



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 A61K 31/425 // C07D 417/12	A1	(11) 国際公開番号 WO98/10760 (43) 国際公開日 1998年3月19日(19.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03199 (22) 国際出願日 1997年9月11日(11.09.97) (30) 優先権データ 特願平8/241910 1996年9月12日(12.09.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三共株式会社(SANKYO COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 横山富久(YOKOYAMA, Tomihisa)[JP/JP] 藤原俊彦(FUJIWARA, Toshihiko)[JP/JP] 堀越大能(HORIKOSHI, Hiroyoshi)[JP/JP] 吉岡慎二(YOSHIOKA, Shinji)[JP/JP] 〒140 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 中村 稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY POTENTIATOR CONTAINING TROGLITAZONE (54)発明の名称 トログリタゾンを含むグルタチオン還元酵素活性増強剤 (57) Abstract Problem: to provide a glutathione reductase activity potentiator. Means for resolution: a glutathione reductase potentiator containing troglitazone or a pharmacologically acceptable salt thereof.		

(57) 要約

[課題]

グルタチオン還元酵素活性増強剤の提供。

[解決手段]

トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含有する、グルタチオン還元酵素活性増強剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴス ラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

トログリタゾンを含むグルタチオン還元酵素活性増強剤

〔技術分野〕

本発明は、トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含む、優れたグルタチオン還元酵素活性増強剤に関する。

〔背景技術〕

グルタチオンは生体内組織に幅広く存在し、細胞内の主な還元剤であり、酸化還元的代謝において、重要な役割を担っている。特に、還元型グルタチオン（G S H）は、その分子内に存在するチオール基により、種々の細胞防御及び修復機構において重要な役割を担っている。グルタチオンパーオキシダーゼは、G S H による過酸化物（過酸化水素や過酸化脂質など）の還元反応を触媒する酵素であり、抗酸化物機構における重要な酵素である。一方グルタチオン還元酵素は、酸化されたグルタチオン（酸化型グルタチオン：G S S G）を、N A D P H 存在下に、還元してG S H に再生する酵素である。

これらの化合物及び酵素を含む抗酸化物機構によって、細胞は酸化促進物（例えば、上記過酸化物及び遊離ラジカルなど）の有害な作用から保護されている。酸化促進物及び抗酸化物機構間の均衡が前者優位となったときに、酸化的ストレスが生じる [J. Appl. Physiol. 1996 Nov., 81(5), 2199-2202 頁]。その酸化的ストレスは様々な疾患に関与しており、例えば、虚血性心疾患；白内障；特発性肺線維症；慢性腎不全；パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん、筋萎縮性側索硬化症、脳虚血のような、末梢神経及び中枢神経を含む神経系の疾患；並びに胃潰瘍に関連しているとの報告がある [J. Appl. Physiol. 1996 Nov., 81(5), 2199-2202 頁；Free Radical Biology & Medicine, Vol.21, No.6, 845-853頁 (1996 年)；Free Radical Biology & Medicine, Vol.20, No.7, 925-931 頁 (1996 年)；Gastroenterology, 112, 855-863頁 (1997 年)]。

また、W O 9 4 / 1 2 5 2 7 には、内因性G S H の合成を促進する化合物が、

酸化的な組織障害、特に過剰の遊離ラジカルによる障害に関する病的状態のようなグルタチオンの欠乏によって起こる様々な疾患の治療に適するとの開示があり、そのような疾患の例として、アルコールの多飲、生体異物、放射線による障害、肝疾患によって起こる細胞内の酸化状態、薬及び化学物質による中毒、重金属による中毒、脳の生理学的な加齢（例えば、記憶及び学習能力の喪失のような、酸化性物質に対する防御機構の変化によるグルタチオン濃度の減少のために起こる脳の衰退であるパーキンソン病）、並びに、急性及び慢性の神経変性疾患（急性の病状としては、急性の虚血状態、特に大脳の発作、低血糖症、及びてんかん発作；慢性の病状としては、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病）、免疫機構の機能異常、特に癌の免疫治療、不妊症、特に雄性不妊があげられている。更に、その化合物は、遊離ラジカルの主たる原因となる虚血状態に続く器官の再灌流にも適すると開示されている。更に、特開昭64-26516号には、グルタチオン濃度を上昇させる化合物が、白内障、肝疾患及び腎疾患をはじめとする各疾患の治療及び予防に有用であると開示されている。

これらから、グルタチオン還元酵素活性を増強して、GSHの供給量を増やす化合物は、上記内因性GSHの合成を促進する化合物及びグルタチオン濃度を上昇させる化合物と同様の効果を奏すると考えられ、すなわち、上記のような疾患の予防又は治療のために使用することができると考えられる。

ところで、上述のように、白内障も酸化ストレスが関与している疾患であり、白内障患者においては水晶体中GSHの劇的な減少がみられること、並びに老年者の水晶体、X線白内障患者の水晶体、及び核白内障患者の水晶体においては、蛋白質のチオール基が高度に酸化されていることが報告されている[V.N.Reddy, Exp. Eye Res. 50, 771-778 (1990)]。したがって、酸化ストレスを主たる病因とするこれらの白内障は、グルタチオン還元酵素活性を増強させることにより、予防又は治療が可能であると考えられる。

一方、糖尿病性白内障は、糖尿病を原因とする白内障であり、糖尿病合併症の一症例でもある。糖尿病に罹患している患者においては、ポリオール代謝系が亢進しており、この現象が糖尿病性白内障などの様々な糖尿病性合併症の原因であると考えられている。このポリオール代謝系においては、細胞内グルコースがア

ルドース還元酵素（A R）によって、N A D P H存在下に、ソルビトールに還元される反応が律速段階であるので、ポリオール代謝系が亢進することにより、ソルビトールの生成量が上昇する [Satish K.Srivastava et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 82, 7222-7226(1995)]。このソルビトールは生体膜透過性が低いので、細胞内に蓄積される。ソルビトールが水晶体中に蓄積した場合、浸透圧が高まり、水晶体は膨張し [Kinoshita et al., Metabolism 28-4 sup-1, 462-469(1979)]、浮腫が生じ、細胞が変性して白内障が発症すると考えられている。従来、A Rを阻害して細胞内ソルビトールの蓄積を抑制することより、白内障を予防又は治療できるとの仮説に基づいて、多くのA R阻害剤が研究開発されている。

これに対し、グルタチオン還元酵素とA Rが共存する場合、前者が優先的にN A D P Hを消費するので、グルタチオン還元酵素活性を増強させることによりA Rの機能が抑制され、その結果、ポリオールの蓄積が抑制されることが報告されている [Yokoyama et al., Exp.Eye Res. 58, 207-218(1994)]。

すなわち、グルタチオン還元酵素活性を増強させる化合物は、糖尿病性白内障をも予防又は治療可能であると考えられる。

トログリタゾンはインスリン非依存性糖尿病薬として市販されており、更にその他糖尿病合併症など、種々の疾患の治療又は予防のために用いられ得ることが知られているが、グルタチオン還元酵素活性増強作用を有することは知られていなかった。

[発明の開示]

本発明者らはトログリタゾンの医薬としての用途について鋭意研究を行った結果、トログリタゾンが優れたグルタチオン還元酵素活性増強作用を有していることを見出して本発明を完成した。

本発明は、

(1) トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含有する、グルタチオン還元酵素活性増強剤

に関する。

好適には、

(2) 還元型グルタチオンの欠乏によって起こる疾患の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤

であり、更に好適には、

(3) 酸化ストレスによって起こる疾患の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤

であり、より更に好適には、

(4) 虚血性心疾患の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤、

(5) 特発性肺線維症の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤、

(6) 慢性腎不全の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤、

(7) 酸化ストレスによって起こる神経系の疾患の予防又は治療のための、

(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤、

(8) 胃潰瘍の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤、及び

(9) 白内障の予防又は治療のための、(1)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤である。

特に、(9)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤において、好適には、

(10) 白内障が水晶体中にポリオールが蓄積することによって起こる白内障、水晶体中に高分子量蛋白質が蓄積することによって起こる白内障又は水晶体中に過酸化物が蓄積することによって起こる白内障である、(9)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤であり、

更に好適には、

(11) 白内障が水晶体中に高分子量蛋白質が蓄積することによって起こる白内障又は水晶体中に過酸化物が蓄積することによって起こる白内障である、(9)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤であり、

より更に好適には、

(12) 白内障が老人性白内障である、(9)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤であり、

最も好適には、

(13) 白内障が糖尿病性ではなく、老人性白内障である、(9)に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤である。

本発明において、

「還元型グルタチオンの欠乏によって起こる疾患」とは、アルコールの多飲、生体異物又は放射線による障害；肝疾患によっておこる細胞内の酸化状態；薬及び化学物質による中毒；重金属による中毒；脳及び神経変性疾患（例えば、脳虚血、大脳の発作、低血糖症、てんかん、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病）のような神経系の疾患；免疫機構の機能異常、特に癌の免疫治療；不妊症、特に雄性不妊；虚血性心疾患；白内障；特発性肺線維症；慢性腎不全；並びに胃潰瘍のような疾患を示す。

「酸化的ストレスによって起こる疾患」とは、上記「神経系の疾患」、虚血性心疾患、白内障、特発性肺線維症、慢性腎不全、及び胃潰瘍を示し、「酸化的ストレスによって起こる神経系の疾患」とは、上記「神経系の疾患」を示す。

「ポリオール」の語は、糖がアルドース還元酵素（AR）によって還元されて生成する糖アルコールを意味し、そのような糖アルコールとしては、例えば、ソルビトール、ガラクトチールをあげることができる。

「水晶体中にポリオールが蓄積することによって起こる白内障」としては、特に、糖尿病性白内障、糖白内障及びガラクトース白内障をあげることができる。

「高分子量蛋白質」の語は、分子中に少なくとも1つのチオール基を有するペプチド又は蛋白質が、そのチオール基を介して、分子内もしくは分子間のジスルフィド結合を形成することにより生成する蛋白質を意味する。更に、「分子中に少なくとも1つのチオール基を有するペプチド又は蛋白質」には、陽イオン運搬

能及び膜透過能に関連する細胞膜蛋白質のうちチオール基を有するものも含まれる。

「水晶体中に高分子量蛋白質が蓄積することによって起こる白内障」としては、特に、老人性白内障、X線白内障、核白内障をあげることができる。

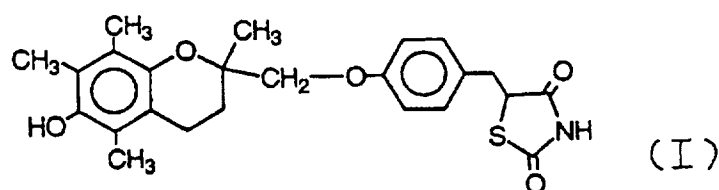
「過酸化物」の語は、スーパーオキサイド (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) 及び一重項酸素 (singlet oxygen; 1O_2)、ペルオキシラジカル、アルコキシラジカルなどの酸化的遊離ラジカル；並びに過酸化水素 (H_2O_2)、及び過酸化脂質などの、酸化的遊離ラジカルを放出し得る化合物を意味する。

「水晶体中に過酸化物が蓄積することによって起こる白内障」としては、特に、老人性白内障をあげることができる。

「糖尿病性ではなく、老人性」の白内障とは、加齢によって起こる白内障であって糖尿病を病因としないもの、すなわち糖尿病にかかっていない高齢者に発症する白内障を意味する。

尚、上記「還元型グルタチオンの欠乏によって起こる疾患」のうち、一度発症すると正常状態に、完全には戻らない疾患があるが、それらの疾患の「治療」とは、その病状の進行の阻止又は遅延を意味する。

トログリタゾンは下記式 (I)：



を有する化合物である。

本発明に示す薬理上許容される塩とは、トログリタゾンは、塩にすることが出来るので、その塩をいい、その様な塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、のようなアルカリ金属塩；カルシウム塩のようなアルカリ土類金属塩を挙げることができる。

トログリタゾンは、その分子内に2つの不斉炭素有するので、4種類の異性体が存在する。本発明の化合物においては、これらの異性体およびこれらの異性体の混合物がすべて単一の式、即ち上記式(I)で示されている。従って、本発明はこれらの異性体およびこれらの異性体の混合物をもすべて含むものである。

トログリタゾン又はその薬理上許容される塩は、大気中に放置したり、又は、再結晶をすることにより、水分を吸収し、吸着水が付いたり、水和物となる場合があり、そのような水和物も本発明に包含される。

本発明のグルタチオン還元酵素活性増強剤はトログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含有している。トログリタゾンは、特開昭60-51189号に記載の方法によって製造することができる。

トログリタゾン又はその薬理上許容される塩の投与形態としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤もしくはシロップ剤等による経口投与、または注射剤もしくは座剤等による非経口投与をあげることができる。これらの製剤は賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定剤、矯味矯臭剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。

ここに、賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、ぶどう糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α -デンプン、デキストリン、カルボキシメチルデンプンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルラン；などの有機系賦形剤；および軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；磷酸水素カルシウムのような磷酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩；などの無機系賦形剤をあげることができる。

滑沢剤としては、例えばステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーガム、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫

酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；D L-ロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；および、上記澱粉誘導体などをあげることができる。

結合剤としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴールおよび前記賦形剤と同様の化合物をあげることができる。

崩壊剤としては、例えば低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、内部架橋クロスカルメロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類をあげることができる。

安定剤としては、例えばメチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；およびソルビン酸をあげることができる。

矯味矯臭剤としては、例えば通常使用される、甘味料、酸味料、香料等をあげることができる。

更に、本発明のトログリタゾンを含むグルタチオン還元酵素活性増強剤は、眼に局所的に投与することができる。眼への局所的投与に適した剤形としては、薬剤を投与した後にほぼ完全な状態で残存する固形挿入剤の形、または涙液に溶解するかまたは他の方法で崩壊する崩壊性挿入剤であり、例えば溶液、懸濁液、ゲル、眼軟膏及び固形挿入剤などをあげることができる。

これらの眼科用組成物の処方は、下限値としては、0.01%、好適には0.1%で、上限値としては、10%、好適には5%で、トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含むことができる。

眼科用組成物は、無毒の眼科用無機又は有機担体を含んでいてもよく、典型的な眼科用組成物のための担体としては、例えば水、低級アルコールまたはアラ

ルカノールのような水と混和する溶剤と水との混合物、植物油、ポリアルキレングリコール、石油を基剤とするジェリー、エチルセルロース、オレイン酸エチル、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ミリスチン酸イソプロピル及びその他の通常に使用する受容可能な担体をあげることができる。また眼科用組成物は、乳化剤、防腐剤、湿潤剤、賦形剤などのような無毒の補助物質、例えばポリエチレングリコール200、300、400及び600、カーボワックス1000、1500、4000、6000及び10000、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピルのようなp-ヒドロキシ安息香酸エステル、低温殺菌性を持つことが知られており且つ使用して無毒な、第四級アンモニウム化合物（例えば、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウム）、フェニル水銀塩のような抗菌剤、チメロサル、メチル及びプロピルバラベン、ベンジルアルコール、フェニルエタノール、食塩、ホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウムのような緩衝剤成分、グルコン酸緩衝剤、及びソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミチレート、ジオクチルナトリウムスルホスクシネート、モノチオグリセロール、チオソルビトール、エチレンジアミン四酢酸などを含むこともできる。

更に適当な眼科用賦形剤を使用することができ、それらには通常のリン酸緩衝賦形剤（例えば、リン酸ナトリウム緩衝剤、リン酸カリウム緩衝剤）、等張性ホウ酸賦形剤、等張性食塩賦形剤、等張性ホウ酸ナトリウム賦形剤などが含まれる。

本発明において、トログリタゾン又はその薬理上許容される塩の投与量は症状、年齢、投与方法等によって異なるが、例えば経口投与の場合には、成人に対して1日あたり、下限として0.1mg（好ましくは1mg）、上限として、1000mg（好ましくは500mg）を1回または数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。静脈内投与の場合には、成人に対して1日当たり、下限として0.01mg（好ましくは0.1mg）、上限として、500mg（好ましくは200mg）を1回または数回に分けて、症状に応じて投与することが望ましい。

トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含有する製剤は、例えば次の方法により製造することができる。

製剤例 1. 散剤

トログリタゾン 5 g、乳糖 895 g およびトウモロコシデンプン 100 g をブレンダーで混合すると、散剤が得られる。

製剤例 2. 顆粒剤

トログリタゾン 5 g、乳糖 865 g および低置換度ヒドロキシプロピルセルロース 100 g を混合した後、10%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液 300 g を加えて練合する。これを押し出し造粒機を用いて造粒し、乾燥すると顆粒剤が得られる。

製剤例 3. カプセル剤

トログリタゾン 5 g、乳糖 115 g、トウモロコシデンプン 58 g およびステアリン酸マグネシウム 2 g をV型混合機を用いて混合した後、3号カプセルに180 mg ずつ充填するとカプセル剤が得られる。

製剤例 4. 錠剤

トログリタゾン 5 g、乳糖 90 g、トウモロコシデンプン 34 g、結晶セルロース 20 g およびステアリン酸マグネシウム 1 g をブレンダーで混合した後、錠剤機で打錠すると錠剤が得られる。

製剤例 5. 点眼剤

トログリタゾン	2.0 g
リン酸二ナトリウム	0.716 g
リン酸一ナトリウム	0.728 g
塩化ナトリウム	0.400 g

p-ヒドロキシ安息香酸メチル	0.026 g
p-ヒドロキシ安息香酸プロピル	0.014 g
滅菌精製水	適量
水酸化ナトリウム	適量

全 量	100 ml
-----	--------

pH 7.0として常法により点眼液を調製する。

[発明を実施するための最良の形態]

以下に、実施例をあげて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1. 還元酵素活性増強作用

(1) 水晶体器官培養

6乃至8週例のSD系雄ラット（日本SLC）を二酸化炭素吸入により窒息死させた後、両眼球を摘出した。この眼球の後部の強膜を切開し、硝子体及び虹彩一毛様体を除去して、水晶体を取り出した。

こうして得られたそれぞれの水晶体を、6ウェル組織培養プレート（FALCON）中で後述するいずれかの培養液 3 ml に浸し、培養した。培養は、5%

二酸化炭素（空气中）存在下、湿度100%、37℃に保たれた炭酸ガスインキュベーター中で48時間おこなった。

負の対照用の培養液としては、ペニシリン（20単位/ml）及びストレプトマイシン（20 µg/ml）を含有するメディウム199（Medium 199、GIBCO）を用いた。

正の対照用の培養液としては、上記負の対照用の培養液と精製水の混合液（85：15）でガラクトース（D-galactose）を溶解し、30 mMの濃度でガラクトースを含有する溶液を調製して、これを用いた。

試験用の培養液としてはトログリタゾン（troglitazone）を10%アセトン水に溶解又は懸濁させて、上記正の対照用の培養液に1%の割合で添加し、この溶液を用いた。該試

験用の培養液はトログリタゾンの濃度が0.2 μ M、2 μ M及び20 μ Mのものをそれぞれ調製して用いた。

また、培養した水晶体は凍結して保存した。

ここで、負の対照用の培養液で培養された水晶体は、正常状態の水晶体に相当し、正の対照用の培養液で培養された水晶体は、ガラクトース負荷を受けた水晶体に相当し、試験用の培養液で培養された水晶体は、ガラクトース負荷を受け、且つ、トログリタゾンを投与された水晶体に相当する。

(2) グルタチオン還元酵素活性の測定

(1) で培養した水晶体を用いて、グルタチオン還元酵素水溶液を調製し、その酵素活性を測定した。

すなわち、凍結したラット水晶体を2 mlの蒸留水中でホモジナイズした後、これを遠心分離(10,000 g、20分間)に供して、得られた上清を酵素標本とした。

1 mM 酸化型グルタチオン(GSSG)及び100 μ M NADPHを含有するリン酸緩衝液 0.6 mlに酵素標本 400 μ lを加えて、25℃で6分間反応をおこなった。消費されずに反応液中に残ったNADPHによる吸光度(340 nm: OD_{340nm})を測定し、反応前のOD_{340nm}と反応終了後のOD_{340nm}の差(Δ OD_{340nm})をNADPH消費量とし、グルタチオン還元酵素活性の指標とした。結果(Δ OD_{340nm}/分/水晶体)を表1に示す。

表 1

対照群		トログリタゾン添加群	
負の対照 (- ガラクトース)	正の対照 (+ ガラクトース)	2 μ M	20 μ M
0.027 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.031 $\pm$ 0.000	0.031 $\pm$ 0.001

表1から明らかなように、トログリタゾンを添加した群の Δ OD_{340nm}は、負

及び正の対照試験におけるそれよりも大きく、より多くのNADPHが消費された。すなわち、トログリタゾンを添加することにより、グルタチオン還元酵素活性は増強された。

実施例 2. アルドース還元酵素 (AR) 阻害作用

AR活性は、実施例 1 (1) と同様に培養した水晶体を酵素の起源として、Hayman and Kinoshitaらの方法(J.Biol.Chem. 240, 877-882(1965)) に準じて測定した。

すなわち、実施例 1 (1) と同様に培養したラット水晶体を生理食塩水で洗浄し、0.05 mM EDTA 液中でホモジナイズした。これを遠心分離 (10,000 g、15 分間) に供して、得られた上清を酵素標品として用いた。この酵素液を、0.5 mM DL-グリセルアルデヒド、0.4 M 硫酸リチウム、0.05 mM NADPH、67 mM リン酸 1 水素ナトリウム及び 1 mM EDTA を含有する蒸留水溶液に加えて酵素反応を開始させた。室温で 7 分間反応を行った後、消費されずに反応液中に残った NADPH の吸光度 (340 nm) を測定した。反応開始前の吸光度と反応後の吸光度の差を NADPH 消費量とし、AR 活性の指標とした。

トログリタゾンは 0.2 μ M、2 μ M の濃度では、AR 阻害作用を示さなかった。

実施例 3. 水晶体内のポリオール蓄積抑制作用

ガラクトースが AR による還元反応を介して生成するポリオールであるガラクトールの水晶体内の量を測定した。

すなわち、実施例 (1) に準じて培養し、凍結したラット水晶体を 1 ml の 0.6 mM ジメチルメルカプトグルコース (内部標準物質) 蒸留水溶液中でホモジナイズし、これに氷冷したエタノール 2.4 ml を添加して、5 分間放置した。これを遠心分離 (10,000 g、5 分間) に供して、得られた上清 25 μ l をスクリーキャップバイアルに入れて、凍結乾燥した。これに 70 μ l のピリジン及び 20 μ l のフェニルイソシアネートを添加した後、55 $^{\circ}$ C で 5 分間

インキュベートした。更に $20 \mu\text{l}$ のメタノールを添加して、 55°C で 1 時間インキュベートした。これに $90 \mu\text{l}$ のピリジンを添加して検体とした。これを高速液体クロマトグラフィー（移動相；アセトニトリル：エタノール：水（= 5 : 2 : 3）混合液、流速； $1 \text{ ml}/\text{分}$ ）に注入し、分光光度計で吸光度（ 240 nm ）を測定し、各水晶体 1 個に含まれていたガラクトトールの量を算出した。正の対照群におけるガラクトトール量を 100 としたときの、トログリタゾン添加群におけるガラクトトールの量を表 2 に示す。

表 2

トログリタゾンの 添加濃度	$0 \mu\text{M}$ (正の対照)	$2 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$
ガラクトトール量	100	65 ± 8	47 ± 6

表 2 から明らかなように、トログリタゾンは、水晶体内のガラクトトール蓄積を濃度依存的に抑制した。

実施例 4. 過酸化脂質低下作用

実施例 1 (1) に準じて培養したラット水晶体中の過酸化脂質の量を測定した。

すなわち、水晶体湿重量を測定した後、 1 mM EDTA を含む 50 mM トリスー塩酸緩衝液（ $\text{pH} \ 7.6$ ） 0.5 ml 中でホモジナイズした。これを遠心分離（ $2,500 \text{ g}$ 、 30 分間）に供して、得られた上清に含まれる過酸化脂質を測定した。測定は過酸化脂質測定用キット（LP0-586, BIOXYTECH S.A. 社）を用いて行い、マロンアルデヒド及びヒドロキシアルケナールを過酸化脂質の指標として、過酸化脂質を比色定量した。得られた結果（水晶体 1 g 中の過酸化脂質量： nmol/g ）を表 3 に示す。

表 3

対照群		トログリタゾン添加群	
負の対照 (- ガラクトース)	正の対照 (+ ガラクトース)	2 μ M	20 μ M
0.68 $\pm$ 0.28	5.17 $\pm$ 1.09	4.52 $\pm$ 0.19	1.25 $\pm$ 0.92

表3から明らかなように、ガラクトースを負荷することにより水晶体内の過酸化脂質濃度は上昇するが、その上昇の程度は、トログリタゾンを添加することにより、濃度依存的に抑制された。

[産業上の利用可能性]

実施例1に示されたように、トログリタゾンは、グルタチオン還元酵素活性増強作用を有しており、生体内におけるGSHの供給量を増加させることができるので、還元型グルタチオンの欠乏によって起こる疾患の予防又は治療のために用いることができる。更に、実施例4に示されたように、トログリタゾンは過酸化脂質を低下させるので、酸化ストレスによって起こる疾患（特に、水晶体における酸化ストレスによって起こる疾患である白内障）の予防又は治療のために用いることができる。

また、実施例1、2及び3の結果から明らかなように、トログリタゾンは、AR阻害活性を示さない濃度（2 μ M）においても、グルタチオン還元酵素活性増強作用及びポリオール蓄積抑制作用を示した。すなわち、トログリタゾンは、グルタチオン還元酵素活性を増強することによりポリオール代謝系を抑制し、ポリオールの蓄積を抑制した。したがって、トログリタゾンを含有するグルタチオン還元酵素活性増強剤は、糖尿病性白内障のような、細胞内にポリオールが蓄積することによって起こる疾患の予防又は治療のために用いることができる。

請 求 の 範 囲

1. トログリタゾン又はその薬理上許容される塩を含有する、グルタチオン還元酵素活性増強剤。
2. 還元型グルタチオンの欠乏によって起こる疾患の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
3. 酸化ストレスによって起こる疾患の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
4. 虚血性心疾患の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
5. 特発性肺線維症の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
6. 慢性腎不全の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
7. 酸化ストレスによって起こる神経系の疾患の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
8. 胃潰瘍の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
9. 白内障の予防又は治療のための、請求の範囲第1項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
10. 白内障が水晶体中にポリオールが蓄積することによって起こる白内障、水晶体中に高分子量蛋白質が蓄積することによって起こる白内障又は水晶体中に過酸化物が蓄積することによって起こる白内障である、請求の範囲第9項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
11. 白内障が水晶体中に高分子量蛋白質が蓄積することによって起こる白内障又は水晶体中に過酸化物が蓄積することによって起こる白内障である、請求の範囲第9項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。
12. 白内障が老人性白内障である、請求の範囲第9項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。

1 3 . 白内障が糖尿病性ではなく、老人性白内障である、請求の範囲第 9 項に記載のグルタチオン還元酵素活性増強剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K31/425 // C07D417/12

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. Cl⁶ A61K31/425 // C07D417/12

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)

CAS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/L (QUESTEL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-51189, A (Sankyo Co., Ltd.), March 22, 1985 (22. 03. 85), Claims; page 3, lower right column, lines 10 to 12 & EP, 139421, A1 & US, 4572912, A & AU, 8432559, A	1-3, 7, 9-13
A		4-6, 8
X	JP, 61-36284, A (Sankyo Co., Ltd.), February 20, 1986 (20. 02. 86), Claims; page 4, lower right column, lines 4 to 6 (Family: none)	1-3, 7, 9-13
A		4-6, 8
X	JP, 62-5980, A (Sankyo Co., Ltd.), January 12, 1987 (12. 01. 87), Claims; page 103, upper right column, lines 2 to 5 & EP, 207581, A1 & US, 5104888, A & AU, 8654122, A	1-3, 7, 9-13
A		4-6, 8
X	JP, 62-234085, A (Sankyo Co., Ltd.), October 14, 1987 (14. 10. 87), Claims; page 5, upper right column, line 11 to page 6, lower right column, line 15 (Family: none)	1-3, 7, 9-13
A		4-6, 8

☒ 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 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 December 3, 1997 (03. 12. 97)	Date of mailing of the international search report December 16, 1997 (16. 12. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 5-202042, A (Sankyo Co., Ltd.), August 10, 1993 (10. 08. 93),	1-3, 7, 9-13
A	Claims; Par. No. (0043) (Family: none)	4-6, 8
A	JP, 1-26516, A (Teijin Ltd.), January 27, 1989 (27. 01. 89), Claims (Family: none)	1 - 13
A	WO, 88/00182, A1 (Teijin Ltd.), January 14, 1988 (14. 01. 88), Claims & EP, 276317, A1 & US, 4927808, A	1 - 13
A,P	COMINACINI et al. Effects of troglitazone on in vitro oxidation of LDL and HDL induced by copper ions and endothelial cells. Diabetologia, Feb. 1997, Vol. 40, pages 165-172	1 - 13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A 61 K 31/425 // C 07 D 417/12

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. Cl⁶ A 61 K 31/425 // C 07 D 417/12

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)

CAS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/L (QUESTEL)

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	J P, 60-51189, A (三共株式会社), 22, 3月, 1985 (22.03.85), 特許請求の範囲, 第3頁, 右下欄, 第10-12行	1-3, 7, 9-13
A	& EP, 139421, A1 & US, 4572912, A & AU, 8432559, A	4-6, 8
X	J P, 61-36284, A (三共株式会社), 20, 2月, 1986 (20.02.86), 特許請求の範囲, 第4頁, 右下欄, 第4-6行	1-3, 7, 9-13
A	(ファミリーなし)	4-6, 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」 先行文献ではあるが、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

03.12.97

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

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)

高 原 慎 太 郎

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

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
X A	J P, 62-5980, A (三共株式会社), 12, 1月, 1987 (12.01.87), 特許請求の範囲, 第103頁, 右上欄, 第2-5行 & EP, 207581, A1 & US, 5104888, A & AU, 8654122, A	1-3, 7, 9-13 4-6, 8
X A	J P, 62-234085, A (三共株式会社), 14, 10月, 1987 (14.10.87), 特許請求の範囲, 第5頁, 右上欄, 第11行-第6頁, 右下欄, 第15行 (ファミリーなし)	1-3, 7, 9-13 4-6, 8
X A	J P, 5-202042, A (三共株式会社), 10, 8月, 1993 (10.08.93), 特許請求の範囲, 段落【0043】 (ファミリーなし)	1-3, 7, 9-13 4-6, 8
A	J P, 1-26516, A (帝人株式会社), 27, 1月, 1989 (27.01.89), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-13
A	WO, 88/00182, A1 (帝人株式会社), 14, 1月, 1988 (14.01.88), 特許請求の範囲 & EP, 276317, A1 & US, 4927808, A	1-13
A, P	COMINACINI et al. Effects of troglitazone on in vitro oxidation of LDL and HDL induced by copper ions and endothelial cells. Diabetologia, Feb. 1997, Vol.40, pages 165-172	1-13