-/-) ノックアウトマウス (PLA2 K0) と比較している。

【図6-1】図6A~6Dは、インドール化合物 (図6A、図6C、図6D) およびインドール関連化合物 (図6B) の化学構造を示したものである。

【図6-2】図6A~6Dは、インドール化合物 (図6A、図6C、図6D) およびインドール関連化合物 (図6B) の化学構造を示したものである。

50

【図 7 - 1】図7Aおよび7Bは、PLA2IB酵素阻害を評価するためのin-vitro 蛍光測定分析の図解（図7A）と、その分析によりILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] を評価した例6Aの結果をグラフで示したもの（図7B）である。

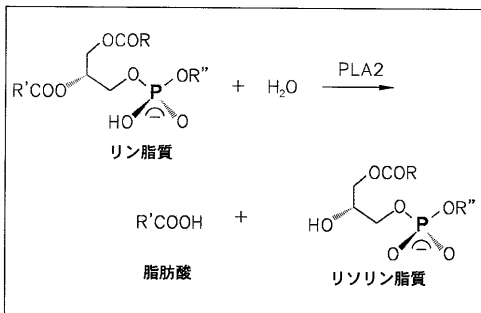
【図 7 - 2】図7Aおよび7Bは、PLA2IB酵素阻害を評価するためのin-vitro 蛍光測定分析の図解（図7A）と、その分析によりILY-4001 [2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] を評価した例6Aの結果をグラフで示したもの（図7B）である。

【図 8】図8Aおよび8Bは、例6Bで、ILY-4001[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] についてのin-vitro roCaco-2浸透性研究の結果（図8A）と、ルシファーイエローおよびプロプラノロールを細胞間輸送および細胞内輸送の比較標準として用いた結果（図8B）である。

【図 9】図9は、例4に記したILY-4001[2-(3-(2-アミノ-2-オキソアセチル)-1-(ピフェニル-2-イルメチル)-2-メチル-1H-インドール-4-イロキシ)酢酸] の全体的な合成経路をまとめた、化学式を含む図解である。

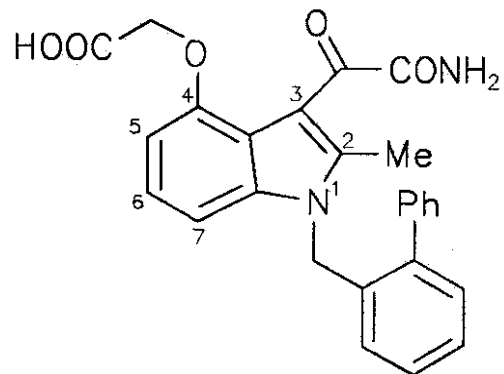
【図 1】

図 1

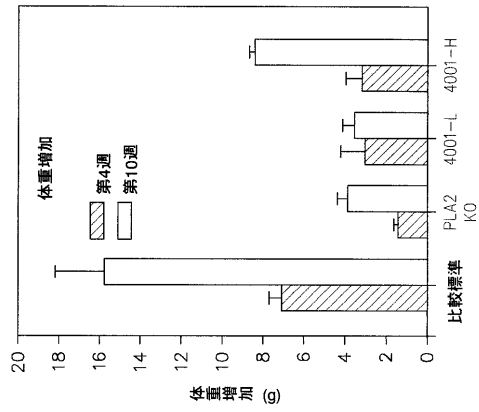


【図 2】

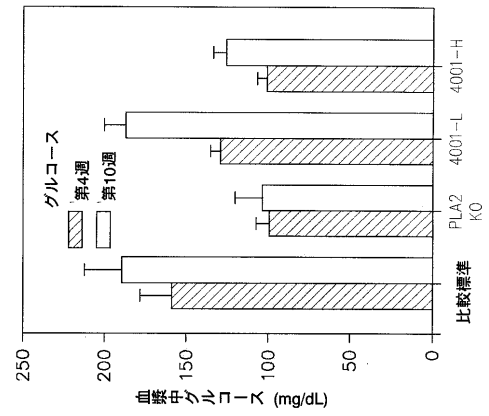
図 2



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

図 5B

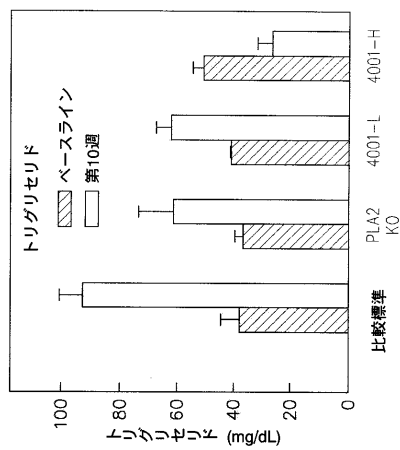
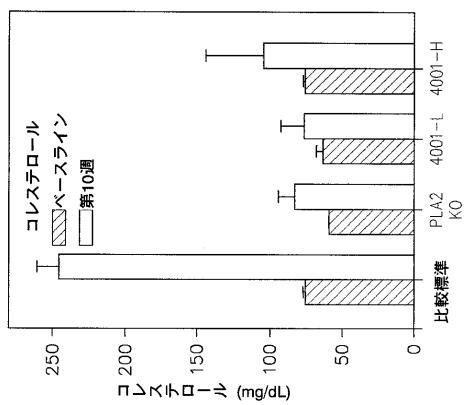


図 5A



【 図 6 - 1 】

図6A

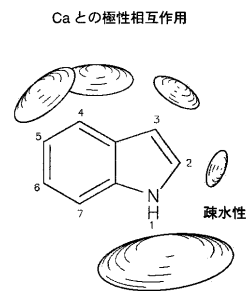
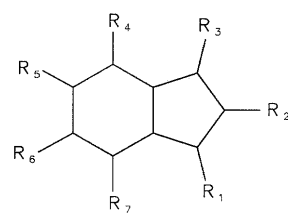


図6B



【 図 6 - 2 】

図6C

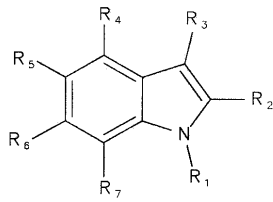
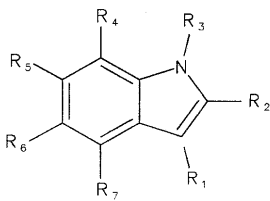
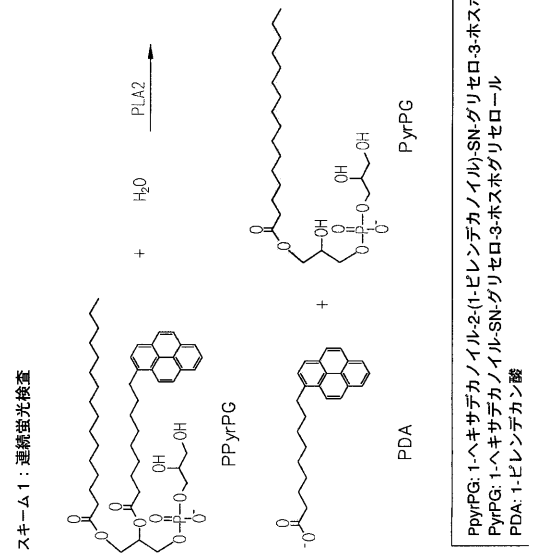


図6D



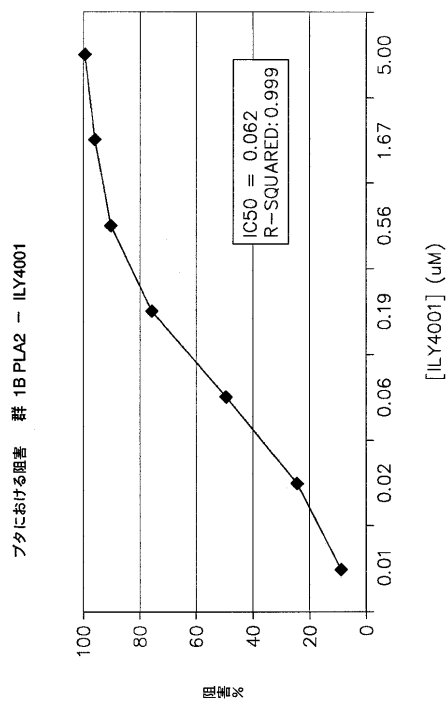
【 図 7 - 1 】

図 7A



【 図 7 - 2 】

図 7B



【 図 8 】

図8A

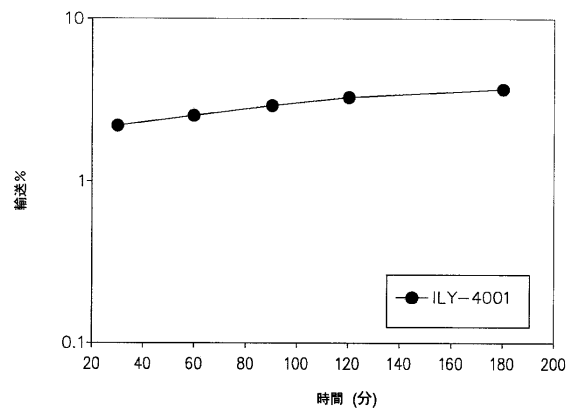
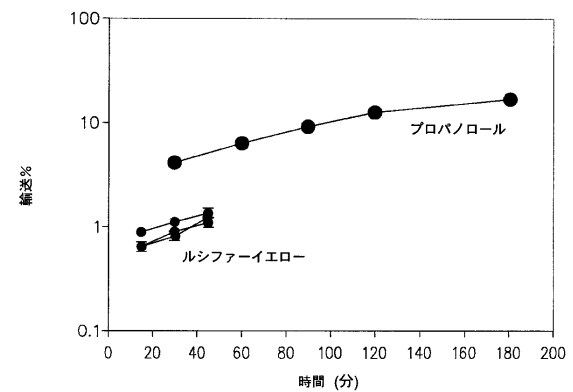
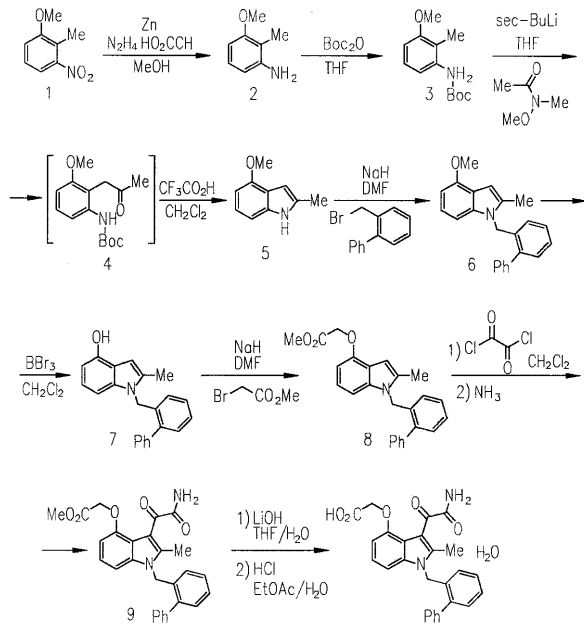


図8B



【 図 9 】

図 9



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/05015281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 31/425, 31/41, 31/405, 31/40

US CL : 514/369, 373, 381, 415, 419

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)

U.S. : 514/369, 373, 381, 415, 419

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONEElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EAST, CAS-ONLINE, USPATALL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,654,326 A (BACH et al.) 05 August 1997 (05.08.1997), see the entire document.	1-7, 11-13, 21, 23, 24, 34-37 and 51-55
X	US 6,630,496 B1 (SEEHRA et al.) 07 October 2003 (07. 10.2003), see the entire document.	1-7, 11-13, 21, 23, 24, 34-37 and 51-55

☐ 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 published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 2005 (14.11.2005)

Date of mailing of the international search report

29 NOV 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT. Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer

Kevin E. Weddington

Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/05015281

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-10,14-20,22,25-33,38-50 and 56-59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 2 3 L 1/30 (2006.01) A 2 3 L 1/30 Z

(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, 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, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, 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 バイセ, ジェリー エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 2, ロスアルトス, アルバード アベニュー 2 7 0

(72)発明者 チャン, ハン ティン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 0, リバーモア, ガーネット ドライブ 2 2 0

(72)発明者 コープ, マイケル ジェイムズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 2, バークリー, ラッセル ストリート 1 1 1

(72)発明者 ホイ, デイビッド
 アメリカ合衆国 オハイオ 4 5 2 4 1, シンシナティ, シャーブルック ドライブ 3 4 6 0

F ターム(参考) 4B018 MD07 ME03 ME04

4C084 AA17 AA19 AA20 MA02 MA52 NA05 ZA362 ZA452 ZC332 ZC612

4C086 AA01 AA02 BC13 MA01 MA02 MA04 MA52 NA05 ZA36 ZA45

ZC02 ZC33