

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年8月28日 (28.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/070235 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/245, A61P
1/00, 1/02, 7/02, 7/10, 11/00, 11/06, 13/10, 17/00, 17/04,
17/06, 19/02, 25/04, 29/00, 37/08, 43/00

(ITOH,Yoshinori) [JP/JP]; 〒812-0041 福岡県 福岡市
博多区吉塚1丁目10-5-203号 Fukuoka (JP). 千堂 年昭
(SENDO,Toshiaki) [JP/JP]; 〒815-0034 福岡県 福岡市
南区南大橋2-20-17 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01814

(74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA,Kiyoshi et al.); 〒
100-0004 東京都 千代田区 大手町 2丁目 2番 1号 新
大手町ビル 3 3 1 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003年2月19日 (19.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-46613 2002年2月22日 (22.02.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鳥居薬
品株式会社 (TORII PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒103-0023 東京都 中央区 日本橋本町三丁目
4番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大石 了三
(OISHI,Ryozo) [JP/JP]; 〒814-0001 福岡県 福岡市
早良区百道浜 3-4-8-503 Fukuoka (JP). 伊藤 善規

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS FOR INHIBITING TRYPTASE

(54) 発明の名称: トリプターゼ阻害用医薬組成物

(57) Abstract: Because of having a potent inhibitory effect on tryptase, 6' -amidino-2' -naphthyl 4-guanidinobenzoate or its pharmaceutically acceptable salt are useful as remedies or preventives for diseases such as systemic anaphylaxis, aspirin-hypersensitive asthma, asthma, interstitial pulmonary diseases, allergic diseases, atopic diseases, skin hydroa, hypersthesia, itch, gingivitis, edema, psoriasis, pulmonary fibrosis, arthritis, periodontal disease, coagulation failure, renal interstitial fibrosis, hyper-vasopermeability or pulmonary edema occurring as side effects of X-ray contrast media, hay fever and so on.

(57) 要約:

6' -アミジノ-2' -ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩は、トリプターゼに対して強力な阻害作用を有し、全身アナフィラキシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症、知覚過敏症、掻痒症、歯肉炎、浮腫、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用としての血管透過性亢進又は肺浮腫、花粉症などの疾患の治療又は予防のための治療剤として有用である。

WO 03/070235 A1



添付公開書類：
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

トリプターゼ阻害用医薬組成物

5 技術分野

本発明は、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有するトリプターゼ阻害用医薬組成物に関する。更に、本発明は、トリプターゼ阻害作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とするプロテイナーゼ活性化型受容体-2 (PAR-2; proteinase-activated receptor-2) 抑制用医薬組成物に関する。

背景技術

トリプターゼは、肥満細胞によって発現されるセリンプロテイナーゼファミリーの四量体要素であって、1984年にはヒトの肺から単離精製された。トリプターゼは、肥満細胞が活性化されると、予め合成されたヒスタミン、キマーゼ、プロテオグリカン等の媒介物質と一緒に細胞外間隙に放出される (Schwartz Lewis Seldin, 1981; Caughey Lazarus, 1988)。ヒトトリプターゼについては、血漿中や細胞外間隙中で十分に触媒的に活性である点で、セリンプロテイナーゼの中でも特異的である [Schwartz Bradford, 1986; Goldstein Leong, 1992]。細胞レベルでは、I型アレルギーに関与する肥満細胞 (mast cell) のうち、皮膚深部の結合織型肥満細胞にはトリプターゼ、キマーゼ、カルボキシペプチターゼが存在するが、肺上皮内の粘膜型肥満細胞にはトリプターゼは存在するがキマーゼは存在しないとの報告もある。

トリプターゼは、他のトリプシン様セリンプロテイナーゼの活性を調節する天然の抗プロテアーゼ、例えば粘液プロテアーゼ阻害剤 (=抗ロイコプロテアーゼ又はHUS I-I)、抗トロンビンIII、 α 1-プロテイナーゼ阻害剤、 α 2-マクログロブリン、又はC1-エステラーゼ阻害剤によっては阻害されない (Alter Kramps, 1990; Smith Hougland, 1984; Schwartz Bradford, 1986; Harvima Schechter, 1988; Cromlish Seidah, 1987)。

トリプターゼと各種疾患の関係に関しては、下記の如き患者においてトリプターゼ濃度が通常より増加しているとの報告がなされている：

肥満細胞症を有する患者、及び全身アナフィラキシー後の患者 (Schwartz Metcalfe, 1987 ; Schwartz Yunginger, 1989) ；

- 5 アスピリン過敏性喘息を有する患者のアスピリン攻撃後の全身応答の最中の患者 (特にその血漿中に) (Bosso Schwartz, 1991) ；

喘息を有する患者 (Broide Gleich, 1991 ; Bousquet Chanez, 1991, WenzelFowler, 1988) ；

間質性肺疾患を有する患者 (Walls Bennett, 1991) ；

- 10 間質性膀胱炎を有する患者 (Theoharides TC, Kempuraj D, Sant GR., 2001) ；

過敏性腸症候群を有する患者 (Pang X, Boucher W, Triadafilopoulos G, Sant GR, Theoharides TC, 1996) ；

- 15 アレルギー性患者の抗原攻撃感染後の患者 (特にその気管支肺胞洗浄液中に) (Castells, 1988 ; Butrus, 1990) ；

アトピー性及びアレルギー性皮膚を有する患者 (特に、皮膚抗原チャレンジ後の皮膚水疱液中に) (Shalit Schwartz, 1990 ; Atkins Schwartz, 1990) ；

季節性アレルギー性鼻炎を有する患者 (特に、局所抗原チャレンジ後の鼻洗浄液中に) (Juliusson Holmberg, 1991) ；

- 20 歯肉炎及び歯周炎を有する患者 (特に、その歯肉滲出液中に) (Cox Eley, 1989, J Period Res ; Eley Cox, 1992, J Dent) ；

乾癬を有する患者 (特に、その病変皮膚中に) (Harvima Naukkarinen, 1989) 。

- 25 更には、トリプターゼが肥満細胞関連疾患の病因に直接関係していることは、*in vitro*試験的にも確認されており、それによれば、トリプターゼは、気道平滑筋の収縮性を増大させ (Sekizawa, 1989) 、血管作用性腸ペプチドを不活性化させることによって、その気管支拡張作用を破壊することが知られている (Tam Caughey, 1990 ; TamFranconi, 1990 ; Franconi, 1989) 。このことから、トリプターゼは、喘息の病原性媒介物質であると提唱された。さらに、トリプターゼは、

繊維芽細胞の有力な分裂促進剤であることが示され、喘息や間質性肺疾患の肺繊維症に関係しているとの報告もある (Ruoss Hartmann, 1991 ; Hartmann Ruoss, 1992) 。トリプターゼが、プロストロメリシン (=MMP-3) を活性化し、プロストロメリシンが次いでコラーゲナーゼを活性化して、軟骨や歯周結合組織の破壊を開始させることから、トリプターゼは、それぞれ関節炎や歯周病の病因にも関係があるとされている (Gruber Marchese, 1989 ; Gruber Schwartz, 1990 ; Cox Eley, 1989, J Period Res ; Eley Cox, 1992, J Dent) 。また、トリプターゼは、高分子量キニノーゲンのプロ凝固剤 (凝固剤前駆体) 機能を不活性化し (Maier Spragg, 1983) 、フィブリノーゲンを開裂させることにより (Schwartz Bradford Littman, 1985) 、血液凝固障害を促進させ得ることも知られている。

トリプターゼは、トリプシン様プロテイナーゼの一般的阻害剤、例えばジイソプロピルフルオロホスフェート、フェニルメチルスルホニルフルオリド及びトシル-L-リジンクロロメチルケトンにより阻害されるとの報告もある (SmithHougland, 1984 ; Harvima Schechter, 1988) が、それら化合物は、毒性も高く、安定性も悪いため、生体内用途には不適當であり、in vitro試験用としてさえも不適當であるといわれている。更に、トリプターゼ阻害作用を有することが知られているペプチド-アルギニンアルデヒドのロイペプチン及びアンチパイン (Cromlish Seidah, 1987) 、 (Caughey, 1993) も、トリプターゼの阻害効果が弱く、有用性が限定されていた。

特表平9-500532号公報には、ポリペプチドである精製されたヒトトリプターゼ阻害剤分子、及びヒルの抽出物から得られたトリプターゼ阻害剤が記載されている。

トリプターゼと各種疾患の関係については上記のとおりだが、更に、次のようなことも知られている。例えば、腎間質線維化については、肥満細胞が関与しており、その主要蛋白分解酵素であるトリプターゼが、線維芽細胞増殖や細胞外基質合成促進に関与しているとの報告もなされている (J Am Soc Nephrol 12 : 1668-1676, 2001) 。

花粉症に関しても、次のような報告がある。まず、空気中の花粉 (抗原) が鼻や目の粘膜にはりつき体内に侵入すると、生体は抗原を異物とみなし、IgE抗体

を作る。特に花粉症の人は、このIgE抗体が過剰に作られてしまう。IgE抗体は、まず細胞の表面に付着する。そこに更に抗原が侵入してくると、抗体と結合して「抗原抗体反応」が生じ、細胞内からヒスタミン、ヘパリン、トリプターゼなどの化学伝達物質が放出される。これらの化学伝達物質は、知覚神経の末端を刺激したり、粘膜の浮腫をおこしたり、粘液の分泌をひどくする作用がある。そのため鼻水が過剰に出たり、目がかゆくなったり、鼻詰まりが起こる。

炎症やX線造影剤による副作用とトリプターゼの関係について、次のような報告もなされている。炎症細胞に関しては、肥満細胞、好塩基球、好酸球及び気道上皮細胞の活性化機序について多角的な検討が行われている。まず、X線造影剤の副作用の発症メカニズムであるが、高浸透圧性X線造影剤はヒト好塩基球からヒスタミン遊離をひき起こし、さらにこの遊離率は免疫学的刺激によるそれと有意に相関することが明らかになった。アレルギー患者では免疫学的ヒスタミン遊離能が亢進していることはよく知られているので、特にアレルギー患者においてX線造影剤の副作用の発生頻度が高い理由は、このような現象に起因している可能性が示唆された。また、代表的なX線造影剤であるイオキサグル酸に対するIgE抗体の検出を行った結果、副作用を示した患者の約30%にIgE抗体が検出できた。しかし、その量は非常に僅かであるので、この特異IgE抗体の意義については、現在検討中である。X線造影剤でショック症状を起こした患者の血清中にはトリプターゼの濃度が増加していたので、激しい副作用の際には肥満細胞からメディエーターが遊離されていることを確認した。次に、アスピリン喘息の発症機序であるが、このような患者にアスピリンの負荷試験を行い、経時的に尿を採集して各種のメディエーターの代謝産物を測定したところ、ロイコトリエンE₄、11b-PGF_{2a}及びメチルヒスタミンの有意な増加が認められた。この結果は、アスピリン喘息患者ではアスピリンによって少なくとも肥満細胞からのメディエーター遊離が起きていることを示すと共に、アスピリン喘息の治療にも貢献すると考えられる。

上記事実より、トリプターゼを阻害する薬剤は、全身アナフィラキシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症状、歯肉炎、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、

腎間質線維化、X線造影剤の副作用、花粉症等、トリプターゼに起因する各種疾患の治療剤として有効であると考えられている。

一方、最近になってトリプターゼが、preteinase activated receptor-2 (PAR-2) に対して特異的な刺激作用を有する事が明らかにされている。そこで、
5 以下、プロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR ; proteinase-activated receptor) 、特にPAR-2について述べる。

プロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR) はG蛋白共役型受容体の一種であり、アゴニストプロテイナーゼによって受容体分子のN末細胞外ペプチド鎖が特定部位で切断され、露出された受容体活性化配列が受容体分子の別の部位に結合する
10 ことによって活性化する。1991年、PAR-1がヒト血小板のトロンビン受容体としてクローニングされ、そのユニークな活性化メカニズムが明らかにされた。その後、今日に至るまでにPAR-2、PAR-3、PAR-4がクローニングされた。4つのPARのうち、PAR-1、PAR-3、PAR-4はトロンビン受容体であるのに対し、PAR-2はトロンビンでは全く活性化されず、
15 トリプシン、トリプターゼなどいくつかのプロテイナーゼが内因性アゴニスト酵素候補として同定される。

PAR-1はヒト血小板の活性化に重要な役割を演じ、神経系、消化器系、呼吸器系、血管系その他に広く分布し、様々な機能の制御に関与する。また、PAR-2もPAR-1同様、生体内に広く分布し、PAR-1とは異なる種々の機能
20 を修飾する。

更に、「日本薬理学雑誌」(岡山大・医・薬理 西堀正洋)によれば、次のような報告がなされている。血小板と並んで重要なPARs発現細胞は、血管内皮細胞と血管平滑筋である。PAR-1あるいはPAR-2刺激は内皮(NO)依存性の血管拡張反応を惹起する。血管内皮細胞におけるPAR-2発現はLPS、
25 IL-1 β 、TNF- α で著明に増加し(J Biol Chem 271, 14910-14915, 1996)、septicshockにはPAR-2が関与することが示唆されている(Circulation 99, 2590-2597, 1999)。血管内皮及び好中球のPAR-1刺激は両細胞のselectin発現を亢進する。このように、血管破綻に伴うトロンビンの生成は、PAR-1刺激を介して、血管拡張、好中球の集積浸潤を惹起し、炎症反応の進行に密接に関

与している。PAR-1、PAR-2刺激により培養血管内皮細胞と平滑筋細胞は増殖亢進がおこるが、冠動脈のバルーン再狭窄モデルでは、血管内膜と中膜層にPAR-2受容体が強発現し、内膜の増殖性肥厚にPAR-2受容体刺激が関与することが示唆された。PAR-2受容体刺激プロテイナーゼとしてこれまで

5 トリプシンの他に肥満細胞トリプターゼが同定されている。

更にまた、PAR-2の生理的役割に関して、呼吸器上皮に存在するPAR-2はイノシトールリン脂質代謝を介して情報を伝達し、特に気道上皮細胞ではLPS作用を修飾し、肺上皮細胞では好中球の接着を促進するなど多彩な生理作用を惹起し、感覚神経系に存在するPAR-2が炎症性疼痛の発現に関与する一方、

10 胃粘膜ではCGRPやタキキニン類の遊離を介して粘液分泌を促進し胃粘膜に対して保護的に作用するとの報告もある。

このように、PAR-2が、痛覚過敏、疼痛、気道収縮、浮腫など様々な病態生理に関与していることはよく知られたところであり、PAR-2に対して特異的な刺激作用を有するトリプターゼを効果的に阻害できるならば、PAR-2受

15 容体に関与する様々な疾患への適用、すなわち、知覚過敏の抑制や鎮痛作用、抗搔痒作用（PAR-2は知覚神経終末にあり、トリプターゼの刺激によりCGRPやsubstance Pを遊離、トリプターゼやPAR-2アゴニストペプチドにより痛覚過敏発症）、抗浮腫作用、抗喘息作用（気道におけるPAR-2刺激により気管収縮）など多岐にわたる効果が期待できる。特に、軟膏剤としてアトピー性皮膚

20 炎の時の抗搔痒剤としての適用、神経痛や帯状疱疹後痛などの知覚過敏に対する抑制剤としての適用が大いに期待できる。

上記のとおり、トリプターゼ阻害活性を有する化合物として、ジイソプロピルフルオロホスフェート、フェニルメチルスルホニルフルオリド及びトシルーLーリジンクロロメチルケトン等が既に知られてはいるものの、未だ活性が十分では

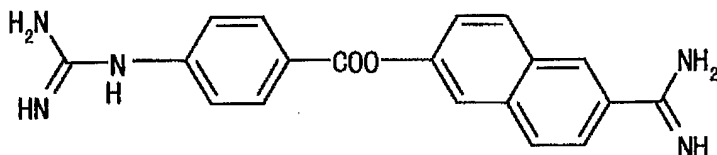
25 なく、より強力な阻害作用を有する化合物が待ち望まれている。

発明の開示

本発明者らは、かかる要望に基づき、より強力かつ安全なトリプターゼ阻害剤を見出すべく鋭意研究を行ったところ、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グ

アニジノベンゾエートが、誰一人として予想し得ないような驚異的な阻害作用を有することを見出して、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記式で表される6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有するトリプターゼ阻害用医薬組成物に関する。



10 ここで、塩としてはメシル酸塩が好ましく、また、トリプターゼとしては、ヒトトリプターゼが好ましい。

更に本発明は、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、全身アナフィラキシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、間質性膀胱炎、過敏性腸
15 症候群、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症、知覚過敏症、疼痛、掻痒症、歯肉炎、浮腫、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用としての血管透過性亢進又は肺浮腫、及び花粉症からなる群から選ばれる疾患の治療又は予防のための医薬組成物に関する。

ここで、塩としてはメシル酸塩が好ましく、また、好適な疾患としては、疼痛、
20 掻痒症、間質性膀胱炎、過敏性腸症候群、又はX線造影剤の副作用としての血管透過性亢進若しくは肺浮腫である。

更に本発明は、トリプターゼ阻害作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有するプロテイナーゼ活性化型受容体-2抑制用医薬組成物に関する。

25 ここで、トリプターゼがヒトトリプターゼであり、トリプターゼ阻害作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩が6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はそのメシル酸塩であるのが好ましい。

なお、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート（一般名「ナファモスタット」）は、特公昭61-1063号公報に記載されており、さ

らに同公報には、該化合物がトリプシン、プラスミン、カリクレイン及びスロンビンに対して強い阻害活性を有しており、抗トリプシン剤、抗プラスミン剤、抗カリクレイン剤及び抗スロンビン剤として有用である旨が記載されている。また、上記化合物のメシル酸塩は、一般名で「メシル酸ナファモスタット」と呼ばれるものであって、既に、「膵炎の急性症状の改善」及び「汎発性血管内血液凝固症」の治療剤、ならびに「血液透析等の体外循環時」の抗凝固剤として上市されている。

図面の簡単な説明

10 図1は、ヒト肺由来精製トリプターゼ活性に対するメシル酸ナファモスタット及びメシル酸ガベキサートの阻害作用を示すグラフである。

図2は、培養血管内皮細胞におけるタンパク透過性測定装置である。

図3は、トリプターゼ及びプロテイナーゼ活性化型受容体・(PAR-2) アゴニストペプチド (SLIGKV) による培養血管内皮細胞でのタンパク透過性亢進作用を示すグラフである。

図4は、培養血管内皮細胞におけるトリプターゼによるタンパク透過性亢進に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフである。

図5は、ヨード造影剤イオキサグル酸によるラット肺での血管透過性亢進作用に対するメシル酸ナファモスタット及びメシル酸ガベキサートの抑制作用を示すグラフである。

図6は、ヨード造影剤イオキサグル酸によるラット動脈血酸素分圧、二酸化炭素分圧及びpHの変化に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフである。

図7は、ヨード造影剤イオキサグル酸によるラット肺浮腫（水分含量増加、 Na^+ 含量増加ならびに K^+ 含量減少）に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のトリプターゼ阻害用医薬組成物の有効成分として使用する6'-アミ

ジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートは、特公昭61-1063号公報記載の方法にしたがって製造することができる。本発明のPAR-2抑制用医薬組成物の有効成分としては、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートが代表的なものとして挙げられる。

- 5 本発明のトリプターゼ阻害用医薬組成物、PAR-2抑制用医薬組成物の有効成分は、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、局所内などの非経口的投与あるいは経口投与のいずれの投与経路でも投与することができる。

投与量については、投与方法、治療又は予防の目的、患者の年齢、体重等に依存するが、約0.005~約100mg/Kg体重とすることが好ましい。

- 10 有効成分を静脈内、筋肉内、皮内、皮下などの投与経路により投与する場合には、注射剤の剤型で投与される。注射剤の場合、有効成分に加えて、それらの医薬組成物を通常pH=約3.5~7に維持するための緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝剤を添加してもよく、更に、等張性を調整するための塩化ナトリウム、マンニトール又はソルビトールを添加してもよい。それらは凍結乾燥形態又は溶解形態とすることができ、後者の場合には、抗菌性保存剤、例えば0.2~0.3%の4-ヒドロキシ安息香酸メチルエステル又はエチルエステルを溶液中に含んでいることが好ましい。

- 有効成分を局所投与する場合の剤型としては、水性溶液、ローション若しくはゼリー、油性溶液若しくは懸濁液、又は油脂状軟膏若しくは乳液状軟膏を挙げることができる。水性溶液、ローション若しくはゼリーの製剤は、例えば、本発明の有効成分をpH=4~6.5の水溶性緩衝液中に溶かし、更に所望であれば、それに1又は複数の他の物質を添加することにより調製される。有効成分の濃度は、溶液約10ml中又はゼリー約10g中、約0.08~約1.5mg、好ましくは0.25~1.0mgである。局所投与用の油性溶液若しくは懸濁液としては、
25 例えば、湿潤剤（例えば、ステアリン酸アルミニウム）及び/又はHLB値（親水性-親油性比）が10未満である界面活性剤（例えば、グリセロールモノステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノステアレート又はソルビタンモノオレエート等の多価アルコールの脂肪酸モノエステル）を所望により適宜添加したオイルに、本発明の有効成分を溶解もしくは懸濁させることにより得

ることができる。油脂状軟膏は、例えば、10未満のHLB値を有する界面活性剤を必要に応じて添加した塗り広げられる油脂状軟膏基剤中に、本発明の有効成分を懸濁させることにより得られる。乳液状軟膏は、10未満のHLB値を有する界面活性剤を必要に応じて添加した軟質の塗り広げられる油脂状軟膏基剤中で、

5 本発明の有効成分の水溶液を粉砕することにより得られる。局所投与用の製剤として用いる場合には、保存剤を含んでいてもよい。

本発明の有効成分を経口的に投与する場合の剤型としては、錠剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤、カプセル剤などが挙げられる。また、吸入剤や噴霧剤の剤型でもよい。これらの製剤は、通常の方法をそのまま適用して製造することができる。

10 特に、神経痛や帯状疱疹後疼痛治療薬としては経口投与用製剤が好適であり、抗搔痒薬としては軟膏剤が、また、喘息発作治療薬としては吸入剤が好適である。

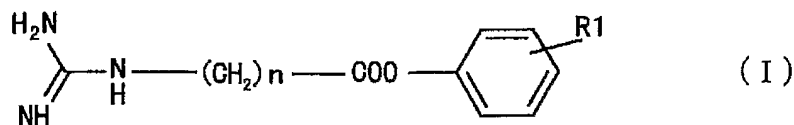
6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのトリプターゼに対する阻害活性評価、並びに6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのPAR-2に対する作用及びその確認方法について説明する。

15 6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのヒト由来トリプターゼに対する阻害活性は、t-butylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA) を基質として行い、公知のトリプターゼ阻害剤である「ガベキサート」(WO97/037969号公報に化合物1として記載されている)の阻害効果と比較することによって評価

20 した。

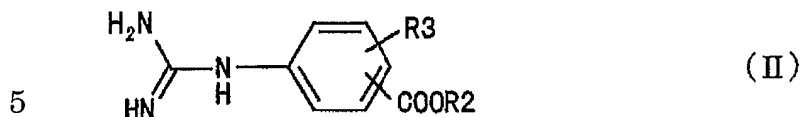
ここで、WO97/037969号公報には、下記、式(I)のグアニジノ脂肪酸誘導体、式(II)のグアニジノ安息香酸誘導体、式(III)のグアニジノフェノール誘導体、式(IV)のアミジノフェノール誘導体等から選ばれる1種以上を有効成分とするトリプターゼ阻害剤が記載されている：

25



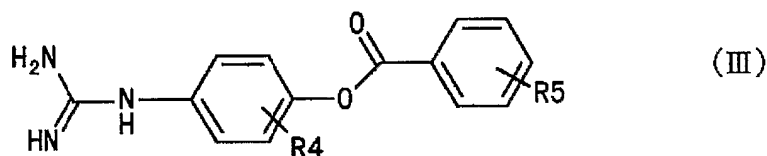
(式中、R1は水素原子、ハロゲン原子、ニトロ基、アルキル基、アルコキシ基、

カルボキシ基又はアルコキシカルボニル基を表わし、 n は3～6の整数を表わす。)で示されるグアニジノ脂肪酸誘導体；



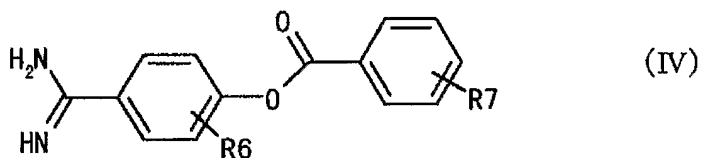
(式中、 R_2 はフェニル基、ナフチル基、置換フェニル基又は置換ナフチル基を表わし、 R_3 は種々の置換基を表わす。)で示されるグアニジノ安息香酸誘導体；

10



(式中、 R_4 及び R_5 は種々の置換基を表わす。)で示されるグアニジノフェノール誘導体；

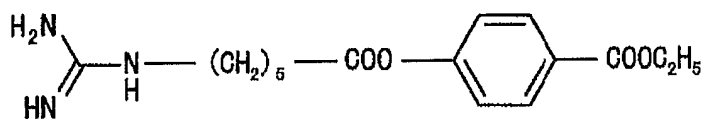
15



20 (式中、 R_6 及び R_7 は種々の置換基を表わす。)で示されるアミジノフェノール誘導体。

そして、上記の通り、同公報には、式(I)で示される化合物の具体例として下記化合物1が記載されている：

化合物1；6-グアニジノヘキサン酸・p-エトキシカルボニルフェニルエステル(一般名「ガベキサート」)。

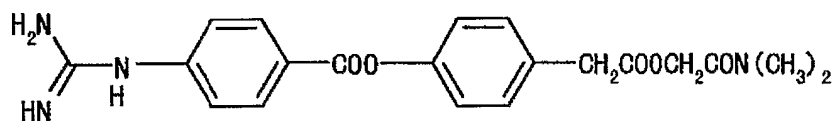


- 5 なお、同公報には、上記式 (I I) で示されるグアニジノ安息香酸誘導体の例として、特開昭48-29732号及び同49-24917号（米国特許第3824267号）、同49-11842号、同50-4038号、同50-69035号、同51-16631号、同52-89640号（米国特許第4021472号）、同53-15412号、同53-147044号、同54-70241号及び同55-55154号（米国特許第4224342号）、同55-115865号及び同55-115863号（米国特許第
- 10 4283418号）、同56-34662号（米国特許第4310533号）、同62-111963号及び同63-165357号（欧州特許公開第222608号）、同55-100356号、同56-110664号、同57-53454号、同57-142956号、同57-142957号、同57-179146号、同58-41855号、同58-49358号、同61-286361号、同61-286362号、同62-103058号、同62-155253号及び英国特許公開第2083818号及び第2095239号に記載された化合物が含まれる、と
- 15 記載している。

そしてまた、上記式 (I I) のより好ましい化合物として、下記化合物 2～4 の3つの化合物が挙げられている：

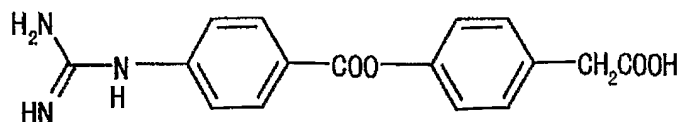
化合物 2：p-（p-グアニジノベンゾイルオキシ）フェニル酢酸N，N-ジメチルカルバモイルメチルエステル（一般名「カモスタット」）；

20

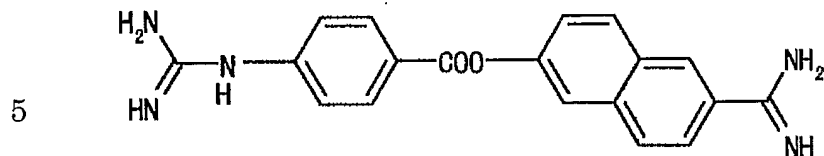


化合物 3：p-（p-グアニジノベンゾイルオキシ）フェニル酢酸（「カモスタット」代謝物）；

25



化合物 4 : p-グアニジノ安息香酸 6'-アミジノナフト-2-イルエステル
(一般名「ナファモスタット」)。



更にまた、同公報には、上記化合物 2 及び 3 のメタンスルホン酸塩のトリプターゼ阻害活性が、 IC_{50} 値でそれぞれ 30.0 及び 4.33 nM であった旨記載されている。しかしながら、化合物 4 については、単に化合物名が羅列されて

10 いるのみであって、化合物 4 が化合物 2 及び 3 と同様のトリプターゼ阻害活性を有することを裏付ける実験的な証明もなされていなければ、また、それを裏付ける理論的根拠も何ら示されていない。ちなみに、化合物 2 は特許第 1002769 号 (特公昭 54-41583 号公報) に包含され、一方、化合物 4 は特許第 1332984 号 (特公昭 61-1063 号公報) に包含され、両者は、化学構造

15 的に見て、発明思想が異なるとして、それぞれ別異の特許として許可されている。このように、同公報には、化合物 4 がトリプターゼ阻害活性を有することを実験的又は理論的に裏付ける記載がないばかりか、化合物 2 及び 3 がトリプターゼ阻害活性を有するならば必然的に化合物 4 も同様の作用を有することを裏付けるような理論的、実験的な根拠もまったく示されていない。

20 本発明者らは、また、以前より種々のヨード造影剤による副作用としての血管透過性亢進、肺浮腫の発現機序について研究を行っており、その過程で、いくつかの薬剤がその副作用を抑制するという事を見出していたが、今回、6'-アミジノ-2'-ナフチル 4-グアニジノベンゾエート (3-10 mg/kg, i.v.) を投与することによって肺血管透過性亢進及び肺浮腫が完全に抑制されることを新

25 に見出した。

ところで、PAR-2 に関して言えば、トリプターゼが preteins activated receptor-2 (PAR-2) に対して特異的な刺激作用を有することが明らかにされているが、今回、本発明者らは、ウシ大動脈由来培養内皮細胞を用いた透過性測定実験によって、トリプターゼが正に顕著なタンパク透過性亢進作用を有し、

また、同様の作用がPAR-2アゴニストのペプチドでも認められることを確認し、更に、このトリプターゼによる透過性亢進作用が6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートによって強力に抑制されることを見出した。

同じく、本発明者らは、トリプターゼが、血管内皮細胞にあるPAR-2を直接的に刺激することにより、タンパク透過性亢進を引き起こすこと、及び造影剤による浮腫等の副作用にトリプターゼ/PAR-2系が関与していることを見出した。

以上のように、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのPAR-2に対する抑制作用は、非常に興味深いものであり、本発明者らは、別途、ヨード造影剤によるラット肺機能低下及び肺浮腫に対する6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートの作用をin vivoのデータによって調べてみた。なお、試験を行うにあたって、肺機能低下の指標は、動脈血中酸素分圧(PaO₂)低下とし、さらに、肺浮腫の指標は、肺組織中水分含量増加、Na⁺含量増加、K⁺含量減少とした。その結果、ヨード造影剤イオキサグル酸の投与により、PaO₂の低下、肺組織水分含量及びNa⁺含量の増加が見られ、これら肺機能低下及び肺浮腫は、いずれも6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートにより完全に抑制されることを見出した。

上記記載に加えて、以下に示す実施例から明らかな通り、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートは非常に強力にトリプターゼを阻害するので、過度のトリプターゼに起因するであろう疾患、例えば、全身アナフィラキシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、間質性膀胱炎、過敏性腸症候群、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症状、歯肉炎、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用、花粉症等、トリプターゼに起因する各種疾患の治療剤として極めて有効であると考えられる。

また、本実験系から明らかなとおり、トリプターゼはプロテイナーゼ活性化型受容体(PAR-2)を刺激することにより透過性を亢進すると考えられ、一方、PAR-2は知覚神経や気管支にも存在し、トリプターゼの刺激により、発痛、痛覚過敏、搔痒、気道収縮が引き起こされることから、6'-アミジノ-2'-

ナフチル4-グアニジノベンゾエートのメシル酸塩はトリプターゼ/PAR-2系が関与すると考えられる病態、特に、知覚過敏、痛み、搔痒、浮腫、喘息等の治療薬として有用である。

5 以下に、実施例に基いて本発明を更に詳細に説明する。

まず、使用する薬剤として、ヒト肺由来精製トリプターゼ (EC 3.4.21.59、cat No. 202-14471、生化学用、和光純薬)、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのメシル酸塩 (メシル酸ナファモスタット) 及びメシル酸ガベキサート、及び t-butylloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA) (Sigma社) を準備した。Boc-Phe-Ser-Arg-MCAは、DMSOに溶解し (75 μ M)、最終的に20倍希釈して用いた。

実施例 1

15 ヒトトリプターゼ阻害活性の測定

ヒト肺由来精製トリプターゼ活性に対するメシル酸ナファモスタットの阻害作用を測定した。対照として公知のメシル酸ガベキサートを用いた。

メシル酸ナファモスタットをTris-HCl緩衝液に溶解し、トリプターゼ (最終濃度は1 nM) を加えて37°Cにて5分間放置した。この混液に基質液としてBoc-Phe-Ser-Arg-MCA (最終濃度は3.75 μ M) を加え、37°Cにて5分間反応させた後、100°Cの湯浴中に30-60秒間浸すことにより反応を停止させた。この混液を遠沈 (13000回転、5分間) 後、励起波長370 nm、蛍光波長460 nmで分解産物の蛍光強度を測定し、酵素活性の指標とした。対照のメシル酸ガベキサートについても、同様の測定を行った。ヒト肺由来精製トリプターゼ活性に対するメシル酸ナファモスタット及びメシル酸ガベキサートの阻害作用を示すグラフを図1に示す。グラフ中、各値は平均値 \pm S. E.を示す (N=4-5、ただし、0.1及び1 nMではN=2)。

図1に示したように、メシル酸ナファモスタットは極めて強力、かつ、濃度依存的にヒト肺由来精製トリプターゼ活性を抑制し、そのIC₅₀値は0.016

nMであった。一方、対照として用いたメシル酸ガベキサートの IC_{50} 値は 194 nM であった。メシル酸ナファモスタットは、公知のメシル酸ガベキサートの約 12000 倍という驚異的な阻害活性を示すことが分かる。

5 実施例 2

培養血管内皮細胞におけるトリプターゼの透過性亢進作用

培養血管内皮細胞（ウシ大動脈内皮細胞）を用いて、トリプターゼ及び PAR-2 アゴニストとして知られる Serine-Leucine-Isoleucine-Glycine-Lysine-Valine (SLIGKV) によるタンパク（ウシ血清アルブミン）の透過性亢進作用を調べた。また、メシル酸ナファモスタットによるその抑制作用についても実験を行った。

タンパクの透過性の測定には、図 2 に示した装置を用いた。本装置は、プラスチック製のプレート外容器と、その中に内装できるインサートからなり、該インサートの底部は平面状のポリカーボネート膜（孔径 $3.0\text{ }\mu\text{m}$ 、面積 1.0 cm^2 ）が装着されている。ポリカーボネート膜にウシ大動脈内皮細胞の培養細胞（ 4.0×10^4 個/ cm^2 ）を播種し、10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含有する Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を培地として、95% O_2 、5% CO_2 条件下で 4~5 日間培養後透過性実験に供した。なお、培地は 2 日毎に交換した。透過用タンパクは、エバンスブルーを結合させて標識したウシ血清アルブミン (Ab-EB) の Krebs-Ringer 溶液を用いた。

透過性実験は、インサートに培養したウシ血管内皮細胞を Krebs-Ringer 液 (pH 7.4) でよく洗浄し、プレート内に浸した。プレートには Krebs-Ringer 液 1.5 ml を予め満たし、インサートには Krebs-Ringer 液 0.5 ml を添加して両者の液面が一致するようにした。所定濃度のトリプターゼ又は PAR-2 アゴニストとしての SLIGKV を、エバンスブルーを結合したウシ血清アルブミン (Ab-EB; 最終アルブミン濃度は 4%、エバンスブルー濃度は $0.67\text{ mg}/\text{ml}$ として使用) とともにインサート内に添加し、外液中に漏出した Ab-EB 濃度を測定して (620 nm における吸光

度)、タンパク透過性の指標とした。トリプターゼ及びプロテイナーゼ活性化型受容体(PAR-2)アゴニストペプチド(SLIGKV)による培養血管内皮細胞でのタンパク透過性亢進作用を示すグラフを図3に示す。グラフ中、各値は平均値±S.E.を示す。

- 5 図3に示したように、トリプターゼ及びPAR-2アゴニストペプチドのSerine-Leucine-Isoleucine-Glycine-Lysine-Valine(SLIGKV)はともに血管内皮細胞におけるタンパク透過性亢進作用を引き起こし、トリプターゼの効力はPAR-2アゴニストペプチド(SLIGKV)の約10000倍であった。

10 実施例3

メシル酸ナファモスタットによる、トリプターゼ によって亢進されるタンパク透過性の抑制作用

- トリプターゼの存在が、培養血管内皮細胞におけるタンパクの透過性を亢進させることは、上記実施例2から明らかである。本実施例では、実施例2と同様の
15 方法に従い、メシル酸ナファモスタットによるその抑制作用について実験を行った。メシル酸ナファモスタットをトリプターゼとともにインサート内に添加しておいた以外は、実施例2と同一の方法とし、トリプターゼの添加量は最終濃度が1nMとなるようにした。

- 結果を図4に示す。図4は、培養血管内皮細胞におけるトリプターゼによるタ
20 ンパク透過性亢進に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフであり、グラフ中、各値は平均値±S.E.を示す(N=4-7)。本試験によれば、トリプターゼによるタンパク透過性亢進作用は、メシル酸ナファモスタットにより濃度依存的に抑制され、そのIC₅₀値は0.029nMであった。

25 実施例4

ヨード造影剤によるラット肺における血管透過性亢進に対する メシル酸ナファモスタット及びメシル酸ガベキサートの抑制作用

ラットをペントバルビタールNa(50mg/kg)腹腔内投与により麻酔し、イオキサグル酸(ヘキサブリックス320、田辺製薬)(4gヨード/kg)を

- エバンスブルー生理食塩溶液 (20 mg/kg) とともに大腿静脈より注入した。注入容量は16 ml/kgとし、注入速度は1.5 ml/分とした。注入10分後に放血屠殺し、肺動脈を生理食塩水にて灌流後、肺組織を摘出し、秤量した。肺組織に漏出したエバンスブルーはホルムアミドにより抽出し (4 ml/g 組織
- 5 湿重量)、620 nmにおける吸光度により定量した。一方、肺組織は60℃にて24時間乾燥させた後、乾重量を測定した。血管透過性は肺組織に漏出したエバンスブルーの単位乾燥重量当りの量として表した。また、肺機能について調べる目的で、動脈血中の酸素分圧 (PaO₂)、二酸化炭素分圧 (PaCO₂) 及びpHを、造影剤投与5、10、20、40及び60分後にi-STAT (i-STAT
- 10 Cooperation、ニュージャージー、米国) を用いて大腿動脈よりモニターした。さらに、肺浮腫を調べる目的で、造影剤投与1時間後にラット肺を摘出し、肺組織水分含量ならびにNa⁺及びK⁺含量を測定した。肺水分含量 (%) は100 x (湿重量-乾燥重量) / 湿重量として表わした。一方、Na⁺及びK⁺含量は原子吸光光度計 (フレイム法) により測定した。結果を図5、6及び7に示す。
- 15 図5は、ヨード造影剤イオキサグル酸によるラット肺での血管透過性亢進作用に対するメシル酸ナファモスタット及びメシル酸ガベキサートの抑制作用を示すグラフであり、グラフ中、各値は平均値±S.E.を示す()内の数字; 例数、*P<0.05, **P<0.01; 対照群との比較 (Dunnett's test))。図5に示したように、ヨード造影剤イオキサグル酸の投与により、ラ
- 20 ット肺での血管透過性は顕著に亢進した。メシル酸ナファモスタット (3-10 mg/kg) はイオキサグル酸による血管透過性亢進作用を有意、かつ、強力に抑制し、特に10 mg/kg投与群ではイオキサグル酸による血管透過性亢進は全く認められなかった。一方、メシル酸ガベキサート (50 mg/kg) はイオキサグル酸による血管透過性亢進作用を有意に抑制したが、メシル酸ナファモ
- 25 スタットの場合ほど顕著な抑制は認められなかった。
- また、図6は、ヨード造影剤イオキサグル酸によるラット動脈血酸素分圧、二酸化炭素分圧及びpHの変化に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフであるが (各値は平均値±S.E.、各群4-6匹のラットを使用、*P<0.05; 非投与群との比較 (Dunnett's test))、図6に示される結果

より、イオキサグル酸の投与により、肺機能低下による動脈血酸素分圧の有意な減少が見られ、メシル酸ナファモスタット（10 mg/kg）はこの酸素分圧の低下を完全に抑制していることが分かる。

さらに、図7のヨード造影剤イオキサグル酸によるラット肺浮腫（水分含量増加、Na⁺含量増加ならびにK⁺含量減少）に対するメシル酸ナファモスタットの抑制作用を示すグラフ（各値は平均値±S.E.、各群4-6匹のラットを使用、*P<0.05；非投与群との比較（Dunnett's test）、†P<0.05；イオキサグル酸単独投与群との比較（Dunnett's test））から、イオキサグル酸による肺水分含量増加、肺組織中Na⁺含量の増加といった、いわゆる肺浮腫の発現が、メシル酸ナファモスタット（10 mg/kg）の投与により抑制されることが明らかとなった。

製剤例 1

下記成分を用い、常法により注射剤を製する。

15	メシル酸ナファモスタット	5.0 mg
	注射用蒸留水	2 ml

製剤例 2

下記成分を注射用蒸留水に溶解し、凍結乾燥することによって、用時溶解して

20 用いる注射剤を製する。

	メシル酸ナファモスタット	10.0 mg
	ホウ酸	1.0 mg
	D-マンニトール	20.0mg

25 製剤例 3

下記成分を注射用蒸留水に溶解し、凍結乾燥することによって、用時溶解して用いる注射剤を製する。

	メシル酸ナファモスタット	10.0 mg
	コハク酸	1.0 mg

D-マンニトール	20.0 mg
----------	---------

製剤例 4

下記成分を注射用蒸留水に溶解し、凍結乾燥することによって、用時溶解して

5 用いる注射剤を製する。

メシル酸ナファモスタット	10.0 mg
安息香酸	1.0 mg
D-マンニトール	20.0 mg

10 製剤例 5

1 カプセルにメシル酸ナファモスタットを 100.0 mg 含有するように下記成分・分量を混和し、常法によりカプセル剤を製する。

メシル酸ナファモスタット	100.0 mg
乳 糖	59.0 mg
15 結晶セルロース	33.4 mg
カルシウムカルボキシ	
メチルセルロース	3.6 mg
ステアリン酸マグネシウム	4.0 mg
計	200.0 mg

20

製剤例 6

製剤 500 mg 中にメシル酸ナファモスタットを 50.0 mg 含有するように下記成分・分量を混和し、常法により細粒剤を製する。

メシル酸ナファモスタット	50.0 mg
25 乳 糖	249.0 mg
D-マンニトール	75.0 mg
とうもろこしでんぷん	110.0 mg
ヒドロキシプロピルセルロース	16.0 mg
計	500.0 mg

製剤例 7

軟膏 1 g 中にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 含有するように下記成分・分量を秤取し、常法により軟膏剤を製する。

5	メシル酸ナファモスタット	1.0 g
	エチレングリコール	20.0 g
	流動パラフィン	5.0 g
	白色ワセリン	74.0 g
	計	100.0 g

10

製剤例 8

クリーム 1 g 中にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 含有するように下記成分・分量を秤取し、常法によりクリーム剤を製する。

	メシル酸ナファモスタット	1.0 g
15	エチレングリコール	20.0 g
	セスキオレイン酸ソルビタン	4.0 g
	ワセリン	30.0 g
	パラフィン	7.0 g
	ラノリン	4.0 g
20	パラオキシ安息香酸メチル	0.6 g
	精製水	33.4 g
	計	100.0 g

製剤例 9

25 クリーム 1 g 中にメシル酸ナファモスタット 10 mg を含有するように下記成分・分量を秤取し、常法によりクリーム剤を製する。

	メシル酸ナファモスタット	1.0 g
	エチレングリコール	30.0 g
	鯨ロウ	5.0 g

	ラノリン	5.0 g
	セタノール	25.0 g
	自己乳化型モノステアリン酸グリセリン	3.5 g
	モノステアリン酸ソルビタン	1.5 g
5	グリセリン	3.0 g
	カルボキシビニルポリマー(1%水溶液)	5.0 g
	水酸化カリウム	0.2 g
	パラオキシ安息香酸メチル	0.6 g
	精製水	20.2 g
10	計	100.0 g

製剤例 10

ローション 1 g 中にメシル酸ナファモスタットを 10 mg 含有するように、下記成分・分量を秤取し、常法によりローション剤を製する。

15	メシル酸ナファモスタット	1.0 g
	エチレングリコール	30.0 g
	プロピレングリコール	64.0 g
	イソプロピルアルコール	5.0 g
	計	100.0 g

20

産業上の利用の可能性

6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩のトリプターゼ阻害作用については、不思議なことに、今日まで報告されていない。驚くべきことに、上記実験結果から明らかのように、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩、特に、6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエートのメシル酸塩(メシル酸ナファモスタット)は、公知のメシル酸ガベキサート(IC₅₀値は194 nM)よりも遥かに強力なトリプターゼ阻害作用(IC₅₀値は0.016 nM)を有することが、ここに初めて明らかとなった。

そして、驚くべきことに、メシル酸ナファモスタットの効力はメシル酸ガベキサートの何と12000倍以上であった。

よって、本発明のトリプターゼ阻害用医薬組成物は、全身アナフィラキシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、間質性膀胱炎、過敏性腸症候
5 群、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症、知覚過敏症、疼痛、掻痒症、歯肉炎、浮腫、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用としての血管透過性亢進又は肺浮腫、及び花粉症からなる群から選ばれる疾患の治療又は予防のための治療剤としての今後の研究開発が大いに期待されるものである。

10 一方、トリプターゼが、血管内皮細胞をはじめ、消化管、知覚神経、気管支、等、生体内に広く分布するプロテイナーゼ活性化型受容体（PAR-2）を選択的に活性化することによって、気道平滑筋の収縮、知覚神経からのタキキニン遊離を介した発痛、痛覚過敏、掻痒、炎症、浮腫を引き起こすという公知の事実からして、また、トリプターゼが培養血管内皮細胞におけるタンパク透過性を亢進
15 したのと同様に、PAR-2アゴニストペプチドも同様の作用を示した本試験結果からして、メシル酸ナファモスタットは、トリプターゼによる培養血管内皮細胞でのタンパク透過性亢進作用を強力、かつ、濃度依存的に抑制することが明らかとなった。

一方、ヨード造影剤による副作用としての肺不全やアナフィラキシー様作用は、
20 主として肥満細胞由来ヒスタミン及びトリプターゼの作用に基づくと考えられている。本実験において、ヨード造影剤は顕著な肺血管透過性亢進を引き起こし、この作用はメシル酸ナファモスタットによりほぼ完全に抑制された。一方、メシル酸ガベキサートでは肺血管透過性亢進は有意に抑制されたものの、その効果は不完全であった。

25 以上のことから、メシル酸ナファモスタットはトリプターゼ活性を強力に阻害することにより、トリプターゼ/PAR-2系が関与すると考えられる前述の如き疾患、特に、神経痛や帯状疱疹後疼痛等の知覚過敏症、掻痒症、浮腫、喘息等の疾病に対して治療予防の効果が期待できるものである。

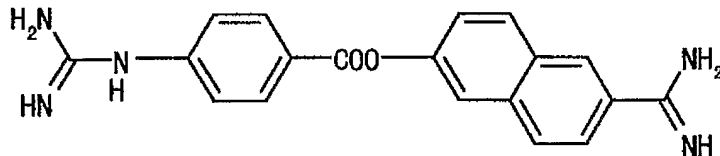
従って、本発明の阻害用医薬組成物及び抑制用医薬組成物は、全身アナフィラ

キシー疾患、アスピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症、知覚過敏症、掻痒症、歯肉炎、浮腫、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用としての血管透過性亢進又は肺浮腫、及び花粉症からなる群から選ばれる疾患の治療

5 又は予防のための治療剤として有用である。

請求の範囲

1. 下記式で表される6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有するトリプターゼ阻害剤
5 害用医薬組成物。



- 10 2. 塩がメシル酸塩である、請求項1に記載の医薬組成物。
3. トリプターゼがヒトトリプターゼである、請求項1又は2に記載の医薬組成物。
4. 6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、全身アナフィラキシー疾患、ア
15 スピリン過敏性喘息、喘息、間質性肺疾患、間質性膀胱炎、過敏性腸症候群、アレルギー性疾患、アトピー性疾患、皮膚水疱症、知覚過敏症、疼痛、掻痒症、歯肉炎、浮腫、乾癬、肺繊維症、関節炎、歯周病、血液凝固障害、腎間質線維化、X線造影剤の副作用としての血管透過性亢進又は肺浮腫、及び花粉症からなる群から選ばれる疾患の治療又は予防のための医薬組成物。
- 20 5. 塩がメシル酸塩である、請求項4に記載の医薬組成物。
6. 疾患が、疼痛、掻痒症、間質性膀胱炎、過敏性腸症候群、又はX線造影剤の副作用としての血管透過性亢進若しくは肺浮腫である、請求項4又は5に記載の医薬組成物。
7. トリプターゼ阻害作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩を有
25 効成分として含有するプロテイナーゼ活性化型受容体-2抑制用医薬組成物。
8. トリプターゼがヒトトリプターゼであり、トリプターゼ阻害作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩が6'-アミジノ-2'-ナフチル4-グアニジノベンゾエート又はそのメシル酸塩である請求項7に記載の医薬組成物。

FIG. 1

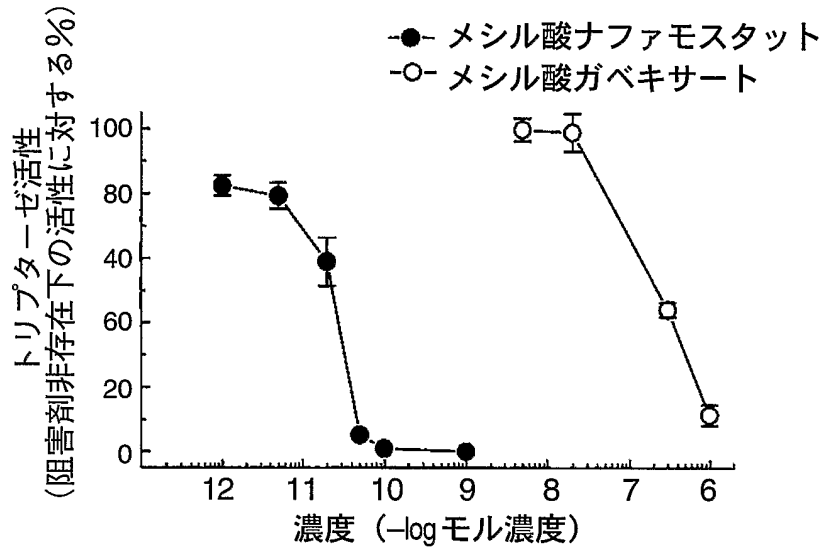


FIG. 2

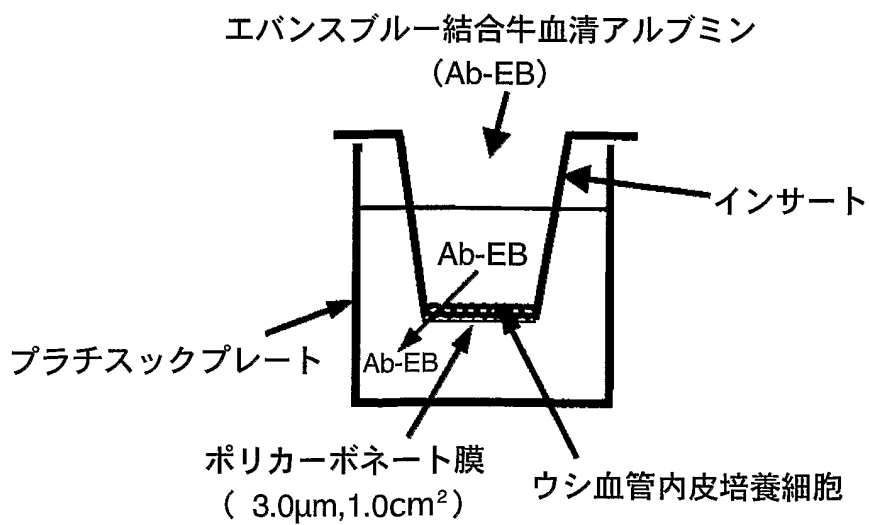


FIG. 3

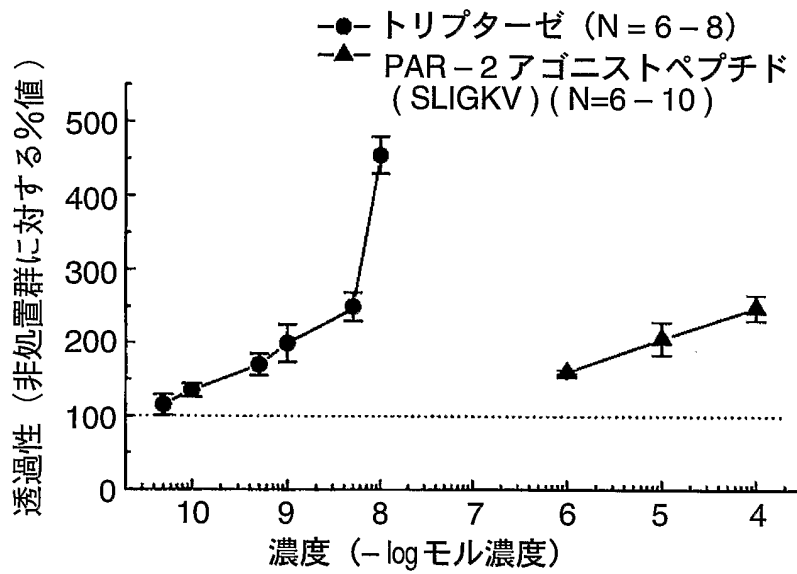


FIG. 4

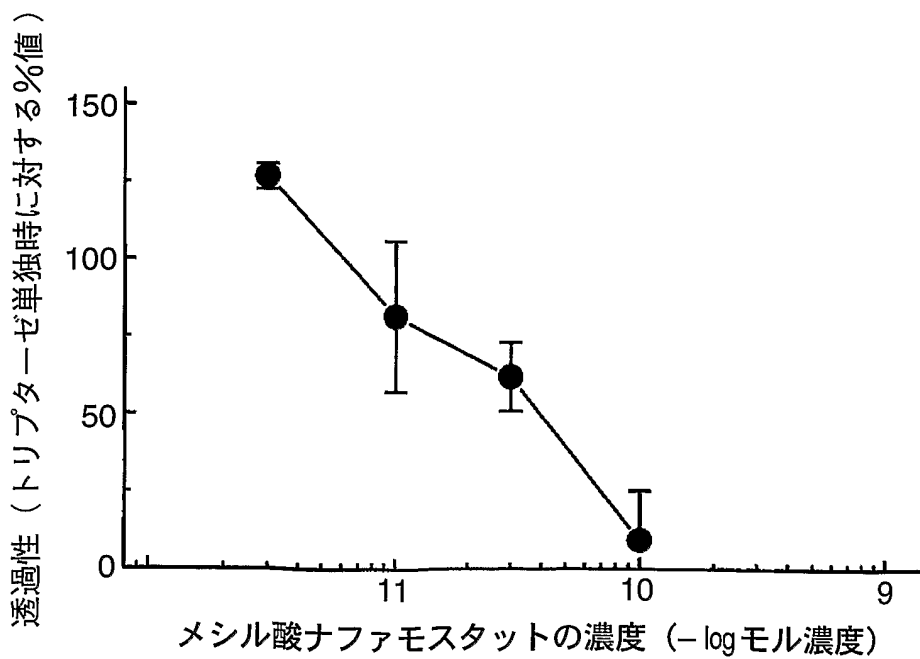


FIG. 5

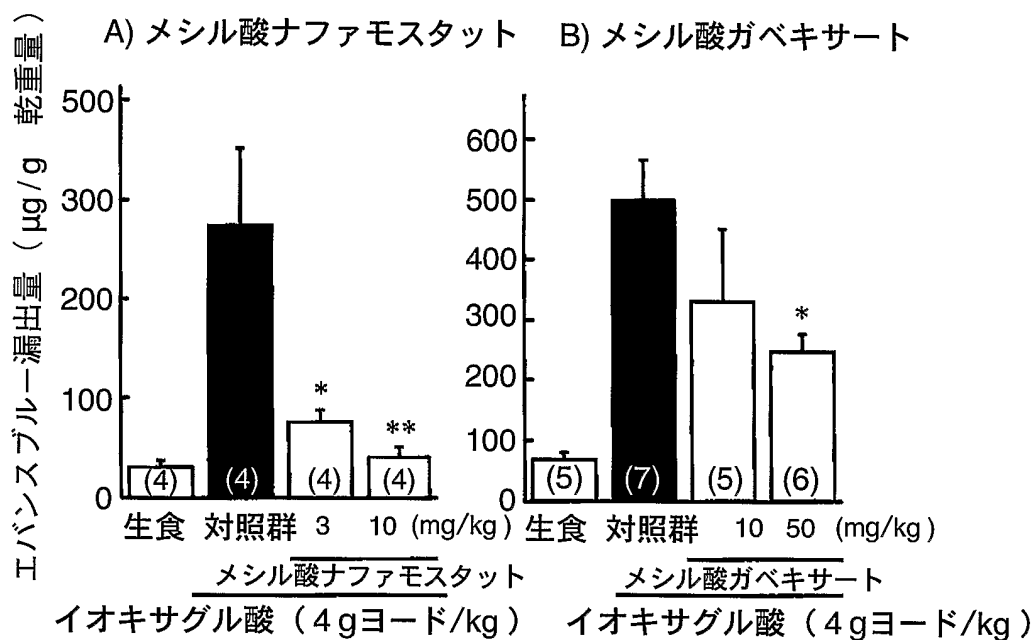
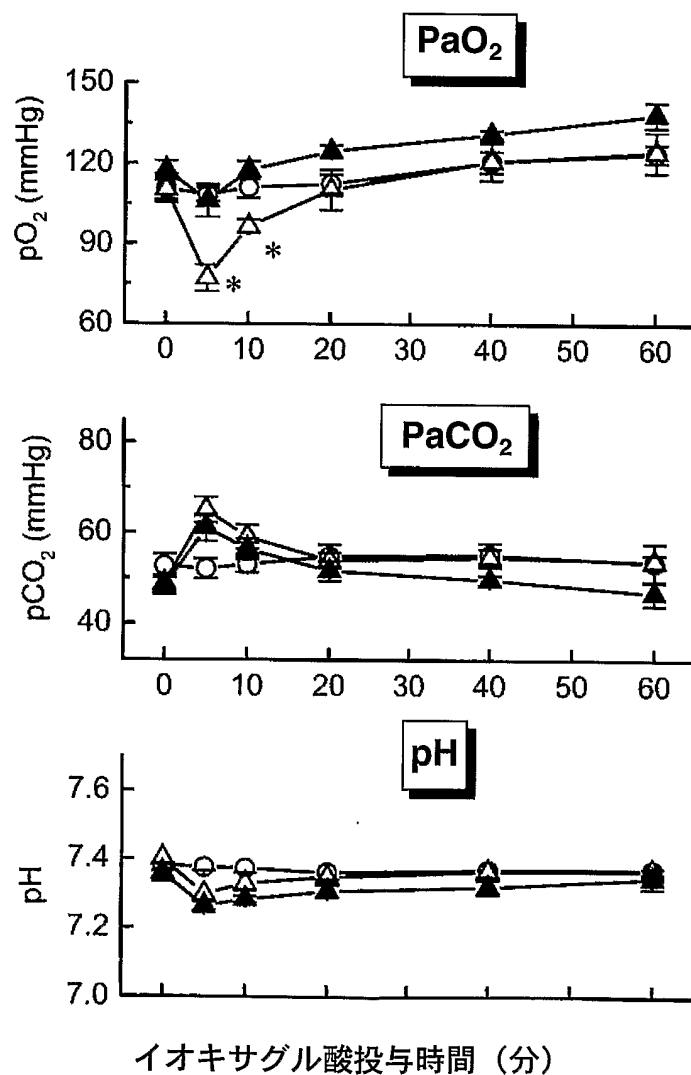
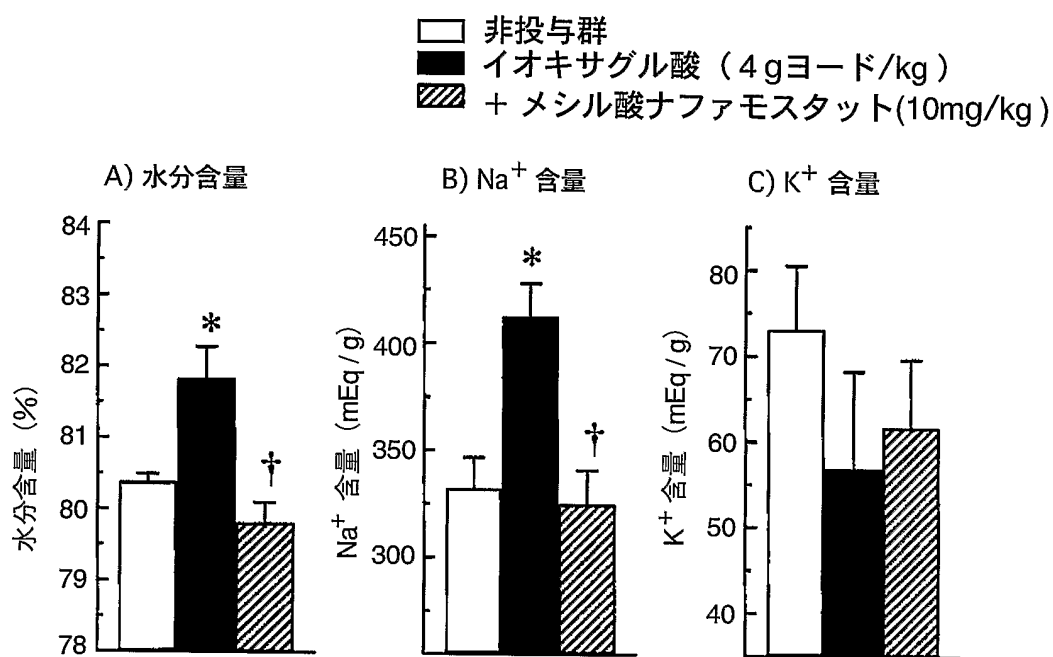


FIG. 6



- 非投与群
- △- イオキサグル酸 (4gヨード/kg)
- ▲- イオキサグル酸 + メシル酸ナファモスタット(10mg/kg)

FIG. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K31/245, A61P1/00, 1/02, 7/02, 7/10, 11/00, 11/06, 13/10, 17/00, 17/04, 17/06, 19/02, 25/04, 29/00, 37/08, 43/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K31/245 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 97/37969 A1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 October, 1997 (16.10.97), Particularly, page 15, compound 4; page 31, lines 8 to 18 & EP 893437 A1	1-8 8
X	JP 61-1063 B2 (Torii Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 January, 1986 (13.01.86), Full text & EP 48433 A2	1-8
X Y	Molino, Marina; Barnathan, Elliot S.; Numerof, Robert; Clark, Jim; Dreyer, Mark; Cumashi, Albana; Hoxie, James A.; Schechter, Norman; Woolkalis, Marilyn; Brass, Lawrence F., "Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2", Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol.272, No.7, pages 4043 to 4049	7 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"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 25 March, 2003 (25.03.03)		Date of mailing of the international search report 08 April, 2003 (08.04.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01814

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

It is not clear to what extent of structures are involved in the expression "a compound having an effect of inhibiting tryptase" as set forth in the claim, which makes the scope of the drugs according to the invention unclear.

Thus, claim 7 and the description do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

Such being the case, documents of prior art were examined in this international search report based on the compounds specifically presented in the description.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

group of the inventions as set forth in claims 1 to 6 and the group of the inventions as set forth in claims 7 and 8 involving one or more of the same or corresponding special technical features. Also, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Thus, this international application does not fulfill the requirement of unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01814

Box I 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.: 7
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:
(See extra sheet.)

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II 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:

The inventions as set forth in claims 1 to 6 relate to the utilization of compounds having a specific chemical structure in drugs for inhibiting tryptase, while the inventions as set forth in claims in 7 and 8 relate to the utilization of an active ingredient, which is not specified by a chemical structure, in drugs for inhibiting proteinase. Thus, these groups of inventions are completely different from each other in technical ideas concerning the active ingredients. Moreover, the medicinal uses per se of them had been publicly known. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between the
(continued to extra sheet)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/245, A61P1/00, 1/02, 7/02, 7/10, 11/00, 11/06, 13/10, 17/00, 17/04, 17/06, 19/02, 25/04, 29/00, 37/08, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/245

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 97/37969 A1 (小野薬品工業株式会社) 1997.10.16, 特に第15 頁化合物4, 第31頁第8-18行, & EP 893437 A1	1-8 8
X	JP 61-1063 B2 (鳥居薬品株式会社) 1986.01.13, 全文, & EP 484 33 A2	1-8
X Y	Molino, Marina; Barnathan, Elliot S.; Numerof, Robert; Clar k, Jim; Dreyer, Mark; Cumashi, Albana; Hoxie, James A.; Schec hter, Norman; Woolkalis, Marilyn; Brass, Lawrence F., "Intera ctions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR	7 8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.03.03

国際調査報告の発送日

03.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
内藤 伸一



4 P 3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 7 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
別紙参照。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6の発明は、特定の化学構造を有する化合物をトリプターゼ阻害用医薬に用いる発明であり、請求の範囲7-8の発明は、化学構造によって特定されない有効成分をプロテイナーゼ阻害用医薬に用いる発明であるから、両者は有効成分についての技術的思想が全く異なるものである。また、両者の医薬用途自体は公知のものにすぎない。してみれば、請求の範囲1-6の発明と請求の範囲7-8の発明の間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとはいえず、両者が単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。したがって、この国際出願は発明の単一性の要件を満たしていない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	-2", Journal of Biological Chemistry , 1997, Vol.272, No.7,p4 043-4049	

第 I 欄の 2. について

請求の範囲に記載された「トリプターゼ阻害作用を有する化合物」なる文言は、明細書の記載を検討しても、いかなる構造のものまでを包含するものなのか明確であるとはいえないから、本願発明医薬の範囲を不明確にするものである。

したがって、請求の範囲 7 及び明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

そこで、この国際調査報告では、明細書に具体的に記載された化合物に基づいて先行技術文献調査を行った。